

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.02.013

卓燊, 秦海光, 陈君, 等. 绞股蓝对大鼠肝组织内细胞色素 P450 和 GST、UGT 活性的影响[J]. 广西植物, 2014, 34(2): 194-197

Zhuo S, Qin HG, Chen J, et al. Effects of *Gynostemma pentaphyllum* on the cytochrome P450 and GST, UGT activities in liver of rat[J]. *Guihaia*, 2014, 34(2): 194-197

绞股蓝对大鼠肝组织内细胞色素 P450 和 GST、UGT 活性的影响

卓 燊¹, 秦海光¹, 陈 君², 杨子明^{3*}(1. 广西科技大学 医学院, 广西 柳州 545005; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 3. 广西植物
功能物质研究与利用重点实验室, 广西植物研究所, 广西 桂林 541006)

摘 要: SD 大鼠自由饮用绞股蓝汁(绞股蓝汁每天新鲜配制, 浓度为每 100 g 水 2 g 茶叶, 100 °C 的水温浸泡 30 min, 取上清液), 连续给药 60 d, 取出肝脏, 用差速离心法制备各肝脏胞浆液及肝脏微粒体, 采用双光束紫外分光光度法测定 CYP3A、CYP2E1、NADPH-细胞色素 C 还原酶、UGT、GST 的活性及细胞色素 b5 的含量, 结果显示绞股蓝可显著升高细胞色素 b5 的含量, 显著诱导 CYP3A、UGT、GST、NADPH-细胞色素 C 还原酶的活性, 但对 CYP2E1 没有影响。提示绞股蓝与药物合用时, 在体内可能会发生代谢性药物相互作用。

关键词: 绞股蓝; 细胞色素 P450; 谷胱甘肽-S-转移酶; 尿苷二磷酸-葡萄糖醛酸基转移酶; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)02-0194-04

Effects of *Gynostemma pentaphyllum* on the cytochrome P450 and GST, UGT activities in liver of rat

ZHUO Shen¹, QIN Hai-Guang¹, CHEN Jun², YANG Zi-Ming^{3*}(1. *Guangxi University of Science and Technology*, Liuzhou 545005, China; 2. *Human University of Chinese Medicine*, Changsha 410208, China; 3. *Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization*, *Guangxi Institute of Botany*, Guilin 541006, China)

Abstract: The SD rats were maintained on freshly prepared aqueous extract of *Gynostemma pentaphyllum* (2%) while the control rats were given distilled water for 60 days. Rat liver was taken and liver microsomes and cytochrome enzymes were obtained by different velocity centrifugation. Then the total contents and activities of CYP450 and GST, UGT of rats determined by double wavelength ultraviolet spectrophotometry. The results showed that the *G. pentaphyllum* could increase the content of b₅; increase the activity of CYP3A, UGT, GST, NADPH-cytochrome C reductase; but had no effect on CYP2E1. The study showed that co-administered with those drugs metabolized by the above major metabolizing enzymes in liver, metabolic herb-drug interactions would happen.

Key words: *Gynostemma pentaphyllum*; CYP450; GST; UGT; rat

药物代谢酶可分为 I 相和 II 相代谢酶, 可代谢内源性物质和外源性物质, 代谢的内源性物质有白

三烯、前列腺素、胆酸等; 代谢的外源性物质有致癌物、环境污染物、药物、毒物等, 负责药物代谢的主要

收稿日期: 2013-11-28 修回日期: 2014-03-10

基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 1140001-36); 广西植物功能物质研究与利用重点实验室主任基金(ZRJJ2012-6)。

作者简介: 卓燊(1975-), 女, 广西来宾人, 硕士研究生, 主管中药师, 研究方向为中药药效与理论研究, (E-mail) zhuoshen@126.com。

*通讯作者: 杨子明, 硕士研究生, 助理研究员, 研究方向为植物活性物开发与利用研究, (E-mail) yangziming198310@126.com。

是 I 相酶中的细胞色素 P450, 而 II 相代谢酶可加速环境污染物、致癌物、毒物等的代谢解毒和排泄 (Yang *et al.*, 2003; 薛春苗等, 2011)。药物相互作用是药物安全性评价的最基本内容之一, 日本、欧美等国家颁布了相关的法律法规或一些指导原则。药物相互作用是指两种或两种以上药物在前后或同时用药时, 在代谢环节产生的相互干扰作用, 结果使疗效增强或减弱 (Informa, 2008; Wienkers, 2005; Kakuda *et al.*, 2011; Josephson, 2010; Ahmi *et al.*, 2010)。中药成分复杂, 但大多有效成分仍要通过药物代谢酶进行代谢分解, 这必然会对药物代谢酶产生诱导或抑制作用, 影响药物代谢酶的活性, 从而影响其他药物的代谢, 也会对药物的有效性及安全性产生影响。

绞股蓝 (*Gynostemma pentaphyllum*) 又名七叶胆、小苦药等, 是葫芦科绞股蓝属植物, 主要分布于中国、日本、朝鲜等国, 为我国常用中药。始载于明代的《救荒本草》作野菜使用, 《本草纲目》中开始将其以乌莓之名入药。绞股蓝以全草药食兼用, 味苦、性寒, 具有清热解毒、补气、止咳、祛痰之功效 (杜小燕等, 2009)。现代药理学研究表明, 绞股蓝具有抗肿瘤 (杜小燕等, 2009)、抗氧化 (陈桂林等, 2012)、抗衰老 (姚丹丹等, 2007)、降血脂 (陈桂林等, 2012)、降血糖 (魏守蓉等, 2005)、抑制肥胖 (魏守蓉等, 2005)、提高免疫力 (张海燕等, 2006) 等功能。绞股蓝作为一种药材或茶饮在我国有着悠久历史, 目前在民间及医院的使用很普遍。因此, 研究绞股蓝对大细胞色素 P450 和 GST、UGT 活性的影响, 有助于了解绞股蓝与其它中药或西药合用时可能的药物性相互作用, 提高临床用药的有效性和安全性。

1 材料与方 法

1.1 药品和试剂

绞股蓝, 购自广西龙州县; NADP⁺、NADPH、葡萄糖-6-磷酸、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、甘油、还原型谷胱甘肽、Tritonx-100 均购置 Solarbio 公司; 细胞色素 C、UDP-葡萄糖醛酸购置 SIGMA 公司; 氨基比林、2-氨基酚、4-氨基酚购置国药集团化学试剂有限公司; 1-氯-2, 4-二硝基苯 (CDNB) 购置 AMRESCO 公司; 地塞米松 (郑州羚锐制药股份有限公司, 批号: 1207182); 苯巴比妥钠 (上海新亚药业有限公司, 批号: 12050); BCA 蛋白测定试剂盒购置碧云天

生物技术研究所; 谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 测定试剂盒购置南京建成生物工程研究所; 肌酐 (Cr)、尿素 (Ur) 测定试剂盒购置四川迈克科技有限责任公司; 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

MIKRO 200 高速冷冻离心机 (HERAEUS 公司); 台式低速离心机 (北京京立离心机有限公司); Beck-Coulter Opima XL-100K 型超速离心机 (Beckman 公司); 酶标仪 (德国 BioTek 公司); TU-1901 紫外可见分光光度计 (北京谱析); 电子天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

1.3 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 (由广西医科大学实验动物中心提供, 合格证号为 SCKX 桂 2003-0003)。

1.4 给药方法

将大鼠随机分成四组: 蒸馏水组、绞股蓝组、阳性组 (苯巴比妥钠组与地塞米松组), 每组 8 只。绞股蓝组自由饮用绞股蓝汁 (绞股蓝汁每天新鲜配制, 浓度为每 100 g 水 2 g 茶叶, 100 °C 的水温浸泡 30 min, 取上清液), 蒸馏水组自由饮用蒸馏水, 连续给药 60 d, 苯巴比妥钠组和地塞米松组与第 57 天分别腹腔注射苯巴比妥钠和地塞米松, 剂量为 80 mg · kg⁻¹, 连续 3 d。

1.5 微粒体和胞浆液的制备

全部大鼠末次给药后, 禁食不禁水, 24 h 后从股动脉取血, 分离血清, -20 °C 保存备用。大鼠处死后, 立即移除肝脏, 用冷的 0.9% 的生理盐水充分灌流、洗净血液和血迹, 使肝脏至白陶土样, 用滤纸吸干, 称重, 用剪刀将组织剪碎, 加入冰冷的 (4 °C) 0.05 mol · L⁻¹ Tris 至 0.15 mol · L⁻¹ KCl (pH7.4) 缓冲液制成的匀浆液, 在 4 °C 2 000 r · min⁻¹ 的条件下离心 15 min, 弃去沉淀; 上清液在 4 °C 10 000 g 的条件下离心 20 min, 弃去沉淀; 上清液在 4 °C 100 000 g 的条件下离心 60 min, 所得沉淀为微粒体, 上清液为胞浆液。

1.6 指标的测定

氨基比林-N-脱甲基酶 (CYP3A)、苯胺-4-羟化酶 (CYP2E1)、NADPH-细胞色素 C 还原酶、葡萄糖醛酸-转移酶、谷胱甘肽-S-转移酶的活性及细胞色素 b5 的含量按照药理实验方法学上的方法测定; ALT、AST、Cr、Ur 的测定均按试剂盒上的说明进行操作。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据统计分析, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两个独立样本均数比较采用 t 检验, 多个样本之间的两两比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 绞股蓝对大鼠肝、肾功能的影响

从表 1 可以看出, 连续给药 60 d 后, 绞股蓝组与蒸馏水组比较其 ALT、AST、Cr、Ur 没有显著性差异。

表 1 绞股蓝对大鼠血清 ALT、AST、Cr、Ur 的影响

Table 1 Effects of *Gynostemma pentaphyllum* on the ALT, AST, Cr, Ur activities in serum of rat ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Group	谷丙转氨酶 ALT ($U \cdot L^{-1}$)	谷草转氨酶 AST ($U \cdot L^{-1}$)	肌酐 Cr ($\mu mol \cdot L^{-1}$)	尿素氮 Ur ($mmol \cdot L^{-1}$)
蒸馏水 Water	6.64 ± 1.49	19.52 ± 2.54	117.23 ± 16.47	7.71 ± 1.3
绞股蓝 <i>G. pentaphyllum</i>	7.02 ± 0.98	18.18 ± 2.45	121.17 ± 17.45	7.42 ± 0.67
苯巴比妥钠 Phenobarbital sodium	6.13 ± 0.88	17.42 ± 3.15	102.27 ± 22.65	7.55 ± 0.79
地塞米松 Dexamethasone	5.88 ± 1.78	16.35 ± 5.41	105.21 ± 13.13	7.69 ± 1.02

注: 与蒸馏水组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。下同。

Note: Compared with water group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. The same below.

2.2 绞股蓝对大鼠肝组织里 GST 和 UGT 活性的影响

从表 2 可以看出, 连续给药 60 d 后, 绞股蓝组与蒸馏水组比较能显著性升高 GST、UGT 活性, $P < 0.01$; 苯巴比妥钠组与蒸馏水组比较能显著性升高 GST、UGT 活性, $P < 0.01$; 地塞米松组与蒸馏水组比较能显著性升高 UGT 活性, $P < 0.01$ 。

表 2 绞股蓝对大鼠肝组织里 GST 和 UGT 活性的影响

Table 2 Effects of *Gynostemma pentaphyllum* on the GST, UGT activities in liver of rat ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Group	谷胱甘肽转移酶 GST ($U \cdot mg^{-1}$)	尿苷二磷酸-葡萄糖醛酸基转移酶 UGT ($nmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$)
蒸馏水 Water	532.33 ± 145.61	0.20 ± 0.07
绞股蓝 <i>G. pentaphyllum</i>	804.45 ± 137.59**	0.42 ± 0.09**
苯巴比妥钠 Phenobarbital sodium	1021.21 ± 88.78**	0.41 ± 0.13**
地塞米松 Dexamethasone	—	0.32 ± 0.05**

2.3 绞股蓝对大鼠肝组织里 CYP3A、CYP2E1、细胞色素 b₅、NADPH-细胞色素 C 还原酶的活性的影响

从表 3 可以看出, 连续给药 60 d 后, 绞股蓝组

与蒸馏水组比较能显著性升高 CYP3A、NADPH-细胞色素 C 还原酶活性, $P < 0.01$, 能显著性升高细胞色素 b₅ 的含量, $P < 0.01$; 苯巴比妥钠组与蒸馏水组比较能显著性升高 CYP3A 活性, $P < 0.01$, 能显著性升高细胞色素 b₅ 的含量, $P < 0.01$; 地塞米松组与蒸馏水组比较能显著性升高 CYP3A、NADPH-细胞色素 C 还原酶的活性, 能显著性升高细胞色素 b₅ 的含量, $P < 0.01$ 。

表 3 绞股蓝对大鼠肝组织里 CYP450 的影响

Table 3 Effects of *Gynostemma pentaphyllum* on the cytochrome P450 activities in liver of rat ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Group	细胞色素 3A CYP3A	细胞色素 2E1 CYP2E1	细胞色素 b ₅ CYPb ₅	P-450 还原酶 NADPH-细胞色素 C reductase
蒸馏水 Water	0.30 ± 0.13	0.041 ± 0.012	0.42 ± 0.07	1.80 ± 0.38
绞股蓝 <i>G. Pentaphyllum</i>	1.09 ± 0.43**	0.054 ± 0.025	0.79 ± 0.12**	4.53 ± 1.05**
苯巴比妥钠 Phenobarbital sodium	1.46 ± 0.70**	—	0.58 ± 0.12**	2.75 ± 1.53
地塞米松 Dexamethasone	1.50 ± 0.45**	—	0.70 ± 0.24*	4.54 ± 1.93**

3 结论与讨论

ALT、AST 是肝细胞损害的敏感指标, Cr、Ur 是肾功能损害的敏感指标, 本实验研究发现大鼠长期饮用绞股蓝对 ALT、AST、Cr、Ur 没有影响, 说明长期饮用绞股蓝不会损害肝、肾功能, 提示我们在平时生活中可以放心饮用绞股蓝。

细胞色素 b₅ 参与细胞色素 P450 的电子转移, 参与药物氧化过程。微粒体细胞色素 b₅ 的含量在同一组织里一般为细胞色素 P450 含量的一半, 所以测定细胞色素 b₅ 的含量也可间接的反应机体内细胞色素 P450 含量的情况。NADPH-细胞色素 C 还原酶在某些药物的代谢中将它从 NADPH 得来的还原电子传递给细胞色素 P450, 将氧化型的细胞色素 P450 转变为还原型的细胞色素 P450, 提高细胞色素 P450 的还原能力。本实验研究结果发现绞股蓝能够显著升高细胞色素 b₅ 含量, 提高 NADPH-细胞色素 C 还原酶的活性, 说明绞股蓝可以提高细胞色素 P450 的含量和活性。在细胞色素 P450 家族的所有基因中 CYP3A 是最重要的一类, 其含量占 CYP450 的 30% 左右, 该酶在许多内、外源化合物的代谢中起着非常重要的作用, 参与多种药物

的代谢,据统计市售药品有 50%左右通过 CYP3A 代谢(Guengerich,2003)。我们的研究结果表明绞股蓝可以显著性诱导 CYP3A 的活性,提示我们在绞股蓝与 CYP3A 代谢的药物合用时,可能会出现相互作用。CYP2E1 在药物和我们经常接触的溶剂及环境污染物的代谢中起着重要作用,CYP2E1 不仅参与药物代谢,而且还能催化许多前致癌物和前毒物的活化过程,CYP2E1 主要通过催化前致癌物去烷基、去硝基等反应而使之转化为致癌物,且其活性不存在明显的个体差异。迄今发现所有 CYP2E1 的底物在动物和人都都是相同的,因此研究动物的 CYP2E1 活性对人具有重要的参考意义(石杰等,2008)。实验结果发现,绞股蓝对 CYP2E1 的活性没有影响,说明绞股蓝没有活化致癌物的作用,提示人们对绞股蓝可以放心使用。

诱导 II 相代谢酶如 UGT、GST 等可加速环境污染、致癌物、毒物等的代谢解毒和排泄。UGT 是化学物质在人体内进行 II 相生物转化时最重要的一种微粒体酶,在所有通过 II 相药物代谢酶代谢的药物中,有约 35%是通过 UGT 代谢的(Kaplan *et al.*, 2003)。GST 能催化谷胱甘肽与细胞色素 P450 催化形成的产物和体内各种反应形成的亲电子剂结合;还能催化谷胱甘肽与体内氧化还原产物和体内代谢形成的氧自由基结合,使其易于从尿液或胆汁中排泄(杨子明等,2011)。绞股蓝可显著诱导 UGT、GST 的活性,说明其可加速药物、毒物等排泄,减少毒性。

苯巴比妥钠是 CYP3A、GST、UGT 的经典诱导剂;地塞米松是 CYP3A、UGT 的经典诱导剂,本实验研究发现苯巴比妥钠组能显著升高 CYP3A、GST、UGT 的活性;地塞米松组能显著升高 CYP3A、UGT 的活性,说明实验结果真实可靠。绞股蓝可以提高大鼠肝组织内细胞色素 b5 的含量,诱导 CYP3A、UGT、GST、NADPH-细胞色素 C 还原酶的活性,这可能是绞股蓝的作用机制之一。绞股蓝对主要药物代谢酶有显著诱导作用,提示绞股蓝与 CYP3A、UGT、GST 等药物代谢酶代谢的药物合用时,可能会发生代谢性相互作用。

参考文献:

David R. 2008. Drug • drug interactions[M]. Second Edition. New York ;Informa Healthcare;53-85
Ahmi OA, Ripp SL. 2010. Evaluation of models for predicting drug-drug interactions due to induction[J]. *Expert Opin Drug*

Met Toxicol, **6**(11):1 399-1 416
Chen GL(陈桂林), Le ZY(乐智勇), Lu KG(卢锐刚), *et al.* 2012. Study on hypolipidemic and antioxidation action of 50% ethanol fraction in gynostemma pentaphyllum(绞股蓝 50%乙醇部位调血脂及抗氧化作用研究)[J]. *China Pharm*(中国药业), **21**(15):11-13
Du XY(杜小燕), Hou Y(侯颖), Qin H(覃华), *et al.* 2009. Studies on the anti tumor activity of polysaccharide from gynostemma pentaphyllum and its mechanism(绞股蓝多糖的抗肿瘤作用及其机制研究)[J]. *Sci Tech Eng*(科学技术与工程), **9**(20):5 968-5 972
Guengerich FP. 2003. Cytochromes P450, drugs, and diseases[J]. *Mol Interv*, **3**(4):194-204
Josephson F. 2010. Drug-drug interactions in the treatment of HIV infection: focus on pharmacokinetic enhancement through CYP3A inhibition[J]. *J Intern Med*, **268**(6):530-539
Kakuda TN, Scholler-Gyure M, Hoetelmans RM. 2011. Pharmacokinetic interactions between etravirine and non-antiretroviral drugs[J]. *Clin Pharm*, **50**(1):25-39
Kaplan M, Hammerman C, Maisels MJ. 2003. Bilirubin genetics for the nongeneticist: hereditary defects of neonatal bilirubin conjugation[J]. *Pediatrics*, **111**(4):886-893
Shi J(石杰), Wang BJ(王本坚), Yang X(杨旭). 2008. Effects of new drug metabolism on CYP1A2 and CYP2E1(体内代谢法研究新药对细胞色素 P4501A2 和 2E1 的影响)[J]. *Chin Hepatol*(肝脏), **13**(5):387-390
Wen CR(魏守蓉), Xue CK(薛存宽), He XB(何学斌), *et al.* 2005. Studies on the declined blood glucose activity of polysaccharide from *Gynostemma pentaphyllum*(绞股蓝多糖降血糖作用的实验研究)[J]. *Chin J Ger*(中国老年学杂志), **25**(4):418-420
Wienkers LC, Heath TG. 2005. Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data[J]. *Nat Rev Drug Discov*, **4**:825-833
Xue CM(薛春苗), Zhang B(张冰), Liu XQ(刘小青), *et al.* 2011. Effects of aconiti lateralis radix praeparata, cinnamomi cortex cassiae, curculiginis rhizoma on the activities of drug metabolizing enzymes CYP3A and GST in rats(附子、肉桂、仙茅对正常大鼠药物代谢酶 CYP3A 和 GST 活性的影响)[J]. *Cjtcmp*(中华中医药杂志), **26**(12):2 823-2 826
Yang XF, He W, Lu WH, Zeng FD. 2003. Effects of scutellarin on liver function after brain ischemia-reperfusion in rats[J]. *Acta Pharm Sin*, **24**:1 118-1 124
Yao DD(姚丹丹), Huang SH(黄善华). 2007. Study on the antiaging function of gynostemma pentaphyllum makino on sub-aging rats(绞股蓝对亚急性衰老大鼠的抗衰老作用研究)[J]. *Mod J Integr Trad Chin West Med*(现代中西医结合杂志), **16**(28):4 112-4 113
Yang ZM(杨子明), Yang XF(杨秀芬). 2011. Inhibition of glutathione-S-transferase by total saponins of panax notoginseng and its kinetics analysis in liver of mice(三七总皂苷对小鼠肝脏谷胱甘肽-S 转移酶的抑制作用及其动力学分析)[J]. *Chin J Chin Mat Med*(中国中药杂志), **36**(17):2 413-2 417
Zhang HY(张海燕), Guo Q(郭强), Wen WY(温伟业). 2006. Effects of gynostemma pentaphyllum on the adjuement of immune function in mice(绞股蓝总皂苷对小鼠免疫功能的影响)[J]. *Chin J Trad Vet Sci*(中兽医学杂志), **2**:13-15