

## · 基础研究 ·

## 二苯乙烯苷对小鼠肝细胞色素 P450 的影响\*

张 锋, 刘 航, 王艳英, 聂 晶, 陆远富, 石京山

(遵义医学院药理学教研室暨贵州省基础药理重点实验室, 贵州遵义 563099)

**摘要:**目的 观察二苯乙烯苷(TSG)对小鼠肝微粒体细胞色素 P450(CYP)的影响。方法 将昆明种雄性小鼠分为空白组、TSG 低剂量组和 TSG 高剂量组, TSG 灌胃 3、5、7 d 后分别麻醉处死小鼠, 取肝脏通过荧光实时逆转录聚合酶链反应(real time RT-PCR)检测小鼠肝脏组织 CYP 相关基因 mRNA 的表达。结果 TSG 作用第 3、5、7 天时均能够抑制 CYP1A2 和 CYP3A4 mRNA 表达; TSG 呈时间依赖性的增加 CYP2E1 mRNA 表达; TSG 作用 7 d 能够显著抑制 CYP4A14 mRNA 表达。此外, TSG 对 CYP2B10、3A11 和 3A25 mRNA 表达无显著性影响。结论 TSG 对 CYP1A2、CYP2E1、CYP3A4 和 CYP4A14 有显著影响, 对 CYP2B10、3A11 和 3A25 无明显作用。

**关键词:**二苯乙烯类; 小鼠; 细胞色素 P450 酶系统; 逆转录聚合酶链反应

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.36.022

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)36-4418-03

## The effects of tetrahydroxystilbene glucoside on mouse liver cytochrome P450\*

Zhang Feng, Liu Hang, Wang Yanying, Nie Jing, Lu Yuanfu, Shi Jingshan

(Department of Pharmacology and Key Lab of Basic Pharmacology of Guizhou, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563099, China)

**Abstract:** Objective To investigate the effects of tetrahydroxystilbene glucoside(TSG) on cytochrome P450(CYP) in mouse livers. Methods Kunming male mice were divided into the blank, low dose and the high dose of TSG groups. 3, 5 and 7 after intragastrical administration of TSG, mice were sacrificed and the mRNA expressions of CYP isoenzymes in mouse livers were measured by real time reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR), respectively. Results TSG significantly inhibited CYP1A2 and CYP 3A4 mRNA expressions at 3th, 5th and 7th day after treatment. TSG time-dependently increased CYP2E1 mRNA expression. TSG inhibited CYP4A14 mRNA expression at 7th day after treatment. Moreover, TSG had no significant effects on CYP2B10, CYP3A11 and CYP3A25 mRNA expressions. Conclusion TSG has significant effects on CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4 and CYP4A14 mRNA expressions but no significant effects on CYP2B10, CYP3A11 and CYP3A25 mRNA expressions.

**Key words:** stilbene; mice; cytochrome P-450 enzyme system; reverse transcription-polymerase chain reaction

细胞色素 P450(cytochrome P450, CYP) 属于药物代谢的第一相酶, 主要存在于肝脏微粒体中, 在药物生物转化中发挥非常重要的作用。大量的研究证实 CYP 被激活或被抑制是引起药物相互作用和导致药物不良反应增加或疗效降低的重要原因<sup>[1]</sup>。因此, 在临床联合用药时, 研究药物对 CYP 的影响, 对于评估其他药物在体内的血药浓度水平可能的改变方向具有指导意义。二苯乙烯苷(tetrahydroxystilbene glucoside, TSG)是何首乌的主要药效成分之一<sup>[2]</sup>。研究发现, TSG 具有抗氧化、抗衰老、增强免疫力、调节血脂、抗动脉粥样硬化、提高学习记忆力、抗炎、抗肿瘤及保肝等作用<sup>[3]</sup>。鉴于 TSG 的药理作用广泛, 与其他药物联合应用潜在机会较多, 本研究拟采用实时逆转录 PCR(real time reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 探讨 TSG 对小鼠肝组织微粒体 CYP 的影响, 以为临床合理用药提供基础药理学依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物** 昆明种雄性小鼠, 体质量 20~24 g, 购自第三军医大学动物实验中心, 许可证号为 SCXK-(军)2012-0410。

**1.2 仪器与试剂** TSG(C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub> 相对分子质量 406, 纯度大于 98%, 批号: 110844200607) 购自中国药品生物制品检定所; RNA 提取试剂盒购自上海华舜生物技术有限公司; RNA 逆转

录试剂盒购自大连宝生物工程有限公司; 所有引物购自上海生工生物工程技术有限公司; RNA 逆转录仪购自德国 Eppendorf 公司; RT-PCR 扩增仪购自美国 BIO-RAD 公司; 紫外分光光度计(型号 TU1810) 购自北京谱析仪器公司; 电子分析天平购自北京赛多利斯电子有限公司; 高速冷冻离心机购自德国 Sigma 公司。

## 1.3 方 法

**1.3.1 实验分组和给药** 昆明种雄性小鼠 45 只分为 3 组: 空白组、TSG 低剂量组(10 mg/kg)、TSG 高剂量组(40 mg/kg), 每组 15 只; 后两组组每天灌胃给予 TSG 溶液, 空白组灌胃给予药物等体积的生理盐水。

**1.3.2 RT-PCR 检测** 药物灌胃 3、5、7 d 后分别用 10% 水合氯醛麻醉小鼠, 固定, 剪开腹腔取肝脏于总 RNA 提取试剂(Trizol)液中匀浆, 根据逆转录试剂盒说明书, 首先提取总 RNA, 逆转录合成第 1 链互补 cDNA, 通过特异性引物对小鼠肝组织中的 CYP1A2、CYP2B10、CYP2E1、CYP3A4、CYP3A11、CYP3A25、CYP4A14 和内参基因  $\beta$ -actin 进行扩增<sup>[4]</sup>, 基因引物序列为:  $\beta$ -actin 上游: 3'-TCG TAC CAC TGG CAT TGT GA-5', 下游: 3'-TCC TGC TTG CTG ATC CAC AT-5'; CYP1A2 上游: GCC TGA GAT ACA GAG GAA GAT

表 1 TSG 对小鼠肝脏 CYP1A2、CYP2E1、CYP3A4 和 CYP4A14 mRNA 表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

基因	组别	3 d	5 d	7 d
CYP1A2	空白组	160.49±37.47	128.33±17.03	137.07±13.40
	TSG 低剂量组	94.85±28.08 <sup>a</sup>	77.52±36.03	86.45±29.35
	TSG 高剂量组	108.20±17.59 <sup>a</sup>	59.63±13.60 <sup>a</sup>	87.60±19.41 <sup>a</sup>
CYP2E1	空白组	85.58±25.41	72.41±29.07	86.95±48.30
	TSG 低剂量组	86.06±28.90	78.46±17.15	139.47±44.96
	TSG 高剂量组	140.37±22.54 <sup>ab</sup>	190.62±34.63 <sup>ab</sup>	284.05±72.83 <sup>a</sup>
CYP3A4	空白组	91.01±14.14	134.23±35.98	174.51±44.49
	TSG 低剂量组	140.59±38.17	100.69±41.58	187.18±70.91
	TSG 高剂量组	46.49±13.75 <sup>a</sup>	44.53±12.71 <sup>a</sup>	29.62±11.88 <sup>a</sup>
CYP4A14	空白组	169.34±42.28	116.48±39.03	164.49±17.11
	TSG 低剂量组	119.96±18.04	52.40±30.29	150.06±29.27
	TSG 高剂量组	109.87±38.18	78.75±32.21	87.31±26.61 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: $P<0.05$ ,与空白组比较;<sup>b</sup>: $P<0.05$ ,与 TSG 高剂量组作用 7 d 时比较。

表 2 TSG 对小鼠肝脏 CYP2B10、CYP3A11 和 CYP3A25 mRNA 表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

基因	组别	3 d	5 d	7 d
CYP2B10	空白组	57.73±33.28	132.36±56.41	207.31±46.03
	TSG 低剂量组	78.33±31.15	136.16±49.03	170.29±29.19
	TSG 高剂量组	66.43±9.18	89.29±38.09	156.03±28.24
CYP3A11	空白组	187.31±49.78	122.65±27.53	123.22±46.43
	TSG 低剂量组	171.22±39.64	77.06±29.45	120.16±34.88
	TSG 高剂量组	115.96±53.13	109.68±18.98	202.31±47.21
CYP3A25	空白组	177.90±55.34	73.33±36.24	135.59±41.24
	TSG 低剂量组	134.54±37.75	40.42±34.01	166.22±63.21
	TSG 高剂量组	145.08±35.53	71.52±41.25	190.56±68.14

CCA-5',下游:3'-GGC ACA TAA CAG GTG TTT GTA GAC T-5';CYP2B10 上游:3'-AAG GAG AAG TCC AAC CAG CA-5',下游:3'-CTC TGC AAC ATG GGG GTA CT-5';CYP2E1 上游:3'-GGC ACC ATG TCT GCC CTC GG-5',下游:3'-CCT CCA CAC ACT CAT GAG CG-5';CYP3A4 上游:3'-AAC TTT GGC ATT GAA CAG CA-5',下游:3'-GGA TGC AGG GAT GAT GAC TA-5';CYP3A11 上游:3'-CTC AAT GGT GTG TAT ATC CCC-5',下游:3'-CCG ATG TTC TAA TGC C-5';CYP3A25; 上游:3'-AGT ACT GGC CAG AGC CTC AA-5',下游:3'-TCG TTC TCC TTG CTG AAC CT-5';CYP4A14 上游:3'-CGA CTC GAT CCA GAA ACT AC-5',下游:3'-ACA GGA CAC ATT GCA GAG AG-5'。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 TSG 对小鼠肝脏 CYP1A2、CYP2E1、CYP3A4 和 CYP4A14 表达的影响 与空白组比较,TSG 高剂量作用 3、5、7 d 后均能够抑制 CYP1A2 mRNA 的表达,而 TSG 低剂量作用 3 d 能够抑制 CYP1A2 mRNA 的表达;TSG 高剂量作用 3、5、7 d 后呈时间依赖性的增加 CYP2E1 mRNA 的表达,TSG

低剂量对 CYP2E1 mRNA 的表达无显著影响;TSG 高剂量作用 3、5、7 d 后均能够显著抑制 CYP3A4 mRNA 的表达,TSG 低剂量对 CYP3A4 mRNA 的表达未见明显作用;TSG 低剂量和高剂量分别作用 3、5 d 后对 CYP4A14 mRNA 的表达无显著影响,而 TSG 高剂量作用 7 d 后能够显著抑制 CYP4A14 mRNA 的表达,见表 1。

2.2 TSG 对小鼠肝脏 CYP2B10、CYP3A11 和 CYP3A25 mRNA 表达的影响 与空白组比较,TSG 低剂量和高剂量分别作用 3、5、7 d 后对 CYP2B10、CYP3A11 和 CYP3A25 mRNA 的表达无显著性影响,见表 2。

## 3 讨 论

药物在体内的过程受到多种因素的共同调节与影响。药物代谢酶系统与转运体都是影响药物代谢动力学过程的关键因素。细胞色素 P450 是以血红素为辅基的 B 族细胞色素超家族蛋白酶,其主要功能是对药物和部分致癌物质进行生物转化<sup>[5]</sup>。药物的专属代谢酶能够被同时应用的其他药物诱导或抑制,通过药物之间的代谢性相互作用导致组织或血液中的底物或代谢产物浓度升高或降低,甚至引起毒性物质在体内的蓄积,从而影响临床用药的疗效和安全性<sup>[6-7]</sup>。

CYP1A、CYP2E 和 CYP3A 是 CYP 酶系中重要的药物代谢酶,调控大多数临床药物的代谢。CYP1A2 是 CYP1A 中最

重要的亚家族,其含量约占肝脏 CYP 总量的 13%。研究发现 CYP1A2 在咖啡因、非那西汀、维拉帕米、对乙酰氨基酚、普萘洛尔、丙咪嗪以及硝苯地平 20 余种药物的代谢中发挥重要作用<sup>[8-9]</sup>。此外,CYP3A 亚家族中 CYP3A4 是成人肝脏中最重要的成分,约占 CYP 总量的 40%,能催化代谢 60% 以上的临床治疗药物,如可的松、红霉素、卡马西平、咪达唑仑、利多卡因、奥美拉唑、雌二醇、辛伐他汀等<sup>[10-11]</sup>。本研究发现,TSG 能够抑制 CYP1A2 和 CYP3A4 基因表达,表明 TSG 在与经 CYP1A2 和 CYP3A4 代谢的药物联合用药时,可能会减慢对其他药物的代谢,应适时调整联合用药的给药剂量,避免因为药物之间的代谢性相互作用引起药物蓄积,从而影响药物的疗效和安全性。

CYP2E 亚家族中尤其以 CYP2E1 最为重要,CYP2E1 约占肝脏 CYP 总量的 7%,目前已经确定的 CYP2E1 的底物已达 70 多种,如醋氨酚、乙醇、吸入性含氟麻醉剂、茶碱、工业和家庭常用的芳香族类化合物等,这些物质在体内经 CYP2E1 催化后可氧化生成毒物或致癌物质,从而严重影响药物的疗效和增加不良反应的发生<sup>[12-14]</sup>。本研究发现 TSG 能够诱导 CYP2E1 基因表达,提示 TSG 与其他通过 CYP2E1 代谢的药物联用时,很可能会导致其他药物代谢加快,进而影响药物疗效。

值得一提的是,本研究发现 TSG 对 CYP4A14 基因表达具有抑制作用。新近研究发现,CYP4A14 的表达增加与脂质过氧化损伤程度密切相关,通过造成体内氧化-抗氧化水平失衡,进而导致肝内氧化应激反应,产生大量活性氧自由基和脂质过氧化物,从而引起肝脏炎症反应<sup>[15-17]</sup>。本研究发现 TSG 能够抑制 CYP4A14 基因表达,提示 TSG 可能影响肝脏内的脂质过氧化反应,其具体作用机制值得进一步的探讨。

综上所述,本实验发现 TSG 对 CYP1A2、CYP3A4 以及 CYP4A14 基因表达具有抑制作用,对 CYP2E1 基因表达具有诱导作用,对 CYP2B10、CYP3A11 和 CYP3A25 基因表达无显著性影响。本研究初步评价了 TSG 对小鼠 CYP 亚家族基因表达的影响,为其在临床应用中产生相互作用的可能性提供了依据,但有关 TSG 对 CYP 酶活性影响具体机制还有待进一步的研究。

#### 参考文献:

[1] Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation[J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 138(1):103-141.

[2] 杨杰,周芝文,杨期东,等. 二苯乙炔苷对脑缺血再灌注大鼠神经保护的作用机制[J]. *中南大学学报:英文版*, 2010, 35(4):321-328.

[3] Wang T, Yang YJ, Wu PF, et al. Tetrahydroxystilbene glucoside, a plant-derived cognitive enhancer, promotes hippocampal synaptic plasticity [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 650(1):206-214.

[4] Zhang F, Qian L, Flood PM, et al. Inhibition of IkappaB kinase-beta protects dopamine neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity [J]. *J Pharmacol Exp*

*Ther*, 2010, 333(3):822-833.

- [5] 常彬霞,貌盼勇,辛绍杰. I 相药物代谢酶细胞色素 P450 及其与肝脏疾病的关系[J]. *解放军医学杂志*, 2010, 35(3):333-335.
- [6] 刘昌辉,郑侠,王宁生,等. 齐墩果酸对大鼠体内细胞色素 P450 酶活性的影响[J]. *中国民族民间医药杂志*, 2012, 21(9):37-39.
- [7] 戴宁,曾民德,彭延申,等. 复方中药对酒精性脂肪肝肝细胞色素 P450 IIE1 表达的影响[J]. *中华肝病杂志*, 2003, 11(11):657-659.
- [8] 张沂,于春令,邸秀珍,等. 氟喹诺酮类药物对大鼠肝微粒体细胞色素 P450 酶系的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2012, 37(11):1059-1063.
- [9] Su T, Mao C, Yin F, et al. Effects of unprocessed versus vinegar-processed *Schisandra chinensis* on the activity and mRNA expression of CYP1A2, CYP2E1 and CYP3A4 enzymes in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 146(3):734-743.
- [10] 赵文婷,张波,李湘晖,等. 疏血通注射液对大鼠细胞色素 P450 酶 6 种亚型活性的影响[J]. *中药新药与临床药理杂志*, 2012, 23(4):445-449.
- [11] Topletz AR, Dennison JB, Barbuch RJ, et al. The Relative Contributions of CYP3A4 and CYP3A5 to the Metabolism of Vinorelbine [J]. *Drug Metab Dispos*, 2013, 41(9):1651-1661.
- [12] 焦建杰,李芹,刘洁,等. 探针药物法评价苦参对大鼠细胞色素 P450 2E1 代谢活性的影响[J]. *中草药*, 2012, 43(9):1799-1802.
- [13] 马瑞芳,韩国柱. 中药对细胞色素 P450 2E1 影响的研究进展[J]. *中草药*, 2009, 40(11):1841-1844.
- [14] 刘天会,徐有青,尤红,等. 表达细胞色素 P2E1 C3A 肝细胞系的建立及其对增殖的影响[J]. *中华肝病杂志*, 2006, 14(11):850-851.
- [15] Aleksunes LM, Klaassen CD. Coordinated regulation of hepatic phase I and II drug-metabolizing genes and transporters using AhR-, CAR-, PXR-, PPAR $\alpha$ -, and Nrf2-null mice [J]. *Drug Metab Dispos*, 2012, 40(7):1366-1379.
- [16] Sobocanec S, Balog T, Saric A, et al. Cyp4a14 overexpression induced by hyperoxia in female CBA mice as a possible contributor of increased resistance to oxidative stress [J]. *Free Radic Res*, 2010, 44(2):181-190.
- [17] Bumpus NN, Johnson EF. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-ribonucleoside (AICAR)-stimulated hepatic expression of Cyp4a10, Cyp4a14, Cyp4a31, and other peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ -responsive mouse genes is AICAR 5'-monophosphate-dependent and AMP-activated protein kinase-independent [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 339(3):886-895.