论著

文章编号:1000-5404(2005)08-0742-03

甘遂配伍甘草对大鼠肝脏 CYP2E1 表达及活性的影响

代方国[1],罗 仁[1],王宇光[2],夏成云[3],谭洪玲[2],肖成荣[2],赵永红[2],高 月[2] ([1]南方医科大学中医系,广州 510515;[2]军事医学科学院放射医学研究所药理毒理研究室,北京 100850;[3]川北医学院附属医院中医科,南充 637000)

提 要:目的 通过检测细胞色素氧化酶 CYP2E1 的表达和活性变化,从分子水平探讨中药配伍禁忌"十八反"理论中甘遂配伍甘草的药理机制。**方法** 利用 RT-PCR 检测大鼠肝脏 CYP2E1 mRNA 水平;通过 Western blot 检测大鼠肝脏 CYP2E1 蛋白表达;采用高效液相色谱(HPLC)法测定 CYP2E1 酶活性。**结果** 甘遂组、甘草组和甘遂甘草配伍组均明显诱导大鼠肝脏 CYP2E1 的表达与活性上升,并发现甘草组和甘遂甘草配伍组对 CYP2E1 活性的诱导作用显著高于甘遂组。**结论** 甘遂可能通过诱导肝脏 CYP2E1 的表达与活性上升,促使其所含的前致癌物质和前毒物转化成为致癌物和毒物,导致对机体的毒性作用;甘遂甘草配伍使用时,甘草对 CYP2E1 活性的诱导能力更强,故而甘草可促进甘遂所含前致癌物质和前毒物转化成为致癌物和毒物的过程,并导致对机体毒性作用的增强,从而表现出"十八反"中药物配伍禁忌的特征。

关键词: 甘遂;甘草;十八反;CYP2E1

中图法分类号: R282.71; R285.5; R322.47 **文献标识码:** A

Compatible effects of euphorbia and glycyrrhiza on CYP2E1 expression and activity in rat liver

DAI Fang-guo[1], LUO Ren[1], WANG Yu-guang[2], XIA Cheng-yun[3], TAN Hong-ling[2], XIAO Cheng-rong[2], ZHAO Yong-hong[2], GAO Yue[2] ([1]Department of Traditional Chinese Medicine, The South Medical University, Guangzhou 510515; [2]Department of Pharmacological Toxicology, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850; [3]Department of Traditional Chinese Medicine, The Affiliated Hospital of Chuanbei Medical College, Nanchong 637000, China)

Abstract: Objective To study the compatible effects of euphorbia and glycyrrhiza on the levels of mRNA, protein expression and the activity of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in male rat liver and explore the significance in chinese medicine principle of "Eighteen imcompatible pairs". **Methods** The mRNA expression level of CYP2E1 was determined by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR). The protein expression level of CYP2E1 was detected by Western blotting. The activity of CYP2E1 was quantitated by HPLC method. **Results** The expression levels of mRNA and protein of CYP2E1 were significantly increased in co-administration group with concomitant enhanced enzyme activity. **Conclusion** Euphorbia exerts its toxicity through inducing CYP2E1 expression and activities in rat liver. Glycyrrhiza may enhance the toxicity of euphorbia *via* predominant capability in CYP2E1 activity induction when co-administrated with euphorbia.

Key words: euphorbia; glycyrrhiza; eighteen imcompatible pairs; CYP2E1

细胞色素氧化酶 P450(cytochrome P450)超家族在肝脏的药物代谢机制和有毒化合物的生物降解过程中发挥重要作用,研究表明 Cytochrome P450 超家族中部分成员酶能催化许多前致癌物质和前毒物转化为致癌物质和有毒物,并对机体造成危害;细胞色素氧化酶 P450 2E1(cytochrome P450 2E1, CYP2E1)即是这部分成员中较重要的一种。

CYP2E1 在体内负责 6 大类、70 余种低分子化学物质的代谢[1],包括苯胺、乙醇、丙酮、氨基甲酸乙酯以及亚硝胺类化合物等;其中大部分为前致癌物和前毒物,小部分为临床药物。CYP2E1 主要通过催化前致癌

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070936)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070936)

作者简介:代方国(1974-),男,吉林省敦化市人,博士,讲师,主要从事中药药理、毒理方面的研究。电话:(010)66931233

通讯作者:高 月,电话:(010) 66931312,E-mail: gaoyue @nic.bmi.ac.cn

收稿日期:2005-02-07;修回日期:2005-04-01

物去烷基、去硝基等反应而使之转化为致癌物。某些药物可诱导或抑制该酶的表达及活性，如果这些药物与其它药物联合用药时，将会对其它药物的代谢产生影响，并可能由此导致不良反应的产生和药物毒性的加重。因此，CYP2E1 一直受到药理、毒理和药物致癌等研究领域的关注。

甘遂与甘草配伍是中药配伍禁忌“十八反”理论中的重要药对，两种药物的药效之间为何存在冲突一直是历代医家关注的热点。本研究试图通过检测甘遂与甘草配伍对大鼠肝脏 CYP2E1 的表达与活性的影响，来进一步探讨二者配伍使用导致毒性作用增强的分子水平机制。

1　材料与方法

1.1　材料

甘遂（河北省安国市中药材市场）、甘草（北京同仁堂中药厂）均产自河北。经本所马百平教授鉴定分别为双子叶植物药大戟科植物甘遂 Euphorbia 的干燥根和双子叶植物药豆科植物甘草 Glycyrrhiza 的干燥根。甘遂称其质量后加入 10 倍量水，浸泡 90 min 后煎煮 3 次，每次 1 h，提取液合并后，旋转蒸发，浓缩药物浓度为 0.75 kg/L；甘草水煎液制备同上，药物浓度为 1.50 kg/L；甘遂、甘草混合煎液按 1∶2 称质量后混合，制备方法同上，药物浓度为 2.25 kg/L。RNA 提取试剂盒、逆转录聚合酶链反应试剂盒（Promega 公司）；CYP2E1 及内参照亲环蛋白（cyclophilin，CYC）的引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成；DL 2000 DNA Marker（TaKaRa 公司）；CYP2E1，β-actin 及相关抗体（Chemicon 公司）；蛋白酶抑制剂鸡尾酒片（Roche 公司）；SD 雄性大鼠 32 只，购自军事医学科学院实验动物中心，体质量 180 ~ 200 g。标准蛋白 BSA 为 Pierce 公司产品。

1.2　方法

1.2.1　动物分组及给药　　将动物随机分为空白组、甘遂组（7.5 g/kg）、甘草组（15.0 g/kg）及甘遂甘草合用组（22.5 g/kg），每组 8 只。空白组用生理盐水，其他各药物组按上述剂量连续灌胃给药 14 d，禁食 24 h 后脱臼处死动物，取微粒体、RNA 和裂解微粒体蛋白。

1.2.2　肝组织总 RNA 提取及 CYP2E1 mRNA 测定　　将大鼠处死后迅速取出肝脏，置于液氮中保存。按 RNA 提取试剂盒说明书提取肝脏总 RNA。测 $D(260)/D(280)$ 值为 1.6 ~ 1.8。取总 RNA 1 μg，加入相关试剂，加 CYP2E1 和 CYC 特异性引物[2] 各 5 μl，RNase-free H_2O 补足反应终体积至 25 μl。扩增 20 轮循环后。将 CYP2E1 和 CYC 等体积的 RT-PCR 扩增产物 10 μl 上样，做琼脂糖凝胶电泳。

1.2.3　肝微粒体的制备　　将大鼠处死后打开腹腔和胸腔，剪开心脏，用注射器吸 4 ℃生理盐水由门静脉灌洗至肝脏呈土黄色。采用超速离心法制备微粒体[3]，于 - 80 ℃分装保存备用。微粒体蛋白浓度采用 Lowery 法定量，使用牛血清白蛋白作为标准。

1.2.4　裂解微粒体蛋白　　取部分上述制备的微粒体沉淀用蛋白裂解液（5% 巯基乙醇，2% SDS，60 mmol/L Tris HCl pH 6.8，10% 甘油，0.5% 去氧胆酸钠，1% 蛋白酶抑制剂）变性溶解，裂解蛋白浓度采用 Bradford 法定量，使用牛血清白蛋白作为标准。

1.2.5　Western blot 检测 CYP2E1 蛋白表达　　裂解的蛋白于 100 ℃水浴 10 min 后，上样于 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳，80 V、30 min 和 100 V、90 min 后，经 200 mA，120 min 将蛋白从胶上转印到孔径 0.2 μmol/L 的硝酸纤维素膜上。将该膜浸于含 50 g/L 脱脂奶粉的 1 × TBST 中室温轻摇 60 min 以封闭非特异性结合位点。1 × TBST 洗 3 次，每次 5 min。加入一抗（CYP2E1 兔抗血清，1∶1 000；β-actin 羊抗血清为内参照，1∶2 000）在室温下孵育 1 h 后，移去一抗，1 × TBST 洗 3 次，每次 5 min。加入二抗（辣根过氧化物酶标记的抗羊和抗兔 IgG，1∶5 000）在室温下作用 1 h，移去二抗，1 × TBST 浸洗 3 次。按 Amersham Pharmacia 公司手册用增敏的化学发光底物（ECL）进行显影。

1.2.6　高效液相（HPLC）法检测 CYP2E1 酶活性　　温孵反应体系中含肝微粒体蛋白 0.2 mg，NADPH 1.0 mmol/L，代谢底物对硝基酚（4-Nitrophenol）0.15 mmol/L，维生素 C 1.0 mmol/L，以 0.1 mol/L 的 Tris·HCl pH 7.4 定容至 0.5 ml。参照文献[4]的方法进行测定。用对硝基酚经 CYP2E1 代谢的特异性产物 1，2-二羟基-4-硝基苯测定标准曲线。

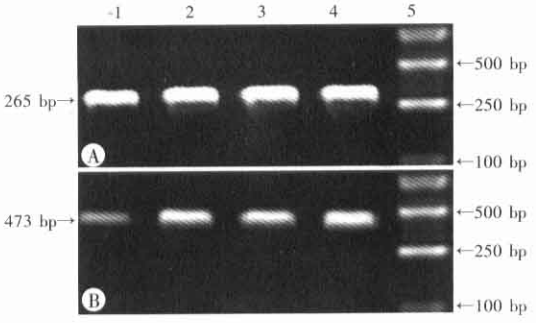
1.3　统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SAS 软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　给药后大鼠肝脏 CYP2E1 mRNA 表达水平的变化

RT-PCR 检测结果显示，与对照组比较，甘遂组、甘草组及甘遂甘草合用组均明显诱导了 CYP2E1 mRNA 的表达，其中又以合用组最为明显（图 1）。



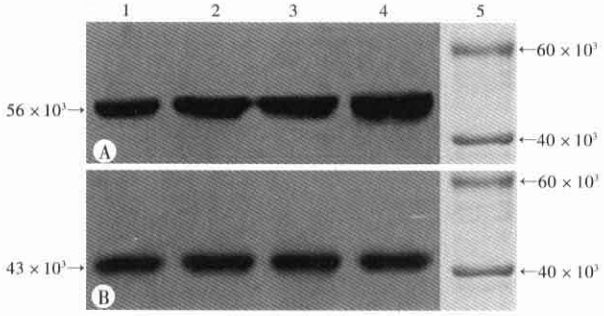
A：Cyclophilin；B：P450 2E1；1：Control group；2：Euphorbia group；3：Glycyrrhiza group；4：Euphorbia + Glycyrrhiza group；5：Marker

图 1　甘遂、甘草单用及配伍使用对大鼠肝脏 CYP2E1 mRNA 表达水平的影响

Fig 1　Effects of administration or co-administration of euphorbia/glycyrrhiza on the CYP2E1 mRNA expression in rat liver

2.2 给药后大鼠肝脏 CYP2E1 蛋白表达的变化

Western blot 检测结果显示，与对照组比较，甘遂组和甘草组中 CYP2E1 蛋白表达有相似程度的增加，而甘遂甘草合用组中增加更为明显一些(图 2)。



A: P459 2E1; B: β-actin; 1: Control group; 2: Euphorbia group; 3: Glycyrrhiza Group; 4: Euphorbia + Glycyrrhiza group; 5: Marker

图 2 甘遂、甘草单用及配伍使用对大鼠肝脏 CYP2E1 蛋白表达水平的影响

Fig 2 Effects of administration or co-administration of euphorbia/glycyrrhiza on the expression of CYP2E1 protein in rat liver

2.3 给药后大鼠肝脏 CYP2E1 酶活性的变化

HPLC 分析结果显示，以 1，2-二羟基-4-硝基苯测定的标准曲线为：Y = 0.046 3X + 0.365 2，r = 0.998 6，据此换算出各组 CYP2E1 酶活性，结果分析表明，与对照组(0.969 ± 0.232)比较，甘遂组(1.444 ± 0.228)、甘草组(1.721 ± 0.337)和合用组(1.713 ± 0.176)中 CYP2E1 酶活性显著上升($P < 0.05$)；而甘草组和合用组的上升又显著高于甘遂组($P < 0.05$)。

3 讨论

中药配伍禁忌歌诀“本草名言十八反，半蒌贝蔹及攻乌，藻戟遂芫俱战草，诸参辛芍叛藜芦”最早见于金元时期张子和的《儒门事亲·卷十四·十八反》。后世医家从各个角度对此进行了验证，现代病理学研究也发现“十八反”配伍对大鼠的心、肝、肾功能有较明显的毒性[5]。本研究即从分子水平对“十八反”中甘遂与甘草配伍禁忌药对的作用机制进行了探索。

中药甘遂中含有巨大戟萜醇及其衍生物和一些二萜酯类化合物，如甘遂萜酯 A、甘遂萜酯 B 等，这些物质经研究表明均对机体有毒性作用；中华人民共和国药典也将甘遂列为有毒中药。研究也表明，甘遂存在激活 EB 病毒早期抗原活性、皮肤刺激及促进肿瘤发生作用，并证实甘遂中含有多种前致癌物质和前毒物[6]。而中药甘草的特性是性甘，平和无毒。

CYP2E1 可将多种前致癌物质转化为致癌物质，并导致机体增加机体罹患肿瘤的几率增加，故而其蛋白表达及活性检测是药物毒理学研究中的重要指标。本研究通过检测表明，甘遂组、甘草组和甘遂甘草配伍组均明显诱导大鼠肝脏 CYP2E1 的表达与活性上升，并提示甘草组和甘遂甘草配伍组对 CYP2E1 活性的诱导作用显著高于甘遂组。基于这些实验结果，我们得出两个结论：①甘遂可能通过诱导肝脏 CYP2E1 的表达与活性上升，促使其所含的前致癌物质和前毒物转化成为致癌物和毒物，导致对机体的毒性作用；②当甘遂甘草配伍使用时，因为甘草对 CYP2E1 活性的诱导能力更强，故而甘草可促进甘遂所含前致癌物质和前毒物转化成为致癌物和毒物的过程，并导致对机体毒性作用的增强，从而表现出“十八反”中药物配伍禁忌的特征。

参考文献：

[1] Koop D R. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1 [J]. FASEB J, 1992, 6(2): 724 - 730.

[2] Morris D L, Davila J C. Analysis of rat cytochrome P450 isoenzyme expression using semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) [J]. Biochem Pharmacol, 1996, 52(5): 781 - 792.

[3] Yasui H, Deo K, Ogura Y, *et al*. Evidence for singlet oxygen involvement in rat and human cytochrome P450-dependent substrate oxidations[J]. Drug Metab Pharmacokin, 2002, 17(5): 416 - 426.

[4] Tassaneeyakul W, Veronese M E, Birkett D J, *et al*. High-performance liquid chromatographic assay for 4-nitrophenol hydroxylation, a putative cytochrome P-4502E1 activity, in human liver microsomes[J]. J Chromatogr, 1993, 616(1): 73 - 78.

[5] 黄文权，程相岭，肖 鸿，等. 甘草甘遂伍用对大鼠心肝肾功能及形态的影响[J]. 第三军医大学学报，2001，23(12)：1439 - 1441.

[6] 聂淑琴，李泽琳，梁爱华，等. 炮制对甘遂、牛膝、苦杏仁特殊毒性及药效的影响[J]. 中国中药杂志，1996，21(3)：153 - 156.

(编辑 薛国文)

关于修回稿件附软盘的说明

为缩短学报出版周期，减少编排错误，请作者根据学报编辑部提出的意见对文稿修改后，将修改稿以 Word 格式存入软盘，并请标明软盘中的文件名、作者姓名及稿件编号，连同修改稿一并送交本刊编辑部或 E-mail: aammt@mail.tmmu.com.cn(校外稿件请邮寄)。

本刊编辑部