DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.1987.03.002

应用皂甙渗透组织研究小鼠灌流肝中辅酶Ⅱ(NADPH)对混合功能氧化作用的兴奋

卫生学教研室：　　吴逸人
美国北卡罗拉大学药理系：Conway JG.；Thurman RG.
美国马利兰大学药理教研室：　Kauffman FC.

提要：小鼠肝以0.001～0.005%浓度的皂甙灌注2～30min可获满意的渗透组织的效果。有关渗透组织的效果可自柠檬酸对LDH的释放和硝基茴香醚代谢的兴奋来估价。禁食小鼠肝脏在灌注二羧酸化合物或辅酶Ⅱ生成系统结合皂甙处理6～8min，则单氧化作用可分别提高60和110%；在喂食小鼠肝中灌注柠檬酸，辅酶Ⅱ或辅酶Ⅱ生成系统结合皂甙处理，单氧化速率可提高40～60%。实验结果支持了这样一个假设，即在完整的肝细胞中，不论喂食或禁食小鼠，单氧化作用是受可利用的辅酶Ⅱ的量所制约。

关键词：小鼠；皂甙；灌流

在氧和基质充裕的情况下，完整细胞中单氧化作用（即混合功能氧化作用）的速率取决于混合功能氧化酶组份的活力和辅酶Ⅱ的供应情况。而后者又先后受到辅酶Ⅱ生成酶所需基质的补充条件和争夺辅酶Ⅱ有关反应的影响[1]。来自禁食大鼠、小鼠和仓鼠的灌流肝以及大鼠的游离肝细胞、醣类如山梨醇、木糖醇和葡萄糖是易于扩散进入细胞而兴奋混合功能氧化作用的，这大概与糖类为辅酶Ⅱ生成系统的酶提供基质有关[2-6]。这些资料提示辅酶Ⅱ是禁食情况下决定混合功能氧化作用速率的一个重要因子，这一点已广为接受。但在喂食情况下，大、小鼠肝中糖类对PNA（对硝基茴香醚）的脱甲基作用无兴奋性[3,5]，也不引起肝内辅酶Ⅱ浓度增高，在这种条件下，有关辅酶Ⅱ的供应是否也是决定混合功能氧化作用速率的一个重要因子问题，根据现有资料尚还不清楚。

近年来常以洗涤剂作为渗透细胞的试药。皂甙(Saponin)是最常用之一，它能渗透细胞，与膜胆固醇形成不溶性复合物，导致膜结构改变[7]。本研究的目的是用皂甙渗透小鼠灌流肝，希望发展一种对肝细胞功能损害较小的渗透细胞方法。选用经过β-萘黄酮处理的C_{57}小鼠作供肝动物，因它的单氧化作用速率很高，故而对辅酶Ⅱ有高的利用率（用PNA作基质时为40μ mole/g/h)[6]。在皂甙处理后，补充辅酶Ⅱ和糖类以此来估价动物在喂食情况下完整肝细胞中辅酶Ⅱ对单氧化作用的影响。本文取得的结果与设想是相符的，即在喂食小鼠肝中补充辅酶Ⅱ是加速单氧化作用的重要决定因子。

材料和方法

1. 动物处理

鼠龄为5—15周的雄性C_{57}小鼠分成两组，一组不控制饮食，另一组灌流前禁食20小时，动物在实

验前均腹腔注入溶于玉米油中的β-萘黄酮进行诱导，每天一次，共三天，剂量为80mg/kg/次。

2. 小鼠肝灌流

肝灌流按Conway等介绍进行操作[5]，采用pH 7.4，温度37℃的Krebs-Henseleit碳酸氢钠缓冲液作灌流液，使用前先以混合氧（5%CO_2+95%O_2）灌充至饱和、自门静脉进行灌流插管，流率约6ml/min/g liver。实验中使用的灌注物如皂甙，二羧酸盐，辅酶Ⅱ和辅酶Ⅱ生成系统均用灌流液配制稀释，使用前调节pH至7.4。它们灌注的时间、次序和浓度见表、图所示。辅酶Ⅱ生成系统是由每分钟注入6mg异柠檬酸盐，0.05单位异柠檬酸盐脱氢酶和35微克$NADP^+$所组成。

3. 分析

PNA在肝内通过单氧化作用转变为游离和结合型的PNP（对硝基酚），而后者又有葡萄糖醛酸结合和硫酸盐结合之分。通常前者占80～90%[5]。故单氧化作用的速率可测定单位时间内每克肝脏分泌游离和结合型PNP浓度而获得。PNA用于灌流时配制成0.2mM，如图示进行灌注。肝流出液中的PNP浓度用分光光度计进行连续观察[2]。流出液中结合型葡萄糖醛酸和硫酸盐PNP测定用酶学法[8]，乳酸脱氢酶(LDH)的测量是用标准的酶学方法[9]。

肝微粒体制备是用差速离心[10]，微粒体中PNA脱甲基酶的活力采用Conway等方法分析[5]。

4. 组织学检查

灌流肝在皂甙灌注10min后，紧接着灌注锥虫兰(0.2mM)，然后再以1%多聚甲醛灌注6分钟进行固定和石蜡包埋。切片作伊红染色，在受损细胞核中锥虫兰能被鉴别[11]。

结　果

1. 皂甙对PNA脱甲基作用影响

柠檬酸盐是富含阴离子的，它正常情况下不进入细胞，因此柠檬酸盐对PNA脱甲基的兴奋作用能用于证明渗透浆膜的情况。PNA脱甲基作用出现兴奋是在当柠檬酸盐增加辅酶Ⅱ生成时，在给小鼠肝灌注PNA时结合不同时间长度浓度为0.001或0.005%的皂甙处理，发现0.005%皂甙处理不给柠檬酸盐的，无论喂食或禁食小鼠肝中PNA的脱甲基作用和PNP结合率均无明显影响（图1，表2）。这种速率略有降低的趋势其最大可能是由于辅酶Ⅱ自细胞中漏出之故；此外单用柠檬酸盐而不给皂甙处理也不对单氧化作用起作用（图2A，3B）。来自禁食小鼠的肝脏灌注0.001%皂甙10min仅产

表1　灌注皂甙对小鼠肝的硝基茴香醚（PNA）脱甲基作用和乳酸脱氢酶释放的影响

皂甙%	营养状况	皂甙灌注时间（分）	离体灌流肝数（只）	PNA脱甲基作用（μ moles/g liver/h）			肝流出液最高LDH活力（u/l）
				皂甙灌注前	皂甙灌注后	差　数	
0.001	禁	2	3	10.9	12.4	1.5	/*
		10	1	17.7	17.7	0	497
		15	1	11.0	21.8	10.8	1315
	食	20	3	17.0	26.5	9.5	1503
		30	1	12.1	37.9	25.8	1103
0.005	禁	2	5	15.8	32.6	16.8**	885
	食	5	2	14.3	40.5	26.2	1949
	喂	2	2	21.4	31.9	10.5	657
	食	5	5	41.1	64.5	23.4**	1230

说明：灌流肝均取自经萘黄酮诱导的C_{57}小鼠。灌流开始后20分钟内进行肝脏冲洗不取样，自20～40分钟内所取样测定的PNA脱甲基作用的值为对照，自40分钟后开始灌注10mM柠檬酸至50分钟起又灌注各种浓度和不同时间长度的皂甙如表示。LDH释放通常在皂甙处理后5分钟开始出现。

* 未测，** $P<0.01$ 运用配对处理的结果。

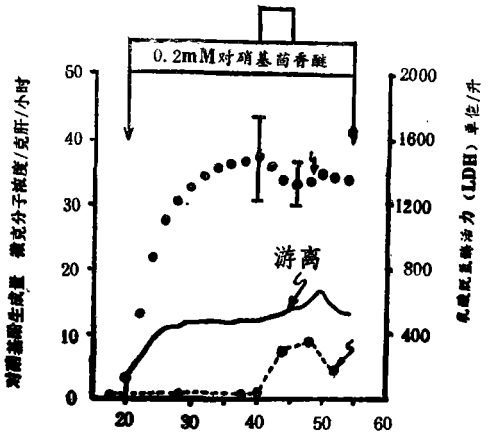


图1 皂甙对β-萘黄酮诱导的喂食小鼠灌流肝对硝基茴香醚（PNA）代射的影响

生LDH轻微释放，未见柠檬酸盐对PNA脱甲基作用产生影响，若灌注时间延长至20 min，则可使单氧化作用速率上升1倍左右（表1）。这时流出液中的LDH值大于1000u/L（表1）。若应用0.005%皂甙，柠檬酸盐在2min内即对禁食小鼠引起混合功能氧化作用兴奋性提高以及LDH释放，但在喂食小鼠需灌注皂甙5min才有类似反应（表1）。

当用0.005%皂甙灌注喂食小鼠肝5min后，在肝小叶周围区约有10%细胞根据锥虫兰吸收情况反映出有不可逆的损伤。这种对周围区特有的损害用洋地黄皂甙(Digitonin)灌注也可获得[12]。

2. 皂甙和柠檬酸盐对微粒体PNA脱甲基作用影响

本实验所用皂甙浓度并不影响辅酶Ⅱ生成系统孵育中的硝基茴香醚脱甲基作用（表3），但0.01%浓度皂甙可降低PNA代谢率三分之一。单用柠檬酸盐（10mM）对PNA脱甲基作用的速率不产生影响（表3）。

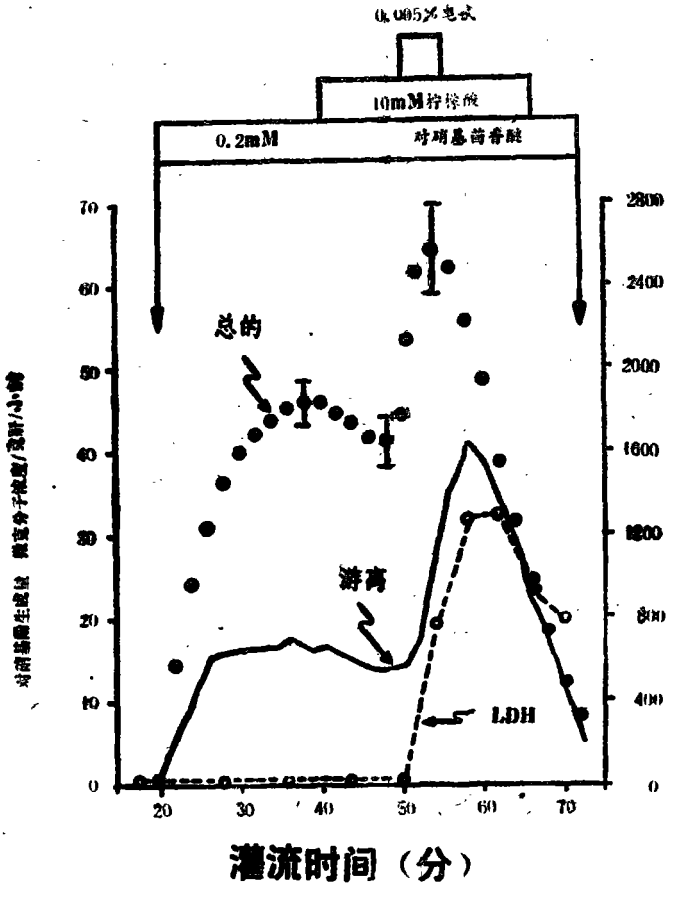
3. 羧酸盐和辅酶Ⅱ对混合功能氧化作用速率的影响

经β-萘黄酮诱导后的小鼠灌流肝，PNA脱甲基速率喂食和禁食动物分别为30—40μ

表2 二羧酸盐和辅酶Ⅱ（NADPH）对皂甙处理的小鼠灌流肝中硝基茴香醚（PNA）脱甲基作用影响

皂甙%	动物营养状况	处理物质	动物数目（只）	PNA脱甲基作用（μ moles/g liver/h）			兴奋（%）
				皂甙灌注前	皂甙灌注后	差数	
0.005	喂食	无	5	37.5±6.4	33.1±3.5	−4.5±3.0	
		柠檬酸***	5	41.1±2.8	64.8±5.4	23.7±3.8**	58
		NADPH	9	30.7±4.9	44.2±4.3	13.4±2.3**	44
		NADPH生成体系	5	34.8±2.6	48.6±4.7	13.8±2.8**	40
	禁食	无	4	20.4±2.9	21.3±1.6	0.9±1.7	
		柠檬酸	5	15.8±2.0	33.3±3.8	17.5±2.0**	111
		NADPH生成体系	5	20.8±1.9	44.2±8.0	23.4±8.8*	112
		异柠檬酸	5	17.7±3.1	31.2±4.1	13.5±2.1**	76
		苹果酸	5	15.9±1.7	25.3±2.0	9.4±2.1*	60

说明：灌流肝来自经萘黄酮诱导后的C_{57}小鼠，灌流开始后20分钟内为冲洗肝脏时间不取样，自20分钟开始灌注PNA，自40分钟起肝内加入二羧酸盐（10mM）或辅酶Ⅰ（200μM）或辅酶Ⅱ生成体系（浓度见本文）；在50分钟起开始灌注皂甙（禁食小鼠）2分钟，（喂食小鼠）5分钟。肝流出液样品每2分钟收集一次，* $P<0.05$；** $P<0.01$；*** 皂甙浓度为0.01%



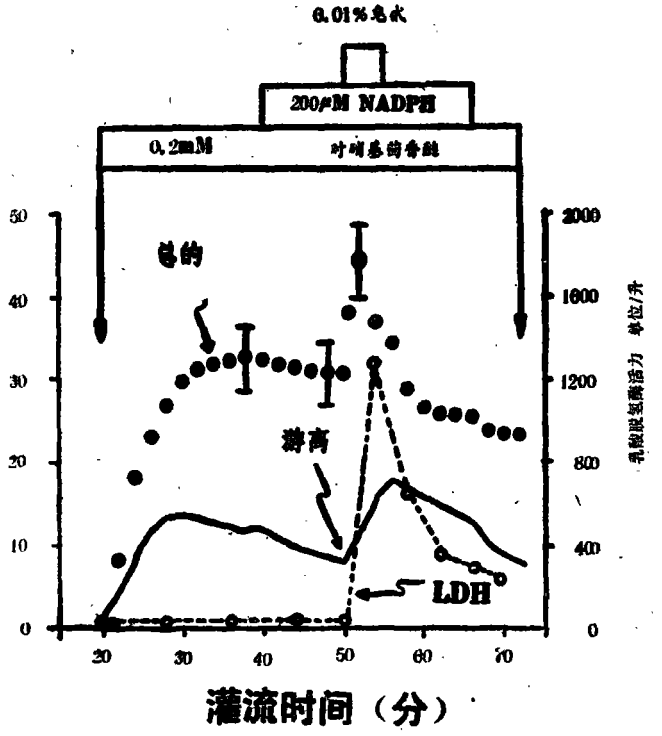


图 2　柠檬酸和辅酶Ⅱ在灌注皂甙前后对β-萘黄酮诱导的喂食小鼠灌流肝对硝基茴香醚(PNA)代谢的影响

(A)　柠檬酸 10mM (5只肝的结果，皂甙0.005%)

(B)　辅酶Ⅱ 200μM (9只肝的结果，皂甙0.01%)

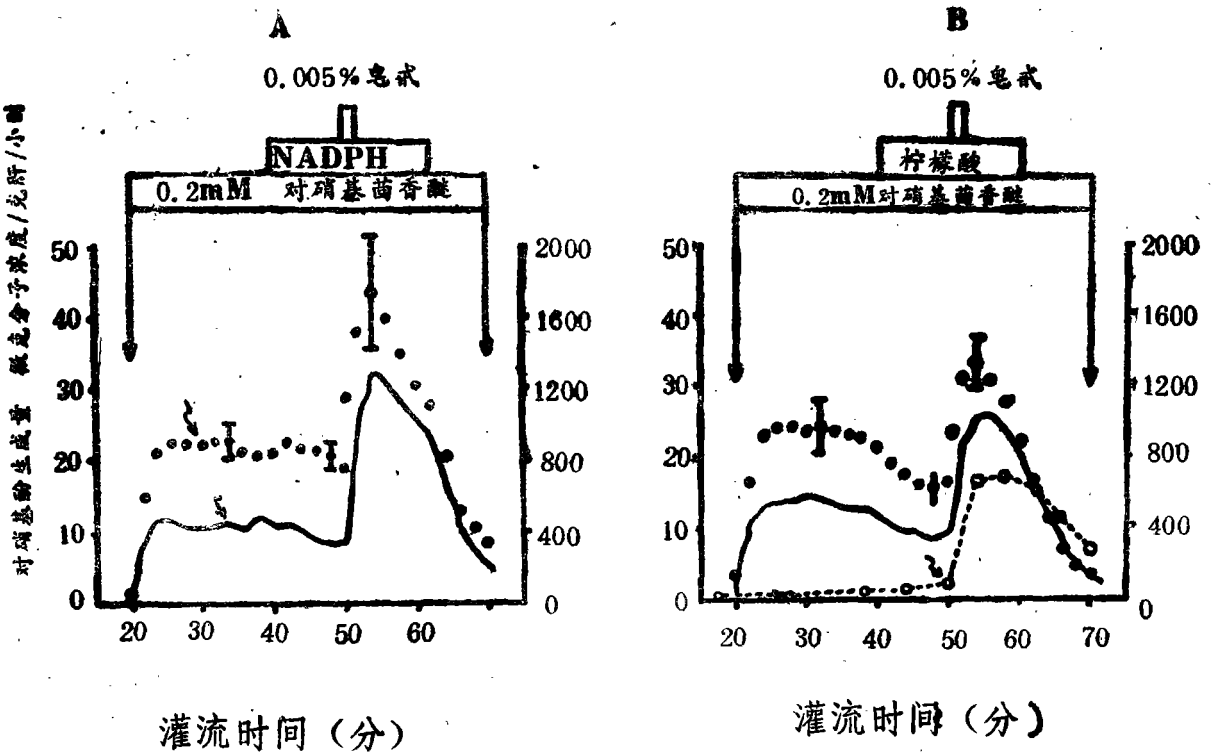


图3 辅酶Ⅰ生成体系和柠檬酸在灌注皂甙前后对β-萘黄酮诱导的喂食小鼠灌流肝的对硝基茴香醚(PNA)代谢影响

(A) 辅酶Ⅰ生成体系（为5只肝脏结果，因用了辅酶Ⅰ生成体系，故未测LDH）
(B) 柠檬酸10mM(5只肝的结果)

表3 皂甙对微粒体硝基茴香醚（PNA）脱甲基酶活力的影响

加入物	PNA 脱甲基作用 (μ moles/min/mg protin) 硝基酚 Ⅰ	硝基儿茶酚 Ⅱ	总量 Ⅰ+Ⅱ
无	3.49	0.42	3.91
柠檬酸 (10mM)	3.21	0.32	3.53
皂甙			
0.0001%	2.67	0.24	2.91
0.001 %	3.43	0.35	3.78
0.01 %	2.06	0.09	2.15

表中值为平均数，它们均各来自6只经β-萘黄酮诱导小鼠肝制备的微粒体总体三次测量结果

moles/g/h，这个结果与Conway等以前报道的相近[5]。在用皂甙前，灌注柠檬酸盐，辅酶Ⅱ或辅酶Ⅰ的生成系统对PNA脱甲基速率无变化（图2,3)。但在灌注柠檬酸盐或辅酶Ⅰ时给予皂甙处理就明显不同，对喂食动物肝内混合功能氧化作用能提高40—60%（图2)。皂甙处理后PNP葡萄糖醛酸化的高速率能维持6—8min，10—12min后混合功能氧化和葡萄糖醛酸化作用二者明显降低（图2,3)。随着单氧化作用兴奋LDH也开始释放到肝流出液中（图2)。

皂甙渗透禁食小鼠肝脏后，柠檬酸盐和

辅酶Ⅱ生成系统二者能提高PNA脱甲基作用约110%；在相同条件下，用异柠檬酸或苹果酸盐也能兴奋约提高60—80%左右（图2，表2）。

讨　论

1. 用皂甙渗透小鼠灌流肝

过去10年渗透细胞膜的研究已取得很大进展。一种称之Filipin的聚烯抗生素复合体具有渗透细胞能力，它能与浆膜胆固醇形成多分子的复合物而不影响腺粒体的功能[13,14]。胆固醇与洗涤剂（皂甙）也可形成不溶复合物[7]，并已广泛用于渗透肌纤维，嗜铬细胞和肝细胞[15-17]。另有洋地黄甙也已用于渗透游离细胞[18]和灌流肝[12]。

本研究发现用浓度为0.005%皂甙只要灌注2min就能获得对禁食小鼠肝的渗透效果，但同样情况下对喂食小鼠需要灌注5min（表1）。此时就出现LDH释放现象以及在实验结束时用锥虫兰染色可有10%肝细胞呈不可逆损伤。三方面的证据说明短暂和适度的皂甙处理损害肝细胞的活力并不显著。第一在灌注0.005%皂甙后小鼠肝内混合功能氧化作用未被抑制（图1，表2），提示单氧化酶成分和细胞辅酶Ⅱ生成系统未受影响；第二根据在皂甙灌注10min内葡萄糖醛酸化未受影响这一事实，证明皂甙对细胞的能量状况并不产生严重影响，因葡萄糖醛酸化作用对细胞内能量和吡啶核甙酸氧化还原情况变化是敏感的[9,20]；第三约90%肝细胞对锥虫兰染料不起作用，说明绝大多数肝细胞未损害。因此在灌注柠檬酸盐或辅酶Ⅱ时结合皂甙渗透处理出现单氧化作用的兴奋和最终产生LDH的释放，这并不意味着严重影响肝细胞的生活力。

2. 辅酶Ⅱ对小鼠灌流肝中混合功能氧化作用的兴奋

Thurman等于1969年指出，给禁食大鼠肝灌注氨基比林（混合功能氧化系统中的一种基质）后，肝的呼吸氧化大为增加[21]，但若在试验中加入抗霉素A，就见不到以上反应，然而用肝微粒体来孵育氧化氨基比林；不论在管中加入或不加入抗霉素A，只要有活化的辅酶Ⅱ生成系统存在就有相应的呼吸氧化速率增高现象[1]，这说明辅酶Ⅱ的供应是禁食大鼠肝中混合功能氧化作用决定速率的主要因子。在禁食状况下，只要灌注山梨糖醇，木糖醇或葡萄糖，由于它们间接地增加了辅酶Ⅱ的供应，灌流肝和游离肝的混合功能氧化作用均出现兴奋[2-5]。因此供应辅酶Ⅱ是禁食情况下单氧化作用速率的决定因子这一观点已获得普遍承认。

喂食动物供应辅酶Ⅱ后对单氧化酶反应的作用至今仍不清楚。未诱导的C_{57}小鼠（对芳香烃有反应的一种具有代表性鼠种）[5]和仓鼠[4]以及经苯巴比妥诱导的大鼠[2]等灌流肝在2min内保持PNP生成呈高速率的直线状态，然后迅速下降到原来的25—50%。这种引起混合功能氧化作用速率下降的最大可能是辅酶Ⅱ的供应问题，因那时氧和基质都是丰富的。这提示辅酶Ⅱ生成系统不能持续供应单氧化作用高速率中辅酶Ⅱ消耗之所需。这符合这样的假设：即用3-甲基胆蒽或β-萘黄酮对芳香烃有反应的小鼠进行诱导，它们的灌流肝能保持单氧化作用在很长时间内具有高速率，但用3-甲基胆蒽处理对芳香烃无反应的小鼠，其肝脏单氧化速率随时间延长而下降（即与未用3-甲基胆蒽处理小鼠相似）。根据PNA脱甲基作用的动力学，认为3-甲基胆蒽处理对芳香烃有反应的小鼠不仅兴奋了P-450系统，而且增加了肝脏供应辅酶Ⅱ的能力[5]。

虽以上告诉我们在喂食情况下辅酶Ⅱ是控制速率的因子，但灌注糖类并不影响肝脏中PNA混合功能氧化作用的速率[3,5]。这可有二种解释，一是喂食条件下辅酶Ⅱ是过剩的，它不是决定单氧化作用速率的一个主要因子；二是在喂食条件下糖类并不对混合功

能氧化作用增加辅酶Ⅱ的补充。

本文皂甙渗透肝脏的研究结果，对以上问题有了较为清晰的认识。对芳香烃产生反应小鼠的肝脏经β-萘黄酮诱导后，在给以辅酶Ⅱ或柠檬酸盐时结合皂甙处理，PNA的混合功能氧化作用可提高40～60%（表2，图2）。这并非是皂甙对混合功能氧化酶有作用，因单用皂甙并不兴奋而是降低游离肝细胞和灌流肝的单氧化作用的（表3，图1）。这些结果显示辅酶Ⅱ确实能兴奋喂食小鼠灌流肝的混合功能氧化作用。在喂食条件下，辅酶Ⅱ供应来自果糖循环最为丰富，所以糖类灌注并不增加辅酶Ⅱ是可能的。另有人发现经苯巴比妥处理的喂食大鼠肝给予葡萄糖并不改变果糖循环流率[22]，这支持了我们以上的结论。

与辅酶Ⅱ有关的细胞色素P450还原酶的代谢常数经测是低于细胞内总的辅酶Ⅱ的含量[23]，那么皂甙渗透的肝中补充辅酶Ⅱ能兴奋混合功能氧化作用，对此作何理解。在完整细胞内大多数辅酶Ⅱ是与各种脱氢酶结合在一起的，主要局限在腺粒体内[24]。而且在完整细胞中许多辅酶Ⅱ的利用体系（如脂肪酸合成，与黄素有关的单氧化作用，谷胱甘肽还原等）均要利用辅酶Ⅱ，因此可以设想在完整细胞中能为单氧化作用所利用的游离型辅酶Ⅱ的浓度是极低的。我们在皂甙处理的肝中加入辅酶Ⅱ或它的生成系统引起诱导小鼠灌流肝单氧化作用兴奋（图2），它完全能解释我们的设想，我们认为在喂食条件下，细胞内游离型辅酶Ⅱ的浓度是细胞色素P450单氧化作用高速率的决定因子。此外辅酶Ⅱ在渗透的大鼠肝瘤细胞中也兴奋苯并芘的代谢，这对我们这个假设也是一个支持[25]。

参考文献

[1] Thurman RG. et al. Pharmac Rev 1980; 31:229.

[2] Thurman RG. et al. J Pharmac Exp Ther 1977; 201:498.

[3] Reinke LA. et al. Biochem Pharmac 1980; 29:813.

[4] Reinke LA. et al. Biochem Pharmac 1984; 33:1315.

[5] Conway JG. et al. Biol Chem 1983; 258:3825.

[6] Moldeus P. et al. Eur J Biochem 1974; 46:351.

[7] Glauert AM. et al. Nature, Lond 1962; 196:952.

[8] Rrinke LA. et al. J Pharmac Exp Ther 1981; 217:863.

[9] Bergmeyer HU. (Ed), Methoden der Entymatischen Analyse Ed 2 Verlag Chemie, Weinheim 1979;

[10] Remmer H. et al. J Molec Pharmac 1966; 2:187.

[11] Belinsky SA. et al. J Pharmac Exy Ther 1984; 230:755.

[12] Quistorff B. et al. Biochem J 1985; 226:289.

[13] Kinsky C. et al. Biochim Biophys Acta 1967; 135:844.

[14] Morton BE. et al. Biochemistry 1967; 6:57.

[15] Brooks JC. et al. J Neurochem 1983; 40:468.

[16] Cassidy P. et al. Pflugers Archs 1980; 387:115.

[17] Joseph SK. et al. J Biol Chem 1984; 259:3077.

[18] Gankema HS. et al. Eur J Biochem 1983; 131:447

[19] Moldeus P. et al. Biochem Pharmac 1978; 27:2583.

[20] AW TY. et al. J Biol Chem 1982; 257: 8997.

[21] Thurman RG. et al. Eur J Biochem 1969; 10:459.

[22] Belinsky AS. et al. Molec Pharmac 1985; 28:371.

[23] Kauffman FC. et al. Biochem J 1979; 184:675.

[24] Hoek JB. et al. In Alcohol and Aldehyde Metabolizing systems Academic Press, New York 1974; 351.

[25] Sadowski IJ. et al. Int J Biochem 1985; 17:1023.

STIMULATION OF MIXED-FUNCTION OXIDATION BY NADPH IN PERFUSED MOUSE LIVERS-STUDIES WITH SAPONIN-PERMEABILIZED TISSUE

Dept. of Hygiene, *Wu Yiren*
Dept of Pharmacology, University of North Carolina,
Conway JG. and Thurman RG
Dept. of Pharmacology, University of Maryland,
Kauffman FC.

In perfused livers from fed and fasted β-naphthoflavonetreated C57BL/6J mice, maximal rates of p-nitroanisole O-demethylation were 30-40 u moles/g/hr and 15-20 u moles/g/hr respectively. The detergent saponin, at concentrations ranging from 0.001 to 0.005%, was infused between 2 and 30 min to establish optimal conditions to permeabilize plasma membranes. Permeabilization was assessed by release of lactate dehydrogenase and stimulation of p-nitroanisole O-demethylation or conjugation of p-nitrophenol by perfused livers. Further, dicarboxylates or NADPH had no effect on rates of monooxygenation by perfused mouse liver in the absence of saponin. In saponin-treated livers from fasted mice, however, rates of monooxygenation were increased rapidly by infusion of dicarboxylates (10 mM malate, citrate, or isocitrate) or an NADPH-generating system (60 and 110% respectively), over a 6-8 min period. During this time period, cellular energetics were not comprised as refleted by normal rates of glucuronidation of p-nitrophenol. Thus, non-permeable metabolites can enter saponin-permeabilized cells in the perfused liver. Rates of monooxygenation were increased 40-60% in livers from fed mice by citrate, NADPH(200uM) or an NADPH-generating system. By contrast, saponin decreased mixed-function oxidation assayed in isolated microsomes incubated with an NADPH-generating system. Taken together, these data support the hypothesis that maximal rates of monooxygenation in intact hepatocytes from fed as well as fasted mice is limited by the availability of NADPH

KEY WORDS: Mice; Saponins; Perfusion