

## 大黄素对大鼠肝脏 CYP450 酶的诱导研究

王青秀<sup>1,4#</sup>, 雷荣辉<sup>1,2#</sup>, 吴纯启<sup>1</sup>, 廖明阳<sup>1</sup>, 肖小河<sup>3</sup>, 王全军<sup>1\*</sup>

1. 军事医学科医学院毒物药物研究所, 抗毒药物与毒理学国家重点实验室(军事医学科学院), 国家北京药物安全评价研究中心, 北京 100850
2. 西安交通大学医学部公共卫生学院, 西安 710061
3. 解放军 302 医院全军中药研究所, 北京 100039
4. 北京市海淀区卫生局卫生监督所, 北京 100037

**摘要:** 目的 探讨大黄素对大鼠肝脏细胞色素 P450 酶 (CYP450) 及其主要亚型的影响。方法 20 只雄性 SD 大鼠, 随机分成 4 组, 每组 5 只, 分别为溶剂对照组, 170、500 和 1 500 mg/kg 大黄素染毒组, 大黄素蒸馏水混悬后连续经口给药 16 d, 结束后次日取大鼠肝脏组织制作微粒体, 分别采用 CO 还原差示光谱法、分光光度法及化学发光法检测大鼠肝脏微粒体总 CYP450 水平, 红霉素脱甲基酶 (CYP3A)、氨基比啉-N-脱甲基酶, CYP1A、CYP2B 和 CYP2E1 酶活性变化。结果 大黄素连续经口给药 16 d, 能够引起大鼠肝脏微粒体总 CYP450 显著升高、可轻度诱导 CYP3A、CYP1A、CYP2E1 和 CYP2B 酶, 500 mg/kg 剂量组最明显。结论 大黄素对大鼠肝脏中 CYP3A、CYP1A、CYP2B 和 CYP2E1 酶均有诱导作用。

**关键词:** 大黄素; 细胞色素 P450; 红霉素脱甲基酶; 氨基比啉-N-脱甲基酶; CYP1A; CYP2B; CYP2E1

中图分类号: R994.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2015) 02-0147-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.02.006

## Induction of cytochrome P450 enzymes by emodin in liver tissue of rats

WANG Qing-xiu<sup>1,4</sup>, LEI Rong-hui<sup>1,2</sup>, WU Chun-qi<sup>1</sup>, LIAO Ming-yang<sup>1</sup>, XIAO Xiao-he<sup>3</sup>, WANG Quan-jun<sup>1</sup>

1. National Beijing Center for Drug Safety Evaluation and Research, State key laboratory of Toxicology and Medical Countermeasures (Academy of Military Medical Sciences), Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China
2. School of Public Health, Xi'an Jiaotong University Health Science Center of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China
3. Department of Pharmacy, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China
4. The Bureau for Health Inspection and Supervision of Haidian District, Beijing 100037, China

**Abstract: Objective** To explore the effects of emodin on cytochrome P450 enzyme (CYP450) and elucidate the toxicity mechanism of emodin. **Methods** Twenty male SD rats were randomly divided into four groups. The extracts of the liver tissues of rats treated with emodin at different doses (170, 500, 1 500 mg/kg for 16 d) were in preparation of microsomes, the activities of total CYP450, CYP3A, aminopyrine N-demethylase, CYP1A, CYP2B, and CYP2E1 were respectively determined by the reduction of CO difference spectroscopy, spectrophotometer, and chemiluminescence method. **Results** Induction of the total cytochrome P450 enzyme, CYP3A, CYP1A, CYP2E1, and CYP2B were observed in the liver tissues of rats treated with emodin for 16 d, the induction effect was most obvious in the liver tissues of rats in 500 mg/kg group. **Conclusion** Emodin could induce the cytochrome P450 enzyme including CYP3A, CYP1A, CYP2B, and CYP2E1 in the liver tissues of rats.

**Key words:** emodin; cytochrome P450 enzyme; CYP3A; aminopyrine N-demethylase; CYP1A; CYP2B; CYP2E1

致癌性和肝肾毒性是大黄素等蒽醌类物质“最可怕”的不良反应, 但目前鲜有临床案例报道, 没有明确的定论。2001 年美国“国家毒理学规划”研究报告, 经口连续给药 14 周以上 (大黄素: 小鼠

收稿日期: 2014-11-03

基金项目: 重大新药创制科技重大专项 (2013ZX09302303, 2012ZX09301-003-001-008)

\*通信作者 王全军, 博士, 副研究员, 研究方向为毒理学与药物临床前安全性评价。E-mail: wangquanjunbeijing@163.com

#并列第一作者

网络出版时间: 2015-03-09 15:13 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1409.R.20150309.1513.001.html>

29 mg/kg, 大鼠 22 mg/kg; 蒽醌: 小鼠 250 mg/kg, 大鼠 135 mg/kg), 可致肝脏肥大、肾小管透明小滴生成和肾矿化、膀胱细胞胞浆改变等<sup>[1]</sup>, 此后针对大黄素的毒性毒理研究在不断深入。田由等<sup>[2]</sup>研究发现, 8 g/(kg·d)染毒对小鼠具有肝脏毒性, 主要表现为丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、谷氨酰基转移酶 ( $\gamma$ -GT) 升高, 肝细胞脂肪变性; 肿瘤坏死因子- $\alpha$  参与过量大黄诱导的肝脏损害过程。张陆勇等<sup>[3]</sup>研究发现大黄总蒽醌经口暴露, 对大鼠的潜在靶器官主要包括肾脏 (特别是肾近曲小管) 和肝脏。Yan 等<sup>[4]</sup>利用 DNA 微阵列技术研究发现大黄总蒽醌导致的肾小管上皮细胞损伤与促分裂素原活化蛋白激酶-6 (MAPK-6) 和 CYP1A1 有关。本课题组前期的体内外研究表明肾脏是大黄的主要毒性靶器官, 大黄素可通过线粒体途径诱导 HK-2 细胞凋亡, 还可诱导细胞周期的 S 期阻滞<sup>[5-6]</sup>。然而大黄素的不良反应有待进一步科学客观地评价, 对其具体的毒性作用机制仍有待进一步深入研究阐明。

细胞色素 P450 (CYP450) 是一类参与内源性和外源性化合物代谢的酶, 主要存在于生物体的内质网内, 属于混合功能氧化酶系统中的一种, 由 CYP450 酶系作用的生物转化是生物体代谢的重要环节, 多种内、外源性化学物对 CYP450 有诱导或抑制作用, 导致酶的数量和活性改变, 并引起自身或其他药动学的改变, 使药物活性代谢成分积累导致毒性增强, 或降低其血药浓度和治疗效果。Yan 等<sup>[4]</sup>研究提示大黄素诱导的肾小管上皮细胞损害可能与 CYP1A1 有关; 体外研究表明大黄素能够诱导多种 CYP450 的活性表达, 如 CYP1A1、CYP1B1 等<sup>[7]</sup>。但目前还未见有大黄素体内诱导 CYP450 活性的报道, 其对 CYP450 的诱导作用还有待进一步探讨。本研究拟以 SD 大鼠为实验模型, 大黄素不同剂量处理后, 取肝脏制作微粒体, 分别检测大鼠肝脏微粒体总 CYP450 含量, 红霉素脱甲基酶 (CYP3A) 和氨基比林-N-脱甲基酶活性, CYP1A、CYP2B、CYP2E1 等酶活性, 以观察大黄素对大鼠肝脏微粒体总 CYP450 及其亚型的效应。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物、药物与试剂

SD 大鼠 20 只, 雄性, SPF 级, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物合格证号为 SCXK (京) 2002-0003, 饲养于军事医学科学院国家北京药物安全评价研究中心屏障设施内, 饲养 1

周后使用。实验设施合格证号为 SCXK- (军) 2007-008。本中心是国际实验动物评估和认可管理委员会 (AAALAC) 认可单位, 也完全遵守中华人民共和国的相关实验动物福利的管理规定。动物试验方案将提交本中心的动物福利委员会 (IACUC) 审查。经动物福利委员会批准后方可开始试验。

大黄素购自江苏淮安市久泰生物技术有限公司, 质量分数  $\geq 98\%$ 。试卤灵 (resorufin, 批号 A008272501) 购于 Acros 公司, 7-苯氧基试卤灵 (7-benzyloxyresorufin, 批号 405924/1) 购于 Fluka 公司, 7-苄氧基试卤灵 (7-pentoxoresorufin, 批号 61K4104) 购于 Sigma 公司, 红霉素 (批号 3552B39) 购于 Amresco 公司。其他试剂均为市售分析纯。

### 1.2 实验设计

20 只雄性大鼠随机分成溶剂对照组和大黄素低、中、高剂量诱导处理组, 每组 5 只动物。大黄素蒸馏水混悬后, ig 给予 0、170、500、1 500 mg/kg 大黄素, 连续给药 16 d, 末次给药 24 h 后乙醚麻醉后处死动物, 处死前 12 h 禁食。

### 1.3 肝脏微粒体制备

肝脏微粒体制备采取差速离心法<sup>[8]</sup>。肝脏取出后, 先用预冷的 0.15 mol/L KCl-0.2 mol/L 蔗糖 (pH 7.5) 缓冲液冲洗血污, 滤纸吸干称质量。然后将肝脏剪碎, 缓冲液冲洗数次。按照 1:3 的比例加入 0.15 mol/L KCl-0.2 mol/L 蔗糖缓冲液, 冰浴中匀浆 5 min 左右, 然后 4 °C 10 000  $\times g$  离心 20 min。上清液经 105 000  $\times g$  4 °C 离心 60 min, 弃上清, 沉淀即为微粒体。将微粒体用预冷的 0.05 mol/L Tris-0.25 mol/L 蔗糖 (pH 7.5) 混悬, 冰浴中短暂超声粉碎, 干冰速冻后, -70 °C 低温保存。

### 1.4 微粒体蛋白测定

微粒体蛋白测定采用 Lowry 法<sup>[9]</sup>。取 1 mL 适当稀释后的微粒体悬液, 加入 5 mL Folin 酚试剂甲 (A 液: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20 g/L, NaOH 4.0 g/L, 酒石酸钾 0.5 g/L; B 液: CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 5.0 g/L, A:B=50:1, 临用前配制), 室温下放置 10 min, 然后再加入 0.5 mL 1 N Folin 酚试剂乙, 立即混匀, 30 min 后于 760 nm 测吸光度 (A) 值。以牛血清白蛋白制作标准曲线, 根据标准曲线及稀释倍数计算蛋白浓度。

### 1.5 肝微粒体总 CYP450 测定

肝微粒体总 CYP450 测定采用 CO 还原差示光谱法<sup>[10]</sup>。取 1 mL 适当稀释的微粒体悬液, 依次加入 5 mL 0.15 mol/L KCl-0.2 mol/L 蔗糖溶液, 40  $\mu$ L

10% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, 立即混匀, 倒入两个光径 1 cm 的比色杯中, 向比色杯中轻轻吹 CO 气体 1 min, 450 nm 和 490 nm 波长测定 A 值。

$$CYP450 \text{ (nmol/mg)} = (A_{450} - A_{490}) \times 1000/91 \times C \times r$$

91 为 CYP450 的毫摩尔消光系数, 单位为 cm<sup>2</sup>/mmol; r 为比色杯光径长度, 单位为 cm; C 为稀释后微粒体悬液蛋白质量浓度, 单位为 mg/mL。

### 1.6 CYP3A 和氨基比啉-N-脱甲基酶活性测定

CYP3A 和氨基比啉-N-脱甲基酶活性测定采用分光光度法<sup>[11-12]</sup>。将微粒体稀释至 1 mg/mL, 加入 0.4 mL 缓冲液 (0.05 mol/L Hepes, 0.15 mol/L KCl, 0.01 mol/L MgCl<sub>2</sub>, pH 7.5) 及终浓度为 400 mmol/L 的红霉素 (或氨基比啉), 37 °C 孵育 3 min。再加入终浓度为 1 mmol/L 的还原型辅酶 II (NADPH), 37 °C 孵育 30 min, 加 1.5 mL 12.5% 的三氯乙酸沉降蛋白, 7 000 r/min 离心 10 min。上清移入另一试管并加入 1 mL Nash 试剂 (450 g/L 乙酸铵, 6 mL/L 乙酰丙酮, 10 mL/L 乙酸, pH6.5), 60 °C 反应 10 min, 412 nm 测定 A 值。以甲醛制作标准曲线, 活性以 nmol HCHO / (min·mg prot) 表示。

### 1.7 总 CYP450、CYP2B、CYP1A 和 CYP2E1 活性测定

总 CYP450 和 CYP2B 酶活性测定采用荧光分光光度法<sup>[13-14]</sup>。CYP1A 活性用化学发光法测定, 按 P450-GloTM 试剂盒说明进行操作。CYP2E1 活性用分光光度法测定<sup>[11-12]</sup>。先将微粒体稀释至 300~900 μg 蛋白/mL。取 0.1 mL 微粒体悬液加入 10 μL 1 mmol/L 7-苯氧基试卤灵 (或 7-苯氧基试卤灵) 储存液 (终浓度 5 μmol/L) 和 1.9 mL 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 7.6), 37 °C 孵育 2 min, 室温下测基线。在搅拌状态下加入 10 μL 50 mmol/L NADPH (终浓度 250 μmol/L), 室温下 Ex=535 nm、Em=595 nm 扫描

测定 10 min, 数据计算以每分 1 次, 计算增长斜率, 以试卤灵为标准绘制标准曲线, 活性以 pmol resorufin / (min·mg prot) 表示。

### 1.8 统计方法

利用 SAS 8.2 软件先经方差齐性检验, 若方差齐, 再进行单因素多水平方差分析, 各组间比较采用 Dunett't 检验。

## 2 结果

### 2.1 大黄素对大鼠肝脏脏器系数的影响

从表 1 可以看出, 大黄素能够引起大鼠体质量明显下降, 而并有一定的剂量效应关系, 肝脏脏器系数增加。

### 2.2 大黄素对大鼠肝脏微粒体 CYP450 的影响

由图 1 可以看出, 大黄素 500 mg/kg 能够引起大鼠肝脏微粒体总 CYP450 含量 (对照组为 0.46 ± 0.064 nmol/mg prot, 升高到 0.681 ± 0.107 nmol/mg prot) 和 CYP3A 酶活性 (对照组为 0.066 ± 0.022 nmol HCHO/mg prot, 升高到 0.104 ± 0.007 nmol HCHO/mg prot) 显著升高 (P < 0.05), 氨基比啉-N-脱甲基酶活性没有明显的变化, 此外, 大黄素连续经口给药 16 d, 可诱导 CYP1A、CYP2E1 和 CYP2B 酶活性明显的升高, 在 500 mg/kg 组最为明显 (表 2)。

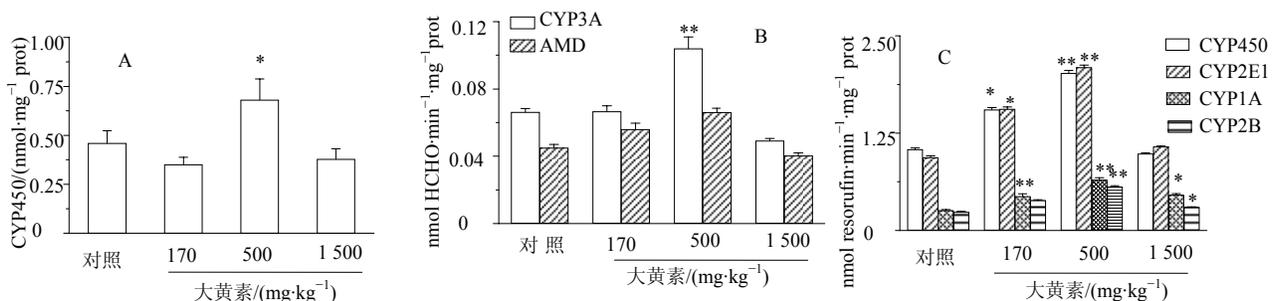
表 1 大黄素对大鼠肝脏脏器系数的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , n=5)

Table 1 Effect of emodin on liver coefficient of SD rats ( $\bar{x} \pm s$ , n=5)

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	体质量/g	肝脏脏器系数
对照	—	267.24±5.97	0.030 8±0.001 3
大黄素	170	254.60±14.44	0.031 8±0.001 0
	500	241.64±22.54	0.034 0±0.002 8
	1 500	242.36±7.15*	0.035 6±0.003 8

与对照组比较: \*P < 0.05

\*P < 0.05 vs control group



与对照组相比: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs control group

图 1 大黄素对总 CYP450 (A), CYP3A 和氨基比啉-N-脱甲基酶 (B) 及 CYP2E1、CYP1A 和 CYP2B (C) 的影响  
Fig. 1 Effects of emodin on total CYP450 (A), CYP3A and aminopyrine N-demethylase (B), CYP2E1, CYP1A, and CYP2B (C)

### 3 讨论

本研究表明大黄素对肝脏多种 CYP450 酶具有诱导作用, 在大鼠重复给药 16 d 试验中发现大黄素引起肝脏脏器系数呈剂量依赖性增高。大黄素可诱导大鼠肝脏微粒体总 CYP450 的含量及 CYP3A、CYP1A、CYP2B 和 CYP2E1 酶活性, 该诱导效应在 500 mg/kg 组最为显著, 但大黄素作用后氨基比啉-N-脱甲基酶未见明显变化。既往研究表明大黄素 100  $\mu\text{mol/L}$  作用 24 h 可诱导 CL5 细胞 (人肺腺癌细胞系) 内 CYP1A1、CYP1B1 mRNA 和蛋白表达升高<sup>[15]</sup>。CYP1A1 参与氧化应激过程中还原型辅酶 II 依赖的电子转移通路, 参与氧化一系列结构无关的化合物, 如类固醇、脂肪酸和外源化合物, 因此被视为致癌物代谢酶<sup>[15]</sup>。Yan 等<sup>[4]</sup>利用 DNA 微阵列技术研究发现大黄总蒽醌经口染毒 13 周, 可致 SD 大鼠肾组织中 CYP1A1 的基因表达上调 3 倍, 据此推测大黄素的肾毒性与其对 CYP1A1 的诱导有关。CYPs 的表达和活性可通过关键转录因子活化产生诱导效应, 其中 CYP3A4、2B6 和 1A1 的诱导可分别通过孕烷受体, 组成性雄烷受体 (CAR), 芳香烃受体 (AhR) 介导实现<sup>[16]</sup>。诱导 CYP2E1 酶活性可通过生物转化将许多底物活性, 进一步诱导氧化应激和肝脏毒性<sup>[16]</sup>。在本研究中 CYP1A、CYP2E1 明显上调可能与大黄素诱导的肾毒性和遗传毒性有关。大黄素对大鼠肝脏中 CYP3A、CYP1A、CYP2B 和 CYP2E1 酶均有诱导作用。

#### 参考文献

- [1] NTP technical report: The toxicology and carcinogenesis studies of emodin in F344/N rats and B6C3F1 mice [J]. *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*, 2001, 493: 1-278.
- [2] 由田. 过量大黄致肝细胞损伤的研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学. 2005.
- [3] 张陆勇, 江振洲, 濮存海, 等. 大黄总蒽醌对 SD 大鼠灌胃给药的长期毒性研究 [J]. *中国生化药物杂志*, 2004, 25(4): 206-209.
- [4] Yan M, Zhang L Y, Sun L X, *et al*. Nephrotoxicity study of total rhubarb anthraquinones on Sprague Dawley rats using DNA microarrays [J]. *J Ethnopharmacolgy*, 2006,

107(2): 308-311.

- [5] 王青秀, 吴纯启, 杨红莲, 等. 大黄素对 HK-2 细胞周期增殖的影响 [J]. *毒理学杂志*, 2007, 21(6): 440-443.
- [6] 王青秀, 吴纯启, 杨红莲, 等. 大黄中游离蒽醌对 HK-2 细胞系的毒性作用研究 [J]. *中国新药杂志* 2007, 16(3): 189-192.
- [7] Wang H W, Chen T L, Yang P C, *et al*. Induction of cytochrome P450 1A1 and 1B1 by emodin in human lung adenocarcinoma cell line CL5 [J]. *Drug metab dispos*, 2001, 29(9): 1229-1235.
- [8] Lubet R A, Mayer R T, Cameron J W, *et al*. Dealkylation of pentoxyresorufin: a rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome(s) P-450 by phenobarbital and other xenobiotics in the rat [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1985, 238(1): 43-48.
- [9] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al*. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, 193(1): 265-275.
- [10] Omura T, Sato R. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. II: Solubilization, purification and properties [J]. *J Biol Chem*, 1964, 239: 2379-2385.
- [11] Hanioka N, Jinno H, Nishimura T, *et al*. Changes in cytochrome P450 enzymes by 1, 1-dichloroethylene in rat liver and kidney [J]. *Arch Toxicol*, 1997, 72(1): 9-16.
- [12] Roe AL, Warren G, Hou G, *et al*. The effect of high dose endotoxin on CYP3A2 expression in the rat [J]. *Pharm Res*, 1998, 15(10): 1603-1608.
- [13] Wardlaw S A, Nikula K J, Kracko D A. *et al*. Effect of cigarette smoke on CYP1A1, 1A2 and CYP2B1/2 of nasal mucosae in F344 rats [J]. *Carcinogenesis*, 1998, 19(4): 655-662.
- [14] Pratibha V N, Sang S P, Paul E T. *et al*. Methoxyresorufin and benzyloxyresorufin: substrates preferentially metabolized by cytochromes P450 1A2 and 2B, respectively, in the rat and mouse [J]. *Biochem Pharmacol*, 1993, 46(5): 933-943.
- [15] Michael D R, Jose A M M, Michael Y, *et al*. Induction and regulation of the carcinogen-metabolizing enzyme CYP1A1 by marijuana smoke and  $\delta^9$ -tetrahydrocannabinol [J]. *Amer J Respir Cell Molec Biol*, 2001, 24(3): 339-344.
- [16] Tompkins L M, Wallace A D. Mechanisms of cytochrome P450 induction [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2007, 21(4): 176-81.