

中草药对细胞色素 P-450 酶调控研究进展

王宇光, 高月*

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要: 对近 5 年国内外关于中草药对细胞色素 P-450 酶调控的文献进行检索、整理分析和归纳总结, 综述了有关中草药及其单体化合物对细胞色素 P-450 酶调控方面的研究进展并评述了对 P-450 酶调控的研究策略。提出加强中草药对 P-450 酶作用的研究有重要意义, 有助于指导中药的安全合理应用和发现新药。

关键词: 中草药; 细胞色素 P-450; 中药复方; 调控

中图分类号: R285 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)05-0477-03

Advances in modulation of cytochrome P-450 by Chinese herbal medicine

WANG Yu-guang, GAO Yue

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Key words: Chinese herbal medicine; cytochrome P-450; compound preparation of Chinese materia medica; modulation

细胞色素 P-450 酶系(cytochrome P-450, CYP), 又称混合功能氧化酶(mixed function oxidase)和单氧酶(monoxygenase), 是由许多同工酶组成的超家族, 主要存在于肝微粒体中, 参与生物体内源性和外源性物质的生物转化。作为人体重要的药物代谢酶, 对药物代谢和药物之间的相互作用有着重要影响。中草药虽然成分复杂, 但药效的物质基础大多数仍然经过 P-450 酶代谢, 或对 P-450 酶产生诱导或抑制, 从而影响其他药物的代谢或产生药物相互作用。从 P-450 酶角度研究中草药有利于从分子水平探讨中草药的作用机制或毒性机制, 并有可能揭示中药之间或中药与西药产生相互作用的关系。本文就近 5 年中草药对细胞色素 P-450 酶调控研究进展作一综述。

1 中草药中各类化合物对细胞色素 P-450 酶调控的研究

1.1 生物碱类: 吴茱萸次碱(rutaecarpine)为芸香科植物吴茱萸中含的生物碱类成分。分别选用不同 CYP 亚型的特异性底物进行酶活性测定。结果显示^[1]吴茱萸次碱可选择性抑制 CYP1A, 而对 CYP2C, CYP2E1 和 CYP3A4 的活性没有影响。为进一步探讨其对 CYP1A 亚家族中何种亚型有抑制作用, 采用了 3-甲基胆蒎处理的小鼠作为模型, 因为 3-甲基胆蒎对 CYP1A1 和 CYP1A2 都有诱导作用, 利于进行酶活性对比, 同时作用 CYP1A2 选择性抑制剂 furafylline 作为对照。结果表明对 CYP1A2 有更强的抑制作用, 酶动力学和 CO 差异光谱显示吴茱萸次碱对 CYP1A2 为非竞争性抑制, 并且抑制作用不是通过破坏 P-450 血红素辅基的完整性和对底物结合位点产生影响。提示吴茱萸次碱可成为研究药物代谢和相互作用时 CYP1A2 强的抑制剂。

紫堇灵、乙酰紫堇灵、原阿片碱系从紫堇中提取的异喹啉生物碱, 都具有次甲二氧基, 可能对肝脏有保护作用。三

者均能显著提高 P-450 含量、氨基比林脱甲基酶活性及苯并吡羟化酶活性, 表明对细胞色素 P-450 酶有诱导作用, 可提高肝脏解毒能力, 可能为抗肝损伤的一个环节。同时三者均能缩短需肝脏 P-450 代谢戊巴比妥引起的睡眠时间, 而 ip 戊巴比妥前 1 h 给予生物碱却能显著延长戊巴比妥睡眠时间, 对不需肝脏代谢的巴比妥钠引起小鼠睡眠时间无延长作用。提示 3 种生物碱对肝细胞色素 P-450 酶呈先抑制后诱导的双重作用^[2]。

1.2 葱醌类: 金丝桃素(hypericin)存在于金丝桃属某些植物中, 具有抑制中枢神经及抗病毒作用。实验中^[3]选用人 CYP 中与药物代谢清除最相关的 5 种酶 CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 和 CYP3A4; 利用杆状病毒科/Sf9 细胞表达系统, 获得从马身体中产生的重组异源表达的以上各种 CYP 并与其相对应的特异性底物混合后加入不同浓度金丝桃素共同孵温; 利用 HPLC-MS 测定底物浓度变化来反映一系列条件下酶的活性, 进而计算半数抑制浓度(IC₅₀)。金丝桃素对 CYP2D6, CYP3A4 和 CYP2C9 的 IC₅₀ 值均低于 10⁻⁶ mol/L, 显示对此 3 种同功酶有较强抑制作用。同时利用 Lineweaver-Burke 图解释了抑制类型, 均为竞争性抑制。提示临床上同时服用被 CYP2D6, CYP3A 和 CYP2C9 代谢的药物时, 可能与金丝桃素产生药物相互作用。

1.3 苯丙素类: 8-甲氧基补骨脂素(8-methoxypsoralen)为豆科植物补骨脂所含的香豆素类化合物, 用于治疗白癜风、牛皮癣。Luke^[4]深入研究了 8-甲氧基补骨脂素对 CYP2B1 的抑制机制。利用苯巴比妥诱导鼠肝药酶后再从中分离纯化出 CYP2B1, 利用高通量 HPLC-荧光法显示其对 CYP2B1 抑制性具有时间依赖性。同时抑制速率常数 K_i 很小, 表明与酶活性位点的特异性结合是造成抑制的主要原因。放射性

* 收稿日期: 2002-08-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070936)

作者简介: 王宇光(1979—), 男, 北京人, 军事医学科学院在读硕士研究生, 专业方向药理学。

Tel: (010) 66931225 E-mail: wyg79@yahoo.com.cn

标记 8-甲氧基补骨脂素并结合 SDS-PAGE 显示其主要与 P-450B1 脂蛋白部分结合。对于研究中药有效成分对 CYPs 抑制机制有很好的启示作用。

水飞蓟素 (silymarin) 是菊科植物水飞蓟中一种木脂素类化合物, 具有很好的保肝作用, 用于肝炎的治疗。水飞蓟素对 CCl₄ 所致脂质过氧化肝损伤模型和不需 P-450 酶代谢的 FeCl₃ 所致的脂质过氧化肝损伤模型都有很好的保护作用。同时实验中看到水飞蓟素能显著提高肝 CYP2E1 活性, 对 CYP2E1 有诱导作用。认为水飞蓟素具有自由基清除的特异性主要是通过激活 CYP2E1, 而 CYP2E1 能显著提高血清谷氨酸丙酮酸转氨酶活性, 加速自由基清除, 从而减少肝损伤, 为水飞蓟素对肝损伤的保护作用提供了可能的机制^[5]。

1.4 萜类: 齐墩果酸 (oleanolic acid) 存在于木犀科齐墩果、女贞等植物中, 有降低转氨酶作用, 用于治疗急性黄疸性肝炎。Western-blot 方法显示齐墩果酸可显著降低 CYP2E1 活性和蛋白表达水平, 对 CYP2E1 呈抑制作用。而 CCl₄ 代谢活化形成 CCl₃ 造成肝损伤的代谢同功酶即为 CYP2E1, 提示齐墩果酸对 CCl₄ 所致肝损伤的保护作用主要是通过抑制 CYP2E1 的表达和活性以阻止 CCl₃ 生成对肝脏的损伤^[6]。从这里可看出齐墩果酸与水飞蓟素对肝损伤保护机制不同。

1.5 黄酮类: 黄芩苷 (baicalin) 为中药黄芩中黄酮类成分。候艳宁等^[7]观察了黄芩苷对小鼠肝细胞 P-450 酶选择性诱导。通过同功酶活性测定和免疫酶联显色方法, 黄芩苷可诱导小鼠肝中 CYP1A1, CYP2B1 和 CYP2C11 3 种同功酶的表达, 对 CYP3A2, CYP2D1 和 CYP2E1 无诱导作用, 表明黄芩苷对细胞色素 P-450 同功酶诱导具有选择性。

葛根素 (puerarin) 为豆科植物葛根中异黄酮类化合物, 为葛根中扩张冠状动脉的有效成分。利用不同 CYP 同功酶的特异性底物作为探针进行不同亚型同功酶的活性测定^[8], 葛根素可选择性诱导 CYP1A1, CYP1A2, CYP2A1, CYP3A1 和 CYP2C11; 而对 CYP2A, CYP2E1 和 CYP2B1 有抑制作用; 同时提高 CYP 含量和 NADPH-(CYP)-C 还原酶活性。以药物代谢最相关的 CYP3A 为研究对象, 葛根素和 CYP3A 预先孵温与葛根素加入后立刻测定比较: 两种情况下 CYP3A 的活性均被抑制, 提示葛根素及其代谢物都能对 CYP3A 产生抑制作用。人肝脏中 CYP 总量的 30% 为 CYP3A, 这种对 CYP3A 调节作用可能产生毒性或临床治疗作用。

1.6 苷类: 栀子苷 (geniposide) 为茜草科植物栀子中环烯醚萜苷成分, 用于治疗肝炎和炎症性疾病。栀子苷能显著降低 CYP450 酶蛋白含量而对 NADPH-(CYP)-C 还原酶和 b₅ 的含量没有影响。同功酶的特异性底物的酶活性测定显示栀子苷可降低 CYP1A1, 混合 CYP 及 CYP3A1/2 的活性, 对 CYP2E1, CYP2B1 活性没有影响。为了进一步确证, 采用单克隆抗体的 western-blot 方法, 电泳后测定同功酶蛋白区带密度的变化, 与对照组比较 CYP1A 和 CYP2E 没有明显变化, 而 CYP3A 的蛋白区带密度明显降低, 从两方面证明栀子

苷可降低 CYP3A 蛋白水平和抑制 CYP3A 酶活性^[9]。

甘草甜素 (glycyrrhizin) 为甘草中三萜皂苷成分。进行探针药物同功酶活性测定时考虑性别因素和剂量因素。结果显示^[10] 甘草甜素对 CYP 各种同功酶都有影响; 对 CYP3A1/2, 1A1, 1A2 有诱导作用; 高剂量对 CYP2C11 有抑制作用并且仅雌性动物组 CYP2C11 受到抑制。这种差异提示性激素的水平可能对 CYP 同功酶质和量进行调控。但总体结果分析雄性动物组 CYP 同功酶对葛根素更为敏感。

2 中草药对细胞色素 P-450 酶调控的研究

对于 P-450 与中草药的研究, 不仅要研究中草药中有效成分(单体)对 P-450 的影响, 而且对于整个中药材本身或其有效部位对 P-450 的影响的研究也是十分必要的。但由于中药成分复杂, 对 P-450 同功酶影响的范围也就更广, 研究难度相对较大。中草药本身对 P-450 酶影响的研究比较符合我国实际, 因为按照中医理论一般都是全草入药, 这样有助于揭示中药配伍禁忌和对肝脏产生药效或毒性的机制。近些年发现的对 P-450 酶有影响的中草药及其所调节主要同功酶亚型见表 1。

表 1 中草药对细胞色素 P-450 酶的调控

Table 1 Modulation of cytochrome P-450 by Chinese herbal medicines

中药或有效部位	CYP 同功酶			文献来源
	CYP1	CYP2	CYP3	
葛根	1A2↑	2B1↓, 2E1↓	3A1↑, 3A↓	8
当归醇沉物	1A1↓	2E1-	3A↑	11
金丝桃提取物	1A-, 1A2↓	2E1↑, 2C9↓ 2C19↓, 2D6↓	3A↑, 3A4↓	3, 12
栀子	1A-	2E1-	3A↓	9
甘草	1A1↑	2B1↑, 2C11↑, 2A1↑	3A1↑, 3A1/2↑	10, 13
人参	1A1↓, 1A2↓, 1B1↓	2E1↓		5, 14
黄芩	1A↑	2B1↓		15
龙胆	1A1↑			

↑ 诱导 ↓ 抑制 - 无影响
↑ induce ↓ inhibition - no effect

从表中可以看出, 中草药调控细胞色素 P-450 酶的能力各异, 同功酶间对中草药敏感性也各异, 说明中草药对 P-450 酶调节的复杂性。金丝桃素是通过对孤核孕激素 X 受体 (PXR) 的激活来抑制 CYP3A 4 mRNA 的表达^[16]。通过酶动力学分析表明人参对 CYP1A1 为竞争性抑制, 而对其他类型的 CYP 抑制为混合型的。

3 中药复方对细胞色素 P-450 酶调控研究

中药复方与 P-450 研究相对滞后, 仅有少量文献报道。杨秋惠等^[17]研究复方丹参对 P-450 影响, 发现其对 CYP2B1, CYP1A2 有诱导作用, 文献报道诱导 CYP2B1 活性增强的物质与肿瘤发生有关, 且 CYP2B1 诱导过程与 CYP1A1 密切相关, CYP1A1 催化外源物致癌有重要作用, 因此复方丹参对 CYP2B1 的诱导有潜在致癌作用。龙胆泻肝汤^[15]可诱导 CYP1A1, 使 CYP1A1 蛋白表达量增加, 但对 CYP2E1 无影响。表明中药复方对 P-450 的调节具有选择

性。日本学者 Keisuke 等^[18]对复方小柴胡汤所诱导的 P-450 基因进行了分离和鉴定。mRNA 差异显示技术显示基因序列与鼠萜酮 16- α 羟化酶 (CYP-P450_{16 α}) 的 cDNA 序列有 99% 相同,提示小柴胡汤作用的分子机制。mRNA 差异显示技术也为其他中草药研究到分子水平提供了技术平台。

4 中药对细胞色素 P-450 酶调控的研究方法

4.1 离体研究——原代肝细胞培养:对 CYP 的诱导和抑制是药物相互作用的主要机制,用离体细胞研究,可以使影响因素(神经、激素等)减少。除临床研究外,原代肝细胞是评价药物对 CYP 调控的最佳实验系统,中草药的研究也不例外。原代肝细胞培养的难点是易失去细胞色素 P-450 酶活性和其他肝特异性功能,因此必须选择良好的培养体系及培养条件。近年来发展起来的三明治培养肝细胞能很好保持肝细胞活性,常用于研究药物代谢。如采用“胶原蛋白凝胶三明治”培养原代大鼠肝细胞能维持 CYP1A1, CYP2E1, CYP3A 活性,与甘草中 18 α -甘草酸成分孵温后能下调 CYP1A1, CYP2E1 和 CYP3A1 的表达^[19]。

4.2 在体研究:在体研究中包括两种研究策略,一种是对中药处理的动物处死后制备肝微粒体,然后测定细胞色素 P-450 酶蛋白含量、酶活性及 mRNA 的表达。另一种是不处死动物或在人体上进行研究,即使用探针药物,根据探针药物的代谢情况来间接判断药物代谢情况。这样能反映在生理或病理状态下药物对 P-450 调控,同时能够获得药物代谢的动力学数据,从而研究药物对 P-450 调控的机制。复方丹参对人体 CYP1A2 调控研究就采用咖啡因(咖啡因 3 甲基由 CYP1A2 催化)作为探针并从尿中检测代谢产物,适于临床研究^[17]。

5 结语

随着中药现代化进程,许多中草药已成为治疗疾病的有效药物,在临床上有广泛应用,由于许多中草药及其有效成分对 P-450 有调节作用,在临床作用时必须考虑到药物的相互作用。研究中草药对细胞色素 P-450 调控不仅对安全合理用药有指导作用,而且有利于与国际医药研究接轨,同时对于新药开发特别是治疗肝病的药物和揭示药物作用机制都有指导意义。

References:

[1] Ueng Y F, Jan W C, Lin L C, *et al.* The alkaloid rutaecarpine is a selective inhibitor of cytochrome P450 1A in mouse and human liver microsomes [J]. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30(3): 349-353.

[2] Wei H L, Liu G T. Protective action of corynoline, acetylcorynoline and protopine against experimental liver injury in mice [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1997, 32(5): 331-336.

[3] Scott R. Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression [J]. *J Pharm Exp Ther*, 2000, 294(1): 88-96.

[4] Luke L, Koenigs, William F. *et al.* Mechanism-based inactivation

tion of cytochrome P4502B1 by 8-methoxypsoralen and several other furanocoumarins [J]. *Biochemistry*, 1998, 37(38): 13184-13193.

[5] Huyn J, Young J, Jong D, *et al.* Protection of rat liver microsomes against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation by red ginseng saponin through cytochrome P450 inhibition [J]. *Planta Med*, 1997, 63: 415-418.

[6] Gwang J. Inhibition of cytochrome P4502E1 expression by oleanolic acid hepatoprotective effects against carbon tetrachloride induced hepatic injury [J]. *Toxicol Lett*, 1999, 105(3): 215-222.

[7] Hou Y N, Zhu X Y, Cheng G F. Effect of baicalin on liver microsomal cytochrome P450 system [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2000, 35(12): 890-892.

[8] Guerra M C, Speroni E, Broccoli M, *et al.* Comparison between Chinese medical herb *Pueraria lobata* crude extract and its main isoflavone puerarin antioxidant properties and effect on rat liver CYP-catalysed drug metabolism [J]. *Life Sci*, 2000, 67(24): 2997-3006.

[9] Kang J J, Wang H W, Liu T Y, *et al.* Modulation of cytochrome P-450 dependent monooxygenases, glutathione and glutathione S-transferase in rat liver by genposide from *Gardenia jasminoides* [J]. *Food Chem Toxicol*, 1997, 35: 957-965.

[10] Wen Y H, Ya W L, Yan N H, *et al.* The induction of liver microsomal cytochrome P450 by *Glycyrrhiza uralensis* and glycyrrhetic acid in mice [J]. *Biomed Environ Sci*, 1999, (12): 10-14.

[11] Wang Z Y, Peng R X, Zhang Z S. Effect of Chinese *Angelica Sinensis* ethanol on CYP isoenzyme [J]. *Mod J Integrated Tradit Chin West Med* (现代中西医结合杂志), 2001, 10(11): 1006-1007.

[12] Bray B J, Perry N B, Menkes D B, *et al.* St. John's Wort extract induced CYP3A4 and CYP2E1 in the Swiss Webster mouse [J]. *Toxicol Sci*, 2002, 66(1): 27-33.

[13] Paolini M, Barillari J, Broccoli M, *et al.* Effect of licorice and glycyrrhizin on rat liver carcinogen metabolizing enzymes [J]. *Cancer Lett*, 1999, 145(1-2): 35-42.

[14] Thomas K, Jie C, Salet A, *et al.* *In vitro* effect of standardized ginseng extracts and individual ginsenosides on the catalytic activity of human CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30(4): 378-384.

[15] Kang J J, Chen Y C, Kuo W C, *et al.* Modulation of microsomal cytochrome P450 by *Radix Scutellariae* and *Gentianae Saabrae Radix* in rat liver [J]. *Am J Chin Med*, 1996, 24(1): 19-29.

[16] Moore L, Goodwin B, Johns S, *et al.* St. John's Wort induced hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97: 7500-7502.

[17] Yang Q H, Meng X Q, Li Y L. Effect on induction of CYP1A2 by compound Danshen [J]. *J Harbin Med Univ* (哈尔滨医科大学学报), 1997, 31(4): 295-296.

[18] Keisuke K, Hajime M, Takato T, *et al.* Long-term administration of "sho-saiko-to" increases cytochrome P-450 level in mouse liver [J]. *Biol Pharm Bull*, 1998, 21(4): 426-428.

[19] Yang J, Peng R X, Yu J P. 18 α -Glycyrrhizic acid down regulated the activities and mRNA expression of cytochrome P450 isoenzymes in rat hepatocyte sandwich cultures [J]. *Chin J Pharm Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2001, 15(2): 155-158.