

# 五味子酚对肝微粒体单加氧酶的诱导作用

刘耕陶 魏怀玲 (中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

**提要** 五味子酚能明显提高大鼠肝微粒体蛋白质和细胞色素 P-450 含量, NADPH-细胞色素 C 还原酶、氨基比林脱甲基酶及苯并芘羟化酶活性, 促进肝细胞滑面内质网增生。此外, 五味子酚能明显降低 CCl<sub>4</sub> 引起的小鼠 SGPT 升高及肝微粒体脂质过氧化。可见, 五味子酚对肝微粒体单加氧酶有诱导作用, 并能减轻 CCl<sub>4</sub> 引起的肝脏损伤。

**关键词** 五味子酚; 肝微粒体单加氧酶; 细胞色素 P-450; 四氯化碳; 脂质过氧化

从北五味子及华中五味子分离出多种木脂素类成分<sup>(1,2)</sup>, 有的对 CCl<sub>4</sub> 肝损伤有保护作用, 能促进肝脏蛋白质及糖原的合成<sup>(3)</sup>, 有的有诱导肝细胞色素 P-450 作用<sup>(4)</sup>。五味子酚 (schisanhenol, 以下简称五酚) 系从红花五味子<sup>(5)</sup> 和翼梗五味子<sup>(6)</sup> 分离出的一种新成分, 亦为木脂素类衍化物, 其结构与去氧五味子素 (deoxy-schizandrin, 五味子甲素) 类似(图 1)

本文报道该化合物诱导大鼠肝微粒体单加氧酶的活性及减轻 CCl<sub>4</sub> 对肝脏的损伤作用。

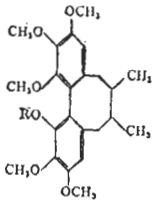


Fig 1. R = H, schisanhenol;  
R = CH<sub>3</sub>, deoxyschizandrin

## 材料与方 法

五酚系本所植化室陈延镛提供, 白色结晶, mp 132-3°C, 不溶于水。临用时配制含 5% 吐温 80 的悬液。NADPH 购自美国 Sigma 公司。

Wistar 大鼠 59 ± (SD) 4 g 和昆明种小鼠 23.7 ± 0.7 g 由中国医学科学院动物中心供应, 均♂。

大鼠禁食一夜后, 从门静脉用冰冷 1.15% KCl-磷酸缓冲液 40 ml 灌洗肝脏, 称肝重, 加 TMS 缓冲液 (Tris 0.05 M, MgCl<sub>2</sub> 3 mM 蔗糖 0.2 M, pH 7.5), 用玻璃匀浆器研磨成 25% 肝匀浆, 9000 × g 离心 20 min, 上清液用 105000 × g 离心 60 min, 所得微粒体层悬于 30% 甘油 TMS 缓冲液, 贮存于 -40°C。

细胞色素 P-450、NADPH-细胞色素 C 还原酶、氨基比林脱甲基酶、苯并芘羟化酶(AHH) 及微粒体蛋白质含量分别按文献<sup>(7-11)</sup>测定。

微粒体脂质过氧化产物丙二酰二醛 (malonic dialdehyde, MDA) 的测定系用硫代巴比妥酸显色法<sup>(12)</sup>。CO 的测定系在温孵中加入适量血红素使其生成羧络血红素, 用分光光度计测定 421 nm 处的吸收峰值<sup>(13)</sup>。

聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 按 Laemmli<sup>(14)</sup>法, 胶浓度为 10%。微粒体蛋白质用量每孔 40 μg。电泳后用日本岛津 SC-910 扫描仪进行直线扫描。

## 结 果

**对大鼠肝微粒体单加氧酶的诱导作用** 将大鼠 14 只分为 2 组, 给药组 6 鼠 ig 五酚 150 mg/kg × 3 d, 对照组 8 鼠 ig 等容量的赋形剂。末次 ig 后 24 h 制备大鼠的肝微粒体, 测定酶活性。结果列于表 1。

大鼠 ig 五酚后肝微粒体细胞色素 P-450, NADPH-细胞色素 C 还原酶、氨基比林脱甲基酶活性及肝脏重量, 肝微粒体蛋白含量均显著增加, 电镜观察的结果发现五酚处理的大鼠肝细胞滑面内质网明显增生(图 2)。以上结果表明五酚对肝微粒体单加氧酶有诱导作用。

给成年♂小鼠 ig 五酚 200 mg/kg, 24 h 后 ip 戊巴比妥钠 50 mg/kg。结果对照组 10 鼠全部入睡, 睡眠 78 ± 22 min, 五酚组 10 鼠中有

Tab 1. Induction of hepatic microsomal monooxygenase by schisanhenol (150 mg/kg/d × 3 d) in rats ( $\bar{x} \pm SD$ )

Assay	Control (8 rats)	Schisanhenol (6 rats)	p value
Liver weight (g%)	4.0 ± 0.1	5.1 ± 0.1	<0.01
Microsomal protein (mg/g liver)	19.5 ± 1.4	22.8 ± 1.9	<0.05
Cytochrome P-450 (nmol/mg protein)	0.72 ± 0.21	1.48 ± 0.29	<0.01
NADPH-cytochrome reductase (nmol/min/mg protein)	64.7 ± 10.6	89.1 ± 12.1	<0.01
Aminopyrine demethylase (nmol HCHO/min/mg protein)	41.8 ± 5.2	65.5 ± 2.7	<0.01
Benz(a)pyrene hydroxylase (nmol/mg protein)	8.5 ± 4.3	15.5 ± 1.9	<0.01

7 鼠未睡, 入睡的 3 鼠只睡眠  $15 \pm 3$  min, 无论入睡鼠数及睡眠时间, 两组之间差异均非常显著. 说明五酚处理的小鼠肝脏代谢戊巴比妥钠的能力明显增强.

### 五酚诱导微粒体细胞色素 P-450 作用性质的鉴定

1. SDS-PAGE 鉴定 将上述实验中对照组大鼠、用五酚处理的及用苯巴比妥 80 mg/kg/d × 3 d 处理的大鼠肝微粒体悬液进行 SDS-PAGE. 从图 3 可见, 用五酚及苯巴比妥诱导的大鼠肝微粒体经 SDS-PAGE 出现一条染色比对照组深而位置相同的蛋白质带(第 4 条). 薄层扫描仪测定该条蛋白质带浓度, 对照组为 23.5%, 五酚组为 28.9%, 苯巴比妥组为

30.7%, 亦表明给药组高于对照组. 文献<sup>(15)</sup>指出, 该条染色加深的蛋白质带为细胞色素 P-450, 与苯巴比妥诱导的类似.

2. 甲吡酮(metyrapone)抑制实验 甲吡酮只抑制细胞色素 P-450, 对细胞色素 P-448 无抑制作用. 因此, 可利用甲吡酮作为鉴别抑制剂鉴定五酚诱导的是 P-450 还是 P-448.

将五酚或苯巴比妥钠诱导的大鼠肝微粒体在体外进行氨基比林脱甲基酶活性测定, 比较加甲吡酮与不加甲吡酮的肝微粒体脱甲基酶活性的差异. 结果见表 2.

与正常大鼠肝微粒体相比较, 用五酚或苯巴比妥诱导的大鼠肝微粒体氨基比林脱甲基酶

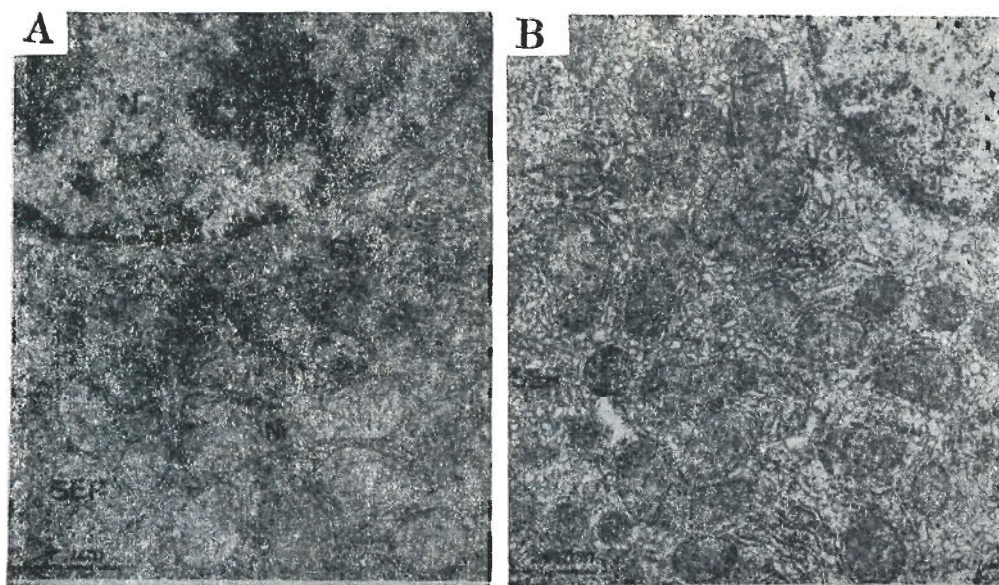


Fig 2. Electron micrograph of liver cells from control (left) and schisanhenol  $3 \times 150$  mg/kg/d treated (right) rats. M = mitochondria; N = nucleus; RER = rough endoplasmic reticulum; SER = smooth endoplasmic, reticulum.

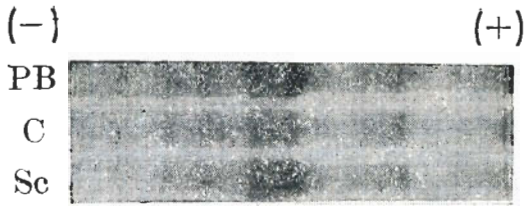


Fig 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of liver microsomes from phenobarbital (PB) control (C), and schisanhenol (Sc).

显著增加, 当加入底物氨基比林之前先加甲吡酮(最终浓度为 1 mM), 氨基比林脱甲基酶活性明显受抑制, 抑制率接近 50%。表明五酚所诱导的细胞色素 P-450 性质与苯巴比妥诱导的属于同一类型。

### 抗 CCl<sub>4</sub> 肝损伤作用

1. 降 SGPT 作用 将成年♂小鼠 18 只均匀分 2 组, 一组 ig 五酚 200 mg/kg, 上下午各一次, 两次相隔 8 h。第 2 次 ig 药后 24 h, ip 0.1% CCl<sub>4</sub> 花生油 10 ml/kg。对照组给予赋形剂。ip CCl<sub>4</sub> 后约 16 h 杀鼠, 测定 SGPT, 五酚组为 1258 ± 331 U% 对照组为 1600 ± 287 U% (P < 0.05)

2. 抑制脂质过氧化实验 用苯巴比妥钠诱导的大鼠肝微粒体蛋白悬液加入 NADPH 及 CCl<sub>4</sub> 0.5 μl, 在 37°C 水浴保温 20 min, 以激发微粒体脂质的过氧化, 测定温孵液中氧化产物 MDA 的生成量。测定结果表明, 于加 CCl<sub>4</sub> 前, 将五酚加入保温介液中(最终浓度为 1 mM), 保温 15 min, MDA 生成量(OD × 100) 对照组为 90 ± 4, 五酚组为 22 ± 2, 抑制率为 76.1%。

Tab 2. Effect of metyrapone 1 mM on aminopyrine demethylase activity (nmol HCHO/min/mg protein) of microsomes from rats treated with schisanhenol (150 mg/kg/d × 3 d). Values are means of duplicate determinations ( $\bar{x} \pm SD$ )

Microsomes	Control	Metyrapone	Inhibition(%)
Control	31.0 ± 0.5	18.5 ± 8.9	40 ± 28
Schisanhenol	38.7 ± 3.5	20.5 ± 4.2	47 ± 4
Phenobarbital	39.9 ± 4.6	21.7 ± 1.7	46 ± 10

可见五酚能抑制 CCl<sub>4</sub> 引起的微粒体脂质过氧化。

3. CCl<sub>4</sub> 转化为 CO 实验 CCl<sub>4</sub> 经肝细胞色素 P-450 代谢后最终有 CO 生成。为了解五酚对此过程有无影响, 又进行了体外温孵实验。将 NADPH 还原的苯巴比妥诱导的大鼠肝微粒体悬液, 加入适量五酚(最终浓度为 1 mM), 37°C 温孵 20 min, 加 CCl<sub>4</sub> 0.5 μl, 血红素 90 μg, 于 1, 3, 5, 7 min, 分别用岛津双光束分光光度计扫描记录从 425-405 nm 吸收峰值的变化。结果表明, 肝微粒体、NADPH、缓冲液与 CCl<sub>4</sub> 一起温孵后 CO 的生成(OD × 100) 对照组为 28.5 ± 4.3, 加五酚 1 mM 组为 17.5 ± 3.5, 抑制率 38.6%。表明五酚对肝微粒体代谢 CCl<sub>4</sub> 有一定抑制性影响。

## 讨 论

我们以往的研究证明, 从五味子提出的甲素、乙素、丙素及醇乙亦有诱导肝细胞色素 P-450 的作用。其诱导性质属于苯巴比妥类型。五酚的化学结构与去氧五味子素不同之处只是其苯环上的一甲氧基为羟基取代, 从本文的结果可看出, 五酚亦是苯巴比妥类型肝细胞色素 P-450 诱导剂。至于诱导肝微粒体细胞色素 P-450 的生物学后果问题, 总的说来是提高机体的解毒功能, 但在另一方面, 又可增加某些化合物如 CCl<sub>4</sub> 及化学致癌物毒性。以 CCl<sub>4</sub> 而言, 其引起肝脏中毒的机理被认为是由于 CCl<sub>4</sub> 经肝细胞色素 P-450 代谢激活后产生自由基 + CCl<sub>3</sub>, 后者引起内质网膜脂质过氧化, 破坏生物膜的结构和功能, 导致肝细胞坏死。本研究的结果表明, 五酚不只是降低 CCl<sub>4</sub> 中毒小鼠的 SGPT, 对 CCl<sub>4</sub> 引起的肝微粒体脂质过氧化, 以及 CCl<sub>4</sub> 代谢转化为 CO 亦有一定抑制作用。五酚的这些作用与五味子的其它成分如乙素等的作用颇相类似。五酚属苯巴比妥类 P-450 诱导剂。而苯巴比妥能增强 CCl<sub>4</sub> 毒性, 五酚则降低 CCl<sub>4</sub> 毒性。两者作用不同原因何在尚难解释。不过我们推测这或许与细胞色素

P-450 形式的多样性有关系。因为哺乳类肝脏存在多种形式的细胞色素 P-450, 其功能亦不尽相同。从大的方面说来, 五酚虽属苯巴比妥类 P-450 诱导剂, 它所诱导的 P-450 形式也许与苯巴比妥所诱导的不完全一样, 这一点只有在提纯 P-450 后才能揭晓。总之, 五味子属果仁中含有许多种能影响肝脏解毒功能的成分, 值得研究。

### 参 考 文 献

- 1 陈延镛、舒增宝、黎莲娘。中国科学 1976; (1): 98
- 2 刘加森、方圣鼎、黄梅芬、高耀良、徐任生。化学学报 1976; 34: 229
- 3 包天桐、徐桂芳、刘耕陶、孙润华、宋振玉。药学报 1979; 14: 1
- 4 刘耕陶、包天桐、魏怀玲、宋振玉。药学报

- 1980; 15: 206
- 5 陈延镛、杨永庆。药学报 1982; 17: 312
- 6 刘加森、黄梅芬、高耀良。化学学报 1980; 36: 193
- 7 Omura T, Sato R. *J Biol Chem* 1964; 239: 2370
- 8 French JS, Coon MJ. *Arch Biochem Biophys* 1979; 195: 565
- 9 Nash T. *Biochem J* 1953; 55: 416
- 10 Nebert DW, Gelboin HV. *J Biol Chem* 1968; 243: 6242
- 11 Lowry OH, Rosesrough NJ, Farr AI, Randall RJ. *ibid* 1951; 193: 265
- 12 Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. In: Flischer S, Parker L, eds. *Methods in enzymology*; vol 52. Biomembranes. Part C. 1st ed. NY: Academic Press, 1978: 302-10
- 13 Liu KT, Lesca P. *Chem Biol Interact* 1982; 41: 39
- 14 Laemmli UK. *Nature* 1970; 227: 680
- 15 Crestel T, Mahu JL, Dansette PM, Leroux JP. *Biochem Pharmacol* 1980; 29: 1127

*Acta Pharmacologica Sinica* 1985 Mar; 6 (1): 41-44

## INDUCTION OF HEPATIC MICROSOMAL MONOOXYGENASES BY SCHISANHENOL IN RATS

LIU Geng-tao, WEI Huai-ling

(*Inst Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050*)

**ABSTRACT** Schisanhenol isolated from the kernels of *Schisandra rubriflora* Rhed et Wils increased the hepatic microsomal P-450, NADPH-cytochrome C reductase, aminopyrine demethylase, benzo (a) pyrene hydroxylase activities and microsomal protein content in rats. Schisanhenol also stimulated proliferation of smooth endoplasmic reticulum of liver cells. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of liver microsomal protein for schisanhenol-treated rats showed that the same major protein staining band intensified as in the case of phenobarbital-induced rats. Metyrapone, a diagnostic inhibitor of cytochrome P-450, markedly inhibited the activity of aminopyrine de-

methylase of microsomes from schisanhenol-treated rats.

Schisanhenol decreased the elevated SGPT levels in CCl<sub>4</sub>-intoxicated mice, and inhibited the CCl<sub>4</sub>-initiated liver microsomal lipid peroxidation and CO formation from CCl<sub>4</sub> *in vitro*. These results indicate that schisanhenol has phenobarbital-like inducing effect on microsomal cytochrome P-450 and protective action against CCl<sub>4</sub> hepatotoxicity in rats.

**KEY WORDS** schisanhenol; microsomal monooxygenases; cytochrome P-450; CCl<sub>4</sub>; lipid peroxidation