

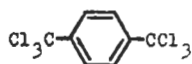
## 六氯对二甲苯对大鼠肝药酶的诱导

戈 苹、全钰珠 (重庆医科大学药理教研室, 重庆 630046)

**提要** 大鼠经 ig HCX 100 或 150 mg/kg, qd × 6 d 后, 戊巴比妥钠催眠时间显著缩短, 肝重增加, 但 SGPT 活性无改变, 其肝匀浆中细胞色素 P-450 和细胞色素 B<sub>5</sub> 含量明显增加, 氨基比林 N-脱甲基酶和戊巴比妥侧链羟化酶活性增强。表明 HCX 有诱导大鼠肝药酶的作用。

**关键词** 六氯对二甲苯; 肝微粒体; 酶诱导; 细胞色素 P-450; 细胞色素 B-5

六氯对二甲苯(hexachloro-p-xylene, HCX)又称血防 846, 是治疗华支睾吸虫病的有效药物之一<sup>(1)</sup>。HCX 的化学结构, 理化特性以及在体内的处置过程和 DDT 相似<sup>(2,3)</sup>。DDT



hexachloro-p-xylene

能显著缩短大鼠环己巴比妥催眠时间, 增强肝微粒体药酶活性<sup>(4)</sup>。HCX 是否与 DDT 一样具有诱导肝药酶的作用, 值得探讨。

### 材料与 方法

大鼠为重庆医科大学动物饲养科繁殖, 均用♂, 179 只, 体重 171 ± SD 16 g。

HCX 西南制药三厂提供。苯巴比妥钠系 BDH 药厂产品, 戊巴比妥钠系 Serva 公司产品。氧化型辅酶 II(含量 > 70%)、葡萄糖-6-磷酸(含量 90%)和还原型辅酶 I 二钠盐(含量 > 70%)均为中国科学院上海生物化学研究所东风试剂厂生产。氨基比林, 比利时进口, 中国医药公司上海化学试剂采购供应站供给, LR。4-氨基安替比林, 上海试剂一厂生产, AR。连二亚硫酸钠, 上海硫酸厂生产, CP。一氧化碳, 自制。HCX 于临用前用玉米油配制成油溶液, 按 10 ml/kg ig。苯巴比妥钠和戊巴比

妥钠于临用前, 用生理盐水配制成溶液, 按 5 ml/kg ip。

**苏醒时脑组织中戊巴比妥浓度的测定** 大鼠禁食 12 h 后, ip 戊巴比妥钠 35 mg/kg, 记录睡眠时间。当翻正反射恢复后, 立即断头, 取出整个脑, 称重后 -12℃ 放置待用。将脑组织用磷酸缓冲液 0.2 mol/L(pH 7.4)在玻璃匀浆管内制备成 20% 匀浆, 参照文献(5)提取并测定脑组织中戊巴比妥浓度。

**肝匀浆中细胞色素 P-450 及细胞色素 B<sub>5</sub> 浓度的测定** 大鼠禁食 12 h 后断头, 取出肝脏, 称重, 立即或在 -30℃ 保存 1-2 d 后参照文献(6)制备成 20% 匀浆, 双层纱布过滤后以 1000 × g 离心 15 min, 然后用含有 KCl 150 mmol/L 和 MgCl<sub>2</sub> 10 mmol/L 的 Tris-HCl 50 mmol/L 缓冲液(pH 7.4)稀释成 2% 的匀浆。

1. 细胞色素 P-450 的测定 2% 肝匀浆参照文献(6)在岛津 uv-300 紫外可见分光光度计上用单波长双光束扫描得还原型细胞色素 P-450-CO 复合物的吸收光谱曲线, 在 450 nm 波长处出现吸收峰。记录 450 nm 与 490 nm 波长处的光密度(OD), 按下式计算细胞色素 P-450 含量。

$$P-450 \text{ nmol/g} = \frac{\Delta OD(450 \text{ nm} - 490 \text{ nm}) \times 1000}{E \times C}$$

式中  $\Delta OD(450 \text{ nm} - 490 \text{ nm})$  代表 450 nm 与 490 nm 波长处的光密度之差, E 是消光系数, 其值为  $104(\text{mmol/L})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。C 代表肝匀浆浓度。

2. 细胞色素 B<sub>5</sub> 的测定 参照文献(7)将 2% 肝匀浆分装至样本比色杯和参照比色杯, 在样本比色杯内加入约 1 mg 还原型辅酶 I 二钠盐, 1 min 后在上述分光光度计上用同样的方法扫描得细胞色素 B<sub>5</sub> 的吸收光谱曲线, 在

425 nm 波长处出现吸收峰, 记录 425 nm 与 450 nm 处的光密度(OD), 按下式计算细胞色素 B<sub>5</sub> 含量。

$$B_5 \text{ nmol/g} = \frac{\Delta OD(425 \text{ nm} - 450 \text{ nm}) \times 1000}{E \times C}$$

式中各符号的意义同上, E 值为  $171(\text{mmol/L})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

**肝匀浆中几种药酶活性的测定** 在冰浴内将肝脏用磷酸缓冲液 0.2 mol/L(pH 7.4) 制备成 20% 的匀浆。

1. 戊巴比妥侧链羟化酶活性的测定 参照文献(8)测定。酶反应在 15 ml 试管中进行。磷酸缓冲反应混合液 0.1 mol/L(pH 7.4) 总容量为 5 ml 内含相当于 0.2 g 肝的肝匀浆、戊巴比妥钠 6  $\mu\text{mol}$ 、葡萄糖-6-磷酸 25  $\mu\text{mol}$ 、烟酰胺 10  $\mu\text{mol}$ 、 $\text{MgCl}_2$  75  $\mu\text{mol}$  和 NADP 5  $\mu\text{mol}$ 。将反应混合液在 37°C 温育 20 min。温育期间, 每隔 5 min 振摇一次, 温育结束后立即将试管移至冰浴中, 用磷酸缓冲液 0.1 mol/L(pH 7.4) 稀释 10 倍, 按前法提取并测定剩余戊巴比妥钠量, 以戊巴比妥钠代谢速率( $\mu\text{mol/h}$ )/g 肝或( $\mu\text{mol/h}$ )/全肝表示肝匀浆戊巴比妥侧链羟化酶活性。

2. 氨基比林 N-脱甲基酶活性的测定 肝匀浆及各种辅助因子用量同上, 氨基比林加入量为 10  $\mu\text{mol}$ , 按上述温育条件温育 20 min 后立即将试管移至冰浴中并迅速将温育物全部移入分液漏斗中, 加氯仿 20 ml, 立即振摇 10 min, 收集氯仿提取液, 离心。取 15 ml 氯仿提取液置于含有 HCl 0.5 mol/L 溶液 6 ml 的分液漏斗中, 振摇 5 min, 静置数 10 min, 待分层后弃去氯仿, 收集 HCl 提取液, 离心。参照文献(9)测定 HCl 提取液中 4-氨基安替比林量。以 4-氨基安替比林生成速率( $\mu\text{mol/h}$ )/g 肝或( $\mu\text{mol/h}$ )/全肝表示肝匀浆中氨基比林 N-脱甲基酶活性。

## 结 果

### HCX 对大鼠戊巴比妥钠催眠时间、肝重

及 SGPT 活性的影响 用药组 ig HCX 每天一次, 连续 6 d, 对照组 ig 相同容量的玉米油, 于末次 ig 后 24 h ip 戊巴比妥钠 35 mg/kg, 按文献(10)测定戊巴比妥钠催眠时间, 然后处死称肝重及测定 SGPT 活性。结果表明, 大鼠 ig HCX 100 或 150 mg/kg, qd  $\times$  6 d 均能显著缩短戊巴比妥钠催眠时间并且明显增加肝脏重量, 但 SGPT 活性无明显变化(表 1)。

Tab 1. Effects of ig hexachloro-p-xylene(HCX) qd  $\times$  6 d on duration of sodium pentobarbital hypnosis, liver weight and SGPT activity in rats. Number of rats in parentheses.  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . \* $p > 0.05$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$

Daily dose of HCX	0	100 mg/kg	150 mg/kg
Duration of hypnosis (min)	121 $\pm$ 47 (8)	54 $\pm$ 24*** (8)	80 $\pm$ 15*** (8)
Liver weight (g/kg)	34 $\pm$ 5 (8)	41 $\pm$ 3*** (8)	45 $\pm$ 5*** (8)
SGPT activity (King's unit)	134 $\pm$ 38 (8)	162 $\pm$ 36* (6)	155 $\pm$ 27* (7)

**HCX 对大鼠苏醒时脑组织中戊巴比妥浓度的影响** 结果见表 2。HCX 组戊巴比妥钠催眠时间较对照组明显缩短, 但苏醒时脑组织中戊巴比妥浓度无明显差别, 且两次实验测得的平均脑组织戊巴比妥浓度很接近。

Tab 2. Effect of HCX (100 mg/kg, qd  $\times$  6 d) on brain pentobarbital concentration in rats during awakening.  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . \* $p > 0.05$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$

	1st expt	2nd expt
Duration of hypnosis (min)		
Control	114 $\pm$ 31(11)	150 $\pm$ 34(8)
Treated	84 $\pm$ 23(9)**	74 $\pm$ 18(9)***
Brain pentobarbital ( $\mu\text{g/g}$ )		
Control	21.7 $\pm$ 7.8(11)	24.8 $\pm$ 4.7(8)
Treated	23.4 $\pm$ 4.3(8)*	23.9 $\pm$ 4.0(9)*

**HCX 对大鼠肝匀浆细胞色素 P-450 和细胞色素 B<sub>5</sub> 含量的影响** 试验组 ig HCX, 有效对照组 ip 苯巴比妥钠, 空白对照组 ig 玉米油

或 ip 生理盐水。于末次给药后 24 h 处死，测定肝匀浆中细胞色素 P-450 和细胞色素 B<sub>5</sub> 浓度。结果(表 3)表明，HCX 与苯巴比妥均能显著增加肝匀浆细胞色素 P-450 和细胞色素 B<sub>5</sub> 浓度。HCX 100 与 150 mg/kg 组细胞色素 P-450 平均浓度分别为玉米油对照组的 1.8 倍和 2.2 倍；细胞色素 B<sub>5</sub> 平均浓度分别为玉米油对照组的 2.0 倍与 2.1 倍。苯巴比妥组细胞色素 P-450 平均浓度为生理盐水对照组的 4.4 倍，细胞色素 B<sub>5</sub> 平均浓度为生理盐水对照组的 2.4 倍，由于 HCX 与苯巴比妥均能明显增加肝重，如果用整个肝来表示细胞色素 P-450 与细胞色素 B<sub>5</sub> 含量，则苯巴比妥和 HCX 增加肝脏细胞色素 P-450 和细胞色素 B<sub>5</sub> 的作用更为明显，苯巴比妥组细胞色素 P-450 平均含量为生理盐水对照组的 6.3 倍，细胞色素 B<sub>5</sub> 为生理盐水对照组的 3.6 倍。HCX 100 与 150 mg/kg 组细胞

色素 P-450 平均含量分别为玉米油对照组的 1.9 倍与 2.6 倍，细胞色素 B<sub>5</sub> 分别为玉米油对照组的 2.3 倍与 2.7 倍。

**HCX 对药物在大鼠肝匀浆内生物转化速率的影响** HCX 与苯巴比妥钠诱导剂量与给药方法同前，末次给药后 24 h 断头处死，测定肝匀浆中戊巴比妥侧链羟化酶和氨基比林 N-脱甲基酶活性。结果表明 HCX 和苯巴比妥钠均能显著增强肝匀浆戊巴比妥侧链羟化酶和氨基比林 N-脱甲基酶活性。如按(μmol/h)/全肝计算，HCX 100 与 150 mg/kg 组戊巴比妥钠生物转化速率分别为玉米油对照组的 3.3 倍与 2.9 倍；氨基比林生物转化速率分别为玉米油对照组的 1.6 倍与 1.3 倍。苯巴比妥钠组戊巴比妥钠生物转化速率为生理盐水对照组的 3.2 倍；氨基比林生物转化速率为生理盐水对照组的 2.5 倍，实验结果见表 4。

Tab 3. Cytochrome P-450 and cytochrome B<sub>5</sub> contents in liver homogenates of rats pretreated with HCX.  $\bar{x} \pm SD$ . \*\*\* $p < 0.01$

Treatment	Dose (mg/kg qd × d)	Cytochrome P-450		Cytochrome B <sub>5</sub>	
		nmol/g of liver	nmol/whole liver	nmol/g of liver	nmol/whole liver
Corn oil		23 ± 9(10)	161 ± 67(10)	9 ± 3(10)	59 ± 23(10)
HCX	100 × 6	41 ± 11(10)***	313 ± 81(10)***	18 ± 3(9)***	135 ± 19(9)***
	150 × 6	50 ± 5(5)***	412 ± 60(5)***	19 ± 7(5)***	158 ± 55(5)***
Saline		24 ± 15(4)	167 ± 103(4)	9 ± 2(4)	59 ± 12(4)
Sodium phenobarbital	75 × 4	105 ± 35(4)***	1045 ± 493(4)***	22 ± 4(4)***	214 ± 70(4)***

Tab 4. Drug metabolizing rates in liver homogenates of rats pretreated with HCX.  $\bar{x} \pm SD$ . \* $p > 0.05$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$

Treatment	Dose (mg/kg qd × d)	Pentobarbital side-chain hydroxylation		Aminopyrine N-demethylation	
		(μmol/h)/g of liver	(μmol/h)/whole liver	(μmol/h)/g of liver	(μmol/h)/whole liver
Corn oil		3.8 ± 1.2(5)	29 ± 10(5)	1.10 ± 0.14(10)	7.1 ± 1.0(10)
HCX	100 × 6	11.1 ± 1.7(5)***	96 ± 25(5)***	1.51 ± 0.28(10)***	11.2 ± 2.4(10)***
	150 × 6	9.6 ± 2.0(5)***	85 ± 24(5)***	1.19 ± 0.28(10)*	9.5 ± 2.7(10)**
Saline		6 ± 4(4)	40 ± 31(4)	0.88 ± 0.15(4)	6.2 ± 1.6(4)
Sodium phenobarbital	75 × 4	13 ± 3(4)**	126 ± 39(4)**	1.59 ± 0.14(4)***	15.3 ± 2.2(4)***

## 讨 论

本文用肝匀浆作为酶源测定了戊巴比妥侧链羟化酶和氨基比林 *N*-脱甲基酶活性。在用肝匀浆作为酶源时存在的主要问题是：肝匀浆中含有大量的蛋白质，能与所加的底物发生非特异性结合；肝匀浆中还存在着能破坏或消耗辅助因子的酶系。本文在测定肝匀浆中药酶活性时，按文献(8)提出的条件和要求，通过过量的底物和辅助因子以克服底物的非特异性结合和辅助因子消耗。

本文发现 HCX 能缩短大鼠戊巴比妥钠催眠时间，提示 HCX 可能有诱导大鼠肝药酶的作用。但在整体实验的条件下，戊巴比妥钠催眠时间除受生物转化速率的影响外，凡具有中枢抑制或中枢兴奋作用的药物均可影响戊巴比妥催眠时间并影响戊巴比妥催眠阈浓度。有中枢抑制作用的药物延长戊巴比妥催眠时间且苏醒时脑组织中戊巴比妥浓度低于对照组。有中枢兴奋作用的药物与此相反。如果药物对戊巴比妥催眠时间的影响仅仅是通过影响肝药酶活性，则苏醒时脑组织中戊巴比妥浓度应无明显改变<sup>(8,10,11)</sup>。HCX 能显著缩短大鼠戊巴比妥钠催眠时间，但对苏醒时脑组织戊巴比妥浓度无明显影响。提示 HCX 在本文给药条件下无明显中枢效应。HCX 缩短戊巴比妥钠催眠时间可能是由于诱导肝药酶加快戊巴比妥从体内的消除所致。

HCX 能增加大鼠肝匀浆细胞色素 P-450 和细胞色素 B<sub>5</sub> 含量，经 HCX 处理的大鼠肝匀浆转化戊巴比妥钠和氨基比林的速率也加快，这些结果均证明 HCX 有诱导大鼠肝药酶的作用。

HCX 能增加肝脏重量并能增加肝匀浆细胞色素 B<sub>5</sub> 含量。细胞色素 B<sub>5</sub> 是肝微粒体膜标记酶之一，它的增加提示肝微粒体可能有增生现象<sup>(12)</sup>。至于肝重增加是否与细胞色素 P-450 和细胞色素 B<sub>5</sub> 增加有关，有待证实。

本文实验结果证实，HCX 与 DDT 相似，

也具有诱导大鼠肝药酶的作用。

## 参 考 文 献

- 1 赵树馨. 华支睾吸虫病. 见: 浙江医科大学, 主编. 传染病学. 北京: 人民卫生出版社, 1980: 304-8
- 2 Wigglesworth VB. The mode of action of DDT. In: Müller P, ed. *DDT: The insecticide dichlorodiphenyltrichloroethane and its significance*; vol 1. 1st ed. Basel: Birkhäuser, 1955; 93-111
- 3 全钰珠. 抗血吸虫病药物的药理: 非锑剂药物. 见: 钱 蕊、刘约翰, 主编. 实用血吸虫病学. 成都: 四川人民卫生出版社, 1982: 138-64
- 4 Hart LG, Fouts JR. Effects of acute and chronic DDT administration on hepatic microsomal drug metabolism in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1963; 114: 388
- 5 Oroszlan SI, Maengwyn-Davies GD. Ultra-violet photometric assay of thiopental and pentobarbital in blood and plasma. *J Am Pharm Assoc* 1960; 49: 507
- 6 Matsubara T, Koike M, Touchi A, Toichino Y, Sugeno K. Quantitative determination of cytochrome P-450 in rat liver homogenate. *Anal Biochem* 1976; 75: 596
- 7 Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I: Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 1964; 239: 2370
- 8 Fouts JR. Liver smooth endoplasmic reticulum "microsomal" drug-metabolizing enzyme system. In: Schwartz A, ed. *Methods in pharmacology*; vol 1. 1st ed. NY: Meredith Corp, 1971: 287-325
- 9 Brodie BB, Axelrod J. The fate of aminopyrine (pyramidon) in man and methods for the estimation of aminopyrine and its metabolites in biological material. *J Pharmacol Exp Ther* 1950; 99: 171
- 10 涂植光、全钰珠. 硝硫氰胺增强戊巴比妥钠的催眠作用. 中国药理学报 1983; 4: 87
- 11 Laroche MJ, Brodie BB. Lack of relationship between inhibition of monoamine oxidase and potentiation of hexobarbital hypnosis. *J Pharmacol Exp Ther* 1960; 130: 134
- 12 Cha YN, Edwards R. Effect of schistosoma mansoni infection on the hepatic drug-metabolizing capacity of mice. *Am J Med Hyg* 1976; 199: 432

## Induction of drug-metabolizing enzymes in rat liver by hexachloro-*p*-xylene

YI Ping, QUAN Yu-Zhu

(Dept Pharmacology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 630046)

**ABSTRACT** Hexachloro-*p*-xylene (HCX), a useful drug for the treatment of clonorchiasis in China, is similar to DDT in chemical structure, physicochemical properties and disposition in the body. Since DDT is a well known hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes inducer, the effects of HCX on the activities of hepatic drug-metabolizing enzymes were investigated.

Hypnotic time induced by sodium pentobarbital was significantly shortened in rats pretreated with ig HCX 100 or 150 mg/kg, qd × 6 d. However, the rat brain pentobarbital concentration during awakening did not change significantly after the pretreatment with HCX. The key component enzyme of the hepatic microsomal drug-metabolizing enzyme system (cytochrome

P-450), the microsomal marker enzyme (cytochrome B<sub>5</sub>) as well as the representative drug-metabolism activities (pentobarbital side chain hydroxylase and aminopyrine N-demethylase) were increased in the rat liver homogenates. Since the liver weight of the rats treated with HCX was increased while the SGPT level still maintained in a normal range, the increase of liver weight may be the result of increases in the enzymes and the smooth endoplasmic reticulum.

The above results suggest strongly that HCX is an inducer of drug-metabolizing enzymes in rat liver.

**KEY WORDS** hexachloro-*p*-xylene, liver microsomes, enzyme induction, cytochrome P-450, cytochrome B-5