

cortex during hypoxia and recovery and leukotriene synthesis in brain tissue, in the rat. *Prostaglandins* 1988; 35 : 15

15 Docherty JC, Wilson TW. Indomethacin increases the formation of lipoxygenase products in calcium ionophore stimulated human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 148 : 534

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 May; 11 (3) : 264-268

蕊木宁对小鼠肝微粒体混合功能氧化酶的诱导作用

黄婉芸¹, 刘耕陶² (中国医学科学院药物研究所药理二室, 北京 100050, 中国)

Induction by kopsinine of hepatic mixed-function oxidase in mice

HUANG Wan-Yun¹, LIU Geng-Tao²
(Department of Pharmacology, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

ABSTRACT Kopsinine is an indole alkaloid. Oral administration of kopsinine 200 mg/kg once daily for 3 d significantly increased liver microsomal protein, cytochrome P-450, cytochrome b₅, NADPH-cytochrome C reductase, aminopyrine demethylase and benzo(a)pyrene hydroxylase activities in mice. kopsinine only induced cytochrome P-450 in rough endoplasmic reticulum of liver. SDS-polyamine gel electrophoresis analysis showed that the protein bands of microsomes from kopsinine treated mice were similar to that induced by phenobarbital in mice. Metyrapone, a specific inhibitor of cytochrome P-450, partially antagonized aminopyrine demethylase activity of microsomes from mice treated with kopsinine. The results suggest that kopsinine yields a pentobarbital-like induction on liver mixed function oxidase in mice. In addition, kopsinine was found to shorten the barbital-induced sleeping time in mice.

KEY WORDS kopsinine; microsomes; mixed function oxidases

提要 蕊木宁能拮抗 CCl₄ 等毒物引起的小鼠肝损伤⁽¹⁾。本文报道蕊木宁 200 mg/kg, qd × 3, ig, 能显著增加小鼠肝微粒体蛋白质含量、细胞色素

P-450、NADPH-细胞色素 C 还原酶、细胞色素 b₅、氨基比林脱甲基酶及苯并芘羟化酶活性。蕊木宁主要提高肝细胞粗面内质网细胞色素 P-450 含量。可见, 蕊木宁对小鼠肝微粒体混合功能氧化酶有诱导作用。

关键词 蕊木宁; 微粒体; 混合功能氧化酶类

前文报告蕊木宁(kopsinine)对 CCl₄ 引起的小鼠肝损伤及肝微粒体脂质过氧化有抑制作用, 细胞色素 P-450 特异性抑制剂甲吡酮(metyrapone)可部分地拮抗 CCl₄ 的脂质过氧化作用^(1,2), 提示肝微粒体细胞色素 P-450 与蕊木宁的抗肝损伤作用有一定关系。鉴于具有抗肝损伤的联苯双酯和五味子素均有诱导肝微粒体细胞色素 P-450 的作用^(3,4), 因此, 本文研究了蕊木宁对小鼠肝混合功能氧化酶的影响。

MATERIALS AND METHODS

昆明种小鼠, 100 只, ♂, 体重 20.2 ± SD 1.8 g。还原型辅酶 II (nicotinamide adenine nucleotide phosphate, NADPH) 细胞色素 C、葡萄糖-6-磷酸均购自 Sigma 公司。

小鼠肝微粒体的制备 小鼠禁食一夜, 次日断头处死, 取出肝脏, 制备肝微粒体⁽⁵⁾, -30℃ 保存。

肝细胞滑面和粗面内质网的分离 小鼠禁食, 次日处死, 将各组中每 3 只小鼠的肝脏合并, 称重, 制成肝匀浆, 分离滑面和粗面内质

Received 1989 Mar 3 Accepted 1990 Jan 13

¹ Now in Department of Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 630046, China

² To whom reprint requests should be addressed.

Tab 1. Induction by kopsinine (200 mg / (kg · d) × 3, po) of liver mixed-function oxidase in mice. $\bar{x} \pm SD$. * $P > 0.05$, *** $P < 0.01$.

Parameter	Control n=6	Kopsinine n=6	Pentobarbital n=4
Liver weight (g / 100 g body wt)	3.8 ± 0.3	4.7 ± 0.3***	5.7 ± 0.4***
Microsomal protein (mg / g liver)	12.1 ± 1.2	14.3 ± 1.3***	15.9 ± 1.1***
Cytochrome P-450 (nmol / mg protein)	0.95 ± 0.25	1.56 ± 0.23***	2.38 ± 0.17***
Cytochrome b ₅ (nmol / mg protein)	0.46 ± 0.1	0.67 ± 0.09***	0.77 ± 0.03***
NADPH-Cytochrome C reductase (nmol / mg protein / min)	71.7 ± 11.6	93.9 ± 11.8***	85.3 ± 2.98***
Aminopyrine demethylase (nmol / mg protein / min)	10.8 ± 1.4	16.3 ± 1.07***	19.4 ± 0.91***
Benzo(a)pyrene hydroxylase	12.4 ± 4.15	20.1 ± 2.7***	29.3 ± 1.69***

网(SER, RER)⁽⁶⁾。另用电镜鉴定分离的两部分内质网的形态。

酶活性测定 微粒体细胞色素 P-450 和细胞色素 b₅⁽⁷⁾、细胞色素 C 还原酶⁽⁸⁾、氨基比林脱甲基酶⁽⁹⁾、苯并芘羟化酶⁽¹⁰⁾、葡萄糖-6-磷酸酶⁽¹¹⁾、微粒体蛋白⁽¹²⁾及 RNA 含量⁽¹³⁾均分别按文献方法测定。

RESULTS

对肝微粒体混合功能氧化酶的诱导作用

将 16 只小鼠分为 3 组, 6 只 ig 蕊木宁 200 mg / kg, qd × 3, 6 只给予同容量蒸馏水, 4 只 ip 苯巴比妥 100 mg / kg, qd × 3。末次给药 24 h 后, 断头处死小鼠, 制备肝微粒体, 测定其中有关酶活性, 结果见 Tab 1。

蕊木宁组肝重量、微粒体蛋白含量、细胞色素 P-450、NADPH-细胞色素 C 还原酶、细胞色素 b₅、氨基比林脱甲基酶及苯并芘羟化酶活性均显著增加, 其作用与苯巴比妥组相似。电镜观察肝细胞滑面内质网增生, 生化 and 形态结果支持蕊木宁对小鼠肝微粒体混合功能氧化酶有诱导作用。

对小鼠戊巴比妥钠睡眠时间的双相影响 每组小鼠 10 只。给药组分别 ig 蕊木宁 200 mg / kg, qd × 3 或 200 mg / kg × 1。对照组给予相同容量蒸馏水, 蕊木宁 3 次组于给药 24 h 后, 1 次组于给药 1 h 后, 均 ip 戊巴比妥

钠 50 mg / kg, 以翻正反射消失和恢复的间隔为睡眠时间。

Tab 2. Effect of kopsinine (200 mg / kg, po) on barbiturate induced sleeping time in mice. n=10 $\bar{x} \pm SD$. *** $P < 0.01$.

Barbiturate (mg / kg, ip)	Time after kopsinine	Group	Sleeping time (min)
Pentobarbital (50)	24 h	control	106 ± 56
		kopsinine	26 ± 6***
	1 h	control	79 ± 21
		kopsinine	197 ± 45***
Barbital(250)	1 h	control	225 ± 26
		kopsinine	117 ± 75***

结果如 Tab 2 所示, 蕊木宁 200 mg / kg × 1 组戊巴比妥钠睡眠时间明显延长。连续给蕊木宁 3 次组戊巴比妥钠睡眠时间则显著缩短, 10 只小鼠中有 4 只未入睡, 表明蕊木宁对小鼠肝混合功能氧化酶活性的影响呈双相性, 即先抑制后诱导。

另用小鼠两组, 每组各 10 只。一组 ig 蕊木宁 200 mg / kg × 1, 另一组相同容量蒸馏水做对照, 1h 后, 两组小鼠均 ip 巴比妥钠 250 mg / kg, 记录小鼠睡眠时间。结果如 Tab 2 所示。蕊木宁组小鼠巴比妥钠引起的睡眠时间明显短于对照组。重复 3 次实验的结果一致。

对 SER 和 RER 细胞色素 P-450 及葡萄糖 6-磷酸酶和 RNA 的影响 将 24 只小鼠均分为两组。一组 ig 蕊木宁 200 mg / kg · qd

Tab 3. Effect of kopsinine on cytochrome P-450, glucose-6-phosphatase and RNA in smooth- and rough-endoplasmic reticulum (SER, RER) in mice. $n=12$. $\bar{x} \pm SD$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$.

Parameter	Kopsinine (mg/kg, qd × 3)	SER	RER
Cytochrome P-450 (nmol/mg protein)	0	0.62 ± 0.20	0.96 ± 0.15
	200	0.91 ± 0.21**	1.02 ± 0.07*
Glucose-6-phosphatase (OD/50 μg protein)	0	0.24 ± 0.07	0.10 ± 0.05
	200	0.23 ± 0.06*	0.11 ± 0.03*
RNA (OD/mg protein)	0	0.29 ± 0.06	0.08 ± 0.02
	200	0.29 ± 0.04*	0.06 ± 0.03*

Note: OD means optical density.

× 3, 一组给蒸馏水作对照。末次给药后小鼠禁食一夜, 次日断头, 取出肝脏, 制成匀浆, 各组中每 3 只小鼠的肝匀浆合并(因 1 只小鼠的肝脏不够), 分离 SER 和 RER。细胞色素 P-450、葡萄糖-6-磷酸酶及 RNA 含量测定的结果见 Tab 3。从 SER 和 RER 的电镜照片可看出, RER 囊泡表面附有许多核糖体颗粒。SER 囊泡表面基本上无颗粒附着(Fig 1)。表明用生化方法分离得到的两种内质网纯度可靠。

从 Tab 3 可看出, 蕊木宁组 RER 细胞色素 P-450 含量明显增加, SER 中细胞色素 P-450 含量无明显变化。蕊木宁对 SER 和 RER 中葡萄糖-6-磷酸酶和 RNA 含量亦无影响。

蕊木宁诱导的小鼠肝微粒体 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及甲吡酮抑制实验 按文献方法⁽¹⁴⁾制备凝胶板, 胶浓度为 10%, 分别取对照组、蕊木宁组及苯巴比妥钠处理组小鼠肝微粒体蛋白悬液(取自本研究实验 1 的肝微粒体) 20 μl 点样 (40 μg 蛋白), 于 30-40 MA, 100-170 V 条件下电泳。泳毕, 用 Coomassie 兰染色。结果发现, 与对照组小鼠比较, 苯巴比妥及蕊木宁诱导小鼠肝微粒体蛋白电泳图谱显示第三条蛋白质带染色加深(Fig 2)。

甲吡酮抑制实验中分别取出上述电泳实验所用肝微粒体蛋白悬液, 蕊木宁组和苯巴比妥组微粒体蛋白样品各取 50 μg, 每管加 2 mg

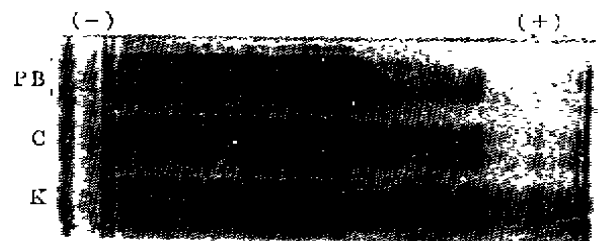


Fig 2. SDS-polyarylamide gel electrophoresis of microsomal protein of livers from mice treated with phenobarbital (PB), control (C) and kopsinine (K), respectively.

NADPH, 甲吡酮(溶于甲醇) 3 mmol/L, 25%甘油-TMS 缓冲液 0.75 ml, 对照管则不加 NADPH 和甲吡酮, 而加相同容量缓冲液和甲醇, 其余操作步骤皆同。于 37 °C 温孵 5 min 后, 各管中加氨基比林 0.1 ml (2.4 mg), 37 °C 水浴继续温孵 20 min 后, 测定氨基比林脱甲基酶活性。

结果表明, 甲吡酮可部分拮抗蕊木宁和苯巴比妥诱导的小鼠肝微粒体脱甲基酶活性, 抑制率蕊木宁组为 18%, 苯巴比妥组为 17%, 两组受抑制的百分率非常接近。看来, 蕊木宁诱导的肝微粒体细胞色素 P-450 与苯巴比妥相似。

DISCUSSION

肝脏混合功能氧化酶在机体解毒过程中起

关键作用。该酶的活性可被一些化合物所诱导或抑制。本研究结果表明, 蕊木宁多次给药能提高小鼠肝微粒体细胞色素 P-450 含量, 促进肝细胞滑面内质网增生, 缩短戊巴比妥钠对小鼠的睡眠时间, 这三方面的实验结果一致支持蕊木宁有诱导肝微粒体混合功能氧化酶的作用。

微粒体是滑面和粗面两种内质网囊泡碎片的总称, 其所含细胞色素 P-450 为总含量。微粒体经梯度离心可分为滑面和粗面内质网两部分, 细胞色素 P-450 分布于两种内质网内。研究表明, 蕊木宁选择性地提高肝细胞粗面内质网细胞色素 P-450 含量, 而不影响滑面内质网细胞色素 P-450 含量。反映蕊木宁诱导的肝细胞色素 P-450 的作用部位是粗面内质网。葡萄糖-6-磷酸酶为内质网的标志酶, 参与糖代谢。蕊木宁并不影响该酶的活性, 表明蕊木宁只诱导内质网中与解毒有关的细胞色素 P-450 活性, 而不影响其它酶的功能。

细胞色素 P-450 诱导剂依其作用性质的不同可分为苯巴比妥、3-甲基胆蒎及 α -碳蒎烯醇酮(PCN)三大类型。甲吡酮为苯巴比妥诱导的细胞色素 P-450 的选择性抑制剂。以肝微粒体蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱所显示的蛋白质带加深和甲吡酮抑制脱甲基酶活性的结果来分析, 蕊木宁可能属于苯巴比妥类型细胞色素 P-450 诱导剂。但是, 蕊木宁对肝脏的作用与苯巴比妥不尽相同, 二者虽均能够诱导肝微粒体细胞色素 P-450, 但蕊木宁可明显降低 CCl_4 的肝脏毒性, 苯巴比妥则否。究竟诱导肝微粒体细胞色素 P-450 与抗肝损伤之间有何内在联系, 有待研究解决。

此外, 本研究还发现, 蕊木宁提前 1 h 给药能缩短巴比妥钠对小鼠的睡眠时间。已知巴比妥钠在体内并不经过肝脏代谢, 由此推测, 蕊木宁对巴比妥钠的催醒作用不是通过对肝脏的影响而起效用, 可能系作用于小鼠大脑的某种生化机理。

REFERENCES

- 1 Huang WY, Liu GT. Protective action of kopsinine against experimental liver injuries in mice. *Acta Pharmacol Sin* 1989; 10: 65
- 2 Huang WY, Liu GT. Mechanism of the protective action of kopsinine against liver injury. *Ibid* 1989; 10: 461
- 3 Liu GT, Bao TT, Wei HL, Song ZY. Induction of hepatocyte microsomal cytochrome P-450 by schizandrin B in mice. *Acta Pharm Sin* 1980; 15: 206
- 4 Liu KT, Cresteil T, Columelli S, Lesca P. Pharmacological properties of dibenzo[a,c]cyclooctene derivatives isolated from *Fructus Schizandrae chinensis* II. Induction of phenobarbital-like hepatic monooxygenases. *Chem Biol Interact* 1982; 39: 315
- 5 Lesca P, Lecoigne P, Paoletti C, Mansuy D. Induction des monooxygenase hepatiques par l'ellipticine chez le rat: Formation de cytochrome P-448, activite hydroxylate. *C R Acad Sci. Ser D* 1976; 282: 1457
- 6 Alvares AP, Parli CJ, Mannering GJ. Induction of drug metabolism. VI. Effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene administration on N-demethylating enzymes systems of rough and smooth hepatic microsomes. *Biochem Pharmacol* 1973; 22: 1037
- 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 French JS, Coon MJ. Properties of NADPH-cytochrome P-450 reductase purified from rabbit liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1979; 195: 565
- 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 Nebert DW, Gelboin HV. Substrate-inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture. I. Assay and properties of induced enzyme. *J Biol Chem* 1968; 243: 6242
- 11 Klaassen CD, Plaa GL. Comparison of the biochemical alternations elicited in livers from rats treated with carbon tetrachloride, chloroform, 1,1,2-trichloroethane and 1,1,1-trichloroethane. *Biochem Pharmacol* 1969; 18: 2019
- 12 Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis Farr A,

Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265

13 Schneider WC. Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. In: Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods of enzymology*; vol 3.

1957: 680-684

14 Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 1970; 227: 680

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 May; 11 (3): 268-271

棉酚衍生物和类似物的抗生育作用¹

王文华²、于宗瀚³、蔡 鸣、徐小梅⁴、吴国沛

(南京药物研究所, 南京 210009; ³中国科学院上海生理研究所, 上海 200031, 中国)

Antifertility actions of gossypol derivatives and analogues¹

WANG Wen-Hua², Yu Zong-Han³, CAI Ming, XU Xiao-Mei⁴, WU Guo-Pei (*Nanjing Institute of Materia Medica, Nanjing 210009; ³Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*)

ABSTRACT This paper report the results of 32 gossypol derivatives and analogues. Among 12 compounds screened by oral administration to ♂ rats, only dipotassium gossypolate (NC030) exhibited an antifertility activity similar to gossypol. Among 24 compounds screened by injecting into pouches of cauda epididymides of rats, 10 exhibited spermicidal activities.

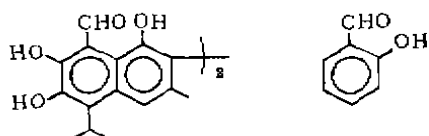
KEY WORDS gossypol; epididymis; antispermato-genic agents

摘要 本文报告了 32 个棉酚衍生物和类似物的抗生育作用研究结果。在 12 个经 ♂ 大鼠口服筛选的化合物中, 仅棉酚二钾(NC030)有同棉酚相类似的抗生育

活性。在 24 个经注射到大鼠附睾尾囊的化合物中, 10 个有杀精子活性。

关键词 棉酚; 附睾; 抗精子发生剂

棉酚(gossypol)为我国首创的男性避孕药。70 年代初期, 我国进行了棉酚分子结构改造⁽¹⁻⁴⁾。证明棉酚分子中的醛基和酚羟基是保持其口服抗生精活性所必须的基团⁽²⁾。因此, 我们从保留棉酚活性基团, 简化棉酚分子骨架入手, 合成了苯、萘、联苯、联萘、酚醛类和有关化合物, 以及一些棉酚衍生物, 其中 12 个进行了 ♂ 大鼠口服筛选⁽⁵⁾。棉酚和有关化合物以外途径给药的研究也有报道⁽⁶⁻⁸⁾, 本文采用大鼠附睾尾囊注射法⁽⁹⁾又筛选了 24 个化合物。



Gossypol

Salicylaldehyde

MATERIALS

32 种棉酚衍生物、酚醛类和有关化合物均由南京药物研究所药物合成室提供, 全部化合物均经元素分析和熔点测定, 新化合物还经 IR 和¹HNMR 测定确证结构, 供实验用。

Received 1988 Nov 4 Accepted 1989 Dec 22

¹ Part of this paper was reported on the Symposium in Fertility Regulation in Male (1984, Nanjing) and on the International Symposium on Recent Advances in Fertility Regulation (1986, Hangzhou), China.

² Now in *Nanjing Contemporary Polytechnic Institute, Nanjing 210016, China*

⁴ *The Hospital of Jiangsu Province Government Office, Nanjing 210024, China*