

DISCUSSION

前文已述及心肌细胞感染病毒后能记录到明显电生理参数异常及心律改变<sup>(7)</sup>，与临床上急性病毒性心肌炎患者中出现的心律失常相似。本实验用地塞米松后能改善 CB<sub>2</sub>V 感染培养心肌细胞的心律失常及电生理参数异常，此与激素有稳定细胞膜完整性，使细胞膜流动性和通透性维持正常有关，所用 Dex 剂量是在前文<sup>(4)</sup>用不同剂量 Dex 实验下所取得的最佳浓度-效应而定。我们在实验中发现所用 Dex 剂量 > 125 μg / (4 × 10<sup>6</sup> 细胞 · 5 ml)，尤其是 400 μg / (4 × 10<sup>6</sup> 细胞 · 5 ml) 时，在光镜下对感染 48-72 h 的心肌细胞仍有相似保护作用，但心肌细胞浆内出现空泡，在地塞米松对照组中也有同样毒性反应。小于此剂量，则对感染早期的心肌细胞保护作用较差，用此剂量在实验中未见到对正常心肌细胞电活动有所影响。

目前临床上对病毒性心肌炎尚缺乏特效治疗方法<sup>(8)</sup>，按本文及前文<sup>(4)</sup>结果，地塞米松的早期较大剂量应用可望减少心肌组织坏死和致命性心律失常发生，结合一般支持疗法，可能有挽救生命的意义。

REFERENCES

- 1 Sainani GS, Krompotic E, Slodki SJ. Adult heart disease due to the Coxsackie virus B infection. *Medicine* 1968; 47 : 133
- 2 Mason JM, Billingham ME, Ricci DR. Treatment of acute inflammatory myocarditis assisted by endomyocardial biopsy. *Am J Cardiol* 1980; 45 : 1037
- 3 Tomioka N, Kishimoto C, Matsumori A, Kawai C. Effects of prednisolone on acute viral myocarditis in mice. *J Am Cell Cardiol* 1986; 7 : 868.
- 4 Yang YZ, Guo Q, Jin PY, et al. Effects of dexamethasone on Coxsackie B-2 virus-infected rat beating heart cells in culture. *Acta Pharmacol Sin* 1989; 10 : 346.
- 5 Yang YZ, Dyke JW. Coxsackie B-2 virus infection in rat beating heart cell culture. *J Virol Methods* 1985; 12 : 217
- 6 Yang YZ, Guo Q, Jin PY, et al. Ultrastructural alterations of the myocardial cells in rat beating heart cell culture infected with coxsackie B-2 virus. *Natl Med J China* 1985; 65 : 524
- 7 Kopecky SL, Gersh BJ. Dilated cardiomyopathy and myocarditis: Natural history, etiology, clinical manifestations and management. *Curr Probl Cardiol* 1987; 12 : 575
- 8 Yuan WL, Chen HZ, Yang YZ, et al. Effects of coxsackie B-2 infections on electrophysiological properties of rat beating heart cells in culture. *Acta Physiol Sin* 1989; 41 : 327

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 Jul; 11 (3) : 331-335

五味子乙素和五味子酚对药物代谢 II 相酶及雌二醇代谢的影响

卢 华、刘耕陶<sup>1</sup> (中国医学科学院药物研究所, 北京 100050, 中国)

**Effects of schizandrin B and schisanhenol on drug metabolizing-phase II enzymes and estradiol metabolism**

LU Hua, LIU Geng-Tao<sup>1</sup> (Department of Pharmacology, Institute of Materia Medica, Chinese

Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

**ABSTRACT** Intragastric gavage of schizandrin B (Sin B) and schisanhenol (Sal) 200 mg/kg once daily for 3 d significantly increased liver glutathione-S-transferase (GSH-S-T) and microsomal cytochrome P-450 in mice and rats. Sin B and Sal antagonized the increase of uterus weight induced by sc estradiol in

Received 1989 Mar 2 Accepted 1990 Apr 23

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed.

ovariectomized, and decreased serum estradiol level in mice. RIA and HPLC showed an enhancement in [<sup>3</sup>H] estradiol metabolism by liver microsomes from Sin B- and Sal-treated mice. The results indicated that both Sin B and Sal have inductive actions on drug metabolizing-phase I and phase II enzymes in mice and rats.

**KEY WORDS** schizandrin B; schisanhenol; glutathione transferases; cytochrome P-450; estradiol

**摘要** 五味子乙素(乙素)和五味子酚(五酚)200 mg/kg, qd × 3 d, ig 在诱导小鼠和大鼠肝微粒体细胞色素 P-450 增加的同时, 亦引起肝谷胱甘肽-S-转移酶(GSH-S-T)明显增加, 乙素和五酚能拮抗雌二醇促去势小鼠子宫重量增加的作用, 降低小鼠血清雌二醇的浓度. 放射免疫和高效液相法证实乙素和五酚能促进小鼠肝微粒体代谢[<sup>3</sup>H]雌二醇的速率.

**关键词** 五味子乙素; 五味子酚; 谷胱甘肽转移酶类; 细胞色素 P-450; 雌二醇

外源性物质如药物及内源性物质如性激素, 大多数在体内先经肝脏药物代谢 I 相酶细胞色素 P-450(cytochrome P-450)氧化、还原及水解后, 生成低毒或无毒性代谢产物, 然后再经药物代谢 II 相酶如尿苷葡萄糖醛酸基转移酶(UDP-glucuronosyltransferase, UDPG-T)和谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase, GSH-S-T)的催化, 分别与葡萄糖醛酸和谷胱甘肽相结合, 形成水溶性复合物, 随尿或胆汁排出体外, 这是机体重要的解毒过程. 我们以往发现五味子乙素(乙素, schizandrin B)和五味子酚(五酚, schisanhenol)能诱导动物肝脏细胞色素 P-450<sup>(1,2)</sup>. 本文报道乙素和五酚对肝脏 UDPG-T 和 GSH-S-T 以及对肝灭活雌激素的影响.

**MATERIALS AND METHODS**

昆明种小鼠, ♀♂兼用, 体重 20.2 ± SD 1.8 g. Wistar 大鼠, ♂, 体重 63 ± 8.5 g. 均由中国医学科学院动物中心供应. 乙素, 五酚均由本所植化室提供, 体内实验时药物用少量

吐温-80 配成混悬液, UDP-葡萄糖醛酸(UDPG), 谷胱甘肽(GSH)购自 Sigma 公司. 雌二醇(法国 Ucla 公司). [<sup>3</sup>H]雌二醇(Amersham).

**肝细胞微粒体蛋白和胞浆液的制备** 小鼠和大鼠于处死前禁食一夜, 取出肝脏, 用超离心法<sup>(3)</sup>制备肝微粒体和胞浆液, 测定微粒体和胞浆液蛋白质<sup>(4)</sup>含量. 及微粒体细胞色素 P-450<sup>(5)</sup>含量.

**UDPG-T 及 GSH-S-T 活性的测定**

0.5 ml Tris-HCl 缓冲液(1 mol/L, pH 7.4)含对硝基酚(4-NP 0.5 mmol/L). 肝微粒体蛋白 0.3 mg 及 0.5% Triton X-100 20 μl. 37℃ 温孵 2 min 加 3 mmol/L UDPGA 起动反应, 37℃ 继续温育 10 min, 用 5% 三氯醋酸终止反应. 离心, 取上清液, 加 NaOH(2 mol/L)0.25 ml, 混匀. 于 405 nm 处测定 A<sup>(16)</sup>. 以每分钟每 mg 蛋白消耗的 nmolc 4-NP 表示 UDPG-T.

胞浆液中 GSH-S-T 活性的测定<sup>(7)</sup>, 步骤如下: 磷酸缓冲液 1 ml(0.1 mol/L, pH 8.5)含肝胞浆液蛋白 50 μg, GSH 1 mmol/L, 空白对照管缓冲液不含上述成分. 37℃ 水浴保温 2 min 后, 加 20% 三氯醋酸终止反应, 离心, 取上清液在 uv 340 nm 测定 A, 依公式计算 GSH-S-T 活性<sup>(7)</sup>.

**去势小鼠子宫生物测定雌激素活性** ♀小鼠在乙醚麻醉下用电烙器切除两侧卵巢, 分组后给予雌激素或药物加雌激素或赋形剂. 实验结束时拉断小鼠颈椎, 称体重和子宫重量. 以子宫 mg/100g 体重表示雌激素活性.

**血清雌二醇的放射免疫测定** 取小鼠血清 0.5 ml, 用 5ml 乙醚提取, 热水浴中挥发干. 用上海内分泌研究所生产的 RIA 试剂盒测定雌二醇含量. 以 pg/ml 血清表示.

**小鼠肝微粒体代谢[<sup>3</sup>H]雌二醇实验** 采用 RIA 和高效液相色谱(HPLC)两种方法检测微粒体代谢雌二醇的速率, RIA 法, 温育液含肝

微粒体蛋白 3 mg 还原型辅酶(NADPH)1.5 mg, [<sup>3</sup>H]雌二醇 200 pg, TMS 缓冲液 (Tris-HCl 0.05 mol/L, MgCl<sub>2</sub> 0.003 mol/L, 蔗糖 0.25 mol/L, pH 7.4), 总容量 2 ml, 37℃ 温育 60 min 后, 取 0.5 ml 反应液用乙醚提取, 挥发干后进行 RIA 测定, 方法同上, 结果以 60 min 内每 mg 蛋白代谢的 [<sup>3</sup>H]雌二醇表示。

HPLC 法, 温育液含肝微粒体蛋白 3 mg, NADPH 1.5 mg, [<sup>3</sup>H]雌二醇 0.1 ml (放射性 15 kBq, 相当于 15 000 cpm) 和 TMS 缓冲液, 总容量为 1 ml, 37℃ 温育 30 min 后用乙醚提取, 挥发干后, 用 HPLC 检测 [<sup>3</sup>H]雌二醇消耗的量, 乙醚提取干燥物溶于甲醇 0.5 ml, 加入适当量非同位素标记雌二醇, 用 Waters 公司 HPLC 测定雌二醇, 流动相为 100% 甲醇, C-18 反相柱, uv 280 检测, 根据 HPLC 上非标记雌二醇的保留时间, 收集相应位置的洗脱液 1 ml, 每分钟收集一管, 加二甲苯闪烁液 5 ml, 测 [<sup>3</sup>H]雌二醇的放射性 cpm。

RESULTS

对小鼠和大鼠肝脏药物代谢 I 相和 II 相酶的影响 给药组 ♂ 小鼠分别 ig 乙素或五酚各 200 mg/kg, qd × 3 d. 对照组服相同容量 2% 吐温-80, d 4 断头处死小鼠, 测定肝微粒体细胞色素 P-450 和胞浆液中 GSH-S-T 及微粒体中 UDPG-T。

乙素和五酚在使肝微粒体细胞色素 P-450 增加的同时, 对胞浆液中 GSH-S-T 活性及肝微粒体 UDPG-T 催化 4-NP 的代谢基本上无影响 (Tab 1)。

大鼠实验中给药天数及剂量与小鼠实验同。从 Tab 1 可看出, 乙素和五酚均能明显提高大鼠肝胞浆液中 GSH-S-T 活性, 对微粒体 UDPG-T 代谢 4-NP 的活性亦无明显影响。大鼠 ip 苯巴比妥 80 mg/kg, qd × 3 d 后, GSH-S-T 活性明显增强, 但 UDPG-T

Tab 1. Influences of schizandrin B (Sin B), schisanhenol (Sal) and phenobarbital (PB) on activities of liver cytosol GSH-S-transferase (GSH-S-T), microsomal UDP-glucuronosyl-transferase (UDPG-T) and cytochrome P-450 in mice. n=7,  $\bar{x} \pm SD$ . \*P>0.05, \*\*P<0.05, \*\*\*P<0.01. 4-NP = nitrophenol.

Drug	GSH-S-T (mg/kg)	UDPG-T(4-NP) nmol/(min·mg protein)	Cytochrome P-450 nmol/mg protein
Mice Control	490 ± 10	18.7 ± 5.3	0.34 ± 0.03
Sin B(200)	510 ± 5*	11.4 ± 5.5*	0.48 ± 0.08***
Sal (200)	520 ± 5*	17.1 ± 7.0*	0.63 ± 0.06***
Rat Control	350 ± 50	29.9 ± 7.3	
Sin B(200)	440 ± 30***	28.1 ± 5.5*	
Sal(200)	460 ± 20***	32.6 ± 4.2*	
PB(80)	440 ± 20***	31.4 ± 2.9*	

活性则无明显变化。

对雌二醇促子宫重量增加的影响 小鼠于摘除卵巢后次日, 分组并给予不同处理 两组小鼠 ig 乙素或五酚各 200 mg/kg, qd × 5 d. 另两组服相同容量 2% 吐温-80. 于给药 d 4, 给药组和吐温对照组中各有一组 sc 雌二醇 (溶于花生油) 30 μg (10 ml)/kg. 另两组则 sc 花生油作对照。

结果乙素和五酚均能显著拮抗雌二醇的促子宫生长作用 (Tab 2)

Tab 2. Effects of Sin B and Sal on the increase of uterus weight and serum estradiol level in ovariectomized mice-treated with estradiol. n=11 (for uterus weight), 6 (serum estradiol level),  $\bar{x} \pm SD$ . \*\*P<0.05, \*\*\*P<0.01 vs estradiol alone.

Estradiol (μg/kg)	Drug (mg/kg)	Weight of uterus (mg/100g body weight)	Serum estradiol level (pg/ml)
-	-	54 ± 12***	13.7 ± 11.0***
30	-	153 ± 38	59.3 ± 6.9
30	Sin B 200	116 ± 29**	20.7 ± 11.4**
30	Sal 200	113 ± 28*	-

Note: 50 μg/kg of estradiol was used in the experiment of serum estradiol determination.

对去势小鼠皮下给雌二醇后血清雌二醇水平的影响 小鼠摘除卵巢后次日分为 3 组, 分别 ig 乙素 200 mg/kg 或 2% 吐温-80 (两组), qd × 4 d. 于给药 d 3, 除一吐温-80 对照

组 sc 花生油 10 ml/kg 外, 其余 2 组均 sc 雌二醇-花生油 50 μg/kg, 次日断头处死小鼠, 取血, 按前述 RIA 法测血清雌二醇水平。

结果如 Tab 2 所示, 乙素组小鼠血清雌二醇水平明显低于雌二醇对照组, 与未给雌二醇对照组比较无显著差异。

对♀小鼠肝微粒体代谢<sup>3</sup>H雌二醇的影响  
♀小鼠分为 3 组, 每组 10 只, 分别 ig 乙素 200 kg/kg 或五酚 200 mg/kg, qd × 3, 对照组服相同容量 2%吐温-80, 末次给药 24 h 后制备肝微粒体, 进行雌二醇体外代谢实验, 用 RIA 法和 HPLC 法测定<sup>3</sup>H雌二醇被微粒体代谢的量, RIA 法只测定了对照组, 乙素组肝微粒体代谢<sup>3</sup>H雌二醇的量, 每组肝微粒体合并, 各做两管, 由 Tab 3 可看出肝微粒体在有 NADPH 存在条件下, 乙素组小鼠肝微粒体代谢<sup>3</sup>H雌二醇的量比对照组高, 而在无 NADPH 存在时, 2 组小鼠肝微粒体代谢<sup>3</sup>H雌二醇的量基本上在同一水平, 每 mg 肝微粒体蛋白代谢的雌二醇对照组为 30.4 ± 0.02 pg, 乙素组为 30.3 ± 0.01 pg。

HPLC 法测定的结果列于 Tab 3, 用五酚及乙素处理小鼠每 mg 肝微粒体蛋白代谢<sup>3</sup>H雌二醇的量均比对照组多, 差异显著。

Tab 3. HPLC and RIA determination of <sup>3</sup>H estradiol metabolism by liver microsomes from mice treated with Sin B and Sal. n=7 (HPLC), 2 (RIA).  $\bar{x} \pm SD$ . \*\*P < 0.05.

Drug (mg/kg)	<sup>3</sup> H estradiol metabolism	
	HPLC method (dpm/mg protein)	RIA method (pg/mg protein.min)
Control	5621 ± 789	41.7 ± 0.01
SinB(200)	6853 ± 277*	50.9 ± 0.02
Sal (200)	6779 ± 45**	—

DISCUSSION

肝细胞色素 P-450 和 GSH-S-T 及 UDPG-T 参与机体的解毒过程并起关键的作用, 本文结果除证实乙素及五酚对肝微粒体细胞色素 P-450 有诱导作用外, 发现此 2 种成分均

能提高大鼠肝胞浆液中 GSH-S-T 的活性, 反映五味子所含的某些成分如乙素和五酚对药物代谢的 I 相和 II 相酶均有增强作用, 但是二者对 UDPG-T 代谢底物 4-NP 的活性并无显著影响, 对此如何解释? 据报道 UDPG-T 可分为两大类型<sup>(8,9)</sup>: (1)3-甲基胆蒎型(3-MC Type 或 GT<sub>1</sub>), 该型 UDPG-T 可被 3-甲基胆蒎诱导, 其代谢底物分子量小, 如 4-NP, 4-溴酚, 1-萘酚等;(2)苯巴比妥型(PB Type 或 GT<sub>2</sub>), 可被苯巴比妥诱导, 其底物分子量较大, 如甾体类, 儿茶酚类, 吗啡等。已知五味子的几种成分如乙素等对肝细胞色素 P-450 的诱导作用属于苯巴比妥型<sup>(10)</sup>而在本实验研究中检验五味子对 UDPG-T 代谢活性时所用的底物为 3-甲基胆蒎型底物 4-NP, 五味子及其成分乙素等对此底物代谢虽无增强作用, 并不意味着五味子及其成分对 UDPG-T 活性无诱导作用, 因苯巴比妥亦无明显影响。

雌二醇主要在肝细胞色素 P-450 的催化下, 氧化还原生成几种羟化产物如雌三醇, 1,6-表雌三醇, 2-甲氧雌酮等, 而后大部分羟化产物在 UDPG-T 和 GSH-S-T 催化下形成葡萄糖醛酸酯及谷胱甘肽复合物, 从尿或胆汁排出, 在慢性肝病时, 雌激素的代谢往往减少, 蓄积体内, 引起某些病理改变如蜘蛛痣、蝴蝶斑, 水钠潴留或黄疸, 本研究观察到乙素及五酚能通过诱导肝脏药物代谢酶, 如细胞色素 P-450 和 GSH-S-T, 有利于雌二醇在肝脏的代谢, 从而降低血清雌二醇的浓度以及雌二醇对靶器官的效应, 如促进子宫生长作用, 总之, 五味子的某些成分能增强肝脏的解毒功能, 改善雌激素的代谢。

REFERENCES

1 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

3  
★  
1  
0 (1730)

2 Liu GT, Wei HL. Induction of hepatic microsomal monooxygenases by schisanhenol in rats. *Acta Pharmacol Sin* 1985; **6** : 41

3 Lesca P, Lecoq P, Paoletti C, Mansuy D. Induction des mono-oxygénases hépatiques par l'ellipticine chez le rat : Formation de cytochrome P<sub>448</sub>. Activité hydroxylante. *C R Hebd Séances Acad Sci, Ser D* 1976; **282** : 1457.

4 Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis Farr A, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193** : 265

5 Omura T, Sato R. Carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *Ibid* 1964; **239** : 2370

6 Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in

mercapturic acid formation. *Ibid* 1974 **249** : 7130

7 Bock KW, Burchell B, Dutton GJ, et al UDP-glucuronosyl-transferase activities. Guidelines for consistent interim terminology and assay conditions. *Biochem Pharmacol* 1983; **32** : 953

8 Wishart GJ. Demonstration of functional heterogeneity of hepatic uridine diphosphate glucuronosyltransferase activities after administration of 3-methylcholanthrene and phenobarbital to rats. *Biochem J* 1978; **174** : 671

9 Roy Chowdhury J, Roy Chowdhury N, Falany CN, Tephly TR, Arias IM. Isolation and characterization of multiple forms of rat liver UDP-glucuronate glucuronosyltransferase. *Ibid* 1986; **233** : 827

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 Jul; **11** (4) : 335-337

### 青蒿酯钠对小鼠小肠电性能和 Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATP 酶活性的影响<sup>1,2</sup>

王京燕、袁丽珍<sup>3</sup>、王明道 (军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071, 中国)

**Effects of sodium artesunate on electrical properties and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activities of mouse small intestine<sup>1,2</sup>**

WANG Jing-Yan, YUAN Li-Zhen<sup>3</sup>, WANG Ming-Dao (*Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China*)

**ABSTRACT** Sodium artesunate (SA), a synthetic derivative of artemisinin first isolated in China, is a water soluble antimalaria used clinically in China. The jejunum of mouse was mounted in Ussing chambers and bathed in NaCl Ringer. There was a potential difference (PD) across the intestinal wall with the serosa being positive. Addition of SA to the mucosal side of the D-glucose (5.5 mmol/L) NaCl Ringer

bathing solution, caused a significant decrease in both PD and short circuit current (*I<sub>sc</sub>*). However, SA had little effect when added to the glucose free Ringer bathing solution. SA 0.1-1.0 mmol/L caused a decrease in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activities *in vitro*. The results suggest that the inhibitory effect on the electrical properties of mouse jejunum is associated with the inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activities.

**KEY WORDS** artesunate, intestinal mucosa; glucose; sodium, potassium adenosine triphosphatase; jejunum

**提要** 小鼠空肠置于含 NaCl Ringer 液的 Ussing chamber 中, 观察到以浆膜侧为正的小肠电位差 (PD)。当 NaCl Ringer 液内含有 D-葡萄糖 5.5mmol/L 时, 青蒿酯钠(SA)加入 Ussing chamber 的粘膜侧, PD 和 *I<sub>sc</sub>* 显著下降。然而在无糖 Ringer 液内 SA 则没有此作用。此外, 试管测定 SA 0.1-1.0 mmol/L 可显著抑制 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶的活性。结果提示, SA 对小鼠空肠电参数的抑制与 Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATP 酶活性受抑有关。

Received 1989 Sep 12 Accepted 1990 Apr 17

<sup>1</sup> Project supported by the National Natural Science Foundation of China, № 3870895

<sup>2</sup> Preliminary report at FASEB meeting in New Orleans LA, USA on 1989 Mar 21.

<sup>3</sup> *Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China.*

**关键词** 青蒿酯钠; 肠粘膜; 葡萄糖; 钠钾腺苷三磷酸酶; 空肠