

· 论 著 ·

复方银杏叶胶囊对肝损伤大鼠 CYP2E1、CYP3A4 的影响

刘亚锋, 潘苏华

[摘要] 目的 研究复方银杏叶胶囊(CGB)对酒精性肝损伤大鼠 CYP2E1、CYP3A4 活性的影响。方法 正常组和酒精性肝损伤模型组均以 CGB[(250 mg/(kg·d))]灌胃,分别在灌胃 CGB 前及灌胃 1 周后,灌胃探针药氯唑沙宗(50 mg/kg)及氨苯砜(20 mg/kg),于探针药灌后 24 h 内不同时间点采血,测定各探针药血药浓度。结果 灌胃 CGB 前,模型组氯唑沙宗和氨苯砜的 AUC_{0-24} 、 C_{max} 均显著低于正常组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。灌胃 CGB 后,模型组氯唑沙宗和氨苯砜的 AUC_{0-24} 、 C_{max} 均较灌胃前显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);且氯唑沙宗的 $t_{1/2}$ 灌胃 CGB 后明显高于灌胃前($P < 0.05$)。结论 CGB 能够明显抑制酒精性肝损伤大鼠 CYP2E1、CYP3A4 酶活性。

[关键词] 酒精性肝损伤;银杏叶提取物;CYP2E1;CYP3A4

[中图分类号] R969.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2011)02-0100-04

Influence of the compound Ginkgo Biloba on CYP2E1 and CYP3A4 enzyme activity in hepatic injured rats

LIU Ya-feng, PAN Su-hua. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210046, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect of the compound Ginkgo Biloba (CGB) on CYP2E1 and CYP3A4 activity in hepatic alcohol-injured rats. **Methods** CGB was orally administrated to the normal and the alcohol-injured hepatic injury model rats. Two group rats underwent 2-cycle pharmacokinetic experiments before and after being treated with CGB(250 mg·kg⁻¹·d⁻¹) for 7 days, in which the rats were concomitantly administered Chlorzoxazone (50 mg/kg) and Dapsone (20 mg/kg) by gastrogavage followed by blood-withdrawing from orbital bleeding at different intervals within 24 hours. **Results** Before being treated with CGB, compared with normal control group, the AUC_{0-24} and C_{max} of Chlorzoxazone and Dapsone in the model group were decreased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). However, the AUC_{0-24} , and C_{max} of Chlorzoxazone and Dapsone after being treated with CGB in the model group were both larger than those before treatment ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the $t_{1/2}$ of Chlorzoxazone than that that before treatment. **Conclusion** CGB could inhibit activities of CYP2E1 and CYP3A4 in alcohol-injured rats.

[Key words] alcoholic hepatocyte injury; Ginkgo biloba extract; CYP2E1; CYP3A4

银杏叶制剂含有毒性物质银杏酸而具有潜在的肝细胞毒性和强致敏性^[1]。我们以银杏提取物与刺梨汁粉配伍成复方银杏叶胶囊(CGB),期望通过配伍减毒提高银杏叶制剂安全性。经免疫性、化学性肝损伤试验研究证实,CGB 具有肝功能保护作用^[2-3]。为探讨其作用机制是否与抗氧化有关,通过 CYP450 亚型酶 CYP2E1 探针药氯唑沙宗及

CYP3A4 酶探针药氨苯砜对酒精性肝损伤大鼠 CGB 治疗前后的血药浓度变化,分析 CGB 对酒精性肝损伤大鼠 CYP2E1 及 CYP3A4 酶活性的影响,探讨 CGB 干预肝脏的氧化应激损伤是否与 CYP2E1、CYP3A4 酶活性的抑制相关,现将实验结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物 健康 SD 雄性大鼠(清洁级)16 只,体重(270±20)g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。生产许可证号:SCXK(沪)2007-2005,常规条件饲养。

基金项目: 江苏省中医局基金项目(H-024)

作者简介: 刘亚锋(1981-),女,河南郑州人,硕士研究生,研究方向:中药心脑血管药理

作者单位: 210046 江苏南京,南京中医药大学

通讯作者: 潘苏华, E-mail: shpan2222@yahoo.com.cn

1.2 仪器与药品、试剂 Agilent 1100 高效液相色谱仪, Mettler Toledo AL-104 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); CGB(自制, 批号: 091126); 酒精度 56% (v/v) 红星二锅头白酒(北京红星股份公司); 氯唑沙宗、氨苯砜对照品均购自 Sigma 公司; 内标替硝唑对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 130351-200102); 甲醇、乙腈均为色谱纯; 二氯甲烷为分析纯; 超纯水由 Millipore 超纯水系统制备。

1.3 分组与给药 16 只大鼠, 先随机分为两组, 即为正常对照组(正常组)和酒精性肝损伤模型组(模型组)。模型组大鼠灌胃给予白酒-玉米油混悬液^[4]。白酒的摄入量第 1 周为 8 g/(kg·d), 第 2 周 10 g/(kg·d), 第 3 周和第 4 周为 12 g/(kg·d)。玉米油的摄入量为 2 ml/(kg·d)。造模成功后, 两组大鼠均分别灌胃 CYP2E1 探针药物氯唑沙宗(50 mg/kg)和 CYP3A4 探针药物氨苯砜(20 mg/kg), 分别在给药前和给药后 5 min、10 min、15 min、30 min、1 h、2 h、3 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h 经眼底静脉丛采血约 0.3 ml 备用。随后模型组给予 CGB 250 mg/(kg·d)连续灌胃 7 d, 第 8 天时再按前法重复采血, 制备血浆备用。

1.4 大鼠血浆样品处理 精密吸取 80 μl 大鼠含药血浆, 加入 20 μl 内标(替硝唑 80 mg/L)后, 振匀 30 s; 加入 0.8 ml 二氯甲烷, 涡旋振荡 3 min, 12 000 r/min 离心 10 min(离心半径 8 cm), 取下层有机相 0.7 ml 于氮气流下吹干; 30% 乙腈 200 μl 复溶后, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进样分析。

1.5 色谱条件 色谱柱: Agilent Zorbax SB-C18 (4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水。梯度洗脱, 梯度为 0 min(10% 乙腈)→5 min(16% 乙腈)→13 min(40% 乙腈)→16 min(10% 乙腈)→18 min(10% 乙腈), 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 280 nm; 进样量: 10 μl; 柱温: 30 ℃。

1.6 统计学处理 两组大鼠药动学实验数据经 DAS 2.0 软件处理后, 氯唑沙宗药时曲线符合二室

模型($W = 1/CC$), 氨苯砜药时曲线符合一室模型($W = 1/CC$), 并得到 $t_{1/2}$ (半衰期)、 C_{max} (血药峰浓度)、 T_{max} (达峰时间)、 AUC_{0-24} (血药浓度-时间曲线下面积)等药动学参数。药动学参数行方差分析; 给药前后组间比较行配对 t 检验, 其中 $t_{1/2}$ 、 T_{max} 进行非参数检验(Wilcoxon: 符号秩检验), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CGB 对酒精性肝损伤大鼠 CYP2E1 酶活性的影响 正常和肝损伤模型大鼠分别单次灌胃给予氯唑沙宗, 结果模型组大鼠各时间点的氯唑沙宗血药浓度均显著低于正常组(图 1); 且模型组大鼠 AUC_{0-24} 、 C_{max} 均较正常组显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。由于氯唑沙宗代谢与 CYP2E1 酶活性诱导相关, 由此提示酒精刺激可使大鼠体内 CYP2E1 酶活性升高。大鼠灌胃 CGB 1 周后与灌胃前比较, 模型组大鼠血浆中氯唑沙宗各时间点血药浓度均明显升高(图 2), CGB 可使模型组氯唑沙宗的 AUC_{0-24} 升高至给药前的 1.79 倍, 且模型组 AUC_{0-24} 、 C_{max} 、 $t_{1/2}$ 给药后均较给药前显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果提示 CGB 可抑制酒精性肝损伤大鼠体内 CYP2E1 酶活性。见表 1。

2.2 CGB 对酒精性肝损伤大鼠 CYP3A4 酶活性的影响 CGB 给药前, 单次灌胃给予正常和肝损伤模型大鼠 CYP3A4 特异性探针药物氨苯砜。模型组与正常组大鼠比较, 各时间点血浆中氨苯砜血药浓度均显著降低(图 3); 且模型组大鼠 AUC_{0-24} 、 T_{max} 、 C_{max} 均较正常组显著降低($P < 0.05$)。提示酒精刺激可导致大鼠体内 CYP3A4 酶活性升高。大鼠灌胃 CGB 1 周后与灌胃前比较, 模型组大鼠血浆中氨苯砜各时间点血药浓度均明显升高(图 4), CGB 可使模型组氨苯砜的 AUC_{0-24} 升高至给药前的 1.44 倍, 且模型组 AUC_{0-24} 、 C_{max} 给药后均较给药前显著升高($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 CGB 给药前后大鼠氯唑沙宗药动学参数比较($\bar{x} \pm s$)

药动学参数	正常组($n=8$)	模型组($n=8$)	CGB 给药前($n=8$)	CGB 给药后($n=8$)
C_{max} (mg/L)	25.70 ± 4.93	13.70 ± 4.70**	12.88 ± 3.60	20.01 ± 5.29▲▲
T_{max} (h)	0.46 ± 0.10	0.22 ± 0.04	0.22 ± 0.04	0.32 ± 0.14
$t_{1/2}$ (h)	7.30 ± 3.30	5.25 ± 2.00	5.40 ± 1.80	8.81 ± 2.30▲
AUC_{0-24} [mg/(L·h)]	51.30 ± 17.56	30.74 ± 9.40*	32.73 ± 11.22	55.00 ± 14.13▲
$AUC_{0-\infty}$ [mg/(L·h)]	52.39 ± 18.13	32.59 ± 10.55*	35.51 ± 13.16	57.52 ± 13.01▲

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与给药前比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

表 2 CGB 给药前后大鼠氯唑沙宗药动学参数比较($\bar{x} \pm s$)

药动学参数	正常组(n=8)	模型组(n=8)	CGB 给药前(n=8)	CGB 给药后(n=8)
C_{max} (mg/L)	7.16 ± 1.47	4.70 ± 1.39 *	3.94 ± 1.40	5.24 ± 1.20 [▲]
T_{max} (h)	6.67 ± 1.63	4.67 ± 1.63	4.67 ± 1.63	7.67 ± 4.03
$t_{1/2}$ (h)	10.82 ± 3.02	6.56 ± 2.46 *	6.56 ± 2.46	9.78 ± 4.26
AUC_{0-24} [mg/(L·h)]	85.42 ± 25.63	49.64 ± 19.60 *	49.64 ± 19.60	71.37 ± 23.75 [▲]
$AUC_{0-\infty}$ [mg/(L·h)]	93.75 ± 22.95	56.84 ± 18.19 *	51.48 ± 21.04	92.51 ± 39.30 [▲]

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与给药前比较,[▲] $P < 0.05$

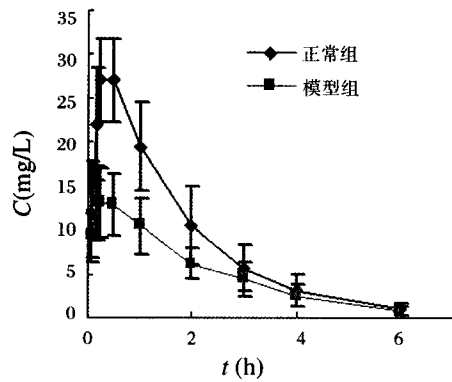


图 1 CGB 给药前正常组和模型组大鼠体内氯唑沙宗药时曲线

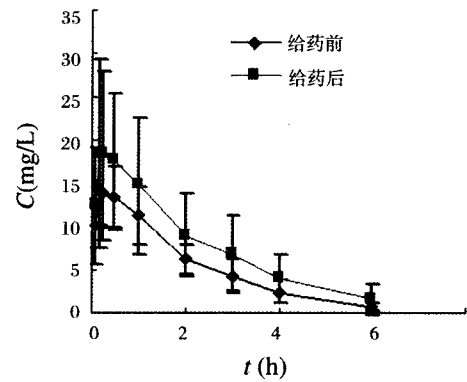


图 2 模型组大鼠 CGB 给药前后氯唑沙宗药时曲线

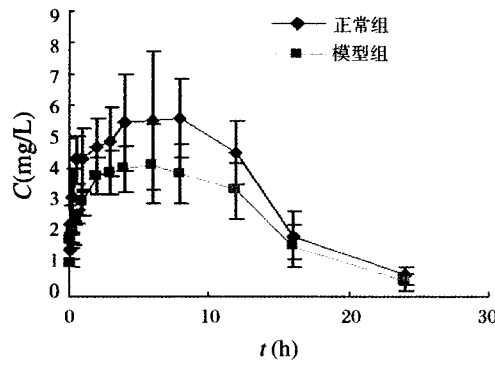


图 3 CGB 给药前正常组和模型组大鼠氯唑沙宗药时曲线

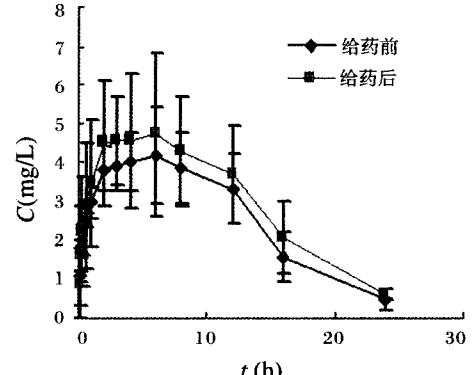


图 4 模型组大鼠 CGB 给药前后氯唑沙宗药时曲线

3 讨论

CYP2E1、CYP3A4 是肝脏药物代谢酶 P450 的重要亚型,为药物与毒物代谢的主要酶类。有研究报道大剂量乙醇可诱导 P4502E1 活性,产生大量的 OH⁻、O²⁻、H₂O₂ 等自由基,使 DNA、蛋白质和脂质发生氧化损伤^[5]。从 CGB 治疗前后的酒精性肝损伤大鼠血浆氯唑沙宗和氨苯砜的药动学参数分析结果看出,酒精刺激肝损伤过程中 CYP2E1、CYP3A4 酶蛋白活性明显增强,提示酒精性肝损伤过程中 CYP2E1、CYP3A4 的高诱导参与了氧化损伤过程;而 CYP2E1 酶活性降低则对氧化应激损伤具有负反馈效应^[6]。CGB 可明显抑制酒精性肝损伤模型大鼠血浆 CYP2E1 酶活性,由此认为 CGB 防护酒精性

肝损伤机制可能与抗氧化应激相关。其物质基础可能系银杏提取物(GBE)含有的黄酮类抗氧化物质抑制了乙醇对 CYP2E1 活性表达^[7]。同时刺梨含有黄酮及大量的维生素 C、维生素 E 及超氧化物歧化酶(SOD),既可阻断氧自由基的产生,也可直接清除氧自由基、抑制脂质过氧化反应^[8]。由此两者配伍可能通过多环节协同而产生更强的抗氧化作用,从而减轻氧化应激损伤程度。

目前有关 CYP3A4 对乙醇代谢过程的研究有不同结论^[9-10],本研究发现酒精性肝损伤 CYP3A4 活性也产生了变化,且 CGB 抑制酒精性肝损伤大鼠血浆 CYP2E1 酶活性的同时也抑制了 CYP3A4 酶活性,由于 CYP3A4 活性的变化存在相当复杂的机制,因此尚待进一步探讨。

综上所述,银杏叶提取物与刺梨配伍,通过协同

抗氧化不仅有利于减轻脂质过氧化损伤,同时可保护肝脏功能,这为保肝调脂药物研究提供了新思路。

【参考文献】

- [1] Tada Y, Kagota S, Kubota Y, et al. Long-term feeding of Ginkgo biloba extract impairs peripheral circulation and hepatic function in aged spontaneously hypertensive rats[J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31(1):68-72.
- [2] 潘苏华, 吴丽. 复方银杏叶胶囊对大鼠肝损伤的防护作用[J]. 中西医结合肝病杂志, 2008, 18(6):360-361.
- [3] 潘苏华, 牛文明, 吴丽, 等. 银杏叶提取物与刺梨配伍抗实验性肝损伤作用[J]. 药学实践杂志, 2009, (27)6:437-438.
- [4] 张桂英, 吴光健, 王宝贵. 白桦脂醇对大鼠酒精性肝损伤保护作用[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(3):378-379.
- [5] Lu Y, Cederbaum AI. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol[J]. Free Radic Biol Med, 2008, 44(5):723-738.

- [6] 康晓琳, 薛永志, 武润生, 等. 酒精性肝损伤大鼠细胞色素 P450 CYP2E1 和细胞色素 P450 CYP3A 的代谢活性[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2010, 24(4):286-290.
- [7] 刘晓平, 栾佳杰, Christopher G. 银杏叶提取物双重抗氧化作用的研究[J]. 中成药, 2009, 31(7):1004-1009.
- [8] 于丽伟, 王聪智, 何蓉蓉, 等. 刺梨果汁对拘束负荷诱发小鼠肝损伤的保护作用[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(5):730-734.
- [9] Liangpunsakul S, Kolwankar D, Pinto A, et al. Activity of CYP2E1 and CYP3A enzymes in adults with moderate alcohol consumption: a comparison with nonalcoholics[J]. Clin Pharmacol Ther, 2005, 77(3):178-188.
- [10] He P, Court MH, Greenblatt DJ, et al. Factors influencing midazolam hydroxylation activity in human liver microsomes[J]. Drug Metab Dispos, 2006, 34(7):1198-1207.

(收稿日期:2011-01-08;修回日期:2011-01-23)

(本文编辑:潘雪飞;英文编辑:王建东)

· 个 案 ·

异时异位三重复癌 1 例

王鑫洪, 林考兴, 曹治列

【关键词】 三重复癌; 异时; 异位

【中图分类号】 R730.26 【文献标志码】 B 【文章编号】 1672-271X(2011)02-0103-01

1 病例报告

患者,男,81岁。1993年5月因无痛性肉眼血尿6h入院,经检查诊断“左肾占位”,行左肾根治切除术,术中见:左肾上极包块约9.0 cm×8.0 cm×7.0 cm,包膜完整。术后病理报告左肾透明细胞癌。1994年1月因黏液性血便半个月入院,经肠镜检查诊断“乙状结肠癌”,即予左半结肠切除术,术中见:乙状结肠中下段可见包块约4.0 cm×3.0 cm×2.5 cm,浆膜光滑,未见肿大淋巴结。术后病理报告乙状结肠管状腺癌,术后常规化疗,恢复良好。2010年3月因上腹部不适,隐痛2个月入院,经胃镜检查诊断“贲门胃底癌”,行全胃切除术,术中见:贲门胃窦小弯侧见一溃疡型包块约13.0 cm×9.0 cm×5.0 cm,胃浆膜面质硬,皮革样改变。术后病理报告贲门小弯侧中分化管状腺癌,溃疡型,淋巴结8枚,均阴性,术后化疗、免疫治疗,现恢复良好。家族中母亲患有直肠肿瘤史,无兄弟姐妹。

2 讨论

重复癌又称多原发恶性肿瘤、多重癌等,是指在同一个体内单个或多个器官组织同时或先后发生两种或两种以上的原发性恶性肿瘤。其诊断标准:①每一种肿瘤需在组织学上符合恶性肿瘤的诊断;②每一种肿瘤有其独特的病理形态;③每一种肿瘤发生在不同的部位或器官;④必须除外转移癌或复发癌^[1-2]。发生间隔时间在6个月以内者称为同时性重复癌,在6个月以上者称为异时性重复癌。其发病率同时性癌为2%~5%,异时性癌更低为0.8%。本病例第一次肿瘤与第二次肿瘤发生间隔时间8个月,第二次与第三次间隔时间16年,3次发生肿瘤均为病理确诊,符合重复癌诊断且为异时异位三重复癌,比较罕见。笔者认为,在第一次肿瘤治疗后,要加强定期复查,随访。要对重复癌有足够的认识,及时发现和正确区分转移癌、复发癌与重复癌,采取正确、积极的治疗方法,以取得更好的治疗效果。

【参考文献】

- [1] 张辉,王正慧,陈越平. 56例多原发癌的临床回顾性研究[J]. 西南国防医药, 2009, 19(20):189-191.
- [2] 付尚志. 双原发癌45例临床分析[J]. 肿瘤防治研究, 2001, 28(2):142-143.

(收稿日期:2010-07-27;修回日期:2010-11-15)

(本文编辑:黄佐生)

作者单位: 310013 浙江杭州,解放军117医院泌尿外科

通讯作者: 林考兴, E-mail: linkaoxing117@126.com