·实验研究·

异甘草酸镁对 CCl_4 致急性肝损伤大鼠肝组织CYP1A2、CYP2E1蛋白及其mRNA表达的影响

陈 鑫,葛 芹,张彩云,陈卫东,叶 茜,李 鑫

(安徽中医药大学药学院 安徽省中医药科学院,安徽 合肥 230012)

[摘要]目的 观察异甘草酸镁对 CCl_4 致急性肝损伤大鼠肝组织CYP1A2、CYP2E1蛋白及其mRNA表达的影响,从代谢酶方面探讨异甘草酸镁保肝作用的机制。**方法** 将大鼠分为正常对照组、模型组和给药组,每组6只。尾静脉注射给药,给药组给予20 mg/kg异甘草酸镁,正常组及模型组给予同容积生理盐水,连续14 d。模型组及给药组于给药第13天20:00点灌胃25% CCl_4,剂量为1.6 mL/kg,制备大鼠急性肝损伤模型。各组大鼠于末次给药2 h后,从髂动脉放血处死,取肝组织进行苏木精-伊红染色,观察肝组织病理形态变化;采用RT-PCR及Western-blot检测各组大鼠肝组织中CYP1A2、CYP2E1蛋白及mRNA表达水平。**结果** 肝组织病理学检查显示异甘草酸镁能改善肝组织损伤;模型组CYP1A2和CYP2E1蛋白及mRNA表达水平显著高于正常对照组($P<0.05$),给药组CYP1A2和CYP2E1蛋白及mRNA表达水平较模型组显著降低($P<0.05$)。**结论** 异甘草酸镁能够治疗肝损伤,其减毒机制可能与抑制CYP1A2、CYP2E1的表达有关。

[关键词]异甘草酸镁;CCl_4;CYP1A2;CYP2E1;RT-PCR

[中图分类号]R285.5 [DOI]10.3969/j.issn.2095-7246.2017.01.017

甘草(*Radix Glycyrrhizae*)性味甘平,有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳以及调和诸药之功效[1],是中医最常用的药物之一,有"十方九草"之称[2]。甘草酸(glycyrrhizic acid,GL)是甘草的主要活性成分,其钾、钙盐为甘草甜素(glycyrrhizin),水解后生成二分子葡萄糖醛酸和一分子甘草次酸(glycyrrhetinicacid,GA)。由于其18位手性碳原子 C—H 键(18H)的构型不同,因此甘草酸存在两种差向异构体,即18α-甘草酸(18α-GL)和18β-甘草酸(18β-GL)[3]。异甘草酸镁属于第4代GL类药物,为单一18α-异构体甘草酸的镁盐。异甘草酸镁对慢性肝炎有治疗作用[4]。目前异甘草酸镁已经被广泛应用于治疗慢性病毒性肝炎和化学治疗所致的一系列肝病[5-6]。但异甘草酸镁保肝作用的机制仍在探索中。

CYP1A2和CYP2E1是P450酶的重要亚型,均能催化许多前毒物和前致癌物转化为有毒物和致癌物质,对机体产生一定的危害[7]。本实验通过使用 CCl_4 在大鼠体内建立急性肝损伤的模型[8],研究异甘草酸镁对CYP1A2和CYP2E1表达的影响,从代谢酶角度阐释异甘草酸镁治疗肝损伤的机制。

基金项目:安徽省科技厅自然科学项目(1408085MH196);国家自然科学基金项目(51303006)

作者简介:陈鑫(1993-),女,硕士研究生

通信作者:张彩云,cyzhang6@163.com

1 材料

1.1 试剂 异甘草酸镁注射液(批号140417104):江苏正大天晴药业股份有限公司;CCl_4、橄榄油:国药集团化学试剂有限公司;三氯甲烷($CHCl_3$)(分析纯)、异丙醇(分析纯):上海凌峰化学试剂有限公司;无水乙醇(分析纯):上海试剂四厂;DEPC水(批号D1007):Generay biotech公司;逆转录试剂盒(批号K1622):Thermo公司;QuantiNova SYBR Green PCR试剂盒(批号208054):QIAGEN公司;Trizol(15596026):美国Invitrogen公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号P0012S),SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5X)(批号P0015)、一抗稀释液:Beyotime公司;一抗[CYP1A2(ab170204),兔多克隆抗体;CYP2E1(ab84598),兔多克隆抗体]:Abcam;β-actin(TA-09)鼠单克隆抗体:北京中杉金桥公司;二抗[山羊抗兔IgG-HRP标记(ZB-2301)、山羊抗小鼠IgG-HRP标记(ZB-2305)]:北京中杉金桥公司。

1.2 仪器 AB-135型十万分之一分析天平:德国梅特勒公司;实时荧光定量PCR仪:Applied Biosystems公司;ELX800uv荧光定量酶标仪:Bio-TEK公司;MX-S微型漩涡混合仪:SCILOGEX公司;冷冻高速离心机、微量移液枪、MiniSpin系列个人型离心机:Thermo公司;磁力搅拌器:予华仪器有限责任公司;快速半干式转渍器:BIO-RAD公司;硝酸纤维化膜:Pall公司;ZWY-240恒温培养振荡器:上海智城分析仪器制造;Gel DOX XR电泳凝胶

成像系统：美国伯乐公司。

1.3　动物　SD大鼠18只，雌雄各半，体质量为180～200 g，生产许可证号为SCXK(皖)2011-002，由安徽医科大学实验动物中心提供。

2　方法

2.1　动物模型复制及给药　健康SD大鼠，适应性喂养1周。将大鼠分为正常对照组、模型组和给药组，每组6只。尾静脉注射给药，给药组给予20 mg/kg异甘草酸镁，正常组及模型组给予同容积生理盐水，连续14 d。模型组及给药组于给药第13天20:00灌胃25% CCl_4，剂量为1.6 mL/kg，制备大鼠急性肝损伤模型。各组于末次给药2 h后，从髂动脉放血处死大鼠，取肝组织，置于液氮中保存。

2.2　肝组织病理形态观察　取肝右叶相同的部位，称取大小相似的肝组织薄片，用10%的甲醛溶液固定，脱水，石蜡包埋，进行常规苏木精-伊红(hematoxylin-eosin，HE)染色，切片，显微镜下观察肝组织病理学变化。

2.3　RT-PCR检测各组大鼠肝组织中CYP1A2及CYP2E1 mRNA表达　按照RNA提取要求，利用Trizol提取各组大鼠肝脏中总RNA。在荧光定量酶标仪上测样品的OD_{260}、OD_{280}和OD_{320}值，根据其值确定RNA的纯度和浓度，并将各组RNA稀释至0.5 μg/μL。逆转录反应根据逆转录试剂盒的要求加入反应体系，逆转录条件为42 ℃ 60 min，70 ℃ 5 min，在PCR仪上合成cDNA，并在−20 ℃保存备用。PCR反应是根据PCR试剂盒的要求，以1 μL cDNA为模板，加入上下游引物10 μmol/L(见表1)各1 μL，以及SYBR Premix Ex Taq™ 5 μL，加入DEPC-H_2O至终反应体系为10 μL。PCR的反应条件为预变性95 ℃ 1 min，变性95 ℃ 15 s，适应的退火温度为72 ℃ 30 s，溶解曲线分析为65～95 ℃，0.5 ℃，扩增的循环数均为40个循环。根据RT-PCR仪检测的结果得出内参的CT值以及所测亚型的CT值，根据相应的计算方法进行比较各组CYP1A2及CYP2E1 mRNA水平是否发生了变化。

表1　β-actin、CYP1A2、CYP2E1基因引物的DNA序列

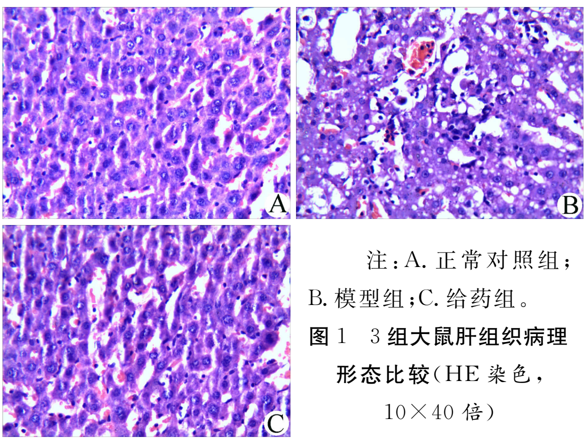
体系成分	引物序列
Rat-Actin	5′-CTGAACCCTAAGGCCAACCG-3′
	5′-GACCAGAGGCATACAGGGACAA-3′
Rat-CYP2E1	5′-GGGGAATGGGGAAACAGGGTA-3′
	5′-CAATCAGAAATGTGGGGTCAA AAGG-3′
Rat-CYP1A2	5′-GAACTACAAAGACAACGGTG-3′
	5′-TCTTTCCACTGCTTCTCATC-3′

2.4　采用Western-blot检测各组大鼠肝组织中CYP1A2及CYP2E1蛋白表达　按1 mL RIPA组织裂解液加10 μL苯甲基磺酰弗氟(100 mmol/L)提取50 mg大鼠肝组织为标准，提取各组肝脏总蛋白。利用BCA蛋白浓度测定试剂盒对提取的蛋白浓度进行定量以确定上样量为每孔60 μg，总蛋白变性后由十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate，SDS)分离胶套装进行分离，得到所需分子量范围的胶(10%分离胶和3%浓缩胶)，然后进行转膜以及封闭得到所需蛋白条带，对蛋白条带进行一抗(1∶1 000)、二抗(1∶10 000)孵育，最后放入化学发光仪器中检测蛋白条带。根据得到的条带用Image J进行灰度分析，以确定各组CYP2E1蛋白水平是否发生变化。

2.5　统计学方法　连续型变量采用“均数±标准差($\bar{x}\pm s$)”进行统计学描述。采用Prism 6.0(Graphpad software，San Diego，USA)统计软件进行单因素方差分析及两个独立样本t检验。$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　3组大鼠肝组织病理形态比较　正常对照组大鼠肝细胞结构清晰，肝细胞核大而圆，核膜清晰，核仁明显，无细胞变性坏死(图1A)；模型组肝细胞变性坏死，肝细胞肿胀较明显，有炎性细胞出现(图1B)，表明CCl_4致肝损伤模型复制成功；给药组仍有部分病变，但炎性细胞变少，肝小叶结构排列略整齐(图1C)，可见异甘草酸镁可以改善肝损伤。



注：A.正常对照组；B.模型组；C.给药组。

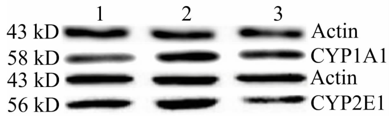
图1　3组大鼠肝组织病理形态比较(HE染色，10×40倍)

3.2　3组大鼠肝组织CYP1A2、CYP2E1 mRNA及蛋白表达水平比较　模型组CYP1A2和CYP2E1蛋白及mRNA表达水平显著高于正常对照组($P<0.05$)，给药组CYP1A2和CYP2E1蛋白及mRNA表达水平较模型组显著降低($P<0.05$)。见表2、图2。

表2 3组大鼠肝组织CYP1A2、CYP2E1 mRNA及其蛋白相对表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CYP1A2 mRNA	CYP2E1 mRNA	CYP1A2蛋白	CYP2E1蛋白
正常对照	6	1.000±0.187	1.000±0.092	1.000±0.035	1.000±0.011
模型	6	2.439±0.285*	1.936±0.040*	1.154±0.033*	1.432±0.028*
给药	6	1.461±0.043#	0.943±0.104#	1.024±0.019#	0.910±0.030#

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$。



注:1.正常对照组;2.模型组;3.给药组。

图2 3组大鼠肝组织CYP1A2和CYP2E1蛋白表达水平(Western blot法)

4 讨论

肝脏在药物(外源性物质)代谢和处置中起着十分重要的作用,大多数药物和毒物都在肝脏内经生物转化作用而排出体外[8]。而过度地暴露肝脏于一些毒性环境、乙醇、过量药物以及一些化学药物,例如CCl_4中都将损害肝脏,并产生急性肝损伤的病症,最终导致肝炎和肝纤维化[9]。急性肝损伤已经成为临床的常见病,从病理生理的角度来说,这是一种无菌炎症,如果不对其进行治疗,将会导致多器官损伤以及免疫功能不全[10]。

异甘草酸镁现为临床上常用于治疗急性肝损伤的药物,它具有抗炎,保护肝细胞膜以及改善肝功能的作用,其有效成分是18α-GL,具有较强的抗肝炎、免疫抑制以及抗生物氧化等多种功效[11-12]。近年来已有文献[13]报道异甘草酸镁对CCl_4诱导的急性肝损伤小鼠具有保护作用,笔者通过研究异甘草酸镁对肝组织中细胞因子、核转录因子κB、细胞间黏附因子-1表达的影响探讨异甘草酸镁保护作用的机制。顾新等[14]研究了异甘草酸镁对CCl_4肝损伤小鼠的保护作用,实验通过测定血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶和组织匀浆中丙二醛、超氧化物歧化酶的含量,并用病理学检查方法研究异甘草酸镁对肝损伤的保护作用,确定其保护机制与其抗自由基、提高氧化酶的活性有关。这些研究表明,异甘草酸镁保肝作用的机制是多方面的,但目前仍未有从代谢酶的角度研究异甘草酸镁保护肝脏作用的机制。

细胞色素P450酶(cytochrome P450,CYP450)是肝微粒体混合功能氧化酶中最重要的一族,在外源性物质和内源性物质的代谢中具有极其重要的作用[15]。CYP1A2的含量占CYP450酶总量的13%,在药物代谢、前致癌物激活的过程中均起着重要的作用,其活性与许多药物的疗效或毒性以及一些肿瘤的易感性密切相关[16]。CYP2E1在肝脏中占CYP450氧化酶含量的7%,参与小分子有机化合物的代谢,且主要通过催化前致癌物去烷基、去硝基等反应而使之转化为致癌物[8]。某些药物能抑制酶的表达和酶的活性,如果这些药物与其他药物联合用药时,则将会对其他药物的代谢产生影响,例如三七能够显著性抑制酒精性肝病大鼠体内CYP2E1的表达,从而减轻脂质过氧化反应,成为防治酒精性肝病的治疗方式之一[17]。因此,药物对CYP1A2及CYP2E1影响的研究一直受到药理、毒理以及药物致癌等领域的广泛关注。

本研究表明,异甘草酸镁对CCl_4引起的肝损伤大鼠肝组织中CYP1A2和CYP2E1 mRNA及蛋白表达水平均有下调作用,说明异甘草酸镁在CYP1A2及CYP2E1基因的转录和翻译过程中发挥作用,提示异甘草酸镁可能通过抑制CYP1A2和CYP2E1的表达拮抗CCl_4产生的肝毒性。笔者将在以后的实验中继续探索异甘草酸镁对CYP1A2及CYP2E1活性的影响,以期阐明其拮抗肝毒性的作用机制。

参考文献:

[1] 王巧娥,任虹,曹学丽.甘草研究开发与利用现状[J].中国农学通报,2011,27(4) 290-295.

[2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:化学工业出版社,2010:80-81.

[3] 谭亲友.甘草酸18H差向异构体及其水解产物对Ⅱ相解毒酶的影响及其机制的研究[D].长沙:中南大学,2012.

[4] KAI JC,WAN YC,XIA C,et al.Increased elimination of paclitaxel by magnesium isoglycyrrhizinate in epithelial ovarian cancer patients treated with paclitaxel plus cisplatin:a pilot clinical study[J].Eur J Drug Metab Pharmacokinets,2014,39(1):25-31.

[5] SUN L,SHEN J,PANG X,et al.Phase Ⅰ safety and sharmacokinetic study of magnesium isoglycyrrhizinate after single and multiple intravenous doses in Chinese healthy volunteers[J].J Clin Pharmacol,2007,47(6):767-773.

[6] 宋佳伟,邢蓉.异甘草酸镁的药理与临床[J].中国新药与临床杂志,2012,31(10):578-626.

[7] 刘树民,张琳,李颖,等.黄药子与当归配伍对大鼠肝脏CYP1A2、CYP2E1基因mRNA表达的影响[J].中药药

理与临床,2006,22(3):97-98.

[8] 刘恩荔,谢敏,王玉峰,等.白芍总苷在急性 CCl_4 肝损伤大鼠与正常大鼠体内的药代动力学比较研究[J].中国药学杂志,2012,47(7):534-538.

[9] Rasool M, Iqbal J, Malik A, et al. Hepatoprotective effects of silybum marianum (silymarin) and glycyrrhizaglabra (glycyrrhizin) in combination: a possible synergy[J]. Evid Based Complement Alterna Med, 2014 (3):1-9.

[10] Srungaram P, Rule JA, He JY, et al. Plasma osteopontin in acute liver failure[J]. Cytokine, 2015, 73(2): 270-276.

[11] 陈尉华,徐中南,陆伦根,等.异甘草酸镁对培养肝细胞增殖影响的实验研究[J].肝脏,2006,11(1):15-17.

[12] 董丽萍,于锋,柳静,等.异甘草酸镁对D-氨基半乳糖急性肝损伤模型小鼠的保护作用研究[J].中国药房,2006,17(12):902-904.

[13] 鲍启德,杨兰兰,王利,等.异甘草酸镁对 CCl_4 诱导小鼠急性肝损伤的保护作用[J].世界华人消化杂志,2008,16(9):1004-1007.

[14] 顾新,董丽萍,刘宇宸,等.异甘草酸镁对急性四氯化碳肝损伤小鼠保护作用的研究[J].中国药师,2009,12(1):37-39.

[15] 张小梅,冯毅凡,陈耕夫,等.细胞色素P450与中草药代谢关系的研究进展[J].广东药学院学报,2011,27(3):327-331.

[16] 李菲,程泽能.与细胞色素 P_{450} 1A2相关的药物相互作用[J].中国药房,2002,13(9):568-569.

[17] 黎艳,陈芝芸,严茂祥,等.三七对酒精性肝病大鼠肝组织CYP2E1表达的影响[J].中华中医药杂志,2011(6):1395-1398.

(收稿日期:2016-07-05;编辑:曹健)

Influence of Magnesium Isoglycyrrhizinate on Protein and mRNA Expression of CYP1A2 and CYP2E1 in Liver Tissues in Rats with Acute Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride

CHEN Xin, GE Qin, ZHANG Cai-yun, CHEN Wei-dong, YE Qian, LI Xin

(*School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Academy of Chinese Medicine, Anhui Hefei* 230012, *China*)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the influence of magnesium isoglycyrrhizinate on the protein and mRNA expression of CYP1A2 and CYP2E1 in liver tissues in rats with acute liver injury induced by carbon tetrachloride (CCl_4) and the mechanism of the liver-protecting effect of magnesium isoglycyrrhizinate from the aspect of metabolic enzymes. **Methods** Rats were randomly divided into normal control group, model group, and magnesium isoglycyrrhizinate group, with 6 rats in each group. All the rats were administered by caudal vein injection for 14 consecutive days; the rats in the magnesium isoglycyrrhizinate group were given magnesium isoglycyrrhizinate 20 mg/kg, and those in the normal control group and the model group were given normal saline of the same volume. The rats in the model group and the magnesium isoglycyrrhizinate group were given 25% CCl_4 by gavage on day 13 at 20:00 at a dose of 1.6 mL/kg to establish a rat model of acute liver injury. At 2 hours after the last administration, the rats were sacrificed via exsanguination of the iliac artery, and the liver tissues were collected to observe pathomorphological changes of the liver by hematoxylin and eosin staining. RT-PCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression of CYP1A2 and CYP2E1 in liver tissues. **Results** Liver pathology showed that magnesium isoglycyrrhizinate reduced liver injury. The model group had significantly higher protein and mRNA expression of CYP1A2 and CYP2E1 than the normal control group ($P<0.05$), and the magnesium isoglycyrrhizinate group had significantly lower protein and mRNA expression of CYP1A2 and CYP2E1 than the model group ($P<0.05$). **Conclusion** Magnesium isoglycyrrhizinate can reduce liver injury, and its attenuation mechanism may involve inhibiting the expression of CYP1A2 and CYP2E1.

[**Key words**] Magnesium isoglycyrrhizinate; Carbon tetrachloride; CYP1A2; CYP2E1; RT-PCR