

- [4] 上海中医学院:《针灸学》,98页,人民卫生出版社,1974年。
[5] 姜凯采:《上海中医学院院报》,1960年,1期,1页。
[6] 木下晴都:日本针灸治疗学会志,28(1):24,1979。
[7] R. Melzack: *Acupuncture & Electro-Therapeutics Research*, 3, 109, 1979。

- [8] D. Sabolovoc: *ibid.*, 3, 97, 1978。
[9] 中医研究院针灸研究所神经科:《中医杂志》,1979年,9期,15页。
[10] R.J. Luciani: *Am. J. Acupuncture*, 4(6), 371, 1978。

[本文于1982年4月6日收到]

肝微粒体酶诱导作用的昼夜节律

何绍雄 吴亮

(天津市药物研究所)

近年来,实验证明多种药物的药理效应和毒性反应呈现昼夜节律性以至季节节律性^[1,2]。鉴于药物的药理效应和毒性反应与其代谢过程密切相关,而肝微粒体酶的活性或/和含量将直接影响药物的代谢过程,特别某些药物在服用期间能对肝微粒体酶发生诱导作用,以致改变其代谢过程,从而影响其药理效应和毒性反应。为此,探讨药物的药理效应和毒性反应的时间节律是否与肝微粒体酶的时间节律,特别是与此酶诱导后的时间节律存在一定的内在联系,是一个值得研究的问题。本文以测定肝微粒体中的细胞色素 p-450 (简称 p-450), NADPH-细胞色素 c 还原酶(简称 Cyto. C 还原酶)和 O-去乙基酶为指标,研究以苯巴比妥和 β -萘黄酮合并诱导后肝微粒体酶的昼夜节律,为进一步研究这种节律的机制奠定基础。

材料和方法

试剂

- 1, 辅酶 II NADP, 美国 Sigma 化学公司出品。
- 2, 还原型辅酶 II NADPH, 日本东方酵母公司出品。
- 3, 7-乙氧基香豆素: 以日本化成工业公司出品之香豆素为原料, 本实验室依文献方法合成^[3]。
- 4, 葡萄糖-6-磷酸二钠 G-6-p (上海东风生化试剂厂出品)。

5, G-6-p 脱氢酶, 用啤酒酵母依文献方法制备^[4], 将以硫酸铵分级沉淀后所得的酶液用磷酸钙凝胶吸附, 其洗脱液再以硫酸铵沉淀即得所需之酶制剂。此酶制剂的活力依其将 NADP 转化为 NADPH 的量加以测定, 本实验中所用产品的活力约为 1mM/ml/分。

6, 氧化型细胞色素 c (天津生化制药厂出品), 含量为 8—10mg/ml。

7, β -萘黄酮 (日本半井化学药品公司出品)。

动物分组及诱导过程 动物均采用雄性津白 II 号纯系小鼠, 体重 20—30 克, 将动物按特定的给药和处死的时间分为三组, 其特定时间为 0700, 1500 和 2300。每组都分为两部分, 一部分为给药诱导组, 另一部分为给相应溶剂的未诱导组。各组动物在实验期间其饲养条件、环境温度及明暗变化时间等均尽量保持一致。所有各组动物均按下述方法在特定时间给药 (或溶剂), 并处死动物剖取肝脏。

诱导组动物在处死前四天的特定时间给药, 第一天腹腔注射苯巴比妥钠生理盐水溶液 (10mg/ml) 30mg/kg, 第二、三、四天均注此溶液 (20mg/ml) 60mg/kg。第三天同时加注 β -萘黄酮油溶液 (10mg/ml) 80mg/kg, 四天给药结束后, 动物空腹, 并在次日特定时间, 处死动物剖取肝脏, 称重, 然后依下法制取肝微粒体酶。

肝微粒体酶的制取 将肝脏在低温下用

1.15%KCl 溶液制成匀浆, 9,000 × g 离心 30 分, 上清液于 105,000 × g 离心 1 小时, 所得沉淀以 1.15%KCl 溶液洗涤后, 再于 105,000 × g 离心 1 小时, 将所得沉淀悬浮于介质液中, - 20℃ 保存。

蛋白质含量测定 依 Lowry 等方法进行^[5]。

p-450 含量测定 依 Johannesen 和 Dipierre 方法进行^[6], 采用差光谱法测定 p-450 的总量。

Cyto.C 还原酶的测定 依 Williams 和 Kamin 方法进行^[7]。反应体系总体积为 3ml, 其中含 0.33MKCN 0.1ml, G-6-p 脱氢酶 0.05ml, 脱氢酶反应混合液 0.4ml (以 0.25 M pH8.0 Tris-HCl 缓冲剂配制而成, 含 6.25mM MgCl₂, 7.25mM G-6-p, 3.2mM NADP), 微粒体酶 50μg (蛋白质), 氧化型细胞色素 c 0.03ml, 以 0.1M pH7.8 的磷酸缓冲液补足至总体积。

O-去乙基酶的测定 以 7-乙氧基香豆素为底物, 依 Greenlee 和 Poland 的荧光分光法进行^[8]。

实验和结果

动物肝重的昼夜节律 将各组动物在特定时间称取体重及肝重, 求其比值, 并经统计处理, 如表 1。由表可见, 各特定时间诱导组的肝重均显著高于未诱导组, 未诱导组在各特定时间组间肝重无显著差异, 而诱导组以 1500 给药的肝重显著高于其他两个时间组, 0700 及 2300 两时间组间无显著差异。

p-450 含量的昼夜节律 将制得之微粒体

表 1 动物肝重的昼夜节律* (mg 肝重/g 体重)

特 定 时 间	0700	1500	2300
未诱导组 (n = 12)	64.6±8	62.2±8	66.7±7
诱 导 组 (n = 16)	75.5±9	88.0±8	71.6±8
p	<0.05	<0.001	<0.05
p'	>0.5	>0.5	>0.5
p''	<0.05	<0.05	>0.25

*n 各组动物数
p 诱导及未诱导组各相应时间组间的显著性测定。
p' 未诱导组内相邻两时间组间的显著性测定。
p'' 诱导组内相邻两时间组间的显著性测定。

表 2 p-450 含量的昼夜节律* (n mole/mg 蛋白质)

特 定 时 间	0700	1500	2300
未诱导组 (n = 6)	0.48±0.25	0.60±0.07	0.53±0.09
诱导组 (n = 10)	1.22±0.20	1.94±0.50	1.23±0.20
p	<0.005	<0.005	<0.005
p'	>0.05	>0.05	>0.05
p''	<0.05	<0.005	>0.05

* 表中 n, p, p' 和 p'' 意义同表 1。

酶依法测定 p-450 含量, 如表 2。诱导组各特定时间组的 p-450 含量均较未诱导组显著增高; 而未诱导组各时间组间无显著差异。诱导组中以 1500 给药的 p-450 含量显著高于其他两个时间组, 而 0700 及 2300 两组间无显著差异。

O-去乙基酶活力的昼夜节律 将制得的微粒体酶依法测定其 O-去乙基酶活力, 如表 3, 诱导组各时间组的 O-去乙基酶活力均显著高于未诱导组; 而诱导及未诱导组内各时间组均以 1500 及 2300 两时间组的活力显著高于 0700 组, 1500 和 2300 两组间无显著差异。

诱导组动物 Cyto.C 还原酶的活力 将

表 3 去乙基酶活力的昼夜节律* (nmole/mg 蛋白质分)

特 定 时 间	0700	1500	2300
未诱导组 (n = 6)	0.028±0.006	0.124±0.027	0.120±0.037
诱导组 (n = 10)	0.453±0.083	0.643±0.078	0.640±0.066
p	<0.005	<0.005	<0.005
p'	<0.05	>0.05	<0.05
p''	<0.05	>0.05	<0.05

* 本表中 n, p, p' 和 p'' 意义同表 1。

表4 诱导动物各时间组的 Cyto.C 还原酶活力*

特 定 时 间	0700 (n = 6)	1500 (n = 7)	2300 (n = 8)
酶活力 (mg/mg) 蛋白质/分	1.23±0.40	1.01±0.30	1.11±0.33
p	>0.5	>0.5	>0.5

*n各组动物数, p 相邻两时间组间的显著性测定。

诱导动物的微粒体酶依法测定 Cyto.C 还原酶的活力。如表4各时间组的 Cyto.C 还原酶活力无显著差异。

讨 论

肝微粒体酶系是代谢外源性物质,例如药物的重要据点,多数药物及其他外源性物质,如食品添加剂,杀虫剂,防腐剂等均由此酶系转化为极性较大的物质以便排出体外。此酶系的主要组成部分为一种黄素蛋白,即 NADPH-细胞色素 c 还原酶和总称为细胞色素 p-450 的一组色素蛋白。因此,探讨这两种成份的昼夜节律,就可比较全面的了解肝微粒体酶系的节律特征。鉴于去烷基反应是药物代谢过程中的重要反应,且肝微粒体酶系存在着多种形式及广泛的底物,因此同时测定 O-去乙基酶活力的节律将有助于进一步了解肝微粒体酶系中 p-450 含量的节律变化与各具体药物代谢酶的节律变化之间的关系。我们所以考虑选用以 7-乙氧基香豆素为底物的 O-去乙基酶作为指标,主要是由它对诱导作用具有较高敏感性^[8]。

文献指出^[9],苯巴比妥及 β-萘黄酮能诱导不同类型的 p-450,我们采用两者混合诱导以尽量保证不同类型的 p-450 得到诱导并反映出其节律的变化。

实验表明,正常小鼠的肝重及 p-450 含量均无昼夜节律性,但如以苯巴比妥及 β-萘黄酮诱导后,除其肝重及 p-450 含量均较未诱导组显著增高外,并呈现以 1500 时间组为最高的显著的昼夜节律。由于肝微粒体酶的诱导作用与肝增大是伴存的偶联发生的现象^[10],表示不但提高了酶的活力而且也同时促进蛋白的合成,这样诱导后肝重及 p-450 含量出现同样的昼

夜节律,似可说明肝微粒体酶在外界因素的诱导下,其酶蛋白的合成具有昼夜节律性。

O-去乙基酶活力的昼夜节律与肝重和 p-450 含量不同,不论是否诱导,0700 时间组的活力均较 1500 和 2300 显著为低,说明在肝微粒体酶中 p-450 含量的节律变化并不能反映各具体药物代谢酶的节律变化。

Cyto.C 还原酶在药物氧化代谢过程中的作用是氧化 NADPH 为 NADP⁺,并将一个电子转移到已与药物底物发生过作用的氧化型 p-450 上,从而促成 p-450 对药物底物的羟化作用。鉴于诱导后的 Cyto.C 还原酶的活力并不呈现相应的昼夜节律,因此我们推测,在肝微粒体酶中此酶可能还对药物底物的氧化反应起一定的调节和限制作用。

鉴于多种药物对肝微粒体酶具有诱导作用,因之在一定时间内反复使用这类药物时必须注意由于其诱导作用的时间节律所致的对疗效和毒副作用的影响,在新药研究中,由于药物的药理效应和毒性反应常首先在啮齿类动物中进行试验,可以设想,单纯使用均分法给药进行研究时,可能由于时间节律的存在而难以得到理想的结果。

参 考 文 献

- [1] Delbarre, F. et al.: *Adv. Biosci.*, 19, 15, 1979.
- [2] Markiewicz, A. et al.: *Int. J. Pharmacol. Biopharm.*, 17, 409, 1979.
- [3] Ullrich, V. and Weber, P.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 353, 1171, 1972.
- [4] Colowick, S. P. and Kaplan, N. O.: *Methods in Enzymology*, Vol. 1, 323, Academic Press, 1955.
- [5] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193, 256, 1951.
- [6] Johannesen, K. A. M. and Depierre, L. W.: *Anal. Biochem.*, 86, 725, 1978.
- [7] William, C. H. and Kamin, H.: *J. Biol. Chem.*, 237, 587, 1962.
- [8] Greenlee, W. F. and Poland, A.: *J. Pharmacol. and Exp. Therap.*, 205, 596, 1978.
- [9] Haugen, D. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, 251, 1817, 1976.
- [10] Manen, C. et al.: *Biochem Pharmacol.*, 27, 219, 1978.

[本文于1982年8月26日收到]