

木犀草素对大鼠肝肾组织中11 β -羟基类固醇脱氢酶的影响

邓 斌, 洪晓丹, 姚秋燕, 韦炳华

(中山大学附属第一医院药学部, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】考察木犀草素对大鼠组织11 β -羟基类固醇脱氢酶(11 β -HSD)基因表达、蛋白表达和酶活性的影响。【方法】24只雄性大鼠随机分为4组,称重后灌胃给予1%羧甲基纤维素钠溶液或木犀草素低(5 mg/kg)、中(10 mg/kg)、高(20 mg/kg)剂量组连续14 d后,取肝、肾等糖皮质激素靶组织,采用定量RT-PCR法测定大鼠肝肾组织11 β -HSD I及11 β -HSD II基因表达,Western Blot法测定大鼠肝肾组织11 β -HSD I和11 β -HSD II蛋白表达,以代谢产物泼尼松、泼尼松龙的生成速率表示酶活性。【结果】木犀草素显著诱导肝脏组织11 β -HSD I基因表达,抑制11 β -HSD II基因表达;显著抑制肾脏11 β -HSD I基因表达,诱导11 β -HSD II基因表达。木犀草素给药组对肝11 β -HSD I蛋白表达呈明显的上调趋势,对肝11 β -HSD II蛋白表达呈明显的下调趋势;对肾11 β -HSD II蛋白表达呈明显的上调趋势,对肾11 β -HSD I蛋白表达呈明显的下调趋势。木犀草素明显诱导肝11 β -HSD I、肾11 β -HSD II活性。【结论】木犀草素可通过影响大鼠肝肾组织中11 β -HSD I和11 β -HSD II基因表达、蛋白表达和酶活性,影响糖皮质激素体内活化及肝肾组织中激素水平。

关键词:木犀草素;11 β -羟基类固醇脱氢酶;基因表达;蛋白表达;酶活性

中图分类号:R9

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2017)05-0685-08

Effect of Luteolin on 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase in Rat Liver and Kidney

DENG Bin, HONG Xiao-dan, YAO Qiu-yan, WEI Bing-hua

(Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Corresponding to: WEI Bing-hua; E-mail: 352045963@qq.com

Abstract: 【Objective】 To investigate the effect of Luteolin on mRNA expression, protein expression and enzyme activity of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (11 β -HSD) in rats. 【Methods】 Twenty-four rats were randomly divided into 4 groups and orally administrated with vehicle (1% CMC-Na solution) or Luteolin (5, 10 or 20 mg/kg daily) for 14 days. Gene expression of 11 β -HSD I and 11 β -HSD II in liver and kidney was determined with quantitative RT-PCR method. Protein expression was determined with quantitative Western Blot method. The enzyme activity was expressed as the production rate of metabolites of prednisone and prednisolone. 【Results】 Luteolin significantly induced gene expression of 11 β -HSD I and inhibited gene expression of 11 β -HSD II in liver tissues, significantly inhibited gene expression of 11 β -HSD I and induced gene expression of 11 β -HSD II in kidney tissues. Luteolin obviously up-regulated protein expression of 11 β -HSD I and down-regulated protein expression of 11 β -HSD II in liver tissues, down-regulated protein expression of 11 β -HSD I and up-regulated protein expression of 11 β -HSD II in kidney tissues. Luteolin significantly induced activity of 11 β -HSD I in liver and 11 β -HSD II in kidney. 【Conclusions】 Luteolin could change the activity of corresponding enzyme through affecting gene expression, protein expression and enzyme activity of 11 β -HSD I and 11 β -HSD II in liver and kidney tissues in rat, and affect in vivo activation of glucocorticoids and hormone level in liver and kidney.

Key words: luteolin; 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase; gene expression; protein expression; enzyme activity

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(5): 685-692]

收稿日期: 2017-02-15

基金项目: 广东省中医药局项目(20131145)

作者简介: 邓斌, 硕士, 主管药师, 研究方向: 药理学, E-mail: 2429793286@qq.com; 韦炳华, 通信作者, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 药理学, E-mail: 352045963@qq.com

糖皮质激素包括内源性的由肾上腺皮质分泌的一类甾体激素(主要是皮质醇)和人工合成药物(包括泼尼松、地塞米松等),具有调节糖、脂肪和蛋白质的生物合成和代谢的作用^[1]。糖皮质激素体内代谢途径涉及CYP3A羟化代谢、P-gP转运、葡萄糖醛酸化代谢和11 β -羟基类固醇脱氢酶(11 β -HSD)代谢,其中11 β -HSD是最重要的代谢酶。泼尼松口服给药后,经肠道吸收后在肝脏转化为活性代谢物泼尼松龙,这是由11 β -HSD催化的可逆反应^[2-3]。11 β -HSD催化糖皮质激素C11位的酮基和羟基间的氧化还原反应,在人类使有生物活性的皮质醇与无活性的11-脱氢皮质酮(可的松)相互转化,在啮齿类动物,则催化皮质酮与脱氢皮质酮之间的转化,当使用外源性糖皮质激素时,可催化泼尼松与泼尼松龙之间的转化^[4-5]。11 β -HSD有两种亚型:11 β -HSD I和11 β -HSD II。本实验室前期研究^[6]得出丹墨胶囊与醋酸泼尼松合用时,可显著影响泼尼松、泼尼松龙局部组织浓度,促进肝组织中泼尼松的活化代谢,提高脾、胸腺等淋巴器官中泼尼松龙浓度,降低肾、脂肪组织中泼尼松龙浓度。丹墨胶囊可以影响肝肾11 β -HSD的基因表达,由于丹墨胶囊成分复杂,其对糖皮质激素代谢酶11 β -HSD I和11 β -HSD II的诱导或抑制存在相当复杂的机制^[7]。而墨早莲(丹墨胶囊君药)在临床上发挥激素减量作用的药理学基础,在提高激素的免疫抑制作用的同时,可以减少诸如水钠潴留、高血压、脂肪重新分布等不良反应;墨早莲提取物与醋酸泼尼松合用时,还能通过影响11 β -HSD,影响糖皮质激素的体内活化/失活,从而影响糖皮质激素的临床疗效^[8]。木犀草素(Luteolin,化学式:C₁₅H₁₀O₆,相对分子质量:286.23,化学结构见图1)是墨早莲中的重要黄酮成分,木犀草素可能通过影响11 β -HSD从而影响糖皮质激素的体内活化/失活,进而影响糖皮质激素的临床疗效。因此,从丹墨胶囊中选出作用确切的活性单体,进一步研究和探讨活性单体对大鼠肝、肾组织11 β -HSD的影响,为下一步开发高选择性糖皮质激素代谢酶诱导剂或抑制剂提供依据,具有一定的临床意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级SD健康大鼠,雄性200~250g,购自

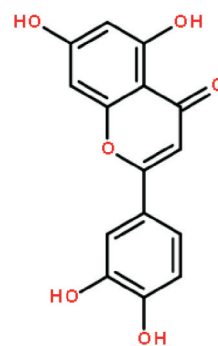


图1 木犀草素结构式

Fig.1 The structural formula of luteolin

广东省医学实验动物中心,实验动物许可证号:SCXK(粤)2008-0002,质量合格号:0090790。动物室内温度20~25℃,相对湿度40%~70%,换气次数10~15次/h,保持12h光照循环,饲养期间自由饮水进食,提供实验室标准动物饲料,符合我国《实验动物管理条例》和《医学实验动物管理实施细则》。24只大鼠随机分为4组,称重后给予1%羧甲基纤维素钠溶液(CMC-Na)或木犀草素-CMC-Na混悬液低、中、高三个剂量组(5、10、20mg/kg)灌胃14d后处死大鼠,立即取肝、肾等糖皮质激素靶组织,用冰冻生理盐水冲洗至无血色,于液氮中保存备用。

1.2 药物和试剂

木犀草素原料药(含量>98%,批号:XC071225,西安小草植物科技有限公司);泼尼松(含量>98%,批号:200-020-5,美国Sigma公司);泼尼松龙(含量>98%,批号:200-021-7,美国Sigma公司);地塞米松(含量>95%,批号:200-003-9,美国Sigma公司);羧甲基纤维素钠(批号:MKAA1662,美国Sigma-Aldrich公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型,碧云天生物技术研究);兔抗人11 β -HSD I一抗、兔抗人11 β -HSD II一抗(Abcam公司);鼠抗人GAPDH一抗(美国Santa Cruz公司);羊抗鼠二抗(武汉博士德生物工程有限公司);羊抗兔二抗(美国cell signaling公司);Western一抗稀释液、Western二抗稀释液、Western一抗二抗去除液、显影定影试剂盒(碧云天生物技术研究)。甲醇为色谱纯;其余试剂均为国产分析纯。

1.3 HPLC法的建立和验证

1.3.1 仪器和色谱条件 Waters高效液相色谱仪(600型低压梯度泵,717型自动进样器,2489型

紫外检测器, Empower 色谱工作站), 美国 Waters 公司。色谱柱: Nucleodur 100-5 C18 (5 μm , I.D. 4.6 mm \times 250 mm); 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 紫外检测波长: 240 nm; 流动相: (A) 甲醇: 0.2% 磷酸水溶液 (体积比 55:45), (B) 乙腈; 流速: 1 mL/min; 进样时间: 35 min。

1.3.2 生物样本处理 精密量取大鼠血浆或组织匀浆 100 μL , 置 1.5 mL 塑料离心管中, 加入内标溶液 20 μL , 涡旋 30 s 混匀。加入 0.1 mol/L NaOH 溶液 20 μL , 涡旋 1 min。加入乙酸乙酯 600 μL , 涡旋 1 min, 12 000 $\times g$ 离心 10 min, 吸取上清液至另一干净离心管, 40 $^{\circ}\text{C}$ 下 N_2 吹干。残渣以纯乙腈 20 μL 溶解, 涡旋 1 min, 12 000 $\times g$ 离心 10 min, 取上清液 10 μL 进样。

1.3.3 方法验证 HPLC 法通过专属性验证, 如标准曲线线性、精确度、准确度、回收率等。预期的保留时间内对分析物和内标没有明显的干扰。大鼠组织内的分析物浓度在线性范围内线性良好。日间和日内精确度和准确度符合要求。因此, 经验证结果满意, 可满足泼尼松和泼尼松龙的浓度测定。

1.4 采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定微粒体蛋白质浓度

取浓度为 5 mg/mL 的蛋白标准品适量, 用生理盐水稀释至终浓度 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 按体积比 50:1 BCA 试剂 A 与 B 配制适量 BCA 工作液, 充分混匀。将标准品按 0、1、2、4、8、12、16、20 μL 加到 96 孔板的标准品孔中, 加生理盐水补足至 20 μL , 加适当体积样品到 96 孔板的样品孔中, 加生理盐水补足至 20 μL , 各孔加入 BCA 工作液 200 μL , 室温放置 2 h。于 562 nm 测定吸光度, 以蛋白浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标绘制标准曲线。根据标准曲线计算出肝、肾微粒体蛋白浓度。

1.5 大鼠肝肾微粒体制备

大鼠用乙醚施予安乐死, 立即取出肝脏、肾脏用冰冻生理盐水冲洗, 分别称重后均匀分为几部分, 用 4 $^{\circ}\text{C}$ 的蔗糖溶液洗涤数次, 按 1:2 体积比加入蔗糖溶液, 在冰浴中制成匀浆, 匀浆液转移至离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$, 16 000 $\times g$ 离心 20 min。取上清液 4 $^{\circ}\text{C}$, 100 000 $\times g$ 超速离心 60 min。弃上清液。取沉淀用焦磷酸钾溶液洗涤一次, 混悬均匀, 再次于 4 $^{\circ}\text{C}$, 100 000 $\times g$ 超速离心 60 min。弃上清液, 沉淀用 2 倍的含 20% 甘油的 Tris-HCl 缓冲液重悬, 分装, 80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.6 微粒体孵化

为了获取肝肾中强的松/强的松龙最理想的代谢条件, 孵化时间和微粒体浓度, 观察培养时间和微粒体浓度对大鼠肝肾中强的松微粒体代谢的影响。

肝微粒体孵育条件: 孵育体系总体积 200 μL 。取 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的大鼠肝微粒体溶液 20 μL , 加入 2.79 mmol/L 泼尼松标准液 20 μL (反应底物) 和 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 140 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预孵 5 min。加入 1 mmol/L NADPH 20 μL 启动反应, 25 min 后, 按 1:3 体积比加入甲醇 600 μL 终止反应。

肾微粒体孵育条件: 孵育体系总体积 200 μL 。取 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的大鼠肾微粒体溶液 20 μL , 加入 2.77 mmol/L 泼尼松龙标准液 20 μL (反应底物) 和 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 140 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预孵 5 min。加入 1 mmol/L NADP+ 20 μL 启动反应, 45 min 后, 按 1:3 体积比加入甲醇 600 μL 终止反应。

1.7 大鼠微粒体蛋白浓度对代谢的影响

在不同蛋白浓度的肝微粒体酶中加入泼尼松, 在孵育体系经 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴孵育 25 min 后, 考察代谢物生成量与肝微粒体蛋白浓度的关系, 结果表明, 在 1~5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 范围内, 随着蛋白浓度的增加, 代谢产物泼尼松龙的生成量呈线性增加。选定 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的微粒体蛋白浓度为最佳孵育蛋白浓度。

在不同蛋白浓度的肾微粒体酶中加入泼尼松龙, 在孵育体系经 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴温孵 25 min 后, 考察代谢物生成量与肾微粒体蛋白浓度的关系, 结果表明, 在 0.5~3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 范围内, 随着蛋白浓度的增加, 代谢产物泼尼松的生成量呈线性增加。选定 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的微粒体蛋白浓度为最佳孵育蛋白浓度。

大鼠肝/肾微粒体温孵液 200 μL , 加入 2.55 mmol/L 的内标地塞米松标准液 10 μL 及甲醇 600 μL , 涡旋 1 min, 12 000 $\times g$ 离心 5 min, 取上清液 10 μL 进样进行肝、肾微粒体 HPLC 分析。

1.8 实时荧光定量 PCR 法

称取 100 mg 组织, 加入 1 mL Trizol 试剂在冰上进行研磨, 装于 1.5 mL 离心管中; 颠倒混匀 10 下, 室温放置 5 min, 加入 200 μL 三氯甲烷, 颠倒混匀 15 s, 室温放置 5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\times g$ 离心 15

min, 转上层水相于另一 1.5 mL 离心管中, 加入 400 μ L 异丙醇, 上下混匀 10 下, 室温静置 10 min; 4 $^{\circ}$ C, 12 000 $\times g$ 离心 10 min, 弃上清, 管底可见少许白色沉淀物(为 RNA), 加入预冷的 75% 乙醇 1 mL, 漂洗, 然后 4 $^{\circ}$ C, 7 500 $\times g$ 离心 5 min; 弃上清, 加入预冷的 75% 乙醇 1 mL 反复漂洗 2~3 次; 弃去上清, 室温放置 10 min, 使 RNA 干燥, 加入 DEPC 水 20 μ L 溶解 RNA, 测定 RNA 浓度及纯度后用于荧光定量 RT-qPCR 实验。按 Takara 的 PrimeScript RT reagent Kit 试剂盒说明操作, 采用荧光定量 RT-qPCR 法测定大鼠各组织中 11 β -HSD I 和 11 β -HSD II 表达, 以 β -actin 为内参照, 引物序列见表 1。cDNA 合成逆转录条件为: 37 $^{\circ}$ C 15 min 进行反转录反应, 85 $^{\circ}$ C 5 s 进行反转录酶失活反应, 反应后冷却至室温, 置 -20 $^{\circ}$ C 保存。RT-PCR 扩增采用两步法, 具体反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 反复循环 40 次 \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 h, 95 $^{\circ}$ C 15 s。Light Cycler 2.0 Real-Time Detection System (Roche, Hercules, CA, USA)。定量 PCR 扩增后得到各基因的 CT 值, CT 值是每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数, 一般起始拷贝数越多, CT 值越小。

1.9 免疫印迹

用免疫印迹杂交 (Western blot) 法检测大鼠肝、肾 11 β -HSD I、11 β -HSD II 蛋白的表达。称取 100 mg 组织, 加入 1 mL RIPA 裂解液和 10 μ L PMSF, 在冰上匀浆, 然后 4 $^{\circ}$ C, 21 200 $\times g$ 离心 30 min, 将上清转移至 1.5 mL 离心管中得到蛋白样品; 通过 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白样品浓度。取蛋白匀浆液离心后的上清液 400 μ L, 然后按体积比 1:4 加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5 \times) 100 μ L, 100 $^{\circ}$ C 水浴中煮沸 5 min, 使其蛋白完全变性, 然后样品放于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用; 采用

聚丙烯酰胺凝胶电泳, 待样品中的溴酚蓝迁移至胶的前沿时, 停止电泳, 取出两块胶板, 去除积层胶, 取出凝胶, 进行电转移 (100 V 转移 60 min), PVDF 膜需事先在甲醇中浸泡 10 min 中活化; 电转移后, 倒掉封闭液, 用 TBST 略洗一下, 加入用 Western 一抗稀释液按比例稀释的一抗 (11 β -HSD I 1:800, 11 β -HSD II 1:1000, GAPDH 1:500), 4 $^{\circ}$ C 过夜。回收一抗, PVDF 膜浸 TBST 中, 平播 5 min, 连续 3 次, 清洗膜上残余一抗; 倒掉洗膜液, 加入用 Western 二抗稀释液按比例稀释的二抗 (羊抗鼠 1:10 000, 羊抗兔 1:4 000), 于水平摇床上杂交 1 h。取出 PVDF 膜, 用 TBST 洗 3 次, 每次 5 min。最后进行化学发光反应 (ECL)。每组样品进行三次电泳, 用于重复验证结果。将胶片与 Marker 条带对比, 确定目的条带位置。完成 Western 化学发光检测后, 分别使用 GAPDH 一抗和羊抗鼠二抗进行 GAPDH 蛋白检测。

1.10 数据处理

采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因的相对表达量:

将 X 光胶片用 Image J 软件分析得到各蛋白条带的灰度值, 将各灰度值按以下方法计算: 目的蛋白的相对灰度值 = 目的蛋白的灰度值/内参蛋白 (GAPDH) 的灰度值; 目的蛋白的相对表达量 = 样品的相对灰度值/空白的相对灰度值。

大鼠肝、肾微粒体温孵液进行 HPLC 分析, 根据标准曲线计算泼尼松、泼尼松龙的浓度, 以代谢产物 (泼尼松、泼尼松龙) 生成量/反应时间计算每单位蛋白的药物生成速率 ($\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) 表示酶活性。

所有数据以均值和标准差 ($\text{mean} \pm \text{SD}$) 表示。统计学方法采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。数据处理软件为 SPSS 17.0 统计学软件 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)。

表 1 引物序列表
Table 1 Sequence of primers

Gene	Primer
11 β -HSD I	5'-TGACCAAGGTCAAGGTGTCCA-3'
	5'-ATGATCTCCAGGGCGCATTC-3'
11 β -HSD II	5'-GACCTTAGCCCCGTGTAGATG-3'
	5'-GGCAGGTAGTGGTGGATGAAA-3'
β -actin	5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'
	5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'

2 结果

2.1 肝肾组织及血液的糖皮质激素水平

大鼠分别给予各剂量木犀草素灌胃给药14 d后灌胃给予单剂量醋酸泼尼松42 mg/kg,与单用醋酸泼尼松相比,合用木犀草素及醋酸泼尼松肝组织中0.5 h、4 h泼尼松浓度均显著降低,而0.5 h肝组织泼尼松龙浓度则显著升高。与单用醋酸泼尼松相比,合用木犀草素及醋酸泼尼松肾组织中0.75 h、4 h泼尼松浓度均显著升高,而0.75 h肾组织泼尼松龙浓度则显著减少(表2)。木犀草素高中低三个剂量组均不同程度升高泼尼松龙的血药峰浓度,其中高、中剂量组泼尼松龙的血药峰浓度显著升高(图2)。

2.2 木犀草素对大鼠肝肾组织中11β-羟基类固醇脱氢酶基因表达的影响

木犀草素显著诱导肝脏11β-HSD I基因表达,5、10、20 mg/kg组与对照组相比,肝脏11β-HSD I基因表达分别提高了29%、20%和70%;抑制肝脏11β-HSD II基因表达,5、10、20 mg/kg组肝脏11β-HSD II基因表达分别比对照组降低45%、41%和70%。木犀草素显著抑制肾脏11β-HSD I基因表达($P < 0.05$),5、10、20 mg/kg组与对照组相比,分别降低了17%、23%和26%;显著诱导11β-HSD II的基因表达($P < 0.01$),5、10、20 mg/kg组分别比对照组升高42%、46%和41%(图3)。

2.3 木犀草素对大鼠肝肾组织中11β-羟基类固醇脱氢酶蛋白表达的影响

木犀草素对肝、肾组织中11β-HSD蛋白表达量均有显著影响。5、10、20 mg/kg木犀草素使大鼠肝组织11β-HSD I蛋白表达升高26%、49%、66%,11β-HSD II蛋白表达降低24%、34%、56%;

表2 大鼠灌胃给予木犀草素(10 mg/kg)14 d后口服单剂量泼尼松(42 mg/kg),肝肾组织中泼尼松与泼尼松龙浓度
Table 2 The tissue concentration of prednisone and prednisolone following a single oral administration of prednisone acetate (42 mg/kg) to rats intragastrically administered with luteolin (10 mg/kg) for 14 days (ng/g, n = 3)

t/h	0.5		0.75		4.0		F	P
	Control	Luteolin	Control	Luteolin	Control	Luteolin		
Prednisone								
Liver	28.1 ± 9.6	10.7 ± 4.9 ²⁾	14.7 ± 2.7	20.2 ± 8.6	14.5 ± 2.6	5.6 ± 3.8 ¹⁾	5.06	0.01
Kidney	15.6 ± 0.7	17.1 ± 3.9	23.3 ± 6.8	56.6 ± 14.9 ²⁾	19.7 ± 3.3	37.8 ± 11.9 ²⁾	3.78	0.02
Prednisolone								
Liver	100.8 ± 19.6	154.5 ± 24.9 ¹⁾	225.2 ± 41.2	285.9 ± 32.1	143.8 ± 61.7	111.3 ± 28.3	2.59	0.04
Kidney	10.1 ± 4.8	8.6 ± 3.9	146.6 ± 11.6	105.7 ± 25.4 ¹⁾	/	/	1.31	0.05

1) $P < 0.05$ vs control. Data are mean ± SD; 2) $P < 0.01$ vs control. Data are mean ± SD

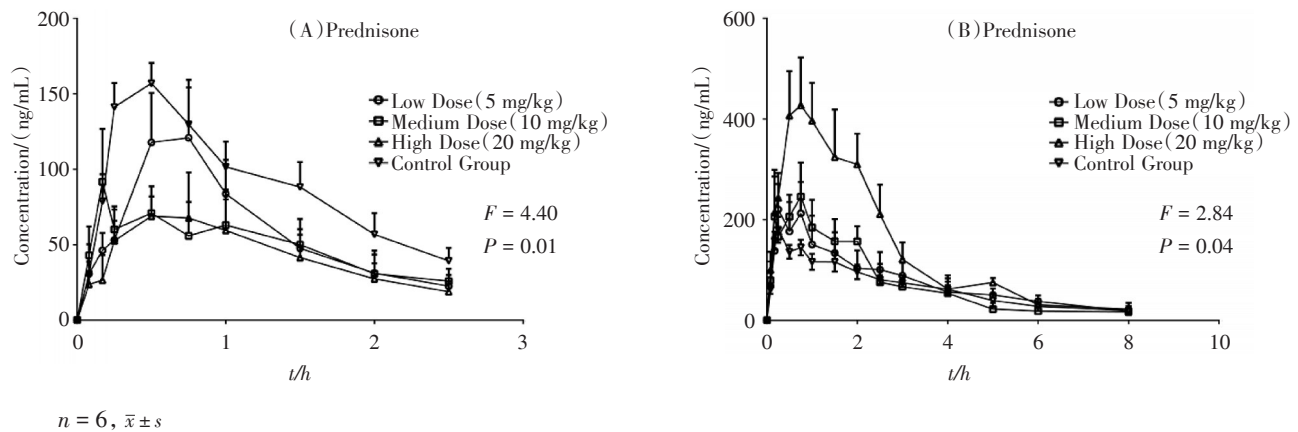
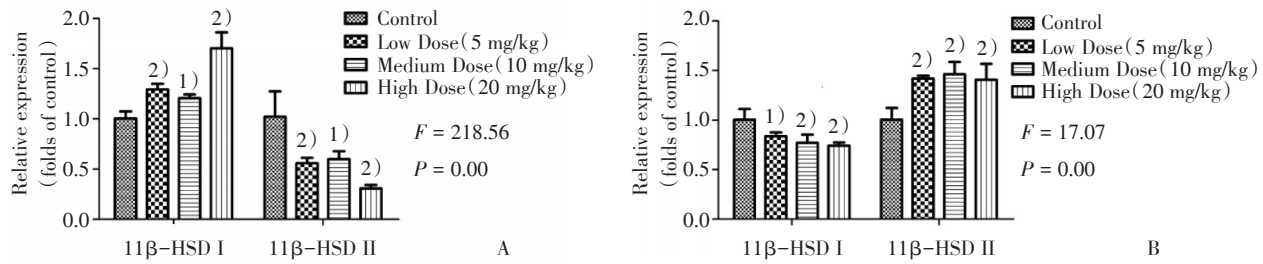


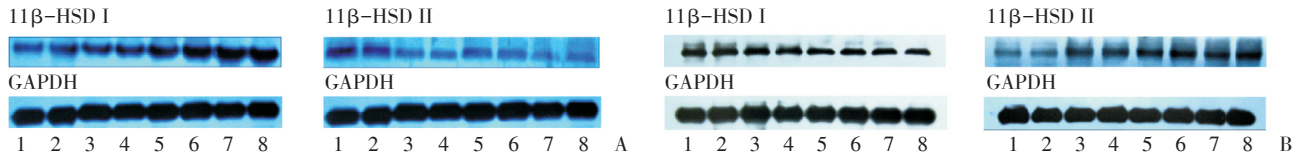
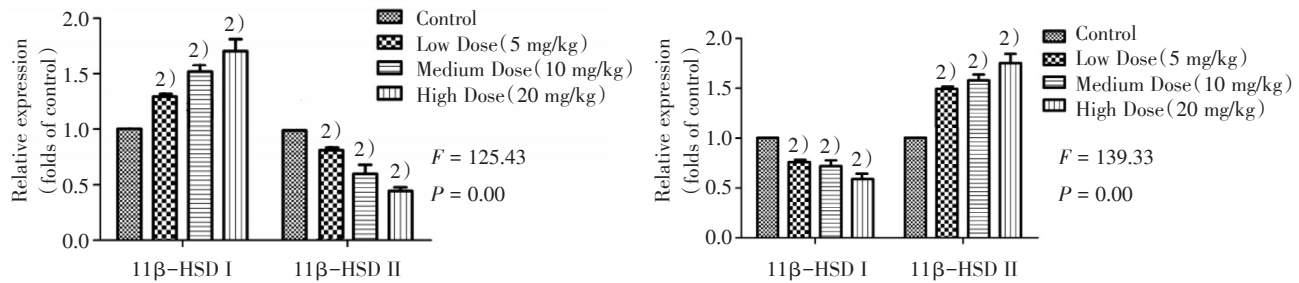
图2 大鼠灌胃给予木犀草素(5, 10, 20 mg/kg)14 d后口服单剂量泼尼松(42 mg/kg),泼尼松(A)与泼尼松龙(B)血药浓度
Fig.2 Plasma profile of prednisone (A) and prednisolone (B) following a single oral administration of prednisone acetate (42 mg/kg) to rats intragastrically administered with luteolin (5, 10, 20 mg/kg) for 14 days



Rats were orally administrated with vehicle (CMC-Na) or Luteolin (5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg) for 14 days. Liver(A) and kidney(B) were harvested and then 11β-HSD I and 11β-HSD II mRNA were analyzed. Data are expressed as fold change over the control group (mean ± SD, $n = 6$) 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ vs control.

图3 木犀草素对大鼠肝(A)、肾(B)组织11β-HSD I和11β-HSD II基因表达的影响

Fig.3 Effects of Luteolin on the gene expression of 11β-HSD I and 11β-HSD II in rat liver (A) and kidney (B)



Rats were orally administrated with vehicle (CMC-Na) or Luteolin (5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg) for 14 days. Liver(A) and kidney(B) were harvested and then 11β-HSD I and 11β-HSD II protein levels were analyzed. Data are expressed as fold change over the control group (mean ± SD, $n = 6$). 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ vs control. 1, 2: control group; 3, 4: Luteolin 5 mg/kg; 5, 6: Luteolin 10 mg/kg; 7, 8: Luteolin 20 mg/kg.

图4 木犀草素对大鼠肝(A)、肾(B)组织11β-HSD I和11β-HSD II蛋白表达的影响

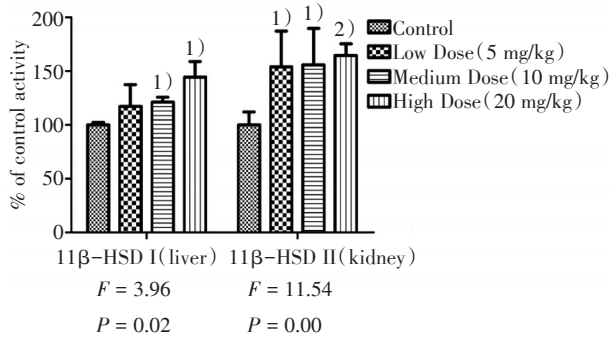
Fig.4 Effects of Luteolin on the protein expression of 11β-HSD I and 11β-HSD II in rat liver (A) and kidney (B)

肾组织11β-HSD II蛋白表达升高47%、55%、84%，11β-HSD I蛋白表达降低32%、37%、47%。木犀草素对11β-HSD蛋白表达的影响存在浓度依赖性，高剂量组作用最显著。因此，木犀草素对肝11β-HSD I蛋白表达呈明显的上调趋势，对11β-HSD II蛋白表达呈明显的下调趋势；对肾11β-HSD II蛋白表达呈明显的上调趋势，对11β-HSD I蛋白表达呈明显的下调趋势(图4)。

2.4 木犀草素对大鼠肝肾组织中11β-羟基类固醇脱氢酶活性的影响

与阴性对照组比，木犀草素灌胃后大鼠肝11β-HSD I酶活性均有所升高，低、中、高剂量组

酶相对活性分别为(117.3 ± 20.1)%、(121.3 ± 4.4)%、(144.4 ± 14.5)%，中、高剂量组与阴性对照组间差异统计学意义($P < 0.05$)；肾11β-HSD II酶活性均有所升高，低、中、高剂量组酶相对活性分别为(153.9 ± 33.3)%、(155.9 ± 33.9)%、(164.5 ± 10.9)%，低、中、高剂量组与阴性对照组间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。因此，木犀草素明显诱导肝11β-HSD I、肾11β-HSD II活性，以高剂量木犀草素诱导作用最强。木犀草素对大鼠肝/肾微粒体11β-HSD活性的影响，说明木犀草素可通过11β-HSD酶影响泼尼松、泼尼松龙的体内代谢，调节局部组织浓度。(图5，表3)。



Rats were orally administrated with vehicle (CMC-Na) or Luteolin (5, 10, 20 mg/kg) for 14 days. Liver and kidney microsomes were isolated and then 11β-HSD I and 11β-HSD II enzyme activities were analyzed. Data are expressed as fold change over the control group (mean ± SD, n = 6). 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ vs control.

图5 木犀草素对大鼠肝11β-HSD I和肾11β-HSD II酶活性的影响

Fig.5 Effects of Luteolin on the enzyme activity of 11β-HSD I in liver and 11β-HSD II in kidney

3 讨论

3.1 对照组的选择

大鼠灌胃时以羧甲基纤维素钠溶液作为对照组,是由于木犀草素难溶于水,用CMC-Na做成混悬剂,分散均匀,可以保证给药剂量准确。

3.2 底物的选择

11β-HSD I可催化泼尼松转化为泼尼松龙,11β-HSD II可催化泼尼松龙转化为泼尼松,两者均具有特异性,因此,泼尼松和泼尼松龙可作为

11β-HSD I、11β-HSD II酶活性测定的底物。11β-HSD I主要存在于肝脏组织,而11β-HSD II在肾脏组织中的含量比较高,虽然肝、肾组织中也分别有少量的11β-HSD II、11β-HSD I的存在,但因其含量非常低,对考察待测目的酶的活性并没有明显的影响。

3.3 测定结果的意义

RT-PCR、Western blot及体外酶活性测定结果表明,木犀草素与墨旱莲提取物类似,对11β-HSD I和11β-HSD II在转录和蛋白质表达水平都可发挥作用,可通过诱导肝11β-HSD I和肾11β-HSD II的mRNA和蛋白表达,影响到肝11β-HSD I和肾11β-HSD II酶活性,从而影响肝、肾组织中泼尼松龙与泼尼松相互转化。但尚不能排除墨旱莲提取物所含化学成分及其体内代谢物对肝11β-HSD I和肾11β-HSD II酶活性的直接抑制作用。

木犀草素对肝11β-HSD I基因表达、蛋白表达的上调作用不及墨旱莲提取物,但对肝11β-HSD I酶活性的诱导作用强于墨旱莲提取物,可能与墨旱莲提取物中多种化学成分对11β-HSD I酶活性的共同作用有关。

临床病例及动物模型均证实^[9],肾病综合征患者体内肝脏泼尼松活化代谢减弱,泼尼松龙血药浓度低于正常人,从而影响激素疗效。同时肾11β-HSD II活性减少且不能使失活糖皮质激素起效,引起水钠潴留、高血压和其他盐皮质激素样不良反应。木犀草素可诱导肝11β-HSD I活性,依次促进激素代谢活化,增加强的松龙血浆浓度,

表3 灌胃给予木犀草素(5, 10, 20 mg/kg) 14 d对大鼠肝肾泼尼松(2.79 mmol/L)、泼尼松龙(2.77 mmol/L)代谢的影响
Table 3 The effect of luteolin (5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg) on the metabolism of prednisone(2.79 mmol/L) and prednisolone(2.77 mmol/L) in rat liver and kidney microsomes, respectively, after 14 days treatment

Treatment	Activities of enzymes (pmol ⁻¹ ·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)	
	11β-HSD I(liver microsomes)	11β-HSD II(kidney microsomes)
Control	383.8 ± 9.0	22.6 ± 2.7
Luteolin(mg/kg)		
5	450.2 ± 77.2	35.3 ± 7.7 ¹⁾
10	465.5 ± 17.0 ¹⁾	36.4 ± 7.8 ¹⁾
20	554.3 ± 55.5 ¹⁾	37.2 ± 2.5 ²⁾
F	3.96	11.54
P	0.02	0.00

n = 6, 1) $P < 0.05$ vs control. Data are mean ± SD; 2) $P < 0.01$ vs control. Data are mean ± SD

提高激素功效。此外,木犀草素可通过诱导肾11 β -HSD II加速强的松龙在肾中失活,减少盐皮质激素类强的松龙诱导的不良反应,应是临床上墨旱莲降低糖皮质激素的盐皮质激素样不良反应机制之一。因此,联合应用木犀草素和强的松龙治疗肾脏疾病可加速强的松龙失活同时减少激素不良反应。

糖皮质激素疗效及不良反应,与靶细胞内的激素浓度明显相关。墨旱莲与醋酸泼尼松合用时,促进肝组织中泼尼松的活化代谢,降低肾组织中泼尼松龙浓度,是墨旱莲在临床上发挥激素减量作用的药动学基础,在提高激素的免疫抑制作用木犀草素对大鼠肝肾微粒体11 β -HSD的影响与墨旱莲相似,显示木犀草素联合应用强的松治疗肾病综合症中可能的临床价值。

参考文献

- [1] Rose JQ, Yurchak AM, Jusko WJ. Dose dependent pharmacokinetics of prednisone and prednisolone in man [J]. *J Pharmacokinet Biopharm*, 1981, 9(4): 389-417.
- [2] Conti M, Frey FJ, Escher G, et al. Renal handling of prednisolone/prednisone: effect of steroid dose and 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 1994, 9(11): 1622-1628.
- [3] Pickup ME. Clinical pharmacokinetics of prednisone and prednisolone [J]. *Clin Pharmacokinet*, 1979, 4(2): 111-128.
- [4] Stewart PM, Krozowski ZS. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase [J]. *Vitam Horm*, 1999, 57(3): 249-324.
- [5] Quinkler M, Oelkers W, Diederich S. Clinical implications of glucocorticoid metabolism by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases in target tissues [J]. *Eur J Endocrinol*, 2001, 144(2): 87-97.
- [6] Ren B, Wei BH, Li RM, et al. Study on the Pharmacokinetics Drug-drug Interaction of Danmo Capsules with Prednisone in Rats [J]. *Int J Pharmacol*, 2013, 9(2): 164-169.
- [7] 任斌, 韦炳华, 李瑞明, 等. 丹墨胶囊对正常大鼠11 β -羟基类固醇脱氢酶及己糖-6-磷酸脱氢酶基因表达的影响 [J]. *中成药*, 2013, 35(10): 2078-2082.
Ren B, Wei BH, Li RM, et al. Effect of Danmo Capsules on gene expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase and hexose 6- phosphate dehydrogenase in rat tissues [J]. *Chin Trad Pat Med*, 2013, 35(10): 2078-2082.
- [8] Xu CS, Wei BH, Fu XH, et al. Effect of eclipta prostrata on 11beta- hydroxysteroid dehydrogenase in rat liver and kidney [J]. *Evid Based Compl Alt*, 2014(1): 133-142.
- [9] 夏运成, 张旭光, 李江, 等. HPLC法测定强的松的血药浓度及其临床应用价值 [J]. *医学临床研究*, 2006, 11(08): 1215-1218.
Xia YC, Zhang XG, Li J, et al. Quantitation of serum prednisone concentration by high- performance liquid chromatography [J]. *J Chin Res*, 2006, 11(08): 1215-1218.

(编辑 孙慧兰)