

药食两用物质效用成分对人孕烷X受体的激活效应及 细胞增殖抑制筛选

张祖奇^{1,2}, 张光晨², 阮盼盼², 林毅², 谭洪玲², 肖成荣², 马增春², 王宇光^{2*}, 高月^{1,2*}

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004;

2. 军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所, 北京 100850)

[摘要] **目的:**探讨药食两用物质甘草(甘草苷、甘草酸)、鱼腥草(槲皮素、鱼腥草素)、夏枯草(迷迭香酸)、决明子(橙黄决明素)、茯苓(茯苓酸)、百合(百合皂苷、秋水仙碱)、枸杞子(枸杞多糖)7种药食两用物质中10种效用成分对人孕烷X受体(PXR)的激活效应并筛选其潜在的毒性成分。**方法:**利用细胞增殖与活性检测(CCK-8)法考察了甘草苷、甘草酸、槲皮素、鱼腥草素、迷迭香酸、橙黄决明素、茯苓酸、秋水仙碱(10、20、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、百合皂苷、枸杞多糖(10、20、50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)10种成分对正常的人肝细胞(L02)增殖抑制的影响;通过生化分析仪检测药物处理后对L02细胞乳酸脱氢酶(LDH)释放的影响;Hoechst 33342染色考察了10种效用成分对L02细胞凋亡的影响;利用分泌型荧光素酶报告基因系统,将PXR表达载体和含细胞色素P450 3A4(CYP3A4)转录调控区的报告基因载体共转染L02细胞,10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 利福平(RIF)为阳性对照,用甘草苷、甘草酸、槲皮素、鱼腥草素、迷迭香酸、橙黄决明素、茯苓酸、秋水仙碱(5、10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和百合皂苷、枸杞多糖(5、10、20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)10种成分分别处理24 h,进行荧光素酶活性检测。**结果:**与空白组比较,秋水仙碱、百合皂苷、槲皮素会导致细胞活力呈浓度依赖性降低($P<0.05$, $P<0.01$),槲皮素、迷迭香酸、甘草酸、秋水仙碱、橙黄决明素、茯苓酸可以增加L02细胞中LDH的释放率($P<0.05$, $P<0.01$),迷迭香酸、甘草苷、枸杞多糖处理后部分细胞的高亮浓染细胞核的比例逐渐上升($P<0.05$, $P<0.01$);pcDNA3.1-PXR与pGLuc-CYP3A4共转染L02细胞时,与空白组比较,橙黄决明素、茯苓酸对PXR有激活效应($P<0.05$),甘草苷、甘草酸对PXR有抑制效应($P<0.05$)。**结论:**在长期服用药食两用物质时,应注意其对药物代谢酶的影响及可能产生的相互作用,提高药食两用物质的安全性。

[关键词] 药食两用物质;人孕烷X受体;细胞色素P450 3A4(CYP3A4);分泌型荧光素酶报告基因系统

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)13-0042-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220821

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220209.1411.004.html>

[网络出版日期] 2022-02-09 15:30

Activating Effect of Effective Components in Medicinal and Edible Substances on Human Pregnane X Receptor and Cytotoxicity Screening

ZHANG Zuqi^{1,2}, ZHANG Guangchen², RUAN Panpan², LIN Yi², TAN Hongling²,

XIAO Chengrong², MA Zengchun², WANG Yuguang^{2*}, GAO Yue^{1,2}

(1. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the activating effects of ten important effective components in seven medicinal and edible substances on human pregnane X receptor (PXR), including Glycyrrhizae Radix et Rhizoma (liquiritin and glycyrrhizic acid), Houttuyniae Herba (quercetin and houttuynifonate), Prunellae Spica

[收稿日期] 2021-11-18

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2019YFC1604901)

[第一作者] 张祖奇,在读硕士,从事药理学研究,E-mail:zz15797752707@163.com

[通信作者] *王宇光,博士,副研究员,从事中药药理毒理研究,E-mail:wangyg@bmi.ac.cn;

*高月,博士,研究员,博士生导师,从事中药药理毒理研究,E-mail:gaoyue@bmi.ac.cn

(rosmarinic acid), Cassiae Semen (aurantio-obtusin), Poria (pachymic acid), Lili Bulbus (*Lilium brownii* saponin and colchicine), and Lycii Fructus (*Lycium barbarum* polysaccharide) and screen potentially toxic components. **Method:** Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to investigate the cytotoxic effect of liquiritin, glycyrrhizic acid, quercetin, houttuynon, rosmarinic acid, pachymic acid, aurantio-obtusin, and colchicine (10, 20, and 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and *L. brownii* saponin and *L. barbarum* polysaccharide (10, 20, and 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) on normal human hepatocyte cell line (L02). The release of lactate dehydrogenase (LDH) in L02 cells after drug treatments was detected by the biochemical analyzer. The apoptosis induced by ten effective components was explored by Hoechst 33342 staining. The secreted luciferase reporter system was used to co-transfect the PXR expression vector and reporter gene vector containing cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) transcriptional regulatory region into L02 cells, with 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rifampicin (RIF) as a positive control. After treated with liquiritin, glycyrrhizic acid, quercetin, houttuynon, rosmarinic acid, aurantio-obtusin, pachymic acid, and colchicine (5, 10, and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and *L. brownii* saponin and *L. barbarum* polysaccharide (5, 10, and 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h, the cells were tested for secreted luciferase activity. **Result:** Compared with the control group, colchicine, *L. brownii* saponin, and quercetin decreased the cell viability ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the control group, quercetin, rosmarinic acid, glycyrrhizic acid, colchicine, aurantio-obtusin, and pachymic acid increased the release rate of LDH in L02 cells ($P<0.05$, $P<0.01$). The proportion of hyperchromatic nuclei increased gradually after rosmarinic acid, liquiritin, and *L. barbarum* polysaccharide treatments as compared with the control group ($P<0.05$, $P<0.01$). In terms of co-transfection of pcDNA3.1-PXR and pGLuc-CYP3A4 into L02 cells, compared with the control group, aurantio-obtusin and pachymic acid showed activating effects on PXR ($P<0.05$), whereas liquiritin and glycyrrhizic acid showed inhibitory effects ($P<0.05$). **Conclusion:** The findings suggest that when medicinal and edible substances are taken for a long time, attention should be paid to their influence on drug-metabolizing enzymes and possible interactions, so as to improve their safety.

[Keywords] medicinal and edible substances; human pregnane X receptor; cytochrome P450 3A4 (CYP3A4); secreted luciferase reporter system

药食两用物质是指由国家食品药品监督管理总局认可发布,既可以当作食品原料用于各种食品,又可以当作药物治疗疾病的物质^[1]。食物和药物同样具有偏性,具有四气五味,具有食养和治疗作用,但并不是说两者没有界限,对来自天然的药物和食品的区别,人们的认识也是由模糊到清晰的过程。前人区分食物和药物主要基于其主要功能不同,而首要原则是安全性。药物主要用于治疗疾病,食物则须安全并提供人体的营养。一些药品本身就是食物,如生姜、大枣;一些食物却有某些治疗功能,如大蒜^[2]。随着国民生活质量的不断提高,药食两用物质应用广泛,如食品调料、保健品、茶饮类制品等,但部分中药可能引发各种不良反应^[3-6],部分药食两用物质尚存在有害物质不明、机制不清、毒性筛选方法体系不足等问题。现阶段,临床合理安全用药管理中,对毒性明显的药物重视和关注度较高,而对于毒性不明显或具有潜在毒性的药物或药食两用物质却未给予足够的重视^[7]。细胞色素

P450作为重要的外源物代谢酶,主要分布于肝、肾等组织器官中,参与90%以上临床药物的代谢,当其活性受到抑制或诱导时,易发生不良反应^[8]。细胞色素P450(CYP450)3A4(CYP3A4)是细胞色素P450超家族的主要成员,负责代谢50%以上的临床药物,对药物的吸收、代谢、排泄有重要的作用^[9]。核受体超家族成员孕烷X受体(PXR)是一个配体激活型转录因子,在肝脏和肠道组织中高表达,在肝脏功能中起着至关重要的作用^[10]。PXR介导的CYP450 3A(CYP3A)调控途径被认为是临床药物相互作用的重要分子基础。同时PXR可被多种中药激活,调控下游靶基因即CYP450的表达,使药物疗效降低或者消失,从而导致不利的药物相互作用产生,PXR在中药配伍禁忌与中药毒性早期预测方面具有重要作用^[11]。因此,研究药物对CYP3A4的影响对药物的相互作用及早期毒性筛选具有重要意义。已有部分文献研究了甘草苷^[12]、甘草酸^[13]、槲皮素^[14]对CYP3A4肝药酶的影响,但关于药食两

用物质有效成分对CYP3A4酶的作用与药物潜在毒性的关系研究较少。本研究试图阐明药食两用物质中效用成分对CYP3A4的影响所造成其代谢变化,从而引起其潜在的毒性,主要考察了7种药食两用物质中的10种效用成分对PXR受体的激活效应及对细胞活力的影响,期望通过观察药物对CYP3A4肝药酶的影响来解释药物的潜在毒性作用,为公众日常食用提供参考和指导。

1 材料

1.1 试剂及药物 鱼腥草素(批号HXSW200813-1)、枸杞多糖(批号HXSW200616-1)、百合皂苷(批号HXSW200618-3)均购买于西安华兴生物科技有限公司,纯度均为98%;槲皮素(批号wkq20061112)、甘草酸(批号wkq20022509)均购买于四川省维克奇生物科技有限公司,纯度均为98%;甘草苷(批号SH19082902)、橙黄决明素(批号SH20041402)、茯苓酸(批号SH20090104)、迷迭香酸(批号SH20060201)均购买于北京赛百草科技有限公司,纯度均为98%;秋水仙碱(批号F527883)购买于上海一飞生物科技有限公司,纯度98%;RPMI 1640培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)、Opti-MEM、青-链霉素(美国Gibco公司,批号分别为8120299、RNBK4894、2276989、FG101)、胎牛血清(FBS,康源生物科技有限公司,批号FS201-02)、胰酶(Sigma公司,批号BL512A)、Hoechst 33342活细胞染色液(碧云天公司,批号H1399);乳酸脱氢酶(LDH)生化试剂盒(Roche公司,批号55580701);TransIT-X2转染试剂(美国Mirus公司,批号MIR 6000);分泌型荧光素酶报告基因检测试剂盒(北京原平皓公司,批号LF104-02);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂(日本Dojindo公司,批号NW592)。

1.2 仪器 371型细胞培养箱(美国Thermo公司),SW-CJ-1F型超净工作台(北京长城空气净化设备有限公司),120型倒置显微镜(日本Nikon公司),VICTOR X5型酶标仪(美国Perkin Elmer),Cobas c 311型生化分析仪(德国Roche公司),Cytation 5型活细胞成像系统(美国BioTek公司)。

1.3 细胞和质粒 L02细胞(CRL-12461)购买于ATCC细胞库,细胞复苏后传至3代用于后续实验。在37℃、5%CO₂的条件下,培养于含有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中,待细胞长至80%~90%时,按1:2进行传代,平均2~3 d传一代,取对数生长期细胞进行实验。质粒pcDNA3.1-PXR与pGLuc-CYP3A4由实验室构建并保存。

2 方法

2.1 CCK-8法检测细胞存活率 将对数生长期的L02细胞以每孔1万个的密度接种于96孔培养板。待细胞生长至70%~80%时,去除培养液,经PBS洗涤后,加入含有不同浓度药物成分的培养基,同时设溶剂组(不含细胞)和空白组。药物干预24 h后,吸去含药培养基,每孔同时加入无血清培养基100 μL和CCK-8 10 μL,37℃孵育2 h,酶标仪测450 nm处吸光度A。每组设定3个复孔,计算细胞存活率。细胞存活率=(A_{加药组}-A_{溶剂组})/(A_{空白组}-A_{溶剂组})×100%。

2.2 细胞上清LDH含量测定 将L02细胞以每孔1.2×10⁶个接种于6孔板,待其生长至70%~80%,用不同浓度药物处理24 h,收集细胞上清,上机检测。

2.3 Hoechst 33342染色 将L02细胞以每孔2.5×10⁵个的密度接种于24孔板,待其生长至70%~80%时,用不同浓度药物处理24 h,吸去培养液,PBS洗2次,加入Hoechst 33342染液染色20 min,弃去染色液,用PBS洗2次,置于活细胞成像系统下观察。

2.4 药物处理和荧光素酶活性检测 按照转染试剂TransIT-X2说明书操作,取对数生长期L02细胞,胰酶消化,细胞计数,按照每孔2.5×10⁵个细胞接种于24孔板中,当细胞密度达到约80%时,用Opti-MEM培养液稀释质粒。每孔定量加入pcDNA3.1-PXR表达质粒500 ng,pGLuc-CYP3A4报告基因质粒250 ng与TransIT-X2转染试剂2 μL,质粒与转染试剂室温孵育30 min,在每孔细胞中加入100 μL混合转染液,轻轻摇匀,37℃、5%CO₂培养箱孵育12 h,吸去混合液,加入含有不同浓度药物含2%血清不含青-链霉素RPMI 1640培养基,设置10 μmol·L⁻¹利福平(RIF)给药孔作为RIF组,每组分别设3个复孔。药物干预培养24 h,吸取待测细胞培养基上清10 μL至96孔板底部;将Gluc Dilution Buffer 60×室温融化后,按照每个样品60 μL的体系,根据样品数量加入Gluc Dilution Buffer 60×,轻轻混匀后使用,放入仪器进行检测,记录发光结果。

2.5 统计学处理 采用GraphPad Prism 8.0软件和Image J软件进行统计学处理,多组数据间比较采用单因素方差分析,两两比较采用t检验处理,P<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 药食两用物质中效用成分对L02细胞存活率的影响 CCK-8结果显示,与空白组比较,秋水仙碱和百合皂苷作用L02细胞24 h有一定的细胞增殖

抑制,细胞活力呈浓度依赖性降低($P<0.01$),橙黄决明素、茯苓酸在10、20、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时表现出能增加L02细胞活力($P<0.05, P<0.01$),槲皮素在低浓度可以促进细胞活力,在高浓度时抑制细胞活力的现象($P<0.05, P<0.01$)。与空白组比较,甘草苷、甘草酸、

迷迭香酸、鱼腥草素(10、20、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和枸杞多糖(10、20、50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)对L02细胞无细胞增殖抑制。见表1。因此,选择20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为筛选的最高浓度,不会由于药物浓度过高而导致细胞大量死亡。

表1 10种效用成分对细胞存活力的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 Impacts of ten important effective components on cell viability ($\bar{x}\pm s, n=3$)

药物	组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞活性/%	药物	组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞活性/%
鱼腥草	空白组		100.00	决明子	空白组		100.00
	槲皮素组	10	106.10 \pm 1.98 ²⁾		橙黄决明素组	10	107.70 \pm 0.99 ²⁾
		20	95.85 \pm 1.07 ¹⁾		20	107.10 \pm 3.95 ²⁾	
		50	89.44 \pm 2.65 ²⁾	50	105.30 \pm 0.635		
	空白组		100.00	茯苓	空白组		100.00
	鱼腥草素组	10	104.90 \pm 6.57		茯苓酸组	10	109.70 \pm 4.67 ²⁾
20		102.40 \pm 7.63	20		111.20 \pm 1.23 ²⁾		
50		101.40 \pm 5.47	50	107.70 \pm 2.90 ¹⁾			
甘草	空白组		100.00	百合	空白组		100.00
	甘草苷组	10	101.40 \pm 1.15		百合皂苷组	10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	92.17 \pm 6.43
		20	102.30 \pm 1.51		20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	85.98 \pm 9.31	
		50	98.27 \pm 3.08	50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	77.59 \pm 5.75 ²⁾		
	空白组		100.00	空白组		100.00	
	甘草酸组	10	103.30 \pm 0.95	秋水仙碱组	10	57.45 \pm 6.74 ²⁾	
20		102.50 \pm 3.88	20	47.06 \pm 5.40 ²⁾			
50		98.56 \pm 2.24	50	47.97 \pm 0.20 ²⁾			
夏枯草	空白组		100.00	枸杞	空白组		100.00
	迷迭香酸组	10	101.00 \pm 2.89		枸杞多糖组	10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	101.90 \pm 4.66
		20	100.90 \pm 3.62		20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	99.32 \pm 3.41	
50		97.74 \pm 4.35	50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	101.00 \pm 5.46			

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05, ^2)$ $P<0.01$ (表1-表4同)

3.2 10种药食两用物质效用成分对L02细胞中LDH释放的影响 LDH释放被看做细胞膜完整性的重要指标,并被用于细胞增殖抑制检测。与空白组比较,迷迭香酸和槲皮素处理后导致细胞LDH释放呈显著浓度依赖性的升高($P<0.01$),这提示这两种药物有潜在的毒性,其中甘草酸、秋水仙碱、橙黄决明素、茯苓酸对L02细胞中LDH释放有一定程度的影响($P<0.05$),甘草苷、鱼腥草素、枸杞多糖、百合皂苷对细胞中LDH的释放未见明显影响。见表2。

3.3 10种药食两用物质效用成分对L02细胞形态及细胞核的影响 与空白组比较,迷迭香酸、甘草苷、枸杞多糖处理后部分细胞的细胞核呈现致密浓染的高亮蓝色荧光,且随着药物浓度的增加,高亮浓染细胞核的比例逐渐上升($P<0.05, P<0.01$),橙黄

决明素、甘草酸、鱼腥草素、百合皂苷显示出相反的趋势($P<0.05, P<0.01$);与空白组比较,槲皮素、茯苓酸给药后,高亮浓染细胞核的比例有所增加($P<0.01$)。见表3。Hoechst 33342染色剂可以进入凋亡细胞的细胞核,在活细胞成像系统下,表现为致密颗粒状强荧光集聚(亮蓝色高荧光)。Hoechst 33342染色结果显示,秋水仙碱给药处理24 h,具有明显的细胞增殖抑制,导致细胞数量明显减少。见图1-图3。

3.4 10种药食两用效用成分对PXR介导的CYP3A4的转录调节作用 橙黄决明素:与空白组比较,橙黄决明素在20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对PXR-CYP3A4具有诱导作用($P<0.05$)。甘草苷:与空白组比较,甘草苷在5、10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对PXR-

表2 10种效用成分对L02细胞中LDH释放的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

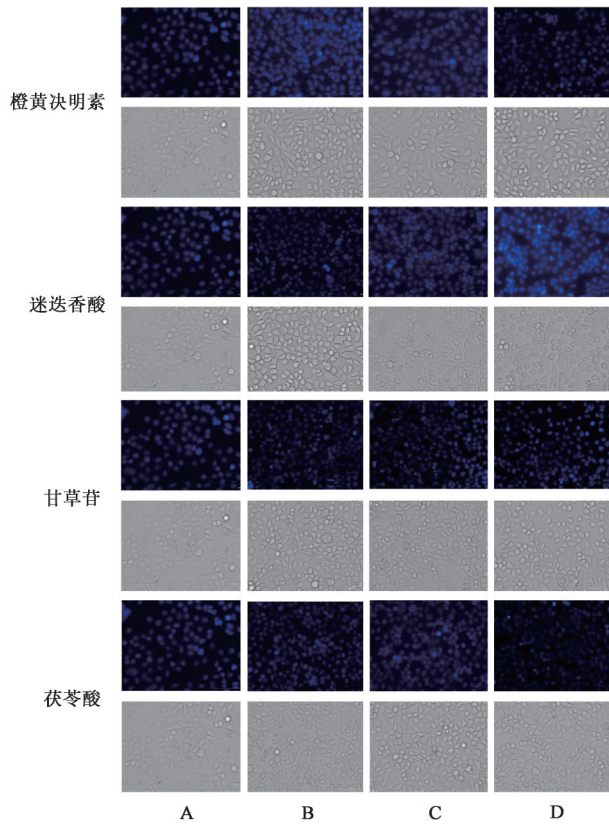
Table 2 Effect of ten important effective components on release of LDH in L02 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

药物	组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	LDH/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	药物	组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	LDH/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	
鱼腥草	空白组		62.17±1.26	决明子	空白组		62.17±1.26	
	槲皮素组	10	63.07±1.01		橙黄决明素组	10	65.17±0.76 ¹⁾	
		20	66.80±0.72 ²⁾		20	65.00±1.00 ¹⁾		
		50	66.53±0.50 ²⁾	50	63.50±0.50			
	甘草	空白组		62.17±1.26	茯苓	空白组		62.17±1.26
		鱼腥草素组	10	64.40±1.40		茯苓酸组	10	67.43±0.51 ²⁾
20			64.93±2.10	20		66.20±0.72 ²⁾		
50			64.53±1.29	50	64.27±0.64 ¹⁾			
夏枯草		空白组		62.17±1.26	百合	空白组		62.17±1.26
		甘草苷组	10	63.70±0.26		百合皂苷组	10 mg·L ⁻¹	63.93±0.61
	20		63.13±1.03	20 mg·L ⁻¹		63.87±1.21		
	50		62.20±1.06	50 mg·L ⁻¹	64.43±0.93			
	空白组		62.17±1.26	空白组		62.17±1.26		
		甘草酸组	10	64.20±1.06	秋水仙碱组	10	66.23±1.37 ¹⁾	
			20	64.63±1.10 ¹⁾	20	66.37±1.10 ¹⁾		
	50		64.80±0.72 ¹⁾	50	65.80±1.71 ¹⁾			
	迷迭香酸组	10	63.50±0.87	枸杞	空白组		62.17±1.26	
20		66.67±0.58 ²⁾	枸杞多糖组		10 mg·L ⁻¹	62.90±1.85		
50		68.17±0.76 ²⁾	20 mg·L ⁻¹		64.90±0.56			
			50 mg·L ⁻¹	62.33±0.31				

表3 10种效用成分对L02细胞核的平均荧光强度影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of ten important effective components on average fluorescence intensity of L02 nuclei ($\bar{x} \pm s, n=3$)

药物	组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	平均荧光强度	药物	组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	平均荧光强度	
鱼腥草	空白组		46.56±1.01	决明子	空白组		46.56±1.01	
	槲皮素组	10	50.32±2.73		橙黄决明素组	10	89.40±1.63 ²⁾	
		20	64.54±4.00 ²⁾		20	78.67±1.98 ²⁾		
		50	51.93±0.91	50	58.64±1.84 ²⁾			
	甘草	空白组		46.56±1.01	茯苓	空白组		46.56±1.01
		鱼腥草素组	10	84.04±2.38 ²⁾		茯苓酸组	10	58.82±2.65 ²⁾
20			73.59±1.63 ²⁾	20		64.23±1.13 ²⁾		
50			52.77±1.27 ¹⁾	50	35.28±1.13 ²⁾			
夏枯草		空白组		46.56±1.01	百合	空白组		46.56±1.01
		甘草苷组	10	33.69±1.45 ²⁾		百合皂苷组	10 mg·L ⁻¹	82.93±1.48 ²⁾
	20		37.92±1.29 ²⁾	20 mg·L ⁻¹		52.91±5.94		
	50		42.48±1.87	50 mg·L ⁻¹	57.22±1.91			
	空白组		46.56±1.01	空白组		46.56±1.01		
		甘草酸组	10	54.95±0.88 ¹⁾	秋水仙碱组	10	58.78±1.59	
			20	36.62±1.68 ²⁾	20	38.26±1.96		
	50		31.39±2.31 ²⁾	50	54.69±8.66			
	迷迭香酸组	10	58.49±0.79 ²⁾	枸杞	空白组		46.56±1.01	
20		72.30±0.85 ²⁾	枸杞多糖组		10 mg·L ⁻¹	41.39±1.54		
50		99.80±1.19 ²⁾	20 mg·L ⁻¹		58.17±1.90 ¹⁾			
			50 mg·L ⁻¹	105.9±4.25 ²⁾				



注:A. 空白组;B~D. 10、20、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组(图2同)

图1 4种重要效用成分对L02细胞形态及细胞核的影响(Hoechst 33342, $\times 100$)

Fig. 1 Effect of four important effective components on the morphology and nucleus of L02 cells (Hoechst 33342, $\times 100$)

CYP3A4具有显著抑制作用($P < 0.01$)。茯苓酸:与空白组比较,茯苓酸在5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对PXR-CYP3A4具有诱导作用($P < 0.05$)。其在10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对PXR-CYP3A4也具有诱导作用,差异无统计学意义。槲皮素:与空白组比较,槲皮素在10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对PXR-CYP3A4具有显著诱导作用($P < 0.01$)。其在20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对PXR-CYP3A4具有抑制作用,差异无统计学意义。迷迭香酸:与空白组比较,迷迭香酸随着浓度的升高,对PXR-CYP3A4具有微弱诱导作用,差异无统计学意义。甘草酸:与空白组比较,甘草酸在10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对PXR-CYP3A4具有抑制作用($P < 0.05$)。其在5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对PXR-CYP3A4具有抑制作用,差异无统计学意义。秋水仙碱:与空白组比较,秋水仙碱在5、10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对PXR-CYP3A4具有抑制作用,差异无统计学意义。枸杞多糖:与空白组比较,枸杞多糖在5、10、20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对PXR-CYP3A4具有诱导作用,差异无统计学意义。百合皂苷:与空白组比较,百合皂苷随着浓度由低到高,

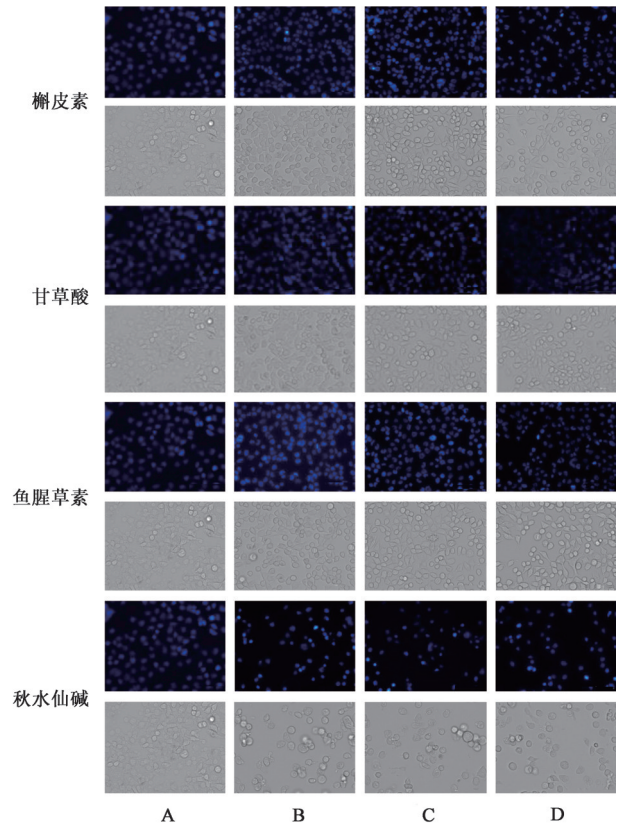
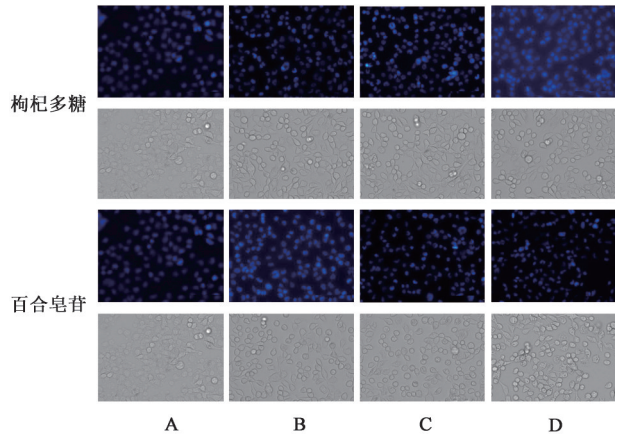


图2 4种重要效用成分对L02细胞形态及细胞核的影响(Hoechst 33342, $\times 100$)

Fig. 2 Effect of four important effective components on the morphology and nucleus of L02 cells (Hoechst 33342, $\times 100$)



注:A. 空白组;B~D. 10、20、50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图3 2种重要效用成分对L02细胞形态及细胞核的影响(Hoechst 33342, $\times 100$)

Fig. 3 Effect of two important effective components on the morphology and nucleus of L02 cells (Hoechst 33342, $\times 100$)

对PXR-CYP3A4的作用由抑制变为诱导,差异无统计学意义。鱼腥草素:与空白组比较,鱼腥草素在5、10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对PXR-CYP3A4具有抑制作用,差异无统计学意义。见表4。

表4 10种成分对PXR介导的CYP3A4的调控作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Regulatory effect of ten important effective components on PXR-mediated CYP3A4 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

药物	组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	PXR-CYP3A4诱导倍数	药物	组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	PXR-CYP3A4诱导倍数
	空白组		1		空白组		1
鱼腥草	RIF组	10	5.725 \pm 0.121 ²⁾	决明子	RIF组	10	2.224 \pm 0.127 ²⁾
	槲皮素组	5	1.117 \pm 0.158		橙黄决明素组	5	1.016 \pm 0.088
		10	2.831 \pm 0.785 ²⁾			10	1.032 \pm 0.188
		20	0.437 \pm 0.299			20	1.302 \pm 0.020 ¹⁾
RIF组	10	1.228 \pm 0.534	茯苓	RIF组	10	2.638 \pm 0.166 ²⁾	
鱼腥草素组	5	0.455 \pm 0.060		茯苓酸组	5	1.920 \pm 0.588 ¹⁾	
	10	0.619 \pm 0.112			10	1.685 \pm 0.564	
	20	0.554 \pm 0.105	20		1.551 \pm 0.237		
甘草	RIF组	10	1.771 \pm 0.235 ²⁾	百合	RIF组	10	1.881 \pm 0.123 ²⁾
	甘草苷组	5	0.459 \pm 0.037 ²⁾		百合皂苷组	5 mg \cdot L ⁻¹	0.855 \pm 0.218
		10	0.457 \pm 0.045 ²⁾			10 mg \cdot L ⁻¹	1.129 \pm 0.377
		20	0.423 \pm 0.043 ²⁾			20 mg \cdot L ⁻¹	1.283 \pm 0.030
RIF组	10	1.511 \pm 0.565	RIF组	10	2.537 \pm 0.907 ²⁾		
甘草酸组	5	0.468 \pm 0.110	秋水仙碱组	10	0.532 \pm 0.090		
	10	0.260 \pm 0.025 ¹⁾		20	0.575 \pm 0.083		
	20	0.285 \pm 0.149 ¹⁾		50	0.755 \pm 0.097		
夏枯草	RIF组	10	2.844 \pm 0.494 ²⁾	枸杞	RIF组	10	2.005 \pm 0.311 ²⁾
	迷迭香酸组	5	0.949 \pm 0.068		枸杞多糖组	10 mg \cdot L ⁻¹	1.371 \pm 0.370
		10	1.054 \pm 0.088			20 mg \cdot L ⁻¹	1.371 \pm 0.355
		20	1.061 \pm 0.219			50 mg \cdot L ⁻¹	1.533 \pm 0.060

4 讨论

药食两用物质是我国人民在生产实践中认识药物和食物并对两者关系的概括,具体指药物和食物都来源于自然界,都以初生代谢产物和次生代谢产物为物质基础,在中医药理论指导下应用于实践^[15-25]。截至2018年,中华人民共和国国家卫生健康委员会公布的药食同源目录中的中药材共有110种^[26]。药食两用物质自身具有高频次、长周期、大剂量、多组分等使用属性,其毒性发生具有隐匿性、作用机制复杂等特征,需要创新相关毒性筛选和确证方法体系,这也是本文需要采用更新的方法体系发现更多的潜在毒性成分的意义所在。随着近年来药食同源药材的广泛应用,其相关的潜在毒性研究引起人们的重视。其中有研究显示,决明子在急性、亚慢性毒性研究中,使小鼠出现不同程度的肝、肾损伤^[27-28];鱼腥草毒性较低,小鼠鱼腥草素灌胃的半数致死量为(1.6 \pm 0.081) g \cdot kg⁻¹^[29];夏枯草临床仅见过敏不良反应的报道^[30];有研究显示长期食用甘草有一定的毒性,在急性毒性实验中,尚未发现甘

草5种提取液有毒性反应^[31-32];大量服食百合可能引起心烦心悸、面色潮红、坐卧不安、全身有蚁行感,以头部为甚的过敏反应^[33];茯苓和枸杞子未见相关毒性报道^[34-35]。因此尽快筛查出容易导致毒性及不良反应的药材是目前急需解决的问题。

CYP450是由血红素-巯基盐蛋白所组成的超家族,主要存在于生物体的内质网内,既可以代谢内源性物质,如甾体激素、维生素及类花生四烯酸类化合物等,又可以代谢外源性物质,在药物代谢中起主要作用的为CYP1、CYP2及CYP3家族。由CYP450酶系作用的生物转化是生物体代谢的重要环节,多种内、外源性化学物对CYP450有诱导或抑制作用,导致酶的数量和活性改变,并引起自身或其他药动学的改变,使药物活性代谢成分积累导致毒性增强或降低其血药浓度和治疗效果^[36]。CYP3A4是最重要的人类CYP同工酶,因为其通常参与许多外源物质和临床批准药物的代谢。CYP3A4在前列腺、乳腺、肠道、结肠和小肠中表达。然而,其表达在肝脏中最为丰富,占总CYP蛋白含

量的30%^[37]。PXR作为调控因子,在CYP3A4的表达中起到主要调控作用。许多药物能活化PXR,间接影响CYP3A4的表达^[38]。研究药物对PXR介导的CYP3A4的转录调节作用有重要的意义。

基于实验室先前构建的CYP3A4质粒和PXR质粒,本研究利用分泌型荧光素酶报告基因法,采用目的基因与调控基因质粒共转染L02细胞来筛选药物。细胞活性实验发现,在20 μmol·L⁻¹给药浓度下,10种药物对细胞的活力影响不大,鉴于质粒转染实验对细胞活力有一定的影响,因此选择此浓度作为最大给药浓度。研究结果表明,秋水仙碱、百合皂苷、槲皮素、迷迭香酸、橙黄决明素、茯苓酸、甘草苷、甘草酸、枸杞多糖随着浓度的增加对L02细胞具有一定的细胞增殖抑制。转染结果显示橙黄决明素、枸杞多糖对CYP3A4的调控为诱导效应,百合皂苷对CYP3A4的调控随着给药浓度的升高由抑制反转为诱导,甘草苷、甘草酸、秋水仙碱、鱼腥草素对CYP3A4产生抑制作用,茯苓酸对CYP3A4的调控为诱导效应,但随着给药浓度的升高诱导效应有所减弱,槲皮素在10 μmol·L⁻¹时对CYP3A4的调控具有明显诱导效应,迷迭香酸对CYP3A4的调控无

明显影响。有文献研究表明许多结构差异较大的化学物可诱导或抑制CYP3A的活性,这在临床上可以引起药物间的相互作用,降低药效甚至无效,严重者则产生不良反应^[39-40]。通过调研文献发现,在日常生活食用剂量下,百合中的秋水仙碱每日最大剂量相当于5.82 mg,百合皂苷为14.088 mg,槲皮素为128.5 mg,迷迭香酸为30 mg,橙黄决明素为12 mg,茯苓酸为88.5 mg,甘草苷为50 mg,甘草酸为200 mg,枸杞多糖为216 mg,由于现有文献关于这些药物成分相关的代谢研究比较缺乏,因此关于他们的潜在的长期毒性及对CYP3A4肝药酶的长期影响还需要进一步的研究。本文研究结果显示这10种药物效用成分对CYP3A4有诱导或抑制效应,并且筛选出长时间使用可能会有潜在的毒性的一部分药物成分,但是药物对CYP3A4的诱导或抑制效应与其毒性的关系还需要进一步的实验进行探索。综上所述,本文在外源物代谢酶水平上对药食两用物质潜在的毒性进行了初步探究,这提示在长期使用药食同源药物时,应注意由于长周期大剂量服用引起药物相互作用从而导致潜在的肝损伤风险。药食两用物质效用成分含量及代谢情况见表5。

表5 药食两用物质效用成分含量及代谢情况

Table 5 Contents of effective components and metabolism of medicinal and edible substances

药食同源中药	药典用量/g	药效成分	含量	药物代谢情况
甘草	2~10	甘草苷	不少于0.5% ^[41]	总甘草素是甘草苷在体内的主要暴露形式,总甘草素不易产生组织蓄积现象 ^[47]
		甘草酸	不少于2% ^[41]	甘草酸的生物利用度很低,首过效应明显,只有极少部分通过尿液排泄 ^[48]
鱼腥草	15~25	槲皮素	1.17~5.14 mg·g ⁻¹ ^[42]	槲皮素在体内易发生分解、甲基化、羟基化、硫酸酯化及葡萄糖醛酸化等一结合反应,生成小分子化合物或生成水溶性更高的代谢物排出体外 ^[49]
		鱼腥草素	3.60%~7.23% ^[43]	-
夏枯草	9~15	迷迭香酸	不少于0.2% ^[41]	迷迭香酸在大鼠体内主要发生甲基化、磺酸化和葡萄糖醛酸化等代谢反应,代谢产物主要经尿液和胆汁排出体外,主要分布在肾脏 ^[50]
决明子	9~15	橙黄决明素	不少于0.08% ^[41]	橙黄决明素在大鼠体内吸收迅速 ^[51]
茯苓	10~15	茯苓酸	0.085%~0.59% ^[44]	-
百合	6~12	百合皂苷	0.32~1.174 mg·g ⁻¹ ^[45]	分子量较大的皂苷类成分,通常在肠道中吸收较差,生物利用度低 ^[52]
		秋水仙碱	0.048 5% ^[46]	-
枸杞子	6~12	枸杞多糖	不少于1.8% ^[41]	-

药食两用物质的安全性评价技术,常规遵循食品安全国家标准和GLP条件下药品毒性评价方法,以动物实验作为重要指标,侧重毒性效应、组织、器官终点事件观察。随着替代毒理学技术的发展,基于工程细胞筛选和模式生物的模式成为整体动物的传统毒性测试模式的重要补充,涵盖关键毒性靶

点(如局部毒性、靶器官毒性等)的毒性测试替代方法已应用于食品及药物安全性评价,以解决风险评估过程中物质基础特征、毒性通路等问题,形成基于毒性作用机制的毒性物质发现和减毒策略,本文的筛选研究为深入机制的研究和减毒方法形成奠定基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 云无心. 食、药、药食两用, 区别在哪里[J]. 生命与灾害, 2016(12):38-39.
- [2] 单峰, 黄璐琦, 郭娟, 等. 药食同源的历史和发展概况[J]. 生命科学, 2015, 27(8):1061-1069.
- [3] 黄娜娜, 郭欣, 蔡涛涛, 等. 决明子不同提取物单次给药对小鼠肝、肾“量-时-毒”关系研究[J]. 中国药物警戒, 2017, 14(10):594-598.
- [4] 邹义英, 李军生. 决明子类保健食品的潜在安全风险分析[J]. 食品科技, 2009, 34(5):295-297.
- [5] JANG H S, ROH S Y, JEONG E H, et al. Ginkgotoxin induced seizure caused by vitamin B6 deficiency[J]. J. Epilepsy Res, 2015, 5(2):104-6.
- [6] 周冠强, 李元峰, 张肇勋. 鱼腥草注射液致过敏反应63例文献分析[J]. 中国药房, 2013, 24(36):3436-3439.
- [7] 石镇港, 姜德建. 药食同源中药安全性研究进展[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(6):772-777.
- [8] 汪美汐, 王宇光, 高月等. 何首乌中大黄素对L02肝细胞CYP亚酶表达及细胞毒性的影响[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(11):1543-1548.
- [9] 张照研, 王宇光, 高月, 等. 何首乌中THSG和蒽醌类成分对人孕烷X受体介导的CYP3A4的调控作用[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(24):4827-4833.
- [10] 苟小军, 高珊珊, 曹健美. 孕烷X受体在肝病中的研究进展[J]. 医学综述, 2020, 26(7):1269-1272.
- [11] ZHOU S F. Drug behaves substrates inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4 [J]. Curr Drug Metab 2008, 9(4):310-322.
- [12] 李晗, 张广平, 叶祖光, 等. 基于药物代谢酶CYP3A4的乌头碱配伍人参皂苷、甘草苷的减毒机制研究[J]. 药物评价研究, 2020, 43(2):199-205.
- [13] 涂江华. 甘草酸对CYP450酶的影响及其机制研究[D]. 长沙:中南大学, 2010.
- [14] 叶林虎, 闫明珠, 常琪, 等. 槲皮素及其糖苷类化合物对P450酶活性的体外抑制作用[J]. 中国药学杂志, 2014, 49(12):1051-1055.
- [15] 何亚磊, 蔡叶锐, 魏引, 等. 基于NF- κ B通路研究槲皮素对心肌缺血再灌注损伤大鼠的影响[J]. 中医学报, 2021, 36(7):1491-1496.
- [16] 钟兆银, 黄锁义. 鱼腥草提取物鱼腥草素对肿瘤细胞抑制作用[J]. 广东化工, 2019, 46(16):27-28.
- [17] 熊锋, 李毅成, 林春博, 等. 橙黄决明素对脂多糖诱导的大鼠软骨细胞的抗炎和软骨保护作用[J]. 广西医科大学学报, 2020, 37(4):645-651.
- [18] 刘云帆, 杜月梅, 刘晓艺, 等. 枸杞多糖对顺铂诱导小鼠睾丸支持细胞凋亡的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2021, 26(6):624-630.
- [19] 罗飞, 张明辉, 陈立珂, 等. 迷迭香酸抑制NLRP3炎性小体的活化对创伤性颅脑损伤大鼠脑组织损伤和海马区神经元凋亡的影响[J]. 免疫学杂志, 2021, 37(7):568-574.
- [20] 王佳, 梁葵香, 刘艳妮, 等. 茯苓酸通过上调miR-133a影响子宫肌瘤细胞增殖凋亡及表皮生长因子的水平[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(9):1069-1074.
- [21] 陈千, 熊富良, 张雪琼, 等. 甘草苷对感染后咳嗽(肺阴虚证)小鼠的止咳作用机制及抗氧化作用的研究[J]. 华中师范大学学报:自然科学版, 2020, 54(5):841-848, 873.
- [22] 路凯, 白宁, 陈方, 等. 甘草酸治疗对骨癌痛小鼠痛行为及脊髓炎症反应的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(13):2249-2253.
- [23] 张维西, 朱峰, 胡瑞, 等. 百合总皂苷的现代研究进展[J]. 河北北方学院学报:自然科学版, 2017, 33(6):42-43, 46.
- [24] 申利红, 李雅. 秋水仙碱的研究与应用进展[J]. 中国农学通报, 2009, 25(21):185-187.
- [25] 唐雪阳, 谢果珍, 周融融, 等. 药食同源的发展与应用概况[J]. 中国现代中药, 2020, 22(9):1428-1433.
- [26] 石镇港, 姜德建. 药食同源中药安全性研究进展[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(6):772-777.
- [27] 黄娜娜, 郭欣, 蔡涛涛, 等. 决明子不同提取物单次给药对小鼠肝、肾“量-时-毒”关系研究[J]. 中国药物警戒, 2017, 14(10):594-598.
- [28] 高芑, 隋海霞, 刘海波, 等. 决明子乙醇提取物的亚慢性毒性研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2004(5):410-415.
- [29] 杨仓良. 毒药本草[M]. 北京:中国中医药出版社, 1998:189-190, 217-221, 842-849.
- [30] 丁涛. 中草药不良反应及防治[M]. 北京:中国中医药出版社, 1992:105.
- [31] 孙新明, 肖莺, 周剑莉, 等. 甘草对雄性小鼠睾丸生殖毒性的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(13):3507-3510.
- [32] 程艳芹, 王英姿, 李明春. 甘草5种方法提取液主要药效学及急性毒性比较[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(6):435-439.
- [33] 林夏静, 郑景陆. 从中医角度看药食同源之百合[J]. 光明中医, 2008(4):512-513.
- [34] 姚霞, 许利嘉, 肖伟, 等. 枸杞子的安全性问题探讨[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(12):2971-2972.
- [35] 杨亚丽, 孙景, 李涛, 等. 云茯苓中重金属含量测定及安全性评价[J]. 中药材, 2016, 39(6):1343-1346.
- [36] 谢瑞芳, 周昕. 中药对细胞色素P450代谢影响的研

- 究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2009, 14(6):697-701.
- [37] ZHANG Z, REN S, TANG X, et al. Human PXR-mediated transcriptional activation of CYP3A4 by 'Fuzi' extracts. *Toxicol Mech Methods*, 2019, 29(3): 155-164.
- [38] 张照研, 王宇光, 高月, 等. 何首乌6种成分对人孕烷X受体介导的CYP3A4的调控作用[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(20):4104-4110.
- [39] DRESSER G K, SPENCE J D, BAILEY D G. Pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2000, 38(1): 41-57.
- [40] DAI D, TANG J, ROSE R, et al. Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 299(3):825-831.
- [41] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020:1088.
- [42] 王莲, 袁艺. 不同产地鱼腥草中绿原酸、槲皮素含量测定[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(7):1081-1083.
- [43] 薛青松. 鱼腥草挥发油的研究进展[J]. 中国药业, 2014, 23(4):15-18.
- [44] 徐德宏, 谭朝阳, 杨勇, 等. 茯苓功效成分茯苓酸的研究进展[J]. 食品科学, 2022:1-18.
- [45] 杨郑州, 韦敏珍, 谢晓娜. 不同品种百合中皂苷和多糖的含量测定[J]. 轻工科技, 2017, 33(8):41-42.
- [46] 刘鹏, 林志健, 张冰. 百合的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(23): 201-211.
- [47] 张爱杰, 刘羽康, 司端运. 甘草苷体内暴露特征及体外跨膜转运机制研究[J]. 中草药, 2021, 52(7): 2053-2061.
- [48] 杨飞, 吴德康, 卞勇, 等. 葛根苓连汤中葛根素、黄芩苷、小檗碱与甘草酸组合在大鼠体内代谢产物研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9):164-168.
- [49] 许春莲. 长期灌胃槲皮素后小鼠血液与组织内槲皮素及异鼠李素形式代谢产物分布[D]. 南昌:南昌大学, 2015.
- [50] 张晶. 连钱草活性多糖结构及迷迭香酸的代谢研究[D]. 南昌:江西中医药大学, 2020.
- [51] 戴迎春, 邓楠, 刘文. 橙黄决明素在正常大鼠体内的药动学[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(14):1271-1274.
- [52] 宋玮, 郑伟, 马百平, 等. 中药皂苷类成分的体内代谢研究进展[J]. 药学学报, 2018, 53(10): 1609-1619.

[责任编辑 张丰丰]