

# 灯盏细辛和赤芍配伍组方对小鼠部分肝细胞色素 P450 亚型活性的影响及其机制分析

刘亭<sup>1</sup>, 刘香香<sup>1,2</sup>, 陆定艳<sup>1,3</sup>, 杨健<sup>1,3</sup>, 吴琼<sup>1</sup>, 王永林<sup>1</sup>, 李勇军<sup>2\*</sup>

1. 贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室/药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550004;
2. 贵州医科大学 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004;
3. 贵州医科大学 药学院, 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的:探讨灯盏细辛和赤芍配伍组方(辛芍组方)对小鼠细胞色素 P450 酶(CYP450s)主要亚型 CYP1a2, CYP2d22, CYP2e1 和 CYP3a11 代谢活性的影响以及相关机制。方法:小鼠分为 5 组,分别为正常组、苯巴比妥组(70 mg·kg<sup>-1</sup>)和辛芍组方低、中、高剂量组(0.31, 0.62, 1.25 g·kg<sup>-1</sup>)。给药结束后,取各组小鼠肝脏制备微粒体,考察 CYP1a2, CYP2d22, CYP2e1 和 CYP3a11 的代谢活性;并提取肝组织总 RNA 和蛋白,实时荧光定量聚合酶链式反应法(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)考察辛芍组方对 CYP1a2, CYP2d22, CYP2e1, CYP3a11 和孕烷 X 受体(PXR) mRNA 及蛋白表达的影响;利用报告基因法考察辛芍组方对 PXR 的激活作用。结果:与正常组比较,辛芍组方可诱导 CYP3a11 酶活性,上调 CYP3a11, PXR mRNA 和蛋白水平,并具有 PXR 激活作用( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与模型组比较,辛芍中、高剂量组方能抑制 CYP1a2 酶活性( $P < 0.05$ ),但对 CYP1a2 的 mRNA 水平和蛋白水平无明显影响;而辛芍组方对 CYP2e1, CYP2d22 的酶活性, mRNA 水平和蛋白水平无明显影响。结论:辛芍组方具有 CYP3a11 活性诱导作用,该作用很可能与辛芍组方上调 PXR 表达并激活 PXR 从而促进 CYP3a11 表达有关;而其 CYP1a2 活性抑制作用机制与 CYP1a2 的表达调控无关,需要进一步研究。

**[关键词]** 灯盏细辛和赤芍配伍组方; 细胞色素 P450; 孕烷 X 受体; 机制

**[中图分类号]** R22;R24;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)13-0124-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181328

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180416.1700.003.html>

**[网络出版时间]** 2018-04-17 9:24

## Effect and Mechanism of Xinshao Formula on Activities of Cytochrome P450s in Mice Liver

LIU Ting<sup>1</sup>, LIU Xiang-xiang<sup>1,2</sup>, LU Ding-yan<sup>1,3</sup>, YANG Jian<sup>1,3</sup>, WU Qiong<sup>1</sup>, WANG Yong-lin<sup>1</sup>, LI Yong-jun<sup>2\*</sup>

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics/State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China;

2. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine (TCM) (Ministry of Education), Guizhou Medical University,

Guiyang 550004, China; 3. College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of erigerontis herba and paeoniae radix rubra formula (Xinshao formula) on the metabolic activity of main subtypes (CYP1a2, CYP2d22, CYP2e1 and CYP3a11) of cytochrome P450s (CYP450) in mice liver and explore its mechanism. **Method:** Mice were randomly divided into

**[收稿日期]** 20180122(027)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81760699,81260636);贵州省科学技术厅人才团队项目(黔科合平台人才[2016] 5613·677)

**[第一作者]** 刘亭,博士,副教授,从事中药药理学研究, E-mail: t-liu@163.com

**[通信作者]** \*李勇军,教授,从事天然药物研究, Tel:0851-86908468, E-mail: 1838174671@qq.com

normal group, phenobarbital group ( $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), and low-, middle-, high-dose Xinshao formula groups ( $0.31, 0.62, 1.25 \text{ g crude drug} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). After administration, the livers of mice were used to prepare microsomes to determine the metabolic activities of CYP1a2, CYP2d22, CYP2e1 and CYP3a11. The mRNA and protein expression levels of these four CYP450 enzymes and pregnane X receptor (PXR) in liver tissue of mice were evaluated by quantitative real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot. The effect of Xinshao formula on the activation of PXR was estimated by reporter gene assay. **Result:** As compared with the normal group, Xinshao formula could induce the enzyme activity of CYP3a11, up-regulate the mRNA and protein expression levels of CYP3a11 and PXR, and activate PXR ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). As compared with the model group, middle and high dose Xinshao formula could inhibit CYP1a2 activity ( $P < 0.05$ ), but had no significant effect on the mRNA and protein expression levels of CYP1a2; while Xinshao formula had no significant effects on the activities and the expressions of CYP2e1 and CYP2d22. **Conclusion:** Xinshao formula could induce enzyme activity of CYP3a11, and the mechanism may be associated with up-regulating PXR expression, activating PXR and promoting CYP3a11 expression. Xinshao formula also could decrease the CYP1a2 activity, but it was not related to regulation of CYP1a2 expression, and the mechanism needs a further study.

[ **Key words** ] Xinshao formula; cytochrome P450; pregnane X receptor (PXR); mechanism

细胞色素 P450 (CYP450) 主要存在于肝组织中,是一种在生物体内代谢大部分内源性和外源性化合物(包括药物)的超基因家族。其活性决定着药物的代谢速率,直接影响到药物的清除率<sup>[1]</sup>。当两种药物合用时则可能发生药物代谢性相互作用,导致药效降低甚至产生毒副作用。因此,研究药物对 CYP450 活性的影响,对于阐明药物间的代谢性相互作用,指导临床合理用药有重要意义。美国食品药品监督管理局已经把测定药物对 CYP450 酶活性的影响列为申报新药必须开展的实验<sup>[2]</sup>。

贵州民族地区常把由灯盏细辛和赤芍配伍而成的辛芍组方用于治疗偏瘫,有较好的临床基础。本课题组对辛芍组方的化学成分<sup>[3,4]</sup>、组方合理性<sup>[5]</sup>、制备工艺<sup>[6-7]</sup>、质量控制方法<sup>[8]</sup>、药效学<sup>[9-15]</sup>和安全性<sup>[16-18]</sup>进行了系统研究。实验结果表明辛芍组方具有抗凝血、抗血栓形成、软化扩张血管、改善微循环、增强病灶组织抗氧化能力、对脑缺血再灌注损伤大鼠具有明显保护作用等功能,具有开发成新药的巨大潜力。但目前尚未开展辛芍组方对 CYP450 活性影响的实验。为了完善辛芍组方的基础研究,本文以小鼠为模型,研究辛芍组方对小鼠细胞色素 P450 酶主要亚型 CYP1a2, CYP2d22, CYP2e1 和 CYP3a11 代谢活性的影响以及相关机制,以期预测辛芍组方可能产生的代谢性相互作用提供实验基础。

## 1 材料

**1.1 动物和细胞株** 清洁级雄性昆明种小鼠,体重  $22 \sim 25 \text{ g}$ ,由贵州医科大学实验动物中心提供,动

物合格证号 SCXK(黔)2012-0001;动物实验经贵州医科大学实验动物伦理委员会审核批准,批准编号为 1603113。HepG2 购自中国科学院细胞库。

**1.2 药物与试剂** 灯盏细辛提取物与赤芍提取物制备参照文献[14]方法。灯盏细辛和赤芍药材由贵州医科大学生药学教研室龙庆德教授鉴定分别为菊科飞蓬属植物短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* 的干燥全草和毛茛科植物川赤芍 *Paenia veitchii* 的干燥根。灯盏细辛提取物和赤芍提取物按 2:3 比例配伍(质量比),得辛芍组方。辛芍组方由贵州省药物制剂重点实验室制备提供。trizol(美国 Life 公司,批号 157707);Eastep 总 RNA 提取试剂盒,双荧光素酶检测试剂盒, FuGENE6 转染试剂(Promega 公司,批号分别为 20170801, E1910, 0000254749); SYBR® Premix Ex Taq™ II, TransScript™ One-Step RT-PCR SuperMix(大连宝生物有限公司,批号分别为 RR047A, RR820A);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH), CYP1a2, CYP2e1, CYP3a11, YP2D22, PXR 的引物由上海生工公司合成;  $\text{Na}_2\text{NADP}$ , G-6-P, G-6-PDH(上海海叶生物公司,批号分别为 SM0313KB14, WJ0717EA14, K09M6C1);普萘洛尔、右美沙芬、非那西丁(大连美仑生物公司,批号分别为 F0315AS, A0516AS, A1116AS);氨基比林(国药集团化学试剂有限公司,批号 F20161112);抗 GAPDH 小鼠单克隆抗体,抗 CYP1a2, CYP2e1, CYP3a11, CYP2d22, PXR 多克隆抗体,羊抗兔抗体,羊抗鼠抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab8245, ab170204, ab28146, ab3572, ab98137, ab192579,

ab205718, ab205719); DMEM 高糖培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司, 批号分别为 8217231, 1217694, 1785989); pGL3-P3A4, pcDNA3.1-PXR 和 pRL-TK 质粒由本实验室构建保存。

**1.3 仪器及软件** Quantity One 4.6.2 凝胶分析软件, PowerPac Basic 型电泳仪, Trans-Blot Turbo 型转膜仪, CFX96 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Bio-Rad 公司); Varioskan LUX 型多功能酶标仪, Thermo fresco 17 型高速冷冻离心机, Ultimate 3000 UPLC-PDA 型高效液相仪器, Biomate 3S 型核酸蛋白紫外测定仪(美国 Thermo 公司); Optima MAX-XP 型超高速离心机(美国 Beckman 公司); G:BOX ChemiXL1.4 型凝胶成像仪(英国 Syngene 公司)。

## 2 方法

**2.1 分组与给药** 取雄性昆明小鼠随机分为 5 组, 分别为空白组、苯巴比妥组、辛芍组方低、中、高剂量组, 每组 6 只。根据前期工作<sup>[9]</sup>设定辛芍组方给药剂量, 辛芍组方低、中、高剂量分别为 0.31, 0.62, 1.25 g·kg<sup>-1</sup>, 腹腔注射连续给药 14 d。苯巴比妥组给药量为 70 mg·kg<sup>-1</sup>, 腹腔注射连续给药 7 d<sup>[19]</sup>; 空白组给药剂量为 5 mL·kg<sup>-1</sup>, 腹腔注射连续给药 14 d<sup>[19]</sup>。

**2.2 小鼠肝微粒体的制备** 小鼠末次给药后禁食过夜, 称体质量后颈椎脱臼处死。迅速取出肝脏, 用生理盐水经肝门静脉除去肝组织中残血, 再用预冷的生理盐水洗净肝组织表面残血, 称质量。用眼科剪将肝组织剪成碎块, 加入 3 倍于肝重的匀浆缓冲液(100 mmol·L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> PMSF, 20% 甘油, pH 7.4) 匀浆, 并用两层纱布过滤匀浆液。然后按文献方法<sup>[20]</sup>, 用超高速离心机将滤液制备成微粒体。步骤如下 4 ℃ 1 万 × g 离心 20 min, 取上清于 4 ℃ 105 000 × g 离心 60 min; 弃上清, 用匀浆缓冲液重悬沉淀即得小鼠肝微粒体, 并用 BCA 试剂盒测定肝微粒体蛋白浓度。

## 2.3 药物代谢酶的活性测定

**2.3.1 CYP1a2 酶活性的测定** 利用非那西丁体外代谢法, 根据非那西丁代谢量测定 CYP1a2 酶活性<sup>[21]</sup>。取肝微粒体(5 g·L<sup>-1</sup>) 100 μL 与 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 非那西丁 200 μL 混匀, 37 ℃ 预孵育 5 min 后加 NADPH 200 μL 再生体系(40 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 4 U·L<sup>-1</sup> G-6-PDH, 2 mmol·L<sup>-1</sup> NaDP<sup>+</sup> 和 40 mmol·L<sup>-1</sup> G-6-P), 37 ℃ 水浴 30 min。用冰乙腈

200 μL 终止反应。15 000 × g 离心 20 min, 取上清液 90 μL 加入 1.00 g·L<sup>-1</sup> 普萘洛尔 10 μL, 高效液相分析。色谱条件: 上样量 20 μL; Luna C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 60% 甲醇-40% 水(0.04% 三乙胺和 0.04% 乙酸乙酯), 用冰乙酸调 pH 至 3.0; 流速 0.6 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温 40 ℃; 检测波长 280 nm。

**2.3.2 CYP2d22 酶活性的测定** 采用右美沙芬体外代谢法, 根据右美沙芬代谢量来测定 CYP2d22 酶活性<sup>[21]</sup>。取肝微粒体(5 g·L<sup>-1</sup>) 100 μL 与右美沙芬(0.03 mol·L<sup>-1</sup>) 200 μL 混合。37 ℃ 预孵育 5 min 后加入 NADPH 200 μL 再生系统, 37 ℃ 水浴 30 min, 用冰乙腈 200 μL 终止反应。15 000 × g 离心 20 min, 取上清液 90 μL 与普萘洛尔(1.00 g·L<sup>-1</sup>) 10 μL 混匀后, 高效液相分析。色谱条件同 2.3.1 项。

**2.3.3 CYP3a11 酶活性的测定** 采用氨基比林体外代谢法, 依据甲醛生成量测定 CYP3a11 酶活性<sup>[21]</sup>。取肝微粒体(5 g·L<sup>-1</sup>) 100 μL, 磷酸盐缓冲液(PBS) 150 μL 和 80 mmol·L<sup>-1</sup> 氨基比林 50 μL, 混匀。37 ℃ 预孵育 5 min 后加入 NADPH 再生系统 50 μL, 37 ℃ 孵育 60 min, 加入 30% 三氯乙酸 250 μL 终止反应。再加 Nash 试剂 250 μL, 混匀后 60 ℃ 水浴 10 min, 室温放置 20 min。以不含微粒体的空白体系调零, 于 412 nm 波长处测定吸光度 A。

**2.3.4 CYP2e1 酶活性的测定** 采用苯胺体外代谢法, 根据对氨基酚的生成量来计算 CYP2e1 的酶活性<sup>[21]</sup>。取 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 苯胺 50 μL, 5 g·L<sup>-1</sup> 肝微粒体 100 μL, 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 650 μL 和 NADPH 再生系统 200 μL 混合。37 ℃ 孵育 5 min 后, 加入 30 mol·L<sup>-1</sup> 过氧化氢基丙异苯溶液 50 μL, 37 ℃ 孵育 10 min。然后加入预冷 35% 三氯乙酸溶液 400 μL 终止反应, 离心, 取上清液 1 mL, 加入碳酸钠溶液 500 μL 1 mol·L<sup>-1</sup>, 混匀后再加入 0.2% 酚试剂 500 μL, 室温下反应 40 min 后, 于 630 nm 波长处测定 A。

**2.3.5 测定 CYP450s 和 PXR 的 mRNA 水平** 按 trizol 和 Eastep 总 RNA 提取试剂盒说明书提取各组总 RNA。取总 RNA 2.0 μg, 按说明书操作, 用 TransScript™ One-Step RT-PCR SuperMix 合成 cDNA。cDNA 稀释 50 倍后作为模板, 按说明书用 SYBR® Premix Ex Taq™ II 进行 Real-time PCR 检测, 引物序列如表 1 所示。Real-time PCR 反应体系为 1.0 μL cDNA 模板, 上下游引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>) 各 0.8 μL,

SYBR® Premix Ex Taq™ II 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足 20 μL。反应在 CFX96 型 Real-time PCR 仪上进行, PCR 扩增程序为 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 35 s, 读板, 40 个循环; 绘制溶解曲线。用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 方法分析数据。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primers used for PCR

目的基因	引物序列(5'-3')	产物大小 /bp
CYP1a2	上游AGAGCCTCAAGGACCCAGGT	140
	下游CGTCCCCTACTGCTGACT	
CYP2e1	上游GGATATTCTCTTCAACAAAC	116
	下游AATTGTAAGCCTGGATCCAG	
CYP3a11	上游GAGATGTTAAATATCTGCAT	133
	下游AATTCATCATGAGCTGAAGA	
CYP2d22	上游CTCAGAGTGAATCCTCCTGA	138
	下游TCAATCCTAACTCCAGCTAC	
PXR	上游AGCTGGAGCCGAGTTGGCCT	141
	下游GACATTGAAGTGGTAGCCAT	
GAPDH	上游CCCATCACCATCTTCCAGGA	117
	下游GTGGGCCCGGCCTTCTCCA	

**2.4 测定 CYP450s 和 PXR 的蛋白水平** 取 2.2 项制备的微粒体等蛋白量(30 μg 蛋白)上样,经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,用转膜仪在恒流 2.5 A, 10 min 的条件下将目的条带转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。转膜后,5% BSA 室温封闭 1 h;再分别加入抗 GAPDH 抗体(1:2 000),抗 CYP1a2 抗体(1:2 000),抗 CYP2e1 抗体(1:1 000),抗 CYP3a11 抗体(1:1 000)和抗 CYP2d22 抗体(1:2 000),抗 PXR 抗体(1:1 000),室温孵育 2 h;洗膜 3 次后加入相应二抗(1:5 000),室温孵育 2 h;洗膜 3 次后 ECL 试剂盒曝光显色。凝胶成像系统拍照保存,Quantity One 4.6.2 凝胶分析软件分析灰度值。

**2.5 报告基因法检测辛芍组方对 PXR 的激活作用**

HepG<sub>2</sub> 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基在 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 环境中静置培养。细胞生长至 80% ~ 90% 融合度时,用胰蛋白酶消化并调整细胞密度至 2 × 10<sup>5</sup> 个/mL,接种于 24 孔板中,每孔 0.5 mL。培养 24 h 后,按说明书用 FuGENE6 转染试剂将 pGL3-P3A4, pcDNA3.1-PXR 和 pRL-TK 质粒共转染 HepG2 细胞。转染 6 h 后,将细胞分为二甲亚砜(DMSO)组、苯巴比妥组(10 μmol·L<sup>-1</sup>)和辛芍组方低、中、高剂量组(12.5, 25, 50 mg·L<sup>-1</sup>)。各

组 DMSO 的终体积分数为 0.1%,辛芍组方浓度参照课题组前期工作设置<sup>[14]</sup>。药物处理细胞 36 h 后,用双荧光素酶活性分析试剂盒检测荧光素酶活性,表征药物的 PXR 激活能力。

**2.6 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组数据采用单因素方差分析分析后,用 *t* 检验来比较两组间差异,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

**3 结果**

**3.1 对小鼠的体质量、肝重、肝指数的影响** 与空白组比较,辛芍组方对体质量、肝重和肝指数的都无明显影响。见表 2。

表 2 辛芍组方对小鼠的体质量、肝重、肝指数的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Table 2 Effect of Xinshao formula on weight, liver weight, liver index in mice( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	体质量/g	肝重/g	肝指数/%
空白	-	24.83 ± 0.71	1.47 ± 0.11	0.059 ± 0.005
苯巴比妥	0.07	24.72 ± 1.30	1.55 ± 0.13	0.063 ± 0.006
辛芍组方	0.31	23.91 ± 1.53	1.44 ± 0.17	0.061 ± 0.008
	0.62	24.17 ± 1.48	1.49 ± 0.09	0.062 ± 0.006
	1.25	24.28 ± 0.67	1.54 ± 0.19	0.063 ± 0.008

**3.2 对小鼠肝 CYP450 酶活性的影响** 与空白组比较,辛芍组方上调小鼠肝脏 CYP3a11 的酶活性 1.3 ~ 1.6 倍(*P* < 0.05, *P* < 0.01);中、高剂量辛芍组方能将 CYP1a2 酶活性抑制到空白组的 74% ~ 80% (*P* < 0.05),但是对 CYP2e1 和 CYP2d22 的酶活性无明显影响。见表 3。

**3.3 对小鼠肝 CYP450 酶和 PXR mRNA 表达的影响** 与空白组比较,低、中、高剂量的辛芍组方能上调 CYP3a11 mRNA 水平 1.7 ~ 2.3 倍(*P* < 0.01),高剂量辛芍组方能上调 PXR mRNA 水平 1.4 倍(*P* < 0.05)。但辛芍组方组的 CYP1a2, CYP2e1 和 CYP2d22 mRNA 水平与空白组比较无显著性差异。见表 4。

**3.4 对小鼠肝 CYP450 酶和 PXR 蛋白表达的影响** 与空白组比较,小鼠肝组织中 CYP3a11 的蛋白水平随着辛芍组方的剂量均有不同程度的升高(1.4 ~ 1.6 倍, *P* < 0.01);高剂量辛芍组方能上调 PXR 蛋白水平 1.3 倍(*P* < 0.05);辛芍组方组的 CYP1a2, CYP2e1 和 CYP2d22 蛋白水平与空白组比较无明显差异。见图 1,表 5。

表 3 辛芍组方对小鼠 CYP450 酶活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

**Table 3 Effect of Xinshao formula on enzyme activities of CYP450s in mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )** nmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>

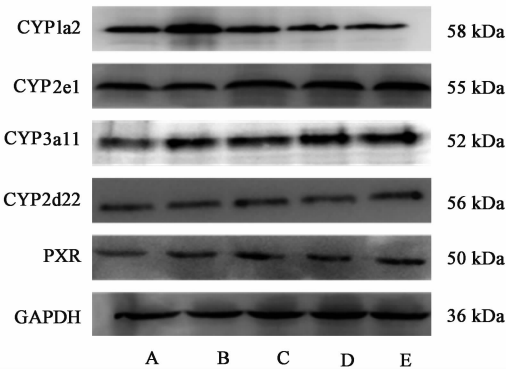
组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	CYP1a2	CYP2e1	CYP3a11	CYP2d22
空白	-	0.432 ± 0.058	0.127 ± 0.026	0.480 ± 0.088	1.174 ± 0.178
苯巴比妥	0.07	0.718 ± 0.131 <sup>2)</sup>	0.133 ± 0.022	0.679 ± 0.105 <sup>2)</sup>	1.209 ± 0.135
辛芍组方	0.31	0.415 ± 0.117	0.123 ± 0.017	0.663 ± 0.136 <sup>1)</sup>	1.145 ± 0.174
	0.62	0.357 ± 0.055 <sup>1)</sup>	0.129 ± 0.020	0.704 ± 0.155 <sup>1)</sup>	1.120 ± 0.156
	1.25	0.321 ± 0.063 <sup>1)</sup>	0.120 ± 0.023	0.771 ± 0.151 <sup>2)</sup>	1.112 ± 0.141

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 4, 5 同)。

表 4 辛芍组方对小鼠 CYP450 酶和 PXR mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

**Table 4 Effect of Xinshao formula on mRNA expressions of CYP450 and PXR in mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )**

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	CYP1a2	CYP2e1	CYP3a11	CYP2d22	PXR
空白	-	1.000 ± 0.178	1.000 ± 0.169	1.000 ± 0.189	1.000 ± 0.175	1.000 ± 0.194
苯巴比妥	0.07	1.913 ± 0.305 <sup>2)</sup>	1.155 ± 0.229	1.782 ± 0.211 <sup>2)</sup>	1.066 ± 0.181	1.149 ± 0.222
辛芍组方	0.31	0.917 ± 0.139	1.116 ± 0.231	1.689 ± 0.206 <sup>2)</sup>	1.090 ± 0.144	1.160 ± 0.199
	0.62	0.923 ± 0.170	1.054 ± 0.153	1.852 ± 0.215 <sup>2)</sup>	1.113 ± 0.162	1.265 ± 0.207
	1.25	0.975 ± 0.240	1.109 ± 0.188	2.269 ± 0.335 <sup>2)</sup>	1.145 ± 0.194	1.414 ± 0.211 <sup>1)</sup>



A. 空白组; B. 苯巴比妥组; C. 辛芍组方 0.31 g·kg<sup>-1</sup> 组; D. 辛芍组方 0.62 g·kg<sup>-1</sup> 组; E. 辛芍组方 1.25 g·kg<sup>-1</sup> 组

图 1 CYP1a2, CYP2e1, CYP 3a11, CYP2d22 和 PXR 蛋白表达水平  
Fig.1 Expression of CYP1a2, CYP2e1, CYP 3a11, CYP2d22 and PXR protein

表 5 辛芍组方对小鼠 CYP450 及 PXR 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

**Table 5 Effect of Xinshao formula on protein expressions of CYP450s and PXR in mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )**

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	CYP1a2/GAPDH	CYP2e1/GAPDH	CYP3a11/GAPDH	CYP2d22/GAPDH	PXR/GAPDH
空白	-	0.785 ± 0.033	1.034 ± 0.119	0.743 ± 0.058	0.898 ± 0.129	0.685 ± 0.177
苯巴比妥	0.07	1.191 ± 0.164 <sup>2)</sup>	1.004 ± 0.145	1.051 ± 0.179 <sup>2)</sup>	0.868 ± 0.215	0.772 ± 0.124
辛芍组方	0.31	0.716 ± 0.104	1.113 ± 0.135	1.071 ± 0.094 <sup>2)</sup>	0.887 ± 0.175	0.789 ± 0.092
	0.62	0.702 ± 0.121	1.124 ± 0.202	1.106 ± 0.120 <sup>2)</sup>	0.869 ± 0.192	0.794 ± 0.087
	1.25	0.708 ± 0.160	1.022 ± 0.124	1.198 ± 0.163 <sup>2)</sup>	0.939 ± 0.151	0.905 ± 0.088 <sup>1)</sup>

3.5 对 PXR 的激活作用 报告基因法结果显示,与空白溶媒 DMSO 组比较,辛芍组方能激活 PXR,显著增加 PXR 的转录活性。随着辛芍组方浓度的增加,PXR 转录活性呈剂量依赖性增强,低、中、高剂量辛芍组方能上调 PXR 转录活性达 1.6 ~ 2.1 倍 ( $P < 0.01$ )。见表 6。

#### 4 讨论

细胞色素 P450 酶多表达于肝脏,其中 CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4 以及 CYP2D6 是人肝内最主要的 P450 亚型,含量约占肝内的 CYP450 酶总量的 50% 以上,并且负责代谢大多数的药物<sup>[22]</sup>。小鼠是用于药物机制研究和药物的化学效能的典型模型之一<sup>[23]</sup>。研究发现,小鼠和人的药物代谢酶的基因具有高度同源性,底物谱及其相近,对小鼠

表 6 辛芍组方对 PXR 的激活作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 6 Effect of Xinshao formula on activation of PXR ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	PXR 激活程度/倍
DMSO	-	1.000 ± 0.146
苯巴比妥	0.07	1.721 ± 0.151
辛芍组方	0.31	1.671 ± 0.121 <sup>2)</sup>
	0.62	1.795 ± 0.188 <sup>2)</sup>
	1.25	2.084 ± 0.157 <sup>2)</sup>

注:与 DMSO 组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

CYP450 酶进行研究,对人亦具有重要参考意义<sup>[21]</sup>。在小鼠中,人 CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4 以及 CYP2D6 的直系同源亚型是分别是 CYP1a2, CYP2e1, CYP3a11 和 CYP2d22<sup>[24]</sup>。因此,本文以小鼠为模型,来探究辛芍组方对 CYP1a2, CYP2e1, CYP3a11 和 CYP2d22 酶活的影响及其机制。

实验结果表明辛芍组方对 CYP2e1, CYP2d22 的酶活性, mRNA 水平和蛋白水平无明显影响;中、高剂量的辛芍组方能抑制 CYP1a2 酶活性,但对 CYP1a2 的 mRNA 水平和蛋白水平无明显影响;辛芍组方低、中、高剂量均可诱导 CYP3a11 酶活性,并且能上调 CYP3a11 的 mRNA 和蛋白水平。说明辛芍组方能通过诱导 CYP3a11 的表达来增加小鼠的肝 CYP3a11 活性。但辛芍组方的 CYP1a2 抑制活性并不通过表达调节这一途径。

PXR 属于核受体超家族中的一员,被外源物激活后,进入细胞核,与 DNA 转录起始位点上游应答元件结合,激活基因转录。研究表明, PXR 是人和啮齿类动物一系列 CYP450 的关键转录调控因子,包括 CYP3A 家族的多个亚型<sup>[25]</sup>。因此,外来药物如果能增加 PXR 的表达或者是能激活 PXR,都能引起 CYP3A 家族亚型的表达上调。本研究发现辛芍组方能上调 CYP3a11 的表达水平。为了研究其机制,笔者进一步研究了辛芍组方对 PXR 表达的影响和激活作用。笔者发现低、中、高的辛芍组方均能激活 PXR,增加 PXR 的转录活性,并且高剂量的辛芍组方还能上调 PXR 的表达。

综上所述,辛芍组方对 CYP2e1, CYP2d22 酶活性没有明显影响;对 CYP1a2 的酶活性有抑制作用,其机制需要进一步研究;对 CYP3a11 酶活性有诱导作用,其机制可能和辛芍组方上调并激活 PXR 从而增加 CYP3a11 表达量相关。

[参考文献]

[ 1 ] 杜犀,何新,黄宇虹,等.应用 Cocktail 探针药物法分析中药对 CYP450 酶活性影响的研究进展[J].中国中药杂志,2016,41(24):4541-4549.

[ 2 ] 李文兰,杜娟,季宇彬,等.肉桂酸的代谢与 CYP450 酶的相关性研究[J].中国药理学杂志,2009,44(4):266-270.

[ 3 ] 王永林,郑林,王爱民,等.高效液相色谱法测定注射用辛芍中野黄芩苷含量[J].贵阳医学院学报,2008,33(1):32-33.

[ 4 ] 李勇军,何迅,刘丽娜,等.HPLC 测定注射用辛芍冻干粉针中芍药苷的含量[J].中国中药杂志,2008,33(2):202-203.

[ 5 ] 王永林,黄勇,兰燕宇,等.注射用辛芍冻干粉针药味配伍作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(7):38-40.

[ 6 ] 苏红,兰燕宇,马琳,等.采用聚酰胺除辛芍(冻干粉针)中赤芍提取物鞣质的工艺研究[J].中国中药杂志,2008,33(6):632-635.

[ 7 ] 杨先炯,王永林,王爱民,等.气相色谱法测定注射用辛芍冻干粉针有机溶剂残留量[J].时珍国医国药,2009,20(2):342-343.

[ 8 ] 苏红,王爱民,王永林,等.注射用辛芍(冻干粉针)指纹图谱研究[J].中国中药杂志,2007,32(15):1515-1517.

[ 9 ] 黄勇,王永林,兰燕宇,等.注射用辛芍对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用和对脑微循环血流量的影响[J].中国新药杂志,2008,17(2):119-123.

[ 10 ] 王海军,王永林,兰燕宇,等.注射用辛芍对麻醉大鼠脑循环的影响[J].时珍国医国药,2008,19(12):2898-2899.

[ 11 ] 王海军,王永林,方泰慧,等.注射用辛芍对神经、呼吸、心血管系统影响的实验研究[J].中国药业,2008,17(23):4-5.

[ 12 ] 刘丽娜,兰燕宇,郑林,等.灯盏细辛、赤芍配伍对血栓形成和凝血时间的交互作用[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(21):157.

[ 13 ] 董永喜,董莉,付思红,等.辛芍组方对氧糖剥夺损伤的神经 PC12 细胞凋亡的影响及其机制研究[J].中国药房,2016,27(28):3907-3910.

[ 14 ] 刘宗炎,董莉,董永喜,等.灯盏细辛与赤芍配伍组方对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 致 PC12 细胞损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(5):180-183.

[ 15 ] 刘亭,刘香香,陈亭亭,等.灯盏细辛和赤芍配伍组方对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及对 NF- $\kappa$ B 通路的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(8):85-90.

[ 16 ] 何迅,李勇军,王永林,等.注射用辛芍(冻干粉针)与

- 常用输液配伍稳定性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(5): 9-11.
- [17] 牟景丽, 兰燕宇, 郑林, 等. 灯盏细辛与赤芍组方的急性毒性实验研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(10): 2335-2337.
- [18] 陈祖云, 迟明艳, 王永林. 辛芍提取物对大鼠的毒性研究[J]. 贵阳医学院学报, 2010, 35(2): 151-153.
- [19] 许黎君, 居文政, 陈为烤, 等. 灯盏细辛注射液对小鼠肝微粒体细胞色素 P450 含量的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2008, 13(10): 1122-1126.
- [20] 田维毅, 王庆学, 王文佳, 等. 葛根散对急性酒精性肝损伤小鼠肝微粒体 CYP450 含量及 Cyp2e1 活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 183-186.
- [21] 王文华, 杨洋, 吴琼, 等. 参芎葡萄糖注射液的丹参组分对小鼠细胞色素 P450 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(22): 150-153.
- [22] Leucuta S E, Vlase L. Pharmacokinetics and metabolic drug interactions [J]. Curr Clin Pharmacol, 2006, 1(1): 5-20.
- [23] 刘莹, 刘楠启, 王国丽. 雌雄小鼠肝脏中 I 相代谢酶的 mRNA 表达谱[J]. 药物生物技术, 2013, 20(5): 381-385.
- [24] 李明明, 周婷, 徐峰. 人、大鼠和小鼠细胞色素 P450 直系同源亚型比较[J]. 药学服务与研究, 2017, 17(2): 81-86.
- [25] 曹昌娥, 赖泳, 杜一民. 常见中药组分对孕烷 X 受体介导的 CYP3A4 转录调节机制的研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(7): 594-598.

[责任编辑 周冰冰]