

参芎葡萄糖注射液对小鼠肝细胞色素 P450 酶活性及表达的影响

王文华¹, 刘亭², 龚菲², 吴林霖², 谢婷², 潘芬¹, 谢德琴¹, 李黎², 王爱民^{1*}

(1. 贵阳医学院药学院, 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004;

2. 贵阳医学院贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004)

[摘要] 目的:研究参芎葡萄糖注射液(Shenxiang glucose injection, SGI)对小鼠肝脏细胞色素 P450 2_{E1}(CYP2_{E1}), 3_{A11}(CYP3_{A11}), 1_{A2}(CYP1_{A2})和 2_{D22}(CYP2_{D22})酶活性以及 mRNA 表达水平的影响。方法:将昆明小鼠随机分为正常组, 苯巴比妥组(0.70 g·kg⁻¹), 以及 SGI 低、中、高剂量组(13.0, 19.5, 26.0 g·kg⁻¹)。各组小鼠每天尾静脉注射药物 1 次, 连续注射 7 d 后处死。取其肝脏制备肝微粒体进行体外代谢实验, 测定 CYP2_{E1}, CYP2_{D22}, CYP1_{A2} 和 CYP3_A 的酶活性。并用实时荧光定量聚合酶链式反应 qPCR 技术定量分析小鼠肝组织中 CYP2_{E1}, CYP2_{D22}, CYP1_{A2} 和 CYP3_{A11} 的 mRNA 表达水平。结果:与正常组比较, 各给药组小鼠肝指数没有显著差异。体外代谢实验表明, 相较正常组, 高剂量 SGI 能下调 CYP2_{E1} 酶活性 0.45 倍($P < 0.05$); 中剂量和高剂量的 SGI 可上调 CYP1_{A2} 酶活性 1.2 ~ 1.23 倍($P < 0.05$); 而 SGI 对 CYP3_A 和 CYP2_{D22} 的活性无显著影响。qPCR 分析发现, 相较正常组, 高剂量 SGI 组 CYP2_{E1} mRNA 的表达下调了 0.6 倍($P < 0.01$); SGI 中剂量和高剂量组的 CYP1_{A2} mRNA 的表达分别上调了 1.7 倍和 2.6 倍($P < 0.05$)。SGI 组和正常组之间的 CYP3_{A11} 和 CYP2_{D22} mRNA 表达量无显著性差异。结论:中高剂量的 SGI 能上调小鼠肝 CYP1_{A2} 的表达, 并诱导小鼠肝 CYP1_{A2} 的酶活性。而高剂量的 SGI 能下调小鼠肝 CYP2_{E1} 的表达, 并抑制小鼠肝 CYP2_{E1} 的酶活性。

[关键词] 参芎葡萄糖注射液; 细胞色素 P450; 肝微粒体

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)09-0127-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016090127

Effects of Shenxiang Glucose Injection on Activities and Expressions of Hepatic Cytochrome P450 Enzymes in Mice

WANG Wen-hua¹, LIU Ting², GONG Fei², WU Lin-lin², XIE Ting²,
PAN Fen¹, XIE De-qin¹, LI Li², WANG Ai-min^{1*}

(1. *Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine (TCM), School of Pharmacy, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China;*

2. *Guizhou Province Key Laboratory of Drug Preparation, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China)*

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Shenxiang glucose injection (SGI) on the activities and mRNA expressions of hepatic cytochrome P450 2_{E1} (CYP2_{E1}), 3_{A11} (CYP3_{A11}), 1_{A2} (CYP1_{A2}) and 2_{D22} (CYP2_{D22}) in mice. **Method:** Kunming mice were randomly divided into normal group, hepatic microsomal enzyme inducer group, and SGI low dose, middle dose and high dose (13.0, 19.5, 26.0 mL·kg⁻¹) groups. The

[收稿日期] 20150511(007)

[基金项目] 贵州省科学技术基金项目(黔科合 J 字[2013]2034 号);贵州省卫生厅科学技术基金项目(丹参与华法林相互作用的机制研究);贵州省教育厅大学生创新创业重点项目(201410660005);贵州省中药现代化专项项目(黔科合中药字[2013]5062 号);黔科合 ZY 字[2013]3020)

[第一作者] 王文华, 硕士, 从事中药药效物质基础及质量控制研究, Tel:15761600284, E-mail:1026512104@qq.com

[通讯作者] *王爱民, 教授, 硕士生导师, 从事中药民族药药效物质基础及质量控制研究, Tel:0851-6908468, E-mail:gywam100@gmail.com

mice were killed after medicines administration once a day for consecutive 7 days by tail intravenous injection. Liver microsomes were prepared for *in vitro* metabolism experiment to determine the enzyme activities of CYP2_{E1}, CYP2_{D22}, CYP1_{A2} and CYP3_A, and quantitative real-time PCR was employed to examine the mRNA expressions of these four CYP450 enzymes in liver tissues of mice. **Result:** There was no significant difference in the liver indexes between various treatment groups and normal group. *In vitro* metabolism experiment showed that, as compared with the normal group, CYP2_{E1} activity was decreased by 0.45 times in the SGI high dose group ($P < 0.05$), and CYP1_{A2} activities were increased by 1.20-1.23 times in the SGI middle dose and high dose groups ($P < 0.05$). SGI was found to have no significant effect on the activities of CYP3_A and CYP2_{D22}. The results of fluorescence quantitative PCR showed that, as compared with the normal group, CYP2_{E1} mRNA expression was decreased by 0.45 times in the SGI high dose group ($P < 0.01$), and CYP1_{A2} mRNA expressions were increased by 1.7 times and 2.6 times respectively in SGI middle dose and high dose groups ($P < 0.05$). There was no significant difference between SGI groups and normal group in the mRNA expressions of CYP3_{A11} and CYP2_{D22}. **Conclusion:** Middle dose and high dose SGI could up-regulate the hepatic CYP1_{A2} mRNA expressions and induce the enzyme activity of CYP1_{A2} in mice; high dose SGI could down-regulate the hepatic CYP1_{A2} mRNA expressions and inhibit enzyme activity of CYP2_{E1} in mice.

[**Key words**] Shenxiong glucose injection; cytochrome P450; liver microsomes

细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450, CYP450) 主要存在于肝脏中,参与多种内源和外源性物质的氧化代谢,在药物代谢中起到了重要的作用。环境因素,性别,年龄,服药时间的长短以及特定结构的外源物都会影响 CYP450 的活性^[1],进而对药物的代谢产生影响。在我国,临床上中西药联用非常普遍,并时常产生药物代谢性相互作用,导致不良反应的发生。研究表明,CYP450 的激活或抑制是引起药物代谢性相互作用,导致不良反应发生的重要原因^[2]。因此,研究中药对 CYP450 活性和表达的影响,对增加临床中西药联合用药的合理性和安全性具有指导意义。参芎葡萄糖注射液 (SGI) 是由丹参和盐酸川芎嗪配伍组成的中药注射剂^[3],临床上主要用于心脑血管疾病的治疗^[4-5],在临床广泛应用。但参芎葡萄糖注射液对肝药酶活性的影响尚未见报道,因而无法预测与其他药物联用可能导致的药物相互作用及可能产生的后果。因此,本研究拟采用体外代谢法和实时荧光定量聚合酶链式反应 (qPCR) 技术,检测参芎葡萄糖注射液对小鼠肝组织中 4 种主要 CYP450 亚型酶活性和 mRNA 表达的影响,分析其与其他临床常用药物联用时可能产生的相互作用,为临床合理、安全联合用药提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级昆明种雄性小鼠,体重 22 ~ 25 g,由贵阳医学院实验动物房提供,动物合格证号 SCXK(黔)2012-0001。

1.2 药物及试剂 参芎葡萄糖注射液 (贵州景峰注射剂有限公司,批号 H52020703),苯巴比妥 (北京索莱宝有限公司,批号 20150508),Trizol (美国 Invitrogen 公司,批号 79402),Eastep 总 RNA 提取试剂盒 (美国 Promega 公司,批号 20140801),TransScript™ One-Step RT-PCR SuperMix (大连宝生物有限公司,批号 RR047A),CYP1_{A2}, CYP2_{E1}, CYP3_{A11}, CYP2_{D22} 以及甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 的引物由上海生工公司合成;DEPC 水 (上海生工公司,批号 DD1005),SYBR® Premix Ex Taq™ II (大连宝生物有限公司,批号 RR820A),Na₂NADP (上海海叶生物有限公司,批号 SM0313KB14),G-6-P (上海海叶生物有限公司,批号 WJ0717EA14),G-6-PDH (上海海叶生物有限公司,批号 K09M6C1),右美沙芬 (美仑生物,批号 A0516AS),普萘洛尔 (美仑生物,批号 F0315AS),非那西丁 (美仑生物,批号 A1116AS),甲醇 (科密欧试剂,批号 20150105),MgCl₂,磷酸氢二钾,磷酸二氢钾,氯化钾,氯化钠,无水氯化钙和 Na₂S₂O₄ (均为分析纯)。

1.3 仪器 CFX96 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司),Biomate 3S 型核酸蛋白紫外测定仪 (美国 Thermo 公司),Thermo fresco 17 型高速冷冻离心机 (美国 Thermo 公司),PHS-3C 型 pH 计 (上海仪电科学仪器股份有限公司),Ultimate 3000 UPLC-PDA 型高效液相仪器 (美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 动物分组 将雄性昆明种小鼠 25 只随机分为 5 组,正常组,苯巴比妥组($0.70 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),根据 SGI 的临床剂量换算成小鼠的剂量,低剂量组($13.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),中剂量组($19.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),高剂量组($26.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),各组小鼠每天注射 1 次,分别连续给药 7 d。

2.2 肝指数测定以及肝微粒体的制备 小鼠末次给药禁食 16 h,断颈处死,剪开腹腔取其肝脏,用装满冰冷生理盐水的注射器,经肝门静脉灌注法除去肝中残血,洗至土黄色,用冰冷的 KCl 溶液漂洗肝脏 3 次,用滤纸吸干水分后称重,计算肝指数(肝指数 = 小鼠肝脏质量/小鼠体重 $\times 100\%$)。把肝组织剪碎,将肝组织碎片加入约 2 倍肝组织质量的匀浆液中。匀浆后两层纱布过滤,将得到的组织匀浆液在 $10\,000 \times g$ 离心场力作用下离心 20 min,取上清液与 CaCl_2 溶液按 10:1 的比例进行混合,最后在 $15\,000 \times g$ 离心场力作用下离心 20 min,弃去上清液,粉红色沉淀即为肝微粒体。用 KCl 磷酸盐缓冲液洗涤上述沉淀,在 $15\,000 \times g$ 离心场力作用下离心 20 min,用 20% 甘油的磷酸盐缓冲液重新均匀混悬,即为微粒体混悬液。混悬液分装后 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存。采用 BCA 法测定微粒体蛋白浓度。

2.3 药物代谢酶的活性测定

2.3.1 CYP1_{A2}酶活性的测定 采用非那西丁体外代谢法来测定 CYP1_{A2}酶活性^[6]。将待测肝微粒体稀释到 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,取 100 μL 肝微粒体于 1.5 mL 离心管中,加入非那西丁($0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)200 μL , $37\text{ }^\circ\text{C}$ 振荡孵育 10 min。然后加入 NADPH 200 μL 再生系统($2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{NADP}$, $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ G-6-P}$, $4 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1} \text{ G-6-PDH}$, $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$),于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中振荡 30 min 后,加入三氯乙酸 200 μL 终止反应。 $15\,000 \times g$ 离心 20 min,取 90 μL 上清液加入普萘洛尔($1.07 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)10 μL ,混匀,用高效液相检测。色谱条件为上样量 20 μL ; Luna C₁₈ 色谱柱($4.6 \text{ mm}\times 250 \text{ mm}$, 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 $0.6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $40\text{ }^\circ\text{C}$,检测波长 280 nm。

2.3.2 CYP2_{D22}酶活性的测定^[6] 采用右美沙芬体外代谢高效液相测定,将待测肝微粒体稀释到 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,取肝微粒体 100 μL 于 1.5 mL 离心管中,加入右美沙芬($0.03 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)200 μL 。 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 振荡孵育 10 min 后,加入 NADPH 200 μL 再生系统

($2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{NADP}$, $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ G-6-P}$, $4 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1} \text{ G-6-PDH}$, $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$),于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中振荡孵育 30 min,最后加入三氯乙酸 200 μL 终止反应。 $15\,000 \times g$ 离心 20 min,取上清液 90 μL 加入普萘洛尔($1.07 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)10 μL ,混匀,用高效液相检测。色谱条件同 2.3.1。

2.3.3 CYP3_A酶活性的测定 采用氨基比林 N-脱甲基酶 ADM 法^[7],通过 Nash 比色法测定甲醛生成量的多少来反映 CYP3_A 的活性。将待测肝微粒体稀释到 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,取 100 μL ,加入 PBS 缓冲液 0.15 mL,混匀后加入 $86.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨基比林 0.05 mL,混匀, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 3 min 后加入 NADPH 发生系统 0.05 mL($2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{NADP}$, $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ G-6-P}$, $4 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1} \text{ G-6-PDH}$, $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$), $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 60 min 后取出,加入 30% 三氯乙酸 0.25 mL 终止反应。再加 Nash 试剂 0.25 mL,混匀后 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 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 CYP2_{E1}酶活性的测定 采用苯胺羟化酶 ANH 法^[7],用分光光度法测定对氨基酚的生成量,从而反映 CYP2_{E1} 的活性。将待测肝微粒体稀释到 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,取 100 μL 加入测定管,再加入苯胺溶液 0.05 mL,对照管加入水 0.05 mL。 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 30 min,加入冰冷 20% 三氯乙酸溶液 1.0 mL,冰浴 5 min。取上清液 1.0 mL,加入 1% 酚试剂 1.0 mL,混匀,再加入碳酸钠 1.0 mL 混匀。室温下反应 30 min,于 630 nm 波长处测定 A。

2.4 小鼠总 RNA 的提取与纯化 末次给药禁食 16 h,断颈处死,剪开腹腔取其肝脏,用预冷的生理盐水将肝脏的血冲洗干净,然后取肝脏约 20 mg 于已除 RNA 酶的手动玻璃匀浆器中,在冰上加入 Trizol 进行匀浆,并按 Eastep RNA 提取试剂盒说明书,提取纯化肝脏总 RNA。

2.5 RAN 质量检测 取 RNA 样品 10 μL 加入 DEPC 水 990 μL 稀释 100 倍,用核酸蛋白紫外测定仪检测 RNA 样品 260 nm,280 nm 波长下的吸收度。根据 A_{260} 值计算样品浓度,用 A_{260}/A_{280} 判断样品纯度。采用 1.5% 琼脂糖凝胶, $1 \times \text{TAE}$,恒压 ($5 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$),电泳 30 min,通过 28 S 和 18 S 条带灰度值比值来分析 RNA 样品的完整性。

2.6 小鼠肝脏 CYP450 mRNA 水平的测定 取 RNA 2.0 μg 按照 TransScript™ One-Step RT-PCR SuperMix 说明书进行逆转录反应。20 μL qPCR 反

应体系包括逆转录反应产物 2.0 μL, 上下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 0.8 μL, SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 10 μL。在 CFX96 qPCR 仪上进行反应, PCR 扩增程序为 95 °C 持续 30 s, 95 °C 持续 5 s, 60 °C 持续 34 s, 共 40 个循环, 循环结束后绘制溶解曲线。每次扩增均设置 GAPDH 内参照。用 2^{-ΔΔC_t} 方法分析数据。所用引物序列见表 1。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 引物序列

Table 1 primer sequences

基因	引物序列	产物长度 /bp
CYP1 _{A2}	5'-CATCCCCACAGCACAACAA-3'	83
	5'-TCCCACCTTGGCCAGGACT-3'	
CYP3 _{A11}	5'-ACAAACAAGCAGGGATGGAC-3'	89
	5'-GCTAGAGGAGCACCAAGCTG-3'	
CYP2 _{D22}	5'-CAGTGTTGTACTAAATGGGCT-3'	158
	5'-GCTAGGACTATACCTTGAGAGCG-3'	
CYP2 _{E1}	5'-AGTGCAGAGCGCTTGTACACA-3'	197
	5'-AAGAACAGGTCGGCCACAGT-3'	
GAPDH	5'-GGCCTCCAAGGAGTAAGACC-3'	101
	5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3'	

3 结果

3.1 对小鼠肝指数和微粒体蛋白含量的影响 各实验组与正常组之间的肝指数没有显著性差异, 说明苯巴比妥和各剂量的参芎葡萄糖注射液对小鼠肝

脏质量没有明显影响。而各实验组与正常组之间在微粒体蛋白含量上存在差异, 其中苯巴比妥组和参芎葡萄糖注射液低剂量组的微粒体蛋白含量明显升高 2 倍多 ($P < 0.05$), 参芎葡萄糖注射液中高剂量组的微粒体蛋白含量升高了 4 倍多 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 参芎葡萄糖注射液对小鼠肝指数和微粒体蛋白含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effects of SGI on liver index and microsome protein content in mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肝指数/%	蛋白含量/g·L ⁻¹
正常	-	0.067 ± 0.101	5.49 ± 0.95
苯巴比妥	0.7	0.077 ± 0.021	14.68 ± 1.23 ¹⁾
SGI	13.0	0.063 ± 0.062	14.23 ± 0.52 ¹⁾
	19.5	0.065 ± 0.107	24.62 ± 0.85 ²⁾
	26.0	0.067 ± 0.029	28.20 ± 0.50 ²⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 3~4 同)。

3.2 对小鼠肝脏 CYP1_{A2}, CYP2_{D22}, CYP2_{E1} 和 CYP3_A 酶活性的影响 与正常组比较, 阳性苯巴比妥组显著上调了 CYP2_{E1}, CYP3_A, CYP1_{A2} 的酶活性, 这与文献报道一致^[8]。实验结果表明, 高剂量的参芎葡萄糖注射液对于小鼠肝脏 CYP2_{E1} 活性有着明显的抑制作用; 与正常组比较, 高剂量参芎葡萄糖注射液能下调 CYP2_{E1} 酶活性 0.45 倍 ($P < 0.05$)。与正常组比较, 中剂量和高剂量组的 CYP1_{A2} 的酶活性上调了 1.2 ~ 1.23 倍 ($P < 0.05$), 说明中剂量和高剂量的参芎葡萄糖注射液可以诱导小鼠肝脏 CYP1_{A2} 活性。而参芎葡萄糖注射液对 CYP3_A 和 CYP2_{D22} 的酶活性无显著影响。见表 3。

表 3 参芎葡萄糖注射液对小鼠肝脏 CYP2_{E1}, CYP1_{A2}, CYP2_{D22} 和 CYP3_A 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effects of SGI on enzyme activities of liver CYP2_{E1}, CYP1_{A2}, CYP2_{D22} and CYP3_{A11} in mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CYP2 _{E1}	CYP1 _{A2}	CYP2 _{D22}	CYP3 _A
正常	-	0.10 ± 0.01	0.98 ± 0.07	1.08 ± 0.07	0.18 ± 0.01
苯巴比妥	0.7	0.17 ± 0.01 ¹⁾	1.16 ± 0.04 ¹⁾	0.98 ± 0.08	0.22 ± 0.02 ¹⁾
SGI	13.0	0.09 ± 0.00	1.15 ± 0.07	1.16 ± 0.03	0.20 ± 0.01
	19.5	0.08 ± 0.00	1.20 ± 0.01 ¹⁾	1.17 ± 0.04	0.18 ± 0.01
	26.0	0.04 ± 0.01 ¹⁾	1.23 ± 0.04 ²⁾	1.19 ± 0.02	0.16 ± 0.02

3.3 对 CYP1_{A2}, CYP2_{D22}, CYP2_{E1} 和 CYP3_{A11} mRNA 表达的影响 参芎葡萄糖注射液高剂量组 CYP2_{E1} 的 mRNA 水平为正常组的 0.6 倍, 其差异具显著性意义 ($P < 0.01$); 参芎葡萄糖注射液高剂量组和中剂量组 CYP1_{A2} 的 mRNA 水平分别为正常组的 2.6 倍和 1.7 倍, 其差异具有显著性意义 ($P < 0.05$); 参

芎葡萄糖注射液高、中、低剂量组 CYP3_{A11} 和 CYP2_{D22} 的 mRNA 水平与正常组比较, 差异无显著性意义。以上结果说明, 参芎葡萄糖注射液对 CYP1_{A2} 的表达有诱导作用, 而对 CYP2_{E1} 的表达有抑制作用。这一结果与体外代谢实验的结果相符。见表 4。

表 4 参芎葡萄糖注射液对小鼠肝脏 CYP1_{A2}, CYP2_{D22}, CYP2_{E1} 和 CYP3_{A11} mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effects of SGI on expression of liver CYP1_{A2}, CYP2_{D22}, CYP2_{E1} and CYP3_{A11} mRNA in mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CYP1 _{A2} mRNA	CYP2 _{E1} mRNA	CYP3 _{A11} mRNA	CYP2 _{D22} mRNA
正常	-	1.000 ± 0.058	1.000 ± 0.404	1.000 ± 0.102	1.000 ± 0.105
苯巴比妥	0.7	1.433 ± 0.126	1.263 ± 0.173	1.171 ± 0.271	0.861 ± 0.143
SGI	13.0	1.472 ± 0.122	1.105 ± 0.283	1.304 ± 0.096	0.852 ± 0.097
	19.5	1.720 ± 0.158 ¹⁾	1.031 ± 0.401	1.203 ± 0.209	1.220 ± 0.112
	26.0	2.641 ± 0.303 ²⁾	0.664 ± 0.061 ²⁾	0.832 ± 0.087	1.266 ± 0.006

4 讨论

细胞色素 P450 酶多表达于肝脏,可代谢人体内约 75% 的药物^[9],其中 CYP1_{A2}, CYP2_{E1}, CYP3_{A4} 以及 CYP2_{D6} 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^[10]。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^[11]。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 CYP450 酶进行研究,对人亦具有重要参考意义^[12]。因此,本文以小鼠为模型,来探究参芎葡萄糖注射液对肝药酶的酶活和表达的影响。由于尚无 CYP3_{A11} 酶活性的测定方法,所以本实验用 CYP3_A 酶活性来间接反映 CYP3_{A11} 的酶活性。

根据已有文献,本研究用生理盐水组和苯巴比妥组分别作为正常组和阳性药组^[13],根据临床用药剂量设置了参芎葡萄糖注射液低中高剂量组。实验结果表明,参芎葡萄糖注射液对小鼠肝脏系数影响不显著,但均能提高肝微粒体蛋白含量。相较于正常,高剂量的参芎葡萄糖注射液能下调 CYP2_{E1} 酶活性 0.45 倍;中剂量和高剂量的参芎葡萄糖注射液可上调 CYP1_{A2} 活性 1.2 ~ 1.23 倍。而正常组和给药组之间的 CYP3_A 和 CYP2_{D22} 酶活性无显著影响。

为了探究参芎葡萄糖注射液影响 CYP2_{E1} 和 CYP1_{A2} 活性的可能机制,本文对给药后 P450 亚型转录的变化进行了研究。本文首先考察了多种 RNA 提取方法,最终确定了使用 Trizol 进行组织匀浆,Eastep 总 RNA 提取试剂盒进行基因组 DNA 消化和 RNA 纯化的提取方案。Trizol 可有效抑制 RNA 酶活性,确保 RNA 样品的完整性,Eastep 总 RNA 提取试剂盒可在纯化柱上进行基因组 DNA 消化,消除了基因组 DNA 对实验结果的影响,并且也简化了实验步骤。用该方案提取到的 RNA,完整性和纯度均符合 qPCR 的要求,且具有较高的重复性。

结果表明,参芎葡萄糖注射液可明显下调

CYP2_{E1} 的 mRNA 水平,上调 CYP1_{A2} 的 mRNA 水平,而对 CYP3_{A11} 和 CYP2_{D22} 的 mRNA 水平没有显著影响。这一结果与与体外代谢实验的结果相符。这提示 CYP2_{E1} 活性的下降和 CYP1_{A2} 活性的升高,跟其转录水平有关,转录水平的减弱或增强,调控了蛋白的翻译,进而间接对酶活产生了影响。CYP1_{A2} 可参与咖啡因、非那西丁、氯氮平、美西律、普萘洛尔等多种药物的代谢^[14];CYP2_{E1} 是许多有机小分子化合物和药物的代谢酶,如乙醇、扑热息痛、氯唑沙宗等^[15-16]。因此当参芎葡萄糖注射液与由 CYP1_{A2}, CYP2_{E1} 代谢的药物联合使用时,应注意适当调整这些药物的使用剂量。

有文献报道丹参水溶性成分原儿茶醛对 CYP3_{A4}, CYP2_{D6} 的活性呈弱抑制作用^[17]。川芎嗪可影响 CYP3_A 家族的酶活性^[18]。参芎葡萄糖注射液是丹参水提物和盐酸川芎嗪配伍组成的中药注射剂,本研究发现其对小鼠肝 CYP2_{E1} 有抑制作用,对 CYP1_{A2} 有诱导作用,而对 CYP2_{D22} 以及 CYP3_A 均无显著影响。本实验结果与文献的差异可能和所用动物模型有关,但也从一个侧面提示笔者,中药复方制剂对 CYP450 酶影响并不是其单一成分的相加或相减。

[参考文献]

[1] Stamou M, Korwel I, Lein P J, et al. Cytochrome p450 mRNA expression in the rodent brain: species-, sex-, and region-dependent differences [J]. Drug Metab Dispos, 2014, 42 (2) : 239-244.

[2] Sinz M, Wallace G, Sahi J. Current industrial practices in assessing CYP450 enzyme induction: preclinical and clinical [J]. AAPSJ, 2008, 10 (2) : 391-400.

[3] 郑林, 庞秀清, 兰燕宇, 等. UPLC 同时测定参芎葡萄糖注射液中 6 种主要成分 [J]. 中草药, 2012, 34 (7) : 1276-1279.

[4] 刘旭, 郭盛. 参芎葡萄糖注射液治疗冠心病心肌缺血临床观察 [J]. 中国中医急诊, 2008, 17 (7) : 903-905.

- [5] 唐东晖. 参芎胶囊联合银杏叶提取物治疗脑血管性痴呆的临床观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(23): 2542-2543.
- [6] 王永辉. 柴胡总皂苷对小鼠药物代谢酶及 P-糖蛋白的影响[D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.
- [7] 徐淑云, 卞如濂, 陈修, 等. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 517-519.
- [8] 王德才, 高允生, 齐永秀. 葛根素对小鼠和大鼠肝微粒体细胞色素 P450 的影响[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(10): 1194-1195.
- [9] Larsen B T, Guterman D D, Hatoum O A. Emerging role of epoxyeicosatrienoic acids in coronary vascular function [J]. Eur J Clin Invest, 2006, 36(5): 293-300.
- [10] Leucuta S E, Vlase L. Pharmacokinetics and metabolic drug interactions [J]. Curr Clin Pharmacol, 2006, 1(1): 5-20.
- [11] 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.
- [12] Guo Y, Pope C, Cheng X, et al. Dose-response of barbering on hepatic cytochromes P450 Mna expression and activities in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 13(8): 111-118.
- [13] 陈为烤, 居文政, 许黎君, 等. 脉络宁注射液对小鼠肝药酶活性的影响[J]. 药学与临床研究, 2008, 16(5): 351-354.
- [14] 马璟, 钱蓓丽. 人类细胞色素 P450s 研究概况及其在新药安全性评价中的应用[J]. 中国新药杂志, 2002, 11(1): 36-42.
- [15] 翁小刚, 朱晓新, 梁日欣, 等. 中草药代谢与细胞色素 P450 的关系研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(12): 104-107.
- [16] 刘萍, 黄颖, 胡本容, 等. 甲基莲心碱对大鼠肝 CYP450 酶含量及 CYP2_{D1}, CYP3_{A1}, CYP2_{E1} mRNA 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 161-164.
- [17] 叶娜, 万丽, 杨秋楠, 等. 丹参注射液对人肝微粒体酶 CYP2_{C9}, CYP2_{C19}, CYP2_{D6} 体外抑制作用的研究[J]. 药物评价研究, 2014, 37(6): 502-506.
- [18] 况晓东, 李新华, 熊玉卿. 川芎嗪在大鼠肝微粒体系统中的代谢研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1971-1975.

[责任编辑 周冰冰]

《中国实验方剂学杂志》社声明

本刊近期发现有某些网站使用类似本刊网站的域名, 冒用本刊名义, 骗取审稿费及版面费。

现本刊郑重声明: ① <http://www.syfjxzz.com> 为本刊唯一域名, 其他域名均非本刊。

② 本刊不会以任何名义收取任何审稿费。

③ 投稿成功后, 为确保稿件安全请与责任编辑电话联系。

对于假冒本刊名义、侵犯本刊权利的不正当行为, 本刊将通过法律程序进行维权。