

参芎葡萄糖注射液的丹参组分对小鼠细胞色素 P450 的影响

王文华¹, 杨洋¹, 吴琼¹, 郑林¹, 李黎¹, 何彬¹, 王爱民², 李勇军², 刘亭^{1*}

(1. 贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004;

2. 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004)

[摘要] 目的:考察参芎葡萄糖注射液中的主要组分丹参(*Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, SM)水提取物对小鼠细胞色素 P450 酶(CYPs)主要亚型(CYP1A2, CYP2D22, CYP3A11 和 CYP2E1)的影响。方法:昆明种雄性小鼠分为 5 组,分别为正常组,苯巴比妥组,丹参水提取物组($3.9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),丹参低、高剂量组($2.6, 5.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),连续 7 d 给药。取各组小鼠的肝脏组织,提取肝脏中 RNA 以及制备肝微粒体,检测各组小鼠 CYP450 酶活性, mRNA 和蛋白水平的变化。结果:与正常组比较,丹参高剂量组可以显著降低 CYP2E1 的酶活性, mRNA 和蛋白表达的水平($P < 0.05$),丹参对 CYP1A2, CYP3A11, CYP2D22 没有显著性影响。结论:参芎葡萄糖注射液中的丹参组分可以影响 CYP2E1 的酶活性, mRNA 以及蛋白的表达。

[关键词] 丹参; 细胞色素 P450 酶; 细胞色素 P450 酶 1A2; 细胞色素 P450 酶 2D22; 细胞色素 P450 酶 3A11; 细胞色素 P450 酶 2E1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)22-0150-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016220150

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160906.0919.036.html>

[网络出版时间] 2016-09-06 9:19

Effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* in Shenxiong Glucose Injection on Cytochrome P450 in Mice

WANG Wen-hua¹, YANG Yang¹, WU Qiong¹, ZHENG Lin¹, LI Li¹,
HE Bin¹, WANG Ai-min², LI Yong-jun², LIU Ting^{1*}

(1. *Guizhou Provincial Key Laboratory of Drug Preparation, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China*; 2. *Engineering Research Center for Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine under Ministry of Education, Guiyang 550004, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of water extracts from the main component *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* (SM) in Shenxiong glucose injection on subtypes (CYP1A2, CYP2D22, CYP3A11 and CYP2E1) of mice cytochrome P450 (CYP450). **Method:** Male mice from Kunming were randomly divided into blank group, phenobarbital group, and SM water extract group ($3.9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), and SM low and high-dose groups ($2.6, 5.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). Then the mice were killed after the animals were administered with medicines by gavage once daily for consecutively 7 days. Liver RNAs were collected to prepare microsomes, in order to determine the enzyme activities of CYP2E1, CYP2D22, CYP1A2 and CYP3A, and quantitative real-time PCR and Western blot was employed to examine the mRNA and protein expressions of these four CYP450 enzymes in liver tissues of mice. **Result:** Compared with the normal group, CYP2E1 activity, and mRNA and protein expressions were decreased in the SM high-dose group ($P < 0.05$). SM had no effect on the activities of CYP1A2,

[收稿日期] 20150829(009)

[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);贵州省中药现代化专项(黔科合中药字[2013]5062 号,黔科合 ZY 字[2013]3020);贵州省民族药与中药开发应用工程技术研究中心(贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目黔科合重 G 字[2013]4001)

[第一作者] 王文华, 硕士, 从事中药药理研究, Tel:15761600284, E-mail:1026512104@qq.com

[通讯作者] * 刘亭, 副教授, 硕士生导师, 从事中药药理研究, Tel:14785563829, E-mail:1586740@qq.com

CYP3A and CYP2D22. **Conclusion:** SM in Shenxiong glucose injection has effects on CYP2E1 enzymatic activity, and mRNA and protein expressions.

[**Key words**] *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; cytochrome P450; cytochrome P450 1A2; cytochrome P450 2D22; cytochrome P450 3A11; cytochrome P450 2E1

中药以复方为主,但中药成分复杂,进入人体后经过药物代谢酶的转化,对细胞色素 P450 酶(CYP450)的酶活性产生影响,不同的中药成分形成了复杂的体系^[1]。参芎葡萄糖注射液主要成分丹参和川芎嗪组成,临床上主要用于心脑血管疾病的治疗^[2-3]。课题组前期药理研究表明参芎葡萄糖注射液可以上调小鼠肝细胞色素 P450 酶 CYP1A2 的表达以及抑制小鼠肝 CYP2E1 的表达。研究丹参成分对 CYP450 的影响,更进一步阐明复方的表达是单方的影响还是复方整体之间的相互作用。本实验将从酶活性水平, mRNA 表达和蛋白质表达 3 个方面研究丹参组分对 CYP450 的多个亚型的影响,为完善该药的代谢性相互作用和指导临床合理用药奠定基础。

1 材料

1.1 动物 清洁级昆明雄性小鼠,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 丹参(厂家提供), Eastep 总 RNA 提取试剂盒(美国 Promega 公司,批号 20140801), SYBR® Premix Ex Taq™ II 及 Trans Script™ One-Step 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR) Super Mix(大连宝生物有限公司,批号分别为 RR820A, RR047A); Na₂NADP, 葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-P)及葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH)(上海海叶生物生物公司,批号分别为 SM0313KB14, WJ0717EA14, K09M6C1); 右美沙芬、普萘洛尔、非那西丁(大连美仑生物公司,批号分别为 A0516AS, F0315AS, A1116AS); β-肌动蛋白(β-actin), 细胞色素 P450 酶 CYP1A2, CYP2E1 抗体(巴傲德生物有限公司,批号分别为 BS6007M, BS2188, BS6577); CYP1A2, CYP2E1, CYP3A11, CYP2D22 及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的引物由上海生工公司合成。

1.3 仪器 CFX96 型实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)仪及电泳仪、转膜仪(美国 Bio-Rad 公司), Biomate 3S 型核酸蛋白紫外测定仪, Thermo fresco 17 型高速冷冻离心机及 Ultimate 3000 型 UPLC-PDA 高效液相色谱仪(美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 丹参的提取 称取丹参药材粉末(过 40 目

筛)0.5 g,加水 25 mL,称定质量,加热回流 2 h,再称定质量,用水补足减失的质量,摇匀,2 300 × g 离心 5 min,取上清液用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,取续滤液,即得,置于 4 °C 保存备用。

2.2 小鼠肝微粒体的制备 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,经肝门静脉灌洗法除去肝中残血,用冰冷的 KCl 溶液漂洗肝脏 3 次。把肝组织剪碎,匀浆后两层纱布过滤,将得到的组织匀浆液在 1 万 × g 离心 20 min,采用 CaCl₂ 沉淀法制备肝微粒体,最后在 15 000 × g 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 × g 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 °C 冰箱中保存。采用 BCA 法测定微粒体蛋白浓度。药物代谢酶的活性测定方法参考文献^[4-5]。

2.3 小鼠 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,然后取肝脏大约 20 mg 于手动玻璃匀浆器中,并按 Eastep RNA 提取试剂盒说明书,提取纯化肝脏总 RNA。利用核酸蛋白紫外测定仪检测 RNA 样品 260, 280 nm 波长下的吸光度 A。根据 A₂₆₀ 值计算样品浓度,用 A₂₆₀/A₂₈₀ 判断样品纯度。采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,通过 28S 和 18S 条带灰度值比值来分析 RNA 样品的完整性。

2.4 小鼠肝脏 mRNA 水平的测定 取 RNA 2.0 μg 按照 Real-time PCR 说明书进行逆转录反应。通过特异性引物对小鼠肝组织中的 CYP1A2, CYP2E1, CYP3A11, CYP2D22 和内参基因 GAPDH 进行扩增,基因引物序列 GAPDH 上游 5'-GGCCTCCAAGGAGT AAGACC-3', 下游 5'-AGGGGTCTAGGCAACTG-3'; CYP1A2 上游为 5'-CATCCCCACAGCACAACAA-3', 下游为 5'-TCCCCTTGCCAGGACTTC-3'; CYP2E1 上游 5'-AGTGCAGAGCGCTTGACACA-3', 下游为 5'-AAGAACAGGTCCGCCACAGT-3'; CYP3A11 上游为 5'-ACAAACAAGCAGGGATGGAC-3', 下游为 5'-GGTAGAGGAGCACCAAGCTG-3'; CYP2D22 上游为 5'-CAGTGGTTGACTAAATGGG CT-3', 下游 5'-GCTAGGACTATACCTTGAGAGCG-3'。20 μL Real-

time PCR 反应体系包括:2.0 μL 逆转录反应产物,上下游引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 0.8 μL , SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 10 μL 。在 CFX96 荧光定量 PCR 仪上进行反应,PCR 扩增程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析数据。

2.5 小鼠肝脏 CYP450 蛋白的测定 小鼠肝微粒体采用 BCA 蛋白定量方法,用裂解液把肝微粒体的浓度调节至 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,超声裂解,4 $^{\circ}\text{C}$,15 000 $\times g$ 离心 10 min 去上清。取 50 μg 蛋白,98 $^{\circ}\text{C}$ 沸水浴煮沸 5 min。样品 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳,80 V 电压电泳至分离胶,100 V 电压电泳至溴酚蓝前缘移动到凝胶底部。电泳完成后,PVDF 膜以及凝胶经 30 min 的转移液冰浴,将蛋白从胶上转印到 PVDF 膜上,将 PVDF 膜浸于含 5% BSA 的 1 \times TBST (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 8.0,150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl

pH 7.7,0.05% 聚山梨酯),室温震荡 1.5 h,加适量以含 5% BSA 的 1 \times TBST 稀释的一抗在室温下孵育 1 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。用 1 \times TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加 1 \times TBST 稀释的 1:20 000 的二抗,室温孵育 1 h 后用 1 \times TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。按照 ECL 发光试剂盒说明书进行显色。

2.6 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。

3 结果

3.1 对 CYP1A2, CYP2D22, CYP2E1 和 CYP3A 酶的影响 与正常组比较,丹参组分高剂量组可以下调小鼠肝脏 CYP1A2, CYP3A 的活性,但无统计显著性;相较正常,丹参组分高剂量组能下调 CYP2E1 酶活性 0.32 倍 ($P < 0.05$)。与正常组比较,丹参对 CYP1A2, CYP3A 和 CYP2D22 的酶活性无显著影响。见表 1。

表 1 丹参组分对小鼠肝 CYP450 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* (SM) on enzyme activities of liver CYP2E1, CYP1A2, CYP2D22 and CYP3A11 in mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	CYP1A2	CYP2E1	CYP3A	CYP2D22
正常	-	0.427 \pm 0.045	0.034 \pm 0.008	0.321 \pm 0.108	0.416 \pm 0.037
苯巴比妥	70	0.442 \pm 0.091	0.047 \pm 0.022	0.852 \pm 0.057 ¹⁾	0.515 \pm 0.424
SM 临床剂量	2.6	0.391 \pm 0.056	0.023 \pm 0.007	0.576 \pm 0.325	0.514 \pm 0.032
丹参组分	3.9	0.268 \pm 0.052	0.015 \pm 0.005	0.461 \pm 0.294	0.504 \pm 0.067
	5.2	0.235 \pm 0.023	0.011 \pm 0.001 ¹⁾	0.203 \pm 0.139	0.645 \pm 0.044

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

3.2 对 CYP450 mRNA 表达的影响 丹参组分高剂量组 CYP2E1 的 mRNA 水平为正常组的 0.43 倍

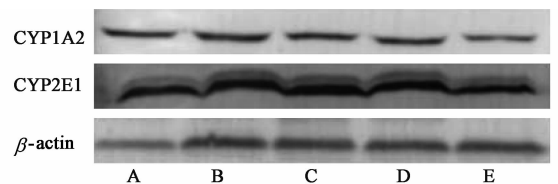
($P < 0.05$),对 CYP1A2, CYP3A11 mRNA 的表达具有下调趋势。见表 2。

表 2 丹参成分对小鼠肝 CYP450 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effects of SM on mRNA expression of liver CYP450 in mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	CYP1A2/GAPDH	CYP2E1/GAPDH	CYP3A11/GAPDH	CYP2D22/GAPDH
正常	-	1.000 \pm 0.115	1.000 \pm 0.077	1.000 \pm 0.072	1.000 \pm 0.105
苯巴比妥	70	1.233 \pm 0.106	1.356 \pm 0.123	1.071 \pm 0.151	0.961 \pm 0.123
SM 临床剂量	2.6	1.130 \pm 0.105	1.273 \pm 0.155	0.967 \pm 0.089	0.997 \pm 0.112
丹参组分	3.9	1.030 \pm 0.140	0.726 \pm 0.126	0.772 \pm 0.068	1.163 \pm 0.097
	5.2	0.872 \pm 0.058	0.437 \pm 0.062 ¹⁾	0.753 \pm 0.044	1.330 \pm 0.082

3.3 丹参组分对 CYP1A2 和 CYP2E1 蛋白表达的影响 小鼠连续 ig 7 d 不同剂量的丹参,Western blot 测定肝脏微粒体中 CYP1A2, CYP2E1 蛋白表达量。见图 1。经统计分析,肝微粒体中 CYP1A2, CYP2E1 相对蛋白表达量随着丹参组分的剂量均有不同程度的降低,但只有丹参组分高剂量组的小鼠 CYP2E1 表达量与正常组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。见表 3。



A. 正常组;B. 苯巴比妥组;C. 丹参组分 2.6 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;D. 丹参组分 3.9 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;E. 丹参组分 5.2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组

图 1 各组小鼠 CYP1A2, CYP2E1 蛋白的表达

Fig.1 Expression of CYP1A2, CYP2E1 protein in each mice

表 3 丹参组对小鼠肝 CYP450 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Effect of SM on protein expression of liver CYP450 in mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	CYP1A2	CYP2E1
正常	-	1.094 ± 0.076	1.070 ± 0.085
苯巴比妥	70	1.396 ± 0.087	1.213 ± 0.075
SM 临床剂量	2.6	1.058 ± 0.108	1.002 ± 0.099
丹参组分	3.9	0.983 ± 0.119	0.955 ± 0.092
	5.2	0.905 ± 0.062	0.780 ± 0.052 ¹⁾

4 讨论

本课题组前期考察了参芎葡萄糖注射液对小鼠细胞色素 P450 同工酶的影响。发现参芎葡萄糖注射液可以诱导 CYP1A2 及抑制 CYP2E1 的表达,为了确定参芎葡萄糖注射液中的 2 种药物代谢酶的表达是由单方还是复方引起的,故制备了参芎葡萄糖注射液中的主要成分丹参。实验结果表明,丹参高剂量对 CYP2E1 酶活性, mRNA 以及蛋白表达都具有下调作用。与参芎葡萄糖注射液的结果一致,推测丹参是参芎葡萄糖注射液产生抑制作用的效应物质。研究表明川芎嗪对人肝微粒体 CYP2E1, CYP1A2 等主要的药物代谢酶的活性没有显著影响^[6],对大鼠体外肝细胞 CYP1A2 无诱导作用^[7],但川芎嗪对大鼠肝微粒体 CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1 的酶活性有诱导作用^[8],故推测体内外的各种复杂因素会影响药物的代谢过程,研究药物对 CYP 酶的影响需结合体内与体外的实验共同来验证。

经过丹参单方对于 CYP450 的影响研究发现,丹参作用 7 d 后下调了 CYP1A2 的酶活性,但无显著性差异。而参芎葡萄糖注射液对 CYP1A2 的酶活性则具有诱导作用,可见参芎葡萄糖注射液复方整体对 CYP1A2 酶活性有调节作用并不是丹参单方的作用。有文献指出复方丹参片对 CYP1A2 的酶活性具有诱导作用^[9],同样发现丹参片(含丹酚酸 B)可以显著上调大鼠原代肝细胞 CYP1A2 活性^[10]。然而,复方丹参滴丸对人肝脏药物代谢酶 CYP1A2 的活性无明显影响^[11],复方丹参注射液(含丹参素)不影响 CYP1A2 的活性^[12]。有报道指出隐丹参酮诱导大鼠肝脏中 CYP1A2 和 CYP2E1 的活性^[13]。丹参酮 I 可使大鼠肝细胞中 CYP1A2 的活性升高^[10],所以各种复方中因当成分不一致时,对 CYP450 活性的影响也存在差异。高剂量的丹参抑制了 CYP2E1 的酶活性,高剂量的复方对 CYP2E1 也有一定的抑制作用。文献报道丹参中的丹参酮 I 和隐丹参酮抑制 CYP2E1 的活性^[14],隐丹参酮升高大鼠肝脏中 CYP1A2 和 CYP2E1 的活性^[13],推测丹

参下调了 CYP2E1 的表达可能是丹参中某个单体成分或者是多种单体的影响。

总之,复方对 CYP450 的影响并不是单方药效的简单相加或者相减^[14]。本研究结果表明高剂量丹参对 CYP2E1 有抑制作用,对乙醇、茶碱、氟烷、氯唑沙宗、对乙酰氨基酚及烟草等一些主要由 CYP2E1 进行代谢的药物,当丹参与这些药物联合使用时,应充分考虑其可能潜在的相互作用^[15]。

[参考文献]

[1] 梁森,马增春,易剑峰,等. 四物汤及其配伍对大鼠肝脏 P450 酶活性及 mRNA 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(21): 3720-3724.

[2] 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.

[3] 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.

[4] 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.

[5] 徐淑云,卞如谦,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.

[6] 易飞,黄心一. 人肝微粒体中川芎嗪对 CYP 酶活性的影响[C]. 重庆: 成渝药学会学术年会, 2008: 144-148.

[7] 谭妍,沈国林,庄笑梅,等. 四物汤效应成分基于 CYP 酶的相互作用研究[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(10): 1456.

[8] 尚芳红,俸珊,张飞燕,等. 加味佛手散及其配伍对大鼠肝脏 P450 酶活性及肝细胞形态的影响[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(10): 2030-2036.

[9] 杜玮. 丹参多组分药动力学研究及其制剂的质量评价[D]. 兰州: 兰州大学, 2008.

[10] Lee W Y, Zhou X, Or P M, et al. Tanshinone I increases CYP1A2 protein expression and enzyme activity in primary rat hepatocytes [J]. Phytomedicine, 2012, 19(2): 169-176.

[11] 吴慧,陈作忠,彭向前. 复方丹参滴丸对人肝脏药物代谢酶 CYP1A2 活性的影响[J]. 中国药房, 2008, 19(15): 1182-1184.

[12] 甄立棉. “Cocktail”探针药物法研究丹参注射液对家兔 CYP450 的影响[D]. 哈尔滨: 哈尔滨医科大学, 2010.

[13] 潘莹. 隐丹参酮非临床药动力学研究[D]. 广州: 中山大学, 2008.

[14] 李芸,陈小平. 丹参活性成分或制剂对 CYP450 活性的影响及药物相互作用研究进展[J]. 中南药学, 2014, 12(1): 57-62.

[15] 武佰玲,刘萍,高月,等. 酸枣仁、远志和桔梗水提液对大鼠肝 CYP450 酶活性及 mRNA 表达的调控作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 235-239.

[责任编辑 周冰冰]