

· 药理 ·

艾迪注射液对DEN诱导型肝癌大鼠体内细胞色素P450酶表达的影响

朱晓青, 陆苑, 刘亭, 潘洁, 刘春花, 李勇军, 王永林*

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

[摘要] 目的:观察艾迪注射液(AD)对二乙基亚硝胺(DEN)化学诱导的原发性肝癌(HCC)大鼠体内细胞色素P450(CYP450)4种亚型酶CYP1A2, CYP2E1, CYP3A2, CYP2C11 mRNA和蛋白表达的影响。方法:健康SD雄大鼠随机选取3只作为空白组,余下大鼠采用DEN间断性诱导原发性肝癌大鼠模型,模型成功后随机将大鼠分为模型组,AD组,每组3只。正常组与模型组腹腔注射10 mL·kg⁻¹生理盐水,AD组腹腔注射10 mL·kg⁻¹ AD,1次/d,共干预14 d。采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测CYP1A2, CYP2E1, CYP3A2, CYP2C11 mRNA和蛋白的表达。结果:Real-time PCR结果表明,给药14 d,与正常组比较,模型组大鼠癌旁组织(PCT)和癌灶组织(CT)CYP1A2, CYP2E1, CYP3A2, CYP2C11 mRNA表达均明显下调($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,AD组PCT中4种亚型酶mRNA表达明显下调($P<0.05$, $P<0.01$),CT中4种亚型酶mRNA表达明显上调($P<0.05$)。Western blot结果表明,与正常组比较,模型组CT中CYP1A2, CYP2E1, CYP3A2, CYP2C11蛋白表达均显著下调($P<0.01$),PCT中CYP3A2, CYP2C11蛋白表达显著下调($P<0.01$);与模型组比较,AD组CT, PCT中CYP1A2, CYP2E1, CYP3A2, CYP2C11蛋白表达有下调趋势,差异无统计学意义。结论:AD可下调大鼠肝组织中CYP1A2, CYP2E1, CYP3A2, CYP2C11 mRNA和蛋白的表达。临床使用AD时,应注意可能因CYP450酶抑制引起的药物相互作用。

[关键词] 艾迪注射液; 诱导型肝癌; 二乙基亚硝胺; 细胞色素P450; 蛋白; mRNA

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)08-0043-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210721

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210126.0945.001.html>

[网络出版日期] 2021-1-26 9:51

Effect of Aidi Injection on Expression of Cytochrome P450 Enzyme in DEN-induced Hepatocellular Carcinoma Rats

ZHU Xiao-qing, LU Yuan, LIU Ting, PAN Jie, LIU Chun-hua, LI Yong-jun, WANG Yong-lin*

(State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceuticals, Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine (Ministry of Education), School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Aidi injection (AD) on the expression of cytochrome P450 isoenzyme 1A2, 2E1, 3A2, 2C11 (CYP1A2, 2E1, 3A2, 2C11) mRNA and protein in rats with N-nitrosodiethylamine (DEN) chemically induced primary hepatocellular carcinoma (HCC). **Method:** Three

[收稿日期] 20201005(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81860718, U1812403);中央引导地方科技发展专项(黔科中引地[2018]4006);贵州医科大学学术新苗培养及创新探索专项(黔科合平台人才[2017]5718);贵州省科技厅人才团队项目(黔科合平台人才[2016]5613/5677);贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合KY字[2021]171)

[第一作者] 朱晓青,在读硕士,从事中药药效物质基础研究, E-mail: 1358402320@qq.com

[通信作者] *王永林,教授,从事中药药效物质基础研究, E-mail: gywyl@gmc.edu.cn

healthy SD male rats were randomly selected as the blank group, and the remaining rats were treated with DEN intermittently induced primary hepatocellular carcinoma rat model. After success of the model, the rats were randomly divided into model group and AD group, with 3 rats in each group. The rats in the blank group and model group were intraperitoneally injected with $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ saline, while those in the AD group were intraperitoneally injected with $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ AD once a day, a total of 14 d intervention. Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot were used to detect the mRNA and protein expressions of CYP1A2, CYP2E1, CYP3A2 and CYP2C11, respectively. **Result:** Real-time PCR results showed that after 14 days of drug administration, compared with the blank group, the mRNA expressions of CYP1A2, CYP2E1, CYP3A2 and CYP2C11 were all down-regulated in para-cancerous tissue (PCT) and cancerous tissue (CT) in model group, and there were significant differences ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the mRNA expressions of the four subtype enzyme were significantly down-regulated in PCT in the AD group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the mRNA expressions of the four subtype enzyme were significantly up-regulated in CT ($P < 0.05$), and the expression was down-regulated overall. Western blot results showed that compared with the blank group, the protein expressions of CYP1A2, CYP2E1, CYP3A2 and CYP2C11 in CT of the model group were significantly down-regulated ($P < 0.01$), and the protein expressions of CYP3A2 and CYP2C11 were significantly down-regulated in PCT ($P < 0.01$). Compared with the model group, the protein expressions of CYP1A2, CYP2E1, CYP3A2 and CYP2C11 in CT and PCT were down-regulated in the AD group, but the differences were not statistically significant. **Conclusion:** AD can down-regulate the mRNA and protein expressions of CYP1A2, CYP2E1, CYP3A2 and CYP2C11 in rat liver tissues. In clinical use of AD, attention should be paid to drug interactions that may be caused by CYP450 enzyme inhibition.

[Key words] Aidi injection; induced hepatocellular carcinoma; *N*-nitrosodiethylamine; cytochrome P450; protein; mRNA

艾迪注射液(AD)是由斑蝥、人参、黄芪、刺五加制成的中药复方制剂,具有清热解毒、消瘀散结的功能,其中以斑蝥为君药,佐以人参、黄芪、刺五加为臣药^[1]。临床上常作为辅助用药与化疗药物如顺铂,阿霉素,奥沙利铂,5-氟尿嘧啶等联用治疗原发性肝癌(HCC),肺癌,直肠癌,恶性淋巴瘤,妇科恶性肿瘤等实体瘤以增强抗癌效果,提高免疫力和改善癌症患者的生活质量^[2-7]。但目前有关AD与其他药物联用时相互作用并无详细报道,而其临床合并用药的风险逐年增加。有关文献表明大部分代谢性药物相互作用主要通过影响细胞色素P450(CYP450)酶的代谢来实现^[8-12]。同时课题组前期已经发现AD对体外人和大鼠肝微粒体中CYP450酶具有一定抑制作用,但是目前尚未有报道AD对体内的CYP450酶表达的影响进行研究,由于正常生理状态下和疾病状态下机体可能存在差异,故本实验建立了二乙基亚硝胺(DEN)诱导型肝癌大鼠模型,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别考察AD对大鼠体内细胞色素P450 1A2, 2E1, 3A2和2C11(CYP1A2, CYP2E1, CYP3A2, CYP2C11)

mRNA和蛋白表达的影响,预测AD对通过CYP450酶代谢的化疗药物在体内药物代谢动力学过程的影响,为AD在临床与化疗药物联合使用时优化临床给药方案,避免药物相互作用,降低药物不良反应提供科学理论依据。

1 材料

1.1 动物 健康雄性SD大鼠11只(SPF级,180~200 g)由长沙市天勤生物技术有限公司提供,动物合格证号SCXK(湘)2014-0011,本研究得到贵州医科大学实验动物伦理委员会审核批准,批准编号1801207。

1.2 药品与试剂 AD(贵州益佰制药有限责任公司,批号20150627);二乙基亚硝胺(大连美仑生物科技有限公司,批号D0516A);trizol(美国Invitrogen公司,批号101004);Estep总RNA提取试剂盒(美国Promega公司,批号0000197548);TransScript™ One-Step RT-PCR SuperMix和SYBR® Premix Ex Taq™ II[宝生物工程(大连)有限公司,批号分别为00351597, AK7005];焦碳酸二乙酯(DEPC)水和4S Red Plus Nucleic[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号分别为A910H10001,

C415BA0001]; RNASore 样本保存液(北京天根生化科技有限公司, 批号 DP408-02); BCA 蛋白浓度测定试剂盒, $5 \times$ TRIS-硼酸-乙二胺四乙酸(TBE)溶液, 十二烷基硫酸钠(SDS), TRIS, Glycine(北京索莱宝科技有限公司, 批号分别为 20170121, 20160624, 365E137, 1348Q0613, 2026L041); SDS 凝胶配制试剂盒, SDS 聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳液, QuickBlock Western 封闭液, QuickBlock Western 一抗稀释液, Western 洗涤液($10 \times$), QuickBlock Western 二抗稀释液(均江苏碧云天有限公司, 批号分别为 P0015A, P0014A, P0023C3, P0013C4, P0131C4, P0024C2); CYP1A2 抗体, CYP2E1 抗体, CYP3A2 抗体, CYP2C11 抗体, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH), 山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)(H&L)-辣根过氧化物酶(HRP), 山羊抗小鼠 IgG(H&L)-HRP(美国 Abcam 公司, 批号分别为 gr136912-3, gr136132-1, gr136210-6, gr131983-7, gr1362209, gr216930-6, gr124950-7); Western 转膜液和 ECL 化学发光试剂盒(美国 Bio-Rad 公司, 批号分别为 640886211, 8800503)。

1.3 仪器 Bin-Rad 680 型酶标仪, Trans-Blot Turbo 型蛋白快速转印仪, Mini PROTEAN[®] Tetra Cell 型垂直电泳槽, CFX96 型实时荧光定量 PCR 仪和 Powerpax Basic 型 DNA 凝胶电泳仪器(美国 Bio-Rad 公司); 101-1A 型电热恒温培养箱(天津泰斯特仪器有限公司); CS501A 型全自动恒温水浴槽(重庆银河试验仪器有限公司); Allegra 64R 型低温高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司); Biomate 3S 型核酸蛋白紫外测定仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); G-BOX ChemiXL1.4 型 Syngene 凝胶成像仪(英国 Syngene 公司)。

2 方法

2.1 动物造模、分组及给药 根据文献报道和前期课题组使用的改良法建立 DEN 诱导的肝癌大鼠模型^[13-14]。取健康雄性 SD 大鼠自由饮用含 $95 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DEN 的溶液(每日更换), 连续饮用 1 个月, 中断修养 1 个月, 再继续饮用含 DEN 溶液 70 d。模型评价标准为观察造模期间大鼠粪便、进食、毛发、精神状态等并结合核磁共振观察来确定原发性肝癌模型是否成功, 同时造模结束后随机抽取 2 只大鼠处死取肝脏组织, 通过肝癌确诊手段的“金标准”病理组织学检查来确认模型复制成功。将大鼠分为模型组, AD 组和正常大鼠三组, 每组 3 只。正常组和模型组大鼠腹腔注射生理盐水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, AD 组大鼠腹腔

注射 AD $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 1 次/d, 连续给药 14 d。末次给药结束后, 大腿股动脉放血处死大鼠, 快速取肝脏, 冲洗干净后分离各组癌旁组织(PCT), 癌灶组织(CT)以及正常组肝脏组织(NLT), 即得到 5 份组织, 分别为 AD 组癌旁组织(AD-PCT), AD 组癌灶组织(AD-CT), 模型组癌旁组织(Control-PCT), 模型组癌灶组织(Control-CT)和正常组肝脏组织(NLT), 并迅速将各组组织放入 RNASore 样本保存液于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.2 Real-time PCR 检测 CYP450 酶 mRNA 表达的方法 取肝组织大约 20 mg, 加入 trizol 试剂 200 μL 冰上匀浆, 按 Eastep 总 RNA 提取试剂盒说明书操作, 提取纯化肝脏总 RNA。取 RNA 2.0 μg 进行逆转录反应, 按 PrimeScript[™] RT Reagent Kit(TaKaRa) 试剂盒说明书操作。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($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 0.4 μL , SYBRPremix Ex Taq II ($2 \times$)10 μL 。PCR 扩增程序为 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, 40 个循环; 循环结束后绘制熔解和扩增曲线。每次扩增均设置 GAPDH 作为内参, 分析并计算待测样本的循环数(C_t), 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析数据。Real-time PCR 引物序列见表 1, 所有引物由上海英骏有限公司设计与合成。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
CYP1A2	上游 ACTGTACTCTTCCCGCAGCCTGAC	150
	下游 TTCAACTATCCCACCCGACAACC	
CYP2E1	上游 GAGACCACCGTTGTCTAGTTTGT	120
	下游 CCAGCCCTCAAGAGGTAGTTA	
CYP3A2	上游 TCAGAGGTATCTGTGTTCTTC	150
	下游 GTGTTCTCAGAGGTATCTTC	
CYP2C11	上游 GCTTAGGACCCTGAAATTAAG	150
	下游 AGGTCTCTGGTAATTGTGTTCTCA	
GAPDH	上游 TATGCCAACACCCTCAGTGC	110
	下游 CTGCTTCTGGTACTCATCC	

2.3 Western blot 检测 CYP450 酶蛋白的表达 取肝组织 100 mg 加 RIPA 裂解液, 并于冰上匀浆, 获得总蛋白提取液。然后, 按 BCA 蛋白定量试剂盒说明书操作, 测定总蛋白含量。取蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳分离后转膜。室温下放入封闭缓冲液中封闭 15 min, 分别加入 CYP1A2 抗体(1:5 000), CYP2E1 抗体(1:5 000), CYP3A2 抗体(1:5 000),

CYP2C11 抗体(1:1 500), GAPDH 抗体(1:5 000), 在室温下孵育 2 h, 洗膜后, 与 HRP 标记的山羊抗兔/鼠 Ig G(1:1 万)室温孵育 1 h, 洗膜后, 用 ECL 显影并用凝胶成像系统成像, 使用 Quantity one 凝胶图像分析软件对图片进行灰度值分析。

2.4 统计学分析 以 $\bar{x} \pm s$ 表示结果, 采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析, One-Way ANOVA 后, 用 Dunnett's test 分析方法比较各组间差异。两组间比较采用 T-test 法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

表2 AD对大鼠肝组织中 CYP1A2, CYP2E1, CYP3A2, CYP2C11 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of AD on mRNA expressions of CYP1A2, CYP2E1, CYP3A2, CYP2C11 in liver tissues of rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	组织	剂量/mL·kg ⁻¹	CYP1A2	CYP2E1	CYP3A2	CYP2C11
模型	PCT		0.333±0.076 ²⁾	0.702±0.241 ¹⁾	0.310±0.034 ²⁾	0.179±0.007 ²⁾
	CT		0.033±0.002 ²⁾	0.076±0.009 ²⁾	0.026±0.006 ²⁾	0.012±0.001 ²⁾
AD	PCT	10	0.199±0.016 ³⁾	0.286±0.089 ³⁾	0.167±0.002 ⁴⁾	0.076±0.024 ⁴⁾
	CT	10	0.082±0.011 ⁵⁾	0.201±0.056 ⁵⁾	0.096±0.021 ⁵⁾	0.065±0.008 ⁵⁾

注: 设正常组肝组织 CYP1A2, CYP2E1, CYP3A2, CYP2C11 mRNA 相对表达均为 1; 与正常组肝组织比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组 PCT 比较 ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与模型组 CT 比较 ⁵⁾ $P < 0.01$ 。

3.1.2 AD对CYP2E1 mRNA 表达的影响 与正常组肝组织比较, 模型组 PCT 和 CT 中 mRNA 表达水平明显下调 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组 PCT 比较, AD 组 PCT 中 CYP2E1 mRNA 表达水平明显下调 ($P < 0.05$); 与模型组 CT 比较, AD 组 CT 中 CYP2E1 mRNA 表达水平显著上调 ($P < 0.01$)。见表 2。

3.1.3 AD对CYP3A2 mRNA 表达的影响 与正常组肝组织比较, 模型组 PCT 和 CT 中 CYP3A2 mRNA 表达水平均显著下调 ($P < 0.01$); 与模型组 PCT 比较, AD 组 PCT 中 CYP3A2 mRNA 表达水平显著下调 ($P < 0.01$); 与模型组 CT 比较, AD 组 CT 中 CYP3A2 mRNA 表达水平显著上调 ($P < 0.01$)。见表 2。

3.1.4 AD对CYP2C11 mRNA 表达的影响 与正常组肝组织比较, 模型组 PCT 和 CT 中 CYP2C11 mRNA 表达水平均显著下调 ($P < 0.01$); 与模型组 PCT 比较, AD 组 PCT 中 CYP2C11 mRNA 表达水平显著下调 ($P < 0.01$); 与模型组 CT 比较, AD 组 CT 中 CYP2C11 mRNA 表达水平显著上调 ($P < 0.01$)。由于 CT 占整个肝脏的比例较小, 因此从肝脏整体水平上, AD 下调 CYP2C11 mRNA 表达。见表 2。

3.2 AD对CYP450酶蛋白表达的影响

3.2.1 AD对CYP1A2蛋白表达的影响 与正常组肝组织比较, 模型组 CT 中 CYP1A2 蛋白表达水平显

3 结果

3.1 AD对CYP450酶 mRNA 表达的影响

3.1.1 AD对CYP1A2 mRNA 表达的影响 与正常组肝组织比较, 模型组 PCT 和 CT 中 CYP1A2 mRNA 表达水平均显著下调 ($P < 0.01$); 与模型组 PCT 比较, AD 组 PCT 中 CYP1A2 mRNA 表达水平明显下调 ($P < 0.05$); 与模型组 CT 比较, AD 组 CT 中 CYP1A2 mRNA 表达水平显著上调 ($P < 0.01$)。见表 2。

著下降 ($P < 0.01$), 在模型组 PCT 中 CYP1A2 蛋白表达水平有下降趋势但无显著性差异; 与模型组 PCT 比较, AD 组 PCT 中 CYP1A2 蛋白表达水平有下调趋势但无显著性差异; 与模型组 CT 比较, AD 组 CT 中 CYP1A2 蛋白表达水平有上调趋势但无显著性差异。见图 1, 表 3。

3.2.2 AD对CYP2E1蛋白表达的影响 与正常组肝组织比较, 模型组 CT 中 CYP2E1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 在模型组 PCT 中 CYP2E1 蛋白表达水平无显著性差异; 与模型组 PCT 比较, AD 组 PCT 中 CYP2E1 蛋白表达水平有下调趋势但无显著性差异; 与模型组 PCT 比较, AD 组 CT 中 CYP2E1 蛋白表达水平有上调趋势但差异无统计学意义。见图 1, 表 3。

3.2.3 AD对CYP3A2蛋白表达的影响 与正常组肝组织比较, 模型组 PCT 和 CT 中 CYP3A2 蛋白表达水平均显著下调 ($P < 0.01$); 与模型组中 PCT 和 CT 比较, AD 组 PCT 合 CT 中 CYP3A2 蛋白表达水平差异无统计学意义。见图 1, 表 3。

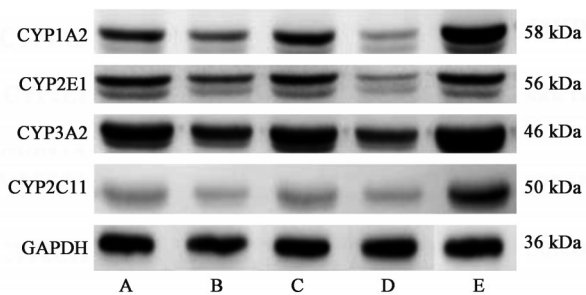
3.2.4 AD对CYP2C11蛋白表达的影响 与正常组肝组织比较, 模型组 PCT 和 CT 中 CYP2C11 蛋白表达水平均显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组中 PCT 和 CT 比较, AD 组 PCT 和 CT 中 CYP2C11 蛋白表达水平差异无统计学意义。见表 3, 图 1。

表 3 AD 对大鼠肝组织中 CYP1A2, CYP2E1, CYP3A2, CYP2C11 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of AD on protein expressions of CYP1A2, CYP2E1, CYP3A2, CYP2C11 in liver tissue of rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	组织	剂量/mL·kg ⁻¹	CYP1A2/GAPDH	CYP2E1/GAPDH	CYP3A2/GAPDH	CYP2C11/GAPDH
模型	PCT		0.798±0.077	1.025±0.043	0.641±0.041 ¹⁾	0.528±0.027 ¹⁾
	CT		0.197±0.031 ¹⁾	0.311±0.089 ¹⁾	0.353±0.054 ¹⁾	0.347±0.046 ¹⁾
AD	PCT	10	0.668±0.052	0.727±0.075	0.698±0.046	0.461±0.060
	CT	10	0.322±0.068	0.559±0.054	0.389±0.039	0.278±0.022

注: 设正常组肝组织 CYP1A2, CYP2E1, CYP3A2, CYP2C11 蛋白相对表达均为 1; 与正常组肝组织比较 ¹⁾P<0.01。



A. AD 组 PCT; B. AD 组 CT; C. 模型组 PCT; D. 模型组 CT; E. 正常组肝组织

图 1 各组大鼠肝组织中 CYP1A2, CYP2E1, CYP3A2, CYP2C11 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoretic of CYP1A2, CYP2E1, CYP3A2 and CYP2C11 protein expressions in liver tissues of rats in each group

4 讨论

原发性肝癌是我国第四位常见恶性肿瘤和第二位肿瘤致死原因,其严重危害我国人民生命健康^[15]。目前晚期肝癌的治疗以西医手段为主,但在使用化学药物治疗时其存在诸多局限性,如化疗的不良反应大,长期应用化疗药易产生耐药性等^[16]。中药因“多成分”“多环节”“多途径”“多靶点”的作用特点,在临床实践中越来越多地与化学药物联合使用。由于中药成分复杂,应用疗程较长,易对化学药物的体内药物代谢动力学过程产生影响,改变药物的血药浓度,进而改变治疗效果,因此有必要通过动物肝癌模型对中药在体内的过程进行研究。目前肝癌动物模型可通过自发、诱发、移植和转基因等^[17-18]方式建立,由于诱发模型的癌变过程和人类肝癌变化过程相似,同时影像学表现也相似^[19],对于临床研究应用具有一定的指导意义。诱发方法又包括物理、化学和生物诱发,其中化学诱发在肝癌模型中较为常见。化学诱导常用的诱导剂有亚硝胺、芳香胺类、四氯化碳、黄曲霉素等,相关文献表明 DEN 对肝脏针对性强,肝细胞肝癌所占比例大,是目前应用较广泛的一种化学试剂诱发肝癌模型,同时给药方式简单,给药剂量易于调整,癌变诱发率高^[17]。故本研究采用了间断性 DEN 诱导肝癌

模型。

细胞色素 P450 酶主要分布于肝脏中,是药物代谢中重要的代谢酶,主要参与药物 I 相代谢。CYP450 酶中与药物代谢有关的 3 个大的亚家族中 CYP3A4 是表达量最大的亚型酶,占人体肝脏 CYP450 的 30%~40%,有近 50% 的药物通过 CYP3A4 进行代谢^[20];CYP1A2 占肝脏 CYP450 酶的 13%~15%,参与临床约 5% 药物的代谢^[21];CYP2C9 约占 CYP450 酶总量的 20%^[22],CYP2C9 酶参与 15%~20% 的药物代谢,主要代谢小的亲脂分子^[23]。CYP2E1 蛋白表达量约占 CYP450 总量的 7%,但 mRNA 超过 CYP450 总量 50%^[24-25]。本实验选择 CYP1A2, CYP2E1, CYP2C9 和 CYP3A4 这 4 种与药物代谢密切相关的亚型酶,涵盖了与药物代谢相关的大部分酶亚型,他们在大鼠体内对应的是 CYP1A2, CYP2E1, CYP2C11 和 CYP3A2^[26]。本实验结果,与正常组肝组织比较,模型组 CT 与 PCT 中 CYP1A2, CYP2E1, CYP3A2, CYP2C11 mRNA 和蛋白表达均下调。表明在正常生理状态和病理状态下这 4 种亚型酶 mRNA 和蛋白表达有差异,说明在疾病状态下进行研究更具有指导意义。与模型组比较,AD 组 PCT 中 4 种亚型酶 mRNA 表达下调,而在 CT 中 mRNA 表达上调,但在肝脏总体水平上 mRNA 表达下调;AD 组 PCT 中 CYP1A2 和 CYP2E1 蛋白表达下调,而在 CT 中蛋白表达上调,但在肝脏总体水平上蛋白表达下调,这与二者 mRNA 表达一致,而 CYP3A2, CYP2C11 在 AD 组 PCT 和 CT 中蛋白表达无显著性差异。对 CYP1A2, CYP2E1 mRNA 和蛋白表达具有一定的抑制作用;对 CYP1A2, CYP2E1 的 mRNA 表达有明显抑制作用,但蛋白表达无明显影响。这意味着其酶活性可能受到抑制,当临床使用的药物以这 4 种酶代谢时,应当注意因酶活性的改变而导致药物在体内血药浓度升高。

目前 AD 在临床上常作为辅助用药与化疗药物联用,常见的化疗药物有阿霉素、奥沙利铂、紫杉

醇、顺铂、培美曲塞、环磷酰胺、氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、长春新碱、吉非替尼、强的松、泼尼松等^[27-29],其中阿霉素、甲氨蝶呤、奥沙利铂、紫杉醇、环磷酰胺等代谢与这4种亚型酶有关^[30-35],当AD与其联用时,可能导致化疗药物血药浓度的升高,从而增强化疗药物的治疗效果,这可能是AD发挥增强化疗药物治疗效果的作用机制之一。但是,化疗药物通常毒副作用较强,若血药浓度超出最高治疗浓度,则可能导致毒副作用的产生,因此联合AD使用需要注意避免化疗药物在体内过于蓄积。通过研究AD对肝癌大鼠体内4种亚型酶表达的影响,对促进合理配伍用药并最大限度地避免盲目联合用药所导致的不良后果,保证临床用药的有效性和安全性有着重要指导意义。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 王国栋,米淑玲. 复方斑蝥注射液在中西医结合治疗恶性肿瘤中的临床研究与应用进展[J]. 医学综述, 2011, 17(5):779-781.

[2] 何红. 艾迪注射液联合化疗治疗老年非小细胞肺癌效果观察[J]. 临床合理用药杂志, 2020, 13(13): 51-53.

[3] 韩瑜. 艾迪注射液联合XELOX化疗治疗晚期原发性肝癌的临床效果[J]. 河南医学研究, 2020, 29(8):1439-1440.

[4] 肖齐生. 艾迪注射液联合化疗治疗中、晚期癌症患者的临床分析[J]. 药品评价, 2019, 16(20):70-71.

[5] WANG X L, JIN W M, FANG B M, et al. Aidi injection combined with CHOP chemotherapy regimen in the treatment of malignant lymphoma: a Meta-analysis based on randomized controlled trials[J]. J Cancer Res Ther, 2016, 12(5): 11-14.

[6] 祝永福,张东伟,宇明慧,等. 艾迪注射液联合化疗对晚期胃癌患者临床疗效及癌因性疲乏、生活质量的影响[J]. 湖北中医药大学学报, 2019, 21(4): 29-33.

[7] 邱楠,陈小凤,艾长江,等. 艾迪注射液联合化疗治疗卵巢癌的疗效及安全性Meta分析[J]. 世界中西医结合杂志, 2019, 14(4):467-472, 480.

[8] 潘莹,邓颖,毕惠嫦,等. 隐丹参酮对大鼠肝微粒体CYP酶的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(4):331-334.

[9] JIN S E, SEO C S, SHIN H K, et al. Traditional herbal formulas to as treatments for musculoskeletal disorders: their inhibitory effects on the activities of human microsomal cytochrome P450s and UDP-

glucuronosyltransferases [J]. Pharmacogn Mag, 2016, 12(48):241-252.

[10] SHEN Z, WANG Y, GUO W, et al. Potential herb-drug interaction of shexiang baixin pill *in vitro* based on drugmetabolism/transporter[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(12):5545-5556.

[11] JIN S E, HA H, SEO C S, et al. Expression of cytochrome P450s in the liver of rats administered with socheongryong-tang, a traditional herbal formula[J]. Pharmacogn Mag, 2016, 12(47):211-218.

[12] PANDIT S, KANJILAL S, AWASTHI A, et al. Evaluation of herb-drug interaction of a polyherbal Ayurvedic formulation through high throughput cytochrome P450 enzyme inhibition assay [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 197:165-172

[13] YANG F C, ZHENG S S, IANG T A. The establishment of primary liver cancer model in rats improved method[J]. Natl Med J Chin, 2004, 84(23): 2018-2019.

[14] 陆苑,潘洁,杨淑婷,等. 艾迪注射液对肝癌大鼠谷胱甘肽-S-转移酶的影响[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(8):1170-1174.

[15] 《原发性肝癌诊疗规范》编写专家委员会. 原发性肝癌诊疗规范(2019年版)[J], 中国临床医学, 2020, 27(1):140-160.

[16] CHIANG M H, CHANG L W, WANG J W, et al. Herb-drug pharmacokinetic interaction of a traditional chinese medicine jia-wei-xiao-yao-san with 5-fluorouracil in the blood and brain of rat using microdialysis[J]. Evid-Based Compl Alt, 2015, doi: org/10. 1155/2015/729679.

[17] 韦武,郭红星. 大鼠肝癌模型建立的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1):119-123.

[18] 李果,朱柱,戴小明,等. 肝癌动物模型建立的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(2):285-289.

[19] 张嘉宁,顾为望,许乙凯,等. 大鼠肝癌模型的建立及影像学表现[J]. 中国实验动物学杂志, 1999, 9(2):37-40.

[20] HOHMANN N, HAEFELI W E, MIKUS G. CYP3A activity: towards dose adaptation to the individual[J]. Expert Opin Drug Met, 2016, 12(5):479-497.

[21] 林琴,贾金雪,王涛,等. 抑制NF- κ B的活化对免疫性肝损伤大鼠CYP1A2的影响[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(11):1605-1609.

[22] 李智,王果,周宏灏. CYP2C9基因多态性及其功能意义研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2008(6):601-609.

[23] 赵阳阳,许智慧,刘妍,等. 细胞色素P450基因多态

- 性与药物代谢研究进展[J]. 临床药物治疗杂志, 2017, 15(4):1-6.
- [24] PORUBSKY P R, MENEELY K M, SCOTT E E. Structures of human cytochrome P-450E1. Insights into the binding of inhibitors and both small molecular weight and fatty acid substrates [J]. J Biol Chem, 2008, 283 (48) :33698-33707.
- [25] VKOCAREK T A, ZANGAR R C, NOVAK R F. Post-transcriptional regulation of rat CYP2E1 expression: role of CYP2E1 mRNA untranslated regions in control of translational efficiency and message stability[J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 376 (1) :180-190.
- [26] HAN Y L, LI D, REN B, et al. Evaluation of impact of Herba Erigerontis injection, a Chinese herbal prescription, on rat hepatic cytochrome P450 enzymes by cocktail probe drugs[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 139(1):104-109.
- [27] 汤红霞,王梦影,鹿婧,等. 艾迪注射液联合VAD化疗方案治疗多发性骨髓瘤患者的效果[J]. 中国医药导报, 2018, 15(25):67-70,74.
- [28] 施子夏,张劲,张兵兵,等. 艾迪注射液联合TP方案治疗非小细胞肺癌的临床观察[J]. 中国药房, 2016, 27(23):3234-3237.
- [29] 陆国权,周晓红,陈红,等. 艾迪注射液辅助利妥昔单抗联合CHOP化疗方案治疗弥漫性大B细胞淋巴瘤[J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(3) : 733-737.
- [30] DENG S, KRUGER A, KLESCHYOV A L. Gp91phox-containing NAD (P) H oxidase increases superoxide formation by doxorubicin and NADPH [J]. Free Radical Bio Med, 2017, 42(4):466-473.
- [31] 王向文. CYP3A4基因单核苷酸多态性同儿童ALL大剂量甲氨蝶呤治疗不良反应的相关性研究[D]. 重庆:重庆医科大学, 2016.
- [32] 王淑梅,孙路路,曾蔚欣,等. 细胞色素P450 2E1基因多态性与急性淋巴细胞白血病易感性及其与甲氨蝶呤血清浓度关系探讨[J]. 中国临床药理学杂志, 2014, 30(9):773-775,779.
- [33] 杨建伟,苏颖,陈增,等. CYP3A4基因多态性与晚期胃癌患者接受紫杉醇/奥沙利铂多线化疗、化疗周期数及不良反应的相关性[J]. 临床与病理杂志, 2014,34(1):22-28.
- [34] ZHOU D, LU Y, STEINER M S, et al. Cytochrome P-450 2C9 sensitizes human prostate tumor cells to cyclophosphamide via a bystander effect. [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44: 2659-2663.
- [35] 耿祥飞,张广州,任娟,等. 紫杉醇对食蟹猴和人CYP1A2、CYP3A4及CYP2A6酶代谢的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(9):30-33.

[责任编辑 张丰丰]