

· 心脑血管疾病用药专栏 ·

# 盐酸川芎嗪对小鼠肝细胞色素 P<sub>450</sub> 酶活性及表达调控的影响\*

王文华<sup>1,2</sup>, 张泽萍<sup>1,2</sup>, 杨洋<sup>1,2</sup>, 李勇军<sup>1,2</sup>, 龚菲<sup>1,3</sup>, 李黎<sup>1,2</sup>, 何彬<sup>1,3</sup>, 孙佳<sup>1,2</sup>, 刘亭<sup>1,2</sup>

(贵州医科大学 1. 药学院; 2. 贵州省药物制剂重点实验室; 3. 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 探讨盐酸川芎嗪对小鼠肝细胞色素 P<sub>450</sub> 酶(CYPs)主要亚型及相关核受体的影响。方法 将小鼠分为 5 组: 空白对照组、苯巴比妥组、盐酸川芎嗪小剂量(13.0 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)组、盐酸川芎嗪中剂量(19.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)组、盐酸川芎嗪大剂量(26.0 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)组, 连续 7 d 给药。取 5 组小鼠的肝脏组织, 制备肝微粒体、提取 RNA, 检测 5 组小鼠 CYP 活性、mRNA 水平和蛋白表达的变化。结果 与空白对照组比较, 盐酸川芎嗪大剂量组 CYP1A2 酶活性、mRNA 水平和蛋白表达分别上调 1.43, 1.44 和 1.40 倍( $P < 0.05$ )。盐酸川芎嗪组 CYP2E1、CYP2D22、CYP3A 的酶活性、mRNA 水平与空白对照组比较, 均差异无统计学意义。与空白对照组比较, 盐酸川芎嗪大剂量组 AhR mRNA 水平上调 1.6 倍( $P < 0.05$ )。盐酸川芎嗪对 HNF-4 $\alpha$ 、PXR 和 PPAR $\alpha$  的 mRNA 水平无显著影响。随着盐酸川芎嗪的剂量增高, CYP2E1 蛋白表达有上升趋势, 但无显著性影响。结论 盐酸川芎嗪对小鼠体内肝 CYP2E1、CYP2D22、CYP3A、HNF-4 $\alpha$ 、PXR 和 PPAR $\alpha$  无显著影响, 但对 CYP1A2 活性有诱导作用, 该作用很可能与盐酸川芎嗪上调 AhR 水平从而促进 CYP1A2 表达有关。

**关键词** 川芎嗪; 盐酸; 细胞色素 P<sub>450</sub> 酶; 细胞色素 P<sub>450</sub> mRNA 表达

中图分类号 R285.5; R543

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2017)04-0390-06

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.04.008

## Effect of Ligustrazine Hydrochloride on Activity and Expression Regulation of Cytochrome P<sub>450</sub> in Hepatocyte of Mice

WANG Wenhua<sup>1,2</sup>, ZHANG Zeping<sup>1,2</sup>, YANG Yang<sup>1,2</sup>, LI Yongjun<sup>1,2</sup>, GONG Fei<sup>1,3</sup>, LI Li<sup>1,2</sup>, HE Bin<sup>1,3</sup>, SUN Jia<sup>1,2</sup>, LIU Ting<sup>1,2</sup> (1. School of Pharmacy; 2. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics; 3. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

**ABSTRACT Objective** To investigate the influence of ligustrazine hydrochloride on cytochrome P<sub>450</sub> and nuclear receptor in hepatocyte of mice. **Methods** Mice were randomly divided into blank control group, phenobarbital group, and ligustrazine hydrochloride low-, medium- and high-dose groups (13.0, 19.5 and 26.0 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>). Then the mice were sacrificed after were administered medicines once daily for consecutive 7 days. Liver microsomes were prepared to determine the enzyme activities. Quantitative real-time PCR and Western blotting was employed to examine the expression of these four CYP450 enzymes and nuclear receptor in liver tissue of mice. **Results** Compared with the blank control group, CYP1A2 activity, mRNA and protein expression were increased by 1.43, 1.44 and 1.40 times ( $P < 0.05$ ) respectively in the ligustrazine hydrochloride dose group. Ligustrazine hydrochloride was found to have no impact on the activities of CYP2E1, CYP3A and CYP2D22. AhR mRNA was increased by 1.6 times ( $P < 0.05$ ) in the ligustrazine hydrochloride dose group. Ligustrazine hydrochloride was found to have no impact on the expression of HNF-4 $\alpha$ , PXR and PPAR $\alpha$ . **Conclusion** Ligustrazine hydrochloride is found to have no impact on the expression of CYP2E1, CYP2D22, CYP3A, HNF-4 $\alpha$ , PXR and PPAR $\alpha$ , but induces the activity of CYP1A2. This effect is likely to be related to increasing AhR level to promote the expression of CYP1A2.

**KEY WORDS** Ligustrazine, hydrochloride; Cytochrome P<sub>450</sub> enzymes; Cytochrome P<sub>450</sub> mRNA expression

中药成分复杂, 具有较多的化学成分, 不同配伍组成的复方机制也较多<sup>[1]</sup>。中药的多种成分作用于机体形成复杂的相互作用体系, 而复方整体效应的重要基础正是这些复杂的相互作用。产生相互作用的原因是中药的有效成分进入体内要经过 CYP 酶进行代谢, 并有可能导致酶活性被诱导或抑制, 从而影响其他物

质的代谢, 引起药物之间的相互作用<sup>[2]</sup>。参芎葡萄糖注射液主要由丹参和盐酸川芎嗪组成, 盐酸川芎嗪有扩张血管、改善组织微循环、抑制血小板粘附等作用<sup>[3]</sup>。临床常用于治疗缺血性心脑血管疾病和缺血性肢体血管疾病<sup>[4]</sup>。本课题组前期研究了参芎葡萄糖注射液及其组分丹参对小鼠 CYP 同工酶的影响。

笔者在本研究中继续考察参芎葡萄糖注射液中的另一种主要成分盐酸川芎嗪对细胞色素 P<sub>450</sub> 同工酶的影响,进而完善参芎葡萄糖注射液的代谢性相互作用的研究。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 清洁级昆明雄性小鼠,体质量 22 ~ 25 g,由贵州医科大学实验动物房提供,动物生产许可证号:SCXK(黔)2012-0001。饲养条件:室温(22 ± 1)℃,湿度:58%,昼夜规律饲养,标准饮食、饮水。

**1.2 材料和试剂** 盐酸川芎嗪(北京索莱宝科技有限公司,批号:YC-0720131020);苯巴比妥(北京索莱宝科技有限公司,批号:20150508);Eastep 总 RNA 提取试剂盒(Promega 公司,批号:20140801);SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II(大连宝生物有限公司,批号:RR820A)、TransScript<sup>™</sup> One-Step RT-PCR SuperMix(大连宝生物有限公司,批号:RR047A);CYP1A2、CYP2E1、CYP3A11、CYP2D22、肝细胞核因子 4α(human liver cell nucleus factor-4α, HNF-4α)、孕甾烷 X 受体(pregnanane X receptor, PXR)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α(proxisome proliferator activation receptors, PPARα)、芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)的引物均由上海生工公司合成;氧化型辅酶 II 二钠(Na<sub>2</sub> NADP,批号:SM0313KB14)、6-磷酸葡萄糖(G-6-P,批号:WJ0717EA14)、G-6-PDH(批号:K09M6C1)均由上海海叶生物公司提供;右美沙芬(批号:A0516AS)、普萘洛尔(批号:F0315AS)、非那西丁(批号:A1116AS)均由大连美仑生物公司提供;β-actin 抗体(批号:BS6007M)、CYP1A2 抗体(批号:BS2188)、CYP2E1 抗体(批号:BS6577)购自巴傲德生物有限公司。

**1.3 仪器** CFX96 实时荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司),Biomate 3S 核酸蛋白紫外测定仪(美国 Thermo 公司);Thermo fresco 17 高速冷冻离心机(美国

Thermo 公司);Ultimate 3000 UPLC-PDA 高效液相仪器(美国 Thermo 公司);电泳仪、转膜仪(美国 BIO-RAD 公司)。

**1.4 小鼠肝微粒体的制备** 将小鼠分为 5 组:空白对照组、苯巴比妥组、盐酸川芎嗪小剂量(13.0 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)组、盐酸川芎嗪中剂量(19.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)组、盐酸川芎嗪大剂量(26.0 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)组,连续 7 d 给药。5 组小鼠末次给药后禁食 16 h,处死,剪开腹腔取其肝脏,用装满冰冷 0.9% 氯化钠溶液的注射器,经肝门静脉灌注法除去肝中残血,用冰冷的氯化钾溶液漂洗肝脏 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 10 000 × g 离心场力作用下离心 20 min,采用氯化钙沉淀法制备肝微粒体,最后在 15 000 × 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。用氯化钾磷酸盐缓冲液洗涤上述沉淀,在 15 000 × 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 ℃ 冰箱中保存。采用 BCA 法测定微粒体蛋白浓度。

## 1.5 药物代谢酶的活性测定

**1.5.1 CYP1A2 酶活性的测定** 采用非那西丁体外代谢法来测定 CYP1A2 酶活性<sup>[5]</sup>。将待测肝微粒体稀释到 5 g·L<sup>-1</sup>,取 100 μL 肝微粒体于 1.5 mL 离心管中,加入非那西丁(0.05 mol·L<sup>-1</sup>)200 μL,37 ℃ 振荡孵育 10 min。然后加入 200 μL 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)再生系统(2 mmol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub> NADP,20 mmol·L<sup>-1</sup> G-6-P,4 U·L<sup>-1</sup> G-6-PDH,20 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>),于 37 ℃ 水浴中振荡 30 min 后,加入三氯乙酸 200 μL 终止反应。15 000 × g 离心 20 min,取 90 μL 上清液加入普萘洛尔(1.07 g·L<sup>-1</sup>)10 μL,混匀,用高效液相检测。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),用冰醋酸调 pH 值至 3.0;流速 0.6 mL·min<sup>-1</sup>;柱温 40 ℃;检测波长 280 nm。

**1.5.2 CYP2D22 酶活性的测定** 采用右美沙芬体外代谢高效液相色谱法测定,将待测肝微粒体稀释到 5 g·L<sup>-1</sup>,取 100 μL 肝微粒体于 1.5 mL 离心管中,加入右美沙芬(0.03 mol·L<sup>-1</sup>)200 μL。37 ℃ 振荡孵育 10 min 后,加入 NADPH 再生系统 200 μL,于 37 ℃ 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 × g 离心 20 min,取上清液 90 μL 加入普萘洛尔(1.07 g·L<sup>-1</sup>)10 μL,混匀,用高效液相色谱法检测。色谱条件同“1.5.1”项<sup>[5]</sup>。

收稿日期 2016-02-04 修回日期 2016-04-11

**基金项目** \* 国家自然科学基金资助项目(81603189);贵州省中医药、民族医药科学技术研究专项课题(QZYY-2016-061);2014 年贵州省教育厅大学生创新创业重点项目(201410660005);

**作者简介** 王文华(1989-),内蒙古人,女,在读硕士,从事中药药理研究。电话:0851-86908468,E-mail: 1026512104@qq.com。

**通信作者** 刘亭(1981-),贵州遵义人,男,副教授,博士,从事中药药理研究。电话:0851-86908468,E-mail: t-liu@163.com。

**1.5.3 CYP3A 酶活性的测定** 采用氨基比林 *N*-脱甲基酶 ADM 法,通过 Nash 比色法测定甲醛生成量来反映 CYP3A 的活性<sup>[6]</sup>。将待测肝微粒体稀释到5 g·L<sup>-1</sup>,取 100 μL,加入磷酸盐缓冲液(PBS)0.15 mL,混匀后加入 86.4 mmol·L<sup>-1</sup>氨基比林0.05 mL,混匀,37 ℃水浴 3 min 后加入 NADPH 发生系统 0.05 mL,37 ℃孵育 60 min 后取出,加入 30% 三氯醋酸 0.25 mL 终止反应。再加 Nash 试剂 0.25 mL,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 波长处测定吸光度值(*A*值)。

**1.5.4 CYP2E1 酶活性的测定** 采用苯胺羟化酶 ANH 法,用分光光度法测定对氨基酚的生成量,从而反映 CYP2E1 的活性<sup>[6]</sup>。将待测肝微粒体稀释到 5 g·L<sup>-1</sup>,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 ℃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 波长处测定吸光度。

**1.6 小鼠 RNA 的提取与纯化** 末次给药后禁食 16 h,断颈处死,剪开腹腔取其肝脏,用预冷 0.9% 氯化钠溶液将肝脏的血冲洗干净,然后取大约 20 mg 的肝脏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。核酸蛋白紫外测定仪检测 RNA 的 *A*<sub>260</sub>/*A*<sub>280</sub> 值均在 1.8~2.1 之间符合要求。采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,比较 28S 和 18S 条带的灰度值。

**1.7 小鼠肝脏 mRNA 水平测定** 取 cDNA 2.0 μg,按照 TransScript™ One-Step RT-PCR SuperMix 说明书进行逆转录反应。荧光定量聚合酶链反应体系 20 μL 包括:逆转录反应产物 2.0 μL,上下游引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>)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 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 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<sup>(-ΔΔCt)</sup> 方法分析数据。引物序列见表 1。

**1.8 小鼠肝脏 CYP 蛋白表达的测定** 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 mg·mL<sup>-1</sup>。取蛋白 50 μg,100 V 电压电泳至溴酚蓝前缘移动至凝胶底部。电泳完成后,将蛋白从胶上转印到聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)上,将 PVDF 浸于含 5% 牛血清清蛋白(albumin from bovine serum, BSA)的 1×TBST,室温震荡 1.5 h,加适量以含 5% BSA 的 1×TBST 稀释的的一抗(兔抗

表 1 引物序列  
Tab.1 Primer sequences

基因	正向引物	反向引物
AhR	ACCAGAACTGTGAGGCTTGG	CTCCCATCGTATAGGGAGCA
HNF-4α	CGGAGCCCTGCAAAAGT	CCAGTCTCACAGCCCATTCC
PXR	CCCATCAACGTAGAGGAGGA	TCTGAAAAACCCCTTGCATC
PPARα	CCATACAGGAGAGCAGGGATTT	TTACCTACGCTCAGCCCTCTTC
CYP1A2	CATCCCCACAGCACAAACAA	TCCCAGTTGGCCAGGACTTC
CYP3A11	ACAAACAAGCAGGGATGGAC	GGTAGAGGAGCACCAAGCTG
CYP2D22	CAGTGTTGTACTAAATGGGCT	GCTAGGACTATACCTTGAGAGCG
CYP2E1	AGTGCAGAGCGCTGTACACA	AAGAACAGGTCGGCCACAGT
GAPDH	AGTATGACTCCACTCACGGCAAAT	GTCTCGCTCCTGGAAGATGGT

CYP1A2 的抗体浓度为 1:500,兔抗 CYP2E1 的抗体浓度为 1:400,鼠抗 GAPDH 的抗体浓度 1:5 000);在室温下孵育 1 h,4 ℃过夜。用 1×TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,各加入 1×TBST 稀释的鼠、兔二抗(1:20 000),室温孵育 1 h 后用 1×TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。按照 ECL 发光试剂盒说明书进行显色。

**1.9 统计学方法** 采用 SPSS18.0 版统计软件进行 One-Way ANOVA 检验分析,组间数据进行 Dunnett 或 Dunnett's T<sub>3</sub> 检验;计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 盐酸川芎嗪对小鼠的体质量和肝质量及肝指数的影响** 与空白对照组比较,盐酸川芎嗪和苯巴比妥组的体质量都有增加,但差异无统计学意义;各给药组与空白对照组之间的肝指数差异无统计学意义,说明盐酸川芎嗪对小鼠肝脏质量无明显影响。肝脏指数(%)=(肝脏质量/体质量)×100%。见表 2。

表 2 5 组小鼠体质量及肝脏质量和肝脏指数比较  
Tab.2 Comparison of body weight, liver weight and liver index among five groups of mice

组别	体质量	肝质量	肝指数/ 肝质量/体质量
	g	g	%
空白对照组	24.9 ± 0.880	1.52 ± 0.101	0.061 ± 0.002
苯巴比妥组	26.5 ± 1.003	1.52 ± 0.111	0.057 ± 0.005
盐酸川芎嗪			
小剂量组	26.66 ± 0.761	1.40 ± 0.044	0.052 ± 0.001
中剂量组	27.62 ± 0.446	1.72 ± 0.115	0.062 ± 0.004
大剂量组	26.06 ± 0.542	1.58 ± 0.090	0.060 ± 0.003

**2.2 盐酸川芎嗪对 CYP1A2、CYP2D22、CYP2E1 和 CYP3A 代谢活性的影响** 盐酸川芎嗪对小鼠肝脏 4 种亚酶活性的影响(表 3)。与空白对照组比较,盐酸川芎嗪大剂量组的 CYP1A2 酶活性升高了 1.43 倍

( $P < 0.05$ )。盐酸川芎嗪对 CYP2E1、CYP2D22、CYP3A 的酶活性与空白对照组比较,均差异无统计学意义。

**2.3 盐酸川芎嗪对 CYP1A2、CYP2D22、CYP2E1 和 CYP3A11 mRNA 水平的影响** 本实验所提取的 RNA 条带清晰,没有模糊弥散的现象,且 28S 条带的亮度是 18S 条带的约 2 倍,说明提取的 RNA 完整性符合实验要求。紫外分光光度计检测结果表明提取的 RNA 的  $A_{260}/A_{280}$  比值在 1.8~2.0 之间,说明提取的 RNA 纯度满足实验要求。实时荧光定量 PCR 考察了盐酸川芎嗪对小鼠肝脏 4 种  $P_{450}$  同工酶 mRNA 表达的影响(表

4)。与空白对照组比较,盐酸川芎嗪大剂量组上调了 CYP1A2 mRNA 水平( $P < 0.05$ );盐酸川芎嗪对 CYP3A11、CYP2D22 和 CYP2E1 的 mRNA 的水平差异无统计学意义。

**2.4 盐酸川芎嗪对 AhR、HNF-4 $\alpha$ 、PXR 和 PPAR $\alpha$  mRNA 表达的影响** 本实验用实时荧光定量聚合酶链反应考察了盐酸川芎嗪对小鼠肝脏相关核受体 mRNA 表达的影响。与空白对照组比较,盐酸川芎嗪大剂量组 AhRmRNA 水平上调 1.56 倍( $P < 0.05$ ),对 HNF-4 $\alpha$ 、PXR 和 PPAR $\alpha$  的 mRNA 水平均差异无统计学意义。见表 5。

表 3 5 组小鼠肝 CYP 酶活性比较

Tab.3 Comparison of the activity of hepatic CYP enzyme among five groups of mice				nmol·mg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> , $\bar{x} \pm s, n=5$
组别	CYP1A2	CYP2E1	CYP3A	CYP2D22
空白对照组	0.433 ± 0.076	0.042 ± 0.292	0.543 ± 0.008	1.390 ± 0.162
苯巴比妥组	0.524 ± 0.036	0.087 ± 0.022 <sup>*1</sup>	0.852 ± 0.057 <sup>*1</sup>	1.815 ± 0.424
盐酸川芎嗪				
小剂量组	0.498 ± 0.008	0.035 ± 0.320	0.550 ± 0.005	1.511 ± 0.133
中剂量组	0.493 ± 0.021	0.048 ± 0.092	0.565 ± 0.009	1.712 ± 0.115
大剂量组	0.620 ± 0.017 <sup>*1</sup>	0.051 ± 0.106	0.616 ± 0.032	1.334 ± 0.055
与空白对照组比较, <sup>*1</sup> $P < 0.05$				
Compared with blank control group, <sup>*1</sup> $P < 0.05$				

表 4 5 组小鼠肝 CYP mRNA 表达的比较

Tab.4 Comparison of the mRNA expression of hepatic CYP enzyme among five groups of mice				$\bar{x} \pm s, n=5$
组别	CYP1A2 mRNA	CYP2E1 mRNA	CYP3A11 mRNA	CYP2D22 mRNA
空白对照组	1	1	1	1
苯巴比妥组	1.325 ± 0.106	1.189 ± 0.123	1.102 ± 0.101	1.152 ± 0.130
盐酸川芎嗪				
小剂量组	0.980 ± 0.150	1.300 ± 0.055	0.933 ± 0.202	0.633 ± 0.080
中剂量组	1.170 ± 0.040	1.076 ± 0.106	0.980 ± 0.055	1.176 ± 0.088
大剂量组	1.435 ± 0.234 <sup>*1</sup>	1.296 ± 0.146	1.333 ± 0.123	1.023 ± 0.039
与空白对照组比较, <sup>*1</sup> $P < 0.05$				
Compared with blank control group, <sup>*1</sup> $P < 0.05$				

表 5 5 组小鼠肝核受体 mRNA 表达的比较

Tab.5 Comparison of the mRNA expression of hepatic nuclear receptor among five groups of mice				$\bar{x} \pm s, n=5$
组别	AhR mRNA	PPAR $\alpha$ mRNA	PXR mRNA	HNF-4 $\alpha$ mRNA
空白对照组	1	1	1	1
苯巴比妥组	1.760 ± 0.231 <sup>*1</sup>	1.567 ± 0.090 <sup>*1</sup>	2.067 ± 0.099 <sup>*2</sup>	1.850 ± 0.090 <sup>*1</sup>
盐酸川芎嗪				
小剂量组	1.050 ± 0.115	0.661 ± 0.085	0.928 ± 0.083	0.993 ± 0.115
中剂量组	1.133 ± 0.089	1.140 ± 0.058	1.100 ± 0.057	1.110 ± 0.057
大剂量组	1.567 ± 0.145 <sup>*1</sup>	1.333 ± 0.088	1.237 ± 0.058	1.266 ± 0.145
与空白对照组比较, <sup>*1</sup> $P < 0.05$ , <sup>*2</sup> $P < 0.01$				
Compared with blank control group, <sup>*1</sup> $P < 0.05$ , <sup>*2</sup> $P < 0.01$				

**2.5 盐酸川芎嗪对 CYP1A2 和 CYP2E1 蛋白表达的影响** Western-blotting 测定肝脏微粒体中 CYP1A2、CYP2E1 的蛋白表达,结果见图 1 和表 6。与空白对照组比较,盐酸川芎嗪大剂量组 CYP1A2/GAPDH 蛋白表达上调 1.4 倍( $P < 0.05$ );盐酸川芎嗪对小鼠肝脏中的 CYP2E1/GAPDH 蛋白表达无显著性影响。

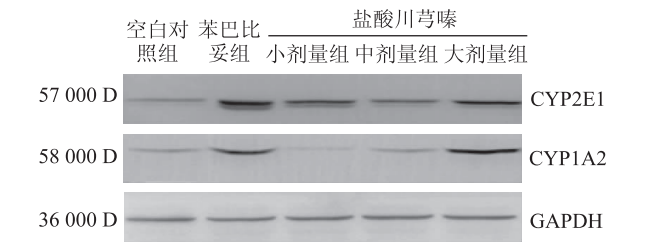


图 1 CYP1A2、CYP2E1 蛋白表达相对水平  
Fig. 1 Relative protein expression of CYP1A2 and CYP2E1

表 6 5 组小鼠肝 CYP 蛋白表达的比较  
Tab. 6 Comparison of the protein expression of hepatic CYP enzyme among five groups of mice  $\bar{x} \pm s, n = 5$

组别	CYP1A2/GAPDH	CYP2E1/GAPDH
空白对照组	1.020 ± 0.076	0.989 ± 0.065
苯巴比妥组	1.310 ± 0.087	1.188 ± 0.120
盐酸川芎嗪		
小剂量组	0.723 ± 0.060	0.904 ± 0.096
中剂量组	0.857 ± 0.072	0.908 ± 0.080
大剂量组	1.430 ± 0.062 <sup>*1</sup>	1.217 ± 0.110

与空白对照组比较, <sup>\*1</sup> $P < 0.05$   
Compared with blank control group, <sup>\*1</sup> $P < 0.05$

3 讨论

细胞色素 P<sub>450</sub> 是体内重要的 I 相代谢酶之一。主要存在于动物肝脏,中药复方配伍使用时,中药有效成分与其他药物之间产生的代谢性相互作用,会对 CYP<sub>450</sub> 酶的活性产生影响,从而影响治疗效果或产生药物毒性<sup>[7]</sup>。参芎葡萄糖注射液是由丹参和盐酸川芎嗪配伍组成的中药注射剂,在临床上广泛应用。本实验是对参芎葡萄糖注射液的主要成分盐酸川芎嗪的研究。实验结果表明,盐酸川芎嗪对小鼠肝脏中的 CYP3A11、CYP2D22 和 CYP2E1 的活性及表达无显著影响,对 CYP1A2 的药物代谢酶的酶活性、mRNA 以及蛋白表达具有诱导作用。

近年来,研究人员对细胞色素的调控因子进行了广泛研究,发现大部分 CYP1A、2B、2D、2E、3A、4A 家族成员的表达受到 NR 如 PXR 的调节<sup>[8-9]</sup>。NR 是一类脂溶性配体依赖的转录因子,此类因子在外源性物

质对转录水平的基因表达调控中起着重要的作用<sup>[10]</sup>。AHR 调控 CYP1A 家族的表达, HNF-4α 主要调节 CYP2D22 的水平; PXR 主要激活 CYP3A 异构体; PPARα 激活 CYP2E 亚型等<sup>[11]</sup>。许多化合物对 CYP 酶活性的调节作用是通过 NR 介导的<sup>[12]</sup>。因此,本文进一步研究了盐酸川芎嗪对 CYP3A11、CYP2D22、CYP2E1 和 CYP1A2 及调控因子表达的影响。给药 7 d 后,盐酸川芎嗪组对 CYP3A11、CYP2D22 和 CYP2E1 的调控因子 PXR、HNF-4α 和 PPARα 的表达无显著变化,但盐酸川芎嗪可以上调 AhR 表达。这一结果与盐酸川芎嗪对 CYP3A11、CYP2D22、CYP2E1 和 CYP1A2 的作用一致。

CYP1A2 在前致癌物的代谢活化中发挥了重要作用,它的活性与许多药物的疗效或毒性以及一些肿瘤的易感性密切相关,是人体参与药物的代谢的重要亚型。诱导剂与 AhR 相结合,形成复合物进入细胞核与转运因子结合成异二聚体,该异二聚体通过与 CYP1A2 启动子区上游的特异性结合位点结合,从而调节 CYP1A2 的转录,改变 CYP1A2 的表达,起到诱导作用<sup>[13]</sup>。实验结果表明,盐酸川芎嗪对小鼠肝脏中 CYP1A2 活性和表达有诱导作用,很可能是由盐酸川芎嗪上调 AhR 的表达所致。

笔者在本实验中从酶活性、mRNA 与蛋白水平检测盐酸川芎嗪对小鼠肝药物代谢酶的影响。结果显示盐酸川芎嗪对小鼠体内肝 CYP2E1、CYP2D22、CYP3A、HNF-4α、PXR 和 PPARα 没有显著性影响,但对 CYP1A2 的活性有诱导作用,而这种作用很可能与盐酸川芎嗪上调 AhR 水平从而促进 CYP1A2 表达有关。本课题组前期发现参芎葡萄糖注射液可以诱导 CYP1A2 及抑制 CYP2E1 的表达,其主要成分丹参对 CYP2E1 酶活性、mRNA 及蛋白表达都具有显著抑制作用,结合本实验结果,推测参芎葡萄糖注射液的 CYP1A2 诱导作用主要由盐酸川芎嗪产生。

CYP1A2 酶在肝中的含量次于 CYP3A 和 CYP2C<sup>[14]</sup>,是乙酰氨基酚、非那西丁、华法林、芳香胺、丙咪嗪、乙酰苯胺、雌二醇、茶碱等的药物主要代谢酶<sup>[15]</sup>。因此当盐酸川芎嗪与这些药物联合使用时,应考虑二者之间可能存在潜在的相互作用。但有文献报道,盐酸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<sup>[16]</sup>。对大鼠体外肝细胞 CYP1A2 无诱导作用<sup>[17]</sup>。但盐酸川芎嗪对大鼠肝微粒体 CYP1A2、CYP2D6、CYP2E1 的酶活性有诱导作用<sup>[18]</sup>。盐酸川芎嗪可以诱导小鼠的 CYP1A2 的表达,但对其他代谢酶虽有上调趋势,但差异无统计

学意义。这表明不同的动物模型、给药方式及给药周期等因素都会影响药物的代谢过程。因此研究中药对 CYP 酶的影响还需结合临床的试验来验证。

#### 参考文献

- [1] 闫广利,王喜军. 基于药物代谢酶和转运蛋白的中药方剂配伍规律研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化基础研究,2008,10(5):25-28.
- [2] 李晓宇,刘泉林. CYP<sub>450</sub>酶特性及其应用研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学,2008,13(8):942-946.
- [3] 李秋怡,干国平,刘焱文. 川芎的化学成分及药理研究进展[J]. 时珍国医国药,2006,17(7):1298-1299.
- [4] 王海东,靳宝兰,朱简. 中西医结合治疗急性脑梗死 70 例临床观察[J]. 中国中西医结合急救杂志,2006,13(3):191.
- [5] 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,2012:131-142.
- [6] 魏伟,吴希美,李元建,等. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2010:183-186.
- [7] LEUCUTA S E,VLASE L. Pharmacokinetics and metabolic drug interactions[J]. Curr CLin Pharmacol,2006,1(1):5-20.
- [8] IMEN A B,PASCUSSI J M,PATRICK M, et al. Effect of aflatoxin B1 on nuclear receptors PXR, CAR, AHR and their target cytochromes P<sub>450</sub> mRNA expression in primary cultures of human hepatocytes[J]. Intern J Toxic,2012,31(1):86-93.
- [9] HUANG L,BI H C,LIU Y H, et al. CAR-mediated up-regulation of CYP3A4 expression in LS174T cells by Chinese herbal compounds[J]. Drug Met Pharm,2011,26(4):331-340.

- [10] ZHANG Y W,BAOM H,HU L, et al. Dose-response of oridonin on hepatic cytochromes P<sub>450</sub> mRNA expression and activities in mice[J]. J Ethno Pharm,2014,155(1):714-720.
- [11] WANG Y Y,YANG J,LIU H, et al. Effects of tetrahydroxystilbene glucoside on mouse liver cytochrome P<sub>450</sub> enzyme expressions[J]. Xenobiotica,2015,45(4):279-285.
- [12] LAU A J,YANG G,RAJARAMAN G, et al. Human pregnane X receptor agonism by Ginkgo biloba extract: assessment of the role of individual ginkgolides [J]. J Pharm Exp Ther,2010,335(3):771-780.
- [13] SULEM P,GUDBJARTSSON F,GELLER F, et al. Sequence variants at CYP1A1-CYP1A2 and AHR associate with coffee consumption [J]. Hum Mol Genet,2011,20(10):2071-2077.
- [14] 余小翠,黄丽军,刘高峰,等. 丹红注射液对大鼠肝微粒体 5 种 CYP 亚型酶活性的影响[J]. 医药导报,2012,31(3):277-281.
- [15] 于盼盼,杭鹏洲,张波,等. 稳心颗粒对大鼠细胞色素 P<sub>450</sub> 酶的影响[J]. 医药导报,2012,31(7):834-838.
- [16] 易飞,黄心一. 人肝微粒体中川芎嗪对 CYP 酶活性的影响[C]. 成都:2008 年成渝药学年会,2008,144-148.
- [17] 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):1456-1461.
- [18] 尚芳红,俸珊,张飞燕,等. 加味佛手散及其配伍对大鼠肝脏 P<sub>450</sub> 酶活性及肝细胞形态的影响[J]. 中国中药杂志,2015,40(10):2030-2036.

## 2018 年《医药导报》各期药物专栏要目

第 1 期	感染性疾病用药专栏	第 2 期	心脑血管疾病用药专栏
第 3 期	呼吸系统疾病和结核病用药专栏	第 4 期	中药与天然药物专栏
第 5 期	抗肿瘤药物专栏	第 6 期	妇产科和计划生育用药专栏
第 7 期	神经系统疾病用药专栏	第 8 期	风湿和免疫系统疾病用药专栏
第 9 期	儿科疾病用药专栏	第 10 期	精神和心理疾病用药专栏
第 11 期	糖尿病及代谢性疾病用药专栏	第 12 期	皮肤病和性病用药专栏

若投专栏稿件,请至少在该期出版前 8 个月将稿件通过《医药导报》杂志官方网站(www.yydbzz.com 或 www.yydb.cn)在线投稿系统投稿,以便及时送审和处理稿件。谢谢!