

### 3 讨论

黑加仑籽是从黑加仑果实加工后的果渣中分离而得的种子, 主要有效成分为  $\gamma$ -亚麻酸。有研究表明黑加仑籽油连续饲服 3 周能明显降低高脂血症家兔血清 TC、TG、LDL-C 含量; 连续饲服 6 周能明显抑制家兔动脉粥样硬化斑块的形成<sup>[3]</sup>。付涛等<sup>[4]</sup>研究表明, 泽泻汤有预防性降血脂作用。顾施健等<sup>[5]</sup>研究表明, 泽泻汤对正常血压小鼠有降低其收缩压作用。张兴桑等<sup>[6]</sup>研究表明, 山楂水提液具有调节血脂、预防动脉硬化的作用。随着人们生活水平的提高和饮食文化的改变, 高血压伴有高脂血症的情况越来越多, 也就越来越引起人们的关注。在降压的同时, 如能够控制血脂水平, 则有助于预防、逆转靶器官的损害, 也就有可能降低心脑血管病的发生。目前对于高血压复合高脂血症比较提倡的联合治疗方案是抗高血压药物长效钙离子拮抗剂+ACEI+他汀类降 TC 药物, 但对于其产生的不良反应方面都没有取得完全满意的效果。因此寻求疗效明确、价格低廉、不良反应小的药物, 具有非常重要的现实意义。

本实验结果表明, 通过析因设计的拆方研究, 由析因方差分析筛选出了黑加仑籽、泽泻汤和山楂的共同组方为降压调脂的最优组方。该优选组方可有效降低肾性高血压复合高脂血症的大鼠的

SBP、TC、TG、LDL-C, 升高 HDL-C。其降压调脂效力与阳性对照组(卡托普利+血脂康)效果基本相近。同时病理学观察发现, 该优选组方对减轻和防止肝脏的脂肪性变具有一定作用; 并可减轻肾小球动脉硬化及胸主动脉中膜增厚症状。本研究结果证明, 黑加仑籽和山楂与泽泻汤组方配伍对肾性高血压合并高脂血症大鼠有较稳定、持久的降压调脂作用, 并有效保护肝、肾及胸主动脉。

### REFERENCES

- [1] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 941-960, 1017-1021.
- [2] LI L Z, LYU G Y, CHEN S H, et al Effect of the total saponins of *Panax notoginseng* leaves on blood lipid levels, liver function and lipid peroxidation in hyperlipidemia rats by fat emulsion [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2014, 31(6): 662-666.
- [3] 周效平, 李庆忠, 马辉. 黑加仑油药理作用研究[J]. *中医学报*, 2002, 30(3): 56.
- [4] FU T, JIANG L J, CHEN G L. Effect of bioactive fractions of *Rhizoma Alismatis* decoction on the levels of serum lipids and its antioxidant capacity in rats [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2012, 23(2): 266-268.
- [5] GU S J, WU J, LIU D Y. The blood pressure regulated effect of Zexie Decoction in mice [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2010, 21(2): 272-273.
- [6] 张兴桑, 梁欣娜, 王乃平, 等. 山楂水提液及山楂颗粒对高脂模型小鼠的影响[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(12): 2905-2906.

收稿日期: 2015-12-25

## 呋喃二烯对肝脏细胞色素 P450 酶不同亚型的影响

宋飞凤<sup>1</sup>, 陈萌<sup>1,2</sup>, 沈剑<sup>1</sup>, 李丽萍<sup>1</sup>, 蒋惠娣<sup>1\*</sup> (1. 浙江大学药学院药物分析与药物代谢研究室, 杭州 310058; 2. 浙江大学医学院附属第二医院, 杭州 310009)

**摘要:** 目的 考察呋喃二烯(furanodiene, FDE)对肝脏微粒体主要的细胞色素 P450(CYP)酶活性的影响。方法 采用探针底物法, 考察 FDE 在体外孵育体系中对大鼠和人肝微粒体 CYP1A、CYP2A、CYP3A、CYP2C、CYP2D、CYP2E1 的抑制作用, 并计算相应的 IC<sub>50</sub> 值; 采用微粒体体外“鸡尾酒”孵育法(cocktail 法), 考察大鼠经低、高剂量 FDE(40 mg·kg<sup>-1</sup> 和 160 mg·kg<sup>-1</sup>)连续灌胃 7 d, 其肝微粒体主要 CYP 酶活性的变化。结果 FDE 对大鼠肝微粒体 CYP2D1 和 CYP2C6/7 有较弱的抑制作用, 其 IC<sub>50</sub> 分别为 15.8 和 23.8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 对人肝微粒体 CYP2C9 也有较弱的抑制作用, IC<sub>50</sub> 为 26.1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。与对照组比较, 大鼠灌胃 40 mg·kg<sup>-1</sup> FDE, 肝微粒体主要 CYP 酶活性无显著变化; 灌胃 160 mg·kg<sup>-1</sup> 后, 肝微粒体 CYP2E1 活性为对照组的 164%。结论 FDE 对大鼠和人肝微粒体 CYP 主要亚型的抑制作用较弱; 40 mg·kg<sup>-1</sup> FDE 对大鼠肝微粒体主要 CYP 酶未显示明显诱导作用, 160 mg·kg<sup>-1</sup> FDE 对肝微粒体 CYP2E1 有一定的诱导作用。

**关键词:** 呋喃二烯; 肝微粒体; 细胞色素 P450; 抑制; 诱导

作者简介: 宋飞凤, 女, 博士生 Tel: (0571)88208431 E-mail: songfeifeng113@126.com \*通信作者: 蒋惠娣, 女, 博士, 教授 Tel: (0571)88208408 E-mail: hdjiang@zju.edu.cn

## Inhibitory and Inductive Effects of Furanodiene on Hepatic Cytochrome P450

SONG Feifeng<sup>1</sup>, CHEN Meng<sup>1,2</sup>, SHEN Jian<sup>1</sup>, LI Liping<sup>1</sup>, JIANG Huidi<sup>1\*</sup> (1. Department of Pharmaceutical Analysis and Drug Metabolism, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the inhibitive and inductive effect of furanodiene (FDE) on main cytochrome P450 isoforms(CYPs) in rat and human liver microsomes. **METHODS** Probe substrate method was used to evaluate the *in vitro* inhibitory effect of FDE on CYP1A, CYP2A, CYP3A, CYP2C, CYP2D and CYP2E1 in rat and human liver microsomes. Rats were administered with FDE at a dosage of 40 mg·kg<sup>-1</sup> or 160 mg·kg<sup>-1</sup> by gastric lavage for successive 7 days, then the metabolic activities of main CYPs in liver microsomes were evaluated by cocktail-LC-MS/MS method. The inductive effect of FDE was evaluated by comparing the activities of main CYP450 isoforms in rat liver microsomes with or without treatment of FDE. **RESULTS** FDE inhibited the activities of CYP2D1 and CYP2C6/7 in rat liver microsomes, with the IC<sub>50</sub> values of 15.8 and 23.8 μmol·L<sup>-1</sup>, respectively. FDE also inhibited CYP2C9 activity in human liver microsomes with the IC<sub>50</sub> of 26.1 μmol·L<sup>-1</sup>. Compared with the vehicle group, 40 mg·kg<sup>-1</sup> FDE did not obviously change the activities of main CYPs in rat microsomes, while 160 mg·kg<sup>-1</sup> of FDE increased the activity of CYP2E1 to 164% of the vehicle group. **CONCLUSION** FDE has a negligible or weak inhibitory effect on main CYP450 in rat and human liver microsomes, FDE can not induce main CYP450 in rat liver microsomes at 40 mg·kg<sup>-1</sup> while induce CYP2E1 to some extent at 160 mg·kg<sup>-1</sup>.

**KEY WORDS:** furanodiene; liver microsome; CYP; inhibition; induction

呋喃二烯(furanodiene, FDE)为倍半萜烯化合物,其化学名为(5E,9Z)-3,6,10-三甲基-4,7,8,11-四氢化芳癸并[b]呋喃,广泛存在于姜科植物蓬莪术 [*Curcuma zedoaria* (Berg) Rose]、温郁金(*Curcuma wenyujin*)和广西莪术(*Curcuma kwangsiensis*)等<sup>[1-2]</sup>,具有较好的抗肿瘤、抗氧化、抗病毒、抗炎、扩张血管和保肝作用,对病毒性肺炎也有很好的疗效<sup>[3-4]</sup>。体外研究表明,FDE具有较高的抑制和杀伤肿瘤细胞能力,可诱导 HepG2、Hela、HL-60、PC-3、SGC-7901、HT-1080 及 U251 等多种肿瘤细胞的凋亡。体内研究显示,FDE 能显著抑制小鼠子宫颈癌肿瘤 U14 和肉瘤 S180 的生长<sup>[5]</sup>。鉴于 FDE 显著的抗肿瘤效果,其作为抗肿瘤候选药物具有较好的开发前景,对 FDE 的代谢性药物相互作用进行研究和预测,可为 FDE 的成药性评价提供实验依据。

细胞色素 P450(CYP)酶是人体内重要的药物代谢酶,参与了临床约 75% 的药物代谢,其中,CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A4 是主要的 CYP 同工酶,不同药物对其诱导或抑制是产生临床代谢性相互作用的主要原因<sup>[6-7]</sup>。FDE 对 CYP 酶的影响目前未见报道。本研究考察 FDE 对大鼠和人肝微粒体主要 CYP 酶的抑制和诱导作用,以预测 FDE 是否会发生有临床意义的代谢性

药物相互作用,为 FDE 的开发提供参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 药品与试剂

呋喃二烯(杭州民生药业有限公司);奥美拉唑(浙江康恩贝制药股份有限公司);睾酮(上海百灵威技术有限公司);非那西丁、右美沙芬、氯唑沙宗、咪达唑仑、硝苯地平、甲苯磺丁脲、氯雷他定、香豆素均购自南京德宝生化器材有限公司;紫杉醇、对乙酰氨基酚、去甲基右美沙芬、6-羟基氯唑沙宗、1-羟基咪达唑仑、4-羟甲基甲苯磺丁脲、枸橼酸、枸橼酸脱氢酶、氧化/还原型辅酶 II ( $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP/ $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form, NADPH)均购自美国 Sigma 公司;乙腈、甲酸为美国 Tedia 公司生产;人肝微粒体[瑞德肝脏疾病研究(上海)有限公司,批号:SUBK]由 10 个健康男性蒙古人种(年龄 21~38 岁)的混合肝脏制备;其余试剂均为国产分析纯。

#### 1.2 动物

SD 大鼠,♂,体质量 180~220 g,清洁级,由浙江省医学科学院实验动物中心提供,动物质量合格证:医动字第 SCXK(浙)20080033 号。饲养及管理均严格按照实验室动物的要求及相关的浙江大学饲养规则,在温度为(22±2)℃,湿度为

(50±10)%的空调间饲养。

### 1.3 大鼠肝微粒体制备

按照文献<sup>[8]</sup>的方法采用差速离心法制备大鼠肝微粒体。

### 1.4 HPLC 检测 CYP 酶各亚型探针底物浓度

Agilent 1100 高效液相色谱仪(G1311A 四元泵, DAD 检测器, 柱温箱, Agilent 化学工作站, 自动进样器); 色谱柱为 Diamosil C<sub>18</sub> 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温: 30 °C; 进样量: 50 μL; 各底物流动相和检测波长见表 1。

表 1 CYP450 探针底物测定色谱条件

Tab. 1 Chromatographic conditions for determination of CYP probe substrates

底物	流动相	波长/nm
睾酮	乙腈: 0.5% HAC 水溶液(55: 45)	244
非那西丁	乙腈: 水(30: 70)	254
氯唑沙宗	乙腈: 0.5% HAC 水溶液(35: 65)	279
奥美拉唑	乙腈: 10 mmol·L <sup>-1</sup> 磷酸二氢钾水溶液(35: 65)	302
甲苯磺丁脲	乙腈: 10 mmol·L <sup>-1</sup> 醋酸钠缓冲液(pH 4.3)(45: 55)	230
香豆素	乙腈: 1%甲酸水溶液(35: 65)	275
咪达唑仑	乙腈: 15 mmol·L <sup>-1</sup> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 水溶液(52: 48)	220
硝苯地平	乙腈: 水(52: 48)	240
紫杉醇	乙腈: 水(55: 45)	227
右美沙芬	乙腈(1%甲酸): 5 mmol·L <sup>-1</sup> 醋酸铵(1%甲酸)(40: 60)	LC-MS/MS 分析

### 1.5 LC-MS/MS 定量检测 CYP 酶探针底物的代谢产物

色谱条件: Waters XBridge C<sub>18</sub> 柱(50 mm×2.1 mm, 3.5 μm); 进样量为 7 μL; 柱温为 30 °C; 流动相 A 为含 1%甲酸的 10 mmol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵溶液, B 为含 1%甲酸的乙腈。洗脱梯度程序为 75% A(0~0.5 min, 0.4 mL·min<sup>-1</sup>), 50%A (0.55 min, 0.2 mL·min<sup>-1</sup>), 0%A(1.5 min, 0.2 mL·min<sup>-1</sup>), 75%A(2.5 min, 0.2 mL·min<sup>-1</sup>), 75%A(3.0 min, 0.4 mL·min<sup>-1</sup>)。

质谱条件: WATERS ACQUITY UPLC-MS 超高压液相三重四级杆质谱联用仪(四元泵, 柱温箱, MassLynx V4.1 化学工作站, 自动进样器); 电喷雾离子源(ESI); 正离子扫描(ES<sup>+</sup>)和负离子扫描(ES<sup>-</sup>); 多离子反应监测(MRM)(监测离子见表 2); 干燥气为 N<sub>2</sub>; 碰撞气为氩气; 脱溶剂气温度为 350 °C; 离子源温度为 120 °C; 毛细管电压为 32 kV

(ES<sup>+</sup>)/3 kV(ES<sup>-</sup>); 锥孔电压为 35 V(ES<sup>+</sup>)/37 V(ES<sup>-</sup>); 碰撞能量为 2 eV(ES<sup>+</sup>)/1 eV(ES<sup>-</sup>), 其他参数见表 2。

右美沙芬测定条件: 流动相组成见表 1, 流动相流速为 0.4 mL·min<sup>-1</sup>; 正离子扫描(ES<sup>+</sup>); 选择离子检测(SIR); 毛细管电压为 39 kV; 锥孔电压为 48 V。

表 2 CYP 酶各亚型探针底物代谢产物和内标氯雷他定的质谱参数

Tab. 2 Parameters of mass spectra of metabolites of CYP and loratadine (IS)

被测物质	定量离子(m/z)	扫描方式
对乙酰氨基酚(CYP1A)	152/110	ES <sup>+</sup>
去甲基右美沙芬(CYP2D1)	258/157	ES <sup>+</sup>
1-羟基咪达唑仑(CYP3A1/2)	342/203	ES <sup>+</sup>
氯雷他定(内标)	383/267	ES <sup>+</sup>
4-羟基甲苯磺丁脲(CYP2C)	184/120	ES <sup>-</sup>
6-羟基氯唑沙宗(CYP2E1)	285/186	ES <sup>-</sup>

### 1.6 FDE 对大鼠和人肝 CYP 酶的抑制作用

取大鼠或人肝微粒体适量, 用再生系统将其稀释到一定蛋白浓度, 再分别向体系中加入各 CYP 酶的探针底物<sup>[9]</sup>(表 3 和表 4), 混匀后分别加入系列浓度(大鼠: 0.5~125 μmol·L<sup>-1</sup>; 人: 5~200 μmol·L<sup>-1</sup>)FDE, 并以等体积溶剂 DMSO 为空白对照, 大鼠和人肝微粒体孵育体系终体积分别为 200 μL 和 100 μL, DMSO 的含量控制在 0.25%。于 37 °C 恒温水浴振荡预孵育 3 min 后, 加入 2 μL NADP/NADPH(0.27 mmol·L<sup>-1</sup>/0.12 mmol·L<sup>-1</sup>)的 1% NaHCO<sub>3</sub> 溶液启动反应, 孵育一定时间后, 用适宜终止溶剂终止反应, 涡旋 1 min, 13 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液以 LC/MS 法测定右美沙芬浓度, 以 HPLC 测定 CYP 酶其余探针底物浓度, 计算 FDE 对 CYP 酶各亚型催化活性的抑制率及 IC<sub>50</sub> 值。

表 3 CYP 底物与大鼠肝微粒体孵育条件

Tab. 3 Incubation condition of CYP substrates with rat liver microsomes

底物	终浓度/ μmol·L <sup>-1</sup>	蛋白浓度/ mg·mL <sup>-1</sup>	孵育时间/ min	终止溶剂
睾酮	50	0.2	5	200 μL 冰乙醇
非那西丁	20	0.5	20	200 μL 冰乙醇
氯唑沙宗	40	0.5	10	200 μL 冰乙醇
奥美拉唑	20	0.2	5	200 μL 冰乙醇
甲苯磺丁脲	70	1.0	90	40 μL 10%三氯乙酸
右美沙芬	10	1.0	30	200 μL 冰乙醇
香豆素	20	0.5	15	200 μL 冰乙醇

表 4 CYP 底物与人肝微粒体孵育条件

Tab. 4 Incubation condition of CYP substrates with human liver microsomes

底物	终浓度/ μmol·L <sup>-1</sup>	蛋白浓度/ mg·mL <sup>-1</sup>	孵育时间/ min	终止溶剂
睾酮	50	0.5	30	200 μL 冰乙醇
咪达唑仑	10	0.5	30	200 μL 冰乙醇
硝苯地平	10	0.5	30	200 μL 冰乙醇
非那西丁	20	0.5	60	200 μL 冰乙醇
氯唑沙宗	40	0.5	30	200 μL 冰乙醇
奥美拉唑	20	0.4	30	200 μL 冰乙醇
甲苯磺丁脲	70	0.5	60	200 μL 冰乙醇
紫杉醇	10	0.5	30	200 μL 冰乙醇
香豆素	20	0.5	60	200 μL 冰乙醇
右美沙芬	10	0.5	60	200 μL 冰乙醇

### 1.7 FDE 对大鼠肝微粒体 CYP 酶的诱导作用考察

**1.7.1 大鼠给药处理** 18 只 SD 大鼠随机分成 3 组, 每组 6 只, 分别为对照组(灌胃给予空白豆油溶液), 低、高剂量 FDE 组(分别给予 40, 160 mg·kg<sup>-1</sup> FDE 的豆油溶液, 连续灌胃 7 d), 第 8 天制备肝微粒体, 以“cocktail”-LC-MS/MS 法测定肝微粒体中主要 CYP 酶亚型的代谢活性。

**1.7.2 “cocktail”-LC-MS/MS 法<sup>[10]</sup>测定大鼠肝微粒体中主要 CYP 酶活性** 以再生系统将肝微粒体稀释到蛋白含量为 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>, 向体系中加入探针底物非那西丁(CYP1A1/2)、氯唑沙宗(CYP2E1)、甲苯磺丁脲(CYP2C6/7)、右美沙芬(CYP2D1)、咪达唑仑(CYP3A1/2)的 DMSO 混合溶液, 使体系中底物的终浓度分别为 5, 80, 70, 1, 5 μmol·L<sup>-1</sup>, 孵育体系终体积为 200 μL, 于 37 °C 恒温水浴振荡预孵育 3 min 后, 加入 2 μL NADP/NADPH (0.27 mmol·L<sup>-1</sup>/0.12 mmol·L<sup>-1</sup>)的 1% NaHCO<sub>3</sub> 溶液启动反应, 继续孵育 10 min 后加入氯雷他定内标溶液(氯雷他定终浓度为 80 ng·mL<sup>-1</sup>)及 1.0 mL 乙酸乙酯, 涡旋提取, 取上清液 800 μL, 经真空抽干后, 用 150 μL 流动相复溶, 于 13 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液按“1.5”项下方法测定各代谢产物浓度。另以不加启动子的孵育样品作为对照组, 计算酶活性。

### 1.8 数据处理

CYP 酶抑制作用的评价以 IC<sub>50</sub> 值为指标, IC<sub>50</sub> 值计算如下: 通过测定探针底物的剩余量确定 CYP 酶的抑制率。抑制率(%)=(不同浓度药物组测

得的探针底物量-对照组测得的探针底物量)/对照组测得的探针底物量×100%。用 GraphPad Prism 5.0 软件将剩余活性对药物浓度的对数值作图计算 IC<sub>50</sub>。根据通用 CYP 酶抑制强度分级规则<sup>[11]</sup>, IC<sub>50</sub><1 μmol·L<sup>-1</sup> 为强抑制剂, 1 μmol·L<sup>-1</sup><IC<sub>50</sub><10 μmol·L<sup>-1</sup> 为中等强度抑制剂, IC<sub>50</sub>>10 μmol·L<sup>-1</sup> 为弱抑制剂。

CYP 酶诱导作用以酶相对活性为指标。CYP 酶亚型的相对活性以空白对照的百分比表示, 相对活性=FDE 处理组酶活性/对照组酶活性×100%。实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用 GraphPad Prism 5.0 中 One-way ANOVA 检验分析组间差异。

## 2 结果

### 2.1 FDE 对大鼠肝微粒体 CYP 酶的抑制作用

大鼠肝微粒体体外代谢抑制研究显示, FDE 对大鼠肝微粒体 CYP2E1 未显示抑制作用, 对 CYP1A1/2、CYP2A1/2 抑制的 IC<sub>50</sub> 值>125 μmol·L<sup>-1</sup>, 对 CYP3A1/2 及 CYP2C11 抑制的 IC<sub>50</sub> 为 30~60 μmol·L<sup>-1</sup>, 对 CYP2C6/7、CYP2D1 抑制的 IC<sub>50</sub> 值<30 μmol·L<sup>-1</sup>, 结果见表 5。

表 5 FDE 对大鼠肝微粒体 CYP 亚型的 IC<sub>50</sub>

Tab. 5 IC<sub>50</sub> values of Funarodiene on CYP isoforms in rat liver microsomes

底物	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
氯唑沙宗(CYP2E1)	/
非那西丁(CYP1A1/2)	>125
香豆素(CYP2A1/2)	>125
睾酮(CYP3A1/2)	49.4
奥美拉唑(CYP2C11)	59.5
甲苯磺丁脲(CYP2C6/7)	23.8
右美沙芬(CYP2D1)	15.8

### 2.2 FDE 对人肝微粒体 CYP 酶的抑制作用

人肝微粒体体外代谢研究显示, FDE 对人肝微粒体 CYP2E1 和 CYP2A6 未显示抑制作用, 对 CYP2C9 的 IC<sub>50</sub> 值为 26.1 μmol·L<sup>-1</sup>, 对其他 CYP 亚型抑制的 IC<sub>50</sub> 值均>200 μmol·L<sup>-1</sup>, 结果见表 6。

### 2.3 FDE 对大鼠肝微粒体 CYP 酶的诱导作用

与溶剂处理组比较, 大鼠连续 7 d 灌胃 40 mg·kg<sup>-1</sup> FDE 后, 肝微粒体主要 CYP 酶活性未显示明显差异, 而连续灌胃 160 mg·kg<sup>-1</sup> FDE 后, 仅 CYP2E1 活性增加到溶剂组的 164%, 与对照组比较, 差异具有统计学意义(P<0.05)。结果见图 1。

表 6 FDE 对人肝微粒体 CYP 亚型的 IC<sub>50</sub>

Tab. 6 IC<sub>50</sub> values of furanodiene on CYP isoforms in rat liver microsomes

底物	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
睾酮(CYP3A4/5)	>200
咪达唑仑(CYP3A4/5)	>200
硝苯地平(CYP3A4/5)	>200
非那西丁(CYP1A2)	>200
氯唑沙宗(CYP2E1)	/
甲苯磺丁脲(CYP2C9)	26.1
奥美拉唑(CYP2C19)	>200
香豆素(CYP2A6)	/
紫杉醇(CYP2C8)	>200
右美沙芬(CYP2D6)	>200

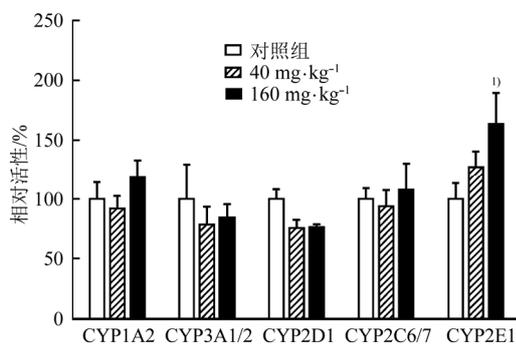


图 1 大鼠连续灌胃 FDE 7 d 后肝微粒体 CYP450 各亚型的催化活性( $n=6$ ,  $\bar{x} \pm s$ ) 与对照组比较, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ 。

Fig. 1 Relative activities of CYP isoforms in rat liver microsomes after oral administration of furanodiene for successive 7 days( $n=6$ ,  $\bar{x} \pm s$ ) Compared with the control group, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ .

### 3 讨论

CYP 酶可以代谢体内多种内源性和外源性物质, 在药物和致癌物的代谢过程中具有极其重要的作用。药物可能通过对 CYP 的诱导或抑制作用, 使合用药物代谢发生改变, 引起代谢性药物-药物相互作用<sup>[12]</sup>。因此, 临床前考察药物对 CYP450 酶活性的影响, 有助于评价药物安全性, 预测药物相互作用, 指导药物的科学开发。

本研究考察了 FDE 对大鼠和人主要 CYP450 酶的抑制作用, 在体外孵育体系中 FDE 对多数 CYP 酶亚型几乎未显示抑制作用, 仅对大鼠肝微粒体的 CYP2C6/7 和人肝微粒体的 CYP2C9 表现出较弱的抑制作用, 其 IC<sub>50</sub> 分别为 23.8 μmol·L<sup>-1</sup> 和 26.1 μmol·L<sup>-1</sup>。Pei 等<sup>[13]</sup>以 10 mg·kg<sup>-1</sup> 给大鼠灌胃 FDE, 其血浆中 C<sub>max</sub> 均 ≤ 0.4 μmol·L<sup>-1</sup>, 远低于

IC<sub>50</sub>; 给大鼠灌胃 20 mg·kg<sup>-1</sup> FDE, 考察给药后 1~12 h 肝脏中 FDE 的浓度, 发现其在 5 h 达最高 1.11 μg·g<sup>-1</sup>(约为 5 μmol·L<sup>-1</sup>), 因此, FDE 对 CYP 酶产生有临床意义的抑制作用的可能性较小。

FDE 体内对大鼠肝微粒体 CYP 酶诱导研究结果表明, 大鼠连续 7 d 灌胃 40 mg·kg<sup>-1</sup> 或 160 mg·kg<sup>-1</sup> FDE 后, 低剂量组与对照组肝微粒体主要 CYP 酶活性未显示明显差异, 高剂量时仅对 CYP2E1 活性表现出较弱的诱导作用, 对其他 CYP 亚型无明显诱导。鉴于 160 mg·kg<sup>-1</sup> 的 FDE 已远高于药效学有效剂量, 提示 FDE 对肝微粒体 CYP 酶的诱导作用并不强。由于外源物对 PXR 的激活是 CYP 酶诱导的主要机制之一, 但是文献报道大鼠与人 PXR 的配体结合部位仅有 76% 同源性<sup>[8]</sup>, 因此, 从大鼠的诱导结果可能不能简单外推到人。此外, 以 PXR-CYP3A4 及 CAR-2B6 报告基因法<sup>[14]</sup>考察了 FDE(10 μmol·L<sup>-1</sup>) 对人 PXR 及 CAR 是否具有激活作用, 结果显示, FDE 对 PXR 及 CAR 的激活作用仅为阳性 CYP3A4 诱导剂利福平(10 μmol·L<sup>-1</sup>) 及 CYP2B6 诱导剂 CITCO(2 μmol·L<sup>-1</sup>) 的 35% 及 3%, 提示 FDE 通过激活人 PXR 及 CAR 对 CYP3A4 及 CYP2B6 产生有临床意义的可能性不大。

综上所述, 本研究考察了 FDE 对 CYP 酶抑制和诱导作用, 结果显示, FDE 仅对大鼠 CYP3A1/2, CYP2D1, CYP2C6/7 和人 CYP2C9 显示较弱的抑制作用; 与对照组比较, 大鼠连续 7 d 灌胃 40, 160 mg·kg<sup>-1</sup> FDE, 仅高剂量组的肝微粒体 CYP2E1 酶活性有一定程度的增强, 提示 FDE 对 CYP 酶诱导作用不强。

### REFERENCES

- [1] BRIESKORN C H, NOBLE P. Furanosesquiterpenes from the essential oil of myrrh [J]. *Phytochemistry*, 1983, 22(5): 1207-1211.
- [2] MARADUFU A, WARTHEN J D. Furanosesquiterpenoids from *Commiphora myrrh* oil [J]. *Plant Sci*, 1988, 57(2): 181-184.
- [3] MAKABE H, MARU N, KUWABARA A, et al. Anti-inflammatory sesquiterpenes from *Curcuma zedoaria* [J]. *Nat Prod Res*, 2006, 20(7): 680-685.
- [4] BA Z, ZHENG Y, ZHANG H, et al. Potential anti-cancer activity of furanodiene [J]. *Chin J Cancer Res(中国癌症研究)*, 2009, 21(2): 154-158.
- [5] SUN X Y, ZHENG Y P, LIN D H, et al. Potential anti-cancer activities of Furanodiene, a Sesquiterpene from *Curcuma wenyujin* [J]. *Am J Chin Med*, 2009, 37(3): 589-596.
- [6] FOWLER S, ZHANG H. In vitro evaluation of reversible and

- irreversible cytochrome P450 inhibition: current status on methodologies and their utility for predicting drug-drug interactions [J]. *AAPS J*, 2008, 10(2): 410-424.
- [7] AI C H, SUN H X, LI H, et al. In vitro inhibition of cytochrome P450 activities by active constituents of Chinese herbal drugs [J]. *Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报)*, 2011, 27(4): 519-523.
- [8] 曾苏. 药物代谢学[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2008: 337-339.
- [9] Food and Drug Administration. Drug interaction studies-study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations [S]. Draft Guidance for Industry, 2012: 41-44
- [10] HE F, BI H, XIE Z, et al. Rapid determination of six metabolites from multiple cytochrome P450 probe substrates in human liver microsome by liquid chromatography/mass spectrometry: application to high-throughput inhibition screening of terpenoids [J]. *Rapid Commun Mass SP*, 2007, 21(5): 635-643.
- [11] TRIGGLE D J, TAYLOR J B. *Comprehensive Medicinal Chemistry* [M]. 2th ed. Elsevier Science Ltd, 2007: 246.
- [12] WRIGHTON S A, VANDENBRANDEN M, RING B J. The human drug metabolizing cytochromes P450 [J]. *J Pharmacokinet Biop*, 1996, 24(5): 461-473.
- [13] PEI L, LIU S, ZHENG J, et al. A sensitive method for determination of furanodiene in rat plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study [J]. *Biomed Chromatogr*, 2012, 26(7): 826-832.
- [14] XU C, LUO M Y, JIANG H D, et al. Involvement of CAR and PXR in the transcriptional regulation of CYP2B6 gene expression by ingredients from herbal medicines [J/OL]. *Xenobiotica*, 2015, 45(9): 773-781.

收稿日期: 2015-08-04

## 黄连素对四氯化碳诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用

姚必瑜, 黄智铭\* (温州医科大学附属第一医院, 浙江 温州 325401)

**摘要:** 目的 探讨黄连素对四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用及其机制。方法 30只 C57 小鼠, ♂, 随机分为对照组、 $\text{CCl}_4$ 组和黄连素组, 每组 10 只。黄连素组在  $\text{CCl}_4$  注射前 1 h 腹腔注射黄连素( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),  $\text{CCl}_4$ 组和黄连素组腹腔注射  $\text{CCl}_4$  橄榄油溶液( $0.5\%$ ,  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 对照组腹腔注射橄榄油溶液( $0.5\%$ ,  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。24 h 后麻醉下处死小鼠, 收集血清和肝脏标本, 采用生化检测 ALT 和 AST, HE 染色后观察肝脏病理学形态, Western blot 检测 JAK2 和 STAT3, p-JAK2 和 p-STAT3。RT-PCR 和 ELISA 检测炎症因子白介素-6(IL-6)和白介素 8(IL-8)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的表达和分泌。结果 与对照组相比,  $\text{CCl}_4$ 组病理改变明显增加, p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达量明显增加, JAK2 和 STAT3 表达无明显变化, IL-6、IL-8 和 TNF- $\alpha$ 表达和分泌明显增加。与  $\text{CCl}_4$ 组相比, 黄连素组病理改变明显减轻, p-JAK2、p-STAT3 表达明显减少, IL-6、IL-8 和 TNF- $\alpha$ 表达和分泌也明显减少, 但 JAK2 和 STAT3 表达仍无明显变化。结论 黄连素预处理可通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路激活而减少炎症反应, 从而减轻  $\text{CCl}_4$  诱导的急性肝损伤。

**关键词:** 黄连素; 四氯化碳; 急性肝损伤; 炎症; JAK2/STAT3

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2016)04-0424-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.04.009

### Berberine Protect Mice Against $\text{CCl}_4$ -induced Acute Liver Injury

YAO Biyu, HUANG Zhiming\* (*The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325401, China*)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate potential protection and mechanism of berberine in  $\text{CCl}_4$ -induced acute liver injury. **METHODS** 30 male C57 mice were randomly divided into three groups: control group,  $\text{CCl}_4$  group and berberine group. The mice in berberine group were injected berberine( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , ip) before 1 h of  $\text{CCl}_4$  injection. Moreover, the mice in berberine group and  $\text{CCl}_4$  group received  $\text{CCl}_4$  olive oil injection( $0.5\%$ ,  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , ip), and the control group injected with olive oil( $0.5\%$ ,  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , ip). These mice were sacrificed after 24 h  $\text{CCl}_4$  olive oil injection under anesthesia. Blood samples and liver tissue were collected. The liver dysfunction were evaluated by examining ALT and AST. The pathology of liver tissues was observed according to HE staining. And the protein level of JAK2, STAT3, p-JAK2 and p-STAT3 were measured by Western blotting. Moreover, the expression of IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  were evaluated by RT-PCR and ELISA. **RESULTS** Compared with the

作者简介: 姚必瑜, 男, 硕士生, 主治医师 Tel: 13958662051  
任医师, 硕导 Tel: 13706658620 E-mail: 13706658620@126.com

E-mail: 1042157787@qq.com \*通信作者: 黄智铭, 男, 硕士, 主