

- 2015, 11(4): 691-701.
- [11] YOSHIDA Y, TSUJI T, WATANABE S, et al. Efficacy of combination treatment with fingolimod (FTY720) plus pathogenic autoantigen in a glucose-6-phosphate isomerase peptide (GPI325-339)-induced arthritis mouse model [J]. Biol Pharm Bull, 2013, 36(11): 1739-1746.
- [12] ZHANG Z, ZHANG Z, FAUSER U, et al. FTY720 attenuates accumulation of EMAP-II+ and MHC-II+ monocytes in early lesions of rat traumatic brain injury [J]. J Cell Mol Med, 2007, 11(2): 307-314.
- [13] ROLLAND W B, LEKIC T, KRAFFT P R, et al. Fingolimod reduces cerebral lymphocyte infiltration in experimental models of rodent intracerebral hemorrhage [J]. Exp Neurol, 2013, 241(1): 45-55.
- [14] HASEGAWA Y, SUZUKI H, SOZEN T, et al. Activation of sphingosine 1-phosphate receptor-1 by FTY720 is neuroprotective after ischemic stroke in rats [J]. Stroke, 2010, 41(2): 368-374.
- [15] ROLLAND W B 2ND, MANAENKO A, LEKIC T, et al. FTY720 is neuroprotective and improves functional outcomes after intracerebral hemorrhage in mice [J]. Acta Neurochir Suppl, 2011, 111(2): 213-217.
- [16] HINSON H E, ROWELL S, SCHREIBER M. Clinical evidence of inflammation driving secondary brain injury: A systematic review [J]. J Trauma Acute Care Surg, 2015, 78(1): 184-191.
- [17] ABDUL-MUNEER P M, SCHUETZ H, WANG F, et al. Induction of oxidative and nitrosative damage leads to cerebrovascular inflammation in animal model of mild traumatic brain injury induced by primary blast [J]. Free Radic Biol Med, 2013, 60(2): 282-291.
- [18] DONG X Q, YU W H, HU Y Y, et al. Oxymatrine reduces neuronal cell apoptosis by inhibiting Toll-like receptor 4/nuclear factor kappa-B-dependent inflammatory responses in traumatic rat brain injury [J]. Inflamm Res, 2011, 60(5): 533-539.
- [19] DONG X Q, DU Q, YU W H, et al. Anti-inflammatory effects of oxymatrine through inhibition of nuclear factor-kappa B and mitogen-activated protein kinase activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglia cells [J]. Iran J Pharm Res, 2013, 12(1): 165-174.
- [20] JANSSEN S, SCHLEGEL C, GUDI V, et al. Effect of FTY720-phosphate on the expression of inflammation-associated molecules in astrocytes *in vitro* [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(4): 6171-6177.

收稿日期: 2015-11-30

和厚朴酚、厚朴酚、梔子苷、绿原酸和黄芪甲苷对人和大鼠体外 CYP1A2、CYP3A 和 CYP2D 的抑制作用

刘澄铭^{a,b}, 职文倩^{a,b}, 任静^{a,b}, 张培玉^{a,b}, 郜娜^{a*} (郑州大学, a.临床药理研究所; b.临床医学系, 郑州 450052)

摘要: 目的 观察和厚朴酚、厚朴酚、梔子苷、绿原酸和黄芪甲苷 5 种中药成分体外对人和大鼠肝 CYP1A2、CYP3A 和 CYP2D 的抑制作用。方法 在人和大鼠肝微粒体孵育体系中, 分别以非那西丁、咪达唑仑和右美沙芬为探针, 应用 HPLC 检测受试物对探针代谢产物生成量的影响, 评估 5 种中药成分对 CYP1A2、CYP3A 和 CYP2D 在该体系中的活性影响, 并计算得到抑制率和 IC₅₀。结果 和厚朴酚对人和大鼠 CYP1A2、CYP2D 的 IC₅₀ 值分别为 5.5、3.9、35.3 和 46.7 μmol·L⁻¹; 厚朴酚对人 CYP1A2、大鼠 CYP1A2 和 CYP2D 的 IC₅₀ 值分别为 23.8、29.1 和 39.9 μmol·L⁻¹; 梔子苷、绿原酸和黄芪甲苷对 3 种 CYP 酶亚型的 IC₅₀ 均 >100 μmol·L⁻¹; 和厚朴酚对人和大鼠 CYP3A 的 IC₅₀ 均 >100 μmol·L⁻¹; 厚朴酚对人 CYP3A、CYP2D 和大鼠 CYP3A 的 IC₅₀ 均 >100 μmol·L⁻¹。结论 和厚朴酚体外对人和大鼠 CYP1A2 和 CYP2D 有抑制作用, 厚朴酚体外对人和大鼠 CYP1A2、大鼠 CYP1A2 和 CYP2D 有抑制作用, 均呈浓度依赖性。

关键词: 和厚朴酚; 厚朴酚; 梔子苷; 绿原酸; 黄芪甲苷; 细胞色素 P450; 肝微粒体

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2016)07-0871-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.07.009

In Vitro Inhibitory Effects of Honokiol, Magnolol, Geniposide, Chlorogenic Acid, and Astragaloside IV on CYP1A2, CYP3A and CYP2D Activity in Human and Rats

LIU Chengming^{a,b}, ZHI Wenqian^{a,b}, REN Jing^{a,b}, ZHANG Peiyu^{a,b}, GAO Na^{a*} (Zhengzhou University, a.Clinical Pharmacology Research Institute; b.Department of Clinical Medicine, Zhengzhou 450052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the *in vitro* inhibitory effects of five kinds of herbal constituents (honokiol, magnolol, geniposide, chlorogenic acid, astragaloside IV) on CYP1A2, CYP3A and CYP2D in human and rat liver microsomes.

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目计划(15A310025); 郑州大学全国大学生创新创业训练计划资助项目(2014xjxm340)

作者简介: 刘澄铭, 男 Tel: 15225096695 E-mail: 1358842624@qq.com *通信作者: 郜娜, 女, 博士, 副教授 Tel: (0371)66912310 E-mail: gaonawei@zzu.edu.cn

METHODS The activities of CYP1A2, CYP3A and CYP2D in human and rat liver microsomes were evaluated by detecting turnovers of its substrates after treatment with the five kinds of herbal constituents *in vitro* by HPLC. Phenacetin, midazolam and dextromethorphan were used as substrates of CYP1A2, CYP3A and CYP2D, then the inhibition ratio and IC_{50} were calculated. **RESULTS** The IC_{50} of honokiol on CYP1A2 in human and rat were 5.5, 3.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and CYP2D in human and rat were 35.3 and 46.7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The IC_{50} of magnolol on CYP1A2 in human, CYP1A2 and CYP2D in rat were 23.8, 29.1 and 39.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The IC_{50} of geniposide, chlorogenic acid and astragaloside IV on the three kinds of CYP enzyme subtypes were greater than 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The IC_{50} of honokiol on human and rat CYP3A were $>100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The IC_{50} of magnolol on human CYP3A, CYP2D and rat CYP3A were also $>100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. **CONCLUSION** The activities of CYP1A2 and CYP2D in human and rat liver microsomes are respectively inhibited by honokiol, the activities of CYP1A2 in human and rat liver microsomes and CYP2D in rat liver microsomes are respectively inhibited by magnolol, which are all in a dose-dependent manner *in vitro*.

KEY WORDS: honokiol; magnolol; geniposide; chlorogenic acid; astragaloside IV; cytochrome P450; liver microsomes

近年来, 中药在临床中应用日益广泛, 厚朴、栀子、金银花和黄芪是 4 种常见中药, 其作为主要成分的中药制剂在中国药典 2010 年版中收录的有近 100 种。例如: 清开灵注射液、藿香正气口服液、茵栀黄注射液、穿心莲注射液等^[1]。而它们的主要药理活性成分分别是和厚朴酚、厚朴酚、栀子苷、绿原酸、黄芪甲苷, 其中和厚朴酚与厚朴酚为同分异构体。随着中药制剂的广泛应用以及联合用药的机会增多, 中药制剂与其他合成药物的相互作用日益受到重视, 随之而来的不良反应也逐渐凸显, 相关报道不断增多^[2-4]。

细胞色素 P450 酶(cytochrome P450, CYP450)是介导临床药物代谢的主要代谢酶, 对 CYP 酶的抑制可改变合用药物的药动学, 进而影响临床用药的有效性和安全性。而关于这 5 种中药成分对 CYP 酶活性的影响虽有相关报道, 但结果差异较大, 有的甚至呈现相反的结果。比如Duan等^[5]、Jeong 等^[6]和 Joo 等^[7]所研究的厚朴酚对人肝微粒体 CYP1A2、CYP2D 和 CYP3A 的 IC_{50} 的差异较大, 韩永龙等^[8]和 Kang 等^[9]所研究的栀子苷对 CYP3A 体外作用的结果相反。

本研究应用肝微粒体体外代谢法^[10], 选用美国 FDA 推荐的探针底物^[11], 系统评价 5 种中药成分对人和大鼠 3 种主要 CYP 酶亚型的体外抑制作用, 以期临床合理用药提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器与试药

Agilent1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent); UV-200 型紫外分光光度计(日本岛津); FS-1 型高速匀浆机(江苏金坛医疗仪器厂); 6L-88B 型漩涡混匀器(海门市其林贝尔有限公司); Milli-Q 超纯水制造系统(美国 Millipore 公司); Biofuge Stratos 型低温高速离心机(德国 heraeus 公司)。

和厚朴酚(批号: 20140315, 纯度: 98%)、厚朴酚(批号: 20140318, 纯度: 98%)、栀子苷(批号: 20140208, 纯度: 98%)、绿原酸(批号: 20140310, 纯度: 98%)和黄芪甲苷(批号: 20140121, 纯度: 98%)均购自郑州华文化化工有限公司; 非那西丁(批号: 100024-201405, 纯度: 99.5%)和对乙酰氨基酚(批号: 100039-201312, 纯度: 99.5%)购自中国食品药品检定研究院; 右美沙芬(Dr.Ehrenstorfer Gemany, 纯度: 98%, 批号: 00323); 去甲基右美沙芬(Gerilliant analytical reference standards, 批号: 40117, 纯度: 95%); 咪达唑仑注射液(江苏恩华药业股份有限公司, 批号: 20110432, 规格: 2 mL : 10 mg); 1'-羟基咪达唑仑(美国 cayman 公司, 批号: FN-3130901, 纯度: 98%); NADPH(北京索来宝科技有限公司, 批号: NO524F0122); 甲醇、乙腈均为色谱纯; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验样本

健康成年 SPF 级 SD 大鼠, ♂, 体质量(200±20)g, 动物合格证号: No.41003100001228, 由河南省实验动物中心提供。正常人肝组织 12 例, 来自郑州大学第一附属医院和河南省人民医院, 属于肝血管瘤患者手术切除病灶旁的正常组织, 并经病理检验证明, 切除后, 马上用预冷的生理盐水冲洗, 剪成小块, 分装于液氮保存。本实验方案已通过郑州大学伦理委员会批准, 受试者均签署知情同意书。

2 方法

2.1 肝微粒体的制备

实验前将所用试剂及用具置于冰箱预冷。采用钙沉淀法制备混合大鼠肝微粒体, 差速离心法制备混合人肝微粒体, 分别分装后置于-80℃冰箱保存。采用 Bradford 法测定蛋白浓度^[12]。

2.2 孵育反应

采用总体积为 100 μL 的孵育体系, 包含磷酸盐缓冲液(终浓度 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4)、EDTA(终浓度 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、 MgCl_2 (终浓度 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、微粒体蛋白(终浓度 0.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、抑制剂(对照组为相同体积的超纯水)以及相应的探针分别是非那西丁(终浓度 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、咪达唑仑(终浓度 18 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、右美沙芬(终浓度人 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、鼠 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[13-14]。预孵育 5 min 后加 NADPH(终浓度 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)启动反应, 而非那西丁、咪达唑仑和右美沙芬 3 种底物的孵育时间分别为

30 min(人和大鼠)、5 min(人)和 20 min(大鼠)、20 min(人)和 40 min(大鼠), 之后冰浴终止反应, 再分别加入冰乙腈 20 μL 、冰乙腈 20 μL 、高氯酸 10 μL (浓度 12.7 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)后, 涡旋混合 2 min, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清进样。

2.3 肝微粒体中代谢产物的测定

应用 HPLC 检测各探针代谢产物的生成量, 其色谱条件见表 1。另外, 郑州大学临床药理研究所对各探针代谢产物的方法学已进行了全面考察, 包括专属性、精密度及回收率, 结果证明均符合生物样本的测定要求^[14-15]。

表 1 HPLC 检测 3 种探针代谢产物的色谱条件

Tab. 1 Chromatographic conditions of 3 kinds of probe metabolites by HPLC

探针代谢产物	流动相	检测波长/nm	进样量/ μL
对乙酰氨基酚	甲醇: 醋酸铵(0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)=20: 80	257	80
1'-羟基咪达唑仑	甲醇: 乙腈: 水=53: 13: 34	220	50
去甲右美沙芬	磷酸水(43.60 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$): 乙腈=70: 30	荧光: 激发波长: 280; 发射波长: 320	20

2.4 酶活性测定

CYP 酶活性的抑制程度用抑制率(inhibition ratio, IR)表示, $\text{IR}=(1-\text{实验组转化率平均值}/\text{对照组转化率平均值})\times 100\%$ ^[16]。对 CYP 酶有抑制作用的中药成分, 考察其系列浓度(3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.50, 125.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对 CYP 酶的影响, 并计算半数抑制浓度 IC_{50} 。

2.5 统计分析方法

运用 SPSS 17.0 统计软件对各项数据资料进行统计学分析。

3 结果

3.1 标准曲线

以对乙酰氨基酚、1'-羟基咪达唑仑和去甲右美沙芬浓度 C 对样品峰面积 A 作线性回归, 所得标准曲线方程见表 2, 线性关系良好, 符合生物样本的测定要求。

表 2 肝微粒体中各探针代谢产物的标准曲线方程($n=5$)

Tab. 2 The standard curve equation of each probe metabolite in liver microsome ($n=5$)

探针代谢产物	标准曲线方程	r	线性范围/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
对乙酰氨基酚	$C=0.030\ 5A+0.0580$	0.999 9	0.31~20.00
1'-羟基咪达唑仑	$C=0.025\ 0A+0.0761$	0.999 7	0.23~28.80
去甲右美沙芬	$C=0.010\ 7A+0.0381$	1.000 0	0.12~30.68

3.2 抑制率和半数抑制浓度

用不同浓度的和厚朴酚、厚朴酚、栀子苷、绿原酸和黄芪甲苷, 经孵育反应, 以各探针代谢

产物生成量的抑制率作为评价指标来考察受试药物对 CYP 酶的抑制活性。结果可见, 5 种浓度为 125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的中药成分对人和大鼠 CYP 酶活性的抑制作用有较大差别, 其中栀子苷、绿原酸和黄芪甲苷对 3 种 CYP 酶的抑制率均<50%, 而和厚朴酚对人和大鼠 CYP1A2、CYP2D, 厚朴酚对人 CYP1A2 和大鼠 CYP1A2、CYP2D 的抑制率均>80%。此外, 关于对 CYP 酶有明显抑制作用的中药成分, 又考察了其对 CYP 酶的 IC_{50} , 结果见图 1。

4 讨论

近几年来, 药物相互作用导致的药物不良反应日趋严重, 发生率大约占总药物不良反应的 30%^[17]。药物相互作用中参与代谢最重要的酶为细胞色素 P450 酶, 其中 CYP1A2、CYP3A 和 CYP2D 是相对重要的 3 个 CYP 酶亚型, 催化了进入人体大约 80%药物的氧化代谢, 其比例分别为: 5%~10%、47%和 27.5%^[18], 是机体代谢药物的主要决定因素。另外 CYP 酶催化外源物的代谢具有范围广、专一性差以及易受抑制和诱导等特点, 药物对 CYP 酶的抑制能降低其他合用药物的体内代谢, 打破合用药物与其代谢产物之间的平衡, 增高血药浓度或引起蓄积, 从而导致药物的药效增强乃至不良反应的发生。因此, 研究中药及其有效成分对 CYP 酶活性的抑制作用对于临床安全用药、降低药物相互作用的风险显得尤为必要。

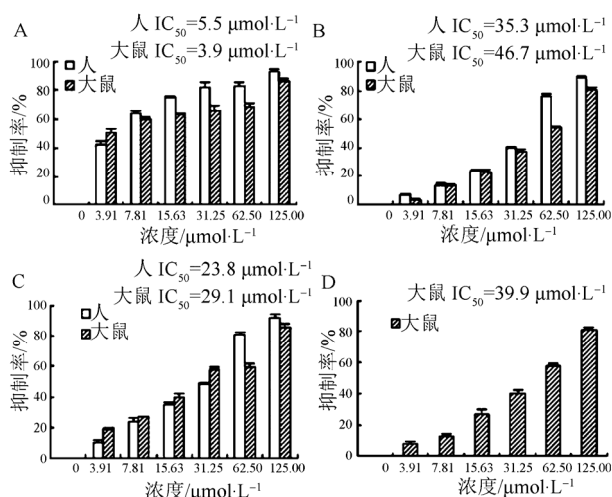


图1 不同浓度中药成分对人和大鼠 CYP 的抑制率及 IC_{50} 的影响($n=2$)

A-和厚朴酚对人和大鼠 CYP1A2 的影响; B-和厚朴酚对人和大鼠 CYP2D 的影响; C-厚朴酚对人和大鼠 CYP1A2 的影响; D-厚朴酚对大鼠 CYP2D 的影响。

Fig. 1 Effects on inhibition ratio and IC_{50} of different concentrations of ingredient on CYP in human and rats($n=2$) A-effects of honokiol on CYP1A2 in human and rats; B-effects of honokiol on CYP2D in human and rats; C-effects of magnolol on CYP1A2 in human and rats; D-effects of magnolol on CYP2D in rats.

本研究的结果表明,根据通用的 CYP 酶抑制剂强度分级规则^[19],和厚朴酚对人和大鼠 CYP1A2 为中等抑制剂,对人和大鼠 CYP2D 为弱抑制剂;厚朴酚对人和大鼠 CYP1A2 为弱抑制剂,对大鼠 CYP2D 为弱抑制剂,且均呈浓度依赖性。在临床应用时,需要关注和厚朴酚,厚朴酚对肝 CYP1A2 和 CYP2D 的抑制作用,因其在与通过 CYP 酶代谢的药物合用时产生相互作用的风险较高。可本研究结果和 Duan 等^[5]的结果不完全一致,这可能因为 Duan 等所使用的人肝微粒体背景不详。人肝微粒体多来源于肝癌患者,而疾病对 CYP 酶活性可能有一定影响,从而会影响到结果的准确性。另外,本研究结果也表明绿原酸、槲皮苷和黄芪甲苷对人和大鼠 3 种 CYP 酶,厚朴酚对人 CYP3A、CYP2D 和大鼠 CYP3A,和厚朴酚对人和大鼠 CYP3A 均无抑制作用,所以其在临床中出现明显酶抑制作用的可能性较小,进而这些成分在与通过 CYP 酶代谢的药物合用时产生相互作用的风险较低。

有文献报道^[20],FDA 推荐当 $[I]/K_i > 0.1$ 时($[I]$ 为抑制剂峰浓度),则应该开展临床研究。厚朴酚与和厚朴酚在人体内的血药浓度未见相关报道。袁成等^[21]的研究结果显示,在大鼠灌胃给予厚朴

提取液后,厚朴酚与和厚朴酚的 C_{max} 分别为 $0.974 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.522 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($3.66 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.96 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。将其与本研究的 IC_{50} 相比得出,厚朴酚与和厚朴酚的 C_{max} 与 IC_{50} 的比值分别为 $0.1 \sim 0.12$ 和 $0.04 \sim 0.5$ 。因此,根据本研究结果,有必要进一步考察厚朴酚与和厚朴酚体内对大鼠 CYP1A2 和 CYP2D 的影响。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 420-1234.
- [2] MARENGONI A, PASINA L, CONCOREGGI C, et al. Understanding adverse drug reactions in older adults through drug-drug interactions [J]. *Eur J Intern Med*, 2014, 25(9): 843-846.
- [3] ZHAO C, LI Y S, JIANG M L, et al. Advance of the interaction between cytochrome P450 and xenobiotics [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2014, 31(8): 1020-1024.
- [4] 俞振伟, 韩 钢, 马 珂. 住院患者中成药使用状况调查及基于 CYP450 的潜在药物相互作用风险分析[J]. *中国医院药学杂志*, 2012, 32(6): 459-460.
- [5] DUAN J, XIAO J, CHEN Y, et al. Inhibition of magnolol and honokiol on cytochrome P450 enzymes in rat and human liver microsomes [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2015, 7(2): 167-172.
- [6] JEONG H U, KONG T Y, et al. Effect of honokiol on cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase enzyme activities in human liver microsomes [J]. *Molecules*, 2013, 18(9): 10681-10693.
- [7] JOO J, LIU K H. Inhibitory effect of honokiol and magnolol on cytochrome P450 enzyme activities in human liver microsomes [J]. *Mass Spectrometry Letters*, 2013, 4(2):34-37.
- [8] HAN Y L, MENG X L, LI D, et al. *In vitro* inhibition of six cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes by qingkailing injection and its two active components (baicalin and geniposide) [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2011, 46(19): 1486-1490.
- [9] KANG J J, WANG H W, LIU T Y, et al. Modulation of cytochrome P-450-dependent monooxygenases, glutathione and glutathione S-transferase in rat liver by geniposide from *Gardenia jasminoides* [J]. *Food Chem Toxicol*, 1997, 35(10/11): 957-965.
- [10] 宋振玉, 刘耕陶. 当代药理学[M]. 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1994: 74.
- [11] HUANG S M, TEMPLE R, THROCKMORTON D C, et al. Drug interaction studies: study design, data analysis, and implications for dosing and labeling [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 81(2): 298-304.
- [12] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [13] GAO N, QI B, LIU F J, et al. Inhibition of baicalin on metabolism of phenacetin, a probe of CYP1A2, in human liver microsomes and in rats [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(2): e89752. Doi: 10.1371/journal.pone.0089752. eCollection 2014.
- [14] TIAN X. Inhibition of baicalin on the metabolism of CYP3A, CYP2D in rats and humans [D]. Zhengzhou University, 2013.
- [15] GAO N. Effects of baicalin on the pharmacokinetics of liver

- CYP2E1, CYP1A2 probe drugs in human and rats [D]. Zhengzhou University, 2013.
- [16] 吕秋军. 新药药理学研究方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 685.
- [17] CHO Y Y, JEONG H U, KIM J H, et al. Effect of honokiol on the induction of drug-metabolizing enzymes in human hepatocytes [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2014, 8(8): 2137-2145.
- [18] PINTO N, DOLAN M E. Clinically relevant genetic variations in drug metabolizing enzymes [J]. *Curr Drug Metab*, 2011, 12(5): 487-497.
- [19] PARMENTIER Y, BOSSANT M J, BERTRAND M, et al. *In vitro* studies of drug metabolism [M].//TESTA B, VAN DE WATERBEEMD H. *Comprehensive Medicinal Chemistry II -ADME-Tox Approaches*. Beijing: Science Press, 2007: 246.
- [20] SHARDLOW C E, GENERAUX G T, MACLAUCHLIN C C, et al. Utilizing drug-drug interaction prediction tools during drug development: enhanced decision making based on clinical risk [J]. *Drug Metab Dispos*, 2011, 39(11): 2076-2084.
- [21] YUAN C, LIANG A J, ZENG L, et al. Pharmacokinetics profile of magnolol and honokiol in Wistar rats [J]. *Pharm J Chin PLA(解放军药理学学报)*, 2003, 19(4): 258-261.
- 收稿日期: 2015-11-03

聚丁二炔生物传感器变色免疫法检测乳腺癌 MCF-7 细胞

范彩霞¹, 徐新^{2*}, 陈志喜², 肖旺钊³, 纪孝峰⁴(1.汕头大学医学院, 广东 汕头 515041; 2.汕头大学医学院附属粤北人民医院, 广东 韶关 512024; 3.三明学院资源与化工学院, 福建 三明 365004; 4.三明市第一医院普外科, 福建 三明 365004)

摘要: 目的 合成能特异性识别肿瘤细胞的聚丁二炔生物传感器。方法 超声乳化-共价修饰法制备聚丁二炔/磷脂 (polydiacetylene/Phospholipid, PDA/PC) 纳米囊泡, 通过共价修饰法将鼠抗人细胞角蛋白抗体 CK19 共价修饰固定在 PDA/PC 纳米囊泡表面, 制备可变色的 PDA/PC 生物传感器, 用于检测肿瘤细胞。透射电镜负染技术, 激光散射粒径测定仪、紫外-可见分光光度计扫描, 计算比色响应(colorimetric response, CR)等对合成的 PC/PDA 生物传感器进行表征, 以乳腺癌细胞株 MCF-7 为模型, 模拟考察 PDA/PC 生物传感器识别鉴定外周血循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs) 可行性。结果 TEM 检查结果显示制备的 PDA/PC 生物传感器呈球形或类球形、粒径均匀, 平均粒径约为 (223.4±23.6)nm; 激光散射粒径分析仪显示生物传感器的强均粒径和分散系数为 298.4 nm 和 0.184; 特异性抗原加入后, 纳米粒发生团聚, 颜色出现由蓝至红的变化, 且 CR 值随着抗原浓度增加而增加, 与高表达的乳腺癌细胞 MCF-7 发生特异性结合, 充分混匀后, 溶液颜色产生由蓝至红的变化。结论 成功合成由单克隆抗体抗 CK19 修饰的 PDA/PC 生物传感器, 通过免疫化学显色技术, 可快速、有效、灵敏的检测溶液中微量乳腺癌 MCF-7 细胞, 为 PDA/PC 生物传感器技术在 CTC 识别上的应用奠定基础。

关键词: 聚丁二炔生物; 变色免疫分析; 合成; 表征; 乳腺癌 MCF-7 细胞

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)07-0875-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.07.010

Detection of MCF-7 Breast Cancer Cell Line Based on Polydiacetylene Chromatic Immunoassay

FAN Caixia¹, XU Xin^{2*}, CHEN Zhixi², XIAO Wangchuan³, JI Xiaofeng⁴(1.Shantou University Medical College, Shantou 515041, China; 2.Affiliated Yuebei People's Hospital, Shantou University Medical College, Shaoguan 512026, China; 3.College of Resource and Chemical Engineering, Sanming University, Sanming 365004, China; 4.Department of General Surgery, Sanming First Hospital, Sanming 365001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To synthesize PDA/PC biosensor capable of specific recognition of cancer cells by immunoassay. **METHODS** Polydiacetylene/phospholipids (PDA/PC) nanoparticle vesicles were prepared by sonication and subsequent EDC/NHS coupling. Anti-Cytokeratin19 monoclonal antibody was covalent linked to PDA/PC nanoparticle vesicle to fabricate a polydiacetylene (PDA)-based colorimetric biosensor for detecting tumor cells. Physicochemical property were characterized by transmission electron microscope negatively staining technique, laser scattering particle size analyzer and UV-Vis spectrophotometer. Colorimetric response CR changing with the amount of CK19 antigen were determined to assess their color change sensitivity. Breast tumour cell line MCF-7 was chosen as a model to evaluate the biosensor to determine the tumor cell

基金项目: 福建省卫生教育联合攻关计划项目(WKJ-FJ-36); 韶关市医药卫生项目(Y13158); 韶关市科学计划项目(卫)(2013-CX/K191); 汕头大学医学院博士后基金资助项目

作者简介: 范彩霞, 女, 博士, 副主任药师 Tel: (0751)6913465 E-mail: mydream0509@qq.com *通信作者: 徐新, 男, 博士, 教授, 主任医师, 硕导 Tel: (0751)6913202 E-mail: 03xuxin@163.com