

• 研究论文 •

海藻 - 昆布药对对大鼠肝微粒体代谢酶的影响及肝毒性研究

沈晶晶¹, 张春华¹, 陈山乔¹, 范国荣^{2,3*}

1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306

2. 中国人民解放军第二军医大学药学院, 上海 200433

3. 上海市药物(中药)代谢产物研究重点实验室, 上海 200433

摘要: **目的** 发现不同剂量海藻 - 昆布药对提取物对大鼠肝微粒体代谢酶的诱导或抑制作用, 预测服用海藻 - 昆布药对时可能出现的药物 - 药物相互作用及肝脏毒性。 **方法** 雌雄各半 SD 大鼠 18 只, 被随机分为海藻 - 昆布药对低、高剂量组和对照组, 低、高剂量组大鼠分别 ig 给予海藻 - 昆布药对提取物 10.8、86.4 g/(kg·d), 连续经口给药 15 d 后麻醉处死, 取肝组织制备肝微粒体及 HE 染色石蜡切片。通过肝微粒体体外孵育方法测定 3 种肝脏 CYP450 同工酶特异性底物非那西丁(CYP1A2)、氯唑沙宗(CYP2E1)及咪达唑仑(CYP3A4)的降解和代谢产物生成量来评价肝药酶的诱导或抑制作用, 并以光镜下的组织病理切片检查来考察其肝毒性。 **结果** 低剂量组大鼠无显著诱导或抑制 3 种 CYP450 代谢酶亚型 1A2、2E1 和 3A4 现象, 肝组织出现了肝窦扩张、轻度水肿等适应性改变, 高剂量组能显著诱导 CYP3A4 亚型, 但也不能显著的诱导或抑制肝微粒体代谢酶 CYP1A2、CYP2E1 亚型, 肝组织出现了脂肪变、点状坏死等可逆性损伤。 **结论** 海藻 - 昆布药对具有诱导肝微粒体代谢酶 CYP3A4 的作用和轻微的肝细胞毒性, 高剂量经口给药能引起有临床意义的 CYP450 酶的诱导现象和肝脏损伤并可能导致不期望的药物 - 药物相互作用。

关键词: 海藻 - 昆布药对; 肝微粒体; CYP450; 诱导/抑制; 肝毒性

中图分类号: R994.2

文献标志码: A

文章编号: 1674 - 6376 (2015) 03 - 0256 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.03.005

Effects of *Sargassum fusiforme*-*Laminaria japonica* Chinese medicine pair on cytochrome P450 *in vitro* and study on its hepatotoxicity

SHEN Jing-jing¹, ZHANG Chun-hua¹, CHEN Shan-qiao¹, FAN Guo-rong^{2,3}

1. College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

3. Shanghai Key Laboratory for Pharmaceutical (Chinese Materia Medica) Metabolite Research, Shanghai 200433, China

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory or inducing effects on cytochrome P450 (CYP) and study the hepatotoxicity of Chinese medicine pair (CMP) of *Sargassum fusiforme*-*Laminaria japonica*. **Methods** Eighteen SD rats, half male and half female, were randomly divided into three groups: low-dose, high-dose, and control groups. All groups were treated with crude polysaccharides extracted from *S. fusiforme*-*L. japonica* or saline by ig administration for 2 weeks. All liver microsomes were prepared by the calcium-ion deposition method. Three specific probe drugs were utilized for co-incubating in rat liver microsomes, including phenacetin (1A2), chlorzoxazone (2E1), and midazolam (3A4). The concentration of the metabolites formed from each substrate was determined by HPLC. Pathomorphology of rat liver was observed with HE staining to describe the potential hepatotoxicity. **Results** The CMP with low dose (10.8 g/kg/d) had no significant inhibitory or inducing effects on liver microsome CYP450 while some adaptive changes occurred in the rat liver (e.g. cellular swelling and dilation of hepatic sinusoid). The high dose one (86.4 g/kg/d) had a significant inducing effect on CYP3A4 but no effect on CYP1A2 or CYP2E1 while some irreversibly damages happened in the liver

收稿日期: 2015-01-09

基金项目: 上海市科委重点实验室课题 (13DZ2272500)

作者简介: 沈晶晶 (1990—), 男, 硕士研究生在读, 研究方向为海洋生物资源利用。Tel: (021)81871266 E-mail: clancyshen@hotmail.com

*通信作者 范国荣, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为现代中药质量评价与代谢分析研究。Tel: (021)81871260 E-mail: guofan@163.com

(e.g. fatty change and point necrosis). **Conclusion** As for clinic applying, the drug-drug interactions as well as hepatic injury might occur when the CMP of *S. fusiforme*-*L. japonica* taken in high dose administration.

Key words: Chinese medicine pair of *Sargassum fusiforme*-*Laminaria japonica*; liver microsome; CYP450; inhibitory/inducing effects; hepatotoxicity

海藻和昆布是中医古籍中常用的药对组合,海藻为马尾藻科植物海蒿子 *Sargassum pallidum* (Turn.) 或羊栖菜 *Sargassum fusiforme* (Harv.), 昆布为海带科植物海带 *Laminaria japonica* (Aresch.) 或翅掌科植物昆布 *Ecklonia kurome* (Okam.)^[1]。两药配伍主要用于癭瘤、瘰癧、痰饮水肿等治疗,一般认为其水溶性的多糖组分发挥药效作用^[2-4]。

从海带、羊栖菜等海藻中提取分离的多糖成分能提高机体免疫力,产生抗肿瘤、抗病毒和降血糖等多种生物学活性^[5-6]。但是,有关这些藻类多糖在较高给药剂量下对肝微粒体药物代谢酶的影响及肝毒性研究鲜有报道。

本研究以海藻-昆布药对的主体成分粗多糖为试验对象,建立大鼠肝微粒体孵育体系,通过测定非那西丁(CYP1A2)、氯唑沙宗(CYP2E1)及咪达唑仑(CYP3A4)等3种CYP450同工酶的特异性探针药物的代谢和降解状况来推测其对肝药酶的诱导或抑制作用,并以肝病理切片的检查结果对肝毒性进行表征,为临床合理用药提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

Dionex U3000 高效液相色谱系统(美国 Dionex 公司),配备 DAD 检测器,自动进样器及 Chromeleon 7.0 色谱工作站;XS205Du 十万分之一电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);DK-S22 电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);OUAN CR3i 台式高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher 公司)。KD-BM 生物组织包埋机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);JJ-12J 脱水机(武汉俊杰电子有限公司);JB-L5 冻台(武汉俊杰电子有限公司);RM2016 生

物组织切片机(上海徕卡仪器有限公司);KD-P 摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);DGX-9003B 烘箱(上海福玛实验设备有限公司)

1.2 药材

海藻、昆布中药饮片,产地福建,批号 131001,执行标准:《中国药典》2010 版。

1.3 试剂

CYP1A2、CYP2E1、CYP3A) 及代谢产物对乙酰氨基酚、1-羟基咪达唑仑以及 6-羟基氯唑沙宗由中国科学院上海药物研究所药物代谢研究中心及瑞德肝脏疾病研究(上海)有限公司提供;内标原儿茶酸、利眠宁(质量分数 99.0%)由上海市药物(中药)代谢产物研究重点实验室提供;NADPH、BCA 蛋白浓度测定试剂盒由大连美仑生物技术有限公司提供;甲醇、甲酸(色谱纯,美国 Prompter 公司),其他试剂为国产分析纯化学试剂。

1.4 动物

SD 大鼠,清洁级,雌雄各半,体质量 180~200 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号 2007000565992。

2 方法

2.1 海藻-昆布有效成分提取

称取海藻和昆布中药饮片适量,按古方药对方 1:1 比例^[7]粉碎混匀,加去离子水浸泡过夜,之后于 80~90 °C 水浴回流提取 2 次,1 h/次。提取液经合并后减压浓缩至原体积 1/10,离心取上清,缓慢加入 5 倍体积 95%乙醇静置过夜,抽滤沉淀,于 60 °C 鼓风干燥得海藻-昆布药对粗多糖提取物^[8-9]。其主要组分为多糖,同时含有一定量的粗蛋白和水溶性色素,具体的质量标准见表 1。

表 1 海藻-昆布药对粗多糖的质量标准

Table 1 Quality standard of crude polysaccharides extracted from *S. fusiforme*-*L. japonica*

指标	标准	理化反应	结果	说明
外观	浅褐色疏松状	蒽酮硫酸反应	阳性	有糖类化合物存在
水溶性	≥0.3 g/mL	费林试剂反应	阴性	无还原糖
总糖含量	17%~21% (以葡萄糖标定)	碘-碘化钾反应	阴性	无淀粉
粗蛋白含量	12%~15% (BCA 试剂盒法 ^[12])	硫酸呋唑反应	阳性	有糖醛酸存在酸性多糖
水分含量	9%~12% (卡尔费休法 ^[1])	双缩脲反应	阳性	有蛋白质存在

2.2 动物分组与给药

选取清洁级 SD 大鼠 18 只,雌雄兼顾,适应饲养环境 1 周后,随机分为 3 组,即海藻-昆布药对粗多糖低、高剂量组和对照组。低、高剂量组分别 ig 给药 10.8、86.4 g/(kg·d)的粗多糖提取物,连续给药 15 d,对照组 ig 给予相同剂量的生理盐水。

2.3 肝微粒体及肝切片制备^[10-11]

大鼠末次给药禁食不禁水 24 h 后麻醉处死,剪开腹腔,用冰镇的生理盐水从门静脉冲洗肝脏,滤纸吸干,称质量,切取小片肝叶固定于 4%多聚甲醛,另取 1 g 肝碎块,用 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4) 制成 20%的匀浆,于 4 °C、12 500 ×g 离心 15 min,取上清,加 CaCl₂ 至 8 mmol/L 钙离子浓度,混匀,冰浴 5 min,于 4 °C、24 000 ×g 离心 25 min,弃上清,得粉色肝微粒体沉淀,用 Tris-HCl 缓冲液重悬后冻存于 -80 °C。用 BCA 试剂盒测定肝微粒体蛋白浓度^[12]。固定 24 h 后的肝小叶经石蜡包埋切片,二甲苯、梯度酒精脱蜡,HE 染色后透明、中性树胶封片。

2.4 肝微粒体孵育与处理

参照文献^[13-14]方法,建立孵化体系,在 200 μL 的孵化体系中分别含 NADPH 1.0 mmol/L, MgCl₂ 10.0 mmol/L, KCl 10.0 mmol/L, 肝微粒体蛋白 0.5 mg/mL, 非那西丁 10.0 μg/mL (氯唑沙宗 5 μg/mL, 咪达唑仑 5 μg/mL), 反应体系中有有机溶剂的含量保持在 1%以内。

反应体系在 37 °C 恒温水浴中预孵化 5 min 后加入 NADPH 启动反应,温孵 30 min 后,以 200 μL 冷甲醇终止反应,之后准确加入内标溶液 20 μL 和醋酸乙酯 1.6 mL 进行液液萃取^[15],萃取液于 30 °C 水浴下氮气流挥干,用 200 μL 流动相复溶,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 100 μL 置于进样瓶中,自动进样 20 μL 进行 LC-UV 分析,内标法定量检测。

2.5 色谱条件^[16]

色谱柱为 Diamonsil TMC₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); CYP1A2 代谢样品色谱条件:流动相为甲醇 (0.1%甲酸) (A) -水 (0.1%甲酸) (C), 梯度洗脱 (0~5 min: 18% A, 5~10 min: 18%~60% A, 10~15 min: 60% A); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长为 247 nm, 柱温 30 °C; CYP2E1 代谢样品色谱条件:流动相为甲醇 (A) -水 (B), 梯度洗脱 (0~10 min: 37%~75% A), 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长为 287 nm, 柱温 25 °C; CYP3A4

代谢样品色谱条件:流动相为甲醇 (A) -水 (0.02% 甲酸) (B) 梯度洗脱 (0~11 min: 40%~60% A), 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长为 223 nm, 柱温 30 °C。在该条件下,各探针药物、内标及其代谢产物间的分离度 > 1.5, 生物样品内源性物质及其他物质均不干扰样品峰和内标峰。

2.6 统计学分析

统计数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,根据测得的反应液中代谢产物的浓度及原型药物的降解结果,计算 CYP1A2、CYP3A4 和 CYP2E1 三种代谢酶亚型对特异性探针药物的代谢反应率,即 CYP1A2、CYP3A4 和 CYP2E1 的活性。用 SPSS 19.0 软件进行独立样本 *t* 检验统计学分析。

3 结果

3.1 对肝脏指标的影响

按照试验设计,海藻-昆布药对粗多糖连续 ig 给药 SD 大鼠 15 d 后,脱颈椎处死,肝脏系数 (g/100 g) 和肝微粒体蛋白含量 (mg/g) 见表 2。统计分析表明,海藻-昆布药对粗多糖连续给药 15 d 后其肝脏系数和肝微粒体蛋白水平与对照组相比均无显著差异。

表 2 肝脏系数及肝微粒体蛋白量比较 (*n* = 6)

Table 2 Comparison on liver coefficient and liver microsome protein content (*n* = 6)

组别	肝脏系数/%	肝微粒体蛋白/(mg·g ⁻¹)
低剂量	5.17 ± 0.70	5.50 ± 1.78
高剂量	5.34 ± 0.61	5.46 ± 1.07
对照	5.09 ± 0.51	5.38 ± 1.40

3.2 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 酶活性测定结果与评价

按“2.4”的样品预处理步骤进行色谱分析,以探针药物峰面积/内标的峰面积 (A_{AS}/A_{IS} , *Y*) 和代谢产物峰面积/内标的峰面积 (A_{AS}/A_{IS} , *Y*) 分别对各自相应的浓度 (*C*, μg/mL) 进行加 (1/*X*) 线性回归,所得 3 组探针底物与产物的随行标准曲线方程如下: CYP1A2 标准曲线方程 $Y = 6.1058X - 1.4666$, $R^2 = 0.99968$, 线性范围 2.061~103.050 μg/mL; 对乙酰氨基酚标准曲线方程 $Y = 5.2706X - 0.3481$, $R^2 = 0.99925$, 线性范围 0.203~10.150 μg/mL; CYP2E1 标准曲线方程 $Y = 82.1575X + 1.5783$, $R^2 = 0.99899$, 线性范围 0.2034~10.170 μg/mL; 6-羟基氯唑沙宗标准曲线方程 $Y = 52.0299X +$

4.839 2, $R^2=0.999\ 14$, 线性范围 0.102 2~5.11 $\mu\text{g/mL}$; CYP3A4 标准曲线方程 $Y=19.739\ 5X-2.004\ 4$, $R^2=0.999\ 28$, 线性范围 0.202 8~10.140 $\mu\text{g/mL}$; 1-羟基咪唑达唑仑标准曲线方程 $Y=27.920\ 1X-1.502\ 1$, $R^2=0.999\ 89$, 线性范围 0.102 5~5.125 $\mu\text{g/mL}$ 。通过以上实时活性测定样品分析批的相应随行标准曲线方程计算得各代谢酶亚型的活性数据, 其结果见表3。

在低剂量经口给药条件下, 肝微粒体代谢酶

亚型 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 各探针药物降解剩余量和生成的代谢产物量与对照组相比差异无统计学意义; 在高剂量经口给药条件下, 肝微粒体代谢酶亚型 CYP1A2 和 CYP2E1 各探针药物降解剩余量和生成的代谢产物量与对照组相比无显著差异, 但 CYP3A4 探针药物降解剩余量和生成的代谢产物量与对照组相比差异有极显著 ($P<0.01$), 提示高剂量下大鼠肝微粒体代谢酶 3A4 亚型被显著诱导。

表3 SD大鼠肝微粒体各代谢酶亚型活性($n=6$)

Table 3 Subtype activity of hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes in SD rats ($n=6$)

组别	CYP1A2($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	对乙酰氨基酚($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	CYP2E1($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	6-羟基氯唑沙宗($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	CYP3A4($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	1-羟基咪唑达唑仑($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
低剂量	8.365 4 $\pm$ 0.154 0	0.436 6 $\pm$ 0.038 4	3.608 8 $\pm$ 0.242 5	1.001 8 $\pm$ 0.172 2	3.328 4 $\pm$ 0.192 8	0.630 1 $\pm$ 0.083 7
高剂量	8.381 6 $\pm$ 0.091 6	0.438 5 $\pm$ 0.029 3	3.656 9 $\pm$ 0.173 8	1.001 7 $\pm$ 0.177 5	2.689 4 $\pm$ 0.141 9**	1.020 6 $\pm$ 0.048 4**
对照	8.376 6 $\pm$ 0.128 0	0.449 9 $\pm$ 0.028 4	3.676 7 $\pm$ 0.288 4	0.953 2 $\pm$ 0.129 2	3.436 4 $\pm$ 0.070 6	0.583 0 $\pm$ 0.066 6

与对照组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group

3.3 肝脏病理学检查

对照组解剖观察可见肝脏色泽红润、质地柔软、形态大小正常。光镜下肝细胞无肿胀、萎缩或坏死, 中央静脉及肝窦未见扩张, 门管区胆管无增生, 间质无炎细胞浸润。低剂量组解剖观察可见肝脏颜色、质地及形态与对照组无异。光镜下可见肝细胞轻度水肿, 肝窦有所扩张, 中央静脉及门管区正常。高剂量组解剖观察可见肝脏颜色暗红, 形态大小和质地正常。光镜下可见肝细胞水肿呈气球样变并伴随脂肪变, 部分肝小叶静脉瘀血并有含铁血黄素沉着, 部分门管区有炎细胞浸润, 有两例出现了点状坏死和凋亡增多, 具体见图1。

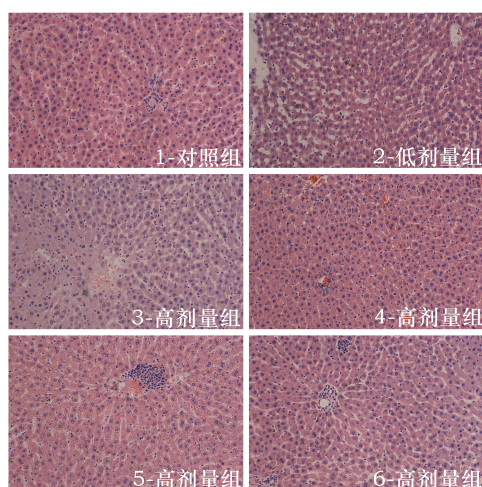


图1 肝组织切片病变图(HE染色)

Fig. 1 Lesions diagram of liver sections (HE staining)

4 讨论

4.1 海藻-昆布对肝脏药物代谢酶的影响

肝脏是药物新陈代谢和解毒的主要场所, 其富含催化药物 I 相代谢的 CYP450 酶, 90%以上的代谢性相互作用都是由 CYP450 酶活性改变引起的, 其中代表性的同工酶有 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4^[18]。通过考察这 3 种代表性同工酶在药物作用下诱导/抑制效果, 能有效预测其潜在的药物-药物相互作用影响。

石杰、于玮洁等^[19-20]分别在海洋硫酸多糖药物 SPMG-911、AOSC-971 和 916 对大鼠 CYP450 的影响的离体实验中发现: 以褐藻多糖为基础经化学修饰而得的 SPMG-911 对雄性大鼠 CYP1A2 具有明显的抑制作用 ($P<0.05$), 但对 CYP2E1 和 CYP3A4 无显著影响; 以昆布多糖为基础经化学修饰而得的 AOSC-971 对雄性大鼠的 CYP2E1 具有显著的诱导作用 ($P<0.05$), 但对 CYP1A2 和 CYP3A4 无显著影响; 以甲壳素为基础经分子修饰而得的 916 对 CYP450 各主要亚型酶无显著的诱导或抑制作用, 也无显著地性别差异。由此可见不同结构特征和相对分子质量的海洋硫酸多糖在对肝微粒体代谢酶亚型的诱导/抑制方面差异较大, 其具体的作用机制还有待深入发掘。

本研究选择中医古方(《证治准绳·疡医》、《宣明论方》及《校注妇人良方》等)中海藻-昆布药的配比和最大处方剂量为低剂量, 其 8 倍剂量为

高剂量(分别约合《中国药典》2010年版推荐剂量的7倍和56倍),按体表面积换算法^[21]折算,则低剂量的大鼠等效剂量为10.8 g/(kg·d),高剂量的大鼠等效剂量为86.4 g/(kg·d)。该给药方案接近于临床实际应用,能更好地反应海藻-昆布药对在最大处方剂量及超处方剂量下对机体肝脏CYP450药物代谢酶系的影响。

研究结果显示,以古方药对1:1配伍的海藻-昆布药对粗多糖在低剂量给药条件下对CYP450各主要亚型酶无显著的诱导或抑制作用,而在高剂量给药条件下,CYP3A4被显著的诱导,CYP1A2和CYP2E1无显著差异。进而推测:海藻-昆布药对粗多糖可能是CYP3A4的潜在诱导剂,在高剂量经口给药下可能会引起有临床意义的CYP3A4亚型酶的诱导现象的发生并阻碍经由该亚型酶特异性代谢的药物的治疗效果。由于CYP3A4亚型酶参与介导了50%~60%临床常用治疗药物的代谢^[22],这就意味着在与海藻和昆布联合用药时(特别是高剂量下)需密切关注其潜在的药物相互作用影响。

4.2 海藻-昆布的肝毒性

与对照组相比,低剂量和高剂量组大鼠的肝脏在颜色、质地及形态外观上无明显变化,其肝脏系数与对照组相比无统计学差异,说明大鼠肝脏没有表现出明显的充血、肿胀或大片坏死现象,进而可以推测海藻-昆布药对粗多糖对肝组织宏观上的毒性表现并不明显。

病理切片的显微观察表明低剂量和高剂量组大鼠的肝脏均发生了形态学上的改变,低剂量组以肝窦扩张和轻度水肿为主的适应性改变。高剂量组以中度水肿和脂肪样变为主(如图1中②号所示)的可逆性损伤病变,这可能与药物引起细胞液体和离子内稳态变化的损伤以及改变肝细胞质内脂肪酸含量的分布有关。其中,两例大鼠肝细胞的点状坏死和细胞凋亡增多(如图1中⑤号所示)可能与药物引起的线粒体功能失调有关^[23]。关于海洋藻类多糖是否具有潜在肝毒性的问题目前仍不清楚,但从本研究结果中可知,其对肝组织的确造成了一定的细胞形态学上的改变,但这些改变可能是肝脏受大剂量药物影响下的适应性变化,肝脏一般能经得起中等程度的片状坏死,在去除病因的若干天后坏死细胞可以被清除,代之以再生细胞,重建正常的结构和功能,其大部分损伤可以逆转^[24],由于镜下观察结果中未见大片的坏死或凋亡现象发生,可以推测

在停药后的预后表现良好。

综上所述,海藻-昆布药对在常规临床剂量下使用有着较高的安全性,其对肝脏CYP450药物代谢酶的影响及肝细胞毒性损伤甚微,但在高剂量特别是超限情况下的使用需对其药物-药物相互作用影响和潜在肝毒性予以高度重视。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2010.
- [2] 南京中医药大学.中药大辞典[M].上海:上海科学技术出版社,2006.
- [3] Kalimuthu S. *Advances in Food and Nutrition Research* [M]. Elsevier, 2014.
- [4] Alekseyenko T V, Zhanayeva S Y, Venediktova A A, *et al.* Antitumor and antimetastatic activity of fucoidan, a sulfated polysaccharide isolated from the Okhotsk Sea *Fucus evanescens* brown alga [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2007, 143(6): 730-732.
- [5] 徐旭,于冰,汤立达.海洋生物多糖的药用功能[J].天津药学,2004,16(6): 51-53.
- [6] Guerra Dore C M, Faustino Alves M G, Santos N D, *et al.* Antiangiogenic activity and direct antitumor effect from a sulfated polysaccharide isolated from seaweed [J]. *Microvasc Res*, 2013, 88: 12-18.
- [7] 王肯堂.证治准绳[M].北京:人民卫生出版社,2014.
- [8] 张喆迩,刘雪莲,许剑锋,等.羊栖菜硫酸多糖的提取工艺与最佳提取条件[J].食品工业科技,2008,29(11): 192-194.
- [9] 曹刚.海带多糖的分离纯化、结构鉴定及生物活性研究[D].长春:东北师范大学,2010.
- [10] 刘艳,王海霞,黄丽军,等.大鼠肝微粒体法测定3种中药对CYP3A4亚型的作用[J].医药导报,2011,30(3): 285-289.
- [11] 梁运霞.动物源食品毒理学基础及检验[M].北京:中国农业出版社,2008.
- [12] 李海玲,彭书明,李凇,等.4种常用蛋白浓度测定方法的比较[J].中国生化药物杂志,2008,29(4): 277-282.
- [13] Lin W, Zhang J, Ling X, *et al.* Evaluation of the effect of TM208 on the activity of five cytochrome P450 enzymes using on-line solid-phase extraction HPLC-DAD: A cocktail approach [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013, (923-924): 29-36.
- [14] 曾超,刘艳,刘高峰,等.刺五加注射液对大鼠肝微粒体四种CYP450亚型酶活性的影响[J].中国临床药理学与治疗学,2012,17(2): 164-170.
- [15] 李昂,褚扬,闫希军,等.养血清脑颗粒对大鼠肝CYP1A2活性的影响[J].中国药房,2010,21(43):

- 4038-4040.
- [16] 礼 嵩, 唐原君, 范国荣, 等. 注射用盐酸头孢他美对大鼠肝微粒体 CYP1A2、CYP3A4 和 CYP2E1 活性的影响 [J]. 第二军医大学学报, 2013, 34(11): 1231-1236.
- [17] 刘静波. 食品科学与工程专业实验指导 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010, 9: 24.
- [18] Sandosh P. *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine* [M]. Academic Press, 2014.
- [19] 石 杰. 海洋药物 911、971 对 CYP450 不同亚型代谢酶的影响及其性别差异的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2005.
- [20] 于玮洁. 海洋硫酸多糖 916 对大鼠 CYP450 不同亚型代谢酶的影响及性别差异的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
- [21] 杨 斐, 胡 纓. 实验动物学基础与技术 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 2010.
- [22] Luo G, Guenther T, Gan L S, *et al.* CYP3A4 induction by xenobiotics: biochemistry, experimental methods and impact on drug discovery and development [J]. *Curr Drug Metab*, 2004, (5): 483-505.
- [23] 孟凡翠, 徐为人, 汤立达, 等. 药物重要脏器毒性及其早期预测方法的探讨 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(1): 8-14.
- [24] Yang J, Okabe H, Monga S P. *Liver Development, Regeneration, and Stem Cells. Pathobiology of Human Disease* [M]. Academic Press, 2014.