

## 基于药物代谢酶CYP3A4的乌头碱配伍人参皂苷、甘草苷的减毒机制研究

李 晗, 张广平, 杨依霏, 张海静, 马 梦, 陈腾飞, 叶祖光\*

中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700

**摘要:** 目的 考察乌头碱配伍人参皂苷Rb<sub>1</sub>、甘草苷后对HepG2药物代谢酶(Cytochrome P450, CYP450)中3A4亚型的报告基因荧光活性、mRNA转录及蛋白翻译水平的影响。方法 将pGLuc-CYP3A4报告基因质粒与pcDNA3.1-hPXR表达质粒共转染HepG2细胞, 检测乌头类生物碱、人参皂苷和甘草的单体成分对CYP3A4的激活效应; 并利用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)及Western blotting技术检测人参皂苷Rb<sub>1</sub>、甘草苷与乌头碱对CYP3A4 mRNA及蛋白水平的影响。结果 报告基因模型检测结果显示, 与对照组比较, 乌头碱、新乌头碱、次乌头碱和乙酰乌头碱能下调CYP3A4报告基因荧光强度( $P < 0.05$ ), 其中乌头碱下调能力最强, 人参皂苷Rb<sub>1</sub>、Rc、Re、Rg<sub>1</sub>以及甘草苷、异甘草苷、甘草素和甘草酸均能上调报告基因的荧光强度( $P < 0.05, 0.01$ ), 其中人参皂苷Rb<sub>1</sub>和甘草苷上调能力最明显; 同时乌头碱能下调CYP3A4 mRNA与蛋白表达水平( $P < 0.05, 0.01$ ), 人参皂苷Rb<sub>1</sub>和甘草苷能逆转乌头碱下调CYP3A4的能力( $P < 0.05, 0.01$ )。结论 人参皂苷Rb<sub>1</sub>、甘草苷与乌头碱配伍后可上调CYP3A4的表达, 减少乌头碱在体内蓄积时间, 起到减毒的作用。

**关键词:** 乌头碱; 人参皂苷; 甘草苷; CYP3A4; 配伍

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2020)02-0199-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.02.005

## Study on toxicity reduction mechanism of aconitine combined with ginsenoside and liquiritin based on drug metabolic enzyme CYP3A4

LI Han, ZHANG Guangping, YANG Yifei, ZHANG Haijing, MA Meng, CHEN Tengfei, YE Zuguang

Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects of aconitine combined with ginsenoside Rb<sub>1</sub> and liquiritin on the fluorescence activity, transcription level and protein translation level of 3A4 subtype of hepatocyte cytochrome P450 (CYP450) in HepG2. **Methods** The pGLuc-CYP3A4 reporter gene plasmid and pcDNA3.1-hPXR expression plasmid were co-transfected into HepG2 cells to detect the activation effect of aconitines, ginsenoside and components of Glycyrrhiza uralensis on CYP3A4. The expression of ginsenoside Rb<sub>1</sub>, liquiritin and aconitine was detected by qRT-PCR and Western blotting. **Results** The results of reporter gene model test showed that aconitine, mesaconitine, hypaconitine and aconitine 3-acetate could down-regulate the fluorescence activity of CYP3A4 reporter gene ( $P < 0.05$ ). Aconitine had the strongest down-regulation ability. Ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Rc, Re, Rg<sub>1</sub> and liquiritin, iso liquiritin, liquiritigenin and glycyrrhiza acid could up-regulate the fluorescence activity of reporter gene ( $P < 0.05$  and  $0.01$ ), among which ginsenoside Rb<sub>1</sub> and liquiritin were more up-regulation. At the same time, aconitine can down-regulate the expression of CYP3A4 and ginsenoside Rb<sub>1</sub> and liquiritin can reverse the ability of aconitine to down-regulate CYP3A4 ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ). **Conclusion** Ginsenoside Rb<sub>1</sub>, liquiritin and aconitine can up-regulate the expression of CYP3A4, reduce the accumulation time of aconitine *in vivo* and play a role in reducing toxicity.

**Key words:** aconitine; ginsenoside; liquiritin; CYP3A4; compatibility

毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 为一类重要的有毒植物, 广泛分布于北半球的山区或较冷地区。附子为其子根的加工品, 因其回阳救

逆之功备受名家青睐<sup>[1]</sup>, 作为毒与效并存的药物, 附子既可以产生治疗作用, 也可导致毒性的发生<sup>[2]</sup>。附子主要成分为双酯型生物碱, 主要包括乌头碱、

收稿日期: 2019-07-02

基金项目: 国家重点研发计划资助(2018YFC1708204)

第一作者: 李 晗, 女, 助理研究员, 主要从事中药药理研究。E-mail: wzf38@126.com

\*通信作者: 叶祖光, 男, 研究员, 主要从事中药药理研究。E-mail: yezuguang@sina.com

新乌头碱、次乌头碱和乙酰乌头碱等,这些成分被认为既是其发挥药理作用的物质基础,同时也是产生毒性的主要成分<sup>[3]</sup>。人参为五加科草本植物人参 *Panax ginseng* C.A. Meyer 的根,具有大补元气、益气固脱、安神益智、生津养血的功效<sup>[4]</sup>。人参中人参皂苷的含量约为4%,是人参药效成分之一<sup>[5]</sup>。根据皂苷元结构的不同,人参皂苷被分为原人参二醇类皂苷,如人参皂苷  $Rb_1$ 、 $Rc$  等;原人参三醇类皂苷,如人参皂苷  $Rf$ 、 $Rg_1$ , 以及齐墩果酸类皂苷,人参中的二醇型与三醇型皂苷数量较多,因此被认为是人参的最重要药效成分。甘草系豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *G. inflate* Bat. 或光果甘草 *G. glabra* L. 的根及根茎除去杂质、洗净、润透并干燥的炮制品,具有清热解毒、补脾益气、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药的功效<sup>[6]</sup>,其主要活性成分为三萜皂苷类如甘草酸和黄酮类如甘草苷、异甘草苷以及甘草素等。临床用药过程中,人参、甘草常与附子配伍以达到减毒增效的目的<sup>[7-8]</sup>,而该药对的配伍机制研究也成为讨论热点,现阶段研究多集中于配伍后物质基础的改变、与胃肠吸收动力的变化等<sup>[9-11]</sup>,但从肝脏药物代谢酶角度考虑配伍后产生减毒增效的机制研究较少。本课题组前期从整体动物水平上进行了附子配伍人参、甘草对细胞色素 P450(CYP)酶的调控作用研究。研究发现人参、甘草与附子配伍后可上调 CYP3A,起到减毒作用。但是对 CYP3A4 的诱导作用是否由药材中的有效单体成分调控部分内容有待进一步探索。

## 1 材料

### 1.1 药物与主要试剂

乌头碱(批号 110720-200410,规格 20 mg)、新乌头碱(批号 110799-201106,规格 20 mg)、次乌头碱(批号 110798-201308,规格 20 mg)和乙酰乌头碱(批号 111796-201303,规格 20 mg),均购于中国食品药品检定研究院;人参皂苷  $Rb_1$  (批号 HG027159198,规格 20 mg)、人参皂苷  $Rc$  (批号 HG027168198,规格 20 mg)、人参皂苷  $Re$  (批号 HG027169198,规格 20 mg)和人参皂苷  $Rg_1$  (批号 110703-201529,规格 20 mg),均购自宝鸡市辰光生物科技有限公司;甘草苷(批号 L468830,规格 10 mg)、异甘草苷(批号 I820850,规格 5 mg)、甘草酸(批号 599400,规格 10 mg)、甘草素(批号 ASB-00012290-005,规格 5 mg),购于北京百灵威科技有限公司。二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司);pcDNA3.1-hPXR 和 pGLuc-CYP3A4 质粒由本实验

室冷冻保存;高塘培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(美国 Hyclone 公司);双抗(北京索莱宝科技有限公司);胰酶(上海 Sangon Biotech 公司);MTS 细胞存活率试剂盒(美国 Promega 生物技术有限公司);RNA 提取试剂盒、反转录与 real time PCR 试剂盒(北京全式金公司);BCA 蛋白定量试剂盒与 Western blot 配胶试剂盒(北京康为世纪公司);一抗 CYP3A4 兔抗人(美国 Proteintech 公司);二抗辣根酶标记山羊抗兔 IgG 抗体(上海 Abcam 贸易有限公司);其他试剂均为国产分析纯。

## 1.2 仪器

细胞培养箱(美国 Thermo 公司);Microfuge 22R 型台式高速离心机(美国 Beckman 公司);倒置显微镜(德国 ZEISS 公司);98-1-B 电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司);RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);NANODROP ONE 核酸浓度测定仪(美国 Thermo 公司);GeneAmp PCR System 2400 型 PCR 仪(美国 Perkin Elmer 公司);VICTOR X 型多标记酶标仪(美国 Perkin Elmer 公司产品);Step one plus 型 Real time PCR 仪(美国 Applied Biosystem 公司);Western blot 电泳仪(英国 GE 公司);Western blot 转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);SCILOGEX 180-E 摇床(杭州奥盛仪器有限公司);显影照相机(美国 GE 公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

HepG2 细胞生长在含有 10% 胎牛血清,1% 非必需氨基酸,100  $\mu\text{g/mL}$  青霉素和链霉素的 DMEM 培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度的条件下贴壁培养,以 1:3 的比例传代,取对数生长期用于实验。

### 2.2 MTS 法测定细胞活性

取对数生长期的 HepG2 细胞,以  $2 \times 10^4$ /孔密度接种于 96 孔板,培养 24 h 后于光镜下观察,如细胞状态稳定、贴壁生长及增殖状态正常,则更换培养液。实验分为空白组(不接种细胞),对照组(接种细胞不加药),乌头碱组、新乌头碱组、次乌头碱组和乙酰乌头碱组(5、10、20、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$ ),人参皂苷  $Rb_1$  组、 $Rc$  组、 $Re$  组和  $Rg_1$  组(5、10、20、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$ )以及甘草苷组、异甘草苷组、甘草素组和甘草酸组(5、10、20、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$ ),培养 24 h,每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTS,在 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中避光孵育 3 h,酶标仪测定 490 nm 处的吸光度(A)值。

细胞存活率=(药物组 A 值-空白组 A 值)/(对照组 A 值-空白组 A 值)

### 2.3 质粒转染与分泌型荧光素酶报告基因的检测

按照转染试剂 TransIT-X2 说明,转染前 1 天取对数生长期 HepG2 细胞接种于 500  $\mu\text{L}$  不含抗生素培养基的 96 孔板中,每组 3 个复孔,待第 2 天细胞约 80% 融合时,用 Opti-MEM 培养液稀释质粒。每孔定量加入 500 ng pcDNA3.1-hPXR 与 250 ng pGLuc-CYP3A4,并与转染试剂 TransIT-X2 室温孵育 30 min 后加入 HepG2 细胞中。随后加入 20  $\mu\text{mol/L}$  受试药物,DMSO 为溶剂对照组,酮康唑(10  $\mu\text{mol/L}$ )和利福平(RIF,10  $\mu\text{mol/L}$ )为阳性对照组。药物处理结束后吸取 10  $\mu\text{L}$  待测细胞培养基上清至 96 孔白板孔底部;将 Gluc Dilution Buffer 60 $\times$ 室温融化后,按照每个样品 60  $\mu\text{L}$  的体系,根据样品数量加入 Gluc Dilution Buffer 60 $\times$ ,轻轻混匀后使用;放入仪器进行检测,记录发光结果。将各药物处理组荧光强度与溶剂对照组荧光强度比值为

比活性。

### 2.4 qRT-PCR 检测单体成分对 CYP3A4 mRNA 表达的影响

取 HepG2 细胞,以细胞数  $1.2 \times 10^6$ /孔接种于 6 孔板中,根据“2.3”项实验结果,选择调控 CYP3A4 能力最强的单体成分进行实验。将乌头碱(20  $\mu\text{mol/L}$ )、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>(20  $\mu\text{mol/L}$ )以及甘草苷(20  $\mu\text{mol/L}$ )与阳性药酮康唑(10  $\mu\text{mol/L}$ )和利福平(10  $\mu\text{mol/L}$ )分别处理细胞,药物处理 24、48 h 后,提取细胞总 RNA,用紫外分光光度计检测 RNA 浓度和纯度( $A_{260}/A_{280}$  的值为 1.8~2.0)。取总 RNA 1  $\mu\text{g}$ ,按照试剂盒说明书将总 RNA 逆转录成 cDNA 后进行 qRT-PCR 检测,分析采用 SYBR GREEN 法,PCR 反应条件为 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s、95  $^{\circ}\text{C}$  5 s、60  $^{\circ}\text{C}$  30 s、72  $^{\circ}\text{C}$  30 s,共 40 个循环。最终所得数据用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  公式分析。用于扩增的特异性引物序列见表 1。

表 1 实时定量 PCR 引物

Table 1 Primer sequences used for Q-PCR reactions

| 基因             | 正向引物(5'-3')             | 反向引物(5'-3')           |
|----------------|-------------------------|-----------------------|
| CYP3A4         | CCTCCCTGAAAGATTCAGCA    | GCTCTCAAGCACCTAAGAGCG |
| $\beta$ -Actin | CAAGGTCATCCATGACAACTTTG | GGGCCATCCACAGTCTTCTG  |

### 2.5 Western blotting 检测单体成分对 CYP3A4 蛋白表达的影响

取 HepG2 细胞,以细胞数  $1.2 \times 10^6$ /孔接种于 6 孔板中,将乌头碱、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、甘草苷与阳性药酮康唑(10  $\mu\text{mol/L}$ )分别处理细胞,药物处理 48 h 后,收集 6 孔板细胞,加入 100  $\mu\text{L}$  预冷的 RIPA 裂解液,置于冰上裂解 30 min 后,收集细胞,4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min,离心 10 min,提取全蛋白,采用 BCA 法进行蛋白质定量,100  $^{\circ}\text{C}$ 、10 min 变性,50  $\mu\text{g}$  蛋白经 8%SDS-PAGE 电泳分离,将蛋白转移至 NC 膜,室温下脱脂牛奶封闭 2 h,分别孵育 CYP3A4 (1:500) 与 GAPDH(1:1 000)的一抗,TBST 洗膜 3 次,孵育二抗(1:1 000),TBST 洗膜 3 次,加入 ECL 发光液进行化学发光,显影后进行图像分析,用 Image J 软件计算灰度值,以目标蛋白/GAPDH 灰度值的比值作为各组蛋白表达的相对含量。

### 2.6 数据处理

实验结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组计量资料的比较采用 GraphPad Prism 5 软件的  $t$ -test 方法进行统计学分析。

## 3 结果

### 3.1 MTS 法检测细胞活性结果

结果显示,随着给药浓度的增加,乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、乙酰乌头碱和人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rc、Re、Rg<sub>1</sub> 以及甘草苷、异甘草苷、甘草素和甘草酸对 HepG2 细胞的存活率无显著性影响,结果见表 2。

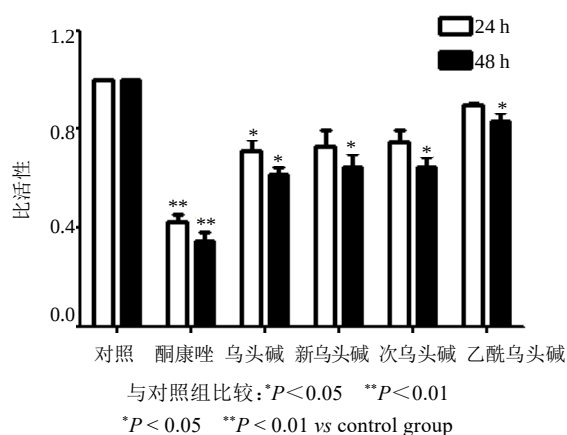
### 3.2 分泌型荧光素酶报告基因检测结果

分泌型荧光素酶报告基因检测结果显示,作用 48 h,与对照组比较,乌头碱、新乌头碱、次乌头碱和乙酰乌头碱对报告基因的影响基本一致,比活性均显著下降( $P < 0.05$ ),其中在筛选浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$ ,处理时间为 48 h 时,乌头碱抑制作用较明显,见图 1。因此选取浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$  处理时间为 48 h 的乌头碱进行后续转录水平的实验。

人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rc、Re 和 Rg<sub>1</sub> 组对报告基因激活效应趋势基本一致,在筛选浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$ ,处理时间为 24、48 h 时,与对照组比较,人参皂苷 Rc、Re 和 Rg<sub>1</sub> 均对 CYP3A4 产生了诱导效应( $P < 0.05$ 、0.01);在筛选浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$ ,处理时间为 48 h 时,人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 对 CYP3A4 的激活效应明显( $P <$

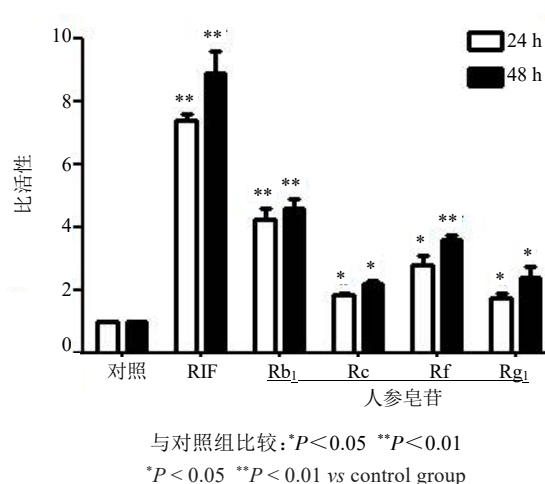
表2 单体成分对 HepG2 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Table 2 Effect of components on survival rate of HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别                   | 不同给药浓度的细胞存活率/%                        |                                        |                                        |                                        |                                         |                                         |
|----------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
|                      | 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ |
| 乌头碱                  | 99.52 $\pm$ 5.90                      | 99.15 $\pm$ 8.65                       | 105.49 $\pm$ 3.46                      | 107.48 $\pm$ 8.16                      | 104.48 $\pm$ 5.57                       | 99.08 $\pm$ 10.59                       |
| 新乌头碱                 | 103.18 $\pm$ 2.98                     | 101.19 $\pm$ 6.61                      | 104.29 $\pm$ 1.49                      | 99.84 $\pm$ 1.48                       | 98.41 $\pm$ 6.06                        | 95.85 $\pm$ 7.13                        |
| 次乌头碱                 | 104.85 $\pm$ 1.42                     | 106.43 $\pm$ 5.14                      | 100.62 $\pm$ 3.49                      | 103.19 $\pm$ 2.41                      | 99.91 $\pm$ 3.15                        | 95.96 $\pm$ 1.61                        |
| 乙酰乌头碱                | 99.82 $\pm$ 2.88                      | 99.19 $\pm$ 5.62                       | 101.65 $\pm$ 4.56                      | 101.85 $\pm$ 5.78                      | 97.12 $\pm$ 4.15                        | 97.25 $\pm$ 5.65                        |
| 人参皂苷 Rb <sub>1</sub> | 99.45 $\pm$ 2.54                      | 98.12 $\pm$ 2.14                       | 96.62 $\pm$ 1.16                       | 97.29 $\pm$ 1.62                       | 99.29 $\pm$ 2.06                        | 98.18 $\pm$ 7.88                        |
| 人参皂苷 Rc              | 101.23 $\pm$ 4.12                     | 99.03 $\pm$ 2.45                       | 102.46 $\pm$ 2.91                      | 101.35 $\pm$ 2.62                      | 97.51 $\pm$ 2.15                        | 97.61 $\pm$ 1.31                        |
| 人参皂苷 Rf              | 102.65 $\pm$ 3.12                     | 101.82 $\pm$ 1.41                      | 101.45 $\pm$ 2.12                      | 99.45 $\pm$ 1.29                       | 99.65 $\pm$ 2.41                        | 98.78 $\pm$ 1.21                        |
| 人参皂苷 Rg <sub>1</sub> | 100.24 $\pm$ 4.74                     | 100.32 $\pm$ 3.26                      | 99.61 $\pm$ 4.94                       | 107.82 $\pm$ 3.12                      | 107.49 $\pm$ 2.28                       | 103.46 $\pm$ 5.92                       |
| 甘草苷                  | 101.67 $\pm$ 0.92                     | 104.76 $\pm$ 4.32                      | 100.97 $\pm$ 2.92                      | 106.52 $\pm$ 7.83                      | 107.89 $\pm$ 6.48                       | 104.59 $\pm$ 5.17                       |
| 异甘草苷                 | 102.16 $\pm$ 5.61                     | 104.24 $\pm$ 12.17                     | 107.26 $\pm$ 3.02                      | 105.96 $\pm$ 5.72                      | 104.37 $\pm$ 10.24                      | 97.03 $\pm$ 19.06                       |
| 甘草素                  | 102.77 $\pm$ 4.46                     | 103.46 $\pm$ 5.92                      | 97.68 $\pm$ 11.54                      | 103.48 $\pm$ 14.44                     | 112.03 $\pm$ 7.98                       | 112.9 $\pm$ 2.68                        |
| 甘草酸                  | 105.38 $\pm$ 4.62                     | 101.57 $\pm$ 4.66                      | 100.28 $\pm$ 8.55                      | 105.34 $\pm$ 4.92                      | 111.55 $\pm$ 6.69                       | 106.39 $\pm$ 5.10                       |

图1 不同时间点乌头类生物碱对 CYP3A4 报告基因比活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Fig. 1 Fold induction of relative CYP3A4 luciferase activity by aconitum alkaloids ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

0.01)。因此选取浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$  处理时间为 48 h 的人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 进行后续转录水平实验, 见图 2。

与 人 参 皂 苷 诱 导 CYP3A4 的 结 果 相 似, 与 对 照 组 比 较, 甘 草 苷、异 甘 草 苷、甘 草 酸 作 用 24、48 h 和 甘 草 素 作 用 48 h 均 能 显 著 上 调 CYP3A4 报 告 基 因 的 荧 光 强 度 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 在 筛 选 浓 度 为 20  $\mu\text{mol/L}$ , 处 理 时 间 为 48 h 时, 甘 草 苷 对 CYP3A4 的 激 活 效 应 最 明 显 ( $P < 0.01$ ), 因 此 选 取 浓 度 为 20  $\mu\text{mol/L}$ , 处 理 时 间 为 48 h 的 甘 草 苷 进 行 后 续 转 录 水 平 实 验。见图 3。

图2 不同时间点人参皂苷对 CYP3A4 报告基因比活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Fig. 2 Fold induction of relative CYP3A4 luciferase activity by ginsenosides ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

### 3.3 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、甘草苷与乌头碱配伍对 HepG2 细胞 CYP3A4 mRNA 表达的影响

根据“3.2”项筛选结果, 选择调控 CYP3A4 能力最强的单体成分人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、甘草苷与乌头碱, 观察对 HepG2 细胞 CYP3A4 mRNA 表达的影响。如图 4 所示, 与对照组比较, 乌头碱 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理细胞 48 h 后, 抑制 CYP3A4 mRNA 的表达 ( $P < 0.01$ ); 同时人参皂苷 Rb<sub>1</sub> (20  $\mu\text{mol/L}$ )、甘草苷 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 分别处理细胞 48 h 后, 可诱导 CYP3A4 mRNA 的表达 ( $P < 0.01$ ); 与乌头碱组比较, 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 与甘草苷均能显著削弱乌头碱抑制 CYP3A4



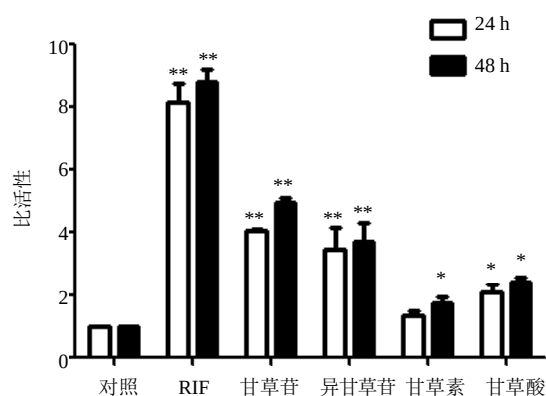


图3 不同时间点甘草有效单体成分对CYP3A4报告基因比活性的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig 3 Fold induction of relative CYP3A4 luciferase activity by components of liquiritin ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

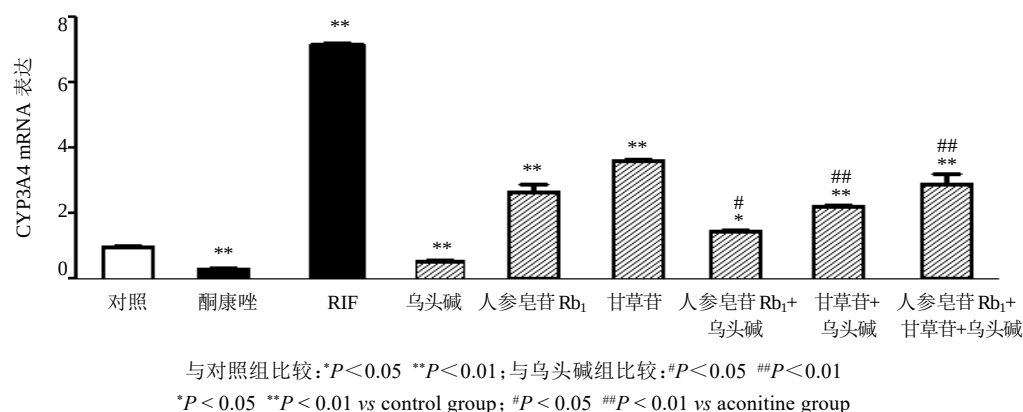


图4 qRT-PCR法检测人参皂苷Rb<sub>1</sub>、甘草苷与乌头碱配伍对HepG2细胞中CYP3A4 mRNA表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 4 Fold induction of CYP3A4 mRNA expression relative to  $\beta$ -Actin mRNA by compatibility of ginsenoside Rb<sub>1</sub>, liquiritin and aconitine in HepG2 cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

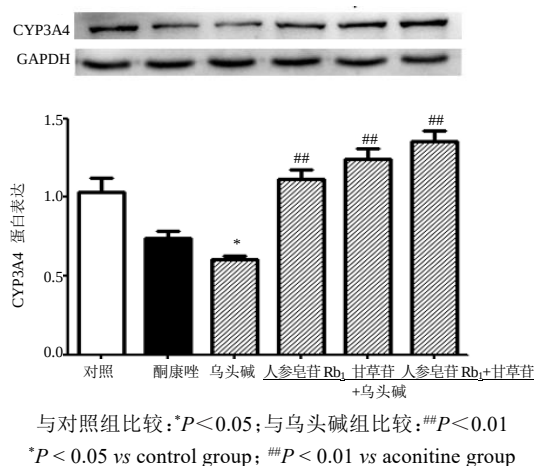


图5 人参皂苷Rb<sub>1</sub>、甘草苷与乌头碱配伍对CYP3A4蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig.5 Induction of CYP3A4 protein expression by compatibility of ginsenoside Rb<sub>1</sub>, liquiritin and aconitine ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

mRNA的作用( $P < 0.05, 0.01$ ),其中人参皂苷Rb<sub>1</sub>+甘草苷+乌头碱共处理组上调CYP3A4的mRNA的能力最强( $P < 0.01$ )。

### 3.4 人参皂苷Rb<sub>1</sub>、甘草苷与乌头碱配伍对HepG2细胞CYP3A4蛋白表达的影响

运用Western blotting检测人参皂苷Rb<sub>1</sub>、甘草苷与乌头碱配伍对HepG2 CYP3A4蛋白表达的影响。结果显示,与对照组比较,乌头碱显著抑制CYP3A4蛋白的表达( $P < 0.05$ );与乌头碱组比较,人参皂苷Rb<sub>1</sub>与甘草苷均能显著削弱乌头碱抑制CYP3A4蛋白表达的作用( $P < 0.01$ );其中人参皂苷Rb<sub>1</sub>+甘草苷+乌头碱共处理组上调CYP3A4蛋白表达能力最强。见图5。

## 4 讨论

CYP450酶是超家族基因编码的蛋白,作为体

内重要的I相代谢酶系,涉及众多内源性与外源性物质的生物转化<sup>[12]</sup>。其中CYP3A4为CYP超家族具有主导地位的氧化酶,在人肝微粒体中约占30%,占肠道CYP的比例为70%,并负责临床上近50%药物的代谢<sup>[13]</sup>,如甾体抗炎药、非甾体抗炎药、免疫抑制剂以及口服避孕药等,并且某些药物又是CYP3A4的抑制剂或诱导剂。因此当联合使用两种或两种以上的药物时,极易导致药物相互作用<sup>[14]</sup>。报道显示,由酶抑制导致的药物相互作用约占总比例的70%,而酶诱导引发的占23%,其他占7%<sup>[15]</sup>。所以在临床用药过程中,研究者对酶抑制作用的关注远远大于酶诱导作用。与此同时伴随科学技术的发展与人们对药品安全认识的日益提高,中药的安全性问题引起了社会的广泛讨论。配伍减毒法是中药减毒的经典方法,研究发现,配伍药对中的

某味药调控 CYP450 酶,与此同时受到调控的 CYP450 酶可以反作用于配伍组合中其他组分,因此配伍组合参与 CYP450 酶有关中药间相互作用的机会可能更多<sup>[16]</sup>。

附子作为回阳救逆第一要药,在中医临床急危重症的救治中具有非常重要的地位。作为“毒”与“效”并存的附子,其主要有效成分为乌头类生物碱,研究发现,在啮齿类动物与人体内,生物碱主要通过水解、脱甲基、脱氢和羟化等途径代谢,并且这些代谢途径绝大部分由 CYP3A 介导<sup>[17]</sup>。本课题组前期发现,人参、甘草与附子配伍后可上调大鼠 CYP3A1 mRNA 与蛋白的表达,减少附子代表成分乌头碱在体内的蓄积时间,起到减毒的作用<sup>[18]</sup>。但药材中哪种单体成分发挥作用不得而知。

本实验分别选取附子、人参和甘草的代表有效单体成分,首先通过其对 CYP3A4 报告基因活性进行筛选,然后观察基因转录水平和蛋白翻译水平变化来研究基于药物代谢酶水平的有效单体成分配伍减毒作用机制。当前研究药物调控 CYP450 诱导或抑制的筛选方法主要为体外筛选,包括基于溶液的生物物理化学分析的亲和闪烁法、基于计算机辅助的 QSAR 法和基于核受体转录激活的荧光素酶报告基因法等<sup>[19-21]</sup>,其中报告基因法因基于生理状态而最为常用。因此,本实验选择了实验室前期构建的报告基因质粒,转染 HepG2 细胞后进行有效单体成分诱导或抑制 CYP3A4 的活性筛选<sup>[22]</sup>。分泌型荧光素酶报告基因检测实验结果显示,乌头碱、新乌头碱和乙酰乌头碱均显示出抑制 CYP3A4 荧光素酶活性,其中乌头碱抑制作用最强。同时,人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、Rc、Re 和 Rg<sub>1</sub> 对报告基因激活效应趋势基本一致,均对 CYP3A4 产生了诱导效应,其中人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 诱导能力最佳。与人参皂苷结果相似,甘草苷对 CYP3A4 的激活效应明显。选择分泌型荧光素酶报告基因法检测受试物对 CYP3A4 调控作用具有快速、简便等特点,是筛选 CYP3A4 诱导物的首选方法。但由于报告基因检测技术是基于转录水平的筛选方法,该方法具有一定的局限性<sup>[23]</sup>。要全面阐述酶的抑制或诱导机制,还需在基因与蛋白水平进行进一步验证。与原代肝细胞比较,HepG2 细胞 CYP450 的表达量虽然较低,但仍保留了部分正常肝细胞的功能<sup>[24]</sup>,其主要表达的 CYP450s 有 CYP1A1/2、CYP2B6、CYP2C19、CYP3A4 和 CYP2E1 等<sup>[25-26]</sup>。所以实验选用 HepG2 细胞作为药物对 CYP450 调控检测的细胞模型<sup>[27]</sup>。mRNA 转录

水平实验结果显示,与对照组比较,乌头碱能抑制 CYP3A4 mRNA 的表达,同时人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 与甘草苷均能诱导 CYP3A4 mRNA 的表达;当人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、甘草苷与乌头碱配伍后,人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 与甘草苷均能削弱乌头碱产生抑制 CYP3A4 的 mRNA 作用,其中 Rb<sub>1</sub>+甘草苷+乌头碱共处理组上调 CYP3A4 的 mRNA 的能力最强。蛋白翻译水平的实验结果与 mRNA 转录水平实验结果相似,推测人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、甘草苷与乌头碱配伍对 CYP3A4 酶的调控作用始于 mRNA 转录水平。结合报告基因检测结果、qRT-PCR 与 Western blotting 结果,推测附子配伍人参、甘草的减毒作用机制主要是人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 与甘草苷上调 CYP3A4 相关基因转录及蛋白翻译水平,使乌头碱在体内代谢加快,减少蓄积毒性。

本研究基于 CYP450 酶角度来阐释乌头碱配伍人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、甘草苷减毒的作用机制。从而为附子配伍合理应用和临床药理研究提供了基础,同时为揭示传统中药配伍理论科学内涵提供数据依据,并提高中药复方临床使用的有效性和安全性。

#### 参考文献

- [1] 唐梅,赵立春,徐敏,等. 附子化学成分和药理作用研究进展 [J]. 广西植物, 2017, 37(12): 1614-1627.
- [2] 谢晓芳,彭成. 附子心脏毒效的多维评价和整合分析研究进展 [J]. 世界中医药, 2017, 12(11): 24-31.
- [3] Singhuber J, Zhu M, Prinz S, et al. Aconitum in Traditional Chinese Medicine-A valuable drug or an unpredictable risk [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 126(1): 18-30.
- [4] 李晗,王宇光,马增春,等. 人参皂苷 Rc、Re、Rf 和 Rg<sub>1</sub> 对药物代谢酶 CYP1A1 活性诱导作用研究 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(9): 1217-1223.
- [5] Liang Y, Zhao S. Progress in understanding of ginsenoside biosynthesis [J]. Plant Bol, 2008, 10: 415-421.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [7] 林彦君,游宇,季宁平,等. HPLC-Q-TOF/MS 指纹技术对比分析附子配伍炙甘草前后化学组分变化 [J]. 中草药, 2014, 45(11): 1556-1560.
- [8] 汤响林,易剑峰,梁乾德,等. 人参-附子配伍比例对人参皂苷成分溶出影响研究 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 36-41.
- [9] 沈红,朱玲英,姚楠,等. 甘草与附子配伍对乌头碱、新乌头碱、次乌头碱大鼠药动学的影响 [J]. 中药材, 2011, 34(6): 937-942.
- [10] 杨明,刘小彬,黄庆德. 附子甘草配伍减毒增效机理探析 [J]. 时珍国医国药, 2003, 14(4): 197-198.

- [11] 刘巧云, 张宇燕, 万海同, 等. 次乌头碱与甘草苷、甘草次酸配伍的减毒作用 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(9): 2601-2604.
- [12] Zanger U M, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation [J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 138(1): 103.
- [13] Pelkonen O, Maenpää J, Taavitsainen P, et al. Inhibition and induction of human cytochrome CYP (CYP) enzymes [J]. *Xenobiotica*, 1998, 28(12): 1203-1254.
- [14] Shou M, Lu T, Krausz K W, et al. Use of inhibitory monoclonal antibodies to assess the contribution of cytochromes P450 to human drug metabolism [J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, 394(2): 199-209.
- [15] 周宏灏. 遗传药理学 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 88-90.
- [16] 韩永龙, 李丹, 孟祥乐, 等. 中药复方对细胞色素P450酶的调控研究进展 [J]. *中药材*, 2009, 32(10): 1638-1642.
- [17] Wang Y, Wang S, Liu Y, et al. Characterization of metabolites and cytochrome P450 isoforms involved in the microsomal metabolism of aconitine [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2006, 844(2): 292-300.
- [18] 李晗, 王宇光, 高月, 等. 基于临床用量的参附注射液对大鼠肝脏主要药物代谢酶的影响 [J]. *药学报*, 2013, 48(5): 728-733.
- [19] Sridhar J, Liu J, Foroozesh M, et al. Insights on cytochrome P450 enzymes and inhibitors obtained through QSAR studies [J]. *Molecules*, 2012, 17(8): 9283.
- [20] Raucy J L, Lasker J M. Cell-based systems to assess nuclear receptor activation and their use in drug development [J]. *Drug Metab Rev*, 2013, 45(1): 101-109.
- [21] Jin L, Feng X, Rong H, et al. The antiparasitic drug ivermectin is a novel FXR ligand that regulates metabolism [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1937.
- [22] 霍旺, 张广平, 李晗, 等. CYP1A1体外诱导活性评价模型的建立及其在人参皂苷筛选中的应用 [J]. *药物评价研究*, 2018, 41(10): 1791-1797.
- [23] Moore J T, Kliewer S A. Use of the nuclear receptor PXR to predict drug interaction [J]. *Toxicology*, 2000, 153(1/3): 1-10.
- [24] Brandon E F, Meijerman I, Klijin J S, et al. *In vitro* cytotoxicity of ET-743 (trabectedin, Yondelis), a marine anti-cancer drug, in the HepG2 cell line: influence of cytochrome P450 and phase II inhibition, and cytochrome P450 induction [J]. *Anticancer Drugs*, 2005, 16(9): 935-943.
- [25] Rodriguez A C, Jover R, Gomez L M, et al. Quantitative RT-PCR measurement of human cytochrome P450s: application to drug induction studies [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 376(1): 109-116.
- [26] Westerink W M, Schoonen W G. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2007, 21(8): 1581-1591.
- [27] Ooi J P, Kuroyanagi M, Sulaiman S F, et al. Andrographolide and 14-deoxy-11, 12-didehydro andrographolide inhibit cytochrome P450s in HepG2 hepatoma cells [J]. *Life Sci*, 2011, 88(9/10): 447-454.