

## 【安全性评价】

## 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

霍旺<sup>1</sup>, 张广平<sup>2</sup>, 孙佳<sup>2</sup>, 苏萍<sup>2</sup>, 李晗<sup>2\*</sup>

1. 中国人民解放军总医院, 北京 100853

2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

**摘要:** 目的 建立hAhR介导的CYP1A1体外诱导活性评价模型, 应用于体外快速筛选通过hAhR途径介导的对CYP1A1具有激活能力的药物。方法 利用双荧光素酶报告基因系统, 将CYP1A1启动子序列插入报告基因质粒上游, 构建pGL4.17-CYP1A1质粒, 并与含有hAhR编码区序列的pcDNA3.1-hAhR表达质粒瞬时共转染HepG2细胞, pGL4.17-control、pcDNA3.1(+)分别为pGL4.17-CYP1A1、pcDNA3.1-hAhR的空载体, 建立hAhR-CYP1A1报告基因模型; 应用AhR的完全激动剂TCDD(2 nmol/L)验证该报告基因模型的可靠性, 应用该模型考察人参皂苷Rf、Rc、Re、Rg<sub>1</sub>、Rb、Rd、Rh<sub>2</sub>和Rg<sub>3</sub>(20 μmol/L)通过hAhR途径对CYP1A1的诱导作用。结果 经验证, 报告基因模型构建成功; 人参皂苷Rf、Re、Rg<sub>1</sub>和Rc对AhR具有激活作用, 其中与对照组比较, 人参皂苷Rg<sub>1</sub>、Rc对AhR激活效应显著( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 人参皂苷Rb、Rd、Rh<sub>2</sub>和Rg<sub>3</sub>对AhR无激活作用。结论 本研究建立基于hAhR的CYP1A1体外诱导活性评价模型, 可为具有潜在CYP1A1诱导作用的目标化合物的筛选提供有效、快速的体外筛选手段, 人参皂苷Rg<sub>1</sub>、Rc对AhR-CYP1A1激活效应显著。

**关键词:** CYP1A1; hAhR; 报告基因; 药物筛选; 诱导; 人参皂苷

中图分类号: R962.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)10-1791-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.10.008

Development of *in vitro* evaluation model for CYP1A1 induction and its application in screening of ginsenosidesHuo Wang<sup>1</sup>, ZHANG Guangping<sup>2</sup>, SUN Jia<sup>2</sup>, SU Ping<sup>2</sup>, LI Han<sup>2</sup>

1. Department of Traditional Chinese Medical Hospital of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

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

**Abstract: Objective** The aim of this study is to establish and validate an *in vitro* model to screen potential drug inducers of CYP1A1 mediated via nuclear receptor AhR, which can be applied to evaluate the induction activity toward CYP1A1 by a large number of drugs rapidly and effectively. **Methods** Dual luciferase reporter gene system was performed. The promoter of CYP1A1 DNA was cloned into the firefly luciferase reporter gene vector, pGL4.17[luc2/Neo], in order to construct pGL4.17-1A1. Transiently co-transfecting the pGL4.17-1A1 reporter vector and hAhR expression plasmid pcDNA3.1-hAhR to HepG2 cells, PGL4.17-control and pcDNA3.1(+) were empty vectors of pGL4.17-CYP1A1 and pcDNA3.1-hAhR respectively; And hAhR-mediated CYP1A1 reporter gene model was established. As the full agonist of AhR, TCDD was applied to ensure the reliability of hAhR-mediated CYP1A1 reporter gene model. The model was used to investigate the induction of CYP1A1 by hAhR pathway of ginsenoside Rf, Rc, Re, Rg<sub>1</sub>, Rb, Rd, Rh<sub>2</sub> and Rg<sub>3</sub>. **Results** Nuclear receptor hAhR-mediated CYP1A1 induction model has been established successfully. Ginsenoside Rf, Re, Rg<sub>1</sub> and Rc (20 μmol/L) could activate AhR. Compared with the control group, ginsenoside Rg<sub>1</sub> and Rc had significant activation effect on AhR ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ). Ginsenoside Rb, Rd, Rh<sub>2</sub> and Rg<sub>3</sub> had no activation on AhR. **Conclusion** The establishment of this induction model is an efficient and rapid *in vitro* way of investigation the drug inducers or inhibitors of CYP1A1.

收稿日期: 2018-02-26

基金项目: 国家重大科技专项资助项目(2015ZX09501004-003-002)

第一作者: 霍旺(1987-), 男, 硕士, 医师, 研究方向为中西医结合临床。E-mail: huowang19871126@163.com

\*通信作者: 李晗(1989-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为中药药理。E-mail: wzf38@126.com

**Key words:** CYP1A1; hAhR; reporter gene; drug screening; induction; ginsenoside

人体内主要的药物代谢酶是细胞色素P450(cytochrome P450)超家族,简称CYP,是其基因超家族编码形成的一群蛋白酶<sup>[1]</sup>。CYP1A1是其中主要能够被诱导活化的代谢酶之一<sup>[2]</sup>,能催化食物和环境前致癌物转化为致癌物质,因此它是毒理学领域的研究热点<sup>[3-4]</sup>。CYP1A1表达的诱导机制属于核受体介导型<sup>[5]</sup>,核受体(nuclear receptor, NR)是一种脂溶性配体依赖转录因子,通过内源性或外源性物质激活从而调控靶基因的转录过程。核受体在体内分布广泛,调控的靶基因涉及多种药物代谢酶及转运体,可对药物或毒物在体内的代谢过程产生重要的影响<sup>[6]</sup>。芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)为一种配体依赖性激活的转录因子,配体激活后与AhR核转位蛋白(AhR nuclear translocator, ARNT)形成的二聚体识别并结合靶基因的外源性反应元件(xenobiotic response element, XRE),调控靶基因转录,影响酶活性,进而改变蛋白质功能<sup>[7]</sup>,靶基因主要包括细胞色素CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1,环氧酶2(cyclooxygenase-2, COX-2)<sup>[8]</sup>。

药物代谢诱导为一种常见的代谢性相互作用<sup>[9]</sup>,包括联合用药时产生的相互作用、以及药物与药物代谢酶之间的相互作用,这两种相互作用均可导致药效的降低甚至产生毒性,所以从药物代谢酶与相关核受体的调控角度对药物诱导或者抑制作用进行筛选是揭示药物相互作用重要环节<sup>[10]</sup>。当前研究药物诱导或者抑制的筛选方法主要为体外筛选,包括基于细胞转录激活的双荧光素酶报告基因法,基于溶液的生物物理化学分析的亲和闪烁法和基于计算机辅助的虚拟筛选等<sup>[11-13]</sup>,其中双荧光素酶报告基因法因基于生理状态而最为常用。因此,本研究运用PCR方法,成功克隆CYP1A1基因启动子,将其插入到荧光素酶报告基因载体pGL4.17[luc2/Neo] Vector中,构建了pGL4.17-CYP1A1报告基因质粒;将成功克隆的hAhR编码区序列插入到pcDNA3.1(+)载体中,构建pcDNA3.1-hAhR质粒。同时将报告基因质粒pGL4.17-CYP1A1、表达质粒pcDNA3.1-hAhR与内参质粒pRL-TK瞬时共转染细胞,在细胞水平上建立基于hAhR介导的CYP1A1药物诱导剂的体外筛选模型。

本实验室前期研究发现,人参皂苷Rg<sub>1</sub>可通过激活AhR受体进一步浓度相关性和时间相关性诱

导CYP1A1表达<sup>[14]</sup>。但尚未有关于其他种类的人参皂苷影响CYP1A1活性的报道,所以本实验通过建立此体外筛选模型,并选取8种常见的人参皂苷进行筛选。此模型可用于判断某种药物对CYP1A1是否具有潜在的诱导作用以及对AhR是否具有潜在的激活作用,并以此进一步推测药物与药物代谢酶、药物与药物之间的相互作用。

## 1 材料

### 1.1 细胞

细胞系HepG2,购自中国医学科学院基础医学研究所,由本实验室保存提供。

### 1.2 药物与主要试剂

人参皂苷Rc, 20 mg,批号11641-200802;人参皂苷Re, 20 mg,批号110754-201324;人参皂苷Rg<sub>1</sub>, 20 mg,批号110703-201529;人参皂苷Rf, 20 mg,批号111719-201104;人参皂苷Rb、Rd、Rh<sub>2</sub>和Rg<sub>3</sub>,均购于食品药品生物检定研究院。TCDD(2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo- p-dioxin), 10 mg,批号ED-901-A,购自美国Cerillant公司。

pGL4.17 [luc2 / Neo] Vector、pRL-TK、pcDNA3.1(+)载体(美国Promega公司);大肠杆菌感受态DH5 $\alpha$ (大连TaKaRa公司);限制性内切酶Hind III、Xho I、Bam HI、T4 DNA连接酶(日本NEB公司);转染试剂TransIT-X2(美国Mirus公司);无内毒素质粒小量提取试剂盒和PCR试剂盒(北京全式金公司);DNA提取试剂盒和凝胶回收纯化试剂盒(德国Qiagen公司);双荧光素酶报告基因检测试剂盒(美国Promega公司)。

### 1.3 主要仪器

细胞培养箱(日本三洋公司);倒置显微镜(日本尼康公司);Microfuge 22R型离心机(美国Beckman公司);GeneAmp PCR System 2400型PCR仪(美国Applied Biosystem公司);VICTOR X型多标记酶标仪(美国Perkin Elmer公司)。

## 2 方法

### 2.1 pGL4.17-CYP1A1报告基因质粒构建

CYP1A1的启动子位于CYP1A1的-1566/+38位<sup>[15]</sup>。以人cDNA为模板,采用PCR方法扩增CYP1A1基因启动子。参考基因启动子序列,设计PCR引物,序列如下:上游引物:5'-GCTAGCCTCGAGATCAGAATGTAAA-3'(下划线部分为Xho I酶切位点),下游引物:5'-GCCTTCACAAGCTT

GGCAATCCGGT-3'(下划线部分为HindIII酶切位点)。PCR反应体系: ddH<sub>2</sub>O, 34 μL; dNTP, 4 μL; Primer1, 1 μL; Primer2, 1 μL; DNA模板, 5 μL; Hifi Buffer, 5 μL; 总体积为50 μL。反应条件为: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性45 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 循环40次; 72 °C延伸10 min, 产物4 °C保存待用。取扩增产物, 经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定。同时与pGL4.17[luc2/Neo] Vector载体进行Xho I/Hind III酶切, 酶切成功后进行T4连接。经菌液PCR及双酶切初步鉴定后, 样品送至北京博迈德公司测序, 测序成功后命名为pGL4.17-CYP1A1。

## 2.2 pcDNA3.1-hAhR人真核表达载体构建

以人cDNA为模板<sup>[16]</sup>, 采用PCR方法扩增hAhR编码区序列。设计PCR引物, 序列如下: 上游引物: 5'-GCTAGCGTTTAACTTAAGCTTACC-3'(下划线部分为HindIII酶切位点), 下游引物: 5'-TTTACCGGGACTCTAGACTCGAGTT-3'(下划线部分为Xho I酶切位点), PCR反应体系同上。反应条件为: 95 °C预变性2 min; 95 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 循环40次; 72 °C延伸10 min, 产物4 °C保存待用。取扩增产物, 经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定。同时与pcDNA3.1(+)空载体分别进行Hind III/Xho I双酶切, 酶切成功后进行T4连接。经菌液PCR及双酶切初步鉴定后, 样品送至北京博迈德公司测序, 测序成功后命名为pcDNA3.1-hAhR。

## 2.3 人参皂苷的处理和配制

人参皂苷Rf、Rc、Re、Rg<sub>1</sub>、Rb、Rd、Rh<sub>2</sub>和Rg<sub>3</sub>, 实验前精密称定, 用DMSO完全溶解配制母液浓度为20 mmol/L, 4 °C保存, 实验时用DMEM稀释至20 μmol/L。

## 2.4 基于hAhR-CYP1A1报告基因系统对8种人参皂苷诱导作用的筛选

**2.4.1 细胞培养与瞬时转染** HepG2细胞生长于含有10%特级胎牛血清、1%非必需氨基酸、100 mg/L青霉素和链霉素的DMEM培养液中, 在37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的条件下贴壁培养。瞬时转染实验前一天取对数生长期HepG2细胞, 以每孔5×10<sup>5</sup>个细胞接种于24孔板中, 每组做4个复孔, 培养至细胞密度约为80%。用无抗生素的培养液稀释质粒, 按照转染试剂TransIT-X2说明书, 将250 ng pGL4.17-CYP1A1, 500 ng pcDNA3.1-hAhR以及50 ng pRL-TK内参质粒共转染HepG2细胞, 同时另设pGL4.17-control、pcDNA3.1(+), 分别为pGL4.17-

CYP1A1、pcDNA3.1-hAhR的空载体。按1:50比例加入TransIT-X2转染试剂, 共孵育30 min后加入HepG2细胞中, 100 μL/孔。37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱孵育12 h后更换含有药物的DMEM培养基。

**2.4.2 hAhR介导的CYP1A1报告基因模型验证** 实验设置4组, 分别为对照组[共转染pcDNA3.1(+)与pGL4.17-control]、pGL4.17-CYP1A1组[共转染pGL4.17-CYP1A1与pcDNA3.1(+)]、pcDNA3.1-hAhR组(共转染pcDNA3.1-hAhR与pGL4.17-control)、pGL4.17-CYP1A1 + pcDNA3.1-hAhR组(共转染pGL4.17-CYP1A1与pcDNA3.1-hAhR)。转染完成后各组细胞均加入AhR的完全激动剂TCDD(2 nmol/L), 干预48 h后, 用双荧光素酶活性测定试剂盒进行双荧光素酶活性检测, 重复3次。

取HepG2细胞, 共转染pGL4.17-CYP1A1与pcDNA3.1-hAhR, 设置对照组(DMEM培养基培养)及TCDD 0.5、1.0、2.0、5.0 nmol/L组, TCDD干预48 h后, 用双荧光素酶活性测定试剂盒进行双荧光素酶活性检测, 重复3次。

**2.4.3 对8种人参皂苷诱导作用的筛选** 取HepG2细胞, 共转染pGL4.17-CYP1A1与pcDNA3.1-hAhR, 设对照组(等量0.1% DMSO)、阳性药物TCDD(2 nmol/L)组和人参皂苷Rf、Rc、Re、Rg<sub>1</sub>、Rb、Rd、Rh<sub>2</sub>和Rg<sub>3</sub>(20 μmol/L)<sup>[14]</sup>组。

## 2.5 双荧光素酶活性检测

瞬时共转染48 h后, 弃去24孔板中的培养基, 用PBS洗涤细胞1次, 加入100 μL/孔报告基因裂解缓冲液, 室温震荡15 min后, 12 000 r/min离心5 min, 取上清。取20 μL上清液与100 μL萤火虫荧光素酶检测缓冲液混合后, 采用多功能酶标仪检测萤火虫荧光素酶的活性; 再加入100 μL海肾荧光素酶检测缓冲液, 检测海肾荧光素酶活性, 计算萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值, 即为校正后的荧光素酶活性, 药物的荧光素酶活性与对照组的荧光素酶活性的比值称为诱导倍数。

## 2.6 数据处理

所有数据重复3次, 每次设置3个复孔, 收集数据进行统计学分析。实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用GraphPad Prism 5软件的t-test方法进行统计学分析。

## 3 结果

### 3.1 pGL4.17-CYP1A1报告基因质粒构建

以人基因组DNA为模板扩增得到CYP1A1启

动子,扩增目的片段的理论大小为1 639 bp,PCR后,取扩增产物,经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定结果如图1A所示。将目的片段进行Xho I/Hind III双酶切后,利用凝胶回收试剂盒进行回收纯化,纯化后PCR、凝胶电泳结果如图1B所示。最后将上述纯化后的CYP1A1启动子片段通过T4连接酶进行连接,得到pGL4.17-CYP1A1质粒。转化大肠杆菌后挑取白色菌落利用引物直接进行菌液PCR扩增,初步判断目的片段是否插入以及目的片段的大小,菌液PCR结果如图1C所示。Xho I和Hind III双酶切后,得到理论大小的目的基因片段和载体片段,PCR结果如图1D所示,初步判断质粒构建成功。同时测序分析结果表明,插入到pGL4.17载体中的片段与CYP1A1基因启动子相应的目的基因序列完全一致,表明质粒pGL4.17-CYP1A1构建成功。

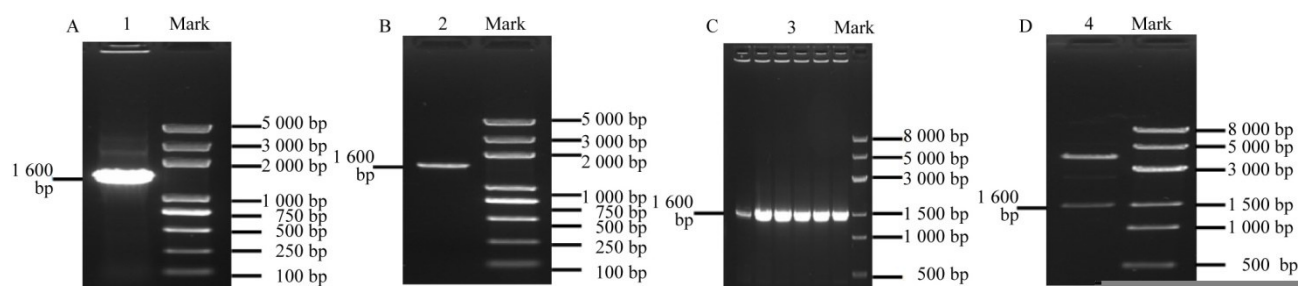
### 3.2 pcDNA3.1-hAhR人真核表达载体构建

以人cDNA为模板,利用PCR方法扩增得到hAhR编码区序列,扩增片段的理论大小为2 562

bp,PCR扩增、取扩增产物,经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果如图2A所示。目的片段进行Hind III/Xho I双酶切后,利用凝胶回收试剂盒进行回收纯化,纯化后PCR结果如图2B所示。将上述纯化后的hAhR编码区序列通过T4连接酶进行连接,得到pcDNA3.1-hAhR质粒。转化大肠杆菌后挑取白色菌落利用引物直接进行菌液PCR扩增,初步判断目的片段是否插入以及目的片段的大小,菌液PCR结果如图2C所示。Hind III和Xho I双酶切后,得到理论大小的目的基因片段和载体片段,初步表明质粒构建成功,PCR结果如图2D所示。同时测序分析结果表明,插入到pcDNA3.1载体中的片段与hAhR相应的编码区序列完全一致,表明质粒pcDNA3.1-hAhR构建成功。

### 3.3 hAhR介导的CYP1A1报告基因模型验证

各组细胞均加入TCDD(2 nmol/L),与对照组比较,共同转染表达质粒pcDNA3.1-hAhR和报告基因质粒pGL4.17-CYP1A1时,TCDD呈现强激活效

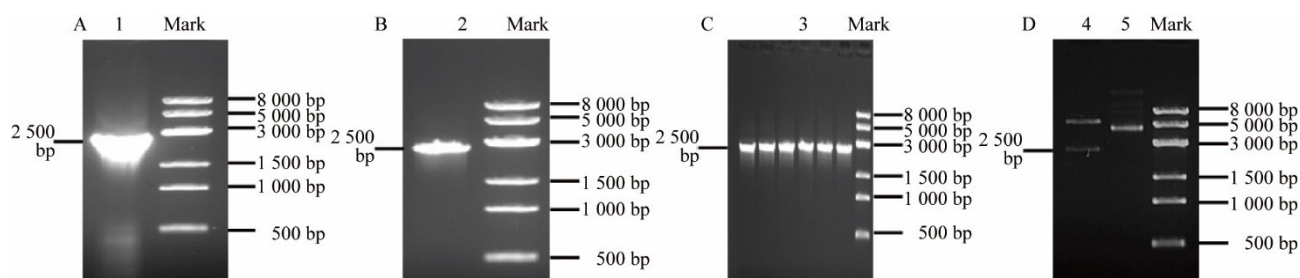


泳道1 - CYP1A1启动子PCR扩增产物;泳道2 - CYP1A1启动子PCR纯化产物;泳道3 - 菌液PCR产物;泳道4 - pGL4.17-CYP1A1质粒Xho I/Hind III双酶切后得到的CYP1A1启动子片段

Lane 1 - PCR product of promoter of CYP1A1; Lane 2 - purification PCR product of promoter of CYP1A1; Lane 3 - PCR product of bacteria liquid; Lane 4 - Promoter fragment of CYP1A1 from Xho I/Hind III digestion of pGL4.17-CYP1A1 plasmid

图1 pGL4.17-CYP1A1报告基因质粒构建的电泳鉴定

Fig. 1 Electrophoresis identification of reporter gene plasmid of pGL4.17-CYP1A1



泳道1:hAhR编码区序列PCR扩增产物;泳道2:hAhR编码区序列PCR纯化产物;泳道3:菌液PCR产物;泳道4:pcDNA3.1-hAhR质粒Hind III/Xho I双酶切后得到的hAhR编码区序列片段;泳道5:重组质粒片段。

Lane 1: PCR product of CDS of hAhR; Lane 2: purification PCR product of CDS of hAhR; Lane 3: PCR product of bacteria liquid; Lane 4: a CDS fragment of hAhR from Hind III/Xho I digestion of pcDNA3.1-hAhR plasmid; Lane 5: recombinant plasmid without digestion.

图2 pcDNA3.1-hAhR人真核表达载体构建的电泳鉴定

Fig. 2 Electrophoresis identification of human pcDNA3.1-hAhR eukaryotic expression vector

应( $P < 0.001$ ), 报告基因的诱导倍数为31; 共转染表达质粒 pcDNA3.1-hAhR 和 pGL4.17-control 质粒时, TCDD 激活作用消失, 表明 AhR 需结合至 CYP1A1 启动子上的顺式作用元件才可激活报告基因系统; 共转染 pcDNA3.1(+) 和 pGL4.17-CYP1A1 报告基因质粒, 出现 TCDD 弱激活效应( $P < 0.001$ ), 表明 HepG2 细胞存在少量内源性 AhR, 对报告基因系统起到弱的激活效应。结果见图3。

进一步测定不同浓度的完全激动剂 TCDD(0、0.5、1、2、5 nmol/L) 对 AhR 的激活作用来验证该报告基因模型的可靠性。结果显示, 随着 TCDD 浓度的增加, hAhR 对 CYP1A1 的转录活化明显上调并呈现浓度相关性( $P < 0.05, 0.01$ ), 见图4。以上结果表明, 基于 hAhR 的 CYP1A1 报告基因模型构建成功。

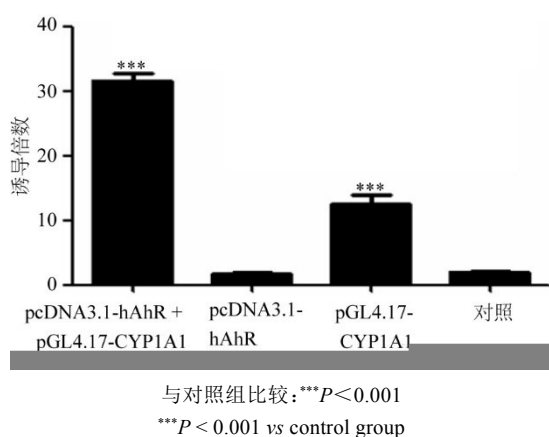


图3 hAhR介导的CYP1A1报告基因模型验证( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig. 3 Validation of hAhR-mediated reporter gene model ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

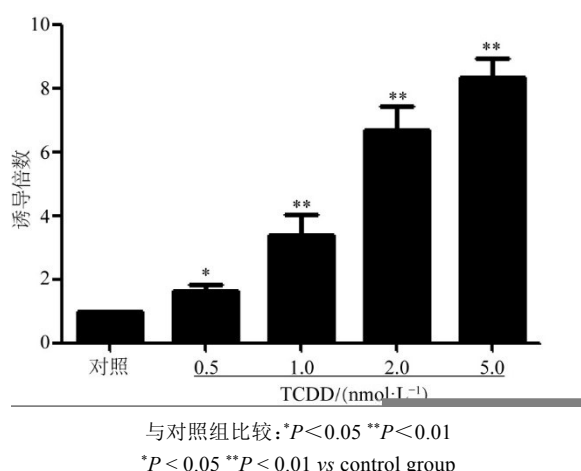


图4 不同浓度 AhR 激动剂对 hAhR 介导的 CYP1A1 报告基因模型验证( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig. 4 Validation of hAhR-mediated reporter gene model with agonist of AhR at different concentrations ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.4 基于 hAhR-CYP1A1 报告基因系统对 8 种人参皂苷诱导作用的筛选

利用构建好的 hAhR 介导的 CYP1A1 报告基因模型, 对人参中常见的 8 种人参皂苷 Rf、Rc、Re、Rg<sub>1</sub>、Rb、Rd、Rh<sub>2</sub> 和 Rg<sub>3</sub> 进行 hAhR 激活作用的筛选, 以此初步考察上述 8 种人参皂苷是否对 CYP1A1 具有潜在诱导能力。结果显示, 与对照组比较, 人参皂苷 Rf、Re、Rg<sub>1</sub> 和 Rc(20 μmol/L) 对 AhR 具有激活作用, 其中人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 与 Rc 对 AhR 激活效应显著( $P < 0.05, 0.01$ )。人参皂苷 Rb、Rd、Rh<sub>2</sub> 和 Rg<sub>3</sub> 对 AhR 无激活作用, 结果见图5。

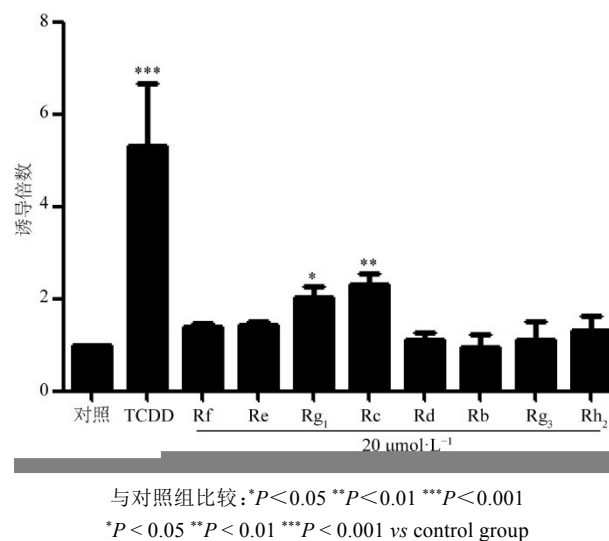


图5 人参皂苷 Rf、Re、Rg<sub>1</sub>、Rc、Rd、Rb、Rg<sub>3</sub> 和 Rh<sub>2</sub> 对 CYP1A1 的激活作用( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig. 5 Fold induction of relative CYP1A1 luciferase activity by ginsenoside ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

## 4 讨论

P450 是一组结构和功能相关的超家族基因编码的同工酶, 主要有 CYP1、CYP2 和 CYP3 三个基因家族, CYP1A1 主要分布于肝外组织, 在肝脏中含量很低, 但极易被诱导, 主要参与外源性物质及毒物的代谢。现已证实, 奥美拉唑<sup>[17]</sup> 和 3-甲基胆蒽<sup>[18]</sup> 均为 CYP1A1 的诱导剂。AhR 是一种以芳香族化合物为配体的配体依赖性激活的转录因子, 现已证实, TCDD 是与 AhR 亲和力最高的完全激动剂。AhR 激活后, 与 ARNT 形成异源二聚体并进入细胞核, 与 CYP1A1 基因启动子区结合后, 调节 CYP1A1 基因的转录<sup>[19]</sup>。CYP450 酶系统在药物相互作用方面具有重要意义, 其中一个重要表现是一种药物对 P450 酶特定亚型产生诱导或抑制作用, 进而改变另一种药物的代谢清除, 影响其血药浓度<sup>[20-21]</sup>。所以在药物代谢过程中, 药物与药物代谢酶之间的作用

以及联合用药产生的相互作用,已经成为医药领域重点关注的问题之一<sup>[22]</sup>。因此,由于CYP所含亚型众多,新药开发与临床使用阶段,需采用多种体外代谢模型对候选药物的代谢进行高通量筛选<sup>[23]</sup>,阐明相互作用发生的机制,并预防因相互作用而对机体造成的损害。基于上述原因,本研究构建了hAhR-CYP1A1体外诱导活性评价模型。

双荧光素酶报告基因法具有操作简单及重复性好等特点,此方法广泛应用于化学药物领域,而在中药领域中的报道较少。在药物诱导CYP450酶的分子机制的研究基础上,本实验将含有CYP1A1的启动子区域(-1566/+38)的报告基因质粒与含有AhR编码区序列的表达质粒联合,用于构建CYP450体外诱导活性评价模型。实验利用PCR技术,以人cDNA为模板,将CYP1A1的启动子区域克隆后插入到pGL4.17载体中,成功构建pGL4.17-CYP1A1报告基因质粒;同时,以人cDNA为模板,采用PCR方法,将AhR编码区序列克隆后插入到pcDNA3.1(+)载体中,成功构建pcDNA3.1-hAhR表达质粒,并与Renilla luciferase质粒pRL-TK共同转染HepG2细胞。

人肝癌细胞系HepG2是目前药物筛选研究中广泛应用的细胞系之一,虽保留了部分代谢外源化合物的能力与CYP活性<sup>[24]</sup>,但细胞中内源性AhR表达量低,进行转染实验后外源性AhR可以实现较高水平的表达,适用于此项实验。

共转染后,经AhR完全激动剂TCDD处理,发现含有启动子调控区序列的荧光素酶数值显著升高,表明hAhR介导的CYP1A1体外诱导活性评价模型构建成功,本研究还应用此体外诱导活性评价模型来检测Rf、Rc、Re、Rg<sub>1</sub>、Rb、Rd、Rh<sub>2</sub>和Rg<sub>3</sub>这8种常见的人参皂苷。结果显示,人参皂苷Rb、Rd、Rh<sub>2</sub>和Rg<sub>3</sub>与0.1%DMSO溶剂对照组间均无统计学差异,提示它们都不能激活hAhR;人参皂苷Rf、Re、Rg<sub>1</sub>和Rc出现激活作用,其中人参皂苷Rg<sub>1</sub>与Rc对hAhR激活效应明显,提示人参皂苷Rg<sub>1</sub>与Rc可能是hAhR的激活剂,其诱导机制及可能引起的病理生理改变有待于进一步研究。

本研究成功构建了基于hAhR的CYP1A1体外诱导活性评价模型,并将其应用于hAhR激活剂的体外筛选。此报告基因模型为CYP1A1潜在诱导剂的发现提供了有效筛选平台,有助于快速预测参与药物代谢的P450酶,及可能引起的药物-药物相互作用,为药物临床应用提供合理参考。

#### 参考文献

- [1] Jin B, Park D W, Nam K W, et al. CpG methylation of the mouse CYP1A2 promoter [J]. *Toxicol Lett*, 2004, 152(1): 11-18.
- [2] Cfa V, Haarmann-Stemmann T. The aryl hydrocarbon receptor repressor - More than a simple feedback inhibitor of AhR signaling: Clues for its role in inflammation and cancer [J]. *Curr Opin Toxicol*, 2017, 2: 109-119.
- [3] Puga A, Ma C, Marlowe J L. The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways [J]. *Biochem Pharmacol*, 2009, 77(4): 713-722.
- [4] Satsu H, Yoshida K, Mikubo A, et al. Establishment of a stable aryl hydrocarbon receptor-responsive HepG2 cell line [J]. *Cytotechnology*, 2015, 67(4): 621.
- [5] Abiko Y, Lin F Y, Lee H, et al. Quinone-mediated induction of cytochrome P4501A1 in HepG2 cells through increased interaction of aryl hydrocarbon receptor with aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator [J]. *J Toxicol Sci*, 2016, 41(6): 775-781.
- [6] 胡东华, 王宇光, 陈志武, 等. 复方丹参滴丸对大鼠肝细胞色素P450酶的影响 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2013, 27(4): 678-684.
- [7] Humphrey-Johnson A, Abukalam R, Eltom S E. Stability of the aryl hydrocarbon receptor and its regulated genes in the low activity variant of Hepa-1 cell line [J]. *Toxicol Lett*, 2015, 233(2): 59.
- [8] Kamenickova A, Anzenbacherova E, Pavek P, et al. Effects of anthocyanins on the AhR-CYP1A1 signaling pathway in human hepatocytes and human cancer cell lines [J]. *Toxicol Lett*, 2013, 221(1): 1-8.
- [9] 马增春, 王宇光, 谭洪玲, 等. 中药与肝脏药物代谢酶之间的相互作用 [J]. *世界华人消化杂志*, 2016(7): 994-1001.
- [10] 李晗, 王宇光, 高月. 孕烷X受体对细胞色素P450CYP3A基因表达的调控在中药配伍禁忌及中药毒性早期预测中的应用 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2015, 29(6): 967-972.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Wang Y G, Ye X, Ma Z C, et al. Induction of cytochrome P450 1A1 expression by ginsenoside Rg1 and Rb1 in

- HepG2 cells [J]. Eur J Pharmacol, 2008, 601(1-3): 73-78.
- [15] Eric L F, Dominique L G, Claudine R, et al. Transcriptional induction of CYP1A1 by Oltipraz in human Caco-2 cells is aryl hydrocarbon receptor - and calcium-dependent [J]. J Biol Chem, 2002, 277(27): 24780-24787.
- [16] Sabine U V, Paul L S. Hypoxia perturbs aryl hydrocarbon receptor signaling and CYP1A1 expression induced by PCB 126 in human skin and liver-derived cell lines [J]. Toxi and App Pharm, 2014, 274(2): 408-416.
- [17] Novotna A, Srovnalova A, Svecarova M, et al. Differential effects of omeprazole and lansoprazole enantiomers on aryl hydrocarbon receptor in human hepatocytes and cell lines [J]. Plos One, 2014, 9(6): e98711.
- [18] Choi J M, Oh S J, Lee S Y, et al. HepG2 cells as an *in vitro* model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics [J]. Arch Pharm Res, 2015, 38(5): 691-704.
- [19] Schulthess P, Löffler A, Vetter S, et al. Signal integration by the CYP1A1 promoter - a quantitative study [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(11): 5318-5330.
- [20] Ong C E, Pan Y, Mak J W, et al. *In vitro* approaches to investigate cytochrome P450 activities: update on current status and their applicability [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2013, 9(9): 1097-1113.
- [21] Li G, Huang K, Nikolic D, et al. High-throughput cytochrome P450 cocktail inhibition assay for assessing drug -drug and drug-botanical interactions [J]. Drug Metab Dispos, 2015, 43(11): 1670.
- [22] Fasinu P S, Bouic P J, Rosenkranz B. An overview of the evidence and mechanisms of herb-drug interactions [J]. Front Pharmacol, 2012, 3: 69.
- [23] 吴慧, 彭英, 孙建国, 等. 体外代谢在新药早期评价中的应用与发展 [J]. 药学学报, 2013(7): 1071-1079.
- [24] Gerets H H J, Tilmant K, Gerin B, et al. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins [J]. Cell Biol Toxicol, 2012, 28(2): 69-87.