

VEGF 可诱导基质金属蛋白酶等表达,改变细胞的细胞外基质,有利于新血管的出芽与生长^[11];③ VEGF 还可通过抑制兴奋性毒性作用,直接保护低氧损伤神经元^[12],减小脑梗死面积^[13];④ VEGF 作为有丝分裂原,能促进脑内神经干细胞增殖分化,提高内源性神经再生^[13],可见增强 VEGF 及其受体表达有助于神经功能的恢复。

本实验结果发现,补阳还五汤能显著提高局灶性脑缺血模型大鼠神经功能,增强脑缺血后 VEGF 及 Flk1 的表达,维持阳性细胞数相对高值时间,增加脑内 VEGF 蛋白水平,随着用药时间延长,其作用优于尼莫地平,提示影响 VEGF 及 Flk1 是补阳还五汤抗脑缺血损伤的又一可能机制。

References:

[1] Yan C, Davis G. Vascular specific growth factor and blood vessel formation [J]. *Nature*, 2000, 407: 242-248.
[2] Meister BJ, Gmonekch F, Bactij F, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human neuroblastoma [J]. *Eur J Cancer*, 1999, 35(3): 445-449.
[3] Chen L G, Qu Y, Ge H Y, et al. Effect of Buyang Huanwu Decoction on expression of adhesion molecules in vascular endothelial cells of blood stasis rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(5): 706-709.
[4] Wang H T, Wang H, Wu Z C, et al. Effect of Buyang Huanwu Decoction on cerebral ischemia-reperfusion injury in atherosclerosis rats [J]. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志),

2003, 23(2): 117-119.
[5] Tang Y H, Deng C Q, Liu W H, et al. Effect of four kinds of active fractions Buyang Huanwu Decoction on cerebral infarction volume in focal cerebral ischemia rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(2): 236-239.
[6] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
[7] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion; evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. *Stroke*, 1986, 17(3): 472-476.
[8] Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, et al. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke [J]. *Stroke*, 1994, 25(9): 1794-1798.
[9] Risau W. Mechanisms of angiogenesis [J]. *Nature*, 1997, 386(6626): 671-674.
[10] Byrne A M, Bouchier-Hayes D J, Harnsey J H. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor [J]. *J Cell Moll Med*, 2005, 9(4): 777-794.
[11] Zhu Y, Lee C, Shen F, et al. Angiopoietin-2 facilitates vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in the mature mouse brain [J]. *Stroke*, 2005, 36(7): 1533-1537.
[12] Svensson B, Peters M, Konig H G, et al. Vascular endothelial growth factor protects cultured rat hippocampal neurons against hypoxic injury via an antiexcitotoxic, caspase-independent mechanism [J]. *J Cere Blood Flow Metab*, 2002, 22(10): 1170-1175.
[13] Sun Y J, Jin K L, Xie L, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(12): 1846-1851.

应用大鼠肝微粒体筛选对细胞色素 P4502D6 有抑制作用的中药

于卫江^{1,2}, 黄丽军¹, 朱大岭^{1,2*}

(1. 哈尔滨医科大学附属第二医院临床药学药物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150081; 2. 哈尔滨医科大学药学院
黑龙江省生物医药工程重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要:目的 从 17 种中药(单体、提取物和注射液)中快速筛选出对细胞色素 P4502D6 (CYP2D6) 亚型有抑制作用的中药, 建立高通量筛选对 CYP2D6 有抑制作用中药的技术平台。方法 取大鼠空白肝微粒体, 分别加入 17 种中药, HPLC 法测定大鼠肝微粒体中 CYP2D6 的探针药物右美沙芬 (DM) 的代谢率, 通过代谢率降低的现象初步筛选出能抑制肝微粒体中 CYP2D6 代谢的药物。结果 槲皮素、黄芩苷、厚朴提取物、清开灵注射液、盐酸川芎嗪注射液可明显降低 DM 的代谢率 ($P < 0.01$)。结论 初步筛选出槲皮素、黄芩苷、厚朴提取物、清开灵注射液、盐酸川芎嗪注射液这 5 种中药可抑制肝微粒体 CYP2D6 酶活性。此方法可作为高通量筛选对 CYP2D6 活性有抑制作用中药的技术平台。

关键词:细胞色素 P4502D6 (CYP2D6); 肝微粒体; 右美沙芬

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)03-0397-05

收稿日期:2006-07-15

基金项目:国家“863”课题 (2002AA2Z3410); 黑龙江省自然科学基金重点资助项目 (ZJY03-08); 哈尔滨医科大学研究生创新基金资助项目

作者简介:于卫江(1980—), 河南省安阳市人, 男, 硕士研究生, 从事受试药物对细胞色素 P450 酶影响的技术平台的研究, 获哈尔滨医科大学创新基金一项。Tel: (0451) 86605835 E-mail: daniss@sina.com

* 通讯作者 朱大岭 Tel: (0451) 86614075 E-mail: dalingz@yahoo.com

Screening of Chinese materia medica possessed inhibitory effect on cytochrome P4502D6 in liver microsomes of rats

YU Wei-jiang^{1,2}, HUANG Li-jun¹, ZHU Da-ling^{1,2}

(1. Institute of Clinical Pharmacy, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, China; 2. Bio-pharmaceutical Engineering Key Laboratory of Heilongjiang, College of Pharmacy of Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

Abstract: Objective To screen the chemical components, extract, and injection, which have the inhibitory effect on cytochrome P4502D6 (CYP2D6) in liver microsomes of rats, from 17 kinds of Chinese materia medica (CMM) and develop a technical method for screening CMM possessed inhibitory effect on CYP2D6 in liver microsomes of rats by high throughput. **Methods** The liver microsomes of rats were incubated with 17 kinds of CMM at the presence of Dextromethorphan (DM). DM Metabolic rate (DX/DM, DX: Dextrophane, metabolites of DM) in liver microsomal reconstituted system was measured by HPLC and used as probe to determine the activity of CYP2D6. The inhibition of CMM on rat CYP2D6 was identified by decreasing the metabolic rate. **Results** Quercetin, baicalin, extract of *Flos Magnoliae Officinalis*, Qingkailing Injection, and Tetramethylpyrazine Hydrochloride Injection inhibited the DM metabolic rate ($P < 0.01$). **Conclusion** Five kinds of CMM have been obtained, they are quercetin, baicalin, extract of *Flos Magnoliae Officinalis*, Qingkailing Injection, and Tetramethylpyrazine Hydrochloride Injection, which can inhibit the activity of CYP2D6 in liver microsomes of rats. The method mentioned above can be used as a useful technique to high throughput screening of CMM possessed the inhibitory effect on CYP2D6.

Key words: cytochrome P4502D6 (CYP2D6); liver microsome; Dextromethorphan (DM)

细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP) 是由多个同工酶组成的基因超家族,参与许多药物和致癌物的氧化代谢作用。其中细胞色素 P4502D6 (CYP2D6) 是一种重要的 CYP 系氧化代谢酶,参与多种重要药物代谢,包括心律失常药、 β 受体阻断药、抗高血压药、三环类抗抑郁药^[1]。近年来,CYP 在中药代谢中的作用日益受到广大研究人员的重视。鉴于中药成分复杂,用一般通用方法需花费大量时间和金钱才能评价其对 CYP 的诱导或抑制作用,因而用简单、快捷的方法估计特定的中药或有效成分对 CYP,特别是某些亚型的影响一直是该领域迫切需要解决的问题。本实验通过 HPLC 法测定 17 种中药单体、提取物及注射液对大鼠肝微粒体重组系统中 CYP2D6 的探针药物右美沙芬 (dextromethorphan, DM) 及代谢物去甲右美沙芬 (dextrophan, DX) 浓度的影响,针对 CYP2D6 这一种亚型酶,快速、简便、准确、大通量的筛选出能抑制其代谢的药物,以便于下一步深入研究药物对 CYP2D6 的影响。

1 材料

成年雄性 Wistar 大鼠,体重 (200 $\pm$ 20) g,由哈尔滨医科大学动物中心提供。DM、DX、己烷磺酸钠购于 Sigma 公司;内标丁丙诺啡 (buprenorphine, DB)、绿原酸、连翘苷、人参皂苷、

芦丁、槲皮素、盐酸小檗碱、熊果酸、黄芩苷购于中国药品生物制品检定所;银杏叶提取物 (含银杏黄酮 24%、银杏总内酯 6%),红景天提取物 (含红景天苷 2%),厚朴提取物 (含厚朴总酚 50%) 购于宁波中药制药厂;穿琥宁注射液 (脱水穿心莲内酯琥珀酸半酯单钾 20 mg/mL,宜宾制药厂),舒血宁注射液 (总黄酮醇苷 0.84 mg/mL,银杏内酯 A 0.06 mg/mL,万荣三九药业有限公司),生脉注射液 (人参皂苷 Rg₁ 0.08 mg/mL,人参皂苷 Re 0.04 mg/mL,雅安三九药业有限公司),清开灵注射液 (黄芩苷 5 mg/mL,总氮 2.5 mg/mL,河北神威药业有限公司),黄芪注射液 (黄芪甲苷 0.08 mg/mL,河北神威药业有限公司),盐酸川芎嗪注射液 (盐酸川芎嗪 20 mg/mL,上海第一生化药业公司);甲醇、乙腈为色谱纯;正丁醇、正己烷、磷酸二氢钾、氢氧化钠为国产分析纯。Waters 2010 色谱管理系统 (717 自动进样器,616 泵,470 荧光检测器);高速冷冻离心机 (美国 Beckman 公司),Hypersil-C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m,大连依利特公司),SHA-C 型水浴恒温振荡器 (江苏金坛市亿通电子有限公司)。

2 方法

2.1 肝微粒体制备:大鼠肝组织经剪碎、漂洗、吸干后称质量,按 1:4 加入匀浆缓冲液 (50 mmol/L Tris, 11.5 g/L KCl, HCl 调 pH 至 7.4),水浴,用

玻璃匀浆器制成肝匀浆,4℃下9 000×g离心20 min,取上清液转移至超速离心管内4℃下100 000×g离心60 min,沉淀即为肝微粒体,重悬于0.25 mol/L蔗糖溶液中,分装,置-80℃冰箱内保存备用。

2.2 肝微粒体体外温孵系统:温孵反应体系中肝微粒体蛋白质量浓度1 mg/mL、NADP⁺ 1 mol/L、异柠檬酸钠200 mmol/L、异柠檬酸脱氢酶10 U/mL、MgCl₂ 10 mmol/L、探针药物DM 0.3 mmol/L,以0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.4)定容至500 μL,加入NADP⁺开始反应。37℃水浴中孵化30 min,加入50 μL冰冷的三氯醋酸终止反应。

2.3 肝微粒体样品处理及色谱条件:于500 μL温孵反应液中加入50 μL DB内标溶液(2 mmol/L),3 mol/L氢氧化钠100 μL,正己烷-正丁醇(9:1)2.0 mL,混悬振荡5 min,3 000×g离心5 min,取上层有机相2 mL置具塞离心管中,加入0.01 mol/L盐酸150 μL混悬3 min,3 000×g离心5 min,取下层水相20 μL进样分析。色谱条件为Waters 2010 色谱管理系统(717 自动进样器,616 泵,470 荧光检测器);流动相:0.01 mol/L磷酸二氢钾-0.01 mol/L己烷磺酸钠-乙腈-甲醇(33:33:100:94),pH 4.0,体积流量1.0 mL/min,色谱柱:Hypersil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),室温下测定,E_x=280 nm,E_m=310 nm。

2.4 抑制实验:空白肝微粒体分为18组:对照组、绿原酸组、连翘苷组、人参皂苷组、芦丁组、槲皮素组、小檗碱组、熊果酸组、黄芩苷组、银杏叶提取物组、红景天提取物组、厚朴提取物组、穿琥宁注射液组、舒血宁注射液组、生脉注射液组、清开灵注射液组、黄芪注射液组、川芎嗪注射液组。对照组温孵反应体系同2.2项,其余17组在其温孵反应体系中分别加入绿原酸、连翘苷、人参皂苷、芦丁、槲皮素、盐酸小檗碱、熊果酸、黄芩苷、银杏叶提取物、红景天提取物、厚朴提取物(质量浓度均为0.1 mg/mL),穿琥宁注射液、舒血宁注射液、生脉注射液、清开灵注射液、黄芪注射液、盐酸川芎嗪注射液20 μL(本实验中中药质量浓度均高于人体最大给药量的血药浓度),孵化条件和色谱条件同上,分别与对照组DM代谢率(DX/DM)比较。

2.5 统计学处理:实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较各组分间差异用Dunnett-*t*检验分析。

3 结果

用HPLC法测定18组大鼠肝微粒体中DX与

DM的浓度,计算DM的代谢率(DX/DM)。17组中药肝微粒体DM的代谢率分别与对照组比较,结果显示槲皮素、黄芩苷、厚朴提取物、清开灵注射液、盐酸川芎嗪注射液可明显降低DM的代谢率($n=6$, $P<0.01$),而其他中药对DM的代谢率没有显著影响($n=6$, $P>0.05$),结果见表1,色谱图见图1。

表1 17种中药对大鼠肝微粒体中DM代谢率的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of 17 kinds of CMM on DM metabolic rate in liver microsomes of rat ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	DM代谢率(DX/DM)	组别	DM代谢率(DX/DM)
对照	0.063±0.012 5	银杏叶提取物	0.044±0.018 0
绿原酸	0.074±0.009 8	红景天提取物	0.082±0.019 0
连翘苷	0.073±0.007 2	厚朴提取物	0.005±0.000 9**
人参皂苷	0.048±0.012 4	穿琥宁注射液	0.071±0.006 5
芦丁	0.077±0.012 6	舒血宁注射液	0.048±0.013 0
槲皮素	0.004±0.000 8**	生脉注射液	0.047±0.014 3
盐酸小檗碱	0.062±0.003 1	清开灵注射液	0.013±0.003 6**
熊果酸	0.055±0.004 3	黄芪注射液	0.055±0.007 7
黄芩苷	0.008±0.002 4**	盐酸川芎嗪注射液	0.013±0.003 0**

与对照组比较:** $P<0.01$

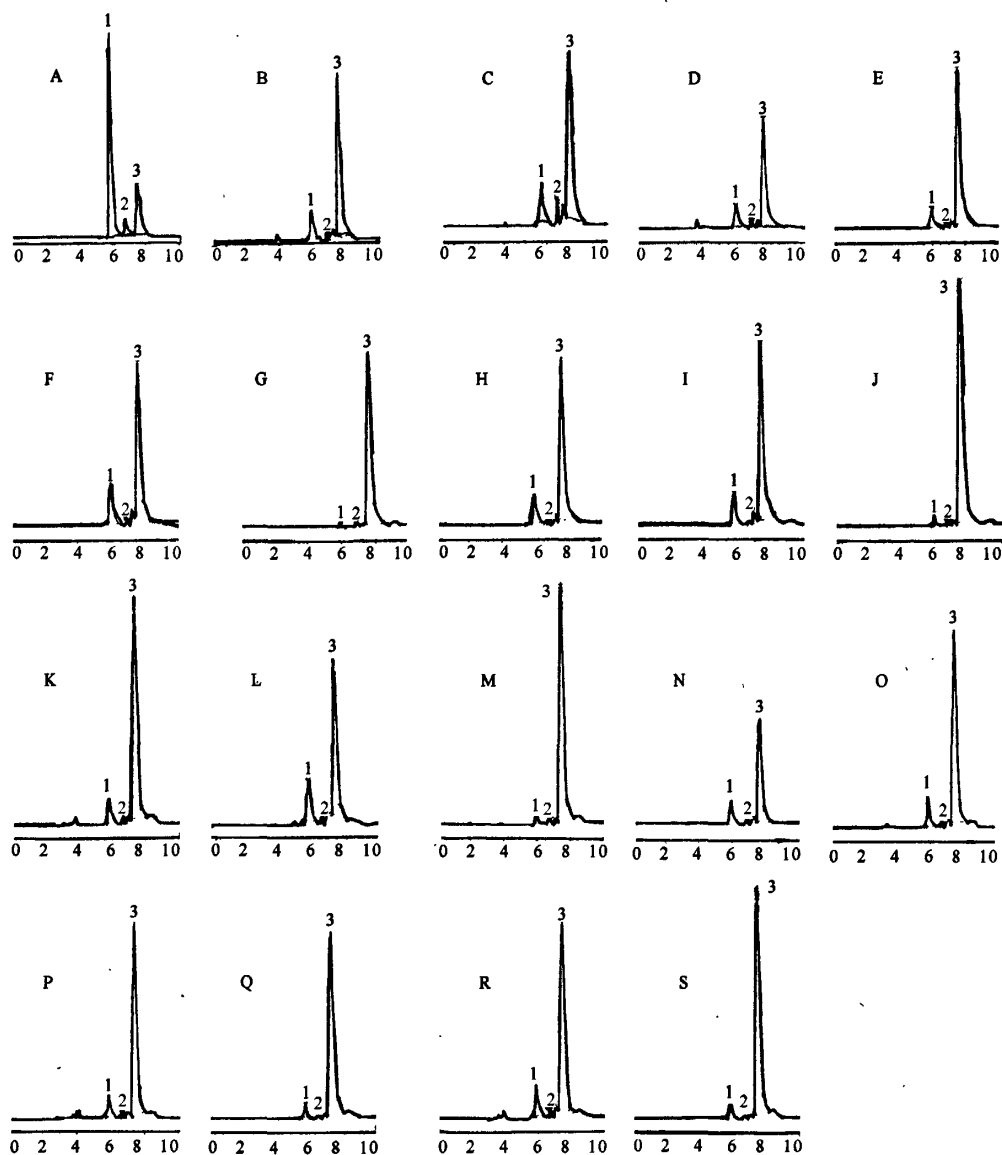
* $P<0.01$ vs control group

4 讨论

本研究通过体外肝微粒体重组系统和HPLC方法,建立了高通量筛选对CYP2D6有抑制作用中药的技术平台。通过该平台,初步筛选出槲皮素、黄芩苷、厚朴提取物、清开灵注射液、盐酸川芎嗪注射液这5种中药可抑制肝微粒体CYP2D6酶活性。

CYP酶药物代谢的研究是中药当前研究的热点问题,有文献报道胡柚汁中分离纯化出的萜类化合物对CYP酶活性具有抑制作用^[2]。银杏叶提取物能明显升高CYP1A1、CYP1A2、CYP2B1、CYP2E1及CYP3A等酶活性^[3]。葛根素使CYP2A1、CYP1A1/2、CYP3A1、CYP2C11活性增加,粗提物使CYP1A2、CYP3A1、CYP2B1活性增加^[4]。吴茱萸次碱对CYP1A2、CYP2C19、CYP2E1和CYP2D6的活性有显著抑制作用,而对CYP2C9和CYP3A4的活性无显著影响^[5]。甘遂可通过诱导肝脏CYP2E1的表达与活性上升,促使其所含的前致癌物和前毒物转化为致癌物和毒物,导致对机体的毒性作用^[6]。但上述研究多涉及一味中药或其提取物,而本实验是针对CYP2D6这一种亚型,快速、简便的筛选方法,可在短期内筛选出对CYP2D6有抑制作用的中药或有效成分。

本研究通过抑制实验,在体外肝微粒体重组系统中直接加入受试药物,药物在体外大鼠肝微粒体



1-DX 2-DB 3-DM

A-对照品 B-对照组 C-绿原酸 D-连翘苷 E-人参皂苷 F-芦丁 G-槲皮素 H-盐酸小檗碱 I-熊果酸

J-黄芩苷 K-银杏叶提取物 L-红景天提取物 M-厚朴提取物 N-穿琥宁注射液 O-舒血宁注射液

P-生脉注射液 Q-清开灵注射液 R-黄芪注射液 S-盐酸川芎嗪注射液

A-reference substance B-control group C-chlorogenic D-forsythine E-ginsenoside F-rutin G-quercetin H-berberine hydrochloride I-ursolic acid J-baicalin K-Ginkgo biloba leaf extract L-Rhodiola rosea M-Flos Magnoliae

Officinalis extract N-Chuanhuning Injection O-Shuxuening Injection P-Shengmai Injection

Q-Qingkailing Injection R-Huangqi Injection S-Tetramethylpyrazine Hydrochloride Injection

图 1 对照品(A)、对照组(B)、17 种中药组(C~S)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substance (A), control group (B), and liver microsomes of 17 kinds of CMM groups (C-S)

重组系统中可能和 DM 竞争酶位点,使探针药物 DM 的代谢率降低,从而可以筛选出经过 CYP2D6 代谢的药物。本实验结果表明槲皮素、黄芩苷、厚朴

提取物、清开灵注射液和盐酸川芎嗪注射液可明显降低 DM 的代谢率 ($P < 0.01$),从而初步筛选出经 CYP2D6 亚型酶代谢的这 5 种中药。值得注意的是

药物对 CYP2D6 亚型酶的长效作用和本实验研究的短效作用是有差别的,它涉及到转录和翻译水平的变化,必须在体内长期药物实验中完成,尽管如此,本研究为下一步全面研究药物对 CYP2D6 的影响(诱导或抑制,长效或短效)奠定了基础,从而使药物研究的目的性更加明确,避免了实验中受试药物选择的盲目性。

本实验中选用的中药有成分单一的中药单体,有成分较为简单的中药提取物以及成分复杂的中药合剂,然而通过本实验中色谱条件及提取方法的优化,实验结果肝微粒体中 DM、DX 和 DB 三者峰型稳定,分离良好,与干扰成分也可较好的分离。因而本实验方法可以克服中药成分复杂的难点,适用于大多数的药物对 2D6 亚型酶作用的研究。

对于 CYP 药物代谢的研究,有很多方法。有文献报道应用不同 CYP 亚型抗体封闭酶蛋白,HPLC 法测定受试药物代谢率的变化确定药物对酶活性的影响^[7]。用紫外和荧光分光光度法测定肝微粒体 CYP 酶系水平及活性^[8]。应用竞争法反转录-聚合酶链式反应(Competitive RT-PCR)半定量分析考察药物对 CYP 基因表达的影响^[9],采用 RT-PCR 技术检测大鼠肝中 5 种 CYP 同工酶 CYP1A1、CYP2B1/2、CYP2C11、CYP2E1、CYP3A1 mRNA 的表达^[10]。这些方法均是针对一种或几种药物的研究,均未解决受试药物选择的问题,然而本实验方法从另一个角度出发针对 CYP2D6 这一种亚型筛选出在肝微粒体中能抑制其代谢的药物,并且不受药物种类的限制。但是本实验只能针对一个亚型定性地说药物在肝微粒体中对 CYP2D6 的抑制作用,难以从量上对各个药物的抑制能力进行精确描述,主要原因是中药成分复杂,难以统一它们在肝微粒体中的浓度,所以作为一种药物筛选实验是很合适

的。另外,本实验提出了一种筛选药物思路,可以用于经其他亚型酶代谢药物的筛选。

References:

- [1] Fu L Q, Wu D Z. Cytochrome P450 and genetic polymorphism [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2001, 17(1): 21-25.
- [2] Tassanayakul W, Guo L Q, Fukuda K, et al. Inhibition selectivity of grapefruit juice components on human cytochrome P450 [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 378 (2): 356-363.
- [3] Yang X F, Wang N P, Lu W H, et al. Effects of *Ginkgo biloba* extract and tanshinone on cytochrome P450 isozymes and glutathione transferase in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24(10): 1033-1038.
- [4] Guerra M C, Speroni E, Broccoli M, et al. Comparison between Chinese medical herb *pueraria lobata* crude extract and its main isoflavone *puerarin* antioxidant properties and effects on rat liver CYP-catalysed drug metabolism [J]. *Life Sci*, 2000, 67(24): 2997-3006.
- [5] Cao Y J, Cao W, Yu Q, et al. Inhibitory effect of *rutaecarpine* on cytochrome P450s in human liver microsome [J]. *Cent South Pharm* (中南药学), 2005, 3(4): 243-245.
- [6] Dai F G, Luo R, Wang Y G, et al. Compatible effects of *Euphorbia* and *Glycyrrhiza* on CYP2E1 expression and activity in rat liver [J]. *Acta Acad Med Mil Tert* (第三军医大学学报), 2005, 27(8): 742-744.
- [7] Ma X C, Wang H X, Xin J, et al. Identification of cytochrome P4501A2 as enzyme involved in the microsomal metabolism of *Huperzine A* [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 461: 89-92.
- [8] Zhu M, Wang R, Zhang Y Q, et al. Study on hepatic cytochromes P450 methodology in Wistar rats [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther* (中国临床药理学与治疗学), 2004, 9 (5): 500-503.
- [9] Yang X F, Wang N P, Zeng F D. Effects of ginkgolides on gene expression of hepatic cytochrome P-450 in rats [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30(13): 1009-1013.
- [10] Wang Y G, Gao Y, Chai B X, et al. Modulation of the activities and mRNA expression of cytochrome P450 isoenzymes in rat liver by *Panax ginseng* and coadministration with *Veratrum nigrum* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29(4): 366-400.

五加皮 Age 蛋白的药动学研究

赵学涛,单保恩*,张 静

(河北医科大学第四医院 科研中心暨河北省肿瘤基因诊断、预防和治疗重点实验室,河北 石家庄 050011)

摘 要:目的 研究五加皮 Age 蛋白的药动学特征。方法 采用氯胺 T 法用¹²⁵I 标记 Age 蛋白,形成¹²⁵I-Age 复合

收稿日期:2006-09-28

基金项目:国家自然科学基金资助项目(3037153);河北省自然科学基金资助项目(C2004000610)

作者简介:赵学涛(1977—),男,河北省阜城县,硕士研究生,研究方向为肿瘤免疫及抗肿瘤药物开发。

Tel: (0311) 86095247 E-mail: ZXT7701@yahoo.com.cn

* 通讯作者 单保恩 Tel: (0311) 6033941-283 Fax: (0311) 6992004 E-mail: baoshan@yahoo.com.cn