

组的 AUC 为 $259.51 \text{ min} \cdot \mu\text{g/mL}$, 水溶液组的 AUC 为 $130.19 \text{ min} \cdot \mu\text{g/mL}$, 微乳组较水溶液组显著增加, 说明微乳组可以显著提高川芎嗪在脑部的分布, 增加脑药量。

肝药浓度微乳组经时变化与脑药浓度类似, 药物浓度峰出现在 5 min , 水溶液组肝药浓度在 2.5 min , 水溶液达峰时间较微乳组快, 说明微乳在肝中有一定的缓释作用。比较肝药峰浓度, 微乳组为 $10.66 \mu\text{g/mL}$, 水溶液只有 $6.33 \mu\text{g/mL}$, 并且微乳组的 AUC 大于水溶液组, 提示微乳亦改变了川芎嗪药物在肝中的药动学, 增加了肝中的分布。

3 讨论

黄志力等^[4]通过对川芎嗪静注后大鼠组织中药物浓度经时变化的观察, 川芎嗪的肝脏摄取率最高, 其他依次为心脏、脾、脑、睾丸、肺、肾、肌肉、血浆, 其主要分布于血流丰富的大循环和组织, 脑内的分布不高。而本实验川芎嗪微乳与水溶液的比较证明了: 微乳可以改变川芎嗪在血、脑、肝的药动学行为, 分布均有所增加, 并且脑药分布提高明显。微乳增加了川芎嗪在血浆、脑、肝内浓集的倾向, 血浆中药物浓度增加说明周围组织中药物浓度会相对减少, 此时脑药浓度的显著提高可能是由于微乳中的油相组分增强了药物与脑组织的亲和性, 同时微乳属于纳米微粒载药体系, 可使微乳携带包裹于内相(油相)的药物迅速通过血脑屏障, 提高药物在脑内的分布^[5]。由以上结果预测, 川芎嗪微乳具有脑靶向性。川芎嗪常用于脑血管类疾病的治疗, 但脑内的分布

并不高, 所以今后对川芎嗪微乳脑靶向性研究具有十分重要的意义。

实验过程中, 由于小鼠的个体差异以及繁琐的样品前处理过程, 实验数据难免产生误差。而与传统的样品采集和处理技术相比, 微透析则较有优势^[6]: 微透析对取样部位的伤害很小, 几乎不影响组织中的生理过程, 得到的样品更能反映物质进入人体后的实际变化; 不改变组织细胞外液中的液体平衡, 既可以对同一组织进行长时间连续采样, 也可以对同一动物进行多个部位采样, 用较少的实验动物就可以得到足够的数据, 避免了由于动物的个体差异所造成的实验误差; 其所得样品干净, 可以直接进行样品分析, 省去了繁琐的样品前处理步骤。所以在今后对川芎嗪微乳脑靶向的研究中可以利用微透析采样技术, 避免不必要的误差, 使实验结果更加可靠。

参考文献:

- [1] 舒冰, 周重建, 马迎辉, 等. 中药川芎中有效成分的药理作用研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22(9): 1043-1047.
- [2] Lawrence M J, Gareth D R. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2000, 45: 89-121.
- [3] 王利胜, 袁爱贤, 韩坚, 等. HPLC 法测定川芎嗪在小鼠血浆、脑、肝中的含量 [J]. 中国药房, 2008, 19(9): 654-656.
- [4] 黄志力, 桂常青, 孙瑞元. 盐酸川芎嗪在大鼠体内的分布 [J]. 中国药理学通报, 1994, 10(4): 297-299.
- [5] 全新勇, 黄春玉, 姚静, 等. 尼莫地平微乳在小鼠体内的分布及靶向性评价 [J]. 中国药科大学学报, 2002, 33(4): 293-296.
- [6] 韩冬, 班春林, 崔黎丽, 等. 微透析技术及在药理学中的应用进展 [J]. 药学实践杂志, 2005, 23(3): 139-142.

丹参酮 A 对大鼠细胞色素 P450 酶的诱导作用

和凡^{1,2}, 钟国平², 赵立子², 毕惠嫦², 黄民^{2*}

(1. 广州市妇女儿童医疗中心, 广东 广州 510120; 2. 中山大学药学院, 广东 广州 510080)

摘要:目的 研究丹参酮 A 对大鼠细胞色素 P450 酶的诱导作用。方法 丹参酮 A 7、20、60、180 mg/(kg·d) 4 个剂量组, 雄性 SD 大鼠连续 ig 7 d, 取肝脏组织, 应用体外“cocktail”方法, 反转录-聚合酶链反应, 免疫印迹杂交方法分别检测 CYP450 酶活性、基因表达和蛋白表达的变化。结果 丹参酮 A 能显著诱导 CYP1A2 及 CYP2E1 的活性以及基因、蛋白表达, 且呈剂量依赖性; 高剂量组能增强 CYP2C19 的活性, 但对基因、蛋白表达没有影响; 对包括 CYP3A1 在内的其他亚型没有影响。结论 丹参酮 A 对大鼠多种 CYP450 亚型有诱导作用。

关键词:丹参酮 A; 细胞色素 P450 酶; 诱导

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)06-0938-05

* 收稿日期: 2008-08-11

基金项目: 广东省高等学校中药有效性与安全性重点实验室开放基金 (kf07007)

作者简介: 和凡 (1978—), 男, 广东省广州市人, 主管药师, 博士研究生, 至今已在国内外发表论文 10 余篇, 主要从事药物代谢酶和临床药理学研究。Tel: (020) 81330652 E-mail: hefan_yh@tom.com

* 通讯作者 黄民 E-mail: huangmin@mail.sysu.edu.cn

丹参酮 A (tanshinone A, TS A) 是丹参 *salvia miltiorrhiza* Bunge 根中的二萜醌类脂溶性有效成分,具有多种药理作用,如心血管作用、抗肿瘤、抗氧化、抗菌消炎作用等^[1],有良好的新药开发前景。在新药的研发中,代谢性相互作用非常重要,其主要是由细胞色素 P450 酶 (CYP450) 所介导的。本实验室研究提示 CYP2C19、CYP3A、CYP2D6 主要参与了丹参酮 A 的代谢^[2];体外肝微粒体孵育实验亦表明丹参酮 A 能强烈抑制 CYP1A2 的活性^[3]。然而丹参酮 A 在体内对主要 CYP450 的活性、基因以及蛋白表达的影响 (尤其是诱导),国内外尚未见报道。本实验旨在进一步研究丹参酮 A 在大鼠体内对 CYP450 酶的作用并探讨其机制,为完善该药的代谢性相互作用和指导临床合理用药奠定基础。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂与仪器:丹参酮 A 由中山大学药学院药物化学教研室提取,质量分数大于 99.8%;非那西丁 (PHE)、扑热息痛 (PAR)、甲苯磺丁脲 (TOL)、4-羟基甲苯磺丁脲 (OHTOL)、奥美拉唑 (OME)、右美沙芬 (DEXM)、氧去甲基右美沙芬 (DEXP)、氯唑沙宗 (CHL)、6-羟基氯唑沙宗 (OHCHL)、硝苯地平 (NIF)、氧化硝苯地平 (DNIF) 购自美国 Sigma 公司;5-羟基奥美拉唑 (OHOME) 瑞典 Astra Zeneca 公司惠赠;氯雷他定 (内标, LOR)、苯巴比妥 (PB)、地塞米松 (DEX) 均购自中国药品生物制品检定所;NADPH tetrasodium salt 购自德国 Appli Chem 公司;总 RNA 提取试剂 (Trizol) 购自美国 Promega 公司;反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 试剂购自日本 TaKaRa 公司;实验所用引物由上海生物工程技术服务有限公司合成;抗体:羊抗鼠 IgG-HRP (CYP1A2),兔抗鼠 IgG-HRP (CYP2E1),兔抗鼠 IgG-HRP (CYP3A1),小鼠抗大鼠 IgG-HRP (β -actin) 购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;甲醇、醋酸乙酯为色谱-质谱纯购自美国 Tedia 公司;水为超纯水;其他试剂为分析纯。

Finnigan TSQUANTUM 型三重四极杆液相色谱-质谱系统,配有电喷雾离子化源、Surveyor 输液泵及自动进样器以及 Xcalibur 1.3 数据采集软件、Lcquan 数据处理软件,美国 Finnigan 公司产品;C₁₈ XTerra MS 分析柱 (100 mm × 2.1 mm, 5 μ m),美国 Waters 公司产品;PTC2100 型聚合酶链反应 (PCR) 扩增仪,Biometra 公司产品;Mini—

PROTEAN3 电泳系统,Mini Trans-Blot 转膜系统,GDS-8000 UVP 凝胶成像系统 (含 LAB WOEK45 处理软件),美国 BIO-RAD 公司产品。

1.2 动物及处理:SD 大鼠,清洁级,雄性,250 ~ 280 g,购于中山大学医学院实验动物中心。随机分为 7 组,每组 3 只。药物均溶解或混悬于 0.2% 的羧甲基纤维素钠溶液。阳性对照组:地塞米松 (CYP3A1 的对照) 100 mg/(kg · d),ip,每天 1 次,连续 4 d;苯巴比妥 (其他亚型的对照) 80 mg/(kg · d),ip,每天 1 次,连续 3 d。丹参酮 A 组:4 个质量浓度分别为 7、20、60、180 mg/(kg · d),ig,每天 1 次,连续 7 d。空白对照组:等量的 0.2% 羧甲基纤维素钠溶液,ig,每天 1 次,连续 7 d。大鼠处死前 12 h 禁食,末次给药 24 h 后断头处死取肝脏。

1.3 探针底物法检测 CYP 活性:按照差速离心法制备大鼠肝微粒体^[3]。不同的 CYP 亚型活性根据本实验室建立的体外“cocktail”模型检测^[3]:孵育体系总体积 500 μ L,包含微粒体蛋白 (0.25 mg/mL),磷酸盐缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.4),探针混合物 10/100/5/2.5/20/5 μ mol/L PHE/TOL/OME/DEXM/CHL/NIF (1A2/2C6/2C11/2D2/2E1/3A1),37 $^{\circ}$ C 水浴预孵育 5 min,加入 NADPH (1 mmol/L) 启动反应,20 min 后,加醋酸乙酯 2 mL 终止反应,同时加入内标工作液 (氯雷他定 10 μ mol/L) 10 μ L,相应的 6 种代谢物 PAR/OHTOL/OHOME/DEXP/OHCHL/DNIF 用 LC/MS/MS 分析定量。

1.4 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 分析^[4]:按试剂盒说明方法,提取总 RAN。逆转录合成第 1 链互补脱氧核糖核酸 (cDNA),然后通过特异性引物 PCR 扩增大鼠肝组织中的 CYP1A2、CYP3A1 基因和内部参照物“管家”基因即亲环素 (cyclophilin, CYC) 基因 (CYP1A2 的上下游引物分别为 5'-GT-CACCTCAGGGAATGCTGTG-3' 和 5'-GTTGACAACTCTTCTCCTGAGG-3';CYP3A1 的上下引物分别为 5'-ATCCGATATGGAGATCAG-3' 和 5'-GAAGAAAGTCCTTGTCTGC-3'。CYC 的上下游引物分别为 5'-CTTCGACATCACGGCTGATGG-3' 和 5'-CAGGACCTGTATGCTTCAG-3'),反应程序均为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,94 $^{\circ}$ C 变性 0.5 min,56 $^{\circ}$ C 退火 0.5 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,循环 30 次,最后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检查,GDS-8000 UVP 成像系统定量分析。

1.5 免疫印迹杂交 (Western blotting) 分析^[5]:大

鼠肝微粒体中的 CYP1A2、3A1、2E1 和 β -actin 蛋白表达用 Western blotting 检测。肝微粒体用 10 % 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转移至硝酸纤维素膜。该膜经过封闭,预孵一抗、二抗,浸入增强发光化学液中 60 s,曝光后用 GDS-8000 UVP 成像系统定量分析。

1.6 统计分析:数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,处理组与空白对照组的比较采用 t 检验。

2 结果

表 1 丹参酮 A 对大鼠 CYP 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effect of TS A on CYP450 activity of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	CYPs 酶活性/ (pmol · mg ⁻¹ · min ⁻¹)					
		1A2	2C9	2C19	2D6	2E1	3A4
空白对照	-	228.6 ±44.9	144.0 ±14.8	239.6 ±23.0	229.9 ±51.9	603.4 ±151.4	782.2 ±158.8
阳性对照	-	518.9 ±26.8**	190.0 ±65.1	252.3 ±45.2	202.7 ±23.3	935.2 ±23.9*1	1116.7 ±35.4*
丹参酮 A	7	279.9 ±17.6	154.5 ±15.3	236.3 ±21.2	263.2 ±6.3	857.3 ±7.7*	809.3 ±58.9
	20	449.6 ±59.3**	147.0 ±42.5	271.3 ±22.6	267.7 ±16.1	913.9 ±16.9**	832.4 ±40.3
	60	557.2 ±56.8**	141.2 ±47.7	303.2 ±8.9**	258.0 ±40.8	985.5 ±122.0**	794.4 ±106.9
	180	796.5 ±70.9**	143.6 ±14.7	317.7 ±12.2**	239.5 ±34.7	1274.4 ±86.8**	798.5 ±24.9

与空白对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

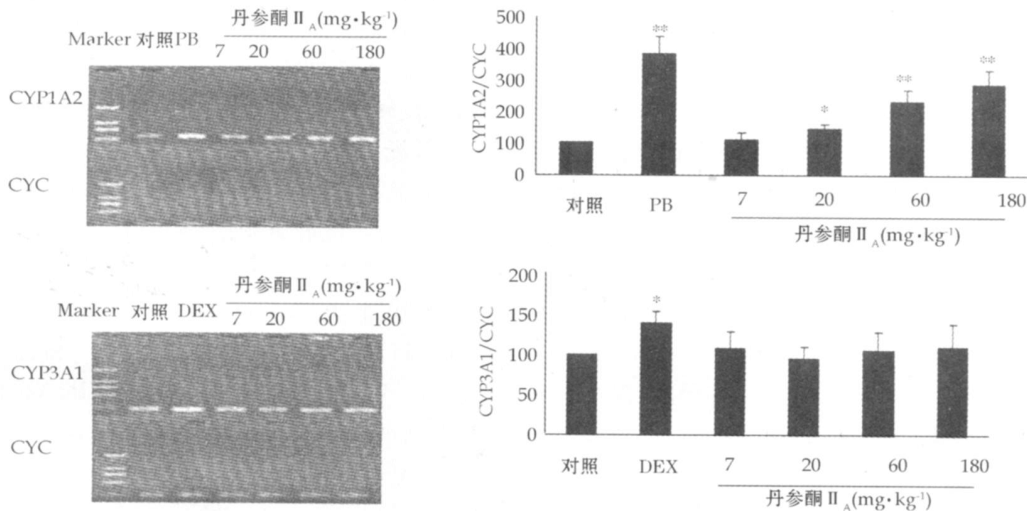
阳性对照组:地塞米松 (100 mg/kg) 为 CYP3A1 的对照,苯巴比妥 (80 mg/kg) 为其他亚型的对照

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs blank control group; positive control group: DEX (100 mg/kg) for CYP3A1; PB (80 mg/kg) for other CYPs

2.2 丹参酮 A 对大鼠 CYP1A2 和 CYP3A1 基因表达的影响:总 RNA 提取后电泳,紫外灯下观察,可见 28 S、18 S、5 S 3 条带,表明所提取的 RNA 结构完整,RNA 样本的 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 值为 1.78,表明所提取的 RNA 纯度较高。丹参酮 A 能诱

2.1 丹参酮 A 对大鼠 6 种 CYP 酶活性的影响:丹参酮 A 能明显的诱导大鼠肝脏 CYP1A2 和 CYP2E1 的活性,且呈剂量依赖性:7、20、60、180 mg/(kg · d) 4 个剂量组使 CYP1A2 的活性分别增加了 22.4 %、96.9 %、144.3 %、249.1 %;使 CYP2E1 的活性分别增加了 42.1 %、51.4 %、63.3 %、111.3 %。60、180 mg/(kg · d) 组也能诱导 CYP2C19 的活性,分别增加了 26.8 %、32.6 %。丹参酮 A 对其他亚型没有影响。结果见表 1。

导大鼠肝脏 CYP1A2 的基因表达,20、60、180 mg/(kg · d) 组分别比对照组提高 46.2 %、132.5 %、187.1 %,7 mg/(kg · d) 组则没有影响。4 个剂量组对 CYP3A1 的基因表达无影响。结果见图 1。



与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

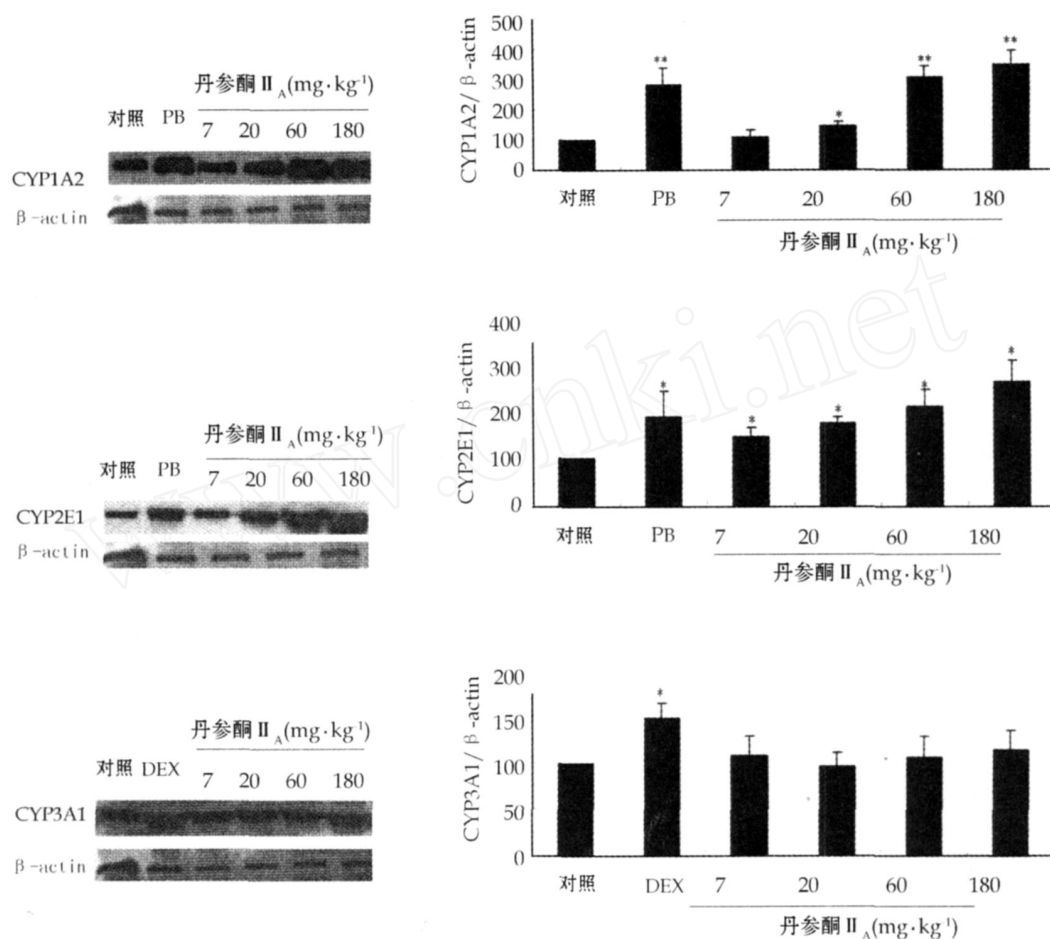
图 1 丹参酮 II A 对大鼠 CYP1A2 及 CYP3A1 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Effect of TS A on rat CYP1A2 and CYP3A1 mRNA expression ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.3 丹参酮 A 对大鼠 CYP1A2、CYP2E1、CYP3A1 蛋白表达的影响:丹参酮 A 能诱导大鼠 CYP1A2 的蛋白表达,20、60、180 mg/(kg · d) 组

分别比对照组提高 52.7 %、205.2 %、242.5 %,7 mg/(kg · d) 组则没有影响。4 个剂量组也能诱导 CYP2E1 蛋白表达,分别提高了 32.6 %、76.2 %、

113.8 %、164.4 %。对 CYP3A1 的蛋白表达则没有影响。结果见图 2。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图 2 丹参酮 A 对大鼠 CYP1A2、CYP2E1 及 CYP3A1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig.2 Effect of TS_A on rat CYP1A2, CYP2E1, and CYP3A1 protein expression ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3 讨论

丹参酮 A 作为有开发前景的新药,需要研究其代谢途径以及对 CYP450 酶的影响(抑制、诱导),这是明确药物相互作用的基础。本实验室前期研究表明 CYP2C19、CYP3A、CYP2D6 主要参与了丹参酮 A 的代谢,丹参酮 A 在体外能强烈抑制 CYP1A2 的活性。在此基础上,本实验进一步研究了丹参酮 A 在大鼠体内对 CYP450 酶的诱导作用。结果显示,丹参酮 A 能显著诱导 CYP1A2 的基因、蛋白表达以及活性,并且呈剂量依赖性,这和其能与芳香烃受体(AhR)结合,而 AhR 作为一种配基激活转录因子,继而上调 CYP1A2 的表达有关。丹参酮 A 对于 CYP2E1 的基因、蛋白表达和活性的影响也是一致的。临床上大约 60 % 的药物经 CYP3A 代谢,而丹参酮 A 对 CYP3A1 没有影

响,这对于避免药物相互作用也许是个利好的现象。高剂量丹参酮 A 也能提高 CYP2C19 的活性。由于实验条件所限,本研究没有考察更多的 CYP 酶亚型的基因和蛋白表达的影响,需要进一步的研究。丹参酮 A 能与多种 CYP 亚型发生相互作用,这增加了临床上合并用药发生相互作用的可能性。在中药活性成分的研究中,人们发现药物相互作用的类型和给药剂量、频率、途径均有关系,也和种属差异有关。所以必须进一步的深入研究,才能明确丹参酮 A 的药物相互作用,指导其临床合理用药。

参考文献:

- [1] 梁 勇, 羊裔明, 袁淑兰. 丹参酮药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中草药, 2000, 31(4): 304-306.
- [2] 毕惠嫦, 和 凡, 温莹莹, 等. 丹参酮 A 在大鼠肝微粒体酶中的代谢动力学 [J]. 中草药, 2007, 38(6): 882-886.
- [3] He F, Bi H C, Huang M, et al. Rapid determination of six

metabolites from multiple cytochrome P450 probe substrates in human liver microsome by liquid chromatography/mass spectrometry: application to high-throughput screening for cytochrome P450 inhibition effect of terpenoids [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21: 635-643.

[4] 苏启表, 和凡, 卢宇靖, 等. 抗肿瘤活性物 SYU IQ25 对

大鼠肝组织细胞色素 P450 基因表达的影响 [J]. *中国基层医药*, 2006, 13(5): 721-722.

[5] Deng Y, Bi H C, Zhao L Z, et al. Induction of cytochrome P450s by terpene trilactones and flavonoids of the *Ginkgo biloba* extract EGb 761 in rats [J]. *Xenobiotica*, 2008, 38: 465-481.

广藿香挥发油对肠屏障功能的保护作用

谢肄聪, 唐方*

(天津医科大学总医院 中医科, 天津 300052)

摘要:目的 研究广藿香挥发油对缺血-再灌注大鼠肠屏障功能的保护作用。方法 采用肢体缺血-再灌注模型, 观察肠上皮组织形态、肠黏液分泌量及肠黏膜肥大细胞数目, 检测血浆二胺氧化酶 (DAO) 活性。结果 与对照组比较, 模型组小鼠肠黏膜结构损伤明显, 肠黏液分泌量明显减少 ($P < 0.01$), 肥大细胞数目明显增多 ($P < 0.01$), 血浆 DAO 活性降低 ($P < 0.01$)。广藿香挥发油能显著提高肠黏液分泌量 ($P < 0.01$), 能显著减少肥大细胞数目 ($P < 0.05, 0.01$), 并能降低血浆 DAO 活性 ($P < 0.05, 0.01$), 减轻肠黏膜上皮结构的损伤。结论 广藿香挥发油对缺血-再灌注损伤的肠屏障功能的保护作用机制与增加肠黏液分泌量, 减少肠黏膜肥大细胞数目, 降低 DAO 活性并维持正常的肠黏膜上皮结构有关。

关键词:广藿香挥发油; 肠屏障; 肥大细胞; 二胺氧化酶

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)06-0942-03

广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 为芳香运脾法的常用、主要药物。广藿香为唇形科刺蕊草属植物。其味辛, 微温, 归脾、胃、肺经, 具有芳香化浊, 开胃止呕, 发表解暑的功能, 临床用以芳香除秽, 疏通中州, 恢复脾胃受纳运化。广藿香含挥发油约 1.5%, 广藿香醇为挥发油主要成分, 占 52%~57%。本实验以肢体缺血-再灌注大鼠为模型, 通过对肠组织形态学观察, 肠黏液分泌量、血浆二胺氧化酶 (DAO) 活性及肠黏膜肥大细胞数目的测定来阐述广藿香挥发油成分对肠屏障功能的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物: 一级 Wistar 大鼠 50 只, 雌雄不限; 平均体重 (250 ± 20) g, 购自军事医学科学院四所, 实验大鼠适应性平衡饲养 1 周后用于实验。

1.2 药品与试剂: 广藿香挥发油 (主要含广藿香醇) 采用蒸馏法提取, 生药产地广东, 制成含生药 50 mg/g 原液, 由天津达仁堂制药厂提供。投药前用 0.1% 羧甲基纤维素钠溶液稀释。磷酸缓冲液, 0.2 mol/L, pH 7.2, 购自北京鼎国生物技术发展中心。

辣根过氧化物酶溶液, 40 μg/mL, 购自北京鼎国生物技术发展中心。邻联 (二) 茴香胺, 5 mg/mL, 购自 Sigma 公司。尸胺二氢氯化物溶液, 1.75 mg/mL, 购自 Sigma 公司。二胺氧化酶 (DAO) 标准品, 购自 Sigma 公司。

1.3 模型制备: 肢体缺血-再灌注模型制备采用改良 Yassin 法^[1]。于造模前 24 h 禁食, 以 10% 水合氯醛 (0.3 mL/100 g) ip 行术前麻醉。约 5 min 后, 使用统一拉力强度橡皮筋, 结扎实验大鼠双侧大腿根部, 环绕 2 周, 持续 3 h, 造成双下肢缺血。迅速解除结扎, 形成肢体再灌注, 18 h 后结束实验。对照组在行腹腔麻醉后, 不做结扎处理。

1.4 分组及给药: 造模前将实验动物随机分为对照组、模型组各 10 只, 中药组 30 只。中药组用量按 200 mg/(kg·d) 的 10 倍、15 倍、20 倍计算, 分别为 2、3、4 g/(kg·d), 每投药组各 10 只。每次 ig 2 mL, 对照组及模型组给予等量 0.1% 羧甲基纤维素钠溶液, 各组连续 ig 5 d。于实验开始第 6 天, 模型组及中药组进行肢体缺血-再灌注造模。对照组不作任何处理。

* 收稿日期: 2008-10-06

作者简介: 谢肄聪 (1969—), 女, 天津市人, 副主任医师, 主要从事中医药消化系统疾病防治及研究工作。

E-mail: xieyicong2006@126.com

* 通讯作者 唐方 Tel: (022) 60363599 E-mail: zhongyi3599@sina.com