

多反应监测方法评估丹参和人参对大鼠肝药酶的调控作用

程汉兴^{1,2}, 孙爱华², 王宇光³, 高月^{3*}, 姜颖^{1,2*}

1. 安徽医科大学, 合肥 安徽 230032

2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京蛋白质组研究中心, 蛋白质组学国家重点实验室, 北京 102206

3. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所 药理毒理研究室, 北京 100850

摘要: **目的** 建立新型特异性强的高通量细胞色素 P450 (CYP) 丰度测定方法, 以人参和丹参为工具药考察药物对肝药酶的调控作用。 **方法** 采用基于质谱多反应监测 (MRM) 模式方法, 以串联配体法 (QconCAT) 表达合成的重标肽段作为内标对丹参与人参处理后, 对 9 种大鼠肝脏 CYP (CYP1A1、CYP1A2、CYP2B1、CYP2B2、CYP2C6、CYP2C11、CYP3A1、CYP3A2、CYP17A1) 蛋白特异肽段进行定量, 探讨丹参和人参对肝脏 CYP 酶的表达上调或者下调作用。 **结果** QconCAT 重标合成内标肽段与肝脏样品肽段质谱表征一致, 与对照组相比, 丹参与人参作用后, 对大鼠肝内 CYP1A1、CYP2B2 的表达均具有下调作用, 对 CYP1A2、CYP2B1 的表达均具有上调作用。丹参同时下调 CYP3A2、CYP2C11 和 CYP17A1 的表达, 而人参则上调这 3 种蛋白的表达。建立了 MRM 方法对大鼠肝脏 CYP 蛋白定量方法, 定量方法相对标准偏差在 5.9% 以内, 相对误差在 6.8% 以内, 定量标准曲线的线性系数大于 0.9。 **结论** 对 9 种大鼠肝脏 CYP 酶进行定量研究, 其中 CYP2B1、CYP2B2 和 CYP17A1 是首次进行蛋白质定量研究。丹参与人参对 CYP 亚型产生的调控作用存在差异性, 为药物配伍实践中提供临床参考价值, 避免不良药物相互作用反应。

关键词: 人参; 丹参; CYP450; 多反应监测; 药物配伍

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)20-3647-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.20.015

Evaluation of regulation of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax ginseng* on rat liver CYP450 using multiple reaction monitoring

CHENG Han-xing^{1,2}, SUN Ai-hua², JIANG Ying^{1,2}

1. Anhui Medical University, Hefei 230032, China

2. Beijing Proteome Research Center, State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 102206, China

3. Department of Pharmacology and Toxicology, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Abstract: Objective To establish a new specific and high-throughput method for CYP450 quantification, and to investigate the effect of drugs on rat liver CYP450 using *Salvia miltiorrhiza* and *Panax ginseng* as tool drugs. **Methods** Mass spectrometry with multiple reaction monitoring (MRM) was applied to quantify nine rat liver enzyme CYP450 isoforms from the rat model with *S. miltiorrhiza* and *P. ginseng*. With QconCAT heavy peptides as internal standard, we aimed to assess the effects of *S. miltiorrhiza* and *P. ginseng* on CYP450 isoforms. **Results** The relative standard deviation and relative error of this method were less than 5.9% and 6.8%, respectively, with good linearity ($r^2 > 0.9$). Nine CYP450s isoforms (CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, CYP2B2, CYP2C6, CYP2C11, CYP3A1, CYP3A2, and CYP17A1) in rat liver microsome treated with *S. miltiorrhiza* and *P. ginseng* were also quantified. Compared with the control, *S. miltiorrhiza* downregulated the expression levels of CYP1A1, CYP2B2, CYP3A2, CYP2C11, and CYP17A1, while upregulated CYP1A2 and CYP2B1. For the effects of *P. ginseng*, the expression of CYP1A1 and CYP2B2 was decreased, while CYP1A2, CYP2B1, CYP3A2, CYP2C11, and CYP17A1 were increased. **Conclusion** We successfully construct a method with MRM to quantify rat liver CYP450 isoforms. And we firstly quantify CYP2B1, CYP2B2, and CYP17A1 in rat liver. The results reveal the regulation of CYP450 by *S. miltiorrhiza* and *P. ginseng*, which could provide clinical application for drug compatibility in practice, and avoid adverse drug reactions. **Key words:** *Panax ginseng* C. A. Mey.; *Salvia miltiorrhiza* Bge.; cytochrome P450; multiple reaction monitoring; drug compatibility

收稿日期: 2016-03-21

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973” 计划) (2014CBA02001, 2011CB505304)

作者简介: 程汉兴 (1992—), 男, 硕士, 研究方向为中药与肝脏蛋白质组学研究。Tel: (010)61777061 E-mail: chenghanxing09@126.com

*通信作者 姜颖 (1975—), 女, 研究员, 研究方向为肝脏重要生理病理过程相关的蛋白质组研究。

Tel: (010)61777071 E-mail: jiangying304@hotmail.com

高月 Tel/Fax: (010) 66931312 E-mail: gaoyue@nic.bmi.ac.cn

以细胞色素 P450 酶 (CYP) 系为主的药物代谢酶参与大部分药物在体内的药理代谢途径^[1], 此领域日益受到药理和毒理学研究者的重视。美国 FDA 要求每个新药在临床前研究其代谢的 CYP 酶亚型^[2]。目前, 针对中药药物代谢酶传统定量研究方法具体主要有以下 3 种: 基于免疫印迹法的蛋白丰度定量; 基于实时定量聚合酶链反应的 mRNA 丰度检测; 基于探针药物法的酶活性测定。CYP 酶家族蛋白丰度较低, 同源性高, CYP 酶家族高度同源, 不同亚型的肽段之间存在 3~10 个氨基酸的差异^[3]。免疫印迹法无法对同源性高, 缺乏针对特异抗原决定簇抗体的 CYP 酶亚型进行定量, 例如 CYP3A1 和 CYP3A2, CYP1A2 和 CYP1A1 等; mRNA 水平无法正确评估相应蛋白水平, 2 种实验方法分别存在特异性不强、准确度不高、重现性不好等缺点, 基于探针药物法的酶活性测定方法只针对几种主要的 CYP 酶进行研究, 罕见的 CYP 酶亚型极少有相关报道, 因此需要建立新的特异性更强的高通量 CYP 酶丰度测定方法。中药药理研究中, 需要建立评估中药单用及配伍对 CYP 酶影响的高通量方法。MRM 技术具有灵敏度高、重现性好、准确度高及通量高的特点^[4], 联合同位素标记技术能很好地区分这些序列同源性较高的 CYP 酶亚型并进行定量, QconCAT 法^[5]是通过重组质粒表达特定设计的重型同位素肽段作为内标肽段, 与人工合成重型同位素肽段相比, 成本和纯度上具有优势, 质谱通过预设候选靶蛋白特异肽段的离子对信息, 对符合规则的离子进行信号记录, 计算相关离子峰面积, 进而计算目标蛋白的丰度^[6]。该方法具有成本低、通量高、准确度高的特点。丹参与人参是临床常用的两味中药, 中药十八反理论研究中, 丹参与人参是研究“诸参辛芍叛藜芦”理论中两味常见且临床使用频繁的药物, 人参参与多种药物配伍使用, 如炮制附子、熟地黄、麦冬、白术^[7]等; 丹参与三七、冰片、川芎、葛根配伍使用。丹参与人参配伍的药物种类广泛, 因此将丹参与人参作为 2 个工具药物研究其对 CYP 酶丰度的影响, 评估 2 味药物对 CYP 酶的调控作用, 为临床药物的合理配伍使用提供参考。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 Wistar 大鼠 18 只, 体质量 180~220 g, 雌雄各半, 由军事医学科学院实验动物中心提供,

许可证号 SCXK (军) 2014-008。

1.2 药品与试剂

人参、丹参药材购自河北安国中药材市场, 均经军事医学科学院放射与辐射研究所马百平教授鉴定分别为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根, 唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根, 均符合《中国药典》2015 年版规定。色谱级甲酸、乙腈、甲醇购自 Merck Millipore 公司; 碳酸氢铵、十二烷基硫酸钠、甲叉聚丙烯酰胺和丙烯酰胺、甘氨酸、三羟甲基氨基甲烷均购自 Amresco 公司; 质谱级酶切胰酶 Trypsin 购自美国 Promega 公司; SILAC Protein Quantitation Kit-DMEM 购自美国 Thermo fisher 公司; 二硫苏糖醇 (DTT) 和碘乙酰胺 (IAA) 购自美国 Sigma 公司; 蛋白酶抑制剂 Cocktail 购自 Roche 公司 (货号 04693132001); 谷胱甘肽琼脂糖 4B 购自 GE Healthcare; 还原型谷胱甘肽购自美国 Sigma 公司; BCA Protein Assay Kit 购自美国 Thermo fisher 公司。QconCAT 质粒由上海捷瑞生物工程有限公司合成, GST 质谱级肽段由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

1.3 仪器

高分辨率质谱仪 AB sciex 5500 购自 Sciex 公司, 台式离心机购自 Thermo Fisher 公司; 高速低温离心机购自 Scilogex 公司; 超高速离心机购自 Beckman Coulter 公司; 电泳仪、凝胶成像仪器购自 Bio-Rad 公司; 恒温水浴箱购自北京长风仪器有限公司; MX-5 型涡旋振荡器购自 Scilogex 公司; pH 计、精密电子天平均购自 Mettler Toledo 公司; multiskan MK3 酶标仪购自 Thermo Fisher 公司, 真空浓缩仪购自 Thermo Fisher 公司; Speedvac Plus 型超声破碎仪购自 Ultral Sonics 公司; 旋转培养器购自海门其林贝尔公司, 超纯水仪购自 ELGA 公司; 分光光度计 Smart Spec 3000 购自 Bio-Rad 公司; 磁力搅拌器购自上海司乐仪器公司。

2 方法

2.1 药材提取及给药

取人参或丹参, 称质量后加入 10 倍量水, 浸泡 90 min 后煎煮 3 次, 每次 1 h, 提取液合并, 旋转蒸发浓缩至生药质量浓度为 10 g/L; 收集, 备用。

大鼠随机分成对照组、丹参组、人参组, 每组 6 只。每组大鼠分别 ig 给药, 丹参组和人参组给药剂量均为 10 g/kg^[8], 连续给药 7 d。

2.2 肝微粒体的提取

给药结束后,大鼠断头处死,将血放净后迅速在靠近门静脉处取出肝脏,通过门静脉注入生理盐水将肝脏内血冲洗干净,后用清洗缓冲液反复冲洗肝脏数遍,用滤纸将水份吸干,称肝脏湿质量,将处理好的肝脏剪成1~2 mm的细小碎块,按1:3质量体积比加入匀浆液,将匀浆液倒入匀浆器中,转头匀浆至肝组织完全粉碎呈粉红色糊状,将粉碎的肝组织倒入10 mL离心管中,4 ℃,9 000×g,离心15 min,取上清,将上清液4 ℃,100 000×g,离心60 min,弃上清,得到粉红色沉淀,即为肝微粒体,用重悬缓冲液重悬微粒体沉淀,涡旋混匀分装,蛋白定量,-80 ℃冻存。

2.3 QconCAT 质粒的设计与生成

根据文献报道^[9-10]以及 PeptideAtlas 数据库(www.peptideatlas.org)的鉴定信息,选取相关研究较多,丰度相对较高的9种大鼠 CYP450 蛋白: CYP1A1、CYP1A2、CYP2B1、CYP2B2、CYP2C6、CYP2C11、CYP3A1、CYP3A2、CYP17A1,对这些目标蛋白筛选特异肽段:(1)根据 PeptideAtlas 数据库质谱鉴定结果,剔除含有漏切肽段的肽段,在 NCBI 数据库中对这些肽段序列进行比对,选取特异性的肽段^[11];(2)肽段序列通过 genepattern esp-prediction 在线软件(<http://www.broadinstitute.org/cancer/software/genepattern/proteomics#esp>)^[12]预测打分,分数越高即代表肽段在质谱中检出效应越高,挑选大于0.5分的肽段,选择能被质谱良好捕捉到的肽段序列。将这些蛋白质对应的特异性肽段串联在一起,并转化为基因序列,将设计好的基因序列插入到 pGEX-4T-2 载体上^[13],QconCAT 质粒设计时带上表达 GST 蛋白标签,将基因序列送往上海捷瑞生物工程有限公司进行合成。

2.4 QconCAT 质粒的转化与表达

根据文献报道进行质粒转化实验^[14],构建表达该基因的大肠杆菌菌体。取1 mL培养液基因测序,甘油保存。吸取20 μL菌液于2 mL氨苄青霉素的LB培养基振荡培养10 h,150 r/min,37 ℃,待细菌生长期到指数期[细菌培养液吸光度(*A*)值为0.8],吸取10 μL培养液入SILAC DMEM培养基中[富含重稳定同位素标记精氨酸(L - $^{13}\text{C}_6$ Arginine)和重稳定同位素标记赖氨酸(L - $^{13}\text{C}_6$ lysine)],振荡培养10 h,45 r/min,37 ℃,待细菌生长期到指数期,吸取10 μL到3 mL SILAC DMEM培养基中,

45 r/min,37 ℃,*A*值到1.0后吸取8 μL异丙基硫代半乳糖苷溶液加入到上述细菌培养液,表达3 h后3 000×g离心收集菌体,加入8 μL的蛋白酶抑制剂,500 μL PBS重悬,冰浴中进行超声破碎(超声0.2 s,停1 s,共6 min),至液体澄清后停止,3 000×g离心10 min,取100 μL谷胱甘肽琼脂糖4B,500×g离心5 min,去除上清液,用PBS反复洗涤2次,将裂解液加入到填料中,4 ℃旋转反应2.5 h。500×g离心5 min,取上清,沉淀中加入500 μL PBS洗涤2次。加40 μL洗脱液,室温反应0.5 h。500×g离心3 min,上清保留。上清为纯化蛋白,使用BCA法进行蛋白定量。

2.5 蛋白的酶切和质谱检测

分别取纯化蛋白溶液和肝微粒体蛋白溶液50 μL,加入10 μL 100 mmol/L DTT溶液,56 ℃反应0.5 h,后加入10 μL 100 mmol/L IAA溶液暗处反应0.5 h。加入40 μL胰酶酶切工作液涡旋后于37 ℃水浴反应15 h,酶切结束后冻干除盐,配制100 fmol/μL重标QconCAT肽段溶液,溶剂为A液(0.1% FA+水),取大鼠肝微粒体蛋白质20 μL,使用基于超滤辅助样品制备酶切法^[15]。取2 μL酶切肽段,加入重标肽段1 μL,用A液溶解至20 μL,待上质谱。上样量5 μL。

2.5.1 色谱条件 色谱柱为C₁₈毛细管分析柱(150 mm×75 μm,5 μm),流动相A相为乙腈-水-甲酸(2:98:0.1),B相为乙腈-水-甲酸(98:2:0.1),梯度洗脱程序:0~5 min,95% A;5~65 min,95%~65% A;65~70 min,65%~5% A;70~75 min,95% A;体积流量350 nL/min,柱温55 ℃;进样量5 μL。

2.5.2 质谱条件 正离子模式;喷射电压1 900 V,毛细管温度为240 ℃;采用SRM扫描模式:Q1的分辨率设置为0.7(FWHM);Q2的氩气碰撞压力为0.199 5 Pa(1.5 mTorr);Q3的分辨率设置为0.7(FWHM);循环时间为2 s;质谱扫描范围*m/z* 250~1 250,质谱采集时间为75 min。

2.6 方法的精密度和准确度评估

分别配制3个不同质量浓度的GST肽段(IEAIPQIDK)溶液,分别为10、20、100 fmol/μL。加入1 μL上述溶液到3 μL肝微粒体酶切肽段基质溶液中,再加入内标后质谱检测3次,计算质量浓度值的相对标准偏差(RSD)值和相对误差(RE)值^[16],考察方法的精密度和准确度。

2.7 质谱数据分析

用 skyline 软件 (版本号 v 3.5.1.9926) 对质谱原始结果 wiff 文件进行分析, 通过目的肽段峰强度, 计算 QconCAT 蛋白的标记效率, 通过目的蛋白肽段的平均丰度计算目的蛋白实际丰度。

2.8 目的蛋白标准曲线的绘制

配制 QconCAT 轻标蛋白梯度样品, 分别为 2、10、20、50、200、500 fmol/ μ L, 通过定量结果得到每条 CYP450 特异肽段的定量检测范围和线性方程。用 skyline 软件进行分析^[17], 横坐标为轻标 QconCAT 的上样量, 纵坐标为峰面积, 绘制标准曲线, 计算线性方程和相关系数。

2.9 大鼠肝微粒体目的蛋白丰度测定

将 1 μ g 大鼠肝微粒体蛋白酶切产物与 50 fmol 重标的 QconCAT 肽段混合, 上质谱, 用 skyline 软件进行数据分析。内标重型同位素肽段与样本中轻同位素肽段在质谱同一个保留时间内洗脱流出, 通过内标肽段相应的离子峰面积和样本肽段中离子峰面积进行归一化比较, 计算肽段相应的实际丰度, 相应的蛋白丰度为肽段实际丰度的中位值, 共对大鼠模型肝微粒中 9 种 CYP 酶亚型蛋白进行定量, 分别为 CYP1A1、CYP1A2、CYP2B1、CYP2B2、CYP2C6、CYP2C11、CYP3A1、CYP3A2、CYP17A1。

2.10 数据分析

对目的肽段定量结果使用 skyline 软件对峰面积数据进行处理分析, 计算 QconCAT 蛋白的标记效率, 通过目的蛋白肽段的平均丰度计算目的蛋白实际丰度^[18]。

3 结果与分析

3.1 QconCAT 目的蛋白肽段的设计

选取的 9 个蛋白质对应的 21 条特异肽段, 构建 2 个 QconCAT 质粒表达目的蛋白。最终选取出的目的蛋白对应的特异肽段见表 1。

3.2 QconCAT 肽段离子对的优化

根据前期质谱鉴定信息, 针对每条肽段, 分别选取信号最强的 6 个离子对, 在质谱上进行验证, 选取 3 个信号最合适的离子对进行定量^[19-20]。结果 9 个蛋白的 21 条肽段中, 被检测到 16 条, 未检测到的肽段多为超过 12 个氨基酸和含有修饰基团的肽段, 检测到的肽段优化后离子对见表 2。以 FADLAPIGLPHR 为例, 二级质谱图见图 1。

3.3 方法精密度和准确度的考察

配制 3 种不同质量浓度的 GST 肽段溶液 (10、

表 1 QconCAT 质粒中的目的肽段

Table 1 Selected specific peptide sequences designed in QconCAT plasmids

蛋白	肽段	蛋白	肽段
CYP1A1	HSSFVPFTIPHSTIR	CYP2C1	EALVDLGEEFSGR
	IQEELDTVIGR		ICAGEALAR
	LDENANVQLSDDK		GSFPVSR
CYP1A2	NSIQDITGALFK	CYP3A1	LSRQGLLQPTK
	DNGGLIPQEK	CYP3A2	DIELDGLFIPK
	YTSFVPFTIPHSTTR		DSIAFFQK
	TVQEHYQDFNK		PLPFLGTVLNYYK
CYP2B1	FSDLVPIGVPHR	CYP17A	ANVDSSIGEFTVPK
CYP2B2	FADLAPIGLPHR		SCIGEALAR
CYP2C6	GSFPVAEK		TFTEGIVDATGDR
	FTLTTLR		

表 2 方法优化后 CYP 酶的肽段离子对

Table 2 Ion pairs of specific peptide of cypenzyme after optimization

蛋白	肽段序列	MRM 离子对 (m/z)	
		Q1	Q3
CYP1A1	HSSFVPFTIPHSTIR	863.4	1 168.6, 710.4, 924.5
	IQEELDTVIGR	636.8	660.4, 902.5, 1 031.5
	LDENANVQLSDDK	730.8	464.2, 577.3, 705.3
CYP1A2	DNGGLIPQEK	535.7	501.3, 614.4, 784.5
	NSIQDITGALFK	653.8	1 105.6, 636.4, 864.5
	TVQEHYQDFNK	704.8	651.3, 814.4, 951.4
	YTSFVPFTIPHSTTR	877.4	811.4, 912.5, 1 059.6
CYP2B1	FSDLVPIGVPHR	446.2	409.2, 565.3, 775.4
CYP2B2	FADLAPIGLPH	436.2	1 088.6, 409.2, 579.3
CYP2C6	GSFPVAEK	417.7	347.2, 543.3, 690.4
	FTLTTLR	426.2	490.3, 603.4, 704.4
CYP2C11	IC[CAM]AGEALAR	480.7	616.3, 687.4, 847.4
	GSFPVSR	439.7	391.2, 490.3, 587.3
	EALVDLGEEFSGR	711.3	1 009.5, 894.4, 781.3
CYP3A1	LSRQGLLQPTK	620.9	655.4, 768.5, 896.5
CYP3A2	DIELDGLFIPK	630.3	789.4, 902.5, 1 031.5
	DSIAFFQK	478.2	569.3, 640.3, 753.4
	PLPFLGTVLNYYK	762.9	900.5, 957.5, 1 070.6
CYP17A1	TFTEGIVDATGDR	691.3	634.3, 733.3, 903.5
	SC[CAM]IGEALAR	488.7	559.3, 616.3, 729.4
	ANVDSSIGEFTVPK	735.4	1 070.6, 1 064.6, 777.4

20、100 fmol/ μ L), 使用 3 个浓度样品进行方法定量精确度的考察, 用定量方法检测 3 次, 计算浓度值的 RSD 和 RE, 具体数据见表 3。低、中、高 3 个浓度样品的定量 RSD 在 3.11%~5.91%, 符合定量要求。

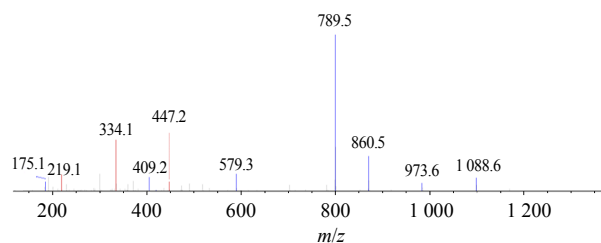


图 1 CYP2B2 特征肽段 FADLAPIGLPHR 的二级质谱图
Fig. 1 MS/MS spectra for CYP2B2 specific peptide (FADLAPIGLPHR)

表 3 GST 肽段的定量与方法精确度

Table 3 Quantification of GST peptide and method precision

样品浓度/ (fmol·μg ⁻¹)	定量值 (fmol·μg ⁻¹)				RSD/%	RE/%
	1	2	3	平均值		
10	9.69	10.85	11.13	10.56	5.91	5.27
20	19.88	20.69	22.76	21.11	5.74	5.26
100	99.32	101.75	106.97	102.68	3.11	6.79

3.4 标记效率和标准曲线的考察

根据标记效率=重标的峰面积/(重标的峰面积+轻标的峰面积)^[21-22]分别计算蛋白各肽段的标记效率,以纯化的 LSRQGLLQPTK 重型同位素标记肽段为例,重标肽段(母离子 m/z 为 633.35)与轻标肽段(母离子 m/z 为 630.34)强度见图 2,20 条肽段标记效率均为 97%以上,可用于后续实验,具体标记效率结果见表 4,其中 16 条 CYP450 特异肽段目的肽段检测丰度与上样量线性关系良好,具体数据见表 5。根据标准曲线定量需要满足在其线性范围内,实验结果显示 CYP1A2 的肽段 NSIQDITGALFK 离子对 653.8/1 105.6, CYP3A2 的肽段 DIELDGLFIPK 离子对 630.3/1 031.5, CYP2C11 的肽段 IC [CAM] AGEALAR 离子对 762.9/1 070.6 线性范围不好,相关系数 (R^2) 小于

0.9,因此在实际计算过程中剔除掉该离子对数据,避免造成干扰。大部分肽段定量曲线呈现很好的线性关系, R^2 均在 0.9 以上,满足方法学要求。

3.5 人参和丹参对大鼠肝脏 CYP 酶调控作用

通过 skyline 软件对数据进行分析并通过标准曲线计算得到丹参作用后大鼠肝脏微粒体中 CYP1A1、CYP1A2、CYP2B1、CYP2B2、CYP2C6、CYP2C11、CYP3A1、CYP3A2 和 CYP17A1 平均蛋白浓度分别为 10.87、24.34、5.43、4.77、29.73、11.49、149.04、42.19、9.84 fmol/μg; 人参作用后的大鼠肝脏微粒体种 CYP1A1、CYP1A2、CYP2B1、CYP2B2、CYP2C6、CYP2C11、CYP3A1、CYP3A2 和 CYP17A1 平均蛋白浓度分别为 9.62、3.56、18.49、5.60、8.61、10.41、183.01、100.04、27.01 fmol/μg。变异系数 (CV) 值在 25% 以内,定量结果见图 3。

与对照组比较,丹参处理组下调 CYP1A1、CYP2B2、CYP2C6、CYP2C11、CYP3A2 和 CYP17A1 蛋白的表达,上调 CYP1A2、CYP2B1 和 CYP3A1 蛋白的表达;人参处理组下调 CYP1A1 和 CYP2B2 蛋白的表达,上调 CYP1A2、CYP2B1、CYP2C6、CYP2C11、CYP3A1、CYP3A2 和 CYP17A1 蛋白的

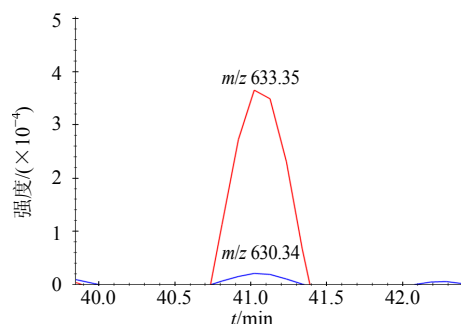


图 2 QconCAT 重标肽段标记效率 (以 LSRQGLLQPTK 肽段为例)

Fig. 2 Labeling efficiency of QconCAT peptide (LSRQGLLQPTK for example)

表 4 重标 QconCAT 肽段的标记效率

Table 4 Labeling efficiency of heavy stable isotope labeled QconCAT peptides

序列	标记效率/%	序列	标记效率/%	序列	标记效率/%
HSSFVPFTIPHSTIR	98.54	FSDLVPIGVPHR	98.58	LSRQGLLQPTK	98.77
IQEELDTVIGR	97.77	FADLAPIGLPHR	95.61	DIELDGLFIPK	98.06
LDENANVQLSDDK	98.26	GSFPVAEK	98.95	DSIAFFQK	98.74
NSIQDITGALFK	98.43	FTLTTLR	98.30	PLPFLGTVLNYYK	97.92
DNGGLIPQEK	97.65	EALVDLGEESGR	98.30	ANVDSSIGEFTVPK	98.50
TVQEHYQDFNK	98.14	ICAGEALAR	98.54	SCIGEALAR	99.68
YTSFVPFTIPHSTTR	99.16	GSFPVSR	99.07	TFTEGIVDATGDR	98.27

表5 QconCAT 肽段的标准曲线信息

Table 5 Standard curves of QconCAT peptides for quantification

蛋白	肽段	离子对(<i>m/z</i>)	线性方程	线性范围/fmol	<i>R</i> ²
CYP1A1	HSSFVPFTIPHSIR	863.4/1 168.6	<i>Y</i> =0.215 <i>X</i> −0.078	2~500	0.92
		863.4/710.4	<i>Y</i> =0.281 <i>X</i> −0.056	2~500	0.96
		863.4/924.5	<i>Y</i> =0.271 <i>X</i> −0.123	2~500	0.96
	IQEELDTVIGR	636.8/660.4	<i>Y</i> =0.256 <i>X</i> −0.055	2~500	0.96
		636.8/902.5	<i>Y</i> =0.267 <i>X</i> −0.073	2~500	0.96
636.8/1 031.5		<i>Y</i> =0.289 <i>X</i> −0.091	2~500	0.92	
CYP1A2	DNGGLIPQEK	730.8/705.3	<i>Y</i> =0.269 <i>X</i> −0.112	2~500	0.97
		535.7/501.3	<i>Y</i> =0.108 <i>X</i> −0.081	2~500	0.95
		535.7/784.5	<i>Y</i> =0.271 <i>X</i> −0.132	2~500	0.97
	NSIQDITGALFK	653.8/1 105.6	<i>Y</i> =0.216 <i>X</i> −0.125	2~500	0.73
		653.8/636.4	<i>Y</i> =0.252 <i>X</i> −0.167	2~500	0.91
		653.8/814.4	<i>Y</i> =0.109 <i>X</i> −0.083	2~500	0.93
	TVQEHYQDFNK	704.8/651.3	<i>Y</i> =0.099 <i>X</i> −0.055	5~500	0.95
		704.8/951.4	<i>Y</i> =0.109 <i>X</i> −0.032	20~500	0.93
CYP2B1	FSDLVPIGVPHR	446.2/565.3	<i>Y</i> =0.113 <i>X</i> −0.050	5~500	0.93
		446.2/775.4	<i>Y</i> =0.110 <i>X</i> −0.085	10~500	0.91
		446.2/409.2	<i>Y</i> =0.256 <i>X</i> −0.141	10~500	0.95
CYP2B2	FADLAPIGLPH	436.2/1 088.6	<i>Y</i> =0.260 <i>X</i> −0.149	100~500	0.95
		436.2/409.2	<i>Y</i> =0.265 <i>X</i> −0.154	20~500	0.96
		436.2/579.3	<i>Y</i> =0.114 <i>X</i> −0.099	20~500	0.92
CYP2C6	GSFPVAEK	417.7/347.2	<i>Y</i> =0.119 <i>X</i> −0.080	50~500	0.95
		417.7/543.3	<i>Y</i> =0.258 <i>X</i> −0.182	2~500	0.92
		417.7/690.4	<i>Y</i> =0.116 <i>X</i> −0.05	2~500	0.96
	FTLTTLR	426.2/490.3	<i>Y</i> =0.115 <i>X</i> −0.101	2~500	0.91
		426.2/603.4	<i>Y</i> =0.101 <i>X</i> −0.033	2~500	0.96
		426.2/704.4	<i>Y</i> =0.108 <i>X</i> −0.088	5~500	0.93
		468.2/678.4	<i>Y</i> =0.107 <i>X</i> +0.122	2~500	0.69
CYP2C11	IC[CAM]AGEALAR	480.7/616.3	<i>Y</i> =0.270 <i>X</i> −0.145	2~500	0.97
		480.7/687.4	<i>Y</i> =0.115 <i>X</i> −0.036	2~500	0.92
		480.7/847.4	<i>Y</i> =0.117 <i>X</i> −0.095	2~500	0.91
		439.7/391.2	<i>Y</i> =0.118 <i>X</i> −0.089	2~500	0.93
	GSFPVSER	439.7/490.3	<i>Y</i> =0.116 <i>X</i> −0.092	2~500	0.92
		439.7/587.3	<i>Y</i> =0.112 <i>X</i> −0.073	2~500	0.92
		620.9/655.4	<i>Y</i> =0.119 <i>X</i> −0.064	5~200	0.93
		620.9/768.5	<i>Y</i> =0.115 <i>X</i> −0.053	2~500	0.93
CYP3A1	LSRQGLLQPTK	620.9/896.5	<i>Y</i> =0.111 <i>X</i> −0.09	2~500	0.92
		630.3/789.4	<i>Y</i> =0.112 <i>X</i> −0.092	2~500	0.92
		630.3/902.5	<i>Y</i> =0.102 <i>X</i> −0.039	5~500	0.95
CYP3A2	DIELDGLFIPK	630.3/1 031.5	<i>Y</i> =0.126 <i>X</i> +0.049	100~500	0.68
		478.2/569.3	<i>Y</i> =0.148 <i>X</i> −0.121	5~500	0.95
		478.2/640.3	<i>Y</i> =0.109 <i>X</i> −0.083	5~500	0.91
	DSIAFFQK	478.2/753.4	<i>Y</i> =0.116 <i>X</i> −0.07	5~500	0.90
		691.3/634.3	<i>Y</i> =0.253 <i>X</i> −0.151	5~500	0.91
CYP17A1	TFTEGIVDATGDR	691.3/733.3	<i>Y</i> =0.117 <i>X</i> −0.074	2~500	0.90
		691.3/903.5	<i>Y</i> =0.171 <i>X</i> −0.069	2~500	0.92
		488.7/559.3	<i>Y</i> =0.254 <i>X</i> −0.171	2~500	0.91
	SC[CAM]IGEALAR	488.7/616.3	<i>Y</i> =0.150 <i>X</i> −0.089	2~500	0.96

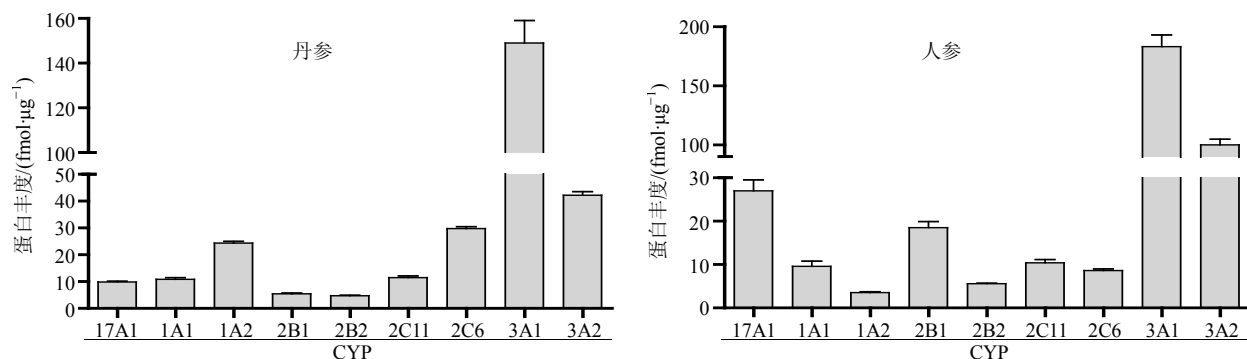


图3 丹参与人参作用后大鼠肝脏 CYP450 蛋白平均丰度

Fig. 3 Average abundance of rat liver microsome CYP450 treated with *S. miltiorrhiza* and *P. ginseng*

表达。与对照组相比，丹参与人参作用后大鼠肝脏内 9 种 CYP450 调控变化见图 4，以 CYP2B2 肽段 FADLAPIGLPH 为例，丹参组、人参组与对照组肽段离子对质谱图见图 5。将 CYP 酶的表达受药物上调或下调调控情况进行归纳总结，结果见表 6。

4 讨论

通过质谱检测到丹参与人参药物作用前后肝脏 CYP 酶丰度，可以评估药物作用后对肝药酶的表达产生上调或下调作用，对研究中药的药物相互作用具有重要意义。实验发现丹参与人参与对 CYP1A1 的表达存在下调作用，与前期文献报道一致^[23]，丹参与人参可上调 CYP3A1 和 CYP3A2 蛋白的表达，丹参下调 CYP3A2 蛋白的表达。虽然丹参与人参同属，但在 CYP3A2 肝药酶代谢上存在相

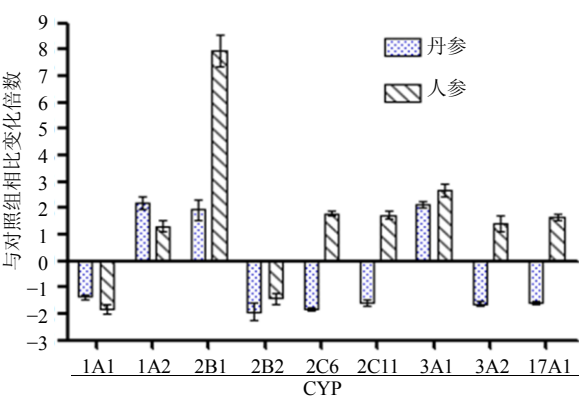
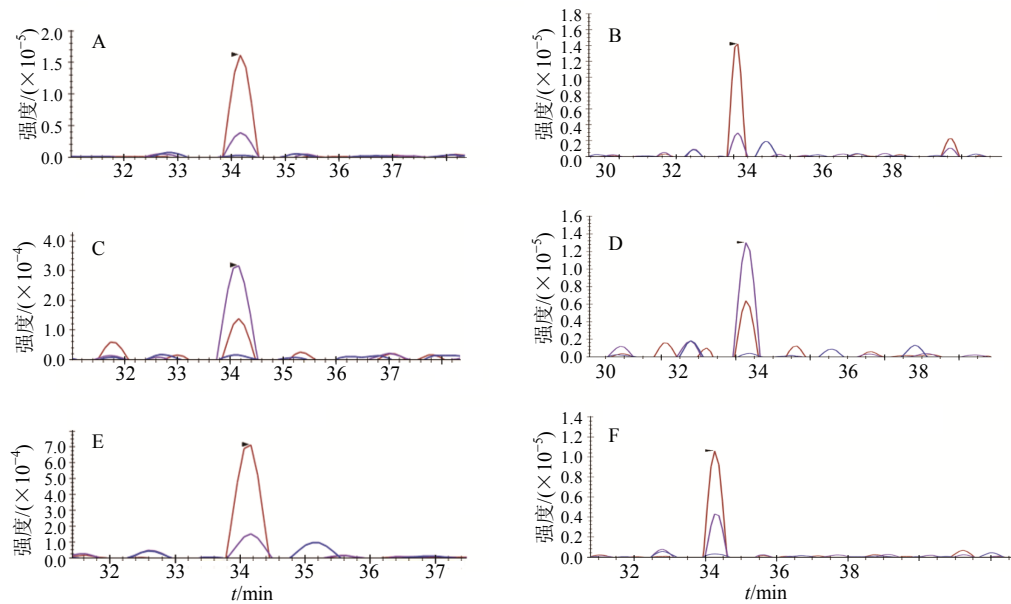


图 4 丹参与人参作用后与对照组肝脏中 CYP450 丰度比较
Fig. 4 Comparison on f CYP450 abundance in liver of rats in control group after administration with *S. miltiorrhiza* or *P. ginseng*



A-对照组轻标肽段 B-对照组内标肽段 C-丹参组轻标肽段 D-丹参组内标肽段 E-人参组轻标肽段 F-人参组内标肽段
A-peptide of control B-internal standard peptide of control C-peptide of *S. miltiorrhiza* group D-internal standard peptide of *S. miltiorrhiza* group
E-peptide of *P. ginseng* group F-internal standard peptide of *P. ginseng* group

图 5 对照组及丹参与人参作用后肝脏中 CYP2B2 肽段 FADLAPIGLPHR 质谱峰强度
Fig. 5 MS intensity spectra of CYP2B2 peptide FADLAPIGLPHR in liver of rats in control group after treatment with *S. miltiorrhiza* or *P. ginseng*

表 6 丹参与人参对大鼠肝药酶 CYP450 亚型表达调控趋势

Table 6 Regulation impact of <i>S. miltiorrhiza</i> or <i>P. ginseng</i> on subtype expression of rat liver CYP450s isoforms									
药物	CYP1A1	CYP1A2	CYP2B1	CYP2B2	CYP2C6	CYP3A1	CYP3A2	CYP2C11	CYP17A1
丹参	132% ↓	201% ↑	197% ↑	208% ↓	193% ↓	215% ↑	190% ↓	188% ↓	171% ↓
人参	181% ↓	142% ↑	783% ↑	184% ↓	179% ↑	264% ↑	165% ↑	177% ↑	182% ↑

↑ 代表上调比例，↓ 代表下调比例
↑ up-regulation ratio, ↓ down-regulation ratio

反作用,两者配伍时需关注由于 CYP3A2 蛋白引起的药物相互作用。对于 CYP1A2,人参作用组和丹参作用组相对对照组蛋白丰度上调接近 2 倍。CYP2B 亚族中,CYP2B1 和 CYP2B2 调控水平存在相反结果,丹参与人参对 CYP2B1 的表达具有上调效应,但对于 CYP2B2 的表达具有下调效应。推测 CYP2B1 与 CYP2B2 在药物代谢过程中存在互补代偿作用。丹参下调 CYP2C6 蛋白的表达,与已有报道文献一致^[24]。且大鼠源 CYP2C6 与人源 CYP2C9 序列相似度高^[25],已有报道丹参抑制 CYP2C9 酶活性^[26],从人源到大鼠源推断,相应的调控趋势一致。

药物上调或下调 CYP 酶表达的机制依然缺乏完整系统的解释原因,最主要的调控机制主要与孕烷 X 受体(PXR)和组成型雄甾烷受体(CAR)有关,两者是 CYP 酶表达转录过程中上游蛋白受体,人参可通过结合和激活 PXR 的表达,从而诱导肝内 CYP3A1 和 CYP3A2 转录表达;丹参可能通过抑制 PXR 的激活,进而下调 CYP3A2 的表达,人参则通过 CAR 与视黄酸 X 受体形成二聚体,诱导 CYP2B1 转录表达。关于 CYP2C11 和 CYP17A1 等相关上游调控机制依然模糊,绝大多数低丰度 CYP 酶亚型功能报道较少,被诱导或抑制的原因仍有待进一步研究^[27]。

丹参与人参同属参类,部分药物代谢酶调控情况一致,但存在不同。心脑血管疾病患者用药时,丹参会与抗凝药物华法林一同服用,丹参下调 CYP3A2 蛋白的表达,而华法林主要由 CYP3A2 代谢,因此当丹参与华法林药物同服时,华法林在机体代谢减慢,药物蓄积浓度变高,丹参影响了华法林药物的代谢,所以华法林药物需要酌情减小剂量,避免药物浓度超过治疗窗口阈值。人参是一种具有滋补作用的药物,服用他汀等药物的高血脂患者,会服用人参提高体质。人参上调 CYP3A1 和 CYP3A2 两个主要的肝药酶的表达,而他汀类主要经 CYP3A 家族蛋白代谢,人参的使用诱导了他汀类的代谢,影响他汀类药物的调脂药效,因此应避免两者同时服用或者减少人参用量。由于 CYP 酶作用产生的影响,是临床配伍用药需要注意的重要事项。不同的药物搭配使用,须避免药物相互作用造成的不良反应。研究药物作用后对 CYP 酶蛋白丰度的调控作用具有重要意义。实验首次对 CYP 酶亚型 CYP2B1、CYP2B2、CYP17A1 丰度进行定量研究,有助于理解其生物功能。本研究在 CYP 酶参与中药代谢药理研究中产生提示作用。

参考文献

- [1] 高月. 基于药物代谢酶的中药毒性研究[J]. 毒理学杂志, 2007(4): 282-282.
- [2] Hingorani G P, Rhodes S P. 2012 FDA draft guidance for CYP induction of investigational new drug candidates: theory and practice [J]. *Drug Metabol Rev*, 2012, 44(9): 78-79.
- [3] Deutsch E W. The peptideatlas project [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 604(Suppl 1): 285-296.
- [4] Bluemlein K, Ralser M. Monitoring protein expression in whole-cell extracts by targeted label-and standard-free LC-MS/MS [J]. *Nat Protocol*, 2011, 6(6): 859-869.
- [5] Pratt J M, Simpson D M, Doherty M K, et al. Multiplexed absolute quantification for proteomics using concatenated signature peptides encoded by QconCAT genes [J]. *Nat Protocol*, 2006, 1(2): 1029-1043.
- [6] Pefffers M J, Beynon R J, Clegg P D. Absolute quantification of selected proteins in the human osteoarthritic secretome [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(10): 20658-20681.
- [7] 李孟璇, 孙林, 孟兆青, 等. 人参白术药对配伍前后化学成分变化研究 [J]. 中草药, 2014, 45(24): 3549-3552.
- [8] 王宇光, 高月, 柴彪新, 等. 人参、藜芦合用对大鼠肝 P450 酶活性及 mRNA 表达的调控作用 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(4): 366-370.
- [9] Liu X, Hu L, Ge G, et al. Quantitative analysis of cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes by the combination of proteomics and chemical probe-based assay [J]. *Proteomics*, 2014, 14(16): 1943-1951.
- [10] 张丽军, 贾小芳, 尹林, 等. 蛋白质组学方法研究唐草片对微粒体 CYP450 酶的影响 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 2136-2139.
- [11] Gillette M A, Carr S A. Quantitative analysis of peptides and proteins in biomedicine by targeted mass spectrometry [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(1): 28-34.
- [12] Searle B C, Egertson J D, Bollinger J G, et al. Using data independent acquisition (DIA) to model high-responding peptides for targeted proteomics experiments [J]. *Mol Cell Prot*, 2015, 14(9): 2331-2340.
- [13] Chawner R, McCullough B, Giles K, et al. QconCAT standard for calibration of ion mobility-mass spectrometry systems [J]. *J Prot Res*, 2012, 11(11): 5564-5572.
- [14] Russell M R, Achour B, McKenzie E A, et al. Alternative fusion protein strategies to express recalcitrant QconCAT proteins for quantitative proteomics of human drug metabolizing enzymes and transporters [J]. *J Prot Res*, 2013, 12(12): 5934-5942.

- [15] Wisniewski J R, Zougman A, Nagaraj N, *et al.* Universal sample preparation method for proteome analysis [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 359-362.
- [16] Turtoi A, Castronovo V. Isotopically labeled proteome as an internal standard for multiple reaction monitoring-based biomarker quantification [J]. *Expert Rev Prot*, 2012, 9(3): 245-248.
- [17] MacLean B, Tomazela D M, Shulman N, *et al.* Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(7): 966-968.
- [18] Carroll K M, Simpson D M, Evers C E, *et al.* Absolute quantification of the glycolytic pathway in yeast: deployment of a complete QconCAT approach [J]. *Mol Cell Prot Mep*, 2011, 10(12): 293-302.
- [19] Schilling B, Rardin M J, MacLean B X, *et al.* Platform-independent and label-free quantitation of proteomic data using MS1 extracted ion chromatograms in Skyline application to protein acetylation and phosphorylation [J]. *Mol Cell Prot*, 2012, 11(5): 202-214.
- [20] 刘喜东, 朱俊, 丛宇婷, 等. 基于蛋白质组学的细胞色素 P450 和葡萄糖醛酸转移酶亚型绝对定量分析 [J]. 分析化学, 2014, 42(1): 10-15.
- [21] 陆亚丽. 藜芦人参合用对 HepG2 细胞的增毒效应及肝药酶定量方法的建立 [D]. 长沙: 中南大学, 2013.
- [22] Larance M, Bailly A P, Pourkarimi E, *et al.* Stable-isotope labeling with amino acids in nematodes [J]. *Nat Methods*, 2011, 8(10): 849-851.
- [23] 胡东华, 王宇光, 陈志武, 等. 复方丹参方对大鼠心脏细胞色素 P450 酶的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(1): 75-80.
- [24] 薛清丹, 鞠爱霞, 王鹏, 等. 复方丹参注射液对大鼠肝脏细胞色素 P450 酶不同亚型的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(14): 71-76.
- [25] Daniel W A, Haduch A, Syrek M, *et al.* Direct and indirect interactions between antidepressant drugs and CYP2C6 in the rat liver during long-term treatment [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2006, 16(8): 580-587.
- [26] 徐斌, 赵刚, 位华, 等. 20 味中成药对 5 个人肝微粒体酶活性的影响 [J]. 药学实践杂志, 2009, 27(5): 353-356.
- [27] Luo G, Cunningham M, Kim S, *et al.* CYP3A4 induction by drugs: correlation between a pregnane X receptor reporter gene assay and CYP3A4 expression in human hepatocytes [J]. *Drug Metabol Disp*, 2002, 30(7): 795-804.