

• 药理与临床 •

何首乌水提取物及其主要成分对人肝细胞 L02 中 CYP1A2、CYP2C9 和 CYP2E1 mRNA 表达的影响

王子建, 李浩[#], 李登科, 陈静, 吴双, 周明, 全正扬, 孙震晓*

北京中医药大学生命科学院, 北京 100102

摘要: 目的 分析何首乌水提取物中主要化学成分及其量, 阐明何首乌水提取物及其主要成分对人正常肝实质细胞 L02 中 CYP1A2、CYP2C9 和 CYP2E1 mRNA 表达的影响。方法 HPLC 测定何首乌水提取物中主要化学成分及其质量分数; MTT 法确定何首乌水提取物及其主要成分对 L02 细胞活力的影响; 实时荧光定量 PCR 测定 L02 细胞中 CYP1A2、CYP2C9 和 CYP2E1 mRNA 表达量。结果 何首乌水提取物主要含有二苯乙烯苷、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素和大黄素甲醚, 各成分在何首乌水提取物中的质量分数分别为 (1.14 $\pm$ 0.03) %、(0.106 9 $\pm$ 0.001 6) %、(0.010 8 $\pm$ 0.000 9) %、(0.003 55 $\pm$ 0.000 19) %; 何首乌水提取物及其主要成分作用 L02 细胞 24 h, 何首乌水提取物和大黄素对细胞活力的影响随着药物浓度的增加抑制作用增强, IC₅₀ 值分别为 7.290 mg/mL 和 0.082 mmol/L, 二苯乙烯苷、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷和大黄素甲醚在实验浓度范围内对细胞活力的抑制作用不明显; 何首乌水提取物、大黄素均可明显抑制 L02 细胞中 CYP1A2、CYP2C9、CYP2E1 mRNA 的表达; 大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷抑制 CYP1A2 和 CYP2C9 的 mRNA 表达; 二苯乙烯苷抑制 CYP1A2 mRNA 表达, 但激活 CYP2C9 mRNA 表达; 大黄素甲醚浓度依赖性抑制 CYP1A2、CYP2C9 mRNA 表达, 却表现低浓度抑制、高浓度激活 CYP2E1 mRNA 表达。结论 何首乌水提取物抑制 L02 细胞中 CYP1A2、CYP2C9 和 CYP2E1 mRNA 表达是其所含各种成分综合作用的结果, 何首乌 4 种主要成分均可抑制 CYP1A2 mRNA 表达, 蒽醌成分是抑制 CYP2C9 mRNA 表达的主要成分, 游离蒽醌是抑制 CYP2E1 mRNA 表达的主要成分。

关键词: 何首乌水提取物; 蒽醌衍生物; CYP1A2; CYP2C9; CYP2E1; 二苯乙烯苷; 大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷; 大黄素; 大黄素甲醚

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)23-4912-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.23.015

Effects of aqueous extract of *Polygoni Multiflori Radix* and its main constituents on expression of mRNA of CYP1A2, CYP2C9, and CYP2E1 in human liver L02 cells

WANG Zi-jian, LI Hao, LI Deng-ke, CHEN Jing, WU Shuang, ZHOU Ming, QUAN Zheng-yang, SUN Zhen-xiao
College of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: Objective To analyze the main chemical constituents and their contents in aqueous extract of *Polygoni Multiflori Radix* (PMR, root of *Polygonum multiflorum*), and to elucidate the effects of aqueous extract of PMR and its main constituents on the expression of the mRNA of CYP1A2, CYP2C9, and CYP2E1 in human liver L02 cells. **Methods** The main chemical constituents and their content in aqueous extract of PMR were determined by HPLC. The cytotoxicity of aqueous extract of PMR and its main constituents on L02 cells was determined by MTT assay. The mRNA expression of CYP1A2, CYP2C9, and CYP2E1 in L02 cells were detected by quantitative real-time PCR. **Results** There were four main well-separated chromatographic peaks standing for tetrahydroxy stilbene glucoside, emodin-8-*O*- β -D-glucoside, emodin and physcion in aqueous extract of PMR. The content of these

收稿日期: 2017-04-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473418); 国家林业局野生动植物保护项目 (2016-2018); 北京中医药大学东直门医院“111”协同创新院际合作项目 (2016-DZM111-ZY008); 北京中医药大学研究生自主课题项目 (2017-JYB-XS-145)

作者简介: 王子建, 男, 在读硕士研究生。E-mail: wanggg92@126.com

***通信作者** 孙震晓, 女, 教授, 博士生导师。Tel: (010)84738646 E-mail: sunzxcn@hotmail.com

#并列第一作者 李浩, 男, 硕士研究生。E-mail: 763617285@qq.com

components in aqueous extract of PMR was $(1.14 \pm 0.03)\%$, $(0.1069 \pm 0.0016)\%$, $(0.0108 \pm 0.0009)\%$, $(0.00355 \pm 0.00019)\%$, respectively. The cytotoxicity of aqueous extract of PMR and emodin on L02 cells at 24 h was dose-dependent, and the concentration of 50% inhibition was 7.290 mg/mL and 0.082 mmol/L respectively. Tetrahydroxy stilbene glucoside, emodin-8-*O*- β -*D*-glucoside and physcion did not show significant cytotoxicity on L02 cells in the experimental concentrations. Aqueous extract of PMR and emodin significantly inhibited the expression of mRNA of CYP1A2, CYP2C9, and CYP2E1 in L02 cells. Emodin-8-*O*- β -*D*-glucoside inhibited the expression of mRNA of CYP1A2 and CYP2C9. Tetrahydroxy stilbene glucoside inhibited the expression of mRNA of CYP1A2 but activated the expression of mRNA of CYP2C9. Physcion inhibited the expression of mRNA of CYP1A2 and CYP2C9 in a dose-dependent manner, but inhibited the expression of mRNA of CYP2E1 in low concentration and activated the expression of mRNA of CYP2E1 in high concentration. **Conclusion** The inhibition of aqueous extract of PMR on the expression of mRNA of CYP1A2, CYP2C9, and CYP2E1 in L02 cells is the combined effect of all components in it. The main four components all inhibit the expression of mRNA of CYP1A2. The anthraquinone is the main component inhibiting the expression of mRNA of CYP2C9. The free anthraquinone is the main component inhibiting the expression of mRNA of CYP2E1.

Key words: aqueous extract of *Polygoni Multiflori Radix*; anthraquinone derivatives; CYP1A2; CYP2C9; CYP2E1; tetrahydroxy stilbene glucoside; emodin-8-*O*- β -*D*-glucoside; emodin; physcion

何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根, 为临床常用中药, 《中国药典》2015年版一部收载, 其味苦、甘、涩, 性微温, 归肝、心、肾经, 具有解毒、消痈、截疟、润肠通便的作用, 主要用于疮痈、瘰癧、风疹瘙痒、久疟体虚、润肠通便等^[1], 但近年来报道服用何首乌有引起临床肝损害的潜在风险^[2-3]。

肝脏是药物代谢的重要器官之一, 而肝脏细胞中的细胞色素 P450(CYP450)酶系统参与了约 70% 的临床药物的代谢。据报道, 临床药物 90% 的氧化反应是由其中的 CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4 这 6 种酶来催化完成的^[4]。如果外源化合物抑制了 CYP450 酶系统, 则会导致某些中药成分无法被代谢而蓄积在肝脏中, 从而造成肝损伤^[5]。为阐明何首乌肝毒性机制, 本课题组前期研究了何首乌对大鼠肝主要 CYP450 活性的影响, 发现 SD 大鼠 ig 何首乌水提物后, 大鼠肝微粒体 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP2C11 (人类 CYP2C9 与雄性大鼠 CYP2C11 蛋白具有 77% 的同源性^[6]) 酶活性受到抑制, 同时测定大鼠肝微粒体 CYP1A2 与 CYP2E1 的 mRNA 表达情况, 发现这 2 个亚型的 mRNA 表达显著下降, 与其酶活性下调一致^[7-8]。CYP450 酶的表达及对药物的反应具有一定种属特异性^[9], 本研究在何首乌水提物对大鼠肝脏 CYP450 酶影响的基础上, 利用人肝细胞 L02, 研究何首乌水提物对人肝细胞 CYP450 酶亚型 CYP1A2、CYP2C9、CYP2E1 mRNA 表达的影响, 进一步分析何首乌水提物中主要成分对人肝细胞 CYP450 酶表达的影响, 为阐明何首乌肝毒性提供参考。

1 材料

1.1 药材

何首乌购自北京同仁堂饮片有限责任公司, 批号 401002398, 产地湖北, 经北京中医药大学中药学院刘春生教授鉴定为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根。

1.2 细胞及培养基

人正常肝实质细胞 L02 为北京中医药大学生命科学学院生物制药实验室冻存, RPMI 1640 培养基及胎牛血清购自美国 Gibco 公司, 胰蛋白酶购自 Biodee 公司, 96 孔细胞培养板购自 Costar 公司, Eppendorf 管购自 Axygen 公司。

1.3 药品与试剂

对照品 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -*D*-葡萄糖苷 (二苯乙烯苷, 批号 140317)、大黄素 (批号 140422)、大黄素甲醚 (批号 140211)、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷 (批号 140822) 均购自四川维克奇生物科技有限公司, 质量分数均 $\geq 98\%$; 二甲基亚砜 (DMSO)、噻唑蓝 (MTT) 均购自 Sigma Aldrich 公司; iQTM SYBR[®] Green Super mix (BIO-RAD 公司); GelRed 核酸染料 (北京博奥拓达科技有限公司); PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit [宝生物工程 (大连) 有限公司]; RNeasy Pure Total RNA Kit RNeasy 高纯总 RNA 快速提取试剂盒 RN03 (北京艾德莱生物科技有限公司); 设计合成 β -actin、CYP1A2、CYP2C9、CYP2E1 引物 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]。

1.4 仪器

CO₂ 培养箱 (Sanyo 公司); 超净台 (哈尔滨东

联电子技术开发有限公司); 倒置显微镜 (Nikon 公司); 酶标仪 (Bio-Tek 公司); 荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司)。

2 方法

2.1 何首乌水提物的制备

称取何首乌药材饮片(何首乌干燥块根)102.32 g, 装于圆底烧瓶中, 以 10 倍量蒸馏水煎煮提取 2 h, 滤过后, 8 倍量蒸馏水煎煮提取 1.5 h, 合并 2 次水煎液, 浓缩, 冷冻减压干燥到恒定质量, 得到何首乌水提物干粉 25.55 g (得率为 24.97%), 避光贮存于 -20 °C 备用。

2.2 何首乌水提物主要成分分析

2.2.1 供试品溶液的制备 精密称取何首乌水提物粉末 31.71 mg, 甲醇超声溶解, 并稀释定容至 10 mL, 即得供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取一定量二苯乙烯苷、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素和大黄素甲醚对照品, 甲醇溶解定容, 即得浓度依次为 2.264、0.481、0.289、0.390 mmol/L 的对照品溶液。分别精密吸取对照品溶液各 1.0 mL 置于同一 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 以 0.45 μ m

滤膜滤过, 制成含二苯乙烯苷 226.4 μ mol/L、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷 48.1 μ mol/L、大黄素 28.9 μ mol/L、大黄素甲醚 39.0 μ mol/L 的混合对照品溶液。

2.2.3 HPLC 测定条件^[10-11] 色谱柱为 Dikma Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为 0.5% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B); 检测波长 280 nm; 体积流量 1 mL/min; 柱温为室温; 梯度洗脱: 0 min, 10% B; 45 min, 35% B; 70 min, 100% B。色谱图见图 1。从图中可见各对照品与样品的保留时间一致, 分离效果良好。

2.2.4 线性关系的考察 分别精密吸取各对照品溶液, 甲醇梯度稀释, 每个对照品均选取 5 个以上浓度, 各对照品浓度范围如下: 二苯乙烯苷 113.2~2 263.8 μ mol/L、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷 2.4~96.2 μ mol/L、大黄素 1.0~28.9 μ mol/L、大黄素甲醚 0.4~101.5 μ mol/L。各浓度对照品以 0.45 μ m 滤膜滤过, 备用。以上溶液进样 10 μ L, 记录峰面积, 以峰面积为纵坐标 (Y), 浓度为横坐标 (X) 建立标准曲线。4 种对照品的线性回归方程见表 1, 峰面积和各对照品的浓度线性良好, 回归系数均大于 0.999。

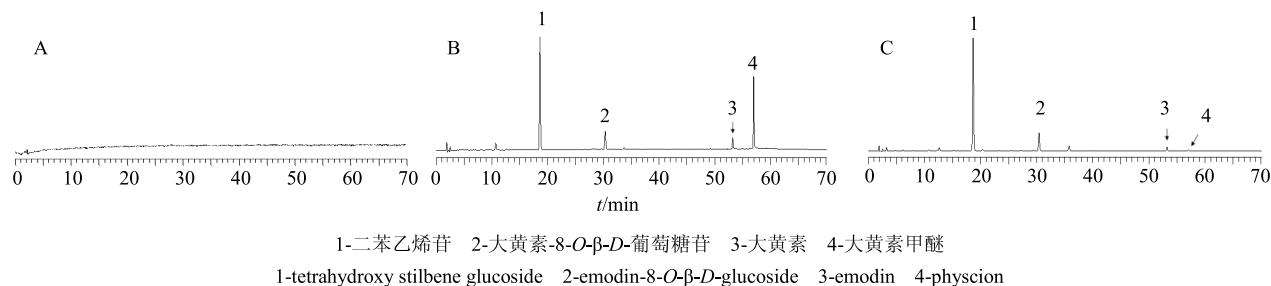


图 1 甲醇 (A)、混合对照品 (B) 和何首乌水提物 (C) HPLC 图

Fig. 1 HPLC of methanol (A), mixture standards (B) and aqueous extract of *Polygoni Multiflora Radix* (C)

表 1 4 种对照品的线性回归方程

Table 1 Regression equation of four kinds of standards

对照品	回归方程	线性范围/(mmol·L ⁻¹)	<i>r</i>
二苯乙烯苷	$Y=29\,722\,X-125\,033$	0.113 2~2.263 8	0.999 9
大黄素-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	$Y=52\,836\,X+12\,471$	0.002 4~0.096 2	0.999 6
大黄素	$Y=66\,516\,X+9\,284.5$	0.001 0~0.028 9	0.999 8
大黄素甲醚	$Y=67\,576\,X-313.33$	0.000 4~0.101 5	0.999 9

2.2.5 重复性考察 制备 6 份何首乌水提物, 精密吸取 3.171 mg/mL 何首乌水提物供试品溶液 10 μ L, 分别进样, 测定二苯乙烯苷、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素和大黄素甲醚峰面积, 计算 RSD 值。

结果各成分峰面积的 RSD 均小于 5.0%, 说明方法重复性良好, 符合实验要求。

2.2.6 稳定性考察 取“2.2.5”项中某一批次质量浓度为 3.171 mg/mL 的何首乌水提物供试品溶液,

同一样品溶液,连续测定 5 d,测定二苯乙烯苷、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚峰面积,计算 RSD 值。结果各成分峰面积的 RSD 均小于 5.0%,说明样品稳定性良好,符合实验要求。

2.2.7 回收率试验 精密量取已知量的何首乌供试品溶液 300 μ L,精密加入大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷对照品溶液 200 μ L (浓度为 0.053 mmol/L),混匀后,进样 10 μ L,重复实验 6 次;精密量取已知量的何首乌供试品溶液 2 mL,分别精密加入二苯乙烯苷对照品 290.42 μ g、大黄素对照品 2.82 μ g、大黄素甲醚对照品 1.12 μ g,混匀后,进样 10 μ L,重复实验 6 次,依法测定,计算回收率及 RSD 值。结果二苯乙烯苷、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚的回收率为 99.36% (RSD 3.61%)、109.14% (RSD 1.60%)、102.84% (RSD 11.82%)、109.53% (RSD 2.97%);表明本测定方法回收率符合要求。

2.3 何首乌水提物及其主要成分用于细胞实验的溶液配制

精密称取何首乌水提物干粉,以 RPMI 1640 完全培养基超声溶解 2 h,使其质量浓度相当于生药 8 mg/mL,以 0.22 μ m 微孔滤器除菌,再等比稀释为质量浓度 4、2、1 mg/mL 的加药培养基。用同样培养基配制母液浓度为 0.984 mmol/L 的二苯乙烯苷和 0.925 mmol/L 的大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷溶液,各母液使用时再等比稀释成多个浓度梯度,并以 RPMI 1640 完全培养基为溶剂对照组;大黄素和大黄素甲醚在 RPMI 1640 培养基中溶解度较差,故先用 DMSO 配制母液:大黄素用 DMSO 配制成 14.802 mmol/L 的溶液,再用培养基稀释为 0.148 mmol/L 的母液 (DMSO 体积分数为 1%);大黄素甲醚用 DMSO 配制成 14.071 mmol/L 的溶液,再用培养基稀释为 0.141 mmol/L 的母液 (DMSO 体积分数为 1%),各母液使用时再等比稀释成多个浓度梯度,并设相应浓度的 DMSO 为溶剂对照组。

2.4 加药

L02 细胞以每孔 6 000 个细胞接种于 96 孔板,每孔加入 100 μ L 培养基(边缘孔用无菌 PBS 填充),每个浓度 6 个重复。5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h,吸去培养基,分别加入含 8、4、2、1 mg/mL 何首乌水提物(药物质量浓度以生药量计算);0.984、0.492、0.246、0.123 mmol/L 二苯乙烯苷;0.925、0.463、0.231、0.116、0.058 mmol/L 大黄素-8-*O*- β -*D*-

葡萄糖苷;0.148、0.074、0.037、0.019、0.010 mmol/L 大黄素;0.141、0.071、0.036、0.018 mmol/L 大黄素甲醚的加药 RPMI 1640 完全培养基,5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。

2.5 细胞活力测定

吸去含药培养基,加入 MTT 工作液 100 μ L,5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 继续孵育 4 h,弃掉 MTT 工作液;每孔加入 150 μ L 的 DMSO,低速振荡 10 min,使得蓝紫色结晶物充分溶解,在酶标仪 570 nm 波长处测定吸光度(A)值。计算细胞活力抑制率,采用寇氏改良法计算半数抑制浓度(IC₅₀)值。

$$\text{细胞活力抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{加药}}) / A_{\text{对照}}$$

2.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 测定细胞中 CYP1A2、CYP2C9 和 CYP2E1 mRNA 的表达

2.6.1 RNA 的提取 取对数生长期的 L02 细胞,制成单细胞悬液,以每孔 180 000 个细胞(由 96 孔板每孔 6 000 个细胞换算)的密度接入 6 孔板,待细胞贴壁良好,加入含药培养基,根据 MTT 结果,何首乌水提物及主要成分均设低、高 2 个剂量组:何首乌水提物按生药量设 2、4 mg/mL 组、二苯乙烯苷 0.246、0.492 mmol/L 组、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷 0.116、0.231 mmol/L 组、大黄素 0.019、0.037 mmol/L 组、大黄素甲醚 0.018、0.036 mmol/L 组,作用 24 h,提取各组细胞的 RNA。使用酶标仪测定 RNA 的浓度及纯度,1% 琼脂糖凝胶电泳检验所提 RNA 的完整性。

2.6.2 逆转录合成 cDNA 第一链 以总 RNA 为模板,用 PrimeScriptTM 1st strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒逆转录合成 cDNA。

2.6.3 CYP1A2、CYP2C9、CYP2E1 引物合成 在 GenBank 上查找人源的 CYP450 酶各亚型的 mRNA 全序列,以之为模板,通过 Primer Premier 5 软件设计 20 bp 左右的上下游引物,扩增产物为 80~150 bp,选择评分较高的引物,通过 Primer-BLAST 检验引物的特异性,经上海生工生物工程有限公司合成设计引物,引物信息见表 2。

2.6.4 qRT-PCR 反应条件 预变性 95 $^{\circ}$ C, 30 s;变性 95 $^{\circ}$ C, 5 s;退火、延伸 60 $^{\circ}$ C, 30 s,共 40 个循环;65~95 $^{\circ}$ C (每次增加 0.5 $^{\circ}$ C) 测定熔解曲线。

2.7 数据处理及统计学分析

将实验数据进行统计分析,结果用 SPSS Statistics 19.0 统计软件进行单因素方差分析,方差不齐采用非参数检验。

表 2 β -actin、CYP1A2、CYP2C9、CYP2E1 引物信息Table 2 Primer information of β -actin, CYP1A2, CYP2C9, and CYP2E1

基因	序列 (5'→3')	长度/bp	GC/%	退火温度/℃
β -actin	正向引物: TGAGCGCAAGTACTCTGTGTGGAT	24	50.0	62.0
	反向引物: TAGAAGCATTTGCGGTGCACGATG	24	50.0	62.0
CYP1A2	正向引物: CTGGAGACCTTCCGACACT	19	57.9	59.7
	反向引物: ACCTGCCACTGGTTTACG	18	55.6	57.3
CYP2C9	正向引物: ACGGATTTGTGTGGGAGAAG	20	50.0	57.8
	反向引物: CTGAGATGGTGTCAAGGTTC	20	55.0	59.8
CYP2E1	正向引物: GCAAGAGATGCCCTACATGGA	21	52.4	60.0
	反向引物: GGCACGAGGGTGATGAA	18	61.1	59.6

3 结果

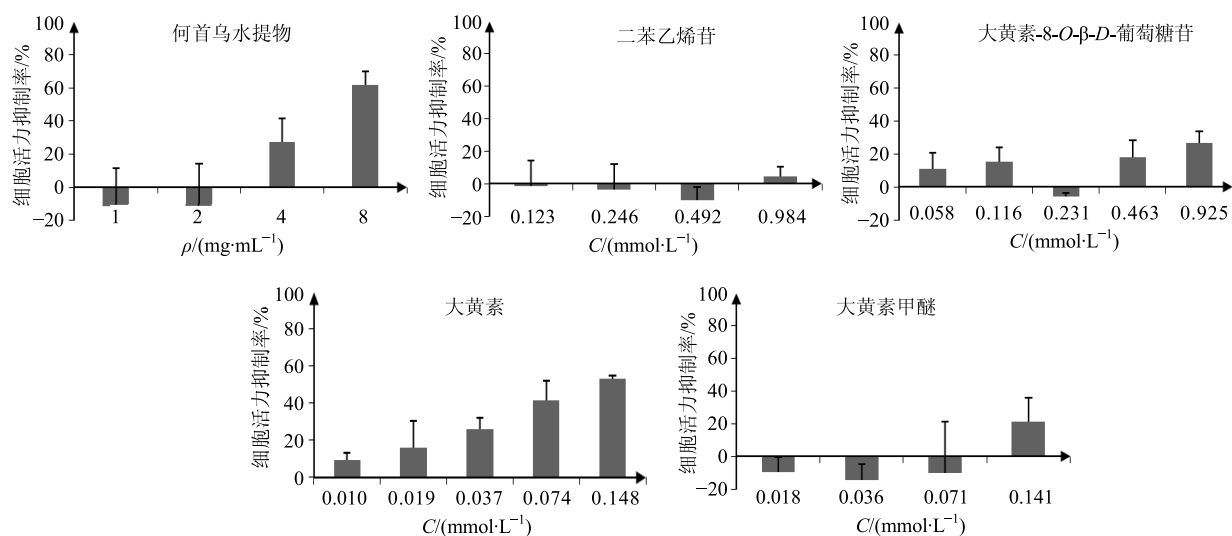
3.1 何首乌水提取物中主要成分定量分析结果

根据 HPLC 测定结果可知, 何首乌水提取物主要成分的质量分数为二苯乙烯苷 (1.14 ± 0.03) %、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷 (0.1069 ± 0.0016) %、大黄素 (0.0108 ± 0.0009) %、大黄素甲醚 (0.00355 ± 0.00019) %。

3.2 何首乌水提取物及其主要成分对 L02 细胞活力的影响

何首乌水提取物及其主要成分作用 L02 细胞 24 h, 各药物对 L02 细胞活力的影响结果见图 2。何首乌水提取物和大黄素对细胞活力的抑制作用随浓度

增加而增强, IC_{50} 值分别为 7.290 mg/mL 和 0.082 mmol/L, 二苯乙烯苷、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷和大黄素甲醚在实验浓度范围内对细胞活力的抑制作用不明显。后续实验选择对 L02 细胞活力影响较小的各药物浓度, IC_{50} 值可计算的按照 IC_{50} 值的 1/4 和 1/2 取整数, 即何首乌水提取物 2、4 mg/mL、大黄素 0.019、0.037 mmol/L, 大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷在 0.231 mmol/L 以下可以确定没有细胞毒性, 故选择 0.116、0.231 mmol/L。在实验浓度范围内对细胞活力没有明显影响的二苯乙烯苷选择 0.246、0.492 mmol/L、大黄素甲醚选择 0.018、0.036 mmol/L, 进一步研究其对 L02 细胞 CYP450 mRNA 表达的影响。

图 2 何首乌水提取物及其主要成分对 L02 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Fig. 2 Effects of aqueous extract of PMR and its main constituents on viability of L02 cells ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.3 何首乌水提取物及其主要成分对 L02 细胞 CYP1A2、CYP2C9 和 CYP2E1 mRNA 表达的影响

由图 3 可知, 何首乌水提取物可以显著抑制 L02 细胞 CYP1A2 mRNA 的表达, 2 mg/mL 何首乌水提取物

CYP1A2 mRNA 表达量约为对照组的 60% ($P < 0.01$), 4 mg/mL 何首乌水提取物组 CYP1A2 mRNA 表达量约为对照组 50% ($P < 0.05$), 其抑制 CYP1A2 mRNA 表达作用具有一定剂量依赖性。2 mg/mL 何首乌水

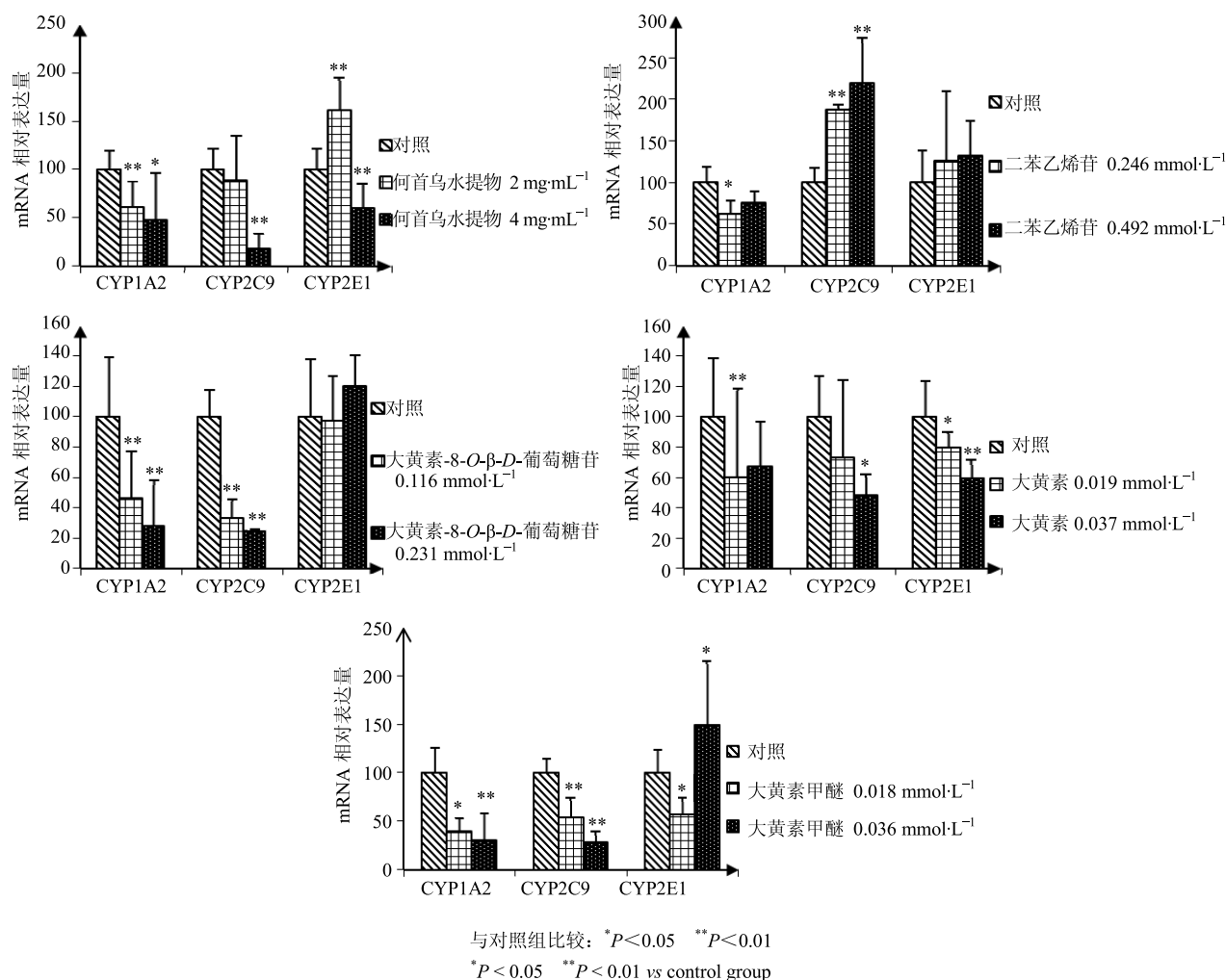


图 3 何首乌水提取物及其主要成分对 L02 细胞 CYP1A2、CYP2C9、CYP2E1 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 3 Effects of aqueous extract of PMR and its main constituents on mRNA expression of CYP1A2, CYP2C9, and CYP2E1 in L02 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

提物对 CYP2C9 mRNA 的表达没有显著影响, 但有抑制趋势, 4 mg/mL 何首乌水提取物能够显著抑制 CYP2C9 mRNA 的表达, 表达量约为对照组的 20% ($P < 0.01$)。2 mg/mL 何首乌水提取物显著促进 CYP2E1 mRNA 的表达, 表达量约为对照组的 1.6 倍 ($P < 0.01$), 4 mg/mL 却可以显著抑制 CYP2E1 mRNA 的表达, 表达量约为对照组的 60% ($P < 0.01$)。

二苯乙烯苊 0.246、0.492 mmol/L 均对 CYP1A2 mRNA 的表达具有一定抑制作用, 其中, 二苯乙烯苊浓度为 0.246 mmol/L 时, CYP1A2 mRNA 的表达量约为对照组的 60% ($P < 0.01$); 2 种浓度二苯乙烯苊对 CYP2C9 mRNA 的表达均有显著的促进作用, 且具有剂量依赖性, 0.246 mmol/L 的二苯乙烯苊组 CYP2C9 mRNA 的表达量约为对照组的 1.9 倍 ($P < 0.01$), 0.492 mmol/L 的二苯乙烯苊组 CYP2C9

mRNA 的表达量约为对照组的 2.2 倍 ($P < 0.01$); 0.246、0.492 mmol/L 二苯乙烯苊对 CYP2E1 mRNA 的表达均没有显著影响。

大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷可以显著抑制 CYP1A2 mRNA 的表达, 0.116 mmol/L 组 CYP1A2 mRNA 的表达量约为对照组的 40% ($P < 0.01$), 0.231 mmol/L 组 CYP1A2 mRNA 的表达量仅约为对照组的 20% ($P < 0.01$), 其抑制作用具有浓度依赖性; 并且对 CYP2C9 mRNA 的表达具有显著的浓度依赖性抑制作用, 0.116 mmol/L 组其表达量约为对照组的 30% ($P < 0.01$), 0.231 mmol/L 组其表达量约为对照组的 20% ($P < 0.01$); 而大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷在 0.116、0.231 mmol/L 的浓度下对 CYP2E1 mRNA 的表达没有显著的影响。

大黄素对 CYP1A2 mRNA 的表达具有显著抑

制作用,当大黄素浓度为 0.019 mmol/L 时,CYP1A2 mRNA 的表达量约为对照组的 60% ($P<0.01$); 大黄素对 CYP2C9 mRNA 的表达有显著抑制作用,并且呈现浓度依赖性,0.019 mmol/L 大黄素组 CYP2C9 mRNA 的表达量约为对照组的 70%,抑制作用没有统计学意义,0.037 mmol/L 大黄素组 CYP2C9 mRNA 的表达显著降低 ($P<0.05$),其表达量约为对照组的 45%; 大黄素可以显著抑制 CYP2E1 mRNA 的表达,且具有浓度依赖性,0.019 mmol/L 大黄素组 CYP2E1 mRNA 的表达量约为对照组的 80% ($P<0.05$),0.037 mmol/L 大黄素组 CYP2E1 mRNA 的表达量约为对照组的 60% ($P<0.01$)。

大黄素甲醚对 CYP1A2 mRNA 的表达具有显著抑制作用,且具有浓度依赖性。大黄素甲醚浓度为 0.018 mmol/L 时,CYP1A2 mRNA 的表达量约为对照组的 40% ($P<0.05$),0.036 mmol/L 时,CYP1A2 mRNA 的表达量约为对照组的 25% ($P<0.01$); 大黄素甲醚对 CYP2C9 mRNA 的表达有较强的抑制作用,并且呈现浓度依赖性,大黄素甲醚 0.018 mmol/L 组 CYP2C9 mRNA 的表达量约为对照组的 50% ($P<0.01$),0.036 mmol/L 组 CYP2C9 mRNA 的表达量约为对照组的 25% ($P<0.01$)。大黄素甲醚对 CYP2E1 mRNA 表达的影响随浓度变化而不同,0.018 mmol/L 大黄素甲醚组 CYP2E1 mRNA 的表达量约为对照组的 50%,显著抑制 CYP2E1 mRNA 的表达 ($P<0.05$),大黄素甲醚 0.036 mmol/L 组 CYP2E1 mRNA 的表达量约为对照组的 1.5 倍,显示促进 CYP2E1 mRNA 的表达 ($P<0.05$)。

根据 HPLC 测定的该批何首乌水提取物中 4 种主要成分的质量分数,换算后,实验设定的二苯乙烯苷、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚低、高浓度约为低、高质量浓度何首乌水提取物相应成分测定浓度的 4、20、20、70 倍。因而,低浓度组大黄素甲醚对 CYP2E1 mRNA 表达的抑制作用与高浓度组何首乌水提取物抑制 CYP2E1 mRNA 表达的结果是一致的。

4 讨论

已知中药何首乌主要成分有二苯乙烯类、蒽醌类、磷脂类及鞣质类等^[12-13]。目前对何首乌肝毒性物质的研究主要集中在蒽醌^[14-18]、二苯乙烯苷^[18-20]、鞣质^[21-22]等物质上,但已有的研究尚不能确定何首乌水提取物中引起临床肝毒性的成分及机制^[23]。本课题

组前期研究发现,如果人为抑制大鼠肝脏 CYP1A2 或 CYP2E1 的表达,大鼠单次 ig 给予何首乌水提取物即可引起血清转氨酶升高,如果模拟临床上反复间隔给药,大鼠血清转氨酶会急剧升高,提出临床人群 CYP450 酶的遗传多态性是导致何首乌临床肝毒性的原因之一的观点^[24]。为进一步探讨何首乌水提取物及其主要成分是否干预人肝细胞 CYP450 酶的表达,本研究选取人肝实质细胞 L02 为研究对象,研究何首乌水提取物及其主要成分对人肝细胞主要 CYP450 酶 CYP1A2、CYP2C9、CYP2E1 的 mRNA 表达的影响,发现一定质量浓度的何首乌水提取物可明显抑制 L02 细胞中 CYP1A2、CYP2C9、CYP2E1 mRNA 的表达,特别是发现何首乌水提取物中主要成分二苯乙烯苷、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、大黄素和大黄素甲醚均可抑制 CYP1A2 的表达,蒽醌类成分大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、大黄素和大黄素甲醚是引起 CYP2C9 表达下调的主要成分,而二苯乙烯苷作用相反,对 CYP2C9 表达有明显上调作用,游离蒽醌大黄素和大黄素甲醚是何首乌水提取物中引起 CYP2E1 表达下调的主要成分,大黄素和大黄素甲醚对 3 种 CYP450 酶的影响与何首乌水提取物较为一致,而二苯乙烯苷对 CYP2C9 mRNA 表达的影响与何首乌水提取物和蒽醌类成分不一致,值得深入探讨。

有关何首乌提取物对 CYP450 酶活性及表达的研究目前报道并不多,有报道制何首乌提取物对大鼠肝脏总的 CYP450 表达活性没有明显影响^[25],但可引起 CYP2E1 的表达低下^[26]。前期大鼠实验研究发现,何首乌及制何首乌水提取物可抑制大鼠肝 CYP450 酶 CYP1A2、CYP2E1、CYP2C11(CYP2C9) 的活性及表达^[7-8,11]。其他课题组也有报道,何首乌水提取物在一定剂量下给药大鼠,表现出对 CYP1A2 和 CYP2C9 活性的抑制^[27]。本研究表明,何首乌水提取物对 CYP450 酶基因表达的影响可能涉及到混合物中各成分的相对变化以及相互作用,但一定剂量下可引起 CYP1A2、CYP2C9 和 CYP2E1 这 3 种亚型 mRNA 表达的抑制,其中起抑制作用的成分主要为蒽醌类化合物,二苯乙烯苷对不同亚型的影响有所不同。

有研究发现,何首乌中大黄素能够诱导 L02 细胞中 CYP1A2、CYP2E1 的表达并对 CYP2C9 表现一定的抑制作用^[28],其结果与本研究结果不一致,分析造成实验结果存在差异的原因可能有:加药时

机以及作用于细胞的时间不同,本课题组是细胞贴壁后开始加药,24 h后收集细胞提取RNA,而文献中接种细胞同时加药,接种细胞数未知,作用16 h;大黄素的给药浓度不同。另外,因为CYP亚型的引物信息、逆转录条件、mRNA表达的检测方法及其灵敏度和准确度均不同可能也会造成结果的不同。其他课题组研究报道大黄素能够对CYP1A2^[29-30]、CYP2C9^[30-31]具有一定的抑制作用,以上结果均与目前研究结果一致。

分析实验中何首乌水提物及其主要成分对L02细胞活力的影响,何首乌水提物对L02细胞活力的抑制作用(IC₅₀为7.290 mg/mL)远大于相应浓度下所测何首乌主要成分抑制作用的总和(该浓度下二苯乙烯苷、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚的浓度为0.204、0.018、0.003、9.10×10⁻⁴ mmol/L,该浓度下各化合物对细胞没有表现出明显的细胞毒性),这提示何首乌水提物作为一种混合物,除了本研究测得的何首乌几种主要成分外,可能还存在其他肝毒性成分,或者成分之间存在一定相加或协同作用^[32],引起何首乌水提物肝细胞毒性作用的增强。本实验结果表明,何首乌水提物主要成分中大黄素对L02细胞有较强的细胞毒性且能一定程度上抑制CYP1A2、CYP2C9、CYP2E1的表达。据报道,大黄素在体内主要由CYP1A2/1代谢成2-羟基大黄素^[33],也有报道说明大黄素容易在细胞内产生蓄积^[34]。初步推测大黄素或游离蒽醌可能是何首乌致肝细胞损伤的主要物质,其毒性可能与CYP1A2、CYP2C9、CYP2E1表达或活性的抑制有关,其毒性机制还需要进一步验证。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 张 力, 杨晓辉, 孙震晓. 何首乌临床不良事件回顾性研究及风险控制措施探讨 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(13): 1724-1729.
- [3] 孙震晓, 张 力. 何首乌及其制剂相关肝损害国内文献回顾与分析 [J]. 药物不良反应杂志, 2010, 12(1): 26-30.
- [4] Tanaka E, Hisawa S. Clinically significant pharmacokinetic drug interactions with psychoactive drugs: antidepressants and antipsychotics and the cytochrome P450 system [J]. *J Clin Pharm Ther*, 1999, 24(1): 7-15.
- [5] 侯 健, 孙 娥, 宋 捷, 等. 肝脏药物代谢酶CYP450与中药肝毒性的关系 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(15): 2774-2780.
- [6] Bae S K, Lee D Y, Lee A K, et al. Effects of cysteine on the pharmacokinetics of intravenous torasemide in rats with protein-calorie malnutrition [J]. *J Pharm Sci*, 2004, 93(9): 2388-2398.
- [7] 杨红莉. 何首乌及制首乌对大鼠和人肝细胞色素P450酶的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [8] 李 浩, 杨红莉, 李登科, 等. 何首乌水提物对大鼠肝脏CYP1A2、CYP2E1酶活性及mRNA表达抑制作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(7): 1370-1375.
- [9] 张晓璐, 乐 江. 细胞色素P450的工具药选择及种属差异的研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(5): 697-701.
- [10] 张艳辉, 于 超, 郭延垒, 等. 高效液相色谱法测定鼠肝微粒体中CYP1A2酶的活性及动力学考察 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(2): 189-193.
- [11] 吴 双, 李 浩, 孙震晓. 制何首乌对大鼠肝CYP1A2酶活性及mRNA表达的抑制作用 [J]. 世界中医药, 2016, 11(3): 475-479.
- [12] 方文君, 谭兴起, 胡永胜, 等. 中药何首乌肝毒性物质基础及其毒性机制研究 [J]. 海峡药学, 2015, 27(6): 41-43.
- [13] 梅 雪, 余刘勤, 陈小云, 等. 何首乌化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(1): 122-131.
- [14] 贾歌刘畅, 庞晶瑶, 柏兆方. 何首乌及其成分对人正常肝细胞凋亡的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(11): 46-49.
- [15] 张瑞晨, 刘 斌, 孙震晓, 等. 何首乌提取物对人正常肝细胞L02周期阻滞及凋亡的影响 [J]. 中西医结合学报, 2010, 8(6): 554-561.
- [16] Ma J, Zheng L, He Y S, et al. Hepatotoxic assessment of *Polygoni Multiflori Radix* extract and toxicokinetic study of stilbene glucoside and anthraquinones in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 162: 61-68.
- [17] Tu C, Gao D, Li X F, et al. Inflammatory stress potentiates emodin-induced liver injury in rats [J]. *Front Pharmacol*, 2015, 6: 233-239.
- [18] Yu J, Xie J, Mao X J, et al. Hepatotoxicity of major constituents and extractions of *Radix Polygoni Multiflori* and *Radix Polygoni Multifloriv Praeparata* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(3): 1291-1299.
- [19] 林龙飞. 何首乌致肝损伤成分及作用机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [20] 马 喆, 赵珺睿, 董冉冉, 等. 基于高内涵分析技术的何首乌提取物及其主要成分肝毒性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4021-4029.
- [21] 胡锡琴, 李娅琳, 王 磊. 何首乌中鞣质对大鼠肝脏生

- 化指标的影响 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(1): 63-65.
- [22] 严晓莺, 陈巨鹏, 许冬青, 等. 没食子酸对人正常肝细胞 LO2 的体外细胞毒性研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(8): 1582-1583.
- [23] 邵 丹, 李晓菲, 尹 萍, 等. 基于炮制减毒思想的何首乌肝毒性物质基础初步研究 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2044-2050.
- [24] Deng K L, Jing C, Zhen Z G, *et al.* Hepatotoxicity in rats induced by aqueous extract of *Polygoni Multiflori Radix*, root of *Polygonum multiflorum* related to the activity inhibition of CYP1A2 or CYP2E1 [J]. *Evidence-Based Complement Altern Med*, 2017, doi: 10.1155/2017/9456785.
- [25] 卫培峰, 吴燕燕, 焦晨莉, 等. 何首乌不同成分对大鼠肝脏细胞色素 P450 的影响 [J]. 陕西中医学院学报, 2009, 32(4): 68-69.
- [26] 卫培峰, 张 敏, 焦晨莉, 等. 何首乌不同炮制品对大鼠肝脏 CYP2E1 基因 mRNA 表达的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(17): 1445-1448.
- [27] Zhang Y, Ding T, Diao T T, *et al.* Effects of *Polygonum multiflorum* on the activity of cytochrome P450 isoforms in rats [J]. *Pharmazie*, 2015, 70(1): 47-54.
- [28] 汪美汐, 王宇光, 徐焕华, 等. 何首乌中大黄素对 L02 肝细胞 CYP 亚酶表达及细胞毒性的影响 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(11): 1543-1548.
- [29] Sridhar J, Liu J W, Foroozesh M, *et al.* Inhibition of cytochrome p450 enzymes by quinones and anthraquinones [J]. *Chem Res Toxicol*, 2012, 25(2): 357-365.
- [30] 王来友, 李镜清, 陈 涛, 等. 大黄素的 I 相代谢途径及其对细胞色素 P450 酶的抑制作用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 19(3): 241-245.
- [31] 张远冬, 刘学庆, 郭延垒, 等. 大鼠肝微粒体法评价 20 种中药有效成分对 CYP2C9 酶的作用 [J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(24): 2654-2658.
- [32] 胡锡琴, 李 敏, 杨红莲, 等. 何首乌中鞣质与二苯乙烯苷不同配比对大鼠肝功能指标的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2011, 45(4): 56-59.
- [33] Mueller S O, Stopper H, Dekant W. Biotransformation of the anthraquinones emodin and chrysophanol by cytochrome P450 enzymes [J]. *Drug Metabol Dispos*, 1998, 26(6): 540-546.
- [34] 林 佩, 陆建美, 张光远, 等. 何首乌活性成分在肝 L-02 细胞中吸收及代谢产物的 LC-MS/MS 定性分析 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(12): 1048-1053.