

新藤黄酸对大鼠肝微粒体细胞色素 P450 亚型酶活性的影响

陈伟^{1,2}, 何瑞曦^{1,2}, 彭慧^{1,2}, 朱妍妍^{1,2}, 彭代银^{1,2}, 陈卫东^{1,2}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽省中医药科学院, 安徽 合肥 230012)

[摘要]目的 采用“Cocktail”探针药物法考察新藤黄酸对大鼠肝微粒体细胞色素 P450(cytochrome P450, CYP450)亚型酶活性的影响。方法 将新藤黄酸与 6 种亚型酶(CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4)对应的特异性混合探针药茶碱、双氯芬酸钠、奥美拉唑、右美沙芬、氯唑沙宗和咪达唑仑与大鼠肝微粒体孵育, 采用高效液相色谱法同时检测肝微粒体中 6 种探针底物的相对酶活性并计算其半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})。结果 不同浓度新藤黄酸作用后大鼠肝微粒体 CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 和 CYP3A4 酶活性相比较, 差异均具有统计学意义, 且随着新藤黄酸的浓度增高, 各种酶的活性呈现明显的降低趋势。通过抑制曲线计算得到新藤黄酸对 CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4 的 IC_{50} 值分别为 4.18、45.61、10.02 $\mu\text{mol/L}$, 对 CYP1A2、CYP2C9、CYP2E1 的 IC_{50} 值均大于 100 $\mu\text{mol/L}$ 。结论 新藤黄酸对 CYP2C19 酶活性有中等抑制作用, 对 CYP3A4 酶活性有弱抑制作用, 但对 CYP1A2、CYP2C9、CYP2D6、CYP2E1 酶活性没有抑制作用。

[关键词]新藤黄酸; “Cocktail”探针药物法; 大鼠肝微粒体; 细胞色素 P450

[中图分类号]R285.5 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2016.01.023

藤黄为藤黄科植物藤黄树(*Garcinia hanburyi* Hook. F.)的树干被割伤后的胶状树脂, 中医主要用于攻毒、消肿、祛腐敛疮、止血、杀虫等, 主治痈疽肿毒、溃疡、湿疮、肿瘤、顽癣、跌打损伤及烫伤等。藤黄中含藤黄酸、新藤黄酸和别藤黄酸等成分^[1-2]。研究证实, 新藤黄酸(结构式见图 1)对多种肿瘤细胞, 如肝癌 HepG2 细胞、肺癌 A549 细胞、结肠癌 HCT116 细胞均有不同程度的抑制作用^[3-5], 而对正常细胞不敏感, 且不影响脾、肾等器官的功能。

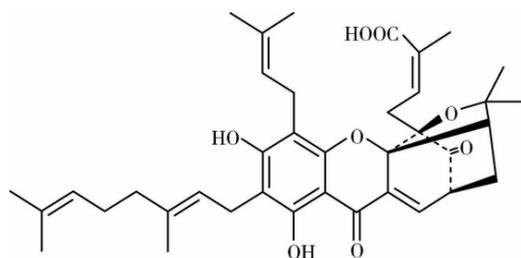


图 1 新藤黄酸结构式

细胞色素 P450(cytochrome P450, CYP450)是肝微粒体混合功能氧化酶中最重要的族, 参与了多数药物及内源性物质在体内的代谢^[6-7], 其活性决定药物的代谢速率和清除率, 而 CYP450 本身又可

被药物诱导或抑制, 导致与其联用的其他药物或者自身代谢的改变, 从而产生代谢性药物相互作用, 影响药效, 产生不良反应^[8]。其主要亚型 CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 和 CYP3A4 参与市面上约 90% 以上药物代谢^[9]。本实验旨在通过采用“Cocktail”探针药物法同时测定 6 种亚型酶底物的含量, 评价新藤黄酸对大鼠肝微粒体 CYP450 不同亚型酶活性的影响, 为新藤黄酸进一步的开发应用提供一定的依据。

1 材料

1.1 主要仪器 岛津 LC-15C 型高效液相色谱仪: 日本岛津公司; AB135-S 十万分之一天平: METTLER TOLEDO 公司; XW-80A 微型旋涡混合仪: 上海沪西分析仪器厂有限公司; TG16-WS 台式高速离心机: 长沙湘仪离心机仪器有限公司; WB-2000 恒温水浴锅: 郑州长城科工贸有限公司; HaierDW-86L388A 立式超低温保存箱: 青岛海尔特种电器有限公司。

1.2 药品与试剂 SD 大鼠肝微粒体(20 mg/mL, 置于 -86°C 冰箱中冷冻保存)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NADPH)再生系统(A 液、B 液, 置于 -86°C 冰箱中冷冻保存)、100 mmol Tris-HCl(pH=7.4)缓冲液: 均购于武汉普来特生物医药技术有限公司; 茶碱(批号 100121-201104)、双氯芬酸钠(批号 100334-200302)、奥美拉唑(批号 100367-201305)和氯唑沙宗(批号 100364-

基金项目: 国家重大新药创制项目(009ZX09103-399); 安徽省科技攻关计划项目(1301042099); 安徽省高校省级自然科学基金研究重点项目(KJ2011A190)

作者简介: 陈伟(1989-), 女, 硕士研究生

通信作者: 陈卫东, anzhongdong@126.com

201302)均购自中国食品药品检定研究院;右美沙芬(批号 Y-104140421)和地西洋(批号 D-104140403)均购自于西安万昌生物科技有限公司;咪达唑仑(批号 D01-20140801)购自于天津一方科技有限公司,纯度均大于99%;新藤黄酸(纯度 $\geq 98\%$):安徽中医药大学新藤黄酸课题组提供;乙腈、甲醇均为色谱纯;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 不同浓度新藤黄酸溶液的配制 精密称取新藤黄酸,加二甲基亚砜(dimethyl sulphoxide, DMSO)溶解,制备成摩尔浓度为20、8、4、2、1、0.25、0.062 5 mmol/L 溶液。

2.1.2 “Cocktail”探针药物溶液的配制 精密称取茶碱、双氯芬酸钠、奥美拉唑、右美沙芬、氯唑沙宗和咪达唑仑,加甲醇溶解,制备成质量浓度分别为0.180、0.636、0.345、0.680、0.542、0.390 g/L 的“Cocktail”混合溶液。

2.1.3 内标溶液的配制 精密称取地西洋,加甲醇溶解,制成质量浓度为5 mg/L 的内标溶液。

2.2 孵育体系 孵育反应体系总体积为500 μL 。体系包括SD大鼠肝微粒体蛋白(0.4 mg/mL), Tris-HCl 缓冲液(100 mmol/L, pH 值为7.4), NADPH 再生系统(A液、B液)以及6种混合探针底物(茶碱、双氯芬酸钠、奥美拉唑、氯唑沙宗、右美沙芬和咪达唑仑,终浓度分别为0.9、3.18、3.45、3.40、2.71、0.975 mg/L),整个孵育体系中药物体积控制在1%以内。

2.3 实验分组 分为新藤黄酸组、空白组、无活性组。其中新藤黄酸组又按不同浓度分为7个组(终浓度分别为100、40、20、10、5、1.25、0.312 5 $\mu\text{mol/L}$)。空白组加入等容积DMSO,无活性组不加NADPH 再生系统,以获得最大底物浓度。

2.4 孵育方法 向已加入10 μL SD大鼠肝微粒体(终浓度为0.4 mg/mL)的Tris-HCl 缓冲液中分别加入2.5 μL 不同浓度的新藤黄酸受试溶液和2.5 μL 含有6种探针底物的“Cocktail”混合溶液(操作过程均在冰浴上进行)。旋涡20 s混匀后置于37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预孵化5 min,加入30 μL NADPH 再生系统启动反应,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min后,加入含有5 mg/L 地西洋的甲醇溶液500 μL 终止反应,旋涡振摇1 min,15 000 r/min 离心10 min,取上清液,进样20 μL 。每组平行做3份。

空白组加入等容积DMSO,无活性组不加NADPH 再生系统,以获得最大底物浓度,其他操作

同新藤黄酸组。按下式计算各CYP同工酶在不同药物作用下的相对酶活性。

$$\text{相对酶活性} = \frac{\text{总底物浓度} - \text{剩余底物浓度}}{\text{总底物浓度}} \times 100.$$

用GraphPad Prism 5.0 软件按非线性回归,将酶相对活性对新藤黄酸浓度的对数值作图,并计算半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})。

2.5 6种探针底物的高效液相色谱条件 Unitary C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm);以水(含0.1%乙酸)为流动相A,以乙腈为流动相B,梯度洗脱程序见表1;流速1.0 mL/min;检测波长为270 nm;柱温30 $^{\circ}\text{C}$ 。结果茶碱、双氯芬酸钠、奥美拉唑、氯唑沙宗、右美沙芬和咪达唑仑与内标物峰形良好,分离完全,无杂质峰干扰,空白肝微粒体对测定无干扰,专属性强,见图2。

表1 流动相梯度洗脱程序

时间/ min	乙腈/ %	0.1%乙酸 水溶液/%	时间/ min	乙腈/ %	0.1%乙酸 水溶液/%
0	16	84	18	60	40
3	16	84	19	90	10
4	45	55	25	90	10
15	45	55	28	16	84
16	60	40	30	16	84

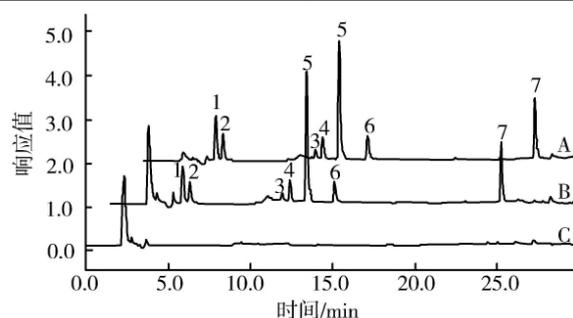


图2 大鼠肝微粒体中6种探针药物及内标的高效液相色谱图

2.6 高效液相色谱法测定6种探针药物的方法学考察

2.6.1 标准曲线的制备及线性范围 采用倍半稀释法,将探针药物的储备溶液配制成一系列浓度的“Cocktail”混合溶液,茶碱的浓度分别为0.225、0.45、0.9、1.8、3.6、4.95、5.4 mg/L,双氯芬酸钠的浓度分别为0.795、1.59、3.18、6.36、12.72、17.49、19.08 mg/L,奥美拉唑的浓度分别为0.862 5、1.725、3.45、6.9、13.8、18.975、20.7 mg/L,右美沙

芬的浓度分别为 0.85、1.7、3.4、6.8、13.6、18.7、20.4 mg/L, 氯唑沙宗的浓度分别为 0.667 5、1.355、2.71、5.42、10.84、14.685、16.02 mg/L, 咪达唑仑的浓度分别为 0.243 8、0.487 5、0.975、1.95、3.9、5.362 5、5.85 mg/L。分别取大鼠肝微粒体 10 μ L 加入 500 μ L Tris-HCl 缓冲液(100 mmol/L, pH 值为 7.4), 经 60 $^{\circ}$ C 加热使肝微粒体失活, 冷却至室温后加入一系列不同浓度的“Cocktail”混合探针溶液 2.5 μ L, 加入含有 5 mg/L 地西洋的甲醇溶液 500 μ L 沉淀蛋白, 旋涡振摇 1 min, 15 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 进样 20 μ L, 记录色谱图。每组平行做 3 份。分别以茶碱、双氯芬酸钠、奥美拉唑、右美沙芬、氯唑沙宗和咪达唑仑与内标峰面积比值(y)对各探针药物的浓度(x)进行线性回归, 结果线性回归良好, 回归系数均大于 0.995, 见表 2。

表 2 大鼠肝微粒体中 6 种探针底物的回归方程

探针底物	线性范围/(mg/L)	回归方程	r
茶碱	0.112 5~2.700	$y=0.251 7x+0.037 3$	0.998 7
双氯芬酸钠	0.397 5~9.540	$y=0.134 0x+0.082 9$	0.999 1
奥美拉唑	0.215 6~5.175	$y=0.103 4x+0.005 4$	0.997 6
右美沙芬	0.338 0~8.010	$y=0.134 7x+0.045 1$	0.997 5
氯唑沙宗	0.425 0~10.200	$y=0.068 5x-0.001 3$	0.999 2
咪达唑仑	0.121 9~2.925	$y=0.067 4x+0.014 5$	0.998 8

2.6.2 灵敏度 按色谱峰信噪比(S/N)为 3 作为检测下限, 茶碱、双氯芬酸钠、奥美拉唑、右美沙芬、氯唑沙宗和咪达唑仑的最低检测限分别为 0.05、0.05、0.03、0.05、0.05 和 0.08 mg/L。

2.6.3 精密度与准确度 分别取大鼠肝微粒体 10 μ L 加入 500 μ L Tris-HCl 缓冲液(100 mmol/L, pH 值为 7.4), 经 60 $^{\circ}$ C 加热使肝微粒体失活, 冷却至室温后加入低、中、高 3 种浓度的“Cocktail”混合溶液, 每个浓度平行制备 5 份, 同时做空白对照, 按“2.6.1”项下操作处理样品, 分别于同日内测定及连续 5 d 内测定 5 次, 分别计算日内和日间精密度及准确度。结果见表 3, 所有样品的日内精密度和日间精密度小于 10%, 同时低、中、高 3 个浓度准确度在 85%~115% 范围内, 符合生物样品分析要求。

2.6.4 回收率试验 分别取大鼠肝微粒体 10 μ L 加入 500 μ L Tris-HCl 缓冲液(100 mmol/L, pH 值为 7.4), 经 60 $^{\circ}$ C 加热使肝微粒体失活, 冷却至室温后加入低、中、高 3 种浓度的“Cocktail”混合溶液, 各探针药物的 3 种浓度见表 3。每个浓度平行制备 5 份, 同时做空白对照, 按“2.6.1”项下操作处理样品, 进样分析得到峰面积, 另取相应浓度的标准溶液直接进样, 记录峰面积, 按照公式“绝对回收率=100% \times 样品峰面积/对照品峰面积”计算其绝对回收率。将茶

表 3 肝微粒体样本中各探针药物的日内、日间精密度和准确度($n=5$)

探针底物	浓度/(mg/L)	日内精密度/%	日内准确度/%	日间精密度/%	日间准确度/%
茶碱	0.450 0	4.30	97.37	6.30	94.35
	1.800 0	1.45	97.21	3.45	95.43
	5.400 0	2.28	98.87	5.28	95.80
双氯芬酸钠	1.590 0	3.56	98.04	5.23	94.95
	6.360 0	2.15	98.65	3.25	95.62
	19.080 0	1.50	98.55	4.41	95.80
奥美拉唑	1.725 0	3.27	97.11	5.25	95.35
	6.900 0	2.15	98.73	4.03	93.64
	20.700 0	2.42	98.55	3.56	92.06
右美沙芬	1.355 0	5.16	96.51	7.25	93.75
	5.420 0	3.07	98.03	5.51	92.54
	16.020 0	3.36	98.72	8.20	92.01
氯唑沙宗	1.700 0	5.16	97.39	6.24	92.86
	6.800 0	1.81	97.43	3.75	90.92
	20.400 0	2.66	99.81	3.54	92.24
咪达唑仑	0.487 5	7.03	95.51	9.50	90.35
	1.950 0	1.91	98.02	4.71	95.33
	5.850 0	3.32	94.70	5.20	92.82

碱、双氯芬酸钠、奥美拉唑、右美沙芬、氯唑沙宗和咪达唑仑峰面积与内标峰面积比值代入标准曲线方程计算出药物浓度, 与理论浓度比较, 计算方法回收率, 其公式为“方法回收率=100% \times 药物浓度/理论浓度”。结果茶碱、双氯芬酸钠、奥美拉唑、右美沙芬、氯唑沙宗和咪达唑仑的低、中、高浓度的绝对回收率和方法回收率均大于 70%, 且在待测浓度范围内, 样品低、中、高浓度的回收率稳定(RSD<10%), 符合生物样品分析要求。

2.6.5 稳定性 分别取大鼠肝微粒体 10 μ L 加入 500 μ L Tris-HCl 缓冲液(100 mmol/L, pH 值为 7.4), 经 60 $^{\circ}$ C 加热使肝微粒体失活, 冷却至室温后加入低、中、高 3 种浓度的“Cocktail”混合溶液, 各探针药物的 3 种浓度见表 4。每个浓度平行制备 5 份。分别考察“室温放置 6 h”“长期放置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存 2 周”“反复冻融 3 次”“样品处理后放置 24 h”的稳定性。结果表明, 在上述条件下样品均稳定。

2.7 统计学方法 使用 SPSS 16.0 统计软件和 Excel 2007 进行数据的处理与分析, 连续型变量采用“均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)”进行统计学描述, 新藤黄酮组和空白组采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

新藤黄酮对大鼠肝微粒体 CYP450 亚型酶活性

的影响见表 4。不同浓度新藤黄酸作用后,大鼠肝微粒体 CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2E1、CYP2D6 和 CYP3A4 酶活性相比较,差异均具有统计学意义(CYP1A2: $F_{(7,16)} = 124.29, P = 0.000$; CYP2C9: $F_{(7,16)} = 31.23, P = 0.000$; CYP2C19: $F_{(7,16)} = 49.55, P = 0.000$; CYP2D6: $F_{(7,16)} = 126.43, P = 0.000$; CYP2E1: $F_{(7,16)} = 30.09, P = 0.000$; CYP3A4: $F_{(7,16)} = 222.56, P = 0.000$)。以酶相对活性为纵坐标,以新藤黄酸浓度的对数值为横坐标作

图,可以得到新藤黄酸对 CYP 亚型酶 CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2E1、CYP2D6 和 CYP3A4 活性的抑制曲线,见图 3。由图 3 可以直观地发现,随着新藤黄酸浓度的增高,各种酶的活性呈现明显的降低趋势。通过抑制曲线计算得到抑制 50% 酶活性的 IC_{50} 值,见表 5。结果新藤黄酸对 CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4 的 IC_{50} 值分别为 4.18、45.61、10.02 $\mu\text{mol/L}$,对 CYP1A2、CYP2C9、CYP2E1 的 IC_{50} 值均大于 100 $\mu\text{mol/L}$ 。

表 4 新藤黄酸对大鼠肝微粒体 CYP 亚型酶相对活性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ ($\mu\text{mol/L}$)	CYP1A2	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP2E1	CYP3A4
空白	0	43.17 \pm 0.44 ^a	33.27 \pm 0.93 ^a	51.50 \pm 0.35 ^a	49.17 \pm 2.62 ^{abcg}	17.63 \pm 1.81 ^a	56.27 \pm 0.15 ^a
GNA	0.312 5	33.70 \pm 0.15 ^b	25.60 \pm 0.64 ^b	37.30 \pm 0.93 ^b	51.27 \pm 0.23 ^b	23.30 \pm 0.56 ^a	52.10 \pm 0.35 ^b
	1.25	32.80 \pm 0.93 ^b	30.37 \pm 1.05 ^a	38.73 \pm 0.93 ^b	55.60 \pm 0.21 ^{cd}	22.10 \pm 0.59 ^a	50.80 \pm 1.13 ^{ab}
	5	35.33 \pm 1.10 ^b	33.93 \pm 1.16 ^{ad}	25.27 \pm 0.33 ^c	49.63 \pm 0.24 ^b	24.40 \pm 0.85 ^a	54.17 \pm 1.08 ^{ab}
	10	35.03 \pm 1.42 ^b	37.73 \pm 1.57 ^d	18.60 \pm 0.36 ^d	52.03 \pm 0.48 ^{bd}	26.20 \pm 0.79 ^a	26.30 \pm 1.06 ^c
	20	23.90 \pm 0.85 ^c	25.00 \pm 2.35 ^{bc}	10.00 \pm 3.70 ^{bcd}	31.70 \pm 0.50 ^{eg}	20.23 \pm 0.97 ^a	17.23 \pm 1.12 ^d
	40	20.00 \pm 1.27 ^d	13.90 \pm 1.64 ^e	11.93 \pm 4.08 ^{abcd}	17.40 \pm 1.57 ^f	13.63 \pm 2.38 ^{ab}	12.80 \pm 2.57 ^{cd}
	100	3.43 \pm 1.79 ^e	34.80 \pm 0.78 ^{ad}	15.67 \pm 1.85 ^{cd}	10.17 \pm 3.09 ^{ef}	3.50 \pm 1.60 ^b	17.43 \pm 1.23 ^{cd}

注:GNA 表示新藤黄酸;具有相同右上标字母的组别相比较, $P > 0.05$;不具有相同右上标字母的组别相比较, $P < 0.05$ 。

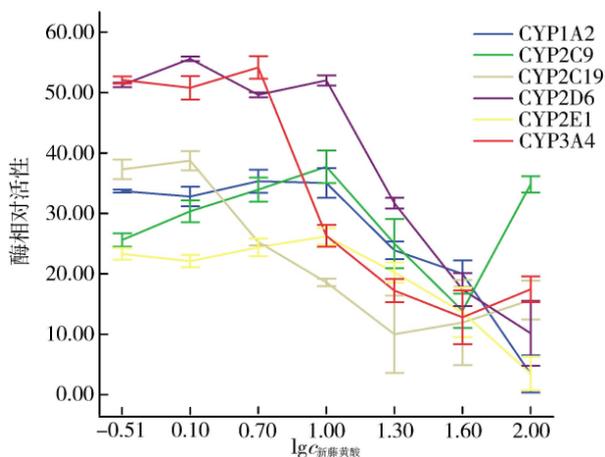


图 3 新藤黄酸对 CYP 各亚型酶活性的抑制曲线图

表 5 新藤黄酸对各 CYP 亚型酶活性的 IC_{50} 值

CYP 亚型酶	特异性探针底物	IC_{50} 值/ $(\mu\text{mol/L})$
CYP1A2	茶碱	>100
CYP2C9	双氯芬酸钠	>100
CYP2C19	奥美拉唑	4.180
CYP2D6	右美沙芬	45.61
CYP2E1	氯唑沙宗	>100
CYP3A4	咪达唑仑	10.02

4 讨论

本实验选择了 CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 和 CYP3A4 六种亚型酶以及各酶对应的探针底物茶碱、双氯芬酸钠、奥美拉唑、右美沙芬、氯唑沙宗和咪达唑仑,采用高效液相色谱法测定肝微粒体孵育样本中底物的浓度,此法能够保

证肝微粒体样本中底物浓度测定的准确性。通过对 6 种探针底物进行全波长扫描发现各探针底物的最大紫外吸收波长都在 270 nm 附近,最终将 270 nm 定为紫外检测波长。考虑到需要分离的物质是具有不同化学结构及理化性质的多成分(6 种探针底物和内标物),本实验选用了 0.1% 乙酸为水相、乙腈为有机相进行梯度洗脱。

大鼠肝微粒体体外代谢实验的关键是酶活性的保持,因此,课题组参考相关文献将肝微粒体提前分装,放置于 $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,以防反复冻融降低肝微粒体 CYP450 的酶活性^[10]。同时加样操作在冰浴上进行,孵育反应的温度选择 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,有氧环境下进行孵育,以保持酶活性,维持正常反应。孵育反应结束选择冰甲醇作为终止试剂,无内源性干扰,且终止效果较好。根据美国相关指导原则^[11],肝微粒体体外孵育体系中加样容积不超过 1%,肝微粒体蛋白浓度、孵育时间和 NADPH 对孵育反应都有影响,经过考察本实验选择的肝微粒体蛋白浓度、孵育时间和 NADPH 加入量满足实验所需,能使反应有效地进行。

本研究在体外以“Cocktail”探针药物法结合大鼠肝微粒体孵育体系评价新藤黄酸对大鼠肝微粒体 CYP450 酶活性的影响,通过测定酶活性获得抑制曲线和 IC_{50} 。根据通用的 CYP450 酶抑制剂强度分级规则^[12]可知:若 $IC_{50} < 1\ \mu\text{mol/L}$ 表示抑制作用很

强,容易抑制药物代谢酶引发药物相互作用;若 $1 \mu\text{mol/L} < \text{IC}_{50} < 10 \mu\text{mol/L}$,表示该药物具有中等抑制作用,其抑制作用一般需要经过体内验证;若 $\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{mol/L}$ 表示抑制作用较弱,在临床上不太可能抑制 CYP450 酶的活性,产生代谢性药物的相互作用。因此,从实验结果可知,新藤黄酸对 CYP2C19 酶活性有中等抑制作用,对 CYP3A4 酶活性有弱抑制作用,但对 CYP1A2、CYP2C9、CYP2D6、CYP2E1 酶活性没有抑制作用。是否在临床应用时产生抑制作用需进行人肝微粒体或与人体合并用药验证。

参考文献:

- [1] 王鸣,冯照,赵友谊,等. 中药藤黄的研究和应用[J]. 中国野生植物资源,2003,22(1):1-4.
- [2] 吕归宝,杨秀贤,黄乔书. 藤黄中新藤黄酸的分离及其结构[J]. 药学学报,1984,19(8):636-639.
- [3] Yan F, Wang M, Li J, et al. Gambogenic acid induced mitochondrial-dependent apoptosis and referred to Phospho-Erk1/2 and Phospho-p38 MAPK in human hepatoma HepG2 cells[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2012, 33(2): 181-190.
- [4] Cheng H, Su JJ, Peng JY, et al. Gambogenic acid inhibits proliferation of A549 cells through apoptosis inducing through up-regulation of the p38 MAPK cascade [J]. J Asian Nat Prod Res, 2011, 13(11): 993-1002.
- [5] 戴婷婷,程卉,苏婧婧,等. 新藤黄酸通过内质网应激诱导人结肠癌 HCT116 细胞凋亡的研究[J]. 安徽中医药大学学报,2014,33(1):63-66.

- [6] Youdim KA, Tyman CA, Jones BC, et al. Induction of cytochrome P450: assessment in an immortalized human hepatocyte cell line (Fa2N4) using a novel higher throughput cocktail assay[J]. Drug Metab and Dispos, 2007, 35(2): 275-282.
- [7] Frye RF. Probing the world of cytochrome P450 enzymes[J]. Mol Interv, 2004, 4(3): 157-162.
- [8] 李芹,王睿. 细胞色素 P4502D6 基因多态性和药物相互作用[J]. 中国临床药理学与治疗学,2006,11(4):369-374.
- [9] 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.
- [10] Walsky RL, Obach RS. Validated assays for human cytochrome P450 activities [J]. Drug Metab Dispos, 2004,32(6):647-660.
- [11] US FDA. Guidance for industry: Drug interaction studies—study design, data analysis, and implication for dosing and labeling [EB/OL]. [2015-07-21]. <http://www.fda.gov/downloads/drugs/developmentapprovalprocess/developmentresources/druginteractionlabeling/ucm091837.pdf>.
- [12] Liu Y, Jiao J, Zhang C, et al. A simplified method to determine five cytochrome p450 probe drugs by HPLC in a single run [J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(4): 717-720.

(收稿日期:2015-09-15;编辑:张倩)

Effects of Gambogenic Acid on Activities of Cytochrome P450 Enzymes in Rat Liver Microsomes

CHEN Wei^{1,2}, HE Rui-xi^{1,2}, PENG Hui^{1,2}, ZHU Yan-yan^{1,2}, PENG Dai-yin^{1,2}, CHEN Wei-dong^{1,2} (1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 2. Anhui Academy of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of gambogenic acid on the activities of cytochrome P450 (CYP450) enzymes in rat liver microsomes by a probe-drug cocktail. **Methods** The rat liver microsomes were incubated with gambogenic acid and the mixture of specific probe drugs (theophylline, diclofenac sodium, omeprazole, dextromethorphan, chlorzoxazone, and midazolam) for the six CYP450 enzymes (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, and CYP3A4). High-performance liquid chromatography was applied to measure the relative enzymatic activities of six probe substrates in liver microsomes and calculate half maximal inhibitory concentration (IC_{50}). **Results** After incubation with gambogenic acid at various concentrations, there were significant differences in the activities of CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, and CYP3A4 in rat liver microsomes, and with the increasing concentration of gambogenic acid, the activities of these enzymes decreased significantly. According to the inhibitory curve, the IC_{50} of gambogenic acid for CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4 was 4.180, 45.61, and 10.02 $\mu\text{mol/L}$, respectively, and the IC_{50} of gambogenic acid for CYP1A2, CYP2C9, and CYP2E1 was higher than 100 $\mu\text{mol/L}$. **Conclusion** Gambogenic acid has a moderate inhibitory effect on the activity of CYP2C19

· 方药研究 ·

金钱白花蛇的微性状鉴别

穆二廷¹, 刘耀武², 杨青山³, 孙煜峥²

(1. 国家中药材产品质量监督检验中心, 安徽 亳州 236800; 2. 亳州职业技术学院, 安徽 亳州 236800; 3. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012)

[摘要]目的 对目前药材市场上流通的金钱白花蛇及其伪品进行鉴别。方法 利用性状鉴别法对金钱白花蛇及伪品进行性状鉴别, 利用微性状鉴别法对金钱白花蛇及伪品的鳞片特征进行鉴别。结果 4个样品中, 仅一种样品为金钱白花蛇, 其他3种样品为赤练蛇, 其中2种样品为黑漆染色的赤练蛇。结论 微性状鉴别法可以用于金钱白花蛇的真伪鉴别, 市场上流通的金钱白花蛇造假严重, 危及患者用药安全。

[关键词]金钱白花蛇; 混伪品; 性状鉴别; 微性状鉴别

[中图分类号]R931.5 [DOI]10.3969/j.issn.2095-7246.2016.01.024

金钱白花蛇为眼镜蛇科动物银环蛇 *Bungarus multicinctus* Blyth 的干燥幼体^[1]。夏、秋二季捕捉, 剖开蛇腹, 除去内脏, 擦净血迹, 用乙醇浸泡处理后, 盘成圆形, 用竹签固定, 干燥。金钱白花蛇味甘咸, 性温, 有毒, 归肝经, 祛风、通络、止痉, 用于风湿顽痹、麻木拘挛、半身不遂、抽搐痉挛、破伤风、麻风疥癣、瘰疬恶疮等^[2]。金钱白花蛇是常用贵重药材, 药材市场上不乏假的金钱白花蛇^[3]。为了摸清药材市场流通的金钱白花蛇的真伪情况, 本课题组在安徽省亳州药材市场随机购买4批次金钱白花蛇, 利用性状鉴别法和微性状鉴别法对4种实验样品进行研究。

1 材料

1.1 仪器 XSZ-G型生物显微镜: 重庆光电仪器有限公司; MC-D500(E)型500万像素电子摄像目镜: 江西上饶县凤凰光学集团; 佳能60D照相机: 日本佳能公司。

1.2 药材 4批次金钱白花蛇样品(含伪品)购于安徽省亳州药材市场。编号为A、B、C、D。见图1。

2 方法

2.1 性状鉴别

2.1.1 头部鉴别特征 A样品头部7片鳞片, 大小不一, 区分明显, 对称, 棕黑色。B样品头部经过处

理, 鳞片不能区分, 连成一片, 头后部鳞片脱落, 露出头骨骼。C样品头部有5片鳞片, 大小不一, 区分明显, 对称, 灰黑色。D样品头部黑色染色明显, 不能区分鳞片数, 黑而发亮。

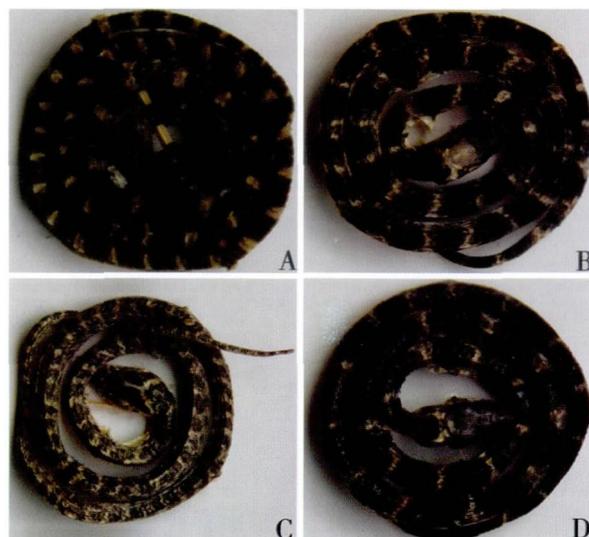


图1 4种金钱白花蛇样品性状特征(×1倍)

2.1.2 蛇盘特征 A样品蛇盘紧实, 蛇头上翘突出蛇盘, 蛇尾从蛇盘底部嵌入蛇盘, 蛇尾粗短。B、C、D样品蛇盘不规整、松弛, 蛇头与蛇盘齐平, 蛇尾偶尔有嵌入蛇盘, 蛇尾细长。

2.1.3 斑纹鉴别特征 A样品白棕色与黑棕色相间, 斑纹规则且区分明显。黑棕色斑纹宽度是白棕色斑纹宽度的3~5倍, 尾部斑纹相间较密, 宽度比例接近1:1。B样品黑色与白色相间, 斑纹不规则,

基金项目: 国家自然科学基金项目(81303177)

作者简介: 穆二廷(1987-), 男, 硕士

通信作者: 刘耀武, lywahljy@163.com

and a weak inhibitory effect on the activity of CYP3A4, but shows no inhibitory effects on CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, and CYP2E1.

[Key words] Gambogic acid; Probe-drug cocktail; Rat liver microsome; Cytochrome P450