

寒证大鼠细胞色素 P₄₅₀ 亚酶的表征及肉桂的调控

常新林 胡亚丹 钟 婷 李坤丽 张玉杰 孙振晓 杨 洁 张园园

(北京中医药大学中药学院, 北京, 100102)

摘要 目的:考察寒证大鼠肝脏细胞色素 P₄₅₀ (CYP₄₅₀) 亚酶的表征特点及热性中药的调控效果。方法:选取知母-石膏-黄柏-龙胆草制备寒性造模药,对 SD 大鼠诱导 21 d 后复制寒证模型;另取肉桂提取物对寒性大鼠进行干预,制备观察组;用生理盐水处理为对照组。钙盐沉淀法制备肝脏微粒体,与混合探针药物温孵,用高效液相色谱 (HPLC) 法测定探针药物的代谢消除百分率,评价 CYP₄₅₀ 亚酶活性变化。提取肝脏总 RNA,实时荧光定量 PCR 法测定 CYP₄₅₀ 亚酶的 mRNA 表达。结果:寒性中药对大鼠 CYP3A1 酶的活性和 mRNA 具有显著的抑制作用,热性肉桂具有一定的调控作用,并且这种调控发生在 mRNA 水平。结论:本研究从多角度系统评价和验证寒证机体 CYP₄₅₀ 亚酶的表征特点及热性中药的调控效果。

关键词 寒证;大鼠;肉桂;细胞色素 P₄₅₀;Cocktail 探针法;mRNA;造模;调控

Characterization of CYP₄₅₀s in Cold Syndrome Rats and the Regulative Effect of Cinnamomum Cassia

Chang Xinlin, Hu Yadan, Zhong Ting, Li Kunli, Zhang Yujie, Sun Zhenxiao, Yang Jie, Zhang Yuanyuan

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract Objective: To study the characterization of five kinds of CYP₄₅₀ in the liver of cold syndrome rats and the regulative effect of heat traditional Chinese medicine. **Methods:** Cold syndrome model was induced in SD rats for 21 days by gavage of Anemarrhena asphodeloides-Gypsum Fibrosum-Cortex Phellodendri-Gentiana scabra. In addition, cold syndrome rats were treated with Cinnamomum cassia extract to prepare the treatment group. Saline was used as the control medicine. The liver microsomes were prepared by calcium precipitation method, incubated with mixed probe drugs, and the percentage of metabolic elimination of the probe drugs was determined by HPLC method to evaluate CYP₄₅₀ activity. Total RNA was extracted from the liver and mRNA expression of CYP₄₅₀s was determined by real-time fluorescent quantitative PCR. **Results:** The cold medicine can inhibit the activity and mRNA of CYP3A1 in rats. Cinnamomum cassia has a certain regulative effect which took place at mRNA level. **Conclusion:** This study should be further combined with protein expression experiments to evaluate and verify the characteristics of CYP₄₅₀ enzyme in cold syndrome and the regulation effect of heat traditional Chinese medicine from multi-angle system.

Key Words Cold syndrome; Rat; Cinnamomum cassia; CYP₄₅₀; Cocktail probe method; mRNA

中图分类号:R282 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.02.015

中药药性理论是中医药基本理论之一,寒热药性理论是其基础和核心。以偏纠偏是药物治疗作用的本质所在,即“热者寒之、寒者热之”。现代基因技术、代谢组学和药物动力学等研究表明,寒、热证候下机体的代谢网络明显偏离正常,而经中药干预后模型动物的代谢谱回归至正常范围,呈现一定的网络修复的效果^[1-4]。细胞色素 P₄₅₀ 酶 (CYP₄₅₀ 酶) 为机体代谢网络中最重要的功能蛋白,是机体内、外源小分子物质代谢的主要承担者,在维持机体内环境的稳态、代谢对机体有害的物质和免疫方面发挥着重要作用^[5]。研究表明,热证(寒证)下,机体肾上腺皮质激素、性激素等类固醇激素,胆固醇、脂肪酸等内源性物质代谢异常^[6-9],CYP₄₅₀ 酶作为直接参

与上述物质代谢的功能蛋白^[10],其表达水平的特异性改变将反映热证(寒证)下机体代谢网络特点。另有研究报道配伍热性药后,寒性药对 CYP₄₅₀ 酶的抑制作用得到调控^[11-12]。我们选取肝脏中含量较高的 5 种 CYP₄₅₀ 亚酶,以寒证模型大鼠为载体,采用热性中药肉桂进行干预,从酶的活性和 mRNA 表达水平考查寒证机体 CYP₄₅₀ 酶的表征特点及热性中药的调控效果,考察 CYP₄₅₀ 酶与中药药性的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 选取雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 24 只,体质量 (200 ± 10) g,购自北京维通利华实验动物中心,许可证号 SCXK(京)2012-0001。大鼠于

基金项目:国家自然科学基金项目(81303241)

作者简介:常新林(1993.04—),男,硕士研究生,研究方向:中药化学,E-mail:754608409@qq.com

通信作者:张园园(1979.01—),女,博士研究生,副教授,研究方向:中药药物代谢动力学,E-mail:choenen@163.com

实验室常规饲养,实验前禁食 12 h,自由饮水。

1.1.2 药物 肉桂、知母、石膏、黄柏、龙胆草药材购自北京同仁堂药店,经北京中医药大学药用植物教研室王学勇教授鉴定。

1.1.3 试剂与仪器 探针药物美托洛尔(CYP2D1 底物)、氨苯砜(CYP3A1 底物)、非那西丁(CYP1A2 底物)、氯唑沙宗(CYP2E1 底物)、甲苯磺丁脲(CYP2C11 底物),内标五味子醇甲,NADPNa₂,D-葡萄糖-6-磷酸二钠、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、考马斯亮蓝 G-250 均购于 Sigma 公司;乙腈、甲醇为色谱纯(美国 Fisher);引物、RT 试剂、荧光定量 PCR 试剂、sybr greenI 均购自 ShineGene 公司。LC-10AT 高效液相色谱仪(日本岛津),FTC2000 荧光定量 PCR 仪(加拿大 Funglyn Biotech);GL-21M 高速冷冻离心机(上海卢湘仪)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 采用水煎法制备。分别称取造模用(知母-生石膏-黄柏-龙胆草 1.5:2:1:1)^[13]、治疗用(肉桂)药材,8 倍量水浸泡 1 h,回流提取 1 h,滤过后用 6 倍量水回流提取 30 min,2 次药液合并,减压浓缩至造模用药液浓度为 1 g 生药/mL,低剂量观察组药液浓度为 1 g 生药/mL,高剂量观察组药液浓度为 3 g 生药/mL。

1.2.2 给药方法 采用造模药复制热证模型,每鼠每日上午灌胃给予 4 mL 造模用药液,连服 21 d;正常对照组给予等体积生理盐水。第 8 天起每日下午,观察组分别灌胃给予相应的药物治疗(10 mL/kg),模型对照和正常对照组给予生理盐水(10 mL/kg),连续 14 d。大鼠末次给药后 2 h 腹腔注射 25% 的乌拉坦麻醉处死,取肝组织剪碎、漂洗、吸干,-80 ℃ 保存。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 Cocktail 实验 1)大鼠肝微粒体的制备 取大鼠肝组织,按 1:3 的比例加入 KCL 缓冲液,匀浆。将匀浆液于 4 ℃,4 500 r/min 离心 20 min,再取上清液与 88 mmol/L CaCl₂ 溶液混匀,使终浓度为 8 mmol/L,冰浴 5 min,再于 4 ℃,13 000 r/min,离心 20 min,用 KCl 缓冲液洗涤沉淀 1 次,所得微粒体以 Tris-蔗糖缓冲液(pH7.4)混悬,-80 ℃ 保存^[14]。

2)温孵条件及样品处理 精密量取各探针药物溶液于 PE 管中,氮气吹干,加入 200 μL 大鼠肝微粒体蛋白(2 mg/L),于 37 ℃ 水浴均匀振荡 3 min,加入 200 μL NADPH-发生系统,于 37 ℃ 水浴中反应 30 min 后立即按 1:3 的比例加入冰甲醇终止反应,加

入 20 μL 0.06 mg/mL 内标,于 4 ℃,6 000 r/min,离心 20 min。取上清液氮气吹干,甲醇溶解后用高效液相色谱(HPLC)法分析。

3)HPLC 实验 迪马 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),(NH₄)₂HPO₄ 缓冲盐(A,pH 3.6),乙腈(B)梯度洗脱,程序如表 1,流速:1.0 mL/min,柱温:40 ℃,检测波长 230 nm。色谱图如图 1 所示。可见 5 种探针药物与内标物峰形良好,空白肝微粒体实验也未见干扰,方法专属性强。

用 HPLC 法测定各探针底物浓度,计算代谢消除百分率。公式如下:

探针底物代谢消除百分率(%) =

$$\frac{\text{加入探针底物的量} - \text{测得探针底物的量}}{\text{加入探针底物的量}} \times 100$$

表 1 流动相洗脱程序

T(min)	A(%)	B(%)
0.01	72	28
5.00	72	28
5.01	55	45
20	30	70

1.2.3.2 实时荧光定量 PCR 1)RNA 的提取与鉴定 取剪碎的肝组织,每 50~100 mg 加入 1 mL TRIzol 试剂,按试剂说明书进行提取,将提取的 RNA 溶解于适量无 RNase 水中。空白组 A₂₆₀/A₂₈₀ = 1.97;实验组 A₂₆₀/A₂₈₀ 的结果介于 1.8~2.0,即没有残余蛋白,RNA 纯度较高(图 2)。

2)逆转录 配制逆转录反应体系(总体积 20 μL),其中含 2×RT buffer 10 μL、6N 随机引物(100 pmol/μL)1 μL、RT-mix 1 μL、模板(RNA)5 μL、DEPC 水 3 μL。反应条件为 25 ℃ 10 min,42 ℃ 50 min,85 ℃ 5 min。

3)荧光定量 PCR 对 Cocktail 法检测到有活性改变的 3 种亚酶进行 mRNA 水平检测。PCR 反应体系(总体积 50 μL)中包含 2×PCR buffer 25 μL、Primers(25 pmol/μL)2 μL、Sybr green I(20 pmol/μL)0.5 μL、模板(cDNA)2 μL、DEPC 水 20.5 μL。扩增条件为 94 ℃ 4 min,94 ℃ 20 s,退火温度为 60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 秒循环 35 次,72 ℃ 检测信号。以 β-actin 为内参基因,进行 PCR 扩增产物的实时定量分析,用 2^{-ΔΔCT} 方法分析 mRNA 的表达。检测的 CYP₄₅₀ 亚酶及特异性引物序列见表 2。

1.3 统计学方法 采用 SAS 9.3 统计软件处理。代谢消除百分率以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间平均值比较采用 LSD-t 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

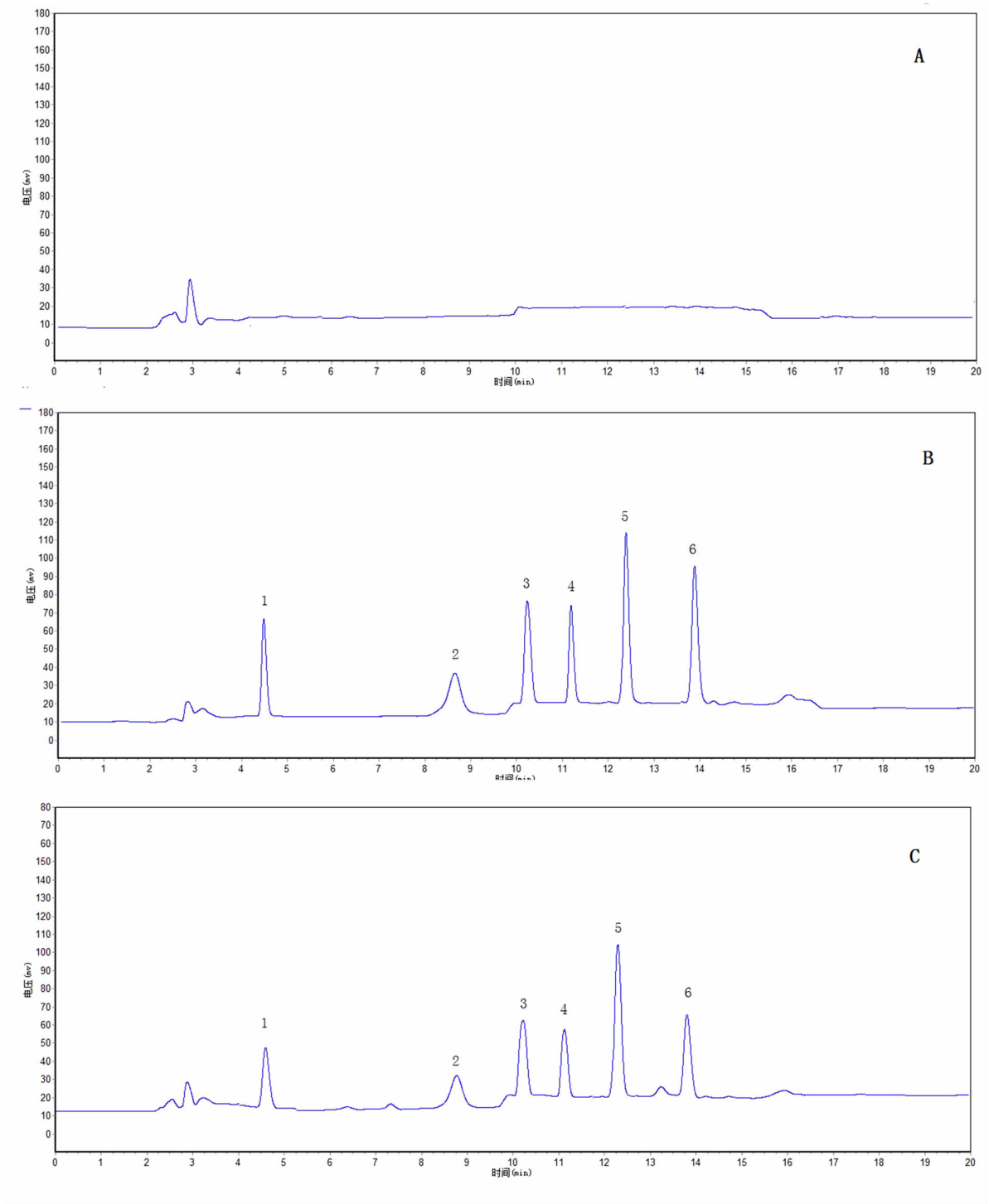


图 1 HPLC 色谱图

注:A. 空白肝微粒体;B. 探针药物 + 内标混合对照溶液;C. 大鼠肝微粒体 + 5 种探针药物 + 内标的温孵样品。1. 美托洛尔;2. 氨苯砜;
3. 非那西丁;4. 氯唑沙宗;5. 甲苯磺丁脲;6. 内标

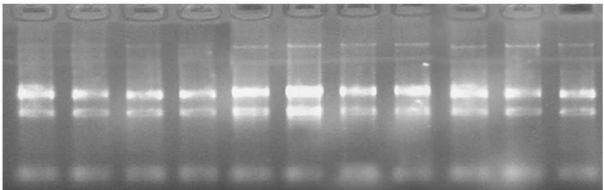


图 2 Sybr green

2 结果

2.1 CYP₄₅₀ 亚酶的活性 与空白组比较,寒性造模药物可非常显著抑制 CYP3A1、CYP1A2 的活性。治疗后,肉桂高剂量组对寒证大鼠 CYP3A1 的活性有非常显著的上调趋势,肉桂高、低剂量组对寒证大鼠 CYP1A2 的活性都有显著上调作用。对于 CYP2E1,

表 2 实时荧光定量引物序列

CYP ₄₅₀ 亚酶	上游引物	下游引物	片段长度 (bp)
CYP3A1	GAGATCACAGCCCACTCAATC	AGGTGGGAGTGCCTTATTG	160
CYP1A2	CTCCGTTACTCCTCAACTCTC	GGCTGTCTGTGATGTCCCG	136
CYP2E1	GTTTTCCCTAAGCATTTCTCCG	CAGAAATGTGGGGTCAAAAGG	133
Actin	CCCATCTATGAGGGTTACGC	TTTAATGTCACGCACGATTTC	150

表 3 大鼠肝微粒体中探针药物的代谢消除百分率($\bar{x} \pm s, \%$, $n = 6$)

组别	美托洛尔	氨苯砜	非那西汀	氯唑沙宗	甲苯磺丁脲
寒证模型组	23. 27 ± 2. 15	33. 59 ± 7. 20 *	16. 09 ± 4. 24 *	31. 10 ± 3. 36	22. 57 ± 2. 21
肉桂低剂量组	24. 50 ± 4. 39	34. 60 ± 5. 16	20. 11 ± 3. 24 [△]	32. 07 ± 4. 28	20. 31 ± 2. 01
肉桂高剂量组	23. 74 ± 3. 07	40. 12 ± 4. 77 [△]	20. 69 ± 3. 15 [△]	34. 33 ± 6. 09 [△]	21. 79 ± 3. 33
空白组	25. 66 ± 1. 32	47. 96 ± 0. 24	22. 26 ± 2. 83	32. 84 ± 1. 81	20. 29 ± 3. 63

注:与空白组比较, * $P < 0. 05$;与模型组比较, [△] $P < 0. 05$

寒性中药对大鼠肝微粒体该酶活性无显著影响,给予高剂量肉桂后,酶活性被诱导。而 CYP2D1 和 CYP2C11 活性未受药物影响。见表 3。

2.2 CYP₄₅₀ 亚酶的 mRNA 表达 表明在 mRNA 水平,寒性大鼠 CYP3A1 的表达也被显著抑制。给予热性药肉桂后,寒证大鼠 CYP3A1 的 mRNA 表达上调。而给药组 CYP1A2、CYP2E1 的 mRNA 与空白组无差异,即酶活性改变的机制不是发生在 mRNA 水平。见表 4。

表 4 大鼠肝脏 CYP₄₅₀ 亚酶的 mRNA 表达

组别	CYP3A1	CYP1A2	CYP2E1
寒证模型组	0. 41 ± 0. 69 *	0. 94 ± 0. 17	0. 96 ± 0. 96
肉桂低剂量组	0. 87 ± 0. 18 [△]	0. 91 ± 0. 33	1. 07 ± 0. 12
肉桂高剂量组	0. 81 ± 0. 23 [△]	0. 87 ± 0. 31	0. 93 ± 0. 09
空白组	1. 00 ± 0. 08	1. 00 ± 0. 11	1. 00 ± 0. 12

注:与空白组比较, * $P < 0. 05$;与模型组比较, [△] $P < 0. 05$

3 讨论

CYP₄₅₀ 酶为体内最重要的代谢酶,仅 CYP2D6、CYP3A、CYP1A2、CYP2E1、CYP2C19 五种亚酶就参与了 90% 的药物代谢^[15],其在大鼠体内的同源蛋白分别为 CYP2D1、CYP3A1/2、CYP1A2、CYP2E1、CYP2C11。其中 CYP3A 是人体内表达最丰富的 CYP₄₅₀ 酶,在药物代谢中发挥绝对重要的作用,可代谢进 50% 的药物。本研究表明,寒性中药对大鼠 CYP3A1 酶的活性和 mRNA 具有显著的抑制作用,热性肉桂具有一定的调控作用,并且这种调控发生在 mRNA 水平。

本研究选取 Cocktail 探针药物法考查酶活性,从而探讨寒证机体 CYP₄₅₀ 酶的特征特点及热性中药的调控效果,方法的优点在于可以在单个试验过程获得多个代谢途径的信息,从而真实地反映出药物

对 CYP₄₅₀ 不同亚型代谢酶的影响,此外,该方法受个体间的差异影响也比较小,省时经济、简便灵敏。

药物对 CYP₄₅₀ 酶活性的影响机制包括酶的基因表达、转录水平、翻译水平等多方面。只有 CYP₄₅₀ 同工酶的活性、蛋白水平和 mRNA 水平都降低(升高)才表明该酶被抑制(诱导)^[16]。因此,本研究要进一步结合蛋白表达实验,从多角度系统评价和验证寒证机体 CYP₄₅₀ 酶的特征特点及热性中药的调控效果。

参考文献

[1] 王米渠,冯韧,严石林,等. 基因表达谱芯片与中医寒证的 7 类相关基因[J]. 中医杂志,2003,44(4):288-289.

[2] 冯韧. 用基因芯片研究热药治疗寒证的差异基因表达谱[D]. 成都:成都中医药大学,2004.

[3] 周红光. 代谢组学在中医基础理论研究中的应用[J]. 中国中医药信息杂志,2013,20(9):101-104.

[4] 陈烁,王秀凤. 肾虚证代谢组学研究进展[J]. 广东药科大学学报,2015,31(6):829-832.

[5] Slaughter RL, Edwards DJ. Recent advances; the cytochrome P₄₅₀ enzymes [J]. Ann Pharmacother, 1995, 29(6):619-624.

[6] 王子晨,张建军,朱映黎,等. 阿萨伊对虚热和虚寒证大鼠的脂肪代谢、免疫物质和内分泌激素的影响[J]. 中国中药杂志,2017,42(13):2552-2557.

[7] 秦路平,张汉平,张卫东,等. 蛇床子素和蛇床子总香豆素对肾虚大鼠血清甲状腺激素和促甲状腺激素的影响[J]. 中国中西医结合杂志,1996,16(9):552-553.

[8] 成秀梅,杜惠兰,路帅,等. 寒凝血瘀模型大鼠下丘脑神经递质的变化及其对生殖内分泌的影响[J]. 北京中医药大学学报,2012,35(10):670-672.

[9] 闫波,孙国祥,孙万阳,等. 中药寒热温凉四性研究方法与思路[J]. 中南药学,2016,6(6):572-580.

[10] 赵阳阳,许智慧,刘妍,等. 细胞色素 P₄₅₀ 基因多态性与药物代谢研究进展[J]. 临床药物治疗杂志,2017,14(4):6-11.

- (3):272-278.
- [8] Wu Y, Cui W, Zhang D, et al. The shortening of leukocyte telomere length relates to DNA hypermethylation of LINE-1 in type 2 diabetes mellitus[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(43):73964-73973.
- [9] Ma D, Zhu W, Hu S, et al. Association between oxidative stress and telomere length in Type 1 and Type 2 diabetic patients[J]. *J Endocrinol Invest*, 2013, 36(11):1032-1037.
- [10] Shen Q, Zhao X, Yu L, et al. Association of leukocyte telomere length with type 2 diabetes in mainland Chinese populations[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(4):1371-1374.
- [11] Gallicchio L, Gadalla SM, Murphy JD, et al. The Effect of Cancer Treatments on Telomere Length: A Systematic Review of the Literature[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2018, 110(10):1048-1058.
- [12] Fyhrquist F, Silventoinen K, Saijonmaa O, et al. Telomere length and cardiovascular risk in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy: the LIFE study[J]. *J Hum Hypertens*, 2011, 25(12):711-718.
- [13] Wang YY, Chen AF, Wang HZ, et al. Association of shorter mean telomere length with large artery stiffness in patients with coronary heart disease[J]. *Aging Male*, 2011, 14(1):27-32.
- [14] Fan HC, Chen CM, Chi CS, et al. Targeting Telomerase and ATRX/DAXX Inducing Tumor Senescence and Apoptosis in the Malignant Glioma[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(1):200-221.
- [15] Arsenis NC, You T, Ogawa EF, et al. Physical activity and telomere length: Impact of aging and potential mechanisms of action[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(27):45008-45019.
- [16] Bauman AE, Smith BJ. Healthy ageing: what role can physical activity play? [J]. *Med J Aust*, 2000, 173(2):88-90.
- [17] Hafstad AD, Boardman NT, Lund J, et al. High intensity interval training alters substrate utilization and reduces oxygen consumption in the heart[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2011, 111(5):1235-1241.
- [18] Kemi OJ, Loennechen JP, Wisløff U, et al. Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2002, 93(4):1301-1309.
- [19] Sies H, Berndt C, Jones DP, et al. Oxidative Stress[J]. *Annu Rev Biochem*, 2017, 86:715-748.
- [20] Maes M, Galecki P, Chang YS, et al. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2011, 35(3):676-692.
- [21] Borgstahl GEO, Oberley-Deegan RE. Superoxide Dismutases (SODs) and SOD Mimetics[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2018, 7(11):156-159.
- [22] Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach[J]. *Biol Chem*, 2017, 398(10):1095-1108.
- [23] Schmitt B1, Vicenzi M2, Garrel C3, et al. Effects of N-acetylcysteine, oral glutathione (GSH) and a novel sublingual form of GSH on oxidative stress markers: A comparative crossover study[J]. *Redox Biol*, 2015, 6:198-205.
- [24] Dąbrowska N, Wiczowski A. Analytics of oxidative stress markers in the early diagnosis of oxygen DNA damage[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2017, 26(1):155-166.
- [25] Tian F, Tong TJ, Zhang ZY, et al. Age-dependent down-regulation of mitochondrial 8-oxoguanine DNA glycosylase in SAM-P/8 mouse brain and its effect on brain aging[J]. *Rejuvenation Res*, 2009, 12(3):209-215.
- [26] Zheng J, Bizzozero OA. Traditional reactive carbonyl scavengers do not prevent the carbonylation of brain proteins induced by acute glutathione depletion[J]. *Free Radic Res*, 2010, 44(3):258-266.
- [27] Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014:360438.
- [28] Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo[J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28(4):505-513.
- (2018-04-19 收稿 责任编辑:杨觉雄)
- (上接第 329 页)
- [11] 田义超, 周静, 徐凌云. 银杏内酯 B 注射液对大鼠体外肝微粒体 CYP1A2 活性的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2014, 30(3):204-207.
- [12] 奚丽君. 以半夏药对研究七情配伍对细胞代谢酶 P₄₅₀ 的影响[D]. 南京:南京中医药大学, 2009.
- [13] 梁月华, 李薪萍, 任红. 寒证热证时中枢、内脏、尿内儿茶酚胺及 5-羟色胺的变化[J]. *中医杂志*, 1991, 32(12):38-40.
- [14] 韦灵玉, 张玉杰, 魏宝红, 等. 黄连黄芩及配伍诱导对大鼠肝微粒体 5 种 CYP₄₅₀ 亚酶活性的影响[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(9):1426-1428.
- [15] 爱德华. 类药性质—概念、结构设计与方法, 从 ADME 到安全性优化[M]. 钟大放译. 北京:科学出版社, 2011:186.
- [16] 陈西敬. 药物代谢动力学研究进展[M]. 北京:化学工业出版社, 2008:100.
- (2016-11-30 收稿 责任编辑:杨觉雄)