

吴茱萸碱与吴茱萸次碱经PXR、CAR核受体通路影响CYP3A4表达的研究

黄凌*, 邝少轶, 张丽*(海南医学院药学院药理教研室, 海口 571101)

中图分类号 R285;R962 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)35-3274-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.35.04

摘要 目的:研究吴茱萸碱与吴茱萸次碱能否通过孕烷X受体(PXR)、组成型雄甾烷受体(CAR)通路转录调节CYP3A4的活性。方法:PXR表达质粒与CYP3A4报告质粒、CAR表达质粒与CYP3A4报告质粒瞬时转染到LS174T细胞后,分别给予2.5、10、40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的吴茱萸碱与吴茱萸次碱,采用报告基因检测CYP3A4荧光素酶活性;采用二步灌注法分离小鼠原代肝细胞,给予2.5、10、40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的吴茱萸碱与吴茱萸次碱,采用实时荧光定量链式聚合酶反应(R-PCR)与液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法检测小鼠原代肝细胞中CYP3A11基因表达和酶活性。结果:在10、40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下,吴茱萸碱经PXR核受体通路使CYP3A4报告基因荧光素酶活性分别增加至3.41、4.15倍;10、40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下吴茱萸次碱能使利福平对PXR的诱导作用减少,分别降低37.7%、45.34%,吴茱萸次碱能使CAR阳性药物CITCO对CAR的诱导作用减少29%。10、40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下吴茱萸碱能使CYP3A11 mRNA表达分别增加至2.67、3.80倍;40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下吴茱萸次碱能下调原代小鼠肝细胞中35%的CYP3A11 mRNA表达。10、40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下吴茱萸碱能显著增加CYP3A11酶功能活性分别至3.63、3.01倍;吴茱萸次碱在40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下能显著减少34.54% CYP3A11酶功能活性。结论:吴茱萸碱能通过PXR核受体通路诱导CYP3A4荧光素酶、mRNA表达及酶活性,吴茱萸次碱能通过PXR、CAR通路共同抑制CYP3A4荧光素酶、mRNA表达及酶活性。

关键词 吴茱萸碱;吴茱萸次碱;药物相互作用;孕烷X受体;组成型雄甾烷受体;CYP3A4

Effects of Evodiamine and Rutecarpine on Human CYP 3A4 through PXR and CAR Pathway

HUANG Ling, KUANG Shao-yi, ZHANG Li (Dept. of Pharmacology, School of Pharmacy, Hainan Medical College, Haikou 571101, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of evodiamine and rutecarpine on the activity of cytochrome CYP 3A4 through pregnane X receptor (PXR) and constitutive androstane receptor (CAR) pathway. METHODS: PXR plasmid and the CYP3A4 report plasmid or CAR plasmid and the CYP3A4 report plasmid were transiently transfected into the LS174T cell, and the evodiamine and rutecarpine 2.5, 10 and 40 $\mu\text{mol/L}$ were incubated with the LS174T cell. The activities of luciferase were determined with CYP3A4 report gene. Primary hepatocytes were isolated from mice by two steps perfusion method and then treated with evodiamine and rutecarpine 2.5, 10 and 40 $\mu\text{mol/L}$. CYP3A11 mRNA expression and enzymatic activity of primary hepatocytes were measured using real-time PCR and LC-MS/MS. RESULTS: The evodiamine 10 and 40 $\mu\text{mol/L}$ could significantly enhanced 3.41 and 4.15 folds of luciferase activity in CYP3A4 report gene through PXR pathway. Rutecarpine 10 and 40 $\mu\text{mol/L}$ could reduce the effect of rifampicin on PXR, decreasing by 37.7% and 45.34%, respectively. Rutecarpine could reduce 29% induction of CAR caused by CITCO (positive activator of CAR). After exposed to evodiamine 10, 40 $\mu\text{mol/L}$, the expression of CYP3A11 mRNA was significantly 2.67 and 3.80 fold increased, respectively; the expressions of CYP3A11 mRNA in 35% primary hepatocytes were significantly down-regulated by rutecarpine 40 $\mu\text{mol/L}$. Evodiamine 10, 40 $\mu\text{mol/L}$ increased 3.63 and 3.01 folds of CYP3A11 enzyme activity significantly; after exposed to rutecarpine 40 $\mu\text{mol/L}$, CYP3A4 enzyme activity was decreased by 34.54% significantly. CONCLUSIONS: Evodiamine can significantly enhance the CYP3A4 luciferase, mRNA expression and enzyme activity through PXR mediated pathway. Rutecarpine can significantly inhibit the CYP3A4 luciferase, RNA expression and enzyme activity through PXR/CAR mediated pathway.

KEY WORDS Evodiamine; Rutecarpine; Drug interaction; Pregnane X receptor; Constitutive androstane receptor; CYP3A4

近年来,天然药物在使用过程中常与其他药物联用,大大增加了发生药物相互作用的风险^[1]。目前,药物相互作用在药物代谢酶与药物转运体方面的作用机制已被研究得较为透彻,而最常见的原因是CYP酶的诱导和抑制^[2]。其中,CYP3A4亚型是最重要也是最广泛存在于人体的CYP450酶,常参与50%以上常用药物的代谢^[3],其诱导或抑制将产生复杂的药

物和其他化合物之间的相互作用。研究发现,内、外源性物质对于CYP3A酶活性的抑制或诱导作用往往是源于其激活了多种核受体(Nuclear receptors, NRs),其中孕烷X受体(Pregnane X receptor, PXR)和组成型雄甾烷受体(Constitutive androstane receptor, CAR)是最关键的调节CYP3A4酶表达和活性的核受体,它们在被大量不同化学结构的配体激活后,对于CYP3A4具有显著的抑制或诱导作用^[4]。在美国,超过64%的制药企业在新药研发过程中均采用报告基因检测方法研究所开发药物是否经PXR、CAR核受体通路影响CYP3A4的酶活性,从而避免导致潜在的药物相互作用^[5]。

* 讲师,博士。研究方向:药动学、药物相互作用与神经药理学。电话:0898-31350701

通信作者:副教授。研究方向:神经药理学与肿瘤药理学。电话:0898-31350701。E-mail:zhanglihai@hotmail.com

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss) Benth 干燥近成熟的果实^[6], 其味苦、辛, 性温热, 能温中散寒、疏肝止痛, 常用于治疗头痛、腹脘冷痛, 呕吐泄泻、痛经、高血压等症。吴茱萸的主要活性成分为生物碱^[7], 其中最为重要的生物碱为吴茱萸碱 (Evodiamine) 与吴茱萸次碱 (Rutecarpine)。药理学研究表明, 吴茱萸碱具有镇痛消炎、强心、收缩支气管的作用; 吴茱萸次碱对缺血性心肌具有保护作用, 可抑制炎症浸润、渗出和组织增生^[8]。尽管吴茱萸碱与吴茱萸次碱的药效学研究已较深入, 但其药物代谢学的研究尚少, 且无吴茱萸碱及吴茱萸次碱通过核受体通路影响药物代谢酶作用的相关机制研究。鉴于此, 本研究旨在探讨吴茱萸碱及吴茱萸次碱能否通过 CAR 与 PXR 这两条核受体通路共同影响 CYP3A4 的转录调控, 为预测可能存在的药物相互作用和指导临床合理用药、提高用药安全性提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

ISM 827 型蠕动泵 (瑞士 Ismatec 公司); 2.0 light cycler 定量 PCR 仪 (美国罗氏公司); Waters2695 型高效液相色谱系统 (美国 Waters 公司); Masslynx V4.0 型数据采集软件、Quattro microTM 型质谱系统 (英国 Micromass 公司); BB16 型 CO₂ 培养箱 (美国 Heraeus 公司); 免疫发光检测仪 (芬兰 Thermo Labsystem 公司); Optima LE-80K 型超速离心机 (德国 Beckman 公司); 752N 型紫外分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司); SHA-C 型恒温水浴振荡器 (金坛富华仪器有限公司); TGL-16 G 型台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); XSZ-D2 型显微镜 (重庆光学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

CITCO{6-(4-Chloro phenyl) imidazo[3,2,1-b][1,3]thiazole-5-carbaldehyde-O-(3,4-dichlorobenzyl)}、利福平 (Rifampicin, RIF)、地塞米松、DMSO (Dimethyl sulfoxide)、鼠尾胶原、IV 型胶原酶均购自 Sigma 公司; 吴茱萸碱、吴茱萸次碱 (中国食品药品检定研究院, 批号分别为 151623-201159、141003-201122, 纯度均 >98%); 氧化硝苯地平、氯雷他啶 (北京四环科宝制药有限公司); GAPDH 上下游引物、CYP3A11 上下游引物、SYBR Premix Ex TaqTM、PrimeScriptTM 逆转录试剂盒、0.1% DEPC 均购自日本 TaKaRa 公司; Trizol 试剂、LipofectamineTM 2 000 转染脂质体试剂均购自美国 Invitrogen 公司; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (美国 Promega 公司); L-谷胱甘肽、胎牛血清、Williams' E 培养基、L-15 培养基均购自美国 Gibco 公司; 氯仿、异丙醇、无水乙醇均购自广州化学试剂厂。

1.3 动物

SPF 级 Balb/C 小鼠, ♂, 体质量 (25 ± 3)g, 购自广东省实验动物中心 [动物使用合格证号: SCXK (粤) 2008-002]。所有动物均按照国家实验动物公司饲养和使用指南, 饲养在 (20 ± 5) °C SPF 级动物实验室, 12 h 明暗循环。

1.4 细胞与质粒

人结肠癌 LS174T 细胞株购自中国科学院上海细胞库; pCR3-hCAR 由德国 Margarete Fischer-Bosch 临床药理研究所 Oliver Burk 教授惠赠^[9]; pSG5-hPXR、pGL3-CYP3A4-XREM 报告质粒由美国堪萨斯大学 Jeff Staudinger 教授惠赠^[10]; PRL-TK 购自美国 Promega 公司。

2 方法

2.1 细胞的培养

人结肠癌 LS174T 细胞株, 使用含 10% 碳吸附胎牛血清的无双抗改良型 1640 培养基于 5% CO₂、37 °C 培养箱培养, 待用。

2.2 PXR-CYP3A4、CAR-CYP3A4 报告基因检测法检测药物对荧光素酶的诱导

将 LS174T 细胞接种 96 孔板, 当细胞汇合度达 80% 时将 pSG5-hPXR 表达质粒 (50 ng/well)、pGL3-CYP3A4-XREM 报告质粒 (100 ng/well)、PRL-TK 内参质粒 (15 ng/well) 与脂质体 (LipofectaminTM 2 000) 孵育 20 min 后加入 96 孔板 6 h, 更换含 10% 碳吸附胎牛血清的无酚红、无双抗的 1640 培养基并分别给予阳性药物 RIF (10 μmol/L, 即 RIF 组)、吴茱萸碱与吴茱萸次碱 (40、10、2.5 μmol/L, 即高、中、低浓度组) 孵育 24 h (以基础培养基作空白对照)。将 PCR3-hCAR 表达质粒 (30 ng/well)、pGL3-CYP3A4-XREM 报告质粒 (60 ng/well)、PRL-TK 内参质粒 (15 ng/well) 与脂质体 (LipofectaminTM 2 000) 孵育 20 min 后加入 96 孔板 6 h, 更换含 10% 碳吸附胎牛血清的无酚红、无双抗的 1640 培养基并分别给予阳性药物 CITCO (10 μmol/L, 即 CITCO 组)、吴茱萸碱与吴茱萸次碱 (2.5、10、40 μmol/L, 即高、中、低浓度组) 孵育 24 h (以基础培养基作空白对照) 后进行荧光素酶和海肾荧光素酶测定, 每孔荧光素酶活性值 = 荧光素酶/海肾荧光素酶。

2.3 PXR-CYP3A4、CAR-CYP3A4 报告基因检测法检测药物对荧光素酶的抑制

将 pSG5-hPXR 表达质粒、pGL3-CYP3A4-XREM 报告质粒与内参质粒按“2.2”项下比例混合后, 与脂质体 (LipofectaminTM 2 000) 孵育 20 min 后加入 96 孔板 6 h, 更换含 10% 碳吸附胎牛血清的无双抗的 1640 培养基, 分为空白对照 (基础培养基) 组、RIF (基础培养基) 组和吴茱萸碱高、中、低浓度 (40、10、2.5 μmol/L) 组与吴茱萸次碱高、中、低浓度 (40、10、2.5 μmol/L) 组。各组中 RIF 浓度均为 10 μmol/L, 孵育 24 h, 观察各浓度吴茱萸碱经 PXR 核受体通路对 RIF 诱导的抑制作用。PCR3-hCAR 表达质粒、pGL3-CYP3A4-XREM 报告质粒与内参质粒按“2.3”项下比例混合, 与脂质体 (LipofectaminTM 2 000) 孵育 20 min 后加入 96 孔板 6 h, 更换含 10% 碳吸附胎牛血清的无双抗的 1640 培养基, 分为空白对照 (基础培养基) 组、CITCO (基础培养基) 组和吴茱萸碱高、中、低浓度 (40、10、2.5 μmol/L) 组与吴茱萸次碱高、中、低浓度 (40、10、2.5 μmol/L) 组。各组中 CITCO 浓度均为 10 μmol/L, 孵育 24 h, 观察各浓度吴茱萸次碱经 CAR 通路对 CITCO 诱导作用的抑制效应, 每孔荧光素酶活性值 = 荧光素酶/海肾荧光素酶。以上每组 3 孔复孔。

2.4 吴茱萸碱及吴茱萸次碱对原代小鼠肝细胞 CYP3A11 基因表达的影响

2.4.1 小鼠原代肝细胞模型的复制^[11] SPF 级 Balb/C ♂ 小鼠 1 只, 称体质量, ip 20% 的乌拉坦 (1 ml/100g) 麻醉小鼠, 固定, 分离小鼠下腔静脉, 静脉留置针下腔静脉插管及固定, 剪断肝门静脉; 37 °C 不含钙、镁含 EGTA 的 D-Hank's 溶液 (pH7.4) 恒速灌流, 至肝脏呈灰黄色无血色即停止灌流; 37 °C 预热的 0.05% 的 I 型胶原酶溶液进行恒速灌流, 直至肝脏表面按压不反弹。小心快速剪下肝脏, 注意保持肝脏表面包膜完整; 将肝脏

放置于培养皿中,冲洗净表面的污血,用含钙的0.05%的I型胶原酶溶液将其浸没,注射器吸取胶原酶对肝脏进行多孔灌注,使肝细胞充分消化;加入足够量的不含胎牛血清的Williams'E培养基,钝性扯开肝外包膜,让肝细胞释放入培养基中,200目的金属筛网过滤培养基,离心半径8 cm 500 r/min离心1 min,弃上清液,重复使用新鲜培养基清洗1次后,台盼蓝染色,记录存活率,计数;用含10%胎牛血清的Williams'E培养基重悬细胞,轻轻吹打细胞至均匀和不成团,在铺被鼠尾胶原中以 1×10^5 /孔接种24孔板,放入37℃CO₂细胞培养箱中培养;12 h后进行第1次换液,弃去漂浮死亡细胞,观察贴壁率,继续培养,以后每24 h换一次液,并观察细胞贴壁状态。小鼠原代肝细胞在台盼蓝染色后,倒置显微镜对细胞进行形态学观察,存活率80%以上,即可种板。

2.4.2 原代肝细胞的培养与分组 给药 待种板小鼠肝细胞12 h后,更换含10%胎牛血清的Williams'E培养基,待小鼠原代肝细胞贴壁于24孔板12 h后,分别同吴茱萸碱与吴茱萸次碱(40、10、2.5 μmol/L,即高、中、低浓度组)、地塞米松(10 μmol/L,即地塞米松组)、空白培养基孵育48 h,其中空白培养基作为空白对照,地塞米松作为阳性对照。以上每组3孔复孔。

2.4.3 总RNA提取及cDNA合成 各组经药物处理48 h,小鼠原代肝细胞用PBS清洗3次后,加入Trizol试剂500 μl,充分吹匀后移入经DEPC水处理的1.5 ml EP管中,0.1 ml氯仿颠倒混匀10次后,静置5 min;4℃离心半径8 cm 12 000 r/min离心15 min,可见液体分为RNA层(上)、蛋白质层(中层)和DNA层(下层)三相。将含RNA的上层液相移入另一经DEPC水处理的EP管中,加等体积异丙醇约200 μl,颠倒混匀10次,置于-20℃约20 min,沉淀RNA;4℃12 000 r/min离心15 min,小心吸上清液弃去,EP管底部有少许白色RNA沉淀物;加入75%乙醇1 ml,轻柔洗涤RNA沉淀,4℃离心半径8 cm 12 000 r/min离心15 min;弃上清液,倒置5~10 min,使之干燥,DEPC水10~20 μl重悬沉淀,取RNA 5 μl用于定量和纯度检测,剩余部分于-80℃保存。用PrimeScript™ RT reagent Kit逆转录试剂盒合成cDNA(按说明书),-20℃保存,以便进行后续实时PCR分析。

2.4.4 实时PCR分析CYP3A11基因表达 合成目的基因CYP3A11和内参基因GAPDH上下游引物(TAKARA公司)。CYP3A11上游引物:5'-GAGGGAAGCATTGAGGAG-3',CYP3A11下游引物:5'-CCCATATCGGTAGAGGAG-3';GAPDH上游引物:5'-TCACCACCATGGA GAAGGC-3',GAPDH下游引物:5'-GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA-3'^[12]。采用SYBR® Premix Ex Taq™ kit试剂盒,按照试剂盒说明书进行实时PCR分析的操作。采用Slightcycler2.0定量PCR仪检测实时PCR扩增,反应条件如下:94℃60 s;94℃30 s(×45);58℃30 s(×45);72℃30 s(×45);95℃10 s;65℃45 s;95℃0 s;40℃60 s。

2.4.5 结果分析 利用数据分析软件对每个样品的实时荧光定量PCR反应结果进行分析,并自动计算出Ct(扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时所经过的扩增循环次数)值。采用相对Ct值(ΔCt)的方法对CYP3A4基因的表达水平进行定量,以GAPDH为内参对照,药物处理细胞后CYP3A11基因的表达水平相对于对照组的变化的变化为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 倍。

具体计算方法如下:先将各个样品中CYP3A11靶基因的Ct值减去内参对照GAPDH的Ct值得到各自的ΔCt值,然后计算各组的平均ΔCt值,再将各组的平均ΔCt值减去空白对照组的平均ΔCt值,即得到ΔΔCt值,用于计算各相关基因表达的变化倍数。

2.5 液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法检测原代小鼠肝细胞中CYP3A11的酶活性

2.5.1 小鼠原代细胞培养及给药处理 小鼠肝细胞分离后接种6孔板。以上每组3孔复孔。种板后12 h,分别与吴茱萸碱及吴茱萸次碱(40、10、2.5 μmol/L,即高、中、低浓度组)、地塞米松(10 μmol/L,即地塞米松组)与空白培养基孵育。其中,空白培养基作为空白对照,地塞米松(10 μmol/L)作为阳性对照,给药72 h后提取各组总蛋白。

2.5.2 小鼠原代细胞蛋白的提取与含量测定 用预冷的PBS洗涤上述不同处理组的原代肝细胞3次,加150 μl蛋白裂解液裂解细胞,4℃震荡孵育30 min,细胞刮仔细刮下细胞,细胞悬液倾一侧,4℃继续孵育30 min,吸入1.5 ml EP管,4℃离心半径8 cm 12 000 r/min离心20 min,移上清液至另一个EP管中,上清液即为所需要的蛋白溶液。-80℃冻存,备用。采用酶标仪和考马斯亮蓝法对各组蛋白进行定量。根据标准曲线,计算相应的蛋白浓度;所有处理组的蛋白质量浓度均调整为10 mg/ml,蛋白于-80℃保存,待用。

2.5.3 硝苯地平LC-MS/MS分析方法^[13] 制备浓度为500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.812 5 nmol/L的氧化硝苯地平的标准曲线;按以下比例制备标准曲线溶液,溶液总体积为200 μl:取各处理组中10 mg/ml的蛋白10 μl,分别与50.0、25.0、12.5、6.25、3.125、1.562 5、0.781 25 μmol/L氧化硝苯地平2 μl和PBS 168 μl置于10 ml棕色离心管中,后续各试验步骤与硝苯地平检测步骤相同;硝苯地平代谢反应体系:反应总体积为200 μl,取各组中10 mg/ml的蛋白10 μl、500 μmol/L硝苯地平2 μl和PBS 168 μl置于10 ml棕色离心管中,于37℃水浴孵育5 min后,加入10 mmol/L NADPH 20 μl,37℃水浴孵育20 min,加入预冷的乙酸乙酯500 μl终止反应。在有反应体系的棕色管中,加10 μmol/L氯雷他定内标10 μl,涡旋1 min,静置10 min后,4℃离心半径8 cm 3 500 r/min离心10 min,转移上层有机相至另一棕色离心管中,于真空干燥器中挥干,残渣用流动相(甲醇-水,80:20, V/V)200 μl复溶,涡旋混合1 min,离心半径8 cm 15 000 r/min离心5 min,取上清液100 μl入进样瓶,进样10 μl。整个操作需要避光。

2.6 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件进行单因素方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间采用Dunnett's s两两比较法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 CYP3A4荧光素酶活性测定结果

3.1.1 吴茱萸碱与吴茱萸次碱经PXR通路对CYP3A4荧光素酶活性的影响 与空白对照组比较,RIF组CYP3A4荧光素酶活性显著增强($P < 0.01$),表明PXR-CYP3A4荧光素酶报告基因体系成功复制;吴茱萸碱高、中浓度组CYP3A4荧光素酶活性显著增强($P < 0.01$),达空白对照组的3.41、4.15倍;而吴茱萸次碱各浓度组CYP3A4荧光素酶活性改变无统计学意义,反

而在40、10 μmol/L浓度下体现出对CYP3A4荧光素酶活性有轻微抑制作用。吴茱萸碱与吴茱萸次碱经PXR通路对CYP3A4荧光素酶活性的影响见图1。

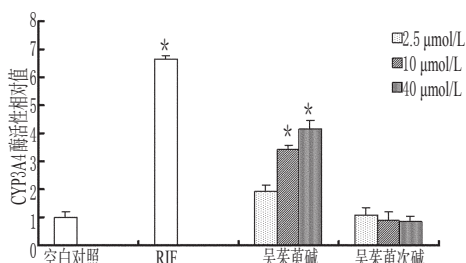


图1 吴茱萸碱与吴茱萸次碱经PXR通路对CYP3A4荧光素酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
与空白对照比较: * $P < 0.01$

Fig 1 Effects of evodiamine and rutecarpine on CYP3A4 luciferase activity through PXR pathway($\bar{x} \pm s, n=3$)
vs. normal control: * $P < 0.01$

3.1.2 吴茱萸碱与吴茱萸次碱经CAR通路对CYP3A4荧光素酶活性的影响 与空白对照组比较, CITCO组CYP3A4荧光素酶活性显著增强($P < 0.01$), 表明CAR-CYP3A4荧光素酶报告基因体系成功复制, 具有较高的筛选敏感性; 吴茱萸碱各浓度组CYP3A4荧光素酶活性改变无统计学意义($P > 0.05$); 吴茱萸次碱各浓度组CYP3A4荧光素酶活性改变无统计学意义($P > 0.05$)。吴茱萸碱与吴茱萸次碱经CAR通路对CYP3A4荧光素酶活性的影响见图2。

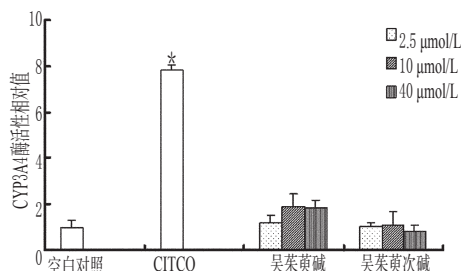


图2 吴茱萸碱与吴茱萸次碱经CAR通路对CYP3A4荧光素酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
与空白对照比较: * $P < 0.01$

Fig 2 Effects of evodiamine and rutecarpine on CYP3A4 luciferase activity through CAR pathway($\bar{x} \pm s, n=3$)
vs. normal control: * $P < 0.01$

3.1.3 吴茱萸碱、吴茱萸次碱与RIF经PXR通路对CYP3A4荧光素酶活性的影响 与空白对照组比较, RIF组CYP3A4荧光素酶活性显著减弱($P < 0.01$)。与RIF组比较, 吴茱萸碱高浓度+RIF组CYP3A4荧光素酶活性显著增强, 提示吴茱萸碱与RIF具有协同作用于PXR通路诱导CYP3A4活性的作用; 吴茱萸次碱高、中浓度+RIF组CYP3A4荧光素酶活性减弱37.7%、45.34%, 提示吴茱萸次碱与利福平共同给药能抑制利福平介导的由PXR通路对CYP3A4荧光素酶的诱导作用。吴茱萸碱、吴茱萸次碱与RIF经PXR通路对CYP3A4荧光素酶活性的影响见图3。

3.1.4 吴茱萸碱、吴茱萸次碱与CITCO经CAR通路对CYP3A4荧光素酶活性的影响 与空白对照组比较, CITCO组CYP3A4荧光素酶活性显著增强($P < 0.01$)。与CITCO组比较, 吴茱萸碱各浓度+CITCO组与CYP3A4荧光素酶活性改变无统计学意义, 提示吴茱萸碱不能通过CAR核受体通路影

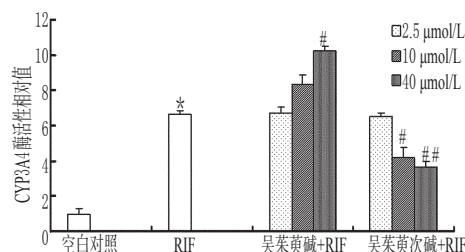


图3 吴茱萸碱、吴茱萸次碱与RIF经PXR通路对CYP3A4荧光素酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

与空白对照比较: * $P < 0.01$; 与RIF阳性对照比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$
Fig 3 Effects of evodiamine, rutecarpine and RIF on CYP3A4 luciferase activity through PXR pathway($\bar{x} \pm s, n=3$)
vs. normal control: * $P < 0.01$; vs. RIF positive control: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

响CYP3A4的荧光素酶表达; 吴茱萸次碱高浓度+CITCO组CYP3A4荧光素酶显著减弱, 提示吴茱萸次碱能抑制CITCO经CAR通路所介导的CYP3A4荧光素酶的诱导作用, 使CYP3A4报告基因表达降低29% ($P < 0.05$)。吴茱萸碱、吴茱萸次碱与CITCO经CAR通路对CYP3A4荧光素酶活性的影响见图4。

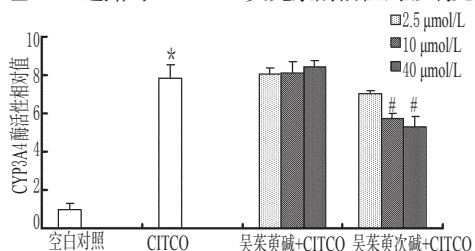


图4 吴茱萸碱、吴茱萸次碱与CITCO经CAR通路对CYP3A4荧光素酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

与空白对照比较: * $P < 0.01$; 与CITCO阳性对照比较: # $P < 0.05$
Fig 4 Effects of evodiamine, rutecarpine and CITCO on CYP3A4 luciferase activity through CAR pathway($\bar{x} \pm s, n=3$)
vs. normal control: * $P < 0.01$; vs. CITCO positive control: # $P < 0.05$

3.2 吴茱萸碱与吴茱萸次碱对CYP3A11 mRNA表达的影响 阳性药物地塞米松在10 μmol/L浓度下, 能显著上调原代小鼠肝细胞中CYP3A11 mRNA表达至6.84倍。与空白对照组比较, 吴茱萸碱在10、40 μmol/L浓度时能显著增加CYP3A11的mRNA表达至空白对照组的2.67、3.80倍($P < 0.01$ 或 $P < 0.01$); 而吴茱萸次碱在40 μmol/L浓度下, 能下调原代小鼠肝细胞中35%的CYP3A11 mRNA表达, 与CYP3A4报告基因检测结果一致($P < 0.05$)。吴茱萸碱与吴茱萸次碱对原代鼠肝细胞中CYP3A11 mRNA表达的影响见图5。

3.3 吴茱萸碱与吴茱萸次碱对CYP3A11酶活性的影响 氧化硝苯地平特征吸收出峰时间为1.42 min, 内标氯雷他定特征吸收出峰时间为2.25 min。地塞米松能使硝苯地平经CYP3A11代谢的产物氧化硝苯地平的量增加至3.98倍($P < 0.01$), 吴茱萸碱在10、40 μmol/L浓度时能显著增加氧化硝苯地平的量至空白对照组的3.63、3.01倍($P < 0.05$); 吴茱萸次碱在40 μmol/L浓度时能显著减少34.54%的氧化硝苯地平生成($P < 0.05$)。氧化硝苯地平与内标氯雷他定的LC-MS/MS吸收峰见图6; 吴茱萸碱与吴茱萸次碱对原代鼠肝细胞中CYP3A11酶活性的影响见图7。

4 讨论

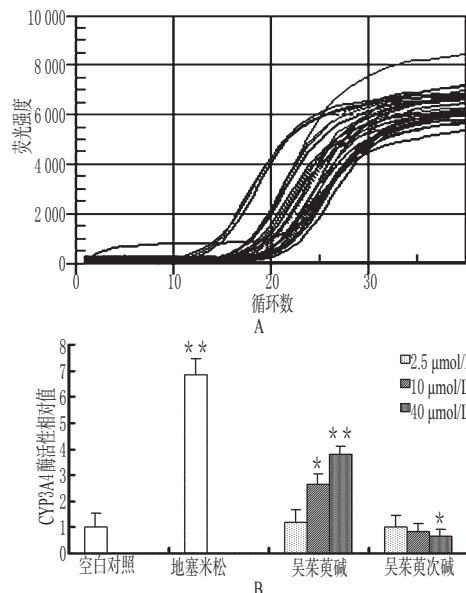


图5 吴茱萸碱与吴茱萸次碱对原代鼠肝细胞中CYP3A11 mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

A. 荧光信号图; B. 统计图

与空白对照比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig 5 Effects of evodiamine and rutecarpine on the expression of CYP3A11 mRNA in primary hepatocytes of mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A. fluorescence; B. Result of statistic

vs. normal control: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

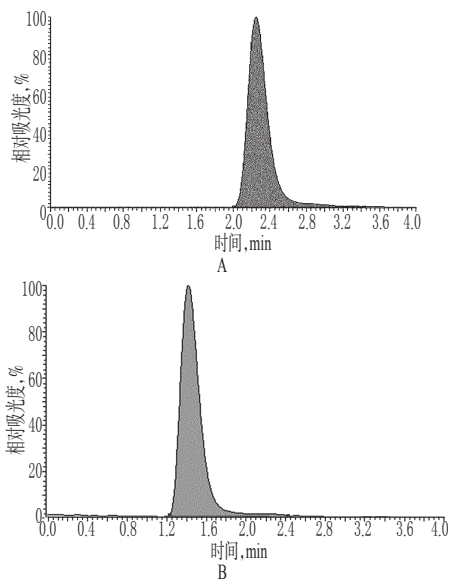


图6 氧化硝苯地平及内标氯雷他定的LC-MS/MS吸收峰图

A. 氧化硝苯地平; B. 氯雷他定

Fig 6 The absorption peak of dehydronifedipine and loratadine (internal standard) by LC-MS/MS assay

A. dehydronifedipine; B. loratadine

近年来,随着对CYP3A4诱导表达调控研究的深入,发现核受体对调节CYP3A4转录起着重要作用,PXR及CAR这两类核受体对CYP3A4的活性起着至关重要的调控作用,它们介导了大量临床处方药的代谢。当药物作为外源化合物配体与PXR及CAR结合后形成复合物,令核受体活化,药物-PXR或

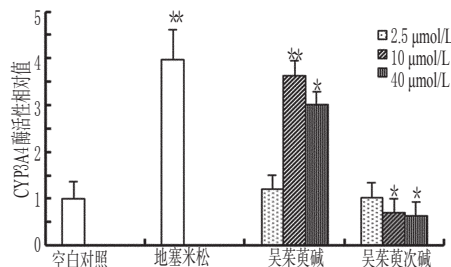


图7 吴茱萸碱及吴茱萸次碱对原代鼠肝细胞中CYP3A11酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

与空白对照比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig 7 Effects of evodiamine and rutecarpine on CYP3A11 enzyme activity in primary hepatocytes of mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

vs. normal control: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

药物-CAR受体复合物再与胞浆内的视黄醛X受体(Retinoid X receptor, RXR)形成异源二聚体后进入细胞核内,作用于细胞核内CYP3A的基因上游调控序列近端启动子序列和远端增强子序列中的ER-6及DR-3元件,从而起到调节CYP3A基因的表达及酶功能活性,进一步引发药物相互作用的生物学效应。这两类核受体除了以各自的方式调控CYP3A的转录外,还能以“交叉对话”的方式共同调节CYP3A转录,它们通过作用CYP3A4相应的DNA元件起着或共同、或交互调节的作用^[14],提示应增加对外源性物质的在这两个信号通路之间交联作用的研究,因此笔者在本研究中除了观察药物对PXR及CAR各自的影响外,还观察吴茱萸生物碱能否同时经过PXR、CAR这两条核受体通路调节CYP3A4的转录,从而预测吴茱萸生物碱对CYP3A4活性的影响,为发挥监测药物相互作用起到一定的先导作用。

鉴于此,笔者通过采用荧光素酶报告基因检测技术来观察吴茱萸碱及吴茱萸次碱是否为PXR与CAR的外源性配体,此方法的特点为特异性高、快速稳定、对受试物需求量少,是国内、外最广泛采用的对具有核受体激活作用的药物进行高通量筛选的检测手段。本研究中,阳性对照组结果显示,较高灵敏度的PXR-CYP3A4、CAR-CYP3A4荧光素酶报告基因体系成功建立;还发现吴茱萸碱能通过PXR核受体通路显著增加CYP3A4荧光素酶活性,但不能通过CAR核受体通路影响CYP3A4报告基因荧光素表达;吴茱萸次碱各浓度组并未显示出能通过PXR、CAR核受体通路诱导CYP3A4荧光素酶活性,反而体现出能经CAR核受体通路轻微抑制CYP3A4荧光素酶活性。该部分结果提示,吴茱萸碱可能作为PXR的配体从而激活CYP3A4 DNA反应元件,上调CYP3A4的表达。

笔者同时将吴茱萸生物碱与具有特异性诱导作用的阳性药物RIF、CITCO共同给药,旨在观察吴茱萸碱及吴茱萸次碱能否上调或抑制RIF及CITCO对CYP3A4的诱导作用,并进一步发现吴茱萸生物碱能否竞争性与PXR或CAR结合从而影响阳性药物与PXR及CAR的结合,使阳性药物对CYP3A4荧光素酶活性的诱导程度发生改变。结果表明,吴茱萸碱与RIF共同给药能使RIF经PXR通路对CYP3A4荧光素酶活性的诱导作用提高显著,提示吴茱萸碱与RIF具有协同作用于PXR通路诱导CYP3A4活性的作用;而吴茱萸次碱与RIF或CITCO共同给药,反而使能抑制RIF及CITCO经PXR、CAR通路对CYP3A4荧光素酶的诱导作用,提示吴茱萸次碱能竞争性

抑制RIF、CITCO与PXR及CAR结合,进而抑制RIF与CITCO对CYP3A4基因表达与酶功能活性的诱导,且吴茱萸次碱是通过“交叉对话”作用对两条核受体通路同时抑制的。

用荧光素酶报告基因检测法检测CYP3A4转录水平的改变具有较高效、敏感等特点,是筛选CYP3A4诱导物的理想方法。但是,要全面阐述酶的诱导或抑制,还应在基因和酶活性水平进行鉴定。因此,本文采用原代肝细胞模型,观察给予吴茱萸碱及吴茱萸次碱后对原代肝细胞中CYP3A11基因表达及酶活性的影响。本文采用高敏感性的实时PCR法检测吴茱萸碱及吴茱萸次碱对原代小鼠肝细胞中CYP3A11 mRNA表达的影响发现,吴茱萸碱能显著增加CYP3A11的mRNA表达;而吴茱萸次碱在高浓度下能下调原代小鼠肝细胞中CYP3A11的mRNA表达,此结果与CYP3A4报告基因检测结果一致。笔者进一步采用LC-MS/MS法检测吴茱萸碱及吴茱萸次碱对原代小鼠肝细胞中CYP3A11酶功能活性的影响时发现,吴茱萸碱在中、高浓度时能显著增加硝苯地平的代谢产物氧化硝苯地平的浓度;而吴茱萸次碱在高浓度时能显著减少氧化硝苯地平的生成。该结果进一步证明了吴茱萸碱确实能诱导CYP3A的基因表达及酶功能活性,其机制可能与其通过与PXR核受体结合,从而上调了PXR对CYP3A4 DNA反应元件的调控有关。而吴茱萸次碱则能下调CYP3A11的基因表达及酶功能活性,其机制为通过同时竞争性地与PXR及CAR两条核受体通路结合,发挥“交叉对话”的交叉协同抑制作用,从而下调CYP3A的基因表达及酶功能活性的作用。

综上,本研究采用双荧光素酶报告基因检测方法,结合原代小鼠肝细胞模型,首次从机制上证实了吴茱萸碱及吴茱萸次碱对CYP3A的影响。为进一步从分子水平探讨吴茱萸生物碱对CYP酶影响机制提供了充分的参考和依据;同时,也为最大限度地提高吴茱萸及关键生物碱的有效性和安全性及临床联合用药提供了数据参考。但是,由于动物原代肝细胞或病源性细胞并不能完全、正确体现出药物单体对正常人肝细胞CYP3A4的影响,因此还需在今后利用人原代肝细胞进行试验及基因敲除小鼠模型等整体动物实验,来研究吴茱萸碱及吴茱萸次碱在体内是否也能通过PXR、CAR核受体介导CYP3A的转录调控,并希望能引入转基因动物以补充相关体内动物实验内容,从而更全面地阐明吴茱萸碱和吴茱萸次碱对核受体通路的介导及CYP3A的影响。

参考文献

[1] Fugh-Berman A. Herb-drug interactions[J]. *Lancet*, 2000, 355(9198): 134.
[2] Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, et al. Interindividual variations in human liver cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994, 270(1): 414.

[3] 谷元,司端运,刘昌孝.CYP3A4酶介导的人类药物代谢性别差异[J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(9): 1121.
[4] Moore LB, Maglich JM, McKee DD, et al. Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR) and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors[J]. *Mol Endocrinol*, 2002, 16(5): 977.
[5] Chu V, Einolf HJ, Evers R, et al. In vitro and in vivo induction of cytochrome P450: a survey of the current practices and recommendations: a pharmaceutical research and manufacturers of america perspective[J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37(7): 1339.
[6] 谢宗万,范崔生,朱兆仪.全国中草药汇编:上册[M].北京:人民卫生出版社,1975:452-453.
[7] 唐元清,冯孝章,黄量,等.吴茱萸化学成分的研究[J]. *药学学报*, 1996, 31(2): 151.
[8] 戴媛媛,刘保林,窦昌贵.吴茱萸及其有效成分的药理研究进展[J]. *中药材*, 2003, 26(4): 295.
[9] Burk O, Arnold KA, Geick A, et al. A role for constitutive androstane receptor in the regulation of human intestinal MDR 1 expression[J]. *Biol Chem*, 2005, 386(6): 503.
[10] Goodwin B, Liddle E, Hodgsonand C. The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module[J]. *Mol Pharmacol*, 1999, 56(6): 1329.
[11] Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells[J]. *Meth-od Cell Biol*, 1976, 3(2): 29.
[12] Huang L, Bi HC, Huang M, et al. CAR-mediated up-regulation of CYP3A4 expression in LS174T cells by Chinese herbal compounds[J]. *Drug Metab Pharmacokin*, 2011, 26(4): 331.
[13] He F, Bi HC, 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 inhibition screening of terpenoids[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(5): 635.
[14] Burk O, Arnold KA, Nussler AK, et al. Antimalarial artemisinin drugs induce cytochrome P450 and MDR1 expression by activation of xenosensors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor[J]. *Mol Pharm*, 2005, 67(6): 1954.

(收稿日期:2013-01-28 修回日期:2013-03-22)

《中国药房》杂志——《中国科学引文数据库》(CSCD)来源期刊,欢迎投稿、订阅