



7种中药提取物对PXR介导的CYP3A4 转录调节作用

徐玉英, 张寅, 周凡, 郑一凡, 朱心强*
(浙江大学营养与食品安全研究所, 浙江杭州310058)

[摘要] 目的:观察7种中药的粗提取物能否通过活化孕烷X受体(PXR)诱导CYP3A4的转录表达。方法:采用浸提法和回流法制备中药的粗提取物。用PXR依赖的瞬时转染报告基因试验检测7种中药粗提取物的诱导作用。结果:菊花、枸杞子、丹参水提取物,菊花、山楂、金银花、山药、丹参醇提取物等均能通过活化PXR诱导HepG₂细胞CYP3A4基因的转录表达。结论:菊花水提取物、枸杞子水提取物、丹参水提取物、菊花醇提取物、山楂醇提取物、枸杞子醇提取物、金银花醇提取物、山药醇提取物和丹参醇提取物等7种中药的提取物均能诱导CYP3A4基因的转录表达,其作用机制是通过活化PXR。菊花、山楂、枸杞子、金银花、山药和丹参的摄入可能影响其他CYP3A4底物在体内的代谢。

[关键词] 孕烷X受体;CYP3A4;报告基因实验;山药;金银花;丹参;山楂;枸杞子

细胞色素P450 3A4 (cytochrome P450 3A4, CYP3A4)是人体最主要的外源化学物代谢酶,参与50%~60%临床常用药物以及一些环境化学物的氧化代谢^[1]。孕烷X受体(pregnane X receptor, PXR)是近年来发现的CYP3A4转录调节因子^[2],许多药物和环境化学物可以通过PXR调节CYP3A4的转录,从而影响多种作为CYP3A4底物的药物或环境化学物的代谢,其结果可能引起药物相互作用,甚至导致药物不良反应^[3-4]。作者曾发现染料木黄酮、拟雌内脂、槲皮素、山柰酚、大豆异黄酮、木犀草素、白藜芦醇、姜黄等植物化学物能通过活化PXR诱导HepG₂细胞CYP3A4基因的转录表达^[5-7]。慕鹰等还报道五味子、甘草等中药提取物也有类似作用^[8]。本文通过瞬时共转染含人PXR序列质粒和含CYP3A4反应元件报告基因质粒的报告基因试验,观察了杭白菊、金银花、山药、大枣、丹参、山楂和枸杞子等7种常用中药粗提取物对PXR依赖的CYP3A4的转录调节作用,目的是了解它们对主要药物代谢酶CYP3A4的潜在影响。

1 材料

1.1 细胞及其培养试剂 人肝肿瘤细胞株HepG₂,由浙江大学生物电磁学研究所提供;胎牛血清,购自PARR公司;活性炭,购自美国Sigma公司;葡聚糖T70,购自瑞典Pharmacia Fine Chemicals公司;无酚红DMEM培养基,购自吉诺生物制品公司;0.25%胰蛋白酶;PBS液。

1.2 质粒及其扩增试剂 tk-(CYP3A4)3-Luc报告基因质粒、人pCMX-HSXR表达质粒和 β -半乳糖苷酶表达质粒(CMV β -gal,作为转染对照)由美国Pittsburgh大学药学院慕鹰博士惠赠。3种质粒均为氨苄抗性。*Escherichia coil* BL21菌种,由浙江大学生科院陈苏博士惠赠;LB固体和液体培养基;含氨苄青霉素50 mg·L⁻¹的LB固体和液体培养基;0.1 mol·L⁻¹ CaCl₂;质粒纯化提取试剂盒(AxyPrep Plasmid Miniprep Kit, AXYGEN公司);内切酶(XbaR I, Hind III, Bam H I等, Fermentas公司);琼脂糖;5×TAE。

1.3 转染和检测试剂 脂质体(lipofectamine™ 2000, Invitrogen公司)、荧光素酶测定试剂盒(Promega公司)、 β -半乳糖苷酶测定试剂盒附带报告基因裂解缓冲液(β -galactosidase enzyme assay system with reporter lysis buffer, Promega公司)。

1.4 受试物 杭白菊(*Chrysanthemi Flos*)、山楂(*Crataegi Fructus*)、枸杞子(*Lycii Fructus*)、金银花(*Lonicerae Japonicae Flos*)、山药(*Dioscoreae Rhizo-*

[稿件编号] 20101117002

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30471472);浙江省自然科学基金面上项目(M303870)

[通信作者] *朱心强, Tel: (0571) 88208143, Fax: (0571) 88208143, E-mail: zhuxq@zju.edu.cn

[作者简介] 徐玉英,在读博士,研究方向为食品毒理学, Tel: (0571) 88208145



ma)、丹参(*Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*)、大枣(*Jujubae Fructus*),均购自杭州老百姓大药房,由浙江省药检所中药室副主任郭增喜进行鉴定。利福平(rifamycin, 美国 Serva 公司,为已知的 CYP3A4 诱导物)。

1.5 设备 高速低温离心机(Heraeus 公司);恒温摇床(Forma Scientific 公司);制冰机(SIM-F123, SANYO);二氧化碳培养箱(Heraeus);凝胶成像仪(Pharmacia Biotech);酶标仪。

2 方法

2.1 中药提取物的制备 称取干燥中药,置于烧瓶中,加入 10 倍体积的水摇匀,静置 30 min,于 60 °C

水浴提取 24 h,把上清液倒入容器里,剩下的中药用同样的方法提取 1 次,把上清液合并入第 1 次上清液,得到中药的水提取物。称取相同质量的干燥中药,置于烧瓶中,加入 10 倍体积的 95% 乙醇溶液,静置 30 min,回流提取 2 h,把上清液倒入容器里,剩下的中药用同样的方法提取 2 次,把 3 次上清液合并,得到中药的醇提取物。分别把上清液倒入平皿,于 60 °C 干燥,得到中药提取物净重,算出提取率。各种中药的水提取物用 20% 乙醇作为溶剂,各种中药的醇提取物用 80% 乙醇作为溶剂,配制各浓度的储备液,0.45 μm 微孔滤膜过滤,4 °C 保存待用(表 1)。

表 1 中药的提取率及其储备浓度

No.	药品	干重/g	水提取物			醇提取物		
			质量/g	提取率/%	质量浓度/g · mL ⁻¹	质量/g	提取率/%	质量浓度/g · mL ⁻¹
1	杭白菊	20	4.302	21.51	1	2.610	26.10	0.4
2	山楂	10	6.396	63.96	0.5	5.072	50.72	1
3	枸杞子	30	7.842	26.14	1	9.263	30.88	0.75
4	金银花	30	6.528	9.70	1.5	8.817	39.35	1
5	山药	20	0.490	2.45	4	0.35	1.75	4
6	丹参	30	13.161	43.87	0.7	1.80	6.00	1.5
7	大枣	10	1.943	19.43	1	5.396	53.96	1

2.2 试验测定 按照说明进行 MTT 测定各浓度中药提取物的细胞毒性,然后采用脂质体转染法将 3 种经纯化、鉴定后的质粒共转染入 HepG₂ 细胞,24 孔培养板中 3 种质粒[tk-(CYP3A4)-Luc, pCMX-hPXR, pCMV β-gal]比例为 45:15:16。细胞转染质粒 4 h 后,换成含有相应浓度中药提取物的完全 DMEM 培养液培养 24 h 后,裂解细胞,进行荧光素酶和 β-gal 活性测定。

2.3 统计分析 以本次实验溶剂对照组(20% 乙醇和 80% 乙醇处理细胞组)的荧光素酶活性值作为基础表达(统计分析时以 1 表示),各种待测物的荧光素酶活性与其相比,以倍数表示表达量的高低。数据用 SPSS 13.0 处理,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计分析时采用方差分析, $P < 0.05$ 为统计学上差异有显著性。

3 结果

3.1 7 种中药水提取物对 CYP3A4 的诱导作用 7 种中药水提取物和利福平分别作用于 HepG₂ 细胞 24 h 后,10 μmol · L⁻¹ 利福平与溶剂组 20% 乙醇有显著性差异($P < 0.05$)。在水提取物中,杭白菊、

枸杞子、丹参与溶剂组 20% 乙醇有显著性差异($P < 0.01$),而山楂、金银花、山药、大枣与溶剂组 20% 乙醇没有显著性差异,其中枸杞子、丹参与 10 μmol · L⁻¹ 利福平有显著性差异($P < 0.01$)(表 2)。

表 2 不同中药水提取物在 HepG₂ 细胞中的诱导效应($\bar{x} \pm s$)

药品	质量浓度/g · L ⁻¹	n	荧光素酶活性倍数
利福平	100 [*]	4	1.87 ± 0.51
	10 [*]	4	5.36 ± 0.26 ¹⁾
杭白菊	2	3	8.15 ± 0.95 ²⁾
山楂	1	3	0.86 ± 0.51
枸杞子	2	3	12.48 ± 2.02 ^{3,4)}
金银花	3	6	0.78 ± 0.50
山药	8	5	1.68 ± 0.21
丹参	1.4	3	18.24 ± 1.43 ^{3,5)}
大枣	2	3	2.33 ± 0.41

注: * 单位为 μmol · L⁻¹; 与阴性对照比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$; 与 10 μmol · L⁻¹ 利福平比⁴⁾ $P < 0.01$, ⁵⁾ $P < 0.001$ 。

3.2 7 种中药的醇提取物对 CYP3A4 的诱导作用 7 种中药醇提取物分别作用于 HepG₂ 细胞 24 h 后,杭白菊、山楂、枸杞子、金银花、山药、丹参与溶剂



组80%乙醇比较有显著性差异($P < 0.05$),而大枣与溶剂组80%乙醇没有显著性差异(表3)。

表3 不同中药醇提取物在 HepG₂ 细胞中的诱导效应($\bar{x} \pm s$)

药品	质量浓度/g · L ⁻¹	n	荧光素酶活性倍数
杭白菊	0.8	3	5.56 ± 0.34 ¹⁾
山楂	1	3	14.99 ± 1.99 ^{3,4)}
枸杞子	1.5	3	7.16 ± 1.55 ²⁾
金银花	2	5	20.35 ± 8.73 ^{3,5)}
山药	8	3	46.35 ± 4.01 ^{3,5)}
丹参	3	3	5.99 ± 1.43 ¹⁾
大枣	2	4	2.41 ± 1.09

注:与阴性对照比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$;与10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 利福平比⁴⁾ $P < 0.05$,⁵⁾ $P < 0.01$ 。

4 结论与讨论

近年来,研究中药有效成分和其他天然植物产物成分对药物代谢酶影响的报道日渐增多。许多中药,尤其具有肝保护作用、解毒和抗氧化作用的中药,往往可以改变 CYP 酶活性。如甘草或五味子预处理大鼠后,活化 PXR 诱导大鼠肝微粒体中 CYPs 如 CYP3A4 的转录表达,从而加速丙咪嗪和华法林等药物代谢^[8]。有研究发现菊花、山楂、枸杞子、杏仁、金银花、山药、丹参和大枣对肝有保护作用^[9-12],其肝保护作用的分子机制可能与促进肝生物转化 I 相、II 相反应酶的活性有关。如菊花提取物影响大鼠肝微粒体 CYPs,其中菊花的乙酸乙酯提取物影响大鼠实验性肝损伤^[10];山楂具有抗氧化抗炎作用,其中山楂总黄酮可以保护酒精性肝损伤^[13];山药合剂改善糖尿病大鼠肝功能减退;丹参乙酸乙酯提取物增加 CYP3A 的表达^[14],且丹参水溶性成分丹参酸具有护肝作用^[15],而有些报导丹参提取物抑制 CYPs 催化活性^[12];大枣多糖保护肝损伤,抗肝纤维化^[10]。本研究发现,菊花水提取物和醇提取物、山楂醇提取物、枸杞子水提取物和醇提取物、金银花醇提取物、山药醇提取物以及丹参醇提取物均能通过活化 PXR 诱导 HepG₂ 细胞 CYP3A4 基因的转录表达,其中山楂醇提取物、枸杞子水提取物、金银花醇提取物、山药醇提取物和丹参水提取物活化 PXR 诱导 HepG₂ 细胞 CYP3A4 基因的转录表达能力明显比 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 利福平的诱导作用更强($P < 0.01$),提示这些中药可能通过调节 CYP3A4,影响其他药物或环境化学物的代谢,甚至可能发生药物相互作用。

因此,有必要进一步从 CYP3A4 蛋白表达水平和 CYP3A4 酶活性水平加以深入研究。

随着对中药活性成分的分析 and 植物化学物的深入研究,发现越来越多的中药提取物通过表皮生长因子受体、HER2/neu 基因、环丙烷加氧酶-2、核因子 kappa-B 转录因子、蛋白激酶和 Bcl-2 蛋白等信号分子,影响基因表达、信号传导和各种酶的活性,从而被用于抗血管生成,具有防治肿瘤的作用^[16-17]。然而,中药成分与所用的提取溶剂或提取方法有很大关系。如大部分植物雌激素(异黄酮、拟雌内酯和木质素类等),是极性化合物,能够通过甲醇提取。但是山药的雌激素活性成分并不存在于甲醇提取物中,而是存在于乙酸乙酯提取物中^[18]。这也许可以解释本实验枸杞子、丹参提取物的实验结果与已发表的一些文献^[8, 14]存在差异的原因。

[参考文献]

- [1] Guengerich F P. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1999, 39: 1.
- [2] Kliewer S A, Moore J T, Wade L, et al. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway [J]. Cell, 1998, 92(1): 73.
- [3] Bertilsson G, Heidrich J, Svensson K, et al. Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1998, 95(21): 12208.
- [4] Lehmann J M, McKee D D, Watson M A, et al. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions [J]. J Clin Invest, 1998, 102(5): 1016.
- [5] 刘冬英,杨敏,祝慧娟,等. 几种植物化学物对人孕烷 X 受体介导的细胞色素 P450 3A4 转录调节作用[J]. 浙江大学学报:医学版,2006,35(1):8.
- [6] 刘冬英,祝慧娟,郑一凡,等. 山奈酚调节细胞色素 P450 3A4 转录表达的研究[J]. 浙江大学学报:医学版,2006,35(1):14.
- [7] 孙剑寒,朱心强. 孕烷 X 受体和 CYP3A 相关性的研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2003, 17(3): 235.
- [8] Mu Y, Zhang J, Zhang S, et al. Traditional Chinese medicines Wu Wei Zi (*Schisandra chinensis* Baill) and Gan Cao (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) activate pregnane X receptor and increase warfarin clearance in rats [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 316(3): 1369.
- [9] Song Y H, Liu Q, Lv Z P, et al. Protection of a polysaccharide from *Salvia miltiorrhiza*, a Chinese medicinal herb, against immunological liver injury in mice [J]. Int J Biol Macromol, 2008, 43(2): 170.



- [10] 黄正明,杨新波. 抗肝炎中药现代研究与应用[M]. 郑州:郑州大学出版社,2006.
- [11] Rusu M A, Tamas M, Puica C, et al. The hepatoprotective action of ten herbal extracts in CCl₄ intoxicated liver [J]. *Phytother Res*, 2005, 19(9): 744.
- [12] Qiu F, Zhang R, Sun J, et al. Inhibitory effects of seven components of danshen extract on catalytic activity of cytochrome P450 enzyme in human liver microsomes [J]. *Drug Metab Disposition*, 2008, 36(7): 1308.
- [13] Kao E S, Wang C J, Lin W L, et al. Anti-inflammatory potential of flavonoid contents from dried fruit of *Crataegus pinnatifida* *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Agr Food Chem*, 2005, 53(2): 430.
- [14] Kuo Y H, Lin Y L, Don M J, et al. Induction of cytochrome P450-dependent monooxygenase by extracts of the medicinal herb *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2006, 58(4): 521.
- [15] Lin Y L, Wu C H, Luo M H, et al. In vitro protective effects of salvianolic acid B on primary hepatocytes and hepatic stellate cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 105(1/2): 215.
- [16] Sagar S M, Yance D, and Wong R K Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer-Part 2 [J]. *Current Oncology (Toronto, Ont)*, 2006, 13(3): 99.
- [17] Sagar S M, Yance D, and Wong R K Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer-Part 1 [J]. *Current Oncology (Toronto, Ont)*, 2006, 13(1): 14.
- [18] Cheng W Y, Kuo Y H, and Huang C J Isolation and identification of novel estrogenic compounds in yam tuber (*Dioscorea alata* Cv. Tainung No. 2) [J]. *J Agr Food chem*, 2007, 55(18): 7350.

Human pregnane X receptor-mediated transcriptional regulation of CYP3A4 by extracts of 7 traditional Chinese medicines

XU Yuying, ZHANG Yin, ZHOU Fan, ZHENG Yifan, ZHU Xinqiang*

(*Institute of Nutrition and Food Safety, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China*)

[**Abstract**] **Objective:** To test whether 7 herbs stimulate human pregnane X receptor (PXR)-mediated *CYP3A4* transcription. **Method:** Transient cotransfection reporter gene assays were performed with human PXR expression plasmids and a reporter plasmid containing the XRES in the *CYP3A4* gene promoter in HepG₂ cells. **Result:** The aqueous extracts of *Chrysanthemi Flos*, *Lycii Fructus*, and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, and the methanol extracts of *Chrysanthemi Flos*, *Crataegi Fructus*, *Lycii Fructus*, *Lonicerae Japonicae Flos*, *Dioscoreae Rhizoma*, and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, activated human PXR-mediated transcription. **Conclusion:** The aqueous extracts of *Chrysanthemi Flos*, *Lycii Fructus*, and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, and the methanol extracts of *Chrysanthemi Flos*, *Crataegi Fructus*, *Lycii Fructus*, *Lonicerae Japonicae Flos*, *Dioscoreae Rhizoma*, and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* are inducers of *CYP3A4* by activating PXR, and thus may influence the metabolism of other substrates on *CYP3A4*.

[**Key words**] pregnane X receptors; cytochrome P450; reporter gene assay; *Dioscoreae Rhizoma*; *Lonicerae Japonicae Flos*; *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; *Crataegi Fructus*; *Lycii Fructus*

doi:10.4268/cjmm20111126

[责任编辑 刘 ■]