论著

文章编号:1000-5404(2013)24-2654-05

大鼠肝微粒体法评价20种中药有效成分对CYP2C9酶的作用

张远冬[1],刘学庆[1],郭延垒[2],张有金[2],石 亮[2],王二豪[2],于 超[2] (400016 重庆,重庆医科大学:公共卫生学院生殖生物学研究室[1],生命科学研究院[2])

[摘要] **目的** 建立体外大鼠肝微粒体中CYP2C9酶活性测定方法,并以此方法评价20种中药有效成分单体对大鼠CYP2C9酶的作用。**方法** 以双氯芬酸(Diclofenac)为探针,在实验组大鼠肝微粒体孵育体系中加入20种中药有效成分单体,在37 ℃水浴温孵15 min后冰乙腈终止反应,HPLC测定各孵育体系中探针药物的代谢产物4′-羟基双氯芬酸的转化率,并与对照组比较其差异来评价各有效成分对CYP2C9酶活性的作用。**结果** 4′-羟基双氯芬酸、双氯芬酸及其内标香豆素三者分离良好且无其他内源性物质干扰;动力学考察表明双氯芬酸在0.25 mg/mL的大鼠肝微粒体体系中孵育15 min,测得酶动力学参数V_{max}为0.145 6 nmol/(min·mg),K_m为8.270 μmol/L;抑制实验考察发现:黄芩素、蛇床子素、大黄素、獐牙菜苦苷、淫羊藿苷、白藜芦醇实验组中4′-羟基双氯芬酸转化率分别为(402.60±10.58)、(210.90±10.26)、(414.46±10.32)、(509.83±26.45)、(355.44±15.87)、(387.34±22.16)pmol/(min·mg),显著低于对照组[(735.80±17.27)pmol/(min·mg),$P<0.05$],其他中药成分实验组与对照组比较,其转化率无统计学差异。**结论** 建立了中药有效成分对CYP2C9酶作用的体外大鼠肝微粒体研究方法,并初步评价了黄芩素、蛇床子素、大黄素、獐牙菜苦苷、淫羊藿苷、白藜芦醇对CYP2C9具有抑制作用,在临床联合用药中需注意其可能引起的药物-药物相互作用。

[关键词] 大鼠肝微粒体;CYP2C9;中药有效成分

[中图法分类号] R285.5;R322.47;R345 [文献标志码] A

Effects of 20 active ingredients of traditional Chinese herbs on CYP2C9 activities in rat liver microsomes

Zhang Yuandong[1], Liu Xueqing[1], Guo Yanlei[2], Zhang Youjin[2], Shi Liang[2], Wang Erhao[2], Yu Chao[2] ([1]Department of Reproductive Biology, School of Public Health, [2]Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish a method for evaluating the activity of cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) using diclofenac as the probe compound in rat liver microsomes (RLMs) *in vitro*, and to investigate the impact of 20 active ingredients of traditional Chinese herbs on CYP2C9 activity. **Methods** Diclofenac and 20 active ingredients of traditional Chinese herbs were incubated with RLMs for 15 min at 37 ℃, and the reaction was terminated by cold acetonitrile. The conversion ratio of 4′-hydroxydiclofenac was determined by HPLC. Finally, the effects of the 20 active ingredients of traditional Chinese herbs on CYP2C9 activities were evaluated by comparison of the conversion ratio with control group. **Results** 4′-hydroxydiclofenac, diclofenac and coumarin were perfectly separated. After diclofenac incubation with 0.25 mg/mL RLM for 15 min, the kinetic parameters were revealed, V_{max} 0.145 6 nmol/(min·mg) and K_m 8.270 μmol/L. Among the 20 active ingredients, baicalein, cnidiadin, emodin, swertiamarin, icariin, and resveratrol displayed strong inhibition on CYP2C9 with the conversion ratio of 402.60±10.58, 210.90±10.26, 414.46±10.32, 509.83±26.45, 355.44±15.87, and 387.34±22.16 pmol/(min·mg), respectively, which were significantly lower than that of control group 735.80±17.27 pmol/(min·mg) ($P<0.05$). **Conclusion** The method for evaluating influences of active ingredients of traditional Chinese herbs on CYP2C9 activity in RLMs *in vitro* is successfully established. Baicalein, cnidiadin, emodin, swertiamarin, icariin, and resveratrol inhibit CYP2C9 activity *in vitro*, indicating that we should pay attention to drug-drug interactions of these active ingredients when they are used concomitantly with other drugs in clinical practice.

[基金项目] 重大新药创制科技重大专项(2010ZX09401-306-1-1);重庆市科技创新能力建设项目(CSTC2010AA5058)

[通信作者] 于 超,E-mail:yuchaom@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130923.1226.002(2013-09-23)

[**Key words**] rat liver microsomes; CYP2C9; active ingredients

Supported by the Major Project of New Drug Science and Technology (2010ZX09401-306-1-1) and the Project of Scientific Technological Innovation Capacity Construction of Chongqing (CSTC2010AA5058). Corresponding author: Yu Chao, E-mail:yuchaom@163.com

细胞色素P450(cytochrome P450 proteins, CYP450)是人体内主要的药物代谢酶,CYP2C9是其中最重要的亚型酶之一,约占CYPs总量的10%~20%[1],临床上约15%的药物经由CYP2C9代谢,包括非甾体类抗炎药、磺酰脲类降糖药、血管紧张素Ⅱ抑制剂,以及临床常用口服抗凝剂(S)-华法林等[2]。其中,经CYP2C9代谢的苯妥英钠、(S)-华法林和甲苯磺丁脲等常用药物的治疗窗狭窄、安全性低[3]。在临床联合用药时,CYP2C9酶被合用药物竞争性诱导或抑制,极易改变上述药物的药动学行为及药效,导致毒副作用的发生。因而,评价药物对CYP2C9酶的诱导或抑制能力极其重要。而酶活性的测定则是评价过程中的关键环节,因此,建立准确可靠的酶活性测定方法对于预测和评价药物相互作用潜在的风险性具有重要意义。

目前,临床治疗中常常进行中西药联合用药,而中药有效成分对CYP酶的抑制或诱导作用引起体内其他药物蓄积或清除加快,导致药物药效降低或毒副作用的发生频率大大增加。以往的研究报道了多种中药提取物或有效成分对CYP2C9具有诱导或抑制作用。如Taki等[4]报道银杏叶提取物体内诱导CYP2C9酶活性导致华法林抗凝作用增强,出血副作用增加;Si等[5]报道了多种黄酮及黄酮醇对CYP2C9具有强抑制作用;Qiu等[6]报道了丹参酮是一个CYP2C9酶的竞争性抑制剂。因此,研究更多的中药有效成分对CYP2C9的作用对预防和降低药物-药物相互作用风险及临床合理安全用药具有重要意义。本研究通过建立快速、简便、准确的方法评价了20种中药有效成分对CYP2C9酶的作用,为进一步研究有效成分或相关药物的体内代谢和安全性评价提供参考,以期能够指导临床合理用药,避免药物联合用药时相互作用的发生。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

LC-2010A HT高效液相色谱系统;TB-85型恒温水浴箱(日本岛津公司);R21G型高速冻离心机(日本日立公司);XS-105十万分之一精密天平(瑞士METTLER TOLED公司)。4′-羟基双氯芬酸(4′-Hydroxydiclofenac,32412-10MG,Sigma);双氯芬酸钠盐(Diclofenac sodium salt,D6899-10G,Sigma);香豆素(Coumarin,C4261-100G,Sigma),葡萄糖-6-磷酸、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸水合物(β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrate,β-$NADP^+$)均购自Sigma公司,甲醇、乙腈(色谱纯)购自TEDIA公司,其他试剂均为国产分析纯。

白藜芦醇(Resveratrol,R5010-100MG)、丹皮酚(1,2-Dichloro-4-nitrobenzene,D68800-100MG)购自Sigma公司;栀子苷(Geniposide,HPLC≥98%)购于成都普思生物科技有限公司;黄芩素(Baicalein,0715-9909)、苦杏仁苷(Amygdalin,820-200002)、蛇床子素(Cnidiadin,0822-9802)、葛根素(Puerarin,752-200108)、绿原酸(Chlorogenic acid,0753-9910)、大黄素(Emodin,756-8902)、芦丁(Rutin,0080-9705)、橙皮苷(Hesperidin,0721-200010)、柴胡皂苷d(Saikosaponind,110778-200506)、五味子乙素(γ-Schisandrin,110765-200205)、五味子甲素(Deoxyschizandrin,0764-200107)、土贝母苷甲(Tubeimoside 1, 1536-200001)、獐牙菜苦苷(Swertiamarin,0785-9502)、延胡索乙素(Tetrahydropalmatine, 0726-9906)、淫羊藿苷(Icariin, 0737-9910)、贝母素甲(Peimine,750-9303)、芍药苷(Paeoniflorin,0736-200014)均购自中国食品药品鉴定研究院。

1.2 色谱条件

采用色谱柱Agilent ZORBAX SB-C18反相柱(150 mm×4.6 mm,5 μm),流动相:乙腈-0.01 mol/L醋酸铵(48∶52,体积比,用醋酸调pH至3.60),流速1.00 mL/min,柱温:30 ℃,检测波长:280 nm。

1.3 标准品溶液的配制

精密称取4′-羟基双氯芬酸0.003 17 g,甲醇配制成10 mmol/L的母液;精密称取双氯芬酸钠盐0.003 21 g,用超纯水配制成10 mmol/L的母液;精密称取内标香豆素0.001 49 g,用乙腈配制成10 mmol/L的母液,均置于-20 ℃冰箱中储存备用。称取适量的各中药有效成分单体,用乙腈或超纯水配制成1 mg/mL母液储存-4 ℃冰箱备用。

1.4 大鼠肝微粒体的制备

采用差速离心法[7]制备大鼠肝微粒体(RLM)。清洁级雄性SD大鼠10只(由重庆医科大学实验动物中心提供,实验动物质量合格许可证号:SCXK(渝)2007-0002),体质量(220±10)g,断头处死,取肝脏,用含0.15 mmol/L氯化钾的磷酸缓冲液洗至土黄色,用滤纸擦干称重,以1∶3(质量体积比)加入100 mmol/L磷酸钾缓冲液(pH 7.4)制备匀浆液,将匀浆液转移至10 mL特制超速专用离心管中,4 ℃下9 000×g离心20 min,此时匀浆液可分为3层,取中上2层上清转移至另一新的10 mL特制超速专用离心管中,-4 ℃下105 000×g超速离心60 min;倾去上清,沉淀重悬于100 mmol/L磷酸钾缓冲液中,冰上混匀,再于-4 ℃下105 000×g超速离心60 min;弃上清,沉淀即为肝微粒体,将其重悬于适量的100 mmol/L磷酸钾缓冲液中,分装后贮存于-80 ℃备用。以小牛血清白蛋白为标准品,采用Lowry法测定微粒体中的蛋白含量[8]。

1.5 CYP2C9酶孵育条件的优化

酶反应体系包括:80 μmol/L双氯芬酸溶液20 μL,2.5 mg/mL鼠肝微粒体蛋白溶液20 μL,还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)生成系统(100 mmol/L葡萄糖-6-磷酸、10 U/mL葡

萄糖-6-磷酸脱氢酶、10 mmol/L 的 β-NADP$^+$、40 mmol/L 氯化镁各20 μL),80 μL 磷酸钾缓冲液(PBS,pH 7.4)。上述体系在37 ℃水浴中预孵育3 min后,加入20 μL β-NADP$^+$启动反应,继续孵育15 min后加入180 μL冰乙腈终止反应,再加入20 μL内标溶液,于4 ℃下12 000×g离心15 min,取上清液20 μL进行HPLC分析(n=6)。

在不同蛋白浓度的大鼠肝微粒体孵育体系中,加入不同浓度的底物双氯芬酸溶液,孵育不同时间,分别以乙腈和甲醇终止反应,根据测定产物4′-羟基双氯芬酸的生成量,考察最佳孵育蛋白浓度和最适反应时间,并以Graphpad prism 5.01软件计算酶代谢动力学参数最大酶促反应速率(V_{max})及最大反应速率一半时的底物浓度(K_m)。

1.6 中药有效成分对CYP2C9作用

为了考察各个中药有效成分对CYP2C9酶的作用,进行了各有效成分存在下CYP2C9酶活性的测定。参考文献[9]中方法,实验分为对照组和实验组。对照组只加入终浓度为8.00 μmol/L的底物双氯芬酸和蛋白浓度为0.25 mg/mL的大鼠肝微粒体进行孵育,实验组除上述底物和微粒体外,再分别加入终浓度均为0.1 mg/mL的丹皮酚、黄芩素、苦杏仁苷、蛇床子素、葛根素、绿原酸、栀子苷、大黄素、芦丁、橙皮苷、柴胡皂苷d、五味子乙素、五味子甲素、土贝母苷甲、獐牙菜苦苷、延胡索乙素、淫羊藿苷、贝母素甲、芍药苷、白藜芦醇试液进行孵育,按1.5对样品进行处理,HPLC测定产物4′-羟基双氯芬酸的生成浓度,并以其转化率作为酶活性指标,转化率(pmol/min)=(C×1 000)/B×T,C(nmol/mL)表示孵育后体系中生成的产物4′-羟基双氯芬酸的浓度,B(mg/mL)表示孵育体系中蛋白浓度,T(min)为孵育时间[10]。将实验组与对照组进行比较,若转化率显著降低且存在统计学差异时,则表明对CYP2C9酶具有抑制作用。

1.7 统计学分析

每个实验至少重复3次,采用SPSS 17.0软件进行统计学分析,结果以$\bar{x}\pm s$表示,2组间比较采用t检验,检验水准为0.05。

2 结果

2.1 专属性

在优化的色谱条件下,内标、代谢物4′-羟基双氯芬酸及底物双氯芬酸的峰形良好,保留时间分别为5.2、6.5、16.6 min,酶反应体系中无内源性物质干扰,且加入20种中药有效成分在此色谱条件下不干扰产物及内标峰的测定。见图1。

2.2 标准曲线

对系列浓度为0.5、1、2.5、5、7.5、10、15、20 μmol/L的4′-羟基双氯芬酸标准品酶孵育体系进行HPLC分析。以4′-羟基双氯芬酸浓度[C(μmol/L),X]为横坐标,4′-羟基双氯芬酸与内标峰面积比值(A1/A2,Y)为纵坐标,绘制标准曲线。经线性回归表明4′-羟基双氯芬酸在浓度为0.5~20 μmol/L范围内线性关系良好,回归方程为Y=−0.761 8X+1.817 8(r=0.999 6)。其检测限(LOD)为0.25 μmol/L(S/N≥3,n=5),定量下限(LLOQ)为0.5 μmol/L,平行测定5次RSD<1.15%。

2.3 精密度与稳定性

取低、中、高浓度分别为1、7.5、15 μmol/L的4′-羟基双氯芬酸标准品加入酶孵育体系进行HPLC分析,于1 d内平行测定5次及连续测定3 d,考察日内、日间精密度,结果见表1,其RSD均小于5%,符合生物样品分析检测要求。

平行处理相同浓度下的4′-羟基双氯芬酸样品2份,分别置于室温和−20 ℃下保存,考察室温及冻融条件下的样品稳定性。结果表明在1周内室温下3个浓度的RSD分别为4.77%、3.81%、2.07%;冻融条件下3个浓度的RSD分别为8.46%、1.51%、1.17%,表明样品在室温及冻融条件下1周内均较为稳定。

表1 日内、日间精密度考察结果(n=6)

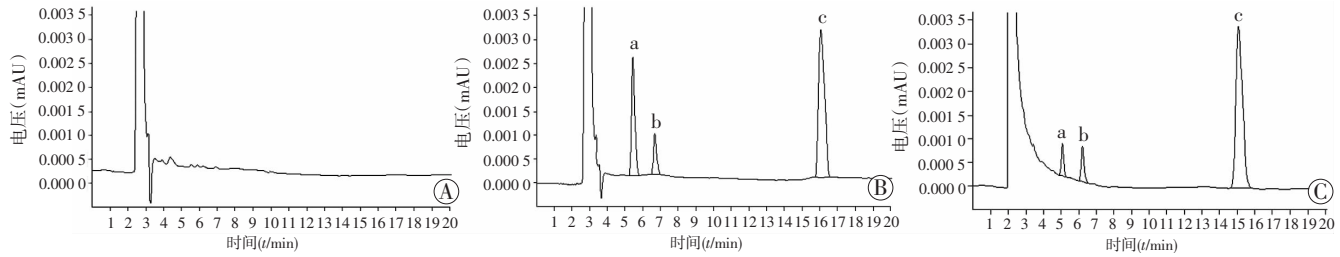
浓度(μmol/L)	日内精密度		日间精密度	
	$\bar{x}\pm s$	RSD(%)	$\bar{x}\pm s$	RSD(%)
低	0.94±0.03	2.64	1.05±0.04	3.57
中	7.31±0.06	0.84	7.28±0.12	1.65
高	14.38±0.31	2.16	14.60±0.27	1.83

2.4 加样回收率

为了考察孵育体系中4′-羟基双氯芬酸的回收率,分别取浓度为1.2、1.5、1.8 μmol/L的4′-羟基双氯芬酸酶反应体系,加入蛋白浓度为2.5 mg/mL活性微粒体,考察回收率,结果见表2。其加样回收率在85.83%~92.78%之间,RSD小于5%,表明检测方法准确度良好。

表2 4′-羟基双氯芬酸在大鼠肝微粒体中的回收率(n=9)

样品浓度(μmol/L)	加入浓度(μmol/L)	测定浓度(μmol/L)	回收率(%)	RSD(%)
1.4182	1.2	2.45±0.04	85.83	1.63
1.4182	1.5	2.73±0.12	87.33	4.41
1.4182	1.8	3.08±0.08	92.78	2.59



A:空白微粒体;B:双氯芬酸、4′-羟基双氯芬酸、香豆素标准品加失活微粒体;C:双氯芬酸微粒体温孵后;a:香豆素;b:4′-羟基双氯芬酸;c:双氯芬酸

图1 双氯芬酸和产物4′-羟基双氯芬酸、内标香豆素的HPLC色谱分析

2.5 CYP2C9酶孵育条件的优化

为了得到酶孵育体系中适宜的蛋白浓度,处理蛋白浓度为0.05、0.1、0.2、0.25、0.5 mg/mL的酶反应体系,测定各蛋白浓度的酶反应体系中产物的生成量,以蛋白浓度(X)与产物生成量(Y)绘制曲线,见图2A,结果显示在0~0.25 mg/mL范围内生成的产物量与蛋白浓度呈线性关系,因此选择蛋白浓度为0.25 mg/mL的RLM用于CYP2C9酶动力学分析。

为了得到适宜的孵育时间,平行制备5组酶反应体系,分别在孵育5、10、15、20、25 min后终止反应,测定各时间点终止后产物的生成量,以孵育时间(X)与产物生成量(Y)绘制曲线,见图2B,结果显示在0~15 min的孵育时间内,酶促反应呈线性关系,因此选择15 min的孵育时间用于CYP2C9酶动力学分析。

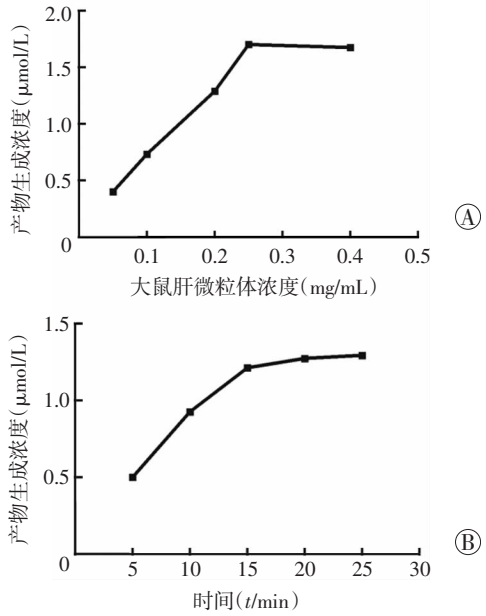


图2 孵育蛋白浓度(A)和孵育时间(B)与生成的产物4′-羟基双氯芬酸浓度曲线

2.6 CYP2C9酶动力学分析

通过孵育条件的优化,确定合适的蛋白浓度为0.25 mg/mL,孵育时间为15 min,选用冰乙腈为终止试剂,在此条件下进行CYP2C9酶动力学分析。处理底物浓度为1、2、4、6、8、10、15、20、30、40、50、60 μmol/L的酶反应体系,测定不同浓度底物的酶反应体系中产物的生成量,以底物浓度(X)与产物的生成速率(Y)绘制米氏曲线,经Graphpad prism 5.01软件作图(图3)。得双氯芬酸经大鼠肝微粒体中CYP2C9代谢的酶动力学参数:V_{max}为0.728 2 nmol/(min·mg),K_m为8.270 μmol/L。

2.7 中药有效成分对CYP2C9的作用

经HPLC分析20组中药有效成分孵育体系中代谢产物4′-羟基双氯芬酸的转化率,通过独立样本t检验结果表明:与对照组比较,黄芩素、蛇床子素、大黄素、獐牙菜苦苷、淫羊藿苷、白藜芦醇组产物4′-羟基双氯芬酸的转化率明显降低($P<0.05$),表明其对CYP2C9酶具有抑制作用;而其他有效成分单体对4′-羟基双氯芬酸的转化率没有显著影响($P>0.05$),对CYP2C9酶无作用,见表3。

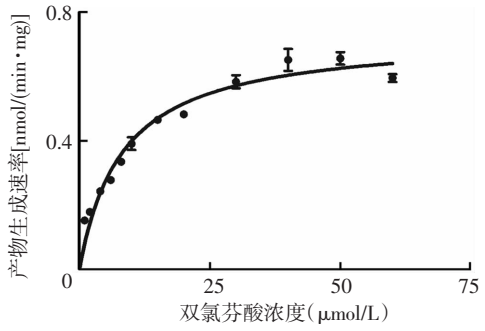


图3 底物双氯芬酸浓度与反应速率曲线

表3 20种中药有效成分单体对4′-羟基双氯芬酸转化率的影响
[pmol/(min·mg),$\bar{x}\pm s$]

中药有效成分	转化率	中药有效成分	转化率
对照组	735.80±17.27		
实验组			
丹皮酚	620.50±15.87	柴胡皂苷d	613.10±31.74
黄芩素	402.60±10.58[a]	五味子乙素	631.46±21.16
苦杏仁苷	614.10±21.16	五味子甲素	712.75±16.31
蛇床子素	210.90±10.26[a]	土贝母苷甲	616.97±15.93
葛根素	603.91±21.61	獐牙菜苦苷	509.83±26.45[a]
绿原酸	660.45±15.47	延胡索乙素	766.07±21.41
栀子苷	691.19±15.28	淫羊藿苷	355.44±15.87[a]
大黄素	414.46±10.32[a]	贝母素甲	719.76±14.72
芦丁	755.11±15.46	芍药苷	696.61±15.37
橙皮苷	715.17±10.35	白藜芦醇	387.34±22.16[a]

a:$P<0.05$,与对照组比较

3 讨论

中药有效成分对CYP酶的作用研究是当前中药在临床应用和新药研发中的热点,体外探针底物与肝微粒体孵育法测定酶活性是考察药物对CYP酶作用的常用方法。双氯芬酸(diclofenac)是FDA批准用于CYP2C9酶活性研究的特异性探针底物[11],其主要被催化为4′-羟基双氯芬酸(4′-Hydroxydiclofenac),文献[12]通过重组的CYP2C9酶及CYP2C9抑制剂,证实4′-羟基双氯芬酸几乎完全由CYP2C9催化生成。因此,本研究以双氯芬酸为探针底物,通过测定代谢产物4′-羟基双氯芬酸的转化率,分析大鼠肝微粒体中CYP2C9的酶动力学参数,能够快速准确测定CYP2C9酶活性,并应用于中药有效成分对CYP2C9酶作用的评价。

在酶反应动力学研究中,生成的产物与反应时间和蛋白浓度均应呈现线性关系,即底物的消耗量应小于20%[6],因此,其反应时间和蛋白浓度均应在线性范围内选择。本研究通过孵育时间和蛋白浓度的优化,得出合适的蛋白浓度为0.25 mg/mL,孵育时间为15 min,在

此条件下测定双氯芬酸经大鼠肝微粒体中 CYP2C9 代谢的酶动力学参数：V_{max}为 0.728 2 nmol/(min·mg)，K_m为 8.270 μmol/L。参照文献[13]，选择酶反应体系中探针药物的浓度应[S]≤K_m，同时考虑到检测的便利，在底物消耗小于20%范围内生成产物量应尽可能多，因此选取的底物浓度为 8.00 μmol/L。

在体外评价药物相互作用可能性及研究药物代谢途径的实验中，常需要用有机试剂来溶解难溶性药物，但某些有机试剂可使酶活性改变，从而造成体外-体内预测准确度降低[14]。为了选择合适的有机溶剂，本研究考察了甲醇、乙醇、乙腈 3 种常用有机溶剂对 RLM 中 CYP2C9 酶催化双氯芬酸活性的影响，结果表明1%的甲醇和乙醇即对 CYP2C9 有明显的抑制作用，而5%以下的乙腈均对 CYP2C9 酶无影响。因此，在本实验中一律选用乙腈作为难溶性药物的有机溶剂。

本实验通过大鼠肝微粒体体外孵育法初步评价了20种中药药效成分对 CYP2C9 酶活性的影响。其中黄芩素、蛇床子素、大黄素、獐牙菜苦苷、淫羊藿苷、白藜芦醇对 CYP2C9 具有明显的抑制作用。上述药效成分均具有各自独特的药理活性，含上述药效成分的中草药或中草药制剂广泛应用于临床相应疾病的治疗，且往往与西药联合使用而达到治疗疾病的目的。因此，含上述药效成分的中草药或中草药制剂与经 CYP2C9 代谢的药物联合服用的概率非常大。而本研究发现黄芩素、蛇床子素、大黄素、獐牙菜苦苷、淫羊藿苷、白藜芦醇对 CYP2C9 具有明显的抑制作用。因而，在临床用药中应注意上述有效成分或相关中药的联合用药。而其具体的抑制机制及强度，将在今后的实验研究中进一步探讨，为临床合理用药提供参考。

在上述20种药效成分中，五味子甲素、五味子乙素、苦杏仁苷、葛根素、栀子苷、芦丁、橙皮苷、芍药苷等是目前预防和治疗心脑血管疾病的常用中药主要有效成分，其具有良好的降血脂、降血压、降血糖以及扩张血管的药理作用，在临床上常与主要由 CYP2C9 代谢的降血糖血压药物甲苯磺丁脲、洛沙坦等联合用药，因此，本研究考察了上述各药效成分对 CYP2C9 酶的抑制作用，结果显示其对 CYP2C9 酶不存在显著的抑制作用，表明联合用药时由 CYP2C9 代谢抑制而导致的药物相互作用的可能性极小。由于药物在体内需经过复杂的吸收、分布、代谢和排泄的过程，且体外实验结果可能会因孵育体系中酶蛋白浓度、底物种类和浓度、酶孵育时间以及受试物浓度的影响而存在误差，因此，这些药效成分在体内对酶活性的作用需进一步考察。

参考文献：

[1] Zhou S F, Liu J P, Chowbay B. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact[J]. Drug Metab Rev, 2009, 41(2): 89-295.

[2] Niemi M, Cascorbi I, Timm R, *et al*. Glyburide and glimepiride pharmacokinetics in subjects with different CYP2C9 genotypes[J]. Clin Pharmacol Ther, 2002, 72(3): 326-332.

[3] Yasar U, Tybring G, Hidestrand M, *et al*. Role of CYP2C9 polymorphism in losartan oxidation[J]. Drug Metab Dispos, 2001, 29(7): 1051-1056.

[4] Taki Y, Yokotani K, Yamada S, *et al*. Ginkgo biloba extract attenuates warfarin-mediated anticoagulation through induction of hepatic cytochrome P450 enzymes by bilobalide in mice[J]. Phytomedicine, 2012, 19(2): 177-182.

[5] Si D, Wang Y, Zhou Y H, *et al*. Mechanism of CYP2C9 inhibition by flavones and flavonols[J]. Drug Metab Dispos, 2009, 37(3): 629-634.

[6] 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 Dispos, 2008, 36(7): 1308-1314.

[7] 金科涛，王宇光，徐彭，等. HPLC 测定大鼠肝微粒体 P450 活性方法学研究进展[J]. 药物分析杂志，2006，26(3)：415-419.

[8] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al*. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193(1): 265-275.

[9] 于卫江，黄丽军，朱大岭. 应用大鼠肝微粒体筛选对细胞色素 P4502D6 有抑制作用的中药[J]. 中草药，2007，38(3)：397-401.

[10] 吕秋军. 新药药理学研究方法[M]. 北京：化学工业出版社，2007：685.

[11] Mancy A, Antignac M, Minoletti C, *et al*. Diclofenac and its derivatives as tools for studying human cytochromes P450 active sites: particular efficiency and regioselectivity of P450 2Cs[J]. Biochemistry, 1999, 38(43): 14264-14270.

[12] Bort R, Mace K, Boobis A, *et al*. Hepatic metabolism of diclofenac: role of human CYP in the minor oxidative pathways[J]. Biochem Pharmaeol, 1999, 58(5): 787-796.

[13] Bjornsson T D, Callaghan J T, Einolf H J, *et al*. The conduct of *in vitro* and *in vivo* drug-drug interaction studies : A Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA) perspective[J]. Drug Metab Dispos, 2003, 31(7): 815-832.

[14] Gonzalez-Perez V, Connolly E A, Bridges A S, *et al*. Impact of organic solvents on cytochrome P450 probe reactions: filling the gap with (S)-Warfarin and midazolam hydroxylation[J]. Drug Metab Dispos, 2012, 40(11): 2136-2142.

（**收稿**：2013-06-18；**修回**：2013-07-24）

（编辑　张　维）