论著

文章编号:1000-5404(2014)02-0130-05

没食子酸及其氧化产物对大鼠肝微粒体 CYP3A 的抑制效应

石 亮,张远冬,王二豪,惠俊敏,郭延垒,于 超 (400016 重庆,重庆医科大学生命科学研究院)

[摘要] **目的** 体外研究没食子酸对大鼠肝微粒体 CYP3A 的抑制效应。**方法** 将不同浓度没食子酸与鼠肝微粒体及探针底物在 37 ℃下孵育,用高效液相色谱-紫外法测定探针底物的代谢产物生成率,计算 IC_{50} 值。在 NADPH 存在或不存在时,将没食子酸与鼠肝微粒体在 37 ℃下分别预孵育 0、15、30 min 后继续孵育 15 min,测定探针底物的代谢产物生成率,观察没食子酸对 CYP3A 抑制的时间依赖性。在无 NADPH 存在时,将不同浓度没食子酸与鼠肝微粒体在 37 ℃下分别预孵育 0、30 min 后继续孵育 15 min,测定探针底物的代谢产物生成率,计算出两实验组 IC_{50} 平移值(IC_{50} shift)。观察 2.5 h内没食子酸在紫外-可见光光谱下的变化。在无 NADPH 存在时,将抗氧剂与没食子酸及鼠肝微粒体在 37 ℃下共同预孵育,观察抗氧剂谷胱甘肽和维生素 C 的加入对没食子酸抑制强度的影响。**结果** 没食子酸对 CYP3A 表现出浓度依赖性抑制($P<0.05$),IC_{50}为 130.2 μg/mL。预孵育无 NADPH 存在时,没食子酸对 CYP3A 表现出时间依赖性抑制($P<0.05$),且抑制强度远大于 NADPH 存在的实验组。在无 NADPH 存在时,没食子酸与鼠肝微粒体在 37 ℃下分别预孵育 0 min和 30 min,两实验组间的 IC_{50} 平移值达 11.9。紫外-可见光全波长扫描观察显示,没食子酸在孵育过程中生成了 2 种反应产物。抗氧剂的加入能显著降低没食子酸对 CYP3A 的抑制能力($P<0.05$)。**结论** 没食子酸对 CYP3A 的活性表现出较强的不可逆性抑制,具有诱导药物-药物相互作用的风险。

[关键词] 没食子酸;肝微粒体;CYP3A;大鼠

[中图法分类号] R285.5;R333.4;R969.2 [文献标志码] A

Inhibitory effect of gallic acid and its oxidation products on CYP3A in rat liver microsomes

Shi Liang, Zhang Yuandong, Wang Erhao, Hui Junmin, Guo Yanlei, Yu Chao (Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the inhibitory effect and mechanism of gallic acid on CYP3A in rat liver microsomes *in vitro*. **Methods** Rat liver microsomes were incubated with different concentrations of gallic acid and probe substrates at 37 ℃. The formation of metabolites was detected by high performance liquid chromatography-UV and IC_{50} was calculated according to the formation rates of metabolites at various concentrations of gallic acid. Gallic acid was used to pre-incubate with rat liver microsomes in the presence or absence of NADPH at 37 ℃ for 0, 15 and 30 min separately. Probe substrate metabolite generation rate was measured to observe the time-dependent inhibition of CYP3A after 15 min incubation. Different concentrations of gallic acid and rat liver microsomes were pre-incubated without NADPH at 37 ℃ for 0 and 30 min separately and IC_{50} shift value was calculated according to the formation rates of metabolites after 15 min incubation. Time-dependent changes in UV-visible spectra of gallic acid within 2.5 h were observed. Antioxidants such as glutathione and vitamin C were used to incubate with gallic acid and rat liver microsomes without NADPH at 37 ℃ and the effects of antioxidants on inhibitory potency of gallic acid were observed. **Results** Gallic acid exhibited concentration-dependent inhibitory effects on CYP3A ($P<0.05$), with IC_{50} value of 130.2 μg/mL. Pre-incubation with rat liver microsomes in the absence of NADPH, gallic acid exhibited time-dependent inhibitory effects on CYP3A ($P<0.05$) and the inhibitory potency was much greater than the experimental group with NADPH

[基金项目] 国家自然科学基金(81070222);高等学校博士学科点专项科研基金(20125503110008)

[通信作者] 于 超,电话:(023)68485589, E-mail:yuchaom@163.com

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

in pre-incubation. Between 0 min and 30 min pre-incubation experimental groups in the absence of NADPH, the IC_{50} shift value was 11.9. Two reaction products of gallic acid were observed with UV-visible spectra. Adding antioxidants could significantly reduce the inhibitory potency of gallic acid on CYP3A ($P < 0.05$). **Conclusion** Gallic acid shows irreversible inhibition on CYP3A which may induce drug-drug interaction.

[**Key words**] gallic acid; liver microsomes; CYP3A; rats

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81070222) and the Specialized Research Fund for Doctoral Program of Higher Education (20125503110008). Corresponding author: Yu Chao, Tel: 86-23-68485589, E-mail: yuchaom@163.com

CYP3A作为CYP450酶系中最为重要的一种亚型,参与约38个类别150多种药物的代谢[1]。大量研究表明,药物的毒副作用的产生与人体肝脏中CYP450酶系代谢活性的改变密切相关。因此,研究药物对CYP3A酶活性的影响,对于临床合理用药具有重要参考意义。没食子酸(gallic acid),又名五倍子酸,其广泛存在于掌叶大黄、大叶桉、山茱萸等中药材中,具有很高的药用价值。有研究表明没食子酸具有抗炎抑菌、降酯[2]等药理作用,还具有抗肿瘤[3-4]、抗乙肝病毒的功效。在国内,中西药联合使用较为普遍,因而发生中-西药药物相互作用的可能性大大增加。没食子酸还广泛存在于红酒和绿茶等食品中,这同时也增加了发生食物-药物相互作用的风险。目前,国内外有关没食子酸对CYP3A活性影响的研究较少。本研究通过体外温孵法研究了没食子酸及其反应产物对大鼠CYP3A活性的抑制效应及机制,提示经CYP3A代谢的药物与没食子酸联合使用时可能产生药物-药物相互作用。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

LC-2010A高效液相色谱系统、紫外检测器(日本岛津公司);TB-85型恒温水浴箱(日本岛津公司);R21G型高速冷冻离心机(日本日立公司);SB-3200DT超声波清洗机(宁波新芝公司);Elix10超纯水净化系统(美国MILLIPORE公司);组织匀浆机(德国IKA公司);XS-105十万分之一精密天平(瑞士METTLER TOLED公司)。

没食子酸(纯度>99.8%,批号:LJ0505B019J)购自BIO Biobasic公司,睾酮(纯度>99.8%,批号:139700232739111)购自Fluka公司,氯化镁购自Aladin公司,皮质醇、6-磷酸葡萄糖、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、NADP+均购自Sigma公司。甲醇购自Tedia公司,其他试剂为市售分析纯。

1.2 大鼠肝微粒体制备

清洁级7~8周龄雄性SD大鼠10只,体质量(200±20)g,由重庆医科大学实验动物中心提供[实验动物质量许可证号:SCXK(渝):2007-0002]。

大鼠断头处死,取肝脏,用PBS洗至土黄色,采用差速离心法制备微粒体[5-6],制备完成后用PBS缓冲液混悬均匀,放置于-80 ℃冰箱中保存待用。以小牛血清白蛋白为标准品,采用Lowry法测定微粒体蛋白含量[7],测得肝微粒体蛋白含量为35.2 mg/mL。

1.3 液相条件

通过HPLC-UV法测定睾酮经CYP3A的代谢产物6β-羟基睾酮的生成量来评价CYP3A的活性。色谱柱为Waters Symmetry C18柱(4.6×150 mm,5 μm);流动相为甲醇-水,梯度洗脱,甲醇和水起始比例为52∶48,在12 min内变为70∶30,然后在5 min内变为80∶20,最后在3 min内恢复到52∶48;柱温30 ℃;流速为1.0 mL/min;检测波长为254 nm。

1.4 没食子酸的稳定性考察

精确称取没食子酸标准品溶解于PBS(pH为3.5)中配置成浓度为250 μg/mL的溶液,取以上溶液200 μL与1 800 μL PBS(pH为7.4)混合均匀后置于37 ℃水浴中连续孵育2.5 h。用紫外分光光度计对孵育液进行全波长扫描,确定没食子酸的最大吸收波长。分别于0、0.5、1、1.5、2、2.5 h取孵育液测定其在没食子酸最大吸收波长处的光密度值。用不同时间的孵育组与0 h孵育组的光密度值的百分比来评价没食子酸的稳定性。

1.5 没食子酸对CYP3A抑制的浓度依赖性考察

将没食子酸(浓度分别为500、1 000、1 500 μg/mL)20 μL,6-磷酸葡萄糖(100 mmol/L)20 μL,6-磷酸葡萄糖脱氢酶(10 U/mL)20 μL,氯化镁(40 mmol/L)20 μL,大鼠肝微粒体(2 mg/mL)20 μL,睾酮-10%甲醇溶液(150 μmol/L)20 μL,PBS溶液(pH为7.4)60 μL,在37 ℃水浴下预孵育3 min,加入20 μL的NADP+(10 mmol/L)溶液启动反应,孵育体系总量为200 μL。继续孵育15 min后用180 μL冰乙腈终止反应,加入20 μL皮质醇(100 μmol/L)溶液作为内标。混合液用高速离心机在12 000 r/min下离心15 min,取上清进HPLC分析,进样量20 μL。空白组用20 μL的PBS(pH为3.5)代替没食子酸。以没食子酸组与空白组6β-羟基睾酮生成量的百分比来评价CYP3A的剩余酶活性。

1.6 没食子酸对CYP3A抑制的IC_{50}值测定

精确称取没食子酸,溶解于PBS(pH为3.5)中配制成5 mg/mL溶液,用PBS(pH为3.5)梯度稀释成4、3、2、1、0.8、0.4、0.2 mg/mL的溶液。按照1.5的方法将以上各浓度的没

食子酸20 μL加入到孵育体系中孵育和测定。空白组用20 μL PBS(pH为3.5)代替没食子酸。以没食子酸组与空白组中6β-羟基睾酮生成量的百分比评价CYP3A的剩余酶活性。使用GraphPad Prism v5.0软件绘制没食子酸浓度对剩余酶活性的曲线图,并计算IC_{50}。

1.7 没食子酸对CYP3A抑制的时间依赖性考察

实验分为2组,预孵育时有NADPH存在实验组为NADPH(+)组,预孵育时无NADPH存在的实验组为NADPH(-)组。NADPH(+)组的处理方法:将没食子酸(150 μg/mL)20 μL,6-磷酸葡萄糖(100 mmol/L)20 μL,6-磷酸葡萄糖脱氢酶(10 U/mL)20 μL,NADP+(10 mmol/L)20 μL,氯化镁(40 mmol/L)20 μL,大鼠肝微粒体(2 mg/mL)20 μL,PBS溶液(pH为7.4)40 μL,在37 ℃水浴下分别预孵育0、15、30 min;NADPH(-)组中同体积的PBS溶液(pH为7.4)代替NADP+,其他实验条件完全相同。预孵育完成后加入20 μL的NADP+(10 mmol/L)和20 μL睾酮-10%甲醇溶液(150 μmol/L)溶液共同启动反应,继续孵育15 min后用180 μL冰乙腈终止反应,加入20 μL皮质醇(100 μmol/L)溶液作为内标。混合液在用高速离心机在12 000 r/min下离心15 min,取上清进HPLC分析,进样量为20 μL。以没食子酸组与空白组中6β-羟基睾酮生成量的百分比评价CYP3A的剩余酶活性。

1.8 IC_{50}平移实验

精确称取没食子酸,溶解于PBS(pH为3.5)中配制成1 mg/mL溶液,用PBS(pH为3.5)梯度稀释成300、250、200、150、100、50 μg/mL的溶液待用,空白组没食子酸用同体积的PBS(pH为3.5)代替。具体实验方法参照1.7中NADPH(-)组,将实验分成2组,一组在NADPH不存在的情况下将各浓度没食子酸与鼠肝微粒体共同预孵育0 min,另一组在NADPH不存在的情况下预孵育30 min。预孵育完成后用NADP+和底物睾酮共同启动反应,正式反应15 min后,进HPLC分析,进样量20 μL。以没食子酸组与空白组中6β-羟基睾酮生成量的百分比评价CYP3A的剩余酶活性。用Graph Pad Prism v5.0软件绘制没食子酸浓度对剩余酶活性的曲线图,并计算2组的IC_{50},以两者的比值来计算IC_{50}平移值。

1.9 没食子酸反应产物的紫外-可见光全波长扫描

精确称取没食子酸标准品溶解于PBS(pH为3.5)中配置成浓度为250 μg/mL的溶液,取以上溶液200 μL与1 200 μL PBS(pH为7.4)、200 μL 6-磷酸葡萄糖(100 mmol/L)、200 μL 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(10 U/mL)、200 μL氯化镁(40 mmol/L)混合均匀后置于37 ℃水浴中连续孵育2.5 h。分别于0、0.5、1、2、2.5 h取孵育液进行紫外-可见光全波长扫描,扫描波长范围为200~800 nm。

1.10 抗氧剂对没食子酸抑制作用的考察

实验分4组,分别为空白组、没食子酸组、没食子酸+谷胱甘肽组及没食子酸+维生素C组。实验方法参照1.7中NADPH(-)组,空白组加入没食子酸的溶剂20 μL,没食子酸组加入没食子酸(1.5 mg/mL)20 μL,没食子酸+谷胱甘肽组加入没食子酸(1.5 mg/mL)和谷胱甘肽(50 mmol/L)各20 μL,没食子酸+维生素C组加入没食子酸(1.5 mg/mL)和维生素C(10 mmol/L)各20 μL。预孵育体系的总量为200 μL,时间为15 min。预孵育完成后加入NADP+和睾酮-10%甲醇溶液溶液共同启动反应,继续孵育15 min后用180 μL冰乙腈终止反应,加入20 μL皮质醇(100 μmol/L)溶液作为内标。混合液在用高速离心机在12 000 r/min下离心15 min,取上清进HPLC分析,进样量为20 μL。以实验组与空白组中6β-羟基睾酮生成量的百分比评价CYP3A的剩余酶活性。

1.11 统计学分析

数据处理和统计采用GraphPad Prism v5.0软件,组间比较采用单因素方差分析。检验水准为0.05。

2 结果

2.1 没食子酸的稳定性

体外孵育体系的pH为7.4,温度为37 ℃,没食子酸在此条件下可能不稳定。利用紫外-可见光分光光度计考察了孵育条件下没食子酸的稳定性,见图1。结果表明,没食子酸最大吸收波长为259 nm。随着孵育时间的延长,没食子酸的光密度值出现一定程度降低,但是2.5 h内的降低量不超过2%。因体外孵育时间不会超过1 h,故没食子酸不稳定带来的影响可以忽略。

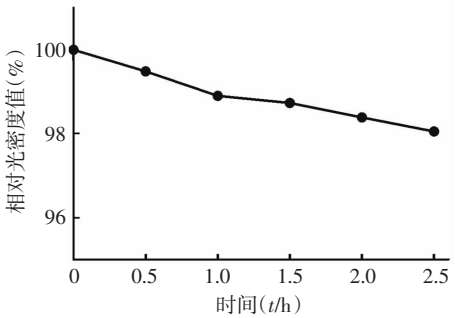
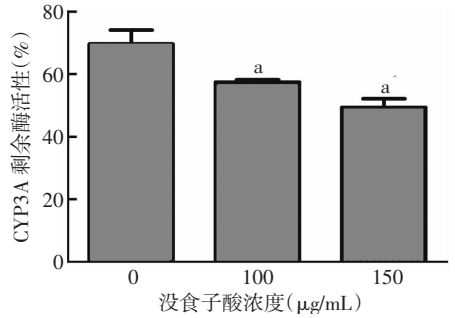


图1 孵育不同时间没食子酸稳定性

2.2 没食子酸对CYP3A的浓度依赖性抑制考察

没食子酸对CYP3A产生了抑制,且随着没食子酸浓度的增加,抑制效应呈现增大趋势,说明抑制具有浓度依赖性($P<0.05$)。见图2。



a:$P<0.05$,与50 μg/mL没食子酸组比较;b:$P<0.05$,与100 μg/mL没食子酸组比较

图2 不同浓度没食子酸对CYP3A的抑制

2.3　没食子酸对 CYP3A 抑制的 IC_{50} 值

没食子酸对 CYP3A 存在较弱的抑制，IC_{50} 值为 130.2 μg/mL，95% 的置信区间范围为 104.3～162.4 μg/mL。见图 3。

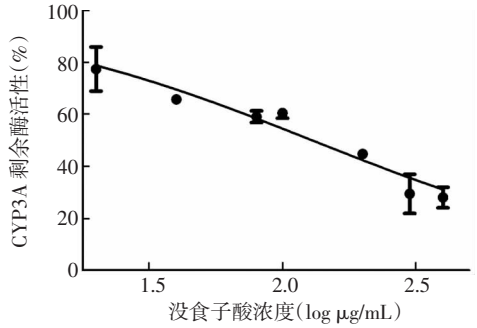
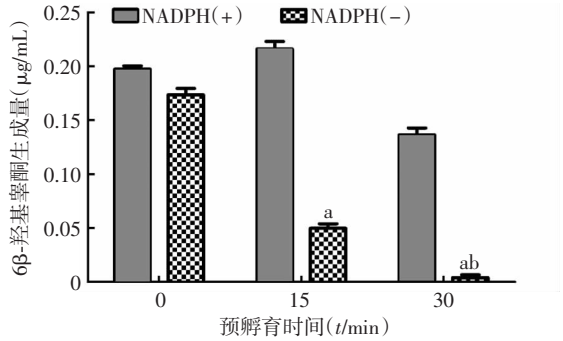


图 3　不同浓度没食子酸对 CYP3A 剩余酶活性曲线

2.4　没食子酸对 CYP3A 时间依赖性抑制的影响

2 个实验组中没食子酸对 CYP3A 的抑制均呈现明显的 NADPH 依赖性. 且在相同的预孵育时间下，NADPH(－)组的抑制强度明显高于 NADPH(＋)组。NADPH(－)组中抑制呈现明显的时间依赖性($P<0.05$)，而在 NADPH(＋)组抑制则无明显时间依赖性。这提示没食子酸在无 NADPH 存在的预孵育中可能产生了某种反应产物，对 CYP3A 产生不可逆的抑制。见图 4。



a：$P<0.05$，与预孵育 0 min 比较；b：$P<0.05$，与预孵育 15 min 的 NADPH(－)组比较

图 4　没食子酸对 CYP3A 抑制时间的依赖性

2.5　IC_{50} 平移实验

实验结果表明，无 NADPH 存在时预孵育 0 min 的实验组 IC_{50} 为 227.8 μg/mL，无 NADPH 存在时预孵育 30 min 的实验组 IC_{50} 为 19.14 μg/mL，两实验组 IC_{50} 平移值为 11.9。IC_{50} 平移值 >1.5 则可认为出现了明显的 IC_{50} 的平移。这提示没食子酸可能通过生成了一种抑制能力更强反应产物对 CYP3A 产生不可逆的抑制，且这种反应物的产生并非是由 NADPH 介导的。见图 5。

2.6　没食子酸反应产物的紫外-可见光全波长扫描

在 450 nm 和 620 nm 处出现了 2 个新的吸收峰，且 2.5 h 内最大吸收波长处光密度值随着孵育时间的增加而增大，说明没食子酸在预孵育的过程中生成了反应产物。见图 6。

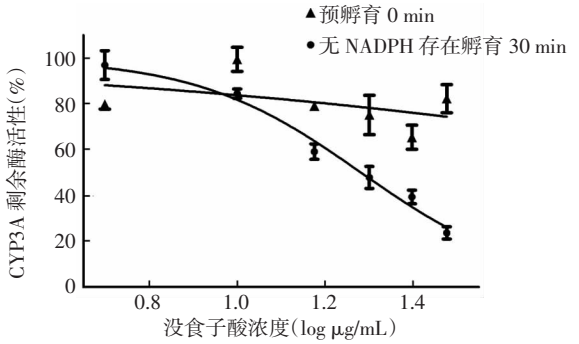


图 5　不同浓度没食子酸预孵育不同时间的 IC_{50} 平移

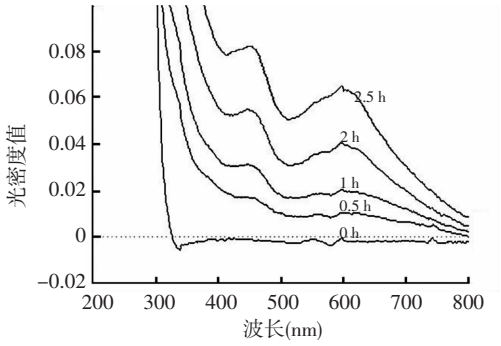
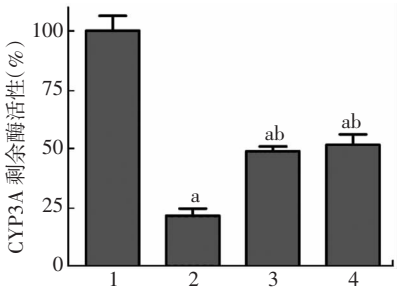


图 6　没食子酸反应产物的紫外-可见光全波长扫描

2.7　抗氧剂对没食子酸的抑制作用

没食子酸组与空白组相比，CYP3A 的活性被抑制 78.5%。加入了抗氧剂谷胱甘肽的实验组中，没食子酸对 CYP3A 抑制率降低为 51.2%($P<0.05$)。加入维生素 C 的实验组中抑制率降低为 48.4%($P<0.05$)。这说明抗氧剂能够明显减弱没食子酸对 CYP3A 的抑制，证实没食子酸主要是通过生成某种氧化产物而对 CYP3A 产生不可逆性的抑制。见图 7。



1：空白组；2：没食子酸组；3：没食子酸＋谷胱甘肽组；4：没食子酸＋维生素 C 组　a：$P<0.05$，与空白组比较；b：$P<0.05$，与没食子酸组比较

图 7　抗氧剂对没食子酸的抑制作用

3　讨论

细胞色素 P450 酶系在人体肝脏的药物代谢中发挥主要作用，其活性被抑制是导致药物-药物相互作用最常见的原因之一[8]。抑制的机制可分为可逆性、半不可逆性和不可逆性。其中不可逆性抑制发生的原因

通常是由于抑制剂的代谢物与酶之间形成了共价结合,酶活性的丧失在新酶重新合成出之前都不能恢复,且这种共价结合复合物在还可能作为半抗原在体内触发自身免疫反应。因此,不可逆性抑制是一种后果更为严重的抑制,其导致药物-药物相互作用的风险更大[9]。CYP3A作为CYP450酶系中最为重要的一种亚型,参与人体内大多数药物的代谢,因此对其抑制机制的研究具有十分重要的意义。不可逆性抑制的发生被认为是的时间依赖性抑制的产生的严重后果。

有研究[10]报道没食子酸在酸性和碱性条件下不稳定。本文首先考察了没食子酸在孵育条件的稳定性,发现没食子酸在有限的孵育时间内发生的降解对实验结果的影响可以忽略。在预孵育时存在NADPH和不存在NADPH两种情况分别研究了没食子酸对CYP3A抑制的时间依赖性。发现相较于预孵育存在NADPH的实验组,不存在NADPH的实验组中没食子酸对CYP3A的抑制呈现更明显的时间依赖性,且抑制能力也更强。由于产生不可逆性抑制的原因主要是母体化合物的代谢物与CYP发生共价结合,因此,推测在NADPH不存在时生成了某种反应产物。

为进一步研究现象产生的原因,本研究参考相关文献[11],进行了IC_{50}平移实验。在NADPH不存在的情况下,将不同浓度没食子酸与鼠肝微粒体分别预孵育0 min和30 min。若没食子酸在NADPH不存在的情况下孵育能生成与CYP3A共价结合的反应产物,那么预孵育0 min和30 min时反应产物生成量的显著差异会导致IC_{50}值发生明显平移。实验结果表明预孵育0 min组与预孵育30 min组比较,IC_{50}值发生了11.9倍的平移,远远高于FDA规定的1.5倍的界定值[12]。预孵育0 min组的IC_{50}达到了227.8 μg/mL,表现为很弱的抑制。这说明没食子酸本身的抑制能力较弱,而其反应产物表现出较强的抑制能力。因在预孵育反应中不存在NADPH,没食子酸反应产物无法由NADPH介导生成,而可能是由非NADPH介导的其他途径产生。这是一种较为罕见的现象,国外也有研究报道了类似现象[13]。

在实验中观察到预孵育中存在NADPH的实验组,没食子酸对CYP3A的抑制强度远弱于NADPH不存在的实验组。NADPH是一种还原性物质,故猜想没食子酸可能发生氧化反应生成了氧化产物,而NADPH能减少此类氧化产物的生成。本研究通过紫外全波长扫描观察到了两种新物质的生成;通过加入抗氧剂谷胱甘肽和维生素C,观察到没食子酸的抑制效应减弱的现象。这都提示没食子酸是通过生成氧化产物而表现出不可逆性抑制的。

没食子酸不但可以作为药物使用,其在绿茶、红酒等日常食品饮品中也具有较高的含量。没食子酸对CYP3A产生不可逆性抑制,这提示没食子酸与经CYP3A代谢的药物合用时很有可能导致药物-药物相互作用。另外,日常食用富含没食子酸的食品及饮料时应注意食品的保存,避免因没食子酸在空气中久置而产生对CYP3A具有较强抑制能力的氧化产物,增加潜在的食物-药物相互作用的可能性。

参考文献:

[1] Belle D J, Callaghan J T, Gorski J C, *et al*. The effects of an oral contraceptive containing ethinyloestradiol and norgestrel on CYP3A activity [J]. Br J Clin Pharmacol, 2002, 53(1): 67-74.

[2] 葛斌, 谢梅林, 顾振纶, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对大鼠高脂性脂肪肝的治疗作用研究[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(4): 510-514.

[3] 李沐涵, 殷美琦, 冯靖涵, 等. 没食子酸抗肿瘤作用研究进展[J]. 中医药信息, 2011, 28(1): 109-111.

[4] 何文飞, 何大维, 马超, 等. 没食子酸抑制人神经母细胞瘤增殖作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(2): 107-110.

[5] 郭延垒, 于超, 杨竹, 等. HPLC法测定大鼠UGT1A6的酶活性及体外动力学分析[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(4): 717-720, 696.

[6] 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.

[7] 焦利敏, 廖学品, 石碧. 紫外分光光度法下直接测定蛋白质溶液的浓度[J]. 化学研究与应用, 2007, 19(5): 562-566.

[8] 张艳辉, 于超, 郭延垒, 等. 黄芪甲苷通过抑制大鼠体内CYP1A2酶活性影响药物相互作用[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(13): 1300-1303.

[9] Barbara J E, Kazmi F, Parkinson A, *et al*. Metabolism-dependent inhibition of CYP3A4 by lapatinib: evidence for formation of a metabolic intermediate complex with a nitroso/oxime metabolite formed *via* a nitrone intermediate[J]. Drug Metab Dispos, 2013, 41(5): 1012-1022.

[10] 吴雪钗, 于波涛, 侯艾林, 等. 没食子酸稳定性研究[J]. 西南国防医药, 2006, 16(5): 484-485.

[11] Lee J Y, Lee S Y, Oh S J, *et al*. Assessment of drug-drug interactions caused by metabolism-dependent cytochrome P450 inhibition [J]. Chem Biol Interact, 2012, 198(1/3): 49-56.

[12] Berry L M, Zhao Z. An examination of IC50 and IC50-shift experiments in assessing time-dependent inhibition of CYP3A4, CYP2D6 and CYP2C9 in human liver microsomes [J]. Drug Metab Lett, 2008, 2(1): 51-59.

[13] Wright J N, Slatcher G, Akhtar M. 'Slow-binding' sixth-ligand inhibitors of cytochrome P-450 aromatase. Studies with 19-thiomethyl- and 19-azido-androstenedione[J]. Biochem J, 1991, 273 (Pt 3): 533-539.

(**收稿**:2013-07-15;**修回**:2013-08-16)

(编辑 张 维)