

不同生理状态下人参总皂苷对 HepG2 细胞 CYP2B6 mRNA 和蛋白表达的影响

严弋敬, 孙海燕, 刘冬, 李艳, 万红霞

(深圳职业技术学院应用化学与生物技术学院, 广东深圳 518055)

摘要: 本文研究人参总皂苷在正常和炎症状态下对 HepG2 细胞 CYP2B6 mRNA 和蛋白表达的影响。采用索式提取法提取人参总皂苷, Real-Time PCR 及 Western Blot 技术检测细胞中 CYP2B6 mRNA 和蛋白表达。结果显示, 正常状态下人参总皂苷低 (15 g/mL)、中 (60 g/mL) 与高 (240 g/mL) 剂量均显著诱导 CYP2B6 mRNA 表达 ($p < 0.05$), 中、高剂量均显著诱导 CYP2B6 蛋白的表达 ($p < 0.05$)。使用 LPS 孵育细胞制造炎症模型, LPS 对 CYP2B6 mRNA 表达无影响, 但显著诱导 CYP2B6 蛋白的表达 ($p < 0.05$)。使用人参总皂苷和 LPS 共同孵育细胞后, 炎症状态下人参总皂苷中、高剂量对 CYP2B6 mRNA 的表达仍有显著诱导效果 ($p < 0.05$), 低和中剂量则均能显著诱导 CYP2B6 蛋白的表达, 但高剂量则对 CYP2B6 的蛋白表达则呈现抑制作用 ($p < 0.05$)。提示炎症状态能够改变人参总皂苷对 CYP2B6 mRNA 和蛋白的表达, 因此联合用药时, 应考虑不同生理状态下人参对代谢性药物相互作用的影响。

关键词: 人参总皂苷; 炎症; CYP2B6

文章编号: 1673-9078(2016)12-39-44

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.12.007

Effects of Total Ginsenosides on Expression of CYP2B6 mRNA and Protein in HepG2 Cells in Normal and Inflammatory States

YAN Yi-jing, SUN Hai-yan, LIU Dong, LI Yan, WAN Hong-xia

(School of Applied Chemistry and Biological Technology, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China)

Abstract: The purpose of this study was to determine the effects of total ginsenosides on the expression of CYP2B6 mRNA and protein in HepG2 cells during normal and inflammatory states. Total ginsenosides were extracted using the Soxhlet extraction method and colorimetric analysis was employed to measure the concentration of total ginsenosides. The expression levels of CYP2B6 mRNA and protein were detected by RT-PCR and western blot, respectively. The results showed that in the normal state, low, medium, and high concentrations of total ginsenosides could induce the expression of CYP2B6 mRNA in HepG2 cells ($p < 0.05$), and medium and high concentrations could induce CYP2B6 protein expression ($p < 0.05$). LPS treatment of HepG2 cells could significantly increase CYP2B6 protein levels ($p < 0.05$) but had no effect on CYP2B6 mRNA. Compared with the normal state, medium and high concentrations of total ginsenosides could induce the expression of CYP2B6 mRNA after LPS treatment ($p < 0.05$). Low and medium concentrations of total ginsenosides could induce expression of CYP2B6 protein, while the high concentration had an inhibitory effect in LPS-treated HepG2 cells ($p < 0.05$). These results suggested that inflammation state can change the mRNA and protein expression of CYP2B6 induced by total ginsenosides. Therefore, drug-drug interaction between *Panax ginseng* and other drugs during the normal physiological state and LPS infection should be considered.

Key words: total ginsenosides; inflammation; CYP2B6

肝脏细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450)

收稿日期: 2015-12-14

基金项目: 广东省科技计划项目 (2013B051000089); 深圳市战略性新兴产业发展专项资金 (JCYJ20130331151222011); 深圳市科技计划项目 (JCYJ20140901162541286)

作者简介: 严弋敬 (1992-), 女, 在读研究生, 研究方向: 天然活性成分的分析及代谢组学研究

通讯作者: 孙海燕 (1972-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 天然活性成分的分析及代谢组学研究

氧化酶又称混合功能氧化酶和单加氧酶, 广泛存在于动物、植物及微生物的各种组织中, 是负责大多数临床药物、环境致癌物、外源毒物及内源活性物质生物转化的主要酶系统, 具有重要的药理、生理及病理学意义。CYP450 是一类亚铁血红素-硫醇盐蛋白的基因超家族, 由不同的基因家族和亚家族组成。CYP2B6 是人类 CYP2B 亚家族的重要成员, 广泛分布于人体肝脏、肾脏、肺、小肠、子宫内膜及支气管肺泡的巨噬细胞等, 参与多种内源性和外源性物质的合成和代

谢^[1]。CYP2B6 介导了大约 8% 临床药物的代谢, 其中包括如抗肿瘤药环磷酰胺、他莫昔芬、抗 HIV 感染的非核苷类逆转录酶抑制剂依法韦仑、抗抑郁药安非他酮、丙咪嗪、常用麻醉药氯胺酮和异丙酚等^[2]。除此之外, CYP2B6 还参与了很多毒物(如农药)的代谢, 是重要的外源性毒物代谢酶之一^[3]。因此, 稳定的 CYP2B6 活性是保障药物治疗安全有效的重要前提。

人参(Ginseng)是我国的一种传统中药, 为五加科植物人参 *Panax ginseng* C.A.Mey. 的干燥根或根茎, 具有大补元气、复脉固脱、补脾益肺与生津安神之功效, 是我国最具保健价值的传统中药。人参化学成分复杂, 生物活性广泛, 研究证明人参皂苷为其主要有效成分之一。有数据显示, 目前在全世界范围约有 13%~65% 的肿瘤等患者同时服用人参进行综合治疗及减轻放化疗所引起的不良反应, 同时人参也广泛用于免疫力低下和慢性疾病的营养保健和辅助治疗^[4]。因此人参对 CYP450 的调节会改变其合用药物的代谢过程, 产生代谢性药物相互作用。本课题组已深入研究了人参总皂苷对正常生理状态下部分 CYP450 亚型的作用, 但由于肿瘤、糖尿病和自身免疫性疾病等状态下机体大多处于一种慢性炎症状态^[5], 因此本文在前期研究的基础上, 分别从正常和炎症状态入手, 对比不同生理状态下人参对 HepG2 细胞 CYP2B6 mRNA 和蛋白表达的调控, 所用实验模型更接近临床实际状态, 更有利于对人参参与抗肿瘤药物等之间的联合使用提供参考。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

人参购自北京同仁堂(集团)股份有限公司。人参标准品 Re 购自中国食品药品检定研究院, 质量分数 92.7%。香草醛粉末、WME 固体粉末培养基均购自 sigma。新生牛血清, 双抗(青链霉素混合液 100×)均购自 Gibco 公司。白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-8(IL-8)检测试剂盒(德国西门子公司)。总 RNA 柱式提取试剂盒、1×TE buffer 与 5×蛋白上样缓冲液均购自生工生物, 实验所用引物委托上海生工生物合成。反转录 PrimeScript™ RT Master Mix(Perfect Real Time)和 SYBR® Premix Ex Tap™ II(Til RNaseH Plus)均购自 Takara(宝生物工程大连有限公司)。NP-40 裂解液购自 Merck 公司。BCA 法蛋白浓度测定试剂盒和 Griess 试剂盒购自 Pierce 公司。兔多克隆抗体 CYP2B6、GAPDH 一抗, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 抗体均购自 abcam。ECL 反应液购自

BIO-RAD。甲醇、正丁醇、硫酸、无水乙醇和氯仿均为国产试剂, 分析纯。

1.2 仪器

HERA cell 240 型 CO₂ 细胞培养箱, 美国 Thermo 公司; DM IRB 型荧光倒置显微镜, 德国 Leica 仪器公司; Spectra Max M5e 多功能酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; 5180 R 型冷冻离心机、22331 Hamburg 紫外分光光度计, 德国 Eppendorf 公司; Laborota 4001 型旋转蒸发仪, 德国 Hedolphg 公司; MS1 Minishaker 漩涡混合仪, 德国 IKA 公司; LightCycler 1.5 荧光定量 PCR 仪, 瑞士 Roche 公司; MiniProtein 电泳系统、Mini Trans-Blot 转膜系统和全自动凝胶成像仪, 美国 BIO-RAD 公司。

1.3 细胞

细胞株人肝癌细胞 HepG2 为本实验室保存。将 HepG2 细胞接种在 Complete Medium 培养基中生长, 培养基中含有 5% 胎牛血清(FBS)、10 mM Hepes 缓冲液、5 mg/mL 胰岛素、0.05 mg/mL 氢化可的松、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素。细胞在 5% CO₂、37 °C 条件下培养。待细胞进入对数生长期后用 0.05% 胰蛋白酶直接消化传代。实验所用的细胞在第 10~30 代之间。

1.4 对照品溶液的制备

精密称取人参皂苷 Re 标准品 10.0 mg 至 10 mL 容量瓶中, 加超纯水定容至刻度线, 混匀, 制成 1.0 mg/mL 的标准品溶液, 备用。

1.5 供试品溶液的制备

取新鲜人参片磨成粉过 80 目筛。称取人参粉末 1.00 g, 用滤纸包好, 放入索式提取器中, 100 mL 甲醇溶液 75 °C 水浴加热回流 4 h。将甲醇溶液放置在旋转蒸发仪上, 60 °C 蒸干甲醇。30 mL 超纯水溶解人参提取物, 每次加 30 mL 水饱和正丁醇萃取三次, 合并正丁醇层。旋转蒸发 70 °C 蒸干正丁醇, 用超纯水定容至 10 mL。根据中国药典规定的香草醛-硫酸法测定人参总皂苷含量。

1.6 人参总皂苷对 HepG2 细胞 CYP2B6 mRNA 和蛋白表达的影响

1.6.1 分组

实验共分为以下组别: 对照组: 正常细胞未处理

组; 人参总皂苷低、中和高剂量组(分别表示为: RSL(15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、RSM(60 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和 RSH(240 $\mu\text{g}/\text{mL}$); LPS 组(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 人参总皂苷低、中和高剂量分别和 LPS 合用组(分别表示为: LPS+RSL、LPS+RSM 和 LPS+RSH)。

1.6.2 LPS 诱导炎症模型的建立

以 LPS(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)刺激 HepG2 细胞 24 h 建立体外炎症模型, 采用化学发光法检测细胞培养上清中 IL-6 和 IL-8 的含量。通过和对照组相比, IL-6、IL-8 的含量分别由(10.8 \pm 2.1) pg/mL 和(15.6 \pm 1.8) pg/mL 上升至(23.4 \pm 3.8) pg/mL 和(32.6 \pm 2.9) pg/mL , 具有显著统计学意义($p < 0.01$), 表明 LPS 能够通过上调 IL-6 和 IL-8 的水平建立炎症模型。

1.6.3 RNA 的提取和 cDNA 的合成

细胞液浓度 4×10^5 个/mL 接种于 12 孔板, 1 mL/孔。培养过夜后, 弃掉培养基, 加入含有人参总皂苷的无 FBS 的 CM 培养基至人参总皂苷的浓度为 15、60 和 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 培养 48 h, 与 LPS 共作用的组别在人参总皂苷作用 24 h 后, 加入 LPS(1 mg/mL) 2 μL , 继续共培养 24 h。用总 RNA 柱式提取试剂盒提取 RNA, RNA 溶解于 50 L RNase-free H_2O 中。取 5 μL RNA 用于测定其纯度与浓度, 用紫外分光光度计测 A_{260}/A_{280} , $1.8 \leq A_{260}/A_{280} \leq 2.1$ 合格。反转录体系为 5 \times PrimScript RT Master Mix (Perfect Real Time) 2 μL , 总 RNA 0.5 μg , RNase Free dH_2O 加至 10 μL 。反转录的条件为 37 $^\circ\text{C}$ 、15 min, 85 $^\circ\text{C}$ 、5 s, 4 $^\circ\text{C}$ 、forever, 反转录产物-20 $^\circ\text{C}$ 保存。

1.6.4 实时荧光 PCR 反应

将反转录产物 2 倍稀释后作为 PCR 反应模板, 内参 GAPDH 的引物序列为 Forward: *ggaccaccagcccagcaagag*, Reverse: *gaggaggggagattcagtgtggtg*^[5]; CYP2B6 引物序列为 Forward: *tctgatgccaatggggcactgaa*, Reverse: *gggcgatgccttcaccaagacaaat*^[6]。PCR 反应体系为 4.5 μL cDNA 模板, 上下游引物 10 μM 各 1.8 μL , 2 \times SYBR Green I 22.5 μL , 高压灭菌双蒸水至终体积 45 μL , 混匀, 20 $\mu\text{L}/\text{管}$ 做两个复孔。反应条件为起始 95 $^\circ\text{C}$ 、30 s, 扩增时 95 $^\circ\text{C}$ 、5 s; 60 $^\circ\text{C}$ 、20 s 循环 50 次, 溶解曲线分析。进行荧光定量 PCR 反应。

1.6.5 数据分析

实时荧光定量 PCR 数据采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CP}}$ 法进行相对定量分析。目的基因诱导或抑制倍数 = $2^{-\Delta\Delta\text{CP}}$, CP 值是热循环仪中荧光达到阈值的循环数, $\Delta\Delta\text{CP}$ = 实验组 ΔCP (目的基因 CP-内参基因 CP) - 对照组 ΔCP (目的基因 CP-内参基因 CP)。

1.6.6 蛋白提取和浓度测定

细胞液浓度 4×10^5 个/mL 接种于 12 孔板, 1 mL/孔。培养过夜后, 弃掉培养基, 加入含有人参总皂苷的无 FBS 的 CM 培养基至人参总皂苷的浓度为 15、60 和 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 作用 2 h 后, 加入 LPS(1 mg/mL) 2 μL , 共培养 24 h。加入 1% NP-40 裂解液(含 20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 10%甘油, 2 mM EDTA, 10 μM 蛋白酶体抑制剂) 100 μL , 冰上裂解 30 min, 4 $^\circ\text{C}$, 14000 r/min 离心 15 min, 取上清。用 BCA 法蛋白浓度测定试剂盒测样品蛋白浓度。5 \times 蛋白上样缓冲液稀释后, 95 $^\circ\text{C}$ 、5 min, 存放于-80 $^\circ\text{C}$ 。

1.6.7 Western-Blot

样品蛋白提取液中的 CYP2B6 和 GAPDH 蛋白表达用 Western blot 检测, 电转移至 PVDF 膜上, 经过封闭、孵一抗和二抗, 浸入 ECL 发光混合液中 5 min, 曝光后用 Image Lab Software 5.2.1 成像系统定量分析。

1.7 NO 的测定

采用通用的 Griess 试剂法测定。按照设定好的时间点收集细胞培养上清, 96 孔板中每孔加 100 μL 上清和等量的 Griess 试剂混合, 于室温下静置 10 min, 550 nm 处测定其 OD 值, 根据绘制好的 NaNO_2 标准曲线计算 NO 的含量。

1.8 统计学分析

实验结果用 Mean \pm SD 表示, 显著性采用 SPSS 20.0 统计学软件进行分析, $p < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 人参总皂苷含量测定

人参总皂苷含量平行测定 3 次, 取平均值。测得人参总皂苷含量为 3.54%, RSD 值为 0.96%。

2.2 人参总皂苷对 HepG2 细胞中 CYP2B6

mRNA 表达的影响

2.2.1 正常生理状态下对 HepG2 细胞中 CYP2B6 mRNA 表达的影响

按照 1.6.1 分组的方法, 实验组分别用人参总皂苷低、中、高剂量孵育正常培养的人肝癌 HepG2 细胞 48 h, 对照组不做处理后, 测定 mRNA 的表达。RT-PCR 结果见图 1, 在正常生理状态下, 人参总皂苷低、中和高剂量均能显著诱导 CYP2B6 mRNA 的表达

($p < 0.05$), 其中低和中剂量的诱导效果呈现一定的剂量依赖性, 高剂量诱导效果有所下降。表明随着剂量的增加, 人参总皂苷对 CYP2B6 mRNA 的诱导作用先增强后减弱, 但整体均呈现诱导作用。

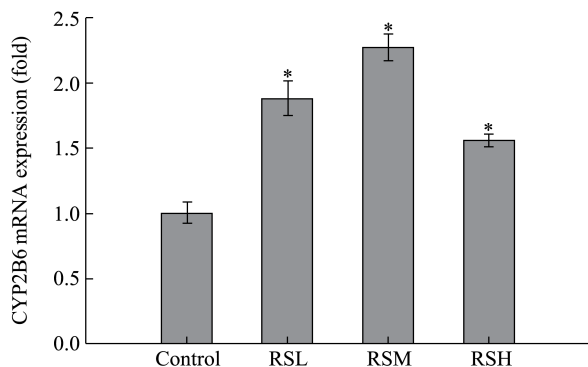


图1 人参总皂苷对 CYP2B6 mRNA 表达的影响

Fig.1 Effect of total ginsenosides on CYP2B6 mRNA expression

注: Control-空白对照组; RSL-人参总皂苷低剂量组 (15 $\mu\text{g/mL}$); RSM-人参总皂苷中剂量组 (60 $\mu\text{g/mL}$); RSH-人参总皂苷高剂量组 (240 $\mu\text{g/mL}$); 与空白组比较, $*p < 0.05$ 。

2.2.2 炎症状态下对 HepG2 细胞中 CYP2B6 mRNA 表达的影响

按照 1.6.1 分组的方法, 实验组分别用人参总皂苷低、中和高剂量孵育正常培养的人肝癌 HepG2 细胞 24 h 后, 加入 LPS 继续共孵育 24 h, 对照组不做处理后, 测定 mRNA 的表达。RT-PCR 结果见图 2, 与对照组相比, 单纯使用 LPS 孵育细胞, CYP2B6 mRNA 表达无显著变化, 但呈现一定的抑制趋势。LPS 与人参联合使用后, 人参总皂苷低剂量组对 CYP2B6 mRNA 的表达无显著作用, 中和高剂量则与正常生理状态下的作用类似, 均能显著诱导 CYP2B6 mRNA 的表达 ($p < 0.05$)。表明与正常生理状态下相比, 炎症状态下人参总皂苷的低剂量对 CYP2B6 mRNA 的作用发生了改变, 这一改变可能和 LPS 对 CYP2B6 mRNA 具有一定的抑制作用有关。

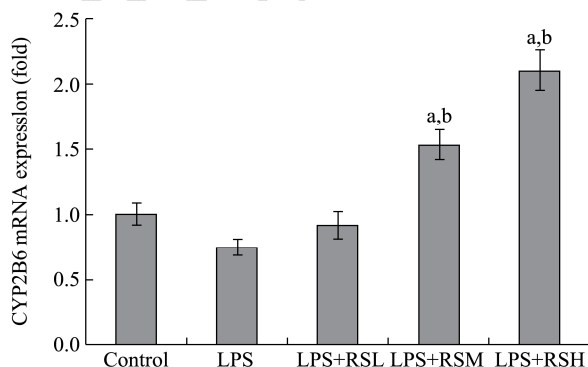


图2 人参总皂苷在炎症状态下对 CYP2B6 mRNA 表达的影响

Fig.2 Effect of total ginsenosides on CYP2B6 mRNA expression in LPS-induced cells

注: Control-空白对照组; LPS-炎症模型组 (2 $\mu\text{g/mL}$); LPS+RSL-炎症状态人参总皂苷低剂量组 (15 $\mu\text{g/mL}$); LPS+RSM-炎症状态人参总皂苷中剂量组 (60 $\mu\text{g/mL}$), LPS+RSH-炎症状态人参总皂苷高剂量组 (240 $\mu\text{g/mL}$)。a, 与空白组比较, $p < 0.05$; b, 与 LPS 组比较, $p < 0.05$ 。

2.3 人参总皂苷对 HepG2 细胞中 CYP2B6 蛋白表达的影响

2.3.1 正常生理状态下对 HepG2 细胞中 CYP2B6 蛋白表达的影响

按照 1.6.1 分组的方法, 实验组分别用人参总皂苷低、中和高剂量孵育正常培养的人肝癌 HepG2 细胞 48 h, 对照组不做处理后, 进行 Western-Blot 实验, 结果见图 3, 表明在正常生理状态下, 与对照组相比, 人参总皂苷低剂量对 CYP2B6 蛋白表达无显著影响, 人参总皂苷中、高剂量均能显著诱导 CYP2B6 蛋白的表达 ($p < 0.05$), 且中剂量组诱导效果最显著, 这与正常状态下人参总皂苷对 CYP2B6 mRNA 表达的影响呈现一致的趋势。

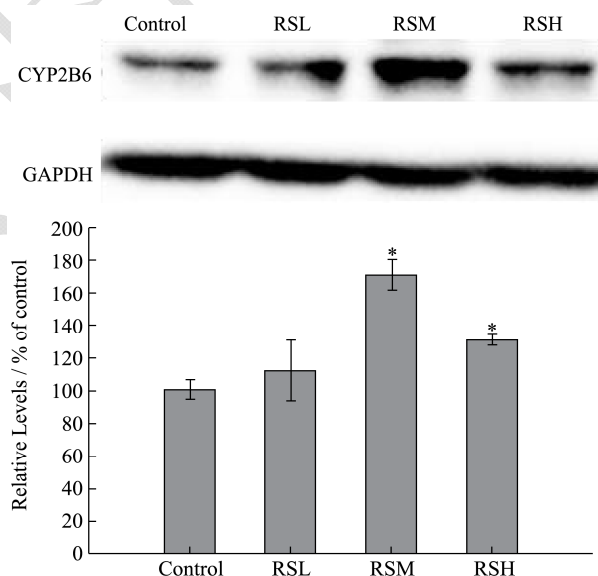


图3 人参总皂苷对 CYP2B6 蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of total ginsenosides on CYP2B6 protein expression

注: Control-空白对照组; RSL-人参总皂苷低剂量组 (15 $\mu\text{g/mL}$); RSM-人参总皂苷中剂量组 (60 $\mu\text{g/mL}$); RSH-人参总皂苷高剂量组 (240 $\mu\text{g/mL}$); 与空白组比较, $*p < 0.05$ 。

2.3.2 炎症状态下对 HepG2 细胞中 CYP2B6 蛋白表达的影响

按照 1.6.1 分组的方法, 实验组分别用人参总皂苷低、中和高剂量孵育正常培养的人肝癌 HepG2 细胞 24 h 后, 加入 LPS 继续共孵育 24 h, 对照组不做处理后, 进行 Western-Blot 实验, 结果见图 4, 与对照组

相比,单纯使用 LPS 孵育细胞制造炎症模型,结果表明 LPS 能够显著诱导 CYP2B6 蛋白的表达 ($p<0.05$),表明炎症状态可以改变 CYP2B6 的蛋白表达水平;使用 LPS 与人参联合孵育细胞后,与对照组相比,人参总皂苷低和中剂量均能诱导 CYP2B6 蛋白的表达 ($p<0.05$),但人参总皂苷高剂量则表现出对 CYP2B6 蛋白表达的抑制作用。提示与正常生理状态下人参总皂苷高剂量对 CYP2B6 蛋白的诱导作用不同,LPS 导致的炎症状态下人参总皂苷高剂量对 CYP2B6 蛋白表达呈现显著的抑制作用,这一作用可能与蛋白的翻译后修饰有关。

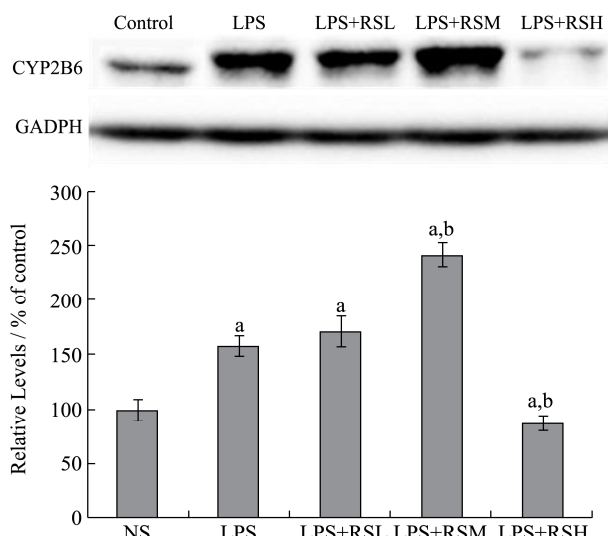


图4 人参总皂苷在炎症状态下对 CYP2B6 蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of total ginsenosides on CYP2B6 protein expression in LPS-induced cells

注: Control-空白对照组; LPS-炎症模型组 (2 $\mu\text{g/mL}$); LPS+RSL-炎症状态人参总皂苷低剂量组 (15 $\mu\text{g/mL}$); LPS+RSM-炎症状态人参总皂苷中剂量组 (60 $\mu\text{g/mL}$); LPS+RSH-炎症状态人参总皂苷高剂量组 (240 $\mu\text{g/mL}$)。a, 与空白组比较, $p<0.05$; b, 与 LPS 组比较, $p<0.05$ 。

2.4 人参总皂苷对 HepG2 细胞中 CYP2B6 蛋白表达的影响机制

为了探讨 LPS 所致炎症状态下人参总皂苷高剂量组抑制 CYP2B6 蛋白表达的原因,我们分别对 LPS、LPS+RSL、LPS+RSM 和 LPS+RSH 对诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 蛋白表达的影响进行了研究。如图 5 所示,和对照组相比, LPS 能够显著抑制 iNOS 的蛋白表达,但随着合用人参总皂苷剂量的增加, LPS 对 iNOS 的抑制作用逐渐减弱。人参总皂苷高剂量组则将 LPS 对 iNOS 的抑制作用翻转为显著的诱导作用 ($p<0.05$)。进一步对孵育后 0、12、24、36 和 48 h

内细胞培养液中 NO 的生成进行测定 (图 6),结果显示与对照组相比, LPS 组在孵育 12 h 内 NO 生成增加,但随后出现下降,且合用人参总皂苷低、中剂量组也呈现 NO 生成先增加后有所下降的趋势,可能与之后的 iNOS 抑制有关。但合用人参总皂苷高剂量组在 48 h 内 NO 呈上升趋势,表明人参总皂苷高剂量组通过诱导 iNOS 蛋白表达, NO 生成持续增多,而 CYP2B6 的翻译后修饰与 NO 关系密切,提示 CYP2B6 蛋白质半胱氨酸有可能与 NO 结合发生巯基亚硝基化修饰,从而易于被泛素-蛋白酶体识别而快速降解。

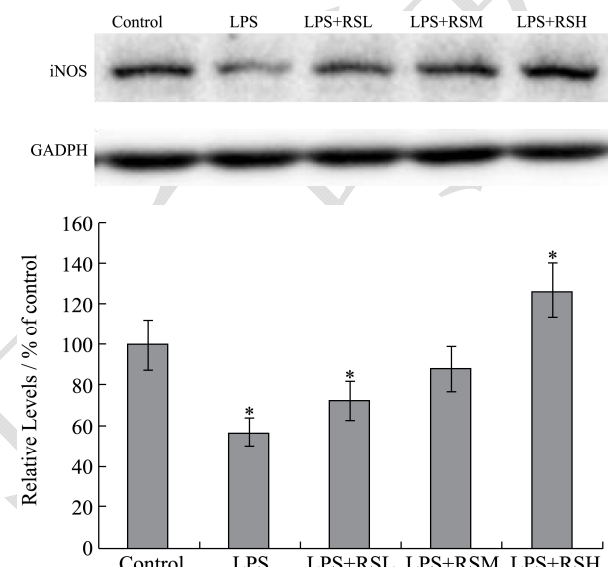


图5 人参总皂苷在炎症状态下对 iNOS 蛋白表达的影响

Fig.5 Effect of total ginsenosides on iNOS protein expression in LPS-induced cells

注: Control-空白对照组; LPS-炎症模型组 (2 $\mu\text{g/mL}$); LPS+RSL-炎症状态人参总皂苷低剂量组 (15 $\mu\text{g/mL}$); LPS+RSM-炎症状态人参总皂苷中剂量组 (60 $\mu\text{g/mL}$); LPS+RSH-炎症状态人参总皂苷高剂量组 (240 $\mu\text{g/mL}$); 与空白组比较, $*p<0.05$ 。

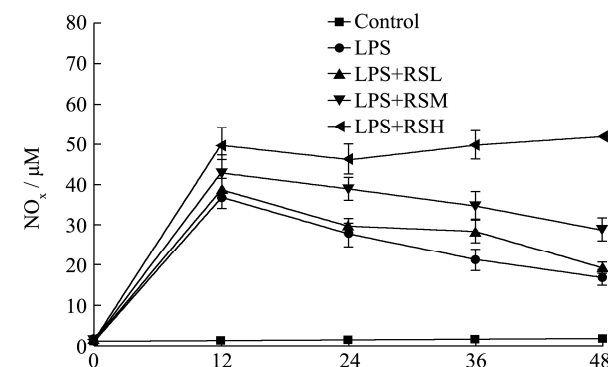


图6 人参总皂苷在炎症状态下对 NO 生成的影响

Fig.6 Effect of total ginsenosides on NO synthesis in LPS-induced cells

注: Control-空白对照组; LPS-炎症模型组 (2 $\mu\text{g/mL}$);

LPS+RSL-炎症状态人参总皂苷低剂量组 (15 μg/mL);

LPS+RSM-炎症状态人参总皂苷中剂量组 (60 μg/mL);

LPS+RSH-炎症状态人参总皂苷高剂量组 (240 μg/mL)。

3 结论

3.1 目前人参在世界范围作为药品和保健食品得到了极其广泛的应用, 因此人参和抗肿瘤药等化学药物之间的相互作用得到了人们的重视, 开展了很多相关研究^[7,8]。但目前对人参合理用药的研究只是在正常机体状态下进行, 并未考虑到使用者本身真实的生理状态-炎症状态。本文在以往研究的基础上, 着重从炎症状态这一最常见的病理状态入手, 探讨该状态下人参对 HepG2 细胞 CYP2B6 mRNA 和蛋白表达的调控。结果显示, 在正常生理状态下, 人参总皂苷各剂量组均对 CYP2B6 mRNA 表达呈现诱导作用, 中和高剂量均对 CYP2B6 蛋白表达呈现诱导作用, 且人参总皂苷中剂量对 CYP2B6 mRNA 和蛋白的诱导效果都最显著。但在 LPS 所致炎症状态下, 人参总皂苷高剂量组对 CYP2B6 mRNA 的诱导作用更加显著, 且高剂量对 CYP2B6 蛋白的表达呈现抑制作用, 与正常状态下对 CYP2B6 蛋白的诱导作用相反。进一步机制研究显示, 炎症状态下人参总皂苷高剂量组能够显著诱导 iNOS 的表达, NO 生成增多, 而 CYP2B6 蛋白的翻译后修饰与 NO 关系密切, 提示 NO 和泛素-蛋白酶体系统在炎症状态下人参总皂苷对 CYP2B6 蛋白的转录后修饰降解中起到了至关重要的作用, 具体机制仍有待进一步深入探讨^[9,10]。

3.2 传统的药物代谢研究一般仅考虑药物对机体正常生理状态下的影响, 但近年的研究发现炎症等病理状态下药物对机体的作用更加复杂。本文研究结果显示, 与正常生理状态相比, 炎症状态会使人参总皂苷对肝 CYP2B6 的作用发生改变, 从而对合用药物的体内代谢过程产生不同影响。因此, 药物代谢研究应考虑到机体的不同生理状态, 选用更接近临床实际状态的实验模型和条件, 更有利于对临床联合用药的安全有效提供参考。

参考文献

- [1] Hai-feng Zhang, Na Gao, Ting-ting Liu, et al. Effect of cytochrome b5 content on the activity of polymorphic CYP1A2, 2B6, and 2E1 in human liver microsomes [J]. Plos One, 2015, 10(6): e0128547
- [2] Choon-Myung Lee, Bong-Yoon Kim, Lian Li. Nitric oxide-dependent proteasomal degradation of cytochrome P450 2B proteins [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(2): 889-898
- [3] Ernest H, Randy LR. The importance of cytochrome P450 2B6 in the human metabolism of environmental chemicals [J]. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2007, 113: 420-428
- [4] Rong Lu, Hui-Rong Fan, Jing Gao, et al. Effect of ginseng extract and ginsenosides on activity of cytochrome P450 [J]. Asian Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 2005, 5(1): 17-24
- [5] 孙海燕. 炎症状态对 CYP2B6 活性改变及其作用机制的研究进展[J]. 中国医药生物技术, 2014, 9(1): 62-64
SUN Hai-yan. Progress inflammatory state of CYP2B6 activity and its mechanism of change [J]. Chinese Medical Biotechnology, 2014, 9(1): 62-64
- [6] Alison E Aitken, Choon-Myung Lee, Edward T Morgan. Roles of nitric oxide in inflammatory downregulation of human cytochromes P450 [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2008, 44: 1161-1168
- [7] LU Ya-li. *In vitro* assessment of increasing cytotoxicity of veratrum nigrum induced by panax ginseng and quantification of hepatic drug-metabolizing enzymes [D]. ChangSha: Central South University, 2013
- [8] Liu Y, Li W, Li P, et al. The inhibitory effect of intestinal bacterial metabolite of ginsenosides on CYP3A activity [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2004, 27(10): 1555-1560
- [9] Morgan E T. Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome P450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics [J]. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2009, 85: 434-438
- [10] Sun H Y, Lee C M, Tripathi S, et al. Nitric oxide-dependent CYP2B1 degradation is potentiated by a cytokine-regulated pathway and utilizes the immunoproteasome subunit LMP2 [J]. Biochemical Journal, 2012, 445: 377-382