·药物动力学研究·

含砷、汞类矿物中药对小鼠肝 / 肠 Cyp3a 和肠道 P-gp 的影响

余文浩[1]，奇锦峰[1]，孙　晨[1]，张　娜[1]，王永辉[2]，林　梅[3]（1. 广州中医药大学药理教研室，广东 广州 510006；2. 河南省驻马店市人民医院药剂科，河南 驻马店 463000；3. 广东佛山南海中医院，广东 佛山 528200）

摘要：目的　研究雄黄、水飞雄黄、朱砂、氯化汞（$HgCl_2$）对小鼠肝 / 肠细胞色素 P450（cytochrome P450，CYP450）及肠道 P- 糖蛋白（P-glycoprotein，P-gp）的影响。**方法**　将 120 只 NIH 小鼠随机分为纯水组，羧甲基纤维素钠（CMC）对照组，利福平组（40 mg·kg^{-1}），酮康唑组（1.8 mg·kg^{-1}），雄黄高、低剂量组（60，15 mg·kg^{-1}），水飞雄黄高、低剂量组（60，15 mg·kg^{-1}），朱砂高、低剂量组（120，30 mg·kg^{-1}）和 $HgCl_2$ 高、低剂量组（0.2，0.05 mg·kg^{-1}）。小鼠每天灌胃 2 次，连续 5 d。第 6 天灌胃 1 h 后摘取肝脏和全段小肠。用超微量 ATP 酶测试盒测定肠匀浆液中 P-gp 依赖性 ATP 酶的活性；用紫外分光光度法测定梯度离心分离的小鼠肝 / 肠微粒体中 Cyp3a 的活性；用实时定量 PCR（real-time PCR，RT-PCR）法测定肝中 Cyp3a11 和肠道 P-gp 基因（Abcb1b）mRNA 的表达。**结果**　小鼠肠道 P-gp 偶联的 ATP 酶活性测定结果显示，雄黄、水飞雄黄、朱砂和 $HgCl_2$ 的高、低剂量组与 CMC 对照组比较差异均有统计学意义（$P < 0.05$，$P < 0.01$）；用红霉素和氨基比林为探针药检测肝脏和小肠微粒体 Cyp3a 酶活性的结果显示，各供试物组的 Cyp3a 酶活性均显著高于 CMC 对照组（$P < 0.05$，$P < 0.01$），而 RT-PCR 结果显示各供试物均能显著诱导 Cyp3a11 和抑制 Abcb1b 的 mRNA 表达。**结论**　雄黄、水飞雄黄、朱砂、$HgCl_2$ 对小鼠肝脏和肠道中的 Cyp3a 均具有显著的诱导作用，而对肠道 P-gp 的转运活性则有显著抑制作用。

关键词：雄黄；朱砂；氯化汞；细胞色素 P450；P- 糖蛋白；mRNA 表达
中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1003-9783(2015)01-0068-06
doi：10.3969/j.issn.1003-9783.2015.01.017

Effects of Mineral Chinese Medicine Containing Arsenic and Mercury on Mice Hepatic/Intestinal Cyp3a and Intestinal P-gp

YU Wenhao[1]，QI Jinfeng[1]，SUN Chen[1]，ZHANG Na[1]，WANG Yonghui[2]，LIN Mei[3]（1. Department of Pharmacy，Guangzhou University of Chinese Medicine，Guangzhou 510006 Guangdong，China；2. Department of Pharmacy，Zhumadian People's Hospital，Zhumadian 463000 Henan，China；3. Nanhai Hospital of Traditional Chinese Medicine，Foushan 528200 Guangdong，China）

Abstract：Objective　To investigate the effects of realgar，levigated realgar，cinnabar and mercuric chloride（$HgCl_2$）on mice hepatic/intestinal cytochrome P450（CYP450）and intestinal P-glycoprotein（P-gp）. **Methods**　One hundred and twenty NIH mice were randomly divided into normal group，sodium carboxymethylcellulose（SCMC）group，rifampicin group（40 mg·kg^{-1}），ketoconazole group（1.8 mg·kg^{-1}），high- and low-dose realgar groups（60，15 mg·kg^{-1}），high- and low-dose levigated realgar groups（60，15 mg·kg^{-1}），high- and low-dose cinnabar groups（120，30 mg·kg^{-1}），and high- and low-dose $HgCl_2$ groups（0.2，0.05 mg·kg^{-1}）. The mice were orally treated with the corresponding medicine twice a day for 5 continuous days. On the experiment day 6，the liver and intestine were

收稿日期：2014-08-22
作者简介：余文浩，男，硕士研究生，研究方向：药物代谢动力学。Email：hjbfwhy@163.com。通讯作者：奇锦峰，研究员，硕士生导师，研究方向：药物代谢动力学。Email：qijinfeng2005@aliyun.com。

quickly isolated one hour after intragastrical administration. The activities of P-gp coupled ATPase in intestinal homogenate were detected by minim ATP enzyme test kit. The activities of Cyp3a in liver/intestine were detected by ultraviolet spectrophotometry, and the expression of hepatic Cyp3a11/Abcb1b mRNA was estimated by real-time PCR. **Results** P-gp coupled ATPase activities were significantly improved in both high and low dosage groups of realgar, levigated realgar, cinnabar and $HgCl_2$, and the differences were significant compared with SCMC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Hepatic and intestinal microsomal Cyp3a activities showed by erythromycin and aminophenazone probes were significantly increased, hepatic Cyp3a11 mRNA expression was enhanced and intestinal Abcb1b mRNA expression was inhibited in both high and low dosage groups of realgar, levigated realgar, cinnabar and $HgCl_2$ compared with SCMC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Realgar, levigated realgar, cinnabar and $HgCl_2$ exert an effect on obviously inducing the expression of CYP3a in mice liver and intestine while inhibiting intestinal P-gp activities.

Keywords: Realgar; Cinnabar; Mercuric chloride; Cytochrome P450; P-glycoprotein; mRNA expression

雄黄(realgar)为硫化物类矿物雄黄族雄黄[1]，朱砂(cinnabar)为硫化物类矿物辰砂族辰砂[2]。《中国药典》收载的安宫牛黄丸、牛黄解毒片等含有这 2 味药[3]。雄黄、朱砂的主要成分为难溶性的四硫化四砷(As_4S_4)、硫化汞(HgS)，而所含少量三氧化二砷(As_2O_3)、氯化汞($HgCl_2$)等可溶性盐具有极强的毒副作用[3-4]。

CYP3A 家族是人体肝脏和小肠细胞中含量最丰富的 CYPs 亚型，尤以 CYP3A4 为主。它参与约 50 % 临床药物的生物转化，是造成代谢性药物相互作用的主要原因[5]。P-gp 是 ATP 结合盒(ATP-binding cassette, ABC)家族药物转运体中最重要的一员，是多药耐药基因(multi-drug resistance 1，MDR1)表达的产物，具有 ATP 依赖性的药物外排功能[6]。肠道内表皮细胞膜上的 P-gp 可主动将已吸收的药物泵入肠腔，从而降低血药浓度。因此口服药物的首过效应被认为主要来自肝脏及小肠的 CYP3A 和 P-gp[5,7]。近年来动物实验和人群流行病学报道侧重于探究雄黄和朱砂在肝脏、肾脏等的蓄积而引起的组织学损伤和对基因表达的影响[8-9]，但较少探究它们对药物代谢酶和转运体活性的调控所引起的药物相互作用而引发的不良反应[10]。本课题通过研究雄黄、水飞雄黄、朱砂和 $HgCl_2$ 对小鼠肝脏和肠道 Cyp3a 及肠道 P-gp 的影响，探讨其引起不良反应的部分机理。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 NIH 小鼠，雌雄各半，体质量(23 ± 5)g，广州中医药大学实验动物中心，许可证号：SCXK(粤)2013-0020。保持室温(25 ± 2)℃，湿度(55 ± 10)%，12 h 明暗周期。动物随意进食，动物福利和实验均符合相关实验动物管理条例和实验动物伦理要求。

1.2 供试品 雄黄(产地：湖南，广州药材公司，批号：20100612)；水飞雄黄(按《中国药典》水飞雄黄法制备)；朱砂(产地：贵州，水飞炮制品，广州药材公司，批号：H2012092304，HgS 含量为 98.6 %)；$HgCl_2$(广州化学试剂厂，批号：20110601-1，纯度 > 99.5 %)。雄黄、水飞雄黄、朱砂用 0.5 %羧甲基纤维素钠(CMC)配成混悬液。

1.3 试剂 胃蛋白酶(活度 1∶3000)，美国华美生物工程公司，批号：140111；利福平，广东华南药业集团有限公司，批号：121108；酮康唑，南京白敬宇制药有限责任公司，批号：130321；CMC，国药集团，批号：F20121021；红霉素(Erythromycin)，上海思域化工科技有限公司，批号：E1217029；氨基比林(Aminopyrine)，上海思域化工科技有限公司，批号：I1211011；Folin 酚蛋白定量试剂盒，北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司，批号：2B4001100；还原型辅酶Ⅱ(NADPH)，瑞士 Roche 公司，批号：140321；超微量 ATP 酶测定试剂盒，南京建成生物工程研究所，批号：130914；RNA 提取试剂、PrimeScript™ RT reagent Kit、SYBR® Premix Ex Taq™ Ⅱ，日本 TaKaRa 公司，批号：AK5304。其他试剂均为市售分析纯级。

1.4 仪器 Himac CR22G 高速冷冻离心机(日立制作所)；Heaeus Biofuge stratos 高速冷冻离心机(Thermo Electron Corporation)；WFG7200 型紫外可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限责任公司)；Multipette plus 手动连续分液器(德国 Eppendorf 公司)；SOLAAR S4 原子吸收光谱仪(美国 Thermo 公司)；SmartSpec plus 核酸蛋白检测仪(BIO-RAD Laboratories，USA)；ABI 7500 型 RT-PCR 仪(Applied Biosystems，USA)。

2 方法

2.1 朱砂中可溶性汞含量的测定

2.1.1 人工胃液的配制[11] 取稀盐酸(10 %)16.4 mL，加纯水约 800 mL 与胃蛋白酶 10 g，摇匀，加纯水稀释至 1000 mL，即得人工胃液。

2.1.2 可溶性汞含量测定[12] 由中山大学药学院中心实验室测定。称取朱砂 0.2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，加入人工胃液 30 mL，磁力搅拌 30 min，滤过，加 20 mL 人工胃液磁力搅拌 3 次，每次 20 min。滤液合并，置 100 mL 量瓶中，加稀盐酸至刻度定容，摇匀。采用石墨炉原子吸收光谱仪测定 Hg 含量。

2.2 分组、给药及生物样品采集 实验所设雄黄、水飞雄黄以及朱砂的高、低剂量分别相当于《中国药典》剂量上限的 4 倍和 1 倍(按照小鼠与人体表面积折算相当于临床剂量的倍数)，$HgCl_2$ 中可溶性汞的剂量约与朱砂所含可溶性汞等量。将 NIH 小鼠随机分为 12 组，每组 10 只。分别为纯水组，0.5 % CMC 对照组，利福平组(40 mg·kg^{-1})，酮康唑组(1.8 mg·kg^{-1})，雄黄高、低剂量组(60，15 mg·kg^{-1})，水飞雄黄高、低剂量组(60，15 mg·kg^{-1})，朱砂高、低剂量组(120，30 mg·kg^{-1})和 $HgCl_2$ 高、低剂量组(0.2，0.05 mg·kg^{-1})。小鼠每天灌胃 2 次，连续 5 d，给药体积 20 mL·kg^{-1}。第 6 天灌胃 1 h 后迅速摘取小鼠肝脏与全段小肠放入 -80 ℃保存。

2.3 P-gp 偶联的 ATP 酶活性测定[13] 根据 P-gp 在转运底物的同时伴随 ATP 的水解，通过检测 ATP 水解产生的无机磷的量来检测 P-gp 对底物的转运作用。实验通过在 P-gp 偶联的 ATP 酶抑制剂 Na_3VO_4 存在和不存在情况下，以供试物诱导无机磷生成量之差来衡量供试物对 P-gp 依赖性的 ATP 酶的激活能力。具体操作按超微量 ATP 酶测试盒说明书中测定小肠组织 ATP 酶活性的步骤进行。

2.4 微粒体的制备 小鼠肝脏和小肠微粒体的分离参照文献方法[14]，在冰水浴中进行。从 -80 ℃冰箱中取出肝脏和小肠，切成小块，放入电动匀浆器中，倒入约 5 倍量预冷的磷酸缓冲液(PBS，pH 7.4)，以 1000 r·min^{-1} 匀浆。经梯度离心后，将所得微粒体用适量 PBS 重悬后分装，贮存于 -80 ℃备用。微粒体及肠匀浆液中蛋白含量用 Folin- 酚法定量(以小牛血清标准蛋白作参照)。

2.5 肝和肠微粒体中 Cyp3a 酶活性的测定 按文献法[15]测定小鼠肝脏和小肠微粒体中 Cyp3a 活性。依据甲醛标准曲线计算该酶活性，单位以 nmol·min^{-1}·mg^{-1} 表示。

2.6 RT-PCR 分析 Cyp3a11 和肠道 P-gp 基因(Abcb1b)的 mRNA 表达

2.6.1 总 RNA 的提取 肝脏和小肠总 RNA 的提取严格按照 RNA 提取试剂盒说明书进行。用紫外分光光度法测定 A260，A280，并计算其比值，用以检测 RNA 的纯度。取比值在 1.8 ~ 2.0 之间的样本进行逆转录操作。

2.6.2 逆转录反应 逆转录反应使用 PrimeScript™ RT reagent Kit 进行。用 ABI 7500 RT-PCR 仪进行逆转录，反应条件为：37 ℃ 15 min，85 ℃ 31 s，1 个循环。

2.6.3 聚合酶链反应测定 mRNA 表达水平 PCR 反应使用 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒，反应在 ABI 7500 RT-PCR 仪上进行。PCR 反应条件为：95 ℃预变性 30 s，然后进入循环阶段，每个循环包括 95 ℃变性 15 s，56 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 31 s，共 40 个循环。以 GAPDH 作为内参照，计算 Cyp3a11 和 Abcb1b 的 mRNA 表达的相对水平。特异性引物序列根据文献[16]进行设计，均由上海生工生物工程有限公司合成，见表 1。

表 1 RT-PCR 的引物序列

Table 1 Primer sequences for the RT-PCR

基因	检索号	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	扩增长度 /bp
Cyp3a11	NM_007818	CGCCTCTCCTTGCTGTCACA	CTTTGCCTTCTGCCTCAAGT	260
Abcb1b	NM_011075	GAGCTGTGACTATCTGAGGTGCT	GGCTTCTCATCTTGATGGAGTTA	114
GAPDH	M32599	GGTGAAGGTCGGTGTGAACG	CTCGCTCCTGGAAGATGGTG	233

2.6.4 基因表达的计算方法 以同一份目的基因含量与 GAPDH mRNA 含量的比值表示目的基因的表达水平，然后计算供试物组小鼠与纯水组小鼠中目的基因表达水平的比值。

2.7 统计学处理方法 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析，所有实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较用 LSD 法检验，$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 朱砂中可溶性汞含量 结果显示，朱砂中可溶性汞含量为 705.7 μg·g^{-1}。

3.2 小鼠肝/肠微粒体 Cyp3a 活性测定结果 由梯度甲醛浓度(浓度范围 0.001 ~ 0.05 μmol·mL^{-1}，9 个浓度)获得回归方程 Y=0.1945X+0.0157，r=0.9988。依此标准曲线计算肝 / 肠微粒体 Cyp3a 活性。无论以红霉素还是氨基比林为底物，供试物组(雄黄、水飞雄黄、朱砂和 $HgCl_2$ 高、低剂量组)小鼠肝 / 肠微粒体 Cyp3a 的活性均显著高于 CMC 对照组($P < 0.05$，$P < 0.01$)，且 CMC 对照组与纯水组差异无统计学意义($P>0.05$)，见表 2。

表 2 小鼠肝/肠微粒体 Cyp3a 活性测定结果($\bar{x} \pm s$，nmol·min^{-1}·mg^{-1}，n=10)

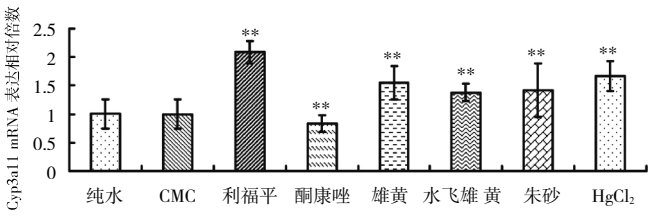
Table 2 The measurement results of Cyp3a activity in mice hepatic and intestinal microsomes

组名	剂量	肝脏 Cyp3a 活性		肠道 Cyp3a 活性	
	/mg·kg^{-1}	红霉素	氨基比林	红霉素	氨基比林
纯水组	-	0.11 ± 0.013	0.30 ± 0.031	0.18 ± 0.059	0.18 ± 0.044
CMC 对照组	-	0.11 ± 0.010	0.29 ± 0.031	0.17 ± 0.030	0.18 ± 0.042
利福平组	40	0.36 ± 0.043**	0.82 ± 0.090**	0.34 ± 0.064**	0.40 ± 0.071**
酮康唑组	1.8	0.10 ± 0.008	0.25 ± 0.018	0.08 ± 0.018**	0.10 ± 0.026**
雄黄高剂量组	60	0.26 ± 0.035**	0.71 ± 0.121**	0.27 ± 0.042**	0.36 ± 0.072**
雄黄低剂量组	15	0.19 ± 0.052*	0.45 ± 0.041**	0.24 ± 0.024*	0.24 ± 0.035*
水飞雄黄高剂量组	60	0.22 ± 0.041*	0.68 ± 0.065**	0.25 ± 0.051**	0.29 ± 0.038**
水飞雄黄低剂量组	15	0.19 ± 0.034*	0.39 ± 0.089*	0.23 ± 0.038*	0.24 ± 0.024*
朱砂高剂量组	120	0.21 ± 0.075*	0.66 ± 0.118**	0.28 ± 0.078**	0.29 ± 0.075**
朱砂低剂量组	30	0.20 ± 0.062*	0.59 ± 0.109**	0.27 ± 0.063**	0.27 ± 0.082**
$HgCl_2$ 高剂量组	0.2	0.26 ± 0.054**	0.60 ± 0.159**	0.34 ± 0.099**	0.31 ± 0.059**
$HgCl_2$ 低剂量组	0.05	0.21 ± 0.066*	0.53 ± 0.135**	0.26 ± 0.016**	0.28 ± 0.058**

注：与 CMC 对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

3.3 小鼠肝脏Cyp3a11 mRNA 表达水平的测定结果 与 CMC 对照组比较，所有供试物组小鼠肝脏Cyp3a11 对应的 mRNA 均被显著诱导($P < 0.01$)，见图 1。

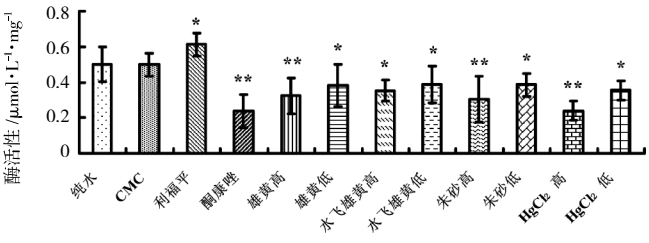
3.4 小鼠肠道 P-gp 偶联的 ATP 酶活性测定结果 所有供试物组小鼠肠道 P-gp 偶联的 ATP 酶的活性与 CMC 对照组比较均被显著抑制($P < 0.05$，$P < 0.01$)，见图 2。



注：与 CMC 对照组比较，$^{**}P < 0.01$。

图 1 小鼠肝脏 Cyp3a11 mRNA 表达水平($\bar{x} \pm s$，n=10)

Figure 1 The measurement results of Cyp3a11 mRNA expression in mice liver

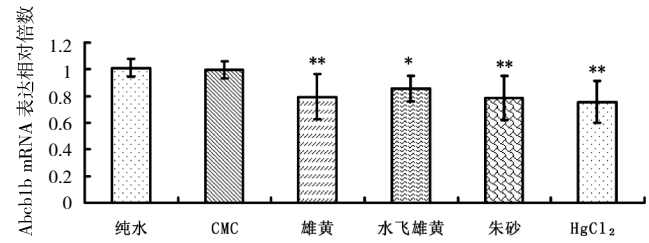


注：与 CMC 对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

图 2 小鼠肠道 P-gp 偶联的 ATP 酶活性的测定结果($\bar{x} \pm s$，n=10)

Figure 2 The measurement results of P-gp coupled ATPase activity in mice intestine

3.5 小鼠肠道 Abcb1b mRNA 表达测定结果 与 CMC 对照组比较，所有供试物组的高剂量均显著抑制 Abcb1b 对应的 mRNA 在小肠中的表达($P < 0.05$，$P < 0.01$)，见图 3。



注：与 CMC 对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

图 3 小鼠肠道 Abcb1b mRNA 表达测定结果($\bar{x} \pm s$，n=10)

Figure 3 The measurement results of Abcb1b mRNA expression in mice intestine

4 讨论

CYPs 酶系被抑制或诱导是引起代谢性药物相互作用进而引发药物不良反应的主要因素[7,17]。CYP3A4 是 CYPs 酶系中最重要的亚族，约占肝脏 CYPs 含量的 34 %和超过 70 %的小肠 CYPs 活性，是参与口服药物首过效应的主要代谢酶[18]。本研究以 FDA 推荐的红霉素和氨基比林为探针药[19]，双重验证了供试物对肝 / 肠 Cyp3a 活性的影响。两种探针药测定的结果显示(表 2)雄黄、水飞雄黄、朱砂、$HgCl_2$ 的高、低剂量组对小鼠肝 / 肠 Cyp3a 活性均具有诱导作用，且均与诱导剂利福平作用类似($P < 0.05$，$P < 0.01$)。虽然雄黄经过炮制(水飞)后具有减毒增效的功效[20]，但本研究结果表明水飞雄黄与雄黄具有类似的诱导 Cyp3a 作用，而可溶性汞($HgCl_2$)与朱砂具有类似的诱导 Cyp3a 的作用，由此可推测 $HgCl_2$ 可能是朱砂产生

诱导 Cyp3a 的活性成分。抑制剂酮康唑显著抑制肠 Cyp3a 活性，但对肝 Cyp3a 活性无明显抑制作用，可能是由于酮康唑的给药剂量不当。

本实验同时用 RT-PCR 法检测 Cyp3a11（人类 CYP3A4 基因对应的小鼠基因是 Cyp3a11[21]）mRNA 在肝脏中的表达水平，结果显示（图 1），与 CMC 对照组比较，雄黄、水飞雄黄、朱砂、$HgCl_2$ 均显著上调其在肝脏中的表达（$P < 0.01$），此结果与前述生化法测定酶活性的结果一致，进而验证了供试物对Cyp3a 酶具有显著的诱导作用。

药物转运体（Transporters）是一类跨过细胞膜转运各种内源性和外源性化合物的功能蛋白[22]，如外排型的转运体 P-gp。通过测定与 P-gp 偶联的 ATP 酶的活性和小鼠肠道 P-gp 基因（Abcb1b）[16]mRNA 表达水平来考查各供试物对 P-gp 活性的影响。P-gp 是ATP 酶依赖性的药物转运体，可主动将已吸收的药物或其他外源物泵出细胞外，从而降低其生物利用度[23]。许多 P-gp 的底物或调控体已被证明能够抑制或诱导 P-gp 偶联的 ATP 酶活性[24]。本实验结果显示，各供试物的高、低剂量均对 P-gp 偶联的 ATP 酶活性和 Abcb1b 的 mRNA 表达均有显著的抑制作用（$P < 0.05$，$P < 0.01$），可以推断雄黄、水飞雄黄、朱砂、$HgCl_2$ 具有抑制 P-gp 的作用。

大量研究表明，决定口服药物生物利用度的主要因素是肝 / 肠 CYP3A 对药物的生物转化作用和肠道的 P-gp 对药物的主动外排作用[25]。人类 CYP3A4 基因位于染色体（7q21.3 ~ 7q22.1），而 P-gp 相对应的 MDR1 基因也位于染色体（7q21.12），两基因处于同一染色体上相邻的位置并有部分重叠[26]。上述结果表明，雄黄、水飞雄黄、朱砂、$HgCl_2$ 均能诱导Cyp3a 和抑制 P-gp 的活性，在药物首过效应中产生协同作用。因此提示含雄黄、朱砂的药物与其他药物联合用药时可能影响其首过消除而改变疗效。

（致谢：本校 2010 级毕业实习生参与部分实验工作，在此表示谢意。）

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典（一部）[M]. 北京：中国医药科技出版社，2010：277.

[2] 梁爱华，商敏凤. 朱砂的毒性研究概况[J]. 中国中药杂志，2005，30（4）：249-252.

[3] 张永文，马秀璟，阳长明. 含朱砂、雄黄的中药制剂的质量控制及安全性评价问题分析[J]. 中国中药杂志，2010，35（11）：1501-1504.

[4] 李春英，梁爱华，王金华，等. 雄黄砷的蓄积性研究[J]. 中国中药杂志，2011，36（14）：1895-1900.

[5] Kumar YS，Adukondalu D，Sathish D，et al. P-Glycoprotein- and cytochrome P-450-mediated herbal drug interactions[J]. Drug Metabol Drug Interact，2010，25（1-4）：3-16.

[6] Marchetti S，Mazzanti R，Beijnen JH，et al. Concise review：Clinic relevance of drug drug and herb drug interactions mediated by the ABC transporter ABCB1（MDR1，P-glycoprotein）[J]. Oncologist，2007，12（8）：927-941.

[7] Cordon-Cardo C，O'Brien JP，Casals D，et al. Multidrug-resistance gene（P-glycoprotein）is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites[J]. Proc Natl Acad Sci USA，1989，86（2）：695-698.

[8] Santra A，Maiti A，Das S，et al. Hepatic damage caused by chronic arsenic toxicity in experimental animals [J]. J Toxicol Clin Toxicol，2000，38（4）：395-405.

[9] Welborn JR，Shpun S，Dantzler WH，et al. Effect of alpha-ketoglutarate on organic anion transport in single rabbit renal proximal tubules[J]. Am J Physiol，1998，274（1-2）：165-174.

[10] 何海洋，吴琴，刘杰，等. 朱砂及其复方对小鼠肝脏细胞色素 P450 酶基因表达的影响[J]. 时珍国药医药，2011，22（6）：1373-1375.

[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典（二部）[M]. 北京：中国医药出版社，2010：158.

[12] 丁敬华，王娜，姜泓，等. 柱前衍生化高效液相色谱法测定朱砂中可溶性汞的含量[J]. 化学研究，2010，21（3）：80-82.

[13] Xia CQ，Milton MN，Gan LS. Evaluation of drug-transporter interactions using in vitro and in vivo models [J]. Curr Drug Metab，2007，8（4）：341-363.

[14] Yanagiba Y，Ito Y，Kamijima M，et al. Octachlorostyrene induces cytochrome P450，UDP-glucuronosyl transferase and sulfotransferase via the aryl hydrocarbon receptor and constitutive androstane receptor [J]. Toxicol Sci，2009，111（1）：19-26.

[15] Wang RW，Newton DJ，Scheri TD，et al. Human cytochrome P450 3A4-catalyzed testosterone 6 beta-hydroxylation and erythromycin N-demethylation. Competition during catalysis[J]. Drug Metab Dispos，1997，25（4）：502-507.

[16] Ito K，Kubota Y，Toda T，et al. Effect of hydrocotarnine on cytochrome P450 and P-glycoprotein [J]. Drug Metab.Pharmacokinet，2009，24（1）：108-113.

[17] Gao N，Zou D，Qiao HL. Concentration-dependent inhibitory effect of baicalin on the plasma protein binding and metabolism of chlorzoxazone，a CYP2E1 probe substrate，in rats in vitro and in vivo [J]. PLoS One，2013，8（1）：e53038.

[18] 程春雷，游雪甫. 细胞色素 P450 3A 研究进展[J]. 国外医药（抗生素分册），2004，25（3）：124.

[19] del Amo EM，Heikkinen AT，Mönkkönen J. In vitro in vivo correlation in p-glycoprotein mediated transport in intestinal absorption [J]. Eur J Pharm Sci，2009，36：200-211.

[20] 马斌，李彤，姜泓. 我国雄黄及其复方的毒副作用研究进展[J]. 中华中医药学刊，2013，31（8）：1623-1625.

[21] Hart SN，Cui Y，Klaassen CD，et al. Three patterns of Cytochrome P450 gene expression during liver maturation in mice[J]. Drug Metab Dispos，2009，37（1）：116-121.

[22] Lin CC, Fan HY, Kuo CW, et al. Evaluation of Chinese-herbal-medicine-induced herb-drug interactions: focusing on organic anion transporter 1 [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 2012: 967182.

[23] Lin SP, Wu PP, Hou YC, et al. Different influences on tacrolimus pharmacokinetics by coadministrations of zhi ke and zhi shi in rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2011, 2011: 751671.

[24] Zhang S, Morris ME. Effects of the flavonoids biochanin A, morin, phloretin, and silymarin on P-glycoprotein-mediated transport [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 304(3): 1258-1267.

[25] Li C, Lee MY, Choi JS. Effects of silybinin, CYP3A4 and P-glycoprotein inhibitor in vitro, on the bioavailability of loratadine in rats[J]. Pharmazie, 2010, 65(7): 510-514.

[26] Manov I, Bashenko Y, Hirsh M, et al. Involvement of the multidrug resistance P-glycoprotein in acetaminophen-induced toxicity in hepatoma-derived HepG2 and Hep3B cells[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2006, 99(3): 213-224.

(编辑：梁进权)

天然冰片对甲氨蝶呤透过血肿瘤屏障的影响

郭军洽，张　荣，段美美，邢燕梅(广州中医药大学临床药理研究所，广东 广州 510405)

摘要：目的　探讨天然冰片对甲氨蝶呤(MTX)透过血肿瘤屏障的影响。**方法**　采用立体定向技术，以 C6 胶质瘤细胞建立 C6 脑胶质瘤大鼠模型，14 d 后，将模型大鼠随机分为对照组(0.5 %羧甲基纤维素钠)，冰片高、低剂量组（140，35 mg·kg^{-1})。灌胃给药 1 h 后，3 组大鼠均尾静脉注射 MTX 20 mg·kg^{-1}，于注射后不同时间点采集血样及脑组织，高效液相色谱法测定血浆与脑组织中 MTX 的浓度，并计算主要药动学参数。**结果**　与对照组比较，冰片高、低剂量组的血浆中 MTX AUC_{0-t}，$AUC_{0-\infty}$ 均显著降低（$P < 0.01$)；冰片高剂量组脑组织中 MTX AUC_{0-t}，$AUC_{0-\infty}$ 显著升高($P < 0.05$)，冰片低剂量组脑组织中 MTX AUC_{0-t}，$AUC_{0-\infty}$ 亦有升高趋势，但差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论**　天然冰片可增加 MTX 在 C6 脑胶质瘤模型大鼠脑组织中的分布，提高其在脑组织中的生物利用度。

关键词：天然冰片；甲氨蝶呤；血肿瘤屏障；药物动力学

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1003-9783(2015)01-0073-05

doi：10.3969/j.issn.1003-9783.2015.01.018

Effects of Natural Borneol on Methotrexate Penetrating Across Blood-tumor Barrier

GUO Junqia, ZHANG Rong, DUAN Meimei, XING Yanmei (Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Objective To establish a C6/SD glioma model and to explore the effects of natural borneol on the penetration of methotrexate(MTX) across blood tumor barrier. **Methods** Horseley-Clarke technique was used for the establishment of C6/SD glioma model. Fourteen days after the modeling, the model rats were randomly divided into control group(0.5 % sodium carboxymethyl cellulose), low-dose borneol group(35 mg·kg^{-1} borneol) and high-dose borneol group(140 mg·kg^{-1}). One hour after intragastrical administration, MTX(20 mg·kg^{-1}) were injected into the rats of the three groups through caudal vein. Plasma and brain tissue samples were collected at corresponding time after intravenous injection. The concentrations of MTX in the plasma and brain were determined by high performance liquid chromatography, and the main parameters were determined by software PK-solution 2.0. **Results** Plasma AUC0-t and $AUC_{0-\infty}$ of MTX in the high- and low-dose borneol groups were obvious lower than the control group($P < 0.01$). AUC_{0-t}

收稿日期：2014-06-20

作者简介：郭军洽，女，硕士研究生，研究方向：中药有效性与安全性评价。Email：786966096@qq.com。通讯作者：张荣，副研究员，硕士生导师，研究方向：中药有效性与安全性评价。Email：zhangrong@gzucm.edu.cn。

基金项目：国家自然科学基金(81173379)。