

terms of volatile components by headspace-gas chromatography-ion mobility spectrometry [J]. *Anal Methods-UK*, 2019, 11 (4): 530-536.

[13] 袁志鹰, 罗林明, 陈乃宏, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 法分析百合珠芽化学成分及其薯蓣皂苷元抗肿瘤活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(5): 808-813; 831.

[14] 袁志鹰, 夏江南, 刘月新, 等. 百合中王百合苷 A 对土壤肥力的响应分析[J]. 中成药, 2019, 41(10): 2526-2529.

[15] 袁志鹰, 刘湘丹, 裴 刚, 等. HPLC 测定百合中对香豆酸、没食子酸含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(5): 82-85.

[16] Wu T, Li X, Li T, *et al.* *Apocynum venetum* leaf extract exerts antidepressant-like effects and inhibits hippocampal and cortical apoptosis of rats exposed to chronic unpredictable mild stress [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018(2): 1-8.

[17] 张 胜, 张 尧, 李彪许, 等. 山奈酚对 CUMS 抑郁模型大鼠海马神经元过度自噬和氧化应激损伤的保护作用[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(2): 146-150; 155.

[18] Wei L, Kan L Y, Zeng H Y, *et al.* BDNF/TrkB pathway mediates the antidepressant-like role of H₂S in CUMS-exposed rats by inhibition of hippocampal ER stress[J]. *Neuromolecular Med*, 2018, 20(2): 252-261.

[19] 孔 靛, 李宝才, 向 诚. 中药有效成分组的研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(22): 3289-3296.

[20] 吴 丹, 高 耀, 向 欢, 等. PI3K/Akt 信号通路在抑郁症及抗抑郁中药作用机制研究中的进展[J]. 中草药, 2019, 50(18): 4461-4469.

[21] 袁 丽, 李德顺, 吴建红, 等. 百合知母汤对 CUMS 抑郁症大鼠行为及海马中 BDNF/TrkB 表达变化的影响[J]. 中华中医药学刊, 2016(12): 2941-2944.

[22] Tao W, Dong Y, Su Q, *et al.* Liquiritigenin reverses depression-like behavior in unpredictable chronic mild stress-induced mice by regulating PI3K/Akt/mTOR mediated BDNF/TrkB pathway[J]. *Behav. Brain Res*, 2016, 308: 177-186.

丹参-红花药对对心肌缺血大鼠 CYP450 酶活力和 mRNA 表达的影响

王小平^{1,2}, 杜少兵¹, 白吉庆¹, 王鹏飞¹, 王 金¹, 胡锦涛¹, 高 速¹, 李 娜¹
(1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 咸阳 712046)

摘要: **目的** 探讨丹参-红花药对对心肌缺血大鼠 CYP450 酶活力和 mRNA 表达的影响。**方法** 大鼠随机分为模型组、空白对照组、丹参-红花 (3:1) 组、丹参-红花 (2:1) 组、丹参-红花 (1:1) 组, 连续给药 15 d 后麻醉大鼠, 取出肝脏, 每组 10 只用于检测 3 种探针底物的浓度, 其余 10 只用于实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 测定 CYP₁A₂、CYP₂E₁ 和 CYP₃A₂ mRNA 表达。**结果** 与模型组相比, 丹参-红花药对 (3:1, 2:1) 组大鼠非那西丁、氯唑沙宗、咪达唑仑的代谢消除率降低 ($P<0.05$); 与空白组比较, 模型组大鼠 CYP₁A₂、CYP₂E₁ 和 CYP₃A₂ mRNA 表达水平升高 ($P<0.05$)。与模型组相比, 丹参-红花药对 (3:1, 2:1) 组大鼠 CYP₁A₂、CYP₂E₁ 和 CYP₃A₂ mRNA 表达水平降低 ($P<0.05$)。**结论** 丹参-红花药对 (3:1, 2:1) 可下调模型大鼠 CYP₁A₂、CYP₂E₁ 和 CYP₃A₂ mRNA 表达, 显著抑制酶活力, 在 3:1 比例下作用最强。

关键词: 丹参-红花药对; CYP₁A₂; CYP₂E₁; CYP₃A₂; mRNA
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)03-0782-05
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.03.043

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎, 临床常用于胸痹心痛, 心烦不眠, 热痹疼痛, 月经不调, 痛经经闭等^[1]。红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花。临床常用于经闭, 痛经, 胸痹心痛, 跌扑损伤等^[2]。丹参-红花是近现代临床常用的活血化瘀药对, 从中医方剂数据库和复方专利中检索出同时含有丹参-红花的方剂共 2 646 首^[3]; 2015 年版《中国药典》一部成

方制剂和《国家中成药标准汇编》中同时含丹参-红花的方剂共 30 首^[4]。本研究以丹参-红花为研究对象, 采用 cocktail 探针药物法, 以探针药物的代谢消除百分率为指标^[5], 评价丹参-红花临床配伍常用比例 (1:1、2:1、3:1) 对大鼠细胞色素 P450 (Cytochrome P-450, CYP450) 酶活性的影响, 同时采用实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 测定 CYP450 酶中 3 种亚型 mRNA 的表达水平, 为丹参-红花

收稿日期: 2019-07-27
基金项目: 国家自然科学基金项目 (81974544); 陕西省教育厅重点实验室项目 (18JS025); 陕西省科技厅社发攻关项目 (2019SF-286)
作者简介: 王小平 (1976—), 女, 博士, 教授, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: (029) 38185165, E-mail: wangxiaoping323@126.com

最佳配伍比例的筛选提供数据支撑，并为探讨其协同增效的机理奠定基础。

1 材料

1.1 仪器 戴安 UltiMate 3000 全自动 HPLC 仪 [配置四元梯度泵、自动进样器、二极管阵列检测器、变色龙 6.8 色谱工作站,赛默飞世尔(上海)仪器有限公司];Avanti JXN-26 高速冷冻离心机(贝克曼库尔特中国分公司);ME204 双量程电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);Direct-Q 3UV 纯化水机(美国 Millipore 公司);PHSJ-3F 型 PH 计(上海精密仪器仪表有限公司);多管漩涡混合器(杭州瑞诚仪器有限公司);氮吹仪(上海乔跃仪器有限公司);全自动分析心电图机(深圳市科曼医疗设备有限公司);Exicycler™ 96 荧光定量 PCR 仪(韩国 Bioneer 公司);NanoDrop 2000 超微量紫外-可见分光光度计(美国 Thermo 公司)。

1.2 试剂 非那西丁(批号 20151204,纯度 99.2%)购于北京索莱宝科技有限公司;氯唑沙宗(批号 100364-201302,纯度 99.8%)、鬼臼毒素(批号 111645-200301,纯度 98.9%)均购于中国食品药品检定研究院;咪达唑仑(批号 171250-200401;纯度 99.8%);盐酸异丙肾上腺素注射液(批号 41150102)购于上海禾丰制药有限公司;RNA 提取试剂盒(批号 93956420,美国罗氏生物制药有限公司);Super M-MLV 反转录酶(批号 PR6502,北京百泰克生物技术有限公司);2×Power Taq PCR Master Mix 试剂(批号 PR1702,北京百泰克生物技术有限公司);SYBR Green 试剂(批号 SY1020,北京索莱宝科技有限公司);HyClone PBS 缓冲液(批号 AAF203865,美国赛默飞世尔科技上海有限公司);RNase inhibitor(批号 RP5602,北京百泰克生物技术有限公司);引物由生工生物工程(上海)有限公司合成;还原型辅酶Ⅱ(Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)四钠(批号 041939)购于罗氏公司;考马斯亮蓝(批号 20160415)购于南京建成生物工程研究所;乌来糖(批号 20140421)购于上海山浦化工有限公司。TRIS-base、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、蔗糖、无水氯化钙均为分析纯,购自天津市天力化学试剂有限公司;甲醇、乙腈均为色谱纯(德国 Merk 公司);水为超纯水;其余试剂均为分析纯。

1.3 药物 丹参、红花均购于河北安国药材市场,经陕西中医药大学药学院白吉庆副教授鉴定,丹参为唇形科鼠尾草属丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎,红花为菊科红花属植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花。参照 2015 版《中国药典》一部丹参、红花药材标准项下的内容进行检查,均符合标准。

1.4 动物 100 只 SD 大鼠,SPF 级,体质量(200±10)g,由西安交通大学医学部实验动物中心提供,动物生产许可证号 SCXK(陕)2015-002。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 中药提取液制备 按一定比例(3:1、2:1、1:1)称取丹参、红花适量,加 10 倍量水浸泡 30 min,提取 1 h,过滤,第 2、3 次各加 8 倍量水,每次提取 1 h,滤过,滤液合并,分别减压浓缩至 1、0.75、0.5 g 生药/mL,备用。

2.1.2 探针溶液、内标溶液制备 分别精密称取非那西丁和氯唑沙宗对照品适量,精密量取咪达唑仑注射液适量,加甲醇溶解,制成混合探针药物溶液(非那西丁 13.74、27.48、54.96、109.92、219.84 mg/L,氯唑沙宗 7.42、14.84、29.67、59.35、118.70 mg/L,咪达唑仑 3.26、6.52、13.03、26.06、52.12 mg/L),4℃保存备用。精密称取鬼臼毒素对照品,甲醇制成 12.28 mg/L 内标溶液,备用。

2.2 动物造模 选择心电图正常的健康大鼠,试验前测定并记录Ⅱ导联心电图(纸速 50 mm/s,1 mV=20 mm),腹腔注射 5 mg/kg 盐酸异丙肾上腺素制备动物模型^[6-10],连续给药 3 d,于最后 1 次给药 30 min 后,用 20%乌拉坦麻醉大鼠(1 g/kg)并记录心电图。将造模前后的心电图进行比较,具备下列条件之一者说明造模成功:①ST 段向上或向下偏移超过 0.1 mV;②T 波高耸且超过同导联 R 波的 1/2;③T 波高耸且伴有 ST 段移位。

2.3 Cocktail 探针法评估丹参-红花药对对大鼠 CYP450 酶活力的影响

2.3.1 分组与给药 大鼠随机分为空白对照组、模型组、丹参-红花(3:1)组、丹参-红花(2:1)组、丹参-红花(1:1)组,每组 10 只,每天灌胃 1 次,灌胃体积 2 mL,对照组和模型组给予蒸馏水,其余各组给予“2.1.1”项下提取液,持续给药 15 d。

2.3.2 肝微粒体制备 末次给药后,用 20%乌拉坦麻醉大鼠(1 g/kg),快速打开腹腔,从门静脉注射预先制冷的生理盐水至肝脏呈土黄色,取出肝脏,用预先制冷的缓冲液清洗干净,用滤纸吸干表面液体,剪碎肝脏组织,准确称取 3 g,加入 80.5 g/L 蔗糖溶液 12 mL,匀浆。匀浆液在 4℃、10 000 r/min 离心 20 min,取上清,置于离心管中,加入 10 倍量 9 g/L CaCl₂,混合均匀,冰浴放置,5 min 后,15 000 r/min 离心 15 min,弃去上清液,即得微粒体。微粒体用 Tris-HCL 缓冲液洗涤,15 000 r/min 离心 15 min,取沉淀用 18.17 g/L Tris-HCL 缓冲液重悬,使得每 1 mL 含 1.1 mg 肝微粒体,取出部分稀释,用于测定蛋白含量,其余贮藏于-70℃用于体外孵育实验。

2.3.3 体外温孵 取上述肝微粒体的重悬液,每份 100 μL,分别加入 20 μL 混合探针药物溶液(非那西丁 109.92 mg/L、氯唑沙宗 59.35 mg/L、咪达唑仑 20.06 mg/L)和 30 μL PBS 缓冲液,37℃水浴预孵育 5 min,加入 NADPH 启动反应,使体系总体积为 200 μL(肝微粒体终质量浓度 0.6 mg/mL,NADPH 终质量浓度 256.26 mg/L),37℃水浴孵育 30 min,立即放入冰水浴中,加入 4℃甲醇-乙腈(1:1)混合溶液 600 μL 终止反应,再加 20 μL 内标溶液涡旋混匀 1 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,

室温下氮气吹干。

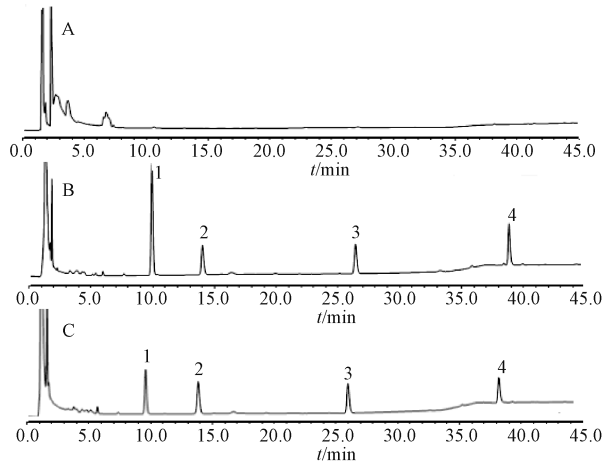
2.3.4 探针底物测定 测定前用 200 μL 流动相复溶“2.3.3”项下残渣，涡旋混匀 1 min，0.22 μm 滤膜过滤，进样 15 μL，HPLC 分析非那西丁、氯唑沙宗及咪达唑仑。按下式计算各探针底物的代谢消除率，以评价 CYP_{1A}₂、CYP_{2E}₁ 和 CYP_{3A}₂ 的活性。

消除率=
$$\frac{\text{加入底针底物的量}-\text{测得探针底物的量}}{\text{加入探针底物的量}}\times 100\%$$

2.3.5 探针底物测定的 HPLC 条件 ZORBAX StableBond 80Å C₁₈ 色谱柱（150 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相甲醇（A）-水（B），梯度洗脱（0~5 min，30%~35% A；5~10 min，35%~38% A；10~15 min，38%~46% A；15~30 min，46%~54% A；30~45 min，54%~65% A）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 35℃；检测波长 235 nm；进样量 15 μL。

2.3.6 探针底物 HPLC 测定的方法学考察

2.3.6.1 专属性考察 取空白肝微粒体孵育体系，含探针药物和内标物的肝微粒体孵育体系和给药组肝微粒体的孵育体系，注入 HPLC 仪，结果见图 1。由图 1 可知，3 种探针药物与内标物峰形对称性好，基线平直，探针药物、内标物分离完全，无杂质峰干扰，且空白肝微粒体孵育体系对 3 种探针药物的测定无干扰。



A. 空白肝微粒体孵育体系 B. 含探针药物和内标物的肝微粒体孵育体系 C. 给药组肝微粒体孵育体系 1. 非那西丁 2. 氯唑沙宗 3. 鬼臼毒素（内标） 4. 咪达唑仑

图 1 大鼠肝微粒体中 3 种探针药物的 HPLC 色谱图

2.3.6.2 线性关系考察 取空白组的肝微粒体，精密加入适量各系列质量浓度的混合探针药物溶液，每批 3 份，按“2.3.3”项下方法体外温孵，按“2.3.4”项下方法复溶后测定。以各探针药物和内标物的峰面积比值（Y）为纵坐标，各探针药物的质量浓度（X）为横坐标进行线性回归，再以探针药物峰响应信号与噪音信号比为 10 时的探针药物浓度为定量限，结果见表 1。

2.3.6.3 精密度试验 取空白组的肝微粒体，精密加入适量高（混标中非那西丁 219.84 mg/L）、中（混标中非那西丁 54.96 mg/L）、低（混标中非那西丁 13.74 mg/L）质量浓度的混合探针药物溶液，各 3 份，按“2.3.3”项下方法

表 1 3 种探针药物线性关系

探针药物	回归方程	r	线性范围/ (mg·L ⁻¹)	定量限/ (mg·L ⁻¹)
非那西丁	Y=0.196 4X+0.061 1	0.999 2	1.37~21.99	1.37
氯唑沙宗	Y=0.125 4X+0.203 6	0.997 6	0.74~11.87	0.74
咪达唑仑	Y=0.658 8X+0.052 7	0.998 9	0.33~5.21	0.33

体外温孵，按“2.3.4”项下方法复溶制得高、中、低质量控制（QC）样品，每个样品 1 d 内重复测定 5 次，计算日内精密度；连续测定 5 d，计算日间精密度。结果，非那西丁、氯唑沙宗和咪达唑仑日内、日间峰面积 RSD 分别为 1.85%~6.58%、1.74%~3.5%、1.67%~2.7%。

2.3.6.4 稳定性试验 按“2.3.6.3”项下方法制备高、中、低质量控制（QC）样品，每个时间点平行 3 份，氮气吹干后于 4℃分别放置 0、4、8、12、24 h，-20℃分别放置 0、6、12、18、24、30 d，测定前按“2.3.4”项下方法复溶，进行液相分析。结果，4℃下 3 种探针药物峰面积 RSD 均小于 0.9%，-20℃下均小于 4.9%，表明非那西丁、氯唑沙宗和咪达唑仑在 4℃时 24 h 内稳定，-20℃时 30 d 内基本稳定。

2.3.6.5 准确度试验 按“2.3.6.3”项下方法制备高、中、低质量控制（QC）样品，根据测定值与加入量的比值计算准确度。结果，非那西丁、氯唑沙宗、咪达唑仑的准确度分别在 96.1%~100.2%、96.9%~103.2%、96.8%~99.9% 之间，RSD 在 1.0%~9.9% 之间。

2.3.7 统计学分析 用 SPSS 13.0 软件进行分析，数据以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2.3.8 结果 各给药组非那西丁加入 1.08 mg，氯唑沙宗加入 1.19 mg，咪达唑仑加入 0.52 mg，不同比例丹参-红花对 3 种探针药物的代谢消除率见表 2。由此可知，不同比例丹参-红花药对 CYP_{1A}₂、CYP_{2E}₁ 和 CYP_{3A}₂ 的活性均表现显著的抑制作用（ $P<0.05$ ）。

表 2 不同给药组心肌缺血大鼠肝微粒体中 3 种探针药物的消除率（ $\bar{x}\pm s$ ，n=10）

探针药物	组别	测得量/mg	代谢消除率/%
非那西丁	模型组	0.82±0.02	24.42±1.76
	丹参-红花(1:1)组	0.95±0.03	12.10±2.33*
	丹参-红花(2:1)组	0.96±0.03	11.36±1.57*
	丹参-红花(3:1)组	0.97±0.02	10.04±1.62*
氯唑沙宗	模型组	0.90±0.03	24.22±2.97
	丹参-红花(1:1)组	0.93±0.05	21.82±3.85
	丹参-红花(2:1)组	1.03±0.06	13.63±5.09*
	丹参-红花(3:1)组	1.07±0.02	9.94±2.05*
咪达唑仑	模型组	0.30±0.02	42.00±2.95
	丹参-红花(1:1)组	0.34±0.02	36.42±3.28
	丹参-红花(2:1)组	0.40±0.01	23.47±1.90*
	丹参-红花(3:1)组	0.42±0.01	19.15±1.76**

注:与模型组比较* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

2.4 RT-PCR 法测定丹参-红花药对大鼠 CYP450 酶 mRNA 表达的影响

2.4.1 分组与给药 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型

组、丹参-红花（3：1）组、丹参-红花（2：1）组、丹参-红花（1：1）组，每组 10 只，灌胃体积 2 mL，每天给药 1 次，对照组和模型组给予蒸馏水，其余各组给予“2.1.1”项下提取液，持续 15 d。末次给药后，20% 乌拉坦（1 g/kg）麻醉大鼠，迅速取出肝脏组织，-80℃ 保存。

2.4.2 RNA 提取与浓度测定 按 RNA 提取试剂盒说明书提取肝脏总 RNA，并于 260、280 nm 波长处测定吸光度 OD_{260} 、 OD_{280} ，两者比值介于 1.8~2.0 之间时，提取的 RNA 纯度视为合格。

2.4.3 引物设计及特异性验证考察 基因 β -actin、 CYP_1A_2 、 CYP_2E_1 和 CYP_3A_2 的引物由生工生物工程（上海）有限公司合成，引物序列信息和扩增产物长度见表 3。

表 3 大鼠 CYP450 酶引物序列

名称	类型	序列(5'-3')	长度/bp
CYP_1A_2	正向	CTGGAGATCTACCGATACACA	223
	反向	TCTCACTCAGGCTTGTGCG	
CYP_2E_1	正向	GAAGTGAAGGACACAGCACA	203
	反向	GTTGGAAGGACAAGATTGAT	
CYP_3A_2	正向	GAAACCCGTCTGATTTCTAAG	183
	反向	GACAAAGGAGAGTGTGCTGC	
β -actin	正向	GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTAGC	155
	反向	GGCCGGACTCATCTACTCTGCTT	

随机选择样本进行 RT-PCR 反应，结果 β -actin、 CYP_1A_2 、 CYP_2E_1 和 CYP_3A_2 基因 RT-PCR 扩增产物的融解曲线都为单一的特异峰，说明 RT-PCR 中的荧光均为目的基因 cDNA 扩增双链 DNA 发出的荧光，即引物特异性好，可进行后续的定量测定。见图 2~4。

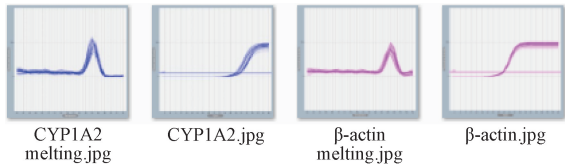


图 2 CYP_1A_2 基因 RT-PCR 扩增产物的融解曲线

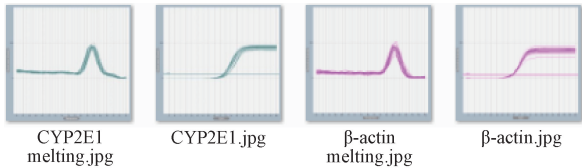


图 3 CYP_2E_1 基因 RT-PCR 扩增产物的融解曲线

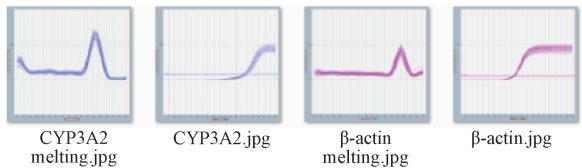


图 4 CYP_3A_2 基因 RT-PCR 扩增产物的融解曲线

2.4.4 RT-PCR 测定 将大鼠肝组织提取的总 RNA 反转录合成 cDNA，按下述体系进行 RT-PCR 反应：cDNA 模板 1 μ L，10 μ mol/L 正、反向引物各 0.50 μ L，SYBR GREEN

（稀释至 20 $\times$ ）0.3 μ L，2 $\times$ Power Taq PCR MasterMix 10 μ L，用超纯水 H_2O 补足至 20 μ L。RT-PCR 反应程序为 94℃ 预变性 5 min，94℃ 变性 10 s，60℃ 退火 20 s，72℃ 延伸 30 s，循环 40 次。用 RT-PCR 仪自带软件进行荧光定量分析，得出 Ct， $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 的表达量。结果见表 4。

表 4 大鼠肝脏 CYP450 酶 3 种亚型 mRNA 表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	CYP_1A_2	CYP_2E_1	CYP_3A_2
空白组	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.07
模型组	2.94 $\pm$ 0.15 ^{##}	2.54 $\pm$ 0.17 ^{##}	2.55 $\pm$ 0.16 ^{##}
丹参-红花(1:1)组	2.11 $\pm$ 0.16 [*]	1.94 $\pm$ 0.14	2.27 $\pm$ 0.13
丹参-红花(2:1)组	1.73 $\pm$ 0.10 ^{**}	1.71 $\pm$ 0.10 [*]	1.74 $\pm$ 0.06 [*]
丹参-红花(3:1)组	1.17 $\pm$ 0.07 ^{**}	1.33 $\pm$ 0.09 ^{**}	1.12 $\pm$ 0.04 ^{**}

注：与空白组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

由表 4 可以看出，与空白组比较，模型大鼠肝脏组织中 P450 酶 3 种亚型的 mRNA 的表达增加 ($P<0.01$)；与模型组比较，丹参-红花不同比例均能够抑制模型大鼠肝组织中 P450 酶 3 种亚型 mRNA 表达，其抑制程度与丹参的剂量呈依赖性。其中，丹参-红花（3：1、2：1）组能显著抑制模型大鼠 CYP_1A_2 、 CYP_2E_1 和 CYP_3A_2 mRNA 表达，丹参-红花（1：1）组能显著抑制模型大鼠 CYP_1A_2 mRNA 表达 ($P<0.05$)，同时对 CYP_2E_1 和 CYP_3A_2 也具有抑制作用，但与模型组比较，差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 讨论

丹参、红花配伍比单独使用丹参、红花具有更好的药理作用^[5,11]。肝微粒体 CYP450 是口服药物进入体内代谢的主要途径， CYP_1 、 CYP_2 和 CYP_3 是参与药物代谢的主要家族^[13]。研究表明，不同病理生理因素可调节 CYP450 同工酶的活性^[14-16]。因此，本实验采用急性心肌缺血模型大鼠研究丹参-红花配伍对心肌缺血大鼠 CYP450 酶活力及其 mRNA 表达的影响，结果与文献报道一致^[12]。

目前已知的 CYP_1A_2 特异性代谢的药物有非那西丁、咖啡因等^[17-18]，咖啡因不易获得，非那西丁价廉易得； CYP_2E_1 特异性代谢的药物有氯唑沙宗、对位硝基酚和 *N*-亚硝基二甲胺^[19-20]，氯唑沙宗 90% 经 CYP_2E_1 代谢生成 6-羟基氯唑沙宗；咪达唑仑是人体 CYP_3A_4 特异性代谢药物， CYP_3A_4 是人体特有的，人体 CYP_3A_4 与大鼠体内的 CYP_3A_2 相当^[17,21]。因此，本研究选用非那西丁、氯唑沙宗和咪达唑仑为探针底物。

在含丹参、红花的中药复方中，两者比例 1：1 者占 20.8%，2：1 者占 45.8%，3：1 者占 31.2%^[22-23]，因此，本研究选用 1：1、2：1、3：1。结果表明，3：1 时对酶的抑制作用更显著，这与药效学研究结果^[22]和临床使用比例相吻合，推测该药对协同增效机理可能与上述酶的活性有关。

当丹参、红花配伍比例为 3：1、2：1 时，由于对 CYP_1A_2 、 CYP_2E_1 、 CYP_3A_2 活性有显著的抑制作用，导致上述 3 种酶对其特异性代谢药物的代谢减慢。因此，在临

床上 CYP₁A₂、CYP₂E₁、CYP₃A₄ 的特异性代谢药物与丹参、红花（3：1、2：1）联合用药时，建议应适当调整三者使用剂量。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：76-77.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：151.

[3] 杨旭杰. 肖诗鹰. 基于频数分析的中药复方有效专利防治心血管疾病用药规律研究[J]. 中国中药杂志，2012，37（17）：2661-2666.

[4] Yu M L, Yan C L, Liu H X, *et al.* Network pharmacology exploration reveals endothelial inflammation as a common mechanism for stroke and coronary artery disease treatment of Danhong injection[J]. *Sci Rep*, 2017, 154(27): 1-18.

[5] 高丽娜, 崔元璐, 延 阔, 等. 丹参红花配伍研究进展[J]. 中草药, 2016, 47(4): 671-679.

[6] Guo J H, Yong Y H, Aa J Y, *et al.* Compound danshen dripping pills modulate the perturbed energy metabolism in a rat model of acute myocardial ischemia [J]. *Sci Rep*, 2016, 37919: 1-13.

[7] 王银燕, 袁 良, 杨 帆, 等. 调脾护心方对异丙肾上腺素致大鼠急性心肌缺血的保护作用[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(8): 1848-1850.

[8] Wang Q W, Yu X F, Xu H L, *et al.* Ginsenoside RE improves isoproterenol-induced myocardial fibrosis and heart failure in rats, evid. based complement [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 3714508.

[9] 王银燕, 袁 良, 杨 帆, 等. 调脾护心方对急性心肌缺血模型大鼠心肌 Ang II、ACE、AGTR1 蛋白及 AGT、AGTR1、ET-1mRNA 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(4): 470-477.

[10] Zhang X J, Tan H, Shi Z F, *et al.* Growth differentiation factor 11 is involved in isoproterenol-induced heart failure[J]. *Mol Med Rep*, 2019, (19): 4109-4118.

[11] 刘剑刚, 张大武, 李 婕, 等. 丹参、红花水溶性组分及配伍对大鼠心肌缺血/再灌注损伤作用的实验研究[J].

中国中药杂志，2011，36(2)：189-194.

[12] 王小平, 白吉庆, 胡锦萍, 等. 丹参-红花药对配伍前后对大鼠肝药酶亚型 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 活性的影响[J]. 药物评价研究, 2017, 40(3): 300-306.

[13] 周 璐, 徐婷婷, 金若敏, 等. 吴茱萸水煎液对大鼠肝药酶亚型影响比较研究[J]. 中国药理学通报, 2014, 30（2）：279-282.

[14] 敖 英, 彭仁琇, 杨 静, 等. 心肌缺血再灌注对肝脏 CYP 酶系统的影响[J]. 中国药理通讯, 2007, 24(3): 25-25.

[15] 娄建石, 刘 颖, 焦建杰, 等. “Ccokatil” 法评价肝缺血再灌与缺血预适应对大鼠 CYP 酶活性的影响[C] //第九届全国药物和化学异物代谢学术会议论文集. 武汉：中国药理学学会药物代谢专业委员会，2009：227.

[16] 刘 颖. “Cocktail” 法评价肝缺血再灌注与缺血预适应对大鼠细胞色素 CYP 酶活性的影响[D]. 天津：天津医科大学，2007.

[17] Cheng C, Qian J C, Wang Z, *et al.* Influences of *Corydalis decumbens* on the activities of CYP450 enzymes in rats with a cocktail approach[J]. *Bio Med Res Int*, 2019, 2019: 9614781.

[18] 孙冰婷, 居文政, 谈恒山. Cocktail 法研究 CYP450 酶活性影响因素的探讨[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(6): 558-562.

[19] Chen L, Yang C S. Effects of cytochrome P450 2E1 modulators on the pharmacokinetics of chlorzoxazone and 6-hydroxychlorzoxazone in rats[J]. *Life Sci*, 1996, 58(18): 1575-1585.

[20] 焦建杰, 李 芹, 刘 洁, 等. 探针药物法评价苦参对大鼠细胞色素 P450 2E1 代谢活性的影响[J]. 中草药, 2011, 43(9): 1799-1802.

[21] Sun W, Wang Z, Chen R, *et al.* Influences of anlotinib on cytochrome P450 enzymes in rats using a cocktail method[J]. *BioMed Res Int*, 2017, 2017: 3619723.

[22] 杨文潮, 王小平, 白吉庆. 丹参-红花配伍比例对血瘀证大鼠血液流变学和血流动力学的影响[J]. 西北农林科技大学学报（自然科学版）, 2015, 43(12): 35-40.

[23] 王小平, 王鹏飞, 白吉庆. 丹参-红花组分配伍对雌、雄性心肌缺血大鼠肝药酶亚型影响的比较研究[J]. 药物评价研究, 2017, 40(12): 1711-1716.