

黄山毛峰茶多酚提取物对肝药酶Cyp3a11的调控作用

左 丹^{1,2}, 刘 冬², 李仕琪², 秦亦飞², 孙海燕^{2,*}, 明 建^{1,*}

(1.西南大学食品科学学院, 重庆 400715;

2.深圳职业技术学院 深圳市发酵精制检测系统重点实验室, 广东 深圳 518055)

摘 要:以黄山毛峰为原料,采用实时荧光定量反转录聚合酶链式反应法和蛋白免疫印迹法研究其茶多酚提取物对肝药酶Cyp3a11及孕烷X受体(pregnane X receptor, PXR)的mRNA和蛋白表达影响,在此基础上采用瞬时共转染报告基因技术进一步验证是否通过PXR实现对Cyp3a11表达调控。结果表明:黄山毛峰茶多酚提取物各剂量组(75、150、300 mg/(kg·d))均能显著调控小鼠肝Cyp3a11、PXR mRNA及其蛋白表达;报告基因实验结果显示,100、200、300 µg/mL黄山毛峰茶多酚提取物经PXR通路使细胞色素P4503A4基因荧光素酶活力分别增加(3.86±0.05)、(4.82±0.72)、(5.38±0.11)倍。研究表明黄山毛峰茶多酚提取物可激活PXR通路调控肝药酶Cyp3a11的表达。

关键词:黄山毛峰茶;肝药酶Cyp3a11;孕烷X受体;mRNA;蛋白表达

Regulatory Effect of Tea Polyphenol Extracts from Huangshan Maofeng Tea on the Drug-Metabolizing Enzyme Cyp3a11

ZUO Dan^{1,2}, LIU Dong², LI Shiqi², QIN Yifei², SUN Haiyan^{2,*}, MING Jian^{1,*}

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Shenzhen Key Laboratory of Fermentation, Purification and Analysis, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China)

Abstract: In this paper, we explored the effect of tea polyphenols from Huangshan Maofeng tea on the mRNA and protein expression levels of the drug-metabolizing enzyme Cyp3a11 and pregnane X receptor (PXR) by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) and Western blot. We further used the transient co-transfection reporter gene assay to verify the role of PXR in regulating Cyp3a11 expression. The results showed that the tea polyphenols at doses of 75, 150 and 300 mg/(kg·d) could significantly induce the mRNA and protein expression of PXR and Cyp3a11. Reporter gene screening showed that the tea polyphenols at doses of 100, 200 and 300 µg/mL could significantly enhance cytochrome P4503A4 (CYP3A4) luciferase activity by (3.86 ± 0.05), (4.82 ± 0.72) and (5.38 ± 0.11) folds through the PXR pathway as compared to the solvent control group. Therefore, tea polyphenols from Huangshan Maofeng tea can significantly upregulate CYP3A4 expression via activating the PXR-CYP3A4 pathway.

Keywords: Huangshan Maofeng tea; drug-metabolizing enzyme Cyp3a11; pregnane X receptor; mRNA; protein expression

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201821029

中图分类号: O625.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2018)21-0189-07

引文格式:

左丹, 刘冬, 李仕琪, 等. 黄山毛峰茶多酚提取物对肝药酶Cyp3a11的调控作用[J]. 食品科学, 2018, 39(21): 189-195. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201821029. <http://www.spkx.net.cn>

ZUO Dan, LIU Dong, LI Shiqi, et al. Regulatory effect of tea polyphenol extracts from Huangshan Maofeng tea on the drug-metabolizing enzyme Cyp3a11[J]. Food Science, 2018, 39(21): 189-195. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201821029. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2018-04-18

基金项目: 广东省科技计划项目(2013B051000089); 深圳市科技计划项目(JCYJ20170818114529521; JCYJ20160530173755124)

第一作者简介: 左丹(1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品化学与营养学。E-mail: 804403185@qq.com

*通信作者简介: 孙海燕(1972—), 女, 教授, 博士, 研究方向为天然活性成分分析及代谢组学。E-mail: susan@szpt.edu.cn

明建(1972—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品化学与营养学。E-mail: mingjian1972@163.com

茶是世界三大饮料之一^[1], 茶多酚是茶叶多酚类化合物的总称。茶叶中含有30多种茶多酚, 占茶叶干质量的15%~30%, 在茶叶发挥主要生物活性及药理学活性中起主导作用^[2-4]。但民间历来有“药茶不能同食”的说法, 认为茶能降低药物疗效, 然而饮茶对药物的影响一直未见全面报道, 相关作用机制也缺乏全面的实验证据^[5-7]。

肝脏细胞色素P450 (cytochrome P450, CYP450) 氧化酶是参与大多数临床药物、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, 其中CYP450 3A4氧化酶 (CYP3A4) 占肝脏P450氧化酶总量的35%, 由于小鼠和人的药物代谢酶基因具有同源性, 小鼠肝Cyp3a11相当于人肝CYP3A4表达^[8-9]。大量研究证实, 孕烷X受体 (pregnane X receptor, PXR) 是调控CYP3A4基因表达的关键转录因子, 它是核受体 (nuclear receptors, NRs) 超家族中的重要成员, 内外源化合物通过激活PXR介导的信号通路调节CYP3A4表达是影响物质在体内代谢的重要途径^[10]。其机制为: 当PXR被内源性和外源性化合物激活后, 构象发生改变, 并与视黄醇X受体 (retinoid X receptor, RXR) 结合形成异源二聚体, 在某些辅助蛋白酶的作用下, 与CYP3A4基因启动子上特定位置结合, 发挥转录调控作用, 引发一系列的生物学效应^[11]。

本实验采用实时荧光定量反转录聚合酶链式反应 (real-time reverse transcription polymerase chain reaction, real-time RT-PCR) 和Western blot法, 研究黄山毛峰茶多酚对小鼠肝Cyp3a11、PXR的影响, 并采用双荧光素酶报告基因技术阐明茶多酚调控CYP3A4的作用机制, 以期揭示“药茶不能同食”的理论依据, 为临床合理用药、保障用药安全性和有效性提供科学指导。

1 材料与方法

1.1 动物、材料与试剂

C57BL/6小鼠 (雌性SPF级, 7~8周龄, 体质量(17±2) g, 许可证号: SCXK (粤) 2011-0015) 和饲料均购自南方医科大学实验动物中心。

人肝癌HepG2细胞株购自中国科学院上海细胞库。pSG5-hPXR表达质粒为美国德州大学西南医学中心Steven Kliewer教授惠赠; pGL3-CYP3A4-XREM报告质粒为美国堪萨斯大学Jeff Staudinger教授惠赠; pRL-TK内参质粒、pSG5空载体、大肠杆菌DH5α菌株购自北京天恩泽基因科技有限公司。

黄山毛峰购于安徽黄山, 属二级茶叶, 经烘干、打粉, 过80目筛, 避光4℃保存。

UNIQ-10柱式TRIzol总RNA抽提试剂盒、1×TE buffer、Cyp3a11、PXR引物、Loading buffer 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; PrimeScript™

RT Master Mix、SYBR®Premix Ex Taq™ (TliRNaseH Plus)、RNase-free水 日本Takara公司; 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒 美国Pierce公司; 脱脂奶粉 美国CST公司; NP-40 美国Merck公司; ECL化学发光液、预染蛋白Marker 美国Bio-Rad公司; 胰蛋白酶、酵母提取物 英国Oxoid公司; 氯化钠、氨苄青霉素、甘油 美国Amresco公司; plasmid Midi Kit 德国QIAGEN公司; 利福平 (rifampicin, RIF)、二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、四甲基乙二胺、过硫酸铵、100×蛋白酶抑制剂、乙酸、乙腈、福林-酚试剂、没食子酸 (gallic acid, GA)、表儿茶素 (epicatechin, EC)、表没食子儿茶素 (epigallocatechin, EGC)、儿茶素 (catechin, C)、儿茶素没食子酸酯 (catechin gallate, CG) 美国Sigma公司; Cyp3a11、PXR一抗 (多克隆兔抗)、二抗 (辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔) 英国Abcam公司; DMEM basic (1×)、澳洲特级胎牛血清、Penicillin-Streptomycin双抗、体积分数0.05%胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 (trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid, trypsin-EDTA) (1×)、Opti-MEM培养基 美国Gibco公司; Lipofectamine®3000 Transfection Kit 美国Invitrogen公司; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒 美国Promega公司; 没食子儿茶素没食子酸酯 (gallocatechin gallate, GCG)、咖啡因 (caffeine, CAF)、没食子儿茶素 (gallocatechin, GC) 北京盛世康晋化工研究院; 表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin gallate, EGCG) 广州和为化工有限公司; 表儿茶素没食子酸酯 (epicatechin gallate, ECG) 上海源叶生物科技有限公司; 甲醇、氯仿、无水乙醇等均为国产试剂。

1.2 仪器与设备

5180R型冷冻离心机、22331紫外分光光度计、微量移液枪、普通PCR仪 德国Eppendorf公司; FastPrep-24样品处理系统 安倍医疗器械贸易 (上海) 有限公司; ABI Q6 Flex全功能定量PCR仪 美国Applied Biosystems公司; MiniProtein电泳系统、MiniTrans-Blot转膜系统、全自动凝胶成像仪 美国Bio-Rad公司; SpectraMax M5e多功能酶标仪 美国Molecular Devices公司; Laborota4001型旋转蒸发仪 德国Hedolph公司; MS1 Minishaker漩涡混合仪 德国IKA公司; DMIRB倒置生物荧光显微镜 德国Leica公司; LC-20A高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 仪 日本岛津公司; ZORBAX Eclipse Plus C₁₈色谱柱 美国Agilent公司。

1.3 方法

1.3.1 茶多酚提取物含量及组分分析

1.3.1.1 黄山毛峰茶多酚的提取

参照GB/T 8313—2008《茶叶中茶多酚和儿茶素

类含量的检测方法》^[12]并稍作修改：取20 g已处理的黄山毛峰茶粉，按1:25 (m/V)加入预热的体积分数70%甲醇溶液，70℃水浴中冷凝回流冷浸提30 min，重复浸提3次，合并滤液，将滤液旋转蒸发至原体积的15%~20%，保证甲醇几乎被完全蒸发，再用3倍体积氯仿萃取1次，再次旋转蒸发，旋至萃取后体积的5%左右，溶解剩余部分于超纯水中。15 000 r/min离心20 min，取上清液，真空冷冻干燥，常温避光保存。

1.3.1.2 茶多酚提取物总多酚含量测定

总多酚含量测定采用Folin-Ciocalteu法^[13]。茶多酚含量以每克茶多酚提取物中所含的没食子酸当量 (mg GAE/g m_d) 表示。每个样品做3组平行。

1.3.1.3 HPLC法分析茶多酚组成

样品储备液制备：准确称取黄山毛峰茶多酚提取物10 mg，用体积分数50%甲醇溶液溶解，定容至10 mL，经0.45 μ m有机膜过滤，于-80℃冰箱贮藏备用。

标准品溶液制备：准确称取标准品GA、CAF、EGCG、EC、EGC、ECG、C、GC、CG、GCG 5 mg，分别用体积分数50%甲醇溶液定容至5 mL，于-80℃冰箱贮藏备用。使用前，根据实验需要将各标准品贮备液用体积分数50%的甲醇溶液等梯度稀释成适合浓度，配制成标准工作液以及混合标准溶液。进样前经0.45 μ m有机滤膜过滤。

色谱条件：色谱柱为ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m)；流动相A为体积分数0.17%乙酸溶液；流动相B为体积分数100%乙腈；检测波长280 nm；流速1 mL/min；进样量10 μ L；柱温35℃。HPLC梯度洗脱程序参考李艳等^[14]的方法 (表1)。

表1 高效液相色谱洗脱条件
Table 1 Elution conditions for HPLC

时间/min	流动相A体积分数/%	流动相B体积分数/%
0~10	98~97	2~3
10~15	97~93	3~7
15~30	93~90	7~10
30~55	90~88	10~12
55~65	88~86	12~14
65~75	86~85	14~15
75~80	85~75	15~25

1.3.2 茶多酚提取物对肝药酶Cyp3a11的调控作用

1.3.2.1 动物实验设计

将24只健康成年SPF级C57BL/6小鼠随机分为4组，即空白对照组，黄山毛峰茶多酚提取物低 (75 mg/(kg·d)，以体质量计，下同)、中 (150 mg/(kg·d))、高剂量 (300 mg/(kg·d)) 组。动物在相对湿度50%~60%、温度20~25℃、光照/黑暗分别为12 h的SPF级屏障环境中饲养。每天早上分别对实验组小鼠灌

胃不同剂量黄山毛峰茶多酚提取物，持续7 d，空白对照组按体质量 (10 mL/kg) 灌胃超纯水7 d，灌胃2 h后正常进食、饮水。第7天灌胃2 h后断颈处死，取肝组织，-80℃保存。

1.3.2.2 RNA的提取及real-time RT-PCR实验

取冻存的小鼠肝脏50 mg，按照UNIQ-10柱式TRIzol总RNA抽提试剂盒和PrimeScript™ RT Master Mix试剂盒提取及逆转录RNA。紫外分光光度计测定RNA纯度。采用SYBR® Premix Ex Taq™ (TliRNaseH Plus) 试剂盒对mRNA的表达进行相对定量，所有操作均在冰上进行；选择 β -actin作为内参基因，定量方法采用比较阈值法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法)，计算实验组和空白对照组之间的基因表达水平的差异^[15]。引物序列参考文献[16]设计 (表2)。

表2 Real-time RT-PCR引物
Table 2 Real-time RT-PCR primers used in this study

基因	序列 (5'-3')
β -actin	F: TGTTACCACTGGGACGACA
	R: GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA
Cyp3a11	F: ACAACAAGCAGGGATGGAC
	R: GGTAGAGGAGCACCAAGCTG
PXR	F: GTTCAAGGGCGTCATCAACT
	R: TCGTGTGAACCTCAGGATG

1.3.2.3 蛋白提取及Western blot实验

用蛋白裂解液 (每1 mL加10 μ L 100 mmol/L的PMSF) 提取肝脏蛋白，用BCA法定量蛋白质量浓度，取所需体积的蛋白质溶液按比例加入5×Loading buffer，100℃沸水浴煮5 min。样品经过电泳、转膜、封闭、孵育一抗、洗膜、孵育二抗、洗膜，加入ECL发光液反应5 min后，采用化学发光成像系统进行自动曝光，并用Image Lab 5.1软件系统对各显色条带进行半定量分析。

1.3.2.4 质粒瞬时转染与双荧光素酶报告基因检测

对数生长期HepG2细胞按 1×10^4 个/孔接种到96孔板中，培养24 h。将质粒pSG5-hPXR或pSG5、pRL-TK、CYP3A4-XREM-Luc、脂质体与Opti-MEM培养基孵育20 min。移去96孔中原有培养基，每孔加入50 μ L无双抗的DMEM培养基 (含体积分数10%胎牛血清)。完成孵育后，向每孔中加入50 μ L上述脂质体-DNA混合物。培养24 h后，加入含有不同质量浓度黄山毛峰茶多酚提取物 (茶多酚低、中、高质量浓度组分别为100、200、300 μ g/mL) 的无血清培养基，同时设置10 μ mol/L RIF作为阳性对照组，体积分数0.1% DMSO作为溶剂对照组。给药24 h后，移去培养基，并用磷酸盐缓冲液洗涤细胞1次，按双荧光素酶报告基因检测试剂盒操作说明进行双荧光酶活力检测。

1.4 数据统计分析

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS 20.0统计学软件对数据进行统计分析，统计方法采用单因素方差分析

(analysis of variance, ANOVA), 多重比较检验进行显著性分析, $P<0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 茶多酚提取物含量及组分分析

根据没食子酸浓度与吸光度得标准曲线: $y=0.0024x+0.0323$ ($R^2=0.9988$), 式中 y 表示吸光度, x 表示没食子酸质量浓度, 由该回归方程计算得出黄山毛峰茶多酚提取物中总多酚含量为 (434.11 ± 8.76) mg GAE/g m_d 。HPLC结果表明黄山毛峰茶多酚提取物中含EGCG (265.57 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 占总物质的26.6%)、ECG (133.05 $\mu\text{g}/\text{mg}$)、C (69.27 $\mu\text{g}/\text{mg}$)、EGC (64.92 $\mu\text{g}/\text{mg}$)、CAF (37.85 $\mu\text{g}/\text{mg}$)、EC等物质 (图1、表3)。

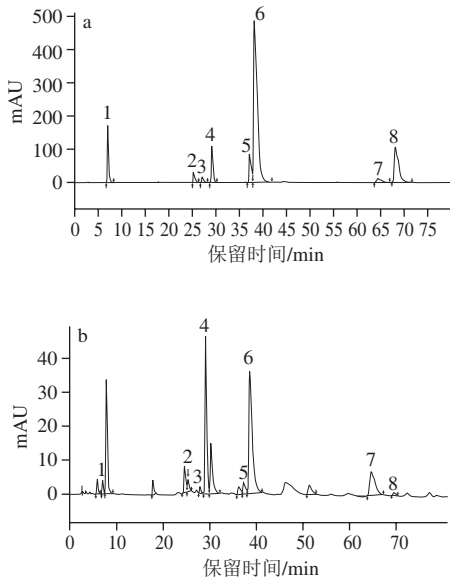


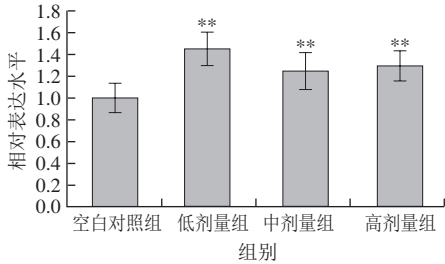
图1 茶多酚混合标准品(A)、黄山毛峰茶多酚提取物(B)在280 nm波长处的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of mixed standards of tea polyphenols (A) and tea polyphenols from Huangshan Maofeng tea (B)

表3 HPLC定量分析黄山毛峰茶多酚
Table 3 HPLC quantitative analysis of tea polyphenols in Huangshan Maofeng tea

序号	标准品	保留时间/min	回归方程	相关系数	多酚含量/ ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
1	GA	7.019	$y=30.556x-13.608$	0.999	3.24
2	EGC	25.257	$y=1.6527x-2.659.5$	0.994	64.92
3	C	27.050	$y=807.18x-8.145.5$	0.988	69.27
4	CAF	29.035	$y=30.122x+5.827.1$	0.998	37.85
5	EC	37.086	$y=10.576x-14.893$	0.995	11.35
6	EGCG	38.121	$y=9.516.1x-725.923$	0.970	265.57
7	ECG	64.317	$y=4.955.1x-26.561$	0.948	133.05
8	CG	68.018	$y=11.815x+1.532.4$	0.978	3.45

2.2 黄山毛峰茶多酚提取物对Cyp3a11表达水平的影响



**,与空白对照组相比差异极显著 ($P<0.01$), 下同。

图2 黄山毛峰茶多酚提取物对小鼠肝Cyp3a11 mRNA表达的作用
Fig. 2 Effect of tea polyphenols from Huangshan Maofeng tea on mRNA expression of Cyp3a11 in liver of mice

如图2所示, 与空白对照组相比, 黄山毛峰茶多酚提取物各剂量组对小鼠肝Cyp3a11 mRNA的表达呈显著诱导作用 ($P<0.01$), 无明显的量效关系。

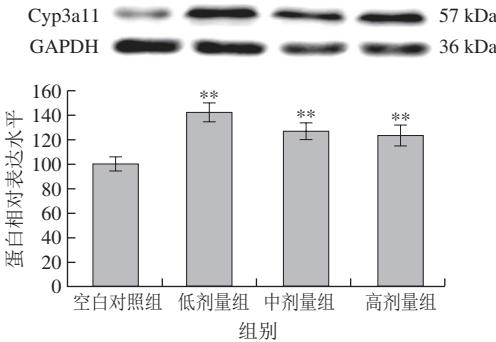


图3 黄山毛峰茶多酚提取物对小鼠肝Cyp3a11蛋白表达的作用
Fig. 3 Effect of tea polyphenols from Huangshan Maofeng tea on protein expression of Cyp3a11 in liver of mice

如图3所示, 与空白对照组相比, 黄山毛峰茶多酚提取物各剂量组均对小鼠肝Cyp3a11蛋白的表达有显著诱导作用 ($P<0.01$), 随剂量的升高诱导作用逐渐减弱, 呈一定的量效关系。

由图2、3可以看出, 在黄山毛峰茶多酚提取物对小鼠肝Cyp3a11的影响作用中, 其mRNA和蛋白表达的分析结果趋势不大相同, 但总体说来, 各剂量组对小鼠肝Cyp3a11 mRNA及其蛋白的表达均呈显著诱导作用, mRNA表达结果与蛋白表达结果一致, 说明黄山毛峰茶多酚提取物对小鼠肝Cyp3a11呈显著诱导作用。

2.3 黄山毛峰茶多酚提取物对PXR表达水平的影响

如图4所示, 与空白对照组相比, 黄山毛峰茶多酚提取物各剂量组均对小鼠肝PXR mRNA的表达呈显著诱导作用 ($P<0.01$), 随剂量的增高诱导作用逐渐减弱, 存在明显的量效关系。

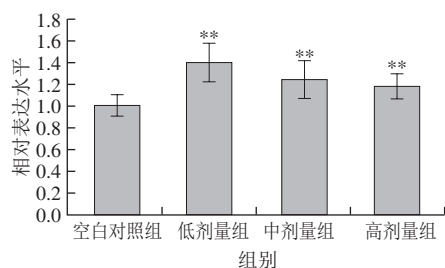


图4 黄山毛峰茶多酚提取物对小鼠肝PXR mRNA表达的作用

Fig. 4 Effect of tea polyphenols from Huangshan Maofeng tea on mRNA expression of PXR in liver of mice

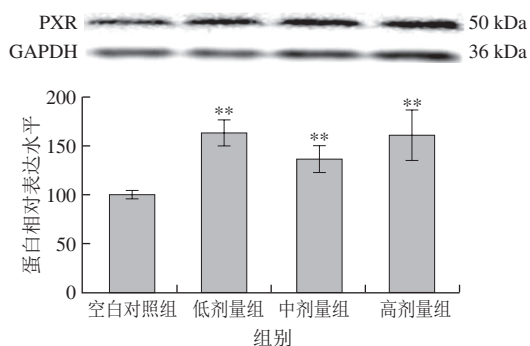


图5 黄山毛峰茶多酚提取物对小鼠肝PXR蛋白表达的作用

Fig. 5 Effect of tea polyphenols from Huangshan Maofeng tea on protein expression of PXR in liver of mice

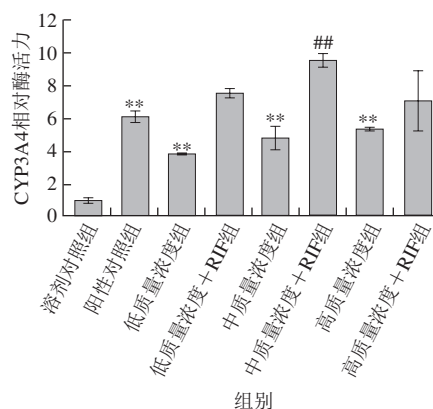
如图5所示,与空白对照组相比,黄山毛峰茶多酚提取物各剂量组均对小鼠肝PXR蛋白的表达有极显著诱导作用 ($P<0.01$),无明显的量效关系。

由图4、5可以看出,在黄山毛峰茶多酚提取物对小鼠肝PXR的影响作用中,其mRNA和蛋白表达的分析结果趋势不大相同,但总体说来,黄山毛峰茶多酚提取物各剂量组对小鼠肝PXR mRNA及其蛋白的表达均呈显著诱导作用,mRNA表达结果与蛋白表达结果一致,说明黄山毛峰茶多酚提取物对小鼠肝PXR呈显著诱导作用。

2.4 黄山毛峰茶多酚提取物对PXR-CYP3A4双荧光素酶报告基因的影响

与溶剂对照组比较,阳性对照组CYP3A4荧光素酶活力极显著增强 ($P<0.01$),是溶剂对照组的6.11倍,表明高灵敏度的PXR-CYP3A4荧光素酶报告基因体系成功建立(图6);随着黄山毛峰茶多酚提取物质量浓度的升高,CYP3A4荧光素酶活力逐渐增强 ($P<0.01$),100、200、300 $\mu\text{g/mL}$ 黄山毛峰茶多酚提取物剂量组分别是溶剂对照组的 (3.86 ± 0.05)、(4.82 ± 0.72)、(5.38 ± 0.11)倍,呈现一定的剂量依赖性,提示黄山毛峰茶多酚提取物可能作为PXR的配体从而激活CYP3A4 DNA反应元件,上调CYP3A4的表达。与阳性对照组比较,黄山毛峰茶多酚提取物低、中、高各质量浓度+RIF组CYP3A4荧光素酶活力均有不同程度增强,其

中,中质量浓度+RIF组CYP3A4荧光素酶活力极显著增强 ($P<0.01$),说明黄山毛峰茶多酚提取物与RIF能够协同作用于PXR通路诱导CYP3A4活性。



**与溶剂对照组相比差异极显著 ($P<0.01$);

##与阳性对照组相比差异极显著 ($P<0.01$)。

图6 黄山毛峰茶多酚提取物经PXR通路对CYP3A4荧光素酶活性的影响

Fig. 6 Effect of tea polyphenols from Huangshan Maofeng tea on CYP3A4 luciferase activity through the PXR pathway

3 讨论

茶多酚主要经由CYP450酶代谢,其中CYP3A作为P450家族中最重要的I相药物代谢酶系统参与多种内源性及外源性物质在体内转化^[17]。而通过它进行代谢作用的物质本身亦会对它产生作用,其诱导或抑制将产生复杂的药物和其他药物或化合物之间的相互作用,这种相互作用可能会引起药物在体内的潜在毒性^[18-19]。国内外大量研究表明,内、外源性物质对于CYP3A酶活性的抑制或诱导作用往往是源于其作为配体激活了多种NRs,其中PXR是CYP3A4的关键转录调控因子^[20-21]。目前国内外研究主要集中在茶多酚提取物一些生物活性上,如对抗氧化、抗肿瘤、抑菌等,而茶多酚对肝药酶的影响作用研究甚少^[22]。本实验从基因转录水平和蛋白表达水平上对黄山毛峰茶多酚提取物对小鼠肝Cyp3a11的作用进行了探讨,并采用双荧光素酶报告基因检测技术来观察黄山毛峰茶多酚提取物是否为PXR的外源性配体,从基因调控角度阐明茶多酚影响Cyp3a11的作用机制。

PXR报告基因依据PXR调节CYP3A4表达而建立,通过此实验模型可了解外源化学物对CYP3A4的诱导情况及对CYP3A4的诱导是否通过PXR这一途径起作用。PXR活化在报告基因实验和人肝细胞实验中有很好的相关性,实验系统不存在个体差异,重现性好。本研究采用了目前报告基因应用最为广泛的HepG2细胞模型,该细胞中的PXR表达量低,内源性干扰少,故外源性的PXR可以实现高表达。为了提高实验系统的灵敏度,优化质粒转染

体系,基于本实验室各方面的条件及其他成员的研究,最终选择每孔转染的质粒质量分别为:100 ng pSG5-hPXR、100 ng pGL3-CYP3A4-XREM以及6 ng pRL-TK。

本研究结果表明:1)黄山毛峰茶多酚提取物中总多酚含量为 (434.11 ± 8.76) mg GAE/g m_d ,主要含有EGCG、ECG、C、EGC这4种物质,含量高达532.81 μ g/mg,占总物质的53.3%。此外,在HPLC图中存在其他高响应峰,可推断黄山毛峰茶多酚提取物中还含有其他含量较高的酚类物质及衍生物,需要进一步确认这些高含量物质,以便更全面分析黄山毛峰茶多酚提取物中主要酚类组分成分及含量对肝药酶的调控作用。2)黄山毛峰茶多酚提取物各剂量组对小鼠肝Cyp3a11及核受体PXR的mRNA和蛋白表达均呈显著诱导作用,说明黄山毛峰茶多酚提取物能诱导小鼠肝Cyp3a11表达各剂量组可能机制为通过对调控PXR实现。PXR是一种配体依赖性转录因子,底物广泛,配体上官能团电子性质对PXR调节方向至关重要,决定其是PXR抑制剂或激活剂^[23-24]。3)报告基因检测结果进一步验证上述判断,黄山毛峰茶多酚提取物可通过激活PXR通路来上调CYP3A4表达。Rhodes等^[25]在CYP3A4启动子区发现并鉴定了反向重复序列(everted repeat, ER)-6、远端外源物反应增强子模体、直接重复序列(directed repeat, DR)-3等PXR的反应元件。此外,结合人源化转基因小鼠模型可知,CYP3A4诱导表达的种属特征完全由PXR受体决定^[26]。4)PXR-CYP3A4途径不是一个封闭式的反应模式,CYP3A4调控区可以和多种核受体结合从而促进或抑制基因的表达,且它们对CYP3A4转录调控作用方式及调节转录过程之间的关联有待进一步研究。Burk等^[27]研究表明PXR和组成型雄甾烷受体(constitutive androstane receptor, CAR)能以交互方式的方式共同调节CYP3A4转录活化,显示核受体对P450酶的调控方式可能具有网络性。Keisuke^[28]等曾报道肝X受体 α (liver X receptor α , LXR α)在CYP3A4的表达中的独特双重作用:作为CYP3A4正调节因子,LXR α 可通过dNR1和eNR3A4反应元件上调CYP3A4表达,但却抑制PXR介导CYP3A4表达。此外,影响CYP3A4表达的因素很多,如一些影响核受体与CYP3A4结合的因素^[29]、物质与酶的直接结合产生的竞争性抑制效应或变构效应等^[30-31]。

综上所述,黄山毛峰多酚提取物通过PXR通路来诱导Cyp3a11表达,从而影响其他药物或化学物在人体的代谢,甚至有可能发生与合用药物之间的相互作用。要全面阐述酶的抑制或诱导机制,这些方面仍需继续深入研究,如黄山毛峰多酚提取物对Cyp3a11表达的影响是否与其他核受体如CAR、LXR α 有关,它们与配体之间的结合能力和结合顺序是否有差异,当介导Cyp3a11表达时它们之间的关系又如何。此外,还需要结合黄

山毛峰多酚提取物对其他CYP450亚型和其他药物代谢酶(如酯酶、葡萄糖醛酸基转移酶及药物转运体(如P-糖蛋白)的相关作用及它们之间的联系才能准确预测黄山毛峰多酚提取物对其他药物或化学物代谢行为的影响。

参考文献:

- [1] ALFERINK L J M, FITTIPALDI J, DE JONG J C K, et al. Coffee and herbal tea consumption is associated with lower liver stiffness in the general population: the Rotterdam study[J]. Journal of Hepatology, 2017, 67(2): 339-348. DOI:10.1016/j.jhep.2017.03.013.
- [2] 宛晓春. 茶叶生物化学[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2007: 1-25.
- [3] RASHIDI B, MALEKZADEH M, GOODARZI M, et al. Green tea and its anti-angiogenesis effects[J]. Biomedicine and Pharmacotherapy, 2017, 89: 949-956. DOI:10.1016/j.biopha.2017.01.161.
- [4] PULIGUNDLA P, MOK C, KO S, et al. Nanotechnological approaches to enhance the bioavailability and therapeutic efficacy of greentepolyphenols[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 34: 139-151. DOI:10.1016/j.jff.2017.04.023.
- [5] KUMAR M, JAIN M, SEHGAL A, et al. Modulation of CYP1A1, CYP1B1 and DNA adducts level by green and white tea in Balb/c mice[J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(12): 4375-4381. DOI:10.1016/j.fct.2012.08.045.
- [6] 任红, 刘冬, 郑少杰, 等. 铁观音多酚提取物对小鼠肝Cyp450s的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(7): 201-206. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201707032.
- [7] CHEN H D, SANG S M. Biotransformation of tea polyphenols by gut microbiota[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 7(1): 26-42. DOI:10.1016/j.jff.2014.01.013.
- [8] LU C, SUR I A, SHYU W C, et al. Assessment of cytochrome P450-mediated drug-drug interaction potential of orteronel and exposure changes in patients with renal impairment using physiologically based pharmacokinetic modeling and simulation[J]. Biopharmaceutics and Drug Disposition, 2014, 35(9): 543-552. DOI:10.1002/bdd.1919.
- [9] HRYCAY E G, BANDIERA S M. Expression, function and regulation of mouse cytochrome P450 enzymes: comparison with human cytochrome P450 enzymes[J]. Current Drug Metabolism, 2009, 10(10): 1151-1183. DOI:10.2174/138920009790820138.
- [10] ROSENBERG S A, XIA M, HUANG R, et al. QSAR development and profiling of 72,524 REACH substances for PXR activation and CYP3A4 induction[J]. Computational Toxicology, 2017, 1: 39-48. DOI:10.1016/j.comtox.2017.01.001.
- [11] ZADOYAN G, FUHR U. Phenotyping studies to assess the effects of phytopharmaceuticals on *in vivo* activity of main human cytochrome p450 enzymes[J]. Planta Medica, 2012, 78(13): 1428-1457. DOI:10.1055/s-0031-1298536.
- [12] 国家市场监督管理总局. 茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法: GB/T 8313—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 1-5.
- [13] CHU Y F, SUN J, WU X, et al. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(23): 6910-6916.
- [14] 李艳, 刘梅森, 万红霞, 等. 高效液相色谱法测定玉米中的游离酚和结合酚[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(9): 108-111.
- [15] COCCI P, MOSCONI G, PALERMO F A. Partial cloning, tissue distribution and effects of epigallocatechin gallate on hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase mRNA transcripts in goldfish (*Carassius auratus*)[J]. Gene, 2014, 545(2): 220-225. DOI:10.1016/j.gene.2014.05.030.

- [16] 张轶雯. 冬凌草甲素对CYP450酶的影响及其机制研究[D]. 长沙: 中南大学, 2014: 33.
- [17] 左丹, 廖霞, 李瑶, 等. 基于肠道吸收机制的膳食多酚代谢研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(7): 266-271. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201707042.
- [18] 曾苏. 药物代谢学[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2004: 50-65.
- [19] CORSONELLO A, ABBATECOLA A M, FUSCO S, et al. The impact of drug interactions and polypharmacy on antimicrobial therapy in the elderly[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2015, 21(1): 20-26. DOI:10.1016/j.cmi.2014.09.011.
- [20] PONDUGULA S R, FLANNERY P C, ABBOTT K L, et al. Diindolylmethane, a naturally occurring compound, induces CYP3A4 and MDR1 gene expression by activating human PXR[J]. *Toxicology Letters*, 2015, 232(3): 580-589. DOI:10.1016/j.toxlet.2014.12.015.
- [21] WANG Y M, ONG S S, SERGIO C, et al. Role of CAR and PXR in xenobiotic sensing and metabolism[J]. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2012, 8(7): 803-817. DOI:10.1517/17425255.2012.685237.
- [22] NIBIR Y M, SUMIT A F, AKHAND A A, et al. Comparative assessment of total polyphenols, antioxidant and antimicrobial activity of different tea varieties of Bangladesh[J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2017, 7(4): 352-357. DOI:10.1016/j.apjtb.2017.01.005.
- [23] LIU Y, BEYER A, AEBERSOLD R. On the dependency of cellular protein levels on mRNA abundance[J]. *Cell*, 2016, 165(3): 535-550. DOI:10.1016/j.cell.2016.03.014.
- [24] KORTAGERE S, KRASOWSKI M D, EKINS S. Ligand- and structure-based pregnane X receptor models[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2012, 929: 359-375. DOI:10.1007/978978-1-62703-050-2_15.
- [25] RHODES S P, OTTEN J N, HINGORANI G P, et al. Simultaneous assessment of cytochrome P450 activity in cultured human hepatocytes for compound-mediated induction of CYP3A4, CYP2B6, and CYP1A2[J]. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2015, 63(3): 223-226. DOI:10.1016/j.vascn.2010.11.002.
- [26] BANERJEE M, CHEN T. Differential regulation of CYP3A4 promoter activity by a new class of natural product derivatives binding to pregnane X receptor[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2013, 86(6): 824-835. DOI:10.1016/j.bcp.2013.07.023.
- [27] BURK O, ARNOLD K A, NUSSLER A K, et al. Antimalarial artemisinin drugs induce cytochrome P450 and MDR1 expression by activation of xenosensors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor[J]. *Molecular Pharmacology*, 2005, 67(6): 1954-1965. DOI:10.1124/mol.104.009019.
- [28] KEISUKE W, KAORI S, YURI T, et al. Dual roles of nuclear receptor liver X receptor α (LXR α) in the CYP3A4 expression in human hepatocytes as a positive and negative regulator[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2013, 86(3): 428-436. DOI:10.1016/j.bcp.2013.05.016.
- [29] HANSEN K H, HELIN K. Epigenetic inheritance through self-recruitment of the polycomb repressive complex 2[J]. *Epigenetics*, 2009, 4(3): 133-138. DOI:10.4161/epi.4.3.8483.
- [30] BASHEER L, KEREM Z. Interactions between CYP3A4 and dietary polyphenols[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 2015: 1-15. DOI:10.1155/2015/854015.
- [31] 冯彬彬, 张建海, 徐晓玉. 内异消体外对大鼠肝脏CYP450酶活性的影响[J]. *中国现代应用药学*, 2016, 33(11): 1365-1372. DOI:10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.11.004.