

文章编号: 1674-5566(2012)03-0389-07

黄芩等中药提取物对异育银鲫肝微粒体 CYP1A 和 CYP3A 的抑制作用

周常^{1,2}, 周帅¹, 房文红¹, 李国烈¹, 杨先乐², 李新苍¹, 胡琳琳¹

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所 农业部海洋与河口渔业资源及生态重点开放实验室, 上海 200090; 2. 上海海洋大学 国家水生动植物病原库, 上海 201306)

摘要: 通过肝微粒体体外孵育实验, 研究黄芩、柴胡、连翘、吴茱萸和野菊花 5 种中药提取物对异育银鲫肝微粒体 CYP450 的影响。体外给药测定 IC_{50} 以及相关酶动力学参数, 并推测其可能的作用机制。结果显示, 5 种中药对 7-乙氧基异吩噻酮-O-脱乙基酶 (EROD) (CYP1A 标志酶) 的抑制程度为黄芩 > 连翘 > 野菊花 > 柴胡 ≈ 吴茱萸, 半抑制浓度 (IC_{50}) 依次为 0.27, 2.88, 7.62, 16.20 和 16.42 mg/mL, 酶促反应动力学常数 V_{max} 和 K_m 为 (83.33 ± 11.32) pmol/(min · mg) 和 (3.05 ± 0.89) μ mol/L。据此计算黄芩、连翘、野菊花、柴胡和吴茱萸的抑制常数分别为 0.16, 0.39, 0.61, 0.40 和 0.59 mg/mL; 黄芩、连翘和吴茱萸对红霉素-N-脱甲基酶 (ERND) (CYP3A 标志酶) 有很弱的抑制作用, IC_{50} 分别为 90.9, 70.8 和 43.5 mg/mL。柴胡和野菊花未检测到对 ERND 有抑制作用。结果表明, 这 5 种中药对 CYP 酶的影响因亚型不同而差别较大, 对 CYP1A 的抑制均较显著, 而对 CYP3A 的抑制则不明显。进一步研究它们对 CYP1A 的抑制机制, 推测黄芩、柴胡和吴茱萸对 EROD 的抑制为竞争性抑制, 野菊花和连翘则是反竞争性抑制。建议这 5 种中药与其他渔药合用时, 要注意其引起其他渔药的药动学的变化, 使疗效发生改变。

研究亮点: 通过肝微粒体体外体系, 研究了黄芩等 5 种中药提取物对异育银鲫 CYP1A 和 CYP3A 的抑制作用, 并推测出中药提取物对 CYP1A 的抑制类型; 结果提示, 当这 5 种中药与其他渔药联合使用时, 要考虑到这些中药对 CYPs 的抑制而导致联合用药的渔药相关药动学的改变, 从而引起疗效上的变化。

关键词: 中药提取物; 异育银鲫; 肝微粒体; CYP1A; CYP3A; 抑制

中图分类号: S 963.1

文献标志码: A

中药成分虽复杂, 但其单体或有效成分与化学合成药一样, 多数由细胞色素 P450 (CYPs) 参与代谢, 而且中药还能影响 CYPs, 或诱导或抑制。CYPs 的抑制或诱导可能会改变与其联合用药的药物代谢, 从而使药物的疗效降低或者产生严重的不良反应^[1]。已有研究表明, 很多中药对 CYPs 具有抑制作用^[2], 从而导致联合用药的药物代谢减缓^[3], 因此, 评价中药对 CYPs 活性的抑制效应对于临床安全用药、降低药物间相互作用的风险有重要的意义。随着人们对水产品药残的关注, 中药由于具有低毒、低污染和不易产生耐药性等优点, 在水产动物疾病防治中应用日益

受到重视, 已逐渐应用于鱼类细菌和病毒性疾病预防, 且常被推荐和化学渔药联合使用, 如黄连和诺氟沙星合用防治细菌性烂鳃病^[4], 但有关中药对水生动物 CYPs 的影响知之甚少。本试验选用我国主要淡水养殖鱼类异育银鲫为试验动物, 以在体外得到广泛的认可 EROD 和 ERND 分别作为 CYP1A 和 CYP3A 体外指示探针, 检测中药对 CYP1A 和 CYP3A 活性的影响, 旨在探讨中药对 CYPs 的影响及作用机制, 为指导水产临床配伍用药, 减少因药物相互作用而导致的药物不良反应, 发挥药物的最大疗效提供理论参考。

收稿日期: 2011-05-03

修回日期: 2012-01-05

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2007M06)

作者简介: 周常(1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物药理学。E-mail: zhou_chang_2008@163.com

通讯作者: 房文红, E-mail: whfang06@yahoo.com.cn

1 材料与amp;方法

1.1 试剂及仪器

黄芩、柴胡、连翘、吴茱萸和野菊花 5 种中药提取物为上海世恒冠公司产品,均为每 20 kg 药材抽提出 1 kg 的提取物。7-乙氧基异吩唑酮和试卤灵购自 Sigma 公司,还原性辅酶 II (NADPH) 购自上海生工生物工程技术有限公司,其余试剂(分析纯)均为国药集团上海化学试剂公司产品。其他仪器包括超速冷冻离心机(Beckman Optima L-100XP),荧光分光光度计(上海三科仪器有限公司,970CRT)。

1.2 试验动物饲养

异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*) (以下简称鲫)购自上海青浦某养殖场,暂养于实验室水族箱内,水温 26 ~ 28 °C,不间断水循环和充氧,投喂适量颗粒饲料并及时排污和清理残饵,饲养 4 周后挑选健康的个体用于试验,体重为(210 ± 21) g。

1.3 鲫肝微粒体制备和蛋白含量测定

肝微粒体制备参照 NOVI 等^[5]方法,制备的微粒体蛋白含量测定参照 BRADFORD^[6]。

1.4 EROD 和 ERND 活性测定

EROD 活性测定参照 LANGE 等^[7]方法,ERND 活性测定方法参照 TU 和 YANG^[8]。

1.5 中药提取对 CYP1A 与 CYP3A 的半抑制率(IC₅₀)测定

1.5.1 CYP1A 的 IC₅₀

在总体积为 1 mL 的体外微粒体反应体系中,中药提取物(分别为 0、0.5、1、5、10 和 100 mg/mL)、鲫肝微粒体蛋白 0.6 mg/mL、0.05 mol/L Tris-HCL (pH 7.4) 和 3 μmol/L 7-乙氧基异吩唑酮 37 °C 水浴中预孵育 2 min 后加入同样经预孵育 2 min 的 10 mmol/L 的 NADPH 启动反应,反应 5 min 后加入等体积甲醇终止反应。5 000 × g 离心 10 min,取上清液于 Ex 535 nm、Em 586 nm 测定其产物试卤灵浓度。每个样品做 3 个平行。所得数据以抑制剂浓度(mg/mL)作为横坐标,抑制率(%)作为纵坐标作图,采用 Sigmaplot 11.0 软件计算各种中药提取物的 IC₅₀。

1.5.2 CYP3A 的 IC₅₀

在总体积为 2 mL 的体外微粒体反应体系中,中药提取物(分别为 0、0.5、1、5、10 和 100

mg/mL)、鲫肝微粒体蛋白 1 mg/mL、70 mmol/L Tris-HCL (pH 7.4) (含 0.07 mmol/L EDTA) 和 5 mmol/L 红霉素 37 °C 水浴中预孵育 2 min 后加入同样经预孵育 2 min 的 10 mmol/L 的 NADPH 启动反应,反应 30 min 后加入 0.2 mL 25% ZnSO₄ 混匀,静置 2 min 后加同体积的饱和 Ba(OH)₂,5 000 × g 离心 10 min,取上清液于 412 nm 处测定吸光值。每个样品做 3 个平行。所得数据以抑制剂浓度(mg/mL)作为横坐标,抑制率(%)作为纵坐标作图,采用 Sigmaplot 11.0 软件计算各种中药提取物的 IC₅₀。

1.6 中药提取物对鲫肝微粒体药酶的抑制类型分析

将中药提取物均配制成浓度为 10 mg/mL 的母液,1 mL 反应体系(0.05 mol/L Tris-HCL, pH 7.4)中含有 0.6 mg/mL 鲫肝微粒体蛋白和不同浓度的中药提取物(黄芩、柴胡和连翘终浓度均为 0、0.5 和 1 mg/mL,吴茱萸和野菊花终浓度均为 0、1 和 5 mg/mL);在 37 °C 水浴中预孵育 2 min 后加入同样经预孵育 2 min 的 10 mmol/L 的 NADPH 启动反应,继续在 37 °C 水浴中振荡孵育 2 min,加入 7-乙氧基异吩唑酮(终浓度分别为 1、2、4 和 8 μmol/L),反应 5 min 后加入等体积甲醇终止反应。5 000 × g 离心 10 min,取上清液于 Ex 535 nm、Em 586 nm 测定其产物试卤灵浓度。每个试验重复 3 次。所得数据做 Lineweaver-Burk 图。 K_m 和 V_{max} 的计算参照 MORRIS 等^[9]和 DIXON^[10]的方法。

2 结果

2.1 中药提取物对鲫 CYP1A 和 CYP3A 抑制作用

在鲫肝微粒反应体系中,底物为 3 μmol/L,不添加中药提取物时,对照组 EROD 和 ERND 活性分别为(34.87 ± 7.65)和(2 396.78 ± 249.45) pmol/(min · mg)。以提取物浓度为横坐标,以 EROD 活性剩余百分比为纵坐标作图,不同浓度中药提取物对鲫肝微粒体 CYP1A-EROD 和 CYP3A-ERND 活性的抑制结果见图 1。可以看出,CYP1A 活性随着中药提取物药物浓度升高,肝微粒体 CYP1A-EROD 活性呈现下降趋势,5 种中药对 EROD 的抑制程度为黄芩 > 连翘 > 野菊花 > 柴胡 ≈ 吴茱萸;而 5 种中药对 CYP3A 的抑制

作用较弱,仅黄芩、连翘和吴茱萸对 ERND 有很弱的抑制作用,未检测到柴胡和野菊花的抑制作用。

用。表 1 为计算所得到的中药提取物对 CYP1A 和 CYP3A 的 IC_{50} 值。

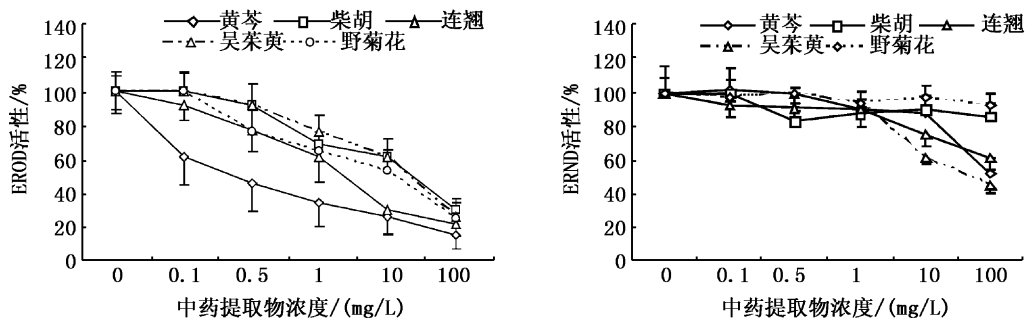


图 1 5 种中药提取物对异育银鲫肝微粒体 EROD 和 ERND 活性的影响 ($n=3$)

Fig. 1 Effects of the five herbal extracts on EROD and ERND activities of hepatic microsomes from carp ($n=3$)

表 1 中药提取物对异育银鲫肝微粒体 CYP1A 和 CYP3A 的 IC_{50}

Tab. 1 IC_{50} of herbal extracts on the CYP1A and CYP3A of hepatic microsomes from carp

中药提取物	mg/mL	
	CYP1A IC_{50}	CYP3A IC_{50}
黄芩	0.27	90.9
连翘	2.88	70.8
柴胡	16.20	-
吴茱萸	16.42	43.5
野菊花	7.62	-

注: - 表示没有影响。

2.2 中药提取物对鲫 CYP1A 抑制类型分析

以底物浓度 $1/[S]$ 作为横坐标,反应速度 $1/[V]$ 作为纵坐标,按 Lineweaver-Burk 法作图,确定提取物的抑制类型。结果见图 2,黄芩、柴胡和吴茱萸所得的曲线有一个共同焦点并且落在 $1/[V]$ 轴上,说明这 3 种中药的抑制类型为竞争性抑制;连翘和野菊花所得到的曲线为平行线,则说明是反竞争性抑制。酶促反应动力学常数 V_{max} 和 K_m 为 (83.33 ± 11.32) pmol/(min · mg) 和 (3.05 ± 0.89) μ mol/L。抑制常数 (K_i) 以中药提取物 (I) 作为横坐标,反应速度 $1/[V]$ 作为纵坐标,按 Dixon 作图求得图 3,据此计算黄芩、柴胡、连翘、吴茱萸和野菊花的抑制常数 K_i 分别为 0.16、0.40、0.39、0.59 和 0.61 mg/mL。

3 讨论

肝微粒体体外温孵法已是被广泛接受的评价对 CYPs 的抑制效应的实验方法^[11],但进行体

外抑制试验对代谢系统(本实验为肝微粒体体外反应体系)有些要求:(1) CYP 探针底物的酶动力学参数 (V_{max} 和 K_m) 一般要求这些数据在文献报道平均值的 3 倍以内^[12],在人和小鼠上,EROD 的 K_m 为 1 μ mol/L,而本实验中鲫肝微粒体 EROD 的 K_m 为 (3.05 ± 0.89) μ mol/L,基本处在 3 倍以内;(2)测定药物对 CYPs 的 IC_{50} 时,微粒体蛋白浓度一般在 0.01 ~ 1 mg/mL;(3)溶解抑制剂有机溶剂最好不超过整个反应体系体积比的 0.5%^[12];(4)在体外抑制试验开始之前,应判断此抑制剂是否为机理性抑制剂。比较权威的是 GHANBARI 等^[13] 和 GRIMM 等^[14] 报道的方法,即酶与至少 6 个浓度的抑制剂及共温孵因子孵育 30 min 后,测定 IC_{50} 值,另外测定不经失活温孵 IC_{50} 值;如果不经失活的 IC_{50} 值减少 1.5 倍以上,说明存在机理性抑制。本实验表明 5 种中药提取物对 CYP1A 的抑制不是机理性抑制。由此可见,本实验的肝微粒体体外反应体系满足评价中药对 CYPs 抑制效应的条件。

以 EROD 和 ERND 分别作为 CYP1A 和 CYP3A 体外探针得到广泛的认可^[15-16]。对于哺乳动物来说,EROD 与非那西丁、咖啡因是 CYP1A 常用的探针底物。哺乳动物 CYP1A 主要有 CYP1A1 和 CYP1A2 两种基因,两者的氨基酸序列有 30% 的差异^[17],都参与-乙氧基异吩唑酮的代谢,但只有 CYP1A2 只参与非那西丁 N-脱乙酰基反应和咖啡因 C-脱氧基反应^[18]。对于水产动物,较多研究将其作为水产动物 CYP1A 的标志酶^[19]。作为 CYP3A 的体外探针,ERND 与睾酮

6 β -羟化酶具有很高的相关性^[20],将其作为 CYP3A 探针得到的数据具有很好的一致性。所以本文分别采用 EROD 与 ERND 作为探针检测中药对 CYP1A 和 CYP3A 活性的影响,评价中药对它们的抑制效应,对预测药物在体内可能发生的代谢性相互作用和安全用药提供可靠的理论支持。

中药对 CYPs 的作用与药物剂量密切相关。

IWATA 等^[21]研究得出,31 种中药提取物对人肝微粒体 ERND 的抑制具有剂量依赖性。本实验也说明随着体外中药浓度的升高,CYP1A 和 CYP3A 的活性逐渐下降,其中黄芩的抑制作用最强,IC₅₀达到了 0.27 mg/mL。而且,同一种中药对不同 CYP450 亚型的抑制程度也不相同,本实验所研究的 5 种中药对 CYP1A 的抑制作用均远大于 CYP3A。

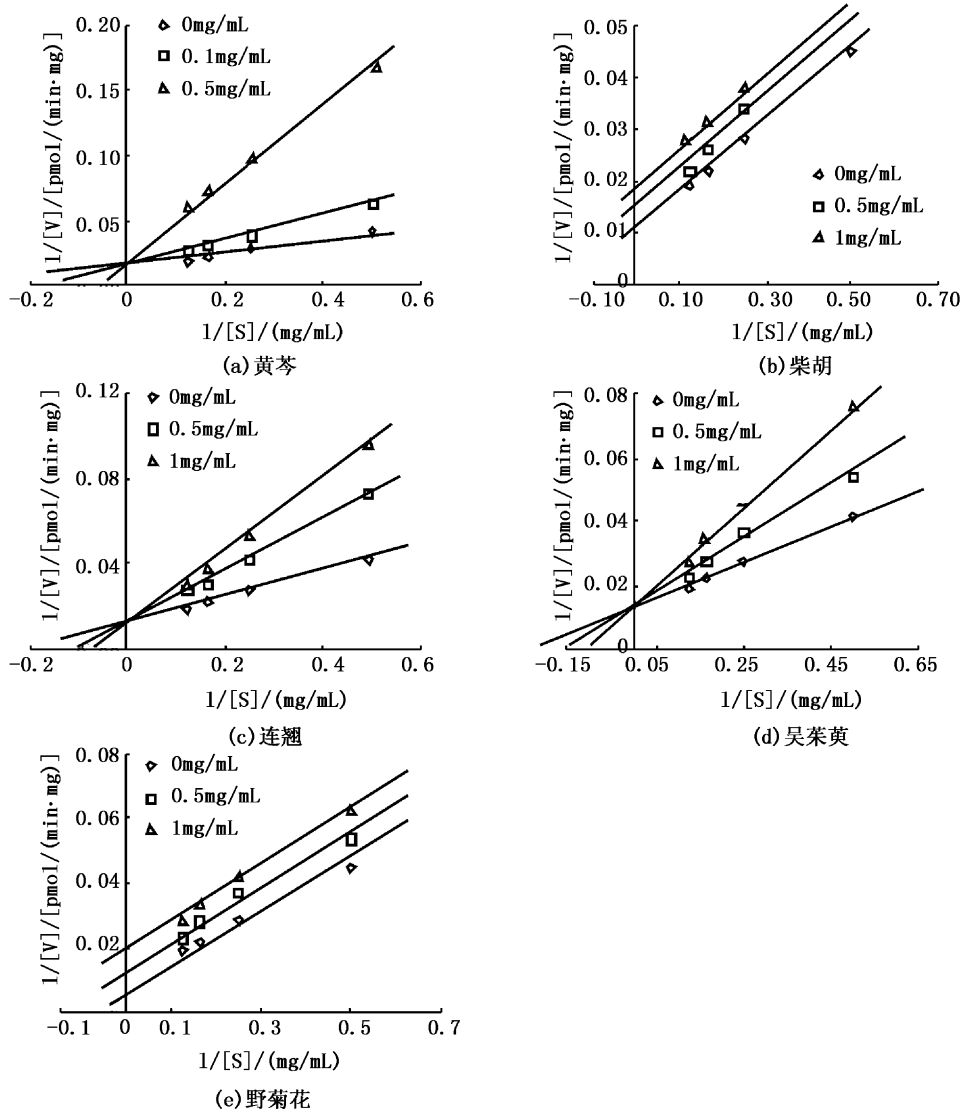


图 2 不同浓度的中药提取物下 CYP1A 的 Lineweaver-Burk 曲线图

Fig. 2 Lineweaver-Burk plots of CYP1A activity assays at different concentrations of herbal extracts

中药对 CYPs 的作用因不同物种和不同中药而有差异。对于小鼠等哺乳动物,黄芩^[22]、连翘^[23]、野菊花^[24]和吴茱萸^[25]对 CYP1A 都表现出抑制作用,在本实验中同样得到了证明。但柴胡注射液对大鼠 CYP1A2 亚型没有影响^[26],而本

试验却发现柴胡提取物在鲫肝微粒体中可以抑制 CYP1A 的活性。吴茱萸次碱对鼠肝脏 EROD 活性显示了很强的抑制作用,并且表现为非竞争性抑制;在人微粒体中,1nmol/L 的吴茱萸次碱能使 EROD 下降了 98%^[27],而在本实验中吴茱萸

对鲫肝微粒体 EROD 的抑制作用较人微粒体弱了许多,而且表现为竞争性抑制。对于 CYP3A,菊花的乙醇提取物可以抑制 CYP3A^[24],连翘^[23]、吴茱萸^[28]对人肝微粒体 CYP3A4 都有抑制作用;

而在本实验中,黄芩、连翘和吴茱萸对 ERND 抑制作用较弱,IC₅₀ 分别为 90.9,70.8 和 43.5mg/mL,柴胡和野菊花未检测到抑制作用。

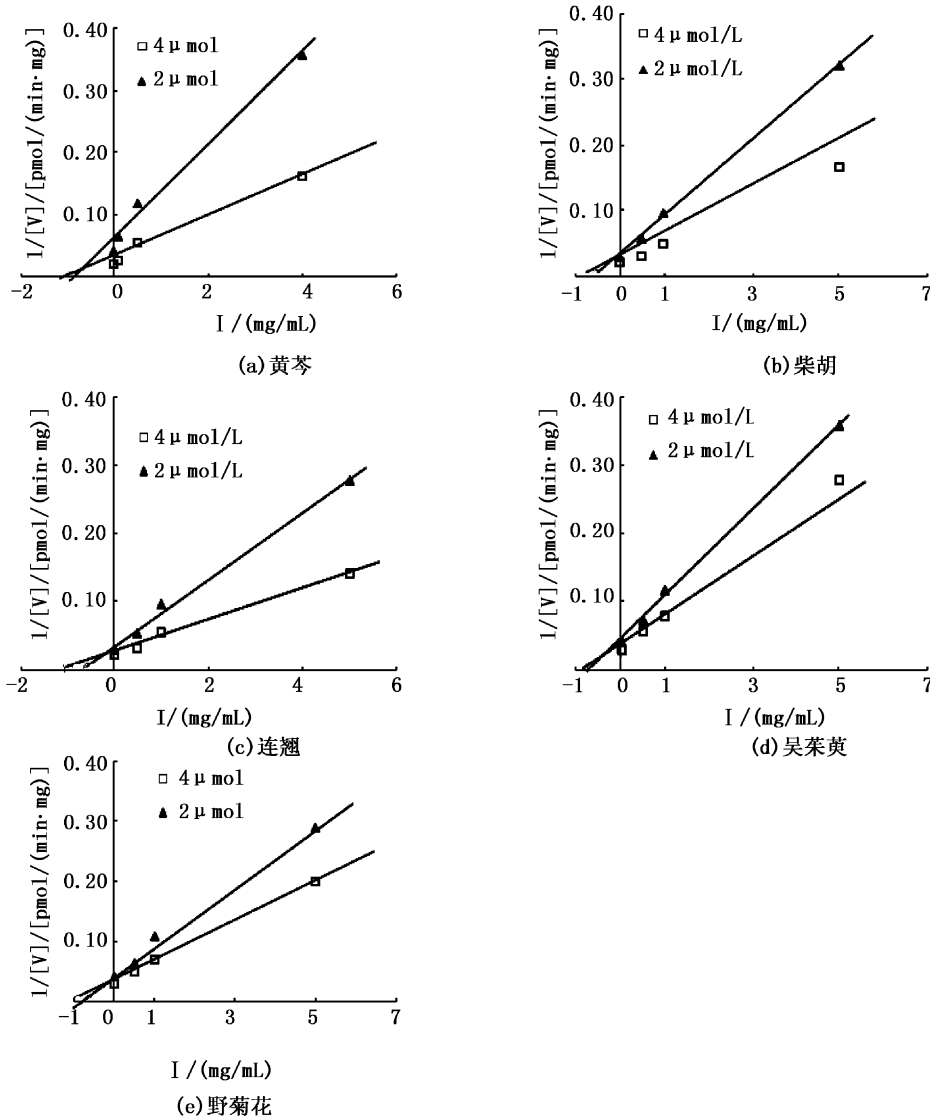


图 3 不同浓度的中药提取物下 CYP1A 的 Dixon 曲线图
Fig.3 Dixon plots of CYP1A activity assays at different concentrations of herbal extracts

中药对 CYPs 的作用因有效成分不同而有较大的区别。例如黄芩有效成分黄芩苷对小鼠肝微粒体 CYP1A 具有诱导作用,但对 CYP3A 没有影响;有效成分黄芩素能诱导小鼠肝微粒体 CYP1A,却抑制 CYP3A,而有效成分汉黄芩素对小鼠肝微粒体 CYP1A 和 CYP3A 均有抑制作用^[29]。在本实验中,黄芩提取物对鲫肝微粒体 CYP1A 和 CYP3A 均有抑制作用,推测所用黄芩提取物中的有效成分可能是汉黄芩素。中药提

取物的成分较为复杂,今后需要进一步探索中药各有效成分对水生动物 CYPs 的作用,为指导联合用药提供理论指导。

参考文献:

- [1] MEYER U A. Overview of enzymes of drug metabolism[J]. Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, 1996, 24 (5):449-459.
- [2] HOKKANEN J, TOLONEN A, MATTILA S, et al. Metabolism of hyperforin, the active constituent of St. John's wort, in

- human liver microsomes [J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011, 42(3) :273 – 284.
- [3] 黄果,李凯鹏,杨洁,等. 吴茱萸成分在大鼠肝微粒体对盐酸小檗碱代谢的影响[J]. *中国药理学杂志*, 2010, 45(20) : 1544 – 1548.
- [4] 杨先乐. *新编渔药手册* [M]. 北京: 中国农业出版社, 2005:317 – 319.
- [5] NOVI S, PRETTI C, COGNETTI A M, et al. Biotransformation enzymes and their induction by β -naphthoflavone in adult sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 1998, 41(1/2) :63 – 81.
- [6] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2) :248 – 254.
- [7] LANGE U, GOKSOYR A, SIEBERS D, et al. Cytochrome P450 1A-dependent enzyme activities in the liver of dab (*Limanda limanda*): kinetics, seasonal changes and detection limits [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 1999, 123(4) :361 – 371.
- [8] TU Y Y, YANG C S. High-affinity nitrosamine dealkylase system in rat liver microsomes and its induction by fasting [J]. *Cancer Research*, 1983, 43(2) :623 – 629.
- [9] MORRIS M T, COPPIN A, TOMAVO S, et al. Functional analysis of *Toxoplasma gondii* protease inhibitor [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(47) : 45259 – 45266.
- [10] DIXON M. The determination of enzyme inhibitor constants [J]. *Biochemical Journal*, 1953, 55(1) :170 – 171.
- [11] CARR J L, TINGLE M D, MCKEAGE M J. Satraplatin activation by haemoglobin, cytochrome C and liver microsomes in vitro [J]. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 2006, 57(4) : 483 – 490.
- [12] 曾苏. *药物代谢学* [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2008: 337 – 356.
- [13] GHANBARI F, ROWLAND Y K, BLOOMER J C, et al. A critical evaluation of the experimental design of studies of mechanism based enzyme inhibition, with implications for in vitro-in vivo extrapolation [J]. *Current Drug Metabolism*, 2006, 7(3) :315 – 334.
- [14] GRIMM S W, EINOLF H J, HALL S D, et al. The conduct of in vitro studies to address time-dependent inhibition of drug-metabolizing enzymes: a perspective of the pharmaceutical research and manufacturers of America [J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 2009, 37(7) :1355 – 1370.
- [15] MONARI M, FOSCHI J, MATOZZO V. Investigation of EROD, CYP1A immunopositive proteins and SOD in haemocytes of *Chamelea gallina* and their role in response to B[a]P [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2009, 149(3) :382 – 392.
- [16] PAOLINI M, BIAGI G L, CANTELLI F G. The many consequences of chemical-and genetic-based modulation of drug metabolizing enzyme activities [J]. *Life Sciences*, 1999, 65(8) :75 – 79.
- [17] HEILMANN L J, SHEEN Y Y, BIGELOW S W, et al. Trout P4501A1: cDNA and deduced protein sequence, expression in liver and evolutionary significance [J]. *DNA*, 1998, 7: 379 – 387.
- [18] RENDIC S, DI CARLO F J. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors [J]. *Drug Metabolism Reviews*, 1997, 29(1/2) :413 – 580.
- [19] JÖNSSON M E, BRUNSTRÖN, BRANDT I. The zebrafish gill model: Induction of CYP1A, EROD and PAH adduct formation [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 91(1) :62 – 70.
- [20] FUKUDA K, OHTA T, OSHIMA Y, et al. Specific CYP3A4 inhibitors in grapefruit juice: furocoumarin dimers as components of drug interaction [J]. *Pharmacogenetics*, 1997, 7(5) :391 – 396.
- [21] IWATA H, TEZUKA Y, USIA T, et al. Inhibition of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2D6 by extracts from 78 herbal medicines [J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2004, 21(1) :42 – 50.
- [22] KIM B R, KIM D H, PARK R, et al. Effect of an extract of the root of *Scutellaria baicalensis* and its flavonoids on aflatoxin B₁ oxidizing cytochrome P450 enzymes [J]. *Planta Medica*, 2001, 67(5) :396 – 399.
- [23] 闫淑莲, 扈金萍, 徐艳霞, 等. “Cocktail” 探针药物同时评价连翘对肝细胞色素 P450 的影响 [J]. *中国药理学杂志*, 2003, 38(10) :761 – 763.
- [24] 侯佩玲, 乔晋萍, 张瑞萍, 等. 菊花提取物对大鼠肝微粒体细胞色素 P450 的影响 [J]. *中医学报*, 2003, 31(3) : 447 – 450.
- [25] UENG Y F, WANG J J, LIN L C, et al. Induction of cytochrome p450-dependent monooxygenase in mouse liver and kidney by rutaecarpine, an alkaloid of the herbal drug *Evodia rutaecarpa* [J]. *Life Sciences*, 2001, 70(2) :207 – 217.
- [26] 王晶, 余辉艳, 郭蕾, 等. 柴胡注射液对大鼠细胞色素 P450 各亚型活性的影响 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2007, 12(9) :1037 – 1041.
- [27] UENG Y F, JAN W C, LIN L C, et al. The alkaloid rutaecarpine is a selective inhibitor of cytochrome P450 1A in mouse and human liver microsomes [J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 2002, 30(3) :349 – 353.
- [28] SANG K L, JUNG H L, HYE H Y, et al. Characterization of human liver cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of rutaecarpine [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 41(1) :304 – 309.
- [29] IWATA H, TEZUKA Y, KADOTA Y, et al. Metabolism-dependent inhibition of CYP3A4 and CYP2D6 by extracts from 26 herbal medicines [J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2004, 21(6) :281 – 286.

Inhibition of Chinese herbal extracts on CYP1A and CYP3A of liver microsomes from crucian carp (*Carassius auratus gibelio*)

ZHOU Chang^{1,2}, ZHOU Shuai¹, FANG Wen-hong¹, LI Guo-lie¹, YANG Xian-le², LI Xin-cang¹, HU Lin-lin¹

(1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries Resources and Ecology, Ministry of Agriculture, Shanghai 200090, China; 2. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: This study focused on the inhibition of five kinds of Chinese herbal extracts (Scutellaria, Forsythia, Bupleurum, Evodia and Chrysanthemum) on CYP1A and CYP3A of crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) liver microsomes. IC_{50} and kinetic parameters of enzymatic reaction were determined in vitro and the inhibition mechanism was speculated. The results showed that the level of inhibition of five kinds of Chinese herb extracts on CYP1A was Scutellaria > Forsythia > Chrysanthemum > Bupleurum \approx Evodia; the IC_{50} were 0.27, 2.88, 7.62, 16.20 and 16.42 mg/mL, and the inhibition constants (K_i) were 0.13, 0.38, 3.39, 1.74 and 70 mg/mL respectively. The kinetic parameters of enzymatic reaction, V_{max} and K_m were (83.33 ± 11.32) pmol/(min · mg) and (3.05 ± 0.89) μ mol/L, respectively. Scutellaria, Forsythia and Bupleuru had a weak inhibition on CYP3A activity with the IC_{50} of 90.9, 70.8 and 43.5 mg/mL, respectively. No inhibition was observed for Chrysanthemum and Bupleurum on CYP3A. Furthermore, it was speculated that Scutellaria, Chrysanthemum and Bupleurum were competitive inhibitors, while Evodia and Forsythia were uncompetitive inhibitors. In this study, inhibition of five Chinese herbs on the CYP450 enzymes varied greatly due to different subtypes and it showed that the inhibition on CYP1A was significant but no significant inhibition on CYP3A. It suggested that the inhibition of CYP450 isoenzyme by herb extracts might lead to increase plasma levels and change the pharmacokinetics of drug metabolized by these isoenzymes, therefore, more care is needed when using the co-administered prescription drugs.

Key words: Chinese herbal extracts; crucian carp; liver microsome; CYP1A; CYP3A; inhibition