

## 五酯片提取物对人 CYP3A4 及 CYP3A5 重组酶活性的抑制作用及其机制

覃小玲<sup>1</sup>, 段文海<sup>1</sup>, 李嘉丽<sup>2</sup>, 黄 民<sup>2</sup>, 毕惠嫦<sup>3\*</sup>

(1. 广东食品药品职业学院, 广东 广州 510520; 2. 中山大学药学院, 广东 广州 510006;  
3. 南方医科大学药学院, 广东 广州 510515)

**摘要:** 五酯片是临床上常用的护肝中药单方制剂, 常被用来治疗各种原因引起的肝损伤。前期研究表明五酯片可通过抑制 CYP3A 从而升高移植患者、大鼠体内他克莫司、环孢素、紫杉醇等药物的血药浓度。CYP3A4 和 CYP3A5 是 CYP3A 的两种重要亚型, 但它们在催化活性及对抑制剂敏感性上表现不同。对 CYP3A4 和 CYP3A5 抑制作用的差异可能会导致不同的药物相互作用, 这种相互作用的风险在体内可能会被进一步放大。可见, 研究五酯片对 CYP3A4 及 CYP3A5 活性抑制作用的异同具有较好的临床治疗学及经济学意义。然而, 目前尚未见五酯片对 CYP3A4 及 CYP3A5 活性的抑制作用及作用机制的相关研究。因此, 本研究利用人重组 CYP3A4 (recombinant human CYP3A4, rhCYP3A4)、人重组 CYP3A5 (recombinant human CYP3A5, rhCYP3A5) 考察五酯片提取物对 CYP3A4、CYP3A5 活性的影响及作用特征、机制。结果表明, 五酯片提取物对 CYP3A4、CYP3A5 活性的抑制作用存在 NADPH、孵育时间及浓度依赖性; 其与 CYP3A4 及 CYP3A5 的结合比较牢固, 不能通过透析来消除; 其对 CYP3A5 的抑制作用稍强于其对 CYP3A4 的抑制作用。因此, 临床上合用五酯片时, 要警惕由此引起的中西药药物相互作用。

**关键词:** 五酯片; 华中五味子; CYP3A4; CYP3A5; 中西药药物相互作用

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)08-2453-08

## Mechanistic understanding of the inhibitory effect of cytochrome P450 3A4 and 3A5 by Wuzhi tablet (*Schisandra sphenanthera* extract)

QIN Xiao-ling<sup>1</sup>, DUAN Wen-hai<sup>1</sup>, LI Jia-li<sup>2</sup>, HUANG Min<sup>2</sup>, BI Hui-chang<sup>3\*</sup>

(1. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

**Abstract:** Wuzhi tablet (WZ) is a prescribed herbal medicine extracted from *Schisandra sphenanthera*, which is widely used to protect the liver injury and drug-induced hepatotoxicity in clinical practices. Previous studies showed that WZ significantly increased the blood concentrations of tacrolimus, cyclosporine A, paclitaxel by inhibiting the cytochrome P450 3A (CYP3A)-mediated metabolism. CYP3A4 and CYP3A5 are the most important isoenzymes among the CYP3A subfamily. However, there are some differences in the catalytic and inhibitory activities between CYP3A4 and CYP3A5, which may lead to different risk of drug-drug and herb-drug interactions, and the risks may be further amplified *in vivo*. Currently, few reports have compared the herbal medicine

收稿日期: 2022-05-26; 修回日期: 2022-06-18.

基金项目: 广东省中医药局科研项目 (20221283); 广东省普通高校特色创新类项目 (2021KTSCX243); 广东食品药品职业学院自然科学项目 (2021ZR01).

\*通讯作者 Tel: 86-20-61648530, E-mail: bihchang@smu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0651

inhibitory effects between CYP3A4 and CYP3A5 mediated metabolic reactions. Therefore, detailing the inhibitory effect of WZ on CYP3A4 and CYP3A5 will help understand and predict the potential herb-drug interaction. The results showed that WZ inhibited CYP3A4 and CYP3A5 in a NADPH-, time- and concentration- dependent manner. WZ showed more potent inhibition on CYP3A5 than CYP3A4. Cautions warranted when combining WZ with other therapeutic drugs to avoid the potential herb-drug interaction.

**Key words:** Wuzhi tablet; *Schisandra sphenanthera*; CYP3A4; CYP3A5; herb-drug interaction

为了降低药物的毒性和提高药物的疗效, 中草药常被用来与化学药物(西药)同时使用。然而, 中草药和西药的联合使用可能会产生中草药-西药药物相互作用(herb-drug interaction), 导致严重的不良事件。细胞色素 P450 3A (cytochrome P450 3A, CYP3A) 是最重要的药物代谢酶, 参与市场上大概 60% 治疗药物的代谢<sup>[1-3]</sup>。CYP3A4、CYP3A5 是 CYP3A 家族最重要的两个亚型。由于在人体肝脏含量最多, CYP3A4 被认为是人的肝脏和肠道最重要的代谢酶; 而 CYP3A5 在人体中呈多态性表达, 在 1/3 的白种人和 1/2 的非裔美国人中贡献高达 50% 的肝脏 CYP3A 代谢<sup>[4]</sup>。尽管 CYP3A4 和 CYP3A5 的氨基酸序列同源性高达 83%、底物重叠性非常高<sup>[5]</sup>, 但是两种亚型在催化活性及对抑制剂敏感性上表现不同<sup>[5,6]</sup>。对于大多数药物, CYP3A4 的催化活性往往比 CYP3A5 高<sup>[6]</sup>。然而, CYP3A5 对于一些常用的治疗窗较窄的药物如抗肿瘤药长春新碱和免疫抑制剂他克莫司的清除或代谢的贡献要高于 CYP3A4<sup>[7,8]</sup>。可见, 对 CYP3A4 及 CYP3A5 抑制作用的差异可能会导致不同的药物相互作用, 这种相互作用的风险在体内可能会被进一步放大。目前, 很少有关于中草药对 CYP3A4 及 CYP3A5 介导的代谢反应抑制作用差异的研究。因此, 对比中草药对 CYP3A4 及 CYP3A5 的抑制作用的异同可以帮助理解及预测不良的药物相互作用。

五酯片是华中五味子 (*Schisandra sphenanthera*) 的乙醇提取物单方制剂 (国药准字 Z20025766), 主要活性成分为木脂素类化合物, 包括五味子甲素 (schisandrin A)、五味子乙素 (schisandrin B)、五味子丙素 (schisandrin C)、五味子醇甲 (schisandrol A)、五味子醇乙 (schisandrol B)、五味子酯甲 (schisantherin A) 等<sup>[9]</sup>, 具有抗肝细胞损伤、改善肝细胞代谢的作用, 常用于辅助治疗各种类型肝损伤<sup>[9,10]</sup>, 包括用于防治解热镇痛药对乙酰氨基酚或免疫抑制剂他克莫司所致肝损害<sup>[11-14]</sup>。本课题组之前利用 HPLC 测定了五酯片的指纹图谱, 并利用 HPLC-MS/MS 测定了片剂中木脂素各成分的含量<sup>[15]</sup>。本课题组及其他课题组之前的研究表明五味子单方制剂如五酯片及其木脂素活性成分可通过抑制 CYP3A 的活性从而使肾移植患者或大鼠体内

CYP3A 底物-他克莫司、环孢素、紫杉醇等的血药浓度显著升高<sup>[12,13,16-21]</sup>。此外, 有不少文献<sup>[22,23]</sup>报道五味子提取物及其木脂素活性成分可以抑制体外 CYP3A 的活性。日本学者 Iwata 等<sup>[22]</sup>和韩国学者 Seo 等<sup>[23]</sup>均报道五味子酯甲、五味子醇乙及 gomisins B、gomisins G、gomisins N 可不同程度抑制人肝微粒体 CYP3A 活性, 五味子酯甲、五味子醇乙对 CYP3A 活性的抑制作用呈时间和浓度依赖性, 但这些研究均未区分五味子各活性成分对 CYP3A4 及 CYP3A5 活性作用的异同。我国学者<sup>[24]</sup>报道五味子酯甲及 gomisins G 可显著抑制 CYP3A4 及 CYP3A5 中咪达唑仑的代谢, 五味子酯甲对 CYP3A4 的抑制作用比 CYP3A5 强; 而 gomisins G 则相反, 其对 CYP3A4 的抑制作用比 CYP3A5 弱。可见, 不同的五味子活性成分对 CYP3A4 及 CYP3A5 的抑制作用存在差异, 仅仅考察五味子某一成分对 CYP3A4 及 CYP3A5 抑制作用的差异很难准确地反映临床上五味子制剂对 CYP3A4 及 CYP3A5 抑制作用的差异, 对于预测含五味子制剂-西药药物间相互作用的准确度亦有限。

五酯片是目前国内临床上经常使用的护肝中药, 是五味子乙醇提取物单方制剂, 成分相对简单, 且已被准确定量; 研究五酯片对 CYP3A4 及 CYP3A5 活性的抑制作用及其特征的异同更具临床治疗学及经济学意义。然而, 目前尚未见五酯片对 CYP3A4 及 CYP3A5 活性的抑制作用及作用机制的相关研究。因此, 本研究利用 CYP3A 经典底物咪达唑仑 (midazolam, MDZ), 以咪达唑仑的代谢物 1-羟基咪达唑仑 (1-OH MDZ) 的生成速率表示 CYP3A 的酶活性, 考察五酯片提取物对人重组 CYP3A4 (recombinant human CYP3A4, rhCYP3A4)、人重组 CYP3A5 (recombinant human CYP3A5, rhCYP3A5) 酶活性的影响及作用特征、机制。

## 材料与方法

**药品与试剂** 五酯片 (广西方略药业有限公司, 批号: 091026); 酮康唑及还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH, Sigma-Aldrich 公司); 咪达唑仑 (midazolam,

MDZ, 99%, IL Co., San Bruno, USA, Lot No. 750149); 1'-羟基咪达唑仑 (1-hydroxyl midazolam, 1-OH MDZ, 98%, IL Co., San Bruno, USA, Lot No. 472031); 磷酸二氢钾 (批号: 20100401-1)、磷酸氢二钾 (批号: 20101202-1) 及氯化镁 (批号: 20110201-1) 均购自广州化学试剂厂; 叔丁基甲醚、二氯甲烷等均购自美国TEDIA试剂公司; 色谱分析实验中所用试剂均为色谱纯。透析袋购自北京鼎国生物技术有限公司 (截留分子量: 8 000~14 000 kD, D36 mm)。

**五酯片提取物配制** 五酯片提取物按照本课题组的方法<sup>[13]</sup>提取。具体操作如下: 取五酯片数片置研钵中研细, 称取一定量的五酯片粉末, 加100倍量的无水乙醇 ( $w:v = g:mL$ ) 混匀后超声60 min, 3 500 g离心10 min, 取上清液。残渣加100倍量的无水乙醇混匀后超声60 min, 3 500 g离心10 min, 取上清液。合并2次上清液, 真空干燥器中干燥。残留物加入二甲基亚砜(DMSO)溶解, 配成浓度为 $0.4 g \cdot mL^{-1}$  (含五味子酯甲 $20 mmol \cdot L^{-1}$ ) 的五酯片提取物储备液,  $-80^{\circ}C$ 保存。

**仪器设备** SHA-C型恒温水浴振荡器 (金坛市富华仪器有限公司); 5417-R低温高速离心机 (德国Eppendorf公司); Surveyor高效液相-质谱联用仪 (美国Finnigan公司)。

**孵育体系** 孵育体系总体积200  $\mu L$ , 反应体系中包含NADPH ( $1 mmol \cdot L^{-1}$ ), rhCYP3A4 ( $12.5 pmol \cdot mL^{-1}$ , BD Biosciences, 美国) 及 rhCYP3A5 ( $12.5 pmol \cdot mL^{-1}$ , BD Biosciences, 美国), 磷酸盐缓冲液 ( $0.1 mol \cdot L^{-1}$ , pH 7.4) 及咪达唑仑。咪达唑仑用适量的DMSO配制成浓度为 $20 mmol \cdot L^{-1}$ 的母液, 五酯片提取物母液见“五酯片提取物配制”项所示; 反应体系中有有机溶剂的含量小于0.5%。反应在 $37^{\circ}C$ 水浴中进行, 预孵育5 min, 加入NADPH或咪达唑仑启动反应, 反应后加冰叔丁基甲醚-二氯甲烷 (3:1) 1 mL终止反应。按已建立的咪达唑仑的LC-MS/MS方法<sup>[25]</sup>, 将样本处理后进样分析。以咪达唑仑的代谢物1-羟基咪达唑仑的生成速率表示CYP3A的酶活性。

**五酯片提取物对 rhCYP3A4 及 rhCYP3A5 活性的抑制作用** 首先考察五酯片提取物对 rhCYP3A4 及 rhCYP3A5 活性抑制作用, 初步确定五酯片提取物是否为CYP3A强抑制剂。具体操作如下: 取 rhCYP3A4 ( $12.5 pmol \cdot mL^{-1}$ ) 或 rhCYP3A5 ( $12.5 pmol \cdot mL^{-1}$ ), 加入2、20、200  $\mu g \cdot mL^{-1}$  的五酯片提取物 (分别含0.1、1、10  $\mu mol \cdot L^{-1}$  五味子酯甲) 及20  $\mu L$  咪达唑仑 (终浓度为5  $\mu mol \cdot L^{-1}$ ), 阴性对照用等量的溶剂代替。上述孵育体系在 $37^{\circ}C$ 水浴中预孵5 min, 加入NADPH (终浓度 $1 mmol \cdot L^{-1}$ ) 启动反应。继续孵育5 min后, 加入冰叔

丁基甲醚-二氯甲烷 (3:1) 1 mL终止反应。按已建立的咪达唑仑的LC-MS/MS方法<sup>[25]</sup>, 将样本处理后进样分析。以咪达唑仑的代谢产物1-羟基咪达唑仑的生成速率表示CYP3A的酶活性。

### 五酯片提取物对 rhCYP3A4 及 rhCYP3A5 活性的作用特征及机制

**NADPH 依赖性实验** 为了阐明五酯片提取物对CYP3A活性的抑制特征, 考察其对CYP3A活性的抑制作用是否存在NADPH依赖性, 设计了以下两组实验。一组只加五酯片提取物但不加NADPH预孵育, 具体操作如下: 分别取 rhCYP3A4 ( $12.5 pmol \cdot mL^{-1}$ ) 或 rhCYP3A5 ( $12.5 pmol \cdot mL^{-1}$ ), 加入10  $\mu L$  系列浓度的五酯片提取物 (终质量浓度0.625、1.25、2.5、5、10、20  $\mu g \cdot mL^{-1}$ ) 或酮康唑 (CYP3A可逆性抑制剂, 终浓度0.625、1.25、2.5、5、10  $\mu mol \cdot L^{-1}$ )、20  $\mu L$  咪达唑仑 (终浓度5  $\mu mol \cdot L^{-1}$ ),  $37^{\circ}C$  预孵育5 min后, 加入NADPH (终浓度 $1 mmol \cdot L^{-1}$ ) 启动反应。另一组实验则是加入NADPH与五酯片提取物共同预孵育, 具体操作如下: 分别取 rhCYP3A4 ( $12.5 pmol \cdot mL^{-1}$ ) 或 rhCYP3A5 ( $12.5 pmol \cdot mL^{-1}$ ), 加入10  $\mu L$  系列浓度的五酯片提取物 (终质量浓度分别为0.625、1.25、2.5、5、10、20  $\mu g \cdot mL^{-1}$ ) 或酮康唑 (终浓度分别为0.625、1.25、2.5、5、10  $\mu mol \cdot L^{-1}$ ) 及20  $\mu L$  NADPH (终浓度 $1 mmol \cdot L^{-1}$ ),  $37^{\circ}C$  预孵育5 min后, 加入20  $\mu L$  咪达唑仑 (终浓度5  $\mu mol \cdot L^{-1}$ ) 启动反应。上述体系于 $37^{\circ}C$ 水浴箱中孵育5 min后, 加入冰叔丁基甲醚-二氯甲烷 (3:1) 1 mL终止反应, 按已建立好的生物样本中咪达唑仑的LC-MS/MS方法<sup>[25]</sup>, 将样品处理后进样分析。通过GraphPad Prism 5.0软件sigmoidal dose-response模式, 计算出五酯片提取物对CYP3A4及CYP3A5的 $IC_{50}$ 值。对比加NADPH预孵育组 (+NADPH) 及未加NADPH预孵育组 (-NADPH) 的 $IC_{50}$ 值, 阐明五酯片提取物对CYP3A4及CYP3A5活性的抑制作用是否存在NADPH依赖性。

**时间及浓度依赖性实验 (抑制动力学参数)** 为了考察五酯片提取物对于CYP3A活性的抑制作用是否为时间和浓度依赖性, 设计了以下实验。分别取 rhCYP3A4 ( $12.5 pmol \cdot mL^{-1}$ ) 或 rhCYP3A5 ( $12.5 pmol \cdot mL^{-1}$ ), 加入10  $\mu L$  系列浓度的五酯片提取物 (终质量浓度0.625、1.25、2.5、5、10、20  $\mu g \cdot mL^{-1}$ ) 或酮康唑 (终浓度分别为0.625、1.25、2.5、5、10  $\mu mol \cdot L^{-1}$ ) 及20  $\mu L$  NADPH (终浓度 $1 mmol \cdot L^{-1}$ )。分别在 $37^{\circ}C$ 预孵育0.5、15、30 min后, 加入20  $\mu L$  咪达唑仑 (终浓度5  $\mu mol \cdot L^{-1}$ ) 启动反应。 $37^{\circ}C$ 水浴箱中孵育5 min后, 加入冰叔丁基甲醚-二氯甲烷 (3:1) 1 mL终止反应, 按已建立好的生物样本中咪达唑仑的LC-MS/MS方法<sup>[25]</sup>, 将样品处理后进样分

析, 计算五酯片提取物对 CYP3A4 及 CYP3A5 活性的抑制动力学参数。

抑制动力学参数计算按照 Waley<sup>[26]</sup> 及 Silverman<sup>[27]</sup> 的方法, 参数包括导致酶失活为最高酶失活率一半时的抑制剂浓度 ( $K_i$ )、最大失活速率常数 ( $k_{\text{inact}}$ )、酶失活最初速率常数 ( $k_{\text{obs}}$ ) 和酶分子一半失活所需时间 ( $t_{1/2}$ )。其中  $k_{\text{obs}}$  为不同预孵育时间点的“剩余酶活性”对数值之差与预孵育时间进行线性回归所得方程的斜率。由方程  $k_{\text{obs}} = k_{\text{inact}}[I]/(K_i + [I])$  计算其他参数, 其中  $[I]$  代表抑制剂的最初浓度。酶分子一半失活所需时间  $t_{1/2} = \ln 2/k_{\text{inact}}$ 。

**透析实验** 通过考察经五酯片提取物预处理过的 rhCYP3A4 及 rhCYP3A5 在透析前后 CYP3A 酶活性的变化来考察五酯片提取物与 CYP3A 酶结合是否可逆、是否牢固。实验具体操作: 取 1 mL 的 rhCYP3A4 ( $12.5 \text{ pmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 或 rhCYP3A5 ( $12.5 \text{ pmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 数份, 分别加入五酯片提取物 (终浓度  $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 或酮康唑 ( $2 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 或同体积的溶剂 ( $n = 4$ ), 加入 NADPH (终浓度  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 置  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴箱中预孵育 15 min。之后, 将上述各处理组的孵育样品平均分成两组, 并进行以下处理: 将其中一组 rhCYP3A4 或 rhCYP3A5 孵育液按每管  $200 \text{ }\mu\text{L}$  转移至  $1.5 \text{ mL}$  EP 管中, 每管分别加入  $10 \text{ }\mu\text{L}$  咪达唑仑 (终浓度  $5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 继续孵育 5 min 后, 加入冰叔丁基甲醚-二氯甲烷 (3:1)  $1 \text{ mL}$  终止反应, 以测定透析前 rhCYP3A4 及 rhCYP3A5 活性。将另一组 rhCYP3A4 或 rhCYP3A5 孵育液转移至透析袋中, 用透析袋专用夹子将透析袋夹紧后放入装有  $2 \text{ L}$  磷酸盐缓冲液的玻璃烧杯中,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  下轻轻搅拌, 每 5~6 h 更换新的磷酸盐缓冲液一次。16 h 后, 将透析后的 rhCYP3A4 及 rhCYP3A5 按每管  $200 \text{ }\mu\text{L}$  转移至  $1.5 \text{ mL}$  EP 管中, 每管分别加入  $10 \text{ }\mu\text{L}$  咪达唑仑 (终浓度  $5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴箱中预孵育 5 min, 加入  $20 \text{ }\mu\text{L}$  NADPH (终浓度  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 启动反应, 继续孵育 5 min 后, 加入冰叔丁基甲醚-二氯甲烷 (3:1)  $1 \text{ mL}$  终止反应。重复上述实验。孵育液按已建立好的生物样本中咪达唑仑的 LC-MS/MS 方法<sup>[25]</sup>, 将样品处理后进样分析。对比透析前和透析后各处理组 1-羟基咪达唑仑的生成率, 以考察各处理组透析前后 CYP3A 的活性的变化。

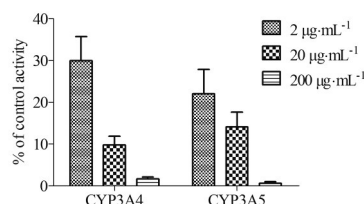
**Table 1** NADPH-dependent inhibition of midazolam 1-hydroxylation of WZ extract and ketoconazole with or without NADPH pretreatment in rhCYP3A4 or rhCYP3A5. Data are expressed as  $\text{IC}_{50} \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for WZ extract and  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for ketoconazole.  $n = 4$

Treatment	CYP3A4		CYP3A5		Ratio (3A4/3A5)	
	-NADPH	+NADPH	-NADPH	+NADPH	-NADPH	+NADPH
WZ extract	5.2	2.4	3.8	1.9	1.37	1.24
Ketoconazole	0.98	1.16	1.91	1.85	0.51	0.63

## 结果

### 1 五酯片提取物对 rhCYP3A4 及 rhCYP3A5 活性的抑制作用

采用五酯片提取物对咪达唑仑的代谢物 1-羟基咪达唑仑的生成速率的抑制程度来表示其对 rhCYP3A4、rhCYP3A5 酶活性的抑制作用强弱, 结果见图 1。 $2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的五酯片提取物对 rhCYP3A4、rhCYP3A5 组酶活性有很强的抑制作用, 五酯片提取物浓度越高, 其对 rhCYP3A4、rhCYP3A5 酶活性的抑制作用越强。



**Figure 1** Inhibitory effect of Wuzhi tablet extract (WZ extract) on recombinant human CYP3A4 (rhCYP3A4) or recombinant human CYP3A5 (rhCYP3A5) midazolam 1-hydroxylation activity. The concentration of rhCYP3A4 or rhCYP3A5 was  $12.5 \text{ pmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The rhCYP3A4 or rhCYP3A5 was incubated for 5 min at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  in the presence of midazolam ( $5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and different concentrations of WZ extract ( $2, 20, 200 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).  $n = 4, \bar{x} \pm s$

### 2 五酯片提取物对 rhCYP3A4 及 rhCYP3A5 活性的作用特征及机制

**2.1 NADPH 依赖性实验** 结果表明 (表 1): 加入 NADPH 预孵育后, 五酯片提取物对 rhCYP3A4 的  $\text{IC}_{50}$  从  $5.2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  下降至  $2.4 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 而酮康唑对 rhCYP3A4 的  $\text{IC}_{50}$  分别为  $0.98$  和  $1.16 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。同样的, 加入 NADPH 预孵育后, 五酯片提取物对 rhCYP3A5 的  $\text{IC}_{50}$  从  $3.8 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  下降至  $1.9 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 而酮康唑对 rhCYP3A5 的  $\text{IC}_{50}$  分别为  $1.91$  和  $1.85 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

加入 NADPH 预孵育后, 五酯片提取物对 rhCYP3A4、rhCYP3A5 的  $\text{IC}_{50}$  值较未加 NADPH 预孵育组的  $\text{IC}_{50}$  显著降低, 而 CYP3A 的可逆性抑制剂酮康唑对 rhCYP3A4、rhCYP3A5 的  $\text{IC}_{50}$  值与未加 NADPH 预孵育组的  $\text{IC}_{50}$  相近。提示五酯片提取物对 rhCYP3A4、rhCYP3A5 活性的抑制作用存在 NADPH 依赖性, 而 CYP3A 的可逆性抑制剂酮康唑对 rhCYP3A4、rhCYP3A5 活性的抑制作用不存在 NADPH 依赖性。

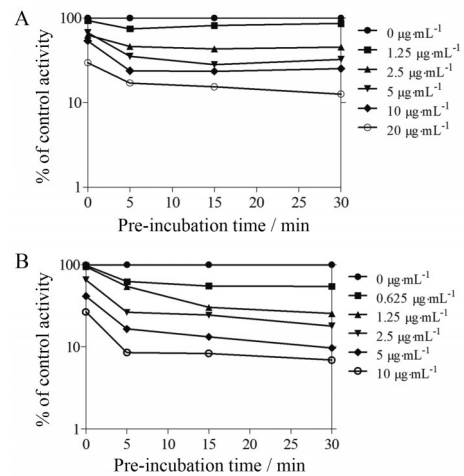
此外, 未加NADPH及加NADPH预孵育时, 五酯片提取物对CYP3A4及CYP3A5的 $IC_{50}$ 比值( $IC_{50,CYP3A4}/IC_{50,CYP3A5}$ )分别为1.37和1.24; 相应的, 酮康唑对CYP3A4及CYP3A5的 $IC_{50}$ 比值( $IC_{50,CYP3A4}/IC_{50,CYP3A5}$ )分别为0.51和0.63。结果提示, 五酯片提取物对CYP3A5的抑制作用比CYP3A4稍强, 而酮康唑则刚好相反, 其对CYP3A5的抑制作用要比CYP3A4弱。

**2.2 时间及浓度依赖性实验 (抑制动力学参数)** 五酯片提取物对rhCYP3A4及rhCYP3A5活性抑制作用的时间及浓度依赖性实验结果见表2、3及图2、3。

五酯片提取物、酮康唑在rhCYP3A4孵育体系中预孵育0、5、15、30 min后(表2, 图2), 五酯片提取物对rhCYP3A4的 $IC_{50}$ 分别为5.2、2.4、2.2、2.2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 酮康唑对rhCYP3A4的 $IC_{50}$ 分别为0.98、1.16、0.95、1.05  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。同样的, 五酯片提取物、酮康唑在rhCYP3A5孵育体系中预孵育0、5、15、30 min后, 五酯片提取物对rhCYP3A5的 $IC_{50}$ 分别为3.8、1.9、0.6、0.6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 酮康唑对rhCYP3A5的 $IC_{50}$ 分别为1.91、1.85、1.84、1.87  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。随着预孵育时间及抑制剂浓度的增加, 五酯片提取物对rhCYP3A4、rhCYP3A5活性的抑制作用愈强; 但CYP3A的可逆性抑制剂酮康唑对rhCYP3A4、rhCYP3A5活性的抑制作用并未随着预孵育时间的变化而变化。提示五酯片提取物对rhCYP3A4、rhCYP3A5活性的抑制作用呈时间及浓度依赖性, 而CYP3A的可逆性抑制剂酮康唑对rhCYP3A4、rhCYP3A5活性的抑制并不存在这种特性。

五酯片提取物对rhCYP3A4、rhCYP3A5活性的抑制动力学参数见表3、图3。结果如下: 五酯片提取物对rhCYP3A4的 $k_{\text{inact}}$ 、 $K_i$ 、 $t_{1/2}$ 分别为0.075  $3\text{ min}^{-1}$ 、3.63  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、9.20 min。而五酯片提取物对rhCYP3A5的 $k_{\text{inact}}$ 、 $K_i$ 、 $t_{1/2}$ 分别为0.101  $\text{min}^{-1}$ 、1.05  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、6.86 min。

**2.3 透析实验** 为了解五酯片提取物对rhCYP3A4、rhCYP3A5活性的抑制作用是否可逆, 本课题组进一步考察了五酯片提取物加入及未加入NADPH预孵育15 min, 在4 °C透析16 h后对rhCYP3A4、rhCYP3A5活



**Figure 2** The log of percentage of control activity versus preincubation time of WZ extract on rhCYP3A4 (A) and rhCYP3A5 (B) midazolam 1-hydroxylation activity. The rhCYP3A4 (12.5 pmol·mL<sup>-1</sup>) or rhCYP3A5 (12.5 pmol·mL<sup>-1</sup>) were preincubated with 0.5% DMSO (vehicle control) or varying concentrations of WZ extract (0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and NADPH at 37 °C for 0, 5, 15 and 30 min in 100 mmol·L<sup>-1</sup> potassium phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.05 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA. Midazolam was added after the incubation and midazolam 1-hydroxylation activity was determined. Each point represents the means of duplicate experiments.  $n = 4$

性的影响, 而CYP3A可逆性抑制剂酮康唑作为可逆性抑制剂的阳性对照, 结果见表4及图4。

透析前, 五酯片提取物、酮康唑对rhCYP3A4的活性分别相当于空白对照组的百分比(%):  $4.9 \pm 0.4$ 、 $1.8 \pm 0.3$ 。而透析后, 五酯片提取物、酮康唑对rhCYP3A4的活性分别相当于空白对照组的百分比(%):  $24.1 \pm 0.7$ 、 $89.6 \pm 3.6$ 。同样的, 透析前, 五酯片提取物、酮康唑对rhCYP3A5的活性分别相当于空白对照组的百分比(%):  $9.8 \pm 0.4$ 、 $19.3 \pm 2.3$ 。而透析后, 五酯片提取物、酮康唑对rhCYP3A5的活性分别相当于空白对照组的百分比(%):  $47.3 \pm 9.1$ 、 $95.3 \pm 14.7$ 。

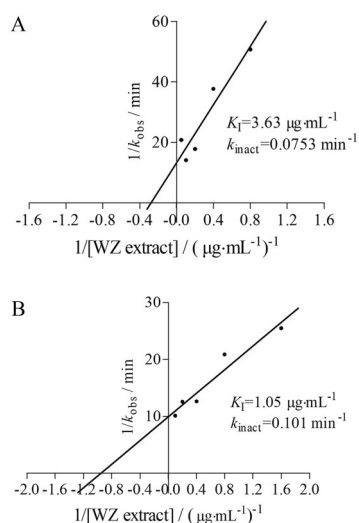
上述结果表明五酯片提取物对rhCYP3A4及rhCYP3A5的抑制作用不能通过透析完全消除; 而

**Table 2** Time- and concentration- dependent inhibition of midazolam 1-hydroxylation of WZ extract in presence of NADPH in rhCYP3A4 or rhCYP3A5. Data are expressed as  $IC_{50}$   $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  for WZ extract and  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for ketoconazole.  $n = 4$

Treatment	CYP 3A4				CYP 3A5			
	0 min	5 min	15 min	30 min	0 min	5 min	15 min	30 min
WZ extract	5.2	2.4	2.2	2.2	3.8	1.9	0.6	0.6
Ketoconazole	0.98	1.16	0.95	1.05	1.91	1.85	1.84	1.87

**Table 3** Inhibition kinetics parameters of WZ extract on midazolam 1-hydroxylation in rhCYP3A4 or rhCYP3A5.  $n = 4$

Treatment	CYP 3A4			CYP 3A5		
	$k_{\text{inact}}/\text{min}^{-1}$	$K_i/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$t_{1/2}/\text{min}$	$k_{\text{inact}}/\text{min}^{-1}$	$K_i/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$t_{1/2}/\text{min}$
WZ extract	0.0753	3.63	9.20	0.101	1.05	6.86



**Figure 3** A plot of the half-life of enzyme inactivation *versus* the inverse of WZ extract concentration on rhCYP3A4 (A) and rhCYP3A5 (B) midazolam 1-hydroxylation activity. The rhCYP3A4 (12.5 pmol·mL<sup>-1</sup>) or rhCYP3A5 (12.5 pmol·mL<sup>-1</sup>) were preincubated with 0.5% DMSO (vehicle control) or varying concentrations of WZ extract (0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μg·mL<sup>-1</sup>) and NADPH at 37 °C for 0, 5, 15 and 30 min in 100 mmol·L<sup>-1</sup> potassium phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.05 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA. Midazolam was added after the incubation and midazolam 1-hydroxylation activity was determined. Each point represents the means of duplicate experiments, *n* = 4

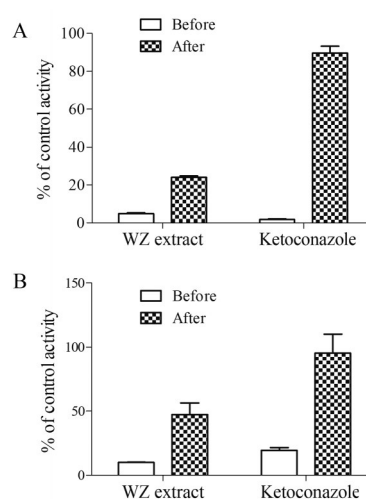
**Table 4** The inhibition of rhCYP3A4 or rhCYP3A5 midazolam 1-hydroxylation activity by WZ extract (10 μg·mL<sup>-1</sup> containing 0.5 μmol·L<sup>-1</sup> schisantherin A) and ketoconazole (2 μmol·L<sup>-1</sup>) before and after dialysis for 16 h. Data is expressed as % of control activity. *n* = 4,  $\bar{x} \pm s$

Treatment	CYP 3A4		CYP 3A5	
	Before	After	Before	After
WZ extract	4.9 ± 0.4	24.1 ± 0.7	9.8 ± 0.4	47.3 ± 9.1
Ketoconazole	1.8 ± 0.3	89.6 ± 3.6	19.3 ± 2.3	95.3 ± 14.7

CYP3A 的可逆性抑制剂酮康唑对 rhCYP3A4 及 rhCYP3A5 的抑制作用则可以通过透析基本得以消除; 提示五酯片提取物与 rhCYP3A4 及 rhCYP3A5 的结合比较牢固, 不易解离。

### 讨论

由于 CYP3A 代谢酶在药物代谢中的重要作用 (约 60% 临床使用药物经 CYP3A 代谢) 及其底物的广泛性<sup>[1-3]</sup>, CYP3A 介导的药物相互作用特别是中草药-西药药物相互作用得到了越来越广泛的关注。尽管 CYP3A4 和 CYP3A5 在氨基酸序列上及底物上高度同源性、高度重叠, 但它们在催化性能和抑制活性方面都存



**Figure 4** Effect of dialysis on the inactivation of rhCYP3A4 (A) and rhCYP3A5 (B) midazolam 1-hydroxylation activity by WZ extract. rhCYP3A4 or rhCYP3A5 (12.5 pmol·mL<sup>-1</sup>) were preincubated with WZ extract (10 μg·mL<sup>-1</sup>) and ketoconazole (2 μmol·L<sup>-1</sup>) with or without NADPH at 37 °C for 15 min in 100 mmol·L<sup>-1</sup> potassium phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.05 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA. Then the aliquot was transferred to a dialysis bag and dialyzed at 4 °C for 16 h. The rhCYP3A4 and rhCYP3A5 activity was determined before and after dialysis. Data are expressed as means of duplicate experiments. *n* = 4,  $\bar{x} \pm s$

在差异<sup>[4-6]</sup>。然而, 有关中草药对 CYP3A4 和 CYP3A5 的抑制作用差异的研究很少。因此, 确定中成药单方制剂五酯片对 CYP3A4 和 CYP3A5 的抑制作用, 将有助于预测不良的五酯片-西药药物相互作用。

本实验孵育时间、蛋白浓度及底物咪达唑仑的浓度均通过实验优化所得。咪达唑仑与人重组酶在 37 °C 水浴孵育不同的时间 (1~30 min), 考察代谢物 (1-羟基咪达唑仑) 的生成量与孵育时间的关系。结果表明, 在 1~20 min 内咪达唑仑呈线性消除 (相关系数为 0.98), 故选择 5 min 为最佳孵育时间。此外, 本课题组考察 1-羟基咪达唑仑的生成量与人重组酶蛋白浓度 (2.5~100 pmol·mL<sup>-1</sup>) 的关系。结果表明, 在 2.5~100 pmol·mL<sup>-1</sup> 浓度内, 随着蛋白浓度的增加, 咪达唑仑的消除呈线性增加 (相关系数: rhCYP3A4, 0.999; rhCYP3A5, 0.999); 故选定 12.5 pmol·mL<sup>-1</sup> 作为 rhCYP3A4 及 rhCYP3A5 为最佳孵育蛋白浓度。另外, 本课题组考察不同浓度的咪达唑仑 (0.5~100 μmol·L<sup>-1</sup>) 在人重组酶体系中与代谢物生成量的关系, 结果表明, 在 0.5~5 μmol·L<sup>-1</sup> 范围内, 随着底物咪达唑仑浓度的增加, 代谢物的生成呈线性增加 (相关系数如下: rhCYP3A4, 0.97; rhCYP3A5, 0.95)。对于 rhCYP3A4 及 rhCYP3A5, 咪达唑仑的 *K<sub>m</sub>* 值分别为 7.45、4.93 μmol·L<sup>-1</sup>; 综合考虑, 选定 5 μmol·L<sup>-1</sup> 为孵育

实验中底物的最佳浓度。

本研究表明五酯片提取物对 rhCYP3A4 及 rhCYP3A5 活性的抑制作用均存在 NADPH、预孵育时间及浓度依赖性。加入 NADPH 预孵育 5 min 后, 五酯片提取物对 CYP3A4 及 CYP3A5 的  $IC_{50}$  均下降到未加 NADPH 预孵育时的 1/2 左右, 提示五酯片提取物对 CYP3A4 及 CYP3A5 的抑制作用存在 NADPH 依赖性。在 NADPH 存在的情况下, 五酯片提取物对 rhCYP3A4 及 rhCYP3A5 中咪达唑仑 1-羟基化活性的抑制作用随预孵育时间而增强。这之前报道五味子酯甲、五味子醇乙对人肝微粒体 CYP3A 活性的抑制作用呈时间和浓度依赖性<sup>[22,23]</sup>结果相似。此外, 这也与本课题组之前的体内实验结果一致, 五酯片升高大鼠体内他克莫司 (CYP3A 底物) 血药浓度存在时间和剂量依赖性<sup>[28]</sup>。

五酯片提取物使 rhCYP3A4 及 rhCYP3A5 活性下降一半所需时间 ( $t_{1/2}$ ) 分别为 9.20 和 6.86 min, 表明五酯片提取物对 CYP3A4 及 CYP3A5 酶活性的抑制作用非常快。五酯片提取物对 CYP3A4 及 CYP3A5 活性的抑制作用不能通过透析消除, 提示五酯片提取物与 CYP3A4 及 CYP3A5 酶形成了牢固的灭活复合物; 而对照酮康唑对 CYP3A4 及 CYP3A5 活性的抑制作用并不存在 NADPH 及预孵育时间依赖性, 其对 CYP3A 活性的抑制作用可通过透析得以恢复。上述结果提示五酯片提取物对 CYP3A4 及 CYP3A5 活性的抑制机制有别于 CYP3A 可逆性、竞争性抑制剂酮康唑, 以一种不可逆性机制抑制 CYP3A4 及 CYP3A5 活性。基于五酯片对 CYP3A 的抑制特征, 若五酯片和 CYP3A 底物药物合用, 其对这些 CYP3A 底物药物药动学的影响短期内很难消除, 因此要警惕五酯片和 CYP3A 底物药物的相互作用。

本课题组之前的研究表明单次灌胃给与临床剂量相当的  $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  五酯片 0.25 h 后, 大鼠肝脏中五味子酯甲的含量为  $0.50 \pm 0.27 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[29]</sup>, 远高于五酯片提取物对 CYP3A4 的  $IC_{50}$  ( $2.2 \sim 5.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 含五味子酯甲  $0.11 \sim 0.26 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、CYP3A5 的  $IC_{50}$  值 ( $0.6 \sim 3.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 含五味子酯甲  $0.031 \sim 0.19 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 提示五酯片与 CYP3A 底物药物间发生药物相互作用的可能性很高。此外, 五酯片提取物对 CYP3A4 的  $k_{\text{inact}}$  值 ( $0.075 \text{ 3 min}^{-1}$ ) 较其对 CYP3A5 的  $k_{\text{inact}}$  值 ( $0.101 \text{ min}^{-1}$ ) 小, 而其对 CYP3A4 的  $K_i$  值较其对 CYP3A5 的  $K_i$  值大, 提示五酯片提取物对 CYP3A4 及 CYP3A5 活性的抑制作用存在差异 (表 3)。在 NADPH 存在的前提下, 预孵育 0、5、15、30 min, 对应的  $IC_{50}$  比值 ( $IC_{50, \text{CYP3A4}}/IC_{50, \text{CYP3A5}}$ ) 分别为 1.37、1.26、3.67、3.67, 提示五酯片提取物对 CYP3A5 的抑制作用稍强于其对 CYP3A4 的抑

制作用。而经典的 CYP3A 竞争性可逆性抑制剂酮康唑, 在不同预孵育时间, 其对 CYP3A4、CYP3A5 的  $IC_{50}$  比值 ( $IC_{50, \text{CYP3A4}}/IC_{50, \text{CYP3A5}}$ ) 基本不变, 维持在 0.5~0.6 左右, 与已发表的文献<sup>[30]</sup>相似, 其对 CYP3A4 的抑制作用要强于其对 CYP3A5 的抑制作用。我国学者报道五味子酯甲及 gomisin G 抑制 CYP3A4 及 CYP3A5 中咪达唑仑的代谢存在差异, 五味子酯甲对 CYP3A4 的抑制作用要强于其对 CYP3A5 的抑制作用; 而 gomisin G 对 CYP3A4 的抑制作用要弱于其对 CYP3A5 的抑制作用<sup>[24]</sup>。可见, 虽然同为 CYP3A 抑制剂或同类化合物, 但其对 CYP3A4、CYP3A5 活性的抑制作用均可能存在差异, 而这些差异有可能在临床上进一步放大。因此, 一定要警惕化合物或中草药对 CYP3A4、CYP3A5 活性抑制作用差异, 避免不必要的不良反应。

总而言之, 本研究表明五酯片提取物对 CYP3A4 及 CYP3A5 活性的抑制作用存在 NADPH、预孵育时间及浓度依赖性; 其与 CYP3A4 及 CYP3A5 的结合比较牢固, 不能通过透析来消除; 此外, 其对 CYP3A5 的抑制作用稍强于其对 CYP3A4 的抑制作用。临床上合用五酯片时, 要警惕由此引起的中草药-西药药物相互作用。

**作者贡献:** 覃小玲负责进行实验实施、数据收集和结果分析; 段文海和李嘉丽参与实验实施; 覃小玲负责撰写、修改文章; 毕惠娟和黄民负责指导整个实验实施及指导文章的撰写和修改。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data [J]. *Drug Metab Rev*, 2002, 34: 83-448.
- [2] Rodrigues AD, Rushmore TH. Cytochrome P450 pharmacogenetics in drug development: *in vitro* studies and clinical consequences [J]. *Curr Drug Metab*, 2002, 3: 289-309.
- [3] Molenaar-Kuijsten L, van Balen DEM, Beijnen JH, et al. A review of CYP3A drug-drug interaction studies: practical guidelines for patients using targeted oral anticancer drugs [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 670862.
- [4] Kuehl P, Zhang J, Lin Y, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression [J]. *Nat Genet*, 2001, 27: 383-391.
- [5] Niwa T, Murayama N, Emoto C, et al. Comparison of kinetic parameters for drug oxidation rates and substrate inhibition potential mediated by cytochrome P450 3A4 and 3A5 [J]. *Curr Drug Metab*, 2008, 9: 20-33.
- [6] Niwa T, Yasumura M, Murayama N, et al. Comparison of catalytic

- properties of cytochromes P450 3A4 and 3A5 by molecular docking simulation [J]. *Drug Metab Lett*, 2014, 8: 43-50.
- [7] Dennison JB, Kulanthaivel P, Barbuch RJ, et al. Selective metabolism of vincristine *in vitro* by CYP3A5 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34: 1317-1327.
- [8] Deri M, Szakal-Toth Z, Fekete F, et al. CYP3A-status is associated with blood concentration and dose-requirement of tacrolimus in heart transplant recipients [J]. *Sci Rep*, 2021, 11: 21389.
- [9] Huyke C, Engel K, Simon-Haarhaus B, et al. Composition and biological activity of different extracts from *Schisandra sphenanthera* and *Schisandra chinensis* [J]. *Planta Med*, 2007, 73: 1116-1126.
- [10] Panossian A, Wikman G. Pharmacology of *Schisandra chinensis* Bail.: an overview of Russian research and uses in medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 118: 183-212.
- [11] Fan X, Jiang Y, Wang Y, et al. Wuzhi tablet (*Schisandra sphenanthera* extract) protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity by inhibition of CYP-mediated bioactivation and regulation of NRF2-ARE and p53/p21 pathways [J]. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42: 1982-1990.
- [12] Li J, Chen S, Qin X, et al. Wuzhi tablet (*Schisandra sphenanthera* extract) is a promising tacrolimus-sparing agent for renal transplant recipients who are CYP3A5 expressers: a two-phase prospective study [J]. *Drug Metab Dispos*, 2017, 45: 1114-1119.
- [13] Qin XL, Bi HC, Wang XD, et al. Mechanistic understanding of the different effects of Wuzhi Tablet (*Schisandra sphenanthera* extract) on the absorption and first-pass intestinal and hepatic metabolism of tacrolimus (FK506) [J]. *Int J Pharm*, 2010, 389: 114-121.
- [14] Qin XL, Chen X, Wang Y, et al. *In vivo* to *in vitro* effects of six bioactive lignans of Wuzhi tablet (*Schisandra sphenanthera* extract) on the CYP3A/P-glycoprotein-mediated absorption and metabolism of tacrolimus [J]. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42: 193-199.
- [15] Qin XL, Chen X, Zhong GP, et al. Effect of Tacrolimus on the pharmacokinetics of bioactive lignans of Wuzhi tablet (*Schisandra sphenanthera* extract) and the potential roles of CYP3A and P-gp [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21: 766-772.
- [16] Cheng F, Li Q, Wang J, et al. Effects and safety evaluation of Wuzhi capsules combined with tacrolimus for the treatment of kidney transplantation recipients [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2021, 46: 1636-1649.
- [17] Cheng X, Ma J, Xu X, et al. Effect of Wuzhi capsules on cyclosporine A concentration in children with aplastic anemia immunotherapy: a single-center observational study [J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2022, 15: 365-369.
- [18] Jiang W, Wang X, Xu X, et al. Effect of *Schisandra sphenanthera* extract on the concentration of tacrolimus in the blood of liver transplant patients [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2010, 48: 224-229.
- [19] Jin J, Bi H, Hu J, et al. Effect of Wuzhi tablet (*Schisandra sphenanthera* extract) on the pharmacokinetics of paclitaxel in rats [J]. *Phytother Res*, 2011, 25: 1250-1253.
- [20] Xue XP, Qin XL, Xu C, et al. Effect of Wuzhi tablet (*Schisandra sphenanthera* extract) on the pharmacokinetics of cyclosporin A in rats [J]. *Phytother Res*, 2013, 27: 1255-1259.
- [21] Yan L, Yang ZQ, Shi YY, et al. Effects of Wuzhi capsules on blood concentration of tacrolimus in renal transplant recipients [J]. *Ann Transplant*, 2019, 24: 594-604.
- [22] Iwata H, Tezuka Y, Kadota S, et al. Identification and characterization of potent CYP3A4 inhibitors in *Schisandra* fruit extract [J]. *Drug Metab Dispos*, 2004, 32: 1351-1358.
- [23] Seo HJ, Ji SB, Kim SE, et al. Inhibitory effects of *Schisandra* lignans on cytochrome P450s and uridine 5'-diphospho-glucuronosyl transferases in human liver microsomes [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13:371.
- [24] Zhao J, Sun T, Wu JJ, et al. Inhibition of human CYP3A4 and CYP3A5 enzymes by gomisin C and gomisin G, two lignan analogs derived from *Schisandra chinensis* [J]. *Fitoterapia*, 2017, 119: 26-31.
- [25] Xue X, Huang M, Xiao H, et al. Rapid and simultaneous measurement of midazolam, 1'-hydroxymidazolam and digoxin by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to an *in vivo* study to simultaneously measure P-glycoprotein and cytochrome P450 3A activity [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 55: 187-193.
- [26] Waley SG. Kinetics of suicide substrates. Practical procedures for determining parameters [J]. *Biochem J*, 1985, 227: 843-849.
- [27] Silverman RB, George C. Mechanism of inactivation of gamma-aminobutyric acid aminotransferase by (*S,E*)-4-amino-5-fluoropent-2-enoic acid [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, 150: 942-946.
- [28] Qin XL, Li JL, Wang SH, et al. Co-administration of Wuzhi tablet (*Schisandra sphenanthera* extract) alters tacrolimus pharmacokinetics in a dose- and time-dependent manner in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 263: 113233.
- [29] Qin XL, Duan WH, Wang HF, et al. Determination of hepatic and small intestinal distribution of lignans of Wuzhi tablet in rats by liquid chromatography tandem mass spectrometry method [J]. *Acta Pharm Sin (药 学 学 报)*, 2016, 51: 1891-1896.
- [30] Walsky RL, Obach RS. Validated assays for human cytochrome P450 activities [J]. *Drug Metab Dispos*, 2004, 32: 647-660.