

UFLC-MS/MS 研究胡椒碱在不同种属肝微粒体中的代谢稳定性和代谢表型

苟立平^{1,2}, 邓星^{1,2}, 罗莉娅^{1,2}, 汤明海², 万丽^{1*}

¹成都中医药大学药学院, 成都 611137; ²四川大学华西医院肿瘤生物治疗研究室, 成都 610041

摘要: 应用体外肝微粒体孵育体系, 考察胡椒碱在人、SD 大鼠、小鼠、恒河猴和比格犬 5 个种属肝微粒体中的代谢稳定性, 比较代谢的种属差异, 确定其在人肝微粒体中的代谢表型。通过 UFLC-MS/MS 检测方法, 测定胡椒碱在各个种属肝微粒体中孵育后的剩余浓度, 考察他们的代谢稳定性及体外代谢动力学参数。采用化学抑制法考察胡椒碱在人肝微粒体中的代谢表型。结果表明胡椒碱在人、SD 大鼠、小鼠、恒河猴和比格犬的肝微粒体中, 半衰期 $T_{1/2}$ 分别为 31.36、48.46、138.60、147.45、165.00 min; 体外固有清除率 CL_{int} 分别为 0.0442、0.0286、0.0100、0.0094、0.0084 mL/(mL·mg); 在人肝微粒体中, 胡椒碱主要被 CYP3A4 和 CYP2C9 酶代谢。推测胡椒碱在各种肝微粒体中的代谢均相对较稳定, 其中大鼠和人的肝微粒体代谢性质最相近, 在后续的实验中可以考虑用大鼠的代谢结果预测人的代谢结果; 人肝微粒体中参与胡椒碱代谢的酶主要有 CYP3A4 和 CYP2C9。

关键词: 胡椒碱; 代谢稳定性; 酶表型; 代谢产物; 肝微粒体

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)2-0216-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.2.006

Investigation of metabolic stability and metabolic enzyme phenotype of piperine in different species of liver microsomes by UFLC-MS/MS

GOU Li-ping^{1,2}, DENG Xing^{1,2}, LUO Li-ya^{1,2}, TANG Ming-hai², WAN Li^{1*}

¹School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

²Department of Cancer Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Abstract: *In vitro* liver microsomal incubation system was used to investigate the metabolic stability of piperine in liver microsomes of human, SD rats, mice, Rhesus monkeys and Beagle dogs, compare the metabolic difference between different species and determine the metabolic phenotype of piperine in human liver microsomes. Selective chemical inhibition was used to investigate the metabolic phenotype of piperine in human liver microsomes. The remaining concentrations of piperine incubated in various species of liver microsomes were determined by UFLC-MS/MS and evaluated their metabolic stability and *in vitro* pharmacokinetic parameters. Selective chemical inhibition was used to predict the metabolic phenotype of piperine in human liver microsomes. It can be speculated that the half-life of piperine in the liver microsomes of SD rats, mice, Rhesus monkeys and Beagle dogs respectively were 31.36, 48.46, 138.60, 147.45, and 165.00 min; The intrinsic clearance rate was 0.0442, 0.0286, 0.0100, 0.0094 and 0.0084 mL/(mL·mg); In human liver microsomes, piperine was mainly metabolized by CYP3A4 and CYP2C9 enzymes. The results showed that the metabolism of piperine in all kinds of liver microsomes is relatively stable, the metabolic properties of liver microsomes in rat is similar mostly to human. It can be considered that metabolism results from rats can be used to predict human metabolic results in subsequent experiments. The results showed that CYP3A4 and CYP2C9 primary participate in metabolism of piperine.

Key words: piperine; metabolic stability; metabolic phenotype; metabolite; liver microsomes

胡椒碱 (Piperine, Pip) 为本实验室从胡椒科植物胡椒 (*Piper nigrum* L.) 的干燥成熟果实中提取、分离、纯化获得的吡咯烷类酰胺生物碱, 纯度大于 99%。Pip 是胡椒发挥药效作用的主要成分之一,

收稿日期: 2018-03-15 接受日期: 2018-07-26

基金项目: 国家自然科学基金 (81673653)

* 通信作者 Tel: 86-015982418713; E-mail: wanli8801@163.com

药理作用较为广泛,已知具有抗惊厥^[1]、抗炎^[2]、抑制胆结石^[3]、抗溃疡^[4]等作用。近年来的研究表明,Pip 具有抗癌活性^[5-8]。由于其结构简单(见图 1),有利于对其结构进行修饰,且具备药效基团的化学结构特征,如具有氢键接受体、疏水中心和芳环中心等可与受体结合的特征性单元。因此,其本身不仅可作为一种新药进行研发,而且化学研究空间为进一步化学合成研究获得高活性低毒性先导化合物奠定了基础^[9]。

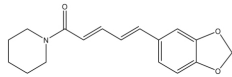


图 1 胡椒碱化学结构

Fig. 1 Chemical structure of Piperine

体外代谢研究相比之下可直接观察候选化合物与受靶点的选择性作用,不需要消耗大量的样品和实验动物,操作简便快捷,且能指导后期药效、药动以及安全性评价的模型选择,缩小体内研究的筛选范围,节约研发成本^[10]。为全面了解 Pip 在不同种属中的代谢特性,为后续研究提供支撑,本课题研究了 Pip 在不同种属肝微粒体中的代谢稳定性及在人体肝微粒体中的代谢产物,采用选择性化学抑制法考察 Pip 在人肝微粒体中的代谢表型,为深入了解 Pip 的代谢特征和临床合理用药提供依据。

1 实验材料

超快速液相色谱(UFLC)系统包括:SIL-30AC 自动进样器,LC-30AD 高压输液泵,CBM-20A 连接器,CTO-20AC 柱温箱(日本岛津公司)、Acquity UP-LC[®] Hss C₁₈(2.1 mm × 100 mm,1.8 μm);AB SCI-EX QTRAP5500 三重四级杆质谱仪(美国 AB 公司);数据处理软件(MultiQuant 3.0.2);W201B 升降智能水浴锅(郑州长城科工贸有限公司);Thermo Heraeus Fresco 17 低温冷冻离心机(Thermo Scientific 公司);230V-U K 涡旋混合器(Labnet International 公司);BT 125D 电子天平(赛多利斯仪器(北京)有限公司);移液枪(德国 Eppendorf 公司)。

胡椒碱(Piperine,Pip):由四川大学生物治疗国家重点实验室分离纯化而得,纯度>99%;内标白屈菜红碱对照品,购于成都瑞芬思生物科技有限公司,纯度>98%。大鼠、人、犬、猴、小鼠等肝微粒体:20 mg/mL NADPH 发生系统:A 液(含 MgCl₂)、B 液,均购自武汉普莱特生物医药技术有限公司,于-80 °C 冷冻保存;α-萘黄酮(α-Naphthoflavone,ANF;纯度

大于 98.0%,东京化成工业株式会社);毛果芸香碱(Pilocarpine,中国食品药品检定研究院)、盐酸噻氯匹定(Ticlopidine,TCP;纯度 99.7%,中国食品药品检定研究院);奎尼丁(Quinidine,QND;纯度>98.0%,TCI 上海化成工业发展有限公司);二乙基二硫代氨基甲酸钠(Clomethiazole,纯度>99%,sigma 公司)、酮康唑(Ketoconazole,KCZ;纯度 99.0%,Dr Ehrenstorfer 公司),磺胺苯吡唑(Sulphaphenazole,SUP;纯度>99%,Sigma 公司);水:Milli-Q 18.2 MΩ,25 °C,由本实验室制备;甲醇:批号:163629,Fisher Scientific 公司;甲酸:色谱纯,纯度 98%,批号:1001003297,Fluka Analytical 公司。

2 方法

2.1 溶液的制备

Pip 溶液的制备:称取 Pip 适量,用甲醇溶解为 1 mg/mL 对照品储备液。

内标溶液的制备:称取白屈菜红碱适量,用甲醇稀释成 10 ng/mL 的内标工作液。

2.2 UFLC-MS/MS 条件

液相条件:流速 0.3 mL/min;样品室温度:10 °C;柱温:30 °C;流动相为 0.1% 甲酸水(A 相)-甲醇(B 相),梯度洗脱,0~2 min,55%~90% B,2~5 min,90% B;进样体积 2 μL。

质谱条件:电喷雾离子化(ESI)方式,检测离子为正离子;毛细管电压 5.5 kV,离子源温度 500 °C,去簇电压(DP)为 120 V。采用多级反应检测模式(MRM)模式,测定 Pip 和内标化合物,其对应的监测离子对和碰撞能量分别为 Pip(*m/z* 286.2 → 201.1,33 eV),内标白屈菜红碱(*m/z* 348.3 → 332.2,43 eV)。

2.3 Pip 在不同种属肝微粒体体外代谢孵育模型中的稳定性

2.3.1 代谢稳定性孵育模型

参考文献^[11],每个孵育体系总体积为 206 μL,包含 188 μL K₂HPO₄ 缓冲液(即 PBS,100 mM,pH 7.4)和 12 μL NADPH 发生系统(10 μL A 液和 2 μL B 液于冰浴上临时混合制得),冰浴上加入 1 μL 200 μmol/L Pip 后,于 37 °C 预孵 5 min,分别加入 5 μL 各种属肝微粒体溶液启动反应。孵育时间为 0、5、15、30、45、60 min。待反应完毕后,取孵育后的样品(200 μL)加 400 μL 含内标 10 ng/mL 的冰甲醇终止反应,涡旋混匀 3 min,13 000 rpm 离心 15 min,取上清液于进样瓶中。平行实验 3 次,考察 Pip 在不

同种属肝微粒体中的代谢稳定性。

2.3.2 体外半衰期

将孵育 0 min 时间点 Pip 的浓度作为 100% ,其他孵育时间点的浓度与之相比得剩余百分量 ,将各时间点的剩余百分量的自然对数与孵育时间作线性回归 ,求得斜率 k ,根据公式半衰期 $T_{1/2} = -0.693/k$;肝微粒体中的固有清除率 $CL_{int} = 0.693 \times \text{孵育液 (mL)} / [T_{1/2} (\text{min}) \times \text{肝微粒体 (mg)}]$ 。

2.4 Pip 在 CYP450 酶中的代谢表型研究

2.4.1 代谢表型研究体系

根据文献^[12] ,代谢表型研究体系采用选择性化学抑制剂法。所选的 CYP3A4 抑制剂为酮康唑 (1 $\mu\text{mol/L}$) ,CYP2D6 抑制剂为奎尼丁 (10 $\mu\text{mol/L}$) ,CYP2C9 抑制剂为磺胺苯吡唑 (20 $\mu\text{mol/L}$) ,CYP2A6 抑制剂为毛果芸香碱 (25 $\mu\text{mol/L}$) ,CYP2C19 抑制剂为盐酸噻氯匹定 (50 $\mu\text{mol/L}$) ,CYP2E1 抑制剂为二乙基二硫代氨基甲酸钠 (100 $\mu\text{mol/L}$) ,CYP1A1 为 α -萘黄酮 (1 $\mu\text{mol/L}$) 。代谢表型反应时间、酶蛋白浓度及底物浓度根据“2.3.1”项下确定。

设定 Pip 孵育浓度为 1 $\mu\text{mol/mL}$,人肝微粒体浓度为 20 mg/mL 。以 2.3.1 项下孵育体系 ,冰浴上加入 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 Pip 溶液 1 μL ,各选择性化学抑制剂 1 μL ,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 预孵 5 min 后 ,加入人肝微粒体溶液 5 μL ,涡旋混匀 ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min ,反应结束后 ,加入 400 μL 含内标 10 ng/mL 的冰甲醇终止反应 ,每个样品平行 3 份。

另设置未发生反应样品为阴性对照组 (不加 NADPH 发生液 ,只加等量甲醇) ;设定完全发生反应为阳性对照组 (加入 NADPH 发生系统 ,但不加抑制剂 ,只加等量甲醇) 。利用 UFLC-MS/MS 测定 Pip 的剩余浓度 ,考察不同选择性化学抑制剂对 Pip 代谢的影响。

2.4.2 数据处理

抑制率 = $[1 - (\text{阴性对照组浓度} - \text{实验组浓度}) / (\text{阴性对照组浓度} - \text{阳性对照组浓度})] \times 100\%$ 。利用 OriginLab 9.0、EXCEL 软件进行数据处理和制图。

2.5 体外代谢产物研究

设定 Pip 孵育终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$,在 2.3.1 项下孵育体系 ,冰浴上加入 5 000 $\mu\text{mol/L}$ 的 Pip 溶液 2 μL ,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 预孵 5 min 后 ,加入人肝微粒体溶液 5 μL ,涡旋混匀 ,分别于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 0 min 和 90

min ,反应结束后 ,加入 200 μL 冰甲醇终止反应。照 2.3.1 项下处理后 ,利用 UFLC-MS/MS 进行进样测定。

2.6 方法学考察

2.6.1 专属性考察

取 PBS 188 μL ,加入 5 μL 高温灭活的肝微粒体 ,记为“孵育体系 I” 。取“孵育体系 I” ,加入 400 μL 含内标 10 ng/mL 的甲醇溶液 ,照“2.3.1”项下的样品处理方法进行处理 ,即得空白对照样品 A。另取“孵育体系 I” ,加入含内标 10 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的甲醇溶液 400 μL 和 200 $\mu\text{mol/L}$ Pip 溶液 1 μL ,同法处理 ,得对照样品 B。

2.6.2 线性关系

精密吸取 Pip 对照品贮备液 ,用甲醇逐级稀释为质量浓度分别为 390.5、781、1 563、3 125、6 250、12 500、25 000、50 000 ng/mL 的系列对照品溶液。于“孵育体系 I”中分别加入 1 μL 上述系列对照品溶液 ,涡旋混匀 ,照“2.3.1”项下样品处理方法进行处理 ,照“2.2”项下液质条件进行测定。利用“MultiQuant 3.0.2”数据处理软件 ,求得直线回归。

2.6.3 准确度

照“2.6.2”项下 ,制得质量浓度分别为 781、31.25、400 ng/mL 的低、中、高三组质控浓度样品 ,进行准确度实验 ,同法处理后进行分析 ,计算各质控样品的回收率。每组样品平行 5 份。

2.6.4 精密度

照“2.6.3”项下 ,配制低、中、高浓度质控样品 ,用质控样品的日内和日间 RSD 表示。日内每隔 2 h 处理一组低、中、高浓度样品 ,共处理 5 组 ,计算日内精密度。日间精密度连续 3 天测定 3 个分析批次 ,每个浓度测定 5 个样品来计算日间精密度。

2.6.5 基质效应

照“2.6.3”项下 ,配制低、中、高浓度质控样品 ,分别测定峰面积 A ;另取 Pip 对照品溶液 ,加含内标 10 ng/mL 流动相制成相同浓度的溶液 ,分别测定峰面积 B ,每组平行 5 份。基质效应公式为 $A / B \times 100\%$,此值应在 85% ~ 115% 之间。

3 结果

3.1 方法学考察

在“2.2”实验条件下 ,Pip 与内标白屈菜红碱的保留时间分别为 4.27、2.93 min ,达到基线分离 ,且无空白基质干扰 ,说明该方法专属性良好 ,结果见图 2。利用“MultiQuant 3.0.2”数据处理软件 ,求得直

线回归为: $y = 0.13178x + 0.37841 (r = 0.9959)$, 各浓度的准确度偏差均小于 15%, 表明在 3.91 ~ 500 ng/mL 范围内, Pip 的浓度与响应值呈良好的线性关系, 符合要求。低、中、高质控样品的回收率分别为 $(110.82 \pm 3.91)\%$ 、 $(107.81 \pm 4.96)\%$ 、 $(107.96 \pm 3.17)\%$ 。实验结果表明, 该浓度范围

内, 回收率较高, 准确度符合要求, 测定结果准确、可信。日内和日间精密度 RSD 小于 5%, 符合要求。基质效应在 85% ~ 115% 范围内, 对测定结果影响较小。方法学验证结果表明, 该方法特异性好, 准确度、精密度和基质效应等均符合要求, 结果见表 1。

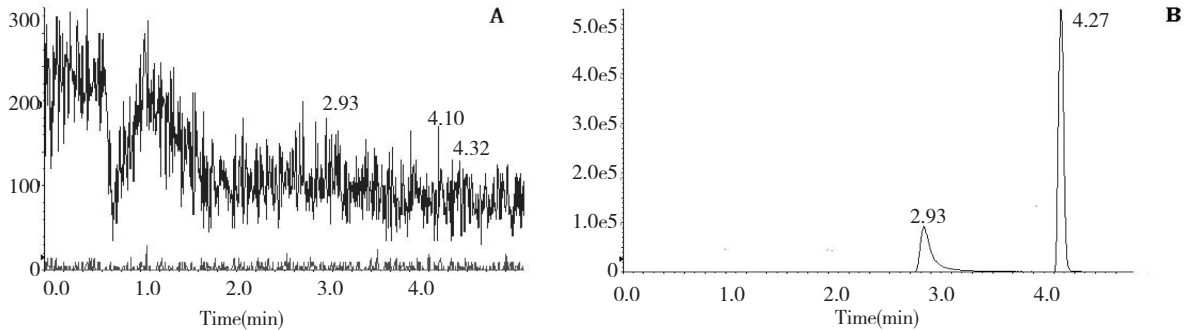


图 2 Pip 及内标白屈菜红碱的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of Pip and internal standard compound chelerythrine

注: A 为空白对照样品; B 为加入 Pip 及内标白屈菜红碱的标准对照样品。

Note: A is a blank control sample; B is a standard control sample added Pip and internal standard chelerythrine.

表 1 Pip 的准确度、精密度和基质效应测定 (n = 5)

Table 1 Accuracy, precision and matrix effect of Piperine (n = 5)

质量浓度 Concentration (ng/ mL)	准确度 Accuracy	精密度 RSD Precision RSD (%)		基质效应 Matrix effect (%)
		日内 Day	日间 Daytime	
低 Low	110.82 ± 3.91	3.34	4.57	100.64
中 Middle	107.81 ± 4.96	4.40	4.90	97.45
高 High	107.96 ± 3.17	2.08	3.28	98.70

3.2 Pip 在不同种属肝微粒体中的代谢稳定性

分别考察了 Pip 在人、大鼠、小鼠、猴和犬的 5 个种属肝微粒体中的代谢稳定性, Pip 均发生了代谢。孵育时间与底物剩余百分比的自然对数孵育曲线见图 3。其中在猴和犬肝微粒体中代谢较为相似, 在小鼠、猴和大鼠肝微粒体中代谢较缓慢, 在人和大鼠肝微粒体中代谢较明显。

3.3 体外半衰期与固有清除率

在人、大鼠、小鼠、恒河猴和比格犬肝微粒体中, 以孵育时间为横坐标, 以底物剩余百分比的自然对数为纵坐标作线性回归, 在肝微粒体中的线性方程人为 $y = -0.0221x + 4.392 (r^2 = 0.9357)$, 大鼠为 $y = -0.0143x + 4.375 (r^2 = 0.8568)$, 昆明种小鼠为 $y = -0.0074x + 4.5598 (r^2 = 0.9677)$, 恒河猴为 $y = -$

$0.0047x + 4.6013 (r^2 = 0.9915)$, 比格犬为 $y = -0.0042x + 4.5927 (r^2 = 0.9918)$ 。由各线性的斜率 k 求得 Pip 在各种属中的半衰期和固有清除率 (见表 2)。

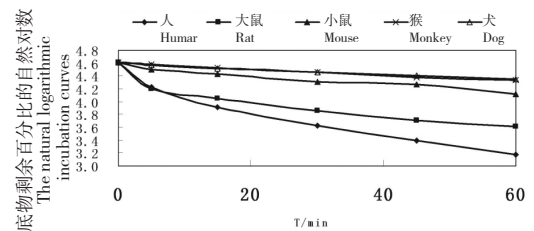


图 3 Pip 在人、大鼠、小鼠、猴和犬 5 个种属肝微粒体中各时间点与底物剩余百分比的自然对数孵育曲线

Fig. 3 The natural logarithmic incubation curves of Piperine with the percentage of substrate remaining at each time point in human, rat, mouse, monkey and dog liver microsomes

表2 Pip 在人、SD 大鼠、小鼠、恒河猴和比格犬 5 个种属肝微粒体中的体外代谢半衰期和固有清除率

Table 2 Half-life in vitro and intrinsic clearance of Piperine in human, rat, mouse, monkey and dog liver microsomes

种属 Species	$T_{1/2}$ (min)	CL_{int} mL/(min · mg)
人 Human	31.36	0.0442
大鼠 Rat	48.46	0.0286
小鼠 Mouse	138.6	0.0100
猴 Monkey	147.45	0.0094
犬 Dog	165.00	0.0084

3.4 Pip 在人肝微粒体中的代谢表型

CYP3A4 和 CYP2C9 是参与 Pip 代谢的主要同

表3 各抑制剂对人肝微粒体中 Pip 代谢的影响

Table 3 Effect of inhibitors on metabolism of Piperine in human liver microsomes

抑制剂亚型 Inhibitor (CYP) subtypes	Pip 质量浓度 Concentration of Pip (ng/mL)			平均质量浓度 Average concentration (ng/mL)	SD	RSD	抑制率 Inhibition rate (%)
	1	2	3				
KCZ(CYP3A4)	233.62	256.43	253.58	247.88	12.43	5.01	81.13
QND(CYP2D6)	8.12	8.28	7.84	8.08	0.22	2.76	2.15
SUP(CYP2C9)	210.96	214.23	209.82	211.67	2.29	1.08	69.21
pilocarpine(CYP2A6)	3.99	3.39	3.20	3.53	0.41	11.69	0.65
TCP(CYP2C19)	7.09	7.14	6.97	7.07	0.09	1.24	1.81
clomethiazole(CYP2E1)	6.56	6.05	5.78	6.13	0.40	6.46	1.51
ANF(CYP1A1)	14.45	13.57	13.26	13.76	0.62	4.49	4.02
阳性对照组 Positive control group	1.48	1.64	1.56	1.56	0.08	5.13	0.00
阴性对照组 Negative control group	312.66	300.27	302.52	305.15	6.60	2.16	-

4 结论

本文建立了 Pip 的 UFLC-MS/MS 定量测定方法, 该方法专属性强, 灵敏度高, 线性、准确度、精密度和基质效应等均符合生物样品的测定要求。Pip 在人、大鼠、小鼠、恒河猴和比格犬肝微粒体中体外代谢半衰期 $T_{1/2}$ 分别为 31.36、48.46、138.60、147.45、165.00 min; 体外固有清除率分别为 0.0442、0.0286、0.0100、0.0094、0.0084 mL · min⁻¹ · mg⁻¹, 推测 Pip 在人和大鼠肝微粒体中代谢较接近, 代谢相对较快; 在小鼠、猴和犬肝微粒体中代谢速率接近, 均较慢; 表明 Pip 在人、SD 大鼠、小鼠、恒河猴和比格犬肝微粒体中代谢速率存在明显的种属差异。在后续进行体内实验动物的选择时, 可以考虑采用与人代谢较为接近的大鼠作为参考。目前, CYP 代谢酶表型的确定主要有特定的化学物质或抗体作为特定酶的抑制剂(特异性化

工酶, 代谢抑制率分别为 81.13% 和 69.21%。各抑制剂对人肝微粒体中 Pip 代谢的影响结果见表 3。

3.5 体外代谢产物研究

图 4 A 为孵育 0 min 与孵育 90 min 的样品色谱对比图。将孵育 0 min 的提取色谱图上保留时间为 9.92 min 的色谱峰命名为 M0。通过图 4 A 可知, 孵育 90 min 的提取色谱在 M0 的基础上, 新增了 3 个色谱峰, 保留时间分别为 6.94、7.55、10.21 min, 依次命名为 M1 (6.94 min)、M2 (7.55 min)、M3 (10.21 min)。[M + H]⁺ 峰 m/z 依次为 274.15、318.24 和 284.19, 分别见图 4 D、E、F。各谱图详见图 4。

学抑制剂法) 和重组人源 CYP 同工酶法。由于重组人源 CYP 同工酶法相对来说成本更高, 因此本实验采用选择性化学抑制剂法。考察受试药物的代谢被作用药物抑制时, 选择了该酶已知的强抑制剂。代谢表型实验结果表明人肝微粒体中参与 Pip 代谢的酶主要有 CYP3A4 和 CYP2C9。代谢表型的研究可以预测其潜在的药物-药物相互作用。Pip 在与其他药物联用时, 需考虑经 CYP3A4 和 CYP2C9 代谢的药物之间的相互作用, 如与经 CYP3A4 代谢的大环内酯类抗生素(如红霉素、克拉霉素等)、CYP450 酶抑制剂咪唑类抗真菌药(如主要的 CYP3A4 抑制剂酮康唑、伊曲康唑等)、经 CYP2C9 代谢的药物(如苯妥英、甲苯磺丁脲)、钙拮抗剂(如尼卡地平、维拉帕米、美贝拉地尔等)^[13, 14] 实施个体化治疗, 提高药物疗效、降低不良反应的发生率。

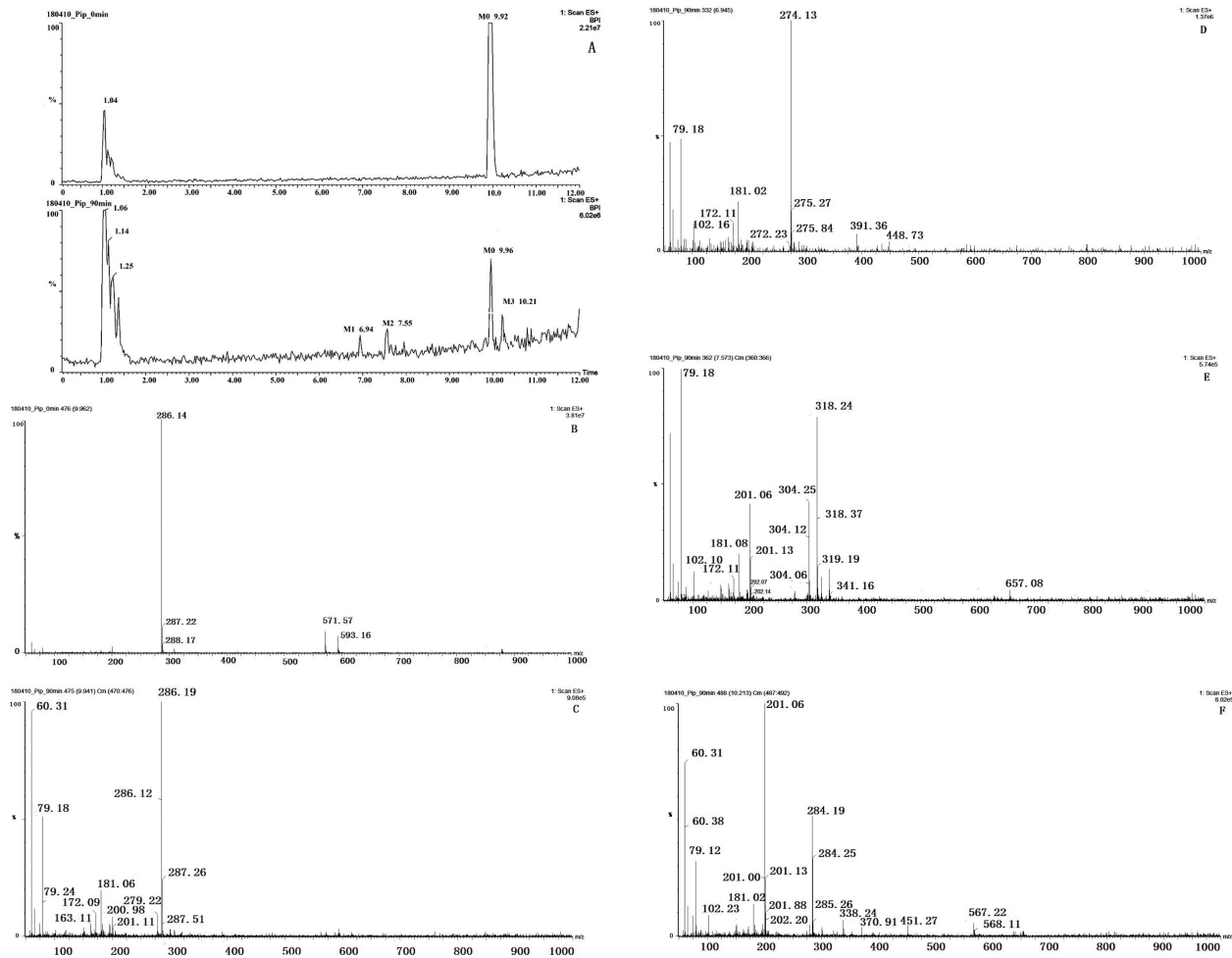


图4 孵育0 min与孵育90 min的样品色谱对比图及各色谱峰质谱图

Fig. 4 The chromatograms of samples incubated for 0 min and 90 min and mass spectrum of each chromatogram peaks

注:A为孵育0 min与孵育90 min的样品色谱对比图;B为孵育0 min M0 质谱图;C为孵育90 min M0 质谱图;

D为孵育90 min M1 质谱图;E为孵育90 min M2 质谱图;F 孵育90 min M3 质谱图。

Note:A is Chromatograms of samples incubated for 0 min and 90 min. ;B is incubation of M0 spectra for 0 min;C is incubation of M0 spectra for 90 min;D is incubation of M1 spectra for 90 min;E is incubation of M2 spectra for 90 min;F is incubation of M3 spectra for 90 min.

参考文献

- Mao K ,Lei D ,Zhang H ,et al. Anticonvulsant effect of piperine ameliorates memory impairment ,inflammation and oxidative stress in a rat model of pilocarpine-induced epilepsy [J]. *Experimental & Therapeutic Med* 2017 ,13:695.
- Hu D ,Wang Y ,Chen Z ,et al. The protective effect of piperine on dextran sulfate sodium induced inflammatory bowel disease and its relation with pregnane X receptor activation [J]. *J Ethnopharmacol* 2015 ,169:109-123.
- Song XY ,Xu S ,Hu JF ,et al. Piperine prevents cholesterol gallstones formation in mice [J]. *Eur J Pharmacol* ,2015 , 751:112-117.
- Mehmood MH ,Gilani AH. Pharmacological basis for the medicinal use of black pepper and piperine in gastrointestinal disorders [J]. *J Med Food* 2010 ,13:1086-1096.
- Siddiqui S ,Ahmad MS ,Jafri A ,et al. Piperine triggers apoptosis of human oral squamous carcinoma through cell cycle arrest and mitochondrial oxidative stress [J]. *Nutrition & Cancer* 2017 9:1-9.
- Zheng B ,Wang X ,Ma TH. Inhibitory effect of piperine on human HepG2 hepatocarcinoma cell *in vitro* [J]. *Chin J Lab Diagn (中国实验诊断学)* 2012 ,16:218-220.
- Hou XF. Effect of piperine on the expression of inflammatory cytokines and antimicrobial peptides in human colonic carcinoma cell lines [D]. Guangzhou: Jinan University (暨南大学) 2015.

(下转第353页)

- 45 Ling K et al. Progress in research on pharmacological effects of *Morinda officinalis* [J]. J Fujian College of Tradit Chin Med(福建中医学院学报) 2007, 17(3):67-69.
- 46 Cui CB. Studies on the antidepressant active constituents in the roots of *Morinda officinalis* how [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志) 1995 20(1):36.
- 47 Xu LZ, et al. BDNF-GSK-3 β - β 2-catenin pathway in the mPFC is involved in antidepressant-like effects of *Morinda officinalis* oligosaccharides in rats [J]. Int J Neuropsychopharmacol 2017 20(1):88.
- 48 Chen YZ et al. The discussion on the anti-depression mechanism of bajitian from vitamin D axis [J]. West J Tradit Chin Med (西部中医药) 2017 30:128-130.
- 49 Anatoly Kreinin et al. Blood BDNF level is gender specific in severe depression [J]. Plos One 2015 10:127643.
- 50 Liu YH et al. Protective and therapeutic effects of *Morinda officinalis* polysaccharides on osteoporosis of ovariectomized-rats [J]. Hainan Med(海南医学) 2014 20:2973-2975.
- 51 Zhao J et al. Study on oligosaccharide extracted from *Morinda officinalis* improve the reproductive ability of mice [J]. J Yunan College of Tradit Chin Med(云南中医学院学报), 2018 41:7-10.
- 52 Cheng LX. Anti-inflammatory effects of *Morinda officinalis* on uterine ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Tradit Chin Med Res(中医研究) 2018 31:68-70.
- 53 Feng GQ et al. Study on the angiogenesis of chicken chorio-allantoic membrane and rat myocardial infarction model induced by *Morinda officinalis* [C]. Urumqi:Conference on Biochemistry and Molecular Pharmacology 2007.
- 54 Yang JK et al. Study on the promotion of chicken chorio-allantoic membrane angiogenesis by *Morinda officinalis* [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志) 2010 35:360-363.
- 55 Liu FH et al. Treatment of 42 cases of mild and moderate depression with bayu tianwei sugar capsule [J]. Shanxi Med(陕西中医) 2012 33:165-167.
- 56 Kong QM et al. Efficacy and safety of *Morinda officinalis* oligose capsule in the treatment of depression [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志) 2011 27:170-173.

(上接第 221 页)

- 8 Selvendiran K, Banu SM, Sakthisekaran D. Protective effect of piperine on benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice [J]. Clin Chim Acta 2004 350:73.
- 9 Liu P, Suo JX, Yu TF. Research progress of pharmacological effects of piperine [J]. Chin Drug App Monit(中国药物应用与监测) 2007 4(3):7-9.
- 10 Li XB. The *in vitro* and *in vivo* metabolism studies of F18 in rat liver microsomes and rats [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine(成都中医药大学), 2016.
- 11 Cohen LH, Remley MJ, Raunig D et al. *In vitro* drug interactions of cytochrome p450: an evaluation of fluorogenic to conventional substrates [J]. Drug Metab Dispos 2003 31:1005.
- 12 Liu ZJ, Fu DX, Tang G. FDA drug interaction research guide (draft) interpretation of 2006 Edition [J]. J Int Pharm Res(国际药学研究杂志) 2008 35(1):50-58.
- 13 Wu H. CYP3A4 Enzyme-related clinical drug interactions [J]. Chin J Pharmacov(中国药物警戒) 2016 13:286-290.
- 14 Wang JH. Cytochrome CYP2C9 and clinical rational use [J]. Shandong Med J(山东医药) 2009 49:111-112.

(上接第 263 页)

- 5 Siskos EP, Mazomenos BE, Konstantopoulou AA. Isolation and identification of insecticidal components from *Citrus aurantium* fruit peel extract [J]. J Agric Food Chem 2008 56:5577-5581.
- 6 Zhang C, Xiao YQ, GuKou YY, et al. Studies on chemical constituents from roots of *Peucedanum praeruptorum* II [J]. China J Chin Mat Med(中国中药杂志) 2006 31:1333.
- 7 Zhang J, Li YB, Qian DW, et al. Chemical constituents from *Chrysanthemum morifolium* ramat [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发) 2006 18:71-73
- 8 Yan C, Cheng XY, Sui H, et al. Antioxidant activities and chemical compositions of *Thymus quinquecostatus* Celak [J]. J Beijing Univ TCM(北京中医药大学学报) 2016 39:383-389.
- 9 Zhao YX. Study about action and mechanism of apigenin on the tumor multidrug resistance cells [D]. Suzhou: Suzhou University(苏州大学) 2017.
- 10 Dong F, Liu HZ, Sun Y, et al. Isolation and identification of bergapten in dry root of *Glehnia littoralis* and preliminary determination of its antitumor activity *in vitro* [J]. J Plant Res Envir(植物资源与环境学报) 2010 19:95-96.