

论 著

细胞色素 P450 2C9 * 8 与 CYP2C9 * 27 慢病毒表达载体的构建及在 HEK239T 细胞中的稳定表达

廖 凯^{1,2}, 刘 勇³, 万子衿¹, 李 巍^{1,2}

(1. 扬州大学医学院, 江苏 扬州, 225001; 2. 江苏省中西医结合老年病防治重点实验室, 江苏 扬州, 225001; 3. 大连理工大学 生命与医药学院, 辽宁 盘锦, 124221)

摘要:目的 构建人细胞色素 P450 2C9 (CYP2C9) 及突变体 CYP2C9 * 8 与 CYP2C9 * 27 的慢病毒表达质粒, 并于 HEK293T 细胞中稳定表达。方法 反转录人肝总 RNA 获得 cDNA, PCR 扩增获得 CYP2C9 编码序列, 并克隆至载体 MigR1 上, 获得慢病毒表达重组质粒 MigR1-CYP2C9。以该质粒为模板, 重叠 PCR 方法分别引入 449G > A 与 449G > T 点突变, 并分别克隆至 MigR1, 获得 MigR1-CYP2C9 * 8 与 MigR1-CYP2C9 * 27 慢病毒表达质粒。在 HEK 293T 细胞中进行病毒包装, 并采用获得的慢病毒感染 HEK293 细胞, 经流式分选和单克隆挑取获得稳定表达 CYP2C9、CYP2C9 * 8 与 CYP2C9 * 27 的细胞, 命名为 293T-2C9、293T-2C9 * 8 与 293T-2C9 * 27。实时定量 PCR (qRT-PCR) 与 Western blot 检测胞内 CYP2C9 表达。采用 CYP2C9 的特异性底物双氯芬酸对 CYP2C9 的活性进行评价。**结果** 成功构建 MigR1-CYP2C9、MigR1-CYP2C9 * 8 与 MigR1-CYP2C9 * 27 表达载体。采用构建病毒感染获得的单克隆细胞 293T-2C9、293T-2C9 * 8 与 293T-2C9 * 27 在 30 代后荧光显微镜下观察可见绿色荧光表达率在 100%, qRT-PCR 与 Western blot 均表明有目标分子表达。提取自这三株细胞的微粒体均可催化双氯芬酸代谢为 4-羟基双氯芬酸。**结论** 成功构建稳定表达 CYP2C9、CYP2C9 * 8 与 CYP2C9 * 27 人源化细胞模型, 该方法构建的细胞可用于 CYP2C9 * 8 与 * 27 两个突变体的功能研究。

关键词: 细胞色素 P450 2C9 (CYP2C9); CYP2C9 * 8; CYP2C9 * 27; 慢病毒; HEK293T

中图分类号: R 329.2 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2018)07-001-06 DOI: 10.7619/jcmp.201807001

Construction of cytochrome P450 2C9 * 8 and CYP2C9 * 27 lentiviral expression plasmid and stable express in HEK293 cells

LIAO Kai^{1,2}, LIU Yong³, WAN Zijin¹, LI Wei^{1,2}

(1. Medical College of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, 225001; 2. Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Geriatric Diseases in Jiangsu, Yangzhou, Jiangsu, 225001; 3. School of Life and Medicine of Dalian University of Technology, Panjin, Liaoning, 124221)

ABSTRACT: Objective To construct lentiviral expression plasmids of CYP2C9, CYP2C9 * 8 and CYP2C9 * 27, and to express CYP2C9, CYP2C9 * 8 and CYP2C9 * 27 stably in HEK293T cells. **Methods** CYP2C9 coding region was obtained by reverse transcription PCR from the human liver total RNA, and then cloned into the mammalian expression vector MigR1. CYP2C9 * 8 or CYP2C9 * 27 coding sequences were obtained from MigR1-CYP2C9 by overlapping PCR and then cloned into MigR1. The coding sequences were introduced to HEK293 cells by lentivirus, and 293T-2C9, 293T-2C9 * 8 and 293T-2C9 * 27 were screened by flow cytometry and monoclonal picking. Cellular fluorescence, qRT-PCR, Western blot and the metabolic activity assays were used to identify the cells. **Results** MigR1-CYP2C9, MigR1-CYP2C9 * 8 and MigR1-CYP2C9 * 27 plasmids were constructed. All monoclonal cells 293T-2C9, 293T-2C9 * 8 and 293T-2C9 * 27 cell lines expressed GFP after 30 passages. Both qRT-PCR and Western blot assay showed CYP2C9 expression in the cells. Microsomes of the three cell lines were capable of catalyzing diclofenac to 4-OH diclofenac.

收稿日期: 2017-10-20 录用日期: 2017-12-10

基金项目: 江苏省教育厅自然基金项目(14KJB310026); 江苏省扬州市自然科学基金(YZ2014020); 扬州大学创新培育项目

通信作者: 李巍, E-mail: weili@yzu.edu.cn

Conclusion 293T-2C9, 293T-2C9 * 8 and 293T-2C9 * 27 cell lines stably express CYP2C9, CYP2C9 * 8 and CYP2C9 * 27, respectively. The cell lines provide useful tools for the function investigation of CYP2C9 * 8 and CYP2C9 * 27.

KEY WORDS: cytochrome P4502C9 (CYP2C9); CYP2C9 * 8; CYP2C9 * 27; lentivirus; HEK293T

CYP2C9 是人体内重要的药物 I 相代谢酶,参与了超过 15% 临床药物的代谢清除^[1], 其底物包括 S-华法林、苯妥英、双氯芬酸、格列甲嗪和甲苯磺丁脲等。CYP2C9 基因具有高度的多态性, 目前已发现超过 60 种 CYP2C9 突变体。这些基因多态性可能影响其底物药的代谢速率及血药浓度, 在药物不良反应中起到了关键作用^[2-3]。故研究 CYP2C9 基因多态性对临床安全用药、药物不良反应的预测及指导合理用药具有重要的意义。

CYP2C9 * 8 (449G > A) 为非裔美国人 CYP2C9 常见的单碱基突变^[4-5], 而在亚洲人中该位点常见突变为 CYP2C9 * 27 (499G > T), 在蛋白序列上 CYP2C9 蛋白上 150 位精氨酸分别突变为赖氨酸和组氨酸^[2, 6]。体外数据^[7-8]表明, 在对催化底物代谢速率的影响上, CYP2C9 * 8 与 CYP2C9 * 27 表现出了不同的选择性。这两种突变均导致 CYP2C9 的底物氯沙坦等药物的代谢清除速率降低。CYP2C9 * 8 代谢双氯芬酸和氟西汀的速率与野生型 CYP2C9 相比均下降, 而 CYP2C9 * 27 催化双氯芬酸和氟西汀代谢的速率与野生型并无显著差异^[9-10]。此外 CYP2C9 * 8 代谢清除苯妥英速率降低, 而 CYP2C9 * 27 却导致了代谢清除速率的显著上升^[11]。目前 CYP2C9 * 8 与 CYP2C9 * 27 突变体对酶活性影响的机制仍未完全明确, 因此构建 CYP2C9 * 8 与 CYP2C9 * 27 的表达体系, 对研究底物代谢的变化和催化机制十分必要。

细胞色素 P450 (CYPs) 为膜蛋白, 大肠杆菌表达 CYPs 后与脂质重构是目前常见的表达 CYPs 的方法之一^[12], 另外常用的真核表达模型为昆虫细胞模型, 具有表达量高的优点, 但没有足够的辅酶表达以支持反应^[13]。这些模型可能在蛋白修饰或脂质构成上与人存在种属差异, 可能导致使用这些模型获得的数据与人体数据存在差异。另外目前也缺乏稳定表达 CYP2C9 * 8 与 CYP2C9 * 27 的人源化体系。因此本研究通过建立慢病毒表达质粒, 将 CYP2C9 * 8 与 CYP2C9 * 27

稳定表达于人 HEK293T 细胞, 对于 CYP2C9 * 8 与 CYP2C9 * 27 的功能和催化机制研究是一个有效的模型。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

逆转录试剂盒、PCR 扩增试剂盒 (PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase)、DL 5000 DNA 分子质量标准、EcoR I 限制性内切酶、Xho I 限制性内切酶、E. coli DH5 α 感受态细胞购自 Takara 公司, T4 连接酶购自 NEB 公司, 胶回收试剂盒、DNA 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司, MigR1、pCMV-VSV-G 与 pC-MV-Gag-Pol 质粒由扬州大学郁多男教授惠赠, HEK293T 细胞由扬州大学郑英教授惠赠, TRIzol、lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司, CYP2C9 抗体购自 Bio-rad 公司, β -actin 抗体、HRP-山羊抗小鼠二抗和 HRP-山羊抗兔二抗购自中杉金桥公司。

1.2 重组质粒的构建

TRIzol 法提取人肝组织总 RNA, 并逆转录。采用带有限制性内切酶酶切位点的 CYP2C9 编码区的上下游引物 (CYP2C9-RE-F 与 CYP2C9-RE-R, 引物序列见表 1) 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物采用 EcoR I 和 Xho I 进行双酶切, 纯化后采用 T4 DNA 连接酶与 EcoR I 和 Xho I 双酶切后的 MigR1 质粒进行连接。将连接产物转化至感受态 E. coli DH5 α , 双酶切筛选阳性克隆并送生工公司测序。获得 CYP2C9 的重组慢病毒表达质粒, 命名为 MigR1-CYP2C9。

用重叠 PCR 方法构建 CYP2C9 * 8 与 CYP2C9 * 27 编码序列。采用含有 449 位 G > A 的正义引物 (CYP2C9 * 8-F) 与 CYP2C9-RE-R 组合, 含有 449 位 G > A 的反义引物 (CYP2C9 * 8-R) 与 CYP2C9-RE-F 组合, 以 MigR1-CYP2C9 为模板, 分别 PCR 扩增获得两段产物。将这两段产物

组合进行重叠 PCR 反应,获得含有限制性内切酶酶切位点的 CYP2C9 * 8 的编码序列。采用含有 449 位 G > T 的正义引物 CYP2C9 * 27-F 与 CYP2C9-RE-R 组合,含有 449 位 G > T 的反义引物 CYP2C9 * 27-R 与 CYP2C9-RE-F 组合,同样方法获得含有限制性内切酶酶切位点的 CYP2C9 * 27 的编码序列。限制性内切酶酶切 CYP2C9 * 8 与 CYP2C9 * 27 编码序列后并连接至 MigR1 载体,筛选阳性克隆并测序鉴定。获得 CYP2C9 * 8 与 CYP2C9 * 27 的重组慢病毒表达质粒,命名为 MigR1-CYP2C9 * 8 与 MigR1-CYP2C9 * 27。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	序列(5'→3')
CYP2C9-RE-F	CCGCTCGAGGAGATGGATTCTCTTGCGTC
CYP2C9-RE-R	CCGGAATTCTCAGACAGGAATGAAGCA
CYP2C9 * 8-F	AGGCAGTGGCCTTCTCTTGA
CYP2C9 * 8-R	TGTTCAAGAGGAAGCCCACTG
CYP2C9 * 27-F	CTCTCCACAAGGCAGAGGG
CYP2C9 * 27-R	GGAAGCCCTCTGCCCTTGTTGA

1.3 表达 CYP2C9、CYP2C9 * 8 与 CYP2C9 * 27 的细胞株的建立

HEK293T 细胞培养于 3×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板后培养 24 h,用 Lipfectamine 2000 将 MigR1、MigR1-CYP2C9、MigR1-CYP2C9 * 8 或 MigR1-CYP2C9 * 27 分别与病毒包装质粒 GAG-POL 和 VSV-G 共转染 293T 细胞(DNA 分别为 1.8、0.6 和 0.6 μg),5 h 后更换为新鲜培养基。24 h 后收集培养基上清,采用 0.45 μm 滤膜过滤,获得含慢病毒的培养基,加入聚凝胺(终浓度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。293T 细胞(3×10^5 /孔)接种于 6 孔板后培养 24 h,更换培养基为上一步获得的含病毒的培养基,继续培养 72 h 后,更换培养基为 RPIM1640 培养基(含 10% 胎牛血清、100 KU/L 青霉素和 100 mg/链霉素)。传代至 100 mm 细胞培养皿继续培养后,进行流式分选,稀释至 6 个/mL,接种于 100 mm 细胞培养皿(5 mL),培养 72 h。于荧光显微镜下观察,挑取表达绿色荧光蛋白的克隆至 24 孔板中。细胞传代 30 代后绿色荧光蛋白仍稳定表达,细胞命名为 293T-MigR1、293T-2C9、293T-2C9 * 8 与 293T-2C9 * 27。

1.4 胞内 CYP2C9 表达水平的检测

1.4.1 qRT-PCR 检测 CYP2C9 的 mRNA 水平: Trizol 法提取 293T-MigR1、293T-2C9、293T-2C9 * 8

与 293T-2C9 * 27 的总 RNA 进行反转录。采用 SYBR Green qRT-PCR 方法,利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 对 CYP2C9 的相对表达量进行分析。CYP2C9 和 GAPDH 的 qRT-PCR 引物序列见参考文献^[14]。

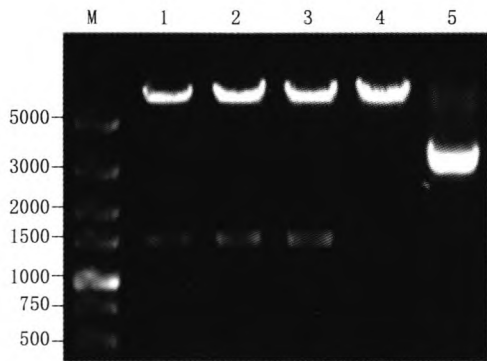
1.4.2 Western Blot 检测 CYP2C9 的蛋白表达水平: RIPA 裂解液收集 293T-MigR1、293T-2C9、293T-2C9 * 8 与 293T-2C9 * 27 细胞全蛋白。以 20 μg 的蛋白量上样于 10% SDS-PAGE 凝胶并电泳,将蛋白转移到硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉封闭,分别与 CYP2C9 抗体(1 : 5 000 稀释)或 β -actin 抗体(1 : 1 000 稀释)于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗 3 次后与 HRP-山羊抗兔抗体(1 : 5 000 稀释)或 HRP-山羊抗小鼠抗体(1 : 5 000 稀释)室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, ECL 显色,用化学发光成像系统成像(Tanon 5500)。

1.4.3 CYP2C9 活性检测: 分别培养 293T-MigR1、293T-2C9、293T-2C9 * 8 与 293T-2C9 * 27 至对数生长期并用细胞刮刀收集全部细胞并重悬于含 0.15 mol/L KCl 的 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 值 7.4),70W 功率下超声破碎细胞,于 9 000 $\times g$ 离心 20 min,收集上清后 100 000 $\times g$ 离心 1 h,获得沉淀重悬于 100 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.4),即为细胞的微粒体悬液。人肝微粒体的制备方法见参考文献[15]。分别上述取微粒体(0.5 mg/mL)与氯化镁(MgCl_2)(5 mmol/L),双氯芬酸钠(100 $\mu\text{mol}/\text{L}$)及 NADPH(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)混合,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 后加入甲醇终止反应。采用 LC/MS/MS 检测代谢产物 4-羟基双氯芬酸^[14]。

2 结果

2.1 重组表达质粒的鉴定

来自人肝组织的 cDNA 经 PCR 扩增后,获得产物大小在 1 500 bp 左右。通过重叠 PCR 法获得产物大小也约为 1 500 bp,与预期 CYP2C9 编码序列一致。上述片段分别插入 MigR1 质粒后,重组获得的 MigR1-CYP2C9、MigR1-CYP2C9 * 8 与 MigR1-CYP2C9 * 27 质粒分别经 EcoR I 和 Xho I 双酶切,得到与预期片段相符约 6 000 bp 的载体片段和约 1 400 bp 的目的片段(图 1)。测序结果利用 NCBI 中的 Blast 工具与 CYP2C9 进行比对,结果表明 449G > A (CYP2C9 * 8)与 449G > T (CYP2C9 * 27)突变成功(图 2),序列中无其他突变。



M: DNA marker DL5000; 1: MigR1-CYP2C9 双酶切产物;
2: MigR1-CYP2C9 * 8 双酶切产物; 3: MigR1-CYP2C9 * 27
双酶切产物; 4: MigR1 双酶切产物; 5: MigR1 质粒

图 1 重组慢病毒表达质粒的双酶切验证

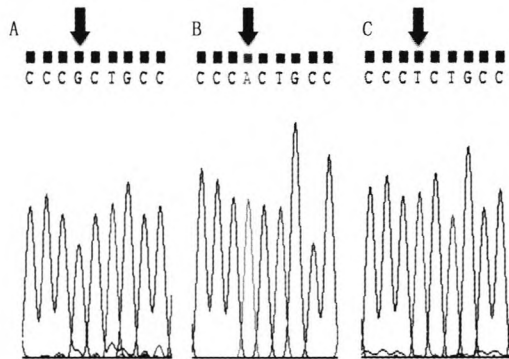


图 2 重组质粒 MigR1-CYP2C9(A)、MigR1-CYP2C9 * 8(B)
与 MigR1-CYP2C9 * 27(C) 测序结果

2.2 绿色荧光蛋白的表达情况

细胞连续培养 30 代后,在荧光显微镜下观察可以看到 293T-2C9、293T-2C9 * 8、293T-2C9 * 27 与 293T-MigR1 细胞均有明显的绿色荧光,而未感染的 293T 细胞未见绿色荧光(图 3)。

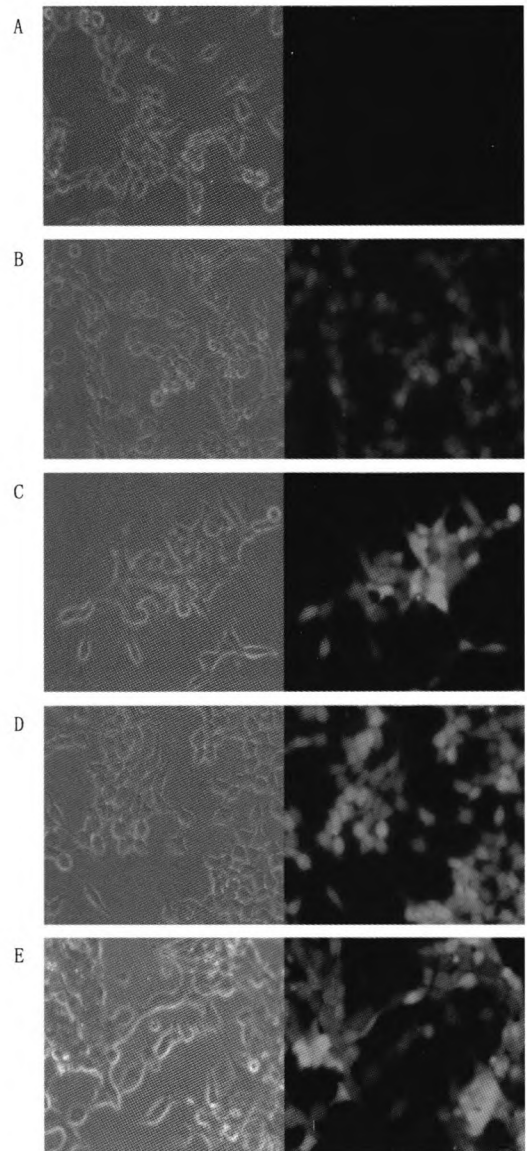
2.3 qRT-PCR 检测 CYP2C9 mRNA 水平

细胞连续培养 30 代后,提取 293T-MigR1、293T-2C9、293T-2C9 * 8 与 293T-2C9 * 27 胞内的总 RNA,逆转录后,采用 qRT-PCR 方法,检测胞内的 CYP2C9 mRNA 表达水平。与空质粒对照组(293T-MigR1)比较,293T-2C9、293T-2C9 * 8 与 293T-2C9 * 27 胞内的 mRNA 高水平明表达(图 4)。

2.4 Western blot 检测 CYP2C9 蛋白表达水平

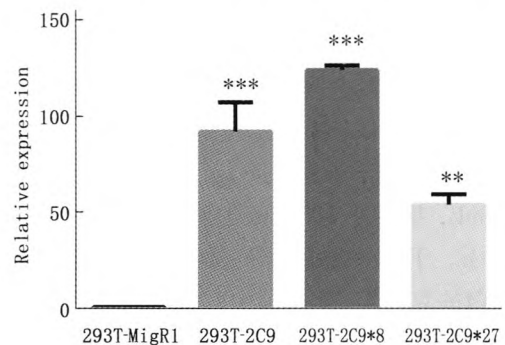
细胞连续培养 30 代后,提取 293T-MigR1、293T-2C9、293T-2C9 * 8 与 293T-2C9 * 27 细胞总蛋白。Western blot 结果显示,293T-2C9、293T-2C9 * 8 与 293T-2C9 * 27 细胞株及阳性对照(肝组织裂解液)在 53kd 附近可见特异性条带,而空质粒对照(293T-MigR1)组未见条带(图 5)。

万方数据



左图为明场图像,右图为荧光图像。

图 3 HEK293T(A)、293T-MigR1(B)、
293T-2C9(C)、293T-2C9 * 8(D)、293T-2C9 * 27(E)
与细胞连续培养 30 代后,细胞内的绿色荧光水平。



*** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$ 。

图 4 293T-MigR1、293T-2C9、293T-2C9 * 8 与
293T-2C9 * 27 细胞连续培养 30 代后,细胞内
CYP2C9 mRNA 的相对表达量。

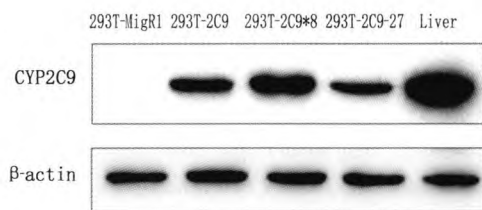


图5 Western blot 检测细胞内 CYP2C9 蛋白的表达水平

2.5 CYP2C9 活性检测

提取细胞微粒体,采用特异性探针底物双氯芬酸对 CYP2C9 的活性进行评价。双氯芬酸与微粒体在 NADPH 存在条件下分别孵育后,检测 4-羟基双氯芬酸的生成速率。结果表明,采用 Western blot 蛋白相对表达量标准化结果后, 293T-2C9、293T-2C9 * 8 与 293T-2C9 * 27 的微粒体均有催化双氯芬酸代谢为 4-羟基双氯芬酸的活性,而且催化活性为 CYP2C9 与 CYP2C9 * 27 接近,而 CYP2C9 * 8 的催化活性较弱(图 6)。

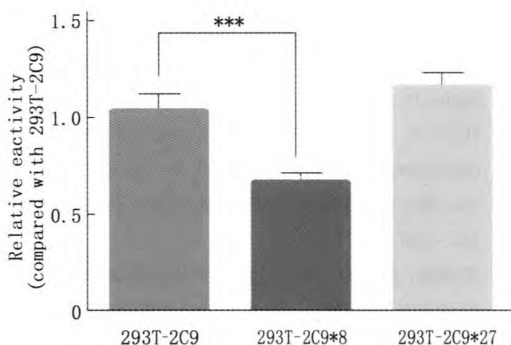


图6 293T-2C9、293T-2C9 * 8 与 293T-2C9 * 27 细胞微粒体催化双氯芬酸生成 4-羟基双氯芬酸的相对生成速率

3 讨论

CYP2C9 * 8 (R150H) 与 CYP2C9 * 27 (R150L) 虽然为同位点的突变,但其对底物代谢清除速率的影响因底物而异^[7-11]。因此评价不同药物代谢速率所受的影响对预测血药浓度和预防药物不良反十分必要^[16]。尽管体内实验研究可以直接反映基因多态性对药物的血药浓度的影响,但由于突变体出现频率较低和直接人体实验的存在安全风险^[17]等原因,重组表达突变体并进行体外酶活性评价是可行的替代方法^[18-19]。CYPs 为膜蛋白,在大肠杆菌中表达后常与二月桂酰基卵磷脂(DLPC)重构^[20-23]。杆状病毒-昆虫细胞体系也是常见的 CYPs 表达体系^[24-26]。上述系统中磷脂成分与人膜磷脂成分存在差异,这些

差异对 CYPs 的活性的影响也影响体外模型预测的准确性^[27-28]。体外研究中,应用昆虫 Sf21、非洲绿猴 COS-7 与人 HepG2 细胞所表达 CYP2C9 * 2 突变体,在研究该突变对甲苯磺丁脲的代谢影响中得到了相反的结论。本研究采用人源 HEK293 细胞表达 CYP2C9 及其突变体,可极大降低表达体系的种属差异在代谢酶活性研究存在的潜在影响。

本研究采用了慢病毒包装质粒后感染 HEK293T 细胞,其效率明显高于使用脂质体直接转染质粒,有效提高了流式分选和单克隆筛选的效率。获得的单克隆细胞在传代 30 代后仍保持 100% 绿色荧光,可稳定表达外源基因。qRT-PCR 与 Western blot 实验结果这表明目标蛋白在 HEK293T 细胞中高表达。

以双氯芬酸为底物研究表明, CYP2C9 * 8 催化生成 4-羟基双氯芬酸的速率低于野生型 CYP2C9, 该结果与人体内结果相符^[29], 表明该稳定表达 CYP2C9 * 8 的细胞模型可适合体内代谢情况的预测研究。CYP2C9 特异性底物甲苯磺丁脲的体内研究表明, CYP2C9 * 27 突变并不显著影响甲苯磺丁脲的体内药代动力学行为^[30]。本研究构建的 CYP2C9 * 27 与野生型 CYP2C9 的代谢速率相近,该结果与体内结论相似。表明本研究构建的稳定表达体系适用于 CYP2C9 * 8 与 CYP2C9 * 27 两个突变体的研究。

综上所述,本研究成功建立一种稳定表达 CYP2C9、CYP2C9 * 8 与 CYP2C9 * 27 的细胞模型,为 CYP2C9 蛋白 150 位的常见突变体的代谢能力的预测和 CYP2C9 底物的药物的安全用药提供理论依据。

参考文献

- [1] Miners J O, Birkett D J. Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism[J]. Br J Clin Pharmacol, 1998, 45(6): 525-538.
- [2] Maekawa K, Fukushima-Uesaka H, Tohkin M, et al. Four novel defective alleles and comprehensive haplotype analysis of CYP2C9 in Japanese [J]. Pharmacogenet Genomics, 2006, 16(7): 497-514.
- [3] Zanger U M, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation[J]. Pharmacol Ther, 2013, 138(1): 103-141.
- [4] Cavallari L H, Vaynshteyn D, Freeman KM, et al. CYP2C9 promoter region single-nucleotide polymorphisms linked to the

- R150H polymorphism are functional suggesting their role in CYP2C9 *8-mediated effects[J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2013, 23(4): 228–231.
- [5] Liu Y, Jeong H, Takahashi H, et al. Decreased warfarin clearance associated with the CYP2C9 R150H (*8) polymorphism[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2012, 91(4): 660–665.
- [6] Dai D P, Xu R A, Hu L M, et al. CYP2C9 polymorphism analysis in Han Chinese populations: building the largest allele frequency database[J]. *Pharmacogenomics J*, 2014, 14(1): 85–92.
- [7] Wang Y H, Pan P P, Dai D P, et al. Effect of 36 CYP2C9 variants found in the Chinese population on losartan metabolism in vitro [J]. *Xenobiotica*, 2014, 44(3): 270–275.
- [8] Dai D P, Wang Y H, Wang S H, et al. In vitro functional characterization of 37 CYP2C9 allelic isoforms found in Chinese Han population [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(11): 1449–1456.
- [9] Ji Y, Chen S, Zhao L, et al. In vitro assessment of 39 CYP2C9 variants found in the Chinese population on the metabolism of the model substrate fluoxetine and a summary of their effects on other substrates [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2015, 40(3): 320–327.
- [10] Xia M M, Wang L, PP P A, et al. The role of CYP2C9 genetic polymorphisms in the oxidative metabolism of diclofenac in vitro[J]. *Pharmazie*, 2014, 69(12): 898–903.
- [11] Chen L G, Wang Z, Zhu Y, et al. In vitro metabolism of phenytoin in 36 CYP2C9 variants found in the Chinese population[J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 253: 93–99.
- [12] Kaspera R, Narahariseti S B, Evangelista E A, et al. Drug metabolism by CYP2C8. 3 is determined by substrate dependent interactions with cytochrome P450 reductase and cytochrome b5[J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 82(6): 681–691.
- [13] Hiratsuka M. In vitro assessment of the allelic variants of cytochrome P450 [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2012, 27(1): 68–84.
- [14] 李巍, 虞茜, 万子衿, 等. 雷公藤内酯醇对肝细胞色素 P450 的诱导及机制研究[J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(3): 7–15.
- [15] Li W, Liu Y, He Y Q, et al. Characterization of triptolide hydroxylation by cytochrome P450 in human and rat liver microsomes[J]. *Xenobiotica*, 2008, 38(12): 1551–1565.
- [16] Zhou Y, Ingelman-Sundberg M, Lauschke V M. Worldwide Distribution of Cytochrome P450 Alleles: A Meta-analysis of Population-scale Sequencing Projects[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2017, 102(4): 688–700.
- [17] Hiratsuka M. Genetic Polymorphisms and in Vitro Functional Characterization of CYP2C8, CYP2C9, and CYP2C19 Allelic Variants[J]. *Biol Pharm Bull*, 2016, 39(11): 1748–1759.
- [18] Dai D P, Wang S H, Li C B, et al. Identification and Functional Assessment of a New CYP2C9 Allelic Variant CYP2C9 *59[J]. *Drug Metab Dispos*, 2015, 43(8): 1246–1259.
- [19] Wienkers L C, Heath T G. Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(10): 825–833.
- [20] Jerabek P, Florian J, Martinek V. Lipid molecules can induce an opening of membrane-facing tunnels in cytochrome P450 1A2 [J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2016, 18(44): 30344–30356.
- [21] Dawaliby R, Trubbia C, Delpote C, et al. Phosphatidylethanolamine Is a Key Regulator of Membrane Fluidity in Eukaryotic Cells[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(7): 3658–3667.
- [22] Liu K C, Hughes J M X, Hay S, et al. Liver microsomal lipid enhances the activity and redox coupling of colocalized cytochrome P450 reductase-cytochrome P450 3A4 in nanodiscs [J]. *FEBS J*, 2017, 284(14): 2302–2319.
- [23] Llerena A, Alvarez M, Dorado P, et al. Interethnic differences in the relevance of CYP2C9 genotype and environmental factors for diclofenac metabolism in Hispanics from Cuba and Spain[J]. *Pharmacogenomics J*, 2014, 14(3): 229–234.
- [24] Hu G X, Pan P P, Wang Z S, et al. In vitro and in vivo characterization of 13 CYP2C9 allelic variants found in Chinese Han population[J]. *Drug Metab Dispos*, 2015, 43(4): 561–569.
- [25] 常泽娜, 杨长青. 中药注射剂对细胞色素 P450 2C9 酶活性及细胞色素 P450 2C9 底物的药物代谢影响的研究现状 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33(12): 1165–1168.
- [26] 王晓东, Arthur I. Cederbaum 细胞色素 P450 2E1 在酒精性肝损伤中的作用及研究进展[J]. *第三军医大学学报*, 2016, 38(14): 1585–1592.
- [27] 李辉, 李妙男, 康品方, 等. 细胞色素 P450 3A4 + 894C > T 基因多态性与急性冠脉综合症患者冠状动脉介入术预后的关系[J]. *南方医科大学学报*, 2017, 37(2): 261–265.
- [28] 王晓焕, 傅薇, 张云坤, 等. CYP2C19 基因多态性与云南汉族人群冠心病的相关性研究 [J]. *中华全科医学*, 2017, 15(5): 763–766.
- [29] 张巧利, 张丽娟, 李芬. 细胞色素 P450 基因多态性对围绝经期妇女潮热易感性的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2016, 38(14): 1639–1644.
- [30] Song B J, Akbar M, Jo I, et al. Translational Implications of the Alcohol-Metabolizing Enzymes, Including Cytochrome P450-2E1, in Alcoholic and Nonalcoholic Liver Disease[J]. *Adv Pharmacol*, 2015, 74: 303–372.