

丹参注射液对人肝微粒体酶 CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 体外抑制作用的研究

叶娜, 万丽*, 杨秋楠, 李小彬, 王海蓉, 肖昌兵

成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137

摘要: 目的 评价丹参注射液在体外对人肝微粒体酶 CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 活性的影响。方法 将丹参注射液与 CYP450 酶 3 种亚型 (CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6) 的特异性探针底物甲苯磺丁脲、奥美拉唑、右美沙芬与大鼠肝微粒体进行孵育, 采用 LC-MS/MS 法测定对应 3 种代谢产物 4-羟基甲苯磺丁脲、5-羟基奥美拉唑、右啡烷的浓度, 求出 IC_{50} 。结果 丹参注射液对 CYP2C9、CYP2C19 和 CYP2D6 的 IC_{50} 值均 $>50 \mu\text{g/mL}$ 。结论 丹参注射液对人肝微粒体酶 CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 没有抑制作用。

关键词: 细胞色素 P450 酶; 丹参注射液; 人肝微粒体; 抑制

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2014)06-0502-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.06.005

In vitro inhibition of Danshen Injection on human liver cytochrome P450 enzyme CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6

YE Na, WAN Li, YANG Qiu-nan, LI Xiao-bin, WANG Hai-rong, XIAO Chang-bing

The Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of Danshen injection on the activities of three human cytochrome P450 enzymes (CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6) *in vitro*. **Methods** The Danshen injection, three specific probe of cytochrome P450 enzymes (including orinase, omeprazole, and dextromethorphan) and human liver microsome were coincubated. The concentration of the three kinds of metabolites (including 4-hydroxy tolbutamide, 5-hydroxy omeprazole, and dextrophan) were analyzed by LC-MS/MS assay. The values of IC_{50} were calculated. **Results** The IC_{50} values of Danshen Injection on CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 were more than $50 \mu\text{g/mL}$. **Conclusion** The Danshen Injection has not significant inhibitory effect on the activities of CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6.

Key words: cytochrome P450 enzyme; Danshen Injection; human liver microsome; inhibition

合并用药是临床上非常常见,也是导致药物相互作用的主要诱因,可发生在药物的吸收、分布、代谢、排泄过程,其中发生在代谢过程的药物相互作用占到 40%^[1-2]。而细胞色素 P450 系统为一类亚铁血红素-硫醇盐蛋白的超家族,参与各种内源性、外源性物质包括药物、毒物、致癌物质等的代谢,其中超过 80% 药物代谢由其介导,很大程度影响药物代谢相互作用^[3-4]。因此,了解药物本身对 CYP450

酶的作用,从而避免潜在的药物相互作用,大大降低了不良反应和毒性反应发生的几率^[5]。

中药注射剂成分复杂,近年来其不良反应频频发生,葛根素、鱼腥草、刺五加、清开灵注射液等事件,使大众对中药注射剂的安全性给予高度关注。本实验室前期研究发现丹参注射剂对大鼠肝微粒体酶 CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 呈现出不同程度的抑制作用。因此,为比较其种属差异,进一步研

收稿日期: 2014-09-03

作者简介: 叶娜 (1989—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为药物分析、中药有效成分及质量标准研究。

Tel: 13808206512 E-mail: yena310@126.com

*通信作者 万丽 (1965—), 女, 教授, 主要从事药物分析、中药有效成分及质量标准研究。Tel: 15982418713 E-mail: wanli8801@163.com

究其对人肝微粒体酶的影响,本研究采用探针药物法考察丹参注射液对人肝微粒体酶 CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 的影响,用于指导丹参注射液临床安全用药。

1 材料

1.1 仪器

Waters2010 型高效液相色谱仪(600 泵、717 自动进样器、996PD 紫外检测器、Waters MassLynx V4.1 Software 数据处理系统); Thermo Heraeus Fresco 17 低温冷冻离心机(Thermo Scientific); XW—80A 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂); HGC—24 型氮吹仪(北京瑞邦兴业科技有限公司); Millipore 纯水系统(美国 Millipore 公司)。

1.2 药品与试剂

丹参注射液(批号 1403019, 安徽天洋药业有限公司); 人肝微粒体(20 mg/mL)购自武汉普莱特生物医药技术有限公司, 于-80 ℃冷冻保存; NADPH 发生系统(A 液、B 液)购自武汉普莱特生物医药技术有限公司, 于-80 ℃冷冻保存; 甲苯磺丁脲购自德国 Dr.Ehrenstorfer 公司, 奥美拉唑、右美沙芬、地西洋对照品均购自中国食品药品检定研究院, 4-羟基甲苯磺丁脲购自美国 Sigma 公司, 5-羟基奥美拉唑、右啡烷购自加拿大 Toronto Research Chemicals 公司。甲醇、乙腈为色谱纯, 购自 Fisher Scientifics 公司, 其他化学试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 孵育体系

每个孵育体系总体积为 200 μL , 体系包括 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液($\text{pH}=7.4$) 188 μL , NADPH 发生系统 12 μL (A 液 10 μL , B 液 2 μL), 临用时冰浴上混合制得。各探针底物及对应的代谢产物、孵育浓度/时间及酶亚型如下^[6-7]: 甲苯磺丁脲(4-羟基甲苯磺丁脲, 100 $\mu\text{mol/L}$, 30 min, CYP2C9); 奥美拉唑(5-羟基化奥美拉唑, 20 $\mu\text{mol/L}$, 20 min, CYP2C19); 右美沙芬(右啡烷, 150 $\mu\text{mol/L}$, 10 min,

CYP2D6)。

2.2 样品处理

取上述孵育体系, 冰浴上加入 1 μL 的一系列浓度的丹参注射液(1、10、100、1 000、10 000 $\mu\text{g/mL}$) 和 1 μL 的各特异性探针底物(空白对照样品不加丹参注射液, 只加等量溶剂), 在 37 ℃水浴中预热 5 min, 冰浴上加入 2 μL 的肝微粒体酶, 轻轻混匀, 根据不同的探针底物在 37 ℃水浴中孵育 10~30 min, 加入 4 ℃甲醇溶液(含内标地西洋 20 ng/mL) 1 000 μL 混匀终止反应, 每个样品平行测定 3 次。实验中加入孵育体系中的药物体积控制在 1%以内。

取终止反应后含内标的肝微粒体反应体系样品, 旋涡振荡混匀 3 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 1 000 μL , 40 ℃下氮气吹干, 相应的流动相 100 μL 复溶, 旋涡振荡混匀 3 min, 12 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液适量, 进样 5 μL , 用 LC-MS/MS 法测定各特异性底物对应的代谢产物的生成量。

优化各代谢物的提取方法: 4-羟基甲苯磺丁脲用醋酸乙酯萃取, 5-羟基奥美拉唑和右啡烷用甲醇萃取。

2.3 UPLC-MS/MS 条件

2.3.1 色谱条件 4-羟基甲苯磺丁脲和右啡烷色谱条件相同: 色谱柱为 Waters Acquity UPLC™ BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水(65:35), 体积流量 0.2 mL/min, 柱温 30 ℃, 样品室温度 10 ℃, 运行时间 2 min, 进样体积 5 μL 。

5-羟基奥美拉唑色谱条件: 色谱柱为 Phenomenex kinetex C₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈-水(梯度洗脱: 0~2.5 min, 35%乙腈~60%乙腈), 体积流量 0.2 mL/min, 柱温 30 ℃, 样品室温度 10 ℃, 运行时间 2.5 min, 进样体积 5 μL 。

2.3.2 质谱条件 通过优化选择质谱参数, 最终确定的 3 种代谢物的质谱条件, 结果见表 1。

表 1 各代谢产物测定的质谱参数及 MRM 检测条件

Table 1 Mass spectrum parameters and MRM condition of each metabolite

内标/代谢物	离子源	毛细管电压/kV	锥孔电压/V	萃取锥孔电压/V	碰撞能量/eV	检测离子对
4-羟基甲苯磺丁脲	ESI ⁻	2.6	25	3	25	285.08>186.04
5-羟基奥美拉唑	ESI ⁺	2.7	15	5	15	362.22>214.18
右啡烷	ESI ⁺	2.6	23	5	28	258.24>157.16
地西洋(内标)	ESI ⁺	2.5	30	5	44	285.20>193.10

2.4 数据处理

用各模型底物的代谢物的生成速率反映微粒体孵育体系中各 CYP450 亚型酶的活性；设定不加丹参注射液的代谢底物的孵育体系中各同工酶活性为 100%，作为对照组；样品组代谢物生成速率相对于对照组生成速率的百分比，作为各亚型酶的剩余活性。

剩余活性 = 各探针底物样品代谢物生成速率 / 对照样品代谢物生成速率

采用 SPSS17.0 数据处理软件进行数据的统计分析。对于正态分布的参数，两组间比较采用独立样本 *t* 检验。用 Origin8.0 对数据进行作图，计算丹参注射液对各 CYP450 酶亚型的 IC₅₀ 值。

3 结果

3.1 方法学验证

3.1.1 专属性 各待测组分及内标的峰形及分离良好，具有较高的特异性。4-羟基甲苯磺丁脲、5-羟基奥美拉唑、右啡烷及内标地西洋的保留时间分别是 1.34、2.28、1.18、1.26 min。

3.1.2 标准曲线 采用上述选定的液相、质谱条件对 3 种代谢物进行定量，各代谢产物质量浓度 (ng/mL) 为横坐标，待测物峰面积 (As) 与内标峰面积 (Ai) 的比值 (As/Ai) 为纵坐标，采用加权最小二乘法进行线性回归，得浓度与响应值的回归方

程，线性范围见表 2。

3.1.3 精密度与准确度试验 空白肝微粒体孵育系统中，制备代谢物的低、中、高 3 个质量浓度代谢产物质控样品，按“2.2”项下处理，即加入 4 ℃ 甲醇溶液（含内标地西洋 20 ng/mL）1 000 μL，旋涡振荡混匀 3 min，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液 1 000 μL，40 ℃ 下氮气吹干，相应的流动相 100 μL 复溶，旋涡振荡混匀 3 min，12 000 r/min 离心 15 min，吸取上清液适量，进样 5 μL，测定批内和批间差异。结果见表 3，表明低、中、高 3 个质量浓度的批内、批间精密度均小于 15%，符合要求，精密度良好。

3.1.4 提取回收率 空白肝微粒体孵育系统中，制备代谢物的低、中、高 3 个质量浓度代谢产物质控样品，按“2.2”项下处理，测定提取回收率。结果见表 3，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。

表 2 各代谢物的线性范围

Table 2 Linear range of each metabolite

代谢物	回归方程	线性范围	<i>r</i>
4-羟基甲苯磺丁脲	$Y=0.089X+0.231$	1.0~1 000 ng/mL	0.994
5-羟基奥美拉唑	$Y=0.099X+0.044$	0.5~1 000 ng/mL	0.997
右啡烷	$Y=0.161X-0.020$	1.0~1 000 ng/mL	0.998

表 3 不同探针代谢物批内、批间精密度和准确度 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Intra-assay precision, inter-assay precision, and recovery of probe metabolites ($\bar{x} \pm s, n=6$)

成分	理论质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	批间精密度		批内精密度		回收率/%
		实测浓度/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%	实测浓度/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%	
4-羟基甲苯磺丁脲	5	4.87±0.49	10.12	6.02±0.51	8.45	101.55±3.69
	250	265.76±17.43	6.56	267.94±13.48	5.03	97.12±2.93
	800	847.26±40.08	4.73	826.31±26.94	3.26	95.42±5.78
5-羟基奥美拉唑	5	5.09±0.20	3.86	5.06±0.42	8.26	89.75±7.07
	250	257.79±15.24	5.91	235.44±14.72	6.25	90.58±4.60
	800	841.56±65.14	7.74	832.36±25.80	3.10	100.84±6.08
右啡烷	5	5.97±0.54	9.01	5.80±0.44	7.57	89.26±3.94
	250	247.06±12.97	5.25	262.68±8.09	3.08	107.68±7.25
	800	837.93±48.35	5.77	772.95±41.66	5.39	96.26±8.31

3.1.5 稳定性试验 制备低、中、高 3 种质量浓度的 4-羟基甲苯磺丁脲、5-羟基奥美拉唑、右啡烷样品，按“2.2”项下处理，测定于进样器中放置 24 h (4 ℃)，-80 ℃ 冰冻放置 7 d 条件下的稳定性。结果表明，各代谢产物于微粒体样品中稳定性良好 (表 4)。

3.1.6 基质效应 取空白肝微粒体孵育体系，分别加入低、中、高 3 种质量浓度的不同代谢产物，按“2.2”项下处理，与相应浓度代谢产物样品结果进行比较，以两者峰面积的比值来计算基质效应。结果表明，各组分基质效应的平均值在 89.74%~102.03% (表 4)。

表4 不同探针代谢物的稳定性及基质效应 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Stability and matrix effect of probe metabolites ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

成分	理论浓度/ (ng·mL ⁻¹)	4℃放置 24 h		-80℃放置 7 d		基质效应/%
		平均实测浓度/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%	平均实测浓度/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%	
4-羟基甲苯磺丁脲	5	5.73±0.43	7.45	5.48±0.44	7.99	90.88
	250	240.39±14.38	5.98	253.02±4.45	1.76	102.03
	800	816.57±56.34	6.90	828.74±22.21	2.68	93.59
5-羟基奥美拉唑	5	6.18±0.40	6.49	5.34±0.33	6.09	97.98
	250	273.36±10.52	3.85	257.45±12.25	4.76	89.74
	800	822.94±23.62	2.87	837.31±24.53	2.93	94.82
右啡烷	5	4.71±0.56	11.94	5.09±0.49	9.57	93.12
	250	268.53±12.30	4.58	246.27±14.46	5.87	90.07
	800	826.77±30.34	3.67	798.69±26.60	3.33	96.68

3.2 丹参注射液对3种CYP亚酶IC₅₀的测定

丹参注射液对人CYP450酶各亚型(CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6)的抑制曲线见图1。可见,丹参注射液对CYP2C9、CYP2C19和CYP2D6的IC₅₀值>50 μg/mL,各组与空白组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

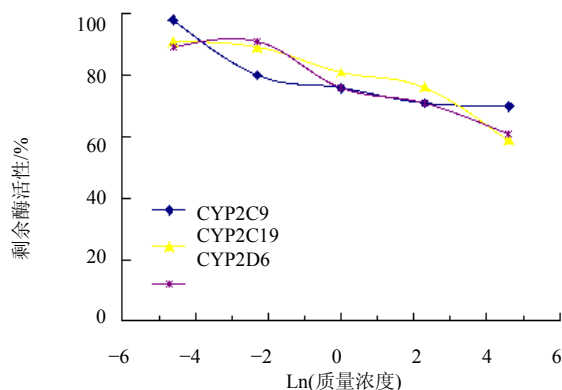


图1 丹参注射液对3种人CYP亚酶介导的探针底物的影响
Fig. 1 Effect of Danshen Injection at different concentration on three human CYP450 enzyme activity

4 讨论

本研究建立了较为简单快捷的分析方法,专属性强、线性范围宽,灵敏度、准确度高,满足生物样品分析方法的一般准则,在前期研究丹参注射液对大鼠肝微粒体酶抑制作用的基础上,针对性选择CYP2C19、CYP2C9和CYP2D6亚型酶,考察丹参注射液在人肝微粒体中对3种亚型酶的影响,便于比较其种属差异。为进一步预测药物相互作用,合理用药及安全性评价提供重要依据。

丹参注射液是由丹参经水提取制成的无菌溶剂,主要含有丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸B和丹酚酸A6等指标性成分^[8]。文献

指出原儿茶醛对CYP3A4、CYP2D6呈弱抑制作用,丹参素则是CYP2C9的中等强度抑制剂^[9],刘高峰等^[10]发现丹参注射液对家兔CYP2D6有抑制作用。从实验结果可知,丹参注射液对人CYP2C9、CYP2C19和CYP2D6均没有抑制作用,与文献存在差异。由于文献^[8]中原儿茶醛及丹参素乃丹参提取物,浓度较大,再者,不同的含丹参有效成分制剂对CYP450活性的影响不同^[11-13],所以本实验结果与文献报道的差异可能与药物作用浓度、剂型、种属有关。由此提示,通过CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6代谢的化学药物联合使用丹参注射液时可能相对安全,但其体内代谢结果是否与体外代谢一致,还有待于进一步临床实验进行验证,从而最大程度避免产生代谢性药物相互作用导致的药物不良反应。

参考文献

- [1] 孙家钰,苗佳. 抗菌药物与细胞色素P450的相关研究[J]. 华西医学, 2012, 27(7): 982-984.
- [2] 黄宇星,刘二伟. 联合用药的药物相互作用及研究方法[J]. 药物评价研究, 2014, (3): 276-279.
- [3] Dong, X, Zhu, L, Wang, J, et al. Effects of atrazine on cytochrome P450 enzymes of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Chemosphere*, 2009, 77(3): 404-412.
- [4] 魏春燕,吴逢波,徐珽. CYP450与药物相互作用[J]. 中国药业, 2014, 23(6): 17-20.
- [5] Bort R, Ponsoda X, Carrasco E, et al. Comparative metabolism of the nonsteroidal antiinflammatory drug, aceclofenac, in the rat, monkey, and human [J]. *Drug Metab Dispos*, 1996, 24(9): 969-975.
- [6] 任磊. 液质联用技术对抗癌药物PAC-1的代谢研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2009.
- [7] Cohen LH, Remley M J, Raunig D, et al. *In vitro* drug interactions of cytochrome p450: an evaluation of

- fluorogenic to conventional substrates [J]. *Drug Metab Dispos*, 2003, 31(8): 1005-1015.
- [8] 李 耿, 辛文峰, 杜金行, 等. UPLC 法同时测定丹参注射剂中 6 个成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25(12): 2021-2024.
- [9] Qiu F, Zhang R, Sun J, *et al*. Inhibitory effects of seven components of danshen extract on catalytic activity of cytochrome P450 enzyme in human liver microsomes [J]. *Drug Metab Dispos*, 2008, 36(7): 1308-1314.
- [10] 刘高峰, 甄立棉, 黄丽军. 丹参注射液对家兔体内 CYP1A2、CYP2D6 和 CYP3A4 活性的影响 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(7): 775-780.
- [11] 孙 敏, 刘 鹏, 付晓丽, 等. 植物成分与细胞色素 P450 相互作用的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(35): 465-468.
- [12] 刘松灿, 张 亮, 裘福荣, 等. 9 种常用含丹参中成药对人肝微粒体, CYP3A 的体外抑制作用 [J]. 中成药, 2013, 35(8): 1766-1779.
- [13] 李 芸, 陈小平. 丹参活性成分或制剂对 CYP450 活性的影响及药物相互作用研究进展 [J]. 中南药学, 2014, 12(1): 57-62.