

丹参-红花组分配伍对雌、雄性心肌缺血大鼠肝药酶亚型影响的比较研究

王小平, 王鹏飞, 白吉庆, 王金, 胡锦涛, 权利娜

陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046

摘要:目的 比较丹参-红花组分配伍对不同性别大鼠肝药酶亚型 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 的影响。方法 取 SD 大鼠按不同性别随机分为丹参-红花高、低剂量(生药 4、2 g/kg)组及模型组 and 对照组, ip 盐酸异丙肾上腺素制备心肌缺血模型, 丹参-红花高、低剂量组给予相应提取物, 模型、对照组给予等体积的蒸馏水, 连续 ig 给药 21 d 后, 取肝组织剪碎制备微粒体, 加入非那西丁、氯唑沙宗、睾酮分别作为 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 的特异性探针底物, 体外温孵育, 建立高效液相色谱(HPLC)法检测探针底物浓度, 测定 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 活性。结果 ①雄性大鼠实验结果显示, 与对照组比较, 模型组显著抑制 CYP2E1 和 CYP3A4 的活性($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, 丹参-红花高剂量组显著抑制 CYP2E1 和 CYP3A4 的活性($P < 0.05$ 、 0.01); 低剂量组显著抑制 CYP2E1 的活性($P < 0.05$), 诱导 CYP3A4 ($P < 0.01$)。②雌性大鼠实验结果显示, 与对照组比较, 模型组显著抑制 CYP2E1 和 CYP3A4 的活性($P < 0.05$), 对 CYP1A2 的影响不显著; 与模型组比较, 丹参-红花高剂量组显著抑制 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 的活性($P < 0.05$ 、 0.01); 丹参-红花低剂量组抑制 CYP2E1 的活性($P < 0.05$), 对 CYP1A2 和 CYP3A4 的影响不显著。③实验结果对比显示, 丹参-红花对雄性、雌性大鼠肝药酶亚型的影响相同点是均抑制了 CYP2E1 和 CYP3A4 活性, 尤其对 CYP2E1 的抑制作用比较明显; 不同点是丹参-红花低剂量诱导了雄性大鼠 CYP3A4 活性, 但对雌性大鼠 CYP3A4 活性无明显影响。结论 丹参-红花组分配伍对不同性别大鼠部分肝药酶亚型活性的影响存在一定的差异。

关键词: 丹参; 红花; CYP1A2; CYP2E1; CYP3A4; 大鼠; 心肌缺血; 肝药酶; 探针

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)12-1711-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.12.007

Comparative study on effect of *Salvia miltiorrhiza* and *Carthamus tinctorius* compatibility on activity of drug-metabolism enzymes in male and female rats with myocardial ischemia

WANG Xiao-ping, WANG Peng-fei, BAI Ji-qing, WANG Jin, HU Jing-ping, QUAN Li-na

Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

Abstract: Objective To compare the effect of the activity of drug-metabolism enzymes caused by the compatibility of *Salvia miltiorrhiza* and *Carthamus tinctorius* in male and female rats with myocardial ischemia. **Methods** SD rats were respectively divided into four groups according to different genders: control group, model group, CSC high and low dose (4 and 2 g/kg) groups. Myocardial ischemia model was prepared by ip isoprenaline hydrochloride. Rats were ig administered respectively with distilled water or equal volume of *Salvia miltiorrhiza* and *Carthamus tinctorius* extract for consecutive 21 d. Liver tissue was cut for microsomal preparation, and phenacetin, chlorzoxazone and testosterone were used as specific probes of CYP2E1, CYP1A2 and CYP3A4 for *in vitro* incubation. A high performance liquid chromatography (HPLC) method was established to detect the probe substrate concentration and determine the activities of CYP1A2, CYP2E1, and CYP3A4. **Results** ① In male rats, compared with control group, the activities of CYP2E1 and CYP3A4 were significantly inhibited in model groups ($P < 0.05$ or 0.01); Compared with model group, the activities of CYP2E1 and CYP3A4 were significantly inhibited in CSC high dose groups ($P < 0.05$ or 0.01), the activities of CYP2E1 were significantly inhibited in low dose groups ($P < 0.05$), and the activities of CYP3A4 were significantly induced in low dose groups ($P < 0.01$); ② In female rats, compared with control group, the activities of CYP2E1 and CYP3A4 were

收稿日期: 2017-04-14

基金项目: 国家自然科学基金委项目(81573624); 陕西省教育厅资助项目(2013JK0835)

作者简介: 王小平(1976—), 女, 陕西宝鸡人, 博士后, 硕导, 研究方向为中药分析与代谢研究。

significantly inhibited in model groups ($P < 0.05$); Compared with model group, the activities of CYP1A2, CYP2E1, and CYP3A4 were significantly inhibited in high dose groups ($P < 0.05$ or 0.01), and the activities of CYP2E1 were significantly inhibited in low dose groups ($P < 0.05$); ③ According to the results of the experiment in male and female rats, the similarity of the effect of *Salvia miltiorrhiza* and *Carthamus tinctorius* on the activity of drug-metabolism enzymes in male and female rats was that the activities of CYP2E1 and CYP3A4 were all significantly inhibited in high dose groups, which was especially obvious for CYP2E1. The difference was that the activity of CYP3A4 was significantly induced in male rats, while that was not affected in female rats.

Conclusion The activity of drug-metabolism enzymes induced or inhibited by *Salvia miltiorrhiza* and *Carthamus tinctorius* extract is different between male and female rats.

Key words: *salvia miltiorrhiza* Bge.; *Carthamus tinctorius* L.; CYP1A2; CYP2E1; CYP3A4; rats; myocardial ischemia; liver drug-metabolism enzymes; probe

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎, 味苦、微寒, 归心、肝经, 具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈之功效, 用于胸痹心痛、脘腹胁痛、癥瘕积聚、热痹疼痛、心烦不眠、月经不调、痛经经闭、疮疡肿痛。红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花, 夏季花由黄变红时采摘, 阴干或晒干, 性味辛、温, 归心、肝经, 具有活血通经、散瘀止痛之功效, 用于经闭、痛经、恶露不行、癥瘕痞块、胸痹心痛、瘀滞腹痛、胸胁刺痛、跌扑损伤、疮疡肿痛^[1]。丹参-红花配伍是常用的活血化瘀相须药对, 从中医方剂数据库中检索出同时含有丹参-红花药对的方剂共有 2 630 首; 在复方专利中同时含有丹参-红花药对的方剂共有 16 首^[2]。

临床曾报道, 丹红注射液使用过量, 出现腹痛、头痛、胸闷、恶心呕吐、皮疹、肝损伤等不良反应, 且女性明显多于男性^[3-6]。课题组前期实验显示, 雌性大鼠给予 2 g 生药/kg 丹参-红花药对提取物 21 d, 血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 在给药 7 d 起升高, 持续到给药末; 病理损伤以多发肝细胞灶性坏死和炎症细胞浸润为主要表现。但同等条件下, 雄性大鼠给予相同剂量的该药对提取物时, 血清 ALT、AST 及肝脏病理学检测均无明显变化。上述结果提示, 丹参、红花配伍对雄性、雌性大鼠毒性表现的差异可能与其影响雄性、雌性大鼠肝内代谢有关。因此, 本实验研究丹参-红花组分配伍对不同性别大鼠肝细胞色素 P450 酶主要亚型的影响。

1 材料

1.1 主要仪器

戴安 UltiMate 3000 全自动高效液相色谱仪 (赛默飞世尔科技有限公司); BT125D 型双量程电子分析天平 (赛多利斯股份有限公司); Direct-Q 3UV

纯化水机 (默克密理博); EXPERT 18K-R 台式高速冷冻离心机 (湖南吉尔森科技发展有限公司); PHSJ-3F 型 pH 计 (上海仪电科学仪器股份有限公司); MX-S 型漩涡混合器 (美国 Scilogex); MTN-2800D 氮吹浓缩装置 (天津奥特赛恩斯仪器有限公司); 上海光电 ECG-6951D 单道热线阵自动心电图机 (上海光电医用电子仪器有限公司)。

1.2 主要试剂

非那西丁 (批号 042K2533)、氯唑沙宗 (批号 027K1562)、睾酮 (批号 201102001)、还原型辅酶 II (批号 099K7002), 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 盐酸异丙肾上腺素注射液 (批号 41150102), 购自上海禾丰制药有限公司; 色谱纯甲醇, 购自美国 Merck 公司; 甲硝唑 (批号 100191-200606), 购自中国食品药品检定研究院。

1.3 试药

丹参、红花, 均购于河北安国药材市场, 由陕西中医药大学药学院白吉庆副教授鉴定分别为唇形科鼠尾草属丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎, 菊科红花属植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花。参照《中国药典》2015 版“丹参、红花含量测定方法”, 测得丹参药材中含丹参酮 IIA、隐丹参酮和丹参酮 I 的总量为 1.05%, 丹酚酸 B 的质量分数为 5.6%; 红花药材中羟基红花黄色素 A 的质量分数为 1.5%; 山柰素的质量分数为 0.15%, 均符合药典标准。

丹参饮片 3 kg, 加 6 倍量 20% 乙醇回流提取 3 次, 1 h/次, 滤过, 滤液合并, 上 DM130 大孔吸附树脂 (1 mL 树脂上 5 mg 总酚酸), 用柱体积 1 倍量水洗后, 继用柱体积 3 倍量 70% 乙醇洗脱, 收集 70% 乙醇洗脱液, 60 °C 减压浓缩至稠膏状, 真空干燥, 即得丹参提取物 (丹参酮 IIA、隐丹参酮和丹参酮 I 的总量为 2.1%, 丹酚酸 B 的质量分数为 45.6%, 丹

参总酚酸的质量分数为 54.7%)。

红花药材 3 kg, 加 10 倍量水 80 °C 提取 3 次, 0.5 h/次, 滤过, 滤液合并, 上聚酰胺柱 (1 mL 聚酰胺上黄色素 5 mg), 用柱体积 1 倍量水洗后, 再用柱体积 6 倍量 60% 乙醇洗脱, 收集 60% 乙醇洗脱液, 60 °C 减压浓缩, 至稠膏状, 真空干燥, 即得红花提取物 (羟基红花黄色素 A 的质量分数为 6.5%; 山柰素的质量分数为 3.15%)。

1.4 实验动物

SPF 级 SD 大鼠, 体质量 (200±10) g, 由西安交通大学医学部实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (陕) 2012-003。

2 方法与结果

2.1 心肌缺血模型的制备^[7-8]、分组及给药

选取心电图正常的大鼠 48 只, 随机分为丹参-红花高、低剂量组及模型组和对照组, 每组 12 只, 雌雄各半。除对照组外, 其余各组 ip 盐酸异丙肾上腺素 5 mg/kg, 连续 3 d, 对照组 ip 等量生理盐水, 于末次注射 30 min 后, 用 20% 的乌拉坦麻醉大鼠, 测定 II 导联心电图 (纸速 50 mm/s, 1 mV=20 mm)。与注射前心电图进行自身比较, 具备下列条件之一者则造模成功: ① ST 段向上或向下偏移超过 0.1 mV; ② T 波高耸且超过同导联 R 波的 1/2; ③ T 波高耸且伴有 ST 段移位。以 QRS 复合波终点为基线测量, 以 ST 段的偏移距离为诊断依据, 选择 5 次心跳计算 ST 段偏移的毫伏平均值。

丹参-红花高、低剂量组分别 ig 给予生药 4、2 g/kg (根据丹参和红花在复方中常出现的比例 3:1 进行组分配伍, 低剂量中红花的剂量是临床等效剂量放大 5 倍, 在此基础上确定丹参的剂量), 模型组和对照组 ig 等体积蒸馏水, 给药体积均为 10 mL/kg, 每天给药 1 次, 连续给药 21 d 后, 禁食, 处理动物。摘取肝脏, 置于一 80 °C 冰箱中保存备用。

2.2 微粒体制备、体外温孵及样品处理

2.2.1 微粒体制备 取肝组织剪碎, 加入 4 倍量 0.25 mol/L 蔗糖匀浆, 在 4 °C 下 13 000 r/min 离心 20 min; 取上清液按体积比 1:10 加入 88 mmol/L CaCl₂ 混匀, 冰浴 5 min, 13 000 r/min 离心 15 min; 弃上清液, 将沉淀用 Tris-HCL 缓冲液洗涤一次, 13 000 r/min 离心 15 min, 沉淀用 0.15 mol/L Tris-HCL 缓冲液重悬, 使得肝微粒体浓度为 0.6 mg/mL。

2.2.2 体外温孵育 每组做 3 个平行样, 分别以非

那西丁、氯唑沙宗、睾酮作为 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 的特异性探针底物, 各组肝微粒体分别加入一定量的探针药物, 以 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 稀释至 200 μL, 37 °C 水浴预孵育 5 min, 加入还原型辅酶 II (NADPH, 1 mmol/L) 启动反应, 在 37 °C 预孵育 30 min, 加入 0.05 mL 冰冷的乙腈终止反应。

2.2.3 样品处理 加入 10 μL 内标液 (甲硝唑, 浓度 0.4 mg/mL), 涡旋振荡混匀 1 min, 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液于 37 °C 氮气下吹干, 甲醇 200 μL 复溶, 涡旋 1 min, 0.22 μm 滤膜过滤, 用高效液相色谱 (HPLC) 仪测定各探针药物剩余量。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Krosmail C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇 (A)-水 (B); 梯度洗脱程序为 0~5 min, 30%~35%A; 5~12 min, 35%~40%A; 12~15 min, 40%~42%A; 15~25 min, 42%~44%A; 25~32 min, 44%~50%A; 32~35 min, 50%~62%A; 35~45 min, 62%~63%A; 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长为 230 nm, 柱温为 40 °C, 进样量 15 μL。

2.4 统计分析

各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 采用单因素方差分析进行检验。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性考察 取①空白微粒体孵育体系②在空白肝微粒体孵育体系中精密加入一定量的混合探针药物溶液及内标, 混匀 (非那西丁的终浓度为 13.6 μmol/L; 氯唑沙宗的终浓度为 13.52 μmol/L; 睾酮的终浓度为 1.92 μmol/L) ③肝微粒体样品+内标, 按照“2.2.3”项方法处理, 按照“2.3”项下的色谱条件测定, 如图 1 所示, 探针药物非那西丁、氯唑沙宗、睾酮和内标物甲硝唑分离度好, 相应位置无干扰, 表明该方法专属性好。

2.5.2 线性关系的考察 向丹参-红花高剂量组肝微粒体孵育体系 (不含 NADPH) 中加入混合探针药物, 加入 10 μL 内标液 (甲硝唑, 浓度 0.4 mg/mL), 涡旋 1 min, 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液于 37 °C 氮气下吹干, 甲醇 200 μL 复溶, 涡旋 1 min, 0.22 μm 滤膜过滤, 得到系列浓度的探针药物溶液 (非那西丁的终浓度为 3.4、6.8、13.6、27.2、54.4、108.8 μmol/L; 氯唑沙宗的终浓度为 3.38、6.76、13.52、27.04、54.08、108.16 μmol/L; 睾酮的终浓

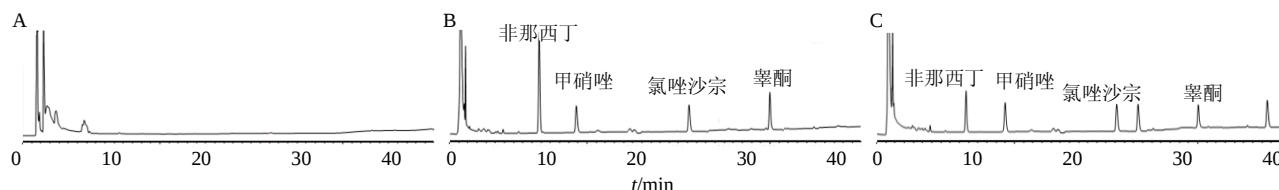


图1 空白微粒体(A)、空白微粒体+探针药物+内标(B)和肝微粒体样品+内标(C) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of blank liver microsomal (A), blank liver microsomal + probe drugs + internal standard (B), and liver microsomal sample with probe drugs + internal standard (C)

度为 0.48、0.96、1.92、3.84、7.68、15.36 $\mu\text{mol/L}$ 。每个浓度平行制备 3 份，注入 HPLC 仪，测定以非那西丁、氯唑沙宗和睾酮与内标物峰面积比值为纵坐标，探针药物浓度为横坐标，进行线性回归，回归方程： $Y_{\text{非那西丁}}=0.1865X+0.0389$ ， $r=0.9989$ ； $Y_{\text{氯唑沙宗}}=0.1645X+0.023$ ， $r=0.9991$ ； $Y_{\text{睾酮}}=0.6485X+0.0285$ ， $r=0.9974$ 。即非那西丁在 3.4~108.8 $\mu\text{mol/L}$ ，氯唑沙宗在 3.38~108.16 $\mu\text{mol/L}$ ，睾酮在 0.48~15.36 $\mu\text{mol/L}$ 范围内线性关系良好。

2.5.3 最低定量限试验 在空白肝微粒体孵育体系中精密加入一定量的混合探针药物溶液适量，混匀，逐步稀释，以探针药物峰信号与噪音信号比 10:1 为最低定量质量浓度，重复测定 3 次。非那西丁、氯唑沙宗、睾酮最低定量限分别为 3.4、3.38、0.48 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.5.4 精密度试验 取空白肝微粒体孵育体系，分别精密加入各探针药物溶液，内标溶液 10 μL ，涡旋 1 min，13 000 r/min 离心 10 min，取上清液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 氮气下吹干，甲醇 200 μL 复溶，涡旋 1 min，0.22 μm 滤膜过滤，得到不同浓度的探针药物样品（非那西丁的浓度为 3.4、13.6、108.8 $\mu\text{mol/L}$ ；氯唑沙宗的浓度为 3.38、13.52、108.16 $\mu\text{mol/L}$ ；睾酮的浓度为 0.48、1.92、15.36 $\mu\text{mol/L}$ ），按“2.3”项下的色谱条件检测，同 1 天内不同浓度各平行测定 5 次，计算日内精密度；对上述各浓度连续检测 5 d，计算日间精密度。结果见表 1。

2.5.5 稳定性试验 按“2.5.4”项下的方法制备高、中、低浓度的质控样品，每个浓度平行制备 3 份。将高、中、低 3 个浓度的样品于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存 24 h，每 4 h 测定 1 次，非那西丁高、中、低浓度的 RSD 分别为 1.5%、2.8%、1.9%；氯唑沙宗高、中、低浓度的 RSD 分别为 2.2%、3.5%、3.8%；睾酮高、中、低浓度的 RSD 分别为 2.3%、1.9%、1.5%；在冻融—冷冻循环试验中，将质控样品置于 -60 $^{\circ}\text{C}$ 下 24 h，取出后于室温下自然融解，置于 -60 $^{\circ}\text{C}$ 下 24 h，如此冻融—冷冻循环 2 次后测定，非那西丁高、中、

表 1 3 种探针药物的精密度试验结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 1 Intra- and inter-day precision data for three kinds of probe drugs ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

成分	浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	日内变异系数		日间变异系数	
		测定浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	RSD/%	测定浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	RSD/%
非那西丁	3.40	2.73 $\pm$ 0.08	2.93	2.72 $\pm$ 0.06	2.21
	13.60	12.95 $\pm$ 0.21	1.62	12.92 $\pm$ 0.28	2.17
	108.80	107.82 $\pm$ 6.36	5.90	106.85 $\pm$ 7.31	6.84
氯唑沙宗	3.38	3.26 $\pm$ 0.24	7.36	3.15 $\pm$ 0.31	9.84
	13.52	13.35 $\pm$ 0.38	2.85	13.05 $\pm$ 1.35	10.34
	108.16	107.84 $\pm$ 5.55	5.15	107.68 $\pm$ 1.95	1.81
睾酮	0.48	0.42 $\pm$ 0.05	11.9	0.39 $\pm$ 0.05	12.82
	1.92	1.86 $\pm$ 0.24	12.9	1.75 $\pm$ 0.12	6.86
	15.36	14.86 $\pm$ 0.45	3.03	14.83 $\pm$ 0.56	3.78

低浓度的 RSD 分别为 5.2%、6.8%、8.3%；氯唑沙宗高、中、低浓度的 RSD 分别为 7.5%、8.6%、9.2%；睾酮高、中、低浓度的 RSD 分别为 6.5%、6.9%、7.2%；长期稳定性试验中，将质控样品于 -60 $^{\circ}\text{C}$ 保存 15 d 进行测定，非那西丁高、中、低浓度的 RSD 分别为 9.8%、8.9%、10.1%；氯唑沙宗高、中、低浓度的 RSD 分别为 9.3%、9.6%、10.2%；睾酮高、中、低浓度的 RSD 分别为 8.7%、9.3%、9.5%。表明样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存 24 h、-60 $^{\circ}\text{C}$ 下冻融—冷冻循环至少 2 次、-60 $^{\circ}\text{C}$ 保存 15 d，探针药物浓度无明显变化，基本稳定。

2.5.6 回收率实验 按“2.5.4”项下的方法制备高、中、低浓度的血浆质控样品，按照“2.3”项下色谱条件，连续进样 6 次，记录峰面积，与未经处理的相应浓度的探针药物溶液的峰面积比较，计算提取回收率。结果见表 2。

2.5.7 重复性试验 按“2.5.4”项下的方法制备高、中、低浓度的血浆质控样品各 6 份，按照“2.3”项下色谱条件测定，记录峰面积，非那西丁高、中、低浓度的 RSD 分别为 5.37%、3.56%、4.39%，氯唑

表2 3种探针药物和内标物的回收率($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 2 Absolute recoveries for three kinds of probe drugs and IS ($\bar{x} \pm s, n=5$)

成分	浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率/%	标准偏差/%	RSD/%
非那西丁	3.40	92.1 $\pm$ 11.2	3.28	3.56
	13.60	92.6 $\pm$ 10.7	3.15	3.40
	108.80	100.3 $\pm$ 13.3	2.18	2.17
氯唑沙宗	3.38	89.5 $\pm$ 9.8	5.78	6.46
	13.52	94.2 $\pm$ 11.9	2.47	2.62
	108.16	97.6 $\pm$ 9.6	3.23	3.31
睾酮	0.48	88.9 $\pm$ 10.0	5.92	6.66
	1.92	92.4 $\pm$ 9.7	5.12	5.54
	15.36	93.6 $\pm$ 12.5	4.31	4.60

沙宗高、中、低浓度的 RSD 分别为 5.61%、3.64%、4.74%，睾酮高、中、低浓度的 RSD 分别为 4.73 %、5.61%、5.98%。

2.6 探针药物剩余量的测定

各组肝微粒体孵育体系中加入非那西丁 60 $\mu\text{mol/L}$ 、氯唑沙宗 120 $\mu\text{mol/L}$ 、睾酮 20 $\mu\text{mol/L}$ ，温孵完成后按“2.2.3”项方法处理，按照“2.3”项下色谱条件测定，记录峰面积，结果见表 3、4。

对雄性大鼠肝药酶亚型活力的影响：与对照组比较，模型组可不同程度的抑制 CYP2E1 和 CYP3A4 的活性 ($P<0.05$ 、 0.01)，对 CYP1A2 的影响不显著；与模型组比较，丹参-红花高剂量组可显著抑制 CYP2E1 和 CYP3A4 的活性 ($P<$

表3 雄性大鼠肝微粒体孵育体系中各探针药物剩余量测定结果($\bar{x} \pm s, n=12$)Table 3 Determination of residual amounts of probe drugs in liver microsome incubation system of male rats ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	非那西丁/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	氯唑沙宗/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	睾酮/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照	—	41.34 $\pm$ 1.61	57.35 $\pm$ 1.12	6.97 $\pm$ 0.42
模型	—	42.34 $\pm$ 1.23	76.07 $\pm$ 0.68*	12.05 $\pm$ 0.11**
丹参-红花	4	49.60 $\pm$ 0.43	101.67 $\pm$ 2.02###	13.46 $\pm$ 0.02#
	2	44.80 $\pm$ 0.84	98.99 $\pm$ 0.26#	7.11 $\pm$ 0.05###

与对照组比较：* $P<0.05$ ** $P<0.01$ ；与模型组比较：# $P<0.05$ ### $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ ### $P<0.01$ vs model group

表4 雌性大鼠肝微粒体孵育体系中各探针药物剩余量测定结果($\bar{x} \pm s, n=12$)Table 4 Determination of residual amounts of probe drugs in liver microsome incubation system of female rats ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	非那西丁/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	氯唑沙宗/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	睾酮/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照	—	41.30 $\pm$ 1.91	57.49 $\pm$ 1.62	6.79 $\pm$ 0.62
模型	—	40.34 $\pm$ 1.45	68.07 $\pm$ 0.60*	9.05 $\pm$ 0.23*
丹参-红花	4	54.61 $\pm$ 0.34#	108.07 $\pm$ 2.12###	15.06 $\pm$ 0.03##
	2	45.81 $\pm$ 0.64	88.99 $\pm$ 0.23#	9.11 $\pm$ 0.65

与对照组比较：* $P<0.05$ ** $P<0.01$ ；与模型组比较：# $P<0.05$ ### $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ ### $P<0.01$ vs model group

0.05、0.01)，对 CYP1A2 的影响不显著；丹参-红花低剂量组显著抑制 CYP2E1 的活性 ($P<0.05$)，诱导 CYP3A4 ($P<0.01$)，对 CYP1A2 的影响不显著。

对雌性大鼠肝药酶亚型活力的影响：与对照组比较，模型组可不同程度的抑制 CYP2E1 和 CYP3A4 的活性 ($P<0.05$)，对 CYP1A2 的影响不显著；与模型组比较，丹参-红花高剂量组显著抑制 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 的活性 ($P<0.05$ 、 0.01)；低剂量组抑制 CYP2E1 的活性 ($P<0.05$)，对 CYP1A2 和 CYP3A4 的影响不显著。

3 讨论

急性心肌缺血动物模型的制备方法分为两类，①冠脉夹闭法、微量直流电刺激法、化学灼烧法及冠脉局部滴敷药物法；②闭胸法，通过注射或接种使动物产生相应疾病，包括异物法及注射药物诱发冠脉痉挛法。开胸法要求以呼吸机辅助呼吸，创伤大，动物死亡率高；闭胸法简便易行，手术创伤小，动物死亡率低，用这种方法制备的模型进行实验研究，结果相对准确，误差小^[7]。

盐酸异丙肾上腺素是一个强的 β 受体兴奋剂，能通过加快心率、增强心肌收缩力等环节增加心肌

耗氧量,造成心脏负荷过重,心肌微循环及代谢障碍,连续应用可形成心肌梗死样变化。盐酸异丙肾上腺素诱导心肌缺血模型,多用于药理、药效学的研究,既可预防给药亦可治疗给药^[8]。故本实验采用盐酸异丙肾上腺素诱导大鼠心肌缺血。

关于探针药物的测定方法,在文献资料的基础上^[9],根据共存成分和待测成分的特点,对检测方法进行优化,形成本实验的检测方法。本实验建立的方法精密度、稳定性、回收率、重复性的RSD均小于最大允许值15%,试验方法符合相关技术要求,可用于大鼠肝微粒体中非那西丁、氯唑沙宗、睾酮3种探针药物的测定。

肝药酶是药物进入体内代谢的主要途径,参与了超过70%的药物代谢,肝药酶家族中CYP1、CYP2和CYP3是参与药物代谢的主要家族^[10]。研究表明,不同病理生理因素可调节CYP同工酶的活性^[11-13],如心肌缺血再灌注,CYP2E1和CYP3A1活性降低明显,特别是CYP3A1,但对CYP2B1、CYP2B2无明显影响等^[12]。不少中药对雌、雄大鼠的毒性不同^[3-6],是否与其对肝药酶的影响差异相关?本实验进行了丹参-红花配伍对雄、雌性大鼠肝药酶亚型影响的比较研究。

雌性、雄性大鼠实验结果对比显示,丹参-红花高剂量对雄性、雌性大鼠肝药酶亚型的影响相同点是均抑制了CYP2E1和CYP3A4的活性,尤其对CYP2E1的抑制作用比较明显。不同点是丹参-红花低剂量诱导了雄性大鼠CYP3A4活性,但对雌性大鼠CYP3A4活性无明显影响。CYP3A是人肝脏内含量最丰富的P450酶,其中CYP3A4是人肝主要表达和参与代谢的亚型,约50%的临床药物和内源性物质需经过CYP3A4代谢^[11]。临床资料显示,丹参-红花配伍不良反应的发生,女性明显多于男性^[3-6]。前期实验结果显示,长期给予的丹参-红花,雌性大鼠肝毒性反应较雄性大鼠更为明显。因此,丹参-红花配伍低剂量对不同性别大鼠肝药酶亚型CYP3A4活性的影响不同,会对药物在雄性、雌性大鼠体内代谢速度及

代谢产物有较大的影响,推测可能是影响该药对不良反应表现的差异原因之一。这为进一步研究药酶活性与药物体内毒性反应相关性提供了实验依据。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2015.
- [2] 杨旭杰,肖诗鹰.基于频数分析的中药复方有效专利防治心血管疾病用药规律研究[J].中国中药杂志,2012,37(17):2661-2666.
- [3] 罗春飞,詹小兰,徐惠娟.丹红注射液与丹参注射液临床不良反应对比观察[J].中国乡村医药,2016,(10):8.
- [4] 谭慧心.2005—2015年丹红注射液的不良反应文献分析[J].现代药物与临床,2016,31(2):242-245.
- [5] 王荔,刘晓慧.丹红注射液不良反应例文献分析[J].中国药房,2016,27(17):2352-2354.
- [6] 南家林.31例丹红注射液不良反应文献分析[J].中国药业,2016,25(16):83-85.
- [7] 吴广均,张云.Langendorff法、冠脉结扎法及ISO诱导心肌缺血模型的比较[J].现代中西医结合杂志,2011,20(22):2849-2851.
- [8] 刘新军,苏式兵.碧血胶囊对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌缺血的保护作用[J].中西医结合心脑血管病杂志,2012,10(6):707-709.
- [9] 孙佳,陆苑,潘洁,等.参芎葡萄糖注射液对肝脏6种亚型微粒体细胞色素P450酶的抑制作用[J].贵州医科大学学报,2016,41(7):775-778.
- [10] 周璐,徐婷婷,金若敏,等.吴茱萸水煎液对大鼠肝药酶亚型影响的比较研究[J].中国药理学通报,2014,30(2):279-282.
- [11] 敖英,彭仁琇,杨静,等.心肌缺血再灌注对肝脏CYP酶系统的影响[J].中国药理通讯,2007,24(3):25.
- [12] 娄建石,刘颖,焦建杰,等.“Cocktail”法评价肝缺血再灌注与缺血预适应对大鼠CYP酶活性的影响[A].第九届全国药物和化学异物代谢学术会议,2009,227.
- [13] 娄建石.“Cocktail”法评价肝缺血再灌注与缺血预适应对大鼠细胞色素CYP酶活性的影响[D].天津:天津医科大学,2007.