

## 注射用益气复脉（冻干）对 CYP450 药物代谢酶 1A2、2B6 和 3A4 诱导作用的体外研究

罗瑞芝<sup>1</sup>, 余斐斐<sup>2</sup>, 周大铮<sup>3</sup>, 苏小琴<sup>3</sup>, 鞠爱春<sup>3</sup>, 胡卓汉<sup>2</sup>, 李伟<sup>4</sup>, 赵利斌<sup>4</sup>, 胡利民<sup>1\*</sup>

1. 天津中医药大学, 天津 300193
2. 瑞德肝脏疾病研究(上海)有限公司, 上海 201203
3. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410
4. 天津天士力研究院, 天津 300410

**摘要:** **目的** 评价注射用益气复脉(冻干, YQFM)对人原代肝细胞中的药物代谢酶 CYP1A2、2B6 和 3A4 是否具有诱导作用。**方法** 采用 3 个单供体的人原代肝细胞分别与不同质量浓度(0.026、0.260 和 2.600 mg/mL)的 YQFM 或特异性诱导剂(CYP1A2 诱导剂: 50 μmol/L 奥美拉唑; CYP2B6 诱导剂: 1 000 μmol/L 苯巴比妥; CYP3A4 诱导剂: 25 μmol/L 利福平)于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下共孵育 3 d, 液质联用技术(LC-MS/MS)检测酶活性, 实时荧光定量 PCR 技术检测 CYP1A2、2B6 和 3A4 mRNA 表达量。**结果** YQFM 在测试浓度条件下对人原代肝细胞的 CYP1A2、CYP2B6 和 CYP3A4 的酶活性和 mRNA 的表达均无诱导作用。**结论** YQFM 不具有显著的基于药物代谢酶诱导的中药和化学药的相互作用。

**关键词:** 注射用益气复脉(冻干); CYP1A2; CYP2B6; CYP3A4; CYP450 药物代谢酶; 中药和化学药的相互作用

**中图分类号:** R962.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2018)03-0417-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.03.011

## *In Vitro* study of induction effects of Yiqi Fumai Lyophilized Injection on CYP450 metabolizing enzymes 1A2, 2B6 and 3A4

LUO Ruizhi<sup>1</sup>, YU Feifei<sup>2</sup>, ZHOU Dazheng<sup>3</sup>, SU Xiaoqin<sup>3</sup>, JU Aichun<sup>3</sup>, HU Zhuohan<sup>2</sup>, LI Wei<sup>4</sup>, ZHAO Libin<sup>4</sup>, HU Limin<sup>1</sup>

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China
2. Research Institute for Liver Disease (Shanghai) Co., Ltd. Shanghai 201203, China
3. Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300410, China
4. Tasly Academy, Tianjin 300410, China

**Abstract: Objective** To evaluate the effect of Yiqi Fumai Lyophilized Injection (YQFM) on the drug metabolism enzyme CYP1A2, 2B6 and 3A4 in human primary hepatocytes. **Methods** In this study, human primary hepatocytes were used from three individual donor, and incubated with different concentrations (0.026, 0.260 and 2.600 mg/mL) of YQFM or specific inducer (CYP1A2 inducer: 50 μmol/L Omeprazole; CYP2B6 inducer: 1 000 μmol/L Phenobarbital; CYP3A4 inducer: 25 μmol/L Rifampicin) under condition of 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 3 d. The enzyme activity was determined by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS), and mRNA expression of CYP1A2, 2B6 and 3A4 was detected by fluorescent quantitative PCR. **Results:** YQFM showed no induction on CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 enzyme activities and mRNA expression in human primary hepatocytes under test concentration. **Conclusion** YQFM does not have a significant Herb-Drug Interaction (HDI) based on the induction of drug metabolism enzyme.

**Key words:** Yiqi Fumai Lyophilized Injection; CYP1A2; CYP2B6; CYP3A4; CYP450 metabolizing enzymes; Herb-Drug Interaction

注射用益气复脉(冻干)(YQFM)是在传统中 粉针剂, 由红参、麦冬、五味子 3 味中药组成, 具  
医经典方生脉散的基础上研发而成的纯中药注射用 有益气复脉、养阴生津的功效<sup>[1]</sup>, 在临床上治疗冠

收稿日期: 2017-07-27

第一作者: 罗瑞芝, 研究方向为中药, 博士。E-mail: luorz@tasly.com

\*通信作者: 胡利民, 天津中医药大学研究员, 博士生导师, 中药药理与毒理学研究方向。E-mail: huliminth@126.com Tel: 13132125219

心病心绞痛、心力衰竭(心功能不全)、心肌病等都取得了良好的效果<sup>[2-5]</sup>。在实际临床应用中, YQFM 有较多合并用药的情况, 存在潜在药物相互作用的风险。肝脏药物代谢酶 CYP450 是催化药物 I 相代谢的主要酶类, 90% 以上的代谢性药物相互作用都是由 CYP450 酶活性改变引起的<sup>[6]</sup>。前期研究表明, YQFM 对大鼠 CYP1A2 和 CYP3A4 酶的活性具有诱导作用<sup>[7]</sup>。由于潜在的种属差异性, 根据 CFDA 药物相互作用指导原则(2012)中的建议: “用人的体外模拟人的体内”, 选择在人的体外模型(人原代肝细胞)测试系统中, 进行 YQFM 对药物代谢酶活性诱导作用的研究, 用于支持后续临床用药的安全性评价。本研究通过检测酶活性和 mRNA 表达量评价 YQFM 对人原代肝细胞中的 CYP1A2、CYP2B6 和 CYP3A4 是否有诱导作用。

## 1 材料

### 1.1 测试系统与药品

实验所用的 3 个单供体的超低温冷冻人原代肝细胞(批号: HNN、RMH 和 RSE), 由美国体外技术公司 Bioreclamation IVT 提供。

注射用益气复脉(冻干)粉针, 由天津天士力之骄药业有限公司提供, 批号 20160408; 因 YQFM 是含多种有效成分的中药复合物, 在临床上无法直接测得其血浆浓度, 所以按照临床用量(0.65 g/瓶×8 瓶=5.20 g)并假设成人循环血量为 5 000

mL, 计算静态最高血浆质量浓度为 1.04 mg/mL。根据药品说明书, 将 0.65 g/50 mL, 即 13.0 mg/mL 质量浓度作为 100% 原液。设计 0.2% (0.026 mg/mL)、2% (0.260 mg/mL) 和 20% (2.600 mg/mL) 作为实验浓度<sup>[7-8]</sup>。给药溶液的具体配制过程如下: 将 0.65 g 粉末溶于 2 mL 的无菌水作为 2 500% 的储备液, 然后用无菌水按 10 倍梯度分别稀释至 250% 和 25% 的工作液浓度, 再用细胞培养液将上述 2 500%、250% 和 25% 的溶液均分别稀释 125 倍, 得到相当于含 20%、2% 和 0.2% YQFM 注射液的给药培养液, 直接与肝细胞共同孵育。

### 1.2 试剂与器材

非那西丁(货号 77440)、安非他酮(货号 B102)、奥美拉唑(货号 O-104)、利福平(货号 R3501)、对乙酰氨基酚(货号 A3035), 均购自 Sigma 公司; 苯巴比妥、罗红霉素(批号 20141010), 均购自中国食品药品检定研究院; 睾酮(厂家 Dr. Ehrenstorfer, 货号 17322500); 羟基安非他酮(厂家 GM, 货号 H0818); 6 $\beta$ -羟基睾酮(厂家 BD, 货号 451012); RNAprep 总 RNA 提取试剂盒(货号 DP430)、FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒(货号 KR106)、SuperReal PreMix 荧光定量 PCR 试剂盒(货号 FP206), 厂家 TIANGEN; 序列特异性引物与 TaqMan 探针由 Invitrogen 合成, 引物和探针序列见表 1。

表 1 引物和探针序列

Table 1 Primer and probe sequence

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')	探针 (5' FAM - 3' TAMRA)
CYP1A2	CCTCCTTCTTGCCCTTCACC	GGATGTAGAAGCCATTCAGCG	CCCCACAGCACAACAAGGGACA
CYP2B6	ACTCTCCGCTACGGCTTCC	ATGGCATTGTTGGCTCGGTC	ATGCTCAAATACCCTCATGTTGCAGAGAGAGT
CYP3A4	TGCAGGAGGAAATTGATGCA	GTCAAGATACTCCATCTGTAGCA	TTTTACCCAATAAGGCACCACCCACCTATG
$\beta$ -Actin	CCTGGCACCCAGCACAAT	GCCGATCCACACGGAGTACT	TCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC

### 1.3 主要仪器

LC-MS/MS 系统包括 Shimadzu LC 20 (日本岛津)液相色谱及自动进样系统, 和 API4000 三重四级杆检测器(美国应用生物系统有限公司), 操作以及数据采集软件为 Analyst 1.5.1。

## 2 方法

### 2.1 人原代肝细胞的孵育与处理

超低温冷冻人原代肝细胞从液氮中取出后于孵育基中复苏, 用贴壁培养液稀释成  $0.7 \times 10^6$ /mL 的活细胞密度, 铺在 I 型胶原 96 孔板中, 于 37 °C、

5% CO<sub>2</sub> 条件下预孵育 6~12 h 后, 用显微镜观察确认贴壁形成单层细胞。然后将贴壁培养液更换成肝细胞培养液继续培养过夜。第 2 天加入含不同质量浓度的 YQFM (0.026、0.260、2.600 mg/mL) 或阳性诱导剂 (CYP1A2 诱导剂: 奥美拉唑, 终浓度为 50  $\mu$ mol/L; CYP2B6 诱导剂: 苯巴比妥, 终浓度为 1 000  $\mu$ mol/L; CYP3A4 诱导剂: 利福平, 终浓度为 25  $\mu$ mol/L) 的培养液。阴性对照组 1 用含与阳性诱导剂组相同 DMSO 的空白肝细胞培养液处理, 作为阳性诱导剂组的阴性对照; 阴性对照组 2 含有纯肝

细胞培养液, 作为测试组的阴性对照。各组样品与肝细胞在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 3 d, 每天更换含药的培养液。每组均为 3 个平行样, 连续给药 3 d 后, 检测酶活性和 mRNA 表达。

## 2.2 酶活性检测

YQFM、阳性诱导剂及阴性对照组细胞孵育结束后, 弃去孵育基, 加入探针底物 (CYP1A2 底物: 非那西丁, 终浓度 100 μmol/L; CYP2B6 底物: 安非他酮, 终浓度 100 μmol/L; CYP3A4 底物: 睾酮, 终浓度 100 μmol/L) 溶液, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育 60 min 后, 取上清转移至含预冷甲醇的离心管中, 离心取上清后, 通过 LC-MS/MS 方法分别检测样本中的代谢产物: 对乙酰氨基酚、羟基安非他酮和 6β-羟基睾酮, 具体检测方法见参考文献<sup>[8-9]</sup>, 来评价 CYP1A2、2B6 和 3A4 的酶活性。阳性对照组酶活性 ≥ 阴性对照组 2 倍为数据可接受的标准, 即排除了假阴性的可能。计算各组酶活性与相应阴性对照组的比值, 为相对酶活性。

## 2.3 mRNA 表达分析

YQFM、阳性诱导剂及阴性对照组细胞孵育结束后, 弃去孵育基, 用 RNA 提取试剂盒裂解细胞后提取细胞内总 RNA, 试剂盒配有 DNase I 消化功能, 以降低基因组 DNA 的污染。用 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒反转录成 cDNA。取 2~4 μL cDNA, 利用 SuperReal PreMix 荧光定量 PCR 试剂

盒, 在 iQ5 荧光定量 PCR 仪上进行分析。

基因表达数据用内参基因 β-actin 校正, 相对表达差异采用常用的 ΔΔCt 法<sup>[10]</sup>。阳性诱导剂组 mRNA 的相对表达水平 ≥ 阴性对照组 4 倍为数据可接受的标准。罗红霉素 (10 μmol/L) 对 CYP450 的 mRNA 表达没有诱导作用<sup>[10]</sup>, 在实验中作为阴性参比对照药, 用于排除因 PCR 的非特异性扩增导致假阳性的可能。

## 2.4 结果评价原则

依据 CFDA 2012 年 5 月颁布的“药物相互作用研究指导原则”和 USFDA 的相关指南<sup>[11]</sup>, 对酶活性有诱导作用的评价标准为: 当测试组的“相对阳性对照活性” ≥ 40% 时, 测试物被认为对酶活性具有潜在的诱导作用; 对 mRNA 表达有诱导作用的评价标准为: 当测试组的 mRNA 表达量 ≥ 阴性对照组 4 倍时, 测试物被认为对酶的 mRNA 表达具有潜在的诱导作用。

## 3 结果

### 3.1 对酶活性的诱导作用

3 个批次的人原代肝细胞 (RSE、HNN 和 RMH) 分别与质量浓度为 0.026、0.260 和 2.600 mg/mL 的 YQFM 共孵育后, 其 CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 亚酶活性均低于阳性对照的 40%, 提示 YQFM 在上述测试浓度范围对 CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 亚酶的酶活性无潜在诱导作用。结果见图 1。

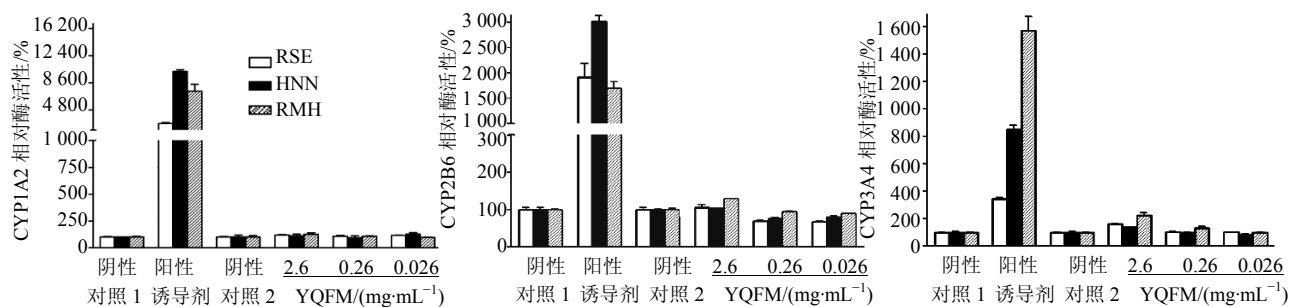


图 1 YQFM 对 CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 酶活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Effects of YQFM on enzyme activity of CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.2 对 mRNA 表达的诱导作用

3 个批次的人原代肝细胞 (RSE、HNN 和 RMH) 分别与测试浓度为 0.026、0.260 和 2.600 mg/mL 的 YQFM 共孵育后, CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 的 mRNA 的表达水平均小于阴性对照的 4 倍, 提示 YQFM 在上述测试浓度范围对 CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 的 mRNA 表达不具有诱导作用。

见图 2。

### 3.3 实验系统的对照

在本次研究中, CYP1A2、CYP2B6、CYP2B6 的诱导剂分别为奥美拉唑、苯巴比妥和利福平, 以上阳性诱导剂的选择是基于 CFDA 和 USFDA 颁布的指导原则<sup>[11]</sup>, 它们对 3 个批次肝细胞中 CYP1A2、2B6 和 3A4 的酶活性和 mRNA 的表达均存在明显的

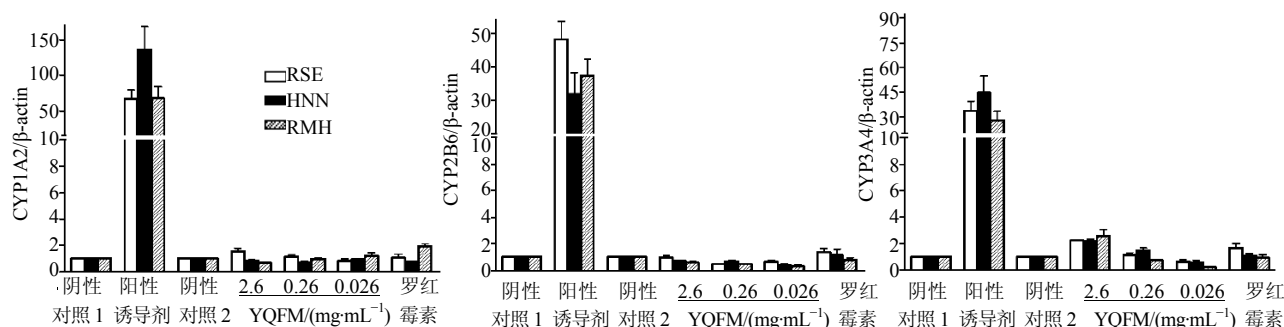


图2 YQFM对CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4的mRNA表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 2 Effects of YQFM on mRNA expression of CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

诱导作用, 其中对酶活性的诱导倍数均超过阴性对照组的2倍, 对mRNA表达量的诱导倍数均超过4倍, 提示该实验系统合格且排除了假阴性的可能性。同时, 本研究采用了对CYP450药物代谢酶没有诱导作用的罗红霉素作为阴性参比对照<sup>[12]</sup>, 其对3个批次肝细胞中的CYP1A2、2B6和3A4的mRNA表达诱导倍数均不超过阴性对照组的2倍, 提示该实验系统合格且排除了假阳性的可能性。

YQFM不具有显著的基于药物代谢酶诱导的中药和化学药的相互作用(Herb-Drug Interaction, HDI)。

#### 4 讨论

YQFM是由红参、麦冬和五味子3味中药的提取物制成, 文献表明, 五味子提取物对CYP3A4活性的抑制与诱导均见过报道<sup>[13]</sup>, 且五味子提取物对大鼠CYP3A酶活性在时间上呈现先抑制后诱导的双重作用<sup>[14]</sup>; 研究显示, YQFM中含有的五味子醇甲对大鼠CYP1A2和CYP3A4的活性有诱导作用<sup>[7]</sup>。而本研究结果表明: YQFM对人原代肝细胞中的CYP3A4不具有诱导作用。分析其原因主要有以下2个方面: ①诱导作用的分子机制和表现型存在种属差异性, 例如利福平对人原代肝细胞中的CYP3A酶来说是一种强诱导剂, 但是对大鼠肝细胞中的CYP3A无诱导作用; 奥美拉唑对人肝细胞中的CYP1A有诱导作用, 但是同样的诱导作用没有在大鼠肝细胞中被观察到<sup>[15]</sup>, 由此可以推断用人原代肝细胞评价酶诱导作用更适用于临床前的安全性评价。②种属的代谢产物差异性导致的, 诱导实验需要将肝细胞与药物进行3d的孵育, 因此严格意义上来说, 诱导实验评价的是药物母体和其代谢(中间)产物对酶诱导的潜在作用, 即诱导作用可能来

源于母体也可能来源于代谢产物。由于CYP450酶以及其他代谢酶在不同种属肝脏中的组成和相对含量存在差异<sup>[16]</sup>, 因此五味子在大鼠和人肝细胞中的代谢反应和生成的代谢产物种类或量也可能存在着种属差异<sup>[17]</sup>, 最终导致由代谢产物引起的诱导作用的不同表现。

药物对CYP450酶的诱导或抑制作用是临床发生药物间相互作用的重要原因, 其中酶的诱导作用既可以引起药物母体的代谢加快, 使其母体药效降低导致血浆浓度达不到药效范围, 或有毒代谢产物的增加导致毒副作用<sup>[18]</sup>; 也可以对通过代谢活化发挥药效的药物起到药效增效的作用。而HDI是药物安全性评价研究中的一个重要内容, HDI的挑战在于, 一个复方中常常含有多味中药, 而一味中药中又含有多种组分(如YQFM), 因此复方中药的HDI不同于化药的相互作用(Drug-Drug Interaction, DDI), 属于多元的测试物。复方中药的HDI是多味中药多种组分的综合作用, 因而具有非常现实的临床意义。

基于药物代谢酶诱导的HDI, 其临床意义在于有可能会影响同时使用的化药的药动学参数, 如 $C_{max}$ 、AUC等, 从而影响化药的疗效。因此HDI对于某些患者, 如患有心血管疾病、感染性疾病、肿瘤等, 或者某些特殊群体(如代谢酶活性偏低的儿童和老年患者、代谢酶遗传变异性患者), 在临床合并用药和个体化用药时, 可能需要评估预测以及验证其潜在风险。

本实验遵循CFDA和USFDA的指导原则<sup>[11]</sup>, 应用了人原代肝细胞评价了YQFM对3个CYP450亚酶的诱导作用, 同时使用了3个不同单供体的人原代肝细胞用于判断是否存在个体差异性, 以及从

低到高的3个不同的给药浓度用于判断是否存在浓度相关性。且对于预测临床结果,排除了传统的动物实验的种属差异,有更进一步的临床意义。本次研究提示,通过CYP1A2、CYP2B6和CYP3A4代谢的化学药物联合使用YQFM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,从而最大程度避免临床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] 褚延斌,苏小琴,李德坤,等.基于一测多评法对注射用益气复脉(冻干)中9种成分的质量控制研究[J].中草药,2017,48(17):3537-3544.
- [2] 杨颖,姜涛,王凤,等.注射用益气复脉(冻干)治疗冠心病心力衰竭(气阴两虚证)60例临床研究[J].中医药学报,2012,40(4):115-117.
- [3] 孙静,王凤,刘影哲,等.注射用益气复脉(冻干)治疗冠心病心绞痛136例[J].中西医结合心脑血管病杂志,2011,9(9):1034-1035.
- [4] 孙兰军,郑偕扣,郝长颖.注射用益气复脉(冻干)治疗冠心病心力衰竭的多中心临床研究[J].中国当代医药,2012,19(17):7-10.
- [5] 乔曦.注射用益气复脉在临床中的应用[J].光明中医,2014,29(10):2205-2207.
- [6] 王崇,刘克辛.药物代谢性相互作用[J].食品与药品,2007,9(12A):46-49.
- [7] 于初楚,胡冰,褚扬,等.注射用益气复脉(冻干)对大鼠肝微粒体CYP1A2、CYP3A4活性的影响研究[J].中国中药杂志,2011,36(10):1378-1381.
- [8] 余小翠,黄丽军,刘高峰,等.丹红注射液对大鼠肝微粒体5种CYP亚型酶活性的影响[J].中国医药导报,2012,31(3):277-281.
- [9] 刘丽雅,韩永龙,余奇,等.10种心血管类中药注射剂对人细胞色素P4507种亚型的体外抑制作用[J].中国药房,2014,25(11):990-993.
- [10] 周良云,刘谈,王升,等.实时荧光定量PCR研究进展及其在中药领域的应用[J].中国现代中药,2016,18(2):246-262.
- [11] Guidance for Industry - Drug Interaction studies - study design, data analysis, and implications for dosing and labelling [S]. 2006.
- [12] Fahmi O A, Kish M, Boldt S, et al. Cytochrome P450 3A4 mRNA is a more reliable marker than CYP3A4 activity for detecting pregnane X receptor - activated induction of drug - metabolizing enzymes [J]. Drug Metab Dispos, 2010, 38(9): 1605-1611.
- [13] 翟健秀,刘志惠,韩娜,等.五味子对CYP450活性的影响及其机制探讨[J].世界科学技术-中医药现代化,2015,17(1):52-55.
- [14] 陈倩,吴育晶,程能能,等.五味子提取物对大鼠肝CYP3A酶的双重作用[J].药学学报,2010,45(9):1194-1198.
- [15] Chang L, Albert P L. Species comparison in P450 induction: effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague - Dawley rat, mini-pig, and beagle dog [J]. Chem Biol Interact, 2001, 134: 271-281.
- [16] 程婕,杨凌.细胞色素P450氧化还原酶的研究进展[J].中国药理学通报,2006,22(2):129-133.
- [17] Zhuang X M, Lin Q H, Li C Z, et al. *In vitro* comparison of rotundine metabolism in liver microsomes of human, dog and rat [J]. Chin Pharmacol Bull, 2009, 25(9): 1147-1149.
- [18] Ribeiro V, Lechner M C. Cloning and characterization of a novel CYP3A1 allelic variant: analysis of CYP3A1 and CYP3A2 sexhormone-dependent expression reveals that the CYP3A2 gene is regulated by testosterone [J]. Arch Biochem Biophys, 1992, 293(1): 147.