

【 安全性评价 】

注射用益气复脉（冻干）对人肝微粒体 CYP450 各亚型酶活性的影响

李 智^{1,2}, 侯 建³, 李 伟³, 李德坤^{1,2*}, 宋美珍^{1,2}, 万梅绪^{1,2}, 鞠爱春^{1,2*}

1. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410
2. 天津市中药注射剂安全评价企业重点实验室, 天津 300410
3. 天士力控股集团有限公司, 天津 300410

摘要: 目的 研究注射用益气复脉(冻干, YQFM)对人肝微粒体的细胞色素 P450 亚型酶 CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A4 活性的影响。方法 差速离心法制备人肝微粒体, 体外人肝微粒体、YQFM (6.5、32.5、65.0、325.0、650.0、3 250.0 和 6 500.0 $\mu\text{g/mL}$) 和 7 种底物探针在还原型辅酶 $\beta\text{-NADPH}$ 的作用下, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴孵育 30 min, 同时设置阴性对照(空白缓冲液)和阳性对照(各亚酶的选择性抑制剂)组; 应用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法测定探针底物的代谢产物生成量, 酶活性以相对阴性对照的百分比表示。结果 与阴性对照组比较, 32.5、65.0、325.0、650.0、3 250.0 浓度的 YQFM 对 CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A4 活性均不发挥抑制作用; 半数抑制浓度(IC_{50})均大于 6 500 $\mu\text{g/mL}$ 。结论 YQFM 在临床使用过程中发生药物相互作用的概率较小。

关键词: 注射用益气复脉(冻干); CYP450 酶; 探针底物法; 药物相互作用

中图分类号: R962.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)07-1224-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.07.011

Effect of injection of Yiqi Fumai Lyophilized Injection on activity of CYP450 subtypes in human liver microsomes

LI Zhi^{1,2}, HOU Jian³, LI Wei³, LI Dekun^{1,2}, SONG Meizhen^{1,2}, WAN Meixu^{1,2}, JU Aichun^{1,2}

1. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd, Tianjin 300410, China
2. Tianjin Key Laboratory of Safety Evaluation Enterprise of Traditional Chinese Medicine Injections, Tianjin 300410, China
3. Tasly holding group co., ltd, Tianjin 300410, China

Abstract: Objective To study the influence of Yiqi Fumai Lyophilized Injection (YQFM) on the activities of cytochrome P450 enzymes of human liver microsomes CYP450 *in vitro* by cocktail probe drugs approach. **Methods** Human liver microsomes were prepared by differential centrifugation. Human liver microsomes and seven probes were incubated with different concentrations (32.5, 65.0, 325.0, 650.0, 3 250 $\mu\text{g/mL}$) of YQFM at 37 $^{\circ}\text{C}$ in presence of $\beta\text{-NADPH}$. The concentrations of produced metabolites in the reaction solution were determined by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method assay. The enzyme activity was expressed as a percentage of the relative negative control. **Results** Compared with negative control group, YQFM of 32.5, 650, 325, 650, 3250, 6 500.0 $\mu\text{g/mL}$ played no inhibitory effect on liver microsomal CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19 and CYP3A4 activity, and the median inhibitory concentration (IC_{50}) was greater than 6 500 $\mu\text{g/mL}$. **Conclusion** The probability of drug interaction in the process of clinical use of YQFM is small.

Key words: Yiqi Fumai Lyophilized Injection (YQFM); cytochrome P450; cocktail probe approach; drug interaction

收稿日期: 2018-01-16

基金项目: 天津市中药注射剂关键技术校企协同创新实验室建设项目 (17PTSJYC00090)

第一作者: 李 智 (1984—), 女, 中级工程师, 研究方向为药理药效和药物安全性研究。Tel: (022) 26735673 E-mail: tsl-lizhi2016@tasly.com

*通信作者: 李德坤, 男, 工程师, 研究方向为中药注射剂工艺研究、质量标准研究, 安全性及药物警戒研究。

Tel: (022)26736712 E-mail: lidekun@tasly.com

鞠爱春 (1973—), 男, 高级工程师, 研究方向为中药注射剂工艺及质量控制。Tel: (022)86342096 E-mail: juaichun@tasly.com

注射用益气复脉(冻干, YQFM)是由中医益气养阴的著名古方生脉散演变而来。在我国被广泛用于治疗冠心病劳累型心绞痛气阴两虚证, 症见胸痹心痛、心悸气短、倦怠懒言、头晕目眩、面色少华、脉细弱或结代; 以及冠心病所致慢性左心功能不全 II、III 级气阴两虚证, 症见心悸、气短, 甚则气急喘促、胸闷隐痛、倦怠乏力、面色苍白、动则出汗等, 疗效显著。临床实验表明, 在治疗心脏衰竭方面, YQFM 相较于传统标准医学治疗有更好的疗效以及更少的副作用^[1]。YQFM 中 3 种中药成分对治疗心血管疾病和调节心血管功能均有显著疗效^[2-5], 临床上应用比较广泛, 与其它药物的联用也比较常见。

细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 是药物代谢的主要酶系, CYP450 酶中几种重要的亚型, 包括 CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A4 等, 参与 90% 以上的药物代谢过程。药物对 CYP450 酶的抑制或促进有可能引起药物的相互作用或者临床使用的不良反应, 进而增加患者的治疗风险, 已经引起医药界的极大关注^[6-10]。因此, 通过体外研究 YQFM 对人肝微粒体的 CYP450 亚酶活性的影响, 预测可能发生的药物相互作用, 对指导中药注射剂的临床安全使用、规避临床用药风险具有重要意义。

1 材料

1.1 药品及主要试剂

YQFM, 规格: 每支 0.65 g, 批号 20150109, 天津天士力之骄药业有限公司生产。非那西汀 (Sigma 77440, STBB2177M9); 安非他酮 (Sohon, 批号 201306-1); 双氯芬酸 (Sigma UC-291, 093); 右美沙芬 (Sigma D2531, 120K1657); 阿莫地啉 (Sigma A2799, 038F0993V); S-美芬妥英 (Sigma UC175, BCBB6110); 睾酮 (Sigma-86500, 58-22-0); α -萘磺酮 (Sigma N5757, 087K0067); 塞替派 (货号 52-24-4, 常州淞弘进出口有限公司); 磺胺苯吡啉 (Sigma S0758, 096K1462); 奎尼丁 (Sigma, 货号 066K2509); 槲皮素 (Sigma Q4951, 020M1566); 噻氯匹定 (Sigma T6654, 020M1566); 酮康唑 (GM, K0421, 531F01); 混合人肝微粒体, 购于美国 BD 公司; β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸还原酶 (β -NADPH), 购于瑞士 Roche 公司; 甲醇, 购自美国 FisherScientific 公司; 柳胺酚, 购自上海金易精细化工有限公司; 超纯水由 Millipore 超纯水

制造系统制备。

1.2 主要仪器

Agilent 1200 Series system, 美国 Agilent; MIKRO 220R 低温高速离心机, 德国 Hettich 公司; pH 计与 XS105S 电子分析天平, 瑞士 Mettler Toledo; Sorvall RC 6+离心机, 美国 Thermo scientific 公司。

2 方法

2.1 溶液的配制

YQFM 用 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.4) 溶液配制成质量浓度为 19.5 mg/mL 的储备溶液, 再用 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 溶液稀释, 使孵育时终质量浓度分别为 6.5、32.5、65.0、325.0、650.0、3 250.0 和 6 500.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

人肝微粒体的制备采用差速离心法^[7], 所有操作均在 4 $^\circ\text{C}$ 进行, 微粒体蛋白浓度以 Lowry 法并用小牛血清白蛋白作标准对照测定^[8]。制备好的肝微粒体分装后 -80 $^\circ\text{C}$ 的冰箱中保存备用。

2.2 检测药品对 CYP450 各亚酶活性的影响

建立人肝微粒体体外孵育反应体系^[9]: 混合人肝微粒体蛋白的终质量浓度为 0.3 mg/mL; β -NADPH 终浓度为 1 mmol/L; MgCl_2 浓度为 3.3 mmol/L; $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.4) 缓冲液浓度为 100 mmol/L; CYP450 亚酶 CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 3A4 选择性抑制剂浓度分别为: α -萘磺酮 30 $\mu\text{mol/L}$ 、塞替派 200 $\mu\text{mol/L}$ 、槲皮素 20 $\mu\text{mol/L}$ 、磺胺苯吡啉 10 $\mu\text{mol/L}$ 、噻氯匹定 5 $\mu\text{mol/L}$ 、奎尼丁 10 $\mu\text{mol/L}$ 和酮康唑 5 $\mu\text{mol/L}$; 探针底物溶液终浓度分别为: 非那西汀 30 $\mu\text{mol/L}$ 、安非他酮 200 $\mu\text{mol/L}$ 、阿莫地啉 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 、双氯芬酸 25 $\mu\text{mol/L}$ 、S-美芬妥英 100 $\mu\text{mol/L}$ 、右美沙芬 8 $\mu\text{mol/L}$ 、睾酮 50 $\mu\text{mol/L}$ 。

实验分为 3 组, 阴性对照: 混合人肝微粒体与空白 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液在 37 $^\circ\text{C}$ 预孵育 15 min 后, 加入 CYP450 各亚酶的探针底物和 CYP450 的辅酶 β -NADPH, 于 37 $^\circ\text{C}$ 共同孵育 30 min。阳性对照组: 混合人肝微粒体分别与各亚酶的选择性抑制剂在 37 $^\circ\text{C}$ 预孵育 15 min 后, 加入各亚酶的探针底物和 β -NADPH, 于 37 $^\circ\text{C}$ 共同孵育 30 min。YQFM 组: 混合人肝微粒体分别与 YQFM (6.5、32.5、65.0、325.0、650.0、3 250.0 和 6 500.0 $\mu\text{g/mL}$) 在 37 $^\circ\text{C}$ 预孵育 15 min 后, 加入各亚酶的探针底物和 β -NADPH, 于 37 $^\circ\text{C}$ 共同孵育 30 min。各组均设 3 个平行样本。

反应结束之后,所有组均加入预冷的含内标的甲醇终止反应,涡旋混合后 12 000 r/min 离心 5 min,取上清上样,液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)定量检测:CYP450 亚酶 CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 3A4 代谢探针产物——对乙酰氨基酚、羟基安非他酮、*N*-去乙基阿莫地喹、4-羟基双氯芬酸、4-羟基美芬妥英、右啡烷、6 β -羟基睾酮。色谱和质谱条件均与文献报道相同^[10],分别考察不同浓度的 YQFM 对不同酶亚型的抑制活性。

2.3 数据分析

CYP450 亚酶的酶活性以相对阴性对照的百分比表示,数据依照如下公式计算:

相对酶活性 = (阳性对照/YQFM 组产物浓度) / 阴性对照组产物浓度

平均值、标准偏差、相对活性通过软件 Microsoft Excel 2007 计算,浓度分别为 6.5、32.5、65.0、325.0、650.0、3 250.0 和 6 500.0 $\mu\text{g/mL}$ 测试物对 CYP450 各亚型酶的半数抑制浓度(IC₅₀)值主要通过 Graphpad prism 5.0 软件进行非线性回归

分析计算。

3 结果

3.1 对 CYP450 亚酶活性的影响

阴性对照组 CYP450 各亚酶酶活性为 100%,阳性对照选择性抑制剂 α -萘磺酮、塞替派、槲皮素、磺胺苯吡唑、噻氯匹定、奎尼丁、酮康唑分别显著抑制了 CYP1A2、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A4 约 94.9%、85.9%、29.8%、81.7%、70.6%、93.6%、98.0% 的活性,结果表明,测试系统可以用于评价 YQFM 对 CYP450 各亚酶酶活性的抑制作用。

YQFM 对人肝微粒体中 CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A4 活性的影响见图 1。32.5、65.0、325.0、650.0、3 250.0、6 500.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 YQFM 对人肝微粒体中的 CYP2C8、CYP2C9、CYP2D6 酶活性无显著影响。与阴性对照比较,32.5、65.0、325.0、650.0、3 250.0 $\mu\text{g/mL}$ YQFM 组 CYP1A2 酶活性显著升高($P < 0.05$ 、0.01)。质量浓度为 32.5、65.0、325.0、650.0、3 250.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 YQFM 对 CYP2B6、CYP2C19 和 CYP3A4 的活

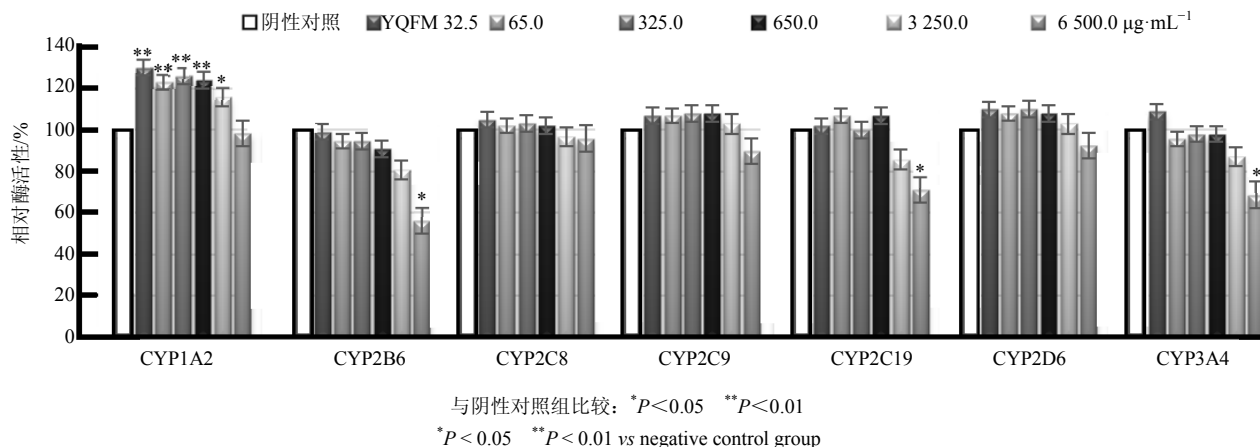


图 1 YQFM 对 CYP450 亚酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of YQFM on CYP450 enzymes activity ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

性无明显影响,在质量浓度为 6 500 $\mu\text{g/mL}$ 时,CYP2B6、CYP2C19 和 CYP3A4 的酶活性分别为阴性对照的 56.1%、68.8%、71.3%,酶活性明显降低($P < 0.05$)。

3.2 评价 YQFM 对 CYP450 各亚酶酶活性的抑制作用

依据美国 FDA 发布的药物相互作用研究指导原则^[10](2012)对浓度分别为 6.5、32.5、65.0、

325.0、650.0、3 250.0 和 6 500.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 YQFM 对 CYP450 亚酶 CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A4 的活性抑制作用进行评价。通过 Graphpad prism 5.0 软件对各组相对酶活性进行非线性回归分析,并计算 IC₅₀ 值,结果见图 2。结果表明,YQFM 对 7 个亚酶 CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A4 的 IC₅₀ 值均大于

6 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 在最高浓度时 6 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对 CYP2B6、CYP2C19 和 CYP3A4 的酶活性呈现一

定的抑制作用; 浓度 $\leq 325.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, YQFM 对 7 个亚酶均不发挥明显抑制作用。

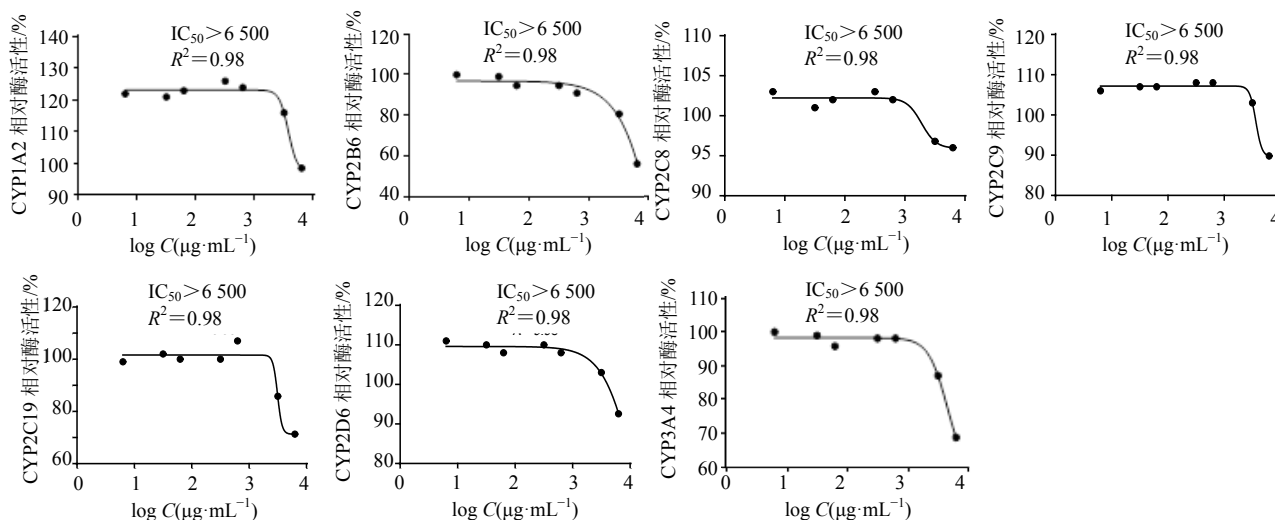


图2 YQFM对CYP450亚酶活性的抑制作用评价

Fig. 2 Evaluation of inhibitory effect of YQFM on activity of CYP450 subenzyme

4 讨论

本研究采用底物探针法评价了不同浓度的YQFM对人肝微粒体CYP450酶亚系中的CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6和CYP3A4的抑制作用,方法快速、灵敏,便于分析研究。

本实验结果显示,65.0、325.0、650.0、3 250.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的YQFM对CYP1A2活性没有抑制作用,因为药物对此酶的诱导或抑制作用,在临床上联合用药都可能会影响CYP1A2酶的活性,存在发生不良反应的潜在风险。YQFM是由红参、麦冬、五味子提取物制得,含有人参皂苷和木脂素成分^[13],低于3 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的YQFM对人肝微粒体中的CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6和CYP3A4的活性没有抑制作用,高剂量6 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组,虽对CYP2B6、CYP2C19和CYP3A4的酶活性呈现出一定的抑制作用,但半数抑制率(IC_{50})均大于6 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$,具体结果见图2所示。

临床常规使用YQFM最高浓度为静脉滴注20.4 mg/mL ,给药体积约250 mL,以正常人的血浆容量为5 000 mL计算,YQFM在人体内的最高血药浓度约为1 040 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。通过评价不同浓度的YQFM对CYP450亚型CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6和CYP3A4代谢活性的影响,表明YQFM在临床推荐剂量下使用的安

全性是可靠的。如增加YQFM的给药剂量,应充分考虑YQFM对联合药物代谢的影响^[11-12],与经过CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19和CYP3A4代谢的药物合用时,必要时调整合用药物的给药剂量。

本实验初步探讨了YQFM对CYP450亚酶活性的影响,CYP450家族虽然是占主导地位的一组代谢酶,但生物体内还有其他类别的重要的药物代谢酶,包括负责乙酰化、甲基化和去酯化的酶^[14-15]等。因此,关于YQFM的药物相互作用仍需进一步深入研究,以更好地解释临床上将YQFM与其他药物联合使用的科学性和合理性。

参考文献

- [1] 张兆琨. 辨证分型论治对冠心病慢性心力衰竭预后的影响 [J]. 中医临床杂志, 2010, 22(10): 850-851.
- [2] Chang H L, Kim J H. A review on the medicinal potentials of ginseng and ginsenosides on cardiovascular diseases [J]. JGR, 2014, 38(3):161-166.
- [3] Shen L, Feng Y, Lian S, et al. Chemical constituents from The Fibrous Root of *Ophiopogon japonicus*, and their effect on tube formation in human myocardial microvascular endothelial cells [J]. Fitoterapia, 2012, 85(1): 57-63.
- [4] Huang Y L, Kou J P, Ma L, et al. Possible mechanism of the anti-inflammatory activity of ruscogenin: role of intercellular adhesion molecule - 1 and nuclear factor-kappaB [J]. JPS, 2008, 108(2):198-205.

- [5] Alexander P, Georg W. Pharmacology of Schisandra chinensis Bail.: an overview of Russian research and uses in medicine [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 118(118): 183-212.
- [6] Kennedy D A, Seely D. Clinically based evidence of drug-herb interactions: a systematic review [J]. Expert Opin Drug Saf, 2010, 9: 79-124.
- [7] von Bahr C, Groth C G, Jansson H, et al. Drug metabolism in human liver *in vitro*: establishment of a human liver bank [J]. Clin Pharmacol Ther, 1980, 27(6): 711-725.
- [8] Lowry O H, Rosebrough H J, Farr A, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. JBC, 1951, 193: 265-275.
- [9] 叶林虎, 孔令提, 肖冰心, 等. LC-MS/MS 同时测定 5 种探针底物代谢产物和快速评价细胞色素 P450 同工酶的活性 [J]. 中国药物警戒, 2013, 10: 263-268.
- [10] U S FDA. Guidance for industry - drug interaction studies - study design, data analysis, and implications for dosing and labelling [S]. September, 2006.
- [11] 谢瑞芳, 周 晰. 中药对细胞色素 P450 代谢影响的研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2009, 14(6): 697-701.
- [12] Lzzo A A, Emst E. Interactions between herbal medicines and pre-scribed drugs [J]. Drugs, 2009, 69(13): 1777-1798.
- [13] 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.
- [14] Mu Y, Zhang J, Zhang S, et al. Traditional Chinese Medicines Wu Wei Zi (Schisandra chinensis Baill) and Gan Cao (Glycyrrhiza uralensis Fisch) activate pregnane X receptor and increase warfarin clearance in rats [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 316(3): 1369-1377.
- [15] 王静娴, 陆 苑, 黄 勇, 等. Cocktail 探针药物法评价灯盏乙素及其苷元对大鼠细胞色素 P450 酶的影响 [J]. 中国医药工业杂志, 2014, 45(3): 261-264.