

痹祺胶囊配伍组分对体内 CYP450 同工酶活性的影响

张韶瑜, 宋乃宁, 樊慧蓉, 刘昌孝*

天津药物研究院 天津药代动力学与药效动力学省部共建国家重点实验室, 天津 300193

摘要: **目的** 通过体内实验评价痹祺胶囊配伍组方对细胞色素 P450 同工酶 (cytochrome P450, CYP450) 活性的影响。**方法** 采用全新的“Cocktail”一点法, 建立 LC-MS/MS 法测定大鼠体内 5 种探针药物非那西丁、甲苯磺丁脲、美芬妥英、右美沙芬和咪达唑仑及其相应的代谢产物的浓度, 分析和评估痹祺胶囊配伍组分对大鼠体内 5 种 CYP450 酶的诱导和/或抑制作用。**结果** 痹祺胶囊组方存在基于 CYP450 的配伍规律, 与空白对照组比较, 君药+臣药组、君药+使药组、君药+臣药+佐药组、君药+臣药+使药组、君药+佐药+使药组及痹祺胶囊全药组对 CYP1A2 具有显著诱导作用; 君药+臣药组、君药+臣药+佐药组、君药+臣药+使药组及痹祺胶囊全药组对 CYP2C9 具有显著诱导作用。**结论** 痹祺胶囊组方存在基于 CYP450 酶较显著的配伍规律, 为进一步研究痹祺胶囊组方配伍的科学性和安全性奠定良好基础。

关键词: 痹祺胶囊; 组方配伍; CYP450 同工酶; “Cocktail”一点法; LC/MS/MS

中图分类号: R285.62 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)08-1571-05

Effects of components in Biqi Capsulae prescription compatibility on activities of cytochrome P450 *in vivo*

ZHANG Shao-yu, SONG Nai-ning, FAN Hui-rong, LIU Chang-xiao

State Key Laboratory of Pharmacodynamics and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To investigate and evaluate the effect of components in Biqi Capsulae prescription compatibility on activities of cytochrome P450 (CYP450) *in vivo*. **Methods** A new “Cocktail” one point method has been established, including five probes of Phenacetin, Tolbutamide, mephenytoin, Dextromethorphan, and midazolam. An LC-MS/MS analytical method has been established to determine the above five probes and their corresponding metabolites to analyze and evaluate the potential *in vivo* induction and (or) inhibition of components from Biqi Capsulae on the above five CYP450 in rats. **Results** Biqi Capsulae prescription has compatibility based on CYP450. Compared with blank group, groups of “principal + assistant”, “principal + mediator”, “principal + assistant + complement”, “principal + assistant + mediator”, “principal + complement + mediator”, and whole Biqi Capsulae could significantly induce the activity of CYP1A2. Moreover, groups of “principal + assistant”, “principal + assistant + complement”, “principal + assistant + mediator”, and whole Biqi Capsulae could significantly induce the activity of CYP2C9. **Conclusion** Biqi Capsulae prescription has significant compatibility based on CYP450. These results provide the important information and establish good foundation for further investigation on scientificity and safety of Biqi Capsulae prescription compatibility.

Key words: Biqi Capsulae; prescription compatibility; cytochrome P450 (CYP450); “Cocktail” one point method; LC/MS/MS

方剂配伍一直以来都是中医药学研究的热点, 配伍使用时不同中药的众多成分间构成了复杂的相互作用体系, 这些相互作用是复方整体效应的重要基础。药物在机体内的生物转化主要由肝药酶催化, 其中细胞色素 P450 同工酶 (cytochrome P450, CYP450) 是催化药物进行代谢作用的重要的酶系, 其活性也能被许多化合物诱导或抑制, 从而引起药物间的相互作用^[1-2]。

痹祺胶囊处方来源于汉代名医华佗传世验方“一粒仙丹”, 由马钱子、地龙、党参、茯苓、白术、甘草、川芎、丹参、三七、牛膝等组成^[3]。由于痹祺胶囊组方中君药马钱子的毒性较大, 对其疗效的发挥和国际药物的准入带来不利影响, 所以有必要开展有关痹祺胶囊安全性的研究。本实验试图从痹祺胶囊组方中不同药味如何影响君药对肝脏 CYP450 作用的角度, 研究方剂中不同配伍组分之

收稿日期: 2010-10-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (306.30075); “973”计划资助项目 (2004BC158902); 天津市自然科学基金资助项目 (08JCYBJC07500)

作者简介: 张韶瑜 (1980—), 女, 博士, 主要从事药物代谢研究。

*通讯作者 刘昌孝, 中国工程院院士。Tel: (022)23006863 E-mail: liuchangxiao@163.com

间的相互作用,进一步研究君药与臣、佐、使药之间的关系,从而为阐明痹祺胶囊组方中君臣佐使的作用和地位、深入研组方原理以及全面评价痹祺胶囊组方配伍的安全性和科学性打下基础。

1 材料

马钱子、党参、白术、茯苓、丹参、三七、川芎、牛膝、地龙、甘草、痹祺胶囊全粉,均为痹祺胶囊生产厂家天津达仁堂达二药业有限公司提供并鉴定。苯巴比妥片购于上海金山制药有限公司;利福平胶囊购于沈阳红旗制药有限公司;氯霉素原料药购于浙江普洛医药科技有限公司。

咪达唑仑(midazolam, MZ)、1'-羟基咪达唑仑(1'-hydroxy-midazolam, OH-MZ)、S-美芬妥英(mephenytoin, MP)、4'-羟基美芬妥英(4'-hydroxy-mephenytoin, OH-MP)、右啡烷(dextrorphan, DX)、羧基甲苯磺丁脲(carboxy-tolbutamide, COOH-TB)、4-羟基甲苯磺丁脲(4-hydroxy-tolbutamide, OH-TB)及 β -葡萄糖醛酸苷酶(VII-A型)均购于Sigma公司;非那西丁(Phenacetin, PA)购于天津力生制药有限公司;扑热息痛(Paracetamol, APAP)由沈阳药科大学提供;右美沙芬(Dextromethorphan, DM)、甲苯磺丁脲(Tolbutamide, TB)、溴莫普林(Brodiprim)、氧氟沙星(Ofloxacin)及美洛昔康(Meloxicam)由天津药物研究院提供。

TSQ Quantum Discovery MAX型液相色谱-质谱-质谱联用仪(配有ESI源、LC泵以及Xcalibur数据处理系统,美国Thermo Finnigan公司);TurboVAP浓缩仪(美国Caliper公司);KH-851型旋涡混合器(上海环宇仪器厂);SYZ-550型石英亚沸高纯水蒸馏器(天津市鑫洲科技有限公司);微量移液器(上海求精生化试剂仪器有限公司)。分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。TGL-16型高速离心机(上海医疗器械六厂)。

雄性Wistar大鼠,体质量为(220±20)g,购于中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心,合格证号:SCXK(津)2005-0001。

2 方法

2.1 拆方分组

君药组:马钱子,君药+臣药组:马钱子、党参、白术、茯苓、丹参,君药+佐药组:马钱子、三七、川芎、牛膝、地龙,君药+使药组:马钱子、甘草,君药+臣药+佐药组:马钱子、党参、白术、茯苓、丹参、三七、川芎、牛膝、地龙,君药+臣药+使

药组:马钱子、党参、白术、茯苓、丹参、甘草,君药+佐药+使药组:马钱子、三七、川芎、牛膝、地龙、甘草,痹祺胶囊全药组:所有10味药组合。

同时设羧甲基纤维素钠(CMC-Na)对照组、苯巴比妥诱导剂阳性对照组(CYP1A2、2C9、2D6及3A)、利福平诱导剂阳性对照组(CYP2C19)、氯霉素抑制剂阳性对照组。

2.2 药物制备

痹祺胶囊方剂中各药材均由生产厂家按照痹祺胶囊生产工艺进行超微粉碎,并符合痹祺胶囊生产标准,可直接入药。称取痹祺胶囊全粉18g于盛有150mL 1% CMC-Na溶液的研钵中,充分研磨至药材粉末全部润湿、无气泡且分散均匀。其他拆方组均按照痹祺胶囊全药组(生药量120mg/mL)配制质量浓度,并按照各药材在方剂中的配伍比例同法进行制备。

混合探针药物的配制:精密称取PA 100mg、MP 1mg、DM 40mg、TB 80mg,以10mL 30%聚山梨酯80助溶后,转移至100mL量瓶中,加入8mL MZ注射液(5mg/mL),以0.9%氯化钠注射液定容至刻度,混合均匀备用。

2.3 测定条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱Shiseido C₁₈(150mm×4.6mm, 5 μ m, Shiseido Fine Chemicals);流动相甲醇-20mmol/L甲酸胺(含0.1%甲酸)(75:25);体积流量0.4mL/min;柱温35 $^{\circ}$ C;内标为溴莫普林(2 μ g/mL,血液样品);氧氟沙星(5 μ g/mL,尿液样品,正离子检测);美洛昔康(1 μ g/mL,尿液样品,负离子检测)。

2.3.2 质谱条件 离子源ESI源:正离子模式(4200V);负离子模式(-4000V);毛细管温度280 $^{\circ}$ C;鞘气(N₂)压力206.85kPa;辅助气(N₂)体积流量3.3L/min;碰撞气(Ar)压力0.2133Pa;扫描方式:选择性反应监测(SRM)方式,扫描宽度0.5,扫描时间0.2s;探针药物及代谢产物的相对分子质量(MW)、母离子(m/z)、子离子(m/z)、检测方式及碰撞能量(eV)见表1、2。

2.4 样品处理

2.4.1 血浆样品处理 0.2mL血浆中加入10 μ L溴莫普林内标溶液(2 μ g/mL)并于涡旋混合器震荡0.5min后,将混合物通过Oasis[®]HLB固相萃取小柱(1mL甲醇及1mL双蒸水预处理)进行提取。载有样品的固相萃取小柱先后以1mL双蒸水及1mL

表 1 血浆样品测定的质谱条件

Table 1 MS condition of determination on plasma

待测物	MW	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	检测方式	碰撞能量/eV
PA	179	180	138	ESI ⁺	20
APAP	151	152	110	ESI ⁺	20
MZ	325	326	291	ESI ⁺	30
OH-MZ	341	342	324	ESI ⁺	25
溴莫普林 (IS)	338	339	281	ESI ⁺	35

表 2 尿液样品测定的质谱条件

Table 2 MS condition of determination on urine

待测物	MW	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	检测方式	碰撞能量/eV
OH-MP	234	235	150	ESI ⁺	17
DM	271	272	215	ESI ⁺	25
DX	257	258	199	ESI ⁺	25
氧氟沙星 (IS)	361	362	318	ESI ⁺	25
TB	270	269	170	ESI ⁻	20
OH-TB	286	285	186	ESI ⁻	21
COOH-TB	300	299	92	ESI ⁻	40
美洛昔康 (IS)	351	350	286	ESI ⁻	15

5%甲醇洗脱后,再以 2×1 mL 甲醇洗脱。收集甲醇洗脱液,并于 37 °C 氮气流下吹干。残留物加入 150 μL 流动相振荡溶解,进样 20 μL,进行 LC/MS/MS 分析。

2.4.2 尿液样品处理 所有标准曲线及质控样品均未经 β-葡萄糖醛酸苷酶催化。将 50 μL 尿液以 450 μL 双蒸水稀释后加入 20 mmol/L 甲酸胺 (pH 4.75) 500 μL、氧氟沙星内标溶液 (5 μg/mL) 10 μL、美洛昔康内标溶液 (1 μg/mL) 10 μL,于涡旋混合器振荡 0.5 min,将混合物通过 Oasis[®] HLB 固相萃取小柱进行提取 (提取方法同血浆样品处理),进样 20 μL,进行 LC/MS/MS 分析。

2.5 动物实验

60 只雄性 Wistar 大鼠随机分为 12 组,每组 5 只,分别为: (1) CMC-Na 对照组; (2) 君药组; (3) 君药+臣药组; (4) 君药+佐药组; (5) 君药+使药组; (6) 君药+臣药+佐药组; (7) 君药+臣药+使药组; (8) 君药+佐药+使药组; (9) 痹祺胶囊全药组; (10) 苯巴比妥诱导剂阳性对照组; (11) 利福平诱导剂阳性对照组; (12) 氯霉素抑制剂阳性对照组。各组分别 ig 给予空白溶液 (1% CMC-Na)、君药、君药+臣药、君药+佐药、君药+使药、君药+臣药+佐药、君药+臣药+使药、君药+佐药+使药、痹祺胶囊全药 (1.2 g/kg)、苯巴比妥 (40

mg/kg)、利福平 (50 mg/kg)、氯霉素 (50 mg/kg),给药体积 1 mL/100 g,连续 7 d。每组动物均于实验前禁食过夜后,清晨尾 iv 给予“Cocktail”混合探针药物,其中含有 PA (5 mg/kg)、MZ (2 mg/kg)、MP (0.05 mg/kg)、DM (4 mg/kg)、TB (2 mg/kg),给药量为 0.5 mL/100 g。

各实验组大鼠均置于代谢笼中,于给药 1 h 后内眦取血,3 000 r/min 离心 5 min,分离血浆;并收集 0~6、6~12 h 尿液。测定前,在 0.5 mL 0~6 h 稀释尿液样品中加入 250 μL 20 mmol/L 甲酸胺溶液 (pH 4.75) 以及 250 μL 5 000 U/mL 的 β-葡萄糖醛酸苷酶 (20 mmol/L 甲酸胺溶液中, pH 4.75) 后,于 37 °C 水浴中孵育 12 h。血浆和尿液样品分别按照“2.4”项下进行提取,进样 20 μL 测定。

2.6 数据处理

由各组大鼠在不同时间点的探针药物及其代谢产物的血药及尿药浓度计算出均值和标准差。

酶活性: 第 1 小时血浆中 APAP 与 PA 浓度之比,及 OH-MZ 与 MZ 浓度之比分别作为 CYP1A2 与 CYP3A4 酶活性指标; 0~6 h 尿样中 OH-MP 的总回收量,及 DX 与 DM 浓度之比分别作为 CYP2C19 与 CYP2D6 酶活性指标^[4-6]; 6~12 h 尿样中 TB 的代谢率作为 CYP2C9 的酶活性指标,即 OH-TB 与 COOH-TB 的总量除以剩余 TB 量^[7]。

2.7 统计分析

采用 SPSS 11.5 软件进行计算分析。采用方差分析 (One-Way ANOVA) 比较组间各 P450 同工酶的活性差异。当总体上存在显著性差异, 方差齐时通过 Dunnett *t* (2-sided) 法检验, 方差不齐时通过 Dunnett T3 法检验。

3 结果

3.1 血药、尿药浓度及酶活性测定结果

探针药物 PA、APAP、MZ 及 OH-MZ 取血时间点为 1 h, 测定血药浓度; 此外收集 0~6、6~12 h 尿液, 测定尿药浓度, 通过血药、尿药浓度及收集的尿体积计算各同工酶的酶活性指标, 结果见表 3。

表 3 痹祺胶囊配伍组分对 CYP450 同工酶活性的影响

Table 3 Effect of components in Biqi Capsulae prescription compatibility on activities of CYP450

组别	CYP1A2	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A
空白对照	5.13±0.63	168.0±41.9	273.0± 76.7	0.60±0.19	0.064±0.023
君药	6.21±0.91	178.0±35.4	208.0± 49.2	0.57±0.27	0.065±0.031
君药+臣药	11.57±2.41*	298.0±42.0*	316.0±168.0	0.62±0.23	0.067±0.012
君药+佐药	4.92±0.53	149.0±81.5	266.0± 96.4	0.49±0.25	0.042±0.014
君药+使药	8.01±0.47*	163.0±53.1	304.0±117.0	0.46±0.22	0.025±0.015
君药+臣药+佐药	9.79±1.78*	269.0±23.8*	233.0± 79.1	0.59±0.11	0.049±0.012
君药+臣药+使药	8.20±1.18*	264.0±24.4*	287.0±146.0	0.37±0.20	0.061±0.039
君药+佐药+使药	9.00±1.16*	173.0±35.5	210.0± 81.1	0.64±0.20	0.028±0.009
痹祺胶囊全药	10.70±1.48*	364.0±72.2*	284.0± 58.0	0.60±0.26	0.032±0.023
诱导剂阳性对照	9.03±1.35*	292.0±33.8*	808.0±123.0*	1.29±0.20*	0.115±0.027*
抑制剂阳性对照	1.59±0.64*	61.7± 3.8*	134.0± 32.4*	0.16±0.03*	0.022±0.007*

与空白对照组比较: **P*<0.05

**P*<0.05 vs blank control group

3.2 统计结果

经过统计分析, 阳性对照组 (诱导剂阳性对照组和抑制剂阳性对照组) 与空白对照组 5 种酶的酶活性指标比较, 方差分析中的 *F* 检验均存在显著性差异, 且阳性对照组与空白对照组的 *P* 值均小于 0.05, 存在显著性差异, 证明本实验中采用的评价 P450 同工酶的诱导或抑制作用的方法是可靠的。

3.2.1 痹祺胶囊组方对 CYP1A2 的影响 方差分析中 *F* 检验存在显著性差异, 表明有必要进行多重统计比较; 方差齐次性检验中 *P*<0.05, 表明方差不具有齐次性, 所以选择 Dunnett T3 检验进一步进行多重统计比较。结果显示, 君药+臣药组、君药+使药组、君药+臣药+佐药组、君药+臣药+使药组、君药+佐药+使药组及痹祺胶囊全药组的 *P* 值均小于 0.05, 表明以上各组与对照组比较, CYP1A2 酶活性存在显著性差异。实验结果显示, 与对照组比较, 痹祺胶囊配伍组中的君药+臣药组、君药+使药组、君药+臣药+佐药组、君药+臣药+使药组、君药+佐药+使药组及痹祺胶囊全药组明显诱导 CYP1A2, 以上各实验组 CYP1A2 酶活性分别增加 125.5%、56.1%、90.8%、59.8%、75.4%、

108.6%, 提示痹祺胶囊配伍组方中存在诱导 CYP1A2 的活性成分。

3.2.2 痹祺胶囊组方对 CYP2C9 的影响 方差分析中的 *F* 检验存在显著性差异, 表明有必要进行多重统计比较; 方差齐次性检验中 *P*>0.05, 表明方差具有齐次性, 因此选择 Dunnett *t* 法检验, 进一步进行多重统计比较。结果显示, 君药+臣药组、君药+臣药+佐药组、君药+臣药+使药组及痹祺胶囊全药组的 *P* 值均小于 0.05, 表明以上各组与空白对照组比较, CYP2C9 酶活性存在显著性差异。实验结果显示, 与空白对照组比较, 痹祺胶囊配伍组中的君药+臣药组、君药+臣药+佐药组、君药+臣药+使药组及痹祺胶囊全药组明显诱导 CYP2C9, 以上各实验组 CYP2C9 酶活性分别增加 77.6%、59.8%、56.8%、116.6%, 提示痹祺胶囊配伍组方中存在诱导 CYP2C9 的活性成分。

3.2.3 痹祺胶囊组方对 CYP2C19、CYP2D6 及 CYP3A 的影响 CYP2C19: 方差分析中的 *F* 检验不存在显著性差异, 表明不具有进行多重统计比较的必要性。CYP2D6: 方差分析中的 *F* 检验不存在显著性差异, 表明不具有进行多重统计比较的必要

性。CYP3A: 方差分析中的 F 检验存在显著性差异, 表明具有进行多重统计比较的必要; 方差齐次性检验中 $P < 0.05$, 表明方差不具有齐次性, 所以选择 Dunnett T3 检验进一步进行多重统计比较。结果显示, 各实验组与空白对照组比较 P 值均大于 0.05, 表明各组与空白对照组比较 CYP3A 酶活性均不存在显著性差异。

4 结论

痹祺胶囊组方中存在基于 CYP450 同工酶的配伍规律。其中君药+臣药组、君药+使药组、君药+臣药+佐药组、君药+臣药+使药组、君药+佐药+使药组及痹祺胶囊全药组对 CYP1A2 有诱导作用, 而对 CYP2C19、CYP3A4、CYP2D6 无统计学显著影响。君药+臣药组、君药+臣药+佐药组、君药+臣药+使药组及痹祺胶囊全药组对 CYP2C9 有诱导作用, 而对 CYP2C19、CYP3A4、CYP2D6 无统计学显著影响。

5 讨论

本实验采用“Cocktail”探针药物一点测定法, 在实验动物给予探针药物后, 在某特定时间点取血, 同时测定探针药物及其相应代谢产物的血药浓度, 并计算得出酶活性指标, 即代谢产物与探针药物的血药浓度之比, 通过对不同实验动物组之间酶活性指标进行统计分析, 比较有无显著性差异, 从而评价不同实验动物组之间 P450 酶活性的差异。

已有研究发现马钱子中的马钱子碱和番木鳖碱不影响本实验的 5 种 CYP450 活性, 而与佐药中的甘草酸和甘草次酸合并后对 CYP2C9 和 CYP2C19 有一定的影响^[8]。从痹祺胶囊组方对 CYP450 影响的实验结果可以看出, 痹祺胶囊组方存在基于 CYP450 的较为显著的配伍规律。特别是君药马钱子配伍使药甘草后, 显示出对 CYP1A2 明显的诱导作用, 这一配伍规律的发现为揭示痹祺胶囊组方配伍后的减毒作用提供了新的思路。本实验

结果为进一步探讨君药、臣药、佐药和使药在痹祺胶囊组方配伍中的作用地位, 全面综合地分析与评价痹祺胶囊组方配伍的科学性奠定了良好基础。痹祺胶囊组方基于 CYP450 的配伍规律性也为全面综合地分析与评价本方剂的科学性, 推动痹祺胶囊的国际药物准入奠定良好的基础。

参考文献

- [1] 王睿. 细胞色素 P450 氧化酶基因多态性对药物代谢影响的研究进展 [J]. 中国临床药学杂志, 2004, 20(2): 134-138.
- [2] 吴伯镛. 细胞色素 P450 酶与合理用药 [J]. 药品评价, 2005, 2(4): 301-302.
- [3] 高晶, 曾勇, 于飞, 等. 痹祺胶囊全方及拆方抗炎镇痛作用研究 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 93-96.
- [4] Zhu B, Ouyang D S, Chen X P, *et al.* Assessment of cytochrome P450 activity by a five-drug cocktail approach [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2001, 70(5): 455-461.
- [5] Kashuba A D, Nafziger A N, Kearns G L, *et al.* Quantification of intraindividual variability and the influence of menstrual cycle phase on CYP2D6 activity as measured by dextromethorphan phenotyping [J]. *Pharmacogenetics*, 1998, 8(5): 403-410.
- [6] McCune J S, Lindley C, Decker J L, *et al.* Lack of gender differences and large intrasubject variability in cytochrome P450 activity measured by phenotyping with dextromethorphan [J]. *J Clin Pharmacol*, 2001, 41(7): 723-731.
- [7] Damkier P, Brosen K. Quinidine as a probe for CYP3A4 activity: intrasubject variability and lack of correlation with probe-based assays for CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2000, 68(2): 199-209.
- [8] Zhang S Y, Song N N, Gao J, *et al.* Effect of glycyrrhctic acid and glycyrrhetic acid on the inhibitory cytochrome P450 activities of brucine and strychnine *in vitro* test [J]. *Asian J Pharmacodynam Pharmacokinet*, 2009, 9(4): 277-286.