

延胡索与白芷组分配伍对延胡索乙素在大鼠肝微粒体中酶促反应动力学的影响

廖正根^{1*}, 万彦婷², 梁新丽¹, 祝婧云¹, 赵国巍¹, 王光发¹

1. 江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330001

2. 武警江西总队医院 妇产科, 江西 南昌 330006

摘要: **目的** 研究延胡索总生物碱(TA)中延胡索乙素(TET)在肝微粒体中的酶促反应动力学, 并比较白芷有效组分白芷香豆素(Cou)、挥发油(VO)与TA配伍后对TET酶促反应动力学的影响。**方法** 超速离心法制备大鼠肝微粒体, 采用高效液相色谱法测定孵育液中TET原形药物的浓度。比较TA、TA-Cou、TA-VO、TA-Cou-VO配伍各组中TET的酶促反应动力学, 推导出药物米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_{max}); 并计算TET肝内清除率(CL_{int})。**结果** TA配伍组中的TET在大鼠肝微粒体内代谢反应的 V_{max} 、 K_m 和 CL_{int} 分别为0.12 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}\cdot\text{mg})$ 、5.40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、0.022 $\text{L}/(\text{min}\cdot\text{mg})$; TA-Cou组分别为0.27 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}\cdot\text{mg})$ 、40.18 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、0.006 $\text{L}/(\text{min}\cdot\text{mg})$; TA-VO组分别为0.57 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}\cdot\text{mg})$ 、22.60 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、0.025 $\text{L}/(\text{min}\cdot\text{mg})$; TA-Cou-VO组分别为0.84 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}\cdot\text{mg})$ 、23.25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、0.036 $\text{L}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。**结论** TA配伍白芷有效组分可降低TA中TET在肝内的 CL_{int} 。

关键词: 延胡索总生物碱; 白芷有效组分; 配伍; 延胡索乙素(TET); 酶促反应动力学; 大鼠肝微粒体

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)09-1783-05

Compatible effects of *Corydalis Rhizoma* and *Angelicae Dahuricae Radix* components on enzymatic reaction kinetics of *dl*-tetrahydropalmatine in rat liver microsomes

LIAO Zheng-gen¹, WAN Yan-ting², LIANG Xin-li¹, ZHU Jing-yun¹, ZHAO Guo-wei¹, WANG Guang-fa¹

1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330001, China

2. Obstetrics & Gynecology and Pediatrics, Hospital of Jiangxi Corps of Chinese Armed Police Force, Nanchang 330006, China

Abstract: Objective To study the enzymatic reaction kinetics of *dl*-tetrahydropalmatine (TET) in total alkaloid (TA) of *Corydalis Rhizoma* in rat liver microsomes and to investigate the compatible effects of the effective components such as coumarin (Cou) and volatile oil (VO) in *Angelicae Dahuricae Radix* with TA in *Corydalis Rhizoma* on enzymatic reaction kinetics of TET. **Methods** Rat liver microsomes were prepared by ultracentrifugation and the TET concentration in incubation medium was determined by HPLC. Comparative study on the enzymatic reaction kinetics of TET in each group of TA, TA-Cou, TA-VO, and TA-Cou-VO to deduce the michaelis constant (K_m) and maximum reaction rate (V_{max}) of TET in each group and calculate the clearance rate (CL_{int}) of TET in each group. **Results** The K_m , V_{max} , and CL_{int} in TA group were 0.12 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}\cdot\text{mg})$, 5.40 $\mu\text{mol}/\text{L}$, and 0.022 $\text{L}/(\text{min}\cdot\text{mg})$, respectively; In TA-Cou group they were 0.27 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}\cdot\text{mg})$, 40.18 $\mu\text{mol}/\text{L}$, and 0.006 $\text{L}/(\text{min}\cdot\text{mg})$, respectively; In TA-VO group they were 0.57 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}\cdot\text{mg})$, 22.60 $\mu\text{mol}/\text{L}$, and 0.025 $\text{L}/(\text{min}\cdot\text{mg})$, respectively; In TA-Cou-VO they were 0.84 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min}\cdot\text{mg})$, 23.25 $\mu\text{mol}/\text{L}$, and 0.036 $\text{L}/(\text{min}\cdot\text{mg})$, respectively. **Conclusion** The effective components of TA in *Corydalis Rhizoma* with Cou and VO in *Angelicae Dahuricae Radix* could decrease CL_{int} of TET in TA of liver.

Key words: total alkaloid (TA) of *Corydalis Rhizoma*; effective components of *Angelicae Dahuricae Radix*; compatibility; *dl*-tetrahydropalmatine (TET); enzymatic reaction kinetics; rat liver microsomes

配伍是中药应用的主要形式, 中药复方独特的 要阐明复方的作用机制, 必先探究其配伍规律。研究配伍规律和效用的优势已为长期临床实践所证实。 研究中中药复方配伍规律的方法有: 采用神经网络建模,

收稿日期: 2011-01-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30960516); 国家重大新药创制中药新型给药系统技术平台(2009ZX09310-005); 江西省自然科学基金资助项目(2007GZY0932)

作者简介: 廖正根(1967—), 男, 博士、教授, 研究方向为药物新剂型与新技术。Tel: (0791)7119011 E-mail: lyzlyg@163.com

运用数据挖掘法将描述性的原始信息转化为科学数据^[1]；通过统计、分析与研究古今治疗某种疾病的一定样本数量的方剂组方配伍用药情况，归纳总结出该病的方剂配伍用药规律^[2]；以及物理、化学和生物效应等方法^[3-5]。元胡止痛方由延胡索、白芷两味中药组成，具有理气、活血、止痛之功效，用于气滞血瘀的胃痛、胁痛、头痛及痛经等的治疗^[6]。处方中延胡索主要组分为总生物碱，白芷中有效组分主要为总香豆素和挥发油^[7]。以往的研究结果表明，白芷总香豆素和挥发油可增强延胡索总生物碱(TA)的镇痛效应^[5]。药物进入机体后，其吸收、分布、代谢、消除等对药效具有较大的影响。白芷的活性组分是否通过影响TA在体内的药动学行为而增强其镇痛效应还不甚清楚。药物代谢酶是药物相互作用的主要机制，药物代谢可以显著改变药物的活性，诱导或抑制药物代谢酶是药物相互作用的主要机制。目前，从药物代谢方面开展中药复方配伍的研究鲜见报道。本实验研究了TA中延胡索乙素(TET)在肝微粒体中的酶促反应动力学，并比较白芷有效组分白芷香豆素(Cou)、挥发油(VO)与TA配伍后对TET酶促反应动力学的影响，为探讨元胡止痛方的配伍机制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪(包括 G1322A 脱气器、G1310A 四元泵、G1316A 柱温箱、G1321A FLD 检测器、Agilent-Chemistry 工作站，安捷伦科技有限公司)；高速冷冻离心机(Sigma 公司)；BT—2000 氮气吹干仪(北京八方世纪科技有限公司)；XW—80A 微型涡旋混合仪(上海沪西分析仪器厂)。

1.2 药品与试剂

延胡索生物碱，自制，以TET计总生物碱质量分数为80.0%，含TET 1.82%；白芷挥发油(VO)，自制，提取率2.0%， α -蒎烯、甲基-环癸烷、1-十四烷醇质量分数分别为6.71%、7.4%、3.80%；白芷香豆素(Cou)，自制，以欧前胡素计总香豆素质量分数为50.1%，含欧前胡素3.2%。TET对照品，购自中国药品生物制品检定所，批号110726-200409。氧化型辅酶II(β -NADP)、葡萄糖-6-磷酸、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶均为Sigma公司产品；还原型辅酶II(β -NADPH)为Solarbio公司产品。

1.3 动物

健康SD大鼠，雌雄不限，体质量180~200 g，

江西中医学院实验动物中心提供，合格证号：JZDW 2009-0031。

2 方法

2.1 肝微粒体的制备^[8]

雌性大鼠5只，禁食16 h后脱臼处死，迅速剪开心脏，用注射器以4℃生理盐水由门静脉灌注，结扎上腔静脉，灌注至肝脏呈土黄色。将肝脏剪碎，用Tris-HCl 1:4匀浆，冰浴超声分散30 s，4℃、20 000×g离心20 min。取上清于4℃、100 000×g离心60 min，弃上清，所得沉淀部分即为肝微粒体。按初始匀浆时每克肝组织加入1 mL Tris-HCl 储存液(4℃)重悬微粒体，冰浴，玻璃匀浆管手动研磨，使微粒体均匀分散，-70℃保存备用。采用考马斯亮蓝法测定肝微粒体悬浮液蛋白质量浓度。

2.2 溶液配制

2.2.1 0.1 mol/L Tris-HCl 储存液的制备 Tris 12.12 g，EDTA 二钠 0.372 1 g，蒸馏水 800 mL，充分搅拌溶解，加浓HCl调节pH至7.5，将溶液定容至1 L。高温、高压灭菌后，室温保存。

2.2.2 BSA 溶液的制备 取10 mg BSA溶于10 mL去离子水中，即得。

2.2.3 TET 对照品溶液的制备 精密称取TET对照品适量，用甲醇溶解并制成626 μ mol/L的贮备液。精密量取贮备液适量，用甲醇稀释成9.23、18.46、36.92、73.86、147.7、295.4 μ mol/L系列浓度对照品溶液，备用。

2.2.4 空白温孵液的制备 将大鼠肝微粒体高温灭活，并用0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液配制成蛋白质浓度为1.0 mg/mL的空白温孵液。

2.2.5 考马斯亮蓝试剂的配制 考马斯亮蓝 G-250 100 mg溶于95%乙醇50 mL中，加入85%磷酸100 mL，用蒸馏水稀释至1 000 mL，滤纸滤过。最终试剂中含考马斯亮蓝 G-250 0.1 mg/mL，乙醇47 mg/mL。

2.2.6 标准蛋白质溶液的配制 结晶牛血清蛋白，预先经微量氏定氮法测定蛋白氮的量，根据其纯度用NaCl溶液配制成100 μ g/mL蛋白溶液。

2.3 色谱条件^[6]

色谱柱为Crosasil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm，5 μ m)，流动相为乙腈-0.1%磷酸水(50:50，三乙胺调节pH 6.0)，体积流量为1.0 mL/min，激发波长为232 nm，发射波长为323 nm，柱温25℃，进样量为20 μ L。

2.4 肝微粒体悬浮液中蛋白的测定^[9]

取16支试管,分两组平行操作。各组8支试管分别取100 $\mu\text{g/mL}$ 的BSA溶液0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mL,各管以NaCl缓冲液补足至1.0 mL,涡旋振荡后各加5 mL考马斯亮蓝试剂,以吸光度($A_{595\text{nm}}$)为纵坐标,标准蛋白的量为横坐标,绘制标准曲线。根据标准曲线测得肝微粒体蛋白质量浓度为2.1 mg/mL 。

2.5 样品温孵条件

参考文献方法^[10],反应体系(0.5 mL,用Tris-HCl缓冲液溶解、稀释为蛋白质量浓度为1.0 mg/mL)中含 β -NADP 0.5 mmol/L 、 β -NADPH 0.5 mmol/L 、葡萄糖-6-磷酸 5.0 mmol/L 、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 1.0 U/mL ,肝微粒体蛋白质量浓度为1.0 mg/mL 。每个反应体系中分别加入不同质量浓度试剂(TA、TA-Cou、TA-VO、TA-Cou-VO)的甲醇溶液10 μL ,反应体系中甲醇终体积分数小于1%。

37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴振荡(150 r/min)一定时间后,加甲醇2 mL终止反应,每个样品平行温孵2次。

2.6 样品处理

取上述温孵后的反应体系0.5 mL,加入甲醇2 mL,旋涡混合2 min,10 000 $\times g$ 离心10 min。精密吸取上清液2 mL,于45 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干仪水浴吹干,用0.5 mL流动相复溶,40 000 $\times g$ 离心10 min,取20 μL ,按上述色谱条件进行测定。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 专属性试验 将肝微粒体分为3份,分别加入TA、TA-Cou-VO、Cou-VO,另设空白温孵液,按“2.6”项下方法处理后测定。在上述色谱条件下,TET与肝微粒体中的内源性杂质能较好地分离,空白肝微粒体温孵液中的内源性杂质及其他杂质不干扰样品峰,基线噪音小,TET的保留时间约为11 min,说明该方法专属性较高。见图1。

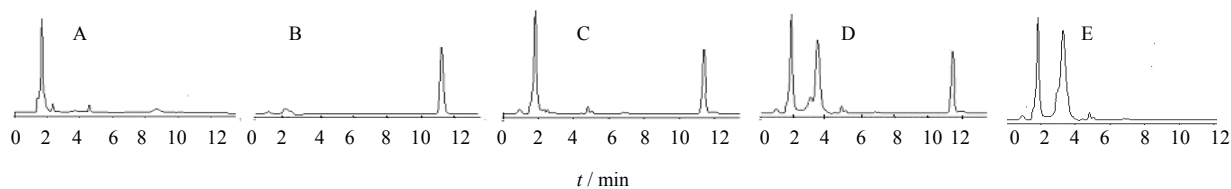


图1 空白孵育液(A)、TET对照品(B)、肝微粒体+TA(C)、肝微粒体+TA-Cou-VO(D)和肝微粒体+Cou-VO(E)的HPLC图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank incubation medium (A), TET reference substance (B), liver microsomes+TA (C), liver microsomes+TA-Cou-VO (D), and liver microsomes+Cou-VO (E)

3.1.2 线性关系考察 在空白温孵液中加入不同浓度的TET对照品溶液,使TET的浓度分别为0.184、0.368、0.737、1.477、2.954、5.908 $\mu\text{mol/L}$,按“2.6”项下方法处理后进样测定,以TET的峰面积(A)对浓度(C)绘制标准曲线,结果TET在0.184~5.908 $\mu\text{mol/L}$ 线性关系良好,回归方程为 $A=372.43 C+118$, $r=0.9997$ 。

3.1.3 回收率试验 在空白温孵液中加入不同浓度的TET溶液,配制成0.368、1.477、2.954 $\mu\text{mol/L}$ 3种浓度的溶液,各5份,按“2.6”项下方法处理后进样测定,连续测定5 d,记录TET的峰面积,求得平均回收率92.2%,RSD为6.23%。

3.1.4 精密度试验 按“2.6”项方法操作,测定日内、日间精密度RSD分别为3.12%、5.76%。

3.2 不同配伍对TET在大鼠肝微粒体中的酶促反应动力学的影响

3.2.1 孵育时间的影响 将蛋白质量浓度为1.0 mg/mL 的肝微粒体温孵液分为4组,分别加入TA(4.8 mg/mL)、TA-Cou(4.8 $\text{mg/mL}+1.5 \text{ mg/mL}$)、TA-VO(4.8 $\text{mg/mL}+5 \mu\text{g/mL}$)、TA-Cou-VO(4.8 $\text{mg/mL}+1.5 \text{ mg/mL}+5 \mu\text{g/mL}$),从开始振荡(37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴,150 r/min)计时,分别于5、15、30、45、60、90、120 min取样,处理后进样测定。结果显示,在0~15 min内,TA、TA-Cou、TA-VO、TA-Cou-VO各组中TET呈线性消除,15~60 min消除速率减缓,60~120 min几乎无变化。各组中TET的代谢趋势相近,代谢速率有所不同。最终本实验所选的温孵时间为15 min。见图2。

3.2.2 肝微粒体悬浮液中蛋白质量浓度的影响 蛋白质量浓度分别为0.25、0.5、1.0 mg/mL 的肝微粒体悬浮液,与TA(4.8 mg/mL)、TA-Cou(4.8 $\text{mg/mL}+1.5 \text{ mg/mL}$)、TA-VO(4.8 $\text{mg/mL}+5 \mu\text{g/mL}$)、

TA-Cou-VO (4.8 mg/mL+1.5 mg/mL+5 μ g/mL) 温孵 15 min, 处理后进样测定。结果显示, 随着肝微粒体蛋白质浓度的增加, 各组中 TET 消除增加, 因此选择肝微粒体蛋白质质量浓度为 1.0 mg/mL。见图 3。

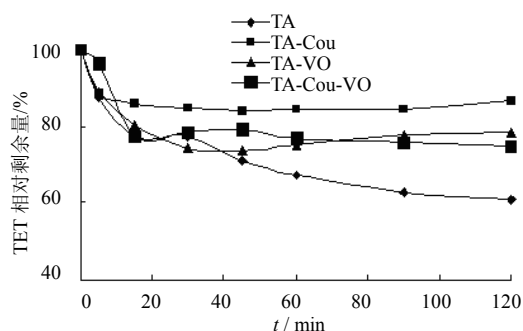


图 2 孵育时间对 TA 及各配伍药物中 TET 代谢的影响

Fig. 2 Effects of incubated time on TET metabolism in TA and each group

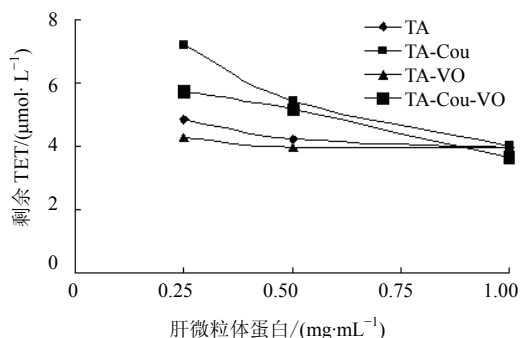


图 3 微粒体蛋白浓度对 TA 及各配伍各组药物中 TET 代谢的影响

Fig. 3 Effects of concentration of microsomes proteinum on TET metabolism in TA and each group

3.2.3 底物浓度对 TET 代谢速率的影响 在肝微粒体温孵液中分别加入不同浓度的 TA、TA-Cou、TA-VO、TA-Cou-VO, 使 TA 质量浓度分别为 0.2、0.6、1.2、2.4、4.8、9.6 mg/mL, TA-Cou 质量浓度分别为 (0.2+0.06)、(0.6+0.18)、(1.2+0.37)、(2.4+0.75)、(4.8+1.5)、(9.6+3.0) mg/mL, TA-VO 质量浓度分别为 (0.2 mg/mL+0.3 μ g/mL)、(0.6 mg/mL+0.625 μ g/mL)、(1.2 mg/mL+1.25 μ g/mL)、(2.4 mg/mL+2.5 μ g/mL)、(4.8 mg/mL+5.0 μ g/mL)、(9.6 mg/mL+10 μ g/mL), TA-Cou-VO 质量浓度分别为 (0.2 mg/mL+0.06 mg/mL+0.3 μ g/mL)、(0.6 mg/mL+0.18 mg/mL+0.625 μ g/mL)、(1.2 mg/mL+0.37 mg/mL+1.25 μ g/mL)、(2.4 mg/mL+0.75 mg/mL+2.5 μ g/mL)、(4.8 mg/mL+

1.5 mg/mL+5 μ g/mL)、(9.6 mg/mL+3 mg/mL+10 μ g/mL), 肝微粒体蛋白 1.0 mg/mL。37 $^{\circ}$ C 水浴振动 (150 r/min) 15 min, 温孵时间为 15 min。结果显示, TA、TA-Cou、TA-VO、TA-Cou-VO 中 TA 质量浓度在 0.2~4.8 mg/mL 时, 反应速率随底物质量浓度的增加而骤增; 此后随着底物质量浓度的升高, 反应速率不再增加, 说明酶已接近饱和状态。见图 4。

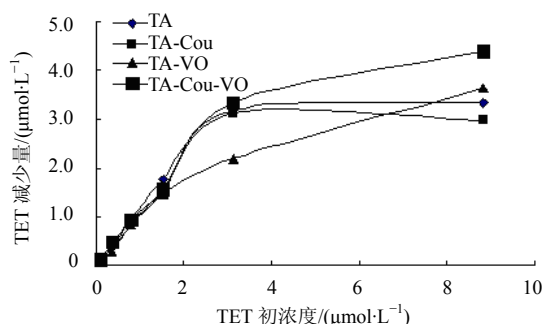


图 4 底物质量浓度对 TA 及各配伍各组药物中 TET 代谢的影响

Fig. 4 Effects of substrate concentration on TET metabolism in TA and each group

根据米氏方程与双倒数作图法 Lineweaver-Burk plot, 分别求得 TA、TA-Cou、TA-VO、TA-Cou-VO 4 组药物中 TET 在肝微粒体代谢反应的最大速率 ($V_{\max}$)、米氏常数 (K_m) 和肝内消除率 CL_{int} ($V_{\max}/K_m$)。结果见表 1。可见 TA-Cou 配伍后, TA 中的 TET 酶代谢动力学参数变化较大, 其 K_m 值远大于 TA 组, CL_{int} 值远小于 TA 组, 表明 TA 配伍 Cou 后, 可能降低了酶对底物的清除能力。

表 1 TA 及各配伍各组中 TET 酶促反应动力学参数

Table 1 Parameters of enzymatic reaction kinetics of TET in TA and different components

组别	$V_{\max}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1})$	$K_m/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$CL_{\text{int}}/(\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1})$
TA	0.12	5.40	0.022
TA-Cou	0.27	40.18	0.006
TA-VO	0.57	22.60	0.025
TA-Cou-VO	0.84	23.25	0.036

4 讨论

细胞色素 P450 (CYP 450) 是由多个同工酶组成的基因超家族, 参与许多药物和致癌物的氧化代谢作用。位于肝脏中的 CYP 450, 是人体中重要的药物代谢酶, 占人体 CYP 450 总量的 50% 以上, 参

与催化代谢 60%以上的药物^[8]。中药中许多成分是 P450 酶的底物、诱导剂或抑制剂,因此有可能存在基于 P450 酶的药物相互作用。中药配伍使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;药物代谢也可增加生物转化率,从而降低药物浓度,使药物作用降低,显著改变药物的药理活性^[1-3]。很多中药中的成分也是 CYP3A4 的诱导剂或抑制剂,可抑制或诱导代谢酶对所配伍药物的破坏,进而改变整个复方的药理效应。因此,从药物代谢方面研究中药配伍规律有助于了解中药及成分间的相互作用、变化规律及与药效学之间的内在联系等,为揭示传统中药配伍理论科学内涵和临床合理配伍用药提供依据。

配伍是中药应用的主要形式,但对其作用机制的内涵及物质间相互作用规律的研究,尤其是从药动学角度进行系统研究还较少。元胡止痛方有较长的应用历史,但对其配伍机制的研究较少。以往的研究表明,白芷有效组分可增强 TA 的镇痛效应^[5]。笔者曾研究了白芷有效组分对 TA 中 TET 在大鼠体内的药动学及肠吸收的影响,结果表明白芷有效组分可增加 TA 中 TET 的吸收,提高 TET 的生物利用度^[6]。 $V_{\max}$ 、 K_m 和 CL_{int} 为酶动力学主要参数, K_m 值表示酶对底物的亲和能力, K_m 值越大,酶对底物的亲和能力则越小, CL_{int} 表示酶对底物的清除能力, CL_{int} 值越大,酶对底物的清除能力则越大。上述研究结果表明,配伍白芷总香豆素后 (TA-Cou),TA 中的 TET 酶代谢动力学参数变化较大,其 K_m 远大于 TA 组, CL_{int} 远小于 TA 组,表明 TA 配伍

Cou 后可能降低了酶对底物的清除能力,这可能与白芷增强延胡索的镇痛效应有关,其具体配伍机制仍有待深入研究。

参考文献

- [1] 蒋永光,胡波,刘娟,等. 方剂配伍的数据挖掘可行性探索 [J]. 四川中医, 2004, 20(9): 25-30.
- [2] 华浩明. 浅论文献研究在方剂学科研中的方法、内容 & 意义 [J]. 江苏中医, 2001, 22(6): 1-4.
- [3] 苏孝共,朱光辉,王增寿. 白芍与柴胡不同比例配伍芍药苷水煎出量的比较 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2005, 22(3): 256-257.
- [4] 武洲,刘建利,令亚萍,等. 龙胆汤配伍过程中化学成分定性定量研究 [J]. 西北大学学报: 自然科学版, 2006, 36(1): 103-106.
- [5] 朱央央,余伯阳. 元胡止痛方配伍的化学和药效学比较研究 [J]. 中国药科大学学报, 2003, 34(5): 461-464.
- [6] 梁新丽,廖正根,王光发,等. 白芷提取物与延胡索总碱配伍对延胡索乙素在大鼠体内药代动力学的影响 [J]. 药学报, 2009, 44(6): 645-650.
- [7] 张富强,聂红,韦艺,等. 白芷的化学与药理研究进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2002, 18(3): 190-192.
- [8] 于卫江,黄丽军,朱大岭,等. 应用大鼠肝微粒体筛选对细胞色素 P450 有抑制作用的中药 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 397-401.
- [9] 曹稳根,赵海泉,焦庆才. 考马斯亮蓝与牛血清白蛋白相互作用机理的研究 [J]. 激光生物学报, 2008, 17(1): 32-37.
- [10] 何坎,全珏珠. 左旋和右旋吡啶酮在人和大鼠肝微粒体内的代谢 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1993, 7(3): 210-213.