

探针药物法评价苦参对大鼠细胞色素 P450 2E1 代谢活性的影响

焦建杰, 李 芹*, 刘 洁, 汪 云, 李家男, 惠洋洋, 娄建石

天津医科大学基础医学院 药理学教研室, 天津 300070

摘要: 目的 以氯唑沙宗作为探针药物, 研究苦参对大鼠细胞色素 P450 2E1 (CYP 2E1) 体内代谢活性的影响。方法 将 Wistar 大鼠随机分为对照组、苦参组、苯巴比妥阳性对照组。苦参组大鼠 ig 给予苦参颗粒 (100 mg/kg) 溶液, 对照组 ig 给予等体积的生理盐水, 阳性对照组 ip 苯巴比妥注射液 50 mg/kg, 各组均每日给药 1 次, 连续 5 d。第 6 天各组大鼠尾 iv 氯唑沙宗 (5 mg/kg) 溶液, 于给药前及给药后不同时间点眼内眦静脉取血 0.8 mL, HPLC 法测定氯唑沙宗血药浓度。结果 与对照组相比, 苦参组给予苦参 5 d 后, 氯唑沙宗的 AUC 和 $C_{\max}$ 明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), CL 明显升高 ($P < 0.05$); 而苦参组的主要药动学参数与苯巴比妥组比较无显著差异 ($P > 0.05$)。结论 苦参可明显诱导大鼠 CYP 2E1 的体内代谢活性, 其作用强度与苯巴比妥相当。

关键词: 苦参; 细胞色素 P450 2E1; 代谢; 探针药物法; 氯唑沙宗

中图分类号: R282.710.5; R969.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)09-1799-04

Evaluation on effect of *Sophora flavescens* roots on metabolic activity of cytochrome P450 2E1 in rats by probe drug method

JIAO Jian-jie, LI Qin, LIU Jie, WANG Yun, LI Jia-nan, HUI Yang-yang, LOU Jian-shi

Department of Pharmacology, School of Basic Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To study the effect of *Sophora flavescens* roots on the metabolic activity of cytochrome P450 2E1 (CYP 2E1) in rats with chlorzoxazone as probe drug. **Methods** The rats were randomly divided into three groups: control group, *S. flavescens* roots group, and phenobarbital group. *S. flavescens* roots granule and normal saline were ig administrated with a dose of 100 mg/kg once daily for 5 d to rats in *S. flavescens* roots and control groups, respectively. Sodium phenobarbital injection (50 mg/kg) was ip administered once daily for 5 d. On the day 6, the tails of all the rats in each group were iv injected with chlorzoxazone (5 mg/kg), then venous blood samples from rat's eye canthus were collected at a set of time-points before and after the administration. The plasma concentration of chlorzoxazone was determined by HPLC. **Results** In *S. flavescens* roots group, AUC and $C_{\max}$ of chlorzoxazone were significantly lower ($P < 0.05$, 0.01) while CL was significantly higher ($P < 0.05$) than those of rats in the control group. There was no significant difference in the main pharmacokinetic parameters between *S. flavescens* roots and phenobarbital groups ($P > 0.05$). **Conclusion** *S. flavescens* roots could significantly induce the metabolic activity of CYP 2E1 in rats *in vivo* and the strength of the induction corresponds to that of phenobarbital.

Key words: roots of *Sophora flavescens* Ait.; cytochrome P450 2E1 (CYP 2E1); metabolism; probe drug method; chlorzoxazone

苦参为豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根, 性寒, 味苦, 具有清热解毒、祛风燥湿、杀虫利尿等功效。苦参富含生物碱类和黄酮类成分, 具有抗肿瘤、抗心律失常、抗肝损伤、抗肝纤维化、抗病原微生物、中枢抑制等多种药理作用^[1-2], 临床应用极其广泛。

中药成分复杂, 因此中西药联合应用容易出现药物相互作用, 而 40% 的药物相互作用是由药物代

谢酶所引起的^[3], 所以研究中药对细胞色素 P450 (CYP450) 酶活性的影响, 对于优化临床给药方案, 提高临床用药的安全性和有效性具有重要意义。细胞色素 P450 2E1 (CYP 2E1) 在肝脏中占细胞色素氧化酶总量的 7%, 许多小分子有机化合物和药物在体内经 CYP 2E1 代谢。本实验以氯唑沙宗作为 CYP 2E1 的探针药物, 通过研究大鼠给予苦参前后氯唑沙宗药动学的变化, 探讨苦参对大鼠 CYP 2E1

收稿日期: 2011-12-10

基金项目: 天津市自然科学基金重点项目 (09JCZDJC21500); 高等学校博士学科点专项科研基金 (新教师基金) 资助课题 (20091202120012)

作者简介: 焦建杰, 男, 高级实验师。

*通讯作者 李 芹 Tel: (022)23542523 E-mail: liqinql@163.com

体内代谢活性的影响,为其临床合理应用提供借鉴。

1 材料

1.1 药品与试剂

苦参颗粒, 1 g/袋, 江阴天江药业有限公司, 批号 0910105; 氯唑沙宗对照品, 批号 200901, 购自中国药品生物制品检定所; 氯唑沙宗原料药, 山东鲁南制药厂, 批号 20080704; 地西洋原料药, 山西大同制药厂, 批号 20071124; 苯巴比妥注射液, 0.1 g/mL, 天津市金耀氨基酸有限公司, 批号 1002011; 0.9%氯化钠注射液, 吉林科伦康乃尔制药有限公司, 批号 S090805 E2; 磷酸氢二铵、磷酸及氯仿均为分析纯, 甲醇为色谱纯, 水为双蒸水。

1.2 仪器

Agilent 1100 HPLC 工作系统, 美国 Agilent 公司; CAY—1 型液体快速混合器, 北京长安仪器厂; B600 型低速自动平衡离心机, 白洋离心机厂; K—550—GE 漩渦混合器, 美国 Scientific Industries 公司; PB153—S 精密分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司。

1.3 动物

Wistar 大鼠, 雌雄各半, 体质量 (200±20) g, 由军事医学科学院放射医学研究所实验动物中心提供, 动物生产合格证号 ASCSK (津) 2005-0001。

2 方法与结果

2.1 分组与给药

精密称取苦参颗粒适量, 加水溶解制成 10 mg/mL 的苦参溶液。将 Wistar 大鼠随机分为对照组、苦参组、苯巴比妥阳性对照组, 每组 6 只, 苦参组 ig 给予苦参颗粒溶液 (100 mg/kg, 根据人用剂量换算), 对照组 ig 等体积生理盐水, 阳性对照组 ip 苯巴比妥注射液 50 mg/kg, 各组均每日给药 1 次, 连续 5 d。第 6 天各组大鼠均尾 iv 氯唑沙宗

5 mg/kg 1 次。

2.2 样本采集与处理

分别于氯唑沙宗溶液注射前及注射后 5、10、15、20、30 min 和 1、2、4、8、12、24 h 眼内眦静脉取血 0.8 mL, 至肝素化离心管中, 3 500 r/min 离心 10 min, 分离血浆。准确吸取血浆样本 200 μ L, 加入 4 μ g/mL 地西洋内标溶液 100 μ L, 涡旋振荡 30 s, 加入 2 mL 醋酸乙酯, 于快速液体混合器混匀 5 min 后 3 500 r/min 离心 10 min。取下层有机相置玻璃离心管中, 于 40 $^{\circ}$ C 水浴中以氮气吹干。残渣用 100 μ L 流动相复溶, 20 μ L 进样, 记录色谱图。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为 0.05 mol/L 磷酸氢二铵缓冲溶液 (磷酸调 pH 值至 3.4) - 甲醇 (35:65), 体积流量 1.0 mL/min, 紫外检测波长 230 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 进样量 20 μ L。

2.4 方法学考察

2.4.1 标准曲线的绘制 准确吸取大鼠空白血浆 150 μ L, 加入不同质量浓度的氯唑沙宗对照品溶液 50 μ L, 使血浆药物质量浓度分别为 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 μ g/mL, 加入 4 μ g/mL 地西洋内标溶液 100 μ L, 每个质量浓度平行配制 3 份。按“2.2”项下方法操作, 记录峰面积。以氯唑沙宗与内标峰面积比值为横坐标 (X), 氯唑沙宗血浆药物质量浓度为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 求得直线回归方程为 $Y=4.313 X+0.556$, $r=0.998 5$, 线性范围为 0.2~50.0 μ g/mL。

2.4.2 专属性试验 按“2.2”项方法操作, 考察方法的专属性。结果表明在上述色谱条件下, 氯唑沙宗与内标峰峰形良好, 分离完全, 无杂质峰干扰。结果见图 1。

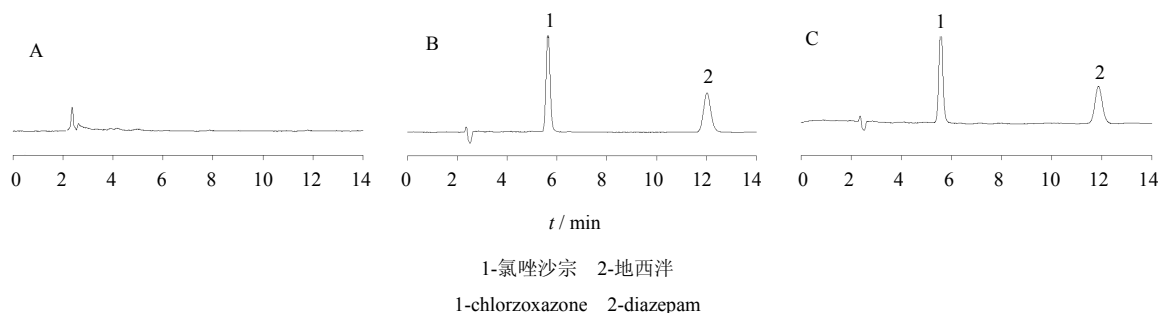


图 1 大鼠空白血浆 (A)、空白血浆+氯唑沙宗对照品+地西洋 (B)、血浆样品+地西洋 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank plasma (A), blank plasma + chlorzoxazone + diazepam (B), and plasma sample + diazepam (C)

2.4.3 稳定性试验 准确吸取大鼠空白血浆 150 μL , 加入不同质量浓度的氯唑沙宗溶液 50 μL , 使其质量浓度分别为 0.5、2.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$, 加入 4 $\mu\text{g/mL}$ 地西洋内标溶液 100 μL , 每个质量浓度平行配制 18 份, 置 -20°C 冰箱中保存, 分别于 0、5、10、15、20、30 d ($n=3$) 冻融, 测定氯唑沙宗的质量浓度, 考察样品在冷冻贮存下的稳定性。结果血浆样品冷冻 1 个月后氯唑沙宗质量浓度变化在 $\pm 8\%$ 以内。

2.4.4 精密度试验 准确吸取大鼠空白血浆 150 μL , 加入不同质量浓度的氯唑沙宗溶液 50 μL , 使其质量浓度分别为 0.5、2.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$, 加入 4 $\mu\text{g/mL}$ 地西洋内标溶液 100 μL , 每个质量浓度平行配制 5 份。按“2.2”项下方法操作, 于同日内不同时间点连续进样 5 次, 计算日内精密度; 连续 5 d 进样, 计算日间精密度。结果质量浓度分别为 0.5、2.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 时, 日内精密度分别为 6.6%、5.5%、5.4%; 日间精密度分别为 7.4%、5.2%、5.4%。

2.4.5 回收率试验 准确吸取大鼠空白血浆 150 μL , 加入不同质量浓度的氯唑沙宗溶液 50 μL , 使其质量浓度分别为 0.5、2.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$, 加入 4 $\mu\text{g/mL}$ 地西洋内标溶液 100 μL , 每个质量浓度平行配制 5 份, 按“2.2”项下方法操作, 记录峰面积。另取相应质量浓度的氯唑沙宗对照品溶液直接进样, 记录峰面积, 计算其绝对回收率。将氯唑沙宗峰面积与内标峰面积比值代入标准曲线计算出药物质量浓度, 与理论值比较, 计算其相对回收率。结果血浆中氯唑沙宗低、中、高 3 种质量浓度的绝对回收率分别为 $(98.32 \pm 5.91)\%$ 、 $(89.23 \pm 4.92)\%$ 、 $(81.52 \pm 3.75)\%$, RSD 分别为 6.0%、5.5%、4.6%; 相对回收率分别为 $(100.01 \pm 5.4)\%$ 、 $(96.33 \pm 3.94)\%$ 、

$(91.24 \pm 7.09)\%$, RSD 分别为 5.4%、4.1%、7.8%。

2.5 数据处理及分析

使用中国药理学学会数学药理专业委员会编制的药动学软件 DAS 2.0 的非房室模型计算氯唑沙宗的主要药动学参数, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 采用方差分析进行组间比较, Dunnett's 检验进行两两比较。

2.6 药动学研究

与对照组相比, 苦参组给予苦参 5 d 后, 氯唑沙宗的 AUC 和 $C_{\max}$ 明显降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 而 CL 明显升高 ($P < 0.05$); 而苦参组的主要药动学参数与苯巴比妥组比较无显著差异 ($P > 0.05$)。3 组大鼠氯唑沙宗的血药浓度-时间曲线见图 2。药动学参数结果见表 1。

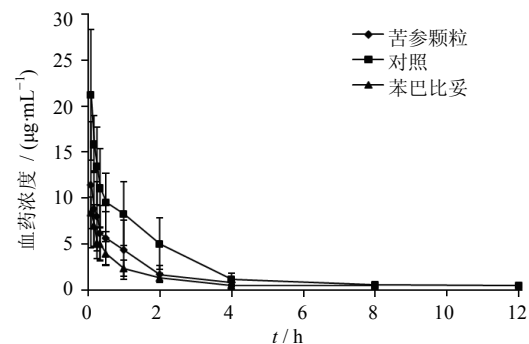


图2 各组大鼠氯唑沙宗的血药浓度-时间曲线

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curves of chlorzoxazone in three groups of rats

3 讨论

CYP 2E1 主要存在于肝脏微粒体中, 也存在于其他组织, 如肺、肾、脑、肠、黏膜和骨髓中。近来在白细胞和淋巴细胞中也检测到 CYP 2E1 的表达^[4]。CYP 2E1 不仅参与药物的代谢, 还能催化许多前致

表1 氯唑沙宗 (iv 给药) 在大鼠体内的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Main pharmacokinetic parameters after iv administration of chlorzoxazone in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

参 数	单 位	对 照	苦参颗粒	苯巴比妥
AUC_{0-4}	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$	28.743 ± 10.835	$14.211 \pm 7.963^*$	$8.899 \pm 2.709^{**}$
$AUC_{0-\infty}$	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$	30.456 ± 10.406	$15.463 \pm 8.008^{**}$	$9.840 \pm 3.140^{**}$
MRT_{0-4}	h	1.789 ± 0.417	1.483 ± 0.390	1.280 ± 0.423
$MRT_{0-\infty}$	h	2.610 ± 0.988	2.405 ± 1.146	1.972 ± 0.870
$t_{1/2}$	h	2.366 ± 1.405	1.827 ± 0.954	1.362 ± 0.634
CL	$\text{L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	0.182 ± 0.064	$0.416 \pm 0.228^*$	$0.570 \pm 0.247^{**}$
$C_{\max}$	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	15.878 ± 3.062	$8.888 \pm 4.142^{**}$	$7.027 \pm 2.292^{**}$

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

癌物和前毒物的活化过程^[5]。CYP 2E1 的底物多达 75 种,如乙醇、醋氨酚、茶碱、吸入性含氟麻醉剂、芳香族类化合物等^[6],其活性易受药物许多因素影响,从而对药物的疗效、不良反应以及化学物质的毒性反应产生重要影响^[7-8]。氯唑沙宗是中枢性肌松药,主要在肝脏经 6-羟化代谢生成 6-羟基氯唑沙宗,该途径几乎单由 CYP 2E1 催化,所以氯唑沙宗可在体内外作为 CYP 2E1 的探针药物以反映其活性^[9]。苯巴比妥可以促进肝脏内质网增生和微粒体膜结合蛋白合成,使 CYP450 的量增加,是目前国内外研究 CYP450 的公认诱导剂^[10]。因此本实验选择氯唑沙宗作为 CYP 2E1 的探针药物,苯巴比妥作为阳性对照药物。

结果表明,与对照组相比,苦参组大鼠给予苦参溶液 5 d 后,氯唑沙宗的 AUC 和 $C_{\max}$ 分别降低了 49.2%、44.0%,CL 升高了 128.6%,苦参组与苯巴比妥组相比主要药动学参数均无显著差异,表明给予苦参溶液 5 d 后,氯唑沙宗在大鼠体内的代谢明显加快,提示苦参对大鼠 CYP 2E1 有诱导作用,且作用强度与苯巴比妥相当。

苦参的临床应用极其广泛,研究其对 CYP450 各种亚型酶活性的影响可以预测合用药物间相互作用,为临床上中西药合理联用提供依据。本实验结果提示,苦参对 CYP 2E1 具有诱导作用,可使 CYP 2E1 活性增强,因此苦参与其他经 CYP 2E1 代谢的药物联合应用时,可能会使药物代谢加快,从而影响疗效,临床应用时应适当调整用药剂量,以提高疗效,减少不良反应。本研究只评价了苦参对 CYP 2E1 体内代谢活性的影响,而苦参中对 CYP 2E1 产生影响的主要成分,将在后续研究中继续深入探讨。

参考文献

- [1] 蒋合众. 苦参碱及氧化苦参碱药理作用和制备方法研究进展 [J]. 实用中西医结合临床, 2007, 7(1): 89-90.
- [2] 顾关云, 肖年生, 蒋 昱, 等. 苦参的化学成分、生物活性和药理作用 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(5): 265-271.
- [3] Ingelman-Sundberg M, Sim S C, Gomez A, et al. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects [J]. *Pharmacol Ther*, 2007, 116(3): 496-526.
- [4] Yamazoe Y, Ito K, Yoshinari K. Construction of a CYP2E1-template system for prediction of the metabolism on both site and preference order [J]. *Drug Metab Rev*, 2011, 43(4): 409-439.
- [5] Aiub C A, Gadermaier G, Silva I O, et al. N-nitrosodiethylamine genotoxicity evaluation: A cytochrome P450 induction study in rat hepatocytes [J]. *Genet Mol Res*, 2011, 10(4): 2340-2348.
- [6] Khojasteh S C, Prabhu S, Kenny J R, et al. Chemical inhibitors of cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes: A re-evaluation of P450 isoform selectivity [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2011, 36(1): 1-16.
- [7] Sinz M, Wallace G, Sahi J. Current industrial practices in assessing CYP450 enzyme induction: Preclinical and clinical [J]. *AAPS J*, 2008, 10(2): 391-400.
- [8] 马瑞芳, 韩国柱. 中药对细胞色素 P450 2E1 影响的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(11): 1841-1844.
- [9] Frye R F. Probing the world of cytochrome P450 enzymes [J]. *Mol Interv*, 2004, 4(3): 157-162.
- [10] Halwachs S, Kneuer C, Honscha W. Downregulation of the reduced folate carrier transport activity by phenobarbital-type cytochrome P450 inducers and protein kinase C activators [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1768(6): 1671-1679.