

谷红注射液对 CYP450 酶的抑制和诱导作用的体内外研究

刘凡琪, 王婧媛, 张露丹, 李自强*, 黄宇虹*

天津中医药大学第二附属医院, 天津 300250

摘要:目的 考察谷红注射液对体外及体内细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 酶的影响。方法 人肝微粒体“Cocktail”探针底物法进行体外酶抑制实验, 检测 7 种探针底物代谢产物的相对生成量, 计算半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC_{50}), 评估谷红注射液 (0.05%~10%) 对 7 种 CYP450 亚酶抑制作用。人原代肝细胞体系进行体外酶诱导实验, 分别检测酶活性及其 mRNA 表达水平, 评估谷红注射液对 CYP450 酶诱导作用。采用整体动物法进行体内酶活性实验, 检测 7 种特异性探针底物血浆药物浓度, 评估谷红注射液 (0.9、3.6 mL/kg) 对大鼠 7 种 CYP450 亚酶活性的影响。结果 谷红注射液对人肝微粒体 CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A4 的 IC_{50} 值分别为 1.98%、7.95%、2.85%、5.39%、4.92%、7.76% 和 3.41%, 均大于 0.5% (理论临床最大血药浓度值); 人原代肝细胞 CYP1A2、CYP2B6 和 CYP3A4 mRNA 表达增加 >2 倍, 且前两者呈浓度相关性增加, 对 CYP1A2 酶活性高于阳性对照 40%。谷红注射液在超临床剂量下使大鼠 CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19 和 CYP3A4 酶的体内探针底物茶碱、安非他酮、奥美拉唑和咪达唑仑的总清除率明显增加、系统暴露降低。结论 谷红注射液在临床剂量下对 7 种 CYP450 酶无显著抑制作用, 但不排除高剂量下对 CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19 和 CYP3A4 的诱导效应, 建议开展使用敏感探针底物的临床试验以进一步确认潜在的药物相互作用。

关键词: 谷红注射液; 细胞色素 P450 酶; 药物相互作用; 酶的抑制; 酶的诱导; 中西药相互作用

中图分类号: R285.62 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)06-1839-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.06.006

In vitro and *in vivo* study of inhibition and induction effect of Guhong Injection to CYP450 enzymes

LIU Fanqi, WANG Jingyuan, ZHANG Ludan, LI Ziqiang, HUANG Yuhong

Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300250, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Guhong Injection (谷红注射液) on cytochrome P450 (CYP450) enzyme *in vitro* and *in vivo*. **Methods** The *in vitro* enzyme inhibition test was carried out by human liver microsomal “Cocktail” probe substrate method, the relative production of metabolites of seven kinds of probe substrates was detected, the half inhibition concentration (IC_{50}) was calculated, and the inhibitory effect of Guhong Injection (0.05%—10%) on seven kinds of CYP450 subenzymes was evaluated. *In vitro* enzyme induction test was carried out in human primary hepatocyte system to detect the enzyme activity and mRNA expression level, and evaluate the induction effect of Guhong Injection on CYP450 enzyme. The whole animal method was used to detect the plasma drug concentration of seven specific probe substrates and evaluate the effects of Guhong Injection (0.9, 3.6 mL/kg) on the activities of seven CYP450 subenzymes in rats. **Results** The IC_{50} values of Guhong Injection on human liver microsome CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 were 1.98%, 7.95%, 2.85%, 5.39%, 4.92%, 7.76% and 3.41%, respectively, all greater than 0.5% (theoretical clinical maximum blood drug concentration). The expressions of CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 mRNA in human primary hepatocytes increased more than twice times, and the former two increased in a concentration-dependent manner; the activity of CYP1A2 enzyme was 40% higher than that of the positive control. The total clearance rates of theophylline, bupropion, omeprazole and midazolam, which were the probe substrates of CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19 and CYP3A4

收稿日期: 2023-10-11

基金项目: 天津市教委科研计划项目 (2021ZD030)

作者简介: 刘凡琪 (1994—), 女, 博士, 研究方向为中医药防治心脑血管疾病临床与基础。E-mail: 526181159@qq.com

*通信作者: 李自强, 男, 博士, 副研究员, 研究方向为中药药理学。E-mail: lzqpharm@126.com

黄宇虹, 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药临床药理评价。E-mail: hyh101@126.com

enzymes in rats, were significantly increased and systemic exposure decreased at ultra-clinical dose. **Conclusion** Guhong Injection has no significant inhibitory effect on seven CYP450 enzymes at clinical dose, but does not rule out the induction effect on CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19 and CYP3A4 at high dose. It is suggested that clinical trials using sensitive probe substrates should be carried out to further confirm potential drug interactions.

Key words: Guhong Injection; cytochrome P450 enzyme; drug interactions; inhibition of enzymes; induction of enzymes; interaction between Chinese and Western medicines

随着中西医结合的不断深入及中西药联用的日益普遍,因中西药相互作用而引起的安全性风险越来越受到关注。细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 酶是体内参与药物及其他外源性物质代谢的主要酶系。CYP450 酶活性被抑制或诱导是药物代谢性相互作用的主要靶点,尤其是 CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A,其表达和功能的改变可引起药动学乃至药效学的改变^[1]。目前,欧美中等国家及国际人用药品注册技术协调会(ICH)出台的药品相互作用研究技术指南^[2-4],强调了 CYP450 酶在介导药物相互作用中的作用,并提供了研究方法、评价指标等的指导,但是在中医药的适用性尚不强。

谷红注射液由乙酰谷酰胺和红花提取物制成,具有抗血栓形成、改善微循环、抗氧自由基等作用^[5],在临床上常与氯吡格雷、他汀类药物等联用治疗心脑血管疾病^[6-8]。但谷红注射液药物相互作用研究尚不完善,本研究结合中药多成分、多靶点的自身特性,开展谷红注射液人肝微粒体体外酶抑制实验和人原代肝细胞体外酶活和 mRNA 诱导实验,并建立大鼠血浆中 7 种探针底物同时测定的 UPLC-MS/MS 法,以比较“Cocktail”探针底物体内药动学过程的变化,开展体内外关联性研究。旨在为谷红注射液与其他药物临床上安全、有效地联用提供依据,为中药注射剂代谢性相互作用研究提供参考。

1 材料

1.1 药品与试剂

谷红注射液(批号 20210310, 10 mL/支)购自通化谷红制药有限公司;对照品非那西丁(批号 77440, 质量分数 $\geq 99\%$)、槲皮素(批号 Q4951, 质量分数 $\geq 95\%$)、奥美拉唑(批号 O104, 质量分数 $\geq 98\%$)、利福平(批号 R3501, 质量分数 $\geq 97\%$)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH, 批号 SLCK5429, 质量分数 $\geq 97\%$)购自美国 Sigma 公司;安非他酮(批号 100671-201802, 质量分数 $\geq 99\%$)、阿莫地喹

(批号 101217-201401, 质量分数 $\geq 91\%$)、双氯芬酸(批号 100334-201803, 质量分数为 100%)、氢溴酸右美沙芬(批号 100201-201204, 质量分数 $\geq 94\%$)、对乙酰氨基酚(批号 100018-201610, 质量分数 $\geq 99\%$)、噻氯匹定(批号 100542-201002, 质量分数 $\geq 99\%$)、酮康唑(批号 100294-201904, 质量分数 $\geq 99\%$)、苯巴比妥(批号 171222-201206, 质量分数 $\geq 99\%$)、咪达唑仑(批号 171265-201402, 质量分数 $\geq 99\%$)、羟基红花黄色素 A(批号 111637201810, 质量分数为 93.10%)、乙酰谷酰胺(批号 100859-202003, 质量分数为 98.40%)购自中国食品药品检定研究院;美芬妥英(批号 21J49-F1, 质量分数 $\geq 98\%$)、6 β -羟基睾酮(批号 21J052-D2, 质量分数为 100%)、 α -萘黄酮(批号 21J136-P1, 质量分数 $\geq 99\%$)、磺胺苯吡唑(批号 21J122-C3, 质量分数 $\geq 99\%$)、奎尼丁(批号 21J118-02, 质量分数 $\geq 98\%$)购自上海甄准生物科技有限公司;睾酮(批号 G1088065, 质量分数 $\geq 98\%$)购自 Dr.Ehrenstorfer 公司;羟基安非他酮(批号 FN11131910, 质量分数为 100%)、去甲右美沙芬(批号 FN04251903, 质量分数为 100%)购自 Cerilliant 公司;N-去乙酰阿莫地喹(批号 2229-086A2, 质量分数 $\geq 98\%$)、4-羟基双氯芬酸(批号 2088-058A7, 质量分数 $\geq 99\%$)购自 TLC 公司;4-羟基美芬妥英(批号 107180, 质量分数 $\geq 98\%$)购自美国 MCE 公司;舍曲林(批号 5PBO-HB, 质量分数 $\geq 99\%$)购自日本 TCI 公司;茶碱(批号 C14045635, 质量分数 $\geq 99\%$)、甲苯磺丁脲(批号 C12652045, 质量分数 $\geq 99\%$)、瑞格列奈(批号 C12448607, 质量分数 $\geq 99\%$)、美托洛尔(批号 C14110839, 质量分数 $\geq 98\%$)购自上海麦克林公司;罗红霉素(批号 294889, 质量分数 $\geq 98\%$)购自 J&K 公司;细胞贴壁培养液(批号 S03316)、细胞培养液(批号 Z99009)购自美国 Bioreclamation IVT 公司;RNA 提取试剂盒(批号 DP430)、cDNA 第一链合成试剂盒(批号 KR116-02)、qRT-PCR 试剂盒(批号 FP206-02)购自天根

生化有限公司；甲醇、乙腈、甲酸购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 体外体系与动物

人肝微粒体 (SDL, 24 mg/mL)、人原代肝细胞 (HVN、QBU 和 MHK) 购自美国 Bioreclamation IVT 公司。

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 200~250 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 合格证号 SCXK (京) 2019-0008。动物实验经中国医学科学院放射医学研究所实验动物伦理委员会审核并批准 (批准号 No.IRM-DWLL-2022209)。

1.3 仪器

超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); AB GHRAP 5500 型质谱仪 (美国 AB Sciex 公司); Rotor-Gene Q 型荧光定量 PCR 仪 (德国 QIAGEN 公司);

5430R 型高速离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 谷红注射液对人肝微粒体 7 种 CYP450 酶的体外抑制研究

2.1.1 人肝微粒体体外抑制实验 肝微粒体孵育体系包括人肝微粒体 (0.5 mg/mL)、NADPH (1 mmol/L)、体外探针底物 (表 1) 混合液、谷红注射液或阳性抑制剂、磷酸盐缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.4)。不同体积分数 (0.05%、0.1%、0.25%、0.5%、1%、2.5%、5%、10%) 的谷红注射液或阳性抑制剂 (表 1) 与人肝微粒体预孵育 15 min 后, 加入探针底物和 NADPH, 37 °C 孵育 30 min。每组样品 3 个平行, 孵育体系有机溶剂占比 < 1%。冰甲醇 (含氧氟沙星 20 ng/mL) 终止反应, 涡旋 3 min, 13 500 r/min 离心 10 min, 取上清液待测。

表 1 实验所用探针底物、抑制剂、诱导剂

Table 1 Probe substrates, inhibitors and inducers used in this study

CYP 酶	体外探针底物		体外阳性抑制剂		体外阳性诱导剂		体内探针底物	
	名称	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	名称	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	名称	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	名称	给药量/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
CYP1A2	非那西丁	30	α -萘黄酮	2	奥美拉唑	50	茶碱	8
CYP2B6	安非他酮	50	舍曲林	10	苯巴比妥	1 000	安非他酮	2
CYP2C8	阿莫地喹	5	槲皮素	20	—	—	瑞格列奈	1
CYP2C9	双氯芬酸	25	磺胺苯吡唑	10	—	—	甲苯磺丁脲	1
CYP2C19	美芬妥英	50	噻氯匹定	10	—	—	奥美拉唑	10
CYP2D6	右美沙芬	8	奎尼丁	10	—	—	美托洛尔	10
CYP3A4	睾酮	25	酮康唑	10	利福平	25	咪达唑仑	8

2.1.2 探针底物的代谢产物含量测定 采用 UPLC-MS/MS 方法测定上述 7 种探针底物的代谢产物生成量^[9]。

(1) 色谱条件: Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-0.1% 甲酸乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~3 min, 90%~10% A; 3~4 min, 10% A; 4~4.2 min, 10%~90% A; 4.2~8.0 min, 90% A; 柱温 30 °C; 进样量 2.000 μL 。

(2) 质谱条件: ESI⁺ 模式, 质谱多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 扫描; 气帘气 275.8 kPa; 碰撞气 48.265 kPa; 喷雾电压 5 500 V; 加热器温度 450 °C; 离子源雾化压力 344.75 kPa; 离子源加热辅助气压力 344.75 kPa; 入口电压 10 V; 碰撞出口电压 13 V; 驻留时间 50 ms; 其他 MRM 参数见表 2。

2.1.3 数据处理 谷红注射液临床静脉滴注常用剂

表 2 体外探针底物代谢产物的 MRM 参数

Table 2 MRM parameters for metabolites of *in vitro* probe substrates

代谢产物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	去簇电压/V	碰撞能/V
对乙酰氨基酚	152.1	110.2	80	22
羟基安非他酮	256.2	238.2	30	10
N-去乙基阿莫地喹	328.1	283.1	20	22
4-羟基双氯芬酸	312.1	231.2	31	24
4-羟基美芬妥英	235.2	150.3	30	25
去甲右美沙芬	258.2	157.1	30	50
6 β -羟基睾酮	305.2	269.3	18	19
氧氟沙星 (内标)	362.2	318.1	50	27

量为 10~20 mL/d, 一般正常成人循环血液总量有 4~5 L, 可得到临床剂量时的理论最大血药浓度为 0.5%。本研究以体积分数作为体外孵育体系的给药剂量及其半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC₅₀) 的计算^[9]。采用 GraphPad 8 软件进行非线性拟合并计算 IC₅₀ 值。

2.2 谷红注射液对人原代肝细胞 CYP450 酶的体外诱导研究

2.2.1 人原代肝细胞的体外诱导实验 人原代肝细胞复苏后,用贴壁培养液稀释成 7×10^5 个/mL,按照每孔 100 μ L 铺在预铺 I 型胶原的 96 孔板中,于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下孵育过夜,贴壁形成单层细胞,然后更换成肝细胞培养液继续培养。第 2 天加入含不同体积分数(0.005%、0.05%、0.10%、0.50%、1.00%、5.00%)的谷红注射液或阳性诱导剂(表 1)或阴性对照药(罗红霉素 10 μ mol/L)培养

液,以空白培养液为空白对照,连续给药 2 d,取培养液检测酶活性,收集细胞检测酶 mRNA 表达。采用 3 个供体,每个供体平行 3 份。

2.2.2 qRT-PCR 法测定 CYP 酶 mRNA 表达 用 RNA 提取试剂盒提取细胞内总 RNA,经 DNase I 柱消化后,用 Fast Quant cDNA 第一链合成试剂盒从总 RNA 反转录合成 cDNA。取 2~4 μ L cDNA 作为模板,利用 Super Real Pre Mix 试剂盒进行 qRT-PCR。引物和探针序列见表 3。

2.2.3 UPLC-MS/MS 法测定 CYP 酶活性 采用

表 3 CYP450 亚酶的引物和探针序列

Table 3 Primers and probe sequences of CYP450 subenzymes

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	ATGGCATTGCTCGGTC	ATGCTCAAATACCCTCATGTTGCAGAGAGAGT
CYP3A4	TGCAGGAGGAAATTGATGCA	GTCAAGATACTCCATCTGTAGCA	TTTACCCAATAAGGCACCAACCCACCTATG
β -actin	CCTGGCACCCAGCACAAT	GCCGATCCACACGGAGTACT	TCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC

UPLC-MS/MS 方法测定上述 3 种探针底物的代谢产物生成量^[10]。

(1) 色谱条件: Phenomenex Synergi Hydro RP 色谱柱(30 mm×2.1 mm, 4 μ m);流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈(B),梯度洗脱: 0~1.5 min, 95%~5%A; 1.5~1.7 min, 5%A; 1.7~1.71 min, 5%~95%A; 1.71~2.0 min, 95%A;柱温 45 $^{\circ}$ C;进样量 5.0 μ L。

(2) 质谱条件: ESI⁺模式,MRM 扫描;气帘气 137.9 kPa;碰撞气 68.95 kPa;喷雾电压 5 500 V;加热器温度 500 $^{\circ}$ C;离子源雾化压力 344.75 kPa;离子源加热辅助气压力 344.75 kPa;入口电压 10 V;驻留时间 30 ms;其他 MRM 参数见表 4。

2.2.4 数据处理

(1) 酶活性诱导评价:当相对阳性对照活性 $\geq$ 40%时,实验药对酶活性具有潜在的诱导作用^[2-3]。

表 4 体外探针底物代谢产物的 MRM 参数

Table 4 MRM parameters of metabolites of *in vitro* probe substrate

代谢产物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	去簇电压/V	碰撞能/V	碰撞出口电压/V
对乙酰氨基酚	152.1	110.1	48	22	6
羟基安非他酮	256.2	167.2	30	30	9
6 β -羟基睾酮	305.4	269.3	65	26	15
甲苯磺丁脲 (内标)	271.1	155.0	57	26	15

相对阳性对照活性=(实验组样本相对活性-阴性对照组样本相对活性)/(阳性对照组样本相对活性-阴性对照组样本相对活性)

(2) mRNA 表达诱导评价:当 mRNA 表达的诱导倍数 $\geq$ 空白组 2 倍且呈浓度相关性增加,具有潜在的诱导作用^[2-3]。

Δ Ct=目的基因的 Ct-内参 β -actin 的 Ct

$\Delta\Delta$ Ct=实验组或阳性对照组的 Δ Ct-阴性对照组的 Δ Ct
诱导倍数= $2^{-\Delta\Delta$ Ct}

2.3 谷红注射液对大鼠 CYP450 酶的体内影响研究

2.3.1 体内实验 24 只 SD 大鼠随机分为对照组和谷红注射液低、高剂量组,每组 8 只。谷红注射液低、高剂量组分别尾 iv 谷红注射液 0.9、3.6 mL/kg,对照组给予生理盐水,1 次/d,连续 10 d。第 10 天给药 30 min 后,给予体内混合探针药物(表 1)溶液。给予探针前(0 min),后 5、10、20、30、45 min 和 1、2、4、6、9、12、24 h,于眼内眦取血 0.25 mL,置于肝素钠离心管,3 000 r/min 离心 10 min,得到血浆。取血浆 95 μ L,加内标工作液 5 μ L、甲醇 300 μ L,涡旋 3 min,13 000 r/min 离心 10 min,取上清液稀释 5 倍,待测。

2.3.2 血浆中 7 种探针底物含量测定的 UPLC-MS/MS 法 UPLC-MS/MS 法同时测定 7 种体内探针底物在血浆中的含量。

(1) 色谱条件: Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) -0.1% 甲酸乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~0.5 min, 90% A; 0.5~2.5 min, 90%~10% A; 2.5~4.1 min, 10%~90% A; 4.1~6.0 min, 90% A; 柱温 30 °C; 进样量 2.0 μL。

(2) 质谱条件: ESI⁺模式, MRM 扫描; 气帘气 275.8 kPa; 碰撞气 48.265 kPa; 喷雾电压 5 500 V; 加热器温度 450 °C; 离子源雾化压力 344.75 kPa; 离子源加热辅助气压力 344.75 kPa; 入口电压 10 V; 碰撞出口电压 13 V; 驻留时间 50 ms; 其他 MRM 参数见表 5。

表 5 体内探针底物的 MRM 参数

Table 5 MRM parameters of *in vivo* probe substrates

体内探针底物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	去簇电压/V	碰撞能/V
茶碱	181.0	124.0	33	27
安非他酮	240.1	184.0	35	18
瑞格列奈	453.0	230.2	44	32
甲苯磺丁脲	155.0	100.0	23	24
奥美拉唑	346.2	198.0	29	14
美托洛尔	268.1	116.1	73	23
咪达唑仑	326.1	291.2	20	36
苯妥英钠 (内标)	253.2	182.2	153	32

2.3.3 方法学验证 参照生物样品定量分析方法验证指导原则, 对该方法的选择性、标准曲线范围、精密度、准确度、提取回收率、基质效应、稳定性等进行验证。探针药物茶碱、安非他酮、瑞格列奈、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、美托洛尔和咪达唑仑的标准曲线范围分别为 10~10 000、1~500、1~1 000、10~10 000、1~1 000、1~500、1~500 ng/mL, 最小二乘法线性回归, 权重因子 $1/\chi^2$ 。安非他酮、美托洛尔和咪达唑仑的低、中、高质控质量浓度分别为 2、25、250 ng/mL; 瑞格列奈和奥美拉唑的低、中、高质控质量浓度分别为 2、75、750 ng/mL; 茶碱和甲苯磺丁脲的低、中、高质控质量浓度分别为 20、750、7 500 ng/mL, 各质控质量浓度分别考察精密度、准确度、提取回收率、基质效应 ($n=6$)。考察分析物在基质中常温保存 24 h、-80 °C 保存 14 d、冻融 3 次稳定性 ($n=3$)。

2.3.4 数据处理 采用 Phoenix WinNonlin 8.1 软件的非房室模型法计算各探针底物的药动学参数, 主要包括最大血药浓度 ($C_{\max}$)、0 到最后 1 个采血点的药时曲线下面积 ($AUC_{0\sim t}$)、0 到∞ 的药时曲线下

面积 ($AUC_{0\sim\infty}$)、清除率 (CL) 等。

2.4 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 采用 GraphPad Prism 8.4.3 软件绘图。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 药动学参数差异采用独立样本 *t* 检验 (方差齐) 或采用 *t'* 检验 (方差不齐)。

3 结果

3.1 方法学验证

3.1.1 专属性 空白血浆、加内标空白血浆及血浆样本的总离子流图见图 1, 血浆中茶碱、安非他酮、瑞格列奈、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、美托洛尔、咪达唑仑和苯妥英钠保留时间分别为 1.80、2.39、2.88、2.99、2.28、2.24、2.49、2.75 min, 无杂峰干扰, 专属性良好。

3.1.2 标准曲线与定量限 探针药物在 1~500、1~1 000、10~10 000 ng/mL 内线性关系良好, 回归方程和定量限见表 6。

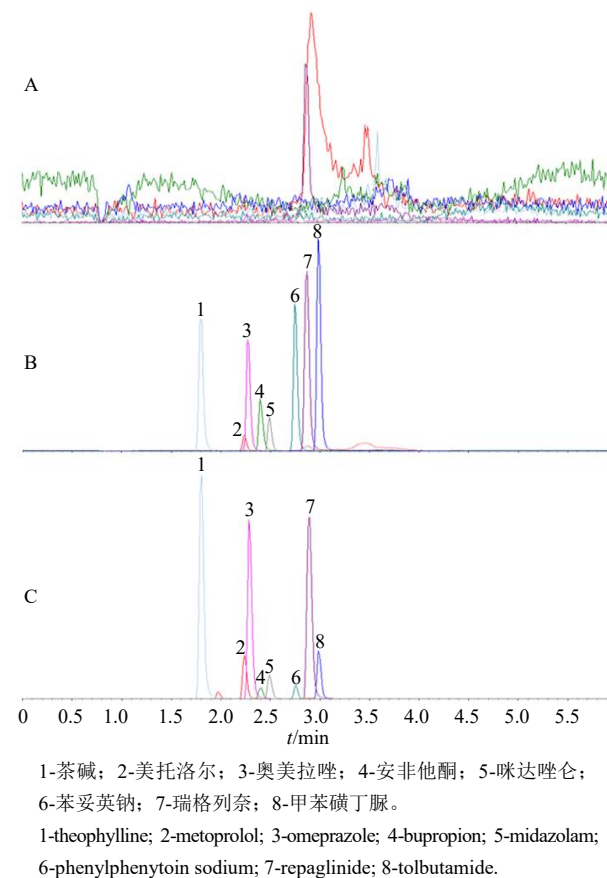


图 1 空白血浆 (A)、加内标空白血浆 (B) 和给药后血浆样本 (C) 的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of blank plasma (A), blank plasma with internal standard (B) and post administration plasma sample (C)

表 6 标准曲线、线性范围和定量限

Table 6 Standard curve, linear range and limit of quantification

药物	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	定量限/(ng·mL ⁻¹)
茶碱	<i>Y</i> =0.001 65 <i>X</i> +0.002 34	0.996 1	10~10 000	10
安非他酮	<i>Y</i> =0.012 5 <i>X</i> +0.006 53	0.994 7	1~500	1
瑞格列奈	<i>Y</i> =0.023 3 <i>X</i> +0.154	0.996 9	1~1 000	1
甲苯磺丁脲	<i>Y</i> =0.001 9 <i>X</i> +0.005 88	0.997 3	10~10 000	10
奥美拉唑	<i>Y</i> =0.012 1 <i>X</i> +0.002 92	0.996 1	1~1 000	1
美托洛尔	<i>Y</i> =0.003 34 <i>X</i> +0.073 1	0.995 8	1~500	1
咪达唑仑	<i>Y</i> =0.008 19 <i>X</i> +0.013 3	0.995 5	1~500	1

3.1.3 精密度和准确度 各探针底物精密度和准确度良好，结果见表 7。

3.1.4 提取回收率 各探针药物的提取回收率 RSD 均<15%，提取回收率合格，结果见表 7。

3.1.5 基质效应 各药物浓度的内标归一化基质效应因子的 RSD 均<15%，说明基质效应符合要求，结果见表 7。

3.1.6 稳定性考察 各探针药物在各种处理后质量浓度的 RSD 均<10.0%，表明样品在常温下存放 24 h、-80 ℃条件下存放 14 d 以及冻融 3 次后稳定，结果见表 8。

3.2 谷红注射液的体外抑制作用

体外阳性抑制剂处理后的各 CYP 亚型剩余酶活性均低于 50%，探针底物代谢受到明显抑制，孵

育体系合格。不同体积分数（0.05%~10%）的谷红注射液处理后，CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A4 酶的 IC₅₀ 值分别为 1.98%、7.95%、2.85%、5.39%、4.92%、7.76%和 3.41%，各 CYP450 酶亚型的相对活性均出现不同程度的降低（图 2），但是均大于临床剂量时的理论最大血药浓度值 0.5%。

3.3 谷红注射液的体外诱导作用

供体 HVN、QBU、MHK 的人原代肝细胞与阳性诱导剂共孵育后，其酶相对活性（实验组酶活性/空白对照组酶活性）为 235.5%~4 480%，均高于 200%，提示实验体系合格。如表 9 所示，在 3 个供体中，谷红注射液在 0.005%~5%对 CYP2B6、CYP3A4 酶的相对阳性对照活性均低于 40%。而在供体 MHK，谷红注

表 7 各探针药物的精密度、准确度、提取回收率和基质效应

Table 7 Precision, accuracy, extraction recovery rate and matrix effect of each probe drug

探针药物	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	精密度 RSD/%		准确度/%		提取回收率/%	基质效应因子 RSD/%
		日内	日间	日内	日间		
茶碱	20	5.77	2.53	95.68	97.34	102.86	6.57
	750	6.49	1.12	98.63	99.89	106.03	4.41
	7 500	5.36	2.04	95.47	93.80	102.02	8.10
安非他酮	2	7.19	8.85	109.83	100.82	101.58	9.34
	25	9.86	0.73	104.43	104.76	106.28	6.06
	250	4.52	1.74	105.78	107.13	104.90	7.74
瑞格列奈	2	9.43	4.82	95.55	98.01	89.65	11.43
	75	5.82	4.00	93.00	96.62	94.58	3.45
	750	3.45	4.18	92.13	95.55	95.55	4.95
甲苯磺丁脲	20	10.30	2.93	93.88	97.07	103.68	4.57
	750	6.08	1.14	98.43	99.68	106.87	5.70
	7 500	3.19	2.23	91.60	93.98	105.67	3.88
奥美拉唑	2	6.92	5.25	102.07	96.61	93.59	4.58
	75	7.14	1.36	91.42	92.82	90.49	4.67
	750	3.94	3.00	91.57	93.68	92.68	4.35
美托洛尔	2	10.59	5.73	99.60	98.46	96.65	7.57
	25	11.01	4.99	96.87	97.04	105.82	5.65
	250	4.97	2.43	97.23	98.90	105.33	5.39
咪达唑仑	2	8.99	1.48	95.80	94.99	99.77	12.05
	25	7.11	5.79	99.78	97.49	105.49	6.92
	250	3.16	6.54	99.67	100.00	104.93	5.19

表 8 各探针药物的稳定性

Table 8 Stability of each probe drug

探针药物	理论质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	常温 24 h		-80 °C 14 d		冻融 3 次	
		实测值/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%	实测值/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%	实测值/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%
茶碱	20	19.20	0.52	19.50	7.45	18.17	3.67
	750	802.67	3.86	815.33	2.90	676.00	3.44
	7 500	7 436.67	11.34	7 166.67	7.80	6 976.67	3.70
安非他酮	2	2.13	1.95	2.18	11.21	2.04	2.99
	25	27.43	7.19	27.57	4.62	23.17	3.77
	250	280.33	7.01	263.67	7.53	240.33	1.92
瑞格列奈	2	2.07	9.23	2.19	5.02	2.16	6.02
	75	75.90	4.11	77.70	3.90	63.63	6.23
	750	720.00	5.36	718.00	6.31	674.67	2.83
甲苯磺丁脲	20	19.20	0.52	19.50	7.45	18.17	3.67
	750	704.33	3.76	802.67	3.86	676.00	3.44
	7 500	7 436.67	11.34	7 166.67	7.80	6 976.67	3.70
奥美拉唑	2	1.98	8.72	1.99	4.50	1.89	5.34
	75	76.90	2.06	78.37	3.56	65.97	3.99
	750	764.33	12.26	751.67	3.89	694.00	5.56
美托洛尔	2	2.20	4.22	1.86	2.18	1.96	7.80
	25	27.30	5.76	26.80	2.08	21.63	2.63
	250	252.33	11.92	260.67	3.44	233.33	5.43
咪达唑仑	2	1.75	3.26	1.88	4.44	1.92	6.81
	25	25.67	3.24	26.67	5.11	20.77	3.68
	250	242.00	14.67	269.67	5.75	235.00	1.53

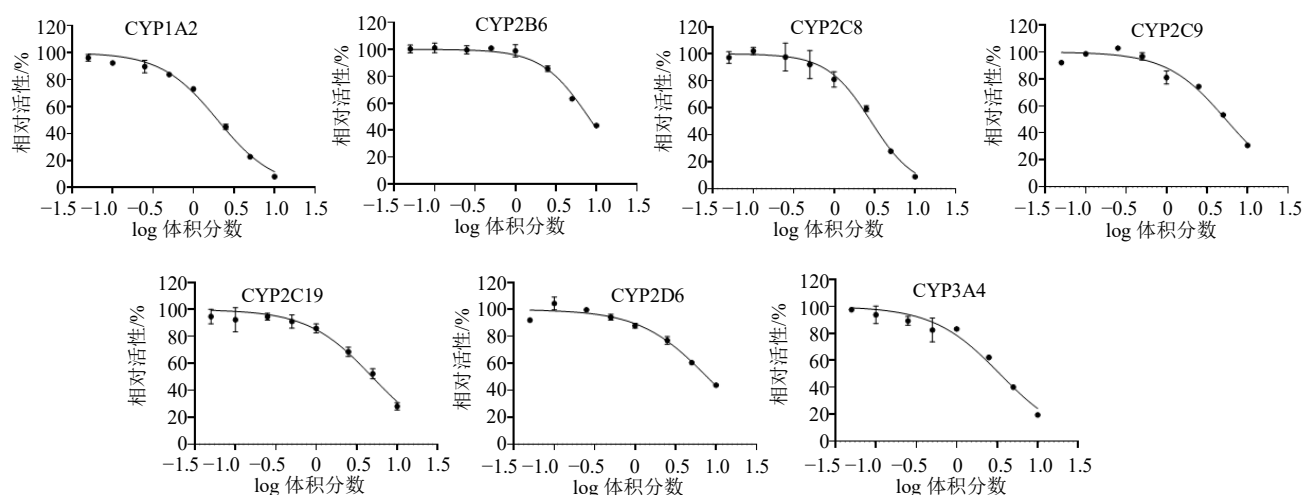


图 2 谷红注射液对人肝微粒体 CYP450 酶 7 个亚型的抑制曲线 ($n = 3$)

Fig. 2 Inhibition curve of Guhong Injection on seven subtypes of human liver microsomal CYP450 enzyme ($n = 3$)

表 9 谷红注射液对人原代肝细胞 CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Effect of Guhong Injection on activity of CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 enzymes in human primary hepatocytes

($\bar{x} \pm s, n = 3$)

体积分数/%	CYP1A2 相对阳性对照活性/%			CYP2B6 相对阳性对照活性/%			CYP3A4 相对阳性对照活性/%		
	HVN	QBU	MHK	HVN	QBU	MHK	HVN	QBU	MHK
5.000	4.84 ± 4.06	8.24 ± 9.59	72.79 ± 11.34	8.34 ± 3.77	19.64 ± 3.06	8.09 ± 0.93	<0	<0	<0
1.000	<0	2.87 ± 9.45	64.59 ± 18.22	0.89 ± 0.27	3.76 ± 1.91	4.56 ± 0.38	<0	<0	<0
0.500	4.58 ± 3.52	2.14 ± 2.27	44.75 ± 13.00	<0	1.75 ± 0.59	5.63 ± 1.94	<0	<0	<0
0.100	<0	<0	8.69 ± 6.94	<0	<0	0.15 ± 2.18	<0	<0	<0
0.050	<0	<0	5.33 ± 5.17	<0	<0	<0	<0	<0	<0
0.005	<0	<0	<0	<0	<0	<0	<0	<0	<0

HVN、QBU、MHK 为 3 个供体的人原代肝细胞。

HVN, QBU and MHK are three donors of human primary hepatocytes.

注射液在 0.5%~5%对 CYP1A2 酶相对阳性对照活性高于 40%,推测对 CYP1A2 酶活性具有一定的诱导作用。

阳性对照组对 3 个批次的人原代肝细胞的 *CYP1A2*、*CYP2B6* 和 *CYP3A4* 诱导倍数均高于空白对照的 2 倍,而阴性对照组均低于空白对照的 2 倍,

表明孵育体系合格(图 3)。谷红注射液(0.05%~10%)使 *CYP1A2*、*CYP2B6*、*CYP3A4* 酶 mRNA 表达倍数分别增加最高达 18.74、7.74、5.96 倍,且呈浓度相关性,说明谷红注射液对 *CYP1A2*、*CYP2B6*、*CYP3A4* 的 mRNA 表达具有潜在的诱导作用。

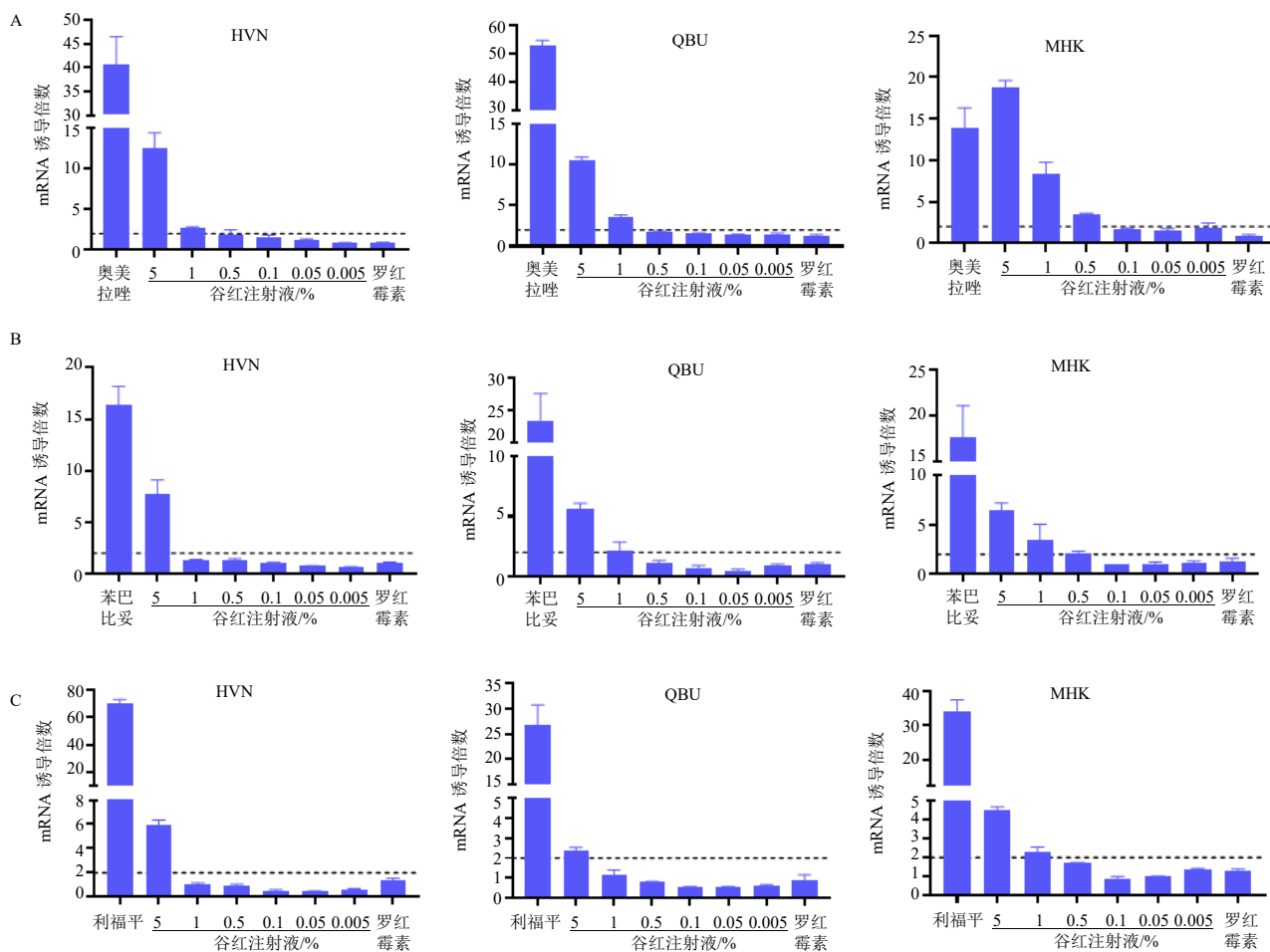


图 3 谷红注射液对人原代肝细胞 *CYP1A2* (A)、*CYP2B6* (B)、*CYP3A4* (C) 的 mRNA 诱导倍数 ($n = 3$)

Fig. 3 mRNA induction multiple of Guhong Injection on *CYP1A2* (A), *CYP2B6* (B) and *CYP3A4* (C) in human primary hepatocytes ($n = 3$)

3.4 谷红注射液对大鼠体内 CYP450 酶的影响

茶碱、安非他酮、瑞格列奈、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、美托洛尔、咪达唑仑的药时曲线见图 4,药动学参数见表 10。与对照组比较,谷红注射液高剂量组中茶碱的 $AUC_{0 \sim t}$ 和 $AUC_{0 \sim \infty}$ 降低 19.67%、20.33%,安非他酮的 $AUC_{0 \sim \infty}$ 降低 40.41%,咪达唑仑的 $AUC_{0 \sim t}$ 和 $AUC_{0 \sim \infty}$ 降低 57.88%、57.43%,具有统计学意义 ($P < 0.05$)。谷红注射液低剂量组中奥美拉唑的 $AUC_{0 \sim t}$ 和 $AUC_{0 \sim \infty}$ 降低 43.14%、41.69%,高剂量组 $AUC_{0 \sim t}$ 和 $AUC_{0 \sim \infty}$ 降低 49.53%、49.60%,具有统计学意义 ($P < 0.05$)。瑞格列奈、甲苯磺丁

脲和美托洛尔的药动学参数无明显变化。谷红注射液使大鼠体内 *CYP1A2*、*CYP2B6*、*CYP2C19* 和 *CYP3A4* 酶活性被明显增加,而 *CYP2C8*、*CYP2C9* 和 *CYP2D6* 的酶活性无明显变化。

4 讨论

本研究中体外抑制实验底物和抑制剂的选择参考 FDA 体外药物相互作用指导原则^[2],抑制剂的浓度经过预实验确定,还比较了 7 个亚型酶抑制剂一起加入以及分成 α -萘黄酮、磺胺苯吡唑、噻氯匹定、奎尼丁、酮康唑和舍曲林、槲皮素 2 组分别加入,结果发现 7 个抑制剂混合加入后,每种亚型酶活性

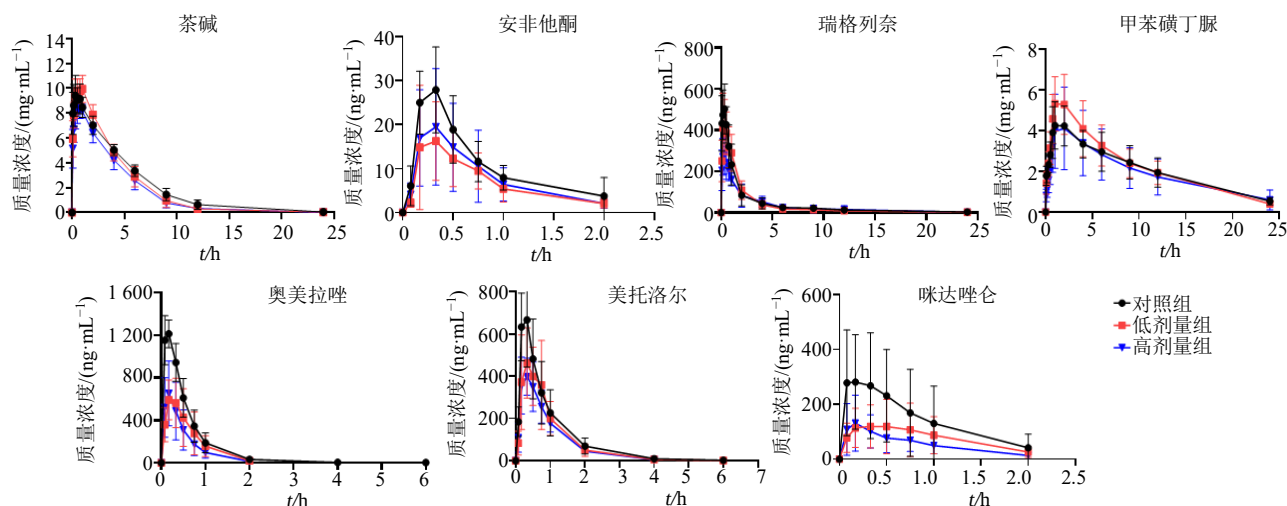


图 4 各探针药物血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 4 Blood drug concentration-time curve of each probe drug ($\bar{x} \pm s, n=8$)

表 10 各探针药物主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 10 Main pharmacokinetic parameters of each probe drug ($\bar{x} \pm s, n=8$)

探针药物	组别	$t_{1/2}/h$	$C_{max}/(ng \cdot mL^{-1})$	$AUC_{0-2}/(ng \cdot h \cdot mL^{-1})$	$AUC_{0-\infty}/(ng \cdot h \cdot mL^{-1})$	$CL/(L \cdot h \cdot kg^{-1})$	V_d/mL
茶碱	对照	2.51 ± 0.61	$9\ 771.25 \pm 1\ 422.20$	$50\ 230.84 \pm 6\ 686.36$	$51\ 021.88 \pm 6\ 479.90$	47.74 ± 5.59	169.99 ± 38.22
	低剂量	2.34 ± 0.67	$10\ 520.00 \pm 919.90$	$47\ 286.51 \pm 6\ 233.28$	$47\ 492.46 \pm 6\ 153.11$	51.46 ± 7.18	174.70 ± 63.19
	高剂量	2.39 ± 0.52	$8\ 707.50 \pm 577.27$	$40\ 351.04 \pm 6\ 345.27^*$	$40\ 647.46 \pm 6\ 115.31^*$	$60.30 \pm 8.39^*$	207.38 ± 55.88
安非他酮	对照	0.63 ± 0.17	28.33 ± 8.85	20.73 ± 5.56	23.41 ± 6.68	$28\ 263.34 \pm 9\ 484.12$	$25\ 904.78 \pm 11\ 552.59$
	低剂量	0.61 ± 0.17	17.01 ± 7.94	13.75 ± 7.08	17.01 ± 7.98	$44\ 674.97 \pm 21\ 679.74$	$35\ 096.24 \pm 10\ 271.93$
	高剂量	0.49 ± 0.06	18.94 ± 9.35	14.80 ± 8.23	$13.95 \pm 6.00^*$	$51\ 059.67 \pm 19\ 938.07^*$	$35\ 320.46 \pm 11\ 155.52$
瑞格列奈	对照	5.16 ± 1.83	532.75 ± 111.01	942.01 ± 234.99	970.62 ± 232.35	328.28 ± 83.20	$2\ 409.88 \pm 985.36$
	低剂量	5.97 ± 2.82	461.50 ± 131.93	883.99 ± 205.74	904.26 ± 209.78	354.02 ± 97.79	$3\ 142.47 \pm 2\ 075.29$
	高剂量	3.82 ± 1.06	300.63 ± 76.78	716.52 ± 288.82	731.57 ± 288.08	483.28 ± 202.59	$2\ 755.19 \pm 1\ 777.02$
甲苯磺丁脲	对照	6.97 ± 0.85	$4\ 573.75 \pm 1\ 039.94$	$50\ 220.00 \pm 11\ 799.71$	$55\ 774.96 \pm 12\ 906.34$	5.76 ± 1.71	57.65 ± 16.05
	低剂量	5.81 ± 0.93	$5\ 653.75 \pm 1\ 438.97$	$54\ 319.41 \pm 13\ 712.80$	$57\ 780.27 \pm 14\ 394.44$	5.65 ± 1.95	48.50 ± 22.49
	高剂量	7.62 ± 2.07	$4\ 238.75 \pm 1\ 890.96$	$47\ 343.86 \pm 20\ 640.72$	$55\ 197.78 \pm 27\ 612.37$	6.91 ± 3.26	71.38 ± 35.22
奥美拉唑	对照	3.09 ± 3.17	$1\ 266.25 \pm 150.58$	809.94 ± 182.09	820.22 ± 186.53	$3\ 882.12 \pm 997.51$	$18\ 423.61 \pm 20\ 106.08$
	低剂量	0.40 ± 0.27	$632.25 \pm 206.79^*$	$460.55 \pm 202.96^*$	$478.27 \pm 200.55^*$	$7\ 681.77 \pm 3\ 839.27^*$	$4\ 394.56 \pm 3\ 048.41$
	高剂量	1.47 ± 1.51	$654.75 \pm 286.24^*$	$408.77 \pm 199.51^*$	$413.35 \pm 203.72^*$	$9\ 578.44 \pm 6\ 105.20^*$	$16\ 381.41 \pm 13\ 544.52$
美托洛尔	对照	0.87 ± 0.30	698.63 ± 195.29	689.64 ± 302.94	696.72 ± 304.40	$5\ 032.49 \pm 1\ 804.60$	$6\ 148.77 \pm 2\ 388.02$
	低剂量	0.62 ± 0.13	482.00 ± 162.05	497.88 ± 198.08	501.47 ± 196.97	$6\ 876.67 \pm 2\ 452.76$	$6\ 045.28 \pm 2\ 385.21$
	高剂量	0.62 ± 0.06	444.00 ± 92.82	434.25 ± 86.62	443.94 ± 96.37	$7\ 053.46 \pm 1\ 375.27$	$6\ 288.09 \pm 1\ 384.48$
咪达唑仑	对照	1.30 ± 0.73	264.31 ± 125.20	261.79 ± 153.76	267.56 ± 153.40	$13\ 291.24 \pm 8\ 138.37$	$19\ 019.76 \pm 6\ 084.75$
	低剂量	0.78 ± 0.21	149.91 ± 86.98	196.23 ± 131.30	233.55 ± 124.49	$14\ 087.75 \pm 8\ 059.33$	$16\ 765.89 \pm 11\ 093.63$
	高剂量	0.74 ± 0.20	$103.33 \pm 29.76^*$	$110.27 \pm 45.89^*$	$113.90 \pm 45.64^*$	$24\ 385.51 \pm 8\ 926.78^*$	$26\ 602.93 \pm 11\ 943.42$

与对照组比较: * $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group.

可被明显抑制。谷红注射液对人肝微粒体 7 种亚酶 IC_{50} 值均大于其在人体内最大血药浓度 (0.5%), 推测其在临床剂量范围内, 与上述酶底物联用时发生药物相互作用的可能性较小。

诱导实验以代谢酶的 mRNA 表达水平作为代谢酶诱导的评价终点, 与评价酶活性相比更加敏感, 可以降低 CYP450 酶诱导假阴性的概率。原代肝细

胞被广泛用于预测 CYP450 药物诱导的潜在作用, 并已被 FDA 批准为该领域的有效工具^[11]。本研究发现谷红注射液可使人原代肝细胞 CYP1A2、CYP2B6 和 CYP3A4 的 mRNA 水平均提高超过 2 倍且呈浓度相关性增加, 表明其对入原代肝细胞 3 种主要亚酶有潜在的诱导作用, 与 CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 酶底物联用时可能会降低其疗效。

体内 Cocktail 探针药物法将个体间差异、个体内随时间变化的生理影响和成本降低,可用于药物对不同 CYP450 亚型活性的研究^[12]。谷红注射液以临床等效剂量连续给药后,大鼠体内 CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19 和 CYP3A4 的酶活性被明显诱导,与体外诱导实验结果一致。在脑血管疾病常见药中,他汀类药物如阿托伐他汀、辛伐他汀,抗凝药物华法林,抗血小板药物氯吡格雷,均为 CYP3A4 的底物。建议临床上尽量避免谷红注射液与上述药物的联用,尤其 CYP3A4 底物,可能会诱导其代谢加快从而降低疗效的风险。

综上,本研究评估了谷红注射液体外对人源 CYP450 酶抑制和诱导作用,结果显示谷红注射液可诱导 CYP1A2、CYP2B6 和 CYP3A4 酶的 mRNA 表达。体内评估了对大鼠 CYP450 酶的影响,提示体内与体外结果一致。谷红注射液对 CYP450 酶诱导可能产生的代谢性相互作用及其临床意义,需要进一步通过临床试验证实。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突
参考文献

- [1] Zanger U M, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation [J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 138(1): 103-141.
- [2] FDA. *In vitro* drug interaction studies—Cytochrome P450 enzyme-and transporter-mediated drug interactions guidance for industry [S]. 2020: 1-43.
- [3] NMPA. 药物相互作用研究技术指导原则 (试行) [S]. 2021: 1-62.
- [4] ICH. Drug interaction studies M12 [S]. 2022: 1-69.
- [5] 周宏稷, 安毅. 谷红注射液治疗急性脑梗死的临床疗效及对血液流变学影响的 Meta 分析 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(19): 3171-3177.
- [6] Zhang W W, Xin J, Zhang G Y, *et al*. Efficacy of Guhong Injection versus Butylphthalide and Sodium Chloride Injection for mild ischemic stroke: A multicenter controlled study [J]. *World J Clin Cases*, 2022, 10(21): 7265-7274.
- [7] 宋杨. 降纤酶与谷红注射液联合对急性脑梗死患者神经功能及血液流变学的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(10): 140-142.
- [8] 姜川, 方旭, 冯建利, 等. 谷红注射液联合丹参多酚酸盐治疗急性脑梗死的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(7): 1322-1326.
- [9] 强婷婷, 李益萍, 王肖龙. 生脉注射液体外对 CYP450 酶与转运体抑制作用的研究 [J]. 中草药, 2021, 52(12): 3568-3575.
- [10] 王卓, 王湛博, 程亚楠, 等. 五味子乙素对 CYP450 药物代谢酶诱导作用的体外研究 [J]. 药学研究, 2017, 36(10): 559-564.
- [11] Dvorak Z. Opportunities and challenges in using human hepatocytes in cytochromes P450 induction assays [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2016, 12(2): 169-174.
- [12] 宋菲, 杨健, 王春, 等. Cocktail 探针药物法评价羊耳菊对大鼠 CYP450 酶活性的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(2): 60-67.

[责任编辑 李亚楠]