

灯盏生脉胶囊有效组分对大鼠细胞色素 P450 酶同工酶作用的体外研究*

黎奔¹, 陈俊平¹, 钟玲¹, 段晓红¹, 郭建文², 蔡业峰²

广东省中医院¹ 药剂科, ² 神经一科(广州 510120)

【摘要】 目的 探讨灯盏生脉胶囊 6 种有效组分对细胞色素 P450 酶(CYP450 酶) 4 种主要亚型(同工酶)的作用。方法 采用大鼠肝微粒体体外孵育的方法和液质联用(LC/MS/MS)技术,通过体外 cocktail 高通量筛选,选择不同的 CYP450 酶同工酶特异性探针底物与灯盏生脉有效组分共同孵育,比较灯盏生脉有效组分对大鼠肝微粒体中 CYP450 酶同工酶抑制作用。结果 五味子甲素对大鼠肝微粒体 CYP3A1、2C6 及 2C11 有弱抑制作用,五味子酯甲对 CYP3A1 及 2C11 有弱抑制作用,IC₅₀值均在 10~50 μmol/L 之间。结论 本研究初步界定参与灯盏生脉胶囊有效组分代谢的大鼠 CYP450 酶同工酶,及其有效组分对大鼠 CYP450 酶同工酶的抑制作用,为灯盏生脉胶囊与其他药物的联合使用提供科学依据。

【关键词】 灯盏生脉胶囊; 细胞色素 P450 酶; 抑制作用

The interaction between the active components of Dengzhanshengmai Capsule and CYP450 enzymes in rats in vitro. LI Ben^{*}, CHEN Jun-ping, ZHONG Ling, DUAN Xiao-hong, GUO Jian-wen, CAI Ye-feng. ^{*} Department of Pharmacy, the Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China

【Abstract】 Objective To study the interactions between 6 components of Dengzhanshengmai Capsule and 4 isoenzymes of cytochrome P450 (CYP450) *in vitro*. **Methods** CYP450 isoenzymes, which were involved in drug metabolism, were attained from rat hepatic microsomes with liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS/MS). Efficacies on enzyme inhibition of the 6 effective components of Dengzhanshengmai Capsule were assessed. **Results** Mild inhibitory effects on rat liver microsomal CYP3A1, 2C6 and 2C11 were found in Schizandrin A. Meanwhile, mild inhibitory effects on rat liver CYP3A1 and 2C11 were found in Schisantherin A, with both IC₅₀ values between 10 and 50 μmol/L. **Conclusion** In the study, primary evaluation of inhibitory efficacy of Dengzhanshengmai Capsule on CYP450 isoenzymes is carried out, providing evidences for further application of Dengzhanshengmai Capsule in treatment.

【Key words】 Dengzhanshengmai Capsule; cytochrome P450 isozyme; inhibition

灯盏生脉胶囊以云南特有的高原植物灯盏细辛为原料,辅以“生脉饮”处方用药——人参、五味子、麦冬,具有益气养阴、活血化瘀之功效;全方可增强心脏对缺血缺氧耐受性,改善微循环,抑制血小板聚集,促进纤溶活性,具有显著的降低血液黏稠度及降脂作用^[1-3],在临床上灯盏生脉胶囊常与抗血小板聚集药、降压降脂等多种药物合用。根据 2010 年版中国药典和相关文献^[4-6],灯盏生脉胶囊质量控制中的有关主要成分为野黄芩苷、咖啡酸、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg1、五味子甲素、五味子乙素、五味子醇甲及五味子酯甲。2008 年 5 月至 2011 年 8 月,本研究通过高通量筛选^[7-8],比较灯盏生脉有效组分在大鼠肝微粒体中的抑制作用,选择不同细胞色素 P450 酶(cytochrome P450, CYP450 酶)同工酶特异性探针底物与灯盏生脉有效组分共同孵育,初步界定参与灯盏生脉胶囊有效组分代谢的 CYP450 酶同工酶,研究灯盏生脉胶囊有效组分对大鼠 CYP450 酶同工酶的抑制作用,以期灯盏生脉胶囊的进一步使用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 非那西丁(PHE)、甲苯磺丁脲(TOL)、奥美拉唑(OME)、硝苯地平(NIF)、扑热息痛(PRA)、4-羟基甲苯磺丁脲(OHTOL)、5-羟基奥美拉唑(OHOME)、氧化硝苯地平(DNIF),以上对照品均购于 Sigma 美国公司;人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg1、五味子甲素、五味子酯甲、野黄芩苷、氯雷他定(以上对照品均购于中国药品生物制品检定所);NADPH;甲醇、乙酸乙酯(色谱纯,美国天地公司);超纯水;甲酸及其他试剂为国产分析纯试剂。Finnigan TSQ QUANTUM 型三重四级杆液相色谱-质谱系统(美国 Thermo 公司);C18 XTerra MS 分析柱(100 mm × 2.1 mm, 5 μm)(美国 Waters 公司)。

1.2 制备大鼠肝微粒体 SPF 级 SD 大鼠 12 只,不分雌雄,体重(200 ± 20) g,由中山大学东校区实验动物中心提供,按照差速离心法制备肝微粒体,Lowry 法测定蛋白浓度, -80℃ 保存备用。大鼠肝微粒体中 4 种 CYP450 酶亚型(同工酶)的活性通过以下探针反应来表示,CYP1A2:以 PHE 氧去甲基化反应来表示;CYP2C6:以 TOL 4-羟基化反应生成 OHTOL 表示;CYP2C11:以 OME 5-羟基化反应生成 OHOME 表示;

* 广东省科技计划项目(编号:2008B060600044),广东省自然科学基金资助项目(编号:S2011010005420)

CYP3A4: 以 NIF 氮去氢反应生成 DNIF 表示。

1.3 色谱质谱条件 色谱条件: 正离子监测 流动相为 甲醇: 水(含 0.1% 甲酸) 为 70: 30, 流速为 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, 柱温为室温; 质谱条件: 离子源为电喷雾电离源 (ESI+); 电喷雾电压为 3 500 V; 加热毛细管温度为 350 $^{\circ}\text{C}$; 鞘气(N_2) 压力位 103.425 kPa, 辅助气(N_2) 压力为 6.895 kPa, 碰撞气(Ar) 压力为 0.133 Pa; 扫描峰宽为 0.7 Th; 扫描方式为选择反应监测, 定量监测的离子对和碰撞能量 见表 1。

表 1 底物代谢物的质谱条件

代谢物与内标	离子对(m/z)	碰撞能量(eV)
PRA	152/110	10
OHTOL	287/171	18
OHOMe	362/241	10
DNIF	345/284	28
氯雷他定	383/266	41

1.4 灯盏生脉胶囊有效组分对大鼠肝微粒体 CYP450 酶同工酶的体外作用 孵育体系总体积为 200 μL , 各浓度有效组分用甲醇溶解 5 μL (包含空白对照), 标准探针混合液 PHE、TOL、OMe、NIF 浓度分别为 10、100、5、5 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 磷酸盐缓冲液(0.1 mmol/L, pH=7.4), 大鼠肝微粒体蛋白为 0.25 mg/mL, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预孵育 5 min, 加 20 μL NADPH (终浓度为 0.1 mmol/L) 启动反应, 孵育 20 min, 加入冰乙酸乙酯 500 μL 终止反应, 加入内标 10 μL , 涡旋振荡 3 min, 静置 10 min, 于 13 000 r/min 中离心 10 min, 吸取上层液于另一 EP 管中, 真空干燥, 用甲醇: 超纯水(70: 30) 200 μL , 涡旋振荡, 于 16 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 100 μL 于进样瓶中, 进样 10 μL , 生成的相应代谢物为 PRA、OH-TOL、OHOMe 及 DNIF。每个样品制作 3 份, 每个浓度设定 3 个浓度(1、10、50 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 以判断其抑制程度。

表 3 灯盏生脉有效组分(50 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 底物代谢物的浓度

灯盏生脉胶囊组分	1A2	2C6	2C11	3A1
空白对照	23.186 \pm 1.816	33.709 \pm 3.124	103.407 \pm 4.522	134.462 \pm 4.194
人参皂苷 Rb1	22.748 \pm 0.572	45.455 \pm 1.859*	85.258 \pm 3.812*	124.013 \pm 7.553
人参皂苷 Re	17.783 \pm 1.568	32.114 \pm 0.228	82.608 \pm 1.970*	113.102 \pm 2.517**
人参皂苷 Rg1	14.835 \pm 1.637*	28.215 \pm 0.028*	66.150 \pm 1.439**	92.726 \pm 3.468**
五味子甲素	22.863 \pm 1.434	10.654 \pm 0.244**	7.931 \pm 0.440**	32.526 \pm 2.348**
五味子酯甲	18.807 \pm 1.647*	26.588 \pm 1.122*	34.766 \pm 2.299**	35.957 \pm 1.449**
野黄芩苷	20.244 \pm 0.983	34.629 \pm 0.565	77.785 \pm 1.782**	106.697 \pm 4.581**

与空白对照比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 4 灯盏生脉有效组分对大鼠肝微粒体 CYP450 酶

灯盏生脉胶囊组分	同工酶抑制作用的 IC ₅₀ 值 $\mu\text{mol}/\text{L}$			
	1A2	2C6	2C11	3A1
人参皂苷 Rb1	>50	>50	>50	>50
人参皂苷 Re	>50	>50	>50	>50
人参皂苷 Rg1	>50	>50	>50	>50
五味子甲素	>50	10 ~ 50	10 ~ 50	10 ~ 50
五味子酯甲	>50	>50	10 ~ 50	10 ~ 50
野黄芩苷	>50	>50	>50	>50

1.5 结果判定 根据中药单体对大鼠肝微粒体的抑制程度分为 3 个临界浓度 4 个等级^[5], 分别为 1、10、50 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 各分为强抑制($\text{IC}_{50} \leq 1 \mu\text{mol}/\text{L}$)、中抑制($1 \mu\text{mol}/\text{L} < \text{IC}_{50} \leq 10 \mu\text{mol}/\text{L}$)、弱抑制($10 \mu\text{mol}/\text{L} < \text{IC}_{50} \leq 50 \mu\text{mol}/\text{L}$) 及无抑制($\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{mol}/\text{L}$), 设定 3 个浓度进行筛选, 判断其对大鼠肝微粒体 CYP450 酶同工酶的抑制程度, 抑制率 = (空白对照底物代谢物浓度 - 各浓度底物代谢物浓度) / 空白对照底物代谢物浓度 $\times 100\%$ 。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 12.0 统计软件对比各浓度对肝微粒体的抑制程度, 并对有抑制作用的有效组分进行 Student's *t* 检验。

2 结果

五味子甲素对大鼠肝微粒体 CYP3A1、2C6、2C11 有弱抑制作用, 五味子酯甲对 CYP3A1、2C11 有弱抑制作用。五味子甲素和五味子酯甲在浓度为 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时对相关 CYP450 酶同工酶抑制率均高于 50% ($P < 0.01$), IC_{50} 值均在 10 ~ 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 之间, 见表 2。灯盏生脉胶囊有效组分对大鼠肝微粒 CYP450 酶的 4 种同工酶均无抑制, 见表 3、4。

表 2 五味子甲素和五味子酯甲对大鼠 CYP450 酶同工酶的抑制率 ($\bar{x} \pm s$) %

灯盏生脉有效组分	2C6	2C11	3A1
五味子甲素			
1 $\mu\text{mol}/\text{L}$	3.7 \pm 2.4	3.7 \pm 1.7	5.0 \pm 3.1
10 $\mu\text{mol}/\text{L}$	24.0 \pm 2.2	18.4 \pm 2.3	26.1 \pm 6.0
50 $\mu\text{mol}/\text{L}$	68.0 \pm 0.7	92.3 \pm 0.4	75.8 \pm 1.7
五味子酯甲			
1 $\mu\text{mol}/\text{L}$	3.3 \pm 1.0	2.5 \pm 1.7	8.2 \pm 4.7
10 $\mu\text{mol}/\text{L}$	12.3 \pm 2.3	16.7 \pm 3.6	27.0 \pm 6.6
50 $\mu\text{mol}/\text{L}$	20.2 \pm 3.4	66.4 \pm 2.2	73.3 \pm 1.1

3 讨论

随着现代中医药的快速发展, 临床上中西药的联合应用也越来越广泛, 而它们之间的相互作用也逐年增加^[9]。中药有效成分中, 绝大多数显著的相互作用都是由中药介导对 CYP450 酶的调节作用引起的, 如当灯盏生脉胶囊与氯吡格雷联用时, 应注意密切监测氯吡格雷的抗凝指标和血药浓度。因此要保证中药应用的安全性, 阐明和证实中药可能对人体内多种 CYP450 酶

的影响显得越来越重要和迫切,只有这样才能有效避免由于 CYP450 酶介导的中西药物的相互作用。

以往有报道^[10-11]发现,人参皂苷类成分中仅人参皂苷 Rd 对 CYP3A4、2C9 和 2C19 有微弱的抑制作用,而其他皂苷类成分只有在高浓度(50 mg/mL)时才对 CYP1A2 表现出微弱的抑制作用,还发现人参皂苷 Re 增加了 CYP2C9 的活性。而某些临床试验^[12]却发现含有人参的中成药与经 CYP3A4 代谢的药物如 NIF 等联用时会导致低血压等现象发生。本实验发现某些人参皂苷类成分在高浓度时对大鼠肝微粒体有微弱的抑制作用,但并不超过 50%。由于药物在体内的转运较为复杂,而且会随着使用剂量、给药途径等的变化而不同,有可能是其他因素使体内与体外实验产生差异。有文献^[13]报道五味子酯甲对 CYP3A4 具有强抑制作用,而本实验用浓度为 50 μmol/L 的五味子酯甲对 CYP3A 的底物抑制作用为 75%,与文献报道有较小差异,这可能与所用评价标准和所用体系中肝微粒体蛋白种属、微粒体蛋白浓度和所用底物不同有关。黄酮类成分也是灯盏生脉胶囊的主要活性成分,本实验发现野黄芩苷对 CYP450 酶 4 种同工酶无抑制作用,与文献^[7]报道一致,可能原因如文献所述与糖基的存在有关,分子中结合糖基使分子体积增大,构象也不再为平面,从而无法进入活性中心。以上结果提示灯盏生脉胶囊能影响 CYP450 酶,对于其与其他药物联用的体内外研究仍需进一步研究。

本研究在前期研究建立的体外 cocktail 高通量筛选模型的基础上,选择不同的 CYP450 酶同工酶特异性探针底物与灯盏生脉有效组分共同孵育,比较灯盏生脉有效组分在大鼠肝微粒体中抑制作用。通过高灵敏性和选择性的液质联用(LC/MS/MS 技术)对各药物进行分离分析,使实验结果更加准确。研究结果表明五味子甲素对大鼠肝微粒体 CYP3A1、2C6、2C11 有弱抑制作用,五味子酯甲对 CYP3A1、2C11 也有弱抑制作用。五味子甲素和五味子酯甲在浓度为 50 μmol/L 时对相关 CYP450 酶同工酶抑制率均高于 50%。本课题通过初步筛选出介导灯盏生脉胶囊有效组分代谢所涉及的 CYP450 酶同工酶,以期对灯盏生脉胶囊与其他药物的联合使用提供科学依据。

参考文献

- [1] 陈新谦,金有豫,汤光,等. 新编药理学 [M]. 15 版. 北京:人民卫生出版社,2004: 363.
- [2] 何蔚,曾繁典. 灯盏花素治疗缺血性脑血管病的药理作用和临床研究[J]. 中国临床药理学杂志,2002,18(6): 458-461.
- [3] 高安. 灯盏生脉胶囊佐治冠心病心绞痛 30 例[J]. 广东医学,2007,28(7): 1165.
- [4] 中华人民共和国药典编委会. 中华人民共和国药典: 中药材与饮片卷 [M]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社,2010: 138.
- [5] 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.
- [6] CORTHOOT J, NAESSENS T, APERS S, et al. Quantitative determination of ginsenosides from Panax ginseng roots and ginseng preparations by thin layer chromatography—densitometry [J]. J Pharma Biomed Anal, 1999, 21(1): 187-192.
- [7] HE F, BI H C, XIE Z Y, et al. Rapid determination of six metabolites from multiple cytochrome P450 probe substrates in human liver microsome by liquid chromatography/mass spectrometry: application to high-throughput inhibition screening of terpenoids [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21(5): 635-643.
- [8] 和凡,钟国平,赵子立,等. LC-MS/MS 法研究黄酮类化合物对人肝微粒体细胞色素 P450 酶 6 种亚型的体外抑制作用 [J]. 中国新药杂志,2009,18(24): 2340-2344, 2348.
- [9] IZZO A A, ERNST E. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: a systematic review [J]. Drugs, 2001, 61(15): 2163-2175.
- [10] HENDERSON G L, HARKEY M R, GERSHWIN M E, et al. Effects of ginseng components on c-DNA-expressed cytochrome P450 enzyme catalytic activity [J]. Life Sci, 1999, 65(15): PL209-PL241.
- [11] CHANG T K, CHEN J, BENETTON S A. In vitro effect of standardized ginseng extracts and individual ginsenosides on the catalytic activity of human CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 [J]. Drug Metab Dispos, 2002, 30(4): 378-384.
- [12] 吴秀华,申屠建央,史美甫. 细胞色素 P450 酶系和药物的不良反应 [J]. 药学专论,2001,10(11): 19-21.
- [13] IWATA H, TEZUKA Y, KADOTA S, et al. Identification and characterization of potent CYP3A4 inhibitors in Schisandra fruit extract [J]. Drug Metab Dispos, 2004, 32(12): 1351-1358.

(收稿日期:2011-08-17 编辑:罗劲娜)

死亡率和病死率

(1) 死亡率表示在一定期间一定人群中,死于某病(或死于所有原因)的频率,是测量人群死亡危险最常用的指标,用于衡量一定期间某地区人群死亡危险性大小的一项指标。通常取自长期随访观察的特定人群,需要做大量的人群调查随访工作才能获得。常以年为单位,多用千分率、十万分率表示。其计算公式为:

$$\text{死亡率} = \frac{\text{某期间内(因某病)死亡总数}}{\text{同期平均人口数}} \times K; K = 100\%、1000\% \text{或} 10000\%$$

(2) 病死率表示一定时期内,患某病的全部患者中因该病死亡者所占的比例。病死率表示确诊疾病的死亡概率,可反映疾病的严重程度,也可反映诊治能力等医疗水平。其计算公式为:

$$\text{病死率} = \frac{\text{某时期内因某病死亡人数}}{\text{同期患某病的患者数}} \times 100\%$$

本刊编辑部