

20味中成药对 5个人肝微粒体酶活性的影响

徐斌¹,赵刚²,位华²,钱小峰²,李静娴²,徐文² (1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院,上海 200025; 2. 中国人民解放军第二军医大学长征医院,上海 200003)

摘要 目的:考察六神丸等 20个常用中成药对 CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6和 CYP3A4这 5个人肝微粒体中主要的药物代谢酶的活性是否有影响。方法:采用人肝微粒体孵育法,分别采用非那西丁、甲苯磺丁脲、美芬妥因、氢溴酸右美沙芬和咪达唑仑作为 5个酶的探针药物,采用液相色谱-质谱联用法测定了探针药物代谢产物的浓度,比较分别加入待测药物和空白缓冲液时代谢产物的初始生成速度。结果:六神丸对 CYP1A2有明显抑制作用,IC₅₀为 28.75 μg/mL;肝苏颗粒对 CYP2C19有明显抑制作用,IC₅₀为 29.80 μg/mL;丹参片对 CYP1A2有明显抑制作用,IC₅₀为 48.55 μg/mL;贝羚胶囊对 CYP1A2有明显抑制作用,IC₅₀为 17.45 μg/mL;复方夏天无片对 CYP2D6有明显抑制作用,IC₅₀为 40.26 μg/mL;丹参酮胶囊对 CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6和 CYP3A4均有明显抑制作用,IC₅₀分别为 7.04、13.97、55.77、33.90 μg/mL和 34.57 μg/mL;通风定胶囊对 CYP2D6有明显抑制作用,IC₅₀为 37.56 μg/mL。结论:所测定的多数中成药对药物代谢酶有明显的抑制作用,这些药物与药物代谢酶的底物药物联用发生药物相互作用的可能性较大,临床联合用药须谨慎。

关键词 中成药;人肝微粒体;药物代谢酶;抑制

中图分类号:R286 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2009)05-0353-04

Effects of 20 Chinese patent medicines on the catalytic activities of five main cytochrome P450s of human liver microsomes

XU Bin¹, ZHAO Gang², WEI Hua², QIAN Xiao-feng², LI Jing-xian², XU Wen² (1. Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China; 2. Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

ABSTRACT Objective: The effects of the 20 Chinese Patent Medicines on the catalytic activities of five main drug metabolism enzymes of human liver microsomes, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4, were assessed. **Methods:** Human liver microsomes incubation experiment was carried out to assay the injection on the catalytic activities of the enzymes. Phenacetin, tolbutamide, S-mephenytoin, dextromethorphan and midazolam were used as the substrates of the enzymes. After the incubation, the five metabolites of the substrates were quantified by HPLC-MS/MS method. The inhibition was calculated by comparing the formation velocities of metabolites with or without test drug. **Results:** Liu Shen Pill showed obvious inhibitory effect on CYP1A2 with an IC₅₀ of 28.75 μg/mL; Gan Su Granule showed obvious inhibitory effect on CYP2C19 with an IC₅₀ of 29.80 μg/mL; Dan Shen Tablet showed obvious inhibitory effect on CYP1A2 with an IC₅₀ of 48.55 μg/mL; Bei Ling Capsule showed obvious inhibitory effect on CYP1A2 with an IC₅₀ of 17.45 μg/mL; Xia Tian Wu Compound Tablet showed obvious inhibitory effect on CYP2D6 with an IC₅₀ of 40.26 μg/mL; Tanshinone Capsule showed obvious inhibitory effects on CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 with IC₅₀s of 7.04, 13.97, 55.77, 33.90 and 34.57 μg/mL. Tong Feng Ding Capsule showed obvious inhibitory effect on CYP2D6 with an IC₅₀ of 37.56 μg/mL. **Conclusion:** Most test drugs showed obvious inhibitory effect on the catalytic activities of drug metabolism enzymes. The result indicated that Chinese Patent Medicine had the potential to induce drug-drug interactions and special attention should be paid when they are used in combined with other drugs.

KEY WORDS Chinese patent medicine, human liver microsomes, drug metabolism enzyme, inhibition

基金项目:本研究由“重大新药创制”科技重大专项课题资助。基金名称:中药 5 类新药甘西鼠尾总酚酸片临床前研究 (2009ZX09102-134);中药药效物质基础及物质资源库研究关键技术 (2009ZX09502-013)。

作者简介:徐斌 (1966-),男,本科,副主任药师。Tel: (021) 64379502, E-mail: xubin_1966@hotmail.com。

通讯作者:徐文。Tel: (021) 81874129, E-mail: xuwen78@126.com。

中药的应用在我国已有数千年的历史,具有作用缓和、疗效明确、毒性低等特点。但是,近年来中药的安全性受到质疑,尤其是中药与其它药物发生相互作用导致不良反应越来越受到关注。由于药物

代谢导致的相互作用是目前最主要的药物相互作用,药物代谢的主要器官是肝脏,肝细胞的微粒体药物代谢酶参与了多数药物的体内代谢^[1~4]。药物代谢酶在代谢药物的同时其活性也受药物影响^[5~10],药物与酶结合的比较紧密就会使阻止酶与其它底物的结合,产生竞争性抑制;药物与酶的调控位点结合会使酶的活性增强或减弱,产生激动作用或非竞争性抑制作用。药物对药物代谢酶的影响会导致其它酶底物药物代谢速度的降低或增强,影响到药物的吸收和代谢消除,因此是导致药物相互作用的一个关键环节,已引起广大药学科工作者的高度重视。在国外新药研发的临床前研究中,药物对药物代谢酶的影响已经被列入经常考察的范畴,而药物对药物代谢酶的抑制作用是必须考察的项目,考察的主要药物代谢酶是参与药物一相代谢的肝微粒体代谢酶,主要亚型是细胞色素 3A (CYP3A,以 CYP3A4 为主)、细胞色素 1A2 (CYP1A2)、细胞色素 2C9 (CYP2C9)、细胞色素 2C19 (CYP2C19)和细胞色素 2D6 (CYP2D6),这 5 个酶参与了约 80%药物的体内代谢^[11]。本研究考察了 20 味常用的中药对上述 5 个酶的活性是否产生影响(主要是考察是否有抑制作用),提示该药对其它药物的体内代谢是否产生影响,指导临床合理用药。

1 材料与仪器

1.1 材料 人肝脏由本院肝移植科提供;替硝唑(中国药品生物制品检定所);咪达唑仑注射液(江苏恩华药业集团有限公司);氧化型辅酶 II (NADP⁺) (Fluka 公司);葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸、1-羟基咪达唑仑、甲苯磺丁脲、4-羟基甲苯磺丁脲、氢溴酸右美沙芬、O-脱甲基右美沙芬、非那西丁、对乙酰氨基酚、S-美芬妥英、羟基美芬妥英、酮康唑、磺胺苯吡唑、氯雷他定、奎尼丁、萘黄酮均购于 Sigma 公司;其余试剂均为分析纯。

1.2 待测药物 六神丸(上海雷允上药业有限公司,批号 080502);肝苏颗粒(四川古蔺肝苏药业有限公司,批号 080701);强肝胶囊(石家庄东方药业有限公司,批号 20080421803);益胆片(北京医药集团合肥神鹿双鹤药业有限责任公司,批号 08073085);珍菊降压片(上海雷允上药业有限公司,批号 071208);松龄血脉康胶囊(成都康弘制药有限公司,批号 080508);丹参片(上海雷允上药业有限公司,批号 080534);贝羚胶囊(上海雷允上药业有限公司,批号 080103);复方夏天无片(江西天施康中药股份有限公司,批号 08070401);复方川芎胶囊(山东凤凰制药股份有限公司,批号 0808209);

通塞脉片(江苏南星药业有限责任公司,批号 080622);丹参酮胶囊(河北兴隆希力药业有限公司,批号 20080904);金水宝胶囊(江西济民可信金水宝制药有限公司,批号 080935);麝香保心丸(上海和黄药业,批号 20070611);痛风定胶囊(成都中汇制药有限公司,批号 080704);通迪胶囊(贵州安泰药业有限公司,批号 20080819);杞菊地黄胶囊(上海雷允上药业有限公司,批号 08060101);通心络胶囊(石家庄以岭药业股份有限公司,批号 080801);强力天麻杜仲胶囊(上海雷允上药业有限公司,批号 080508);仲景胃灵片(深圳市中联制药有限公司,批号 0801001)。

1.3 仪器 美国 Agilent 6410A triple quadrupole 液质联用系统,配有 G1311A 四元泵、G1322A 真空脱气机、G1329A 自动进样器和 G1316A 柱温箱,使用 MassHunter 软件控制系统及数据处理;色谱柱为美国 Agilent ZORBAX SB-C18 column (3.5 μm , 2.1 \times 100 mm) 色谱柱;ULT1786-3-V37 型超低温冰箱(美国 Revco Scientific);TDL-5 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂);SHA-C 恒温水浴振荡器(江苏太仓实验设备厂);液体快速混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

2 实验方法

2.1 微粒体的制备 参考文献采用钙沉淀法制备^[12]。主要操作如下:将肝称重,剪为碎片,用 1.15% KCL 的磷酸缓冲液 (pH = 7.4) 反复冲洗后,以 4 倍体积的 Tris-KCl 缓冲液 (50 mM Tris, 1.15% KCl, pH = 7.4) 悬浮溶解,匀浆机制成匀浆。匀浆离心 20 min (4 $^{\circ}\text{C}$, 14,000 $\times g$),取上清液加入 0.1 倍体积的氯化钙溶液 (88 mM) 后离心 20 min (4 $^{\circ}\text{C}$, 14,000 $\times g$)。下层粒状物再次用 Tris-KCl 缓冲液混匀后离心 20 min (4 $^{\circ}\text{C}$, 14,000 $\times g$),得下层悬浮物即为微粒体。将微粒体重悬于磷酸盐缓冲液 (pH 7.4, 250 mM 葡萄糖) 中, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.2 微粒体孵育 反应体系中先分别加入微粒体、底物和待测药物(或空白溶剂),置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预孵化振荡 5 min,加入 NADPH 生成系统启动反应。肝微粒体、NADP⁺、氯化镁、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸的终浓度分别为 0.5 mg/mL、1 mM、5 mM、0.8 U/mL 和 10 mM,各个酶的探针药物浓度和孵育时间见表 1。37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴振荡反应一段时间后,加入冰乙腈(含内标替硝唑 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 终止反应。涡旋混合 1 min, 2000 $\times g$ 离心 10 min,取上清液 10 μL 进入 LC-MS/MS 系统测定底物的代谢产物的浓度。采用 Lowry 法测定微粒体中蛋白的浓

度^[13]。

表 1 微粒体孵育各个酶的探针药物浓度及孵育时间

酶的亚型	探针药物浓度 / μM	孵育时间 /min
CYP1A2	25	10
CYP2C9	100	60
CYP2C19	100	60
CYP2D6	5	30
CYP3A4	5	5

2.3 质谱测定探针药物代谢产物的浓度 液质联用测定各个代谢产物的条件如下:仪器为 Agilent公司的 6410A 三重四级杆液质联用仪,分离采用 Agilent公司的 ZORBAX SB-C₁₈柱(3.5 μm , 2.1 \times 100 mm),除对乙酰氨基酚的测定外其它成分的色谱条件为等度洗脱,流动相为乙腈-水-甲酸(50:50:0.05, v/v/v),流速 0.3 mL/min,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,进样量 10 μL 。对乙酰氨基酚的为梯度洗脱,溶液 A 为乙腈,溶液 B 为 0.1%甲酸(v/v),洗脱程序为 0-0.6 min:A 由 5%升到 33%,0.6~2.4:A 升到 95%,维持 1.6 min。流速也为 0.3 mL/min,其它条件也同等度洗脱。质谱采用 ES 源,正离子模式,喷雾电压 4000 V,源温度为 105 $^{\circ}\text{C}$;雾化气为氮气,雾化压力为 40 psi;去溶剂气为氮气,温度 350 $^{\circ}\text{C}$,流速为 10 L/min;碰撞气为高纯氮气,压力为 0.1 MPa;质谱的半峰宽均为 0.7 amu。采用多反应监测(MRM)模式对药物离子浓度进行测定,各个代谢产物及内标的监测条件见表 2。

表 2 五个 CYP 酶探针药物的代谢产物及内标的质谱条件

酶的亚型	代谢产物	质谱条件(MRM 模式)			
		母离子	子离子	传输能量 /V	碰撞能量 /eV
CYP1A2	对乙酰氨基酚	151.2	110.1	135	10
CYP2C9	羟基甲苯磺丁脲	287.2	188.1	100	7
CYP2C19	羟基美芬妥英	235.2	150.2	120	15
CYP2D6	O-脱甲基右美沙芬	258.3	157.1	140	45
CYP3A4	羟基米达唑仑	342.2	324.2	160	20
内标	替硝唑	248.2	121.1	140	15

2.4 待测药物浓度设定及评定依据 待测药物除去片剂包衣或胶囊壳,研细,取适量精密称定,用磷酸盐缓冲液(0.1M, pH = 7.4)配制成一定浓度的混悬液并使最终反应体系中待测药物的终浓度分别为 5 $\mu\text{g/mL}$ 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 。加入待测药物后代谢产物的生成速率变化超过 10% 被认为是有明显影响。对于在 50 $\mu\text{g/mL}$ 时抑制率超过 50% 的待测药物,则进一步考察 7 个浓度待测药物的抑制作用,求算 IC_{50} 值。

3 结果

3.1 阳性抑制剂对酶活性抑制作用 为了评价实验模型的合理性,我们在测定药物的同时测定了各个酶的阳性抑制剂的抑制作用。结果表明 CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A4 的阳性抑制剂 萘黄酮、磺胺苯吡唑、氯雷他定、奎尼丁和酮康唑对各个酶的抑制作用的 IC_{50} 值分别为 1.663、0.874、3.233、0.026 μM 和 0.034 μM ,均表现出明显的抑制作用,表明建立的模型可以用于预测药物对微粒体酶的抑制作用。

3.2 20 个中成药对 5 个酶活性的影响 浓度分别为 5 $\mu\text{g/mL}$ 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 时,20 个中成药对 5 个药物代谢酶活性的影响见表 3。由表可见除强力天麻杜仲胶囊和仲景胃灵片外,其它 18 个中成药都对一个或多个酶表现出明显的抑制作用。

3.3 IC_{50} 值测定结果 六神丸对 CYP1A2 有明显抑制作用, IC_{50} 为 28.75 $\mu\text{g/mL}$,对其余所测定的 CYP 活性无明显影响;肝苏颗粒对 CYP2C19 有明显抑制作用, IC_{50} 为 29.80 $\mu\text{g/mL}$,对其余所测定的 CYP 活性无明显影响;丹参片对 CYP1A2 有明显抑制作用, IC_{50} 为 48.55 $\mu\text{g/mL}$,对其余所测定的 CYP 活性无明显影响;贝羚胶囊对 CYP1A2 有明显抑制作用, IC_{50} 为 17.45 $\mu\text{g/mL}$,对其余所测定的 CYP 活性无明显影响;复方夏天无片对 CYP2D6 有明显抑制作用, IC_{50} 为 40.26 $\mu\text{g/mL}$,对其余所测定的 CYP 活性无明显影响;丹参酮胶囊对 CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A4 均有明显抑制作用, IC_{50} 分别为 7.04、13.97、55.77、33.90 $\mu\text{g/mL}$ 和 34.57 $\mu\text{g/mL}$;通风定胶囊对 CYP2D6 有明显抑制作用, IC_{50} 为 37.56 $\mu\text{g/mL}$,对其余所测定的 CYP 活性无明显影响。

4 讨论

4.1 中药的不良反应及其导致的药物相互作用已引起广泛的重视,但是目前研究较少,不能满足临床合理用药的需要。目前已有研究考察了部分中药提取物或活性成分对代谢酶的影响,但对于中成药的影响研究很少。与中药提取物相比,中成药都经过严格的质量控制,化学成分虽然不完全明确但是这些成分的含量相对稳定,便于研究结果的长期应用;与活性成分单体相比,中成药含有的成分多,不容易遗漏有影响的药物,缺点是影响作用的化学物质基础不明确,研究结果有一定局限性。所以,我们将在下一步的研究中对中成药的化学物质基础进行研究,所得结果将对不同厂

家、不同批次药物的影响作用进行更准确的预测。药物对代谢酶的抑制作用也与代谢酶周围的药物(抑制剂)浓度有关,因此这种抑制作用受到中药

自身的吸收、分布和代谢等影响,即采用动物或健康志愿者进行进一步的体内实验将使预测药物相互作用的结果更加准确。

表 3 20个中成药在浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 时对 5个 CYP酶的抑制活性的影响(酶活性抑制%)

	CYP1A2		CYP2C9		CYP2C19		CYP2D6		CYP3A4	
	5 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$
六神丸	20.25	74.69	0.33	3.47	3.53	4.76	0.53	1.57	0.24	2.58
肝苏颗粒	21.67	43.13	7.89	13.82	28.85	74.64	13.61	25.56	13.56	23.09
强肝胶囊	0.76	1.66	1.37	3.43	0.37	1.52	4.64	21.84	-1.36	2.14
益胆片	11.73	30.89	10.84	25.64	17.36	38.85	10.34	28.31	6.45	11.51
珍菊降压片	12.9	20.75	17.45	31.33	10.38	19.94	7.33	17.86	7.34	9.65
松龄血脉康胶囊	3.72	15.62	10.44	26.39	11.39	26.67	9.87	28.58	9.38	24.92
丹参片	23.59	51.48	9.32	23.73	16.08	37.5	15.37	29.65	6.49	19.05
贝羚胶囊	27.42	68.82	17.37	30.43	4.78	6.25	10.44	28.77	7.84	19.99
复方夏天无片	6.25	27.62	10.73	27.94	20.34	42.86	22.7	66.97	12.38	29.68
复方川芎胶囊	26.25	37.5	4.33	13.12	13.76	32.43	7.67	21.85	10.37	34.12
通塞脉片	9.73	21.05	6.45	19.12	13.23	30.43	6.79	18.73	1.37	6.48
丹参酮胶囊	47.67	89.71	37.58	73.41	24.42	46.38	34.75	71.14	32.51	70.06
金水宝胶囊	1.35	0.87	0.15	0.25	20.52	31.16	17.81	32.56	22.51	43.13
麝香保心丸	10.59	20.33	0.74	1.43	3.99	7.52	1.37	3.82	1.38	4.73
痛风定胶囊	0.33	1.84	0.13	1.29	0.82	7.52	27.78	66.51	1.58	3.67
通迪胶囊	1.51	0.82	1.85	6.73	3.34	5.82	13.13	48.71	1.16	5.74
杞菊地黄胶囊	8.72	20.89	11.81	23.84	17.58	30.77	7.85	18.92	10.5	22.99
通心络胶囊	8.33	24.76	18.54	37.31	8.95	22.22	6.54	10.17	6.48	18.97
强力天麻杜仲胶囊	0.42	0.65	1.58	3.52	-2.71	3.42	1.12	3.63	0.88	1.58
仲景胃灵片	-1.27	1.84	0.63	2.52	0.72	2.84	0.75	3.65	0.25	1.53

注:抑制率高于 10%表示有明显抑制作用,低于 -10%表示有明显激动作用。

4.2 本实验考察了 20个常用的中成药对人肝微粒体主要的药物代谢酶的影响。结果表明其中 18个中药对 1个或多个酶有明显的抑制作用。由于所考察的酶是人体中主要的药物代谢酶,这 5个酶参与了近 80%药物在体内的代谢,所以中药与其它药物的相互作用的可能性非常大。虽然抑制作用与阳性抑制剂相比多数比较弱,但对于药物代谢能力较弱的老年人以及疾病等引起的肝功能不全的患者,这种相互作用可能会导致非常严重的后果,临床联合用药需谨慎。

参考文献:

- [1] 钟大放. 药物代谢 [S]. 北京:中国医药科技出版社, 1996: 1.
- [2] 冷欣夫, 邱星辉. 细胞色素 P450酶系的结构、功能与应用前景 [S]. 北京:科学出版社; 2001: 56.
- [3] 杨秀伟, 郝美荣, 服部征雄. 中药成分代谢分析 [M]. 北京:中国医药科技出版社; 2003: 86.
- [4] Forrester LM, Henderson CJ, Glancey MJ, *et al* Relative expression of cytochrome P450 isoenzymes in human liver and association with metabolism of drugs and xenobiotics [J]. *Biochem*, 1992, 281 (2): 359.
- [5] Murray M. Mechanisms of inhibitory and regulatory effects of Methylene dioxyphenyl compounds on Cytochrome P450-dependent drug oxidation [J]. *Curr Drug Metab*, 2000, 1 (1): 67.
- [6] Aminmanzani A, Beringer P, Jelliffe R. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the newer fluoroquinolone antibacterials [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2001, 40 (3): 169.
- [7] Venkatakrisnan K, VonMLL, Greenblatt DJ. Effects of the antifungal agents on oxidative drug metabolism: clinical relevance [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2000, 38 (2): 111.
- [8] Ivanov M, Groza NV, Myagkova GI. Cytochrome P450-dependent metabolism of arachidonic acid [J]. *Biochem [J]. Mosc*, 1999, 64 (7): 725.
- [9] Hao M, Zhao YQ, Chen PZ, *et al* Structure - activity relationship and substrate dependent phenomena in effects of Ginsenosides on activities of drug-metabolizing P450 enzymes [J]. *Phs One*, 2008, 3 (7): e2697.
- [10] Paine MF, Hart HL, Ludington SS, *et al* The human intestinal cytochrome P450 "PIE" [J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34: 880.
- [11] Cheng S, Qiu F, Wang S, *et al* HPLC analysis and pharmacokinetics of icariin in rats [J]. *J Sep Sci*, 2007; 30 (9): 1307.
- [12] Kim HJ, Chang EJ, Cho SH, *et al* Antioxidative activity of resveratrol and its derivatives isolated from seeds of paeonia lactiflora [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 2002, 66: 1990.
- [13] Lowry OH, Rosebrough N J, Farr A L *et al* Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265.

收稿日期: 2009-08-17