

加味佛手散胶囊体外体内对大鼠肝脏 CYP450 酶活性的影响

尚芳红¹, 俸珊², 陈乾², 陈先进², 徐晓玉^{2*}

(1. 重庆市中药研究院, 重庆 400065; 2. 西南大学药学院中药学院, 重庆 400715)

摘要: 考察加味佛手散胶囊在体外和体内对大鼠肝微粒体 CYP1A2、CYP2C6、CYP2D2、CYP2E1、CYP3A1/2 亚酶活性的影响, 为临床提供药物代谢动力学以及与其他药物合用时的参考。采用肝微粒体体外孵育“鸡尾酒”法, LC-MS/MS 法测定代谢产物, 评价各受试组 CYP 同工酶活性, HE 染色观察用药前后肝组织病理变化。在体外, 最高抑制浓度 3 200 mg·L⁻¹ 加味佛手散胶囊对大鼠肝微粒体 CYP2D2、CYP2E1、CYP3A1/2 的 IC₅₀ 分别为 229.3、361.9 和 274.6 mg·L⁻¹。在体内, 与空白对照组比较, 180 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 的加味佛手散胶囊组 CYP1A2、CYP2C6 和 CYP3A1/2 的酶活性显著升高 ($P < 0.01$)。用药后加味佛手散胶囊组有炎细胞浸润, 但病理变化程度明显较延胡索乙素组轻微。体外抑制体内诱导实验提示加味佛手散胶囊临床使用如果与其他经 CYP2D2、CYP2E1 酶代谢的药物同时使用, 可能使该药作用效果增强, 作用时间延长, 联合用药时应适当减少用药剂量; 如果与其他经 CYP1A2、CYP2C6 酶代谢的药物同时使用, 则可能使该药作用效果减弱, 作用时间缩短, 联合用药时应适当增加用药剂量。另外, 延胡索乙素与阿魏酸、川芎嗪联合使用后, 能显著降低延胡索乙素对大鼠肝脏的毒性作用。本研究动物实验方案获得西南大学药学院实验动物管理与使用委员会的批准。

关键词: 加味佛手散胶囊; 细胞色素 CYP450; 延胡索乙素; 肝毒性; 药物相互作用; 药物代谢动力学

中图分类号: R969 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)06-1101-07

Effects of Jiawei Foshou San capsule on rat hepatic cytochrome P450 enzymes *in vitro* and *in vivo*

SHANG Fang-hong¹, FENG Shan², CHEN Qian², CHEN Xian-jin², XU Xiao-yu^{2*}

(1. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China; 2. College of Pharmaceutical Sciences and Chinese Medicine, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: This study aimed to evaluate the effects of Jiawei Foshou San capsule (JWFSSC) on CYP1A2, CYP2C6, CYP2D2, CYP2E1 and CYP3A1/2 enzyme activities in rat liver microsomes *in vitro* and *in vivo*, and to provide pharmacokinetic data for its combined use with other medicines. After incubating liver microsomes with a cocktail of probe drugs, the metabolites were quantitated with LC-MS/MS to assess the CYP enzyme activity. The hepatic pathological changes were evaluated by histology after hematoxylin and eosin (HE) staining. With the dose range up to 3 200 mg·L⁻¹, the IC₅₀ of JWFSSC for CYP2D2, CYP2E1 and CYP3A1/2 *in vitro* was 229.3 mg·L⁻¹, 361.9 mg·L⁻¹ and 274.6 mg·L⁻¹ respectively. Compared with the vehicle control group, the enzyme activities of CYP1A2, CYP2C6 and CYP3A1/2 showed a significant increase in animals given JWFSSC 180 mg·kg⁻¹·d⁻¹ ($P < 0.01$). Based on histology, several pathological changes were observed in JWFSSC groups: there was less inflammatory infiltration compared to the tetrahydropalmatine (THP) group. These results of inhibition *in vitro* and induction *in vivo* suggest a strengthened efficacy and a prolonged effective time of drugs metabolized by CYP2D2 and

收稿日期: 2019-02-18; 修回日期: 2019-04-19.

基金项目: 科技部重大新药创制专项资助项目 (2014ZX09304-306-04); 重庆市基础研究与前沿探索项目 (cstc2018jcyjAX0669); 重庆市科研机构绩效激励引导专项资助项目 (cstc2018xjl-jbky120002).

*通讯作者 Tel: 86-23-68251679, Fax: 86-23-68251225, E-mail: xuxiaoyu@swu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0118

CYP2E1 enzymes when combined with JWFSSC in use. The dosage of parent drugs should be appropriately reduced when used in combination with JWFSSC. However, if a drug is metabolized by CYP1A2 and CYP2C6 when used in combination with JWFSSC, the effect of the drug is likely reduced and the dosage should be increased appropriately. In addition, the combination of ferulic acid (FA), ligustrazine (LZ) and THP can significantly reduce the toxicity of THP in rat livers. In this study, the program of animal testing had been approved by Committee on the management and usage of experimental animal in the College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University.

Key words: Jiawei Foshou San capsule; cytochrome P450; tetrahydropalmatine; liver toxicity; drug interaction; pharmacokinetics

细胞色素 P450 酶系是肝微粒体混合功能氧化酶系的主要成分,是由多个同工酶组成的基因超家族,参与内源性物质和包括药物、环境化合物在内的外源性物质的代谢^[1]。研究发现,当两种或两种以上药物联用时,由于药物之间的相互作用而使药效或不良反应加强或减弱,甚至出现未预期的不良反应^[2]。药物相互作用可发生在吸收、代谢、排泄、蛋白结合等不同环节,其中药物代谢性相互作用 96% 是由 CYP450 酶介导的,其中酶抑制引起约占 70%,酶诱导引起约占 23%,其他类型占 7%^[3,4]。研究药物对 CYP450 酶的影响,有助于预测代谢性药物相互作用,从而提高药物的有效性和安全性,降低药物的不良反应,指导临床联合用药。目前,欧美各国已把 CYP450 酶系的测定用于新药的筛选及其代谢研究,并把药物对它的作用列为新药申报必须进行的一项实验。我国新的《新药审批管理条例》也在积极倡导进行药物对于代谢酶影响的研究^[5]。

加味佛手散胶囊 (Jiawei Foshou San capsule, JWFSSC) 为西南大学中药研究所自主研发的用于治疗子宫内膜异位症的一种新型中药单体复方制剂,由中医妇科经典方佛手散药物当归、川芎的有效组分阿魏酸 (ferulic acid, FA)、川芎嗪 (ligustrazine, LZ) 及具有止痛作用的延胡索乙素 (tetrahydropalmatine, THP) 配伍而成。研究发现,阿魏酸和川芎嗪均具有抗肿瘤血管生成作用,并能抑制血管内皮生长因子的表达,延胡索乙素具有抑制中枢神经系统,松弛子宫平滑肌,调节内分泌激素水平等作用^[6,7]。课题组前期研究表明,阿魏酸、川芎嗪及延胡索乙素配伍合用具有抗子宫内膜异位症血管生成,抑制子宫内膜异位症移植植物生长作用^[8-10]。本研究采用“鸡尾酒”探针底物法,系统评价加味佛手散胶囊在体内和体外对大鼠肝微粒体 5 种常见肝药酶 CYP450 亚型活性的影响,并观察用药前后肝组织细胞形态变化,以期弄清加味佛手散胶囊与亚酶底物合用时产生药物相互作用的可能性,为临床安全合理用药提供实验资料和依据。

材料与方法

仪器 液质联用系统 (API 4000 Qtrap, SER. N: AR26221101, 岛津 LC-20AD 泵; SIL-20AC 恒温自动进样器, CTO-20A 柱温箱, CBM-20A 控制器, ESI 离子源; Analyst Software 1.5.2 色谱工作站, 美国 Beckman Coulter 公司); Avanti J-301 冷冻高速离心机 (美国 Beckman Coulter 公司); Elix3 超纯水系统 (美国 Millipore 公司), EL2204 电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司), SHB-IIIS 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司), 微量移液器 (德国 Eppendorf 公司)。

药品与试剂 加味佛手散胶囊 (西南大学中药研究所提供, 批号: 20145202); 阿魏酸原料药 (批号: QZ-100427, 纯度 98%)、川芎嗪原料药 (批号: QZ-100511, 纯度 98%)、延胡索乙素原料药 (批号: QZ-091224, 纯度 98%) 均购于南京泽朗有限责任公司; 非那西丁 (批号: E3M0I)、对乙酰氨基酚 (批号: 100018-201610)、甲苯磺丁脲 (批号: 100500-200801)、4-羟基甲苯磺丁脲 (批号: 1-PSB-27-2)、右美沙芬 (批号: KC201003)、去甲右美沙芬 (批号: 1531-23-3)、咪达唑仑 (批号: FE101512-01)、1-羟基咪达唑仑 (批号: FN101512-07)、氯唑沙宗 (批号: 201302)、6-羟基氯唑沙宗 (批号: 6-QFY-28-2)、卡马西平 (批号: 201105)、 α -萘黄酮 (批号: AO222928)、磺胺苯吡啶 (批号: 01022)、奎尼丁 (批号: 1308376)、酮康唑 (批号: 11205) 等均购自天津一方科技有限公司; 还原型辅酶 II (批号: SLBJ6612V) 购自美国 Sigma 公司; BCA 蛋白测定试剂盒 (碧云天生物技术研究所, 批号: P0012); 苏木精 (批号: 39Q10130)、伊红 (批号: DH121) 均购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 20 供体雌性混合大鼠肝微粒体 (批号: RHSO) 购自瑞德肝脏疾病研究 (上海) 有限公司; 甲醇为质谱纯, 购自美国 Fisher 公司; 所有其他溶剂和化学试剂均为分析纯或以上。

动物 SD 雌性大鼠, SPF 级, 体重 (220 \pm 20) g, 由重庆市中药研究院实验动物研究所提供, 生产许可证号 SCXD (渝) 2012-0006, 实验动物质量合格证号

No.0003223。饲养于西南大学药学院/中医药学院 SPF 级实验动物中心, 使用许可证号 SYXK (渝) 2014-0002。大鼠的饲养、繁殖和使用均符合中国《实验动物管理条例》。环境适应性饲养一周后用于实验。本研究动物实验方案获得西南大学药学院实验动物管理与使用委员会的批准。

色谱和质谱条件^[11,12] 色谱柱为 (Agilent Zorbax XDB-C18, 2.1 mm×50 mm, 3.5 μm); 进样量: 10 μL; 检测波长: 280 nm; 流速: 0.45 mL·min⁻¹; 流动相为含 0.1% 甲酸 (A) 和甲醇 (B), 梯度洗脱程序: 0~0.5 min 为 98% A, 2% B; 0.5~2.5 min 保持不变; 2.5~3.5 min 为 2% A, 98% B; 3.5~4.0 min, 保持不变; 4.0~5.0 min, 为 98% A, 2% B。离子源为电子轰击式离子源 (ESI); 扫描方式: 多反应监测 (MRM); 气帘气体为 20 psi (1 psi≈6.9 kPa); 离子喷射电压 (IS): 5 kV (ESI+), -4.2 kV (ESI-); 源内气体 1 (Gas 1) 和源内气体 2 (Gas 2) 分别为 55 和 50 psi, 离子源温度为 550 °C。5 个探针药物代谢产物和内标的 MRM 质谱检测参数如表 1 所示。

体外抑制实验 参照文献^[13], 建立 200 μL 的 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 孵育体系: 包含 0.3 g·L⁻¹ 大鼠肝微粒体蛋白 50 μL, 5 种混合探针底物 [非那西丁 10 μmol·L⁻¹ (CYP1A2), 右美沙芬 2.5 μmol·L⁻¹ (CYP2D2), 甲苯磺丁脲 100 μmol·L⁻¹ (CYP2C6), 咪达唑仑 5 μmol·L⁻¹ (CYP3A1/2), 氯唑沙宗 20 μmol·L⁻¹ (CYP2E1)] 25 μL, 系列浓度的阳性抑制剂或各实验药物。平行设置药物组、阳性抑制剂组和空白对照组。药物组阿魏酸、川芎嗪、延胡索乙素的系列浓度为 0.25、0.5、1、5、10、50、100 和 500 μmol·L⁻¹, 加味佛手散胶囊的系列浓度为 1.6、3.2、6.4、32、64、320、640 和 3 200 mg·L⁻¹。阳性抑制剂 α-萘黄酮 (α-naphthoflavone, CYP1A2) 的浓度为 0.000 1、0.001、0.01、0.05、0.4、1.2、3.6、10.8 和 21.6 μmol·L⁻¹, 磺胺苯吡啶 (sulfaphenazole, CYP2C6) 的浓度为 0.000 1、0.001、0.01、0.1、0.2、0.8、2.4、7.2 和 21.6 μmol·L⁻¹ 奎尼丁 (quinidine, CYP2D2) 的浓度为 0.000 2、0.002、0.01、0.1、0.4、1.0 和 3 μmol·L⁻¹。酮康唑 (ketoconazole, CYP2E1, CYP3A1/2) 的浓度为 0.006、0.06、0.18、0.54、1.62、4.86、14.58 和 58.32 μmol·L⁻¹。每个浓度组设 3 个平行样品。空白对照组不加受试药

或阳性抑制剂。加入 1 mmol·L⁻¹ NADPH 100 μL 启动反应, 将各组于 37 °C 孵育 15 min 后加入含有内标 75 ng·mL⁻¹ 卡马西平的冰甲醇 400 μL 终止反应。10 000×g 离心 5 min, 取上清液, 应用“Cocktail”探针法以及 LC-MS/MS 法分析各探针底物代谢产物的生成量。

体内诱导实验 取雌性 SD 大鼠 90 只, 随机分成 9 组, 每组 10 只。分为 0.5% CMC-Na 溶液 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 空白对照组、苯巴比妥 80 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 阳性诱导剂对照组、阿魏酸 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 组、川芎嗪 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 组、延胡索乙素 30 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 组、加味佛手散原料药 180 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 组、加味佛手散胶囊三剂量组 (45、90、180 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 组, 给药剂量参考前期药效学实验)^[11,12], 灌胃给药, 每日 1 次, 连续给药 28 天。末次给药后将动物禁食 12 h, 水合氯醛麻醉, 剪断腹股沟动脉以排出大鼠体内血液, 取出肝脏, 超速离心法制备肝微粒体^[16]。配制 200 μL 的 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 孵育体系: 包含 0.3 g·L⁻¹ 大鼠肝微粒体蛋白 50 μL (分别含空白对照组、阳性对照组和各实验药物组大鼠的肝微粒体蛋白), 5 种混合探针底物 50 μL (非那西丁 10 μmol·L⁻¹, 右美沙芬 2.5 μmol·L⁻¹, 甲苯磺丁脲 100 μmol·L⁻¹, 咪达唑仑 5 μmol·L⁻¹, 氯唑沙宗 20 μmol·L⁻¹)。其中空白对照组采用灌胃 0.5% CMC-Na 溶液的大鼠肝微粒体蛋白, 阳性对照组采用灌胃苯巴比妥溶液的大鼠肝微粒体蛋白, 各实验药物组则采用相应给药的大鼠肝微粒体蛋白。按体外抑制实验项下的方法, 自“加入 1 mmol·L⁻¹ NADPH 100 μL 启动反应”起, 依法测定各探针底物的代谢产物生成量。

肝脏组织形态学观察 参照文献^[14], 各组实验动物取血处死后立即解剖摘取肝脏, 肉眼观察肝脏表面病理变化, 并固定于 4% 多聚甲醛溶液中, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 4~5 μm 切片, 苏木精和伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色, 中性树胶封片, 荧光显微镜下观察肝组织结构及炎症细胞浸润等症状。

数据处理

体外抑制实验 通过测定探针底物的代谢产物相对生成量来确定酶的相对活性。按 $E_{rel} = C_i/C_0 \times 100\%$ 和抑制率 $\% = 1 - E_{rel}$, 计算受试药物作用下 CYP 酶的相

Table 1 The multiple reaction response monitoring spectrum parameter of the 5 probe substrates and internal standard

Isoform	Substrate metabolite	MS selected ions / m/z	Ion mode	Cone voltage/V	Collision energy/eV
	Carbamazepine	237/194	ESI+	95	40
CYP1A2	Acetaminophen	152/110	ESI+	61	23
CYP2C6	4-Hydroxytolbutamide	287/89	ESI+	60	59
CYP2D2	Dextrorphan	258/199	ESI+	70	38
CYP2E1	6-Hydroxychlorzoxazone	184/120	ESI-	73	26
CYP3A1/2	1-Hydroxymidazolam	342/203	ESI+	83	40

对活性 (E_{rel}) 和抑制率, C_0 为空白对照组孵育反应后代谢产物生成量, C_i 为阳性抑制剂或受试药物组孵育反应后代谢产物生成量^[12,15]。

用 GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad software Inc, CA, USA) 软件将酶活性剩余百分数 E_{rel} 对药物浓度的 Log 值作图, 由抑制曲线得到 IC_{50} 值。

体内诱导实验 由式 1 计算受试药物作用下探针底物的代谢产物生成速率 (V), 作为各酶活性指标, 式 1 中 C 为孵育反应后代谢产物生成量 ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), C_{protein} 为微粒体蛋白的质量浓度 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), t 为孵育时间 (min)^[14]。

$$V (\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}) = \frac{C \times 1000}{C_{\text{protein}} \times t} \quad (1)$$

采用 SPSS Statistics 17.0 统计学软件, 对照组和各给药组之间差异的比较用 T-Test 检验。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

结果

1 加味佛手散胶囊及其组分体外对大鼠肝脏 CYP450 酶的抑制作用

由阳性抑制剂或受试药物对 5 种 CYP450 酶亚型的抑制曲线计算得到 IC_{50} 值。按照通用的 CYP 酶抑制剂强度的分级规则^[6], 若 $IC_{50} > 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为弱抑制剂; $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} < IC_{50} < 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为中等强度抑制剂; $IC_{50} < 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为强抑制剂。首先用已知的阳性抑制剂验证大鼠肝微粒体孵育体系。得到的阳性抑制剂 IC_{50} 值均小于 $1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 表现出明显的抑制作用, 表明所用的孵育体系可以满足 CYP 酶抑制活性评价的要求。

在最高抑制浓度时 (单味药为 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 复方加味佛手散胶囊为 $3\ 200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 阿魏酸和川芎嗪对 5 种 CYP450 亚酶, 延胡索乙素对 CYP1A2、CYP2C6、CYP2D2、CYP2E1, 加味佛手散胶囊对 CYP1A2、CYP2C6 的抑制率均未超过 50%。而延胡索乙素对 CYP3A1/2, 加味佛手散胶囊对 CYP2D2、CYP2E1、CYP3A1/2 的抑制率均大于 50% (表 2)。

由抑制曲线计算得到 IC_{50} 值, 阿魏酸和川芎嗪对 5 种 CYP450 亚酶, 延胡索乙素对 CYP1A2、CYP2C6、CYP2D2、CYP2E1 的 IC_{50} 值大于 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 加味佛手

散胶囊对 CYP1A2、CYP2C6 的 IC_{50} 值大于 $3\ 200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 在临床上产生明显酶抑制作用的可能性较小。延胡索乙素对 CYP3A1/2 的 IC_{50} 为 $7.29 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 显示延胡索乙素为 CYP3A1/2 的中等强度抑制剂。加味佛手散胶囊对 CYP2D2、CYP2E1、CYP3A1/2 的 IC_{50} 分别为 229.3 、 361.9 和 $274.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 均远小于加味佛手散胶囊在孵育液中最高浓度的一半 $1\ 600 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 提示加味佛手散胶囊对 CYP2D2、CYP2E1、CYP3A1/2 的酶活性可能有抑制作用 (图 1)。

2 加味佛手散胶囊及其组分多次给药对大鼠肝脏 CYP450 酶的作用

连续 28 天给药后, 实验结果显示阳性对照组 5 种 CYPs 亚型的酶活性与空白对照组中各酶活性比较, 其 $P < 0.05$, 存在显著性差异, 证明本实验中采用评价大鼠肝药酶 P450 的诱导作用方法是可靠的。

与空白对照组比较, FA、LZ、THP 3 个单体成分组 5 种 CYPs 亚型的酶活性均无显著性差异 ($P > 0.05$); 加味佛手散胶囊 $180 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组和加味佛手散原料药组 CYP1A2、CYP2C6、CYP3A1/2 的酶活性显著升高 ($P < 0.01$); 加味佛手散胶囊 $45 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组、 $90 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组上述 5 种 CYPs 亚型的酶活性均无显著性差异 ($P > 0.05$); 3 个剂量的加味佛手散胶囊组 CYP2D2、CYP2E1 的酶活性均无显著性差异 ($P > 0.05$)。同加味佛手散原料药配伍合用 (FA+LZ+THP) 组比较, 加味佛手散胶囊 $180 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组 5 种 CYPs 亚型的酶活性均无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 2)。

3 加味佛手散胶囊及其组分对大鼠肝组织细胞形态影响

肝组织病理切片 HE 染色结果 (图 3) 显示: 连续给药 28 天后, 空白对照组 (图 3A) 肝脏组织结构完整, 肝小叶轮廓清晰, 肝细胞索状排列整齐, 边缘清晰, 核大而圆, 沿中央静脉呈整齐放射性排列。总体观察, 肝细胞形态正常。FA 组 ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 图 3B) 和 LZ 组 ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 图 3C) 的肝组织结构基本正常, 未见明显肝细胞变性、坏死等病理变化。THP 组 ($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 图 3D) 病理损伤较大, 肝小叶界限不清, 肝细胞排列紊乱, 边缘模糊, 细胞核大小不均, 可见炎症细胞浸润。加味佛手散原料药 (FA+LZ+THP) 组

Table 2 Inhibitory effects of JWFSSC ($3\ 200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and its active components ($500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on CYP isoforms ($n = 3, \bar{x} \pm s$). FA: Ferulic acid; LZ: Ligustrazine; THP: Tetrahydropalmatine; JWFSSC: Jiawei Foshou San capsule

Drug	Activity inhibition/%				
	CYP1A2	CYP2C6	CYP2D2	CYP2E1	CYP3A1/2
FA	2.81 ± 0.80	2.33 ± 0.47	8.13 ± 1.01	3.16 ± 0.15	1.26 ± 0.18
LZ	2.17 ± 0.11	3.05 ± 0.13	9.39 ± 0.63	2.75 ± 0.45	3.73 ± 0.62
THP	1.29 ± 0.22	5.37 ± 0.34	17.4 ± 1.57	33.8 ± 2.02	58.10 ± 2.33
JWFSSC	10.10 ± 0.16	48.13 ± 0.95	97.55 ± 1.38	76.75 ± 1.32	91.96 ± 1.90

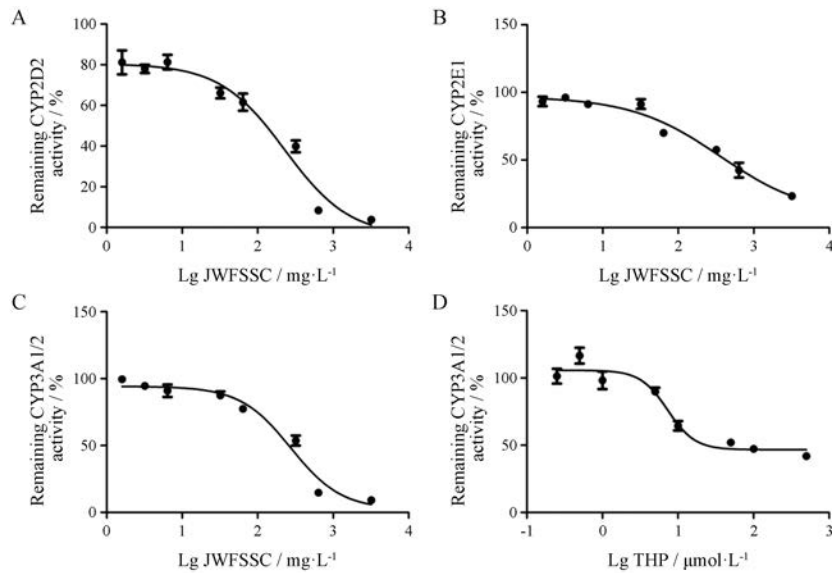


Figure 1 Inhibitory curves of JWFSSC on CYP2D2 (A), CYP2E1 (B), CYP3A1/2 (C) and THP on CYP3A1/2 (D). $n = 3, \bar{x} \pm s$

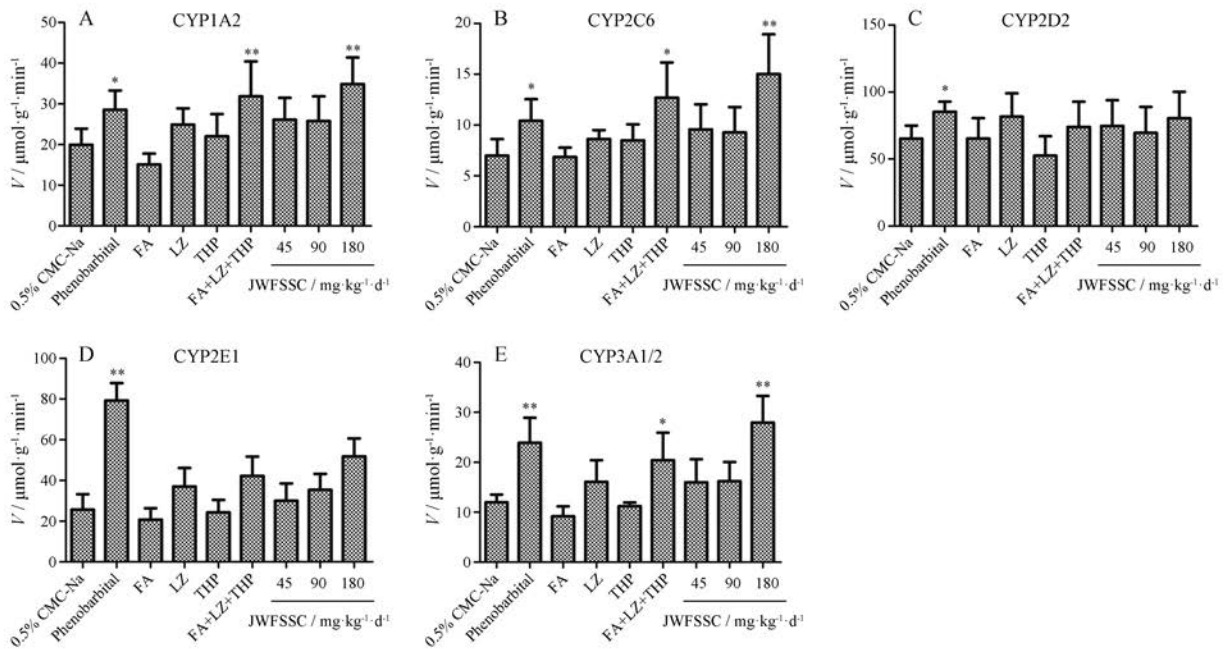


Figure 2 The *in vivo* effects of JWFSSC and its components on CYP1A2 (A), CYP2C6 (B), CYP2D2 (C), CYP2E1 (D), CYP3A1/2 (E) in rat liver microsomes. $n = 10, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs vehicle control

(180 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 图 3E) 和加味佛手散胶囊组 (45、90 和 180 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 图 3F-H) 有炎症细胞浸润, 但较延胡索乙素组, 病变程度普遍较轻。随着加味佛手散胶囊给药剂量的增大, 其病变程度未呈现增大趋势。

讨论

体外单药实验结果显示, 阿魏酸和川芎嗪在大鼠肝微粒体 CYP450 中引起酶抑制作用的可能性比较小, 其结果与同类研究报道相符^[17,18]。本实验结果延胡索乙素对大鼠肝微粒体 CYP3A1/2 的酶活性有较强

的抑制作用, 对 CYP1A2、CYP2C6、CYP2D2、CYP2E1 无明显的抑制作用。然而有报道延胡索乙素对人肝微粒体 CYP2D6 的酶活性有抑制作用^[19], 推测其原因, 可能是动物种属差异所致。复方实验结果显示, 阿魏酸、川芎嗪、延胡索乙素单独给药对大鼠肝微粒体 CYP2D2、CYP2E1 均无抑制作用, 而 3 种药物的复方加味佛手散胶囊给药后有抑制作用。这一现象再次表明中药复方配伍后给药与单味给药相比, 其药代动力学过程可能会发生变化^[20,21]。另外, 延胡索并非传统的有毒中药, 但是左旋延胡索乙素 (左旋四氢帕马丁)

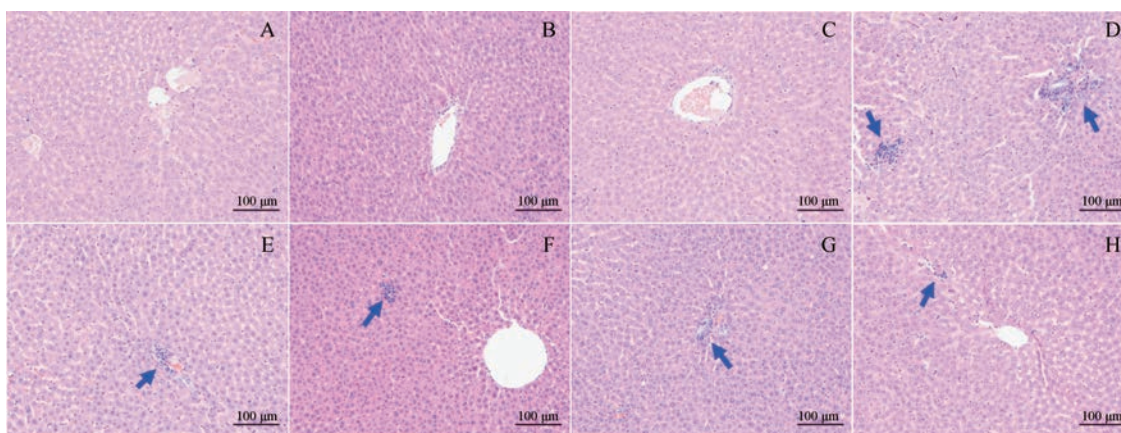


Figure 3 The influences of JWFSSC and its components on the hepatocyte morphology in rat liver tissues ($\times 200$, HE). The liver sections from female Sprague-Dawley rats treated with various doses of the drugs a relatively appearance. For each dosage group, three sections were produced, and the microphotos show the representative foci in the vehicle control rats (A), 100 mg·kg \cdot d $^{-1}$ FA-treated rats(B), 50 mg·kg \cdot d $^{-1}$ LZ-treated rats (C), 30 mg·kg \cdot d $^{-1}$ THP-treated rats (D), 180 mg·kg \cdot d $^{-1}$ (FA+LZ+THP)-treated rats (E), and 45 mg·kg \cdot d $^{-1}$ (F), 90 mg·kg \cdot d $^{-1}$ (G), and 180 mg·kg \cdot d $^{-1}$ (H) JWFSSC-treated rats. The tissues were fixed in paraformaldehyde solution and stained with HE. Some inflammatory cell infiltration was observed, as indicated with arrow

有一定的肝脏毒性。已有文献报道左旋延胡索乙素在临床上应用,有儿童出现抑制神经中枢、呼吸系统等不良反应,成年人常规应用也可能引起急性或者慢性肝炎^[22-24]。国家食品药品监督管理局也要求修订含左旋延胡索乙素药品处方药说明书和非处方说明书,并规定肝病患者慎用含该成分的制剂。目前其肝毒性的机制尚不清楚,或许该物质对肝细胞具有直接毒性,也可能与病人的特异质反应有关^[25]。本实验加味佛手散胶囊中延胡索乙素采用的是消旋体,也出现了肝损伤病理变化。目前还未见关于右旋延胡索乙素肝毒性的报道。后续研究将考察右旋延胡索乙素的肝脏毒性作用,及其作为加味佛手散胶囊制剂的备选原料。

体内实验中延胡索乙素与阿魏酸、川芎嗪3种药物合用同延胡索乙素单独给药比较,肝损伤程度有所减轻,表明配伍阿魏酸、川芎嗪后,能显著降低延胡索乙素不良反应;而且配伍复方能显著激发CYP1A2、CYP2C6、CYP3A1/2的酶活性,加快延胡索乙素单用在肝脏的代谢,减少延胡索乙素对肝细胞形态的损伤,这也印证了药效学研究复方配伍的合理性^[14]。有关加味佛手散胶囊的肝脏毒性作用,有待采用严格规范的GLP实验进一步验证。相同剂量的加味佛手散胶囊与加味佛手散原料药均对CYP1A2、CYP2C6、CYP3A1/2的酶活性具有诱导作用,并且二者的酶活性比较没有显著性差异,提示制剂中的辅料对酶活性无影响。作者还观察到加味佛手散胶囊对CYP3A1/2酶活性既表现出体外抑制效应也表现出体内诱导效应,此现象也有文献^[26]报道。推测其原因可能是体外实验是单次给药,体内实验则是多次给药,大鼠个体具有反馈调节机

制。另外,动物种属差异可能会导致药物的代谢过程在人和大鼠身上出现不同^[27],CYPs各种亚酶在不同组织器官内的表达量也可能存在差异。大鼠的诱导数据可能有助于解释大鼠的多剂量PK-PD模型,但其结果不能完全用于模拟人的反应,而人类肝细胞实验的结果可以被认为是预测人类CYP诱导的决定性因素。因此,下一步将进行基于人原代肝细胞的诱导评价实验。

基于上述结果可知,加味佛手散胶囊临床使用如果与其他经CYP2D2、CYP2E1酶代谢的药物同时使用,可能使该药作用效果增强,作用时间延长,联合用药时应适当减少用药剂量;如果与其他经CYP1A2、CYP2C6酶代谢的药物同时使用,则可能使该药作用效果减弱,作用时间缩短,联合用药时应适当增加用药剂量。

References

- [1] Xing HJ, Wang HB, Sun G. Antioxidant response, CYP450 system, and histopathological changes in the liver of nitrobenzene-treated drakes [J]. Res Vet Sci, 2013, 95: 1088-1093.
- [2] Hu DH, Wang YG, Chen ZW, et al. Effect of compound Danshen Dripping Pills on rat hepatic cytochrome P450 [J]. Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理学与毒理学杂志), 2013, 27: 678-684.
- [3] Venkatakrisana K, von Moltke LL, Obach RS, et al. Drug metabolism and drug interactions: application and clinical value of *in vitro* models [J]. Curr Drug Metab, 2003, 4: 423-459.
- [4] Bertelsen KM, Venkatakrisnan K, von Moltke LL, et al. Apparent mechanism based inhibition of human CYP2D6 *in vitro* by

- paroxetine: comparison with fluoxetine and quinidine [J]. *Drug Metab Dispos*, 2003, 31: 289-293.
- [5] Zhu GX, Wang YG, Li F, et al. Study on the effects of Radix Adenophorae co-administrated with *Veratrum nigrum* L. on cytochrome P450 subtype enzymes activities of rats by cocktail approach using probe drugs [J]. *Chin J Pharmacovigil (中国药物警戒)*, 2013, 10: 257-268.
- [6] Xu XY. *Pharmacology of Chinese Materia Medica (中药药理学)* [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2010: 166-168.
- [7] Xu XY, Chen WH, Ye L, et al. Effect of sodium ferulate and total glucosides in paeony on tumor growth and expression of vascular endothelial growth factor and proliferating cell nuclear antigen in H 22 mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2007, 38: 570-573.
- [8] Tang Q, Shang FH, Wang XC, et al. Combination use of ferulic acid, ligustrazine and tetrahydropalmatine inhibits the growth of ectopic endometrial tissue: a multi-target therapy for endometriosis rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151: 1218-1225.
- [9] Wang J, Yuan Z, Zhao H, et al. Ferulic acid promotes endothelial cells proliferation through up-regulating cyclin D1 and VEGF [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137: 992-997.
- [10] Yang Y, Wang XC, Chen G, et al. Research of therapeutical effect and immunologic mechanism of Jiawei Foshou San on model rats of endometriosis [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2011, 36: 3001-3006.
- [11] He F, Bi HC, Xie ZY, 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: 635-643.
- [12] Shang FH, Feng S, Chen Q, et al. *In vitro* inhibitory effects of Jiawei Foshou San capsule on activity of cytochrome P450 enzymes in rat and human liver microsomes [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 926-930.
- [13] Yan JJ, He X, Feng S, et al. Up-regulation on cytochromes P450 in rat mediated by total alkaloid extract from *Corydalis yanhusuo* [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 306-314.
- [14] Shang FH, Feng S, Zhang FY, et al. Effect of Jiawei Foshou San and its compatibility on hepatic P450 enzyme activity and hepatocyte morphology in rats [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2015, 40: 2030-2036.
- [15] Zhong YH, Shen GL, Yuan H, et al. Evaluation of cytochrome P450 inhibition and induction by psoralen and isopsoralen *in vitro* [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理学与毒理学杂志)*, 2012, 26: 522-528.
- [16] Deng J, Shao J, Markowitz JS, et al. ABC transporters in multi-drug resistance and ADME-Tox of small molecule tyrosine kinase inhibitors [J]. *Pharm Res*, 2014, 31: 2237-2255.
- [17] Ai CH, Sun HX, Li H, et al. *In vitro* inhibition of cytochrome P450 activities by active constituents of Chinese herbal drugs [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2011, 27: 519-523.
- [18] Tan Y, Zhuang XM, Shen GL, et al. Investigation of metabolic kinetics and reaction phenotyping of ligustrazine by using liver microsomes and recombinant human enzymes [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2014, 49: 374-379.
- [19] Sun SY, Wang YQ, Li LP, et al. Stereoselective interaction between tetrahydropalmatine enantiomers and CYP enzymes in human liver microsomes [J]. *Chirality*, 2013, 25: 43-47.
- [20] Jiang B, Cai F, Gao SH, et al. Induction of cytochrome P450 3A by Shexiang Baixin pill and its main components [J]. *Chem Biol Interact*, 2012, 195: 105-113.
- [21] Yan R, Wang Y, Shen WJ, et al. Comparative pharmacokinetics of dehydroevodiamine and coptisine in rat plasma after oral administration of single herbs and Zuojinwan prescription [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82: 1152-1159.
- [22] Li D, Han YL, Yu T, et al. *In vitro* inhibition of Huanglianjiadu Decoction on 6 cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes [J]. *Chin J Chin Pharmacol Ther*, 2012, 17: 131-136.
- [23] Li L, Ye M, Bi K, Guo D. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the identification of *L*-tetrahydropalmatine metabolites in *Penicillium janthinellum* and rats [J]. *Biomed Chromatogr*, 2006, 20: 95-100.
- [24] Wang C, Zhou J, Wang S, et al. Shotgun approach based comparative proteomic analysis of levo-tetrahydropalmatine-induced apoptosis in hepatocytes [J]. *Toxicol Lett*, 2010, 194: 8-15.
- [25] Chen XY, Huang GH, Ma J, et al. Attaching importance to liver injury caused by Chinese herbal medicine [J]. *Chin J Gastroenterol Hepatol (胃肠病学和肝病学杂志)*, 2008, 7: 607-610.
- [26] Zhang YL, Cui YQ, Wang XS, et al. Experimental study on effect of Astragalus granules and Astragalus injection on enzymatic activities of CYP1A2, CYP2D and CYP2C [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2013, 29: 512-519.
- [27] Martignoni M, Groothuis GM, de Kanter R. Species different between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2006, 2: 875-894.