

Cocktail 探针法评价感冒治疗药物对大鼠肝 CYP450 酶活性的作用

林于茜^{1,2,3}, 罗佳怡^{1,2,3}, 王淑美^{1,2,3}, 谢媛媛^{1,2,3*}

(1. 广东药科大学中药学院, 广东广州 510006; 2. 广东省中药质量工程技术研究中心, 广东广州 510006;
3. 国家中医药管理局中药数字化质量评价技术重点实验室, 广东广州 510006)

摘要: 采用 Cocktail 探针药物法评价葛根汤等感冒治疗药物对大鼠肝细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 酶活性的影响。优化大鼠肝微粒体体外孵育体系, 基于液相色谱串联质谱技术 (LC-MS/MS) 建立同时测定大鼠肝微粒体 CYP450 酶中各亚酶探针代谢产物含量的分析方法, Cocktail 探针药物法表征治疗风寒感冒的经典方葛根汤和临床上常用于治疗感冒的西药对乙酰氨基酚、马来酸氯苯那敏、无水咖啡因及盐酸那可汀等对 CYP2D6、CYP2C9、CYP3A4 等亚酶活性的影响, 为它们在临床联合用药安全提供参考。结果表明, 所建立的分析方法稳定可靠, 符合生物样品测定要求。经优化后, 孵育体系中大鼠肝微粒体蛋白浓度为 $3.00 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 孵育时间为 240 min, 终止剂为乙腈, 3 种 CYP 亚酶特异性探针底物右美沙芬、睾酮、甲苯磺丁脲的 K_m 值分别为 21.49、87.33、 $354.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 通过阳性抑制剂验证了所建立孵育体系的有效性。与空白对照组相比, 当各西药浓度和葛根汤提取物浓度分别在 $100.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $3.00 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以内时, 葛根汤提取物、马来酸氯苯那敏及盐酸那可汀对大鼠肝微粒体 CYP2C9、CYP2D6 有抑制作用; 无水咖啡因对大鼠肝微粒体 CYP2C9、CYP3A4 有抑制作用; 对乙酰氨基酚无明显抑制作用; 盐酸那可汀对大鼠肝微粒体 CYP3A4 的诱导作用大于阳性诱导剂活性的 40%, 提示与盐酸那可汀联合用药时, 可能存在一定的药物相互作用风险, 应注意药物治疗剂量。本实验按照广东药科大学实验动物福利伦理委员会指导政策严格执行 (批准号: gdpulacspf2022137)。

关键词: Cocktail 探针法; CYP450 酶; 肝微粒体; 葛根汤; 对乙酰氨基酚; 马来酸氯苯那敏; 无水咖啡因; 盐酸那可汀; 药物相互作用

中图分类号: R283.6 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)04-1103-12

Effects evaluation of cold treatment drugs on the enzymatic activities of rat hepatic CYP450 utilizing the Cocktail probe method

LIN Yu-qian^{1,2,3}, LUO Jia-yi^{1,2,3}, WANG Shu-mei^{1,2,3}, XIE Yuan-yuan^{1,2,3*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;
2. Guangdong Provincial Traditional Chinese Medicine Quality Engineering and Technology Research Center, Guangzhou 510006, China; 3. Key Laboratory of Digital Quality Evaluation Technology of Traditional Chinese Medicine, National Administration of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Cocktail probe drug method was used to evaluate the effect of cold treatment drugs such as Gegen Decoction on cytochrome P450 (CYP450) enzyme activity in rat liver. The *in vitro* incubation system of rat liver microsomes was optimized. Based on LC tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), an analytical method for simultaneous determination of the content of metabolites of each subenzyme probe in rat liver microsome CYP450 enzyme was established. Cocktail probe drug method was used to characterize the effects of Gegen Decoction, a

收稿日期: 2024-10-18; 修回日期: 2025-01-15.

基金项目: 广东省药品监督管理局科技创新项目 (2023ZDZ03).

*通讯作者 E-mail: yuanyuan8078@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-1007

classical prescription for the treatment of wind-cold cold, and acetaminophen, chlorpheniramine maleate, anhydrous caffeine and nactotine hydrochloride, which were commonly used in the treatment of cold, on the activity of CYP2D6, CYP2C9, CYP3A4 and other sub-enzymes in rat liver microsomes, so as to provide reference for the safety of clinical drug combination. The results showed that the established analysis method was stable and reliable, which met the requirements of biological sample determination. After optimization, the protein concentration of rat liver microsomes in the incubation system was $3.00 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, the incubation time was 240 min, and the terminator was acetonitrile. The K_m values of three CYP subenzyme specific probe substrates dextromethorphan, testosterone and tolbutamide were 21.49, 87.33 and $354.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The effectiveness of the established incubation system was verified by positive inhibitors. Compared with the blank control group, when the concentration of each Western medicine and the concentration of Gegen Decoction extract were within $100.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $3.00 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively, Gegen Decoction extract, chlorpheniramine maleate and noscapine hydrochloride had inhibitory effects on CYP2C9 and CYP2D6 enzymes in rat liver microsomes; anhydrous caffeine had inhibitory effects on CYP2C9 and CYP3A4 enzymes in rat liver microsomes; no significant inhibitory effect on acetaminophen; the induction effect of narcotine hydrochloride on CYP3A4 enzyme in rat liver microsomes was greater than 40% of the activity of positive inducer, suggesting that there may be a certain risk of drug interaction when combined with narcotine hydrochloride, and attention should be paid to the dose of drug treatment. The experimental protocol strictly adhered to the guidelines of the Ethics Committee of Animal Research of Guangdong Pharmaceutical University (Approval: gdpulacspf2022137).

Key words: Cocktail probe method; CYP450 enzyme; liver microsome; Gegen Decoction; acetaminophen; chlorpheniramine maleate; anhydrous caffeine; narcotine hydrochloride; drug interaction

中、西医并存是我国医疗体系的重要特征, 中药与西药联合使用的情况普遍存在。合理的中西药联用可达到增效减毒的目的, 但也可能因相互作用 (drug-drug interaction, DDI) 产生不良后果^[1]。细胞色素P450 (cytochrome P450, CYP450) 是参与药物在体内代谢的关键酶, 超过90%的DDI由CYP450介导^[2-4]。当一种药物引起体内CYP450药物代谢酶活性改变时, 将引起另一种联合使用的药物代谢特征发生改变, 产生药物-药物相互作用, 影响药物的疗效和安全^[1]。因此, 人用药品技术要求国际协调理事会 (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH) 建议在新药研发过程中, 确定药物的代谢途径、参与药物代谢的亚酶及药物对酶的作用^[5]。但目前关于中西药合用对CYP450酶活性影响的研究还比较少。

以肝脏为基础的体外药物代谢模型可直接观察到特定代谢亚酶对底物代谢的选择性^[5-7]。Cocktail探针法通过测定多种特异性探针药物与CYP450酶反应后, 其代谢产物含量的变化来评价酶的活性, 并根据酶活性变化评估药物对CYP450酶的诱导或抑制作用, 是体外确定药物作为DDI受变药或促变药风险的常用方法之一^[8], 在阐明中药复方配伍规律、揭示中药配伍禁忌的科学内涵等方面均有应用^[9-12]。

感冒是由六淫、时行病毒侵袭人体而发病, 这些外邪侵入体内, 与正气相争, 导致发热、恶寒、头痛等症

状。临床上常用西药来缓解感冒症状, 并根据中医辨证使用中药复方制剂以“治本”。如收载于《伤寒论》的葛根汤与对乙酰氨基酚、马来酸氯苯那敏、无水咖啡因及盐酸那可汀等联用治疗风寒感冒, 疗效显著^[13,14]。虽已有研究探讨了葛根汤、马来酸氯苯那敏等对CYP450酶活性的影响^[15-17]。但葛根汤与对乙酰氨基酚、马来酸氯苯那敏、咖啡因及盐酸那可汀联合用药时是否存在药物相互作用风险仍未见报道。

因此, 本研究以参与药物代谢的3种亚酶CYP2C9、CYP2D6和CYP3A4为对象, 根据美国FDA的《关于药物相互作用研究的指南》, 选择3种CYP亚酶对应的特异性混合探针底物, 构建大鼠肝微粒体孵育体系^[7]。各底物经特定的CYP450亚酶催化后生成代谢产物的反应式如图1所示。采用液相色谱串联质谱技术 (LC-MS/MS) 建立同时测定大鼠肝微粒体CYP450酶中各亚酶探针代谢产物含量的分析方法。基于Cocktail探针药物法表征治疗风寒感冒的经典方葛根汤和临床上常用于治疗感冒的西药对乙酰氨基酚、马来酸氯苯那敏、无水咖啡因及盐酸那可汀等对CYP2D6、CYP2C9、CYP3A4等亚酶活性的影响, 以期为它们临床联合用药安全提供参考。

材料与方法

试剂和药品 氧化型辅酶II钠 (NADPN₂, 批号: 3100022)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G-6-PDH, 批号:

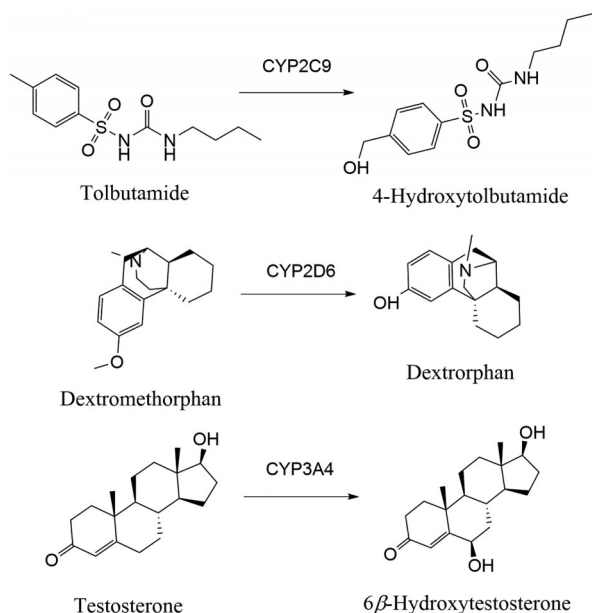


Figure 1 Reaction of each substrate catalyzed by CYP450 sub-enzymes

BA10283580)、酮康唑 (ketoconazole, 批号: 20230302) 及牛血清白蛋白 V (bovine albumin, 批号: 420E056) 均购自索莱宝科技有限公司; 6-磷酸葡萄糖 (G-6-P, 批号: O28GS165980) 购自源叶生物有限公司; 考马斯亮蓝 G250 (批号: 20190530) 购自国药集团化学试剂有限公司; 华法林钠 (warfarin sodium, 批号: CHB210113)、甲苯磺丁脲 (tolbutamide, 批号: CHB201124)、睾酮 (testosterone, 批号: CHB-G-027)、4-羟基甲苯磺丁脲 (4-hydroxy tolbutamide, 批号: CHB-Q-284)、右啡烷 (dextrorphan, 批号: CHB-Y-489)、6 β -羟基睾酮 (6 β -hydroxy testosterone, 批号: CHB210920)、奎尼丁 (quinidine, 批号: CHB201219)、磺胺苯吡唑 (sulfaphenazole, 批号: CHB201221)、无水咖啡因 (anhydrous caffeine, 批号: CHB190630)、盐酸那可汀 (narcotin hydrochloride, 批号: CHB190329) 和对乙酰氨基酚 (acetaminophen, 批号: CHB180228) 均购自成都克洛玛生物科技有限公司; 氢溴酸右美沙芬 (dextromethorphan hydrobromide, 批号: 100201-201204) 和马来酸氯苯那敏 (chlorpheniramine maleate, 批号: 100047-200606) 购自中国食品药品检定研究院; 利福平 (rifampicin, 批号: L2230020) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 本研究所用对照品纯度均大于 98%。葛根、桂枝、炒白芍、炙甘草等中药饮片购于广东省中医院大学城医院。生姜、大枣购于超市。麻黄由中国中医科学院中药研究所代云桃研究员提供并鉴定。磷酸二氢钾 (批号: 032089) 和磷酸氢二钾 (批号: 052026) 均购自天津市致远化学试剂有限公司。质谱级甲酸 (批

号: Lot 220622) 和乙腈 (批号: NOT 224288) 均购自美国赛默飞世尔科技公司; 色谱级甲醇 (批号: Me-00040203) 购自瑞典 Oceanpak 公司。

实验动物 SPF级SD大鼠, 雄性, 体重 260~280 g, 购自广东省医学实验动物中心, 动物许可证号 SCXK (粤) 2022-0002; 实验单位使用许可证号 SYXK (粤) 2017-0125。动物饲养于广东药科大学动物实验中心, 饲养环境温度 20~23 °C, 相对湿度 50%~60%, 光照时间为每天 8:00 到 20:00, 自由摄食、饮水。实验规程和方案经广东药科大学实验动物福利伦理委员会批准 (批准号: gdpulacspf2022137)。

仪器 Waters ACQUITY TQD 液相色谱质谱仪-三重四极杆液质联用仪 (美国 Waters 公司, 包括二元梯度泵、自动进样器、柱温箱、三重四级杆质量分析器和 Masslynx4.1 质谱工作站); XHF-DY 高速分散器 (宁波新芝生物科技股份有限公司); SQP 型十万分之一电子天平 (德国赛多利斯科学仪器有限公司); HWS-26 电热恒温水浴锅 (上海尚道仪器制造有限公司); BMB Free-17 台式高速冷冻离心机 (广州博美科学仪器有限公司); UV-2600 紫外可见分光光度计 [岛津仪器 (苏州) 有限公司]; VOR7EX-5 涡旋仪 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); MTC-100 恒温混匀仪 (杭州米欧仪器有限公司)。

试剂配制

Tris-HCl 储存液配制 (0.1 mol·L⁻¹) 称取 Tris-base 粉末 12.11 g, 加入纯水 500 mL, 浓盐酸调节 pH 至 7.4, 再加纯水定容至 1 000 mL。

磷酸盐缓冲液 (0.1 mol·L⁻¹) 称取磷酸二氢钾 6.80 g, 溶于 50 mL 纯水中, 为 A 液; 磷酸氢二钾 22.80 g, 溶于 100 mL 纯水中, 为 B 液; 取 A 液 19.8 mL 与 B 液 80.2 mL 混合, 加入纯水 900 mL, 混合均匀。

NADPH 再生体系 13 mmol·L⁻¹ 氧化型辅酶 II 二钠 (NADPN₂), 33 mmol·L⁻¹ 6-磷酸葡萄糖 (G-6-P), 4 U·mL⁻¹ 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G-6-PDH) 和 33 mmol·L⁻¹ 氯化镁。

内标溶液配制 称取定量华法林钠 (内标) 标准品适量, 用乙腈溶解、定容, 配制内标溶液。

考马斯亮蓝溶液配制 称取考马斯亮蓝溶液 100 mg, 加入 50 mL 95% 乙醇, 超声 30 min, 充分溶解。加 120 mL 磷酸, 混匀, 用纯水定容至 1 000 mL, 混合均匀。

牛血清蛋白溶液配制 精密称取牛血清蛋白 2.33 mg, 用纯水定容至 10 mL, 摇匀。

底物、代谢产物标准溶液的配制 称取定量甲苯磺丁脲、右美沙芬溶解于二甲基亚砜中, 睾酮、6 β -羟基

睾酮、4-羟基甲苯磺丁脲、右啡烷溶解于甲醇中, 配置成标准溶液密封于4 °C冰箱, 使用时吸取定量母液, 用磷酸盐缓冲液稀释。

标准曲线和质控样品 取各代谢产物适量与60 °C失活30 min的肝微粒体蛋白40 μL (质量浓度为3.00 mg·mL⁻¹), 加磷酸盐缓冲液至200 μL, 加200 μL含华法林钠的乙腈溶液 (内标), 混合均匀, 12 000 ×g, 4 °C, 离心10 min, 取上清液进样分析。

实验共选用3个不同浓度的质控样品, 分别为低、中、高浓度, 不同浓度的质控样品中各代谢产物的浓度分别为4-羟基甲苯磺丁脲 (1.56×10⁻²、6.25×10⁻¹、2.50 μg·mL⁻¹); 右啡烷 (0.74、14.80、23.75 μg·mL⁻¹); 右啡烷 (0.08、1.60、6.40 μg·mL⁻¹)。

葛根汤供试品溶液制备 分别称取葛根冻干粉38.00 mg、麻黄冻干粉25.00 mg、桂枝冻干粉3.00 mg、白芍冻干粉13.00 mg、甘草冻干粉25.00 mg、生姜冻干粉2.50 mg、大枣冻干粉44.50 mg, 溶于10 mL蒸馏水中, 涡旋5 min, 40 °C超声30 min, 使其充分溶解, 得到15.10 mg·mL⁻¹的葛根汤供试品溶液。

各西药对照品溶液配制 分别精密称取对乙酰氨基酚、马来酸氯苯那敏、无水咖啡因适量, 溶于蒸馏水中; 称取盐酸那可汀适量, 溶于甲醇溶液中, 涡旋5 min, 40 °C超声30 min, 使其充分溶解, 配制成1.00 mmol·L⁻¹的各西药母液。

大鼠肝微粒体制备 将SD大鼠麻醉后取其肝脏, 用冰冷的生理盐水清洗离体肝脏至土黄色, 用滤纸吸干水分, 称重后加入4倍量冰冻过的Tris-HCl缓冲液, 12 000 ×g匀浆3次, 每次12 s, 制成肝匀浆; 第一次离心: 4 °C, 9 000 ×g, 离心20 min, 去除上层脂肪后, 取上清液进行第二次离心: 4 °C, 10 500 ×g, 离心60 min, 取沉淀, 即得大鼠肝微粒体; 沉淀加入4倍量Tris-HCl缓冲液重悬, 用一次性滴管吹打使混匀, 分装后冻存于-80 °C冰箱。

分析条件

色谱条件 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.9 μm, 安捷伦科技有限公司, 美国); 流动相: 0.1% 甲酸-水 (A) 和乙腈 (B), 洗脱梯度:

0~2 min, 5%→30% B; 2~5.2 min, 30%→95% B; 5.2~12 min, 95% B; 12~15 min, 95%→5% B; 15~20 min, 5% B。进样体积: 1 μL, 流速: 0.4 mL·min⁻¹, 柱温: 40 °C。

质谱条件 离子源使用电喷雾离子源, 毛细管电压3 kV, 离子源温度400 °C; 去溶剂气为氮气 (650 L·h⁻¹); 扫描方式为正负离子分开扫描 (ES+, ES-); 检测方式为选择离子检测模式 (MRM模式), 用于定量的各化合物质谱信息见表1。

方法学考察

选择性 将经60 °C加热失活的肝微粒体样品加入到由磷酸盐缓冲液组成的孵育体系, 作为空白孵育样品。将空白孵育样品与加入代谢产物以及内标的肝微粒体孵育样品图谱进行比较, 评价所建立方法的专属性。

定量限 取代谢产物右啡烷、6β-羟基睾酮和4-羟基甲苯磺丁脲标准品母液逐级稀释, 以信噪比为10的浓度为最低定量限。

线性关系 分别取各代谢产物适量, 加入60 °C失活30 min的肝微粒体蛋白40 μL (质量浓度为3.00 mg·mL⁻¹), 加磷酸盐缓冲液至200 μL, 加入200 μL含华法林钠的乙腈溶液 (内标), 混合均匀, 离心10 min (12 000 ×g, 4 °C), 取上清液进样分析。

准确度和精密度 分别平行制备5份低、中、高三个浓度质控样品, 连续测定6次, 通过考察各浓度代谢产物与内标物质的相对峰面积的RSD, 得到日内精密度; 连续测定3天, 得到日间精密度。按“准确度 = 测得值/真实值×100%”计算准确度。

稳定性 分别平行制备低、中、高三个浓度的质控样品共5份, 室温下放置1、2、4、8、12和24 h后, 通过考察代谢产物与内标物质的相对峰面积的RSD, 评价稳定性。

基质效应 考察除分析物外的其他组分 (基质) 对分析物的测定是否存在干扰。A: 取低、中、高浓度混合代谢产物溶液, 加磷酸盐缓冲液至200 μL, 加200 μL含华法林钠 (内标) 的乙腈溶液, 混合均匀, 离心10 min (10 500 ×g, 4 °C) 后, 取上清液进样分析。B: 取低、中、高浓度混合代谢产物溶液, 分别与60 °C失活30 min的

Table 1 Mass spectrometry information of each compound

| Compound group | Compound | Detection of ion pairs | Ion mode | Collision voltage/eV |
|-------------------|-------------------------|------------------------|----------|----------------------|
| Probe substrates | Tolbutamide | 271.00→91.07 | ES+ | 30 |
| | Dextromethorphan | 272.16→147.10 | ES+ | 32 |
| | Testosterone | 289.30→97.25 | ES+ | 20 |
| Metabolite | 4-Hydroxy tolbutamide | 285.19→186.32 | ES- | 18 |
| | Dextrorphan | 258.33→157.32 | ES+ | 39 |
| | 6β-Hydroxy testosterone | 305.30→269.42 | ES+ | 16 |
| Internal standard | Warfarin sodium | 307.21→161.28 | ES- | 20 |

肝微粒体蛋白 40 μL , 加磷酸盐至 200 μL , 加 200 μL 含华法林钠 (内标) 的乙腈溶液, 混合均匀, 离心 10 min (10 500 $\times\text{g}$, 4 $^{\circ}\text{C}$) 后, 取上清液进样分析。以质控样品各化合物的相对峰面积 (B) 与同浓度标准品溶液的相对峰面积 (A) 的比值计算基质效应。

大鼠肝微粒体蛋白含量测定 采用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。

标准曲线 精密吸取牛血清蛋白 2.37 mg, 用蒸馏水定容至 10 mL, 摇匀, 得浓度为 $2.37 \times 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的牛血清蛋白溶液。精密吸取 $2.37 \times 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的牛血清蛋白 0.02、0.07、0.09、0.13、0.15、0.18 和 0.20 mL, 分别加蒸馏水至 1 mL, 加入考马斯亮蓝溶液 (稀释 4 倍) 5 mL, 涡旋 2 min, 静置 10 min, 采用紫外分光光度法测定 595 nm 下吸光度。分别以牛血清蛋白浓度和吸光度值为横、纵坐标, 绘制标准曲线。

肝微粒体蛋白含量测定 将大鼠肝微粒体稀释 400 倍后, 取 1 mL, 加入考马斯亮蓝溶液 (稀释 4 倍) 5 mL, 涡旋 2 min, 静置 10 min, 采用紫外分光光度法测定 595 nm 下吸光度。制备 3 个平行样本, 每个样本测 3 次, 以平均值计算蛋白含量。

大鼠肝微粒体孵育方法及优化

肝微粒体孵育方法 精密吸取大鼠肝微粒体适量 (蛋白浓度为 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 加入各探针底物适量, 加磷酸盐缓冲液补足体系至 180 μL 。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 预孵育 10 min, 加入同时预孵育 10 min 的 NADPH 体系 20 μL ($13 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氧化型辅酶 II 钠, $33 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-磷酸葡萄糖, $4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 6-磷酸葡萄糖脱氢酶, $33 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化镁) 启动反应, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 加入 200 μL 冰冷的终止剂, 终止反应, 混匀后, 离心 10 min (10 500 $\times\text{g}$, 4 $^{\circ}\text{C}$), 取上清液进样检测。

孵育体系优化 考察不同肝微粒体用量 (蛋白浓度 0.30、0.50、0.80、1.00、1.50、2.00、3.00 和 $5.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、不同孵育时间 (30、60、90、120、180、240 和 300 min) 和不同终止剂 (①甲醇; ②乙腈; ③甲醇:乙腈 = 1:1) 对酶催化能力的影响。

酶动力学分析 通过对不同底物进行酶动力学分析, 计算各探针底物的 K_m 值, 作为最适底物浓度。 K_m 值是酶促反应速度达到最大反应速度一半时所对应的底物浓度, 是酶的特征常数之一。

肝微粒体孵育体系验证 特异性阳性抑制剂是指明确可抑制某亚酶的药物, 通常以酶活性为 50% 时阳性抑制剂的浓度表示其对 CYP 酶抑制程度 (IC_{50} 值)。在孵育体系中加入 CYP2D6、CYP2C9、CYP3A4 亚酶的特异性抑制剂, 测定不同浓度阳性抑制剂对酶活性的影响, 计算阳性抑制剂 IC_{50} 值。

不同药物对大鼠肝微粒体 CYP450 酶活性的影响 考察各西药浓度在 $100.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以内时, 葛根汤提取物浓度在 $3.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以内时, 对大鼠肝微粒体 CYP3A4、CYP2D6、CYP2C9 酶活性的影响。

葛根汤提取物与西药共同作用对大鼠肝微粒体 CYP450 酶活性影响 采用优化后的孵育方法考察葛根汤提取物、4 个西药以及葛根汤提取物与 4 个西药共同作用对大鼠肝 CYP3A4、CYP2D6、CYP2C9 活性的影响, 并设置空白组进行对照, 葛根汤提取物浓度为 $151.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 乙酰氨基酚浓度为 $240.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 马来酸氯苯那敏浓度为 $2.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 无水咖啡因浓度为 $50.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 盐酸那可汀浓度为 $10.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

数据处理 利用 GraphPad Prism 9.5.1 计算各探针底物的酶促动力学参数 K_m 值; 计算各阳性抑制剂对各亚酶抑制作用的 IC_{50} 值。

CYP450 酶抑制实验 相对酶活性 (%) = 不同药物组代谢产物生成量/空白对照组代谢产物生成量 $\times 100\%$ 。以相对酶活性为纵坐标, 药物浓度的对数值为横坐标, 使用 GraphPad Prism 9.5.1 绘制抑制曲线, 并通过“剂量-反应抑制模型”计算 IC_{50} 值。对于 $\text{IC}_{50} > 100.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的药物, 用抑制率评价其对 CYP 各亚酶的抑制作用。抑制率 (%) = (空白组相对酶活性 - 药物组相对酶活性)/空白组相对酶活性 $\times 100\%$ 。

CYP 酶诱导实验 根据美国 FDA 推荐的酶诱导评价标准, 以受试药物组酶活性相对于空白对照组的提高大于阳性对照组酶活性提高的 40%, 为受试药物酶诱导作用的阈值。

统计学分析 实验结果以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 所得数据采用 GraphPad Prism 9.5.1 进行统计和作图。采用 t 检验评估统计学差异, 当 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

结果

1 方法学验证

1.1 选择性 比较空白孵育样品 (经 60 $^{\circ}\text{C}$ 加热失活的大鼠肝微粒体加入到由磷酸盐缓冲液组成的孵育体系) 与加入代谢产物以及内标标准品的肝微粒体孵育样品, 评价所建立方法的选择性。如图 2 所示, 肝微粒体基质对实验所需分析的目标代谢产物以及内标的测定均不产生干扰, 方法专属性良好。

1.2 最低定量限 依据信噪比 10 确定基质样品中各代谢产物的最低定量限 (LOQ)。右啡烷、 6β -羟基睾酮和 4-羟基甲苯磺丁脲的最低定量限分别为 1.58×10^{-4} 、 1.00×10^{-2} 和 $1.00 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.3 线性关系 以各代谢产物的浓度为横坐标, 相对

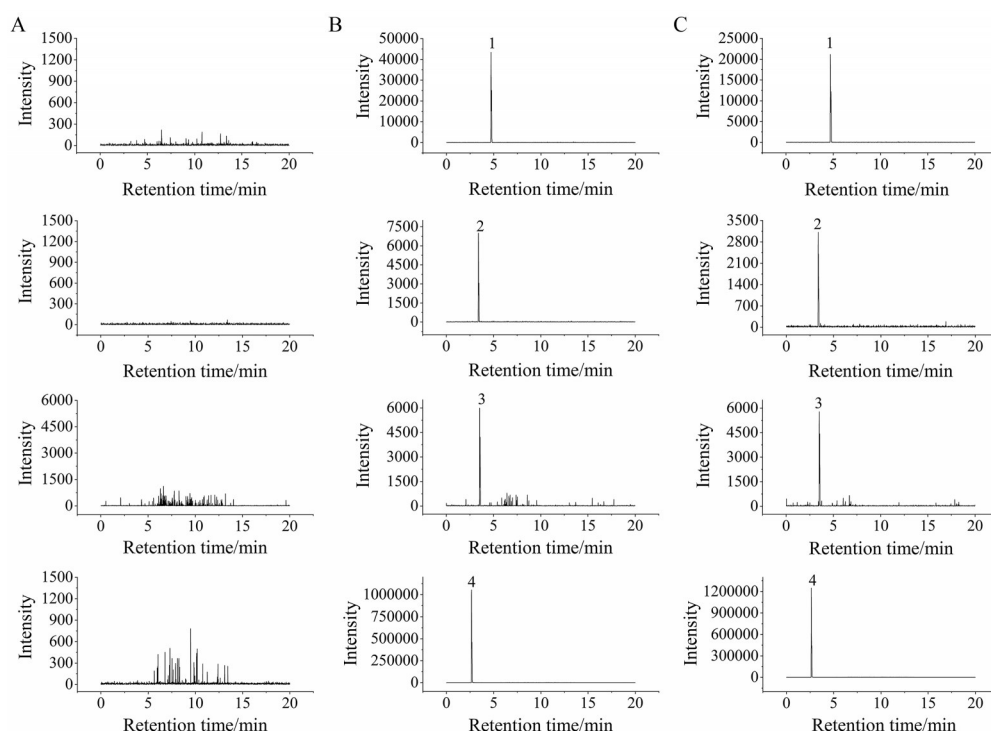


Figure 2 Extracted ion chromatogram of three metabolites of specific probe substrates. A: Blank liver microsome; B: Spiked liver microsome with three metabolites of specific substrates; C: Liver microsome samples after incubation. 1: Warfarin sodium (internal standard); 2: 4-Hydroxyl tolbutamide (metabolite of tolbutamide catalyzed by CYP2C9); 3: 6 β -Hydroxy testosterone (metabolite of dextromethorphan catalyzed by CYP3A4); 4: Dextrorphan (metabolite of testosterone catalyzed by CYP2D6)

峰面积为纵坐标, 拟合标准曲线。各化合物标准曲线及线性范围如表 2 所示, 3 个代谢产物在实验条件下, 显示出良好的线性关系。

1.4 准确度和精密度 分别取 5 份低、中、高三个浓度的质控样品, 连续测定 6 次, 计算各浓度代谢产物与内标物质的相对峰面积的 RSD, 其中, 右啡烷的 RSD 在 1.90%~2.90% 内, 6 β -羟基睾酮的 RSD 在 1.40%~12.50% 内, 4-羟基甲苯磺丁脲的 RSD 在 1.90%~5.30% 内, 均小于 15%; 连续测定 3 天, 计算各浓度代谢产物与内标物质的相对峰面积的 RSD, 右啡烷的 RSD 在 4.30%~8.90% 内; 6 β -羟基睾酮的 RSD 在 9.70%~18.60% 内; 4-羟基甲苯磺丁脲的 RSD 在 4.70%~10.90% 内; 均小于 20.00%, 所建立方法精密度符合生物样品测定相关要求。不同浓度右啡烷的准确度为 86.90%~104.10%, 6 β -羟基睾酮的准确度为 86.30%~101.70%, 4-羟基甲苯磺丁脲的准确度为 93.10%~95.10%, 方法准确可靠。

1.5 稳定性 低、中、高三个浓度的质控样品共 5 份, 室温下放置 1、2、4、8、12 和 24 h 后测定, 计算代谢产物与内标物质的相对峰面积的 RSD, 结果表明, 制备好的低、中、高三个浓度的质控样品在室温下放置 24 h 内, 各代谢产物含量的 RSD 值均小于 16.00%, 说明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定性良好。

1.6 基质效应 将低、中、高不同浓度的混合代谢产物标准品与内标溶液分别加入到失活的大鼠肝微粒体蛋白溶液和磷酸盐缓冲液中, 按供试品溶液制备方法进行制备, 考察除分析物外的其他组分(基质)对分析物测定的干扰情况。结果表明, 各待测物的基质效应在 81.00%~118.00% 之间, 无明显基质效应。

2 孵育体系优化

2.1 大鼠肝微粒体蛋白浓度考察 采用考马斯亮蓝法, 测定牛血清蛋白含量, 标准曲线线性回归方程为 $Y = 0.0616X + 0.1977$, 相关系数 $r = 0.9980$, 线性范围为 $4.60 \times 10^{-3} \sim 4.60 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。考察孵育体系中

Table 2 Standard curve equation and linear range of each substance

| CYP450 sub-enzyme | Metabolite | Regression equation | Linear range/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ | r |
|-------------------|---------------------------------|----------------------|--------------------------------------------------|--------|
| CYP2C9 | 4-Hydroxy tolbutamide | $Y = 1.06X + 0.06$ | 0.0016–5.00 | 0.9998 |
| CYP2D6 | Dextrorphan | $Y = 32.31X + 11.23$ | 0.3700–23.75 | 0.9990 |
| CYP3A4 | 6 β -Hydroxy Testosterone | $Y = 2.74X - 0.04$ | 0.0500–15.00 | 0.9990 |

大鼠肝微粒体蛋白浓度对各探针底物代谢产物生成量的影响。以肝微粒体蛋白浓度为横坐标,各亚酶催化底物所生成的代谢产物含量为纵坐标,绘制折线图,结果如图3A所示。在肝微粒体蛋白浓度分别为3.00、1.00和3.00 mg·mL⁻¹时,代谢产物右啡烷、6 β -羟基睾酮和4-羟基甲苯磺丁脲的生成量最大。因此,确定孵育体系中肝微粒体蛋白浓度为3.00 mg·mL⁻¹。

2.2 孵育时间考察 考察不同孵育时间对各探针底物代谢产物生成量的影响。以孵育时间为横坐标,各亚酶催化底物所生成的代谢产物含量为纵坐标,绘制折线图。如图3B所示,右啡烷、4-羟基甲苯磺丁脲在孵育240 min时生成量最大,6 β -羟基睾酮在孵育60 min时生成量最大,240 min次之,故确定孵育时间为240 min。

2.3 终止剂考察 考察不同终止剂对各探针底物代谢产物生成量的影响。以各终止剂为横坐标,各亚酶催化底物所生成的代谢产物含量为纵坐标,绘制折线图。如图3C所示,右啡烷、6 β -羟基睾酮、4-羟基甲苯磺丁脲均在终止剂为乙腈时,生成量最大,故确定终止剂为乙腈。

2.4 酶动力学分析 以底物浓度为横坐标,各探针底物代谢产物生成速率为纵坐标,绘制酶促动力学曲线,拟合各底物的K_m值。大鼠肝微粒体孵育体系中,各代谢产物酶促动力学曲线如图4所示。结果表明,右美沙芬、睾酮、甲苯磺丁脲的K_m值分别为21.49、

87.33和354.7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,据此确定孵育体系中各探针底物浓度。

2.5 肝微粒体孵育体系验证 为验证所建立的孵育体系是否可用于药物对酶活性作用分析,测定了各CYP亚酶的特异性阳性抑制剂在孵育体系中的IC₅₀值。特异性阳性抑制剂在孵育体系中的IC₅₀值(表3)均在文献^[18-25]报道范围内,表明所建立的孵育体系稳定可靠。

Table 3 The half inhibitory concentration (IC₅₀) of specific positive inhibitor

| CYP450 enzyme | Positive inhibitor | IC ₅₀ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | Literature IC ₅₀ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ [18-25] |
|---------------|--------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| CYP2D6 | Quinidine | 1.285 | 0.012-1.780 |
| CYP3A4 | Ketoconazole | 1.168 | 0.007-1.634 |
| CYP2C9 | Sulfaphenazole | 1.049 | 0.050-2.360 |

3 不同药物对大鼠肝微粒体CYP450酶活性的影响

3.1 葛根汤提取物对大鼠肝微粒体CYP450酶活性的影响 不同浓度葛根汤提取物(2.5~3 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)对大鼠肝微粒体CYP450各亚酶抑制作用如图5A所示。

低浓度葛根汤提取物对各亚酶的抑制作用并不明显。随着浓度增加,葛根汤提取物对大鼠肝微粒体CYP2C9活性表现出先诱导再抑制的作用,对大鼠肝微粒体CYP2D6表现出抑制作用。孵育体系中浓度达到3 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,葛根汤提取物对大鼠肝微粒体

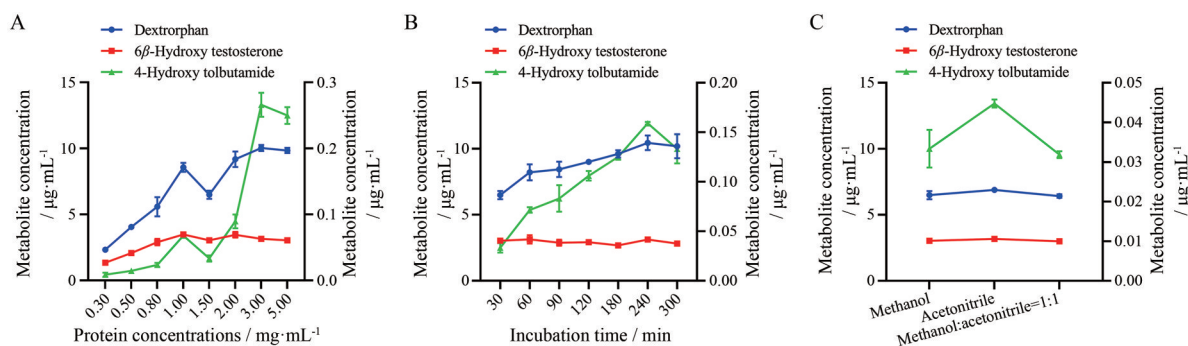


Figure 3 The effect of different incubation conditions on the production of metabolites of probe substrates. A: Protein concentrations of hepatic microsomes; B: Incubation time; C: Reaction terminators

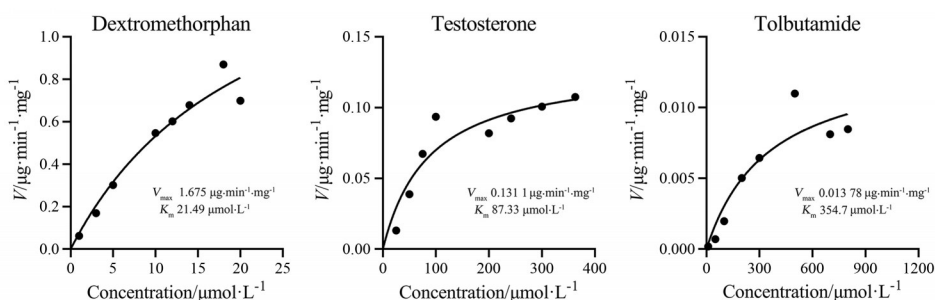


Figure 4 Enzyme kinetics curves of substrates in incubation system of rat liver microsomes

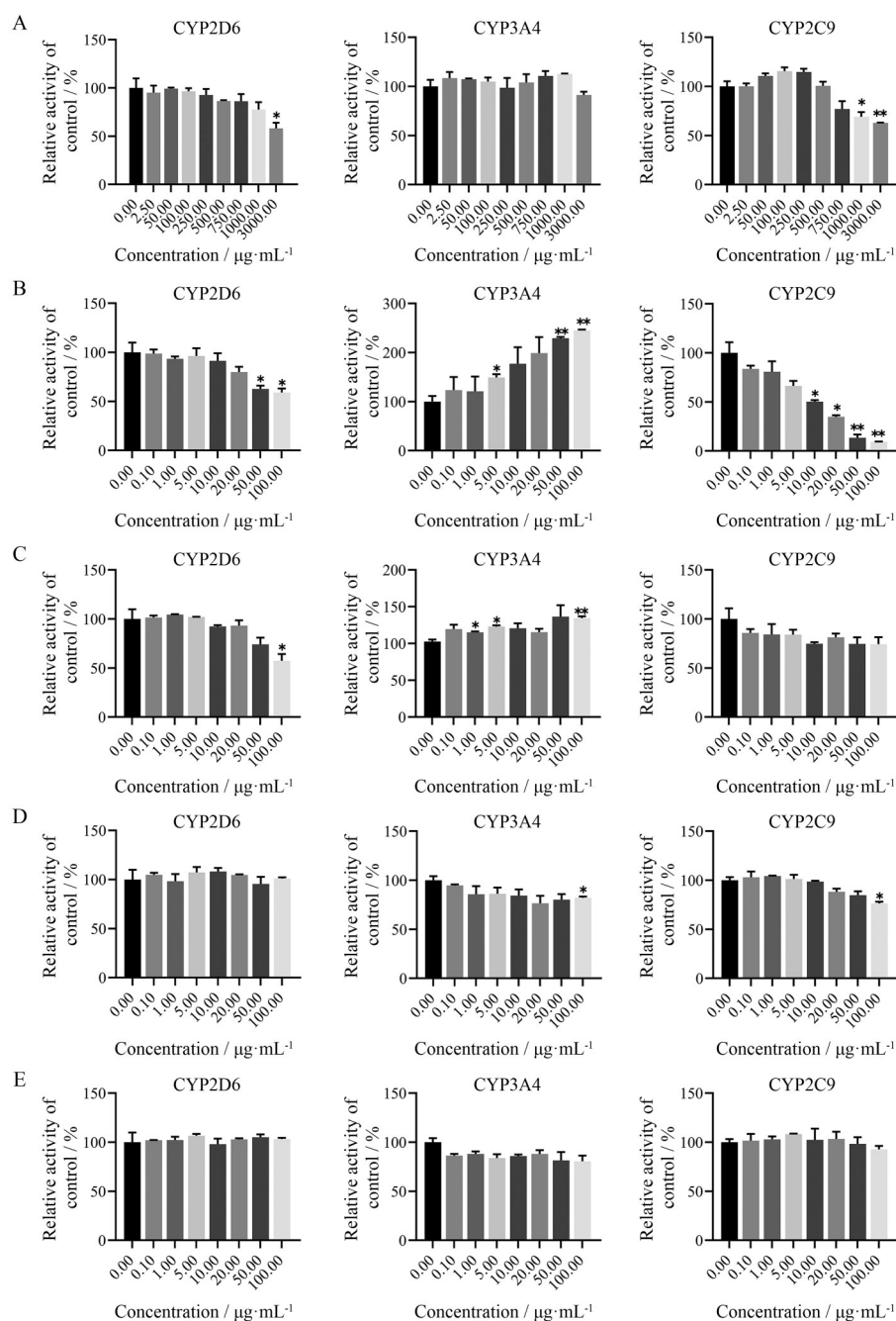


Figure 5 Effects of Gegen Decoction extract and Western medicine on the activity of CYP450 enzyme in rat liver microsome. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs blank group. A–E represents effects of Gegen Decoction extract, narcotine hydrochloride, chlorpheniramine maleate, anhydrous caffeine, acetaminophen on CYP450 enzyme activities, respectively

CYP2D6、CYP2C9的抑制率分别为41.87%、37.15%。

3.2 盐酸那可汀对大鼠肝微粒体 CYP450 酶活性的影响 盐酸那可汀浓度在 $100.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以内时, 随着浓度增大, 表现出对大鼠肝微粒体 CYP2D6、CYP2C9 活性明显的抑制作用 (图 5B)。当盐酸那可汀浓度为 $10.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, CYP2C9 活性已达到 50% 以下, 说明盐酸那可汀可能对大鼠肝微粒体 CYP2C9 的抑制作用较强。计算盐酸那可汀对于大鼠肝微粒

体 CYP2C9、CYP2D6 的 IC_{50} 值, 分别为 8.63 ± 0.61 、 $129.80 \pm 2.20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。根据 FDA 指南相关规定, 当 IC_{50} 介于 $1 \sim 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间时, 被认为是中等程度抑制剂; 提示盐酸那可汀可能是 CYP2C9 中等程度的抑制剂。

此外, 盐酸那可汀表现出对大鼠肝微粒体 CYP3A4 有明显的诱导作用。与对照组相比, 当盐酸那可汀和利福平的浓度均为 $20.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对大鼠肝微粒体

CYP3A4活性的诱导倍数分别为1.98和2.11, 盐酸那可汀的诱导作用几乎与CYP3A4阳性诱导剂利福平的诱导作用相同, 提示在与经CYP3A4代谢的药物联合使用时, 应注意药物治疗剂量。

3.3 马来酸氯苯那敏对大鼠肝微粒体CYP450酶活性的影响 浓度为 $100.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的马来酸氯苯那敏对大鼠肝微粒体CYP2D6具有较明显的抑制作用, 抑制率为42.79%; 对CYP3A4具有微弱的诱导作用(图5C)。孵育体系中药物浓度为 $100.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对CYP2C9的抑制率为25.69%。

3.4 无水咖啡因对大鼠肝微粒体CYP450酶活性的影响 无水咖啡因浓度为 $100.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对大鼠肝微粒体CYP3A4、CYP2C9有微弱的抑制作用, 抑制率分别为17.98%、23.58%, 对CYP2D6无明显抑制作用(图5D)。

3.5 对乙酰氨基酚对大鼠肝微粒体CYP450酶活性的影响 如图5E所示, 对乙酰氨基酚浓度在 $100.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内时对大鼠肝微粒体CYP2D6、CYP2C9及CYP3A4亚酶均无明显抑制作用。

3.6 葛根汤提取物与西药共同作用对大鼠肝微粒体CYP450酶活性影响 考察葛根汤提取物($150.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)与对乙酰氨基酚($240.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、马来酸氯苯那敏($2.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、无水咖啡因($50.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和盐酸那可汀($10.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)共同作用对大鼠肝微粒体CYP450酶活性的影响。如图6所示, 葛根汤提取物对大鼠肝微粒体各亚酶活性影响较小。4个西药共同作用时对CYP2D6和CYP2C9的活性表现出明显的抑制作用, 加入葛根汤提取物后, 能微弱地提高大鼠肝微粒体CYP2D6活性; 但对于CYP2C9来说, 葛根汤提取物与4个西药联用后反而降低了其活性。4个西药共同作用对CYP3A4表现出较明显的诱导作用, 提示葛根汤提取物与4个西药间可能存在DDI风险, 临床上两者联合用药时, 应注意药物治疗剂量。

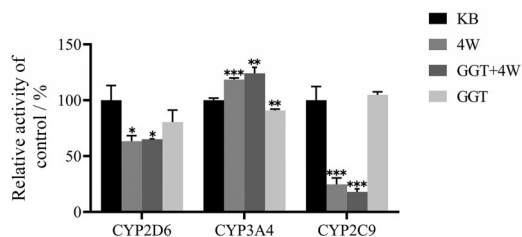


Figure 6 Effects of different groups on the activity of CYP450 enzyme in rat liver microsomes. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs blank group. KB: Blank group; 4W: Mixture of four Western drugs (narcotine hydrochloride, chlorpheniramine maleate, anhydrous caffeine and acetaminophen); GGT: Gegen Decoction extract; GGT+4W: Mixture of GGT and four Western drugs (4W)

讨论

CYP450是一个超家族, 可催化药物在体内进行氧化、还原、水解等反应, 参与生物体内源性和外源性物质的生物转化, 酶的活性高低直接影响药物的代谢速度。CYP450包括CYP2D6、CYP3A4及CYP2C9等亚酶。CYP2D6是CYP450家族的重要成员, 是一种I相药物代谢酶, 主要负责多种药物的氧化代谢, 占肝脏CYP450酶蛋白质量的4%, 却参与并介导了近25%临床常用药物代谢^[26]。CYP3A4占肝内CYP酶总量的近30%, 含量最高, 主要参与体内药物代谢和排泄的过程, 约有50%的药物代谢需要CYP3A4参与^[27]。CYP3A4能促进P-糖蛋白和CYP450酶结合, 从而增加药物的外排效率, 提高药物生物利用度^[27]。CYP2C9是细胞色素P450超家族中的第二亚家族中的一个重要成员, 占肝微粒体P450蛋白总量的较高比例, 能羟化代谢许多不同性质的药物。CYP2C9参与15%~20%的药物代谢, 主要代谢亲脂小分子药物^[28]。它们均在药物代谢中发挥着不可或缺的作用。

Chen等^[29]采用基因重组P450酶系方法评估了葛根汤在治疗传统感冒过程中对4种关键P450亚酶活性的影响, 发现葛根汤能显著抑制大鼠肝微粒体CYP2C19、CYP2D6和CYP2E1的活性。Lee等^[30]研究表明, 葛根汤对P450的8种亚酶(1A2, 2A6, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4)均无显著影响。Takahashi等^[16]研究认为, 葛根汤可抑制人源肝微粒体CYP1A2、CYP2C9和CYP3A4的活性, 其抑制强度顺序为: CYP2C9 > CYP1A2 > CYP3A4。本研究中, 葛根汤提取物对大鼠肝微粒体CYP3A4活性无明显影响, 而对CYP2C9活性的影响则具有剂量依赖性, 对CYP2D6也表现出抑制作用, 与文献^[16, 29, 30]报道基本一致。遗憾的是, 本研究没能在动物模型上考察葛根汤提取物对感冒模型动物肝微粒体CYP450亚酶的影响。

盐酸那可汀为外周性镇咳药, 镇咳作用与可待因相当, 无依赖性, 对呼吸中枢无抑制作用, 适用于不同原因引起的咳嗽。目前尚无盐酸那可汀对CYP450酶活性影响的相关报道。本研究通过SwissADME预测盐酸那可汀可能为CYP2C9、CYP2D6、CYP3A4的抑制剂。进一步通过肝微粒体体外孵育实验, 探讨盐酸那可汀对大鼠CYP2C9、CYP2D6及CYP3A4活性的影响。结果表明, 盐酸那可汀对大鼠肝微粒体CYP2C9、CYP2D6表现出抑制作用, 其 IC_{50} 值分别为 8.63 ± 0.61 、 $129.80 \pm 2.20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 而高浓度的盐酸那可汀(50.00 、 $100.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对大鼠肝微粒体CYP3A4有明显诱导作用, 推测高浓度的药物与相关的受体或酶结合后, 上调药物代谢酶的基因和蛋白表达, 增加

CYP3A4 的表达或活性。盐酸那可汀诱导作用大于阳性诱导剂活性的 40%，提示其在与其他药物联合使用时，可能存在一定的 DDI 风险，应注意药物治疗剂量。

马来酸氯苯那敏随着浓度的增大，表现出对 CYP3A4 的诱导作用及对 CYP2C9、CYP2D6 的抑制作用。它在临床上常与中成药联合使用用于缓解流泪、打喷嚏、流涕等感冒症状。马来酸氯苯那敏在体内首先经由 I 相代谢酶 CYP2D6 代谢，生成羟化代谢产物后经肾脏排泄，在与柴胡联用时，柴胡皂苷 A 和柴胡皂苷 D 均能明显呈浓度依赖性和时间依赖性抑制 CYP2D6 活性，从而抑制马来酸氯苯那敏的代谢^[31]。另一研究表明厚朴提取物也可抑制 CYP2D6 的活性^[31]，因此在使用马来酸氯苯那敏时，应尽量避免与柴胡、厚朴等抑制 CYP2D6 的中药联用，以防引起 DDI。

对乙酰氨基酚和无水咖啡因常联合使用，有研究表明，用对乙酰氨基酚联合咖啡因协同治疗头痛时，咖啡因可加速对乙酰氨基酚的吸收，且镇痛效果是单用对乙酰氨基酚的 1.37 倍，即增强镇痛疗效 37%^[32]。本研究中，无水咖啡因对大鼠肝微粒体 CYP2D6 酶无明显抑制作用，对大鼠肝微粒体 CYP2C9 和 CYP3A4 活性表现出微弱抑制作用。而对乙酰氨基酚浓度在 100.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内时大鼠肝微粒体 CYP2D6、CYP2C9、CYP3A4 无抑制作用。无水咖啡因经 CYP1A2 亚酶代谢，常作为 CYP1A2 亚酶的探针底物使用。研究表明^[33]，黄芪颗粒和黄芪注射液对大鼠 CYP1A2 活性有诱导作用，黄连解毒汤、橘红颗粒等对 CYP1A2 酶活性有抑制作用，因此联用时应注意 DDI。对乙酰氨基酚易引起肝损伤，且 CYP450 的诱导剂可加重对乙酰氨基酚引起的肝损伤。一般正常情况下，服用治疗剂量的对乙酰氨基酚后，大部分对乙酰氨基酚与葡糖醛酸和硫酸结合而解毒，部分对乙酰氨基酚在肝细胞内经 CYP2E1、CYP1A2、CYP3A4 和 CYP2A6 等的作用，转化生成反应性亲电子物 NAPQI，其与谷胱甘肽结合成硫醇尿酸或半胱氨酸衍生物而解毒^[34]。当对乙酰氨基酚达到一定量时，对乙酰氨基酚的代谢途径饱和，过剩的药物会经过其他途径代谢，产生大量半醌类活性中间产物和活性氧，消耗肝脏的谷胱甘肽，使肝脏的抗氧化能力下降，导致损伤^[35]。葛根汤中的白芍及甘草对肝脏有保护作用，白芍提取物对 D-半乳糖胺所致肝损伤和血清谷丙转氨酶升高有明显对抗作用，从而发挥修复肝细胞的作用；甘草可减轻肝细胞变性和坏死程度，降低血清转氨酶活力，提高肝细胞内的糖原和 DNA 含量，促进肝细胞再生，其机制可能是由于中药可改善肝细胞分泌 CYP450 酶^[36]。

药物联用会发生一系列的协同和拮抗作用，产生

增效、减效等一系列结果。本研究中，当葛根汤提取物浓度在 3.00 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以内时，其对大鼠肝微粒体 CYP3A4 活性无明显影响，高浓度葛根汤提取物对大鼠肝微粒体 CYP2C9 和 CYP2D6 表现出明显抑制作用，提示高剂量葛根汤提取物可能会减慢由 CYP2C9 和 CYP2D6 参与代谢的药物的代谢速度，使得药物在体内停留时间延长，增加其血浆浓度，从而可能引发药物蓄积和毒性反应。因此，当葛根汤提取物与由 CYP2D6 代谢的药物马来酸氯苯那敏联用时，可能需要减少马来酸氯苯那敏的用药剂量以避免不良反应。高浓度的盐酸那可汀对大鼠肝微粒体 CYP2C9、CYP2D6 表现出明显的抑制作用，与葛根汤提取物联用时可能会增加对 CYP2C9 和 CYP2D6 的抑制作用从而导致由 CYP2C9 和 CYP2D6 代谢的药物在体内停留时间延长，需根据药物代谢特点，调整药物剂量，确保药物在体内浓度保持在安全有效的范围内。此外，高浓度盐酸那可汀对大鼠肝微粒体 CYP3A4 有明显诱导作用，与其他通过 CYP3A4 代谢的药物合用时，可能会加速后者的代谢过程，可能存在一定的 DDI，从而影响其疗效和安全性。提示临床上葛根汤与马来酸氯苯那敏、盐酸那可汀等西药联合用药，应注意用药治疗剂量。通过进一步研究葛根汤提取物与西药共同作用对大鼠肝微粒体 CYP450 酶活性影响，发现葛根汤提取物对大鼠肝微粒体各亚酶活性影响较小。4 个西药对大鼠肝微粒体 CYP2D6 和 CYP2C9 的相对酶活性表现出明显抑制作用，加入葛根汤提取物后，能微弱地提高大鼠肝微粒体 CYP2D6 酶活性，但对于大鼠肝微粒体 CYP2C9 酶来说，葛根汤提取物与 4 个西药联用后反而降低了其活性。提示葛根汤提取物与 4 个西药间可能存在 DDI 风险，临床上两者联合用药时，应注意药物治疗剂量。本研究采用 Cocktail 探针药物法测定感冒治疗药物葛根汤、盐酸那可汀、马来酸氯苯那敏、对乙酰氨基酚和无水咖啡因对 CYP450 酶活性的影响，为感冒治疗药物联合用药安全提供了参考依据。

作者贡献: 林子茜负责数据的收集和分析、图表的绘制及文章撰写与修改；罗佳怡负责相关实验操作及文章撰写；王淑美和谢媛媛指导本文的选题设计、实验思路与方法建立、实验数据处理、文章撰写。

利益冲突: 本文不存在任何利益冲突。

References

- [1] Kong XY, Chen Q, Wu X, et al. The research progress of interaction between Chinese and Western medicine combination [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med (南京中医药大学学报), 2018, 34: 5-11.

- [2] Strandell J, Wahlin S. Pharmacodynamic and pharmacokinetic drug interactions reported to VigiBase, the WHO global individual case safety report database [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2011, 67: 633-641.
- [3] Wiggins BS, Saseen JJ, Page RL 2nd, et al. Recommendations for management of clinically significant drug-drug interactions with statins and select agents used in patients with cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2016, 134: e468-e495.
- [4] Song FX, Wang R, Yuan YF. Application progress in cytochrome P450 enzymes and research methods of drug metabolism [J]. *Med Recapit (医学综述)*, 2017, 23: 665-669.
- [5] ICH Multidisciplinary Guidelines, M12: Drug Interaction Studies [S/OL]. Beijing: Center for Drug Evaluation, NMPA. 2024-05-21 [2024-10-18]. <https://www.cde.org.cn/ichWeb/guideIch/toGuideIch/4/0>.
- [6] Song CX, Han XH, Guo DL. Application of liver microsomes *in vitro* metabolism in bio-transformation of traditional Chinese medicine [J]. *J Chengdu Univ Tradit Chin Med (成都中医药大学学报)*, 2017, 40: 115-118.
- [7] Liu ZJ, Fu DX, Tang G. Interpretation of FDA drug interaction research guideline (Draft) 2006 edition [J]. *Inter J Pharm Res (国际药学研究杂志)*, 2008, 35: 50-58.
- [8] Zhang WJ, Li MR, Han LF, et al. Evaluation of the effect of psoralen on human cytochrome P450 subunit activities by Cocktail *in vitro* probe method [J]. *J Tianjin Univ Tradit Chin Med (天津中医药大学学报)*, 2018, 37: 494-499.
- [9] Wei WZ, Zhao NN, Lin YF, et al. Evaluation of the effect of ethanol extracts of *Antrodia cinnamomea* on human CYP450 enzyme activity by Cocktail probe method [J]. *Technol Wind (科技风)*, 2021, (3): 139-140.
- [10] Lin J, Lin H, Huang P, et al. Cocktail probe method was used to determine the effect of three different sources of *Asarum* combined with *Veratrum nigrum* on the activity of cytochrome P450 in rat hepatocytes [J]. *J Chin Med Mater (中药材)*, 2014, 37: 1841-1844.
- [11] Cheng L, Wang YW, Wang YL, et al. Compatibility principle research of Yupingfeng powder based on cocktail probe substrates approaches [J]. *Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2013, 38: 618-621.
- [12] Wei WZ, Wang G. Evaluation of the effect of ethanol extracts of *Antrodia innamomea* on rat hepatic CYP450 enzyme activity by Cocktail probe method [J]. *J Shanxi Univ Tradit Chin Med (山西中医药大学学报)*, 2024, 25: 857-864.
- [13] Xie YY, Luo JY, Hu H, et al. Chemical profiling and mechanistic studies of Zhi-Shang-Feng granules against influenza virus by high-performance liquid chromatography coupled with Q exactive focus hybrid quadrupole orbitrap high-resolution mass spectrometry in combination with network pharmacology analysis [J]. *J Sep Sci*, 2023, 46: 2200839.
- [14] Lü SJ, Wang SP, Wu ZQ, et al. Li Shiao's application of Gegen Decoction in the treatment of miscellaneous diseases [J]. *Jiangsu J Tradit Chin Med (江苏中医药)*, 2010, 42: 41-42.
- [15] Seong EJ, Hyekeyung H, Jeong SJ, et al. Effects of Korean traditional herbal formula for common cold on the activities of human CYP450 isozymes [J]. *J Korean Med*, 2014, 35: 47-59.
- [16] Takahashi K, Uejima E, Morisaki T, et al. *In vitro* inhibitory effects of Kampo medicines on metabolic reactions catalyzed by human liver microsomes [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2003, 28: 319-327.
- [17] Guo YL. Drug-Drug Interaction between Chlorpheniramine and Saikosaponin Mediated by CYP2D6 *in vivo* and *in vitro* in Rats (CYP2D6介导的柴胡皂苷与氯苯那敏在大鼠体内、体外相互作用研究) [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2013.
- [18] Wang Z, Zhang HB, Ju BW, et al. *In vitro* inhibitory effects of acteoside on 6 kinds of CYP enzymes in liver microsomes of rats [J]. *China Pharm (中国药房)*, 2022, 33: 685-692.
- [19] Fan HR, Ci XY, Li W, et al. The *in vitro* inhibition and induction of cytochrome P450 activities by bentysrepinine: a novel candidate of anti-hepatitis B virus drug [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 1864-1870.
- [20] Cao Y, Zhong YH, Yuan M, et al. Inhibitory effect of imperatorin and isoimperatorin on activity of cytochrome P450 enzyme in human and rat liver microsomes [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2013, 38: 1237-1241.
- [21] Chen R, Zhou W, Zhang L, et al. Inhibitory effects of cajanonic acid a on 5 kinds of common CYP450 enzyme in human liver microsomes *in vitro* [J]. *China Pharm (中国药房)*, 2021, 32: 195-200.
- [22] Gao L, Song KX, Ren JP, et al. Effects of luteolin on the activities of cytochrome P450 enzymes in rats by Cocktail probe approach [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2022, 31: 590-595.
- [23] Kozakai K, Yamada Y, Oshikata M, et al. Reliable high-throughput method for inhibition assay of 8 cytochrome P450 isoforms using Cocktail of probe substrates and stable isotope-labeled internal standards [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2012, 27: 520-529.
- [24] Feng YY. Study on the Effect of Chinese Medicine Compound UCG on Cytochrome P450 Enzyme Based on Cocktail Probe Method (基于Cocktail探针药物法的中药复方UCG对细胞色素P450酶作用研究) [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2017.
- [25] Liu L, Xiao J, Peng ZH, et al. *In vitro* metabolism of glycyrrhetic acid by human cytochrome P450 [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2011, 46: 81-87.
- [26] Chen JQ. CYP2D6 and ADRB1 Gene Polymorphisms Guide the Individualized Medication of Metoprolol in Elderly Patients with Cardiovascular Diseases (CYP2D6和ADRB1基因多态性指导老年心血管疾病患者美托洛尔个体化用药的研究) [D]. Beijing:

- The Chinese People's Liberation Army Medical College, 2022.
- [27] Han XY, Guo XC, Zhang HX, et al. Effect of epigallocatechin-3-gallate on the activity of cytochrome P450 [J]. *J Prec Med (精准医学杂志)*, 2021, 36: 24-28.
- [28] Huang H, Xiong WN, Tang XJ, et al. Screening of hepatotoxic components and CYP450 inhibitors of *Polygoni Multiflori Radix* based on network toxicology and molecular docking [J]. *Genomics Appl Biol (基因组学与应用生物学)*, 2021, 40: 2863-2873.
- [29] Chen P, Wang J, Zhang HP, et al. Research methods of *in vitro* liver metabolism of drugs [J]. *China Pharm (中国药房)*, 2017, 28: 2703-2707.
- [30] Lee SY, Lee JY, Kang W, et al. Cytochrome P450-mediated herb-drug interaction potential of Galgeun-tang [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 51: 343-349.
- [31] Yu WJ, Zhang B, Zhang WZ. Influence of Magnolia bark extract on CYP2D6 subtype enzyme in rats [J]. *J Clin Med Pract (实用临床医药杂志)*, 2013, 17: 1-3.
- [32] Laska EM, Sunshine A, Mueller F, et al. Caffeine as an analgesic adjuvant [J]. *JAMA*, 1984, 251: 1711-1718.
- [33] 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.
- [34] Zhang HN. Research progress on hepatotoxicity of acetaminophen [J]. *Chin J Hosp Pharm (中国医院药学杂志)*, 2006, 26: 1284-1286.
- [35] Kozer E, Koren G. Management of paracetamol overdose: current controversies [J]. *Drug Saf*, 2001, 24: 503-512.
- [36] Ren P, Ju P. Protective effect on the liver single Chinese medicine [J]. *Chin J Mod Drug App (中国现代药物应用)*, 2011, 5 : 76-77.