

探针药物评价大黄苷元对 P450 酶 CYP1A2 活性的影响

白燕, 冯素香*, 周悌强, 徐艳华, 李建生
(河南中医学院, 郑州 450046)

[摘要] **目的:**研究大黄苷元对大鼠细胞色素 P450 酶(cytochrome P450, CYP450)中 CYP1A2 活性的影响。**方法:**将 SD 大鼠 60 只随机分为 12 组,即空白组,苯巴比妥钠组(PB),地塞米松组(DEX), β -萘黄酮组(β -NF),酮康唑组(KET),大黄苷元不同剂量组;空白组 *ig* 给予 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na),PB,DEX, β -NF 三诱导剂组分别给予苯巴比妥钠注射液 $75\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,地塞米松 $80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, β -萘黄酮 $75\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,KET 抑制剂组给予酮康唑 $82.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,大黄苷元不同剂量组分别给予不同剂量大黄苷元($7.08, 14.40, 30.82, 46.55, 51.63, 61.63, 100.07\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。以非那西丁为探针药物,制得肝微粒体进行孵化实验,样品经处理后,进行高效液相测定其代谢产物对乙酰氨基酚的生成量,研究大黄苷元对 CYP1A2 活性的影响及给药剂量与其活性的关系。**结果:**与空白组、KET 给药组对比,大黄苷元 $61.63, 30.82, 14.40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组与对乙酰氨基酚的生成量有显著差异($P<0.05$),其诱导效应明显弱于 PB 组,DEX 给药组, β -NF 给药组,且随着大黄苷元给药剂量($7.08, 14.40, 30.82, 46.55, 51.63, 61.63, 100.07\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)的增加,对乙酰氨基酚的生成量有增多的趋势。**结论:**大黄苷元对 CYP1A2 有诱导作用,且随其剂量的增加,作用呈增强趋势。

[关键词] 大黄苷元; 细胞色素 P450; 细胞色素 P1A2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)05-0143-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015050143

Aglycone from Rhei Radix et Rhizoma of Probe Drugs for Detecting Influences on CYP1A2 Activity by Rhubarb Aglycone BAI Yan, FENG Su-xiang*, ZHOU Ti-qiang, XU Yan-hua, LI Jian-sheng (Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To study the aglycone from Rhei Radix et Rhizoma (AR) on liver microsomal P450 isozymes/cytochrome P450 (CYP450) CYP1A2 activity in rats by enzyme assays. **Method:** Sixty SD rats were randomly divided into the control group, the phenobarbital sodium (PB) group ($75\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 0.5% sodium carboxyl methyl cellulose, CMC-Na), the dexamethasone (DEX) group ($80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), the beta-naphthoflavone (β -NF) group ($75\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), the ketoconazole (KET) group ($82.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and the different doses of AR groups ($7.08, 14.40, 30.82, 46.55, 51.63, 61.63, 100.07\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). The experiment was performed in the liver microsome and the phenacetin was taken as the probe drug. The acetaminophen concentrations were determined by HPLC and the relationship between CYP1A2 activity and the dosage was conducted. **Result:** Compared with CMC-Na group and the KET group, the production of acetaminophen was very different in the AR groups at $61.63, 30.82, 14.40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($P<0.05$). The induce effect was much weaker than three kinds of induction agents, and it was enhanced with the increasing of the dosage. **Conclusion:** The AR could induce the activity of CYP1A2 in a dose-dependent manner.

[Key words] aglycone from Rhei Radix et Rhizoma; cytochrome P450; cytochrome P1A2

研究表明,大黄苷元对脑缺血损伤具有保护作用,能够抑制血栓形成,保护神经元,其作用可能是通过影响神经细胞凋亡以及相关基因的表达^[1-3]。

药物之间发生相互作用最常见的机制是抑制 P450 酶的活性,细胞色素 P450(CYP450)酶系是微粒体混合功能氧化酶系中最重要氧化酶,临床上超过

[收稿日期] 20140728(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274179);河南省教育厅自然科学研究计划项目(2011A360007)

[第一作者] 白燕,硕士,从事基础医学、中药复方有效组分及配伍研究,Tel:0371-65962746,E-mail:baiyan0371@126.com

[通讯作者] *冯素香,博士,副教授,从事中药质量分析与新药研究,Tel: 0371-65962746,E-mail:fengsx221@163.com

90% 药物由 CYP450 酶的 6 个重要亚型(1A2,2C9,2C19,2D6,2E1 和 3A4)代谢^[4-5],其中 CYP1A2 酶约占肝脏中 P450 酶总量的 13%,参与临床约 20% 药物的代谢^[6]。目前文献中可见运用探针方法评价大黄对 P450 亚型的影响,且表明大黄各单体(大黄酸,大黄素等)对 P450 的亚型有一定的抑制作用^[7]。为了探讨大黄与其他药物联合应用的规律,提高联合用药的安全性,本文从大黄苷元的角度,研究其对 CYP450 酶系中 CYP1A2 的影响^[8]。

非那西丁是 CYP1A2 酶代谢的经典底物之一,其经 CYP1A2 酶所催化发生氧脱乙基化反应生成对乙酰氨基酚,因此常测定对乙酰氨基酚的量来反映 CYP1A2 酶的活性^[9],本文建立鼠肝微粒体中对乙酰氨基酚的 HPLC 测定法,以那西丁作为探针底物,测定 CYP1A2 酶的活性,通过对大黄苷元、酶诱导剂、酶抑制剂生成对乙酰氨基酚量的对比研究,来反映其对 CYP1A2 酶作用。这将为临床上合理应用大黄苷元或含大黄苷元的药物,提供一定的理论指导。

1 材料

1.1 动物 健康 SD 大鼠 60 只,SPF 级,雄性,体重(250 ± 25) g,购于河南省实验动物中心,动物合格证号 SCXK(豫)2010-0002。

1.2 药物及试剂 大黄苷元(含芦荟大黄素 8.7%,大黄酸 11.5%,大黄素 23.1%,大黄酚 26.3%,大黄素甲醚 17.6%),自制。对乙酰氨基酚、非那西丁对照品溶液的制备:精密称取对乙酰氨基酚 20.80 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品储备液(质量浓度为 2.08 g·L⁻¹)。精密称取非那西丁 1.61 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品储备液(质量浓度为 161 μg·L⁻¹)。NADPH 再生系统孵化体系的制备: NADPH 再生系统由 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH 7.40)配制,含有 MgCl₂ 10 mmol·L⁻¹,KCl 10 mmol·L⁻¹和 NADPH 1 mmol·L⁻¹,精密称取 NADPH 1 mg,用 1% NaHCO₃ 定容至 1 mL,即得启动剂。苯巴比妥钠(PB,上海新亚药业公司,批号 010202),地塞米松(DEX),β-萘黄酮(β-NF)及酮康唑(KET)(批号分别为 D1756,N3633,K1003),均购自美国 Sigma 公司(纯度均 > 98%)。非那西丁(中国药品生物制品检定所,批号 100018-200408),对乙酰氨基酚(中国药品生物制品检定所,批号 100095-198904),还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷磷酸(NADPH)购自瑞士 Roche 公司,乙酸乙酯(天津富宇精细化工有限公司,分析纯),实验所用水为纯

净水。

1.3 仪器 e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),3-18K 型高速离心机(配美国 Sigma 公司 12154-H 转子),C₁₈固相萃取柱(天津博纳艾杰尔科技有限公司),F1 移液器(美国 Thermo fisher 集团),ME104E 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多集团),DHG-9053BS-Ⅲ型鼓风干燥箱(上海圣科仪器设备有限公司)。

2 方法

2.1 孵化试验 精密量取 300 μL 孵化液,100 μL CMC-Na 肝微粒体,50 μL 非那西丁,涡旋混合 0.5 min,于 37 ℃恒温箱中预热 5 min,加入 50 μL 启动剂,涡旋混合 1 min,于 37 ℃恒温箱中孵化 30 min,置于 -30 ℃低温冰箱终止反应。

2.2 分组及给药 将大鼠随机分成 12 组,每组 5 只,空白组 *ig* 给予 0.5% CMC-Na 溶液 10 mL·kg⁻¹,PB 诱导组 *ip* 给予 75 mg·kg⁻¹,DEX 诱导组 *ig* 给予 80 mg·kg⁻¹,β-NF 诱导组 *ip* 给予 75 mg·kg⁻¹,Ket 抑制组 *ig* 给予 82.5 mg·kg⁻¹,不同剂量大黄苷元组 *ig* 给予大黄苷元的剂量分别为 7.08,14.40,30.82,46.55,51.63,61.63,100.07 mg·kg⁻¹。诱导剂组和抑制剂组连续给药 3 d,其余各组连续给药 7 d,各组均每日给药 1 次,且均在末次给药 12 h 后禁食不禁水,24 h 后取肝,参考文献[10]方法制备微粒体并测定各组肝微粒体 CYP450 酶含量。

2.3 样品处理及测定方法

2.3.1 样品处理 取孵化实验终止反应后的样品,解冻,涡旋混合 1 min,加 1 mL 乙酸乙酯,涡旋混合 5 min,4 000 r·min⁻¹离心 20 min,吸取上清液,下层再加 1 mL 乙酸乙酯萃取 3 次,合并萃取液,室温,空气流下吹干,加 100 μL 流动相溶解,13 000 r·min⁻¹离心 10 min,离心后取上清液,取 20 μL 进样,进行 HPLC 分析。

2.3.2 色谱条件 Venusil XBPC₁₈ 色谱柱(L)(4.6 mm × 250 mm,5 μm)(天津博纳艾杰尔科技有限公司)。流动相甲醇-水(30:70),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 250 nm,柱温 30 ℃,进样量 20 μL。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组肝微粒体 CYP450 酶含量 与空白组比较,PB 组,DEX 组,β-NF 组,KET 组的 CYP450 酶含量明显升高(*P* < 0.05,*P* < 0.01);与 PB 组,DEX

组,β-NF 组,KET 组比较,大黄苷元不同剂量组的 CYP450 酶含量明显低于以上各组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1。

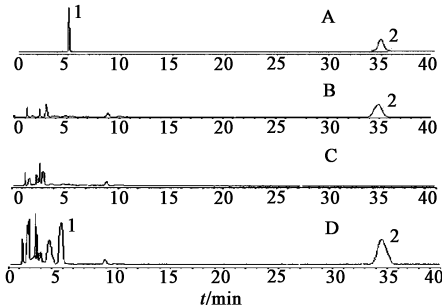
表 1 大黄苷元对大鼠肝微粒体 CYP450 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 1 Effects of the anthraquinones from aglycone from Rhei Radix et Radix et Rhizoma on content of liver microsomal cytochrome P450 in rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	CYP450/μmol·g ⁻¹
空白	—	0.34 ± 0.090
PB	75.00	0.93 ± 0.150 ²⁾
DEX	80.00	0.93 ± 0.043 ²⁾
β-NF	75.00	0.76 ± 0.079 ²⁾
KET	82.50	0.15 ± 0.056 ²⁾
大黄苷元	7.08	0.48 ± 0.031 ¹⁾
	14.40	0.56 ± 0.049 ¹⁾
	30.82	0.44 ± 0.076 ¹⁾
	46.55	0.59 ± 0.060 ¹⁾
	51.63	0.53 ± 0.038 ¹⁾
	61.63	0.68 ± 0.071 ²⁾
	100.07	0.81 ± 0.047 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (图 2 同)。

3.2 方法学评价

3.2.1 方法专属性 以非那西丁为探针,按照以上色谱条件,检测其代谢产物对乙酰氨基酚的生成量,得 CYP1A2 酶活性色谱行为,见图 1。该方法能有效分离样品中各成分,可排除杂质干扰,专属性良好。



A. 对乙酰氨基酚、非那西丁混合对照品;B. 缺肝微粒体阴性样品;C. 缺非那西丁阴性样品;D. 样品;1. 对乙酰氨基酚;2. 非那西丁

图 1 大黄苷元 HPLC
Fig.1 HPLC of aglycone from Rhei Radix et Rhizoma

3.2.2 线性关系 将质量浓度为 0.65,1.3,2.6,5.2,10.4,20.8,41.6 mg·L⁻¹的对乙酰氨基酚溶液,经孵化,按样品处理方法,得对乙酰氨基酚的标准曲线方程为 $Y = 20\,040X - 2\,125.1$ ($R^2 = 0.999\,5$, $n = 7$);结果表明:对乙酰氨基酚在 0.65 ~ 41.6 mg·L⁻¹呈良好的线性关系。采用逐步稀释法得对乙酰氨基酚的最低检测限为 21.6 μg·L⁻¹ ($S/N \geq 3$),定量限为 41.2 μg·L⁻¹。

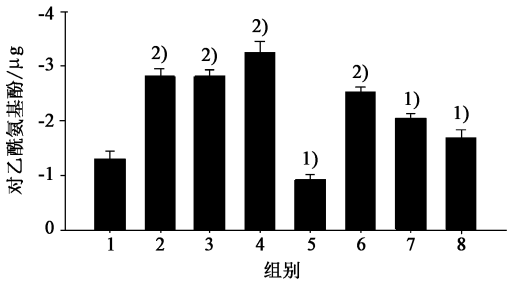
3.2.3 精密度的试验 分别选取高、中、低 3 个浓度,

即对乙酰氨基酚 20.8,5.2,0.65 mg·L⁻¹,按前述方法处理,在 1 d 内分别测定 5 份样品,测定高、中、低浓度的日内精密度的 (RSD) 分别为 7.4%,6.5%,5.6%。每天各测定一份样品,连测 5 d,得高、中、低浓度的日间 RSD 分别为 8.9%,5.0%,7.3%。对乙酰氨基酚的日内和日间 RSD < 10%,符合样品测定要求。

3.2.4 方法回收率 取高、中、低质量浓度分别为 20.8,5.2,0.65 mg·L⁻¹的对乙酰氨基酚对照品溶液,加入到经 100 ℃沸水煮 30 min 灭活的肝微粒体孵育体系中,加入启动剂,配制成系列样品,涡旋混匀后立即于 -30 ℃终止反应。将终止反应后的样品混匀后加入到活化后的 C₁₈固相萃取柱上,用 5%的甲醇水除杂,吹干,然后用 1 mL 甲醇、1 mL 乙腈淋洗。收集的洗脱液于 40 ℃空气流下吹干,将残渣溶于 100 μL 流动相中,采用高效液相色谱法测定,结果显示高、中、低浓度的回收率分别为 (95.4 ± 5.78)%, (96.5 ± 4.53)%, (94.1 ± 3.18)%。

3.3 大黄苷元对 CYP1A2 活性的影响

3.3.1 高、中、低剂量大黄苷元对 CYP1A2 活性的影响 与空白组比较,PB 组,DEX 组,β-NF 组的 CYP1A2 活性明显升高 ($P < 0.01$),KET 组 CYP1A2 活性明显降低 ($P < 0.05$);与 PB 组,DEX 组,β-NF 组,大黄苷元不同剂量组的 CYP1A2 活性明显低于以上各组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 2。



1. 空白组;2. PB 组;3. DEX 组;4. β-NF 组;5. KET 组;6. 大黄苷元 61.63 mg·kg⁻¹组;7. 大黄苷元 30.82 mg·kg⁻¹组;8. 大黄苷元 14.40 mg·kg⁻¹组

图 2 大黄苷元对 CYP1A2 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Fig.2 Effects of aglycone from Rhei Radix et Rhizoma on the CYP1A2 activity ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.3.2 大黄苷元不同给药剂量与对乙酰氨基酚生成量的关系 以非那西丁为探针药物,大黄苷元不同剂量组(7.08,14.40,30.82,46.55,51.63,61.63,100.07 mg·kg⁻¹)肝微粒体进行孵化试验,样品经处理后,进行高效液相测定其代谢产物对乙酰氨基酚的生成量,研究大黄苷元对 CYP1A2 活性的影响。

结果显示:随着大黄苷元剂量的增加,其对 CYP1A2 活性诱导作用增强。见图 3。

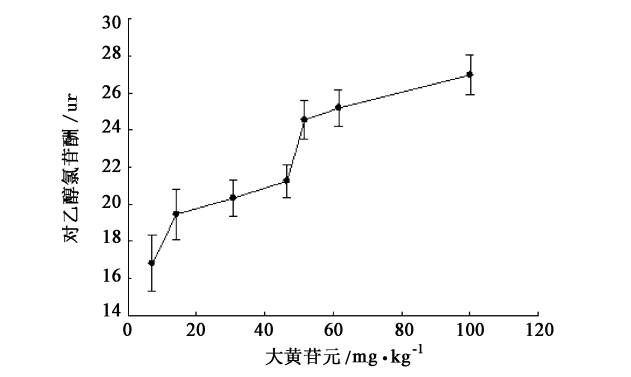


图 3 大黄苷元不同给药剂量与对乙酰氨基酚生成量的关系 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Fig. 3 Relationship between different dosage of aglycone from Rhei Radix et Rhizoma and amount of paracetamol ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

4 讨论

近年来随着临床中西药相互作用被逐渐发现,对其机制的研究也逐渐增多,而对 CYP450 酶系的诱导和抑制被认为是药物间相互作用的主要机制,CYP450 酶的多种同工酶能够参与药物的生物转化过程,减轻外源性物质对机体的毒害^[11],CYP1A2 是重要的 P450 氧化酶之一,在肝组织中有特异性表达,其活性与许多药物的疗效或毒性相关,还参与多种与癌症发生密切相关的化学性毒物(如亚硝酸胺)和内源性激素的代谢,具有重要的药理学和毒理学意义^[12-13]。但是文献中对于 CYP1A2 的报道却很少,本文着眼于对 CYP450 酶系中 CYP1A2 的实验研究,旨在探讨大黄的合理化应用。

本文实验相关剂量设计,是通过参考相关文献^[10],按照人体体表面积和物种给药剂量的换算公式进行转换计算而得的。在样品处理中发现,与甲醇、三氯甲烷相比而言,乙酸乙酯的回收率比较高,所以选择乙酸乙酯作为沉淀剂。

本实验进行了药物对 CYP1A2 酶影响的方法学评价,但对于指导临床用药来说,体外孵育实验稳定、易操作、影响因素较少,但与动物体内代谢事实差距甚大。通过大黄苷元不同剂量组与不同诱导剂和抑制剂组的对比实验,结果显示大黄苷元低剂量组高于 KET 抑制剂给药组,表明大黄苷元对 CYP1A2 有诱导作用,但作用弱于 PB,DEX, β -NF 诱导剂组,且高、中、低剂量组的诱导作用成降低趋势。通过 7 个不同的给药剂量组,来探讨大黄苷元的给药剂量与诱导作用的关系。实验结果显示随着给药

剂量的增高,对乙酰氨基酚的生成量逐渐增高,表明大黄苷元对 CYP1A2 的诱导作用随着剂量的增加有增高趋势。提示大黄苷元可能会增加酶对其他药物的代谢,会使临床上联合用药的疗效降低^[5]。所以,临床上运用大黄苷元或含大黄苷元的药品与其他药物联合应用时,为了达到最好的疗效,应该适时检测药物浓度及调节用药剂量。这为联合用药的合理化提供了一定的理论依据。

[参考文献]

[1] 李建生,刘敬霞,梁生旺,等. 大黄苷元对脑缺血大鼠神经细胞凋亡及相关基因表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2005,20(3):155-157.

[2] 卢宁,张树峰,佟继铭. 大黄水提取物对成年大鼠子宫及卵巢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(21):258-261.

[3] 李建生,刘敬霞,王冬,等. 大黄苷元对不同时间溶栓治疗抗大鼠脑缺血损伤的比较研究[J]. 中华中医药杂志,2011,26(9):1967-1971.

[4] 陈荣,谢陶吟,邹素兰,等. 探针药物法测定大黄对大鼠肝细胞色素 CYP2E1 酶的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2009,18(2):109-111.

[5] 肖娟,王莹,蔡巧玲,等. Cocktail 探针药物法评价半夏泻心汤及不同配伍组对 CYP450 酶活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(4):181-186.

[6] Lynch T, Price A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interaction, and adverse effects[J]. Am Fam Physician,2007,76(3):391-396.

[7] 李丹,韩永龙,孟祥乐,等. 大黄酸对大鼠肝细胞色素 P4503A 酶活性的抑制[J]. 医药导报,2010,29(3):282-285.

[8] Wang B,Zhou S F. Synthetic and natural compounds that interact with human cytochrome P4501A2 and implications in drug development[J]. Current Medicinal Chemistry,2009,31(16):4066-4218.

[9] 张艳辉. 黄芪甲苷对大鼠 CYP1A2 酶活性影响的研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2012.

[10] 冯素香,周悌强,李晓玉,等. 大黄苷元对大鼠肝微粒体 CYP450 酶活性的影响[J]. 中药药理与临床,2013,29(3):41-43.

[11] 张咏莉,崔玉强,汪向升,等. 黄芪颗粒和黄芪注射液对 CYP1A2,CYP2D,CYP2C 亚酶活性影响的实验研究[J]. 中国药理学通报,2013,29(4):512-519.

[12] 王陆军,李仙义,韩晋,等. 日服用次数对大黄体外抗氧化效应的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(15):262-265.

[13] 魏玉辉,秦红岩,段好刚,等. 六味地黄丸对大鼠肝微粒体代谢酶 P450 活性的影响[J]. 中国医院药学杂志,2008,28(19):1665-1668.

[责任编辑 周冰冰]