论著

文章编号:1000-5404(2012)13-1300-04

黄芪甲苷通过抑制大鼠体内 CYP1A2 酶活性影响药物相互作用

张艳辉,于 超,郭延垒,张有金,李文娟,杨 竹,王应雄 (400016 重庆,重庆医科大学生命科学研究院)

[摘要] **目的** 研究黄芪甲苷对大鼠体内 CYP1A2 酶活性的影响,阐明由 CYP1A2 酶所引发的药物相互作用可能性。**方法** 采用色谱柱为 waters-symmetry C_{18}柱(250 mm×4.6 mm I.D.,5 μm);流动相为甲醇和水(体积比17∶83);检测波长=274 nm;柱温=30 ℃;流速=1 ml/min 的色谱条件。7只SD大鼠随机分为2组,实验组3只预给予黄芪甲苷1周,对照组4只给予0.1% DMSO水溶液,第8天分别给予茶碱,通过高效液相色谱法测定探针药物茶碱的血药浓度,比较2组的动力学参数的差异来考察黄芪甲苷对 CYP1A2 酶活性的影响。**结果** 茶碱、内标对乙酰氨基酚二者分离良好且无内源性干扰,茶碱的最低检测限80 nmol/L,线性范围0.2~50 μmol/L,日内日间精密度均小于10%,提取回收率大于91%,实验组的动力学参数药物浓度-时间曲线下面积 $AUC_{(0-\infty)}$(131.16±3.22)明显高于对照组(97.51±6.40),而体内总体清除常数 CL/F(0.12±0.01)明显低于对照组(0.17±0.02)($P<0.05$)。**结论** 黄芪甲苷对大鼠体内 CYP1A2 酶活性有明显的抑制作用,临床用药中应尽量避免与由 CYP1A2 所代谢的药物联合应用。

[关键词] CYP1A2;黄芪甲苷;茶碱;体内

[中图法分类号] R285.5; R345; R969.2 [文献标志码] A

Astragaloside Ⅳ exerts drug interactions *via* inhibiting CYP1A2 activity in rats

Zhang Yanhui, Yu Chao, Guo Yanlei, Zhang Youjin, Li Wenjuan, Yang Zhu, Wang Yingxiong (Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] Objective To determine the effect of astragaloside Ⅳ (AGS-Ⅳ) on the activity of CYP1A2 in rats to elucidate the possibility CYP1A2-induced interactions of drugs. Methods Analysis of theophylline, and acetamidophenol (internal standard) was achieved using waters C_{18} column (250 mm×4.6 mm×5 μm) and a mobile phase consisted of methanol-water (17∶83, v/v) was delivered at a flow rate of 1.0 ml/min at 30 ℃ at a wavelength of 274 nm. Seven rats were divided into 2 groups by simple random sampling. Three rats were intravenously treated with AGS-Ⅳ (3 mg/kg), and the left 4 rats were intravenously administered with an equivalent volume of 0.1% DMSO vehicle once a day for a week. On the eighth day, all of the rats were intragastrically administered theophylline. The concentration of theophylline in the plasma was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The distinction of pharmacokinetic parameters was compared to investigate the effect of AGS-Ⅳ on the activity of CYP1A2. Results Theophylline and acetamidophenol were separated well, the detection limit of theophylline was 80 nmol/L, and the linear rang of our method was 0.2 to 50 μmol/L. The intra-day and inter-day relative standard deviations were both less than 10%, and the recoveries were more than 91. The main pharmacokinetic parameters of area under the concentration-time cure (AUC) of theophylline were higher than control groups (131.16±3.22 *vs* 97.51±6.40). The apparent oral total body clearance value (CL/F) of test group and control group were 0.12±0.01 and 0.17±0.02 respectively, with the former obviously lower than the latter ($P<0.05$). Conclusion AGS-Ⅳ exerts obvious inhibitory effect on CYP1A2 activity in rats, so its should be cautious to co-administer with drugs metabolized by CYP1A2.

[**Key words**] CYP1A2; astragaloside Ⅳ; theophylline; *in vivo*

Supported by the Major Project of New Drug Science and Technology (2010ZX09401-306-1-1) and the Project of Scientific Technological Innovation Capacity Construction of Chongqing (CSTC2010AA5058). Corresponding author: Yu Chao, Tel: 86-23-68485589, E-mail: yuchaom@163.com

[基金项目] 重大新药创制科技重大专项(2010ZX09401-306-1-1);重庆市科技创新能力建设项目(CSTC2010AA5058)

[通信作者] 于 超,电话:(023)68485589,E-mail:yuchaom@163.com

细胞色素 P450s(CYP)是一个多基因家族,对多数药物和外源性物质的代谢起着重要的作用[1]。在临床药物联合使用的过程中,某些药物会诱导或抑制 P450 酶活性而出现药物之间的相互作用,从而导致治疗失败[2]。CYP1A2 酶约占肝脏中 P450 酶总量的 13%,参与临床约 5% 药物的代谢[3],如华法林、茶碱、氯氮平、氨基芴、替加氟等[3],是最重要的药物代谢酶之一。当临床上 CYP1A2 酶抑制剂与经其代谢的药物联用时,将会导致被代谢药物在体内因清除率降低而蓄积,从而引发药物相互作用,产生一系列严重的不良反应。因此,研究药物对 CYP1A2 酶活性的影响进而评估药物之间是否存在相互作用,具有重要的临床意义。

黄芪为豆科植物膜荚黄芪和蒙古黄芪的干燥根,其主要的药理活性成分为黄芪甲苷,具有强心[4]、降血压[5]、抗病毒[6]、抗氧化[7]等药理活性。在临床使用过程中,往往与其他药物联合使用,因此不可避免地存在药物之间尤其是与西药之间的相互作用。在以往研究中,黄芪甲苷对 CYP1A2 酶活性的影响少见报道,其介导的药物间相互作用研究相对较少,因此有必要对此进行更深入研究,以对黄芪甲苷的临床合理化用药提供参考。

茶碱主要被 CYP1A2 酶所代谢,因此茶碱通常作为探针以测定 CYP1A2 酶活性[3]。本研究以茶碱为探针建立测定大鼠体内 CYP1A2 活性的实验方法,并将其应用至黄芪甲苷对 CYP1A2 酶的活性研究,对于评价以 CYP1A2 酶介导的黄芪甲苷与其他药物之间的相互作用有重要意义。

1 材料与方法

1.1 仪器

LC-2010A HT 高效液相色谱系统;紫外检测器(日本岛津公司);Elix10 超纯水净化系统(美国 MILLIPOER 公司);Z233mk 型冷冻离心机(Hermle);XS-105 十万分之一精密电子天平(美国 METTLER TOLEDO 公司)。

1.2 试剂

黄芪甲苷对照品(批号:34318,纯度≥98%,阿拉丁试剂);茶碱对照品(货号:1108801,纯度≥99%,阿拉丁试剂);对乙酰氨基酚对照品(货号:1101813,纯度≥98%,阿拉丁试剂);乙腈、甲醇为色谱纯(美国 TEDIA 公司);其他试剂均为市售分析纯。

1.3 实验动物及分组

清洁级雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠,体质量(200 ± 20) g,由重庆医科大学实验动物中心提供[实验动物质量合格许可证号:SCXK(渝)2007-0002]。

7 只 SD 大鼠随机分为 2 组,实验组 3 只,对照组 4 只。

1.4 方法

1.4.1 标准品试剂的配置 精密称取茶碱,对乙酰氨基酚对照品适量,分别用甲醇和水溶液(1∶4,体积比)溶解至 50 mmol/L, 放于 4 ℃存储至分析。精密称取黄芪甲苷适量,用 0.1% DMSO 水溶液溶解并稀释至 2 mg/ml。

1.4.2 血浆样品的处理 从 SD 大鼠的眼眶采血约 0.5 ml,置于预先肝素化的试管中,以 12 000 r/min 的速率离心 10 min,吸取上清液,放于 -80 ℃存储。精密吸取大鼠血浆样品 75 μl,10 μmol/L 对乙酰氨基酚(内标)45 μl, 乙酸乙酯 1.5 ml 涡旋振荡 3 min,以 10 625 × g 离心 15 min。吸取上清液 1.4 ml,在室温下用氮气流吹干。残渣加入流动相 140 μl,涡旋混合 60 s,再以 10 625 × g 离心 5 min,取上清液进行 HPLC 分析。

1.4.3 色谱条件 色谱柱为 waters-symmetry C_{18}柱 (250 mm × 4.6 mm I.D. ,5 μm);流动相:甲醇∶水 = 17∶83;检测波长 = 274 nm;柱温 = 30 ℃;流速 = 1 ml/min。

1.4.4 标准曲线的建立 精密吸取茶碱标准品溶液,用甲醇和水溶液(1∶4, 体积比)稀释至 0.2、0.5、1、5、10、25、50 μmol/L 的对照品溶液。取空白血浆样品 75 μl,分别加入茶碱的对照品溶液 180 μl,10 μmol/L 的对乙酰氨基酚(内标)45 μl 涡旋 30 s 后,按上述的血浆样品的处理方法进行处理,并进行 HPLC 分析。以茶碱与内标(Y)的峰面积的比值为纵坐标,以茶碱的浓度(X,μmol/L)为横坐标进行线性回归分析。

1.4.5 精密度、回收率及稳定性实验 取浓度为 0.4、7.5、40 μmol/L 低、中、高 3 个对照品溶液及 10 μmol/L 的内标加入空白血浆中,按上述方法进行血浆样品的处理,在选定的色谱条件下于每个样品 1 d 内测定 5 次(标准曲线同时测定)和每天测定 1 次连续测定 3 d,评价日内,日间精密度。

取浓度为 8、10、12 μmol/L 低、中、高 3 个对照品溶液,进行血浆样品的处理并进行 HPLC 分析,每个浓度在同一水平条件下进行 9 个样品分析。以测得各样品实际浓度的均值与加入对照品浓度的比值作为回收率。

取浓度为 0.4、7.5、40 μmol/L 低、中、高 3 个样品,分别在室温保存 1 d 和 -20 ℃保存 1 周后测定,考察其在 1 d 和 1 周内的稳定性。

1.4.6 黄芪甲苷对大鼠体内 CYP1A2 酶活性影响的动力学研究 精密称取茶碱对照品 16.38 mg,溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液中,定容至 7.51 mg/ml,4 ℃放置至用。取 7 只 SD 大鼠,按照简单随机抽样的方法分成给药组和对照组。给药组按照 3 mg/kg 静脉注射黄芪甲苷连续 1 周,而对照组注射 0.1% DMSO 水溶液。第 8 天分别给 2 组 15 mg/kg 灌胃给予茶碱,分别于 0、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、5、7、10、12、24 h 眼眶采血 0.5 ml,按照上述方法处理血浆样品并进行 HPLC 分析。

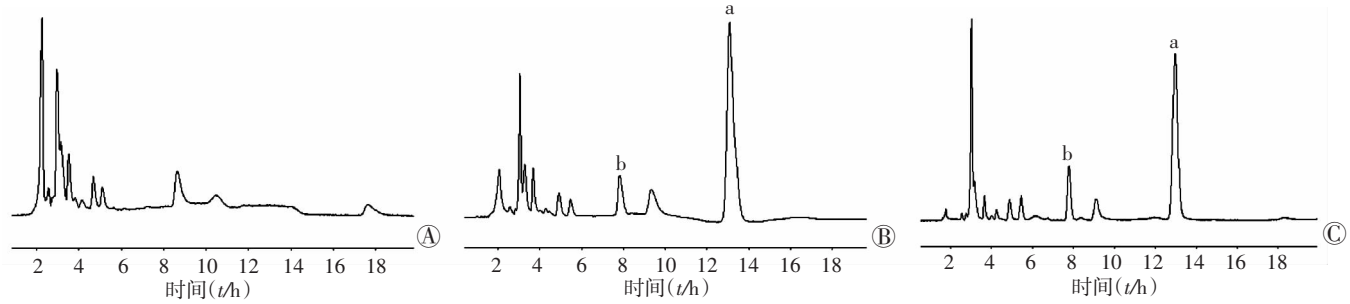
1.5 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 Graphhpad Prism 5.01 软件进行 t 检验,比较实验组和对照组之间主要动力学参数。

2 结果

2.1 专属性

将空白血浆样品、加入茶碱和内标的血浆样品、茶碱灌胃后所得的血浆样品按照选定的色谱条件进行高效液相分析,记录色谱图。可见,茶碱与内标分离良好,且无内源性干扰,见图 1。



A:空白血浆;B:添加对照品和内标的空白血浆;C:大鼠给药7 h后血浆样品的色谱图 a:对乙酰氨基酚(内标);b:茶碱

图1 大鼠血浆高效液相色谱图分析结果

2.2 标准曲线、检测限与定量限

经线性回归分析表明茶碱在0.2~50 μmol/L浓度范围内线性关系良好。回归方程为:Y=1.006 4X-0.005 1(r^2=1)。茶碱的检测线限(LOD)为0.08 μmol/L(S/N≥3),定量限(LLOQ)为0.2 μmol/L。

2.3 精密度、回收率及稳定性

计算低、中、高三样品中茶碱的浓度,以浓度计算日内、日间精密度。结果见表1,RSD均小于10%,表明样品的重现性良好。

以测得各样品实际浓度的均值与加入对照品浓度的比值作为回收率。结果见表2,回收率均大于91%,表明方法良好。

室温保存1 d后,低、中、高3个样品的RSD分别为7.44%、0.74%、0.93%;-20 ℃保存1周后低、中、高3个样品的RSD分别为8.76%、2.98%、2.63%,表明样品在室温下保存1 d和-20 ℃保存1周是稳定的。

表1 茶碱的日内和日间精密度(n=5)

浓度(μmol/L)	日内精密度		日间精密度	
	$\bar{x}\pm s$	RSD(%)	$\bar{x}\pm s$	RSD(%)
0.4	0.37±0.02	5.09	0.37±0.02	6.20
7.5	7.98±0.44	5.51	7.63±0.20	2.75
40	43.46±1.33	3.06	43.22±0.51	0.19

表2 茶碱的提取回收率(n=9)

加入量(μmol/L)	测得量(μmol/L)	回收率(%)	RSD(%)
8	7.31	91.11	3.49
10	9.04	90.89	3.08
12	10.96	91.44	1.08

2.4 黄芪甲苷对大鼠体内CYP1A2酶活性影响的动力学研究

将实验组和对照组所得茶碱血药浓度平均值与采血时间用originPro7.5作图软件进行拟合,见图2。

用3P97药动动力学软件对血药浓度-时间数据进行一室模型分析,采用梯形法计算分别得到各组的动力学参数,见表3。将2组的动力学参数进行比较,结果表明实验组$AUC_{0-\infty}$(131.16±3.22)明显高于对照组(97.51±6.40),而CL/F(0.12±0.01)明显低于对照组(0.17±0.02)。实验组和对照组的动力学参数经t检验,显示$AUC_{0-\infty}$和CL/F 2组之间均存在明显的统计学差异(P<0.05),而其他参数无统计学差异。

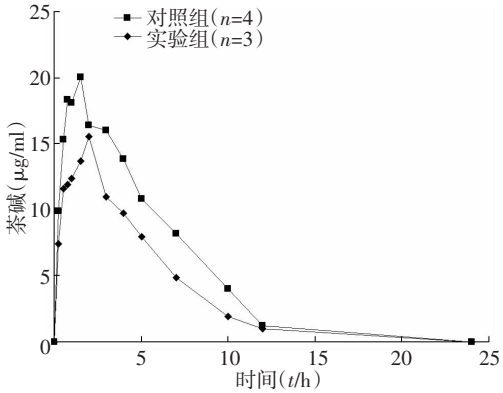


图2 茶碱的药物浓度-时间曲线

表3 2组SD大鼠体内茶碱的药代动力学参数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	$AUC_{(0-\infty)}$ [μg/(ml·h)]	C_{max} (μg/ml)	T_{max}(h)	$T_{1/2}$(h)	CL/F [mg/(kg·h)]
实验组	3	131.16±3.22[a]	20.03±4.48	1.88±0.28	3.09±0.20	0.12±0.01[a]
对照组	4	97.51±6.40	15.93±2.68	2.11±0.23	3.03±0.67	0.17±0.02

a:P<0.05,与对照组比较

3 讨论

中药和西药在临床上常联合使用来达到治疗目的,中-西药之间往往发生相互作用。药物之间相互作用的重要途径之一是通过诱导或抑制P450酶活性而产生,进而导致不良反应。CYP1A2是P450酶中重要的药物代谢酶,临床很多重要的治疗药物,如华法林、咖啡因、美撒痛、氯氮平等[3]均通过其催化作用进行生物转化。当CYP1A2酶活性被抑制而导致药物在体内蓄积时,将导致出现溶血[8]、惊厥[9]、呼吸困难[10]甚至死亡[8]等一系列不良反应发生。因此,本研究黄芪甲苷对CYP1A2酶活性的影响,从而揭示由CYP1A2酶所介导的黄芪甲苷与其他药物之间的相互作用,为黄芪甲苷在临床上的合理化用药提供参考。

在测定酶活性时,探针的选择尤为重要。茶碱主要被CYP1A2酶所代谢,因此茶碱通常作为探针来反应CYP1A2酶的活性[11]。当药物影响CYP1A2酶活性时,应当会改变茶碱的清除[12]。本研究以茶碱为探针建立测定CYP1A2酶活性的实验方法[13],并将其应

用至研究黄芪甲苷对大鼠内 CYP1A2 酶活性的影响。

本研究在选择萃取试剂处理血浆样品。曾使用过甲醇或乙腈为蛋白沉淀剂处理血浆时,沉淀效果均不理想同时测定物质处有很大的干扰。考虑到物质的极性,改用乙酸乙酯沉淀蛋白,同时又通过优化色谱条件,使得茶碱和内标处均无内源性干扰,且回收率均在 90% 以上。

在研究黄芪皂苷对 CYP1A2 酶活性的影响中,发现黄芪皂苷预处理组的 $AUC_{0-\infty}$ 高于对照组而 CL/F 低于对照组,二者都有明显的统计学意义。说明黄芪甲苷降低茶碱的清除率。这将为黄芪甲苷对 CYP1A2 酶活性的抑制,提供直接的证据。

通过本研究显示黄芪甲苷能抑制大鼠内 CYP1A2 酶的活性,因此临床用药中黄芪甲苷应当谨慎的与药物尤其是经由 CYP1A2 酶代谢的药物联用,这将为临床上合理化应用黄芪甲苷或含黄芪甲苷的药物提供依据。

参考文献:

[1] Sheweita S A. Drug-metabolizing enzymes: mechanisms and functions [J]. Curr Drug Metab, 2000, 1(2): 107 - 132.
[2] Wang X, Lee W Y, Or P M, *et al*. Effects of major tanshinones isolated from Danshen (Salvia miltiorrhiza) on rat CYP1A2 expression and metabolism of model CYP1A2 probe substrates [J]. Phytomedicine, 2009, 16(8): 712 - 725.
[3] Wang B, Zhou S F. Synthetic and natural compounds that interact with human cytochrome P450 1A2 and implications in drug development [J]. Curr Med Chem, 2009, 16(31): 4066 - 4218.
[4] 郑培黎, 戴建亚, 陈红, 等. 黄芪甲苷对急性心衰犬心脏舒缩功能的影响[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(12): l534 - 1535.
[5] 石海莲, 刘燕, 马春来, 等. 黄芪皂苷甲对高血压大鼠离体血管舒张功能及一氧化氮的影响[J]. 中国新药与临床杂志, 2009, 28(12): 905 - 910.
[6] Zhang Y, Zhu H, Huang C, *et al*. Astragaloside IV exerts antiviral effects against coxsackievirus B3 by upregulating interferon-gamma[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2006, 47(2): 190 - 195.
[7] 汪明辉, 李双杰. 黄芪甲苷抗氧化机制对病毒性心肌炎保护作用的研究[J]. 临床儿科杂志, 2007, 25(10): 825 - 827, 834.
[8] 曲申宁, 苗兴旺, 朱继东. 华法令与其他药物的相互作用[J]. 西北药学杂志, 1990, 5 (1): 40 - 43.
[9] 莫岚, 钱元恕, 王其南, 等. 依诺沙星对大鼠肝药酶的抑制作用[J]. 中国抗生素杂志, 1995, 20 (5): 384 - 388.
[10] Herrlin K, Segerdahl M, Gustafsson L L, *et al*. Methadone, ciprofloxacin, and adverse drug reactions [J]. Lancet, 2000, 356(9247): 2069 - 2070.
[11] Ogilvie R I. Clinical pharmacokinetics of theophylline[J]. Clin Pharmacokinet, 1978, 3(4): 267 - 293.
[12] Jan W C, Lin L C, Chen C F, *et al*. Herb-drug interaction of Evodia rutaecarpa extract on the pharmacokinetics of theophylline in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2005, 102(3): 440 - 445.
[13] 钟玲, 邱妍川, 尚京川. 人血浆中屈昔多巴的测定及药代动力学研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(11): 1112 - 1114.

(**收稿**:2011-12-26;**修回**:2012-03-02)

(编辑 张 维)

(上接 1296 页)

3 讨论

东方人以单睑居多,重睑术成为最常见的眼部美容手术,通过各种方法将睑板前皮肤与上睑提肌腱膜的纤维在睑板上缘形成粘连,从而形成重睑[3]。目前的重睑手术方法有切开法和非切开法。切开法适应症广,不受单睑条件限制,形成的重睑稳定,但术中破坏上睑皮肤的连续性,手术创伤大,恢复时间长,术后易遗留明显瘢痕;非切开法有埋线法和缝线法,操作简单,恢复快,无手术瘢痕,但线结容易脱落,重睑线容易消失[4]。目前出现三点式微创重睑术,常常只剪除切口下至睑缘间的部分眼轮匝肌,未将切口间的皮下进行贯通,无法祛除三点之间的皮下组织,重睑线上皮肤与睑板前筋膜仅有三点粘连,对于眼睑较厚的患者,术后常出现小切口间的组织臃肿,造成重睑线不自然流畅,并且容易中断甚至消失[5]。

我们近年来采用经小切口皮下隧道祛除部分组织的重睑术,综合了切开法与埋线法重睑术各自的优点。通过三点小切口之间形成贯通的皮下隧道,在隧道内祛除宽约 2 mm 一条眼轮匝肌,从内眦一直延续到外眦,充分暴露睑板前筋膜,使上睑缘上方皮肤完全粘连于睑板前筋膜上,形成一条连贯圆滑的弧线,同时于外切口处祛除上睑多余的眶隔脂肪,所以形成的重睑同切开法一样,效果自然持久。

采用经小切口皮下隧道祛除部分组织的重睑术,术中未破坏上睑皮肤的完整性,保留上睑皮肤的部分血液和淋巴循环,而使术后肿胀明显减轻;所采用的三点式小切口,因每点切口仅有 3 mm,因此术后瘢痕不明显,形成的重睑外形良好,重睑维持时间长。我们通过 185 例实践经验总结,所取得的经验是:①三点式小切口结合皮下隧道重睑术因不能祛除多余的皮肤,对上睑皮肤有明显松弛的患者不宜选用该方法。②在剪除眼轮匝肌同时,应确保剪除组织位于切口下缘,切忌剪除偏上及过多,以免造成术后重睑线过高或形成多重睑线。③眼轮匝肌去除时内侧应达内眦角上方,外侧达外眦角外 5 mm 处,否则可能会出现重睑线中断的现象。④进行皮下缝合时挂住睑板前筋膜的三点应一致,保证重睑线的流畅。

参考文献:

[1] 曲学延,曲学炜, 杜晓岩. 点式切开缝线法重睑术临床应用体会[J]. 中国美容医学, 2011, 20(5): 745.
[2] 潘宝华, 夏炜, 宋保强, 等. 内眦赘皮矫正同期小切口重睑成形术[J]. 中华医学美学美容杂志, 2009, 15(1): 4 - 6.
[3] 王炜. 整形外科学[M]. 杭州:浙江科学技术出版社, 1999: 990 - 996.
[4] 周龙,徐凯, 孔生生. 小切口微创重睑术的临床应用[J]. 中国美容医学, 2010, 19(12): 1786 - 1788.
[5] 李敏, 刘文阁. 三点式小切口重睑术200 例经验体会[J]. 中国美容医学, 2003, 12(6): 639 - 640.

(**收稿**:2012-04-09;**修回**:2012-05-30)

(编辑 王小寒)