

# 归脾汤对雷公藤醇提物致肝损伤大鼠肝微粒体 CYP3A4 酶活性的影响

周文静, 柴智, 王永辉, 李艳彦, 闫润红, 史静超, 周然\*  
(山西中医学院, 太原 030024)

**[摘要]** 目的: 建立一个快速、准确的测定大鼠肝微粒体中 CYP3A4 酶活性的 HPLC, 研究雷公藤醇提物对肝损伤大鼠肝微粒体 CYP3A4 酶活性的影响, 进而探讨归脾汤对其保护机制。方法: 50 只大鼠随机分为正常组、模型组、归脾汤组、P450 诱导组、P450 抑制组。正常组、模型组灌服生理盐水, 归脾汤组灌服归脾汤(9 g·kg<sup>-1</sup>), P450 诱导组、P450 抑制组分别腹腔注射地塞米松(100 mg·kg<sup>-1</sup>)和酮康唑(80 mg·kg<sup>-1</sup>), 连续 ig 4 d 后, 再以雷公藤醇提物(3.25 mg·kg<sup>-1</sup>) ig 3 d 造模。选用 HPLC 以咪达唑仑为探针药物, 检测各组大鼠肝微粒体中 CYP3A4 酶活性。结果: 在所建立的 HPLC 条件下, 咪达唑仑的出峰时间在 8.960 min, 能够完全分离, 且无其他生物基质峰干扰; 线性范围是 0.25 ~ 20 μmol·L<sup>-1</sup> (r = 0.999 9), 符合检测要求, 方法可靠。结果显示, 与正常组比较, 模型组大鼠 CYP3A4 活性明显降低, 差异有统计学意义 (P < 0.05); 与模型组比较, 归脾汤组、CYP450 诱导组大鼠 CYP3A4 活性亦明显升高, 差异有统计学意义 (P < 0.05); 归脾汤组与 CYP450 诱导组之间比较, 大鼠 CYP3A4 活性差异不明显, 无统计学意义。结论: 本方法能够对 CYP3A4 活性进行准确评价, 雷公藤对大鼠肝微粒体 CYP3A4 酶活性有一定的抑制作用, 归脾汤可能通过诱导 CYP3A4 活性而降低雷公藤的毒性从而发挥对肝脏的保护作用。

**[关键词]** 归脾汤; 雷公藤醇提物; 肝损伤; 大鼠肝微粒体

**[中图分类号]** R285.5; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)06-0113-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015060113

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150127.1143.002.html>

**[网络出版时间]** 2015-01-27 11:43

**Influence of CYP3A4 Activity of Guipi Tang to Acute Liver Injury Induced by Extract from *Tripterygium wilfordii* by Ethanol** ZHOU Wen-jing, CHAI Zhi, WANG Yong-hui, LI Yan-yan, YAN Run-hong, SHI Jing-chao, ZHOU Ran\* (Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China)

**[Abstract]** **Objective:** The aim of this study was to establish a rapid and accurate method in order to evaluate the activity of CYP3A4 by the high-performance liquid chromatography (HPLC). The activity of CYP3A4 was evaluated to explore the protective effect and mechanism of Guipi Tang on rats' acute liver injury which is resulted from the extract from *Tripterygium wilfordii* by Ethanol. **Method:** Totally 50 rats were randomly divided into control group, model group, Guipi Tang group, P450 induction group, and P450 inhibition group. The control group and the model group was perfused with physiological saline, the Guipi Tang group was perfused with Guipi Tang (9.0 g·kg<sup>-1</sup>). The P450 induction group and P450 inhibition group have received injection of DXM (100 mg·kg<sup>-1</sup>) and KCZ (80 mg·kg<sup>-1</sup>) in intraperitoneal respectively. After ig 4 days, and perfused with *T. wilfordii* (3.25 g·kg<sup>-1</sup>) for 3 days, the model was established. The activity of CYP3A4 of rat liver microsome was measured by HPLC with midazolam as a probe drug. **Result:** The retention time of midazolam appeared at 8.960 min under the condition of HPLC, while there were no interference peaks. Its suitable linear range was 0.25 ~ 20 μmol·L<sup>-1</sup> (r = 0.999 9), which met the requirement of the whole examination. Compared with the control group, the activity of CYP3A4 in model group decreased (P < 0.05). Compared with the model group, Guipi Tang and

**[收稿日期]** 20140804(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(30873433)

**[第一作者]** 周文静, 硕士, 助教, 从事方剂效用及其物质基础研究, Tel:0351-3179702, E-mail:zhouwengjing0918@163.com

**[通讯作者]** \*周然, 博士, 教授, 博士生导师, 从事方剂效用及其物质基础研究, Tel:0351-2272390, E-mail:zhou58@sohu.com

P450 induction group increase the CYP3A4 activity ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The evaluation method of CYP3A4 activity is accurate. *T. wilfordii* can inhibit CYP3A4 activity significantly. Guipi Tang could reduce the toxicity of *T. wilfordii* and protect liver through inducing the CYP3A4 activity.

**[Key words]** Guipi Tang; extract from *Tripterygium wilfordii* by ethanol; liver injury; rat liver microsome; HPLC; CYP3A4

雷公藤为卫矛科植物雷公藤的根及根茎。性凉,味辛苦,归肝、肾经,现代广泛用于自身免疫性疾病,疗效肯定。但雷公藤有大毒,其所致肝损伤在相关文献报道中居单味肝损伤中药之首<sup>[1]</sup>,很大程度上限制了其在临床上推广应用。研究雷公藤在体内的代谢过程及与药物配合的相互作用,对降低雷公藤的毒性及扩大临床运用范围有巨大的作用。

药物代谢主要在肝脏,依赖于肝微粒体中的多种酶系,最重要的是CYP450酶系。CYP450酶系中最主要的亚酶是细胞色素氧化酶CYP3A4,占人体CYP450总含量的50%以上,是人体中重要的药物代谢酶<sup>[2]</sup>。研究表明,CYP3A4可以被很多药物诱导或抑制,特别是在药物联合应用时,CYP3A4对药物代谢影响较大,以至于影响药物的药效及毒性<sup>[3]</sup>。文献报道,CYP3A4是雷公藤的主要代谢酶<sup>[4]</sup>。研究雷公藤对P450酶的影响,对了解雷公藤的代谢过程及如何解毒有重要的意义。

本实验建立以咪达唑仑(midazolam, MDZ)为探针药物检测CYP3A4酶活性的HPLC法,观察归脾汤对雷公藤致大鼠肝损伤在体内代谢对CYP3A4酶活性的影响,进一步阐明雷公藤所致肝损伤的发病机制及归脾汤的保护作用机制。

## 1 材料

**1.1 药材及雷公藤醇提物的制备** 雷公藤醇提物的制备,雷公藤药材采自江西九江,经山西省药品检验所鉴定为卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* 的干燥根。雷公藤自然干燥粉碎成细粉。取雷公藤细粉1 600 g,用10倍体积的95%乙醇冷浸12 h,超声处理45 min,冷却至室温,补足质量,以3 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min取上清液,上清液用旋转蒸发器减压回收乙醇至无醇味,置真空干燥中干燥,称重,得药物粉末150.49 g,计算药物提取率为9.41%,即每克雷公藤醇提物相当于原药材10.63 g。灌胃用蒸馏水配成所需药物浓度。归脾汤(黄芪12 g,龙眼肉12 g,人参6 g,白术6 g,茯神9 g,木香6 g,酸枣仁12 g,当归9 g,远志6 g,甘草3 g),购自北京同仁堂饮片有限责任公司。原药材加10倍量水,煎2次合并滤液,浓缩配成含生药浓度为100%药液(即药液

含生药1 g·mL<sup>-1</sup>),4℃保存备用。

**1.2 动物** SD大鼠,体重100~120 g,雌雄各半,SPF级,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号为SCXK(京)2009-0004。动物购回后雌雄分笼饲养于(22±2)℃,55%湿度环境中,自由摄水摄食,适应性饲养1周后开始实验。

**1.3 仪器与试剂** BS224S型1/1万电子天平(德国赛多利斯),KQ-300VDE型超声波清洗器(昆山市仪器有限公司),DL-5-B型低速大容量离心机(上海安亭),Waters2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司);Tris(武汉博士德生物工程有限公司),PBS(武汉博士德生物工程有限公司),甘油(浙江黄岩人民化工厂),辅酶II(NADP)(美国Sigma公司),咪达唑仑(北京百灵威科技有限公司,批号171250-200401),地塞米松(武汉大华伟业科技发展公司,批号1950-2-2),酮康唑(武汉远城科技发展有限公司,批号467936)。

## 2 方法

**2.1 分组** 选取SD大鼠50只,雌雄各半,随机分为5组,每组10只,分别为①正常组;②模型组;③归脾汤组;④P450诱导组;⑤P450抑制组。

**2.2 给药** 归脾汤组按照4.5 g·kg<sup>-1</sup>剂量ig,P450诱导组按照100 mg·kg<sup>-1</sup>剂量对大鼠进行ip地塞米松,P450抑制组按照80 mg·kg<sup>-1</sup>剂量对大鼠进行ip酮康唑,每天1次,连续4 d,模型组给予等体积的生理盐水ig。从第5天开始除正常组外其余各组均按照3.25 g·kg<sup>-1</sup>剂量雷公藤醇提物给大鼠ig,每天1次,连续3 d;正常组ig等体积的生理盐水,每天1次,连续7 d。ig体积均为20 mL·kg<sup>-1</sup>,大鼠在实验期间自由进食和饮水,每天称重并根据体重及时调整给药量。前期实验证明雷公藤所致肝损伤造模成功,且归脾汤对其有保护作用<sup>[5]</sup>。

## 2.3 溶液配制

**2.3.1 标准溶液的配制** 精密称取1.25 mg咪达唑仑对照品,置于5 mL量瓶中,加入甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制备为2 mmol·L<sup>-1</sup>的标准溶液。然后精密吸取2 μL咪达唑仑标准溶液,加入双蒸水48 μL,使咪达唑仑浓度为80 μmol·L<sup>-1</sup>。

**2.3.2 洗涤缓冲液** 0.25 mol·L<sup>-1</sup>蔗糖溶液,称取80 g蔗糖溶于去离子水中,调pH 7.4,定容到1 L。

**2.3.3 匀浆缓冲液** 甘油-Tris-HCl-KCl缓冲液,称取5.28 g Tris,7.45 g KCl,溶于500 mL去离子水中,加甘油300 mL,用HCl调节pH 7.4,然后加去离子水定容至1 L,使溶液含甘油30%,Tris 0.1 mol·L<sup>-1</sup>,KCl 0.15 mol·L<sup>-1</sup>。

**2.4 肝微粒体的制备** 按差速离心法<sup>[6]</sup>制备大鼠肝微粒体:末日给药后大鼠禁食16 h,置于冰上处死,迅速经肝门静脉注射预冷的0.25 mol·L<sup>-1</sup>蔗糖溶液,清除器官内的残留血液,称取1.5 g肝脏,剪刀剪碎,用蔗糖溶液冲洗2~3次去除血红蛋白,剪成浆状;加4倍肝重的预冷的0.25 mol·L<sup>-1</sup>蔗糖溶液,用匀浆机制备为肝匀浆;放入离心管中,冷冻离心30 min(4℃,100 000 g);取上清液冷冻离心60 min(4℃,100 000 g),得到粉红色沉淀,即肝微粒体;弃去上清液,粉红色沉淀用1倍肝重的甘油-Tris-HCl-KCl缓冲液涡旋混匀分装,每只0.5 mL,置于-80℃冰箱内保存备用。采用考马斯亮蓝法(Bradford法)测定肝微粒体蛋白浓度。

**2.5 体外孵育** 将0.5 μmol NADPH,2.5 μmol MgCl<sub>2</sub>,0.5 mg肝微粒体,2 μmol奥美拉唑加1 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl-KCl缓冲液补齐成总体积为500 μL的反应体系,在37℃水浴中预孵育15 min后,加入NADPH启动反应。

**2.6 样品处理** 孵育20 min后迅速向体系中加入2 mL遇冷的二氯甲烷终止反应,涡旋震荡后于37℃,10 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,取有机相用氮气吹干,取上清用流动相溶解,使总体积仍补充为500 μL,待进样检测。

**2.7 色谱条件** Diamonsil<sup>TM</sup> C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-水45:55,流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长225 nm,柱温30℃,进样量20 μL。

**2.8 结果判定及数据处理** 酶活性指标以探针药物的转化程度(tumover, TR)为指标,TR(pmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>)=(ΔC×1 000)/(B×T)。其中ΔC为探针药物孵育反应前后的浓度差(μmol·L<sup>-1</sup>),B为微粒体蛋白的浓度(g·L<sup>-1</sup>),T为孵育时间(min)<sup>[7]</sup>。统计分析软件应用SPSS 17.0统计软件进行统计分析,采用t检验进行两两比较。

### 3 结果

#### 3.1 咪达唑仑方法学考察结果

**3.1.1 专属性** 在2.7项色谱条件下,咪达唑仑的

峰型尖锐,肝微粒体中无内源性物质及杂质干扰,咪达唑仑的保留时间为8.960 min。

**3.1.2 标准曲线和线性关系** 在所建立的肝微粒体孵育体系中,分别加入咪达唑仑,使其浓度分别为0.25,0.5,1.0,2.0,4.0,8.0,16.0,20.0 μmol·L<sup>-1</sup>,按2.6项方法处理后进样。以咪达唑仑样品的浓度X(μmol·L<sup>-1</sup>)为横坐标,峰面积Y为纵坐标,回归方程为:Y=0.321 0X+0.008 8,r=0.999 9。表明其在0.25~20.00 μmol·L<sup>-1</sup>线性关系良好。咪达唑仑方法的最低检测浓度为0.025 μmol·L<sup>-1</sup>(n=5)。

**3.1.3 精密度** 按照3.1.2项方法测得咪达唑仑对照液在0.5,4.0,20 μmol·L<sup>-1</sup>时的日内及日间精密度,结果日内RSD分别为0.7%,1.8%,3.1%;日间RSD分别为0.7%,2.0%,3.0%。

**3.1.4 稳定性** 实验分别取高、中、低3个浓度的样品按照3.1.2项方法处理,分别在0,2,4,6,8,12,24 h进行测定,结果显示,其浓度没有明显变化,RSD分别为1.6%,1.4%,1.6%,表明肝微粒体中咪达唑仑样品在24 h内稳定。

**3.1.5 回收率** 在所建立的肝微粒体孵育体系中,按照3.1.2方法,配制0.5,4.0,20 μmol·L<sup>-1</sup>的低、中、高3种浓度的咪达唑仑对照品溶液样品各5份,按2.6方法处理后进样分析,测得3种浓度的咪达唑仑的以含药样品经对照液样品在所建立的孵育体系中的方法回收率;同样将咪达唑仑对照品直接加入流动相中,配制上述3个浓度进样,计算绝对回收率。见表1。

表1 咪达唑仑样品回收率试验结果( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 1 Recovery determination results of midazolam( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

加入浓度/ μmol·L <sup>-1</sup>	方法回收率/%		绝对回收率/%	
	比率	RSD	比率	RSD
0.5	71.28 ± 3.85	3.8	101.88 ± 2.73	3.8
4.0	78.56 ± 3.64	2.5	99.42 ± 2.94	3.0
20.0	73.46 ± 3.15	2.7	98.57 ± 2.31	2.4

**3.2 归脾汤对雷公藤致大鼠肝损伤 CYP3A4 酶活性测定结果** 结果显示,与正常组比较,模型组大鼠 CYP3A4 活性明显降低,差异有统计学意义(P<0.05);与模型组比较,归脾汤组,CYP450 诱导组大鼠 CYP3A4 活性亦明显升高(P<0.05);CYP450 抑制组大鼠 CYP3A4 活性有所降低,但差异无统计学意义;归脾汤组与 CYP450 诱导组之间比较,大鼠 CYP3A4 活性差异不明显,无统计学意义。见表2。

表2 归脾汤对雷公藤致大鼠肝微粒体 CYP3A4 酶活性测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Results of CYP3A4 activity of Guipi Tang to rat liver microsomes induced by *Tripterygium wilfordii* ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	酶活性/ $U \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$
正常	456.24 ± 31.61
模型	402.34 ± 35.70 <sup>1)</sup>
归脾汤	468.07 ± 21.20 <sup>2)</sup>
CYP450 诱导	470.12 ± 25.59 <sup>2)</sup>
CYP450 抑制	365.26 ± 36.62 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

#### 4 讨论

本实验对雷公藤产生肝损伤机制提出了新见解,认为雷公藤引起的肝损伤与 P450 酶系有关。同时以中医方剂归脾汤进行对抗,探讨其保护机制。

CYP450 是一组结构和功能相关的超家族基因编码的同工酶,主要存在于生物体的内质网内,是混合功能氧化酶中最重要的一种酶系<sup>[8]</sup>。参与药物代谢的 CYP450 同工酶依次是 CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1<sup>[9]</sup>,其中 CYP3A4 含量最多,约占人体肝脏 CYP 的 30% ~ 40%,有 50% 的药物通过其进行代谢<sup>[10]</sup>。有文献报道,P450 同工酶中参与雷公藤代谢的为 CYP2C19 和 CYP3A4,而 CYP3A4 是雷公藤的主要代谢酶<sup>[11]</sup>。所以本实验中主要以 CYP3A4 来研究雷公藤醇提物在体内的代谢。

另外 CYP450 酶系可受多种因素的影响,尤其是药物,能够显著影响 CYP450 酶系的含量或活性,表现为诱导或抑制效应,这种效应可以改变许多药物的药理或毒理活性<sup>[12]</sup>,药物配伍后可导致 CYP450 酶变化,有可能对药物的代谢产生影响,引起药物—药物相互作用,从而导致药物的药效及毒性的改变<sup>[13]</sup>。这也是本实验中选用中医方剂归脾汤进行对抗的原因所在。

本实验中模型组与正常组,CYP450 诱导组比较,大鼠肝脏 CYP3A4 活性降低 ( $P < 0.05$ );归脾汤组与模型组比较 CYP3A4 活性升高 ( $P < 0.05$ );与 CYP450 诱导组比较,归脾汤组大鼠肝脏 CYP3A4 活性差异不明显。可见,雷公藤致大鼠肝损伤与其降低雷公藤代谢的关键酶 CYP3A4 的活性有关,且归

脾汤对 CYP3A4 有诱导作用,可能通过提高 CYP3A4 的活性而发挥其防治作用。

#### [参考文献]

[1] 傅肖岩,劳邵贤.重视中药所致肝损害[J].中药新药与临床药理,2003,14(2):130-133.

[2] Chu I, Favreau L, Soares T, et al. Validation of higher through-putting-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry assays to conduct cytochrome P450s CYP2D6 and CYP3A4 enzyme inhibition studies in human liver microsomes [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2000,14(4):207-208.

[3] 夏成云,高月,周京国,等.大戟配伍甘草对大鼠肝功能及肝脏微粒体中 CYP3A2 的影响[J].中国中医急症,2006,15(9):1013-1015.

[4] Li W, Liu Y, He Y Q, et al. Characterization of triptolide hydroxylation by cytochrome P450 in human and rat liver microsomes [J]. Xenobiotica, 2008, 38(12):1551-1565.

[5] 周文静,柴智,王永辉,等.归脾汤对雷公藤醇提物致急性肝损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(9):169-171.

[6] vonBahr C, Groth C G, Jansson H, et al. Drug metabolism in human liver *in vitro*: establishment of a human liver bank [J]. Clin Pharmacol Ther, 1980, 27(6):711-725.

[7] 吕秋军.新药药理学研究方法[M].北京:化学工业出版社,2007:685-687.

[8] 赵春梅,宓穗卿.肝微粒体细胞色素 P450 研究概况 [J].中药新药与临床药理,2002,13(5):334-337.

[9] Park B K. Cytochrome P450 enzymes in the heart [J]. Lancet, 2000, 355(9208):945-946.

[10] 易飞,周宏源.天然药物对 CYP3A 的影响 [J].中国临床药理学与治疗学,2008,13(3):344-349.

[11] 韦登明,黄光照.雷公藤及其单体的药理和毒理病理学研究进展 [J].中药材,2003,26(12):894-897.

[12] 张宾,张临通.近年中药对 CYP450 酶系影响的研究进展 [J].中药药理与临床,2005,21(6):15-17.

[13] 肖成荣.半楼贝莖及配伍乌头对大鼠肝细胞色素 P450 酶含量的影响 [J].天津中医药,2004,21(4):311-314.

[责任编辑 邹晓翠]