

# 扶正化癆方对原代大鼠肝细胞中 CYP450 的影响

张亚蕾<sup>1</sup>, 郑天慧<sup>1,2</sup>, 刘伟<sup>1,3</sup>, 陶艳艳<sup>1</sup>, 王长虹<sup>3</sup>, 杨涛<sup>1\*</sup>, 刘成海<sup>1,2\*</sup>

(1. 上海中医药大学附属曙光医院肝病研究所, 心血管病研究所, 上海市中医临床重点实验室, 上海 201203; 2. 华东理工大学药学院, 上海 200237; 3. 上海中医药大学中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室, 中药新资源与质量标准综合评价国家中医药管理局重点研究室, 上海 201203)

**[摘要]** 目的: 采用原代大鼠肝细胞 (PRH) 研究扶正化癆方 (FZHY) 对大鼠细胞色素 P450 酶 (CYP450) 的影响。方法: 采用两步灌注法分离大鼠原代肝细胞, 形成肝板结构后加入 FZHY 共培养 24 h, 换成含有 4 种 CYP450 同工酶 (CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4) 对应的特异性探针药物 (非那西丁、甲苯磺丁脲、氢溴酸右美沙芬、睾酮) 的培养基, 培养 2 h 后吸取上清液, 利用 UPLC-MS/MS 对探针药物的代谢产物进行检测, 考察 FZHY 对探针药物代谢产物生成量的影响, 评价 FZHY 对 PRH 中 CYP450 代谢活力的影响。结果: PRH 中 CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 与 CYP3A4 具有良好的代谢活力。4 种探针药物在 0~500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  内对 PRH 没有毒性, 在 0.5~500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  时, FZHY 对 PRH 没有毒性。FZHY 在 5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  时对 PRH 具有轻微的保护作用, 并能使甲苯磺丁脲的代谢活化值——米氏常数 ( $K_m$ ) 降低 20.8%; 氢溴酸右美沙芬的  $K_m$  降低 39.2%; 非那西丁的  $K_m$  降低 17.4%; 并使睾酮的  $K_m$  显著降低。结论: FZHY 能抑制原代大鼠肝细胞中 CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 和 CYP3A4 的代谢活性。

**[关键词]** 扶正化癆方; 细胞色素 P450 酶; 原代肝细胞; 中药复方; 非那西丁; 甲苯磺丁脲; 氢溴酸右美沙芬; 睾酮

**[中图分类号]** R22; R289; R283.6; R284; R94 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)09-0022-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20180902

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180214.1522.011.html>

**[网络出版时间]** 2018-02-15 14:54

## Effect of Fuzheng Huayu Recipe on CYP450 in Primary Rat Hepatocytes

ZHANG Ya-lei<sup>1</sup>, ZHENG Tian-hui<sup>1,2</sup>, LIU Wei<sup>1,3</sup>, TAO Yan-yan<sup>1</sup>,  
WANG Chang-hong<sup>3</sup>, YANG Tao<sup>1\*</sup>, LIU Cheng-hai<sup>1,2\*</sup>

(1. Institute of Liver Diseases, Institute of Cardiovascular Disease, Shanghai Key Laboratory of Traditional Chinese Clinical Medicine, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai 201203, China;

2. School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;

3. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of TCM, Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines, Ministry of Education, Key Laboratory of Comprehensive Evaluation of New Resources and Quality Standards of TCM, State Administration of TCM, Shanghai 201203, China)

**[Abstract]** **Objective:** Taking primary rat hepatocytes (PRH) model, to explore the effect of Fuzheng Huayu recipe (FZHY) on rat cytochrome P450 enzyme (CYP450). **Method:** PRH were isolated and cultured by

**[收稿日期]** 20170823(012)

**[基金项目]** 国家国际科技合作专项(2014DFA31440); 上海市医学领军人才计划项目(LJ10005); 上海中医药事业发展三年行动计划项目(ZY3-CCCX-2-1003)

**[第一作者]** 张亚蕾, 在读硕士, 从事中西医结合防治慢性肝病研究, Tel: 021-20256409, E-mail: yarey\_zhang@163.com

**[通信作者]** \* 刘成海, 教授, 从事中西医结合防治慢性肝病研究, Tel: 021-20256409, E-mail: chenghailiu@hotmail.com;

\* 杨涛, 副研究员, 从事中药活性成分作用机制研究, Tel: 021-20256409, E-mail: yangtao8579@163.com

two-step perfusion method. With the formation of the hepatic plate structure, FZHY was added to culture for 24 h, then replaced with culture medium containing specific probe substrates of CYP450 (phenacetin-CYP1A2, tolbutamide-CYP2C9, dextromethorphan hydrobromide-CYP2D6, testosterone-CYP3A4), the supernatant was aspirated after 2 h, the corresponding products of the probe drugs were detected by UPLC-MS/MS. **Result:** CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4 in PRH had good metabolic activity. The probe drugs had no toxicity on PRH in the range of 0-500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , FZHY had no toxicity on PRH in the range of 0.5-500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . FZHY could slightly protect PRH with concentration of 5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . After PRH was cultured with 5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  FZHY for 24 h, Michaelis constant ( $K_m$ ) of tolbutamide decreased by 20.8%,  $K_m$  of dextromethorphan hydrobromide decreased by 39.2%,  $K_m$  of phenacetin decreased by 17.4%,  $K_m$  of testosterone decreased significantly. **Conclusion:** FZHY can inhibit the activity of CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4 in PRH.

[**Key words**] Fuzheng Huayu recipe; cytochrome P450 enzyme; primary hepatocytes; compound Chinese medicine; phenacetin; tolbutamide; dextromethorphan hydrobromide; testosterone

细胞色素 P450 酶(CYP450)是参与药物在体内生物转化的主要代谢酶<sup>[1]</sup>,约 60% 的处方药物经过该酶系统进行生物转化<sup>[2]</sup>。CYP450 的活性变化可直接影响药物的体内动力学以及后续生物学效应<sup>[3]</sup>,同时药物对 CYP450 也能产生诱导或抑制作用,导致与该药物联用的其他药物或自身代谢的改变,进而引起药物相互作用或不良反应<sup>[4]</sup>,严重者可导致药物开发的早期终止或使用受限,甚至药物撤出市场<sup>[5]</sup>。因此研究药物与 CYP450 的关系可以深入了解药物的体内代谢过程,为临床药物的合理使用提供参考<sup>[6]</sup>。

扶正化瘀方(FZHY)由丹参、五味子、桃仁、发酵虫草菌粉、绞股蓝和松花粉 6 味中药组成,临床中常将其与抗病毒及保肝药等联用,用于治疗如乙病毒感染等慢性肝病导致的肝纤维化<sup>[7]</sup>。课题组前期采用 Cocktail 探针药物法<sup>[8]</sup>对多种同工酶进行测定,发现 FZHY 对正常与肝纤维化模型大鼠 5 种主要代谢酶(CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4)的影响是不同的。通过比较空白组与模型组发现,肝纤维化模型大鼠的 CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 的活性均被明显的抑制, CYP2C9 则被诱导,说明空白组与模型组大鼠 CYP450 的活性状况是不同的。另外, FZHY 对空白组与模型组大鼠 CYP450 的影响也不尽相同,考虑药物在体内的吸收、代谢、排泄是一个复杂的过程,对探针药物药代动力学的影响因素也可能是多方面的。因此,本实验拟采用大鼠原代细胞体外孵育法,利用前期建立的 UPLC-MS/MS<sup>[8-9]</sup>检测原代大鼠肝细胞(PRH)与 FZHY 共培养后,加入 4 种公认的特异性探针药物进行孵育,研究 FZHY 对探针底物相对应代谢产物(对乙酰氨基酚, 4-羟基甲苯磺丁脲,

去甲右美沙芬和 6 $\beta$ -羟基睾酮)生成量的影响,从体外阐明 FZHY 对 4 种 CYP450 同工酶的影响,为 FZHY 的临床应用提供依据。

## 1 材料

ACQUITY UPLC-Quattro Premier XE 型超高效液相色谱-三重四级杆质谱联用仪(美国 Waters 公司,含 MassLynx<sup>TM</sup> 4.1 工作站软件), SBH130D/3 型干式热氮吹仪(美国 Stuart 公司), MTC-100 型恒温混匀仪(杭州米欧仪器有限公司), 5415R 型台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司), BP211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司), Milli-Q 型超纯水器(美国 Millipore 公司), IX70 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司), Steri-Cycle 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo Scientific 公司), HL-2 型恒流泵(上海沪西仪器厂)。

胎牛血清(批号 1205330), MEM 培养基(批号 1774427), RPMI-1640 培养基(批号 1708065), IV 型胶原酶(批号 1645768)均购于美国 Gibco 公司; 八肽胆囊收缩素(CCK-8)试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司,批号 C16693), 非那西丁(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司,批号 30301), 甲苯磺丁脲、对乙酰氨基酚、柳胺酚(美国 Sigma 公司,批号分别为 SLBG2388V, A7302, 53209, 纯度均 > 98.5%), 氢溴酸右美沙芬(中国食品药品检定研究院,批号 100201-201003, 纯度 > 98.5%); 睾酮(批号 SJ-DW-009), 去甲右美沙芬(批号 SJ-CW-006), 4-羟基甲苯磺丁脲(批号 SJ-CW-004), 6 $\beta$ -羟基睾酮(批号 SJ-CW-008)均购于瑞德肝脏疾病研究(上海)有限公司, 纯度均 > 98.5%; 扶正化瘀方(FZHY)浸膏粉(上海现代医药科技发展公司,批号 131014, 干膏率 13.75%), 水为自制超纯水, 甲醇、乙腈为色谱纯,

其余试剂为分析纯。

细胞培养基(自制,取 RPMI-1640 或 MEM 培养基干粉 1 袋,  $\text{NaHCO}_3$  2.2 g, 链霉素 62.5 mg, 青霉素 0.1 g, 加水至 1 L, pH 调至 7.2, 过膜除菌, 于 4 °C 保存), 灌流液 [ 自制, 取  $\text{NaCl}$  8.0 g,  $\text{KCl}$  0.4 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.078 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.151 g, 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) 2.38 g, 酚红 0.006 g,  $\text{NaHCO}_3$  0.35 g, 加葡萄糖 0.9 g, 乙二醇双四乙酸 0.19 g, 加水至 1 L, 用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaOH}$  溶液将 pH 调至 7.2, 成前灌流液; 或取  $\text{NaCl}$  8 g,  $\text{KCl}$  0.4 g,  $\text{CaCl}_2$  0.56 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.078 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.151 g, HEPES 2.38 g, 酚红 0.006 g,  $\text{NaHCO}_3$  0.35 g, 加水至 1 L, 将 pH 调至 7.2, 得酶灌流液, 过膜, 除菌, 于 4 °C 保存]。探针药物 (非那西丁、氢溴酸右美沙芬、甲苯磺丁脲、睾酮) 均用二甲基亚砷溶解, 配制浓度为  $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的母液; 相应代谢产物 (对乙酰氨基酚, 去甲右美沙芬, 4-羟基甲苯磺丁脲,  $6\beta$ -羟基睾酮) 均用甲醇溶解, 配制浓度为  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的母液。

SPF 级 Wistar 雄性大鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK (京) 2016-0011, 体质量 ( $85 \pm 20$ ) g, 饲养于上海中医药大学实验动物中心, 许可证号 SYXK (沪) 2014-0008。动物的处理及实验已通过上海中医药大学伦理委员会批准, 批准号 ACSHU-2011-G115。

## 2 方法

**2.1 原代大鼠肝细胞 (PRH) 的分离与培养**<sup>[10]</sup> 腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 (剂量  $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 麻醉大鼠后置于超净工作台上, 仰卧固定, 用 75% 乙醇消毒皮毛。采用 U 型剖腹术暴露门静脉, 并于肠系膜近肝脏处, 用 18 G 留置针行门静脉穿刺。以 37 °C 预热前灌流液缓慢冲洗肝脏, 并迅速剪断下腔静脉放血, 至肝脏变为土黄色, 换酶灌流液灌流直到肝脏表面开始出现微透明状小泡, 停止灌流, 剪下肝脏, 置于预冷的 MEM 培养液中, 撕开肝包膜后用 MEM 轻柔混匀, 双层纱布过滤, 滤液在  $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 4 °C 条件下离心洗涤 1 min, 弃上清。MEM 培养液重悬细胞,  $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心洗涤 1 min, 共 3 次, 最后 1 次离心完成 3 min 后弃上清。用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI-1640 培养液重悬细胞后使用台盼蓝染色并于显微镜下计数。用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液稀释细胞至  $2 \times 10^5$  个/mL, 每孔 100  $\mu\text{L}$  种于 96 孔板, 于 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度的培养箱中培养, 6 h 后更换培养液。经活性计算分离得到

的 PRH 活率均  $>90\%$ , 培养 48 h 内生长期较好, 适用于实验研究。

**2.2 检测条件**<sup>[11]</sup> ACQUITY UPLC BEH  $\text{C}_{18}$  色谱柱 ( $2.1 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$ ,  $1.7 \mu\text{m}$ ), 流动相 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 1 min, 8% ~ 25% B; 1 ~ 4 min, 25% ~ 70% B; 4 ~ 5 min, 70% B), 流速  $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 柱温 45 °C, 进样量 10  $\mu\text{L}$ 。待测物在电喷雾正离子模式下采用多反应监测 (MRM) 模式进行检测。毛细管电压 2.5 kV, 萃取电压 2.0 V, 离子源温度 120 °C, 脱溶剂温度 400 °C, 脱溶剂气 ( $\text{N}_2$ ) 流速  $700 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ , 锥孔气 ( $\text{N}_2$ ) 流速  $75 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ , 氩气作为碰撞气。非那西丁检测离子对  $m/z$  151.90 ~ 109.80, 锥孔电压 30 V, 碰撞电压 15 V; 氢溴酸右美沙芬检测离子对  $m/z$  258.30 ~ 156.90, 锥孔电压 45 V, 碰撞电压 37 V; 甲苯磺丁脲检测离子对  $m/z$  286.60 ~ 171.00, 锥孔电压 30 V, 碰撞电压 20 V; 睾酮检测离子对  $m/z$  305.30 ~ 269.30, 锥孔电压 30 V, 碰撞电压 18 V; 内标物 (IS) 柳胺酚检测离子对  $m/z$  230.00 ~ 120.77, 锥孔电压 30 V, 碰撞电压 22 V。数据采集与处理通过 MassLynx<sup>TM</sup> 4.1 工作站软件完成。

**2.3 样品处理** 精密移取 4 种探针药物同等浓度的细胞培养液各 50  $\mu\text{L}$  (总体积共 200  $\mu\text{L}$ ), 加入含  $16.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  柳胺酚的乙腈溶液 600  $\mu\text{L}$ , 采用混匀仪在  $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 4 °C 条件下自动混合涡旋 10 min 以沉淀蛋白, 在  $13000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 4 °C 条件下离心 10 min, 吸取上清液 640  $\mu\text{L}$  至 1.5 mL 离心管中, 于 35 °C 条件下  $\text{N}_2$  吹干, 用含 10% 乙腈的初始流动相 80  $\mu\text{L}$  复溶; 采用混匀仪在  $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 4 °C 条件下自动混合涡旋 10 min 进行复溶, 在设定  $13000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 4 °C 条件下离心 10 min, 吸取上清液至液相小瓶中待测。

**2.4 CYP450 活性的表征** 取新鲜分离的 PRH, 以每孔  $2 \times 10^4$  个接种于 96 孔板中, 6 h 后更换培养液。待细胞出现肝板结构时, 更换培养液, 加入含有探针药物的 RPMI-1640 培养液 (含 10% FBS), 每孔 200  $\mu\text{L}$ , 平行 3 份, 与细胞共孵育 2 h, 采用 2.3 项下方法操作, 利用 UPLC-MS/MS 进行检测。

**2.5 探针药物对 PRH 的毒性** 取新鲜分离的 PRH, 以每孔  $2 \times 10^4$  个接种于 96 孔板中, 6 h 后更换培养液。待细胞出现肝板结构时, 更换培养液, 加入含有梯度浓度 (0 ~ 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 探针药物的 RPMI-1640 培养液 (含 10% FBS), 每孔 200  $\mu\text{L}$ , 平行 3 份。继续培养 24 h 后弃去培养液, 加入 CCK-8

与RPMI-1640培养液比例为1:10的混合液,每孔加入100  $\mu\text{L}$ ,置培养箱孵育2 h,分别在450,630 nm处测定吸光度A,细胞存活率 =  $A_{\text{给药组}}/A_{\text{空白组}} \times 100\%$ 。

**2.6 FZHY对PRH的毒性与活性** 取新鲜分离的PRH,以每孔 $2 \times 10^4$ 个接种于96孔板中,6 h后更换培养液。待细胞出现肝板结构时,更换培养液,加入含有梯度质量浓度(0,0.5,1,5,10,20,50,100,500  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )FZHY的RPMI-1640培养液(含10%FBS),每孔200  $\mu\text{L}$ ,平行6份。继续培养24 h后弃培养液,其中3个复孔换成RPMI-1640培养液(含10%FBS),每孔200  $\mu\text{L}$ ;另3个复孔换成含0.5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 的RPMI-1640培养液,用于考察FZHY对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导细胞损伤的保护作用。培养箱孵育10 min后均弃去培养液,换成CCK-8与RPMI-1640培养液比例为1:10的混合液,每孔加入100  $\mu\text{L}$ ,置培养箱孵育2 h后分别在450,630 nm处测定A,计算细胞存活率。

**2.7 FZHY对PRH酶促动力学的影响** 取新鲜分离的PRH,以每孔 $2 \times 10^4$ 个接种于4块96孔板中,边缘孔加入PBS,6 h后更换培养液。待细胞出现肝板结构时,更换培养液,每块板均一半孔换成含FZHY(5  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )的RPMI-1640培养液(含10%FBS),每孔200  $\mu\text{L}$ ,另一半孔换成RPMI-1640培养液(含10%FBS),每孔200  $\mu\text{L}$ 。继续培养24 h后4块板均更换培养液,换成含梯度浓度探针药物的RPMI-1640培养液,每个浓度药物设置6个复孔,与细胞共孵育2 h后按2.3项下方法操作。

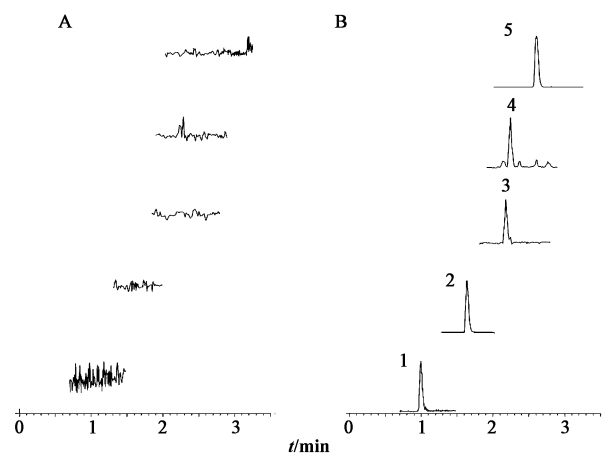
**2.8 数据处理** 采用UPLC-MS/MS检测探针药物代谢产物峰面积与内标峰面积的比值,计算培养液中代谢产物的浓度( $C_{\text{product}}$ )。按公式 $V = C_{\text{product}}/(T \times C_{\text{cell}})$ 计算反应速度(V),式中T为反应时间, $C_{\text{cell}}$ 为体系中细胞数量。而后求反应速度与底物浓度(S)的比值V/S。以V(以每个细胞数计算)为纵坐标,V/S为横坐标,按照Eadie-Hofstee作图法进行作图,得酶促反应方程。

### 3 结果

**3.1 标准曲线** 取探针代谢产物对照品母液用水稀释成对乙酰氨基酚,去甲右美沙芬,4-羟基甲苯磺丁脲,6 $\beta$ -羟基睾酮浓度均为500  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品储备液,通过稀释获得系列浓度的混合对照品工作液。按2.3项下方法操作,以待测物质量浓度为横坐标,待测物与内标的峰面积比值为纵坐标,利用加权最小二乘法进行线性回归,结果对乙酰氨基

酚标准曲线为 $y = 0.0014x + 0.1694 (r = 0.9956)$ ,线性范围0.01~5.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,定量限5  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;去甲右美沙芬标准曲线为 $y = 9 \times 10^5x + 0.0063 (r = 0.9988)$ ,线性范围0.10~1.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,定量限50  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;4-羟基甲苯磺丁脲标准曲线为 $y = 0.001x + 0.4289 (r = 0.9953)$ ,线性范围0.05~25.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,定量限20  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;6 $\beta$ -羟基睾酮标准曲线为 $y = 0.0003x + 0.0324 (r = 0.9992)$ ,线性范围0.05~5.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,定量限20  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**3.2 CYP450活性的表征** 通过UPLC-MS/MS可以检测到CYP1A2,CYP2C9,CYP2D6,CYP3A4相应的4种探针药物的代谢产物及内标柳胺酚,见图1。结果显示本方法测得待测物峰形及分离效果较好,表明PRH中具有CYP1A2,CYP2C9,CYP2D6与CYP3A4,且代谢活性较好。



A. 空白细胞培养液;B. 供试品;1. 对乙酰氨基酚;2. 4-羟基甲苯磺丁脲;3. 去甲右美沙芬;4. 6 $\beta$ -羟基睾酮;5. 柳胺酚(IS)

图1 加入探针药物2 h后细胞培养液中代谢产物的UPLC-MS/MS  
Fig.1 UPLC-MS/MS chromatograms of metabolites in cell culture fluid after adding probe drugs for 2 h

**3.3 探针药物对PRH的毒性** 为了获得探针药物的安全使用剂量,考察了不同浓度探针药物对PRH细胞活力的影响,结果发现与对照孔(用空白溶剂代替探针药物)相比较,探针药物非那西丁(浓度0~500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),氢溴酸右美沙芬(0~500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),甲苯磺丁脲(0~500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),睾酮(0~500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )对PRH的细胞活力均无显著影响,表明在这些剂量范围内使用探针底物是安全的。

**3.4 FZHY对PRH的毒性与活性** 结果发现与空白组相比,加入不同质量浓度(0,0.5,1,5,10,20,50,100,500  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )FZHY孵育24 h对PRH的细胞活力无影响,细胞存活率分别为(100.00  $\pm$

6.32)% , (94.34 ± 8.12)% , (102.11 ± 6.27)% , (105.48 ± 7.19)% , (103.81 ± 6.95)% , (98.96 ± 7.22)% , (105.62 ± 8.01)% , (102.74 ± 6.08)% 和 (99.25 ± 7.12)% 。采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导细胞损伤模型考察 FZHY 的保护作用,发现与模型组比较,仅加入 5 μg·L<sup>-1</sup> FZHY 时,PRH 细胞活性有所增强,故后续对酶活性影响的研究即选择该剂量。见表 1。

表 1 不同质量浓度扶正化痰方对原代大鼠肝细胞活性的影响 (x̄ ± s, n=3)

Table 1 Effect of FZHY with different concentration on activity of primary rat hepatocytes (PRH) (x̄ ± s, n=3)

扶正化痰方质量浓度 / μg·L <sup>-1</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 浓度 / μmol·L <sup>-1</sup>	细胞存活率 / %
0	0	100.00 ± 7.58
0	0.5	61.24 ± 7.13 <sup>1)</sup>
0.5	0.5	58.74 ± 5.18 <sup>1)</sup>
1	0.5	64.83 ± 6.95 <sup>1)</sup>
5	0.5	74.58 ± 8.29 <sup>1,2)</sup>
10	0.5	60.19 ± 6.21 <sup>1)</sup>
20	0.5	58.12 ± 7.24 <sup>1)</sup>
50	0.5	64.07 ± 6.88 <sup>1)</sup>
100	0.5	58.33 ± 7.14 <sup>1)</sup>
500	0.5	60.05 ± 6.27 <sup>1)</sup>

注:与未加扶正化痰方和未加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比较<sup>1)</sup> P < 0.001;与未见扶正化痰方但加了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组比较<sup>2)</sup> P < 0.05。

3.5 FZHY 对 PRH 酶促动力学影响 4 种 CYP450 同工酶 (CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 和 CYP3A4) 的酶促动力学行为见图 2, 结果发现非那西丁、甲苯磺丁脲、氢溴酸右美沙芬的酶促动力学均符合米氏方程描述的典型酶促反应动力学模型, 奎酮的的酶促动力学符合希尔方程描述的典型酶促反应动力学模型。

FZHY 在有效剂量 (5 μg·L<sup>-1</sup>) 下对 4 种 CYP450 同工酶酶促反应的影响见图 3。结果发现 5 μg·L<sup>-1</sup> FZHY 能降低甲苯磺丁脲的代谢活化值——米氏常数 (K<sub>m</sub>) 处于 110 ~ 87.15 μmol·L<sup>-1</sup>, 最大反应速度 (V<sub>max</sub>) 从 7.4 × 10<sup>-4</sup> nmol·min<sup>-1</sup> 到 6.9 × 10<sup>-4</sup> nmol·min<sup>-1</sup>; 降低氢溴酸右美沙芬的 K<sub>m</sub> 从 97.7 μmol·L<sup>-1</sup> 到 59.4 μmol·L<sup>-1</sup>, V<sub>max</sub> 从 44.9 × 10<sup>-4</sup> nmol·min<sup>-1</sup> 至 35.8 × 10<sup>-4</sup> nmol·min<sup>-1</sup>; 降低非那西丁的 K<sub>m</sub> 从 214.2 μmol·L<sup>-1</sup> 到 177 μmol·L<sup>-1</sup>, V<sub>max</sub> 显著降低; 降低奎酮的 K<sub>m</sub> 从 4.73 μmol·L<sup>-1</sup> 至 1.07 μmol·L<sup>-1</sup>, 但对 V<sub>max</sub> 没有影响。

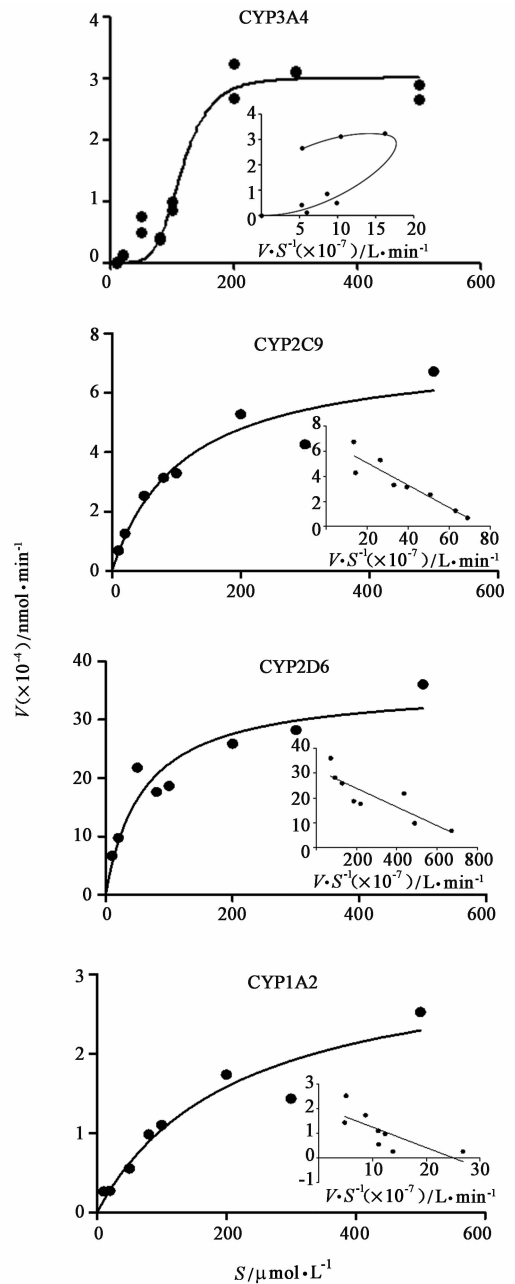


图 2 原代大鼠肝细胞中不同探针药物的酶促动力学分析 (n=3)  
Fig. 2 Enzymatic kinetics analysis of probe substrates in PRH (n=3)

#### 4 讨论

大鼠原代细胞体外模型既排除了其他器官和组织的影响,又能较好地保留和维持了肝细胞的完整形态及肝细胞的代谢活性,能够相对真实地反映了药物在体内的代谢情况,为最接近载体肝脏研究药物代谢的体系之一,目前已被广泛用于各种药物的体外代谢评价<sup>[12]</sup>。然而,采用此模型用于评估中药复方对 CYP450 的影响并不多见。在本研究中,按两步灌注法分离大鼠原代肝细胞,其 CYP450 同工酶 CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4 代谢能力较

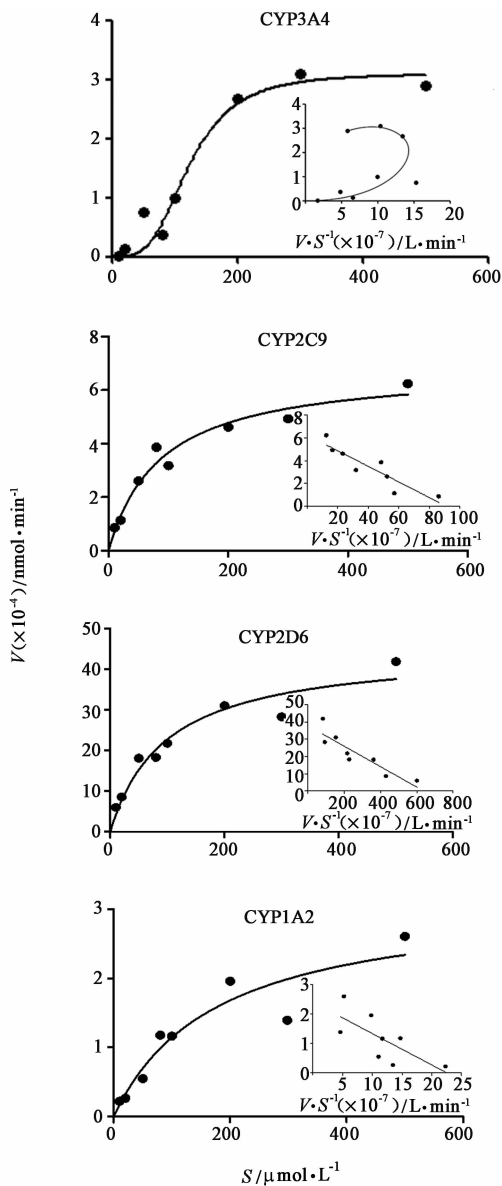


图 3 FZHY 对原代大鼠肝细胞中探针药物酶促动力学的影响 (n=3)

Fig. 3 Effect of FZHY on enzymatic kinetics analysis of probe substrates in PRH (n=3)

好。并且 FZHY 在  $0.5 \sim 500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  内对大鼠原代肝细胞无毒性,而当药物质量浓度为  $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  时,对  $\text{H}_2\text{O}_2$  导致的肝细胞损伤具有一定的保护作用。

本研究结果表明 FZHY 能显著抑制大鼠原代肝细胞中 CYP2C9, CYP2D6 和 CYP1A2, 三者的  $K_m$  分别能降低 20.8%, 39.2% 和 17.4%; FZHY 也能一定程度抑制 CYP3A4 的代谢能力。将体外试验结果与前期体内试验结果进行比较,在体内试验时发现 FZHY 能显著抑制正常大鼠 CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 和 CYP2D6 的活性,但对 CYP3A4 的活性影响不明显<sup>[8]</sup>,这与当前体外细胞试验有一定的相

近之处,但是抑制程度不如在体内明显。这可能由于中药复方成分复杂,且各种成分对 CYP450 的影响不同,对 CYP450 的影响并非简单的剂量加和,因此对中药复方很难做到消除剂量依赖性的影响。此外,在机体中 CYP450 分布范围较广,肝脏、小肠、脑组织中甚至生殖系统中均有存在,体内 CYP450 的影响因是整体综合作用,与单纯器官的影响很难完全一致<sup>[13-14]</sup>。本文开展了中药复方对原代肝细胞中 CYP450 的影响,但在研究中还存在一些问题,例如中药复方提取物的溶解性、提取物的颜色等理化性质可能会对实验结果造成影响,尽可能降低药物浓度,消除这些因素的影响才能保证有较准确的实验结果。另外,由于中药复方成分复杂,尚不清楚是单一或一群成分影响药物代谢酶的活性,这还有待进一步研究证实。

[参考文献]

[ 1 ] Wienkera L C, Heath T G. Predicting *in vivo* drug interactions from *in vivo* drug discovery data [ J ]. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4 ( 10 ): 825-833.  
 [ 2 ] Venkatakrishnan K, Von-Moltke L L, Greenblatt D J. Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of *in vitro* models [ J ]. J Clin Pharmacol, 2001, 41 ( 11 ): 1149-1179.  
 [ 3 ] WANG J J, GUO J J, ZHAN J, et al. An *in vitro* cocktail assay for assessing compound-mediated inhibition of six major cytochrome P450 enzymes [ J ]. J Pharmaceut Anal, 2014, 4 ( 4 ): 270-278.  
 [ 4 ] 陈红,程再兴,吴锦俊,等.川乌配伍半夏对大鼠 CYP3A 的影响 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 ( 2 ): 75-80.  
 [ 5 ] Kalgutkar A S, Obach R S, Maurer T S. Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 enzymes: chemical mechanisms, structure-activity relationships and relationship to clinical drug-drug interactions and idiosyncratic adverse drug reactions [ J ]. Curr Drug Metab, 2007, 8 ( 5 ): 407-447.  
 [ 6 ] LIN D J H, LU A Y H. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications [ J ]. Clin Pharmacokin, 1998, 35 ( 5 ): 361-390.  
 [ 7 ] YANG T, LIU S, WANG C H, et al. Comparative pharmacokinetic and tissue distribution profiles of four major bioactive components in normal and hepatic fibrosis rats after oral administration of Fuzheng Huayu recipe [ J ]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 114: 152-158.  
 [ 8 ] 郑天慧,刘伟,李淑萍,等.扶正化瘀方对正常及肝纤维化大鼠体内 CYP450 酶的影响 [ J ]. 中国中药杂志,

- 2015,40(6):1166-1172.
- [ 9 ] XU W, ZHANG Y, ZHOU C, et al. Simultaneous quantification six active compounds in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study of Pien-Tze-Huang [ J ]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2017, doi: 10.1016/j.jchromb.2017.07.033.
- [ 10 ] Aghdai M H, Jamshidzadeh A, Nematizadeh M, et al. Evaluating the effects of dithiothreitol and fructose on cell viability and function of cryopreserved primary rat hepatocytes and HepG2 cell line [ J ]. Hepat Mon, 2013, 13(1):e7824.
- [ 11 ] 汤俊,王峥涛. UPLC-MS 用于体外大鼠肝微粒体 CYP1A2 和 CYP2D1 酶代谢活性表征及动力学研究 [ J ]. 中国药学杂志, 2015, 50(12):1043-1047.
- [ 12 ] 李耀庭,吕建军,周舒雅,等. 原代肝细胞分离培养及其作为致癌物预测体外模型应用的进展 [ J ]. 药物分析杂志, 2015, 35(7):1134-1139.
- [ 13 ] 周文静,柴智,王永辉,等. 归脾汤对雷公藤醇提取物致肝损伤大鼠肝微粒体 CYP3A4 酶活性的影响 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(6):113-116.
- [ 14 ] Uehara S, Uno Y, Nakanishi K, et al. Marmoset Cytochrome P450 3A4 ortholog expressed in liver and small-intestine tissues efficiently metabolizes midazolam, alprazolam, nifedipine, and testosterone [ J ]. Drug Metab Dispos, 2017, 45(5):457-467.
- [责任编辑 刘德文]