

乳香没药对细胞色素 P450 活性的影响

周昆*, 朱桃桃, 马志会, 王安红

(天津中医药大学中医药研究院, 方剂学教育部重点实验室, 天津 300193)

[摘要] 目的: 考察乳香没药对细胞色素 P450 活性的影响。方法: 56 只小鼠分为对照组和乳香 + 没药 3.15, 2.10, 1.05 g·kg⁻¹ 剂量组, 连续 ig 给药 7 d; 48 只小鼠分为对照组和乳香、没药、乳香 + 没药组, ig 给药 3.15 g·kg⁻¹ 1 次。所有小鼠末次药后 30 min ip 给予戊巴比妥钠, 观察乳香没药对 P450 的影响。40 只大鼠分为对照组、乳香组、没药组、乳香 + 没药组, 以 3.00 g·kg⁻¹ 连续 ig 给药 14 d, 取肝脏制备各组动物肝微粒体, 并用 cocktail 探针法考察乳香没药对大鼠 CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4 的影响。结果: 乳香 + 没药 3.15, 2.10, 1.05 g·kg⁻¹ 剂量连续给药 7 d 均可使戊巴比妥钠诱导的小鼠睡眠率降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而单次给药 3.15 g·kg⁻¹ 有使戊巴比妥钠诱导的小鼠睡眠率升高的趋势。乳香、没药及乳香 + 没药混合物组大鼠肝微粒体体外对非那西丁、氯唑沙宗代谢率显著高于对照组, 而氨苯砜无明显差异。结论: 乳香、没药连续用药均使 CYP1A2, CYP2E1 活性增强, 而对 CYP3A4 则无显著影响。

[关键词] 乳香; 没药; 细胞色素 P450; CYP1A2; CYP2E1; CYP3A4

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0131-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110920.1432.016 **[网络出版时间]** 2011-09-20 14:32

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110920.1432.016.html>

Influence of Olibanum and Myrrha on Activity of Cytochrome P450

ZHOU Kun*, ZHU Tao-tao, MA Zhi-hui, WANG An-hong

(Institute of Traditional Chinese Medicine(TCM), Key Laboratory of Pharmacology of TCM Formulae
by Ministry of Education, Tianjin University of TCM, Tianjin 300193)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of Olibanum and Myrrha on the activity of cytochrome P450 and its isoforms. **Method:** 56 mice were divided into control group and 3 groups treated with Olibanum + Myrrha (3.15, 2.10, 1.05 g·kg⁻¹) for 7 days. And other 48 mice were divided into control group and 3 groups that were intragastrically administrated once with Olibanum + Myrrha, Olibanum, Myrrha (3.15 g·kg⁻¹). 30 min after last administration, mice were intraperitoneal injected with pentobarbital sodium, to observe the influence of Olibanum and Myrrha on P450. Forty rats were divided into four groups by random. 3 groups were intragastrically treated with Olibanum + Myrrha, Olibanum, Myrrha (3.00 g·kg⁻¹) once a day for 14 days and the control group with water. Liver microsomes of rats was prepared to investigate the influence on CYP1A2, CYP2E1 and CYP3A4 of Olibanum and Myrrha by three-drug cocktail approach *in vitro*. **Result:** The number of sleeping mice was significantly decreased of groups which were treated with Olibanum and Myrrha (3.15, 2.10, 1.05 g·kg⁻¹) for 7 days, and yet the number was increased with once administration. The phenacetin and chlorzoxazone metabolic rates of Olibanum and Myrrha and its mixture groups were significantly higher than the control group in liver microsomes, and there was significantly different on dapson. **Conclusion:** The activity of CYP1A2 and CYP2E1 was increased with the continuous use of Olibanum and Myrrha, and CYP3A4 was not significantly affected.

[收稿日期] 20110426(011)

[基金项目] 重大新药创制专项(2011ZX09201-201-21)

[通讯作者] * 周昆, 助理研究员, 从事中药的毒性机制、减毒技术研究和新药研发, Tel: 13920396693, E-mail: z. k. ken@263.net

[Key words] Olibanum; Myrrha; cytochrome P450; CYP1A2; CYP2E1; CYP3A4

乳香和没药均有活血止痛的功效,两者常作为对药在复方中使用,临床应用广泛,在药典中含有乳香、没药的中成药就有 30 多个。近年研究发现乳香没药可引起动物肝损害^[1-2],而乳香、没药与其他药材一起使用对其本身肝毒性或其他药材的药效和毒性是否会有影响尚不得而知。细胞色素 P450 作为人体重要的 I 相药物代谢酶系统,在药物代谢和药物间相互作用方面存在着重要价值,本文考察了乳香和没药对细胞色素 P450 及其亚型 CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4 活性的影响,为分析乳香没药与其他药材配伍时肝毒性的变化及对其他药材代谢的影响提供实验基础。

1 材料

1.1 受试药物 乳香和没药均购自天津市顺时德大药房。药材粉碎过 80 目筛备用。

1.2 动物 Wistar 大鼠和昆明种小鼠, SPF 级,合格证号 SCXK(津)2009-0001,购自天津市山川红实验动物科技有限公司。饲养于天津中医药大学实验动物中心,所用饲料为大鼠全价颗粒饲料为天津市华荣实验动物科技有限公司生产。

1.3 试剂与仪器 戊巴比妥钠(国药集团化学试剂有限公司进口分装);甲硝唑(中国药品生物制品检定所);非那西丁,氯唑沙宗(Alfa Aesar);氨苯砞(Fluka);NADPH(Roche);TRIS(ANGUS);甲醇,乙腈(色谱纯,天津康科德科技有限公司);KCl, CaCl₂, K₂HPO₄, HCl, H₃PO₄等(分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司);纯水(Millipore 制备)。

AX205 型分析天平(METTLER TOLEDO), JJ2000 型精密电子天平(常熟双杰测试仪器厂), L8-80M 型高速离心机(Beckman), N-EVAP111 型氮吹仪(Organomation), Waters600E 型高效液相(Waters 2487 紫外检测器)。

2 方法

2.1 对戊巴比妥钠诱导小鼠睡眠的影响^[3]

2.1.1 乳香 + 没药连续用药对戊巴比妥钠诱导小鼠睡眠的影响 56 只小鼠,雌雄各半,分为对照组和乳香 + 没药 3.15, 2.10, 1.05 g·kg⁻¹ 剂量组。连续 ig 给药 7 d,对照组给予等量洁净自来水,末次药后 30 min 给予 45 mg·kg⁻¹ 的戊巴比妥钠,以小鼠的翻正反射消失 1 min 作为入睡,观察各组动物的睡

眠情况。组间比较使用卡方检验。

2.1.2 单次用药对戊巴比妥钠诱导小鼠睡眠的影响 48 只小鼠,雌雄各半,分为对照组和乳香、没药、乳香 + 没药(1:1)混合物组,剂量均为 3.15 g·kg⁻¹。ig 给药 1 次,药后 30 min 给予 35 mg·kg⁻¹ 的戊巴比妥钠,观察各组动物的睡眠情况。

2.2 对大鼠 CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4 的影响 大鼠 40 只,雌雄各半,分为对照组、乳香组、没药组、乳香 + 没药(1:1)混合组,给药组均以 3.00 g·kg⁻¹ 剂量连续 ig 给药 14 d,对照组给予等量洁净自来水。末次药后 24 h 取肝脏用生理盐水从肝门静脉冲洗肝脏至土黄色,取 1 g 肝脏用钙沉淀法制备肝微粒体^[3],沉淀加 1 mL K₂HPO₄ 缓冲液即为肝微粒体悬液,于 -80 °C 保存。考察各组大鼠肝微粒体体外对非那西丁、氯唑沙宗、氨苯砞的代谢情况,分别对应 CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4,以探针药峰面积与内标峰面积比值为指标。并设空白组,其中加入肝微粒体为失活肝微粒体。组间比较使用单因素方差分析。

2.2.1 体外肝微粒体体系 肝微粒体悬液、NADPH 及混合底物工作液的磷酸缓冲液组成体外肝微粒体体系。取肝微粒体悬液 60 μL 和含非那西丁、氯唑沙宗、氨苯砞均为 4 mg·L⁻¹ 的磷酸缓冲液 100 μL 至离心管中,与 NADPH 孵育液分别在 37 °C 预热 5 min,将 40 μL 已预热的 NADPH 加入肝微粒体与混合底物工作液混中启动反应,60 min 后加入 CH₂Cl₂ 800 μL 终止反应。反应完毕后加入 10 μL 质量浓度为 102 mg·L⁻¹ 的甲硝唑内标溶液,涡旋混合 2 min, 5 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。取有机相 700 μL,氮气吹干,用 100 μL 甲醇溶解,于 14 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取 20 μL 进样分析。

2.2.2 方法学考察 在失活肝微粒体中加入不同浓度底物混合物,按样品处理方法处理,检测底物的最低检测线。在线性范围内取高、中、低 3 个浓度底物混合后进行回收率、日内精密度,每个浓度 5 个样,每一浓度连续测定 3 d 为日间精密度。色谱条件为 Agilent TC-C18 (5 μm, 4.6 mm × 150 mm) 色谱柱,流动相为乙腈-水(24:76) 流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,检测波长 280 nm。

3 结果

3.1 乳香没药对戊巴比妥钠诱导小鼠睡眠的影响

乳香没药混合物连续使用,在不同剂量均可使戊巴比妥钠诱导的小鼠睡眠只数减少,作用强度与用药剂量呈负相关(表1)。单次给药的结果表明,乳香和没药均可使小鼠入睡数增加,与对照组无显著性差异(表2)。

表1 乳香+没药连续用药7 d对戊巴比妥钠诱导小鼠睡眠的影响($n=14$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	入睡数 /只	入睡率 /%
对照	-	13	92.9
乳香+没药	3.15	10	71.4
	2.10	7 ¹⁾	50.0
	1.05	5 ²⁾	35.7

注:与对照组比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

表2 乳香、没药及二者配伍单次用药对戊巴比妥钠诱导小鼠睡眠的影响($n=12$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	入睡数/只	入睡率/%
对照	-	8	66.7
乳香+没药	3.15	11	91.7
乳香	3.15	11	91.7
没药	3.15	11	91.7

3.2 对大鼠 CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4 的影响

3.2.1 方法学考察 非那西丁、氯唑沙宗、氨苯砜和内标甲硝唑分离良好,出峰时间依次为甲硝唑 3.168 min,氨苯砜 8.374 min,非那西丁 10.722 min,

表4 乳香、没药及二者配伍对大鼠肝微粒体体系中探针药物的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

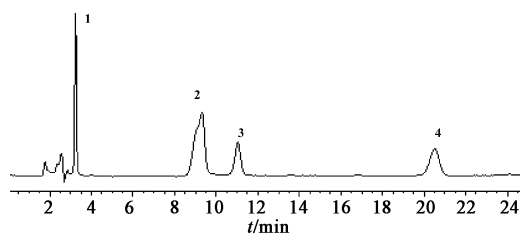
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	非那西丁(CYP1A2)		氯唑沙宗(CYP2E1)		氨苯砜(CYP3A4)	
		浓度	代谢率/%	浓度	代谢率/%	浓度	代谢率/%
空白	-	0.63 ± 0.03	-	0.88 ± 0.04	-	2.26 ± 0.18	-
对照	-	0.56 ± 0.05	11	0.75 ± 0.06	15	1.59 ± 0.17	30
乳香+没药	3.00	0.42 ± 0.04 ^{3,4)}	24	0.30 ± 0.11 ^{3,4)}	48	1.43 ± 0.21	37
乳香	3.00	0.44 ± 0.03 ³⁾	30	0.32 ± 0.11 ^{3,4)}	64	1.42 ± 0.47	37
没药	3.00	0.48 ± 0.06 ²⁾	33	0.46 ± 0.10 ³⁾	66	1.52 ± 0.15	33

注:与对照组比²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.001$;与没药组比较⁴⁾ $P < 0.01$;浓度为探针药峰面积与内标峰面积比值;代谢率为各组与空白组比较,探针药物减少的百分比。

4 讨论

戊巴比妥钠代谢的快慢直接受 P450 活性的影响。小鼠连续 ig 给予乳香没药 7 d 使戊巴比妥钠诱导的小鼠睡眠只数减少,说明戊巴比妥钠在体内代谢加快,乳香没药连续使用可使 P450 活性增强,但

氯唑沙宗 19.454 min,未受干扰。3 个探针药的标准曲线方程及相关指标见表 3。



1. 甲硝唑;2. 氨苯砜;3. 非那西丁;4. 氯唑沙宗

图1 含3个探针药及内标的肝微粒体 HPLC

表3 3个探针药的标准曲线方程及相关指标($\bar{x} \pm s, n=12$)

探针药	标准曲线方程	相关系数	线性范围 /mg·L ⁻¹	最低检测限 /μg·L ⁻¹
非那西丁	$Y = 5.8403X + 0.0281$	0.9998	0.5 ~ 32	20
氯唑沙宗	$Y = 2.2696X - 0.0399$	0.9993	0.5 ~ 32	40
氨苯砜	$Y = 0.8210X + 0.0087$	0.9998	0.25 ~ 16	10

非那西丁回收率在 95.22% ~ 105.64%,氯唑沙宗在 94.43% ~ 106.58%,氨苯砜在 98.49% ~ 106.28%。

非那西丁日内及日间 RSD 在 2.97% ~ 8.37%,氯唑沙宗在 1.51% ~ 10.84%,氨苯砜在 2.59% ~ 9.23%。

3.2.2 对 CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4 探针药物代谢的影响 反应完毕后,乳香组、没药组、乳香+没药混合组肝微粒体体系中非那西丁和氯唑沙宗的浓度显著低于对照组,而氨苯砜则无显著差异。结果表明,无论是乳香、没药还是其混合物均可使大鼠 CYP1A2, CYP2E1 活性增强,而对 CYP3A4 则无显著影响。

这个诱导作用却与乳香没药的剂量呈现负相关性,表明乳香没药在剂量增大的同时也在抑制戊巴比妥钠在体内的代谢。乳香没药单次给药使戊巴比妥钠诱导的小鼠睡眠率升高更加证实了这一点,小鼠睡眠率升高说明戊巴比妥钠的代谢被乳香没药所抑

黄芪不同有效部位配伍对骨髓抑制模型小鼠粒系调控因子的影响

张红梅¹, 范颖^{1*}, 林庶茹²

(1. 辽宁中医药大学方剂学科, 沈阳 110032;

2. 辽宁中医药大学中医分子生物学实验室, 沈阳 110032)

[摘要] 目的:考察黄芪不同有效部位配伍对骨髓抑制模型小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、肿瘤坏死因子- β (TNF- β)的影响。方法:BALB/c 小鼠实验第 1,3,5 天 ip 环磷酰胺 $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 复制骨髓抑制模型。分为正常组、模型组、黄芪饮片组、酮苷组、糖苷组、糖酮组、糖苷酮组。造模当日给药,正常组、模型组按 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ig 蒸馏水;黄芪饮片组按 $10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ig 黄芪水煎液;各有效部位配伍组按黄芪生药量 $10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 分别 ig 相应治疗药物(酮苷组 $0.227 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,糖苷组 $0.610 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,糖酮组 $0.514 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,糖苷酮组 $0.678 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。连续 ig 15 d。ELISA 法检测小鼠骨髓细胞 GM-CSF, G-CSF, TNF- β 含量。结果:糖苷组、糖酮组 GM-CSF 含量明显增加($P < 0.05$);糖苷组、糖酮组 G-CSF 含量明显增加,且优于黄芪饮片组($P < 0.05$);黄芪不同有效部位配伍组 TNF- β 含量均明显减少,且糖苷组减少 TNF- β 含量优于酮苷组、糖酮组、糖苷酮组($P < 0.05$)。结论:黄芪有效部位可能通过调控细胞因子调控粒系造血;黄芪多糖与皂苷、黄酮配伍后促进粒系造血效果较优。

[关键词] 黄芪;有效部位;配伍;骨髓抑制;粒系造血;环磷酰胺

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0134-04

[收稿日期] 20110507(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873232);辽宁省优秀人才项目(2009R39)

[第一作者] 张红梅,讲师,博士,从事方剂配伍规律及效应机制研究

[通讯作者] * 范颖,教授,博士生导师,从事方剂配伍规律及效应机制研究, Tel:024-31207104, E-mail: lnzyfy@126.com

制,而整个实验距离首次用药不足 2 h,乳香没药在此时间中对 P450 表达的影响可以忽略,可能是直接影响酶空间结构而导致其活性降低或者竞争性抑制戊巴比妥钠代谢。从乳香没药用 7 d 诱导 P450 活性增强来看,更可能是竞争性抑制,但这个推测尚需进一步研究证实。

根据文献^[4-5]及可获得性选择非那西丁、氯唑沙宗、氨苯砞分别作为 CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4 的探针药物。文献^[5]指出氯唑沙宗的浓度较低时 CYP1A2 与 CYP2E1 对其有相同的催化能力,若实验中氯唑沙宗的代谢变化完全由 CYP1A2 引起,则乳香没药混合物、乳香、没药组中氯唑沙宗的代谢率与对照组代谢率的比值应该与非那西丁的相同,而实际上氯唑沙宗比值为 3.2, 4.3, 4.4, 而非那西丁比值为 2.2, 2.7, 3.0, 所以氯唑沙宗的代谢应存在 CYP2E1 的催化效果,乳香没药混合物、乳香、没药连续给药可以诱导 CYP2E1 活性增强,乳香对 CYP2E1 的诱导作用强于没药。

P450 活性的改变对于联合用药的有效性和安全性有明显影响,乳香没药连续使用诱导 CYP1A2 和 CYP2E1 活性增强,提示通过 CYP1A2 和 CYP2E1 代谢而产生毒性代谢产物的药物在与乳香没药合用时应当注意剂量的适当调整。

[参考文献]

- [1] 周昆,代志,柳占彪,等. 壮骨关节丸中肝毒性药材的筛选研究[J]. 中国药物警戒, 2009, 6(11): 641.
- [2] 周昆,谈英,柳占彪,等. 乳香没药对大鼠肝毒性的比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 221.
- [3] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2002: 511.
- [4] 胡道德,顾磊,姚慧娟,等. 反相高效液相色谱法同时检测 4 种细胞色素 P450 探针药物[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(1): 71.
- [5] 郭喻,汪晖. 人细胞色素 P450 同工酶探针底物特异性的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(7): 851.

[责任编辑 聂淑琴]