

# 金铃子散不同配比方对大鼠肝药酶 CYP450 3A4 活性的影响

成龙,王岚,王彦礼,梁日欣\*,杨伟鹏\*,王伟,胡楠,殷小杰,翁小刚,王怡薇,杨庆  
(中国中医科学院中药研究所,北京 100700)

**[摘要]** 目的:通过比较金铃子散不同配比方对肝细胞色素 P450 3A4(cytochrome P450 3A4,简称 CYP 3A4)活性的影响,探讨其配伍规律。**方法:**按  $L_9(3^4)$  正交表,设计 9 个不同配比组方。体外实验采用大鼠肝微粒体孵育体系,测定不同配比方对 CYP 3A4 的半数抑制浓度( $IC_{50}$ );体内实验采用大鼠,口服给予金铃子散不同配比方 5 d 后注射探针药物睾酮,通过微透析探针采集肝脏部位样品,HPLC 测定 6- $\beta$ -羟基-睾酮和原型物睾酮浓度,二者浓度之比作为 CYP 3A4 酶活性指标。**结果:**川楝子、延胡索单味提取物和配比方 1~9 体外对肝药酶 CYP 3A4 的  $IC_{50}$  分别为(2.59 ± 0.33),(0.87 ± 0.30),(1.14 ± 0.20),(1.00 ± 0.13),(1.19 ± 0.10),(2.33 ± 0.15),(1.39 ± 0.19),(1.14 ± 0.20),(1.29 ± 0.14),(1.43 ± 0.32),(1.49 ± 0.28) mg·L<sup>-1</sup>;体内实验结果显示:与正常对照组比较,金铃子散不同配比方、川楝子和延胡索单味提取物处理组大鼠 CYP 3A4 的酶活性均降低,金铃子散配比方抑制 CYP 3A4 酶活性的强弱顺序:方 1(方 4) > 方 7 > 方 2(方 5) > 方 8 > 方 3 > 方 9。**结论:**不同配比方对 CYP 3A4 酶的活性均有影响,川楝子和延胡索配伍显示出协同抑制作用。

**[关键词]** 金铃子散;细胞色素 P450 3A4;中药配伍;微透析

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0117-06

**[DOI]** CNKI:11-3495/R.20110920.1429.002 **[网络出版时间]** 2011-09-20 14:29

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110920.1429.002.html>

## Influence of Jinglingzi Powder with Different Compatibility on the Activity of Cytochrome P450 3A4 from Rat Liver Microsomes

CHENG Long, WANG Lan, WANG Yan-li, LIANG Ri-xin\*, YANG Wei-peng\*, WANG Wei, HU Nan,  
YIN Xiao-jie, WENG Xiao-gang, WANG Yi-wei, YANG Qing

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To illustrate the compatibility of Jinglingzi powder by investigating the influence of Jinglingzi powder with different compatibility on the enzymatic activity of cytochrome P450 3A4(CYP 3A4) from rat liver microsomes. **Method:** The different compatibility of Jinglingzi powder was designed based on the orthogonal array  $L_9(3^4)$ . *In vitro* test, rat liver microsomes incubation system was applied to detect the 50% inhibitory concentration of Jinglingzi powder with different compatibility. *In vivo* experiment, rats were administered orally with the different compatibility of Jinglingzi powder (dose: 9.75 g·kg<sup>-1</sup>) from day 1 to day 5, then injected probe drug testosterone. The biosamples from liver tissue were obtained by microdialysis probe, then to be analysed by HPLC. The concentration of 6- $\beta$ -testosterone and testosterone were accurately determined. The ratio hepatic concentration of 6- $\beta$ -testosterone to hepatic concentration of testosterone, was applied to describe the CYP 3A4 enzyme activity. **Result:** The half maximal inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) of the extract of Toosendan fruit, Rhizoma Corydalis and

**[收稿日期]** 20110422(010)

**[基金项目]** 国家中医药管理局中医药行业科研专项(200807036)

**[第一作者]** 成龙,博士生,执业药师,从事中药药代动力学研究,E-mail:chengl2009@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \*梁日欣,博士,研究员,博导,从事中药药理、药物代谢动力学研究,Tel:010-64014411-2948, E-mail:rxliang@yahoo.com

\*杨伟鹏,博士,副研究员,硕士生导师, Tel:010-64046469, E-mail: hrbywp@sina.com.cn

Jinglingzi Powder(formula. 1-9) on the enzymatic activity of CYP3A4 were  $(2.59 \pm 0.33)$ ,  $(0.87 \pm 0.30)$ ,  $(1.14 \pm 0.20)$ ,  $(1.00 \pm 0.13)$ ,  $(1.19 \pm 0.10)$ ,  $(2.33 \pm 0.15)$ ,  $(1.39 \pm 0.19)$ ,  $(1.14 \pm 0.20)$ ,  $(1.29 \pm 0.14)$ ,  $(1.43 \pm 0.32)$ ,  $(1.49 \pm 0.28)$   $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. *In vivo* test, the CYP3A4 enzyme activity was inhibited by the different compatibility of Jinglingizi powder, compared with the normal control group. The inhibited intensity of Jinglingizi powder followed the order: formula 1 (formula 4) > formula 7 > formula 2(formula 5) > formula 8 > formula 3 > formula 9. **Conclusion:** The CYP3A4 enzyme activity is inhibited by the different compatibility of Jinglingizi powder, compared with the normal control group. Compatibility of Jinglingizi powder synergetically down-regulate the the CYP3A4 enzyme activity.

[**Key words**] Jinglingzi powder; cytochrome P 3A4; compatibility of traditional Chinese medicine; microdialysis

金铃子散出自《素问·病机气宜保命集》，由川楝子和延胡索 2 味药组成，前者行气疏肝、泄肝火，后者活血止痛，二者使配伍气行血畅，疼痛自止，为临床治疗胸痛、脘腹疼痛的常用方剂。探讨复方配伍规律是中药研究领域的关键问题，复方配伍规律的现代研究经历了从饮片到成分、从体外到体内、从单一方法研究到多学科技术融合的历程，在不同层次和不同角度上均取得了显著的进展<sup>[1-2]</sup>。然而，目前的研究缺乏对配伍药性、药效差异的体内物质变化过程的本质研究<sup>[3]</sup>。药物在肝脏的生物转化依赖于微粒体中的多种酶系，肝细胞色素 P450 3A4(简称 CYP 3A4)是一类重要 CYP450 酶系，约占肝脏总 CYPs 的 30%，占肠壁总 CYPs 的 70%，在内源性甾类化合物和至少 50% 的药物的氧化、过氧化、还原代谢中充当重要的角色，其中 CYP 3A4 是最重要的 P450 3A 成员之一，主要参与药物体内的 I 相代谢转化过程，其活性高低影响许多药物的治疗效果及毒性反应<sup>[4-6]</sup>。本研究体外实验以方剂对 CYP 3A4 酶活性的影响为切入点，以  $\text{IC}_{50}$  作为指标，研究配伍与方剂效应(体外对 CYP 3A4 酶活性影响)的关系。

微透析技术是一种基于透析原理的新型膜采样和膜分离技术，具有活体、原位、实时、动态在线检测等突出特点<sup>[7]</sup>。微透析技术最大的优点是可在基本不干扰体内正常生命过程的情况下进行活体采样，若将探针埋入肝脏，可直观分析药物肝脏代谢过程或代谢机制。本课题体内实验采用微透析方法，以睾酮为探针药，以代谢产物 6- $\beta$ -羟基-睾酮与原形物睾酮浓度之比作为酶活性指标，考察金铃子散不同配伍对方对 CYP 3A4 酶活性的影响。

## 1 材料

1.1 试药和试剂 川楝子、延胡索饮片均购自安徽

亳州饮片厂，经鉴定符合《中国药典》2010 年版规定。川楝子提取物、延胡索提取物由中日友好医院剂型室按优选工艺分别进行提取，得率分别为 22.4%，11.5%。延胡索提取物中延胡索乙素(tetrahydropalmatine, THP)和延胡索甲素(corydaline, CDL)的含量分别为 6.67, 5.43  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。川楝子提取物中川楝素含量为 3.68  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。6- $\beta$ -羟基-睾酮(批号 S41876, Acros Organics)，睾酮(批号 A0277793, Acros Organics)，6-磷酸葡萄糖(批号 004669, Roche)， $\beta$ -萘黄酮(批号 10113547, Alfa Aesar)，氧化型辅酶 II(批号 4769, Sigma)，甲醇(色谱纯, Fisher 公司)，其他试剂均为分析纯试剂。苯巴比妥钠注射液(批号 0807302, 天津金耀氨基酸有限公司)。

1.2 动物 SPF 级健康成年 Wistar 大鼠，雄性，体重 200 ~ 220 g，北京维通利华实验动物技术有限公司提供，许可证号 SCXK(京)2007-0001。

1.3 仪器 HPLC 色谱仪(Agilent 液相色谱仪及数据处理系统)，Diamond Kromasil-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ )，美国 Avanti J-30I 超高速离心机；日本 MDF-U 50V 超低温冰箱(-80  $^{\circ}\text{C}$ )；国产 BHW-2 电热恒温水浴箱等。

## 2 方法

2.1 金铃子散的配比设计与药物配制 参考含有川楝子和延胡索的传统方剂中二者用量，按照正交表  $L_9(3^4)$  设计，川楝子、延胡索 2 因素，不同剂量设 3 个水平，设计 1:1, 1:2, 1:3, 3:1, 3:2, 3:3, 4:1, 4:2, 4:3 配伍方组，其中 1:1 和 3:3 方均为经典金铃子散方，同时设川楝子、延胡索单味药提取物组。各组取相应生药量比例的川楝子提取物、延胡索提取物混合，体外实验均采用 50% 甲醇溶液作为溶剂配

制,体内实验采用纯净水混悬配制。

## 2.2 对大鼠肝药酶 CYP 3A4 体外活性的影响

**2.2.1 大鼠肝微粒体制备** 采用离心沉淀法,参照文献<sup>[8-9]</sup>方法稍作改进,测定蛋白含量,将肝微粒体悬液分装, -80 °C 保存备用。

**2.2.2 大鼠肝微粒体混合酶系组成** 肝微粒体悬液 1.2 mL, 0.4 mol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 溶液 120 μL, 1.65 mol·L<sup>-1</sup> KCl 溶液 120 μL, 6-磷酸葡萄糖 15 mg, 氧化型辅酶 II 20 mg, 纯净水 4.56 mL, 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 6 mL, 震荡混匀;混合酶系配制在冰上进行,临用时现配。

**2.2.3 大鼠肝微粒体混合酶反应体系组成** 受试药物 50% 甲醇溶液 50 μL, 浓度为 0.35 μmol·L<sup>-1</sup> 的睾酮 (CYP 3A4 特征底物) 溶液 50 μL, 400 μL 上述大鼠肝微粒体混合酶系。预实验摸索出 90% 抑制率对应的方药浓度, 以此浓度为起始浓度, 依次 1:3 稀释 8 个浓度梯度, 以此系列浓度作为测试液, 每 1 浓度平行 3 管操作, 同时设 50% 甲醇溶剂管; 实验重复 1 次, 即每 1 个浓度对应 6 个数据。

**2.2.4 CYP 3A4 酶代谢活性检测** 大鼠肝微粒体混合酶反应体系的混合操作在冰上进行, 之后将孵育管置 37 °C 水浴中孵育 60 min 后, 加入 0.5 mL 冰冷甲醇终止反应, 取出, 4 °C 冰箱放置 3 h 沉淀蛋白后, 18 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 取上清液, 按照下列 HPLC 条件, 测定睾酮及代谢产物 6-β-羟基-睾酮浓度。

**2.2.5 睾酮及代谢产物 6-β-羟基-睾酮 HPLC 测定**  
HPLC-UV 条件: Diamond C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 甲醇-水 (梯度洗脱 0 ~ 9 min, 22: 78, 9 ~ 10 min, 22: 78 ~ 75: 25, 10 ~ 25 min, 75: 25), 运行时间 30 min; 检测波长 245 nm, 柱温 30 °C; 进样量 20 μL; 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。

**2.2.6 抑制率及半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 计算** 抑制率的计算公式如下:

$$\text{抑制率} = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100\%$$

( $m_0$ : 不加受试药 6-β-羟基-睾酮生成量,  $m_1$ : 加受试药后 6-β-羟基-睾酮生成量)

按照上式计算不同浓度对应的抑制率, 然后采用改良 Bliss 法<sup>[10]</sup>, SPSS 11.5 软件计算 IC<sub>50</sub>。

## 2.3 对大鼠体内肝药酶 CYP 3A4 活性的影响

**2.3.1 大鼠分组及处理** 大鼠随机分为正常对照组、诱导剂组、川楝子、延胡索、1 ~ 9 号配方组 (其中

1 号方和 6 号方比例相同), 共 12 组, 每组 5 只。正常对照组不作处理; 诱导剂组 ip 苯巴比妥钠第 1 天剂量 30 mg·kg<sup>-1</sup>, 第 2 ~ 4 天剂量增加到 60 mg·kg<sup>-1</sup>, 第 3 ~ 4 天 ip β-萘黄酮 (80 mg·kg<sup>-1</sup>); 川楝子和延胡索组分别 ig 对应的单味药提取物, 剂量均为生药量 9.75 g·kg<sup>-1</sup>; 1 ~ 9 号配方 8 组 (其中 1 号方和 6 号方比例相同) 分别 ig 给予对应比例的提取物, 剂量均为生药量 9.75 g·kg<sup>-1</sup> (金铃子散临床等效剂量的 5 倍), 连续给药 5 d, 第 5 天动物禁食 12 h。

## 2.3.2 微透析取样的方法学建立

**2.3.2.1 回收率实验** 取睾酮和 6-β-羟基-睾酮混合溶液, 置入探针, 以生理盐水为透析液, 设定透析液流速, 测定透析液中二者的浓度。按照下式计算回收率:

$$\text{回收率} = \frac{\text{透析液中浓度}}{\text{探针外溶液浓度}} \times \text{稀释倍数} \times 100\%$$

在上述条件下设定每一样品收集时间 30 min, 连续收集透析液 1.5 h。测定透析液中的浓度考察回收率的变异性。

**2.3.2.2 透析速度和时间的确定** 微透析液的流速一般在 1 ~ 5 μL·min<sup>-1</sup>, 参照本实验室的条件和实际样品需求, 设定 2 μL·min<sup>-1</sup>。因为本项实验需要考察药物代谢酶在肝脏部位对特异性底物睾酮的代谢消除行为, 结合本实验室的具体实验条件, 设定取样时间为 30 min, 连续收集样品 4 h。

**2.3.3 微透析样品收集** 末次给药后动物禁食 12 h, 乌拉坦麻醉后, 固定大鼠, 剑突下缘切开 2 cm 小口, 暴露出肝脏, 于肝左叶针刺一孔作为取样通道, 植入探针。大鼠尾静脉注射给予睾酮溶液, 启动样品收集, 泵流速 2 μL·min<sup>-1</sup>, 每份样品收集时间 30 min, 连续收集样品 4 h, 近似的取样时间点为 0.25, 0.75, 1.25, 1.75, 2.25, 2.75, 3.25, 3.75 h。

**2.3.4 样品处理和分析** 取透析液 60 μL 加入甲醇 50 μL, 混匀按照 2.2.5 条件进样分析, 测定睾酮及 6-β-羟基-睾酮浓度。

**2.3.5 数据处理** CYP 3A4 酶活性以肝脏 6-β-羟基-睾酮 (代谢产物) 与睾酮 (原型物) 的浓度之比来表示<sup>[11-13]</sup>。

**2.4 统计分析** 体外实验 IC<sub>50</sub> 和体内 CYP 3A4 酶活性数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析和多因素方差分析, 此外还进行正交-t 值分析<sup>[14]</sup>。

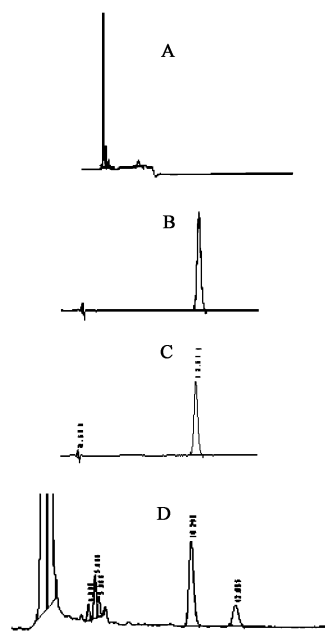
### 3 结果

**3.1 样品分析方法学确认** 在选定的色谱条件下, 6- $\beta$ -羟基-睾酮和睾酮的保留时间分别为 10.3, 12.7 min, 透析液中内源性基质和肝微粒体反应体系中的其他成分均不影响测定, 具有良好的特异性和分离度, 见图 1。

6- $\beta$ -羟基-睾酮和睾酮的线性范围分别为 2.08 ~ 0.010 mg · L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9993$ ), 4.8 ~ 0.024 mg · L<sup>-1</sup> ( $r = 0.9996$ ), 二者的日内、日间精密 RSD 均小于 10% ( $n = 6$ ), 准确度均在 90% ~ 115%。

**3.2 微透析样品采集方法学确认** 在选定的采样条件下, 6- $\beta$ -羟基-睾酮和睾酮的探针回收率分别为 28.9%, 32.2%, 二者回收率稳定, RSD 分别为 7.4%, 6.5%。

**3.3 各组方样品的对 CYP 3A4 半数抑制浓度** 表 1 结果显示: 川楝子、延胡索单味提取物和金铃子散不同配比方对 CYP 3A4 酶活性有抑制作用。表 2 多因素方差分析结果显示: 川楝子的剂量水平对 CYP 3A4 酶的抑制活性影响有显著差异, 剂量水平 1 和 2 之间差异显著; 延胡索的剂量水平对 CYP 3A4 酶的抑制活性影响无显著差异。结合正交  $t$ -值法



A. 空白样品; B. 6- $\beta$ -羟基-睾酮; C. 睾酮; D. 样品

图 1 睾酮及其代谢产物样品 HPLC

分析结果(表 3), 延胡索的剂量水平 2, 3 之间无差异, 不同配比方药对 CYP 3A4 酶的抑制的强弱顺序: 方 2 (方 3) > 方 1 > 方 8 (方 9) > 方 7 > 方 5 > 方 4。

表 1 金铃子散不同配比方对 CYP 3A4 的 IC<sub>50</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	组方	肝微粒体孵育体系终浓度	对应 6- $\beta$ -羟基-睾酮生成	IC <sub>50</sub>
		/mg · L <sup>-1</sup>	抑制率/%	/mg · L <sup>-1</sup>
川楝子	川楝子提取物	31.86	79.8 ± 1.2	2.59 ± 0.33
延胡索	延胡索提取物	10.62	81.2 ± 3.1	0.87 ± 0.30 <sup>1)</sup>
方 1	1:1	3.54	88.9 ± 5.1	1.14 ± 0.20 <sup>1)</sup>
方 2	1:2	3.54	87.7 ± 2.1	1.00 ± 0.13 <sup>1)</sup>
方 3	1:3	3.54	90.1 ± 4.9	1.19 ± 0.10 <sup>1)</sup>
方 4	3:1	10.62	78.5 ± 1.2	2.33 ± 0.15 <sup>2)</sup>
方 5	3:2	10.62	83.5 ± 2.7	1.39 ± 0.19 <sup>1, 2)</sup>
方 6	3:3	3.54	88.9 ± 5.1	1.14 ± 0.20 <sup>1)</sup>
方 7	4:1	31.86	93.7 ± 2.4	1.29 ± 0.14 <sup>1)</sup>
方 8	4:2	31.86	92.6 ± 3.1	1.43 ± 0.32 <sup>1, 2)</sup>
方 9	4:3	31.86	92.8 ± 2.7	1.49 ± 0.28 <sup>1, 2)</sup>

注: 与川楝子单味提取物组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与延胡索单味提取物组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ; 1:1 表示川楝子与延胡索的配比, 后续类推。

表 2 金铃子散不同配比方对 CYP 3A4 影响的多因素方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	均方差	F	P
延胡索	8.94 E-007	2	4.47 × 10 <sup>-7</sup>	1.26	0.298
川楝子	3.24 E-006	2	1.62 × 10 <sup>-6</sup>	4.56	0.018
误差	1.25 E-005	35	3.56 × 10 <sup>-7</sup>		

表 3 不同配比金铃子散对 CYP 3A4 酶活性影响正交

*t* 值法分析 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

统计项	川楝子	延胡索
M1	3.33	4.76
M2	4.86	3.82
M3	4.21	3.82
D1-2	-1.53	0.94
D1-3	-0.88	0.94
D2-3	-0.65	0
<i>t</i> 1-2	6.29	3.87
<i>t</i> 1-3	3.62	3.87
<i>t</i> 2-3	2.56	0
P1-2	[ <i>t</i> = 6.29 > 2.692] <sup>2)</sup>	[ <i>t</i> = 3.87 > 2.692] <sup>2)</sup>
P1-3	[ <i>t</i> = 3.62 > 2.692] <sup>2)</sup>	[ <i>t</i> = 3.87 > 2.692] <sup>2)</sup>
P2-3	[ <i>t</i> = 2.56 > 2.014] <sup>1)</sup>	<i>t</i> = 0 < 2.014

注: M1, M2, M3: 分别是该列药物低、中、高剂量酶活性之和; D1-2 是 M1 与 M2 极差; D2-3 是 M2 与 M3 极差; D1-3 是 M1 与 M3 极差。 *t* (0.05, 45) = 2.014; *t* (0.01, 45) = 2.692<sup>1)</sup> *P* < 0.05, <sup>2)</sup> *P* < 0.01 (表 5 同)。

表 4 金铃子散不同配比方对大鼠体内 CYP 3A4 酶活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	组方	$\frac{C_{6-\beta-T}}{C_T}_{15\text{ min}}$	$\frac{C_{6-\beta-T}}{C_T}_{45\text{ min}}$	$\frac{C_{6-\beta-T}}{C_T}_{75\text{ min}}$
药物诱导	-	8.3 ± 2.6	17.0 ± 3.5	28.1 ± 3.8
正常对照	-	5.6 ± 1.2 <sup>1)</sup>	12.0 ± 2.3 <sup>1)</sup>	19.6 ± 3.8 <sup>1)</sup>
川楝子提取物	川楝子	5.2 ± 3.0 <sup>1)</sup>	11.8 ± 4.3 <sup>1)</sup>	17.9 ± 1.6 <sup>1)</sup>
延胡索提取物	延胡索	5.0 ± 2.4 <sup>1)</sup>	12.3 ± 2.9 <sup>1)</sup>	17.7 ± 4.5 <sup>1)</sup>
方 1	1:1	3.1 ± 1.7 <sup>1, 2)</sup>	12.4 ± 3.1 <sup>1)</sup>	15.8 ± 7.5 <sup>1)</sup>
方 2	1:2	3.5 ± 1.1 <sup>1, 2)</sup>	10.8 ± 1.5 <sup>1)</sup>	17.2 ± 4.6 <sup>1)</sup>
方 3	1:3	4.5 ± 1.5 <sup>1)</sup>	13.0 ± 1.4 <sup>1)</sup>	17.0 ± 2.6 <sup>1)</sup>
方 4	3:1	3.3 ± 0.8 <sup>1, 2)</sup>	12.8 ± 1.8 <sup>1)</sup>	15.8 ± 6.0 <sup>1)</sup>
方 5	3:2	4.0 ± 1.9 <sup>1)</sup>	10.0 ± 3.2 <sup>1)</sup>	15.5 ± 1.1 <sup>1)</sup>
方 6	3:3	3.1 ± 1.7 <sup>1, 2)</sup>	12.4 ± 3.1 <sup>1)</sup>	15.8 ± 7.5 <sup>1)</sup>
方 7	4:1	3.7 ± 0.6 <sup>1)</sup>	10.8 ± 3.3 <sup>1)</sup>	14.8 ± 2.9 <sup>1)</sup>
方 8	4:2	3.8 ± 0.8 <sup>1)</sup>	13.8 ± 3.3	15.3 ± 3.8 <sup>1)</sup>
方 9	4:3	3.9 ± 1.1 <sup>1)</sup>	10.3 ± 3.6 <sup>1)</sup>	15.0 ± 1.9 <sup>1)</sup>

注: 与药物诱导组比较<sup>1)</sup> *P* < 0.05; 与正常组比较<sup>2)</sup> *P* < 0.05;  $\frac{C_{6-\beta-T}}{C_T}_{15\text{ min}}$  表示 15 min 时的代谢产物 6-β-羟基-睾酮与原形物睾酮的浓度比, 后续类推, 以此指标反映酶活性; 1:1 表示川楝子与延胡索的配比, 后续类推。

神, 却有应手取愈之功……”。基于小复方的配伍研究对于揭示中药复方配伍规律有着先导意义。以往的配伍研究, 更多的关注配伍与药效之间的联系, 采取的是“方剂配伍-机体效应”模式。本课题从“方剂配伍-药物代谢酶”关系的角度探讨复方配伍规律, 以药物对体内药物代谢酶的影响为观察指标, 探讨复方配伍规律。

目前研究药物对 CYP450 酶活性影响的方法主

3.4 给予各组方药物处理后, 6-β-羟基-睾酮与睾酮浓度之比 与诱导剂组比较, 金铃子散不同配比方、川楝子和延胡索单味提取物处理组的大鼠体内 CYP 3A4 的酶活性均有显著差异。与正常对照组比较, 金铃子散不同配比方、川楝子和延胡索单味提取物处理组 3 个时间点大鼠体内 CYP 3A4 的酶活性均有降低趋势, 其中 15 min 时间点, 方 1, 2, 4 组大鼠体内 CYP 3A4 的酶活性降低有统计学意义 (表 4)。

对 15 min 时间点 CYP 3A4 酶活性的正交 *t* 值法分析结果, 延胡索的剂量水平之间有差异, 随着延胡索剂量水平增加对 CYP 3A4 酶抑制作用降低。金铃子散配比方抑制 CYP 3A4 酶活性的强弱顺序: 方 1 (方 4) > 方 7 > 方 2 (方 5) > 方 8 > 方 3 > 方 9; 其中方 1, 方 4, 方 2 的抑制作用有统计学意义 (表 5)。

#### 4 讨论

金铃子散首见于刘完素《素问·病机气宜保命集》为“疗肝郁化火而致的胸胁、腹脘、疝气痛、痛经”等痛症的代表方剂, 时珍曰: “方虽小制, 配合存

要有基因分型法和探针药物法。探针药物已广泛用于不同个体 CYP450 表型和活性的研究, 其直接理论依据是: 选择目标代谢酶的特征代谢底物作为探针药, 通过测定探针药的代谢情况考察目标代谢酶的活性, 探针药物代谢产物的生成量与酶活性直接相关。本实验中 6-β-羟基-睾酮的生成量是反应 CYP 3A4 酶活性的指标, 一般情况下以 AUC 作为统计 6-β-羟基-睾酮相对生成量指标, 但睾酮体内半衰

表 5 不同配比金铃子散对  $\frac{C_{6-\beta-T}}{C_T}$  15 min  
影响正交  $t$  值法分析 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

统计项	川楝子	延胡索
M1	11.1	10.1
M2	11.1	11.3
M3	11.4	11.5
D1-2	0.7	-1.2
D1-3	-0.3	-1.4
D2-3	-1.0	-0.2
t1-2	1.19	2.04 <sup>1)</sup>
t1-3	0.51	2.38 <sup>1)</sup>
t2-3	1.70	0.34
P1-2	$t = 1.19 < 2.692$	$[t = 2.04 > 2.028]^{1)}$
P1-3	$t = 0.51 < 2.692$	$[t = 2.38 > 2.028]^{1)}$
P2-3	$t = 1.70 < 2.014$	$t = 0 < 2.014$

期短,在 1.5 h 后肝脏鞣酮的浓度低于检测限,数据点较少(3 个)不适宜进行曲线拟合。肝脏 6- $\beta$ -羟基-鞣酮的浓度与 6- $\beta$ -羟基-鞣酮相对生成量直接相关,在药物浓度的时间点相同、剔除个体差异后 6- $\beta$ -羟基-鞣酮 AUC 与 6- $\beta$ -羟基-鞣酮的浓度成正比关系,因此采用经过校正个体差异的参数( $C_{6-\beta\text{-羟基-鞣酮}}/C_{鞣酮}$ )作为反应 CYP1A2 酶活性的指标。微透析取样技术在药代动力学研究中具有以下优势:对机体正常生命过程干扰小、在体、实时和在线;透析膜可截留生物大分子物质,方便后续分析<sup>[14]</sup>。为实时监测药物在肝脏部位代谢消除过程,利用微透析取样技术的优点,采用注射经 CYP 3A4 专一代谢的特征底物鞣酮,在肝脏直接植入探针,检测鞣酮及 6- $\beta$ -羟基-鞣酮的浓度变化直观反应肝药酶对药物消除的行为特性,描述肝药酶活性的变化规律。将微透析技术和探针药物研究方法二者结合起来,基于微透析取样技术的探针药物浓度监测能较好的进行在体肝药酶 CYP 3A4 活性实时监测,这是本实验的创新之处。

本实验中,体内和体外实验结果均显示不同配伍对 CYP 3A4 有抑制作用,且与配比相关。川楝子和延胡索配伍之后可以显著体内抑制 CYP 3A4 活性,抑制作用的强弱与复方配比相关,药物代谢酶的活性被抑制,药物体内的消除过程减慢,配伍发挥协同作用。本实验以金铃子散对 CYP 3A4 酶活性的

影响作为方剂主效应,通过体内和体外实验探讨金铃子散配伍变化与方剂主效应差异的相关性,方剂配伍后药性和药效的差异在药物代谢层面表现为对肝药酶活性影响不同。

[参考文献]

[1] 于友华,王永炎,赵宜军,等. 方剂配伍规律的研究[J]. 中国中药杂志,2001,26(4):219.

[2] 王喜军,张宁,常存库. 方剂配伍规律的研究现状和未来发展[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2006,8(4):13.

[3] 闫广利,王喜军. 基于药物代谢酶和转运蛋白的中药方剂配伍规律研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2008,10(5):25.

[4] 张荣,朱大岭. CYP 3A 基因表达分子机制的研究进展[J]. 医学研究通讯,2005,34(2):57.

[5] 易飞,周宏灏. 天然药对 CYP 3A 的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学,2008,13(3):344.

[6] 王安,周宏灏. 细胞色素氧化酶 CYP 3A4 基因突变与表型研究进展[J]. 中国临床药理学杂志,2005,21(6):459.

[7] 曹岗,邵玉蓝,张云,等. 微透析技术在药理学和药物代谢研究中的应用[J]. 中草药,2009,40(4):663.

[8] T Omura, R Sato. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I. evidence for it hemoprotein Nature [J]. J Biol Chem,1964,239(7):2370 .

[9] T Omura, R Sato. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes II. evidence for it hemoprotein Nature[J]. J Biol Chem,1964,239(7):2379.

[10] 赵斌,葛金芳,朱娟娟,等. 小议在 MTT 法测细胞增殖抑制率中 IC<sub>50</sub> 的计算方法[J]. 安徽医药,2007,11(9):834.

[11] 翁小刚. 戊己丸提取物不同配伍组方对大鼠 CYP450 酶的影响研究[D]. 北京:中国中医科学院,2010.

[12] Food and Drug Administration (CDER, CBER) Guidance for Industry *in vivo* drug metabolism/Drug interaction studies —Study Design, Data Analysis, and Recommendations for Dosing and Labeling November 1999.

[13] European Medicines Agency Guideline on the Investigation of Drug Interactions 22 April, 2010.

[14] 孙卫民,孙瑞元. 中药方剂研究的正交  $t$  值法[J]. 中药药理与临床,1992,8(1):41.

[责任编辑 聂淑琴]