



半夏泻心汤及不同配伍组对大鼠肝脏 CYP450 酶活性的影响

蔡巧玲, 崔波, 王莹, 安歆, 王新宏*, 马越鸣

(上海中医药大学, 上海 201203)

[摘要] 目的:研究半夏泻心汤及不同配伍组对大鼠肝微粒体 CYP450 亚型酶的影响,从肝脏代谢角度评价半夏泻心汤组方的合理性。方法:将大鼠随机分为全方组、辛开组、苦降组、甘补组及空白对照组,分别灌胃水煎液,运用肝微粒体体外温孵法,对探针底物进行孵育,并结合超高效液相检测方法,测定各探针底物代谢产物的含量,计算代谢速率,以反映各给药组的肝微粒体 CYP2C6, CYP2E1, CYP3A1/2 亚型酶活性。结果:与空白组相比,全方组,苦降组对各亚型酶均起抑制作用($P < 0.01$);辛开组对 CYP2C6 有抑制作用($P < 0.01$),而对 CYP2E1 和 CYP3A1/2 无显著抑制作用;甘补组对 CYP2C6 和 CYP2E1 亚型起抑制作用($P < 0.01$),而对 CYP3A1/2 无抑制作用。结论:全方对大鼠肝微粒体 CYP450 酶起抑制作用,比较各配伍组间差异,苦降组抑制作用较其他配伍组显著。

[关键词] 半夏泻心汤;配伍;CYP450 酶;肝代谢;温孵

细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP) 属血红蛋白类酶,又称肝药酶或单加氧酶^[1],是人体内最重要的药物代谢酶。其中 CYP2C9 在人肝微粒体中含量较丰富,代谢的药物相当广泛,约占临床常用药物的 10% ~ 12%^[2]。CYP2E1 主要参与许多小分子毒性物质和前致癌物质转化为致癌物,对有害物质在体内的积蓄造成机体危害^[3]。CYP3A4 是肝脏中 CYP450 酶含量最丰富的亚型酶,在多种外源性物质和药物的代谢中起到至关重要的作用,是最重要的 P450 酶^[4]。大鼠肝脏 CYP450 酶中没有 CYP2C9 和 CYP3A4 亚型,与之功能相对应的是 CYP2C6 和 CYP3A1/3A2。

半夏泻心汤由半夏、干姜、黄连、黄芩、人参、炙甘草、大枣 7 味中药组成,半夏、干姜辛开而温为辛开组,以散脾气之寒;黄芩、黄连苦泻而寒为苦降组,以降胃气之热;人参、甘草、大枣甘温调补为甘补组,和脾胃、补中气,以复中焦升降功能,此即辛开

苦降甘调之法。课题组前期实验发现,半夏泻心汤及各配伍组对黄连生物碱和黄芩活性成分在肝微粒体中的代谢存在较大差异,给药组中全方组较配伍组代谢抑制作用强,基于此结果,本研究试图从肝脏 CYP450 寻找各给药组间代谢差异原因,探寻半夏泻心汤及不同配伍组对肝脏 I 相代谢酶的活性影响,以评价半夏泻心汤组方的配伍意义及合理性。

1 材料

1.1 仪器 Waters ACQUITY UPLC H-Class 超高效液相色谱仪 (Empower 色谱工作站), Optima LE-80K 超高速离心机、FJ-200 高速分散均质机 (上海金达生化仪器有限公司)、NSKY-100X 恒温培养振荡器 (上海苏坤实业有限公司)、QT-1 漩涡混合器 (上海琪特分析仪器有限公司)。

1.2 试剂和药材 甲苯磺丁脲 (批号 100500-200801), 氯唑沙宗 (批号 100364-200301) 均购自中国食品药品检定研究院; 睾酮 (批号 044k0132/081k0731)、 6β -OH 睾酮 (批号 FN 032508-02), 4-OH 甲苯磺丁脲 (批号 FN 052702-06), 6-OH 氯唑沙宗 (批号 FN061906-01B), β -NADPH (批号 122H7000) 购自美国 Sigma 公司; 磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、氯化镁、生理盐水、甘油等均购自国药集团化学试剂有限公司; 考马斯亮蓝试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 甲醇、乙腈 (色谱级) 购自美国 Merck 公司, 其余试剂均为分析纯。

[稿件编号] 20120118006

[基金项目] 2011 年度上海市教育委员会科研创新重点项目 (11ZZ110); 上海高校创新团队建设 (2009); 上海市教育委员会预算内项目 (09JW11)

[通信作者] * 王新宏, 教授, 博士生导师, 研究方向为药物分析, Tel: (021) 51322183, E-mail: wangxin6020@126.com

[作者简介] 蔡巧玲, 硕士, 主要从事中药体内分析, Tel: (021) 5122450, E-mail: colathai@yahoo.cn



半夏四川产,批号 090606;黄芩河北产,批号 090402;黄连四川产,批号 090720;干姜山东产,批号 090624;大枣山东产,批号 091019;以上均购自上海康桥中药饮片有限公司;炙甘草新疆产,批号 090323;人参辽宁产,批号 090108,购自上海金桥养和堂药店。经陈燕军药师鉴定,符合 2010 年版《中国药典》一部规定。

1.3 动物 清洁级 SD 大鼠雄性,体重 200 ~ 250 g,由上海中医药大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(沪)2003-0002。动物观察室室温 20 ~ 25 °C,相对湿度为 38% ~ 41%。

2 方法

2.1 药物制备 按半夏-干姜-黄芩-黄连-人参-炙甘草-大枣 12:9:9:3:9:9:6,辛开组(半夏、干姜),苦降组(黄芩、黄连),甘补组(人参、炙甘草、大枣),半夏泻心汤全方组分别加入 10 倍量水,煎煮提取 2 次,每次 45 min。滤过,合并药液浓缩至每 1 mL 含生药量 1 g,其余配伍组浓缩至相等体积,备用。

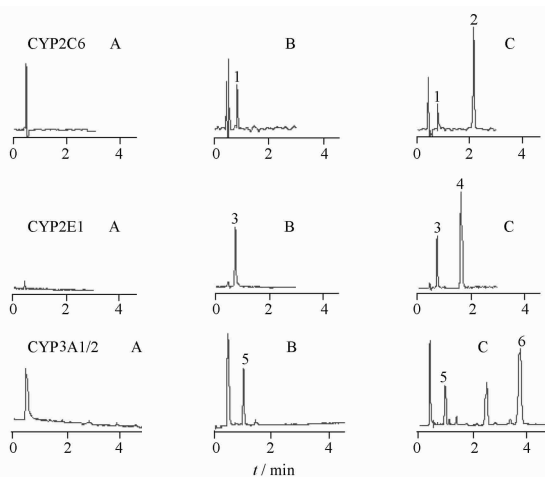
2.2 动物分组及给药 SD 雄性大鼠,30 只,随机分为 5 组,每组 6 只:半夏泻心汤全方组、辛开组、苦降组、甘补组和空白对照组。每日给药 15 mL · kg⁻¹,连续灌胃 7 d,空白对照组给等量的生理盐水。

2.3 肝微粒体制备 用差速离心法^[5]制备肝微粒体。大鼠末次给药禁食 24 h 后(自由饮水),脱颈椎处死大鼠,迅速开腹腔用冰冷的生理盐水经门静脉灌洗肝脏至土黄色,用滤纸吸弃肝脏表面水分,称质量。立即放入磷酸盐缓冲液中,剪碎洗净血污至无色,按 1:3 加入磷酸盐缓冲液,于冰浴中制成匀浆,4 °C,1 万 × g 离心 20 min,上清液过滤除漂浮脂类物,滤液 4 °C,105 000 × g 离心 60 min 弃上清,沉淀用磷酸盐缓冲液(0.1 mol · L⁻¹,pH 7.4)悬浮均匀,4 °C,105 000 × g 离心 60 min,沉淀即为肝微粒体,后加入含 20% 甘油,1 mmol · L⁻¹ EDTA 的磷酸盐缓冲液(0.1 mol · L⁻¹,pH 7.4)重悬,分装冻存于 -80 °C。用考马斯亮蓝法测定肝微粒体蛋白浓度^[6]。

2.4 温孵条件 总体积 200 μL,反应体系中包含 NADPH(1 mmol · L⁻¹),磷酸盐缓冲液(0.1 mol · L⁻¹,pH 7.4),MgCl₂(5 mmol · L⁻¹),肝微粒体蛋白质量浓度 0.8 g · L⁻¹及探针底物分别为甲苯磺丁脲(500 μmol · L⁻¹),氯唑沙宗(50 μmol · L⁻¹),睾酮(100 μmol · L⁻¹)。反应在 37 °C 水浴中进行,预孵育 5 min,加入 NADPH 启动反应,分别孵育 60,40,10

min 后,2 倍量冰冷乙腈终止反应,涡旋 3 min,12 000 r · min⁻¹离心 10 min,上清液 UPLC 分析检测。

2.5 色谱条件 Agilent C₁₈ 柱(4.6 mm × 50 mm, 2.7 mm),流动相为乙腈(A)-0.2% 乙酸(B),流速 1.0 mL · min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 4 μL。其中 CYP2C6:乙腈(A)-0.2% 乙酸(B) 40:60,检测波长 229 nm。CYP2E1:乙腈(A)-0.2% 乙酸(B) 65:35,检测波长 287 nm。CYP3A1/2:乙腈(A)-0.2% 乙酸(B) 65:35,检测波长 254 nm。在选定的色谱条件下,本方法具有良好的专属性,出峰时间均在 5 min 内,见图 1。



A. 空白大鼠肝微粒体;B. 灭活肝微粒体加代谢产物对照液;C. 正常肝微粒体温孵探针底物的样品;1. 4-OH 甲苯磺丁脲;2. 甲苯磺丁脲;3. 6-OH 氯唑沙宗;4. 氯唑沙宗;5. 6β-OH 睾酮;6. 睾酮。
图 1 大鼠肝微粒体中探针底物及其代谢产物的 UPLC 图

Fig. 1 UPLC chromatograms of probe substrates and metabolites in rat liver microsomal

2.6 肝微粒体中亚型酶活性 以各探针药物的代谢产物生成速率(V)作为酶活性指标,以 $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 表示,按如下公式计算,其中 C 为孵育反应后代谢产物生成量($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), C_{protein} 为微粒体蛋白的质量浓度($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), t 为孵育时间(min)。

$$V = \frac{C \times 1\,000}{C_{\text{protein}} \times t}$$

2.7 各给药组大鼠亚型酶活性抑制百分率 各给药组酶活性与空白对照组酶活性比较计算抑制率 I ,计算公式如下,其中 V_0 为空白组酶活性, V_1 为给药组酶活性。

$$I = \frac{V_0 - V_1}{V_0} \times 100\%$$



2.8 统计学处理 应用 SPSS 15.0 软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA) 分析,各数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 半夏泻心汤全方及不同配伍组对大鼠肝脏 CYP2C6 亚型酶活性影响 与空白组比较,各给药组大鼠肝微粒体温孵体系中甲苯磺丁脲代谢速率均有显著性下降 ($P < 0.01$)。甲苯磺丁脲的代谢速率:辛开组 > 苦降组 > 全方组 > 甘补组;辛开组、苦降组、全方组、甘补组的代谢抑制率分别达 25.74% ,32.45% ,43.95% ,45.27% (表 1)。

表 1 甲苯磺丁脲在各给药组大鼠肝微粒体中的代谢 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 The metabolic of tolbutamide in decoction given group rat liver microsomes ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$V/\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	$I/\%$
空白	96.95 ± 7.44	0
全方	54.85 ± 5.28 ¹⁾	43.95 ± 5.68 ¹⁾
辛开	73.32 ± 6.11 ¹⁾	25.74 ± 4.89 ¹⁾
苦降	66.26 ± 6.25 ¹⁾	32.45 ± 3.75 ¹⁾
甘补	53.67 ± 5.22 ¹⁾	45.27 ± 7.63 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表 2, 3 同), 浓度均为 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.2 半夏泻心汤全方及不同配伍组对大鼠肝脏 CYP2E1 亚型酶活性影响 与空白组比较,除辛开组对大鼠肝脏 CYP2E1 酶活性无显著抑制作用,各给药组大鼠肝微粒体温孵体系中氯唑沙宗代谢速率均有显著性下降 ($P < 0.01$)。氯唑沙宗的代谢速率:辛开组 > 甘补组 > 苦降组 > 全方组。辛开组、甘补组、苦降组、全方组的代谢抑制率分别达 4.47% ,34.96% ,48.88% ,52.36% (表 2)。

表 2 氯唑沙宗在各组大鼠肝微粒体中的代谢 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 The metabolic of chlorzoxazone in decoction given group rat liver microsomes ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$V/\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	$I/\%$
空白	283.8 ± 26.82	0
全方	136.7 ± 15.71 ¹⁾	52.36 ± 6.67 ¹⁾
辛开	272.4 ± 31.98	4.47 ± 0.85
苦降	145.5 ± 15.34 ¹⁾	48.88 ± 7.77 ¹⁾
甘补	182.9 ± 20.24 ¹⁾	34.96 ± 5.38 ¹⁾

注:浓度为 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.3 半夏泻心汤全方及不同配伍组对大鼠肝脏 CYP3A1/2 亚型酶活性影响 与空白组比较,各给药组肝微粒体温孵体系中辛开组和甘补组对大鼠 CYP3A1/2 酶活性无显著性抑制作用,全方组和苦降组对睾丸酮代谢速率均有明显下降 ($P < 0.01$),且苦降组抑制作用强于全方组。睾丸酮的代谢速率:甘补组 > 辛开组 > 全方组 > 苦降组。甘补组、辛开组、全方组、苦降组的代谢抑制率分别 5.47% ,11.73% ,52.38% ,75.85% (表 3)。

表 3 睾丸酮在各组大鼠肝微粒体中的代谢 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 The metabolic of testosterone in decoction given group rat liver microsomes ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	$V/\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	$I/\%$
空白	562.4 ± 50.30	0
全方	270.1 ± 27.96 ¹⁾	52.38 ± 9.26 ¹⁾
辛开	501.6 ± 42.82	11.73 ± 1.47
苦降	139.1 ± 14.69 ¹⁾	75.85 ± 9.32 ¹⁾
甘补	533.1 ± 46.77	5.475 ± 0.95

注:浓度为 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

4 讨论

本实验考察了各亚型酶的米氏常数及最大反应速率,结果均符合 FDA 相关规定,可确定探针底物最佳孵育浓度。同时比较肝微粒体蛋白质量浓度为 0.2 ~ 1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,孵育时间 0 ~ 60 min 对各亚型酶代谢进行分析,基于各探针底物的生物转换率控制在 10% 左右,蛋白质量浓度越高,基质影响较高及对 NADPH 的需求越高等诸多原因,最后选择最佳肝微粒体蛋白浓度为 0.8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, CYP2C6, CYP2E1, CYP3A1/2 孵育时间分别为 60, 40, 10 min,均与相关参考文献的报道一致^[7]。

实验结果发现与空白组相比,全方组对 CYP2C6, CYP2E1, CYP3A1/2 亚型酶均起抑制作用,且抑制作用较其他配伍组强。表明半夏泻心汤可减缓亚型酶对活性成分的代谢速率,一定程度上有助于体内吸收。苦降组对 CYP2C6, CYP2E1, CYP3A1/2 亚型酶的作用仅次于全方组,推测主要来自黄连成分的作用。

王抚梦等^[8]发现半夏具有增加 CYP2E1 活性和表达的作用, CYP2E1 可能间接参与半夏毒性的产生。本实验结果显示由半夏、干姜组成的辛开组仅抑制 CYP2C6 的表达,而对 CYP2E1, CYP3A1/2 无



显著抑制作用;推测半夏、干姜配伍后未激活CYP2E1,从而避免肝脏过氧化、中毒等损伤。

中药多组分和多靶点的特性决定了其相互作用机制的复杂性,对主要有效成分的酶抑制活性评价可以为深入认识中药合理配伍应用及机制提供科学依据。中药有效成分对CYP450酶的抑制能降低合用的其他中药成分或化学药物的体内代谢消除,打破合用药物与其代谢产物之间的平衡,增高血药浓度或引起蓄积,可能导致药物的药效增强乃至不良反应或毒性反应的发生。因此,评价中药有效成分对CYP450酶的抑制活性对于临床安全用药、降低药物-药物相互作用的风险有重要的意义。

[参考文献]

[1] Nelson D R, Koymans L, Kamataki T, et al. P450 super family update on new sequences, gene mappin accession numbers and nomenclature[J]. *Pharmacogenetics*, 1996,6 (1):1.
[2] Goldstein J A. Clinic relevance of genetic polymorphisms in the

human CYP2C subfamily[J]. *Br J Clin Pharmacol*,2001,52(4):349.
[3] Ghanayem B I, Hoffler U. Investigation of xenobiotics metabolism, genotoxicity, and carcinogenicity using CYP2E1 (-/-) mice[J]. *Curr Drug Metab*,2007,8(7):728.
[4] Belle D J, Callaghan J T, Gorski J C, et al. The effects of an oral contraceptive containing ethinyloestradiol and norgestrel on CYP3A activity[J]. *Br J Clin Pharmacol*,2002,53(1):67.
[5] 张均田. 现代药理实验方法. 下册[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998:1642.
[6] 李娟,张耀庭,曾伟,等. 应用考马斯亮蓝法测定总蛋白含量[J]. *中国生物制品学杂志*,2000,13(2):118.
[7] Xia C H. Herb-drug interactions: *in vivo* and *in vitro* effect of shenmai injection, a herbal preparation, on the metabolic activities of hepatic cytochrome P450 3A1/2, 2C6, 1A2, and 2E1 in rats [J]. *Planta Med*,2010,76(3):245.
[8] 王抚梦,卢燕,孔令东,等. 半夏厚朴汤及君臣配伍对小鼠肝脏CYP450和肾脏离子转运子的影响[J]. *中国中药杂志*,2011,36(1):60.

***In vitro* effect of Banxiaxixin Tang and different combinations on hepatic CYP450 in rats**

CAI Qiaoling, CUI Bo, WANG Ying, AN Rui, WANG Xinhong*, MA Yueming
(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] To study the effect of Banxiaxixin Tang and different combinations on CYP450 in rat liver microsomes, from the point of liver metabolism, evaluate significance of Banxiaxixin Tang compatibility. The rats were randomly divided into five groups: Banxiaxixin Tang group, pungent-swelling group, bitter-descending group, sweet-invigorating group and control group, which were all given decoction by gavage. Using liver microsomes *in vitro* incubation method, probe substrate were incubated and their metabolites was detected by ultra-high performance liquid chromatography, then was calculated metabolic rate to reflect the drug-treated liver microsomes CYP2C6, CYP2E1, CYP3A1/2 activity. The results showed that comparing with the control group, both Banxiaxixin Tang group and bitter-descending group showed inhibition on all enzyme subtype ($P < 0.01$), pungent-swelling group showed significant inhibition on CYP2C6, but no inhibition on CYP2E1 and CYP3A1/2; sweet-invigorating group showed inhibition on CYP2C6 and CYP2E1, but no inhibition on CYP3A1/2. Compared the inhibition on CYP with the three combinations, bitter-descending group was significant higher than other groups. Banxiaxixin Tang group showed inhibition on rat liver microsomes CYP450, and the activity may be come from bitter-descending group.

[Key words] Banxiaxixin Tang; combinations; CYP450; liver metabolism; incubation

doi:10.4268/cjcm20121429

[责任编辑 陈玲]