

# 基于 Cocktail 探针法的玉屏风散复方配伍研究

成龙, 王怡薇, 王彦礼, 李涛, 张会会, 杨伟鹏\*

(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:以 Cocktail 探针药物法评价玉屏风散对肝微粒体 CYP450 主要亚型活性的影响,探讨复方配伍规律。方法:按拆方设计,设计7个组方,采用大鼠肝微粒体孵育体系,测定其对 CYP 主要亚型的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。结果:玉屏风散及拆方对肝药酶 CYPs 的 IC<sub>50</sub>均大于生药 1.0 g · L<sup>-1</sup>,对 CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4 而言,玉屏风散及拆方配伍后的 IC<sub>50</sub>较方中主要影响因子的 IC<sub>50</sub>有增大的趋势(对酶活性的影响减小);对 CYPs 而言,配伍后的实测 IC<sub>50</sub>较线性预测值有减小的趋势。结论:从药物对代谢酶活性影响的角度而言,玉屏风散配伍应用具有一定优势和合理性。

**[关键词]** 玉屏风散;CYP450;中药配伍;IC<sub>50</sub>;Cocktail 探针药物法

“辨证论治”是中医认识和治疗疾病特有的思维方法,中药配伍应用是体现中医理论和“辨证论治”思想的现实载体。探究中药配伍规律及内在联系<sup>[1]</sup>,对阐明中医辨证论治理论的科学内涵和中药复方的作用机制是必不可少,是中药复方研究领域期待解决的关键问题。既往的研究结果表明<sup>[2-3]</sup>:复方配伍后,指标成分的体内药代行为显著改变,配伍影响主要组分的吸收和吸收-代谢情况,也就是说配伍影响复方组份的 ADME 行为,对这些药动学行为差异的深层次原因探究,药物代谢酶可能是破解方剂配伍规律研究的着眼点之一。细胞色素 P450 酶对进入机体外源物的代谢起重要作用,FDA 和 EMEA 新药研究指南中强调药物代谢酶间相互作用研究<sup>[4-5]</sup>,常见的研究方法是通过体外测定药物对肝微粒体中 CYP450 不同亚型酶活性的影响来评估候选药物对细胞色素 P450 抑制作用,常规的方法费时、费力成本很高。近年来,使用混合的 CYP 底物法,例如 Cocktail 法<sup>[6-7]</sup>,在体内外试验中已被广泛运用<sup>[8]</sup>,本文以玉屏风散为例,采用 Cocktail 法来探索中药复方对药物代谢酶影响的规律。

## 1 材料

### 1.1 仪器与试剂 HPLC 色谱仪(岛津 10A-LC 液

相色谱仪及数据处理系统),Diamond C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),美国 Beckman Counter Avanti J-30I 超高速离心机。

对乙酰氨基酚(批号 099K0127V, Sigma)、非那西丁(批号 STBB2177, Sigma)、香豆素(批号 100M1878V, Sigma)、7-羟基香豆素(批号 92997PJ, Sigma)、甲苯磺丁脲(Fluca, 批号 011M1397V, Sigma)、羟基甲苯磺丁脲(批号 1-PSB-27-2, Toronto Research Chemicals Inc)、奥美拉唑(批号 BCBF-2161V, Sigma)、5-羟基奥美拉唑钠(批号 2-WHH-100-2, Toronto Research Chemicals Inc)、睾酮(批号 A0277793, Acros Organics),甲醇(色谱纯, Fisher 公司),其他试剂均为分析纯。

**1.2 试药** 黄芪,白术和防风饮片购自北京同仁堂药店,经鉴定符合《中国药典》2010 年版一部相关规定。玉屏风散方由黄芪 20 g,白术 20 g,防风 10 g 配伍而成;取黄芪,白术和防风、两两配伍和全方,各药材对应量,加总药材重量 10 倍的水,煎煮 1 h,药液趁热过滤;药渣加 8 倍量水继续煎煮 1 h,合并滤液,浓缩成每毫升含 1.0 g 生药的药液, -20 °C 冰箱中保存备用。HPLC-MS 法测定玉屏风散提取物中各成分含量。

## 2 方法

**2.1 大鼠肝微粒体制备** 采用离心沉淀法,参照文献方法<sup>[9-10]</sup>稍作改进制备肝微粒体,以小牛血清白蛋白为标准品,BCA 试剂盒测定微粒体蛋白含量(1.48 g · L<sup>-1</sup>),分装于 PE 管, -80 °C 保存备用。

**2.2 Cocktail 法的条件** Cocktail 法探针药物标准溶液配制、样品制备及探针药物、代谢产物 HPLC 测

[稿件编号] 20120807003

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(30801542);中国中医科学院基本科研业务费自主选题项目(ZZ2006112, ZZ2007046)

[通信作者] \* 杨伟鹏, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事中药药代动力学和中药药理研究, Tel: (010)64014411-2981, E-mail: hrbywp@sina.com

定等方法学研究详见文献[4-5]。

**2.3 大鼠肝微粒体混合酶孵化反应体系** 微粒体孵化体系包括:肝微粒体悬液(蛋白终浓度  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),还原型辅酶 II ( $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgCl}_2$ ,  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KCl}$ ,  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲液(pH 7.4),受试药物溶液  $50 \mu\text{L}$ ,混合探针药物,总体混合液体积为  $200 \mu\text{L}$ 。将反应体系置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴中预先加热  $5 \text{ min}$  后,加入还原型辅酶 II 启动反应,孵育  $60 \text{ min}$  后,加入  $0.5 \text{ mL}$  冰冷甲醇终止反应,取出,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱放置  $3 \text{ h}$  沉淀蛋白后,  $18\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $20 \text{ min}$ ,取上清液,测定各探针药物及代谢产物的浓度。

**2.4 试验药物配制** 取前述玉屏风散浓缩液(生药  $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),均采用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸盐(pH 7.4)缓冲液 1→3 梯度稀释后作为供试药物,每一样品最少稀释 6 个浓度梯度,梯度稀释液加入 2.3 所述体系中进行孵育和测定。

**2.5 抑制率及半数抑制浓度  $\text{IC}_{50}$  计算** 抑制率计算参照下列计算公式之一。

$$\text{抑制率} = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

$m_0$ :不加受试药代谢物生成量; $m_1$ :加受试药后代谢物的生成量。

$$\text{抑制率} = \frac{w_t}{w_0} \times 100\% \quad (2)$$

$w_0$ :探针药物的加入量, $w_t$ :加受试药后探针药物的剩余量。

对于能找到探针药物对应的特征代谢产物对照品的按照上式(1)计算不同浓度对应的抑制率,对于没有找到探针药物代谢产物对照品的按照上式(2)计算不同浓度对应的抑制率,然后采用改良 Bliss 法<sup>[11]</sup>,SPSS 11.5 软件计算  $\text{IC}_{50}$ 。

配伍后  $\text{IC}_{50}$  的预测采用如下线性关系式(3)预测。

$$\text{IC}_{50\text{-预}} = \text{IC}_{50\text{-黄}} \times W\%_{\text{黄}} + \text{IC}_{50\text{-白}} \times W\%_{\text{白}} + \text{IC}_{50\text{-防}} \times W\%_{\text{防}} \quad (3)$$

$\text{IC}_{50\text{-预}}$  为按线性关系预测的配伍后半数抑制浓度, $\text{IC}_{50\text{-黄}}$  为黄芪的半数抑制浓度, $W\%_{\text{黄}}$  为方中黄芪的质量百分比,依此类推。

### 3 结果

**3.1 各组方样品的对大鼠肝微粒体 CYP 五个亚型的半数抑制浓度** 从体外实验结果来看,玉屏风散及拆方对 CYP450 不同亚型的  $\text{IC}_{50}$  均大于生药  $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,玉屏风散及单味药的提取率(提取物占生药总重的比率)在  $10\% \sim 20\%$ ,为便于计算以  $10\%$  计, $\text{IC}_{50}$  大于生药  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  换算成提取物为大于提取物  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;提取物中主要为小分子活性成分,按照小分子药物的平均相对分子质量多在  $100 \sim 1\ 000$  计算,玉屏风散全方及拆方对 CYP450 不同亚型的  $\text{IC}_{50}$  均大于  $0.1 \sim 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。按照通用判定标准  $\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,即为弱抑制作用,结果显示玉屏风散及拆方提取物对 CYP450 的主要亚型活性无显著抑制。见表 1。

表 1 玉屏风散及拆方对 CYP450 的  $\text{IC}_{50}$  ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 The  $\text{IC}_{50}$  of Yupingfeng powder with the decomposed recipes to CYP 450 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	功效	CYP1A2	CYP2C19	CYP3A4	CYP2A6	CYP2C9	生药 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
黄芪	补气	$6.91 \pm 0.10$	$9.07 \pm 0.80$	$3.33 \pm 0.45$	$5.59 \pm 0.13$	$6.25 \pm 0.33$	
白术	益气	$7.72 \pm 0.15$	$10.14 \pm 1.20$	$1.12 \pm 0.25$	$4.79 \pm 0.33$	$8.67 \pm 0.52$	
防风	解表	$9.35 \pm 0.08$	$5.59 \pm 0.10$	$1.69 \pm 0.33$	$3.59 \pm 0.30$	$9.49 \pm 0.30$	
黄芪+白术	补益	$6.87 \pm 0.20$	$9.14 \pm 0.20$	$1.14 \pm 0.20$	$3.14 \pm 0.20$	$4.14 \pm 0.35$	
黄芪+防风	补气,解表	$7.52 \pm 0.23$	$10.50 \pm 0.83$	$1.87 \pm 0.30$	$2.59 \pm 0.34$	$5.59 \pm 0.34$	
白术+防风	益气,解表	$7.52 \pm 0.19$	$8.00 \pm 0.63$	$1.40 \pm 0.23$	$1.70 \pm 0.33$	$4.07 \pm 0.23$	
玉屏风散	全方	$8.28 \pm 0.14$	$6.19 \pm 0.50$	$1.90 \pm 0.10$	$1.19 \pm 0.10$	$4.19 \pm 0.60$	

方中黄芪、防风、白术对 CYP1A2 的影响程度依次降低,配伍后对酶活性影响较方中主要影响因子(黄芪)有所减小;对 CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4 而言,配伍后的  $\text{IC}_{50}$  较方中主要影响因子的  $\text{IC}_{50}$  有增大的趋势,也即对酶活性的影响有减小的趋势;对

CYP2A6 和 CYP2C9 而言,配伍后的  $\text{IC}_{50}$  较方中任一影响因子的  $\text{IC}_{50}$  均有减小,对酶活性的影响有增大的趋势。

**3.2 各组方样品对大鼠肝微粒体 CYP 的  $\text{IC}_{50}$  测定值与线性预测值比较** 除个别数据外,对 CYP1A2,

CYP2C19, CYP3A4 而言, 配伍后的实际 IC<sub>50</sub> 较线性预测值有减小的趋势, 见表 2。对 CYP2A6, CYP2C9

而言, 配伍后的实际 IC<sub>50</sub> 较线性预测值均减小, 见表 3。

表 2 玉屏风散及拆方对 CYP450 1A2, 3A4, 2C19 的 IC<sub>50</sub> ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 2 The comparative analysis IC<sub>50</sub> of Yupingfeng powder with the decomposed recipes to CYP450 1A2, 3A4 and 2C19 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	功效	配比	CYP1A2		CYP3A4		CYP2C19	
			测定值	线性结果	测定值	线性结果	测定值	线性结果
黄芪 + 白术	补益	2:2:0	6.87 ± 0.20	7.31	1.14 ± 0.20	2.22	9.14 ± 0.20	9.61
黄芪 + 防风	补气, 解表	2:0:1	7.52 ± 0.23	7.73	1.87 ± 0.30	2.59	10.50 ± 0.83	7.91
白术 + 防风	益气, 解表	0:2:1	7.52 ± 0.19	8.26	1.40 ± 0.23	1.31	8.00 ± 0.63	8.62
玉屏风散	全方	2:2:1	8.28 ± 0.14	7.72	1.90 ± 0.10	2.12	6.19 ± 0.50	8.81

表 3 玉屏风散及其拆方对 CYP450 2A6, CYP2C9 的 IC<sub>50</sub> 结果比较 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 3 The comparative analysis IC<sub>50</sub> of Yupingfeng powder with the decomposed recipes to CYP 450 2A6 and 2C9 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	功效	配比	CYP2A6		CYP2C9	
			测定值	线性结果	测定值	线性结果
黄芪 + 白术	补益	2:2:0	3.14 ± 0.20	5.19	4.14 ± 0.35	7.46
黄芪 + 防风	补气, 解表	2:0:1	2.59 ± 0.34	4.92	5.59 ± 0.34	7.33
白术 + 防风	益气, 解表	0:2:1	1.70 ± 0.33	4.39	4.07 ± 0.23	8.94
玉屏风散	全方	2:2:1	1.19 ± 0.10	4.88	4.19 ± 0.60	9.13

#### 4 讨论

玉屏风散出自中医名著《世医得效方》, 主治卫气虚弱, 不能固表之证。方中黄芪益气固表止汗为君; 白术补气健脾为臣; 佐以防风走表而散风邪, 合黄芪、白术以益气祛邪。中药 (尤其是复方) 是一个复杂体系, 虽然中药这一体系有复杂和不确定性, 但中药进入体内大多要经过 CYP 的处置, 因此研究中药与 CYP450 酶系之间相互关系对于揭示传统中药复方配伍理论科学内涵和指导临床合理配伍用药有着重要意义<sup>[4]</sup>。中药配伍, 在一定程度上也是药物相互作用的表现形式之一。CYP450 酶是药物体内代谢的重要酶系, 其中 6 种重要的 CYPs 亚型: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 参与了约 90% 的临床使用药物的代谢, CYP450 酶被抑制或诱导是引起药物相互作用的重要原因之一。本实验结果表明对 CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4 而言, 配伍后对酶活性影响均较方中主要影响药味 (因子) 有减小, 也就是说配伍后因酶活性抑制而引起的药物相互作用的几率降低, 从药物代谢酶活性的角度也揭示中药配伍使用的安

全性更好, 也从代谢酶的角度阐释了中药配伍的合理性。

基于复方配伍与药物代谢酶相互作用的配伍规律研究是本课题组近年来一直探索的课题, 为从药物代谢层面探讨中药复方配伍规律开辟了新的研究领域和思路<sup>[3,4,14]</sup>, 本实验从体外结果来看, 玉屏风散及拆方提取物对 CYP450 的主要亚型无显著抑制活性。对于中医药这样一个复杂体系进行研究的时候, 混沌无序、非对称、非平衡是绝对的, 而笔者应寻求相对的、线性的、有序的解决办法。笔者在拆方研究中比较了配伍后的实测值和线性预测值, 结果表明对 CYP 主要亚型而言, 配伍后的实测 IC<sub>50</sub> 较线性预测值均减小。简单线性模型来预测复方配伍对 CYP 活性的影响不准确, 这也提示中药复方配伍不是简单的药味的加减, 而是展现出整体性和复杂性。

#### [参考文献]

- [1] 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.
- [2] 王喜军, 张伯礼. 基于药物代谢组学的方剂配伍规律及配伍科学价值揭示[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(10):1346.
- [3] 王伟. 金铃子散不同配伍的肠吸收特征研究[D]. 北京:中

- 国中医科学院, 2011.
- [ 4 ] 成龙. 基于肝药酶代谢的金铃子散复方配伍研究[D]. 北京:中国中医科学院, 2012.
- [ 5 ] 成龙, 王岚, 王彦礼, 等. 基于吸收-代谢模型的金铃子散复方配伍研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(22):1346.
- [ 6 ] 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 [S]. 1999.
- [ 7 ] European Medicines Agency. Guideline on the investigation of drug interactions [S]. 2010.
- [ 8 ] A Tolonen, A Petsalo, M Turpeinen, et al. *In vitro* interaction cocktail assay for nine major cytochrome P450 enzymes with 13 probe reactions and a single LC/MSMS run: analytical validation and testing with monoclonal anti-CYP antibodies [J]. *J Mass Spectrom*, 2007, 42: 960.
- [ 9 ] M J Kim, H Kim, I J Cha, et al. High-throughput screening of inhibitory potential of nine cytochrome P450 enzymes *in vitro* using liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19: 2651.
- [ 10 ] 和凡, 赵立子, 毕惠嫦, 等. 6种细胞色素 P450 酶亚型特异性底物的酶动力学研究 [J]. 中国药房, 2009, 20(17): 1310.
- [ 11 ] T Omura, R Sato. The Carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes I. evidence for its hemoprotein nature [J]. *J Biomed Chem*, 1964, 239(7):2370.
- [ 12 ] T Omura, R Sato. The Carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes II. solubilization, purification [J]. *J Biomed Chem*, 1964, 239(7):2379.
- [ 13 ] 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.
- [ 14 ] 成龙, 王岚, 王彦礼, 等. 金铃子散不同配比方对大鼠肝药酶 CYP1A2 活性的影响 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(5): 648.

## Compatibility principle research of Yupingfeng powder based on cocktail probe substrates approaches

CHENG Long, WANG Yi-wei, WANG Yan-li, LI Tao, ZHANG Hui-hui, YANG Wei-peng\*

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

[ **Abstract** ] To elucidate the compatibility principle of Yupingfeng powder, a cocktail probe substrates approaches were developed. The enzymatic activity of cytochrome P450 from rat liver microsome was evaluated after being interfered with 7 prescriptions of Yupingfeng powder, which was designed according to the decomposed recipes design of traditional Chinese medicine. *In vitro* test, rat liver microsome incubation system was utilized to detect the 50% inhibitory concentrations of Yupingfeng powder with the decomposed recipes to cytochrome P450 (CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4) enzyme. The CYPs IC<sub>50</sub> value of Yupingfeng powder with different compatibility were greater than crude drug 1.0 g · L<sup>-1</sup>, which indicated that all Yupingfeng powder prescriptions had no significant inhibitory activity to cytochrome P450. For CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4, the IC<sub>50</sub> value of Yupingfeng powder with the decomposed recipes had a tendency to increase, compared with the major impact factor from Yupingfeng powder. For CYPs, the detected IC<sub>50</sub> of Yupingfeng powder with the decomposed recipes tended to decrease, compared with the linearly predicted value. From the point of view of the impact of drugs on the metabolic activity, the compatibility of Yupingfeng powder has certain advantages and reasonable.

[ **Key words** ] Yupingfeng powder; cytochrome P450; compatibility of traditional Chinese medicine; IC<sub>50</sub>; cocktail probe substrates approaches

doi:10.4268/cjcm20130428

[ 责任编辑 陈玲 ]