

## 心血管药物速效救心丸和 通心络胶囊对大鼠细胞色素 P450 酶的影响

卜明华<sup>1,2</sup>, 郑咏秋<sup>1</sup>, 张颖<sup>1</sup>, 李利群<sup>1</sup>, 刘建勋<sup>1</sup>, 刘东春<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 中国中医科学院西苑医院实验研究中心, 北京 100091;

<sup>2</sup> 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016, 辽宁

**摘要** 目的: 观察速效救心丸和通心络胶囊对大鼠药物代谢酶细胞色素 P450(CYP450) 的影响。方法: 给予大鼠试验药物后制备肝及小肠微粒体, CO 还原差示光谱法测定肝微粒体 CYP450 含量, 蛋白免疫印迹法检测肝微粒体中 CYP1A2、CYP2C11、CYP2E1、CYP3A 和肠微粒体中 CYP3A 蛋白的表达量。结果: 速效救心丸组和通心络胶囊组与空白对照组比较, 大鼠肝脏 CYP450 含量无显著变化( $P > 0.05$ ); 但是 Western blotting 实验对肝脏和肠道中多种 CYP450 酶表达量测定的结果显示, 速效救心丸可诱导肝脏 CYP1A2 表达, 但抑制肝脏 CYP2C11 和肠道 CYP3A 表达( $P < 0.05$ ); 通心络胶囊可诱导大鼠肝脏 CYP1A2、CYP2E1 蛋白表达( $P < 0.05$ )。结论: 速效救心丸和通心络胶囊对大鼠肝脏 CYP450 酶总量无影响, 但是, 在蛋白质水平对特定亚型蛋白的表达量有影响, 由此可能引发的药物相互作用不容忽视。

**关键词** 细胞色素 P450(CYP450); 蛋白免疫印迹法; 药物相互作用

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 1009-2501(2011)06-0601-05

心脑血管病是目前我国发病率、致残率和死亡率最高的疾病。在老年人中, 心脑血管病发病率高达 30%, 心脑血管病发病率高, 用药居各类疾病之首。速效救心丸作为心血管系统常用药在临床应用已有 20 多年, 它不仅有效地应用于心脏病人的急救, 而且具有抗动脉粥样硬化、改善微循环、保护心肌细胞和血管、改善血液流变性、降低血脂以及强大的解痉镇痛作用, 长期使用能明显改善心功能、降低心绞痛发作、防治心肌梗死<sup>[1]</sup>。通心络胶囊是以益气药与昆虫类通络药物为主研制而成的治疗冠心病、心绞痛的中药新制剂, 能有效防治心脑血管病<sup>[2]</sup>。在这些中药制剂的临床应用当中, 常常会与其他药物联合使用, 由此可能引发的药物相互作用不容忽视。

药物相互作用是指同时或先后序贯使用两种或两种以上药物时, 某一种药物的作用由于其他药物或化学物质的存在而受到干扰, 使其疗效发生变化或发生毒性反应。药物作为外源物质进入体内, 机体由于自我保护的功能要对其进行相应的生物转化以利其排除体外。在此过程中, 细胞色素 P450(CYP450) 是参与外源物质生物转化的主要酶类, 临床上 90% 以上的药物需要经过 CYP450 酶代谢<sup>[3]</sup>, 因而 CYP450 酶被诱导或抑制而引发的药物相互作用不容忽视。有研究<sup>[4-5]</sup>报道速效救心丸和通心络胶囊中的相同成分冰片

2011-03-14 收稿 2011-04-12 修回

国家科技部重大专项课题(2009ZX09502-006); 国家自然科学基金基金项目(30701101)

卜明华, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 生药学。

Tel: 010-62835641 E-mail: bmh113@126.com

张颖, 通信作者, 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 药代动力学。

Tel: 010-62835641 E-mail: zhyingde@sina.com

刘东春, 通信作者, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 中药有效物质的吸收与代谢。

Tel: 024-23843711 E-mail: liude@syphu.edu.cn

以及通心络胶囊中的其他成分如人参<sup>[6]</sup>可影响 CYP450 酶活性,而总方的相关研究鲜有报道。本实验通过测定肝脏总微粒体含量以及几种主要 CYP450 酶亚型的蛋白表达水平,研究这 2 种药物可能存在的基于 CYP450 酶诱导/抑制的药物相互作用。

## 1 材料与方法

**1.1 药品与试剂** 速效救心丸(天津中新药业集团股份有限公司第六中药厂,批号:618034)、通心络胶囊(石家庄以岭药业,批号:080519)。

BCA 蛋白试剂盒(批号:1A109681,美国 PIERCE)、ECL 试剂盒(批号:2161462,美国 PIERCE)、一抗 CYP1A2 (Rabbit Anti+Rat, Lot No: LV1441557)、CYP2C11 (Rabbit Anti+Rat, Lot No: LV1472052)、CYP2E1 (Sheep Anti+rat, Lot No: POS1450405)、CYP3A (Mouse Anti+Rat, Lot No: 0610041756) 均购自 Chemicon 公司,二抗 Anti+Mouse IgG Peroxidase Conjugate (Lot No: 018K4851)、Anti+Rabbit IgG Peroxidase Conjugate (Lot No: 057K4802) 均购自 Sigma 公司, Rabbit Anti+Sheep IgG, HRP Conjugate (Lot No: 1414989) 购自 Millipore 公司。

**1.2 实验动物** SD 大鼠(SPF 级),雄性,体重(213±24)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证编号:SCXK(京)2007-0001。大鼠给予标准饮食和水,饲养于中国中医科学院西苑医院动物室(SPF 级),12 h 日夜节律。

**1.3 大鼠肝脏 CYP450 酶的诱导/抑制模型** 将 15 只 SD 大鼠随机均分成 5 组:空白对照组;酶抑制组(CCl<sub>4</sub><sup>[7]</sup>: 0.8 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 2 d, i. p.);酶诱导组(苯巴比妥<sup>[7]</sup>: 0.8 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 7 d, i. g.);给药组经灌胃方式分别连续 10 d 给予相当于临床剂量的通心络胶囊(120.32 mg/kg, 2 次/d)和速效救心丸组(30.85 mg/kg, 2 次/d)。

**1.4 肝脏和肠微粒体制备** 将大鼠颈椎脱臼处死后打开腹腔和胸腔,用 4℃ 生理盐水由门静脉灌洗至肝脏呈土黄色,迅速取出肝脏及十二指肠部分,用滤纸吸干肝脏并用 4℃ 生理盐水将肠道内容物冲洗干净,滤纸吸干,称重。各取 0.5 g 肝脏及肠道,其余肝脏液氮速冻后于-80℃ 保存以制备细胞色素 P450 总量测定用微粒体 采用

差速离心法制备微粒体:肝脏 1: 4(W/V) 比例加入含 1.15% KCl 的磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH7.4)及酶抑制剂(比例 150 μL/mL)匀浆后于 4℃ 1×10<sup>4</sup> g 离心 20 min,取上清液于 4℃ 1×10<sup>5</sup> g 离心 60 min:取沉淀重悬于 1 mL 重悬液(0.1 mol/L 磷酸缓冲液 pH 7.4,含 1.15% KCl 和 20% 甘油)中,分装后于-80℃ 保存备用。微粒体蛋白浓度采用 BCA 法定量,使用牛血清白蛋白作为标准。

**1.5 细胞色素 P450 总量的测定** 参照 Omura 法。微粒体制备同前,不加酶抑制剂。微粒体蛋白匀浆适量以 pH 7.4 的 20% 磷酸盐缓冲液稀释到 0.5 mg/mL,加入适量连二亚硫酸钠(还原剂 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>),混匀后,等量分装于对照杯及测定杯中,置双光束分光光度计,扫描测定对照池 400~500 nm 基线,测定杯轻轻充一氧化二氮约 1 min,再扫描测定 400~500 nm 间吸光度值,计算 450 nm 及 490 nm 的差示光谱得到 ΔA 值,按以下公式计算 P450 总含量(nmol/mg 蛋白)。P450 总含量(nmol/mg 蛋白)= ΔA/[91×稀释后蛋白浓度(mg/mL)]×1000。

**1.6 Western blotting 分析** 裂解微粒体蛋白:取部分上述制备的微粒体用蛋白裂解液变性溶解(1:3, V/V),裂解蛋白浓度采用 BCA 法定量,使用牛血清白蛋白作为标准。

取实验组及对照组大鼠制备的肝微粒体用 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转移至 PVDF 膜上。于室温摇床上封闭液(TBST+3% BSA)中封闭 40 min,分别加入 CYP1A2 的抗体(1:4000)、CYP2C11 的抗体(1:4000)、CYP2E1 的抗体(1:2000)及 CYP3A 的抗体(1:2000) 4℃ 孵育过夜,用 TBST 冲洗 6 次,每次 8 min,于室温摇床上再封闭(TBST+3% BSA) 30 min,分别加入二抗(CYP1A2 的二抗为 1:62500、CYP2C11 的二抗为 1:62500、CYP2E1 的二抗为 1:50000 及 CYP3A 的二抗为 1:50000) 室温摇床上孵育 2 h,用 TBST 冲洗 8 次,每次 10 min。ECL 化学发光法发光显迹, X 射线胶片显影, X 射线胶片用 GeneSnap 4 软件对免疫特异性条带进行分析。

**1.7 统计分析** 采用 SPSS 16.0 进行秩和检验比较组间差异的显著性 两组间比较用 Mann-

Whitney U 检验法,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 速效救心丸和通心络胶囊对大鼠肝指数、肝微粒体蛋白和 CYP450 酶含量的影响** 大鼠灌胃给予速效救心丸和通心络胶囊 10 d 后, 通心络组肝指数(肝湿重/体重)增加( $P < 0.05$ ), 且微粒体蛋白含量略有增加; 而速效救心丸组这两种指标无明显改变( $P > 0.05$ )。经 CO 还原差示光谱法测定肝微粒体 CYP450 含量, 结果显示速效救心丸组 CYP450 酶总量有所增加, 相反的, 通心络胶囊组 CYP450 酶含量下降, 但二者与空白组比较不具有统计学差异( $P > 0.05$ )。

表 1 大鼠给予速效救心丸和通心络胶囊后肝指数和 CYP450 酶含量( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	肝指数 (g/kg)	CYP450 酶含量 (nmol/mg 蛋白)
抑制模型组	47.7 ± 2.02 <sup>b</sup>	0.12 ± 0.06 <sup>b</sup>
诱导模型组	45.9 ± 2.08 <sup>b</sup>	1.39 ± 0.30 <sup>c</sup>
空白对照组	34.6 ± 1.87	0.72 ± 0.24
通心络胶囊组	39.4 ± 1.93 <sup>b</sup>	0.50 ± 0.27
速效救心丸组	37.6 ± 4.29	0.93 ± 0.28

与空白对照组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$

## 2.2 Western Blotting 检测 CYP450s 蛋白表达

**2.2.1 速效救心丸对大鼠 CYP450s 蛋白表达的影响** 图 1 与图 2 所示分别为大鼠连续给予速效救心丸 10 d 后肝脏和肠道微粒体中 CYP450 酶亚型的表达量, 除肝脏 CYP2E1 蛋白表达量未明显改变( $P > 0.05$ ), 其余 3 种酶亚型表达量均有改变。速效救心丸对大鼠肝脏 CYP2C11 和肠道 CYP3A 的蛋白表达有抑制作用( $P < 0.05$ ), 但对肝脏 CYP1A2 和 CYP3A 有诱导作用( $P < 0.05$ ) (图 3)。

**2.2.2 通心络胶囊对大鼠 CYPs 蛋白表达的影响** 图 4 与图 5 所示为连续给予通心络胶囊 10 d 后大鼠肝脏和肠道微粒体中 CYP450 酶亚型的表达量, 由图 6 可明显看出, 连续给予通心络可使大鼠肝微粒体中 CYP1A2、2E1 的表达量均明显增加( $P < 0.05$ ); 对肝脏和肠道微粒体中 CYP3A 表达有一定的诱导作用。

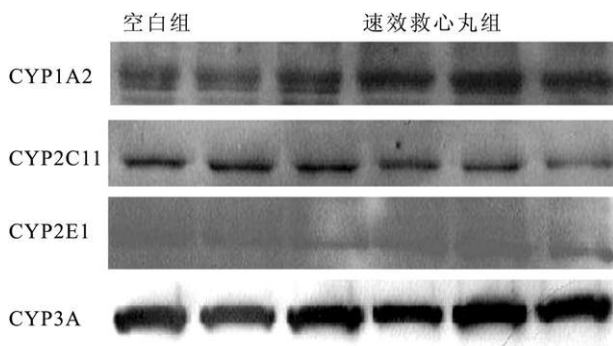


图 1 速效救心丸组肝脏 CYPs 蛋白表达量

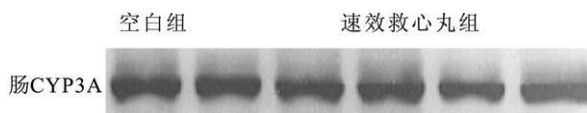


图 2 速效救心丸组肠道 CYP3A 蛋白表达量

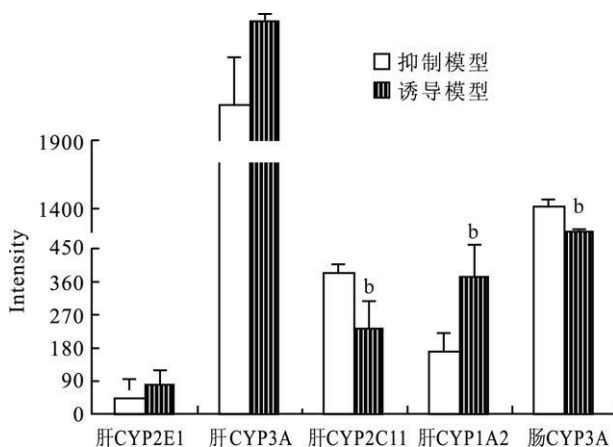


图 3 CYPs 蛋白表达量比较( $\bar{x} \pm s$ )

与抑制模型组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$

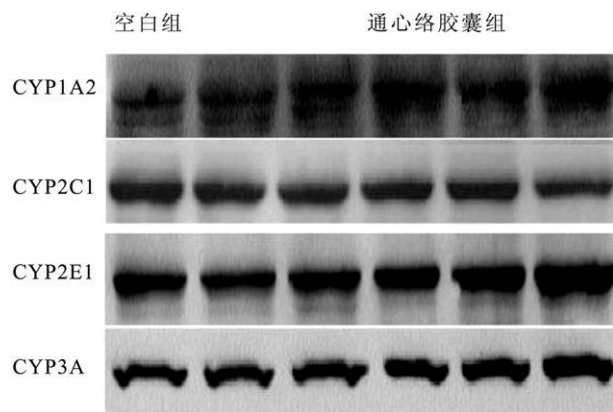


图 4 通心络胶囊组肝脏 CYPs 蛋白表达量

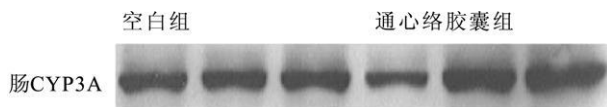


图5 通心络胶囊组肠道 CYP3A 蛋白表达量

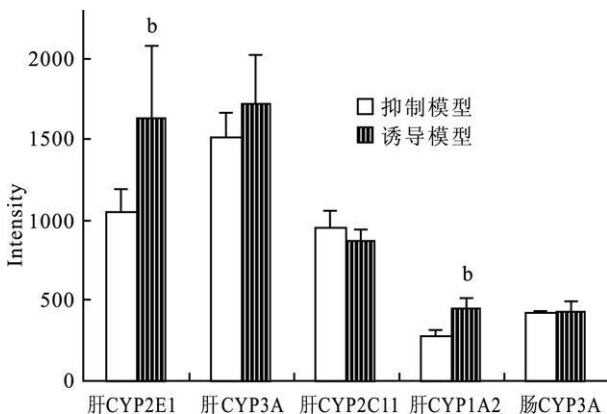


图6 CYPs 蛋白表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

与抑制模型组比较<sup>b</sup>  $P < 0.05$

### 3 讨论

研究结果显示速效救心丸和通心络胶囊长期给药后,对大鼠体内主要药物代谢酶的个别亚型影响显著。速效救心丸对大鼠肝脏 CYP3A 和 1A2 均表现出诱导作用,而对 CYP2C11 和肠道 CYP3A 均表现出抑制作用 ( $P < 0.05$ ),对于肠道和肝脏的 CYP3A4 表现出不同的作用,这可能与中药多组分有关,不同药物成分作用于不同部位引起。通心络胶囊可明显诱导 CYP2E1 和 1A2 ( $P < 0.05$ ),对 CYP3A 有一定的诱导作用。

文献<sup>[4-5]</sup>报道单独使用冰片可诱导大鼠肝脏 CYP450 酶,但是未对具体的亚型进行深入研究。我们的研究结果则显示这两种含冰片中药制剂共同表现出对 CYP1A2 的诱导。这种诱导作用一方面可以加速其自身代谢,另一方面还可能引起由于代谢酶活性改变而引起的药物相互作用。CYP1A2 在内源性底物代谢及一些致癌物质(黄曲霉毒素、真菌毒素、亚硝酸胺等)的激活过程中均起重要作用,并参与了咖啡因、非那西丁、醋氨酸、17 $\beta$  雌二醇、普萘洛尔、维拉帕米、硝苯地平、丙咪嗪等二十几种药物的代谢<sup>[8]</sup>。本研究结果提示这两种药物不宜长期服用,且应避免与以上药物合用;若临床应用不可避免,应关注以上药物的血药浓度。但是 CYP1A2 的诱导是否由冰片成分引起还有待深入研究

大鼠体内 CYP2C11 与人类 CYP2C9 无论是从酶动力学角度还是对甲苯磺丁脲的代谢途径分析,在不同物种间都具有最高的相似度<sup>9-10]</sup>。人体内 CYP2C 约占 CYP450 蛋白总量的 20%, CYP2C9 能羟化代谢许多不同性质的药物,例如抗凝血药华法林、降糖药甲苯磺丁脲、抗惊厥药苯妥因等一系列心血管类药物和非甾体抗炎药物<sup>[11]</sup>。故临床应用速效救心丸时应尽量避免与此类治疗指数比较窄的药物合用,避免因体内实际剂量升高而致中毒。

CYP2E1 与许多易挥发性麻醉剂(如甲氧烷、二乙醚、三氯乙烷、氟仿等)及芳香族类化合物的体内代谢有关<sup>[12]</sup>,其表达量增加对肝脏是有一定的毒性,研究结果提示通心络胶囊应尽量避免长期使用。

本研究从蛋白表达水平考察了 2 种中药制剂对大鼠 CYP450 酶主要亚型的诱导/抑制作用,但是考虑到蛋白水平的改变能否体现出代谢酶活性的改变还未明确,本研究拟进行大鼠在体 cocktail 探针药物试验,研究药物对 CYP450 酶可能存在的短期、长期的诱导/抑制作用;另外,实验动物与人类的 CYP450 酶存在的种属差异也不容忽视,因此,在临床更深入地研究药物相互作用则更具有指导联合用药的意义。

### 参考文献

- [1] 刘清安,赵克.速效救心丸的临床新用途[J].淮海医药,2007,25(4):382-384.
- [2] 郑沁鈞.通心络胶囊药理及临床应用研究进展[J].河北中医,2003,25(5):393-395.
- [3] 朱立勤,姜建石.细胞色素 P450 与药物代谢的研究现状[J].中国临床药理学与治疗学,2004,9(10):1081-1086.
- [4] 赵春梅.冰片单次和多次给药对肝脏微粒体药物代谢酶的影响[D].广州中医药大学,2002.
- [5] 胡利民,姜民,王少峡,等.合成冰片对大鼠肝 CYP450 酶含量及 CYP3A1 mRNA 表达的影响[J].天津中医药,2005,22(04):284-286.
- [6] 谢瑞芳,周昕.中药对细胞色素 P450 代谢影响的研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2009,14(6):697-701.
- [7] 陈磊,肖红,刘文英.米氮平在鼠肝微粒体中的体外代谢研究[J].中国临床药理学与治疗学,2005,10(5)509-513

- [ 8 ] 马璟, 钱蓓丽. 人类细胞色素 P450s 研究概况及其在新药安全性评价中的应用[ J ]. 中国新药杂志, 2002, 11(1): 36- 42.
- [ 9 ] Bogaards J, Bertrand M, Jackson P, et al. Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man[ J ]. Xenobiotica, 2000, 30( 12 ): 1131- 1152.
- [ 10 ] Dogterom P, Rothuizen J. A species comparison of tolbutamide metabolism in precision-cut liver slices from rats and dogs. Qualitative and quantitative sex differences[ J ]. Drug Metab Dispos, 1993, 21( 4 ): 705.
- [ 11 ] Spatzenegger M, Jaeger W. Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug-metabolism[ J ]. Drug Metab Rev, 1995, 27(3): 397- 417.
- [ 12 ] 王敏, 孙安盛, 吴芹, 等. 淫羊藿苷对小鼠肝微粒体细胞色素 P450 酶及其亚型 CYP2E1 活性的影响[ J ]. 华西药理学杂志, 2009, 24(2): 133- 135.

## Impact of cardiovascular drug Quick-Acting Heart Reliever and Tongxinluo capsules on CYP450s in rats after successive administration

BU Ming-hua<sup>1,2</sup>, ZHENG Yong-qiu<sup>1</sup>, ZHANG Ying<sup>1</sup>, LI Li-qun<sup>1</sup>, LIU Jian-xun<sup>1</sup>, LIU Dong-chun<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Research Center, Xiyuan hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China; <sup>2</sup>College of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, Liaoning, China

**ABSTRACT AIM:** To investigate the influence of Quick-Acting Heart Reliever and Tongxinluo capsules on drug metabolic enzyme cytochrome P450(CYP450) system in rats. **METHODS:** Rat liver and intestine microsome were prepared after a ten-day continuous administration of Quick-Acting Heart Reliever and Tongxinluo capsules. The content of total CYP450s in rat liver microsome was measured by UV-visible absorption spectrometry. Meanwhile, the protein expression of CYP1A2, CYP2C11, CYP2E1 and CYP3A in the liver microsome and CYP3A in the small intestine microsome was detected by western blotting assay. **RESULTS:** No significant difference of total CYP450 content was observed between each treatment group and control group

( $P > 0.05$ ). Western blot analysis showed that Quick-Acting Heart Reliever induced the CYP1A2 in liver microsome, but inhibited the liver CYP2C11 and CYP3A in intestine microsome; Tongxinluo capsules induced the expression of CYP1A2 and CYP2E1 in liver microsome. **CONCLUSION:** Quick-Acting Heart Reliever and Tongxinluo capsules exhibit induction/inhibition on the expression of CYP450 isoforms. The results suggest that the related possible side effects of drug-drug interaction could not be neglected in the period of clinical therapy. **KEY WORDS** Cytochrome P450 (CYP450); Western blotting; Drug interaction

本文编辑: 李娟