

• 论著 •

血塞通及川芎嗪对细胞色素 P450 不同亚型代谢酶影响的研究

石 杰, 陈安进, 张 芳, 王本坚

(青岛市立医院药物研究室, 山东 青岛 266071)

【摘要】 目的 研究血塞通和川芎嗪对肝微粒体细胞色素 P450(CYP450)酶系统不同亚型的影响, 预测它们之间及与其他药物间的相互作用, 并为临床合理用药提供参考。**方法** 通过研究 CYP450 亚型 CYP1A2、CYP3A4 的专属探针药物咖啡因、氨苯砜的体外代谢变化, 评价血塞通和川芎嗪对这两个酶的诱导或抑制作用。**结果** 对照组、血塞通组和川芎嗪组中咖啡因和氨苯砜的浓度均随时间延长而降低, 3 组间差异无统计学意义。血塞通组探针药物咖啡因体外半衰期明显短于对照组[(19.24±2.37)min 比 (25.15±2.02)min, $P<0.01$], 川芎嗪组咖啡因体外半衰期[(27.67±4.64)min]与对照组无明显差异, 说明血塞通对肝药酶 CYP1A2 有诱导作用, 而对 CYP3A4 无影响; 血塞通组和川芎嗪组探针药物氨苯砜体外半衰期与对照组比较差异均无统计学意义[(16.29±2.94)min、(15.16±1.67)min 比 (16.16±1.51)min, P 均 >0.05], 说明川芎嗪对肝药酶 CYP1A2 和 CYP3A4 均无影响。**结论** 药物对 CYP450 各亚型酶的影响不同。血塞通在同 CYP1A2 代谢相关的药物合用时, 应充分考虑其对 CYP1A2 的影响, 以避免可能出现的毒性反应或不良反应。

【关键词】 细胞色素 P450; 肝微粒体; 血塞通; 川芎嗪; 咖啡因; 氨苯砜

中图分类号: R285.5; R969.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2008)06-0342-04

Effects of traditional Chinese medicine Panax notoginsenoside (血塞通) and Tetramethylpyrazine (川芎嗪) on cytochrome P450 subtype enzymes SHI Jie, CHEN An-jin, ZHANG Fang, WANG Ben-jian. Department of Drug Research, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266071, Shandong, China

【Abstract】 Objective To study the effects of traditional Chinese medicine Panax notoginsenoside (PNS, 血塞通) and Tetramethylpyrazine (TMPz, 川芎嗪) on different subtypes of cytochrome P450 (CYP450), based on that, to forecast the inter-reaction between these two drugs and between each one of them and another drug, and also to estimate the safety assessment of them. **Methods** The metabolic changes of caffeine and dapsone which are the specific probe drugs for subtypes of CYP450, CYP1A2 and CYP3A4, were studied in vitro to estimate the inhibition or induction effects of PNS and TMPz. **Results** The concentrations of caffeine and dapsone, the probe drugs in liver cytochrome P450, in control group, PNS group and TMPz group were all declined with time prolongation, and there were no significant differences among the three groups. The half life time ($t_{1/2}$) of caffeine in PNS group was obviously shorter than that in control group [(19.24±2.37) minutes vs. (25.15±2.02) minutes, $P<0.01$], while the $t_{1/2}$ of caffeine in TMPz group [(27.67±4.64) minutes] showed no remarkable difference from that in the control group. It was suggested that PNS induce CYP1A2, but have no effect on CYP3A4. The $t_{1/2}$ of dapsone in PNS group and TMPz group showed no difference from that of the control group [(16.29±2.94) minutes, (15.16±1.67) minutes vs. (16.16±1.51) minutes, both $P>0.05$]. It was suggested that TMPz have no effect on both CYP1A2 and CYP3A4. **Conclusion** Different drugs have different effects on different CYP450 subtype enzymes. When PNS is used in combination with other drugs which are related to the metabolism of CYP1A2 enzyme, its induction effect on CYP1A2 should be considered fully to avoid toxic effect or the potential adverse reactions.

【Key words】 Panax notoginsenoside; Tetramethylpyrazine; cytochrome P450; caffeine; dapsone

人类肝脏中与药物代谢密切相关的细胞色素 P450(CYP450)亚型主要有 CYP1A2、CYP3A4 和 CYP2E1 等。许多因素如药物或环境致癌物、化学毒物的成分和结构等可以造成 CYP450 酶活性的差

异, 从而引起人体内许多药物的代谢和效应差异。血塞通注射液、川芎嗪注射液作为治疗心脑血管等疾病的药物已广泛应用^[1-2], 由于二者在临床适应证上有许多相似之处, 故在使用过程中往往出现不加区别地混用, 或为增强疗效而合用。虽然对于二者各自的药理作用机制研究较多^[3-6], 但对它们的体内代谢半衰期及对 CYP450 的影响等方面的研究尚未见报

基金项目: 山东省青岛市科技局科技计划项目(K2-26)

作者简介: 石 杰(1968-), 女(汉族), 山东省人, 医学博士, 副主任药师, Email: jieshiqd68@yahoo.com.cn.

道。根据中医药理论,这两种药物的性味归经、功用均有差异,因此阐明这两种药物对 CYP450 的诱导或抑制作用对于药物的药代动力学研究、药物的安全性评价、预防临床用药中的药物间相互作用以及临床给药方案的设计都有非常重要的意义。鉴于此,本研究中通过观察肝药酶 CYP1A2 和 CYP3A4 的专属探针药物咖啡因、氨苯砜的体外代谢变化,探讨血塞通和川芎嗪对肝微粒体 CYP450 酶系统不同亚型的影响,进一步深入了解其各自的代谢特点及相互间的差异,为临床合理应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物:Wistar 大白鼠,体重(230±20)g,雌雄各半,由青岛市药物检定所提供。动物禁食、禁水 24 h 用于实验。

1.2 肝微粒体的制备^[6]:断头处死大鼠,剪开腹、胸腔,用生理盐水从门静脉冲洗肝脏后取出,称湿重后用蔗糖溶液制备组织匀浆,低温高速离心 15 min,取上清液,加 CaCl₂ 溶液,冰浴后再次离心,弃上清液,将沉淀板重悬于 Tris 液中,得微粒体悬液。

1.3 肝微粒体基本参数测定

1.3.1 蛋白质标准曲线绘制^[7]及蛋白质含量测定:取白蛋白标准品,分别用蒸馏水配制不同浓度标准溶液,采用考马斯亮蓝染色法绘制蛋白质标准曲线,并根据公式计算蛋白质含量。

蛋白质标准曲线方程为: $Y(\mu\text{g/ml}) = 976.197\ 907\ 7X - 16.593\ 451\ 33$ ($r=0.999\ 8$)

$$\text{蛋白质含量}(\text{mg/g}) = \frac{Y(\mu\text{g/ml})/1\ 000}{20\%}$$

1.3.2 CYP450 含量测定^[8]:采用 Omura 法,根据公式计算 CYP450 的含量。肝微粒体参数结果显示,肝湿重(6.50±1.36)g,肝微粒体蛋白含量(17.27±6.33)mg/g, CYP450 总量(0.42±0.14)nmol/mg,表明符合体外实验要求。

$$\text{CYP450}(\text{nmol/mg}) = \frac{(A_{450} - A_{490}) \times 1\ 000}{91 \times \text{蛋白终浓度}(\text{mg/ml})}$$

1.4 体外孵育:①孵育时间选择:固定体外孵育的其他条件,观察不同孵育时间咖啡因、氨苯砜浓度衰减的变化,选择 60 min 为体外孵育时间。②孵育蛋白浓度选择:恒定体外孵育体系中的其他条件,观察咖啡因和氨苯砜两种探针药物浓度随肝微粒体蛋白浓度变化情况,选择肝微粒体蛋白浓度为 1 mg/ml 作为孵育浓度。③体外孵育方法:将制备的空白肝微粒体稀释至 1 mg/ml,取 3 ml 加入离心管,加 1 ml 探针药物工作原液(咖啡因 0.2 mg/ml,氨苯砜 0.15 mg/ml);空白对照组加三羟甲基氨基甲烷-

盐酸盐(Tris-HCl)缓冲液 0.5 ml;川芎嗪组加 0.12 mg/ml 川芎嗪注射液 0.1 ml 以及 Tris-HCl 缓冲液 0.4 ml;血塞通组加 3 mg/ml 血塞通注射液 0.1 ml 以及 Tris-HCl 缓冲液 0.4 ml^[9-10]。各组中加入预热的还原型辅酶 I (NADPH)溶液 0.5 ml 启动反应,分别于 0、5、10、20、40、60 min 各取 0.4 ml 反应液立即放入-20℃冰箱中终止反应。

1.5 肝微粒体中咖啡因、氨苯砜测定方法的建立:

①待测成分提取:将冷冻的肝微粒体在室温下解冻,吸取 200 μl,加入 20 μl 内标甲硝唑(110 μg/ml)混匀,加 5 ml 提取液(甲醇:乙酸铵=25:75),振荡、离心后吸取有机相 4 ml,氮气吹干,加 120 μl 甲醇溶解。②色谱结果:将空白肝微粒体混悬液、加探针药物和内标的肝微粒体混悬液及加血塞通肝微粒体混悬液进行色谱分析,由所得液相色谱图可知空白肝微粒体混悬液对此无干扰。

1.6 检测方法的方法学认证:①绘制咖啡因及氨苯砜标准曲线,得出咖啡因的标准曲线方程为: $Y = 3.551\ 7X + 0.222\ 5$ ($r=0.999\ 3$);氨苯砜的标准曲线方程为: $Y = 3.582\ 3X + 0.367\ 8$ ($r=0.999\ 1$);其中 X 为咖啡因或氨苯砜和内标的面积比值, Y 为浓度。②按标准曲线处理方法,每一浓度于当日早、中、晚测定 3 次后改连续 3 d 每日测定 1 次,观察测定结果的准确度和重现性。咖啡因日内差最大变异系数为 5.77%,日间差最大变异系数为 7.69%;氨苯砜分别为 5.19% 和 8.70%,说明本法当日测定与日间测定的结果稳定。③回收率实验显示,咖啡因为 1.0、8.0、32.0 μg/ml 浓度时回收率为 104.00%、102.50%、99.66%;氨苯砜为 0.5、4.0、16.0 μg/ml 浓度时回收率为 92.00%、109.25%、99.44%。④灵敏度实验:按上述实验条件及处理方法进样 50 μl,以信噪比为 3 确定的最低检测浓度为本方法灵敏度。咖啡因和氨苯砜的灵敏度均为 0.1 μg/ml。

1.7 统计学处理:采用 SAS 软件,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 与 CYP1A2 有关的结果(表 1):各组肝微粒体中咖啡因探针药物浓度随时间延长呈逐渐下降的趋势,但 3 组间比较差异无统计学意义。对照组浓度对数的体外代谢方程式为: $Y = -0.023\ 7X + 3.678\ 4$ ($r=0.996\ 1$);血塞通组: $Y = -0.020\ 5X + 3.632\ 6$ ($r=0.993\ 0$);其中 Y 为浓度对数, X 为时间。

2.2 与 CYP3A4 有关的结果(表 1):各组肝微粒体

表 1 各组肝微粒体中探针药物咖啡因及氨苯矾浓度及其体外半衰期比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	咖啡因浓度($\mu\text{g/ml}$)						咖啡因体外半衰期(min)
		0 min	5 min	10 min	20 min	40 min	60 min	
对照组	10	42.76 $\pm$ 1.30	33.38 $\pm$ 1.98	29.67 $\pm$ 1.56	22.61 $\pm$ 1.16	15.02 $\pm$ 0.94	9.74 $\pm$ 0.53	25.15 $\pm$ 2.02
血塞通组	10	41.23 $\pm$ 2.87	29.44 $\pm$ 4.38	25.48 $\pm$ 3.65	19.10 $\pm$ 1.78	11.59 $\pm$ 0.78	6.89 $\pm$ 1.15	19.24 $\pm$ 2.37*
川芎嗪组	10	43.89 $\pm$ 3.07	34.50 $\pm$ 1.65	29.50 $\pm$ 1.23	24.12 $\pm$ 1.04	16.00 $\pm$ 1.17	10.78 $\pm$ 1.37	27.67 $\pm$ 4.64

组别	动物数	氨苯矾浓度($\mu\text{g/ml}$)						氨苯矾体外半衰期(min)
		0 min	5 min	10 min	20 min	40 min	60 min	
对照组	10	29.06 $\pm$ 1.51	22.01 $\pm$ 2.34	17.15 $\pm$ 2.04	10.68 $\pm$ 1.07	7.07 $\pm$ 1.12	3.02 $\pm$ 0.68	16.16 $\pm$ 1.51
血塞通组	10	28.79 $\pm$ 1.17	20.04 $\pm$ 2.87	16.24 $\pm$ 2.73	11.23 $\pm$ 2.28	6.39 $\pm$ 2.05	1.48 $\pm$ 0.52	16.29 $\pm$ 2.94
川芎嗪组	10	29.06 $\pm$ 1.51	22.01 $\pm$ 2.34	17.15 $\pm$ 2.04	10.68 $\pm$ 1.07	7.07 $\pm$ 1.12	3.02 $\pm$ 0.68	15.16 $\pm$ 1.67

注:与对照组比较,* $P<0.01$

中氨苯矾探针药物浓度随时间延长呈逐渐下降的趋势,但 3 组间比较差异均无统计学意义。对照组浓度对数的体外代谢方程式为: $Y=-0.037\ 1X+3.245\ 5$ ($r=0.964\ 6$);血塞通组 $Y=-0.045\ 0X+3.367\ 8$ ($r=0.975\ 3$);其中 Y 为浓度对数, X 为时间。

2.3 体外代谢参数比较(表 1):血塞通组中咖啡因的体外半衰期较对照组明显缩短($P<0.01$),表明血塞通对 CYP1A2 有诱导作用,而氨苯矾的体外半衰期无明显变化;川芎嗪组中咖啡因和氨苯矾的半衰期均无明显变化,表明川芎嗪对 CYP1A2 和 CYP3A4 无诱导作用。

3 讨论

CYP3A4 是 CYP450 酶系中最主要的同工酶。而 CYP1A2 在肝脏中含量占 CYP450 蛋白总量的 13%,且不同个体的 CYP1A2 含量及活性差异可高达 60 倍以上。现已发现,许多药物经 CYP1A2 催化代谢,芳胺、杂环胺及一些含卤烃化物均是 CYP1A2 的重要底物。CYP1A2 在药物代谢、前致癌物激活过程中均起重要作用,其活性与许多药物的疗效或毒性及一些肿瘤的易感性密切相关,是人体参与药物代谢的另一重要亚型。因此,本研究中选择 1A2 与 3A4 两个亚型作为研究对象。

本研究中所使用的两种探针药物咖啡因、氨苯矾不产生相互作用,对分析方法不存在潜在的干扰,且具有高度敏感性和专属性,这与文献[11-13]报道的结果一致。在参考文献资料的基础上,我们进一步优化了色谱条件,创建了一整套同时测定咖啡因及氨苯矾两种探针药物的高效液相色谱(HPLC)方法。该方法色谱峰峰形良好、分离完全、无内源性杂峰干扰,精密度和回收率高。血塞通的药用成分三七总皂苷均为达玛烷型皂苷;川芎嗪的化学结构为生物碱单体四甲基吡嗪,二者均有较强的极性,在本实

验条件下不影响探针药物的检测。

本研究结果显示,血塞通对 CYP1A2 有诱导作用,而对 CYP3A4 无影响;川芎嗪对 CYP1A2 和 CYP3A4 都无影响。药物对 CYP450 存在多种诱导机制主要有:①相应基因转录水平增加;②mRNA 稳定性增加;③酶蛋白抗降解能力和稳定性增加。不同 CYP450 同工酶的诱导机制不同,对 CYP1A2 的主要诱导机制为相应基因转录水平及 mRNA 稳定性增加两种机制。血塞通对 CYP1A2 的诱导机制属于哪一种还有待于进一步的研究。文献报道血塞通、川芎嗪具有促进细胞修复及再生、保护内皮细胞并逆转其功能紊乱等作用,因而在心脑血管等疾病的治疗中广泛应用[14-15]。本研究结果显示,血塞通对 CYP1A2 有诱导作用,可增加相应酶底物的生物转化率,在临床同时使用主要由 1A2 代谢的药物,如扑热息痛、咖啡因、芳香胺、丙咪嗪、华法林、雌二醇、乙酰苯胺、非那西丁、茶碱等时,会使得它们的代谢加快,因此应注意适当调整上述药物的剂量[16]。否则可能会对药物疗效产生影响。文献报道川芎嗪主要由 CYP3A 代谢,因而与血塞通合用时二者发生相互作用的潜在可能性较小。

参考文献

[1] 宋海波,陈万强,孟生泉,等.三七总皂甙注射液治疗肺源性心脏病急性发作期心力衰竭疗效观察[J].中国中西医结合急救杂志,1999,6(8):347-349.
[2] 王海东,靳宝兰,朱简.中西医结合治疗急性脑梗死 70 例临床观察[J].中国中西医结合急救杂志,2006,13(3):191.
[3] 鹿中华,王锦权,陶晓根,等.川芎嗪对豚毒症大鼠肝细胞线粒体保护作用的实验研究[J].中国中西医结合急救杂志,2008,15(2):85-88.
[4] 吴海云,王士雯,朱姝,等.川芎嗪在急性冠状动脉综合征中抗炎作用的研究[J].中国中西医结合急救杂志,2004,11(4):196-198.
[5] 胡瑛媛,樊水平.应用中药活性成分治疗脑出血的机制研究[J].中国中西医结合杂志,2006,26(4):376-380.
[6] 赵春梅,寇娜娜.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:广州中医药大学临床药理研究所, 2002.
- [7] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [8] 张均田. 现代药理实验方法(上册)[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998: 61.
- [9] 况晓东, 李新华, 熊玉卿. 川芎嗪在大鼠肝微粒体系统中的代谢研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1971-1975.
- [10] 王艳萍, 孟庆彪, 王伟东, 等. 血塞通注射液药代动力学研究[J]. 中国药房, 2002, 13(3): 144-145.
- [11] 吕淑莲, 惠金萍, 徐艳霞, 等. Cocktail 探针药物同时评价连翘对肝细胞色素 P450 的影响[J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(10): 761-763.
- [12] Streetman DS, Bleakley JF, Kim JS, et al. Combined phenotypic assessment of CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase with the "Cooper-stown cocktail" [J]. Clin Pharmacol Ther, 2000, 68(4): 375-383.
- [13] Frey RF, Matzke GR, Adedoyin A, et al. Validation of the five-drug "Pittsburgh cocktail" approach for assessment of selective regulation of drug-metabolizing enzymes [J]. Clin Pharmacol Ther, 1997, 62(4): 365-367.
- [14] 王万铁, 林丽娜, 徐正祚, 等. 内皮细胞功能紊乱在肝缺血/再灌注损伤中的作用及川芎嗪的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(6): 350-352.
- [15] 李青, 詹文涛, 赵怀璧, 等. 三七皂甙对急性有机磷农药中毒脏器损伤的保护作用研究[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(7): 390-393.
- [16] 骆文香, 张银娣. 药物代谢中的肝细胞色素 P450 [J]. 药学进展, 1999, 23(1): 27-33.
- (收稿日期: 2008-07-22 修回日期: 2008-09-25)
(本文编辑: 李银平)

• 经验交流 •

5 例复杂肱骨近端骨折患者的治疗分析

陈 晖

(天津大港医院骨二科, 天津 300270)

【关键词】骨折; 肱骨; 人工肱骨头置换

中图分类号: R274.11 文献标识码: B 文章编号: 1008-9691(2008)06-0345-02

2005 年 8 月—2008 年 1 月, 采用人工肱骨头置换加综合疗法治疗复杂肱骨近端骨折取得满意疗效, 报告如下。

1 临床资料

1.1 病例: 5 例患者中男 3 例, 女 2 例; 年龄 51~66 岁, 平均 60 岁; 均为单侧肱骨近端骨折(Neer 分型为四部分骨折), 闭合性损伤, 其中 4 例骨折合并脱位。

1.2 手术方法: 采用全麻或高位臂丛神经阻滞麻醉。患者取沙滩椅位或平卧位, 于肩关节前行拐杖切口, Thompson 入路, 于胸大肌、三角肌间隙进入。保护头静脉, 将头静脉向内牵开, 暴露肱二头肌长、短头和喙肱肌腱。上肢外旋后, 切除少量肩胛下肌, 暴露并打开关节囊, 取出肱骨头, 注意要尽量保留大、小结节骨块。扩髓后置入骨水泥型假体, 置入时后倾 30°~40°, 颈干角 140°, 而后冲洗、缝合、置引流管。术后 24 h 即开始肩关节被动辅助训练, 术后 6 周, X 线片上示肱骨大、小结节开始愈合行主动功能锻炼, 辅以理疗及口服舒筋活血中药治疗。

1.3 结果: 5 例随访 6~24 个月, 平均作者简介: 陈 晖 (1973-), 男 (汉族), 天津市人, 主治医师。

12 个月。伤口均一期愈合, 未出现疼痛、神经损伤, 无关节不稳、脱位、感染等。肩关节活动范围可外展 85°、前屈 90°、外旋 32°、内旋至胸 1~2(L1~L2) 水平; X 线片显示肱骨大、小结节愈合良好。

1.4 典型病例: 患者男性, 58 岁; 车祸致伤, 伤及左肩部及骶尾部。入院查体: 神清, 血压 105/70 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa), 心肺无异常; 左肩部肿胀畸形, 局部有压痛, 左肩活动受限, 左上肢无明显感觉异常, 骶尾部有压痛。入院 X 线片提示: 左肱骨近端粉碎性骨折合并脱位, 尾骨骨折。诊断为: ①左肱骨近端 Neer 四部分骨折合并脱位; ②尾骨骨折。入院后进行相关检查, 于伤后 3 d 行左肱骨近端粉碎性骨折切开人工肱骨头置换术, 手术时间约 70 min, 出血量约 300 ml。术后 2 周伤口拆线。术前后 X 线检查结果见彩色插图 1~2。

2 讨论

肱骨近端骨折治疗的目的是解除疼痛, 尽早恢复肩关节功能, 其治疗方式的选择取决于年龄、骨折粉碎程度、肱骨近端血运破坏程度以及骨质疏松情况。目前适用于四部分骨折和骨折脱位, 肱骨

头劈裂性骨折、压缩性骨折; 合并严重骨质疏松的三部分骨折和骨折脱位等。人工肱骨头置换对适应证是一种很好的治疗方法。术中注意: 肩关节活动度最大、关节盂浅小, 其稳定性有赖于关节囊、韧带、肌肉及骨性组织共同完成, 因而准确的解剖复位和确实的固定, 保证大、小结节重建的质量非常重要。

术后康复训练对患者肩关节功能恢复起着至关重要的作用。按照 Neer 等^[1]康复原则, 我们对患肩进行功能锻炼的经验是: 在第一阶段如果辅以理疗、磁疗、激光等物理疗法, 以及口服舒筋活血中药治疗, 可以加速肩关节周围组织的血液循环, 促进新陈代谢, 具有抗炎、镇痛、促进伤口愈合、松解粘连、滑利关节的作用; 再配合适当的功能锻炼, 能加强和巩固治疗效果, 缩短康复时间, 提高康复训练的效果。

参考文献

- [1] Neer CS 2nd, Watson KC, Stanton FJ. Recent experience in total shoulder replacement [J]. J Bone Joint Surg Am, 1982, 64(3): 319-337.

(收稿日期: 2008-07-22)

(本文编辑: 李银平)