

健脾化浊方对阿托伐他汀体外代谢的影响

王英杰 沈智杰 王肖龙 毛玉昌 郭蔚 胡卓汉

【摘要】 目的:在体外基于细胞色素(CYP450)酶系研究健脾化浊方对阿托伐他汀代谢的影响。 方法:首先将健脾化浊方与人肝微粒体预孵育 15 min 后,加入 CYP 3A4 的底物睾酮及还原型辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸,于 37℃ 共同孵育 30 min,之后加入 0.5 ml 预冷的甲醇终止反应,取等量上清于高效液相质谱分析仪上检测 6 β -羟基睾酮的生成,确立体外肝微粒体中健脾化浊方对 CYP3A4 酶的作用。再将稀释好的健脾化浊方及人肝微粒体加入 96 深孔板中,然后加入阿托伐他汀,对照组中则加入阴性对照物,取上清用于液相色谱/质谱/质谱分析。 结果:健脾化浊方对肝药酶 CYP3A4 有较强的抑制作用($IC_{50} = 10.5$),并且能延缓阿托伐他汀在肝细胞微粒体内的代谢,使其药物浓度显著提高($P < 0.01$)。 结论:体外健脾化浊方通过对 CYP3A4 酶的抑制作用而影响了阿托伐他汀的代谢,中药和西药联用存在着药物相互作用。

【关键词】 健脾化浊方;肝药酶;CYP3A4;阿托伐他汀

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2013.06.016

Effect of tonifying spleen and eliminating turbidity decoction on atorvastatin metabolism in vitro WANG Ying-jie¹, SHEN Zhi-jie¹, WANG Xiao-long¹, MAO Yu-chang², GUO Wei¹, HU Zhuo-han².

1. Department of Cardiovascular, Shanghai Shuguang Hospital affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China; 2. RILD Research Institute for Liver Disease, Shanghai 201203, China

【Abstract】 Objective: To evaluate the effect of tonifying spleen and eliminating turbidity decoction (TSET) on atorvastatin metabolism based on CYP450 enzyme in vitro. **Methods:** Firstly, different concentrations of TSET were co-incubated with liver microsomes for 15 min at 37℃, then testosterone, the substrate of CYP3A4, and NADPH was added to incubate for another 30 min at 37℃. The reaction was terminated with pre-cooled 0.5 ml methanol, and then 6 β -hydroxyl testosterone in the supernatant was measured by high performance liquid chromatography-mass spectrometry technology (HPLC-MS). Secondly, atorvastatin was incubated with or without TSET and liver microsomes, and concentration of atorvastatin in supernatant was determined by HPLC-MS at a series of time points. **Results:** With the increase of TSET concentration, the activity of liver metabolizing enzyme CYP3A4 in liver microsomes was significantly inhibited ($IC_{50} = 10.5$). TSET significantly increased the concentration of atorvastatin when incubated together with liver microsomes ($P < 0.01$). **Conclusion:** TSET reduces the metabolism of atorvastatin in liver microsomes possibly through inhibiting the activity of CYP3A4. TSET and atorvastatin may have remarkable synergy effect.

【Key words】 Tonifying spleen and eliminating turbidity decoction; Liver metabolizing enzyme; CYP3A4; Atorvastatin

中西药联合应用是常见的临床治疗方式,有效

提高了临床疗效。药物的相互作用可通过抑制或诱导药物代谢酶(包括细胞色素 P450 酶系等)产生,从而使药物及其代谢产物血浆和组织浓度呈几何级数程度增加或减少^[1,2]。通过增效作用,使活性药物代谢减慢提高其血药浓度,增加生物利用度,但同时也带来了安全问题。

前期研究发现健脾化浊方(tonifying spleen and eliminating turbidity decoction, TSET)与阿托

基金项目:上海市教育委员会科研基金(2010JW44);上海市中医药事业发展三年行动计划项目(zysnxd-cc-yjxy);上海市自然科学基金(13ZR1462100)

作者单位:201203 上海中医药大学附属曙光医院心血管科,上海市中医临床实验室(王英杰,沈智杰,王肖龙,郭蔚);201203 上海,瑞德肝脏疾病研究(上海)有限公司(毛玉昌,胡卓汉)

通信作者:王肖龙,Email:wxlqy0214@163.com

伐他汀联用可以使低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)降低更多。

鉴于阿托伐他汀主要通过肝药酶 CYP3A4 代谢,本研究以肝细胞微粒体体外孵育为实验条件,观察 TSET 与阿托伐他汀共同孵育下后者代谢曲线的变化,并以阳性底物对照,初步探讨健脾化浊方对阿托伐他汀代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

中药均购自上海蔡同德堂中药饮片有限公司,中药复方水提取物由上海药物标准化研究所制备,其均含生药量 1 g/ml。

探针底物: 睾酮(Fluka 86500, 美国 Sigma-Aldrich 公司)。产物标准品: 6 β -羟基睾酮(Gentest 451656, 美国 BD 公司)。阳性对照的抑制剂: 酮康唑(Ketoconazole K1003, 美国 Sigma-Aldrich 公司)。高效液相色谱仪(Agilent 1100 型, 美国安捷伦公司), 自动进样器(CTC, 美国 LEAP 公司), 三重四级杆质谱分析仪(API4000, 美国 AB 公司)。

混合人肝微粒体: 在知情同意和相关捐献法规条件下的无病原人肝组织, 超速离心制备, 并根据美国食品和药品监督管理局(USFDA)的指导原则特征化 CYP450 亚酶活性, 产品适合用于体外药物相互作用研究。人肝微粒体由瑞德肝脏疾病研究(上海)有限公司惠赠, 阿托伐他汀由辉瑞制药有限公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 TSET 对 CYP3A4 的抑制作用 人原代肝细胞贴壁并形成单细胞层后, 用磷酸盐缓冲液(PBS)将蛋白质浓度从 20 mg/ml 人肝微粒体稀释至 0.9 mg/ml。用甲醇配制 40 mmol/L 的睾酮储备液, 用 PBS 缓冲液稀释至 300 μ mol/L 工作液待用。用 PBS 配制 6 β -还原型辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADPH)为 6 mmol/L。将 50 μ l 微粒体溶液和 50 μ l TSET (1g/ml) 混合, 于 37 $^{\circ}$ C 预孵育 15 min, 然后加入 CYP3A4 的探针底物睾酮工作液 25 μ l, 再加入 25 μ l 辅酶 β -NADPH 溶液, 于 37 $^{\circ}$ C 共同孵育 30 min。各试剂在反应体系中的终浓度为: 微粒体 0.3 mg/ml, 6 β -NADPH 1 mmol/L, 睾酮 50 μ mol/L, 中药复方的终浓度为 10 mg/ml 和 3.3 mg/ml。反应体系内有机溶剂的含量在 1% 以内。反应结束后加入 0.75 ml 预冷的含内标(柳氮酚 160 ng/ml)的甲醇终止反应, 4000 转/分离心 10 min。取等量上清于高效液相质谱分析仪上检测 6 β -羟基睾酮的生成。阳性对照组用酮康唑代替中药溶液。用二甲亚砜配制 10 mmol/L 的酮康唑储

备液, 用 PBS 缓冲液稀释为 30 μ mol/L 工作液待用, 孵育体系同实验组。反应体系中酮康唑的终浓度为 10 μ mol/L。阴性对照组以测试中药的溶媒替代中药溶液, 进行上述程序的孵育。样品于液相色谱/质谱/质谱(LC/MS/MS)上检测代谢产物 6 β -羟基睾酮的生成。

1.2.2 TSET 对阿托伐他汀的体外代谢影响 阿托伐他汀组将稀释好的阿托伐他汀及肝微粒体加入 96 深孔板中; TSET + 阿托伐他汀组将稀释好的 TSET、阿托伐他汀及肝微粒体加入 96 深孔板中; 非酶系统组将稀释好的阿托伐他汀加入 96 深孔板中。3 组都在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 15 min, 然后分别加入阴性对照物睾酮及阳性对照物酮康唑; 再加入 NADPH 于 37 $^{\circ}$ C 下继续孵育。在孵育 0、15、30、60 和 120 min 时, 在上述反应体系中取出 100 μ l 后加入 500 μ l 预冷的含内标的甲醇终止反应, 离心最后的混合物 10 min, 取上清用于 LC/MS/MS 技术分析。通过测定 6 β -羟基睾酮的生成确定 CYP3A4 亚酶的相对活性, 由下式计算 CYP3A4 的相对酶活性:

$$\text{CYP3A4 相对活性} = \frac{\text{样本峰面积比}}{\text{阴性对照组峰面积比}} \times 100\%$$

1.3 统计学处理

利用 Microsoft Excel 2003 对实验数据进行分析, 以平均数 \pm 标准差 ($M \pm SD$) 表示。用 GraphPad Prism5.0 软件将酶相对活性与中药浓度的 Log 值作图。

2 结果

2.1 TSET 对 CYP3A4 的抑制作用

结果显示, 随着 TSET 药物浓度的增加 CYP3A4 的活性下降, 浓度为 93.5 mg/ml 时抑制作用最强, 提示 TSET 对 CYP3A4 具有较强的抑制作用, $IC_{50} = 10.5$, 见表 1。

表 1 TSET 对 CYP3A4 的抑制作用

TSET 浓度 (mg/ml)	CYP3A4 活性 (%)
935	16.90 \pm 0.80
312	5.83 \pm 0.77
93.5	1.62 \pm 0.04
31.2	9.61 \pm 0.13
9.35	49.40 \pm 1.50
3.12	77.00 \pm 1.00
阴性对照	100.00 \pm 0.00
酮康唑	1.36 \pm 0.16

2.2 TSET 在肝细胞微粒体中对阿托伐他汀的代谢影响

阿托伐他汀在肝微粒体内单独孵育 15 min 时药物浓度即出现明显的降低, 到 120 min 时浓度更低; 而阿托伐他汀与 TSET 共同在肝微粒体内孵育时, 即使到

120 min 还保持很高的药物浓度,显示 TSET 对阿托伐他汀的代谢有显著的抑制作用,见表 2。

表 2 阿托伐他汀在大鼠肝微粒体中的代谢

孵育时间 (min)	阿托伐他汀药物浓度百分比 (%)		
	阿托伐他汀	TSET+阿托伐他汀	非酶系统
0	99.35±1.65	100.80±2.20	98.85±3.15
15	44.70±1.30	82.30±3.20 ⁽¹⁾	N/A
30	25.70±0.10	78.90±1.30 ⁽¹⁾	N/A
60	17.05±0.95	84.00±0.20 ⁽¹⁾	94.35±0.45
120	17.65±1.05	89.85±6.45 ⁽¹⁾	102.50±0.50

注:与阿托伐他汀组相比较,⁽¹⁾ $P<0.01$; N/A 即未测(不需要检测多点)

3 讨论

CYP450 是人体微粒体氧化酶系中最重要的一族氧化酶,参与机体内大部分外源性、内源性物质的代谢。临床有 90% 以上的药物经过 CYP450 代谢,其中 50% 由 CYP3A4 介导。药物可显著影响药酶的活性,从而加速或减缓底物或其他药物代谢。这些构成了药物体内过程和相互作用的物质基础。抑制或诱导药物代谢酶是药物相互作用的主要机制^[3,4]。

阿托伐他汀是羟甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂,通过竞争性抑制 HMG-CoA 还原酶从而阻断胆固醇生物合成,降低致动脉粥样硬化的 LDL-C 水平。大量循证医学证据表明积极降脂可使不同血脂水平和不同人群获得显著临床效果,能显著减少致命或非致命心肌梗死、血管重建、脑卒中发病率,降低总死亡率^[5]。阿托伐他汀口服后吸收迅速,1~2 h 内血浆浓度达峰,因经肝内、肠道广泛首过效应,口服后绝对生物利用度仅为 14%^[6]。研究发现,阿托伐他汀与 CYP450、3A4 的抑制剂(环孢菌素、克拉霉素)合用时会发生相互作用,导致阿托伐他汀血浆浓度增加。Hermann 等^[7]对 18 例服用环孢菌素治疗的肾移植患者,同时每日口服 10 mg 阿托伐他汀共 4 周,与平均年龄为 18 岁的 18 名健康志愿者比较药动学参数。阿托伐他汀酸及酯的曲线下面积(AUC) 0~24 h 分别增加了 8 倍和 4 倍,对-羟基-阿托伐他汀的峰值浓度 C_{max} 增加约 37 倍($P<0.0001$),说明使用环孢菌素治疗的肾移植患者使用阿托伐他汀时存在较大的不良反应风险。而相反,Wakelee 等^[8]发现非小细胞型肺癌患者使用化疗药物贝沙罗汀时联合应用阿托伐他汀降脂治疗中,作为 CYP450、3A4 诱导剂的贝沙罗汀能显著降低阿托伐他汀的疗效,使其 AUC 下降至 50% ($P<0.05$)。单一使用他汀类药物,肌病发生率通常低于 0.04%,横纹肌溶解症发生率更低。据推测约 1/2 的不良反应是由于他汀与其他药

物的相互作用引起。因此,他汀类药物与其他药物的相互作用已受到普遍关注。

中医药在临床的广泛应用,使得中药与西药在临床上联合应用非常普遍,因而中药和西药的相互作用也引起了医药界的关注。TSET 为我科室降脂验方,具有降脂、改善内皮功能及抗氧化应激的作用^[9]。临床发现 TSET 与阿托伐他汀钙联合应用能更有效地降低 LDL-C 水平。中药无论其成分多么复杂,在体内起作用的物质基础仍然属于化合物范畴,在体内同样会面临着机体 CYP450 酶系对它的代谢。本研究中发现 TSET 在体外肝微粒体中孵育可以抑制 CYP3A4 酶的活性,与阿托伐他汀共孵育时,影响了阿托伐他汀的代谢曲线,增加了阿托伐他汀的作用时间和血药浓度。中药和西药联用存在着药物相互作用,要关注中药和西药联用的益处和风险。

参 考 文 献

[1] USFDA; Guidance for Industry : Drug Interaction Studies- Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing and Labeling[M]. 2006.

[2] Montastruc F, Sommet A, Bondon-Guitton E, et al. The importance of drug-drug interactions as a cause of adverse drug reactions: a pharmacovigilance study of serotonergic reuptake inhibitors in France[J]. Eur J Clin Pharmacol, 2012,68(5):767-775.

[3] Lynch T, Price A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects [J]. Am Fam Physician, 2007, 76(3):391-396.

[4] 朱大岭, 韩维娜, 张荣. 细胞色素 P450 酶系在药物代谢中的作用[J]. 医药导报, 2004, 23(7): 440-443.

[5] Miller M, Cannon CP, Murphy SA, et al. Impact of triglyceride levels beyond low-density lipoprotein cholesterol after acute coronary syndrome in the PROVE IT-TIMI 22 trial[J]. J Am Coll Cardiol, 2008, 51(7):724-730.

[6] Gibson DM, Stern RH, Abel RB, et al. Absolute bioavailability of atorvastatin in man[J]. Pharm Res, 1997, 14(2):253.

[7] Hermann M, Asberg A, Christensen H, et al. Substantially elevated levels of atorvastatin and metabolites in cyclosporine treated renal transplant recipients[J]. Clin Pharmacol Ther, 2004, 76(4):388-391.

[8] Wakelee HA, Takimoto CH, Lopez-Anaya A, et al. The effect of bexarotene on atorvastatin pharmacokinetics: results from a phase I trial of bexarotene plus chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2012, 69(2):563-571.

[9] 郭蔚, 王英杰, 沈智杰, 等. 降脂丸治疗高脂血症 54 例[J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(9): 30-31.

(收稿:2013-10-09 修回:2013-10-21)
(本文编辑:金谷英)