

基于 CYP450 酶的复方苦参注射液代谢及其与紫杉醇相互作用的研究

蔡小军¹, 陈艳², 贺晴¹, 陆一¹, 张秀红¹, 黄凯¹, 温浩^{1*}

(1.南京医科大学附属无锡市人民医院, 江苏 无锡 214023; 2.无锡卫生高等职业技术学校药理学系, 江苏 无锡 214028)

摘要:目的 基于细胞色素 P450 酶(CYP450s)的代谢, 考察复方苦参注射液体外与紫杉醇的相互作用, 为临床应用提供参考。

方法 将不同体积百分比浓度的复方苦参注射液与 CYP2C8 同工酶的探针底物紫杉醇及人肝微粒体共同孵育, 采用 LC-MS/MS 检测特异性探针底物代谢物 6 α -羟基紫杉醇的生成量, 计算半数抑制浓度(IC₅₀)。结果 复方苦参注射液在 0.600 g/mL 时对 CYP2C8 的抑制率为 100.0%, 其 IC₅₀ 值为 0.052 8 g/mL。结论 复方苦参注射液在体外与紫杉醇注射液之间存在基于 CYP2C8 的代谢性相互作用, 为临床应用两药抗肿瘤提供了参考。

关键词:紫杉醇; 复方苦参注射液; CYP450 酶; 药物相互作用; 肝微粒体

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-0482(2018)01-0087-04

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2018.0087

Research on Metabolism of Compound Sophora and Its Interaction with Paclitaxel Based on Cytochrome P450s

CAI Xiao-jun¹, CHEN Yan², HE Qing¹, LU Yi¹, ZHANG Xiu-hong¹, HUANG Kai¹, WEN Hao^{1*}

(1.Wuxi People's Hospital of Nanjing Medical University, Wuxi, 214023, China; 2.Pharmaceutical Department, Wuxi Higher Health Vocational Technology School, Wuxi, 214028, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the metabolism of compound sophora injection based on cytochrome P450s enzyme and its interaction with paclitaxel *in vitro* in order to provide references for clinical application. **METHODS** Different concentrations of compound sophora injection (v/v) were co-incubated with human liver microsomes and the substrates of CYP2C8 (paclitaxel). After the co-incubation, 6 α -OH-paclitaxel as the specific substrate metabolite was analyzed by LC-MS/MS assay and then the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated. **RESULTS** The inhibition rate of compound sophora injection on CYP2C8 was 100.0% at 0.600 g/mL and its IC₅₀ value was 0.052 8 g/mL. **CONCLUSION** Drug-drug interaction induced by the inhibition of CYP450 enzymes exists between compound sophora injection and paclitaxel *in vitro*, which can provide reference for the clinical application of these two drugs in cancer therapy.

KEY WORDS: paclitaxel; compound sophora injection; CYP450 enzyme; drug interaction; liver microsomes

复方苦参注射液是以苦参、白土苓为处方组成的国内独创、疗效独特的中药新制剂, 临床广泛应用于癌肿疼痛、出血的治疗。紫杉醇是促进微管聚合的新型抗肿瘤药物, 主要用于非小细胞肺癌、转移性卵巢癌和乳腺癌的治疗。临床在使用紫杉醇 135~175 mg/m² 静脉化疗期间(每 21 d 注射 1 次)给予复方苦参注射液 20 mL qd 静脉滴注, 发现部分患者出现骨髓抑制加重、II 度甚至 III 度神经毒性发生率增加。紫杉醇所导致的这些副反应的增多可能与其药物暴露量增加以及血药浓度高于其有效浓度范围相关^[1]。而复方苦参注射液与紫杉醇合用后是否会导致紫杉醇血药浓度升高未见报道。因此, 本实验基

于细胞色素 P450(CYP450)酶的代谢, 采用探针药物法考察复方苦参注射液体外与紫杉醇的相互作用, 以初步探讨紫杉醇临床合用复方苦参注射液时骨髓抑制以及神经毒性增加的原因, 为临床合用两药抗肿瘤提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

聚丙烯 96 孔板, 2.2 mL/孔 (Apricot Designs Inc., CA, USA); 纯水系统 (PURELAB Classic, ELGA, England); 移液器 (Single/Multiple channels, Eppendorf, Germany); 液体处理工作站 (PP-550DS, Apricot Designs Inc., CA, USA); 离心机

收稿日期: 2017-07-21

基金项目: 江苏省药学会医院药学基金(201409)

作者简介: 蔡小军(1983—), 男, 主管药师。* 通信作者: 温浩, 男, 副主任药师, 主要从事临床药学研究, E-mail: greenhaowen@126.com

(Eppendorf, Germany); pH 测量仪 (SevenEasy™ S20, Mettler Toledo, Switzerland); 质谱仪 (AB Sciex API4000, Framingham, MA, USA); 高效液相色谱 (LC20-AD, LC30-AD, Shimadzu, Kyoto, Japan); 进样器 (CTC PAL, Zwingen, Switzerland; SIL30-AC, Shimadzu, Kyoto, Japan)。

1.2 主要药品与试剂

复方苦参注射液 (规格: 5 mL, 含生药量 2 g/mL, 批号: 20151019, 山西振东制药有限公司); 人肝微粒体 (Human liver microsomes, HLM) (批号: 38291, Corning); 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADPH) (批号: 002162-050403, Chem-impex international); 氯化镁、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾均为分析纯; 甲醇、乙腈均为色谱纯 (Merck Millipore); 紫杉醇 (批号: S115007, 纯度 98%)、咪康唑 (批号: BCB5966V, 纯度 100%)。

2 方法

2.1 待测药物、阳性抑制剂、底物与人肝微粒体工

表 1 复方苦参注射液稀释方法

储备液浓度 (v/v)/%	稀释液体积/ μ L	PB 溶液体积/ μ L	工作液浓度 (v/v)/%	最终浓度 (v/v)/%	最终生药量 浓度/(g·mL ⁻¹)
储备液	600	—	100	30.0	0.600
100	300	300	50.0	15.0	0.300
50.0	300	300	25.0	7.50	0.150
25.0	240	360	10.0	3.00	0.060
10.0	200	400	3.33	1.00	0.020
3.33	200	400	1.11	0.333	0.006
1.11	200	400	0.370	0.111	0.002

2.2 体外孵育方法

孵育总体系为 200 μ L: 将上述 2.1 中配制好的 20.0 μ L 底物工作液、100 μ L 人肝微粒体工作液、60.0 μ L 复方苦参注射液或阳性对照抑制剂的工作液加入反应板中, 反应体系中人肝微粒体的终浓度为 0.100 mg/mL, 紫杉醇的终浓度为 10.0 μ mol/L, 复方苦参注射液的终浓度见上表 1, 阳性对照组的反应体系中咪康唑终浓度为 3.00 μ mol/L, 阴性对照则加入等量的空白溶剂 (PBS 缓冲液)。反应板置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中预热 10 min, 然后加入 20.0 μ L 辅助因子启动反应。反应时间均为 10 min。样品在 (37 \pm 0.2) $^{\circ}$ C 下进行孵育反应, 供试品进行 1 个平行, 阳性对照进行 2 个平行。

孵育体系到达相应的反应时间后, 分别加入 400 μ L 含有内标 (200 ng/mL 的甲苯磺丁脲) 的终

作液的配制

复方苦参注射液, 以原液作为储备液, 依次根据下表 1 稀释为 100%、50.0%、25.0%、10.0%、3.33%、1.11% 和 0.370% 的工作液, 然后将工作液加入到反应体系后, 使复方苦参注射液的最终浓度分别为 30.0%、15.0%、7.50%、3.00%、1.00%、0.333%、0.111% (含生药量分别为 0.600、0.300、0.150、0.060、0.020、0.006、0.002 g/mL)。CYP2C8 的阳性抑制剂咪康唑用 DMSO 配制成 3.0 mmol/L 的储备液, 并用 ACN 和 PB 稀释成 10 μ mol/L 的工作液; 探针底物紫杉醇用 MeOH 溶解成 2.5 mmol/L 储备液, 然后用 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH=7.4) 配制成 100 μ mol/L 的工作液, 人肝微粒体用 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH=7.4) 配制成 0.200 mg/mL 的工作液^[2]。

止液至反应板中终止反应。充分震荡后置于离心机以 4 000 r/min 离心 20 min, 然后取出上清液并加入超纯水稀释, 稀释比例为 2:1。将反应板置于摇板上以 1 000 r/min 摇板 10 min 使溶液混合均匀。LC-MS/MS 进样分析。

2.3 探针底物的代谢物 LC-MS/MS 测定条件

色谱柱: ACE5 Phenyl, 50 mm \times 2.1 mm (ACE-125-0502), 流动相 A: 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B: 乙腈, 流速: 0.8 mL/min; 柱温: 40 $^{\circ}$ C。电喷雾正离子化 (ESI⁺) 下流动相梯度洗脱程序 (0~1.70 min, 95%~5% A; 1.70~1.81 min, 5%~95% A; 1.81~2.00 min, 95%~95% A), 喷雾电压 5 500 V, 源温度为 600 $^{\circ}$ C。各代谢产物及内标的质谱检测条件见表 2。

表2 探针底物代谢物及内标的质谱条件

酶亚型	代谢物	离子源	质谱条件			
			母离子	子离子	锥孔电压/eV	碰撞能量/eV
CYP2C8	6 α -羟基紫杉醇	ESI ⁺	870.5	525.2	60	23
内标	甲苯磺丁脲	ESI ⁺	271.1	155.3	52	40

2.4 数据采集、处理与分析

分析物和内标色谱图采集由 Analyst 软件(1.6.2 AB Sciex, Framingham, MA, USA)进行,色谱图积分由 MultiQuant 软件(3.0.2 AB Sciex, Framingham, MA, USA),采用半定量方法计算分析物与内标的峰面积比值。

用探针底物代谢物的剩余活性百分比体现 CYP2C8 酶的活性。设定不加供试品或阳性抑制剂的孵育体系中该同工酶的活性为 100% 作为对照。该同工酶剩余活性百分比=(不同体积百分比浓度的供试品或单个浓度的阳性抑制剂样品的底物代谢产物峰面积比/对照组代谢产物峰面积比)×100%。

以剩余活性百分比为纵坐标,抑制剂浓度为横坐标,应用 SigmaPlot (V.11) 软件中三参数反曲对数方程进行非线性回归分析,max:最大酶活性;x:供试品或阳性抑制剂的浓度;y:对应浓度下的酶活

性;Hillslope:斜率。方程式如下:

$$y = \frac{\max}{1 + (\frac{x}{IC_{50}})^{-hillslope}}$$

计算供试品及阳性抑制剂的 IC₅₀ 值。当供试品在 0.060 g/mL 时 CYP2C8 同工酶剩余活性百分比大于 50% 时,IC₅₀ 值被标记为大于“0.060 g/mL”。

3 结果

3.1 阳性抑制剂对 CYP450 酶活性的抑制作用

为评价实验方法的合理性,在测定药物对 CYP450 酶抑制作用的同时也测定了阳性抑制剂的作用。结果表明,咪康唑在 3.00 μ mol/L 时,CYP2C8 的活性是阴性对照的 23.9%,咪康唑对 CYP2C8 的 IC₅₀ 值是 0.941 μ mol/L。结果见表 3,测定图谱见图 1。

表3 阳性抑制剂对人肝微粒体中 6 α -羟基紫杉醇的影响

组别	浓度/ (μ mol·L ⁻¹)	N-Desethylamodiaquine		峰面积比平均值	酶活性/%	IC ₅₀ /(μ mol·L ⁻¹)
		代谢物峰面积	内标峰面积			
咪康唑	3.00	266	131 900	0.002 0	23.9	0.941
		247	129 800			
阴性对照组	0	1 265	137 000	0.008 0		
		946	131 900			

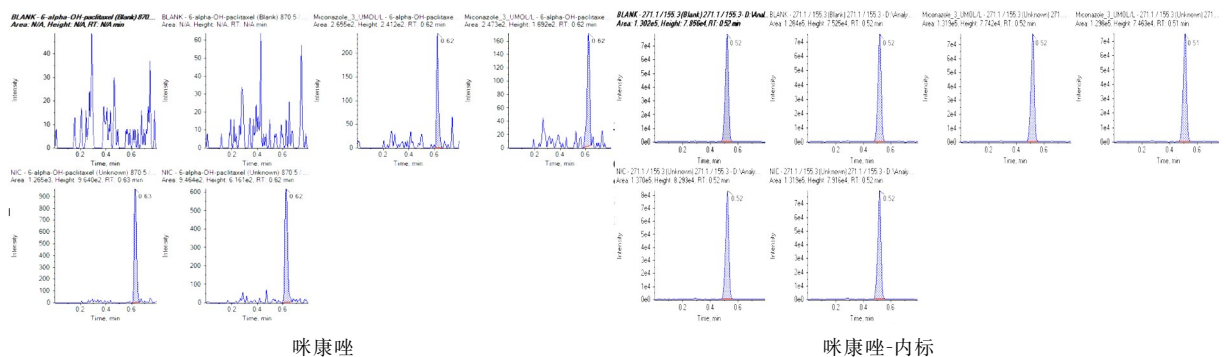


图1 咪康唑测定图谱

3.2 复方苦参注射液对 CYP2C8 酶活性的抑制作用

CYP2C8 的活性是通过紫杉醇羟基化反应生成 6 α -羟基紫杉醇来测定。复方苦参注射液在浓度 0.002、0.006、0.020、0.060、0.150、0.300、0.600 g/mL 时,CYP2C8 的活性是阴性对照的112.3%、135.8%、

96.4%、52.1%、0.0%、0.0%、0.0%(见表 4);复方苦参注射液在 0.600 g/mL 时对 CYP2C8 的抑制率为 100.0%,其 IC₅₀ 值为 0.052 8 g/mL,表明复方苦参注射液在体外对紫杉醇存在基于 CYP2C8 代谢的药物相互作用。测定图谱见图 2。

表 4 复方苦参注射液对人肝微粒体中 6 α -羟基紫杉醇活性的影响

抑制剂	浓度/ (g · mL ⁻¹)	N-Desethylamodiaquine		峰面积比平均值	酶活性/%	IC ₅₀ /(g · mL ⁻¹)
		代谢物峰面积	内标峰面积			
复方苦参注射液	0.600	0	88 930	0.000	0.0	0.052 8
	0.300	0	106 000	0.000	0.0	
	0.150	0	113 200	0.000	0.0	
	0.060	597	126 400	0.004 72	52.1	
	0.020	1 203	137 700	0.008 74	96.4	
	0.006	1 763	143 200	0.012 30	135.8	
	0.002	1 449	142 300	0.010 20	112.3	
	0.000	1 308	144 300	0.009 06	100.0	

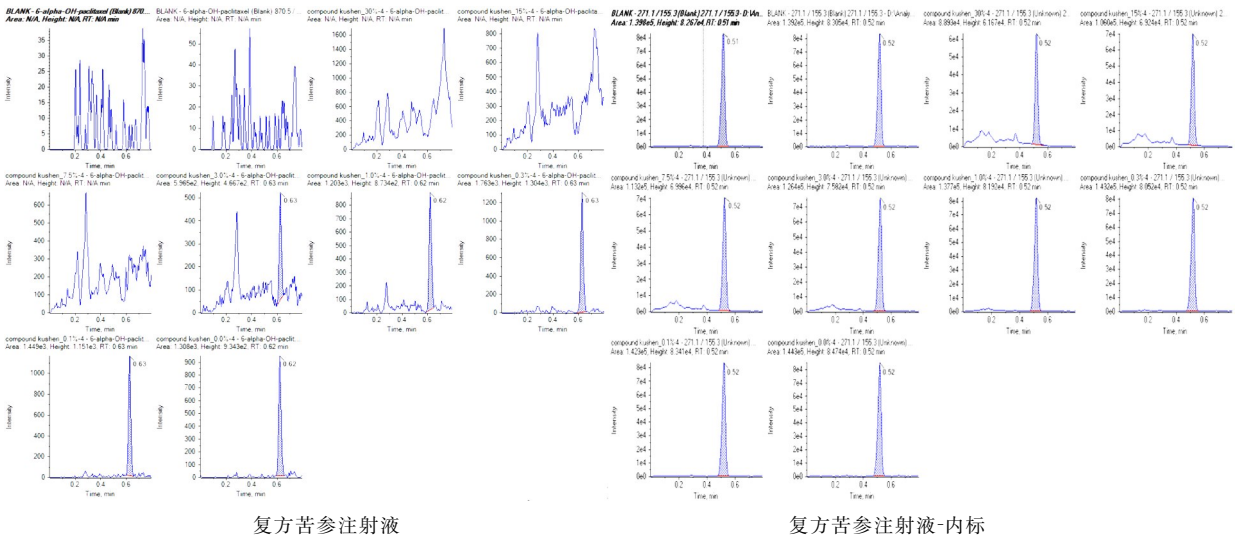


图 2 复方苦参注射液测定图谱

4 讨论

我们课题组基于 CYP450 同工酶 CYP2C8 的代谢,考察了体外复方苦参注射液与紫杉醇的相互作用。本实验中,CYP2C8 的活性是通过紫杉醇羟基化反应生成 6 α -羟基紫杉醇来测定^[3],从而评估复方苦参注射液在体外共孵育体系中对紫杉醇代谢为 6 α -羟基紫杉醇过程的影响。实验研究结果显示,咪康唑在 3.00 μ mol/L 时,CYP2C8 的活性是阴性对照的 23.9%,咪康唑对 CYP2C8 的 IC₅₀ 值是 0.941 μ mol/L,而复方苦参注射液在 0.600 g/mL 时对 CYP2C8 的抑制率为 100.0%,其 IC₅₀ 值为 0.052 8 g/mL。上述结果表明,体外复方苦参注射液影响紫杉醇通过 CYP2C8 介导的代谢,推测临床合用两者时,紫杉醇引起粒细胞减少等骨髓抑制毒性加重以及出现 2 度与 3 度神经毒性反应发生率增加的原因可能是由于复方苦参注射液抑制了 CYP2C8 的活性从而减少了紫杉醇的代谢,导致紫杉醇原形药的血药浓度增加。

综上所述,本研究初步明确了复方苦参注射液体外对紫杉醇通过 CYP2C8 介导的代谢产生影响,预测了两者药物-药物相互作用的可能性,为临床两药合用时的安全性提供了一定的参考。但体外的研究并不能完全表征药物在体内的实际情况,体内的微环境较为复杂,影响因素较多,两者在体内使用说明书中所推荐的治疗剂量时是否产生代谢性相互作用而影响紫杉醇的血药浓度尚需在体内进行深入研究。

参考文献:

[1] HERTZ DL, ROY S, MOTSINGER-REIF AA, et al. CYP2C8 * 3 increases risk of neuropathy in breast cancer patients treated with paclitaxel[J]. Ann Oncol, 2013, 24(6):1472-1478.
 [2] 刘丽雅, 韩永龙, 余奇, 等. 消癌平注射液等 4 种抗肿瘤中药注射液对人肝微粒体中 CYP450 酶 7 种亚型的体外抑制作用研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 19(5): 522-527.
 [3] MAKIA NL, GOLDSTEIN JA. CYP2C8 is a novel target of peroxisome proliferator-activated α (PPAR α) in human liver.[J]. Mol Pharmacol, 2016, 89(1):154-164.

(编辑:杨敏敬)