

## 基于 CYP2C9 亚型酶研究丹红注射液与阿司匹林的相互作用

唐进法<sup>1,2</sup>, 张帆<sup>2</sup>, 李伟霞<sup>1</sup>, 曹英杰<sup>1</sup>, 王晓艳<sup>1</sup>, 张书琦<sup>2</sup>, 李学林<sup>1,2\*</sup>

(1. 河南中医药大学第一附属医院药学部, 河南 郑州 450000; 2. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450000)

**摘要:** 目的 基于 CYP2C9 亚型酶研究丹红注射液与阿司匹林的相互作用。方法 以 CYP2C9 为载体, 双氯芬酸为探针底物, 其代谢产物 4-羟基双氯芬酸为检测指标, 采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间-串联质谱 (UPLC-Q-TOF-MS/MS) 中的 TOF-MRM 检测模式测定 4-羟基双氯芬酸含量, 比较不同体积分数丹红注射液 (0.4%、0.8%、1.6%)、不同剂量阿司匹林 (20、60、100 mg) 单独给药及其联合给药对 CYP2C9 亚型酶活性的影响。结果 与空白组比较, 各体积分数丹红注射液对 CYP2C9 亚型酶活性均有显著抑制作用 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 抑制类型为混合型, 但各剂量阿司匹林对其作用均不明显 ( $P > 0.05$ )。与中剂量丹红注射液单独给药比较, 联合高剂量阿司匹林后对 CYP2C9 亚型酶活性有显著差异 ( $P < 0.01$ ); 与低、中剂量阿司匹林单独给药比较, 联合中、高体积分数丹红注射液给药后对其有显著差异 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与高剂量阿司匹林单独给药比较, 联合高剂量丹红注射液给药后对其有显著差异 ( $P < 0.01$ )。结论 阿司匹林与丹红注射液联合使用时, 对 CYP2C9 亚型酶活性有一定相互作用, 并与两者给药顺序有相关性。

**关键词:** 丹红注射液; 阿司匹林; CYP2C9 亚型酶; 相互作用

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)08-1700-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.08.006

## Interaction between Danhong Injection and aspirin based on CYP2C9 isoform enzyme

TANG Jin-fa<sup>1,2</sup>, ZHANG Fan<sup>2</sup>, LI Wei-xia<sup>1</sup>, CAO Ying-jie<sup>1</sup>, WANG Xiao-yan<sup>1</sup>, ZHANG Shu-qi<sup>2</sup>, LI Xue-lin<sup>1,2\*</sup>

(1. Department of Pharmacy, the First Hospital Affiliated to Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China; 2. College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

**KEY WORDS:** Danhong Injection; aspirin; CYP2C9 isoform enzyme; interaction

研究表明, 临床合并用药数量越多, 产生不良反应的风险越大, 提示药物相互作用的机理对促进临床合理用药具有重要意义<sup>[1-3]</sup>。

肝脏是人体内药物代谢的主要器官, 机体 90% 以上的药物都通过肝脏细胞色素 P450 酶 (CYP450) 系统代谢, 对药物代谢快慢具有决定作用, 不同药物对 CYP450 各亚型酶活性的抑制或诱导作用也有所差异, 其中 CYP2C9 亚型酶占

CYP450 酶总量的 20% 左右, 在药物代谢中具有非常重要的作用。双氯芬酸是美国药物体内外研究指南推荐的 CYP2C9 的探针产物, 其 4-羟化代谢几乎完全由 CYP2C9 亚型酶介导, 虽然也经过 CYP2C19 亚型酶代谢, 但其催化双氯芬酸 4-羟化代谢的  $K_m$ 、 $V_{max}$  分别仅为 CYP2C9 的 1/18、1/9, 并且目前未见其他亚型酶参与该反应的报道<sup>[4-7]</sup>。

丹红注射液作为临床用量较大、联合用药情况

收稿日期: 2018-01-15

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目 (17A360001, 17A360005); 常州四药临床药学科研基金 (CZSYJJ16025)

作者简介: 唐进法 (1974—), 男, 副主任药师, 硕士生导师, 从事中药药代动力学研究。Tel: (0371) 66233562, E-mail: a0519@163.com

\* 通信作者: 李学林 (1960—), 男, 主任药师, 博士生导师, 从事中药合理应用及中药应用形式研究。Tel: (0371) 66245342, E-mail: lixuelin450000@163.com

较多的中药注射液之一,广泛用于治疗冠心病、心绞痛和心肌梗塞等疾病;小剂量阿司匹林(75~100 mg)是重要的抗血小板药物,被认为是临床防治心脑血管疾病的基石药物之一<sup>[8-9]</sup>。通过医院集中监测发现,丹红注射液与阿司匹林联合使用的频次最高,两者单独使用时对CYP450亚型酶活性有一定影响,但合用时的相互作用却鲜有研究。对单一酶亚型进行测定时,不仅能全面分析通过该亚型酶之间的代谢性相互作用,也为最终进行“cocktail”探针药物法提供出合适的孵育、仪器分析等条件<sup>[10-13]</sup>。因此,本实验通过人肝微粒体体外孵育研究丹红注射液与阿司匹林单用及合用对CYP2C9亚型酶活性的影响,探讨两者之间是否存在代谢性相互作用,对提高临床合理用药水平具有重要的指导意义。

## 1 材料

1.1 仪器 Waters Acquity I-Class UPLC Xevo-G2-XS QTOF/MS,包括QSM四元溶剂管理器、SMFTN样品管理器、masslynx V 4.1工作站(美国Waters公司);CPA225D电子分析天平(十万分之一,德国赛多利斯公司);IKA Vortex3型涡旋混匀器(德国IKA公司);SHZ-C数显水浴恒温振荡器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);Neofuge 1600R台式低温高速离心机(上海力申科学仪器股份有限公司)。

1.2 试剂 丹红注射液(菏泽步长制药有限公司,批号16091056,规格10 mL);阿司匹林(北京索莱宝科技有限公司,批号227D011,规格250 g);瑞格列奈(上海源叶生物科技有限公司,批号L17S6N3494,含有量 $\geq 99\%$ );双氯芬酸、4-羟基双氯芬酸(加拿大TRC公司);磺胺苯吡唑(美国Sigma公司);NADPH(美国Xenotech公司)。甲醇、乙腈为色谱纯(德国Merck公司);其他试剂均为分析纯;水为超纯水。

1.3 微粒体 混合人肝微粒体(美国Xenotech公司)。

## 2 方法

2.1 溶液制备 取双氯芬酸、4-羟基双氯芬酸对照品适量,少量甲醇溶解,50 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.4)稀释成73.5、2 560  $\mu\text{mol/L}$ 贮备液。精密称取磺胺苯吡唑对照品适量,少量DMSO:甲醇(1:10)溶解,50 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.4)稀释成159 mmol/L贮备液。取瑞格列奈(内标)适量,乙腈溶解并定容,配成30  $\mu\text{mol/L}$

贮备液。

2.2 孵育体系 人肝微粒体体外孵育体系的终体积为200  $\mu\text{L}$ ,包括人肝微粒体蛋白(0.75 mg/mL)、 $\text{MgCl}_2$  (3 mmol/L)、磷酸盐缓冲液(50 mmol/L、pH 7.4)、探针药物(40  $\mu\text{mol/L}$ )、不同质量浓度的药物或阳性抑制剂。在37  $^\circ\text{C}$ 水浴中预孵育5 min后,加入NADPH再生系统(1 mmol/L)启动反应,孵育35 min。用含内标瑞格列奈的冰乙腈终止反应,涡旋震荡30 S后,4  $^\circ\text{C}$ 下13 000  $\times g$ 离心10 min,取上清液,通过UPLC-Q-TOF-MS/MS进行分析。

### 2.3 分析条件

2.3.1 色谱 ACQUITY UPLC<sup>®</sup> HSS T3  $\text{C}_{18}$ 色谱柱(2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ );流动相0.1%甲酸(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~4 min, 30%~100% B; 4~5.5 min, 100% B; 5.5~7.5 min, 100%~30% B);柱温30  $^\circ\text{C}$ ;体积流量0.4 mL/min;进样量0.5  $\mu\text{L}$ 。

2.3.2 质谱 电喷雾电离源(ESI),负离子灵敏度模式;毛细管电压2.5 kV;锥孔电压40 V;离子源温度120  $^\circ\text{C}$ ;脱溶剂温度550  $^\circ\text{C}$ ;锥孔气体积流量50 L/h;脱溶剂气体积流量800 L/h;多反应监测(MRM)。用于定量分析的离子反应为4-羟基双氯芬酸  $m/z$  310.0~266.0、瑞格列奈  $m/z$  451.3~379.2;锥孔电压40 V;碰撞能量9 eV;扫描时间0.2 s;扫描范围  $m/z$  50~1 000。1 ng/mL亮氨酸脑啡肽( $m/z$  556.3)进行质量数实时校正,0.5 mmol/L甲酸钠进行质量轴校正。

2.4 探针米氏常数  $K_m$  测定 取终浓度2.5、5、10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ 的双氯芬酸,与“2.2”项下其他成分共同孵育,孵育后处理方法同“2.2”项,测定方法同“2.3.2”项,计算探针产物4-羟基双氯芬酸的浓度及生成速率,通过GraphPad Prism 7.0软件进行非线性拟合,作图并计算  $K_m$ 。

2.5  $\text{IC}_{50}$  测定 取终浓度0.005、0.01、0.02、0.04、0.08  $\mu\text{mol/L}$ 磺胺苯吡唑、不同体积分数(0.2%、0.3%、0.4%、0.8%、1.6%)丹红注射液或不同剂量(20、40、60、80、100 mg)阿司匹林,分别与“2.2”项下其他成分共同孵育,空白组加入等体积磷酸盐缓冲液代替,每组平行3份。孵育后处理方法同“2.2”项,测定方法同“2.3.2”项。

2.6 丹红注射液抑制常数( $K_i$ )测定 选择不同体积分数(0、0.5 $\text{IC}_{50}$ 、 $\text{IC}_{50}$ 、2 $\text{IC}_{50}$ )丹红注射液

和不同浓度 (0.5 $K_m$ 、2 $K_m$ 、4 $K_m$ ) 双氯芬酸, 分别测定探针产物 4-羟基双氯芬酸的反应速度, 绘制抑制动力学曲线, 计算  $K_i$ 。

### 2.7 丹红注射液与阿司匹林相互作用对 CYP2C9 亚型酶活性的影响

2.7.1 丹红注射液预孵育 取低、中、高 3 个体积分数 (0.4%、0.8%、1.6%) 的丹红注射液, 分别与人肝微粒体蛋白 (0.75 mg/mL) 预孵育 10 min, 然后加入低、中、高 3 个剂量 (20、60、100 mg) 的阿司匹林, 分别与“2.2”项下其他成分共同孵育, 空白组加入等体积磷酸盐缓冲液代替, 每组平行 3 份, 孵育后处理方法同“2.2”项, 测定方法同“2.3.2”项。

2.7.2 阿司匹林预孵育 除药物加入顺序外, 其他操作同“2.7.1”项。

2.8 统计学分析 通过 SPSS 20.0 软件进行处理, 数据用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

3.1 探针产物标准曲线 以 4-羟基双氯芬酸的浓度为横坐标 ( $X$ ), 其峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标 ( $Y$ ) 进行回归, 得标准曲线为  $Y = 0.1228X + 0.0196$  ( $R^2 = 0.9961$ ), 在 0.08 ~ 24  $\mu\text{mol/L}$  范围内线性关系良好。质谱图见图 1~2。

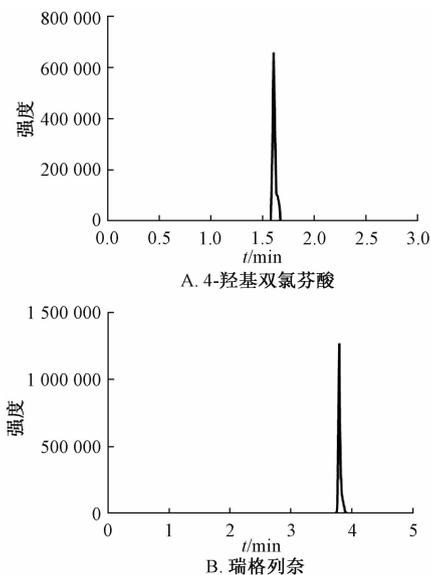


图 1 各成分提取离子流图

Fig. 1 Chromatograms for extracted ion current of various constituents

3.2 探针产物  $K_m$  根据 Michaelis-Menten 方程 (图 3) 可知,  $K_m$  为 17.38  $\mu\text{mol/L}$ ,  $V_{max}$  为 0.5935  $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 。

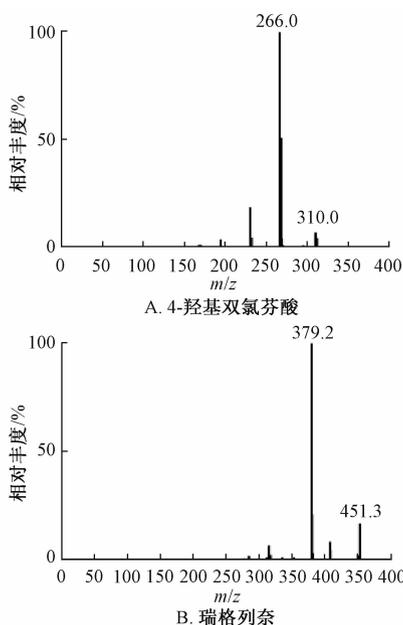


图 2 各成分二级质谱图

Fig. 2 MS2 spectra of various constituents

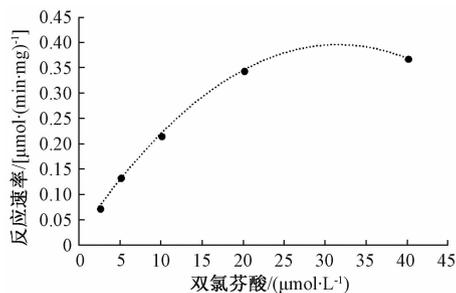


图 3 双氯芬酸 Michaelis-Menten 方程

Fig. 3 Michaelis-Menten equation of diclofenac

3.3 对 CYP2C9 亚型酶的  $IC_{50}$  以磺胺苯吡唑浓度的对数为横坐标, CYP2C9 亚型酶的相对活性为纵坐标作图, GraphPad Prism 7.0 软件进行非线性拟合, 测得磺胺苯吡唑  $IC_{50}$  为 0.038  $\mu\text{mol/L}$ , 曲线见图 4A。然后, 以丹红注射液体积分数的对数为横坐标, CYP2C9 亚型酶的相对活性为纵坐标作图, GraphPad Prism 7.0 软件进行非线性拟合, 测得丹红注射液  $IC_{50}$  为 0.1%, 曲线见图 4B。另外, 阿司匹林  $IC_{50}$  大于 100  $\mu\text{mol/L}$ , 抑制作用较弱。

3.4 丹红注射液  $K_i$  根据双倒数曲线 (图 5) 可知, 丹红注射液  $K_i$  为 0.1%, 抑制类型介于竞争型和非竞争型之间, 为混合型抑制。

3.5 丹红注射液与阿司匹林相互作用对 CYP2C9 亚型酶活性的影响

3.5.1 丹红注射液预孵育 表 1 显示, 丹红注射液组与空白组比较, 探针产物浓度显著降低 ( $P <$

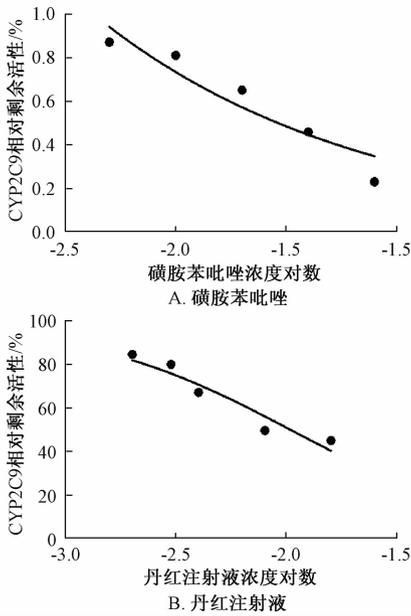


图4 样品 IC<sub>50</sub> 曲线

Fig. 4 IC<sub>50</sub> curves for samples

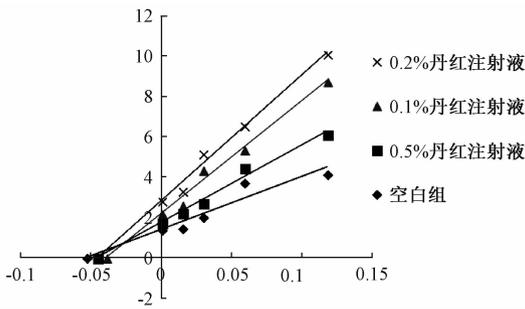


图5 丹红注射液双倒数曲线

Fig. 5 Double reciprocal curves for Danhong Injection

0.05,  $P < 0.01$ ), 即对 CYP2C9 亚型酶活性均有抑制作用; 低、中体积分数组与阿司匹林合用后, 与空白组比较均无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 而高体积分数组与阿司匹林合用对 CYP2C9 亚型酶活性有显著抑制作用 ( $P < 0.05$ ); 与相应的丹红注射液单用组比较, 除了丹红注射液中体积分数组与阿司匹林高剂量组有显著性差异外 ( $P < 0.01$ ), 其他组差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。由此可知, 丹红注射液与阿司匹林合用对 CYP2C9 亚型酶活性的影响呈非浓度依赖性。

3.5.2 阿司匹林预孵育 表2显示, 与空白组比较, 阿司匹林组对 CYP2C9 亚型酶活性无显著抑制作用 ( $P > 0.05$ ), 仅阿司匹林低剂量组与高体积分数丹红注射液合用后有显著抑制作用 ( $P < 0.01$ ); 与相应单用组比较, 阿司匹林低、中剂量组分别与低、高体积分数丹红注射液合用后有显著

性差异 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 阿司匹林高剂量组与高体积分数丹红注射液合用后对 CYP2C9 亚型酶活性有显著抑制作用 ( $P < 0.01$ )。

表1 丹红注射液、阿司匹林合用对 CYP2C9 活性的影响 (I)

Tab. 1 Effects of combined use of Danhong Injection and aspirin on CYP2C9 activity ( I )

组别	探针产物/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )
空白组	3.72 ± 0.16
0.4% 丹红注射液	2.80 ± 0.22 *
0.4% 丹红注射液 + 20 mg 阿司匹林	3.18 ± 0.14
0.4% 丹红注射液 + 60 mg 阿司匹林	3.52 ± 0.10
0.4% 丹红注射液 + 100 mg 阿司匹林	3.58 ± 0.11
0.8% 丹红注射液	2.68 ± 0.18 *
0.8% 丹红注射液 + 20 mg 阿司匹林	2.96 ± 0.11
0.8% 丹红注射液 + 60 mg 阿司匹林	2.93 ± 0.10
0.8% 丹红注射液 + 100 mg 阿司匹林	2.92 ± 0.13 ▲▲
1.6% 丹红注射液	2.57 ± 0.15 **
1.6% 丹红注射液 + 20 mg 阿司匹林	2.65 ± 0.16 *
1.6% 丹红注射液 + 60 mg 阿司匹林	2.63 ± 0.12 *
1.6% 丹红注射液 + 100 mg 阿司匹林	2.67 ± 0.18 *

注:与空白组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 合用组与相应剂量丹红注射液单用组比较, ▲▲  $P < 0.01$

表2 丹红注射液、阿司匹林合用对 CYP2C9 活性的影响 (II)

Tab. 2 Effects of combined use of Danhong Injection and aspirin on CYP2C9 activity ( II )

组别	探针产物/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )
空白组	3.60 ± 0.16
20 mg 阿司匹林	3.95 ± 0.20
20 mg 阿司匹林 + 0.4% 丹红注射液	3.67 ± 0.21
20 mg 阿司匹林 + 0.8% 丹红注射液	2.32 ± 0.17 ▲
20 mg 阿司匹林 + 1.6% 丹红注射液	1.45 ± 0.31 ***▲▲
60 mg 阿司匹林	4.06 ± 0.13
60 mg 阿司匹林 + 0.4% 丹红注射液	3.80 ± 0.12
60 mg 阿司匹林 + 0.8% 丹红注射液	3.22 ± 0.16 ▲▲
60 mg 阿司匹林 + 1.6% 丹红注射液	2.77 ± 0.20 ▲▲
100 mg 阿司匹林	4.84 ± 0.13
100 mg 阿司匹林 + 0.4% 丹红注射液	4.97 ± 0.11
100 mg 阿司匹林 + 0.8% 丹红注射液	3.47 ± 0.18
100 mg 阿司匹林 + 1.6% 丹红注射液	3.16 ± 0.16 ▲▲

注:与空白组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 合用组与相应剂量阿司匹林单用组比较, ▲  $P < 0.05$ , ▲▲  $P < 0.01$

#### 4 讨论

根据课题组前期对人肝微粒体外孵育条件的优化结果, 控制孵育时间 (35 min)、蛋白浓度 (0.75 mg/mL) 与探针产物 4-羟基双氯芬酸的生成速率呈线性关系, 4-羟基双氯芬酸浓度占双氯芬酸浓度的比例不超过 20%。在此条件下, 测得探针双氯芬酸的米氏常数 ( $K_m$ ), 将其作为后续孵育体系中的终浓度, 而且控制溶解探针有机溶剂的体积

分数在孵育体系中所占比例不超过0.1%。

由于中药注射液直接入血，故根据人体血液体积可推算出丹红注射液在血液中的体积分数。本实验选择临床常用量(20~80 mL)对应的体积分数(0.4%~1.6%)来计算丹红注射液对于CYP2C9亚型的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)、抑制常数(K<sub>i</sub>)。在与丹红注射液合用时，阿司匹林通常为小剂量使用(75~100 mg)，考虑到药物的绝对生物利用度，将其剂量定为20~100 mg<sup>[1,3,14]</sup>。

CYP2C9在人肝细胞微粒体中含有量丰富，占CYP450酶总量的20%左右，仅次于CYP3A亚型酶。临床中大约有10%的药物经过该亚型代谢，特别是包括一些治疗指数较窄的药物(如华法林、苯妥英钠、苯巴比妥等)。因此，基于人肝微粒体CYP2C9亚型酶的药物之间相互作用的研究十分必要<sup>[5,7]</sup>。

本实验研究了丹红注射液与阿司匹林联用对CYP2C9亚型酶活性的影响，发两者之间存在相互作用，可能与文献[10]报道的两者联用会影响后者体内代谢过程有某种程度上的联系。然而，肝脏中CYP450同工酶种类繁多，应同时测定多种亚型相对应的探针药物，即采用“cocktail”法，获得多个CYP450同工酶表型的信息，才能系统的研究药物之间的代谢性相互作用。今后，将测定CYP2D6、CYP3A4等单个亚型，综合各亚型情况选取合适的孵育、仪器分析等条件进行“cocktail”探针药物法，全面考察丹红注射液与阿司匹林之间可能存在的相互作用，对保证临床常用药物的安全性和有效性具有重要意义<sup>[15-17]</sup>。

#### 参考文献:

[1] 黄宇星, 刘二伟. 联合用药的药物相互作用及研究方法[J]. 药物评价研究, 2014, 37(3): 276-279.  
[2] 周文. 药物流行病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 4-5.

[3] 刘彦卿, 洪燕君, 曾苏. 代谢性药物-药物相互作用的研究进展[J]. 浙江大学学报(医学版), 2009, 38(2): 215-224.  
[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] 吴逢波, 陈泽莲, 徐珽, 等. CYP2C9基因多态性与合理用药研究[J]. 中国药房, 2007, 18(29): 2308-2309.  
[6] 李焕德, 李坤艳. 药物代谢性相互作用体外研究的重要性[J]. 中南药学, 2005, 3(3): 179-181.  
[7] 陈珩, 蔡泓敏, 冯端浩, 等. CYP2C9和CYP2C19基因多态性对药物代谢的影响及个体化用药研究进展[J]. 中国药物应用与监测, 2014, 11(4): 240-244.  
[8] 唐进法, 徐涛, 孟菲, 等. 合并用药对丹红注射液安全性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13): 294-297.  
[9] 孙海欣, 王文志. 从指南到临床: 谈阿司匹林在心脑血管疾病一级预防中的应用[J]. 中国实用内科杂志, 2012, 32(5): 395-397.  
[10] 李建萍. 丹红注射液与阿司匹林药物相互作用特征与机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.  
[11] 刘丽雅, 韩永龙, 余奇, 等. 10种心血管类中药注射剂对人细胞色素P<sub>450</sub>7种亚型的体外抑制作用[J]. 中国药房, 2014, 25(11): 990-993.  
[12] Li X L, Tang J F, Li W X, et al. Postmarketing safety surveillance and reevaluation of Danhong Injection: clinical study of 30888 cases [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 610846.  
[13] 余小翠, 黄丽军, 刘高峰, 等. 丹红注射液对大鼠肝微粒体5种CYP亚型酶活性的影响[J]. 医药导报, 2012, 31(3): 277-281.  
[14] 周权, 姚彤炜, 曾苏. 代谢性药物的相互作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2001, 17(4): 313-318.  
[15] 曾超, 刘艳, 刘高峰, 等. 刺五加注射液对大鼠肝微粒体四种CYP450亚型酶活性的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2012, 17(2): 164-170.  
[16] 叶娜, 罗红丽, 李容, 等. 丹参注射液对大鼠肝微粒体CYP450亚型酶体外抑制作用[J]. 中成药, 2015, 37(5): 948-953.  
[17] 缪萍, 裘福荣, 曾金, 等. 甘草诱导CYP3A促进附子代谢的减毒配伍机制[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(9): 2813-2817.