藏药佐太对大鼠CYP1A2和NAT2活性的影响$^{\Delta}$

范雪汝*,朱俊博,姚星辰,袁 明,李向阳(青海大学医学院药学系,西宁 810001)

中图分类号 R966 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408(2015)28-3932-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.28.15

摘 要 目的:研究藏药佐太对大鼠细胞色素氧化酶(CYP1A2)、药物代谢酶*N*-乙酰基转移酶2(NAT2)活性的影响。方法:将70只SD大鼠随机均分为正常对照(生理盐水)组和佐太低、中、高剂量(1.2、3.8、12 mg/kg)单次给药组和多次给药组(每天1次,连续12 d),分别ig给药。正常对照组、佐太单次给药组于第2天,佐太多次给药组于第13天分别ig给予咖啡因(25 mg/kg),5 h后采集尿液,按10 mg/ml加入维生素C。采用高效液相色谱法测定大鼠尿液中咖啡因代谢物5-乙酰氨基-6-甲酰氨基-3-甲基尿酸(AFMU)、1-甲基黄嘌呤(1X)、1-甲基尿酸(1U)、1,7-二甲基尿酸(17U)的含量,以(AFMU+1X+1U)/17U、AFMU/(AFMU+1X+1U)比值来反映CYP1A2和NAT2活性。结果:与正常对照组比较,佐太中剂量单次给药组及多次给药组、高剂量多次给药组大鼠(AFMU+1X+1U)/17U、AFMU/(AFMU+1X+1U)比值降低,即CYP1A2和NAT2活性降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:佐太对大鼠CYP1A2和NAT2活性有明显抑制作用。
关键词 藏药;佐太;*N*-乙酰基转移酶2;细胞色素氧化酶;大鼠

Effects of Tibetan Medicine Zuotai on the Activities of CYP1A2 and NAT2 in Rats

FAN Xue-ru,ZHU Jun-bo,YAO Xing-cheng,YUAN Ming,LI Xiang-yang(Dept. of Pharmacy, Medical College of Qinghai University, Xining 810001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of Tibetan medicine Zuotai on the activities of cytochrome oxidase (CYP1A2) and drug metabolism enzyme *N*-acetyltransferase 2 (NAT2) in rats. METHODS: 70 SD rats were equally randomized into a normal control (normal saline) group, the groups of single administration of low, middle and high-dose (1.2, 3.8 and 12 mg/kg) Zuotai and the groups of multiple administrations thereof (once daily for 12 consecutive days). The rats were given drugs ig. caffeine (25 mg/kg) was given ig to the rats in the normal control group and the groups of single administration on the 2nd day, and to those in the groups of multiple administrations on the 13th day. 5 h later, their urine was collected and added with vitamin C based on 10 mg/ml. High performance liquid chromatography (HPLC) was adopted to determine the cafeine metabolites contents of 5-acetamido-6-formamido-3-methyl-uric acid (AFMU), 1-methylxanthine (1X), 1-methyl-uric acid (1U) and 1, 7-dimethyl uric acid (17U) in rats' urine, and the activities of CYP1A2 and NAT2 were reflected through (AFMU+1X+1U)/17U and AFMU/(AFMU+1X+1U). RESULTS: Compared with normal control group, the (AFMU+1X+1U)/17U and AFMU/(AFMU+1X+1U) in rats were decreased, namely the activities of CYP1A2 and NAT2 were lower in the groups of single administration of middle-dose Zuotai and multiple administrations of middle and high-dose Zuotai than in the normal control group. There was statistical difference ($P<0.05$). CONCLUSIONS: Zuotai can obviously inhibit the activities of CYP1A2 and NAT2 in rats.
KEYWORDS Tibetan medicine; Zoutai; *N*-acetyltransferase 2; Cytochrome oxidase; Rats

佐太又名佐塔,是将剧毒水银特殊炮制后加其他辅助药物,经过一系列炮制工艺制成的黑色粉末,具有调血、生肌健脾、滋补强身的功效,被雪域人民称之为藏药中的至宝[1]。曾勇等[2]研究发现,其具有一定的镇静和催眠作用。目前对佐太的研究主要集中在毒性方面[3-5],而对佐太与药物代谢关系方面的研究报道较少。

细胞色素氧化酶(CYP1A2)是最重要的肝药酶之一,而药物代谢酶*N*-乙酰基转移酶2(NAT2)参与了20多种肼类化合物及致癌性芳香胺和杂环胺类化合物的生物激活或灭活代谢。因此,研究药物对以上两种酶活性的影响,对于阐明药物的相互作用具有重要意义。目前,在CYP1A2与NAT2酶活性的测定中,最常用的方法是通过测定探针药物来反映酶活性的变化。咖啡因以其安全性好的特点,已成为一种有效的探针药物[6],其代谢产物主要为5-乙酰氨基-6-甲酰氨基-3-甲基尿酸(AFMU)、1-甲基黄嘌呤(1X)、1-甲基尿酸(1U)、1,7-二甲基尿酸(17U)。常用AFMU/(AFMU+1X+1U)比值来反映NAT2酶的活性(比值越低,酶活性越低);因17U仅由CYP1A2酶催化,所以常用(AFMU+1X+1U)/17U比值来反映CYP1A2酶的活性(比值越低,酶活性越低)[7-8]。笔者通过探讨藏药佐太对药物代谢酶CYP1A2和NAT2活性的影响,期望为藏药方剂的合理配伍和临床合理用药提供一定的参考。

1 材料

1.1 仪器

1200型高效液相色谱(HPLC)仪(美国Agilent公司);N2000色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所);XW-80A漩涡混合器(上海精科有限公司);TGL-16B高速离心机(上海安亭科学仪器厂);Optima MAX-XP超速离心机(美国Beckman Coulter有限公司)。

Δ 基金项目:青海大学医学院中青年科技项目(No.2011-KYY-06)

*讲师,硕士。研究方向:中药、藏药药动学。电话:0971-6119561。E-mail:fanxueru111@sina.com

1.2 药品与试剂

佐太(青海省藏医院,批号:20111002,主要含汞、金、铜和铅等金属,含量分别为52.29%、0.14%、0.26%、0.17%);咖啡因(国药集团化学试剂有限公司,批号:20071224,纯度:≥99%);AFMU(加拿大Toronto化学试剂公司,批号:1-JHW-86-1,纯度:≥94%);1U(德国Fluka公司,批号:1399520,纯度:≥98%);1X(加拿大Toronto化学试剂公司,批号:2-FJ-103-1,纯度:≥97%);17U(美国Sigma公司,批号:87H2516,纯度:≥95%);甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

健康SD大鼠,70只,♀♂兼半,体质量(200±20) g,由甘肃中医学院实验动物中心提供[实验动物使用合格证号:SCXK(甘)2011-0001]。

2 方法与结果

2.1 分组与给药

将70只大鼠随机均分为正常对照(生理盐水)组和佐太低、中、高剂量(1.2、3.8、12 mg/kg)的单次给药组和多次给药组(每天1次,连续12 d)。正常对照组、单次给药组大鼠于第2天,多次给药组大鼠于第13天均按25 mg/kg剂量ig探针药物咖啡因。给药剂量依据预实验结果确定。

2.2 样品采集

各组大鼠ig咖啡因5 h后采集尿液,按10 mg/ml的量加入维生素C,冷冻保存,备用。

2.3 含量测定方法的建立

2.3.1 色谱条件 色谱柱:Eclipse XDB C_{18}(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.05%醋酸(B),采用梯度洗脱(0～7 min,2%～8% A;7～15 min,8% A);流速:1.0 ml/min;检测波长:280 nm;柱温:20 ℃;进样量:20 μl。

2.3.2 样品预处理 取"2.2"项下尿样0.2 ml于离心管中,4 ℃、16 000 r/min离心10 min(离心半径为6 cm),收集上清液。

2.3.3 对照品溶液的制备 精密称取1X 5.00 mg,置于5 ml量瓶中,加入纯净水溶解并定容至刻度,摇匀,即得质量浓度为1 mg/ml的1X贮备液。取1X贮备液0.5 ml于5 ml量瓶中,加入纯净水定容至刻度,取适量上述溶液,稀释成质量浓度分别为10、1 μg/ml的1X对照品溶液。同法制备质量浓度分别为10、1 μg/ml的1U、17U和AFMU对照品溶液。

2.3.4 专属性考察 分别取一定质量浓度的1X、1U、17U、AFMU对照品溶液,按"2.3.2"项下方法处理的空白尿液,1X、1U、17U、AFMU对照品溶液和空白尿液的混合液,给药5 h后的尿液,按"2.3.1"项下色谱条件进样,记录色谱图。结果表明,尿液中的内源性物质不干扰1X、1U、17U和AFMU的测定,且各物质间分离度较好,色谱图见图1。

2.3.5 标准曲线的制备 取数支离心管,分别加入1X、1U、17U和AFMU对照品溶液适量,用空白尿液稀释成质量浓度分别为1、2、4、6、10、20 μg/ml的标准尿液样品,每个质量浓度制备5份。按"2.3.2"项下离心操作,再按"2.3.1"项下色谱条件进样,记录色谱图。以峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x,μg/ml)为横坐标进行线性回归。结果显示,1X、1U、17U、AFMU检测在质量浓度1～20 μg/ml范围内线性关系均良好,回归方程见表1。

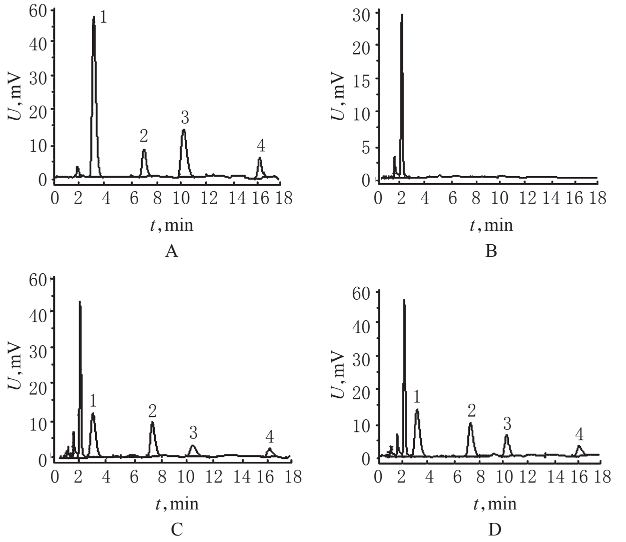

图1 高效液相色谱图

A.对照品溶液;B.空白尿液;C.空白尿液+对照品溶液;D.给药5 h后尿液;1.AFMU;2.1U;3.1X;4.17U

Fig 1 HPLC chromatograph

A. reference solution; B. blank urine; C. blank urine added with reference solution; D. urine after administration 5 h; 1. AFMU; 2. 1U; 3. 1X; 4. 17U

表1 回归方程结果

Tab 1 Results of regression equation

对照品溶液	线性回归方程	r
AFMU	y=184.8x+17.3	0.999 7
1U	y=103.3x−23.8	0.999 1
1X	y=53.5x+5.4	0.999 0
17U	y=154.2x−52.1	0.999 2

2.3.6 方法回收率与精密度试验 按"2.3.5"项下方法分别制备质量浓度为1、6、20 μg/ml的1X、1U、17U、AFMU标准尿液样品。按"2.3.2"项下离心操作后按"2.3.1"项下色谱条件进样(每个质量浓度连续进样5次),记录色谱图,计算方法回收率。同日内连续测定5次,考察日内精密度;每日测定1次,连续测定5 d,考察日间精密度,结果见表2。

表2 方法回收率和精密度试验结果($\bar{x}\pm s$,n=5)

Tab 2 Results of relative recovery rates and precision test ($\bar{x}\pm s$, n=5)

组别	加入量,μg/ml	方法回收率		精密度	
		测得量,μg/ml	RSD,%	日内RSD,%	日间RSD,%
AFMU	1	91.18±2.0	2.19	4.96±0.8	5.08±0.6
	6	100.44±3.4	3.39	6.38±1.0	8.67±0.9
	20	91.01±3.0	3.30	3.88±1.3	4.21±1.0
1U	1	93.66±4.8	5.12	5.40±0.9	4.06±1.1
	6	99.67±8.1	8.13	3.16±1.3	6.10±1.3
	20	94.99±3.2	3.37	4.48±1.1	5.71±0.7
1X	1	99.60±6.2	6.22	7.18±0.5	5.62±1.0
	6	97.37±5.7	5.85	5.05±1.4	6.62±0.9
	20	100.99±6.2	6.14	4.07±1.5	5.56±1.2
17U	1	88.56±4.1	4.63	8.23±0.9	8.55±0.5
	6	92.41±3.7	4.00	5.21±1.0	6.63±1.0
	20	93.02±3.2	3.44	4.98±1.3	5.33±0.6

2.3.7 稳定性试验 按"2.3.5"项下方法分别制备质量浓度为

1、6、20 μg/ml标准尿液样品，各8份。分别在室温放置0、8 h和−20 ℃冷冻1、10、30、60、90、120 d后自然解冻。按"2.3.2"项下离心操作，再按"2.3.1"项下色谱条件进样，记录色谱图。结果，低、中、高质量浓度尿液样品的RSD分别为AFMU：5.12%、4.33%和2.80%（$n=8$），1U：7.02%、5.44%和4.60%（$n=8$），1X：8.10%、6.79%和6.01%（$n=8$）。

2.4 统计学方法

所有数据均以$\bar{x} \pm s$表示。采用SPSS 17.0软件和One-Way ANOVA方法进行统计分析。$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2.5 CYP1A2和NAT2活性测定及评价

给予探针药物咖啡因5 h后，采用HPLC法分别测定尿液中咖啡因代谢产物AFMU、1U、1X、17U的含量，以（AFMU+1X+1U)/17U比值评价CYP1A2活性，以AFMU/(AFMU+1X+1U)比值评价NAT2的活性。结果，与正常对照组比较，中剂量单次给药组，中、高剂量多次给药组大鼠CYP1A2的活性分别降低了44.7%、28.2%和51.2%，NAT2的活性分别降低了29.9%、16.4%和16.4%，差异有统计学意义（$P<0.05$）。CYP1A2和NAT2活性测定结果见表3。

表3 各组大鼠CYP1A2和NAT2活性测定结果（$\bar{x} \pm s$，$n=10$）

Tab 3 Results of the activities of CYP1A2 and NAT2 in rats of all groups（$\bar{x} \pm s$，$n=10$）

指标	正常对照组	单次给药			多次给药		
		低剂量组	中剂量组	高剂量组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
CYP1A2	8.51±3.60	10.15±1.94	4.71±1.22*	10.85±1.59	7.08±2.22	6.11±2.13*	4.15±1.21*
NAT2	0.67±0.11	0.59±0.08	0.47±0.12*	0.57±0.08	0.67±0.10	0.56±0.15*	0.56±0.11*

注：与正常对照组比较，*$P<0.05$

Note：vs. normal control group，*$P<0.05$

3 讨论

据文献报道，汞、砷、银、锌、铅等金属对CYP450酶活性有抑制作用[9-10]。而佐太主要含汞、金、银、铁等金属，本研究结果显示，中剂量和高剂量佐太对CYP1A2和NAT2的活性均有抑制作用，与上述文献报道结果相一致。

AFMU作为咖啡因代谢物之一，其性质极不稳定，因此，本研究将尿液用维生素C进行了酸化，并且及时进行操作，尽量缩短处理时间。欲考察酶活性，必须选择针对特异性的底物进行分析。应用咖啡因进行NAT2的活性分析是20世纪发展起来的方法，与其他探针药物比，咖啡因没有不良反应，受试者易于接受。本研究采用梯度洗脱的方法测定主要代谢物的含量，较之传统的尿液直接进样，不仅有助于保护分析柱，而且也提高了检测的准确度。

本研究结果中，中剂量单次给药组大鼠CYP1A2和NAT2的活性均显著降低，但高剂量单次给药组大鼠CYP1A2的活性反而升高，推测金属对酶的活性影响可能与金属离子的浓度有关，超过一定范围后对酶活性就没有影响。而高剂量多次给药组大鼠CYP1A2的活性又显著降低，推测多次给药引起了大鼠肝、肾功能损伤，所以影响了酶的活性，具体的作用机制还有待进一步研究。另外，本研究采用青海省藏医院研制的佐太作为研究对象，而西藏、四川、甘肃等地的佐太是否也会有相同结果，以及在人体中能否得到相同的结果，也有待进一步考察。

参考文献

[1] 索朗.佐塔的炮制[J].中国民族医药杂志，2007，13（5）：40.

[2] 曾勇，何毓敏，刘颖.藏药佐塔对中枢神经系统的部分药理作用研究[J].四川中医，2005，24（11）：36.

[3] 李天才，索有瑞.藏药七十味珍珠丸中矿物质元素在大鼠体内代谢途径探讨[J].中医药学刊，2003，21（3）：356.

[4] 李天才，索有瑞.藏药七十味珍珠丸中矿物质元素在体内蓄积性水平研究[J].中国科学院研究生院学报，2003，20（3）：348.

[5] 杨宝寿，江吉村，降拥，等.藏药佐塔中汞的作用特点和安全性研究[J].西藏研究，2004（1）：74.

[6] 李军，彭向前，张鉴，等. HPLC直接进样测定咖啡因代谢物评价三种药物代谢酶活性[J].中国临床药理学与治疗学，2005，10（7）：768.

[7] 陈尧，欧阳冬生，谭志荣，等. HPLC同时检测咖啡因及其代谢产物并在健康中国人群中CYP1A2，CYP2A6，NATR和XO酶活性评价中的应用[J].中国临床药理学与治疗学，2007，12（10）：1 175.

[8] 吴慧，张霞.复方丹参滴丸对药物代谢酶CYP1A2，NAT2和XO活性影响的研究[J].中国现代应用药学，2009，26（1）：8.

[9] Anwar-Mohamed A，Elbekai RH，El-Kadi AO. Regulation of CYP1A1 by heavy metals and consequences for drug metabolism[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*，2009，5（5）：501.

[10] John GL，Laura BH，Mark AM，*et al*. Nanosilver particle effects on drug metabolism in vitro[J]. *Drug Metab Dispos*，2010，38（12）：2 246.

（收稿日期：2014-11-19 修回日期：2015-01-25）

（编辑：林 静）

《中国药房》杂志——中文核心期刊，欢迎投稿、订阅