

基于药物代谢酶的中药十八反研究*

□王宇光 马增春 梁乾德 刘 明 陆倍倍 谭洪玲 肖成荣 高 月**

(军事医学科学院放射与辐射研究所 北京 100850)

张伯礼** (天津中医药大学 天津 300193)

摘 要:“十八反”是中药药性理论的重要组成部分,是古今临床医家用药配伍禁忌的核心内容,几千年来指导和影响着中医临床安全用药。随着人类社会的进步和对医疗健康的需求不断提高,中药安全性问题日益受到社会广泛关注,而“十八反”则是目前中药安全性研究亟待解决的关键科学问题。“十八反”中药反与不反的客观界定及其科学本质的阐明,对完善中药配伍禁忌理论,丰富和发展中药配伍理论体系具有重大意义。细胞色素 P450 酶作为人体重要的 I 相药物代谢酶系统,对药物代谢和药物之间的相互作用有着重要影响。中药以合并用药为主且其中许多成分或许为 P450 酶的底物、诱导剂或抑制剂,因此有可能存在基于 P450 酶的中药相互作用。本课题组将现代药理学中药物相互作用的分子基础 P450 酶引入中药相互作用的研究,对十八反中各组药物与药物代谢酶的关系进行了较系统的研究,为揭示一类基于药物代谢酶的中药相互作用模式,阐明中药配伍产生相反作用的分子机制和中药十八反配伍禁忌的科学内涵提供了实验依据。

关键词:十八反 药物代谢酶 P450 酶 配伍禁忌

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2011.01.006

一、基于药物代谢酶的中药十八反研究问题的提出

中医药是中华民族优秀文化的灿烂结晶,数千年来为中华民族的繁衍生息做出了不可磨灭的贡献。当今世界在“回归自然”思潮的影响下,许多国家寻找天然药物的呼声日渐高涨,而中药以其丰富的资源、独特

的疗效、毒副作用少等特点,已引起世界各国的关注。中药同西药相比一直被认为使用安全,不良反应少,但由于中药所含的化学成分复杂,因此很难对所发生的不良反应做出科学的解释,无法使更多的人正确使用中药。随着中草药应用的日益广泛,中药的安全性和不良反应问题逐渐显现,因此中药毒理学的研究亟待加强,特别是思路创新和相关技术平台的建立。

以往对于中药配伍机制的研究多为化学层面的研

收稿日期: 2010-06-12

修回日期: 2011-01-25

* 国家自然科学基金面上项目(30070936): 基于药物代谢酶的中药十八反配伍禁忌研究,负责人:高月;国家自然科学基金面上项目(30701112): PXR 受体介导 CYP3A 激活途径与甘草调和诸药配伍机制研究,负责人:王宇光;北京市自然科学基金课题(7093127): 人参皂苷与 AhR 相互作用对 CYP1A1 致癌性影响,负责人:王宇光;国家“973”计划中医理论专项(2011CB505304): “诸参辛芍叛藜芦”配伍关系与毒效表征的基础研究,负责人:王宇光。

** 通讯作者:高月,研究员,主要研究方向:中药药理与中药毒理,Tel:010-66931312,E-mail:gaoyue@yahoo.com;张伯礼,本刊学术顾问,中国工程院院士,主要研究方向:中医药基础研究,Tel:022-27493265,E-mail:zhangbolipr@126.com。

究,特别是配伍前后方剂化学成分的变化^[1],为阐明中药配伍机理提供了物质基础方面的证据(图 1A),但我们认为这种研究思路仅能够反映中药配伍规律的一个层面,只是单纯考虑到了药物自身之间组合对彼此成分的影响或变化,而忽视了作为药物在治疗疾病过程中机体对其产生的影响及其与药物配伍规律之间的关系。许多中药在成百上千的方剂中都具有相同的药性和相似的配伍关系,如甘草因具有“调和诸药,缓解药物毒性、烈性”的药性而在许多方剂组方时都加入甘草,这种配伍规律的普遍性如果仅从化学的角度研究配伍规律,可能对于一个或几个方剂的配伍规律能够加以阐明,但这并不代表着甘草配伍机制的普遍性和共通性,因为与甘草配伍的中药甚多且成分各异,甘草不可能对各类中药的化学成分在煎煮的变化上都产生相同的影响,应该更多的从机体角度去加以阐明,因为各种不同的方剂都作用在同一个对象上,即有机体。在这里我们提出一种与以往不同的观点,即方剂中具有普遍配伍规律的药物作用在机体的某个环节或靶点,这些环节或靶点会对与其配伍的其他中药产生相同的干预或作用(图 1B),从而使得不同的方剂在配伍应用于机体后达到了减毒增效的目的,即形成了配伍规律;若不同的方剂在配伍应用于机体后致毒性增加,即形成了配伍禁忌。我们认为这样可以以另一种新的思维或模式去探讨方剂配伍规律,即机体参与下的中药间的相互作用。

上文提到的环节或靶点应该是具有维持机体正常生理功能或对药物产生重要影响的蛋白质,药物代谢酶(细胞色素 P450)作为机体对药物或外源物代谢的最主要功能蛋白,恰恰符合这样的靶点特征,其在维持机体内环境的稳态及代谢对机体有害物质方面发挥了重要作用。我们设想是否存在方剂中的个药作用于细胞色素 P450 酶系统,影响了细胞色素 P450 酶的活性进而对方剂中的其它药物的代谢和药理效应产生影响,使配伍合用的药物特性发生改变而形成了中药间相互作用,而这种药物代谢酶参与下形成的具有普遍性中药间相互作用可能即为某些配伍规律或配伍禁忌在机体上的真实反映和客观存在。

细胞色素 P450 酶(Cytochrome P450),

又称混合功能氧化酶(Mixed function oxidase)和单氧酶(Monooxygenase),属于血红素蛋白基因超家族,编码一系列的代谢酶系统,主要存在于肝微粒中,参与生物体内源性和外源性物质的生物转化^[2]。作为人体重要的 I 相药物代谢酶系统,其对药物代谢和药物之间的相互作用有着重要影响。当药物联合应用时经常发生的药物相互作用就是由于一种药物通过诱导或抑制 P450 酶特定的亚型,从而改变了另一种药物的代谢清除特性,导致不利于机体的药物相互作用,有时甚至产生致命的药物相互作用^[3]。我们能否转换思维将其移植到中药配伍理论研究中,因为中药强调合并用药,方剂以复方为主,含有多种中药,因此中药配伍存在与 P450 酶有关的中药间相互作用的机会可能更多;同时中药不论其成分多么复杂,但在体内起作用的物质基础仍然属于化合物范畴,既然是化合物,则同样面临着机体对其的处置即 P450 酶的代谢。这样中药配伍就符合基于药物代谢酶产生药物相互作用的两个基本要素,即药物对 P450 酶产生影响,进一步受到影响的 P450 酶再作用于药物,改变药物的代谢特征,这就是基于 P450 酶的药物相互作用的分子基础。基于这种推论,我们认为中药配伍禁忌中同样存在由 P450 酶参与的药物相互作用。基于中药在临床上被广泛应用,对于中药复方的配伍理论研究引入 P450 酶是必要的。

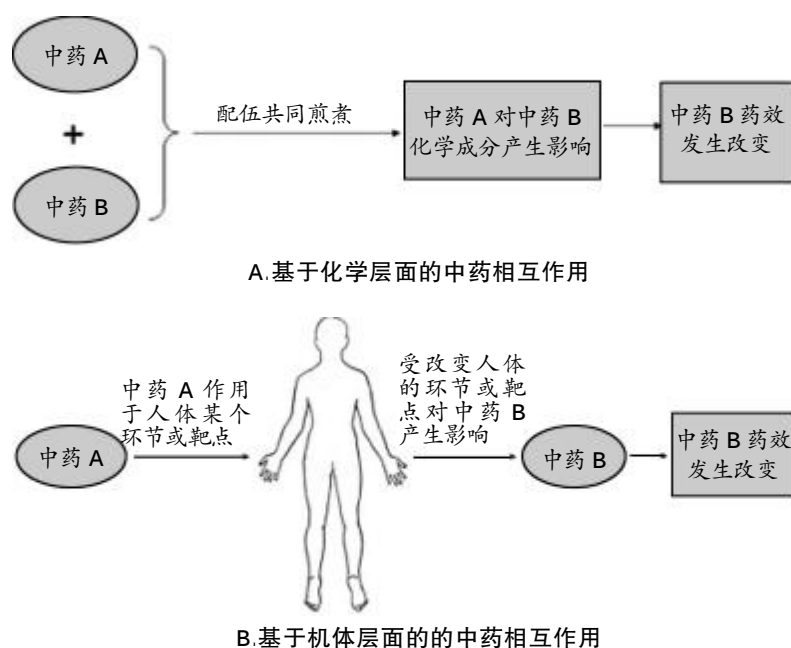


图 1 中药间相互作用

中药配伍规律或配伍禁忌众多,我们选择了中药“十八反”作为研究对象。原因为中药十八反是中药药性理论的重要组成部分,是中药七情中“相反”这一配伍关系的具体体现,为历代医家所推崇,它在指导中药合理配伍使用中一直发挥着重要作用。药物相反的含义为药物合用产生药性变化的配伍禁忌,表现为疗效丧失或毒性增加。十八反是古人在临床用药中发现的现象,从古到今,研究大都集中在对这种现象的确证上,而对产生这种现象的机理尚不十分清楚^[4]。

近年来国内外有很多文献报导了中草药或其有效成分对 P450 酶的诱导或抑制作用^[5]。这些结果一方面体现了中草药调控细胞色素 P450 酶的能力各异,同功酶间对中草药敏感性也各异,说明中草药对 P450 酶调节的复杂性。十八反各相反药对配伍在一起究竟对 P450 酶产生了怎样的影响(诱导或抑制)?我们分别从酶活性、基因和蛋白水平考察了各单药及其配伍合用对 P450 酶的影响,同时我们对十八反中重要毒性成分藜芦定碱、乌头碱的代谢特征进行了研究,为进一步综合分析可能产生的中药间相互作用奠定基础。以下重点以“诸参辛芍叛藜芦”为模式对象,揭示基于药物代谢酶的中药十八反间的相互作用。

二、以“诸参辛芍叛藜芦”为模式的
基于药物代谢酶的相反配伍机制研究

1. “诸参辛芍叛藜芦”各相反药对
在基因、酶活性层次对 P450 酶的影响

分析“诸参辛芍叛藜芦”可以看出其中 3 组相反药的特点,第一组中藜芦为剧毒中药,其它非毒性中药与其配伍构成相反对。设想这种配伍所致毒性增强的中药间相互作用源于配伍应用时影响了机体药物代谢酶的变化,进而会对藜芦中毒性成分的代谢产生影响。我们分别从酶活性、基因水平考察了各单药及其配伍合用对 P450 酶的影响。结果见表 1。苦参、丹参、人参、南沙参与藜芦合用时对主要的药物代谢酶 CYP3A 酶活性产生了抑制作用,可能会对藜芦中重要的生物碱类毒性成分代谢产生影响而致毒性增强,产生基于 CYP3A 的中药间相互作用的配伍禁忌。从结果看,不同中药对 P450 亚酶确有调控作用并且具有选择性,有些相反

药对在酶活性和 mRNA 水平影响具有一致性,有些存在不一致性,表明合用对 P450 酶的调节可能起始于不同环节。通过相反中药对 P450 酶调控作用来揭示中药间配伍前后对亚酶的影响,可初步探讨一些药物相互作用,接下来我们将对中药中某些关键成分(功效成分或毒性成分)被 P450 亚酶代谢的情况进行研究,确定某些成分的代谢关键酶,再结合调控的研究结果来综合分析药物间相互作用,有助于阐明十八反相反作用的机理。我们在对单药或合用对 P450 亚酶 mRNA 表达影响显示出不同处理组之间有一些 P450 基因的差异表达^[6],这也为我们进一步研究相关药物对药物代谢酶的诱导或抑制的机制研究提供了线索。

2. 藜芦中重要毒性成分藜芦定碱(Veratridine)经
P450 代谢后代谢产物及代谢酶亚型的鉴定

鉴于药物代谢酶在外源物质代谢中发挥的重要作用,有必要对藜芦中毒性成分的代谢情况进行深入研究,确定 P450 酶改变对藜芦有毒物质代谢产生的影响。Veratridine 是一种从百合科藜芦属植物中提取的脂溶性生物碱,是中药藜芦中的主要生物碱之一,被认为其毒性成分的代表^[7]。Veratridine 通过与 Na⁺通道蛋白位点 2 结合阻止通道的失活,引起钠离子内流和膜去极化,诱导神经细胞的凋亡,并且 Veratridine 的毒性很可能与其代谢相关。我们建立了 Veratridine 的体外代谢体系,考察了 Veratridine 在大鼠肝微粒体中的代

表 1 “诸参辛芍叛藜芦”各相反药对在基因及酶活性层次对 P450 酶的影响

组别	酶活性水平				mRNA 水平				
	P450	b5	3A	2E1	1A1	2B1/2	2C11	2E1	3A1
藜芦	-	-	↓	-	-	↓	↑	-	↓
苦参	↓	-	↓	↓	-	-	-	↑	-
藜-苦	↓	↓	↓	↓	-	-	↓	↓	-
丹参	-	-	↓	-	-	-	-	-	-
藜-丹	-	↓	↓	↓	-	↓	↓	-	↓
人参	↓	-	↓	↓	↑	↓	-	-	↑
藜-人	↓	↓	↓	↓	↑	-	-	-	↓
南沙参	-	-	-	-	↑	-	-	-	-
藜-南	↓	-	-	-	-	-	-	-	↓
玄参	-	-	-	-	-	-	-	-	↓
藜-玄	↓	-	-	-	-	↓	-	-	↓
细辛	-	-	-	-	↑	↓	-	↓	↓
藜-细	↓	-	-	-	↑	-	-	-	-
白芍	↑	-	↑	↑	-	-	-	↑	-
藜-白	-	-	-	↑	-	-	-	-	↓

谢情况,以及 5 种特定 P450 亚型选择性抑制剂对 Veratridine 体外代谢的影响。通过高效液相和液质联用技术分析了 Veratridine 的体外代谢情况,推测 Veratridine 体外 7 个代谢产物的结构^[8](见表 2),确定 Veratridine 可能的体外代谢途径,继而分析 Veratridine 代谢途径,认为 Veratridine 代谢产物中存在活性中间体邻二苯酚和邻醌类物质的可能。活性代谢中间体通过与 DNA、RNA 以及关键蛋白等生物大分子发生共价结合造成细胞损伤,邻二苯酚和邻醌类物质被认为具有神经毒性。化学抑制实验结果显示,4 种 P450 亚型(CYP1A,CYP2B,CYP2E1,

CYP3A) 参与了 Veratridine 的体外代谢,见图 2。相关 P450 亚型的表达和功能变化将造成 Veratridine 对机体毒性作用的改变。综合前面酶活性的结果,我们认为一方面藜芦中重要的毒性成分 Veratridine 可能因药物配伍使用过程中细胞色素 P450 总含量和 CYP3A 活性被抑制发生蓄积而造成毒性;另一方面 Veratridine 经 CYP1A 代谢有可能产生邻二苯酚或醌类毒性物质,活性代谢中间体通过与 DNA、RNA 以及关键蛋白等生物大分子发生共价结合造成细胞损伤,邻二苯酚和邻醌类物质被认为具有神经毒性,相反药对配伍对 CYP1A 的诱导作用可能会使邻二苯酚或醌类毒性物质生成增多而致毒性,见图 3。

三、基于药物代谢酶的中药十八反相互作用研究的意义

本研究将现代药理学中药物相互作用的分子基础-P450 酶引入中药相互作用的研究,以中药十八反为研究范例,通过酶活性分析、分

子生物学技术和现代色谱技术等综合分析中药对 P450 酶活性、mRNA 及蛋白表达水平影响;进一步通过液质联用技术结合体外代谢实验对典型的毒性成分乌头碱、藜芦定碱的代谢特征进行深入分析;并对甘草对 CYP3A 的诱导表达机制进行了探讨。系统研究了中药十八反中各相反药对药物代谢酶的影响,并有针对性阐明了各组中可能产生“相反”的中药相互作用机理,发现了一些基于药物代谢酶的中药相互作用模式,显示了一些配伍禁忌的机制和科学内涵,为临床用药提供理论依据。对与 P450 酶有关中药的发现也为它

表 2 Veratridine 体外代谢产物的色谱行为和质谱特征信息

Metabolite	Retention time (min)	[M+H] ⁺ (m/z)	Major fragment ions	Identification
Veratridine	6.84	674	656,492,474,456,438	Veratridine
M1	4.21	660	642,492,474,456	4'-O-Demethyl-veratridine
M2	4.79	660	642,492,474,456	3'-O-Demethyl-veratridine
M3	8.98	704	686,492,474,438	6'-Methoxyl-veratridine
M4	6.20	672	490,472,436	Dehydrogen-veratridine
M5	3.23	690	672,508,472	Hydroxyl-veratridine
M6	3.88	690	672,508,472	Hydroxyl-veratridine
M7	4.53	690	672,508,472	Hydroxyl-veratridine

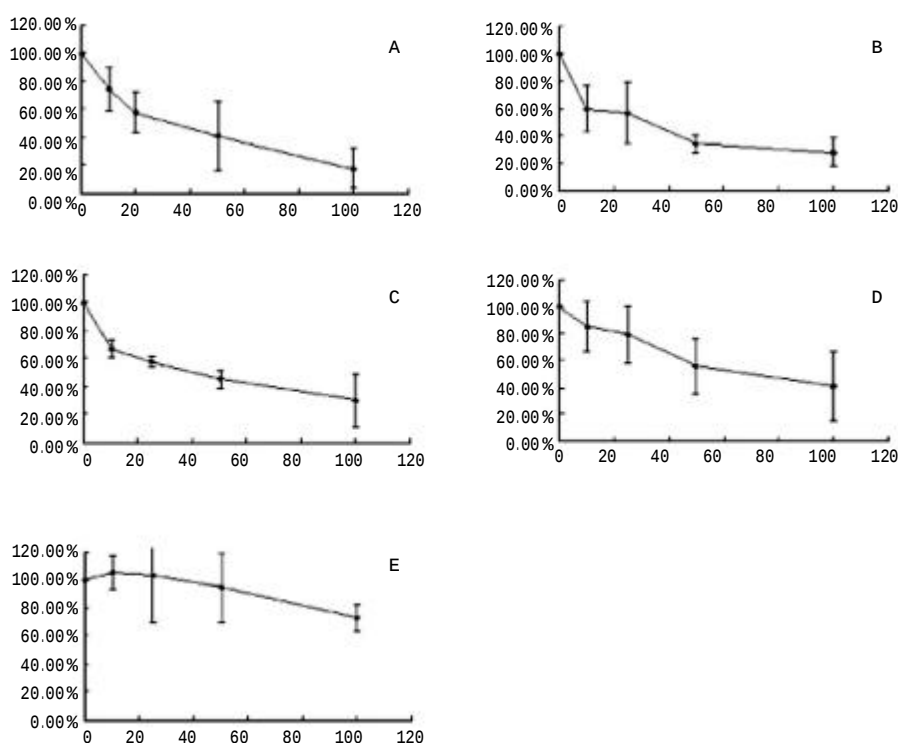


图 2 不同 CYPs 抑制剂对 veratridine(20 μ M)体外代谢的影响

们与其它药物配伍提供理论依据,对新组方有一定的指导意义。同时我们也认为基于药物代谢酶的中药十八反相互作用研究只是十八反研究的一个方面,也不可能仅局限于药物代谢酶的角度,应采用现代药理学、数学药理学、分子生物学、药物化学、现代药剂学、生物信息学、数学与计算机科学等相关学科的技术与方法,系统研究“十八反”药物配伍关系,阐明其相互作用、配伍关系、宜忌条件以及化学本质和生物学基础,揭示中药“十八反”的科学实质,将有助于中药配伍禁忌理论的提升,丰富和完善中药配伍理论。

参考文献

- 1 任钧国,顾蕾,宋闫军. 中药配伍的化学研究简述. 中医研究, 2000, 13 (2):63~64.
- 2 Guengerich FP. Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. J Biol Chem, 1991, 266(16):10019~10022.
- 3 Lin JH, Lu AY. Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450enzymes. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001, 41:535~567.
- 4 王宇光,高月. 中药十八反的药理毒理研究进展. 中国实验方剂学杂志, 2003, (9)3:60~63.
- 5 王宇光,高月. 中草药对细胞色素 P450 酶调控的研究进展. 中草药, 2003, 5:477.
- 6 王宇光,高月,柴彪新,等. 中药人参与其藜芦合用对大鼠肝 P450 酶活性及 mRNA 表达的调控作用. 中国中药杂志, 2004, 29(4):366~370.
- 7 Swiss ED, Bauer RO. Acute toxicity of veratrum derivatives. Proc Exp Biol Med, 1951, 76(4):847~849.
- 8 Xuan Ye, Yuguang Wang, Minghui Yang, et al. Investigating the in vitro metabolism of veratridine: characterization of metabolites and involved cytochrome P450 isoforms. Journal of Chromatography B, 2009, 877:141~148.

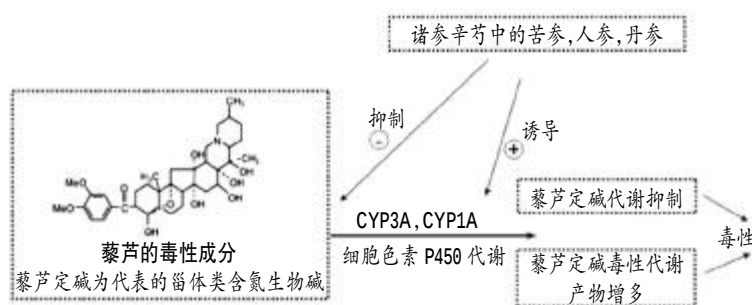


图3 基于药物代谢酶“诸参辛芍藜芦”配伍禁忌的可能机制

Study on the Eighteen Incompatible Pairs Based on Cytochrome P450

Wang Yuguang¹, Ma Zengchun¹, Liang Qiande¹, Liu Ming¹, Lu Beibei¹, Tan Hongling¹,
Xiao Chengrong¹, Gao Yue¹, Zhang Boli²

(1. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Abstract: Eighteen incompatible pairs was one of the most important part of the theory of Chinese herbal property theory of TCM, Drug interactions can frequently arise when drugs are coadministered and one drug modulates the metabolic clearance of the second drug through inhibition or induction of a specific CYP enzyme, possibly leading to adverse drug interactions (ADR), including some fatal interactions. Recently, drug-drug interactions based on CYP and the modulated mechanism of CYP by drugs are more concerned. The safety and ADR of Traditional Chinese medicine (TCM) frequently arise with an increasing consumption of TCM, where they are often administrated in combination and the constitutes in herbal preparations maybe substrates, inhibitors or inducers of CYP, so it maybe exist herb-herb interactions based on CYP. CYP, the molecular basis of drug-drug interaction in modern pharmacology was taken into the study of herb-herb interaction. We systemically studied the relationship between eighteen incompatible medicaments and CYP, and the goal of this study was to provide experimental evidences to the mode of herb-herb interaction based on CYP and the mechanism of incompatible medicaments. All these results indicated that compatibility of medicines in a prescription also have herb-herb interaction based on P450. The interaction mode could express as herb may induce or inhibit CYP isozymes, and the modulated CYP isozymes would further have an impact on the metabolism of constitutes in coadmistrated herbs and cause herb-herb interaction.

Keywords: Eighteen incompatible pairs, Drug metabolism enzyme, Cytochrome P450, Incompatible combination

(责任编辑:李沙沙 张志华, 责任译审:高月)