

利用体内探针法考察植物药和天然产物对人体细胞色素 P450 和 P-糖蛋白活性的影响

叶蓁, 朱玲玲, 周权^{*}(浙江大学医学院附属第二医院, 杭州 310009)

摘要: 目的 促进植物药和天然产物对人体细胞色素 P450 和 P-糖蛋白活性影响的人体研究的深入, 预期临床相互作用, 提高合理用药水平。方法 综述体内探针法在该领域的国内外的应用。详细介绍应用方法和注意事项。结果 国外利用体内探针法的研究较热。鸡尾酒探针法的应用已成熟。结论 在我国应大力支持和推广体内探针法在新药研发和临床应用中的研究。

基金项目: 浙江省中医药管理局科技计划(2007CB173; 2011ZB075)

作者简介: 叶蓁, 女, 硕士 *通讯作者: 周权, 男, 博士, 主任药师, 硕导

Tel: (0571)87784615

E-mail: zhouquan142602@zju.edu.cn

关键词: 植物药; 细胞色素 P450; P-糖蛋白; 体内探针法

中图分类号: R963

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)07-0596-08

Investigation on Modulation of Human Cytochrome P450 and P-glycoprotein by Herb or Natural Product Using *in Vivo* Probe Substrate

YE Zhen, ZHU Lingling, ZHOU Quan^{*}(The Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To promote the *in vivo* investigation on modulation of human cytochrome P450 and P-glycoprotein by herb or natural product, anticipate clinical drug interaction and improve rational drug use. **METHODS** Literatures using *in vivo* probe substrate were reviewed. **RESULTS** Research in this respect abroad is hot. Cocktail methods are widely used. **CONCLUSIONS** *In vivo* probe substrate phenotyping studies should be paid more attention in investigation on modulation of CYP and P-gp by herb and natural products.

KEY WORDS: herb; cytochrome P450; P-glycoprotein; probe substrate

植物药、天然产物与化学药的相互作用问题越来越受到药物研发部门、临床药理与临床药学部门的重视^[1]。临床应用中有不少因发生代谢性相互作用或转运环节发生的相互作用而引起疗效降低或毒性增加的个案报道。例如,接受环孢素维持治疗的器官移植患者若服用贯叶连翘提取物可能会出现器官排异症状,长期接受苯妥英钠和丙戊酸钠治疗的癫痫患者服用银杏叶提取物后可出现癫痫发作。以葡萄柚汁 100 mL 吞服辛伐他汀 20 mg 相当于用白开水吞服辛伐他汀 260 mg,增加了横纹肌溶解发生风险。研究表明,在 15%同时服用常规西药和植物药的病人中,40%的人会面临植物药-西药有相互副作用的潜在风险^[2]。

药物代谢动力学分为药物代谢与药物转运。细胞色素 P450 是人体内代谢酶中最为重要的一个家族。因此,对于进入临床药理阶段或已上市的植物药制剂,考察其对人体细胞色素氧化酶 P450(CYP)和 P-糖蛋白(P-gp)活性的影响是十分必要的。探针底物法的应用可以满足这方面的需求。本文总结近年来应用探针法考察植物药和天然产物对人体 CYP 活性影响的研究进展,以促进临床应用。

1 CYP 体内探针

1.1 CYP3A 的探针底物

CYP3A 是最重要的 CYP,临床中约有 60%的药物经 CYP3A 代谢。CYP3A 在人的肝脏和小肠内含量最为丰富,分别占总 CYP 的 30%和 70%。CYP3A4 是 CYP3A 中最重要的同工酶,CYP3A5 在 10%~30%的成人肝组织中有表达,是 CYP3A 主要的肝外表达形式。CYP3A5 与 CYP3A4 有相同

底物结合特性,但酶活性比 CYP3A4 约低 80%。应用合适的 CYP3A 活性探针底物,来考察植物药和天然产物对其的影响,具有十分重要的临床意义。

1.1.1 咪达唑仑 咪达唑仑(Midazolam)是一种短效的安定类药物,可用于入睡困难的失眠症治疗以及手术或诊断性操作前用药。口服吸收迅速完全,肠、肝首过效应明显。咪达唑仑主要在肝和小肠中代谢,主要代谢途径是 CYP3A4/3A5 介导的 1'-羟化和 4-羟化。咪达唑仑不是 P-gp 底物。成人口服常用剂量为 7.5~15 mg,静脉注射常用剂量为 0.15~0.2 mg·kg⁻¹。

1.1.1.1 以咪达唑仑清除率或 AUC 为指标 该法要求有完整的采样时间点。口服咪达唑仑的清除率或血药浓度-时间曲线下面积(AUC)可反映小肠和肝 CYP3A 总的活性,而静脉注射咪达唑仑的总体清除率只反映肝脏 CYP3A 活性。Mueller 等^[3]以口服 7.5 mg 咪达唑仑后 AUC_{0-12h} 反映 CYP3A 活性,考察了贯叶连翘(St. John's wort)对 CYP3A 的影响。口服 6 种贯叶连翘制剂 2 周后咪达唑仑的 AUC_{0-12 h} 均下降,且下降幅度与制剂中贯叶金丝桃素含量密切相关。每日服用 2.7 g 贯叶连翘粉末片(含贯叶金丝桃素 0.13 mg)仅引起 AUC_{0-12h} 下降 21.1%;每日服用 2.7 g 贯叶连翘粉末片(含贯叶金丝桃素 12 mg)可引起 AUC_{0-12 h} 下降 47.9%;提取物(相当于贯叶金丝桃素 41 mg·d⁻¹)则引起 AUC_{0-12 h} 下降 79.4%。

1.1.1.2 以单个时间点的代谢比为指标 口服 7.5 mg 咪达唑仑后 0.5 h 或口服 8 mg 咪达唑仑后 1 h 时的 1'-羟基咪达唑仑与咪达唑仑的血药浓度比值

能反映 CYP3A 活性。Gurley 等^[4]以口服 8mg 咪达唑仑后 1 h 时 1'-羟基咪达唑仑与咪达唑仑的血药浓度比值为指标,证明北美黄连根提取物胶囊(1 323 mg tid)连服 2 周后人体 CYP3A 活性无显著改变,卡瓦胡椒提取物胶囊(1 227 mg tid)连服 2 周后 CYP3A 活性显著抑制,而阳性对照组(连服利福平 300 mg bid 或克拉霉素 500 mg bid 7d),却显示了显著的诱导和抑制作用。

1.1.2 内源性氢化可的松 内源性氢化可的松(Cortisol, C)的 C-6 β 羟化完全由 CYP3A 催化。因此,6 β -羟基氢化可的松(6 β -hydroxycortisol, 6 β -OHC)的形成清除率($CL_{(6\beta-OHC)}$)可以作为 CYP3A 的探针^[5]。 $CL_{(6\beta-OHC)} = X_{(6\beta-OHC)} / AUC_{(C)}$ 。式中 $X_{(6\beta-OHC)}$ 指 6 β -OHC 的尿排泄量, $AUC_{(C)}$ 指氢化可的松的 AUC,这 2 种数据可通过测定尿液中 6 β -OHC 浓度和氢化可的松血浆浓度计算得到。

内源性 6 β -OHC/C 试验对试验者无创伤,目前主要有两种方法。一种是测定 24 h 尿样内的 6 β -OHC/C 比值,这种方法比较费时,而且尿样采集不充分会影响结果。Hu 等^[6]以该法测定了 12 名中国健康志愿者的 6 β -OHC/C 为 3.54 ± 2.32 。另一种方法为收集晨尿,测定 6 β -OHC/C 比值。Rouits 等^[7]认为应以早晨第 1 次尿排空后 1 h 再次采集的尿样(约早晨 8:00~9:00)为测定样品。12 名健康志愿者 6 β -OHC/C 的基线水平为 1.4~9.9,饮用葡萄柚汁 200 mL tid 后,6 β -OHC/C 下降了 30%~70%。贯叶连翘提取物($900 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$)服用 2 周后,尿液 6 β -OHC/C 增加 2.1 倍^[8]。通常应用 HPLC 测定尿液中的 6 β -OHC 和 C,缺点是分析周期长。LC-MS/MS 的应用使得测定更为快速、灵敏和专属^[9]。尿液中 6 β -OHC/C 比值不是最佳的 CYP3A 活性反映指标,但在评估 CYP3A4 诱导或抑制影响时仍非常实用^[10]。

1.1.3 非洛地平 非洛地平吸收完全,首过效应显著,在肝中被广泛代谢。CYP3A4 是其主要代谢酶。口服 10 mg 非洛地平缓释片后非洛地平的 AUC 和 $C_{\max}$ 可以作为 CYP3A4 活性反映指标。Dresser 等^[11]报道志愿者服用 600 mg 薄荷油、300 mL 葡萄柚汁能使非洛地平的 AUC 分别增加 173%和 140%,均使 $C_{\max}$ 增加。Paine 等^[12]研究发现,葡萄柚汁对非洛地平 $C_{\max}$ 和 AUC 增加程度显著高于去呋喃香豆素的葡萄柚汁。机制是葡萄柚汁中的呋喃香豆素抑制非洛地平系统前药物代谢,从而增加其生物利用度。

1.1.4 辛伐他汀 辛伐他汀主要经 CYP3A4/5 代谢, CYP3A4 与辛伐他汀的亲合力要比 CYP3A5 高 3 倍。以口服单剂量 40 mg 辛伐他汀后辛伐他汀的 $C_{\max}$ 和 $AUC_{0-\infty}$ 为指标,可考察试验药对 CYP3A4 活性影响。Sugimoto 等^[13]考察了服用 300 mg 贯叶连翘胶囊 tid(相当于贯叶金丝桃素 $2.7 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$)应用 2 周后,10 mg 辛伐他汀口服后的 AUC_{0-24} 下降了 48%,提示贯叶连翘提取物对 CYP3A 有显著诱导作用。但研究显示,咪达唑仑和辛伐他汀的口服清除率在基线水平和酶抑制剂处理后显著相关,但在酶诱导处理后无相关性。提示与咪达唑仑相比,辛伐他汀对 CYP3A 活性的预测能力要低^[14]。

在 CYP3A 的探针底物实际应用中应注意几点:口服 CYP3A 探针法反映的是小肠和肝脏 CYP3A 活性的综合,静脉给药探针反映的是肝 CYP3A 活性。通常作为探药应用时的用量要小于常规治疗剂量,以减少不良反应的发生。像口服咪达唑仑作为探针药物时的剂量范围宽($75 \mu\text{g} \sim 8 \text{ mg}$),而常用剂量为 7.5~15 mg。若 CYP3A 探针底物也是 P-gp 的底物,例如红霉素,那么应用这种探针时可能不能真实地反映 CYP3A 的活性。MDZ 和阿普唑仑不是 P-gp 的底物,因此可真实反映 CYP3A 活性。由于无创的探针试验方法实用性强,若可能的话,可以采集尿液和唾液样本。以单个时间点的探针药物浓度或代谢比为指标则患者的依从性会增加。一些探针法不能很好反映 CYP3A 的基线活性,但却能灵敏反映 CYP3A 的诱导或抑制作用。因此在代谢性相互作用的定性和定量上仍有较好的应用价值^[1]。应根据实验室的分析测试条件选用合适的探针。例如,以口服 $75 \mu\text{g}$ 咪达唑仑、20 mg 丁螺环酮作为 CYP3A 的探针,由于灵敏度的限制,一般的色谱法难以达到要求。若应用 LC-MS/MS,则可应用性大大增加。

1.2 CYP2C9 探针

CYP2C9 在人肝 CYP 中的相对含量可达 20%,约有 10%的药物经 CYP2C9 代谢,因此其临床意义也十分突出。Xie 等^[15]以单剂量服用 25 mg 氯沙坦后 8 h 内尿液中氯沙坦/E-3174 比值为 CYP2C9 活性反映指标,证明芍药根水煎液(相当于原生药材 $30 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$)连服 5 d 对 CYP2C9 无明显影响。服用 50 mg 双氯芬酸钠的稳态药动学参数或 500 mg 甲苯磺丁脲的尿代谢比(口服后 6~12 h 内尿液中 4-

羟基甲苯磺丁脲+羧基甲苯磺丁脲)/甲苯磺丁脲)也可反映 CYP2C9 活性, Mohutsky 等^[16]证明银杏提取物 120 mg bid 服用 1 周后对人体 CYP2C9 无影响, 结果与体外实验显示银杏提取物对 CYP2C9 具有强抑制作用不同。Greenblatt 等^[17]以单剂量口服 100 mg 氟比洛芬的 AUC 和 CL 为 CYP2C9 活性探针, 证明银杏叶制剂 120 mg 连续给予 3 个剂量后对 CYP2C9 活性无影响。

1.3 CYP1A2 探针

CYP1A2 催化代谢临床上许多重要药物, 而且还与许多前致癌物和前毒物的代谢及活化有关, 因此建立测定 CYP1A2 活性的方法具有重要的临床意义。苗丽娟等^[18]证明志愿者服用刺五加片(每次 5 片, 3 次·d⁻¹)能使 CYP1A2 活性显著下降。试验前 1 日晚饮服 3 g 咖啡, 集 12 h 隔夜尿, 采用液相色谱法分析尿液样本, 以尿液中 1,7-二甲基黄嘌呤在尿中相对含量(总尿量×1,7-二甲基黄嘌呤的峰面积/内标峰面积)表示 CYP1A2 活性。以咖啡因为探针药物, 通过测定人尿中咖啡因 4 种主要代谢产物 5-乙酰氨基-6-甲酰氨基-3-甲基尿酸(AFMU)、1-甲基尿酸(1U)、1-甲基黄嘌呤(1X)和 1,7-二甲基尿酸(17U)的含量, 采取代谢物比率(AFMU+1X+1U)/17U, 可反映 CYP1A2 在体内的活性。吴慧等^[19]研究发现, 服用复方丹参滴丸(每次 100 mg, 1 天 2 次)28 d 后对人 CYP1A2 活性的影响无统计学意义。

1.4 CYP2C19 和 CYP3A4 探针

奥美拉唑(Omeprazole)口服后吸收迅速, 在肝内广泛代谢, 主要代谢物为 5'-羟基奥美拉唑和奥美拉唑酮, 它们分别由 CYP2C19 和 CYP3A4 介导生成。通常以 $AUC_{\text{奥美拉唑}}/AUC_{\text{奥美拉唑酮}}$ 为来反映 CYP3A4 活性, 以口服奥美拉唑后 3 h 时的 $AUC_{\text{奥美拉唑}}/AUC_{5'-\text{羟基奥美拉唑}}$ 来反映 CYP2C19 活性。Bottiger 等^[20]提出利用口服 20 mg 奥美拉唑 3 h 时的单个血样样本同时测定 CYP2C19 和 CYP3A4 的活性。Yin 等^[21]以口服奥美拉唑 40 mg 后 12 h 内的 $AUC_{\text{奥美拉唑}}/AUC_{5'-\text{羟基奥美拉唑}}$ 为 CYP2C19 活性反映指标, 发现银杏叶(140 mg, bid)连续服用 12 d 后对 CYP2C19 有显著诱导作用, 而且诱导程度在 CYP2C19 慢代谢表中更高。CYP3A4 活性指标 $AUC_{\text{奥美拉唑}}/AUC_{\text{奥美拉唑酮}}$ 未显著改变。Fan 等^[22]以 20 mg 奥美拉唑为探针, 考察了中药茵陈蒿口服溶液(10 mL tid, 连服 14 d)对 CYP2C19*1/*1 患者的 CYP2C19 和 CYP3A4 的

影响, 发现 $AUC_{\text{奥美拉唑}}/AUC_{5'-\text{羟基奥美拉唑}}$ 和 $AUC_{\text{奥美拉唑}}/AUC_{\text{奥美拉唑酮}}$ 分别下降了 64.80% 和 63.31%。结果表明, 茵陈蒿口服液可诱导 CYP3A4 和 CYP2C19。

2 鸡尾酒探针法

鸡尾酒体内探针试验(Cocktail approach)的定义: 同时给予多种低剂量的探针底物, 测定生物样本中每个探针底物的代谢比(Metabolic ratio, MR), 同时获取多种药物代谢酶的活性信息。在多剂量的试验药物给予前后应用鸡尾酒体内探针试验, 可以明确对一些临床意义突出的药物代谢酶是否有诱导抑制作用, 预测与相应代谢酶的底物发生相互作用的可能。该法省时经济, 但要求探针底物灵敏专属、探针间无相互作用、分析方法专属性强^[1,23]。FDA 认为只要鸡尾酒探针法经过确证, 其结果可作为新药申报资料。

2.1 外源性探针联合内源性探针

Saruwatari 等^[24]考察了小柴胡汤对人体 CYP1A、CYP3A 和黄嘌呤氧化酶(XO)的影响, 以单剂量口服 150 mg 咖啡因后 8 h 内的尿液为分析样本, 测定 5-乙酰氨基-6-氨基-3-甲基尿嘧啶(AAMU)、1U、1X、17U、6β-OHC 和氢化可的松的浓度, 以(AAMU+1U+1X)/17U、1U/(1U+1X)和尿液排泄比值(6β-OHC/C)分别反映 CYP1A2、XO 和 CYP3A 活性, 发现小柴胡汤 2.5 g bid 连续服用 5 d 后能下降 CYP1A 和 XO 活性, 对 CYP3A 影响不大。

2.2 两种底物法

2.2.1 阿普唑仑和右美沙芬 阿普唑仑的口服生物利用度较高(约 90%), 无首过效应, 也不是 P-gp 底物, 主要经肝 CYP3A 广泛代谢, 因此可用作肝脏 CYP3A 活性的探针底物。通常以阿普唑仑药动学参数来反映 CYP3A 活性。例如, 阿普唑仑 AUC 的变化能灵敏反映 CYP3A4 受抑制或诱导情况^[25]。也可用单个时间点的血药浓度来反映 CYP3A4 活性^[26]。口服单剂量阿普唑仑(1 mg)后 6, 8, 10 和 24 h 时阿普唑仑的血浆浓度与阿普唑仑的 AUC 显著相关。以口服 30 mg 右美沙芬和 2 mg 阿普唑仑为鸡尾酒探针, 以右美沙芬/右啡烷尿液浓度比值反映 CYP2D6 活性, 以 0~60 h 内阿普唑仑的药动学参数反映 CYP3A4 活性。应用该法发现贯叶连翘提取物(485 mg bid)、银杏叶提取物(120 mg bid)、缬草提取物(1 000 mg 睡前服用)分别连续应用 2 周后对 CYP2D6 和 CYP3A4 活性影响不明显^[27-29]。

2.2.2 咪达唑仑和咖啡因 程泽能等^[30]以服用 7.5 mg 咪达唑仑和 100 mg 咖啡因后的药动学参数分别作为 CYP3A 和 CYP1A2 的活性反映指标,证明了止咳橘红颗粒(1 包 bid)服用 3 d 后对 CYP3A4 具有较弱的抑制作用,对 CYP1A2 无影响。

2.3 四种底物法

2.3.1 咪达唑仑、咖啡因、氯唑沙宗和异喹胍 口服 8 mg MDZ 和 100 mg 咖啡因后 24 h,再服用 500 mg 氯唑沙宗和 5 mg 异喹胍。以 MDZ 和咖啡因服药后 1 h 血清 1'-OHMDZ/MDZ 反映 CYP3A 活性,6 h 时血清 1,7-二甲基黄嘌呤/咖啡因反映 CYP1A2 活性。以氯唑沙宗服用后 2 h 血清 6-羟基氯唑沙宗/氯唑沙宗反映 CYP2E1 活性,以服药后 8 h 内异喹胍尿液回收率反映 CYP2D6 活性。Gurley 等应用该法考察了贯叶连翘提取物、大蒜油、人参、银杏、北美黄连、卡瓦胡椒、蓝棕果、枳实和缬草提取物服用 4 周后对上述四种 CYP 的影响。结果发现,贯叶连翘提取物能显著诱导 CYP2E1 和 CYP3A4,大蒜油能降低 CYP2E1 活性 39%,北美黄连提取物对 CYP2D6 和 CYP3A4/5 有强抑制作用,卡瓦胡椒对 CYP2E1 有抑制作用,人参、银杏、蓝棕果、枳实和缬草提取物对 CYP 无显著影响^[31-33]。这种基于单个时间点的鸡尾酒探针法为研究植物药与化学药相互作用提供了实用的手段。

2.3.2 咖啡因、甲苯磺丁脲、右美沙芬和咪达唑仑 Gorski 等^[34]应用鸡尾酒探针法(咖啡因 200 mg、甲苯磺丁脲 500 mg、右美沙芬 30 mg、口服咪达唑仑 5 mg 或静脉注射咪达唑仑 0.05 mg·kg⁻¹)研究了紫锥菊根 400 mg qid 连续服用 8 d 后对人体 CYP 的影响。发现咪达唑仑的静脉清除率增加了 34%,AUC 下降了 23%,而口服清除率未显著下降,咖啡因的口服清除率显著下降,甲苯磺丁脲和右美沙芬的清除率未显著改变。提示紫锥菊根对肝脏 CYP3A 具有诱导作用,对 CYP1A2 具有抑制作用,对 CYP2C9 和 CYP2D6 无显著影响。

2.3.3 咖啡因、右美沙芬、氯沙坦和丁螺环酮 丁螺环酮吸收迅速,首过代谢明显,在肝中被广泛代谢。丁螺环酮主要经 CYP3A4 代谢。经典的 CYP3A4 抑制剂可使丁螺环酮的生物利用度增加 3~19 倍。FDA 推荐丁螺环酮作为 CYP3A 抑制能力研究的灵敏体内探针底物^[35]。Chow 等^[36]以口服 100 mg 咖啡因、30 mg 右美沙芬、25 mg 氯沙坦和

10 mg 丁螺环酮组成鸡尾酒探针,测定 0~8 h 内尿液中右美沙芬/右啡烷比值(CYP2D6)和氯沙坦/E3174 比值(CYP2C9)、服药后 4 h 时 1,7-二甲基黄嘌呤/咖啡因血浆浓度比值(CYP1A2)。以丁螺环酮 AUC 反映 CYP3A4 活性。发现服用茶多酚 4 周(相当于 800 mg·d⁻¹ 表没食子儿茶素没食子酸酯)后对 CYP1A2、CYP2D6 和 CYP2C9 活性无影响,但能引起丁螺环酮 AUC 增加 20%,提示 CYP3A4 活性有一定下降。

2.4 5 种底物法

口服 100 mg 咖啡因、100 mg 美芬妥英、100 mg 美托洛尔、125 mg 氯唑沙宗和 7.5 mg 咪达唑仑。收集服药后 0~8 h 的尿液和 1, 4, 6 h 时 3 个时间点的静脉血。以服药后 0~8 h 尿液中美托洛尔/ α -羟化美托洛尔和 4'-羟基美芬妥英尿排泄量/剂量分别反映 CYP2D6 和 CYP2C19 活性,以服药后 1 h 血浆 1'-羟基咪达唑仑与咪达唑仑、服药后 4 h 血浆 6-羟基氯唑沙宗/氯唑沙宗和服药后 6 h 血浆 1,7-二甲基黄嘌呤/咖啡因分别反映 CYP3A、CYP2E1 和 CYP1A2 的活性。Yao 等^[37]应用该法发现,健康志愿者服用青藤碱片(80 mg·d⁻¹)7 d 后 CYP2C19 活性降低 69%。

3 P-gp 探针底物法

P-gp 是一种外排型转运体,广泛存在于肠壁、胆管、肾小管、血脑屏障和肿瘤组织中,其作用是加速药物从这些组织的外排。P-gp 的底物中有很多为临床常用药物,P-gp 活性与药物生物利用度、耐药性和相互作用密切相关,测定 P-gp 体内活性具有重要临床意义。

3.1 非索非那定探针法

Kim 等^[38]采用随机双交叉试验,12 名健康志愿者口服槲皮素(500 mg tid)或安慰剂 7d,在试验第 8 d 口服非索非那定片剂 60 mg,随后测定非索非那定的人体药动学参数。非索非那定的 C_{max} 显著增加 60%,AUC 显著增加 50%,提示短程服用槲皮素对 P-gp 活性产生抑制作用。

Robertson 等^[39]报道,13 名健康志愿者口服银杏叶提取物(120 mg bid)28 d,第 29 天再服用单剂量咪达唑仑 8 mg 和非索非那定片 120 mg。结果表明,非索非那定的药动学并没有产生显著性差异,但是咪达唑仑的 AUC 和 C_{max} 分别下降了 33%和 31%,说明银杏叶提取物诱导了 CYP3A 介导的代谢,但对 P-gp 的活性没有影响。

有文献报道了一项随机、双周期、安慰剂对照临床试验,以非索非那定药动学参数作为人体内 *P*-gp 活性的探针。14 名健康男性志愿者随机口服黄芪颗粒(4 g bid)或安慰剂(4 g bid),多剂量连续服用 1 周后,服用非索非那定片 120 mg,采集不同时间点的血浆,计算药动学参数,并进行生物等效性统计分析。在未分 MDR1 C3435T 基因型亚组的情况下,发现临床剂量下黄芪颗粒连续服用一周对人体 *P*-gp 活性无显著影响。可以预见,临床常见重要的 *P*-gp 底物与黄芪颗粒合用,其药动学不会受到显著影响,临床上可以安全伍用,但它的影响具有 MDR1 C3435T 基因型依赖性。在 MDR1 C3435T 基因型分亚组的情况下,显示了黄芪颗粒对 *P*-gp 的影响。黄芪颗粒对野生型等位基因个体中的 *P*-gp 有一定的抑制作用。野生型个体中的 *P*-gp 受到的抑制作用程度要大于突变型个体中 *P*-gp 受到的抑制作用程度^[40]。

3.2 地高辛探针法

Gurley 等^[41]将 16 名健康志愿者随机分为两组,分别服用奶蓟 900 mg·d⁻¹ 和黑升麻提取物 40 mg·d⁻¹(两者皆为食品添加剂)14 d 后,服用地高辛片剂 0.4 mg,采集服药前、服药后 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12, 24 h 的血清,计算地高辛的药代动力学参数 AUC₀₋₃、AUC₀₋₂₄、CL/F、t_{1/2} 和 C_{max}。30 d 洗脱期后,志愿者在随机服用 *P*-gp 诱导剂利福平(600 mg·d⁻¹)或 *P*-gp 抑制剂克拉霉素(1 000 mg·d⁻¹)7 d 的基础上,服用地高辛 0.4 mg,计算药动学参数作为 *P*-gp 调节剂的阳性对照。AUC_{0-3 h} 是一个敏感指标。结果表明这两种食物添加剂均没有对地高辛的 AUC_{0-3 h} 产生统计学差异的影响,说明奶蓟和黑升麻提取物都不是 *P*-gp 的潜在调节剂,不会对人体内 *P*-gp 的活性产生影响。

Gurley 等^[42]以口服地高辛 0.25 mg 为 *P*-gp 的探针药物,发现贯叶连翘提取物(每次 300 mg, 3 次·d⁻¹)和紫锥花(每次 267 mg, 3 次·d⁻¹)14d 后,贯叶连翘提取物和利福平(300 mg bid, 7d)显著降低了地高辛的 AUC₀₋₃, AUC_{0-24 h} 和 C_{max}, 克拉霉素显著增加了上述参数,而紫锥花对地高辛药动学参数无显著影响。提示为贯叶连翘提取物对 *P*-gp 有诱导作用。

3.3 他林洛尔探针法

他林洛尔(Talinolol)是一种β₁-受体阻断剂,该

药物基本不代谢,是 *P*-gp 的底物。Schwarz 等^[43]利用口服他林洛尔 50 mg 和静脉给药他林洛尔 30 mg 的药动学参数作为 *P*-gp 活性的探针,考察了贯叶连翘提取物(900 mg·d⁻¹)连服 12d 对 *P*-gp 活性的影响,结果发现口服他林洛尔的 AUC 下降 31%,小肠 MDR1 表达增加,提示贯叶连翘提取物对 *P*-gp 的诱导作用。Fan 等^[44]以口服他林洛尔(100 mg)为 *P*-gp 探针,研究发现银杏提取物(360 mg·d⁻¹)连服 14 d 后引起他林洛尔的 C_{max} 增加 36%, AUC 增加 26%,提示银杏提取物可能对 *P*-gp 的抑制作用。

4 CYP 和 *P*-gp 探针底物

CYP3A 与 *P*-gp 底物存在显著的重叠性,而且两者在小肠、肾及肝可联合表达。CYP3A 与 *P*-gp 在小肠上皮细胞的协同作用,可造成许多药物的生物利用度下降。因此,同时测定 CYP3A 和 *P*-gp 的活性具有重要的临床意义,有较好的应用前景。

Kirby 等^[45]提出口服地高辛和咪达唑仑合用可分别作为 *P*-gp 和 CYP3A 体内活性探针。具体方法是口服 2 mg 咪达唑仑 1 h 后服用 0.5 mg 地高辛。收集 48 h 内的尿液,以及咪达唑仑服药后 6 h 内 10 个时间点的全血。以咪达唑仑 CL/F 或 1'-羟基咪达唑仑形成清除率(1'-羟基咪达唑仑 24h 尿排泄量/咪达唑仑 AUC_{0-∞})反映 CYP3A 活性。Malati 等^[46]利用口服 8 mg 咪达唑仑片和 120 mg 非索非那定片后的药动学参数分别作为 CYP3A4 和 *P*-gp 的活性探针指标,发现人参(Panax ginseng)500mg bid 连服 28 d 后 CYP3A4 活性显著增加,而 *P*-gp 活性未显著改变。

5 总结和展望

用体内探针法测定考察植物药和天然产物制剂对人体 CYP 和 *P*-gp 活性影响,以预期临床相互作用发生,已经受到了国外制药公司新药研发部门以及临床药学研究人员的重视。鸡尾酒探针法的应用已成熟。在我国应大力支持和推广体内探针法在新药研发和临床应用中的研究。需要注意的是,研究需要伦理批准和受试者知情同意,分析方法需要专属灵敏。另外,探针法研究需要较大的资金投入。研究设计要慎密,注意样本量大小,尽可能设计安慰剂对照,或 CYP(或 *P*-gp)调节剂干预的阳性对照组,这样研究的误差会降低。利用单点或单个时间段样本的体内探针法有更强的实用价值。

REFERENCES

- [1] ZHOU Q. Clinical pharmacokinetics and drug interaction. ZENG S. Clinical pharmacokinetics(临床药物代谢动力学) [M]. Beijing: People's medical publishing House, 2007: 106-109.
- [2] BUSH T M, RAYBURN K S, HOLLOWAY S W, et al. Adverse interactions between herbal and dietary substances and prescription medications: a clinical survey [J]. *Altern Ther Health Med*, 2007, 13(2): 30-35.
- [3] MUELLER S C, MAJCHER-PESZYNSKA J, UEHLEKE B, et al. The extent of induction of CYP3A by St. John's wort varies among products and is linked to hyperforin dose [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2006, 62(1): 29-36.
- [4] GURLEY B J, SWAIN A, HUBBARD M A, et al. Supplementation with goldenseal (*Hydrastis canadensis*), but not kava kava (*Piper methysticum*), inhibits human CYP3A activity in vivo [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2008, 83(1): 61-69.
- [5] FURUTA T, SUZUKI A, MORI C, et al. Evidence for the validity of cortisol 6 beta-hydroxylation clearance as a new index for in vivo cytochrome P450 3A phenotyping in humans [J]. *Drug Metab Dispos*, 2003, 31(11): 1283-1287.
- [6] HU Z, GONG Q, HU X, et al. Simultaneous determination of 6beta-hydroxycortisol and cortisol in human urine and plasma by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for phenotyping the CYP3A activity [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, 826(1/2): 238-243.
- [7] ROUITS E, BOISDRON-CELLE M, MOREL A, et al. Simple and sensitive high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of urinary free cortisol and 6beta-hydroxycortisol in routine practice. For CYP3A4 activity evaluation in basal conditions and after grapefruit juice intake [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003, 793(2): 357-366.
- [8] KAWAGUCHI A, OHMORI M, TSURUOKA S, et al. Drug interaction between St John's Wort and quazepam [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2004, 58 (4): 403-410.
- [9] LUTZ U, BITTNER N, UFER M, et al. Quantification of cortisol and 6 beta-hydroxycortisol in human urine by LC-MS/MS, and gender-specific evaluation of the metabolic ratio as biomarker of CYP3A activity [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010, 878(1): 97-101.
- [10] CHEN Y C, GOTZKOWSKY S K, NAFZIGER A N, et al. Poor correlation between 6beta-hydroxycortisol: cortisol molar ratios and midazolam clearance as measure of hepatic CYP3A activity [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2006, 62(2):187-195.
- [11] DRESSER G K, WACHER V, WONG S, et al. Evaluation of peppermint oil and ascorbyl palmitate as inhibitors of cytochrome P4503A4 activity *in vitro* and *in vivo* [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2002, 72(3): 247-255.
- [12] PAINE M F, WIDMER W W, HART H L, et al. A furanocoumarin-free grapefruit juice establishes furanocoumarins as the mediators of the grapefruit juice-felodipine interaction [J]. *Am J Clin Nutri*, 2006, 83(5): 1097-1105.
- [13] SUGIMOTO K, OHMORI M, TSURUOKA S, et al. Different effects of St John's wort on the pharmacokinetics of simvastatin and pravastatin [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2001, 70(6): 518-524.
- [14] CHUNG E, NAFZIGER A N, KAZIERAD D J, et al. Comparison of midazolam and simvastatin as cytochrome P450 3A probes [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2006, 79(4): 350-361.
- [15] XIE H J, YASAR U, SANDBERG M, et al. *Paeoniae Radix*, a traditional Chinese medicine, and CYP2C9 activity [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2002, 27(3): 229-230.
- [16] MOHUTSKY M A, ANDERSON G D, MILLER J W, et al. Ginkgo biloba: evaluation of CYP2C9 drug interactions *in vitro* and *in vivo* [J]. *Am J Ther*, 2006, 13(1): 24-31
- [17] GREENBLATT D J, VON MOLTKE L L, LUO Y, et al. Ginkgo biloba does not alter clearance of flurbiprofen, a cytochrome P450-2C9 substrate [J]. *J Clin Pharmacol*, 2006, 46(2): 214-221.
- [18] MIAO L J, MENG X Q. Actions of *acanthopanax senticosus* on microsome CYP 450 in livers of human and rats [J]. *J Harbin Med Univ(哈尔滨医科大学学报)*, 1997, 31(4): 295-296.
- [19] WU H, CHEN Z Z, PENG X Q, et al. Effect of compound Danshen dripping pills on cytochrome CYP1A2 activity [J]. *Chin Pharm(中国药房)*, 2008, 19(15): 1182-1184.
- [20] BÖTTIGER Y. Use of omeprazole sulfone in a single plasma sample as a probe for CYP3A4 [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2006, 62(8): 621-625.
- [21] YIN O Q, TOMLINSON B, WAYE M M, et al. Pharmacogenetics and herb-drug interactions: experience with Ginkgo biloba and omeprazole [J]. *Pharmacogenetics*, 2004, 14(12): 841-850.
- [22] FAN L, WANG G, WANG LS, et al. Herbal medicine yin zhi huang induces CYP3A4-mediated sulfoxidation and CYP2C19-dependent hydroxylation of omeprazole [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(10): 1685-1692.
- [23] ZHOU Q, YAO T W, ZENG S. The progress in phenotyping of drug metabolism [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2000, 17(6): 423-429.
- [24] SARUWATARI J, NAKAGAWA K, SHINDO J, et al. The *in vivo* effects of sho-saiko-to, a traditional Chinese herbal medicine, on two cytochrome P450 enzymes (1A2 and 3A) and xanthine oxidase in man [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2003, 55(11): 1553-1559.
- [25] DRABANT S, TOTM M, BERECZKI A, et al. Effect of tofisopam on the single-oral-dose pharmacokinetics and pharmacodynamics of the CYP3A4 probe drug alprazolam [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2006, 62(7): 587-588.
- [26] WENNERHOLM A, ALLQVIST A, SVENSSON J O, et al. Alprazolam as a probe for CYP3A using a single blood sample: pharmacokinetics of parent drug, and of alpha- and 4-hydroxy metabolites in healthy subjects [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2005, 61(2): 113-118.
- [27] DONOVAN J L, DEVANE C L, CHAVIN K D, et al. Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*) effects on CYP2D6 and CYP3A4 activity in normal volunteers [J]. *Drug Metab Dispos*, 2003, 31(5): 519-522.
- [28] MARKOWITZ J S, DONOVAN J L, LINDSAY D C, et al. Multiple-dose administration of Ginkgo biloba did not affect cytochrome P-450 2D6 or 3A4 activity in normal volunteers [J]. *J Clin Psychopharmacol*, 2003, 23(6): 576-581.
- [29] DONOVAN J L, DEVANE C L, CHAVIN K D, et al. Multiple night-time doses of valerian (*Valeriana officinalis*) had minimal effects on CYP3A4 activity and no effect on CYP2D6 activity in healthy volunteers [J]. *Drug Metab Dispos*, 2004, 32(12): 1333-1336.
- [30] CHEN Z N, ZHANG B K, LI F, et al. The inhibit effect of Zhi-Ke-Ju-Hong on CYP3A4 and CYP1A2 activity[J]. *Chin Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志)*, 2002, 18(3): 215-218.
- [31] GURLEY B J, GARDNER S F, HUBBARD M A, et al. Cytochrome P450 phenotypic ratios for predicting herb-drug interactions in humans [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2002, 72(3): 276-287.

- [32] GURLEY B J, GARDNER S F, HUBBARD M A, et al. *In vivo* effects of goldenseal, kava kava, black cohosh, and valerian on human cytochrome P450 1A2, 2D6, 2E1, and 3A4/5 phenotypes [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2005, 77(5): 415-426.
- [33] GURLEY B J, GARDNER S F, HUBBARD M A, et al. *In vivo* assessment of botanical supplementation on human cytochrome P450 phenotypes: Citrus aurantium, Echinacea purpurea, milk thistle, and saw palmetto [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2004, 76(5): 428-440.
- [34] GORSKI J C, HUANG S M, PINTO A, et al. The effect of echinacea (Echinacea purpurea root) on cytochrome P450 activity in vivo[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2004, 75(1):89-100.
- [35] Food and Drug Administration/Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry: *in vivo* drug metabolism/ drug interaction studies: study design, data analysis and recommendations for dosing and labeling. <http://www.fda.gov/cder/guidance/2635fnl.htm> [EB/OL]. 1999-10-06.
- [36] CHOW H H, HAKIM I A, VINING D R, et al. Effects of Repeated Green Tea Catechin Administration on Human Cytochrome P450 Activity [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006, 15(12): 2473-2476.
- [37] YAO Y M, CAO W, CAO Y J, et al. Effect of sinomenine on human cytochrome P450 activity [J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 379(1/2): 113-118.
- [38] KIM K A, PARK P W, PARK J Y. Short-term effect of quercetin on the pharmacokinetics of fexofenadine, a substrate of P-glycoprotein, in healthy volunteers [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2009, 65(6): 609-614.
- [39] ROBERTSON S M, DAVEY R T, VOELL J, et al. Effect of Ginkgo Biloba extract on lopinavir, midazolam, and fexofenadine pharmacokinetics in healthy subjects [J]. *Curr Med Res Opin*, 2008, 24(2): 591-599.
- [40] YE Z. Modulation of human P-gp by multiple doses of Astragalus root extract granules using fexofenadine as a phenotyping probe: a randomised placebo-controlled clinical trial [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2010.
- [41] GURLEY B J, BARONE G W, WILLIAMS D K, et al. Effect of milk thistle (Silybum marianum) and black cohosh (Cimicifuga racemosa) supplementation on digoxin pharmacokinetics in humans [J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34(1): 69-74.
- [42] GURLEY B J, SWAIN A, WILLIAMS D K, et al. Gauging the clinical significance of P-glycoprotein-mediated herb-drug interactions: comparative effects of St. John's wort, Echinacea, clarithromycin, and rifampin on digoxin pharmacokinetics [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2008, 52(7): 772-779.
- [43] SCHWARZ U I, HANSO H, OERTEL R, et al. Induction of intestinal P-glycoprotein by St John's wort reduces the oral bioavailability of talinolol [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 81(5): 669-678.
- [44] FAN L, TAO G Y, WANG G, et al. Effects of Ginkgo biloba extract ingestion on the pharmacokinetics of talinolol in healthy Chinese volunteers [J]. *Ann Pharmacother*, 2009, 43(5): 944-949.
- [45] KIRBY B, KHARASCH E D, THUMMEL K T, et al. Simultaneous measurement of *in vivo* P-glycoprotein and cytochrome P450 3A activities [J]. *J Clin Pharmacol*, 2006, 46(11): 1313-1319.
- [46] MALATI C Y, ROBERTSON S M, HUNT J D, et al. Influence of Panax ginseng on cytochrome P450 (CYP) 3A and P-glycoprotein (P-gp) activity in healthy participants [J]. *J Clin Pharmacol*, 2012, 52(6): 932-939.