

附子药代动力学研究进展

杨晓珊 吴锦俊 卢琳琳 朱丽君 刘中秋

(广州中医药大学国际中医药转化医学研究所, 广州, 510006)

摘要 附子为毛茛科多年生草本植物乌头子根的加工品, 具有局麻、镇痛、镇静、强心、抗炎、抗肿瘤等功效, 广泛用于治疗跌打损伤, 风湿关节炎, 肿瘤等疾病。由于在临床使用过程中不良反应和中毒事件频频发生, 近年来对附子提取物及其有效/有毒成分的药代动力学研究甚多, 作者对此研究近况做一综述。

关键词 附子; 药代动力学

Progress of Pharmacokinetic Study on Fuzi

Xiaoshan Yang, Jinjun Wu, Linlin Lu, Lijun Zhu, Zhongqiu Liu

(International Institute for Translational Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract Fuzi, the processed lateral roots of *Aconitum carmichaeli* (Ranunculaceae family), is a widely used traditional Chinese medicinal herb due to their excellent pharmacological activities including anti-inflammation, analgesics, local anesthesia, and anti-tumor effect. Since there have been reports of adverse events, even toxic events of Fuzi, many pharmacokinetic studies were conducted to research Fuzi extract and its active ingredients. Present paper summarized progress of the researches.

Key Words Fuzi; Pharmacokinetic study

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2014.02.010

附子(*Aconitum carmichaeli* Debx)为毛茛科多年生草本植物乌头子根的加工品, 具有局麻、镇痛、镇静、强心、抗炎、抗肿瘤等功效, 主要用于治疗跌打损伤, 风湿关节炎肿瘤等疾病。从化学成分上看, 乌头属植物中的主要成分是二萜生物碱, 约占总重的 7% ~ 10%, 具有显著的药理活性, 同时也是毒性成分。附子中二萜类生物碱主要有三种: 双酯型二萜类生物碱、单酯型二萜类生物碱和原碱型二萜类生物碱。在我国, 附子作为药用植物应用于临床已有二千多年的历史, 然而由于其治疗剂量和中毒剂量非常接近, 在临床使用过程中不良反应和中毒事件频频发生, 限制其广泛应用。所以, 近年来国内外研究者从附子提取物及其活性/毒性成分的药代动力学方面入手, 研究其发挥药理作用的物质基础以它对机体的影响。

1 附子提取物药动学研究

近年来, 人们利用现代检测技术从动物整体水平上, 对附子提取物的吸收代谢特征进行了大量研究, 为附子的临床安全应用提供了许多重要信息。

Pen 等^[1]大鼠灌胃附子水提物(0.45 g/kg)后, 测定了大鼠体内乌头碱(Aconitine, AC)、中乌头碱(Mesaconitine, MA)、次乌头碱(Hypaconitine, HA)、苯

甲酰乌头原碱(Benzoylaconine, BAC)、苯甲酰中乌头原碱(Benzoylmesaconine, BMA)和苯甲酰次乌头原碱(Benzoylhypaconine, BHA)的血药浓度, 它们在大鼠体内的达峰时间(T_{max})分别为 41.39、56.39、70.53、35.18、24.68 和 26.79 min。其半衰期($T_{1/2}$)分别为 220、192.06、252.93、186.62、138.11 和 70.20 min。说明附子提取物中乌头类生物碱在大鼠体内吸收迅速, 并且代谢较快, 经过 24 h 后, 在体内残留极少, 无蓄积现象。Zhang 等人^[2]在受试者静脉滴注不同剂量的“参附注射液”, 发现 AC、MA 和 HA 在人体血液中浓度极低, 几乎检测不到。而三种苯甲酰乌头类生物碱则呈现较高的血药浓度(BMA > BHA > BAC), 三者的半衰期皆在 1 h 内, 且在 45 min 内都达到血药浓度峰值。

此外, 附子治疗风湿性关节炎等慢性疾病, 常要求多剂量给药, 以达到有效的血药浓度, 但同时也可能引起蓄积中毒。唐澜等^[3]经大鼠灌胃给药附子醇提物, 结果表明多剂量给药后乌头碱的达峰时间(T_{max})快于单剂量给药, 而吸收程度(AUC)为单剂量给药的 1.5 倍, 且乌头碱的血浆蛋白结合率很低(23.9% ~ 31.9%), 提示乌头碱在体内能快速消除。所以, 附子

提取物经吸收入血后在大鼠体内残留较少,毒性以急性毒性为主,并不会增加附子临床长期给药蓄积中毒的可能性。

2 附子有效成分药动力学研究

附子的主要成分是二萜生物碱,包括 AC、MA、HA 和毒性较小的 BAC、BMA、BHA、乌头原碱(aconine)、中乌头原碱(mesaconine)和次乌头原碱(hypaconine)。

在药代动力学中,口服药物的生物利用度是衡量药物有效和安全的重要指标,而药物在体内的吸收与代谢的处置过程中,存在着由外排转运蛋白和药物代谢酶共同组成的一个相互偶联、相互制约、互相平衡的“生物利用度屏障”。因此,深入了解外排转运蛋白和药物代谢酶对药物的体内处置作用及其机理,可以增加药物的疗效,减少药物毒副反应。

2.1 附子有效成分的吸收机理研究 外排转运蛋白,例如 P 糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp),多药耐药相关蛋白(Multidrug Resistance Protein 2, MRP2)和乳腺癌耐药蛋白(Breast Cancer Resistance Protein, BCRP),作为机体的第一道防护屏障阻碍外来物对机体的入侵,把吸收进血液中的外来物外排至肠腔,从而保护机体,但也降低了药物的生物利用度。

叶玲等^[4]采用 Caco-2、MDCKII、MDCKII-MDR1 以及 MDCKII-BCRP 细胞模型研究了附子有效成分(AC、MA、HA、BAC、BMA、BHA、aconine 和 mesaconine)的体外吸收转运情况。研究发现 P-gp 和 BCRP 参与了 AC、MA 和 HA 在细胞的吸收转运,MRP2 很有可能也参与了它们的吸收转运;此外,MRP2 有可能参与 BAC、BMA 和 BHA 的吸收转运,而 P-gp 和 BCRP 并没有参与它们的吸收转运。目前没有研究证明外排转运蛋白参与 aconine 和 mesaconine 的吸收转运。Yang 等^[5-6]也证实了无论是体外实验,在体肠灌流实验,还是体内实验,P-gp 都参与了 AC 的吸收转运,是乌头碱口服生物利用度低的重要原因之一。利用大鼠外翻肠囊法和在体肠灌流技术,Zhang 等^[7]证明了 AC、MA 和 HA 在回肠的吸收最好,其次是空肠和十二指肠;P-gp 介导 AC、MA 和 HA 的吸收转运,然而 MRP2 却并不影响这三者的吸收。Li Na 等^[8]更是用 Caco-2 细胞模型证实了 AC、MA 和 HA 不仅是 P-gp 的底物,而且是 P-gp 的抑制剂。

因此,大量研究证明了外排转运蛋白介导附子有效成分的吸收转运,其规律为生物碱的毒性越大,受到的外排作用越大,即 AC、MA、HA > BAC、BMA、BHA > aconine、mesaconine、hypaconine。

2.2 附子有效成分的代谢机理研究

2.2.1 附子有效成分的体外代谢研究 肝脏含有大部分的代谢活性酶,而且具有很高的血流量,是药物代谢最重要的器官。因此,药物代谢不仅影响药物作用的强弱和持续时间的长短,而且还会影响药物治疗的安全性,具有重要的现实意义。采用细胞色素 P450 酶(Cytochrome P450 enzymes, CYP450)技术进行体外代谢研究可以快速了解药物的代谢方式、途径,可为药物毒性研究提供重要信息。

附子有效成分经吸收入机体后即与机体间发生一系列的相互作用。研究发现,在水解酶的作用下,毒性较大的双酯乌头生物碱能被代谢成毒性较小的单酯型生物碱和原碱型生物碱^[9]。Wang 等证实了乌头碱在大鼠肝微粒体的作用下,通过脱甲基、脱乙基、脱氢、脱二甲基和脱乙酰基方式产生 6 个代谢产物,参与代谢的主要 CYP450 亚型为 CYP3A 和 CYP1A1/2^[10]。然而,在人肝微粒体的催化下,乌头碱主要在 CYP3A4/5 和 CYP2D6 的作用下产生 6 个代谢产物,代谢方式为羟基化、脱甲基、脱氢、脱乙基和脱二甲基^[11]。由于 AC 和 MA 和 HA 具有相似的结构,研究表明 MA 和 HA 的代谢机理和 AC 相似。叶玲等^[12]采用人肝微粒体,CYP 化学抑制剂,单克隆抗体和人源化重组 CYP450 等方法证实了 MA 在人肝微粒体的作用下,至少生成 9 个代谢产物。主要的代谢途径包括去甲基,脱氢,羟基化和脱氢去甲基。而 HA 则至少生成了 11 个代谢产物,代谢途径为去甲基,脱氢,羟基化,脱氢去甲基和脱二甲基^[13]。CYP3A4 和 CYP3A5 在 MA 和 HA 的代谢中都发挥着至关重要的作用,其它 CYP450 亚型只发挥次要作用或不参与代谢。

AC 和 MA 和 HA 在炮制过程中产生的一级水解产物 BAC、BMA 和 BHA 也有同样的代谢方式。BAC、BMA 和 BHA 在人肝微粒体的作用下,主要通过脱甲基、羟基化、脱氢去甲基和脱乙基等方式,分别产生 7、8 和 9 个代谢产物,主要受 CYP3A4/5 代谢酶的影响^[14]。但是,AC 和 MA 和 HA 的二级水解产物乌头原碱、中乌头原碱和次乌头原碱却几乎不被肝脏代谢。文献报道乌头类生物碱的毒性归因于 C8 位的乙酰基,C14 位的苯甲酰基,C1、C6、C16 和 C18 位的甲氧基,这些基团的解离可降低其毒性。从结构推断,乌头类生物碱的去甲基,脱氢去甲基代谢产物与原型相比,毒性可能降低。

综上所述,附子主要有效/有毒成分在肝脏中主要被 CYP3A4/5 代谢,代谢率为 AC、MA、HA > BAC、BMA、BHA > aconine、mesaconine、hypaconine,表明生物碱的毒性越大,越容易被机体代谢,降低毒性,再排出

体外。

2.2.2 附子有效成分的体内代谢研究 研究发现 AC 在大鼠体内血药浓度低,吸收极为迅速,并且代谢较快。大鼠经口服给药 AC(0.2 mg/kg)后,其达峰浓度(C_{max})、达峰时间(T_{max})和消除半衰期($T_{1/2}$)分别为 9.66 ng/mL、46 min 和 77.18 min^[3,15]。此外,大鼠尾静脉给药 AC、MA 和 HA(各 0.6 μg/kg)后,在大鼠体内不仅检测到了 AC、MA 和 HA,还检测到了 BAC、BMA、BHA、aconine 和 mesaconine,表明高毒性的双酯型生物碱在体内可被代谢为毒性较低的单酯型生物碱和原碱型生物碱。而且 AC、MA 和 HA 在体内的消除比他们的代谢产物 BAC、BMA、BHA、aconine 和 mesaconine 快得多(2.6~7.5 倍),预示着毒性越大的乌头类生物碱被机体消除的速率越快^[9]。

Tazawa 等人^[16]也考察了大鼠尾静脉给药 AC(0.02 mg/kg)后血浆中 AC 的药动学特征,发现 AC 血药浓度在 1 h 内迅速下降,之后缓慢下降。同样,大鼠灌胃给药 AC(0.1 mg/kg 和 1 mg/kg)都显示 AC 消除迅速($T_{max}=45$ min),且血药浓度低。大量实验表明乌头类生物碱在大鼠体内吸收极为迅速,并且代谢较快,生物利用度低^[17]。

3 附子提取物及其有效成分对 CYP450 酶的影响

近年来,有关中药与中药之间,中药与化学药物之间基于代谢性相互作用的报道越来越多^[18]。临床上,附子一般与其他中药配伍使用,以达到“减毒增效”的作用。研究表明,AC 在人和大鼠体内,其主要代谢途径都是以水解代谢和脱甲基代谢、羟化代谢及脱氢代谢为主,这些代谢途径主要由 CYP3A 介导^[19]。通过体内探针法,大鼠体外肝微粒体孵育法和 Western-blot 技术,结果表明无论是单次口服 AC(0.125mg/kg)还是连续 7 d 口服 AC(0.125mg/kg)后,AC 对 CYP3A 的活性和蛋白表达均未产生显著性影响,提示临床上 AC 暴露不会增加基于代谢性的药物相互作用发生的危险^[20]。Yamada 等^[21]利用大鼠体外肝微粒体孵育法,对大鼠连续 4 d 口服给药 AC(0.002 mg/kg),AC 并没有显著改变 CYP3A 的活性。毕云枫等^[22]通过超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)的多反应监测(MRM)技术,结合多探针底物方法,对单酯型及双酯型乌头类生物碱组分对细胞色素 P450 亚型的活性影响进行了研究,结果表明单酯型生物碱组分对 CYP2C 及 CYP2D 的抑制能力较强,双酯型生物碱组分对 CYP1A2、CYP3A、CYP2C 和 CYP2D 有较弱的抑制作用。

此外,许多研究者开展了附子或乌头提取物对

CYP450 的影响。石苏英等^[23]采用高效液相色谱、蛋白质免疫印迹和反转录聚合酶链式技术,发现乌头水提物能显著降低 CYP1A2、CYP2E1、CYP3A1/2 的活性,而对其蛋白表达无明显影响。葛卫红等^[24]研究证实,乌头水提物能抑制 CYP1A2 和 CYP2E1 的活性,但诱导 CYP3A4 活性。来硕等^[25]研究报道,0~0.5 mg/mL 浓度范围的附子水提物时大鼠 CYP3A 具有诱导作用且呈现浓度依赖性,但在浓度 0.50~1.00 mg/mL 的范围内,其诱导作用开始减弱。

4 附子毒性研究

附子用之不当,易发生不良反应和中毒事件。因为附子中二萜生物碱尤其是双酯型二萜生物碱有很强的毒性,主要表现为神经毒性和心脏毒性^[26]。在小鼠中,AC、MA 和 HA 的半数致死量(LD₅₀)分别为 1.8、1.9 和 5.80 mg/kg^[3,27]。研究发现,在小鼠中,AC5%致死量(LD₅)和半数致死量(LD₅₀)分别为 0.2602 和 2.01 mg/kg,进一步验证了乌头碱的巨大毒性^[28]。因此,临床应用附子必须经过炮制,炮制过程可使高毒性的双酯型二萜类生物碱水解为低毒性(毒性低 100 倍以上)的单酯型二萜类生物碱和原碱型二萜类生物碱,从而达到减毒增效的作用。

5 小结

综上所述,附子提取物及其有效/有毒成分的生物利用度屏障由药物代谢酶和外排转运蛋白组成,此屏障能减低附子的毒性,起到减毒的作用,但也是导致附子生物利用度低的重要原因之一。附子有效成分在体内消除迅速,在体内残留少,它的不良反应大多由急性毒性造成,多剂量给药并没有增加附子的毒性,长期服用不会引起蓄积中毒。对附子及其有效/有毒成分进行药代动力学研究,可为附子的临床有效和安全用药提供依据。

参考文献

- [1] Peng WW, Li W, Li JS, et al. The effects of Rhizoma Zingiberis on pharmacokinetics of six Aconitum alkaloids in herb couple of Radix Aconiti Lateralis - Rhizoma Zingiberis[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 148(2): 579-586.
- [2] Zhang F, Tang MH, Chen LJ, et al. Simultaneous quantitation of aconitine, mesaconitine, hypaconitine, benzoyleaconine, benzoylmesaconine and benzoylhypaconine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and pharmacokinetics evaluation of "SHEN-FU" injectable powder[J]. J Chromatogr B, 2008, 873(2): 173-179.
- [3] Tang L, Gong Y, Lv C, et al. Pharmacokinetics of aconitine as the targeted marker of Fuzi(Aconitum carmichaeli) following single and multiple oral administrations of Fuzi extracts in rat by UPLC/MS/MS[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 141(2): 736-741.

- [4] Ye L, Yang X, Yang Z, et al. The role of efflux transporters on the transport of highly toxic aconitine, mesaconitine, hyaconitine, and their hydrolysates, as determined in cultured Caco-2 and transfected MDCKII cells[J]. *Toxicol Lett*, 2013, 216(2-3): 86-99.
- [5] Yang C, Zhang T, Li Z, et al. P-glycoprotein is responsible for the poor intestinal absorption and low toxicity of oral aconitine: In vitro, in situ, in vivo and in silico studies[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 273(3): 561-568.
- [6] Yang C, Li Z, Zhang T, et al. Transcellular transport of aconitine across human intestinal Caco-2 cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 57: 195-200.
- [7] Zhang JM, Liao W, He YX, et al. Study on intestinal absorption and pharmacokinetic characterization of diester diterpenoid alkaloids in precipitation derived from fuzi-gancao herb-pair decoction for its potential interaction mechanism investigation[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 147(1): 128-135.
- [8] Li N, Tsao R, Sui Z, et al. Intestinal transport of pure diester-type alkaloids from an aconite extract across the Caco-2 cell monolayer model[J]. *Planta Med*, 2012, 78(7): 692-697.
- [9] Ye L, Gao S, Feng Q, et al. Development and validation of a highly sensitive UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of aconitine, mesaconitine, hyaconitine, and five of their metabolites in rat blood and its application to a pharmacokinetics study of aconitine, mesaconitine, and hyaconitine[J]. *Xenobiotica*, 2012, 42(6): 518-525.
- [10] Wang Y, Wang S, Liu Y, et al. Characterization of metabolites and cytochrome P450 isoforms involved in the microsomal metabolism of aconitine[J]. *J Chromatogr B*, 2006, 844(2): 292-300.
- [11] Tang L, Ye L, Lv C, et al. Involvement of CYP3A4/5 and CYP2D6 in the metabolism of aconitine using human liver microsomes and recombinant CYP450 enzymes[J]. *Toxicol Lett*, 2011, 202(1): 47-54.
- [12] Ye L, Tang L, Gong Y, et al. Characterization of metabolites and human P450 isoforms involved in the microsomal metabolism of mesaconitine[J]. *Xenobiotica*, 2011, 41(1): 46-58.
- [13] Ye L, Wang T, Yang C, et al. Microsomal cytochrome P450-mediated metabolism of hyaconitine, an active and highly toxic constituent derived from Aconitum species[J]. *Toxicol Lett*, 2011, 204(1): 81-91.
- [14] Ye L, Yang XS, Lu LL, et al. Monoester-Diterpene Aconitum Alkaloid Metabolism in Human Liver Microsomes; Predominant Role of CYP3A4 and CYP3A5[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/941093>.
- [15] Fan YF, Xie Y, Liu L, et al. Paeoniflorin reduced acute toxicity of aconitine in rats is associated with the pharmacokinetic alteration of aconitine[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 141(2): 701-708.
- [16] Tazawa T, Zhao HQ, Li Y, et al. A new enzyme immunoassay for aconitine and its application to quantitative determination of aconitine levels in plasma[J]. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26(9): 1289-1294.
- [17] Chen L, Yang J, Davey AK, et al. Effects of diammonium glycyrrhizinate on the pharmacokinetics of aconitine in rats and the potential mechanism[J]. *Xenobiotica*, 2009, 39(12): 955, 963.
- [18] Izzo AA, Ernst E. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: an updated systematic review[J]. *Drugs*, 2009, 69(13): 1777-1798.
- [19] Tang L, Ye L, Lv C, et al. Involvement of CYP3A4/5 and CYP2D6 in the metabolism of aconitine using human liver microsomes and recombinant CYP450 enzymes[J]. *Toxicol Lett*, 2011, 202(1): 47-54.
- [20] Zhu L, Yang X, Zhou J, et al. The exposure of highly toxic aconitine does not significantly impact the activity and expression of cytochrome P450 3A in rats determined by a novel ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method of a specific probe buspirone[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 51: 396-403.
- [21] Yamada H, Nakamura T, Oguri K. Induction of rat hepatic cytochromes P450 by toxic ingredients in plants: lack of correlation between toxicity and inductive activity[J]. *J Toxicol Sci*, 1998, 23(5): 395-402.
- [22] 毕云枫, 刘舒, 李雪, 等. 乌头类生物碱组分在 CYP450 中的代谢指纹图谱及对 CYP450 活性的影响[J]. *高等学校化学学报*, 2013, 34(9): 2084-2089.
- [23] 石苏英, 金科涛, 沈建幸, 等. 贝母、乌头合用对大鼠肝脏 CYP450 的调控作用[J]. *中国医院药学杂志*, 2007, 27(8): 1013-1016.
- [24] 葛卫红, 赵晓英, 林洁, 等. 浙江不同产地浙贝配伍乌头对大鼠肝细胞色素 P450 重要同工酶含量的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2010, 28(2): 300-303.
- [25] 来硕, 王春梅, 刘华凤. 黄柏和附子及其单体成分对 CYP3A 活性的影响[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(6): 1404-1406.
- [26] Van Landeghem AA, De Letter EA, Lambert WE, et al. Aconitine involvement in an unusual homicide case[J]. *Int J Legal Med*. 2007, 121(3): 214-219.
- [27] Singh S, Fadnis PP, Sharma BK. Aconite poisoning[J]. *J Assoc Physicians India*, 1986, 34(11): 825-826.
- [28] Wada K, Nihira M, Hayakawa H, et al. Effects of long-term administrations of aconitine on electrocardiogram and tissue concentrations of aconitine and its metabolites in mice[J]. *Forensic Sci Int*, 2005, 148(1): 21-29.

(2014-01-06 收稿 责任编辑:洪志强)