

黄芩素、槲皮素、高良姜素对黄嘌呤氧化酶 靶点占有率的模拟分析

杨海洋¹, 汪国鹏², 杨文宁¹, 李雪岩¹, 森慕黎¹, 江晓泉¹, 王静³, 刘洋^{1*}

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488;

2. 中财瀚熙(北京)生物科技发展有限公司, 北京 101503;

3. 北京大学药学院天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191)

[摘要] 目的:模拟分析黄芩素、槲皮素、高良姜素对黄嘌呤氧化酶体内靶点占有率。方法:通过体外酶促反应测定非布司他、黄芩素、槲皮素、高良姜素对黄嘌呤氧化酶的半数抑制浓度(IC₅₀),利用分子对接技术对其结合自由能进行预测,同时,采用表面等离子共振技术测定其结合速率常数(k_{on})和解离速率常数(k_{off})。基于测定的结合动力学参数和提取的药物代谢动力学数据建立体内靶点占有率模型。结果:非布司他、黄芩素、槲皮素、高良姜素对黄嘌呤氧化酶的IC₅₀分别为0.002 7, 1.63, 0.38, 1.59 μmol·L⁻¹,非布司他的IC₅₀与文献报道一致。预测的非布司他体内靶点占有率曲线与其临床药效持续时间相吻合。当大鼠按100 mg·kg⁻¹单次灌胃给予槲皮素长循环脂质体时,体内靶点占有率>70%的持续时间约3.9 h;当大鼠按200 mg·kg⁻¹单次口服给予黄芩素和高良姜素时,体内靶点占有率>50%的持续时间分别约为10, 1.7 h。结论:利用药靶结合动力学和体内药代动力学曲线建立的黄嘌呤氧化酶靶点占有率预测模型能有效地评估化合物对靶点的体内抑制活性。

[关键词] 黄嘌呤氧化酶; 靶点占有率; 药靶结合动力学; 结合速率常数(k_{on}); 解离速率常数(k_{off}); 半数抑制浓度(IC₅₀); 表面等离子共振(SPR)

[中图分类号] R22;R857.3;R28;O6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)14-0147-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210485

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210111.1427.004.html>

[网络出版日期] 2021-01-12 10:55

Simulation Analysis of Occupancy Rates of Baicalein, Quercetin and Galangin on Target Sites of Xanthine Oxidase

YANG Hai-yang¹, WANG Guo-peng², YANG Wen-ning¹, LI Xue-yan¹, SEN Mu-li¹,
JIANG Xiao-quan¹, WANG Jing³, LIU Yang^{1*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;

2. Zhongcai Hanxi (Beijing) Biological Technology Development Co. Ltd., Beijing 101503, China;

3. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences,
Peking University, Beijing 100191, China)

[Abstract] **Objective:** To simulate the occupancy rates of baicalein, quercetin and galangin on the target sites of xanthine oxidase *in vivo*. **Method:** In this experiment, the half inhibitory concentration (IC₅₀) of febuxostat, baicalein, quercetin and galangin against xanthine oxidase were determined by *in vitro* enzymatic reaction. Binding free energy was predicted by molecular docking technology and their association rate constant (k_{on}) and dissociation rate constant (k_{off}) were determined by surface plasmon resonance technology. Based on

[收稿日期] 20201110(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81973295)

[第一作者] 杨海洋,在读硕士,从事药物代谢与药靶结合研究,E-mail:yanghaiyang_bucm@163.com

[通信作者] *刘洋,教授,博士,从事药物代谢与药靶结合研究,E-mail:liuyang@bucm.edu.cn

measured binding kinetic parameters (k_{on} and k_{off}) and extracted pharmacokinetic data, the target occupancy model *in vivo* was established. **Result:** The IC_{50} values of febuxostat, baicalein, quercetin and galangin were 0.002 7, 1.63, 0.38, 1.59 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The IC_{50} of febuxostat was very close to that reported in the literature. The predicted curve of target occupancy rate *in vivo* of febuxostat was consistent with its duration of clinical efficacy. When single intragastric administration of long-circulating liposomes of quercetin with dose of 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ in rats, the time of target occupancy rate $>70\%$ *in vivo* lasted for about 3.9 h. When rats were orally administered baicalein and galangin with dose of 200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, the time of target occupancy rate $>50\%$ *in vivo* lasted for about 10 h and 1.7 h, respectively. **Conclusion:** The prediction model of xanthine oxidase target occupancy constructed by drug target binding kinetics and *in vivo* pharmacokinetic curves can effectively evaluate the *in vivo* inhibitory activity of compounds against the target.

[**Keywords**] xanthine oxidase; target occupancy; drug target binding kinetics; association rate constant (k_{on}); dissociation rate constant (k_{off}); half inhibitory concentration (IC_{50}); surface plasmon resonance (SPR)

痛风是由于人体血液中尿酸增多,导致尿酸盐在周围关节处沉积,引发机体产生炎症反应的疾病^[1]。从中医角度来看,痛风属于痹证,与体内湿气过多、寒邪侵袭等因素有关^[2]。中医通过辨证施治,对痛风的不同病证采取不同的治疗方法,通常选用清热解毒、散寒通络、化痰止痛的中药配伍治疗^[3-6]。黄芩、金钱草可清热解毒,高良姜可散寒通络止痛,常与其他中药配伍使用,用于痛风的治疗^[7-9]。黄芩素、槲皮素、高良姜素分别为黄芩、金钱草、高良姜的主要有效成分^[10],均对黄嘌呤氧化酶具有良好的体内或体外抑制活性^[11-13]。

黄嘌呤氧化还原酶是一种可催化黄嘌呤生成尿酸的酶,是治疗痛风和高尿酸血症的重要靶标^[14]。目前,抑制剂与酶的体外活性研究多侧重于测定其半数抑制浓度(IC_{50})和抑制类型等,但近年来研究逐渐发现,很多化合物体外测定的 IC_{50} 与体内药效相关性较差,这主要是因为药物在机体内的实际状况并不是处于封闭的恒定状态,而是血药浓度和机体内环境不断变化的开放状态^[15],所以在封闭系统下测定的 IC_{50} 不能很好地对应于机体开放系统的药效活性。在这样的背景下,相关研究人员开始探索药物与靶点结合的动力学过程与临床药效活性的关联。2000年前后,研究人员发现药物与靶点的结合、解离过程与药物体内药效具有相关性,此后,国际制药公司和科研院所的科研人员一直在努力研究这个方向,试图建立可以进行数学评价的整体方法。例如,WALKUP等^[16]利用结合动力学参数开发了一种机制性的药代动力学-药效动力学(PK-PD)模型并成功预测6个脱乙酰基酶(LpxC)抑制剂在感染动物模型中的驻留时间和体内抗菌

药效的关系;GEORGI等^[17]借助结合动力学参数和PK模型表征了270种蛋白激酶抑制剂与40种临床相关靶标的相互作用。

模拟药物与靶点结合的动力学过程,需要获取结合动力学参数[结合速率常数(k_{on})和解离速率常数(k_{off})]。表面等离子共振(SPR)是一种实时的、无标记的活性分子互作分析技术^[18],可用于酶结合动力学参数 k_{on} 和 k_{off} 的测定,并于2016年被正式收录至《美国药典》和《日本药典》^[19-20]。本实验采用体外酶促反应测定非布司他、黄芩素、槲皮素、高良姜素对黄嘌呤氧化酶的 IC_{50} ,借助分子对接技术对其结合自由能进行预测,同时,利用SPR技术测定其结合动力学参数。基于测定的结合动力学参数和提取的药代动力学数据建立体内靶点占有率模型,评估各化合物对黄嘌呤氧化酶体内占有水平的动态过程,以期对中药临床用药和治疗痛风药物的开发提供参考。

1 材料

TU-1810型紫外-可见分光光度计(北京普析通用有限责任公司),Biacore S200型等离子共振仪(通用电气医疗生物科学有限公司),Starter 2100型pH计(深圳市展华仪器仪表有限公司),BT125D型电子分析天平[赛多利斯仪器系统(北京)有限公司]。

黄嘌呤[阿拉丁试剂(上海)有限公司,批号B1921090,纯度98%],黄嘌呤氧化酶、乙醇胺[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,批号分别为SLCB1289,398136,纯度分别为 $\geq 99.5\%$, $\geq 99\%$],二甲基亚砜(DMSO,天津百伦斯生物技术有限公司,批号20180515,纯度 $>99\%$),槲皮素、高良姜素、黄

芩素对照品(上海诗丹德标准技术服务有限公司,批号分别为1116,107,1873,纯度分别为>95%,≥98%,≥98%),非布司他(febugostat)对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号Y16O8C45697,纯度98%);S系列CM5芯片,乙酸钠(pH 4.5),磷酸盐缓冲液(PBS)-P+ buffer(10×)和氨基偶联试剂盒(通用电气医疗生物科学有限公司,批号分别为10280904, BR-1003-50, 28-9950-84, BR-1000-50)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 PBS 称取氯化钠22.5 g,十二水合磷酸氢二钠7.32 g,二水合磷酸二氢钠0.97 g和乙二胺四乙酸二钠37.44 mg置同一烧杯内,加去离子水400 mL超声使溶解,用1 μmol·L⁻¹ NaOH溶液调pH至7.5,转移至500 mL量瓶中,加去离子水定容至刻度,即得。

2.1.2 黄嘌呤氧化酶溶液 取一支黄嘌呤氧化酶溶液置于25 mL的量瓶内,用适量PBS稀释,配制成1 μmol·L⁻¹的母液。

2.1.3 黄嘌呤溶液 精密称取黄嘌呤11.41 mg于烧杯内,加少量NaOH溶液超声使溶解,加入适量PBS,用稀释后的HCl溶液调pH至7.5,然后转移至100 mL量瓶中,加PBS定容,配制成0.75 mmol·L⁻¹黄嘌呤母液。

2.1.4 对照品溶液 精密称取非布司他15.81 mg,黄芩素11.39 mg,高良姜素13.51 mg,以及槲皮素15.11 mg,置于5 mL量瓶中,分别用DMSO超声使溶解并定容至刻度,得各对照品母液。

2.2 酶促反应体系建立

2.2.1 酶活稳定性考察 反应总体积5 mL,先加入0.75 mmol·L⁻¹黄嘌呤溶液1 mL和PBS 3.8 mL,然后加入1 μmol·L⁻¹黄嘌呤氧化酶溶液0.2 mL启动反应,室温反应10 min,于298 nm处测定吸光度A。分别于不同时间点(0, 2, 4, 6, 8 h)重复上述操作测定A,结果在8 h内A的RSD<5%,说明酶活在8 h内基本稳定。

2.2.2 酶终浓度考察 将底物终浓度固定配制为250 μmol·L⁻¹,配制一系列不同酶终浓度的反应体系,反应10 min后于298 nm处测定A。以A对酶终浓度进行线性拟合,结果发现当酶终浓度为2.88~43.2 nmol·L⁻¹时,A与酶终浓度呈良好线性关系,根据实验需要最终选择酶终浓度4 nmol·L⁻¹。

2.2.3 底物终浓度的考察 将酶终浓度固定配制为4 nmol·L⁻¹,配制一系列不同底物终浓度的反应体系,反应10 min后于298 nm处测定A,计算酶反

应速率(V)。考察不同底物终浓度对V的影响,结果V随底物终浓度增加逐渐增大,但增加速率逐渐减小而后趋于零。利用JMP 13.0软件对底物终浓度和酶反应速率进行拟合,计算酶的米氏常数(K_m)为17 μmol·L⁻¹。

2.3 IC₅₀的测定 固定酶终浓度4 nmol·L⁻¹,底物终浓度35 μmol·L⁻¹(底物终浓度由2K_m计算得到),分别配制系列不同终浓度非布司他、黄芩素、槲皮素、高良姜素的酶促反应体系,加酶溶液启动反应,室温反应6 min,以只有底物黄嘌呤的缓冲液作为空白,于298 nm处测定A,并将不加抑制剂时的A记为A₀,加抑制剂时的A记为A_i。按公式抑制率=(A₀-A_i)/A₀×100%计算抑制率。利用GraphPad Prism 8.3.0软件对抑制剂浓度和相应的抑制率拟合,计算各化合物的IC₅₀,结果发现黄芩素、槲皮素、高良姜素的IC₅₀分别为1.63, 0.38, 1.59 μmol·L⁻¹;阳性药非布司他的IC₅₀为0.002 7 μmol·L⁻¹,与文献[21]报道十分接近,说明建立的酶促反应体系较为合理。

2.4 分子对接 从PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)数据库下载各化合物sdf格式文件,从蛋白质数据库RCSB PDB(<https://www1.rcsb.org>)下载黄嘌呤氧化酶PDB格式文件,利用Molecular Operating Environment 2019软件对蛋白去水加氢后进行分子对接,对接结果显示,非布司他、槲皮素、高良姜素、黄芩素与黄嘌呤氧化酶的结合自由能分别为-23.03, -19.21, -17.80, -18.16 kcal·mol⁻¹(换算方式为1 cal=4.186 J)。结合自由能越低,表示抑制剂与酶越容易结合,所形成的复合物越稳定。

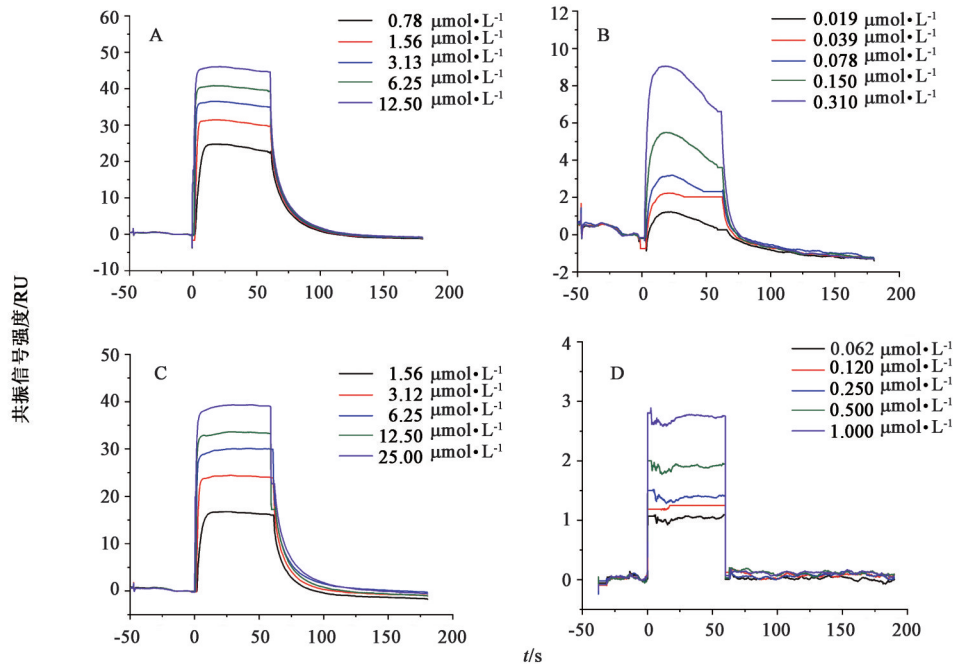
2.5 结合动力学参数的测定

2.5.1 芯片活化与蛋白固定 将羧基活化试剂1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)与交联试剂N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)按1:1混匀,流经CM5传感器芯片以活化芯片表面。用pH 4.5的乙酸钠配制50 mg·L⁻¹黄嘌呤氧化酶溶液,在25 °C下运行氨基偶联试剂和PBS-P+ buffer将酶偶联固定在CM5芯片上。偶联之后,固定化水平为13 000 RU(共振单位,1 RU响应值大致等于芯片表面结合物质浓度1 μg·m⁻²变化),未与NHS反应的羧基用乙醇胺封闭。对于参比通道,只活化并封闭芯片表面,不偶联固定黄嘌呤氧化酶,以校正化合物与芯片表面的非特异性结合对实验结果的影响。

2.5.2 动力学参数的测定 将DMSO体积分数分别为4.5%和5.8%的PBS-P+ buffer按不同比例混匀配成6个不同体积分数DMSO的校正溶剂,以校正

仪器响应信号。用PBS-P+ buffer将各对照品母液稀释成含5% DMSO的对照品溶液,接着用5% DMSO的PBS-P+ buffer参考IC₅₀分别稀释,配制一系列不同浓度的供试样品溶液。以含5% DMSO的PBS-P+ buffer为流动相,含50% DMSO的PBS-P+ buffer作为冲洗剂,以非布司他作为阳性对照,按照预设的方法进行结合动力学参数测定。各化合物的结合动力学曲线见图1,结果发现酶结合动力学

曲线随着抑制剂浓度的增加呈明显变化,说明抑制剂浓度范围设置比较合理。使用Biacore T200将数据集按结合模型或稳态模型1:1进行拟合分析,计算获得各化合物的结合动力学参数(k_{on},k_{off})和亲和力参数[平衡解离常数(K_d)],见表1。结果非布司他的k_{on}与k_{off}分别为7.47×10⁷ mol·L⁻¹·s⁻¹,0.015 3 s⁻¹;黄芩素、槲皮素、高良姜素的K_d均处于1×10⁻⁵~1×10⁻¹²,表明三者均具有较强的亲和力。



A. 槲皮素;B. 高良姜素;C. 黄芩素;D. 非布司他

图1 各物质的表面等离子共振信号

Fig. 1 Surface plasmon resonance signal of each compound

表1 各化合物的动力学参数

Table 1 Kinetic parameters of each compound

化合物	k _{on} /mol·L ⁻¹ ·s ⁻¹	k _{off} /s ⁻¹	K _d /mol·L ⁻¹
槲皮素	2.669×10 ⁵	0.054 74	2.051×10 ⁻⁷
黄芩素	6.027×10 ⁵	0.057 13	9.478×10 ⁻⁷
高良姜素	4.250×10 ⁵	0.076 00	1.809×10 ⁻⁷
非布司非	7.470×10 ⁷	0.015 30	2.050×10 ⁻¹⁰

2.6 药物-黄嘌呤氧化酶占有率预测模型研究 药物要达到理想的治疗效果需要满足2个条件:①能够占据足够多的靶点;②维持足够长的占靶时间。因此,选择靶点占有率水平和一定占靶水平的持续时间为评价指标,以非布司他为阳性对照,建立黄酮类化合物黄芩素、槲皮素、高良姜素的大鼠体内靶点占有率模型,探讨不同给药剂量和剂型对体内靶点占有率动态过程的影响。

2.6.1 体内占有率模型的建立 利用GetData 2.20

软件从文献提取非布司他^[22]、槲皮素^[23-24]、黄芩素^[25]、高良姜素^[26]口服给药的血浆药时曲线数据,通过查阅各化合物的解离常数(pKa)和油水分配系数(lgP)^[27-29],按公式 $K_{pu}=X \times f_{iw} / Y + f_{ew} + [P \times f_{NL} + (0.3 \times P + 0.7) \times f_{NP,P}] / Y + \{1 / fu - 1 - [P \times f_{NL,P} + (0.3 \times P + 0.7) \times f_{NP,P}] / Y\} \times [PR]_T / [PR]_p$ 采用Rodgers机制方程计算组织-血浆游离分数(K_{pu})^[30-31],接着利用公式 $K_p = K_{pu} \times fu$, $fu_T = X \times fu / (Y \times K_p)$, $C_t = C \times K_p \times fu_T$ 计算得到各化合物肝脏游离药物的药时曲线^[32-35]。基于游离药物药时曲线数据和结合动力学参数(k_{on}和k_{off})借助公式 $[EI]_t = (k_{on} \times C_{(t)} \times [E]_0) / (k_{on} \times C_{(t)} + k_{off}) \times [1 - e^{-(k_{on} \times C_{(t)} + k_{off}) \times t}]$ 和公式 $[TO]_t = [EI]_t / [E]_0 \times 100\%$ ^[36],计算得到药靶占有率随时间的变化曲线,建立非布司他、黄芩素、槲皮素、高良姜素的体内黄嘌呤氧化酶占有率预测模型。对于弱酸化合物而言, $X = 1 + 10^{pH_{iw} - pK_a}$, $Y = 1 + 10^{pH_p - pK_a}$,其中pH_p=7.4,pH_{iw}=7;f_{iw},

f_{EW}, f_{NL}, f_{NP} 分别为肝组织细胞内水体积系数、细胞外水体积系数、中性脂质体积系数、中性磷脂体积系数, $f_{NL,P}$ 和 $f_{NP,P}$ 分别为血浆中中性脂质体积系数和中性磷脂体积系数, $[PR]_T$ 和 $[PR]_P$ 分别为组织中白蛋白或脂蛋白的浓度、血浆中白蛋白或脂蛋白的浓度, 其值源于文献[30-31]; P 为化合物在正辛醇和水中分配系数的比值, K_p 为组织-血浆平衡分配系数, K_{pu} 为组织-血浆游离分数, f_u 为血浆游离药物百分数, f_{uT} 为组织内游离药物百分数, C_t 为不同时间点 t 的肝脏组织内游离药物浓度, C 为血浆药物浓度, $[EI]_t$ 为不同时间点 t 的酶-抑制剂复合物浓度, $[E]_0$ 为初始酶浓度, $C_{(t)}$ 为不同时间点 t 的靶点附近游离药物浓度, $[TO]_t$ 为靶点占有率。

2.6.2 体内占有率模型验证 选择具有明确黄嘌呤氧化酶抑制机制的临床常用于治疗痛风和高尿酸血症的上市药物非布司他对模型进行验证。基于 2.6.1 项下方法和公式, 以非布司他临床口服剂量 80 mg 建立体内药靶占有率模型, 见图 2(A)。结果发现非布司他给药后约 0.5 h 能够对黄嘌呤氧化酶达到 100% 的占有, 并维持 80% 以上占有率的时间约 18.5 h, 与其在临床上的实际药效表现和给药间隔(每天 1 次)基本相吻合^[37], 表明该模型建立成功, 可用于预测化合物与黄嘌呤氧化酶体内靶点占有水平的动态过程分析。

2.6.3 单次给予高良姜素的体内靶点占有率时间曲线 从文献[26]获取药时曲线数据, 并基于线性动力学假设和 2.6.1 项下方法和公式, 模拟按剂量 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 单次给予高良姜素后, 大鼠体内黄嘌呤氧化酶靶点占有率的预测时间曲线, 见图 2(B)。结果发现大鼠给予高良姜素后, 在 1.4 h 时对黄嘌呤氧化酶的靶点占有率达到最大, 为 72%, 能维持靶点占有率达到 50% 以上的持续时间约 1.7 h。

2.6.4 单次给予黄芩素的体内靶点占有率时间曲线 从文献[25]提取药时曲线数据, 按 2.6.1 项下公式模拟按剂量 $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 单次给予黄芩素后, 大鼠体内黄嘌呤氧化酶占有率预测时间曲线见图 3(A)。结果发现大鼠体内黄嘌呤氧化酶占有率随时间呈双峰趋势, 这与黄芩素的血浆药时曲线呈双峰趋势有关; 基于线性动力学假设, 调整黄芩素的给药剂量为 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 见图 3(B), 结果发现大鼠体内黄嘌呤氧化酶的占有率达 50% 以上的持续时间约 10 h。

2.6.5 单次给予槲皮素的体内靶点占有率时间曲线 基于线性动力学假设和 2.6.1 项下方法和公式,

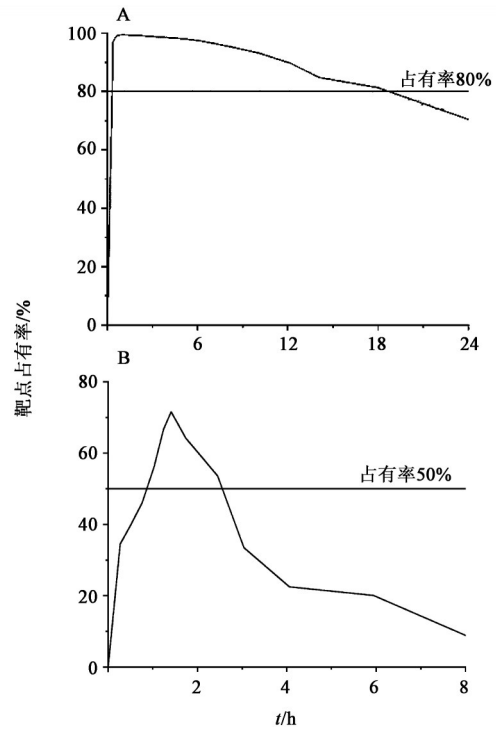
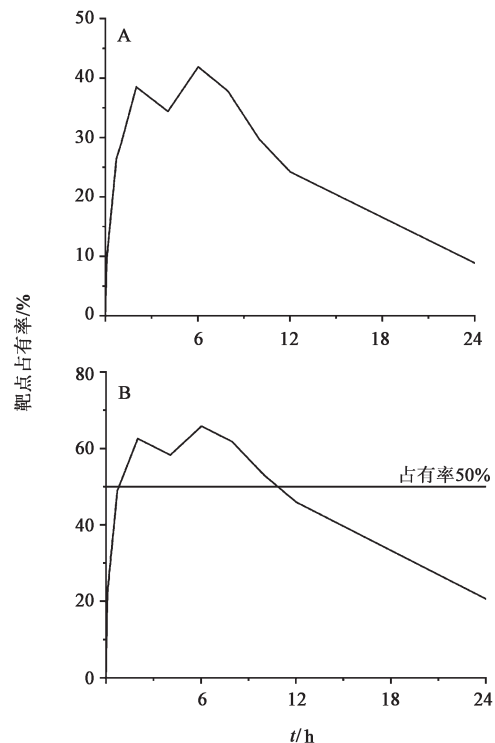


图2 非布司他(A)与高良姜素(B)的体内靶点占有率曲线
Fig. 2 *In vivo* target occupancy curves of febuxostat (A) and galangin (B)



A. 剂量 $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; B. 剂量 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
图3 黄芩素的体内靶点占有率曲线
Fig. 3 *In vivo* target occupancy curves of baicalin

模拟大鼠给药槲皮素后的体内靶点占有率。按照剂量 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 单次灌胃给予槲皮素后, 大鼠体内

黄嘌呤氧化酶占有率预测时间曲线见图4(A)。结果发现在0.66 h时,靶点占有率达到最大,为50%。当大鼠按剂量 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 单次灌胃给予槲皮素长循环脂质体后,槲皮素对黄嘌呤氧化酶的靶点占有率预测曲线见图4(B),结果发现其对黄嘌呤氧化酶的最大占有率可达86%,占有率达70%以上的持续时间约3.9 h。

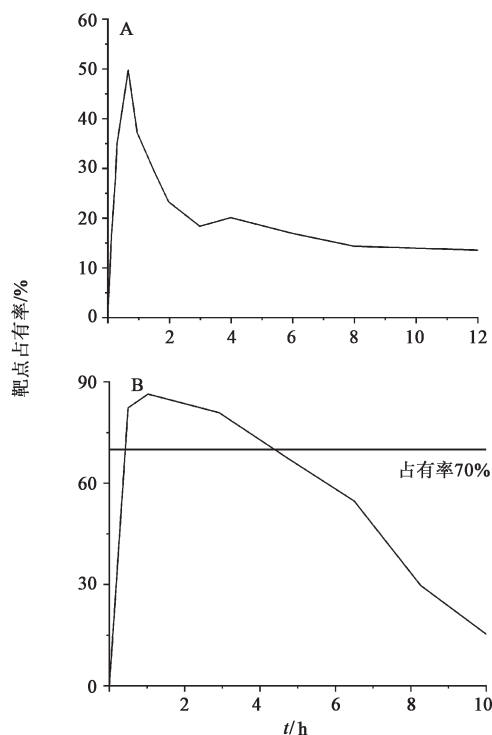


图4 槲皮素(A)和槲皮素长循环脂质体(B)的体内靶点占有率曲线
Fig. 4 *In vivo* target occupancy curves of quercetin (A) and long-circulating liposomes of quercetin (B)

3 讨论

本文利用体外酶促反应试验测定了非布司他、黄芩素、槲皮素、高良姜素对黄嘌呤氧化酶的 IC_{50} ,借助分子对接技术对其结合自由能进行预测,采用SPR技术测定四者的结合动力学参数 k_{on} 和 k_{off} ,并基于测定的结合动力学参数和提取的药代动力学数据建立体内靶点占有水平动态模型,评估各化合物对黄嘌呤氧化酶体内抑制的动态过程。结果发现黄芩素和高良姜素的 IC_{50} 较为接近,槲皮素的 IC_{50} 较二者小;大鼠分别单次灌胃给予相同剂量的黄芩素和高良姜素($200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)时,黄芩素体内靶点占有率50%以上的持续时间约10 h,这与其存在肝肠循环而延长了血药浓度持续时间有关;高良姜素体内靶点占有率最高可达72%,而槲皮素长循环脂质体单次以 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量给药时,体内靶点占有率最

高可达86%,为3个化合物最大靶点占有率的最高值。本文建立的模型结合了体内药代动力学数据和药物靶标结合动力学数据,尽管可以更好地评估化合物的体内抑制活性,但也面临着靶点附近游离药物浓度的测定、体内靶点占有率的实测等技术难点,后续本课题组将尝试借助黄嘌呤氧化酶检测试剂盒测定大鼠给药后不同时间点肝脏黄嘌呤氧化酶的活性,以进行更深一步的研究。

目前以黄嘌呤氧化酶为靶点治疗痛风的药物有别嘌醇、托匹司他和非布司他。其中别嘌醇在体内主要以其活性代谢产物氧嘌呤醇发挥药效,故在用SPR测定结合动力学参数时,未考虑将其作为阳性对照药;托匹司他^[38]与非布司他^[39]均可选择作为阳性对照药,但由于相对于托匹司他来说,非布司他SPR测得的结合动力学参数与黄酮类化合物更为接近,故建模时选择非布司他作为阳性对照药进行模拟。

本研究同时采用了反应进度曲线和酶活恢复的实验方法测定了非布司他的动力学参数,结果 k_{on} 为 $(13.33\pm 3.5)\times 10^7\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, k_{off} 为 $\leq 0.16\times 10^{-5}\text{ s}^{-1}$ 。 k_{on} 与SPR的测定结果差异较小,但2个方法测得的 k_{off} 差异较大。由于黄酮类化合物受溶解度的限制和紫外吸收的影响,无法采用反应进度曲线和酶活恢复方法测定黄酮-抑制剂复合物的结合动力学参数。因此,在模拟计算时,非布司他和黄酮类化合物均采用SPR测得的结合动力学参数进行计算。

黄嘌呤氧化酶广泛分布于哺乳动物肝、肠、肺、肾、心、脑及血浆等部位,但主要在肝脏分布。药靶结合模型中药物浓度是指靶点附近游离药物浓度,因此,采用这些化合物在肝脏中游离药物浓度来模拟计算较为合理。由于肝脏游离药物浓度未能从文献直接获得,故本模型采用Rodgers机制方程先计算 K_{pu} ,再利用其他公式计算肝脏游离药物浓度,如果能获得或测得肝脏游离药物浓度值,将会在一定程度上增加数学模型的预测能力。

评估药物对酶的抑制作用的经典方法是采用 IC_{50} (或 K_d)进行评估,但这种方法只能反映药靶结合的平衡状态,不能反映整个药靶结合的动力学过程。靶点占有率数学模型是一个评价药物和靶点相互作用强有力的工具^[40]。此模型结合了化合物体内PK数据及药物与靶点结合、解离速率常数而建立,综合考虑了化合物的体内PK过程和药物靶标结合动力学过程^[41]。相比经典药靶结合评价方法(IC_{50} 评价法),利用药靶结合动力学模型^[42-43]更能

相对客观、有效地评估化合物对靶点的体内抑制活性,可为活性化合物的初步筛选提供新思路。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 曾小峰,陈耀龙. 2016中国痛风诊疗指南[J]. 浙江医学, 2017, 39(21):1823-1832.
- [2] 杨振博,张肖敏,赵梦慧. 中医药治疗痛风研究概述[J]. 光明中医, 2020, 35(15):2425-2428.
- [3] 梁晖,张意侗,解纪惠,等. 急性痛风性关节炎的中药治疗进展[J]. 中国中医急症, 2019, 28(3):553-556.
- [4] 彭磊. 基于数据挖掘的国医大师治疗痛风用药规律研究[J]. 河南中医, 2020, 40(10):1515-1518.
- [5] 吴双. 基于数据挖掘的赵进喜教授治疗高尿酸血症经验总结[D]. 北京:北京中医药大学, 2018.
- [6] 张涵雨,李艳. 国医大师李济仁治疗痹病用药规律分析[J]. 中医学报, 2020, 35(1):99-104.
- [7] 兰月. 高良姜抗痛风活性部位研究[D]. 武汉:中南民族大学, 2019.
- [8] 张玉萍. 黄芩巧治关节痛[J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(8):50-51.
- [9] 姚饒,何枢衡,唐英. 金钱草抗痛风活性组分的提取分离及药效筛选[J]. 中国现代中药, 2014, 16(12):985-988, 995.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015.
- [11] ZHU J X, WANG Y, KONG L D, et al. Effects of *Biota orientalis* extract and its flavonoid constituents, quercetin and rutin on serum uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 93:133-140.
- [12] 陈海青,周璇,王秀秀. 槲皮素治疗高尿酸血症的机制研究[J]. 光明中医, 2019, 34(9):1340-1344.
- [13] MENG X, MAO Z, LI X, et al. Baicalein decreases uric acid and prevents hyperuricemic nephropathy in mice[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25):40305-40317.
- [14] ELION G B. The purine path to chemotherapy (nobel lecture) [J]. *Angew Chem Int Edit*, 1989, 28(7):870-878.
- [15] COPELAND R A. The drug-target residence time model: a 10-year retrospective [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(2):87-95.
- [16] WALKUP G K, YOU Z P, ROSS P L, et al. Translating slow-binding inhibition kinetics into cellular and *in vivo* effects[J]. *Nat Chem Biol*, 2015, 11(6):416-423.
- [17] GEORGI V, SCHIELE F, BERGER B T, et al. Binding kinetics survey of the drugged kinome [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(46):15774-15782.
- [18] WILLEMSSEN-SEEGER N, UITDEHAAG J C M, PRINSEN M B W, et al. Compound selectivity and target residence time of kinase inhibitors studied with surface plasmon resonance [J]. *J Mol Biol*, 2017, 429(4):574-586.
- [19] The United States Pharmacopeial Convention. *The United States Pharmacopeia* [M]. 39th edition. Washington: US Pharmacopeia Origination Press, 2016.
- [20] Pharmaceuticals and Medical Devices Agency of Japan. *The Japanese Pharmacopoeia* [M]. 17th edition. Tokyo: The Ministry of Health, Labor and Welfare, 2016.
- [21] ŠMELCEROVIĆ A, TOMOVIĆ K, ŠMELCEROVIĆ Ž, et al. Xanthine oxidase inhibitors beyond allopurinol and febuxostat; an overview and selection of potential leads based on *in silico* calculated physico-chemical properties, predicted pharmacokinetics and toxicity [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 135:491-516.
- [22] CHANDU B R, KANALA K, HWISA N T, et al. Bioequivalence and pharmacokinetic study of febuxostat in human plasma by using LC-MS/MS with liquid liquid extraction method [J]. *Springerplus*, 2013, 2(1):194.
- [23] 王刚,杜士明,常明泉,等. 槲皮素长循环纳米脂质体的制备及大鼠体内药动学参数测定[J]. 医药导报, 2012, 31(10):1275-1278.
- [24] 张瑜,张富赓,张少强,等. 芪苈强心胶囊中芥子碱硫酸盐、槲皮素和山柰酚在大鼠体内的药动学研究 [J]. 中国药房, 2019, 30(15):2042-2046.
- [25] 何秀琼,裴利霞,王一涛,等. 高效液相色谱法研究大鼠灌胃黄芩素的药动学 [J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(22):1901-1905.
- [26] 李建梅,霍仕霞,高莉,等. 不同纯度高良姜素的药代动力学比较研究 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(9):1307-1310.
- [27] 何翊. 槲皮素及其衍生物在 Caco-2 细胞模型上的吸收机制的研究 [D]. 南昌:南昌大学, 2015.
- [28] LEMAŃSKA K, SZYMUSIAK H, TYRAKOWSKA B, et al. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones [J]. *Free Radical Bio Med*, 2001, 31(7):869-881.
- [29] 梁然,陈长慧,艾希成,等. 黄芩素与黄芩苷抗氧化活性差异的结构原因 [J]. 波谱学杂志, 2010, 27(1):132-140.
- [30] RODGERS T, ROWLAND M. Physiologically based

- pharmacokinetic modelling 2: predicting the tissue distribution of acids, very weak bases, neutrals and zwitterions[J]. *J Pharm Sci*, 2006, 95(6):1238-1257.
- [31] RODGERS T, LEAHY D, ROWLAND M. Physiologically based pharmacokinetic modeling 1: predicting the tissue distribution of moderate-to-strong bases[J]. *J Pharm Sci*, 2005, 94(6):1259-1276.
- [32] JAISWAL J V, WADEGAONKAR P A, HAJARE S W. The bioflavonoid galangin suppresses the growth of ehrlich ascites carcinoma in Swiss Albino mice: a molecular insight [J]. *Appl Biochem Biotech*, 2012, 167(5):1325-1339.
- [33] KHOSRAVAN R, KUKULKA M J, WU J T, et al. The effect of age and gender on pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of febuxostat, a novel nonpurine selective inhibitor of xanthine oxidase[J]. *J Clin Pharmacol*, 2008, 48(9):1014-1024.
- [34] TANG Y H, ZHU H Y, ZHANG Y Y, et al. Determination of human plasma protein binding of baicalin by ultrafiltration and high-performance liquid chromatography [J]. *Biomed Chromatogr*, 2006, 20(10):1116-1119.
- [35] BOULTON D W, WALLE U K, Walle T. Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1998, 50(2):243-249.
- [36] WANG G, JI Y, LI X, et al. Utilizing the combination of binding kinetics and micro-pharmacokinetics link *in vitro* α -glucosidase inhibition to *in vivo* target occupancy[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(9):493.
- [37] Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. Report on the deliberation results [EB/OL]. (2016-04-04) [2020-10-28]. <https://www.pmda.go.jp/files/000223355.pdf>
- [38] MATSUMOTO K, OKAMOTO K, ASHIZAWA N, et al. FYX-051: a novel and potent hybrid-type inhibitor of xanthine oxidoreductase[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 336(1):95-103.
- [39] OKAMOTO K, EGER B T, NISHINO T, et al. An extremely potent inhibitor of xanthine oxidoreductase. Crystal structure of the enzyme-inhibitor complex and mechanism of inhibition [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(3):1848-1855.
- [40] COPELAND R A. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists* [M]. 2nd edition. New York: John Wiley & Sons, Inc, 2013.
- [41] LU H, TONGE P J. Drug-target residence time: critical information for lead optimization[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2010, 14(4):467-474.
- [42] 刘志宝, 吴耽, 唐娟, 等. 辛芍组方效应成分在正常和脑缺血再灌注损伤大鼠肝微粒体中的酶促反应动力学分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(1):169-176.
- [43] COPELAND R A. The drug-target residence time model: a 10-year retrospective [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(2):87-95.

[责任编辑 刘德文]