

黄芩苷对大鼠和人肝微粒体 CYP450 酶的抑制作用

黄凯^{1*}, 刘志浩², 贺晴¹

(1. 南京医科大学 附属无锡市人民医院, 江苏 无锡 214023;
2. 大连医科大学 药学院, 辽宁 大连 116044)

[摘要] **目的:**观察黄芩苷对大鼠/人肝微粒体细胞色素 P450(CYP450)酶活性的抑制作用,比较种属差异性,评价其发生药物相互作用的可能性。**方法:**通过采用体外肝微粒体温孵体系结合特异性探针底物的方法,结合应用 LC-MS/MS 检测各探针底物的代谢物的生成量,质谱检测条件为电喷雾离子化(ESI)源,选择性反应监测(SRM)扫描方式,色谱分离条件为 ZORBAX Eclipse-plus C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm),流动相甲醇-0.1% 甲酸水溶液梯度洗脱,流速 0.2 mL·min⁻¹,计算半抑制浓度(IC₅₀)。**结果:**黄芩苷对大鼠肝微粒体 CYP450 酶 7 种亚型均无抑制作用,而对人肝微粒体 CYP1A2, CYP2C19 和 CYP2E1 有较弱的抑制作用,IC₅₀ 分别为 39.72, 40.91, 32.83 μmol·L⁻¹。**结论:**黄芩苷对 CYP450 酶的抑制作用存在种属差异性,是人 CYP1A2, CYP2C19, CYP2E1 的弱抑制剂,临床静脉用药时,应注意可能因 CYP450 酶抑制引起的药物相互作用。

[关键词] 黄芩苷; 细胞色素 P450 酶; 抑制作用; 药物相互作用

[中图分类号] R945; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)03-0020-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016030020

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151215.0910.004.html>

[网络出版时间] 2015-12-15 9:10

Inhibition of Baicalin on Activity of Cytochrome P450 Enzyme in Rat and Human Liver Microsomes

HUANG Kai^{1*}, LIU Zhi-hao², HE Qing¹

(1. Wuxi People's Hospital of Nanjing Medical University, Wuxi 214023, China;
2. College of Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate inhibition of baicalin on activity of cytochrome P450 (CYP450) enzyme in rat and human liver microsomes, and then compare species difference between them. In addition, possibility of drug interaction with baicalin was evaluated. **Method:** Liver microsomes combine with specific probe substrates were used *in vitro* and metabolites of substrates were determined by LC-MS/MS. The mass spectrometer was operated with electrospray ionization (ESI) and selective reaction monitoring (SRM) scan mode. Chromatographic separation was performed on a ZORBAX Eclipse-plus C₁₈ column with mobile phase of methanol-water (containing 0.1% formic acid) by gradient elution. Hemi-inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated to assess inhibition of baicalin on CYP450. **Result:** In rat liver microsomes, baicalin showed no inhibition on CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 and CYP3A4. However, in human liver microsomes, CYP1A2, CYP2C19 and CYP2E1 were inhibited weakly by baicalin, IC₅₀ of them were 39.72, 40.91, 32.83 μmol·L⁻¹. **Conclusion:** Species difference exists in inhibition of baicalin on CYP450, baicalin is a weak inhibitor for CYP1A2, CYP2C19 and CYP2E1. Drug interaction caused by inhibition of CYP450 enzymes should be paid attention, when baicalin is used intravenously in clinic.

[Key words] baicalin; cytochrome P450 enzyme; inhibition; drug interaction

黄芩苷是从黄芩中提取的含量较高的黄酮类化合物,具有抗糖尿病、保肝、抗肿瘤、抗氧化、阻滞钙离子通道等药理作用^[1-2],临床可用于治疗急、慢性肝炎和迁延性肝炎。细胞色素 P450(CYP450)是人体重要的氧化酶,大多数药物进入体内都经其代谢^[3]。CYP450 的抑制或诱导是引起代谢性药物相互作用的主要原因,特别是由代谢酶抑制所致的药物相互作用约占全部相互作用的 70%^[4]。因此,研究药物对代谢酶的抑制作用,对临床合理用药和避免潜在的药物相互作用具有重要指导意义。

目前,黄芩苷对 CYP450 各亚型的抑制作用尚未进行系统性研究。本实验拟考察黄芩苷对大鼠/人肝微粒体 CYP450 的 7 种主要亚型的抑制作用,并比较种属差异性,为黄芩苷的临床给药方案优化、用药安全性和有效性改进、潜在代谢性药物相互作用避免提供参考。

1 材料

TSQ Quantum AccessTM型三重四级杆质谱仪和 Scientific Heraeus Fresco 21 型冷冻高速离心机(美国 Thermo Fisher),Ultra-Pro 80 型冷冻超速离心机(德国 Sorvall 公司),Milli-Q 型超纯水仪(美国 Millipore)。

黄芩苷对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-14083014),普萘洛尔、白藜芦醇、噻氯匹定和盐酸安非他酮(中国食品药品检定研究院,批号分别为 100783-200401,111535-200502,100542-201002,100671-200301),1-羟基安非他酮(加拿大 TRC 公司),混合人肝微粒体[瑞德肝脏疾病研究所(上海)有限公司产品,蛋白质量浓度 20 mg·L⁻¹],非那西丁、美芬妥英、氯唑沙宗等均购自美国 Sigma 公司,甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

雄性 SD 大鼠,体重 180~220 g,由大连医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(辽)2008-0002。

2 方法与结果

2.1 大鼠肝微粒体的制备

按差速离心法制备肝微粒体,采用 Lowry 法测定蛋白质量浓度^[5]。大鼠麻醉后,取肝组织,吸干水分、称重、减碎,按 1:4 加入匀浆缓冲液(50 mmol·L⁻¹三羟甲基氨基甲烷,3 mmol·L⁻¹氯化镁,200 mmol·L⁻¹蔗糖,pH 7.4),于 4 ℃离心(10 000 × g,下同)30 min,取上清于 4 ℃离心 60 min,沉淀即为肝微粒体,沉淀中按 1 mL·g⁻¹加入匀浆缓冲液重悬,分装,测定大鼠肝微粒体的蛋

白浓度,-80 ℃冰箱内保存备用。

2.2 探针底物的代谢产物定量分析条件

ZORBAX Eclipse-plus C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm),柱温 35 ℃,流动相甲醇(A)-0.1%甲酸水溶液(B),流速 0.2 mL·min⁻¹。电喷雾正离子化(ESI⁺)下流动相梯度洗脱程序(0~0.8 min,5% A;0.8~5.0 min,5%~95% A;5.0~7.0 min,95%~5% A),喷雾电压 4 000 V;电喷雾负离子化(ESI⁻)下流动相洗脱程序(0~0.5 min,5% A;0.5~4.5 min,5%~95% A;4.5~6.0 min,95%~5% A),喷雾电压 3 500 V。各代谢产物的质谱条件见表 1。各代谢产物的标准曲线线性范围均为 1~1 000 μg·L⁻¹(R²>0.99),精密度 RSD 和准确度(RE)均<15%,基质效应范围 87.2%~97.12%,回收率 83.67%~96.84%,样品处理后室温放置 6 h 稳定,符合生物样品分析要求。

表 1 探针底物代谢产物选择性反应监测的质谱参数

Table 1 SRM parameters for metabolites of probe substrates

离子源	代谢产物	监测离子对	碰撞能量/eV	
ESI ⁺	对乙酰氨基酚	152/110	16	
	1-羟基安非他酮	256/238	10	
	4-羟基双氯芬酸	312/230	30	
	4-羟基美芬妥英	235/150	19	
	右啡烷	258/157	37	
	1-羟基咪达唑仑	342/203	24	
	普萘洛尔(内标)	260/116	17	
	ESI ⁻	6-羟基氯唑沙宗	184/120	21
		白藜芦醇(内标)	227/143	31

2.3 温孵条件的优化

将不同质量浓度大鼠/人肝微粒体(0.25,0.5,1.0 g·L⁻¹),探针底物和三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)缓冲液(50 mmol·L⁻¹,pH 7.4,下同)于 37 ℃水浴预温孵 5 min,加入 0.1 mmol·L⁻¹还原型辅酶 II(NADPH)20 μL 启动反应,温孵体系的终体积 200 μL(有机溶剂体积分数<0.5%),温孵不同时间(5,10,15,20,25,30,40,50,60 min)后,加入冰乙腈(含内标)200 μL 终止反应。样品振荡混匀,高速离心(14 000 × g,5 min)2 次,取上清液 5 μL 进行 HPLC-MS/MS 分析,测定底物代谢物的生成量(n=2)。在不同蛋白浓度下作温孵时间与底物代谢物生成量的回归方程,确定微粒体蛋白浓度和温孵时间,见表 2。

2.4 酶促动力学参数的计算

微粒体蛋白浓度和温孵时间确定后,选取不同质量浓度的代谢酶探针底物、大鼠/人肝微粒体和 Tris-HCl 缓冲液,按 2.3 项下方法操作,测定代谢物生成量(n=3)。采用 GraphPad

Prism 5.0 软件中的非线性回归得到各探针底物的米氏常数(K_m)和最大反应速率(V_{max}),结果见表 3。

表 2 CYP450 酶探针底物在大鼠/人肝微粒体温孵体系中的反应条件

Table 2 Reaction conditions for CYP450 enzyme probe substrates in rat and human liver microsomes

代谢酶	探针底物	代谢产物	大鼠肝微粒体		人肝微粒体	
			反应时间/min	反应时间/min	反应时间/min	蛋白质质量浓度/g·L ⁻¹
CYP1A2	非那西丁	对乙酰氨基酚	20	20	20	0.25
CYP2B6	安非他酮	1-羟基安非他酮	20	20	20	0.25
CYP2C6(CYP2C9)	双氯酚酸	4-羟基双氯酚酸	10	20	20	0.25
CYP2C11(CYP2C19)	美芬妥英	4-羟基美芬妥英	20	20	30	0.50
CYP2D2(CYP2D6)	右美沙芬	右啡烷	10	10	10	0.25
CYP2E1	氯唑沙宗	6-羟基氯唑沙宗	10	10	10	0.25
CYP3A1/2(CYP3A4/5)	咪达唑仑	1-羟基咪达唑仑	10	5	5	0.25

注:大鼠肝微粒体中蛋白质质量浓度均为 0.5 g·L⁻¹。

表 3 CYP450 酶探针底物在大鼠/人肝微粒体温孵体系中的参数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 K_m and V_{max} of CYP450 enzyme probe substrates in rat and human liver microsomes ($\bar{x} \pm s, n=3$)

代谢酶	探针底物	底物浓度/ mol·L ⁻¹	大鼠肝微粒体		人肝微粒体	
			$K_m/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$V_{max}/\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$	$K_m/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$V_{max}/\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$
CYP1A2	非那西丁	10 ~ 1 000	172.5 ± 15.3	13.4 ± 0.4	220.3 ± 34.9	23.6 ± 1.2
CYP2B6	安非他酮	10 ~ 1 000	36.2 ± 2.9	1.9 ± 0.1	87.2 ± 1.0	9.7 ± 1.1
CYP2C6(CYP2C9)	双氯酚酸	2.5 ~ 200	10.1 ± 1.0	58.4 ± 1.5	9.6 ± 1.6	105.0 ± 4.1
CYP2C11(CYP2C19)	美芬妥英	25 ~ 1 000	90.9 ± 6.1	2.4 ± 0.3	130.3 ± 0.1	4.1 ± 1.0
CYP2D2(CYP2D6)	右美沙芬	1 ~ 200	4.2 ± 0.4	28.7 ± 0.7	24.1 ± 3.2	28.9 ± 1.2
CYP2E1	氯唑沙宗	10 ~ 1 000	116.0 ± 9.1	47.9 ± 1.0	69.9 ± 4.3	49.9 ± 0.7
CYP3A1/2(CYP3A4/5)	咪达唑仑	2 ~ 100	8.6 ± 1.7	114.3 ± 5.4	3.7 ± 0.4	523.5 ± 10.5

2.5 阳性抑制剂对大鼠/人肝微粒体 CYP450 酶亚型的抑制作用 选取不同浓度的阳性抑制剂、代谢酶探针底物(浓度接近 K_m),大鼠/人肝微粒体和 Tris-HCl 缓冲液,按 2.3 项下方法操作,测定代谢物生成量($n=3$),采用 GraphPad Prism 5.0 软件计算半抑制浓度(IC_{50})。CYP1A2, CYP2B6, CYP2C6(CYP2C9), CYP2C11(CYP2C19), CYP2D2(CYP2D6), CYP2E1 和 CYP3A1/2(CYP3A4/5)的阳性抑制剂分别为吡拉茶碱、塞替派、磺基苯吡唑、噻氯匹定、奎尼丁、戒酒硫和酮康唑。计算在大鼠肝微粒体中的 IC_{50} 分别为 32.42, 45.34, 23.67, 12.94, 19.12, 21.54, 1.37 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 在人肝微粒体中的 IC_{50} 分别为 6.51, 18.43, 0.27, 6.98, 0.08, 7.62, 0.02 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结果表明阳性抑制剂对 CYP450 酶各亚型表现出了明显的抑制作用。

2.6 黄芩苷对大鼠/人肝微粒体 CYP450 酶亚型的抑制作用 取黄芩苷(0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和探针底物(浓度接近 K_m),0.5 g·L⁻¹大鼠肝微粒体和 Tris-HCl 缓冲液,按 2.3 项下方法操作进行 HPLC-MS/MS 分析,观察黄芩苷对各代谢产物生成的抑制作用($n=3$)。人肝微粒体(0.25 ~ 0.5 g·L⁻¹)温孵反应处理过程同大鼠肝微粒。

结果发现黄芩苷对大鼠肝微粒体 7 种 CYP450 同工酶亚型的 IC_{50} 均 > 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,说明无抑制作用。黄芩苷对人肝微粒体 CYP1A2, CYP2C19 和 CYP2E1 有不同程度的抑制作用,但对其他亚型无抑制作用。将剩余酶活性对对数抑制浓度作图,得 CYP1A2, CYP2C19 和 CYP2E1 酶的抑制曲线,计算 IC_{50} 分别为 39.72, 40.91, 32.83 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。按通用的 CYP450 酶抑制剂强度分级规则对药物的抑制强度进行分级。 $IC_{50} < 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为强抑制剂, $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} < IC_{50} < 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为中等强度抑制剂, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} < IC_{50} < 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为弱抑制剂^[6]。说明黄芩苷为 CYP1A2, CYP2C19 和 CYP2E1 的弱抑制剂。

3 讨论

在药物的生物转化过程中, CYP450 酶的活性决定了药物的代谢速率和清除率;而 CYP450 酶同时又可以被多种药物抑制或诱导,从而产生代谢性药物相互作用,影响药效,产生不良反应^[7]。2012 年颁布的《药物相互作用研究指南》中明确指出,进行药物相互作用研究时,需首先考察药物对 CYP450 酶亚型活性的影响^[8]。

肝微粒体外温孵法是目前用的一种预测药物相

相互作用的试验方法^[9-10]。本文通过优化了大鼠/人肝微粒体温孵体系的各种反应条件,并结合阳性抑制剂试验结果,表明建立的肝微粒体温孵体系是合理的^[11-13],并充分证实黄芩苷对人和大鼠 CYP450 酶亚型的抑制作用存在一定程度的种属差异性。体外试验中,黄芩苷对人 CYP1A2 和 CYP2C19 无抑制作用($IC_{50} > 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)^[14];而文献研究表明黄芩苷对人 CYP1A2 有较弱的抑制作用($IC_{50} 36.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)^[1]。本文证实黄芩苷为人 CYP1A2 弱抑制剂,与文献研究结果基本一致。

目前,以黄芩苷为主要成分的药物剂型以片剂为主,但口服吸收差、生物利用度低,为避免胃肠道对药物的破坏,提高药效,黄芩苷注射剂正在研制中^[15-16]。因此,评价黄芩苷对 CYP450 酶的体外抑制作用对于预测临床药物相互作用具有重要指导意义。黄芩苷口服给药可能不会对其他药物产生代谢性药物相互作用^[17-18]。文献报道大鼠静脉注射治疗剂量的黄芩苷,可抑制 CYP1A2, CYP2E1, CYP2D 和 CYP3A,显著性增加其底物的达峰浓度和药时曲线下面积^[1, 19-21]。目前尚无静滴或静注黄芩苷的人体药代动力学数据,但本文研究结果表明在相同抑制浓度下,黄芩苷对人肝微粒体 CYP450 酶亚型(CYP1A2, CYP2C19 和 CYP2E1)的抑制作用要强于大鼠。因此,临床静滴黄芩苷与 CYP1A2, CYP2D, CYP3A, CYP2C19 和 CYP2E1 底物药物合用时,可能会发生代谢性药物相互作用。

[参考文献]

[1] Gao N, Qi B, Liu F J, et al. Inhibition of baicalin on metabolism of phenacetin, a probe of CYP1A2, in human liver microsomes and in rats [J]. PLoS One, 2014, 9 (2): e89752.

[2] 康杰芳,任婷婷. 中药黄芩的研究进展[J]. 陕西农业科学, 2009, 55(4): 128-131.

[3] Wang C, Liu K X. The drug-drug interaction mediated by efflux transporters and CYP450 enzymes[J]. 药理学学报, 2014, 49(5): 590-595.

[4] 魏春燕,吴逢波,徐珽. CYP450 与药物相互作用[J]. 中国药业, 2014, 23(6): 17-20.

[5] 韩永龙,余奇,孟祥乐,等. 灯盏细辛注射液对大鼠肝微粒体 CYP3A 的抑制作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2009, 14(8): 891-895.

[6] 黎奔,陈俊平,钟玲,等. 灯盏生脉胶囊有效组分对大鼠细胞色素 P450 酶同工酶作用的体外研究[J]. 广东医学, 2011, 32(24): 3161-3163.

[7] 吴奕富. 穿破石对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 福建中医学院学报, 2008, 18(3): 30-32.

[8] 肖娟,王莹,蔡巧玲,等. Cocktail 探针药物法评价半

夏泻心汤及不同配伍组对 CYP450 酶活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4): 181-186.

[9] Watanabe Y, Kojima H, Takeuchi S, et al. Metabolism of UV-filter benzophenone-3 by rat and human liver microsomes and its effect on endocrine-disrupting activity[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2015, 282(2): 119-128.

[10] Men L, Zhao Y, Lin H, et al. Characterization of *in vitro* metabolites of TM-2, a potential antitumor drug, in rat, dog and human liver microsomes using liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2014, 28(20): 2162-2170.

[11] 林庆辉,庄笑梅,邓婧婷,等. 罗通定和羟考酮体外代谢的相互作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2009, 23(5): 404-410.

[12] 孙鲁宁,丁黎,严拯宇,等. LC-MS/MS 法研究苯环喹溴铵对大鼠肝微粒体 CYP450 酶的抑制作用[J]. 中国药科大学学报, 2013, 44(2): 134-140.

[13] 曹艳,钟玉环,原梅,等. 欧前胡素和异欧前胡素对人和大鼠肝微粒体细胞色素 CYP450 酶活性的抑制作用[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(8): 1237-1243.

[14] 韩永龙,孟祥乐,李丹,等. 清开灵注射液及其主要成分黄芩苷和栀子苷对人肝微粒体 CYP450 酶 6 种亚型的体外抑制作用研究[J]. 中国药理学杂志, 2011, 41(19): 1486-1490.

[15] 张琪,陈忻. 黄芩苷的药动学研究进展[J]. 中南药学, 2011, 9(3): 209-212.

[16] 倪小佳. 基于用药合理与安全分析中药注射剂治疗脑卒中的临床研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 317-322.

[17] 吴黎莉,张尊建,许风国,等. 黄芩苷胶囊的人体生物等效性研究[J]. 中国新药与临床杂志, 2005, 24(9): 687-690.

[18] Li M, Shi A, Pang H, et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of a single ascending dose of baicalin chewable tablets in healthy subjects [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 156(1): 210-215.

[19] Gao N, Fang Y, Qi B, et al. Pharmacokinetic changes of unbound theophylline are due to plasma protein binding displacement and CYP1A2 activity inhibition by baicalin in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 150(2): 477-484.

[20] Tian X, Cheng Z Y, He J, et al. Concentration-dependent inhibitory effects of baicalin on the metabolism of dextromethorphan, a dual probe of CYP2D and CYP3A in rats[J]. Chem Biol Interact, 2013, 203(2): 522-529.

[21] Gao N, Zou D, Qiao H L. Concentration-dependent inhibitory effect of baicalin on the plasma protein binding and metabolism of chlorzoxazone, a CYP2E1 probe substrate, in rats *in vitro* and *in vivo* [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53038.

[责任编辑 刘德文]