

藏药余甘子鞣质部位对大鼠肝微粒体代谢酶 P450 活性的影响^{*}

崔雅萍, 杨光辉, 亓 旗, 吴玲芳, 陈文静, 梁文仪, 李 师, 张兰珍^{**}

(北京中医药大学中药学院 北京 100102)

摘 要:目的:考察藏药余甘子鞣质部位对大鼠肝微粒体代谢酶 P450 活性的影响。方法:采用“Cocktail”探针底物与大鼠肝微粒体体外温孵法,通过 HPLC 同时测定 6 种探针药物氨苯砜、氢溴酸右美沙芬、香豆素、非那西丁、氯唑沙宗、甲苯磺丁脲的代谢消除率,评价余甘子鞣质部位对 P450 酶中 CYP3A4、CYP2D6、CYP2A6、CYP1A2、CYP2E1、CYP2C9 亚酶活性的影响。结果:余甘子鞣质部位对 P450 酶影响较小,CYP3A4、CYP1A2 的 IC_{50} 值超过 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,CYP2C9 的 IC_{50} 值超过 $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结论:藏药余甘子鞣质部位对肝 P450 酶活性影响较弱。

关键词:余甘子鞣质部位 大鼠肝微粒体 代谢酶 P450 活性

doi:10.11842/wst.2016.07.013 中图分类号:R282 文献标识码:A

余甘子(*Phyllanthi Fructus*)为大戟科植物余甘子 *Phyllanthus emblica* L. 的干燥成熟果实,系藏族习用药材^[1]。鞣质及酚酸类成分为其主要成分,具有抗脂质过氧化、抗肿瘤、抗癌、护肝益肾、抗病毒、抗菌等作用^[2]。

藏药主要以复方形式应用,也作为辅助药物与西药同时服用。藏药成分间的相互作用以及藏药-西药药物相互作用报道较少。抑制或诱导 P450 酶都可能产生相应的药物-药物相互作用,增加患者的治疗风险。在临床用药过程中,药物对 P450 酶抑制作用的危害远大于诱导作用,尤其是与部分治疗窗狭窄的药合用会导致中毒^[3]。CYP450 各亚型活性的变化会导致由相关亚型代谢的药物血浆浓度过高或过低,从而影响临床治疗效果^[4-7]。

本实验采用“Cocktail”探针药物法,结合 HPLC 技术进行余甘子鞣质部位大鼠肝微粒体体外温孵研究,评价其对 P450 酶活性的影响,为研究余甘子鞣

质部位体内成分代谢提供实验依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 1525 型高效液相色谱仪(PAD 检测器; Empower 软件);氮吹仪(EYELA MG-2200);水浴锅(科伟 HH-4);涡旋混合器(北京北德科学器材有限公司)。

1.2 试剂

甲醇(美国 Fisher 公司,色谱纯);蒸馏水(哇哈哈纯净水);氨苯砜(批号:142160)、氢溴酸右美沙芬(批号:KGC1-4EJ3)、香豆素(批号:1001833416)、非那西丁(批号:77440)、氯唑沙宗(批号:481850)、甲苯磺丁脲(批号:301955)、五味子醇甲(批号:110857-201111)、酮康唑(批号:973125)、奎尼丁(批号:216807)、反苯环丙胺(批号:834733)、 α -萘黄酮(批号:1001977041)、二乙基二硫代甲酸钠(批号:100183505)、氟康唑(批号:433638)等原料药;NADPN_{a2}(批号:11012231001)、六磷酸

收稿日期 2016-06-19

修回日期 2016-06-19

^{*} 国家自然科学基金面上项目(81274187)基于藏药余甘子酚酸类成分体内动态变化的抗癌药效物质与质量控制研究,负责人 张兰珍。

^{**} 通讯作者 张兰珍,本刊编委,研究员,博士生导师,主要从事中药和民族药药效物质研究。

葡萄糖(批号:B6146)、六磷酸葡萄糖脱氢酶批号(1001293755)、 MgCl_2 (批号:2105-100)均购于北京拜尔迪医药技术有限公司,SD大鼠肝微粒体为实验室自制,蛋白含量为 $34.52 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

余甘子药材购自于西藏藏医院,产地尼泊尔。经北京中医药大学阎玉凝教授鉴定为大戟科叶下珠属植物余甘子 *Phyllanthus emblica* L. 的干燥成熟果实。

2 方法与结果

2.1 “Cocktail” 探针药物法的建立

2.1.1 溶液的配制

取氨苯砒、氢溴酸右美沙芬、香豆素、非那西丁、氯唑沙宗、甲苯磺丁脲适量于10 mL容量瓶中,甲醇定容,配成各探针浓度分别为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合探针溶液,作为储备液备用。五味子醇甲(内标物):取 4.01 mg ,10 mL容量瓶中甲醇定容。

NADPH再生系统:含 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADPN $_2$, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 六磷酸葡萄糖, $2 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ 六磷酸葡萄糖脱氢酶, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 。

2.1.2 肝微粒体体外温孵反应

将混合探针储备液适量稀释200倍后,取 $100 \mu\text{L}$ 于2 mL EP管中,氮气吹干,加入Tris-HCL缓冲液溶解的肝微粒体($2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) $100 \mu\text{L}$,于 37°C 水浴中预温孵5 min,加入 $100 \mu\text{L}$ NADPH再生系统启动反应,反应体系总体积为 $200 \mu\text{L}$,包含SD大鼠肝微粒体蛋白 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, NADPH再生系统($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NADPN $_2$ 、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 六磷酸葡萄糖、 $1 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$ 六磷酸葡萄糖脱氢酶、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2)以及6种混合探针底物:氨苯砒、氢溴酸右美沙芬、香豆素、非那西丁、氯唑沙宗、甲苯磺丁脲(终浓度分别为:25、10、10、25、25、 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$),温孵时间30 min。

2.1.3 样品处理方法

温孵30 min后在反应体系中按1:3比例加入冰甲醇结束反应,加入内标物(五味子醇甲 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) $50 \mu\text{L}$,涡旋3 min, 4°C , $12\ 000 \text{ g} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心20 min,取上清液,氮气吹干, $200 \mu\text{L}$ 50%甲醇复溶, 4°C , $12\ 000 \text{ g} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心20 min, $20 \mu\text{L}$ 进HPLC分析。

2.1.4 色谱条件

Diamonsil C $_{18}$ (2)色谱柱($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$,

$5 \mu\text{m}$),流速: $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温: 35°C ,流动相:甲醇-0.2%冰醋酸溶液,梯度洗脱,进样量: $20 \mu\text{L}$ 。

2.1.5 专属性考察

按照2.1.4 HPLC-UV条件,测定空白肝微粒体、空白肝微粒体中加入探针底物和内标物。实验结果如图1。

实验结果显示,空白肝微粒体所含内源性物质不干扰探针药物和内标物的测定,7个被测成分峰形良好,符合测定要求。

2.1.6 肝微粒体温孵体系酶浓度和温孵时间的确定

控制肝微粒体温孵时间,以探针药物氨苯砒为底物,设置体系肝微粒体浓度分别为0.25、0.50、1.00、1.50、 $2.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 考察肝微粒体浓度对代谢反应的影响。结果如表1和图2所示。

控制肝酶浓度,以探针药物氨苯砒为底物,设置温孵时间分别为5、10、20、30、60、120 min考察温孵时间对代谢反应的影响。结果如表2和图3所示。分析实验结果可得,反应体系中肝酶浓度达 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、温孵时间为30 min时,底物代谢趋于平缓,因而确定为实验条件。

2.1.7 方法学验证

(1) 标准曲线的制备

采用倍半稀释法,将探针药物的储备溶液配制成一系列梯度浓度的“Cocktail”探针混合溶液:氨苯砒(6.25 、 10.00 、 16.70 、 25.00 、 50.00 、 $100.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$);氢溴酸右美沙芬(2.5 、 4.0 、 6.7 、 10.0 、 20.0 、 $40.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$);香豆素(2.5 、 4.0 、 6.7 、 10.0 、 20.0 、 $40.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$);非那西丁(6.25 、 10.00 、 16.70 、 25.00 、 50.00 、 $100.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$);氯唑沙宗(6.25 、 10.00 、 16.70 、 25.00 、 50.00 、 $100.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$);甲苯磺丁脲(2.5 、 4.0 、 6.7 、 10.0 、 20.0 、 $40.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

取稀释梯度浓度的混合探针,用灭活的肝微粒体按2.1.2项下温孵方法进行温孵实验。分别绘制6种探针药物标准曲线,结果见表4。

(2) 精密度和稳定性实验

分别取低、中、高3个浓度的混合探针药物 $100 \mu\text{L}$ 于EP管中,氮气吹干,加入灭活肝酶 $200 \mu\text{L}$ 溶解,按2.1.3项下方法处理样品,配置探针药物低、中、高三个浓度的基质混合对照品,每个样本平行制备3份。同一样品于同日内测定连续测定6次,计算日

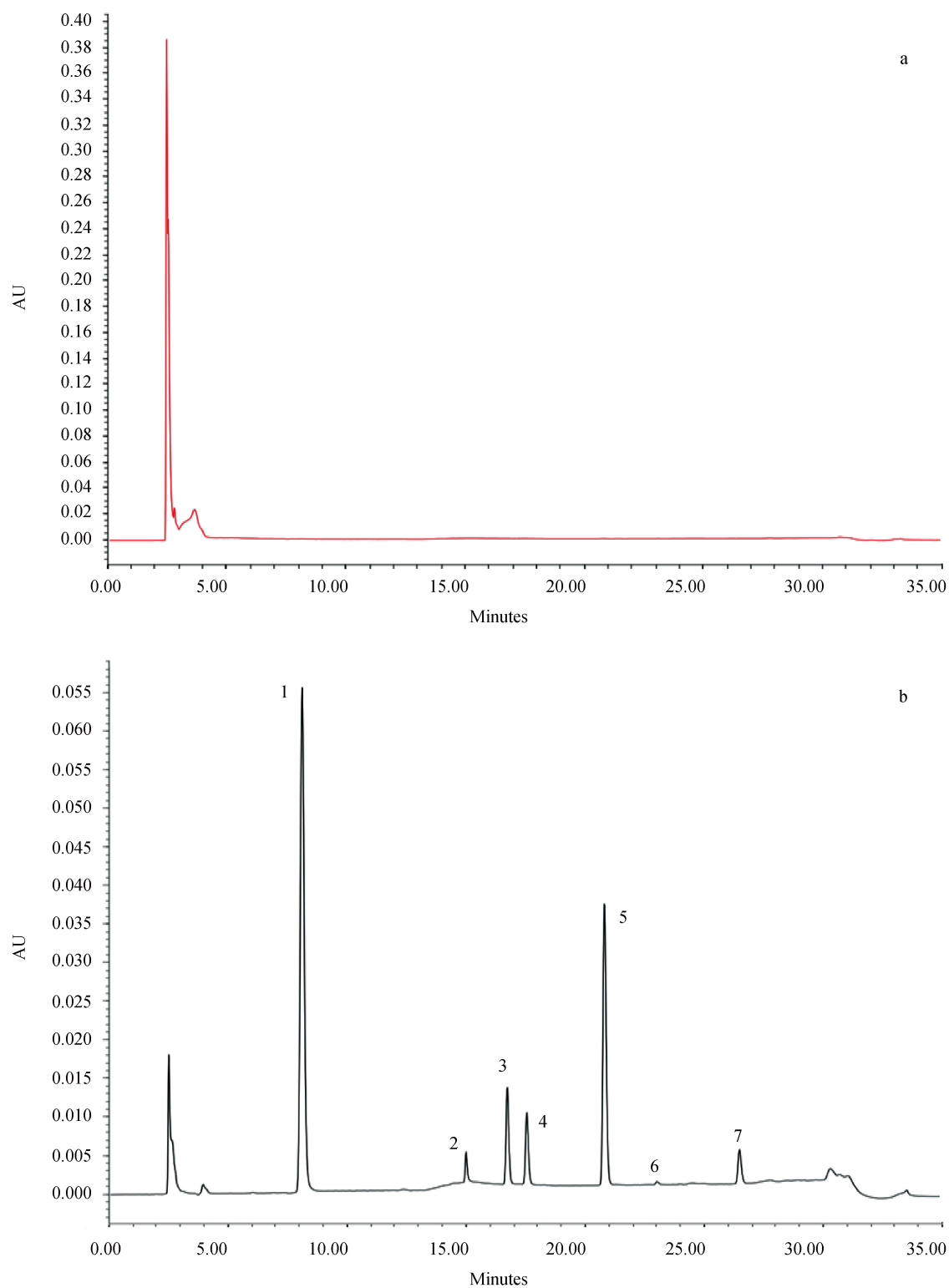


图1 空白肝微粒体加混合探针和内标物 HPLC 色谱图

注 :a. 空白肝微粒体 ,b. 空白加探针药物和内标 ;1. 氨苯矾 ,2. 氢溴酸右美沙芬 ,3. 香豆素 ,4. 非那西丁 ,5. 氯唑沙宗 ,6. 甲苯磺丁脲 ,7. 内标物。

表 1 肝微粒体浓度对探针底物代谢消除率的影响 /%

肝微粒体浓度 /mg·mL ⁻¹	探针底物代谢消除率					
	氨苯砜	氢溴酸右美沙芬	香豆素	非那西丁	氯唑沙宗	甲苯磺丁脲
0.25	2	3	1	1	2	1
0.5	7	3	2	3	9	3
1.0	10	7	8	5	13	6
1.5	11	14	16	5	11	5
2.0	11	15	18	6	20	5

表 2 肝微粒体温孵时间对探针底物代谢消除率的影响 /%

温孵时间 /min	探针底物代谢消除率					
	氨苯砜	氢溴酸右美沙芬	香豆素	非那西丁	氯唑沙宗	甲苯磺丁脲
5	3	13	4	2	4	2
10	7	17	10	3	5	4
20	8	21	13	6	15	8
30	10	22	15	7	11	6
60	10	20	14	5	11	6
120	11	24	19	10	14	13

表 3 肝微粒体中各探针药物标准曲线方程式

探针药物	标准曲线	<i>r</i>	线性范围 /μmol·mL ⁻¹
氨苯砜	$Y = 0.654 1X - 4.281 1$	0.999 4	6.25–100.00
氢溴酸右美沙芬	$Y = 0.054 1X - 0.109 5$	0.998 6	2.50–40.00
香豆素	$Y = 0.200 5X - 0.434 1$	0.997 2	2.50–40.00
非那西丁	$Y = 0.068 5X - 0.346 2$	0.998 1	6.25–100.00
氯唑沙宗	$Y = 0.298 9X - 1.538 7$	0.998 1	6.25–100.00
甲苯磺丁脲	$Y = 1.044 9X - 2.145 9$	0.997 1	2.50–40.00

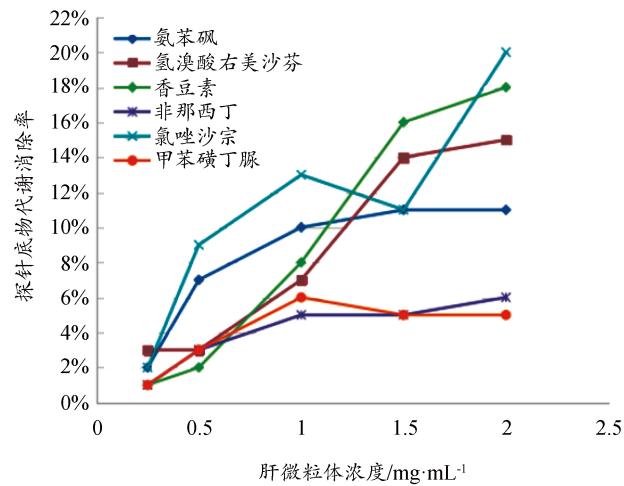


图 2 混合探针代谢率变化图

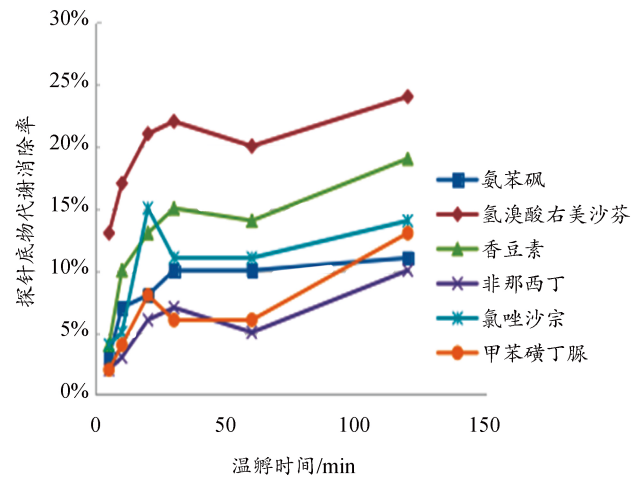


图 3 混合探针代谢率变化图

内精密密度,连续3天内测定3次,计算日间精密密度。将样本放置24 h后测定,考察样本在24 h内的稳定性。结果显示6种探针药物测定的日内精密密度和日间精密密度良好,RSD均小于6%,样本24 h稳定性良好,RSD均小于5%,符合样本含量测定的要求。

(3) 回收率实验

按(2)项下方法制备混合探针药物低、中、高3个浓度的基质混合对照品,平行3组,另取相应浓度的标准溶液直接进样,计算绝对回收率。结果显示6种探针药物的绝对回收率均大于73.08%,且RSD均小于5%,符合样本含量测定要求。

2.2 阳性抑制剂对大鼠肝微粒体代谢酶 P450 活性影响

2.2.1 阳性抑制剂对 P450 酶活性的抑制

选取添加阳性抑制剂与未加抑制剂的对照组进行比较,以探针底物的代谢率来反映酶的活性,每个阳性抑制剂系列浓度均为0.01/0.1/1/10/100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,平行做3份。

2.2.2 酶活性(control activity)的计算

使用已建立的 HPLC 法测定 6 种探针底物的峰面积,将其与内标峰面积的比值代入各探针底物的肝微粒体标准曲线中计算出各探针底物浓度,以未加阳性抑制剂和受试中药提取物的空白对照的活性为 100%,计算各 CYP450 亚型在不同药物作用下的相对酶活性。

2.2.3 抑制曲线及 IC_{50} 值

采用 Graphpad prism 5.0 软件进行非线性回归分析,将酶相对活性对各抑制剂浓度的对数值作图,并计算 IC_{50} 值。结果如表 4 和图 4 所示。实验结果表明,选用的各抑制剂的 IC_{50} 值均小于 5 μM ,抑制作用效果良好。

2.3 余甘子鞣质部位对肝微粒体代谢酶 P450 活性的影响

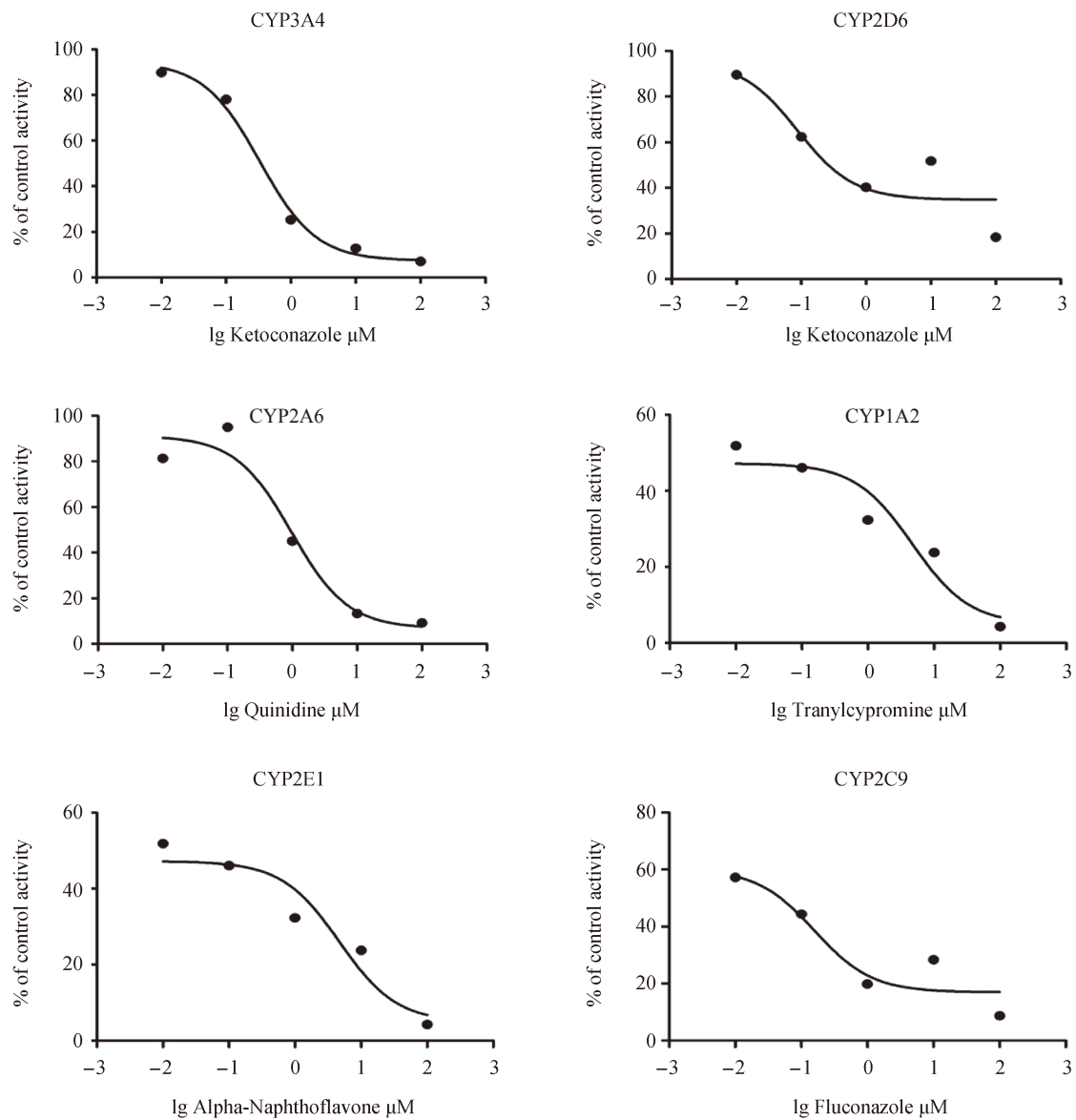
以余甘子鞣质部位替换 2.2 项下孵育体系中的阳性抑制剂。余甘子鞣质部位提取物的梯度终浓度为 0.102、1.020、10.170、101.720、1 017.200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

表 4 添加阳性抑制剂后各 P450 酶亚型的相对酶活性 ($n=3$)

抑制剂浓度/ μM	P450 酶亚型相对酶活性					
	CYP3A4	CYP2D6	CYP2A6	CYP1A2	CYP2E1	CYP2C9
0.01	89.86%	89.65%	81.34%	51.89%	76.62%	57.22%
0.10	78.11%	62.38%	95.04%	46.06%	77.50%	44.35%
1.00	25.30%	40.30%	4.51%	32.35%	69.02%	19.85%
10.00	12.77%	51.80%	13.29%	2.379%	44.26%	28.34%
100.00	7.08%	18.34%	9.17%	4.25%	33.95%	8.69%
IC_{50}	0.330 70	0.086 95	0.973 20	4.68 30	3.91 20	0.158 50

表 5 余甘子鞣质部位对 P450 酶亚型的相对酶活性的影响 ($n=3$)

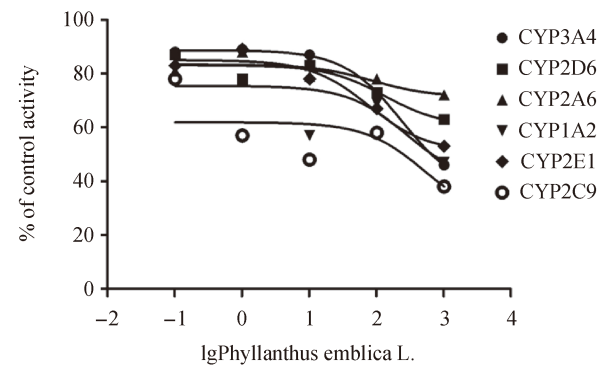
鞣质部位浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	P450 酶亚型相对酶活性					
	CYP3A4	CYP2D6	CYP2A6	CYP1A2	CYP2E1	CYP2C9
0.102	88%	87%	81%	87%	83%	78%
1.020	89%	78%	88%	78%	89%	57%
10.170	87%	83%	79%	57%	78%	48%
101.720	73%	73%	78%	69%	67%	58%
1 017.200	46%	63%	72%	47%	53%	38%
IC_{50}	241.60	132.60	88.24	274.20	78.45	503.30

图4 阳性抑制剂抑制曲线($n=3$)

空白对照组和实验组同时进行，分别计算相应的 IC_{50} 值，结果如表5和图5所示。实验结果表明：余甘子鞣质部位对于肝微粒体代谢酶P450各亚型的 IC_{50} 值均大于 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，且对CYP3A4、CYP1A2的 IC_{50} 值超过 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，对CYP2C9的 IC_{50} 值超过 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3 讨论

依照通用的 CYP450 酶抑制剂强度分级规则^[8-9]：当某种中药的提取物对 P450 酶亚型的半数抑制浓

图5 余甘子鞣质部位抑制曲线 ($n=3$)

度 IC_{50} 值小于 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,被认为有很强的抑制作用,在临床使用过程中发生药物相互作用的可能性较大,结果可能使其他由 CYP450 酶代谢的药物疗效减弱甚至失效;当 IC_{50} 值介于 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 到 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,被认为有明显的抑制作用;当 IC_{50} 值介于 100 到 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,被认为有微弱的抑制作用;当 IC_{50} 值大于 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 则认为抑制作用不明显,临床联合用药相对安全。

本实验结果表明余甘子鞣质部位对于肝微粒体代谢酶 P450 各亚型抑制作用的 IC_{50} 值均大于 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 且对 CYP3A4、CYP1A2 的 IC_{50} 值超过 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对 CYP2C9 的 IC_{50} 值超过 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 说明余甘子鞣质部位对于肝酶活性的抑制作用并不强烈,在临床使用过程中发生药物相互作用的可能性较小。余甘子鞣质部位对肝微粒体 P450 代谢酶 6 种主要亚型的抑制作用不明显,不易产生相应的药物-药物相互作用。

参考文献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (一部). 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 179.
- 2 孙雪飞, 张鸿雁, 夏青, 等. 藏药余甘子药材及其鞣质部位的指纹图谱评价研究. 中国中药杂志, 2014, 39(7): 1173-1178.
- 3 叶林虎, 闫明珠, 孔令提, 等. 槲皮素及其糖苷类化合物对 P450 酶活性的体外抑制作用. 中国药理学杂志, 2014, 49(12): 1051-1055.
- 4 王欢欢, 吕雅瑶, 彭博, 等. 基于液相色谱-质谱联用的肝微粒体中药物代谢酶定量方法研究进展. 色谱, 2015, 6: 553-557.
- 5 袁红昌. 穿心莲内酯对大鼠肝微粒体 CYP450 酶活性的体内外影响研究. 河南科技大学, 2015.
- 6 Ong C E, Pan Y, Mak J W, et al. *In vitro* approaches to investigate cytochrome P450 activities: update on current status and their applicability. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2013, 9(9): 1097-1113.
- 7 Sevrioukova I F, Poulos T L. Understanding the mechanism of cytochrome P450 3A4: Recent advances and remaining problems. *Dalton Trans* 2013, 42(9): 3116-3126.
- 8 Usia T, Iwata H, Hiratsuka A, et al. CYP3A4 and CYP2D6 inhibitory activities of Indonesian medicinal plants. *Phytomedicine*, 2006, 13(1-2): 67-73.
- 9 Sevier D K, Hokkanen J, Tolonen A, et al. Rapid screening of commercially available herbal products for the inhibition of major human hepatic cytochrome P450 enzymes using the N-in-one cocktail. *Xenobiotica*, 2010, 40(4): 245-254.

Effects of Tannins Extracted from *Phyllanthi Fructus* on the Activity of Cytochrome P450 Enzymes in Rats

Cui Yaping, Yang Guanghui, Qi Qi, Wu Lingfang, Chen Wenjing, Liang Wenyi, Li Shi, Zhang Lanzhen
(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract: This study aimed to investigate the effects of tannins extracted from Tibetan medicine *Phyllanthi Fructus* on cytochrome P450 enzyme of liver microsomes in rats. Cocktail probe substrates were incubated with liver microsomes *in vitro*. Metabolic elimination percentages of the six probe substrates, including dapsone, dextromethorphan hydrobromide, coumarin, phenacetin, chlorzoxazone and tolbutamide, were determined by HPLC. The effects of tannins extracted from Tibetan medicine *Phyllanthi Fructus* on the enzymatic activity of rat liver microsomal P450s was evaluated. It was found that tannins extracted from *Phyllanthi Fructus* did not impact P450 enzymes. The IC_{50} values of CYP3A4 and CYP1A2 were over $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, while the IC_{50} value of CYP2C9 was superior to $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. In conclusion, Tannins extracted from Tibetan medicine *Phyllanthi Fructus* did not significantly affect cytochrome P450 enzymes.

Keywords: Tannins extracted from *Phyllanthi Fructus*, rat liver microsomes, metabolic enzyme P450, activity

(责任编辑:姜月滢,责任译审:朱黎婷)