

斯皮诺素对人肝微粒体细胞色素P₄₅₀酶的体外抑制作用

张巧月^{1*},刘艳艳¹,万昶宸¹,廖曼¹,张霞¹,刘天意²,张兰桐^{1#}(1.河北医科大学药学院药物分析教研室,石家庄 050017;2.哈尔滨医科大学药学院,哈尔滨 150081)

中图分类号 R361^{+.3} 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)19-2645-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.19.15

摘要 目的:研究斯皮诺素对人肝微粒体细胞色素P₄₅₀(CYP₄₅₀)酶7种亚型(CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2D6、CYP1A1、CYP2C19和CYP3A4)的体外抑制作用。方法:以200.00、100.00、50.00、25.00、12.50、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39 μmol/L的斯皮诺素与人肝微粒体共同孵育,分别以他克宁、安非他酮、盐酸阿莫地喹、双氯芬酸钠、美芬妥英、氢溴酸右美沙芬和咪达唑仑作为上述7种亚型CYP₄₅₀酶的特异性探针药物。采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱法测定7种探针药物的代谢产物生成量,计算斯皮诺素对人肝微粒体中7种亚型CYP₄₅₀酶的半数抑制浓度(IC₅₀)。结果:斯皮诺素对人肝微粒体7种亚型CYP₄₅₀酶的IC₅₀分别为1 714、1 158、226.1、2 288、80.59、101.1、1 119 μmol/L,均大于50 μmol/L。结论:斯皮诺素对人肝微粒体CYP₄₅₀酶的上述7种亚型均无抑制作用,引发药物代谢性相互作用的可能性较小。

关键词 斯皮诺素;超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱法;细胞色素P₄₅₀酶;抑制作用

Inhibition Effect of Spinosin on Cytochrome P₄₅₀ Enzymes from Human Liver Microsomes *in vitro*

ZHANG Qiaoyue¹, LIU Yanyan¹, WAN Changchen¹, LIAO Man¹, ZHANG Xia¹, LIU Tianyi², ZHANG Lantong¹
(1.Teaching and Research Section of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;2.School of Pharmacy, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibition effect of spinosin on 7 subtypes (CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP1A1, CYP2C19 and CYP3A4) of cytochrome P₄₅₀ (CYP₄₅₀) enzymes from human liver microsomes *in vitro*. METHODS: Taking 200.00, 100.00, 50.00, 25.00, 12.50, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39 μmol/L spinosin and human liver microsomes for incubation, using daktarin, bupropion, amodiaquine hydrochloride, diclofenac sodium, mephenytoin, dextromethorphan hydrobromide and midazolam as the specific probe drugs for above-mentioned 7 subtypes of CYP₄₅₀ enzymes. UPLC-Q-TOF-MS was conducted to detect generation amount of 7 probe drug metabolites, and the half inhibitory concentration (IC₅₀) of spinosin on 7 subtypes of CYP₄₅₀ enzymes from human liver microsomes was calculated. RESULTS: IC₅₀ of spinosin on 7 subtypes of CYP₄₅₀ enzymes from human liver microsomes were 1 714, 1 158, 226.1, 2 288, 80.59, 101.1, 1 119 μmol/L, respectively, which were higher than 50 μmol/L. CONCLUSIONS: Spinosin has no inhibition effect on above-mentioned 7 subtypes of CYP₄₅₀ enzymes from human liver microsomes, with very low probability of inducing metabolic drug interactions.

KEYWORDS Spinosin; UPLC-Q-TOF-MS; Cytochrome P₄₅₀ enzymes; Inhibition effect

酸枣仁(*Semen Zizyphi Spinosae*, SZS)是鼠李科(Phamnaceae)植物酸枣[*Zizyphus jujuba* Mill. var *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou]的干燥成熟种子^[1],是治疗失眠和焦虑的经典中药之一,其化学成分包括达玛烷型三萜皂苷、黄酮类化合物、生物碱、三萜类化合物、维生素和多糖等^[2]。现代药理研究表明,酸枣仁黄酮能显著延长巴比妥钠诱导小鼠睡眠的时间^[3]。斯皮诺素为酸枣仁黄酮的主要活性物质,是酸枣仁汤镇静催眠的药效物质基础之一^[4],能通过5-羟色胺(5-HT)系统延长戊巴比妥诱导大鼠睡眠的时间^[5]。所以,深入研究斯皮诺素对进一步开发和利用酸枣仁具有一定意义。

代谢性相互作用主要是由于药物对代谢酶产生诱

* 硕士研究生。研究方向:药物分析与质量控制。电话:0311-86266419。E-mail:694910334@qq.com

通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:药物质量控制、药动学。电话:0311-86266419。E-mail:zhanglantong@263.net

导或抑制作用所致,起主导作用的是细胞色素P₄₅₀酶(Cytochrome P₄₅₀, CYP₄₅₀)^[6]。肝CYP₄₅₀酶系是一类含铁的血红素蛋白超家族,负责大量外源性化合物的氧化代谢,同时对部分内源性化合物的代谢也起着重要作用,在人体内易被联合应用的药物诱导和抑制,从而导致药物浓度发生巨大变化,产生增效或毒副作用^[7-8]。人体内CYP₄₅₀酶是由多种同工酶组成的大家族,其中CYP1A1、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6和CYP3A4与药物代谢密切相关。研究药物对CYP₄₅₀酶作用的方法主要包括体内代谢组学实验以及体外亚细胞或细胞试验^[9]。本文采用美国FDA推荐的特异性探针药物研究斯皮诺素对人肝微粒体中7种亚型CYP₄₅₀酶的影响,通过评估斯皮诺素在体外代谢体系中对CYP₄₅₀酶特异性探针底物的抑制程度,预测其在体内可能引发的药物代谢性相互作用,为其临床安全用药提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

AB SCIEX Triple-TOF 5600+三重四级杆-飞行时间质谱仪,包括 Duospray 离子源、Analyst Software 1.7 数据采集分析软件(美国 AB 公司);LC-30A 超高效液相色谱仪,包括 CTO-30A 柱温箱、CBM-20A 系统控制器和 SIL-30AC 自动进样器(日本岛津公司);D3024R 高速冷冻离心机(美国 Scilogex 公司)。

1.2 药品与试剂

斯皮诺素对照品(成都普菲德生物技术有限公司,批号:121220,纯度:>98%);磺胺甲噁唑、安非他酮、盐酸阿莫地喹、双氯芬酸钠、氢溴酸右美沙芬对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100025-3200904、100671-200301、101217-201401、100334-200302、100201-201204,纯度:>98%);他克宁对照品(加拿大 Trc 公司,批号:A629700,纯度:>98%);美芬妥英对照品(北京百灵威科技有限公司,批号:303768,纯度:>98%);咪达唑仑注射液(江苏恩华药业股份有限公司,批号:20150208,规格:2 mL:10 mg);还原型辅酶 II (NADPH,北京索莱宝科技有限公司,批号:524F016,纯度:>98%);50 人合 1 混合人源肝微粒体、氯化镁(美国 BD Bioscience 公司,批号:H0610、20140730);水为纯净水,甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 斯皮诺素对照品溶液 精密称取斯皮诺素对照品适量,用甲醇溶解制成 40 mmol/L 的贮备液;精密量取贮备液适量,用甲醇依次稀释成系列浓度对照品溶液。

2.1.2 内标溶液 精密称取磺胺甲噁唑对照品适量,用甲醇溶解并稀释成 170 ng/mL 的溶液。

2.1.3 探针药物溶液 分别精密称取安非他酮(CYP2B6 探针)、盐酸阿莫地喹(CYP2C8 探针)、双氯芬酸钠(CYP2C9 探针)、氢溴酸右美沙芬(CYP2D6 探针)、他克宁(CYP1A1 探针)、美芬妥英(CYP2C19 探针)和咪达唑仑(CYP3A4 探针)对照品适量^[10],分别用甲醇溶解制成 5、1、1、1、5、30、1 mmol/L 的溶液。

2.1.4 氯化镁溶液 精密称取氯化镁适量,用磷酸盐缓冲液(PBS)溶解制成 16 mmol/L 的溶液。

2.2 人肝微粒体温孵反应

试验分为人肝微粒体温孵体系组[含人肝微粒体、探针药物和系列浓度的斯皮诺素对照品溶液的 PBS (pH 7.2~7.4)]和空白组(等量甲醇)。各组先 37 °C 预热孵化振荡 10 min,再加入预热的 NADPH 启动反应^[11-12]。NADPH、氯化镁的终浓度分别为 2、4 mmol/L;系列浓度的斯皮诺素对照品溶液在孵育体系中的终浓度分别为 200.00、100.00、50.00、25.00、12.50、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39 μmol/L,温孵体系的体积为 200 μL,有机溶剂体积

低于总温孵体系体积的 1%,每个温孵体系平行制备 3 份。温孵体系于 37 °C 恒温振荡反应一段时间后取出,立即加入含内标的冰甲醇 200 μL 终止反应。7 种亚型 CYP₄₅₀ 酶对应的探针药物的浓度、人肝微粒体质量浓度和温孵时间见表 1。

表 1 7 种亚型 CYP₄₅₀ 酶对应的探针药物的浓度、人肝微粒体质量浓度和温孵时间

Tab 1 Probe substrate concentration, mass concentration of human liver microsomes and incubation time of 7 subtypes of CYP₄₅₀ enzymes

探针药物	酶亚型	探针药物浓度, μmol/L	人肝微粒体质量浓度, mg/mL	温孵时间, min
安非他酮	CYP2B6	25	0.2	15
盐酸阿莫地喹	CYP2C8	5	0.2	15
双氯芬酸钠	CYP2C9	5	0.2	15
氢溴酸右美沙芬	CYP2D6	5	0.2	15
他克宁	CYP1A1	25	0.2	15
美芬妥英	CYP2C19	150	0.5	30
咪达唑仑	CYP3A4	5	0.2	5

2.3 样品处理

将终止反应的样品涡旋 2 min,14 000×g 离心 10 min,取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。取续滤液进样分析,测定 7 种探针药物的代谢产物生成量。

2.4 代谢产物的含量测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱:Poroshell 120 EC C₁₈(50 mm×2.1 mm,2.7 μm);流动相:0.05% 甲酸水溶液(A)-0.05% 甲酸乙腈溶液(B),梯度洗脱(0~3 min,15% B~50% B;3~5 min,50% B~95% B;5~5.5 min,95% B;5.5~6 min,95% B~15% B;6~7.5 min,15% B);流速:400 μL/min;柱温:40 °C;进样量:5 μL。

2.4.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI 源),TurboV 离子源,正离子模式,源喷射电压:5 500 V;雾化温度:550 °C,雾化气(GS1,N₂)压力:55 psi,辅助气(GS2,N₂)压力:55 psi,气帘气(N₂)压力:30 psi。

2.5 数据分析

数据处理软件为 MultiQuant 3.0。温孵体系中探针药物代谢产物的生成量代表酶的活性。以(峰面积_{样品组代谢产物}/峰面积_{内标})/(峰面积_{空白组代谢产物}/峰面积_{内标})计算酶的相对活性(%)。以相对活性为纵坐标、抑制剂(斯皮诺素)浓度的对数值(lgc)为横坐标,应用 GraphPad Prism 5.0 软件进行非线性拟合,计算斯皮诺素对 7 种亚型 CYP₄₅₀ 酶的半数抑制浓度(IC₅₀)。斯皮诺素对 7 种亚型 CYP₄₅₀ 酶的抑制曲线见图 1。

结果显示,斯皮诺素对 CYP1A1、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4 的 IC₅₀ 分别为 1 714、1 158、226.1、2 288、80.59、101.1、1 119 μmol/L,远大于 50 μmol/L。这说明斯皮诺素对这 7 种亚型 CYP₄₅₀ 酶没有抑制作用,其由于代谢性相互作用而引发不良反应的可能性很小;在临床应用时,不易引发代

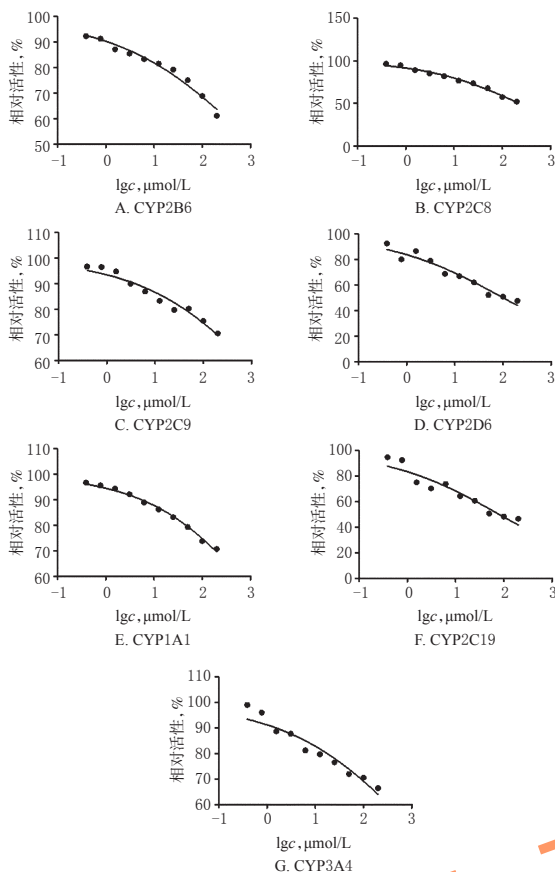


图1 斯皮诺素对CYP₄₅₀酶7种亚型的抑制曲线

Fig 1 Inhibition curves of spinosin on 7 subtypes of CYP₄₅₀ enzymes

代谢性药物相互作用。

3 讨论

内标物的选择应符合化学性质稳定、与被测物质性质相近、不与样品中的物质发生反应且保留时间与被测物质相近的要求。预试验中笔者比较了磺胺甲噁唑和盐酸苯海拉明,发现磺胺甲噁唑在正离子模式下峰形较好,故选定磺胺甲噁唑为本试验内标物。

参与肝脏药物代谢的CYP₄₅₀酶有CYP1、CYP2、CYP3及CYP4四个家族。酶抑制作用所致的药物相互作用的临床意义远大于酶诱导作用,酶抑制作用约占代谢性相互作用的70%^[6]。根据美国FDA推荐,本试验选择了7种特异性探针药物安非他酮、盐酸阿莫地喹、双氯芬酸钠、氢溴酸右美沙芬、他克宁、美芬妥英和咪达唑仑来评价斯皮诺素对7种亚型CYP₄₅₀酶的抑制作用,其生成的代谢产物分别为羟基安非他酮、N-脱乙基阿莫地喹、4'-羟基双氯芬酸、O-脱甲基右美沙芬、1-羟基他克宁、4'-羟基美芬妥英和1-羟基咪达唑仑。

IC₅₀表示药物在产生50%抑制作用时的药物浓度。该值越小,代表药物的抑制作用越强^[6]。化合物对CYP₄₅₀酶的抑制程度可按IC₅₀分为如下等级:强抑制剂(IC₅₀≤1 μmol/L),中等抑制剂(1 μmol/L<IC₅₀≤10 μmol/L),弱

抑制剂(10 μmol/L<IC₅₀≤50 μmol/L);当IC₅₀大于50 μmol/L时,化合物则被认为没有抑制作用^[13]。

本试验结果表明,斯皮诺素对人肝微粒体CYP₄₅₀酶的7种亚型CYP1A1、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6和CYP3A4均无抑制作用,引发药物代谢性相互作用的可能性较小。该结果为斯皮诺素的进一步临床研究和联合用药提供了实验基础。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:366-367.
- [2] 马进杰,刘萍,马百平.酸枣仁化学成分及其镇静催眠作用研究进展[J].国际药学研究杂志,2011,38(3):206-211.
- [3] Jiang JG, Huang XJ, Chen J, *et al.* Comparison of the sedative and hypnotic effects of flavonoids, saponins and polysaccharides extracted from Semen Zizyphus jujube [J]. *Nat Prod Res*, 2007, 21(4):310-320.
- [4] Li YJ, Bi KS. Study on the therapeutic material basis of traditional Chinese medicinal preparation Suanzaoren decoction[J]. *Chem Pharm Bull*, 2006, 54(6):847-851.
- [5] Wang LE, Bai YJ, Shi XR, *et al.* Spinosin, a C-glycoside flavonoid from Semen Zizyphi Spinosae, potentiated pentobarbital-induced sleep via the serotonergic system [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2008, 90(3):399-403.
- [6] 刘洁.“Cocktail”探针药物法评价丹参酮Ⅱ_A对大鼠肝微粒体细胞色素P₄₅₀不同亚型体外代谢活性的影响[D].天津:天津医科大学,2012.
- [7] 李丹,韩永龙,余奇,等.不同功效中药对细胞色素P₄₅₀影响的研究进展[J].中国药房,2011,22(7):656-658.
- [8] 许爱霞,贾海,袁继勇,等.振源胶囊对细胞色素P₄₅₀酶CYP1A2、CTP3A4、CYP2E1的影响[J].中国药房,2010,21(35):3290-3292.
- [9] 杨本坤,王素军,莫李立,等.药物代谢体外模型的研究进展[J].广东药科学,2011,27(6):649-652.
- [10] Yuan L, Jia PP, Sun YP, *et al.* Study of in vitro metabolism of m-nisoldipine in human liver microsomes and recombinant cytochrome P₄₅₀ enzymes by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 97(97):65-71.
- [11] 陈建龙,张玉玲,董宇,等. Cocktail探针药物法评价小檗碱对肝微粒体CYP₄₅₀酶的抑制作用[J].中国中药杂志,2013,38(12):2009-2014.
- [12] 徐文,王泽霞,刘涛,等.丹参中11个活性成分对人肝微粒体细胞色素酶活性的作用研究[J].中国药学杂志,2015,50(7):619-622.
- [13] 李海云.常用中药成分对药物代谢酶CYP3A4活性的影响[D].上海:第二军医大学,2009.

(收稿日期:2016-10-26 修回日期:2016-12-15)

(编辑:邹丽娟)