

毛蕊花糖苷对大鼠肝微粒体中6种CYP酶的体外抑制作用[△]

王志^{1,2*}, 张海波^{1,2}, 居博伟¹, 胡君萍¹, 杨建华^{1,2#} (1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆医科大学第一附属医院药学部, 乌鲁木齐 830011)

中图分类号 R285.5; R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)06-0685-08
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.06.07



摘要 目的 考察毛蕊花糖苷对大鼠肝微粒体细胞色素P450(CYP)酶的体外抑制作用。方法 采用探针底物法,在大鼠肝微粒体中加入0.1、0.3、1、3、10、30 μmol/L的毛蕊花糖苷,与探针底物非那西丁、美芬妥因、双氯芬酸、香豆素、右美沙芬、睾酮(分别为CYP1A2、CYP2C19、CYP2C9、CYP2A6、CYP2D6、CYP3A4酶的底物)共同孵育。在另设空白对照组和阳性抑制剂组[α -萘黄酮、噻氯匹定、磺胺苯吡唑、毛果芸香碱、奎尼丁、酮康唑(分别为CYP1A2、CYP2C19、CYP2C9、CYP2A6、CYP2D6、CYP3A4酶的抑制剂)]的基础上,以吲达帕胺为内标,采用超高效液相色谱-串联质谱法检测相应代谢产物(对乙酰氨基酚、4-羟基美芬妥因、4-羟基双氯芬酸、7-羟基香豆素、右啡烷、6 β -羟基睾酮)的含量,运用GraphPad v8.0软件计算半数抑制浓度(IC₅₀);采用计算机分子对接技术,将毛蕊花糖苷和阳性抑制剂分别与CYP酶进行分子对接,分析二者分子结合方式及结合能力强弱。结果 毛蕊花糖苷对CYP1A2、CYP2A6酶的IC₅₀>30 μmol/L,对CYP2D6、CYP2C19、CYP2C9、CYP3A4酶的IC₅₀分别为24.87、21.52、12.56、7.55 μmol/L。毛蕊花糖苷与CYP3A4酶之间可形成氢键并产生疏水作用力,酮康唑与CYP3A4酶之间可形成氢键并产生静电相互作用;毛蕊花糖苷和酮康唑与CYP3A4酶的结合自由能分别为-10.2、-12.4 kcal/mol(1 kcal/mol=4.19 kJ)。结论 毛蕊花糖苷对大鼠肝微粒体中CYP3A4酶有中等强度的抑制作用,且亲和力与阳性抑制剂相当;该化合物对其他5种CYP酶的抑制作用弱。

关键词 毛蕊花糖苷;大鼠肝微粒体;细胞色素P450酶;抑制作用;探针底物法;超高效液相色谱-串联质谱;分子对接技术

In vitro inhibitory effects of acteoside on 6 kinds of CYP enzymes in liver microsomes of rats

WANG Zhi^{1,2}, ZHANG Haibo^{1,2}, JU Bowei¹, HU Junping¹, YANG Jianhua^{1,2} (1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the *in vitro* inhibitory effects of acteoside on cytochrome P450(CYP) enzymes in liver microsomes of rats. **METHODS** Using probe substrates method, acteoside (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 μmol/L) was incubated with probe substrates phenacetin, mephenytoin, diclofenac, coumarin, dextromethorphan and testosterone (substrates of CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2A6, CYP2D6 and CYP3A4 enzymes, respectively) in liver microsomes of rats. Another blank control group and positive inhibitor group [α -naphthoflavone, ticlopidine, sulfabenzazole, pilocarpine, quinidine and ketoconazole (inhibitors of CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2A6, CYP2D6 and CYP3A4 enzymes, respectively)] were set up. Using indapamide as the internal standard, the contents of corresponding metabolites (acetaminophen, 4-hydroxymephenytoin, 4-hydroxydiclofenac, 7-hydroxycoumarin, dextran, 6 β -hydroxytestosterone) were detected by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The IC₅₀ values were calculated by GraphPad v8.0 software. By computer molecular docking technology, acteoside and positive inhibitors were molecularly docked with the CYP enzyme, and the binding mode and strength of the two molecules were analyzed. **RESULTS** The IC₅₀ values of acteoside to CYP1A2 and CYP2A6 enzymes were more than 30 μmol/L, and those of acteoside to CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9 and CYP3A4 enzymes were 24.87, 21.52, 12.56 and 7.55 μmol/L, respectively. The hydrogen bond and hydrophobic force could form between acteoside and CYP3A4 enzyme, and the hydrogen bond and electrostatic interaction could form between ketoconazole and CYP3A4 enzyme. The binding free energy of acteoside and ketoconazole to CYP3A4 enzyme were -10.2 and -12.4 kcal/mol (1 kcal/mol=4.19 kJ), respectively. **CONCLUSIONS** Acteoside shows moderate inhibitory effect on CYP3A4 enzyme in liver microsomes of rats, and its affinity is equivalent to that of positive inhibitor; the compound shows weak inhibitory effect on other 5 CYP enzymes.

KEYWORDS acteoside; liver microsome in rats; cytochrome P450 enzymes; inhibitory effect; probe substrates method; ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; molecular docking technology

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81860735);新疆维吾尔自治区科学技术厅科技创新领军人才后备人选项目(No.2019XS14);新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室(No.XJDX1713)

* 主管药师。研究方向:天然药物化学、临床药学。电话:0991-4366579。E-mail:wzls913@163.com

通信作者:主任药师,教授,博士生导师,博士。研究方向:天然药物化学。电话:0991-4362893。E-mail:yjh-yft@163.com

男性不育症是目前临床较为难治的疾病,其发病率呈逐年上升的趋势^[1-2]。现代医学认为,男性不育症的病因复杂,发病机制尚不清晰,但可确定的是:人体的正常生殖活动是在下丘脑-垂体-性腺轴的协调下完成的,所有异常的激素水平均可以影响男性生殖功能,导致男性生育能力降低^[3]。睾酮是经典的生殖内分泌激素,在

男性不育症的诊治中起着至关重要的作用。现有研究表明,细胞色素P450(cytochrome P450, CYP)酶是影响睾酮生成及代谢的主要酶,是肝微粒体混合功能氧化酶系统的主要组成部分,是机体代谢药物的重要酶^[4-5]。CYP1A2、CYP2C19、CYP2C9、CYP2A6、CYP2D6、CYP3A4等CYP酶与药物代谢功能的关联尤为密切,其代谢的药物占有CYP酶代谢药物的80%以上^[6]。药物产生相互作用的主要原因是CYP酶被抑制或诱导,约70%的代谢性相互作用主要是通过抑制药物代谢酶而产生的^[7]。

毛蕊花糖苷(结构式见图1)是从列当科Orobanchaceae肉苁蓉属*Cistanche*植物肉苁蓉*Cistanche deserticola* Y. C. Ma中提取的一种含量较高的苯乙醇苷类化合物^[8-9]。2020年版《中国药典》(一部)将毛蕊花糖苷列为肉苁蓉药材质量控制的指标成分^[10]。肉苁蓉是我国传统名贵补益类中药,性温、味甘,归肾经,具有补肾阳、益精血等功效^[11]。古代中医药典籍记载,肉苁蓉为补肾要药,是中医治疗男性不育症的核心药物,是历代补肾阳方剂中使用频率较高的补益药之一^[12]。有研究表明,肉苁蓉醇提物中的苯乙醇苷类化合物可使大鼠血清睾酮水平和CYP酶表达水平均显著升高^[13]。睾酮水平的升高除了与其介导的CYP酶表达增多有关外,还与其介导的代谢相关CYP酶被抑制有关^[14]。笔者由此推测,睾酮水平的升高可能与CYP酶被肉苁蓉苯乙醇苷类化合物抑制有关。基于此,本研究利用超高效液相色谱-串联质谱(ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)法结合肝微粒体体外代谢法^[15],选用《美国食品药品监督管理局药物相互作用评价指南》推荐的底物^[16],考察毛蕊花糖苷对大鼠肝微粒体中6种常见CYP酶CYP1A2、CYP2C19、CYP2C9、CYP2A6、CYP2D6、CYP3A4的影响,探讨该化合物是否会引起代谢性相互作用;同时,采用计算机分子对接技术对其潜在作用进行验证,以期毛蕊花糖苷的临床前研究和新药研发提供参考依据。

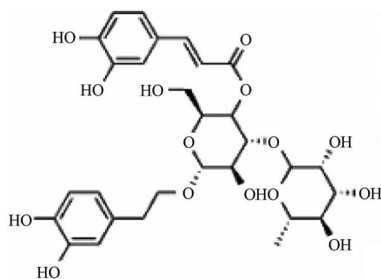


图1 毛蕊花糖苷的结构式

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Acquity型UPLC-三重四极杆质谱联用仪(美国Waters公司)、Thermo Sorvall ST 16R型高速冷冻离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司)、DK-S26型恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公

司)、DW-HL678型超低温冰箱(中科美菱低温科技股份有限公司)、雷磁PHSJ-3F型pH计(上海仪电科学仪器股份有限公司)、ME215S型分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)、MS3微型旋涡混合仪(德国IKA公司)、PURELAB Chorus 1 Complete型超纯水仪(英国ELGA公司)等。

1.2 主要药品与试剂

毛蕊花糖苷对照品(批号516V079,纯度 $\geq 98\%$)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸二钠(批号310O021,纯度 $\geq 98\%$)、葡萄糖-6-磷酸-二钠(批号407H034,纯度 $\geq 98\%$)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(批号821J012,纯度为90%)、非那西丁对照品(批号517C025,纯度 $\geq 98\%$)、对乙酰氨基酚对照品(批号615C023,纯度 $\geq 98\%$)、7-羟基香豆素对照品(批号923A024,纯度 $\geq 98\%$)均购自北京索莱宝科技有限公司;4-羟基美芬妥因对照品(批号20J001,纯度 $\geq 98\%$)、右啡烷对照品(批号202006,纯度 $\geq 98\%$)、睾酮对照品(批号202006,纯度 $\geq 98\%$)、6 β -羟基睾酮对照品(批号20J001,纯度 $\geq 98\%$)均购自北京汇智泰康医药技术有限公司;吲达帕胺对照品(内标,批号C10982435,纯度 $\geq 98\%$)、无水磷酸氢二钾(批号C10124744,纯度 $\geq 98\%$)、磷酸二氢钾(批号C11768869,纯度 $\geq 99.5\%$)、双氯芬酸对照品(批号C10093999,纯度 $\geq 98\%$)、香豆素对照品(批号C10929365,纯度 $\geq 98\%$)、 α -萘黄酮对照品(批号C10983885,纯度 $\geq 98\%$)、磺胺苯吡唑对照品(批号C10648002,纯度 $\geq 98\%$)、奎尼丁对照品(批号C10709588,纯度 $\geq 98\%$)、噻氯匹定对照品(批号C11608567,纯度 $\geq 98\%$)均购自上海麦克林生化科技有限公司;美芬妥因对照品(批号C34141133C65B,纯度 $\geq 98\%$)购自北京爱普拜生物科技有限公司;4-羟基双氯芬酸对照品(批号Y19O11W125336,纯度 $\geq 98\%$)、毛果芸香碱对照品(批号Y19O11W125514,纯度 $\geq 98\%$)、酮康唑对照品(批号C11573894,纯度 $\geq 98\%$)均购自上海源叶生物技术有限公司;右美沙芬对照品(批号1911271150R,纯度 $\geq 99\%$)购自广东翁江化学试剂有限公司;甲醇(色谱纯)和甲酸(色谱纯)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 其他

SD大鼠肝微粒体(20 mg/mL)购自北京汇智泰康医药技术有限公司,批号为20190910RS。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品溶液 精密称取毛蕊花糖苷对照品适量,用甲醇稀释并定容,配制成浓度为3 000 $\mu\text{mol/L}$ 的贮备液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存,备用。临用前,精密量取毛蕊花糖苷贮备液适量,依次用甲醇稀释成浓度分别为30、10、3、1、0.3、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的系列对照品溶液。

2.1.2 内标溶液 精密称取吲达帕胺对照品适量,用甲醇稀释并定容,配制成质量浓度为1 mg/mL的内标贮备液,于4 ℃下保存,备用。临用前,精密量取内标贮备液适量,用甲醇稀释成质量浓度为25 ng/mL的内标溶液。

2.2 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸再生系统溶液的配制

称取烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸二钠、葡萄糖-6-磷酸-二钠、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶各适量,分别用水溶解,分装并于-80 ℃下保存。使用时,取三者混合,配制成含烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸二钠7.5 mmol/L、葡萄糖-6-磷酸-二钠75 mmol/L、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶15 U/mL的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸再生系统溶液(后文简称“再生系统溶液”)。

2.3 探针底物溶液、代谢产物溶液及阳性抑制剂溶液的配制

精密称取CYP1A2、CYP2C19、CYP2C9、CYP2A6、CYP2D6、CYP3A4的探针底物(非那西丁、美芬妥因、双氯芬酸、香豆素、右美沙芬、睾酮)、代谢产物(对乙酰氨基酚、4-羟基美芬妥因、4-羟基双氯芬酸、7-羟基香豆素、右啡烷、6 β -羟基睾酮)和阳性抑制剂(α -萘黄酮、噻氯匹定、磺胺苯吡唑、毛果芸香碱、奎尼丁、酮康唑)对照品各适量,用甲醇稀释并定容,配制成质量浓度均为1 mg/mL的贮备液,于4 ℃下保存,备用。临用前,精密量取上述单一贮备液,用甲醇稀释成浓度分别均为0.1、2.5、1、1、2、1 mmol/L的溶液,备用。

2.4 肝微粒体孵育体系的建立

肝微粒体孵育体系终体积为200 μ L,体系中包含再生系统溶液60 μ L、4 mmol/L氯化镁20 μ L、肝微粒体20 μ L、探针底物20 μ L、0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.4,下同)100 μ L,其中甲醇含量不超过1%。配制方法如下:将磷酸盐缓冲液、肝微粒体、探针底物溶液、毛蕊花糖苷溶液或阳性抑制剂溶液混匀,于37 ℃水浴中预孵育5 min,加入再生系统溶液启动反应,再于37 ℃水浴中孵育相应时间(表1)后取样。向取出的孵育液中加入冰甲醇(终止反应)和内标溶液各100 μ L,于4 ℃下以12 000 r/min离心10 min,取上清液。将上述6种上清液等体积涡旋混合,于4 ℃下以12 000 r/min离心10 min,取上清液,进样测定。每个样本平行操作3次。

表1 6种探针底物肝微粒体孵育体系的反应条件

探针底物	CYP酶	肝微粒体蛋白质量浓度/(mg/mL)	孵育时间/min
非那西丁	CYP1A2	0.5	20
美芬妥因	CYP2C19	0.5	20
双氯芬酸	CYP2C9	0.5	60
香豆素	CYP2A6	0.5	60
右美沙芬	CYP2D6	0.5	10
睾酮	CYP3A4	0.5	10

2.5 分析方法的建立

2.5.1 色谱条件 以Acquity UPLC III BEH C₁₈(50 mm \times 2.1 mm,1.7 μ m)为色谱柱,以甲醇为流动相A、0.5%甲

酸溶液为流动相B进行梯度洗脱(洗脱程序见表2);流速为0.2 mL/min;柱温为35 ℃;样品室温度为4 ℃;运行时间为10 min;进样量为5 μ L。

表2 UPLC流动相梯度洗脱程序

时间/min	甲醇/%	0.05%甲酸溶液/%
0	25	75
0.5	25	75
5	95	5
7	95	5
7.1	25	75
10	25	75

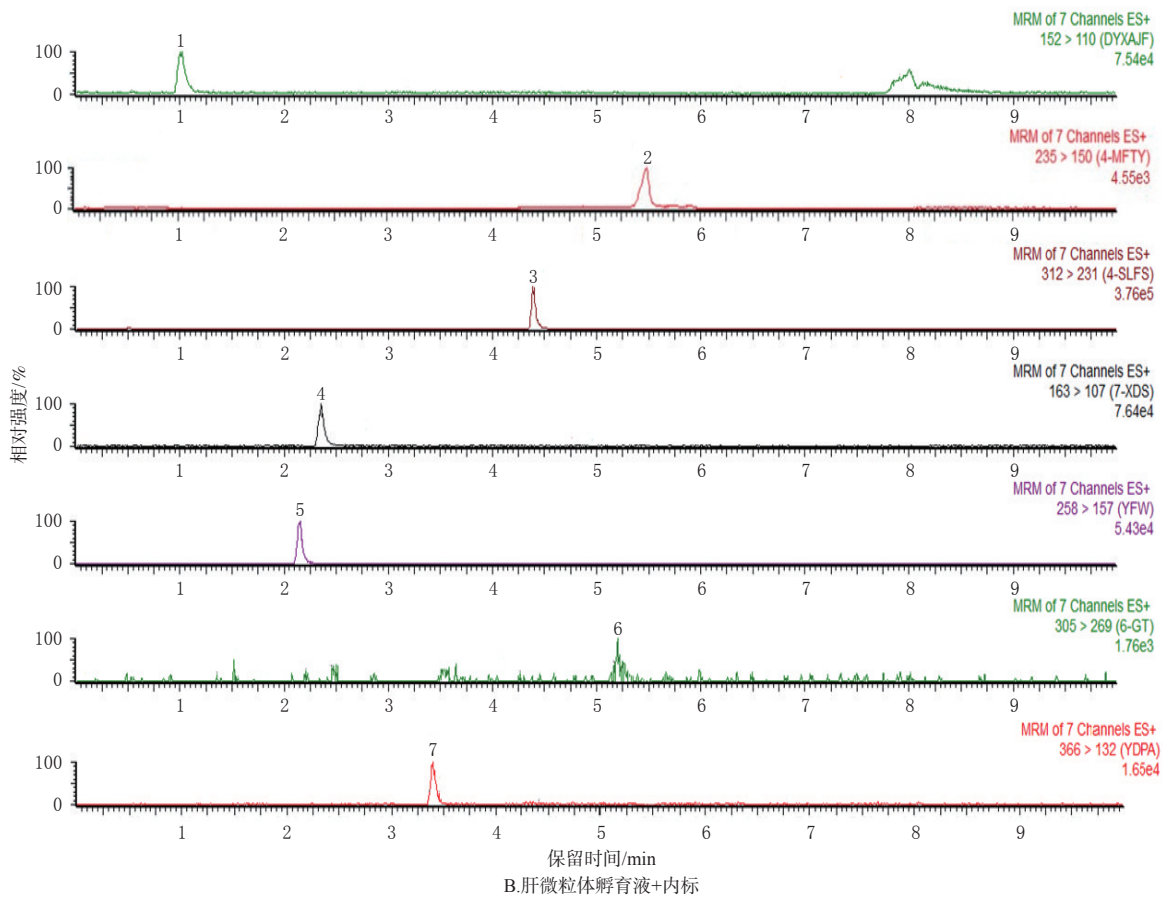
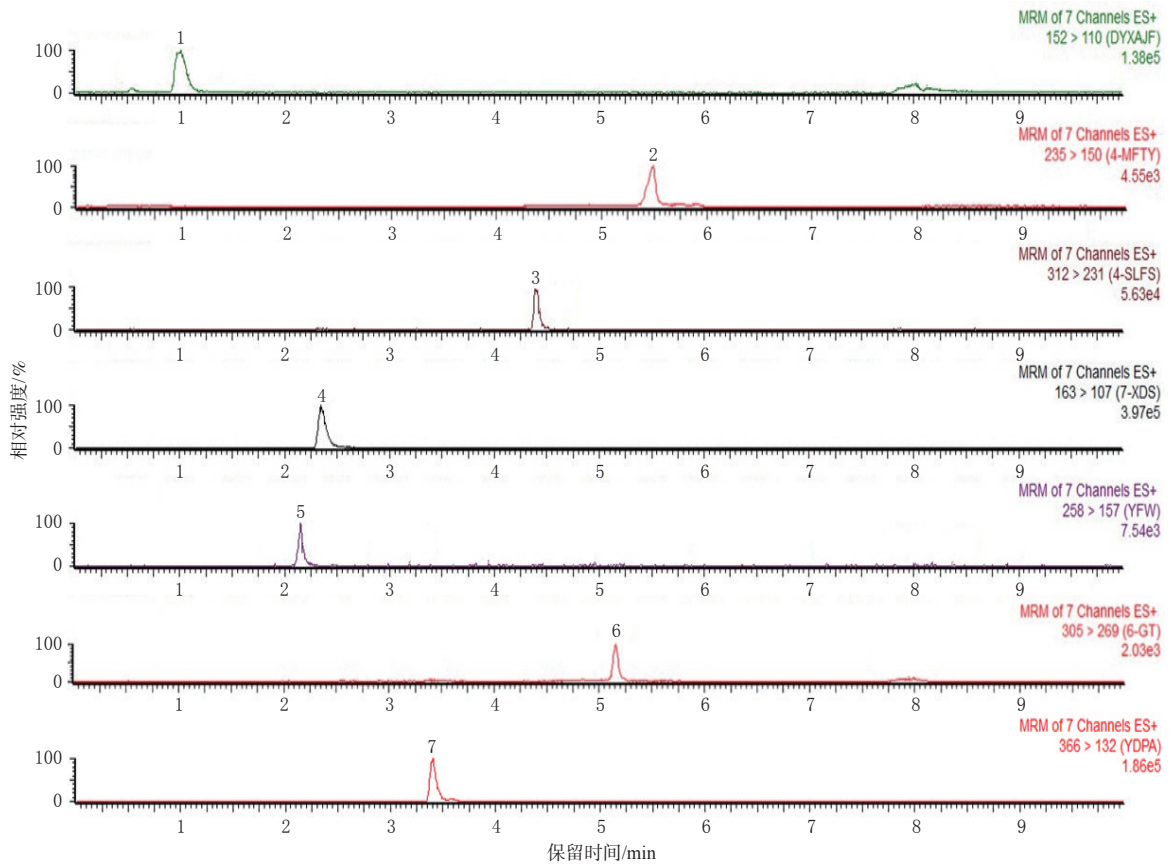
2.5.2 质谱条件 离子源为电喷雾电离源,离子源温度为150 ℃;毛细管电压为0.5 kV;脱溶剂气温度为350 ℃;锥孔气流量为1 L/h;脱溶剂气流量(氮气)为650 L/h;碰撞气为氩气(纯度大于99.999%);扫描模式为多反应监测模式,扫描方式为正离子扫描;数据采集范围为m/z 10~1 000,数据采集及处理软件为MassLynx V4.1工作站,通过调谐优化质谱参数,最终确定6种探针底物的代谢产物和内标的质谱条件如表3所示。

表3 6种探针底物的代谢产物和内标的质谱条件

代谢产物/内标	探针底物	前体离子m/z	产物离子m/z	锥孔电压/V	碰撞电压/eV
对乙酰氨基酚	非那西丁	152	110	39	14
4-羟基美芬妥因	美芬妥因	235	150	33	17
4-羟基双氯芬酸	双氯芬酸	312	231	25	20
7-羟基香豆素	香豆素	163	107	40	20
右啡烷	右美沙芬	258	157	40	40
6 β -羟基睾酮	睾酮	305	269	39	15
吲达帕胺(内标)		366	132	34	15

2.5.3 专属性考察 取空白肝微粒体,除不加探针底物、毛蕊花糖苷、内标外,其余按“2.4”项下方法处理,按“2.5.1”“2.5.2”项下色谱与质谱条件进样测定,记录色谱图(图略);将“2.3”项下代谢产物溶液和“2.1.2”项下内标溶液加至灭活的空白肝微粒体中,离心后同法进样测定,记录色谱图(图2A);按“2.4”项下方法制备肝微粒体孵育液,同法进样测定,记录色谱图(图2B)。结果显示,代谢产物对乙酰氨基酚、4-羟基美芬妥因、4-羟基双氯芬酸、7-羟基香豆素、右啡烷、6 β -羟基睾酮和内标的保留时间分别约为1.0、5.5、4.4、2.4、2.2、5.2、3.4 min,各色谱峰峰形和分离度均良好,表明本方法专属性良好。

2.5.4 线性关系与定量下限考察 分别吸取对乙酰氨基酚、4-羟基美芬妥因、4-羟基双氯芬酸、7-羟基香豆素、右啡烷、6 β -羟基睾酮单一贮备液适量,用甲醇稀释,配制成对乙酰氨基酚浓度分别为0.26、0.52、1.04、2.09、4.18、8.35 μ mol/L,4-羟基美芬妥因、4-羟基双氯芬酸、7-羟基香豆素、右啡烷浓度分别均为0.36、1.44、4.32、8.64、17.28、34.56 μ mol/L,6 β -羟基睾酮浓度分别为1.72、6.91、4.32、20.76、82.94、165.89 μ mol/L的对照品溶液。将上述6种代谢产物对照品溶液加至灭活的空白肝微粒体中,制成不同浓度的系列工作溶液,按“2.4”项下方法处



1: 对乙酰氨基酚; 2: 4-羟基美芬妥因; 3: 4-羟基双氯芬酸; 4: 7-羟基香豆素; 5: 右啡烷; 6: β -羟基睾酮; 7: 内标

图2 对乙酰氨基酚等6种代谢产物定量分析的总离子流图

理,按“2.5.1”“2.5.2”项下色谱与质谱条件进样测定,记录峰面积,每个浓度进行双样本分析。以代谢产物的浓度(x)为横坐标、其与内标的峰面积比值(y)为纵坐标进行线性回归,结果见表4。

表4 对乙酰氨基酚等6种代谢产物的回归方程、线性范围和定量下限

代谢产物	标准曲线	r	线性范围/($\mu\text{mol/L}$)	定量下限/($\mu\text{mol/L}$)
对乙酰氨基酚	$y=0.1469x+0.0575$	0.9972	0.000163~0.0163	0.000163
4-羟基美芬妥因	$y=0.2001x+0.0124$	0.9966	0.000170~0.0427	0.000170
4-羟基双氯芬酸	$y=0.4566x-0.0012$	0.9979	0.000170~0.0427	0.000170
7-羟基香豆素	$y=0.6990x-0.0360$	0.9989	0.000170~0.0427	0.000170
右啡烷	$y=2.3705x+0.1555$	0.9978	0.000170~0.0427	0.000170
6 β -羟基萘酮	$y=1.5850x+0.1032$	0.9988	0.000819~0.0819	0.000819

2.5.5 精密度与准确度试验 按“2.5.4”项下方法配制6种代谢产物定量下限和低、中、高浓度工作溶液,每个浓度平行6份,按“2.4”项下方法处理,按“2.5.1”“2.5.2”项下色谱与质谱条件进样测定,记录峰面积,计算批内精密度RSD和批内准确度[准确度=(测得值/真实值) \times 100%,下同];连续测定3d,计算批间精密度RSD和批间准确度,结果见表5。

表5 对乙酰氨基酚等6种代谢产物的精密度与准确度试验结果

代谢产物	浓度/($\mu\text{mol/L}$)	精密度RSD/%		准确度/%	
		批内(n=6)	批间(n=3)	批内(n=6)	批间(n=3)
对乙酰氨基酚	0.000163	8.81	5.30	95.03	91.87
	0.000326	4.57	6.03	100.40	101.20
	0.008150	5.50	6.30	97.87	105.00
	0.011410	3.98	4.35	99.79	99.38
4-羟基美芬妥因	0.000170	5.00	6.52	99.13	94.37
	0.000340	4.54	7.85	102.60	99.34
	0.021350	7.14	5.70	94.64	99.15
	0.029890	2.83	4.22	101.30	100.30
4-羟基双氯芬酸	0.000170	5.86	6.63	95.00	96.28
	0.000340	6.80	5.21	101.80	96.25
	0.021350	5.56	6.27	99.15	99.74
	0.029890	2.78	3.61	101.20	100.70
7-羟基香豆素	0.000170	8.65	7.11	97.83	93.75
	0.000340	5.05	4.56	95.43	93.06
	0.021350	6.07	5.41	99.95	100.70
	0.029890	2.61	2.42	99.17	97.99
右啡烷	0.000170	7.30	5.67	92.41	92.91
	0.000340	5.23	7.29	95.73	96.50
	0.021350	4.95	4.54	99.63	98.90
	0.029890	3.27	3.05	99.55	99.98
6 β -羟基萘酮	0.000819	7.35	6.54	93.23	92.19
	0.001638	7.07	6.23	94.48	96.25
	0.040950	3.53	2.64	101.90	101.00
	0.057330	3.45	4.27	101.60	99.83

2.5.6 基质效应 取空白肝微粒体,按“2.4”项下方法处理后,分别加入相应浓度的6种代谢产物的对照品溶液(按“2.3”项下方法配制),制成低、中、高浓度工作溶液,每个浓度平行6份,按“2.5.1”“2.5.2”项下色谱与质谱条件进样测定,记录峰面积(A_1)。另制备不含肝微粒体但含6种代谢产物和内标的对照品溶液,溶液终浓度与上

述浓度保持一致,同法进样测定,记录峰面积(A_2)。以 A_1 除以 A_2 计算代谢产物、内标的基质因子,以代谢产物的基质因子除以内标的基质因子计算经内标归一化的基质因子,结果见表6。

表6 对乙酰氨基酚等6种代谢产物的基质效应(n=6)

代谢产物	浓度/($\mu\text{mol/L}$)	内标归一化基质因子/%
对乙酰氨基酚	0.000326	92.87
	0.008150	96.38
	0.011410	96.45
	0.000340	92.91
4-羟基美芬妥因	0.000340	92.91
	0.021350	95.57
	0.029890	94.87
	0.000340	94.50
4-羟基双氯芬酸	0.000340	94.50
	0.021350	95.50
	0.029890	94.52
	0.000340	94.89
7-羟基香豆素	0.000340	94.89
	0.021350	97.40
	0.029890	95.52
	0.000340	95.25
右啡烷	0.000340	95.25
	0.021350	97.42
	0.029890	92.30
	0.001638	96.59
6 β -羟基萘酮	0.001638	96.59
	0.040950	94.03
	0.057330	94.22

2.5.7 稳定性试验 按“2.5.4”项下方法配制6种代谢产物低、中、高浓度工作溶液,按“2.4”项下方法处理后,分别考察室温下放置4h、进样器(4 $^{\circ}\text{C}$)中放置24h、-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存20d条件下的稳定性,结果见表7。

表7 对乙酰氨基酚等6种代谢产物的稳定性试验结果(n=3)

代谢产物	浓度/($\mu\text{mol/L}$)	RSD/%		
		室温下放置4h	4 $^{\circ}\text{C}$ 放置24h	-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存20d
对乙酰氨基酚	0.000326	4.17	4.73	7.12
	0.008150	2.89	3.22	3.43
	0.011410	1.91	3.16	3.22
4-羟基美芬妥因	0.000340	4.73	4.79	6.04
	0.021350	4.03	3.34	3.78
	0.029890	2.31	3.13	1.12
4-羟基双氯芬酸	0.000340	5.98	6.94	4.56
	0.021350	3.39	2.37	3.16
	0.029890	3.05	2.39	4.86
7-羟基香豆素	0.000340	4.76	5.31	6.13
	0.021350	3.92	2.39	4.19
	0.029890	3.62	3.19	4.29
右啡烷	0.000340	4.80	6.81	5.61
	0.021350	2.25	2.31	3.19
	0.029890	1.93	2.86	3.99
6 β -羟基萘酮	0.001638	6.44	3.46	5.33
	0.040950	3.64	2.75	5.61
	0.057330	3.61	1.91	3.63

2.6 肝微粒体孵育实验

2.6.1 肝微粒体孵育方法 肝微粒体孵育实验设置为空白对照组、阳性抑制剂组和毛蕊花糖苷组。按“2.4”项下方法建立体外孵育体系,毛蕊花糖苷组孵育体系中分别加入浓度为0.1、0.3、1、3、10、30 $\mu\text{mol/L}$ 的毛蕊花糖苷

溶液,阳性抑制剂组孵育体系中分别加入 α -萘黄酮、噻氯匹定、磺胺苯吡唑、毛果芸香碱、奎尼丁、酮康唑的磷酸钾缓冲液使各个阳性抑制剂的终浓度分别为25、20、10、10、10、1 $\mu\text{mol/L}$,空白对照组孵育体系中用等体积的磷酸钾缓冲液代替药物,各组孵育体系中探针底物非那西丁、美芬妥因、双氯芬酸、香豆素、右美沙芬、睾酮的浓度分别为150、25、30、10、10、50 $\mu\text{mol/L}$ ^[17]。孵育相应时间后取样,按“2.4”项下方法处理,再按“2.5.1”“2.5.2”项下色谱与质谱条件进样测定,计算各探针底物对应代谢产物对乙酰氨基酚、4-羟基美芬妥因、4-羟基双氯芬酸、7-羟基香豆素、右啡烷、6 β -羟基睾酮的含量。以空白对照组中代谢产物的含量为100%,以其余各组代谢产物的含量与空白对照组的百分比计算剩余酶活性(%)。以药物浓度的对数值为横坐标、剩余酶活性为纵坐标,采用GraphPad v8.0软件进行非线性拟合并计算半数抑制浓度(median inhibitory concentration, IC_{50})。

2.6.2 阳性抑制剂的酶抑制作用 阳性抑制剂 α -萘黄酮、噻氯匹定、磺胺苯吡唑、毛果芸香碱、奎尼丁、酮康唑对大鼠肝微粒体中CYP1A2、CYP2C19、CYP2C9、CYP2A6、CYP2D6、CYP3A4的 IC_{50} 分别为2.16、1.19、0.75、3.34、0.16、0.06 $\mu\text{mol/L}$,与相关文献^[18]结果基本一致,证明了本方法具有可行性。

2.6.3 毛蕊花糖苷的酶抑制作用 毛蕊花糖苷对大鼠肝微粒体中CYP1A2、CYP2C19、CYP2C9、CYP2A6、CYP2D6、CYP3A4酶的抑制曲线见图3。毛蕊花糖苷对大鼠肝微粒体中CYP1A2、CYP2A6酶的 $\text{IC}_{50}>30 \mu\text{mol/L}$ (本研究将毛蕊花糖苷的最高浓度设定为30 $\mu\text{mol/L}$, IC_{50} 超过30 $\mu\text{mol/L}$ 则认为无抑制作用),对大鼠肝微粒体中CYP2D6、CYP2C19、CYP2C9、CYP3A4酶的 IC_{50} 分别为24.87、21.52、12.56、7.55 $\mu\text{mol/L}$ 。参考国际通用的

CYP酶抑制剂强度分级规则—— IC_{50} 小于1 $\mu\text{mol/L}$ 为强抑制剂, IC_{50} 介于1~<10 $\mu\text{mol/L}$ 为中等强度抑制剂, IC_{50} 介于10~50 $\mu\text{mol/L}$ 为弱抑制剂^[19],毛蕊花糖苷是CYP3A4的中等强度抑制剂,对其他CYP酶的抑制作用弱。

2.7 分子对接

为了更好地理解毛蕊花糖苷与CYP酶之间的相互作用,采用分子对接法进行解释。CYP酶的蛋白结构从PDB蛋白数据库(<http://www.rcsb.org/>)下载;生成X、Y、Z坐标尺寸为50 \times 50 \times 50的网格框,网格点间距为0.375 \AA (1 $\text{\AA}=1\times 10^{-10} \text{ m}$)。使用AutoDock Vina 1.1.2软件分别将毛蕊花糖苷和阳性抑制剂的小分子连接到CYP酶的刚性蛋白中,采用拉马克学习遗传算法(Lamarckian genetic algorithm, LGA)计算毛蕊花糖苷和阳性抑制剂与CYP酶之间的分子对接活性域。根据对接结果,可以得到若干个对接结构,根据最低对接能量选择最优构象。利用Discovery Studio 2019软件打开CYP酶蛋白结构和对接结果,分析毛蕊花糖苷和阳性抑制剂与CYP酶之间的结合靶点和作用方式,同时计算两个复合物的结合自由能并进行比较,以判断亲和力的强弱。根据“2.6.3”项下结果,选择CYP3A4酶分别与毛蕊花糖苷、阳性抑制剂酮康唑进行分子对接。结果显示,毛蕊花糖苷与CYP3A4酶的相互作用(图4A)主要是通过氢键以及疏水作用力来介导的,包括该化合物分别与GLN-79、LYS-390形成氢键,与GLN-79、PRO-107形成C—H键,与PRO-227、LYS-378具有 π -烷基相互作用;酮康唑与CYP3A4酶的相互作用(图4B)主要是通过氢键以及静电相互作用来介导的,包括该化合物分别与ALA-370、ARG-372、PRO-107形成C—H键,与LEU-373具有 π -烷基相互作用,与PHE-213、PHE-304具有烷基相互作用,

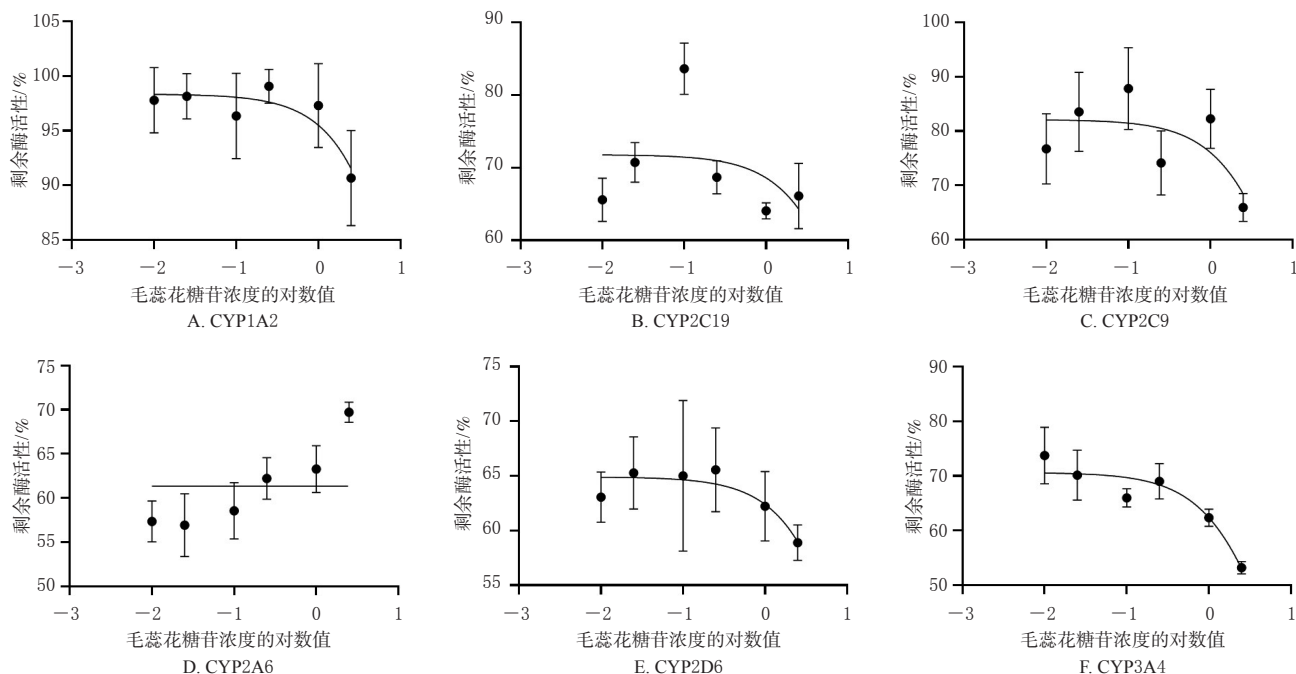


图3 毛蕊花糖苷对大鼠肝微粒体中6种CYP酶的抑制曲线($n=3$)

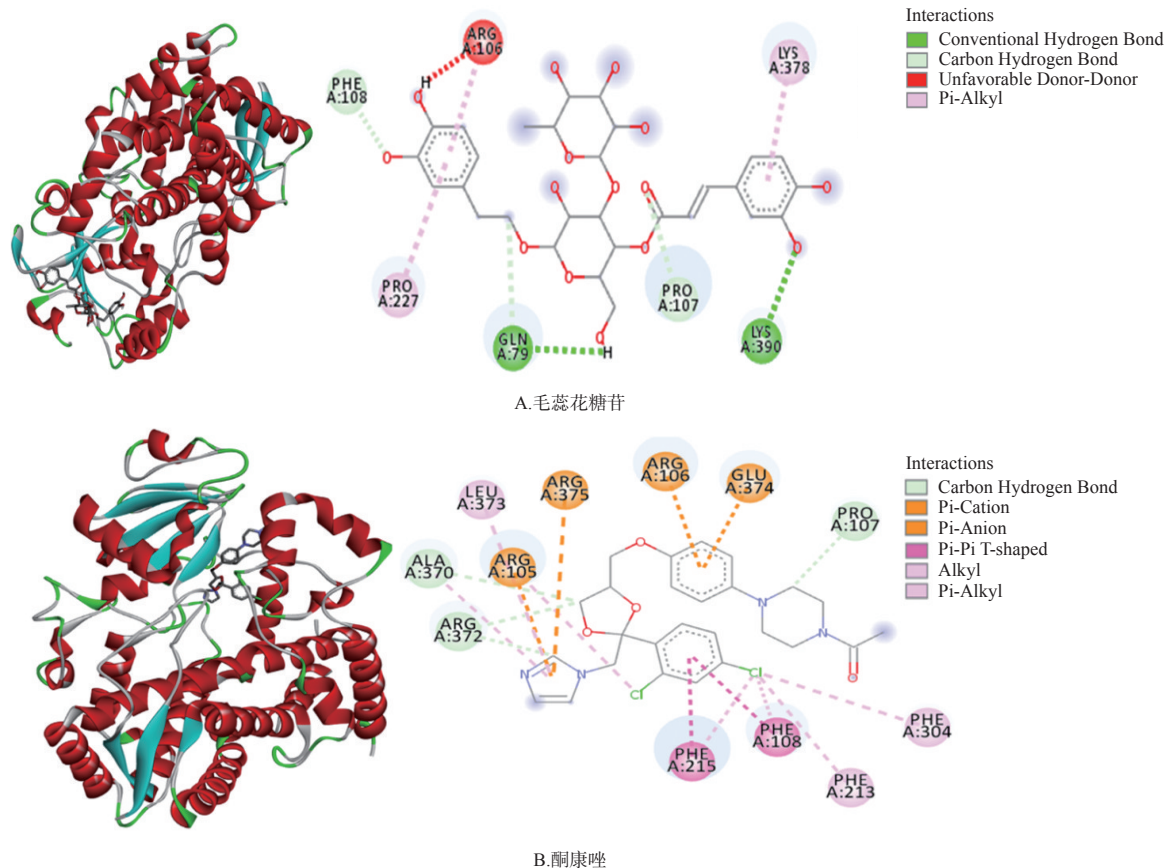


图4 毛蕊花糖苷、酮康唑与CYP3A4的对接模式图

与 PHE-215、PHE-108 具有 π - π 堆积作用,与 ARG-106、GLU-374 具有 π -阳离子静电相互作用,其咪唑环与 ARG-105、ARG-375 具有 π -阴离子静电相互作用。毛蕊花糖苷和阳性抑制剂酮康唑与 CYP3A4 的结合自由能分别为 -10.2 、 -12.4 kcal/mol (1 kcal = 4.19 kJ)。结合自由能绝对值越大,代表体系能量越稳定,结合能力越强^[20]。

3 讨论

酶抑制作用是预测药物相互作用的常用核心指标,被认为是研究药物代谢的关键^[21],因此近年来关于药物对 CYP 酶的抑制作用研究较常见,且多以促进临床安全用药为目的^[22-23]。本课题组以毛蕊花糖苷对 CYP 酶的抑制作用为机制研究的切入点,探究毛蕊花糖苷对睾酮水平调节的影响:首先以毛蕊花糖苷为研究对象,采用经典的大鼠肝微粒体体外孵育体系,借助快速灵敏的 UPLC-MS/MS 分析方法并结合探针底物法,对 CYP 酶探针底物的代谢产物进行测定,综合评估了毛蕊花糖苷对大鼠肝微粒体中 6 种 CYP 酶活性的影响;随后根据体外抑制实验结果,借助计算机辅助技术,针对性地将 CYP3A4 酶分别与毛蕊花糖苷、阳性抑制剂酮康唑进行分子对接,计算并比较两者的亲和力。由体外抑制实验结果可知,毛蕊花糖苷对大鼠肝微粒体中 CYP3A4 酶有中等强度抑制作用,而对其他 5 种 CYP 酶的抑制作用弱。由分子对接计算出的结合自由能可知,毛蕊花糖苷和阳性抑制剂酮康唑与 CYP3A4 酶的结合能力相当,且可通过氢键、疏水作用等方式发生相互作用,其结果可

间接印证体外抑制实验。

影响肝微粒体体外孵育反应的条件主要有肝微粒体浓度、底物种类及浓度、孵育时间以及再生系统,这些条件在实验中相互影响、相互制约。为了使肝微粒体孵育反应的结果更加准确、可靠,本课题组前期尽可能地优化了孵育体系的反应条件。(1)肝微粒体浓度:为了使代谢产物的形成速率与孵育时间、肝微粒体浓度成线性^[24-25],本实验以不同肝微粒体浓度 (0.2 、 0.5 、 0.8 mg/mL) 进行孵育,选择了代谢产物产量高且线性关系良好的 0.5 mg/mL 作为最终的肝微粒体浓度。(2)底物种类及浓度:因肝微粒体种属不同、体内外抑制条件不同,选择的底物种类也不同,故应根据《美国食品药品监督管理局药物相互作用评价指南》^[16]及 CYP 酶的种属对应关系选择合适的底物,这样才能得到较为准确的结果;同时在浓度方面,因为选择的底物种类可能不同,故不宜直接照搬文献记载的浓度,而应当在保证规定的底物清除率^[26]范围内,设定均匀的若干个浓度点进行考察以选择最优解。因本实验涉及底物较多,具体优化浓度过程不做赘述。(3)孵育时间:通常肝微粒体实验所用的孵育时间为 $5\sim 60$ min,但不同底物反应速率差异性大。为达到各 CYP 酶的最佳代谢产物量,本实验考察了每个 CYP 酶的孵育反应时间,并以文献数据^[27]为参照,选择 ± 10 min 进行优化预实验,最终确定最优孵育时间(表 1)。(4)再生系统:对于肝微粒体来说,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸二钠、葡萄糖-6-磷酸-二钠及葡萄糖-6-磷酸脱氢

酶是激活CYP酶介导代谢所需的关键辅助因子。该再生系统所含物质的保质期通常为3~6个月,在配制后酶活性随储存时间延长而下降,因此配制成贮备液后,应保证在适宜的储存条件(-80℃)下储存并尽早使用,以防储存时间过长而导致再生系统失活。

综上所述,毛蕊花糖苷对大鼠肝微粒体中CYP3A4酶有中等强度的抑制作用,且亲和力与阳性抑制剂相当;对其他5种CYP酶的抑制作用弱。但本研究也存在着一定的局限:由于在体研究涉及复杂的生物膜、调节通道等生理机制,故体外研究的预测性可能不完全准确^[25];同时,考虑到大鼠和人的CYP酶存在种属差异,且体内外代谢也存在一定的差异,故本课题组后期将在人源肝微粒体中继续研究毛蕊花糖苷对CYP3A4酶代谢的影响,进一步探究其对体内睾酮水平调节的作用机制。

参考文献

- [1] MINHAS S, BETTOCCHI C, BOERI L, et al. European Association of Urology guidelines on male sexual and reproductive health: 2021 update on male infertility[J]. *Eur Urol*, 2021, 80(5): 603-620.
- [2] BARRATT C L R, BJÖRNDAHL L, DE JONGE C J, et al. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance: challenges and future research opportunities[J]. *Hum Reprod Update*, 2017, 23(6): 660-680.
- [3] 邓庆. 136例血清性激素水平与男性不育症研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(3): 358-359.
- [4] ZHANG H, BASIT A, BUSCH D, et al. Quantitative characterization of UDP-glucuronosyltransferase 2B17 in human liver and intestine and its role in testosterone first-pass metabolism[J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 156: 32-42.
- [5] 王崇, 刘克辛. 外排型转运体与CYP450酶所介导的药物相互作用[J]. *药学报*, 2014, 49(5): 590-595.
- [6] 谢海棠, 贾元威, 谭志荣, 等. 豆腐果苷对人肝微粒体CYP450酶体外抑制作用研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2011, 31(17): 1404-1407.
- [7] 刘晓强, 袁淋文, 臧敏, 等. 评价HPPH对细胞色素P450酶体外代谢活性的影响[J]. *药学与临床研究*, 2014, 22(1): 29-33.
- [8] 李瑞燕, 赵明波, 屠鹏飞, 等. 一标多测法同时测定肉苁蓉中5种苯乙醇苷类成分的含量[J]. *J Chin Pharm Sci*, 2019, 28(8): 537-546.
- [9] ZHOU F, HUANG W S, XU T, et al. Natural P-gp inhibitor EGCG improves the acteoside absorption in Caco-2 cell monolayers and increases the oral bioavailability of acteoside in rats[J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 146: 111827.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 140.
- [11] 邱新建, 胡随瑜, 罗杰坤, 等. 《神农本草经》男性病相关用药归类分析[J]. *湖南中医药大学学报*, 2017, 37(2): 131-132.
- [12] 李昌璟. 《古今图书集成·医部全录》种子门方与导师治疗不育方的配伍用药数据挖掘比较分析[D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
- [13] 王甜. 管花肉苁蓉醇提物对雄性大鼠性激素水平的影响及CYP450酶介导的机理研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.
- [14] 刘克辛, 韩国柱. 临床药物代谢动力学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2009: 77-78.
- [15] 郑咪. 不同聚合度的PEG对人肝微粒体CYP酶的抑制作用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [16] U. S. FDA. Guidance for industry drug interaction studies: study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations[S]. 2012-02-01.
- [17] 于敏, 张双庆, 闻镍, 等. 细胞色素P450酶系体外药物代谢研究方法进展[J]. *中国药事*, 2013, 27(1): 81-87.
- [18] LEE J Y, LEE S Y, OH S J, et al. Assessment of drug-drug interactions caused by metabolism-dependent cytochrome P450 inhibition[J]. *Chem Biol Interact*, 2012, 198(1/2/3): 49-56.
- [19] JOHN B T, DAVID J T. Comprehensive medicinal chemistry II [M]. Oxford: Oxford university press, 2007: 231-257.
- [20] FERREIRA L G, DOS SANTOS R N, OLIVA G, et al. Molecular docking and structure-based drug design strategies[J]. *Molecules*, 2015, 20(7): 13384-13421.
- [21] CHO Y Y, JEONG H U, KIM J H, et al. Effect of honokiol on the induction of drug-metabolizing enzymes in human hepatocytes[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2014, 8: 2137-2145.
- [22] 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.
- [23] MEN L, ZHAO Y L, LIN H L, 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.
- [24] 孙鲁宁, 丁黎, 严拯宇, 等. LC-MS/MS法研究苯环喹啉铵对大鼠肝微粒体CYP450酶的抑制作用[J]. *中国药科大学学报*, 2013, 44(2): 134-140.
- [25] 曾苏. 药物代谢学[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2008: 214-216.
- [26] 陈鹏, 汪静, 张红盼, 等. 药物体外肝代谢的研究方法[J]. *中国药房*, 2017, 28(19): 2703-2707.
- [27] 陈琳. 白芷呋喃香豆素的体内外处置以及基于CYP酶的药物相互作用研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2017.
- [28] CHARRON C S, NOVOTNY J A, JEFFERY E H, et al. Consumption of baby kale increased cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) activity and influenced bilirubin metabolism in a randomized clinical trial[J]. *J Funct Foods*, 2020, 64: 103624.

(收稿日期:2021-10-20 修回日期:2022-02-14)
(编辑:邹丽娟)