

羊耳菊提取物对大鼠和人肝微粒体 CYP450 酶的体外抑制作用*

潘洁¹, 秦兰^{1,2}, 杨淑婷^{1,2}, 巩仔鹏³, 李勇军¹, 陆苑^{3**}

(1. 贵州医科大学 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心 & 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州 贵阳 550004;
2. 贵州医科大学 药学院, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 考察羊耳菊(YEJ)提取物对大鼠和人肝微粒体 CYP450 酶的 6 种主要亚型酶的抑制作用。方法: 采用钙盐沉淀法提取肝微粒体, 在肝微粒体孵育体系中, 用 PBS 溶液将 YEJ 提取物逐级稀释至 5 个不同浓度(0.01、0.05、0.25、0.5、1 g/L), 分别与混合探针底物(非那西丁、氯唑沙宗、右美沙芬、奥美拉唑、甲苯磺丁脲、咪达唑仑和睾酮)共同孵育, 采用超高效液相色谱串联质谱法(UPLC-MS/MS)同时测定 6 种探针底物对应代谢物的生成量, 以空白溶剂组的代谢物生成量为 V_0 , 其余不同 YEJ 提取物浓度的代谢物生成量为 V_x , 求得剩余酶活性 $I = (1 - V_x/V_0) \times 100$, 通过 GraphPad v 5.0 软件拟合曲线, 并计算 IC_{50} 值。结果: YEJ 提取物对大鼠肝微粒体 CYP1A2、CYP2C11、CYP2C19、CYP2D4、CYP2E1 和 CYP3A2 的 IC_{50} 值范围为 0.287 ~ 152.407 g/L, 对人肝微粒体 CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 和 CYP3A4 的 IC_{50} 值范围为 0.258 ~ 19.275 g/L。结论: YEJ 提取物对大鼠和人肝微粒体中 6 种亚型酶活性存在较弱的抑制作用。

[关键词] 细胞色素 P450 酶; 抑制作用; 药物相互作用; 人肝微粒体; 大鼠肝微粒体; 羊耳菊提取物

[中图分类号] R22; R285; R969.1; R284; R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)11-1273-05

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.11.006

Inhibitory Effects of *Inula Cappa* Extract on Cytochrome P450 Enzyme of Rat and Human Liver Microsomes *in vitro*

PAN Jie¹, QIN Lan^{1,2}, YANG Shuting^{1,2}, GONG Zipeng³, LI Yongjun¹, LU Yuan³

(1. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM & State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;
2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effects of *Inula cappa* (YEJ) extract on the activities of six CYP450 enzyme isoforms in rat and human liver microsomes. **Methods:** Liver microsomes were extracted by calcium salt precipitation. In the liver microsome incubation system, YEJ extract was diluted to 5 different concentrations (0.01, 0.05, 0.25, 0.5, 1 g/L) with phosphate buffer saline (PBS) buffer, and then incubated with a mixed probe substrates (phenacetin, chlorzoxazone, dextromethorphan, omeprazole, tolbutamide, midazolam, and testosterone). The metabolite amount was determined by ultra performance liquid chromatography-tandem mass

*[基金项目] 国家自然科学基金项目(81860734;U1812403); 中央引导地方科技专项项目[黔科中引地(2018)4006]; 贵州省科技厅人才团队项目[黔科合平台人才(2016)5613\5677]

** 通信作者 E-mail:314521537@qq.com

网络出版时间:2019-11-21 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20191120.2125.006.html>

spectrometry (UPLC-MS/MS). The amount of metabolites produced by the blank solvent group was recorded as V_0 , and the amount of metabolites produced by the other different YEJ extract concentrations was recorded as V_x . Residual enzyme activity (I) was calculated using the equation $I = (1 - V_x/V_0) \times 100$, and the activity curve was fitted by GraphPad v 5.0 software. IC_{50} values were calculated based on the activity curve. **Results:** The IC_{50} values of YEJ extracts ranged from 0.287 to 152.407 g/L on rat liver microsomal CYP1A2, CYP2C11, CYP2C19, CYP2D4, CYP2E1 and CYP3A2, and the IC_{50} values range from 0.258 to 19.275 g/L on human liver microsomes. **Conclusion:** YEJ extract has a weak inhibitory effect on the activity of six isoforms of CYP450 in rat and human liver microsomes.

[**Key words**] cytochrome P450 enzyme; inhibition; drug interaction; human liver microsomes; rat liver microsomes; *Inula cappa* extract

细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 主要存在肝脏中,是介导药物体内代谢最重要的一种超基因家族酶^[1-2]。CYP450 酶最主要的 6 种酶为 CYP1A2、CYP2C11 (人 CYP2C9)、CYP2C19、CYP2D4 (人 CYP2D6)、CYP2E1 及 CYP3A2 (人 CYP3A4),介导着体内绝大多数药物的代谢^[3-4]。临床药物代谢相互作用导致的不良反应中,70% 是由于 CYP450 酶被抑制^[5-6],因此,研究体外药物对 CYP450 酶主要亚型酶的抑制作用显得极其重要^[7-8]。羊耳菊 (*Inula cappa*, YEJ) 为菊科旋覆花属植物的新鲜或干燥全草^[9],是贵州苗族常用药材,苗语药名为“Bex nioux dant”(近似汉译音为“白牛胆”),在《苗族医药学》《中华本草·苗药卷》、2003 版《贵州省中药、民族药质量标准》中均有收载,常用于感冒发热、咽喉肿痛、风湿疼痛、疮疡疔毒及乳痈等症,有独特疗效^[10-11]。目前,市场上产品连菊感冒胶囊、鼻康片、双喉痹通颗粒和菊上黄清片等制剂均以 YEJ 为主药^[12-13],这些制剂或 YEJ 草药存在与其他抗菌药联合用药的情况^[14]。通常情况下抗菌药物的治疗效果由其血药浓度决定,若血药浓度过低,达不到治疗效果,反而导致耐药性的发生。目前,有关于 YEJ 对 CYP450 酶的体外抑制作用尚未见报道,本研究采用肝微粒体体外孵育技术结合“Cocktail 探针药物法”,以非那西丁、氯唑沙宗、右美沙芬、奥美拉唑、甲苯磺丁脲、咪达唑仑和睾酮为探针药物,考察 YEJ 提取物对大鼠和人肝微粒体 CYP450 的 6 种主要亚型酶 CYP1A2、CYP2C11 (人 CYP2C9)、CYP2C19、CYP2D4 (人 CYP2D6)、CYP2E1、CYP3A2 (人 CYP3A4) 的抑制作用,预测其在联合用药时潜在的代谢性相互作用,为其临床联合用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 超高压液相色谱-三重四级杆质谱联用仪(美国 Waters 公司),CS501A 超级恒温水浴箱(中国重庆银河试验仪器有限公司),Allegra 64R 低温高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司),700 系列超低温冰箱(美国 Thermo 公司)。

1.1.2 药材与试剂 实验中所用 YEJ 药材采集于贵州,经过贵州省食品药品检验所李杨主任药师鉴定为 *Inula cappa* (Buch. - Ham. ex D. Don) DC. 全草,非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、右美沙芬、睾酮购于美国 Sigma 公司(批号分别为 81105、90925、20321、10519、090M1298V),咪达唑仑注射液购于江苏恩华药业股份有限公司(批号 0150120),氯唑沙宗、对乙酰氨基酚购于中国食品药品检定研究院(批号分别为 100364-200301、100018-200408),右啡烷购于上海樊克生物有限公司(批号 FK-J1795),6-羟基氯唑沙宗、羟基甲苯磺丁脲、5-羟基奥美拉唑和 6 β -羟基睾酮购于加拿大 TRC 公司(批号分别为 1-PSB-27-2、1-PSB-27-2、6-QFY-28-2、KIT0635), α -羟基咪达唑仑购于美国 Cerilliant 公司(批号 FN101512-07),混合人肝微粒体(HLM)购于美国 BD 公司,G-6-P、G-6-PD 购于美国 Sigma 公司,NADP⁺ 购于 Roche 公司,乙腈购于德国默克试剂公司,其他无机盐均为分析纯,甲醇为色谱纯。

1.1.3 实验动物 健康 SD 大鼠、雄性、体质量(280 \pm 20)g,由重庆腾鑫生物技术有限公司提供,为清洁级动物,动物许可证号[SCXK(渝)2015-0001]。

1.2 方法

1.2.1 液相条件 色谱柱 Waters BEH C₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) 柱, 流速为 0.35 mL/min、柱温 45 ℃、流动相为 0.1% 甲酸乙腈(A) - 0.1% 甲酸水溶液(B)。检测 7 种专一性代谢产物的梯度条件为 0 ~ 3.0 min 5% ~ 65% A, 3.0 ~ 3.5 min 65% ~ 90% A, 3.5 ~ 4.5 min 10% A。进样体积为 2 μL。

1.2.2 质谱条件 电喷雾电离源(ESI), 毛细管电压 3 kV, 离子源温度 120 ℃, 去溶剂气温度 350 ℃, 去溶剂气 N₂、流速 650 L/h, 反吹气 N₂、流速 50 L/h, 碰撞气 Ar、流速 0.16 mL/min, 质谱数据采集及处理软件为 MassLynx V4.1 工作站, 扫描方式为多反应离子监测模式(MRM), 离子对条件见表 1。

表 1 质谱条件

Tab. 1 The mass spectrometric settings

检测物	ESI	Parent (m/z)	Daughter (m/z)	Cone (V)	Collision (eV)
对乙酰氨基酚	+	152.0	110.0	30	15
6-羟基氯唑沙宗	-	183.8	120.0	30	20
羟基甲苯磺丁脲	-	285.0	186.0	35	18
6β-羟基睾酮	+	305.3	269.3	35	15
α-羟基咪达唑仑	+	342.0	324.0	35	20
5-羟基奥美拉唑	+	362.2	214.0	20	15
右啡烷	+	258.4	199.0	25	25
葛根素(内标)	+	417.0	267.0	40	30

1.2.3 制备大鼠混合肝微粒体(RLM) 6 只雄性 SD 大鼠, 禁食过夜, 自由饮水; 次日, 股动脉处死, 立即取出肝脏、采用钙盐沉淀法^[15] 制备肝微粒体, 混合均匀并分装, 于 -80 ℃ 下储存备用; 临用前按考马斯亮蓝试剂盒指导方法测定总蛋白浓度, 再用 PBS(0.1 mol/L, pH 7.4) 缓冲盐溶液配制成所需浓度。

1.2.4 YEJ 提取物对 RLM 和 HLM 中 CYP450 亚型酶的抑制作用 孵育体系终体积为 200 μL, 包

括肝微粒体蛋白(0.5 g/L)、NADP⁺ (20 g/L)、G-6-P(20 g/L)、MgCl₂ (13.3 g/L)、G-6-PD(40 U/mL)、非那西丁(1.0 mol/L)、氯唑沙宗(1.5 mol/L)、右美沙芬(1.0 mol/L)、奥美拉唑(0.25 mol/L)、甲苯磺丁脲(1.0 mol/L)、咪达唑仑(0.5 mol/L) 和睾酮(0.5 mol/L), 以及不同浓度(0.01、0.05、0.25、0.5、1 g/L) 的 YEJ 提取物, 冰浴上操作。在 RLM 或 HLM 孵育体系中加入不同浓度 YEJ 提取物后, 37 ℃ 恒温水浴中预孵 3 min, 再加入混合探针底物开始反应; 实验中溶解探针药物的有机溶剂甲醇小于 1%, DMSO 小于 0.1%, 不引起酶活性的改变; 孵育时间为 60 min, 每个浓度平行操作 5 次, 反应结束后加入 100 μL 冰甲醇终止反应, 再加入 100 μL 内标溶液(葛根素 2 mg/L)、涡混、超声 3 min、15 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2 μL 按照“1.2.1”和“1.2.2”项下 UPLC-MS/MS 分析 7 种探针药物对应的代谢物生成量, 通过 GraphPad v 5.0 软件拟合曲线并计算半数抑制浓度(IC₅₀) 值。

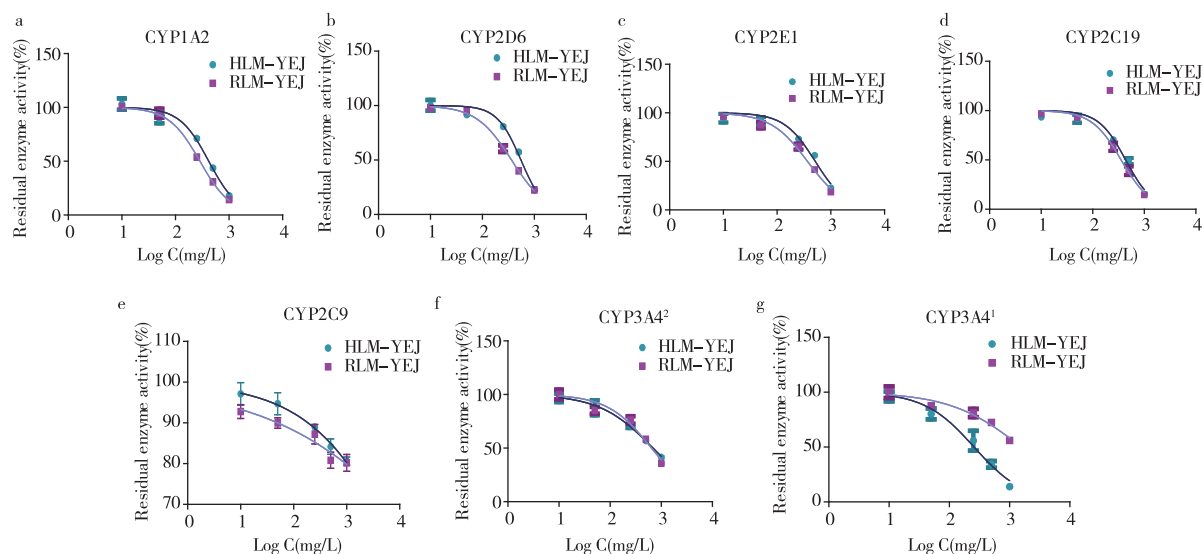
2 结果

以空白溶剂组的代谢物生成量为 V₀, 其余不同体积百分浓度的代谢物生成量为 V_x, 剩余酶活性 $I = (1 - V_x/V_0) \times 100$; 然后以剩余酶活性为纵坐标, YEJ 提取物提取物不同浓度的对数值为横坐标, 通过 GraphPad v 5.0 软件拟合曲线并计算 IC₅₀ 值。结果如表 2 和图 1 所示, CYP1A2、CYP2C11 (人 CYP2C9)、CYP2C19、CYP2D4 (人 CYP2 D6)、CYP2E1 和 CYP3A2 (人 CYP3A4) 亚型酶的 IC₅₀ 值远远大于羊耳菊提取物临床一次剂量(0.011 32 ~ 0.022 65 g/L), 提示羊耳菊提取物对 CYP1A2、CYP2C11 (人 CYP2C9)、CYP2C19、CYP2D4 (人 CYP2 D6)、CYP2E1 和 CYP3A2 (人 CYP3A4) 亚型酶活性体外抑制作用较弱。

表 2 YEJ 提取物对 RLM 和 HLM 6 种 CYP450 亚型酶的 IC₅₀

Tab. 2 IC₅₀ values of YEJ extract on six CYP450 isoforms in RLM and HLM

CYP(鼠)	CYP(人)	探针药物	代谢物	IC ₅₀ (g/L)	
				RLM	HLM
1A2	1A2	非那西丁	对乙酰氨基酚	0.287	0.419
2E1	2E1	氯唑沙宗	6-羟基氯唑沙宗	0.365	0.553
2D4	2D6	右美沙芬	右啡烷	0.369	0.514
2C19	2C19	奥美拉唑	6-羟基奥美拉唑	0.356	0.436
2C11	2C9	甲苯磺丁脲	羟基甲苯磺丁脲	152.407	19.275
3A2	3A4	咪达唑仑	羟基咪达唑仑	0.645	0.692
-	-	睾酮	羟基睾酮	1.583	0.258



注: a 示对乙酰氨基酚生成量, 表示 CYP1A2 酶剩余活性; b 示右啡烷生成量, 表示 CYP2D6 酶剩余活性; c 示 6-羟基氯唑沙宗生成量, 表示 CYP2E1 酶剩余活性; d 示羟基奥美拉唑生成量, 表示 CYP2C19 酶剩余活性; e 示羟基甲苯磺丁脲生成量, 表示 CYP2C9 酶剩余活性; f 示 α -羟基咪达唑仑生成量, 表示 CYP3A4 酶剩余活性; g 示 6 β -羟基睾酮生成量, 表示 CYP3A4 酶剩余活性。

图 1 YEJ 提取物对 RLM 和 HLM 6 种 CYP450 亚型酶的抑制作用 ($n=3$)

Fig. 1 *In vitro* inhibitory effects of YEJ extract on the activities of six CYP450 isoforms in RLM and HLM

3 讨论

药物代谢酶以 CYP450 为主, 药物对 CYP450 酶活性的抑制作用将导致联用药物的毒副作用的发生, 因此为保证患者用药的安全性及有效性, 在中药的口服制剂研究过程中考察药物对 CYP450 酶潜在的抑制作用是不可或缺的一部分^[16-17]。大鼠和人存在种属差异^[18-19], 因此本实验采用肝微粒体体外孵育技术结合“Cocktail 探针药物法”, 考察了 YEJ 提取物对 RLM 和 HLM 中 6 种亚型 CYP1A2、CYP2C11 (人 CYP2C9)、CYP2C19、CYP2D4 (人 CYP2D6)、CYP2E1 和 CYP3A2 (人 CYP3A4) 的酶活性的影响。结果表明, YEJ 提取物对大鼠肝微粒体 CYP1A2、CYP2C11、CYP2C19、CYP2D4、CYP2E1 和 CYP3A2 的 IC_{50} 值范围为 0.287 ~ 152.407 g/L, 对人肝微粒体 CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 和 CYP3A4 的 IC_{50} 值范围为 0.258 ~ 19.275 g/L。YEJ 1 次口服生药量为 15 ~ 30 g 生药/次^[20], 其提取物的转化率为 7%, 则生药相当于 1.05 ~ 2.1 g YEJ 提取物, 对应孵育体系中药物浓度分别为 0.011 32 ~ 0.022 65 g/L, IC_{50} 远高于临床一次口服剂量, 提示 YEJ 提取物对 RLM 和 HLM 中 6 种亚型

酶活性的抑制作用非常弱, 因此推测 YEJ 有关制剂在临床上使用时, 与其他药物发生竞争性抑制作用的可能性比较低。

4 参考文献

- [1] 孙佳, 陆苑, 潘洁, 等. 参芎葡萄糖注射液对肝脏 6 种亚型微粒体细胞色素 P450 酶的抑制作用[J]. 贵州医科大学学报, 2016, 41(7): 775-778.
- [2] 王静娴, 陆苑, 黄勇, 等. Cocktail 探针药物法评价灯盏乙素及其苷元对大鼠细胞色素 P450 酶的影响[J]. 中国医药工业杂志, 2014, 45(3): 261-264.
- [3] 宋菲, 杨健, 王春, 等. Cocktail 探针药物法评价羊耳菊对大鼠 CYP450 酶活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(2): 60-67.
- [4] 刘蓬蓬, 贾天柱, 徐珊, 等. Cocktail 探针药物法评价生、制黄柏对 CYP450 酶亚型的影响[J]. 中药材, 2015, 38(10): 2065-2069.
- [5] 陆苑, 谢玉敏, 潘洁, 等. 超高效液相色谱法检测 6 种探针底物代谢产物并评价人细胞色素 P450 同工酶活性[J]. 贵阳医学院学报, 2015, 40(6): 560-565.
- [6] 蔡小军, 黄凯, 宋惠珠, 等. 斑蝥酸钠维生素 B6 和复方苦参注射液对人肝微粒体细胞色素 P450 酶活性的抑制作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(21): 2150-2153.

- [7] 孙鲁宁, 吴春勇, 赵舜波, 等. 药物对人肝 CYP450 酶诱导和抑制作用体外评价体系的建立与验证[J]. 药学学报, 2017, 52 (12): 1924 – 1932.
- [8] 陈燕芬, 陈景秀, 孙萌, 等. SM-1 对人肝微粒体细胞色素 P450 亚型酶的抑制作用[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(5): 627 – 629.
- [9] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志, 第 75 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1985.
- [10] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003.
- [11] 张敬杰, 赵能武, 潘炉台. 苗医治疗疾病常用的菊科植物药[J]. 中国民族医药杂志, 2010, 16 (2): 25.
- [12] 巩仔鹏, 李梅, 熊荻菲菲, 等. 基于体内外炎症模型研究羊耳菊提取物的抗炎活性[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(12): 2050 – 2055.
- [13] 巩仔鹏, 侯靖宇, 侯佳, 等. 羊耳菊活性部位提取物在大鼠胆汁中代谢产物的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 29: 1700 – 1705.
- [14] 刘斌, 沈维青, 刘柏林. 抗菌药物的临床合理应用分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(11): 2670 – 2671.
- [15] KATIA ROBERTA A, BELAZ, REGINA V, et al. HPLC-fluorescence determination of EROD activity in wistar rat liver microsomes obtained by two different extraction procedures[J]. Curr Pharm Anal, 2013, 9: 43 – 53.
- [16] DONG G, ZHOU Y, SONG X, et al. In vitro inhibitory effects of bergenin on human liver cytochrome P450 enzymes[J]. Pharm Biol, 2018, 56(1): 620-625.
- [17] 侯健, 孙娥, 宋捷, 等. 肝脏药物代谢酶 CYP450 与中药肝毒性的关系[J]. 中国中药杂志, 2016, 41 (15): 2774 – 2780.
- [18] 潘洁, 陆苑, 孙佳, 等. 艾迪注射液对体外人和大鼠肝微粒体中 CYP450 酶的抑制作用[J]. 中成药, 2016, 38(11): 2332 – 2337.
- [19] 吴桐, 阳海鹰, 原梅, 等. 雷公藤甲素在人和大鼠肝微粒体代谢消除和酶动力学的比较研究[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(10): 1414 – 1419.
- [20] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[M]. 贵阳: 贵州科学技术出版社, 2003.
- (2019-06-28 收稿, 2019-10-28 修回)
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 张启芳