

紫草羟基萘醌对大鼠肝微粒体 CYP2D6 的影响

杨力¹, 邹晓丽², 柴媛媛², 许卉^{2*}, 刘珂^{2,3} (1.沈阳化工大学化学工程学院, 沈阳 110142; 2.烟台大学药学院, 山东 烟台 264005; 3.山东靶点药物研究有限公司, 山东 烟台 264005)

摘要: 目的 研究紫草羟基萘醌(HNA)对大鼠肝微粒体 CYP2D6 的影响。方法 Wistar 大鼠, ♂, 口服给予不同剂量的 HNA(5, 60 mg·kg⁻¹·d⁻¹)或等量的空白溶媒, 连续给药 2 周后制备肝微粒体。以体外探针药物右美沙芬的代谢物右啡烷的生成速率来反映 CYP2D6 的活性, 通过比较给药组与空白溶媒组酶活性的差异来评价 HNA 对大鼠肝微粒体 CYP2D6 的影响。结果 建立了一种以右美沙芬为探针底物评价大鼠肝微粒体 CYP2D6 活性的方法。口服给予 HNA 两周后, 两个剂量组大鼠的肝微粒体蛋白含量、细胞色素 P450 总量、b5 含量以及 CYP2D6 的活性与空白溶媒组相比差异均无统计学意义。结论 5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 和 60 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 剂量的紫草羟基萘醌口服 2 周对 Wistar 大鼠肝微粒体 CYP2D6 的活性均无显著影响, 没有明显的诱导或抑制作用。

关键词: 紫草羟基萘醌; 大鼠肝微粒体; CYP2D6; 右美沙芬

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2011)09-0792-04

Influence of Hydroxynaphthoquinone of *Arnebia Euchroma* (Royle) Johust. on Rat CYP2D6 Activity

YANG Li¹, ZOU Xiaoli², CHAI Yuanyuan², XU Hui^{2*}, LIU Ke^{2,3} (1. Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, China; 2. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China; 3. Shandong Target-Drug Research Co. Ltd., Yantai 264005, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the influence of hydroxynaphthoquinone of *Arnebia Euchroma* (Royle) Johust. (HNA) on CYP2D6 activity of Wistar rats. **METHODS** Liver microsomes of male Wistar rats were prepared after orally administrated HNA (5 and 60 mg·kg⁻¹·d⁻¹) or vehicle for 2 weeks. The CYP2D6 activity of rats was examined by the *in vitro* formation rate of dextrorphan metabolized from dextromethorphan. The effect of HNA on CYP2D6 was evaluated by comparing the data from administration groups with those from control group. **RESULTS** An accurate and rapid method was established to inspect CYP2D6 activity of rats by using dextromethorphan hydrobromide as a probe substrate. The study showed no significant differences on contents of microsome protein, cytochrome P450, cytochrome b5 and CYP2D6 activity among the administration groups and control group. **CONCLUSION** Oral administration of HNA for 2 weeks at dosage level ranging from 5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ to 60 mg·kg⁻¹·d⁻¹ has no effect on CYP2D6 activity of Wistar rats. This result indicates that HNA orally administrated to rats has no significant inhibitory or inductive effect on CYP2D6 activity in liver microsome.

KEY WORDS: hydroxynaphthoquinone of *Arnebia Euchroma* (Royle) Johust.; rat liver microsome; CYP2D6; dextromethorphan

紫草为紫草科植物新疆紫草 *Arnebia Euchroma* (Royle) Johnst. 或内蒙紫草 *Arnebia guttaata* Bunge 的干燥根, 性甘、咸、寒, 归心、肝经。具有凉血, 活血, 解毒透疹的功能。临床常用于血热毒盛、斑疹紫黑、麻疹不透、疮疡、

湿疹、水火烫伤的治疗^[1]。现代研究表明, 紫草含有苯酚及苯醌类成分、生物碱、酚酸类、三萜酸和酸性多糖等化学成分, 其中羟基萘醌类色素 (HNA) 是主要有效成分^[2]。有关 HNA 的研究涉及药理活性、药动学特征以及化学合成等诸多方

作者简介: 杨力, 女, 硕士生 Tel: 13920884632
Tel: (0535)6706030 E-mail: xuhui33@sina.com

E-mail: yangli_sisi@126.com

*通信作者: 许卉, 女, 博士, 副教授

面^[3-5], 但针对这类化学成分对细胞色素 P450 酶 (CYP450)影响的研究目前尚未见文献报道。

CYP450 酶是 I 相生物转化中催化多种药物、前毒物、前致癌物等外源性物质的主要酶类, 主要由 CYP1, CYP2 和 CYP3 三个亚族组成。其中 CYP2D6 是一种重要的 CYP450 氧化代谢酶, 参与代谢的药物占总 CYP450 代谢药物的 30%^[6]。由 CYP2D6 参与代谢的很多药物有效剂量范围很窄, 单用时可能对其活性产生诱导或抑制的作用, 多种药物合用时可能引发药物相互作用。因而研究药物对 CYP2D6 的影响具有重要的临床意义。

本试验以右美沙芬作为 CYP2D6 的探针底物, 通过 HPLC 测定体外孵化体系中代谢物右啡烷的浓度, 由其生成速率来评价肝微粒体 CYP2D6 的活性, 并根据给药组和空白溶媒组肝微粒体 CYP2D6 酶比活性差异的统计分析结果考察 HNA 对 CYP2D6 的影响, 为 HNA 进一步的开发提供实验依据。

1 材料

1.1 试剂

HNA 由山东靶点药物研究有限公司提供, 依药典方法测定其中羟基萘醌含量 $\geq 85\%$; 牛血清白蛋白(BSA)、氢溴酸右美沙芬、酒石酸右啡烷、非那西丁均购自美国 Sigma 公司; 考马斯亮蓝 G-250(Serva 公司); NADPH(Roche 公司); 其他试剂均为市售分析纯或色谱纯。

1.2 动物

成年 Wistar 大鼠, δ , (370 \pm 30)g, 由北京芳缘园实验动物养殖场提供。实验动物合格证号: SCXK(京)2006-2008。

1.3 仪器和设备

UV-2550 双光束紫外可见分光光度计(日本岛津公司); SHA-CA 水浴恒温振荡器(金坛市恒丰仪器厂); Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。

2 方法

2.1 给药方法

Wistar 大鼠 15 只随机分成 3 组, 每组 5 只。根据药效学实验确定的有效剂量, 分别灌胃给予低剂量(5 mg·kg⁻¹·d⁻¹)和高剂量(60 mg·kg⁻¹·d⁻¹)的 HNA 以及等量的空白溶媒。每天给药 1 次, 连续给药 2 周。

2.2 肝微粒体的制备与评价

大鼠于末次给药后禁食 24 h, 断头处死, 迅

速取出肝脏, 用冰冷生理盐水洗净血液。将肝脏剪碎, 加入 4 倍于肝湿重的 0.25 mol·L⁻¹ 蔗糖溶液, 用钙沉淀法^[7]制备肝微粒体悬液, 分装于试管中, 放置于 -80 °C 冰箱保存备用。微粒体蛋白含量以 BSA 为标准, 根据 Bradford 法^[8]测定。细胞色素 P450 总量采用 CO 还原差示光谱法^[9]测定。细胞色素 b5 含量的测定除不用 CO 气体外, 其余步骤与细胞色素 P450 含量测定方法相同^[10]。

2.3 CYP2D6 孵化条件及样本处理方法

孵化体系中包含氢溴酸右美沙芬 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MgCl₂ 2 mmol·L⁻¹, NADPH 1 mmol·L⁻¹, 肝微粒体蛋白 0.5 mg·mL⁻¹, 总体积为 500 μL 。37 °C 水浴振荡中预孵化 5 min 后, 加入 NADPH 启动反应, 孵化 30 min 后冰水浴终止反应。加入 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 非那西丁溶液(内标)100 μL , 3 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 100 μL , 以及萃取液(正己烷: 二氯甲烷: 异丙醇=20: 10: 1)2 mL, 涡旋混合 1 min, 8 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清于 40 °C 水浴下氮气吹干, 加入 150 μL 流动相复溶, 14 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清进行 HPLC 分析。

2.4 酶动力学实验

2.4.1 孵化条件优化 孵化体系中其他条件不变, 在 5~60 min 内不同时间点停止反应, 其余按“2.3”项下方法操作。以孵化时间-右啡烷浓度作图, 选择在线性范围内的时间点确定最佳孵化时间。肝微粒体蛋白浓度实验设定范围在 0.1~0.7 mg·mL⁻¹, 其余按“2.3”项下方法操作。以肝微粒体蛋白浓度-右啡烷浓度作图, 选择在线性范围内的肝微粒体蛋白浓度确定最佳孵化蛋白浓度。

2.4.2 酶动力学参数 孵化体系中其他条件不变, 在 40~400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内改变探针药物氢溴酸右美沙芬的浓度, 其余按“2.3”项下方法操作。以孵化体系中氢溴酸右美沙芬浓度及右啡烷产率作双倒数方程, 根据方程求算孵化体系中氢溴酸右美沙芬的 K_m 和 V_{\max} 值。

2.5 色谱条件

色谱柱 Alltima C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇-水(含 0.2%磷酸)为 43: 57; 柱温为 30 °C; 流速为 1 mL·min⁻¹; 检测波长为 278 nm; 进样量为 20 μL 。

2.6 统计学处理

以右啡烷生成的速率作为酶活性指标, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用 t 检验, $P < 0.05$

为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 方法学考察

在优化的色谱条件下，孵化体系中右美沙芬、内标、右啡烷的色谱峰形尖锐，分离良好，微粒体的内源性物质对测定不产生干扰。色谱图见图 1。

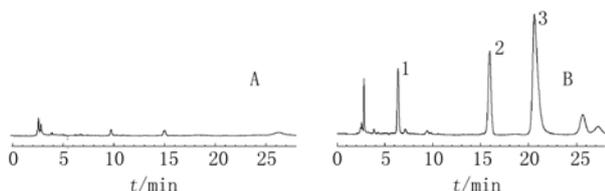


图 1 氢溴酸右美沙芬和右啡烷的色谱图

A-空白肝微粒体; B-孵化体系; 1-氢溴酸右美沙芬; 2-非那西丁; 3-右啡烷

Fig 1 HPLC chromatogram of dextromethorphan hydrobromide and dextrorphan

A-blank hepatic microsome; B-incubation system; 1-dextromethorphan hydrobromide; 2-phenacetin; 3-dextrorphan

取右啡烷系列浓度标准溶液加入高温灭活肝微粒体中，其余按“2.3”项下方法操作，HPLC 进样分析，以右啡烷浓度(C)为横坐标，右啡烷与内标的峰面积比(Y)为纵坐标，用加权最小二乘法进行线性回归，结果表明，右啡烷在 $1.0\sim 40.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内线性关系良好，典型的标准曲线为： $Y=0.0417C-0.0046$ ($r=0.9998$)，最低定量限为 $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($n=6$)。

分别制备低、中、高(右啡烷浓度分别为 20, 100, $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 3 个浓度的质控样品，每个浓度 3 个平行样并随同标准曲线进行测定。结果显示，对于 3 个浓度的质控样品，根据随行标准曲线所得的浓度与理论值间的偏差均在 $\pm 15\%$ 以内，提取回收率分别为 82.9%，88.6%和 89.4%。

3.2 酶动力学考察

3.2.1 最佳孵化条件 孵化体系中代谢物右啡烷的浓度与孵化时间在 5~45 min、与肝微粒体蛋白浓度在 $0.1\sim 0.5 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内分别呈线性关系，同时考虑分析方法最低定量限的需要，最终选择孵化时间为 30 min，微粒体蛋白浓度为 $0.5 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，与文献[11]基本一致。结果见图 2 和图 3。

3.2.2 酶动力学参数 根据实验数据计算得到 Lineweaver-Buck 方程为 $Y=27.576X+2.93$ ($r=0.9819$)，据此进一步求得孵化体系中氢溴酸右美沙芬的 K_m 为 $9.412 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ， V_{max} 为 $0.341 \text{nmol}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ，与文献[12]报道的数据接近。考虑分析方法最低定量

限的需要，最终选择孵化体系中底物浓度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。上述条件与文献[11, 13]基本一致。

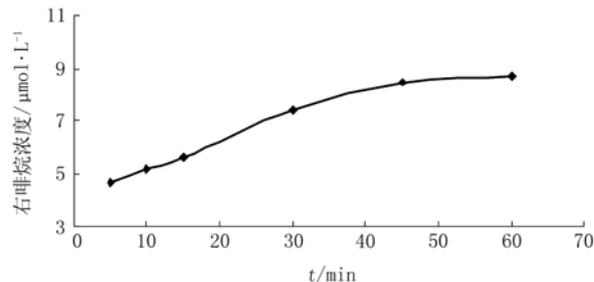


图 2 孵化时间对右啡烷浓度的影响

Fig 2 Effect of time on the dextrorphan concentration

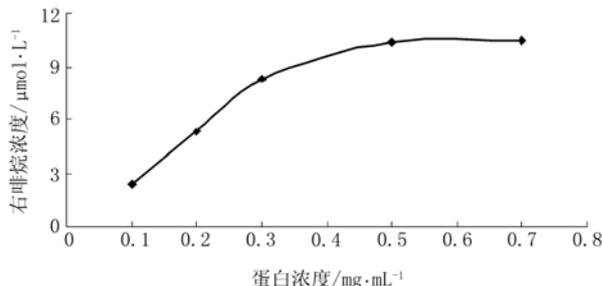


图 3 肝微粒体蛋白浓度对右啡烷浓度的影响

Fig 3 Effect of concentration of hepatic microsome protein on the dextrorphan concentration

3.3 HNA 对肝微粒体蛋白含量及 P450 和 b5 总量和细胞色素 CYP2D6 的影响

两个给药剂量组与空白溶媒组之间差异无统计学意义，且酶反应速率均在 V_{max} 附近。结果见表 1。

表 1 HNA 对大鼠肝微粒体蛋白含量、细胞色素 P450 和 b5 总量、酶比活性的影响 ($n=5$)

Tab 1 Effects of HNA on rat liver microsome protein content, cytochrome P450 enzyme and b5 amount and enzyme specific activity ($n=5$)

组别	蛋白含量/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	P450 总量/ $\text{nmol}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein}^{-1}$	b5 含量/ $\text{nmol}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein}^{-1}$	酶比活性/ $\text{nmol}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$
空白溶媒组	5.382 ± 0.823	1.286 ± 0.140	0.622 ± 0.150	0.660 ± 0.028
低剂量组	4.541 ± 0.871	1.361 ± 0.199	0.776 ± 0.123	0.671 ± 0.087
高剂量组	6.069 ± 0.969	1.120 ± 0.585	0.759 ± 0.253	0.672 ± 0.053

4 讨论

目前体外测定 CYP2D6 活性使用的探针底物主要有异喹胍、右美沙芬、布非洛尔、琥珀酸美托洛尔等^[12]；内标的使用主要有丁丙诺啡^[11]、阿霉素^[13]、苯海拉明^[14]、咖啡因^[15]等；孵化体系的处理方法主要有有机相反提取^[11]、固相小柱萃取^[15]等；检测方法主要有 LC-FD^[13]、LC-UV^[15]、LC-MS/MS^[14]。本实验建立了一种以非那西丁为内

标, 以甲醇-水(含 0.2%磷酸)=43:57 为流动相, 用 HPLC 测定 CYP2D6 活性的方法。以正己烷-二氯甲烷-异丙醇(20:10:1)混合剂进行液液萃取前处理, 孵化体系中右啡烷浓度在 20~400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内的提取率和准确度均符合要求, 各色谱峰的峰形和分离度良好, 无内源性杂质干扰, 且保留时间适中。

根据酶反应的动力学特征和要求, 对肝微粒体体外孵化条件进行优化, 确定酶反应活性测定的最佳条件为肝微粒体蛋白浓度 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、底物氢溴酸右美沙芬浓度 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、共孵化时间 30 min。实验结果显示, 不同剂量的 HNA 连续口服给药 2 周, 对大鼠肝微粒体中的蛋白总量、细胞色素 P450 和 b5 的含量以及 CYP2D6 的活性均无影响, 表明 HNA 在联合用药的情况下因对 CYP2D6 诱导或抑制而出现药物相互作用的潜在可能性较小。CYP2D6 在人、猴、狗、鼠等物种间的活性相当一致^[6], 因此, 通过本试验的结果可以预测, HNA 口服给药对人肝微粒体 CYP2D6 活性可能不会产生显著的影响。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2005: 664-665.
- [2] XIAO P G. Modern Chinese Materia Medica(新编中药志) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002: 976.
- [3] LUO X Y, LI M H, LÜ L, et al. Research progress of pharmacological action and application of *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc [J]. J Dalian Univ(大连大学学报), 2005, 25(2): 80-83.

- [4] LI H Y, LUO S R, ZHOU T H. Metabolism of shikonin in rats [J]. J Chin Pharm Sci(中国药学), 1999, 8(3): 148-151.
- [5] XU D F, GUAN P J, MAO Z Q, et al. Progress on total synthesis of shikonin [J]. Chin J of Org Chem(有机化学), 2005, 25(7): 771-779.
- [6] WANG N, LIU H C, HOU Y N. Cytochrome P4502D6 in drug metabolism [J]. Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志), 2001, 7(4): 308-312.
- [7] ZNEG S. Drug Metabolism(药物代谢学) [M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2004: 250.
- [8] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding [J]. Anal Biochem, 1976(72): 248-254.
- [9] OMURA T, SATO R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. evidence for its hemoprotein nature [J]. J Biol Chem, 1964, 239(7): 2370-2378.
- [10] ZHANG N, YU W J, WANG X L, et al. Cytochrome P450 contents and activity in hepatic microsome of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Mar Fish(海洋渔业), 2007, 29(2): 148-152.
- [11] RAE Y, SORAYA M, XIAOXIONG W, et al. Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study *in vitro* drug interactions [J]. Drug Metab Dispos, 2002, 30(12): 1311-1319.
- [12] YU W J, HUANG L J, LIU Y, et al. The influence of soduim ozagrel on rat CYP2D6 [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2007, 23(1): 67-72.
- [13] ZHANG L L, LIU Y J, YUAN P, et al. Metabolism method of dextromethorphan *in vitro* [J]. J Chongqing Med Univ (重庆医科大学学报), 2008, 33(3): 325-328.
- [14] GAO Z W, SHI X J, YU T, et al. Simultaneous determination of the inhibitory potency of compounds on the activity of five cytochrome P-450 enzymes using a cocktail probe substrates method [J]. Acta Pharm Sin (药理学报), 2007, 42(6): 589-594.
- [15] LI Z. The effects of crude extract of *Scutellarla barbata* D. Don on the activities of cytochrome P450 in HLMS. [D]. Changsha: Central South University, 2007.