

芫花主要黄酮成分对肝微粒体 UGTs 及 UGT1A1 活性的体外抑制作用

陈红影, 苗培培, 郭嫦娥, 陈宁, 马鹏凯, 李红品, 朱虹宇, 高兴, 张玉杰^{*} (北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

摘要: 目的 考察芫花主要黄酮成分芫花素和芹菜素对尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UGTs)及 UGT1A1 活性的影响。方法 采用体外肝微粒体孵育模型, 以 4-硝基酚(4-nitrophenol, 4-NP)为底物检测 UGTs 活性, 胆红素为底物检测 UGT1A1 活性; 利用 UV 及 UPLC-MS/MS 测定底物或代谢产物的含量。结果 对 UGTs, 在大鼠肝微粒体、小鼠肝微粒体以及人肝微粒体孵育体系中, 芫花素和芹菜素均能不同程度地抑制 UGTs 活性; 抑制强弱顺序: 在大鼠肝微粒体温孵体系中, 芫花素>芹菜素; 在小鼠肝微粒体以及人肝微粒体温孵体系中, 芹菜素>芫花素。对 UGT1A1, 在人肝微粒体孵育体系中, 芫花素和芹菜素均表现为中等强度的竞争性抑制作用, 抑制强弱顺序: 芹菜素($IC_{50}=12.40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)>芫花素($IC_{50}=23.21 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。结论 芫花素和芹菜素对不同肝微粒体孵育体系中 UGTs 及 UGT1A1 均可产生显著抑制作用且存在种属差异。芫花素及芹菜素可能存在基于 UGT 酶的药物相互作用。

关键词: 芫花; 芫花素; 芹菜素; UGTs; UGT1A1; 肝微粒体; 抑制作用

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)03-0305-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.03.001

In Vitro Inhibitory Effect of Main Flavonoids Ingredients of Genkwa Flos on Liver Microsomal UGTs and UGT1A1 Activities

CHEN Hongying, MIAO Peipei, GUO Chang'e, CHEN Ning, MA Pengkai, LI Hongpin, ZHU Hongyu, GAO Xing, ZHANG Yujie^{*} (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the inhibition of genkwanin and apigenin on UGTs and UGT1A1 activities of different liver microsomes. **METHODS** In the present study, *in vitro* liver microsomal incubation model was used. 4-nitrophenol (4-NP) and bilirubin were elected as substrates to determine activities of UGTs and UGT1A1 by UV and UPLC-MS/MS, respectively. **RESULTS** Genkwanin and apigenin significantly inhibited UGTs activity in rats, mice and human liver microsome. In rats liver microsome temperature hatch system, the inhibition strength suitable genkwanin was higher than apigenin. In mice and human liver microsome temperature hatch system, the inhibition strength suitable apigenin was higher than genkwanin. UGT1A1 activity was inhibited by genkwanin and apigenin with IC_{50} about 23.21, 12.40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in human liver microsome, respectively. The inhibition types were competitive inhibition. Inhibition of apigenin was better than genkwanin. **CONCLUSION** The results indicate that genkwanin and apigenin show different level of inhibition effects. This result may be caused drug interactions based on UGT1A1 enzyme.

KEY WORDS: Genkwa Flos; genkwanin; apigenin; UGTs; UGT1A1; liver microsomes; inhibitory effect

芫花是中国特有的瑞香科植物 *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. 的干燥花蕾, 性温, 味苦、辛; 归肺、胃、大肠经^[1]。研究表明其具有镇咳、祛痰、镇痛、抗肿瘤等广泛的药理作用^[2-4], 但长期大剂量使用芫花可致肝、肾、脑等器官出现严重损伤^[5-6]。芫花的毒性使其在临床应用受到极大限制, 而其致毒机制尚不清楚。芫花素和芹菜素是芫花中主要的黄酮类代表性成分^[7], 结构见图 1。尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UDP-glucuronosyltransferases,

UGTs)是体内重要的Ⅱ相代谢酶之一, 内外源性化合物及毒性代谢物清除与解毒的机制是其经 UGTs 催化转化为极性较强的结合物, 后经肾脏排出体外, 从而完成内外源性化合物以及毒性代谢物在体内的代谢消除^[8]。尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1A1(UGT1A1)是葡萄糖醛酸转移酶中重要一员, 对内外源性物质在体内的代谢与清除起着重要的作用。胆红素是机体本身产生的一种有毒代谢物^[9], 也是 UGT1A1 的内源性特征底物^[10]。当

基金项目: 国家自然科学基金项目(81274177); 北京中医药大学自主选题项目(2016-JYB-XS048, 2016-JYB-XS081, 2016-JYB-XS058)

作者简介: 陈红影, 女, 硕士生 Tel: 18800021396 E-mail: happyhy_chen@163.com ^{*}通信作者: 张玉杰, 女, 教授, 博导 Tel: (010)84738618 E-mail: zhyj227@126.com

UGT1A1 的活性受到抑制时,将导致胆红素代谢出现障碍,排出受阻,引发毒性^[11]。因此,研究药物对代谢酶的作用,对了解药物的相互作用,指导临床的合理用药具有重要的意义。已有报道黄酮类化合物对 CYP450 酶活性的影响^[12],研究表明茺花所含羟基茺花素能显著提高肝微粒体 UGTs 的活性^[13],另有茺花粗提物在大鼠体内的药动学研究^[14]结果表明,体内也可能对 UGT1A1 酶产生中等抑制作用,但其具体体内的结果还需进一步研究。而茺花中主要黄酮成分茺花素和芹菜素对 UGTs 的活性影响却尚未清楚。

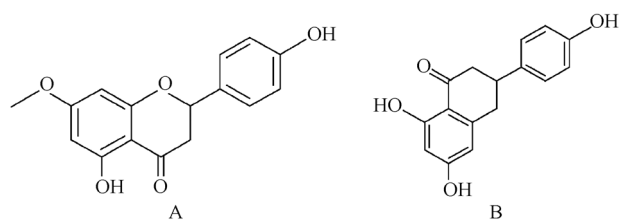


图 1 茺花素(A)和芹菜素(B)的结构式

Fig. 1 The structure of genkwanin(A) and apigenin(B)

本实验采用肝微粒体体外孵育方法,分别以 4-硝基酚(4-nitrophenol, 4-NP)和胆红素为探针底物,利用 UV 和 UPLC-MS/MS 分别测定底物及代谢产物的含量变化,考察茺花主要黄酮类成分茺花素和芹菜素对人和鼠肝微粒体孵育体系中 UGTs 及对人肝微粒体(HLM)孵育体系 UGT1A1 活性的影响,探讨茺花致毒的可能性机制,同时为可能的潜在代谢性药物相互作用提供实验依据。

1 仪器与试剂

1.1 试剂

茺花(安徽本草国药有限公司,批号:14010602),经北京中医药大学中药学院张贵君教授鉴定为瑞香科植物茺花 *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. 的干燥花蕾;茺花素、芹菜素(批号:111899-201202,111901-201102,纯度均 $\geq 98\%$)、氢溴酸右美沙芬(批号:100201-201003,纯度 $\geq 98\%$)、胆红素(批号 100077-201206,纯度 $\geq 99.3\%$)均购自中国食品药品检定研究院;胆红素双葡萄糖醛酸酯(BDG)(纯度 $\geq 98\%$)、胆红素单葡萄糖醛酸酯(BMG1、BMG2)(纯度 $\geq 98\%$)、尿苷-5'-二磷酸三钠盐(UDPGA)、D-葡萄糖二酸-1,4-内酯均购自 Sigma Aldrich 公司;丙甲菌素(北京拜耳迪生物技术有限公司);混合雄性大鼠肝微粒体(RLM)、男性混合肝微粒体均购自汇智泰康生物技

术(北京)有限公司;考马斯亮蓝 G-250 购自美国 Sigma 公司;4-NP 购自上海江莱生物科技有限公司;乙腈、甲醇为色谱纯(美国 Fisher 公司);其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

日本岛津高效液相色谱仪(LC-20AT 四元高压泵,SPD-20A UV-vis; DGO-20A 在线真空脱气机, SIL-20A 自动进样器, GTO-10AS VP 柱温箱及 LC 色谱工作站); Waters AcquityTM UPLC 超高效液相色谱仪,串联 Waters XevoTM MQ-TOF/MS 质谱系统(美国, Waters 公司); TU-1901 紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); ER-182A 型分析天平(日本 A&D 公司); MTN-2800D 型氮气吹干仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司); VORTEX GENIUS 3 漩涡混匀仪(IKA); DKZ-450B 型电热恒温振荡水槽(上海森信实验仪器有限公司); TGL 20M 台式高速冷冻离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司); G-16 型高速离心机(北京白洋离心机厂)。

1.3 动物

昆明种小鼠,♂,体质量(20 ± 2)g,由斯贝福(北京)实验动物科技有限公司提供,动物合格证号: SCXK(京)2011-0004。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

2.1.1 茺花素和芹菜素混合对照品溶液的配制 分别精密称取茺花素和芹菜素对照品各适量,加甲醇溶解并定溶于 10 mL 量瓶中,得浓度为 0.568 5 和 0.540 4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的茺花素和芹菜素混合对照品储备液,4℃下保存,备用。

2.1.2 丙甲菌素溶液的制备 精密称取丙基菌素适量,加入适量的 DMSO 使之完全混悬后,再缓慢加入 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲溶液溶解并定容,制成浓度为 0.2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的丙甲菌素溶液,备用。

2.1.3 UDPGA 溶液的制备 精密称取 UDPGA 适量,加入 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲溶液使溶解,并定容制成浓度为 4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 UDPGA 溶液,备用。

2.1.4 D-葡萄糖二酸-1,4-内酯和 MgCl_2 混合溶液的制备 精密称取 D-葡萄糖二酸-1,4-内酯和 MgCl_2 适量,加入 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲溶液使溶解,并定容,最终溶液中含有 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 D-葡萄糖二酸-1,4-内酯和 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 混合溶液,备用。

2.1.5 内标溶液的制备 精密称取氢溴酸右美沙芬适量,加甲醇溶解制成浓度为 $0.517\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液,4℃贮藏,备用。

2.2 小鼠肝微粒体(MLM)的制备^[15]

采用钙盐沉淀法制备 MLM。取 6 只健康小鼠,禁食不禁水 12 h 后,25%的乌来糖麻醉,放血处死后,取出肝脏称重置于干净烧杯中,首先将肝脏剪碎,然后按 1:3 的比例加入 Tris 缓冲溶液,用内切式组织匀浆机在冰浴中粉碎肝脏制成匀浆液。

将匀浆液于 4℃,10 000×g,离心 20 min,轻轻吸取上清液与 $88\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ CaCl}_2$ 溶液混匀,使 CaCl_2 终浓度为 $8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,混匀,冰浴中静置 10 min,再于 4℃,15 000×g,离心 40 min。用 Tris 缓冲液洗涤沉淀 1 次,所得沉淀用 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Tris}-0.25\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖缓冲溶液混悬,即得 MLM,-80℃冷冻保存。采用考马斯亮蓝法测定肝微粒体蛋白浓度。

2.3 胆红素代谢产物的 UPLC-MS 测定条件^[16]

色谱柱:Acquity UPLC HSS C_{18} 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.8 μm);Acquity UPLC HSS C_{18} VanGuard Pre-column 保护柱(2.1 mm×5 mm,1.8 μm);流动相:A-0.1%甲酸水溶液,B-乙腈;洗脱方法:60%→25%A(0~2.1 min);25%→5%A(2.1~4.2 min);5%A(4.2~8.0 min);5%→60%A(8.0~8.5 min);60%A(8.5~12.5 min);检测波长:450 nm;流速: $0.4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;柱温:35℃;进样量:10 μL。

质谱条件:电喷雾电离源(ESI),锥孔电压:40 V;毛细管电压:2.0 kV;去溶剂气流量: $600\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$;去溶剂温度:350℃;锥孔气流量: $50\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$;源温度 90℃;正离子多反应监测(MRM)采集模式;BDG: $m/z\ 937.33\rightarrow274.27,122.08$;BMG1: $m/z\ 761.30\rightarrow274.30,304.30$;BMG2: $m/z\ 761.30\rightarrow274.27,304.30$;胆红素: $m/z\ 585.27\rightarrow274.30,304.30$ 。

2.4 温孵条件及样品处理

2.4.1 UGTs 活性的测定方法 参照 Bock 等^[17]报道的方法,以 4-NP 为底物,UV 测定。200 μL 的温孵体系包含:MLM、RLM、HLM($0.2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),丙甲菌素($50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ protein}$), $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ UDPGA}$, $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Tris-HCl}$, $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ MgCl}_2$, $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ D-葡萄糖二酸-1,4 内酯}$, $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

4-NP 以及一定浓度的芫花素和芹菜素。37℃预孵育 5 min,加入 UDPGA 启动反应,孵育 30 min 后,加入 2 mL 5%三氯乙酸终止反应,离心($13\ 000\times g$,15 min),取 1 mL 上清液,加入 $0.25\text{ mL}\ 2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaOH}$,于 405 nm 处测定吸光度。

2.4.2 UGT1A1 活性的测定方法^[15] 200 μL 的温孵体系:包括 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}\text{ HLM}$,加入再生系统(终浓度分别为丙甲菌素 $25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$, $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ D-葡萄糖二酸-1,4-内酯}$, $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ MgCl}_2$)和底物胆红素标准溶液。 $100\text{ mmol}\text{ Tris 缓冲溶液}(\text{pH}=7.4)$ 补足体积,冰水浴中静置 15 min 后,于 37℃恒温水浴振荡水槽中预孵育 5 min,加入 UDPGA 启动反应。体系中有有机溶剂的比例≤1%。反应 15 min 后加入 3 倍体积冰冷的乙腈终止反应,离心($13\ 000\times g$,25 min),取上清,UPLC-MS 检测胆红素及胆红素葡萄糖醛酸酯 BDG、BMG1 和 BMG2。

2.5 对 UGT1A1 IC_{50} 的测定

在孵育体系中,固定底物胆红素终浓度不变($0.5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),加入一系列的芫花素(或芹菜素),在体系中的浓度范围为 $0\sim25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,按“2.4.2”项下方法操作。GraphPad Prism 5 处理数据,计算芫花素(或芹菜素)对代谢酶抑制的 IC_{50} 值^[18]。

2.6 对 UGT1A1 的抑制类型的确定

在孵育体系中,分别加入 3 种不同终浓度的底物胆红素溶液($0.516,0.774,1.051\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),然后加入一系列芫花素或芹菜素供试品溶液,浓度范围为 $0\sim25\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,按“2.4.2”项下方法操作。根据所得数据制作双倒数曲线图(Lineweaver-Burk 图)和 Dixon-Plot 图,计算抑制常数 K_i ,判断抑制类型。

2.7 数据处理

UGTs 酶活性($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ protein}$)以底物代谢速率表示,即单位时间单位蛋白浓度下探针底物的消耗量。

$$\text{计算公式: } V = \frac{C}{C_p \times t}$$

C 为体系底物减少浓度($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), C_p 为体系微粒体蛋白浓度($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), t 为温孵时间(min)。

UGT1A1 酶活性($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ protein}$)以 3 个代谢产物(BDG、BMG1、BMG2)总生成速率表示,即单位时间单位蛋白浓度下代谢产物的总生成量。

$$\text{计算公式: } V = \frac{C}{C_p \times t}$$

C 为体系总代谢产物浓度($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), C_p 为体系微粒体蛋白浓度($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), t 为温孵时间(min)。

资料统计结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组实验数据均采用线性回归分析分析, 同时用 SPSS Statistics 17.0 统计软件进行单因素 ANOVA 分析, 方差不齐采用非参数检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 芫花素和芹菜素对 UGTs 活性的影响

与对照组相比, 芫花素和芹菜素均可不同程度的抑制各肝微粒体 UGTs 的活性。抑制强弱顺序: 在 RLM 孵育体系中, 抑制作用芫花素 > 芹菜素; 在 MLM 以及 HLM 孵育体系中, 芹菜素 > 芫花素。结果见表 1。

表 1 芫花素和芹菜素对 UGTs 活性的影响($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of genkwanin and apigenin on UGTs activity ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	UGTs/ $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ protein		
	MLM	RLM	HLM
对照组	0.051 $\pm$ 0.000 6	0.043 $\pm$ 0.000 3	0.039 $\pm$ 0.000 5
芫花素	0.050 $\pm$ 0.003 3	0.001 $\pm$ 0.000 7 ²⁾	0.030 $\pm$ 0.002 1 ¹⁾
芹菜素	0.033 $\pm$ 0.002 5 ¹⁾	0.028 $\pm$ 0.004 0 ¹⁾	0.021 $\pm$ 0.005 1 ¹⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.001$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.001$.

3.2 芫花素和芹菜素对 UGT1A1 活性的影响

本实验以胆红素为特异性底物, 考察芫花素、芹菜素在 HLM 孵育体系中对 UGT1A1 的抑制作用, 结果见图 2。以芫花素和芹菜素($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)浓度分别对 UGT1A1 活性百分率(%)作图, 结果表明, 芫花素和芹菜素均能抑制 UGT1A1 活性。应用 Graphpad Prism 5 进行数据分析, 计算得到芫花素和芹菜素对 HLM 中 UGT1A1 抑制的 IC_{50} 值, 分别为 23.21 和 12.40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 芹菜素抑制强度 > 芫花素。对于 $\text{IC}_{50} < 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的抑制体系, 继续考察药物对酶的抑制类型及抑制常数, 利用代谢产物的生成速率的倒数对底物胆红素的倒数或抑制剂(芫花素和芹菜素)的浓度作图, 分别得到 Lineweaver-Burk 图和 Dixon-Plot 图, 结果表明, 随着抑制剂芫花素和芹菜素浓度的增加, K_m 增大, $V_{\max}$ 不变; 从 Dixon-Plot 图可知, $1/V$ 对抑制剂作图所得的一簇直线相较于第二象限。由此可知芫花素和芹菜素对 HLM 中 UGT1A1 的抑制作用类型均为竞争性抑制, 也符合竞争性抑制作用酶动力学方程。由芫花素和芹菜素对 HLM 中 UGT1A1 的 IC_{50}

值分别为 23.21 和 12.40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 均 < 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 可知芫花素和芹菜素对 HLM 中 UGT1A1 具有中等强度的抑制作用。分别以 Lineweaver-Burk 斜率对芫花素和芹菜素浓度作图计算出抑制动力学参数 K_i 分别为 16.47 和 4.08 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

4 讨论

药物进入体内后大多需要在代谢酶的作用下进行氧化、还原、水解、结合等代谢过程才能完成其在体内的代谢消除, 药物代谢酶功能的改变能影响到药物在体内的处置, 由药物代谢酶抑制介导的药物代谢性相互作用也是造成药物不良反应的常见原因, 严重时会造成各种毒性反应, 甚至可致死亡。根据药物即抑制剂与酶结合的特点, 可将可逆抑制分为竞争性抑制、线性混合型抑制、反竞争性抑制、非竞争性抑制 4 种类型。 IC_{50} 和 K_i 值是研究药物体外代谢抑制性相互作用的 2 个重要的参数。 IC_{50} 是指反应被抑制一半时的底物浓度, 可根据 IC_{50} 大小判断药物对酶的抑制强弱, K_i 表示抑制常数, 可根据 K_i 值预测药物在体内发生相互作用的风险程度^[19]。

UGTs 作为体内最重要的 II 相代谢酶^[20], 是外源性药物、内源性物质在体内清除的重要途径之一^[21]。胆红素是机体本身产生的一种有毒代谢物, 其结合反应是将毒性的未结合胆红素排出体外的一个重要的环节, 主要由肝微粒体中的 UGT1A1 催化完成。胆红素的结构中含有 2 个羧基, 每分子游离胆红素能够结合 2 个葡萄糖醛酸, 双葡萄糖醛酸酯胆红素是主要的结合产物。当 UGT1A1 的活性受到药物外源性物质抑制时, 将导致胆红素代谢出现障碍, 排出受阻, 引发毒性。

本实验以 4-NP 和胆红素分别为 UGTs、UGT1A1 的探针底物, 采用体外肝微粒体孵育方法, 考察芫花主要黄酮类成分芫花素和芹菜素对不同种属肝微粒体中 UGTs 活性的影响, 结果发现, 芫花素和芹菜素对 MLM、RLM 和 HLM 孵育体系中 UGTs 均产生了不同程度的抑制作用; 在 HLM 中, 对 UGTs 活性的抑制作用相对显著, 因此选择对 HLM 中 UGT1A1 活性进行了进一步的深入研究。芫花素和芹菜素均表现为中等强度的抑制作用, 根据 Dixon-Plot 图推测, 二者在 HLM 孵育体系中抑制作用类型为竞争性抑制作用, 其 K_i 值分别为 16.47 和 4.08 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 芹菜素($\text{IC}_{50} = 12.40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的抑制作用强于芫花素($\text{IC}_{50} = 23.21 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

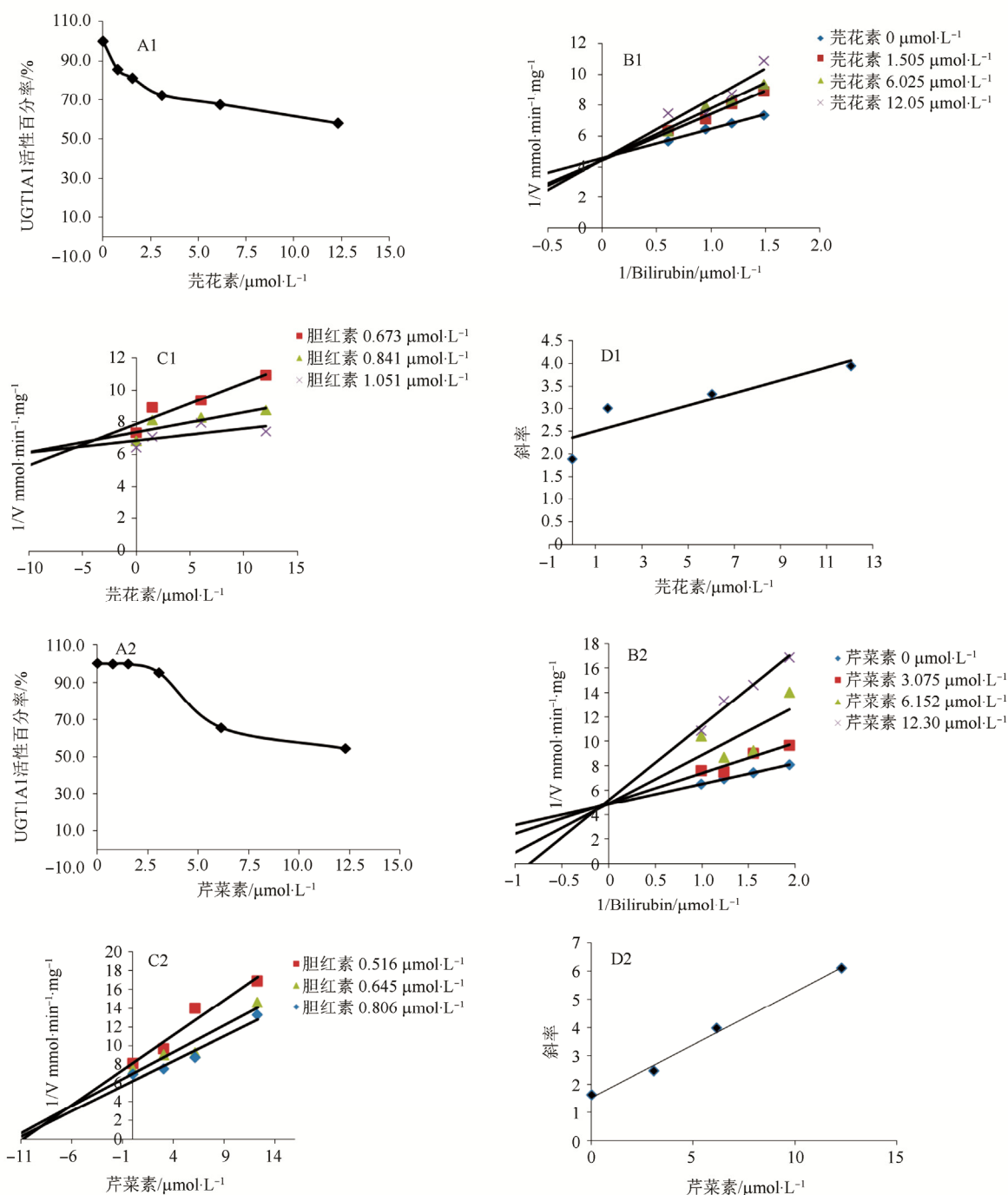


图2 芫花素和芹菜素对HML中UGT1A1活性的抑制作用(A)、Lineweaver-Burk图(B)、Dixon-Plot图(C)及Lineweaver-Burk斜率对芫花素和芹菜素图(D) ($n=3$)

Fig. 2 The inhibition of genkwanin and apigenin on UGT1A1 in human liver microsomes (A), Lineweaver-Burk plot (B), Dixon plot (C) and Second plot of slopes from Lineweaver-Burk plot vs hydroxygenkwanin concentrations (D) ($n=3$)

综上所述, 芫花素和芹菜素对不同种属中UGTs 尤其是 UGT1A1 的活性都产生了不同程度的抑制作用, 会造成芫花中需要UGTs 参与的毒性成分或次生毒性代谢物在体内的代谢转化受阻, 导致其在体内滞留蓄积, 产生毒性, 这可判断为芫花致毒的可能机制之一^[22], 其具体的致毒机制

还需结合药物的代谢途径进一步研究。另外, 研究结果提示芫花素和芹菜素在临床应用时, 应考虑其对代谢酶活性影响产生的药物相互作用, 避免药效学的改变或不良反应的发生。在3种肝微粒体中抑制类型和抑制强弱的不同, 推测原因可能为不同种属中UGT 和UGT1A1 活性存在较大

差异。该研究可为合理开发利用芫花素以及芹菜素提供实验依据, 并为研究药物在临床上的联合用药提供理论借鉴。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 159.
- [2] SEO K A, KIM H J, JEONG E S, et al. *In vitro* assay of six UDP-glucuronosyltransferase isoforms in human liver microsomes, using cocktails of probe substrates and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Drug Met Disp, 2014, 42(11): 1803-1810.
- [3] RODEIRO I, JOSÉ GÓMEZ-LECHÓN M, PEREZ G, et al. *Mangifera indica* L. extract and mangiferin modulate cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase enzymes in primary cultures of human hepatocytes [J]. Phytotherapy Res, 2013, 27(5): 745-752.
- [4] FUJIWARA R, NAKAJIMA M, YAMANAKA H, et al. Effects of coexpression of UGT1A9 on enzymatic activities of human UGT1A isoforms [J]. Drug Met Disp, 2007, 35(5): 747-757.
- [5] LI L Z, SONG S J, GAO P Y. Research progress in the chemical constituents and pharmacological activities of *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. [J]. J Shengyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2007, 24(9): 587-592.
- [6] CHEN Y Y, GUO J M, QIAN Y F, et al. Toxicity of daphnane-type diterpenoids from *Genkwa* Flos and their pharmacokinetic profile in rat[J]. Phytomedicine, 2013, 21(1): 82-89.
- [7] LIN J H, LIN Y T, HUANG Y J, et al. Isolation and cytotoxicity of flavonoids from *Daphnis Genkwa* Flos[J]. J Food Drug Anal, 2001, 9(1): 6-11.
- [8] LAZARUS P, SUN D. Potential role of UGT pharmacogenetics in cancer treatment and prevention: focus on tamoxifen and aromatase inhibitors [J]. Drug Metab Rev, 2010, 42(1): 182-194.
- [9] 危北海, 张万岱. 中西医结合消化病学[M]. 人民卫生出版社, 2003: 441-447.
- [10] LIN J Y. Research process in bilirubin metabolism and its regulations [J]. Fudan Univ J Med Sci(复旦学报: 医学版), 2014, 41(03): 405-411.
- [11] ROGAN E G, BADAWI A F, DEVANESAN P D, et al. Relative imbalances in estrogen metabolism and conjugation in breast tissue of women with carcinoma: potential biomarkers of susceptibility to cancer [J]. Carcin, 2003, 24(4): 697-702.
- [12] 董宇, 王阶, 杨庆, 等. CYP450 酶与中药代谢相互作用关系研究概况[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(1): 100-103.
- [13] MIAO P P, ZHAO Y Y, MIAO Q, et al. Inhibitory effect of different species of hydroxygenkwanin on UGTs and UGT1A1 activities [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2016, 41(3): 504-508.
- [14] ZHEGN L L, YIN L H, XU L N, et al. Pharmacokinetic study of apigenin, 3-hydroxy-genkwanin and genkwanin in rats after oral administration of extraction of *Dephne genkwa* Sieb. et Zucc by LC-MS/MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(1): 54-59.
- [15] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 511.
- [16] WANG Q, ZHANG Y J, DAI Z, et al. Establishment of a method to determine the bilirubin and bilirubin glucuronidations in different systems [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2015, 35(9): 1544-1550.
- [17] BOCK K W, BURCHELL B, DUTTON G J, et al. UDP-Glucuronosyl transferase activities: guidelines for consistent interim terminology and assay condition [J]. Biochem Pharmacol, 1983, 32(6): 953-955.
- [18] WEI B H, YE J, XUE B J, et al. Effect of continuous oral cycloastragenol on the activity of cytochrome P450 enzymes in rats [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2014, 23(4): 476-479.
- [19] 谈恒山, 魏臻. 药物相互作用的研究方法应用进展[J]. 药学与临床研究, 2010, 18(6): 507-512.
- [20] TUKEY R H, STRASSBURG C P. Genetic multiplicity of the human UDP-glucuronosyl transferases and regulation in the gastrointestinal tract [J]. Mol Pharmacol, 2001, 59(3): 405-414.
- [21] LAZARUS P, SUN D. Potential role of UGT pharmacogenetics in cancer treatment and prevention: focus on tamoxifen and aromatase inhibitors [J]. Drug Metab Rev, 2010, 42(1): 182-194.
- [22] CHEN N, MIAO P P, GUO C E, et al. *In vitro* effects of *Genkwa* Flos chloroform extract on activity of human liver microsomes UGTs and UGT1A1 [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2016, 41(17): 3296-3302.

收稿日期: 2016-07-13

(本文责编: 曹粤锋)