

多糖类组分对大鼠肝微粒体酶 CYP1A2 的体外活性抑制作用

房绍英, 孙淑萌, 刘纯, 邵华荣, 程艳玲* (山东省药学院, 山东省生物药物重点实验室, 济南 250101)

摘要: 目的 建立液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)测定大鼠肝微粒体中对乙酰氨基酚含量, 研究人参多糖、贻贝多糖、黄原胶对大鼠肝微粒体细胞色素 P450(cytochrome P450, CYP)1A2 的体外抑制作用。方法 以格列齐特为内标, 建立 LC-MS/MS 测定大鼠肝微粒体中对乙酰氨基酚含量方法。以 α -萘黄酮为阳性对照药, 分别将系列多糖溶液、CYP1A2 酶的特异性探针底物非那西丁及大鼠肝微粒体进行孵育, LC-MS/MS 测定代谢产物对乙酰氨基酚的含量, 计算半数抑制浓度(IC₅₀), 评价人参多糖、贻贝多糖、黄原胶对大鼠肝微粒体 CYP1A2 酶的抑制活性。结果 对乙酰氨基酚在 10~1 000 ng·mL⁻¹ 内线性良好, 精密度试验 RSD 均 < 8.24%, 提取回收率为 92.53%~103.23%, 稳定性试验 RSD 均 < 10.77%。该试验条件下, 在大鼠肝微粒体温孵体系中, 人参多糖、贻贝多糖、黄原胶对 CYP1A2 的 IC₅₀ 值均 > 100 μ mol·L⁻¹。结论 在正常剂量下, 人参多糖、贻贝多糖、黄原胶对 CYP1A2 酶亚型均无抑制作用, 可以与其底物联合用药。

关键词: 人参多糖; 贻贝多糖; 黄原胶; CYP1A2

中图分类号: R917.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2021)24-3155-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.24.017

引用本文: 房绍英, 孙淑萌, 刘纯, 等. 多糖类组分对大鼠肝微粒体酶 CYP1A2 的体外活性抑制作用[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(24): 3155-3159.

Inhibitory Effects of Polysaccharides on the Activity of CYP1A2 Enzyme in Rat Liver Microsomes *in Vitro*

FANG Shaoying, SUN Shumeng, LIU Chun, SHAO Huarong, CHENG Yanling* (Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Shandong Provincial Key Laboratory of Biological Drugs, Jinan 250101, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an LC-MS/MS method for the content determination of acetaminophen in rat liver microsomes and evaluate the inhibitory effects of several polysaccharides includes ginseng polysaccharide, mussel polysaccharide and xanthan gum on the activity of cytochrome P450(CYP)1A2 of rat liver microsomes *in vitro*. **METHODS** LC-MS/MS analytical method was established to determine the concentration of acetaminophen in rat liver microsomes while taking gliclazide as the internal standard. α -Naphthalene flavone was used as the positive control drug, a series of polysaccharide solutions, phenacetin(as the specific probe substrate of CYP1A2 enzyme) and rat liver microsomes were incubated *in vitro* respectively. The content of metabolite acetaminophen was measured by LC-MS/MS and the half inhibitory concentration(IC₅₀) was calculated, so as to evaluate the inhibitory activity of ginseng polysaccharide, mussel polysaccharide and xanthan gum on CYP1A2 enzyme in rat liver microsomes. **RESULTS** The linear range of acetaminophen was 10~1 000 ng·mL⁻¹, RSD of precision test was < 8.24%, extraction recoveries were 92.53%~103.23%, and RSD of stability test was < 10.77%. In mixture metabolic system of rat liver microsome enzymes, the IC₅₀ of ginseng polysaccharide, mussel polysaccharide and xanthan gum were all > 100 μ mol·L⁻¹ under this condition. **CONCLUSION** There is no inhibitory effect of ginseng polysaccharide, mussel polysaccharide and xanthan gum on CYP1A2 enzyme subtypes at normal dose, and they can be used in combination with its substrate.

KEYWORDS: ginseng polysaccharide; mussel polysaccharide; xanthan gum; CYP1A2

近年来, 对多糖类生物资源的挖掘正逐渐成为获得新活性产物及进行新药研发的重要途径之一。本课题组前期研究发现, 贻贝多糖口服具有显著降血脂活性; 黄原胶用于关节腔内注射, 可减轻软骨的降解, 明显缓解骨关节炎疼痛; 人参多糖可调节机体免疫功能, 且其制剂人参多糖注射液已被应用于临床。三者均具有较大的开发潜力。

细胞色素 P450(cytochrome P450, CYP)是微粒体混合功能氧化酶系中最重要氧化酶, 临床

上 > 90% 的药物由 CYP 酶的 6 个重要亚型(1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 和 3A4)代谢^[1-2]。在新药研发过程中, 尽早了解药物是否存在 CYP 酶抑制作用, 对新药上市后临床合理用药、提高药物疗效和减少药物的不良反应有重要意义^[3-5]。因此本研究采用大鼠肝微粒体体外孵育法, 以 α -萘黄酮为阳性对照药, 分别将人参多糖、贻贝多糖、黄原胶与 CYP1A2 酶的特异性探针底物非那西丁及大鼠肝微粒体进行孵育, LC-MS/MS 测定代谢产

作者简介: 房绍英, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (0531)67790613
(0531)67790613 E-mail: chengyanling@163.com

E-mail: 15325460@qq.com *通信作者: 程艳玲, 女, 主任药师 Tel:

物对乙酰氨基酚的含量, 计算半数抑制浓度 (half-inhibitory concentration, IC_{50}), 探索人参多糖、贻贝多糖及黄原胶对大鼠肝微粒体 CYP1A2 亚型酶的抑制活性, 为其药物相互作用研究和临床应用提供基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Ultimate3000 高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher 科技公司); API5500 三重四级杆质谱仪(ABSCIEX 中国公司); Eppendorf 移液器(德国艾本德公司); AUW-120D 型电子分析天平(日本岛津公司); MS3 型漩涡混悬器(IKA 公司); Z216MK 高速冷冻离心机(德国哈默股份公司); Milli-Q Advantage A10 超纯水仪[默克化学技术(上海)有限公司]。

1.2 试剂

人参多糖(批号: 20161222)、贻贝多糖(批号: 20160501)和黄原胶(批号: 20160512)均由山东省药学院自制; 大鼠肝微粒体(瑞德肝脏疾病研究有限公司, 货号: LM-DS-02M); 非那西丁(批号: J1526019; 含量 $\geq 98.0\%$)、对乙酰氨基酚(批号: A171001; 含量: 99.0%)、格列齐特(批号: B1528015; 含量 $\geq 99.0\%$)、 α -萘黄酮(批号: J1515156; 含量: 98.0%)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

2 方法与结果

2.1 LC-MS/MS 分析方法

2.1.1 色谱条件 Accucore C₁₈ 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 2.6 μ m), 流动相: 0.1%甲酸水(A)-甲醇(B), 梯度洗脱(0~0.5 min, 95%A; 0.5~4 min, 95% \rightarrow 5%A; 4~4.1 min, 5% \rightarrow 95%A; 4.1~6 min, 95%A); 流速: 0.5 mL \cdot min⁻¹; 柱温: 45 $^{\circ}$ C; 进样体积: 2 μ L。

2.1.2 质谱条件 ESI 源, 正离子模式, 气帘气压力: 35 psi; 碰撞气: 8 psi; 离子化电压: 5 500 psi; 离子源温度: 550 $^{\circ}$ C; 喷雾气: 55 psi; 辅助加热气: 55 psi; 多重反应监测(MRM)模式, 定量离子与质谱参数见表 1。

表 1 定量离子与质谱参数

Tab. 1 Quantitative ion and mass spectrometry parameters

化合物	离子对	去簇电压/V	碰撞电压/V
对乙酰氨基酚	152.0/110.2	140	24
格列齐特	324.2/127.2	105	22

2.1.3 样品处理 取 100 μ L 样品置于 1.5 mL 离心管中, 加入 10 μ L(浓度为 1 μ g \cdot mL⁻¹)格列齐特内标溶液, 再加入 300 μ L 乙腈溶液, 涡旋振荡 2.0 min, 5 $^{\circ}$ C, 15 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液于进样小瓶中, 进样 2 μ L 检测。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取对乙酰氨基酚对照品适量, 用甲醇溶解制备成 1 mg \cdot mL⁻¹ 的溶液作为储备液, 然后采用逐级稀释的方法, 制备系列对照品溶液, 4 $^{\circ}$ C 贮藏, 备用。

2.2.2 内标溶液的制备 精密称取格列齐特对照品适量, 用甲醇溶解制备成浓度为 8 mg \cdot mL⁻¹ 的内标溶液, 4 $^{\circ}$ C 贮藏, 备用。

2.2.3 系列多糖溶液的制备 精密称取人参多糖、贻贝多糖及黄原胶对照品适量, 分别用 PBS 溶液溶解制备成 10 mmol \cdot L⁻¹ 的溶液作为贮备液, 然后采用逐级稀释的方法, 制备系列多糖溶液, 4 $^{\circ}$ C 贮藏, 备用。

2.2.4 α -萘黄酮溶液的制备 精密称取 α -萘黄酮对照品适量, 用甲醇及 DMSO 溶解制备成 1 mmol \cdot L⁻¹ 的溶液作为储备液, 然后采用逐级稀释的方法, 制备系列阳性抑制剂溶液, 4 $^{\circ}$ C 贮藏, 备用。

2.2.5 非那西丁溶液的制备 精密称取非那西丁对照品适量, 用甲醇及 DMSO 溶解制备成 1 mmol \cdot L⁻¹ 的溶液作为储备液, 然后采用逐级稀释的方法, 制备系列底物溶液, 4 $^{\circ}$ C 贮藏, 备用。

2.2.6 孵育液样品溶液的制备 将大鼠肝微粒体 50 μ L、底物非那西丁溶液 50 μ L 和抑制剂溶液(系列多糖溶液或 α -萘黄酮溶液)50 μ L 混匀, 在 37 $^{\circ}$ C 水浴中预温孵 10 min 后, 加入 NADPH(2 μ mol \cdot L⁻¹) 50 μ L 启动反应。温孵一定时间后, 加入冰甲醇溶液 600 μ L 终止反应。将上清液涡旋 2 min, 15 000 r \cdot min⁻¹ 离心 15 min, 取微粒体样品上清液即得(反应体系中甲醇终体积分数 $<1\%$, DMSO 的终体积分数 $<0.1\%$)。

2.3 方法学考察

2.3.1 方法专属性 分别取空白微粒体、空白微粒体加对乙酰氨基酚及内标格列齐特, 按“2.1”项下色谱、质谱条件进样测定。结果表明, 对乙酰氨基酚和格列齐特的保留时间分别为 0.7, 3.83 min 左右, 肝微粒体中所含的内源性物质不干扰被测物和内标的测定, 且二者峰形良好, 见图 1。

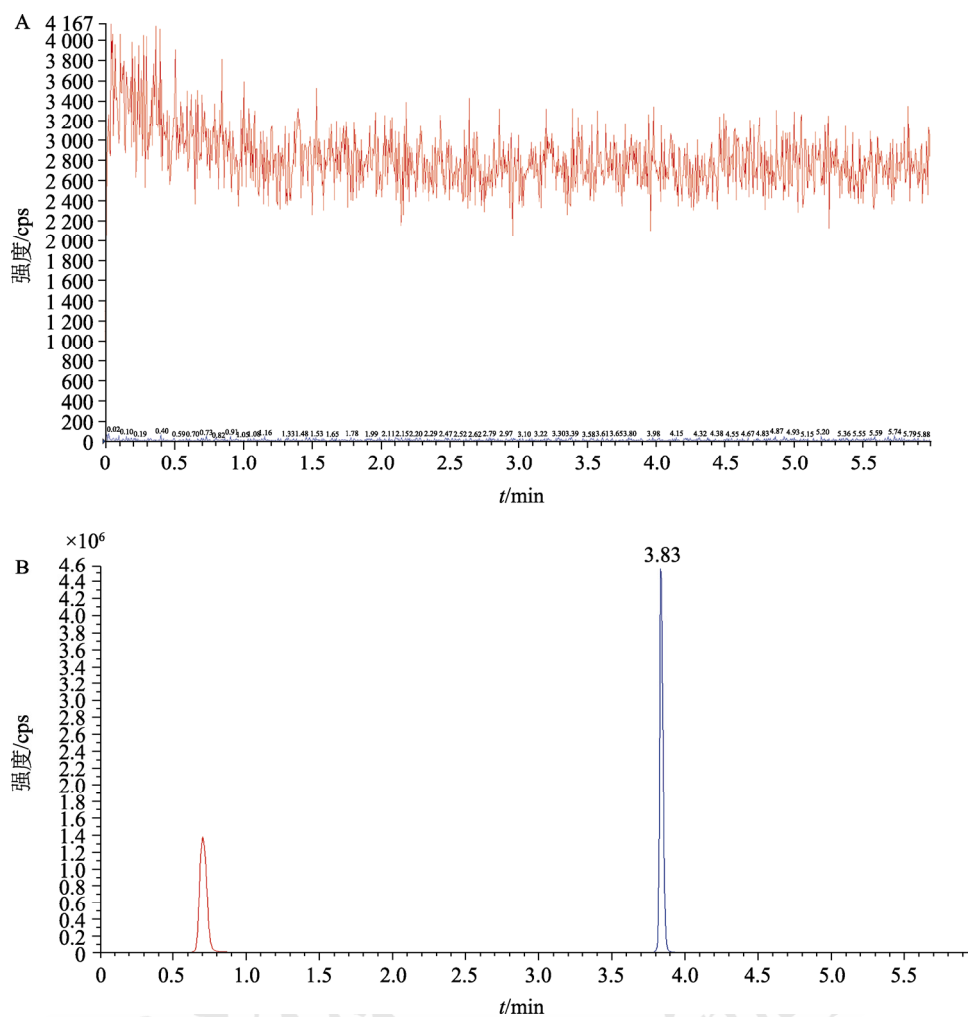


图 1 大鼠肝微粒体样品中空白基质(A)和对乙酰氨基酚及内标格列齐特(B)色谱图

Fig. 1 Chromatogram of blank matrix(A) and acetaminophen and gliclazide(B) in rat liver microsomes samples

2.3.2 标准曲线的制备 以 PBS 溶液代替抑制液溶液和 NADPH 溶液,对乙酰氨基酚对照品溶液代替底物溶液,其余按“2.2.3”项下方法制备混合对照品系列溶液(对乙酰氨基酚终浓度分别为 10, 20, 40, 100, 500, 750, 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),按“2.1”项下色谱、质谱条件进样测定。以对乙酰氨基酚浓度(x)为横坐标、对乙酰氨基酚与内标格列齐特峰面积比值(y)为纵坐标,进行线性回归分析,得大鼠肝微粒体线性回归方程为 $y = 0.00148x + 0.021$ ($r=0.9951$)。结果表明,在大鼠肝微粒体中对乙酰氨基酚检测浓度在 10~1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 呈良好线性关系;定量下限为 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\text{RSD}<15\%$, $n=6$)。

2.3.3 精密度试验 以 PBS 溶液代替抑制液溶液和 NADPH 溶液,对乙酰氨基酚对照品溶液代替底物溶液,其余按“2.2.3”项下方法制备高、中、低浓度的质控样品各 6 份(对乙酰氨基酚终浓度分别为 20, 500, 750 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),按“2.1”项下色谱、

质谱条件考察日内精密度、日间精密度。对乙酰氨基酚在每一浓度水平的日内精密度 $\text{RSD}<7.86\%$,准确度(RE)为 $-3.67\%\sim 6.00\%$;日间精密度 $\text{RSD}<8.24\%$,RE 为 $-10.65\%\sim 5.30\%$ 。

2.3.4 回收率试验 以 PBS 溶液代替抑制液溶液和 NADPH 溶液,对乙酰氨基酚对照品溶液代替底物溶液,其余按“2.2.3”项下方法制备高、中、低浓度的质控样品(对乙酰氨基酚终浓度分别为 20, 500, 750 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),同时制备空白微粒体上清提取液加入相应浓度对照品和内标。按“2.1”项下色谱、质谱条件测定。计算对乙酰氨基酚提取回收率。结果表明,提取回收率为 92.53%~103.23%。

2.3.5 样品稳定性考察 以 PBS 溶液代替抑制液溶液和 NADPH 溶液,对乙酰氨基酚对照品溶液代替底物溶液,其余按“2.2.3”项下方法制备高、中、低浓度的质控样品各 6 份(对乙酰氨基酚终浓

度分别为 20, 500, 750 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 后, 按“2.1”项下色谱、质谱条件测定, 考察 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育样品的稳定性; 同法制备高、中、低浓度的质控样品各 6 份, 于进样室 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 24 h 后测定, 考察 4 $^{\circ}\text{C}$ 进样器中放置样品的稳定性。结果, RSD 均 $<10.77\%$, 表明样品在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 及 4 $^{\circ}\text{C}$ 进样器中放置 24 h 稳定。

2.4 大鼠肝微粒体孵育

2.4.1 大鼠肝微粒体体外孵育体系 按“2.2.3”项下方法制备大鼠肝微粒体体外孵育体系。取微粒体样品上清液按“2.1”项下方法测定对乙酰氨基酚含量。

2.4.2 温孵条件的优化 固定非那西丁浓度 ($200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 将不同浓度的微粒体 ($0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 分别与底物温孵 2 h, 于温孵过程中的不同时间点 (5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 min) 取出一定温孵溶液, 加入沉淀剂终止反应, 测定底物代谢物的生成量。分别在不同蛋白浓度下, 以时间为横坐标, 产物对乙酰氨基酚与内标峰面积比值为纵坐标作图, 确定最优微粒体蛋白浓度为 $0.5\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 最优温孵时间为 30 min。结果见图 2。

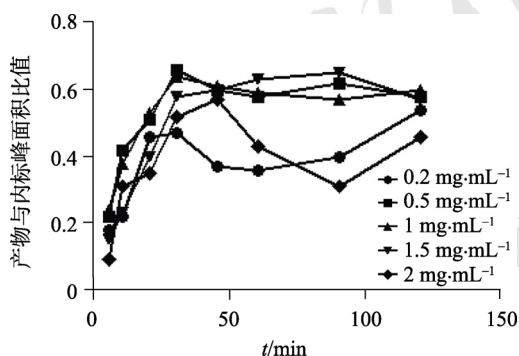


图 2 大鼠肝微粒体体外孵育体系温孵条件的优化
Fig. 2 Optimization of incubation conditions of rat liver microsomes *in vitro* incubation system

2.4.3 微粒体酶活性的测定 以非那西丁为底物 ($20\sim 400\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 以 PBS 溶液代替抑制剂溶液, 按“2.4.1”项下方法操作, 进行温孵反应, LC-MS/MS 测定温孵体系中对乙酰氨基酚的浓度, 计算生成速率 [代谢产物的浓度 / (微粒体蛋白浓度 \times 温孵反应时间)], 使用 Prism 软件 (Graph Pad Software 5.0) 中的非线性回归 (Michaelis-Menten) 计算得到在本实验条件下, 大鼠肝微粒体酶的活性, 即非那西丁的酶促动力学参数 K_m 为

$97.62\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, V_m 为 $946.88\ \text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, 与文献报道一致, 说明此大鼠肝微粒体孵育体系可用于后续研究。

2.5 IC_{50} 的计算

将系列浓度的 CYP1A2 酶的抑制剂溶液 (系列多糖溶液或 α -萘黄酮溶液) 与底物非那西丁溶液按“2.4.1”项下方法操作, 进行温孵, 通过 LC-MS/MS 测定温孵体系中对乙酰氨基酚的浓度, 计算生成速率, 再分别将含不同浓度抑制剂时对乙酰氨基酚的生成速率与不含抑制剂时的生成速率相比得到剩余率 [生成速率 (含抑制剂) / 生成速率 (不含抑制剂) $\times 100\%$], 以剩余率为纵坐标, 抑制剂浓度的对数值为横坐标, 绘制抑制曲线见图 3, 使用 Prism 软件 (Graph Pad Software 5.0) 中的非线性回归 [log (inhibitor) vs response-variable slope] 计算得到在本实验条件下, 阳性对照 α -萘黄酮溶液的 IC_{50} 值为 $2.809\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 人參多糖溶液的 IC_{50} 值为 $264.9\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 贻贝多糖溶液的 IC_{50} 值为 $239.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 黄原胶溶液的 IC_{50} 值为 $207.6\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3 讨论

CYP 酶系负责大部分药物的生物转化作用, 由于其底物特征性不强, CYP 酶系被抑制或被诱导可使药物在体内的药动学行为发生改变, 是导致代谢性药物-药物相互作用的主要原因。其中酶抑制作用的临床意义远大于酶诱导作用, 约占代谢性相互作用的 70%, 这种作用通常会使得治疗窗狭窄的药物发生严重的不良反应^[6-8]。目前, 中西药联用非常普遍, 中药与中药之间、中药与西药之间也有潜在药物相互作用, 许多中药是 CYP450 酶的底物、诱导剂和/或抑制剂。

为了探讨人參多糖、贻贝多糖及黄原胶对 CYP1A2 酶的抑制作用, 本研究建立了 LC-MS/MS 测定大鼠肝微粒体中对乙酰氨基酚含量方法, 与 HPLC 相较, LC-MS/MS 具有灵敏、快速、高效的优点, 更适用于药物代谢研究。方法学验证结果表明该方法选择性强, 准确可重复, 在此色谱条件下, 代谢物与内标出峰良好, 乙腈沉淀蛋白处理后, 大鼠肝微粒体体系内源性物质不干扰测定。关于体外代谢模型, 目前常用的体外代谢模型中肝微粒体模型含有肝脏表达的所有参与药物代谢的 CYP 酶, 已被美国 FDA 认可用于新药代谢途径和对 CYP 酶抑制或诱导作用的研究^[9-10], 且大鼠

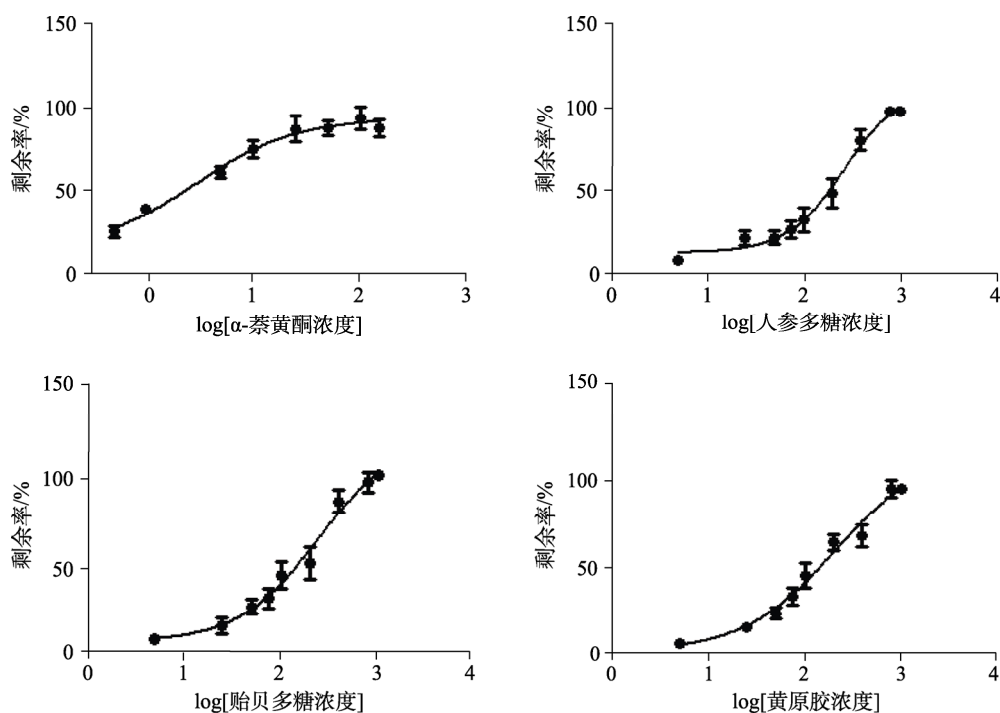


图3 α -萘黄酮溶液及系列多糖溶液对大鼠肝微粒 CYP1A2 酶的体外抑制效果
 Fig. 3 Inhibitory effects of α -naphthoflavone and several polysaccharides on the activity of CYP1A2 of rat liver microsomes

肝微粒体与人类相似度极高，因此本研究选择大鼠肝微粒模型研究人参多糖、贻贝多糖及黄原胶对 CYP1A2 酶的抑制作用。研究表明阳性对照 α -萘黄酮溶液的 IC_{50} 值为 $2.809 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，与文献报道相同；受试物人参多糖溶液 IC_{50} 值为 $264.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、贻贝多糖溶液的 IC_{50} 值为 $239.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、黄原胶溶液的 IC_{50} 值为 $207.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。根据通用的 CYP450 酶抑制剂强度分级规则： $IC_{50} < 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为强抑制剂， $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} < IC_{50} < 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为中等强度抑制剂， $IC_{50} > 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为弱抑制剂， $IC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 认为没有抑制作用^[11-12]。因此在正常剂量下，人参多糖、贻贝多糖及黄原胶对 CYP1A2 酶亚型均无抑制作用，与其底物联合用药时，产生相互作用的风险较低。

REFERENCES

[1] LYNCH T, PRICE A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interaction, and adverse effects[J]. Am Fam Physician, 2007, 76(3): 391-396.
 [2] SUN L N, DING L, YAN Z Y, et al. Determination the inhibitory potency of bencycloquidum bromide on rat liver cytochrome P450 by LC-MS/MS[J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 2013, 44(2): 134-140.
 [3] 孙忠实, 朱珠. 药物代谢性相互作用研究进展[J]. 药物不良反应杂志, 2000(1): 6-14.

[4] 李焕德, 李坤艳. 药物代谢性相互作用体外研究的重要性[J]. 中南药学, 2005, 3(3): 179-181.
 [5] 董鹏达, 郭宪清. 药物代谢性相互作用与合理用药[J]. 中国医药论坛, 2006, 4(4): 53-54.
 [6] 刘静, 苏锐. 丙戊酸钠、拉莫三嗪代谢性相互作用引起患者不良反应的药学干预[C]//2013 年中国临床药学年会暨第九届临床药师论坛论文集. 南昌, 2013: 327-330.
 [7] LIU Y Q, HONG Y J, ZENG S. Recent advances in metabolism-based drug-drug interactions[J]. J Zhejiang Univ: Med Sci(浙江大学学报: 医学版), 2009, 38(2): 215-224.
 [8] CHENG D, XU W R, LIU C X. Progress of research on genetic polymorphism of CYP450s[J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2006, 22(12): 1409-1414.
 [9] BJORNSSON T D, CALLAGHAN J T, EINOLF H J, et al. The conduct of *in vitro* and *in vivo* drug-drug interaction studies: A pharmaceutical research and manufacturers of America(PhRMA) perspective[J]. Drug Metab Dispos: Biol Fate Chem, 2003, 31(7): 815-832.
 [10] XIA J, XIA Z L. Inhibitory effects of tripterygium glycosides on CYP3A activity of rat and human liver microsomes *in vitro*[J]. China Pharm(中国药房), 2015, 26(4): 473-476.
 [11] PARMENTIER Y, BOSSANT M J, BERTRAND M, et al. *In vitro* studies of drug metabolism[M]. Comprehensive Medicinal Chemistry II. Amsterdam: Elsevier, 2007: 231-257.
 [12] ZHANG P Y, REN J, ZHI W Q, et al. Inhibition of CYP450 activity by honokiol and other four components of Chinese traditional medicine *in vitro*[J]. Chin J Clin Pharmacol Ther(中国临床药理学与治疗学), 2017, 22(8): 922-926.

收稿日期: 2020-10-22
 (本文责编: 曹粤锋)