



# 黄芪甲苷对大鼠肝微粒体酶活性影响

单文雅, 张玉峰, 朱捷强, 邵青, 范晓辉\*

(浙江大学药学院中药科学与工程学系, 浙江杭州 310058)

**[摘要]** 目的:研究黄芪甲苷对 CYP450 酶的影响,为制定合理用药方案提供科学依据。方法:以甲苯磺丁脲、氯唑沙宗、香豆素、硝苯地平、非那西丁为探针药, HPLC 测定探针药与相应代谢产物的浓度,在体外的孵育体系中研究黄芪甲苷对 CPY2C9, CPY2E1, CPY2A6, CPY3A4 和 CPY1A2 酶活性的影响。结果:黄芪甲苷对 CYP1A2, CYP2A6, CYP2E1 酶的活性没有明显的影响,而对 CYP2C9 和 CYP3A4 酶的  $IC_{50}$  分别为 35.40, 88.22  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论:黄芪甲苷对 CYP2C9 和 CYP3A4 酶有明显的抑制作用,在与经由 CYP2C9, CYP3A4 酶代谢的药物合用时,可能会产生药物相互作用。

**[关键词]** 黄芪甲苷;肝微粒体;甲苯磺丁脲;硝苯地平

细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450, CYP450) 是参与体内药物代谢的重要酶系<sup>[1]</sup>。某一药物对 CYP450 酶的抑制或诱导,可能会影响其他药物的代谢<sup>[2]</sup>,被认为是引起药物相互作用的重要因素<sup>[3]</sup>。因此,研究药物的代谢途径,对了解药物相互作用、制定合理的临床用药方案等,具有重要指导意义<sup>[4]</sup>。黄芪甲苷 (astragaloside IV) 是常用中药材黄芪的主要活性成分之一,具有多种药理作用,临床应用非常广泛,但也增加了其和其他药物合用的几率。迄今为止,已有多篇文献报道了黄芪甲苷的代谢动力学研究<sup>[5-7]</sup>,但鲜见黄芪甲苷代谢途径及代谢机制的报道。本实验旨在探讨黄芪甲苷的代谢途径,了解其对 CYP450 酶的影响,为含黄芪药材的临床合理用药提供科学依据。

## 1 材料

**1.1 药物与试剂** 黄芪甲苷 (上海融禾医药科技发展有限公司,批号 090310), 甲苯磺丁脲、氯唑沙宗、香豆素、非那西丁 (美国 Alfa Aesar 公司), 硝苯地平 (日本 TCI 公司), 4-羟基甲苯磺丁脲、氧化硝苯地平、6-羟基氯唑沙宗、7-羟基香豆素 (加拿大 TRC 公司), 对乙酰氨基酚 (美国 Sigma 公司)。磷酸 (分析纯,浙江杭州高晶精细化工有限公司);其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

**1.2 动物** 雄性 SD 大鼠,体重 200 ~ 250 g,由浙江大学动物实验中心提供,合格证号 SCXK (浙) 2007-0029。

**1.3 仪器** Avanti J-26 XPI 高速离心机 (美国 Beckman 公司), DK-8D 型电热恒温水槽 (上海精宏实验设备有限公司), Savant SPD121P 离心式浓缩仪 (美国 Thermo 公司), Agilent 高效液相色谱仪 HP 1100 系列 (美国 Agilent 公司)。

## 2 方法

**2.1 大鼠肝微粒体的制备** 取雄性 SD 大鼠肝脏,采用钙盐沉淀法制备肝微粒体<sup>[8]</sup>。然后用 Bradford 法测定其中蛋白为 13.36  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.2 肝微粒体体外孵育体系** 体外孵育体系包括微粒体蛋白 ( $1.3 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G-6-PDH,  $1 \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 磷酸盐缓冲液 ( $100 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.4) 和不同浓度的药物,终体积为 200  $\mu\text{L}$ 。在 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴中预孵育 5 min 后,加入含有 6-磷酸葡萄糖 (G-6-P,  $5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), NADPNa<sub>2</sub> ( $1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和 MgCl<sub>2</sub> ( $5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的溶液启动反应。孵育结束后加入 200  $\mu\text{L}$  冰浴甲醇终止反应,涡旋后 1 万  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min。取上清液 20  $\mu\text{L}$  进样。甲苯磺丁脲的孵育体系则为 400  $\mu\text{L}$ , 孵育后用 400  $\mu\text{L}$  乙腈终止反应。1 万  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上清。加 700  $\mu\text{L}$  乙酸乙酯萃取,取上清,离心浓缩挥干,再用 100  $\mu\text{L}$  甲醇复溶后进样。

**2.3 色谱条件** 采用 Agilent SB-C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流速 0.8  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ , 进样量 20  $\mu\text{L}$ 。4-羟基甲苯磺丁脲:流动相 A 为

**[稿件编号]** 20110627019

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09502-005);国家自然科学基金项目 (81001687, 81173465)

**[通信作者]** \* 范晓辉, 副研究员, 博士生导师, Tel: (0571) 88208596, E-mail: fanxh@zju.edu.cn



0.005% 磷酸水, B 为乙腈, 梯度洗脱 0 ~ 30 min, 35% ~ 70% B; 检测波长 235 nm。6-羟基氯唑沙宗: 流动相 A 为 0.005% 磷酸水, B 为乙腈, 等度洗脱 0 ~ 30 min, 30% B; 检测波长 287 nm。7-羟基香豆素: 流动相 A 为 0.005% 磷酸水, B 为乙腈, 梯度洗脱 0 ~ 30 min, 5% ~ 80% B; 检测波长 310 nm。氧化硝苯地平: 流动相 A 为水, B 为乙腈, 梯度洗脱 0 ~ 21 min, 40% ~ 53% B; 检测波长 235 nm。对乙酰氨基酚: 流动相 A 为水, B 为乙腈, 梯度洗脱 0 ~ 10 min, 5% ~ 10% B; 10 ~ 30 min, 10% ~ 60% B; 检测波长 254 nm。

经方法学验证, 以上方法专属性良好。其中 4-羟基甲苯磺丁脲线性范围 0.297 ~ 5.94  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $R^2 = 0.9999, n = 5$ ), 平均回收率 98.5%; 6-羟基氯唑沙宗线性范围 0.501 ~ 10.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $R^2 = 0.9999, n = 5$ ), 平均回收率 97.2%; 7-羟基香豆素线性范围 2.47 ~ 49.3  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $R^2 = 0.9999, n = 5$ ), 平均回收率 92.1%; 氧化硝苯地平线性范围 2.47 ~ 49.4  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $R^2 = 0.9999, n = 5$ ), 平均回收率 101.3%; 对乙酰氨基酚线性范围 2.84 ~ 56.9  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $R^2 = 0.9998, n = 5$ ), 平均回收率 106.4%。各方法的日间精密度 RSD 均小于 7% ( $n = 6$ ), 日内精密度 RSD 均小于 3% ( $n = 5$ )。样品在 24 h 内浓度基本稳定, RSD 均小于 1% ( $n = 6$ )。

**2.4 黄芪甲苷的半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 的测定** 在孵育体系中, 各种探针药的浓度保持在 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 变化黄芪甲苷的终浓度至 0, 25, 50, 75, 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。根据 2.2 项的步骤反应不同时间 (甲苯磺丁脲 80 min, 氯唑沙宗 20 min, 香豆素 30 min, 硝苯地平 60 min, 非那西丁 20 min)。最后终止反应, 进液相测定探针药代谢产物的含量, 计算黄芪甲苷对各个酶的  $\text{IC}_{50}$ 。

**2.5 黄芪甲苷对各个代谢酶的抑制类型的确定** 选取  $\text{IC}_{50}$  小于 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的探针药, 进一步分析黄芪甲苷对这些代谢酶的抑制类型。配制不同浓度的代谢产物溶液进行分析, 得出标准曲线。配制 3 个不同浓度的探针药溶液, 在孵育体系中, 分别加入不同浓度的探针药物和黄芪甲苷反应。反应一定时间后终止, 进液相测定探针药代谢产物的峰面积, 据此作 Dixon-Plot 图, 并计算  $K_i$ 。

### 3 结果

**3.1 黄芪甲苷对各个代谢酶的  $\text{IC}_{50}$**  黄芪甲苷对

CYP2C9 和 CYP3A4 有一定的抑制作用<sup>[9]</sup>, 其  $\text{IC}_{50}$  分别为 35.40, 88.22  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 见表 1。

表 1 黄芪甲苷对 P450 酶的  $\text{IC}_{50}$  测定

Table 1 The  $\text{IC}_{50}$  values for the inhibition of astragaloside IV on CYP450 enzymes activities

酶类型	底物	代谢产物	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
CYP1A2	非那西丁	对乙酰氨基酚	> 100
CYP2C9	甲苯磺丁脲	4-羟基甲苯磺丁脲	35.40
CYP2A6	香豆素	7-羟基香豆素	> 100
CYP3A4	硝苯地平	氧化硝苯地平	88.22
CYP2E1	氯唑沙宗	6-羟基氯唑沙宗	> 100

**3.2 黄芪甲苷对 CYP2C9 酶的抑制类型** 配制 4-羟基甲苯磺丁脲的不同浓度溶液, 进液相分析, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标的标准曲线方程为  $Y = 19205X - 0.4869$ ,  $R^2 = 0.9998$ , 线性范围 0.297 ~ 5.94  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

底物甲苯磺丁脲的终浓度为 100.8, 125.7, 151.2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 黄芪甲苷的浓度则取 0, 25, 50, 75, 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 每份样品平行 3 份, 按照 2.2 项程序孵育。液相分析 4-羟基甲苯磺丁脲含量。按照 Lineweaver-Burk (双倒数作图法) 方程, 以  $1/[V]$  做纵坐标,  $1/[S]$  做横坐标, 作 Dixon-Plot 图并计算  $K_i$ 。黄芪甲苷对 CYP2C9 酶的抑制类型为竞争性抑制,  $K_i$  为 42.88  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 见图 1。

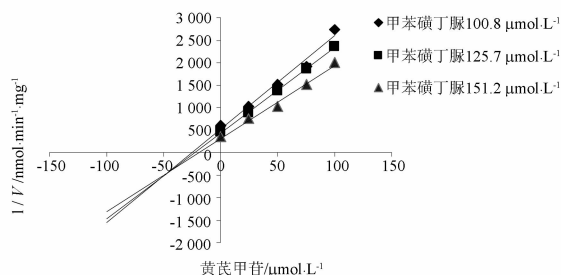


图 1 黄芪甲苷对甲苯磺丁脲的抑制作用

Fig. 1 Dixon plots of the effect of astragaloside IV on tolbutamide formation

**3.3 黄芪甲苷对 CYP3A4 酶的抑制类型研究** 配制氧化硝苯地平的不同浓度溶液, 进液相分析, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标的标准曲线方程为  $Y = 31.985X + 4.5314$ ,  $R^2 = 0.9992$ , 线性范围 2.47 ~ 49.4  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



底物硝苯地平浓度 50.0, 74.9, 99.9  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 黄芪甲苷的浓度则取 0, 25, 50, 75  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 每份样品平行 3 份, 按照 2.2 项程序孵育。液相分析氧化硝苯地平含量。作 Dixon-Plot 图并计算  $K_i$ 。黄芪甲苷对 CYP3A4 酶的抑制类型为反竞争性抑制,  $K_i$  为 33.31  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 见图 2。

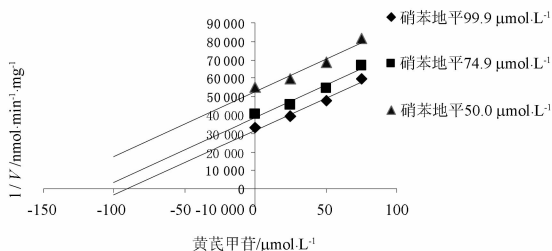


图 2 黄芪甲苷对硝苯地平的抑制作用  
Fig. 2 Dixon plots of the effect of astragaloside IV on nifedipine formation

#### 4 讨论

药物对 CYP450 的抑制情况主要有 4 种类型: 竞争性抑制、非竞争性抑制、反竞争性抑制、混合型抑制<sup>[10]</sup>。本研究显示, 黄芪甲苷对 CYP2C9 和 CYP3A4 有一定的抑制作用, 其  $\text{IC}_{50}$  分别为 35.40, 88.22  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。根据 Dixon-Plot 图可知, 前者为竞争性抑制, 后者为反竞争性抑制。抑制常数  $K_i$  分别为 42.88, 33.31  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

合并用药是临床用药的常见形式, 药物之间可能发生一些相互作用, 从而引起药效的变化, 有时甚至会引起严重的毒副作用<sup>[11]</sup>。近年来, 文献报道了一些药物对 CYP450 的影响<sup>[12-13]</sup>, 氯霉素、西米替丁、安替比林、磺胺<sup>[14]</sup>等药物对 CYP2C9 都有一定的抑制作用。而槲皮素、山柰酚、桑黄素<sup>[15]</sup>等化合物, 则是对 CYP3A4 有一定的抑制作用。Zhao X P 等<sup>[16]</sup>发现, 长春氟宁是经由 CYP3A4 代谢的, 而原儿茶醛对 CYP3A4 有较弱的抑制作用, 丹参素和隐丹参酮则是对 CYP2C9 都有一定的抑制作用<sup>[9]</sup>。因此, 在临床用药过程中, 当黄芪甲苷或含黄芪中药制剂与这些药物合用时, 有可能发生一些相互作用, 导致这些药物的代谢速率变化, 影响药效, 甚至可能引发一些不良反应。

通过对黄芪甲苷的代谢机制的研究, 了解其对

CYP2C9 和 CYP3A4 的抑制作用和抑制类型, 为含黄芪中药制剂临床合理用药提供了科学数据。

#### [参考文献]

- [1] 潘莹, 邓颖, 毕惠嫦, 等. 隐丹参酮对大鼠肝微粒体 CYP 酶的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(4): 331.
- [2] 况晓东, 李新华, 熊玉卿. 川芎嗪在大鼠肝微粒体系统中的代谢研究[J]. 中药中药杂志, 2006, 31(23): 1971.
- [3] 徐斌, 赵刚, 位华, 等. 20 味中成药对 5 个人肝微粒体酶活性的影响[J]. 药学实践杂志, 2009, 27(5): 353.
- [4] 郭喻, 汪晖. 人细胞色素 P450 同工酶探针底物特异性的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(7): 851.
- [5] 陈宁, 张琪, 杜宇, 等. 黄芪甲苷在大鼠体内的药代动力学和组织分布研究[J]. 生物加工过程, 2006, 4(3): 67.
- [6] 顾冰川, 王广基. HPLC-MS 法测定大鼠尿中黄芪甲苷的含量及其尿动力学研究[J]. 中国药科大学学报, 2002, 33(3): 222.
- [7] Zhang Weidong, Zhang Chuan, Liu Runhui, et al. Preclinical pharmacokinetics and tissue distribution of a natural cardioprotective agent astragaloside IV in rats and dogs[J]. Life Sci, 2006, 79: 808.
- [8] 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 511.
- [9] Qiu F, Zhang R, Sun J, et al. Inhibitory effects of seven components of danshen extract on catalytic activity of cytochrome P450 enzyme in human liver microsomes[J]. Drug Metab Dispos, 2008, 36(7): 1308.
- [10] Cornish-Bowden A. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors[J]. Biochem J, 1974, 137(1): 143.
- [11] Rodrigues A D. Drug-drug interactions[M]. 2nd ed. New York: Informa Healthcare, 2008: 688.
- [12] Liu Y T, Hao K, Liu X Q, et al. Metabolism and metabolic inhibition of gambogic acid in rat liver microsomes[J]. Acta Pharmacol Sin, 2006, 27(9): 1253.
- [13] Xia C H, Sun J G, Wang G J, et al. Herb-drug interactions: *in vivo* and *in vitro* effect of Shenmai injection, a herbal preparation, on the metabolic activities of hepatic cytochrome P450 3A1/2, 2C6, 1A2, and 2E1 in rats[J]. Planta Med, 2010, 76(3): 245.
- [14] 陈颢, 王睿. 药物代谢酶细胞色素 P450 2C9 研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(6): 601.
- [15] 郑姣, 周宏源. 黄酮类化合物对细胞色素 P450 CYP1, 2E1, 3A4 和 19 的影响[J]. 药学报, 2007, 42(1): 8.
- [16] Zhao X P, Zhong J, Liu X Q, et al. CYP3A4 mediated *in vitro* metabolism of vinflunine in human liver microsomes[J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(1): 118.



## Inhibitory effects of astragaloside IV on cytochrome P450 enzyme of rat liver microsomes

SHAN Wenya, ZHANG Yufeng, ZHU Jieqiang, SHAO Qin, FAN Xiaohui\*

(College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

[**Abstract**] **Objective:** To provide a scientific basis for the drug-combination and aim to examine whether astragaloside IV has the impact on the cytochrome P450 enzymes. **Method:** Tolbutamide, chlorzoxazone, coumarin, nifedipine, and phenacetin were as probe substrates of rat CYP2C9, CYP2E1, CYP2A6, CYP3A4, and CYP1A2, and were incubated in rat liver microsomes with astragaloside IV. Triplicate samples were run to generate  $IC_{50}$  value by incubating P450 probe substrates in the presence of five concentrations of astragaloside IV in the incubation mixture. The  $K_i$  values were determined by fitting the probe substrate at various inhibitor concentrations to the equations for competitive inhibition, noncompetitive inhibition, noncompetitive inhibition, and mixed-type inhibition. **Result:**  $IC_{50}$  and  $K_i$  values were estimated, and the types of inhibition were determined. Among the five probe substrates, astragaloside IV might not significantly affect CYP2E1, CYP2A6 and CYP1A2-mediated metabolism in rats, but was a competitive inhibitor of CYP2C9 ( $IC_{50}$  35.40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $K_i$  42.88  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), and was a uncompetitive inhibitor of CYP3A4 ( $IC_{50}$  88.24  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $K_i$  33.31  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). **Conclusion:** These results suggested that astragaloside IV inhibited CYP2C9 and CYP3A4, which provided useful information for safe and effective use of astragaloside IV.

[**Key words**] astragaloside IV; liver microsomes; tolbutamide; nifedipine

doi:10.4268/cjcmm20120118

[责任编辑 张宁宁]