

补骨脂素和异补骨脂素对体外细胞色素 P450 酶活性的抑制和诱导作用

钟玉环^{1,2}, 沈国林², 原 梅², 刘万卉¹, 李 桦²

(1. 烟台大学药学院, 山东 烟台 265300; 2. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要:目的 探讨补骨脂素(PSO)和异补骨脂素(IPSO)对细胞色素 P450(CYP)活性的抑制和诱导作用。**方法** 将人肝微粒体或鼠肝微粒体与 PSO 或 IPSO 以及 CYP 特异性探针底物共孵育 30 min, 分别以非那西丁 *O*-脱乙基、甲苯磺丁脲 4-羟基化、美芬妥因 4-羟基化、右美沙芬 *O*-脱甲基化和咪达唑仑 1'-羟基化为同工酶 CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 (大鼠 2D2) 和 CYP3A4 (大鼠 3A1/2) 代谢活性的标志, 用 HPLC-MS/MS 法检测相应代谢产物的生成量并计算相应的 IC₅₀ 值, 评价 PSO 和 IPSO 对 5 种 CYP 同工酶的潜在抑制作用。将 PSO 和 IPSO 或阳性诱导剂与“三明治”培养大鼠肝原代细胞共孵育 72 h 后, 再加入 CYP 探针底物孵育 1 h, 检测相应代谢产物的生成量, 与阳性诱导剂组比较, 评价二者对 CYP1A 和 CYP3A 的诱导作用。**结果** PSO 和 IPSO 对人肝微粒体和鼠肝微粒体的 CYP1A2 均有较强的抑制作用, 在人肝微粒体中的 IC₅₀ 值分别为 0.17 和 0.13 μmol·L⁻¹; 在鼠肝微粒体中的 IC₅₀ 值分别为 0.47 和 0.36 μmol·L⁻¹。二者对人肝微粒体的 CYP2D6 也有中等强度的抑制作用, IC₅₀ 值分别为 3.59 和 9.51 μmol·L⁻¹。PSO 和 IPSO 100 μmol·L⁻¹ 可分别将大鼠肝细胞的 CYP3A 活性提高 1.18 和 0.96 倍, 有一定的诱导作用。**结论** PSO 和 IPSO 能显著抑制 CYP1A2 酶活性, 对 CYP3A 有一定的诱导作用。

关键词: 补骨脂素类; 异补骨脂素; 细胞色素类; 药物相互作用; 微粒体, 肝

中图分类号: R975 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2012)04-0522-07

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2012.04.010

补骨脂素 (psoralen, PSO) 和异补骨脂素 (isopsoralen, IPSO) 属于呋喃香豆素类化合物, 主要存在于补骨脂、无花果、独活和北沙参等中药中, 具有抗肿瘤、抗白血病、拟雌激素、补骨及治疗白癜风等皮肤顽疾等药理作用^[1-3], 在临床上广泛应用, 是补骨脂酊、白癜风片、仙灵骨葆胶囊和益肾补血胶囊等多个中药复方和制剂中的主要成分。血清动力学研究表明, PSO 和 IPSO 是服用补骨脂水煎剂大鼠血清中的主要活性成分^[4]。呋喃香豆素类化合物与 CYP450 酶的相互作用非常复杂, 它们通常由 CYP 酶介导代谢, 也可以抑制 CYP 酶的活性^[5]。有报道, 雄性小鼠连续 28 d 服用 PSO 和 IPSO 后, 肝脏 CYP3A11 的活性和蛋白水平显著增高, CYP2E1 的活性和蛋白水平则减低^[6]。但 PSO 和 IPSO 对 CYP

同工酶抑制和诱导作用的系统研究尚未见报道。

CYP 酶是最重要的药物代谢酶, 参与约 75% 临床药物的体内代谢, 其中 CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 和 CYP3A4 是介导临床药物代谢的 5 个主要的 CYP 同工酶, 对 CYP 酶的诱导和抑制是药物临床产生代谢性相互作用的主要原因^[7-8]。近年来, 服用中草药制剂引起的不良反应受到较大的关注。文献报道, 在同时服用化学药品和中草药制剂或天然补剂的人群中, 约有 40% 的患者可能因中草药-化学药品的相互作用导致不良反应^[8]。中草药制剂中的各种有效成分对 CYP 酶产生诱导或抑制作用可以引起合用药物药代动力学行为的改变, 从而产生代谢性相互作用。因此, 了解中药有效成分对 CYP 酶的诱导和抑制潜能, 对于降低临床药-药相互作用的风险、提高用药安全性具有重要意义。本研究在体外系统中以非那西丁 *O*-脱乙基、甲苯磺丁脲 4-羟基化、美芬妥因 4-羟基化、右美沙芬 *O*-脱甲基化和咪达唑仑 1'-羟基化为 5 种同工酶代谢活性的标志, 评价 PSO 和 IPSO 对 5 个主要人 CYP 同工酶的抑制作用以及对大鼠肝细胞 CYP1A 和 3A 酶的诱导作用, 并比较其对大鼠 CYP1A2 的抑制活性, 为两药的临床合理应用提供科学依据。

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2012ZX09301003); 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2008ZXJ09006-001)

作者简介: 钟玉环 (1986 -), 女, 硕士研究生, 主要从事药物毒物代谢研究, E-mail: laopengyou_12@163.com; 李桦 (1956 -), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事药物毒物代谢研究。

通讯作者: 李桦, E-mail: amms_hli@126.com, Tel: (010)66930664, Fax: (010)68225893

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

PSO、IPSO、咪达唑仑和盐酸普萘洛尔购自中国药品和生物制品检定所;非那西丁、甲苯磺丁脲、S-美芬妥因和右美沙芬购自美国 Sigma 公司;对乙酰氨基酚(扑热息痛)、4-羟基甲苯磺丁脲、4-羟基美芬妥因、右啡烷和 1'-羟基咪达唑仑均购自美国 BD Gentest 公司;CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A4 阳性抑制剂 α -萘黄酮、磺胺苯吡唑、反苯环丙胺、奎尼丁和酮康唑,以及 CYP1A 和 CYP3A 的阳性诱导剂 3-甲基胆蒎和苯巴比妥钠购自 Sigma 公司。甲醇和乙腈为色谱纯,购自美国 Fisher 公司,其他试剂为分析纯。

50 人混合肝微粒体(蛋白含量 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,批号:34689)购自美国 BD Gentest 公司。20 只雄性 SD 大鼠混合肝微粒体为实验室自制,蛋白含量 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。NADPH 购自瑞士 Roche 公司。Agilent 6410B 液质联用仪和 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm \times 50 mm, 3.5 μm)为美国 Agilent 公司产品。

1.2 动物

雄性 SD 大鼠,体质量 200 ~ 240 g,由军事医学科学院实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK-(军)2007-004。

1.3 大鼠肝原代细胞的分离和培养

按照文献[9]采用两步灌注法分离获得大鼠肝原代细胞,以“三明治”夹心培养法^[10]培养分离获得的肝原代细胞。

1.4 LC-MS/MS 定量检测 CYP 探针底物的代谢产物

色谱条件:流动相 A 为含有 0.1% 甲酸和甲酸铵 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液, B 为含有 0.1% 甲酸的乙腈。洗脱梯度程序为 30% B (0 min), 95% B (0.5 ~ 1.5 min), 30% B (1.8 ~ 2.5 min), 运行时间 2.5 min, 流速 $0.3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 。内标为盐酸普萘洛尔 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

质谱条件:以 ESI 源正离子 MRM 方式检测,毛细管温度 300°C ,毛细管电压 +4000 V,碰撞能为 120 V,各代谢产物的选择性检测离子对如表 1 所示。

1.5 PSO 和 IPSO 在人和大鼠肝微粒中 IC₅₀ 的测定

孵育体系为 200 μl 的 $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 7.4), 含有人肝微粒体 (human live microsomes, HLM) 或大鼠肝微粒体 (rat liver microsomes, RLM) (终浓度 $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), NADPH $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 受试药物或阳性抑制剂, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 和 CYP3A4 的探针底物非那西丁 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 甲苯磺丁脲 $120 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,

Tab.1 LC-MS/MS MRM transition and CYP probe metabolites

| Enzyme | Metabolite | MS selected ions |
|---------|-----------------------|------------------|
| CYP1A2 | paracetamol | 152.1/110.1 |
| CYP2C9 | 4-hydroxytolbutamide | 287.0/171.1 |
| CYP2C19 | 4-hydroxy mephenytoin | 235.2/150.1 |
| CYP2D6 | dextrorphan | 258.2/157.1 |
| CYP3A4 | 1'-midazolam | 342.1/324.1 |

Analysis of CYP probe metabolites was performed on HPLC-MS/MS. The internal standard was propranolol $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Their linear range is all 1 - 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

S-美芬妥因 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 右美沙芬 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和咪达唑仑 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在 K_m 值上下选择各探针底物实验浓度。

实验设置空白对照组、阳性抑制剂对照组以及 PSO 和 IPSO 组。PSO 和 IPSO 分别为 0, 0.0015, 0.005, 0.015, 0.05, 0.15, 0.5, 1.5, 5, 15, 50 和 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 阳性抑制剂 α -萘黄酮 (CYP1A2)、奎尼丁 (CYP2D6) 和酮康唑 (CYP3A) 分别为 0, 0.003, 0.015, 0.06, 0.3, 1.5 和 $6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 磺胺苯吡唑 (CYP2C9) 分别为 0, 0.03, 0.15, 0.6, 3, 15 和 $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 反苯环丙胺 (CYP2C19) 浓度为 0, 0.3, 1.5, 6, 30, 150 和 $600 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 每个浓度重复 3 次。

孵育实验开始前先将配制在 $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液中的肝微粒体与各 CYP 酶的探针底物和不同浓度的药物或阳性抑制剂混合, 37°C 水浴预孵育 5 min 后加入同样已预孵育 5 min 的 NADPH 启动反应, 37°C 孵育 30 min, 在孵育终点用 200 μl 含有盐酸普萘洛尔 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甲醇:乙腈 (1:1) 溶液终止反应, $13\ 000 \times g$, 4°C 下离心 10 min, 取上清液进样定量分析各底物的代谢产物生成量, 测得酶活性。将肝微粒体阳性抑制剂组的 IC_{50} 值与文献比较, 验证体外实验体系的可靠性。

1.6 PSO 和 IPSO 对大鼠肝原代细胞 CYP 酶的诱导性测定

将药物母液以 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌后用细胞培养液配制含药培养液:苯巴比妥钠 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、3-甲基胆蒎 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; PSO 和 IPSO 1, 10 和 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (最高浓度根据 MTT 测定结果确定); CYP 探针底物咪达唑仑 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 非那西丁 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

实验平行设置空白对照组、阳性诱导剂对照组以及 PSO 和 IPSO 组。用阳性诱导剂或受试药的含药细胞培养液诱导“三明治”培养肝原代细胞, 连续

3 d, 每个浓度重复 3 次。3 d 诱导期结束后, 吸去含药培养液, 换用等体积含 CYP1A 或 CYP3A 探针底物的细胞培养液孵育 1 h。在孵育终点取孵育液 200 μl , 用 200 μl 含内标的甲醇: 乙腈(1:1) 终止反应, 13 000 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 取上清液进样定量分析各底物代谢产物的生成量, 测得酶活性。将阳性对照组的酶活性与空白对照组进行比较, 酶活性提高 2 倍以上表明诱导模型建模成功。

1.7 PSO 和 IPSO 对 CYP 酶抑制或诱导作用的数据处理

CYP 酶抑制作用的评价以 IC_{50} 值为指标, IC_{50} 值计算如下: 通过测定探针底物代谢产物的生成量确定 CYP 酶的相对活性, 由公式 1 计算不同浓度药物作用下的相对酶活性 E_r :

$$E_r(\%) = c_{i(n)} / c_{i(0)} \times 100\% \quad (1)$$

式中, $c_{i(n)}$ 为不同浓度药物组测得的代谢产物量; $c_{i(0)}$ 为空白对照组的代谢产物量。用 GraphPad Prism 5 软件将相对酶活性 E_r 对药物浓度的对数值作图, 并计算 IC_{50} 值。

CYP 酶诱导评价: 参照美国 FDA 2006 年 9 月发布的《药物相互作用研究指导原则草案》^[11], 以药物组酶活性相对于阳性诱导剂组酶活性的百分比评价受试药物对 CYP1A 和 CYP3A 酶活性的诱导作用, 药物组的酶活性改变 \geq 空白对照组的 40% 可判定受试药具有酶诱导作用。由公式 2 计算相对于阳性对照组的百分比。

$$E_r = \frac{c_{\text{药物}} - c_{\text{对照}}}{c_{\text{阳性对照}} - c_{\text{对照}}} \times 100\% \quad (2)$$

式中, E_r 代表受试药的相对诱导百分比, $c_{\text{药物}}$, $c_{\text{对照}}$ 和 $c_{\text{阳性对照}}$ 分别代表药物组、空白对照组和阳性对照组探针底物代谢产物生成量。

2 结果

2.1 CYP 酶探针底物代谢产物的 HPLC-MS/MS 检测方法确证

肝微粒体和肝细胞培养液中的物质均不干扰各代谢产物的检测, 各代谢产物的线性范围为 1 ~ 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, r^2 值均大于 0.99; 通过测定高中低 3 个浓度质控样品的批内和批间相对标准差(RSD)和相对误差(RE)评价方法的精密度和准确度, 各代谢产物的批内 RSD < 8.4%, 批间 RSD < 12.8%; 批内 RE 在 -2.68% ~ 7.37%, 批间 RE -6.47% ~ 9.58%; 回收率均 > 81.6%。所建检测方法符合定量要求。

2.2 PSO 和 IPSO 对 CYP 酶抑制活性评价

CYP 特异性抑制剂均能显著地抑制 CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 和 CYP3A4 的活性, 得到的抑制曲线呈现典型的倒 S 形特征, 经计算所得的 IC_{50} 值符合参考文献范围^[12], 表明所用的实验体系可以满足 CYP 酶抑制活性评价的要求。

由 PSO 和 IPSO 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 HLM 中 5 种 CYP 同工酶活性的抑制率(表 2)可见, PSO 和 IPSO 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 CYP1A2 的抑制都达到 100%, 对 CYP2C19 和 CYP2D6 的抑制率大于 80%; 而对 CYP2C9 和 CYP3A4 的抑制率约 50%, 抑制作用较弱, 预测其 IC_{50} 值将在 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 或更高。

将剩余酶活性对对数抑制浓度作图, 得到 PSO 和 IPSO 对 CYP 同工酶的抑制曲线, 以 CYP1A2 为代表的抑制曲线见图 1(A, B)。由抑制曲线计算得到的 IC_{50} 值(表 3)。按照通用的 CYP 酶抑制剂强度分级规则^[13], $\text{IC}_{50} < 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为强抑制剂, $1 < \text{IC}_{50} < 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为中等强度抑制剂, $\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为弱抑制剂。因此, 在 HLM 中, PSO 和 IPSO 均为

Tab. 2 Inhibitory effect of psoralen(PSO) and isopsoralen(IPSO) on human liver microsomes (HLM) CYP isoenzymes

| Drug | Inhibitory rate/% | | | | |
|------|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | CYP1A2 | CYP2C9 | CYP2C19 | CYP2D6 | CYP3A4 |
| PSO | 100 \pm 0 | 55.7 \pm 4.3 | 94.3 \pm 0.8 | 91.9 \pm 0.2 | 20.1 \pm 3.6 |
| IPSO | 100 \pm 0 | 55.1 \pm 2.1 | 94.7 \pm 0.6 | 93.5 \pm 0.8 | 33.8 \pm 2.9 |

PSO and IPSO 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ were mixed separately with human liver microsomes (protein content 0.2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) and CYP probe substrates (phenacetin, tolbutamide, S-mephenytoin, dextromethorphan, midazolam for CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4, respectively) in $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ buffer 0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 7.4). The mixture was pre-warmed at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min and then added with NADPH 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ to start the reaction. After 30 min incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$, the reaction was stopped by addition of 200 μl methanol-acetonitrile (1:1) containing propranolol (internal standard) 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. The remaining activities of the CYP isoforms were determined by analyzing the formation of the corresponding probe metabolites with a HPLC-MS/MS method. The inhibitory rate was calculated by the equation $E_r(\%) = c_{i(n)} / c_{i(0)} \times 100\%$. A negative control group (without testing drugs and known inhibitors) and corresponding positive control groups (with known CYP isoform inhibitors) were tested in parallel with the test groups. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$.

CYP1A2 的强抑制剂, IC_{50} 值分别为 0.17 和 $0.13 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 同时 PSO 和 IPSO 是 CYP2D6 的中等程度抑制剂, IC_{50} 值分别为 3.59 和 $9.51 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; PSO 和 IPSO 对 CYP3A4 和 CYP2C9 的 IC_{50} 值均大于 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 在临床上产生显著酶抑制作用的可能性较小。对于 CYP2C19, 虽然 PSO 和 IPSO $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 酶抑制率大于 90%, 但不同浓度的抑制实验未能获得规律性的结果, 因此无法计算 IC_{50} 值。

Tab. 3 IC_{50} of PSO and IPSO on HLM CYP isoenzymes

| Drug | $IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | |
|------|---|--------|
| | CYP1A2 | CYP2D6 |
| PSO | 0.17 | 3.59 |
| IPSO | 0.13 | 9.51 |

PSO and IPSO 0.0015, 0.005, 0.015, 0.05, 0.15, 0.5, 1.5, 5, 15, 50 or $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ were incubated with human liver microsomes ($0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) and corresponding probe substrates. See Tab. 2 for the incubation system and procedure. IC_{50} value for each CYP isoforms tested was obtained from the Sigma plot of remaining CYP activity vs logarithm concentration of the PSO or IPSO.

本研究在 RLM 孵育体系中以上述的同工酶特异性反应, 评价了 PSO 和 IPSO 对 RLM CYP1A2, 2D2 和 3A1/2 酶的抑制作用。平行设置的阳性抑制剂组的结果显示, RLM 中这几个 CYP 同工酶的活性正常。PSO 和 IPSO $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对大鼠 CYP 同工酶活性的抑制率如表 4 所示。PSO 和 IPSO 对 RLM CYP1A2 的

抑制也达到 100%, 对 CYP3A1/2 酶没有显著的抑制作用。在 RLM 孵育体系中, PSO 和 IPSO 对 CYP2D2 的抑制率仅分别为 36.4% 和 60.6%。

由 PSO 和 IPSO 对大鼠 CYP1A2 的抑制曲线图 1C 和 D 计算得到 IC_{50} 值。在 RLM 中, PSO 和 IPSO 也表现为 CYP1A2 的强抑制剂, IC_{50} 值分别为 0.47 和 $0.36 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。PSO 和 IPSO 对 CYP3A1/2 和 CYP2D2 的 IC_{50} 值均 $> 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 产生显著酶抑制的可能性较小。

Tab. 4 Inhibitory effect of PSO and IPSO on rat liver microsomes (RLM) CYP isoenzymes

| Drug | Inhibitory rate/% | | |
|------|-------------------|----------------|----------------|
| | CYP1A2 | CYP2D2 | CYP3A1/2 |
| PSO | 100 ± 0 | 36.4 ± 3.9 | 38.1 ± 2.8 |
| IPSO | 100 ± 0 | 60.6 ± 4.5 | 43.0 ± 1.0 |

See Tab. 2 for the experimental procedure, except using RLM to replace HLM and the activities of CYP isoforms were measured for CYP1A2, 2D2 and 3A1/2 only. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$.

2.3 PSO 和 IPSO 对 CYP 酶诱导活性评价

CYP1A 和 CYP3A 的阳性诱导剂 3-甲基胆蒽和苯巴比妥钠与“三明治”夹心培养大鼠肝原代细胞孵育 3 d 后均能显著诱导两个同工酶的活性, 诱导倍数分别为 4.01 和 3.24, 验证了本研究所用大鼠肝细胞诱导模型的可行性。PSO 和 IPSO $1 \sim 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

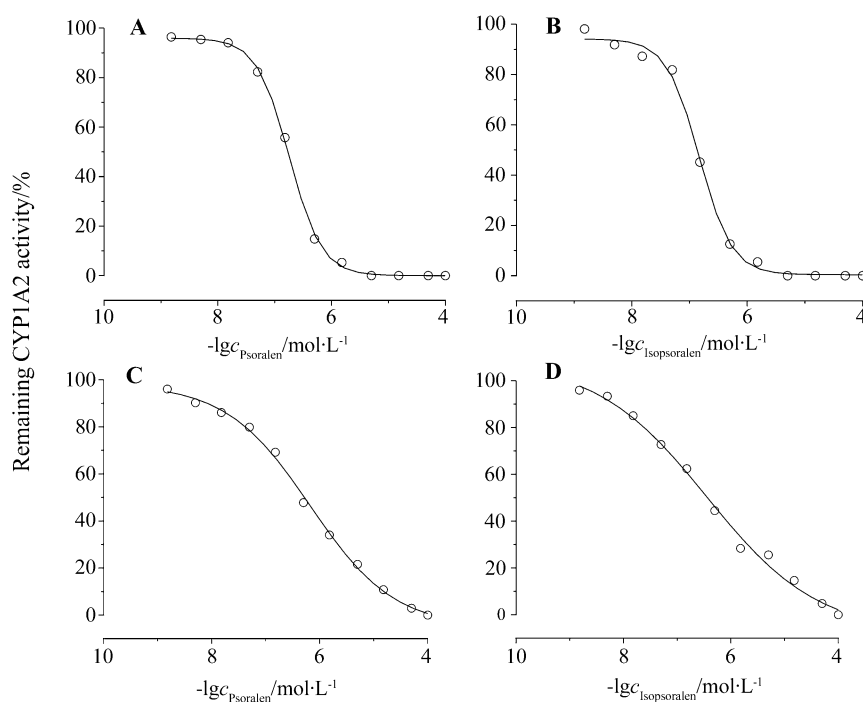


Fig. 1 Inhibitory effect of PSO and IPSO on CYP1A2 of HLM (A and B) and RLM (C and D). See Tab. 2 for the incubation system and procedure.

显示出对大鼠肝原代细胞 CYP1A 活性的抑制作用。底物非那西丁 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 代谢产物的生成浓度低于 LC-MS/MS 检测的定量限,与肝微粒体抑制实验的结果相符。

如表 5 所示,PSO 和 IPSO $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与肝细胞孵育 3 d 后能将 CYP3A 的活性分别提高 1.18 和 0.96 倍,PSO 和 IPSO 引起的酶活性改变均超过阳性对照组的 40%。而 PSO 和 IPSO $1\sim 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 未能引起酶活性的显著改变。由此可知,PSO 和 IPSO 在较高浓度对 CYP3A 有一定的诱导作用。

Tab. 5 Induction effect of PSO and IPSO on CYP3A in RLM

| Group | Concentration of probe metabolite/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | Fold vs negative control | $E_r/\%$ |
|--------|---|--------------------------|----------|
| NC | 55.7 ± 0.8 | 1 | - |
| PC | 180.3 ± 1.9 | 3.24 | 100 |
| PSO 1 | 33.3 ± 3.0 | 0.60 | -17.86 |
| 10 | 58.0 ± 3.7 | 1.04 | 1.79 |
| 100 | 121.8 ± 2.3 | 2.18 | 52.68 |
| IPSO 1 | 28.4 ± 1.0 | 0.51 | -21.88 |
| 10 | 61.3 ± 4.4 | 1.10 | 4.46 |
| 100 | 108.9 ± 9.8 | 1.96 | 42.86 |

PSO and IPSO were incubated with sandwich-cultured primary rat hepatocytes for 72 h. Percentage of control activity was calculated with equation $E_r = (c_{\text{Drug}} - c_{\text{Control}}) / (c_{\text{Positive control}} - c_{\text{Control}}) \times 100\%$. NC: negative control; PC: positive control, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$.

3 讨论

本研究评价了 PSO 和 IPSO 对 5 个主要 CYP 酶的抑制活性,这 5 个 CYP 酶介导了约 90% 临床药物的代谢转化,是药物相互作用评价的重点^[7]。在体外孵育体系中 PSO 和 IPSO 对人和大鼠肝微粒体的 CYP1A2 均表现出强烈的抑制作用,IC₅₀ 值均小于 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。人类 CYP1A2 主要在肝表达,其含量约占肝总 CYP 氧化酶含量的 13%,仅次于 CYP3A 和 CYP2C 家族。在人体内 CYP1A2 参与了华法林、咖啡因、安替比林、对乙酰氨基酚、茶碱、维拉帕米、硝苯地平和丙米嗪等 20 多种药物的代谢转化^[14]。本研究结果提示,当 PSO 和 IPSO 与这些药物合用时,存在 CYP1A2 酶抑制的药-药相互作用风险。此外,两药对 CYP2D6 和 CYP2C19 也表现出一定的抑制作用。

由于 CYP3A 和 2C 家族酶诱导是 PXR 受体活化导致的,CYP1A 的诱导则由 AhR 受体介导^[8],而

CYP2D 通常不被诱导,因此本研究首选 CYP1A 和 3A 作为酶活性诱导评价的对象。在大鼠肝细胞上高浓度的 PSO 和 IPSO 能诱导 CYP3A1/2 酶,这与小鼠连续服用两药后能诱导肝脏 CYP3A11 酶活性的报道相符^[6]。美国 FDA 指导原则草案建议^[11],如果诱导评价结果显示受试药对 CYP3A 有诱导作用,则应进一步在体内研究中考察对 CYP2C 和 CYP2B 的诱导作用。因此,有必要在进一步的研究中评价 PSO 和 IPSO 对 CYP2C 同工酶的诱导作用。

本研究应用酶活性测定作为评价终点,这是美国 FDA 指南草案推荐的酶抑制活性评价方法,以及酶诱导评价的方法之一^[11]。这一方法的优点在于其评价酶功能的改变,直接反映了药物抑制或诱导 CYP 酶对活性的影响,可以用于评估抑制或诱导的临床意义,因为只有酶活性的改变才能在临床上表现出对自身或其他合用药物清除率的影响。但在酶诱导评价中这一方法存在不足,当受试药对 CYP 酶有较强的抑制作用时,有可能掩盖其对酶的诱导潜能^[15]。在本研究大鼠肝细胞实验中,当 PSO 和 IPSO 连续诱导肝细胞 3 d 后,观察到它们对 CYP1A2 酶活性的抑制作用。因此,PSO 和 IPSO 对 CYP1A2 的诱导潜能还需要通过进一步测定 mRNA 水平或蛋白水平的变化来确定。

CYP 酶的种属差异已有较多的报道^[16]。尽管 CYP 酶超级家族的所有成员具有高度保守的氨基酸残基区域,但种属之间在 CYP 酶初级氨基酸序列上存在一些小的差异,这些小的变化能引起底物特异性和酶催化活性上较大的差异。在人和大鼠之间,除了 CYP1A2 具有较高的同源性外,其他酶的分布、表达和活性均有较大差异,特别是 CYP2C 酶。在本研究的 RLM 孵育体系中,PSO 和 IPSO 对大鼠 CYP2D2 的抑制率仅分别为 36.4% 和 60.6%,明显低于其对 HLM CYP2D6 活性的抑制作用,这可能是因为 CYP2D 在人和大鼠之间的种属差异所致。因此,酶抑制和诱导的体外评价还应以人源材料为首选,人肝微粒体或人肝细胞的研究结果可以得到更为合理的体外-体内的外推。

综上所述,本研究评价了两个呋喃香豆素有效成分 PSO 和 IPSO 的酶抑制和诱导活性,结果显示,PSO 和 IPSO 是 CYP1A2 的强抑制剂及 CYP2D6 的中等抑制剂;PSO 和 IPSO $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对大鼠 CYP3A1/2 有一定的诱导作用。PSO 和 IPSO 对 CYP 酶抑制或诱导可能产生的相互作用及其临床意义,还应进一步进行动物或人体研究。

参考文献:

- [1] Zhang HL, Wang YN, Wang JH. Advance on the chemistry and bioactivity of *Psoralea sorylifolia* L. [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2010, **22**(5): 909-913, 918.
- [2] Zhao PW, Niu JZ, Wang JF, Wang DW, Chen JX, Wang LQ. Phytoestrogenic effects of six active components in Chinese medicine[J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2007, **42**(24):1852-1855.
- [3] Li Z, Song BA. Antitumor mechanism and application prospect of psoralen[J]. *J Mountain Agric Biol*(山地农业生物学报), 2007, **26**(3):255-260.
- [4] Song DR, Song HY, Wang YF, Guo J, Xu YY, Pan GX. Study on serum active constituents of rats intragastrically given decoction of Fructus Psoraleae[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*(中华中医药杂志), 2010, **25**(11): 1863-1865.
- [5] Yang SL, Xiong YJ, Fang PF, Zhao XY. Study progression of coumarins on CYP450s [J]. *Cent South Pharm*(中南药学), 2011, **9**(1):45-49.
- [6] Wang X, Lou YJ, Wang MX, Shi YW, Xu HX, Kong LD. Furocoumarins affect hepatic cytochrome P450 and renal organic ion transporters in mice[J]. *Toxicol Lett*, 2012, **209**(1):67-77.
- [7] Fowler S, Zhang H. *In vitro* evaluation of reversible and irreversible cytochrome P450 inhibition; current status on methodologies and their utility for predicting drug-drug interactions[J]. *AAPS J*, 2008, **10**(2):410-424.
- [8] Ai CH, Sun HX, Li H, Zhang XM, Dong DL. *In vitro* inhibition of cytochrome P450 activities by active constituents of Chinese herbal drugs[J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2011, **27**(4):519-523.
- [9] Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells[M]// Allen T. *Introduction to Electron Microscopy for Biologists*. Academic press, 1976:29-83.
- [10] Tchapanian EH, Houghton JS, Uyeda C, Grillo MP, Jin L. Effect of culture time on the basal expression levels of drug transporters in sandwich-cultured primary rat hepatocytes[J]. *Drug Metab Dispos*, 2011, **39**(12): 2387-2394.
- [11] US FDA. Guidance for industry: Drug Interaction Studies-Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling[EB/OL]. [2010-10-29] <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm072101.pdf>
- [12] Lin QH, Zhuang XM, Deng JT, Han G, Gong ZH, Li H. Metabolic interaction between rotundine and oxycodone *in vitro*[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*(中国药理学与毒理学杂志), 2009, **23**(5):404-410.
- [13] Testa B, van de Waterbeemd H. ADME-Tox Approaches[M]//Triggle D, Taylor J. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Beijing: Science Press, 2007:246.
- [14] He N, Ou-yang DS, Zhu B, Yu BN. Pharmacogenetics of drug oxidase CYP450[M]//Zhou HH. *Pharmacogenetics*(遗传药理学). Beijing: People's Military Medical Press, 2003:64-68.
- [15] Chu V, Einolf HJ, Evers R, Kumar G, Moore D, Ripp S, et al. *In vitro* and *in vivo* induction of cytochrome p450: a survey of the current practices and recommendations; a pharmaceutical research and manufacturers of America perspective[J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, **37**(7):1339-1354.
- [16] Martignoni M, Groothuis GM, de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2006, **2**(6):875-894.

Evaluation of cytochrome P450 inhibition and induction by psoralen and isopsoralen *in vitro*

ZHONG Yu-huan^{1,2}, SHEN Guo-lin², YUAN Mei², LIU Wan-hui¹, LI Hua²

(1. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 265300, China; 2. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: OBJECTIVE To evaluate inhibitory and inductive activities of psoralen (PSO) and isopsoralen (IPSO) on cytochrome P450 (CYP) isoforms. **METHODS** PSO or IPSO was incubated with human liver microsomes (HLM) or rat liver microsomes (RLM) for 30 min in the presence of NADPH and CYP probe substrates for CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4. Phenacetin-*O*-deethylation, tolbutamide methyl hydroxylation, mephenytoin 4-hydroxylation, dextromethorphan-*O*-demethylation and midazolam 1'-hydroxylation were used as marked reactions to measure enzyme activities. The relative activities of CYP isoforms were determined by ana-

lyzing the formation of the probe metabolites in the incubation system. IC_{50} was calculated to assess the inhibitory potency of PSO and IPSO on these CYP isoenzymes. To evaluate CYP induction effect, PSO, IPSO or known CYP inducers were incubated with sandwich-cultured rat hepatocytes for 72 h, followed by 1 h incubation of the hepatocytes with CYP1A or 3A substrates to measure the relative activities of CYP isoforms. The enzyme activities in PSO and IPSO groups were compared with those of known inducers to assess the induction potentials. **RESULTS** PSO and IPSO showed a strong inhibitory activity on CYP1A2 in both HLM and RLM incubations *in vitro*. IC_{50} of PSO and IPSO in HLM was 0.17 and 0.13 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 0.47 and 0.36 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in RLM, respectively. A moderate inhibitory activity of PSO and IPSO on CYP2D6 in HLM was also observed, with IC_{50} of 3.59 and 9.51 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. PSO and IPSO 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ demonstrated inductive activity on rat CYP3A. After incubation with rat hepatocytes for 72 h, PSO and IPSO increased CYP3A activity 1.18 and 0.96 times, respectively. **CONCLUSION** PSO and IPSO are strong inhibitors of CYP1A2 but moderate inhibitors for CYP2D6. They also show induction potency on rat CYP3A.

Key words: psoralens; isopsoralen; cytochromes; drug interactions; microsomes, liver

Foundation item: The project supported by National Mega-project of Science Research of China (2012ZX09301003); and National Mega-project of Science Research of China (2008ZXJ09006-001)

Corresponding author: LI Hua, E-mail: amms_hli@126.com, Tel: (010)66930664

(收稿日期: 2012-03-07 接受日期: 2012-04-13)

(本文编辑: 付良青)

《中国药理学与毒理学杂志》编辑部投稿温馨提示

结合本刊的投稿须知(见每年的第1期和第4期杂志)及平时常见的问题,编辑部特做如下温馨提示:

1. 在线(<http://www.cjpt.ac.cn>)投稿成功后,一定尽快邮寄"版权专有使用授权书"及稿件处理费(100元),编辑部收到全部材料后方开始稿件的处理工作。
2. "版权专有使用授权书"可在本刊网站的"下载中心"下载;签名作者的顺序及人数一定要与稿件一致;不方便签字的,可由第一作者或联系作者代签;加盖单位公章。
3. 本刊兼收中英文稿件,文种对稿件的处理无影响,重要的是质量;但英文稿件优先刊出。
4. 为方便修改,文稿要采用 Word 文档格式;提供中英文的文题、摘要、作者单位、关键词及基金。摘要的结果部分不能只进行结论性描述,要给出重要的数据。中文稿件的英文摘要可以比中文摘要详细些,以方便无法阅读中文稿件的读者对论文内容的了解。
5. 用表格形式($\bar{x} \pm s$)提供作图数据;图表和参考文献一律用英文表示,中文期刊(书籍)的中文名称放在括号中。要求图表自明;重要的、对实验结果是不可改变的实验处理过程、英文缩写的全名、重要的计算公式等。
6. 为缩短稿件的处理时间,一定尽快修改稿件,及时传回编辑部。