

· 药物研究 ·

# 大黄酸对大鼠肝细胞色素 P<sub>450</sub> 3A 酶活性的抑制\*

李 丹<sup>1,2</sup>, 韩永龙<sup>1,2,3</sup>, 孟祥乐<sup>1,2</sup>, 孙习鹏<sup>1</sup>, 余 奇<sup>1</sup>, 郭 澄<sup>1,2</sup>

(1. 上海市第六人民医院药剂科, 200233; 2. 上海中医药大学, 201203; 3. 大庆油田总医院临床药学科, 黑龙江 163001)

**[摘要]** 目的 研究大黄酸对大鼠肝微粒体细胞色素 P<sub>450</sub> 3A(CYP3A)酶活性的影响。方法 在体外大鼠肝微粒体孵育体系中加入底物睾酮和不同浓度的大黄酸,采用高效液相色谱仪测定睾酮的羟基化代谢产物 6β 羟基睾酮的含量,计算 CYP3A 酶活性来反映大黄酸对 CYP3A 酶的抑制效果。结果 大鼠肝微粒体孵育体系中,大黄酸对 CYP3A 酶活性有抑制作用,其半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)和 K<sub>i</sub>值分别为 36.74,20.73 μmol · L<sup>-1</sup>。结论 在大鼠肝微粒体体外孵育系统中,大黄酸对 CYP3A 酶具有抑制作用。

**[关键词]** 大黄酸;肝微粒体;CYP3A 酶;抑制作用

**[中图分类号]** R282.71;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2010)03-0282-04

## Inhibitory Effect of Rhein on Cytochrome P<sub>450</sub> Activity of Rat Liver Microsomes

LI Dan<sup>1,2</sup>, HAN Yong-long<sup>1,2,3</sup>, MENG Xiang-le<sup>1,2</sup>, SUN Xi-peng<sup>1</sup>, YU Qi<sup>1</sup>, GUO Cheng<sup>1,2</sup> (1. Department of Pharmacy, the Sixth People's Hospital of Shanghai City, Shanghai 200233, China; 2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3. Department of Clinic Pharmacy, Daqing Oilfield General Hospital, Daqing 163001, Heilongjiang, China)

**ABSTRACT Objective** To evaluate the effects of rhein on the activity of cytochrome P<sub>450</sub> 3A (CYP3A) enzyme of rat liver microsomes. **Methods** Rat liver microsomes were incubated with various concentrations of rhein and testosterone *in vitro*. The inhibition of CYP3A activity by rhein was evaluated by the amount of 6β-hydroxytestosterone which was determined by HPLC. **Results** Rhein suppressed the CYP3A activity in rat liver microsomes, with IC<sub>50</sub> = 36.74 μmol · L<sup>-1</sup> and K<sub>i</sub> = 20.73 μmol · L<sup>-1</sup>, respectively. **Conclusion** Rhein could decrease the enzyme activity of rat liver CYP3A *in vitro*.

**KEY WORDS** Rhein; Liver microsomes; CYP3A; Inhibition

大黄酸(rhein, 4, 5-dihydroxyanthraquinone, RH)属单萜类 1, 8-二羟基蒽醌衍生物,是从大黄、何首乌、虎杖等多种传统中药分离提纯出的有效成分。近年来发现 RH 具有广泛的药理活性,如保肝、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、降糖、调脂等等<sup>[1~3]</sup>。细胞色素 P<sub>450</sub> (cytochrome P<sub>450</sub>, CYP)是人体内一种重要的代谢酶。临床上 >90% 的药物要由 CYP 的 6 个重要亚型(1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 和 3A4)代谢,其中 CYP 代谢的药物中 50% 的药物是由 CYP3A4 代谢<sup>[4,5]</sup>。在人体内, CYP 易被联合使用的药物诱导或抑制,从而

导致药物浓度发生明显的变化,产生增效或毒副作用。笔者发现只有日本学者 IWATA 等<sup>[6]</sup>报道用人肝微粒体研究发现大黄的水提取物对 CYP3A4 酶体外存在抑制作用,其 IC<sub>50</sub> 值为 77 μg · mL<sup>-1</sup>,对 CYP2D6 酶体外也存在抑制作用,其半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)值为 64 μg · mL<sup>-1</sup>。目前,大黄在临床上使用非常广泛,以大黄为君药的方剂主要有大黄附子汤、大黄甘草汤、大承气汤等,临床制剂主要有一清胶囊、麻仁丸、苦黄注射剂等,因此,发生药物相互作用的可能性较高。大黄酸作为大黄中重要的活性成分,研究其对 CYP3A 酶活性的影响,可以预测含有大黄的制剂在临床上可能发生的药物间相互作用,有效地避免因药物相互作用带来的不良反应和毒副作用,为临床安全合理用药提供科学依据。

### 1 材料与仪器

**1.1 实验动物** 清洁级雄性 SD 大鼠,体质量(200 ± 20) g,由复旦大学实验动物科学部提供,许可证号: SCXK(沪)-2002-0002。

**1.2 实验药物与试剂** 睾酮(美国 IL 公司);6β 羟基睾酮(美国 IL 公司);葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH,美国 Sigma 公司);6-磷酸葡萄糖(美国 Sigma 公

**[收稿日期]** 2009-06-24 **[修回日期]** 2009-09-01

**[基金项目]** \*上海市药学会上海医院药学科科研基金资助项目(基金编号:2008-YY-0227)

**[作者简介]** 李 丹(1986-),女,湖北孝感人,在读硕士,从事中药药物代谢及药动学研究。电话:021-64369181-8789, E-mail: lidandorren@126.com。

**[通讯作者]** 郭 澄,教授,主任药师,博士生导师,博士,从事中药学与临床药理学研究。电话:021-64369181-8098, E-mail: gboss@sina.com。

司);氧化型辅酶 II (美国 Sigma 公司);乙二胺四乙酸(美国 Sigma 公司);大黄酸(中国药品生物制品检定所);甲醇(Fisher 公司,色谱纯);实验用的氯化镁溶液等其他试剂均为分析纯,水为双蒸水。

**1.3 主要仪器** 安捷伦 1100 色谱仪(G1312A 高压二元泵、G1322A 在线脱气机、G1314A 紫外检测器、G1316A 柱温箱、G1313A 自动进样器及色谱工作站,美国 Agilent 公司);JA2003 型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司);DY89-II 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司);BR 4i 高速冷冻离心机(法国 Jouan 公司);Optima L-100 × P 制备型超速离心机[贝克曼库尔特实验系统(苏州)有限公司];MDF-U32V 型超低温冰箱(日本 SANYO 公司)。

## 2 方法

**2.1 肝微粒体制备** SD 大鼠经乙醚麻醉后,股动脉放血,迅速打开腹腔,用冰冷的 0.9% 氯化钠溶液经门静脉灌注肝脏至土黄色,剪下肝脏,吸干水分,称质量,迅速在冰上剪碎,用 0.25 mol · L<sup>-1</sup> 冰冷蔗糖溶液冲洗 3 次,纱布过滤,按 1:4 比例加入 0.25 mol · L<sup>-1</sup> 冰冷蔗糖溶液,在冰浴上进行电动匀浆,4 °C 下 10 000 × g 离心 30 min,取上清液转移至超速离心管内 4 °C 下 100 000 × g 离心 60 min,沉淀即为肝微粒体<sup>[7,8]</sup>,于每克沉淀中加入 pH 为 7.4 的磷酸缓冲液 0.5 mL 重悬,定量分装,置 -80 °C 冰箱内保存备用。采用 BCA Protein Assay Kit 试剂盒测定微粒体蛋白浓度。

**2.2 色谱条件** 色谱柱:Inertsil ODS-3 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-水(B);梯度洗脱条件:0→11 min,56%→58%(A);11→11.5 min,58%→80%(A);11.5→19.5 min,80%(A);19.5→20 min,80%→56%(A);post time 为 5 min;流速:1.0 mL · min<sup>-1</sup>;柱温:30 °C;检测波长:245 nm;进样量:50 μL。

**2.3 肝微粒体体外孵育体系** 终体积为 200 μL 的体外孵育体系包括微粒体蛋白(0.5 mg · mL<sup>-1</sup>)、氯化镁(MgCl<sub>2</sub>)溶液 3 mmol · L<sup>-1</sup>、乙二胺四乙酸(EDTA) 1 mmol · L<sup>-1</sup>、水、pH 为 7.4 的磷酸缓冲液(50 mmol · L<sup>-1</sup>)和不同浓度的药物。37 °C 水浴中预孵育 5 min,加入由 G-6-PDH(1 U · mL<sup>-1</sup>)、辅酶 II(NADP)1 mmol · L<sup>-1</sup>和 G-6-P(5 mmol · L<sup>-1</sup>)组成的还原型辅酶 II(NADPH)再生液,启动反应,孵育 40 min。用冰甲醇 200 μL 终止反应,涡旋震荡 30 s,16 000 × g 离心 15 min,取上清液 50 μL 进样,整个体系控制有机溶剂在 1% 以内。

**2.4 孵育时间与微粒体蛋白浓度的优化** 睾酮浓度

为 100 μmol · L<sup>-1</sup> 时,选用 0.10, 0.25, 0.50 和 0.80 mg · mL<sup>-1</sup> 的微粒体蛋白,孵育时间分别为 10, 20, 40 和 60 min,进行体外孵育,处理同上述“2.3”项。测定代谢产物 6β 羟基睾酮的生成量,考察代谢产物生成量与孵育时间及蛋白浓度之间的线性关系。

**2.5 睾酮米氏常数 K<sub>m</sub> 的测定** 取终浓度分别为 20, 40, 80, 120, 160 和 200 μmol · L<sup>-1</sup> 的睾酮进行孵育,处理同上述“2.3”项。测定代谢产物 6β 羟基睾酮的量,计算 6β 羟基睾酮的生成速率,按照非线性回归作图,计算睾酮的米氏常数<sup>[9]</sup>。

## 2.6 IC<sub>50</sub> 值测定

**2.6.1 阳性抑制药的 IC<sub>50</sub> 值测定** 将 CYP3A 酶的特异性抑制药酮康唑,终浓度依次为 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2 和 1.6 μmol · L<sup>-1</sup>,与底物共同孵育,每批包括一个对照(不含抑制药),孵育处理同上述“2.3”项。测定代谢产物 6β 羟基睾酮的峰面积,以 6β 羟基睾酮的浓度与对照样品中 6β 羟基睾酮浓度的比值,即相对活性百分比作为纵坐标,酮康唑浓度的对数值为横坐标,按照非线性回归,作图并计算 IC<sub>50</sub> 值,对方法学进行验证。

**2.6.2 大黄酸的 IC<sub>50</sub> 值测定** 将终浓度依次为 5, 10, 25, 50, 75 和 100 μmol · L<sup>-1</sup> 的大黄酸与 100 μmol · L<sup>-1</sup> 的睾酮共同孵育,孵育处理方法同上述“2.6.1”项,按照非线性回归,作图并计算 IC<sub>50</sub> 值。

**2.7 大黄酸的 K<sub>i</sub> 值测定** 大黄酸分别取 4 种不同的浓度,依次为 0, 10, 40 和 80 μmol · L<sup>-1</sup>,睾酮为 50, 100 和 150 μmol · L<sup>-1</sup> 3 种不同的浓度,孵育处理同上述“2.3”项。根据 Lineweave-Burk(双倒数作图法)方程<sup>[10]</sup>,以 1/[S] 为横坐标,1/[V] 为纵坐标,绘制大黄酸的抑制作用动力学曲线并计算 K<sub>i</sub> 值。

## 3 结果

**3.1 6β 羟基睾酮定量检测标准曲线方程** 6β 羟基睾酮按照以下浓度:1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 和 20.0 μmol · L<sup>-1</sup> 加入到孵育体系中,不加底物和抑制药,孵育处理同上述“2.3”项。以 6β 羟基睾酮的量浓度(X)与其峰面积(Y)计算进行线性回归,得到回归方程为 Y = 16.949 X - 0.191 (r = 1)。按照上述“2.2”项色谱方法,6β 羟基睾酮的保留时间为 12.5 min。

**3.2 孵育时间及微粒体蛋白浓度的优化** 在保证蛋白浓度和孵育时间与代谢产物 6β 羟基睾酮形成量在线性范围内,及高效液相色谱(HPLC)检测 6β 羟基睾酮在最低定量限之上的同时,尽量选择低的蛋白浓度。通过图 1 和 2,可以选择微粒体蛋白浓度为 0.5 mg · mL<sup>-1</sup>,孵育时间为 40 min。

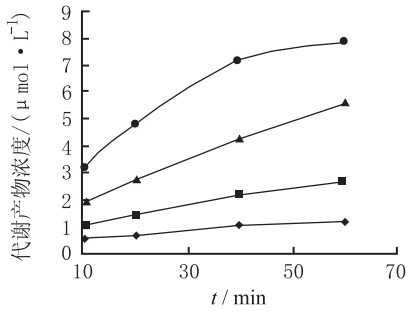


图1 孵育时间与代谢产物形成量在不同的蛋白浓度下的关系

— 蛋白浓度0.10 mg · mL<sup>-1</sup>    — 蛋白浓度0.25 mg · mL<sup>-1</sup>  
 — 蛋白浓度0.50 mg · mL<sup>-1</sup>    — 蛋白浓度0.80 mg · mL<sup>-1</sup>

Fig.1 The relationship between incubation time and metabolite formation with different concentrations of rat liver microsome

— protein 0.10 mg · mL<sup>-1</sup>    — protein 0.25 mg · mL<sup>-1</sup>  
 — protein 0.50 mg · mL<sup>-1</sup>    — protein 0.80 mg · mL<sup>-1</sup>

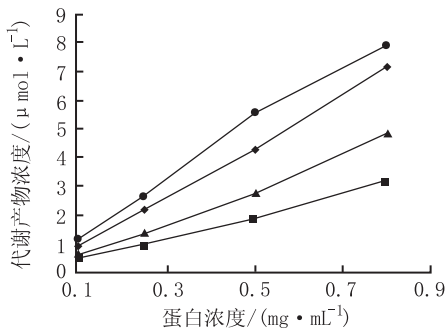


图2 蛋白浓度与代谢产物形成量在不同的孵育时间下的关系

— 孵育时间10 min    — 孵育时间20 min  
 — 孵育时间40 min    — 孵育时间60 min

Fig.2 The relationship between metabolite formation and different concentrations of rat liver microsome within various incubation time

— time 10 min    — time 20 min  
 — time 40 min    — time 60 min

**3.3 睾酮的米氏常数和酮康唑的 IC<sub>50</sub> 值** 通过 Michaelis-Menten 方程计算出睾酮的米氏常数为 (94.19 ± 17.40) μmol · L<sup>-1</sup>, 反应速度 V<sub>max</sub> 为 (0.335 ± 0.027) μmol · min<sup>-1</sup> · mg<sup>-1</sup> (图3)。以酮康唑的浓度对数值为横坐标, CYP3A 酶的相对剩余活性为纵坐标作图(图4), 即可以计算酮康唑对 CYP3A 酶亚型的 IC<sub>50</sub> 值, 为 0.48 μmol · L<sup>-1</sup>, 与文献 [11, 12] 报道的值接近。

**3.4 大黄酸对 CYP3A 酶亚型的 IC<sub>50</sub> 值** 用大黄酸的对数浓度和 CYP3A 酶的相对剩余活性作图(图5), 即可以计算出大黄酸对 CYP3A 酶亚型的 IC<sub>50</sub> 值为 36.74 μmol · L<sup>-1</sup>。

**3.5 大黄酸对 CYP3A 酶亚型的 K<sub>i</sub> 值** 以睾酮的浓度倒数为横坐标, 代谢产物的速率倒数为纵坐标作图(图6), 每个样平行做两次, 其变异系数均在 10% 以内。即可以计算大黄酸对 CYP3A 酶的 K<sub>i</sub> 值为 20.73 μmol · L<sup>-1</sup>。

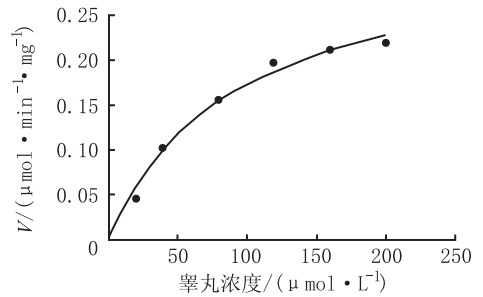


图3 睾酮的米-曼方程曲线

Fig.3 The curve of metabolic rate of CYP3A enzyme with various concentrations of testosterone

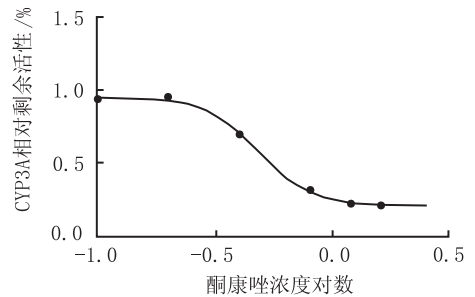


图4 酮康唑对 CYP3A 酶抑制作用曲线

Fig.4 Effect of increasing concentrations of ketoconazole on CYP3A4 activity

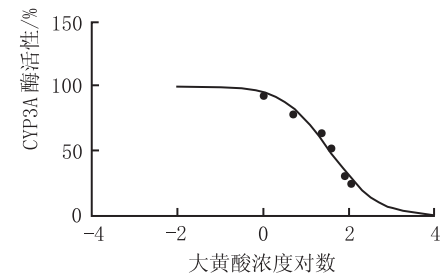


图5 大黄酸对 CYP3A 抑制作用曲线

Fig.5 Inhibitory effect of increasing concentration of rhein on CYP3A

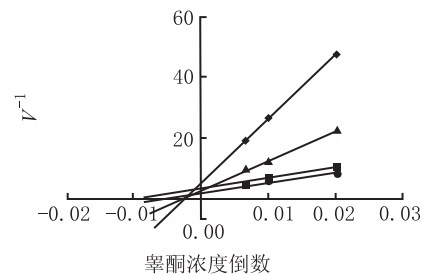


图6 大黄酸对 CYP3A 酶抑制作用的米-曼方程的双倒数曲线

— 0 μmol · L<sup>-1</sup>    — 10 μmol · L<sup>-1</sup>  
 — 40 μmol · L<sup>-1</sup>    — 80 μmol · L<sup>-1</sup>

Fig.6 Lineweaver-Burk plots showing the inhibition of testosterone metabolism via rat liver microsomes by rhein

#### 4 讨论

药物体外代谢研究中,预测药物对 CYP450 酶的抑制作用通常是看其对一个特异性探针底物在体外代谢体系(如肝微粒体和重组 cDNA 表达的 CYP450 酶)中代谢的影响程度,判断该药物对 CYP450 酶的抑制作用,从而预测它在体内可能引起的药物相互作用,为临床进一步研究药物相互作用提供有价值的信息<sup>[13]</sup>。

本研究中选取 CYP3A 特异性抑制剂酮康唑与底物睾酮共同孵育,所得到的  $IC_{50}$  值与文献[11,12]报道的相近,验证了该孵育及检测方法的可靠性。同时选择了低浓度的微粒体蛋白,避免因底物及抑制剂与蛋白产生非特异性的结合,影响体系中的游离浓度而导致结果的偏差。

本研究中底物浓度的选择(接近其  $K_m$  值),孵育时间和蛋白浓度与代谢产物的形成量均在线性范围内,同时控制底物的消耗在 30% 以内等相关要求都是完全参照美国食品药品监督管理局(FDA)《药物相互作用研究指南》2006 年版<sup>[14]</sup>进行。这为研究大黄酸对 CYP3A 酶亚型体外抑制作用提供了准确的方法保障。

目前,中药的代谢性相互作用已经成为研究热点。程泽能等<sup>[15]</sup>通过人体内试验,发现正常剂量使用止咳橘红颗粒对 CYP3A4 的活性有较弱的抑制作用,能够导致 CYP3A4 底物咪达唑仑代谢的轻微抑制。MAKINO 等<sup>[16]</sup>通过体外实验研究发现,小青龙汤能够抑制 CYP3A 的活性,同时在大鼠体内,能够使与之联合使用的硝苯地平的  $C_{max}$  和  $AUC$  均上升,产生代谢性相互作用。本研究发现大黄酸在体外对 CYP3A 存在抑制作用,其  $IC_{50}$  和  $K_i$  均  $< 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,大黄酸在体内对肝 CYP3A 酶活性的影响还有待进一步研究。临床上当 CYP3A4 底物类药物如红霉素、他汀类药物、硝苯地平、环孢素等与含有大黄酸的制剂合并用药时,应考虑到可能存在潜在的代谢性药物相互作用。

[DOI] 10.3870/yydb.2010.03.003

#### [参考文献]

[1] 余佳,吴晓晴,孙海峰,等. 大黄酸及其衍生物的生物活性研究进展[J]. 药学与临床研究, 2008, 16(2): 125-128.

[2] 刘凯,郑海生. 大黄酸的药理作用研究述略[J]. 中医药学刊, 2004, 22(9): 1732-1734.

[3] HUANG Q, LU G, SHEN H M, *et al.* Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb [J]. *Med Res Rev*, 2007, 27(5): 609-630.

[4] LYNCH T, PRICE A. The effect of cytochrome  $P_{450}$  metabolism on drug response, interactions, and adverse effects[J]. *Am Fam Physician*, 2007, 76(3): 391-

396.

[5] ZHOU S, YUNG C S, CHER G B, *et al.* Mechanism-based inhibition of cytochrome  $P_{450}$  3A4 by therapeutic drugs[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2005, 44(3): 279-304.

[6] IWATA H, TEZUKA Y, USIA S, *et al.* Inhibition of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2D6 by extracts from 78 herbal medicines [J]. *J Tradit Med*, 2004, 21(6): 42-52.

[7] VANDERHOEVEN T A, COON M J. Preparation and properties of partially purified cytochrome  $P_{450}$  and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome  $P_{450}$  reductase from rabbit liver [J]. *J Biol Chem*, 1974, 249(19): 6302-6310.

[8] LU A Y, COON M J. Role of hemoprotein  $P_{450}$  in fatty acid omega-hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes [J]. *J Biol Chem*, 1968, 243(6): 1331-1332.

[9] ZIENTEK M, MILLER H, SMITH D, *et al.* Development of an *in vitro* drug-drug interaction assay to simultaneously monitor five cytochrome  $P_{450}$  isoforms and performance assessment using drug library compounds [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2008, 58(3): 206-214.

[10] PEKTHONG D, MARTIN H, ABADIE C, *et al.* Differential inhibition of rat and human hepatic cytochrome  $P_{450}$  by andrographis paniculata extract and andrographolide [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 115(3): 432-440.

[11] TURPEINEN M, UUSITALO J, JALONEN J, *et al.* Multiple  $P_{450}$  substrates in a single run: rapid and comprehensive *in vitro* interaction assay [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2005, 24(1): 123-132.

[12] WALSKY R L, OBACH R S. Validated assays for human cytochrome  $P_{450}$  activities [J]. *Drug Metab Dispos*, 2004, 32(6): 647-660.

[13] MICUDA S, MUNDLOVA L, ANZENBACHEROVA E, *et al.* Inhibitory effects of memantine on human cytochrome  $P_{450}$  activities: prediction of *in vivo* drug interactions [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2004, 60(8): 583-589.

[14] 刘治军,傅得兴,汤光. FDA 药物相互作用研究指南(草案)2006 版解读 [J]. 国际药学研究杂志, 2008, 35(1): 50-58.

[15] 程泽能,张毕奎,李菲,等. 中药止咳橘红颗粒对 CYP3A4 和 CYP1A2 抑制作用的研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2002, 18(3): 215-218.

[16] MAKINO T, MIZUNO F, MIZUKAMI H. Does a kampo medicine containing schisandra fruit affect pharmacokinetics of nifedipine like grapefruit juice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(10): 2065-2069.