

## • 药理与临床 •

## 黄独素 B 的体外代谢通路及其代谢产物研究

杜乐梅<sup>1</sup>, 付淑军<sup>1,3</sup>, 吴增光<sup>1</sup>, 胡 鹏<sup>1</sup>, 刘昌考<sup>1,4</sup>, 何 新<sup>1,2\*</sup>

1. 天津中医药大学中药学院, 天津 301617

2. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

3. 国家药品审评中心, 北京 100022

4. 天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

**摘要:** 目的 基于体外代谢模型对黄独素 B 的代谢稳定性、主要 CYP450 代谢酶表型及其代谢产物进行研究。方法 黄独素 B 分别在人肝微粒体 (HLM) 和大鼠肝微粒体 (RLM) 中共同孵育, 采用 UPLC-MS/MS 检测孵育液中剩余的黄独素 B 含量, 分析其在 HLM 和 RLM 中的代谢稳定性。利用 10 种重组人 CYP450 酶 (1A1、1A2、1B1、2A13、2A6、2B6、2D6、2C9、2C19、3A4) 分别与黄独素 B 共同孵育, 确定其代谢酶表型, 结合大鼠离体肝灌注模型对黄独素 B 的主要代谢酶表型进行确认。此外, 分别对 HLM 和 RLM 孵育体系中的黄独素 B 代谢产物进行定性分析, 考察黄独素 B 在 HLM 和 RLM 中代谢产物的区别。结果 在 HLM 和 RLM 中, 黄独素 B 的转化率分别为 37%、59%, 经 HLM 和 RLM 代谢的体外半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 为 97.4、52.3 min, 推算得到的 HLM 和 RLM 中的固有清除率 ( $CL_{int, in vivo}$ ) 为 8.23、23.9 mL/(min·kg), 肝清除率 ( $CL_h$ ) 为 5.89、16.8 mL/(min·kg), 由此可知黄独素 B 在 RLM 体系中的代谢转化速率较 HLM 中快。黄独素 B 体外代谢酶表型结果可知其 I 相代谢是由多个 CYP 同工酶介导的, 包括 3A4、2C19、2C9、1A13 及 1A1, 其中 CYP3A4 对黄独素 B 的代谢起主导作用; 肝灌注实验结果显示, 随着酮康唑给药剂量的增加, 对肝脏中 CYP3A4 的抑制作用增强, 黄独素 B 在肝脏中的代谢减少, 在灌注液中的剩余量增加, 印证了 CYP3A4 对黄独素 B 的代谢作用。此外, 2 种肝微粒体孵育后的黄独素 B 都只产生了 1 个代谢产物 (M1), 为黄独素 B 去甲基化产物。结论 黄独素 B 在 RLM 中的代谢转化速率较 HLM 中快。黄独素 B 的主要代谢酶表型为 CYP3A4, 其在 HLM 和 RLM 中产生的代谢物均为去甲基化产物。

**关键词:** 黄独素 B; CYP450 酶; 肝微粒体; 代谢通路; 代谢产物

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)23-5760-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.23.017

Study on metabolic pathways and metabolites of Diosbulbin B *in vitro*DU Le-mei<sup>1</sup>, FU Shu-jun<sup>1,3</sup>, WU Zeng-guang<sup>1</sup>, HU Peng<sup>1</sup>, LIU Chang-xiao<sup>1,4</sup>, HE Xin<sup>1,2</sup>

1. School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

3. Center for Drug Evaluation, China Drug Administration, Beijing 100022, China

4. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

**Abstract: Objective** To investigate the metabolic stability, the main CYP450 enzymes phenotypes and metabolites of Diosbulbin B based on *in vitro* metabolism model. **Methods** For metabolic stability study, UPLC-MS/MS was used to detect the remaining Diosbulbin B content in the incubation solution after being incubated with human and rat liver microsomes, respectively. Ten recombinant human CYP450 enzymes (1A1, 1A2, 1B1, 2A13, 2A6, 2B6, 2D6, 2C9, 2C19, 3A4) were used for identifying the metabolic enzyme phenotypes of Diosbulbin B. Moreover, the major metabolic enzyme phenotype for the metabolism of Diosbulbin B was confirmed and verified by the rat isolated hepatic perfusion model. The metabolites of Diosbulbin B in human and rat liver microsomes were determined by LC-MS/MS. **Results** The metabolic percentage of Diosbulbin B in human and rat liver microsomes

收稿日期: 2019-03-19

**基金项目:** 国家自然科学基金重点项目 (81430096); 天津市科技支撑计划重点项目 (16YFZCSY00440); 教育部创新团队发展计划资助项目 (IRT\_14R41); 天津市自然科学基金项目 (17JCYBJC28600)**作者简介:** 杜乐梅, 女, 硕士研究生, 药理学专业。Tel: 18722265853 E-mail: dlmzm@163.com**\*通信作者** 何 新, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药理学研究。E-mail: hexintn@163.com

were 37% and 59%, respectively. Its half-lives  $t_{1/2}$  in human and rat liver microsomes were 97.4 and 52.3 min, respectively. The intrinsic clearance rates  $CL_{int}$  in human and rat livers were 8.23 and 23.9 mL/(min·kg), and liver clearance  $CL_h$  in human and rat livers were 5.89 and 16.8 mL/(min·kg). It can be found that the metabolic rate of Diosbulbin B in rat liver microsomes was faster than in human liver microsomes. There were five CYP enzymes, including 3A4, 2C19, 2C9, 1A13 and 1A1, related to the metabolism of Diosbulbin B, especially CYP3A4. The hepatic perfusion experimental results showed that the metabolism of Diosbulbin B was inhibited by ketoconazole, and the inhibitory effect was enhanced along with the increasing dosage of ketoconazole, which confirmed that CYP3A4 played an important role in metabolism of Diosbulbin B. There was one metabolite (M1) of Diosbulbin B has been found in both human and rat liver microsomes incubation. **Conclusion** The metabolic rate of Diosbulbin B in rat liver microsomes was faster than human liver microsomes. The CYP3A4 plays a leading role in the metabolism of Diosbulbin B. And a demethylated metabolite of Diosbulbin B was appeared in both human and rat liver microsomes incubation.

**Key words:** Diosbulbin B; CYP450 enzymes; liver microsomes; metabolic pathways; metabolites

黄药子为薯蓣科植物黄独 *Dioscorea bulbifera* L. 的块茎,作为广泛使用的传统中药,能清热解毒、凉血止血、化痰消癭<sup>[1]</sup>。现代药理学研究表明黄药子具有抗菌、抗炎和抗肿瘤作用,临床上多用于治疗银屑病、甲状腺疾病及肿瘤等<sup>[2]</sup>。然而,黄药子在临床长期及过量使用会引发严重的药源性肝损伤<sup>[3]</sup>,有研究表明其主要肝毒性成分为二萜内酯类<sup>[4]</sup>。

黄独素 B 在黄药子药材中质量分数为 0.2% 左右<sup>[5]</sup>,是目前发现的含量最高、研究最广的黄药子二萜内酯类成分。已有研究表明黄独素 B 既具有抗炎、抗肿瘤等作用<sup>[6-7]</sup>,又可诱导小鼠肝损伤<sup>[8-10]</sup>,具有“效-毒”共存的特性,既是药效成分又是产生肝毒性的主要成分。目前,黄独素 B 的代谢稳定性、主要 CYP450 代谢酶表型及其代谢产物未见报道。本实验首次研究黄独素 B 在人和大鼠肝微粒体的代谢稳定性及其代谢产物,考察其在人和大鼠肝微粒体中的代谢差异。同时考察黄独素 B 分别在 10 种重组人 CYP450 酶干预下的代谢情况,结合大鼠体外肝灌注实验确定介导其代谢消除的主要代谢酶,对于指导黄药子临床合理用药及其配伍后减毒增效的研究有重要意义,对黄独素 B 因代谢性相互作用从而诱导黄药子的药源性肝损伤具有重要指导意义。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

黄独素 B (质量分数 98%, 批号 AP782D), 购于天津一方科技有限公司; 酮康唑 (Ketoconazole, KTC)、非那西汀 (Phenacidine)、双氯芬酸 (Diclofenac)、奥美拉唑 (Omeprazole)、右美沙芬 (Dextromethorphan)、咪达唑仑 (Midazolam)、普萘洛尔 (Propranolol, 内标) 及二甲基亚砷 (DMSO) 均购于 Sigma-Aldrich 公司; 还原型辅酶 II (NADPH, 批号 SLBC6717V) 购自 Sigma-Aldrich 公司; 雄性

SD 大鼠肝微粒体 (RLM, 蛋白质量浓度 20 mg/mL), 来源于 RILD 公司, 货号 LM-DS-02M; 混合人肝微粒体 (HLM, 蛋白质量浓度 20 mg/mL), 来源于 RILD 公司, 货号 X008067; 10 种重组人 CYP450 酶系 1A1 (批号 C1A1R009/C)、1A2 (批号 C1A2R011B)、1B1 (批号 C1B1LR002/B)、2A13 (批号 C2A13R001C)、2A6 (批号 C2A6R008/C)、2B6 (批号 C2B6R048A)、2D6 (批号 C2D6R035B)、2C9 (批号 C2C9R011/B)、2C19 (批号 C2C19R019B)、3A4 (批号 C3A4R052) 购于瑞德肝脏疾病研究 (上海) 有限公司; 甲醇、乙腈均为色谱纯, 购于 Sigma-Aldrich 公司; 其他溶剂和化学试剂均为分析纯或以上。

### 1.2 动物

雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体质量 200~220 g, 购于北京华阜康生物科技股份有限公司, 许可证号 SCXX (京) 2014-0004。

### 1.3 仪器

API 4000 Qtrap 液相质谱联用系统 (含 2 台岛津 LC-20AD 泵, SIL-20AC 恒温自动进样器, CTO-20A 柱温箱, CBM-20A 控制器, ESI 和 APCI 接口离子源, Analyst Software 1.5.1 色谱工作站); Waters UPLC-Quattro Premier XE 三重四级杆液质联用仪 (含 Binary Solvent manager, Sample manager, Quattro Premier XE MS, Masslynx V4.1 色谱工作站); Sorvall RC6+离心机, 购自美国 Thermo Scientific 公司; DSHZ-300A 水浴锅, 购自江苏太仓市实验设备厂; Model XP205 分析天平, 购自梅特勒公司。

## 2 方法

### 2.1 溶液的配制

**2.1.1 体外孵育溶液配制** 精密称取黄独素 B 适量溶解于 DMSO 中, 将其配制成 10 mmol/L 的储备液, 使用前用磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释成 200  $\mu$ mol/L

的工作溶液。精密称取咪达唑仑适量溶解于 DMSO 中,将其配制成 10 mmol/L 的储备液,使用前用 PBS 稀释成 100  $\mu\text{mol/L}$  的工作溶液,即为阳性对照溶液。

**2.1.2 动物实验溶液配制** (1) 酮康唑溶液配制:精密称取酮康唑粉末加入含有 1% 聚山梨酯-80 的生理盐水中,配成 0.625、1.250、2.500 mg/mL 溶液,备用。(2) 空白肝灌流溶液配制:1 000 mL 纯水中依次加入 NaCl 6.92 g、KCl 0.35 g、CaCl<sub>2</sub> 0.14 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.16 g、MgSO<sub>4</sub> 0.223 g、NaHCO<sub>3</sub> 2.1 g、葡萄糖 3.0 g,待完全溶解后,调节 pH 至 7.4 后于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存,现配现用。(3) 黄独素 B 肝灌流溶液配制:精密称取黄独素 B 适量溶解于 DMSO 中,配制成 6 mg/mL 的母液于 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存。实验前精密移取一定量母液,用空白肝灌流溶液稀释得质量浓度为 3  $\mu\text{g/mL}$  的黄独素 B 灌流液。

## 2.2 黄独素 B 的代谢稳定性研究

**2.2.1 人或大鼠肝微粒体孵育体系的建立** 孵育体系为 200  $\mu\text{L}$  的 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.4), 内含 HLM (蛋白质量浓度 1.0 mg/mL) 或 RLM (蛋白质量浓度 1.0 mg/mL)、NADPH (1.0 mmol/L) 和黄独素 B (2.5  $\mu\text{mol/L}$ ), 每组设 3 个平行样品。将肝微粒体与药物的混合溶液和 NADPH 分别在 37  $^{\circ}\text{C}$  预孵育 5 min 后,加入 NADPH 启动反应,并继续在 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育,于 0、5、15、30、45、60 min 取 20  $\mu\text{L}$  的样品,加入 150  $\mu\text{L}$  含有 5 ng/mL 普萘洛尔 (内标) 的甲醇-乙腈 (1:1) 溶液中,涡旋振荡 1 min, 14 000 r/min 离心 5 min, 取上清液进行 LC-MS/MS 分析,检测黄独素 B 的剩余浓度。孵育实验平行设置加入非那西汀、双氯芬酸、奥美拉唑、右美沙芬、咪达唑仑的阳性对照组和不加辅酶的空白对照组。

**2.2.2 黄独素 B 检测方法** (1) 色谱条件:色谱柱为 Agilent Zorbax XDB C<sub>18</sub> 柱 (50 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ); 流动相为含 0.1% 甲酸的水溶液 (A) -含 0.1% 甲酸的甲醇溶液 (B); 梯度洗脱: 0~0.30 min, 90% A; 0.30~0.80 min, 90%~50% A; 0.80~1.50 min, 50%~2% A; 1.50~2.00 min, 2% A; 2.00~2.01 min, 2%~90% A; 2.01~3.50 min, 90% A; 体积流量 0.45 mL/min; 进样量 10  $\mu\text{L}$ 。(2) 质谱条件:电喷雾离子源 (ESI); 正离子方式扫描; 气帘气 (CUR) 137.90 kPa (20 psi); 喷雾电压 (IS) 5 000 V; 脱溶剂温度 550  $^{\circ}\text{C}$ ; 雾化气 (GS1): 379.225 kPa (55 psi); 加热辅助气 (GS2): 379.225 kPa (55 psi);

信号采集方式:多反应监测 (MRM); 黄独素 B 检测的离子对为  $m/z$  362.1 $\rightarrow$ 317.1, 普萘洛尔 (内标) 的离子对为  $m/z$  260.1 $\rightarrow$ 116.1。本实验分析条件经方法学验证有效<sup>[11]</sup>。

## 2.3 黄独素 B 体外代谢酶表型研究

**2.3.1 基于重组人 CYP450 酶对黄独素 B 代谢酶表型研究** 将 200  $\mu\text{mol/L}$  的黄独素 B 分别与 10 种重组人 CYP450 酶 (终浓度 20 pmol/mL) 混合 (孵育体系中黄独素 B 浓度为 2  $\mu\text{mol/L}$ ), 37  $^{\circ}\text{C}$  预孵育 5 min 后,加入 NADPH (终浓度 1 mmol/L) 启动反应,于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴孵育。分别于 0、60 min, 取 50  $\mu\text{L}$  的样品加入 150  $\mu\text{L}$  含有 5 ng/mL 丁螺环酮 (内标) 的甲醇-乙腈 (1:1) 溶液,沉淀蛋白。涡旋振荡 1 min, 14 000 r/min 离心 5 min, 取上清液进行 LC-MS/MS 分析 (条件同“2.2.2”项), 测定不同重组人 CYP450 酶孵育后黄独素 B 的剩余质量浓度。

**2.3.2 基于大鼠肝灌流实验考察 CYP3A4 抑制剂 (酮康唑) 对黄独素 B 的代谢影响** 12 只 SD 大鼠随机分为 4 组,包括对照组和酮康唑给药组 (5、10、20 mg/kg, 按 8 mL/kg ip 给药), 每组 3 只。各组给予相应体积的药液和溶媒后 1 h 进行黄独素 B 的肝灌流实验,考察酮康唑对黄独素 B 在肝脏代谢的影响。肝灌流实验如下:将麻醉后的大鼠腹部开 V 型切口,暴露肝脏和血管;结扎胆管、门静脉分支、右肾静脉;分离门静脉、肝动脉、下腔静脉并埋线;从门静脉进针插管 (管 1), 将管 1 的另一端放入装有空白灌流液的烧杯里,并在下腔静脉处开一小口,调节蠕动泵体积流量 20 mL/min, 开泵, 剪开大鼠胸腔, 止血钳夹住上腔静脉, 结扎肝动脉, 待肝脏中残余血液全部冲出,即肝脏由深红色变成土黄色, 且下腔静脉的流出液澄清, 可在下腔静脉开口处插管 (管 2) 并结扎, 此时将管 2 的另一端也放入烧杯中, 使灌流液从门静脉进入肝脏到从下腔静脉流出形成一个封闭单一的可循环通路, 泵体积流量调节至 10 mL/min 稳定灌流 10 min。换上含黄独素 B 的灌流液开始循环灌流, 并在 1、3、5、10、20、30、40、50、60 min 各个时间点从循环灌流药液池中取样 0.5 mL, 每次取样后向药液池中补充空白灌流液 0.5 mL。各时间点样品经处理后测定黄独素 B 的剩余浓度。

## 2.4 黄独素 B 在人和大鼠肝微粒体中的代谢产物研究

**2.4.1 人或大鼠肝微粒体孵育体系的建立** 利用“2.2.1”项建立的肝微粒体孵育体系, 将孵育体系中

黄独素 B 浓度调整为 10  $\mu\text{mol/L}$ ，其他孵育条件不变，于孵育 60 min 后终止反应，取上清液进样分析。孵育实验平行设置不加辅酶的空白对照组。

**2.4.2 代谢产物的检测方法** (1) 色谱条件：色谱柱为 Waters Acquity BEH  $\text{RP}_{18}$  柱 (100 mm  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )；流动相为含 0.1% 甲酸的水溶液 (A) - 含 0.1% 甲酸的乙腈溶液 (B)，梯度洗脱：0~14.00 min, 90%~40% A；14.00~17.00 min, 40%~5% A；17.00~17.01 min, 5%~90% A；17.01~20.00 min, 90% A；体积流量 0.3 mL/min；进样量 5  $\mu\text{L}$ 。(2) 质谱条件：电喷雾离子源 (ESI)；正离子方式扫描；毛细管电压 3.2 kV；离子源温度 120 $^{\circ}\text{C}$ ；脱溶剂温度 350 $^{\circ}\text{C}$ ；脱溶剂气体流量 800 L/h；锥孔气体流量 50 L/h；停留时间 0.1 s；质量范围  $m/z$  100~1 000。

## 2.5 数据处理

**2.5.1 半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 及固有清除率 ( $\text{CL}_{\text{int}}$ ) 计算** 将各时间点的黄独素 B 剩余百分率的自然对数与相应的孵育时间作图，经直线回归求得斜率 ( $-K$ )，求得黄独素 B 经微粒体代谢的  $t_{1/2}$ ，应用 Well Stirred Model 对微粒体的数据进行外推，可以得到黄独素 B 在人和大鼠肝中的固有清除率  $\text{CL}_{\text{int, in vivo}}$  和肝清除率  $\text{CL}_h$  [12-13]。

**2.5.2 统计学方法** 本实验所得的数据以  $\bar{x} \pm s$  表示，所得数据利用 SPSS 统计学软件 (版本 17.0) 进行统计学分析，实验中的多组数据利用单因素方差分析法进行分析。

## 3 结果

### 3.1 黄独素 B 在 HLM 和 RLM 中的代谢稳定性

阳性对照非那西汀、双氯芬酸、奥美拉唑、右美沙芬、咪达唑仑在 HLM 和 RLM 中的代谢参数在文献报道范围内，黄独素 B 在未添加 NADPH 的情况下未发生明显消除，证明实验所用孵育体系正常。黄独素 B 在 HLM 和 RLM 中的代谢消除曲线见图 1，依据“2.5”项方法计算得到的黄独素 B 在肝微粒体的  $t_{1/2}$ ，外推得到肝脏的固有清除率  $\text{CL}_{\text{int, in vivo}}$  和肝清除率  $\text{CL}_h$ 。黄独素 B 在 HLM 和 RLM 中孵育 60 min 后原药代谢消除率分别为 36% 和 58%。黄独素 B 在 HLM 和 RLM 的  $t_{1/2}$  分别为 97.4、52.3 min，外推得到的人和大鼠肝脏  $\text{CL}_{\text{int, in vivo}}$  为 8.23、23.9 mL/(min·kg)， $\text{CL}_h$  为 5.89、16.8 mL/(min·kg)，数据表明黄独素 B 在 RLM 体系中的代谢转化速率较 HLM 中快，大鼠肝脏对黄独素 B 的清除率高于人。

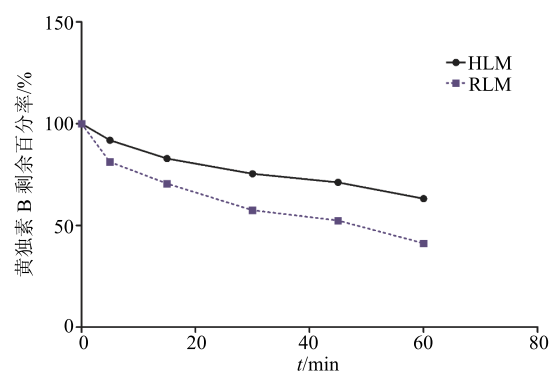


图 1 HLM 和 RLM 孵育体系中黄独素 B 的剩余百分率-时间曲线

Fig. 1 Residual percentage-time curve of Diosbulbin B incubated in human and rat liver microsome

### 3.2 黄独素 B 体外代谢酶表型研究

由图 2 可知，10 种人重组 CYP450 酶中，其主要 5 种 CYP450 酶介导黄独素 B 代谢的主次顺序为  $\text{CYP3A4} > \text{CYP2C19} > \text{CYP2C9} > \text{CYP2A13} > \text{CYP1A1}$ ，黄独素 B 的主要代谢酶是 CYP3A4，代谢率高达 50%。大鼠肝灌流实验结果 (图 3) 显示，随着酮康唑剂量的增加，黄独素 B 在灌流液中的剩余量增加，由此可知 CYP3A4 对黄独素 B 的代谢起着主导性的作用，并且酮康唑对黄独素 B 代谢的抑制作用呈剂量依赖性。

### 3.3 黄独素 B 的代谢产物鉴定及其代谢通路解析

黄独素 B 分别在 HLM 和 RLM 中孵育后总离子流图见图 4。由图可知黄独素 B 分别在 HLM 和 RLM 中孵育后都新增 1 个峰，对黄独素 B (M0) 及其产物 (M1) 分别进行二级质谱分析，谱图见图 5。整理可得 M0 及 M1 的分子离子及各级碎片离子质

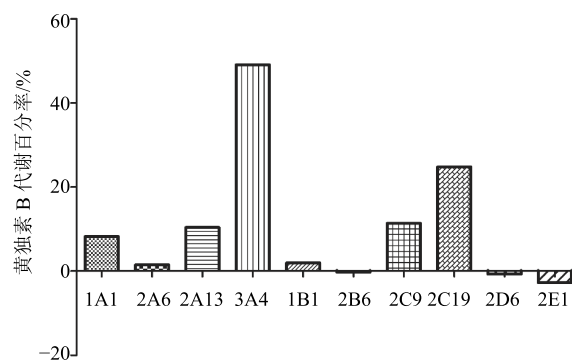


图 2 黄独素 B 在 10 种重组人 CYP450 酶中的代谢百分率  
Fig. 2 Percentage of metabolic Diosbulbin B in 10 recombinant human CYP450 enzymes

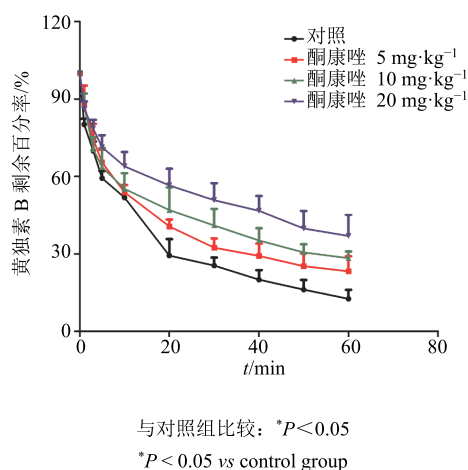


图3 大鼠给予不同剂量酮康唑后肝灌流液中黄独素 B 剩余百分率-时间曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Residual percentage-time curve of Diosbulbin B in hepatic perfusate after administration of different doses of ketoconazole ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

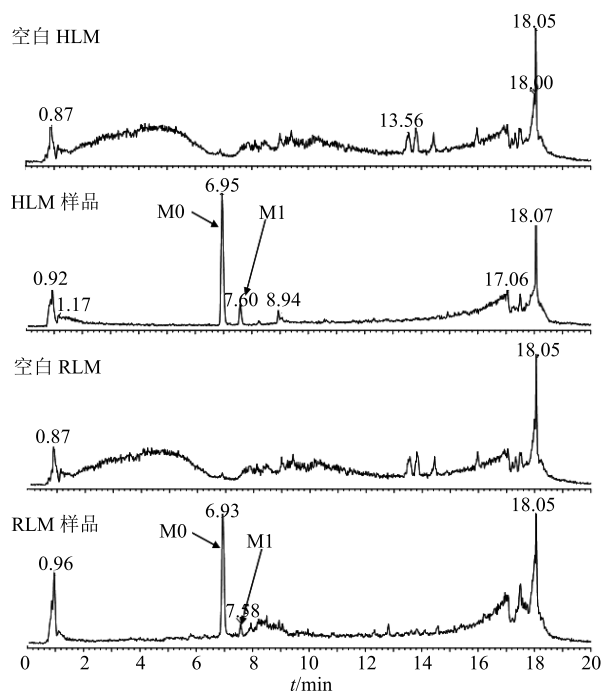


图4 HLM (A) 和 RLM (B) 空白样品及加入黄独素 B 孵育后样品的总离子流图

Fig. 4 Total ion chromatogram of supernate in HRM (A) and RLM (B) incubated with or without Diosbulbin B

表 1 黄独素 B 及其代谢产物的 LC-MS/MS 数据

Table 1 LC-MS/MS data of Diosbulbin B and its metabolites

化合物	分子式	$[M+H]^+$	$t_R/\text{min}$	MS/MS 碎片离子 ( $m/z$ )	RLM	HLM
M0	$C_{19}H_{20}O_6$	345	6.95	317, 299, 271, 253, 161	+	+
M1	$C_{18}H_{18}O_6$	331	7.58	271, 253, 235, 159, 121	+	+

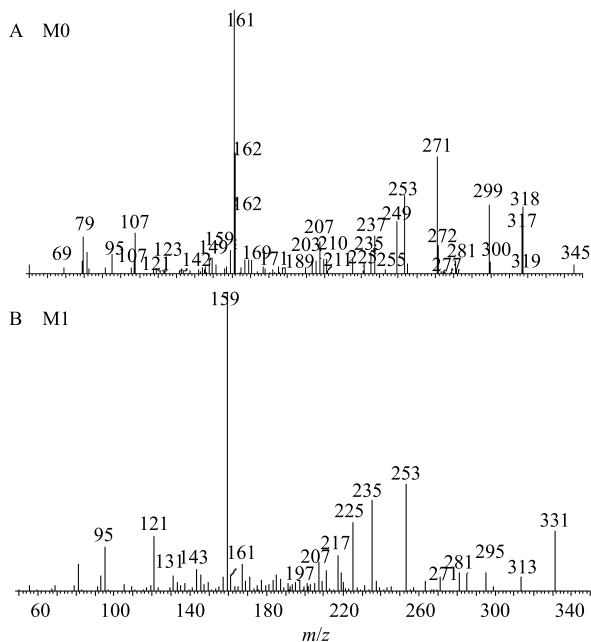


图5 黄独素 B (A) 及其代谢产物 M1 (B) 的二级质谱图  
Fig. 5 Secondary mass spectrum of Diosbulbin B (A) and its metabolite M1 (B)

谱数据见表 1。从碎片分析可知 M1 应为黄独素 B 去甲基的代谢产物。

## 4 讨论

### 4.1 中药肝毒性与 CYP450 酶的关系

随着中医药事业的迅猛发展, 中药在临床的应用越来越广泛。但是, 中药在治疗过程中产生的毒副作用日益显现, 对脏器损害的报道也时有出现, 特别是药源性肝损伤<sup>[14]</sup>。药源性肝损伤产生可能由于中药对药物代谢酶 CYP450 活性的影响(酶诱导剂或者酶抑制剂)而产生的药物相互作用<sup>[15-16]</sup>, 还可能是中药中化学成分自身(原型、活性中间体、代谢产物)的肝毒性作用。

药物作为外源性物质被机体吸收后, 其致毒成分可能为原型、活性中间体<sup>[17]</sup>或代谢产物, 对机体毒性的强弱受原型物质代谢速率、代谢过程的影响。代谢酶 CYP450 作为药物代谢最重要的酶, 其活性直接影响中药中有毒成分的代谢或者前毒物的活化。因此, 基于代谢酶 CYP450 的有毒成分的代谢

研究(代谢性质、代谢通路、CYP450 代谢酶表型)对于带毒中药而言必不可少,不仅为药源性肝损伤机制探索提供重要参考,同时为中药配伍与减毒增效的研究提供线索<sup>[18]</sup>。

## 4.2 中药体外代谢研究思路

体外代谢研究可排除体内干扰因素,为整体实验提供可靠的理论依据。对于体内代谢转化率低、毒性大及缺乏灵敏检测手段的药物而言,体外代谢研究是良好的研究手段。肝脏是药物代谢的重要器官,是机体进行生物转化的主要场所,含有参与药物代谢 CYP450 混合功能氧化酶系统,以肝脏为基础的体外代谢模型因其特有的优势在药物代谢研究中得到广泛应用。

体外代谢评价技术主要利用分子水平模型(如重组人 CYP450 酶)、亚细胞组分水平模型(如肝微粒体和 S9)、细胞水平模型(如动物和人源细胞)及器官水平模型(如肝灌注)等对药物的代谢性质及特点进行评价<sup>[19]</sup>。目前,多数研究人员仅仅选择其中的一种或者 2 种模型进行药物代谢研究,内容单一,结果的延展性并不全面。几种模型的联合交叉应用对于药物的代谢稳定性、代谢产物、代谢通路、代谢酶表型的考察更为全面,对药物代谢研究更具指导意义。本研究选择了多种体外代谢评价技术,包括分子水平、亚细胞组分水平及器官水平,各个模型对于黄独素 B 的代谢研究能够相互补充及验证。

## 4.3 药物代谢酶 CYP450 与黄独素 B 肝毒性的关系

黄药子长期或过量的使用会导致严重肝损伤,本课题组对黄药子的药动学研究发现黄独素 B 在大鼠体内会发生蓄积,机体对黄独素 B 的代谢消除能力不足,可能是引发肝损伤的重要原因之一。有研究发现,甘草与黄药子配伍后能通过提高 CYP450 的活性从而缓解黄药子的肝损伤作用<sup>[21]</sup>。此外,性别差异导致黄独素 B 体内经时过程的变化<sup>[21]</sup>和性别差异导致的 CYP450 表达不同<sup>[22]</sup>,表明黄独素 B 的毒性强弱和性别有关,且最终原因和 CYP450 的种类和数量有关。人和实验动物的 CYP450 种类和数量差别较大。因此,基于人和实验动物肝微粒体对黄独素 B 代谢差异的研究对于后续其毒理的深入研究来说必不可少。

本实验研究的人和大鼠肝微粒体对黄独素 B 的代谢差异性结果显示黄独素 B 在 RLM 中的代谢转化率明显高于 HLM,表明黄独素 B 的代谢消除在

人和大鼠间可能存在一定的种属差异。因此,对黄独素 B 的毒性机制的进一步研究应充分考虑这一差异的存在。

已有体外代谢研究指出黄独素 B 肝毒性产生的原因是其经 CYP450 代谢产生的顺式活性中间体与半胱氨酸、赖氨酸残基反应破坏肝细胞中的关键蛋白而造成肝损伤,且结果表明黄独素 B 的活性中间体主要经 CYP3A4 代谢产生<sup>[22-23]</sup>。本实验对黄独素 B 的代谢酶表型进行研究发现 CYP3A4 是介导黄独素 B 代谢消除最主要的代谢酶,和文献结果一致,且酮康唑(CYP3A4 抑制剂)能有效抑制肝脏对黄独素 B 的代谢消除,呈现一定的剂量-效应关系,提示黄独素 B 与 CYP3A4 抑制剂的代谢性相互作用可能会诱导黄药子的体内蓄积毒性,临床合并用药要尤其注意。

综上所述,黄独素 B 的肝毒性与 CYP3A4 对黄独素 B 的代谢作用关系极为密切。黄独素 B 经 CYP3A4 代谢产生的活性中间体对于肝细胞的损伤是一方面,但是黄独素 B 的原型、活性中间体和代谢产物的毒性作用尚未分别比较研究,不能真正确认 CYP3A4 对黄独素 B 的代谢作用对其肝毒性的影响。因此,对黄独素 B 的毒理机制研究还需从其活性中间体及代谢产物转化率/量对肝细胞毒性的影响等方面入手,最终弄清 CYP3A4 酶对黄独素 B 肝毒性的影响。

## 参考文献

- [1] 李俊萱,于海食,宋雨婷.黄药子的现代研究进展[J].中国医药指南,2013,11(26):52-54.
- [2] 杜丽霞,罗明媚,刘树民.黄药子现代药理学研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2007,9(3):71-72.
- [3] 蒋兆芬.黄药子引起药物性肝炎 17 例报告[J].中医杂志,1987,18(2):37-38.
- [4] Min M A, Jiang Z Z, Ruan J L, et al. Toxicity of a diterpene lactone isolated from *Dioscorea bulbifera* on hepatocyte[J]. *Chin J Nat Med*, 2011, 9(4): 280-285.
- [5] Wang L L, Zhao D S, Shi W. Describing the holistic toxicokinetics of hepatotoxic Chinese herbal medicines by a novel integrated strategy: *Dioscorea bulbifera*, rhizome as a case study[J]. *J Chromatogr B*, 2017, 1064: 40-48.
- [6] 谭兴起,阮金兰,陈海生,等.黄药子抗炎活性成分的研究[J].第二军医大学学报,2003,24(6):677-679.
- [7] Komori T. Glycosides from *Dioscorea bulbifera* [J]. *Toxicon*, 1997, 35(10): 1531-1535.
- [8] 牛成伟,陆 宾,季莉莉,等.黄独素 B 诱导小鼠急性

- 肝损伤及其机制 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(7): 1290-1292.
- [9] Li W W, Lin D J, Gao H Y. Metabolic activation of furan moiety makes diosbulbin B hepatotoxic [J]. *Arch Toxicol*, 2016, 90(4): 863-872.
- [10] 曲晓宇, 周利婷, 张四喜, 等. 黄独素 B 致小鼠肝损伤过程中对肝外排型转运体 Mrp2 表达的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(19): 1633-1636.
- [11] 许玉凤. 黄药子活性成分体内外代谢性质研究 [D]. 北京: 军事医学科学院, 2018.
- [12] Obach R S, Baxter J G, Liston T E. The prediction of human pharmacokinetic parameters from preclinical and *in vitro* metabolism data [J]. *J Pharmacol Exper Therap*, 1997, 283(1): 46-58.
- [13] Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans [J]. *Pharm Res*, 1993, 10(7): 1093-1095.
- [14] 祁亚宾, 邱玲, 姜红丽, 等. 药物性肝损伤 394 例临床特点分析 [J]. 临床肝胆病杂志, 2014, 30(5): 438.
- [15] Liu C X, Yi X L, Si D Y, *et al.* Herb-drug interactions involving drug metabolizing enzymes and transporters [J]. *Curr Drug Metab*. 2011, 12(9): 835-849.
- [16] 杜犀, 何新, 黄宇虹, 等. 应用 Cocktail 探针药物法分析中药对 CYP450 酶活性影响的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(24): 4541-4549.
- [17] Feng S, He X. Mechanism-based inhibition of CYP450: An indicator of drug-induced hepatotoxicity [J]. *Curr Drug Metab*, 2013, 14(9): 921-945.
- [18] 侯健, 孙娥, 宋捷, 等. 肝脏药物代谢酶 CYP450 与中药肝毒性的关系 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(15): 2774-2780.
- [19] 杨本坤, 王素军, 莫李立, 等. 药物代谢体外模型的研究进展 [J]. 广东药学院学报, 2011, 27(6): 649-652.
- [20] 华碧春, 黄智锋, 刘娇. 黄药子与甘草配伍对大鼠肝 CYP450 酶活性及 mRNA 表达的影响 [J]. 中国药理与临床, 2014, 30(4): 79-81.
- [21] Yang B, Wang X, Liu W. Gender-related pharmacokinetics and absolute bioavailability of diosbulbin B in rats determined by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 149(3): 810-815.
- [22] Yang B, Liu W, Chen K. Metabolism of diosbulbin B *in vitro* and *in vivo* in rats: Formation of reactive metabolites and human enzymes involved [J]. *Drug Metab Disp Biol Fate Chem*, 2014, 42(10): 1737-1750.
- [23] Lin D J, Li C Y, Peng Y, *et al.* Cytochrome p450-mediated metabolic activation of diosbulbin B [J]. *Drug Metabol Disp*, 2014, 42(10): 1727-1736.