

基于淫羊藿次苷 II 代谢行为的体外药物相互作用研究

孟繁兴¹, 李妍², 葛广波², 刘树民^{1*}

1. 黑龙江中医药大学, 药物安全性评价中心, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 中国科学院大连化学物理研究所, 药用资源开发组, 辽宁 大连 116023

摘要: **目的** 应用体外实验方法筛选淫羊藿次苷 II 在肝微粒体中的尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (UGT) 抑制剂, 为改善淫羊藿次苷 II 生物利用度提供新思路。**方法** 首先选择槲皮素、山柰酚、桔皮素、柚皮素、水飞蓟素、草质素、胡椒碱、甘草查尔酮 A 以及异银杏双黄酮作为抑制剂筛选对象, 对以上 9 种化合物在人肝微粒体、人肠微粒体、大鼠肝微粒体、猴肝微粒体及小型猪肝微粒体中对淫羊藿次苷 II 葡萄糖醛酸化反应的抑制作用进行初步研究。抑制剂分别选择低、中、高 3 个浓度 (1、10、100 $\mu\text{mol/L}$), 采用超快速高效液相色谱 (UFLC) 法测定代谢产物生成速率, 以 UGT 代谢酶残余活性评价抑制能力。从中筛选出抑制能力较强的化合物 (半数抑制浓度 $\text{IC}_{50} \leq 10 \mu\text{mol/L}$), 对其在人肝微粒体中的抑制机制进行系统研究并计算 IC_{50} 及抑制常数 (K_i) 值。 IC_{50} 值的测定采用单一底物浓度法, 在不同浓度代谢酶抑制剂的孵育体系中, 代谢产物的生成速率不同, 应用非线性回归分析计算而得。 K_i 的测定需在孵育体系中设计 3~4 个底物浓度以及 4~5 个包括 0 点在内的抑制剂浓度, 抑制动力学类型通过 Dixon 作图法和 Lineweaver-Burk 作图法确定, 采用二次作图法计算 K_i 。**结果** 山柰酚、槲皮素及甘草查尔酮 A 对淫羊藿次苷 II 在不同种属肝微粒体及人肠微粒体中的葡萄糖醛酸化反应均具有较强的抑制作用; 对在人肝微粒体中的葡萄糖醛酸化反应抑制作用的 IC_{50} 值分别为 (1.01 \pm 0.26)、(4.65 \pm 0.51)、(5.34 \pm 1.00) $\mu\text{mol/L}$; Dixon 作图法及 Lineweaver-Burk 作图法表明, 甘草查尔酮 A 能够竞争性抑制淫羊藿次苷 II 在人肝微粒体中的葡萄糖醛酸化反应, K_i 值为 0.18 $\mu\text{mol/L}$; 槲皮素遵循混合型抑制动力学模型, K_i 值为 0.23 $\mu\text{mol/L}$; 山柰酚符合非竞争型抑制动力学模型, K_i 值为 0.36 $\mu\text{mol/L}$ 。**结论** 山柰酚、槲皮素及甘草查尔酮 A 能够降低淫羊藿次苷 II 在不同种属肝微粒体中的葡萄糖醛酸化反应速率, 使代谢产物生成减少, 清除减慢。

关键词: 淫羊藿次苷 II; 葡萄糖醛酸化反应; 肝微粒体; 抑制作用; 生物利用度; 山柰酚; 槲皮素; 甘草查尔酮 A

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2016)04-0539-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.04.006

Study on *in vitro* drug interaction based on metabolism behavior of icaricide II

MENG Fan-xing¹, LI Yan², GE Guang-bo², LIU Shu-min¹

1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Drug Safety Evaluation Center, Harbin 150040, China

2. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Laboratory of Pharmaceutical Resource Discovery, Dalian 116023, China

Abstract: Objective To screen the UDP-glucuronosyltransferase (UGT) inhibitors of icaricide II in liver microsomes *in vitro* and provide a new idea to improve the bioavailability of icaricide II. **Methods** In this study, the inhibitory effects of quercetin, kaempferol, hesperetin, naringenin, silymarin, piperine, herbacetin, licochalcone A, and isoginkgetin against icaricide II glucuronidation were assessed firstly. Icaricide II was incubated in human, rat, monkey, minipig liver microsomes and human intestinal microsomes with varying inhibitors concentration (1, 10, and 100 $\mu\text{mol/L}$). An UFLC based method was used to quantify the glucuronide of icaricide II. The residual activity of UGT enzymes was used to evaluate the inhibitory capacity. The inhibitory mechanism and kinetic parameters of inhibitors with the IC_{50} values less than or equal to 10 $\mu\text{mol/L}$ were investigated in human liver microsomes. IC_{50} values were determined by using a single substrate concentration with various concentration of inhibitors and were calculated by non-linear regression analysis. Inhibition kinetic parameters (K_i) were determined by using various concentration of icaricide II in the presence or

收稿日期: 2016-05-08

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (2013CB531800)

作者简介: 孟繁兴 (1981-), 男, 博士研究生, 研究方向为药效物质基础及药物代谢动力学。E-mail: mfx1115@163.com

*通信作者 刘树民, 博士, 教授, 研究方向为中药药性理论及药效物质基础。E-mail: keji-liu@163.com

absence of various concentration of inhibitors. The inhibition kinetic type was evaluated by determining the intersection point in Dixon and Lineweaver-Burk plots. The second plot of slopes from Lineweaver-Burk plot vs inhibitors concentration was utilized to calculate the corresponding inhibition parameter values. **Results** The catalytic activities of human, rat, and monkey minipig liver microsomes and human intestinal microsomes were strongly inhibited by quercetin, kaempferol, and licochalcone A in icaraside II glucuronidation. The calculated IC_{50} values of quercetin, kaempferol, and licochalcone A in human liver microsomes were (1.01 ± 0.26) , (4.65 ± 0.51) , and (5.34 ± 1.00) $\mu\text{mol/L}$, respectively. Both Lineweaver-Burk and Dixon plots demonstrated that licochalcone A was a competitive inhibitor for icaraside II glucuronidation in human liver microsoms with the K_i value of $0.18 \mu\text{mol/L}$. Quercetin was a mixed inhibitor for human liver microsomes mediated icaraside II glucuronidation with the K_i value of $0.23 \mu\text{mol/L}$. Kaempferol is a noncompetitive inhibitor for icaraside II glucuronidation in human liver microsomes with the K_i value of $0.36 \mu\text{mol/L}$. **Conclusion** The glucuronidation of icaraside II in different species liver microsomes can be strongly inhibited by quercetin, kaempferol, and licochalcone A.

Key words: icaraside II; glucuronidation; liver microsomes; inhibition; bioavailability; kaempferol; quercetin; licochalcone A

淫羊藿是我国传统的补益中药,其主要化学成分包括黄酮、木脂素、生物碱及多糖,此外还含有少量的挥发油、棕榈酸和硬脂酸等^[1]。黄酮及其衍生物是淫羊藿化学成分的重要组成部分,体内外药理学实验表明,这一类化合物均存在壮阳作用、雌激素样作用、抗肿瘤、抗炎、抗氧化、心血管及神经系统保护作用等广泛的药理活性^[2]。

淫羊藿苷是淫羊藿主要的黄酮苷类化合物之一^[3-4],其可被人肠道菌代谢转化为淫羊藿次苷 II,淫羊藿次苷 II 是大鼠 ig 给予淫羊藿苷后吸收入血的主要成分,是淫羊藿苷发挥药效的物质基础^[5-6]。此外,包括朝藿定 A、B、C 在内的含有 8 位异戊烯基的黄酮苷类化合物在肠道菌的作用下也可以转化成次级苷,即淫羊藿次苷 II,进而吸收入血发挥药效作用^[7]。

体外药理学研究发现,淫羊藿次苷 II 是高选择性 5 型磷酸二酯酶 (PDE5) 抑制剂,对 PDE5A1 抑制作用的 IC_{50} 值为 160 nmol/L ,抑制强度是其他 5 型磷酸二酯酶的 10 倍^[8-9]。但淫羊藿次苷 II 体内实验数据显示,该化合物口服后受首关效应影响,在大鼠体内的生物利用度仅为 4.1% ^[10]。

进一步的代谢研究发现,葡萄糖醛酸化反应是淫羊藿次苷 II 在大鼠体内主要的生物转化过程,3 位与 7 位双葡萄糖醛酸代谢产物与 7 位单葡萄糖醛酸代谢产物是大鼠血中检测到的主要代谢产物。在大鼠胆汁和尿中 7 位单葡萄糖醛酸代谢产物是检测到的主要产物,而淫羊藿素为在大鼠粪便中主要检测到的代谢产物^[11]。由尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (UDP-glucuronosyltransferase, UGT) 介导的葡萄糖醛酸化反应是药物在体内重要的 II 相代谢反应,参与近 40% 临床药物的代谢^[12]。在人体内,

UGT1A 与 UGT2B 亚家族参与经皮肤、呼吸道以及口腔进入体内的外源性化合物的葡萄糖醛酸化代谢,使之易于排出体外,对机体起到保护作用^[13]。对于存在明显首关效应的药物而言,代谢行为可能是影响其生物利用度的主要原因之一,而 UGT 代谢酶抑制剂的存在能够增加药物的吸收,减慢药物的清除,进而对其生物利用度产生一定程度的改善。

因此,本研究通过体外实验技术,以淫羊藿次苷 II 为底物,分别考察槲皮素、山柰酚、桔皮素、柚皮素、水飞蓟素、胡椒碱、草质素、甘草查尔酮 A 及异银杏双黄酮对淫羊藿次苷 II 在不同种属肝微粒体及人肠微粒体中葡萄糖醛酸化反应的抑制作用,并对具有较强抑制作用的抑制剂 (半数抑制浓度 $IC_{50} \leq 10 \mu\text{mol/L}$) 在人肝微粒体中的抑制机制进行系统的研究,测定 IC_{50} 及抑制常数 (K_i) 值,为提高淫羊藿次苷 II 生物利用度提供有价值的参考信息。

1 材料

1.1 药品与试剂

淫羊藿次苷 II (批号 150627)、山柰酚 (批号 150414)、槲皮素 (批号 150302)、柚皮素 (批号 140330)、桔皮素 (批号 140912)、水飞蓟素 (批号 141102)、胡椒碱 (批号 150329)、草质素 (批号 141217)、甘草查尔酮 A (批号 150724)、异银杏双黄酮 (批号 140316),质量分数均大于 98%,购于成都普菲德生物技术有限公司。

淫羊藿次苷 II-7-O-葡萄糖醛酸代谢产物,实验室制备,制备方法见“2.3”项;尿苷二磷酸葡萄糖醛酸 (UDPGA,批号 069K7017V)、聚乙二醇十六烷基醚 (批号 055K0045),购于美国 Sigma-Aldrich 公司;氯化镁 (MgCl_2 ,批号 20100110)、盐酸 (分析纯,批号 20150818),购于天津市科密欧化学试剂

有限公司; Tris 碱 (批号 527K073), 购于北京索莱宝科技有限公司; 甲酸 (色谱纯, 批号 A0326132), 购于美国 Acros organics 公司。

SD 大鼠肝微粒体 (批号 BDVH)、恒河猴肝微粒体 (批号 ZDD)、小型猪肝微粒体 (批号 RUIB)、人肝微粒体 (批号 LPS)、人肠微粒体 (批号 UGU), 均购于上海瑞德肝脏疾病研究有限公司; 甲醇和乙腈 (色谱纯), 购于美国 Fisher Scientific 公司; 二甲基亚砜 (DMSO, 批号 14010920), 购于美国 TEDIA 公司; 去离子水, 自制。

1.2 仪器

SHIMADZU 超快速高效液相色谱仪 (UFLC)、LC-30AD 高压泵、SPD-20A 紫外/可见光检测器、CBM-20A 系统控制器、DGU-20A 真空在线脱气机、SIL-30AC 自动进样器、CTO-30A 柱温箱、LabSolutions 5.81 数据处理系统, 日本 SHIMADZU 公司; Thermo-Shaker MS-100 恒温混匀仪、HERAEUS X1R 低温高速离心机, 美国 Thermo Scientific 公司; LAB DANCER S25 涡旋振荡器, 德国 IKA 公司; BSA224S 分析天平, 北京赛多利斯科学仪器有限公司; Milli-Q 超纯水制备系统, 美国 MILLIPORE 公司; IMS-20 制冰机, 江苏省常熟市雪科电器有限公司。

2 方法

2.1 主要溶液的配制

精密称取淫羊藿次苷 II 适量, DMSO 溶解, 配制成浓度为 0.5 mmol/L 的标准溶液; 分别精密称取山柰酚、槲皮素、柚皮素、桔皮素、水飞蓟素、胡椒碱、草质素、甘草查尔酮 A、异银杏双黄酮适量, DMSO 溶解, 配制成浓度为 20 mmol/L 的标准溶液, DMSO 依次稀释, 分别得到浓度为 2.0、0.2 mmol/L 的标准溶液, 保存于 4 °C 冰箱待用。

2.2 UFLC 色谱条件

SHIMADZU VP-ODS C₁₈ 色谱柱 (5 μm, 150.0 mm×2.1 mm); 柱温 40 °C; 流动相为乙腈(A)-0.2% 甲酸水 (B); 梯度洗脱程序: 0~7.0 min, 90%~10% B; 7.0~8.0 min, 10% B; 8.0~9.0 min, 10%~90% B; 9.0~12.0 min, 90% B; 体积流量 0.4 mL/min; 检测波长 270 nm; 进样量 5 μL。

2.3 淫羊藿次苷 II 葡萄糖醛酸代谢产物的制备

采用 500 μmol/L 淫羊藿次苷 II 与蛋白浓度为 0.5 mg/mL 的人重组酶 UGT1A1 进行代谢产物制备。37 °C 孵育 24 h, 加入等体积乙腈终止反应, 离

心移取上清液置旋转蒸发仪中除去有机溶剂。残留液通过 SPE 固相萃取柱 (C18WAX, 北京华谱新创科技有限公司) 进行富集和选择性洗脱。

2.4 淫羊藿次苷 II 的 UGT 抑制剂筛选

孵育体系包括: 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 值为 7.4)、5 mmol/L MgCl₂、2 mmol/L UDPGA、1 mg/mL Brij 58。人肝、肠微粒体蛋白浓度分别为 0.03、0.10 mg/mL, 淫羊藿次苷 II 浓度分别为 2.5、5.0 μmol/L。大鼠和猴肝微粒体蛋白浓度均为 0.03 mg/mL, 小型猪肝微粒体蛋白浓度为 0.2 mg/mL, 淫羊藿次苷 II 浓度均为 5 μmol/L。

抑制剂槲皮素、山柰酚、桔皮素、柚皮素、水飞蓟素、胡椒碱、草质素、甘草查尔酮 A 及异银杏双黄酮浓度分别为 1、10、100 μmol/L, 每个样品体积为 200 μL, 双样本, 反应体系中 DMSO 水平控制在 1%。

孵育反应液在金属恒温震荡仪中预孵 3 min 后, 加入 UDPGA 启动反应, 于 37 °C 孵育 20 min 后加入 200 μL 冰乙腈终止反应, 立即涡旋混匀, 4 °C、14 000 r/min 离心 20 min, 取上清液置 UFLC 检测。对照组不加抑制剂。

以淫羊藿次苷 II 葡萄糖醛酸化反应代谢产物的生成速率反应孵育体系中 UGT 酶的活性, 对照组 UGT 酶活性记为 100%, 样品组中淫羊藿次苷 II 代谢产物的生成速率与对照组中代谢产物生成速率的百分比用以标记 UGT 酶的残余活性, 计算公式如下:

$$\begin{aligned} \text{代谢产物生成速率} &= \text{代谢产物浓度} / \text{孵育时间} / \text{蛋白浓度} \\ \text{残余活性百分比} &= \text{样品组代谢产物生成速率} / \text{对照组代谢产物生成速率} \end{aligned}$$

2.5 所选抑制剂 IC₅₀ 值的测定

孵育体系包括: 人肝微粒体蛋白浓度为 0.03 mg/mL, 淫羊藿次苷 II 浓度为 2.5 μmol/L, 山柰酚与槲皮素浓度均选取为 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.5、3.0、6.0 μmol/L, 甘草查尔酮 A 的浓度选取为 0、1.0、1.4、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0 μmol/L, 其余同“2.4”项下条件与操作。

2.6 所选抑制剂 K_i 值的测定

孵育体系包括: 人肝微粒体蛋白浓度为 0.03 mg/mL, 淫羊藿次苷 II 选取的浓度分别为 0.80、1.25、2.50、5.00 μmol/L, 山柰酚与槲皮素的浓度均选取为 0、0.4、0.8、1.6、3.2 μmol/L, 甘草查尔酮 A 的浓度选取 0、1、2、3、5 μmol/L, 其余同“2.4”项

下条件与操作。

2.7 统计学分析

竞争性抑制见方程式 1，混合性抑制见方程式 2，式中的 K_m 和 V_{max} 分别为米氏常数与最大反应速率， $[I]$ 是游离抑制剂的浓度， $[S]$ 是底物浓度， K_i 为抑制常数。 IC_{50} 应用 Graphpad Prism 6.0 软件中非线性回归分析计算而得。 K_i 通常需要在反应体系中设计 3~4 个底物浓度以及 4~5 个包括 0 点在内的抑制剂浓度。抑制动力学类型通过 Dixon 作图法和 Lineweaver-Burk 作图法确定，二次作图法计算 K_i 。

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m(1 + [I]/K_i) + [S]} \quad 1$$

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m(1 + [I]/K_i) + [S](1 + [I]/K_i)} \quad 2$$

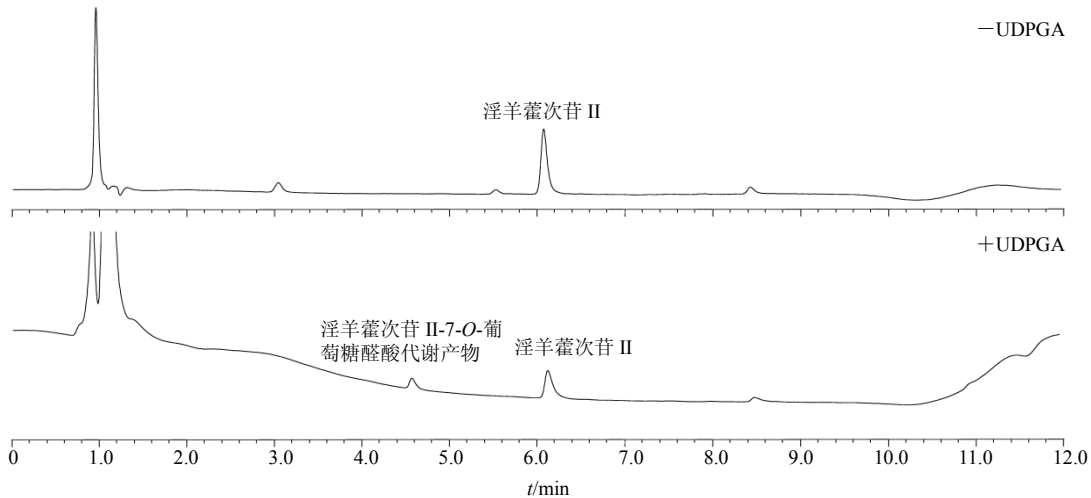


图 1 人肝微粒体中淫羊藿次苷 II 及其葡萄糖醛酸代谢产物 UFLC 检测色谱图

Fig. 1 UFLC of icaricide II and its glucuronide in human liver microsomes

3 结果

3.1 抑制剂筛选结果

淫羊藿次苷 II 在不同种属肝及人肠微粒体中，主要葡萄糖醛酸代谢产物为淫羊藿次苷 II-7-O-葡萄糖醛酸代谢产物，人肝微粒体中淫羊藿次苷 II 及其葡萄糖醛酸代谢产物 UFLC 检测色谱图见图 1。

在人肝微粒体中，当抑制剂山奈酚和异银杏双黄酮浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 时，代谢酶残余活性分别为 58.9% 和 40.0%；当抑制剂山奈酚、槲皮素、草质素及甘草查尔酮 A 浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 时，代谢酶残余活性均为 0。在人肠微粒体中，当抑制剂槲皮素浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 时，代谢酶残余活性为 0，结果见图 2。

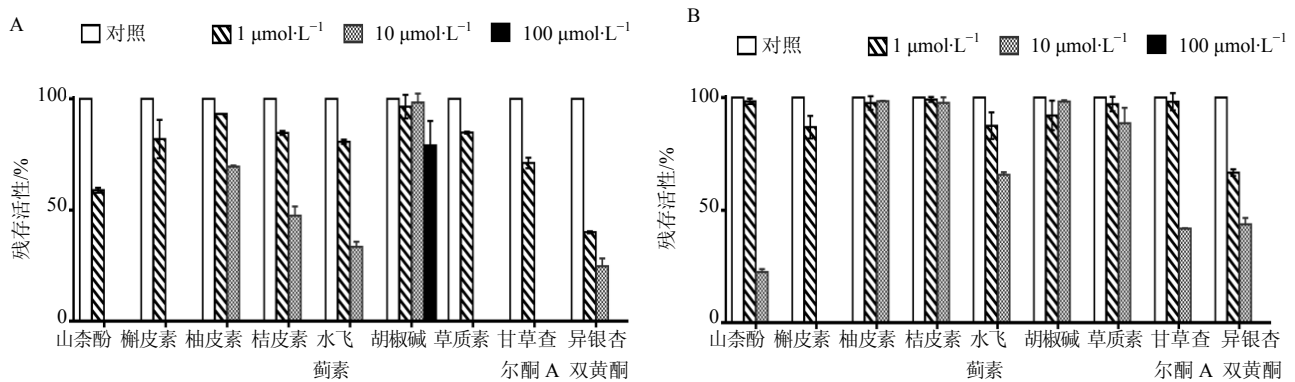


图 2 人肝 (A)、肠 (B) 微粒体中抑制剂筛选结果 ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

Fig. 2 Inhibitor screening of icaricide II in human liver (A) and intestinal microsomes (B) ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

在大鼠肝微粒体中,当抑制剂山柰酚和甘草查尔酮 A 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,代谢酶残余活性分别为 18.2%、19.0%。在小型猪肝微粒体中,当抑制剂甘草查尔酮 A 浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时,代谢酶残余活性为 59.7%;当抑制剂槲皮素与草质素浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,代谢酶残余活性均为 0,山柰酚和甘草

查尔酮 A 组代谢酶残余活性分别为 20.6%、7.88%。在猴肝微粒体中,当抑制剂甘草查尔酮 A 和异银杏双黄酮浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时,代谢酶残余活性分别为 48.9%、59.4%;当抑制剂槲皮素、草质素和甘草查尔酮 A 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,代谢酶残余活性为 0,山柰酚组代谢酶残余活性为 25.5%,结果见图 3。

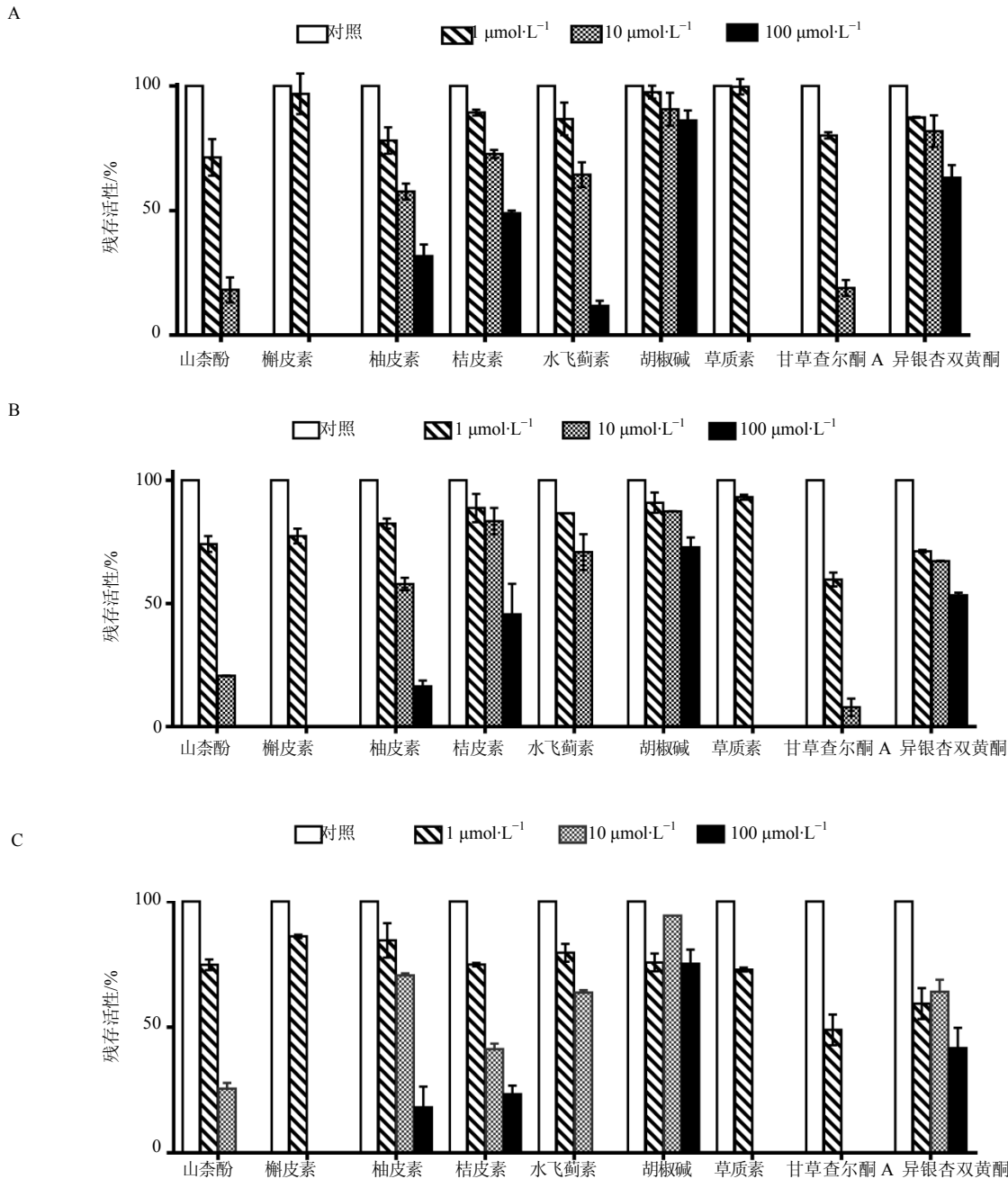


图 3 大鼠 (A)、小型猪 (B) 和猴 (C) 肝微粒体中抑制剂筛选结果 ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

Fig. 3 Inhibitor screening of icaricide II in rat (A), pig (B), and monkey (C) liver microsomes ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

结果表明,在人、大鼠、小型猪、猴肝微粒体及人肠微粒体中,山柰酚、槲皮素、草质素及甘草

查尔酮 A 均对淫羊藿次苷 II 的葡萄糖醛酸化反应有较强的抑制作用。根据实验结果,选择具有较强抑

制作用的山柰酚、槲皮素和甘草查尔酮 A，测定其对人肝微粒体中淫羊藿次苷 II 葡萄糖醛酸化代谢抑制作用的 IC₅₀ 及 K_i 值。

3.2 IC₅₀ 及 K_i 值测定结果

利用不同浓度的抑制剂绘制剂量相关性曲线，结果见图 4，非线性拟合求得抑制剂抑制作用的 IC₅₀ 值，结果见表 1。山柰酚、槲皮素及甘草查尔酮 A 对淫羊藿次苷 II 在人肝微粒体中的葡萄糖醛酸化反应均有较强程度的抑制作用，IC₅₀ 值分别为 (1.01 ± 0.26)、(4.65 ± 0.51)、(5.34 ± 1.00) μmol/L，山柰酚对人肝微粒体的抑制作用略强于槲皮素及甘草查尔酮 A。

分别以混合型、竞争性及非竞争性抑制模型拟合数据，结果见图 5 至图 7，Dixon 作图法及 Lineweaver-Burk 作图法表明，甘草查尔酮 A 能够竞争性抑制淫羊藿次苷 II 在人肝微粒体中的葡萄糖醛酸化反应，K_i 值为 0.18 μmol/L；槲皮素对淫羊藿次苷 II 的葡萄糖醛酸化反应遵循混合型抑制动力学模型，K_i 值为 0.23 μmol/L；山柰酚则符合非竞争型抑制动力学模型，K_i 值为 0.36 μmol/L，结果见表 1。

4 讨论

本研究考察了山柰酚、槲皮素及甘草查尔酮 A 等 9 种化合物对人、大鼠、小型猪、猴肝微粒体及人肠微粒体中淫羊藿次苷 II 葡萄糖醛酸化反应的影

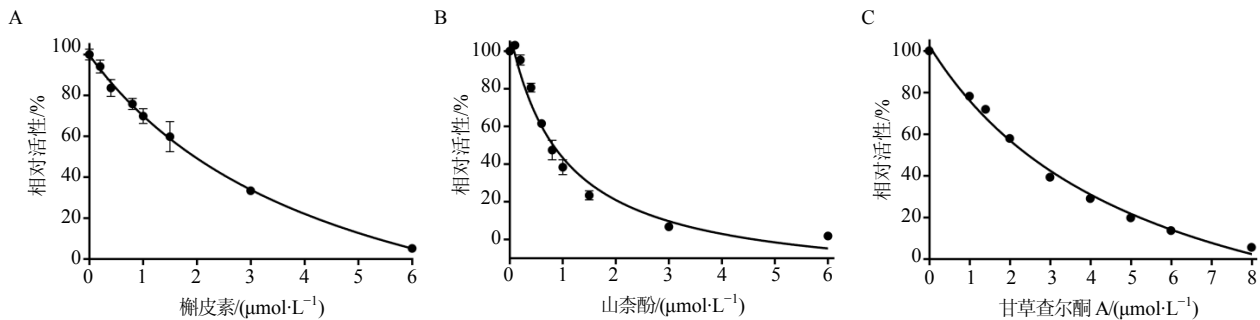


图 4 抑制剂槲皮素 (A)、山柰酚 (B) 与甘草查尔酮 A (C) 的剂量依赖性曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

Fig. 4 Dose-dependent curves of inhibitors quercetin (A), kaempferol (B), and licochalcone A (C) ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

表 1 抑制剂山柰酚、槲皮素与甘草查尔酮在人肝微粒体中 IC₅₀ 与 K_i 值

Table 1 IC₅₀ and K_i values of inhibitor kaempferol, quercetin, and licochalcone A in human liver microsomes

| 抑制剂 | IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹) | K _i /(μmol·L ⁻¹) | 抑制类型 |
|---------|---|---|------|
| 山柰酚 | 1.01 ± 0.26 | 0.36 | 非竞争型 |
| 槲皮素 | 4.65 ± 0.51 | 0.23 | 混合型 |
| 甘草查尔酮 A | 5.34 ± 1.00 | 0.18 | 竞争型 |

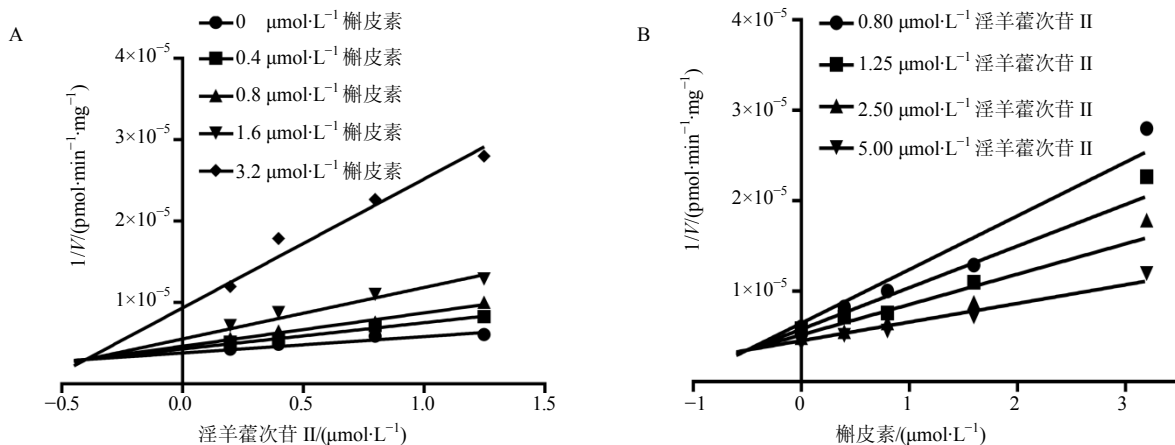


图 5 抑制剂槲皮素的 Dixon 图 (A) 与 Lineweaver-Burk 图 (B) 结果 ($n = 2$)

Fig. 5 Dixon plot (A) and Lineweaver-Burk plot (B) of inhibitory effects of quercetin ($n = 2$)

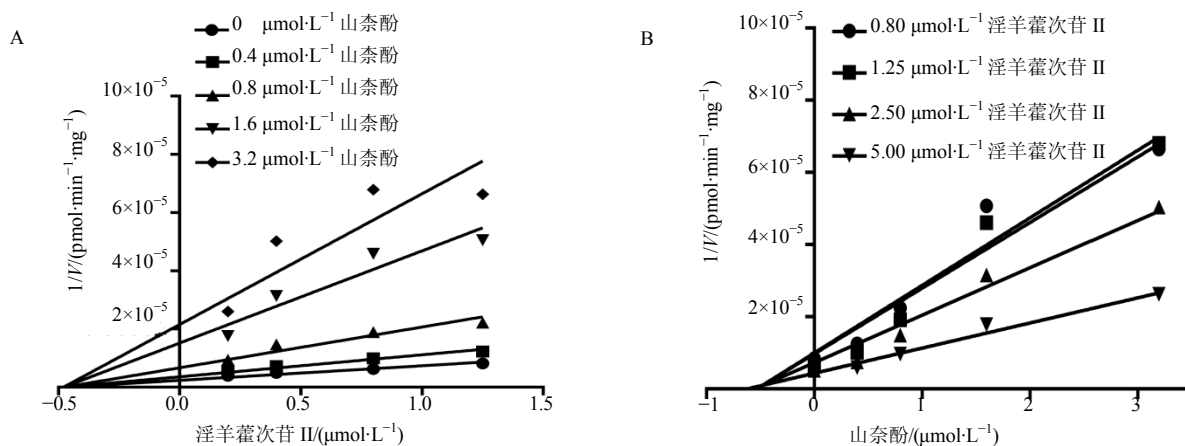


图6 抑制剂山奈酚的 Dixon 图 (A) 与 Lineweaver-Burk 图 (B) 结果 (n = 2)

Fig. 6 Dixon plot (A) and Lineweaver-Burk plot (B) of inhibitory effects of kaempferol (n = 2)

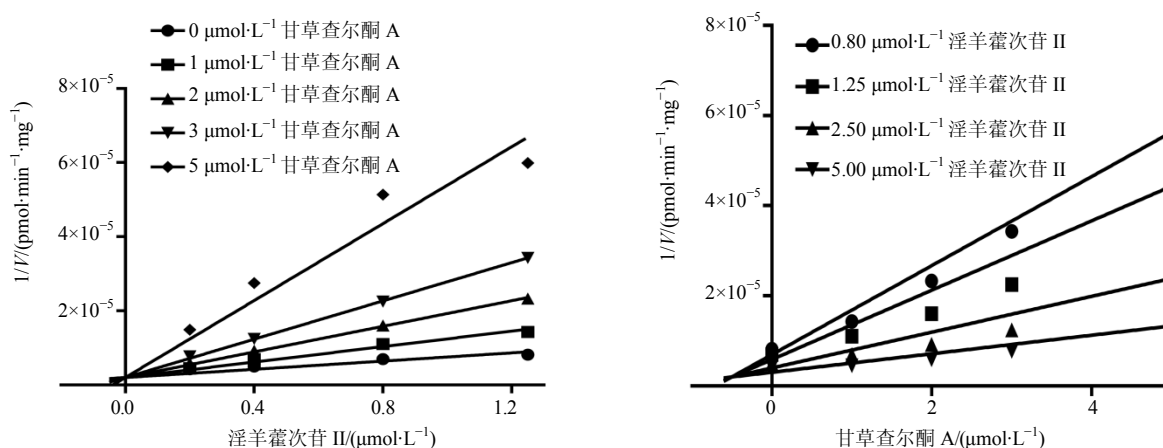


图7 抑制剂甘草查尔酮 A 的 Dixon 图与 Lineweaver-Burk 图结果 (n = 2)

Fig. 7 Lineweaver-Burk plot and Dixon plot of inhibitory effects of licochalcone A (n = 2)

响。淫羊藿次苷 II 属于黄酮类化合物, 研究证实, 多种黄酮类化合物联合使用时, 其中的一种或者几种黄酮类化合物会对另一黄酮化合物的动力学产生影响, 使其生物利用度得到改善^[14], 因此本实验抑制剂的选择主要以黄酮类化合物为主。

虽然有文献报道和实验室未发表数据表明上述 9 种化合物均是葡萄糖醛酸化反应的抑制剂^[15-22], 但代谢酶抑制剂存在底物选择性, 底物不同, 抑制剂对代谢酶的抑制能力不同。代谢研究的实验动物模型选择关系到预测人体内情况的准确性, 故本研究首先对以上 9 种化合物在不同种属肝微粒体及人肠微粒体中对淫羊藿次苷 II 葡萄糖醛酸化反应的抑制能力进行初筛, 对化合物的抑制能力进行评价, 为进一步体内实验动物模型的选择提供参考信息。在人、大鼠、小型猪、猴肝微粒体及人肠微粒体中,

山奈酚、槲皮素、草质素及甘草查尔酮 A 均对淫羊藿次苷 II 的葡萄糖醛酸化反应有较强的抑制作用, IC₅₀ 估算值均在 10 μmol/L 以下。草质素虽然抑制能力强, 但体外试验时发现, 将草质素加入反应体系后会使体系颜色发生明显变化, 由于机制不明确, 因此不将其纳入下一步抑制机制的研究范围内。

代谢性药物-药物相互作用是一把“双刃剑”, 对于治疗窗窄且通过单一酶代谢的药物而言, 与其代谢酶抑制剂合用后往往会引起毒副作用增加, 导致治疗失败; 但其也可以被积极利用, 特别是针对一些受首过效应影响显著导致生物利用度偏低的药物而言, 与代谢酶抑制剂合用后生物利用度会得到明显改善。Basu 等^[23]利用姜黄素抑制霉酚酸的葡萄糖醛酸化反应, 最终使霉酚酸的游离药物浓度提高了 6 到 9 倍。本研究结果显示, 山奈酚、槲皮素及

甘草查尔酮A对于淫羊藿次苷II在微粒体中的葡萄糖醛酸化反应均具有较强的抑制作用,在人肝微粒体中的K_i值分别达到了0.36、0.23、0.18 μmol/L。尽管体外结果表明三者均能降低淫羊藿次苷II的代谢速率,与淫羊藿次苷II合用后有可能改善其生物利用度。但体外实验结果只是提供了一个选择的方向,并不能完全反应体内的真实情况,因此,三者分别与淫羊藿次苷II合用后是否能够提高其生物利用度还需进一步体内实验的验证。

参考文献

- [1] 韩广轩,王麦莉,张军东,等.淫羊藿化学成分研究进展[J].药学实践杂志,2002,20(6):359-361.
- [2] Ma H, He X, Yang Y, *et al.* The genus *Epimedium*: an ethnopharmacological and phytochemical review [J]. *J Ethnopharmacology*, 2011, 134(3): 519-541.
- [3] 韩惠,单淇,周福军,等.淫羊藿中活性成分的代谢产物研究进展[J].现代药物与临床,2013,28(1):78-82.
- [4] 徐文芬,杨雯,何顺志,等.一测多评法测定淫羊藿中淫羊藿苷和朝藿定A、B、C[J].中草药,2016,47(1):130-137.
- [5] 刘铁汉,王毅,王本祥,等.淫羊藿苷的肠菌代谢研究I.肠内细菌对淫羊藿苷的代谢转化[J].中草药,2000,31(11):834-837.
- [6] 翟远坤,葛宝丰,陈克明,等.淫羊藿苷与其代谢产物淫羊藿次苷II对骨髓间充质干细胞成骨性分化影响的比较研究[J].中药材,2010,33(12):1896-1900.
- [7] 韩惠,单淇,周福军,等.淫羊藿中活性成分的代谢产物研究进展[J].现代药物与临床,2013,28(1):78-81.
- [8] 周欣,翟所迪.选择性磷酸二酯酶5抑制剂治疗阴茎勃起功能障碍的临床评价[J].中国医院用药评价与分析,2009,9(6):408-410.
- [9] Wang H, Liu Y, Huai Q, *et al.* Multiple conformations of phosphodiesterase-5: implications for enzyme function and drug development [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(30): 21469-21479.
- [10] Cheng T, Zhang Y, Zhang T, *et al.* Comparative pharmacokinetics study of icariin and icariside II in rats [J]. *Molecules*, 2015, 20(12): 21274-21286.
- [11] Zhao H, Fan M, Fan L, *et al.* Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of metabolites in rats after administration of prenylflavonoids from *Epimediums* [J]. *J Chromatography B*, 2010, 878(16): 1113-1124.
- [12] Rowland A, Miners J O, Mackenzie P I. The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(6): 1121-1132.
- [13] Tukey R H, Strassburg C P. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2000, 40(1): 581-616.
- [14] Moon Y J, Morris M E. Pharmacokinetics and bioavailability of the bioflavonoid biochanin A: effects of quercetin and EGCG on biochanin A disposition in rats [J]. *Mol Pharm*, 2007, 4(6): 865-872.
- [15] Gufford B T, Chen G, Vergara A G, *et al.* Milk Thistle Constituents Inhibit Raloxifene Intestinal Glucuronidation: A Potential Clinically Relevant Natural Product-Drug Interaction [J]. *Drug Metab Dispos*, 2015, 43(9): 1353-1359.
- [16] Sridar C, Goosen T C, Kent U M, *et al.* Silybin inactivates cytochromes P450 3A4 and 2C9 and inhibits major hepatic glucuronosyltransferases [J]. *Drug Metab Dispos*, 2004, 32(6): 587-594.
- [17] Breinholt V M, Offord E A, Brouwer C, *et al.* *In vitro* investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids [J]. *Food Chem Toxicol*, 2002, 40(5): 609-616.
- [18] Zhou H, Shi R, Ma B, *et al.* CYP4501A2 and multiple UGT1A isoforms are responsible for jatrorrhizine metabolism in human liver microsomes [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2013, 34(3): 176-185.
- [19] Stachel N, Skopp G. Formation and inhibition of ethyl glucuronide and ethyl sulfate [J]. *Forensic Sci Int*, 2016, 265: 61-64.
- [20] Williams J A, Ring B J, Cantrell V E, *et al.* Differential modulation of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1)-catalyzed estradiol-3-glucuronidation by the addition of UGT1A1 substrates and other compounds to human liver microsomes [J]. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30(11): 1266-1273.
- [21] Xin H, Qi X Y, Wu J J, *et al.* Assessment of the inhibition potential of Licochalcone A against human UDP-glucuronosyltransferases [J]. *Food Chem Toxicol*, 2016, 90: 112-122.
- [22] Singh J, Dubey R K, Atal C K. Piperine-mediated inhibition of glucuronidation activity in isolated epithelial cells of the guinea-pig small intestine: evidence that piperine lowers the endogeneous UDP-glucuronic acid content [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1986, 236(2): 488-493.
- [23] Basu N K, Kole L, Basu M, *et al.* Targeted inhibition of glucuronidation markedly improves drug efficacy in mice—a model [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 360(1): 7-13.