

吴茱萸次碱对5种黄连生物碱大鼠体外肝代谢的抑制作用

薛宝娟, 李志慧, 张玉杰*, 苏瑾, 叶静, 魏宝红, 杨晓燕, 孙桂霞

北京中医药大学中药学院, 北京 100102

摘要: **目的** 考察吴茱萸主要成分吴茱萸次碱对黄连中5种生物碱肝代谢的抑制作用, 为深入研究黄连吴茱萸药对配伍机制提供依据。**方法** 采用大鼠体外肝微粒体温孵法, 考察吴茱萸次碱对黄连中5种生物碱(黄连碱、表小檗碱、小檗碱、巴马汀和药根碱)肝代谢的抑制作用。**结果** 吴茱萸次碱对黄连碱、表小檗碱、小檗碱、巴马汀、药根碱均存在体外肝代谢抑制作用, 半数抑制浓度(IC_{50})均大于50 $\mu\text{mol/L}$, 表现为体外弱抑制作用; 抑制常数(K_i)的差异性具有统计学意义($P < 0.05$), 抑制作用强弱程度顺序为小檗碱>药根碱>巴马汀>表小檗碱>黄连碱。**结论** 为了解吴茱萸对黄连生物碱主要作用环节和揭示黄连吴茱萸药对配伍机制提供依据。

关键词: 吴茱萸次碱; 黄连生物碱; 体外肝代谢; 黄连碱; 表小檗碱; 小檗碱; 巴马汀; 药根碱

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)09-1293-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.09.018

Inhibition of rutaecarpine on *in vitro* hepatic metabolism of five *Coptis* alkaloids in rats

XUE Bao-juan, LI Zhi-hui, ZHANG Yu-jie, SU Jin, YE Jing, WEI Bao-hong, YANG Xiao-yan, SUN Gui-xia

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: Objective To investigate the inhibition of rutaecarpine, a main component in *Evodiae Fructus*, on the hepatic metabolism of five *Coptis* alkaloids, and to provide the basis for further study of compatibility mechanism between *Coptidis Rhizoma* and *Evodiae Fructus*. **Methods** Using rat liver microsome incubation method, the inhibition of rutaecarpine on hepatic metabolism of five *Coptis* alkaloids *in vitro* was investigated. **Results** Rutaecarpine could inhibit the *in vitro* hepatic metabolisms of coptisine, epiberberine, berberine, palmatine, and jatrorrhizine. The half inhibitory concentration (IC_{50}) was all greater than 50 $\mu\text{mol/L}$ which showed rutaecarpine had a weak inhibition on *Coptis* alkaloids. The differences of inhibition constant (K_i) were statistically significant ($P < 0.05$). The order of inhibited extent was as follows: berberine > jatrorrhizine > palmatine > epiberberine > coptisine. **Conclusion** The results could provide the basis to learn the major role on the links that *Evodiae Fructus* acted on *Coptis* alkaloids and reveal the compatibility mechanism between *Coptidis Rhizoma* and *Evodiae Fructus*.

Key words: rutaecarpine; *Coptis* alkaloids; *in vitro* hepatic metabolism; coptisine; epiberberine; berberine; palmatine; jatrorrhizine

黄连和吴茱萸配伍使用已有悠久历史, 二药一寒一热, 相反相成^[1]。黄连主要成分为异喹啉型生物碱, 包括黄连碱(COP)、表小檗碱(EPI)、小檗碱(BER)、巴马汀(PAL)、药根碱(JAT)等, 吴茱萸次碱(RUT)为吴茱萸的主要成分。近年来的研究发现, 黄连与吴茱萸成分间存在明显的药理学相互作用^[2-3]。黄连生物碱主要在肝脏代谢^[4], 吴茱萸成分中的RUT能选择性抑制大鼠和人肝微粒体酶的活性^[5-9], 吴茱萸成分对BER的大鼠肝代谢具

有抑制作用。由于不同黄连生物碱存在明显肠吸收的选择性^[10], 因此推测吴茱萸对黄连各生物碱肝代谢应存在抑制作用并具有选择性。

本实验采用大鼠体外肝微粒体温孵代谢模型, 通过获得半数抑制浓度(IC_{50})及抑制常数(K_i)值, 判断RUT对黄连中5种生物碱成分(COP、EPI、BER、PAL、JAT)是否具有体外代谢性抑制作用及强弱程度, 比较RUT对这5种生物碱抑制作用的差异性。

收稿日期: 2013-09-02

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81073140, 81274177)

作者简介: 薛宝娟(1981—), 女, 博士研究生, 从事生物药剂学与药代动力学研究。E-mail: baojuanx@126.com

*通信作者 张玉杰 Tel: (010)84738618 E-mail: zhyj227@126.com

1 仪器与材料

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪, 四元梯度洗脱系统, 在线真空脱气机, UV-Vis 检测器, 岛津色谱工作站; F8 型超细匀浆机 (德国 Fluko); Biofuge stratos 台式高速冷冻离心机 (德国 Heraeus); G-16 型高速离心机 (北京白洋离心机厂)。

盐酸黄连碱 (批号 must-12111602)、盐酸小檗碱 (批号 must-12111601), 质量分数均 $\geq 98\%$, 购自成都曼思特生物技术有限公司; 对照品盐酸小檗碱 (批号 110713-200208)、盐酸巴马汀 (批号 732-8701)、盐酸药根碱 (批号 733-8701)、RUT (批号 110801-200304), 质量分数均 $\geq 98\%$, 购自中国食品药品检定研究院; 非那西丁 (PHE)、氧化型辅酶 II (NADPN_2)、*D*-葡萄糖-6-磷酸二钠 (G-6-P) 和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 v (G-6-PDH), 均购自北京拜耳迪物技术有限公司 (Sigma 公司分装); 牛血清白蛋白 (批号 A7906), 购自 Sigma 公司。乙腈、甲醇为色谱纯; 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯试剂。清洁级雄性 SD 大鼠, 体质量 (220 ± 20) g, 由北京维通利华实验动物中心提供。编号 SCXK (京) 2012-0001。

2 方法与结果

2.1 HPLC 色谱条件

色谱柱为 Venusil ASB C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-30 mmol/L 乙酸铵水溶液, 梯度洗脱: 0~20 min, 10%~70%乙腈; 20~35 min, 70%~55%乙腈; 35~36 min, 55%~90%乙腈; 36~43 min, 90%乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 270 nm。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取黄连各生物碱对照品适量, 加甲醇溶解制成各生物碱不同浓度系列溶液 (COP: 2.2~110.4 $\mu\text{mol/L}$; EPI: 2.3~115.6 $\mu\text{mol/L}$; BER: 1.8~115.2 $\mu\text{mol/L}$; PAL: 2.2~120.6 $\mu\text{mol/L}$; JAT: 1.9~110.8 $\mu\text{mol/L}$)。

2.3 内标溶液的制备

精密称取 PHE 对照品适量, 加甲醇溶解配成浓度为 3.74 mmol/L 内标溶液。

2.4 NADPH-发生系统的制备

精密称取 NADPN_2 、G-6-P、G-6-PDH、 MgCl_2 适量, 加水定量溶解, 即得含 2 mmol/L NADPN_2 、20 mmol/L G-6-P、4 U/L G-6-PDH、40 mmol/L MgCl_2 的 NADPH-发生系统。

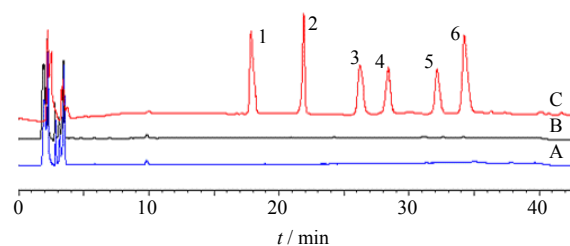
2.5 样品溶液制备

参照文献方法^[1]制备大鼠肝微粒体。分别精密吸取 RUT 溶液于 PE 管中, 氮气吹干甲醇, 加入含大鼠肝微粒体 (蛋白质量浓度为 1.0 mg/mL) 的 Tris-HCl 缓冲液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴振荡预温孵 5 min, 分别加入 COP、EPI、BER、PAL 和 JAT, 加入 200 μL NADPH-发生系统启动反应, 温孵终体积为 0.4 mL, 体系中含 RUT 的初始浓度分别为 0、25、50、100、150 $\mu\text{mol/L}$, 各生物碱的初始浓度依次为 5.6、11.2、22.4 $\mu\text{mol/L}$ 。温孵 30 min 后, 立即按 1:3 的比例加入冰甲醇终止反应, 加入 7.5 μL 的 PHE 溶液。于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液 N_2 吹干, 加甲醇 400 μL 复溶, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、27 000 r/min 离心 20 min, 取上清 20 μL 进样, 进行 HPLC 分析。

2.6 方法学考察

按照“2.5”项方法分别制备各生物碱样品溶液和空白溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 测得 5 种黄连生物碱 HPLC 图 (图 1)。结果 PHE 与黄连各生物碱峰形良好, 分离完全, 肝微粒体色谱图中也未见杂质峰干扰。

各生物碱在相应浓度范围内线性关系良好; 精密密度试验 RSD 在 0.42%~4.16%, 回收率在 91.29%~110.49%; 各生物碱样品溶液室温放置 15 h 未发生明显变化, 符合生物样本测定要求。



A-空白肝微粒体 B-RUT 对照品 C-肝微粒体+黄连生物碱+PHE+RUT 1-JAT 2-PHE 3-EPI 4-JAT 5-PAL 6-BER
A-blank rat liver microsome B-RUT C-blank rat liver microsome + Coptis alkaloids + PHE + RUT 1-JAT 2-PHE 3-EPI 4-JAT 5-PAL 6-BER

图 1 5 种黄连生物碱大鼠肝微粒体孵育液的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of rat liver microsome incubated solutions of five *Coptis* alkaloids

2.7 RUT 对黄连生物碱体外肝代谢的影响

2.7.1 RUT 对黄连生物碱的 IC_{50} 值 固定黄连各生物碱浓度均为 22.4 $\mu\text{mol/L}$, 按照“2.5”项方法操作, 测定孵育液中黄连各生物碱剩余浓度, 计算黄连各生物碱代谢速率 (V), 并在此基础上计算黄连各生

物碱代谢抑制率 (I), 观察 RUT 对黄连各生物碱的抑制能力。

$$V = (C_t - C_0) / (\rho \cdot t)$$

$$I = (V_0 - V_t) / V_0$$

C_0 为温孵体系中黄连各生物碱初始浓度 ($\mu\text{mol/L}$), C_t 为 t (min) 时体系中黄连各生物碱剩余浓度 ($\mu\text{mol/L}$), ρ 为大鼠肝微粒体蛋白质量浓度 (g/L), V_0 为空白组 V , V_t 为各给药组 V

将 I 对 RUT 浓度进行对数曲线拟合, 计算 IC_{50} , 结果见图 2。可知, COP 和 EPI 的 IC_{50} 值均 $>100 \mu\text{mol/L}$, BER、PAL 和 JAT 的 IC_{50} 值均在 $50 \sim 100 \mu\text{mol/L}$, 见表 1。

2.7.2 RUT 对黄连生物碱的表观 K_i 的测定 以 RUT

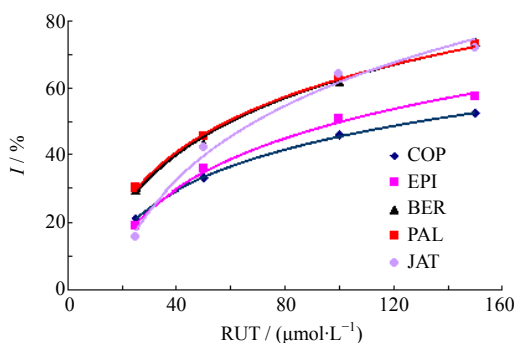


图 2 不同浓度 RUT 对黄连生物碱代谢抑制率曲线图 ($n=5$)

Fig. 2 Curves of metabolic inhibitory rate of RUT with different concentration on *Coptis* alkaloids ($n=5$)

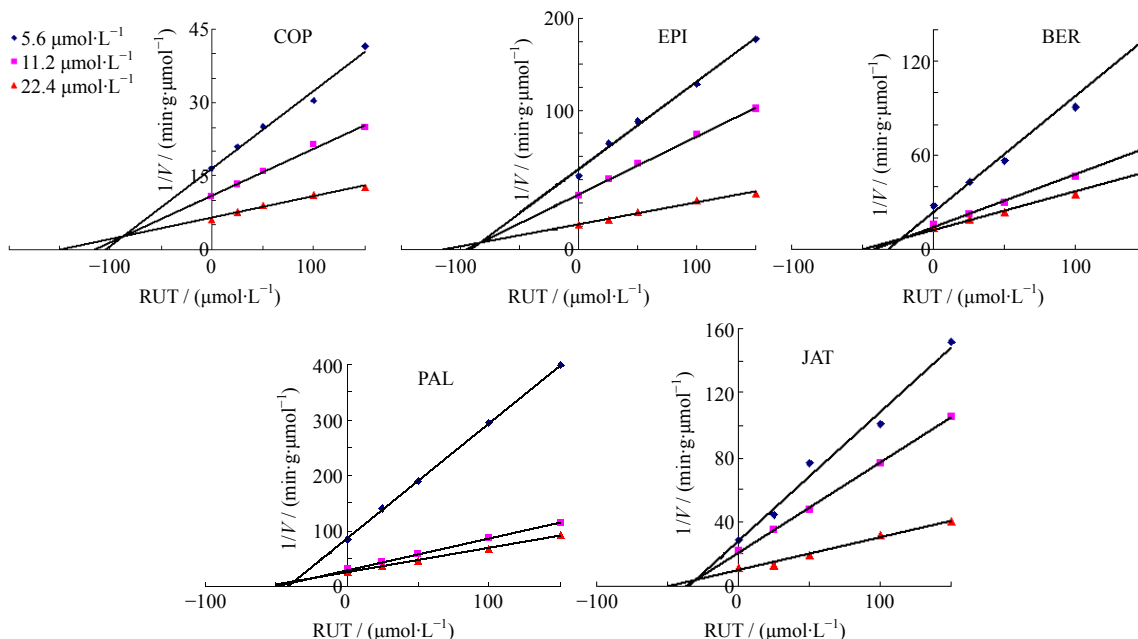


图 3 RUT 对各黄连生物碱代谢的抑制作用 ($n=5$)

Fig. 3 Inhibition of RUT on metabolism of each *Coptis* alkaloid ($n=5$)

表 1 RUT 对 5 种黄连生物碱肝代谢抑制作用的 IC_{50} 和 K_i 值 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 IC_{50} and K_i of RUT against hepatic metabolism of five *Coptis* alkaloids ($\bar{x} \pm s, n=5$)

生物碱	$\text{IC}_{50} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$K_i / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
COP	>100	$88.203 \pm 1.586^{*n***}$
EPI	>100	$83.161 \pm 0.515^{*n***}$
BER	>50	$22.561 \pm 0.718^{***}$
PAL	>50	$37.066 \pm 0.726^{*n**}$
JAT	>50	$30.842 \pm 0.299^{*n**}$

与 COP 比较: $*P < 0.05$; 与 EPI 比较: $^{*}P < 0.05$; 与 BER 比较: $^{**}P < 0.05$; 与 PAL 比较: $^{***}P < 0.05$; 与 JAT 比较: $^{***}P < 0.05$

$^{*}P < 0.05$ vs COP group; $^{*}P < 0.05$ vs EPI group; $^{**}P < 0.05$ vs BER group; $^{***}P < 0.05$ vs PAL group; $^{***}P < 0.05$ vs JAT group

存在下的黄连各生物碱 V 的倒数对 RUT 浓度作 Dixon 图, 进行线性回归。横坐标为 RUT 浓度, 纵坐标为黄连各生物碱 V 的倒数 ($1/V$), 1 种黄连生物碱浓度得 1 条回归曲线, 不同黄连生物碱浓度所得直线交点得横坐标值即为 K_i 值, 如图 3 所示。 K_i 值越小表明抑制能力越强。

由以上实验结果, 得到 RUT 对 5 种黄连生物碱成分的体外肝代谢 K_i 。RUT 对各生物碱抑制作用实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。RUT 对各生物碱 K_i 实验数据采用 SPSS Statistics 17.0 统计软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 同时进行多重比较 (LSD), $P < 0.05$ 有统计学意义, 见表 1。

实验结果表明, RUT 对 5 种黄连生物碱成分均存在体外弱抑制作用, 且对这 5 种母核相同取代基不同的异喹啉类生物碱抑制作用的差异性具有统计学意义。由 IC_{50} 结果可知, RUT 对黄连各生物碱均为体外弱抑制作用; 其对 5 种黄连生物碱成分 K_i 的强弱顺序为 $BER > JAT > PAL > EPI > COP$ 。因此, 推测母核相同取代基不同是 RUT 对异喹啉生物碱成分肝代谢抑制作用存在差异性的原因之一。

3 讨论

中药药效缓慢, 效力温和, 服用时间长。采用体外实验模拟体内代谢过程, 酶抑制和酶诱导均需要一定的时间。为此本课题组前期对药物与肝微粒体温孵时间进行了考察, 结果表明, 在相同的底物浓度和微粒体蛋白浓度温孵条件下, COP、EPI、BER、PAL、JAT 分别在 30、40、60、40、40 min 内呈时间依赖性线性消除, 从而选择的最佳温孵时间均为 30 min。因此本课题在此基础上选择体外肝微粒体温孵时间为 30 min。

影响药物代谢的主要因素是药物代谢酶活性的改变, 诱导和抑制代谢酶是药物相互作用的主要机制^[12]。经诱导的酶大大增加其底物的生物转化率, 从而缩短该底物的体内药理作用时间; 反之, 酶的活性被抑制后, 该底物代谢清除率减慢, 使其疗效作用时间延长^[13]。一般认为, 通过抑制酶活性发生的药物代谢性相互作用的比例远大于诱导酶活性发生的作用^[14]。研究药物体外代谢性相互作用, IC_{50} 和 K_i 值是 2 个重要的参数, 一般认为 IC_{50} 值 $< 1 \mu\text{mol/L}$, 表现为强的抑制能力; $IC_{50} > 50 \mu\text{mol/L}$, 则抑制能力很弱^[15]。

有研究报道, RUT 对大鼠和人 CYP450 酶系有选择性抑制作用^[6], 且研究证实黄连生物碱类成分为 CYP450 酶的底物^[4]。本实验通过研究 RUT 对黄连生物碱体外肝代谢的影响可知: RUT 对 5 种黄连生物碱体外肝代谢存在抑制作用, 且均为体外弱抑制; RUT 对这 5 种母核相同取代基不同的异喹啉类生物碱成分抑制作用的强弱程度不同。

以此推测, 吴茱萸中的 RUT 成分对黄连中的异喹啉类生物碱肝代谢可能因结构不同产生差异性; 进一步推测, RUT 通过特异性抑制 CYP450 酶的活性, 从而使黄连生物碱成分的代谢速率减慢以及代谢程度减小。由于黄连这 5 种生物碱成分具有多种代谢途径, 且 RUT 对 CYP450 酶的作用机制尚不明确, 因此这种代谢性抑制作用是否具有特异性有待

进一步研究。尽管药物体内代谢错综复杂, 药物体外代谢研究不能与体内完全一致。但通过本实验的研究为阐明黄连吴茱萸药对配伍机制, 揭示连萸药对代谢性相互作用产生的原理提供依据, 且对于连萸药对配伍在临床上的应用具有指导意义。

参考文献

- [1] 孙星衍. 神农本草经 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982.
- [2] 王 静, 袁子民, 张振秋. 黄连、吴茱萸药对中盐酸小檗碱在大鼠体内的药代动力学研究 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(5): 755-759.
- [3] 孙万晶. 基于小肠特殊转运方式探讨黄连吴茱萸药对配伍机理 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2007.
- [4] Han Y L, Yu H L, Li D, *et al.* *In vitro* inhibition of Huanglian [*Rhizoma coptidis* (L.)] and its six active alkaloids on six cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes [J]. *Phytother Res*, 2011, 25(11): 1660-1665.
- [5] Ueng Y F, Jan W C, Lin L C, *et al.* The alkaloid rutaecarpine is a selective inhibitor of cytochrome P450 1A in mouse and human liver microsomes [J]. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30(3): 349-353.
- [6] 曹亚杰, 曹 伟, 余 奇, 等. 吴茱萸次碱在人肝微粒体中对细胞色素 P450 酶的抑制作用 [J]. 中南药学, 2005, 3(4): 243-245.
- [7] Chatterjee P, Franklin M R. Human cytochrome P450 inhibition and metabolic-intermediate complex formation by goldenseal extract and its methylenedioxyphenyl components [J]. *Drug Metab Dispos*, 2003, 31(11): 1391-1397.
- [8] Iwata H, Tezuka Y, Kadota S, *et al.* Mechanism-based inactivation of human liver microsomal CYP3A4 by rutaecarpine and limonin from *Evaodia* fruit extract [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2005, 20(1): 34-45.
- [9] 黄 果, 李凯鹏, 杨 洁, 等. 黄连与吴茱萸合用大鼠体外肝代谢研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(5): 651-653.
- [10] Suzuki H, Tanabe H, Mizukami H, *et al.* Selective regulation of multidrug resistance protein in vascular smooth muscle cells by the isoquinoline alkaloid coptisine [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(4): 677-682.
- [11] 徐叔云, 卞如濂, 陈 修. 药理实验方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [12] 王宇光. 基于药物代谢酶的中药相互作用研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2006.
- [13] 刘高峰, 郭兴蕾. 中药对细胞色素 P450 调控作用的研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(1): 139-143.
- [14] 刘 萍, 边 强. 细胞色素 P450 酶系对药物生物转化的作用 [J]. 国外医药: 合成药生化药制剂分册, 2000, 21(5): 305-308.
- [15] 谈恒山, 魏 臻. 药物相互作用的研究方法应用进展 [J]. 药物与临床研究, 2010, 18(6): 507-512.