

阿卡宁的氧葡萄糖醛酸化代谢通路研究

何桂元^{1,2}, 李妍¹, 葛广波¹, 李世阳¹, 宁静¹, 贵林³, 杨凌^{1*}

1. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023

2. 中国科学院大学, 北京 100049

3. 大连医科大学, 辽宁 大连 116044

摘要: **目的** 对紫草素的立体异构单体阿卡宁的氧葡萄糖醛酸化代谢通路进行研究和表征。**方法** 采用液相色谱和质谱联用方法检测阿卡宁和其葡萄糖醛酸化代谢产物; 将阿卡宁在人肝微粒体 (HLM)、人肾微粒体 (HKM) 以及重组人类葡萄糖醛酸转移酶 (UGT) 中孵育, 观察代谢轮廓、筛选参与催化的重组单酶、考察酶动力学; 通过相关性分析以及化学抑制实验阐明 UGT 单酶对阿卡宁的选择性。**结果** 阿卡宁在含尿苷 5'-二磷酸葡萄糖醛酸 (UDPGA) 的 HLM 孵育中, 可以检测到 1 个 UGT 代谢产物。UGT 单酶筛选发现 UGT1A9 高选择性催化阿卡宁。酶动力学研究显示在 HLM、HKM 和 UGT1A9 中阿卡宁的 UGT 代谢都呈底物抑制模式, 并且表观亲和常数 (K_m) 在 3.75~4.50 $\mu\text{mol/L}$ 。阿卡宁和已知 UGT1A9 探针底物异丙酚在 12 例个体人肝中的 UGT 代谢具有很好的相关性, R^2 为 0.88。化学抑制实验显示在 HLM 中, 厚朴酚和尼氟灭酸对阿卡宁的 UGT 代谢具有明显的抑制作用; 睾酮、雷公藤红素和尼罗替尼对阿卡宁的 UGT 代谢均无明显抑制作用。**结论** UGT 代谢是阿卡宁 (紫草素) 在人体的重要代谢途径之一, 阿卡宁是人类 UGT1A9 的一个高选择性探针底物。

关键词: 阿卡宁; 葡萄糖醛酸转移酶; UGT1A9; 氧葡萄糖醛酸化代谢; 紫草素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)11-2242-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.11.015

Study on *O*-glucuronidation pathways of alkannin

HE Gui-yuan^{1,2}, LI Yan¹, GE Guang-bo¹, LI Shi-yang¹, NING Jing¹, GUI Lin³, YANG Ling¹

1. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3. Dalian Medical University, Dalian 116044, China

Abstract: Objective To investigate and characterize the *O*-glucuronidation pathways of the *S*-stereoisomer of shikonin (alkannin). **Methods** Liquid chromatography and mass spectrometry were employed for the detection of alkannin and its glucuronide. The incubation of alkannin in human liver microsomes (HLM), human kidney microsomes (HKM) and recombinant human UDP-glucuronyltransferases (UGT) were employed for the study of metabolism profile, the involved UGT isoforms and kinetic analysis. Recombinant human UGT screening, correlation study and chemical inhibition experiments were used for elucidation the selectivity of UGT isoform towards alkannin. **Results** In the incubation of alkannin in HLM with the presence of UDPGA, a single UGT metabolite was detected. The screening of the recombinant human UGTs found that UGT1A9 high selectively catalyzed the glucuronidation of alkannin. Kinetic analysis revealed the kinetic of alkannin in HLM, HKM and recombinant UGT1A9 all followed substrate inhibition model and the K_m values were 3.75—4.50 $\mu\text{mol/L}$. The glucuronidation of alkannin and propofol, a probe substrate of UGT1A9, in 12 individual HLM showed really good correlation, the correlation coefficient R^2 was 0.88. Chemical inhibition experiments indicated that HLM magnolol and niflumic acid showed obvious inhibition to alkannin glucuronidation; Testosterone, celastrol, and nilotinib did not inhibit alkannin glucuronidation. **Conclusion** This study finds that UGT metabolism is an important metabolism pathway of alkannin in human, and alkannin is a highly selective probe substrate of human UGT1A9.

Key words: alkannin; UDP-glucuronyltransferases; UGT1A9; *O*-glucuronidation; shikonin

收稿日期: 2016-11-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81273590, 81473181)

作者简介: 何桂元 (1975—), 女, 在读博士, 研究方向为药物代谢。Tel: 15241137665 E-mail: guiyuanhe@dicp.ac.cn

*通信作者 杨凌, 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为药物早期 ADME/Tox 属性评价。Tel: (0411)84379317 E-mail: yling@dicp.ac.cn

紫草素是从紫草 *Arnebiae Radix* 的根部提取而来的天然化合物,兼具食品添加剂和药用价值。在中国和澳大利亚等一些国家紫草素被食品和化妆品行业作为添加剂而广泛使用。在中国紫草素用于食品和饮料中的最大允许添加剂量为 100 mg/kg^[1]。天然的紫草素是一对手性化合物的消旋体,分别被称作 shikonin (*R*型)和阿卡宁(alkannin, *S*型)。现代药理学研究发现紫草素具有抗癌、抗炎、抗病毒、抗氧化、促进创伤愈合的作用等^[2-4]。研究发现紫草素 2 个立体异构体在促进创伤愈合、抗微生物、抗炎、抗氧化和抗血栓形成方面的生物活性并没有明显的立体异构选择性^[5-6]。同时研究还发现阿卡宁是一种热休克蛋白 70 (HSP70) 的诱导剂,可以保护角质化细胞对抗紫外线诱导下发生的细胞凋亡^[7]。

动物实验研究发现紫草素在小鼠中的口服生物利用度仅为 34.3%^[8], im 给药的生物利用度为 64.7%。这说明紫草素在经过肠道和肝脏途径进入血液循环发生了明显的首关效应。紫草素在小鼠中的主要排泄方式为尿液和粪便排泄,各占给药剂量的 40%左右,其中紫草素原型仅占排泄物中量的 7.7%和 3.6%。这说明紫草素在体内发生了广泛的代谢。而 Li 等^[9]对紫草素在大鼠体内的代谢研究发现,紫草素在大鼠体内代谢迅速,在胆汁和尿液中都有羟化产物和葡萄糖醛酸化代谢产物的生成。体外研究表明紫草素在肝微粒体中孵育可以生成 3 个主要的羟化产物^[10]。化合物的羟化反应在体内一般多由 I 相代谢的细胞色素 P450 酶(CYP450)所催化。从分子结构上分析,紫草素是萘醌类的化合物,含有 3 个羟基,羟基在人体内经常会被 II 相代谢的葡萄糖醛酸转移酶(UGT)所识别并发生氧葡萄糖醛酸化代谢。

UGT 家族是人体内仅次于 CYP450 家族的第 2 大药物代谢酶^[11]。UGT 介导的葡萄糖醛酸结合代谢不仅会显著影响药物的口服生物利用度和药物的体内药动学过程,同时还与一些临床药物-药物相互作用、药物-草药相互作用、药物-食物相互作用,以及高胆红素血症、癌症、自身免疫性肝炎等多种疾病的发生发展密切相关。UGT 催化的葡萄糖醛酸化代谢反应是以尿苷 5'-二磷酸葡萄糖醛酸(UDPGA)为葡萄糖醛酸的供体将一分子的葡萄糖醛酸转移到含有羟基、羧基、氨基、巯基以及酸性碳原子等基团的脂溶性小分子底物上。葡萄糖醛酸和小分子底物的结合使这些脂溶性小分子底物的

水溶性得到改善,进而更容易被排出体外^[12]。本研究旨在利用体外代谢的方法来研究紫草素的 *S*-异构单体阿卡宁在人体的 UGT 代谢,并对其氧葡萄糖醛酸化代谢通路进行表征。

1 材料和方法

1.1 化学试剂

阿卡宁(质量分数>98%)为实验室从商业化购买的紫草素(质量分数>98%,批号 160318,购于成都普菲德生物技术有限公司)通过手型分离纯化所得。厚朴酚(质量分数>98%,批号 151009)、雷公藤红素(质量分数>98%,批号 16060102),均购于成都普菲德生物技术有限公司;尼罗替尼(质量分数>98%,批号 N-0325015)购于西恩思试剂公司;Brij58、氯化镁、崔氏缓冲盐、UDPGA(尿苷 5'-二磷酸葡萄糖醛酸三钠盐)、二甲基亚砜(DMSO)、牛血清白蛋白(BSA)、睾酮(质量分数>98%)、尼氟灭酸、葡萄糖 6-磷酸脱氢酶、NADP⁺和 *D*-葡萄糖-6-磷酸盐均购自 Sigma-Aldrich(美国)。异丙酚购于百灵威公司;异丙酚 UGT 代谢产物购于 Toronto Research Chemicals(加拿大)。实验所使用的色谱流动相乙腈购于 Tedia(美国),甲酸购于 Sigma-Aldrich(美国),其余试剂均为色谱级或商业化所能购买到的最高级别。

华谱 S-Chiral B 手性化合物分离柱为大连化学物理研究所 1803 组借用。

1.2 酶源

混合人肝微粒体(HLM, $n=11$, Lot. DXOV)和 12 例个体人肝微粒体购于上海肝脏疾病研究所。混合人肾微粒体(HKM, $n=5$, Lot. FPU)购于 Celsis 试剂公司(美国)。12 种表达于昆虫细胞的人类重组 UGT 单酶(UGT1A1、1A3、1A4、1A6、1A7、1A8、1A9、1A10、2B4、2B7、2B15、2B17)购于 BD Gentest Corp(美国)。所有其他使用的试剂都是色谱级或商业化可购买的最高级别。

1.3 分析条件

色谱仪为日本岛津公司的 LC-30A 和 LC-20A(日本,京都);LC-30A 与 AB-Mass-API 4000 质谱(AB 公司)串联,LC-20A 与质谱 LC-MS2010(岛津)串联;色谱柱为 VP-ODS(150 mm×2.0 mm; 3 μ m,日本岛津公司),ODS 预柱(5.0 mm×2.0 mm, 2.2 μ m,日本岛津公司);流动相 A 为乙腈,流动相 B 为 0.2%甲酸水溶液,体积流量为 0.4 mL/min。阿卡宁的超快速液相色谱(UFLC)分析方法为 0~2

min, 90%~70% B; 2~12 min, 70%~20% B; 12~15 min, 70%~5% B; 15~17 min, 5%~90% B; 检测波长为 517 nm。UFLC 上连接 AB-Mass-API 4000 质谱检测器。阿卡宁的 UGT 代谢产物检测具体方法为在正离子模式下检测, 分子离子为 m/z 288.1, 负离子模式下检测为 m/z 286.9, MRM (286.9~217.8), DP 为-85 V, CE 为-40 V。阿卡宁的 UGT 代谢产物分子离子为 m/z 463.2, MRM (463.2~172.9), DP 为-80 V, CE 为-48 V。

1.4 葡萄糖醛酸化反应孵育条件

阿卡宁的葡萄糖醛酸化反应在 pH 7.4 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中进行, 体系中含有一定浓度的底物, 一定浓度的酶, 5 mmol/L $MgCl_2$, 2 mmol/L UDPGA, 反应体系体积为 0.2 mL。当 HLM 或 HKM 作为酶源时, 预先用 Brij58 (0.1 mg/mL) 对微粒体进行活化。将反应体系中除 UDPGA 之外的所有组分都加入至 1.5 mL 管中, 37 °C 条件下预孵 3 min 后, 加入 UDPGA 起始反应, 孵育相应时间后, 加入 100 μ L 乙腈终止反应。充分涡旋后, 在 4 °C、20 000 $\times g$ 条件下离心 20 min, 取上清液用于 UFLC-AB-Mass 4000 检测分析。

1.5 重组人类 UGT 单酶筛选实验

阿卡宁 (10、100 μ mol/L) 和 12 种重组人 UGT 单酶在葡萄糖醛酸化反应条件下进行孵育。反应体系中重组 UGT 酶的质量浓度为 0.1 mg/mL, 反应时间为 60 min, 其余条件同“1.4”项。反应结束后样品的上清液用 UFLC-AB-Mass 4000 检测阿卡宁的 UGT 代谢产物的生成。

1.6 酶动力学分析

为了获得阿卡宁的酶反应动力学参数, 对阿卡宁在混合 HLM、HKM 中以及 UGT1A9 中的葡萄糖醛酸化代谢进行了动力学分析。阿卡宁 (0~500 μ mol/L) 在 5 μ g/mL 的 HLM 蛋白质量浓度条件下, 在含有 0.06% BSA 的葡萄糖醛酸化反应体系中孵育 20 min。阿卡宁在 UGT1A9 中的动力学、反应酶浓度、孵育时间以及体系中 BSA 的量均与在 HLM 中的条件一致。在 HKM 中除酶质量浓度为 3.5 μ g/mL 之外, 其余反应条件与 HLM 和 UGT1A9 中的孵育条件相同。反应体系中所含成分、反应条件以及反应结束后的样品处理同“1.4”项。样品的上清液用 UFLC-AB-Mass 4000 检测分析检测化合物的代谢产物生成。实验数据用 GraphPad Prism 5 软件进行动力学拟合。所有酶源中的动力学均采用底

物抑制公式进行拟合。

$$v = V_{\max}[S]/(K_s + [S] + [S]^2/K_{si})$$

v 为反应速率, $[S]$ 为底物浓度, $V_{\max}$ 是估计的最大反应速率, K_s 为底物与酶的表观亲和常数, K_{si} 为底物抑制常数

1.7 个体人肝中的相关性分析

为了进一步证明阿卡宁是 UGT1A9 的高选择性探针底物, 对阿卡宁与异丙酚 (人类 UGT1A9 的一个已知探针底物^[13]) 在 12 例个体人肝微粒体中的葡萄糖醛酸化代谢进行相关性研究。具体反应条件为异丙酚 75 μ mol/L, HLM 0.5 mg/mL, 反应时间为 20 min, 生成的代谢产物利用岛津液相 UFLC20A-ESI-MS 进行检测。阿卡宁在 12 例个体人肝中的 UGT 代谢反应浓度为 10 μ mol/L, HLM 10 μ g/mL, 反应时间为 28 min, 生成的代谢产物利用 UFLC-AB-Mass 4000 进行检测。

1.8 化学抑制实验

为了进一步探索阿卡宁对 UGT1A9 单酶的选择性, 利用 UGT 酶的一些化学抑制剂对阿卡宁在 HLM 中的葡萄糖醛酸化代谢进行抑制。具体的实验方法为阿卡宁底物浓度 10 μ mol/L, HLM 质量浓度为 5 μ g/mL, 反应孵育 20 min, 体系中添加 0.06% 的 BSA。人肝微粒体在正式代谢孵育之前用 Brij58 (0.1 mg/mL) 进行活化。反应体系中的其他成分同阿卡宁的葡萄糖醛酸化代谢孵育条件一致。抑制剂选取 200 nmol/L 厚朴酚, 厚朴酚是 UGT1A9 酶的一个较强的抑制剂 [抑制常数 (K_i) 为 39 nmol/L]^[14]。尼氟灭酸也是文献报道的一个 UGT1A9 的较强抑制剂 (K_i 为 0.1~0.4 μ mol/L)^[15], 尼罗替尼是 UGT1A1 的一个选择性较高的抑制剂 (K_i 为 0.17 μ mol/L)^[16], 在本实验中选取 10 μ mol/L 浓度进行抑制。文献报道雷公藤红素对 UGT1A6 和 UGT2B7 都具有较强的抑制能力 (K_i 为 0.49 μ mol/L 和 0.045 μ mol/L), 但是对其他 UGT 亚型的抑制能力不详, 本实验选取的雷公藤红素的抑制浓度为 2.5 μ mol/L^[17]。睾酮是 UGT2B17 的一个特异性底物, 表观亲和常数 (K_m) 值为 10 μ mol/L^[18], 在本实验中的使用浓度为 25 μ mol/L。

1.9 代谢半衰期实验

为了比较阿卡宁的 CYP 和 UGT 的代谢速率, 对阿卡宁在 HLM 中的 CYP 和 UGT 代谢半衰期分别进行测定。UGT 反应体系中所含成分同葡萄糖醛酸化反应中的条件相同: 在 50 mmol/L pH 7.4 的崔氏盐酸缓冲液中, 含有 5 mmol/L $MgCl_2$, 阿卡宁 10

$\mu\text{mol/L}$, UDPGA 2 mmol/L , 1% 的 BSA, 反应体积为 0.2 mL 。将反应体系中除 UDPGA 之外的所有成分加入 1.5 mL 管中, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min , 加入 UDPGA 对反应进行起始。在反应时间点为 0 、 5 、 10 、 20 、 40 min , 将 $200\text{ }\mu\text{L}$ 体积的冰冷乙腈加入体系内, 对反应进行终止。样品在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $20\text{ }000\times g$ 的条件下离心 20 min , 取上清液用 MS/MS 进行分析检测阿卡宁的底物减少。CYP 反应体系中含有 100 mmol/L 的 $\text{pH } 7.4$ 磷酸盐冲液(PBS), 4 mmol/L 的 MgCl_2 , HLM 0.5 mg/mL , 阿卡宁 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 以及 NADPH 生成系统 (NADP^+ 10 mmol/L , 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 1 U/mL , 葡萄糖-6-磷酸 10 mmol/L)。将反应体系中除 NADP^+ 之外的所有成分加入 1.5 mL 管中, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min , 加入 NADP^+ 对反应进行起始。在反应时间点为 0 、 5 、 10 、 20 、 40 min , 将 $200\text{ }\mu\text{L}$ 体积的冰冷乙腈加入体系内, 对反应进行终止。样品在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $20\text{ }000\times g$ 的条件下离心 20 min , 取上清液用 MS/MS 检测阿卡宁的底物减少量。在一级动力学条件下, 化合物的代谢速率与浓度呈正比, 所以反应速率随着时间下降。化合物代谢的半衰期 ($t_{1/2}$) 可以依据公式进行计算。

$$t_{1/2} = \ln 2 / \ln c$$

t 是反应孵育时间, c 是底物在相应的时间内剩余百分比

2 结果

2.1 阿卡宁在人肝微粒体中的代谢

在混合 HLM 中, 在 UDPGA 存在的条件下, 在普通 C_{18} 反相液相色谱柱上只有一个阿卡宁的 UGT 代谢产物可以被检测到, 见图 1。其中在 UFLC-DAD-MS 检测下阿卡宁很不容易被离子化, 在负离子检测模式下阿卡宁的分子离子为 m/z 287 , 而阿卡宁的葡萄糖醛酸化代谢产物却比较容易离子化, 负离子模式下质谱响应较好, 分子离子峰为 m/z 463.1 , 相对分子质量比其相应的底物多 176 , 176 为是葡萄糖醛酸的相对分子质量, 所以鉴定该代谢产物为阿卡宁的单葡萄糖醛酸化代谢产物, 见图 2。

2.2 重组人类 UGT 酶筛选

对阿卡宁在 12 种重组人类 UGT 单酶中进行葡萄糖醛酸化代谢实验, 结果显示在所测的 12 种重组 UGT 单酶中参与催化阿卡宁葡萄糖醛酸化代谢的酶亚型主要有 UGT1A9 一个亚型, UGT1A9 对阿卡宁的催化活性在 $100\text{ }\mu\text{mol/L}$ 浓度下是其他酶亚型的 100 多倍, 在 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的浓度下是其他酶亚

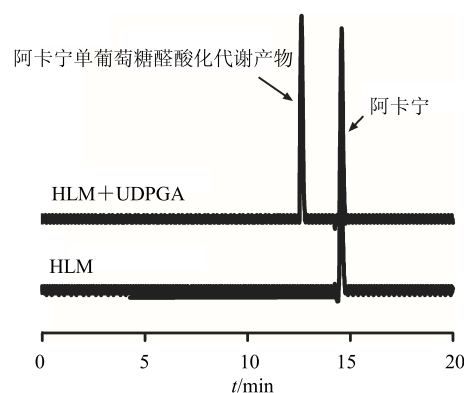


图 1 阿卡宁在 HLM 中的 UGT 代谢轮廓

Fig. 1 UGT metabolism profile of alkannin in HLM

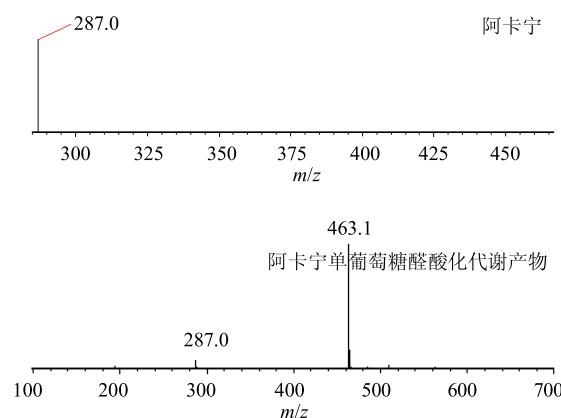


图 2 阿卡宁及其 UGT 代谢产物的质谱图

Fig. 2 Mass spectrometry detection of alkannin and its UGT metabolite

型的活性的 750 多倍。由此可见 UGT1A9 对阿卡宁具有非常高的选择性, 见图 3。

2.3 酶动力学分析

为了获得阿卡宁的葡萄糖醛酸化代谢动力学参数, 对阿卡宁在 HLM 和 HKM 以及重组的

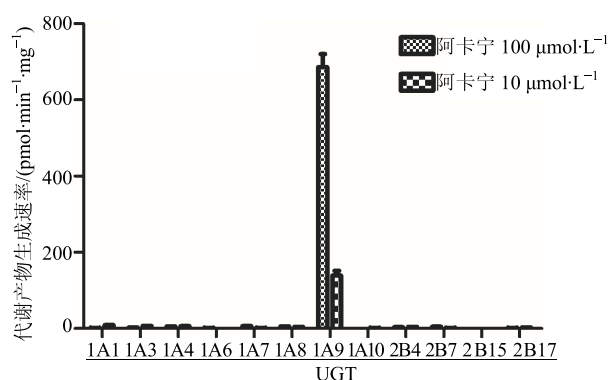


图 3 阿卡宁的重组人类 UGT 酶筛选

Fig. 3 Recombinant human UGTs screening of alkannin

UGT1A9 中进行了代谢动力学研究。动力学研究显示阿卡宁在 HLM、HKM 以及重组的 UGT1A9 中的代谢都呈底物抑制模式。3 种酶源代谢动力学的 K_m 值非常接近 (3.75~4.50 $\mu\text{mol/L}$)，但是从表观清除率上看 HKM 的表观清除率最大，约为 UGT1A9 和 HLM 中的清除率的 2 倍。结果见图 4 和表 1。

2.4 相关性分析

为了进一步证实阿卡宁是 UGT1A9 的一个高选择性的探针底物，对阿卡宁与目前已有的 UGT1A9 探针底物异丙酚在 12 例个体人肝微粒体中的葡萄糖醛酸化代谢进行相关性分析。实验结果显示阿卡宁在 12 例个体人肝中的葡萄糖醛酸化代

谢与异丙酚在 12 例个体人肝中的葡萄糖醛酸化代谢具有良好的相关性，相关系数 R^2 为 0.88，见图 5。

2.5 化学抑制实验

化学抑制实验显示，UGT1A9 的抑制剂厚朴酚和尼氟灭酸对阿卡宁在 HLM 中的葡萄糖醛酸化代谢具有明显的抑制，厚朴酚 (0.2 $\mu\text{mol/L}$) 抑制阿卡宁在 HLM 中的 UGT 代谢残余活性约为 18%，尼氟灭酸 (1 $\mu\text{mol/L}$) 抑制阿卡宁的葡萄糖醛酸化代谢的残余活性为 11% 左右。尼罗替尼 (10 $\mu\text{mol/L}$)，雷公藤红素 (2.5 $\mu\text{mol/L}$) 和睾酮 (25 $\mu\text{mol/L}$) 对阿卡宁的 HLM 葡萄糖醛酸化代谢均无明显的抑制。如图 6 所示。

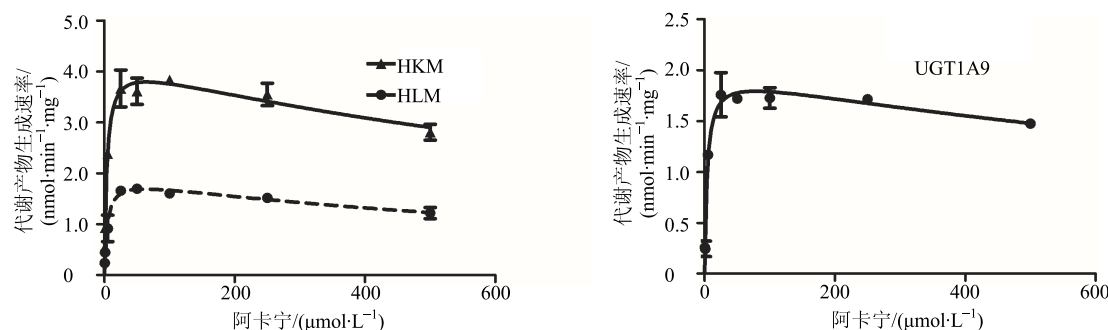


图 4 阿卡宁在 HLM、HKM 和 UGT1A9 中的动力学分析

Fig. 4 Enzyme kinetic analyses of alkannin in HLM, HKM, and UGT1A9

表 1 阿卡宁在不同酶源中的氧葡萄糖醛酸化动力学参数

Table 1 Kinetic parameters of alkannin *O*-glucuronidation in different enzyme sources

酶源	$K_m/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$V_{\max}/(\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1})$	$(V_{\max}/K_m)/(\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1})$	$K_{si}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
HLM	4.47	1.92	0.43	198.1
HKM	3.75	4.24	1.13	185.1
UGT1A9	3.99	1.98	0.50	521.4

酶动力学参数均采用 Substrate inhibition Model 进行拟合

The kinetic analyses were all simulated by substrate inhibition model

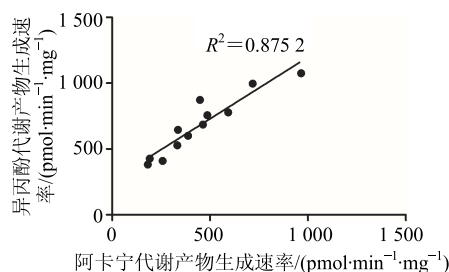


图 5 异丙酚与阿卡宁氧葡萄糖醛酸化速率在 12 例个体人肝中的相关性

Fig. 5 Correlation study of propofol *O*-glucuronidation rate and alkannin *O*-glucuronidation rate in 12 individual human liver microsomes

2.6 代谢半衰期实验

代谢半衰期实验显示，在相同的底物浓度，相同的 HLM 浓度的条件下，阿卡宁的 UGT 代谢 $t_{1/2}$ 为 (9.31 ± 2.34) min，而阿卡宁的 CYP 代谢 $t_{1/2}$ 为 (23.20 ± 3.89) min。二者相比发现 UGT 的代谢速率要远远快于 CYP 的代谢速率，而在体内，由 CYP 催化生成的阿卡宁羟化代谢产物，也可能会再进一步发生葡萄糖醛酸化代谢。

3 讨论

本研究对紫草素的 *S*-型立体异构单体阿卡宁进行了体外 UGT 代谢研究。阿卡宁在 HLM 和 HKM 中都可以检测到一个葡萄糖醛酸化代谢产物。动力

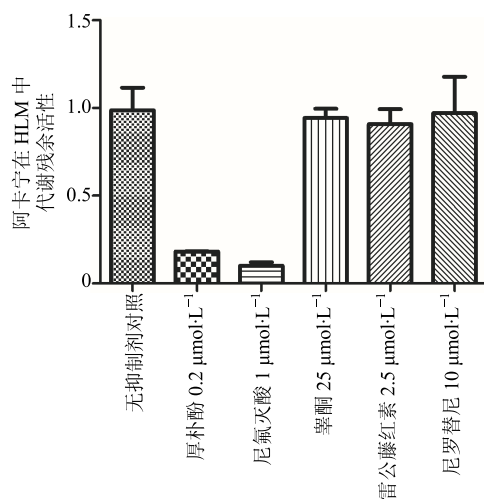


图 6 化学抑制剂对阿卡宁在 HLM 中葡萄糖醛酸化代谢的影响

Fig. 6 Effect of chemical inhibitors to glucuronidation of alkannin in HLM

学研究结果显示阿卡宁在人肝和人肾微粒体中都有较高的最大内在清除率，而在 HLM 中的代谢半衰期实验表明在人肝中 UGT 代谢的速率也要快于 CYP 的代谢速率，而这种代谢速率的差异可能在肾脏会显得更加突出，由此说明与 CYP 代谢相比 UGT 代谢对于阿卡宁来说应该是一条主要的代谢途径。动力学研究表明阿卡宁在 HLM、HKM 和 UGT1A9 中的代谢都呈底物抑制模式，并且在 3 种酶源中的 K_m 值也非常接近。重组 UGT 单酶筛选研究结果还揭示阿卡宁的是人类 UGT1A9 酶的一个高选择性底物。利用阿卡宁与已有的 UGT1A9 探针底物异丙酚在 12 例个体 HLM 中的 UGT 代谢进行相关性分析也发现二者具有较好的相关性。抑制实验显示 UGT1A9 抑制剂厚朴酚和尼氟灭酸对阿卡宁在 HLM 中的葡萄糖醛酸化具有明显的抑制作用，而 UGT1A1 的抑制剂尼罗替尼，UGT1A6 和 UGT2B7 抑制剂雷公藤红素以及 UGT2B17 的底物（或竞争性抑制剂）鞣醌对阿卡宁在 HLM 中的葡萄糖醛酸化代谢都无明显的抑制作用。

UGT1A9 在人体是一个量相对丰富的酶，UGT1A9 在肝脏中的量仅次于 UGT2B7、UGT2B15、UGT2B4、UGT1A1 和 UGT1A4 几个亚型，而在肾脏中 UGT1A9 是蛋白量最高的 UGT 亚型^[19-20]。由于阿卡宁被 UGT1A9 高选择性的代谢，结合 UGT1A9 在人体的组织分布，可以推测阿卡宁

在人体被口服吸收后，肝脏是对其进行 UGT 代谢并产生首关效应的主要场所，肾脏的 UGT 代谢可能是生成紫草素尿液中的代谢产物的主要来源，从代谢清除率来看肾微粒体具有比肝微粒体更强的阿卡宁代谢清除能力。UGT1A9 位于 UGT1A 基因中的 UGT1A7-1A13p 的基因簇中，该基因簇内的酶亚型的氨基酸序列同源性都在 93% 以上^[21]。与 UGT1A7、1A8、和 1A10 3 个亚型相比，UGT1A9 是唯一在肝脏表达丰富的亚型，其余亚型都以肝外表达为主。同时 UGT1A9 的酶蛋白具有耐高温，耐洗涤剂等特点^[22]，偏好催化疏水性强的酚类化合物。阿卡宁作为一种平面酚类的化合物，分子具有较高的疏水性，其底物特征符合 UGT1A9 的底物偏好性。UGT1A9 参与催化的底物也相对广泛如异丙酚、吲哚美辛、麦克酚酸、保泰松、氟比洛芬、依托度酸，恩托卡朋、SN-38 等，同时 UGT1A9 对一些天然产物如黄酮和香豆素类化合物也具有较好代谢能力。

对阿卡宁 UGT 代谢通路的阐明提示人们在使用紫草素作为食品添加剂和药物使用时如果与其他的 UGT1A9 代谢的药物底物或 UGT1A9 抑制剂等共同使用时，可能会引发一些潜在的药物-药物相互作用。UGT1A9 对阿卡宁的高选择性代谢使阿卡宁未来可以作为一个工具分子，在 UGT 的代谢研究中进行应用。

参考文献

- [1] 姚斯洁, 代汉慧, 李 杏, 等. 欧盟与中国食品添加剂法规标准的对比分析 [J]. 职业与健康, 2011, 27(12): 1332-1338.
- [2] Chen X, Yang L, Oppenheim J J, *et al.* Cellular pharmacology studies of shikonin derivatives [J]. *Phytother Res*, 2002, 16(3): 199-209.
- [3] Staniforth V, Wang S Y, Shyur L F, *et al.* Shikonins, phytochemicals from *Lithospermum erythrorhizon*, inhibit the transcriptional activation of human tumor necrosis factor alpha promoter *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(7): 5877-5885.
- [4] Papageorgiou V P, Assimopoulou A N, Couladouros E A, *et al.* The chemistry and biology of alkannin, shikonin, and related naphthazarin natural products [J]. *Angew Chem Int*, 1999, 38(3): 270-300.
- [5] Kourounakis A P, Assimopoulou A N, Papageorgiou V P, *et al.* Alkannin and shikonin: effect on free radical processes and on inflammation—a preliminary

- pharmacochemical investigation [J]. *Arch Pharm Pharm Med Chem*, 2002, 335(6): 262-266.
- [6] Tanaka S, Tajima M, Tsukada M, *et al.* A comparative study on anti-inflammatory activities of the enantiomers, shikonin and alkannin [J]. *J Nat Prod*, 1986, 49(3): 466-469.
- [7] Yoshihisa Y, Hassan M A, Furusawa Y, *et al.* Alkannin, HSP70 inducer, protects against UVB-induced apoptosis in human keratinocytes [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e47903.
- [8] 王文杰, 仪明光, 朱秀媛. ³H-紫草素的吸收、组织分布和排泄 [J]. *药学报*, 1998, 23(4): 246-251.
- [9] Li H Y, Luo S R, Zhou T H. Metabolism of shikonin in rats [J]. *J Chin Pharm Sci*, 1999, 8(3): 148-151.
- [10] 李慧义, 罗淑荣, 周同惠, 等. LC-MS 方法研究紫草素及其体外代谢产物 [A] // 中国分析测试协会科学技术奖发展回顾 [C]. 北京: 北京科学出版社, 2015.
- [11] Williams J, Hyland R, Jones B, Smith D, *et al.* Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC (i) /AUC) ratios [J]. *Drug Metab Dispos*, 2004, 32(11): 1201-1208.
- [12] Argikar U A. Unusual glucuronides [J]. *Drug Metab Dispos*, 2012, 40(7): 1239-1251.
- [13] Court M H. Isoform-selective probe substrates for *in vitro* studies of human UDP-glucuronosyltransferases [J]. *Methods Enzymol*, 2005, 400: 104-116.
- [14] Zhu L, Ge G, He G, *et al.* Potent and selective inhibition of magnolol on catalytic activities of UGT1A7 and 1A9 [J]. *Xenobiotica*, 2012, 42(10): 1001-1008.
- [15] Miners J O, Bowalgaha K, Elliot D J, *et al.* Characterization of niflumic acid as a selective inhibitor of human liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase 1A9: application to the reaction phenotyping of acetaminophen glucuronidation [J]. *Drug Metab Dispos*, 2011, 39(4): 644-652.
- [16] Ai L, Zhu L, Yang L, *et al.* Selectivity for inhibition of nilotinib on the catalytic activity of human UDP-glucuronosyltransferases [J]. *Xenobiotica*, 2014, 44(4): 320-325.
- [17] Zhang Y S, Tu Y, Gao X, *et al.* Strong inhibition of celastrol towards UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) 1A6 and 2B7 indicating potential risk of UGT-based herb-drug interaction [J]. *Molecules*, 2012, 17: 6832-6839.
- [18] Sten T, Bichlmaier I, Kuuranne T, *et al.* UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and UGT2B17 display converse specificity in testosterone and epitestosterone glucuronidation, whereas UGT2A1 conjugates both androgens similarly [J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37(2): 417-423.
- [19] Fallon J K, Smith P C, Neubert H, *et al.* Targeted precise quantification of 12 human recombinant uridine-diphosphate glucuronosyl transferase 1A and 2B isoforms using nano-ultra-high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with selected reaction monitoring [J]. *Drug Metab Dispos*, 2013, 41(12): 2076-2080.
- [20] Sato Y, Nagata M, Tetsuka K, *et al.* Optimized methods for targeted peptide-based quantification of human Uridine-5'-diphosphate-glucuronosyltransferases in biological specimens using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42: 885-889.
- [21] Mackenzie P I, Bock K W, Burchell B, *et al.* Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily [J]. *Pharmacogenet Genom*, 2005, 15(10): 677-685.
- [22] Kurkela M, Garcila-Horsman J A, Luukkanen L, *et al.* Expression and characterization of recombinant human UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): UGT1A9 is more resistant to detergent inhibition than the other UGTs and was purified as an active dimeric enzyme [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(6): 3536-3544.