

· 药物代谢 ·

辛芍组方效应成分在正常和脑缺血再灌注损伤大鼠肝微粒体中的酶促反应动力学分析

刘志宝¹, 吴耽², 唐娟², 苏红³, 李月婷², 巩仔鹏², 黄勇², 王永林^{2*}
(1. 大庆油田总医院, 黑龙江 大庆 163312; 2. 贵州医科大学 贵州省药物制剂
重点实验室, 药学院, 药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550004;
3. 大庆医学高等专科学校, 黑龙江 大庆 163312)

[摘要] 目的:研究辛芍组方中效应成分灯盏乙素、灯盏甲素和芍药苷在正常大鼠和大脑中动脉闭塞(MCAO)局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠肝微粒体中的酶促反应动力学,比较上述成分在不同状态大鼠肝微粒体中的体外酶代谢动力学差异。方法:制备不同状态大鼠的肝微粒体,将辛芍组方与大鼠肝微粒体进行孵育,选择 UPLC-MS 为分析手段,采用底物消除法,计算各成分在正常大鼠和 MCAO 大鼠肝微粒体中的酶反应动力学米氏常数(K_m),最大反应速率(V_{max})及体外肝微粒体对药物的固有清除率(CL_{int}),将各参数进行组间统计学分析。结果:灯盏乙素、灯盏甲素和芍药苷在正常大鼠体外肝微粒体中的 K_m [(0.597±0.065), (0.166±0.012), (0.640±0.046) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]与 MCAO 大鼠中的 K_m [(0.798±0.031), (0.213±0.017), (0.499±0.029) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]均明显不同;与正常组相比,MCAO 大鼠体内的灯盏乙素和芍药苷的 V_{max} 和 CL_{int} 均明显减少($P<0.05$, $P<0.01$),灯盏甲素的 V_{max} 也显著降低($P<0.05$)。结论:辛芍组方的效应成分在脑缺血再灌注损伤大鼠肝微粒体中的代谢速率降低、消除减慢。

[关键词] 辛芍组方; 细胞色素 P450; 酶促反应动力学; 缺血再灌注损伤; 大脑中动脉闭塞; 葛根素
[中图分类号] R22;R969.1;R945;R28;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2019)01-0169-08
[doi] 10.13422/j.cnki.syfxj.20182305
[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20180914.1312.003.html>
[网络出版时间] 2018-9-19 14:28

Kinetic Analysis of Enzymatic Reaction of Active Components from Xinshao Formula in Liver Microsomes of Sham-Operated and Cerebral Ischemia-reperfusion Injury Rats

LIU Zhi-bao¹, WU Dan², TANG Juan², SU Hong³, LI Yue-ting², GONG Zi-peng²,
HUANG Yong², WANG Yong-lin^{2*}
(1. Daqing Oilfield General Hospital, Daqing 163312, China;
2. Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics in Guizhou Province, School of Pharmacy, State
Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University,
Guiyang 550004, China; 3. Daqing Medical College, Daqing 163312, China)

[Abstract] Objective: To investigate and compare enzymatic kinetics of scutellarin, apigenin-7-O-

[收稿日期] 20180529(005)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(81560630);贵州省科技厅科技平台及人才团队计划项目(黔科合平台人才[2017]5601);贵阳市科技局科研创新团队项目(筑科合同[2017]30-29号)
[第一作者] 刘志宝,主管药师,从事中药新药研究开发研究,E-mail:13936722326@163.com
[通信作者] *王永林,教授,博士生导师,从事中药新药研究开发、中药药效物质及中药药动学研究,Tel:0851-86908468,E-mail:2093442771@qq.com

glucronide and paeoniflorin from Xinshao fomula in liver microsomes of sham-operated rats and middle cerebral artery occlusion (MCAO) rats with focal cerebral ischemia-reperfusion injury. **Method:** Xinshao fomula were incubated respectively with liver microsomes of sham-operated rats and MCAO rats, UPLC-MS and substrate elimination method was employed, Michaelis constant (K_m), maximum velocity of enzymatic reaction (V_{max}) and intrinsic clearance (CL_{int}) of these three components from Xinshao fomula in liver microsomes of sham-operated rats and MCAO rats were calculated, these parameters between different groups were evaluated by statistical analysis. **Result:** The K_m values of scutellarin, apigenin-7-*O*-glucronide and paeoniflorin in liver microsomes of MCAO rats were (0.798 ± 0.031), (0.213 ± 0.017), (0.499 ± 0.029) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, which were quite different to these in liver microsomes of sham-operated rats. Compared with the sham-operated group, V_{max} and CL_{int} values of scutellarin and paeoniflorin in liver microsomes of MCAO rats were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and V_{max} of apigenin-7-*O*-glucronide in liver microsomes of MCAO rat was also significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion:** Metabolic rates of these three active components from Xinshao fomula in liver microsomes of MCAO rats with focal cerebral ischemia-reperfusion injury decrease with low elimination rate.

[**Key words**] Xinshao fomula; cytochrome P450; enzymatic kinetics; ischemia-reperfusion injury; middle cerebral artery occlusion; puerarin

辛芍组方(辛芍冻干粉针)是由赤芍、灯盏细辛经现代制剂提取、精致纯化后采用冷冻干燥工艺制得的粉针制剂^[1-2],为贵州少数民族经验方,在民间将两者以汤剂煎服用于治疗偏瘫,具有通经活络、活血化瘀的功效,主要用于预防和辅助治疗中风、偏瘫,且疗效显著^[3]。本课题组前期对辛芍组方进行了系统研究^[4-9],并通过开展辛芍组方在正常和大脑中动脉闭塞(MCAO)大鼠体内的静注药动学研究中发现,组方中效应成分灯盏乙素、灯盏甲素和芍药苷在 MCAO 大鼠体内的清除率降低、半衰期延长^[10],说明上述成分的体内过程发生了变化,而静脉注射给药没有吸收过程,药物的代谢和消除作用就成为影响药物体内过程的主要因素。

肝脏是药物代谢的主要器官,是机体进行生物转化的主要场所,细胞色素 P450(CYP450)酶是肝脏药物代谢的主要酶系,主要存在于肝微粒体中,在药物生物转化过程中发挥着至关重要的作用^[11-13]。因此,本实验拟开展辛芍组方在正常和 MCAO 大鼠肝微粒体中的体外代谢动力学研究,并比较在不同状态下大鼠体外酶代谢动力学差异,为探究该药的药动学差异机制奠定基础,也为该疾病状态下临床合理用药、药物相互作用研究提供参考。

1 材料

ACQUITY UPLC 型超高效液相色谱-Xevo TQ-S 型质谱联用仪(美国 Waters 公司),Allegra 64R 型低温高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司),ZH-2 型涡旋混合器(天津药典标准仪器厂),AE240 型 1/10 万电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公

司],XYN-15LP 型氮吹仪氮气发生器(上海析友分析仪器有限公司)。

灯盏乙素、灯盏甲素、芍药苷、葛根素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 20140123, 20130912,20140125,0752-9605,纯度均 > 98%);葡萄糖-6-磷酸二钠(G-6-P- Na_2),葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PD),氧化型辅酶 II 二钠(NADP-Na_2)和二甲基亚砜(DMSO)均购自北京索莱宝科技有限公司;甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯。辛芍冻干粉针处方由灯盏细辛、赤芍和甘露醇(填充剂)组成;取质检合格的灯盏细辛提取物、赤芍提取物^[10]和甘露醇,加注射用水搅拌使溶解,用饱和氢氧化钠溶液调 pH 7.0 ~ 7.5,混合均匀,煮沸 30 min,分装于已处理好的输液瓶中,塞入丁基橡胶塞及薄膜,轧铝盖,流通蒸汽灭菌 30 min,冷藏 24 h,在无菌条件下用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,滤液分装,冷冻干燥,压盖,即得辛芍冻干粉针。

健康雄性 SD 大鼠,体质量 280 ~ 300 g,SPF 级,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2012-0001。动物于温度(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 饲养,饲养管理均严格按照实验动物的要求及规则,实验前饲养 1 周适应环境。经贵州医科大学实验动物伦理委员会批准,批准编号 1602003。

2 方法

2.1 色谱条件 Waters BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm $\times$ 50 mm,1.7 μm),流速 0.35 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 45 $^{\circ}\text{C}$,进样器温度 4 $^{\circ}\text{C}$,流动相 0.1% 甲酸乙腈溶液(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 1 min,5% A;

1 ~ 3 min, 5% ~ 15% A; 3 ~ 4 min, 15% ~ 20% A; 4 ~ 5 min, 20% ~ 35% A; 5 ~ 6. 5 min, 35% ~ 90% A; 6. 5 ~ 7. 5 min, 90% ~ 35% A; 7. 5 ~ 8. 5 min, 35% ~ 5% A), 进样量 3 μ L。

2.2 质谱条件 采用电喷雾离子源 (ESI), 毛细管电离电压 3 kV, 离子源温度 120 $^{\circ}$ C, 去溶剂气温度 400 $^{\circ}$ C, 喷雾气与反吹气 N_2 , 去溶剂气流速设定 800 L $\cdot$ h $^{-1}$, 扫描方式为选择性离子检测 (SIM), 质谱数据采集及处理软件为 MassLynx 4. 1 工作站。3 个成分及内标用于定量分析的监测离子见表 1。

表 1 待测成分与内标物的质谱参数

Table 1 Mass spectrum parameters of marker compounds and internal standard substance

成分	电喷雾 离子源	m/z	驻留时间 /s	锥孔电压 /V
灯盏乙素	ESI $^{+}$	463. 04	0. 2	22
芍药苷	ESI $^{-}$	525. 12	0. 1	26
灯盏甲素	ESI $^{+}$	447. 36	0. 1	35
葛根素 (内标)	ESI $^{+}$	417. 14	0. 1	40

2.3 溶液的配制

2.3.1 对照品溶液 分别精密称取适量的灯盏乙素、灯盏甲素、芍药苷对照品, 分别加甲醇溶解并定容至 25 mL, 得质量浓度分别为 396. 0, 396. 0, 469. 2 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 的储备液。分别精密量取上述 3 种储备液适量, 用甲醇按梯度稀释至所需浓度, 得系列混合对照品溶液。置冰箱 - 20 $^{\circ}$ C 保存, 备用。

2.3.2 内标溶液 取葛根素 (内标) 5. 0 mg, 精密称定, 用甲醇配制 1 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 内标溶液, 置 - 20 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 备用。

2.3.3 辛芍组方溶液 称取辛芍冻干粉针 20. 0 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加入磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7. 4) 溶解并定容至刻度, 即得辛芍组方储备液。分别精密量取该储备液适量, 用 PBS 按梯度稀释至所需浓度, 得系列辛芍组方溶液。根据灯盏乙素、灯盏甲素、芍药苷 3 种成分在辛芍冻干粉针中的质量分数, 即得各成分的系列标准曲线溶液工作浓度, 见表 2。

2.4 肝微粒体的制备 提取肝微粒体前, 动物随机分为 2 组, 正常组和 MCAO 组。MCAO 组大鼠参照文献 [10] 进行大脑中动脉缺血再灌注手术, 正常组大鼠仅进行手术不插栓线, 24 h 后选择神经功能缺失的大鼠 (评分 $\geq$ 2 分, 采用 Longa 的 5 级 4 分法进行评分^[9]), 摘取肝脏提取肝微粒体。取各组大鼠,

表 2 各待测成分在孵育体系中的系列工作液浓度

Table 2 A series of working fluid concentration in incubation system of these tested components

No.	辛芍组方溶液 质量浓度/mg $\cdot$ L $^{-1}$	孵育体系中的工作溶液浓度/ μ mol $\cdot$ L $^{-1}$		
		灯盏乙素	灯盏甲素	芍药苷
1	0. 1	0. 026 6	0. 007 8	0. 036 1
2	0. 5	0. 133 0	0. 039 1	0. 181 0
3	2. 0	0. 532 0	0. 157 0	0. 722 0
4	6. 0	1. 600 0	0. 470 0	2. 170 0
5	8. 0	2. 130 0	0. 626 0	2. 890 0
6	12. 0	3. 200 0	0. 940 0	4. 330 0
7	24. 0	6. 390 0	1. 880 0	8. 670 0
8	32. 0	8. 520 0	2. 510 0	11. 600 0

每组 5 只, 禁食 16 h 后脱颈处死, 迅速开腹腔, 预冷生理盐水经肝门静脉注入肝脏, 以灌流洗去肝中血液 (至肝脏呈土黄色), 随后剪下肝脏, 用预冷的 0. 15 mol $\cdot$ L $^{-1}$ KCl 溶液清洗肝脏的血水, 滤纸吸干, 称重, 加入预冷匀浆液 [0. 25 mol $\cdot$ L $^{-1}$ 蔗糖, 1 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ 乙二胺四乙酸 (EDTA), 0. 1 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 和 0. 1 mol $\cdot$ L $^{-1}$ 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (Tris-HCl) 缓冲液] 制备肝匀浆液, 肝匀浆液于 0 $^{\circ}$ C, 9 000 $\times g$ 离心 20 min 后收集上清液, 并继续于 0 $^{\circ}$ C, 19 000 $\times g$ 离心 20 min, 测定上清液的体积, 加入 0. 1 倍量 88 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ CaCl $_2$ 溶液 (终浓度 8 mmol $\cdot$ L $^{-1}$), 冰浴搅拌 5 min 后于 27 000 $\times g$ 离心 20 min, 弃上清, 留沉淀, 沉淀经漂洗液清洗, 用 1/2 肝重的混悬液重悬沉淀, 分装, 于 - 80 $^{\circ}$ C 保存。临用前采用聚氰基丙烯酸正丁酯 (BCA) 蛋白定量法测定肝微粒体的蛋白浓度。

2.5 体外肝微粒体孵育试验 孵育体系总体积 200 μ L, 其中包含肝微粒体 (0. 5 g $\cdot$ L $^{-1}$), 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH, 26 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ NADP, 66 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ G-6-P- Na_2 , 40 U $\cdot$ mL $^{-1}$ G-6-PD 和 66 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ MgCl $_2$) 溶液及辛芍组方溶液 100 μ L, 其余为 PBS。取制备好的正常大鼠和 MCAO 大鼠肝微粒体 (终质量浓度 0. 5 g $\cdot$ L $^{-1}$), 加入 NADPH 还原系统, 37 $^{\circ}$ C 预孵育 5 min 后加入系列质量浓度的辛芍组方溶液 100 μ L, 分别继续孵育 0, 5, 15, 20, 30, 45, 60, 90 min 后立即加入预冷甲醇 100 μ L 终止反应。取终止反应后的大鼠肝微粒体孵育液, 加入内标溶液 100 μ L, 涡旋, 超声, 15 000 r $\cdot$ min $^{-1}$ 离心 3 min, 取上清液 3 μ L 进行 UPLC-MS 分析 ($n = 3$)。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件包进行 One-way ANOVA 检验分析,并对组间数据进行 Dunnett's *T*3 检验,各组数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 专属性 设置 3 组肝微粒孵育样品评价专属性。第 1 组空白肝微粒体组,按 2.5 项下方法制备样品,用 PBS 代替辛芍组方溶液加入孵育体系;第 2 组不加 NADPH 再生系统组,按 2.5 项下方法制备样品,用 PBS 代替 NADPH 再生系统;第 3 组辛芍组方组,按 2.5 项下方法制备样品。将制备好 3 组样品按 2.1 和 2.2 项下条件检测。结果表明各色谱峰峰型良好,肝微粒体孵育体系中内源性物质对检测无干扰,检测成分响应值较高,方法专属性良好。

3.1.2 标准曲线绘制和最低定量限考察 精密吸取混合对照品储备液适量,制备成 6 个质量浓度的系列混合对照品溶液,分别加入到空白孵育液中,制成系列质量浓度的对照品肝微粒体样品,按 2.1 和 2.2 项下条件测定,以质量浓度为横坐标,指标成分

峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标,得回归方程,见表 3。结果表明 3 个成分在相应的范围内线性关系良好。配制含混合对照品的肝微粒体溶液,倍比关系稀释,进样分析,按待测成分信噪比 $S/N = 10$ 计算最低定量限(LLOQ),见表 3。

表 3 3 个指标成分的线性关系考察及定量限
Table 3 Linear relations and quantitative limits of three index components

待测 化合物	线性回归方程	<i>r</i>	线性范围 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	LLOQ / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
灯盏乙素	$Y=0.013\ 2X-0.046\ 0$	0.999\ 9	4.75~1\ 188.00	3.42
灯盏甲素	$Y=0.023\ 0X-0.045\ 0$	0.999\ 8	2.33~582.00	1.68
芍药苷	$Y=0.007\ 1X+0.027\ 0$	0.999\ 5	5.63~1\ 407.00	3.12

3.1.3 准确度、精密度及提取回收率考察 取灭活肝微粒,按 3.1.2 项下方法配制高、中、低质量浓度的混合对照品肝微粒体样品,每个质量浓度样品均制备 5 份,按 2.1 和 2.2 项下条件进样分析,连续检测 3 d,计算日内和日间精密度、准确度、提取回收率,见表 4。结果表明该方法准确、可靠、重复性好,提取回收率稳定,符合分析方法的要求。

表 4 3 个效应成分在肝微粒体孵育体系中的准确度、日内和日间精密度、回收率($n=5$)
Table 4 Accuracy, intra-and inter-day precision, recovery rate of three effective components in incubation system of liver microsomes ($n=5$)

待测 化合物	样品中质量 浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	日内			日间			提取回收率 ($\bar{x} \pm s$)/%
		测得质量浓度 ($\bar{x} \pm s$)/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	精密度 RSD /%	准确度 /%	测得质量浓度 ($\bar{x} \pm s$)/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	精密度 RSD /%	准确度 /%	
灯盏乙素	9.51	9.13 $\pm$ 0.75	2.1	96.00	9.01 $\pm$ 0.57	3.2	94.74	83.62 $\pm$ 5.30
	47.53	45.67 $\pm$ 0.94	1.4	96.09	44.63 $\pm$ 0.98	1.7	93.90	88.53 $\pm$ 2.00
	1 188.00	1 175.00 $\pm$ 1.00	1.0	98.91	1 172.00 $\pm$ 1.00	1.9	98.65	98.36 $\pm$ 1.20
灯盏甲素	4.66	4.35 $\pm$ 0.78	3.5	93.35	4.12 $\pm$ 0.89	3.0	88.41	81.25 $\pm$ 7.80
	23.28	21.85 $\pm$ 0.78	2.3	93.86	20.75 $\pm$ 0.88	2.4	89.13	83.85 $\pm$ 2.60
	582.00	578.20 $\pm$ 0.57	1.8	99.35	578.00 $\pm$ 0.53	1.5	99.31	96.23 $\pm$ 1.60
芍药苷	11.26	12.89 $\pm$ 0.96	1.9	114.48	12.05 $\pm$ 0.85	1.8	107.02	84.25 $\pm$ 3.00
	56.28	54.78 $\pm$ 0.86	1.2	97.33	53.48 $\pm$ 0.56	1.2	95.02	98.78 $\pm$ 2.90
	1 407.00	1 402.00 $\pm$ 1.00	1.0	99.64	1 398.00 $\pm$ 1.20	0.9	99.36	99.12 $\pm$ 3.00

3.1.4 稳定性 同上配制高、中、低质量浓度的混合对照品肝微粒体液各 5 份,将样品放置在 37 ℃ 恒温水浴 6 h 及 4 ℃ 进样器内放置 24 h 后进样分析,考察待测成分的稳定性,见表 5。结果表明在 37 ℃ 的肝微粒体孵育体系中放置 6 h 后以及 4 ℃ 进样器中放置 24 h 后,样品稳定性均无明显差异,符合分析方法的要求。

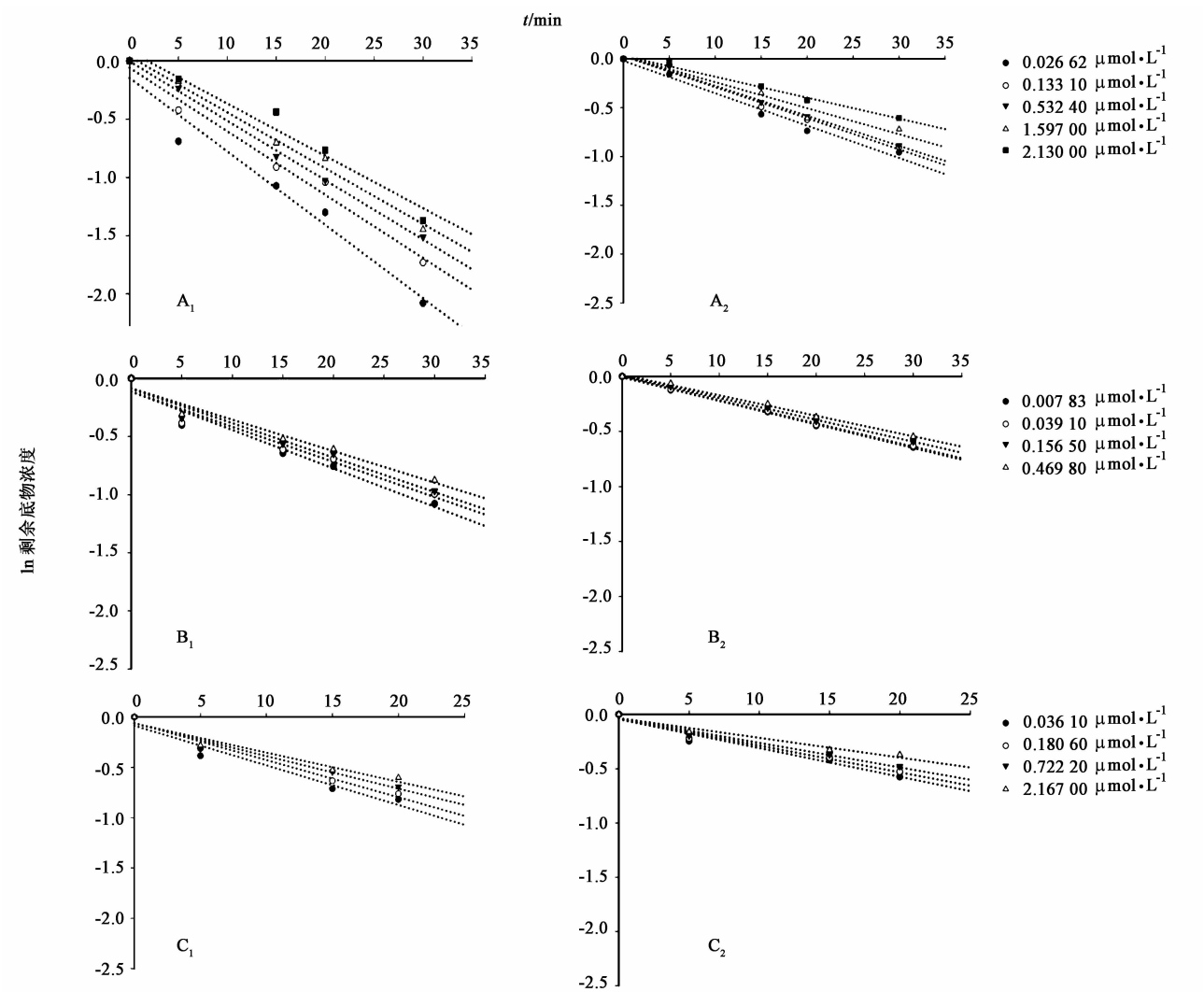
3.2 酶促反应动力学研究 采用底物消除法计算酶促动力学参数^[10]。分别计算各时间点灯盏乙素、灯盏甲素和芍药苷的剩余质量浓度,获得各反应体系中每个待测成分的底物相对剩余率(即各时间点剩余浓度与 0 时浓度的比值),将底物相对剩余率取自然对数对时间进行作图,见图 1。

所得直线的斜率即为该浓度的底物消除速率常

表 5 3 个效应成分在肝微粒体孵育体系的稳定性考察($n=5$)

Table 5 Stability of three effective components in incubation system of liver microsomes($n=5$)

待测化合物	样品中质量浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	37℃恒温水浴箱孵育 6 h			4℃进样器放置 24 h		
		测得质量浓度 ($\bar{x}\pm s$)/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%	准确度/%	测得质量浓度 ($\bar{x}\pm s$)/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%	准确度/%
灯盏乙素	9.51	9.47±0.20	1.1	99.58	9.48±0.24	1.1	99.68
	47.53	46.67±0.23	1.0	98.19	46.93±0.54	1.0	98.74
	1 188.00	1 179±0.41	0.9	99.24	1 184.00±1.00	0.2	99.66
灯盏甲素	4.66	4.59±0.67	1.0	98.50	4.62±0.45	0.5	99.14
	23.28	23.19±0.15	0.9	99.61	21.58±0.78	0.3	92.70
	582.00	581.00±0.54	0.5	99.83	581.00±0.47	0.2	99.83
芍药苷	11.26	11.22±0.41	1.0	99.64	11.23±0.58	1.2	99.73
	56.28	55.78±0.34	0.9	99.11	55.48±0.66	0.9	98.58
	1 407.00	1 406.00±0.32	0.3	99.93	1 405.00±0.64	0.8	99.86



A₁. 正常组中灯盏乙素;B₁. 正常组中灯盏甲素;C₁. 正常组中芍药苷;A₂. MCAO 组中灯盏乙素;B₂. MCAO 组中灯盏甲素;C₂. MCAO 组中芍药苷(图 2 同)

图 1 正常组与 MCAO 组中底物相对剩余率的自然对数与时间的关系

Fig.1 Relationship between natural logarithm of substrate relative residual rate versus time of normal group and MCAO group

数(K_{dep}),随后根据米氏方程演变的底物消除方程,用已经获得的不同底物浓度对应的 $-1/K_{\text{dep}}$ 对底物浓度进行直线回归,见图 2。求得体外 I 相代谢的

米氏常数(K_{m}),最大反应速率(V_{max} ,相对于每克蛋白计算),并结合固有清除率(CL_{int})方程,即可求得该成分的体外肝微粒体对药物的 CL_{int} 。

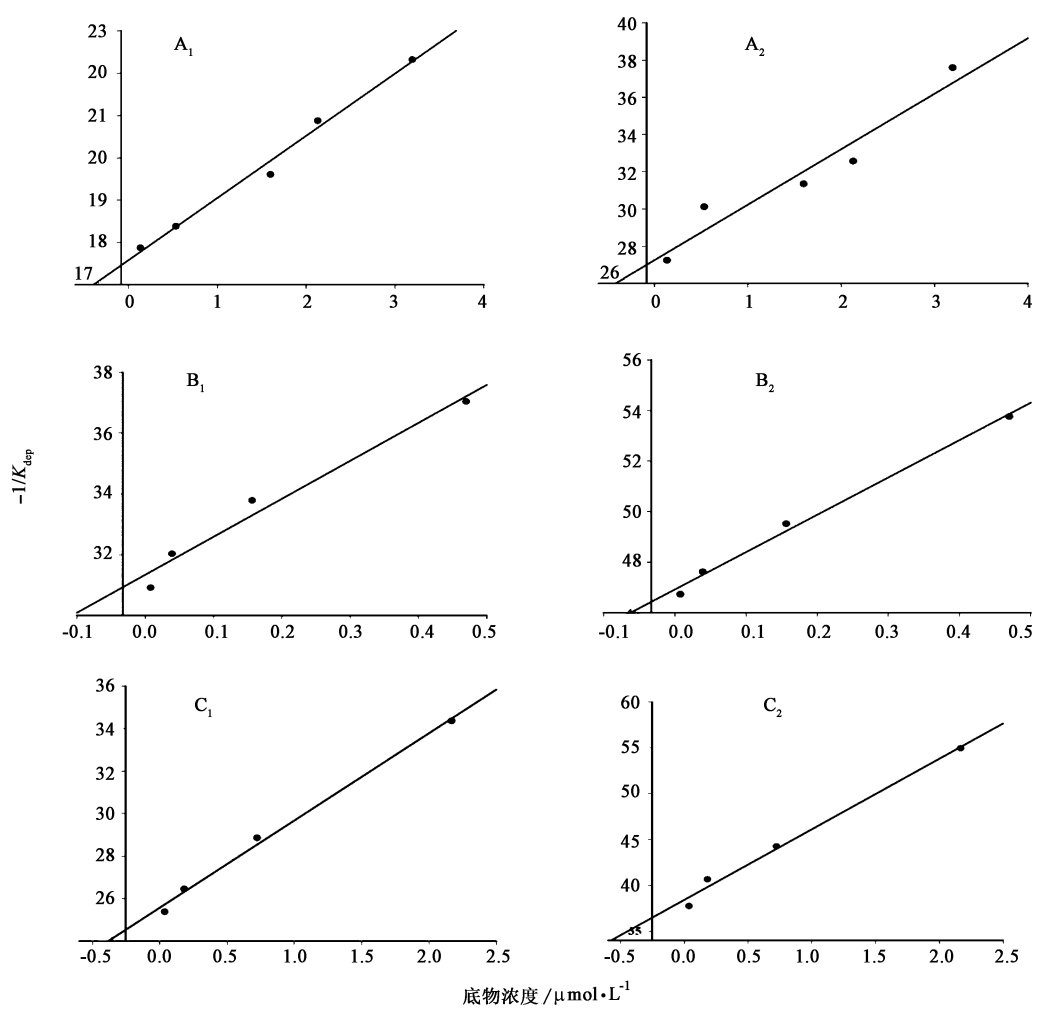


图 2 正常组与 MCAO 组中 $-1/K_{\text{dep}}$ 对底物浓度的线性回归分析
Fig.2 Linear regression analysis of substrate concentration versus $-1/K_{\text{dep}}$ of normal group and MCAO group

$$\begin{aligned}
 [C_s]_t &= C_s \cdot e^{-K_{\text{dep}}t} \\
 K_{\text{dep}} &= K_{\text{dep}(C_s \rightarrow 0)} \left(1 - \frac{C_s}{K_m + C_s} \right) \\
 &= -\frac{V_{\text{max}}}{K_m} \left(1 - \frac{C_s}{K_m + C_s} \right) - \frac{1}{K_{\text{dep}}} \\
 &= \frac{1}{V_{\text{max}}} C_s + \frac{K_m}{V_{\text{max}}} \\
 K_{\text{dep}(C_s \rightarrow 0)} &= -\frac{V_{\text{max}}}{K_m} = \text{CL}_{\text{int}}
 \end{aligned}$$

式中 C_s 是底物初始浓度, $[C_s]_t$ 代表瞬时底物浓度,相应的 $K_{\text{dep}(C_s \rightarrow 0)}$ 代表底物浓度趋于 0 时的消除速率常数。辛芍组方中灯盏乙素、灯盏甲素和芍药苷在不同状态大鼠体外肝微粒体的酶促代谢动力学参数见表 6。结果发现正常大鼠与 MCAO 大鼠的

体外肝微粒体中酶对上述 3 种成分的亲和力存在显著差异;灯盏乙素、灯盏甲素、芍药苷在正常大鼠肝微粒体内的 V_{max} 和 CL_{int} 均高于 MCAO 大鼠,说明上述成分在 MCAO 大鼠体外肝微粒体中的代谢速度降低,消除速率减慢,提示 MCAO 大鼠体外肝微粒体中代谢上述成分的优势 CYP450 酶的活性低于正常组大鼠。

4 讨论

底物消除法是目前测定酶动力学参数的主要方法之一,与传统的产物生成法相比,底物消除法可以在不明确代谢产物以及代谢通路的情况下,获得酶动力学参数,具有一些无可比拟的优越性^[14-15]。为确保采用该方法测定酶动力学参数的精确性,本实验通过考察不同孵育条件下(不同质量浓度和孵

表 6 3 个效应成分在正常大鼠和 MCAO 大鼠体内的酶促动力学参数($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Enzymatic kinetics parameters of three components in normal and MCAO rats($\bar{x} \pm s, n = 3$)

参数/单位	灯盏乙素		灯盏甲素		芍药苷	
	正常	MCAO	正常	MCAO	正常	MCAO
$V_{\max}/\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1}$	45.36 ± 4.00	22.38 ± 3.90 ²⁾	5.33 ± 0.15	4.51 ± 0.48 ¹⁾	24.58 ± 1.90	13.01 ± 0.43 ²⁾
$K_m/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.597 ± 0.065	0.798 ± 0.031 ²⁾	0.166 ± 0.012	0.213 ± 0.017 ¹⁾	0.640 ± 0.046	0.499 ± 0.029 ²⁾
$\text{CL}_{\text{int}}/\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$	0.056 ± 0.004	0.035 ± 0.011 ¹⁾	0.032 ± 0.006	0.021 ± 0.003	0.038 ± 0.006	0.026 ± 0.006 ¹⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

育时间)辛芍组方在肝微粒体中的代谢情况,结果发现灯盏乙素、灯盏甲素和芍药苷分别在0.026 6 ~ 2.13,0.007 8 ~ 0.47,0.036 1 ~ 2.17 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈线性代谢转化,且消除率 > 20%,故选取该浓度的辛芍组方进行酶促代谢动力学参数的研究。由于随着反应时间的延长,底物不再呈线性转化,故实验中选择在了线性代谢的时间段(灯盏乙素、灯盏甲素在0 ~ 30 min,芍药苷在0 ~ 20 min)来进行酶促代谢动力学参数的测定。CYP450 酶是体内参与药物生物转化的主要酶系,在药物代谢和清除上起着决定性的作用^[16]。酶促动力学参数(K_m 、 $V_{\max}$ 及 CL_{int})是反应酶功能和活性的重要指标,本实验通过比较辛芍组方在正常大鼠和 MCAO 大鼠肝微粒体中的 K_m 、 $V_{\max}$ 及 CL_{int} ,发现不同状态大鼠肝微粒体中的酶对灯盏乙素、灯盏甲素和芍药苷的代谢活性不同,与正常组大鼠相比,上述成分在 MCAO 大鼠体外肝微粒体中的代谢速率降低、消除减慢。该实验结果也进一步映证了静脉注射辛芍组方后,灯盏乙素、灯盏甲素和芍药苷在 MCAO 大鼠体内的药代动力学规律^[10],根据该规律可改善药物的用法及用量,从而有助于提高药物的疗效。

本文研究结果提示由脑缺血再灌注损伤引起 MCAO 大鼠肝微粒中代谢上述成分的 CYP450 优势酶活性降低,导致以上成分在 MCAO 大鼠体内的药代动力学行为发生改变,与文献报道脑缺血再灌注损伤会引起大鼠肝脏 CYP450 同工酶的表达降低^[17-18]的结果一致。据文献报道,脑缺血再灌注损伤状态下 CYP450 同工酶表达下调的主要原因可能是核受体转录因子介导的调控 CYP450 转录的信号转导通路受到了抑制^[18]。脑缺血再灌注损伤可通过影响核受体转录因子的表达,从而减少核受体配体复合物的形成,减弱了核受体配体复合物与靶 CYP450 启动子区域特定 DNA 序列的结合作用,从而抑制了核受体对下游靶 CYP450 基因的正常转录,降低 CYP450 的表达^[19-21]。后续将对脑缺血再

灌注损伤状态下 CYP450 优势酶、上游核受体转录调控因子的表达以及核受体因子对靶 CYP450 优势酶基因的转录调控作用进行考察,以揭示在病理状态下代谢发生差异的机制。

[参考文献]

[1] 王永林,黄勇,郑林,等.注射用辛芍冻干粉针药味配伍作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(7):38-40.

[2] 郑林,牟景丽,黄勇,等.UPLC-MS/MS 法同时测定注射用辛芍中 7 种指标成分的含量[J].中国新药杂志,2014,23(1):105-109.

[3] 贵州省药品监督管理局.贵州省中药材、民族药材质量标准[M].贵阳:贵州科技出版社,2003:172.

[4] 陆苑,张洁,兰燕宇,等.灯盏细辛-赤芍组方配比及给药途径的脑保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(21):175-179.

[5] 黄勇,王永林,兰燕宇,等.注射用辛芍对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用和对脑微循环血流量的影响[J].中国新药杂志,2008,17(2):119-123.

[6] 刘宗炎,董莉,董永喜,等.灯盏细辛与赤芍配伍组方对 H₂O₂ 致 PC12 细胞损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(5):180-183.

[7] 郑林,牟景丽,唐丽,等.UPLC-MS 法研究辛芍提取物的药动学及其绝对生物利用度[J].中国新药杂志,2014,23(7):819-823.

[8] 巩仔鹏,胡建春,李梅,等.基于大鼠脑缺血再灌注损伤模型建立辛芍组方中灯盏乙素和芍药苷的 PK-PD 结合模型[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(1):74-78.

[9] 刘亭,刘香香,陈亭亭,等.灯盏细辛和赤芍配伍组方对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及对 NF- κ B 通路的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(9):111-115.

[10] LI Y T, LU Y, HU J C, et al. Pharmcaokinetic comparison of scutellarin and paeoniflorin in sham-operated and middle cerebral artery occlusion ischemia and reperfusion injury rats after intravenous

administration of Xin-Shao formula [J]. Molecules, 2016,21(9) :E1191.

[11] 曾苏. 药物代谢学[M]. 杭州:浙江大学出版社,2008: 140-152.

[12] 贾佩佩,张晓旭,张智勇,等. 染料木苷在大鼠肝微粒体中的代谢及酶促反应动力学研究[J]. 中国药学杂志,2015,50(9) :797-801.

[14] 向云亚. 6-姜酚在大鼠肝微粒体中的代谢研究[D]. 广州:广州中医药大学,2013.

[15] XIA Z L,YING J Y,SHENG R,et al. *In vitro* metabolism of BYZX in human liver microsomes and the structural elucidation of metabolite by liquid chromatography-mass spectrometry method[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,2007,857(2) : 266-274.

[16] Sinz M,Wallace G,Sahi J. Current industrial practices in assessing CYP450 enzyme induction: preclinical and clinical[J]. AAPS J,2008,10(2) :391-400.

[17] YANG X F,HE W,LU W H. Effects of scutellarin on liver function after brain ischemia/reperfusion in rats [J]. Acta Pharmcaol Sin,2003,24(11) :1118-1124.

[18] BING Y T,ZHU S Y,JIANG K. Reduction of thyroid hormones triggers down-regulation of hepatic CYP2B through nuclear receptors CAR and TR in a rat model of acute stroke [J]. Biochem Pharmcaol, 2014, 87 (4) : 636-649.

[19] Feere D A,Velenosi T J,Urquhart B L. Effect of erythropoietin on hepatic cytochrome P450expression and function in an adenine-fed rat model of chronic kidney disease[J]. Brit J Pharmcaol,2015,172(1) :201-213.

[20] Wójcikowski J,Daniel W A. The brain dopaminergic system as an important center regulating liver cytochrome P450 in the rat[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2009,5(6) :631-645.

[21] YANG J,HAO C,YANG D,et al. Pregnane X receptor is required forinterleukin-6-mediated down-regulation of cytochrome P450 3A4 in human hepatocytes[J]. Toxicol Lett,2010,197(3) :219-226.

[责任编辑 刘德文]