

· 实验研究 ·

LC-MS/MS 法研究黄酮类化合物对人肝微粒体细胞色素 P450 酶 6 种亚型的体外抑制作用

和 凡¹, 钟国平², 赵立子², 毕惠嫦², 黄 民²

(1 广州市妇女儿童医疗中心药剂科, 广州 510120; 2 中山大学药学院临床药理研究所, 广州 510080)

[摘要] **目的:**建立液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)研究黄酮类化合物对人肝微粒体细胞色素 P450 酶 6 种亚型的体外抑制作用。**方法:**采用 ESI 正离子和负离子选择反应检测同时测定扑热息痛、4-羟基甲苯磺丁脲、5-羟基奥美拉唑、氧去甲基右美沙芬、6-羟基氯唑沙宗和氧化硝苯地平, 分别代表 CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 的活性; 黄酮类化合物和 6 种探针底物在人肝微粒体中共同孵育, 并计算其 IC₅₀ 值表示对 CYP450 酶的抑制程度。**结果:**黄酮类(水飞蓟宾、金丝桃苷、儿茶素、表儿茶素、葛根素、芦丁、甘草苷以及柚皮苷)的 IC₅₀ 值均大于 50 μmol·L⁻¹, 对 6 种亚型没有抑制作用。而黄酮苷元如槲皮素等均能不同程度地抑制 CYP1A2, IC₅₀ 值从 0.054 μmol·L⁻¹ 到 31.91 μmol·L⁻¹ 不等; 有些对其他亚型如 CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1, CYP3A4 也有一定的抑制作用。所有的黄酮类化合物对 CYP2D6 无抑制活性。黄酮对 CYP3A4 的活性也有激活作用。**结论:**建立的 LC-MS/MS 方法准确、灵敏、可靠。33 种黄酮类化合物对 CYP450 酶 6 种亚型有不同的抑制作用, 这些信息有助于中药-药物相互作用的预测。

[关键词] 液相色谱-串联质谱法; 黄酮类化合物; 细胞色素 P450; 探针底物

[中图分类号] R96 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2009)24-2340-06

Flavonoids inhibit six cytochrome P450 enzymes from human liver microsomes as analyzed by LC-MS/MS method

HE Fan¹, ZHONG Guo-ping², ZHAO Li-zi², BI Hui-chang², HUANG Min²

(1 Department of Pharmacy, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou 510120, China;

2 School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the inhibitory effect of flavonoids on six cytochrome P450 enzymes from human liver microsomes as analyzed by LC-MS/MS method. **Methods:** Six cytochrome P450 probe substrate metabolites (including paracetamol for CYP1A2, 4-hydroxytolbutamide for CYP2C9, 5-hydroxyomeprazole for CYP2C19, dextrorphan for CYP2D6, 6-hydroxychlorzoxazone for CYP2E1 and dehydronifedipine for CYP3A4) were measured by LC-MS/MS with positive and negative ion SRM detection. Flavonoids were incubated with human liver microsomes in the presence of six probe substrates of CYP450 isozymes, and the inhibitory effect were evaluated with IC₅₀ values. **Results:** Flavonoids were classified as the potent, marginal, or weak inhibitors to the CYP450 isozymes. The IC₅₀ values of flavonoids for glycosides substitutions (silybin, hyperoside, catechin, epicatechin, puerarin, rutin, liquiritin and naringin) were above 50 μmol·L⁻¹, but did not show any inhibitory effect on the six CYP450 isoforms. All flavonoid aglycones such as quercetin showed inhibitory effects on CYP1A2 (IC₅₀ values ranged from 0.054 μmol·L⁻¹ to 31.91 μmol·L⁻¹); some of them were able to inhibit other CYP450 isoforms such as

[基金项目] 广东省高等学校中药有效性与安全性重点实验室开放基金(kf07007)。

[通讯作者] 和凡,男,博士,主管药师。联系电话:(020)81330652,E-mail:hefan_yh@tom.com。

[通讯作者] 黄民,男,教授,主要从事药动学和临床药理学研究。联系电话:(020)87334521,E-mail:huangmin@mail.sysu.edu.cn。



CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1, and CYP3A4. All flavonoids did not inhibit CYP2D6. Otherwise, flavone also stimulated the CYP3A4 activity. **Conclusion:** The presented method has acceptable accuracy, precision and sensitivity, and it is suitable for *in vitro* inhibition study. Flavonoids show different inhibitory effects on the activity of CYP450 isozymes; the information is useful for the prediction of flavonoids-drug interactions.

[**Key words**] LC-MS/MS; flavonoids; cytochrome P450; probe substrate

黄酮类化合物是中草药中重要的一类物质,具有多种生物学活性,如抗菌、抗病毒、抗炎、镇痛、保肝、抑制细胞凋亡以及雌激素样作用^[1]。随着中药在国内外应用的日益广泛,由此而产生的药物相互作用越来越引起关注。根据现代药理学理论,这种相互作用主要是由细胞色素 P450 酶(CYP450)所介导的,其中 CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 这 6 种亚型参与了 90% 的临床药物的代谢,是研究的重点所在^[2]。通过体外肝微粒体孵育,考察药物对 CYP450 酶的抑制作用,预测可能存在的相互作用是经典方法之一^[3]。有关黄酮类化合物此方面的研究已有报道^[4-5],但这些研究主要集中在 CYP1A2 和 CYP3A 等少数几个亚型,而且局限于欧美应用较多的几类黄酮类化合物。因此本研究将采用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)同时测定人肝微粒体孵育体系中 6 种特异性探针底物的代谢物(即 cocktail 方法),通过代谢转化的变化来考察 33 种黄酮类化合物对前述 6 种 CYP450 酶亚型的抑制作用,为中药-药物相互作用的预测提供理论基础。

材料与方 法

1 药品与仪器

非那西丁(phenacetin, PHE, 批号:77440)、扑热息痛(paracetamol, PAR, 批号:A4438)、甲苯磺丁脲(tolbutamide, TOL, 批号:T0891)、4-羟基甲苯磺丁脲(4-hydroxytolbutamide, OHTOL, 批号:UC160)、奥美拉唑(omeprazole, OME, 批号:O104)、右美沙芬(dextromethorphan, DEXM, 批号:D9684)、氧去甲基右美沙芬(dextrophan, DEXP, 批号:D127)、氯唑沙宗(chlorzoxazone, CHL, 批号:C4397)、6-羟基氯唑沙宗(6-hydroxychlorzoxazone, OHCHL, 批号:UC148)、硝苯地平(nifedipine, NIF, 批号:N7634)、氧化硝苯地平(dehydronifedipine, DNIF, 批号:UC167)(Sigma, 美国);5-羟基奥美拉唑(5-hydroxyomeprazole, OHOME)(AstraZeneca, 瑞典);黄酮、3-单羟基黄酮、5-单羟基黄酮、6-单羟基黄酮、7-单羟基黄酮、2'-单羟基黄酮、3'-单羟基黄酮、4'-单羟基黄酮、3,7-双羟基黄酮、5,7-双羟

基黄酮、6,7-双羟基黄酮、7,8-双羟基黄酮、7,2'-双羟基黄酮、7,3'-双羟基黄酮、7,4'-双羟基黄酮(7,4'-FLA)(Tedia, 美国);芹菜素(批号:111520-200503)、黄芩素(批号:111595-200403)、桑黄素(批号:111538-200403)、槲皮素(批号:100081-200406)、山柰酚(批号:111755-200701)、异鼠李素(批号:110860-200608)、橙皮素(批号:110721-200613)、染料木素、高良姜素、柚皮素(批号:110723-200612)、柚皮苷(批号:110722-200610)、甘草苷(批号:111610-200604)、葛根素(批号:110752-200511)、芦丁(批号:100080-200707)、金丝桃苷(批号:111521-200303)、水飞蓟宾(批号:110856-200604)、儿茶素(批号:110877-200001)、表儿茶素(批号:110878-200102)、氯雷他定(Loratadine, LOR, 内标, 批号:100615-200602)(以上均购自中国药品生物制品检定所)。NADPH (Appli-Chem, 德国);甲醇、乙酸乙酯(色谱纯, Tedia, 美国);水为超纯水;甲酸及其他化学试剂为国产分析纯试剂。

Finnigan TSQ QUANTUM 型三重四极杆液相色谱-质谱系统(美国 Finnigan 公司);C18 XTerra MS 分析柱(100 mm × 2.1 mm, 5 μm)(美国 Waters 公司)。

2 人肝微粒体制备

中山大学第一附属医院肝移植病人的受体肝,取没有病灶的部分,患者均签署知情同意书,且中山大学伦理委员会批准。6 份肝脏等重量混合,按照差速离心法制备肝微粒体,Lowry 法^[6]测定蛋白质浓度, -80℃ 保存备用。

人肝微粒体中 6 种 CYP450 亚型的活性通过以下探针反应来表示。CYP1A2:非那西丁氧去乙基化反应生成扑热息痛;CYP2C9:甲苯磺丁脲 4-羟基化反应生成 4-羟基甲苯磺丁脲;CYP2C19:奥美拉唑 5-羟基化反应生成 5-羟基奥美拉唑;CYP2D6:右美沙芬氧去甲基化反应生成氧去甲基右美沙芬;CYP2E1:氯唑沙宗 6-羟基化反应生成 6-羟基氯唑沙宗;CYP3A4:硝苯地平氮去氢反应生成氧化硝苯地平。

3 色谱与质谱条件

色谱条件:正离子监测,流动相为甲醇-水(含

0.1% 甲酸) (70:30); 负离子监测, 流动相为甲醇-水(含 0.1% 甲酸) (90:10)。流速均为 300 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温为室温。

离子源为电喷雾电离源(ESI⁺ 或 ESI⁻); 电喷雾电压正离子模式为 3 500V, 负离子模式为 3 500 V; 加热毛细管温度为 350 $^{\circ}\text{C}$; 鞘气(N₂) 压力为 103.425 kPa, 辅气(N₂) 压力为 6.895 kPa, 碰撞气(Ar) 压力为 0.133 Pa; 扫描峰宽为 0.7 Th; 扫描时间为 0.1 s。扫描方式为选择反应监测(SRM), 定量监测的母离子、子离子以及碰撞能量见表 1。

表 1 探针代谢物的质谱条件

代谢物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	极性	碰撞能量(eV)
扑热息痛	152	110	ESI ⁺	10
4-羟基甲苯磺丁脲	287	171	ESI ⁺	18
5-羟基奥美拉唑	362	214	ESI ⁺	10
氧去甲基右美沙芬	258	157	ESI ⁺	33
6-羟基氯唑沙宗	184	120	ESI ⁻	23
氧化硝苯地平	345	284	ESI ⁺	28
氯雷他定(内标)	383	266	ESI ⁺	41

4 黄酮类化合物对 CYP450 酶抑制作用

孵育条件优化结果已另文发表^[7], 简述如下: 总体积 500 μL , 包含微粒体蛋白(0.25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 磷酸盐缓冲液(0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH7.4), 探针标准混

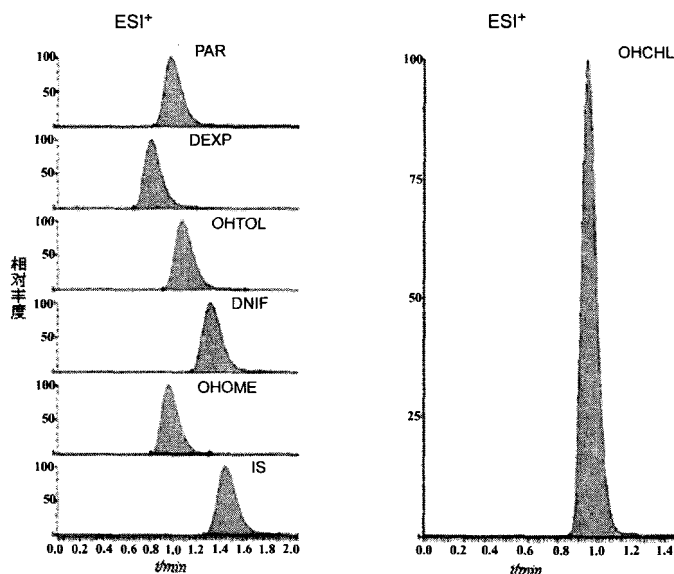
合液(终浓度 10/100/5/2.5/20/5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PHE/TOL/OME/DEXM/CHL/NIF), 不同浓度的黄酮类化合物(DMSO 溶解), 空白对照用等体积 DMSO 代替。反应在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中进行, 预孵 5 min, 加入 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NADPH 启动反应, 20 min 后, 加预冷的乙酸乙酯 2 mL 终止反应, 再加入内标 10 μL 。漩涡振荡 2 min, 静置 10 min, 3 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 转移上层有机相至另一离心管中, 于真空干燥器中挥干, 残渣用甲醇:超纯水(80:20)500 μL 复溶, 漩涡混合 1 min, 15 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液, 进样 10 μL 。生成的相应 6 种代谢物 PAR/OHTOL/OHOME/DEXP/OHCHL/DNIF 用 LC-MS/MS 分析定量。通过 GraphPad Prism 4.0 软件求算 IC₅₀ 值。每个样品平行做 3 管。整个实验操作避光进行。

结 果

1 方法学

在“方法学”项的肝微粒体样品预处理时, NADPH 在乙酸乙酯后加入, 即没有启动反应, 其余处理同前述“黄酮类化合物对 CYP450 抑制作用”项。

1.1 方法的专属性 PAR/OHTOL/OHOME/DEXP/OHCHL/DNIF 以及 IS 的保留时间依次约为 0.97, 1.08, 0.95, 0.81, 0.98, 1.32, 1.45 min, 色谱行为见图 1。空白肝微粒体中的内源性物质对测定无干扰。



PAR:扑热息痛($t_R = 0.97 \text{ min}$); OHTOL:4-羟基甲苯磺丁脲($t_R = 1.08 \text{ min}$); OHOME:5-羟基奥美拉唑($t_R = 0.95 \text{ min}$); DEXP:氧去甲基右美沙芬($t_R = 0.81 \text{ min}$); OHCHL:6-羟基氯唑沙宗($t_R = 0.98 \text{ min}$); DNIF:氧化硝苯地平($t_R = 1.32 \text{ min}$); IS:氯雷他定($t_R = 1.45 \text{ min}$)

图 1 同时测定肝微粒体孵育样品中 6 种探针代谢物的典型 LC-MS/MS 图谱

1.2 标准曲线 在空白肝微粒体孵育体系中,加入不同浓度的代谢物标准混合液,使代谢物的标准曲线范围为(PAR/OHTOL/OHOME/DEXP/OHCHL/DNIF:0.075/0.04/0.05/0.02/0.1/0.0625 ~ 4.8/2.56/3.2/1.28/6.4/4.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。以代谢物浓度为横坐标,代谢物与内标峰面积比为纵坐标,加权最小二乘法进行回归后得线性回归方程(权重系数为 $1/X$)。扑热息痛: $Y = 0.0828 + 0.0001X$, $r = 0.9989$; 4-羟基甲苯磺丁脲: $Y = 0.0202 + 0.0014X$, $r = 0.9979$; 5-羟基奥美拉唑: $Y = 0.0312 + 0.0028X$, $r = 0.9985$; 氧去甲基右美沙芬: $Y = 0.0027 + 0.0013X$, $r = 0.9975$; 6-羟基氯唑沙宗: $Y = -2493.35 + 30.4169X$, $r = 0.9989$; 氧化硝苯地平: $Y = 0.3971 + 0.0071X$, $r = 0.9989$ 。

1.3 提取回收率 在空白肝微粒体孵育体系中,制备代谢物的低、中、高3个浓度质控样品(PAR/OH-

TOL/OHOME/DEXP/OHCHL/DNIF: 0.15/0.08/0.1/0.04/0.2/0.125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 0.6/0.32/0.4/0.16/0.8/0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 2.4/1.28/1.6/0.64/3.2/2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),经样品预处理后进样分析,得目标分析物峰面积为A;将空白样本进行预处理后获得提取液,以此提取液配制QC样品,进样分析,得目标分析物峰面积为B。依“(A/B)×100%”计算提取(绝对)回收率。代谢物的低、中、高3个浓度的质控样品提取回收率见表2。除4-羟基甲苯磺丁脲的回收率约为50%外,其余代谢物的回收率均>80%,而且各个浓度的回收率相近,提取效率是非浓度依赖性,而且满足方法学的要求。

1.4 精密度和准确度 在同一分析批内和连续3个分析批间对代谢物的质控样本进行处理分析,测定方法的批内、批间精密度的(RSD)与准确度(Bias)。结果见表2,显示所有准确度与精密度的值均符合生物样本检测方法的要求。

表2 方法学的回收率、精密度和准确度

n = 5

成分	质控浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率 /%	批内		批间		成分	质控浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率 /%	批内		批间	
			RSD/%	Bias/%	RSD/%	Bias/%				RSD/%	Bias/%	RSD/%	Bias/%
扑热息痛	0.15	82.85	1.74	0.77	5.05	-4.57	氧去甲基 右美沙芬	0.04	81.90	4.71	-1.56	3.67	4.82
	0.60	88.65	2.22	0.85	3.69	8.02		0.16	79.62	4.13	3.92	7.22	0.38
	2.40	83.95	1.01	-0.26	2.15	-2.16		0.64	83.12	5.12	-0.27	5.16	4.42
4-羟基甲 苯磺丁脲	0.08	47.58	6.99	6.43	5.17	4.15	6-羟基氯 唑沙宗	0.20	100.88	2.66	2.84	3.87	7.55
	0.32	46.53	1.89	-0.82	3.68	1.57		0.80	108.20	2.81	5.04	1.66	7.52
5-羟基奥 美拉唑	1.28	50.73	2.45	-1.84	4.97	1.96	氧化硝 苯地平	3.20	110.74	2.85	-9.23	2.87	-4.43
	0.10	75.26	0.76	8.26	5.38	6.39		0.125	90.09	8.20	5.16	6.56	0.73
美拉唑	0.40	82.03	5.71	-6.40	1.46	-8.10	苯地平	0.50	88.19	4.28	3.42	3.19	0.02
	1.60	74.94	6.13	-2.48	6.00	4.54		2.00	91.37	6.12	1.76	4.06	6.33

1.5 稳定性 在肝微粒体孵育实验中,由于实时操作,不涉及冻融及长期保存过程,所以只考察了代谢物质控样品的进样分析液在进样器中保持12h的稳定性。结果显示在此条件下,待测物可以保持稳定,偏离度均<10%。

2 黄酮类化合物对CYP450酶抑制作用

化合物的抑制程度可分为如下等级^[8]:强抑制剂($IC_{50} \leq 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),中等程度抑制剂($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} < IC_{50} \leq 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),弱抑制剂($IC_{50} > 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。当 $IC_{50} > 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,化合物被认为没有抑制作用。考察过程包含2步,第一步:每个黄酮类化合物首先设定3个浓度(1,10,50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),

进行初步筛选,判断其对CYP450酶的抑制程度。第二步:根据第一步的结果,对于那些抑制作用较强的化合物,设定合理的浓度范围(5或6个浓度点),进一步求出确切的 IC_{50} 值。

结果表明水飞蓟宾、金丝桃苷、儿茶素、表儿茶素、葛根素、芦丁、甘草苷以及柚皮苷对6种CYP450酶亚型没有抑制作用。而其他的黄酮类化合物普遍存在抑制CYP1A2的现象,而对其他某些亚型也有一定的抑制作用,例如CYP2C9,CYP2C19,CYP2E1和CYP3A4。未见黄酮类化合物对CYP2D6的抑制作用。 IC_{50} 值见表3。

黄酮除了能强烈抑制CYP1A2的活性,对CYP3A4的活性还有激活作用。当孵育体系中黄酮

的浓度为 1, 3, 10, 20 和 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, CYP3A4 催化硝苯地平的能力分别提高了 3.59%, 14.48%, 30.56%, 81.39% 和 98.93%。

表 3 黄酮类化合物抑制 CYP450 酶 6 种亚型的 IC_{50} 值

黄酮类化合物	6 种亚型的 IC_{50} 值/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$					
	1A2	2C9	2C19	2D6	2E1	3A4
黄酮	0.234	1.233	-	-	-	-
3-单羟基黄酮	0.357	-	-	-	-	-
5-单羟基黄酮	0.314	4.943	-	-	-	-
6-单羟基黄酮	1.282	3.548	-	-	-	-
7-单羟基黄酮	0.24	3.627	-	-	-	-
2'-单羟基黄酮	2.323	6.362	-	-	-	-
3'-单羟基黄酮	1.977	5.598	25.119	-	-	-
4'-单羟基黄酮	1.648	17.393	20.749	-	-	-
3,7-双羟基黄酮	0.703	7.889	-	-	-	-
5,7-双羟基黄酮	0.054	5.225	-	-	-	-
6,7-双羟基黄酮	9.12	5.471	-	-	-	-
8,7-双羟基黄酮	0.631	4.613	-	-	-	-
7,2'-双羟基黄酮	1.113	5.035	-	-	-	-
7,3'-双羟基黄酮	1.174	3.373	20.225	-	-	-
7,4'-双羟基黄酮	3.404	6.607	-	-	-	-
高良姜素	0.153	2.98	-	-	0.478	-
黄芩素	3.069	6.886	28.51	-	5.781	33.806
芹菜素	0.597	3.926	-	-	5.07	-
山柰酚	1.489	6.095	-	-	3.979	-
异鼠李素	1.698	35.156	-	-	-	-
槲皮素	2.978	8.091	23.121	-	6.918	15.381
桑黄素	25.41	22.699	-	-	-	-
染料木素	31.91	6.427	-	-	-	26.424
橙皮素	25.53	17.62	40.644	-	-	-
柚皮素	23.17	15.403	42.855	-	-	46.558

"-": $\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 水飞蓟宾、金丝桃苷、儿茶素、表儿茶素、葛根素、芦丁、甘草苷以及柚皮苷对于 6 种亚型的 IC_{50} 均 $> 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

讨 论

应用肝微体研究药物对 CYP450 酶的抑制作用,进而探讨药物相互作用是国内外常用的方法。然而传统的方法,1 次只孵育 1 种探针,评价 1 种亚型,如果要完成前述主要 6 个主要亚型的研究,将是一个费时、费力、费钱的大工程。近年来国外出现了同时孵育多种探针,即“cocktail”方法,来同时获得多个酶亚型的信息^[9-10]。本实验室也建立同时评价 CYP450 酶 6 个亚型的“cocktail”方法^[7]。

由于 6 种探针代谢物性质各异,通常的 HPLC 很难满足定量要求,所以本研究采用了 LC-MS/MS 方法。6-羟基氯唑沙宗在 ESI^- 模式下响应高于 ESI^+ ,而其他待测物正好相反,所以本实验采用 2 次进样的方法,即分别在正、负离子模式下,对待测物进行定量分析。为了建立良好的样品预处理方法以保证后续分析的准确可信,本实验考察多种处理方法:直接沉淀蛋白法(甲酸、甲醇、乙腈);液-液萃取法(乙醚、乙酸乙酯)和固相萃取法(HLB Oasis 固相萃取柱)。数据显示直接沉淀蛋白法检测不到 5-羟基奥美拉唑;乙醚的萃取效率低,响应值低,特别是 4-羟基甲苯磺丁脲(OHTOL);乙酸乙酯的提取效率明显提高,每个待测物的提取率均 $> 80\%$ (OHTOL 约为 50%),且呈现非浓度依赖性。固相萃取法的提取效率同乙酸乙酯(OHTOL 能提高到 80%),但操作复杂,费用较高。所以选择了乙酸乙酯作为样品预处理的提取剂。此外,本方法采用了等度洗脱,相对于文献中的梯度洗脱^[9-10],操作简便,分析时间短,而且亦能满足方法学验证的要求。

黄酮类化合物是多种中药中的活性成分,应用广泛,同其他药物合用的几率也大,它所引起的药物相互作用已有文献报道^[4-5]。本实验研究了 33 种黄酮类化合物对 6 种主要 CYP450 酶亚型的抑制作用,结果显示黄酮苷类对 CYP450 酶没有抑制作用,这可能与糖基的存在有关。分子中结合糖基使分子体积增大,构象也不再是平面,从而无法进入活性中心^[5]。黄酮苷元普遍存在抑制 CYP1A2 的能力,但程度有所不同,这可能和羟基取代的数目和位置有关^[5,11]。黄酮除了抑制作用外,对 CYP3A4 亦有激活作用,它与其他黄酮类化合物唯一的区别在于没有羟基取代。有文献表明^[11-12],其他没有羟基取代的黄酮类化合物如 7,8-苯骈黄酮和红橘素也能刺激 CYP3A4 的活性。虽然这些结果提示黄酮类化合物能影响 CYP450 酶,有引起药物相互作用的可能,但中药的吸收问题,以及体内外的相关性和差异性,仍需要进一步研究。

中药成分复杂,很难满足现代药物理论的要求,但往往起主要作用的活性成分是一种或几种,即所谓的单体,对单体的研究是目前中药研发的热点。借助 LC-MS/MS,应用体外“cocktail”模型,可以对众多单体进行高通量的筛选,这对于预测中药-药物间相互作用,保证中药安全、有效的使用以及中药现代化有着重要的意义。(下接第 2348 页)

drug paclitaxel has immunosuppressive properties that can effectively promote allograft survival in a rat heart transplant model [J]. *Transplantation*, 2002, 73(2): 216 - 223.

[2] KUROSE A, YOSHIDA W, YOSHIDA M, *et al.* Effects of paclitaxel on cultured synovial cells from patients with rheumatoid arthritis [J]. *Cytometry*, 2001, 44(4): 349 - 354.

[3] HUI A, KULKARNI GV, HUNTER WL, *et al.* Paclitaxel selectively induces mitotic arrest and apoptosis in proliferating bovine synoviocytes [J]. *Arthritis Rheum*, 1997, 40(6): 1073 - 1084.

[4] ALBERS JM, PAIMELA L, KURKI P, *et al.* Treatment strategy, disease activity, and outcome in four cohorts of patients with early rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2001, 60(5): 453 - 458.

[5] ARSENAULT AL, LHOLAK S, HUNTER WL, *et al.* Taxol (paclitaxel) involution of articular cartilage destruction in collagen induced arthritis: an ultrastructural demonstration of an increased supragial chondroprotective layer [J]. *Rheumatology*, 2000, 27(3): 582 - 588.

[6] CAO L, SUN D, CRUZ T, *et al.* Inhibition of experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat by paclitaxel [J]. *Neuroimmunology*, 2000, 108(1-2): 103 - 111.

[7] SONG YW, KIM HA, BAEK HJP, *et al.* Paclitaxel reduces anti-dsDNA antibody titer and BUN, prolonging survival in murine lu-

pus [J]. *Int J Immunopharmacol*, 1998, 20(11): 669 - 677.

[8] BRAHN E, TANG C, BANQUERIGO ML. Regression of collagen-induced arthritis with taxol, a microtubule stabilizer [J]. *Arthritis Rheum*, 1994, 37(6): 839 - 845.

[9] OLIVER SJ, BANQUERIGO ML, BRAHN E. Suppression of collagen-induced arthritis using an angiogenesis inhibitor, AGM-1470, and a microtubule stabilizer, taxol [J]. *Cell Immunol*, 1994, 157(1): 291 - 299.

[10] LAINER-CARR D, BRAHN E. Angiogenesis inhibition as a therapeutic approach for inflammatory synovitis [J]. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2007, 3(8): 434 - 442.

[11] LAINER DT, BRAHN E. New antiangiogenic strategies for the treatment of proliferative synovitis [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2005, 14(1): 1 - 17.

[12] KOUSKOFF V, KORGANOW AS, DUCHATELLE V, *et al.* Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity [J]. *Cell*, 1996, 87(5): 811 - 822.

[13] EDWARDS JC, SZCZEPANSKI L, SZECHINSKI J, *et al.* Efficacy of B2cell2targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(25): 2572 - 2581.

编辑:王宇梅/接受日期:2009-04-20

(上接第 2344 页)

[参 考 文 献]

[1] 周新,李宏杰. 黄酮类化合物的生物活性及临床应用进展 [J]. 中国新药杂志, 2007, 16(5): 350 - 355.

[2] SHIMADA T, YAMAZAKI H, MIMURA M, *et al.* Interindividual variations in human liver cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals [J]. *Pharmacol Exp Ther*, 1994, 270(1): 414 - 423.

[3] VENKATAKRISHNAN K, VON MOLTKE LL, OBACH RS, *et al.* Drug metabolism and drug interactions: application and clinical value of *in vitro* models [J]. *Curr Drug Metab*, 2003, 4(5): 423 - 459.

[4] ZHOU S, GAO Y, JIANG W, *et al.* Interactions of herbs with cytochrome P450 [J]. *Drug Meta Rev*, 2003, 35(1): 35 - 98.

[5] IORI F, DA FONSECA R, RAMOS ML, *et al.* Theoretical quantitative structure-activity relationships of flavone ligands interacting with cytochrome P450 1A1 and 1A2 isozymes [J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13(14): 4366 - 4374.

[6] LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, 193(1): 265 - 275.

[7] HE F, BI HC, XIE ZY, *et al.* Rapid determination of six metabolites from multiple cytochrome P450 probe substrates in human liver microsome by liquid chromatography/mass spectrometry; appli-

cation to high-throughput screening for cytochrome P450 inhibition effect of terpenoids [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(5): 635 - 643.

[8] WHITE RE. High-throughput screening in drug metabolism and pharmacokinetic support of drug discovery [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2000, 40(4): 133 - 157.

[9] SAMUEL A, TESTINO JR, GABOR P. High-throughput inhibition screening of major human cytochrome P450 enzymes using an *in vitro* cocktail and liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 30(5): 1459 - 1467.

[10] UNGER M, FRANK A. Simultaneous determination of the inhibitory potency of herbal extracts on the activity of six major cytochrome P450 enzymes using liquid chromatography/mass spectrometry and automated online extraction [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004, 18(19): 2273 - 2281.

[11] WANG RW, NEWTON DJ, LIU N, *et al.* Human cytochrome P-450 3A4: *in vitro* drug-drug interaction patterns are substrate-dependent [J]. *Drug Metab Dispos*, 2000, 28(3): 360 - 366.

[12] QUINTIERI L, PALATINI P, NASSI A, *et al.* Flavonoids diosmetin and luteolin inhibit midazolam metabolism by human liver microsomes and recombinant CYP 3A4 and CYP3A5 enzymes [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 75(6): 1426 - 1437.

编辑:周卓/接受日期:2009-05-25