

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.08.006  
文章编号: 1005-8982 (2018) 08-0030-05

## 氢溴酸槟榔碱对人肝 CYP450 酶的体外影响

肖润梅<sup>1</sup>, 肖晨曦<sup>2</sup>

(1. 湖北省中西医结合医院 药剂科, 湖北 武汉 430015; 2. 武汉大学 生命科学院, 湖北 武汉 430072)

**摘要: 目的** 采用液质联用法结合特异性探针技术, 研究氢溴酸槟榔碱 (AH) 对人肝微粒体 (HLM) 中细胞色素 P450 (CYP450) 亚型酶的体外影响。**方法** 将 CYP1A2、2E1、3A4、2C9、2D6、2B6 的探针底物分别在 0 ~ 160 μmol/L AH 的 HLM 中温孵, 高效液相法测定 CYP1A2、2E1、3A4、2C9 的酶活性; 高效液相色谱-串联质谱仪测定 CYP2D6、2B6 的酶活性。**结果** AH 对 HLM 中 CYP2D6、2B6、2E1、2C9 的酶活性有轻微抑制作用, 且随 AH 浓度的升高而增强。当 AH 为 160 μmol/L 时, 对 CYP2D6、2B6、2E1、2C9 酶活性的抑制率分别为 36.2%、38.3%、35.0% 和 35.4%。**结论** 槟榔嗜好者使用 CYP1A2、2E1、3A4、2C9、2D6、2B6 6 个 CYP450 酶的底物药物时, 其代谢相互作用的风险仍不可忽视。

**关键词:** 高效液相; 细胞色素 P450; 人肝微粒体; 特异性探针底物; 氢溴酸槟榔碱

**中图分类号:** R285.5

**文献标识码:** A

## Effect of arecoline hydrobromide on human hepatic cytochrome P450 activity *in vitro*

Run-mei Xiao<sup>1</sup>, Chen-xi Xiao<sup>2</sup>

(1. Department of Pharmacy, Hubei Provincial Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Wuhan, Hubei 430015, China; 2. College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430072, China)

**Abstract: Objective** To observe the influences of arecoline hydrobromide (AH) on human hepatic cytochrome P450 activity *in vitro* by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) and a cocktail probe substrates method. **Methods** In this study, six probe substrates of CYP1A2, 2E1, 3A4, 2C9, 2D6 and 2B6 were simultaneously incubated with human liver microsome (HLM) and AH (0-160 μmol/L). The activity of CYP1A2, 2E1, 3A4 and 2C9 was determined by HPLC, and the activity of CYP2D6 and 2B6 was determined by HPLC-MS. **Results** The activity of CYP2D6, 2B6, 2E1 and 2C9 in HLM was slightly inhibited by AH, which was concentration-dependent. When the AH concentration was 160 μmol/L, the inhibitory rates of the activity of CYP2D6, 2B6, 2E1 and 2C9 in HLM were 36.2%, 38.3%, 35.0% and 35.4%, respectively. **Conclusions** The risk of metabolic interaction should not be neglected when the substrate drugs of the six kinds of cytochrome P450 isoforms are administered in betelnut addicts.

**Keywords:** high performance liquid chromatography (HPLC); cytochrome P450; human liver microsome; probe substrate; arecoline hydrobromide

细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 是肝脏进行 I 相生物转化的主要酶系<sup>[1-3]</sup>。对该酶的诱导

或抑制可导致与其联用的药物清除率和毒性改变<sup>[4-6]</sup>。槟榔是仅次于酒精、烟草和咖啡, 被广泛使用的习

惯性嗜好品, 世界上约 10% 的人在使用它<sup>[7-8]</sup>。槟榔中含有多种嘧啶生物碱, 槟榔碱占总生物碱的 0.30% ~ 0.63%<sup>[9-10]</sup>。槟榔碱对 CYP450 酶活性的影响未见报道, 探讨槟榔碱对肝脏代谢功能的影响, 在药理学、毒理学研究中有重要意义<sup>[11-13]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与药品

氢溴酸槟榔碱 (arecoline hydrobromide, AH) (上海阿拉丁试剂, 批号: 20140618, 含量  $\geq 98\%$ ), 6 $\beta$ -羟基睾酮、安非他酮、羟基安非他酮对照品购自美国 Cayman Chemical 公司, 睾酮和甲苯磺丁脲 (德国 Dr.Ehrenstorfer 公司), 4-羟基甲苯磺丁脲、6-羟基氯唑沙宗和去甲基右美莎芬购自加拿大 TRC 公司, 混合人肝微粒体 (human liver microsome, HLM) (美国 BD Gentest 公司), 右美莎芬 (加拿大 Toronto Research Chemicals Inc 公司), 非那西丁 (上海 Alfa Aesar 公司), 对乙酰氨基酚 (日本 TCI 公司), BCA 蛋白试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司), 乙腈和甲醇色谱纯 (德国 Merck 公司)。

### 1.2 实验仪器

HPLC-20A 高效液相色谱仪、LC-MS-8040 三重

四级杆液质联用仪购自日本岛津公司, Vortex-5 型漩涡震荡器 (天津仪器厂), BP211D 电子天平 (德国 Sartorius 公司), 5417 R 小型台式高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司), P 型移液器 (法国 Gilson 公司)。

### 1.3 探针底物与肝微粒体温孵反应条件

以探针底物在 HLM 温孵体系中对特征代谢物的生成量, 评价各种 CYP450 亚型酶的活性, 并在本实验室现有基础上优化反应条件<sup>[14]</sup>。本实验探针底物的浓度选择参考文献 [7-8], 其浓度值均在其表观  $K_m$  值附近。各探针底物在 HLM 中的最佳温孵反应条件见表 1。

### 1.4 探针底物代谢物的检测

CYP3A4、2E1、1A2、2C9 探针底物代谢物的色谱检测在柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ , 进样量 60  $\mu\text{l}$  条件下进行, 其他检测条件见表 2。CYP2D6、CYP2B6 探针底物代谢物的色谱检测在柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ , 流速 0.2 ml/min, 进样量 10  $\mu\text{l}$  条件下进行线性梯度洗脱; 质谱条件: 雾化器 3 L/min, 干燥气 15.0 L/min, 离子喷雾电压 4.5 kV, 碰撞气压力 230 kPa, DL 管温度和加热模块温度分别为 250 和 400 $^{\circ}\text{C}$ , 进样量 10  $\mu\text{l}$ ; 扫描方式为多反应检测; 其他检测条件见表 3。

表 1 探针底物在 HLM 中的最佳温孵反应条件

探针底物	对照	代谢物	微粒体蛋白浓度 / (mg/ml)	温孵反应时间 /min
CYP1A2	50 $\mu\text{mol/L}$ 非那西丁	对乙酰氨基酚	0.75	45
CYP2E1	75 $\mu\text{mol/L}$ 氯唑沙宗	6-羟基氯唑沙宗	0.50	60
CYP3A4	100 $\mu\text{mol/L}$ 睾酮	6 $\beta$ -羟基睾酮	0.50	60
CYP2C9	150 $\mu\text{mol/L}$ 甲苯磺丁脲	4-羟基甲苯磺丁脲	1.00	45
CYP2D6	5 $\mu\text{mol/L}$ 右美莎芬	去甲基右美莎芬	0.50	25
CYP2B6	75 $\mu\text{mol/L}$ 安非他酮	羟基安非他酮	0.25	20

### 1.5 代谢物含量测定的方法学考察

分别对 CYP1A2、2E1、3A4、2C9、2D6、2B6 6 种亚型酶的特异性代谢产物的专属性、线性、回收率和精密度测定进行方法学考察。

### 1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 用方差分析, 两两比较用 LSD- $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

表 2 CYP3A4、2E1、1A2、2C9 探针底物代谢物的检测条件

探针底物	流动相 / (体积比)	检测波长 / 流速 (ml/min)	
		nm	min
CYP3A4	甲醇: 水 = 55 : 45	247	0.8
CYP2E1	水: 乙腈 = 78 : 22	282	1.0
CYP1A2	甲醇: 水 (pH 4.57) = 23 : 77	245	1.0
CYP2C9	乙腈: 0.1% 冰醋酸 = 30 : 70	230	1.0

表 3 CYP2D6、2B6 探针底物代谢物的检测条件

探针底物	定量检测的离子对 / (m/z)	碰撞能量 /V	Q1 预杆电压 /V	Q3 预杆电压
CYP2D6				
右美沙芬	272 → 171	-39.0	-19.0	-17.0
去甲基右美沙芬	258 → 157	-39.0	-17.0	-29.0
CYP2B6				
安非他酮	240 → 184	-16.0	-17.0	-26.0
羟基安非他酮	256 → 238	-12.0	-17.0	-26.0

## 2 结果

### 2.1 专属性

实验得到各代谢产物的专属性色谱分离图(空白肝微粒体温孵液对照组色谱图、各探针底物的特异性代谢产物标准品溶液色谱图,以及各探针底物经肝微粒体代谢后产生代谢产物的色谱图)。实验结果表明,各代谢产物测定专属性良好,代谢产物峰无明显干扰。见图 1。

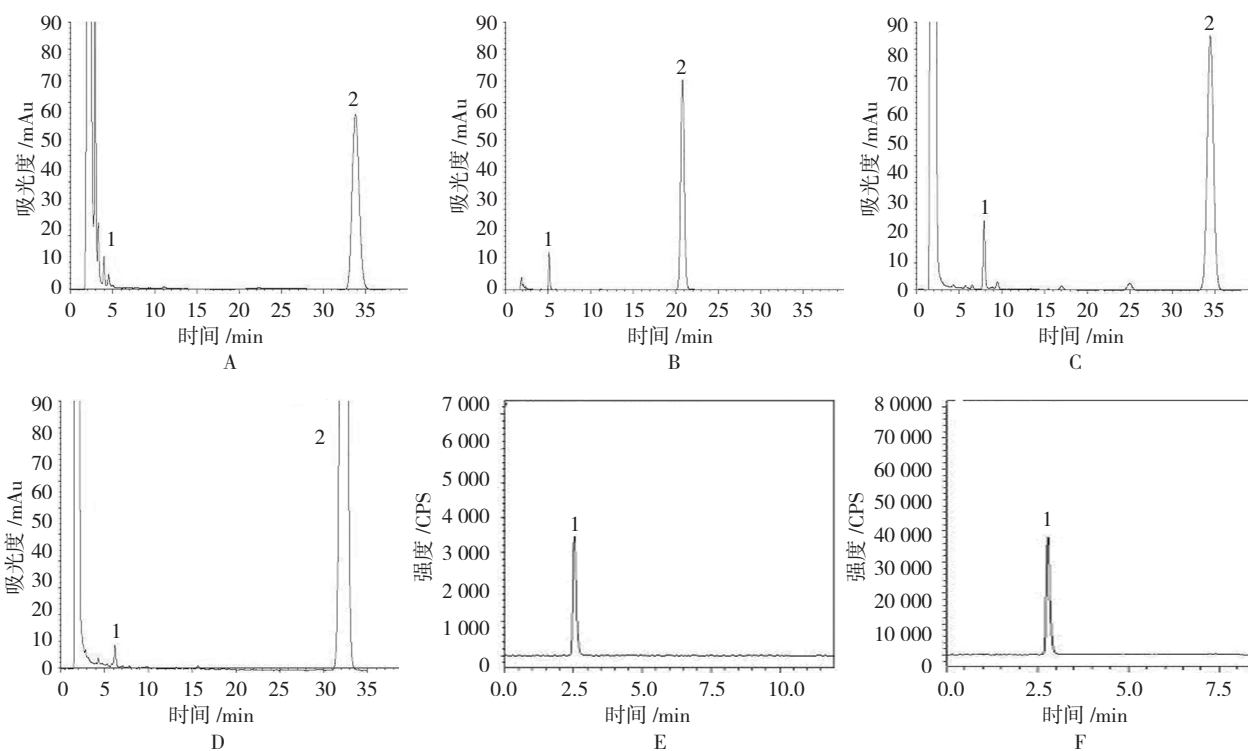
### 2.2 线性范围、精密度和回收率

HLM 各代谢产物的标准曲线、精密度和相对回

收率见表 4。在检测范围内,各代谢产物检测方法准确度较高,检测精密度良好。

### 2.3 AH 对 HLM 中 CYP450 酶活性的影响

与对照组比较, CYP1A2、2E1、3A4、2C9、2D6、2B6 6 种 CYP450 亚型的酶活性出现轻微抑制现象,抑制现象随着 AH 浓度的升高而增强,当浓度达到  $160 \mu\text{mol/L}$  时, HLM 中 CYP3A4、2D6、2B6、2E1、1A2 和 2C9 的酶活性分别降低 17.6%、36.2%、38.3%、35.0%、14.6% 和 35.4%。见图 2。



A: 非那西汀, 1: 对乙酰氨基酚, 2: 非那西汀; B: 七氯挫沙唑宗, 1: 6-羟基氯挫沙唑宗, 2: 氯挫沙唑宗; C: 睾酮, 1: 6 $\beta$ -羟基睾酮, 2: 睾酮; D: 甲苯磺丁脲, 1: 4-羟基甲苯磺丁脲, 2: 甲苯磺丁脲; E: 右美沙芬, 1: 去甲基右美沙芬; F: 安非他酮, 1: 羟基安非他酮

图 1 加入不同探针底物的 HLM 孵育体系

表 4 HLM 各代谢产物的标准曲线、精密度和相对回收率

代谢产物	标准曲线	标准偏差 / ( $\mu\text{mol/L}$ )	精密度 / %	回收率 / ( $\%, \bar{x} \pm s$ )
对乙酰氨基酚	$Y=95.86X+28.66$ $r^2=0.999$	1.00	6.7	$111.3 \pm 7.5$
		4.00	3.3	$95.6 \pm 3.2$
		8.00	3.8	$101.3 \pm 3.9$
6-羟基氯唑沙宗	$Y=20.24X-1.689$ $r^2=0.999$	1.00	7.2	$109.6 \pm 7.9$
		4.00	4.8	$97.6 \pm 4.7$
		8.00	2.5	$98.2 \pm 2.4$
6 $\beta$ -羟基睾酮	$Y=76.25X-8.842$ $r^2=0.999$	1.00	3.8	$101.3 \pm 3.9$
		4.00	4.2	$104.1 \pm 4.4$
		8.00	2.2	$100.0 \pm 2.2$
4-羟基甲苯磺丁脲	$Y=231.9X+72.16$ $r^2=0.999$	0.25	4.2	$95.2 \pm 4.0$
		1.00	4.8	$102.5 \pm 4.9$
		4.00	4.9	$103.5 \pm 5.1$
去甲基右美莎芬	$Y=906933X+1414.06$ $r^2=0.999$	0.04	5.6	$101.6 \pm 5.7$
		0.16	3.5	$96.2 \pm 3.4$
		0.64	2.8	$102.3 \pm 2.9$
羟基安非他酮	$Y=2111200X-1495.86$ $r^2=0.999$	0.04	7.8	$109.6 \pm 8.5$
		0.08	6.4	$99.2 \pm 6.4$
		0.16	3.4	$95.4 \pm 3.2$

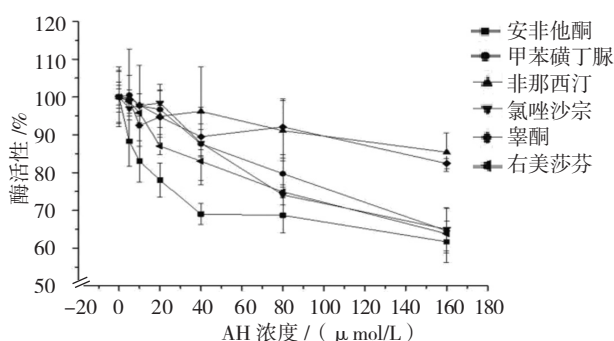


图 2 AH 对 HLM 中 CYP450 酶活性的体外影响

### 3 讨论

目前, 已确定人类 CYP450 基因有 18 个家族、44 个亚家族, 已有 57 种人类 CYP450 酶亚型被克隆和确认<sup>[9]</sup>, 尤其是肝脏中的 CYP2D6、2C、1A2、2E1、2B6、3A4, 分别占 1.0%、20.0%、12.0%、6.0%、0.2% ~ 6.0% 和 29.0% 人肝总量, 分别参与 30%、17%、4%、2%、2% ~ 10% 和 50% 药物代谢<sup>[10]</sup>。实验发现中、低剂量 (80 和 40  $\mu\text{mol/L}$ ) AH 对体外 HLM 中 6 种 CYP450 亚型酶活性仅有极弱抑制作用, 且抑制作用随 AH 浓度的升高而增强。当 AH 为 160  $\mu\text{mol/L}$  时, 对 HLM 中 CYP2D6、2B6、2E1 和 2C9

酶活性的抑制率分别为 36.2%、38.3%、35.0% 和 35.4%。体外 HLM 孵育结合混合探针底物法测定酶活性是一个常用的评价药物对 CYP450 酶抑制作用的方法<sup>[11]</sup>。HLM 的实验结果比动物肝微粒体更接近人体内实验, 体外研究不仅能提供各 CYP450 酶对底物药物的代谢状况, 而且可以排除体内其他因素的干扰, 具有明确、高通量、操作简便等优点, 在为整体实验提供理论依据方面具有较大优势。但是体外实验的结果在选择探针底物的种类和浓度、受试物浓度设定、酶蛋白浓度, 以及微粒体来源等因素方面有可能受到影响, 不同实验的结果可能会有一定的差异<sup>[12]</sup>, 因此在讨论药物可能存在的基于 CYP450 酶代谢相互作用风险时, 应当结合体内实验进行评价。本实验提示, 中、低剂量组咀嚼槟榔可能不会造成严重代谢相互作用。本实验室前期研究表明, 灌胃 AH 能诱导大鼠肝脏 CYP2E1 的体内活性, 但随口服 AH 剂量增加, 出现不同程度的抑制, 且抑制作用随 AH 浓度的升高而增强<sup>[13]</sup>, 与本实验高剂量组结果一致。古桂花等<sup>[14]</sup>从病理学及细胞生物学的角度探讨槟榔碱对小鼠肝细胞凋亡的影响, 发现槟榔碱组的肝细胞及其周边有炎症, 严重

的还会导致细胞凋亡。肝脏是药物代谢的主要器官,这可能是槟榔嗜好者使用 CYP1A2、2E1、3A4、2C9、2D6、2B6 6 个 CYP450 亚型酶的底物药物时,存在代谢相互作用的风险,其具体机制有待进一步研究。

#### 参 考 文 献:

- [1] LYNCH T, PRICE A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects[J]. *Am Fam Physician*, 2007, 76(3): 391-396.
- [2] WANG B, YANG S, HU J, et al. Multifaceted interaction of the traditional Chinese medicinal herb schisandra chinensis with cytochrome P450-mediated drug metabolism in rats[J]. *Ethnopharmacol*, 2014, 155(3): 1473-1482.
- [3] 谢海棠, 贾元威, 谭志荣, 等. 豆腐果苷对人肝微粒体 CYP450 酶体外抑制作用研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2011, 31(17): 1404-1407.
- [4] 冷欣夫, 邱星辉. 细胞色素 P450 酶系的结构、功能与应用前景 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [5] MÜLLER D J, BRANDL E J, HWANG R, et al. The AmpliChip® CYP450 test and response to treatment in schizophrenia and obsessive compulsive disorder: a pilot study and focus on cases with abnormal CYP2D6 drugmetabolism[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2012, 16(8): 897-903.
- [6] 石亮, 张远冬, 王二豪, 等. 没食子酸及其氧化产物对大鼠肝微粒体 CYP3A 的抑制效应 [J]. *第三军医大学学报*, 2014, 36(2): 130-134.
- [7] GUPTA P C, WARNAKULASURIYA S. Global epidemiology of areca nut usage[J]. *Addict Biol*, 2002, 7(1): 77-83.
- [8] TSAI J F, CHUANG L Y, JENG J E, et al. Betel quid chewing as a risk factor for hepatocellular carcinoma: a case-control study[J]. *Br J Cancer*, 2001, 84(5): 709-713.
- [9] YANG X, ZHANG B, MOLONY C, et al. Systematic genetic and genomic analysis of cytochrome P450 enzyme activities in human liver[J]. *Genome Res*, 2010, 20(8): 1020-1036.
- [10] WARREN B L, BELLWARD G D. Cytochrome P450 dependent biotransformation: some recent developments concluding remarks: the multiplicity of cytochromes P-450[J]. *Proc West Pharmacol Soc*, 1980(23): 7-9.
- [11] UTSUNOMIYA H, TILAKARATNE W M, OSHIRO K, et al. Extracellular matrix remodeling in oral submucous fibrosis: its stage-specific modes revealed by immunohistochemistry and in situ hybridization[J]. *Oral Pathol Med*, 2005, 34(8): 498-507.
- [12] TSAI C H, YANG S F, LEE S S, et al. Augmented heme oxygenase-1 expression in areca quid chewing-associated oral submucous fibrosis[J]. *Oral Dis*, 2009, 15(4): 281-286.
- [13] TILAKARATNE W M, KLINIKOWSKI M F, SAKU T, et al. Oral submucous fibrosis: review on aetiology and pathogenesis[J]. *Oral Oncol*, 2005, 42(6): 561-568.
- [14] 古桂花, 曾薇, 胡虹. 槟榔粗提物及槟榔碱对小鼠肝细胞凋亡的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(2): 56-58.

(童颖丹 编辑)