

LC-MS/MS 测定抗肿瘤活性物质咖啡酸-3,4-二羟基苯乙酯及其在人肝微粒体中的药物代谢特点研究

周广骏¹, 胡誉怀², 祝节涛¹, 连晓媛^{2*}

¹江西中医药大学药学院, 南昌 330004; ²浙江大学药学院中药药效与新药创制研究室, 杭州 310058

摘要: 本实验研究抗肿瘤活性物质咖啡酸-3,4-二羟基苯乙酯(CADPE)在体外肝微粒体中的代谢特点。通过CADPE在体外人肝微粒体培养不同时间后,用液质联用测定CADPE及其代谢产物咖啡酸和羟基酪醇在各时间点的药物浓度,描绘各物质的药-时曲线,确定CADPE的代谢特点。CADPE在肝微粒体中的代谢呈单室模型,半衰期($T_{1/2}$)为 0.72 ± 0.09 h。CADPE代谢产物羟基酪醇的达峰时间(T_{max})为 1.30 ± 0.30 h,半衰期($T_{1/2}$)为 3.97 ± 0.58 h,咖啡酸浓度与时间的关系成对数关系。明确了CADPE及其代谢产物羟基酪醇和咖啡酸在体外人肝微粒体中的药代动力学特征,为进一步深入研究CADPE在动物及人体内的药代动力学特征提供了科学依据。

关键词: 液质联用; CADPE; 肝微粒体; 代谢; 咖啡酸; 羟基酪醇

中图分类号: R917

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.5.023

Quantification of Antitumor Caffeic Acid-3,4-Dihydroxybenzylethyl Ester and Its Pharmacokinetic Study in Human Liver Microsomes by LC-MS/MS

ZHOU Guang-jun¹, HU Yu-huai², ZHU Jie-tao¹, LIAN Xiao-yuan^{2*}

¹Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, College of Pharmacy, Nanchang 330004, China;

²College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University Department of Chinese Traditional Medicine Pharmacology and New Drug Discovery, Hangzhou 310058, China

Abstract: To study the pharmacokinetic characteristic of antitumor caffeic acid-3,4-dihydroxybenzylethyl (-3,4-dihydroxyphenethyl) ester (CADPE) in human liver microsomes. Human liver microsomes were incubated *in vitro* with CADPE for different times. LC-MS method was applied to determine the concentrations of CADPE and its metabolites hydroxytyrosol and caffeic acid at the designed time points. An LC-MS analytic method was established and validated to determine the concentrations of CADPE and its metabolites hydroxytyrosol and caffeic acid in human liver microsomes. CADPE metabolism showed single compartment model and its half-life ($T_{1/2}$) was 0.72 ± 0.09 h. The time to peak (T_{max}) and the half-life ($T_{1/2}$) for hydroxytyrosol was 1.3 ± 0.3 h, 3.97 ± 0.58 h, respectively. Hydroxytyrosol metabolism showed single compartment characteristic. The relationship of caffeic acid concentration and time was logarithmic. The concentration of caffeic acid gradually increased and finally reached steady state with the gradual metabolism of CADPE. This study clarified the pharmacokinetic characteristics of CADPE and its metabolites hydroxytyrosol and caffeic acid in human liver microsomes. The data obtained also provided scientific basis for the further investigation of the pharmacokinetic characteristics of CADPE in animals and human.

Key words: LC-MS; CADPE; human liver microsomes; pharmacokinetics; hydroxytyrosol; caffeic acid

肿瘤是目前全球高发致死率较高的疾病,对人类的健康构成了极大的危害。以细胞毒为原理的放疗和化疗是肿瘤手术切除后的主要治疗方法,但放

疗和化疗疗效有限且毒副作用大。虽然分子靶向药物为癌症的治疗开辟了新途径,但它们多以单一靶点为设计原理,其临床疗效未见突破性提高。大量研究表明,炎症反应、氧化应激、肿瘤细胞凋亡机制异常以及包括血管内皮生长因子和表皮生长因子在内的多种生长因子表达增加,在肿瘤的发生和发展过程中起重要作用^[1-3]。因此,寻找选择性地作用于

收稿日期: 2016-11-14 接受日期: 2017-02-20

基金项目: 国家自然科学基金(81274137); 浙江省公益技术研究社会发展项目(2016C33070)

* 通信作者 E-mail: xylian@zju.edu.cn

癌症复杂病因的多靶点的新型优效抗癌药,可以为癌症患者带来新的希望。

多酚类化合物是自然界广泛存在的一类化合物,是目前抗肿瘤药物研究的热点,其多重作用机制逐渐被人们所认识。近年来,针对多酚类化合物抗肿瘤活性的研究受到广泛的重视。例如,茶多酚、姜黄素和咖啡酸苯乙酯的抗肿瘤活性均已有了较为深入的研究^[2,4-6]。

咖啡酸-二羟基苯乙酯(CADPE)是从具有抗肿瘤作用的中药草珊瑚^[7]中分离得到的一种多酚类化合物^[8],目前,该化合物可以高产率化学合成^[8,9]。现有研究证明:CADPE在体外对包括白血病、乳腺癌、结肠癌、卵巢癌、星形胶质细胞胶质瘤、黑色素瘤等九种不同人类癌症的60多种不同的肿瘤细胞株生长都有抑制作用,显示出广谱的抗肿瘤作用,且CADPE在多种肿瘤动物模型中也显示了较好的抗肿瘤作用^[8-15]。此外,CADPE也具有独特的多靶点抗肿瘤作用机制,目前已知的机制至少包括:降低信号传导和转录活化因子3(STAT3)和缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)的活性,抑制血管内皮生长因子(VEGF)表达而阻断肿瘤血管新生;抑制基质金属酶-9(MMP-9)表达和阻断核转录因子激活蛋白-1(AP-1)和FAK/MEK/ERK蛋白酶的激活而抑制肿瘤的迁移和侵袭;抑制Twist表达诱导肿瘤细胞衰老;阻断肿瘤细胞NF- κ B信号传导通路、阻止肿瘤细胞周期传递、促进肿瘤细胞凋亡、抑制拓扑异构酶I(Top I)活性和抗氧化应激等^[8,13-18]。

因此,CADPE具有很好的抗肿瘤药物开发价值及应用前景,但有关CADPE的药代动力学的研究却鲜有报道。本文主要研究CADPE在体外人肝微粒体中的代谢特点,为进一步深入研究CADPE人体内的药代动力学特征提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与材料

超高效液相色谱-串联质谱仪 LC-30 超高效液相色谱仪(日本岛津);AB SCIEX Triple Quad 5500 质谱仪(美国 AB Sciex 公司);Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 色谱柱(100×2.1 mm,2.7 μ m);Milli-Q A10 超纯水器(美国 Millipore 公司);0.22 μ m 有机滤膜(中国捷盛依科科技有限公司);EOFO-94561 数显型旋涡混合器(美国 Tallboys 公司);KQ3200DE 超声波清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司);Himac CR21G 高速离心机(日立工机株式会社)。

CADPE(纯度 98.6%)由本课题组合成;咖啡酸(纯度 98.7%,批号: MUST-12042403)、羟基酪醇(纯度 > 98%)和大黄素(纯度 98.7%,批号: 110756-201512)均购自于中国药品生物制品检定所。甲醇(色谱级,德国 CNW 公司);乙腈(LC-MS 级,美国 ACS 公司);冰乙酸(分析级,天津恒兴试剂公司);超纯水(电阻率 \geq 18.2M Ω ·cm)。

1.2 对照品溶液内标溶液配制

精密称取 CADPE, 羟基酪醇和咖啡酸各 10.0mg,用甲醇水溶液(90:10)溶解后于棕色容量瓶中定容至 25mL,即得浓度为 400 mg/L 的混标储备液。精密称取大黄素 10.0 mg,用甲醇水溶液(90:10)溶解后于棕色容量瓶中定容至 25 mL,即得浓度为 400g/L 的内标储备液。

1.3 质谱条件摸索

将 1.2 操作方法制备获得的对照品储备溶液及内标溶液分别稀释至 500 μ g/L,注射器吸取 1 mL 经微孔滤膜(0.22 μ m)过滤,随后通过微量注射器泵入质谱仪。质谱离子源温度为 600 $^{\circ}$ C,在 ESI 模式下,利用快原子轰击方法(FAB),通过 MRM 方法选用负离子模式寻找各物质相对应的离子对(结果见表 1)。

表 1 CADPE、羟基酪醇、咖啡酸和大黄素的质谱参数
Table 1 MS parameters of CADPE, hydroxytyrosol, caffeic acid and emodin

化合物 Compounds	母离子 Parent ions (m/z)	子离子 Daughter ions (m/z)	驻留时间 Dwell time (msec)	去簇电压 Declustering Potential	碰撞能量 Collision energy
CADPE	315.1	88.9	200	-90	-67
羟基酪醇	152.9	122.9	200	-100	-20
咖啡酸	178.9	134.9	200	-100	-34
大黄素	268.9	105	200	-15	-50

1.4 样品处理

取浓度为 3 mg/L 的 CADPE 溶液(5% DMSO 水溶液)25 μ L 于 1.5 mL 的 EP 管中,加入 200 μ L 肝微粒体溶液中(用前新鲜配制,蛋白浓度为 1.25 g/L,溶解于 100 mM pH = 7.4 的磷酸缓冲液中),混匀并于 37 $^{\circ}$ C 水浴摇床中预孵育 7 min,加入 25 μ L NADPH 溶液(10 mM)混匀激活反应体系,分别于 1、15、30、60、90、120、180、240、360 min 取样 20 μ L 到 1.5 mL EP 管中,立即加入 120 μ L 冰冷甲醇(-80 $^{\circ}$ C 保存 30 min)终止反应,在 4 $^{\circ}$ C 条件下 12000 g 离心 10 min,取上清液冻干保存。将冻干的样品使用 90% 甲醇 100 μ L 复溶,涡旋 30 s,随后 LC-MS/MS 分析测定 CADPE 及其代谢产物浓度。每个实验平行重复 3 次。

1.5 质控样品制备

为了排除反应基质中其他物质和样品处理过程中的干扰,精密称取 CADPE、羟基酪醇和咖啡酸各 10.0 mg,按 1.4 实验方法(不加肝微粒体)进行处理,使 CADPE、羟基酪醇和咖啡酸终浓度为 300 μ g/L。随即取 1 mL 加入 6 mL 冰冷甲醇,在 4 $^{\circ}$ C 条件下 12000 g 离心 10 min,取上清液冻干保存。

1.6 专属性实验

按上述步骤操作,分别制备空白样品(不加入 CADPE)、对照品样品和质控样品,分别用实验方法项下方法测定各样品的色谱图。

1.7 线性关系考察

混标储备液和内标储备液各取 50 μ L,涡旋 30 s 后进行冷冻干燥,待干燥后,加入反应基质上清液 1 mL 涡旋 30 s,梯度稀释配含有标准品 0.10、0.25、0.50、0.75、1.0、2.5、5.0、7.5、10.0、25.0、50.0、75.0、100、200 μ g/L 的系列标准质控样品,按实验方法 2.4 项下方法操作,建立标准曲线。以待测物

的峰面积与内标峰面积之比 Y 为纵坐标,各成分浓度 X 为横坐标进行直线回归,权重系数为 $1/(X * X)$ 。将混标储备液梯度稀释直至各物质的信噪比超出检测限,并根据上述方法所得线性回归方程计算该检测条件下各成分的最低定量限和最低检测限。

1.8 准确度和精密度

按实验方法 1.4 项下方法,分别配制低(2.5 μ g/L)、中(10 μ g/L)和高(50 μ g/L)浓度的质控样品($n = 5$),同法配制与定量下限浓度相当的质控样品,每个浓度进行 5 样本分析,连续测定 3 d。

1.9 稳定性考察

按实验方法 2.4 项下方法,制备标准品溶液,在实验方法 2.5 项的液质条件下,置于样品盘(4 $^{\circ}$ C)保存,分别于 0、12、24、48 h 进样分析,计算咖啡酸、羟基酪醇、CADPE 和大黄素峰面积的 RSD($n = 6$)。

1.10 加标回收率

将制得样品经测定后,平行各取 100 μ L,加入浓度为 100 μ g/L 的标准品 1.0 μ L 置于样品中,涡旋 30 s,进样分析,计算回收率及其 RSD。

2 结果与讨论

2.1 LC-MS/MS 方法专属性

空白样品、对照品样品和质控样品分别用实验方法 1.5 项下方法测定,得到空白样品色谱图 1A、对照品样品色谱图和质控样品色谱图 1B、C。由图 1 可以看出体外反应体系中的其他物质不会干扰待测化合物的测定。

2.2 线性关系

实验结果表明,在现行的实验条件下,CADPE、羟基酪醇、咖啡酸和内标物质大黄素的线性相关系数分别为 0.9994、0.9994、0.9996、0.9991,定量下

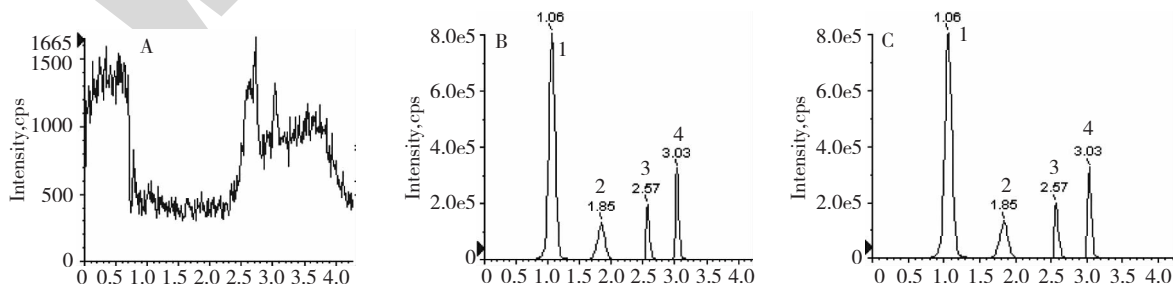


图 1 空白样品(A)、对照品(B)及质控样品(C)的 LC-MRM-MS 色谱图

Fig. 1 LC-MRM-MS chromatograms of blank(A), mixed standards(B) and quality control sample(C)

1: 羟基酪醇; 2: 咖啡酸; 3: CADPE; 4: 内标大黄素

1: Hydroxytyrosol; 2: Caffeic acid; 3: CADPE; 4: Internal standard-Emodin

限分别为 0.08、0.125、0.14、0.02 $\mu\text{g/L}$, 在 0.10 ~ 围内线性关系良好(表 2)。

200 $\mu\text{g/L}$ 或者 0.25 ~ 200 $\mu\text{g/L}$ (咖啡酸)的浓度范

表 2 线性关系考察

Table 2 Linear regression of the investigated compounds

化合物 Compounds	回归方程 Regression equation	相关系数 PPCC (r)	定量范围 Quantitative range (g/L)	定量下限 LOQ (g/L)	检测下限 LOD (g/L)
CADPE	$y = 1.01e^4 x + 1.45e^3$	0.9994	0.10 ~ 200	0.08	0.02
羟基酪醇 Hydroxytyrosol	$y = 9.51e^4 x + 614$	0.9994	0.10 ~ 200	0.125	0.034
咖啡酸 Caffeic acid	$y = 1.78e^4 x + 544$	0.9996	0.25 ~ 200	0.14	0.04
大黄素 Emodin	$y = 1.98e^4 x + 7.96e^3$	0.9991	0.10 ~ 200	0.02	0.007

2.3 基质效应

个浓度下检测物质和内标的相对标准偏差(RSD)为

实验结果(表 3)表明,在现行的测定条件下,各

2.88%、7.78%,基质效应的影响较小。

物质的响应无明显的增强或抑制作用,在高中低三

表 3 基质效应实验结果 [(mean \pm RSD)%, $n = 6$]

Table 3 The results of matrix effect [(mean \pm RSD)%, $n = 6$]

化合物 Compounds	2.5 ($\mu\text{g/L}$)	9.83 ($\mu\text{g/L}$)	51.89 ($\mu\text{g/L}$)
CADPE	89 \pm 7.78	93 \pm 2.99	109 \pm 3.06
羟基酪醇 Hydroxytyrosol	83 \pm 5.89	99 \pm 3.78	103 \pm 3.04
咖啡酸 Caffeic acid	101 \pm 4.64	108 \pm 3.03	102 \pm 2.88
大黄素 Emodin	107 \pm 6.43	87 \pm 4.57	102 \pm 3.66

2.4 精密度与准确度

度的相对标准差(RSD)为 2.14%、6.34%, 日间精

实验结果(表 4)表明,在选优条件下,不同浓度

密度的相对标准差(RSD)大多在 3.51%、6.36%,

的质控样品在日内和日间的准确度较好,日内精密

说明本实验建立的测定方法的精密度较高。

表 4 精密度以及准确度实验结果 ($n = 6$)

Table 4 The results of accuracy and precision ($n = 6$)

化合物 Compounds	浓度 Concentration ($\mu\text{g/L}$)	日内 Intra		日间 Inter	
		准确度 Accuracy (mean %)	精密度 Precision (RSD %)	准确度 Accuracy (mean %)	精密度 Precision (RSD %)
CADPE	2.5	98.55	3.25	99.53	3.59
羟基酪醇 Hydroxytyrosol		94.68	4.85	103.09	4.57
咖啡酸 Caffeic acid		99.55	3.16	96.29	3.86
大黄素 Emodin		105.14	6.34	91.05	12.91
CADPE	9.83	106.75	4.22	90.01	6.36
羟基酪醇 Hydroxytyrosol		99.92	2.66	105.66	4.58
咖啡酸 Caffeic acid		102.55	4.57	95.23	5.6
大黄素 Emodin		102.95	3.99	92.88	10.98
CADPE		104.15	3.81	94.99	4.42
羟基酪醇 Hydroxytyrosol	51.89	101.92	2.99	102.52	4.93
咖啡酸 Caffeic acid		102.85	2.59	94.84	3.51
大黄素 Emodin		99.24	2.14	97.46	9.02

2.5 稳定性

实验结果(表 5)表明,样品在 4 ℃ 条件下置于样品盘中放置 36 h,其各化合物的含量测定结果的

相对标准差(RSD)在 2.20% ~ 4.87% 之间,说明样品稳定性较好。

表 5 稳定性实验结果($n=6$)
Table 5 The results of stability($n=6$)

化合物 Compounds	浓度 Concentration($\mu\text{g/L}$)	12 h (mean \pm RSD) %	22 h (mean \pm RSD) %	36 h (mean \pm RSD) %
CADPE	2.5	100.76 \pm 3.05	99.83 \pm 2.51	99.70 \pm 3.13
羟基酪醇 Hydroxytyrosol		107.85 \pm 8.07	104.56 \pm 7.81	107.54 \pm 7.54
咖啡酸 Caffeic acid		97.76 \pm 4.33	95.43 \pm 4.72	92.95 \pm 2.56
大黄素 Emodin		94.93 \pm 3.93	93.96 \pm 3.31	91.47 \pm 3.47
CADPE	9.83	87.29 \pm 3.79	87.24 \pm 3.51	95.52 \pm 2.24
羟基酪醇 Hydroxytyrosol		108.97 \pm 4.20	102.68 \pm 6.26	106.25 \pm 3.80
咖啡酸 Caffeic acid		95.80 \pm 5.51	92.97 \pm 10.38	88.80 \pm 4.52
大黄素 Emodin		94.19 \pm 2.72	89.82 \pm 8.83	94.7 \pm 4.55
CADPE	51.89	91.51 \pm 2.81	94.81 \pm 4.52	94.41 \pm 3.87
羟基酪醇 Hydroxytyrosol		96.34 \pm 3.58	106.83 \pm 2.23	105.08 \pm 2.98
咖啡酸 Caffeic acid		92.95 \pm 1.53	94.13 \pm 1.70	92.98 \pm 3.02
大黄素 Emodin		94.08 \pm 1.82	89.49 \pm 4.87	95.88 \pm 2.20

2.6 加样回收率

实验结果表明,在现行实验条件下,CADPE 及其代谢产物的回收率较好(96.61 ~ 107.72%) (表

6)。内标物质与 CADPE、羟基酪醇和咖啡酸的加样回收率相接近,平行效果好,具备良好的矫正作用。

表 6 加样回收率结果($n=6$)
Table 6 The results of recovery rate($n=6$)

化合物 Compound	2.50($\mu\text{g/L}$)	9.83($\mu\text{g/L}$)	51.89($\mu\text{g/L}$)
CADPE	104.23 \pm 5.00	109.31 \pm 1.66	102.32 \pm 0.47
羟基酪醇 Hydroxytyrosol	107.20 \pm 3.68	100.66 \pm 10.43	107.29 \pm 2.62
咖啡酸 Caffeic acid	107.72 \pm 8.37	101.15 \pm 2.72	103.12 \pm 4.6
大黄素 Emodin	98.81 \pm 5.95	103.89 \pm 1.94	96.61 \pm 3.29

2.7 CADPE 及其代谢产物的代谢特点

CADPE 及其代谢产物的药时曲线和药动学参数如图 2 和表 7 所示,CADPE 在体外人肝微粒体的代谢曲线呈指数型,线性关系良好($y = 40.296e^{-0.019x}$, $R^2 = 0.9922$),呈单室消除特点,半衰期为 0.72 ± 0.09 h,这与实验实际情况相符。CADPE 的代谢产物羟基酪醇的达峰 T_{max} 为 1.3 ± 0.3 h,峰浓度 C_{max} 为 12.80 ± 0.6 $\mu\text{g/L}$,半衰期为 3.97 ± 0.8 h,呈单室消除特点。而咖啡酸浓度与时间的关系成对数关系,随着 CADPE 的逐渐代谢消除,咖啡酸的浓度也逐渐升高并趋于稳定从而达到

稳态[$y = 6.3453 \ln(x) + 10.986$, $R^2 = 0.9629$]。

CADPE 是一种多酚类抗肿瘤活性物质,具有广谱、高效、低毒和独特的多靶点抗肿瘤作用机制。本文研究了 CADPE 及其代谢产物羟基酪醇和咖啡酸在体外人肝微粒体中的药代动力学特征,丰富了 CADPE 的临床前研究内容,为进一步深入研究 CADPE 在人体内的药代动力学特征提供了研究基础。

液质联用技术具有灵敏度高、定量准确的特点,对于微量物质(包括无紫外吸收和荧光发射的物质)的分析是较好的检测方法,已广泛应用于药物

表7 CADPE 及其代谢产物药动学参数(采用 DAS 3.0 统计软件进行数据处理)

Table 7 The pharmacokinetic parameters CADPE and metabolites ($n = 6$)

化合物 Compounds	T _{1/2} (h)	AUC(0-∞) (h * μg/L)	C _{max} (μg/L)	T _{max} (h)	CL _Z (L/h/kg)
CADPE	0.72 ± 0.10	29.5 ± 1.8	45.58 ± 4.8	0.0 ± 0.0	1.90 ± 0.13
羟基酪醇 Hydroxytyrosol	3.97 ± 0.6	140.0 ± 7.1	12.8 ± 0.6	1.3 ± 0.3	0.49 ± 0.20
咖啡酸 Caffeic acid	456.9 ± 11.0	456.9 ± 11.0	55.8 ± 1.7	10.0 ± 0.0	0.13 ± 0.00

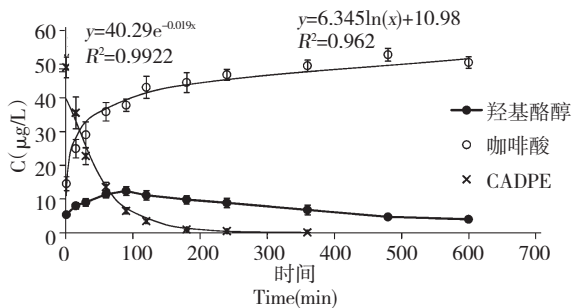


图2 CADPE 及其代谢产物在体外人肝微粒体中的药-时曲线

Fig. 2 Concentration-time curve of CADPE and its metabolites in human liver microsomes

代谢的研究中^[19]。在前期的动物模型的研究过程中发现, CADPE 在微克级别就表现出抗肿瘤药效, 而使用通过紫外检测的 HPLC 方法已无法满足其分析的需要(CADPE 在 HPLC 中的 LOD 和 LOQ 分别为 13 μg/L 和 50 μg/L)^[14], 所以本实验采用灵敏度更高、检测限更低的液质联用技术对 CADPE 及其代谢产物进行含量测定。

CADPE 前期还无较为完全的质谱数据, 本实验通过质谱对该物质进行了初步的质谱条件摸索。在负离子模式下, 使用 10 ~ 80 V 的能量轰击后得到如下碎片离子的质荷比 (m/z): 315. 1、255. 2、178. 9、134. 9、106. 9、88. 9。对比咖啡酸^[20] 和羟基酪醇^[21] 的质谱数据可明显发现, CADPE 可裂解为咖啡酸和羟基酪醇。同时为了使各个物质的离子对响应接近, 我们选择了响应较为合适的子离子 (m/z : 88. 9)。

药物在体内的代谢场所主要发生在肝脏, 肝脏对于药物的代谢主要有微粒体酶系统和非微粒体酶系统, 在微粒体酶系统中 CYPs 尤为重要, 主要参与了一系列的氧化反应, 因为药物在体内的代谢限速步骤是 CYPs 催化的 I 相反应。本课题组的前期研究发现 CADPE 的消除主要是氧化分解^[22-25]。此外, 为了使体外实验的代谢条件易于控制、便于操

作, 故本课题组在体外代谢研究中采用了肝微粒体法进行代谢研究。

3 结论

本实验通过体外实验模拟了 CADPE 在人体肝脏的代谢过程, 根据实验结果, 初步推测 CADPE 在人体内的代谢过程, 从现有的实验结果可发现, CADPE 在肝脏的清除速率很快, 即可能存在较大的肝脏首过效应; CADPE 的代谢产物咖啡酸在人肝脏微粒体代谢速率很缓慢或者不被肝微粒体代谢, 本实验还发现羟基酪醇也可被肝微粒体所代谢。以上研究结果提示我们, 在 CADPE 临床前研究及未来临床使用中需要尽可能避免口服给药, 或可采用联合给药的方式减缓 CADPE 的清除速率(如 CADPE 联合咖啡酸用药), 也可以通过寻找能有效避免 CADPE 在肝脏被清除的剂型, 以提高 CADPE 在人体内的生物利用度。

致谢: 特别感谢浙江大学海洋学院张治针老师在文章的撰写以及投稿过程中的指导与帮助。

参考文献

- 1 Keith CT, Borisy AA, Stockwell BR. Multicomponent therapeutics for networked systems. *Nat Rev Drug Disc*, 2005, 4 (1): 71-78.
- 2 Goel A, Jhurani S, Aggarwal BB. Multi-targeted therapy by curcumin; how spicy is it. *Mol Nutr Food Res*, 2008, 52: 1010-1030.
- 3 Morphy R, Rankovic Z. Fragments, network biology and designing multiple ligands. *Drug Discov Today*, 2007, 12 (3-4): 156-160.
- 4 Khan N, Afaq F, Saleem M, et al. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res*, 2006, 66: 2500-2505.
- 5 Kuo YY, Jim WT, Su LC, et al. Caffeic acid phenethyl ester is a potential therapeutic agent for oral cancer. *Int J Mol Sci*, 2015, 16: 10748-10766.

- 6 Murtaza G, Sajjad A, Mehmood Z, *et al.* Possible molecular targets for therapeutic applications of caffeic acid phenethyl ester in inflammation and cancer. *J Food Drug Anal*, 2015, 23(1):11-18.
- 7 Li WY, Chiu LC, Lam WS, *et al.* Ethyl acetate extract of Chinese medicinal herb *Sarcandra glabra* induces growth inhibition on human leukemic HL-60 cells, associated with cell cycle arrest and up-regulation of pro-apoptotic Bax/Bcl-2 ratio. *Oncol Rep*, 2007, 17:425-531.
- 8 Zhang Z, Xiao B, Chen Q, *et al.* Synthesis and biological evaluation of caffeic acid 3,4-dihydroxyphenethyl ester. *J Nat Prod*, 2010, 73:252-254.
- 9 Zhang ZZ(张治针). Process for preparing 3,4-dihydroxyphenethyl caffeic acid and derivatives thereof Benzene esters of phenyl propionic acid. CN200910115002.4, 2012-07-25.
- 10 Lian XY(连晓媛), Zhang ZZ(张治针). A total polyphenols effective part of *Phyllanthus tuberosus* and its preparation method and application. CN200610050821.1, 2010-06-16.
- 11 Lian XY(连晓媛), Zhang ZZ(张治针). A medicine containing caffeic acid 3,4-dihydroxy phenylethyl ester and its application. CN200910134180.1, 2011-03-02.
- 12 Lian XY(连晓媛), Zhang ZZ(张治针). Medicinal use of caffeic acid 3,4-dihydroxyphenethyl. CN200910114960.X, 2011-08-17.
- 13 Jung JE, Kim HS, Lee CS, *et al.* Caffeic acid and its synthetic derivative CADPE suppress tumor angiogenesis by blocking STAT3-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 2007, 28:1780-1787.
- 14 GuoX(郭欣). Study on antitumor effects of caffeic acid 3,4-dihydroxyphenethyl ester and its pharmacokinetic properties. Hangzhou: Zhejiang University(浙江大学), MSc. 2013.
- 15 Xin WX(辛文秀). Anticancer effect and underlying mechanism of natural small molecule compounds in colorectal cancer and glioma cells. Hangzhou: Zhejiang University(浙江大学), PhD. 2014.
- 16 Won C, Lee CS, Lee JK, *et al.* CADPE suppresses cyclin D1 expression in hepatocellular carcinoma by blocking IL-6-induced STAT3 activation. *Anticancer Res*, 2010, 30:481-488.
- 17 Han H, Du B, Pan X, *et al.* CADPE inhibits PMA-stimulated gastric carcinoma cell invasion and matrix metalloproteinase-9 expression by FAK/MEK/ERK-mediated AP-1 activation. *Mol Cancer Res*, 2010, 11:1477-1488.
- 18 Dong A, Fang Y, Zhang L, *et al.* Caffeic acid 3,4-dihydroxyphenethyl ester induces cancer cell senescence by suppressing twist expression. *J Pharm Exp Ther*, 2011, 339:238-247.
- 19 Jiang YP(姜艳萍), Shan JH(单吉浩), Tian YP(田亚平), *et al.* Application progress of LC-MS/MS technology in drug metabolism research. *Chin J Pharm Anal(药物分析)*, 2014, 3:385-391.
- 20 Li W, Sun Y, Liang W, *et al.* Identification of caffeic acid derivatives in *Actearacemosa* (*Cimicifugaracemosa*, black cohosh) by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectro*, 2003, 17:978-982.
- 21 Boccio PD, Deo AD, Curtis AD, *et al.* Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol in rat plasma and urine after oral administration. *J Chromatogr B*, 2003, 785(1):47-56.
- 22 Wang GJ(王广基). Pharmacokinetics(药物代谢动力学), Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2005.
- 23 Jin KT(金科涛), Wang YG(王宇光), Xu P(徐彭), *et al.* HPLC progress determination microsomes cytochrome P450 activity of rat liver. *Chin J Pharm Anal(药物分析)*, 2006, 3:415-419.
- 24 Wang HH(王欢欢), Lv YY(吕雅瑶), Peng B(彭博), *et al.* Progress in quantitative methods based on liquid chromatography-mass spectrometry for drug metabolizing enzymes in human liver microsomes. *Chin J Chromatogr(色谱)*, 2015, 6:553-557.
- 25 Williams JA, Hyland R, Jones BC, *et al.* Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUCi/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos*, 2004, 32:1201-1208.