

石斛碱在体外肝微粒体代谢的种属差异研究

鲁艳柳,刘浩,曾瑶,黄思,徐亚沙,何芋岐*,陆远富*

遵义医学院 基础药理教育部重点实验室暨特色民族药教育部国际合作联合实验室,遵义 563003

摘要:为了在临床前药效和毒理研究中选择与人有相似代谢性质的实验动物,本实验比较了石斛碱在不同种属肝微粒体间的代谢差异。将石斛碱在SD大鼠、C57BL/6J小鼠、家兔、犬、豚鼠和人的肝微粒体中,分别进行I相和II相代谢。通过底物消除法分析代谢稳定性,并计算体外消除半衰期($t_{1/2}$)。通过保留时间、精确质量数、二级碎片离子信息以及色谱峰面积,对石斛碱在各种属肝微粒体中生成代谢产物的情况进行分析。结果表明,在I相反应中,石斛碱体外消除半衰期依次为家兔<豚鼠<大鼠<小鼠<犬<人;在II相反应中,石斛碱在人、豚鼠肝微粒体中代谢非常慢,而小鼠最快。石斛碱在人肝微粒体体外I相反应中,生成的代谢产物与小鼠、犬的相似。因此,可以选择小鼠和犬作为临床前药代和毒理研究的模型动物。

关键词:石斛碱;肝微粒体;代谢稳定性;代谢产物;种属差异

中图分类号:R285.5;Q946.9

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.9.011

In Vitro Metabolism of Dendrobine in Liver Microsomes of Different Species

LU Yan-liu, LIU Hao, ZENG Yao, HUANG Si, XU Ya-sha, HE Yu-qi*, LU Yuan-fu*

Key Laboratory of Basic Pharmacology of Ministry of Education and Joint International Research

Laboratory of Ethnomedicine of Ministry of Education, Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China

Abstract: In order to select the experimental animals for preclinical pharmacodynamics and toxicology, the characteristics of dendrobine metabolism in human liver microsomes were compared with the other species. Metabolic stability and metabolites of dendrobine were investigated in the liver microsomes of rat, mouse, rabbit, dog, guinea pig and human. The substrate depletion approach was used to evaluate the metabolic stability, and the half-life ($t_{1/2}$) was calculated *in vitro*. The differences in metabolic biotransformation of dendrobine were characterized by metabolite profiling. In the liver microsomal incubation systems of six species, the $t_{1/2}$ values for phase I were as follows: rabbit < guinea pig < rat < mouse < dog < human. Whereas for phase II, the metabolic rates were the slowest in the liver microsomes of human and guinea pig, and the fastest in mouse liver microsomes. In addition, the metabolites of dendrobine for phase I in human liver microsomes were similar to the mouse and dog liver microsomes incubation system. Based on the results of dendrobine metabolism *in vitro*, mouse and dog would be selected for the further metabolism study.

Key words: dendrobine; liver microsomes; metabolic stability; metabolite; species difference

金钗石斛 (*Dendrobium nobile* Lindl.) 是中国药典(2015版)石斛药材的法定来源之一,因其具有益胃生津,滋阴清热作用,在《神农本草经》中列为上品。现代药理学研究表明,金钗石斛总生物碱是金

钗石斛的主要活性成分,具有降血糖^[1]、抗肿瘤^[2]、抗细胞凋亡^[3]、抗氧化^[4]、抗老年痴呆^[5]、抗白内障^[6]、止痛、和解热^[7]等作用。而石斛碱是金钗石斛总生物碱中最主要的特征性成分^[7],开发应用前景相当广阔,因此,对石斛碱进行代谢研究具有重要价值。由于药物在不同种属间的代谢途径、代谢产物往往会存在显著差异^[8],筛选合适的实验动物,对模拟研究人体对药物的处置过程、为临床前药效和毒理研究提供可靠的实验数据,至关重要。在课题组的前期研究中,通过精确质量数和二级碎片离子信息,已鉴定出石斛碱在人肝微粒体中I相代谢的4个主要代谢产物M-250、M-262、M-280和M-

收稿日期:2018-03-06 接受日期:2018-06-08

基金项目:国家自然科学基金(81660685,81560673,81402985);教育部春晖计划(Z2016003);贵州省科技重大专项(黔科合重大专项字[2015]6010);贵州省科学技术基金(黔科合JZ字[2015]2010号,黔科合J字[2015]2158号);贵州省教育厅自然科学研究项目(黔教合KY字[2015]373号);贵州省留学人员科技创新项目(黔人项目资助合同(2015)03号);遵义医学院优秀青年人才项目(15zy-004)

* 通信作者 Tel:86-851-28642303; E-mail:HyqJeff@hotmail.com, luyuanfu2000@163.com

296,以及 II 相代谢的 1 个主要代谢产物 M-440^[9],如图 1。因此,本文将通过模拟 CYP450 及 UGT 酶反应体系,采用基于多重质量亏损的 UPLC-HESI-Orbitrap/MS 技术,比较石斛碱在人肝微粒体中与在 SD 大鼠、C57BL/6J 小鼠、家兔、犬和豚鼠肝微粒体中代谢稳定性和代谢产物的差异,为金钗石斛的进一步开发研究提供参考依据。

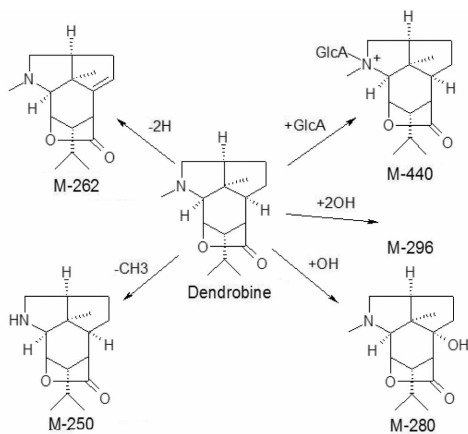


图 1 石斛碱在体外人肝微粒体中的代谢产物

Fig. 1 *In vitro* metabolites of dendrobine in liver microsomes of human

1 仪器与试剂

1.1 仪器

四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱系统,Ultimate 3000 超高效液相色谱系统(Thermo 公司,美国);Genius 1022 液氮发生器(PEAK 公司,英国);Milli-Q 超纯水系统(Millipore 公司,美国);XS205 电子天平(METTLER TOLEDO 公司,瑞士);ZWY-110X50 恒温水浴箱(上海智城分析仪器制造有限公司);XW-80A 漩涡混合仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Microfuge 20R 高速离心机(贝克曼库尔特有限公司,美国);STW-FT24 制冰机(三洋公司,日本)。

1.2 药品与试剂

人肝微粒体(批号 SUBK, $n = 11$, 男性健康蒙古利亚人种,平均年龄 28 岁),购自上海瑞德肝脏疾病研究有限公司,符合遵义医学院人体试验伦理委员会的伦理学标准;SD 大鼠、C57BL/6J 小鼠、家兔、犬、豚鼠肝微粒体,由实验室自制,使用 BCA 法测定各种肝微粒体的蛋白浓度,符合遵义医学院实验动物伦理委员会的伦理学标准。以 CYP3A 特异性探针底物睾酮的 6 β -OH 化代谢评价人、大鼠、小鼠、

家兔、犬、豚鼠肝微粒体酶的活性^[10], V_{max} 值分别为 581.14、407.56、315.69、580.33、257.36、943.21 pmol/min/mg protein。

D-葡萄糖-6-磷酸二钠盐水化合物(G-6-P),葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PD), β -烟酰胺嘌呤二核苷酸磷酸钠盐(β -NADP),丙甲菌素,尿苷-5'- α -D-葡萄糖醛酸(UDPGA)(Sigma-Aldrich 化学制品有限公司,美国,批号分别为 0003671996, 0009001405, 0001184163, A5361-500UL, U6751-1G),石斛碱(北京华迈科生物技术有限责任公司,批号 D990100,质量分数 $\geq 99.0\%$),盐酸伪麻黄碱(中国食品药品检定研究院,批号:171237-201208,质量分数 $\geq 99.9\%$)。乙腈、甲醇、甲酸均为质谱级,其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 实验分组

肝微粒体体外温孵实验中,I 相、II 相代谢反应分别将各种属肝微粒分为 3 组,依次为实验组、阴性对照组、空白组。其中,实验组为含石斛碱的标准孵育体系,阴性对照组的孵育体系中不含起始因子,而空白组的孵育体系中不含石斛碱,每组 3 份,平行实验 3 次。

2.2 溶液的制备

精密称取适量的石斛碱对照品于量瓶中,加入适量甲醇溶解,定容至刻度,得到浓度为 10 mmol/L 的标准溶液。精密称取盐酸伪麻黄碱对照品(IS) 10.01 mg,置于 10 mL 容量瓶中,加乙腈溶解至刻度线,混匀,即得内标储备液,于 4 °C 保存备用。使用前以乙腈稀释,得到含盐酸伪麻黄碱摩尔浓度为 2 μ mol/L 的内标工作液。

2.3 肝微粒体体外温孵实验

2.3.1 代谢稳定性分析

CYP450 酶系孵育体系(100 μ L):肝微粒体(0.5 mg/mL)、G-6-P(10 mmol/L)、G-6-PD(1 U/mL)、 β -NADP(1 mmol/L)、MgCl₂(4 mmol/L)、磷酸缓冲液(K₂HPO₄-KH₂PO₄, 100 mmol/L, pH7.4)、石斛碱(50 μ mol/L)。分别在 37 °C 恒温孵育 0、5、10、15、20、30、45、60、90、120 min,反应完成后加入 100 μ L 预冷的含内标化合物的乙腈,终止反应。20 000 g,4 °C 离心 10 min,取上清液 50 μ L 进行测定。

UGT 酶系孵育体系(200 μ L):肝微粒体(0.5 mg/mL)、丙甲菌素(0.5 mg/mg protein)、UDPGA(5 mmol/L)、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲盐(Tris-

HCl, 50 mmol/L, pH7.4)、MgCl₂ (4 mmol/L)、石斛碱 (50 μmol/L)。加入石斛碱之前, 反应体系先在冰上预孵育 15 min, 加入石斛碱后, 于 37 °C 预孵育 5 min, 随后启动反应, 分别在 37 °C 恒温孵育 0、5、10、15、20、30、45、60、90、120 min, 反应完成后加入 200 μL 预冷的含内标化合物的乙腈, 终止反应。20 000 g, 4 °C 离心 10 min, 取上清液 100 μL 进行测定。

2.3.2 代谢产物分析

按 2.3.1 项下 CYP450 酶系孵育体系, 在 37 °C 恒温孵育 45 min, 反应完成后加入 100 μL 预冷的含内标化合物的乙腈, 终止反应。20 000 g, 4 °C 离心 10 min, 取上清液 50 μL 进行测定。

按 2.3.1 项下 UGT 酶系孵育体系, 在 37 °C 恒温孵育 45 min, 反应完成后加入 200 μL 预冷的含内标化合物的乙腈, 终止反应。20 000 g, 4 °C 离心 10 min, 取上清液 100 μL 进行测定。

2.4 UPLC-HESI-Orbitrap-MS 的分析条件

色谱条件: 采用 Hypersil Gold C₁₈ (150 × 2.1 mm, 1.9 μm) 色谱柱分离; 流动相组成为 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱条件为 0~0.5 min, 5% B; 0.5~15 min, 5%~95% B; 15~17 min, 95% B; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 5 μL。

质谱条件: 采用 HESI 离子化方式; 雾化温度为 300 °C, 离子传输管温度为 350 °C; 鞘气流速为 35 arb, 辅助气流速为 15 arb; 喷雾电压 3.5 kV; 碰撞电压 30、40、50 eV; *m/z* 检测范围 100~1500; 扫描模式为 Full Scan/Targeted-ddMS²/正离子扫描; 分辨率采用 MS Full Scan 70000 FWHM, MS/MS Full Scan 15000 FWHM。

2.5 数据处理与分析

将反应时间 0 min 时石斛碱的浓度设为 100%, 其它时间点的石斛碱浓度与其相比, 得到相应剩余底物浓度百分比。应用 Graph Pad Prism 5.0 软件的线性回归分析, 计算各时间点剩余底物浓度百分比的自然对数与相应的孵育时间的斜率 (-*k*), 由公式 $t_{1/2} = 0.693/k$ 求得石斛碱体外不同种属肝微粒体代谢的消除半衰期($t_{1/2}$)^[11]。

3 结果

3.1 代谢稳定性

3.1.1 I 相代谢

石斛碱在大鼠、小鼠、家兔、犬、豚鼠和人肝微粒体中进行 I 相孵育, 以剩余底物浓度百分比为 *Y* 轴, 以孵育时间为 *X* 轴, 作曲线如图 2。在大鼠、小鼠、

家兔、犬、豚鼠和人不同种属的肝微粒体中, 底物消除速度不一样, 满足一级消除动力学的时间段也不相同。按线性回归方法分别得到 -*k* 值, 并计算 $t_{1/2}$, 结果见表 1。

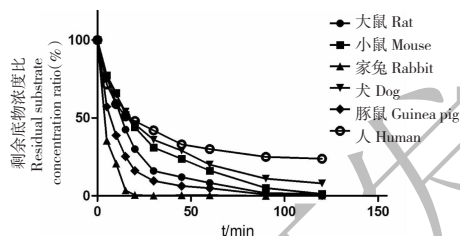


图 2 石斛碱在大鼠、小鼠、家兔、犬、豚鼠和人肝微粒体体外 I 相代谢消除曲线

Fig. 2 *In vitro* elimination curves of phase I metabolism of dendrobine in liver microsomes of rat, mouse, rabbit, dog, guinea pig and human

表 1 石斛碱在大鼠、小鼠、家兔、犬、豚鼠和人肝微粒体体外 I 相代谢的 $t_{1/2}$

Table 1 *In vitro* elimination half-lives of phase I metabolism of dendrobine in liver microsomes of rat, mouse, rabbit, dog, guinea pig and human

肝微粒体种类 Species	时间段 Time (min)	<i>R</i> ²	- <i>k</i>	$t_{1/2}$ (min)
大鼠 Rat	0~90	0.985	0.0434	15.97
小鼠 Mouse	0~90	0.989	0.0311	22.30
家兔 Rabbit	0~15	0.982	0.2103	3.30
犬 Dog	0~60	0.977	0.0252	27.53
豚鼠 Guinea pig	0~30	0.996	0.0894	7.75
人 Human	0~45	0.983	0.0220	31.44

3.1.2 II 相代谢

石斛碱在大鼠、小鼠、家兔、犬、豚鼠和人肝微粒体中进行 II 相孵育, 同样以剩余底物浓度百分比-孵育时间作曲线, 如图 3。在不同种属的肝微粒体中,

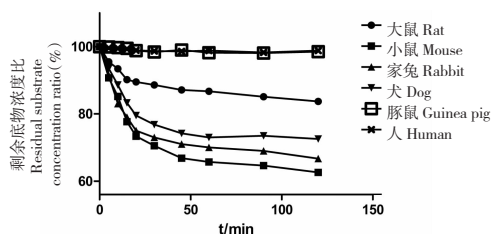


图 3 石斛碱在大鼠、小鼠、家兔、犬、豚鼠和人肝微粒体体外 II 相代谢消除曲线

Fig. 3 *In vitro* elimination curves of phase II metabolism of dendrobine in liver microsomes of rat, mouse, rabbit, dog, guinea pig and human

石斛碱消除速度相差较大。由图可见,在人、豚鼠肝微粒体中,石斛碱消除速度很慢,而小鼠肝微粒体中,石斛碱消除速度较快。通过比较 I 相和 II 相代谢,可以发现,石斛碱在人肝微粒体中的代谢主要是 I 相代谢。

3.2 代谢产物的比较

在前期研究中,已鉴定出石斛碱在人肝微粒体

中 I 相代谢的 4 个主要代谢产物 M-250、M-262、M-280 和 M-296, II 相代谢的 1 个主要代谢产物 M-440,结构如图 1。将石斛碱在大鼠、小鼠、家兔、犬、豚鼠和人肝微粒体中分别进行 I 相、II 相孵育,通过保留时间、精确质量数、二级碎片离子信息以及色谱峰面积,比较各种属肝微粒体中石斛碱代谢产物种类的差异,结果如表 2。

表 2 石斛碱在大鼠、小鼠、家兔、犬、豚鼠和人肝微粒体中 I 相、II 相代谢产物信息

Table 2 Information of phase I and phase II metabolites of dendrobine in liver microsomes of rat, mouse, rabbit, dog, guinea pig and human

编号 No.	保留时间 t_R (min)	分子式 Formula	测得值 Measurement (m/z)	检测结果 Results					
				大鼠 Rat	小鼠 Mouse	家兔 Rabbit	犬 Dog	豚鼠 Guinea pig	人 Human
M-250	6.42	$C_{15}H_{23}NO_2$	250.1801	+++	+++	+	+++	+++	++
M-262	5.90	$C_{16}H_{23}NO_2$	262.1800	+	+	+	+	+	+
M-280	6.83	$C_{16}H_{25}NO_3$	280.1906	+	++	+	++	+	++
M-296	7.14	$C_{16}H_{25}NO_4$	296.1856	+	++	+	+	++	+
M-440	5.99	$C_{22}H_{34}NO_8$	440.2278	-	-	+	-	-	+

注: + 表示检测到, - 表示未检测到;以峰面积为依据,比较同一代谢产物的生成量并标注。

Note: + = identified; - = not detected; based on the peak area, the amounts of metabolites were compared and marked.

4 讨论

金钗石斛作为名贵中药石斛的植物来源之一,不论是考虑其市场需求,还是依据其临床疗效,均有非常大的开发价值。在新药研发的过程中,对其主要的、特征性的成分石斛碱的药物代谢动力学进行研究,是十分必要的。本文主要针对石斛碱,考察了其在体外人肝微粒体中的代谢稳定性和代谢转化,并通过对其他种属肝微粒体进行比较,了解种属间的代谢差异,为进一步研究选择合适的实验动物提供参考,为人体内药物的代谢特征提供可靠的数据,也为运用临床前实验结果设计临床研究提供依据。

获得石斛碱代谢产物的标准品,对其代谢产物进行准确定量,还存在比较大的困难,因此,我们选用底物消除法来评价石斛碱的代谢稳定性,通过剩余底物浓度百分比的自然对数与相应的孵育时间的斜率计算 $t_{1/2}$,描述其药动学性质的主要影响因素即代谢的速度和程度。同时,根据前期的实验结果,比较不同种属肝微粒体中代谢产物的种类和数量,来评价代谢转化的差异。

在 6 个种属 I 相肝微粒体孵育体系中,石斛碱在家兔和豚鼠肝微粒体中代谢最快, $t_{1/2}$ 分别为 3.30、7.75 min,在人和犬肝微粒体中代谢最慢, $t_{1/2}$

分别为 31.44、27.53 min,体外消除半衰期依次为家兔 < 豚鼠 < 大鼠 < 小鼠 < 犬 < 人。在 6 个种属 II 相肝微粒体孵育体系中,石斛碱在人、豚鼠肝微粒体中代谢非常慢,而在小鼠肝微粒体中代谢最快。比较 I 相和 II 相代谢,可以发现石斛碱在体外人肝微粒体中的代谢是以经 I 相代谢为主,并且为快代谢。此实验结果提示,在新药研究中可能需要利用结构改造,来提高代谢稳定性、改善药代性质。

另外,结合表 1、表 2 的结果可以发现,虽然石斛碱在人肝微粒体的代谢产物均可以在家兔肝微粒体孵育体系中发现,但根据代谢产物生成量、代谢速率和程度可以判断,石斛碱在家兔肝微粒体的代谢产物谱应和人的有明显不同。同理,石斛碱在人肝微粒体体外 I 相反应中,生成的代谢产物应与小鼠、犬的相似。根据非临床药动学的研究技术指导原则^[12],综合本实验的研究结果,在新药研发过程中,若选择啮齿类动物,可选择小鼠作为临床前药代和毒理研究的模型动物,若选择非啮齿类动物,可选择犬作为临床前药代和毒理研究的模型动物。本实验结果,为临床前药效和毒理以及与人有相似代谢性质的实验动物的选择,提供了可靠的实验数据,为石斛碱的进一步研究开发提供了参考依据。

参考文献

- 1 Tao F(陶凤), Jin H(金徽), Yang GZ(杨贵忠), *et al.* Effects of the aqueous extract of *Dendrobium nobile* Lindl. on the non-enzymatic glycation and oxidative stress in diabetic rat kidney [J]. *J Shandong Univ: Health Sci* (山东大学学报:医学版), 2012, 50:11-15.
- 2 Liu MK(刘名昆), Li GQ(李国庆). Research progresses on anti-tumor effect of the extract from *Dendrobium nobile* Lindl. [J]. *J Mod Med Health* (现代医药卫生), 2015, 31: 3571-3574.
- 3 Yang S, Gong QH, Wu Q, *et al.* Alkaloids enriched extract from *Dendrobium nobile* Lindl attenuates tau protein hyperphosphorylation and apoptosis induced by lipopolysaccharide in rat brain [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21: 712-716.
- 4 Bin J(宾捷), Hu YM(胡余明), Yin J(尹进), *et al.* Experimental study on antioxidant function of *Dendrobium nobile* Lindl. in aged mice [J]. *Pract Prev Med* (实用预防医学), 2010, 17:1063-1064.
- 5 Yao Y(姚寅). Study on the protective effect and mechanism of alkaloids from *Dendrobium nobile* Lindl. on Alzheimer's [J]. *Health World* (医药前沿), 2013, 2:47-48.
- 6 Bai JL(白金丽), Wen SX(温淑湘). Anti-cataract effects of the extract from *Dendrobium nobile* Lindl. *in vitro* [J]. *Yunnan J Tradit Chin Med Mater Medica* (云南中医中药杂志), 2009, 30:57-59.
- 7 Wang YY(王亚芸), Ren JW(任建武). The progress of study on dendrobine [J]. *J Shandong Agric Univ: Nat Sci* (山东农业大学学报: 自科版), 2015, 46:152-158.
- 8 Wang P, Zhao YL, Zhu YD, *et al.* Metabolism of dictamine in liver microsomes from mouse, rat, dog, monkey, and human [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 119:166-174.
- 9 Lu YL(鲁艳柳), Huang S(黄思), Wang M(汪敏), *et al.* Mass spectrometric technology of orbitrap for structural identification of the metabolites of dendrobine in human liver microsomes [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae* (中国实验方剂学杂志), 2018, 24: 32-37.
- 10 Liu Y(刘勇). Application of early drug metabolism in scientific evaluation of traditional Chinese medicine [D]. Dalian: Chinese Academy of Sciences; Dalian Institute of Chemical Physics, 2006.
- 11 Fan HR(樊慧蓉), Dong SQ(董世奇), Li QS(李全胜), *et al.* *In vitro* metabolism of liquiritigenin in liver microsomes of different species [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2017, 48:320-326.
- 12 China Food and drug administration(国家食品药品监督管理总局). Guidance for non-clinical pharmacokinetics of chemical drugs(化学药物非临床药代动力学研究技术指导原则) [S]. 2014.
- 11 Xie M, Hu B, Wang Y, *et al.* Grafting of gallic acid onto chitosan enhances antioxidant activities and alters rheological properties of the copolymer [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62:9128-9136.
- 12 Woodford JN. A DFT investigation of anthocyanidins [J]. *Chem Phys Lett*, 2005, 410:182-187.
- 13 Becke AD. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange [J]. *J Chem Phys*, 1993, 98:5648.
- 14 Rustioni L, Di Meo F, Guillaume M, *et al.* Tuning color variation in grape anthocyanins at the molecular scale [J]. *Food Chem*, 2013, 141:4349-4357.
- 15 Giusti MM, Ghanadan H, Wrolstad RE. Elucidation of the structure and conformation of red radish (*Raphanus sativus*) anthocyanins using one-and two-dimensional nuclear magnetic resonance techniques [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46: 4858-4863.
- 16 Azevedo J, Oliveira J, Cruz L, *et al.* Antioxidant features of red wine pyranoanthocyanins: experimental and theoretical approaches [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62:7002-7009.
- 17 Mujika JI, Matxain MI. Theoretical study of the pH-dependent antioxidant properties [J]. *J Mol Model*, 2013, 19:1945-1952.
- 18 Leopoldini M, Marino T, Russo N, *et al.* Antioxidant properties of phenolic compounds H-atom versus electron transfer [J]. *J Phys Chem A*, 2004, 108:4916-4922.
- 19 Queiroz AN, Gomes BAQ, Moraes JWM, *et al.* A theoretical antioxidant pharmacophore for resveratrol [J]. *Eur J Med Chem*, 2009, 44:1644e9.
- 20 Lu LL, Qiang M, Li FL, *et al.* Theoretical investigation on the antioxidative activity of anthocyanidins: A DFT/B3LYP study [J]. *Dyes and Pigments*, 2014, 103:175-182.

(上接第 1537 页)