

丹酚酸 A 对大鼠肝脏尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶活性的影响

李艳丽, 田红翠, 翟文婷, 许 卉(烟台大学药学院, 山东 烟台 264005)

摘要: **目的** 考察丹酚酸 A(salvianolic acid A, SAA)对大鼠肝脏尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UGTs)的影响。**方法** SD 大鼠 48 只, 雌雄各半, 随机分为 SAA 组、阳性对照组和空白对照组 3 组。连续给药 1 周后断头处死动物, 分离制备肝组织亚细胞组分, 以对硝基酚(4-NP)为探针药物, HPLC 法测定各亚细胞组分 UGTs 活性。**结果** 在不同肝组织亚细胞组分中, 以肝微粒体的 UGTs 酶活性最高, 且雄鼠显著高于雌鼠; 与空白对照组比较, SAA 组大鼠的肝微粒体蛋白浓度和 UGTs 酶活性均无显著变化, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** SAA 经静脉途径连续给药 1 周对 SD 大鼠肝脏的 UGTs 酶活性无显著的诱导或抑制作用, 提示其在临床应用时发生经 UGTs 酶介导的药物相互作用的潜在风险较小。

关键词: 丹酚酸 A; 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶; 酶活性; 肝微粒体; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013) 06-0558-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.06.008

Effect of Salvianolic Acid A on Rat Hepatic Uridine Diphosphate Glucolactone Transferases Activity

LI Yanli, TIAN Hongcui, ZHAI Wenting, XU Hui (School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005 Shandong, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of salvianolic acid A (SAA) on uridine diphosphate glucolactone transferases (UGTs) activity in the liver of SD rats. **Methods** Forty-eight SD rats were randomly divided into three groups of SAA group, positive control group, and blank control group, 16 animals in each group, half being male. After treatment for one continuous week, the animals were sacrificed, and then liver microsomes, S9 fractions and cytosols were isolated to determine UGTs activity by HPLC method with 4-nitrophenol(4-NP) as a probe drug. **Results** UGTs activity was much higher in rat livermicrosomes than in cytosols and S9 fractions. Moreover, male rats showed relatively higher UGTs activity in liver microsomes thanfemale ones. When compared with the blank control group, protein concentration and UGTs activity in livermicrosomes of SAA group showed no obvious changes ($P > 0.05$). **Conclusion** Continuous uptake of SAA from intravenous administration for one week has no effect on inducing or inhibiting UGTs activity in rat liver microsomes, suggesting than the potential risk of drug-drug interaction of SAA mediated by UGTs should be low in clinic.

Keywords: Salvianolic acid A; Uridine-diphosphate glucolactone transferases; Enzyme activity; Liver microsomes; Rats

II 相结合反应是外源性药物的重要代谢途径之一。其中, 由葡萄糖醛酸转移酶(uridinediphosphate glucuronosyltransferases, UGTs)催化发生的葡萄糖醛酸

结合反应在药物代谢和解毒过程中起着重要的作用^[1]。丹酚酸 A (salvianolic acid A, SAA) 是丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的水溶性酚酸类活性成分, 具有抗氧

收稿日期: 2013-04-15

作者简介: 李艳丽, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 药代动力学。Email: ydlyl1989@163.com。通讯作者: 许卉, 博士, 教授, 研究方向: 中药活性成分与药效物质基础。Email: xuhui33@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81102780)。

化、抗凝、抗血栓形成、保护心脑血管等广泛的药理作用,是近年来备受关注的活性天然产物^[2-4]。大鼠药代动力学研究表明,由静脉途径进入体内的 SAA,可在肝脏发生快速的酚羟基 II 相结合反应,生成多种葡萄糖醛和 / 或甲基结合代谢物,提示 UGTs 为介导 SAA 体内代谢过程的关键酶^[5-6]。基于 12 种人源 UGTs 重组酶的体外研究进一步显示,UGT1A1 和 UGT1A9 是催化 SAA 葡萄糖醛结合代谢的两个主要亚型,尤以 UGT1A9 的催化活性最强^[7]。然而,目前尚未见关于 SAA 对 UGTs 酶活性影响的文献报道。本实验以给药大鼠肝脏的亚细胞组分作为 UGTs 酶供体,与探针药物对硝基酚(4-NP)体外共孵育, HPLC 法测定特异性代谢产物对硝基苯酚- β -葡萄糖醛酸苷(4-NPG)的浓度,根据其生成速率定量评价供体的 UGTs 酶活性,并与相同条件下的空白对照和阳性对照组结果进行统计比较,以考察 SAA 对大鼠肝脏 UGTs 酶活性的影响。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂及仪器 丹酚酸(SAA),由山东靶点药物有限公司提供,经 HPLC 测定,纯度 > 98 %,批号:20080405;苯巴比妥钠注射液,广东邦民制药有限公司,批号:130104;对硝基苯酚(4-NP),天津市科密欧化学试剂有限公司,批号:20090710;牛血清白蛋白(BSA,批号:20110911)、对硝基苯酚- β -葡萄糖醛酸苷(4-NPG,批号:SLBB 1854V)、尿苷-二磷酸葡萄糖(UDPGA,批号:SLBC9398V),美国 Sigma 公司;考马斯亮蓝 G-250,批号:02/2011,德国 Serva 公司。其他试剂均为市售分析纯或色谱纯。UV-2550 型双光束紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;Agilent 1100 高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司。

1.2 动物 健康 SD 大鼠,体质量(250 ± 20)g,山东绿叶制药有限公司实验动物中心,动物合格证号:SYXK(鲁)20030020。

1.3 方法

1.3.1 肝酶诱导 SD 大鼠 48 只随机分为 SAA 组、阳性对照组和空白对照组,每组 16 只,雌雄各半。其中, SAA 组经尾静脉注射 SAA($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),阳性对照组经腹腔注射给予苯巴比妥钠($75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),空白溶媒对照组经尾静脉注射给予等体积空白溶媒(5 % 葡萄糖溶液, $1.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)。各组动物每天给药 1 次,

连续给药 1 周。

1.3.2 大鼠肝组织亚细胞组分制备 各组动物于末次给药 12 h 后禁食(自由饮水),24 h 后断头处死,迅速取出肝脏,称体质量,计算肝指数。在冰水浴下将肝脏剪碎,加入适量蔗糖溶液($0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)混匀,4 °C 下离心(10000 g , 20 min)得肝 S9 组分,采用钙沉淀法制备肝细胞液和肝微粒体。Bradford 法测定各亚细胞组分蛋白含量,并分装冻存($-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$),备用。

1.3.3 亚细胞组分 UGTs 酶活力评价 以 4-NP 为 UGTs 酶底物, HPLC 法测定含亚细胞组分孵育体系中其葡萄糖醛化代谢产物 4-NPG 的浓度,计算代谢产物生成速率,以定量表征各亚细胞组分的 UGTs 酶活力^[8]。孵育体系中含 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$ 、 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ UDPGA}$ 辅因子、0.2 % Triton X-100 和 0.08 mg 亚细胞组分蛋白(依蛋白含量确定加入体积),以 Tris-HCl 缓冲液($0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4)调节孵育体系总体积至 400 μL 。于 37 °C 恒温水浴振荡预孵育 1 min,加入 4-NP 溶液($0.08 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)10 μL ,继续孵育 40 min,加 15 % 高氯酸和 1 % BSA 各 50 μL 以终止反应,离心($12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)15 min,取上清进行 HPLC 分析。按代谢物生成量/(反应时间 $\times$ 蛋白量)计算 UGTs 酶的比活力,即单位时间内每 mg 蛋白生成代谢产物的量。

1.3.4 HPLC 分析条件 Diamonsil C_{18} 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm),流动相:三乙胺-盐酸缓冲液(pH3.0)-乙腈(80:20)(v/v),柱温:30 °C,流速:1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长:305 nm,进样量 20 μL 。

1.4 统计学处理方法 数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS16.0 统计软件,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 4-NPG 浓度测定的 HPLC 方法建立与评价 4-NP 是 UGTs 的底物,在含 UGTs 酶供体的孵育体系中可生成特异性代谢产物 4-NPG,其生成速率可定量反映供试体系的 UGTs 酶活性。受分子结构中苯环母核的影响,4-NPG 在 305 nm 附近显示有最大吸收,可选择作为 HPLC-UV 的检测波长。但由于受葡萄糖醛基极性的影响,4-NPG 在反相色谱系统中的保留不佳。实验筛选以三乙胺-盐酸缓冲液(pH3.0)-乙腈 80:20(v/v)作为流动相,从而获得良好的色谱峰形,以实现准确定量。研究表明,在所建立的 HPLC 分析条件下,4-NPG 具有合适的色谱保留时间,且微

粒体等亚细胞组分的基质成分对代谢产物 4-NPG 的色谱分离均不产生干扰,显示良好的方法专属性。在 5 ~ 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内,4-NPG 的色谱峰面积(Y)与浓度(X)之间呈现良好的线性关系,典型标准曲线为: $Y = 12.707X - 6.3612 (r = 0.9998)$,最低定量限为 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,显示方法具有足够高的灵敏度。此外,针对低、中、高浓度(20, 100, 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)质控样品的测定结果显示,所建立的样品处理方法对于 4-NPG 的提取回收率为 90.41 % ~ 96.47 %,浓度实测值与理论值间的相对偏差均在 $\pm 10\%$ 以内,日间和日内精密度(RSD)小于 3.5 %,表明方法准确度和精密度良好,可实现对孵育体系中 4-NPG 的准确定量。

2.2 大鼠肝脏各亚细胞组分 UGTs 酶活力测定 采用 HPLC 方法定量测定空白对照组大鼠肝脏不同亚细胞组分的 UGTs 酶活力。实验测得肝脏 S9 组分、肝细胞液和肝微粒体的 UGTs 酶活力分别为(4.34 ± 0.11) $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 、(0.15 ± 0.02) $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 、(14.5 ± 0.32) $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ($n = 8$)。方差分析结果显示,不同肝组织亚细胞组分的 UGTs 酶活力存在显著差异,肝微粒体的 UGTs 酶活力显著高于肝 S9 组分和细胞液,尤以肝细胞液的 UGTs 酶活力最低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。上述实验结果表明,大鼠肝脏的 UGTs 酶主要存在于肝微粒体中,因此,后续的 UGTs 酶活力比较研究选择以肝微粒体为考察对象。

2.3 各组大鼠肝微粒体的 UGTs 酶活性比较 见表 1、图 1。各处理组内大鼠的肝指数和肝微粒体蛋白浓度均无显著性差异。与空白对照组比较,苯巴比妥对大鼠肝指数无明显影响,但可显著增加肝微粒体蛋

白浓度,差异有统计学意义($P < 0.05$);SAA 组在肝指数和肝微粒体蛋白浓度两个指标上与空白对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各处理组的肝微粒体 UGTs 酶活性测定结果均显示显著的性别差异,雄鼠显著高于雌鼠($P < 0.05$)。相同性别下的各处理组间比较,苯巴比妥组的大鼠肝微粒体 UGTs 酶活性显著高于空白对照组和 SAA 组($P < 0.05$),雌雄大鼠情况相似,进一步确证了苯巴比妥对大鼠 UGTs 酶的诱导作用^[9]。与此同时,SAA 组雌雄大鼠的肝微粒体 UGTs 酶活性与相应性别的空白对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。这一结果表明,SAA 对不同性别大鼠肝脏的 UGTs 酶活性均无显著的诱导或抑制作用。

表 1 各组大鼠肝指数、肝微粒体的蛋白浓度及 UGTs 酶活性 ($\bar{x} \pm s$)

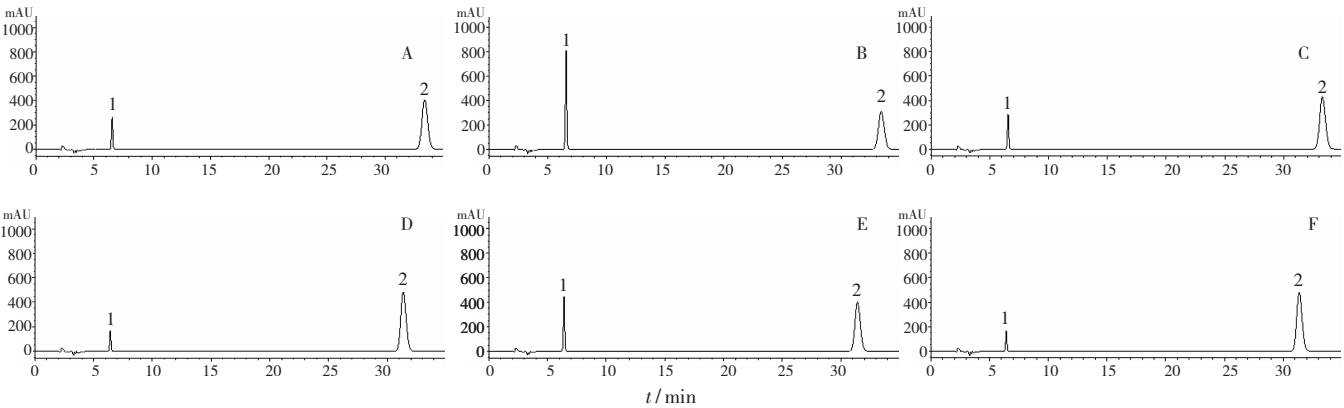
Table 1 Liver index, microsomeprotein content and UGTs activity in liver of both male and female rats

组别	雄鼠			雌鼠		
	肝指数 /%	蛋白浓度 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	UGTs 酶活性 / $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	肝指数 /%	蛋白浓度 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	UGTs 酶活性 / $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$
SAA 组	3.26 ± 0.14	$14.68 \pm 0.96^{\Delta}$	$15.17 \pm 0.90^{\Delta\Delta}$	2.80 ± 0.13	$15.16 \pm 0.72^{\Delta}$	$7.74 \pm 0.68^{\Delta}$
苯巴比妥组	4.03 ± 0.15	$22.86 \pm 1.37^{*}$	$31.82 \pm 1.98^{*}$	2.92 ± 0.15	$23.04 \pm 0.99^{*}$	$18.34 \pm 2.34^{*}$
空白对照组	3.18 ± 0.09	13.86 ± 0.89	17.75 ± 1.07	2.82 ± 0.11	14.52 ± 1.04	7.61 ± 1.43

注:与同性别的空白对照组比较, $^{*}P < 0.05$;与同性别的苯巴比妥组比较, $^{\Delta}P < 0.05$;与雌鼠 SAA 组比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.05$ 。

3 讨论

本实验以 4-NP 为探针底物,采用 HPLC 法检测其特异性代谢产物 4-NPG 生成速率的方法定量评价大鼠肝微粒体 UGTs 酶活性。与传统的以胆红素为底



1 号峰为 4-NPG, 2 号峰为 4-NP; A 为雄鼠 SAA 组; B 为雄鼠苯巴比妥组; C 为雄鼠空白对照组; D 为雌鼠 SAA 组; E 为雌鼠苯巴比妥组; F 为雌鼠空白对照组

图 1 各组大鼠肝微粒体 UGTs 酶活性测定的 HPLC 色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms for UGTs activity determination in rat liver microsomes

物的 Black 法和重氮化比色法相比, 测试条件稳定可控, 线性范围宽, 灵敏度高, 结果准确可靠, 适用于肝微粒体等亚细胞组分中 UGTs 酶活性的定量测定。

联合用药在多种疾病的临床药物治疗中普遍存在, 药物相互作用对临床疗效和安全性的影响因此受到广泛关注。其中, 药物对代谢酶的诱导或抑制作用是导致药物相互作用问题重要因素之一。丹酚酸 A 是一种天然抗氧化剂候选药物, 本课题组在前期研究了该化合物的药理活性和作用机制, 并发现其不影响 CYP450 酶活性^[10]。在此基础上, 本文进一步通过体内动物实验考察其对主要的 II 相结合代谢酶 UGTs 活性的影响。结果表明, SAA 对不同性别大鼠肝指数、肝微粒体蛋白浓度及肝微粒体 UGTs 酶活性均无显著影响, 提示 SAA 在联合用药的情况下因对 UGTs 诱导或抑制而出现药物-药物相互作用的潜在风险较小, 具有良好的安全性。

参考文献:

- [1] Wallig MA. Toxicological highlight: glucuronidation and susceptibility to chemical carcinogenesis[J]. *Toxicological Sciences*, 2004, 78: 1-2.
- [2] Liu GT, Zhang TM, Wang BE, et al. Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes [J]. *Biochem Pharmacol*, 1992, 43: 147-152.
- [3] Fan HY, Fu FH, Yang MY, et al. Antiplatelet and antithrombotic activities of salvianolic acid A[J]. *Thromb Res*, 2010, 126: 17-22.
- [4] Fan HY, Yang L, Fu FH, et al. Cardioprotective effects of salvianolic acid A on myocardial ischemia reperfusion injury in vivo and in vitro [J/OL]. *eCAM*, 2012, doi: 10.1155/2012/508938.
- [5] Hou YY, Peng JM, Chao RB. Pharmacokinetic study of salvianolic acid A in rat after intravenous administration of Danshen injection [J]. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21: 598-601.
- [6] Shen Y, Wang XY, Xu LH, et al. Characterization of metabolites in rat plasma after intravenous administration of salvianolic acid A by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and liquid chromatography ion trap mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23: 1810-1816.
- [7] De EH, Yi Z, Xi JC, et al. Identification and characterization of human UDP-glucuronosyl transferases responsible for the in vitro glucuronidation of salvianolic acid A [J/OL]. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 2012, doi: 10.2133/dmpk.DMPK-12-RG-023.
- [8] Nobumitsu H, Hideto J, Toshiko TK. Determination of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 activity in human and rat liver microsomes by HPLC with UV detection[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2001, 25: 65-75.
- [9] 傅柳松, 彭仁绣. 苯巴比妥诱导下大鼠肝微粒体药酶活性与膜流动性变化的相关性[J]. *药学报*, 1991, 26(8): 567-571.
- [10] Xu H, Guo HF, Zou XL, et al. Effects of Salvianolic acid A on liver cytochrome P450 in rats [C]. In: *Proceedings of 2009 International Conference of Natural Product and Traditional Medicine*. Xi'an, China. 2009, 422-425.

(编辑: 邓响潮)

茶色素在低钙及高钙浓度下对离体蟾蜍心肌收缩力的影响

董 帅¹, 唐泽耀², 张冬梅³, 宫德正³, 孙艺平³, 傅 雷³ (1. 大连医科大学基础实验中心大学生创新实践基地, 辽宁 大连 116044; 2. 大连医科大学药学院, 辽宁 大连 116044; 3. 大连医科大学基础学院, 辽宁 大连 116044)

摘要: 目的 观察不同浓度茶色素(Tea pigment, TP)溶液在低钙和高钙条件下对离体蟾蜍心肌收缩力和心率的影响。**方法** 50 只蟾蜍随机分为正常任氏液组, 任氏液+茶色素组, 低钙任氏液+茶色素组, 高钙任氏液+茶色素组。采用斯氏法制备离体蛙心灌流标本。正常任氏液组离体蟾蜍心脏只灌流任氏液, 任氏液+茶色素组在离体蟾蜍心脏灌流任氏液中加入茶色素溶液, 低钙任氏液+茶色素组在离体蟾蜍心脏灌流低钙任氏液中加入茶色素溶液, 高钙任氏液+茶色素组在离体蟾蜍心脏灌流高钙任氏液中加入茶色素溶液。通过蟾蜍心室外加药, 利用心室收缩波动, 心室吸收药物的方法给药, 心室外容积固定为 1.0 mL, 分别以不同浓度的茶色素进行灌流, 每次加入茶色素后记录 40 min。应用 BL-420F 生物机能实验系统记录离体蟾蜍心肌收缩曲线, 并进行心肌收

收稿日期: 2013-03-07

作者简介: 董帅, 女, 五年制临床医学学生。通讯作者: 傅雷, 高级实验师, 研究方向: 循环和肾脏生理。Email: leifu382@hotmail.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81200155); 2011 年辽宁省大学生科技创新项目。