

丹酚酸 A 体外葡萄糖醛酸结合代谢种属差异的研究

田红翠, 李艳丽, 江云霞, 李方悦, 许 卉(烟台大学药学院, 山东 烟台 264005)

摘要: **目的** 研究丹酚酸 A(salvianolic acid A, SAA)在人和大鼠体外肝微粒体中的葡萄糖醛酸结合代谢反应的种属差异。**方法** 采用人和大鼠肝微粒体体外温孵体系进行 SAA 的葡萄糖醛酸结合代谢, 通过高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)检测确定产物峰; 参考 SAA 标准曲线计算代谢产物生成量, 并通过产物生成量计算酶促动力学参数。**结果** SAA 在人和大鼠肝微粒体中的葡萄糖醛酸结合代谢均产生 4 个相同的葡萄糖醛酸结合代谢产物, 其最大反应速率($V_{\max}$)分别为 0.585, 2.08 nmol·min⁻¹·mg⁻¹; 米氏常数(K_m)分别为 0.037, 0.065 mmol·L⁻¹。**结论** SAA 在人和大鼠体外肝微粒体中发生的葡萄糖醛酸结合代谢产物无差异, 但酶促反应动力学参数 $V_{\max}$ 及 K_m 均有一定的差异, 可能与其葡萄糖醛酸转移酶(UGTs)的活性有关。

关键词: 丹酚酸 A; 葡萄糖醛酸结合; 代谢; 种属差异; 酶促动力学; 高效液相色谱-质谱联用

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)04-0463-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.04.018

Study of Species Differences of Salvianolic Acid A Glucuronidation in Vitro

TIAN Hongcui, LI Yanli, JIANG Yunxia, LI Fangyue, XU Hui (School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005 Shangdong, China)

Abstract: **Objective** To study the species differences of salvianolic acid A(SAA) glucuronidation in human and rat liver microsomes in vitro. **Methods** SAA glucuronidation was carried out in human and rat liver microsomes in-vitro warm-incubation system. We confirmed the chromatographic peak of metabolites by using high performance liquid chromatography-mass spectrography(HPLC-MS), calculated the amount of metabolites by using HPLC-UV, and then got the enzymatic kinetic parameters through the metabolites amount. **Results** Four glucuronic acid metabolites of SAA were detectable in the human and rat liver microsomes. The maximum reaction rate ($V_{\max}$) of glucuronidation was 0.585, 2.08 nmol·min⁻¹·mg⁻¹, and Michaelis-Menten constant(K_m)was 0.037, 0.065 mmol·L⁻¹ in human and rat liver microsomes, respectively. **Conclusion** SAA glucuronidation metabolites are similar in the human and rat liver microsomes, but enzymatic kinetic parameters of $V_{\max}$ and K_m are different, which is probably related with the activity of their glucuronosyl transferase enzyme(UGTs).

Keywords: Salvianolic acid A; Glucuronidation; Metabolism; Species differences; Enzymatic kinetics; High performance liquid chromatography-mass spectrography

丹酚酸 A(salvianolic acid A, SAA)是丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 中的水溶性酚酸类活性成分, 具有抗氧化、抗凝、抗血栓形成等广泛的药理作用, 是极具研究前景的心脑血管保护剂候选药物^[1-3]。大鼠药代动力学研究^[4-6]显示, 由静脉途径进入体内的 SAA

可经肝脏药物代谢酶介导快速发生羟基的 II 相结合反应, 生成多种葡萄糖醛酸以及甲基化的葡萄糖醛酸结合代谢物, 表明葡萄糖醛酸结合代谢是 SAA 体内消除的一条重要途径, 其中催化 SAA 发生葡萄糖醛酸结合代谢反应的尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶

收稿日期: 2013-08-19

作者简介: 田红翠, 女, 硕士研究生, 研究方向: 药物代谢与动力学。Email: thchaoxingqing@126.com。通信作者: 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(81102780); 山东省自然科学基金(ZR2013HZ004); 烟台大学研究生创新基金(YJSY201423)。

(uridine-diphosphateglucuronosyltransferases, UGTs)的主要亚型包括UGT1A1和UGT1A9,尤以UGT1A9的催化活性最强^[7]。在前期研究基础上,本研究进一步考察SAA在人和大鼠肝微粒体体外温孵体系中的代谢行为,比较二者代谢产物谱以及酶促反应动力学参数上的一致性,以揭示其葡萄糖醛酸结合代谢是否存在种属差异,为后续的临床试验研究应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),包括在线脱气机、二元高压泵、自动进样器和 VWD 检测器; Thermo TSQ Quantum Access 三重四级杆串联质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific Inc.),包括电喷雾离子化接口,串连四级杆质谱检测器和 Xcalibur 色谱工作站,与 Agilent 1100 高效液相色谱仪构成高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)联用分析系统。

1.2 药物及试剂 SAA, 山东靶点药物有限公司,经 HPLC 测定,纯度 > 98 %; 对硝基苯酚(4-NP), 天津市科密欧化学试剂有限公司; 对硝基苯酚- β -葡萄糖醛酸苷(4-NPG)、尿苷-二磷酸葡萄糖醛酸(UDPGA), 美国 Sigma 公司; 人源微粒体(HLM)、鼠源微粒体(RLM), 瑞德肝脏疾病研究(上海)有限公司。其他试剂均为市售分析纯或色谱纯。

1.3 UGTs 酶活力评价 参考文献^[8]方法, HPLC 法测定孵育体系中葡萄糖醛酸化代谢产物 4-NPG 的浓度, 计算代谢产物生成速率, 以表征 2 种属肝微粒体的 UGTs 酶活力。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。

1.4 SAA 在肝微粒体中的孵育 孵育体系含 2 mmol $\cdot$ L⁻¹ MgCl₂、0.25% Triton-X-100、适量 UDPGA 辅因子和肝微粒体(HLM 和 RLM 体系蛋白浓度分别为 7.0, 1.3 mg $\cdot$ mL⁻¹), 以磷酸盐缓冲液(0.1 mol $\cdot$ L⁻¹, pH 7.4)调节总体积至 200 μ L, 于 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴振荡预孵育 5 min, 加入 SAA 溶液 10 μ L, 继续孵育一定时间后, 加 5 mol $\cdot$ L⁻¹ HCl 100 μ L 终止反应, 依文献^[9]方法进行溶剂萃取处理后, 分别进行 HPLC 和 LC-MS 分析。

1.5 色谱及质谱条件 色谱条件: Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 流动相: 水(含 0.1 % 甲酸)-乙腈(23:77, V/V), 运行时间: 35 min, 柱温: 30 $^{\circ}$ C, 流速: 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹, 检测波长: 285 nm, 进样量: 20 μ L。质谱条件: 离子极性为负离子

(Negative), 气动辅助电喷雾离子化, 扫描范围 m/z 100~900, 提取离子扫描为 m/z 493, m/z 669, 喷雾电压: 3.5 kV, 毛细传输管温度: 350 $^{\circ}$ C, 鞘气压力: 30 psi, 辅助气压力: 5 bar, 碰撞气(氮气)、鞘气(氮气)流速: 0.75 L $\cdot$ min⁻¹, 辅助气(氮气)流速: 0.15 L $\cdot$ min⁻¹。

1.6 数据处理与统计学方法 根据酶促反应时间、酶浓度计算出酶促反应代谢物的生成速率, 并分别绘制 Michaelis-Menten 曲线和 Lineweaver-Buck 双倒数曲线。进一步计算得 SAA 在不同种属肝微粒体中葡萄糖醛酸结合代谢酶促反应的动力学参数: 最大反应速度($V_{\max}$, 方程截距的倒数)和米氏常数(K_m , 方程斜率与截距的比值)。

实验结果以均数 $\pm$ 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, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

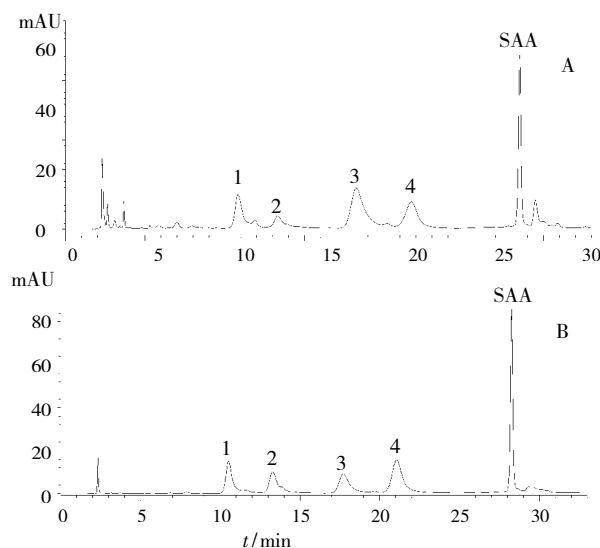
2 结果

2.1 不同种属肝微粒体的 UGTs 酶活力 测定结果表明, HLM 和 RLM 的 UGTs 酶活力分别为(1.38 $\pm$ 0.03)、(9.75 $\pm$ 0.16)nmol $\cdot$ mg⁻¹ $\cdot$ min⁻¹。2 种肝微粒体中 UGTs 酶活性差异有统计学意义($n=6$, $P < 0.05$)。

2.2 代谢产物定量分析方法的建立 由于没有商品化的 SAA 葡萄糖醛酸结合产物标准品, 因此设定母体化合物 SAA 与其葡萄糖醛酸结合代谢产物的 HPLC-UV 峰面积校正因子为 1, 以 SAA 的标准曲线对代谢产物进行定量。在选定的 HPLC-UV 检测条件下, 本方法具有良好的专属性, 在 2 种肝微粒体中, SAA 及其代谢产物峰形良好, 无内源性杂质干扰, 见图 1。

2.3 SAA 体外葡萄糖醛酸结合代谢产物的确认 HPLC-UV 显示, SAA 经 2 种肝微粒体代谢后均有 5 个色谱峰, 用 RLM 孵育体系中的代谢物样品进行离子流图扫描, SAA 分子量为 494, 因此在负离子分子 m/z 493[M-H]⁻处进行提取离子流扫描, 结果见图 2 (C), 在 SAA 前 4 个色谱峰极性均比 SAA 大, 推测是 SAA 葡萄糖醛酸结合产物, 因此在 m/z 669 (493+176)[M-H]⁻处进行提取离子流扫描, 见图 2 (D), 结果显示在 SAA 前 4 个色谱峰均为 SAA 的葡萄糖醛酸结合产物峰, 比原型药 SAA 的分子量多 176 Da, 相当于多了一条单葡萄糖醛酸链, 可初步确定为 SAA 的单葡萄糖醛酸代谢产物。

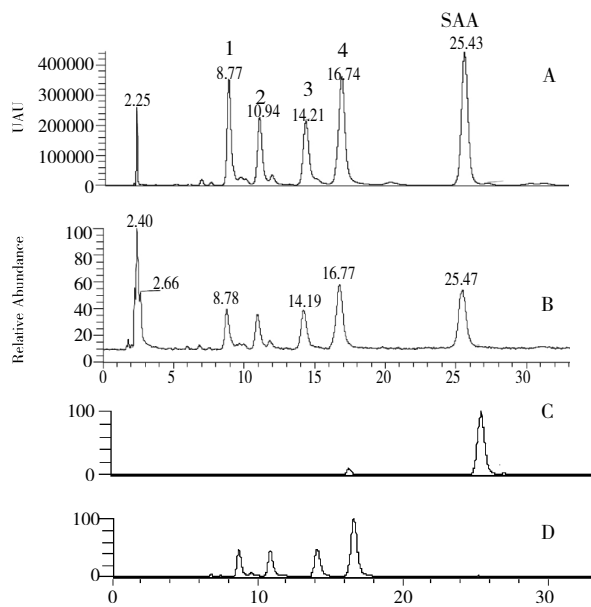
在 HLM 孵育体系中 SAA 前 4 个峰的保留时间与 RLM 孵育体系中一致, 推断在 HLM 和 RLM 中孵育时,



A. HLM 孵育体系; B. RLM 孵育体系

图 1 SAA 及其代谢产物 HPLC-UV 色谱图

Figure 1 HPLC-UV chromatograms of SAA and its metabolites



A. HPLC-UV 图谱; B. 总离子流图; C. 在 m/z 493 处的选择离子流图; D. 在 m/z 669 处的选择离子流图

图 2 SAA 在 RLM 体系中代谢的 HPLC 色谱图及离子流图

Figure 2 HPLC and ion chromatograms of SAA and its metabolites in incubation system of RLM

SAA 的 4 个葡萄糖醛酸结合产物相同 (图 1)。因 HPLC-UV 与 HPLC-MS 法的系统压力不同, 所以造成产物及 SAA 出峰时间稍有差异。

2.4 SAA 在 2 种属肝微粒体中的酶促动力学 2 种属肝微粒体均选取底物浓度为 $1\sim 8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, HLM 孵育体系中 UDPGA 浓度和反应时间分别定为 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 20 min (图 3), RLM 孵育体系中 UDPGA 浓度和反

应时间分别定为 $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 30 min (图 4), 以保证代谢产物在线性范围内产生。根据酶促反应时间、酶浓度计算出酶促反应代谢物的生成速率, 并分别绘制 Michaelis - Menten 曲线和 Lineweaver - Buck 双倒数曲线 (图 5 和图 6)。进一步计算得 SAA 在 HLM 和 RLM 中葡萄糖醛酸结合代谢反应的酶促动力学参数: 最大反应速度 ($V_{\max}$) 分别是 $0.585, 2.08\text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$; 米氏常数 (K_m) 分别是 $0.037, 0.065\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

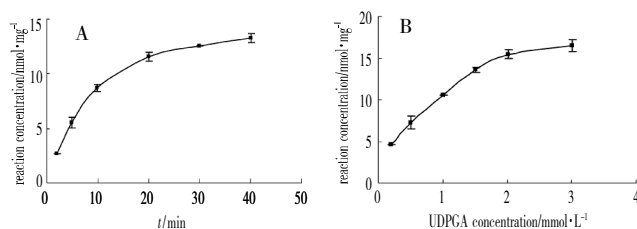


图 3 HLM 孵育体系中孵育时间 (A) 和 UDPGA 浓度 (B) 对 SAA 代谢的影响

Figure 3 Effect of incubation time (A) and concentration of UDPGA (B) on metabolism of SAA in the incubation system of HLM

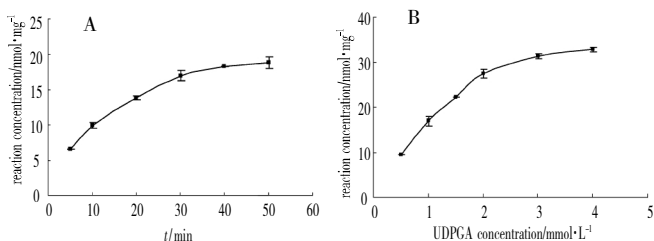


图 4 RLM 孵育体系中孵育时间 (A) 和 UAPGA 浓度 (B) 对 SAA 代谢的影响

Figure 4 Effect of incubation time (A) and concentration of UDPGA (B) on metabolism of SAA in the incubation system of RLM

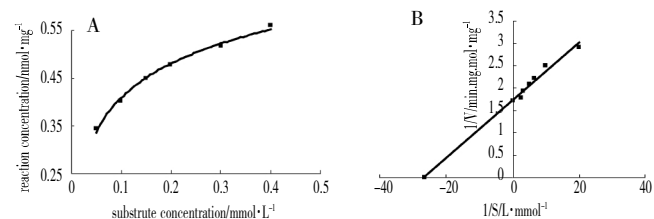


图 5 在 HLM 孵育体系中 SAA 葡萄糖醛酸化代谢的米氏动力学曲线 (A) 和双倒数曲线 (B)

Figure 5 Michaelis-Menten kinetic curve (A) and Lineweaver-Buck double reciprocal curve (B) of glucuronidation of SAA in the incubation system of HLM

3 讨论

与众多天然多酚类化合物相似, 葡萄糖醛酸结合代谢是 SAA 体内消除的重要途径之一。本研究首次通过商品化人源和鼠源肝微粒体为酶供体的体外

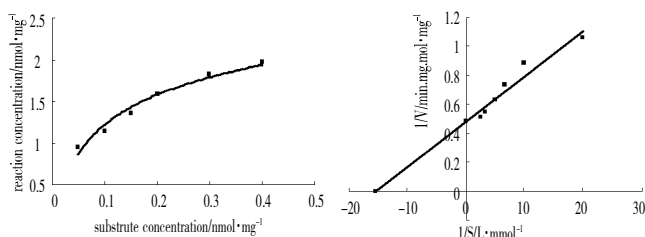


图6 在RLM孵育体系中SAA葡萄糖醛酸化代谢的米氏动力学曲线(A)和双倒数曲线(B)

Figure 6 Michaelis-Menten kinetic curve (A) and Lineweaver-Buck double reciprocal curve (B) of glucuronidation of SAA in the incubation system of RLM

温孵实验,从代谢产物谱和酶促反应动力学特征两个方面定性、定量揭示SAA葡萄糖醛酸结合代谢的种属影响,以期SAA作为候选药物的后续临床评价和应用奠定基础。

本研究结果表明,在相同条件下,SAA在人和大鼠两个种属肝微粒体外温孵代谢体系所生成的代谢产物类别基本一致。经HPLC-MS分析,4个主要代谢产物均为SAA的单葡萄糖醛酸结合代谢物,可能来源于其分子结构中不同位置上羟基的反应。酶促反应动力学研究结果显示,SAA在RLM和HLM体系中的葡萄糖醛酸结合代谢均呈饱和动力学特征,其代谢消除符合米氏方程,酶的特征性常数(K_m)均在 $10^{-5} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水平,与文献^[7]报道的重组人源UGT1A1及UGT1A9酶的 K_m 值基本一致,表明肝脏中UGTs酶对SAA具有较强的亲和力,可催化其快速发生葡萄糖醛酸结合代谢。而HLM体系较RLM体系有更低的 $V_{\max}$ 和 K_m 值,这可能与HLM的UGTs酶活力相对较低有关。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Fan HY, Fu FH, Yang MY, et al. Antiplatelet and antithrombotic activities of salvianolic acid A [J]. Thromb Res, 2010, 126: e17-e22.
- [3] 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]. eCAM, 2012, doi:10.1155/2012/508938.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Xu H, Li YL, Che X, et al. Metabolism of salvianolic acid A and antioxidant activities of its methylated metabolites [J]. Drug Metab Dispos, 2014, 42(2): 274-81.
- [7] Han DE, Zheng Y, Chen X, et al. Identification and characterization of human UDP-glucuronosyl-transferases responsible for the in vitro glucuronidation of salvianolic acid A [J]. Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 2012, 27(6): 579-585.
- [8] 李艳丽,田红翠,翟文婷,等. 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 [J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(6): 558-561.
- [9] 李艳丽,王芳,翟文婷,等. 大鼠肝细胞液体外甲基化代谢丹酚酸A的酶促反应动力学 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(9): 2061-2063.

(编辑:梁进权)

·简讯·

《中药新药与临床药理》杂志为中药新药研发、中药临床药理学学科重要的学术交流平台,学科影响指标、影响因子以及学科排序在全国同类期刊中位居前列,并全面进入国内重要的核心期刊评价系统,是中国中文核心期刊、中国科技核心期刊、RCCSE中国核心学术期刊,2013年经过中国科学引文数据库(简称CSCD)的定量遴选、学科专家评审和中国科学引文数据库来源期刊遴选委员会的评议,本刊再次入选为2013~2014年度中国科学引文数据库来源期刊。在2012年出版的《中国学术期刊影响因子年报(自然科学与工程技术)》中本刊影响因子数据:复合影响因子JIF为1.271,他引JIF为1.140;期刊综合影响因子JIF为0.841,他引JIF为0.797;基金论文比为0.81,在中医学与中药学类119种期刊中列第5位,成为中医药行业具有较高学术地位和重要影响的期刊之一。

(《中药新药与临床药理》编辑部辑)