

## 瑞香素在大鼠肝 S9 中体外代谢研究

梁思成<sup>1,2</sup>, 葛广波<sup>1\*</sup>, 夏杨柳<sup>1</sup>, 齐晓怡<sup>3\*</sup>, 王傲雪<sup>3</sup>, 涂彩霞<sup>3</sup>, 杨凌<sup>1</sup>

(1. 中国科学院大连化学物理研究所药用资源开发研究组, 辽宁 大连 116023; 2. 大连医科大学附属第二医院, 辽宁 大连 116027; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 瑞香素给药后在大鼠体内快速代谢消除, 但机制仍不清楚。本研究开展瑞香素体外代谢特征分析, 鉴定了瑞香素在大鼠肝 S9 (RLS9) 中的代谢产物结构, 测定了不同代谢路径的动力学参数。HPLC-DAD-MS 检测发现, 瑞香素在 RLS9 中转化为 6 个代谢产物, 包括 7-或 8-葡糖醛酸和硫酸酯代谢物、8-甲基代谢物及 7-硫酸酯-8-甲基代谢物。动力学分析表明, 瑞香素在 RLS9 的葡糖醛酸化和甲基化反应符合米氏动力学, 7-*O*-磺酸化反应和 8-*O*-磺酸化反应分别符合双位点和底物抑制动力学。3 条代谢路径中, 清除率最大的为磺酸化反应, 其次为甲基化和葡糖醛酸化反应。借助体外代谢动力学数据和体外-体内关联方法, 预测获得的瑞香素在大鼠体内肝清除率 ( $54.9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 与文献报道的大鼠体内总清除率 ( $58.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 接近。结果表明, 肝脏是瑞香素在大鼠体内主要代谢位点。磺酸化、甲基化和葡糖醛酸化反应是瑞香素在大鼠肝脏中主要清除路径。

**关键词:** 瑞香素; II 相代谢酶; 酶动力学; 肝清除率

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2017) 02-0291-05

## *In vitro* metabolism of daphnetin in rat liver S9 fractions

LIANG Si-cheng<sup>1,2</sup>, GE Guang-bo<sup>1\*</sup>, XIA Yang-liu<sup>1</sup>, QI Xiao-yi<sup>3\*</sup>, WANG Ao-xue<sup>3</sup>,  
TU Cai-xia<sup>3</sup>, YANG Ling<sup>1</sup>

(1. Laboratory of Pharmaceutical Resource Discovery, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China; 2. Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116027, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** Daphnetin is quickly eliminated in rats after dosing, but the mechanism remains unclear. This study was aimed to investigate the *in vitro* metabolism of daphnetin using rat liver S9 fractions (RLS9). The metabolites formed in RLS9 were identified and the kinetic parameters for different metabolic pathways were determined. HPLC-DAD-MS analysis showed that daphnetin was biotransformed to six metabolites, which were identified as 7 or 8 mono-glucuronide and mono-sulfate, 8-methylate, and 7-sulfo-8-methylate. Methylation and glucuronidation of daphnetin exhibited the Michaelis-Menten kinetic characteristics, whereas the substrate inhibition kinetic and the two-site kinetic were observed for 8-sulfate and 7-sulfate formations. Of the 3 conjugation pathways, the intrinsic clearance rate for sulfation was highest, followed by methylation and glucuronidation. By *in vitro-in vivo* extrapolation of the kinetic data measured in RLS9, the hepatic clearance were estimated to be  $54.9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$  which is comparable to the system clearance ( $58.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) observed in rats. In conclusions, the liver might be the main site for daphnetin metabolism in rats. Sulfation, methylation and glucuronidation are important pathways of the hepatic metabolism of daphnetin in rats.

收稿日期: 2016-09-10; 修回日期: 2016-11-18.

基金项目: 国家基础研究计划资助项目 (2013CB531805); 国家自然科学基金资助项目 (81273590, 81473181, 81402822).

\*通讯作者 Tel: 86-411-84379317, Fax: 86-411-84676961, E-mail: geguangbo@dicp.ac.cn; 7xiao1@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0847

**Key words:** daphnetin; phase II enzyme; enzyme kinetics; hepatic clearance

瑞香素 (又称祖师麻甲素) 是我国传统中药祖师麻主要活性成分和质量控制指标成分<sup>[1]</sup>。瑞香素在我国 20 世纪 80 年代即被开发为治疗闭塞性脉管炎、关节炎等疾病的辅助药物, 以瑞香素为主要活性成分的多种瑞香属类植物在土耳其被用于治疗腰痛和发热等的传统草药<sup>[2]</sup>。

药物代谢是药物代谢动力学的核心研究内容, 直接关系药物的安全性和有效性<sup>[3]</sup>。然而, 从动物实验获取的药代、药效数据向人体进行放大和推导, 可能因种属差异获得错误的药理学数据<sup>[3]</sup>。大鼠是以往研究瑞香素代谢、药效机制使用最普遍的模式动物<sup>[1,4-7]</sup>。瑞香素在大鼠体内药物代谢动力学表现为半衰期短 (约 15 min), 但机制仍不清楚<sup>[5]</sup>。作者<sup>[8,9]</sup>曾研究比较瑞香素在大鼠和人肝微粒体中葡萄糖醛酸代谢通路差异; 鉴定了在人肝 S9 (HLS9) 中瑞香素代谢产物结构, 测定了不同代谢通路动力学行为<sup>[8,9]</sup>。然而, 瑞香素在大鼠和人体中代谢轮廓及清除速率是否存在差异尚不清楚。因此, 本研究利用大鼠肝 S9 (RLS9) 考察瑞香素代谢轮廓及动力学行为。

## 材料与方法

**实验材料** 瑞香素 (97%), 丙甲菌素, Brij 58, 氯化镁, *D*-葡萄糖二酸 1,4-内酯 (DSL),  $\beta$ -*D*-葡糖醛酸结合物水解酶, 尿苷酰二磷酸葡萄糖醛酸钠 (UDPGA), *S*-腺苷基甲硫氨酸 (SAM), 二硫苏糖醇 (DTT), 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸 (PAPS), *D*-葡萄糖-6-磷酸盐, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, NADP<sup>+</sup>购自 Sigma-Aldrich。瑞香素代谢产物, 包括瑞香素-7-葡糖醛酸苷、瑞香素-8-葡糖醛酸苷、瑞香素-7-硫酸酯、瑞香素-8-硫酸酯、8-甲基-瑞香素和 7-硫酸酯-8-甲基-瑞香素使用文献<sup>[8,9]</sup>报道方法分离、纯化获得。RLS9 购自瑞德肝脏疾病研究 (上海) 有限公司。

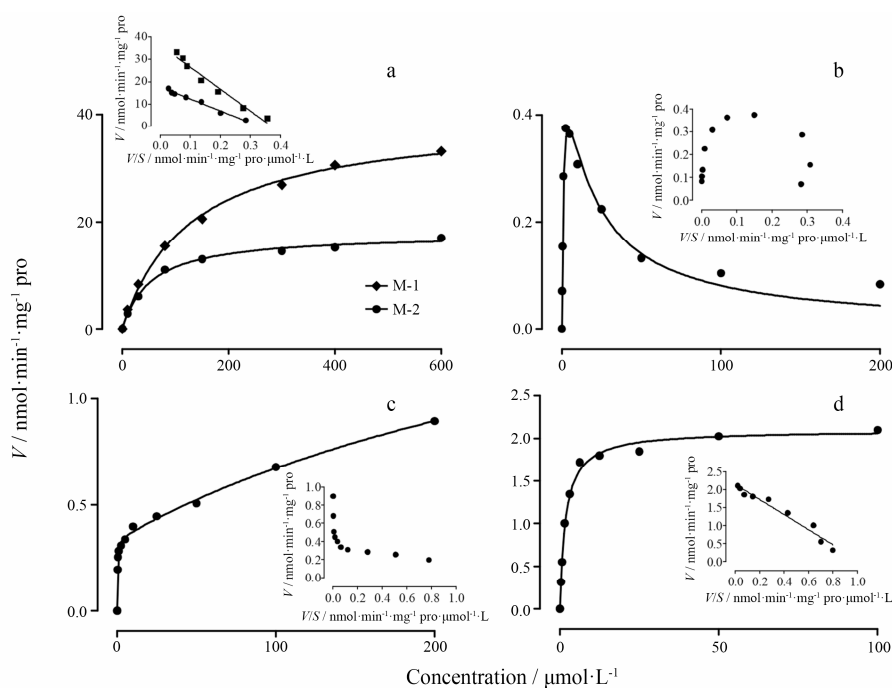
**孵育体系** 使用 I 相和 II 相代谢酶体外研究体系考察瑞香素代谢特征。细胞色素 P450 酶 (CYP) 孵育体系 (总体积 200  $\mu$ L), 包括磷酸钾缓冲液 (pH 7.4, 100 mmol·L<sup>-1</sup>)、NADPH-产生体系 (1 mmol·L<sup>-1</sup> NADP<sup>+</sup>、10 mmol·L<sup>-1</sup> 葡萄糖-6-磷酸、1 U·mL<sup>-1</sup> 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、4 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>)、0.5 mg·mL<sup>-1</sup> RLS9 和瑞香素。II 相酶孵育体系 (总体积 200  $\mu$ L), 包括 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4, 50 mmol·L<sup>-1</sup>)、5 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、0.5 mg·mL<sup>-1</sup> RLS9、辅因子 (5 mmol·L<sup>-1</sup> UDPGA、4

mmol·L<sup>-1</sup> PAPS、1 mmol·L<sup>-1</sup> SAM) 和瑞香素。所有反应在 37 °C 条件下预孵 3 min, 加入辅因子 (NADP<sup>+</sup>、UDPGA、PAPS 或 SAM) 启动反应。37 °C 条件下孵育 60 min 后, 加入甲醇 200  $\mu$ L 终止反应。充分涡旋, 在 4 °C 下 20 000  $\times$ g 离心 10 min 去除蛋白, 取上清液进行 HPLC-DAD-MS 分析。

**分析条件** 使用岛津 LC-MS-2010EV 系统用于瑞香素及其代谢产物的分析和鉴定, 包括控制器 CBM-20A, 两个 LC-20AD 泵, 自动进样器 SIL-20AHT, DAD 检测器, 电喷射离子化 (ESI) 质谱检测器。分析柱为 Shim-pack XR-ODS C<sub>18</sub> 色谱柱 (100.0 mm  $\times$  2.0 mm, 2.2  $\mu$ m), 柱温箱温度设为 40 °C。流动相 A 为乙腈, B 为水 (含 0.2% 甲酸), 流速为 0.3 mL·min<sup>-1</sup>。梯度洗脱条件为: 0~2.0 min, 92%~90% B; 2.0~9.0 min, 90%~70% B; 9.0~11 min, 10% B; 11~16 min, 平衡到 92% B。检测波长设定为 320 nm。使用合成后的瑞香素代谢产物制作标准曲线。代谢产物 M-5 在 0.04~8  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 浓度内线性良好, 其余代谢产物 M-1、M-2、M-3、M-4 和 M-6 在 0.2~30  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 浓度内线性良好, 相关系数大于 0.99。样品测定的准确度和精密度 RSD 值 < 15%。使用 ESI 质谱检测器在正负离子模式下检测瑞香素代谢产物。扫描 *m/z* 范围从 100~1 000。检测器电压设定为  $\pm$ 1.5 kV, CDL 和加热器的温度均设在 250 °C, CDL 电压设定为 40 V。其他检测条件如下: 接口电压为 4.5 kV, 氮气流速 1.5 L·min<sup>-1</sup>, 干燥气 (N<sub>2</sub>) 压力 0.06 MPa。通过 LC-MS Solution 工作站 (3.4.1 版) 进行数据处理。

**动力学分析** 葡萄糖醛酸化孵育体系 (200  $\mu$ L), 包括 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4, 50 mmol·L<sup>-1</sup>)、10 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、10 mmol·L<sup>-1</sup> DSL、25  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 丙甲菌素、0.3 mg·mL<sup>-1</sup> RLS9、5 mmol·L<sup>-1</sup> UDPGA 和 1~600  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 瑞香素, 孵育条件为 37 °C 下 10 min。磺酸化孵育体系 (200  $\mu$ L), 包括 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4, 50 mmol·L<sup>-1</sup>)、5 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、2 mmol·L<sup>-1</sup> DTT、0.3 mg·mL<sup>-1</sup> RLS9、4 mmol·L<sup>-1</sup> PAPS 和 1~200  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 瑞香素, 孵育条件为 37 °C 下 20 min。甲基化孵育体系 (200  $\mu$ L), 包括 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4, 50 mmol·L<sup>-1</sup>)、5 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、2 mmol·L<sup>-1</sup> DTT、0.3 mg·mL<sup>-1</sup> RLS9、1 mmol·L<sup>-1</sup> SAM 和 1~100  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 瑞香素, 孵育条件为 37 °C 下 10 min。以上反应中瑞香素代谢比例不超过 20%, 以确保符合酶





**Figure 3** Enzyme kinetics of glucuronidation (a), sulfation (b: M-3 formation; c: M-4 formation), and methylation (d) of daphnetin by RLS9. Eadie-Hofstee plots ( $V/S-V$ ) are displayed as insets

甲基化反应 ( $1\ 167\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) > 葡糖醛酸化反应 ( $634\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ )。瑞香素在 RLS9 中的代谢动力学参数见表 1。

### 3 瑞香素大鼠体内清除率预测

通过体外数据向体内放大, 获得瑞香素在大鼠肝脏的体内清除率为  $18\ 470\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。基于充分搅拌模型公式, 进一步获得大鼠肝脏清除率 ( $54.9\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。最后, 根据瑞香素的大鼠肝脏清除率和大鼠肝脏血流的比值, 计算出瑞香素在大鼠肝脏中摄取率为 0.99。

### 讨论

瑞香素在口服给药后大鼠体内药代行为表现为半衰期短 (15 min)、生物利用度低 (25%)<sup>[5]</sup>。Shan 等<sup>[5]</sup>使用 LC-MS/MS 分析了瑞香素给药后大鼠血液、尿液、粪便中代谢产物, 并根据代谢产物质谱信息推

测瑞香素主要经过甲基化、葡糖醛酸化、磺酸化代谢清除。但代谢产物结构未得到确认。本研究通过与标准产物比对, 证实瑞香素在大鼠和 HLS9 中的代谢轮廓相同<sup>[8]</sup>。

瑞香素 C-7 和 C-8 位羟基均能发生葡糖醛酸化和磺酸化反应, 但 C-8 位羟基是甲基化反应选择性位点。这与作者<sup>[8]</sup>使用 HLS9 体系发现的情况一致。据报道, 大鼠和人甲基转移酶 (COMT) 催化位点有高达 81% 的同源性, 两者参与催化的氨基酸序列高度一致<sup>[10]</sup>。大鼠和人 COMT 对瑞香素 C-8 羟基选择性代谢的机制可能相同。

在 HLS9 中, 瑞香素磺酸化反应符合底物抑制动力学行为。这与报道的大多数磺酸转移酶 (ST) 底物催化反应特征一致。但在 RLS9 中, 瑞香素 7-O-磺酸化反应符合双位点动力学行为。该发现表明, RLS9 和 HLS9 中的参与瑞香素 7-O-磺酸化反应的 ST 酶

**Table 1** Kinetic parameters of glucuronidation, sulfation and methylation for daphnetin by RLS9. <sup>a</sup>Data were fit into the Michaelis-Menten model. <sup>b</sup>Data were fit into the substrate inhibition model. <sup>c</sup>Data were fit into the two-site model. n.a.: Not applicable

Metabolic reaction	$V_{\max}/\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$	$K_m/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$V_{\max}/K_m (\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1})$	$K_s/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
<sup>a</sup> 7-O-Glucuronidation	$39.6 \pm 1.1$	$128 \pm 10$	309	n.a.
<sup>a</sup> 8-O-Glucuronidation	$17.8 \pm 0.4$	$54.7 \pm 5.2$	325	n.a.
<sup>b</sup> 8-O-Sulfonation	$0.56 \pm 0.05$	$1.1 \pm 0.1$	509	$17.4 \pm 2.6$
<sup>c</sup> 7-O-Sulfonation	$1.6 \pm 0.3$	$387 \pm 30$	1 704	n.a.
<sup>a</sup> 8-O-Methylation	$2.1 \pm 0.1$	$1.8 \pm 0.3$	1 167	n.a.

催化机制可能存在差异。该发现对研究大鼠 ST 酶-配体相互作用具有重要意义。

作者<sup>[8]</sup>前期研究发现, 甲基化反应是瑞香素在 HLS9 中清除率最高路径。同时, 8-*O*-甲基瑞香素被发现具有与瑞香素相近的体外抗炎活性。在本研究中, 磺酸化取代甲基化成为瑞香素在大鼠肝 S9 中清除率最高的代谢路径。由于 8-*O*-甲基瑞香素具有抗炎活性, 而甲基化代谢通路在大鼠和人中贡献不同, 这可能导致两个种属间数据推导存在问题。但需要指出的是, COMTs、STs、葡糖醛酸转移酶 (UGTs) 除在肝脏中表达外, 也在肠道、肾脏中分布<sup>[11-13]</sup>。因此, 大鼠和人的种属差异程度需要通过体内实验进行确认。

肝脏是药物代谢的主要器官。许多药物的肝脏清除接近体内总清除率。本研究使用体外代谢清除率数据推导出了瑞香素在大鼠肝脏中的清除率 ( $54.9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。该值与瑞香素在大鼠体内实际测定值 ( $58.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 接近<sup>[5]</sup>。体外-体内肝脏清除率预测以往多用于考察经细胞色素 P450 酶等 I 相代谢酶催化的化合物<sup>[12]</sup>。本研究结果证明该方法对经 II 相代谢酶催化的化合物同样适用。

## 结论

本研究证明磺酸化、甲基化、葡糖醛酸化是瑞香素在大鼠肝脏中的主要代谢路径。虽然瑞香素在大鼠和人肝脏中具有相同的代谢轮廓, 但各代谢通路的贡献可能存在差异。该结果应在瑞香素种间放大研究中加以重视。

## References

- [1] Gao Q, Shan J, Di L, et al. Therapeutic effects of daphnetin on adjuvant-induced arthritic rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 120: 259-263.
- [2] Yang EB, Zhao YN, Zhang K, et al. Daphnetin, one of coumarin derivatives, is a protein kinase inhibitor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 260: 682-685.
- [3] Lin JH, Lu AY. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development [J]. *Pharmacol Rev*, 1997, 49: 403-409.
- [4] Qu SY, Wu YJ, Wang YH, et al. Metabolism and pharmacokinetics of daphnetin [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 1983, 18: 496-500.
- [5] Shan JJ. Studies on Oral Absorption and Metabolism of the Main Active Constituents of Zushima (祖师麻主要活性成分的口服吸收及代谢研究) [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2009.
- [6] Yao R, Fu Y, Li S, et al. Regulatory effect of daphnetin, a coumarin extracted from *Daphne odora*, on the balance of Treg and Th17 in collagen-induced arthritis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 670: 286-294.
- [7] Behera D, Damre A, Varghese A, et al. *In vitro* evaluation of hepatic and extra-hepatic metabolism of coumarins using rat subcellular fractions: correlation of *in vitro* clearance with *in vivo* data [J]. *Drug Metabol Drug Interact*, 2008, 23: 329-350.
- [8] Liang SC, Xia YL, Hou J, et al. Methylation, glucuronidation, and sulfonation of daphnetin in human hepatic preparations *in vitro*: metabolic profiling, pathway comparison, and bioactivity analysis [J]. *J Pharm Sci*, 2016, 105: 808-816.
- [9] Liang SC, Ge GB, Liu HX, et al. Identification and characterization of human UDP-glucuronosyltransferases responsible for the *in vitro* glucuronidation of daphnetin [J]. *Drug Metab Dispos*, 2010, 38: 973-980.
- [10] Männistö PT, Kaakkola S. Catechol-*O*-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors [J]. *Pharmacol Rev*, 1999, 51: 593-628.
- [11] Riches Z, Stanley EL, Bloomer JC, et al. Quantitative evaluation of the expression and activity of five major sulfotransferases (SULTs) in human tissues: the SULT "pie" [J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37: 2255-2261.
- [12] Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2000, 40: 581-616.
- [13] Obach RS, Baxter JG, Liston TE, et al. The prediction of human pharmacokinetic parameters from preclinical and *in vitro* metabolism data [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, 283: 46-58.