

## 白花前胡丙素、丁素、E 素对羧酸酯酶的抑制作用

杜 佐, 陈大为, 付志伟, 房中则\*, 杨 昆\*

(天津医科大学公共卫生学院, 天津 300070)

**摘要:** 白花前胡丙素、丁素、E 素是从中药白花前胡中提取的重要成分, 具有多种药理学活性。本研究通过体外人肝微粒体孵育体系, 检测白花前胡丙素、丁素及 E 素对人体重要的 I 相代谢酶—羧酸酯酶 1 和羧酸酯酶 2 活性的抑制作用, 同时进行抑制动力学评价和体外-体内外推。结果显示,  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  白花前胡丁素对羧酸酯酶 1 有很强的抑制作用, 抑制率达到 81.7%。白花前胡丁素对羧酸酯酶 1 抑制作用类型为非竞争性抑制, 抑制动力学参数 ( $K_i$ ) 为  $122.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 提示白花前胡丁素可能影响在体内对羧酸酯酶 1 产生影响, 从而引发内源性代谢障碍或药物-药物相互作用。

**关键词:** 白花前胡丙素; 白花前胡丁素; 白花前胡 E 素; 羧酸酯酶 1; 羧酸酯酶 2; 药物-药物相互作用  
中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2017) 01-0066-05

## The inhibition of carboxylesterases by praeruptorin C, D and E

DU Zuo, CHEN Da-wei, FU Zhi-wei, FANG Zhong-ze\*, YANG Kun\*

(School of Public Health, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract:** Praeruptorin C (PC), D (PD) and E (PE) are important compounds extracted from *Peucedanum praeruptorum* DUNN and have been reported to exert multiple pharmacological activities. The present study is purposed to determine the inhibition of PC, PD and PE on the activity of important phase I metabolic enzymes – carboxylesterases (CES). *In vitro* human liver microsomes (HLM) incubation system was used to determine the inhibition potential of PC, PD and PE on the activity of CES1 and CES2. Inhibition behaviour was determined, and *in vitro-in vivo* extrapolation was performed by using the combination of *in vitro* inhibition kinetic parameter ( $K_i$ ) and *in vivo* exposure level of PD. PD exhibited the strongest inhibition on the activity of CES1, with 81.7% activity inhibited by  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  of PD. PD noncompetitively inhibited the activity of CES1 with the  $K_i$  to be  $122.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , indicating inhibition potential of PD towards CES1 *in vivo*. Therefore, closely monitoring the endogenous metabolic disorders caused by PD and interaction between PD and drugs mainly undergoing CES1-catalyzed metabolism is very necessary.

**Key words:** praeruptorin C; praeruptorin D; praeruptorin E; carboxylesterase 1; carboxylesterase 2; herb-drug interaction

中药前胡又称鸡脚前胡, 为伞形科植物白花前胡 (*Peucedanum praeruptorum* DUNN) 的干燥根, 具

有宣散风热、降气化痰等功效, 临床多用于外感风热、肺热痰郁、胸膈满闷等症<sup>[1]</sup>。其主要活性成分包括白花前胡甲素 (praeruptorin A, PA)、白花前胡乙素 (praeruptorin B, PB)、白花前胡丙素 (praeruptorin C, PC)、白花前胡丁素 (praeruptorin D, PD)、白花前胡 E 素 (praeruptorin E, PE) 和 8-甲氧基补骨脂素 (8-methoxypsoralen, 8-MOP) 等化合物<sup>[2]</sup>。

白花前胡丙素是一种角型二氢吡喃香豆素类化

收稿日期: 2016-10-17; 修回日期: 2016-12-12.

基金项目: 天津市千人计划青年项目; 天津市应用基础与前沿技术研究计划一般项目 (15JCYBJC54700); 中国博士后科学基金 (2016M590210).

\*通讯作者 Tel: 18322513076, Fax: 86-22-83336637,

E-mail: fangzhongze@tmu.edu.cn; yangkun@tjmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1024

合物,与白花前胡甲素组成一对外消旋体<sup>[3]</sup>,通过其钙离子拮抗作用机制,表现出显著的降低血压和舒张冠状动脉血管的药理作用<sup>[4]</sup>。在肺损伤小鼠实验模型中,白花前胡丁素及 E 素能显著抑制活性中性粒细胞的浸润,并减少支气管肺泡灌洗液中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素-6 (IL-6) 的水平,从而表现出其应用在肺损伤治疗中的可能性<sup>[5]</sup>。

羧酸酯酶 (carboxylesterase, CES) 是一种重要的 I 相代谢酶,与多种药物、前体药物、环境毒物及内源性物质的解毒和代谢有关,能有效催化羧酸酯类、氨甲酸酯类、酰胺类和硫酸酯类等物质的水解<sup>[6]</sup>。羧酸酯酶主要包括羧酸酯酶 1 (carboxylesterase 1, CES1) 和羧酸酯酶 2 (carboxylesterase 2, CES2), 在组织分布及底物特异性方面存在着较大的差异。CES1 主要在肝脏、单核巨噬细胞和肺上皮细胞表达,在肠道表达极低,偏向于水解含有较小乙醇基和较大乙酰基的底物,如胆固醇、脂肪酸、可卡因和氯吡格雷等; CES2 主要在肠道表达,但在肝脏也有表达,偏向于水解含有较大乙醇基和较小乙酰基的底物,如阿司匹林、普鲁卡因和伊立替康等<sup>[7]</sup>。因此,对羧酸酯酶的抑制作用将影响多种内源性物质以及药物在体内的代谢过程,从而引起内源性代谢障碍以及药物-药物相互作用。

羧酸酯酶参与白花前胡素在体内的代谢过程,白花前胡素经 I 相代谢由羧酸酯酶水解生成代谢产物<sup>[8]</sup>。本课题组前期的研究表明,白花前胡素对人体重要的 II 相代谢酶尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (UDP-glucuronyltransferase, UGT) 有一定的抑制作用<sup>[9]</sup>,但对 I 相代谢酶的抑制作用尚不清楚。因此,本研究的目的是考察白花前胡丙素、丁素及 E 素对羧酸酯酶的抑制作用,通过人肝微粒体 (human liver microsomes, HLM) 孵育特异性底物 2-(2-苯甲酰基-3-甲氧基苯基) 苯并噻唑 [2-(2-benzoyl-3-methoxyphenyl) benzothiazole, BMBT] 以及荧光素二乙酸酯 (fluorescein diacetate, FD) 水解反应,并与羧酸酯酶经典阳性抑制剂新补骨脂异黄酮 (neobavaisoflavone, NB) 比较<sup>[10,11]</sup>,体外检测白花前胡丙素、丁素及 E 素对羧酸酯酶 1 和 2 的代谢活性的抑制潜能,以评估白花前胡丙素、丁素及 E 素通过抑制羧酸酯酶而引发内源性代谢疾病以及药物-药物相互作用的可能性。

## 材料与方法

**实验材料** 二甲基亚砜 DMSO、Tris-HCl、乙腈

(美国 Sigma-Aldrich 公司); 底物 BMBT、FD (中国科学院大连化学物理研究所); 人肝微粒体 HLM (美国 BD 公司); 白花前胡丙素、丁素、E 素,新补骨脂异黄酮 (中国成都普菲德公司); 高效液相色谱 HPLC (美国 Agilent 公司); 恒温混匀仪 (中国杭州奥盛公司); ACCULAB 型电子天平 (中国北京赛多利斯公司)。

**高效液相色谱仪检测条件** 高效液相系统: 含有一个 SCL-10A 系统控制器、两个 LC-10AT 泵、一个 SIL-10A 自动进样器、一个 SPD-10AVP UV 检测器。色谱分离条件: 色谱柱  $C_{18}$  柱 (4.6 mm  $\times$  250 mm)。流动相为含有 0.5% 甲酸的水溶液 (A) 和乙腈 (B)。洗脱方式: 0~12 min, 15% A, 85% B (羧酸酯酶 1); 0~10 min, 30% A, 70% B (羧酸酯酶 2)。流速: 1 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>, UV 检测器波长: 300 nm (羧酸酯酶 1); 280 nm (羧酸酯酶 2)。水是超纯水。曲线计算: 由产物峰面积生成,产物浓度 0.1~100 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 内曲线呈线性并且  $R^2 > 0.99$ 。每个浓度的准确度和精度达 95% 以上。

**体外孵育体系的组成和孵育后处理** 评估白花前胡丙素、丁素及 E 素对羧酸酯酶抑制潜力的孵育系统 (总体积 200  $\mu$ L) 包含人肝微粒体, 50 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 的 Tris-HCl (pH 7.4), 底物 BMBT (羧酸酯酶 1), 底物 FD (羧酸酯酶 2) 以及不同浓度的白花前胡丙素、丁素、E 素及新补骨脂异黄酮。为确保反应速率在线性范围内,所使用的孵育时间和人肝微粒体浓度是事先确定的,见表 1。37  $^{\circ}$ C 预温育 5 min 后在混合物中加入人肝微粒体 10  $\mu$ L 启动反应。反应特定时间后,通过加入乙腈 200  $\mu$ L 来终止反应。然后将混合物在 12 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 条件下离心 10 min, 取上清液 200  $\mu$ L 注射入自动进样瓶,进行 UPLC 分析。

**Table 1** Different concentration of HLM, substrate and time in the incubation system. CES: Carboxylesterase; HLM: Human liver microsomes

Enzyme	HLM/ $\mu$ g $\cdot$ mL <sup>-1</sup>	Substrate/ $\mu$ mol $\cdot$ L <sup>-1</sup>	Time/min
CES1	0.2	10	15
CES2	0.1	15	15

**初步筛选白花前胡丙素、丁素及 E 素对羧酸酯酶的抑制作用** 白花前胡丙素、丁素、E 素及新补骨脂异黄酮分别用 DMSO 稀释至浓度为 100  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>, 各取 1  $\mu$ L 在设定好的孵育条件下分别与羧酸酯酶 1 以及羧酸酯酶 2 进行反应,并观察其抑制情况。设不加抑制剂作为空白对照,且每个样品各做两组平行实验。实验数据取测量值的均值。

**半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 实验** 通过初筛实验, 筛选出抑制率大于 80% 的实验组。用 DMSO 将抑制剂稀释至不同浓度 (0.5、1、5、10、20、40、60、80 和 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 进一步求出 IC<sub>50</sub>。

**抑制动力学参数检测和类型的判断** 通过 IC<sub>50</sub> 实验, 确定抑制剂浓度梯度进行抑制动力学行为 (包括动力学类型和参数) 的测定。采用不同浓度的白花前胡素 (浓度跨越的 IC<sub>50</sub>) 和羧酸酯酶底物。利用 Lineweaver-Burk 作图法求出白花前胡素对筛选出的羧酸酯酶的抑制类型, 抑制动力学参数 ( $K_i$ ) 是通过抑制剂浓度与 Lineweaver-Burk 图的相关斜率计算而得。

**白花前胡素对羧酸酯酶抑制率的计算** 通过 HPLC-UV 检测到的底物的代谢产物峰面积确定产物的含量, 再按抑制率 =  $(1 - E_{\text{抑制剂}} / E_{\text{对照}}) \times 100\%$  计算白花前胡素对羧酸酯酶抑制率,  $E_{\text{抑制剂}}$  是加入抑制剂后的产物含量,  $E_{\text{对照}}$  是不加抑制剂的产物含量。

**抑制动力学评价和体外-体内外推** 在体外-体内外推使用方程:  $AUC_i / AUC = 1 + c_{\text{抑制剂 in vivo}} / K_i$ , 式中  $AUC_i$  是白花前胡素存在的条件下人体内药物的血药浓度曲线下面积;  $AUC$  是白花前胡素不存在的条件下人体内药物的血药浓度曲线下面积;  $c_{\text{抑制剂 in vivo}}$  是人体内抑制剂的血药浓度。通过这个公式可以计算出  $AUC$  的变化, 判断产生药物相互作用的可能性:  $c_{\text{抑制剂 in vivo}} / K_i < 0.1$ , 无可能性;  $0.1 < c_{\text{抑制剂 in vivo}} / K_i < 1$ , 有可能性;  $c_{\text{抑制剂 in vivo}} / K_i > 1$ , 高可能性。

**统计学分析** 实验数据结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较用  $t$  检验。

## 结果

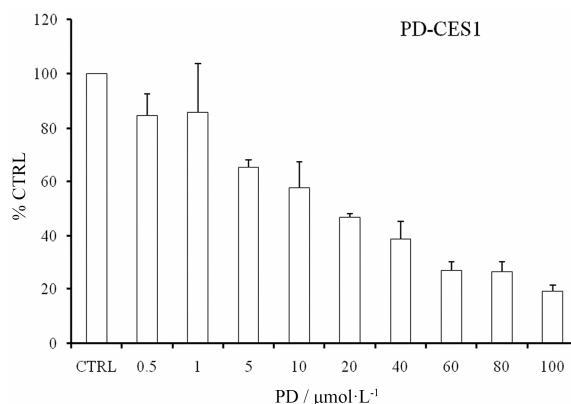
### 1 白花前胡丙素、丁素及 E 素对羧酸酯酶活性的影响

如图 1 所示, 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的白花前胡丙素、丁素及 E 素对羧酸酯酶 2 活性的抑制分别为 65.9%、

59.0% 和 35.1%, 均小于 80%; 白花前胡丙素、丁素及 E 素对羧酸酯酶 1 活性的抑制分别为 38.6%、81.7% 和 75.0%, 其中白花前胡丁素对羧酸酯酶 1 活性有较强的抑制作用 ( $P < 0.05$ )。

### 2 白花前胡丁素对羧酸酯酶 1 的 IC<sub>50</sub>

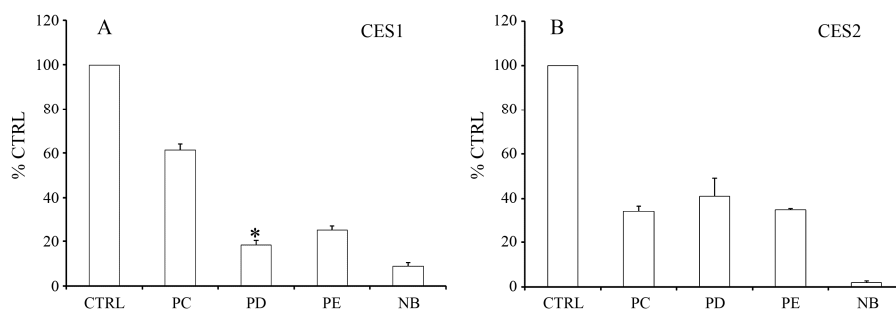
如图 2 所示, 0.5、1、5、10、20、40、60、80 和 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的白花前胡丁素对羧酸酯酶 1 活性的抑制分别为 15.2%、14.1%、34.7%、42.2%、53.2%、61.2%、72.8%、73.1% 和 80.9%。IC<sub>50</sub> 约为 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。



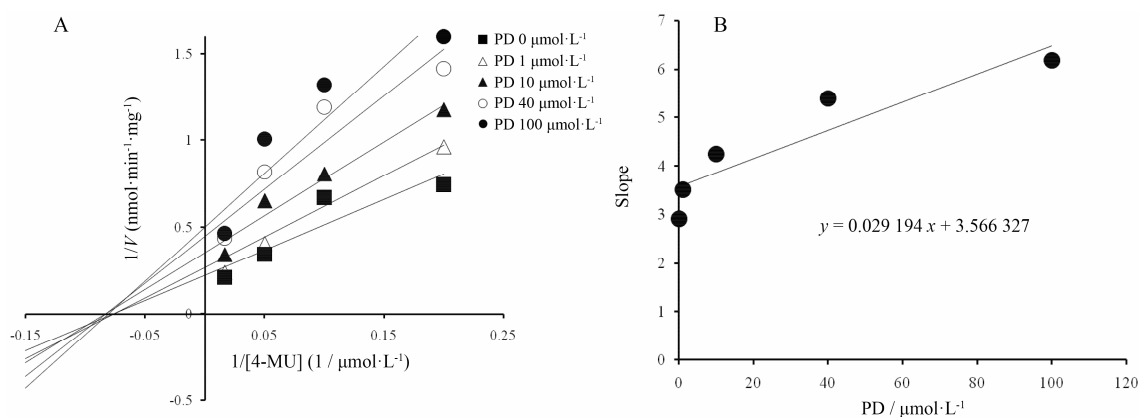
**Figure 2** IC<sub>50</sub> of PD on the activity of CES1. Data were shown by using mean value plus SD

### 3 白花前胡丁素对羧酸酯酶 1 的抑制动力学类型和参数

利用 Lineweaver-Burk 作图法求出白花前胡丁素对羧酸酯酶 1 的抑制类型, 如图 3 所示, 本实验 Lineweaver-Burk 作图的拟合直线相交点位于  $x$  轴 (图 3A), 说明白花前胡丁素对羧酸酯酶 1 的抑制动力学类型属于非竞争性抑制。采用各条线的斜率对白花前胡丁素的浓度二次作图来计算  $K_i$  (图 3B), 白花前胡丁素对羧酸酯酶 1 催化 BMBT 的抑制的拟合方程为  $y = 0.029194x + 3.566327$ 。使用方程, 计算出白花前胡丁素对羧酸酯酶 1 的  $K_i$  为 122.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。



**Figure 1** Inhibition screening of praeurptorin C (PC), praeurptorin D (PD), praeurptorin E (PE) and neobavaisoflavone (NB) on the activity of CES1 and CES2. 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  of PC, PD, PE and NB was used, and data were shown by using mean value plus SD. \* $P < 0.05$  vs control group



**Figure 3** Inhibition kinetics of PD on CES1. (A) Lineweaver-Burk plot of the inhibition of PD on the activity of CES1. Each data point represents the mean value of duplicate experiments. (B) Determination of inhibition kinetic parameter ( $K_i$ ) of PD on the activity of CES1. The vertical axis represents the slopes of the lines from Lineweaver-Burk plot, and the horizontal axis represents the concentrations of PD

#### 4 体外抑制动力学参数推测体内产生药物-药物相互作用的可能性

口服白花前胡丁素 20 mg 后, 大鼠体内最大血药浓度可达到  $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $35 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )<sup>[12]</sup>。假设白花前胡丁素达到相同的血浆浓度, 将白花前胡丁素的体内血药浓度 ( $c_{\text{抑制剂}}$ ) 代入公式, 计算白花前胡丁素的  $c_{\text{抑制剂}}/K_i$  值为 0.29, 表示由于抑制羧酸酯酶 1 所造成的药物 AUC 比未服用白花前胡丁素时增大了 0.29 倍。可以判定在正常剂量下, 有可能导致药物-药物相互作用的产生。

#### 讨论

白花前胡丙素、丁素及 E 素是从中药白花前胡中提取的有效成分, 具有广泛的生化以及药理活性<sup>[13]</sup>。药物在体内的代谢过程要经历 I 相代谢反应和 II 相代谢反应, 白花前胡丙素、丁素及 E 素的代谢过程与 I 相代谢密切相关。白花前胡丙素以及丁素通过对核受体的控制, 上调 I 相代谢酶的表达<sup>[14, 15]</sup>; 白花前胡 E 素在体外人肝微粒体孵育体系中, 产生多种 I 相代谢产物<sup>[16]</sup>。因此, 提示白花前胡丙素、丁素及 E 素可能与重要的 I 相代谢酶羧酸酯酶产生相互作用。本研究用人肝微粒体分别催化羧酸酯酶 1 及羧酸酯酶 2 的特异性底物 BMBT 及 FD 反应, 考察白花前胡丙素、丁素及 E 素对羧酸酯酶活性的抑制作用, 以提示白花前胡丙素、丁素及 E 素产生内源性代谢疾病以及药物-药物相互作用的可能性。白花前胡丁素对羧酸酯酶 1 表现出最显著的影响, 酶活性抑制达 80% 以上。羧酸酯酶 1 是一个重要的 I 相代谢酶, 主要分布在肝脏中<sup>[17]</sup>, 除了在肝脏外源物质解毒方面发挥

重要作用外, 还能参与人体内胆固醇酯和游离脂肪酸的运输和代谢过程<sup>[18]</sup>。因此, 白花前胡丁素可能扰乱这些内源性物质的代谢, 从而引起内源性代谢疾病如高胆固醇血症等。

药物可以通过对代谢酶的诱导或抑制作用影响其他药物的代谢, 从而改变其他药物在该作用靶点部位的有效浓度, 最终产生不良的药物反应。羧酸酯酶 1 是一种很重要的药物代谢酶, 能有效水解含有酯键、酰胺键、硫酯键的多种外源性药物或前体药物, 包括替莫普利、奥司他韦、哌替啶等临床常用药物<sup>[19]</sup>。考虑到白花前胡丁素对羧酸酯酶 1 活性的抑制可能导致不良反应, 本实验研究白花前胡丁素对羧酸酯酶 1 的抑制动力学进一步考察体外抑制能力是否可以被转换成体内抑制能力。结果显示, 白花前胡丁素强烈地抑制羧酸酯酶 1, 且属于非竞争性抑制。非竞争性抑制的特点是抑制剂与酶活性部位以外外部结合而改变活性部位的结构, 使酶活性下降, 导致酶催化这种底物的反应速率下降。进一步通过抑制动力学评价和体外-体内外推揭示了白花前胡丁素可能通过抑制羧酸酯酶在体内产生药物-药物相互作用。

综上所述, 在体外 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育体系中, 用 HPLC-UV 检测方法和人肝微粒体催化特异性底物反应, 来评估白花前胡丙素、丁素及 E 素对羧酸酯酶潜在的抑制作用。其中, 白花前胡丁素对羧酸酯酶 1 活性的抑制作用最为显著, 而且体外抑制潜力也可很好转化成体内抑制能力, 预测白花前胡丁素很可能通过抑制羧酸酯酶 1 在体内引起内源性代谢障碍以及药物-药物相互作用。因此, 对羧酸酯酶 1 有抑制或诱导作用的药物与白花前胡丁素联合应用时, 应注意药物-药物相互作用的影响, 对指导临床用药及新药

开发具有指导意义。

## References

- [1] Xu Z, Wang X, Dai Y, et al. ( $\pm$ )-Praeruptorin A enantiomers exert distinct relaxant effects on isolated rat aorta rings dependent on endothelium and nitric oxide synthesis [J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 186: 239–246.
- [2] Song Y, Jing W, Yan R, et al. Research progress of the studies on the roots of *Peucedanum praeruptorum* Dunn (Peucedani Radix) [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2015, 28: 71–81.
- [3] Wu JYC, Fong WF, Zhang JX, et al. Reversal of multidrug resistance in cancer cells by pyranocoumarins isolated from Radix Peucedani [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 473: 9–17.
- [4] Wu X, Shi CZ, Wu XD. Effects of praeruptorin-C on cytosolic free calcium in cultured rat heart cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 1992, 28: 728–731.
- [5] Yu PJ, Li JR, Zhu ZG, et al. Praeruptorin D and E attenuate lipopolysaccharide/hydrochloric acid induced acute lung injury in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 710: 39–48.
- [6] Hatfield MJ, Umans RA, Hyatt JL, et al. Carboxylesterases: general detoxifying enzymes [J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 259: 327–331.
- [7] Xu Y, Zhang C, He W, et al. Regulations of xenobiotics and endobiotics on carboxylesterases: a comprehensive review [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2016, 41: 321–330.
- [8] Jing WH, Song YL, Yan R, et al. Transport and metabolism of ( $\pm$ )-praeruptorin A in Caco-2 cell monolayers [J]. *Xenobiotica*, 2011, 41: 71–81.
- [9] Liu X, Chen DW, Wu X, et al. The inhibition of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) isoforms by praeruptorin A and B [J]. *Phytother Res*, 2016, 30: 1872–1878.
- [10] Sun DX, Ge GB, Dong PP, et al. Inhibition behavior of Fructus Psoraleae's ingredients towards human carboxylesterase 1 (hCES1) [J]. *Xenobiotica*, 2016, 46: 503–510.
- [11] Li YG, Hou J, Li SY, et al. Fructus Psoraleae contains natural compounds with potent inhibitory effects towards human carboxylesterase 2 [J]. *Fitoterapia*, 2015, 101: 99–106.
- [12] Liang T, Yue W, Du X, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution study of praeruptorin D from radix peucedani in rats by high-performance liquid chromatography (HPLC) [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13: 9129–9141.
- [13] Tang W, Eisenbrand G. *Peucedanum praeruptorum* Dunn [M]//Chinese Drugs of Plant Origin. Berlin Heidelberg: Springer, 1992: 753–757.
- [14] Huang L, Bi HC, Liu YH, et al. CAR-mediated up-regulation of CYP3A4 expression in LS174T cells by Chinese herbal compounds [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2011, 26: 331–340.
- [15] Huang L, Huang M, Li YH, et al. Up-regulation of CYP3A expression through pregnant X receptor by praeruptorin D isolated from *Peucedanum praeruptorum* Dunn [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148: 596–602.
- [16] Song YL, Yan R, Jing WH, et al. Characterization of metabolism of (+)-praeruptorin B and (+)-praeruptorin E in human and rat liver microsomes by liquid chromatography coupled with ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25: 719–730.
- [17] Ross MK, Crow JA. Human carboxylesterases and their role in xenobiotic and endobiotic metabolism [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2007, 21: 187–196.
- [18] Nagashima S, Yagyu H, Takahashi N, et al. Depot-specific expression of lipolytic genes in human adipose tissues [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2011, 18: 190–199.
- [19] Imai T. Carboxylesterase: from drug metabolism to drug discovery [J]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 2009, 134: 281–284.