



生态毒理学报
Asian Journal of Ecotoxicology
ISSN 1673-5897, CN 11-5470/X

《生态毒理学报》网络首发论文

题目：对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸丁酯对人和大鼠肝微粒体 CYP450 酶活性的抑制作用

作者：史丰收，赵潺，王聪，李雅倩，余梦圆，郑君，李萍，李贺，商静静，顾凌郡，陈云霞，苏宁

收稿日期：2021-08-12

网络首发日期：2022-08-23

引用格式：史丰收，赵潺，王聪，李雅倩，余梦圆，郑君，李萍，李贺，商静静，顾凌郡，陈云霞，苏宁. 对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸丁酯对人和大鼠肝微粒体 CYP450 酶活性的抑制作用[J/OL]. 生态毒理学报.
<https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5470.X.20220822.1616.008.html>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20210812001

史丰收, 赵潺, 王聪, 等. 对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸丁酯对人和大鼠肝微粒体 CYP450 酶活性的抑制作用[J]. 生态毒理学报, 2022, 17:

Shi F S, Zhao C, Wang C, et al. Inhibitory effects of propylparaben and butylparaben on CYP450 enzyme activity in human and rat liver microsomes [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17: (in Chinese)

对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸丁酯对人和大鼠肝微粒体 CYP450 酶活性的抑制作用

史丰收³, 赵潺³, 王聪², 李雅倩², 余梦圆¹, 郑君², 李萍²,
李贺¹, 商静静², 顾凌郡², 陈云霞^{1,*}, 苏宁^{1,#}

1. 中国检科院化妆品技术中心, 北京 100176

2. 中检科(北京)化妆品技术有限公司, 北京 100176

3. 中国检科院化学品安全研究所, 北京 100176

收稿日期: 2021-08-12

录用日期: 2021-11-19

摘要: 本文目的是研究对羟基苯甲酸丙酯(羟苯丙酯; propylparaben, PP)和对羟基苯甲酸丁酯(羟苯丁酯; butylparaben, BP)对大鼠肝微粒体(rat liver microsomes, RLM)和人肝微粒体(human liver microsomes, HLM)细胞色素 P450 酶(cytochrome P450 enzyme, CYP)活性的抑制作用, 并评价它们的相互作用潜能。在体外将系列浓度的羟苯丙酯和羟苯丁酯与大鼠和人肝微粒体孵育 60 min, 以非那西丁、安非他酮、甲苯磺丁脲、氯唑沙宗、香豆素、右美沙芬和咪达唑仑为 CYP 探针底物, 应用质谱定量检测各探针底物的代谢产物生成量, 计算得到 IC₅₀ 和 K_i 值, 评价 2 种化学受试物对大鼠和人肝微粒体 CYP450 酶的抑制活性和抑制类型, 并对抑制强度进行分级。大鼠和人肝微粒体中羟苯丙酯是 CYP1A2 酶的中等强度抑制剂, 羟苯丁酯在大鼠肝微粒体中是 CYP1A2 酶的弱抑制剂, 在人肝微粒体中是 CYP1A2 酶的中等强度抑制剂, 观察到对其他 CYP450 酶无抑制作用, 这与用软件预测的羟苯丙酯和羟苯丁酯对 CYP450 酶的抑制种类结果一致, 分子对接的结果也印证了羟苯丙酯和羟苯丁酯对 CYP1A2 酶活性的抑制作用, 按照构效关系和同源 CYP 的物种敏感度预测模型, 本文关于 CYP 的研究结果可以类推到其他哺乳动物和人类。

关键词: 羟苯丙酯; 羟苯丁酯; 肝微粒体; CYP450 酶; 药物相互作用

Inhibitory Effects of Propylparaben and Butylparaben on CYP450 Enzyme Activity in Human and Rat Liver

基金项目: 公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(2020JK035)

第一作者: 史丰收(1998-), 女, 研究实习生, 研究方向为化学品安全, E-mail: 1964424654@qq.com

* **通讯作者**(Corresponding author), E-mail: chenyunxia2009@126.com

共同通讯作者(Co-corresponding author), E-mail: sun@caiq.org.cn

Microsomes

Shi Fengshou³, Zhao Chan³, Wang Cong², Li Yaqian², Yu Mengyuan¹,
Zheng Jun², Li Ping², Li He¹, Shang Jingjing², Gu Lingjun²,
Chen Yunxia^{1,*}, Su Ning^{1,#}

1. Chinese Academy of Inspection and Quarantine Cosmetics Tech Center, Beijing 100176, China

2. C C Tech (Beijing) Co., Ltd., Beijing 100176, China

3. Institute of Chemicals Safety, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China

Received 12 August 2021

accepted 19 November 2021

Abstract: To investigate the inhibitory effects of propylparaben (PP) and butylparaben (BP) on cytochrome (CYP) P450 enzyme activity in rat liver microsomes (RLMs) and human liver microsomes (HLMs) and evaluate their interactional potentials, serial concentrations of PP and BP were incubated with RLMs or HLMs for 60 min *in vitro*. Phenacetin, bupropion, tolbutamide, chlorzoxazone, coumarin, dextromethorphan, and midazolam were used as CYP activity indicators. Metabolites were quantified by mass spectrometry; half maximal inhibitory concentration and inhibition constant were calculated to evaluate the effects and molds of PP and BP inhibitory activity on the CYP450 enzyme, which was graded by strength. PP was a moderate inhibitor of the CYP1A2 enzyme in RLMs and HLMs; BP was a weak inhibitor of the CYP1A2 enzyme in RLMs and a moderate inhibitor of the CYP1A2 enzyme in HLMs. Neither PP nor BP had inhibitory effects on other CYP450 enzymes, which is consistent with the software prediction results. According to the structure-activity relationship and the species sensitivity prediction model of homologous CYP enzymes, the results of these experiments may be generalizable to other mammals and humans.

Key words: propylparaben; butylparaben; liver microsomes; CYP450 enzyme; drug-drug interaction

对羟基苯甲酸酯(parabens, PBs), 又名尼泊金酯, 是对羟基苯甲酸酯类化合物的总称。根据碳链碳原子数和结构的不同, 可将其分为对羟基苯甲酸甲酯、乙酯、丙酯、丁酯和异丁酯等, 是目前世界上用途最广、用量最大、应用频率最高的防腐剂之一。因其杀菌力强、成本低廉、对酸碱稳定等优点, PBs 被广泛应用于医药、食品和化妆品等行业中^[1-3]。相关研究表明, 对羟基苯甲酸酯类物质的酯链越长, 通过皮肤的能力越强, 吸收越多^[4]。虽然研究表明, 对羟基苯甲酸酯类物质可经胃肠道完全吸收、代谢并排泄, 无论是对羟基苯甲酸酯类物质或其代谢物均不在体内蓄积^[5], 但 Darbre 等^[6]研究发现在人乳腺癌组织中可以检测到对羟基苯甲酸酯类物质, 人的血液、尿液、乳汁和组织均被证实可检测出该类物质^[7-9], 并且 PBs 可以通过胎盘屏障从而可能造成胚胎宫内暴露^[10]。这说明在化妆品、食品以及药物中添加的对羟基苯甲酸酯类物质至少有一部分可以被人体组织吸收并保留, 且不能被组织中的酯酶水解成普通的对羟基苯甲酸代谢物。随着对羟基苯甲酸酯类物质在各个领域使用的日益广泛, 其中羟苯丙酯和羟苯丁酯在化妆品中的使用频率较高, 化妆品作为人体经常使用的化学

物质导致人体对羟苯丙酯和羟苯丁酯的暴露机会和吸收水平也很频繁,再考虑到其可能在体内蓄积,因而对羟苯丙酯和羟苯丁酯安全性的评价受到学者们的普遍关注。研究证实羟苯丙酯和羟苯丁酯具有类雌激素作用,因而它们被认定为是一种内分泌干扰素(endocrine disrupting chemicals, EDCs)^[11],而且认为其不利于健康的原因,也与其雌激素样活性有关。研究还表明,羟苯丙酯和羟苯丁酯可使未成熟雌鼠的子宫质量增加^[12-13],并对雄鼠具有生殖毒性,引起雄性动物附睾质量降低^[14-15],同时,羟苯丙酯和羟苯丁酯能抑制精子的形成^[16]。

肝脏是药物生物转化的重要器官,含有参与药物代谢的酶系,其中细胞色素 P450 (CYP) 是催化多种内、外源性物质包括菌体类化合物、药物、环境污染物和化学致癌物进行I相氧化代谢的重要酶系。而由 CYP 酶介导的代谢性相互作用在临床上发生率最高。通过酶的抑制和诱导作用,使底物药物的药代动力学行为发生改变,从而引起药效下降或毒副作用增高,影响临床用药的有效性和安全性。对大鼠、兔、狗和猫等的研究表明,对羟基苯甲酸酯类物质可经胃肠道迅速的吸收、代谢并排泄,在肝脏代谢为葡萄糖醛酸、硫酸等结合物,其安全每日容许摄入量(allowable daily intake, ADI)为 0~5 mg·kg⁻¹^[17]。由于对羟基苯甲酸酯类物质被广泛应用于医药、食品和化妆品等行业中,人体会经常吸收对羟基苯甲酸酯类物质,而代谢酶可以被诱导或抑制而导致代谢性药物相互作用,所以本研究的目的是选择使用频率较高的对羟基苯甲酸酯类物质对羟基苯甲酸丙酯(羟苯丙酯; propylparaben, PP)和对羟基苯甲酸丁酯(羟苯丁酯; butylparaben, BP)作为研究对象,考察它们是否对肝脏细胞色素 P450 存在抑制或诱导作用,从而来说明对羟基苯甲酸酯类物质是否存在药物相互作用的可能。

1. 材料与方法(Materials and methods)

1.1 仪器与试剂

羟苯丙酯和羟苯丁酯(Sigma 公司), CYP 探针底物非那西丁、安非他酮、甲苯磺丁脲、咪达唑仑、香豆素、右美沙芬和氯唑沙宗(BD Gentest 公司), 代谢产物对乙酰氨基酚、羟基安非他酮、4'-羟基甲苯磺丁脲、1-羟基咪达唑仑、7-羟基香豆素、右啡烷和 6-羟基氯唑沙宗(BD Gentest 公司), 混合人肝微粒体(BD Gentest 公司), 混合雄性 SD 大鼠肝微粒体(20 只)为实验室自制, NADPH(Roche 公司)。

DIONEX Ultimate 3000 超高效液相色谱仪(Thermo Fisher 公司), Thermo Q EXACTIVE 质谱仪(Thermo Fisher 公司), C18 (1.7 μ m, 2.1 mm \times 100 mm)色谱柱(Thermo Synchronis 公司), Milli-Q AdvantageA10 型超纯水仪(Millipore 公司, 美国), KQ-250 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 中国), X-30R 离心机(Sigma 公司, 德国)。甲酸(色谱纯)、甲酸铵(色谱纯)、甲醇(色谱纯)和乙腈(色谱纯)均购自美国 Thermo Fisher 公司。

1.2 羟苯丙酯和羟苯丁酯毒性终点预测

利用预测软件ACD/Tox suite 2.95和ACD/ADME suite 5.0筛查羟苯丙酯和羟苯丁酯的毒性终点,重点关注主要的毒性终点,包括Eye irritation、Skin irritation、P450 Inhibitors、

P450 Substrate和Oral Acute Toxicity Hazard Categories (OECD ranges)等,可以快速筛选出羟苯丙酯和羟苯丁酯的主要毒性终点。

1.3 肝微粒体孵育抑制试验

反应体系为 200 μL 磷酸钾缓冲液(pH 7.4), 内含 2 mmol L^{-1} NADPH 和 3.3 mmol L^{-1} 氯化镁, HLM 或 RLM(蛋白含量 0.2 mg mL^{-1})、CYP 酶探针底物、不同浓度的受试化学物(0、0.15、0.5、1.5、5、15、50、100、200 和 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。在各探针底物 K_m 附近选择孵育浓度^[18]: 非那西丁(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、安非他酮(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、甲苯磺丁脲(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、氯唑沙宗(200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、香豆素(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、右美沙芬(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和咪达唑仑(5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。通过定量检测对乙酰氨基酚、羟基安非他酮、4-羟基甲苯磺丁脲、6-羟基氯唑沙宗、7-羟基香豆素、右啡烷和 1'-羟基咪达唑仑生成量, 评价不同浓度的受试化学物对 CYP 同工酶活性的抑制作用。孵育试验前将肝微粒体、探针底物和受试化学物混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴预孵 5 min, 加入同样预孵 5 min 的 NADPH 启动反应, 实验平行 3 组, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min 后, 移至冰上并加入 500 μL 含内标普萘洛尔(100 ng mL^{-1})和甲苯磺丁脲(100 ng mL^{-1})的甲醇-乙腈(V:V=1:1)终止反应, 涡旋, 10 000 r min^{-1} , 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 取上清进样分析, 测定探针产物的生成量, 计算相对酶活性和对应的 IC_{50} 。在相同反应体系条件下, 与不同浓度的底物(10、50、100、200 和 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)反应, 测定探针代谢产物的生成量, 计算不同底物浓度生成代谢产物的速率, 对酶动力学数据进行非线性曲线拟合确定抑制类型, 计算 K_i 值。

1.4 探针代谢产物的质谱定量分析

色谱条件: A 为水(含 0.1% 甲酸和 2.5 mmol L^{-1} 甲酸铵), D 为乙腈; 梯度洗脱, 梯度洗脱程序为 0~0.5 min, 30% D; 0.5~1.5 min, 30%~95% D; 1.5~2.5 min, 95%~95% D; 2.5~3.5 min, 95%~70% D; 3.5~3.6 min, 70%~30% D; 3.6~6.0 min, 30% D。分析时间 0~6 min, 每次进样 5 μL , 流速为 0.3 mL min^{-1} 。色谱柱为 Thermo Hypersil Gold C18 1.7 μm , 2.1 $\text{mm}\times 100\text{ mm}$, 色谱柱温度为 30 $^{\circ}\text{C}$, 自动进样器的温度保持在 4 $^{\circ}\text{C}$ 。在电喷雾离子源(ESI)正负离子 PRM 模式下采集数据, 喷雾电压为 3 500V(+), 2 500V(-); 蒸发温度为 350 $^{\circ}\text{C}$; 鞘气流速为 40 Arb; 辅助气流速为 10 Arb; 毛细管温度为 320 $^{\circ}\text{C}$; S-lens RF 为 50; NCE 为 40。对乙酰氨基酚(152.07061/110.05973)、羟基安非他酮(256.10988/238.09824)、4-羟基甲苯磺丁脲(287.10600/89.03831)、7-羟基香豆素(161.02442/133.02922)、右啡烷(258.18524/133.06422)和 1'-羟基咪达唑仑(342.08039/324.06836)、6-羟基氯唑沙宗(183.98069/120.00903); 正内标普萘洛尔(260.16451/116.10709); 负内标甲苯磺丁脲(269.09654/170.02777)。不同代谢产物色谱图如图 1 所示。

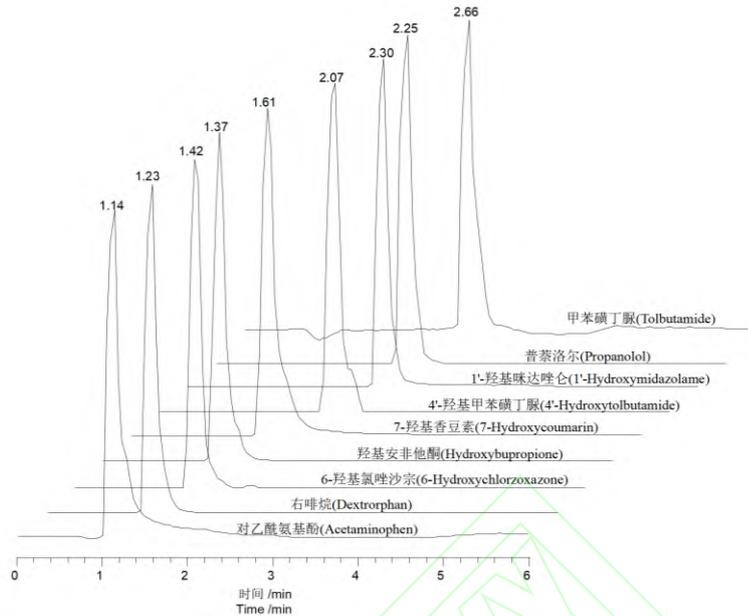


图 1 不同代谢产物的色谱图

Fig.1 Chromatograms of different metabolites

1.5 分子对接

为了研究羟苯丙酯和羟苯丁酯与大鼠和人细胞色素 P4501A2 的作用模式, 利用 AutodockTools 1.5.6^[19-20]把小鼠和人细胞色素 P4501A2 与羟苯丙酯和羟苯丁酯均转化为 PDBQT 格式, 然后利用 Autodock vina 1.1.2^[21]进行分子对接研究。大鼠细胞色素氧化酶 CYP1A2 的三维结构由建模服务器 SWISS-MODEL 构建得到, 模板选择人细胞色素氧化酶 CYP1A2 (PDB ID: 2HI4); 人细胞色素氧化酶 CYP1A2 (PDB ID: 2HI4, 分辨率: 0.195 nm) 是从 RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>)下载得到。大鼠和人 CYP1A2 活性口袋的坐标均设置为: center_x = 2.674, center_y = 18.041, center_z = 19.672; size_x=15, size_y=15, size_z=15。为了增加计算的精确度, 将参数 exhaustiveness 设置为 20。除了特别说明, 其他参数均采用默认值。最后, 选取打分值最高的构象用 PyMoL 1.7.6 进行绘图。

1.6 数据处理与分析

羟苯丙酯和羟苯丁酯的 IC₅₀ 值计算如下: 通过测定扑热息痛生成量计算 CYP1A2 的活性, 由式(1)计算羟苯丙酯和羟苯丁酯作用下的相对酶活性, 式中 Erel 为相对酶活性, Ci(n) 为不同浓度羟苯丙酯和羟苯丁酯组测得的代谢产物生成量, Ci(0)为空白对照组的代谢产物生成量。数据处理软件为 GraphPad Prism 5, 以相对酶活性 Erel 为纵坐标, 化学物浓度的对数值为横坐标, 由抑制曲线计算 IC₅₀ 值。采用 SPSS12.0 软件进行数据处理, 试验数据用平均值±标准偏差(Mean±SD)表示。

$$Erel(\%)=Ci(n)/Ci(0)\times 100\% \quad (1)$$

2. 结果(Results)

2.1 利用软件预测的方法对羟苯丙酯和羟苯丁酯进行毒性终点筛查

由表 1 可知,羟苯丙酯和羟苯丁酯都对 CYP1A2 具有抑制作用,同时主要通过 CYP1A2 代谢,由于 CYP450 酶介导的代谢性相互作用发生率最高,通过酶的抑制作用引起药效下降或毒副作用增高,特别是在我国中、西药合并使用相当普遍的情况下,其可能存在药物相互作用的风险,由表 1 可知,羟苯丙酯和羟苯丁酯具有眼刺激和皮肤刺激作用,同时按照 OECD 的分类危险范围,它们的等级较低,但口服具有毒性,还是需要加强对它们的安全性研究。

表 1 羟苯丙酯和羟苯丁酯的毒性终点

Table 1 Toxicity endpoints of propylparaben and butylparaben

| 化学物质 Compound | 眼刺激 Eye irritation | 皮肤刺激 Skin irritation | CYP450 酶抑制 种类 P450 inhibitors | CYP450 酶代谢 种类 P450 substrate | 口服急性毒性 危险范围(OECD 分级) Oral acute toxicity hazard categories (OECD) | 人每日的最大给药 剂量 (MRDD)/(mg·kg ⁻¹) Maximum daily human dose (MRDD)/(mg·kg ⁻¹) |
|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 羟苯丙酯 Propylparaben | 阳性 Positive | 阳性 Positive | CYP1A2 | CYP1A2 | Cat.4 | 7 |
| 羟苯丁酯 Butylparaben | 阳性 Positive | 阳性 Positive | CYP1A2 | CYP1A2 | Cat.4 | 6 |

2.2 羟苯丙酯和羟苯丁酯对大鼠和人肝微粒体 CYP450 酶的抑制作用

如图 2 所示,在大鼠肝微粒体中,加入系列浓度的羟苯丙酯孵育 60 min,得到抑制 CYP1A2 酶的 IC₅₀ 值为(8.85±0.38) μmol·L⁻¹,对其他 CYP450 酶无抑制作用,加入系列浓度的羟苯丁酯孵育 60 min,得到抑制 CYP1A2 酶的 IC₅₀ 值为(19.43±3.03) μmol·L⁻¹,对其他 CYP450 酶无抑制作用。在人肝微粒体中,加入系列浓度的羟苯丙酯孵育 60 min,得到抑制 CYP1A2 酶的 IC₅₀ 值为(1.63±0.34) μmol·L⁻¹,对其他 CYP450 酶无抑制作用,加入系列浓度的羟苯丁酯孵育 60 min,得到抑制 CYP1A2 酶的 IC₅₀ 值为(7.97±0.82) μmol·L⁻¹,对其他 CYP450 酶无抑制作用(表 2)。继续实验测得,在大鼠肝微粒体中,羟苯丙酯和羟苯丁酯对 CYP1A2 酶都是非竞争性抑制, K_i 值分别为 8.44 μmol·L⁻¹ 和 16.30 μmol·L⁻¹。在人肝微粒体中,羟苯丙酯和羟苯丁酯对 CYP1A2 酶都是非竞争性抑制, K_i 值分别为 2.28 μmol·L⁻¹ 和 5.86 μmol·L⁻¹。按照通用的 CYP 酶抑制剂强度分级规则^[22],对 2 个受试化学物的抑制强度进行分级: IC₅₀<1 μmol L⁻¹ 强抑制剂, 1 μmol L⁻¹<IC₅₀<10 μmol L⁻¹ 为中等强度抑制剂, IC₅₀>10 μmol L⁻¹ 为弱抑制剂。可知大鼠和人肝微粒体中羟苯丙酯是中等强度抑制剂,羟苯丁酯在大鼠肝微粒体中是弱抑制剂,羟苯丁酯在人肝微粒体中是中等强度抑制剂,羟苯丙酯和羟苯丁酯对人肝微粒体 CYP1A2 酶活性的抑制作用强于大鼠肝微粒体,说明羟苯丙酯和羟苯丁酯对肝脏 CYP1A2 酶活性的抑制还存在种属差异,同时羟苯丙酯和羟苯丁酯会经皮肤等被人

体吸收, 更要关注其对人体健康的危害, 因为动物水平的安全研究不能体现其真实的人体危害。

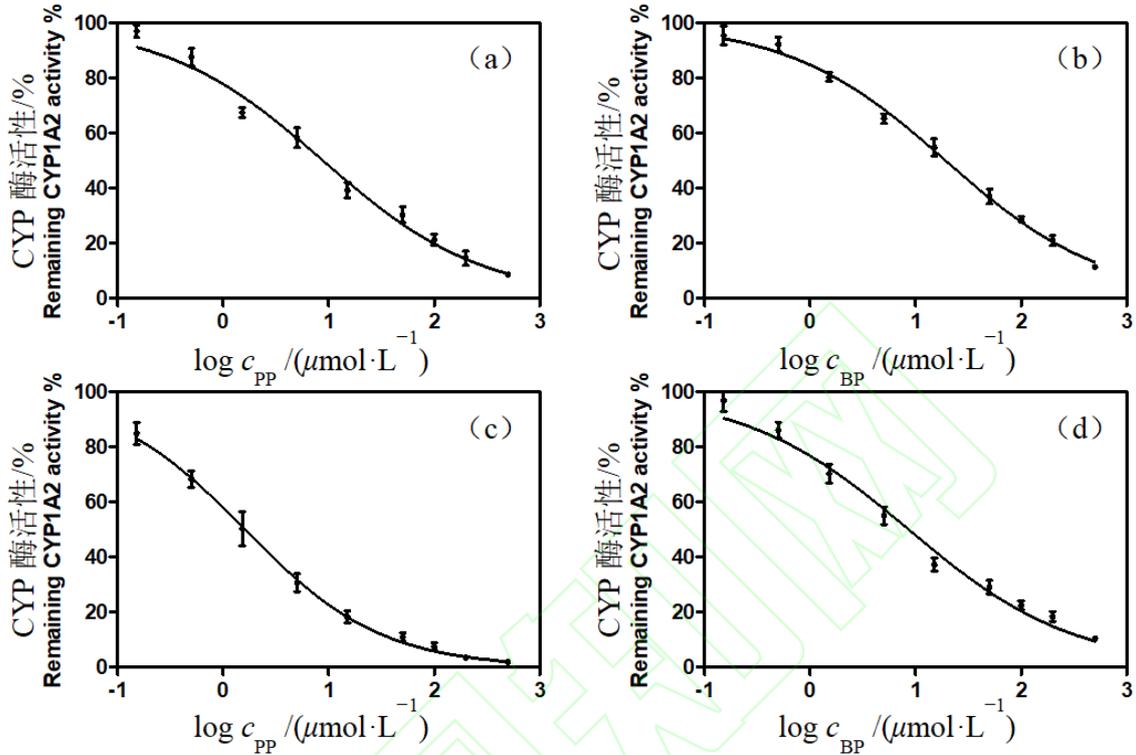


图 2 羟苯丙酯(PP)和羟苯丁酯(BP)对大鼠和人 CYP1A2 的抑制曲线

注: (a)羟苯丙酯-大鼠 CYP1A2; (b)羟苯丁酯-大鼠 CYP1A2; (c)羟苯丙酯-人 CYP1A2; (d)羟苯丁酯-人 CYP1A2。

Fig.2 Inhibition curves of propylparaben (PP) and butylparaben (BP) on CYP1A2 in rats and human

Notes: (a) propylparaben-CYP1A2 in rats; (b) butylparaben-CYP1A2 in rats; (c) propylparaben-CYP1A2 in human; (d) butylparaben-CYP1A2 in human.

表 2 羟苯丙酯和羟苯丁酯对大鼠和人肝微粒体中主要 CYP450 酶活性的抑制作用

Table 2 Inhibitory effects of propylparaben and butylparaben on major CYP450 enzyme activities in rat and human liver microsomes

| CYP | 探针底物 Indicators | 代谢产物 Metabolites | 大鼠 IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹) Rat IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹) | | 人 IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹) Human IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹) | |
|-----|--------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| | | | PP | BP | PP | BP |
| 1A2 | 非那西丁 Phenacetin | 对乙酰氨基酚 Acetaminophen | 8.85 | 19.43 | 1.63 | 7.97 |
| 2A6 | 香豆素 Coumarin | 7-羟基香豆素 7-hydroxycoumarin | NA | NA | >100 | >100 |
| 2B6 | 安非他酮 Bupropion | 羟基安非他酮 Hydroxybupropione | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 2C9 | 甲苯磺丁脲 Bolbutamide | 4'-羟基甲苯磺丁脲 4'-hydroxytolbutamide | NA | NA | NA | NA |
| 2D6 | 右美沙芬 Dextromethorphan | 右啡烷 Dextrorphan | >100 | >100 | >100 | >100 |

| | | | | | | |
|-----|-----------------------|------------------------------------|------|------|------|------|
| 2E1 | 氯唑沙宗 Chlorzoxazone | 6-羟基氯唑沙宗 6-hydroxychlorzoxazone | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 3A4 | 咪达唑仑 Midazolam | 1'-羟基咪达唑仑 1'-hydroxymidazolame | >100 | >100 | >100 | >100 |

2.3 羟苯丙酯和羟苯丁酯与 CYP1A2 的分子对接结果

为了进一步验证羟苯丙酯和羟苯丁酯对 CYP1A2 的抑制作用, 对它们进行了分子对接, 羟苯丙酯与 CYP1A2 分子对接结果显示, 羟苯丙酯紧凑地结合至大鼠和人 CYP1A2 的活性口袋中(图 3(a)和 3(b)), 其亲和力都为 $-7.4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。羟苯丙酯分别位于由大鼠氨基酸残基 Phe-124、Phe-225、Phe-259、Ala-315、Val-380 和 Leu-49 与人氨基酸残基 Phe-125、Phe-226、Val-227、Phe-256、Phe-260、Ala-317 和 Leu-497 所组成的疏水性腔袋, 形成强烈的疏水性相互作用。由图 3(c)和 3(d)可知, 羟苯丙酯的苯环分别可以与大鼠氨基酸残基 Phe-124 和 Phe-225 和人氨基酸残基 Phe-125 和 Phe-226 的侧链形成 CH- π 相互作用和 π - π 堆积作用。此外, 羟苯丙酯的苯环可以与大鼠氨基酸残基 Asp-311 和人氨基酸残基 Asp-320 形成阴离子- π 相互作用。重要的是, 羟苯丙酯可以与大鼠氨基酸残基 Asn-310 (键长 0.22 nm)形成氢键相互作用(图 3(c)), 同时与人氨基酸残基 Asp-320(键长 0.22 nm)和 Ala-317(键长 0.26 nm)形成双重氢键作用(图 3(d)), 这是羟苯丙酯与大鼠和人 CYP1A2 之间主要的作用力。可能正是由于这样特殊的结合模式, 使得羟苯丙酯与大鼠和人 CYP1A2 形成稳定的复合物, 从而起到抑制 CYP1A2 的作用。

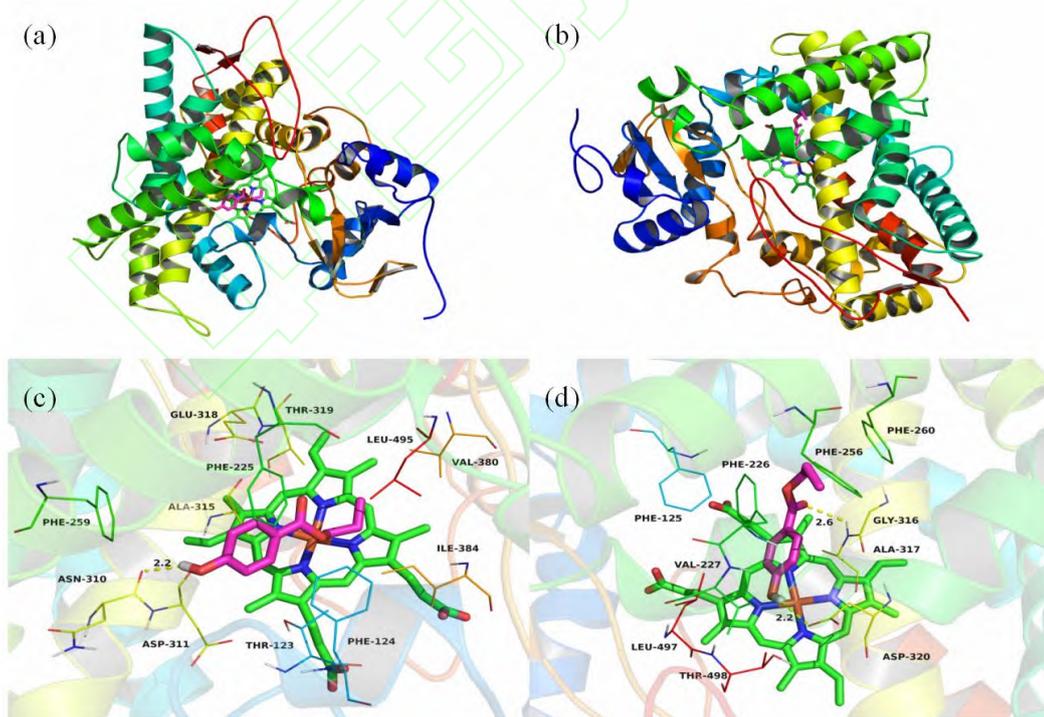


图3 羟苯丙酯与大鼠和人 CYP1A2 分子对接

注: (a)大鼠 CYP1A2(整体图); (b)人 CYP1A2(整体图); (c)大鼠 CYP1A2(细节图); (d)人 CYP1A2(细节图)

Fig.3 Docking of propylparaben with rat and human CYP1A2

Notes: (a) rats CYP1A2 (overall); (b) human CYP1A2 (overall); (c) rats CYP1A2 (detail); (d) human CYP1A2 (detail).

羟苯丁酯与 CYP1A2 分子对接结果显示, 羟苯丁酯紧凑地结合至大鼠和人 CYP1A2 的活性口袋中(图 4(a)和 4(b)), 其亲和力都为 $-7.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ 。羟苯丁酯分别位于由大鼠氨基酸残基 Phe-124、Phe-225、Phe-259、Ala-315、Val-380、Ile-384 和 Leu-495 与人氨基酸残基 Phe-125、Phe-226、Val-227、Phe-256、Phe-260、Ala-317 和 Leu-497 所组成的疏水性腔袋, 形成强烈的疏水性相互作用。由图 4(c)和 4(d)可知, 羟苯丁酯的苯环分别可以与大鼠氨基酸残基 Phe-124 和 Phe-225 和人氨基酸残基 Phe-125 和 Phe-226 的侧链形成 CH- π 相互作用和 π - π 堆积作用。此外, 羟苯丁酯的苯环可以与大鼠氨基酸残基 Asp-311 和人氨基酸残基 Asp-320 形成阴离子- π 相互作用。重要的是, 羟苯丁酯可以与大鼠氨基酸残基 Asn-310(键长 0.22 nm) 形成氢键相互作用(图 4(c)), 同时与人氨基酸残基 Asp-320(键长 0.21 nm)和 Ala-317(键长 0.27 nm)形成双重氢键作用(图 4(d)), 这是羟苯丁酯与大鼠和人 CYP1A2 之间主要的作用力。可能正是由于这样特殊的结合模式, 使得羟苯丁酯与大鼠和人 CYP1A2 形成稳定的复合物, 从而起到抑制 CYP1A2 的作用。

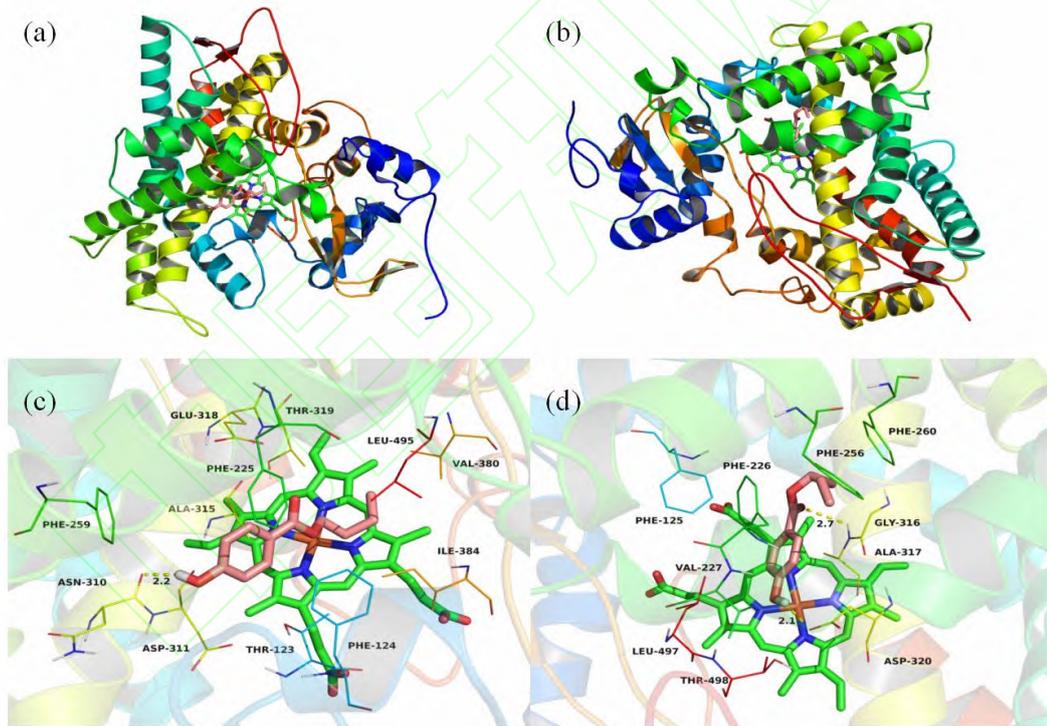


图 4 羟苯丁酯与大鼠和人 CYP1A2 分子对接

注: (a)大鼠 CYP1A2(整体图); (b)人 CYP1A2(整体图); (c)大鼠 CYP1A2(细节图); (d)人 CYP1A2(细节图)。

Fig.4 Docking of butylparaben with rat and human CYP1A2

Notes: (a) rats CYP1A2 (overall); (b) human CYP1A2 (overall); (c) rats CYP1A2 (detail); (d) human CYP1A2 (detail).

3. 讨论(Discussion)

参与人类药物代谢的 CYP 同工酶主要有 CYP1A2、2B6、2C9、2C19、2D6 和 3A4 等, 其中 CYP1A2 是介导药物氧化代谢主要酶系, 约占 CYP 总量的 13%^[23], 它们介导了大部分药物的代谢, 是基于 CYP 酶药物相互作用的研究重点^[24]。本研究在体外大鼠和人肝微粒体

孵育体系中, 选用美国食品药品监督管理局(US FDA)推荐的探针底物^[25], 系统评价了羟苯丙酯和羟苯丁酯对 7 种常见 CYP 酶的抑制作用, 通过 IC₅₀ 的测定评价它们对 CYP450 酶的抑制活性, 发现大鼠和人肝微粒体中羟苯丙酯是 CYP1A2 酶的中等强度抑制剂, 羟苯丁酯在大鼠肝微粒体中是 CYP1A2 酶的弱抑制剂, 羟苯丁酯在人肝微粒体中是 CYP1A2 酶的中等强度抑制剂, 观察到对其他 CYP450 酶无抑制作用, 这与用软件预测的羟苯丙酯和羟苯丁酯对 CYP450 酶的抑制种类结果一致, 分子对接的结果也印证了羟苯丙酯和羟苯丁酯对 CYP1A2 酶活性的抑制作用, 而且羟苯丙酯和羟苯丁酯对肝脏 CYP1A2 酶活性的抑制还存在种属差异, 这与文献报道的 CYP450 酶存在种属差异一致^[26]。因此, 为了评价受试化学物质对 CYP 酶抑制的临床相关性, 应首选人肝微粒体, 动物研究的结果外推至人时, 也应充分考虑 CYP 酶种属差异所致的抑制活性和机制的差异。羟苯丙酯和羟苯丁酯是对羟基苯甲酸酯类物质, 它们被广泛应用于医药、食品和化妆品等行业中, 很容易被人体接触和吸收, 可能与 CYP1A2 底物药物华法林、咖啡因、安替比林、对乙酰氨基酚、维拉帕米和硝苯地平临床药物产生药-药相互作用, 从而影响药物的疗效或增加毒副作用, 所以使用含对羟基苯甲酸酯类物质产品的人群需要关注自身的用药安全, 避免出现药-药相互作用。但由于肝微粒体只是亚细胞结构中的组分, 没有整体细胞中其他酶(如 N-乙酰转移酶)及辅酶, 因此, 一些代谢反应需要通过 II 相酶参与的, 在该体系中就不会进行, 由于药物及其代谢产物在体外肝微粒体孵育体系中很容易接近药物代谢酶, 而不可能完全反映体内的 ADME 情况, 同时由于肝微粒体富含 CYP450s 和 UGTs, 而不像体内和整体细胞那样有其他的酶竞争性参与药物代谢, 所以可能导致其生物转化率远远高于体内或肝细胞, 不符合真实的代谢情况。总之, 本研究从软件预测、肝微粒体抑制和分子对接 3 个方面来确证羟苯丙酯和羟苯丁酯对 CYP1A2 酶的抑制作用以及种属差异, 下一步还需要进行动物或肝细胞水平的研究来确证该研究结果, 保证将肝微粒体孵育体系中的实验结果外推到人体内的准确性。

通讯作者简介: 陈云霞(1987—), 女, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为化妆品安全性评价技术。

共同通讯作者简介: 苏宁(1979—), 男, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为化妆品安全性评价技术。

参考文献(Reference):

- [1] Soni M G, Taylor S L, Greenberg N A, et al. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: A review of the published literature [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2002, 40(10): 1335-1373
- [2] Soni M G, Burdock G A, Taylor S L, et al. Safety assessment of propyl paraben: A review of the published literature [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2001, 39(6): 513-532
- [3] Elder R L. Final report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, and butylparaben [J]. *International Journal of Toxicology*, 1984, 3(5): 147-209
- [4] Lee C H, Kim H J. A study on the absorption mechanism of drugs through biomembranes [J]. *Archives of Pharmacal Research*, 1994, 17(3): 182-189

- [5] Routledge E J, Parker J, Odum J, et al. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1998, 153(1): 12-19
- [6] Darbre P D, Aljarrah A, Miller W R, et al. Concentrations of parabens in human breast tumours [J]. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 2004, 24(1): 5-13
- [7] Aker A M, Johns L, McElrath T F, et al. Associations between maternal phenol and paraben urinary biomarkers and maternal hormones during pregnancy: A repeated measures study [J]. *Environment International*, 2018, 113: 341-349
- [8] Spanier A J, Fausnight T, Camacho T F, et al. The associations of triclosan and paraben exposure with allergen sensitization and wheeze in children [J]. *Allergy and Asthma Proceedings*, 2014, 35(6): 475-481
- [9] Souza I D, Melo L P, Jardim I C S F, et al. Selective molecularly imprinted polymer combined with restricted access material for in-tube SPME/UHPLC-MS/MS of parabens in breast milk samples [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 932: 49-59
- [10] Towers C V, Terry P D, Lewis D, et al. Transplacental passage of antimicrobial paraben preservatives [J]. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 2015, 25(6): 604-607
- [11] Błędzka D, Gromadzińska J, Wąsowicz W. Parabens. From environmental studies to human health [J]. *Environment International*, 2014, 67: 27-42
- [12] Darbre P D, Byford J R, Shaw L E, et al. Oestrogenic activity of benzylparaben [J]. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 2003, 23(1): 43-51
- [13] Oishi S. Effects of propyl paraben on the male reproductive system [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2002, 40(12): 1807-1813
- [14] Oishi S. Effects of butyl paraben on the male reproductive system in mice [J]. *Archives of Toxicology*, 2002, 76(7): 423-429
- [15] Oishi S. Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats [J]. *Toxicology and Industrial Health*, 2001, 17(1): 31-39
- [16] Oishi S. Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of *p*-hydroxybenzoic acid in rats [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2004, 42(11): 1845-1849
- [17] 刘钟栋. 食品添加剂[M]. 南京: 东南大学出版社, 2006: 34
- [18] Zhang D L, Zhu M S, Humphreys W G. *Drug Metabolism in Drug Design and Development: Basic Concepts and Practice* [M]. Hoboken, NJ: Wiley-Interscience, 2008
- [19] Sanner M F. Python: A programming language for software integration and development [J]. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 1999, 17(1): 57-61
- [20] Morris G M, Huey R, Lindstrom W, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility [J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2009, 30(16): 2785-2791
- [21] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2010, 31(2): 455-461
- [22] Testa B, van de Waterbeemd H. Preface to volume 5 [M]//*Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Amsterdam: Elsevier, 2007: 246
- [23] Gonzalez F J, Nebert D W, Hardwick J P, et al. Complete cDNA and protein sequence of a pregnenolone 16 alpha-carbonitrile-induced cytochrome P-450. A representative of a new gene family [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1985, 260(12): 7435-7441
- [24] Fowler S, Zhang H J. *In vitro* evaluation of reversible and irreversible cytochrome P450 inhibition: Current status on methodologies and their utility for predicting drug-drug interactions

[J]. The AAPS Journal, 2008, 10(2): 410-424

[25] United States Food and Drug Administration (US FDA). Guidance for industry: Drug interaction studies—Study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations [EB/OL] . (2012-02-01) [2021-08-12]. [www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance Compliance Regulatory Information/Guidances/UCM292362.Pdf](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance%20Compliance%20Regulatory%20Information/Guidances/UCM292362.Pdf).

[26] Martignoni M, Groothuis G M M, de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction [J]. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 2006, 2(6): 875-894

