

候选新药对大鼠肝细胞色素 P450A4 影响的研究

石杰,张新惠,庄安士(青岛市市立医院药物研究室,山东 青岛 266011)

摘要:目的 研究候选新药(HSH)对大鼠肝细胞色素 P450A4 是否有抑制或诱导作用,以及这种作用是否具有性别差异。方法 取大鼠雌雄各半,随机分为 4 个组:雄性对照组(I)、雄性给药组(II)、雌性对照组(III)、雌性给药组(IV),均采用钙离子沉淀法制备肝微粒体。在各组肝微粒体中同时给予一定剂量的探针药物及目标药物,进行孵育,于不同时间点取样,测定该探针药物的剩余浓度并计算其体外半衰期。结果 HSH 对肝细胞色素 P450A4 无影响。结论 就大鼠而言,药物对肝细胞色素 P450A4 无影响,HSH 在同各种与 CYP3A4 代谢有关的药物合用时,相对安全。

关键词:新药;米唑唑仑;CYP3A4

中图分类号:R282.770.5 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2007)02-0108-03

The Effect of Anti-Ada Ocean Drug Candidate on CYP3A4

SHI Jie, ZHANG Xin-hui, ZHUANG An-shi (Drug Research Department of Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE The inhibitory or inducible effects of the ocean drug candidate on CYP3A4 in rats and their sex-based differences were studied. **METHODS** All rats, half in male and half in female, were divided into four groups randomly: male antitheses group(I), male drug-added group(II), female antitheses group(III), female drug-added group(IV). All liver microsome was prepared by calcium-ion deposition method. Both the probe drug and the drug candidate were added into different groups and incubated. The samples were selected at different time point and the residual concentration of probe drug was determined. Furthermore, the $t_{1/2}$ *in vivo* was calculated. **RESULTS** This drug had no significant effect on CYP3A4 in both male and female rats. **CONCLUSION** As concern as rats, this drug has no effect on CYP3A4, it is relatively safe when it is used in future experiments, or administered with other drugs related to CYP3A4.

KEY WORDS: ocean drug; mizazolam; CYP3A4

肝微粒体细胞色素 P450 酶(CYP450),是一种结构和功能相关的超家族基因编码的同工酶,是生物体内主要的解毒酶系,负责外源性物质及内源性物质的生物转化,在解毒和生物活化中起着重要作用,它可以被某些化合物诱导或抑制,从而影响其他化合物(包括药物)的代谢转化,影响其生物活性和毒性。在人类肝脏中与药物代谢密切相关的 CYP450 主要有 CYP2E1、CYP3A4 等几种亚族。CYP450 具有遗传多态性、交叉重叠性、立体选择性。这些特性使得药物与酶的亲和力、活性等受到影响。因此研究药物对 P450 酶活性的作用(抑制或诱导),对药物安全性评价、药物间相互作用、临床给药方案的设计有非常重要的意义。

美国 FDA1997 年公布了此方面的文件,我国目前也积极倡导进行这方面的研究。

候选新药(以下简称 HSH)经药效学研究证明具有抗老年痴呆的作用,是依据糖类物质与 $\text{A}\beta$ 相互作用构效关系,以昆布为基础原料,通过理性药物设计、借助特定酶解修饰手段,经过大量活性筛选而得到的药效确切、具有特定分子骨架的拮抗 $\text{A}\beta$ 形成的海洋酸性寡糖化合物($M_r = 1300 - 1500$)。

本题旨在研究这个候选 I 类新药对肝药酶是否存在诱导或抑制作用,以及这种作用是否具有性别差异,从而对它进行安全性评价、预测它与其他药物间的相互作用以及为临床合理用药提供参考。

1 材料

1.1 实验所需试剂及其配制

0.25 mol/L 蔗糖:称取蔗糖 85.575 g,加入蒸馏水至 1 L 定容。

20%甘油:量取甘油 100 mL,加入蒸馏水至 500 mL 定容。

88 mmol/L CaCl_2 溶液:精密称取无水 CaCl_2 9.76712 g,加入蒸馏水至 1 L 定容。

0.1 mol/L Tris 液:精密称取 Tris 12.114 g,加入蒸馏水至 1 L 定容,用 6 mol HCl 调节 pH 值至 7.4。

100 mmol Tris-HCl 缓冲液:将 50 mL 0.2 mol Tris 溶液与 38.5 mL 0.2 mol HCl 混匀后,加入 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 101.7 mg,然后以蒸馏水稀释至 100 mL,即得。

NADPH:精密称取 15.308 mg NADPH,置于 10 mL 量瓶中,用 0.1 mol Tris-HCl 缓冲液稀释至刻度。

HSH:精密称取 HSH 0.1 g,置于 100 mL 量瓶中,加蒸馏水至刻度定容。

探针药物:精密称取米唑唑仑 0.02 g,置于 100 mL 量瓶中,加蒸馏水至刻度。

考马斯亮蓝 G-250 染色液的配制:100 mg 的考马斯亮蓝 G-250 溶解于 50 mL 95% 的乙醇中,加入 85% 的磷酸 100 mL,加水定容至 1 L。临用前过滤。

连二亚硫酸钠、甲醇、乙腈、四叔丁基甲醚,色谱纯;HSH

由中国海洋大学海洋药物研究所制备;米唑唑仑由上海罗氏公司提供。

1.2 实验动物

Wistar大鼠,体重为(230±20)g雌雄各半,由青岛市药品检验所提供。所有动物在处死前24h均禁食、禁水。第二天早晨急性处死。

1.3 实验仪器和设备

CO的制取设备(自制):采用甲酸在浓硫酸的催化下,脱羧产生CO气体,用NaOH溶液对多余的甲酸等进行吸收。

HPLC(Waters Company, USA), YQ-3型匀浆仪(江苏江阴县祝圩新北五金塑料厂), CENTRA MR4R离心沉淀机(International Equipment Company), HP8453紫外分光光度计(Hewlett Packard)。

2 方法

2.1 肝微粒体的制备^[2]

2.1.1 线粒体后上清液的制备 取受试大鼠(雌雄各半),禁食过夜,并将生理盐水放入冰箱中冰镇。第二天将大鼠断头处死或击昏,剪开腹腔或胸腔,用注射器吸冰镇的生理盐水20~40mL从门静脉冲洗肝脏至土黄色,从根部剥离并取出肝脏,用滤纸吸干,称重,剪碎,用0.25mol/L蔗糖液制成25%的匀浆,低温高速离心机12500×g离心15min,倒出,保留上清部分,沉淀部分丢弃。此为线粒体后上清液。

2.1.2 微粒体悬液 取每毫升线粒体后上清液加0.1mL 88mmol/L CaCl₂溶液,稍搅拌均匀,放冰浴5min,低温高速离心机27000×g离心15min,上清液倒出,沉淀板重悬于5mL 0.1mol/L的Tris液中(pH 7.4)得微粒体悬液。

2.2 肝微粒体基本参数的测定

2.2.1 蛋白质标准曲线的绘制 取白蛋白标准品,分别用蒸馏水配制成125、250、500、1000、2000、4000μg/mL的A、B、C、D、E、F标准溶液,各取60μL标准溶液,加入3mL考马斯亮蓝染色液,混匀后室温放置15min于分光光度计595nm波长处比色测定^[3]。以蛋白质含量为横坐标,A₅₉₅的值为纵坐标绘制标准曲线。每一管均做复管,得蛋白质曲线。

$$Y(\mu\text{g/mL}) = 942.7045703X + 35.50963957$$

($r = 0.999248$)

$$\text{蛋白质含量 (mg/g)} = [Y(\mu\text{g/mL}) / 1000] / 20\%$$

2.2.2 蛋白质含量测定 取已制备好的肝微粒体悬液60μL,参照“2.2.1”项下蛋白质标准曲线的测定方法及公式进行测定并计算蛋白质的含量。

2.2.3 用Omura法测定细胞色素P450的含量^[4] 取蛋白含量已知的肝微粒体悬液,用pH 7.4 0.1mol/L Tris缓冲液稀释成为每0.5mg/mL的蛋白工作液,分装于两个比色杯(大约各3mL),置双光束紫外分光光度计,扫描测定400和500nm间的基线,向两比色杯内加数毫克连二亚硫酸钠(保险粉),用小玻璃棒小心搅拌,样品杯轻轻充CO大约1min,在扫描测定400~500nm的差示光谱。根据下列公式计算P450的含量。见表1。

$$\text{P450 (nmol/mg蛋白)} = \frac{\Delta A(450-490\text{nm}) \times 1000}{91 \times \text{蛋白终浓度 (mg/mL)}}$$

2.3 探针药物的浓度测定方法

2.3.1 待测成分的提取 将冷冻的肝微粒体在室温下解

表1 大鼠肝微粒体参数测定结果

Tab 1 Results of microsome data in rats

	雄性	雌性	P
肝湿重/g	6.5 ± 1.36	5.18 ± 0.63	0.09
肝微粒体蛋白含量 / (mg/g liver wet)	17.27 ± 6.33	14.75 ± 4.31	0.48
P450总量 / (nmol/mg protein)	0.42 ± 0.14	0.37 ± 0.06	0.43

冻,准备吸取200μL,加入5mL四叔丁基甲醚,充分振摇,准备提取上清液4mL,氮气吹干,加入120μL甲醇溶解。

2.3.2 测定米唑唑仑的色谱条件 C₁₈柱150mm×4.6mm,5.0μm,流动相为甲醇-乙腈-草酸铵(20mmol/L),体积比为35:25:40,流速为1mL/min,进样量为20μL,二极管紫外检测波长为254nm。

2.3.3 色谱行为 空白肝微粒体混悬液,加入探针药物的肝微粒体混悬液在上述色谱条件下进行分析,由所得的液相色谱图可知空白肝微粒体混悬液对米唑唑仑的测定未见干扰。

2.3.4 标准曲线 准确称量一定量的米唑唑仑,用色谱级甲醇溶液稀释至一定刻度,配成1mg/mL的标准工作液,在吸取不同体积的米唑唑仑工作液,加入大鼠空白肝微粒体至刻度,配成米唑唑仑浓度分别为0.5、1、2、4、10、20、40μg/mL的A、B、C、D、E、F的标准溶液,按“2.3.1”和“2.3.2”项下的步骤进行操作。其标准曲线见图1。米唑唑仑: $Y = 0.1909X - 0.0265$ ($n = 7, r = 0.9998$),其中X为积分面积的比值,Y为浓度。

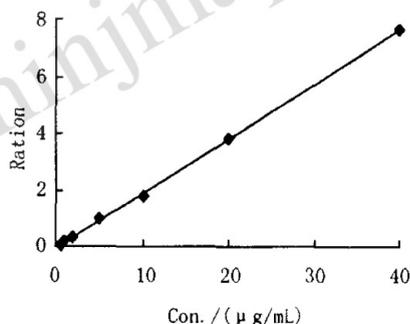


图1 肝微粒体中米唑唑仑的标准曲线

Fig 1 Calibration curve of miltazolam in microsome

2.3.5 精密度提取 取0.25、2、40μg/mL三个浓度,按“2.3.1”和“2.3.2”项下内容进行操作,测3次,间隔7d后再测3次,精密度结果见表2,提取率结果见表3。

表2 米唑唑仑的日内及日间差 ($n = 3 \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Results of miltazolam of intra-day and inter-day ($n = 3 \bar{x} \pm s$)

Concentration / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Intra-day reproducibility		Inter-day reproducibility	
	Concentration / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD / %	Concentration / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD / %
0.25	0.252 ± 0.02	7.94	0.27 ± 0.01	3.70
2	1.90 ± 0.005	0.26	2.03 ± 0.08	3.94
40	41.69 ± 1.32	3.17	40.44 ± 0.09	0.22

表 3 米唑唑仑提取率 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab 3 The extract rate of midazolam ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Concentration /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Detected concentration /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Rate/%
0.25	0.252 \pm 0.02	100.8
2	1.90 \pm 0.005	95.00
40	41.69 \pm 1.32	104.23

2.4 体外孵育

将制备的空白肝微粒体用稀释至 2 mg/mL,取 3 mL 此空白肝微粒体,加入至塑料离心管中,再加入 1 mL 探针药物工作原液(米唑唑仑的浓度为 0.2 mg/mL),空白对照组加入 Tris-HCl 缓冲液 0.5 mL; HSH 组加入 HSH(1 mg/mL) 100 μL 以及缓冲液 400 μL 。将各组肝微粒体以及 NADPH 溶液放入水浴中预热 5 min,加入已预热的 NADPH 溶液 0.5 mL 启动反应。在反应开始后分别于 0, 5, 10, 20, 40, 60 min 各取 400 μL ,立即放入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中终止反应。

2.5 不同用药组中探针药物的浓度测定

取一定量肝微粒体,按照“2.3.1”和“2.3.2”项下的内容进行测定。

3 结果

各组肝微粒体中探针药物的浓度随时间呈逐渐下降的趋势,结果见表 4。

表 4 各组肝微粒体中不同时间米唑唑仑的浓度数据

Tab 4 The concentration of midazolam at different times in rats in different groups

时间 /min	雄性浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		雌性浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
	对照组	HSH 组	对照组	HSH 组
0	33.04 \pm 3.96	35.87 \pm 2.37	33.11 \pm 3.11	34.42 \pm 2.56
5	30.15 \pm 3.66	30.41 \pm 2.16	27.87 \pm 1.92	30.40 \pm 1.73
10	26.07 \pm 3.58	27.75 \pm 2.49	24.41 \pm 1.61	26.97 \pm 1.52
20	22.53 \pm 3.49	22.98 \pm 1.07	21.11 \pm 2.02	22.73 \pm 0.91
40	16.73 \pm 5.14	17.63 \pm 1.91	15.91 \pm 2.65	18.83 \pm 1.25
60	13.21 \pm 4.29	13.06 \pm 2.13	11.83 \pm 3.08	14.58 \pm 1.55

将各组探针药物的浓度数据取自然对数,其浓度对数-时间曲线详见图 2,图 3。根据浓度对数的线性方程计算每个动物的体外半衰期,结果见表 5。

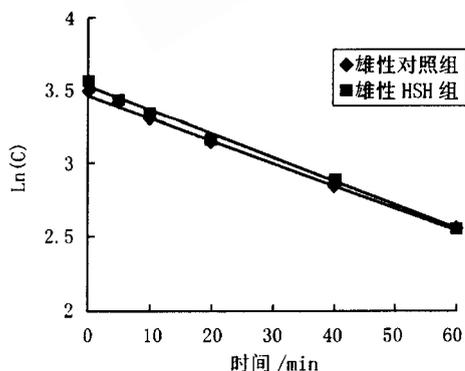


图 2 米唑唑仑在雄性大鼠中的浓度对数-时间曲线

Fig 2 Ln(C)-time curve of midazolam in male rat's microsome

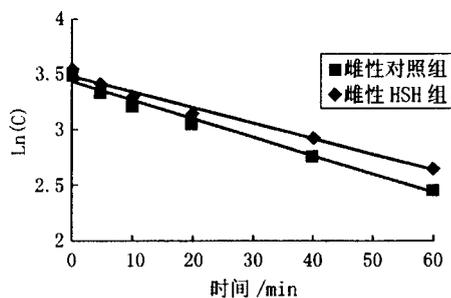


图 3 米唑唑仑在雌性大鼠中的浓度对数-时间曲线

Fig 3 Ln(C)-time curve of midazolam in female rat's microsome

表 5 肝微粒体中米唑唑仑的体外半衰期结果

Tab 5 Results of half-time in-vitro of midazolam in microsome

	对照组	HSH 组	P
雄性	41.87 \pm 13.94	40.24 \pm 9.32	0.83
雌性	38.04 \pm 12.13	46.75 \pm 5.07	0.18

4 讨论

4.1 文献报道:CYP3A4在许多内外源化合物的代谢中起着重要的作用,可参与红霉素、尼莫地平、利多卡因、环孢霉素、奥美拉唑等 38 个类别共 150 多种药物在体内的代谢^[5]。此外,该药酶还参与了部分前致癌物质的活化^[6]。巴比妥类、糖皮质激素、大环内酯类抗生素、利福平均是该酶的诱导。醋竹桃霉素、孕二烯酮则是该酶的抑制剂。有文献报道,激素水平能影响 P450 的含量,其中孕酮可促进药酶的产生^[7]。在成熟大鼠中,雄性的药酶要比雌性高,其药物代谢力强。

4.2 本实验的研究结果表明:药物 HSH 对雄性和雌性大鼠的 CYP3A4 均无影响,因此,药物在与同 CYP3A4 代谢相关的药物合用时,相对安全。故海洋药物 HSH 具有良好的开发前景。

参考文献

- [1] FRYE R F, MATZKE G R, ADEDOYIV A, *et al*. Val idation of the five-dug " Pittsburgh cocktail" approach for assessment of selective regulation of drug metabolizing enzymes[J]. Clin Pharmacol Ther, 1997, 62, 365-376.
- [2] ZHANG Y T. Morden pharmacy experimental methods[M]. Beijing: Beijing Medical University & XieHe Medical University of China, 1998. 61.
- [3] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem. 1976, 72: 248-254.
- [4] OMURA T, SATO R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes[J]. J Biol Chem, 1964, 239: 2370.
- [5] YAMANO S, TATSUNO J, GONZALE F J. The CYP2A3 gene product catalyzes coumarin 7-hydroxylation in human liver microsomes[J]. J Biochemistry, 1990, 29: 1322.
- [6] THUMMEL K E, W I K I N S O N G R. In vivo and in vitro drug interaction involving human CYP3A[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1998, 38: 389-430.
- [7] ZHU H, SHA J H, TIAN Z M. The biological character and control of P450 in spermary[J]. Overseas Medicine(国外医学), 1998, 18(3): 129

收稿日期: 2006-05-25