辛伐他汀对大鼠肝微粒体药物代谢酶活性的影响

吴东方[1]，张蕾[2]， 刘萍[1] (1.武汉大学中南医院药学部，武汉 430071; 2.铜仁地区人民医院药剂科，贵州 铜仁 554300)

摘要：目的 研究辛伐他汀(simvastatin, SV)对大鼠肝脏药物代谢酶活性的影响。**方法** 大鼠口服给予 SV，qd×7，超速离心法分离肝微粒体，一氧化碳示差光谱法测定细胞色素 P450(CYP)含量，以红霉素、苯胺、CDNB、利尿酸、7-羟基-4-甲基香豆素和对羟基联苯为底物分别测定肝微粒体红霉素脱甲基酶(CYP3A4)、苯胺羟化酶(CYP2E1)、谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S transferase, GST)及其π亚型 (πGST)、尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(uridine diphosphoglucuronyl transferase, UGT1 和 UGT2)活性。**结果** 大鼠口服给予 SV 可明显降低大鼠肝微粒体 CYP 含量及 CYP3A4 活性，对 CYP2E1 则没有显明影响。同时,SV 则可显著增高大鼠肝微粒体 GST、πGST 及 UGT1 和 UGT2 活性。**结论** SV 可降低大鼠肝微粒体 CYP3A4 活性，而增高肝微粒体Ⅱ相代谢酶的活性。

关键词：辛伐他汀；药物代谢酶；肝脏

中图分类号：R965 **文献标志码：**A **文章编号：**1007-7693(2009)10-0798-03

Effects of Simvastatin on Drug-metabolizing Enzyme of Liver Microsome in Rats

WU Dongfang[1]，ZHANG Lei[2]，LIU Ping[1](*1.Department of Pharmacy, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China；2. People's Hospital Pharmacy Service of Tongren District, Tongren 554300, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of simvastatin (SV) on drug-metabolizing enzyme of liver microsome in rats. **METHODS** Rats were given SV by oral administration，qd×7. Liver microsome was prepareded by ultracentrifugation. Cytochrome P450 (CYP) content was determined by CO-difference spectrum. Erythromycin, aniline, 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB), ethacrynic acid, 7-hydroxy-4-methylcoumarin and 4-Hydroxybiphenol were used as the substrates for the determination of CYP3A4，CYP2E1, glutathione S transferase(GST) and πGST, uridine diphosphoglucuronyl transferase (UGT1 and UGT2) activities. **RESULTS** After SV oral administration, CYP content and CYP3A4 activity were significantly decreased in rats, but no difference of CYP2E1 activity was found. Meanwhile, SV administration caused a remarkable increase in liver microsome GST, πGST, UGT1 and UGT2 activities. **CONCLUSION** SV increased in CYP3A4 activity and reduced Ⅱ phase drug-metabolized enzyme in rats.

KEY WORDS: simvastatin; drug-metabolized enzyme; liver

辛伐他汀 (simvastatin，SV)是 3-羟-3-甲基戊二酰辅酶 A(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A，HMG-CoA)还原酶抑制剂(他汀类，statins)中常用的调血脂药物之一，由于这类药物选择性抑制肝脏中胆固醇合成的限速酶——HMG-CoA 还原酶，使肝脏脂蛋白生成减少，低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)受体表达增加，从而使血浆胆固醇水平下降，减少动脉粥样硬化及冠心病的发生[1]。尽管 SV 在临床上应用耐受性较好，但与多种药物合并用药时常出现不良反应，尤其是严重的横纹肌溶解症，限制了 SV 的应用[2]。目前认为，SV 主要是经肝脏细胞色素 P450 (cytochrome P450，CYP)3A4 代谢，抑制 CYP3A4 的药物如酮康唑、氟康唑、红霉素等均可增加 SV 的血药浓度，因而增加 SV 不良反应的发生[3]。然而，文献[4]报道，SV 与西沙必利(cisapride)联合应用时，西沙必利血药浓度明显升高，而西沙必利亦主要是在肝脏经 CYP3A4 代谢，可见 SV 亦可能对药物代谢酶活性产生一定的作用，因此，本研究观察了 SV 对肝脏药物代谢酶活性的影响，现将结果报告如下。

1 材料

1.1 药物与试剂

辛伐他汀 (simvastatin，SV，舒降之，杭州默沙东制药有限公司，批号：w1070)，临用前剥开胶囊溶于生理盐水中。牛血清白蛋白 (bovine serum albumin，BSA) (Roche分装)，1-氯-2，4 二硝基苯(1-chloro-2, 4-dinitrobenzene, CDNB)，还原型谷胱甘肽 (glutathione，reduced, GSH)，尿苷二磷酸葡萄糖醛酸(uridine 5-diphosphoglucouronic acid，UDPGA)，红霉素(erythromycin)，利尿酸 (ethacrynic acid)，7-羟基-4-甲基香豆素(7-hydroxy-4-methylcoumarin)，对羟基联苯(4-hydroxybiphenol)，还原型辅酶

作者简介：吴东方，男，博士，主任药师，副教授 Tel：(027)67813200 E-mail：dfwu2003@163.com

Ⅱ(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form，NADPH)，氧化型辅酶Ⅱ(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate，oxidized form，NADP)，异枸橼酸(isocitric acid)，异枸橼酸脱氢酶(isocitric acid dehydrogenase)(Sigma公司)。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

3K30 冷冻离心机(德国 Sigma 公司)；贝克曼 L-M80 超速离心机 (美国 Beckman)；UV2800 型紫外可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司)；UV-3000 双光束双波长分光光度计(日本，岛津)；RF-5000 荧光分光光度计(日本，岛津)；DY89-1 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司)；PHS-25 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司)。

1.3 动物

SD 大鼠，(200±20) g，由武汉大学基础医学院动物实验中心提供，实验动物合格证号：0037156。

2 方法

2.1 动物处理及肝微粒体分离

大鼠随机分为对照组及 SV 高、中、低 3 个剂量组，每组 10 只。SV 高、中、低剂量组给予 SV，剂量分别为 3.6，7.2，14.4 $mg \cdot kg^{-1}$，ig，qd×7。对照组给等容量的生理盐水。末次给药后禁食，16 h 处死。大鼠迅速剖腹，用 30 mL 冰生理盐水从门静脉灌洗肝脏至土黄色，立即摘取肝脏，放在冰生理盐水中漂洗 2 次，吸干，称重，剪碎。用 50 $mmol \cdot L^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4) 制成 25% 肝匀浆，差速离心法制备肝微粒体[5]。肝微粒体按 2 g 肝重$\cdot mL^{-1}$ 以 0.25 $mol \cdot L^{-1}$ 蔗糖液悬浮，−80 ℃保存，以上操作均在 4 ℃下进行。

2.2 生化分析

CYP 含量按文献[6]方法测定。以苯胺和红霉素为底物测定苯胺羟化酶 (aniline hydroxylase, ANH) 及红霉素脱甲基酶 (erythromycin demethylase, ERD) 活性以代表 CYP2E1 和 CYP3A4 活性[7]。以 CDNB 为底物，测定 GST 的活性[8]。以利尿酸为底物，测定 πGST 的活性[9]。分别以 7-羟基-4-甲基香豆素和对羟基联苯为底物，测定尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(uridine diphosphate glucuronosyltransferase，UGT1 和 UGT2)活性[10]。以 BSA 为标准品，按 Lowry 法测定肝微粒体蛋白含量[11]。

2.3 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计软件对数据进行方差分析，并用 q 检验进行组间比较。

3 结果

3.1 SV 对大鼠肝微粒体细胞色素 P450 酶系统的影响

SV 3.6 $mg \cdot kg^{-1}$ 对大鼠肝微粒体 CYP 含量及 CYP3A4 活性没有明显的影响，但 SV 7.2 $mg \cdot kg^{-1}$ 和 14.4 $mg \cdot kg^{-1}$ 则显著降低大鼠肝微粒体 CYP 含量及 CYP3A4 活性，最高降低幅度分别达 20.8%~25.6%和 29.7%~33.1% (P<0.01)。而 SV 3 个剂量 ig 预处理大鼠，肝微粒体 CYP2E1 未见有明显变化，结果见表 1。

表 1 SV 对大鼠肝微粒体细胞色素 P450 酶系统的影响 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of SV on drug-metabolizing enzyme of liver microsome (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	CYP 含量 /$nmol \cdot mg^{-1}pro$	CYP3A4 /$nmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}pro$	CYP2E1 /$nmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}pro$
对照	0.481±0.083	0.357±0.040	0.104±0.027
SV 3.6 $mg \cdot kg^{-1}$	0.434±0.107	0.305±0.039	0.107±0.014
SV 7.2 $mg \cdot kg^{-1}$	0.381±0.046[1)]	0.251±0.051[1)]	0.112±0.019
SV 14.4 $mg \cdot kg^{-1}$	0.358±0.070[1)]	0.239±0.057[1)]	0.097±0.015

注：与对照组比较，[1)] P<0.01

Note: Compared with control group, [1)]P<0.01

3.2 SV 对大鼠肝微粒体 GST 和 UGT 酶活性的影响

SV 口服给药后，除 3.6 $mg \cdot kg^{-1}$ 对大鼠肝微粒体 UGT1 没有明显影响外 (P>0.05)，SV 3 个剂量组均可增高大鼠肝微粒体 GST、πGST、UGT1 和 UGT2 活性，与对照组比较，统计学差异具显著性或高度显著性 (P<0.05 或 P<0.01)。结果见表 2。

表 2 SV 对大鼠肝微粒体 GST 和 UGT 酶活性的影响 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effects of SV on GST and UGT activities of liver microsome (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	GST /$nmol \cdot min^{-1}$ $mg^{-1}pro$	ΠGST /$nmol \cdot min^{-1}$ $mg^{-1}pro$	UGT1 /$nmol \cdot min^{-1}$ $mg^{-1}pro$	UGT2 /$nmol \cdot min^{-1}$ $mg^{-1}pro$
对照	59.9±7.0	13.1±3.1	34.5±4.3	11.9±1.2
SV 3.6 $mg \cdot kg^{-1}$	76.6±11.2[2)]	22.4±9.1[1)]	37.2±5.7	13.9±1.8[1)]
SV 7.2 $mg \cdot kg^{-1}$	76.4±14.2[2)]	23.2±3.9[2)]	41.1±4.0[2)]	14.8±1.4[2)]
SV 14.4 $mg \cdot kg^{-1}$	101.9±22.4[2)]	22.0±9.4[1)]	43.0±5.3[2)]	14.0±1.4[2)]

注：与对照组比较，[1)]P<0.05，[2)] P <0.01

Note: Compared with control group, [1)]P<0.05，[2)] P <0.01

4 讨论

SV 是一种无活性的前体药物，在体内被水解成辛伐他汀酸，即具有较强的抑制胆固醇合成的限速酶 HMG-CoA 还原酶的作用。目前认为[2]，SV (包括阿托伐他汀、洛伐他汀和西立伐他汀等)通过肝脏 CYP3A4 代谢，体外实验显示该酶介导人体

40%~50%在临床应用药物的代谢[4]，因此在临床上药物合并应用时，这些药物可能会对 CYP3A4 产生竞争性抑制，使血药浓度升高，诱发不良反应的发生。本实验结果显示，SV 可明显降低 CYP 含量及 CYP3A4 活性，而对 CYP2E1 的影响不明显，与文献[12]报道一致。

药物及外源性物质在体内经Ⅰ相酶 CYP 氧化代谢后，与药物代谢Ⅱ相酶结合而排出体外。GST 和 UGT 是肝脏最重要的Ⅱ相酶，据文献[13-14]报道，GST 和 UGT 均为两个大家簇，GST 证实有 α、μ、π、θ 等亚型，UGT 有 UGT1 和 UGT2 两个亚型，GST-π 主要参与人体的解毒功能，保护细胞免受毒素或致癌因子的损害，UGT1 主要参与酚类化合物和胆红素的代谢，UGT2 则主要参与类固醇的代谢。本文结果显示，SV 3 个剂量均可明显增加肝微粒体 GST、GST-π 及 UGT1 和 UGT2 酶活性，表明 SV 可增加代谢药物的排泄。

REFERENCES

[1] CORSINI A, BELLOSTA S, BAETTA R, et al. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins [J]. Pharmacol Ther, 1999, 84(3): 413-428.

[2] PAOLETTI R, CORSINI A, BELLOSTA S. Pharmacological interactions of statins [J]. Atherosclerosis Supplements, 2002, 3(1): 35-40.

[3] IGEL M, SUDHOP T, VON BERGMANN K. Metabolism and drug interactions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A-reductase inhibitors (statins) [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2001, 57(5): 357-364.

[4] SIMARD C, O'HARA GE, PREVOST J, et al. Stuy of the drug-drug interaction between simvastatin and cisapride in man [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2001, 57(3): 229-234.

[5] YANG C S, STRICKHART F S, KICHA L P. The effect of temperature on monooxygenase reactions in the microsomal membrabes [J]. Biochim Biophys Acta, 1977, 465(2): 362-70.

[6] WU D F, PENG R X. The effects of sodium ferulate on bromobenzene-induced liver injury in mice [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 1995, 30(10): 597-599.

[7] YANG C S, STRICKHART F S, KICHA L P. Interaction between NADPH-cytochrome P-450 reductase and hepatic microsomes [J]. Biochim Biophys Acta, 1978, 509(2): 326-337.

[8] HABIG W H, PABST M J, JAKOBY W B. Glutathione S-transferase: the first enzymatic stap in mercapturic acid formation [J]. J Biol Chem, 1974, 249(22): 7130-71399.

[9] NARE B, SMITH J M, PRICHARD R K. Induction of glutathione S-transferase isoenzymes in mouse liver by 5-(2-pyrazynl)-4-methyl-1, 2-dithiole-3-thione (oltipraz) [J]. Biochem Pharmacol, 1992, 43(4): 873-879.

[10] LILIENBLUM W, WALLI A K, BOCK K W. Differential induction of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransgerase activities by various inducing agents [J]. Biochem pharmacol, 1982, 31(6): 907-913.

[11] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. J Biol Chem, 1951, 193(1): 265-275.

[12] COHEN L H, VAN LEEUWEN R E W, VAN THIEL G C F, et al. Equally potent inhibitors of cholesterol synthesis in human hepatocytes have distinguishable effects on different cytochrome P450 enzymes [J]. Biopharm Drug Dispos, 2000, 21(9): 353-364.

[13] XU C M, QIAN Y L, ZHANG X. Correlation between genetic polymorphism in CYP2E1 , GST and toxicity of dimethylformamide [J]. Chin J Ind Med (中国工业医学杂志), 2007, 20(1): 39-41.

[14] GU Y, LI Y. Genetic polymorphism in UDP-glucuronosyltransferase and disease susceptibility[J]. J Int Pharm Res (国际药学研究杂志), 2008, 35(2): 107-110.

收稿日期：2008-08-18