

大鼠肝微粒体中 CYP2C9 酶的活性及动力学研究

沈秀微¹, 王哲², 陈帆¹, 吴明钊¹, 潘佩佩², 胡国新^{2*} (1.瑞安市人民医院, 浙江 瑞安 325200; 2.温州医科大学, 浙江 温州 325035)

摘要: 目的 以双氯芬酸为探针药, 建立 HPLC 测定大鼠肝微粒体 CYP2C9 酶活性的方法, 并对其进行动力学考察。方法 采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱; 流动相为乙腈-水-0.1% 三氟乙酸, 梯度洗脱; 流速为 1 mL·min⁻¹; 柱温 30 °C; 检测波长为 278 nm。大鼠肝微粒体加入双氯芬酸钠孵育 30 min 后, 用盐酸和乙酸乙酯终止反应, 加入内标地西洋, 涡旋后高速离心, 取上层有机相吹干复溶进样检测; 以 Lineweaver-Burk 作图计算 K_m 和 V_{max} 。结果 双氯芬酸、4-羟基双氯芬酸和内标分离良好且无内源性干扰。4-羟基双氯芬酸浓度在 0.05~10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内线性关系良好($r=0.999\ 8$), 定量下限为 0.05 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 日内、日间精密度均<10%, 回收率>75%。动力学考察表明选择盐酸和乙酸乙酯作为终止试剂效果良好, 测得大鼠肝微粒体中双氯芬酸羟化反应的 K_m 为 26.87 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, V_{max} 为 2.359 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ pro。结论 该方法稳定, 结果能准确反映 CYP2C9 酶的活性, 可用于相关动力学研究。

关键词: 高效液相色谱法; 肝微粒体; 双氯芬酸; 4-羟基双氯芬酸; CYP2C9

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2013)12-1311-04

Activity and Pharmacokinetics of CYP2C9 in Rat Liver Microsomes

SHEN Xiuwei¹, WANG Zhe², CHEN Fan¹, WU Mingchai¹, PAN Peipei², HU Guoxin^{2*} (1.Rui'an People's Hospital, Rui'an 325200, China; 2.Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a high performance liquid chromatography method for the determination of the activity of CYP2C9 in rat liver microsomes using diclofenac as probe drug. **METHODS** The analytical column was packed with Agilent ZORBAX SB-C₁₈. The mobile phase was acetonitrile-water-0.1% trifluoroacetic acid using gradient elution and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The UV detection wavelength was 278 nm. The incubation was performed with diclofenac at 37 °C for 30 min, then the reaction was terminated by adding HCl solution and ethyl acetate. Then diazepam solution was added. After vortexing for 2 min, the samples were centrifuged at 13 000 r·min⁻¹ for 5 min. The organic phase was transferred into a clean tube and evaporated under nitrogen stream. The residue was dissolved in 100 μL of mobile phase. Then a 20 μL aliquot of the solution was injected into the HPLC system for analysis. **RESULTS** Diclofenac, 4-hydroxydiclofenac and diazepam were perfectly separated. Excellent liner relationship of 4-hydroxydiclofenac was obtained from 0.05–10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($r=0.999\ 8$). RSD of inter- and intra-day preasion were <10% for diclofenac and 4-hydroxy diclofenac, and the method recoveries were >75%. The HCl and ethylacetate were selected as reagent to terminate the reaction. K_m was 26.87 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and V_{max} was 2.359 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ pro. **CONCLUSION** The method is steady, accurate and suitable for assaying CYP2C9 activity which can be used to evaluate the pharmacokinetics of CYP2C9 in rat liver microsomes.

KEY WORDS: HPLC; liver microsomes; diclofenac; 4-hydroxydiclofenac; CYP2C9

细胞色素 P450, 是药物在体内代谢重要的酶系, 在药物代谢和生物转化过程中起重要作用, 主要存在于肝、肠等器官的细胞内质网内。CYP2C9 约占人肝微粒体的 20%^[1], 包括甲苯磺丁脲在内的降血糖药, 非甾体抗炎药, 香豆素, 苯妥英以及华法林是其底物。当 CYP2C9 酶活性被抑制, 这些治疗窗口较窄的底物, 如苯妥英和华法林, 由于代谢变慢, 使得生物利用度提高, 就会引起严重的不良反应^[2]。因此, 测定 CYP2C9

酶的活性对于探索其在不同药物代谢过程中所发挥的作用具有重要的临床意义。研究表明, 双氯芬酸钠是 CYP2C9 的底物, 广泛地被用于研究体外酶的活性^[3-4]。因此, 本实验以双氯芬酸钠为底物, 考察大鼠 CYP2C9 活性, 测定酶动力学参数。本研究首先建立双氯芬酸及其代谢物同时检测的高效液相色谱法, 在此基础上对大鼠肝微粒体 CYP2C9 酶活性检测条件和动力学参数进行分析, 为 CYP2C9 酶在体内外功能的研究提供参考。

作者简介: 沈秀微, 女, 硕士, 初级药师 Tel: (0577)65866408
Tel: (0577)86689574 E-mail: wzhhgx@yahoo.com.cn

E-mail: wei850916@163.com *通信作者: 胡国新, 男, 教授, 硕导

1 材料与方法

1.1 药品、试剂与仪器

双氯芬酸对照品(批号: 100199-201002)、地西洋对照品(批号: 171225-200302)均购自中国药品生物制品检定所, 纯度均为 99.9%; 4-羟基双氯芬酸对照品(TRC 公司, 批号: 64118-84-9, 纯度: 99.9%); 乙腈为一级色谱纯(天津市四友生物医学技术有限公司, 批号: 030912101); 三氟乙酸(Sigma, 批号: 064K3647, 分析纯)。

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 配置有在线脱气机、四元泵、自动进样器、温控箱、二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司)。AB204-A 电子分析天平(梅特勒-托利多上海仪器公司); XK96-B 涡旋混合器(姜堰市新康医疗器械有限公司); 恒温水浴箱(上海试验仪器总厂)。

1.2 动物

清洁级 SD 大鼠, δ , 体质量(250 ± 10)g, 由温州医学院实验动物中心提供, 实验动物合格证号: SYXR(浙)2010-0158。

1.3 对照品溶液的配制

准确称取双氯芬酸对照品 10 mg 于 100 mL 量瓶中, 用纯净水溶解并定容至 100 mL, 得浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的双氯芬酸对照品储备液。准确称取 4-羟基双氯芬酸钠对照品 1 mg 于 10 mL 量瓶中, 用纯净水溶解并用定容至 10 mL, 得浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 4-羟基双氯芬酸钠对照品储备液。精密称取地西洋对照品 10 mg 置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 充分摇匀, 配成浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的地西洋储备液, 用甲醇稀释成 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的内标溶液。

1.4 肝微粒体制备

采用差速离心法制备肝微粒体^[5]。将大鼠断头处死, 迅速取出肝脏, 用冰冷的生理盐水清洗, 滤纸吸干后称重, 每 10 g 肝脏加入 25 mL 蔗糖 PBS 缓冲液, 在冰浴中充分匀浆。匀浆液 $10\,000 \times g$ 离心 15 min 后, 取上清液再次 $10\,000 \times g$ 离心 15 min, 吸取上清液, $100\,000 \times g$ 离心 90 min; 弃上清液, 沉淀用 10 mL 的 PBS 复溶, 80°C 分装保存, 以上所有操作在低于 4°C 环境中进行。用 BCA 法测定微粒体蛋白含量为 $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.5 肝微粒体体外反应及样品的处理

$300 \mu\text{L}$ 体系中含有肝微粒体 0.15 mg , 底物双氯芬酸钠 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Tris-HCl $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。预孵

育 5 min 后, 加入 NADPH 使终浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以启动反应。孵育 30 min 后, 加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸 $30 \mu\text{L}$ 和冰冷的乙酸乙酯 1 mL 以终止反应, 再加入 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内标地西洋 $50 \mu\text{L}$ 。涡旋 2 min 后, $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液 $900 \mu\text{L}$, 50°C 氮气吹干, $100 \mu\text{L}$ 流动相复溶, $20 \mu\text{L}$ 进样检测。

1.6 色谱条件

色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 保护柱为 SB-C₁₈($4.6 \text{ mm} \times 12.5 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 流动相为乙腈-水-0.1%三氟乙酸体系, 梯度洗脱($0 \sim 6 \text{ min}$, 乙腈 $45\% \rightarrow 50\%$, 水 $35\% \rightarrow 30\%$; $6 \sim 12 \text{ min}$, 乙腈 $50\% \rightarrow 62\%$, 水 $30\% \rightarrow 18\%$); 流速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温为 30°C ; 检测波长为 278 nm 。

1.7 双氯芬酸在大鼠肝微粒体中酶动力学

1.7.1 蛋白浓度的选择 吸取 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 底物(双氯芬酸钠) $30 \mu\text{L}$ 分别加入到含大鼠肝微粒体终浓度为 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 体系中, 每个浓度平行 2 管, 37°C 水浴预孵育 5 min 后加入 NADPH 启动反应, 继续孵育 30 min 后置于碎冰中, 加入乙酸乙酯 1 mL 终止反应。再加入 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的地西洋内标工作液 $50 \mu\text{L}$, 涡旋混匀 2 min 后 $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上层有机相于 50°C 氮气吹干, 流动相 $100 \mu\text{L}$ 复溶, 设定 $20 \mu\text{L}$ 进样。

1.7.2 孵育时间的选择 吸取 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 底物(双氯芬酸钠) $30 \mu\text{L}$ 加入到含大鼠肝微粒体(终浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)体系中, 每个时间点平行 2 管, 37°C 水浴预孵育 5 min 后加入 NADPH, 启动反应, 分别在孵育 15, 30, 60, 90, 120 min 后置于碎冰中, 加入乙酸乙酯 1 mL 终止反应。再加入 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的地西洋内标工作液 $50 \mu\text{L}$, 涡旋混匀 2 min 后 $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取有机相于 50°C 氮气吹干, 流动相 $100 \mu\text{L}$ 复溶, 设定 $20 \mu\text{L}$ 进样。

1.7.3 大鼠肝微粒体 CYP2C9 酶活性 在肝微粒体体系(微粒体终浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)中分别加入双氯芬酸钠对照品液, 使双氯芬酸在孵育体系的浓度分别为 2.5, 5, 10, 25, 50, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 37°C 水浴孵育 30 min, 每个浓度平行 2 管。根据 6 个体系生成代谢产物的量, 求出每个反应体系的速度 V , 以双倒数作图, $1/[S]$ 为 x 轴, $1/V$ 为 y 轴, 拟直线回归, 求 K_m 和 $V_{\max}$ 值。

2 结果

2.1 专属性考察

对照品, 空白肝微粒体体系, 双氯芬酸钠, 4-羟基双氯芬酸钠肝微粒体体系, 加入双氯芬酸钠

的肝微粒体反应后体系经 HPLC 分析测定得到的色谱图见图 1。由图可见, 在本实验条件下, 4-羟基双氯芬酸钠、双氯芬酸钠以及内标的保留时间分别为 4.6, 5.6, 10 min。

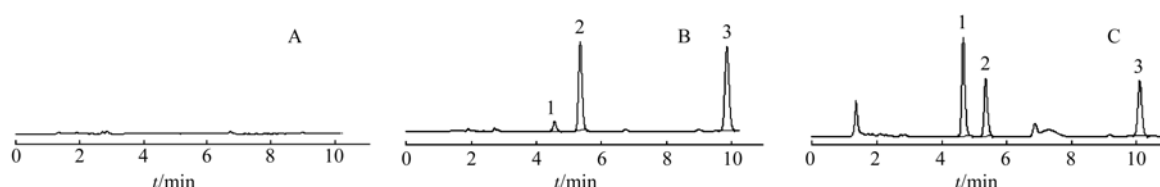


图 1 双氯芬酸及其代谢物 4-羟基双氯芬酸的高效液相色谱图

A-空白肝微粒体; B-肝微粒体+对照品; C-肝微粒体加入双氯芬酸孵育 5 min; 1-4-羟基双氯芬酸; 2-地西洋; 3-双氯芬酸

Fig 1 HPLC chromatograms of diclofenac and 4-hydroxydiclofenac

A-blank liver microsome; B-liver microsome spiked with control; C-liver microsome after incubation 5 min with diclofenac; 1-4-hydroxydiclofenac; 2-diazepam; 3-diclofenac

2.2 标准曲线与检测限

配制 4-羟基双氯芬酸浓度为 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的体系, 加入灭活的微粒体, 按“1.5”项下方法操作, 测定 4-羟基双氯芬酸面积 A_s 、内标峰面积 A_i 。以 4-羟基双氯芬酸对应各点浓度为横坐标(x)绘制 4-羟基双氯芬酸钠的标准曲线。4-羟基双氯芬酸钠的标准曲线回归方程为: $y=0.7562x-0.0257(r=0.9998)$ 。4-羟基双氯芬酸定量下限为 0.05 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 精密度

配制低、中、高 3 种浓度(0.10, 1.00, 8.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的 4-羟基双氯芬酸微粒体对照品溶液, 每一个浓度 6 份, 于同 1 d 内测定计算日内精密度, 连续 3 d 测定计算日间精密度, 结果见表 1。

2.4 提取回收率

配制 4-羟基双氯芬酸钠低、中、高 3 种浓度(浓度为 0.10, 1.00, 8.00 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的微粒体体系(微粒体灭活), 每种浓度 6 份, 处理后检测, 记录 4-羟基双氯芬酸钠的峰面积, 为微粒体体系的峰面积。另取 2 mL EP 管 6 支, 2 个 1 组; 每组配制成终浓度与低、中、高 3 种浓度(浓度为 0.1, 1, 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)相同的对照品溶液, 20 μL 进样检测; 记录不同浓度对应 4-羟基双氯芬酸钠的峰面积, 为纯标的峰面积。结果见表 1。

2.5 稳定性试验

微粒体样品经处理后 12 h 后进行检测, 4-羟基双氯芬酸钠的低、中、高 3 个浓度的 RSD 分别为 3.82%, 6.52%, 2.86%。结果显示代谢产物的微粒体样品经过处理后, 在 12 h 内有良好的稳定性。

表 1 4-羟基双氯芬酸的精密度和回收率结果(n=6)

Tab 1 Precisions and recoveries of 4-hydroxydiclofenac in rat microsome incubations(n=6)

浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	日内精密度 RSD /%	日间精密度 RSD /%	提取回 收率/%
0.10	3.22	3.52	76.21±5.63
1.00	2.56	2.26	82.08±6.83
8.00	2.69	2.29	80.91±3.99

2.6 CYP2C9 酶活性研究结果

2.6.1 微粒体蛋白浓度 微粒体蛋白浓度在 0.1~0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内与生成 4-羟基双氯芬酸钠的浓度呈线性关系, 在该浓度范围内的大鼠肝微粒体, 可以用于动力学分析, 结果见图 2。

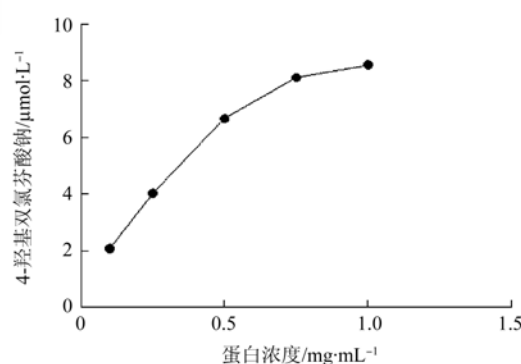


图 2 蛋白浓度与反应生成的羟基双氯芬酸钠曲线

Fig 2 Plot of protein concentration vs 4-hydroxydiclofenac concentration

2.6.2 孵育时间 在 30 min 内, 孵育时间与生成 4-羟基双氯芬酸钠的浓度呈线性关系, 结果见图 3。

2.6.3 肝微粒体 CYP2C9 酶活性 根据 6 个体系生成代谢产物的量, 求出每个反应体系的速度 V ,

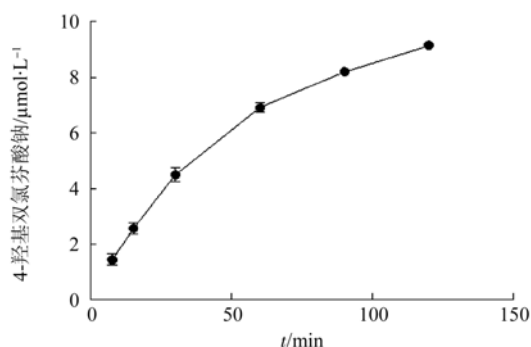


图3 孵育时间与羟基双氯芬酸钠浓度变化曲线

Fig 3 Plot of reaction time vs 4-hydroxydiclofenac concentration

V 等于代谢产物生成的量除以反应时间以及除以微粒体蛋白的质量,以双倒数作图, $1/[S]$ 为 x 轴, $1/V$ 为 y 轴,拟直线回归, $y=11.394x+0.4239$, $r=0.9997$, 求出 $K_m=26.87 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $V_{\max}=2.359 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ pro}$ 。结果见图 4。

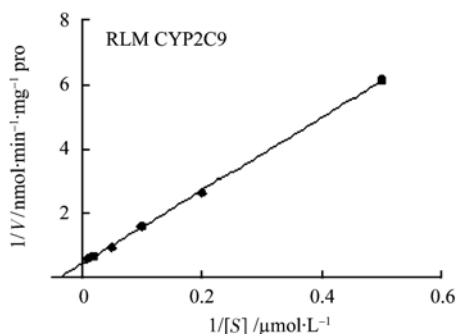


图4 羟基双氯芬酸在不同浓度双氯芬酸钠(2.5~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)下经过大鼠肝微粒体的 CYP2C9 的生成速率

Fig 4 Formation rates of 4-hydroxydiclofenac by CYP2C9 in rat liver microsome under different concentration of diclofenac from 2.5 to 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

3 讨论

双氯芬酸的极性较弱,在反相色谱柱中有较长的保留时间;双氯芬酸经 CYP2C9 介导的 4-羟化代谢后,代谢产物 4-羟基双氯芬酸的极性变大,出峰提前;在等度流动相条件下,两者的保留时间相差较长。本研究采用分段梯度洗脱的方法,在 0~6 min,乙腈比例增加较慢,以保证 4-羟基双氯芬酸和内标的分离,在 6~12 min,乙腈比例增加较快,使双氯芬酸较快出峰。在该条件下,4-羟基双氯芬酸、内标和双氯芬酸三者之间分离良

好,且排除了内源性物质干扰。

在体外微粒体试验中,使用的终止试剂有高氯酸、三氯醋酸、甲醇或乙腈^[6-7]。甲醇和乙腈虽然能很好地终止反应,且在这 2 种检测方法中都不干扰待测物质,但甲醇或乙腈沉淀剂作终止试剂由于稀释作用,使得检测限达不到实验的要求。乙酸乙酯在酸化的条件下也能很好地终止反应,且萃取率高,通过浓缩提高了检测限,故本研究采用乙酸乙酯作为终止试剂。

酶动力学中,代谢产物生成速率与微粒体蛋白浓度和孵育时间呈一定的线性关系。因此在 CYP 酶的蛋白浓度以及孵育时间考察后,选择 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的蛋白浓度,30 min 的反应时间为孵育条件。

本实验采用 HPLC-UV 法,选用双氯芬酸为探针,对大鼠肝微粒体 CYP2C9 酶活性进行测定,系统地考察了酶活性的测定条件和酶动力参数。该方法样品处理简单,分析时间较短,适合体外 CYP2C9 酶活性研究及酶抑制剂的筛选实验。

REFERENCES

- [1] EMOTO C, MURASE S, IWASAKI K. Approach to the prediction of the contribution of major cytochrome P450 enzymes to drug metabolism in the early drug-discovery stage [J]. *Xenobiotica*, 2006, 36(8): 671-683.
- [2] SUVARNA R, PIRMOHAMED M, HENDERSON L. Possible interaction between warfarin and cranberry juice [J]. *BMJ*, 2003, 327(7429): 1454.
- [3] YUAN R, MADANI S, WEI X X, et al. Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study *in vitro* drug interactions [J]. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30(12): 1311-1319.
- [4] LI S Q, ZHANG S Y, LIANG B W. Rapid determination of cytochrome P450 2C9 activity with diclofenac probe using high-performance liquid chromatography [J]. *Pharm J Chin PLA(解放军药学报)*, 2009, 25(3): 227-230.
- [5] JIN K T, WANG Y G, XU P, et al. HPLC progress determination microsome cytochrome P450 activity of rat liver [J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2006, 26(3): 415-419.
- [6] ZHANG Y H, YU C, GUO Y L, et al. HPLC determination of activity of CYP1A2 and its pharmacokinetics in rat liver microsomes [J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2012, 32(2): 189-193.
- [7] QIU X J, WANG Z, XU T, et al. Determination of the activity of CYP3A in rat liver microsomes by HPLC [J]. *Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志)*, 2012, 28(11): 852-853, 856.

收稿日期: 2013-03-13