

SAM 肝细胞色素 P450 3A 对衰老的作用

刘 卉¹ 陈俊抛¹ 平井圭一²

¹第一军医大学珠江医院神经内科 广州 510282 ²金泽医科大学解剖学第一讲座 日本国

摘要 大鼠肝细胞色素 P450 含量与年龄相关的变化是由特异的细胞色素 P450 酶引起的。探讨衰老与细胞色素 P450 3A (CYP3A) 的活性是否有关,本文用红霉素 N-脱甲基酶活性测定法分别检测了 SAM-R₁、SAM-P₁ 和 SAM-P₈ 三组衰老加速鼠 (SAM) 中肝微粒体细胞色素 P450 3A 的活性,每组动物分为 7wk、13wk、36wk 组。结果发现 SAM-P₁ 和 SAM-P₈ 组中随年龄增长,CYP3A 的活性均降低。13wk 时,SAM-P₁ 组 CYP3A 活性下降 39.5% ($t=2.525, P<0.05$);SAM-P₈ 组 CYP3A 活性下降约 43.7% ($t=2.24, P<0.05$),36wk 与 13wk 组相比,SAM-P₁ 组 CYP3A 活性下降约 71.3% ($t=2.84, P<0.02$),SAM-P₈ 组中降低约 62.9% ($t=3.21, P<0.01$),SAM-R₁ 组中 7 至 13wk 时降低约 13.6%,13wk 至 36wk 降低约 38.2%, $t=2.37, P<0.05$ 。提示细胞色素 P450 3A 对衰老有重要影响作用。

关键词 细胞色素 P450 3A;衰老加速鼠;衰老

EFFECT OF AGING ON THE ACTIVITY OF CYP3A IN THE SENESCENCE-ACCELERATED MOUSE(SAM) LIVERS

Liu Hui¹, Chen Jun Pao¹, Kei Ichi Hirai²

¹Department of Neurology, Zhujiang Hospital, Guangzhou 510282, ²Department of Anatomy, Kanazawa medical University, Kanazawa, Japan

Abstract Aging-related changes have been evaluated in hepatic cytochrome P450 content in rats by specific cytochrome P450 enzymes. To determine whether senescence is concerned with CYP3A activity, the activities of the SAM hepatic cytochrome P450 3A (CYP3A) were quantified in vitro as erythromycin N-demethylation in microsomes prepared from SAM-R₁, SAM-P₁ and SAM-P₈, respectively, at 7, 13 and 36 weeks of age in every animal group. We found CYP3A activity was decreased with advancing age in SAM-P₁ and SAM-P₈. At 13 weeks of age, CYP3A activity was about 39.5% lower ($t=2.525, P<0.05$) in SAM-P₁ and about 43.7% lower ($t=2.24, P<0.05$) in SAM-P₈. Compared with 36 to 13 weeks of age these two groups, CYP3A activity was decreased approximately 71.3% ($t=2.84, P<0.02$) in SAM-P₁ and 62.9% ($t=3.21, P<0.01$) in SAM-P₈. It was no significant differences from 7 to 13 weeks of age in SAM-R₁, but from 13 to 36 weeks of age, it was decreased about 38.2% ($t=2.37, P<0.05$). Taken together, the data suggest that CYP3A takes very important effect to senescence.

Key Words Cytochrome P450 3A (CYP3A); Senescence-accelerated mouse (SAM); Senescence

衰老加速(型)鼠 (senescence-accelerated mouse, SAM) 是一种加速衰老的白鼠模型,是由日本 Takeda 等人成功研究制作。它包括衰老加速倾向型 (senescence-accelerated prone mouse, SAM-P) 和衰老加速抵抗型 (senescence-accelerated resistant mouse, SAM-R),后者显示正常年龄组特点。SAM-P 由 SAM-P₁、SAM-P₂、SAM-P₃、SAM-P₆、SAM-P₇、SAM-P₈、SAM-

P₉、SAM-P₁₀及 SAM-P₁₁组成;SAM-R 则由 SAM-R₁、SAM-R₄ 及 SAM-R₅ 组成。从幸存者、生长率及 Gompertzian 作用的结果来看,SAM-P 被认为是加速衰老的年龄模型⁽¹⁾。

细胞色素 P450 是肝脏混合功能氧化酶系 (MFO) 的主要成份,在内源性和外源性化合物的生物转化中起重要作用。大量研究已表明,随着年龄增

长,大鼠中肝微粒体细胞色素 P450 的含量减少⁽²⁾。药物动力学研究证实,某些药物如红霉素,由细胞色素 P450 3A(CYP3A)同工酶在氧化代谢中引起的红霉素清除率随年龄增长而减少⁽³⁾,提示 CYP3A 的活性随年龄的增长而降低⁽⁴⁾。本文主要目的是通过分别测定细胞色素 P450 3A 在 SAM-R₁、SAM-P₁ 及 SAM-P₈ 肝微粒体中的活性,证实 SAM 肝细胞色素 P450 3A 的活性是否随年龄的增长而降低,探讨其对衰老的作用。

材料与方法

1 材料:实验动物为衰老加速鼠(SAM),雄性,体重 100~150 克,实验分 SAM-R₁、SAM-P₁ 和 SAM-P₈ 三组,每组动物又分别分为存活期 7wk、13wk 和 36wk 组。SAM-R₁ 组中 7wk 鼠 5 只,13wk 6 只,36wk 8 只;SAM-P₁ 组中 7wk、13wk 和 36wk 鼠分别为 5、5 和 8 只;SAM-P₈ 组中各为 4、5 和 7 只。动物均由日本京都大学胸部疾病研究所老化生物学教室提供。红霉素和 NADPH 为日本和光纯药业株式会社提供。

2 方法

2.1 肝微粒体制备⁽⁵⁾:上述各组动物禁食 24h 后断头处死,取出肝脏,放入试管内置于冰上。加 4 倍于肝重的 0.25M 蔗糖溶液制备匀浆,经 1000g 离心 10min,4℃。将上清液收集于另一试管内置于冰上,在上述沉淀中再加入 4 倍肝重的 0.25mol 蔗糖溶液搅拌均匀,同样离心速度、时间及条件制得上清液,收集两次上清液于 4℃ 12000g 离心 15min,再取上清液于 400000g 离心 65min。取沉淀物用 0.15mol KCl 溶液制成匀浆,经 400000g 于 4℃ 离心 65min,所得微粒体用新鲜配制 0.1mol Tris-HCl 缓冲液(pH7.4)稀释,Lorry 法⁽⁶⁾测定蛋白浓度。

2.2 肝微粒体细胞色素 P450 3A 活性测定

用新鲜配制的 0.1mol Tris-HCl 缓冲液(pH7.4)稀释肝微粒体,使蛋白终浓度为 0.7~1.0mg/ml,如此分别制备相同 2 份,取名为 A、B 两组。分别于 A、B 组中加入新鲜配制的 0.1mol 红霉素及 0.1mol 半尿素盐酸盐,使最终浓度分别为 1mmol 及 1.25mmol,再用 A 组中加入新鲜配制的 0.1mmol NADPH,最终浓度为 1mmol;加 10%三氯乙酸 100μl 中止 B 组反应后再加 0.1mol NADPH,最终浓度亦为 1mmol,立即摇匀,同时配制作为标准曲线的 C 组,分别配制浓度为 0.5mmol、1.0mmol 及 2.0mmol HCHO 液,取 10⁴ 倍稀释后的 HCHO 液各为 3μl、6μl、12μl,分别加入

0.1mol 半尿素盐酸盐 10μl,10%三氯乙酸 333μl 及 0.1mol Tris-HCl 缓冲液各为 654μl、651μl、645μl,使三个试管总量各为 1.0ml。A、B、C 三组充分摇匀置室温 30min 后,A 组加 10%三氯乙酸 100μl 中止反应,立即摇匀,A、B、C 组全部 2500r/min 离心 10min 以沉淀蛋白。取上清液 200μl,按 Nash⁽⁷⁾法测定代谢产物甲醛生成量。再根据标准曲线求出肝微粒体细胞色素 P450 3A 的活性(μmol/min/mg)。

结果

在 SAM-R₁、SAM-P₁ 及 SAM-P₈ 组中肝微粒体细胞色素 P450 3A 活性的年龄变化见表 1 和图 1。

表 1 SAM 肝微粒体中 CYP 3A 活性的年龄变化

年龄 (周)	CYP 3A 活性 (μmol/min/mg)		
	SAM-R ₁	SAM-P ₁	SAM-P ₈
7	0.3422 ± 0.020 (5)	0.2974 ± 0.084 (5)	0.2392 ± 0.058 (4)
13	0.2955 ± 0.054 (6)	0.1800 ± 0.061 (5)	0.1346 ± 0.018 (5)
36	0.1825 ± 0.039 (8)	0.0516 ± 0.021 (8)	0.0499 ± 0.015 (7)

$\bar{x} \pm s, n = ()$

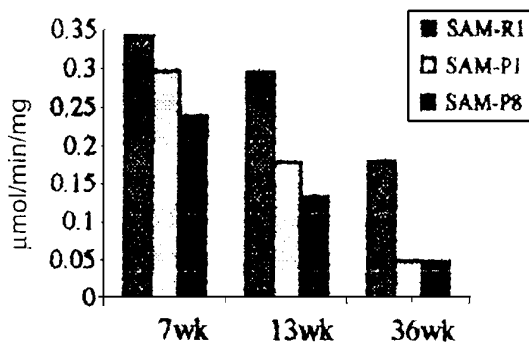


图 1 SAM 肝微粒体中 CYP 3A 活性年龄变化的比较

从表 1 和图 1 中可见,随年龄增长,CYP3A 活性分别于 SAM-P₁ 和 SAM-P₈ 组中均有明显降低。在 SAM-P₁ 组中发现,CYP3A 活性在 13wk 时下降约 39.5%,经 *t* 检验, $t = 2.525, P < 0.05$,13wk 至 36wk 下降约 71.3%, $t = 2.84, P < 0.02$; SAM-P₈ 组 CYP3A 活性在 13wk 时下降约 43.7%, $t = 2.24, P < 0.05$,13wk 至 36wk 时下降约 62.9%, $t = 3.21, P < 0.01$; SAM-R₁ 组 CYP3A 活性则亦在 13wk 时降低约 13.6%,13wk 至 36wk 降低约 38.2%, $t = 2.37, P < 0.05$ 。

讨论

细胞色素 P450 3A 是 Selye 等 1971 年发现的一种细胞色素 P450 亚族⁽⁸⁾, 目前至少已发现有 6 个不同的个体基因。该酶具有大环内脂类抗生素的脱甲基酶活性⁽⁹⁾, 与这类抗生素的代谢及其药理、药效作用关系密切, 肝中药物的清除率可随年龄增加而降低^(10,11)。其中红霉素是肝 CYP3A 特异的酶解物^(12,13), 它在肝中的清除率随年龄增加而降低⁽³⁾。Watkins⁽¹¹⁾ 等人近年研究表明, 服用 [¹⁴C - 红霉素后测定呼出的¹⁴CO₂ 含量的方法是对测量肝免疫反应 CYP3A 的含量及肝微粒体中的红霉素 N - 脱甲基酶活性的一种特异的且又可再生的非侵害性的测量方法。新的 CYP3A 非侵害试验有力说明了红霉素 N - 脱甲基酶作用是由独特的 CYP3A 同工酶完成的⁽¹⁴⁾。已有研究表明大鼠的年龄对外源生物代谢的影响集中于肝微粒体中酶的含量及其活性与年龄有关变化方面的研究^(2,15-16), 肝微粒体的细胞色素 P450 含量降低⁽²⁾ 或不变⁽¹⁵⁾ 已有报导。Leakey 等报道, 对比 2 个月大的年轻成鼠, 在衰老的 22 个月雄性 fischer 鼠中, 肝微粒体细胞色素 P450 选择性同工酶中有的活性降低(如 2B₁, 2B₂, 2C₁₁ 及 2E₁), 也有的活性增高(如 2A₁, 睾酮 5 - 还原酶)⁽¹⁶⁾。与此相反, 有关年龄对混合功能氧化率的影响作用在大鼠肝中的研究资料是有限的。与年轻雄性 fischer 鼠相比, 衰老雄性 fischer 鼠孤立肝细胞中可见 p - 硝基茴香醚的 O - 脱甲基作用降低 41 %⁽¹⁷⁾, 其原因可能是由于 NADPH 供应量变化所致。近年研究表明, 衰老成鼠中肝微粒体蛋白的产量比年轻成鼠降低约 10 %, 这与其它一些关于在雄鼠中肝微粒体细胞色素 P450 的含量随着年龄增长而降低的报道一致⁽¹⁸⁾。

本实验研究证实, 在 SAM-R₁、SAM-P₁ 和 SAM-P₈ 中, CYP3A 的活性均随着年龄增长而降低, 这与本文前面提到的药物动力学研究结果是一致的⁽³⁾, 其中在 SAM-P₁ 和 SAM-P₈ 中降低显著, 这与 SAM-P₁ 和 SAM-P₈ 是具有加速衰老的特征, 而 SAM-R₁ 是具有正常年龄的特点相符合⁽¹⁾。目前认为衰老加速鼠(SAM)是研究有关年龄影响作用、衰老机制及其防治的一种确实有效的动物模型。本实验提示 CYP3A 对衰老有重要影响作用, 这一发现对今后深入研究有关衰老的机理和防治均有一定参考价值。

参考文献

1 Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, et al. A new murine model of

- accelerated senescence. *Mech Ageing Dev*, 1981;17(1):183
- 2 Schmucker DL and Wang RK. Age-related changes in liver drug metabolizing enzymes. *Exp Gerontol*, 1980;15(2):321
- 3 Mignoli A, Pivetta P, Strazzabosco M, et al. Effect of age on single and multiple-dose pharmacokinetics of erythromycin. *Enr J Clin Pharmacol*, 1990;39(1):161
- 4 Hunt CM, Westerkam WR, et al. Effect of age and gender on the activity of human hepatic CYP3A. *Biochem Phar*, 1992;44(2):275
- 5 Burke MD, Thompson S, Elcombe CR, et al. Ethoxy-pentoxo- and benzyloxy phenoxaxones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P450. *Biochem Pharm*, 1985;34(18):3337
- 6 Lorry OH. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951;193(2):265
- 7 Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the hantzsch reaction. *Biochim J*, 1953;55(2):416
- 8 Selye H. Hormones and resistance. *J Pharm Sci*, 1971;60(1):1
- 9 Danan G, Descatoire V, Fessayre D, et al. Self-induction by erythromycin of its own transformation into a metabolite forming an inactive complex with reduced cytochrome P450. *J Pharm Exp Ther*, 1981;218(2):509
- 10 Bach B, Hansen JM, Kampmann JP, et al. Disposition of antipyrine and phenytoin correlated with age and liver volume in man. *Clin Pharmacokinetics*, 1981;6:389
- 11 Greenblatt DJ, Sellers EM, Shader RI. Drug disposition in old age. *N Engl J Med*, 1982;306:1081
- 12 Maurel P, Watkins PB, Wrighton SA, et al. Identification of an inducible form of cytochrome P-450 in human liver. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985;82:6310
- 13 Watkins P, Murray SA, Winkelman LG, et al. The erythromycin breath test as an assay of glucocorticoid-inducible liver cytochromes P450. *J Clin Invest*, 1989;83(4):688
- 14 Hunt CM, Watkins PB, Saenger P, et al. Heterogeneity of CYP3A isoforms metabolizing erythromycin and cortisol. *Clin Pharmacol Ther*, 1992;51(1):18
- 15 Schmucker DL and Wang RK. Effects of aging and phenobarbital on the rat liver microsomal drug-metabolizing system. *Mech Ageing Dev*, 1981;15:189
- 16 Leakey JEA, Cunney HC, Bazare J JR, et al. Effects of aging and caloric restriction on hepatic drug metabolizing enzymes in the Fischer 344 rat. I: The cytochrome P450 dependent monooxygenase system. *Mech Ageing Dev*, 1989;48(1):145
- 17 Swee DJ and Weiner M. Effect of aging on the metabolism of p-nitroanisole and p-nitrophenol in isolated rat hepatocytes. *Age*, 1986;9:95
- 18 Kamataki T, Maeda K, Shimada M, et al. Age-related alteration in the activities of drug-metabolizing enzymes and contents of sex-specific forms of cytochrome P450 in liver microsomes from male and female rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 1985;233:222

(1999 - 03 - 17 收稿;1999 - 05 - 10 修回)