

53: 81.  
5. Lloyd JB. Cell physiology of the rat visceral yolk sac: a study of pinocytosis and lysosome function. *Teratology*, 1990; 41:  
6. 李勇, 吴德生. 啮齿类动物 VYS 体外培养技术及在胚胎

学和畸胎学研究中的应用 (I). 现代预防医学, 1994; 21 (4): 244  
7. 李勇, 吴德生. 啮齿类动物 VYS 体外培养技术及在胚胎学和畸胎学研究中的应用 (II). 现代预防医学, 1995; 22 (1): 58

## 大鼠肝细胞色素 P450 3A 的性别差异

宣贵达 朱心强 郑一凡 黄幸纾

浙江医科大学 杭州 310006

**摘要** 用红霉素 N—脱甲基酶活性测定法检测了正常 SD 大鼠和经苯巴比妥 (PB) 或地塞米松 (DEX) 诱导后大鼠肝微粒体细胞色素 P450 3A 的活性。结果发现雌雄之间均存在性别差异, 未诱导的雄鼠 P450 3A 活性是雌鼠的 3.7 倍。经 PB 或 DEX 诱导后, 雌雄之间的差异缩小到 1.5—2 倍。其原因主要是对雌鼠的诱导倍数明显大于对雄鼠的诱导倍数。

**关键词** 细胞色素 P450 3A; 性别差异; 酶诱导

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。它具有高度的多态性和复杂的种属及个体差异, 这在药理学和毒理学研究中都具有重要意义。我们曾发现一种混配农药对大鼠的急性毒性存在明显的性别差异, 雌雄大鼠经口 LD<sub>50</sub> 差 6—7 倍, 提示参与该农药代谢解毒的酶类在雌雄大鼠体内存在差异。通过对细胞色素 P450 不同亚族的选择性诱导和抑制, 推测出主要解毒酶为 P450 3A 亚族<sup>(2)</sup>。本文的目的是证实大鼠肝细胞色素 P450 3A 存在性别差异, 并观察 P450 3A 对常见诱导剂的反应是否也有性别差异。

### 材料和方法

#### 1. 材料

实验动物为 Sprague-Dawley 大鼠, 体重 200—220g, 由浙江医科大学实验动物中

心提供。苯巴比妥 (PB) 为国产分析纯试剂, 地塞米松 (DEX) 由浙江医科大学药厂生产, 红霉素和 NADPH 为 Sigma 公司进口。

#### 2. 方法

2.1 细胞色素 P450 的诱导: PB 80mg/kg 腹腔注射, 连续诱导 4d。DEX 100mg/kg 灌胃, 连续诱导 3d。

2.2 肝微粒体制备<sup>(2)</sup>: 正常动物和经上述诱导的动物禁食 16h 后断头处死, 取出肝脏, 加 4 倍肝重的 0.25M 蔗糖溶液制备匀浆, 经 9000g 离心 15min, 取上清液于 19000g 再离心 15min, 再取上清液于 100000g 离心 55min。取沉淀物, 用 0.15M KCl 制成匀浆, 于 100000g 离心 40min, 所得微粒体用新鲜配制的 50mM Tris-蔗糖缓冲液 (pH 7.4) 稀释, Lorry 法<sup>(3)</sup>测蛋白浓度。

2.3 红霉素 N—脱甲基酶活性测定: 用新鲜配制的红霉素 stock buffer 液稀释微粒体, 使蛋白终浓度为 2mg/ml 左右, 红霉素浓度

为  $1\mu\text{mol/L}$ 。取试管 5 支, 每支加入上述混悬液  $1\text{ml}$ , 在  $37^\circ\text{C}$  下预孵育  $5\text{min}$ , 加 NADPH (终浓度为  $1\text{mM}$ ) 于试管中启动反应, 并记时。分别于 2, 4, 6, 8,  $10\text{min}$  后加  $1.0\text{ml}$   $15\%$  三氯乙酸中止反应, 立即摇匀,  $3000\text{r/min}$  离心  $10\text{min}$  以沉淀蛋白。取上清液  $1.5\text{ml}$ , 按 Nash 法<sup>(4)</sup> 测定代谢产物甲醛生成量。再根据标准曲线求出红霉素 N—脱甲基酶比催化活性 ( $\text{nmol/min/mg}$ )。

## 结果

不同性别大鼠未诱导组和经 PB 或 DEX 诱导后红霉素 N—脱甲基酶比活性见附表。正常成年雌雄大鼠之间存在性别差异, 雄鼠是雌鼠的 3.7 倍。经 PB 和 DEX 诱导后, 雌雄大鼠体内该酶活性均增加, 雌鼠分别增加了 11.7 倍和 12.8 倍, 雄鼠分别为 5.0 和 6.7 倍。不论 PB 还是 DEX, 对雌鼠的诱导倍数均大于雄鼠的诱导倍数。

表 1. 雌雄大鼠红霉素 N—脱甲基酶比活性的差异

诱导剂	酶活性 ( $\text{nmol/min/mg}$ )	
	雌	雄
对照	$0.21 \pm 0.02$	$0.78 \pm 0.03$
PB	$2.46 \pm 0.18$	$3.89 \pm 0.24$
DEX	$2.68 \pm 0.21$	$5.23 \pm 0.48$

$n = 4, \bar{x} \pm s$

## 讨论

细胞色素 P450 3A 是 Selye 1971 年新发现的一种细胞色素 P450 亚族<sup>(5)</sup>, 目前至少已经发现有 6 个不同的个体基因。该酶可被多种诱导剂诱导, 除苯巴比妥外, 孕烯醇酮— $16\alpha$  蒴 (PCN) 和地塞米松也是其选择性诱导剂。P450 3A 是甾体激素如睾酮等主要的  $6\beta$  羟化酶<sup>(6)</sup>, 在性激素的生物合成、代谢转化中起重要的作用。该酶还具有大环内脂类抗生素的脱甲基酶活性<sup>(7)</sup>, 与这类抗生素的代谢及其药理、药效作用关系密切。近年来有报道

认为 P450 3A 参与多种外源性化合物, 其中包括致癌物的代谢转化<sup>(8,9)</sup>, 因此, P450 3A 在毒理学中的意义逐渐得到认识。有报道 P450 3A 存在种属差异<sup>(10)</sup>。最近又有人发现 P450 3A 还可能存在着性别差异<sup>(11,12)</sup>。Anderson 等<sup>(12)</sup> 在研究 SD 大鼠对 Taxol 的代谢过程中发现, 雄鼠的代谢能力是雌鼠的 2—3 倍。提示雄鼠肝内 P450 3A 的活性可能比雌鼠高。作者还发现, 用 DEX 诱导后, 雌鼠对 Taxol 的代谢能力提高了 6.5 倍, 而雄鼠只提高 2.6 倍。

我们的研究结果与 Anderson 的报道非常相似。如上表所示, 未经诱导的 SD 成年大鼠肝细胞色素 P450 3A 活性存在明显的性别差异, 雄鼠是雌鼠的 3.7 倍。而经 PB 或 DEX 诱导后, 这种差异缩小到 1.5~2 倍。主要原因是这些诱导剂对雌鼠的诱导倍数明显大于对雄鼠的诱导倍数。这与我们对本文前面提到的混配农药急性毒性研究的结果<sup>(1)</sup> 也是一致的。未经诱导前, 雌雄  $\text{LD}_{50}$  差 6.3 倍 (雌雄分别为  $50.1$  和  $316\text{mg/kg}$ )。而经 PB 诱导后, 这种差异减少到 1.9 倍 (雌雄分别为  $681$  和  $1260\text{mg/kg}$ )。

本研究的结果证实了大鼠肝细胞色素 P450 3A 存在着性别差异, 而且它们对诱导剂的反应也有差异。这不仅可以解释引起上述农药大鼠急性毒性性别差异的原因, 而且对今后有关的药物和毒物代谢研究均有参考价值。

## 参考文献

- 1 朱心强, 宣贵达, 郑一凡, 等. 用细胞色素 P450 亚族的选择性诱导和抑制剂推测一种混配农药的代谢解毒酶. 卫生毒理学杂志 (待发表).
- 2 Burke MD, Thompson S, Elcombe CR, et al. Ethoxy-pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P450. *Biochem Pharm*, 1985; 34(18): 3337-3345.
- 3 Lorry OH, et al. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193: 265-275.
- 4 Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by

- means of the hantzsch reaction *Biochem J*, 1953; 55: 416 - 421.
5. Selye H. Hormones and resistance *J Pharm Sci*, 1971; 60 (1): 1- 28
  6. Graves PE, Kaminsky LS, Halpert J. Evidence for functional and structural multiplicity of pregnenolone- 16 $\alpha$ - carbonitrile- inducible cytochrome P450 isozymes in rat liver microsomes *Biochemistry*, 1987; 26(13): 3887- 3894
  7. Danan G, Descatone V, perssagre D. 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- 514
  8. Lee HS, Jin CB, Chong HS, et al Involvement of P450 3A in the metabolism of 7, 8- benzoflavone by human liver microsomes *Xenobiotica*, 1994; 24 (11): 1053 - 1062
  9. Mani C, Pearce R, Parkinson A, et al Involvement of cytochrome P450 3A in catalysis of tamoxifen activation and covalent binding to rat and human liver microsomes *Carcinogenesis*, 1994; 15 (12): 2715- 2720
  10. Chung WG, Buhler DR. The effect of spironolactone treatment on the cytochrome P450 - mediated metabolism of the pyrrolizidine alkaloid senecionine by hepatic microsomes from rats and guinea pigs *Toxicol Appl Pharmacol*, 1994; 127(2): 314- 319.
  11. Niwa T, Kancko H, Naritomi Y, et al Species and sex differences of testosterone and nifedipine oxidation in liver microsomes of rat, dog and monkey. *Xenobiotica*, 1995; 25(10): 1041- 1049.
  12. Anderson CD, Wang J, Kumar CN, et al Dexamethasone induction of taxol metabolism in the rat *Drug Metab Dispos*, 1995; 23(11): 1286- 1290

## 环磷酰胺对小鼠无致畸作用剂量研究

张清林<sup>1</sup> 王郑选<sup>2</sup> 王爱平<sup>1</sup> 王治乔<sup>1</sup>

<sup>1</sup>军事医学科学院毒物药物研究所 北京 100850 <sup>2</sup>福建中医学院生物学教研室 福州 350000

**摘要** 环磷酰胺(cyclophosphamide, CP)分成 1.5, 3 和 6mg/kg 体重三个剂量组,同时设生理盐水对照。小鼠妊娠 d5- 15 皮下注射给药,每天 1 次。实验组及对照组给药体积均为 0.15ml/10g 体重。结果表明,6mg/kg CP 对母鼠和胚胎有明显的毒性,可诱发胎鼠明显的外观、骨骼和内脏畸形。3mg/kg 对胎鼠有一定的胚胎毒性和致畸胎作用。CP 对小鼠的无致畸作用剂量为 1.5mg/kg 体重以下。

**关键词** 环磷酰胺; 致畸性

环磷酰胺(cyclophosphamide, CP)是已知的致畸剂,常用于致畸胎实验的阳性对照物。已知在小鼠妊娠 d10- 12 连续肌注 10mg/kg/d,或在妊娠 d10 一次性肌注 20mg/kg 体重,胎鼠可产生明显的外观和骨骼畸形<sup>(1)</sup>。为探讨 CP 无致畸作用剂量,我们用上海种小鼠进行了研究。

### 材料和方法

— 52 —

1. 受试物 环磷酰胺,上海第十二制药厂生产,批号: 940602。
2. 溶剂 用注射用水配制成原液,用生理盐水作为稀释液。
3. 配制方法 在 200ml CP 玻璃瓶中加入 10ml 注射用水,配制成 20mg/ml 的原液,贮存于 4℃ 冰箱中。临用前用生理盐水稀释成 0.1, 0.2 和 0.4mg/ml 三种使用浓度。
4. 对照 溶剂对照组给等体积的生理盐水。