

五味子醇甲在大鼠肝微粒体内的代谢动力学和性别差异

许美娟^{1,2}, 王广基^{2*}, 谢海棠³, 黄青², 贾元威²

(1. 江苏省中医院 临床药理科, 江苏 南京 210029;

2. 中国药科大学 药物代谢动力学重点实验室, 江苏 南京 210009; 3. 皖南医学院 弋矶山医院, 安徽 芜湖 241001)

摘要: 体外研究五味子醇甲 (schizandrin, SZ) 在大鼠肝微粒体内的代谢动力学和性别差异。制备正常雌、雄大鼠肝微粒体, 与 SZ 共同温孵, 以高效液相色谱法测定 SZ 及其代谢产物。SZ 在雄鼠肝微粒体内代谢反应的最大速率 V_{max} 、米氏常数 K_m 和清除率 Cl_{int} 分别为 $(21.88 \pm 2.30) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} (\text{protein})$, $(389.00 \pm 46.26) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(0.0563 \pm 0.0007) \text{min} \cdot \text{mg}^{-1} (\text{protein})$; 在雌鼠肝微粒体内代谢反应的最大速率 V_{max} 、米氏常数 K_m 和清除率 Cl_{int} 分别为 $(0.61 \pm 0.07) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} (\text{protein})$, $(72.64 \pm 13.61) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(0.0084 \pm 0.0008) \text{min} \cdot \text{mg}^{-1} (\text{protein})$ 。雌、雄鼠肝微粒体内 SZ 的主要代谢物不同, 分别为 7,8-顺二羟基五味子醇甲 (M1) 和 7,8-顺二羟基-2-去甲基五味子醇甲 (M2b)。酮康唑、奎尼丁和奥芬得林对 SZ 在雌、雄大鼠肝微粒体内代谢均有不同程度的抑制作用, 西咪替丁对其在雄鼠肝微粒体内的代谢也有一定的抑制作用。SZ 在雌、雄大鼠肝微粒体中代谢动力学及代谢产物存在明显的性别差异, 这种差异可能主要是由 CYP3A 和 CYP2C11 在大鼠肝微粒体内的性别差异引起的。

关键词: 五味子醇甲; 代谢; 性别差异; 细胞色素 P450; 肝微粒体

中图分类号: R917; R969.1 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)07 - 0730 - 05

Enzyme kinetics of schizandrin metabolism and sex differences in rat liver microsomes

XU Mei-juan^{1,2}, WANG Guang-ji^{2*}, XIE Hai-tang³, HUANG Qing², JIA Yuan-wei²

(1. Department of Clinical Pharmacology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. Key Lab of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 3. Yijsan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China)

Abstract: To study the enzyme kinetics of schizandrin metabolism in different gender in rat liver microsomes, liver microsomes were prepared from male or female rats. Schizandrin was incubated with rat liver microsomes. Schizandrin and its metabolites were isolated and identified by HPLC-UV method. V_{max} , K_m and Cl_{int} of schizandrin in male and female rat liver microsomes were (21.88 ± 2.30) and $(0.61 \pm 0.07) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} (\text{protein})$, (389.00 ± 46.26) and $(72.64 \pm 13.61) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, (0.0563 ± 0.0007) and $(0.0084 \pm 0.0008) \text{min} \cdot \text{mg}^{-1} (\text{protein})$, respectively. The major metabolites of schizandrin in female and male rat liver microsomes were 7,8-dihydroxy-schizandrin (M1) and 7,8-dihydroxy-2-demethyl schizandrin (M2b), respectively. Ketoconazole, quinidine, and orphenadrine had different level effects on schizandrin metabolism in both male and female rat liver microsomes, and cimetidine still had some inhibitory effect in male liver microsomes. CYP3A and CYP2C11 may be the main P450 enzymes in schizandrin metabolism and their difference in rat liver microsomes may be the main reason for the sex difference of metabolic enzyme kinetics and metabolites of schizandrin in rats.

收稿日期: 2006-12-01.

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) “临床前药物代谢动力学关键技术及平台研究”项目 (2003AA2Z3471, 2005AA2Z3C70).

* 通讯作者 Tel: 86 - 25 - 83271544, Fax: 86 - 25 - 85306750, E-mail: guangjiwang@hotmail.com

Key words: schizandrin; metabolism; sex difference; cytochrome P450; liver microsome

五味子醇甲 (schizandrin, SZ) 是常用中药五味子 (*Schisandra chinensis* Baill.) 的主要成分之一, 具有明显的中枢镇静、镇痛、解热、促进肝糖元生成、降低转氨酶、保护肝细胞和抗自由基活性等作用^[1-4], 是保肝、催眠等中药制剂的主要有效成分。文献报道, SZ在大鼠体内吸收较快, 生物利用度不高^[5], 主要有3个代谢产物^[6,7]: 7, 8顺二羟基五味子醇甲 (M1)、7, 8顺二羟基-2-去甲基五味子醇甲 (M2b) 和 7, 8顺二羟基-3-去甲基五味子醇甲 (M2a), 代谢途径见图1。研究表明, 药物的代谢差异是引起药代动力学和药效学差异的主要原因^[8-10], 有关SZ在大鼠肝微粒体内的代谢动力学及性别差异的研究未见文献报道。本文旨在研究SZ在不同性别大鼠肝微粒体内的代谢动力学并探究介导其代谢的酶的亚型, 初步探讨SZ性别差异的机制, 为SZ的药代动力学和药效学及药物相互作用研究提供线索。

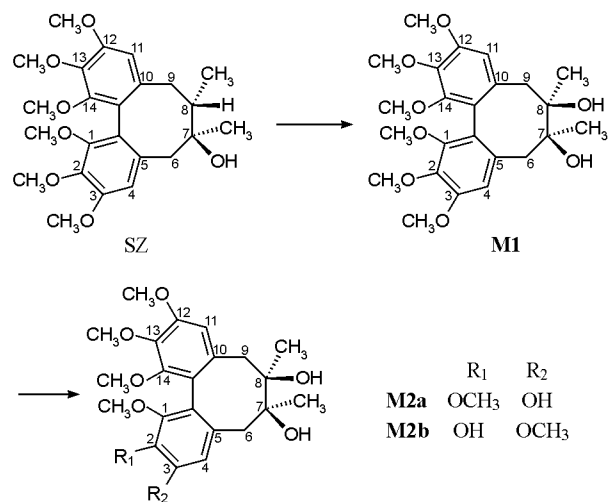


Figure 1 Metabolic pathway of schizandrin (SZ)

材料与方法

药品和试剂 SZ对照品 (含量 > 98%, 成都思科华生物技术有限公司), 内标联苯双酯 (DDB, 中国药品生物制品检定所)。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G-6-P-DH), NADPH (辅酶 II), 葡萄糖-6-磷酸 (glucose-6-phosphate, G-6-P), 酮康唑 (ketonazole, Ket), 奎尼丁 (quinidine, Qui), 奥芬得林 (ophenadrine citrate salt, Orp), 二乙基二硫代氨基甲酸铵 (ammonium diethylthiocarbamate, DDC) 和呋拉茶碱 (furafylline, Fur) 均购自美

国 Sigma 公司; 西咪替丁 (cimetidine, Cim) 和匹鲁卡品 (pilocarpine, Pil) 均购自中国药品生物制品检定所。

仪器 日本岛津 LC-2010 CHT 高效液相色谱仪; 岛津 LC-MS D 2010 高效液相色谱-质谱联用仪。

肝微粒体的制备 取 SD 大鼠, 禁食过夜, 将大鼠断头处死, 自门静脉注入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 冰磷酸钾缓冲液 ($0 \sim 4 \text{ } ^\circ\text{C}$), 冲洗肝脏至土黄色, 迅速取肝, 再用磷酸钾缓冲液将血水冲洗干净, 称重。将肝组织剪碎, 加入一定体积的 ($1 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 肝组织) 磷酸钾缓冲液, 于冰水浴中匀浆, $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ $9\,000 \times g$ 离心 20 min , 取上清液, 于 $105\,000 \times g$ 离心 60 min 。得下层粉红色沉淀即为所需的肝微粒体, 将沉淀物悬浮于含 20% 甘油的磷酸钾缓冲液中 (1 g 组织加入 20% 甘油的磷酸钾缓冲液 1 mL), 置 $-80 \text{ } ^\circ\text{C}$ 冰箱内保存。测定肝微粒蛋白浓度。

温孵条件 反应体系中分别含有 NADPH $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, G-6-P $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, G-6-P-DH $1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, MgCl_2 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 肝微粒体 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。取 SZ 的无水乙醇溶液适量, 加入反应体系中乙醇的终浓度 $< 1\%$, 于 $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ 水浴中温孵振荡, 反应完毕立即取出, 加入冰乙腈溶液 $600 \text{ } \mu\text{L}$ 终止反应。

色谱条件

色谱法 色谱柱: 迪马 Diamonsil C₁₈ 柱 ($250 \text{ mm} \times 4.60 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$), 柱温: $40 \text{ } ^\circ\text{C}$, 流速: $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长: 254 nm , 流动相: 甲醇 (A) 水 (B), 梯度洗脱: 起始比例为 A/B = 35:65 (v/v) 持续至 5 min , $5 \sim 5.1 \text{ min}$ 线性改变流动相比例至 A/B = 55:45, 维持该比例至 10.5 min , 后又回到起始比例再平衡 3 min , 进样量 $20 \text{ } \mu\text{L}$ 。

液质联用法 用于鉴定代谢产物, 液相条件同前, 柱后分流, 电喷雾离子化 (ESI) 方式, 正离子扫描。探针电压: 4.5 kV ; 检测电压: 1.5 kV ; 雾化气流速: $1.5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$; 曲形脱溶剂装置 (CDL) 温度: $250 \text{ } ^\circ\text{C}$; 加热块 (Block) 温度: $200 \text{ } ^\circ\text{C}$ 。二级管阵列检测器 (PDA), 扫描范围: $200 \sim 350 \text{ nm}$ 。

样品处理 取微粒体温孵后的样品 $200 \text{ } \mu\text{L}$, 加入乙腈 $600 \text{ } \mu\text{L}$, 再加入内标 DDB ($100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) $20 \text{ } \mu\text{L}$, 涡旋 3 min , $21\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min , 取上清液进样。

代谢抑制 研究在肝微粒体温孵液(蛋白浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)中分别加入各种代谢酶亚型的抑制剂^[11-16]的抑制效果。初筛时使用 Ket(CYP3A抑制剂)的浓度为 $2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Qui(CYP2D抑制剂)为 $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Op(CYP2B抑制剂)为 $300 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, DDC(CYP2E1抑制剂)为 $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Fur(CYP1A抑制剂)为 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Cim(CYP2C11抑制剂)为 $0.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Pil(CYP2A抑制剂)为 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ 温孵 15 min后,加入 SZ,使其终浓度为 $25 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,雄鼠肝微粒体温孵 15 min,雌鼠肝微粒体温孵 60 min,立即取出样品加入冰乙腈溶液终止反应。选择初筛结果显示有抑制作用的化合物进行不同浓度的抑制实验。

结果

1 SZ代谢物的初步鉴定

本实验发现在 SZ的色谱图(图 2)上除了 SZ(峰 5, 10.23 min)和内标 DDB(峰 4, 9.53 min)的色谱峰外,还有 3个主要色谱峰:峰 1、峰 2和峰 3,保留时间分别为 5.51 min, 5.84 min和 7.83 min。这些峰的峰面积随温孵时间有一定的变化规律,疑为 SZ的代谢产物。经 LC-MS扫描,峰 1、峰 2、峰 3和峰 5(SZ)的 m/z 分别为 457, 457, 471和 455,且峰 1、峰 2和峰 3经 PDA扫描,紫外吸收光谱与 SZ的相似,提示峰 1、峰 2和峰 3可能与 SZ有相同的母核,是 SZ的代谢产物。根据 m/z 数值结合文献^[6,7]推测峰 3可能为 SZ加羟基的代谢物 M1, 峰 1和峰

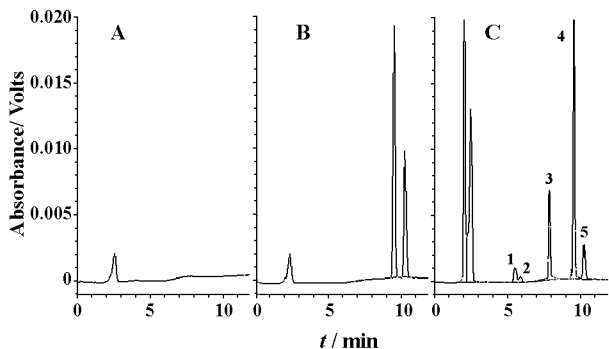


Figure 2 HPLC-UV chromatograms of schizandrin and its metabolites in rat liver microsomes. A: Blank liver microsomes; B: Blank microsomes spiked with SZ ($20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and DDB (IS); C: A male rat liver microsome sample (SZ initial concentration: $25 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 15 min after the reaction system generated, $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ liver microsome protein)

2可能为 SZ加羟基又去甲基的代谢物 M2a和 M2b。

2 SZ在雌雄大鼠肝微粒体内代谢的酶动力学

2.1 温孵时间对 SZ代谢速率的影响 $25 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SZ在 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 肝微粒体中,经 $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ 温孵振荡,以 SZ消除的浓度-时间作图,结果见图 3。在雄鼠肝微粒体内 5~15 min,雌鼠肝微粒体内 5~90 min, SZ呈线性消除。因此雄、雌大鼠肝微粒体温孵时间分别选择 15 min和 60 min。本实验同时检测 SZ在雄、雌大鼠肝微粒体内的 3个可能代谢物的量,以代谢物生成的相对量(代谢物与内标峰面积的比)-时间作图,结果见图 4,可见, SZ在雄、雌大鼠肝微粒体内代谢物的变化情况不同。根据文献^[6], M2b的生成速率约为 M2a的 3倍,推测峰 1可能为 M2b,峰 2可能为 M2a。在温孵系统内,1 h后,雌雄大鼠肝微粒体内的主要代谢物不同,雄鼠肝微粒体内主要为 M2b,雌鼠肝微粒体内主要为 M1。

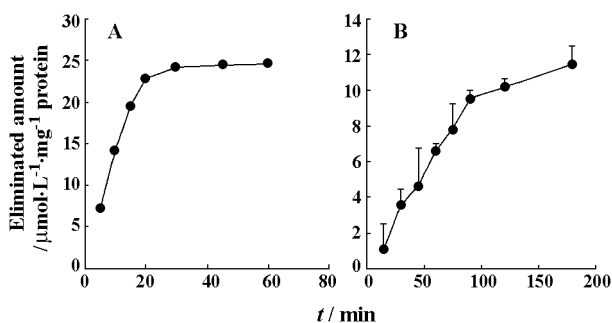


Figure 3 Effect of incubation time on the elimination rate of SZ in male (A) and female (B) rat liver microsomes. ($n=3$)

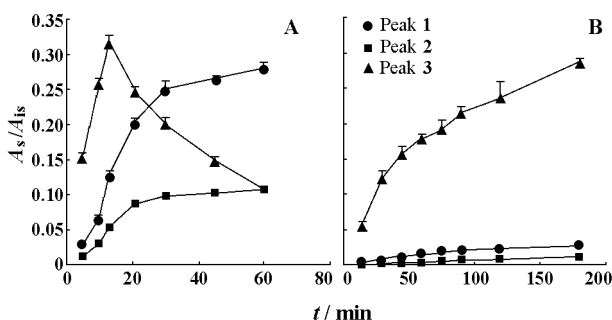


Figure 4 Time-amount profile of SZ metabolites in rat microsomes. A: Male; B: Female

2.2 肝微粒体蛋白浓度对 SZ代谢速率的影响 在上述温孵系统和条件下, $25 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SZ在雄雌大鼠肝微粒体质量浓度分别为 0.1~1.0和 0.25~

2.0 mg· mL⁻¹, SZ的代谢呈线性消除。因此雌雄大鼠肝微粒体均选择 1.0 mg· mL⁻¹为肝微粒体反应蛋白浓度。

2.3 底物浓度对代谢速率的影响 在上述温孵系统和条件下,分别加入 SZ适量,使其在雄雌鼠肝微粒体中浓度为 2.5~1 000和 2.5~200 μmol· L⁻¹。在雄鼠肝微粒体中当底物浓度大于 500 μmol· L⁻¹,雌鼠肝微粒体中底物浓度大于 100 μmol· L⁻¹时,SZ的代谢趋于饱和。根据 Michaelis-Menten方程和 Lineweaver Burk制图法,分别求得 SZ在雌、雄鼠肝微粒体内代谢反应的最大速率 V_{max}、米氏常数 K_m和清除率 CL_{int},结果见表 1。

Table 1 Pharmacokinetic parameters of schizandrin in male and female rat microsomes (n=3, $\bar{x} \pm s$)

Parameter	Male	Female
V _{max} /μmol· L ⁻¹ · min ⁻¹ · mg ⁻¹ (protein)	21.88 ±2.30	0.61 ±0.07
K _m /μmol· L ⁻¹	389.00 ±46.26	72.64 ±13.61
CL _{int} /m in· mg ⁻¹ (protein)	0.056 3 ±0.000 7	0.008 4 ±0.000 8

3 选择性抑制剂对 SZ代谢的影响

在肝微粒体温孵液中分别加入各种代谢酶亚型的抑制剂,初筛结果显示,奎尼丁、奥芬得林和酮康唑等均可以抑制 SZ在两种性别大鼠肝微粒体中的代谢,西咪替丁还可以抑制其在雄鼠肝微粒体内的代谢,而其他药物对其代谢没有明显的影响。因此选用这几种化合物进行不同浓度的抑制实验。

以 SZ的代谢率(以抑制剂浓度为 0时 SZ的代谢量为 1 计算) - 抑制剂的浓度作图, Qui(5, 10, 25, 50和 100 μmol· L⁻¹), Op(50, 100, 250, 500和 1 000 μmol· L⁻¹), Ket(0.5, 1, 2.5, 5和 10 μmol· L⁻¹)和 Cim(0.05, 0.15, 0.75, 1.5和 9 mmol· L⁻¹)对 SZ代谢的抑制作用呈现出明显的浓度相关性。雄性大鼠肝微粒体内,在本实验所选浓度范围内,酮康唑的抑制作用最强,西咪替丁次之,奎尼丁和奥芬得林较弱;在雌性大鼠肝微粒体内,酮康唑抑制作用最强,奥芬得林次之,而奎尼丁最弱。见图 5。

讨论

Cui等^[6]对于 SZ的代谢研究主要是代谢物的结构鉴定和代谢途径的探索。本研究发现,SZ在雌、雄大鼠微粒体内的主要代谢产物和代谢酶动力学均不同。由图 3和图 4可以看出,SZ在雄鼠肝微粒体内代谢非常迅速,代谢物 M1的量先上升后下降,微粒体内 1h后的主要代谢物是 M2b;而在雌鼠肝微粒体内,SZ的代谢较缓慢,M1是 SZ在雌鼠肝微粒体内的主要代谢产物。SZ在大鼠肝微粒体内的最大反应速率 V_{max}、米氏常数 K_m和清除率 CL_{int}也存在很大的性别差异(表 1)。这些体外研究结果提示 SZ在大鼠体内的代谢速率和代谢产物也可能存在性别差异。由于药物的代谢差异是引起药代动力学和药效学差异的主要原因之一,提示在进行 SZ药代动力学和药效学实验时需考虑性别的影响。

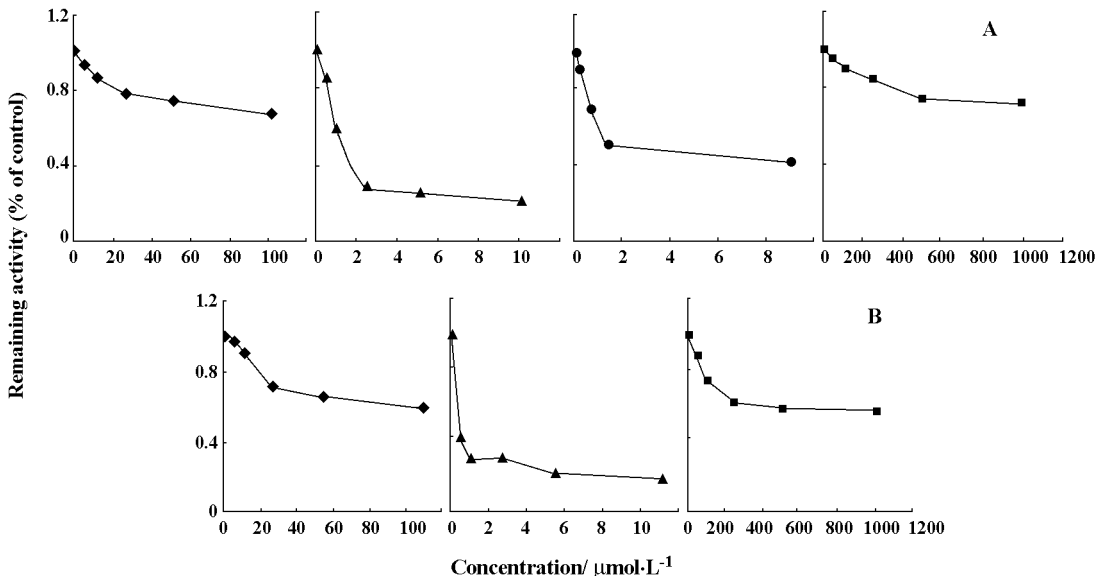


Figure 5 Effect of quinidine (◆-◆), ketoconazole (▲-▲), cimetidine (●-●) and orphenadrine (■-■) on the metabolism of schizandrin in male (A) and female (B) rat liver microsomes

本实验所选用的 CYP450 酶各亚型的抑制剂旨在研究介导 SZ 代谢的 CYP 酶及对性别差异的机制进行初步的探讨。SZ 的主要药理作用之一是中枢的抑制作用, 当介导其代谢的酶受到抑制时, 血药浓度升高很可能会带来严重的不良反应。因此研究其药物代谢酶及与其他药物的相互作用有很重要的临床意义。奎尼丁、奥芬得林和酮康唑等对 SZ 在不同性别大鼠肝微粒体内代谢的不同程度的抑制作用, 提示 CYP2D, CYP2B 和 CYP3A 可能都参与了其在不同性别大鼠肝微粒体内代谢, 酮康唑抑制作用最强, 提示 SZ 主要是由 CYP3A 代谢的, 在临床应用中要注意避免同 CYP3A 酶的抑制剂合用, 以免发生潜在的药物相互作用。西咪替丁对 SZ 在雄鼠肝微粒体内较强的代谢抑制作用, 提示 CYP2C11 (CYP2C11 酶为雄性特异性^[10,17]) 可能也参与了其代谢。

近年来的研究证实, 大鼠体内药物代谢的性别差异主要是由于雌性和雄性大鼠肝中 CYP450 酶的含量和数量上的差异^[10,14-17]所造成的。此外雌性大鼠的 CYP450 酶含量较雄性大鼠低 10% ~ 30%, 这可以解释许多药物在雌性大鼠体内的代谢比雄性大鼠慢。本研究发现 CYP3A, CYP2D 和 CYP2B 可能均参与了 SZ 的代谢 (CYP2C11 还参与了 SZ 在雄鼠肝微粒体内的代谢)。文献^[17]报道, CYP3A2, CYP3A18 和 CYP3A1 在雄性大鼠微粒体内的量分别是雌性大鼠的 10, 20 和 5 倍以上, 而 CYP2C11 达 20 倍以上, CYP2B1 和 CYP2B2 的量也多于雌鼠, 可能正是这些代谢酶的差异引起了 SZ 在不同性别大鼠肝微粒体代谢酶动力学内及代谢物的差异。

总之, SZ 在不同性别大鼠肝微粒体内的主要代谢产物和代谢酶动力学不同, 提示其在体内的药代动力学以至药效学过程也可能存在性别差异, 这种差异可能是由于 CYP3A 和 CYP2C11 在大鼠体内的性别差异引起。SZ 主要由 CYP3A 代谢, 与 CYP3A 的抑制剂合用可能引起潜在的药物相互作用, 值得引起临床注意。

References

- [1] Hancke JL, Brugos RA, Ahumada F. *Schisandrin chinensis* (Turcz.) Baill [J]. *Fitoterapia*, 1999, 70: 451 - 471.
- [2] Niu XY, Wang WJ, Bian ZJ. Effects of schizandrol on the central nervous system [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 1983, 18: 416 - 421.
- [3] Li HT, Hu G. Study on the protective effects of schizandrin on 6-OH DA-induced apoptosis of cultured PC12 Cells [J]. *J Nanjing TCM Univ* (南京中医药大学学报), 2004, 20: 96 - 98.
- [4] Zhang MH, Chen H, Li LZ, et al. Deoxyschizandrin and schizandrin in protect liver against carbon tetrachloride induced damage [J]. *Med J Chin PAPF* (武警医学), 2002, 13: 395 - 396.
- [5] Xu MJ, Wang GJ, Xie HT, et al. Determination of schizandrin in rat plasma by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry and its application in rat pharmacokinetic studies [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, 828: 55 - 61.
- [6] Cui YY, Wang MZ. Metabolic transformation of schizandrin [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 1992, 27: 57 - 63.
- [7] Ikeya Y, Sugama K, Tanaka M, et al. Structure determination of biliary metabolites of schizandrin in rat and dog [J]. *Chem Pharm Bull*, 1995, 43: 121 - 129.
- [8] Shi NJ, Xiong FW. Effect of gender on pharmacokinetics and pharmacodynamics [J]. *Foreign Med Sci (Pharm)* (国外医学 药学分册), 1999, 26: 296 - 299.
- [9] Deng M, Liu HC. Effect of gender on pharmacokinetics [J]. *Chin J Clin Pharmacol* (中国临床药理学杂志), 2004, 20: 68 - 71.
- [10] Zhao Y, Liu XQ, Qian ZY, et al. Sex-dependent metabolism of drugs [J]. *Prog Pharm Sci* (药学进展), 2001, 25: 289 - 293.
- [11] Liu XQ, Zhao Y, Ren YL, et al. Enzyme kinetics of nifedipine metabolism in human liver microsomes [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 2001, 36: 891 - 893.
- [12] Ju MH, Li Y. Metabolism of bicyclol in rat and human liver microsomes *in vitro* [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 2005, 40: 112 - 116.
- [13] Yang ZF, Zhou SY, Mei QB, et al. Metabolic kinetics of MN9202 in Beagle dog liver microsomes [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 2005, 40: 1019 - 1023.
- [14] Wienkers LC, Steenwyk RC, Mizesak SA, et al. *In vitro* metabolism of tirilazad in male and female rats: contribution of cytochrome P4502C11 AND Δ -5 α -reductase [J]. *Drug Metab Dispos*, 1995, 23: 383 - 392.
- [15] Lin JH, Chiba M, Chen IW, et al. Sex-dependent pharmacokinetics of indinavir *in vivo* and *in vitro* evidence [J]. *Drug Metab Dispos*, 1996, 24: 1298 - 1306.
- [16] Kupe man AV, Kalgutkar AS, Marfat A, et al. Pharmacokinetics and metabolism of a cysteinyl leukotriene-1 receptor antagonist from the heterocyclic chromanol series in rats: *In vitro-in vivo* correlation, gender-related differences, isoform identification, and comparison with metabolism in human hepatic tissue [J]. *Drug Metab Dispos*, 2001, 29: 1403 - 1409.
- [17] Hedlund E, Gustafsson JA, Warner M. Cytochrome P450 in the brain [J]. *Curr Drug Metab*, 2001, 2: 245 - 26.