

# 氟他胺在大鼠肝微粒体经细胞色素 P450 1A2 代谢的性别差异

王海学\*, 李 端, 许长江, 刘 骁

(复旦大学药学院药理学教研室, 上海 200032)

**摘要:** 目的 体外研究大鼠肝微粒体细胞色素 P450 1A2 (CYP1A2) 对氟他胺 (flutamide Flu) 代谢的性别差异影响。方法 制备正常 ♀ ♂ 大鼠肝微粒体, 用 CYP1A2 抗体与氟他胺 ( $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 共同温孵, 测定氟他胺主要代谢产物 2-羟基氟他胺 (2-hydroxyflutamide, HF) 和原药的浓度比 (HF/Flu), 评价氟他胺在大鼠肝微粒体代谢的性别差异。结果 在 CYP1A2 抗体浓度为 1:400, 孵育时间为 30 min 条件下, 氟他胺在 ♂ 大鼠肝微粒体中的 HF/Flu 为 ( $1.5 \pm 0.6$ ), 而 ♀ 动物为 ( $0.9 \pm 0.4$ )。不同性别大鼠肝微粒体对氟他胺的代谢存在性别差异 ( $P < 0.01$ )。结论 Flu 在 ♂ 大鼠肝微粒体中代谢快, 而在 ♀ 大鼠肝微粒体中代谢较慢。♂ 大鼠体内的 CYP1A2 酶活性高于 ♀ 大鼠。

**关键词:** 氟他胺; 2-羟基氟他胺; 细胞色素 P450 1A2; 肝微粒体

中图分类号: R963; Q593.1

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2002)08 - 0608 - 03

氟他胺 (flutamide, Flu) 是一个非甾体类抗雄激素药物, 临床上主要用于治疗前列腺癌, 也有抗前列腺增生作用。Flu 通过与雄激素竞争雄激素受体, 并与之结合成无活性复合物, 进入细胞核与核蛋白结合, 抑制依赖雄激素的肿瘤细胞生长。与其他抗雄激素药物相比, 该药的最大优点是无其他激素活性, 可保持大部分患者性欲及性功能。另外, 临床实验证明, 氟他胺也可用于治疗女性多毛症<sup>[1]</sup>。

临床发现氟他胺有不同程度的肝毒性, 表现为转氨酶水平升高、GSH 水平降低、总蛋白巯基含量降低、LDH 释放增加、胆红素水平升高等, 严重者甚至可导致死亡<sup>[2]</sup>, 但氟他胺在大鼠体内的肝毒性与性别有密切关系。Dainel 等<sup>[3]</sup> 研究证明氟他胺对 ♀ 大鼠的肝毒性小于 ♂ 大鼠, 作者认为可能是因为该药在不同性别大鼠体内的代谢存在差异。由于氟他胺在体内主要经细胞色素 P450 1A2 代谢<sup>[4]</sup>, 本文采用细胞色素 P450 1A2 抗体抑制实验, 观察氟他胺在 ♀ ♂ 大鼠肝微粒体中代谢差异, 为阐明其肝毒性机制和临床用药提供依据。

## 材 料 与 方 法

**药品和试剂** 氟他胺标准品 (黄色晶体, 纯度

> 99%), 由复旦大学红旗制药厂提供; 2-羟基氟他胺 (2-hydroxyflutamide, HF) 由复旦大学药学院有机化学教研室夏鹏教授合成; 还原型辅酶 II (reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 由中国科学院生物化学研究所提供; 实验中所用甲醇和乙腈均为 HPLC 级试剂; 甲基睾丸素和细胞色素 P450 1A2 抗体均购自 Sigma 公司。

**肝微粒体制备** Sprague-Dawley (SD) 大鼠, ♀ ♂ 各 10 只, 体重为 200 ~ 230 g。将大鼠断头处死, 取其肝组织后迅速放入 0 ~ 4 ℃ 冰浴中, 然后转入 -70 ℃ 冰箱中保存备用。用差速离心法<sup>[5]</sup> 制备大鼠肝微粒体, 首先将肝组织剪碎用  $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl- $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲液 (PBS) 反复冲洗, 除去血红蛋白后加入上述 PBS 制成肝匀浆。然后先将肝匀浆在高速离心机上于 4 ℃ 以下  $9\,000 \times g$  离心 20 min, 取上清液, 然后  $100\,000 \times g$ , 4 ℃ 以下离心 60 min, 取出粉红色沉淀悬浮于含 30% 甘油的 KCl ( $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )-PBS 中 ( $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 7.4) 中, 置于 -70 ℃ 冰箱内, 贮存备用。肝微粒体蛋白浓度及细胞色素 P450 含量按经典方法测定。

**温孵条件** 按文献<sup>[6]</sup> 方法, 反应体系含 NADPH  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , ♀ ♂ 大鼠肝微粒体 CYP450 总含量均为  $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , CYP1A2 抗体稀释为 1:200 和 1:400 两个浓度。氟他胺用甲醇配置, 每次加入反应体系的甲醇浓度为 1%, 药物在反应体系中的终浓度为  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS (pH 7.4) 将反应体系总体积稀释成 1 mL。37 ℃ 水浴震荡孵育时间分别

收稿日期: 2001-10-08

基金项目: 复旦大学创新基金 (CQF303801)。

\* 通讯作者 Tel: (021) 64041900 - 2558,

E-mail: haixue\_wang@hotmail.com

为 10, 20, 30, 40 min, 结束后立即取出放入 -30 °C 冰箱内终止反应。

**Flu 和 HF 的高效液相色谱分离条件** 参考文献<sup>[7]</sup>报道的 HPLC 方法, 流动相为甲醇-乙腈-水-乙醚(40: 20: 35: 1)。流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 26 °C。紫外检测波长为 234 nm, 甲基睾丸素为内标, 用内标标准曲线法定量。灵敏度为 0.001 AUFS, 进样量为 10 μL。

**样品处理** 1.0 mL 肝微粒体温孵液中, 加入用甲醇配制的内标溶液(15 mg·L<sup>-1</sup>, 15 μL), 乙酸乙酯 4.0 mL, 混旋器上混旋 1.5 min, 于 4 200 × g 离心 5 min, 取 3.0 mL 乙酸乙酯相, 于 50 °C 水浴中 N<sub>2</sub> 吹干。HPLC 测定前用流动相 50 μL 溶解残留物后进样。

**统计方法** 实验结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间显著性比较采用 *t* 检验, 由 SPSS 10.0 统计包完成。

## 结 果

### 1 肝微粒体中氟他胺 (Flu) 及其代谢物 (HF) 的浓度测定

Flu 和 HF 在大鼠肝微粒体反应体系中的提取回收率分别为(75 ± 6) %和(78 ± 10) %, 相对回收率分别为(105 ± 12) %和(103 ± 8) %。方法的检测限按下式计算: 灵敏度 = 峰高 (mm)/水样浓度 (μg·L<sup>-1</sup>), 检测限 = 2 × 噪音 (mm)/灵敏度。Flu 和 HF 的最低检测浓度均为 2 μg·L<sup>-1</sup>。

### 2 Flu 在肝微粒体中反应时间和抗体浓度的确定

Flu 2 mg·L<sup>-1</sup> 在 ♀ ♂大鼠肝微粒体内 37 °C 温孵 30 min 时, 原药 Flu 和代谢物生成量均较易测定, 因此本实验采用 37 °C 温孵 30 min。CYP1A2 抗体浓度在 1: 200 时对肝微粒体 CYP1A2 的抑制作用太强, 从而使 Flu 代谢物生成量较少不易测定, 因此选择 1: 400 较为合适。

### 3 Flu 在 ♀ ♂大鼠肝微粒体 CYP1A2 中的代谢差异

Flu 在不同性别大鼠肝微粒体代谢后, 从其色谱峰上可以清楚看出在上述条件下代谢物 HF 和原药及内标的色谱峰(图 1)。通过比较 Flu 在 ♀ ♂大鼠肝微粒体中代谢物与原药的浓度发现, ♀ 大鼠的代谢比率明显低于 ♂大鼠(表 1), 证明 Flu 在 ♀ 大鼠的代谢比 ♂大鼠慢, Flu 在 ♀ ♂大鼠代谢过程存在明显的性别差异。

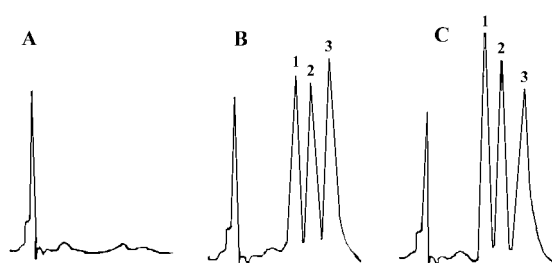


Figure 1 HPLC chromatograms of 2-hydroxyflutamide (1), flutamide (2), and internal standard (3, methyltestosterone)

A. Blank liver microsome; B. Spiked liver microsome; C. Sampling liver microsomes (30 min after rat liver microsomes incubation with NADPH and CYP1A2 antibodies 1: 400)

Table 1 The ratio of concentration of 2-hydroxyflutamide (HF) to flutamide (Flu) in male (M) and female (F) rat liver microsomes *in vitro*

Sex	Flu/ mg·L <sup>-1</sup>	HF/ mg·L <sup>-1</sup>	HF/ Flu
M	0.7 ± 0.4	1.14 ± 0.27	1.5 ± 0.6
F	10.0 ± 0.4*	0.9 ± 0.5*	0.9 ± 0.4**

*n* = 10,  $\bar{x} \pm s$ . \* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01 vs M

## 讨 论

代谢过程对药物的药理作用或毒性的产生有着重要作用, 而性别差异又是影响药物代谢的一个重要因素。药物代谢存在性别差异的原因主要为体内代谢酶的差异。氟他胺在 ♀ ♂大鼠肝微粒体中代谢速率存在性别差异, 提示 ♀ ♂大鼠肝微粒体中 CYP1A2 的活性存在差异。因此可以推测, 人体中 CYP1A2 的差异可能会影响该药物的代谢过程和药理作用。

氟他胺在代谢过程中要生成许多高活性反应中间体, 这些中间产物会影响细胞的膜通透性和增强药物与膜的共价结合力, 因而会造成对肝细胞的损伤<sup>[8]</sup>。当氟他胺在 ♂大鼠体内因过快代谢产生的中间体超过机体肝细胞的解毒能力, 产生的肝毒性可能大于 ♀大鼠。因此, 从毒理学角度出发, 可以考虑降低氟他胺的给药剂量。目前临床研究已经有报道<sup>[9]</sup>建议使用较低剂量的氟他胺, 而保持疗效不变。

药物作用的性别差异研究对新药的研究开发和临床应用有重要的指导意义。需要指出的是, 本研究只是在体外大鼠肝微粒体温孵实验对氟他胺的代谢进行了初步研究, 至于在动物体内和人体中不同性别的代谢过程和毒性情况如何, 还需要做进一步

研究。

## REFERENCES:

- [1] Moghetti P, Castello R, Negri C, *et al.* Flutamide in the treatment of hirsutism: long-time clinical effects, endocrine changes, and androgen receptor behavior [J]. *Fertil Steril*, 1995, **64**(3) :511 - 517.
- [2] Wysowski DK, freiman P, Tourtelot JB, *et al.* Fatal and nonfatal hepatotoxicity with flutamide [J]. *Ann Intern Med*, 1993, **118**(11) :860 - 864.
- [3] Dainel F, Dominique E, Alain B, *et al.* Toxicity of the antiandrogen flutamide in isolated rat hepatocytes [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994, **263**(3) :954 - 269.
- [4] Shet MS, Mchaul M, Fisher CW, *et al.* Metabolism of the antiandrogenic drug (flutamide) by human CYP1 A2 [J]. *Drug Metab Dispos*, 1997, **25**(11) :1298 - 1303.
- [5] Cuyue T, Magang S, A. David R. Substrate-dependent effect of acetonitrile in human liver microsomal cytochrome P450 2C9 activity [J]. *Drug Metab Dispos*, 2000, **28**(5) :567 - 572.
- [6] Shou M, Lu T, Krausz KW, *et al.* Use of inhibitory monoclonal antibodies to assess the contribution of cytochrome P450 to human metabolism [J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, **394**(2 - 3) :199 - 209.
- [7] Xu CJ, Li D. Pharmacokinetics of flutamide and its metabolite 2-hydroxyflutamide in normal and hepatic injury rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1998, **19**(1) :39 - 43.
- [8] Berson A, Wolf C, Chachaty C, *et al.* Metabolic activation of the nitroaromatic antiandrogen flutamide by rat and human cytochromes P450, including forms belonging to the 3A and 1A subfamilies [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1993, **265**(1) :366 - 373.
- [9] Thrasher JB, Deeths J, Bennett C, *et al.* Comparative study of the clinical efficacy of two dosing regimens of flutamide [J]. *Mol Urol*, 2000, **4**(3) :259 - 264.

## SEX DIFFERENCE ON FLUTAMIDE METABOLISM IN RAT LIVER MICROSOMAL CYTOCHROME P450 1A2

WANG Hai-xue, LI Duan, XU Chang-jiang, LIU Xiao

(Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200032, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To assess the sex-difference on flutamide metabolism in rat liver microsomes using rat cytochrome P450 1A2, inhibitory monoclonal antibody. **METHODS** Liver microsomes were prepared from male or female rats. Protein concentration and total cytochrome P450 content were determined. Incubation mixture included liver microsomes ( $1.0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ( $\text{NADPH}$ ,  $0.1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), CYP1 A2 (1:400) and flutamide ( $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ). The incubation time was 30 min. The concentration of flutamide and its major metabolite 2-hydroxyflutamide were analyzed by reverse high performance liquid chromatography. The mobile phase was a mixture of methanol-acetonitrile-water-diethylether (40:20:35:1) with methyltestosterone as internal standard. The detection wavelength was 234 nm. The reaction mixture was extracted with acetic ether 4 mL. Sex-difference on flutamide metabolism was expressed as the difference between the concentration ratio of 2-hydroxyflutamide to flutamide in male and female rat liver microsomes. **RESULTS** The recoveries of flutamide and 2-hydroxyflutamide for the proposed method were more than 75%. The formation of 2-hydroxyflutamide from flutamide was inhibited by CYP1 A2 antibodies (1:400) in male and female rat liver microsome for 30 min of incubation time, but the inhibition of flutamide metabolism in female rat was stronger than that in male. The concentration ratios of 2-hydroxyflutamide to flutamide were ( $1.5 \pm 0.6$ ) and ( $0.9 \pm 0.4$ ) in male and female rat liver microsomes, respectively ( $P < 0.01$ ). **CONCLUSION** The results indicate that the activity of male rat CYP1 A2 is higher than that of the female rat. There is difference in sex-related rate of flutamide metabolism in rat liver microsomes.

**KEY WORDS:** flutamide; 2-hydroxyflutamide; cytochrome P450 1A2; liver microsomes