

黄皮酰胺对映体在大鼠肝微粒体中的酶促反应动力学

朱传江, 张均田*

(中国医学科学院, 中国协和医科大学 药物研究所, 北京 100050)

摘要: 目的 研究黄皮酰胺(clausenamide, Clau)对映体在大鼠肝微粒体中的酶促反应动力学并比较其立体选择性差异。方法 应用反相 HPLC 法测定 Clau 对映体在体外代谢系统中的产物,并用 Eadie-Hofstee 作图法分析数据,求算酶促反应动力学参数 K_m 和 V_{max} 以及肝代谢速率 V_{max}/K_m 。结果 在体外代谢系统中,左旋黄皮酰胺主要生成 7-羟-Clau, 5-羟-Clau 和 4-羟-Clau,其优势代谢途径为 7 位羟化;7 位羟化代谢的 V_{max}/K_m 值高于 5 位和 4 位。右旋黄皮酰胺的 4 位羟化反应 K_m 最小、 V_{max} 最大,因此代谢速率最高,是左旋体 4 位羟化的 8 倍;而其 7-羟-Clau 和 5-羟-Clau 的产生量很小。结论 黄皮酰胺对映体在大鼠肝微粒体中的羟化代谢存在明显的底物立体选择性差异。

关键词: 黄皮酰胺;对映体;大鼠肝微粒体;酶促反应动力学;立体选择性

中图分类号: R282.71; R965 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2003)09 - 0654 - 04

Enzyme kinetics of clausenamide enantiomers in rat liver microsomes

ZHU Chuan-jiang, ZHANG Jun-tian*

(Department of Pharmacology, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: **Aim** To investigate the enzyme kinetics of (-)-3*S*,4*R*,5*R*,6*S*-clausenamide [(-)-Clau] and (+)-3*R*,4*S*,5*S*,6*R*-clausenamide [(+)-Clau] catalyzed by rat liver microsomes and compare their stereoselective differences. **Methods** An *in vitro* metabolic system was built by using rat liver microsomes and NADPH generating system. Clau and its metabolites were determined simultaneously by a reversed-phase high performance liquid chromatography. The kinetic parameters, K_m , V_{max} , and metabolic rate, V_{max}/K_m , were calculated by Eadie-Hofstee plot. **Results** In the metabolic system, (-)-Clau was found to be mainly metabolized to 7-hydroxy-, 5-hydroxy- and 4-hydroxy-Clau, and 7-hydroxylation was a preferential pathway which exhibited higher V_{max}/K_m value ($0.135 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) than those of 5- and 4-hydroxylation (0.063 and $0.068 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectively). For (+)-Clau, it was mainly metabolized to 4-hydroxy-Clau, whereas 7-hydroxy- and 4-hydroxy-Clau were so small that they could not be detected systematically. 4-Hydroxylation of (+)-Clau showed highest V_{max}/K_m value ($0.547 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) among all the metabolites tested, which was 8.0 times higher than that of 4-hydroxylation of its antipode. **Conclusion** The data indicated that there were obvious substrate stereoselective differences in the hydroxylation metabolism of (+)- and (-)-Clau, which provided an explanation of the difference of pharmacokinetic characteristics of Clau enantiomers in rats.

Key words: clausenamide; enantiomer; rat liver microsome; enzyme kinetics; stereoselectivity

药理学研究表明,构型为 3*S*,4*R*,5*R*,6*S* 的左旋黄皮酰胺 [(-)-clausenamide, (-)-Clau] 是一优映体(图 1),具有明显的促智作用^[1-5],而 3*R*,4*S*,5*S*,6*R* 构型的右旋黄皮酰胺 [(+)-Clau] 则是一个劣映

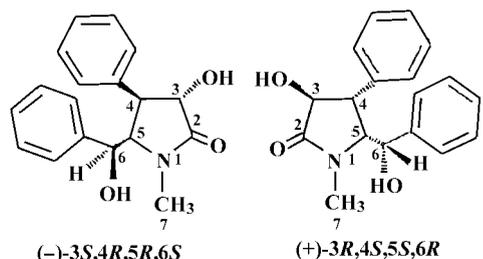


Figure 1 Absolute configuration of clausenamide enantiomers

收稿日期: 2002-09-19.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29790120).

* 通讯作者 Tel: 86 - 10 - 63165179, Fax: 86 - 10 - 63017757,

E-mail: zjtian@public.bta.net.cn

体。体外代谢研究提示,Clau 对映体经历羟化和双羟化反应,至少生成 6 个代谢产物^[6,7]。本研究通过建立大鼠肝微粒体体外代谢系统,观察 Clau 对映体在此系统中的酶促反应动力学过程及其立体选择性差异。

材料与方 法

药品与试剂 Clau 对映体由本所黄量研究员实验室提供;Clau 代谢产物定性参照物(体外代谢提取纯化物)由本所王慕邹研究员实验室赠送; β -NADP, NADH, G-6-P DH, G-6-P, 牛血清白蛋白,为 Sigma 公司产品;Tris 为 Augus 公司产品;DM-9384(内标)^[8], 日本 Daiichi 制药有限公司赠送。

仪器 SCR 20 BA 型低温高速离心机、SCP 70 型低温超速离心机(Hitachi, 日本);XL 90 型低温超速离心机(Beckman, 美国);SP-9A 型色谱仪、SPD-6A 型紫外检测器(Shimadzu, 日本);3394 A 型积分仪(Hewlett Packard, 美国);不锈钢分析色谱柱(250 mm \times 4.6 mm ID, Eka Chemical AB, 瑞典)。

动物 Wistar 大鼠, ♀, 180 ~ 200 g, 购自本院动物研究所繁育场。

肝微粒体制备及其蛋白含量测定 大鼠, 禁食 16 h 后, 断头处死, 迅速取出肝脏, 按 Omura 法^[9]制备微粒体和 Lowry 法^[10]测定微粒体蛋白含量。

体外代谢系统组成^[6,11-13] 代谢系统总体积为 2 mL, NADH (10 mmol \cdot L⁻¹) 0.1 mL, G-6-P DH (10 U \cdot mL⁻¹) 0.1 mL, G-6-P (100 mmol \cdot L⁻¹) 0.1 mL, MgCl₂ (50 mmol \cdot L⁻¹) 0.1 mL, β -NADP (10 mmol \cdot L⁻¹) 0.1 mL, Clau(用吐温-80 配备) 0.1 mL, 大鼠肝微粒体蛋白 0.2 mL, 用 Tris-HCl (50 mmol \cdot L⁻¹, pH 7.4) 加到所需终体积。

反应条件优化 1. 孵育时间, 设定 5, 10, 15, 30, 60, 80, 100 min。在此项中微粒体蛋白和 Clau 终质量浓度分别为 1.6 和 0.3 g \cdot L⁻¹; 2. 微粒体蛋白浓度, 设定系列终质量浓度为 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 4.0 (g \cdot L⁻¹)。在此项中孵育时间为 80 min, Clau 终质量浓度为 0.3 g \cdot L⁻¹; 3. 底物浓度, 设定 Clau 对映体系列终浓度为 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mmol \cdot L⁻¹。此项中孵育时间为 80 min, 微粒体蛋白终质量浓度为 1.6 g \cdot L⁻¹。反应系统预温孵(37 $^{\circ}$ C) 3 min 后, 加入 β -NADP 启动反应系统;每隔 20 min, 通氧一次(10 s/管);到达设定时间, 加入乙酸乙酯 2 mL, 迅速混合, 以终止反应。

样品处理和 HPLC 测定^[14] 各管加入内标

(DM-9384, 乙酸乙酯配制) 0.1 mL, 混旋提取 1 min, 3 500 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 取上层有机相, 水浴挥干(约 85 $^{\circ}$ C);加入甲醇 0.1 mL 重溶残存物, 取 10 μ L 进样。固定相为 Kromasil C₁₈ 色谱柱, 流动相为乙腈-甲醇-水(22.5:17:60.5), 流速 1.2 mL \cdot min⁻¹, 检测波长 257 nm, 纸速 0.5 cm \cdot min⁻¹, 以代谢产物峰面积与内标峰面积的比值作为测定指标。

Clau 对映体酶促反应动力学参数的测定 采用 Eadie-Hofstee 法^[15], 以 v 对 $v/[S]$ 进行线性回归, 求出斜率和截距, 进而求出 K_m 、 V_{max} 和代谢速率 V_{max}/K_m 。底物 Clau 对映体的系列终浓度为 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 和 4 mmol \cdot L⁻¹, 微粒体蛋白终质量浓度为 1.6 g \cdot L⁻¹, 温孵时间为 80 min, 观察指标(Response factor, RF):在(+)-Clau, 为 4-OH Clau 的峰面积与内标峰面积之比;在(-)-Clau, 为 7-OH Clau 5-OH Clau 和 4-OH Clau 的峰面积分别与内标峰面积之比;代谢产物的单位, 因缺乏相应的标准品, 用 μ mol \cdot RF 表示^[13]。

结果

1 温孵时间对 Clau 代谢产物产生的影响

在本温孵系统中, (-)-Clau 主要产生 3 个代谢产物, 即 7-OH Clau, 5-OH Clau 和 4-OH Clau。在 40 min 前, 5-OH Clau 的生成量略高于 7-OH Clau。40 min 后, 7-OH Clau 超过 5-OH Clau。4-OH Clau 的生成量在 3 者中最小。(+)Clau 主要产生 1 个代谢产物, 即 4-OH Clau, 其生成量在全部时间点上高于(-)-Clau 3 个代谢产物。60 min 后, 除 7-OH Clau 继续升高外, 其他所测的代谢产物则始下降(图 2)。综合(-), (+)-Clau 代谢产物的经时过程, 温孵时间宜为 60 ~ 80 min。

2 肝微粒体含量对 Clau 代谢产物产生的影响

微粒体在 0.4 ~ 3.2 g \cdot L⁻¹, 两个对映体的所测代谢产物均逐渐增加, 且在 1.6 g \cdot L⁻¹ 前段增加较快, 至 3.2 g \cdot L⁻¹ 达到最高, 此后除(-)-4-OH Clau 外, 其他则始下降(图 3)。显然, 肝微粒体质量浓度为 3.2 g \cdot L⁻¹ 较合适。

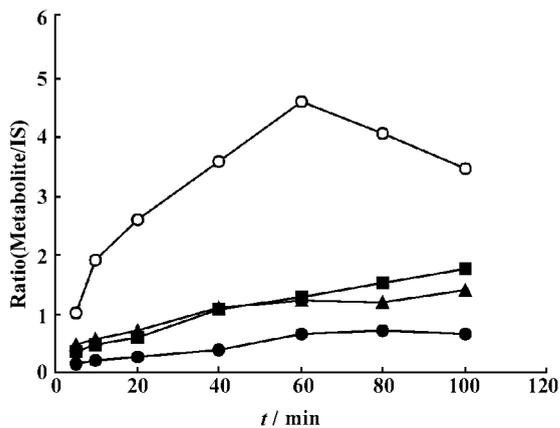
3 底物浓度对 Clau 代谢产物产生的影响

随着底物浓度增加到 1 mmol \cdot L⁻¹, Clau 对映体的代谢产物生成逐渐达到高峰, 呈现出酶和底物作用的饱和状态, 其量或基本不变, 或略有下降。提示底物的合适浓度应为 1 ~ 2 mmol \cdot L⁻¹(图 4)。

4 Clau 对映体酶促反应动力学比较

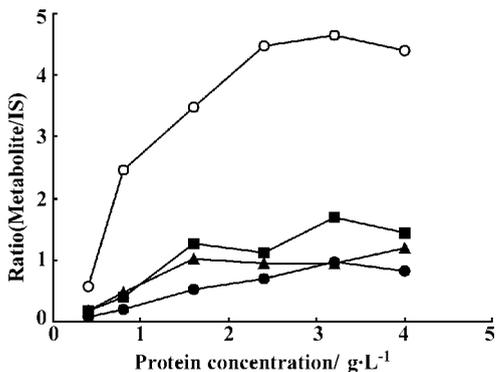
以初始阶段的反应速度和底物浓度(0.125 ~

0.5 mmol·L⁻¹), 求出的酶促动力学参数归纳于表 1。从表中可见, (-)-Clau 的 K_m 值高于 (+)-Clau, 而 V_{max} 值则相反; 代谢速率 (V_{max}/K_m), 在 (+)-Clau 为 0.547 1 μL·min⁻¹·mg⁻¹, 在 (-)-Clau, 3 个途径代谢速率之和为 0.265 4 μL·min⁻¹·mg⁻¹, 两者比值为 2.06, 说明 (+)-Clau 的 4 位羟化反应快于 (-)-Clau 的羟化代谢反应。但从底物的消耗量来看, 左旋的消耗多于右旋, 因此 (-)-Clau 的总代谢量多于 (+)-Clau (结果未显示)。



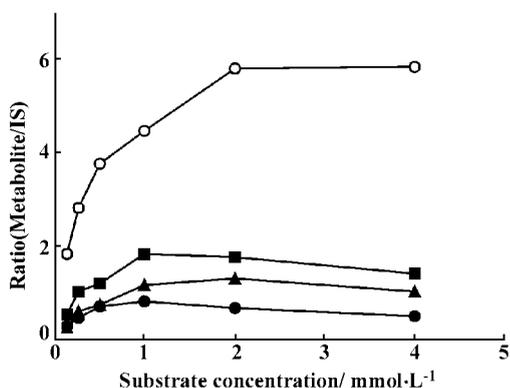
○—○ (+)-4-OH Clau; ●—● (-)-4-OH Clau; ▲—▲ (-)-5-OH Clau; ■—■ (-)-7-OH Clau

Figure 2 Effect of incubation time on the formation of metabolites of clausenamide (Clau) enantiomers. Each Clau enantiomer at a concentration of 1.0 mmol·L⁻¹ (0.3 g·L⁻¹) was incubated with 1.6 g·L⁻¹ hepatic microsomal protein from untreated rats at 37 °C for different times ranging from 5 to 100 min in the presence of NADPH-generating system



○—○ (+)-4-OH Clau; ●—● (-)-4-OH Clau; ▲—▲ (-)-5-OH Clau; ■—■ (-)-7-OH Clau

Figure 3 Effect of microsomal protein concentration on the formation of metabolites of clausenamide (Clau) enantiomers. Each Clau enantiomer at a concentration of 1.0 mmol (0.3 g·L⁻¹) was incubated with different microsomal concentrations ranging from 0.4 to 4.0 g·L⁻¹ hepatic microsomal protein from untreated rats at 37 °C for 80 min in the presence of NADPH-generating system



○—○ (+)-4-OH Clau; ●—● (-)-4-OH Clau; ▲—▲ (-)-5-OH Clau; ■—■ (-)-7-OH Clau

Figure 4 Effect of substrate concentration on the formation of metabolites of clausenamide (Clau) enantiomers in rat liver microsomes. Each Clau enantiomer at a series of final concentrations of 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mmol·L⁻¹ was incubated with 1.6 g·L⁻¹ hepatic microsomal protein from untreated rats at 37 °C for 80 min in the presence of NADPH-generating system

Table 1 Kinetic parameters of clausenamide (Clau) hydroxylations in rat liver microsomes

Metabolite	K _m	V _{max}	V _{max} /K _m
	/mmol·L ⁻¹	/μmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	/μL·min ⁻¹ ·mg ⁻¹
(+)-4-OH Clau	0.259 9	0.142 2	0.547 1
(-)-7-OH Clau	0.507 3	0.068 3	0.134 6
(-)-5-OH Clau	0.869 1	0.054 5	0.062 7
(-)-4-OH Clau	0.518 2	0.035 3	0.068 1

Each Clau enantiomer at a series of final concentrations of 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 mmol·L⁻¹ was incubated with 1.6 g·L⁻¹ microsomal protein from untreated rat at 37 °C for 80 min in the presence of NADPH-generating system. Kinetic data of Clau hydroxylation reactions were analyzed by Eadie-Hofstee plots. Initial reaction rates obtained at three substrate concentrations from 0.125 to 0.5 mmol·L⁻¹ were used to calculate K_m and V_{max} values

讨论

从图 4 和表 1 可见, Clau 对映体存在明显的底物立体选择性。底物立体选择性是指在相同条件下, 两个对映异构体的代谢有质和量的差异^[16]。 (+)-Clau 的优势代谢途径是 4 位羟化, 产生 4-OH Clau, 其产生的速率和量均显著高于 (-)-Clau 的 4-OH Clau, 立体选择方向为 (+) > (-); 而 (-)-Clau 的优势代谢途径为 7 位羟化和 5 位羟化, 产生 7-OH Clau 和 5-OH Clau, 在本代谢系统中, (+)-Clau 的 7-OH Clau 和 5-OH Clau 生成量却很小, 立体选择方向为 (-) > (+), 表明 Clau 对映体有底物立体选择性差异, 且不同代谢途径的立体选择方向不同。类似

的药物有华法令, 维拉帕米, ifosfamide, cibenzoline, 等。

同样, Clau 对映体的酶促动力学特征也明显不同。将底物浓度对反应速度作图可知, Clau 对映体在大鼠肝微粒体中的羟化代谢反应符合单酶催化的 Michaelis-Menten 方程, 动力学数据经 Eadie-Hofstee 作图法直线变换后求得 K_m 及 V_{max} 值。在 (+)-Clau, 4 位羟化的 K_m 值最小、 V_{max} 值最大, 因此其代谢速率最高 ($0.547 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$), 而 5-OH-Clau 和 7-OH-Clau 很小; 在 (-)-Clau, 7 位羟化的代谢速率 ($0.135 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) 高于 5 位和 4 位 (0.063 和 $0.068 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)。两相比较, 右旋体的总代谢率明显高于左旋体。这种差异是肝微粒体内第一相代谢酶选择性平衡的结果, 表明代谢酶对 Clau 对映体的位置特异性。这种差异也是 Clau 对映体药物动力学特征不同的原因之一。但有趣的是, (-)-Clau 的消耗量大于 (+)-Clau, 提示左旋的总代谢转化量多于右旋。已知 Clau 对映体在肝内除了转化为单羟化合物外还可转化成双羟化合物^[7]。因此推测 (-)-Clau 除了测定的代谢产物之外, 可能还有进一步转化产物和/或新的代谢产物生成。

References:

- [1] Duan WZ, Zhang JT. Effects of (-), (+)-clausenamide on anisodine-induced acetylcholine decrease and associated memory deficits in the mouse brain [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1998, **33**(4):259 - 263.
- [2] Duan WZ, Zhang JT. Stimulation of central cholinergic neurons by (-)-clausenamide *in vitro* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1998, **19**(4):332 - 336.
- [3] Jiang XY, Zhang JT. Study on the nootropic mechanism of (-)-clausenamide—influence on the formation of synapses in mouse brain [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 1998, **1**(1):53 - 58.
- [4] Liu SL, Zhang JT. Difference between the effects of (-)-clausenamide and (+)-clausenamide on the synaptic transmission in the dentate gyrus of anesthetized rats [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1998, **33**(4):254 - 258.
- [5] Liu SL, Zhao MR, Zhang JT. Effects of clausenamide on the synaptic transmission of the dentate gyrus in freely-moving rats [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1999, **34**(5):325 - 328.
- [6] Yao QQ, Wang MZ. Metabolic transformation of (-)-clausenamide in rat liver microsomes [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1998, **33**(4):296 - 299.
- [7] Yao QQ, Wang MZ. Metabolic transformation of (+)-clausenamide in rat liver microsomes [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1999, **34**(4):303 - 307.
- [8] Sakurai T, Ojima H, Yamasaki T. Effects of *N*-(2,6-dimethylphenyl)-2-(2-oxo-1-pyrrolidinyl)acetamide (DM-9384) on learning and memory in rats [J]. *Jpn J Pharmacol*, 1989, **50**(1):47 - 53.
- [9] Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes [J]. *J Biol Chem*, 1964, **239**(7):2379 - 2385.
- [10] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, *et al.* Protein measurement with Folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, **193**(1):265 - 275.
- [11] Chen LS, Wang ZJ, Zeng YL. Demethylation by rat hepatic microsomal fraction and deuterium isotope effect of artemether [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1991, **5**(1):53 - 55.
- [12] Cui YY, Wang MZ. The metabolism of homoharringtonine by liver microsomes of rats and rabbits [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1991, **26**(4):274 - 279.
- [13] He K, Quan YZ. Metabolism of (-)- and (+)-praziquantel in human and rat liver microsomes [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1993, **7**(3):210 - 213.
- [14] Zhu CJ, Zhang JT, Qu ZW. Determination of plasma concentration of (-)-clausenamide and 6-hydroxyl-clausenamide in rats by HPLC and their pharmacokinetics [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2000, **35**(7):500 - 504.
- [15] Hofstee BJJ. On the evaluation of the constants V_{max} and K_m in enzyme reactions [J]. *Science*, 1954, **119**(4):329 - 331.
- [16] Testa B. Substrate and product stereoselectivity in monooxygenase-mediated drug activation and inactivation [J]. *Biochem Pharmacol*, 1988, **37**(1):85 - 92.