

糖尿病模型大鼠肝脏 CYP2E1 酶活性的变化

李 玲 张 远*

(北京医科大学药理学系, 北京 100083)

摘要 采用四氧嘧啶诱发糖尿病大鼠模型, 测定肝苯胺羟化酶及其他药酶活性, 同时用氯唑沙宗探针间接评价 CYP2E1 的活性。结果表明, 糖尿病大鼠苯胺羟化酶活性增加 80%, 伴有其他药酶活性增加。大鼠单次 po 氯唑沙宗 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 糖尿病组氯唑沙宗的 C_{max} 和 AUC 分别减少 37% 和 34%, 6-羟氯唑沙宗的 T_{peak} 缩短, 羟化指数(OH-CZX 与 CZX 的 AUC 比或浓度比)升高表明糖尿病大鼠可诱导 CYP2E1 活性。提示糖尿病患者服用经 CYP2E1 酶代谢的药物应慎重。

关键词 糖尿病; CYP2E1; 苯胺羟化酶; 氯唑沙宗

糖尿病是一种常见的代谢紊乱性疾病, 它可使肝脏中多种 P450 酶的含量和活性发生改变^[1], 其中较有代表性的酶是 CYP2E1。糖尿病可诱导 CYP2E1^[2], 其机制是 CYP2E1 mRNA 的稳定作用^[3], 即减少 mRNA 的降解和/或延长 mRNA 的活性。由于 CYP2E1 主要催化外源性物质, 尤其是小分子量的毒前物质和癌前物质如 NMDA、苯胺、乙醚、 CCl_4 等, 并生成有毒物或致癌物^[4], 因此, CYP2E1 活性升高可能增加肿瘤和肝毒性损伤的危险性^[5,6]。本文从细胞生化方面研究糖尿病大鼠肝脏某些酶的活性, 以及用氯唑沙宗作为 CYP2E1 药物探针间接评价糖尿病大鼠肝脏 CYP2E1 活性的影响。

材 料 和 方 法

试剂 四氧嘧啶(中国医学科学院药物研究所药厂); 血糖及 GPT 测定试剂盒(北京中生物高技术公司); 氨基比林、4-氨基酚、甲醛(北京化工厂), 苯胺、氯唑沙宗标准品及 β -葡萄糖苷酶(美国 Sigma 公司); 6-羟氯唑沙宗标准

品及内标物 5-fluorobenzoxazolone (美国 Vanderbilt 大学药理系 GR. Wilkinson 教授惠赠); 氯唑沙宗片剂(山东省医药工业研究所制药厂, 批号 960410)。

仪器 高速冷冻离心机(美国 Sorvall 公司); 超速冷冻离心机(美国 Beckman 公司); UV-260 双波长双光束紫外可见光分光光度计(日本岛津); 高效液相色谱仪系统、U6K 进样阀、M490 多功能紫外可见光可调波长检测器(美国 Waters 公司); SP4270 积分仪(美国 Varian 公司); Alltima C_{18} ($5 \mu\text{m} \times 4 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$) 反相色谱柱(美国 Alltech 公司)。

动物 体重 200 ~ 250 g, δ Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 由北京医科大学实验动物中心提供。

糖尿病大鼠模型的建立 体重 200 ~ 250 g, δ SD 大鼠 20 只, 测基础血糖和称重后随机分组, 禁食 10 h。糖尿病组在吸入乙醚麻醉状态下, 一次阴茎静脉注射 2% 四氧嘧啶(alloxan)溶液 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 对照组在相同条件下注射等容量生理盐水。分别于给药后 1, 3, 5, 7 d, 全部大鼠眼内眦静脉丛取血供测血糖一次, 7 d 内血糖均大于 $400 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ 者为糖尿病模型。

肝微粒体酶的分析 用 Bahr 和 Groth

法^[7]制备肝微粒体, Lowry 法^[8]测微粒体蛋白含量, Omura 和 Sato 法^[9]测细胞色素 P450 和 b₅, 苯胺羟化酶采用 Imai 法^[10], 氨基比林 N 脱甲基酶采用 Nash 法^[11], 用 Laemmli 法^[12]进行 SDS-PAGE 电泳计算 P450 分子量。

血样收集 正常大鼠 8 只和糖尿病大鼠 7 只禁食 12 h, 氯唑沙宗 50 mg·kg⁻¹ po 后, 于不同时间眼内眦静脉取血 1~1.5 ml 置肝素化试管内, 3000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 分离的血浆置 -20℃ 冰箱中贮存待测。

HPLC 法测定血浆中氯唑沙宗(CZX)及代谢物 6-羟氯唑沙宗(OH-CZX)的含量 色谱条件: 流动相为乙腈与 0.5% 醋酸按 30:70(v:v) 混合液, 经 0.45 μm 超滤膜过滤脱气后使用, 流速为 1.0 ml·min⁻¹, 紫外检测波长为 287 nm, 检测灵敏度为 0.01 AUFS, 积分仪衰减为 16。

萃取方法: 血浆样品 0.2 ml 加入 β-葡萄糖苷酶 1000 u, 37℃ 孵育过夜, 加入定量内标 1.04 μg, 混匀后加入 40 μl 1 mol·L⁻¹ HCl 和 2 ml 6% 高氯酸, 3000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 吸取上清液于另一试管, 加入 2 ml 乙酸乙酯, 振荡 3 min, 然后 3000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 吸取上层有机相移入一尖底试管, 37℃ 水浴中氮气吹干, 残渣溶于 50 μl 流动相, 取 5~10 μl 进样, 进行

HPLC 分析。

色谱图及精密度: 6-羟氯唑沙宗、内标物和氯唑沙宗的保留时间分别为 6.2, 10.84 和 18.76 min。6-羟氯唑沙宗和氯唑沙宗的回收率在 99.00%~104.40% 之间, 日内相对标准偏差(RSD)均小于 9%, 日间 RSD 分别小于 7% 和 10%, 最低检测浓度分别为 0.2 和 0.5 μg·ml⁻¹。

结 果

1 糖尿病大鼠模型的建立

大鼠 iv 四氧嘧啶后 2 d 开始出现多饮、多尿及体重不增等典型糖尿病症状, 血糖持续在 400 mg·dl⁻¹ 以上, 于给药后一周, 糖尿病组大鼠血糖(509.1 ± 62.5 mg·dl⁻¹)较对照组血糖(117.0 ± 14.1 mg·dl⁻¹)明显增加(P < 0.001)。因四氧嘧啶对肝脏可能有潜在损伤, 故监测 GPT。结果表明, 给药前后 GPT 无显著差异。见表 1。

2 糖尿病大鼠肝微粒体酶活性的影响

糖尿病大鼠多种肝微粒体酶均有增高, 增量 P450 酶总量为 61%, 微粒体蛋白量为 20%, 细胞色素 b₅ 为 104%, 氨基比林 N 脱甲基酶为 53%, 苯胺羟化酶为 80%, 见表 2。

Tab 1 Body weight, blood glucose and GPT of alloxan - induced diabetic rats

	Control(n = 10)		Diabetes(n = 9)	
	Before	7 days after	Before	7 days after
Body weight/g	224.1 ± 21.3	251.1 ± 26.9**	229.6 ± 23.0	233.3 ± 23.5
Glucose/mg·dl ⁻¹	112.1 ± 19.6	117.0 ± 14.1	108.7 ± 9.2	509.1 ± 62.5***
GPT/u	16.4 ± 7.7	18.1 ± 6.1	16.8 ± 4.0	19.2 ± 5.2

Note: ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs before.

Tab 2 Changes of content and activities of P450 in control and diabetic rats

	Control(n = 10)	Diabetes(n = 9)
Microsome protein/mg·g ⁻¹ liver	9.39 ± 1.56	11.31 ± 1.20**
Total cytochrome P450/nmol·mg ⁻¹ protein	0.33 ± 0.15	0.53 ± 0.11**
Cytochrome b ₅ /nmol·mg ⁻¹ protein	0.49 ± 0.33	1.01 ± 0.38**
Aminopyrine demethylation/nmol formaldehyde·mg ⁻¹ (protein)·min ⁻¹	3.34 ± 0.90	5.12 ± 0.90***
Aniline hydroxylation/nmol p-aminophenol·mg ⁻¹ (protein)·min ⁻¹	0.44 ± 0.22	0.80 ± 0.18**

Note: ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs control.

3 肝微粒体蛋白 SDS-PAGE 电泳

微粒体蛋白迁移至 4.7~5.7 cm 处有一宽的染色浓集带,此带在糖尿病组较之在对照组染色明显加深,根据迁移距离计算此带的分子量介于 49 000~61 000 之间。

4 糖尿病大鼠氯唑沙宗药代动力学的影响

正常和糖尿病大鼠单次 po 氯唑沙宗 50 mg·kg⁻¹,按不同时间测得的血药浓度绘制图,见图 1。用 3P87 实用药代动力学程序拟合并计算药代动力学参数,见表 3。结果表明,氯唑沙宗在大鼠体内的处置符合一房室开放模型,糖尿病大鼠组的 C_{max}(8.15 ± 2.16 μg·ml⁻¹)较对照组的 C_{max}(12.85 ± 3.09 μg·ml⁻¹)降低 37%(P<0.01),AUC(34.16 ± 8.46 μg·ml⁻¹·h)较对照组(52.14 ± 18.21 μg·ml⁻¹·h)减少 34%(P<0.05),但两者的消除 T_{1/2}、清除率(CL/F)和 T_{peak}无明显差异。糖尿病大鼠组氯唑沙宗代谢物 6-羟氯唑沙宗的消除 T_{1/2}为 3.37 ± 1.18 h,AUC 为 28.65 ± 5.93 μg·ml⁻¹·h,与对照组 6-羟氯唑沙宗的消除 T_{1/2}(4.12 ± 1.28 h)和 AUC(29.34 ± 3.65 μg·ml⁻¹·h)无差异,但糖尿病组 6-羟氯唑沙宗的 T_{peak}(0.71 ± 0.32 h)比对照组(1.65 ± 0.37 h)明显缩短(P<0.01)。

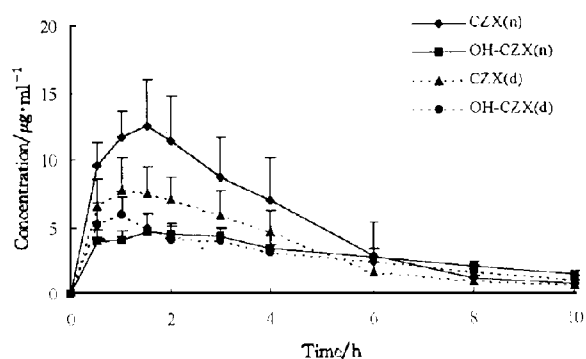


Fig 1 Plasma concentration-time curve of chlorzoxazone(CZX) and OH-CZX in normal and diabetic rats after an oral dose of 50 mg·kg⁻¹ CZX(n: normal rat, d: diabetic rat).

Tab 3 Pharmacokinetic parameters of chlorzoxazone in normal and diabetic rats after a single oral dose of 50 mg·kg⁻¹

Parameter	Control(n = 8)	Diabetes(n = 7)
A/μg·ml ⁻¹	92.44 ± 86.21	31.65 ± 26.91
Ke/h ⁻¹	0.51 ± 0.17	0.40 ± 0.11
Ka/h ⁻¹	1.55 ± 1.37	1.51 ± 0.76
T _{1/2(Ka)} /h	0.65 ± 0.32	0.56 ± 0.23
T _{1/2(Ke)} /h	1.50 ± 0.46	1.83 ± 0.47
T _{peak} /h	1.22 ± 0.23	1.21 ± 0.16
C _{max} /μg·ml ⁻¹	12.85 ± 3.09	8.15 ± 2.16* *
AUC/μg·ml ⁻¹ ·h	52.14 ± 18.21	34.16 ± 8.46*
CL/F _(s) /mg·h ⁻¹ /(μg·ml ⁻¹)	1.12 ± 0.27	1.43 ± 0.59
V/F _(s) /mg·kg ⁻¹ /(μg·ml ⁻¹)	2.15 ± 0.98	3.98 ± 2.47

Note: * P<0.05, ** P<0.01 vs control.

讨 论

糖尿病肝微粒体 P450 酶活性的影响已 20 多年研究,它可诱导多种酶的活性和含量,如 CYP1A, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A 和 CYP4A^[1]。由于 CYP2E1 主要催化外源性物质,尤其是毒前物质和癌前物质^[4],它已成为近年来药代学尤其是遗传药理学研究的热点。

本实验采用四氧嘧啶诱导糖尿病大鼠模型,方法简单,成功率高且模型形成快。四氧嘧啶用量过大可引起肝损伤,测定 GPT 可监测四氧嘧啶造成肝损伤引起药代酶活性的异常改变。本实验结果显示,糖尿病大鼠肝微粒体蛋白、总 P450 和 b5 含量以及氨基比林 N 脱甲基酶和苯胺羟化酶活性分别增加 20%, 61%, 104%, 53% 和 80%。SDS-PAGE 电泳显示,糖尿病组比对照组染色明显加深。因此,糖尿病不仅诱导 P450 酶使其含量增加,活性也明显增加。氨基比林 N 脱甲基酶的活性是由多种 P450 酶决定的,因此文献报道的糖尿病对此酶影响不尽相同,有的增加,有的减少,本文结果显示有诱导作用。苯胺羟化酶活性是反映 CYP2E1 活性特异的体外探针,因此,细胞生化水平实验证实了糖尿病对 CYP2E1 活性有诱导作用。另外,本文应用氯唑沙宗作为 CYP2E1 活性的体内药物探针对氯唑沙宗在糖

尿病大鼠体内的药代动力学进行了研究。体内研究结果显示,糖尿病组大鼠氯唑沙宗的 C_{\max} 比对照组减少 37%, AUC 比对照组减少 34%, 同时糖尿病组氯唑沙宗代谢物 6-羟氯唑沙宗的 T_{peak} 较对照组明显提前 ($P < 0.01$)。目前用氯唑沙宗药物探针评价 CYP2E1 活性的体内实验主要是依据消除 $T_{1/2}$ 、清除率、AUC 等药代动力学参数来反映机体对药物的消除能力,但有人提出用羟化指数 (hydroxylation index, HI) 这一指标更能反映机体对氯唑沙宗的羟化能力,即 6-羟氯唑沙宗与氯唑沙宗在各时间点的浓度比或 AUC 比。本实验糖尿病组和对照组大鼠在给药后 0.5, 1, 1.5, 2, 3 和 4 h 的浓度比均有显著性差异,选择具有代表性的峰时间 ($t = 1.5$) 浓度比,对照组为 0.35 ± 0.04 , 而糖尿病组为 0.68 ± 0.26 , 增加近一倍;如果用 AUC 比表示羟化指数,则对照组 HI 为 0.59 ± 0.13 , 糖尿病组 HI 为 0.88 ± 0.27 , 有显著性差异,表明糖尿病组大鼠羟化能力显著提高,提示糖尿病大鼠诱导了 CYP2E1 酶使机体对氯唑沙宗的代谢加快。因此,无论是 CYP2E1 的体外探针还是体内探针均证实了糖尿病对 CYP2E1 有诱导作用。

总之,糖尿病对 P450 酶的影响是广泛的,除可诱导 CYP2E1 外,还可诱导其它 P450 酶。因此,糖尿病患者应慎重用药,一方面要防止药物用量不足,另一方面由于糖尿病患者 CYP2E1 酶活性升高使用药量过大而加重药物对肝脏的损伤作用。

致谢 美国 Vanderbilt 大学药理系 GR. Wilkinson 教授惠赠 6-羟氯唑沙宗标准品和内标物。

参 考 文 献

- 1 Shimojo N. Cytochrome P450 changes in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Int J Biochem*, 1994, **26**:1261
- 2 Dong Z, Hong J, Ma Q, *et al.* Mechanism of induction of cytochrome P450ac (P450j) in chemically induced and spontaneously diabetic rats. *Arch Biochem Biophys*, 1988, **263**:29
- 3 Song BJ, Matsunaga T, Hardwick JP, *et al.* Stabilization of cytochrome P450j messenger ribonucleic acid in the diabetic rat. *Mol Endocrinol*, 1987, **1**:542
- 4 Koop DR. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB J*, 1992, **6**:724
- 5 Pirmohamed M, Kitteringham NR, Quest LJ, *et al.* Genetic polymorphism of cytochrome P450 2E1 and risk of alcoholic liver disease in Caucasians. *Pharmacogenetics*, 1995, **5**:351
- 6 Kato S, Onda M, Matsukura N, *et al.* Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) genetic polymorphism in a case-control study of gastric cancer and liver disease. *Pharmacogenetics*, 1995, **5**:141
- 7 Bahr CV, Groth CG, Jansson H, *et al.* Drug metabolism in human liver *in vitro*: Establishment of human liver bank. *Clin Pharmacol Ther*, 1980, **27**:711
- 8 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193**:265
- 9 Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem*, 1964, **239**:2370
- 10 Imai Y, Ito A, Sato R. Evidence for biochemically different types of vesicles in the hepatic microsomes fraction. *J Biochem*, 1966, **60**:417
- 11 Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hansh reaction. *Biochem J*, 1953, **55**:416
- 12 Laemmli UK. Cleavage of structural properties during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 1970, **227**:680

CHANGES OF CYP2E1 ACTIVITY IN DIABETIC RAT MODEL

Li Ling(Li L) and Zhang Yuan(Zhang Y)

(*Department of Pharmacology, Beijing Medical University, Beijing 100083*)

ABSTRACT Diabetic rat model was induced by alloxan. To evaluate CYP2E1 activity indirectly, the activities of aniline dehydroxylase and other drug metabolic enzymes were measured. The pharmacokinetic profile of chlorzoxazone(CZX), a drug probe for CYP2E1, was obtained after a single oral dose of $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. The results indicated that diabetes increased aniline dehydroxylase activity by 53%. The C_{max} and AUC of chlorzoxazone in diabetic rats were reduced 37% and 34%, respectively. The T_{peak} of 6-hydroxychlorzoxazone in diabetic rats was shortened apparently. The hydroxylation index described by the AUC ratio of 6-hydroxychlorzoxazone to chlorzoxazone or the ratio of concentration of 6-hydroxychlorzoxazone to chlorzoxazone, which indicated the ability of hydroxylation, was increased in diabetes. In conclusion, diabetes can induce CYP2E1 activity, suggesting that diabetic patients should be cautious when taking some therapeutic drugs which metabolized by CYP2E1.

KEY WORDS Diabetes; CYP2E1; Aniline dehydroxylase; Chlorzoxazone