

双环醇在大鼠和人肝微粒体的代谢

鞠美华, 李 燕*

(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 研究参与双环醇代谢的主要药物代谢酶及代谢动力学参数, 分离鉴定双环醇代谢产物。方法 双环醇与大鼠和人肝微粒体进行温孵, 以高效液相色谱、质谱、核磁共振技术检测并分离鉴定双环醇及其代谢产物。结果 双环醇在地塞米松诱导大鼠肝微粒体中的代谢速率显著高于正常大鼠肝微粒体, 酮康唑可显著抑制双环醇的代谢。双环醇主要代谢产物为: 4-羟基-4'-甲氧基-6-羟甲基-6'-甲氧羰基-2,3,2',3'-双亚甲二氧基联苯和 4-甲氧基-4'-羟基-6-羟甲基-6'-甲氧羰基-2,3,2',3'-双亚甲二氧基联苯。结论 双环醇在大鼠和人肝微粒体的主要代谢产物为 4-羟基-4'-甲氧基-6-羟甲基-6'-甲氧羰基-2,3,2',3'-双亚甲二氧基联苯和 4-甲氧基-4'-羟基-6-羟甲基-6'-甲氧羰基-2,3,2',3'-双亚甲二氧基联苯, 细胞色素 P450 3A 主要参与双环醇代谢。

关键词: 双环醇; 代谢产物; 细胞色素 P450; 肝微粒体

中图分类号: R968.1; R978.7 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2005)02-0111-06

Metabolism of bicyclol in rat and human liver microsomes *in vitro*

JU Mei-hua, LI Yan*

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

Abstract: Aim To study the drug metabolizing enzymes involved in the metabolism of bicyclol and identify the major metabolites of bicyclol in rat and human liver microsomes. **Methods** Bicyclol was incubated with rat and human liver microsomes. The metabolites of bicyclol were isolated by HPLC and identified by MS and ¹H NMR. **Results** The metabolic rate of bicyclol in DEX-induced rat liver microsomes was obviously higher than that in untreated microsomes, while it was much lower in human liver microsomes. Ketoconazole was capable to exhibit strong inhibition (>90%) on bicyclol metabolism. Two metabolites of bicyclol were identified to be 4-hydroxy-4'-methoxy-6-hydroxy-methyl-6'-methoxycarbonyl-2,3,2',3'-bis(methylene-dioxy) biphenyl and 4-methoxy-4'-hydroxy-6-hydroxymethyl-6'-methoxycarbonyl-2,3,2',3'-bis(methylene-dioxy) biphenyl. **Conclusion** CYP3A was considered as the major catalyst involved in bicyclol metabolism *in vitro* and two metabolites of bicyclol in rats were identified as 4-hydroxy-4'-methoxy-6-hydroxy-methyl-6'-methoxycarbonyl-2,3,2',3'-bis(methylene-dioxy) biphenyl and 4-methoxy-4'-hydroxy-6-hydroxymethyl-6'-methoxycarbonyl-2,3,2',3'-bis(methylene-dioxy) biphenyl.

Key words: bicyclol; metabolite; cytochrome P450; liver microsomes

双环醇是中国医学科学院药物研究所创制的抗
肝炎新药。研究表明,双环醇对多种实验性急、慢性

肝损伤均有明显保护作用^[1],临床用于治疗慢性乙
型、丙型病毒性肝炎已取得较好疗效^[2],且具有口
服吸收好、不良反应少的特点,化学结构如图 1 所
示。双环醇在动物体内的吸收、分布、排泄研究结果
表明该药口服生物利用度高,体内分布以肝脏最高。
药物在体内的代谢途径、代谢速率、代谢产物类型等
与药物进入体内所产生的作用特点和强度紧密相

收稿日期: 2004-02-25.

基金项目: 科技部“九五”国家重点科技攻关计划资助项目(96-901-01-45); 美国中华医学基金(CMB).

* 通讯作者 Tel: 86-10-63165172, Fax: 86-10-63017757,

E-mail: yanli@imm.ac.cn

关,因此了解药物在体内的代谢转化过程具有重要意义。本研究利用大鼠和人肝微粒体,对参与双环醇代谢的主要药物代谢酶、体外代谢动力学参数及代谢产物结构进行了检测及鉴定。

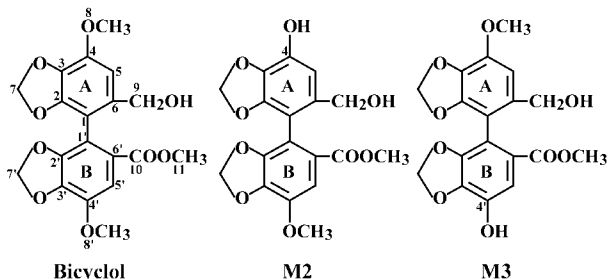


Figure 1 Structures of bicyclol and its metabolites (M2 and M3)

材料和方法

药品与试剂 双环醇 (bicyclol)和联苯双酯 (dimethyl diphenyl bicarboxylate, DDB)由中国医学科学院药物研究所合成室提供。3-甲基胆蒎 (3-methylcholanthrene, 3-MC) 苯巴比妥钠 (phenobarbital sodium, PB) 葡萄糖-6-磷酸 (glucose 6-phosphate, G-6-P)、resoufin及二甲基亚硝胺 (nitrosodimethylamine, NDMA)均购自美国 Sigma公司;氧化型辅酶 II (β -NADP)、ethoxyresoufin (EORR)、pentoxyresoufin (PORR)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucose 6-phosphate dehydrogenase, G-6-P DH, Type XV) 和红霉素 (erythromycin base)均购自德国 Serva公司;地塞米松磷酸二钠盐 (dexamethasone sodium phosphate, DEX) 为瑞士 ROUSSEI UCLAF 产品;酮康唑 (ketoconazole)由西安杨森制药厂惠赠。

实验动物及分组 Wistar大鼠, δ , 体重 125 - 135 g, 由中国医学科学院实验动物中心提供。双环醇诱导组 ig 双环醇 (溶于 PEG400) 200 mg·kg⁻¹, 正常对照组给同体积赋形剂; 3-MC诱导组 ip 3-MC (溶于植物油) 30 mg·kg⁻¹[3]; PB诱导组 ip PB (溶于生理盐水) 80 mg·kg⁻¹[4]; 上述各组动物每天给药 1 次, 连续 3 d; 乙醇诱导组 ig 20%乙醇水溶液 5 mL·kg⁻¹[5]; DEX诱导组 ip DEX (溶于生理盐水) 100 mg·kg⁻¹, 每天 1 次, 连续 4 d[6]。动物处死前 12 h 禁食, 末次给药后 24 h 断头处死。成人肝组织为临床活检标本, 离体后在液氮中冷冻保存, 之后存于 -80 °C 冰箱。按文献方法制备动物和人肝微粒体。肝微粒体蛋白浓度以 Lowry 法测定, 细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 含量以 Omura 和 Sato 方法 [7,8] 测定。

酶活性测定 用动态荧光法 [9] 分别测定 EORR 和 PORR 脱甲基反应产物 resoufin 的生成量以反映 EROD (7-ethoxyresoufin O-deethylase) 及 PROD (7-pentoxyresoufin O-dealkylase) 活性。NDMA 脱甲基酶 (N-nitrosodimethylamine-demethylase) 和红霉素脱甲基酶 (erythromycin-demethylase) 活性测定则分别以 NDMA 和红霉素为底物, 以生成的甲醛量反映酶活性 [10]。

肝微粒体代谢 将不同浓度双环醇与肝微粒体蛋白 10 mg 混合, 用 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液补充至 1 mL, 于 37 °C 预温孵 2 min, 再各加入 NADPH-发生系统 (NADPH-generating system, NADPH-GS: 含 β -NADP 2.22 mmol·L⁻¹, G-6-P 22.2 mmol·L⁻¹, G-6-P-DH 2 U, 溶于 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 1 mL) 1 mL 起始反应。反应液在 37 °C 温孵一定时间后, 加入二氯甲烷 3 mL 终止反应, 加入内标 DDB (10 μ g), 振荡提取 1 min, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 上层水相再以二氯甲烷 3 mL 提取, 合并两次提取有机相, 45 - 55 °C 水浴蒸干。提取物重悬于甲醇 0.2 mL, 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 10 μ L, 稀释 10 倍后用 HPLC 法分析检测双环醇及其代谢产物。体外代谢抑制试验选择抑制剂酮康唑 (终浓度为 0.2 mmol·L⁻¹), 与双环醇同时加入肝微粒体蛋白中, 其余操作方法同上 [11]。

HPLC 测定 Waters HPLC (Waters 2010 色谱管理系统), 996 二极管矩阵检测器, Supelco C₁₈ 反相柱 (4.6 mm × 25.0 cm, 5 μ m), 流动相为甲醇-水 (48:52), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 230 nm, 进样量为 10 μ L。以 DDB 作为内标, 根据双环醇 / DDB 峰面积比制备标准曲线, 并计算双环醇含量 [12]。

代谢产物结构鉴定 质谱用 VG Zab-2f 质谱仪测定, EI 源温度为 200 °C, 电子轰击能量为 70 eV, 扫描范围为 m/z 50 - 1 000。核磁共振氢谱用 Varian-Mercury-300 核磁共振仪测定, 溶剂为 CDCl₃, 温控为 25 °C。

结果

1 药物代谢酶鉴定

应用 3-MC, PB, 乙醇及 DEX 等不同 CYP450 同工酶诱导剂分别处理动物后, 可显著诱导 CYP1A, 2B, 2E 和 3A 酶活性, 诱导倍数依次为 240, 30, 2.3 和 4 倍 (表 1)。在 PB 和 DEX 诱导的肝微粒体中, 双环醇代谢速率显著增加; 而在双环醇诱导肝微粒

Table 1 Effect of bicyclol, 3-methylcholanthrene (3-MC), phenobarbital (PB), ethanol and dexamethasone (DEX) on hepatic microsomal enzymes and metabolism of bicyclol in rats

Parameter	Untreated	Bicyclol	3-MC	PB	Ethanol	DEX
Microsomal protein/mg·mL ⁻¹	16.9 ± 1.5	22.3 ± 1.4**	22.8 ± 1.2**	25.7 ± 1.5***	21.1 ± 1.0**	24.8 ± 2.4**
Cytochrome P450/nmol·mg ⁻¹ (protein)	0.73 ± 0.07	1.28 ± 0.06***	1.34 ± 0.14***	1.70 ± 0.12***	0.65 ± 0.10	0.66 ± 0.07
EROD(CYP1A)/pmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	50 ± 5	66 ± 6*	12250 ± 358***	130 ± 30**	45.0 ± 2.0	43.1 ± 2.4
PROD(CYP2B)/pmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	1.8 ± 0.4	10.1 ± 1.1***	1.10 ± 0.15	55 ± 5***	1.87 ± 0.21	3.9 ± 0.6*
NDMAD(CYP2E)/nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	1.40 ± 0.06	1.29 ± 0.12	1.20 ± 0.14*	1.27 ± 0.14	3.2 ± 0.3***	1.74 ± 0.20**
Erythromycin demethylase (CYP3A)/nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	1.43 ± 0.03	1.9 ± 0.3*	1.57 ± 0.24	2.78 ± 0.26***	1.67 ± 0.17*	5.8 ± 0.6***
Metabolic rate/nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	917 ± 68	825 ± 88	661 ± 67**	1262 ± 127**	834 ± 127	1366 ± 120***

n = 5, $\bar{x} \pm s$. Male rats were treated with bicyclol (200 mg·kg⁻¹, qd × 3, ig), 3-MC (30 mg·kg⁻¹, qd × 3, ip), PB (80 mg·kg⁻¹, qd × 3, ip), ethanol (1 mL·kg⁻¹) and DEX (100 mg·kg⁻¹, qd × 4, ip), respectively. All animals were sacrificed for preparation of hepatic microsomes 24 hours after last administration. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01, *** *P* < 0.001 vs untreated

体中,双环醇代谢量未见明显改变,提示参与双环醇代谢的主要代谢酶为 CYP3A。

双环醇口服给药后可明显诱导 CYP总量的增加,其中以 CYP2B的诱导作用最为显著,对 CYP1A和 3A仅有轻微的诱导作用,对 CYP2E无影响。

双环醇体外代谢抑制试验表明,CYP3A的选择性抑制剂酮康唑可明显抑制双环醇的代谢(表 2)。在未处理及 DEX诱导的大鼠肝微粒体中,双环醇的代谢几乎完全被抑制;在双环醇及 PB诱导的大鼠肝微粒体中,双环醇的代谢也被抑制 90%以上。进一步证明 CYP 3A是参与双环醇代谢转换的主要药物代谢酶。

Table 2 Effect of ketoconazole on bicyclol metabolism in rat liver microsomes

Liver microsomes	Metabolic rate of bicyclol/nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹	
	Control	Ketoconazole
Untreated	0.83 ± 0.06	0.019 0 ± 0.001 0 (2.31)
Bicyclol	0.815 ± 0.007	0.033 0 ± 0.002 0 (4.04)
PB	1.17 ± 0.04	0.116 ± 0.003 (9.93)
DEX	1.32 ± 0.07	0.037 ± 0.003 (2.83)

The final concentration of bicyclol and ketoconazole were 32 μmol·L⁻¹ and 0.2 mmol·L⁻¹, respectively. Value in parentheses denote the percentage of control without ketoconazole. *n* = 3, $\bar{x} \pm s$

2 体外代谢动力学参数测定

在 6 - 32 μmol·L⁻¹底物浓度,测定双环醇在正常、诱导大鼠肝微粒体及人肝微粒体中代谢反应的 *K_m*和 *V_{max}*。用双倒数作图法计算(图 2)得到双环醇体外代谢 *K_m*和 *V_{max}*为:正常大鼠,*K_m* = 12.01 μmol·L⁻¹,*V_{max}* = 3.134 nmol·min⁻¹·mg⁻¹(protein);地塞米松诱导大鼠,*K_m* = 93.45 μmol·L⁻¹,*V_{max}* =

21.98 nmol·min⁻¹·mg⁻¹(protein);人,*K_m* = 0.450 5 μmol·L⁻¹,*V_{max}* = 0.018 nmol·min⁻¹·mg⁻¹(protein)。可见在诱导大鼠肝微粒体中,双环醇代谢反应的 *K_m*和 *V_{max}*均比其在正常大鼠肝微粒体中增加 7 - 8倍,而 *V_{max}*/*K_m*的比值则基本相同。双环醇在人肝微粒体中代谢反应的 *K_m*和 *V_{max}*明显低于在大鼠肝微粒体,*V_{max}*/*K_m*仅相当于其在正常大鼠肝微粒体中的 14.5%。

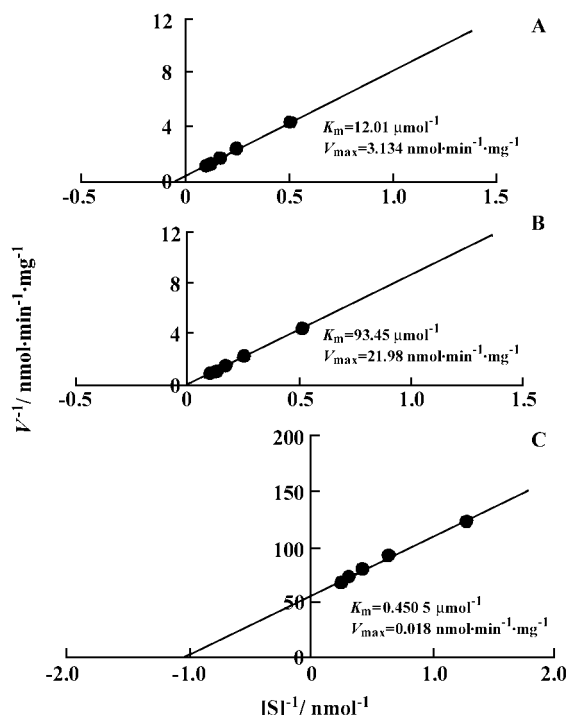


Figure 2 Double reciprocal plots of bicyclol metabolic rate in untreated rat (A), DEX induced rat liver microsomes (B) and human liver microsomes (C). The apparent *K_m* and *V_{max}* were derived by fit in the results to a single-component Michaelis-Menton equation. *n* = 3

3 双环醇体外代谢产物分离鉴定

双环醇在正常大鼠肝微粒体中主要代谢物有 3 个,分别为 M1, M2, M3 (极性强度为 M1 > M2 > M3 > 双环醇),其中以 M3 含量最多,约占代谢产物总量的 70%(图 3)。分别收集 M2 和 M3 HPLC 峰面积下的洗脱液,加入二氯甲烷 3 mL 振荡提取 1 min, 3 000 r·min⁻¹离心 10 min,上层水相再以二氯甲烷 3 mL 提取,合并两次提取有机相,45 - 55 °C 水浴蒸干后进行 MS 和 ¹H NMR 等光谱分析。

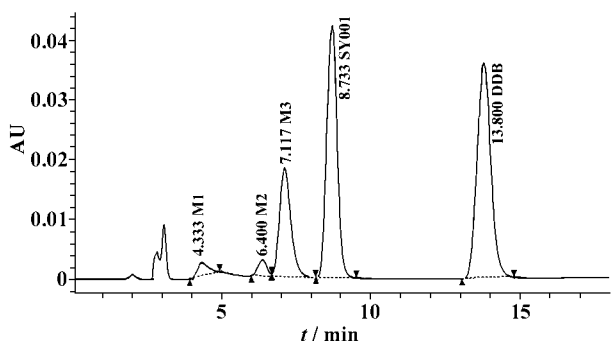


Figure 3 HPLC profile of bicyclol metabolites in untreated rat liver microsomes *in vitro*. Bicyclol metabolites are named as M1, M2 and M3 in polarity order. DDB was used as an internal standard in HPLC analysis

在质谱图中,代谢产物 M2 和 M3 都具有 *m/z* 376 的分子离子峰及 344 (376-CH₃OH), 315 (344-CHO), 300 (315-CH₃) 等碎片峰(图 4),比双环醇的分子离子峰及相应的碎片峰均少 14 个质量单位。因此推断 M2 和 M3 都是比双环醇少 1 个亚甲基(-CH₂)的脱甲基代谢产物。

双环醇的 ¹H NMR 谱图中,有 1 个酯甲基峰 (δ 3.71), 2 个甲氧基峰 (δ 3.95, 3.97), 1 组亚甲基四重峰 (δ 4.34, 4.36, 4.38, 4.41); 2 个芳氢峰 (δ 6.77, 7.34); 2 个次甲二氧基峰,处于羟甲基侧链所在苯环(即 A 环)上者为单峰 (δ 5.91), 处于酯甲基侧链所在苯环(即 B 环)上者为四重裂分峰 (δ 6.01, 6.02, 6.03, 6.04)。代谢产物 M2 的 ¹H NMR 谱图中,只有 1 个甲氧基峰 (δ 3.97), A 环上的芳氢峰向高场移动 (δ 6.77 → 6.72); 其他峰与双环醇基本一致。与此相对应,另一代谢产物 M3 的 ¹H NMR 谱图中,也只有 1 个甲氧基峰 (δ 3.95), A 环上的芳香氢峰未发生改变,而 B 环上的芳氢峰向高场移动 (δ 7.33 → 7.29)。A 环上的次甲二氧基峰裂分为四重峰,其他如酯甲基及 B 环上的次甲二氧基等均未发生改变。双环醇及其代谢产物 M2 和 M3 的 ¹H NMR 见表 3。

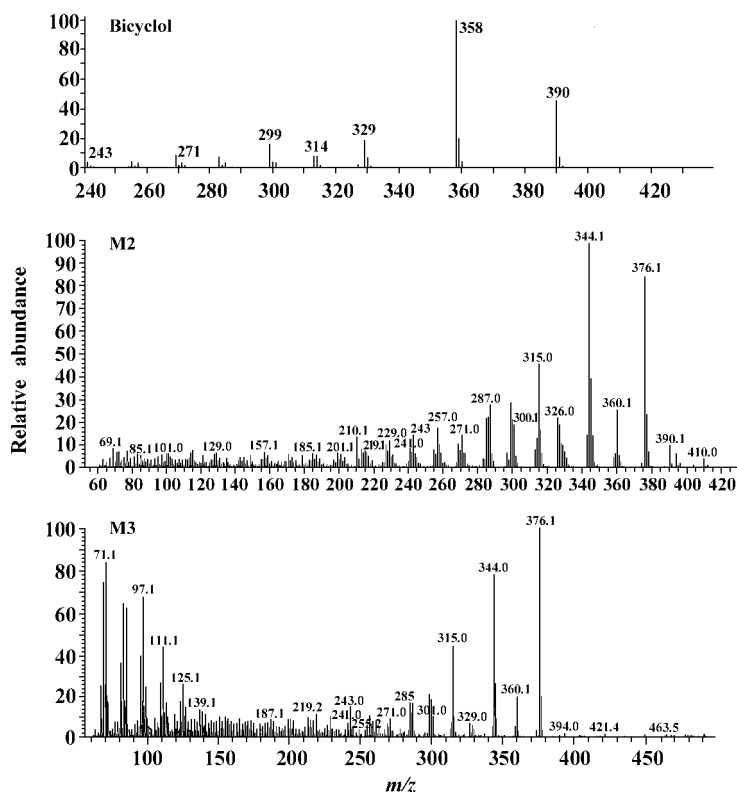


Figure 4 EI mass spectrum of bicyclol and its metabolites M2 and M3

Table 3 ^1H NMR spectra of bicyclol and its metabolites

Position of group	Bicyclol	M3	M2
9-OH			
11-COOCH ₃	3.710 2 (s)	3.708 4 (s)	3.723 1 (s)
8-OCH ₃	3.947 0 (s)	3.945 7 (s)	-
8'-OCH ₃	3.974 1 (s)	-	3.973 1 (s)
9-CH ₂ -	4.335 8, 4.359 6, 4.384 3, 4.408 1 (q, J=12.0 Hz)	4.347 5, 4.371 2, 4.409 7, 4.433 3 (dd, J=19.25 Hz, J=11.80 Hz)	4.306 3, 4.329 8, 5.355 3, 4.379 0 (q, J=12.0 Hz)
7-OCH ₂ O-	5.909 8 (s)	5.910 1, 5.912 8, 5.915 9, 5.918 3 (q, J=1.35 Hz)	5.916 6 (s)
7'-OCH ₂ O-	6.014 7, 6.017 4, 6.034 4, 6.037 1 (dd, J=8.50 Hz, J=1.35 Hz)	6.019 3, 6.021 3, 7.037 6, 6.039 3 (dd, J=8.18 Hz, J=0.89 Hz)	6.025 0, 6.039 2 (d, J=7.07 Hz)
5-ArH	6.770 3 (s)	6.766 2 (s)	6.723 2 (s)
5'-ArH	7.331 5 (s)	7.290 3 (s)	7.331 3 (s)

结合质谱,推断代谢产物 M2为双环醇 A环 4位脱甲基产物, M3为双环醇 B环 4'位脱甲基产物,即 M2结构为 4-羟基-4'-甲氧基-6-羟甲基-6'-甲氧羰基-2,3,2',3'-双亚甲二氧基联苯; M3结构为 4-甲氧基-4'-羟基-6-羟甲基-6'-甲氧羰基-2,3,2',3'-双亚甲二氧基联苯。

讨论

CYPs是机体内参与各种外源物和内源物代谢的重要酶系。以往研究表明,双环醇的肝保护作用与其调控药物代谢酶,加速化学毒物和致癌物代谢密切相关。本研究表明,双环醇在动物体内主要诱导 CYP2B的增加。一般认为,大多数化合物经 CYP2B代谢催化后主要生成无毒或低毒的代谢产物而排出体外,因此双环醇对 CYP2B的显著诱导将有利于肝脏的解毒作用。体外代谢研究显示,双环醇在诱导 CYP同工酶的同时,其自身代谢率并未增加。由于参与双环醇代谢转换的主要同工酶为 CYP3A,而双环醇对 CYP3A只有微弱的诱导作用,因此双环醇不诱导其自身代谢,这对临床长期用药维持有效代谢血药浓度,减少抗药性的产生具有重要意义。

CYP同工酶对外源物的代谢表现出明显的底物交叉重叠性,即多个同工酶参与催化同一反应,其结果将直接影响代谢反应的动力学参数特征。本研究表明,双环醇代谢反应的底物浓度曲线呈典型的米孟氏方程特征,提示双环醇的代谢反应可能主要是由一个 P450同工酶催化的。当然,也不排除其他 CYP450同工酶参与极少量双环醇代谢。在正常大鼠肝微粒体中,双环醇代谢反应的 K_m 在 10^{-5} 数量级;在 DEX诱导的大鼠肝微粒体中,其 K_m 及 V_{max} 均

增加约 7倍,而双环醇代谢反应的 V_{max}/K_m 及酶的转换率 K_{cat} 则极为相近。上述结果也从不同角度提示,DEX诱导的 CYP450 3A是双环醇的主要代谢酶。在人肝微粒体中,双环醇代谢反应的 K_m 只有在正常大鼠肝微粒体中的 3.75%, V_{max} 仅为 0.57%,提示人 CYP450对双环醇的亲合性虽较好,但催化效率较低;对于人细胞色素 P450酶来说,双环醇并非最佳底物 (poor substrate)。

已知体内经 CYP3A代谢的临床药物为数众多,如 nifedipine, midazolam^[13], erythromycin^[14], cyclosporine^[15], lovactin, lidocaine^[16]等,因此,确定参与双环醇代谢的肝药酶具有重要的临床意义。当双环醇与主要经 CYP3A代谢药物或 CYP3A抑制剂(如酮康唑等)合并用药时,应警惕药物间相互作用及可能产生的不良后果。

本研究发现,在大鼠肝微粒体中双环醇主要代谢为 3个代谢产物 M1, M2和 M3,极性大小顺序为 M1 > M2 > M3 > 双环醇。M1的 ^1H NMR谱图证实其为双环醇 2,3位次甲二氧五元环的开环产物,该代谢产物性质极不稳定,不能给出单一的 MS谱图,因此具体结构未能确定。由于 $\text{OCH}_3 \rightarrow \text{OH}$ 后,苯环电子云密度下降,取代基邻位芳氢向高场移动, δ 值减小,据此判定 M2为 4-羟基-4'-甲氧基-6-羟甲基-6'-甲氧羰基-2,3,2',3'-双亚甲二氧基联苯; M3为 4-甲氧基-4'-羟基-6-羟甲基-6'-甲氧羰基-2,3,2',3'-双亚甲二氧基联苯。实验中没有发现双环醇的 C4和 C4'位同时脱甲基的双脱甲基代谢产物。

综上所述,双环醇在大鼠肝微粒体中主要通过 CYP3A催化的 O脱甲基反应,代谢为 4-羟基-4'-甲氧基-6-羟甲基-6'-甲氧羰基-2,3,2',3'-双亚甲二氧基联苯和 4-甲氧基-4'-羟基-6-羟甲基-6'-甲氧羰基-2,3,2',3'-双亚甲二氧基联苯以及其他代谢产物。

双环醇在正常大鼠、诱导大鼠肝微粒体及人肝微粒体中代谢反应的动力学参数 K_m 和 V_{max} 的研究为指导临床合理用药,进一步合成新型、有效的抗肝炎药提供了重要依据。

References:

- [1] Li Y. Pharmacological study and clinical application of bicyclol [J]. *Infect Dis Inf* (传染病信息), 2002, **15** (2): 60 - 61 .
- [2] Yao GB, Ji YY, Wang QH, *et al.* A randomized double-blind controlled trial of bicyclol in treated of chronic hepatitis B [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem* (中国新药与临床杂志), 2002, **21**(8): 457 - 461 .
- [3] N'Guyen QB, Fallone F, Serre E, *et al.* Serum increases CYP1A1 induction by 3-methylcholanthrene [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **297**(2): 249 - 254 .
- [4] Joannard F, Galisteo M, Corcos L, *et al.* Regulation of phenobarbital-induction of CYP2B and CYP3A genes in rat cultured hepatocytes: involvement of several serine / threonine protein kinases and phosphatases [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2000, **16**(5): 325 - 337 .
- [5] Upadhy SC, Tinumalai PS, Boyd MR, *et al.* Cytochrome P4502E (CYP2E) in brain: constitutive expression, induction by ethanol and localization by fluorescence *in situ* hybridization [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, **373**(1): 23 - 34 .
- [6] Pascussi JM, Drocourt L, Fabre JM, *et al.* Dexamethasone induces pregnane X receptor and retinoid X receptor- α expression in human hepatocytes: synergistic increase of CYP3A4 induction by pregnane X receptor activators [J]. *Mol Pharmacol*, 2000, **58**(2): 361 - 372 .
- [7] Omura T, Sato SR. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes, I. Evidence for its hemoprotein nature [J]. *J Biol Chem*, 1964, **239**(7): 2370 - 2378 .
- [8] Omura T, Sato SR. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes, II. Solubilization, purification, and properties [J]. *J Biol Chem*, 1964, **239**(7): 2379 - 2385 .
- [9] Lubet RA, Mayer RT, Cameron JW, *et al.* Dealkylation of pentoxifyresoufin: a rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome (s) P-450 by phenobarbital and other xenobiotics in the rat [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1985, **238**(1): 43 - 48 .
- [10] Yang CS, Tu YY, Koop DR, *et al.* Metabolism of nitrosamines by purified rabbit liver cytochrome P450 isozymes [J]. *Cancer Res*, 1985, **45**(3): 1140 - 1145 .
- [11] Dilmaghanian S, Gerber JG, Filler SG, *et al.* Enantioselectivity of inhibition of cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) by ketoconazole: testosterone and methadone as substrates [J]. *Chimistry*, 2004, **16**(2): 79 - 85 .
- [12] Ji YY, Cheng NN, Yao GB. Pharmacokinetic study of bicyclol in thirty health volunteers [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther* (中国临床药理学与治疗学杂志), 2001, **6**(3): 218 - 221 .
- [13] Patki KC, Von Moltke LL, Greenblatt DJ. *In vitro* metabolism of midazolam, triazolam, nifedipine, and testosterone by human liver microsomes and recombinant cytochromes p450: role of cyp3a4 and cyp3a5 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2003, **31**(7): 938 - 944 .
- [14] Paine MF, Wagner DA, Hoffmaster KA, *et al.* Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein mediate the interaction between an oral erythromycin breath test and rifampin [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2002, **72**(5): 524 - 535 .
- [15] Lupp A, Kuhn UD, Herwig R, *et al.* Cyclosporine A and tacrolimus: *in vitro* investigations on the differential interactions with the cytochrome P450 system in rat and human liver [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2003, **54**(5 - 6): 467 - 473 .
- [16] Elmas T, Mavioglu O, Oztekin S, *et al.* The effect of propofol (anesthetic and inhibitor of CYP3A4) on serum lidocaine concentrations in smokers and chronic alcohol consumers [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2003, **41**(4): 182 - 184 .