

## 药物对肝药酶的影响研究方法

石杰<sup>1,2</sup>, 陈安进<sup>2</sup>, 刘敏<sup>2</sup>, 张新惠<sup>2</sup> (青岛市立医院药物研究室, 山东 青岛 266011)

中图分类号: R977

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2005)08-0742-02

药物对肝药酶影响的研究对于药物的安全性评价、药物间相互作用的预测具有非常重要的意义。美国 FDA 于 1997 年公布了这方面的指导性文件, 我国在新药申报中也积极提倡进行该领域的研究。

目前开展的药物对药酶的影响的研究方法主要分为体内方法和体外两大类。体内研究方法主要为“Cocktail”法, 用特定的选择性探针药物来鉴别个人的代谢表型和评价 CYP450 调控的药物相互作用, 可通过药物代谢的药理学参数来评价, 药理学参数可间接反映肝脏对药物的代谢情况<sup>[1]</sup>, 它的主要优点是能较真实地反映药物在体内环境中对于药酶的诱导或抑制作用。其原理主要为: 同时给予多种相对低剂量的不同的肝药酶专属探针药物, 测定生物样本(尿、血液、唾液)中每个探针药物的代谢率或其它代谢分型指标, 以获得多个代谢酶的表型信息<sup>[2]</sup>。对于那些有多重代谢途径的药物的剂量设计有极为重要的指导意义。因此, 利用“Cocktail”探针药物不仅可以同时检测多种药物代谢酶的活性, 而且还可以根据酶活性的改变了解到药物对某种特异性酶的诱导或抑制, 从而为预测药物相互间的作用提供依据, 对药物进行临床前的安全性评价。

### 1 CYP450 同工酶的特性

**1.1 具有遗传多态性:** 药物代谢有种族和地区差异性, 这些差异有些能够用等位含量不同来解释, 不同等位基因对药物剂量、药物间相互作用均有指导意义, 目前发现的 CYP2C19 有两个等位基因, CYP2D6 有 10 个等位基因。

**1.2 同工酶具有交叉重叠性:** 不同的同工酶都具有相同或相似的作用, 有时同一种底物又可被多种不同的同工酶代谢。

**1.3 具有立体选择性:** CYP450 同工酶代谢同一药物时具有立体选择性, 不同的同工酶对于不同的异构体的亲和力、活性以及消除速度等均有所不同<sup>[3,4]</sup>。

### 2 理想的体内探针药物应具备的条件<sup>[5]</sup>

探针药物是用来对某一特性酶进行表型分析的工具药。它应具备以下特点: (1) 在大范围人群中使用的安全性; (2) 服用、采样、化学分析的简便性; (3) 表型判定的重复性; (4) 对某种酶代谢的特异性。

### 3 主要代谢酶的特点及其体内外探针药物

目前人们研究较多且与药物的代谢关系密切的酶主要有: (1) CYP1A: 是一种可由多环芳香烃诱导的 CYP 亚型, 其含量约占肝脏总量的 13%, 仅次于 CYP3A 和 CYP2C 亚族,

位于第三位<sup>[6]</sup> 具有重要的生理学和毒理学意义。其中 CYP1A2 参与了咖啡因、非那西丁、醋氨酸、等 20 几种药物的代谢, 另外在十几种前致癌物的激活或灭活中发挥重要作用, 且其活性与药物的疗效或毒性及某些肿瘤的易感性密切相关。CYP1A2 是咖啡因地主要代谢酶。估计 90% 以上的咖啡因清除由 CYP1A2 介导。虽然 CYP1A2, CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1 均参与了咖啡因的主要代谢途径(3-去甲基化), 但由于肝脏中 CYP1A2 的含量远远超过了后三者, 故后三者的作用可忽略不计, 且由于咖啡因性质稳定, 测定方法成熟, 易于提取, 故目前常选用咖啡因作为体内外测定 CYP1A2 酶活性的首选探药。近 10 多年来, 国内外对人群中 CYP1A2 的活性及其分布特征进行了大量研究, 结果表明: CYP1A2 的活性个体差异大, 最易受非遗传因素的影响, 且具有明显的种族及性别差异<sup>[7]</sup>。(2) CYP2C: 是一个非常庞大的家族, 包括 CYP2C8, CYP2C9, CYP2C10 和 CYP2C19 4 个亚型。CYP2C 家族占成人肝微粒体 CYP450 总量的 20% 左右, 居第二位<sup>[8]</sup>。神经系统的药物主要由 CYP2C 代谢, 主要有巴比妥类、安定、丙咪唑、奥美拉唑、布洛芬等<sup>[9]</sup>。CYP2C 的某些亚型的代谢不仅存在个体差异、种族差异及性别差异, 还具有多态性, 存在快代谢型(EM)和慢代谢型(PM)2 种代谢表型<sup>[10]</sup>。白种人中的 PM 的发生率为 3-5%, 东方人中的 PM 发生率为 13-23%, 黑人介于白种人和东方人之间<sup>[11]</sup>。Romakes 等<sup>[12]</sup> 从人肝微粒体库中抽样测定了大量人 CYP2C8 的活性, 发现其个体差异可相差 20 倍。S-美芬妥因是 CYP2C19 的最经典的底物, 也是应用很广泛的 CYP2C19 的探针药物。近几年, Balian<sup>[5]</sup> 及 Marinae<sup>[13]</sup> 等对奥美拉唑作为探针药物的可能性做了探讨, 得到了与基因分型一致的结果。氯胍也是近年来有望成为 CYP2C19 的新型探针药物<sup>[14-17]</sup>。(3) CYP2E: 是 CYP450-2 亚型中的重要成分, 占整个人肝 CYP450 总量的 7%<sup>[18]</sup>, 是许多低分子有机化合物及药物在体内的主要代谢酶, 如乙醇、氯唑沙宗、氟烷、甲氧氟烷等均通过 CYP2E1 在体内进行生物转化<sup>[19]</sup>。目前最常用的探针药物是氯唑沙宗。乙醇是该药酶的诱导剂, 4-甲基吡啶为该药酶的抑制剂。(4) CYP3A: 是成人肝微粒体 CYP450 中最重要的成分, 约占 CYP450 总量的 30%-40%, 居第一位<sup>[20]</sup>。该酶在许多内外源化合物的代谢中起着重要作用, 可参与红霉素、尼莫地平、利多卡因、环孢素等 150 多种药物在体内的代谢<sup>[21]</sup>, 目前较好的探针药物为咪唑唑仑和氨苯砜。

### 4 体外研究药物对于代谢酶的影响的方法

采用在体外肝微粒体中试验药物与探针药物共同孵育,然后在不同的时间测定探针药物或试验药物及其代谢产物的方法,通过药物浓度的变化或用特定的预测模型进行研究,如:将底物浓度固定,与系列浓度的抑制剂共孵育,测定底物剩余反应活性,将剩余活性的对数值与抑制剂浓度线性回归,即可求出半数抑制常数( $IC_{50}$ ),其优点是无需明确抑制机理及酶动力学分析。测定  $IC_{50}$  对于高通量筛选中初步了解药物对细胞色素 P450 是否有强抑制作用很有价值。若  $IC_{50} < 1\mu\text{mol/L}$ ,则初步表明药物对该 CYP 抑制能力强;若  $IC_{50} > 50\mu\text{mol/L}$ ,则表明药物对该 CYP 抑制能力弱<sup>[22]</sup>。

用单克隆抗体或特异性抑制剂,诱导或鉴别某些药物的代谢亚型,如用免疫印迹法可定量鉴别临床药物代谢中 CYP3A4/3A5 的作用<sup>[23]</sup>。另外,部分 CYP450 的活性还可通过重组 P450 的动力学参数进行预测<sup>[24]</sup>。

总之,CYP450 的活性除了受到外源性药物的影响之外,还受许多个体因素如性别、年龄、遗传性等的影响。随着研究手段的不断改进和增多,为研究 CYP450 的功能特性及调控提供了有利条件,这将有助于认识药物的代谢特点和个体差异,为药物的安全性评价和指导合理化用药提供了科学依据。

## 参考文献

- [1] Schmider J, Brockmoller J, Arold G, *et al.* Simultaneous assessment of CYP3A4 and CYP1A2 activity in vivo with alprazolam and caffeine [J]. *Pharmacogenetics*. 1999,9(6):725-734.
- [2] Frey RF, Adedoyin A, Porter JA, *et al.* Validation of the Five-Drug "Pitts cocktail" approach for assessment of selective, regulation of drug metabolizing enzymes [J]. *Clin Pharmacol Ther*. 1997,62:365.
- [3] Abelo A, Andersson TB, Bredberg U, *et al.* Stereoselective metabolism by human liver CYP enzymes of a substituted benzimidazole [J]. *Drug Metab Dispos*, 2000,28(1):58.
- [4] Chow T, Hiroi T, Imaoka S *et al.* Isoform-selective metabolism of mianserin by cytochrome P450 2D [J]. *Drug Metab Dispos*, 1999, 27(10):1200.
- [5] Balian JD, Sukhova N, Harris JW, *et al.* The hydroxylation of omeprazole correlates with S-mephenytoin metabolism: a population study [J]. *Clin Pharmacol Ther* 1995,57(6):662-669.
- [6] 王永铭,苏定冯.药理学进展[M].北京:科学出版社,2000:19-31.
- [7] 舒炎,周宏灏.细胞色素 P450 药物氧化代谢酶的遗传药理学进展[A].
- [8] Shimada T, Yanazaki H, Mimura M *et al.* Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians [J]. *J pharmacol Exp Ther*, 1994, 270:414.
- [9] Spatzenegger M, Jaeger W. Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug-metabolism [J]. *Drug Metab Rev*, 1995, 27:397.
- [10] 马璟,钱蓓丽.人类细胞色素 P450s 研究概况及其在新药安全评价中的应用. *中国新药杂志*, 2002,11(1):36-41.
- [11] 周宏灏.分子遗传药理学[A].周宏灏.分子药理学[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1999.224-251.
- [12] Romakes M, Faletto MB, Blaisdell JA, *et al.* Cloning and expression of complementary DNAs for multiple members of the human cytochrome P450 II C subfamily [J]. *Biochemistry*, 1991, 30:3247.
- [13] Marinac JS, Balian JD, Foxworth JW, *et al.* Determination of CYP2C19 phenotype in black American with omeprazole: correlation with genotype [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1996, 60(2):138-144.
- [14] Hoskins JM, Shenfield GM, Gross AS. Relationship between proguanil metabolic ratio and CYP2C19 genotype in a Caucasian population [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1998,46(5):499-504.
- [15] Coller JK, Somogyi AA, Bochner F. Association between CYP 2C19 genotype and proguanil oxidative polymorphism [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1997,43(6):659-660.
- [16] Wanwimolruk S, Bhawan S, Coville PF. Genetic polymorphism of debrisoquine (CYP2D6) and proguanil (CYP 2C19) in South Pacific Polynesian populations [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 1998, 54(5):431-435.
- [17] Somogyi AA, Reinhard HA, Bochner F. Pharmacokinetic evaluation of proguanil: a probe phenotyping drug for the mephenytoin hydroxylase polymorphism [J]. *Br J Clin Pharmacol*. 1996,41(3):175-179.
- [18] Roberts BJ, Song BJ, Soh Y *et al.* Ethanol induces CYP2E1 by protein stabilization [J]. *J Biol Chem*, 1995,270:29632.
- [19] Vieira IM, Sonnier, Cresteil T. Development expression of CYP 2E1 in the human liver. Hypermethylation control of gene expression during the neonatal period [J]. *Eur J Biochem*, 1996,238:476.
- [20] Imaoka ST, Yamada T, Hiroi K *et al.* Multiple forms of human P450 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, systematic characterization and comparison with those of the rat [J]. *Biochem Pharmacol*, 1996,51:1041.
- [21] Yamano S, Tatsuno J, Gonazle FJ, The CYP 2A3 gene product catalyzes coumarin 7-hydroxylation in human liver microsomes [J]. *Biochemistry*, 1990,29:1322.
- [22] Crespi CL, Stresser DM. Fluorometric screening for metabolism-based drug-drug interactions. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2000;44:325-331.
- [23] Mei Q, Tang C, Assang C, *et al.* Role of a potent inhibitory monoclonal antibody to cytochrome P450 3A4 in assessment of human drug metabolism [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, 29(2):749.
- [24] Shimada T, Tsumura F, Yamazaki H. Prediction of human liver microsomal oxidations of 7-hydroxycoumarin and chlorzoxazone with kinetic parameters of recombinant cytochrome P450 enzymes [J]. *Drug Metab Dispos*, 1999, 27(11):1274.

收稿日期:2005-04-30