

# 苯巴比妥和地塞米松对鸡细胞色素 P450 的诱导作用\*

杨海峰<sup>1,2</sup>, 张玲玲<sup>1</sup>, 覃少华<sup>1</sup>, 江善祥<sup>1</sup>

(1 南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京 210095; 2 江苏畜牧兽医职业技术学院 动物药理学系, 江苏 泰州 225300)

**[摘要]** 将 60 只 40 日龄依莎公鸡随机等分为对照组、苯巴比妥 (PB) 诱导组和地塞米松 (DEX) 诱导组, 进行体外肝微粒体酶活性测定和体内安替比林 (AP) 消除动力学试验, 研究苯巴比妥和地塞米松对鸡肝微粒体细胞色素 P450 的诱导作用。结果表明, 与对照组相比, PB 组和 DEX 组的肝微粒体酶活性显著提高 ( $P < 0.01$ ), AP 的代谢速率显著加快 ( $P < 0.01$ )。表明苯巴比妥和地塞米松对鸡肝微粒体细胞色素 P450 具有明显的诱导作用。

**[关键词]** 细胞色素 P450; 苯巴比妥; 地塞米松; 酶诱导; 鸡

**[中图分类号]** S859.7

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2007)05-0069-04

## Induction of phenobarbital and dexamethasone on cytochrome P450 enzymes in chickens

YANG Hai-feng<sup>1,2</sup>, ZHANG Ling-ling<sup>1</sup>, QIN Shao-hua<sup>1</sup>, JIANG Shan-xiang<sup>1</sup>

(1 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China;

2 Animal Pharmaceutics Department, Jiangsu Animal Husbandry and Veterinary College, Taizhou, Jiangsu 225300, China)

**Abstract:** Sixty 40-day-old cocks were randomly divided into control group, phenobarbital (PB)-treated group and dexamethasone (DEX)-treated group. Induction of phenobarbital and dexamethasone on hepatic cytochrome P450 in chickens was investigated by enzyme assays *in vitro* and antipyrine clearance *in vivo*. The results showed that in comparison with control group the activities of hepatic microsomal enzymes and metabolic rate of antipyrine obviously increased in PB-group and DEX-group ( $P < 0.01$ ). Microsomal cytochrome P450 enzymes in chickens could be obviously induced by phenobarbital and dexamethasone and the inducible model of cytochrome P450 *in vivo* was successfully established in this study.

**Key words:** cytochrome P450; phenobarbital; dexamethasone; enzyme induction; chickens

细胞色素 P450 (Cytochrome P450, CYP450 或 P450) 是由一组结构和功能相关的基因超家族编码的同工酶, 主要分布在肝细胞微粒体上, 参与大量外源性和内源性物质的代谢。CYP450 可被许多物质诱导或抑制<sup>[1]</sup>。镇静剂苯巴比妥 (Phenobarbital, PB) 和糖皮质激素地塞米松 (Dexamethasone, DEX) 是经典的肝微粒体 CYP450 诱导剂, 对人和多种实

验动物的 CYP450 均具有诱导作用<sup>[2-4]</sup>。但近年来的研究发现, CYP450 的种属特异性导致同一诱导剂对不同品种动物甚至是同一品种动物的不同品系的诱导机制和诱导效应往往不尽相同<sup>[5]</sup>。为了探讨苯巴比妥 (PB) 和地塞米松 (DEX) 对鸡细胞色素 P450 的诱导作用, 本试验研究了 PB 和 DEX 对鸡肝微粒体酶的活性和探针药物安替比林 (Antipyrine,

\* [收稿日期] 2006-04-07

[基金项目] 江苏省科技攻关项目 (JH02-085)

[作者简介] 杨海峰 (1981 - ), 男, 江苏南通人, 在读硕士, 主要从事兽医药理与毒理学研究, Email: yhf8142@sina.com。

[通讯作者] 江善祥 (1966 - ), 男, 安徽潜山人, 教授, 主要从事兽医药理与毒理学研究, Email: nauvy@sina.com。

AP)代谢的影响,现将研究结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验动物 1日龄健康伊莎雄性雏鸡,购自南京青龙山种鸡厂。

1.1.2 药品与试剂 Tris、考马斯亮蓝 G250、牛血清白蛋白和安替比林为国药集团化学试剂有限公司产品;安替比林标准品为 Fluka 公司产品;乙腈,色谱级, Sigma 公司产品;甲醇,色谱级, Merck 公司产品;肝素钠为中国医药集团上海化学试剂公司产品;注射用苯巴妥钠为上海新亚药业有限公司产品,批号 050304;地塞米松磷酸钠为湖北潜江制药股份有限公司产品,批号 20040525;氯化钠注射液为国营张家港市制药厂生产,批号 05062502; Millipore 超纯水,电阻率 18.2 M $\Omega$ ,由南京农业大学中心实验室制备。

1.1.3 仪器与设备 低温高速离心机和低温超速离心机, Beckman 公司生产;紫外分光光度计,上海光谱仪器有限公司生产;微型漩涡混合仪,上海沪西分析仪器厂生产;电子天平,北京塞多利斯天平有限公司生产;高效液相色谱仪, Waters 公司生产;超声波清洗机,宁波新芝生物科技股份有限公司生产。

### 1.2 试验设计

选取按常规方法饲养至 40 日龄左右、健康、体重相近的伊莎鸡 60 只,随机等分为 3 组, 组为 PB 诱导组,将苯巴妥钠用生理盐水溶解后腹腔注射,剂量为 80 mg/kg; 组为 DEX 诱导组,将地塞米松磷酸钠用生理盐水 5 倍稀释后腹腔注射,剂量为 5 mg/kg; 组为对照组,腹腔注射氯化钠注射液,剂量为 4 mL/kg。每组均在每日早晨 8 时腹腔注射给药 1 次,连续给药 5 d。

### 1.3 鸡肝微粒体 CYP450 酶活性分析

1.3.1 肝微粒体的制备 末次给药后 24 h,将对照组和诱导组的半数鸡称重后颈静脉放血处死,处死前禁食 12 h,尽量放尽血液,迅速剖开腹腔,取出肝脏,用预冷的生理盐水冲去血渍,滤纸擦干、称重,计算肝脏指数。参考文献[6-7]的方法,用超速离心法制备肝微粒体。在靠肝门静脉处取肝 4 g,剪碎后加入 12 mL 预冷的 TMS 缓冲液(0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 + 0.2 mol/L 蔗糖 + 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4)用玻璃匀浆器匀浆。匀浆液 4 mL, 12 000 g 高速离心 20 min,上清液 4 mL, 105 000 g 超速离心 60 min,红色沉淀即为肝细胞微粒体。将微粒体沉

淀取出后用含体积分数 25% 甘油的 KCl-磷酸盐缓冲液(0.15 mol/L KCl + 0.1 mol/L PBS, pH 7.4)悬浮,每克肝加悬浮液 1 mL,涡旋混匀后分装于冻存管中, -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.2 肝微粒体 CYP450 酶活性测定 用 Bradford 法测定肝微粒体蛋白含量,以牛血清白蛋白作标准;用 CO 还原差示光谱法测定细胞色素 P450 含量;用 Nash 比色法测定氨基比林-N-脱甲基酶(AND)和红霉素-N-脱甲基酶(ERND)活性,以甲醛的生成速率表示 AND 和 ERND 的活性;用 Schenkmen 法测定苯胺羟化酶(AH)活性,以 4-氨基酚的生成速率表示 AH 的活性。具体操作见文献[8]。

### 1.4 鸡体内 AP 消除动力学试验

1.4.1 给药与血样采集 对照组和诱导组(PB 诱导组和 DEX 诱导组)的半数鸡称重后侧卧保定,分离两侧翼下静脉,一侧翼下静脉快速注射 AP(剂量为 20 mg/kg),分别于给药后 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 和 210 min 自对侧翼下静脉采血 1 mL,肝素钠抗凝, 4 $^{\circ}$ C, 4 000 r/min 离心 10 min,分离血浆, -20 $^{\circ}$ C 保存待测。

1.4.2 血浆中 AP 浓度的测定 参考 Adnan 等<sup>[9]</sup>的方法并适当改进,采用反相高效液相色谱外标法测定血浆中的安替比林浓度。取鸡血浆样品 0.2 mL 于 1.5 mL Eppendorf 管中,加 0.3 mL 乙腈,在微型漩涡混合仪上振荡 30 s, 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 20  $\mu$ L 注入高效液相色谱仪分析。色谱条件:色谱柱为 Kromasil C<sub>18</sub> (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m),柱温 30 $^{\circ}$ C,流动相为 0.025 mol/L 醋酸钠-乙腈溶液(V(醋酸钠):V(乙腈) = 74:26),使用前超声脱气 20 min,流速为 0.8 mL/min,检测波长为 254 nm,进样量为 20  $\mu$ L。

1.4.3 血药浓度和药动学参数的计算 根据外标标准曲线回归方程计算 AP 的血药浓度,采用 3P97 药代动力学软件处理血药浓度-时间数据,计算药物代谢动力学参数。

### 1.5 数据处理

采用 SPSS 统计学软件对实验数据进行统计学处理,数据以平均值  $\pm$  标准差表示,并对组间数据进行显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 PB 和 DEX 对鸡肝微粒体细胞色素 P450 生化指标的影响

由表 1 可知, PB 组和 DEX 组的肝脏指数、肝微

粒体蛋白含量和细胞色素 P450 含量极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ); PB 组的 AND、ERND 和 AH 的活性均极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ); DEX 组仅 ERND 活性极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ), AND 和 AH 的活性与对照组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。表

表 1 苯巴比妥和地塞米松对鸡肝微粒体细胞色素 P450 酶系的影响 ( $n = 10$ )

Table 1 Effects of phenobarbital and dexamethasone on cytochrome P450 in chickens

指标 Index	对照组 Control group	苯巴比妥组 PB group	地塞米松组 DEX group
肝脏指数/ % Liver index	2.49 ±0.14	3.14 ±0.20 **	3.59 ±0.23 **
肝微粒体蛋白含量/(mg · g <sup>-1</sup> ) Microsomal protein	9.79 ±1.04	12.52 ±1.13 **	13.16 ±1.04 **
细胞色素 P450 含量/(nmol · mg <sup>-1</sup> ) Cytochrome P450	0.62 ±0.06	1.07 ±0.16 **	0.89 ±0.09 **
AND/(nmol · mg <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )	2.14 ±0.27	3.05 ±0.24 **	2.23 ±0.35
ERND/(nmol · mg <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )	0.97 ±0.12	1.86 ±0.17 **	1.74 ±0.14 **
AH/(nmol · mg <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )	0.31 ±0.02	0.47 ±0.05 **	0.29 ±0.03

注: \*\* 表示与对照组相比差异极显著 ( $P < 0.01$ )。下表同。

Note: \*\*, Means significant difference at 0.01 level in comparison with control group. It's the same for the following table.

## 2.2 PB 和 DEX 对鸡体内 AP 代谢的影响

从图 1 可知, PB 组和 DEX 组各时间点的平均血药浓度均明显低于对照组。AP 在鸡体内的代谢呈二室模型, 主要药动学参数见表 2。由图 1 可以看出与对照组相比, PB 组和 DEX 组的药-时曲线下面积 (AUC) 分别减少了 28.1% 和 16.2%, 消除半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 分别缩短了 38.6% 和 31.4%, 总体清除率 (CL) 分别提高了 35.9% 和 23.1%, 差异均达极显著水平 ( $P < 0.01$ )。表明, PB 和 DEX 可显著加快探针药物 AP 在鸡体内的代谢, 因 AP 的代谢快慢主要依赖于 CYP450 活性的强弱, 从而间接证明 PB 和 DEX 对鸡肝 CYP450 具有诱导作用。

表 2 苯巴比妥和地塞米松对鸡血浆中安替比林药代动力学参数的影响 ( $n = 10$ )

Table 2 Effects of phenobarbital and dexamethasone on pharmacokinetic parameters of antipyrine

指标 Index	对照组 Control group	苯巴比妥 PB group	地塞米松 DEX group
$t_{1/2}$ / min	31.14 ±4.67	19.11 ±2.78 **	21.37 ±2.45 **
AUC / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) · min	524.03 ±84.91	376.68 ±65.34 **	438.93 ±80.39 **
CL / ( L · min <sup>-1</sup> · kg <sup>-1</sup> )	0.039 ±0.006	0.053 ±0.007 **	0.048 ±0.006 **

## 3 讨论

药物在体内转化时, 主要经肝微粒体细胞色素 P450 酶系催化进行 I 相代谢反应, 使药物脂溶性下降, 极性增加而被排泄。因此, CYP450 活性强弱影响着药物的代谢、疗效和安全性。同时, 许多药物又可对 CYP450 活性产生抑制或诱导作用, 这是导致联合用药时产生药物代谢性相互作用的主要原因。因此研究 CYP450 的诱导或抑制机制, 对临床合理

明, PB 和 DEX 对鸡肝微粒体 CYP450 具有显著的诱导作用, PB 对细胞色素 P450 含量及其亚型的诱导作用强于 DEX, 但 DEX 对肝脏系数和肝微粒体蛋白含量的影响比 PB 明显。

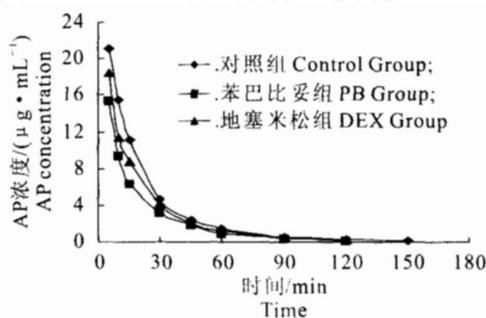


图 1 苯巴比妥和地塞米松对鸡血浆中安替比林浓度的影响 ( $n = 10$ )

Fig. 1 Effects of phenobarbital and dexamethasone on concentration of antipyrine in plasma.

用药、提高药物疗效和降低药物的毒副作用具有重要意义。对和其他哺乳动物而言, PB 和 DEX 是公认的 CYP450 诱导剂, 可以促进肝脏内质网增生和微粒体膜结合蛋白合成, 尤其是细胞色素 P450 含量的增加, 因此 CYP450 诱导作用的出现常常伴随着肝脏重量和微粒体蛋白含量的增加<sup>[10]</sup>。PB 的诱导机制由组成型雄甾烷受体 (Constitutive androstane receptor, CAR) 介导, 此类诱导主要针对 CYP1A、CYP3A 和 CYP2B 亚型<sup>[11]</sup>。DEX 的诱导

机制可能与肝细胞内一种糖皮质激素受体有关<sup>[12]</sup>。但 PB 和 DEX 对鸡肝微粒体 CYP450 有无诱导作用,机制如何,尚未见报道。本研究试验了 PB 和 DEX 对鸡肝微粒体细胞色素 P450 的诱导作用,结果表明,PB 和 DEX 均能显著增加鸡肝脏指数,提示两者具有促进肝细胞内质网增生和蛋白质合成的作用,肝微粒体蛋白和细胞色素 P450 含量的显著提高也进一步证实了上述推断。PB 对鸡体内 AND、ERND 和 AH 均具有诱导作用,而 DEX 对 ERND 有特异性诱导作用。DEX 组鸡肝脏指数和微粒体蛋白含量高于 PB 组,提示 DEX 促进内质网增生和蛋白质合成的作用强于 PB;PB 对 CYP450 含量及其亚型活性的影响则强于 DEX,说明 PB 促进细胞色素 P450 蛋白合成的效率则更高。经 PB 和 DEX 处理后,鸡肝 CYP450 的活性明显提高,使探针药物 AP 在鸡体内的代谢加快,而 PB 组鸡 AP 代谢速率又快于 DEX 组,间接证明了 PB 的酶诱导效应强于 DEX。综合体内、外的试验结果可知,PB 和 DEX 对鸡肝微粒体细胞色素 P450 酶系具有显著的诱导作用,这与在哺乳动物上的研究结果<sup>[13-14]</sup>基本一致。

本研究成功建立了鸡肝微粒体细胞色素 P450 的体内诱导模型,可作为体内动物实验法评价新兽药是否具有 CYP450 诱导作用的阳性模型,对缩短新兽药研发周期、提高药物安全性和避免药物代谢性相互作用,均具有十分重要的理论意义和实用价值。

#### [参考文献]

- [1] 舒焱,周宏灏. 细胞色素 P450 药物氧化代谢酶的遗传药理学进展[M]//王永铭,苏定冯. 药理学进展. 北京:科学出版社,2000:19-36.
- [2] Jun W. Effect of phenobarbital on intralobular expression of CYP2B1/2 in livers of rats[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2000,60:285-291.
- [3] Hani Z. Effect of phenobarbital on hepatic CYP1A1 and CYP1A2 in the Ahr-Null mouse[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1998,55:235-238.
- [4] Gamila F, Grazia G, Mirella Z, et al. The upregulating effect of dexamethasone on tumor necrosis factor production is mediated by a nitric oxide-producing cytochrome P450[J]. *Cellular Immunology*, 1995,160:305-308.
- [5] 李平,程建峰,陈东鸿,等. 地塞米松、苯巴比妥钠和利多卡因对昆明种小鼠肝 P4503A 酶的影响[J]. *第四军医大学学报*, 2001,22(1):26-28.
- [6] Cuyue T, Magang S, David R. Substrate dependent effect of acetoneitrilein human liver microsomal cytochrome P450 2C9 activity[J]. *Drug Metab Dispos*, 2000,28(5):567-572.
- [7] 徐叔云,卞如灏,陈修. 药理学实验方法[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:511-512.
- [8] 杨海峰,江善祥. 鸡肝微粒体细胞色素 P450 酶系检测方法的建立[J]. *中国兽医科技*, 2006,36(2):147-150.
- [9] Adnan E I Y, Dale A R, Hatim A, et al. Simplified determination of antipyrine clearance by liquid chromatography of saliva or plasma[J]. *Pharmaceutical Research*, 1991,8(2):269-272.
- [10] 刘定勇,王浴生,凌保东. 利福定和利福平对小鼠肝微粒体酶的影响比较[J]. *中国抗生素杂志*, 1989,14(5):318-322.
- [11] 王青秀. 细胞色素 P450 表达的诱导机制及其筛选方法的研究进展[J]. *国外医学药学分册*, 2000,30(1):43-46.
- [12] 刘移民. 细胞色素氧化酶 P450 研究新进展[J]. *卫生毒理学杂志*, 2000,14(4):243-246.
- [13] Hani Zaher. Effect of phenobarbital on hepatic CYP1A1 and CYP1A2 in the ahr-null mouse[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1998,55:235-238.
- [14] Monostory K, Vereczkey L. The effect of phenobarbital and dexamethason coadministration on the activity of rat Liver P450 system[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1994,1:351-358.