

# 一种新的多环芳烃型药物代谢酶 诱导剂—抗早孕药 DL-111-IT

刘志强 蔡勇 焦健 陈忆庭 林志英

(浙江医科大学药系, 杭州)

**提要** 以抗早孕药 3-(2-乙基苯基)-5-(3-甲氧基苯基)-1-氢-1, 2, 4-三唑(DL-111-IT) 80 mg/kg 预处理大鼠 4 d, 大鼠肝重无显著增加, 但肝微粒体 P-450 含量为对照组值 1.5 倍左右、P-450 一氧化碳络合物吸收峰波长短移、AHH 催化活性显著增高、UDPGT 缀合平面型底物的能力提高至 2 倍左右, 而肝微粒体 P-450 与甲吡啶及对氨基苯甲酸叔丁酯代谢中间体络合的能力不变或下降, 表明 DL-111-IT 或许是一种新的多环芳烃型药物代谢酶诱导剂。

**关键词** 抗早孕药; 药物代谢; 细胞色素; P-450; UDPGT; AHH 催化活性; 微粒体

3-(2-乙基苯基)-5-(3-甲氧基苯基)-1-氢-1, 2, 4-三唑, 简称 DL-111-IT, 是近年来正在研究、开发的一种非甾体、非前列腺素型妊娠终止剂, 田鼠或大鼠怀孕后 5~7 d, sc DL-111-IT 8 或 100 mg/kg 一次, 即能百分之百终止其妊娠<sup>(1)</sup>。许多研究者报道了上述化合物的药理活性、副作用以及用药后动物生育能力的恢复情况, 但尚无该化合物对药物代谢酶影响的报道, 三唑衍生物对药酶诱导作用的报道也不多见。我们对 DL-111-IT 的药酶诱导活性作了初步研究。

## 材料与方 法

实验动物为本校动物房繁殖的体重 150~200 g Sprague-Dawley 大鼠与 C-57 小鼠。实验中按 80 mg/kg/d 给动物 ip DL-111-IT 菜油溶液或苯巴比妥钠 (PB) 的生理盐水溶液连续 4 d; 或 20 mg/kg/d 3-甲基胆蒎 (3-MC) 菜油溶液连续 3 d; 以注射菜油的动物作对照组。动物睡眠时间测定实验时, 于最后一次给药后 24 h 给大鼠 (或小鼠) ip 75 (或 100) mg/kg 已巴比妥钠生理盐水溶液, 测定给药后动物翻正反射消失延续时间 (已巴比妥睡眠时间), 每组动物不少于 5 只。作大鼠肝脏药物代谢酶催化活性体外测定时, 每组动物数多于 3 只, 最后一次给药后撤除食物, 于次日将大鼠断头处死, 按文献<sup>(2)</sup>制备肝微粒体, 微粒体制备物蛋白质浓度按 Lowry<sup>(3)</sup>方法测定, 然后用蔗糖-Tris 缓冲溶液稀释至 30 mg/ml 悬浮液于 -30°C 下冷藏备用。肝微粒体细胞色素 P-450 (P-450) 含量、对硝基苯甲酰脱甲基酶催化活性、还原态 P-450 对氨基苯甲酸叔丁酯代谢中间体 (MI) 络合物生成量, 3,4-苯骞芘羟化酶 (AHH) 催化活性以及尿嘧二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶 (UDPGT) 缀合 1-萘酚和吗啡催化活性等的测定分别参照文献<sup>(4~9)</sup>报道的方法。其中, 因缀合酶催化活性测定目的和高压液相层析 (HPLC) 柱填料与原报道不尽相同, 本研究所用流动相组成也略有变化, 即为甲醇:20 mmol pH 2.6 磷酸-磷酸盐溶液 (2:1 V/V), 内含 8 mmol 十二烷基硫酸钠 (SDS), 流速 1.5 ml/min, 葡萄糖醛酸酐的定量改用外标法。7, 8-萘黄酮对 DL-111-IT 预处理后

大鼠肝微粒体 AHH 活性选择性抑制作用的实验方法参照文献<sup>(10)</sup>。

NADPH 购自 SIGMA 公司, 对氨基苯甲酸叔丁酯系作者自行合成<sup>(7)</sup>。肝微粒体光谱研究用 Pye Unicam 8800 分光光度计, 日立 MPF-4 荧光分光光度计和 Beckman 327 型 HPLC 仪分别用于 AHH 催化活性和 UDPGT 缀合活性的测定。

## 结 果

### 一. DL-111-I T 对大鼠肝脏混合功能氧化酶催化活性的选择性诱导作用

Tab 1. The influence of pretreatment on monooxygenase activities in male rat hepatic microsomes<sup>a</sup>

Rat pretreatment	Control	PB	DL-111-I T	3-MC
Liver weight (g)	6.6 ± 0.34	8.72 ± 1.03**	7.25 ± 1.30	7.14 ± 0.69
Microsomal protein (mg/g liver)	11.0 ± 1.70	17.1 ± 2.46**	13.5 ± 2.12	11.2 ± 2.60
P-450 (n mol/mg microsomal protein)	1.02 ± 0.14	2.81 ± 0.18**	1.59 ± 0.13**	1.30 ± 0.14*
Peak wavelength of $\pi$ -450-CO complex (nm)	4.497 ± 0.30	449.8 ± 0.18	448.3 ± 0.36**	444.3 ± 0.16**
p-Nitroanisole demethylase activity (n mol/min/mg microsomal protein)	0.76 ± 0.14	2.95 ± 0.47**	1.45 ± 0.31	1.34 ± 0.21*
P-450 metyrapone complex formation ( $\Delta$ A/g microsomal protein)	16.6 ± 1.98	135.2 ± 1.99**	18.3 ± 0.87	7.30 ± 1.91
P-450 MI complex formation <sup>b</sup> ( $\Delta$ A/g microsomal protein)	11.5 ± 7.5	135.1 ± 6.7	lower than control	lower than control
AHH activity (% of control value) <sup>c</sup>	100.3 ± 3.2	lower than control	477 ± 6.9**	449 ± 108.3**

a. Animal number in each experiment is more than 4; Values are  $\bar{X} \pm SD$ ; \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ ;

b. The concentration of substrate (tert-butyl p-aminobenzoate) during incubation was 600  $\mu$ mol/l;

c. AHH activity for control group was 0.096 n mol of 3-OH-3,4-benzopyrene/min/mg microsomal protein at 37°C.

由表 1 可见 ip DL-111-I T 80 mg/(kg·d) × 4 d 预处理大鼠后, 动物肝重无显著增加, P-450 一氧化碳络合物吸收峰波长明显短移、肝微粒体 P-450 含量增至对照组 1.5 倍左右, P-450 甲吡酮 (Metyrapone) 络合物及 P-450 对氨基苯甲酸叔丁酯 MI 络合物形成能力不变或降低, 与此相比, 肝微粒体 AHH 催化活性却提高约 4 倍。上述选择性诱导特征与 3-MC 相似, 却明显不同于 PB 的诱导作用。

### 二. 7, 8-萘黄酮对大鼠肝微粒体 P-450 催化活性的选择性抑制作用

参照文献<sup>(10)</sup>方法, 在 PB 组、对照组和 DL-111-I T 组鼠肝微粒体 AHH 活性测定时, 分别加 (或不加)  $10^{-5}$  mol/L 7, 8-萘黄酮, 然后再加孵育。结果表明, 预先加入 7, 8-萘黄酮仅对 DL-111-I T 组肝微粒体 AHH 活性呈选择性抑制作用, 即使 DL-111-I T 组肝微粒体 AHH 活性降低  $40.2 \pm 10.3\%$  ( $n=4$ ), 而 PB 组或对照组则不受影响。

### 三. 大鼠肝微粒体 UDPGT 催化活性的选择性变化

加肝微粒体蛋白质 0.3 或 0.5 mg/ml 于 1 ml 浓度为 50 mmol 磷酸盐缓冲液 (pH 8.0 内含 10 mmol/L  $MgCl_2$  和 0.3 mg/ml Triton-100) 中, 分别加入 1-萘酚 600  $\mu$ mol/L 或吗啡 2.5 mmol/L, 于 37°C 下孵育 2 min, 加 UDPGA 2 mmol/L 并开始计时, 10 或 20 min 后加浓度为 1 mol 三氯乙酸 100  $\mu$ l 于上述两培育液中, 于 3000 × g 下离心 5 min 以沉淀蛋白质, 将含 1-萘酚或吗啡的培育液离心后之上清液按 1:3 相混, 进样 20  $\mu$ l 作 HPLC, 所得谱图如图 1。按谱图峰高以外标法定量即可计算出肝微粒体缀合 1-萘酚或吗啡的催化活性, 结果列于

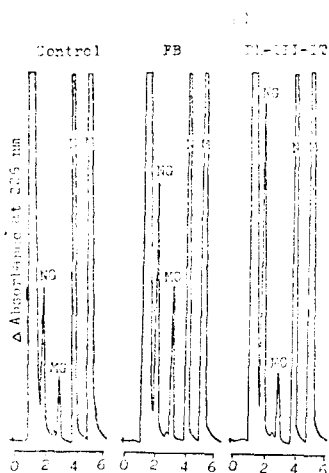


Fig 1. HPLC tracings of microsomal incubations for measuring UDPGT activities towards 1-naphthol and morphine. NG: 1-Naphthol glucuronide; N: 1-Naphthol; M: Morphine. The mobile phase was methanol: 20 mmol pH 2.6 KPi (2:1 v/v) containing 8 mmol SDS. The ODS column was run at room temperature. Flow rate: 1.5 ml/min. Wavelength of UV detector: 226 nm. Column length×I.D. 30 cm×4.6 mm.

Tab 2. UDP glucuronosyltransferase activities in male rat hepatic microsomes ( $\bar{X} \pm SD$ )

Rat pretreatment	Number of animals	UDPGT activity(% of controlvalue) toward	
		1-Naphthol	Morphine
Control <sup>a</sup>	4	100 ± 10	100 ± 24
PB	3	190 ± 29.4**	428 ± 57.2**
PB <sup>b</sup>	6	112 ± 19.6*	392 ± 100.4**
DL-111-IT	3	208 ± 36.4**	108 ± 36.4
3-MC <sup>b</sup>	4	221 ± 10**	132 ± 44*

a. Hepatic microsomal UDPGT activities toward 1-naphthol and morphine were 16.5 ± 0.16 and 6.4 ± 1.5 n mol/min/mg microsomal protein at 37 °C respectively, \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; b. Refer to reference 8.

表 2。

大鼠 ip DL-111-IT 80 mg(kg·d) × 4 d 后, 肝微粒体缀合平面型底物 (1-苯酚) 的能力增高一倍左右, 而缀合立体型底物 (吗啡) 的活性却无显著变化。此选择性变化与 3-MC 预处理结果相似, 而以 PB 预处理大鼠则主要提高肝微粒体缀合吗啡的催化活性。

四. 小鼠和大鼠已巴比妥睡眠时间变化

Tab 3. Hexobarbital sleeping time (min,  $\bar{X} \pm SD$ )

Animal pretreatment	Control	PB	DL-111-IT	3-MC
C-57 male mice	33 ± 4.9 (5)	13.6 ± 3.6** (5)	17.4 ± 4.3** (5)	14.0 ± 3.1** (5)
Male Sprague-Dawley rat	25.2 ± 5.9 (6)	not sleep** (6)	27.4 ± 7.4 (5)	17.9 ± 4.5 (5)

\*\*p < 0.01. Number in ( ) is number of animals.

由表 3 可见, PB, 3-MC 和 DL-111-IT 都能明显缩短 C-57 小鼠的已巴比妥睡眠时间, 但对 Sprague-Dawley 大鼠, 只 PB 能缩短其已巴比妥睡眠时间, 而 DL-111-IT 和 3-MC 则不能。

讨 论

参照文献<sup>(6-8,11,12)</sup>提供的药物代谢酶诱导剂分类依据和本文结果, 可知三唑衍生物 DL-

111-1 T 对肝脏混合功能氧化酶和 UDPGT 的诱导属多环芳烃型。另一有关三唑衍生物 450191-S 的诱导研究认为该化合物属 PB 型药酶诱导剂, 其实验依据是预处理后大鼠肝微粒体 7-烷基香豆素脱烷基酶催化活性, UDPGT 缀合硝基酚的能力, 细胞色素 P-450 和  $b_5$  含量, 以及动物已巴比妥睡眠时间等的变化与 PB 预处理结果相似<sup>(13)</sup>但文献<sup>(9~11)</sup>已指出上述指标难以用来确切区分诱导类型, 本文也证实 DL-111-1 T 和 3-MC 组已巴比妥睡眠时间随动物种族不同呈阳性或阴性结果。

P-450 甲吡酮络合物克分子吸收系数报道尚未统一, 其它共存底物也会影响 P-450 与甲吡酮络合的能力<sup>(14)</sup>, 但还原态 P-450 甲吡酮络合物生成量测定仍为区分诱导特征的、可给出定量依据的简易方法<sup>(7,14)</sup>。比如, 按文献<sup>(15)</sup>报道的该络合物克分子吸收系数 68.5, 可计算出对照组、PB 组和 DL-111-1 T 组大鼠肝微粒体中能与甲吡酮络合的亚族量分别为 23.9, 70 和 16.9%。

P-450 MI 络合物生成量测定是一公认的、可用作估算 P-450 亚族组成的化学探针法, 本文所用的对氨基苯甲酸叔丁酯即为若干化学探针物之一<sup>(14)</sup>。原文献报道, 当对氨基叔丁酯浓度为 60  $\mu\text{mol/L}$  时, PB 诱导后肝微粒体 P-450 中约有 32.5% 的亚族能生成 MI 络合物。本研究将底物浓度增至 600  $\mu\text{mol/L}$  上述百分比上升为 74% 左右, 这或许是由 PB 诱导增多的 P-450 亚族与对氨基苯甲酸叔丁酯作用时呈两种不同亲和力常数的缘故。尽管本文所用对氨基苯甲酸叔丁酯作底物时浓度比原文献值高 10 倍左右, 但 3-MC 和 DL-111-IT 组大鼠肝微粒体 P-450 形成 MI 络合物的能力仍低于对照组。

综上所述, DL-111-IT 或许是一种多环芳烃型药物代谢酶诱导剂, 能选择性诱导增多肝微粒体中的 P-448。鉴于 P-448 在预致癌物体内激活中的作用, 有必要对该化合物诱导的量效和性别差异等作进一步研究, 以对该化合物安全性评价提供生化毒理学依据。

致谢 本研究承中国科学院科学基金会资助, Lerner 教授赠送了 DL-111-IT, Franklin 教授赠送了葡萄糖醛酸酐标准品、UDPGA、和甲吡酮等化学品、宋振玉教授对本文作了审阅。

## 参 考 文 献

- Galliani G, et al. A new non-hormonal pregnancy-terminating agent. *Contraception* 1981;23:163.
- Franklin MR, Estabrook RW. On the inhibitory action of mersalyl on drug oxidation: A rigid organization of the electron transport chain. *Arch Biochem Biophys* 1972;143:318.
- Lowry OH, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265.
- Omura T and Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *Ibid* 1964;239:2370.
- Netter KJ, Seidel O. An adaptively stimulated O-demethylating system in rat liver microsomes and its kinetic properties. *J Pharmacol Exp Ther* 1964;146:63.
- Mitani F, et al. Complex of cytochrome P-450 with metyrapone A convenient method for the quantitative analysis of phenobarbital-inducible cytochrome P-450 in rat liver microsomes. *FEBS Lett* 1982;148:302.
- Liu ZQ(刘志强), Franklin MR. Cytochrome P-450 metabolic intermediate complex formation from p-aminobenzoic acid esters and other arylamines. *Europ J Drug Metab Pharmacok* 1984;9:155.
- Nebert DW. Genetic differences in microsomal electron transport: The Ah locus. In: Fleisher S, Packer L eds. *Methods in Enzymology*. Vol 52. Biomembranes. Part C. 1st ed. New York: Academic Press, 1978:220~40.
- Liu ZQ(刘志强), Franklin MR. Separation of four glucuronides in a single sample by high-pressure liquid chromatography and its use in the determination of UDP Glucuronosyltransferase activity toward four aglycones. *Anal Biochem* 1984;142:340.
- Renison MS, et al. Induction of hepatic microsomal cytochrome P-450 and associated monooxygenases by pentamethyl benzene in the rat. *Biochem Pharmacol* 1983;32:2610.
- 刘志强. 药物对细胞色素 P-450 的诱导与抑制. *浙江药学* 1985;(3):27.
- Le Provost E, et al. Immunological and enzymatic comparison of hepatic cytochrome P-450 fractions from phenobarbital-, 3-methylcholanthrene-,  $\beta$ -naphthoflavon- and 2,3,7,8, -tetra chlorodibenzo-p-

dioxin-treated rats. *Biochem Pharmacol* 1983;32:1673.

13. Matsubara T, et al. Effect of a new sleep inducer 1H-1,2,4-triazolyl benzophenone derivative 590191-S on rat liver drug-metabolizing enzyme system. *Folia Pharmacol Japan* 1985;85:115.
14. 刘志强. 细胞色素 P-450 配体络合物研究近况. 国外医学 药学分册 1986;(5):232.
15. Liu ZQ(刘志强), Franklin MR. Cytochrome P-450 ligands Metyrapone revisited. *Arch Biochem Biophys* 1985;241:397.

## A NEW POLYCYCLIC ARYLHYDROCARBON TYPE INDUCER OF DRUG METABOLIZING ENZYMES—THE CONTRA-GESTATIONAL AGENT DL-111-IT

LIU Zhi-Qiang, CAI Youg, JIAO Jian, CHEN Yi-Ting and LIN Zhi-Ying

(School of Pharmacy, Zhejiang Medical University, Hangzhou)

**ABSTRACT** Following pretreatment of adult male rats with contragestational agent 3-(2-ethylphenyl)-5-(3-methoxyphenyl)-1H-1,2,4-triazol (DL-111-IT) 80mg/kg/d for 4 consecutive days, the liver weight of the animals and the ability of its reduced hepatic cytochrome P-450 to form complex with metyrapone or the metabolic intermediate (MI) of tert-butyl p-aminobenzoate remained unchanged or declined. In contrast, the hepatic cytochrome P-450 increased to 1.5 fold of control value. The absorption peak of reduced cytochrome P-450-CO binding spectrum was hypsochromically shifted, and the microsomal AHH activity as well as the UDP Glucuronosyltransferase activity toward 1-naphthol were significantly enhanced. According to these observations, DL-111-IT may be considered a new polycyclic aromatic hydrocarbon type inducer of the drug metabolizing enzymes.

**Key words** Contra gestational agent; Drug metabolism; Cytochrome P-450; UDPGT; AHH activity; Microsome