

## 研究论文

# DL-111-1T对雌鼠肝脏及人羊膜细胞混合功能氧化酶活性的选择性诱导

刘志强 林志英 孙路 余应年

(浙江医科大学药理学系, 杭州310006)

**提要** 以抗早孕药 3-(2-ethylphenyl)-5-(3-methoxyphenyl)-1H-1,2,4-triazole(DL-111-1T) 20 mg/(kg.d) 预处理♀大鼠 2 d, 即可使动物肝微粒体 MFO 与 UDPGT 达到稳态诱导, 其诱导特征为多环芳烃型。以 0.1 μmol/L DL-111-1T 与人羊膜 FL 细胞孵育 24 h, 可使细胞内 AHH 活性诱导增高 3.5 倍左右, 此诱导能力三倍于 PB, 但仅为 3-MC 的 1/2 左右, 即 DL-111-1T 对人羊膜 FL 细胞中依赖于 P-448 的 MFO 呈现中等程度的选择性诱导作用。UDS 试验则证明 DL-111-1T 本身无致突变性。

**关键词** 细胞色素 P-450; 致突变试验; 非程序 DNA 合成 (UDS); 3-(2-乙基苯基)-5-(3-甲氧基苯)-1H-1,2,4-三唑

前文<sup>(1)</sup>报道了抗早孕药 DL-111-1T [3-(2-ethylphenyl)-5-(3-methoxyphenyl)-1H-1,2,4-triazole] 对♂ Sprague-Dawley 大鼠肝微粒体混合功能氧化酶 (MFO) 和尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶 (UDPGT) 的多环芳烃型诱导作用。鉴于该药将在临床上用于抗早孕, 本文研究了 DL-111-1T 对♀大鼠肝微粒体药物代谢酶诱导的量效和时效关系, 以及体外对人羊膜细胞 FL 系中芳烃羟化酶 AHH 的诱导活性, 以求为 DL-111-1T 安全性评价提供生化毒理学依据。

## 材料与 方法

动物为 Sprague-Dawley ♀大鼠 153±17g, 由本校动物房供应。以 ip DL-111-1T 菜油溶液 20, 40 或 80 mg/kg.d 连续 4 d, 或 ip 20 mg/kg.d 连续 1, 2 或 4 d 预处理大鼠, ip 以等量菜油的大鼠作空白对照, ip 苯巴比妥钠 (PB) 80 mg/(kg.d) × 4 d, 以及 ip 3-甲基胆蒎 (3-MC) 20 mg/(kg.d) × 3 d 大鼠作阳性对照。测定动物睡眠时间时, 于末次给药后 24 h 给大鼠 ip 环己巴比妥 50 mg/kg, 测定给药后动物翻正反射消失延续时间, 每组动物不少于 5 只。大鼠肝微粒体 MFO 和 UDPGT 催化活性体外测定时, 每组动物不少于 3 只, 末次给药后禁食 24 h 将大鼠断头处死, 取冰冷 NS 灌流后肝脏按文献<sup>(2)</sup>制备肝微粒体。微粒体制备物的蛋白质浓度、细胞色素 P-450 (P-450) 含量、对硝基苯甲醚脱甲基酶活性、还原态 P-450-Metyrapone (甲吡酮) 络合物生成量、AHH 活性、及

本文于1988年6月2日收到。

国家自然科学基金资助课题

\*本文为浙江医科大学病理生理教研室

UDPGT 缀合吗啡和 1-萘酚催化活性等的测定分别参照文献<sup>(1,3~8)</sup>报道的方法。

人羊膜细胞 FL 系由我校病理生理教研室在液氮中保存,并以生长用培养基传代维持。培养方法详见文献<sup>(9)</sup>。体外诱导实验时,于细胞(初始密度约  $10^4/\text{ml}$ ) 生长 96 h 后,弃去培养基,用 HBSS 漂洗后,加入含不同浓度不同诱导剂的生长培养基,  $37^\circ\text{C}$  下继续培养 24 h,用 HBSS 再次漂洗诱导培养后细胞,并加入 0.02% EDTA,  $37^\circ\text{C}$  下消化 15 min,重复上述洗涤操作两次,最后用少量 pH 7.4 Tris-HCl 缓冲溶液稀释洗涤后离心沉淀的细胞,按 Lowry 等<sup>(3)</sup>方法测定所得细胞悬液的蛋白质含量,以相同的缓冲溶液将上述悬液稀释至蛋白质浓度为 1~2 mg/ml,按 Atlas 等<sup>(10)</sup>方法测定其 AHH 活性。

DL-111-1T 由意大利 Lerner 教授馈赠; NADP、NADPH、苯并芘 (a)、3-MC 与 UDPGA 等购自 Sigma 公司; 3-羟基苯并芘由美国化学致癌原标准库赠送; 甲吡酮系 Aldrich 产品; Eagle 氏 MEM 培养基购自日本日水制药株式会社。

肝微粒体悬浮液的光谱测定用 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 和 UDPGT 催化活性测定。

## 结 果

一. DL-111-1T 对 ♀大鼠 MFO 的选择性诱导 ip DL-111-1T 80 mg/(kg.d) × 4 d 组、PB 组和 3-MC 组大鼠的肝微粒体 P-450 含量、环己巴比妥睡眠时间、还原态 P-450-甲吡酮络合物生成量、以及 DL-111-1T 组 AHH 活性等的变化如图 1 所示。图中 ♂大鼠数据取自文献<sup>(1)</sup>。

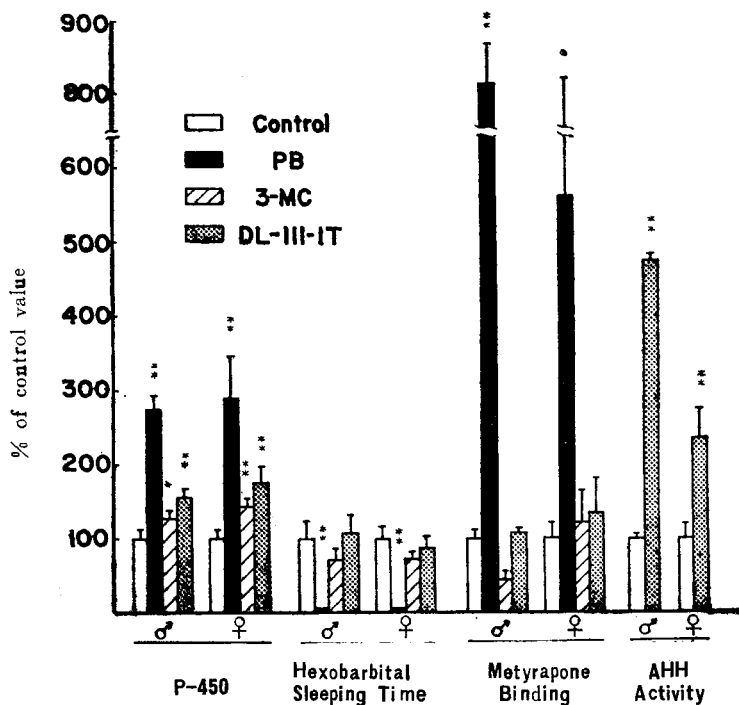


Fig 1. Induction of MFO activities in rat hepatic microsomes by DL-111-1T, PB and 3-MC. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$ . Control value for ♀ rats: P-450 =  $0.81 \pm 0.11$  nmol/mg microsomal protein; Hexobarbital sleeping time =  $3.5 \pm 6$  min; Metyrapone binding =  $4.3 \pm 1.3$   $\Delta$  A/g microsomal protein; AHH activity was expressed as relative fluorescence strength (fluorospectrophotometer for control was  $48.3 \pm 10.5$ ). Values are expressed as  $\bar{X} \pm \text{SD}$ .

ip DL-111-1T 80 mg/kg.d 预处理♀大鼠 4 d 后, 与 3-MC 预处理结果相似, 动物的环己巴比妥睡眠时间、以及还原态 P-450-甲吡酮络合物生成量均无显著变化, 而 AHH 活性却显著增高。上述选择性诱导特征和 PB 预处理后的结果明显不同, 即 DL-111-1T 对♀大鼠也呈现多环芳烃型的药酶诱导作用, 此结果与用♂大鼠<sup>(1)</sup>所作的实验相同。

## 二. DL-111-1T 诱导肝微粒体 MFO 和 UDPGT 活性时的量效和时效关系

以不同剂量 DL-111-1T 预处理♀大鼠后, 动物肝微粒体的 P-450 含量对硝基苯甲酰脱甲基酶活性、AHH 活性、UDPGT 缀合吗啡和 1-萘酚的能力、以及还原态 P-450-CO 络合物吸收峰波长等的变化列于表 1。

Tab 1. Induction of hepatic Microsomal MFO and UDPGT by DL-111-1T (different dose×d) in female rats ( $\bar{X} \pm SD$ )

Pretreatment with DL-111-1T mg/(kg.d)×d	P-450	p-Nitroanisole demethylase activity	AHH activity	UDPGT activity towards		Peak wavelength of P-450-CO
				Morphine	1-naphthol	
% of control value						
Vehicle × 4	100±14	100±47	100±22	100±1	100±30	448.9±0.06
80 × 4	175±21**	314±62**	237±40**	101±2	117±70**	448.1±0.21**
40 × 4	143±14**	237±48**	239±34**	101±1	117±50**	448.2±0.30**
20 × 4	165±27*	222±48**	219±41**	102±4	120±190	448.0±0.30**
20 × 2	143±14**	269±60**	153±30**	101±1	110±50*	448.2±0.39*
20 × 1	112±18	169±58	129±18	102±3	108±60	448.3±0.33*

\*\*P<0.01,\*P<0.05. Control value for ♀ rats: P-450 and AHH activity refer to Fig 1; p-nitroanisole demethylase activity=0.44±0.12 nmol/min·mg microsomal protein; UDPGT activities were expressed as relative peak height in HPLC traces.

由表 1 可见, DL-111-1T 能选择性诱导增高♀大鼠肝微粒体 UDPGT 缀合平面型底物能力, 并使还原态 P-450-CO 络合物吸收峰波长明显短移, 再次证明 DL-111-1T 对♀大鼠肝脏 MFO 及 UDPGT 呈多环芳烃型诱导作用。以 ip 菜油 × 4 d 的大鼠为基准作统计分析表明, 除 ip 20 mg/(kg.d) × 1d 组外, 其余不同剂量、不同预处理天数组大鼠肝微粒体 P-450 含量、对硝基苯甲酰脱甲基酶和 AHH 活性, 以及 UDPGT 缀合 1-萘酚的能力均有显著性增高。ip 20 mg/(kg.d) × 4 d 组 UDPGT 缀合 1-萘酚的能力与对照组相比  $0.05 < p < 0.10$ , 其原因可能是实验误差或动物个体差异较大。若以 ip 20 mg/(kg.d) × 2 d 为基准作统计分析, 则增加诱导剂量或时间, 除 AHH 活性仍有上升趋势 ( $P < 0.05$ ) 外, 其余指标不再有显著性变化, 即 ip 20 mg/(kg.d) × 2d DL-111-1T 已足以使♀大鼠肝脏 MFO 与 UDPGT 达到稳态诱导。

## 三. DL-111-1T 对人羊膜 FL 细胞 AHH 的诱导

1 μmol/L 3-MC 和不同浓度 DL-111-1T 对 FL 细胞 AHH 活性的诱导作用见表 2。

表 2 数据表明, DL-111-1T 浓度为 0.1 μmol/L 时, 其诱导作用最强 (当浓度继续增高时, 细胞 AHH 活性下降, 这或许是高浓度 DL-111-1T 影响了细胞正常生长所致), 可使 FL 细胞 AHH 活性诱导增高 3.5 倍左右, 但仅为 3-MC 的一半, 后者可使 FL 细胞 AHH 活性诱导增高约 9 倍。

Tab 2. Induction of AHH activity in human amnion FL cell by DL-111-1T

Type of inducer	Concentration of inducer ( $\mu\text{mol/L}$ )	AHH activity fmol/min·mg protein
None		148(141~155)*
DL-111-1T	0.001	358
	0.01	482(506~458)
	0.1	663(694~632)
	1	581(599~563)
	10	485(511~459)
	100	211
3-MC	1	1,446(1,410~1,482)

\* $\bar{X}$ (range of two measurements).

## 讨 论

在检验化学品致突变(致癌)性的短期试验方法中,程序外DNA合成(UDS)试验法,是一公认的、有实用价值的短期方法。UDS试验系统中,常用人体某些细胞系作指示系统,以使UDS试验结果更接近于人体实际情况。

生长迅速和培养方便的人上皮细胞系——人羊膜FL细胞,似可用作UES试验中理想的指示生物体。但FL细胞中AHH活性在传代培养过程中丢失很快,为使FL细胞能成为UDS试验中有效的指示体,用FL细胞作UDS试验前,必须对其AHH先作诱导。实验<sup>(11)</sup>证明,将FL细胞与多环芳烃型诱导剂共孵育24h,待其AHH活性达稳态诱导后,此FL细胞便可用作UDS试验中的有效指示系统。然而,为使UDS试验结果单一地反映被检物的致突变(致癌)性,所用的多环芳烃型药酶诱导剂本身必须无致突变性。遗憾的是,至今可供选用的、本身无致突变性的多环芳烃型药酶诱导剂品种极少。

本文结果提示,人羊膜FL细胞可用来区分药酶诱导剂的诱导特性:如PB对人羊膜FL细胞AHH活性的诱导能力仅为3-MC的1/6左右<sup>(11)</sup>,而DL-111-1T对FL细胞AHH活性的诱导能力为3-MC的一半,即为PB的3倍,从而表明DL-111-1T对人羊膜FL细胞中依赖于P-448的AHH呈中等程度的多环芳烃型诱导作用。用DL-111-1T对FL细胞作UDS试验后,结果(数据见表3,详细内容另文报道)表明,DL-111-1T本身不会诱发FL细胞的UDS,故DL-111-1T似可在用UDS研究化学品的致突变(致癌)性时用作无致突变性的P-448诱导剂。

尽管DL-111-1T本身不会诱发UDS,鉴于♀大鼠ip 20 mg/(kg·d) DL-111-1T×2d后,其肝脏MFO活性已被选择性地诱导增高至稳态水平,同时DL-111-1T对人羊膜FL细胞AHH活性也有明显诱导作用,故在临床用药时似仍需顾及可能发生的药物交互作用。

**Tad 3. Unscheduled  $^3\text{H}$ -Tdr incorporation in the acid-insoluble fraction of  $^{14}\text{C}$ -Tdr-prelabelled and synchronized  $\beta$ -NF induced human amnion FL cell exposed to DL-111-1T, B(a)P, MNNG and vehicle(DMSO)**

Concentration (mol/L)	Relative $^3\text{H}/^{14}\text{C}^a$		
	DL-111-1T	B(a)P	MNNG
0	1.00±0.04	1.00±0.04	1.00±0.04
10 <sup>-9</sup>	1.09±0.07		
10 <sup>-8</sup>	1.02±0.02		
10 <sup>-7</sup>	1.10±0.04		
10 <sup>-6</sup>	1.00±0.03		
10 <sup>-5</sup>	0.92±0.01	1.63±0.38*	2.60±0.38**
10 <sup>-4</sup>		1.73±0.49*	

a.  $\pm\bar{X}$ SD, \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ ,  $n>3$

### 参 考 文 献

- 1 刘志强, 等. 一种新的多环芳烃型药物代谢酶诱导剂——抗早孕药 DL-111-1T. 药学报 1987; **22**:575.
- 2 Franklin MR, Estabrook RW. On the inhibitory action of mersalyl on drug oxidation: A rigid organization of the electron transport chain. *Arch Biochem Biophys* 1971; **143**:318.
- 3 Lowry OH, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**:265.
- 4 Omura T, Sato R. The carbon monoxidebinding pigment of liver microsomes: I. Evidence for its hemoprotein nature. *Ibid* 1964; **239**:2370.
- 5 Netter KJ, Seidel O. An adaptively stimulated O-demethylating system in rat liver microsomes and its kinetic properties. *J Pharmacol Exp Ther* 1964; **146**:61.
- 6 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.
- 7 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.
- 8 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.
- 9 Goto T, Weichel EJ. Aryl hydrocarbon mono-oxygenase activity in human primary amnion cell-culture. *Europ J Cancer* 1980; **15**:751.
- 10 Atlas SA, et al. Genetic control of interindividual variations in the inducibility of aryl hydrocarbon hydroxylase in cultured human lymphocytes. *Cancer Res* 1976; **36**:4619.
- 11 Sun L (孙路), et al. A test using cultured cells with induced mixed-function oxygenase in the unscheduled DNA synthesis assay for detecting promutagens/procarcinogens. *Mutation Research* 1987; **191**:45.

## SELECTIVE INDUCING ABILITY OF DL-111-1T TOWARDS MIXED FUNCTION OXIDASE IN FEMALE RAT LIVER AND HUMAN AMNION FLUID CELL

ZQ Liu, ZY Lin, L Sun and YN Yu

(School of Pharmacy, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310006)

**ABSTRACT** Following pretreatment of adult female rats with contraceptive agent 3-(2-ethylphenyl)-5-(3-methoxyphenyl)-1H-1,2,4-triazol(DL 111-1T) 20 mg/kg.d for 2 consecutive days, the hepatic microsomal MFO and UDPGT activities were induced to a constant level, being characteristic of arylhydrocarbon type of induction. Coincubation of human amnion FL cell with 0.1  $\mu\text{mol/L}$  of DL-111-1T for 24 h produced a 4.5-fold induction of AHH activity of the cell. This inducing ability was 3 times that of PB, but 1/2 that of 3-MC. According to these observations, DL-111-1T may also be considered as a polycyclic arylhydrocarbon type inducer toward human amnion FL cell's MFO which contains mainly of cytochrome P-448. UDS test showed that DL-111-1T itself could not induce UDS of FL cell.

**Key words** Cytochrome P-450; Mutagenic tests; Unscheduled DNA synthesis (UDS); 3-(2-Ethylphenyl)-5-(3-methoxyphenyl)-1H-1,2,4-triazol