

佐米曲坦诱导雄性大鼠肝 CYP3A2 的作用机制

韩 坤, 陆思洁, 曾 苏, 余露山*

(浙江大学药学院药物代谢和药物分析研究所, 浙江省抗肿瘤药物研究重点实验室, 浙江 杭州 310058)

摘要: 作者前期研究发现佐米曲坦 (ZOL) 对雄性大鼠肝中 CYP3A2 具有诱导作用, 而对雌性大鼠没有诱导作用。阐明其机制对于研究 ZOL 的药物相互作用和个体化用药具有积极意义。由于生长激素 (GH) 与一些蛋白的性别差异性表达密切相关, 因此, 本研究探究了 ZOL 对大鼠 GH 分泌的影响, 以及其对脑垂体化学损伤大鼠模型肝中 CYP3A2 的诱导作用。结果发现, ZOL 可以抑制正常大鼠体内血浆 GH 水平。与正常组大鼠的诱导结果不同, ZOL 抑制了损伤组雄性大鼠肝中 CYP3A2 的表达。另外, ZOL 对于雌雄原代肝细胞中的 CYP3A1/2 无明显诱导作用。进一步研究发现, 给予 ZOL 后正常雄性大鼠肝中肝细胞核因子 4 α (HNF4 α) 的入核水平明显增加, 而正常雌性大鼠、脑垂体化学损伤大鼠和大鼠原代肝细胞中 HNF4 α 的入核水平无明显变化。结果表明, GH 和 HNF4 α 在 ZOL 性别差异性诱导 CYP3A2 的过程中发挥了重要的作用。

关键词: 佐米曲坦; CYP3A2; 性别选择性诱导; 生长激素; 肝细胞核因子 4 α

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 01-0044-07

Induction study of CYP3A2 in male rats by zolmitriptan

HAN Kun, LU Si-jie, ZENG Su, YU Lu-shan*

(Institute of Drug Metabolism and Pharmaceutical Analysis, Zhejiang Province Key Laboratory of Anti-Cancer Drug Research, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: In our preliminary studies, we observed zolmitriptan (ZOL) treatment led to induction of CYP3A2 in male not female rats. To figure out the reason is of great significance for drug-drug interactions and personalized administration. Since growth hormone (GH) is known as the major mechanistic determinant of sexually-dimorphic gene expression like CYP3A2 in rat liver, the impacts of ZOL on both plasma GH levels in non monosodium glutamate (MSG)-treated rats and CYP3A2 expression in GH depleted MSG-treated rats were studied. ZOL was shown to partially suppress GH levels in both genders. Furthermore, CYP3A2 protein and mRNA level declined in male not female MSG-treated rats. In order to study the possible molecular events involved in the depression of GH and gender-selective induction on rat CYP3A2 by ZOL, the mRNA and protein level (whole protein and nuclear protein) of hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) was investigated. Nuclear accumulation of HNF4 α was observed in the normal male not female rat liver tissue following ZOL treatment. However, this kind of nuclear translocation did not occur in rat hepatocytes and MSG-treated rats. These findings demonstrated CYP3A2 inducibility by ZOL was gender-selective. GH and HNF4 α may play an important role in CYP3A2 induction.

Key words: zolmitriptan; CYP3A2; gender-dependent induction; growth hormone; hepatocyte nuclear factor 4 α

收稿日期: 2016-10-17; 修回日期: 2016-11-28.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30600772).

*通讯作者 Tel: 86-571-88208407, E-mail: yuls@zju.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1007

佐米曲坦 (zolmitriptan, ZOL) 是一种高选择性 5-HT_{1B/1D} 受体激动剂, 临床上用于偏头痛的治疗^[1,2]。体内研究发现氟西汀、普萘洛尔^[3]、地西泮^[4,5]、甲氧氯普胺、西咪替丁等都会导致佐米曲坦药物动力学

的改变。因此,若能获得更多的药物对细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450, CYP450) 的诱导或抑制作用信息,则可预测其在体内发生相互作用的可能性,对临床安全、合理、有效用药,避免不良反应的发生具有重要的指导意义。

实验室前期研究发现:佐米曲坦能性别选择性的诱导雄性大鼠肝中 CYP3A2,而对雌性大鼠肝 CYP3A 没有明显诱导作用^[6,7]。生长激素 (growth hormone, GH)、肝细胞核因子 (hepatocyte nuclear factors, HNFs) 等均被报道和性别差异诱导相关。GH 分泌过程受性腺激素的调节,使得动物和人血浆中 GH 的浓度存在明显的性别差异^[8]。大鼠肝脏中已知含有十几种性别相关的 P450 亚型,雄性大鼠肝细胞含有 CYP2A2、2C11 和 3A2 等,雌性大鼠肝细胞表达 CYP2C12 和 CYP2C7 等^[9,10]。GH 在雄性大鼠中以脉冲式分泌,在雌性大鼠中则不规则持续性分泌。据报道,GH 是大鼠中许多性别差异性表达的 CYP450 的关键调控子^[11-15],而口服佐米曲坦能提高人血浆中 GH 的浓度^[16],这对进一步研究导致 ZOL 诱导大鼠 CYP3A2 具有性别差异的机制提供了思路。HNFs 包括 HNF1 α 、HNF4 α 、HNF3 和 HNF6 等。许多肝 CYP 基因能被 HNF4 α 活化^[17,18],HNF4 α 对人肝中孕烷 X 受体 (pregnane X receptor, PXR) 和组成型雄甾烷受体 (constitutive androstane receptor, CAR) 核受体调节 CYP3A4 的表达也具有重要作用。HNF4 α 对部分肝基因包括 CYP 基因的转录调节作用存在明显的性别差异,能正向调节某些雄性动物中的特异性 CYPs,并且抑制雌性动物中某些特异性 CYPs^[19]。

因此,本文采用放射免疫 (RIA) 方法检测经佐米曲坦诱导后雌雄大鼠体内 GH 的变化,同时采用 2 个 GH 缺陷模型即脑垂体损伤大鼠和原代大鼠肝细胞重复佐米曲坦的诱导实验,从而观察当 GH 不存在的情况下佐米曲坦对 CYP3A 的性别诱导现象是否仍旧存在,并用荧光定量 PCR 和 Western blot 方法观察佐米曲坦对 HNF4 α 的 mRNA、蛋白及入核水平的影响,以探索佐米曲坦性别差异诱导肝 CYP3A 的分子机制。性别差异诱导机制的研究对预测活性化合物或药物候选物药代动力学性别差异以及个体化给药具有十分重要的意义。

材料与方 法

试剂与仪器 Mastercycler ep Realplex 荧光定量 PCR 仪 (Eppendorf), 核酸蛋白浓度测定仪 Gene Quant

pro (Amersham Biosciences), FDG-101 伽马射线流式探头 (日本 Aloka 公司)。佐米曲坦 (ZOL, 浙江大学理学院化学系), 地塞米松 (DEX, Sigma), 谷氨酸单钠盐 (MSG, 康杰生物科技有限公司), Trizol 试剂盒 (生工生物工程股份有限公司), M-MLV 逆转录酶 (Fermentas), 荧光定量 PCR 试剂盒 (天根生化科技), 生长激素放射免疫试剂盒 (Millipore Linco), CYP3A1 兔多克隆抗体 (Abcam), CYP3A2 绵羊多克隆抗体 (Abcam), β -actin 兔多克隆抗体 (Santa Cruz), HNF4 α 山羊多克隆抗体 (Santa Cruz)。

佐米曲坦对大鼠的诱导作用 Sprague-Dawley 大鼠,动物合格证号为: SCXK (沪) 2006-0016,雌雄各半,体重 190 ± 10 g, 从中国科学院上海实验动物中心引进。雌雄动物按体重各均匀分为 5 组,分别为空白,佐米曲坦低剂量、中剂量、高剂量组及阳性对照组。每组共 3 批,每批 3 或 4 只。低、中、高剂量组灌胃给药佐米曲坦分别为 0.5 、 2.5 和 12.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 3 天;空白组灌胃生理盐水,3 天;阳性对照组地塞米松 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 3 天。

微粒体制备 动物末次给药 24 h 后,将动物断头处死,剖腹,用经冰浴冷却的生理盐水灌流,除去肝中血液。取出肝脏 (以下均在 4 $^{\circ}\text{C}$ 以下操作),用生理盐水洗净,滤纸吸干外部水分。取部分肝脏制备肝微粒体,于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用,以 Lowry 法测定微粒体中的蛋白质浓度^[20]。微粒体由 Western blot 检测。剩余的肝脏用于 Real-time PCR 和 Western blot 全蛋白及核蛋白的分析,存储于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。

放射免疫法测定血浆 GH 浓度 正常组大鼠经佐米曲坦诱导 3 天后,尾静脉取血。每隔 15 min 取血 100 μL ,共取 5 h, 3000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后,取上清液。血浆样品处理方法参照 Linco 生长激素 RIA 试剂盒的说明。

大鼠原代肝细胞培养及佐米曲坦的诱导处理 采用两步灌注消化法分离大鼠肝细胞^[21]。将活力在 85% 以上的肝细胞以 $1.25 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种于先铺有 0.2% 明胶层的孔板上,培养液为含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640。新鲜分离的肝细胞贴壁后进行佐米曲坦的诱导实验,含 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松 (阳性对照组) 或含 10 、 50 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3 个浓度佐米曲坦的培养液 (样品组),分别替换六孔板中的培养液,地塞米松和佐米曲坦均溶解于 DMSO 中,DMSO 在培养液中的终浓度低于 0.1%,空白对照组在培养液中加入等量的 DMSO。每组平行 3 孔,培养 3 批原代肝细胞进行同样实验。

脑垂体损伤大鼠造模及佐米曲坦的诱导处理
脑垂体损伤大鼠造模方法如下^[22]: 新生大鼠在出生 24 h 内皮下第一次注射谷氨酸单钠盐 (MSG, 4 mg·g⁻¹ 体重), 此后每隔一天注射一次, 连续注射 5 次。新生大鼠与母鼠一起饲养。一个月后, 雌雄分开饲养。到 3 个月, 开始实验。造模大鼠与正常组大鼠相比主要差别在于脑垂体损伤大鼠血浆中检测不到 GH。动物分组与佐米曲坦的给药处理同正常组大鼠, 见“佐米曲坦对大鼠的诱导作用”。

微粒体代谢实验和原代肝细胞代谢实验 取空白、佐米曲坦低中高剂量诱导、地塞米松诱导阳性对照的雌性或雄性鼠肝微粒体适量 (终质量浓度 1.0 mg·mL⁻¹), 分别加探针底物睾酮, 使其终浓度为 30 μmol·L⁻¹。37 °C 预孵育 5 min, 加烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP, 终浓度为 0.25 mmol·L⁻¹) 与还原型辅酶 II (NADPH, 终浓度为 0.1 mmol·L⁻¹) 启动反应, 再孵育一定时间后, 终止反应。按照“大鼠原代肝细胞培养及佐米曲坦的诱导处理”得到空白、佐米曲坦低中高剂量诱导、地塞米松诱导阳性对照的雌性或雄性鼠原代肝细胞, 进行同样实验。采用 HPLC 法^[7]测定剩余底物浓度, 所得结果与空白对照组比较, 分析是否有显著性差异。

荧光定量 PCR 法测定 CYP3A1、CYP3A2 和 HNF4α 的 mRNA 表达 按 Trizol 一步法提取大鼠肝组织 (正常组大鼠和损伤组大鼠) 和原代肝细胞的总 RNA, A260/A280 为 1.8~2.0。逆转录操作按照试剂盒说明书进行, 样品保存在 -80 °C。PCR 反应体系参照荧光定量试剂盒说明, 实验结果采用 2^{-ΔΔCt} 相对定量法。引物序列见表 1。

Western blot 法测定 CYP3A1、CYP3A2 和 HNF4α 蛋白表达 大鼠原代肝细胞和肝组织 (正常组和损伤组) 均按照 Abcam 说明书, 用 RIPA 裂解液裂解获得总蛋白样本。核蛋白提取按照说明书操作。样品保存在 -80 °C。SDS-PAGE 浓缩胶为 5%, 分离胶为 10%。电泳完成后, 将蛋白转至 PVDF 膜, 转膜条件为 200 mA, 1 h (HNF4α 为 3 h)。CYP3A1 和 HNF4α 封闭条件为含 5% 脱脂牛奶的 PBST (含 0.1% Tween 20 的磷酸缓冲液) 室温封闭 1 h, CYP3A2 封闭条件

为含 5% 脱脂牛奶的 PBST 4 °C 封闭过夜。一抗条件为: 兔抗 CYP3A1 (1:4 000) 和山羊抗 HNF4α (1:100) 4 °C 过夜, 绵羊抗 CYP3A2 (1:1 000) 和兔抗 β-actin (1:3 000) 室温 1 h。二抗条件: HRP 标记的山羊抗兔 (1:3 000), 兔抗绵羊 (1:2 000) 和兔抗山羊 (1:3 000) IgG 室温孵育 1 h。最后蛋白用 ECL 显影, 胶片曝光后用扫描仪扫描。

数据处理 以上数据均用平均值及 SD 表示, 个体差异用 Dunn's 检验表示, 非参数检验采用 Kruskal-Wallis 检验。所有计算均采用 SPSS 软件。

结果

1 佐米曲坦对原代肝细胞 CYP3A1/2 的酶活性、蛋白和 mRNA 水平均无显著影响

由图 1 和表 2 可见, 经佐米曲坦诱导后雄性和雌性大鼠肝细胞中 CYP3A1 和 CYP3A2 蛋白表达水平、酶活性水平和 mRNA 水平都没有明显升高。说明体外诱导实验中, 佐米曲坦对肝细胞 CYP3A1/2 并没有产生体内给药时所表现的性别差异诱导作用。

2 佐米曲坦抑制正常组大鼠生长激素的分泌

如图 2 所示, 给药组、对照组雌雄大鼠的 GH 分

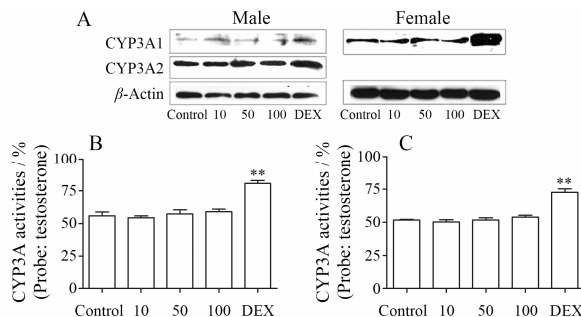


Figure 1 Hepatocytes were induced by media supplemented with zolmitriptan (ZOL, 10, 50 and 100 μmol·L⁻¹), dexamethasone (DEX, 10 μmol·L⁻¹) or control (DMSO) for 48 h after plating. (A) ZOL induction of CYP3A1 and 3A2 proteins in rat hepatocytes (Western blot analysis). (B-C) ZOL induction of CYP3A activities (reduced amount of testosterone, a specific probe substrate of CYP3A), in male (B) and female (C) rat hepatocytes. Testosterone relative values are means ± SD; n ≥ 3. CYP3A proteins were monitored by Western blot in at least three animals/group. **P < 0.01 vs Control

Table 1 Primer sequences for amplification of specific rat genes

Gene	Forward primer 5'→3'	Reverse primer 5'→3'	GenBank accession
CYP3A1	gat gtt gaa atc aat ggt gtg t	ttc aga ggt atc tgt gtt tcc	NM 013105
CYP3A2	agt agt gac gat tcc aac ata t	tca gag gta tct gfg ttt cct	NM 153312
β-Actin	act ggc att gtg atg gac tc	cag cac tgt gtt ggc ata ga	NM 031144
HNF4α	cgg gct ggc cag aag aaa g	agc gca tta atg gag ggt agg	NM 022180

Table 2 Effects of ZOL on the expression of *CYP3A* in the liver of non-MSG (monosodium glutamate) or MSG-pretreated rats and in hepatocytes. *CYP3A2* gene in rats treated with dexamethasone (DEX) is detectable in light of C_t and the melting curve. However, *CYP3A2* gene in female control rats can't be detected. Thus, we can't calculate the normalized gene expression level. Gene expression relative level values are means \pm SD; $n \geq 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group. ND: Not detected; NC: Not be calculated

Dose	Normalized gene expression (Control = 1)			
	Male		Female	
	<i>CYP3A1</i>	<i>CYP3A2</i>	<i>CYP3A1</i>	<i>CYP3A2</i>
Rat hepatocytes				
100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.90 \pm 0.01	0.89 \pm 0.26	0.81 \pm 0.13	N.D.
50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.94 \pm 0.01	0.92 \pm 0.11	0.95 \pm 0.06	N.D.
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.78 \pm 0.20	1.24 \pm 0.24	0.86 \pm 0.07	N.D.
DEX (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	18.9 \pm 0.70**	6.00 \pm 1.41**	8.5 \pm 2.12**	N.C.
Rat liver (MSG-treated)				
12.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.80 \pm 0.56	0.71 \pm 0.04	0.83 \pm 0.13	N.D.
2.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.50 \pm 0.01*	0.49 \pm 0.14*	0.80 \pm 0.24	N.D.
0.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.95 \pm 0.23	0.25 \pm 0.31*	1.45 \pm 0.07	N.D.
DEX (100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	10.05 \pm 0.03**	1.15 \pm 0.21	17.8 \pm 1.20**	N.C.

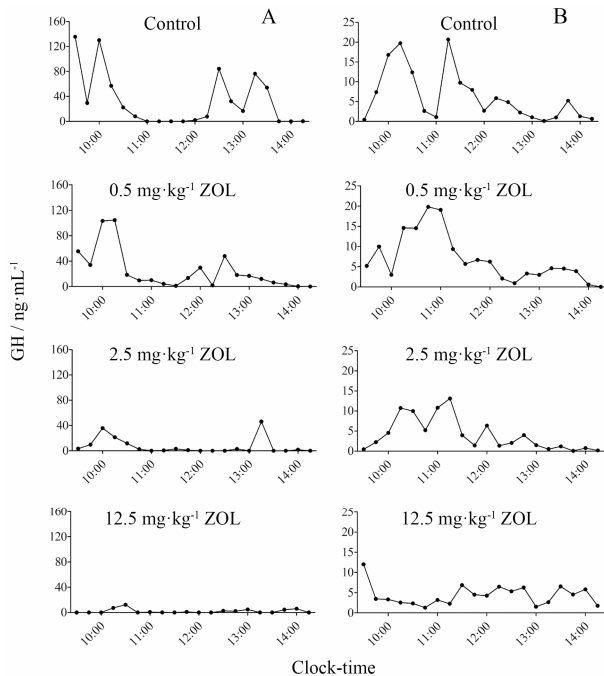


Figure 2 Plasma levels of circulating growth hormone (GH) in non MSG-treated rats exposing to ZOL. (A: Male rats; B: Female rats). Plasma was obtained at 15-min intervals for 5 continuous hr. Rats were treated by ig with saline (control) or ZOL (0.5, 2.5 and 12.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively) dissolved in saline for 3 consecutive days. GH profiles are representative of two collections from at least three rats/group

泌模式和文献报道相符。雄性大鼠生长激素呈“开关”式脉冲分泌，在脉冲中间间隔时大鼠体内血液中几乎测不到GH。而雌性大鼠分泌GH呈“持续性分泌”，虽有一定的脉动，但是很微弱。从分泌模式上来看，佐米曲坦并未改变GH的分泌形式。

结果表明，佐米曲坦显著抑制了血浆生长激素

的峰值。给予低 (0.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、中 (2.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、高 (12.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 剂量的佐米曲坦，雄性大鼠的平均血浆GH浓度分别降低为原来的80%、30%和10%。雌性大鼠的血浆GH峰值同样也显著降低，为对照组的92%、60%和34%。结果说明，佐米曲坦显著抑制了正常组雌雄大鼠的血浆GH分泌。

3 佐米曲坦抑制损伤组雄性大鼠肝脏 CYP3A 酶活性、CYP3A2 蛋白和 mRNA 表达

放射免疫法检测损伤组大鼠造模是否成功。结果显示，损伤组大鼠GH皆在检测限以下。有趣的是，佐米曲坦对损伤组大鼠CYP3A2的作用与正常组大鼠结果恰好相反。如图3和表2，高中低剂量的佐米

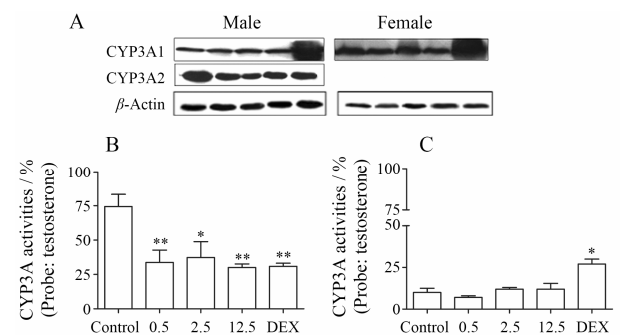


Figure 3 MSG-treated rats were treated by ig with saline or ZOL (0.5, 2.5 and 12.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) or DEX (100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) dissolved in saline for 3 consecutive days. (A) ZOL induction of CYP3A1 and 3A2 proteins in MSG-treated rats (4 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, neonatally, Western blot analysis). (B-C) ZOL induction of testosterone (reduced amount of testosterone, a specific probe substrate of CYP3A), in male (B) and female (C) MSG-treated rats (4 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, neonatally). Testosterone relative values are means \pm SD; $n \geq 3$. CYP3A proteins were monitored by Western blot in at least three animals/group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control

曲坦显著抑制 CYP3A2 蛋白和 mRNA 表达水平。和正常组大鼠类似, 雌性大鼠 CYP3A2 的蛋白和 mRNA 也低于检测水平。酶活性结果与 CYP3A2 蛋白和 mRNA 基本一致, 雄性大鼠 CYP3A 酶活性被佐米曲坦抑制但雌性大鼠 CYP3A 酶活性基本不受影响。

4 佐米曲坦对正常组大鼠, 原代培养大鼠肝细胞及损伤组大鼠 HNF4 α 蛋白和 mRNA 水平的影响

为探究 HNF4 α 是否参与佐米曲坦诱导雄性大鼠 CYP3A2, 分别观察了正常组、损伤组和肝细胞中 HNF4 α 的蛋白和 mRNA 的水平变化, 由于 HNF4 α 入核蛋白水平的变化更直接、更准确地反映佐米曲坦可能引起的 HNF4 α 介导下的 CYP3A 活性变化, 还观察了 3 个模型中 HNF4 α 的蛋白入核水平变化。

在蛋白水平上, 由图 4 可知, 佐米曲坦可以诱导正常组雌雄大鼠 HNF4 α 蛋白, 但雄性的诱导倍数大于雌性, 且佐米曲坦对正常组雌雄大鼠 HNF4 α 入核蛋白水平的影响呈性别选择性, 即对雄性有诱导但对

雌性无明显诱导 (图 4A 和 4B)。佐米曲坦对大鼠原代肝细胞 HNF4 α 蛋白及入核蛋白水平均无显著影响 (图 4C 和 4D)。佐米曲坦诱导损伤组雄性大鼠 HNF4 α 蛋白但对雌性大鼠无显著影响, 核蛋白结果与总蛋白结果不同, 佐米曲坦对损伤组雌雄大鼠核蛋白中的 HNF4 α 均无显著影响 (图 4E 和 4F)。

在 mRNA 水平上, 如表 3 所示, 佐米曲坦对正常组大鼠 HNF4 α 有调控作用, 且这种调控作用具有性别差异, 即对雄性有诱导但对雌性无明显诱导。佐米曲坦对于原代培养肝细胞和损伤组大鼠的 HNF4 α mRNA 有微弱诱导作用, 且这种诱导作用不呈雌雄差异。从整体趋势上看, HNF4 α 的 mRNA 实验结果和 Western blot 结果保持一致。

Table 3 Effects of ZOL on the expression of HNF4 α in the liver of non-MSG or MSG-pretreated rats and in hepatocytes. Gene expression relative level values are means \pm SD; $n \geq 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control

Dose	Normalized gene expression (Control = 1)	
	Male	Female
Rat liver (non-MSG treated)		
12.5 mg·kg ⁻¹	6.65 \pm 0.50**	1.10 \pm 0.14
2.5 mg·kg ⁻¹	3.20 \pm 0.42*	1.75 \pm 0.28
0.5 mg·kg ⁻¹	2.63 \pm 0.50*	1.45 \pm 0.07
Rat hepatocytes		
100 μ mol·L ⁻¹	1.74 \pm 0.24	1.23 \pm 0.33
50 μ mol·L ⁻¹	1.82 \pm 0.92	1.50 \pm 0.23
10 μ mol·L ⁻¹	1.25 \pm 0.69	2.10 \pm 0.42
Rat liver (MSG-treated)		
12.5 mg·kg ⁻¹	2.40 \pm 0.35	1.55 \pm 0.42
2.5 mg·kg ⁻¹	2.00 \pm 0.41	1.68 \pm 0.74
0.5 mg·kg ⁻¹	1.75 \pm 0.35	1.30 \pm 0.77

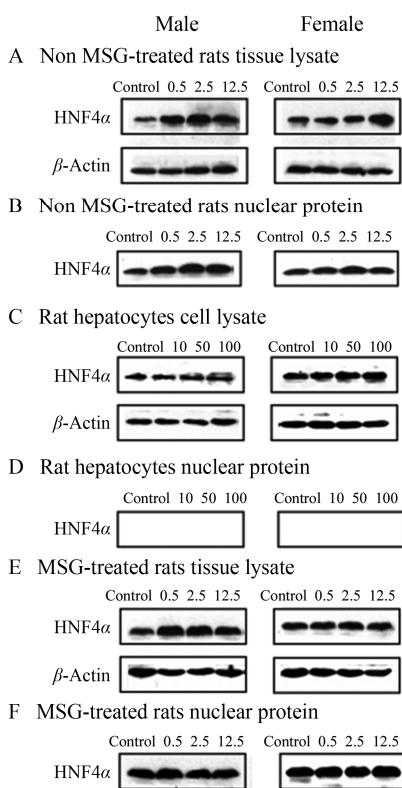


Figure 4 Effects of ZOL on the expression of HNF4 α whole cell proteins and nuclear proteins (Western blot), in non MSG-treated rats (A: Tissue lysate; B: Nuclear protein), rat hepatocytes (C: Cell lysate; D: Nuclear protein), and MSG-treated rats (E: Tissue lysate; F: Nuclear protein). Rats were treated by ig with saline or ZOL (0.5, 2.5 and 12.5 mg·kg⁻¹) suspended in saline for 3 consecutive days. Hepatocytes were induced by media supplemented with ZOL (10, 50 and 100 μ mol·L⁻¹) or control (0.1% of DMSO) for 48 h after plating. HNF4 α proteins were monitored by Western blot in at least three animals/group

讨论

在原代培养大鼠肝细胞实验中, 佐米曲坦对肝细胞中 CYP3A1/2 并没有产生类似体内给药时所表现的性别差异诱导作用。原代培养大鼠肝细胞与正常组大鼠最大的区别在于大鼠肝细胞不受激素的调控, 因此推测这种性别特异性的产生是与体内各种激素调节相关的。在大鼠肝模型中, GH 是性别二态性基因如 CYP3A2 的主要决定因素^[23-27]。而且, 佐米曲坦相对于其他曲坦类药物有更好的渗透性^[28], 神经内分泌的作用可能因此会更显著。因此, GH 可能作为佐米曲坦对 CYP3A2 性别差异诱导的中间物。原代大鼠肝细胞上的实验结果支持了作者的假设。

据报道, GH 峰值的高低会影响雄性大鼠 CYP450 的表达, 而雌性大鼠肝中 CYP450 对于“持

续式”分泌的 GH 峰值变化响应不是十分敏感。对于雄性大鼠, CYP3A2 在 GH 峰值降低时, 其活性、蛋白表达水平和 mRNA 水平反而上升。当 GH 浓度为 0 时, CYP3A2 表达最高。当其接近生理浓度时, 表达才下降^[29]。而对于雌性大鼠来说, 只要 GH 分泌是持续性的, 峰值对 CYP3A2 影响很小, CYP3A2 基本检测不到。他们的实验结果恰好可以解释实验当中两个结果的关联性。因为佐米曲坦可以抑制 GH 的分泌, 所以导致了佐米曲坦诱导雄性大鼠 CYP3A2 这个结果。因此, 佐米曲坦抑制 GH 的分泌可能是导致佐米曲坦诱导雄性大鼠 CYP3A2 的原因之一。

损伤组大鼠的实验结果表明, 佐米曲坦抑制损伤组雄性大鼠肝脏 CYP3A 酶活性、CYP3A2 蛋白和 mRNA 表达。即在去除 GH 影响后, 佐米曲坦的诱导效应被逆转, 这说明佐米曲坦对 CYP3A2 的影响与 GH 存在一定关联。但是, 该结果提示 GH 不是佐米曲坦诱导正常组大鼠肝 CYP3A2 的唯一靶点。可能同时存在抑制途径, 只是诱导的效应强于抑制效应, 因此在正常大鼠中, 综合效应仍然显示为诱导作用。根据文献报道, 众多的五羟色胺再摄取抑制剂 (SSRIs) 因为有五羟色胺能的激活作用, 所以可以抑制 CYP450s 的表达^[30-32], 而佐米曲坦是 5-HT1B/1D 的激动剂, 它的药理作用类似于 SSRIs。因此认为佐米曲坦对损伤组大鼠的抑制作用可能是通过类似的机制引起。但是这种抑制作用在正常组大鼠中小于诱导作用。

HNF4 α 是肝中含量丰富的核受体, 对调节很多肝内基因, 包括许多 CYP450 家族成员有十分重要的作用, 其中还有的显示出性别依赖性^[33-36]。而且据报道, HNF4 α 是由 GH 脉冲控制的^[37]。综合上述结果, 佐米曲坦性别差异诱导正常组大鼠 HNF4 α 的 mRNA、总蛋白、核蛋白水平, 但对原代肝细胞和脑垂体损伤组大鼠这两个不受 GH 影响的模型并无明显影响。通常认为核受体和转录因子入核水平的变化和它们的功能存在关联。因此认为 HNF4 α 可能介导了佐米曲坦性别差异诱导 CYP3A2 这一过程。

本文实验结果显示, 佐米曲坦可以抑制正常大鼠体内血浆 GH 水平。与正常组的诱导结果不同的是, 佐米曲坦不能诱导, 相反的是抑制了损伤组雄性大鼠肝中的 CYP3A2。另外, 佐米曲坦对于雌雄原代肝细胞中的 CYP3A1/2 无明显诱导作用。因此, 认为 GH 可能介导了佐米曲坦诱导雄性大鼠肝中的 CYP3A2。此外, 佐米曲坦性别差异诱导正常组大鼠肝 HNF4 α 的入核水平, 但对于 GH 被化学敲除的损伤组大鼠, 这种性别差异诱导作用消失。这个结果说

明 HNF4 α 可能参与了佐米曲坦性别差异诱导 CYP3A2, 且它的作用模式也和 GH 有关系。综上所述, 佐米曲坦可以性别选择性诱导雄性大鼠肝 CYP3A2, GH 和 HNF4 α 可能参与了这个性别选择性诱导过程。值得注意的是, HNF4 α 发挥作用的分子机制以及这种性别选择性诱导过程对人体是否也有效仍需更多研究, 如 HNF4 α 基因敲除实验以及 EMSA 或免疫沉淀实验的进一步确证。

References

- [1] Lionetto L, Casolla B, Mastropietri F, et al. Pharmacokinetic evaluation of zolmitriptan for the treatment of migraines [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2012, 8: 1043-1050.
- [2] Srinivas NR, Syed M. Intranasal pharmacokinetic data for triptans such as sumatriptan and zolmitriptan can render area under the curve (AUC) predictions for the oral route: strategy development and application [J]. *J Pain Palliat Care Pharmacother*, 2016, 30: 13-24.
- [3] King CD, Rios GR, Green MD, et al. UDP-Glucuronosyltransferases [J]. *Curr Drug Metab*, 2000, 1: 143-161.
- [4] Bjornsson TD, Callaghan JT. Perspective the conduct of *in vitro* and *in vivo* drug-drug interaction studies: a pharmaceutical research and manufacturers of America (PhRMA) perspective [J]. *Drug Metab Dispos*, 2003, 31: 815-832.
- [5] Kaiser N, Neshet R, Oprescu A, et al. Characterization of the action of S 21403 (mitiglinide) on insulin secretion and biosynthesis in normal and diabetic beta-cells [J]. *Br J Pharmacol*, 2005, 146: 872-881.
- [6] Yu LS, Zeng S. Determination of mitiglinide in rat plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2006, 834: 204-207.
- [7] Yu LS, Lu SJ, Zhao NP, et al. Male-specific induction of CYP3A2 in rats by zolmitriptan [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2008, 60: 1601-1607.
- [8] Thangavel C, Boopathi E, Shapiro BH. Intrinsic sexually dimorphic expression of the principal human CYP3A4 correlated with suboptimal activation of GH/glucocorticoid-dependent transcriptional pathways in men [J]. *Endocrinology*, 2011, 152: 4813-4824.
- [9] Shapiro BH, Agrawal AK, Pampori NA. Gender differences in drug metabolism regulated by growth hormone [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1995, 27: 9-20.
- [10] Pampori NA, Shapiro BH. Gender differences in the responsiveness of the sex-dependent isoforms of hepatic P450 to the feminine plasma growth hormone profile [J]. *Endocrinology*, 1999, 140: 1245-1254.

- [11] Li J, Wan Y, Na S, et al. Sex-dependent regulation of hepatic CYP3A by growth hormone: roles of HNF6, C/EBP α and RXR α [J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 93: 92–103.
- [12] Banerjee S, Das RK, Shapiro BH. Growth hormone-independent suppression of growth hormone-dependent female isoforms of cytochrome P450 by the somatostatin analog octreotide [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 715: 256–261.
- [13] Das RK, Banerjee S, Shapiro BH. Noncanonical suppression of GH-dependent isoforms of cytochrome P450 by the somatostatin analog octreotide [J]. *J Endocrinol*, 2013, 216: 87–97.
- [14] Kaji H, Kume T. Regioselective glucuronidation of denopamine: marked species differences and identification of human UDP-glucuronosyltransferase isoform [J]. *Drug Metab Dispos*, 2005, 33: 403–412.
- [15] Ritter JK, Chen F, Sheen YY, et al. A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol, and other UDP-glucuronosyltransferase isozymes with identical carboxyl termini [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267: 3257–3261.
- [16] Miners JO, Mackenzie PI. Drug glucuronidation in humans [J]. *Pharmacol Ther*, 1991, 51: 347–369.
- [17] Thangavel C, Boopathi E, Shapiro BH. Inherent sex-dependent regulation of human hepatic CYP3A5 [J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 168: 988–1000.
- [18] Harding D, Fournel-Gigleux S, Jackson MR, et al. Cloning and substrate specificity of a human phenol UDP-glucuronosyltransferase expressed in COS-7 cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988, 85: 8381–8385.
- [19] Jin CJ, Miners JO, Lilywhite KL, et al. cDNA cloning and expression of two new members of the human liver UDP-glucuronosyltransferase 2B subfamily [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 194: 496–503.
- [20] Pampori NA, Shapiro BH. Feminization of hepatic cytochrome P450s by nominal levels of growth hormone in the feminine plasma profile [J]. *Mol Pharmacol*, 1996, 50: 1148–1156.
- [21] Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study [J]. *J Cell Biol*, 1969, 43: 506–520.
- [22] Pampori NA, Agrawal AK, Waxman DJ, et al. Differential effects of neonatally administered glutamate on the ultradian pattern of circulating growth hormone regulating expression of sex-dependent forms of cytochrome P450 [J]. *Biochem Pharmacol*, 1991, 41: 1299–1309.
- [23] Ahluwalia A, Clodfelter KH, Waxman DJ. Sexual dimorphism of rat liver gene expression: regulatory role of growth hormone revealed by deoxyribonucleic acid microarray analysis [J]. *Mol Endocrinol*, 2004, 18: 747–760.
- [24] Colby HD, Gaskin JH, Kitay JI. Requirement of the pituitary gland for gonadal hormone effects on hepatic corticosteroid metabolism in rats and hamsters [J]. *Endocrinology*, 1973, 92: 769–774.
- [25] Deneff C. Effect of hypophysectomy and pituitary implants at puberty on the sexual differentiation of testosterone metabolism in rat liver [J]. *Endocrinology*, 1974, 94: 1577–1582.
- [26] Gustafsson JA, Stenberg A. Masculinization of rat liver enzyme activities following hypophysectomy [J]. *Endocrinology*, 1974, 95: 891–896.
- [27] Maruyama M, Fujisawa M, Yokosuka M, et al. A new *in vivo* analysis model to detect sexually dimorphic rat liver cytochrome P450 gene expression dependent on growth hormone secretory patterns [J]. *Exp Anim*, 2016, 65: 447–454.
- [28] Martin GR. Pre-clinical pharmacology of zolmitriptan (Zomig; formerly 311C90), a centrally and peripherally acting 5HT_{1B/1D} agonist for migraine [J]. *Cephalgia*, 1997, 17: 4–14.
- [29] Agrawal AK, Shapiro BH. Differential expression of gender-dependent hepatic isoforms of cytochrome P-450 by pulse signals in the circulating masculine episodic growth hormone profile of the rat [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 292: 228–237.
- [30] Hemeryck A, Belpaire FM. Selective serotonin reuptake inhibitors and cytochrome P-450 mediate drug-drug interactions: an update [J]. *Curr Drug Metab*, 2002, 3: 13–37.
- [31] Probst-Schendzielorz K, Viviani R, Stingl JC. Effect of cytochrome P450 polymorphism on the action and metabolism of selective serotonin reuptake inhibitors [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2015, 11: 1219–1232.
- [32] Hirsh-Rokach B, Spectre G, Shai E, et al. Differential impact of selective serotonin reuptake inhibitors on platelet response to clopidogrel: a randomized, double-blind crossover trial [J]. *Pharmacotherapy*, 2015, 35: 140–147.
- [33] Wiwi CA, Gupte M, Waxman DJ. Sexually dimorphic P450 gene expression in liver-specific hepatocyte nuclear factor 4 α -deficient mice [J]. *Mol Endocrinol*, 2004, 18: 1975–1987.
- [34] Wiwi CA, Waxman DJ. Role of hepatocyte nuclear factors in transcriptional regulation of male-specific CYP2A2 [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 3259–3268.
- [35] Wiwi CA, Waxman DJ. Role of hepatocyte nuclear factors in growth hormone-regulated, sexually dimorphic expression of liver cytochromes P450 [J]. *Growth Factors*, 2004, 22: 79–88.
- [36] Park SH, Waxman DJ. Inhibitory cross-talk between STAT5b and liver nuclear factor HNF3 β : impact on the regulation of growth hormone pulse-stimulated, male-specific liver cytochrome P-450 gene expression [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 43031–43039.
- [37] Thunell S. (Far) Outside the box: genomic approach to acute porphyria [J]. *Physiol Res*, 2006, 55: S43–S66.