

底物消除法测定微粒体酶动力学参数的实用性分析

段俊敏, 王晓莹, 郭宾*, 陈波, 姚守拙

(湖南师范大学化学化工学院制药工程系, 化学生物学及中药分析教育部重点实验室, 长沙 410081)

[摘要] 目的: 以细胞色素 P450 酶(CYP) 的特异性底物非那西丁(CYP1A2) 和右美沙芬(CYP2D6) 为探针, 比较底物消除法和传统产物生成法测定的差异, 评价底物消除法的可行性。方法: 基于高效液相色谱技术建立底物及其特征代谢物的定量分析方法, 测量底物在不同起始浓度下的消除初速率(“底物消耗法”)和形成产物的初速率(“产物生成法”); 采用线性回归法和曲线拟合法求算酶动力学参数 K_m 和 V_{max} 。结果: 采用底物消除法测得非那西丁(CYP1A) 的 K_m 和 V_{max} 与产物生成法相近; 但测定 CYP2D 活性时, 因右美沙芬同时被小鼠肝微粒体其它同工酶代谢, 所得表观参数有较大差别。结论: 对特异性强的探针药物, 两方法结果一致。只要选择合适底物探针和数据处理方案, 底物消耗法是一种可靠、简便测定微粒体酶动力学参数的方法。

[关键词] 底物消除; 酶动力学; 细胞色素 P450; 微粒体

[中图分类号] R969.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-8685(2011)07-1691-04

Practicability of substrate deletion approach to measure kinetic parameters for microsomal enzyme

DUAN Jun-min, WANG Xiao-ying, GUO Bin*, CHEN Bo, YAO Shou-zhuo

(Key Laboratory of Chemical Biology and Traditional Chinese Medicine Research, Ministry of Education of China, Pharmaceutical Engineering Department in Academy of Chemistry and Chemical Engineering of Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the practicability of substrate deletion approach by comparing enzyme kinetic parameters obtained from this new approach and the traditional product formation method, using phenacetin and dextromethorphan as substrate probe for cytochrome P450 (CYP) 1A2 and 2D6, respectively. **Methods:** A high-performance liquid chromatographic method was used for monitoring the concentrations of the remaining substrate and its metabolite formation at various reaction time points during the rat liver microsomal incubation. The K_m and V_{max} were calculated by both linear regression and curve fitting for the Michaelis-Menten kinetics. **Results:** The similar kinetic constants are obtained for CYP1A applying phenacetin as probe. However, they varied significantly for probing the CYP2D activities using dextromethorphan as substrate that is metabolized by several isoenzymes at the same time. **Conclusion:** The substrate deletion approach is in good overall agreement with the product formation method for probe substrates with strong specificity, and it can be used as a robust and efficient protocol to determine K_m and V_{max} using microsomes only by choosing the suitable substrate as well as the data analysis processing.

[Key words] Substrate deletion; Enzymatic kinetics; Cytochrome P450; Microsome

运用体外代谢体系获得反应动力学参数以预测或外推药物在体内的转化行为, 是当前药物代谢研究的一项重要内容^[1-2]。表征药物代谢酶催化动力学行为的关键参数是米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{max} (或 V_{max}/K_m 比值即在清除率 CL_{int})^[3]。如何准确快速测定这些参数对药物筛选、体内清除和药物间相互作用评估就显得特别重要^[1-4]。测定参数一般采用产物生成法(product-formation approach)或底物消除法

(substrate-deletion approach); 二者又可分别通过线性回归或曲线拟合来完成数据分析^[5]。常规采用的代谢物生成法要求定量测定一系列底物浓度下特定产物的生成速率, 通过速率对底物浓度的双曲线关系(底物饱和)来定量描述酶促反应动力学特征。由于传统的产物生成法需要预先确定药物的特异代谢途径和产物结构, 底物消除法正逐渐被广泛用于药物在代谢产物结构不明、代谢物标准品难以获得或复杂转化途径情况下细胞色素 P450 酶(CYP) 的表观动力学参数的快速测定^[6-8]。

关于底物消除法的有效性, 已有文献进行了理论验证^[9]。最近, Youdim 等^[10]证实了底物消耗法不仅适用于重组 CYP, 还可用于微粒体混合酶 K_m 和 V_{max} 的测定; 但对少数药物如地昔帕明、双氯芬酸等, 与产物生成法的结果相比仍有较大差

[基金项目] 国家自然科学基金项目(20875028, 21005027)和湖南省教育厅课题(05K009)

[作者简介] 段俊敏(1985-)女, 硕士研究生, 主要从事药物分析与药物代谢研究。

* 通讯联系人, E-mail: binnguo@126.com

异。本文以 CYP1A2 和 2D6 的底物为探针药物,采用底物消除法测定微粒体酶动力学参数,并与传统产物生成法进行比较,进而探究产生差异的原因,为合理使用底物消除法提供依据。

1 材料与方

1.1 实验材料

岛津公司 SHIMADZU LC-20A 高效液相系统(LC-20AT 串联泵, SIL-20A 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, SPD-M20A 紫外检测器)和 RF-10AxL 荧光检测器。SHZ-82B 恒温水浴振荡器(金坛市文华科教实验仪器厂), HPLC 柱为 Spherigel C₁₈ 柱(200 mm×4.6 mm 5 μm)。磷酸氢二钠, 磷酸二氢钠, 三乙胺购自恒兴化学试剂有限公司; 非那西丁(phenacetin), 对乙酰氨基酚(acetaminophen), 右美沙芬(dextromethorphan), 去甲基右美沙芬(dextrophan), NADPH 均为 Sigma 产品。小鼠肝微粒体(10 mg/ml, 冷冻)购自瑞德肝脏疾病研究中心。乙腈、甲醇为色谱纯, 其它试剂均为分析纯, 水为自制双蒸水。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制 底物非那西丁和右美沙芬标准溶液分别采用 100 mmol/L 磷酸缓冲溶液(Na₂HPO₄-NaH₂PO₄, pH 7.4) 配制成为反应所需浓度范围。代谢物乙酰氨基酚和去甲右美沙芬用乙腈:水(95:5, v/v) 配置成系列不同浓度的标准溶液。所配溶液于玻璃试管中 4℃ 保存备用。

1.2.2 产物生成反应孵育体系 微粒体孵育反应参考我们以前实验条件^[4], 在磷酸缓冲液(100 mmol/L, pH=7.4) 中相继加入不同浓度的底物溶液和解冻后小鼠肝微粒体(终浓度为 0.5 mg/ml), 37℃ 预热 3 min 后, 加入新鲜 20 μl NADPH 溶液(终浓度 10 mmol/L, 由磷酸盐缓冲液临时配制), 启动反应。反应体系终体积为 200 μl。反应 30 min 后, 加入 200 μl 的冰甲醇终止反应。

在产物生成预试验中, 考察孵育体系中一定酶蛋白浓度下代谢产物形成与孵育时间(5 min、10 min、15 min、30 min、60 min、120 min) 之间的线性条件, 确定不同探针底物的最佳反应时间。

1.2.3 底物消除反应孵育体系 底物消耗实验条件与上述产物生成反应体系相似, 即非那西丁(6.5 μmol/L ~ 130 μmol/L) 和右美沙芬(5 μmol/L ~ 150 μmol/L) 分别与小鼠肝微粒体一起孵育, 总反应体积为 1000 μl。在 0 min, 2 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 每次取出 150 μl, 加入等体积冰甲醇终止反应。

为了基质匹配制标, 分别取不同浓度的分析物标液与酶混合, 相继加入 200 μl 终止液和 20 μl NADPH 溶液。以相同体积冰甲醇代替上述底物和标样分别作为酶反应和分析物检测的阴性对照。各反应体系中有有机溶剂浓度控制在 1% 以内。

1.2.4 样品处理及色谱分析 反应终止液经高速离心(10000 r/min, 15 min), 沉淀蛋白后, 取上清液 10 μl 直接进样 HPLC 分析。

非那西丁及其代谢物对乙酰氨基酚分析条件: 流动相为 0.05% 乙酸(A)-甲醇(B), 流速 1 ml/min, 检测波长 254 nm。梯度洗脱程序(B 相变化) 为 0→5 min 25%; 5→8 min 25→45%; 8→12 min, 45→45%; 12→15 min, 45→60%; 15→18 min 60%。

右美沙芬及其代谢物去甲基右美沙芬色谱分析条件: 流动相为 0.8% 三乙胺(磷酸 pH 3.5)-甲醇(50:50, v/v), 流速: 1 ml/min, 检测激发波长 280 nm、发射波长 310 nm。

1.3 数据分析

在产物生成法中, 米氏底物饱和方程(1) 通过非线性拟合(Origin 7.0) 直接求算各反应的动力学常数 K_m 和 V_{max}; 或采用双倒数作图法变换为 Lineweaver-Burk 方程(2) 线性回归进行分析, 截距的倒数即为 V_{max}, 斜率乘以 V_{max}, 即得 K_m 值。

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2)$$

在底物消耗法中, 将 0 时间检测的底物浓度值([S]₀) 作为 100% (对照), 其它时间点的底物浓度([S]) 与该值相比得剩余底物水平(%), 以剩余底物水平对反应时间做底物衰减图; 根据一级消除动力学, 该指数衰减曲线(3) 的初始线性阶段斜率即为相应底物浓度下的消耗常数 k_{dep} 值。然后用 k_{dep} 对底物浓度[S]作图, 根据方程(4) 拟合曲线或倒数法直线回归(5), 最终可求算出相应的 K_m 和 V_{max} 值^[6,9,10]。

$$[S] = [S]_0 \cdot e^{-k_{\text{dep}} \cdot t} \quad (3)$$

$$k_{\text{dep}} = k_{\text{dep}([S]=0)} \cdot \left(1 - \frac{[S]}{[S] + K_m}\right) = \frac{V_{\max}}{K_m} \cdot \left(1 - \frac{[S]}{[S] + K_m}\right) \quad (4)$$

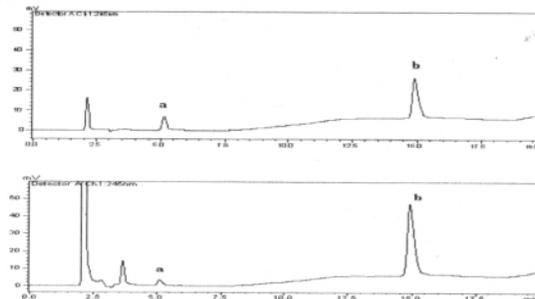
$$\frac{1}{k_{\text{dep}}} = \frac{1}{V_{\max}} \cdot [S] + \frac{K_m}{V_{\max}} \quad (5)$$

2 结果

2.1 微粒体代谢样品的色谱分析

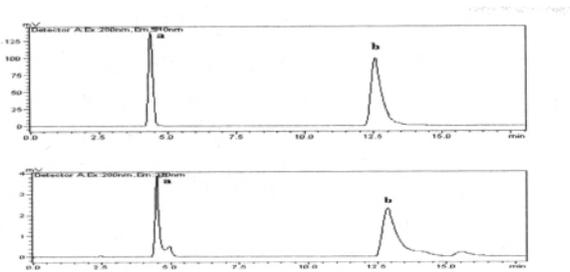
2.1.1 非那西丁在小鼠肝微粒体中的代谢 以非那西丁为底物, 对其在小鼠肝微粒体中的代谢产物进行了色谱分析, 图 1 显示, 采用 HPLC 梯度洗脱方法可以对药物及其代谢产物进行分离检测, 对乙酰氨基酚为单一代谢产物。由于采用较简单的样品前处理方法, 色谱图中较早流出的杂质峰(保留时间小于 5 min) 可能是孵育体系中未充分处理的无机盐类、酶蛋白和辅酶因子等极性组分。

2.1.2 右美沙芬在小鼠肝微粒体中的代谢 图 2 为底物右美沙芬在小鼠肝微粒体中的代谢情况。由于采用特定波长的荧光方法, 检测选择性有所提高, 反应体系杂质峰减少。但代谢物除主要产物去甲右美沙芬外, 还发现有多个未知化学结构组分。



(上图: 对乙酰氨基酚(a) 和非那西丁(b) 混标溶液(甲醇/水, 1:1, v/v); 下图: 非那西丁在小鼠肝微粒体孵育后的样品图)

图 1 探针底物非那西丁及其在与小鼠肝微粒体中的代谢产物色谱图



(上图: 去甲右美沙芬(a)和右美沙芬(b)混标溶液(甲醇/水, 1:1, v/v)中; 下图: 右美沙芬在小鼠肝微粒体孵育后的样品图)

图2 探针底物右美沙芬及其在与小鼠肝微粒体中的代谢产物色谱图
2.2 分析方法学验证

采用HPLC方法对小鼠肝微粒体孵育体系中的底物及其

表1 小鼠肝微粒体反应体系中底物与代谢物的HPLC分析方法学验证

分析物	回归方程及相关系数(r^2)	线性范围(μM)	最低检测限(LOD)(μM)	最低定量限(LLQ)(μM)	平均回收率(%)	精密度RSD(%)
对乙酰氨基酚	$y = 35363x - 2735.4$ 0.9989	0.812 - 81.2	0.05	0.15	86	4.7
去甲右美沙芬	$y = 11367x + 251.54$ 0.9986	0.303 - 30.3	0.009	0.03	91	7.9
非那西丁	$y = 24634x + 4961.2$ 0.9991	0.184 - 290	-	-	87	1.9
右美沙芬	$y = 42942x + 1372.4$ 0.9999	1.78 - 356	-	-	86	2.3

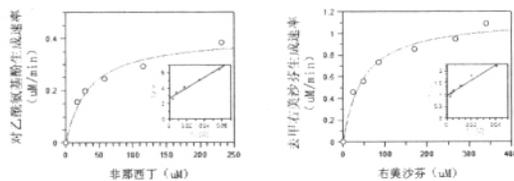


图3 双倒数作图法计算非那西丁(左)和右美沙芬(右)小鼠肝微粒体酶动力学参数

2.3.2 底物消耗法 底物消耗法测定反应体系底物浓度的时间变化,由方程(3)求得 k_{dep} ,然后以 k_{dep} 值对浓度做图,进行线性或非线性拟合,根据(4)、(5)求出 K_m 和 V_{max} 值(图4)。

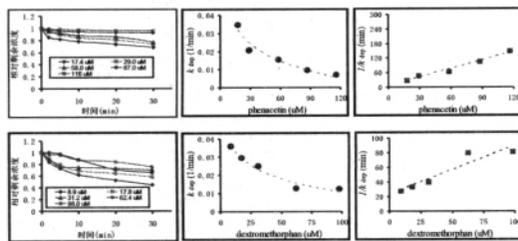


图4 底物消耗法计算非那西丁(上)和右美沙芬(下)小鼠肝微粒体酶动力学参数

2.3.3 动力学参数比较 表2对底物消耗和产物生成两种方法所获得 K_m 、 V_{max} 和 CL_{int} 参数结果进行了对比。从非那西丁代谢动力学参数看,两种方法结果一致,同时发现曲线拟合法比线性回归方法更为可靠。对于右美沙芬,两者并不一致,与传统产物生成法相比,尽管 K_m 相差不大,但底物消耗法测得的清除率提高近一倍。

代谢物进行同时分析,标准曲线及其线性范围、定量限、准确度和精密度均符合生物样品定量分析要求(表1)。考虑到代谢物产率,去甲右美沙芬采用荧光法检测,定量限更低,准确度和精密度也较满意。由于底物药物在体系中的浓度较高,表1未给出最低检测限和定量限。

2.3 酶动力学参数的测定

2.3.1 产物生成法 产物生成法测定微粒体中所产生代谢物的浓度,即分别以非那西丁、右美沙芬为底物测定对乙酰氨基酚、去甲右美沙芬的产生速率,由米氏方程(1)非线性拟合获得各自 K_m 和 V_{max} 值。或采用线性方程(2)做图,计算酶动力学参数,结果见图3。

表2 两种方法测得酶动力学参数值的比较

参数计算方法	非那西丁代谢(CYP1A2)			右美沙芬代谢(CYP2D6)		
	K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$)	CL_{int} ($1/\text{min}/\text{mg}$)	K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$)	CL_{int} ($1/\text{min}/\text{mg}$)
产物生成	线性回归	22.3	3.73	0.168	37.3	2.02
	曲线拟合	33.6	4.86	0.145	46.8	2.31
底物消耗	线性回归	22.14	4.08	0.184	35.2	3.02
	曲线拟合	21.72	3.82	0.176	32.9	2.63

3 讨论

理论上,酶动力学过程可通过产物生成或底物消除来描述,其中产物生成和底物消除均可采用“速率法(微分形式)”或“过程法(积分形式)”方式测量^[11,12]。本文运用高效液相色谱法测量了孵育体系中代谢物的生成速率及底物的消耗速率,实验证实了底物消耗法与传统的产物生成法具有等效性。

底物消耗法测定微粒体中的P450酶动力学时,获得的是表观动力学参数。若要测定某一亚型酶的活性,则需选择只被该酶代谢的特定探针底物^[13]。文中CYP1A的同工酶CYP1A1/2在小鼠肝微粒体中以CYP1A2高水平表达,非那西丁主要被CYP1A2代谢,所以两种方法测定结果基本一致;而人体CYP2D6探针右美沙芬在小鼠肝微粒体中代谢情况较为复杂,小鼠CYP2D家族存在至少九种同工酶(CYP2D9-2D13、2D22、2D26、2D34和2D40),且右美沙芬同时被CYP3A代谢,因此两种方法结果有差异^[14,15]。从前面色谱图也可看出,CYP1A2催化非那西丁代谢为单一产物,CYP2D6催化代谢右

美沙芬时 除代谢为去甲右美沙芬外 还有其它代谢物质峰。因此 底物消除法在选择合适底物时需考虑种属差异。

此外 参数求算过程的数据处理也很关键 本文推导了基于底物消除动力学方程线性转换的新方法 并比较了线性化回归和非线性拟合结果的差异。一般线性方法如双倒数作图法容易受实验设计中底物浓度和初速度测量误差的干扰 导致人为误差放大偏离准确值^[5,11]。总之 当代谢物不明确或难以获得时 底物消耗法在酶动力学参数的快速测定和筛选中具有明显优势。只要选择合适底物探针和数据处理方案 底物消耗法是一种可靠测定微粒体酶动力学参数的简便方法。

[参考文献]

- [1] Wienkers LC, Heath TG. Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(10): 825-833.
- [2] Walsky RL, Obach RS. Validated assays for human cytochrome p450 activities[J]. *Drug Metab Dispos*, 2004, 32(6): 647-660.
- [3] Houston JB. Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance[J]. *Biochem Pharmacol*, 1994, 47(9): 1469-1479.
- [4] 郭宾,段俊敏,王美玲,等. 流动注射-串联质谱法快速筛选植物提取物对药物代谢酶的抑制潜性[J]. *分析化学*, 2010, 38(12): 1692-1697.
- [5] Schnell S, Maini PK. A century of enzyme kinetics: reliability of the K_M and v_{max} estimates[J]. *Comments Theor Biol*, 2003, 8(19): 169-187.
- [6] Obach RS, Reed-Hagen AE. Measurement of Michaelis constants for cytochrome P450-mediated biotransformation reactions using a substrate depletion approach[J]. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30(7): 831-837.
- [7] Komura H, Iwaki M. Nonlinear pharmacokinetics of propafenone in rats and humans: application of a substrate depletion assay using hepatocytes for assessment of nonlinearity[J]. *Drug Metab Dispos*, 2005, 33(6): 726-732.
- [8] Sjögren E, Lennernäs H, Andersson TB, et al. The multiple depletion curves method provides accurate estimates of intrinsic clearance (CL_{int}), maximum velocity of the metabolic reaction (V_{max}), and Michaelis constant (K_m): accuracy and robustness evaluated through experimental data and Monte Carlo simulations[J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37(1): 47-58.
- [9] Nath A, Atkins WM. A theoretical validation of the substrate depletion approach to determining kinetic parameters[J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34(9): 1433-1435.
- [10] Youdim K, Dodia R. Comparison between recombinant P450s and human liver microsomes in the determination of cytochrome P450 Michaelis-Menten constants[J]. *Xenobiotica*, 2010, 40(4): 235-244.
- [11] Nimmo IA, Atkins GL. A comparison of two methods for fitting the integrated Michaelis-Menten equation[J]. *Biochem J*, 1974, 141(3): 913-914.
- [12] Counotte GHM, Prins RA. Calculation of K_m and V_{max} from substrate concentration versus time plot[J]. *Appl Envir Microbiol*, 1979, 38(4): 758-760.
- [13] Suzuki A, Iida I, Tanaka F, et al. Identification of human cytochrome P-450 isoforms involved in metabolism of R(+)- and S(-)-gallopamil: utility of in vitro disappearance rate[J]. *Drug Metab Dispos*, 1999, 27(11): 1254-1259.
- [14] Martignoni M, Groothuis GM, De Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2006, 2(6): 875-894.
- [15] Turpeinen M, Ghicic C, Opritou M, et al. Predictive value of animal models for human cytochrome P450 (CYP)-mediated metabolism: a comparative study in vitro[J]. *Xenobiotica*, 2007, 37(12): 1367-1377.

(收稿日期: 2011-02-14)

山东出入境检验检疫局食品农产品检测中心携手 3M 提升食品安全检测能力

双方签署合作实验室的合作协议

(2011年5月20日)近日 3M 中国有限公司(以下简称 3M)与山东出入境检验检疫局食品农产品检测中心在中国青岛举行了“3M 食品安全合作实验室”(以下简称“合作实验室”)签约及揭幕仪式。出席此次仪式的双方领导有 3M 中国医疗产品部总经理吴亮, 3M 亚太食品安全部总经理廖咏薇, 3M 全球研发及法规总监 Jason L. Edgar, 山东出入境检验检疫局党组成员、副局长李凤贵, 青岛市商务局副局长丛彦, 青岛市科技局农业与社会发展处处长张启光, AOAC 中国区主席鲍蕾博士。

随着食品贸易全球化、加工食品的便利与普及、以及人们饮食习惯的改变,食品安全问题越来越深刻地影响人们的生活。尤其是近年来,我国频频曝出的各种食品安全事件引起了全社会的高度关注,对此,业界也在思考如何避免类似事件的一再发生,除了企业继续强化生产操作流程以外,检测方法标准和行业规范的不断完善也得到了政府相关部门的日益重视,同时对食品检测技术和产品提出了更高的要求。

本次合作正是希望借助双方的技术平台和专家队伍,致力于山东出入境检验检疫局食品农产品检测中心与 3M 公司最新研发技术的合作与应用,加强国际 AOAC 和中国 AOAC 的合作与交流,在检测方法领域一起创造更多的国际合作成果。在提升双方微生物快速检测、鉴定和新方法开发能力的同时,加强 3M 中国有限公司食品安全相关微生物检测产品的应用推广和持续开发,通过建立双方合作的微生物快速检测实验室实现技术研发与市场营运的直接联盟。以“3M 食品安全合作实验室”为纽带开展和促进食品安全检测技术研究、交流与合作,打造国际一流水平的食品安全检测技术平台是 3M 和山东出入境检验检疫局的共同目标。