

异烟肼和利福平致小鼠原代肝细胞损伤时 CYP2E1 和 CYP3A 酶活性的变化

郭 妮^①, 吴红海^②, 薛 改^②, 张运好^②, 侯艳宁^②

[摘 要] 目的 研究异烟肼和利福平对小鼠原代肝细胞的损伤作用及对 CYP450 同工酶 CYP2E1 和 CYP3A 酶活性的影响。方法 从小鼠肝脏中分离出肝细胞, 原代培养 3 d 后, 加入药物后孵育 2 d, 收集细胞培养上清液, 测定其中的乳酸脱氢酶 (LDH) 释放量以反映药物对肝细胞的损伤作用。测定 CYP450 酶活性的细胞分别加入 CYP2E1 和 CYP3A 的特异性底物 (对硝基酚和咪达唑仑) 孵育 2 h 反应终止后用高效液相色谱-质谱法测定特异性底物的浓度, 浓度减少程度代表 CYP2E1 和 CYP3A 活性的变化。结果 与对照组比, 异烟肼中、高浓度组, 利福平高浓度组, 合用中、高浓度组 LDH 的释放量显著增加。与对照组比较, 异烟肼组与合用组 CYP2E1 底物对硝基酚浓度均显著降低; 利福平组与合用组 CYP3A 底物咪达唑仑浓度均显著降低。结论 高浓度的异烟肼和利福平均对小鼠原代肝细胞有损伤作用, 两药合用时, 低浓度能引起肝细胞损伤。异烟肼和利福平对 CYP2E1 和 CYP3A 酶活性的诱导可能是其导致肝损伤的机制之一。

[关键词] 小鼠原代肝细胞; 异烟肼; 利福平; CYP2E1; CYP3A; 肝细胞毒性

[中图分类号] R 965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9926(2011) 03-0221-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1008-9926.2011.03.011

The Hepatocyte Toxicity and the Effect of Isoniazid and Rifampicin on the Activities of CYP2E1 and CYP3A in Mouse Primary Hepatocytes

GUO Ding-ni^①, WU Hong-hai^②, XUE Gai^②, ZHANG Yun-hao^②, HOU Yan-ning^②

^①Hubei Medical University, Shijiazhuang 050017, China ^②Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, China

[Abstract] **Objective** To study the hepatocyte toxicity and the effect of isoniazid and rifampicin on the activities of CYP2E1 and CYP3A in mouse primary hepatocytes. **Methods** The primary hepatocytes were isolated from mice and cultured for 3 days. Then the cells were treated with isoniazid and rifampicin. After two-day culture, culture media were collected for lactate dehydrogenase assay and the level of lactate dehydrogenase leakage was selected as an indicator of hepatocyte damage. Substrates (4-nitrophenol for CYP2E1, midazolam for CYP3A) were added, the concentration of which was measured with high performance liquid chromatography-MS to assess the activities of CYP2E1 and CYP3A. **Results** Compared to the negative control group, the LDH leakage of hepatocytes exposed to rifampicin, isoniazid and their combination was significantly increased. While the concentration of 4-nitrophenol in isoniazid group and combined group was low. The concentration of midazolam in rifampicin group and combined group was significantly different from that in the negative control group. **Conclusions** Rifampicin or isoniazid at an high concentration causes hepatotoxicity. The combination of both drugs at a low concentration causes hepatotoxicity. The hepatotoxicity may be caused by the activity of CYP2E1 and CYP3A induced by isoniazid and rifampicin.

[Key words] Mouse Primary Hepatocytes; isoniazid; rifampicin; CYP2E1; CYP3A; hepatocyte toxicity

异烟肼和利福平为临床常用抗结核药, 抗菌的同时会引起一系列不良反应, 肝毒性是其常见不良反应之一, 两药均能引起肝毒性, 合用或与其它药物

合用时肝毒性增加^[1]。近年的研究表明异烟肼和利福平引起的肝毒性与其对 CYP450 酶的诱导或抑制有关, 本实验室的前期实验也已经证明了异烟肼和利福平能增加小鼠体内 CYP450 酶的含量^[2], 但对单个同工酶的影响并没有一致的看法。本实验拟通过小鼠原代肝细胞检测异烟肼和利福平单用及合用时的肝毒性及对 CYP2E1 和 CYP3A 的影响, 探讨异烟肼和利福平引起肝毒性的机理。

作者简介: 郭丁妮, 硕士研究生。研究方向: 临床药理。Tel: (0311) 87978503 Email: guoddingn@163.com

作者单位: ① 050017 河北石家庄, 河北医科大学; ② 050082 河北石家庄, 白求恩国际和平医院

通讯作者: 侯艳宁, Tel: (0311) 87978211 Email: houyn@163.com

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠, 清洁级, δ 体质量: 25~30g (由河北省实验动物中心提供, 动物合格证号: 902094), 饲养环境: 温度: 20~25℃, 湿度: 40%~60%。

1.2 仪器与试剂 3131 型水套式 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Forma 公司), 倒置显微镜 (重庆光学仪器厂), HP-1100 液相色谱质谱联用系统 (美国 Agilent 公司), G1312A 二元泵, G1313A 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1946D 四极杆质谱检测器, A.09.01 化学工作站, 保护柱、分析柱 (均为 Phenomenex 公司), 80-2B 型高速低温离心机 (上海安亭科学仪器厂), 756MC 型分光光度计 (上海第三分析仪器厂), XW-80A 旋涡混合器 (上海精科实业有限公司), 异烟肼 (规格: 100 g 美国 Sigma 公司, 批号: 075K1581), 利福平 (规格: 1 g 上海索莱宝生物科技有限公司, 批号: R8010), 对硝基酚 (4-Nitrophenol 美国 Alfa Aesar 公司, 批号: 10116387), 咪达唑仑 (规格: 5 mg 江苏恩华药业集团有限公司, 批号: 20081208), IV 型胶原酶 (美国 Sigma 公司, 批号: C5138), Williams' E 培养基 (美国 Sigma 公司, 批号: 058K8305), 新生牛血清 (美国 Hyclone 公司, 批号: NUC0153), 乳酸脱氢酶试剂盒 (南京建成科技有限公司, 批号: 20090910), 鼠尾胶原 (自制, 批号: 20090828), 冰醋酸, 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 肝细胞的制作和培养 肝细胞的分离参照文献 [3] 方法略加修改。取小鼠 5 只, 腹腔注射 60 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉, 固定, 打开腹腔, 分离下腔静脉和肝门静脉, 从下腔静脉插针并固定, 用 37℃ 无菌灌流液 (NaCl 60.8 mmol/L, KCl 3.15 mmol/L, Na₂HPO₄ · 12H₂O 0.7 mmol/L, Hepes 33 mmol/L, pH 7.4) 灌流, 待肝脏体积增大, 肝叶变白时剪断肝门静脉, 灌流 5 min 后改用 37℃ 无菌灌流液 II (含 0.1 g/L IV 型胶原酶和 0.566 g/L CaCl₂ 的灌流液 I) 灌流 5 min, 将肝剪下放入 4℃ 的培养基 (Williams' E Medium 10.8 g/L, NaHCO₃ 2.2 g/L, 10% 胎牛血清, 青霉素 100 U/ml, 链霉素 100 U/ml) 中, 用无菌镊子将肝被膜剥离, 并不断抖动以抖落肝细胞, 细胞悬液以 160 目滤网滤过。以 600 r/min 低温离心 3 min 后弃上清, 用培养基洗涤, 重复 2 次。0.4% 台盼蓝染色, 血细胞计数板测定肝细胞活率及细胞密度。存活率 > 83% 用于试验, 将肝细胞以 2×10^5 /ml 接种于铺有自制鼠尾胶原的 24 孔培养板, 1 ml/孔, 置 37℃, 5%

CO₂ 的培养箱中培养, 24 h 后首次换液, 以后隔 1 天换 1 次, 于第 3 天加入药物。

2.2 给药及分组

2.2.1 测定乳酸脱氢酶的细胞分组 对照组, 异烟肼组 (150, 500, 1000 μ g/ml), 利福平组 (100, 200, 300 μ g/ml), 利福平 + 异烟肼组 (100 + 50, 200 + 100, 300 + 150 μ g/ml)。对照组加入 1 ml 培养液, 药物处理组加入含有相应浓度药物培养液 1 ml 每组 6 孔。加好药物后, 将细胞培养板放入培养箱孵育 2 d 收集细胞培养上清液, 用于测定乳酸脱氢酶的活力。

2.2.2 测定 CYP450 酶的细胞分组 对照组, 异烟肼组 (100 μ g/ml), 利福平组 (200 μ g/ml), 利福平 + 异烟肼组 (200 + 100 μ g/ml)。对照组加入 1 ml 培养液, 药物处理组加入含有相应浓度药物培养液 1 ml 每组 12 孔, CYP2E1 和 CYP3A 各 6 孔, 加好各种浓度的药物后, 把细胞培养板放入培养箱中孵育 2 d 再分别加入 CYP2E1 和 CYP3A4 的相应底物对硝基酚 (200 ng/ml) 和咪达唑仑 (200 ng/ml), 反应 2 h 反应终止后将细胞培养液吸出, 离心, 用 HPLC-MS 测定底物的浓度, 底物浓度的减少代表 CYP2E1 和 CYP3A 的活性的变化。

2.3 样品的测定方法 (1) 测定乳酸脱氢酶活性的方法 按照乳酸脱氢酶试剂盒的方法处理样品, 用分光光度计测定样品在 440 nm 的吸光度值, 并计算乳酸脱氢酶的活力。(2) 测定 CYP450 酶活性的方法 色谱条件: 色谱柱: Gemini C₁₈ 分析柱 (2.0 mm × 50 mm, 5 μ m), C₁₈ 保护柱 (5 μ m, 3.0 mm × 4.0 mm); 流动相: 乙腈-水 (含 0.2% 冰醋酸) (60:40); 流速: 0.2 ml/min 柱温为 30℃; 进样量: 10 μ l。(3) 质谱条件 电喷雾 (ESI) 离子化源, 选择离子监测 (SM) 模式。(4) 对硝基酚检测条件 毛细管电压 2 kV; 氮气流速: 10 L/min 雾化气压力: 210 kPa 干燥气温度: 350℃; 负离子方式检测, 碎片电压为 150 V, M/Z [138.1]⁻。(5) 咪达唑仑检测条件 毛细管电压: 3 kV; 氮气流速: 10 L/min 雾化气压力: 210 kPa 干燥气温度: 350℃; 正离子方式检测, 碎片电压为 50 V, M/Z [326.0]⁺。

2.4 统计分析 统计分析采用 SPSS 13.0 软件处理, 数据以均数 $\bar{x} \pm s$ 标准差表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 组间差异采用单因素方差分析, 统计结果以 $P < 0.05$ 为具有显著性差异。

3 结果

3.1 异烟肼与利福平对小鼠原代肝细胞 LDH 释放

的影响 与对照组比较, 异烟肼中、高浓度 (50Q 1000 $\mu\text{g}/\text{m l}$) 组、利福平高浓度组、异烟肼与利福平合用中、高浓度组、LDH 释放有显著性差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 异烟肼的低浓度组, 利福平的中、低浓度组, 异烟肼与利福平合用低浓度组均无显著性差异 ($P > 0.05$), 结果见表 1。

表 1 异烟肼和利福平单用及合用对

肝细胞 LDH 释放的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	浓度 ($\mu\text{g}/\text{m l}$)	LDH 活力 (U/L)
对照组	...	605.11 $\pm$ 102.30
异烟肼	150	696.82 $\pm$ 196.68
	500	755.86 $\pm$ 102.66 ^b
	1000	774.71 $\pm$ 76.25 ^c
利福平	100	695.98 $\pm$ 99.39
	200	759.63 $\pm$ 146.80
	300	808.63 $\pm$ 148.87 ^b
合用	100 + 50	686.35 $\pm$ 86.27
	200 + 100	793.97 $\pm$ 134.51 ^b
	300 + 150	921.61 $\pm$ 100.40 ^c

注: 与对照组比较, ^b $P < 0.05$ ^c $P < 0.01$ 。

3.2 异烟肼和利福平对小鼠原代肝细胞 CYP2E1 活性的影响 与对照组相比, 异烟肼组与合用组 CYP2E1 底物使硝基酚浓度显著降低 ($P < 0.05$), 利福平组无显著性差异 ($P > 0.05$)。与合用组比较, 利福平组与异烟肼组均无显著性差异 ($P > 0.05$), 结果见表 2。

表 2 异烟肼和利福平单用及合用对

CYP2E1 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	底物浓度 (ng/ml)
对照组	105.22 $\pm$ 11.96
异烟肼组	90.47 $\pm$ 4.25 ^b
利福平组	95.62 $\pm$ 2.85
合用组	88.85 $\pm$ 8.54 ^b

注: 与对照组比较, ^b $P < 0.05$ 。

3.3 异烟肼和利福平对小鼠原代肝细胞 CYP3A 活性的影响 与对照组相比, 利福平组与合用组使 CYP3A 底物咪达唑仑浓度显著降低 ($P < 0.05$), 异烟肼组无显著性差异 ($P > 0.05$)。与合用组比较, 异烟肼组有显著性差异 ($P < 0.05$), 利福平组无显著性差异 ($P > 0.05$), 结果见表 3。

表 3 异烟肼和利福平单用及合用对

CYP3A 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	底物浓度 (ng/ml)
对照组	117.28 $\pm$ 4.45
异烟肼组	114.48 $\pm$ 9.03 ^f
利福平组	106.95 $\pm$ 8.16 ^b
合用组	102.78 $\pm$ 9.13 ^b

注: 与对照组比较, ^b $P < 0.05$ 与合用组比较, ^f $P < 0.05$ 。

4 讨论

有研究显示 CYP2E1 参与异烟肼的代谢, 介导异烟肼的毒性代谢产物腈产生氧自由基, 从而导致脂质

过氧化和 DNA 断裂, 引起细胞损伤, 异烟肼既是其底物又对其有诱导作用, 因此 CYP2E1 是异烟肼引起肝损伤的关键^[4]。对大鼠异烟肼诱导 CYP2E1 活性, 利福平能抑制 CYP2E1 的活性, 两药合用能降低氧自由基的产生^[5]。本实验结果异烟肼能诱导小鼠原代肝细胞 CYP2E1 的活性, 利福平对其没有影响, 两药合用仍呈诱导作用。合用组与异烟肼组对 CYP2E1 的诱导作用并无显著性差异。利福平可通过其它的机制或诱导其它的肝药酶使异烟肼肝毒性增加, 这种现象与利福平诱导 CYP450 酶的活性有关, 而 CYP3A 为 P450 酶系中含量最高、代谢底物最多的同工酶, 与多种药物的相互作用有关^[6]。最近的研究显示外源性物质对 CYP3A 的诱导与孕烷 X 受体 (PXR) 有密切关系, 不同的 PXR 结构决定了药物对 CYP3A 诱导的种属差异。而人与小鼠的 PXR 结构相似, 与大鼠的不同, 抗结核药利福平通过活化 PXR 受体而诱导人和小鼠体内 CYP3A 的活性, 在大鼠体内却不能诱导该酶活性的原因^[7]。在大鼠体内, 利福平不能加重异烟肼引起的肝损伤, 甚至可以缓解异烟肼引起的肝损伤^[5]。而在人和小鼠体内异烟肼和利福平合用均比单用时肝毒性明显增加。这更加证明了, 异烟肼和利福平合用时引起的肝毒性增加可能与利福平诱导 CYP3A 的活性有关。本研究显示利福平在高浓度时引起肝细胞损伤, 与异烟肼合用时低浓度即可引起损伤。利福平诱导 CYP3A 的活性, 异烟肼对其没有影响, 两药合用仍呈诱导作用。

[参考文献]

- [1] Shama S. K. Antituberculosis drugs and hepatotoxicity [J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2004, 4(2): 167-170
- [2] 薛洪源, 侯艳宁, 刘会臣, 等. 利福平异烟肼合用致小鼠肝毒性增加的机理研究 [J]. 解放军药学报, 2002, 18(6): 330-332
- [3] 弗雷谢尼. R. I 动物细胞培养基本技术指南 (第四版) [M]. 北京: 科学出版社, 2004. 427-429
- [4] Shen Ch, Zhang HZ, Zhang GL, et al. Isoniazid induced hepatotoxicity in rat hepatocytes of gel entrapment culture [J]. *Toxicology Letters*, 2006, 167(8): 66-74
- [5] Yue J, Peng RX, Chen J, et al. Effects of rifampin on CYP2E1-dependent hepatotoxicity of isoniazid in rats [J]. *Pharmacological Research*, 2009, 59(2): 112-119
- [6] Alim A, Martin JB, Rob EA, et al. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: Concise up-to-date review [J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2008, 23(5): 192-202
- [7] Lin JH. CYP Induction Mediated Drug Interactions in Vitro Assessment and Clinical Implications [J]. *Pharmaceutical Research*, 2006, 23(6): 1089-1116

(收稿日期: 2010-04-27; 修回日期: 2010-07-13)

(本文编辑: 梁爱君)