论著

文章编号:1000-5404(2008)07-0606-04

大鼠无肝状态小肠CYP3A1酶活性增强和mRNA表达增高及芬太尼肝外代谢

李玉萍[1],顾健腾[1],陶国才[1],向学凤[2],杨 波[2] (第三军医大学西南医院:[1]麻醉科,[2]药理基地,重庆 400038)

摘 要:目的 研究无肝期前后芬太尼血药浓度变化及其代谢酶CYP3A1在大鼠小肠活性的改变和基因表达的变化,探讨无肝期芬太尼的代谢及其形成原因。方法 分两部分实验:实验一,20只大鼠随机分成对照组和阻断肝门组($n=10$),LC/MS/MS法测芬太尼血药浓度,观察无肝期前后芬太尼的代谢;实验二,30只大鼠随机分为3组($n=10$):①为对照组(B1组);②阻断肝门30 min组(B2组);③阻断肝门60 min组(B3组)。采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测各组CYP3A1 mRNA的表达,荧光比色法检测CYP3A1酶的活性。结果 无肝期组芬太尼浓度下降比对照组明显减慢($P<0.05$),但仍有下降趋势。小肠组织CYP3A1酶的活性和mRNA表达水平B2、B3组均明显高于B1组。B2组与B3组差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 芬太尼主要在肝脏代谢,无肝期小肠CYP3A1 mRNA表达上调,酶活性增加,可能为无肝期芬太尼肝外代谢的机制之一。

关键词:芬太尼;细胞色素P450酶;无肝期;血药浓度;RT-PCR;荧光比色法
中图法分类号:R657.3;R966;R971.2 文献标识码:A

Activity and mRNA expression of cytochrome P450 and fentanyl metabolism in rat intestine in anhepatic phase

LI Yu-ping[1], GU Jian-teng[1], TAO Guo-cai[1], XIANG Xue-feng[2], YANG Bo[2] ([1]Department of Anesthesiology, [2]Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the variation of fentanyl concentration and the gene expression and activity of rat intestinal cytochrome P450 3A1 in anhepatic phase. Methods The experiment was comprised of 2 steps. Step 1: The rats were randomly divided into experimental group (group A2, underwent occlusion of the hepatic portal) and control group (group A1), with 10 rats in each group. Fentanyl blood concentration was analyzed by LC/MS/MS. Step 2: The rats were randomly divided into group B1 (control), group B2 and group B3 (the rats underwent devascularization of the hepatic portal for 30 or 60 min). The levels of CYP3A1 in rat small intestine were assessed with RT-PCR and the enzymic activity of CYP3A1 was detected by fluorometry. Results Fentanyl concentration in anhepatic phase dropped more slowly in group A2 than group A1 ($P<0.05$), but still remained descending. The gene expression and the enzymic activity of CYP3A1 in rat small intestine were significantly higher in group B2 and group B3 than those in group B1 ($P<0.05$). The gene expression of CYP3A1 in rat small intestine between group B2 and group B3 was not significantly different. Conclusion Fentanyl metabolism is mainly in the liver. Higher gene expression and enzymic activity of intestinal CYP3A1 occurs in rats in anhepatic phase than the rats whose hepatic portal is occluded, which may be one of the possible mechanisms for extrahepatic metabolism of fentanyl in anhepatic phase.

Key words: fentanyl; CYP3A1; anhepatic phase; plasma concentration; RT-PCR; fluorometry

芬太尼是肝移植手术常用的麻醉性镇痛药,主要通过细胞色素P450(cytochrome P450)系统在肝脏代谢,在人体和大鼠相关代谢酶分别主要为CYP3A4、CYP3A1。细胞色素P450属于血红素蛋白基因超家族,编码一系列代谢酶系统,参与各类不同结构亲脂性化合物的生物转化,增强代谢物水溶性,利于排出体外,从而降低外源物对机体靶器官的毒性效应。以往的研究表明大鼠肝血流阻断后异丙酚代谢酶基因表达增强[1]。这可能是肝移植手术无肝状态下异丙酚能维持稳定药代动力学的原因。国外研究显示芬太尼存在肝外代谢[2],但对其肝外代谢的途径和机制均不明确。本实验以大鼠为动物模型,小肠为研究对象,观察肝血流阻断前后芬太尼的血药浓度及细胞色素P450酶系中芬太尼代谢相关CYP3A1酶活性的变化,并通过RT-PCR了解酶活性改变的机制,为探讨芬太尼肝外代谢的途径及作用机制提供依据。

基金项目:国家自然科学基金(30600585)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30600585)
作者简介:李玉萍,女,湖北省十堰市人,硕士研究生,医师,主要从事肝移植围术期麻醉药代谢方面的研究。E-mail:liyuping@163.com
通信作者:陶国才,电话:(023)68754197,E-mail:gctsc@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2007-12-21;修回日期:2008-02-17

1　材料与方法

1.1　主要试剂与仪器

芬太尼标准品(中国药品生物制品检定所),正己烷(进口)、甲醇、浓氨水均为分析纯;枸橼酸芬太尼注射液为湖北宜昌制药厂产品(生产批号 070201-2),DEPC 购于美国 Sigma 公司,Trizol RNA 提取试剂盒购于北京天根生物制品公司,两步法逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒为日本 TOYOBO 公司产品;PCR Marker 为美国 Promega 公司产品。细胞色素 P450 亚酶 CYP3A 活性比色法定量检测试剂盒为美国 Genmed 公司产品,低温高速冷冻离心机(2 K15 型),－20 ℃低温冰箱(BCD2272 型),PCR 仪(PTC215 型),核酸蛋白紫外分光光度仪(Smart-spect3000 型),凝胶成像分析仪(Bio-Rad 公司),荧光分光光度仪(FN2500 型),高效液相色谱仪(Agilent 1100 型),质谱仪(AB Q TRAP 型)。

1.2　实验动物及分组

SPF 级雄性大鼠 50 只,12～14 周龄,350～400 g。实验一:20 只大鼠分为对照组(A1)和处理组(A2)(每组 10 只),处理组夹闭肝门后两组均由右股静脉缓慢输注芬太尼(20 μg/kg)。实验二:30 只大鼠分为 3 组,每组 10 只,B1 为对照组,B2 为阻断肝门 30 min 组,B3 为阻断肝门 60 min 组。

1.3　无肝动物模型的建立

参照文献[1]制作,具体步骤为:采用乙醚将大鼠麻醉后,右侧颈深静脉置入 24 号静脉留置针,用于采血。右股静脉切开,植入 1.0 号硅胶管,用于注射药物和输液。纵行开腹,游离肝动静脉及胆总管,用动脉夹夹闭阻断入肝血流,无菌纱布覆盖切口防止污染。

1.4　血样采集和处理

乙醚麻醉大鼠,右股静脉切开,植入 1.0 号硅胶管,A1 组直接,A2 组于肝门夹闭后静脉注射芬太尼 20 μg/kg,分别于注射后 1、2、3、5、10、15、20、30、45、60、75、90 min 时间点由颈静脉各采血 0.5 ml,同时回输等量乳酸林格液。于装有血样的 Ep 管中加入内标液氨基比林(10 μg/ml)10 μl,漩涡混合 30 s,加入 0.2 ml 的浓氨水(pH = 13.0)振荡混匀 1 min,再加入正己烷 1.2 ml,振荡混匀 1 min,离心 20 min(3 500 r/min)静置10 min,然后取上清液 1.0 ml,室温下氮气吹干。向吹干的 Ep 管中加入 100 μl 甲醇,振荡 1 min,离心(13 000 r/min)5 min后取上清液 80 μl 进样分析。

1.5　芬太尼标准曲线绘制及样品血药浓度测定

参照文献[3]采用 LC/MS/MS 方法建立标准工作曲线,流动相:甲醇∶甲酸 = 90∶10;柱温:30 ℃;色谱柱:C_{18};质谱条件:芬太尼:Q1/Q3 = 337.10/188.00;Dweu = 200 ms;DP = 42.30;CE = 29.10;CEP = 12.13;CXP = 2.70;氨基比林:Q1/Q3 = 232.10/113.00;Dweu = 200 ms;DP = 24.00;CE = 17.00;CEP = 11.5;CXP = 2.20;标准曲线方程 $y = 0.015\,6x + 0.007\,21$($r = 0.999\,7$)。根据设定条件测定各样本中芬太尼的血药浓度。

1.6　小肠组织的取材

B1 组大鼠直接开腹截取距胃幽门 4 cm 处小肠组织,B2、B3 组分别阻断肝门 30、60 min 后截取距胃幽门 4 cm 处小肠,3 组标本均用 4 ℃盐水洗涤后液氮冻存备用。

1.7　CYP3A1 酶活性的检测

苄氧基异吩噁唑 O-脱烷基化酶(7-benzyloxyresorufin O-dealkylatase;BROD)的活性是 CYP3A1 的诊断标记,其基于 BROD 选择性催化 CYP3A1 的活性,乙氧基异吩噁唑(7-benzyloxyresorufin)在苄氧基异吩噁唑 O-脱烷基化酶的催化下,转化为羟基异吩噁唑酮(resorufin)后荧光峰值的变化(激发波长 530 nm,散发波长 590 nm),来定量测定 CYP3A1 的活性。组织匀浆后根据试剂盒说明严格操作,并根据试剂盒中已给出的各标准品的浓度值及实验所测荧光读数,构建标准曲线,纵坐标(Y 轴)为相对荧光单位,横坐标(X 轴)为不同稀释比例标准羟基异吩噁唑酮浓度值(纳摩尔)。根据标准曲线计算样品羟基异吩噁唑酮浓度。

样品活性 = [羟基异吩噁唑酮浓度(nmol) × 样品稀释倍数] ÷ [样品总容量(ml) × 10(min)] ÷ [样品蛋白浓度(mg · ml^{-1})](nmol · mg^{-1} · min^{-1})

1.8　CYP3A1 基因的 RT-PCR 测定

按照 TRIZOL RNA 提取试剂盒说明书提取小肠组织总 RNA,引物由上海生工生物工程公司合成,所用大鼠 CYP3A1 和 β-actin 引物如下:CYP3A1(455 bp)上游引物:5′-AGTCGTCCTGGTGCTCCTCTAC-3′,下游引物:5′-TGCCTGTCTCCGCCTCTTGCTT-3′;β-actin(229 bp)上游引物:5′-TGCCTGTCTCCGCCTCTTGCTT-3′,下游引物:5′-CGGACTCATCGTACTCCTGCT-3′。用两步法 RT-PCR 试剂盒进行逆转录和 PCR 扩增反应,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,紫外分光密度扫描,并以共同扩增的 β-actin 蛋白基因作为内参照,二者扩增条带密度之比表示 CYP3A1 的表达水平。

1.9　统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 DAS 2.0 软件计算各实验组消除半衰期参数,SPSS 13.0 软件进行统计学分析:血药浓度方面数据采用重复测量数据方差分析,基因条带光密度值和酶活性方面数据采用单因素方差分析。

2　结果

2.1　大鼠无肝期前后芬太尼血药浓度变化

两组血药浓度时量变化趋势见图 1。单次剂量芬太尼注射后,无肝期组(A2)较对照组(A1)芬太尼血药浓度曲线下降速度明显放缓。由 DAS 2.0 软件计算得出无肝期组芬太尼消除半衰期[(7.875 ± 1.241) h]较对照组[(5.323 ± 1.858) h]明显延长($P < 0.01$)。

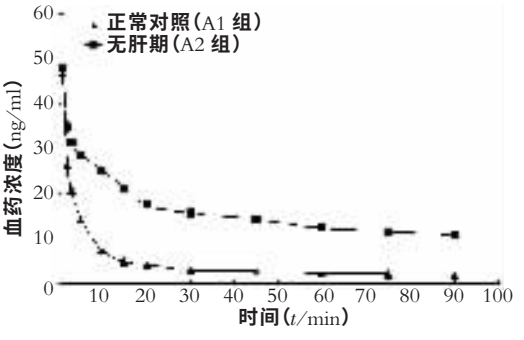
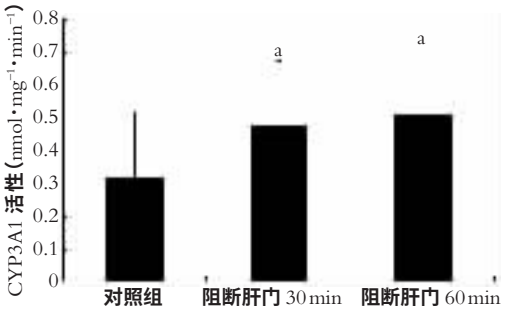


图 1　大鼠芬太尼代谢平均药-时曲线

2.2 大鼠小肠无肝期前后 CYP3A1 酶活性变化

与对照组(B1 组)比较,阻断肝门 30 min(B2 组),阻断肝门 60 min(B3 组)CYP3A1 酶活性差异有统计学意义($P<0.05$),均明显增强(图 2)。

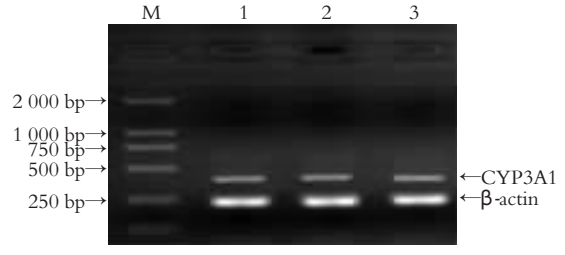


a:$P<0.05$,与对照组比较

图 2 大鼠小肠组织对照组与夹闭肝门不同时间点(30、60 min)酶活性比较

2.3 无肝期大鼠小肠 CYP3A1 基因的 RT-PCR 结果

如图 3 所示 3 组大鼠小肠组织扩增条带。以 CYP3A1 和 β-actin 扫描密度值的比值为相对密度,代表各组大鼠 CYP3A1 mRNA 的表达水平。阻断肝门 30 min (B2 组)(0.83 ± 0.15)、60 min(B3 组)(0.87 ± 0.19) 时,大鼠小肠组织 CYP3A1 的基因表达水平明显高于对照组(B1 组)(0.80 ± 0.15) ($P<0.05$);B2 与 B3 两组相比较,CYP3A1 的基因表达没有统计学意义($P>0.05$)。



M:标准;1:对照组;2:阻断肝门 30 min 组;3:阻断肝门 60 min 组

图 3 无肝期大鼠小肠组织 CYP3A1 mRNA 的 RT-PCR 结果

3 讨论

芬太尼是人工合成的强效麻醉性镇痛药。镇痛作用机制与吗啡相似,为阿片受体激动剂,作用强度为吗啡的 60 ~ 80 倍。与吗啡和哌替啶相比,其作用迅速,维持时间短,不释放组胺、对心血管功能影响小,能抑制气管插管时的应激反应。因此备受临床工作者青睐,是目前麻醉镇痛的主要使用药物。肝脏是芬太尼代谢的主要器官,国外有研究表明芬太尼存在肝外代谢,但肝外代谢对其降解,尤其在无肝状态时的作用并不明确。

本实验以夹闭大鼠肝门模拟肝移植无肝期状态,单次静脉注射芬太尼后,观察阻断入肝血流前后芬太尼血药浓度变化情况,结果显示无肝期组血药浓度衰减明显比正常对照组减慢,消除半衰期延长。在失去肝脏的情况下,芬太尼的代谢显著下降,表明肝脏是芬太尼的主要代谢器官。但是随着无肝期时间的延长,芬太尼血药浓度逐渐呈下降的趋势,说明芬太尼可能存在肝外代谢途径。同时我们对阻断入肝血流后不同时段小肠中 CYP3A1 酶的活性和 mRNA 水平进行测定,结果显示在肝动静脉夹闭 30 min 和 60 min 后 CYP3A1 酶的活性和 mRNA 表达水平显著升高。提示无肝状态下机体通过上调 CYP3A1 的转录水平,增强小肠该酶的活性,从而增强小肠对芬太尼的代谢能力,这可能是芬太尼肝外代谢的机制之一。研究中发现在夹闭 30 min 和 60 min 两个时间点 CYP3A1 酶的活性和 mRNA 表达水平无明显差异,我们考虑可能与实验中所观察时间较短有关,但是其否存在时间依赖性尚需进一步实验来验证。

在 CYP 超家族中,涉及芬太尼代谢的 CYP3A 亚家族成员为 CYP3A4(人),其在大鼠体内的同源蛋白为 CYP3A1/ 2[4,5]。肠内 CYP450 酶主要为 CYP3A4 亚族,分布于上皮细胞[6]。且 CYP3A4 的底物覆盖面很广,如地西泮,咪达唑仑,芬太尼,阿芬太尼,胺碘酮等。它主要通过 C-或 N-脱烃和 C-羟化反应来代谢药物。CYP3A 的表达受多种因素影响,目前研究认为主要受性别,年龄,营养状况及激素水平(包括性激素、糖皮质激素、胰岛素、生长激素等)及全身和局部病理反应如炎性细胞因子的影响,此外有诸多 P450 同工酶的特异性诱导和抑制药均影响该酶系的表达。Jin 等[7]报道 CYP3AmRNA 的表达可被地塞米松增强,且呈剂量依赖性;而脂多糖(LPS)、肿瘤坏死因子(TNF)则减少 CYP3AmRNA 的表达从而影响药物的代谢[8]。另外生长激素的分泌模式也会调节 CYP450 的表达[9]。CYP3A 转录激活的分子机制非常复杂,很多核受体包括糖皮质激素受体(GR)、孕烷 X 受体(PXR)、维生素 D 受体(VDR)和组成型雄甾烷受体(CAR)都可能发挥作用。研究显示[10]石胆酸(LCA)能激活 PXR 并诱导 CYP3A 表达,从而加速 LCA 转化为亲水的 OH2LCA,使其利于排出体外,减少由于胆汁淤积造成的肝损伤,起到保护肝脏的作用。肝移植无肝期机体的内环境发生变化,体内细胞因子、激素水平、电解质的变化都可能使肝外器官 CYP3A 的活性发生改变而影响芬太尼的代谢。本实验表明大鼠小肠中 CYP3A 的基因表达在无肝期 30、60 min 比无肝期前明显增强,这可能与无肝期前后内外源性物质的改变有关。

参与药物代谢的肝外组织包括血浆、皮肤、脑、肺、肾脏、肾上腺、胃肠道等[11,12]。有研究报道[13]细胞膜转运蛋白——阴离子转运多肽-3(aatp-3)在肾脏表达水平的改变可以影响肾脏对药物的清除;同样,无肝期大鼠小肠 CYP3A1 基因表达增强,在一定程度上说明

肝外药酶活性增强可影响药物的代谢。至于无肝期究竟哪些因素促使 CYP3A1 表达增强，及其表达增强是通过何种途径产生的，均需通过进一步研究才能确定。

参考文献：

[1] 顾健腾，陶国才，鲁开智，等. 大鼠肾脏异丙酚代谢相关 ugt1a6 基因在无肝期表达变化的研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(16)：1697－1699.

[2] Kharasch E D，Whittington D，Hoffer C. Influence of hepatic and intestinal cytochrome P4503A activity on the acute disposition and effects of oral transmucosal fentanyl citrate [J]. Anesthesiology，2004，101(3)：729－737.

[3] Huynh N H，Tyrefors N，Ekman L，*et al*. Determination of fentanyl in human plasma and fentanyl and norfentanyl in human urine using LC MS/MS[J]. J Pharm Biomed Anal，2005，37(5)：1095－1100.

[4] Lahoz A，Donato M T，Picazo L，*et al*. Determination of major human cytochrome P450s activities in 96-well plates using liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Toxicol In Vitro，2007，21(7)：1247－1252.

[5] Yang S P，Medling T，Raner G M. Cytochrome P450 expression and activities in rat，rabbit and bovine tongue[J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol，2003，136(4)：297－308.

[6] 王　羽，柳晓泉，王广基. 药物的肝外代谢[J]. 药学进展，2004，28(7)：289－294.

[7] Jin M J，Shimada T，Yokogawa K，*et al*. Contributions of intestinal P-glycoprotein and CYP3A to oral bioavailability of cyclosporin A in mice treated with or without dexamethasone[J]. Int J Pharm，2006，309(1－2)：81－86.

[8] Xu D X，Wei W，Sun M F，*et al*. Kupffer cells and reactive oxygen species partially mediate lipopolysaccharide-induced downregulation of nuclear receptor pregnane X receptor and its target gene CYP3a in mouse liver [J]. Free Radic Biol Med，2004，37(1)：10－22.

[9] Jarukamjorn K，Sakuma T，Jaruchotikamol A，*et al*. Modified expression of cytochrome P450 mRNAs by growth hormone in mouse liver [J]. Toxicology，2006，219(13)：97－105.

[10] Staudinger J L，Goodwin B，Jones S A，*et al*. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity [J]. Proc Natl Acad Sci USA，2001，98(6)：3369－3374.

[11] Kanbak M，Karagoz A H，Erdem N，*et al*. Renal safety and extrahepatic defluorination of sevoflurane in hepatic transplantations [J]. Transplant Proc，2007，39(5)：1544－1548.

[12] Edwards S R，Mather L E. Tissue uptake of ketamine and norketamine enantiomers in the rat：indirect evidence for extrahepatic metabolic inversion [J]. Life Sci，2001，69(17)：2051－2066.

[13] 陈毅飞，陶国才，崔　剑，等. 大鼠无肝状态肾脏罗库溴铵相关转运蛋白 OATP-3 及其基因的表达变化的研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(10)：1040－1042.

（编辑　栾　嘉）

（上接 599 页）

经口检查者术后 1～2 d 内，可能有短暂的咽喉部疼痛，同时咽喉壁因麻醉的关系，产生异物感，患者有咳出分泌物的反射。此时不能勉强咳出分泌物，以免引起黏膜破损，同时可用复方茶多酚等漱口液消毒，也可含服润喉片以减轻症状，利于恢复[3]。若从下消化道进镜者应注意做好肛周护理，让患者卧床休息。

2.4.2　密切观察生命体征的变化　　少数患者可出现腹痛、腹胀，可嘱患者下床活动或者按摩下腹部，以促进肠蠕动利于肠道内的气体排出。若腹痛未缓解或排血便者，要严密观察腹痛的性质、部位、程度，以及大便的颜色、量，如发现剧烈腹痛、腹胀、面色苍白、心率加快、血压下降等表现提示胃肠穿孔。大便次数增多提示肠出血，应及时报告医生。

2.4.3　饮食护理　　检查完毕后 1 h 左右可进食，或待患者作呕吐反射后进食[2]。以易消化的流质或半流质饮食为宜，有取活检者进食温冷的食物，忌食对消化道黏膜有刺激性的食物。

2.4.4　器械处理　　检查完毕后将小肠镜进行初步清洁，然后对内镜进行全管里路的冲洗和浸泡消毒。而后所有仪器、附件消毒后吹干备用。

3　讨论

我科室对 115 例患者行双气囊小肠镜检查过程顺利，检查过程中未发生严重并发症，检出阳性率达 88.6%。在护理配合上我们术前作了耐心的解释，帮助患者消除紧张、恐惧心理，使其积极配合检查。并通过严格的肠道准备及术中熟练的配合，既缩短了检查时间，又减轻了患者的痛苦，提高了小肠镜检查的质量。

在检查操作中应注意因镜体较长，安装时注意保护好前端部，切勿碰及坚硬物体，勿折角。启动主机、气泵，检查内镜注水、注气以及吸引通道是否通畅，气泵自动充气功能是否良好。另外还要准备心电监护仪、吸氧装置、注射针、活检钳、美蓝染色剂等。

此外，行双气囊小肠镜检查，患者容易出现恶心、呕吐、腹痛、腹胀等不良反应，而这些副反应缺乏特异性，且行该检查的患者本身往往就有消化道的疾患，镜检的副反应易与疾患本身的症状相混淆，应引起足够重视，应备好解痉阵痛药物，并及时检查报告。

关键词：小肠疾病　双气囊小肠镜　护理

中图法分类号：R473.5　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 朱建新，钟尚志. 消化内镜护士手册[M]. 北京：科学出版社，1998：10－11.

[2] 高宝芹，孙　平. 纤维胃镜、十二指肠镜检查的护理体会[J]. 哈尔滨医药，2003，23(5)：61.

[3] 詹义全，刘胜春. 原发性小肠肿瘤 58 例临床分析[J]. 重庆医学，2005，35(18)：1682－1684

（编辑　邓强庭）