

CYP450底物、抑制剂、诱导剂及种属特异性的研究进展

刘永敏, 夏玉凤*

中国药科大学中药学院生药学系, 江苏 南京

收稿日期: 2023年2月2日; 录用日期: 2023年3月2日; 发布日期: 2023年3月9日

摘要

细胞色素P450是由多种同工酶组成的超家族, 在内源性与外源性物质的I相代谢中占据主导地位。本文就细胞色素P450同工酶相关的探针底物、抑制剂、诱导剂及动物种属的特异性选择进行了综述, 以期细胞色素P450相关实验设计提供借鉴和参考。

关键词

细胞色素P450, 抑制剂, 诱导剂, 探针底物, 种属差异

Research Progress of CYP450 Substrates, Inhibitors, Inducers and Species Specificity

Yongmin Liu, Yufeng Xia*

Department of Pharmacognosy, School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing Jiangsu

Received: Feb. 2nd, 2023; accepted: Mar. 2nd, 2023; published: Mar. 9th, 2023

Abstract

Cytochrome P450 is a superfamily composed of multiple isoenzymes, which plays a dominant role in phase I metabolism of endogenous and exogenous substances. This review included the specific of probe substrates, inhibitors, inducers and species related to cytochrome P450 isoenzymes, in order to provide reference for the design of cytochrome P450 related experiments.

*通讯作者。

Keywords

Cytochrome P450, Inhibitor, Inducer, Probe Substrate, Species Differences

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 参与机体 90% 以上物质的代谢, 是人体最重要的代谢酶。CYP450 主要参与药物的 I 相代谢, 介导内源性和外源性化合物的氧化、还原及水解反应。已知 CYP450 主要包括 3 个家族, 分别为 CYP1、CYP2、CYP3, 其中 CYP1A1/2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C9、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4 是参与临床药物代谢的重要酶系[1]。外源性物质进入机体内受 CYP450 代谢, 其原型或代谢产物亦诱导或抑制同工酶的活性, 这是临床上产生药物相互作用(DDI)的重要原因。而由 CYP450 酶诱导和抑制所致的代谢性药物相互作用可能会改变合用药物的药动学、药效和毒性。因此研究机体代谢过程中可能参与的 CYP450 酶亚型十分有必要。目前, 主要采用动物体内实验及体外实验如肝微粒体孵育实验、肝细胞原代或细胞系培养及重组酶(cDNA 表达)等技术研究外源性物质对代谢酶的抑制作用; 且主要有 4 种常用酶表型鉴定的方法, 包括化学抑制剂法、抗体抑制剂法、重组酶法及相关性分析法, 这四种方法各有优缺点, 建议同时使用 2 种或 2 种以上方法鉴定, 可使得到的结果更为准确。但目前国内外文献关于 CYP450 酶底物、抑制剂和诱导剂的选择暂无统一标准, 由于同一种化合物可被多种同工酶代谢, 且可能会影响不同 CYP450 的活性。同时临床前研究中, 使用动物实验来预测人体化合物的代谢时, 代谢酶的种属差异性会加大研究工作的难度[2]。已知不同物种之间的氨基酸序列存在差异, 导致底物专一性和催化活性不同, 并且这种差异可能导致不同物种的 CYP450 酶对同一抑制剂或诱导剂显示出不同的作用。如味拉茶碱可抑制人 CYP1A2, 但对猴 CYP1A2 无抑制作用。由此可见, 实验动物的选择也会影响实验结果的准确性。本文将从 CYP450 同工酶的探针底物、抑制剂、诱导剂及种属特异性选择等问题进行概述, 以期对细胞色素 P450 的相关实验设计提供参考和借鉴。

2. CYP1A1/2

人 CYP1A 亚族主要包括 CYP1A1 和 CYP1A2 2 个亚型[3]。CYP1A1 是芳烃受体(AHR)的原型靶标, 通常与二恶英、二苯并呋喃和多环芳烃(PAHs)的毒性和致癌性有关。目前, CYP1A1 活性的测定已被纳入现代毒理学概念和测试指南中, 强调这种酶对化学品风险评估和监管的重要性。CYP1A1 和 CYP1A2 在不同种属、不同组织中的表达差异较大。CYP1A2 主要在人肝脏表达, 而 CYP1A1 在人肝脏表达水平很低, 主要分布在肝外组织如小肠、肾、肺、胎盘、前列腺、皮肤和喉[4]。而 CYP1A1 在大鼠小肠中表达较高, 在小鼠小肠中较低, 在猴和犬的小肠中几乎不表达[5] [6]。

2.1. 探针底物

目前主要采用检测非那西汀 O-去乙基化、咖啡因 N3-去甲基化、他克林 - 羟基化、氯氮平 N-去甲基化和茶碱 N-去甲基化反应的方法来评估 CYP1A2 的活性。一般情况下在人体内由 CYP1A2 介导非那西汀的代谢途径主要有两条, 包括 O-去乙基化反应生成醋氨酚(75%~80%)和去乙酰基反应生成对氨基乙醚(20%~25%), 其中去乙酰基反应后进一步氧化生成毒性代谢产物对氨酚和亚氨醌[7] [8]。咖啡因在人体内

也具有 2 条代谢途径: 咖啡因-N-去甲基反应生成相应的 2-甲基代谢产物(95%)和咖啡因-8-羟基化反应生成 1,3,7-三甲基尿酸(3%), 其中去甲基化途径主要由 CYP1A2 代谢, 同时 CYP2E1 和 CYP2A6 等 CYP450 酶也参与其代谢[9]。而在大鼠体内, 咖啡因由 CYP1A2 代谢生成 1,7-二甲黄嘌呤(3N-去甲基化)和由 CYP2C11 代谢生成 1,3,7-三甲基尿酸(8-羟基化)等途径, 故可通过检测 1,7-二甲黄嘌呤含量评估大鼠 CYP1A2 的活性[9]。他克林是主要由 CYP1A2 介导代谢的抗胆碱酯酶药, 有如下 2 条代谢途径: 在脂环 C1, C2, C3 位置发生羟基化反应, 生成 3 种稳定的代谢产物(1-羟基他克林、2-羟基他克林、3-羟基他克林)和芳香环环化生成不稳定的 7-羟基他克林, 并进一步氧化生成甲基化醌类化合物[10]。由于 CYP1A2 与 CYP1A1 具有高度同源性, 因此 CYP1A2 常用的探针底物也可评估 CYP1A1 的活性[11]。

2.2. 诱导剂和抑制剂

CYP1A1 和 CYP1A2 的表达均受到芳烃受体(AHR)的高度调控[12]。常见的 CYP1A 诱导剂包括奥美拉唑、3-甲基胆蒎、 β -萘黄酮、2,3,7,8-四氯二苯二英(TCDD)、尼古丁、杂环芳香烃类有机化合物、苯巴比妥、咖啡因等。CYP1A2 的诱导具有组织特异性如 3-甲基胆蒎可以诱导肝癌细胞中 CYP1A2 的表达, 但不能诱导乳腺癌细胞中 CYP1A2 的表达[13]。此外有研究表明, 3-甲基胆蒎通过激活 AHR 诱导 CYP1A1, 从而增加大黄素诱导的肝毒性。CYP1A1 抑制介导的 AHR 活化是药物诱导肝毒性的新机制, 且该新机制在化合物阿苯达唑中得到了证实。常用的 CYP1A 抑制剂包括呋拉茶碱、 α -萘黄酮、氟伏沙明等。呋拉茶碱是一种特异性、非竞争性的抑制剂, 能特异性地抑制 CYP1A2, 而不抑制 CYP1A1, 并且对于不同底物, 其抑制程度不同; 而 α -萘黄酮可同时抑制 CYP1A1/2 [14]。

2.3. 种属差异

呋拉茶碱在人和大鼠中均选择性抑制 CYP1A2, 而不抑制 CYP1A1, 不同的是其抑制人 CYP1A2 所需的浓度是大鼠的 1000 倍, 可能由于人和大鼠 CYP1A2 的活性部位不同[15] [16]。与人相比呋拉茶碱抑制小鼠和犬 CYP1A2 活性的作用较小, 并且对猴 CYP1A2 的活性无抑制作用[6]。

3. CYP2A6

人 CYP2A 亚族包括 CYP2A6、CYP2A7、CYP2A13 3 个亚型。CYP2A6 主要在肝脏中表达, 参与代谢多种前致癌物(如尼古丁、亚硝胺)及一些临床药物(如法曲唑、氯美噻唑、丙戊酸), 而 CYP2A7 和 CYP2A13 在肝脏的表达水平很低。大鼠 CYP2A 家族包括 CYP2A1, CYP2A2, CYP2A3 3 个亚型。其中大鼠 CYP2A1/2 的氨基酸序列与人 CYP2A6 具有 60% 的同源性。

3.1. 探针底物

CYP2A6 活性测定的常用探针反应有香豆素-7-羟基化、尼古丁-碳氧化、7-乙氧基香豆素-O-脱乙基化反应等。研究表明在人肝微粒体中 CYP2A6 是催化香豆素-7-羟基化反应主要的酶, 因此香豆素可作为 CYP2A6 的“体内和体外探针” [17], 但人肝微粒体中香豆素-7-羟化酶(CYP2A6)活性容易受到体系中有有机溶剂的影响, 如甲醇不抑制香豆素(0.5~50 μmol)的 7-羟基化, 而二恶烷和四氢呋喃由于在结构上与香豆素相似, 故对其羟基化抑制强度较大[18]。尼古丁也是 CYP2A6 特异性代谢物质, 在人体内可通过碳氧化反应生成无活性的可替宁(70%~80%), 其中可替宁被 CYP2A6 进一步代谢为 3-羟基可替宁[19]。3-羟基可替宁与可替宁的比率, 称为尼古丁代谢物比率(NMR), 是 CYP2A6 活性的公认指数。

3.2. 诱导剂和抑制剂

甲氧沙林(8-甲氧补骨脂素)是一种高效、高选择性的 CYP2A6 抑制剂。有研究发现, 人和非洲猴的香

豆素 7-羟基化反应可被甲氧沙林选择性抑制,但不能被其他亚型酶抑制剂如 α -萘黄酮(CYP1A1)、奎尼丁(CYP2D6)等抑制[20]。此外在人肝微粒体中三羟环丙胺和色胺被证实是 CYP2A6 的特异性抑制剂[21]。CYP2A6 的强抑制剂还包括酮康唑、毛果芸香碱、二乙基二硫代氨基甲酸酯、对硝基苯酚等,其中酮康唑可选择性抑制除 CYP2A6 以外的酶如 CYP3A4。苯巴比妥、利福平、吡唑和灰黄霉素、地塞米松等可诱导 CYP2A6。

3.3. 种属差异

大鼠和人的 CYP2A 在催化甾酮代谢时显示出不同的底物特异性。大鼠 CYP2A 参与内源性类固醇的羟基化反应,其中 CYP2A1 催化甾酮的 7 α -羟基化和 CYP2A2 负责甾酮的 15 α 和 7 α 羟基化,而人的 CYP2A6 不参与其代谢[22]。有研究表明,香豆素 7-羟基酶在大鼠肝微粒体中活性很低,而在猴的肝微粒体中却表现出较高活性。毛果芸香碱在不同物种间的抑制结果差异较大,在兔肝微粒体中完全抑制香豆素 7-羟基酶活性,在人、大鼠和小鼠的肝微粒体中对氯唑沙宗 6-羟基酶活性的抑制占 28%~40%;而在犬和猴肝微粒体中,对双氯芬酸 4-羟基酶活性的抑制达 44%~89% [23]。

4. CYP2B6

人 CYP2B 亚族包括 CYP2B6 和 CYP2B7 2 种亚型,其中 CYP2B6 在肝脏和肝外组织(除小肠外)都有表达[24]。CYP2B6 是最重要的外源性毒物代谢酶之一,还可参与代谢许多临床药物(如依法韦仑、安非他酮、美芬妥因)。大鼠 CYP2B 亚族包括 CYP2B1、CYP2B2、CYP2B3 3 种亚型,其中 CYP2B1 和 CYP2B2 是结构相关的同工酶(97%),具有相似的底物特异性。犬 CYP2B 亚族只包括 CYP2B11,其与大鼠 CYP2B1 的氨基酸序列同源性达 75%。

4.1. 探针底物

CYP2B6 活性测定的常用探针反应有美芬妥因去甲基反应、安非他酮羟基化反应、依法韦仑羟基化反应和 7-乙氧基-4-三氟甲基香豆素 O-脱烷基反应。美芬妥因可作为 CYP2B6 的特异性探针底物。当底物浓度低时主要由 CYP2C9 代谢,当底物浓度 > 1000 μmol 时,该反应主要由 CYP2B6 代谢,并且以去甲基化程度来间接评价肝脏中 CYP2B6 的活性[25]。安非他酮(500 μmol)在体内主要由 CYP2B6 代谢为羟基化安非他酮[26]。依法韦仑在肝内经过羟基化作用形成 8-羟基化依法韦仑,随后 8-羟基化依法韦仑进一步羟基化形成 8,14-二羟基依法韦仑。在依法韦仑 8-羟基化反应中 CYP2B6 是最主要的代谢酶,而 CYP3A4、CYP1A2 发挥次要作用。而形成 8,14-二羟基依法韦仑的过程几乎由 CYP2B6 介导[27]。有机溶剂亦对 CYP2B6 的活性产生影响,0.3%乙腈对 CYP2B6 的抑制程度可达 13% [28]。

4.2. 诱导剂和抑制剂

CYP2B6 可被核受体(NRs)、孕烷 X 受体(PXR)和组成型雄甾烷受体(CAR)共同调控。苯巴比妥可诱导 CYP2B6 的活性(1.7 倍),同时是 CYP2B6 的首选诱导剂,当其浓度在 500~1000 μmol 时,诱导倍数在 5~10 倍。CYP2B6 常用的诱导剂还有地塞米松、利福平等。噻替派是一种 CYP2B6 特异性抑制剂,不能用于体内研究,而噻氯匹定和氯吡格雷在人类临床研究中可作为 CYP2B6 选择性抑制剂,此外噻氯匹定的抑制类型为混合型,而噻替派为竞争性抑制,虽然同为有效的 CYP2B6 的抑制剂,但噻替派的抑制强度约为噻氯匹定的 2 倍[29]。

4.3. 种属差异

大鼠和犬肝微粒体中的 CYP2B 主要参与 7-乙氧基-4-三氟甲基香豆素 O-脱烷基代谢反应,二者具有

相似的酶动力学特征,而在人肝微粒体中,CYP2E1也参与代谢[30]。犬中CYP2B家族只包括CYP2B11,与人CYP2B6的氨基酸序列同源率为75%。有研究发现,在犬中CYP2B11可催化右美沙芬-N-脱甲基化反应,而在人中该反应主要由CYP3A介导[31][32]。

5. CYP2C9

人CYP2C亚族包括CYP2C8、CYP2C9、CYP2C17、CYP2C18、CYP2C19 5种亚型,参与临床上约16%药物的氧化代谢(羟基化),其中CYP2C9代谢的药物约占临床使用药物的10%。CYP2C9在肝脏、肾脏、十二指肠、前列腺、卵巢等均有表达[33]。

5.1. 探针底物

CYP2C9活性测定的常用探针反应有甲苯磺丁脲4-羟基化、S-华法林7-羟基化、双氯芬酸4-羟基化,其中S-华法林7-羟基化一般用于CYP2C9体外活性的测定,甲苯磺丁脲4-羟基化用于CYP2C9体内、体外活性的测定,而双氯芬酸4-羟基化只能用于CYP2C9体外活性的测定[34]。

5.2. 诱导剂和抑制剂

孕烷X受体(PXR)、雄甾烷受体(CAR)、雌激素受体和维生素D受体等多种核受体可诱导CYP2C9的表达,其中PXR在诱导CYP2C9的过程中起着重要作用。许多外源性药物作为PXR配基而激活该受体,从而识别和结合到靶基因启动子特异的DNA序列上,上调CYP2C9的表达[35]。CYP2C9常见的诱导剂有抗病毒类药物如利福平、利托那韦,神经系统药物如苯妥因钠、苯巴比妥等。CYP2C9常见的抑制剂包括磺胺苯吡唑,氟康唑、氟西汀、舍曲林、胺碘酮、氟伐他汀、格列苯脲等,其中磺胺苯吡唑是CYP2C9最有效的抑制剂,但其对CYP2C8,CYP2C19催化的反应也有抑制。

5.3. 种属差异

目前已有研究报道甲苯磺丁脲在体内代谢中存在种属差异。大鼠体内CYP2C催化甲苯磺丁脲4-羟基化反应,人体内CYP2C催化甲苯磺丁脲4-羧基化反应,而犬体内CYP2C催化甲苯磺丁脲N-脱烷基化反应[36]。

6. CYP2D6

人CYP2D亚族包括CYP2D6、CYP2D7和CYP2D8 3种亚型,其中CYP2D6在肝、肾、胎盘、脑、乳腺、肺和小肠中均有表达。CYP2D6参与代谢多种临床药物、内源性神经化学物和毒素[22]。

6.1. 探针底物

CYP2D6活性测定的常用探针反应有右美沙芬O-去甲基化、美托洛尔O-去甲基化。右美沙芬是一种中枢镇咳药,毒性较小,它是由CYP2D6催化的典型底物。一般情况下,在人体内右美沙芬的代谢途径有2条,包括由CYP2D6介导的O-去甲基化反应和由CYP3A3/4和CYP2E1介导的N-去甲基化反应[37]。右美沙芬O-去甲基化反应由于毒性小、无成瘾性,目前已广泛用于代谢表型的鉴定。美托洛尔是一种 β 受体阻断剂,存在R和S两种构型。在人中,CYP2D6会优先选择催化R-美托洛尔O-去甲基化反应[38]。目前美托洛尔已成为人CYP2D6常用的体内探针之一。

6.2. 诱导剂和抑制剂

一般情况下,CYP2D6的底物也是此酶的竞争性抑制剂(可逆性抑制剂),但也存在多种不可逆抑制剂。CYP2D6不可逆抑制剂包括奎尼丁、氟西汀、帕罗西汀、舍曲林、特比奈芬、阿米替林、氟伏沙明、地

昔帕明等。其中奎尼丁是 CYP2D6 的最强抑制剂, 氟西汀和帕罗西汀是 CYP2D6 较强抑制剂, 而舍曲林是 CYP2D6 的中等程度抑制剂[39]。目前 CYP2D6 的诱导剂尚未被发现。近年研究发现, 在 SH-SY5Y 细胞(神经母细胞瘤细胞)体外实验中, 乙醇可诱导 CYP2D6 的表达[40]。

6.3. 种属差异

Uehara 等人[40]采用美托洛尔作为探针底物时发现, 人、狨猴、小型猪和犬肝微粒体中 CYP2D 优先催化 R-美托洛尔 O-去甲基化反应, 而食蟹猴和大鼠肝微粒体中 CYP2D 则分别优先催化 S-美托洛尔 O-去甲基化和 R-美托洛尔 α -羟基化。Thorn 等人[41]采用右美沙芬作为探针底物时发现, 猪肝微粒体 CYP2D6 催化的右美沙芬 O-去甲基化反应的清除率是人肝微粒体中的 10 倍。

7. CYP2E1

CYP2E 亚族不同种属(人、大鼠、小鼠和犬)只包括 CYP2E1 1 种亚型, 其在肝脏及肝外组织如鼻子、口咽和肺均有表达。CYP2E1 参与代谢相对分子量较小、亲脂性较高的前致癌物和一些临床药物。大鼠、小鼠及犬中 CYP2E1 与人同源性达到 80%, 而猴与人 CYP2E1 的同源性高达 96%。

7.1. 探针底物

CYP2E1 常用的 3 个探针底物是氯唑沙宗(*Chlorzoxazone*, CZX)、对硝基邻苯二酚(*P-Nitrophenol*, P-NP)和 N-亚硝基双甲胺(*N-nitrosodimethylamine*, NDMA)。氯唑沙宗可用做 CYP2E1 的体内、体外探针, 而 P-NP 和 NDMA 具有潜在致癌性, 故只可用于体外研究[42]。氯唑沙宗在体内主要生成 6-羟氯唑沙宗, 但该代谢过程并不主要由 CYP2E1 介导, 当氯唑沙宗浓度为 10 μmol 时, CYP1A2 和 CYP2E1 的催化能力相当, 但其浓度达到 500 μmol 时, CYP2E1 的催化速率比 CYP1A2 高 10 倍。在氯唑沙宗浓度较高时, 才可特异性反映 CYP2E1 的活性[43]。氯唑沙宗作为 CYP2E1 的探针底物还存在一些问题如: 在体内试验时口服剂量为 250 或 500 mg 时, 其 6-羟基化反应才可特异性反映 CYP2E1 的活性, 当剂量大于 750 mg, 由于 6-羟基化反应代谢消除不成线性, 无法采用探针底物氯唑沙宗来检测 CYP2E1 的活性[44]。

7.2. 诱导剂和抑制剂

在体外研究中二乙基二硫代氨基甲酸酯常用作 CYP2E1 的抑制剂, 具有时间和 NADPH 依赖性, 当其浓度 < 100 μmol 时, 它对 CYP2E1 活性的抑制具有特异性。双硫仑可通过药物自身抑制 CYP2E1, 也可通过其代谢产物二乙基二硫代氨基甲酸酯和二硫化碳抑制 CYP2E1 的活性, 但其代谢产物二硫化碳也可抑制其他 CYP450 酶[45]。此外咪达唑仑、氯甲噻唑、对位硝基酚、二烯丙基硫化物等也可抑制 CYP2E1 的活性。异烟肼、乙醇、丙酮、吡唑、吡啶等可诱导 CYP2E1 的活性, 其中异烟肼、乙醇、丙酮、是 CYP2E1 的经典诱导剂。

7.3. 种属差异

目前没有明确的证据表明 CYP2E1 介导的代谢存在种属差异。但 Rebeca 等人采用不同浓度的柚皮素处理人和大鼠重组 CYP2E1 酶后发现在人 CYP2E1 中 7-甲氧基-4-三氟甲基香豆素 O-去甲基化的催化效率比在大鼠重组酶中高 45 倍, 其表明 CYP2E1 可能存在种属差异[46]。

8. CYP3A4

人 CYP3A 亚族包括 CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7 和 CYP3A43 4 种亚型, 其中 CYP3A4 及 CYP3A5

在人体肝脏中含量最丰富。CYP3A4 主要在肝脏中表达, 参与多种内源物、前致癌物以及大部分临床药物(38类, 约 150 种)的代谢。

8.1. 探针底物

测定 CYP3A4 活性的常用探针反应有咪达唑仑 4-羟基化、咪达唑仑 1-羟基化、睾酮 6 β -羟基化、硝苯地平-氧化、红霉素 N-去甲基化反应等。咪达唑仑在体内、体外都可作为 CYP3A4 的特异性探针, 当其浓度 < 10 μmol 时, 主要生成 1-羟基咪达唑仑, 在较高浓度时主要生成 4-羟基咪达唑仑。体外肝微粒体孵育试验中可通过测定咪达唑仑的代谢产物含量来反映 CYP3A4 酶的活性, 但其他 CYP450 酶如 CYP3A5 和 CYP2B6 也可参与其代谢[47], 与其他探针药物相比咪达唑仑具有半衰期短、生物利用度低等优点, 但在体内研究时也存在一些局限性, 如只能采取静脉给药方式以避免肠道 CYP3A4 的代谢[48]。睾酮是人体循环中的主要雄激素, 也可作为 CYP3A4 的探针底物, 其在体内经 CYP3A4 代谢成 2 β -、6 β -或 15 β -羟化睾酮。除 CYP3A4 外, CYP2C9 和 CYP2C19 也参与睾酮 6 β -羟基化反应, 但其代谢量仅有 CYP3A4 的 1/10 [49] [50]。

8.2. 诱导剂和抑制剂

CYP3A4 的激活主要由孕烷 X 受体介导, 因此, 孕烷 X 受体活化可用于说明外源性物质对 CYP3A4 的诱导程度。利福平是 CYP3A4 的强效诱导剂, 被 FDA 推荐为诱导试验的首选诱导剂。一般情况下, 当利福平浓度在 10~50 μmol 时, 其诱导倍数为 4~31 倍[51]。其他常见的诱导剂包括苯妥因、卡马西平、沙奎那韦、地塞米松、苯巴比妥等。酮康唑在体内、体外常被用作 CYP3A4 的有效抑制剂, 但其对 CYP3A4 的选择性较差。当酮康唑对 CYP3A4 的抑制率达到 95% 时, 酮康唑的浓度会显著抑制 CYP1B1、CYP2B6 及 CYP2C9/19 [52] [53]。其他常见的抑制剂包括维拉帕米、胺碘酮、伊曲康唑等。

8.3. 种属差异

抗真菌药物酮康唑在人、猪和鱼中是 CYP3A 的抑制剂, 但对大鼠无抑制作用[54]。Jana 等发现酮康唑浓度为 0.05 μmol 时可抑制人 CYP3A4 介导的睾酮代谢反应, 而对犬无抑制作用。此外还发现 CYP3A 在人和马的肝微粒体中参与形成睾酮的代谢产物 11 β -OH-TES, 但在犬中不参与[55]。地尔硫卓在人和食蟹猴中均可抑制 CYP3A 介导的反应, 但 Zuzana 等发现其在食蟹猴中抑制强度是人的 3.9 倍[56]。

9. 结语与展望

表 1 总结了针对不同 CYP450 可选用的底物、诱导剂及抑制剂。随着研究的深入, 发现有些探针底物的特异性和灵敏性不强, 这将会影响 CYP450 酶活性测定的准确性。因此, 选取特异性的探针底物(经单一同工酶代谢)显得尤为必要。同时还需要考虑底物浓度、底物孵育时间、有机溶剂的种类和比例、孵育环境的 pH 值等问题。选择诱导剂和抑制剂时, 应考虑特异性以及诱导或抑制强度对实验结果可能造成的影响。如苯巴比妥可同时诱导 CYP2A6、CYP2B6、CYP2C9 和 CYP3A4; 磺胺苯吡唑是 CYP2C9 最有效的抑制剂, 但其对 CYP2C8, CYP2C19 催化的反应也有抑制。此外一个合理的实验动物模型的选择, 将有助于提高实验数据的准确性。如测定 CYP3A4 酶活性时采用猪得出的结果与人更相符; 而测定 CYP1A2 活性时, 则不建议选用犬作为动物模型。

近年来, 人源化肝的嵌合体小鼠动物模型研究成为趋势。已有研究表明人和人源化肝的嵌合体小鼠肝微粒体中 CYP1A/2A/2B/2C/3A 催化药物氧化代谢的活性相似, 但对于 CYP2D 催化丁哌洛尔 1-羟基化反应和普罗帕酮 4-羟基化反应的活性, 两种模型却显示出差异。此外除了 CYP2B6 外, 人肝和人源化肝

Table 1. Common substrates, inducers, inhibitors and animal models of CYP450
表 1. CYP450 常用底物、诱导剂、抑制剂及常用动物模型

CYP450 亚型	底物 - 反应	诱导剂	抑制剂	最合适动物模型
CYP1A2	非那西汀 O-去甲基 咖啡因 N3-去甲基 他克林羟基化 氯氮平 N-去甲基 茶碱 N-去甲基	奥美拉唑 3-甲基胆蒽 β -萘黄酮 2-甲氧基-4-硝基苯胺	呋拉茶碱 α -萘黄酮 氟伏沙明	除犬之外常见动物 如小型猪等
CYP2A6	香豆素-7-羟基化 尼古丁 - 碳氧化 7-乙氧基香豆素-O-脱乙基	苯巴比妥 利福平 地塞米松	甲氧沙林 三羟环丙胺 色胺	小型猪、猴
CYP2B6	美芬妥因去甲基 安非他酮羟基化 依法韦仑羟基化 7-乙氧基-4-三氟甲基香豆素 O-脱烷基	苯巴比妥 地塞米松 利福平	噻替派 噻氯匹啶 氯吡格雷	小鼠
CYP2C9	甲苯磺丁脲 4-羟基化 S-华法林 7-羟基化 双氯芬酸 4-羟基化	利福平 利托那韦 苯巴比妥	磺胺苯吡唑 氟康唑 格列苯脲	猴
CYP2D6	右美沙芬 O-去甲基 美托洛尔 O-去甲基	乙醇	奎尼丁 氟西汀 帕罗西汀 特比奈芬	犬
CYP2E1	氯唑沙宗 6-羟基化	异烟肼 乙醇 丙酮	二乙基二硫代氨基甲酸酯 酯 双硫仑 氯甲噻唑 对位硝基酚	除犬之外常见动物模型都可
CYP3A4	咪达唑仑 4-羟基化 咪达唑仑 1-羟基化 睾酮 6 β -羟基化 硝苯地平氧化 红霉素 N-去甲基	利福平 苯巴比妥 地塞米松 沙奎那韦	酮康唑 维拉帕米 胺碘酮 伊曲康唑	猪及小型猪

的嵌合体小鼠 P450 的蛋白含量也显示出相似性[57]。总之, 研究药物在动物体内外的代谢特征、代谢酶活性最终可为进一步探究人体代谢特征奠定基础。

参考文献

- [1] Tornio, A. and Backman, J.T. (2018) Cytochrome P450 in Pharmacogenetics: An Update. *Advances in Pharmacology*, **83**, 3-32. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2018.04.007>
- [2] Palrasu, M. and Siddavaram, N. (1969) Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Current Drug Targets*, **19**, 38-54.
- [3] Ma, Q. and Lu, A. (2007) CYP1A Induction and Human Risk Assessment: An Evolving Tale of *in Vitro* and *in Vivo* Studies. *Drug Metabolism and Disposition*, **35**, 1009-1016. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.015826>
- [4] Klomp, F., Wenzel, C., Drozdziak, M., et al. (2020) Drug-Drug Interactions Involving Intestinal and Hepatic CYP1A Enzymes. *Pharmaceutics*, **12**, 1-25. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121201>
- [5] Zhang, Q.Y., Dunbar, D. and Kaminsky, L.S. (2003) Characterization of Mouse Small Intestinal Cytochrome P450 Expression. *Drug Metabolism and Disposition*, **31**, 1346-1351. <https://doi.org/10.1124/dmd.31.11.1346>
- [6] Bogaards, J.J., Bertrand, M., Jackson, P., et al. (2000) Determining the Best Animal Model for Human Cytochrome

- P450 Activities: A Comparison of Mouse, Rat, Rabbit, Dog, Micropig, Monkey and Man. *Xenobiotica*, **30**, 1131-1152. <https://doi.org/10.1080/00498250010021684>
- [7] Guo, J., Zhu, X., Badawy, S., *et al.* (2021) Metabolism and Mechanism of Human Cytochrome P450 Enzyme 1A2. *Current Drug Metabolism*, **22**, 40-49. <https://doi.org/10.2174/18755453MTEyCOTgex>
- [8] Hinson, J.A. (1983) Reactive Metabolites of Phenacetin and Acetaminophen: A Review. *Environmental Health Perspectives*, **49**, 71-79. <https://doi.org/10.1289/ehp.834971>
- [9] Grzegorzewski, J., Bartsch, F., Kller, A., *et al.* (2021) Pharmacokinetics of Caffeine: A Systematic Analysis of Reported Data for Application in Metabolic Phenotyping and Liver Function Testing. *Frontiers in Pharmacology*, **12**, Article ID: 752826. <https://doi.org/10.1101/2021.07.12.452094>
- [10] Faber, M.S., Jetter, A. and Fuhr, U. (2010) Assessment of CYP1A2 Activity in Clinical Practice: Why, How, and When. *Basic Clinical Pharmacology Toxicology*, **97**, 125-134. https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto_973160.x
- [11] Lu, J., Shang, X., Zhong, W., *et al.* (2020) New Insights of CYP1A in Endogenous Metabolism: A Focus on Single Nucleotide Polymorphisms and Diseases. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **10**, 91-104. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.11.016>
- [12] 胡云珍, 姚彤彬. 细胞色素 P4501A 的研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(4): 246-250.
- [13] 肖鹏, 周宏灏. 细胞色素氧化酶 CYP1A2 的研究进展[J]. 中南大学学报, 2008, 33(5): 456-460.
- [14] Doran, A.C., Burchett, W., Landers, C., *et al.* (2022) Defining the Selectivity of Chemical Inhibitors Used for Cytochrome P450 Reaction Phenotyping: Overcoming Selectivity Limitations with a Six-Parameter Inhibition Curve-Fitting Approach. *Drug Metabolism and Disposition*, **50**, 1259-1271. <https://doi.org/10.1124/dmd.122.000884>
- [15] Yamazoe, Y. and Yoshinari, K. (2019) Prediction of Regioselectivity and Preferred Order of Metabolisms on CYP1A2-Mediated Reactions Part 3: Difference in Substrate Specificity of Human and Rodent CYP1A2 and the Refinement of Predicting System. *Drug Metabolism Pharmacokinetics*, **34**, 217-232. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2019.02.001>
- [16] Liu, J., Sridhar, J. and Foroozesh, M. (2013) Cytochrome P450 Family 1 Inhibitors and Structure-Activity Relationships. *Molecules*, **18**, 14470-14495. <https://doi.org/10.3390/molecules181214470>
- [17] Nguyen, V., Espiritu, M. and Elbarbry, F. (2020) Development and Validation of a Sensitive and Specific LC-MS/MS Cocktail Assay for CYP450 Enzymes: Application to Study the Effect of Catechin on Rat Hepatic CYP Activity. *Bio-medical Chromatography*, **34**, e4789. <https://doi.org/10.1002/bmc.4789>
- [18] Kawalek, J.C. and Andrews, A.W. (1980) The Effect of Solvents on Drug Metabolism *in Vitro*. *Drug Metabolism and Disposition*, **8**, 380-384.
- [19] Hosono, H., Kumondai, M., Maekawa, M., *et al.* (2017) Functional Characterization of 34 CYP2A6 Allelic Variants by Assessment of Nicotine C-Oxidation and Coumarin 7-Hydroxylation Activities. *Drug Metabolism and Disposition*, **45**, 279-285. <https://doi.org/10.1124/dmd.116.073494>
- [20] Bagdas, D., Muldoon, P.P., Zhu, A.Z., *et al.* (2014) Effects of Methoxsalen, a CYP2A5/6 Inhibitor, on Nicotine Dependence Behaviors in Mice. *Neuropharmacology*, **85**, 67-72. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.05.006>
- [21] Zhang, W., Kilicarslan, T., Tyndale, R.F., *et al.* (2001) Evaluation of Methoxsalen, Tranylcypromine, and Tryptamine as Specific and Selective CYP2A6 Inhibitors *in Vitro*. *Drug Metabolism and Disposition*, **29**, 897-902.
- [22] Martignoni, M., Groothuis, G.M. and de Kanter, R. (2006) Species Differences between Mouse, Rat, Dog, Monkey and Human CYP-Mediated Drug Metabolism, Inhibition and Induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism Toxicology*, **2**, 875-894. <https://doi.org/10.1517/17425255.2.6.875>
- [23] Juvonen, R.O., Kuusisto, M., Fohrgrup, C., *et al.* (2016) Inhibitory Effects and Oxidation of 6-Methylcoumarin, 7-Methylcoumarin and 7-Formylcoumarin via Human CYP2A6 and Its Mouse and Pig Orthologous Enzymes. *Xenobiotica*, **46**, 14-24. <https://doi.org/10.3109/00498254.2015.1048327>
- [24] Li, L., Zhang, Q.Y. and Ding, X. (2018) A CYP2B6-Humanized Mouse Model and Its Potential Applications. *Drug Metabolism Pharmacokinetics*, **33**, 2-8. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2018.01.001>
- [25] Klaassen, T., Jetter, A., Tomalik-Scharte, D., *et al.* (2008) Assessment of Urinary Mephenytoin Metrics to Phenotype for CYP2C19 and CYP2B6 Activity. *European Journal Clinical Pharmacology*, **64**, 387-398. <https://doi.org/10.1007/s00228-007-0416-z>
- [26] Mango, K., Kiss, A.F., Fekete, F., *et al.* (2022) CYP2B6 Allelic Variants and Non-Genetic Factors Influence CYP2B6 Enzyme Function. *Scientific Reports*, **12**, Article No. 2984. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07022-9>
- [27] Wang, P.F., Neiner, A. and Kharasch, E.D. (2019) Efavirenz Metabolism: Influence of Polymorphic CYP2B6 Variants and Stereochemistry. *Drug Metabolism and Disposition*, **47**, 1195-1205. <https://doi.org/10.1124/dmd.119.086348>
- [28] Patel, R., Barker, J. and ElShaer, A. (2020) Pharmaceutical Excipients and Drug Metabolism: A Mini-Review. *Interna-*

- tional Journal of Molecular Sciences*, **21**, Article No. 8224. <https://doi.org/10.3390/ijms21218224>
- [29] Turpeinen, M., Raunio, H. and Pelkonen, O. (2006) The Functional Role of CYP2B6 in Human Drug Metabolism: Substrates and Inhibitors *in Vitro*, *in Vivo* and *in Silico*. *Current Drug Metabolism*, **7**, 705-714. <https://doi.org/10.2174/138920006778520633>
- [30] Spatzenegger, M., Liu, H., Wang, Q., *et al.* (2003) Analysis of Differential Substrate Selectivities of CYP2B6 and CYP2E1 by Site-Directed Mutagenesis and Molecular Modeling. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **304**, 477-487. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.043323>
- [31] Kawashima, Y., Hagiwara, M., Inoue, Y., *et al.* (2002) Evaluation of Dextromethorphan N-Demethylation Activity as a Biomarker for Cytochrome P450 3A Activity in Man. *Pharmacology and Toxicology*, **90**, 82-88. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2002.900205.x>
- [32] Al-Jenoobi, F.I., Al-Thukair, A.A., Alam, M.A., *et al.* (2014) Effect of Garden Cress Seeds Powder and Its Alcoholic Extract on the Metabolic Activity of CYP2D6 and CYP3A4. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2014**, Article ID: 634592. <https://doi.org/10.1155/2014/634592>
- [33] Shaul, C., Blotnick, S., Adar, L., *et al.* (2022) Phenytoin Metabolic Ratio, a Marker of CYP2C9 Activity, Is Superior to the CYP2C9 Genotype as a Predictor of (S)-Warfarin Clearance. *Clinical Pharmacokinetics*, **61**, 1187-1198. <https://doi.org/10.1007/s40262-022-01141-2>
- [34] Rettie, A.E. and Jones, J.P. (2005) Clinical and Toxicological Relevance of CYP2C9: Drug-Drug Interactions and Pharmacogenetics. *Annual Review Pharmacology and Toxicology*, **45**, 477-494. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095821>
- [35] Daly, A.K., Rettie, A.E., Fowler, D.M., *et al.* (2018) Pharmacogenomics of CYP2C9: Functional and Clinical Considerations. *Journal of Personalized Medicine*, **8**, 1-31. <https://doi.org/10.3390/jpm8010001>
- [36] Uehara, S., Yoneda, N., Higuchi, Y., *et al.* (2021) Methyl-Hydroxylation and Subsequent Oxidation to Produce Carboxylic Acid Is the Major Metabolic Pathway of Tolbutamide in Chimeric TK-NOG Mice Transplanted with Human Hepatocytes. *Xenobiotica*, **51**, 582-589. <https://doi.org/10.1080/00498254.2021.1875515>
- [37] Rudesheim, S., Selzer, D., Fuhr, U., *et al.* (2022) Physiologically-Based Pharmacokinetic Modeling of Dextromethorphan to Investigate Interindividual Variability within CYP2D6 Activity Score Groups. *CPT Pharmacometrics Systems Pharmacology*, **11**, 494-511. <https://doi.org/10.1002/psp4.12776>
- [38] Uehara, S., Ishii, S., Uno, Y., *et al.* (2017) Regio- and Stereo-Selective Oxidation of a Cardiovascular Drug, Metoprolol, Mediated by Cytochrome P450 2D and 3A Enzymes in Marmoset Livers. *Drug Metabolism and Disposition*, **45**, 896-899. <https://doi.org/10.1124/dmd.117.075630>
- [39] Cazet, L., Bulteau, S., Evin, A., *et al.* (2018) Interaction between CYP2D6 Inhibitor Antidepressants and Codeine: Is This Relevant. *Expert Opinion on Drug Metabolism Toxicology*, **14**, 879-886. <https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1496236>
- [40] Fernandez-Abascal, J., Ripullone, M., Valeri, A., *et al.* (2018) β -Naphthoflavone and Ethanol Induce Cytochrome P450 and Protect towards MPP (+) Toxicity in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**, Article No. 3369. <https://doi.org/10.3390/ijms19113369>
- [41] Thorn, H.A., Lundahl, A., Schrickx, J.A., *et al.* (2011) Drug Metabolism of CYP3A4, CYP2C9 and CYP2D6 Substrates in Pigs and Humans. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **43**, 89-98. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.03.008>
- [42] Mahli, A., Erwin, T.W. and Hellerbrand, C. (2019) Establishment of a p-Nitrophenol Oxidation-Based Assay for the Analysis of CYP2E1 Activity in Intact Hepatocytes *in Vitro*. *Toxicology Mechanisms and Methods*, **29**, 219-223. <https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1539800>
- [43] Yamamura, Y., Koyama, N. and Umehara, K. (2015) Comprehensive Kinetic Analysis and Influence of Reaction Components for Chlorzoxazone 6-Hydroxylation in Human Liver Microsomes with CYP Antibodies. *Xenobiotica*, **45**, 353-360. <https://doi.org/10.3109/00498254.2014.985760>
- [44] Hohmann, N., Blank, A., Burhenne, J., *et al.* (2019) Simultaneous Phenotyping of CYP2E1 and CYP3A Using Oral Chlorzoxazone and Midazolam Microdoses. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **85**, 2310-2320. <https://doi.org/10.1111/bcp.14040>
- [45] Pratt-Hyatt, M., Lin, H.L. and Hollenberg, P.F. (2010) Mechanism-Based Inactivation of Human CYP2E1 by Diethyl-dithiocarbamate. *Drug Metabolism and Disposition*, **38**, 2286-2292. <https://doi.org/10.1124/dmd.110.034710>
- [46] Santes-Palacios, R., Olguin-Reyes, S., Hernandez-Ojeda, S.L., *et al.* (2020) Differential Inhibition of Naringenin on Human and Rat Cytochrome P450 2E1 Activity. *Toxicology in Vitro*, **69**, Article ID: 105009. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.105009>
- [47] Denisov, I.G., Grinkova, Y.V., Camp, T., *et al.* (2021) Midazolam as a Probe for Drug-Drug Interactions Mediated by CYP3A4: Homotropic Allosteric Mechanism of Site-Specific Hydroxylation. *Biochemistry-U.S.*, **60**, 1670-1681.

- <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00161>
- [48] Kapetas, A.J., Sorich, M.J., Rodrigues, A.D., *et al.* (2019) Guidance for Rifampin and Midazolam Dosing Protocols to Study Intestinal and Hepatic Cytochrome P450 (CYP) 3A4 Induction and De-induction. *AAPS Journal*, **21**, 78. <https://doi.org/10.1208/s12248-019-0341-y>
- [49] Niwa, T., Yasuda, S., Yamamoto, Y., *et al.* (2021) Contribution of the Human Cytochrome P450 2C Subfamily to the Metabolism of and the Interactions with Endogenous Compounds Including Steroid Hormones. *Die Pharmazie*, **76**, 611-613.
- [50] Kandel, S.E., Han, L.W., Mao, Q.C., *et al.* (2017) Digging Deeper into CYP3A Testosterone Metabolism: Kinetic, Regioselectivity, and Stereoselectivity Differences between CYP3A4/5 and CYP3A7. *Drug Metabolism and Disposition*, **45**, 1266-1275. <https://doi.org/10.1124/dmd.117.078055>
- [51] 于敏, 张双庆, 闻镍, 等. 细胞色素 P450 酶系体外药物代谢研究方法进展[J]. 中国药事, 2013, 27(1): 81-87.
- [52] Liu, Y., Hao, H., Liu, C., *et al.* (2007) Drugs as CYP3A Probes, Inducers, and Inhibitors. *Drug Metabolism Reviews*, **39**, 699-721. <https://doi.org/10.1080/03602530701690374>
- [53] Stresser, D.M., Broudy, M.I., Ho, T., *et al.* (2004) Highly Selective Inhibition of Human CYP3Aa *in Vitro* by Azamulin and Evidence That Inhibition Is Irreversible. *Drug Metabolism and Disposition*, **32**, 105-112. <https://doi.org/10.1124/dmd.32.1.105>
- [54] Zlabek, V. and Zamaratskaia, G. (2011) Comparison of Three Fluorescent CYP3A Substrates in Two Vertebrate Models: Pig and Atlantic Salmon. *Animal*, **6**, 633-640. <https://doi.org/10.1017/S1751731111002096>
- [55] Jana, Z. and Meike, M. (2016) Inhibition of *in Vitro* Metabolism of Testosterone in Human, Dog and Horse Liver Microsomes to Investigate Species Differences. *Toxicology in Vitro*, **29**, 468-478. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.12.018>
- [56] Haarhoff, Z.E., Kramer, M.A., Zvyaga, T.A., *et al.* (2016) Comprehensive Evaluation of Liver Microsomal Cytochrome P450 3A (CYP3A) Inhibition: Comparison of Cynomolgus Monkey and Human. *Xenobiotica*, **47**, 470-478. <https://doi.org/10.1080/00498254.2016.1203042>
- [57] Uehara, S., Yoneda, N., Higuchi, Y., *et al.* (2016) Cytochrome P450-Dependent Drug Oxidation Activities and Their Expression Levels in Liver Microsomes of Chimeric TK-NOG Mice with Humanized Livers. *Drug Metabolism Pharmacokinetics*, **44**, Article ID: 100454. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2022.100454>