

基于多衰减曲线计算药物代谢酶动力学参数的新方法

洪英¹, 郭宾², 段俊敏²

(1. 湖南工业大学 科技学院, 湖南 株洲 412007;
2. 湖南师范大学 化学生物学及中药分析教育部重点实验室, 湖南 长沙 410081)

摘要: 针对近年广泛应用于药代筛选的底物消除法, 基于药物多衰减曲线, 建立了酶促反应的线性化处理方程, 提出了线性转换求解酶动力学参数的新方法。测定了9个探针底物在人肝微粒体中代谢的多衰减曲线, 通过线性回归同时获得米氏常数 K_m 、最大反应速率 V_{max} 和内在清除率 CL_{int} 等参数, 并与传统的底物消除曲线拟合法进行比较分析, 验证了新方法的有效性。多衰减曲线线性作图是一种简便、直观、可靠的数据可视化处理方法。

关键词: 底物消除; 药物代谢酶; 米氏方程; 动力学参数; 线性回归

中图分类号: Q55

文献标志码: A

文章编号: 1673-9833(2011)01-0034-06

A Novel Approach for Calculating Kinetic Parameters of Drug-Metabolizing Enzymes Based on Multiple Depletion Curves

Hong Ying¹, Guo Bin², Duan Junmin²

(1. College of Science & Technology, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China; 2. Key Laboratory of Chemical Biology and TCM Research of Ministry of Education, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: Aiming at the substrate depletion method widely used in multiple drug filtering, establishes a linear equation of enzymatic reaction based on drug decay curve and proposes a new method for linear conversion solution of enzymes kinetic parameters. Determines decay curves of nine probe metabolic reactions in human liver microsomes and obtains by linear regression the Michaelis constant K_m , maximum velocity of the metabolic reaction V_{max} and intrinsic clearance CL_{int} . Comparing with traditional substrate depletion curvilinear fitting method, verifies the effectiveness of the new method. Multi-linear decay curve mapping is a simple, intuitive and reliable data visualization method.

Keywords: substrate depletion; drug-metabolizing enzymes; Michaelis-Menten equation; kinetic parameters; linear regression

0 引言

药物代谢酶催化的分子机制是药学研究领域的热点问题。以细胞色素 P450 (cytochrome P450, 简称 CYP450) 为代表的一组亚铁血红素同工酶超家族 (如

肝药酶 CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6 和 3A4/5 等), 参与了 85% 以上外源药物的机体清除和解毒过程。因此, 运用肝脏微粒体 (microsome) 等酶源材料体外测试 CYP 酶动力学关键参数 (如米氏常数 K_m 、最大反应速率 V_{max} 和内在清除率 $CL_{int} = V_{max}/K_m$)^[1], 以预测或外推药物在体

收稿日期: 2010-11-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21005027)

作者简介: 洪英 (1978-), 女, 湖南攸县人, 湖南工业大学讲师, 硕士, 主要研究方向为生物化学与化学材料,

E-mail: hy19770501@163.com

内的转化行为,已成为当前药物研发中快速药代筛选和毒性评价的一项重要内容^[2-3]。

CYP 酶反应参数可通过测量底物药物的消耗 (substrate-depletion) 或药物代谢物的产生 (metabolite-formation) 来表达^[4-5]。常规的产物生成法需要测定一系列底物浓度下特定产物的生成初速率,通过米氏方程曲线的线性回归或非线性拟合来计算动力学参数。因传统产物生成法需要预先确定药物的代谢产物结构和提供代谢物标准品,而许多情况下药物的代谢物结构不明或其标准品难以获得,因此,底物消除法已被广泛应用于复杂转化途径下 CYP 表观动力学参数的快速测定^[4-8]。

最初,Obach 等采用单一底物浓度指数衰减方法即“体外半衰期”法 (*in vitro* $t_{1/2}$)^[9]快速估算 CL_{int} ,此后多底物浓度消除法即“多衰减曲线”方法^[4-6,8]被进一步用于测定 K_m , V_{max} 和 CL_{int} 。但对这些参数值的计算,目前底物衰减法均采用非线性拟合而非直线回归方式来获得。线性化作图一直是传统产物生成法中最简便、使用最广的数据处理手段,但将其应用于底物多衰减曲线中的新方法尚未见报道。本文基于多衰减

曲线方法,从理论推导出底物消除酶促反应的线性方程,计算探针药物在人肝微粒体中的酶动力学参数,并与传统的底物消除曲线拟合法进行比较,为底物消除线性回归新方法的使用提供依据。

1 实验部分

1.1 实验材料与仪器

实验所用探针底物和特征代谢物标准品见图 1,除咪哒唑仑(中国药品生物制品检定所生产)外,其余均从 Sigma 购得;混合人肝微粒体(20 g/L, -80 °C 冻存)购自 BD (Becton, Dickinson and Company) 公司;还原型辅酶 II (NADPH) 为 Sigma 产品;乙腈和甲醇为 Merck 公司提供的 HPLC 纯试剂;其它化学试剂均为分析纯。

实验所用仪器为:美国 AB (Applied Biosystems) 公司 API-4000 三级四极杆串联质谱仪 (MS/MS),配置 ESI 电喷雾离子源和 Analyst 软件;Agilent 1200 系列高效液相色谱仪,配置四元泵和温控自动进样器;96 孔反应板为美国 Axygen 产品。

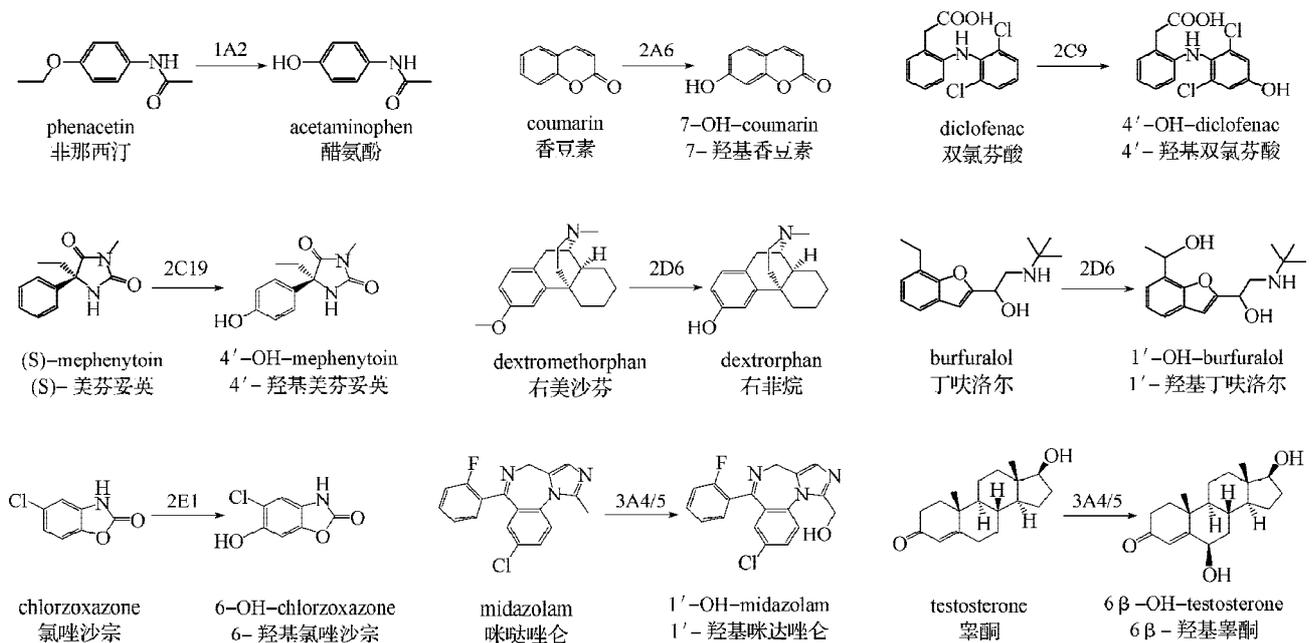


图 1 人体主要 CYP 药物代谢酶及其特征反应

Fig. 1 Chemical structures and drug metabolic reactions catalyzed by human CYPs

1.2 微粒体孵育体系

微粒体孵育反应参考以前的实验条件^[5],在磷酸缓冲液(浓度为 100 mmol/L, pH=7.4)中相继加入不同浓度的底物溶液和解冻后的小鼠肝微粒体(质量浓度为 0.1 g/L),37 °C 预热 3 min 后,加入 40 μL 新鲜的 NADPH 溶液(浓度为 10 mmol/L,由磷酸盐缓冲液临时配制),

启动反应。各反应体系终体积为 400 μL,探针底物及其浓度范围见表 1。在分别反应 0, 2, 5, 10, 20, 30 min 后,每次取出 50 μL,加入等体积冰乙腈终止反应。

分别取不同浓度的分析物标液与酶混合,相继加入 400 μL 终止液和 40 μL 的 NADPH 溶液,作为基质匹配标样。以相同体积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。

表1 底物消耗的LC分离和MRM检测参数

Table 1 LC-MRM detection parameters for the probe reactions

CYP	底物浓度 / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	质荷比 $Q_1 \rightarrow Q_3$	离子模式	碰撞能量 / eV
1A2	5~300	180 → 138	ESI+	24
2A6	0.2~20	147 → 103	ESI+	22
2C9	2~200	296 → 250	ESI+	19
2C19	5~400	219 → 134	ESI+	26
2D6	1~200	272 → 171	ESI+	52
2D6	0.5~100	262 → 188	ESI+	20
2E1	5~400	168 → 132	ESI-	20
3A4/5	0.5~50	326 → 291	ESI+	37
3A4/5	2~300	289 → 109	ESI+	35

1.3 分析检测

加入终止液振动15 s, 96孔板离心(2 000 g, 5 min), 于 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 低温放置15 min, 使缓冲盐-乙腈分离^[5]。每孔各取上层乙腈相10 μL , 对来自6种不同酶孵育体系相应浓度层次的底物反应孔样品、标样孔样品和酶活抑制孔样品分别进行“9合1”式混合, 一次进样对所有分析物进行LC-MS定量分析。

色谱柱采用Zorbax Eclipse XDB-C18 (50 mm \times 2.1 mm, i. d. 5 μm); 流动相组成A为甲醇/水(体积比为10:90, 含0.1%乙酸), B为甲醇/水(体积比为90:10, 含0.1%乙酸); 流速0.3 mL/min; 进样量20 μL 。梯度程序: 0~0.5 min(15%B) \rightarrow 1.5~3.0 min(100%B) \rightarrow 3.1~4.5 min(15%B)。质谱检测采用TurboIonSpray离子源(ESI)多反应监测(MRM), 同时对混合分析物进行母离子(Q_1)和子离子(Q_3)扫描。喷雾电压4 500 V, 离子源温度450 $^\circ\text{C}$, 驻留时间100 ms。各特征底物的主要检测参数见表1。

1.4 数据分析

将0时间点的底物浓度值 c_{S0} 作为参照(100%), 其它时间点的底物浓度 c_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} ; 再用 k_{dep} 对底物浓度 c_S 作图, 经曲线拟合或倒数法直线回归, 最终可求出相应常数 K_m 和 V_{max} 的值。

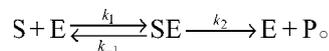
2 结果与讨论

在传统的产物生成法中, 常使用线性化数据处理方法简化米氏曲线方程。除经典的Lineweaver-Burk双倒数作图法外, 还有Hanes-Woolf, Eadie-Hofstee等多种线性化方法^[10]普遍用于酶动力学参数的计算。本文针对药代筛选广泛使用的底物消除法, 提出了线性化处

理新方法, 并对其有效性进行了验证。

2.1 底物消除线性化方程的理论推导

药物作为底物(S)在CYP酶(E)作用下经中间复合物(SE)最后生成代谢产物(P)。



根据稳态平衡理论, 酶催化反应速率 v 取决于瞬时底物浓度 c_S 、酶浓度 c_E 和速率常数 k_1 , k_{-1} 和 k_2 , 其计算式为:

$$v = k_2 c_{SE} = \frac{k_2 c_E c_S}{K_m} = \frac{k_2 c_{E0} c_S}{K_m + c_S}, \quad (1)$$

式中: K_m 为米氏常数, $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$;

酶初始总浓度 c_{E0} 为其瞬时游离浓度 c_E 与中间复合物浓度 c_{SE} 之和, 即 $c_{E0} = c_E + c_{SE}$ 。

在底物消除初始阶段, 按一级速率常数 k_{dep} 衰减, 即 $S \xrightarrow{k_{\text{dep}}} P$ 。则有

$$v = \frac{dc_P}{dt} - \frac{dc_S}{dt} = -k_{\text{dep}} c_S, \quad (2)$$

$$k_{\text{dep}} = -v/c_S,$$

将式(1)代入式(2)可得

$$k_{\text{dep}} = -\frac{k_2 c_E}{K_m} = -\frac{k_2 c_{E0}}{K_m + c_S}。 \quad (3)$$

当底物浓度足够高, 所有游离酶都达到饱和(即 $c_{E0} \approx c_{SE}$)时, 此时速率最大, 因此 $V_{\text{max}} = k_2 c_{E0}$ 。当底物浓度极小时, $c_E \approx c_{E0}$, 由式(3)得到

$$k_{\text{dep}(c_S \rightarrow 0)} = -\frac{k_2 c_{E0}}{K_m} = -\frac{V_{\text{max}}}{K_m} = CL_{\text{int}}, \quad (4)$$

由此, 可得药物多衰减曲线的 k_{dep} 与 c_S 的关系式为:

$$k_{\text{dep}} = k_{\text{dep}(c_S \rightarrow 0)} \left(1 - \frac{c_S}{K_m + c_S} \right) = -\frac{V_{\text{max}}}{K_m} \left(1 - \frac{c_S}{K_m + c_S} \right), \quad (5)$$

对方程式(5)两边进行倒数处理, 得到

$$-\frac{1}{k_{\text{dep}}} = \frac{1}{V_{\text{max}}} c_S + \frac{K_m}{V_{\text{max}}}。 \quad (6)$$

实验时, 选择不同的 c_S 测定相应的 k_{dep} , 以 $-1/k_{\text{dep}}$ 对 c_S 作图, 绘出直线, 外推至与轴线相交, 则纵轴截距为 K_m/V_{max} , 横轴截距为 $-K_m$, 斜率为 $1/V_{\text{max}}$ 。

2.2 底物消除线性回归方法的验证

2.2.1 药物探针的定量分析

由于串联质谱MRM检测的高选择性, 本实验利用LC快速梯度分离, 在5 min内可完成所有代谢物和底物的同时检测, 未出现相互干扰。在以前的实验中, 酶反应液与终止液混合后形成的磷酸盐缓冲液-乙腈系统, 在低温与盐析双重诱导相分离后可直接进样, 对ESI-MS检测干扰小, 基质效应明显减弱^[5]; 此外, 由

于底物消耗法分析物浓度较高,稀释进样后基质效应进一步减弱,可运用外标法准确定量。采用多孵育体系合并式进样,1次分析可同时获取9个体系底物的浓度变化,分析通量大大提高。

LC-MS/MS分析方法的可靠性验证考察了样品前处理MRM定量检测的性能参数,分析物的测量准确度和精密度均符合生物样品定量分析基本要求。采用低温-盐析、基质配标和外标法定量,可获得500倍以上动态线性范围($r^2 > 0.99$)。

2.2.2 底物消除速率常数的浓度依赖性

在底物消除体系中,药物浓度随时间呈指数衰

减。在初始线性阶段,直线斜率即为消除速率常数 k_{dep} 。由于酶促转化时药物代谢酶具有可饱和性,故药物在肝脏微粒体中代谢消除的速率常数呈现为剂量或浓度依赖性。随着底物浓度增大, k_{dep} 逐渐减小,在低浓度和高浓度区段分别呈现一级和零级动力学特征。

2.2.3 多衰减曲线非线性拟合分析

将 k_{dep} 对底物浓度的对数作图,如图2所示。在曲线的拐点,即当 k_{dep} 为最大值一半时对应的底物浓度即为 K_m 。根据方程式(5), K_m 值与曲线幅度的乘积即为酶促反应的最大反应速率 V_{max} 。

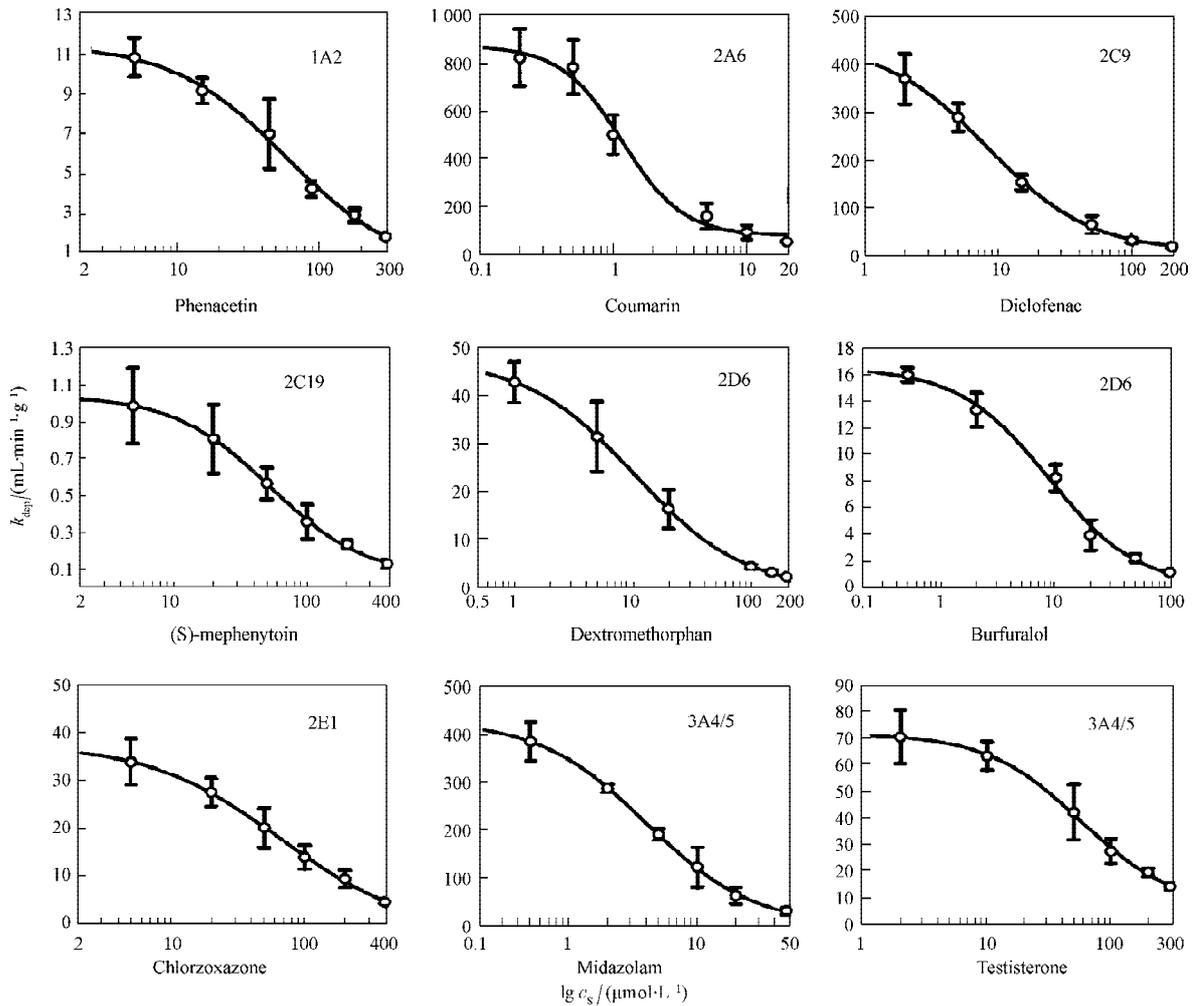


图2 人肝微粒体中药物代谢底物消除的曲线拟合

Fig. 2 Curvilinear fit of depletion rate constants versus drug concentration for metabolic reactions in human liver microsomes

2.2.4 多衰减曲线线性回归分析

本文对 k_{dep} 与 c_s 曲线关系进行简单线性转换。在 $1/k_{dep} - c_s$ 线性图中(见图3),根据理论方程式(6),斜率为 $1/V_{max}$,纵轴截距为 $1/CL_{int}$,横轴截距则表示 K_m 。由于采用单倒数法,误差放大效应较小,作图更直观。

2.2.5 底物消除法酶动力学参数的比较

图4对线性回归新方法与常规的非线性拟合法求

算的参数 K_m , V_{max} 以及 CL_{int} 进行了综合比较,图中虚线区间表示2倍差异范围。从图4可看出:所有底物消耗法的参数值差异均在2倍差异范围之内,说明底物消耗多衰减曲线线性回归分析结果与传统非线性拟合结果是一致的。其中 K_m 值差异最小,仅丁咪洛尔(2D6)和睾酮(3A4/5)的 V_{max} 值以及丁咪洛尔(2D6)和双氯芬酸(2C9)的 CL_{int} 值偏差稍大,这可能与底物

浓度范围较宽有关,若考虑权重因子,相关性会进一步得到改善。

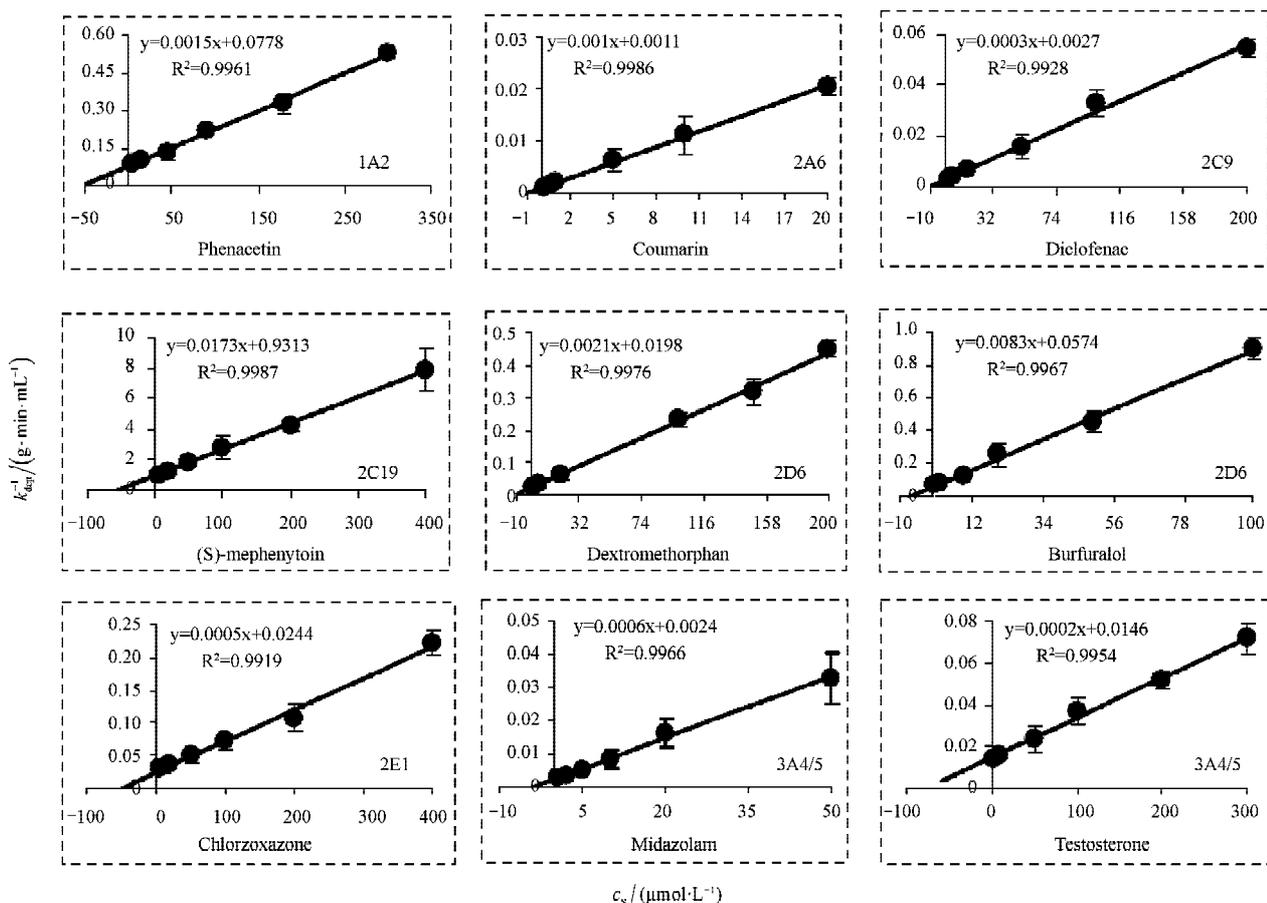


图3 人肝微粒体中药物代谢底物消除的线性回归图

Fig. 3 Linear regression algorithm of depletion rate constants versus drug concentration for metabolic reactions in human liver microsomes

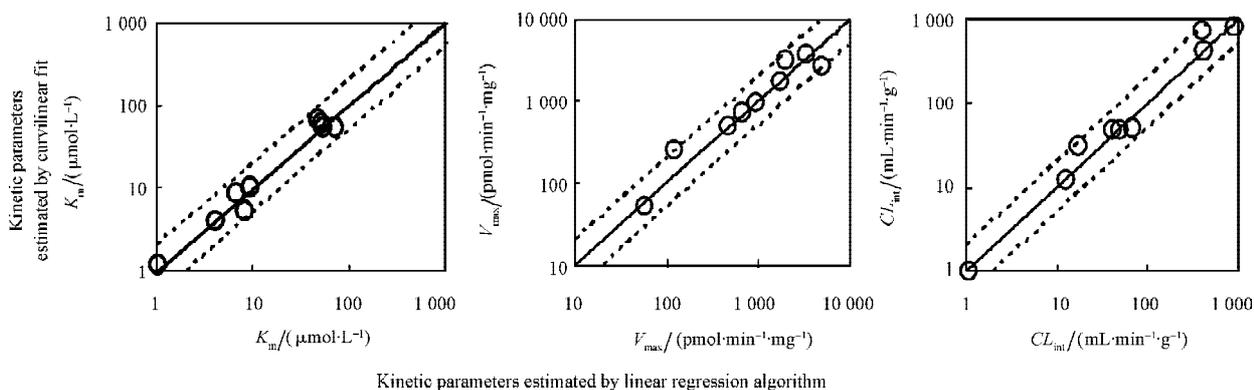


图4 线性回归法与曲线拟合法计算酶动力学参数的相关性

Fig. 4 The correlation of enzymes kinetic parameters calculated by linear regression algorithm and traditional curvilinear fit approach

3 结语

本文针对近年来药代筛选广泛采用的底物消除法,提出了基于多衰减曲线的线性化处理新方法,通过酶动力学参数计算结果的比较,验证了新方法的有效性。多衰减曲线线性回归方法具有分析可靠、设计简单、数据直观的优点,在早期新药研发阶段,较易为分析工作者接受。

参考文献:

- [1] Wienkers Larry C, Heath Timothy G. Predicting in Vivo Drug Interactions from in Vitro Drug Discovery Data[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2005, 4(10): 825-833.
- [2] Yuan Rae, Madani Soraya, Wei Xiaoxiong, et al. Evaluation of Cytochrome P450 Probe Substrates Commonly Used by the Pharmaceutical Industry to Study in Vitro Drug Interactions

- [J]. Drug Metabolism Disposition, 2002, 30 (12): 1311-1319.
- [3] Walsky Robert L, Obach R Scott. Validated Assays for Human Cytochrome P450 Activities[J]. Drug Metabolism Disposition, 2004, 32(6): 647-660.
- [4] Obach R Scott, Reed-Hagen Anne E. Measurement of Michaelis Constants for Cytochrome P450-Mediated Biotransformation Reactions Using A Substrate Depletion Approach[J]. Drug Metabolism Disposition, 2002, 30(7): 831-837.
- [5] 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.
Guo Bin, Duan Junmin, Wang Meiling, et al. Flow Injection Electrospray Ionization Mass Spectrometry Based High-Throughput Inhibition Screening of Herbal Extracts toward Major Human Cytochrome P450s[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2010, 38(12): 1692-1697.
- [6] Sjögren E, Lennernäs H, Andersson T B, 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 Metabolism Disposition, 2009, 37(1): 47-58.
- [7] Nath A, Atkins W M. A Theoretical Validation of the Substrate Depletion Approach to Determining Kinetic Parameters[J]. Drug Metabolism Disposition, 2006, 34(9): 1433-1435.
- [8] 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.
- [9] Obach R Scott, Baxter James G, Liston Theodore E, et al. The Prediction of Human Pharmacokinetic Parameters from Preclinical and in Vitro Metabolism Data[J]. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1997, 283 (1): 46-58.
- [10] Berges J A, Montagnes D J S, Hurd C L, et al. Fitting Ecological and Physiological Data to Rectangular Hyperbolae: A Comparison of Methods Using Monte Carlo Simulations [J]. Mar. Ecol. Prog. Ser., 1994, 114(3): 175-183.

(责任编辑:李玉珍)

株洲市人民政府 湖南工业大学 举行科技合作协议签约仪式

2010年12月22日下午,株洲市政府与湖南工业大学科技合作协议签约仪式在湖南工业大学科技楼报告厅隆重举行。按照协议,双方将深化市校双方在科技方面的合作,共同打造“包装工业园”和“湖南工业大学科技城”等科技合作项目。学校有关单位和科研院所与株洲市建设局、南车株洲电力机车研究所有限公司、株洲云龙示范区管委会等单位签订11项市校合作项目。仪式上,株洲市市长王群与湖南工业大学校长王汉青共同签署了株洲市人民政府与湖南工业大学科技合作协议。按照协议,校企双方将为提升株洲市企业自主创新能力,加强前沿性技术的创新,重点突破优势产业的瓶颈技术,力争在交通装备制造、有色金属冶炼及深加工、陶瓷、新材料等产业的关键技术研发上取得新突破,形成在国际上有较强竞争力的知名品牌和优势企业。

株洲市政府与湖南工业大学合作协议的签订,是株洲经济社会发展中的一件大事和喜事,为双方发挥优势、开展合作提供了崭新、稳定、持久的平台,必将对提高株洲市工业等相关行业科技水平产生重大而深远的影响。

(黄松剑)