

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20181102

## 吡格列酮能部分抑制 2 型糖尿病大鼠肝脏微粒体细胞色素 P450 活性

常 伟<sup>1△</sup>, 闵智慧<sup>2△</sup>, 程韵枫<sup>2</sup>, 唐扣明<sup>1\*</sup>

1. 复旦大学附属中山医院青浦分院临床药理学, 上海 201700

2. 复旦大学附属中山医院临床研究院, 上海 200032

**[摘要]** **目的:**探讨吡格列酮对糖尿病大鼠肝脏微粒体细胞色素 P450 (CYP450)活性水平的影响。**方法:**40 只大鼠随机均分为正常对照组、糖尿病组、低剂量(3 mg/kg)吡格列酮组、高剂量(6 mg/kg)吡格列酮组( $n=10$ )。除正常对照组外,其余各组给予高脂饲料喂养 4 周,采用链脲佐菌素(50 mg/kg)腹腔注射建立糖尿病大鼠模型。造模成功后,低、高剂量吡格列酮组大鼠给予相应剂量吡格列酮灌胃治疗 2 周,提取大鼠肝脏微粒体并检测 CYP450 活性水平,同时进行大鼠体质量和血糖指标的检测。**结果:**与正常对照组相比,糖尿病组大鼠血糖升高( $P<0.01$ ),CYP450 活性水平升高( $P<0.05$ ),体质量下降( $P<0.01$ )。与糖尿病组相比,吡格列酮灌胃 2 周期间,大鼠血糖浓度随吡格列酮浓度升高显著降低( $P<0.01$ ),低、高剂量吡格列酮组大鼠肝微粒体 CYP450 水平均明显降低( $P<0.01$ ),体质量明显升高( $P<0.05$ )。相关分析显示,CYP450 活性水平与大鼠血糖正相关( $r=0.598$ ,  $P<0.01$ ),而与大鼠体质量无明显相关性。**结论:**吡格列酮对糖尿病大鼠肝脏微粒体 CYP450 酶活性有显著抑制作用,能改善其高血糖状态,增加大鼠体质量。

**[关键词]** 吡格列酮;糖尿病;细胞色素 P450;微粒体**[中图分类号]** R 587.1 **[文献标志码]** A

## Effect of pioglitazone on liver microsome cytochrome P450 in diabetic rats

CHANG Wei<sup>1△</sup>, MIN Zhi-hui<sup>2△</sup>, CHENG Yun-feng<sup>2</sup>, TANG Kou-ming<sup>1\*</sup>

1. Department of Clinical Pharmacy, Qingpu Branch, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 201700, China

2. Institute of Clinical Science, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effects of pioglitazone on the cytochrome P450 in the liver microsomes of the diabetic rats. **Methods:** Forty rats were randomly divided into four groups ( $n=10$  in each group): normal control group, diabetes model group, 3 mg/kg and 6 mg/kg pioglitazone groups. Except the normal control, all other groups were fed with high-fat diet for 4 weeks, and then diabetic model rats were established by intraperitoneal injection with streptozotocin (STZ) of 50 mg/kg once. After modeling, rats in the pioglitazone groups were continuously intragastric administrated with pioglitazone for 2 weeks, and then sacrificed and the liver microsomes were extracted for the assay of P450. Meanwhile, the blood glucose and body weight were measured. **Results:** Compared with the normal control, the blood glucose in the diabetes model group increased significantly ( $P<0.01$ ), the expression of cytochrome P450 also significantly increased ( $P<0.05$ ), and body weight significantly decreased ( $P<0.01$ ). Compared with the diabetes model group, during the 2 weeks of gavage, with the increasing of pioglitazone dose, the blood glucose in pioglitazone groups decreased remarkably ( $P<0.01$ ), and the expression of cytochrome P450 obviously decreased in the two pioglitazone groups ( $P<0.01$ ), whereas the body weight increased ( $P<0.05$ ). In addition, the correlation analysis showed that there was a significantly positive correlation between cytochrome P450 and blood glucose in rats and the correlation coefficient was 0.598 ( $P<0.01$ ). There was no significant correlation between cytochrome P450 and body weight in rats. **Conclusions:** Pioglitazone could inhibit the activity of cytochrome P450 in the liver of diabetic rats, reduce the blood glucose, and increase body weight in diabetic rats.

**[Key Words]** pioglitazone; diabetes mellitus; cytochrome P450; microsomes**[收稿日期]** 2018-10-08**[接受日期]** 2018-12-27**[基金项目]** 上海市卫生和计划生育委员会(青年)基金(20144Y0077)。Supported by the Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning Research (Youth) Fund (20144Y0077).**[作者简介]** 常 伟, 硕士, 主管药师。E-mail: 273636555@qq.com

闵智慧, 硕士, 工程师。E-mail: min\_zhihui@zs-hospital.sh.cn

△共同第一作者(Co-first authors).

\*通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-69719190-3208; E-mail: menshishan@126.com

噻唑烷二酮类药物目前广泛应用于治疗2型糖尿病,如吡格列酮(pioglitazone, PIO),可通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )的转录因子起到增强胰岛素敏感性和减轻胰岛素抵抗的作用<sup>[1-4]</sup>。文献证实口服吡格列酮主要经肝脏细胞色素P450(CYP450)酶系和ATP结合盒超家族B1(ABCB1)转运蛋白进行吸收和代谢<sup>[5]</sup>,而且吡格列酮的药代动力学和临床不良反应可能与其影响肝脏CYP450代谢水平有关<sup>[6-7]</sup>。但目前关于吡格列酮对肝脏药物代谢酶影响机制的研究报道较少。因此,本研究探讨吡格列酮对链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠CYP450活性的影响,为临床个体化合理用药提供依据。

## 1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 吡格列酮(pioglitazone, PIO)购于杭州中美华东制药有限公司。链脲佐菌素(streptozotocin, STZ,批号S0130)购自Sigma公司。微粒体分离试剂盒(Microsome Isolation Kit,批号K249-50)购自美国BioVision公司。大鼠CYP450 ELISA试剂盒(cytochrome P450,批号EH0552)购自上海威奥生物科技有限公司。FlexStation 3多功能酶标仪工作站为美国Molecular Devices(MD)公司产品;ONE TOUCH血糖仪购自强生公司;Heraeus Multifuge 高速低温离心机、洗板机 Wellwash 4 MK2 为美国 Thermo 公司产品;高通量组织研磨器为宁波新芝有限公司产品;数显隔水式电热恒温培养箱 PYX-DHS 为上海跃进医疗器械有限公司产品。

1.2 动物模型建立和分组 SPF级6周龄雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠40只购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,体质量(180±20)g。大鼠一般状态良好,反应灵敏,进食及活动正常。大鼠给予基础饲料适应性饲养1周后,随机取出10只作为正常对照组,给予基础饲料持续喂养。剩余30只大鼠为实验组,给予高脂饲料喂养4周后,保持大鼠空腹12 h以上,一次性腹腔注射50 mg/kg STZ(使用前以1%浓度溶解于新鲜配制的0.1 mol/L柠檬酸钠缓冲液中,pH 4.2~4.5);正常对照组腹腔注射等量的柠檬酸钠缓冲液。注射STZ 3 d后,尾静脉采血测定大鼠空腹血糖,以空腹血糖高于16.7 mmol/L为2型糖尿病大鼠模型成功判定的标准。

造模成功的大鼠随机均分为3组( $n=10$ ):糖尿病组、3 mg/kg 吡格列酮组、6 mg/kg 吡格列酮组。按照人与大鼠单位体表面积换算系数计算后得出大鼠吡格列酮灌胃剂量,每天分别进行大鼠3 mg/kg 吡格列酮和6 mg/kg 吡格列酮灌胃1次;糖尿病组和正常对照组给予等量0.9%氯化钠溶液灌胃,糖尿病组大鼠未给任何降糖药物。每天新鲜配制灌胃药液,连续灌胃2周。期间大鼠每2 d称体质量1次,每3 d大鼠尾静脉采血后用血糖检测仪(试纸法)动态监测血糖变化。实验中糖尿病组大鼠由于血糖过高死亡1只。整个过程都遵守动物伦理制度,动物处死为安乐死。

1.3 肝脏微粒体制备 大鼠在处死前禁食12 h,将大鼠颈椎脱臼处死并固定四肢,剪开腹腔进行肝门静脉插管,用冷0.9%氯化钠溶液注射进肝门静脉灌洗肝脏,同时将下腔静脉剪开一小口流出灌洗液,反复灌洗数次直至肝脏呈土黄色时,剪下肝脏用冷0.9%氯化钠溶液漂洗表面血液,再用滤纸吸干称质量。称约500 mg肝组织置于EP管中,剪刀剪碎组织,按照试剂盒说明书立即加入冷Homo buffer 500  $\mu$ L,放入组织匀浆机中进行肝细胞破碎,匀浆好后涡旋振荡30 s,放置于冰上1 min,离心(10 000 $\times g$ ,4 $^{\circ}C$ )15 min。转移中间层至新的离心管中,离心(20 000 $\times g$ ,4 $^{\circ}C$ )20 min,弃上清,用Homo buffer 500  $\mu$ L再离心洗涤细胞沉淀1次,弃上清,沉淀即为肝微粒体。重悬沉淀于500  $\mu$ L冷Storage buffer,-80 $^{\circ}C$ 保存。

1.4 肝脏微粒体CYP450检测 采用双抗体夹心ABC-ELISA法,根据试剂盒说明书,微粒体用标本稀释液作1:2稀释,配好标准浓度溶液。在96孔酶标板中包被好抗大鼠CYP450单抗,每孔各加入标准品或待测样品100  $\mu$ L,每个样本做3复孔,将反应板充分混匀后在37 $^{\circ}C$ 放置40 min。再用洗涤液将反应板充分洗涤4次,每次5 min,在滤纸上印干。每孔加入蒸馏水和第一抗体工作液各50  $\mu$ L(空白孔除外),将反应板充分混匀后在37 $^{\circ}C$ 放置20 min,再用洗涤液将反应板充分洗涤4次,每次5 min,在滤纸上印干。每孔加酶标抗体工作液100  $\mu$ L。将反应板在37 $^{\circ}C$ 放置10 min,再用洗涤液将反应板充分洗涤4次,每次5 min,在滤纸上印干。最后每孔加入底物工作液100  $\mu$ L,置于37 $^{\circ}C$ 暗处反应15 min,每孔加入100  $\mu$ L终止液混匀,30 min内用

酶标仪在 450 nm 处测光密度 ( $D_{450}$ ) 值。CYP450 浓度与  $D_{450}$  值成正比, 可通过绘制标准曲线求出标本中 CYP450 浓度。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组均数采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 方法比较; 多组均数间两两比较采用 Bonferroni 法; 采用 Pearson 相关分析法比较两变量间的相关性, 检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 吡格列酮对大鼠血糖和体质量的影响 结果 (图 1) 表明: 与正常对照组相比, 糖尿病组动态血糖

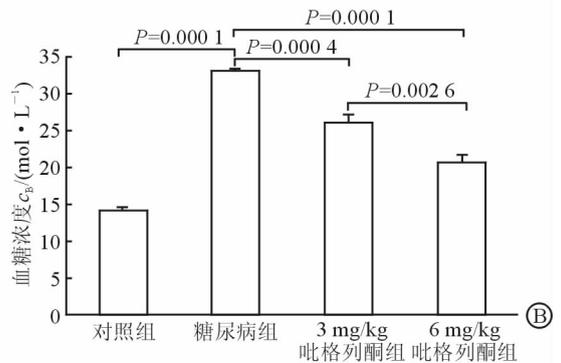
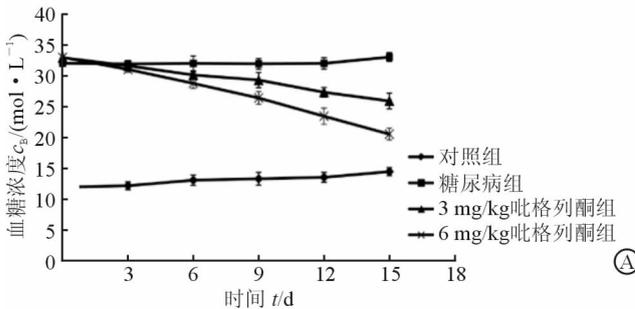


图 1 给药 2 周内各组大鼠血糖的动态变化

A: 给药 2 周内血糖的动态变化; B: 给药 2 周后各组大鼠血糖浓度的比较.  $\bar{x} \pm s$

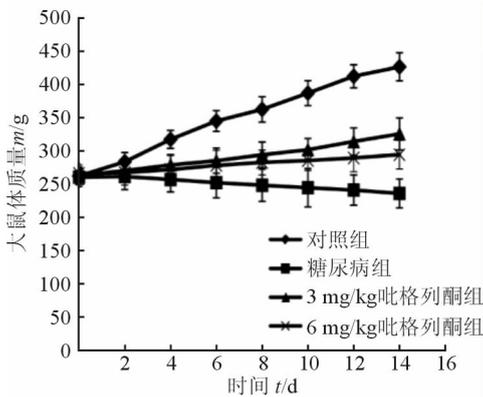


图 2 不同组大鼠体质量动态变化

$\bar{x} \pm s$

2.2 吡格列酮对大鼠 CYP450 水平的影响 结果 (图 3) 表明: 与正常对照组相比, 糖尿病组大鼠 CYP450 水平明显升高, 达到 1 612.10 pg/mL ( $P < 0.05$ ); 不同浓度吡格列酮灌胃后, CYP450 水平均明显降低, 分别为 1 023.98、1 020.74 pg/mL, 两组分别与糖尿病组差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。3、6 mg/kg 吡格列酮组大鼠 CYP450 水平差异无统计学意义。

均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 证实造模成功。与糖尿病组比较, 吡格列酮灌胃 2 周期间, 大鼠血糖浓度随吡格列酮浓度升高而降低。3 mg/kg、6 mg/kg 吡格列酮组在灌胃 2 周后血糖浓度均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 但血糖并未降到正常范围; 不同浓度吡格列酮组间比较, 血糖差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。大鼠灌胃 2 周期间, 与正常对照组比较, 糖尿病组体质量呈显著下降趋势 ( $P < 0.01$ ); 不同浓度吡格列酮组大鼠体质量也明显降低 ( $P < 0.01$ ), 但比糖尿病组体质量增高。两组吡格列酮组间体质量差异无统计学意义 (图 2)。

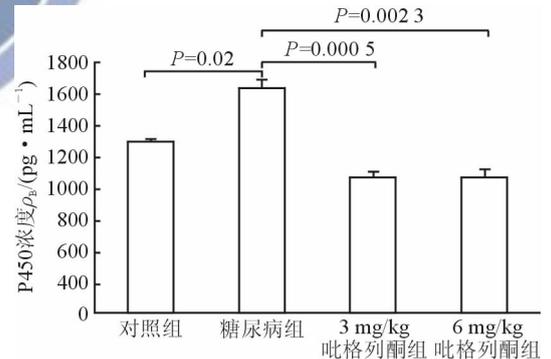


图 3 不同组大鼠 CYP450 水平的比较

$n = 3$

2.3 CYP450 水平与大鼠血糖和体质量的相关分析 相关分析结果显示: CYP450 与大鼠血糖显著正相关 ( $r = 0.598, P = 0.005$ ), CYP450 与大鼠体质量间无明显相关性。

## 3 讨论

流行病学调查<sup>[8]</sup>表明, 随着人们生活方式的快速改变, 我国糖尿病发病率呈现逐年递增趋势, 20 岁以上人群中 2 型糖尿病患病率达 9.7%, 而这些

患者中有 60.7% 仍未确诊,因此糖尿病的诊疗已经成为刻不容缓的挑战。吡格列酮作为临床常用的治疗 2 型糖尿病的药物。目前学术界的共识是该药作为胰岛素增敏剂和有效的降糖药物,主要靶向转录因子 PPAR $\gamma$  而改善胰岛素抵抗,同时促进葡萄糖转运蛋白 4 合成,增强外周组织对葡萄糖的利用,使血糖下降<sup>[9]</sup>。此外,吡格列酮还通过升高超氧化物歧化酶和降低丙二醛等对抗氧化应激,减轻胰岛  $\beta$  细胞损伤,从而降低糖化血红蛋白和血糖<sup>[4,9]</sup>。临床试验已经证实吡格列酮能有效控制糖尿病引起的高血糖<sup>[10]</sup>。与此同时,吡格列酮也出现了许多药物不良反应,包括骨折、水肿、充血性心衰、膀胱癌风险增加等<sup>[11-12]</sup>。研究表明,细胞色素 P450 酶系是肝微粒体中最重要的氧化酶,参与体内多种药物的代谢转化反应,大多数肝脏细胞色素 P450 酶参与吡格列酮的体内代谢过程,其中超过 60% 是由 CYP2C8 和 CYP3A4 两个亚型代谢转化的<sup>[13]</sup>。而且,吡格列酮的药代动力学和临床不良反应可能与其诱导或抑制肝脏细胞色素 P450 酶活性有关<sup>[14]</sup>。由于药物对细胞色素 P450 酶的诱导或抑制是临床产生药物相互作用的重要原因,因此熟悉药物的肝脏代谢情况有助于评价药物安全性和指导临床精准合理的联合用药。

本实验结果显示,糖尿病组大鼠体质量呈显著下降趋势,动态血糖呈显著升高趋势,与正常对照组比较差异均有统计学意义,证明已成功复制了糖尿病大鼠模型。临床糖尿病患者给予吡格列酮口服推荐剂量为 30 mg/60 kg,根据大鼠剂量换算后为 3 mg/kg,因此本实验选择大鼠灌胃浓度分别为 3、6 mg/kg。不同浓度吡格列酮灌胃后与糖尿病组比较,大鼠体质量明显增加,血糖浓度随吡格列酮浓度升高显著降低,但并未降到正常范围,可能与用药时间较短有关。不同浓度吡格列酮组间体质量无显著差异,而血糖有明显统计学差异。以上结果表明吡格列酮能明显降低大鼠血糖,改善高血糖状态,增加大鼠体质量,与相关文献<sup>[15]</sup>报道一致。结果还证明糖尿病大鼠细胞色素 P450 水平比正常对照组升高,提示体内高糖状态时,肝脏细胞色素 P450 酶被诱导而活性升高。当不同浓度吡格列酮治疗 2 周后,两组大鼠细胞色素 P450 水平与糖尿病组比较均明显降低,提示吡格列酮能显著抑制糖尿病大鼠肝脏细胞色素 P450 酶活性。但 3、6 mg/kg 吡格列酮组间细胞色素 P450 水平差异无统计学

意义,提示临床推荐的吡格列酮常规口服剂量就能有效下调细胞色素 P450 酶活性。

本实验相关分析显示,细胞色素 P450 与大鼠血糖具有显著正相关性,相关系数为 0.598 ( $P < 0.01$ ),而 P450 与大鼠体质量间无明显相关性,提示吡格列酮对糖尿病大鼠肝脏细胞色素 P450 水平的抑制作用可能与血糖明显相关而与大鼠体质量水平无关。有文献<sup>[16]</sup>报道,肝脏 P450 酶活性下调与血糖降低具有显著的相关性,而与血脂降低无明显关系。同样 CYP2E1 基因敲除鼠能明显抑制高脂饮食诱发的肥胖和血糖升高,提高胰岛素对肝糖原的分解能力<sup>[17]</sup>,说明 P450 酶系与血糖间有相关性。尽管吡格列酮疗效显著,但糖尿病患者往往还合并其他疾病,患者在服用 2 种以上药物时,每种药物对 P450 酶代谢活性的影响,可能导致某些药物加快代谢速度或者代谢障碍,以及竞争结合 P450 酶进而发生不良反应或导致药物无效。研究报道肝脏细胞色素 P450 酶中 CYP2C8 是主要代谢吡格列酮的亚型,占 39%;而 CYP3A4 占 17%,CYP2C9 和 CYP1A2 占较低的比例<sup>[6]</sup>。最近临床研究表明,与白种人和非洲人种有所不同,中国汉族人群主要携带 CYP2C9 \* 3 基因多态性变异,而不是 CYP2C8 基因多态性变异,前者作用主要促进吡格列酮的药代动力学过程<sup>[18]</sup>,但这个基因具体生物学功能还不明确。相比之下,尤其是选择药物起始治疗剂量时,了解患者的 CYP2C9 表型差异可能有助于预测用药疗效和避免药物之间竞争导致代谢活性下降。

综上所述,本实验结果表明吡格列酮能明显降低大鼠血糖,有效抑制肝脏细胞色素 P450 酶活性,改善高血糖状态,增加大鼠体质量,为进一步优化吡格列酮治疗糖尿病的个体化用药和用药安全提供了依据。随着药物基因组学的发展,在体内外研究和验证吡格列酮肝代谢酶相关基因多态性和功能引起的个体差异,能为指导临床精准合理用药奠定基础。

## 参考文献

- [1] CIPOLLETTA D, FEUERER M, LI A, et al. PPAR- $\gamma$  is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells[J]. *Nature*, 2012, 486(7404): 549-553.
- [2] GENUTH S M. How does pioglitazone prevent progression of impaired glucose tolerance to diabetes? [J]. *Diabetes*, 2013, 62(11): 3663-3665.
- [3] IIZUKA Y, KIM H, HIRAKO S, et al. Benefits of

- combination low-dose pioglitazone plus fish oil on aged type 2 diabetes mice [J]. *J Food Drug Anal*, 2018, 26 (4): 1265-1274.
- [4] DEFRONZO R A, TRIPATHY D, SCHWENKE D C, et al. Pioglitazone for diabetes prevention in impaired glucose tolerance[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(12): 1104-1115.
- [5] JAAKKOLA T, LAITILA J, NEUVONEN P J, et al. Pioglitazone is metabolised by CYP2C8 and CYP3A4 *in vitro*: potential for interactions with CYP2C8 inhibitors[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2006, 99(1): 44-51.
- [6] HANEFELD M. Pharmacokinetics and clinical efficacy of pioglitazone[J]. *Int J Clin Pract Suppl*, 2001, (121): 19-25.
- [7] MARTIN P, GILLEN M, MILLSON D, et al. Effects of fostamatinib on the pharmacokinetics of the CYP2C8 substrate pioglitazone: results from *in vitro* and phase 1 clinical studies[J]. *Clin Pharmacol Drug Dev*, 2016, 5(3): 170-179.
- [8] WANG L, GAO P, ZHANG M, et al. Prevalence and ethnic pattern of diabetes and prediabetes in China in 2013 [J]. *JAMA*, 2017, 317(24): 2515-2523.
- [9] CARIOU B, CHARBONNEL B, STAELS B. Thiazolidinediones and PPAR $\gamma$  agonists: time for a reassessment[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2012, 23(5): 205-215.
- [10] CHO Y K, KIM Y J, KANG Y M, et al. Comparison between sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors and pioglitazone as additions to insulin therapy in type 2 diabetes patients: A systematic review with an indirect comparison meta-analysis[J]. *J Diabetes Investig*, 2018, 9(4): 882-892.
- [11] WEN W, WU P, GONG J, et al. Association of pioglitazone with increased risk of prostate cancer and pancreatic cancer: a functional network study[J]. *Diabetes Ther*, 2018, 9(6): 2229-2243.
- [12] POIANA C, CAPATINA C. Fracture risk assessment in patients with diabetes mellitus[J]. *J Clin Densitom*, 2017, 20(3): 432-443.
- [13] LI H, GAN W, LU L, et al. A genome-wide association study identifies GRK5 and RASGRP1 as type 2 diabetes loci in Chinese Hans[J]. *Diabetes*, 2013, 62(1): 291-298.
- [14] VAN LEEUWEN N, SWEN J J, GUCHELAAR H J, et al. The role of pharmacogenetics in drug disposition and response of oral glucose-lowering drugs [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2013, 52(10): 833-854.
- [15] LU Z X, XU W J, WU Y S, et al. Identification of potential therapeutic targets in the liver of pioglitazone-treated type 2 diabetes Sprague-Dawley rats *via* expression profile chip and iTRAQ assay[J]. *J Diabetes Res*, 2018, 2018: 8120847.
- [16] ZONG H, ARMONI M, HAREL C, et al. Cytochrome P-450 CYP2E1 knockout mice are protected against high-fat diet-induced obesity and insulin resistance[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012, 302(5): E532-539.
- [17] MARZOLINI C, RAJOLI R, BATTEGAY M, et al. Physiologically based pharmacokinetic modeling to predict drug-drug interactions with efavirenz involving simultaneous inducing and inhibitory effects on cytochromes [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2017, 56(4): 409-420.
- [18] YIN S J, QI H M, WANG X, et al. Effects of functional CYP2C8, CYP2C9, CYP3A5, and ABCB1 genetic variants on the pharmacokinetics of insulin sensitizer pioglitazone in Chinese Han individuals [J]. *Pharmacogenetics and genomics*, 2017, 27(4): 125-134.

[本文编辑] 吴秀萍, 贾泽军