

兔激素性股骨头坏死与肝细胞色素 P4503A 酶活性的相关性研究

刘文刚¹, 何伟², 许学猛¹, 吴淮¹

(1. 广东省第二中医院, 广东 广州 510095; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405)

摘要 目的:探讨兔激素性股骨头坏死与肝细胞色素 P4503A 酶活性的相关性。**方法:**将 18 只 SPF 级健康新西兰家兔随机分成 3 组, 即空白对照组、诱导剂组、抑制剂组, 每组 6 只。空白对照组以生理盐水灌胃, 诱导剂组肌肉注射苯巴比妥注射液, 抑制剂组以伊曲康唑混悬液灌胃。连续用药 3 周后, 测定血清肝细胞色素 P4503A 酶活性, 并采用肌注甲泼尼龙琥珀酸钠方法造模。继续用药 3 周后处死动物, 制作并观察病理组织标本, 计算股骨头坏死面积和坏死率。**结果:**①肝细胞色素 P4503A 酶活性。空白对照组用药前后肝细胞色素 P4503A 酶活性比较, 差异无统计学意义($t=1.859, P=0.122$); 诱导剂组用药后肝细胞色素 P4503A 酶活性升高($t=7.482, P=0.002$); 抑制剂组用药后肝细胞色素 P4503A 酶活性降低($t=5.060, P=0.004$)。用药前 3 组肝细胞色素 P4503A 酶活性比较, 差异无统计学意义($F=1.428, P=0.259$); 用药后 3 组肝细胞色素 P4503A 酶活性比较, 差异有统计学意义($F=8.577, P=0.001$); 两两比较, 诱导剂组高于空白对照组和抑制剂组($P=0.018, P=0.003$), 抑制剂组低于空白对照组($P=0.045$)。②股骨头坏死面积。3 组家兔股骨头坏死面积比较, 差异有统计学意义($F=5.289, P=0.005$)。组间两两比较, 诱导剂组坏死面积小于空白对照组和抑制剂组($P=0.024, P=0.008$), 抑制剂组大于空白对照组($P=0.039$)。③股骨头坏死率。3 组家兔股骨头坏死率比较, 差异有统计学意义($F=4.831, P=0.007$)。组间两两比较, 诱导剂组坏死率小于空白对照组和抑制剂组($P=0.045, P=0.015$), 抑制剂组大于空白对照组($P=0.031$)。④肝细胞色素 P4503A 酶活性与股骨头坏死面积及坏死率的相关性。肝细胞色素 P4503A 酶活性与股骨头坏死面积和坏死率均呈负相关($r=-0.740, P=0.001; r=-0.753, P=0.001$)。**结论:**肝细胞色素 P4503A 酶在兔激素性股骨头坏死中起重要作用, 其活性与兔激素性股骨头坏死的发生呈显著负相关。

关键词 股骨头坏死 肝细胞色素 P4503A 酶 酶诱导 动物实验

A study on the correlation between steroid - induced avascular necrosis of femoral head in rabbits and activity of cytochrome P4503A enzyme in liver cell LIU Wen - gang*, HE Wei, XU Xue - meng, et al. * The Second Traditional Chinese Medical Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510095, Guangdong, China

ABSTRACT Objective: To explore the correlation between steroid - induced avascular necrosis of femoral head (SANFH) in rabbits and activity of cytochrome P4503A enzymes (CYP3A) in liver cell. **Methods:** Eighteen healthy SPF New Zealand rabbits were randomly divided into 3 groups as blank control group, inducer group and inhibitor group, 6 cases in each group. Rabbits in blank control group were intragastric administrated with physiological saline, rabbits in inducer group were injected into muscle with phenobarbital, while the others in inhibitor group were intragastric administrated with itraconazole suspension. After 3 weeks of continuous administration, the enzyme activity of serum CYP3A was determined and intramuscular injection of methylprednisolone sodium succinate was used to make models. After the next 3 weeks of continuous administration, the rabbits were sacrificed for making pathological tissue specimens which were observed to measure the rates and areas of femoral head necrosis. **Results:** ①The enzyme activity of CYP3A: There was no statistical difference in the rabbits of blank control group before and after the administration ($t=1.859, P=0.122$). After administration, the enzyme activity of CYP3A of inducer group enhanced ($t=7.482, P=0.002$), while that of inhibitor group depressed ($t=5.060, P=0.004$). There was no statistical difference in the enzyme activity of CYP3A among the 3 groups before administration ($F=1.428, P=0.259$), while there was statistical difference among the 3 groups after administration ($F=8.577, P=0.001$). The enzyme activity of CYP3A of inducer group was higher than that of blank control group and inhibitor group ($P=0.018, P=0.003$), and the enzyme activity of CYP3A of inhibitor group was lower than that of blank control group ($P=0.045$). ②The areas of femoral head necrosis: There was statistical difference among the 3 groups ($F=5.289, P=0.005$). The areas of femoral head necrosis of inducer group were smaller than those of blank control group and inhibitor group ($P=0.024, P=0.008$), and the areas of femoral head necrosis of inhibitor group were bigger than that of blank control group ($P=0.039$). ③The rate of femoral head necrosis: There was statistical difference among the 3 groups ($F=4.831, P=0.007$). The rate of inducer group was lower than

that of blank control group and inhibitor group ($P=0.045, P=0.015$), and the rate of inhibitor group was higher than that of blank control group ($P=0.031$). ④The correlations between CYP3A enzyme activity and the areas and rate of femoral head necrosis: There was a negative correlation between CYP3A enzyme activity and the areas and rate of femoral head necrosis ($r = -0.740, P=0.001; r = -0.753, P=0.001$). **Conclusion:** CYP3A enzyme in liver cell plays an important role in the steroid-induced avascular necrosis of femoral head in rabbits, and its activity has a significant negative correlation with the occurrence of steroid-induced avascular necrosis of femoral head in rabbits.

Key words Femur head necrosis; Cytochrome P4503A enzymes; Enzyme induction; Animal experimentation

随着医学的发展,激素在临床上的应用越来越广泛,激素性股骨头坏死在国内外的报道也越来越多。但同样的激素用量,有些患者会发生股骨头坏死,有些患者则不会。张鹤山等^[1]的研究表明,股骨头坏死的发生可能与激素在体内的蓄积有关。糖皮质激素在体内代谢的关键酶是细胞色素 P4503A 酶 (cytochrome P4503A enzymes, CYP3A), CYP3A 的活性范围较大,低活性的 CYP3A 可能引起血清中皮质类固醇清除率下降,导致游离的糖皮质激素水平升高,从而引起股骨头坏死。为探讨肝 CYP3A 活性在激素性股骨头坏死发病中的作用,我们于 2009 年 9 月至 2010 年 3 月进行了兔激素性股骨头坏死与肝 CYP3A 活性的相关性研究,现总结报告如下。

1 材料和仪器

1.1 实验动物 健康 SPF 级新西兰家兔 18 只,雌雄各半,体质量 2.2~3.1 kg,由广东省医学动物实验中心提供,实验动物合格证号:SCXK(粤)2010-0028。

1.2 实验仪器 CYP3A 亚酶活性比色法定量检测试剂盒,美国 GenMed Scientifics 公司提供,批号:1-423517-10;722 光栅分光光度计,上海嘉标测试仪器有限公司提供;奥林巴斯 BX41 病理图像分析系统,由北京恒荣创科技有限公司提供。

1.3 实验药品 苯巴比妥注射液,每支 100 mg,广东邦民制药有限公司生产,批号:090419;伊曲康唑胶囊,每粒 100 mg,成都信特药业有限公司生产,批号:20090809;注射用甲泼尼龙琥珀酸钠,每支 40 mg, Pfizer Manufacturing Belgium NV 公司生产,批号:R10650。

2 方法

2.1 分组方法 将 18 只家兔按体质量均衡原则随机分成 3 组,即空白对照组、诱导剂组、抑制剂组,每组 6 只。分笼标准饲料喂养,自由摄食饮水,室温控制在 23~25℃,湿度 50%,通风良好。

2.2 肝 CYP3A 的诱导及造模 适应性喂养 1 周后开始实验。空白对照组每天按 10 mL·kg⁻¹体质量生

理盐水灌胃;诱导剂组按 25 mg·kg⁻¹体质量每天肌肉注射苯巴比妥注射液;抑制剂组按 50 mg·kg⁻¹体质量隔天以 5 mg·mL⁻¹伊曲康唑混悬液灌胃。每周称重 1 次,连续用药 3 周后参照 Yamamoto 等^[2]的方法进行股骨头坏死造模,所有家兔均按 20 mg·kg⁻¹体质量在左大腿内侧肌肉注射甲泼尼龙琥珀酸钠,注射后继续常规喂养 3 周。

2.3 肝 CYP3A 活性测定 实验开始前以及 3 周后,家兔禁食不禁水 8 h,次日凌晨耳缘静脉取血 4 mL,用肝素锂抗凝后立即放入离心机中,以 3000 r·min⁻¹离心 10 min,然后小心移取上层黄色液体到新的离心管中,放入 -70℃ 冰箱里保存备测。测试开始前,将存放在 -20℃ 冰箱中的试剂盒内的反应液和底色液放入冰槽内融化,缓冲液室温下预热,然后按试剂盒说明书上的步骤进行检测。先绘制标准曲线,根据标准曲线获得样品对应甲醛浓度。样品活性 = 样品对应甲醛浓度 (μmol·L⁻¹) × 1 (体系容量, mL) × 样品稀释倍数 ÷ 0.035 (样品容量, mL) × 10 min。

2.4 病理组织学检测 实验开始 6 周后用空气栓塞法处死家兔,剖取右后侧股骨头,剔除周围软组织,分组标记后置于 10% 福尔马林溶液中固定,然后送至广东省医学实验动物中心比较医学实验室进行检测。病理组织标本经取材→固定→修块→流水冲洗→脱水→透明→浸蜡→石蜡包埋→切片→HE 染色→封片后制成 HE 染色切片。把制作好的 HE 染色切片置于光学显微镜下进行观察,并采用 Image-Pro Plus 6.0 医学图像分析软件计算股骨头内单位面积坏死率及坏死面积。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件对所得数据进行统计分析,3 组家兔用药前后肝 CYP3A 活性比较采用 *t* 检验,用药前和用药后 3 组间肝 CYP3A 活性比较、3 组间股骨头坏死面积和坏死率比较采用单因素方差分析,用药后 3 组间肝 CYP3A 活性两两比较、3 组间股骨头坏死率两两比较采用 Tamhane's *T*₂ 检验,3 组间股骨头坏死面积两两比较采用 LSD - *t*

检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 实验动物死亡情况 在实验开始后 3 周内抑制剂组因灌胃操作不当死亡 1 只; 造模后空白对照组死亡 2 只、诱导剂组、抑制剂组各死亡 1 只。

3.2 肝 CYP3A 活性 空白对照组用药前后肝 CYP3A 活性比较, 差异无统计学意义 ($t = 1.859, P = 0.122$); 诱导剂组用药后肝 CYP3A 活性升高 ($t = 7.482, P = 0.002$); 抑制剂组用药后肝 CYP3A 活性降低 ($t = 5.060, P = 0.004$)。用药前 3 组肝 CYP3A 活性比较, 差异无统计学意义 ($F = 1.428, P = 0.259$)。用药后 3 组肝 CYP3A 活性比较, 差异有统计学意义 ($F = 8.577, P = 0.001$), 两两比较: 诱导剂组高于空白对照组和抑制剂组 ($P = 0.018, P = 0.003$), 抑制剂组低于空白对照组 ($P = 0.045$)。(表 1)

表 1 3 组家兔用药前和用药 3 周后肝 CYP3A 活性比较 $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

组别	用药前	用药 3 周后	t 值	P 值
空白对照组	126.47 ± 30.43	169.16 ± 33.70	1.859	0.122
诱导剂组	109.02 ± 23.80	351.10 ± 116.38	7.482	0.002
抑制剂组	119.55 ± 27.43	67.28 ± 14.20	5.060	0.004
F 值	1.428	8.577		
P 值	0.259	0.001		

3.3 病理组织学检测结果

3.3.1 光镜观察结果 空白对照组镜下见骨髓坏死, 骨髓腔内脂肪细胞增多、增大, 脂肪细胞相互融合, 造血细胞减少, 部分造血细胞核碎裂、核溶解[图 1(1)], 部分骨细胞陷窝空虚, 局灶骨小梁连续性中断, 部分骨小梁出现坏死[图 1(2)]。诱导剂组镜下见骨髓坏死, 髓腔内脂肪细胞增多、增大, 部分脂肪细胞核消失, 细胞边界不清或融合, 腔内造血细胞减少, 部分造血细胞核碎裂、核溶解, 其中 1 例见骨小梁坏死[图 2(1)], 其余 4 例均未见骨小梁出现连续性中断及骨小梁坏死[图 2(2)]。抑制剂组镜下见骨髓坏死, 骨髓腔内脂肪细胞增多、增大, 脂肪细胞相互融合, 腔内造血细胞减少, 部分造血细胞核碎裂、核溶解, 部分骨小梁出现坏死, 局灶骨小梁连续性中断(图 3)。

3.3.2 股骨头坏死面积及坏死率 ①3 组家兔股骨头坏死面积比较, 差异有统计学意义 ($F = 5.289, P = 0.005$), 组间两两比较: 诱导剂组坏死面积小于空白对照组和抑制剂组 ($P = 0.024, P = 0.008$), 抑制剂组大于空白对照组 ($P = 0.039$)。②3 组家兔股骨头坏死率比

较, 差异有统计学意义 ($F = 4.831, P = 0.007$), 组间两两比较: 诱导剂组坏死率小于空白对照组和抑制剂组 ($P = 0.045, P = 0.015$), 抑制剂组大于空白对照组 ($P = 0.031$)。(表 2)

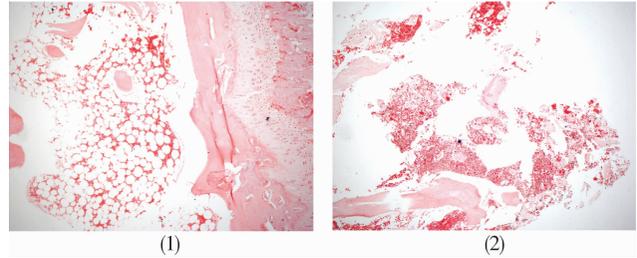


图 1 空白对照组家兔股骨头组织病理学观察(HE 染色 ×100)
(1)镜下脂肪细胞增多 (2)镜下骨小梁连续性中断

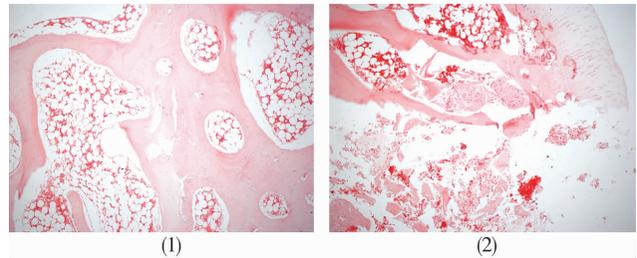


图 2 诱导剂组家兔股骨头组织病理学观察(HE 染色 ×100)
(1)镜下见脂肪细胞增多 (2)镜下未见骨小梁断裂

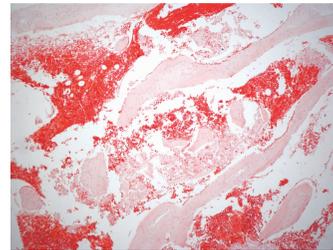


图 3 抑制剂组家兔股骨头组织病理学观察(HE 染色 ×100)

表 2 3 组家兔股骨头坏死面积、坏死率比较

组别	坏死面积(mm^2)	坏死率(%)
空白对照组	0.48 ± 0.33	8.76 ± 5.89
诱导剂组	0.17 ± 0.38	3.03 ± 6.78
抑制剂组	0.71 ± 0.12	13.40 ± 4.15
F 值	5.289	4.831
P 值	0.005	0.007

3.4 肝 CYP3A 活性与股骨头坏死面积及坏死率的相关性 肝 CYP3A 活性与股骨头坏死面积和坏死率均呈负相关 ($r = -0.740, P = 0.001; r = -0.753, P = 0.001$)。

4 讨论

CYP3A 在外源性物质尤其是药物代谢中起重要作用。它参与了临床中约 60% 的药物的代谢, 如尼菲地平、环孢菌素、咪唑唑仑等。CYP3A 也可催化许多内源性物质的代谢, 如睾丸酮及可的松的 $6 - \beta -$

羟化代谢。CYP3A 的基因表达存在明显的个体差异,其活性影响患者对许多常用药物的治疗效果、毒性反应及对于因环境污染物致病的危险性。另外,CYP3A 酶的活性还与多种肿瘤性疾病的发生密切相关^[3]。临床中激素性股骨头坏死的发生存在明显个体差异,在中国人群中尚未开展药物代谢酶活性与激素性股骨头坏死的相关性研究,本实验对肝 CYP3A 与兔激素性股骨头坏死的相关性进行了初步研究。

分析本实验的结果:①肝 CYP3A 活性。用药前,各组肝 CYP3A 活性比较,差异无统计学意义;用药后诱导剂组肝 CYP3A 活性升高,抑制剂组降低,且诱导剂组高于空白对照组和抑制剂组,抑制剂组低于空白对照组。②股骨头坏死面积和坏死率。诱导剂组股骨头坏死面积和坏死率小于空白对照组及抑制剂组,抑制剂组大于空白对照组。③肝 CYP3A 活性与股骨头坏死面积及坏死率的相关性。肝 CYP3A 活性与股骨头坏死面积和坏死率均呈负相关。这表明肝 CYP3A 活性可以被相关药物诱导,肝 CYP3A 活性越高股骨头坏死率越低、坏死面积越小。结合该酶的作用,我们推测可能是由于肝 CYP3A 高活性,对外源性

糖皮质激素的清除作用增强,使糖皮质激素在股骨头局部的蓄积时间缩短、浓度降低,从而降低了激素应用后引起股骨头坏死的发生率。该结论与日本学者 Masada 等^[4]的研究结果相似。

根据这些结果,我们初步认为肝 CYP3A 在兔激素性股骨头坏死中起重要作用,其活性与兔激素性股骨头坏死的发生呈显著负相关。

5 参考文献

[1] 张鹤山,李子荣. 股骨头坏死诊断与治疗的专家建议[J]. 中华骨科杂志,2007,27(2):146-148.

[2] Yamamoto T, Iriya T, Sugioka Y, et al. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid - induced osteonecrosis in rabbits[J]. Arthritis Rheum, 1997, 40(11):2055-2064.

[3] 张虹,范婷婷,方昱. 细胞色素 P450 3A4 的研究进展[J]. 中国医院药学杂志,2009,29(4):317-320.

[4] Masada T, Iwakiri K, Oda Y, et al. Increased hepatic cytochrome P4503a activity decreases the risk of developing steroid - induced osteonecrosis in a rabbit model[J]. J Orthop Res, 2008, 26(1):91-95.

(2010-10-29 收稿 2011-05-10 修回)

(上接第 5 页) 照组平均光密度小于膝骨痹康胶囊低剂量组和中剂量组,抗骨质增生胶囊组平均光密度小于膝骨痹康胶囊中剂量组,膝骨痹康胶囊中剂量组平均光密度大于高剂量组,其余各组比较,差异均无统计学意义。表明膝骨痹康胶囊能上调 KOA 大鼠关节软骨 TGF- β 1 的表达,中剂量膝骨痹康胶囊作用最强。结合以上几点,我们认为中剂量膝骨痹康胶囊能有效下调 KOA 大鼠关节软骨 TNF- α 的表达,同时上调 TGF- β 1 的表达,疗效优于抗骨质增生胶囊。

因此我们认为,膝骨痹康胶囊可能是通过下调 KOA 患者 TNF- α 的表达,同时上调 TGF- β 1 的表达来发挥治疗作用的。但膝骨痹康胶囊是多种成分的混合物,有效成分众多,其治疗机制非常复杂。对 TNF- α 和 TGF- β 1 的影响可能只是其治疗作用的一个方面,其更详细的作用机制还需进一步深入研究。

5 参考文献

[1] 顾延,戴尅戎,裘世静,等. 异常高应力导致关节软骨退变机理的形态学研究[J]. 中华外科杂志,1995,33(10):

597-560.

[2] 贺石林,王键,王净净. 中医科研设计与统计学[M]. 2 版. 长沙:湖南科学技术出版社,2001:48-49.

[3] 李华章,严振国,秦梦,等. 药物铺灸疗法治疗膝关节炎性关节临床观察[J]. 中医正骨,2010,22(4):45-46.

[4] 王定,何伟涛,史晓林,等. 益气温经通络中药在膝骨性关节炎关节镜清理术后的应用[J]. 中医正骨,2009,21(1):6-8.

[5] Serra R, Johnson M, Filvaroff EH, et al. Expression of a truncated, kinase - defective TGF - beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis[J]. J Cell Biol, 1997, 139(2):541-552.

[6] 马少云,陈利新,曹建斌,等. 膝骨性关节炎中医证型与一氧化氮、白介素 1 β 、转化生长因子 β 1 的关系研究[J]. 中医正骨,2008,20(4):3-4.

[7] 陈巍,李彬,唐中尧,等. 膝骨性关节炎患者关节滑液 IL-1 β 和 TNF- α 的表达及临床意义[J]. 广东医学, 2010,31(15):1998-2000.

(2011-02-23 收稿 2011-04-13 修回)