

高效液相色谱法测定急性白血病儿童 细胞色素 P450 3A4 活性的探讨

袁晓军¹, 顾龙君², 赵惠君¹, 唐跃年³, 赵金彩², 陈静², 潘慈²

(上海第二医科大学附属新华医院上海儿童医学中心 1. 儿内科; 2. 血液/肿瘤科; 3. 药剂科, 上海 200092)

[摘要] 目的 细胞色素 P450 3A4 (CYP3A4) 参与了许多环境毒物及包括多种常用化疗药物在内的人体中 50% 以上的药物代谢, 多态性研究表明, CYP3A4 的活性具有广泛的个体差异, 并显示出明显的种族和疾病分布特征。目前国内外尚无进行大样本 CYP3A4 活性测定方法的报道。本研究旨在建立简便、稳定、可靠的 CYP3A4 活性的检测方法, 探讨健康儿童和急性白血病儿童 CYP3A4 的活性分布特点, 为临床开展相关的药理学研究奠定基础。**方法** 采用高效液相色谱法 (HPLC), 同时检测 85 名健康儿童和 120 名急性白血病儿童的 CYP3A4 活性。**结果** 以峰面积内标法定量, 线性范围 0.01 ~ 5 mg/L, 检测限: 氢化考的松 (HC) 为 0.01 mg/L, 6 β -羟基氢化考的松 (6 β -OHC) 为 0.03 mg/L。HC 的日内、日间误差分别小于 2% 和 5%, 6 β -OHC 的日内、日间误差则分别小于 7% 和 10%, 绝对回收率为 98% ~ 106%。健康儿童的 CYP3A4 活性范围为 2.34 ~ 48.88, 平均活性为 9.76 ± 6.99 , 急性髓细胞白血病 (AML) 患儿的 CYP3A4 活性为 13.97 ± 10.84 , 两组之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。急性淋巴细胞白血病 (ALL) 儿童的 CYP3A4 活性范围变化很大, 从 2.00 ~ 585.72 不等, 平均活性为 53.52, 明显高于 AML 组和健康儿童 ($P_1 = 0.0066, P_2 = 0.0065$)。**结论** 该方法可简便、快速地测定 CYP3A4 活性, 灵敏度和准确性较高, 重复性好。ALL 儿童的平均 CYP3A4 活性明显高于 AML 组和健康儿童, 而后两者之间差异无显著性。

[中国当代儿科杂志, 2005, 7(2): 137 - 140]

[关键词] 高效液相色谱; 细胞色素 P450 3A4, 人; 儿童

[中图分类号] R733.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008 - 8830(2005)02 - 0137 - 04

Detection of CYP3A4 activity with HPLC in Chinese children with acute leukemia

Xiao-Jun YUAN, Long-Jun GU, Hui-Jun ZHAO, Yue-Nian TANG, Jin-Cai ZHAO, Jing CHEN, et al. Department of Pediatrics, Shanghai Children's Medical Center, Xinhua Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200092, China (Email: yxj@vip.sina.com)

Abstract: Objective Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) is involved in the metabolisms of many environmental toxins as well as over 50% of drugs including commonly used chemotherapeutic drugs. Polymorphism studies have demonstrated that there are significant individual variations in CYP3A4 activity as well as various distributions in different ethnicities and diseases. Currently there was no reported method in the large scale analysis of CYP3A4 activity. This study aimed to develop a simple, stable and reliable method for the analysis of CYP3A4 activity, and to explore the distributions of the CYP3A4 activity in Chinese children. **Methods** High performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the CYP3A4 activity in 85 healthy children and 120 children with acute leukemia. **Results** The standard curve had the linear range of 0.01-5 mg/L. The minimal detectable amount was 0.01 mg/L for hydrocortisol and 0.03 mg/L for 6 β -hydroxycortisol. Intra- and inter-day assay precisions for hydrocortisol were less than 2% and 5%, respectively, while those for 6 β -hydroxycortisol were less than 7% and 10%, respectively. The recovery rate was 98%-106%. The activity range of CYP3A4 in the healthy controls was 2.34 - 48.88, with the average activity of 9.76 ± 6.99 . Compared with that of children with acute myelogenous leukemia (AML) (13.97 ± 10.84), there was no statistical difference. The range of CYP3A4 activity in children with acute lymphocytic leukemia (ALL) varied from 2.00 to 585.72, with the average activity of 53.52. It was significantly higher than that of AML ($P = 0.0066$) and healthy children ($P = 0.0065$). **Conclusions** This method is rapid and convenient for determining CYP3A4 activity with high sensitivity, accuracy and reproducibility. ALL children have higher CYP3A4 activity than AML and healthy children, while the CYP3A4 activity was similar in the latter two groups.

[Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(2): 137-140]

Key words: High performance liquid chromatography; CYP3A protein, human; Child

[收稿日期] 2005 - 01 - 18; [修回日期] 2005 - 02 - 19

[基金项目] 上海市科学技术发展基金资助项目 (编号 984119010)

[作者简介] 袁晓军 (1968 -) 女, 博士, 主治医师。主攻方向: 儿童血液/肿瘤疾病。

[通讯作者] 顾龙君, 新华医院上海儿童医学中心血液/肿瘤科, 邮编 200092。

细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP) 是药物进入体内进行生物转化的重要代谢酶,它是由多个同工酶组成的基因超家族,其中 CYP3A4 亚型所催化的反应常常是药物在体内代谢的限速步骤。多态性研究表明,CYP3A4 的活性具有广泛的个体差异,并显示出明显的种族和疾病分布特征^[1-3]。目前测定 CYP3A4 活性的方法主要有红霉素呼吸试验、尿氮苯枫还原试验和氢化考的松试验,由于前二种方法需采用同位素或抗麻风药物作为探针,并需反复采集标本,使其临床应用受到极大限制。文献所报道的 HPLC 方法或是色谱条件中需要二极管阵列进行检测^[4],而许多实验室不具备此条件,使其应用受到一定限制;或是样品处理过程中需要固相萃取柱,大大增加了检测成本^[5]。我们建立了一种可简便、稳定、可靠的检测 CYP3A4 活性的 HPLC 方法,同时探讨了 85 名健康儿童和 120 名急性白血病儿童的 CYP3A4 活性分布特点。

1 材料与方法

1.1 仪器与药品

美国惠普公司 (Hewlett-Packard) HP1100 高效液相色谱系统,包括 G1311A 四元泵、G1328A 手动进样器、G1314A 可编程紫外检测器和 G1317A 二维液相工作站。MultiRF 低温高速离心机 (Thermo IEC 公司, USA), IP21 型涡旋混悬器。

标准品氢化考的松 (Hydrocortisol, HC)、6 β -羟基氢化考的松 (6 β -hydroxycortisol, 6 β -OHC) 及内标地塞米松 (dexamethasone, Dex) 均购自 Sigma 公司;乙腈、甲醇、二氯甲烷为色谱纯 (Fisher Scientific 公司),其它试剂为分析纯。

1.2 研究对象

85 名健康儿童为我院健康体检儿童,男 44 名,女 41 名,中位年龄 10 岁。120 名急性白血病儿童为接受新华医院上海儿童医学中心 XH-88 方案和 XH-99 方案系统化疗的病例,男 67 例,女 53 例,中位年龄 8 岁,其中,急性淋巴细胞白血病 (ALL) 80 例,急性髓细胞白血病 (AML) 40 例。

1.3 标本采集

所有受试者在测试前一周禁用细胞色素氧化酶的抑制剂或诱导剂,测试前 3 d 及标本采集当天,禁食含有乙醇、巧克力、咖啡因、葡萄果汁的饮料和花菜、卷心菜、甘蓝等食品。室温下收集 12 h 的过夜 (8PM~8AM) 小便,混匀后留取适量离心,取上清液保存于 -80℃,避免反复冻融。

1.4 实验方法

1.4.1 色谱条件 色谱柱为 C18 柱 (250 x 4.6 mm, 5 μ m Dikma 公司产品)。流动相组成:流动相 A 为 50 mmol/L 磷酸二氢钾-10 mmol/L 醋酸,流动相 B 为乙腈-流动相 A (65:35)。流速 1 mL/min,每次进样 20 μ L,紫外检测波长 254 nm。实验数据用 HP 二维液相工作站处理,以峰面积定量。

1.4.2 样本处理和测定 室温下缓慢融化冻存的样本;每个样本取 1.5 mL,依次加入内标溶液 (100 μ g/ml Dex) 10 μ L、NaCl 0.175 g、K₂HPO₄ 0.25 g 及二氯甲烷 4 mL,涡旋混匀后,4℃离心 3000 rpm x 10 min;取下层有机相,加入适量无水 Na₂SO₄,涡旋数秒,4℃离心 3000 rpm x 10 min;取上清,60℃氮气流吹干。加入 50 μ L 甲醇复溶,进样 20 μ L。

1.4.3 标准曲线的制备 分别定量称取 HC、6 β -OHC 及内标 Dex 适量,用甲醇溶解稀释成 500 μ g/mL,作为标准贮备液。临用前加入健康儿童尿液配制成 8 管系列浓度,分别含 HC 和 6 β -OHC 0.01, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2, 4, 5 μ g/L (各含内标 1 μ g)。按照上述“样本处理和测定”的操作步骤,用内标法定量。记录色谱图,以峰面积对浓度 C 进行直线回归,做标准曲线图。

1.4.4 酶活性计算 分别以 6 β -OHC 和 HC 的峰面积除以内标 Dex 的峰面积,代入由标准曲线推导出的标准方程,计算出 6 β -OHC 和 HC 的浓度,则 CYP3A4 活性 = [6 β -OHC] / [HC]。

1.4.5 回收率与精密度试验 分别配制浓度为 0.1, 1, 5 μ g/L 的 6 β -OHC 和 HC 的三个标准尿样,按上述方法进样测定,另配制相应浓度的标准甲醇溶液,直接进样,两组峰面积之比求其回收率。各浓度日内重复测定 5 次,并连续测定 5 d,计算日间、日内精密度。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 10.0 统计软件包处理数据,CYP3A4 活性用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用秩和检验、方差分析进行分析。

2 结果

2.1 CYP3A4 活性检测方法的建立

2.1.1 方法的专属性 在前述色谱条件下,6 β -OHC 和 HC 与尿液中的干扰成分可完全分离,与内标 Dex 也分离良好,其保留时间 (Rt) 分别为 Rt (6 β -OHC) = 10.54 min, Rt (HC) = 19.04 min, Rt (Dex) = 22.12 min。色谱图见图 1,2。

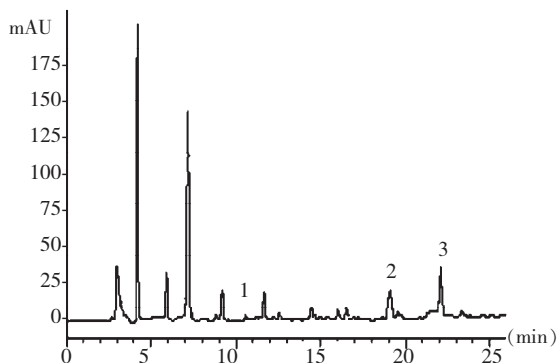


图1 CYP3A4 活性检测的标准品色谱图

1: 6β-OHC Rt = 10.54 min; 2: HC Rt = 19.04 min; 3: Dex Rt = 22.12 min

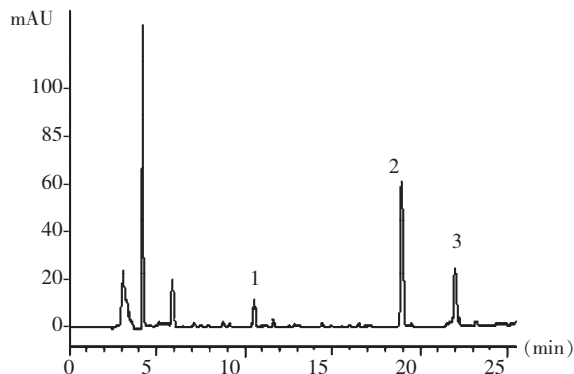


图2 1例 ALL 患儿 CYP3A4 活性检测色谱图

1: 6β-OHC Rt = 10.54 min; 2: HC Rt = 19.04 min; 3: Dex Rt = 22.12 min

2.1.2 线性范围 HC 浓度和 6β-OHC 浓度分别与 HC/Dex (即 x_1)、6β-OHC/Dex (即 x_2) 两峰面积之比呈良好的线性关系, 回归方程分别为: $C_{HC} = 7.758 X_1 - 0.565$ ($r = 0.997$), $C_{6\beta-OHC} = 0.912 X_2 - 0.042$ ($r = 0.998$), 线性范围 0.01 ~ 5 mg/L, 检测限: HC 为 0.01 mg/L, 6β-OHC 为 0.03 mg/L。

2.1.3 回收率与精密度试验 浓度分别为 0.1, 1, 5 μg/L 的 6β-OHC 和 HC 的绝对回收率及日内、日间精密度测定结果见表 1。

表1 尿液中 6β-OHC 和 HC 的回收率及精密度试验
($n = 5$)

药物	浓度 (mg/L)	回收率 (%)	日内差异 RSD(%)	日间差异 RSD(%)
HC	0.1	103	1.8	4.8
	1.0	101	1.1	2.1
	5.0	100	0.9	2.5
6β-OHC	0.1	106	6.4	9.3
	1.0	103	4.5	7.8
	5.0	98	2.1	5.4

2.2 健康儿童 CYP3A4 活性分布

85 名健康儿童的中位年龄为 10 岁, 其中男 44 例, 女 41 例。CYP3A4 活性范围为 2.34 ~ 48.88, 平均活性为 9.76 ± 6.99 。男性儿童的 CYP3A4 活性为 11.88 ± 8.88 , 女性为 7.12 ± 3.37 , 前者明显高于后者 ($P = 0.0077$)。按年龄分组, < 12 岁组的 CYP3A4 活性为 8.97 ± 6.27 , > 12 岁组为 10.43 ± 7.74 , 两组之间 CYP3A4 活性无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.3 急性白血病儿童 CYP3A4 活性

2.3.1 ALL 儿童的 CYP3A4 活性 不同临床诊断及处于不同化疗阶段的 ALL 患儿 CYP3A4 活性

范围变化很大, 从 2.00 ~ 585.72 不等, 平均活性为 53.52, 且不存在性别、年龄差异。

2.3.2 AML 儿童的 CYP3A4 活性 30 例 AML 患儿的 CYP3A4 平均活性为 13.97 ± 10.84 , 不同年龄、性别的 AML 患儿比较, CYP3A4 活性无显著差异 (P 均 > 0.05)。

2.3.3 健康儿童与急性白血病儿童 CYP3A4 活性的比较 尽管急性白血病儿童的 CYP3A4 活性变异范围较大, 但 ALL 患儿的平均活性 (53.52) 仍明显高于 AML 组 (13.97 ± 10.84) 和健康对照组 (9.76 ± 6.99) ($P_1 = 0.0066, P_2 = 0.0065$), 后两组之间 CYP3A4 活性无显著性差异 ($P > 0.05$)。不过我们发现, 临床上具备较多危险因素或对化疗反应差的 AML 患儿, 其 CYP3A4 活性通常低于正常儿童。

3 讨论

流行病学调查提示白血病的发生是环境因素与遗传因素共同作用的结果, 存在一定的遗传易感性。环境致癌物在某种遗传素质下, 通过体内代谢而活化, 而体内代谢酶系统的差异, 是直接影响白血病易感性的基础之一^[6]。CYP 参与了大多数化学致癌物的生物激活过程, 与癌症发生相关, 同时它也是许多化疗药物的生物转化因子, 能够增强或减弱药物的疗效, 但其发挥作用的关键是对环境毒物或药物活化及灭活的相对比率^[7-8]。

CYP3A4 是 CYP 基因超家族中最重要的一个亚型, 它不仅可代谢一些内源性激素 (如氢化考的松、雌激素等) 和某些饮食中的有害污染物, 还参与了许多环境致癌剂以及包括多种常用化疗药物在内的

人体中50%以上的药物代谢^[9-10]。它所催化的反应常常是药物在体内代谢的限速步骤,可影响药物的生物利用度,而药物在体内的药代动力学个体差异往往是由于参与代谢的酶活性存在较大个体差异所致。HC经CYP3A4代谢后产生6 β -OHC,尽管人体内游离的HC与6 β -OHC的分泌量具有生理节奏,但二者比值基本保持恒定,许多学者的研究结果均支持6 β -OHC与HC的比值可以代表CYP3A4活性^[11-12]。本研究在参照国外文献基础上,对色谱条件及样本处理过程进行了改良,采用普通的紫外检测器即可操作,不需要较昂贵的固相萃取柱进行标本处理,且HC和6 β -OHC与尿液中的杂质分离良好,因此可简便、快速地测定CYP3A4活性,灵敏度、准确性及重复性均较好。

国外资料显示,个体间CYP3A4活性可存在约5~60倍的差异^[3, 10, 13-15]。我们采用HPLC方法检测85例健康儿童的CYP3A4活性范围为1.46~48.88,个体变异达33倍,平均活性为 9.76 ± 6.99 。Lykkesfeldt^[5]测定11例健康非吸烟者的CYP3A4活性为 10.09 ± 6.89 ,Joellenbeck^[12]等报道14例健康白种人CYP3A4活性从1.6至21.7不等,平均 6.2 ± 1.6 ;我们检测的结果与之相近,提示中国健康儿童与白种人之间可能不存在种族差别。本研究中,健康男性儿童的CYP3A4平均活性明显高于女性健康儿童。如前所述,CYP3A4基因参与了环境致癌物的生物激活过程,形成的部分活性中间产物可与细胞的大分子物质如DNA或蛋白结合,这些致癌剂-DNA结合物可诱导毒性反应或致癌效应,导致细胞死亡和基因突变^[16]。理论上讲,CYP3A4活性越高,则对有害物质的生物激活作用越强,机体发生癌变的风险就越大。男性儿童的CYP3A4活性明显高于女性,至少可以部分解释儿童急性白血病中男性发病率高于女性这一事实。ALL儿童的平均CYP3A4活性明显高于AML组和健康儿童,而后者之间差异无显著性,提示CYP3A4活性在ALL儿童中的意义可能与AML中不同,有待深入探讨。

[参 考 文 献]

[1] Sata F, Sapone A, Elizondo G, Stocker P, Miller VP, Zheng W, et al. CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in ex-

- ons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity [J]. Clin. Pharmacol Ther, 2000, 67(1): 48-56
- [2] Guengerich FP. Cytochrome P-450: regulation and role in drug metabolism [J]. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 1999, 39: 1-17.
- [3] Hamzeiy H, Vahdati-Mashhadian N, Edwards HJ, Goldfarb PS. Mutation analysis of the human CYP3A4 gene 5' regulatory region: population screening using non-radioactive SSCP [J]. Mutat Res, 2002, 500(1-2): 103-110.
- [4] Santos-Montes A, Gonzalo-Lumbreras R, Izquierdo-Hornillos R. Simultaneous determination of cortisol and cortisone in urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Clinical and doping control applications [J]. J Chromatogr B Biomed Appl, 1995, 673(1): 27-33.
- [5] Lykkesfeldt J, Loft S, Poulsen HE. Simultaneous determination of urinary free cortisol and 6 beta-hydroxycortisol by high-performance liquid chromatography to measure human CYP3A activity [J]. J Chromatogr B Biomed Appl, 1994, 660(1): 23-29.
- [6] 张天泽,徐光伟. 肿瘤学[M]. 上册. 第1版,天津:天津科学技术出版社,1996, 106-113.
- [7] 冷欣夫,邱星辉. 细胞色素P450酶系的结构、功能与应用前景[M]. 北京:科学出版社,2001, 87-96.
- [8] Dai D, Tang J, Rose R, Hodgson E, Bienstock RJ, Mohrenweiser HW, et al. Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2001, 299(3): 825-831.
- [9] Ingelman-Sundberg M. Implications of polymorphic cytochrome p450-dependent drug metabolism for drug development [J]. Drug Metab Dispos, 2001, 29(4 Pt 2): 570-573.
- [10] Keshava C, McCanlies EC, Weston A. CYP3A4 polymorphisms--potential risk factors for breast and prostate cancer: a HuGE review [J]. Am J Epidemiol, 2004, 160(9): 825-841.
- [11] Zheng W, Jin F, Dunning LA, Shu XO, Dai Q, Wen WQ, et al. Epidemiological study of urinary 6beta-hydroxycortisol to cortisol ratios and breast cancer risk [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2001, 10(3): 237-242.
- [12] Joellenbeck L, Qian Z, Zarba A, Groopman JD. Urinary 6 beta-hydroxycortisol/cortisol ratios measured by high-performance liquid chromatography for use as a biomarker for the human cytochrome P-450 3A4 [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1992, 1(7): 567-572.
- [13] Hirota T, Ieiri I, Takane H, Maegawa S, Hosokawa M, Kobayashi K, et al. Allelic expression imbalance of the human CYP3A4 gene and individual phenotypic status [J]. Hum Mol Genet, 2004, 13(23): 2959-2969.
- [14] Wojnowski L. Genetics of the variable expression of CYP3A in humans [J]. Ther Drug Monit, 2004, 26(2): 192-199.
- [15] Mathijssen RH, de Jong FA, van Schaik RH, Lepper ER, Friberg LE, Rietveld T, et al. Prediction of irinotecan pharmacokinetics by use of cytochrome P450 3A4 phenotyping probes [J]. J Natl Cancer Inst, 2004, 96(21): 1585-1592.
- [16] Hsieh KP, Lin YY, Cheng CL, Lai ML, Lin MS, Siest JP, et al. Novel mutations of CYP3A4 in Chinese [J]. Drug Metab Dispos, 2001, 29(3): 268-273.

(本文编辑:王霞)