

基础研究

给药后卡马西平大鼠血药浓度测定及其核磁共振代谢组学分析

蔡 茁¹, 莫立乾², 关山越³, 刘楚阳², 刘 韵², 郭 丹²¹解放军第458医院药剂科, 广东 广州 510602; ²南方医科大学南方医院药学部, 广东 广州 510515; ³中山大学测试中心, 广东 广州 510275

摘要:目的 采用基于核磁共振(NMR)的代谢组学技术分析卡马西平灌胃后对大鼠血清代谢组的影响。方法 24只健康雄性Wistar大鼠,随机分为4组:卡马西平高、中、低剂量组和正常对照组,每组6只。连续灌胃给药7 d后,麻醉后腹主动脉采血,于高效液相色谱仪中检测血清药物浓度,利用核磁共振技术测定血清¹H NMR谱,进行模式识别分析,取肝肾组织进行病理学检查。结果 卡马西平高、中、低3个剂量组稳态血药浓度分别为14.64±1.41、8.54±1.19、4.56±0.64 μg·ml⁻¹,卡马西平高剂量组肝脏有轻微肿胀,各组肾脏组织均无明显病变。血清中丙二胺、去氧皮质酮、脱氢胆固醇、甜菜碱、β-丙氨酸、胱硫醚、4-甲基-2-戊酮酸、肌酸含量下降,糖类、乳酸、琥珀酸、乙酰磷酸、己二酸含量升高。PCA主成分分析表明,给药组和对照组的代谢物存在明显差异,能够被区分开。卡马西平不同剂量组之间,代谢谱无种类的明显差异,只存在代谢物含量高低的不同。结论 卡马西平对正常大鼠的代谢过程具有显著影响,这为卡马西平的临床用药监测和用药安全提供了依据。利用NMR技术对药物药效学和毒理学评价具有独特的优势和重要的价值。

关键词:代谢组学;核磁共振;卡马西平;血药浓度

Determination of serum carbamazepine concentration and metabonomic analysis in rats

CAI Zhuo¹, MO Liqian², GUAN Shanyue³, LIU Chuyang², LIU Yun², GUO Dan²¹Department of Pharmacy, 458 Hospital of PLA, Guangzhou 510602, China; ²Department of Pharmacy, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ³Instrumental Analysis and Research Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

Abstract: Objective To study the effects of carbamazepine on serum metabolic profiles in rats using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. **Methods** Twenty-four healthy male Wistar rats were randomized into 4 groups ($n=6$) for daily intragastric administration of high-, medium- or low-dose carbamazepine or distilled water (control) for 7 days. Blood samples were collected from the abdominal aortic under anesthesia after the treatment to determine serum carbamazepine concentration using high-performance liquid chromatography. ¹H nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectra were acquired for pattern recognition analysis. Histopathological changes of the renal and liver tissues of the rats were also examined. **Results** Steady-state blood concentration of carbamazepine in high-, medium- and low-dose groups were 14.64±1.41, 8.54±1.19, and 4.56±0.64 μg/ml, respectively. Slight liver swelling was found in high-dose group, but none of the groups showed renal pathologies. Compared with the control group, the high-dose carbamazepine group showed lowered serum concentrations of 1,3-diaminopropane, deoxycorticosterone, 7-dehydrocholesterol, betaine, beta-alanine, L-cystathionine, 4-methyl-2-oxovaleric acid, and creatine with increased levels of saccharides, lactate, succinic acid, acetyl phosphate, and adipic acid. Principal component analysis revealed significant differences of the metabolites between carbamazepine-treated groups and the control group. The metabolic profiles showed no differences in the kinds of metabolites although the concentrations of the metabolites varied between the carbamazepine groups. **Conclusions** Carbamazepine significantly affects metabolism in normal rats. This finding provides evidence for clinical drug monitoring and drug safety of carbamazepine. NMR technique has important values for pharmacodynamic and toxicological evaluation of drugs.

Key words: metabonomics; nuclear magnetic resonance; carbamazepine; blood concentration

卡马西平(CBZ)是目前常用的一线抗癫痫药,被广泛用于治疗癫痫、三叉神经痛、双相情感障碍、慢性疼痛等疾病^[1]。研究调查表明,CBZ是使用率最高的抗癫痫药物,41.73%新诊断的癫痫患者首次单药治疗均选择

CBZ^[2]。然而,由于CBZ治疗浓度范围窄(4~12 mg·L⁻¹),生物利用度低,血药浓度个体差异大,容易引起各种形式的不良反应,从轻微的皮疹到严重的条件性疱疹,比如超敏综合症、Stevens-Johnson综合症(SJS)和中毒性表皮坏死松解症(TEN)等^[3-4]。服用卡马西平的前2个月重型药疹的发生风险在1/1000~10/1000,约有25%的TEN和SJS综合症是由卡马西平诱导产生,其死亡率高达30%以上^[5]。由于不良反应发生的不可预见性,所以,寻找不良反应发生的诱因,或者对用药后可能获得的副

收稿日期:2014-02-16

基金项目:广州市白云区科技项目(2010-KZ-34)

作者简介:蔡 茁,副主任药师,E-mail: 2633749347@qq.com

通信作者:郭 丹,主任药师,电话:020-62787585,E-mail: gdan_2007@126.com

作用作出预期初判,显得尤为重要。

代谢组学是专注于细胞、组织或者体液中低相对分子质量代谢物的系统研究方法,它是分析化学组分强有力的工具,也能为疾病的发生发展过程、生化功能及药物的毒性提供重要信息^[6]。因此,它被广泛地用于疾病鉴别诊断、生物标志物的筛选、化合物的安全性评价等领域^[7-8]。目前,两种最常用的代谢组学分析工具为质谱法(mass spectrometry, MS)和核磁共振波谱法(nuclear magnetic resonance, NMR)。其中,NMR是一种无破坏性和入侵性的分析方法,它能在复杂的混合体系中,分析出绝大多数组织分子完整的化学结构^[9-10]。因此,本文通过给予大鼠不同浓度的CBZ,使其达到不同的稳态血药浓度,在检测其血药浓度的同时,结合¹H-NMR法检测其血清中代谢物的变化情况,从而探讨不同血药浓度时,其血清中代谢物的差别,寻找出生物标志物,为卡马西平的临床应用提供新的监测方法,并对其可能诱发的副作用作出初期预判。

1 材料

1.1 试剂和仪器

卡马西平标准品(中国食品药品检定研究院,批号:100142-201105);卡马西平片(广东华南药业集团有限公司,产品批号:110701);氘代三甲基硅烷基丙酸(TSP, Sigma公司, CAS号:24493-21-8);重水(Sigma公司),甲醇(色谱级);其他试剂均为分析纯。

500 MHz 傅里叶变换超导核磁共振谱仪(美国Varian公司,型号:Varian INOVA500NB);高效液相色谱仪(日本岛津,LC-20A);液相色谱柱(美国安捷伦公司,ZORBAX Eclipse Plus-C18);荧光显微镜(Olympus, BX51);低温离心机;超声仪等。

1.2 实验动物

SPF级雄性Wistar大鼠24只,质量合格证号:440021000,许可证号:SYXK(粤)2010-0056,体质量180~200 g,由南方医科大学实验动物中心提供。动物自然昼夜节律光照,适应性喂养1周后进行实验。

2 实验方案

2.1 分组与处理

将24只大鼠随机分为4组,每组6只。卡马西平分高中低3个剂量组,每次灌胃给药剂量分别为200、100、50 mg·kg⁻¹,灌胃体积为4 ml/只,2次/d;正常对照组给予等体积蒸馏水。连续给药7 d,灌胃期间大鼠自由摄食、饮水。

2.2 取材与处理

各组给药7 d后,于末次给药2 h后,10%水合氯醛麻醉,腹主动脉采血,3000 r/min离心10 min后取血清分装,在NMR实验前于-80℃保存;取肾脏和肝脏组

织,于10%福尔马林液中固定后,进行HE染色,观察组织病理变化。

2.3 卡马西平血药浓度测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱:ZORBAX Eclipse Plus-C18柱(4.6 mm, 150 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(55:45);流速:1.0 ml·min⁻¹;检测波:215 nm;柱温:30℃;进样量:20 μl。

2.3.2 血清样品处理 血清室温解冻,精密量取200 μl至2 ml离心管中,加入600 μl甲醇,涡旋混匀30 s,于4℃、12 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液20 μl进样检测。

2.3.3 标准曲线的建立 精密量取空白血清7份,每份200 μl,各加入卡马西平对照品溶液,其终浓度为1.08、2.16、4.32、8.64、12.96、17.28、21.60 μg·ml⁻¹,然后按血清样品处理方法萃取药物,进行检测。方法学的考察,主要参考文献报道的方法^[11]。

2.4 NMR测量前样品的准备

参照Nicholson^[7]的方法:取出血清,室温解冻,14000 r·min⁻¹离心10 min,取上清400 μl,添加0.1% TSP重水溶液100 μl,于5 mm核磁管中超声混匀,于25℃进行测试。

2.5 NMR数据采集

在Varian INOVA500NB傅里叶变换超导核磁共振谱仪上调用弛豫时间编辑(Carr-Purcell-1-Meiboom-Gill, CPMG)采集小分子信号,扩散编辑(longitudinal eddy-delay, LED)采集蛋白大分子信号。具体参数:采用预饱和方式抑制水峰,饱和时间为2 s,谱宽8000 Hz,混合时间0.15 s,采样点数64 K,累加次数128次;自由感应衰减(freeinduction decay, FID)信号经过32 K傅立叶变换转为一维NMR谱图,所用窗函数为0.5 Hz。以TSP为化学位移参考峰的位置,并定为0 ppm。用Mnova软件对¹H NMR谱图进行基线调整,相位校正,将δ0.4~6.0内的谱图进行分段积分(每段0.04 ppm),同时剔除掉溶剂峰的部分(δ4.6~5.2),将所产生的所有积分数据归一化,以Excel文件格式输出保存,用于模式识别分析。

3 数据分析

将所得到的数据文件用SIMCA-P 10.0软件包(瑞典,Umetrics AB, Umea)进行主成分分析(PCA),必要时行偏最小二乘判别分析(PLS-DA)找出特征差异代谢物。分析结果以得分图和载荷图表示。

4 结果

4.1 组织病理学检查

大鼠肝肾组织病理学变化结果见图1。肾组织中,卡马西平各给药组与正常对照组比较,未见明显病变,肾小球结构正常,未见肿胀变性,间质无炎症细胞浸润

和纤维组织增生。肝组织中,卡马西平高剂量组肝细胞有轻微肿胀,其他组肝细胞形态结构完整,中央静脉未

见扩张,汇管区未见炎性细胞浸润和纤维组织增生。

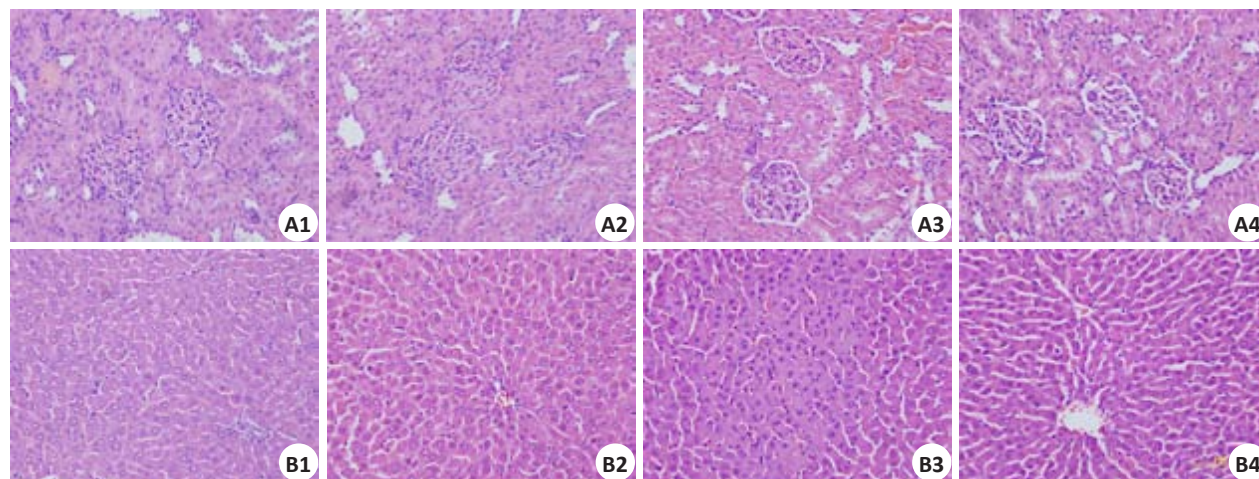


图1 大鼠肝肾组织病理结果

Fig.1 Histopathological examination of the liver and renal tissues in rats (HE staining, original magnification: $\times 100$). A1-A4: Renal tissues in low-, medium-, and high-dose carbamazepine groups and control group, respectively; B1-B4: Liver tissues in low-, medium-, and high-dose carbamazepine groups and control group, respectively.

4.2 卡马西平血药浓度测定

4.2.1 方法学考察 标准曲线建立,以卡马西平对照品的浓度(Y)和峰面积(X)作回归分析,得线性回归方程为 $Y=6.71 \times 10^{-6}X-0.184$, $r=0.9996$ 。卡马西平的线性范围为 $1.08 \sim 21.6 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$,按信噪比以 $S/N=3$ 计,卡马西平的最低检测限为 $0.0165 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。回收率及精密度结果见表1。稳定性试验中,配制含CBZ低、中、高3种浓度的血清各5份,分别在室温(25°C , 24 h)、低温(4°C , 24 h)、3次反复冻融($-20^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$, 24 h内)条件下保存后,各条件下CBZ的回收率分别为 $(97.75 \pm 3.3)\%$ 、 $(98.74 \pm 2.5)\%$ 、 $(94.45 \pm 3.0)\%$,表明样品在上述条件下24 h内稳定性良好。

表1 卡马西平回收率及精密度实验结果

Tab.1 Results of recovery and RSD experiments of CBZ

Added concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Measured concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Recovery percent ($\text{Mean} \pm \text{SD}$, %)	Within-day precision (RSD%)
2.00	2.13 ± 0.078	106.39 ± 3.9	3.7
6.25	5.99 ± 0.16	95.89 ± 2.6	2.7
12.5	12.49 ± 0.16	99.99 ± 1.3	1.3

4.2.2 血药浓度测定 卡马西平对照品、高中低给药组、及正常血清对照组(E)的色谱图见图2。该色谱条件下各组分离良好,内源性物质对测定没有干扰。卡马西平在 10.4 min 左右出峰,峰形良好。经测得卡马西平高中低3个给药组的血药浓度分别为 14.64 ± 1.41 、 8.54 ± 1.19 、 $4.56 \pm 0.64 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$,3个给药组的血药浓度都在线

性范围之内,其中中低剂量组浓度介于治疗窗之间,高剂量组高于治疗窗。

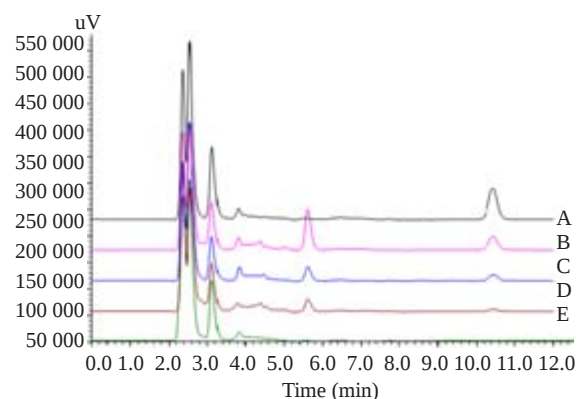


图2 高效液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms. A: CBZ standard; B, C, D: High, medium-, and low-dose carbamazepine groups, respectively; E: Blank serum control group.

4.3 各实验组大鼠血清 ^1H NMR图谱

图3为各实验组大鼠血清的弛豫编辑CPMG和扩散编辑LED ^1H NMR图谱。其中CPMG序列主要检测葡萄糖、氨基酸等小分子化合物的信号,而LED序列主要包括血清中的蛋白质等大分子的信号。由图可以看出,正常对照组与卡马西平高中低3个剂量组之间都存在显著差异。在给药7 d间,卡马西平高中低剂量组大鼠饮食及体质量均无显著性差异,但卡马西平给药组活动相对较少,毛色发黄,其中高、中剂量组有些大鼠眼角膜有不同程度的瘢痕组织形成,推测其与大鼠体内蛋白质代谢物的改变有关。

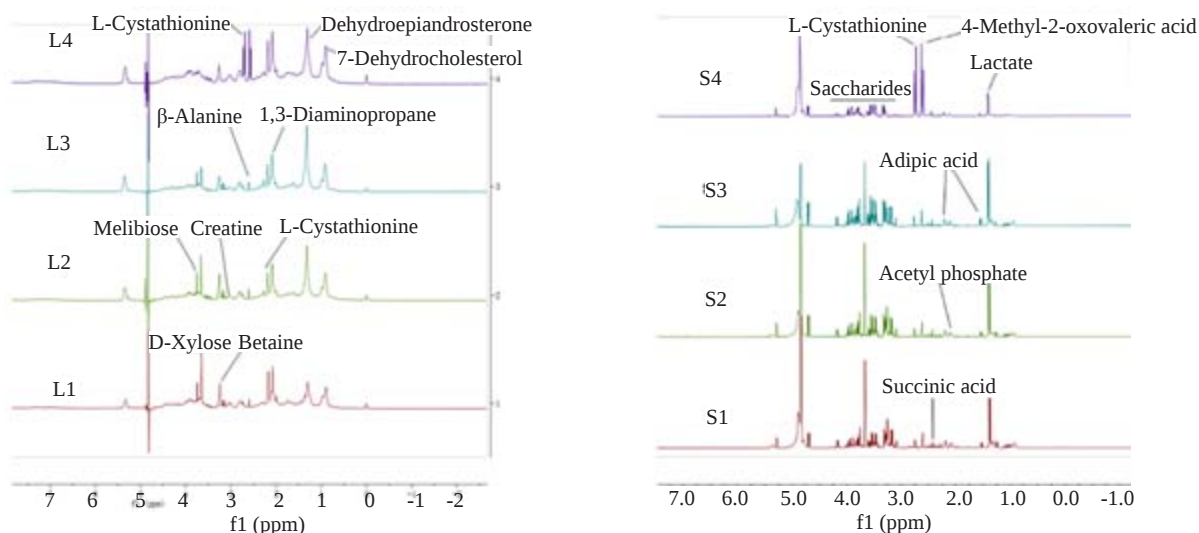


图3 各组大鼠血清LED(L)和CPMG(S)¹H-NMR典型图谱

Fig.3 Typical ¹H-NMR spectra of LED (L1-L4) and CPMG (S1-S4) in serum of rats in each group. (L or S)1-4: Low-, medium-, and high-dose carbamazepine groups and control group, respectively.

4.4 大鼠血清¹H NMR谱模式识别分析

正常对照组与卡马西平高中低剂量组血清的CPMG和LED实验¹H NMR谱的PCA分析结果显示,正常对照组与卡马西平组给药组均能明显区分,卡马西平高中低3个剂量组间也能较好的区分(图4)。CPMG实验中PCA得分图模型参数 $R^2X=0.97$, $Q^2=0.853$,表示该模型能解释因变量97%的信息,模型的可预测程度为85.3%,该模型PCA模型的解释能力较好。LED实验PCA得分图模型参数 $R^2X=0.725$, $Q^2=0.471$,也能较好的解释和预测各变异信息。结合CPMG和LED实验

的¹H NMR谱及因子载荷图分析,卡马西平高剂量组与正常对照组比较,卡马西平高剂量组中丙二胺(3.1、2.07)、去氧皮质酮(1.19、0.7)、脱氢胆固醇(0.88、0.96、5.39)、甜菜碱(3.25)、β-丙氨酸(3.17、2.54)、胱硫醚(3.94、2.71、3.1)、4-甲基-2-戊酮酸(2.60、0.92)、肌酸(3.04)含量下降,糖类(3.42~3.94)、乳酸(1.36)、琥珀酸(2.39)、乙酰磷酸(2.096)、己二酸(2.18、1.54)含量升高。卡马西平高中低3个剂量组之间的代谢物,同样出现了高剂量组与正常对照组之间的变化,变化量介于两者之间。

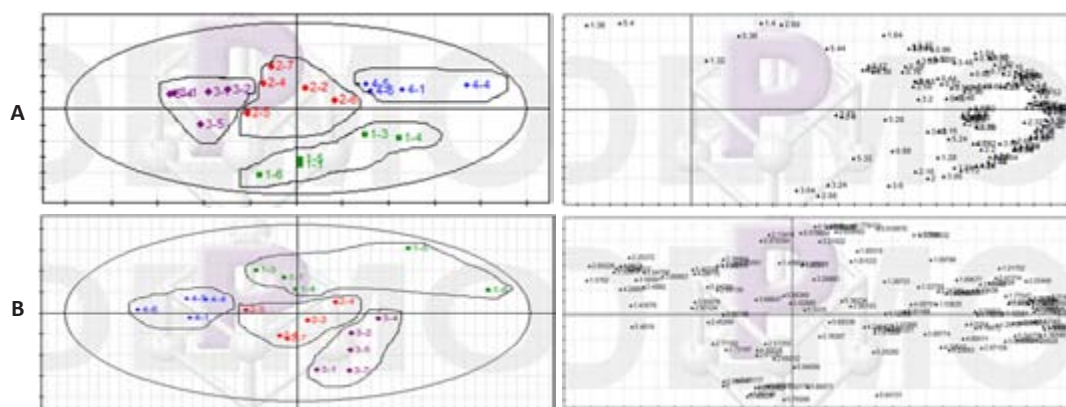


图4 正常对照组与卡马西平组大鼠血清LED(A)和CPMG(B)¹H-NMR图谱数据模式识别分析(左)及相应因子载荷图(右)

Fig.4 PCA scores (left) and loading plots (right) derived from LED (A) and CPMG (B) ¹H-NMR data for each group. 1-1~1-6: CBZ low dose group; 2-2~2-7: CBZ medium dose group; 3-1~3-7: CBZ high dose group; 4-1~4-6: Blank serum control group.

5 讨论

本研究通过代谢组学技术,分析卡马西平不同给药浓度所引起的血清代谢物的变化。通过HPLC测量血药浓度与NMR分析代谢物的结合,更能准确反应出卡

马西平不同浓度所引起体内相应内源性代谢物的改变。常规的病理切片显示,当大鼠卡马西平血药浓度达到 $14.64 \pm 1.41 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时,肝脏只有轻微的肿胀,无其他明显的病理变化,肾脏毒性更是不明显。而¹H NMR图

谱中,卡马西平给药组和正常对照组之间存在显著代谢产物差异;在模式识别分析所得到的积分矩阵图中,样品集中分布于95%的可信区间,所建模型的精度和预测能力都较好,说明建立的模型为卡马西平的临床用药监测,以及对其可能诱发的副作用做出初期预判提供了可能。

在¹H NMR图谱中可以发现丙二胺、去氧皮质酮、脱氢胆固醇、甜菜碱、β-丙氨酸、胱硫醚、4-甲基-2-戊酮酸、肌酸、乳酸、糖类、琥珀酸、乙酰磷酸、己二酸、邻苯二甲酸二乙酯的谱峰峰形改变较为明显。在糖代谢方面,卡马西平给药组较正常对照组糖类物质、乳酸和琥珀酸的浓度普遍升高,琥珀酸和乳酸是三羧酸循环能量代谢及糖酵解的产物。糖类物质浓度升高说明糖代谢异常,乳酸水平上升提示糖酵解过程增强,造成乳酸堆积^[12-13],综合说明了能量代谢失调。

在氨基酸代谢方面,丙氨酸是体内重要的非必须氨基酸。有研究显示其代谢异常与肾小球的滤过和回收功能有关^[14],丙二胺为丙氨酸催化合成的前提,4-甲基-2-戊酮酸为异亮氨酸的代谢产物,三者下降都说明氨基酸代谢异常。甜菜碱在哺乳动物的肝肾中起着维持渗透压和甲基化的重要催化剂作用,它作为甲硫氨酸循环过程中的甲基供体,通过提供甲基使同型半胱氨酸转化为甲硫氨酸,从而对心血管产生有益或有害的作用^[15]。同时,同型半胱氨酸可以通过胱硫醚-β-合成酶催化生成胱硫醚,当与丝氨酸结合后,胱硫醚被催化形成半胱氨酸,后者进一步降解生成牛磺酸和硫酸^[16]。丙氨酸、甜菜碱和胱硫醚水平较低,提示氨基酸代谢水平低可能是卡马西平给药后的生物标志之一。除此之外,7-脱氢胆固醇是由胆固醇在肝脏中转化而来,它可转变为维生素D3,从而进一步生成骨化三醇。7-脱氢胆固醇浓度的降低,说明卡马西平给药大鼠的脂代谢异常。去氧皮质酮是一种盐皮质激素,它是醛固酮合成的前体,其浓度的降低提示激素代谢失调^[17]。

综上所述,本研究通过¹H NMR技术分析了卡马西平给药大鼠血清代谢物的变化,这为卡马西平的临床药物监测和用药安全提供了依据。本研究表明,给卡马西平后大鼠糖代谢、氨基酸代谢和脂代谢等都提示异常,但各种异常代谢标志物所引起的治疗作用或是毒副作用机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Wang Q, Zhou JQ, Zhou LM, et al. Association between HLA-B*1502 allele and carbamazepine-induced severe cutaneous adverse

reactions in Han People of southern China mainland[J]. Seizure, 2011, 20(6): 446-8.

- [2] Guo XZ, Wu XY, Yu PM, et al. Standardized medication strategy for new diagnosed epilepsy[J]. Zhonghua Shen Jing Ge Za Zhi, 2011, 44(1): 6-9.
- [3] Lin YT, Chang YC, Hui RC, et al. A patch testing and cross-sensitivity study of carbamazepine-induced severe cutaneous adverse drug reactions[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2013, 27(3): 356-64.
- [4] Hung SI, Chung WH, Jee SH, et al. Genetic susceptibility to carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions [J]. Pharmacogenet Genomics, 2006, 16(4): 297-306.
- [5] Kim SH, Lee KW, Song WJ, et al. Carbamazepine-induced severe cutaneous adverse reactions and HLA genotypes in Koreans [J]. Epilepsy Res, 2011, 97(1/2): 190-7.
- [6] 白景清, 程翼宇. 代谢组学及其在新药毒理研究中的应用[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(21): 1601-4.
- [7] Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts[J]. Nat Protoc, 2007, 2(11): 2692-703.
- [8] Wang L, Chen J, Chen L, et al. ¹H-NMR based metabonomic profiling of human esophageal cancer tissue[J]. Mol Cancer, 2013, 12: 25.
- [9] Le Moyec L, Mille-Hamard L, Triba MN, et al. NMR metabolomics for assessment of exercise effects with mouse biofluids [J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 404(2): 593-602.
- [10] Aranibar N, Ott KH, Roongta V, et al. Metabolomic analysis using optimized NMR and statistical methods [J]. Anal Biochem, 2006, 355(1): 62-70.
- [11] 钟诗龙, 黎曙霞, 任 斌, 等. 用HPLC法和TDx法测定卡马西平血清浓度的相关性研究[J]. 中国药房, 2003, 14(4): 223-4.
- [12] Constantinou MA, Theocharis SE, Mikros E. Application of metabonomics on an experimental model of fibrosis and cirrhosis induced by thioacetamide in rats[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2007, 218(1): 11-9.
- [13] Dutta M, Joshi M, Srivastava S, et al. A metabonomics approach as a means for identification of potential biomarkers for early diagnosis of endometriosis[J]. Mol Biosyst, 2012, 8(12): 3281-7.
- [14] 刘卫红, 颜贤忠, 张 蕾, 等. 代谢组学技术在高脂血症及动脉粥样硬化痰瘀演变研究中的应用[J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(5): 684-6.
- [15] 江春迎, 杨康敏, 杨 柳, 等. 金黄地鼠动脉粥样硬化发展过程中的NMR代谢组学研究[J]. 药学报, 2013(4): 495-502.
- [16] Lourenço R, Camilo ME. Taurine: a conditionally essential amino acid in humans? An overview in health and disease[J]. Nutr Hosp, 2003, 17(6): 262-70.
- [17] Sokol SI, Portnay EL, Curtis JP, et al. Modulation of the renin-angiotensin-aldosterone system for the secondary prevention of stroke[J]. Neurology, 2004, 63(2): 208-13.

(编辑:黄开颜)