

罗沙司他和恩那度司他对环孢素 A 在大鼠体内药动学特征的影响及其功能验证

徐嘉浩, 秦浩冉, 杨旭萍, 戚听听, 蒋 艳, 薛 晖, 胡 楠*
常州市第一人民医院 药学部, 江苏 常州 213003

摘要: **目的** 探究罗沙司他和恩那度司他对环孢素 A 大鼠体内药动学特征的影响, 并初步探究二者联用导致药动学变化的潜在作用机制, 为临床两类药物联合用药的安全性、合理性提供实验依据。**方法** 将 18 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组、罗沙司他组和恩那度司他组, 分别连续 7 d ig 给予 0.9% 氯化钠溶液、罗沙司他 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、恩那度司他 ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 末次给药后 30 min 后均 ig 给予环孢素 A ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。采用高效液相色谱串联质谱法 (HPLC-MS/MS) 测定大鼠不同时间点环孢素 A 血药浓度, 拟合药时曲线并计算药动学参数; 通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测大鼠肝脏低氧诱导因子 (HIF)-1 α 、细胞色素 P450 3A 酶 (CYP3A) 1/2 及小肠 P-糖蛋白 (P-gp) 的 mRNA 表达水平, 采用 Western blotting 检测肝脏 HIF-1 α 、CYP3A1 的蛋白表达水平。**结果** 药动学方面, 与对照组相比, 罗沙司他组和恩那度司他组的药-时曲线下面积 (AUC)_{0-t}、AUC_{0- ∞} 和峰浓度 (C_{max}) 显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), 清除率 (CL) 显著降低 ($P < 0.05$), 罗沙司他组 CL 降低 54.78%, 恩那度司他组 CL 降低 94.78%, 达峰时间 (t_{max}) 和半衰期 ($t_{1/2}$) 无显著性差异。分子水平方面, 与对照组相比, 罗沙司他组、恩那度司他组大鼠肝脏 HIF-1 α mRNA 表达无显著差异, 蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$); 肝脏 CYP3A1 的 mRNA 和蛋白表达、CYP3A2 的 mRNA 表达均显著降低 ($P < 0.05$); 小肠 P-gp 的 mRNA 表达无显著改变 ($P > 0.05$)。**结论** 罗沙司他和恩那度司他可显著提高大鼠体内环孢素 A 的全身暴露量、降低其清除率。该作用可能通过翻译后水平稳定肝脏 HIF-1 α 蛋白, 进而下调肝脏 CYP3A1/2 的表达, 抑制环孢素 A 的肝脏代谢清除实现。临床联用使用罗沙司他/恩那度司他与环孢素 A 时, 需密切监测环孢素 A 血药浓度并及时调整剂量, 减少药物蓄积引发的不良反应, 保障用药安全。

关键词: 罗沙司他; 恩那度司他; 环孢素 A; 药动学; 药物相互作用; CYP3A1

中图分类号: R969.1; R969.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)05-1632-09

DOI:10.7501/j.issn.1674-6376.2026.05.014

Study on effects and mechanisms of roxadustat and ennaduostat on pharmacokinetics of cyclosporine A in rats

XU Jiahao, QIN Haoran, YANG Xuping, QI Tingting, JIANG Yan, XUE Hui, HU Nan
Department of Pharmacy, the First People's Hospital of Changzhou, Changzhou 213003, China

Abstract: Objective To investigate the effects of roxadustat and ennaduostat on the pharmacokinetic characteristics of cyclosporine A in rats and to preliminarily explore the potential mechanism of the pharmacokinetic changes caused by their combination, providing experimental evidence for the safety and rationality of the clinical combination of these two drugs. **Methods** Eighteen male SD rats were randomly divided into the control group, roxadustat group, and ennaduostat group. They were intragastrically administered 0.9% sodium chloride solution, roxadustat ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and ennaduostat ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) for 7 consecutive days, respectively. Thirty minutes after the last administration, all groups were ig administered cyclosporine A ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). The blood concentration of cyclosporine A at different time points was determined by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), and the pharmacokinetic parameters were calculated by fitting the drug-time curve. The mRNA expression levels of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α , cytochrome P450 3A enzymes (CYP3A) 1/2 in the liver and P-glycoprotein (P-gp) in the small intestine were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR), and the protein expression levels of HIF-1 α and CYP3A1 in the liver were detected by Western blotting. **Results** In terms of pharmacokinetics, compared with the control group, the area under the drug-time

收稿日期: 2026-02-27

基金项目: 常州市科技计划项目 (应用基础研究指导性) (CJ20242020); 江苏省药学会-奥赛康医院药学科研基金资助项目 (A202424)

作者简介: 徐嘉浩, 男, 硕士, 药师, 研究方向为治疗药物监测与临床药学。E-mail: Xujiahao19971016@163.com

*通信作者: 胡 楠, 女, 博士, 主任药师, 研究方向为治疗药物监测与临床药学。E-mail: hn_324@163.com

curve (AUC)_{0-t}、AUC_{0-∞}, and peak concentration (C_{\max}) were significantly increased in the roxadustat group and the ennaduostat group ($P < 0.01, 0.001$), and the clearance rate (CL) was significantly decreased ($P < 0.05$). The CL in the roxadustat group decreased by 54.78%, and that in the ennaduostat group decreased by 94.78%. There was no significant difference in the time to peak concentration (t_{\max}) and half-life ($t_{1/2}$). At the molecular level, compared with the control group, there was no significant difference in the mRNA expression of *HIF-1 α* in the liver of the roxadustat group and the enadutamide group, but the protein expression was significantly increased ($P < 0.05$). The mRNA and protein expression of CYP3A1 and the mRNA expression of *CYP3A2* in the liver were significantly decreased ($P < 0.05$). There was no significant change in the mRNA expression of *P-gp* in the small intestine ($P > 0.05$). **Conclusion** Roxadustat and ennaduostat can significantly increase the systemic exposure of cyclosporine A in rats and decrease its clearance rate. This effect may be achieved by stabilizing the protein expression of HIF-1 α at the post-translational level in the liver, thereby down-regulating the expression of CYP3A1/2 in the liver and inhibiting the hepatic metabolic clearance of cyclosporine A. When roxadustat/ ennaduostat and cyclosporine A are used in combination clinically, the blood concentration of cyclosporine A should be closely monitored and the dose adjusted in a timely manner to reduce adverse reactions caused by drug accumulation and ensure the safety of medication.

Key words: roxadustat; ennaduostat; cyclosporine A; pharmacokinetics; drug interactions; CYP3A1

环孢素是一种高效免疫抑制剂,广泛应用于器官移植术后抗排斥反应及多种自身免疫性疾病的治疗^[1]。但由于其治疗指数较窄,且个体内、个体间药动学差异显著,临床需常规开展治疗药物监测(TDM),以降低移植排斥反应发生率、提高患者存活率,并减少药物不良反应^[2]。此外,环孢素口服吸收存在缓慢、不完全及个体差异大等特点,其生物利用度仅约 30%^[3]。值得注意的是,环孢素不仅是 CYP3A 酶和 P-糖蛋白(P-gp)的代谢底物,同时也是经典的 P-gp 抑制剂^[4]。大鼠 CYP3A 存在多种亚型,其中 *CYP3A1* 是人 *CYP3A4* 的正向同源基因,且被证实具有与人 CYP3A4 相似的功能^[5]。因此,当环孢素与可改变 CYP3A 酶及 P-gp 功能的药物联用时,可能会改变其体内代谢与吸收过程,进而影响治疗效果。

移植后贫血(PTA)是器官移植术后常见并发症之一。相关研究显示,移植后 1 个月内贫血发生率接近 90%,术后 6 个月发生率约为 70%,术后 1 年发生率降至 10%~40%,而术后 5 年发生率仍高达 33.1%^[6]。

低氧诱导因子-脯氨酸羟化酶抑制剂(HIF-PHI)是一类通过模拟低氧环境促进内源性促红细胞生成素(EPO)合成的新型贫血治疗药物^[7-8]。近年来,以罗沙司他、恩那度司他为代表的新型 HIF-PHI 已在全球范围内获批用于慢性肾脏病(CKD)相关贫血的治疗,且在肾性贫血治疗中得到广泛应用^[9]。与此同时,环孢素作为经典免疫抑制剂,常用于肾移植术后抗排斥反应等治疗,使得临床上 2 类药物联合应用的场景日益增多。而环孢素的药动学过程

易受 CYP3A 酶、P-gp 功能调控,且已有研究提示 HIF-PHI 可影响 CYP3A4 表达,这也提示二者联用可能存在药动学相互作用^[10]。然而,目前关于罗沙司他、恩那度司他与环孢素之间的药动学相互作用及其机制研究仍较为匮乏。已有研究报道,HIF-PHI 可通过稳定 HIF- α , 显著降低人肝细胞中 CYP3A4 的 mRNA 及蛋白表达水平^[10];同时临床研究发现,罗沙司他与环孢素联用时,可导致环孢素血药谷浓度明显升高^[11]。但截至目前,关于罗沙司他、恩那度司他与环孢素药动学相互作用的具体机制及作用程度,仍缺乏系统性研究。因此,探究罗沙司他、恩那度司他对环孢素药动学的影响及相关机制,可为临床两类药物联合用药的安全性、合理性提供实验支撑。

基于上述背景,本研究旨在通过大鼠体内实验,阐明两种 HIF-PHI 对环孢素药动学行为的影响,并探讨其潜在作用机制(如代谢酶抑制、肠道吸收改变等),为临床合理联用 HIF-PHI 与环孢素提供理论依据,进而降低治疗风险、优化给药方案。

1 材料

1.1 药品及试剂

环孢素 A 注射液(5 mL:250 mg,批号 P1443)购自瑞士诺华制药有限公司;罗沙司他胶囊(规格 50 mg,批号 525085)由珐博进中国医药技术开发有限公司提供;恩那度司他片(规格 1 mg,批号 B240727)由深圳信立泰药业股份有限公司提供。对照品环孢素 A(批号 2-TVG-410-3,质量分数 98%)由 Cmass 公司供应;子囊霉素(批号 1-OBI-122-2,质量分数 95%)购自 Toronto Research Chemicals 公

司。CYP3A11 抗体 (批号 ab3572) 购自英国 Abcam 公司; β -actin 抗体 (批号 AF7018) 购自 Affinity 公司; 羊抗兔 IgG-HRP (批号 BK0027) 购自贝斯特生物公司; PCR 引物购自上海捷瑞生物工程有限公司; 肽段定量试剂盒 (货号 23275) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 仪器

Triple Quad 4500MD 三重四级杆串联质谱仪、Jasper 高效液相色谱系统 (美国 SCIEX 公司); Bio-Rad 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); Tanon 4600 化学发光图像分析系统 (上海天能科技有限公司); Spectra Max iD3 多功能酶标仪 (英国 Molecular Devices 公司); ProFlex™ PCR 扩增仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); DS-11FX 超微量荧光分光光度计 (美国 DeNovix 公司); QuantStudio 5 实时荧光定量 PCR 仪 (qRT-PCR, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.3 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 200~220 g, 由江苏科标医学检测有限公司提供, 实验动物使用许

可证号 SYXK (苏) 2021-0013。动物饲养于 SPF 级环境中, 室温维持在 (25±2) °C, 湿度范围为 40%~70%, 光照周期为 12 h 明/12 h 暗, 自由摄食饮水。实验方案经常州市第一人民医院动物伦理委员会批准 (批准号 IACUC25-0255)。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件 采用 Phenomenex Kinetex® C₁₈ 色谱柱 (100 mm×3 mm, 2.6 μ m); 流动相为 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵的 0.1% 甲酸水溶液 (A)-0.1% 甲酸甲醇溶液 (B), 梯度洗脱: 0~0.8 min, 40% B, 0.8~2.0 min, 40%→100% B; 2.0~3.8 min, 100% B; 3.8~4.0 min, 100% B→40% B; 4~5 min, 40% B; 进样量 5 μ L; 体积流量 0.55 mL·min⁻¹; 柱温 40 °C。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾离子源 (ESI) 在正离子模式, 结合多反应监测 (MRM) 技术进行扫描。关键质谱参数被详细设定: 毛细管电压设定为 5 500 V, 离子源温度则保持在 550 °C, 雾化气与辅助气的压力均被调至 345 kPa, 气帘气为 207 kPa, 而碰撞气设为 55 kPa。待测物质及内标的关键参数见表 1。

表 1 待测成分质谱参数

Table 1 Parameters of spectrum of component to be measured

化合物	母离子 m/z	子离子 m/z	碰撞电压/V	去簇电压/V	t/min
环孢素 A	1 202.8	1 184.8	40	210	3.30
子囊霉素 (内标)	809.5	756.6	30	100	3.13

2.2 对照品及内标溶液的配制

2.2.1 对照品储备液的制备 精密称取环孢素 A 对照品适量, 以甲醇为溶剂溶解并定量稀释, 配制质量浓度为 5 mg·mL⁻¹ 的环孢素 A 对照品储备液, 均置于 -20 °C 条件下冷藏保存, 备用。临用前, 取环孢素 A 对照品储备液, 以甲醇为稀释剂进行逐级稀释, 制备得到质量浓度为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 μ g·mL⁻¹ 的系列环孢素 A 对照品工作液, 同时配制质量浓度为 1.0、2.0、10.0 μ g·mL⁻¹ 的环孢素 A 质控工作液。

2.2.2 内标溶液的制备 精密称取子囊霉素对照品适量, 以甲醇为溶剂溶解并定量稀释, 配制质量浓度为 2.5 mg·mL⁻¹ 的内标储备液, 均置于 -20 °C 条件下冷藏保存, 备用。临用前, 取子囊霉素储备液, 以甲醇稀释成质量浓度为 0.02 μ g·mL⁻¹ 的内标工作液。

2.3 给药与全血样本采集

将 18 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组、罗沙司他组及恩那度司他组, 每组 6 只。实验开始前所有大鼠禁食 12 h, 期间自由饮水。对照组大鼠 ig 给予 0.9% 氯化钠溶液; 罗沙司他组 ig 给予罗沙司他 (10 mg·kg⁻¹, 以 0.9% 氯化钠溶液溶解)^[12]; 恩那度司他组 ig 给予恩那度司他 (1 mg·kg⁻¹, 以 0.9% 氯化钠溶液溶解)^[13]。3 组均连续给药 7 d, 末次给药前禁食不禁水 12 h; 末次给药后 30 min, 各组均给予环孢素 A 10 mg·kg⁻¹^[13]。

给予环孢素 A 后, 分别于 0.25、0.50、0.75、1.00、2.00、3.00、4.00、6.00、8.00、10.00、12.00、24.00 h 经眼眶静脉丛采集 100 μ L 血液样本, 置于含肝素钠的 1.5 mL EP 管中, 4 °C 保存待测, 收集肝脏和空肠组织样本保存于 -80 °C 和 RNAlater 保存液中^[13]。

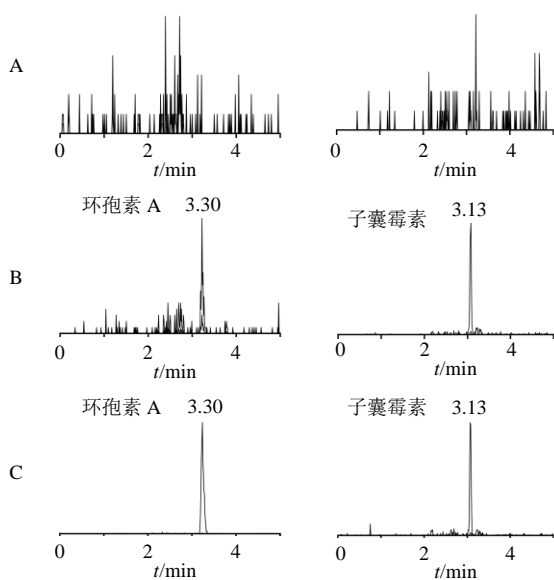
2.4 血浆样品的处理

精密吸取各组大鼠血浆样品 50 μL , 置于 1.5 mL 离心管中, 依次加入 5 μL 内标工作液(0.02 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和 150 μL 甲醇-乙腈(90:10)溶液, 涡旋混匀 3 min, 16 400 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 10 min。随后取 50 μL 上清液至新离心管, 加入 50 μL 纯水稀释, 再次离心后取上清液分析。

2.5 方法学验证

2.5.1 专属性考察

取大鼠空白血浆、空白血浆+对照品溶液(环孢素 A 浓度均为 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、给药 0.5 h 后的含药血浆适量, 并按“2.4”项下方法处理后进行分析。结果显示, 在该分析条件下, 环孢素 A、子囊霉素(内标)出峰时间分别为 3.30、3.13 min, 且空白基质中均未出现明显内源性干扰峰, 表明该方法具有良好专属性。见图 1。



A-空白血浆样品; B-加入对照品溶液的血浆样品; C-给药 0.5 h 后的血浆样品。

A-blank plasma sample; B-plasma mixed with reference standard; C-plasma after 0.5 h of administration.

图 1 大鼠血浆中环孢素 A 与子囊霉素的 MRM 色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of cyclosporine A and ascromycin in rat plasma

2.5.2 线性关系考察

取“2.2”项下的对照品溶液 5 μL , 分别与 45 μL 的空白血浆混合, 按“2.4”项方法处理。以待测物与内标峰面积比值(Y)对全血中实际质量浓度(X)进行加权回归分析, 权重系数 $1/\chi^2$, 拟合回归方程为 $Y=2.822\ 31 X-0.016\ 39$, $r=0.991\ 57$, 线性范围 0.05~2.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 定量下限 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.5.3 精密度及准确度考察

取大鼠空白血浆 45 μL , 加入环孢素 A 低、中、高 3 个质量浓度的对照品溶液 5 μL , 按“2.4”项方法处理, 配制环孢素 A 低、中、高质量浓度的质控样本, 每个质量浓度平行制备 6 份, 通过测定环孢素 A 以及内标物的色谱峰面积比值, 利用预先建立的标准曲线计算其在全血中的质量浓度。在此基础上, 连续测定 3 批(分 3 d 进行), 对日内和日间精密度和准确度进行考察。结果显示, 待测物准确度为 99.88%~114.41%, 批内和批间精密度 RSD 均小于 15%, 表明该方法准确度与精密度满足生物样本定量分析要求。见表 2。

2.5.4 提取回收率及基质效应考察

取大鼠空白全血 45 μL , 加入低、中、高 3 个浓度的环孢素 A 对照品溶液 5 μL , 按“2.4”项方法处理, 按“2.1”项下方法进样分析, 测定各成分峰面积, 记为 A_1 ; 取空白血浆 45 μL , 按“2.4”项下方法处理后, 取上清液分别加入低、中、高质量浓度的环孢素 A 对照品溶液, 涡旋混匀, 平行制备 6 份, 按“2.1”项下条件进样分析, 测定各成分峰面积, 记为 A_2 ; 在不添加血浆基质的情况下, 平行制备 6 份高、中、低 3 个质量浓度的对照品溶液各 100 μL , 按“2.4”项下方法处理, 取上清液, 按“2.1”项下条件进样分析, 测定各成分峰面积, 记为 A_3 。计算提取回收率(A_1/A_2)和基质效应(A_2/A_3), 结果见表 3, 低、中、高 3 个质量浓度下, 环孢素 A 的提取回收率均在 79.27%~85.19%, $\text{RSD}\leq 13.62\%$; 基质效应均在 130.52%~143.19%, $\text{RSD}\leq 9.37\%$ 。以上结果表明,

表 2 环孢素 A 准确度和精密度

Table 2 Accuracy and precision of cyclosporine A

质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	日内($n=6$)			日间($n=18$)		
	实测质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	准确度/%	RSD/%	实测质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	准确度/%	RSD/%
0.1	0.11	112.84	11.98	0.10	99.88	12.87
0.2	0.23	113.25	7.47	0.22	109.36	10.92
1.0	1.11	111.44	5.62	1.14	114.41	9.14

表 3 环孢素 A 提取回收率和基质效应结果 (n=6)
Table 3 Recovery and matrix effect of cyclosporine A (n=6)

质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	提取回收率/%	提取回收率 RSD/%	基质效应/%	基质效应 RSD/%
0.1	85.19 \pm 8.34	9.79	143.19 \pm 6.29	4.39
0.2	82.67 \pm 8.90	10.77	135.66 \pm 9.46	6.97
1.0	79.27 \pm 10.80	13.62	130.52 \pm 12.23	9.37

该方法前处理适用于目标物的提取,且基质中内源性物质的影响较为稳定。

2.5.5 稳定性考察 取大鼠空白全血 45 μL ,并将其配制成低、中、高 3 种质量浓度水平的环孢素 A 的血浆样品,每个质量浓度平行制备 3 份,考察不

同储存条件下(室温放置 72 h、-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻融循环 3 次、4 $^{\circ}\text{C}$ 自动进样器中放置 72 h)样品的稳定性,结果见表 4,在所有储存条件下,各组质量浓度的 RSD 均在 $\pm 14.52\%$ 以内,表明环孢素 A 在各储存条件下稳定性良好。

表 4 环孢素 A 稳定性考察结果 (n=6)
Table 4 Results of the stability study of cyclosporine A (n=6)

质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	室温放置 72 h		4 $^{\circ}\text{C}$ 存放 72 h		-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻融 3 次	
	实测质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	准确度/%	实测质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	准确度/%	实测质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	准确度/%
0.1	0.11	105.61	0.09	90.87	0.09	85.48
0.2	0.20	99.81	0.18	90.48	0.19	92.69
1.0	1.07	107.05	1.01	101.15	0.99	98.60

2.6 药动学研究

连续 7 d 给予罗沙司他及恩那度司他后,3 组环孢素 A 的血药浓度-时间曲线见图 2,药动学参数见表 5。与对照组相比,罗沙司他组和恩那度司他组的药时曲线下面积(AUC) $_{0\sim t}$ 、AUC $_{0\sim\infty}$ 和峰浓度(C_{max})显著升高($P<0.01$ 、 0.001),清除率(CL)明显降低($P<0.05$),达峰时间(t_{max})和半衰期($t_{1/2}$)无显著性差异。罗沙司他组 AUC $_{0\sim t}$ 增加了 0.9 倍, AUC $_{0\sim\infty}$ 增加了 1.24 倍, C_{max} 增加了 0.90 倍, CL 降低了 54.78%;恩那度司他组 AUC $_{0\sim t}$ 增加了 0.69 倍, AUC $_{0\sim\infty}$ 增加了 0.88 倍, C_{max} 增加了 0.70 倍, CL 降低了 94.78%。

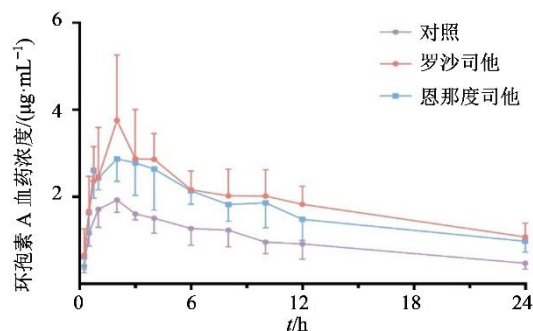


图 2 各组大鼠全血中环孢素 A 血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Concentration-time curves of cyclosporine A in blood of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表 5 主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 5 Key pharmacokinetic parameters ($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	单位	对照	罗沙司他	恩那度司他
AUC $_{0\sim t}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$	23.78 \pm 5.89	45.27 \pm 8.12**	40.16 \pm 7.58***
AUC $_{0\sim\infty}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$	31.82 \pm 8.88	71.42 \pm 22.67**	59.91 \pm 15.27**
t_{max}	h	1.80 \pm 0.84	1.79 \pm 0.51	2.13 \pm 1.22
C_{max}	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	2.01 \pm 0.22	3.81 \pm 1.45***	3.41 \pm 0.65*
CL	$\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	333.98 \pm 91.62	151.01 \pm 42.87***	17.45 \pm 3.68**
$t_{1/2}$	h	12.02 \pm 0.88	16.34 \pm 6.26	14.53 \pm 2.61

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ 。
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group.

2.7 Western blotting 检测大鼠肝脏组织 HIF-1 α 和 CYP3A1 蛋白表达

按蛋白提取说明书提取总蛋白样本。经蛋白 BCA 试剂定量后, 97 °C、10 min 变性。加入 5 \times 十二烷基硫酸钠 (SDS) 上样缓冲液, 10% SDS-PAGE 先电泳 80 V 1 h, 后转为 120 V 0.5 h, 0.32 A 1 h 转膜, 5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 1.5 h。TBST 清洗 7 min \times 4 次, 加入 HIF-1 α /CYP3A1 一抗 (1:1 000) 稀释, 4 °C 孵育过夜。TBST 清洗 7 min \times 4

次, 加入二抗 (1:2 000) 孵育 1.5 h, 再用 TBST 清洗 7 min \times 4 次。蛋白使用 ECL 显影, 于 Tanon 4600 化学发光图像分析系统中曝光。采用 Image J 图像分析软件分析结果, 测得条带的灰度值, 计算目的条带 HIF-1 α /CYP3A1 和内参 β -actin 的比值。

结果见图 3, 与对照组相比, 罗沙司他组和恩那度司他组大鼠肝脏中 HIF-1 α 的蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$), CYP3A1 的蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$)。

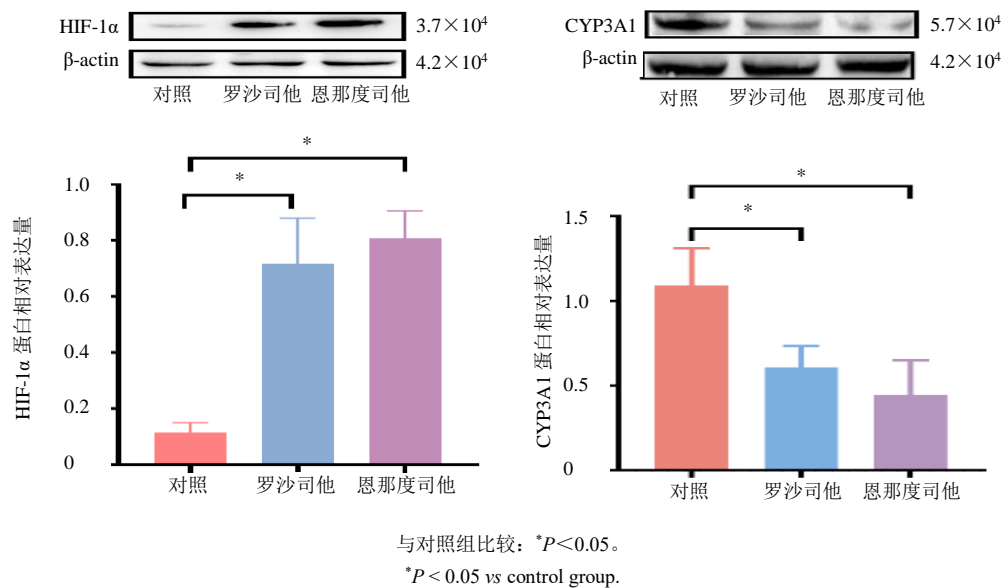


图 3 各组大鼠肝脏中 HIF-1 α 、CYP3A1 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 HIF-1 α and CYP3A1 protein expression in livers of rats from each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.8 qRT-PCR 实验检测肝脏组织 HIF-1 α 、CYP3A1、CYP3A2 和小肠组织 P-gp mRNA 表达水平

取肝脏组织/小肠组织, 按试剂盒说明书提取总 RNA, 测定 RNA 浓度与纯度。按试剂盒操作说明, 反转录为 cDNA 后进行扩增。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 10 s、60 °C 30 s, 共 40 个循环, 引物序列见表 6。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量。

结果见图 4, 与对照组相比, 罗沙司他组和恩那度司他组大鼠肝脏中 HIF-1 α 、P-gp 的 mRNA 的表达水平均无显著差异 ($P > 0.05$); CYP3A1、CYP3A2 的 mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.001)。

2.9 统计学方法

采用 WinNonlin 6.0 软件对测得的血药浓度-时间进行处理与拟合从而获得药动学参数, 所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 t 检验或单因素方差分析

表 6 引物序列

Table 6 Primer sequences

名称	序列 (5'→3')	
HIF-1 α	F: CGGACAACCTCACCAGACAG	R: TGCTGCTTGAAAAAGGGAGC
CYP3A1	F: CTTTCCATTTCCTCAGCCAG	R: TAGGGCTGTATGAGATTCTTTGT
CYP3A2	F: CCGACTTGGAACCCATAGACA	R: AACACAGGCGTTTGACCATC
P-gp	F: CGCTCCCACTTATGATGCTG	R: TACGTGGTCATTTCGTCTCCTCC
GAPDH	F: AGAGACAGCCGCATCTTCTT	R: TTCTCAGCCTTGACTGTGCC

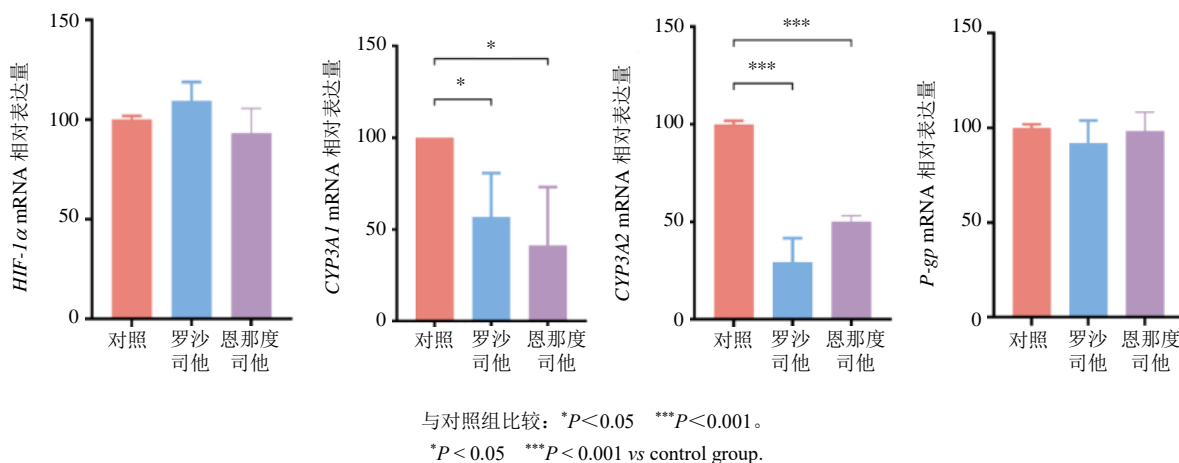


图 4 各组大鼠肝脏中 HIF-1α、CYP3A1、CYP3A2、P-gp mRNA 相对表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Relative expression levels of HIF-1α, CYP3A1, CYP3A2, and P-gp mRNA in livers of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

(One-way ANOVA) 方法对数据进行统计学分析, $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

3 讨论

本研究探讨了罗沙司他和恩那度司他 2 种新型 HIF-PHI 对大鼠体内环孢素 A 药动学的影响及其潜在作用机制。结果显示, 罗沙司他和恩那度司他可显著增加环孢素 A 的全身暴露水平, 具体表现为 AUC 及 C_{max} 显著升高, 而 CL 显著降低。进一步机制研究表明, 2 种药物可在翻译后水平稳定肝脏缺 HIF-1α 蛋白, 进而下调 CYP3A1 的 mRNA 和蛋白、CYP3A2 的 mRNA 表达水平, 而对小肠 P-gp 的 mRNA 表达无显著影响。该发现为 HIF-PHI 与环孢素 A 联合用药时的临床监测提供了重要实验依据。

本团队前期临床研究^[14]发现, 合用罗沙司他后, 患者环孢素 A 的血药浓度-剂量比从 $(39.70 \pm 11.81) \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$ 显著升高至 $(49.86 \pm 19.75) \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$ ($P < 0.05$)。其中, 6 例 (75%) 患者出现该比值升高, 4 例 (50%) 患者的升高幅度达到合用前的 1.40~1.62 倍。鉴于环孢素 A 治疗窗狭窄, 其血药浓度升高可能增加肾毒性风险, 因此这一临床发现具有明确的临床警示意义。

为验证该临床观察、排除混杂因素, 本研究通过体内药动学实验, 探究罗沙司他和恩那度司他对大鼠体内环孢素 A 处置过程的影响。结果显示, 与对照组相比, 2 种药物处理组大鼠的环孢素 A AUC 及 C_{max} 均显著升高, CL 显著降低, 提示 2 药可抑制环孢素 A 的代谢消除, 导致其体内蓄积增加; 而 t_{max} 和 $t_{1/2}$ 无显著差异, 表明药物吸收速率及消除半衰期未发生改变, 进一步证实环孢素 A 暴露量增加

的核心原因是代谢清除能力下降, 明确了 HIF-PHI 对环孢素 A 代谢消除的抑制作用。

此外, 本研究发现罗沙司他组大鼠环孢素 A 的 CL 较对照组降低 94.78%, 降幅远超典型 CYP3A 抑制剂 (如酮康唑的抑制幅度通常 $< 90\%$)^[15]。推测其可能机制包括: (1) 实验动物个体差异 (如 CYP3A 低表达) 可能放大了环孢素 A 的蓄积效应; (2) 恩那度司他可能通过 HIF-1α/叉头框蛋白 O3 (FOXO3) 通路调控药物代谢酶, 形成时间相关性抑制叠加效应^[16]。尽管该现象可能源于小样本偏倚, 但仍建议扩大样本量进一步验证, 并明确恩那度司他对环孢素 A 代谢通路的剂量-效应关系。

为进一步探究其作用机制, 本研究检测了大鼠肝脏中 HIF-1α 的表达水平。结果显示, 罗沙司他组和恩那度司他组大鼠肝脏 HIF-1α 的 mRNA 表达无显著变化, 但蛋白水平显著升高。这一结果精准指向 HIF-PHI 类药物的经典作用机制——通过抑制脯氨酰羟化酶活性, 阻断 HIF-1α 蛋白的羟化降解过程, 从而在翻译后水平实现 HIF-1α 蛋白的积累^[6,17]。稳定后的 HIF-1α 作为转录因子进入细胞核, 可调控下游多种基因的表达, 其中包括药物代谢酶相关基因^[18]。

环孢素 A 在体内主要经肝脏 CYP3A 亚家族代谢 (大鼠体内 CYP3A1/3A2 对应人体内 CYP3A4/5)^[19]。本研究发现, 罗沙司他和恩那度司他可显著下调大鼠肝脏中 CYP3A1 的 mRNA 及蛋白表达水平和 CYP3A2 mRNA 表达水平。其中, CYP3A1 的 mRNA 与蛋白表达同步下调, 提示该调控作用发生在转录水平。结合 HIF-1α 蛋白的积累,

以及已有文献报道 HIF-1 α 可与 CYP3A 基因启动子区的缺氧反应元件 (HRE) 结合, 或通过调控核受体 (如孕烷 X 受体 (PXR)、组成性雄烷受体 (CAR)) 间接发挥作用^[20-21], 初步推测罗沙司他和恩那度司他通过稳定 HIF-1 α 蛋白, 介导对 CYP3A 转录过程的抑制, 进而减缓环孢素 A 的代谢清除, 最终导致其血药浓度升高。

环孢素 A 的体内过程同时受代谢酶和转运蛋白的双重调控, 其中 P-gp 的外排作用对其肠道吸收具有重要影响^[22]。为全面解析药物相互作用机制, 本研究检测了小肠 P-gp 的 mRNA 表达水平。结果显示, 罗沙司他和恩那度司他对小肠 P-gp 的 mRNA 水平无显著影响, 这与最新研究提出的“HIF-PHI 对 P-gp 调控作用有限”的结论一致^[23]。结合药动学研究中 t_{\max} 无显著变化的结果, 可进一步确认 2 种药物导致的环孢素 A 暴露量增加, 主要源于肝脏代谢抑制, 而非肠道吸收增强。这一阴性结果从反面强化了“CYP3A 介导的代谢抑制是药物相互作用主导机制”的结论。

本研究首次系统比较了罗沙司他与恩那度司他 2 种新型 HIF-PHI 对大鼠体内环孢素 A 药动学的影响, 并借助 qRT-PCR 与蛋白质印迹法等分子生物学技术, 初步探讨其潜在作用机制, 为临床联合用药提供了实验依据。本研究设计科学合理, 采用 HPLC-MS/MS 准确测定各时间点环孢素 A 血药浓度, 并结合分子生物学技术, 从肝脏 CYP3A1/2 代谢酶角度解析作用机制, 方法可靠, 结果具有明确的临床参考价值。然而, 本研究仍存在一定局限性: 如样本量较小, 可能影响结果的稳定性; 未探讨不同剂量下 2 种药物对环孢素 A 药动学的潜在差异; 同时, HIF-1 α 调控 CYP3A1 的具体分子通路尚未完全阐明, 研究结论的普适性与机制完整性有待后续研究进一步验证。

综上所述, 罗沙司他和恩那度司他通过上调肝脏 HIF-1 α 蛋白水平, 抑制 CYP3A1/2 的表达, 从而降低环孢素 A 的清除率, 增加其血药浓度。临床上, 当罗沙司他或恩那度司他与环孢素 A 等 CYP3A 底物联用时, 建议密切监测环孢素 A 血药浓度, 必要时调整用药剂量, 以防范药物相互作用导致的肾毒性等不良反应。后续研究可采用 HIF-1 α 抑制剂或基因敲除模型, 进一步验证 HIF-1 α 在该药物相互作用中的因果作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Alqadi R, Alqumia A, Alhomoud I S, et al. Cyclosporine: Immunosuppressive effects, entwined toxicity, and clinical modulations of an organ transplant drug [J]. *Transpl Immunol*, 2025, 88: 102147.
- [2] Zhang Y Y, Guo H L, Wang J, et al. LC-MS/MS and EMIT measure the whole blood concentration of cyclosporine A: The two methods yield concordant results within the dynamic range of the latter, but the former shows broader application scenarios [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2024, 1240: 124154.
- [3] 史金平, 袁海玲. 环孢素血药浓度超限列线图预测模型的构建与验证 [J]. *现代药物与临床*, 2023, 38(8): 2067-2072.
Shi J P, Yuan H L. Construction and verification of the prediction model of blood concentration overrun of cyclosporine by nomogram [J]. *Drugs Clin*, 2023, 38(8): 2067-2072.
- [4] Huang L L, Chen Y, Liu R, et al. P-glycoprotein aggravates blood brain barrier dysfunction in experimental ischemic stroke by inhibiting endothelial autophagy [J]. *Aging Dis*, 2022, 13(5): 1546-1561.
- [5] Hu N, Liu X, Mu Q F, et al. The gut microbiota contributes to the modulation of intestinal CYP3A1 and P-gp in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2021, 162: 105833.
- [6] Tang X X, Liu F, Li Q Y, et al. Roxadustat for patients with posttransplant Anemia: A narrative review [J]. *Kidney Dis*, 2023, 10(1): 32-38.
- [7] Kaplan J M, Sharma N, Dikdan S. Hypoxia-inducible factor and its role in the management of anemia in chronic kidney disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): 389.
- [8] Markham A. Enarodustat: First approval [J]. *Drugs*, 2021, 81(1): 169-174.
- [9] 刘倩倩, 李昕萌, 刘云启. 罗沙司他在治疗慢性肾脏病所致的贫血及其他适应证中的应用进展 [J]. *中国医学创新*, 2025, 22(5): 175-179.
Liu Q Q, Li X M, Liu Y Q. Progress in the application of roxadustat in the treatment of anemia and other indications caused by chronic kidney disease [J]. *Med Innov China*, 2025, 22(5): 175-179.
- [10] Takano H, Yamaguchi J I, Kato S, et al. Downregulation of CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 in human hepatocytes by prolyl hydroxylase domain 2 inhibitors via hypoxia-inducible factor- α stabilization [J]. *Drug Metab Dispos*, 2021, 49(1): 20-30.
- [11] Ma X J, Pai P, Zhu W J, et al. Positive response of a hemodialysis patient with pure red cell aplasia on

- recombinant human erythropoietin therapy to cyclosporine and Roxadustat [J]. *CEN Case Rep*, 2024, 13(6): 445-449.
- [12] Gao Z L, Gao Y X, Wang Q, et al. Study on HIF-PHI combined with iron supplement in treatment of renal anemia in rats [J]. *BMC Nephrol*, 2025, 26(1): 125.
- [13] Fukui K, Shinozaki Y, Kobayashi H, et al. JTZ-951 (enarodustat), a hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor, stabilizes HIF- α protein and induces erythropoiesis without effects on the function of vascular endothelial growth factor [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 859: 172532.
- [14] 雷永芳, 钱卿, 胡楠, 等. 罗沙司他治疗肾移植受者肾性贫血的疗效及对环孢素 A 谷浓度的影响分析 [J]. *中南药学*, 2025, 23(7): 2113-2118.
- Lei Y F, Qian Q, Hu N, et al. Efficacy of roxadustat for renal anemia in kidney transplant recipients and its effect on the trough concentration of cyclosporine A [J]. *Cent South Pharm*, 2025, 23(7): 2113-2118.
- [15] Chen M, Nafziger A N, Bertino J S Jr. Drug-metabolizing enzyme inhibition by ketoconazole does not reduce interindividual variability of CYP3A activity as measured by oral midazolam [J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34(12): 2079-2082.
- [16] Zhang X L, Zhou C B, Chen G Z, et al. Dapagliflozin promotes metabolic reprogramming against myocardial infarction through the MAPK-FOXO3-STC1 and HIF-1 α -STC1 pathways [J]. *Life Sci*, 2025, 377: 123798.
- [17] Li Q Y, Xiong Q W, Yao X F, et al. Roxadustat: Do we know all the answers? [J]. *Biomol Biomed*, 2023, 23(3): 354-363.
- [18] Yang L Q, Luo Z H, Wang S, et al. Roxadustat induces erythroid differentiation of erythroleukemia cells through the hypoxia inducible factor- α /GATA binding protein 1 axis [J]. *Cell Signal*, 2026, 139: 112340.
- [19] Liu X X, Wang Q X, Chen M, et al. Interaction between Changan Granule and its main components in the plasma and CYP450 enzymes [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 308: 116303.
- [20] Zhang J H, Wang R. Changes in CYP3A4 enzyme expression and biochemical markers under acute hypoxia affect the pharmacokinetics of Sildenafil [J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 755769.
- [21] Pai S M, Yamada H, Murata H. Evaluation of drug-drug interaction potential of enarodustat (JTZ-951) using a cytochrome P450 probe cocktail [J]. *Clin Pharmacol Drug Dev*, 2023, 12(7): 667-682.
- [22] Mossel P, Salvi de Souza G, Willemsen A T M, et al. Measurement of cyclosporin induced changes in P-glycoprotein function at the human blood-brain barrier using [18 F] MC225 and PET [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imag*, 2025, 52(12): 4604-4615.
- [23] Feng X H, Ding Y T, Huang Y L, et al. Inhibition of CRM1 reverses hypoxia-driven chemoresistance in acute myeloid leukemia via overcoming HIF-1 α -mediated lysosomal sequestration [J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1710230.

[责任编辑 孙英杰]