

小白菊内酯衍生物 ACT001 对 P450 酶的诱导作用研究

慈小燕¹, 谷元¹, 李薇¹, 武卫党¹, 伊秀林^{1*}, 曾勇^{1*}, 司端运¹, 陈悦²

1. 释药技术与药代国家重点实验室, 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

2. 南开大学药学院, 天津 300071

摘要: **目的** 使用原代培养的人肝细胞研究倍半萜烯内酯类化合物衍生物 ACT001 对 P450 酶的诱导作用, 为 ACT001 的临床使用提供参考。**方法** 分别将 3 批次的冷冻原代人肝细胞进行接种培养, 使用 ACT001 对 CYP1A2、CYP2B6 和 CYP3A4 进行诱导, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 测定 P450 酶 mRNA 表达水平, 液相色谱-质谱联用 (LC-MS/MS) 法测定 P450 酶活力。**结果** P450 酶 mRNA 表达水平及酶活力的结果均显示模型制备成功; 与对照组比较, ACT001 1、6 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞 CYP1A2 mRNA 表达水平和酶活力未见明显变化; ACT001 30 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞 CYP1A2 mRNA 表达水平显著降低, 酶活力虽出现下降趋势, 但不如 mRNA 下降明显。随着 ACT001 浓度增加, CYP2B6 mRNA 表达水平逐渐升高, 与对照组比较, ACT001 30 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞 CYP2B6 mRNA 表达水平显著升高, 均超过对照组的 7 倍, 酶活力增加均 >4 倍, 超过苯巴比妥诱导倍数的 40%。与对照组比较, ACT001 1 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞 CYP3A4 mRNA 表达水平明显升高, 超过对照组的 4 倍, 但未达到阳性诱导剂利福平诱导倍率的 40%, 且随着 ACT001 浓度的增加, 细胞内 CYP3A4 mRNA 表达水平逐渐降低; 同时, ACT001 不同浓度给药后 CYP3A4 酶活力未出现明显升高, 均小于对照组的 2 倍。**结论** ACT001 对 CYP1A2、CYP3A4 没有诱导潜能, 对 CYP2B6 存在诱导潜能, 在临床联合用药时应避免与 CYP2B6 的底物联合使用, 以减少因 P450 酶介导的药物-药物间相互作用 (DDI) 产生的不良反应。

关键词: 小白菊内酯; 倍半萜烯内酯类化合物; ACT001; P450 酶诱导; 原代人肝贴壁细胞

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)06-1424-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.06.025

Induction of P450 enzymes by derivative of parthenolide

CI Xiao-yan¹, GU Yuan¹, LI Wei¹, WU Wei-dang¹, YI Xiu-lin¹, ZENG Yong¹, SI Duan-yun¹, CHEN Yue²

1. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co., Ltd., Tianjin 300301, China

2. College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: Objective In this study, primary cultured human hepatocytes were used to study the induction of P450 enzyme by the sesquiterpene lactone derivative ACT001, which provided reference for the clinical use of ACT001. **Methods** Three batches of frozen primary human hepatocytes were inoculated and cultured, and CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 were induced by ACT001. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to determine the mRNA expression level of P450 enzyme, and the activity of P450 enzyme was determined by LC-MS/MS method. **Results** The expression level of P450 enzyme mRNA and the activity of P450 enzyme showed that the P450 enzyme induction model was successfully established. Compared with the control group, the CYP1A2 mRNA expression level and enzyme activity of ACT001 1 $\mu\text{mol/L}$ and 6 $\mu\text{mol/L}$ group showed no significant changes. The mRNA expression level of CYP1A2 in ACT001 30 $\mu\text{mol/L}$ group was significantly decreased, and the enzyme activity was decreased, but not as significantly as that of mRNA. With the increase of ACT001 concentration, the expression level of CYP2B6 mRNA was gradually increased. Compared with the control group, the expression level of CYP2B6 mRNA in the ACT001 group at 30 $\mu\text{mol/L}$ was significantly increased, which was seven times higher than that in the control group, and the increase of enzyme activity was four times higher than that in the control group, which was 40% higher than that in the phenobarbital sodium induction multiple. Compared with

收稿日期: 2018-05-29

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (81430096); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81503154)

作者简介: 慈小燕 (1987—), 女, 助理研究员, 研究方向为药理学。Tel: (022)84845243 E-mail: cxy871005@yeah.net

*通信作者 伊秀林, 研究员。Tel: (022)84845242 E-mail: yixl@tjipr.com

曾勇, 研究员。Tel: (022)84845243 E-mail: zengy@tjipr.com

the control group, the CYP3A4 mRNA expression level of cells in the ACT001 1 $\mu\text{mol/L}$ group was significantly increased, which was four times higher than that of the control group, but did not reach 40% of the positive inducer rifampicin, and the CYP3A4 mRNA expression level was decreased gradually with the increase of ACT001 concentration. At the same time, there was no significant increase in CYP3A4 enzyme activity after ACT001 administration at different concentrations, which was less than two times of that in the control group. **Conclusion** The data indicated that ACT001 had no induction potential for CYP1A2 and CYP3A4, and had potential for CYP2B6 induction. In combination with CYP2B6 substrates, it should be avoided in clinical combination therapy to reduce adverse reactions caused by P450-mediated drug drug interaction.

Key words: parthenolide; sesquiterpene lactones; ACT001; P450 induction; primary human liver adherent cells

由于多病同治、多药同用案例的不断增多, 基于药物-药物间相互作用 (drug-drug interactions, DDI) 已成为不良反应产生的重要原因之一。DDI 改变了药物原来的体内过程, 产生了单种药物用药所没有的不良反应^[1]。在人体的内源与外源性代谢中, 细胞色素 P450 (cytochrome P450, P450) 酶起着至关重要的作用。P450 酶的诱导和抑制是改变药物生物转化反应最常见的 2 种原因。诱导性相互作用可以导致药效的降低甚至丧失, 也可因酶活性的增高而产生代谢物毒性, 引起严重的不良反应^[2-3]。因此预测基于 P450 酶的诱导作用是新药研发中评价候选药物特性的重要内容。

小白菊内酯 (parthenolide, PTL) 是野生甘菊 *Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip. 的主要提取成分, 它是一种倍半萜烯内酯类 (sesquiterpene lactones, SLs) 化合物^[4]。近年来研究发现小白菊内酯除抗炎外, 还具有抗肿瘤的功效, 对急性髓细胞白血病、恶性胶质瘤、前列腺癌等多种癌症具有治疗作用^[4-7]。ACT001 是在对大量 PTL 结构修饰化合物及衍生物进行筛选的基础上发现的 1 个能选择性消除癌症干细胞的高活性化合物^[8], 为 11 β H,13-二甲基氨基含笑内酯的富马酸盐, 母核为愈创木烷型倍半萜烯内酯, 分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{NO}_7$ ^[9], 结构见图 1, 现已作为抗脑胶质瘤一类新药进入临床研究阶段。

本研究应用冷冻的原代人肝贴壁细胞进行接种

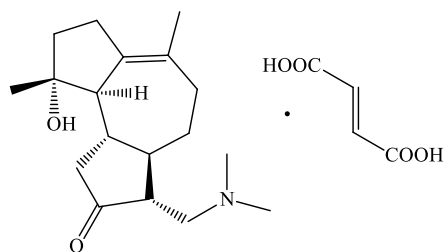


图 1 ACT001 化学结构

Fig. 1 Chemical structure of ACT001

培养, 使用 ACT001 分别对细胞色素氧化酶 (CYP1A2、CYP2B6 和 CYP3A4) 进行诱导, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 测定 P450 酶 mRNA 表达水平, 液相色谱-质谱联用 (LC-MS/MS) 法测定 P450 酶活力, 评价 ACT001 对 P450 酶的诱导潜能, 为 ACT001 的临床研究及合理用药提供参考。

1 材料

1.1 细胞

冷冻原代人肝贴壁细胞 HC4-15 (简称为 HC4)、HC10-10 (简称为 HC10) 及 HC1-34 (简称为 HC1) 购自 Xenotech 公司。

1.2 仪器

HERAcell 150i 二氧化碳培养箱、Sorvall Legend Micro 17R 高速冷冻离心机 (美国 Thermo Scientific 公司); AB54-S 型分析天平 [德国梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]; Mastercycler ep Realplex² 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 仪、微量移液枪 (德国 Eppendorf 公司); CKX41 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); L500 低速离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司); ZHWY 型恒温振荡器 (北京华威兴业科技有限公司); TC-96/G/H (b) C 型基因扩增仪 (杭州博日科技有限公司)。

1.3 药品与试剂

ACT001 (批号 20120704, 质量分数 99.2%) 由天津尚德药缘科技有限公司提供; 注射用奥美拉唑钠购自常州四药制药有限公司 (批号 20150130D1); 利福平、红霉素购自 MCE 公司; 苯巴比妥钠购自北京索莱宝科技有限公司; 地塞米松磷酸钠注射液购自湖北天药药业股份有限公司; 非那西丁购自梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司; 睾酮购自 Acros 公司; 对照品对乙酰氨基酚 (批号 100018-200408, 质量分数 >99%) 购自中国食品药品检定研究院; 对照品羟基安非他酮 (批号 59887)、6 β -羟基睾酮 (批号 47083), 质量分数 >99%, 均购自 BD 公司; 内标吡达帕胺 (批号 Y0703003, 质量

分数>99%)购自天津力生制药股份有限公司。

Williams' E 培养基、胰岛素-转铁因子-硒补充剂 (100×)、青链霉素混合液 (100×)、磷酸盐缓冲液 (PBS, 1×)、含 EDTA 的 0.25%胰酶、胎牛血清 (FBS) 均购自 Gibco 公司; I 型胶原包被 48 孔培养板购自 Corning 公司; DEPC 水购自北京索莱宝科技有限公司; TRNzol Reagent 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 逆转录试剂盒 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit 和 qRT-PCR 试剂盒 Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox) 均购自 Roche 公司; qRT-PCR 引物购自深圳华大基因科技有限公司。

2 方法

2.1 肝细胞培养基的配制

无血清培养基: 在 Williams' E 培养基中添加 0.5%胰岛素-转铁因子-硒补充剂、1%青链霉素混合液 (100×) 和 50 ng/mL 的地塞米松磷酸钠。含血清培养基: 在无血清培养基中加入 10% FBS。

2.2 ACT001 对 P450 酶的诱导

将肝细胞冻存管从液氮罐中取出, 立即放入 39 °C 恒温水浴锅中快速晃动使冻存液快速融化, 于超净工作台中将细胞悬液移入离心管, 加入 37 °C 预温的无血清培养液, 离心弃去上清液, 以含 10% FBS 的培养液悬浮细胞, 接种于胶原蛋白包被的 48 孔培养板中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。3~6 h 后更换无血清培养基。24 h 后, 阳性对照组分别更换含 20 μmol/L 利福平 (CYP3A4 诱导剂)、50 μmol/L 奥美拉唑 (CYP1A2 诱导剂) 和 1 mmol/L 苯巴比妥钠 (CYP2B6 诱导剂) 的培养基; 阴性对照组为含 10 μmol/L 红霉素的培养基; 对照组为空白无血清的培养基^[10]; 实验组为分别含 ACT001 1、6、30 μmol/L 的培养基。每组 3 个复孔。24 h 后更换 1 次相同的培养基。细胞与诱导剂作用时间为 48 h。

2.3 qRT-PCR 测定肝细胞中 CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 mRNA 表达水平

完成诱导的肝细胞 24 孔用 PBS 洗涤 1 次, 按 TRNzol 总 RNA 提取试剂盒说明书及 Roche 公司 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit 逆转录试剂盒说明书, 提取肝细胞的总 RNA 并逆转录为 cDNA。以逆转录的 cDNA 为模板, qRT-PCR 反应体系为 Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox) 25 μL、下游引物 (10 μmol/L) 1.5 μL、上游引物 (10 μmol/L) 1.5 μL、水 (PCR-grade) 18 μL、

cDNA 模板 4 μL, 总体积 50 μL。反应条件为 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 1 min, 40 个循环, 60~95 °C 熔解曲线分析。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Sequences of primers used for qRT-PCR analysis

基因	引物序列 (5'→3')
β-actin	正向引物 GGCATCCTCACCTGAAGTA 反向引物 GGGGTGTTGAAGGTCTCAA
CYP1A2	正向引物 CTTCCGACACTCCTCTTCTT 反向引物 GCCAAACAGCATCATCTTCTC
CYP3A4	正向引物 TGTGGGGCTTTTATGATGGT 反向引物 GAAGGTTGGAGACAGCAATGA
CYP2B6	正向引物 CCATACACAGAGGCAGTCATCT 反向引物 AGAAAGTGGTCAGGATTGAAGG

相对 mRNA 表达量计算 (Livak 法) 同时测定样品中目标基因 (CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4) 和内参基因 (β-actin) 的 C_t 值, 采用 2^{-ΔΔC_t} 计算受试药品组细胞的 CYP 基因与对照组细胞 CYP 基因比较的相对表达量。

2.4 LC-MS/MS 测定肝细胞中 CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 酶活力

2.4.1 LC-MS/MS 测定条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈ (100 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-甲酸铵 (20 mmol/L, 含 0.1%甲酸) (65:35); 柱温 35 °C; 体积流量 0.5 mL/min; 进样器温度 4 °C; 进样体积 5 μL。离子化源: 电喷雾离子化源, 正离子检测; 离子喷雾电压 4 500 V; 温度 600 °C; 卷帘气 138 kPa; 喷雾气 345 kPa; 加热气 586 kPa; 碰撞气 69 kPa。扫描方式: 多反应监测。

2.4.2 对照品溶液的制备 取羟基安非他酮、对乙酰氨基酚、6β-羟睾酮对照品适量, 以甲醇配制成质量浓度为 1 mg/mL 贮备液 I。分别吸取 100 μL 各贮备液 I 于 10 mL 量瓶中, 定容得质量浓度为 10 μg/mL 贮备液 II; 分别取羟基安非他酮、对乙酰氨基酚、6β-羟睾酮贮备液 II 1.890、0.639、7.610 mL 配制成混合对照品贮备液; 随后用甲醇梯度稀释, 得到系列混合对照品溶液。

2.4.3 内标溶液配制 精密称取吲达帕胺 10 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 定容, 混合均匀得 1 mg/mL 内标贮备液 I。精密吸取内标贮备液 I 0.1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 定容, 混匀得 10 μg/mL 内标贮备液 II。精密吸取 5 mL 内标贮备液 II 至 500 mL 量瓶中,

加甲醇定容至刻度,稀释为 100 ng/mL 的内标溶液。

2.4.4 肝细胞培养的上清液样品处理 完成诱导的肝细胞 24 孔用 PBS 洗涤 1 次,以“Cocktail”法混合加入 CYP1A2、CYP2B6 和 CYP3A4 的探针底物(100 $\mu\text{mol/L}$ 非那西丁、200 $\mu\text{mol/L}$ 睾酮、100 $\mu\text{mol/L}$ 安非他酮)进行反应,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h,取 100 μL 肝细胞培养上清液(或空白肝细胞培养液)中加入甲醇 100 μL (或混合对照品溶液)及内标吡达帕胺溶液(100 ng/mL,甲醇配制)200 μL ,涡旋 2 min 混匀,低温 12 000 r/min 离心 10 min,分取上层有机相,进样 5 μL ,进行 LC/MS/MS 分析,同时测定上述探针底物经 CYP 同工酶代谢的产物(对乙酰氨基酚、羟基安非他酮、6 β -羟基睾酮)浓度。分别使用 3 个批次的肝细胞重复此实验。

使用 Analyst 1.5.2 数据处理软件,分别对对乙酰氨基酚、羟基安非他酮、6 β -羟基睾酮和内标吡达帕胺进行积分,得出峰面积。以各代谢产物浓度为横坐标(X),各代谢产物与内标的峰面积比值为纵坐标(Y),用加权最小二乘法(权重为 $1/x^2$)进行回归运算,求得的直线回归方程即为校正曲线。经校正曲线计算当日所测的各代谢产物浓度,用于定量分析人肝细胞 CYP 酶代谢探针底物产生的代谢产物生成量。人肝细胞 CYP 同工酶的活性以各代谢产物的浓度来衡量。

酶活力=代谢产物浓度 $\times$ 代谢产物体积/反应时间

2.4.5 方法学考察

(1) 线性范围:按照“2.4.1”项下条件,测定对乙酰氨基酚、羟基安非他酮、6 β -羟基睾酮浓度的线性范围分别为 6.61~6 614、1.56~782、13.1~13 139 nmol/L。

(2) 准确度和精密度:在低、中、高浓度下,对乙酰氨基酚、羟基安非他酮、6 β -羟基睾酮的准确度分别在-6.90%~5.07%、-7.59%~4.26%、-2.42%~7.17%,批内精密度分别小于 2.41%、2.16%、3.39%,符合生物制品分析方法验证要求。

(3) 绝对基质效应:在实验选择的样品处理、色谱与质谱条件下,对乙酰氨基酚在低、中、高 3 个浓度水平上的绝对基质效应分别为(53.10 $\pm$ 3.24)%、(52.30 $\pm$ 3.03)%、(55.30 $\pm$ 1.06)%;羟基安非他酮在低、中、高 3 个浓度水平上的绝对基质效应分别为(94.90 $\pm$ 10.70)%、(99.50 $\pm$ 2.59)%、(98.70 $\pm$ 1.73)%;6 β -羟基睾酮在低、中、高 3 个浓度水平上的绝对基质效应分别为(104.00 $\pm$ 9.40)%、

(108.00 $\pm$ 3.19)%、(111.00 $\pm$ 2.33)%;内标的基质效应为(104.00 $\pm$ 1.19)%。

(4) 提取回收率:提取回收率的结果表明,对乙酰氨基酚在低、中、高 3 个浓度水平上的回收率分别为(100.00 $\pm$ 5.43)%、(101.00 $\pm$ 1.80)%、(98.80 $\pm$ 1.49)%;羟基安非他酮在低、中、高 3 个浓度水平上的回收率分别为(103.00 $\pm$ 6.57)%、(96.90 $\pm$ 2.05)%、(95.70 $\pm$ 1.63)%;6 β -羟基睾酮在低、中、高 3 个浓度水平上的回收率分别为(98.40 $\pm$ 13.50)%、(99.50 $\pm$ 2.94)%、(95.60 $\pm$ 3.52)%;内标的回收率为(99.00 $\pm$ 1.24)%,均良好。

2.5 数据处理

参照美国 FDA 2012 年发布的《药物相互作用研究指导原则草案》将阳性对照组与对照组进行比较,CYP 基因 mRNA 表达量提高 4 倍以上、CYP 基因酶活性提高 2 倍以上表明阳性对照组的诱导模型建模成功^[10]。以实验组相对于阳性诱导剂组的 mRNA 表达量或酶活力百分比(Er)评价 ACT001 对 CYP1A2、CYP2B6 和 CYP3A4 的诱导潜能,Er $\geq$ 40%可判定为受试药具有酶诱导潜能。

$$\text{Er} = (C_{\text{药物}} - C_{\text{对照}}) / (C_{\text{阳性对照}} - C_{\text{对照}})$$

$C_{\text{药物}}$ 、 $C_{\text{对照}}$ 和 $C_{\text{阳性对照}}$ 分别代表受试组、对照组和阳性对照组 CYP mRNA 表达量或探针底物代谢产物生成量

3 结果

3.1 qRT-PCR 法检测 ACT001 对 P450 酶的诱导作用

在 HC4、HC10 及 HC1 细胞中,与对照组比较,奥美拉唑、苯巴比妥钠、利福平均能显著诱导 CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 mRNA 的表达,表达量提高均在 4 倍以上;阴性对照红霉素对 CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 mRNA 表达水平未见明显影响。上述数据表明 P450 酶诱导模型建立成功,结果见表 2。

与对照组比较,ACT001 1、6 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞 CYP1A2 mRNA 表达水平未见明显变化,ACT001 30 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞 CYP1A2 mRNA 表达水平显著降低。随着 ACT001 浓度的增加,细胞中 CYP2B6 mRNA 表达水平逐渐升高,在 30 $\mu\text{mol/L}$ 时 CYP2B6 mRNA 表达水平显著升高,均超过对照组的 7 倍,接近甚至超过阳性诱导剂苯巴比妥钠的诱导倍数,推测 ACT001 对 CYP2B6 存在诱导潜能。ACT001 1 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞 CYP3A4 mRNA 表达水平显著升高,均超过对照组的 4 倍,但未达到阳性诱导剂利福平

诱导倍数的 40%，随着浓度的增加 CYP3A4 mRNA 表达水平逐渐降低，推测 ACT001 对 CYP3A4 没有诱导潜能。结果见表 2。

3.2 LC-MS/MS 法检测 ACT001 对 P450 酶的诱导作用

在 HC4、HC10 及 HC1 细胞中，与对照组比较，奥美拉唑、苯巴比妥钠、利福平均能明显诱导 CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 表达，表现出对应的酶活力明显增加，均 > 2 。阴性对照红霉素对 CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 表达水平未见明显影响。结果见表 3。

与对照组比较，ACT001 1、6 $\mu\text{mol/L}$ 组 CYP1A2 的酶活性未见明显变化，ACT001 30 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞 CYP1A2 酶活力虽出现下降趋势，但不如 mRNA 表达水平下降明显，推测 ACT001 对 CYP1A2 没有诱导潜能；随着 ACT001 浓度的增加，细胞中 CYP2B6 的酶活性逐渐升高，在 30 $\mu\text{mol/L}$ 时 CYP2B6 的酶活性增加均大于 4 倍，超过苯巴比妥钠的诱导倍数的 40%，推测 ACT001 对 CYP2B6 存在诱导潜能。ACT001 各浓度组细胞中 CYP3A4 的酶活力未出现明显升高，均小于对照组的 2 倍，推测 ACT001 对 CYP3A4 没有诱导潜能。结果见表 3。

表 2 qRT-PCR 法检测 ACT001 对 P450 酶的诱导倍数

Table 2 Fold-induction of CYPs mRNA levels by ACT001 with qRT-PCR

组别	浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	CYP1A2 诱导倍数			CYP2B6 诱导倍数			CYP3A4 诱导倍数		
		HC4	HC10	HC1	HC4	HC10	HC1	HC4	HC10	HC1
对照	—	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
奥美拉唑	50	69.20	46.90	74.60	/	/	/	/	/	/
利福平	20	/	/	/	/	/	/	13.40	17.40	19.00
苯巴比妥钠	1 000	/	/	/	11.90	9.64	9.57	/	/	/
红霉素	10	1.06	0.93	0.94	0.90	0.84	0.82	0.85	0.80	0.88
ACT001	1	0.61	0.74	0.58	2.59	3.27	2.78	4.05	6.84	7.26
	6	0.69	0.82	0.86	3.08	3.60	3.28	3.01	4.14	4.72
	30	0.16	0.17	0.20	7.86	7.84	7.59	1.04	0.83	1.06

表 3 LC-MS/MS 法检测 ACT001 对 P450 酶的诱导倍数

Table 3 Fold-induction of CYPs activities levels by ACT001 with LC-MS/MS

组别	浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	CYP1A2 诱导倍数			CYP2B6 诱导倍数			CYP3A4 诱导倍数		
		HC4	HC10	HC1	HC4	HC10	HC1	HC4	HC10	HC1
对照	—	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
奥美拉唑	50	6.57	22.30	18.30	/	/	/	/	/	/
利福平	20	/	/	/	/	/	/	14.50	12.30	11.60
苯巴比妥钠	1 000	/	/	/	7.39	6.51	7.69	/	/	/
红霉素	10	0.92	0.83	1.47	0.85	0.90	1.55	0.91	0.67	1.29
ACT001	1	0.97	0.82	1.19	1.07	1.68	1.72	3.01	4.73	4.36
	6	0.79	0.92	0.96	1.93	2.01	1.83	2.69	3.35	3.01
	30	0.48	0.56	0.58	5.25	6.86	6.14	0.98	1.36	1.53

4 讨论

P450 酶对诱导剂的反应存在明显的种属差异^[3]，人原代培养肝细胞的代谢处理系统基本保留了正常组织内的细胞活性，能全面反映药物进入人体内的真实状态，因此被认为是 P450 酶诱导实验的金标准，并被 FDA 认证为有效的诱导评价工具^[11]。随着人原代肝细胞的商业化，它被越来越多的药物临床前 P450 酶诱导研究所使用。

美国 FDA 2012 年发布的《药物相互作用研究指导原则草案》及国家食品药品监督管理总局

(CFDA) 在 2014 年颁布的《药物非临床药代动力学研究技术指导原则》^[12]中指出体外诱导实验可通过测定相关 mRNA 表达或酶活性的变化进行评价药物对 P450 酶的诱导作用。用 qRT-PCR 测定 P450 酶 mRNA 表达水平可以在反应进行过程中进行累积扩增产物的分析和检测，具有宽的动态范围和高的灵敏度，但以 mRNA 为评价指标时易高估体内的 DDI^[13]。用 LC-MS/MS 法测定 P450 酶活力可以规避高估问题，真实、直接地反映药物诱导 CYP 酶对活性的影响，但该方法存在的不足是受试药对 P450

酶有较强的抑制作用时,有可能掩盖其对酶的诱导潜能。通常转录水平和酶活性之间有较好的相关性,但在受试药既是酶抑制剂又是酶诱导剂的情况下,对酶的最终效应则取决于抑制和诱导的程度及用药的时程,最初的表现可能是酶的抑制,随着新蛋白的合成,酶的诱导作用才逐渐显现出来^[14-15]。因此开展酶诱导研究时,同时测定 mRNA 表达水平和酶活力的变化,可排除受试物及其代谢产物的酶抑制作用对酶诱导作用等干扰因素的影响,获得更为可靠的结果和合理的解释。但联合 mRNA 表达水平及酶活力的变化来共同研究药物对 P450 酶的诱导作用,在国内尚无文献报道。

通常情况下,体外酶诱导实验的浓度点设置主要参考临床前动物体内有效剂量下的血药浓度情况,若同时有不同动物的血药浓度,以大动物为准。在保证无毒性的前提下,药物浓度应比体内 $C_{\max}$ 高 1 个数量级。ACT001 为抗癌药,可能具有一定的细胞毒性,因此,本研究首先进行了 ACT001 对人肝细胞的预实验。参照 ACT001 的 Beagle 犬体内数据及对癌细胞的体外活性抑制数据,预实验浓度设定为 1、6、30、100 $\mu\text{mol/L}$ 。预实验结果显示 ACT001 在 1、6、30 $\mu\text{mol/L}$ 时,人肝细胞形态没有显著性变化,在 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,人肝细胞出现明显的脱落凋亡,说明对细胞有明显毒性,故最终诱导实验浓度设定为 1、6、30 $\mu\text{mol/L}$ 。

本研究发现 ACT001 对 CYP1A2、CYP3A4 没有诱导潜能,对 CYP2B6 存在诱导作用,诱导能力接近甚至超过阳性诱导剂苯巴比妥钠。ACT001 已作为抗脑胶质瘤一类新药进入临床研究阶段,在临床使用时可能会与其他抗癌药联合使用。如果联合使用的药物为 CYP2B6 的底物如抗癌药环磷酰胺或异环磷酰胺,可能会发生因 ACT001 对 CYP2B6 的诱导致使环磷酰胺或异环磷酰胺的代谢加快,从而降低环磷酰胺或异环磷酰胺的药效。但本研究为体外酶诱导研究,还需进一步实验验证。

参考文献

- [1] 金 艺,夏玉凤. 基于细胞色素 P450 酶的药物相互作用机制探讨 [J]. 海峡药学, 2017, 29(2): 7-10.
- [2] Sun H, Veith H, Xia M, *et al.* Predictive models for cytochrome P450 isozymes based on quantitative high throughput screening data [J]. *J Chem Inform Model*, 2011, 51(10): 2474-2481.
- [3] Lin J H. CYP induction-mediated drug interactions: *In vitro* assessment and clinical implications [J]. *Pharm Res*, 2006, 23(6): 1089-1116.
- [4] Li C J, Guo S F, Shi T M. Culture supernatants of breast cancer cell line MDA-MB-231 treated with parthenolide inhibit the proliferation, migration, and lumen formation capacity of human umbilical vein endothelial cells [J]. *Chin Med J*, 2012, 125(12): 2195-2199.
- [5] Wang W J, Meng Z L, Mo Y C, *et al.* Unloading the infarcted heart affect MMPs-TIMPs axis in a rat cardiac heterotopic transplantation model [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(1): 277-283.
- [6] Czyz M, Lesiakmieczkowska K, Koprowska K, *et al.* Cell context-dependent activities of parthenolide in primary and metastatic melanoma cells [J]. *British J Pharmacol*, 2010, 160(5): 1144-1157.
- [7] Holcomb B K, Yip-Schneider M T, Waters J A, *et al.* Dimethylamino parthenolide enhances the inhibitory effects of gemcitabine in human pancreatic cancer cells [J]. *J Gastrointest Surg*, 2012, 16(7): 1333-1340.
- [8] Zhang Q, Lu Y, Ding Y, *et al.* Guaianolide sesquiterpene lactones, a source to discover agents that selectively inhibit acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells [J]. *J Med Chem*, 2012, 55(20): 8757-8769.
- [9] 孙 亮. 抗癌高活性化合物 ACT001 的临床前药代动力学研究 [D]. 天津: 南开大学, 2013.
- [10] US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Guidance for Industry. Drug Interaction Studies-studydesign, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations [S]. 2012.
- [11] Sinz M, Wallace G, Sahi J. Current industrial practices in assessing CYP450 enzyme induction: Preclinical and clinical [J]. *Aaps J*, 2008, 10(2): 391-400.
- [12] 药物非临床药代动力学研究技术指导原则 [S]. 2014.
- [13] Shou M, Hayashi M, Pan Y, *et al.* Modeling, prediction, and *in vitro in vivo* correlation of CYP3A4 induction [J]. *Drug Metab Dispos*, 2008, 36(11): 2355-2370.
- [14] 慈小燕, 李 薇, 崔 涛, 等. 细胞色素 P450 酶诱导模型的建立及其应用 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27(6): 688-694.
- [15] Chu V, Einolf H J, Evers R, *et al.* *In vitro* and *in vivo* induction of cytochrome p450: A survey of the current practices and recommendations: A pharmaceutical research and manufacturers of america perspective [J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37(7): 1339-1354.