

五酯胶囊对大鼠体内甲磺酸阿帕替尼药动学行为的影响[△]

李亚静^{1,2*}, 刘洪涛², 王祁民², 李颖², 董占军^{1,2#} (1. 河北医科大学研究生学院, 石家庄 050017; 2. 河北省人民医院药学部, 石家庄 050051)

中图分类号 R969.1; R969.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)12-1629-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.12.09

摘要 目的: 建立测定大鼠血浆中甲磺酸阿帕替尼浓度的方法, 并考察单次和多次给予五酯胶囊对大鼠体内甲磺酸阿帕替尼药动学行为的影响。方法: 采用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)检测大鼠血浆中甲磺酸阿帕替尼的浓度。以卡马西平为内标, 色谱柱为 Waters XBridge BEH C₁₈, 流动相为乙腈-0.1% 甲酸溶液(45:55, V/V), 流速为 0.3 mL/min, 柱温为 40 °C, 进样器温度为 15 °C, 进样量为 2 μL; 采用电喷雾离子源, 以多反应监测模式进行正离子扫描, 用于定量分析的离子对质荷比分别为 398.1→212.1 (甲磺酸阿帕替尼)、237.2→194.2 (内标)。将大鼠随机分为对照组 I、观察组 I、对照组 II、观察组 II, 每组 6 只。对照组 I 大鼠单次灌胃甲磺酸阿帕替尼(50 mg/kg, 下同); 观察组 I 大鼠灌胃五酯胶囊(450 mg/kg, 下同), 10 min 后再灌胃甲磺酸阿帕替尼; 对照组 II 大鼠灌胃生理盐水, 每日 1 次, 连续 7 d 后, 再单次灌胃甲磺酸阿帕替尼; 观察组 II 大鼠灌胃五酯胶囊, 每日 1 次, 连续 7 d 后, 再单次灌胃甲磺酸阿帕替尼。分别于灌胃甲磺酸阿帕替尼后 0.25、0.5、1.0、2.0、2.5、3.0、4.0、6.0、8.0、12.0、24.0 h 时自大鼠眼内眦静脉丛采血进行测定。分别采用 DAS 2.1 软件和 *t* 检验计算和比较各组大鼠的药动学参数。结果: 甲磺酸阿帕替尼检测血药浓度的线性范围为 2~2 000 ng/mL, 定量下限为 2 ng/mL; 日内、日间 RSD 均小于 10%, 准确度为 94.93%~104.68%; 基质效应不影响待测物的定量分析。与对照组 I 比较, 观察组 I 大鼠的 *c*_{max}、AUC_{0-24 h}、AUC_{0-∞} 均显著升高, CL_Z 显著降低(*P*<0.05); 与对照组 II 比较, 观察组 II 大鼠的 AUC_{0-24 h}、AUC_{0-∞} 均显著升高, CL_Z 显著降低(*P*<0.05); 与观察组 I 比较, 观察组 II 大鼠的 AUC_{0-24 h}、AUC_{0-∞} 均显著降低(*P*<0.05)。结论: 本研究建立的 LC-MS/MS 法灵敏度高、专属性强, 可用于大鼠血浆中甲磺酸阿帕替尼浓度的测定及药动学研究。五酯胶囊可影响大鼠体内甲磺酸阿帕替尼的药动学行为, 且多次给予五酯胶囊的影响弱于单次给药。

关键词 甲磺酸阿帕替尼; 五酯胶囊; 药动学; 液相色谱-串联质谱法; 大鼠

Effects of Wuzhi Capsules on *in vivo* Pharmacokinetic Behavior of Apatinib Mesylate in Rats

LI Yajing^{1,2}, LIU Hongtao², WANG Qimin², LI Ying², DONG Zhanjun^{1,2} (1. Graduate School of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Dept. of Pharmacy, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang 050051, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the concentration determination of apatinib mesylate in plasma of rats, and to investigate the effects of single and multiple administration of Wuzhi capsules on the pharmacokinetic behavior of apatinib mesylate in rats. METHODS: LC-MS/MS method was used to detect the plasma concentration of apatinib mesylate in rats. Using carbamazepine as internal standard, the determination was performed on Waters XBridge BEH C₁₈ column with mobile phase consisted acetonitrile-0.1% formic acid solution (45:55, V/V) at the flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was 40 °C. The temperature of injector was 15 °C, and the sample size was 2 μL. ESI was used for positive ion scanning in MRM mode. The ion pairs *m/z* used for quantitative analysis were 398.1→212.1 (apatinib mesylate) and 237.2→194.2 (internal standard). The rats were randomly divided into control group I, observation group I, control group II, observation group II, with 6 rats in each group. Control group I were given single administration of apatinib mesylate intragastrically (50 mg/kg, similarly hereinafter). Observation group I was given Wuzhi capsules intragastrically (450 mg/kg, similarly hereinafter), and then 10 min later given apatinib mesylate intragastrically. Control group II was given normal saline intragastrically, once a day, for consecutive 7 d, and then were given single administration of apatinib mesylate. Observation group II was given Wuzhi capsules intragastrically, once a day, for consecutive 7 d, and then 10 min later were given single administration of apatinib mesylate. The blood samples were collected from intraocular canthus vein plexus and determined 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0 h after intragastric administration, respectively. Pharmacokinetic parameters were apatinib mesylate were calculated and compared among those groups by using DAS 2.1 software and *t*-test. RESULTS: The linear range of apatinib mesylate were 2-2 000 ng/mL. The lower

△ 基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(No.H2018307055); 河北省中医药管理局中医药类科研课题计划(No.2018073)

* 硕士研究生。研究方向: 临床药理学。电话: 0311-85988945。E-mail: 15369305382@163.com

主任药师, 硕士生导师。研究方向: 医院药学。电话: 0311-85988604。E-mail: 13313213656@126.com

limit of quantitation was 2 ng/mL. RSDs of intra-day and inter-day were all lower than 10%, and the accuracy were 94.93%-104.68%. Matrix effect did not affect the quantitative analysis of the substance to be measured. Compared with control group I, *c*_{max}, AUC_{0-24 h} and AUC_{0-∞} of observation group I were increased significantly, CL_Z was decreased

significantly ($P<0.05$). Compared with control group II, $AUC_{0-24\text{ h}}$ and $AUC_{0-\infty}$ of observation group II were increased significantly, and CL_z was decreased significantly ($P<0.05$). Compared with observation group I, $AUC_{0-24\text{ h}}$ and $AUC_{0-\infty}$ of observation group II were decreased significantly ($P<0.05$). CONCLUSIONS: Established LC-MS/MS method is sensitive and specific, and can be used for the concentration determination of apatinib mesylate in plasma of rats. Wuzhi capsules can influence *in vivo* pharmacokinetic behavior of apatinib mesylate in rats. The effect of multiple administration of Wuzhi capsules is weaker than that of single administration.

KEYWORDS Apatinib mesylate; Wuzhi capsules; Pharmacokinetics; LC-MS/MS; Rats

甲磺酸阿帕替尼是一种靶向作用于血管内皮生长因子受体2(VEGFR-2)、血小板衍生生长因子受体(PDGFR)、原癌基因(*c-Kit*、*c-Src*)等靶点的小分子抗肿瘤药物,主要用于晚期胃癌的治疗^[1]。该药在发挥明显抗肿瘤作用的同时,会引起转氨酶、胆红素以及乳酸脱氢酶等指标异常升高,导致患者在治疗过程中出现高血压、蛋白尿、手足综合征以及药物性肝损伤等不良反应^[2-3]。五酯胶囊作为临床常用的保肝药物,可明显降低患者体内转氨酶、胆红素、乳酸脱氢酶等指标的含量,临床常将其用于治疗甲磺酸阿帕替尼引起的肝损伤^[4]。甲磺酸阿帕替尼是一种以原型为主要活性物质的小分子药物,在体内主要经细胞色素P₄₅₀(CYP)家族CYP3A4、CYP3A5酶进行代谢^[5]。有研究指出,当五酯胶囊与他克莫司、环孢素合用时,前者可通过抑制其主要代谢酶CYP3A4、CYP3A5的活性来提高患者体内后两者的药物浓度^[6-7]。由此可见,五酯胶囊在缓解甲磺酸阿帕替尼所致肝损伤的同时,可能会影响后者在患者体内的药物浓度。为此,本研究从动物整体水平出发,在建立测定甲磺酸阿帕替尼血药浓度的液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)基础上,初步探讨了单次和多次给予五酯胶囊对甲磺酸阿帕替尼药动学行为的影响,以期为临床合理应用五酯胶囊治疗甲磺酸阿帕替尼致肝损伤提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-30A型超高效液相色谱(UPLC)仪,配有CTO30A型柱温箱、SIL30AC型自动进样器、LC-30AD二元高压梯度泵(日本Shimadzu公司);Sciex 5500型串联四极杆质谱仪,配有Turbo VTM型离子源、三重四极杆质量分析器、Analyst 1.6.1数据采集软件(美国AB公司);TGL-16M型高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);New Classic型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);KQ5200E型超声波清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

甲磺酸阿帕替尼原料药(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:668170103,纯度:99.74%);五酯胶囊(四川禾

正制药有限责任公司,批号:170201,规格:每粒含五味子甲素11.25 mg);卡马西平对照品(内标,中国食品药品检定研究院,批号:100142-201105,纯度:99.7%);乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯净水。

1.3 动物

清洁级健康雄性SD大鼠,2月龄,体质量220~250 g,由河北医科大学实验动物中心提供[动物生产许可证号:SCXK(冀)2013-1-003]。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 甲磺酸阿帕替尼灌胃液 精密称取甲磺酸阿帕替尼原料药适量,用0.5%羧甲基纤维素钠溶液溶解,配制成质量浓度为10 mg/mL的甲磺酸阿帕替尼灌胃液,使用前摇匀。

2.1.2 五酯胶囊灌胃液 五酯胶囊去胶囊壳,内容物混匀,精密称取适量,用水溶解,配制成质量浓度为90 mg/mL(以五味子甲素计)的五酯胶囊灌胃液,使用前摇匀。

2.1.3 内标溶液 精密称定内标对照品适量,置于100 mL量瓶中,用甲醇溶解并定容,摇匀,得质量浓度为10 $\mu\text{g/mL}$ 的内标贮备液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,备用。临用前用甲醇稀释,配制成质量浓度为25 ng/mL的内标溶液。

2.1.4 待测物对照品贮备液及其工作液 精密称取甲磺酸阿帕替尼原料药适量,置于10 mL量瓶中,用甲醇溶解并定容,得质量浓度为100 $\mu\text{g/mL}$ 的贮备液(贮备液I);用50%甲醇稀释贮备液I,配制成甲磺酸阿帕替尼质量分别浓度为10、30、100、300、1 000、3 000、10 000 ng/mL的系列工作液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,备用。

2.1.5 待测物质控样品贮备液及其工作液 精密称取甲磺酸阿帕替尼原料药适量,置于10 mL量瓶中,用甲醇溶解并定容,配制成质量浓度为116 $\mu\text{g/mL}$ 的贮备液(贮备液II);用50%甲醇稀释贮备液II,配制成甲磺酸阿帕替尼质量浓度分别为29、2 030、8 120 ng/mL的系列质控工作液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,备用。

2.2 色谱与质谱条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Waters XBridge BEH C₁₈(100 mm \times 2.1 mm,2.5 μm);流动相:乙腈-0.1%甲酸溶

液(45:55, V/V);流速:0.3 mL/min;柱温:40 ℃;进样器温度:15 ℃;进样量:2 μL。

2.2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),离子源温度:550 ℃;检测模式:正离子;源喷射电压:5 500 V;雾化气(Gas 1)和加热气(Gas 2)压力均为50 psi;气帘气(CUR)压力:20 psi;监测模式:多反应模式(MRM);用于定量分析的离子对质荷比(*m/z*)分别为398.1→212.1(甲磺酸阿帕替尼)、237.2→194.2(内标),解簇电压均为160 V,碰撞能量分别为24、46 eV。

2.3 血浆样品处理

取待测血浆样品50 μL,置于1.5 mL离心管中,加入甲醇(含内标25 ng/mL)200 μL,涡旋混匀2 min,以12 000 r/min离心10 min;取上清液50 μL,加甲醇450 μL,涡旋混匀2 min,待测。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性考察 分别取大鼠空白血浆、标准曲线血浆样品(600 ng/mL)、对照组 I 大鼠单次灌胃甲磺酸阿帕替尼1 h后的血浆样品、观察组 I 大鼠单次灌胃五酯胶囊+甲磺酸阿帕替尼1 h后的血浆样品各适量,按“2.3”项下方法处理后,再按“2.2”项下色谱与质谱条件进样分析,记录色谱图。结果,甲磺酸阿帕替尼与内标的保留时间分别为1.40、1.53 min,血浆中内源性物质不干扰待测物的测定,表明本法专属性良好,详见图1。

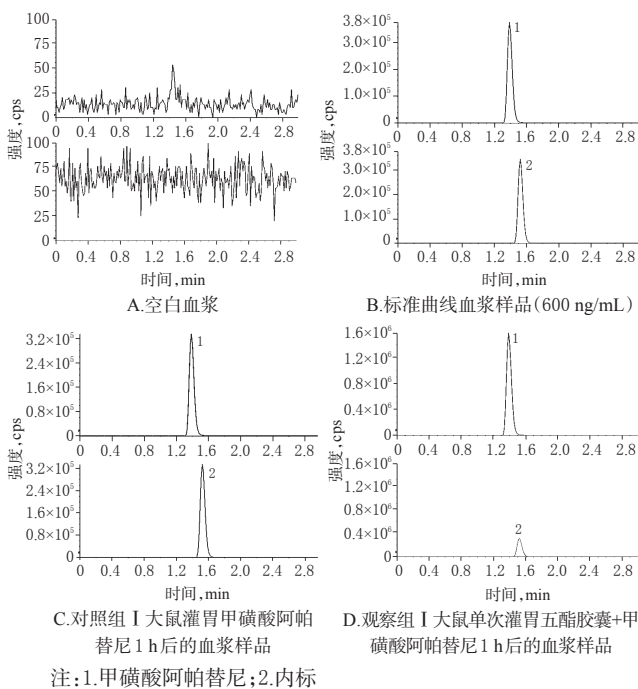


图1 典型MRM图

Fig 1 Typical MRM chromatograms

2.4.2 线性关系与定量下限考察 分别量取“2.1.4”项下系列工作液各10 μL,加入空白血浆40 μL,配制成甲磺酸阿帕替尼质量浓度分别为2、6、20、60、200、600、2 000 ng/mL的标准曲线血浆样品,按“2.3”项下方法处

理后,再按“2.2”项下色谱与质谱条件进样分析,记录峰面积。以待测物与内标的峰面积比值(*y*)为纵坐标、待测物质量浓度(*x*, ng/mL)为横坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=7.70 \times 10^{-3}x+1.24 \times 10^{-5}$ ($r=0.9981$)。结果,甲磺酸阿帕替尼检测质量浓度的线性范围为2~2 000 ng/mL,定量下限为2 ng/mL。

2.4.3 精密性与准确度试验 分别量取“2.1.5”项下系列质控工作液各10 μL,加入空白血浆40 μL,配制成甲磺酸阿帕替尼定量下限质量浓度(2 ng/mL)血浆样品以及低、中、高质量浓度(5.8、406、1 624 ng/mL)质控血浆样品,各质量浓度平行配制5份,按“2.3”项下方法处理后,再按“2.2”项下色谱与质谱条件进样分析,考察日内精密性;连续测定3 d,考察日间精密性。将实测质量浓度与理论质量浓度进行比较,考察准确度。结果,各样品的日内、日间RSD均小于10%,准确度为94.93%~104.68%,符合生物样品定量分析的相关要求^[8],详见表1。

表1 精密性与准确度试验结果

Tab 1 Results of accuracy and precision tests

理论质量浓度, ng/mL	日内			日间		
	实测质量浓度, ($\bar{x} \pm s$), ng/mL	RSD($n=5$), %	准确度, %	实测质量浓度, ($\bar{x} \pm s$), ng/mL	RSD($n=15$), %	准确度, %
2	1.91 ± 0.13	6.78	94.93	1.95 ± 0.13	6.90	97.18
5.8	6.10 ± 0.37	6.02	104.68	5.94 ± 0.32	5.38	102.00
406	400.00 ± 8.51	2.13	98.46	403.00 ± 11.30	2.80	99.30
1 624	1 601.00 ± 65.24	4.07	98.43	1 601.00 ± 65.61	4.10	98.48

2.4.4 提取回收率与基质效应试验 按“2.4.3”项下方法配制甲磺酸阿帕替尼低、中、高质量浓度(5.8、406、1 624 ng/mL)质控血浆样品,按“2.3”项下方法处理后,再按“2.2”项下色谱与质谱条件进样分析,记录峰面积(A)。取空白血浆适量,按“2.3”项下方法处理后,加入相应质量浓度甲磺酸阿帕替尼工作液,使最终质量浓度与质控血浆样品对应,进样分析,记录峰面积(B)。取“2.1.5”“2.1.3”项下质控工作液和内标溶液各10 μL,加入480 μL甲醇,涡旋混匀2 min,进样分析,记录峰面积(C)。各质量浓度均平行操作6次。提取回收率= $A/B \times 100\%$,基质效应= $B/C \times 100\%$ 。结果显示,甲磺酸阿帕替尼的提取回收率(检测值,下同)为93.20%~108.10%,基质效应为89.00%~107.80%(RSD<10%, $n=6$);内标的提取回收率为93.72%~97.87%,基质效应为91.26%~96.82%(RSD<10%, $n=6$),均符合生物样品定量分析的相关规定^[8],详见表2。

表2 提取回收率与基质效应试验结果

Tab 2 Results of recovery and mixture effect tests

待测物	理论质量浓度, ng/mL	提取回收率		基质效应	
		$\bar{x} \pm s$, %	RSD, %	$\bar{x} \pm s$, %	RSD, %
甲磺酸阿帕替尼	5.8	100.64 ± 6.48	6.44	95.78 ± 7.23	7.55
	406	98.62 ± 4.76	4.83	97.02 ± 4.51	4.65
	1 624	96.82 ± 3.96	4.09	96.82 ± 3.96	4.09
内标	20	95.04 ± 1.72	1.81	96.58 ± 3.41	3.53

2.4.5 稳定性试验 按“2.4.3”项下方法配制甲磺酸阿帕替尼低、中、高质量浓度(5.8、406、1 624 ng/mL)质控血浆样品,分别考察上述样品室温放置4 h后再处理、处理后4℃放置8 h,反复冻融(-80℃~25℃)3次后再处理的稳定性。各质量浓度平行操作6次。结果显示,各样品实测质量浓度与理论浓度的比值为92.81%~108.11%(RSD<10%,n=6),表明各样品在上述条件下稳定性良好。

2.5 药动学研究

将SD大鼠随机分为对照组 I、观察组 I、对照组 II、观察组 II,每组6只。对照组 I 大鼠单次灌胃“2.1.1”项下甲磺酸阿帕替尼灌胃液(50 mg/kg,下同);观察组 I 大鼠先灌胃“2.1.2”项下五酯胶囊灌胃液(450 mg/kg,下同),10 min后再灌胃甲磺酸阿帕替尼。对照组 II 大鼠灌胃生理盐水,每日1次,连续7 d,第7天给予生理盐水10 min后,再灌胃甲磺酸阿帕替尼;观察组 II 大鼠灌胃五酯胶囊,每日1次,连续7 d,第7天给予五酯胶囊10 min后,再灌胃甲磺酸阿帕替尼。单次灌胃体积均为5 mL/kg。

分别在灌胃甲磺酸阿帕替尼后0.25、0.5、1.0、2.0、2.5、3.0、4.0、6.0、8.0、12.0、24.0 h时,于大鼠眼内眦静脉丛采血约0.3 mL,置于肝素化离心管中,4 800 r/min离心10 min,分离血浆,按“2.3”项下方法处理后,再按“2.2”项下色谱与质谱条件条件进样测定,记录峰面积,代入随行标准曲线计算甲磺酸阿帕替尼的血药浓度。以平均血药浓度为纵坐标、时间为横坐标,使用Excel 2007绘制甲磺酸阿帕替尼平均药-时曲线,结果见图2;使用DAS 2.1软件的非房室模型^[9]计算其药动学参数,结果见表3。采用SPSS 18.0软件对数据进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

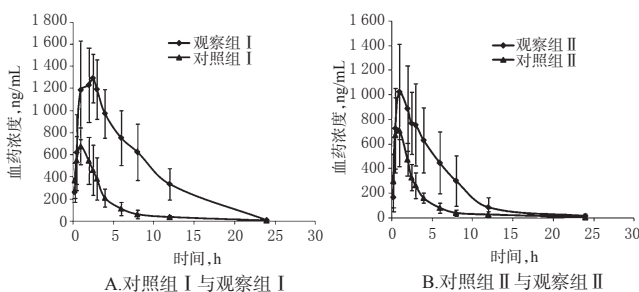


图2 各组大鼠体内甲磺酸阿帕替尼的平均药-时曲线
Fig 2 Average plasma concentration-time curves of apatinib mesylate in rats

由表3可见,与对照组 I 比较,观察组 I 大鼠的 c_{max} 、 $AUC_{0-24 h}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 均显著升高, CL_z 显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组 II 比较,观察组 II 大鼠的 $AUC_{0-24 h}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 均显著升高, CL_z 显著降低,差异

表3 各组大鼠体内甲磺酸阿帕替尼主要药动学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 3 Main pharmacokinetic parameters of apatinib mesylate in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	c_{max} ,ng/mL	$t_{1/2}$,h	t_{max} ,h	CL_z ,mL/(h·kg)	$AUC_{0-24 h}$,ng·h/mL	$AUC_{0-\infty}$,ng·h/mL
对照组 I	716.33±224.39	2.95±0.83	1.08±0.49	8.89±5.04	2 691.09±1 051.69	2 701.16±1 055.25
观察组 I	1 450.50±266.66 [*]	2.48±0.20	1.67±0.75	1.98±0.76 [*]	11 160.07±3 367.60 [*]	11 179.33±3 370.06 [*]
对照组 II	750.67±311.02	2.94±1.03	0.97±0.59	9.84±4.63	2 285.04±687.57	2 293.49±690.54
观察组 II	1 140.00±385.89	2.39±0.48	1.50±0.84	3.87±1.87 [#]	6 150.79±2 509.30 [#]	6 159.60±2 511.50 [#]

注:与对照组 I 比较,^{*} $P < 0.05$;与对照组 II 比较,[#] $P < 0.05$;与观察组 I 比较,[△] $P < 0.05$

Note: vs. control group I, ^{*} $P < 0.05$; vs. control group II, [#] $P < 0.05$; vs. observation group I, [△] $P < 0.05$

均有统计学意义($P < 0.05$)。与观察组 I 比较,观察组 II 大鼠的 $AUC_{0-24 h}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。而其余指标组间比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 样品前处理以及色谱与质谱条件优化

血浆样品前处理中多采用液-液萃取、固相萃取和蛋白沉淀等方法。其中,蛋白沉淀法操作简便且效率较高^[10]。本研究对甲醇、乙腈和高氯酸等沉淀试剂进行了考察。结果显示,以甲醇作为沉淀试剂可获得较高的提取效率,故本研究将其作为血浆样品前处理的溶剂。

在色谱与质谱条件优化方面,本研究在水相中加入了0.1%的甲酸,以提高待测物的离子化效率^[11];同时对有机相(甲醇或乙腈)进行了考察,结果显示,与甲醇比较,以乙腈作为有机相可获得较好的峰形。结合甲磺酸阿帕替尼的难挥发性及其结构特征,本研究采用ESI正离子检测模式对其进行检测,该检测方式比大气压化学电离源(APCI)的灵敏度更高、检测范围更广。此外,为提高待测物的质谱响应值,本课题组对离子源温度以及喷雾气、加热气、气帘气压力等质谱条件进行了优化,最终确定了“2.2.2”项下质谱条件。

3.2 药动学研究剂量优化

甲磺酸阿帕替尼用于治疗晚期胃癌患者的临床常用剂量为500 mg/d,本研究参照文献报道的动物剂量换算公式^[12],按成人用剂量的6.17倍换算大鼠给药剂量,故最终选择甲磺酸阿帕替尼的灌胃剂量为50 mg/kg。相关药动学研究显示,他克莫司的AUC和 c_{max} 随五酯胶囊剂量(25、100、150、450、1 000、1 250 mg/kg)的增加而变化,当五酯胶囊剂量为450 mg/kg时达到峰值^[13],故本研究最终将五酯胶囊的给药剂量确定为450 mg/kg。

3.3 药动学研究试验设计

五酯胶囊多次给药对他克莫司药动学影响研究的结果表明,单次给予五酯胶囊后,他克莫司的 c_{max} 提高3.2倍,AUC提高近6倍;而多次给予五酯胶囊后,他克莫司的 c_{max} 提高2.3倍,AUC提高2.2倍^[13]。由此可见,与

单次给予五酯胶囊比较,多次给予五酯胶囊对他克莫司药动学参数的影响较小。鉴于此,本研究分别考察了单次及多次给予五酯胶囊对甲磺酸阿帕替尼药动学参数的影响;同时参考相关研究的给药时间^[11,14-15],将五酯胶囊的多次给药时间设定为7 d。

3.4 药动学研究结果分析

五酯胶囊为临床上常用的一种保肝药物,主要含有华中五味子,而五味子木脂素为华中五味子的主要提取物和主要有效部位^[10]。五味子木脂素中含量较高的4种成分分别为五味子醇甲、五味子酯甲、五味子甲素、五味子乙素^[16]。文献报道的五味子甲素、五味子酯甲对CYP3A4酶表现出明显的抑制作用,而五味子乙素则对其具有潜在的诱导作用^[17-20]。甲磺酸阿帕替尼是一种以原型为主要活性物质的小分子抗肿瘤药物,经口服后,在人体主要通过肝脏CYP3A4、CYP3A5酶进行代谢^[2]。关于五酯胶囊对他克莫司、环孢素等其他化学药的药动学影响已有报道^[21-24],但尚未见五酯胶囊对甲磺酸阿帕替尼的药动学行为影响的研究。本研究结果表明,单次给予五酯胶囊后,大鼠体内甲磺酸阿帕替尼的药动学参数发生了明显变化, c_{max} 、 AUC_{0-24h} 、 $AUC_{0-\infty}$ 均显著升高,这可能是因为五酯胶囊显著抑制了CYP3A4、CYP3A5酶,使得甲磺酸阿帕替尼的血药浓度升高。连续给予大鼠五酯胶囊7 d后,大鼠体内甲磺酸阿帕替尼的药动学参数亦发生了明显变化, AUC_{0-24h} 、 $AUC_{0-\infty}$ 均显著升高,但与单次相比较升高幅度较小。这提示五酯胶囊可以通过抑制CYP3A4、CYP3A5酶的活性从而影响体内甲磺酸阿帕替尼的药动学特征,提高甲磺酸阿帕替尼的血药浓度;而其连续给药对甲磺酸阿帕替尼药动学参数的影响弱于单次给药,笔者认为可能是由于其长期抑制CYP3A4、CYP3A5酶的同时也代偿性地增强了其他代谢酶的活性,从而降低了这一影响效果,但具体机制尚有待于进一步研究。

综上所述,本试验建立了灵敏度高、专属性强的LC-MS/MS方法,可用于检测大鼠体内甲磺酸阿帕替尼的浓度及其药动学研究。五酯胶囊可影响大鼠体内甲磺酸阿帕替尼的药动学行为,且多次给予五酯胶囊的影响弱于单次给药,这可为临床合理应用五酯胶囊和甲磺酸阿帕替尼提供参考。

参考文献

[1] GENG R, LI J. Apatinib for the treatment of gastric cancer [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2015, 16(1): 117-122.
[2] LI J, QIN S, XU J, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of apatinib in patients with chemotherapy-refractory advanced or metastatic adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction[J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(13): 1448-1454.

[3] LIU X, QIN S, WANG Z, et al. Early presence of anti-angiogenesis-related adverse events as a potential biomarker of antitumor efficacy in metastatic gastric cancer patients treated with apatinib: a Cohort study[J]. *J Hematol Oncol*, 2017. DOI: 10.1186/s13045-017-0521-0.
[4] 杨福泰,李向东,黄巧云.五酯胶囊治疗各种病因所致血清转氨酶升高120例[J].*现代中西医结合杂志*, 2004, 13(8): 1044.
[5] DING J, CHEN X, GAO Z, et al. Metabolism and pharmacokinetics of novel selective vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibitor apatinib in humans[J]. *Drug Metab Dispos*, 2013, 41(6): 1195-1210.
[6] 杨燕,辛华雯,刘飞,等.五酯胶囊对他克莫司增效作用与CYP3A5*3基因多态性的相关性研究[J].*中国药房*, 2017, 28(5): 581-585.
[7] 陈揭剑,梅长林.五酯胶囊对特发性膜性肾病患者环孢素A全血浓度的影响研究[J].*中国全科医学*, 2015, 18(7): 842-845.
[8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:363-368.
[9] GILLESPIE WR.非房室和房室模型分析在临床药动学的比较[J].*国外医学药学分册*, 1992, 19(1): 40-43.
[10] 冯健男,杜守颖,白洁,等.生物样品前处理的研究进展[J].*中国中药杂志*, 2014, 39(21): 4143-4148.
[11] 乔丽曼,王豪,楼旦,等.超高液相色谱-质谱法检测人血浆中格列美脲和氟西汀及其代谢产物[J].*中国临床药理学杂志*, 2015, 31(18): 1873-1876.
[12] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J].*中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069-1072.
[13] 位华.五酯胶囊的药代动力学及与他克莫司相互作用研究[D].上海:第二军医大学,2010.
[14] 宋敏,谭鸿毅,谭志荣,等.单剂量和多剂量口服布洛芬那敏干混悬剂在健康人体的药代动力学[J].*中国临床药理学杂志*, 2010, 26(1): 28-32, 36.
[15] 王玉浩,张雪,周小庭,等.舒尼替尼和雷米普利联合用药在大鼠体内的药代动力学相互作用[J].*中国药科大学学报*, 2017, 48(1): 60-65.
[16] 张汝波.华中五味子的化学成分研究[D].昆明:昆明理工大学,2007.
[17] 李伟,刘亚丽,宋永贵,等.UPLC-Q-TOF-MSE结合OPLS-DA模式快速鉴定南、北五味子化学成分与识别差异标志物[J].*中草药*, 2015, 46(15): 2212-2218.
[18] 吴育晶,程能能,胡卓汉,等.五味子及木脂素成分对肝CYP3A酶活性的影响[J].*中国临床药理学杂志*, 2007, 16(5): 267-271.
[19] 王卓,王湛博,程亚楠,等.五味子乙素对CYP₄₅₀药物代谢酶诱导作用的体外研究[J].*药学研究*, 2017, 36(10): 559-564.
[20] 陈倩,吴育晶,程能能,等.五味子提取物对大鼠肝CYP3A

两种重组蛋氨酸酶表达条件优化及其对人肺腺癌细胞 GLC 的抑制作用研究^Δ

罗沈强^{1*}, 田长富^{2#}[1. 重庆医科大学附属第三医院(捷尔医院)药剂科, 重庆 401120; 2. 昆明医科大学科研实验中心, 昆明 650500]

中图分类号 R965.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)12-1634-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.12.10

摘要 目的: 优化两种重组蛋氨酸酶表达的诱导条件, 并探讨其对宣威人肺腺癌细胞 GLC 的抑制作用。方法: 将重组蛋氨酸酶表达质粒 PGEX-4T1-4A1-MGL 和 PGEX-4T1-3B8-MGL 转染至感受态大肠杆菌 DH5 α 中, 用异丙基- β -D-硫代半乳糖苷诱导表达。以目标蛋白表达量为指标, 采用单因素试验对诱导前菌液起始光密度(OD_{600 nm})值、培养温度、诱导时间等诱导条件进行优化。采用亲和层析法对所得重组蛋氨酸酶 4A1-MGL、3B8-MGL 进行纯化; 采用考马斯蓝法检测其质量浓度, 十二烷基苯磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测其纯度, 分光光度法检测其活性。采用 MTT 法检测经低、中、高剂量重组蛋氨酸酶(4A1-MGL 和 3B8-MGL 分别均为 0.1、0.2、0.4 U/mL)作用 24、48、72 h 后的细胞增殖情况, 并计算细胞抑制率。结果: 两种重组蛋氨酸酶表达的最优诱导条件为菌液起始 OD_{600 nm} 值 0.9、培养温度 37 ℃、诱导时间 5 h。验证试验结果显示, 4A1-MGL、3B8-MGL 的蛋白表达量分别为 1.52 ± 0.04、1.28 ± 0.03 (RSD < 3%, n = 3)。经纯化后, 4A1-MGL 的质量浓度为 (0.70 ± 0.02) mg/mL, 纯度为 (96.42 ± 3.15)%, 活性为 (0.45 ± 0.02) U/mg; 3B8-MGL 的质量浓度为 (0.56 ± 0.02) mg/mL, 纯度为 (97.43 ± 2.96)%, 活性为 (0.91 ± 0.03) U/mg。经低、中剂量 4A1-MGL 和 3B8-MGL 作用 48、72 h, 高剂量 4A1-MGL 和 3B8-MGL 作用 24、48、72 h 后, GLC 细胞的抑制率均显著升高, 且高剂量组作用 72 h 时显著高于同时间点低、中剂量组 (P < 0.05)。结论: 本研究成功优化了重组蛋氨酸酶表达的诱导条件, 所得 4A1-MGL 和 3B8-MGL 可剂量依赖性地抑制 GLC 细胞增殖。

关键词 重组蛋氨酸酶; 诱导条件; 单因素试验; GLC 细胞; 抑制作用

Study on Expression Condition Optimization of Two Recombinant Methioninases and Their Inhibitory Effects on Human Lung Adenocarcinoma Cells GLC

LUO Shenqiang¹, TIAN Changfu²[1. Dept. of Pharmacy, the Third Affiliated Hospital of Chongqing Medical University (Gener Hospital), Chongqing 401120, China; 2. Scientific Research and Experiment Center, Kunming Medical University, Kunming 650500, China]

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the expression induction condition of two recombinant methioninases, and to investigate their inhibitory effects on the proliferation of human lung adenocarcinoma cells GLC. METHODS: Recombinant methioninases expression plasmid PGEX-4T1-4A1-MGL and PGEX-4T1-3B8-MGL were transfected into competent *Escherichia coli* Dh5 α , and induced by isopropyl- β -D-thiogalactoside. Using the expression level of target protein as index, the initial OD_{600 nm} value before induction, culture temperature and induction time were optimized by single factor test. The recombinant methioninase 4A1-MGL

- [21] 吴笑春, 辛华雯, 李馨, 等. 五酯胶囊对健康受试者他克莫司药动学的影响[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(8): 647-650.
- [22] 黄琪, 裴奇, 周于禄, 等. 五酯胶囊对拉米夫定人体内药动力学的影晌[J]. 中南药学, 2007, 5(5): 461-463.
- [23] 石庆玲. 五酯胶囊对阿托伐他汀药动学的影响[D]. 上海: 复旦大学, 2014.

^Δ 基金项目: 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项资金资助项目[No.2018FE001(-194)]

* 药师, 硕士。研究方向: 肿瘤基因治疗。电话: 023-60353253。E-mail: 650807@hospital.cqmu.edu.cn

通信作者: 研究员, 硕士生导师。研究方向: 肿瘤基因治疗。电话: 0871-65922555。E-mail: tiancf@21cn.com

- [24] XUE XP, QIN XL, XU C, et al. Effect of Wuzhi tablet (Schisandra sphenanthera extract) on the pharmacokinetics of cyclosporin A in rats[J]. *Phytother Res*, 2013, 27(8): 1255-1259.

(收稿日期: 2018-10-10 修回日期: 2019-03-18)

(编辑: 张元媛)