

不同肠道微环境下奈妥匹坦帕洛诺司琼胶囊对大鼠白蛋白紫杉醇药动学的影响^Δ

秦源蔓^{1*}, 褚文昊¹, 许佳祺², 李雨桐², 梁 博¹, 张学良¹, 刘 剑^{1#} (1. 河北医科大学第二医院药学部, 石家庄 050073; 2. 河北医科大学药学院, 石家庄 050011)

中图分类号 R979.1; R969.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)16-1993-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.16.07



摘要 **目的** 探究不同肠道微环境下奈妥匹坦帕洛诺司琼胶囊(NEPA)对大鼠注射用紫杉醇(白蛋白结合型)(简称“白蛋白紫杉醇”)药动学的影响。**方法** 将雄性SD大鼠分为正常组和模型组,每组16只。模型组大鼠灌胃万古霉素溶液构建肠道紊乱大鼠模型。造模后次日,分析其肠道菌群多样性,并检测其小肠及肝组织中细胞色素P450 3A1(CYP3A1)、CYP2C11 mRNA及肝组织中上述蛋白的表达。将雄性SD大鼠按前述方法分组,每组16只;将正常组分为TP化疗组(TP-1组)、TP化疗+NEPA组(TP+NEPA-1组),将模型组大鼠随机分为TP化疗组(TP-2组)、TP化疗+NEPA组(TP+NEPA-2组),每组8只。TP+NEPA-1组和TP+NEPA-2组大鼠分别单次灌胃NEPA混悬液25.8 mg/kg(以奈妥匹坦计);1 h后,4组大鼠均单次尾静脉注射白蛋白紫杉醇和顺铂药液。于末次给药后的不同时间点采集血样,以阿奇霉素为内标,采用液相色谱-串联质谱法检测血浆中紫杉醇的质量浓度,并采用DAS 2.0计算其主要药动学参数并进行组间比较。**结果** 与正常组大鼠相比,模型组大鼠的Chao1、Shannon指数均显著降低($P<0.05$),菌群组成及相对丰度变化明显;其肝组织中CYP3A1 mRNA、小肠及肝组织中CYP2C11 mRNA的表达均显著下调($P<0.05$)。与TP-1组比较,TP-2组大鼠体内紫杉醇的药时曲线下面积(AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$)、平均滞留时间(MRT_{0-t}),TP+NEPA-1组及TP+NEPA-2组大鼠体内紫杉醇的达峰浓度(C_{max})、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 均显著升高或延长;TP-2组大鼠体内紫杉醇的清除率(CL),TP+NEPA-1组及TP+NEPA-2组大鼠体内紫杉醇的表观分布容积(V_d)、CL均显著降低或缩短($P<0.05$)。与TP-2组比较,TP+NEPA-2组大鼠体内紫杉醇的 C_{max} 显著升高, V_d 、 MRT_{0-t} 均显著降低或缩短($P<0.05$)。**结论** 肠道菌群紊乱会影响CYP3A1、CYP2C11 mRNA的表达,导致紫杉醇在大鼠体内的清除减慢,暴露量增加;肠道菌群正常时,联用NEPA可增加紫杉醇在大鼠体内的暴露量;肠道菌群紊乱时,联用NEPA对紫杉醇体内暴露量的影响有限。

关键词 奈妥匹坦帕洛诺司琼;白蛋白紫杉醇;肠道菌群;药动学;药物相互作用

Effects of Netupitant and palonosetron hydrochloride capsules on the pharmacokinetics of albumin-bound paclitaxel in rats under different intestinal microenvironments

QIN Yuanman¹, CHU Wenhao¹, XU Jiaqi², LI Yutong², LIANG Bo¹, ZHANG Xueliang¹, LIU Jian¹ (1. Dept. of Pharmacy, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050073, China; 2. School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the impact of Netupitant and palonosetron hydrochloride capsules (NEPA) on the pharmacokinetics of Paclitaxel for injection (albumin bound) (i. e. albumin-bound paclitaxel) under different intestinal microenvironment conditions. **METHODS** Male SD rats were divided into a normal group and a model group ($n=16$). Rats in the model group were intragastrically administered vancomycin solution to establish an intestinal disorder model. The next day after modeling, intestinal microbiota diversity was analyzed, and the mRNA expressions of cytochrome P450 3A1 (CYP3A1) and CYP2C11 in small intestine and liver tissues as well as those protein expressions in liver tissue were measured. Male SD rats were grouped as described above ($n=16$). The normal group was subdivided into the TP chemotherapy group (TP-1 group) and the TP chemotherapy+NEPA group (TP+NEPA-1 group); the model group was subdivided into the TP chemotherapy group (TP-2 group) and the TP chemotherapy+NEPA group (TP+NEPA-2 group) ($n=8$). Rats in the TP+NEPA-1 and TP+NEPA-2 groups received a single intragastric dose of NEPA suspension (25.8 mg/kg, calculated by netupitant). One hour later, all four groups received a single tail vein injection of albumin-bound paclitaxel and cisplatin. Blood samples were collected at different time points after the last administration. Using azithromycin as the internal standard, plasma paclitaxel concentrations were determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The main pharmacokinetic parameters were calculated using DAS 2.0

^Δ 基金项目 河北省2022年度医学科学研究课题计划(No. 20221145)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:临床药学、药物体内相互作用。E-mail:qin030112@163.com

通信作者 副主任药师,硕士生导师,硕士。研究方向:药物体内相互作用。E-mail:27900021@hebmu.edu.cn

software and compared between groups. **RESULTS** Compared with the normal group, the model group showed significantly decreased Chao1 and Shannon indexes ($P<0.05$), significant alterations in microbiota composition and relative abundance, and significantly downregulated expressions of CYP3A1 mRNA in liver tissue and CYP2C11 mRNA in both small intestine and liver tissues ($P<0.05$). Compared with the TP-1 group, the AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, MRT_{0-t} of paclitaxel in the TP-2 group, the c_{max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ of paclitaxel in the TP+NEPA-1 group and TP+NEPA-2 group were significantly increased or prolonged; CL of paclitaxel in the TP-2 group, V_d and CL of paclitaxel in the TP+NEPA-1 group and the TP+NEPA-2 group were significantly decreased or shortened ($P<0.05$). Compared with the TP-2 group, c_{max} of paclitaxel in the TP+NEPA-2 group was significantly increased, and V_d and MRT_{0-t} were significantly decreased or shortened ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Intestinal microbiota disorder affects the mRNA expressions of CYP3A1 and CYP2C11, leading to decreased clearance and increased systemic exposure of paclitaxel. Concomitant administration of NEPA under normal intestinal microbiota condition increases paclitaxel exposure. However, under conditions of intestinal microbiota disorder, concomitant administration of NEPA has a limited impact on paclitaxel systemic exposure.

KEYWORDS netupitant and palonosetron; albumin-bound paclitaxel; gut microbiota; pharmacokinetics; drug interactions

恶性肿瘤已成为全球第二大死因^[1]。目前,对于无法通过手术完全切除或已经扩散的恶性肿瘤,化疗依然是临床标准治疗手段^[2]。注射用紫杉醇(白蛋白结合型)(简称“白蛋白紫杉醇”)是目前在临床上应用较为广泛的天然抗肿瘤药物,其与顺铂组成的TP化疗方案常被用于肺癌、宫颈癌等多种恶性肿瘤的治疗^[3]。实践表明,TP方案所引发的化疗呕吐大多属于高致吐性呕吐,需要给予止吐药进行干预,以缓解患者的不适感。奈妥匹坦帕洛诺司琼胶囊(Netupitant and palonosetron hydrochloride capsules, NEPA)是2019年在我国获批上市的止吐药。该药中的奈妥匹坦和帕洛诺司琼分别靶向神经激肽1受体和5-羟色胺3受体,协同发挥止吐作用,被相关指南推荐用于缓解TP方案引发的高致吐性呕吐^[4]。经研究证实,帕洛诺司琼与细胞色素P450 3A4 (cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4, CYP3A4)酶底物之间不存在具有临床意义的药物相互作用^[5];而奈妥匹坦是CYP3A4酶抑制剂,可能与主要经CYP3A4、CYP2C8酶代谢的白蛋白紫杉醇发生相互作用,从而影响后者的药动学行为^[3,6]。

研究指出,对于合并感染的肿瘤患者需联合使用抗菌药物进行治疗,然而抗菌药物可非选择性地杀灭肠道内细菌,从而造成肠道菌群紊乱^[7]。近年来,相关研究结果显示,肠道菌群不仅可直接影响肠道中CYP酶的表达,而且可通过肠肝轴调控宿主肝脏中代谢酶的表达,最终影响药物的体内代谢过程^[8]。此外,还有研究显示,肠道内的细菌可介导初级胆汁酸转化为石胆酸,而石胆酸与肝脏中CYP3A酶的表达有关,口服抗菌药物可通过影响产石胆酸的肠道细菌组成及丰度,进而对肝脏中CYP3A酶的表达起到调节作用^[9-10]。可见,肠道菌群介导的代谢酶变化也可能是影响药物药动学参数的重要因素之一。基于此,本研究拟考察肠道菌群正常和紊乱条件下联用NEPA对白蛋白紫杉醇药动学的影响,以期为合并感染且需接受化疗止吐治疗的恶性肿瘤患者的临床合理用药提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

LC-20AD型液相色谱仪购自日本Shimadzu公司;API 4000+型三重四极杆质谱仪购自美国AB Sciex公司;SVE-2型垂直电泳仪、SVT-2型转印电泳仪均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;Arhat 96型聚合酶链式反应(PCR)仪、Varioskan LUX型多功能酶标仪均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;LightCycler 480型实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)仪购自瑞士Roche公司;ChemiScope 3000mini型化学发光凝胶成像系统购自上海勤翔科学仪器有限公司;Bioanalyzer 2100型生物分析仪购自美国Agilent公司;NovaSeq 6000测序仪购自美国Illumina公司。

1.2 主要药品与试剂

紫杉醇对照品(纯度99.8%,批号100382-201904)、阿奇霉素对照品(纯度94.3%,批号130593-202004)均购自中国食品药品检定研究院;注射用紫杉醇(白蛋白结合型)(规格100 mg,批号B042308606)购自石药集团欧意药业有限公司;注射用顺铂(规格20 mg,批号FA2Y4001B)购自齐鲁制药有限公司;奈妥匹坦帕洛诺司琼胶囊[规格为每粒硬胶囊含奈妥匹坦0.3 g(0.1 g/片×3片)和盐酸帕洛诺司琼0.5 mg(以 $C_{19}H_{24}N_2O$ 计,软胶囊1粒),批号43001662]由爱尔兰Helsinn Birex Pharmaceuticals Ltd.生产;注射用盐酸万古霉素[规格0.5 g(50万单位,按 $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$ 计),批号216671A]由希腊VIANEX S. A.(PLANT C)生产;TRNzol通用试剂盒(批号DP424)购自天根生化科技(北京)有限公司;BCA蛋白定量检测试剂盒(批号K4101)、ECL化学发光试剂盒(批号K1129)均购自美国APEXBIO公司;逆转录试剂盒(批号R212-02)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;兔抗CYP3A1多克隆抗体(批号TA375293)购自美国OriGene公司;兔抗CYP2C11多克隆抗体(批号16546-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司;辣根过氧化物酶

标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗、兔抗 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体(批号分别为GB23303、GB11001)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;qRT-PCR所用引物由上海伟寰生物科技有限公司设计、合成。

1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠,体重(200±20)g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,动物生产许可证号为SCXK(京)2019-0008。所有动物均饲养于无特定病原体、温度(22±2)℃、相对湿度(55±10)%、昼夜光照周期变化(12 h光照、12 h黑暗)的环境中,自由摄食、饮水。本实验方案经河北医科大学第二医院科研伦理委员会批准(审查决议编号2024-AE385)。

2 方法与结果

2.1 血浆中紫杉醇浓度的检测

以阿奇霉素为内标,采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法检测血浆中紫杉醇的质量浓度。

2.1.1 色谱与质谱条件

色谱柱为Symmetry C₁₈(4.6 mm×150 mm, 3.5 μ m);流动相为0.2%甲酸溶液-甲醇(15:85, V/V);流速为0.7 mL/min;柱温为40℃;进样量为10 μ L。

采用电喷雾离子源,以多反应监测模式进行正离子扫描;离子源温度为550℃;喷射电压为5 500 V;用于紫杉醇及内标定量分析的离子对分别为 m/z 876.2→308.1、 m/z 591.8→158.1,去簇电压分别为100、91 V,碰撞电压分别为45、44 V。

2.1.2 溶液的配制

精密称取紫杉醇对照品适量,加甲醇溶解并稀释,制成质量浓度分别为0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 μ g/mL的系列工作液以及0.2、0.5、5、40 μ g/mL的定量下限、低、中、高质量浓度质控样品溶液。精密称取内标对照品适量,加甲醇溶解并稀释,制成质量浓度为25 μ g/mL的内标工作液。

取空白血浆(来源于未经任何处理的健康SD大鼠,下同)90 μ L,加入上述紫杉醇系列工作液10 μ L,制成质量浓度为20、50、100、200、500、1 000、2 000、5 000 ng/mL的系列模拟血浆样品以及20、50、500、4 000 ng/mL的定量下限、低、中、高质量浓度的质控模拟血浆样品。

2.1.3 血浆样品处理

取血浆样品100 μ L,置于1.5 mL离心管中,加入内标工作液10 μ L,涡旋混匀1 min;再加入含0.1%甲酸的乙腈400 μ L,涡旋混匀2 min,以1.09×10⁴ r/min离心10

min,取上清液,备测。

2.1.4 方法学考察

(1)专属性:取空白血浆样品、1 000 ng/mL的模拟血浆样品、未造模大鼠给予TP化疗+NEPA后1 h的血浆样品各适量,按“2.1.3”项下方法处理(空白血浆样品不加内标),再按“2.1.1”项下条件进样,记录色谱图。结果(图略)显示,紫杉醇和内标的保留时间分别为2.7、1.3 min,色谱峰峰形良好,血浆中的内源性物质及联用药物不干扰紫杉醇的定量分析。

(2)标准曲线绘制与定量下限考察:取“2.1.2”项下系列模拟血浆样品,按“2.1.3”项下方法处理,再按“2.1.1”项下条件进样分析,记录峰面积。以紫杉醇与内标的峰面积比值为纵坐标(Y)、紫杉醇质量浓度为横坐标(X),使用加权最小二乘法(加权系数为1/X²)进行线性回归,得回归方程为 $Y=0.001\ 01X+0.003\ 02$ ($R^2=0.999\ 2$),紫杉醇检测质量浓度的线性范围为20~5 000 ng/mL,定量下限为20 ng/mL。

(3)精密度、准确度与提取回收率试验:取“2.1.2”项下定量下限及低、中、高质量浓度质控模拟血浆样品,按“2.1.3”项下方法处理,再按“2.1.1”项下条件进样分析,记录峰面积A并代入随行标准曲线计算血浆中紫杉醇的质量浓度,每样品平行测定5次,考察日内精密度(以RSD表示)和准确度(以实测质量浓度与理论质量浓度的相对误差,即RE表示);连续测定3 d,考察日间精密度和准确度。取空白血浆,加入含0.1%甲酸的乙腈沉淀蛋白,取上清液90 μ L,分别加入“2.1.2”项下低、中、高质量浓度质控样品溶液10 μ L和内标工作液10 μ L,混匀,按“2.1.1”项下条件进样分析,记录峰面积B,每样品平行测定5次,以“ $A/B\times100\%$ ”计算提取回收率。结果见表1。

(4)基质效应试验:取空白血浆,加入含0.1%甲酸的乙腈沉淀,取上清液90 μ L,分别加入“2.1.2”项下低、中、高质量浓度质控样品溶液10 μ L和内标工作液10 μ L,混匀,按“2.1.1”项下条件进样分析,记录峰面积B;将空白血浆替换为等体积的甲醇,重复上述操作,按“2.1.1”项下条件进样分析,记录峰面积C。每质量浓度平行5份,以“ $B/C\times100\%$ ”计算紫杉醇和内标的基质因子(matrix factor, MF),再以“紫杉醇的MF值/内标的MF值 $\times100\%$ ”计算内标归一化MF值。结果显示,低、中、高质量浓度样品中紫杉醇的内标归一化MF值分别为(160.65±14.81)%、(166.02±7.52)%、(165.52±7.30)%,

表1 紫杉醇定量分析的精密度、准确度与提取回收率试验结果

理论质量浓度/(ng/mL)	日内精密度(n=5)			日间精密度(n=3)			提取回收率(n=5)	
	实测质量浓度($\bar{x}\pm s$)/(ng/mL)	RSD/%	RE/%	实测质量浓度($\bar{x}\pm s$)/(ng/mL)	RSD/%	RE/%	实测质量浓度($\bar{x}\pm s$)/(ng/mL)	RSD/%
20	19.67±1.05	5.34	-1.65	19.56±1.20	6.13	-2.20		
50	52.40±2.41	4.60	4.80	50.07±3.86	7.71	0.14	97.80±5.19	5.31
500	487.00±22.45	4.61	-2.60	493.13±29.46	5.97	-1.37	103.32±2.83	2.74
4 000	3 808.60±103.20	2.71	-4.78	3 865.07±214.21	5.54	-3.37	108.22±1.82	1.68

RSD 分别为 9.21%、4.53%、4.41% (均小于 15%, $n=5$), 提示紫杉醇的测定不受基质效应干扰。

(5) 稳定性: 取“2.1.2”项下低、中、高质量浓度的质控模拟血浆样品, 各 5 份, 分别考察其在进样器内放置 4 h、反复冻融 ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}\sim\text{室温}$) 3 次、长期冻存 15 d 的稳定性。结果显示, 上述条件下, 低、中、高质量浓度质控模拟血浆样品实测质量浓度的 RSD 分别为 5.24%、5.53%、5.19%, 3.31%、7.07%、1.87% 和 4.13%、4.57%、3.49% (均小于 15%, $n=5$), 提示紫杉醇在不同条件下稳定性良好。

2.2 肠道菌群紊乱大鼠模型的建立、验证及对 CYP 酶表达的影响

2.2.1 模型建立与验证

(1) 模型建立: 取 SD 大鼠 32 只, 随机分为正常组 (Normal 组) 和模型组 (Model 组), 每组 16 只。Model 组大鼠灌胃万古霉素溶液 50 mg/kg (以生理盐水为溶剂)^[11], Normal 组大鼠灌胃等体积生理盐水, 每天 1 次, 连续 7 d, 构建肠道紊乱大鼠模型。

(2) 模型验证: 于造模完成后次日 (实验第 8 天) 收集各组大鼠新鲜粪便, 置于无菌冻存管中, 于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存。取上述粪便样品, 进行微生物 16S rRNA 高通量测序 (由上海派森诺生物科技股份有限公司完成), 并利用 Greengenes 数据库对测序结果进行处理、分析, 对比两组在物种组成、 α 多样性、 β 多样性方面的差异, 结果分别以箱式图、散点图呈现。其中, α 多样性包括 Chao1 指数和 Shannon 指数, 分别反映菌群丰度和多样性 (上述指数越大, 表明某菌群丰度越高、多样性越丰富); β 多样性评价采用距离矩阵与主坐标分析 (principal coordinates analysis, PCoA), 以评估各样品细菌组成的相似程度 (若各样品的空间位置相距越远, 表明其组成差异越大)^[12]。采用 SPSS 20 软件对数据进行统计分析。符合正态分布的数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验; 不符合正态分布的数据以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示, 组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

(3) 验证结果: 两组大鼠肠道菌群物种比较结果 (图 1) 显示, 门水平上, 与 Normal 组比较, Model 组大鼠肠道菌群中厚壁菌门 Firmicutes 的相对丰度显著降低, 放线菌门 Actinobacteria 基本被耗竭 ($P<0.05$); 而变形菌门 Proteobacteria、螺旋体门 Spirochaetota 的相对丰度均显著升高 ($P<0.05$); 此外, 拟杆菌门 Bacteroidota 的相对丰度虽有所降低, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。属水平上, 与 Normal 组比较, Model 组大鼠肠道菌群中条件致病菌埃希氏菌属 *Escherichia*、副拟杆菌属 *Parabacteroides_B*、*Ornithospirochaeta* 的相对丰度均显著升高 ($P<0.05$); 而有益菌属乳酸杆菌属 *Lactobacillus*、双歧杆菌属 *Bifidobacterium*、罗姆布茨菌属 *Romboutsia_B*、梭菌属 *Clostridium_T* 则基本被耗竭 ($P<0.05$)。肠道菌群多样性分析结果 (图 2) 显示, 与 Normal 组比, Model 组大

鼠的 Chao1 指数、Shannon 指数均显著降低 ($P<0.05$), 且 PCoA 提示两组大鼠的肠道菌群组成差异明显。上述结果表明, 肠道菌群紊乱大鼠模型构建成功。

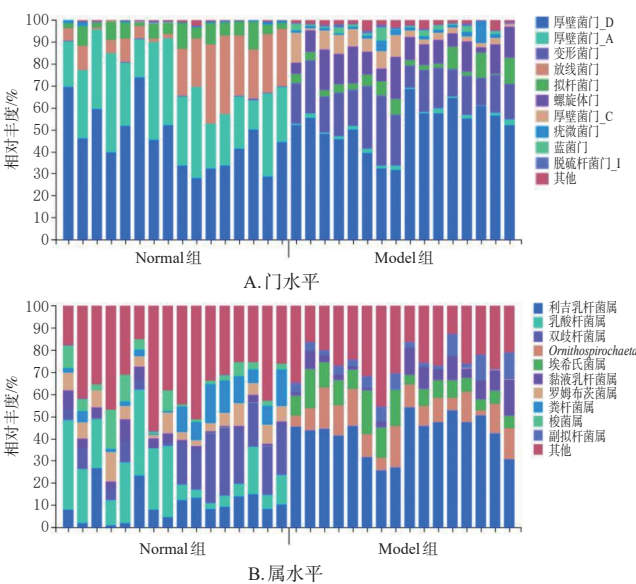


图 1 两组大鼠肠道菌群组成比较

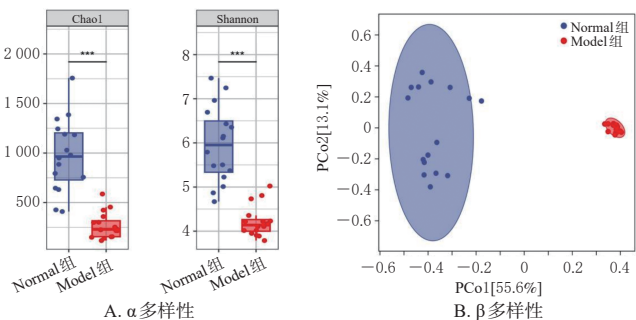


图 2 两组大鼠肠道菌群多样性比较

2.2.2 肠道菌群紊乱对大鼠体内 CYP 酶表达的影响

验证后, 随机取各组 3 只大鼠, 麻醉后处死, 迅速分离其小肠和肝组织, 清除表面血迹和污渍后, 用滤纸吸干, 经液氮冻速后, 于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存。分别采用 qRT-qPCR 法和 Western blot 法检测两组大鼠小肠及肝组织中 CYP3A1、CYP2C11 mRNA 及肝组织中 CYP3A1、CYP2C11 蛋白的表达情况 (人 CYP3A4 和 CYP2C8 在大鼠体内的同源物分别为 CYP3A1 和 CYP2C11^[13])。

(1) qRT-PCR 实验: 取上述冻存的大鼠小肠及肝组织适量, 研磨后, 以柱提法提取总 RNA, 待测定其浓度和纯度后逆转录成 cDNA, 并以此 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系包括正/反向引物 (序列及产物长度见表 2) 各 0.2 μL 、 $2\times$ 扩增试剂 5 μL 、cDNA 模板 1 μL , 加无酶水至 10 μL 。PCR 反应条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火/延伸 30 s, 共 40 个循环。以 β -actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 CYP3A1、CYP2C11 mRNA 的表达水平, 结果以 Normal 组为参照进行归一化处理。

表2 PCR引物序列及扩增产物长度

目的基因	引物(5'→3')	产物长度/bp
CYP3A1	正向:TCTGTGAGAAGCATCGAGT	92
	反向:TCGGATAGGGCTGTATGAGATT	
CYP2C11	正向:ACACGTGGATGTCACAGCTAA	148
	反向:GGCATCTGGCTCTGTCTTT	
β -actin	正向:GACATGCCGCTGGAGAAAC	92
	反向:AGCCCAGGATGCCCTTAGT	

(2)Western blot 实验:取上述冻存的大鼠肝组织适量,研磨后于冰上裂解,再混匀、离心。取上清液,经BCA法测定含量后,于沸水浴中加热15 min使变性。取变性蛋白适量,经电泳分离后转膜,以5%牛奶封闭30 min;洗膜后,加入CYP3A1、CYP2C11、 β -actin一抗(稀释比例分别为1:1 000、1:1 000、1:2 000),4℃下孵育过夜;洗膜后,加入相应二抗(稀释比例为1:5 000),室温下孵育30 min;再次洗膜后,加入ECL试剂显影、成像。使用Image J软件,用各目的蛋白与内参蛋白(β -actin)的灰度值比值作为目的蛋白的表达水平,结果以Normal组为参照进行归一化处理。

(3)检测结果:CYP3A1、CYP2C11 mRNA及蛋白表达检测结果(表3、图3)显示,与Normal组比较,Model组大鼠肝组织中CYP3A1 mRNA、小肠及肝组织中CYP2C11 mRNA的表达均显著下调($P<0.05$),而其余指标虽有下调趋势,但组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表3 两组小鼠体内CYP3A1、CYP2C11 mRNA及蛋白表达的比较($\bar{x}\pm s,n=3$)

组别	小肠CYP3A1 mRNA	肝CYP3A1 mRNA	肝CYP3A1	小肠CYP2C11 mRNA	肝CYP2C11 mRNA	肝CYP2C11
Normal组	1.00±0.49	1.00±0.19	1.00±0.11	1.00±0.37	1.00±0.06	1.00±0.26
Model组	0.90±0.21	0.57±0.08 ^a	0.81±0.20	0.52±0.12 ^a	0.54±0.14 ^a	0.72±0.04

a:与Normal组比较, $P<0.05$ 。

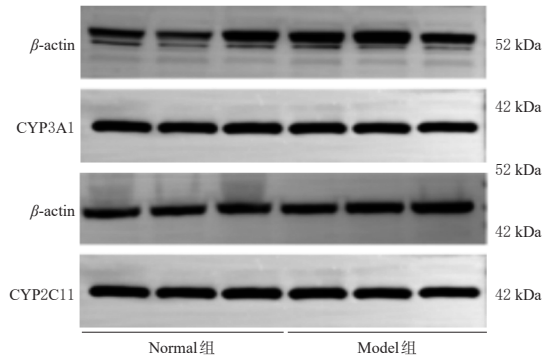


图3 两组大鼠肝组织中CYP3A1、CYP2C11蛋白表达的电泳图

2.3 药动学实验

另取32只大鼠,随机分为Normal组和Model组,各16只;将Normal组大鼠随机分为TP化疗组(TP-1组)、TP化疗+NEPA组(TP+NEPA-1组),将Model组大鼠随机分为TP化疗组(TP-2组)、TP化疗+NEPA组(TP+NEPA-2组),每组8只。禁食、不禁水12 h后,TP+

NEPA-1组和TP+NEPA-2组大鼠分别单次灌胃NEPA混悬液25.8 mg/kg(以奈妥匹坦质量计,以生理盐水为溶剂)^[14],TP-1组和TP-2组大鼠单次灌胃等体积生理盐水;1 h后,4组大鼠均单次尾静脉注射白蛋白紫杉醇药液14.82 mg/kg和顺铂药液11.12 mg/kg(均以生理盐水为溶剂)^[3]。分别在末次给药后0.08、0.25、0.5、1、2、4、6、10、16、24 h于眼内眦取血0.3 mL置于含肝素的离心管中,以 1.09×10^4 r/min离心5 min,取上层血浆,按“2.1.3”项下方法处理,再按“2.1.1”项下条件进样分析,以随行标准曲线计算各组大鼠血浆中紫杉醇的含量。采用DAS 2.0软件计算药动学参数,采用SPSS 20软件进行统计分析。其中,药时曲线下面积(AUC)、达峰浓度(c_{\max} ,即首点实测质量浓度)需经对数转换后再进行组间比较,具体统计学方法同“2.2.1(2)”项。

与TP-1组比较,TP+NEPA-1组大鼠体内紫杉醇的平均 c_{\max} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 分别增加了28.33%、42.46%、40.26%,平均表观分布容积(V_d)、清除率(CL)分别下降了35.40%、17.91%,组间比较差异均有统计学意义($P<0.05$);其平均半衰期($t_{1/2}$)下降了9.54%,平均滞留时间(MRT_{0-t})延长了3.32%,但组间差异均无统计学意义($P>0.05$)。与TP-2组比较,TP+NEPA-2组大鼠体内紫杉醇的平均 c_{\max} 增加了23.88%,平均 V_d 、 MRT_{0-t} 分别下降了29.36%、30.86%,组间比较差异均有统计学意义($P<0.05$);其平均 $t_{1/2}$ 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 分别下降了33.89%、4.31%、4.43%,但组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。与TP-1组比较,TP-2组大鼠体内紫杉醇的平均 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 MRT_{0-t} 分别增加了35.06%、35.09%、59.72%,平均CL下降了25.97%,组间比较差异均有统计学意义($P<0.05$);其平均 $t_{1/2}$ 、 V_d 分别增加了36.84%、0.93%,平均 c_{\max} 下降了1.26%,但组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。与TP-1组比较,TP+NEPA-2组大鼠体内紫杉醇的平均 c_{\max} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 分别增加22.32%、29.25%、29.10%,平均CL、 V_d 分别下降了20.60%、28.70%,组间比较差异均有统计学意义($P<0.05$);其平均 $t_{1/2}$ 降低了9.54%, MRT_{0-t} 增加了10.43%,但组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。结果见表4、图4。

4 讨论

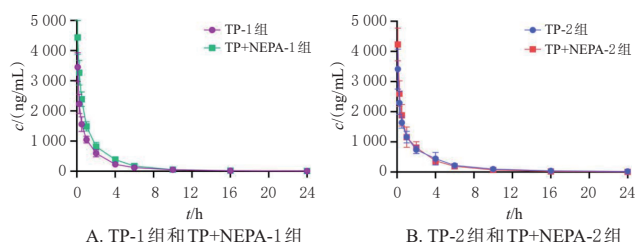
4.1 定量分析条件的优化

本课题组在流动相优化过程中发现,以0.2%甲酸溶液-甲醇作为流动相时,紫杉醇的色谱峰峰形及响应均更佳,这可能是因为紫杉醇结构中缺乏氨基、羧基等易电离基团,而加入甲酸可促进其电离^[15]。本课题组前期曾采用多西他赛作为内标,但在实践中发现,以简单的蛋白沉淀法处理尾静脉注射紫杉醇的大鼠血浆样品后,所得色谱图中内标的色谱峰较小(约为模拟血浆样品的一半),不利于紫杉醇的准确定量;随后,本课题组

表4 各组大鼠血浆中紫杉醇的药动学参数比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	$t_{1/2}/h$	$c_{max}/(ng/mL)$	$AUC_{0-t}/(ng \cdot h/mL)$	$AUC_{0-\infty}/(ng \cdot h/mL)$	$CL/(L/h)$	$V_d/(L/kg)$	MRT_{0-t}/h
TP-1组	3.04±0.94	3 458.29±476.62	4 420.80±786.13	4 552.99±839.89	3.35±0.62	14.04±2.06	2.11±0.56
TP+NEPA-1组	2.75±0.90	4 437.94±558.22 ^a	6 298.09±768.27 ^a	6 386.22±794.18 ^a	2.75±0.90 ^a	9.07±2.40 ^a	2.18±0.37
TP-2组	4.16±1.79	3 414.85±662.44	5 970.94±1 148.10 ^a	6 150.43±1 246.23 ^a	2.48±0.50 ^a	14.17±4.31	3.37±0.89 ^a
TP+NEPA-2组	2.75±0.75	4 230.30±541.08 ^{ab}	5 713.80±1 320.69 ^a	5 878.11±1 293.27 ^a	2.66±0.79 ^a	10.01±1.55 ^{ab}	2.33±0.56 ^b

a: 与TP-1组比较, $P<0.05$; b: 与TP-2组比较, $P<0.05$ 。

图4 各组大鼠血浆中紫杉醇的药时曲线($\bar{x} \pm s, n=8$)

改用液液萃取法处理样品,上述现象消失,推测可能与给药后血样中白蛋白含量增加,导致蛋白沉淀不完全,并与蛋白结合率高($>95\%$)的多西他赛共沉淀有关^[3]。鉴于液液萃取操作复杂且误差大,本研究最终选用蛋白结合率较低的阿奇霉素作为内标,仍采用蛋白沉淀法处理样品。此样品处理方法操作简便、误差小,方法学考察结果符合2020年版《中国药典》(四部)的相关要求。

4.2 肠道菌群紊乱对紫杉醇在大鼠体内药动学的影响

万古霉素经口服给药后在肠道内的浓度较高,对肠道细菌的抑制作用较强,并可破坏正常菌群的结构,加之其不与受试药物发生相互作用,故本研究选用万古霉素构建肠道菌群紊乱大鼠模型^[16]。本研究结果显示,肠道菌群紊乱后,大鼠血浆中紫杉醇的平均 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 MRT_{0-t} 分别较正常大鼠提高了35.06%、35.09%、59.72%,平均CL下降了25.97%(TP-2组 vs. TP-1组, $P<0.05$),说明药物在体内的清除速度减慢,暴露量增加。研究指出,肠道菌群改变可通过影响CYP酶活性而影响静脉用甲苯磺丁脲的药动学参数以及腹腔给予咪达唑仑在小鼠体内的代谢和组织积累^[17-18]。此外,梭菌属、乳酸杆菌属、拟杆菌属、双歧杆菌属细菌在胆盐水解酶的作用下可将初级胆汁酸转化为次级胆汁酸^[19],而次级胆汁酸中的石胆酸是孕烷X受体(pregnane X receptor, PXR)的配体,两者结合后可上调CYP3A1 mRNA的表达^[20-21];色氨酸的活性产物吲哚-3-丙酸(indole-3-propionic acid, IPA)是PXR的另一个配体,梭菌属细菌可介导色氨酸转化为IPA并上调CYP3A1 mRNA的表达^[8,22];肠道菌群的代谢产物[如短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)]可通过门静脉进入肝脏,从而改变多种药物酶mRNA的表达^[23],而厚壁菌门中的梭菌属可生成SCFAs,是维持肠道功能正常的有益菌属^[24]。本研究结果显示,肠道菌群紊乱后,Model组大鼠厚壁菌门、拟杆菌门的相对丰度有不同程度降低,双歧杆菌属、乳酸杆菌属及产生SCFAs的梭菌属均基本被耗竭;此外,肝组

织中CYP3A1 mRNA、小肠及肝组织中CYP2C11 mRNA的表达均显著下调,肝组织中CYP3A1、CYP2C11蛋白的表达亦有下调趋势,笔者由此推测,TP-2组大鼠体内紫杉醇暴露量的增加可能与肝脏中CYP3A1、CYP2C11 mRNA表达下调有关。

4.3 联用NEPA对紫杉醇在大鼠体内药动学的影响

本研究结果显示,正常大鼠联用NEPA后,其体内紫杉醇的平均 c_{max} 、 $AUC_{0-\infty}$ 分别提高了28.33%、40.26%(TP+NEPA-1组 vs. TP-1组),提示在肠道菌群正常的情况下,联用NEPA可增加紫杉醇在大鼠体内的暴露量,有助于提高抗肿瘤药效。此外,本研究结果还显示,与肠道菌群紊乱但未联用NEPA的大鼠比较,肠道菌群紊乱的大鼠联用NEPA后,其体内紫杉醇的平均 c_{max} 提高了23.88%,平均 V_d 、 MRT_{0-t} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 分别下降了29.36%、30.86%、4.31%、4.43%(TP+NEPA-2组 vs. TP-2组),提示肠道菌群紊乱+联用NEPA可使紫杉醇在大鼠体内的暴露量呈下降趋势;与肠道菌群正常的大鼠比较,肠道菌群紊乱的大鼠联用NEPA后,其体内紫杉醇的平均 c_{max} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 分别提高了22.32%、29.25%、29.10%(TP+NEPA-2组 vs. TP-1组),提示在肠道菌群紊乱的环境下,NEPA增加紫杉醇暴露量的作用明显不及肠道菌群正常的环境,即肠道菌群紊乱+联用NEPA不会对紫杉醇的暴露量产生叠加影响,笔者推测可能是因为肠道菌群紊乱破坏了肠道的正常功能^[25],从而影响了NEPA在肠道内的吸收或在肝脏中的代谢,进而减弱了NEPA对紫杉醇的影响^[26],但具体机制尚待进一步探索。此外,本研究结果还显示,无论是肠道菌群正常的大鼠还是肠道菌群紊乱的大鼠,联用NEPA后,其 $t_{1/2}$ 均短于联用前,由于 $t_{1/2}$ 的长短取决于 V_d 和CL的比值,故笔者推测这可能与 V_d 、CL的降幅接近,或 V_d 降低更为显著,或个体差异大有关,但仍需后续研究予以验证。

综上所述,肠道菌群紊乱会影响CYP3A1、CYP2C11 mRNA的表达,导致紫杉醇在大鼠体内的清除减慢,暴露量增加;在肠道菌群正常的条件下,联用NEPA可增加紫杉醇在大鼠体内的暴露量;在肠道菌群紊乱的条件下,联用NEPA对紫杉醇体内暴露量的影响有限。本研究通过研究肠道菌群、宿主和药物三者之间的关系,初步揭示了肠道菌群及联用NEPA对白蛋白紫杉醇药动学的潜在影响,为复杂情境下的临床化疗方案优化提供了理论支持。

参考文献

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3):229-263.
- [2] VASAN N, BASELGA J, HYMAN D M. A view on drug resistance in cancer[J]. Nature, 2019, 575(7782):299-309.
- [3] 陈伟, 王燕婷, 王宇, 等. 紫杉类抗肿瘤药物药学服务中国专家共识[J]. 中国医院用药评价与分析, 2022, 22(12):1409-1427.
- [4] RAPOPORT B L, HERRSTEDT J, SNOW R C, et al. 2023 updated MASCC/ESMO consensus recommendations: prevention of nausea and vomiting following multiple-day chemotherapy, high-dose chemotherapy, and breakthrough nausea and vomiting[J]. Support Care Cancer, 2023, 32(1):36.
- [5] NATALE J J, SPINELLI T, CALCAGNILE S, et al. Drug-drug interaction profile of components of a fixed combination of netupitant and palonosetron: review of clinical data[J]. J Oncol Pharm Pract, 2016, 22(3):485-495.
- [6] DEB S, HOPEFL R. Simulation of drug-drug interactions between breast cancer chemotherapeutic agents and antiemetic drugs[J]. Daru, 2023, 31(2):95-105.
- [7] DE MARTEL C, GEORGES D, BRAY F, et al. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis[J]. Lancet Glob Health, 2020, 8(2):e180-e190.
- [8] LI X C, GUO X L, LIU Y X, et al. Antibiotics affect the pharmacokinetics of n-butylphthalide *in vivo* by altering the intestinal microbiota[J]. PLoS One, 2024, 19(6):e0297713.
- [9] ZIMMERMANN M, ZIMMERMANN-KOGADEEVA M, WEGMANN R, et al. Mapping human microbiome drug metabolism by gut bacteria and their genes[J]. Nature, 2019, 570(7762):462-467.
- [10] WALSH J, GHEORGHE C E, LYTE J M, et al. Gut microbiome-mediated modulation of hepatic cytochrome P450 and P-glycoprotein: impact of butyrate and fructooligosaccharide-inulin[J]. J Pharm Pharmacol, 2020, 72(8):1072-1081.
- [11] HUANG C, FENG S Y, HUO F J, et al. Effects of four antibiotics on the diversity of the intestinal microbiota[J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(2):e0190421.
- [12] 陈怡琴, 杨娇, 裴文丽, 等. 黑逍遥散对APP/PS1小鼠认知障碍及其肠道菌群的调节作用[J/OL]. 中国实验方剂学杂志, 2025:1-18[2025-06-11]. <https://link.cnki.net/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.20250905>.
- [13] MANHAS D, BHATT S, RAI G, et al. Rottlerin renders a selective and highly potent CYP2C8 inhibition to impede EET formation for implication in cancer therapy[J]. Chem Biol Interact, 2023, 380:110524.
- [14] 中国抗癌协会癌症康复与姑息治疗专业委员会, 中国抗癌协会肿瘤临床化疗专业委员会, 中国抗癌协会肿瘤支持治疗专业委员会, 等. 中国抗肿瘤治疗相关恶心呕吐预防和治疗指南: 2023 版[J]. 中华肿瘤杂志, 2024, 46(6):481-501.
- [15] 钱隽, 郁韵秋. 液相色谱-质谱联用分析紫杉醇和多西他赛中流动相体系的优化[J]. 复旦学报(医学版), 2012, 39(6):605-610.
- [16] HAAK B W, LANKELMA J M, HUGENHOLTZ F, et al. Long-term impact of oral vancomycin, ciprofloxacin and metronidazole on the gut microbiota in healthy humans[J]. J Antimicrob Chemother, 2019, 74(3):782-786.
- [17] GUO J, XU Y, CHEN L J, et al. Gut microbiota and host CYP450s co-contribute to pharmacokinetic variability in mice with non-alcoholic steatohepatitis: effects vary from drug to drug[J]. J Adv Res, 2022, 39:319-332.
- [18] TOGAO M, KAWAKAMI K, OTSUKA J, et al. Effects of gut microbiota on *in vivo* metabolism and tissue accumulation of cytochrome P450 3A metabolized drug: midazolam[J]. Biopharm Drug Dispos, 2020, 41(7):275-282.
- [19] FLOWERS S A, BHAT S, LEE J C. Potential implications of gut microbiota in drug pharmacokinetics and bioavailability[J]. Pharmacotherapy, 2020, 40(7):704-712.
- [20] AVIOR Y, LEVY G, ZIMERMAN M, et al. Microbial-derived lithocholic acid and vitamin K2 drive the metabolic maturation of pluripotent stem cells-derived and fetal hepatocytes[J]. Hepatology, 2015, 62(1):265-278.
- [21] ISHII M, TODA T, IKARASHI N, et al. Gastrectomy increases the expression of hepatic cytochrome P450 3A by increasing lithocholic acid-producing enteric bacteria in mice[J]. Biol Pharm Bull, 2014, 37(2):298-305.
- [22] WIKOFF W R, ANFORA A T, LIU J, et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(10):3698-3703.
- [23] MUN S J, LEE J, CHUNG K S, et al. Effect of microbial short-chain fatty acids on CYP3A4-mediated metabolic activation of human pluripotent stem cell-derived liver organoids[J]. Cells, 2021, 10(1):126.
- [24] BILEN M, DUFOUR J C, LAGIER J C, et al. The contribution of culturomics to the repertoire of isolated human bacterial and archaeal species[J]. Microbiome, 2018, 6(1):94.
- [25] NATIVIDAD J M, AGUS A, PLANCHAIS J, et al. Impaired aryl hydrocarbon receptor ligand production by the gut microbiota is a key factor in metabolic syndrome[J]. Cell Metab, 2018, 28(5):737-749.e4.
- [26] ZHANG X T, HAN Y, HUANG W, et al. The influence of the gut microbiota on the bioavailability of oral drugs[J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(7):1789-1812.

(收稿日期:2025-03-04 修回日期:2025-06-29)

(编辑:张元媛)