HY152-J 对人重组肝微粒体细胞色素 P450 亚型酶的体外抑制作用

冯有恒[1,2]，王纪元[1,2]，顾留歌[1,2]，秦　燕[1,2*]

（1. 中国医药工业研究总院上海医药工业研究院创新药物与制药工艺国家重点实验室，上海 200437；
2. 上海市生物物质成药性评价专业技术服务中心，上海 200437）

摘要：目的 考察 HY152-J 对人重组肝微粒体细胞色素 P450（CYP450）5 种亚型酶活性的影响。**方法** 利用不同浓度 HY152-J 与重组酶的体外孵育试验，以睾酮、咪达唑仑、美芬妥英、右美沙芬、非那西汀和双氯芬酸为 CYP450 酶探针底物，应用优化液相色谱 - 串联质谱（LC-MS/MS）法比较代谢产物（6β- 羟基睾酮、1- 羟基咪达唑仑、4- 羟基美芬妥英、去甲右美沙芬、对乙酰氨基酚和 4- 羟基双氯芬酸）的量，计算半数抑制浓度（IC_{50}）值，评价 HY152-J 对 5 种人 CYP450 亚型酶的抑制活性。**结果** 在 HY152-J 浓度范围为 0 ～ 200 μmol/L 的各孵育体系中，CYP3A4（6β- 羟基睾酮）、CYP3A4（1- 羟基咪达唑仑）、CYP2C19（4- 羟基美芬妥英）、CYP2D6（去甲右美沙芬）、CYP1A2（对乙酰氨基酚）和 CYP2C9（4- 羟基双氯芬酸）的剩余活性百分比分别为 4.6%、0.6%、0.3%、8.1%、32.5% 和 15.3%，对应 IC_{50} 值分别为 21.02、2.66、1.23、14.9、71.0 和 35.8 μmol/L。**结论** HY152-J 对 CYP3A4（1- 羟基咪达唑仑）和 CYP2C19 具有中度抑制作用，对 CYP3A4（6β- 羟基睾酮）、CYP2D6、CYP1A2 和 CYP2C9 抑制作用较弱。

关键词：HY152-J；肝微粒体；细胞色素 P450 酶；优化液相色谱 - 串联质谱（LC-MS/MS）

中图分类号：R521；R978.3　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1672-9188（2018）02-0130-05

DOI：10.13683/j.wph.2018.02.011

Inhibitory effect of HY152-J against artificial restructured human liver microsomal CYP450 enzymes *in vitro*

FENG You-heng[1,2], WANG Ji-yuan[1,2], GU Liu-ge[1,2], QIN Yan[1,2*]

（*1. State Key Lab of New Drug and Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200437;*
2. Shanghai Professional and Technical Service Center for Biological Material Druggability Evaluation, Shanghai 200437, China）

Abstract: ***Objective*** To study the inhibitory effect of HY152-J against artificial restructured human liver microsomal CYP450 enzymes *in vitro*. ***Methods*** The method of single substrate CYP450 enzyme probe was used to study the inhibitory effect of HY152-J, and the metabolites of the precipitated samples for each probe were analyzed by LC-MS/MS. The concentration of metabolites was assayed to calculate the IC_{50} for inhibitory potency evaluation. ***Results*** The residual activities of CYP3A4（6β-hydroxytestosterone）, CYP3A4（1-hydroxymidazolam）, CYP2C19（4-hydroxymephenytoin）, CYP2D6（dextrophan）, CYP1A2（acetaminophen）and CYP2C9（4-hydroxydiclofenac）were analyzed as 4.6%, 0.6%, 0.3%, 8.1%, 32.5% and 15.3% respectively, and the IC_{50} values were 21.02, 2.66, 1.23,14.9, 71.0 and 35.8 μmol/L. ***Conclusion*** The inhibitory effects of HY152-J on CYP3A4（1-hydroxymidazolam）, CYP2C19 are moderate inhibition，and the effects on CYP3A4（6β-hydroxytestosterone）, CYP2D6, CYP1A2 and CYP2C9 are very few effections.

Key words: HY152-J; liver microsome; CYP450 enzyme; LC-MS/MS

收稿日期：2017-11-06；**修回日期：**2017-12-18

作者简介：冯有恒，硕士研究生，专业方向：药物代谢动力学。

通信作者：秦　燕，研究员，从事药物代谢动力学研究。

基金项目：上海市科委“科技创新行动计划”生物医药领域科技支撑项目（编号：13431900203）。

耐多药结核病（MDR-TB）是指结核杆菌对异烟肼、利福平等一线抗结核药物耐药性增加而形成的更为严重且较难治愈的结核病[1]。MDR-TB 是导致肺结核患者死亡的主要原因，目前该病患者的数量不断增加，生命安全受到严重威胁，故研制新型的抗耐多药结核杆菌的药物具有十分重要的意义[2-3]。研究抗耐多药结核杆菌的作用机制研究发现，小分子化合物 HY152-J（图 1）的效果优于目前临床常用的一线抗结核药，该化合物具有一定的成药性，有望开发成为一种抗 MDR-TB 的新药[4-5]。

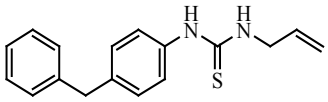


图 1　HY152-J 的化学结构式

Figure 1　The chemical structural formula of HY152-J

细胞色素 P450（CYP450）酶是肝微粒体混合功能氧化酶体系中最重要的功能氧化酶，临床的绝大多数药物通过该酶的 5 种重要亚型（1A2、2C19、2D6、3A4 和 2C9）在代谢过程中发挥作用[6]。药物筛选早期知晓 HY152-J 对肝药酶是否存在抑制作用，对上市后指导临床用药、提高药物疗效和降低药物的不良反应具有重要意义。本研究应用单一探针底物法测定人重组肝微粒体 CYP450 酶中的 5 种亚型酶的活性参数[7]。在稳定的温孵体系条件下，应用优化液相色谱 - 串联质谱（LC-MS/MS）分析研究 HY152-J 对肝微粒体 CYP450 酶的 5 种亚型酶（1A2、2D6、2C19、3A4 和 2C9）是否存在抑制作用，旨在为后续药物的相互作用和临床用药研究提供参考。

1　材料与方法

1.1　仪器

戴安公司 Mltimate 3 000 液相色谱系统（包括 Mltimate 3 000 型三元输液泵，Mltimate 3 000 型柱温箱，Mltimate 3 000 型自动进样器和 Mltimate 3 000 型真空脱气机）和 AB 公司 4000 Q-Trap 型串联质谱仪，配有电喷雾电离源（ESI 源），AB 公司 Analyst（version 1.5.1）；CPA225D 型十万分之一电子天平（北京赛多利斯仪器系统有限公司）；DK-8B 型电热恒温水槽（上海精宏实验设备有限公司）；5415R 型冷冻高速离心机、AG22331 Hamburg 型旋涡混合器（德国 Eppendorf 公司）。

1.2　试剂

HY152-J 原料药（生产批号：20151125，含量≥ 98%）由复旦大学提供；人重组肝微粒体酶 CYP1A2（生产批号：69375）、CYP2C19（生产批号：69446）、CYP2D6（生产批号：75311）、CYP3A4（生产批号：81745）及 CYP2C9（生产批号：4266002）均购自美国 BD Gentest 公司。还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADPH）（生产批号：LPC0N11），购自北京百灵威科技有限公司；苯海拉明（生产批号：A0286925），购自 ACROS 公司；二甲基亚砜（生产批号: LPC0N11），购自 SIGMA 公司。

1.3　溶液配制

HY152-J 溶液：精密称取化合物 HY152-J 适量，用二甲基亚砜溶解，制成 1 mg/ml 的贮备液。精密吸取贮备液适量，用 50% 甲醇逐级稀释成系列浓度校准工作液（浓度为 0、0.5、1、5、10、25、50 及 200 μmol/L），4 ℃保存。

代谢物对照品溶液：精密称取各个代谢物对照品（6β- 羟基睾酮、1- 羟基咪达唑仑、4- 羟基美芬妥英、去甲右美沙芬、对乙酰氨基酚和 4- 羟基双氯芬酸）适量，用甲醇溶解，制成对照品贮备液。精密吸取贮备液适量，用 50% 甲醇逐级稀释成系列浓度代谢物对照品校准工作液，用 50% 甲醇同法分别稀释代谢物对照品贮备液制成低浓度、中浓度和高浓度溶液，作为质控工作液，4 ℃保存。

内标溶液：精密称取苯海拉明对照品适量，加甲醇溶解，配制成 1 mg/ml 的内标贮备液。精密吸取内标贮备液适量，用 50% 甲醇稀释成 50 ng/ml 内标工作液，4 ℃保存。

1.4 温孵体系及样品处理

在 100 μl 总孵育体系中，将磷酸盐缓冲盐溶液（100 mmol/L）、重组酶（250 pmol/ml）、探针底物和受试药混匀，37 ℃ 水浴条件下预孵 5 min，加入 NADPH（1 mmol/L）启动反应。反应至一定时间，取一倍体积的冰乙腈终止反应，再加入内标工作液和两倍孵育体系体积的冰乙腈沉淀，反应最终体系有机溶剂的最终含量不超过 1。涡旋混合，13 000 rpm 离心 5 min（4 ℃），取上清进样分析。根据本课题组建的方法[8-10]，5 种亚型酶对应的探针底物及其代谢产物、孵育浓度及时间如下：睾酮（6β- 羟基睾酮，50 μmol/L，35 min, CYP3A4）、咪达唑仑（1- 羟基咪达唑仑，5 μmol/L，10 min，CYP3A4）、美芬妥英（4- 羟基美芬妥英，100 μmol/L，35 min，CYP2C19）、右美沙芬（去甲右美沙芬，10 μmol/L，20 min，CYP2D6）、非那西汀（对乙酰氨基酚，50 μmol/L，50 min，CYP1A2）和双氯芬酸（4- 羟基双氯芬酸，100 μmol/L，30 min，CYP2C9）。

1.5 样品测定

将浓度为 0、0.5、1、5、10、25、50 和 200 μmol/L 的 HY152-J 溶液分别与 CYP450 的 5 种亚型酶对应的 6 种底物温孵。以 LC-MS/MS 方法测定孵育体系中代谢物浓度，使用 GraphPad Prism5. 0 软件计算各亚型酶代谢物（6β- 羟基睾酮、1- 羟基咪达唑仑、4- 羟基美芬妥英、去甲右美沙芬、对乙酰氨基酚和 4- 羟基双氯芬酸）的半数抑制浓度（IC_{50}）值。

1.6 色谱条件

色谱柱 KromasiLC$_{18}$ 柱（150×2.1 mm，5 μmol/L）；流动相甲酸铵溶液（A）：甲醇（B），梯度洗脱（洗脱程序见表 1）；流速 0.3 ml/min；柱温 40 ℃。

表 1 液相色谱分离的梯度洗脱程序

Table 1 High performance liquid chromatography separation gradient elution procedure

时间/min	A/%	B/%
0.0	80	20
0.3	10	90
3.0	10	90
3.1	80	20
5.5	80	20

1.7 质谱条件

离子源为电喷雾离子源（ESI）；干燥气体（N_2）温度 500 ℃；电喷雾电压为 5 500 V；检测方式为正离子检测；扫描方式选择反应监测（MRM）方式；扫描时间为 0. 1 s。质谱检测参数见表 2。

1.8 方法学验证

用 LC-MS/MS 法测得 5 种亚型酶的 6 种代谢物标准曲线。测得代谢物（对乙酰氨基酚、4- 羟基美芬妥英、去甲右美沙芬、6β- 羟基睾酮、1- 羟基咪达唑仑、4- 羟基双氯芬酸）的线性回归方程。

2 结果

2.1 线性关系考察

结果表明，各个代谢产物在各自浓度范围内线性关系良好，在空白孵育体系中分别加入低、中、高三个浓度质控样品，测得各代谢物精密度均小于

表 2 LC-MS/MS 法测定 7 种待测物的 MRM 参数

Table 2 The MRM parameters of seven kinds of waiting matters determined by using LC-MS/MS method

检测离子	母离子（Q 1 Mass）/Da	子离子（Q 3 Mass）/Da	去簇电压（DP）/V	碰撞电压（CE）/eV
苯海拉明	256.1	167.1	50	16
1-羟基咪达唑仑	342.0	324.2	117	30
对乙酰氨基酚	152.0	110.1	71	24
4-羟基美芬妥英	235.1	150.2	95	28
去甲右美沙芬	258.2	157.2	100	52
6β-羟基睾酮	305.1	269.3	97	30
4-羟基双氯芬酸	312.1	230.0	61	46

15%，准确度均波动在上下 15% 之内（表 3），符合生物样品测定的相关规范。

2.2 样品测定结果

结果显示，各亚型酶代谢物 6β- 羟基睾酮、1- 羟基咪达唑仑、4- 羟基美芬妥英、去甲右美沙芬、对乙酰氨基酚及 4- 羟基双氯芬酸的剩余活性比值分别为 4.6%、0.6%、0.3%、8.1%、32.5% 和 15.3%，对应 IC_{50} 值分别为 21.02、2.66、1.23、14.9、71.0 和 35.8 μmol/L。HY152-J 在 0 ～ 200 μmol/L 浓度范围内，药物对 CYP1A2、CYP2D6、CYP3A4（1- 羟基咪达唑仑）、CYP2C19、CYP3A4（6β- 羟基睾酮）

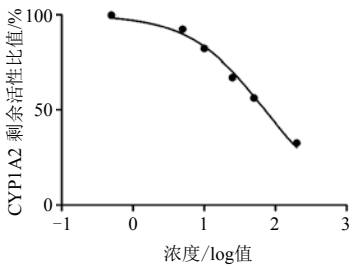


图 2　CYP1A2 剩余活性比值
Figure 2　Residual activity of CYP1A2

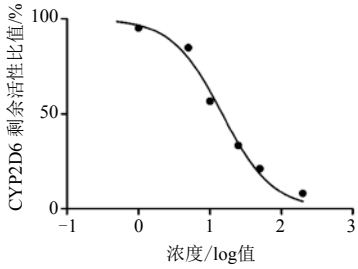


图 3　CYP2D6 剩余活性比值
Figure 3　Residual activity of CYP2D6

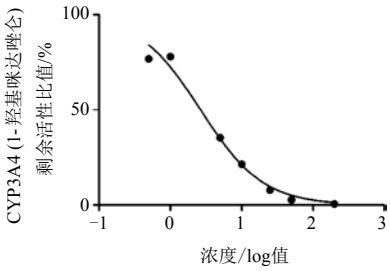


图 4　CYP3A4（1- 羟基咪达唑仑）剩余活性比值
Figure 4　Residual activity of CYP3A4 (1-hydroxymidazolam)

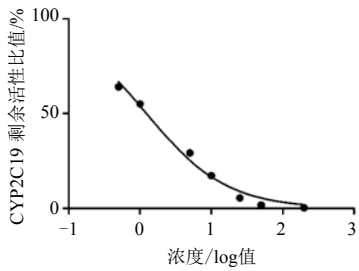


图 5　CYP2C19 剩余活性比值
Figure 5　Residual activity of CYP2C19

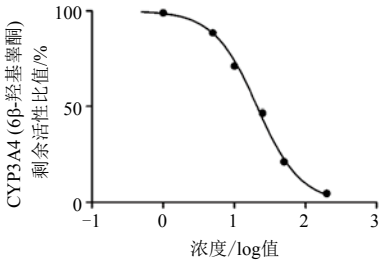


图 6　CYP3A4（6β- 羟基睾酮）剩余活性比值
Figure 6　Residual activity of CYP3A4 (6β-hydroxytestosterone)

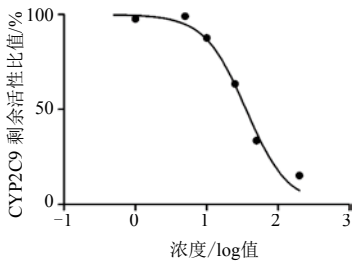


图 7　CYP2C9 剩余活性比值
Figure 7　Residual activity of CYP2C9

表 3 各代谢产物测定的线性回归方程

Table 3 Linear regression equation for the determination of metabolic products

检测离子	线性方程	相关系数	线性范围/nmol·ml^{-1}	精密度	准确度
对乙酰氨基酚	$Y=5.49\times10^{-5}X+7.81\times10^{-4}$	0.997 1	100~4 000	3.4～9.0	87.3～93.3
4-羟基美芬妥英	$Y=6.45\times10^{-4}X-4.39\times10^{-5}$	0.999 6	10~1 000	7.2～10.1	90.1～104.2
去甲右美沙芬	$Y=1.55\times10^{-3}X+4.04\times10^{-2}$	0.998 2	100~4 000	1.4～7.8	94.1～99.3
6β-羟基睾酮	$Y=2.77\times10^{-4}X+7.22\times10^{-3}$	0.999 8	250~25 000	6.7～12.0	101.9～112.5
1-羟基咪达唑仑	$Y=3.58\times10^{-3}X+0.16$	0.997 6	50~2 500	8.1～13.2	86.2～110.9
4-羟基双氯芬酸	$Y=3.87\times10^{-3}X+4.65\times10^{-2}$	0.999 2	50~4 000	8.2～11.9	99.5～103.5

和 CYP2C9 的抑制结果见图 2 ～ 7。

3 讨论

本研究在体外重组人肝微粒体孵育体系中，探针底物选用了美国食品药品管理局推荐的种类和浓度，系统性地评价了 HY152-J 对于 5 种比较常见 CYP 同工酶的抑制作用[7]。通过建立 LC-MS/MS 法定量评价了 HY152-J 对 CYP 酶的抑制活性。采用单一探针底物法，使 CYP450 各亚型酶分别与其对应的底物反应，有效避免了混合探针底物温孵对试验结果造成的干扰，最大程度优化了不同酶亚型的反应程度。肝微粒体 CYP450 酶 3A4、2C19、2D6、1A2 和 2C9 介导了 90% 以上临床药物的生物转化，是作为 CYP 酶药物相互作用的研究重点[7]。从参考文献知悉，IC_{50} ＞ 10 μmol/L 属于较弱抑制，1 μmol/L ＜ IC_{50} ＜ 10 μmol/L 属于中度抑制，IC_{50} ＜ 1 μmol/L 属于强抑制[11]。

4 结论

本研究结果显示，HY152-J 对 CYP2C19 和 CYP3A4（1- 羟基咪达唑仑）属于中度抑制作用；对 CYP3A4（6β- 羟基睾酮）、CYP2D6、CYP1A2 和 CYP2C9 抑制作用较弱。其血浆浓度或有效剂量的确定及其临床意义尚需作进一步评价。

参考文献：

[1] World Health Organization. Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistanttuberculosis[M]. Switzerland: WHO, 2014: 672-682.

[2] Köser CM, Javid B, Liddell K, *et al*. Drug-resistance mechanisms and tuberculosis drugs[J]. Lancet, 2015, 385(9965): 305-307.

[3] World Health Organization. Global tuberculosis report 2016[R]. Switzerland: WHO, 2016.

[4] 李梁, 肖峰, 许玲美, 等. 抗结核候选化合物 HY152-J 与转运蛋白 P-gp 相互作用的 LC-MS/MS 法考察[J]. 中国医药工业杂志, 2016, 47(10): 1289-1293.

[5] 李梁, 顾留歌, 檀琼, 等. 候选药物 HY152-J 大鼠在体肠吸收动力学研究[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(6): 665-669.

[6] Tanaka E. Clinically important pharmacokinetic drug-drug interactions: role of cytochrome P450 enzymes[J]. J Clin Pharm Ther, 1998, 23(6): 403-416.

[7] Lynch T, Price A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects[J]. Am Fam Physician, 2007, 76(3): 391-396.

[8] Huang SM, Strong JM, Zhang L, *et al*. New era in drug interaction evaluation: US Food and drug administration update on CYP enzymes, transporters, and the guidance process[J]. J Clin Pharmacol, 2008, 48(6): 662-670.

[9] Fowler S, Zhang H. *In vitro* evaluation of reversible and irreversible cytochrome P450 inhibition: current status on methodologies and their utility for predicting drug-drug interactions[J]. Am Assoc Pharmaceutical Sci J, 2008, 10(2): 410-424.

[10] Chatterjee P, Franklin MR. Human cytochrome P450 inhibition and metabolic-intermediate complex formation by goldenseal extract and its methylenedioxyphenyl components[J]. Drug Metab Dispos, 2003, 31(11): 1391-1397.

[11] Falzon D, Schünemann HJ, Haraμsz E, *et al*. World Health Organization treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis, 2016 update[J]. Eur Respir J, 2017, 49(3): 1602308-1602308.

（责任编辑：王 佳）