

雷公藤甲素衍生物雷腾舒的体外代谢研究

徐叶^{1,2}, 杜江波¹, 冯慧瑾¹, 左建平¹, 许红涛^{1*}, 李援朝^{1*}, 钟大放^{1,2*}

(1. 中国科学院上海药物研究所新药研究国家重点实验室, 上海 201203; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 本课题的目的是研究雷公藤甲素衍生物雷腾舒的体外代谢特征。将雷腾舒分别与人、猴、犬、大鼠或小鼠的肝细胞一起孵育, 共鉴定出4个代谢物, 分别为环氧水解开环代谢物(M1)、谷胱甘肽结合代谢物(M2)和单氧化并谷胱甘肽结合代谢物(M3-1和M3-2)。在人或大鼠肝微粒体孵育体系中, 共鉴定出7个代谢物, 分别为脱氢代谢物(M4)和单氧化代谢物(M5-1~M5-6)。通过化学半合成和大鼠原代肝细胞孵育的方法获得代谢物的对照品, 并与以上代谢物相对比, 确认了5个代谢物的结构, 分别为12,13-环氧水解开环代谢物M1、12-谷胱甘肽结合代谢物M2、(16S)-单羟基化代谢物M5-1、(2R)-单羟基化代谢物M5-4和(19R)-单羟基化代谢物M5-5。体外活性评价显示, 仅(2R)-羟基化代谢物表现出弱的免疫抑制活性, 其活性不足母体药物的十分之一, 同时毒性也显著降低。提示雷腾舒可能在体内经历代谢失活和减毒。

关键词: 雷腾舒; 药物代谢; 代谢物鉴定; 肝细胞; 肝微粒体

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)08-1484-09

Studies on the metabolism of a triptolide derivative (5R)-5-hydroxytriptolide *in vitro*

XU Ye^{1,2}, DU Jiang-bo¹, FENG Hui-jin¹, ZUO Jian-ping¹, XU Hong-tao^{1*},
LI Yuan-chao^{1*}, ZHONG Da-fang^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The purpose of current study is to investigate the metabolic profile of a triptolide derivative (5R)-5-hydroxytriptolide *in vitro*. (5R)-5-Hydroxytriptolide was incubated with the hepatocytes of human, monkey, dog, rat or mouse, respectively. Compared with inactivated hepatocytes, four metabolites were identified in hepatocytes from all five species: oxidative ring-opening metabolite (M1), glutathione-conjugating metabolite (M2), and monooxidative combined with glutathione-conjugating metabolites (M3-1 and M3-2), respectively. In human or rat liver microsomes, seven metabolites of (5R)-5-hydroxytriptolide were found, dehydrogenated metabolite (M4) and monooxidative metabolites (M5-1 – M5-6), respectively. Reference standards for the metabolites were obtained either through chemical semisynthesis or biotransformation through rat primary hepatocytes. The structures of five metabolites were confirmed, which were 12,13-epoxy ring-opening metabolite M1, 12-glutathione-conjugating metabolite M2, (16S)-, (2R)- and (19R)-monohydroxylated metabolites M5-1, M5-4, and M5-5, respectively. *In vitro* activity assay revealed that only (2R)-hydroxylated metabolite exhibited weak immunosuppressive activity with less than one-tenth the activity of its parent drug, and a significant decrease in toxicity was observed. It is suggested that (5R)-5-hydroxytriptolide might undergo metabolic inactivation and detoxification *in vivo*.

Key words: (5R)-5-hydroxytriptolide; metabolism; metabolite confirmation; hepatocytes; liver microsomes

收稿日期: 2019-04-24; 修回日期: 2019-06-03.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373479).

*通讯作者 Tel: 86-21-50800738, E-mail: dfzhong@simm.ac.cn; ycli@mail.shenc.ac.cn; xuht@shanghaitech.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0327

雷公藤甲素是中药雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. F., TwHF) 有效成分中最具代表性的化合物, 于1972年从雷公藤中提取分离出来, 为环氧二萜内酯类化合物, 具有抗炎、免疫抑制^[1,2]以及广谱的抗癌活性^[3]。然而, 雷公藤甲素也历来被认为是雷公藤毒性的主要来源, 例如肝、肾、生殖系统毒性等^[4,5], 这些都极大地限制了雷公藤甲素的临床应用。为了得到具有良好成药性的雷公藤内酯醇衍生物, 药物化学家对其进行了大量的结构改造^[6]。雷腾舒作为雷公藤甲素结构改造的衍生物之一, 是雷公藤甲素 (5*R*)-位羟基化衍生物, 与雷公藤甲素具有类似的药理活性^[7,8]。

雷腾舒作为1类新药, 2008年申请临床, 申报适应证为“类风湿性关节炎”, 并于2009年获得临床试验批件。2017年雷腾舒又以新的适应证—艾滋病慢性异常免疫激活—向国家食品药品监督管理局提出了申请, 并于2018年获得了临床试验批件 (http://www.spfchina.com/news_center/news_detail.html?id=29)。

尽管雷腾舒的药理活性得到了广泛的关注和研究, 但目前与其药物代谢相关的研究报道则相对较少。在前期的研究中^[9], 作者发现与雷公藤甲素类似, 雷腾舒也主要由CYP3A4 (占64.2%) 代谢, 但未对其代谢物进行表征。

结合以上背景, 本研究的目的是通过体外代谢模型 (肝细胞和肝微粒体) 研究雷腾舒的代谢特征, 并对雷腾舒的代谢物结构进行确证, 为临床研究提供一定的支持。

材料与amp;方法

材料与试剂 雷腾舒 (批号: T8-235-95, 99.11%) 由上海医药集团中央研究院合成室提供 (中国), 地塞米松 (批号: Y16N6C5757) 购自上海源叶生物科技有限公司 (中国), 雷公藤甲素 (批号: O1006AS) 购自大连美仑生物技术有限公司 (中国), 大鼠 (批号: 21027) 和人 (批号: 23418) 肝微粒体购自BD公司 (Woburn, MA, USA), 混合原代人肝细胞 (批号: 1410266)、混合原代食蟹猴肝细胞 (批号: 1610047)、混合原代雄性比格犬肝细胞 (批号: 1610325)、混合原代雄性Sprague-Dawley大鼠肝细胞 (批号: 1610175) 和混合原代雄性CD-1小鼠肝细胞 (批号: 1510134) 购自美国Xenotech公司, 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (批号: 10380624, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 购自德国罗氏公司, 羧甲基纤维素钠 (批号: SLBT6423, sodium carboxymethylcellulose, CMC-Na) 购自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), 甲醇 (批号: I0951807816) 和乙腈 (批号: JA06330, HPLC级) 购自

德国Merck公司 (Darmstadt, Germany), 甲酸 (批号: 37UHN-HN, 分析纯) 购自Fluka公司 (St. Louis, MO, USA); 去离子水由Millipore Milli-Q纯水仪制备 (Millipore, Molsheim, France)。其他试剂如未经特殊说明, 均购自国药集团, 分析纯。

体外肝细胞孵化实验 雷腾舒储备液由DMSO制备。每个孵化体系总体积为100 μL , 介质为William's Medium E培养基 (pH 7.4), 包括细胞密度为每毫升 1.0×10^6 个肝细胞和终浓度为 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的雷腾舒, 37°C 孵化, 在反应180 min后加入冰冷乙腈100 μL 终止反应, 所有孵化样本均为双样本。将孵化样品双样本合并, 全取合并样品, 加入乙腈400 μL , 涡流1 min, 离心5 min ($11\ 000 \times g$), 取出全部上清液置于10 mL试管中, 于 40°C 氮气流下吹干, 残留物以乙腈-水 (1:9) 120 μL 复溶。取复溶液5 μL 用于UPLC-UV/Q TOF 5600+ MS进样分析。

体外肝微粒体孵化实验 孵育体系 (200 μL) 包括磷酸缓冲液 ($100 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4), 大鼠或人肝微粒体 ($1 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 雷腾舒 ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和NADPH ($2 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。每一反应体系都重复双样本, 以不加NADPH的体系作为阴性对照组。 37°C 孵育1 h后, 用两倍体积的冰冷乙腈 (400 μL) 终止反应。混合物涡流混匀后, $11\ 000 \times g$ 离心5 min, 全部取上清转移至玻璃管中, 于 40°C 氮气流下吹干, 残留物以乙腈-水 (1:9) 120 μL 复溶。取复溶液5 μL 用于UPLC-UV/Q TOF 5600+ MS进样分析。

体外肝微粒体代谢稳定性 孵育体系 (100 μL) 包括磷酸缓冲液 ($100 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4), 大鼠或人肝微粒体 ($1 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 雷腾舒 ($3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和NADPH ($2 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。每一反应体系都重复双样本。 37°C 孵育, 大鼠肝微粒体孵育样本分别于0、5、10、15、30、45和60 min的时间点, 人肝微粒体于0、20、40 min、1、2、3、6 h的时间点, 用等体积含内标 (雷公藤甲素 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的冰冷乙腈 (100 μL) 终止反应。混合物涡流混匀后, $11\ 000 \times g$ 离心5 min, 全部取上清于 40°C 氮气流下吹干, 残留物以乙腈-水 (1:9) 120 μL 复溶。雷腾舒的检测采用文献^[9]中的非衍生化的检测条件。

仪器和检测条件

代谢物的检测 使用Triple TOF 5600+型四极杆-飞行时间串联质谱仪 (Q-TOF MS), 配备电喷雾电离源 (ESI源) 和CDS自动校正系统, 美国Applied Biosystems公司; Acquity UPLC液相色谱系统, 包括二元输液泵、自动进样器、柱温箱、脱气机, 美国Waters公司。

色谱分离 采用Waters柱子 (100 mm \times 2.1 mm,

1.8 μm ID), 柱温设为 40 $^{\circ}\text{C}$, 自动进样器温度为 4 $^{\circ}\text{C}$ 。流动相为 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵水溶液含 0.1% 甲酸 (A 相) 和乙腈 (B 相), 流速为 0.4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 采用梯度洗脱, 0~3.00 min, 5% B 相, 3.00~15.00 min, B 相从 5% 增加到 45%, 15.00~17.00 min, B 相从 45% 增加到 99%, 17.00~21.00 min, B 相从 99% 降到 5%。

质谱检测 通过 Triple TOF 5600⁺ MS (AB Sciex)。质量范围设为 m/z : 100~1 000, 电喷雾电离源, 正离子检测模式, 离子源电压为 5 500 V, 源温度为 550 $^{\circ}\text{C}$, 离子源气体 1 为 55 psi (1 psi \approx 6.9 kPa), 离子源气体 2 为 55 psi, 气帘气体为 40 psi, 去簇电压为 80 V。一级全扫描时碰撞能量为 10 eV, 产物离子扫描时碰撞能量为 20 ± 10 eV, 扫描范围为 m/z 100~1 000, 采用自动校正系统 (CDS) 外标法校正质量数, 信息相关扫描方式 (information-dependent acquisition, IDA) 和质量亏损过滤 (mass defect filter, MDF) 共同用于激发二级质谱采集。

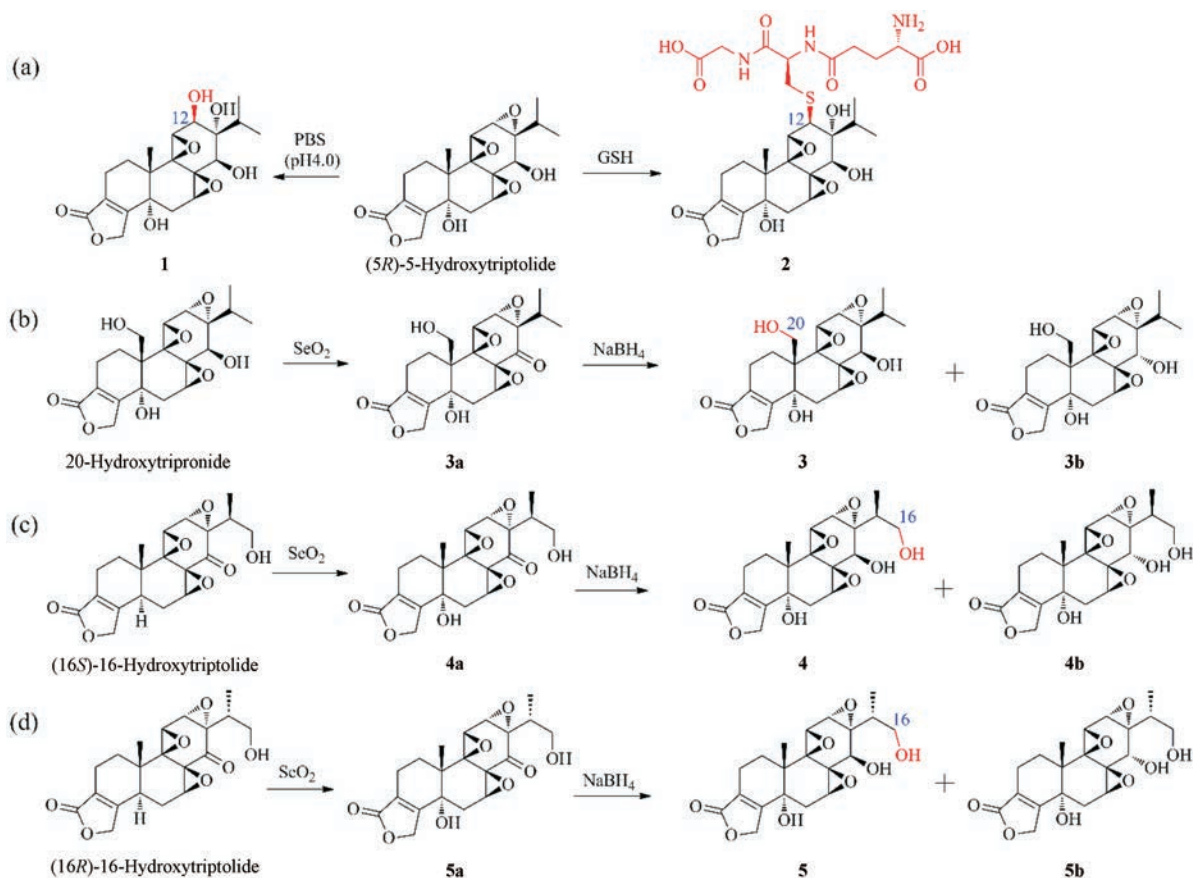
代谢物对照品制备

化学合成法制备代谢物 代谢物对照品的制备, 主要通过两种方法: 化学合成法和生物转化法。化学合成共得到 5 个雷腾舒的衍生物, 如路线图 1 所示。其中化合物 3 的合成方法已在之前的文章中描述过^[10],

采用二氧化硒 (SeO_2) 分别氧化 (16*S*)-羟基雷公藤内酯酮 (hydroxytriptolide) 和 (16*R*)-羟基雷公藤内酯酮^[11] 的烯丙位 (C-5) 得到相应的 C-5 位羟基化合物 4a 和 5a, 然后用硼氢化钠 (NaBH_4) 还原其 C-14 位羰基得到化合物 4 和 5。化合物 1、2、4 和 5 的合成过程描述如下。

化合物 1 的合成: 称取雷腾舒 (25 mg, 0.065 mmol) 置于 100 mL 反应瓶中, 加入磷酸缓冲溶液 50 mL (pH = 4.0), 回流反应 24 h, 冷却到室温后, 加入二氯甲烷萃取, 依次用饱和食盐水、清水洗涤, 二氯甲烷层浓缩后经 HPLC 分离得到化合物 1 (11.5 mg, 0.029 mmol, 45%, 白色固体)。¹H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 4.94 (dd, $J = 14.9, 10.7$ Hz, 2H), 4.02 (dd, $J = 5.5, 1.7$ Hz, 1H), 3.79 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 3.33 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H), 3.25 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 2.48~2.00 (m, 4H), 1.90~1.71 (m, 1H), 1.31 (dd, $J = 11.8, 3.7$ Hz, 1H), 1.14 (s, 3H), 1.01 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 0.91 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, MeOD) δ 175.7, 161.8, 128.4, 77.8, 76.3, 73.1, 70.6, 70.1, 65.3, 61.9, 60.4, 59.5, 41.4, 31.5, 28.5, 26.0, 18.1, 17.1, 16.0, 15.9; HRMS (ESI) Calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 395.170 6, found 395.171 1。

化合物 2 的合成: 称取还原性谷胱甘肽 (76.8 mg,



Scheme 1 The processes of the synthesis of compounds 1-5 (a-d)

0.25 mmol) 置于 100 mL 反应瓶中, 加入碳酸钠缓冲溶液 (pH 9.2) 20 mL, 然后用 NaOH 溶液 (0.5 mol·L⁻¹) 调 pH 8.4, 之后加入溶有雷腾舒 (20 mg, 0.05 mmol) 的四氢呋喃溶液 5 mL, 室温搅拌反应过夜后, 加入二氯甲烷萃取, 依次用饱和食盐水、清水洗涤, 二氯甲烷层浓缩后经 HPLC 分离得到化合物 **2** (26.6 mg, 0.039 mmol, 79%, 白色固体)。¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ 4.91 (q, *J* = 18.4 Hz, 2H), 4.53 (dd, *J* = 9.4, 4.6 Hz, 2H), 3.92 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 3.69 (t, *J* = 9.8 Hz, 2H), 3.56 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 3.44 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 3.31 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 3.28~3.14 (m, 2H), 2.91 (dd, *J* = 14.1, 9.7 Hz, 1H), 2.51~2.14 (m, 7H), 2.12~1.92 (m, 4H), 1.63 (dq, *J* = 8.5, 6.4 Hz, 1H), 1.26 (dd, *J* = 12.5, 5.0 Hz, 1H), 0.96 (s, 3H), 0.84 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.74 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 176.2, 175.8, 174.8, 171.5, 160.3, 126.8, 78.1, 74.2, 71.4, 69.9, 66.9, 60.5, 60.0, 58.8, 53.9, 52.6, 45.5, 43.0, 39.7, 33.1, 31.2, 29.0, 28.4, 26.8, 23.9, 16.1, 15.6, 14.6, 14.4; HRMS (ESI) Calcd. for C₃₀H₄₂N₃O₁₃ [M+H]⁺ 684.243 8, found 684.244 5。

化合物 **4** 的合成: 称取化合物 **4a** (20 mg, 0.051 mmol) 置于 10 mL 反应瓶中, 加入甲醇 1 mL, 冷却到 0 °C 之后加入 NaBH₄ (3.8 mg, 0.1 mmol), 搅拌反应 30 min 后, 经 HPLC 分离得到化合物 **4** (5.1 mg, 25%, 白色固体)。¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 4.96~4.91 (m, 2H), 3.87 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 3.68 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 3.49 (s, 1H), 3.46 (dd, *J* = 10.9, 7.8 Hz, 1H), 3.40~3.34 (m, 2H), 2.29 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 2.40~2.12 (m, 3H), 2.14~1.99 (m, 2H), 1.82 (td, *J* = 11.9, 6.2 Hz, 1H), 1.64~1.55 (m, 1H), 1.25 (dd, *J* = 12.8, 5.4 Hz, 1H), 1.14 (s, 3H), 0.97 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, MeOD) δ 174.5, 162.2, 125.7, 72.8, 70.7, 68.9, 63.3, 62.4, 62.2, 61.2, 58.9, 56.5, 54.9, 40.4, 36.5, 30.5, 23.4, 16.7, 15.4, 11.4; HRMS (ESI) Calcd. for C₂₀H₂₅O₈ [M+H]⁺ 393.154 9, found 393.154 9。

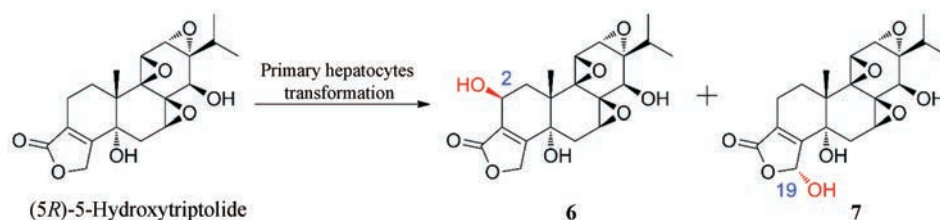
化合物 **5** 的合成: 称取化合物 **5a** (15 mg, 0.038 mmol) 置于 10 mL 反应瓶中, 加入甲醇 1 mL, 冷却到 0 °C 后加入 NaBH₄ (2.9 mg, 0.076 mmol), 搅拌反应 30 min 后,

经 HPLC 分离得到化合物 **5** (3.6 mg, 24%, 白色固体)。¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 4.97~4.90 (m, 2H), 3.88 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 3.69 (dd, *J* = 11.1, 6.3 Hz, 1H), 3.58~3.56 (m, 2H), 3.51 (dd, *J* = 11.1, 6.5 Hz, 1H), 3.36 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 2.29 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 2.25~2.15 (m, 3H), 2.14~2.00 (m, 2H), 1.96 (dt, *J* = 14.0, 7.0 Hz, 1H), 1.82 (td, *J* = 12.0, 6.2 Hz, 1H), 1.63~1.55 (m, 1H), 1.27~1.19 (m, 1H), 1.14 (s, 3H), 0.97 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, MeOD) δ 174.6, 162.2, 125.7, 72.3, 70.7, 68.9, 63.9, 63.3, 62.3, 61.2, 59.0, 56.4, 55.1, 40.4, 38.8, 30.5, 23.4, 16.7, 15.4, 11.1; HRMS (ESI) Calcd. for C₂₀H₂₅O₈ [M+H]⁺ 393.154 9, found 393.154 7。

通过生物转化法制备代谢物对照品 雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (6~8 周龄, 200~220 g) 购自上海斯莱克实验动物有限公司 [合格证号: SCXK (沪) 2007-0005], 被饲养于清洁级动物饲养房中, 动物房中温度恒定, 相对湿度恒定, 12 h 昼夜循环。所有动物实验均经过中国科学院上海药物研究所实验动物伦理委员会批准。

连续 3 天灌胃给予地塞米松 (50 mg·kg⁻¹·d⁻¹, CMC-Na 混悬), 利用两步灌流法分离制备大鼠原代肝细胞。代谢物的生物转化是将雷腾舒 100 μmol·L⁻¹ 与自制的大鼠肝原代细胞混悬液 (每毫升 1.0×10⁶ 个细胞) 共同孵化, 孵化体积为 50 mL, 共 10 份, 37 °C 孵育 4 h, 收集孵化液, 离心去除沉淀后, 浓缩, 利用半制备液相分离纯化, 最终得到两个单加氧的代谢物 **6** 和 **7** (路线图 2)。

化合物 **6** (白色固体): ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 5.04~4.90 (m, 1H), 4.49 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 3.86 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 3.58 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 3.47 (s, 1H), 3.35 (s, 1H), 2.38 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 2.28~2.20 (m, 1H), 2.18 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 2.05 (dd, *J* = 13.9, 5.8 Hz, 1H), 1.43 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H), 1.32 (s, 3H), 0.99 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.86 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, MeOD) δ 175.0, 165.7, 127.6, 73.8, 72.2, 70.0, 65.6, 64.6, 62.9, 60.4, 60.1, 58.2, 56.1, 41.8, 34.5, 31.8, 29.2, 20.1, 18.0, 17.1; HRMS (ESI) Calcd. for C₂₀H₂₅O₈ [M+H]⁺ 393.154 9, found 393.155 9。



Scheme 2 The process of obtaining of compounds **6** and **7**

化合物 **7** (白色固体): ^1H NMR (500 MHz, MeOD) δ 6.45 (s, 1H), 3.88 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 3.60 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 3.50 (s, 1H), 3.36 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 2.49 (dd, $J = 15.8, 5.2$ Hz, 1H), 2.38 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 2.32~2.21 (m, 2H), 2.21~2.12 (m, 1H), 1.83 (td, $J = 12.0, 6.3$ Hz, 1H), 1.25 (dd, $J = 12.7, 5.6$ Hz, 1H), 1.17 (s, 3H), 1.02 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 0.89 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, MeOD) δ 171.7, 162.0, 129.8, 100.5, 72.4, 71.2, 64.1, 63.2, 61.2, 59.1, 56.5, 54.7, 40.4, 30.3, 27.8, 23.3, 17.2, 16.6, 15.7, 15.5; HRMS (ESI) Calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 393.154 9, found 393.155 2.

代谢物毒性和免疫抑制活性评价

细胞制备 BALB/c 小鼠 (雄性, 6~8 周龄, 购自上海斯莱克实验动物有限公司) 在无菌环境下被处死, 摘取脾脏, 去除细胞碎片和细胞团块, 制备成单个脾脏细胞悬液。红细胞用 Tris-氯化铵缓冲溶液 ($0.155 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4Cl 和 $16.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris, pH 7.2) 裂解。单核细胞清洗后, 用含有青霉素 ($100 \text{ u}\cdot\text{L}^{-1}$) 和链霉素 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 RPMI 1640 培养基重悬。体外实验时, 将 5 只小鼠脾脏混合用于细胞制备。

MTT 实验 细胞毒性实验采用 MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide) 法测定, 将脾细胞悬液 (每孔 1×10^4 , $100 \mu\text{L}$) 与雷腾舒或者雷腾舒的衍生物 (化合物 **1**~**7**) 的含 10% 胎牛血清的培养液 ($100 \mu\text{L}$) 一起培养 48 h, 三样本平行。不加药的细胞作为对照组。之后吸除药液 $120 \mu\text{L}$, 每孔加入新鲜配置的 MTT 溶液 ($20 \mu\text{L}$, $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 即终浓度为 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 37°C 下培养 4 h, 小心吸去上清, 每孔加入 DMSO $150 \mu\text{L}$, 震荡 10 min, 之后于 570 nm 处读取 OD 值并计算细胞死亡率。

细胞分裂实验 脾淋巴细胞与 $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 刀豆蛋白 A (concanavalin A, ConA) 或 $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、雷腾舒或其衍生物 (化合物 **1**~**7**) 于 37°C 共同培养 48 h, 三样本平行。在培养结束前的 8 h 加入 $[\text{^3H}]$ -thymidine $25 \mu\text{L}$, 然后继续培养 48 h, 最后收集细胞置于玻璃纤维过滤器中, 使用 Beta

闪烁计数器来测量放射性。

数据处理 代谢物鉴定的样品采用 AB Sciex 公司的 Analyst[®] TF V1.6 和 Waters 公司的 Masslynx V4.1 软件进行数据采集, 采用 AB Sciex 公司的 PeakView[®] V1.2 和 MetabolitePilot V1.5 软件进行数据分析。

代谢稳定性数据通过 Analyst 软件 (1.6.2; AB Sciex, Foster City, CA, USA) 采集, 结果利用 Excel 软件处理, 以平均值 (双样本) 表示。肝脏固有清除率 (CL_{int}) 计算采用以下方法^[12,13]: 以孵育体系中原形药物的 ln (剩余率) 对孵育时间作图, 进行线性回归得到斜率 k , 按公式 1 求得药物的体外清除半衰期 ($t_{1/2}$, min) 和 CL_{int} ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$):

$$t_{1/2} = -0.693/k$$

$$\text{CL}_{\text{int}} = \frac{0.693}{t_{1/2}} \times \frac{\text{孵育体积 (mL)}}{\text{微粒体 (mg)}} \times \frac{\text{微粒体 (mg)}}{\text{肝重 (g)}} \times \frac{\text{肝重 (g)}}{\text{体重 (kg)}} \quad (1)$$

结果

1 雷腾舒在 5 种属肝细胞中的代谢物

利用 MetabolitePilot 软件对雷腾舒的人、猴、犬、大鼠和小鼠肝细胞孵化样品数据进行处理, 获得相关的代谢物质谱图和紫外色谱图 (图 1)。与失活肝细胞相比, 除原形药物外, 在人、猴、犬、大鼠和小鼠细胞孵化样品中共检测到 3 种相关离子, 分别为氧化开环代谢产物 (M1)、谷胱甘肽结合代谢产物 (M2) 和单氧化并谷胱甘肽结合代谢产物 (M3-1 和 M3-2), 见表 1。除猴肝细胞中检测到全部 3 种代谢产物外, 其他种属的肝细胞中均只检测到部分。

2 雷腾舒在人和大鼠肝微粒体中的代谢物

随后将雷腾舒和人或大鼠肝微粒体共同孵育, 利用 MetabolitePilot 软件对雷腾舒的微粒体样品数据进行处理, 获得相关的代谢物谱图 (图 2)。与阴性对照组相比, 除原形药物外, 人肝微粒体中鉴定得到 4 个代谢产物, 大鼠肝微粒体中鉴定得到 7 个代谢产物。其中

Table 1 The UPLC/Q-TOF-MS information of (5*R*)-5-hydroxytriptolide metabolites in the hepatocytes of human, monkey, dog, rat and mouse

Metabolite	Metabolic pathway	Formula	m/z	ppm	t_{R}/min	LC-MS peak area				
						Human	Monkey	Dog	Rat	Mouse
M0	Parent	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_7$	377.159 2	-0.6	9.36	4.89E+04	6.64E+04	7.04E+04	5.96E+04	5.39E+04
M1	Hydrolysis of epoxy group	$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_8$	395.168 8	-3.2	8.13	6.03E+02	6.90E+02			
M2	Glutathione conjugation	$\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_{13}\text{S}$	684.243 5	0.3	7.08	1.23E+04	5.97E+04	9.48E+03	1.12E+04	3.20E+04
M3-1	Glutathione conjugation and oxidation	$\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_{14}\text{S}$	700.236 7	-2.2	6.14		2.70E+03			
M3-2	Glutathione conjugation and oxidation	$\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_{14}\text{S}$	700.237 2	-1.4	6.46		3.63E+03		2.49E+03	

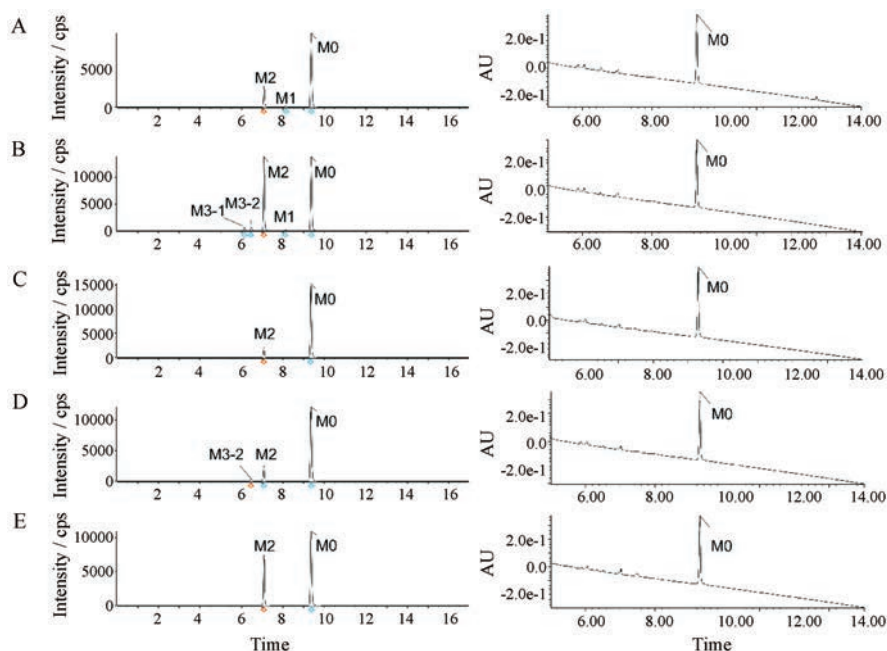


Figure 1 Metabolic profiles of (5R)-5-hydroxytriptolide in human (A), monkey (B), dog (C), rat (D) and mouse (E) hepatocyte

人肝微粒体中的4种代谢物在大鼠肝微粒体中都有检测到,说明不存在人肝微粒体特异性的代谢物(表2),分别命名为M4、M5-1~M5-6。

3 雷腾舒的UPLC/Q-TOF MS分析

对雷腾舒溶液进行UPLC/Q-TOF MS分析,推测质谱裂解规律,为其代谢产物结构推测奠定基础。在本研究选取的色谱条件下,雷腾舒的色谱保留时间为9.35 min,一级全扫描质谱图中(图3A),获得 m/z 377.158 8的准分子离子 $[M+H]^+$ 。雷腾舒的结构中仅含有C、H、O三种原子,产物离子扫描模式下(图3B)未获得特征性碎片离子。

4 代谢物鉴定

4.1 代谢物M1 ($[M+H]^+$, m/z 395.171) 根据准确分子量,推测M1的分子式组成为 $C_{20}H_{26}O_8$,与原形药物相比增加了18 Da,这一变化有可能是因为雷腾舒12,13-位环氧开环的代谢物。该代谢物经过比对,与化合物1的色谱和质谱行为一致。

4.2 代谢物M2 ($[M+H]^+$, m/z 684.244) 根据准确分子量,推测M2的分子式组成为 $C_{30}H_{41}N_3O_{13}S$,与原形药物相比增加了307 Da,暗示M2为雷腾舒谷胱甘肽结合代谢物。经比对,M2与化合物2具有相同的色谱和质谱行为。

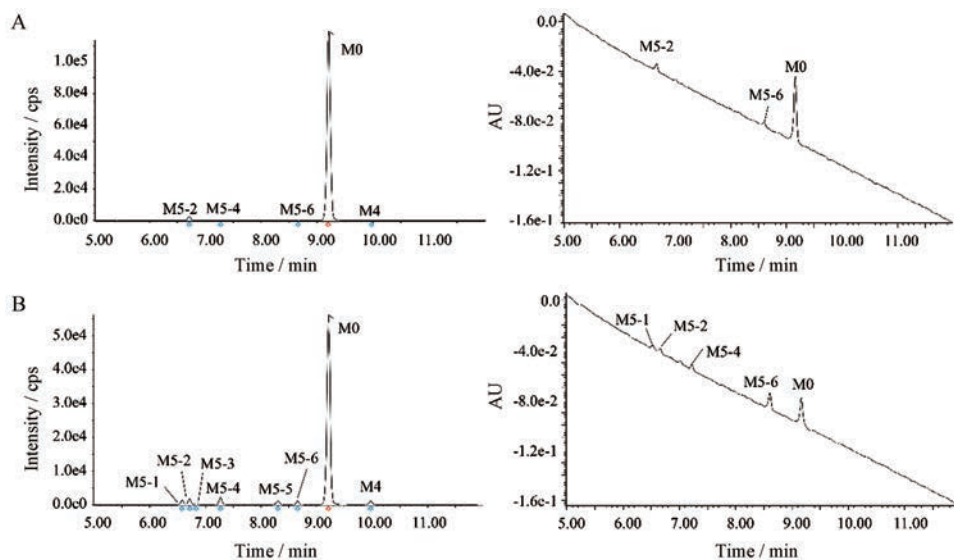


Figure 2 Metabolite profiles of (5R)-5-hydroxytriptolide in human (A) and rat liver microsomes (B)

Table 2 The UPLC/Q-TOF-MS information of (5*R*)-5-hydroxytriptolide metabolites in human liver microsomes (HLM) and rat liver microsomes (RLM). *M5 is actually a mono-oxidation metabolite of (5*R*)-5-hydroxytriptolide which is assumed to be unstable in the ionization source

Metabolite	Metabolic pathway	Formula	<i>m/z</i>	ppm	<i>t_R</i> /min	LC-MS peak area	
						HLM	RLM
M0	Parent	C ₂₀ H ₂₄ O ₇	377.160 5	2.6	9.37	5.25E+05	2.38E+05
M4	Desaturation	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	375.144 5	1.7	10.1	9.71E+02	4.70E+03
M5-1	Oxidation	C ₂₀ H ₂₄ O ₈	393.155 6	3.1	6.72		5.14E+03
M5-2	Oxidation	C ₂₀ H ₂₄ O ₈	393.155 2	2.1	6.85	1.17E+04	7.02E+03
M5-3	Oxidation	C ₂₀ H ₂₄ O ₈	393.155 4	2.6	6.96		1.29E+03
M5-4	Oxidation	C ₂₀ H ₂₄ O ₈	393.155 3	2.4	7.39	3.04E+02	8.38E+03
M5-5*	Desaturation	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	375.145 0	3.2	8.46		5.01E+03
M5-6	Oxidation	C ₂₀ H ₂₄ O ₈	393.154 7	0.9	8.78	9.87E+02	4.48E+03

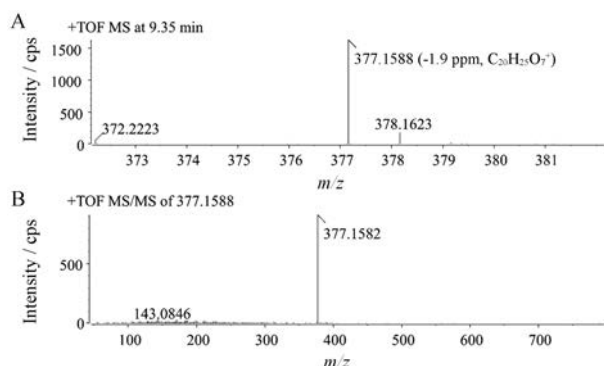


Figure 3 UPLC/Q-TOF-MS analysis of (5*R*)-5-hydroxytriptolide solution. A: MS spectrum of *m/z* (5*R*)-5-hydroxytriptolide; B: MS/MS spectrum of (5*R*)-5-hydroxytriptolide

4.3 代谢物 M3 ([M+H]⁺, *m/z* 700.239) M3-1 和 M3-2 的准确分子质量相同, 推测其分子式组成为 C₃₀H₄₁N₃O₁₄S, 与原形药物相比增加了 323 Da, 暗示 M3 为雷腾舒单氧化并谷胱甘肽结合代谢物, 代谢位点未知。

4.4 代谢物 M4 ([M+H]⁺, *m/z* 375.144) 根据准确分子量, 推测其分子式组成为 C₂₀H₂₂O₇, 与原形药物相比减少了 2 Da, 即原形药物脱去一分子 H₂, 脱氢位点未知。

4.5 代谢物 M5 ([M+H]⁺, *m/z* 393.155) M5-1~M5-6 与原形药物相比均增加了 16 Da。根据准确分子量, 推测其分子式组成为 C₂₀H₂₄O₇, 暗示 M5 为雷腾舒单氧化代谢物。其中 M5-5 仅检测到母离子脱去一分子 H₂O 后的碎片离子, 推测该单氧化代谢物可能不稳定, 极容易发生源内裂解, 丢失一分子 H₂O。经过与化合物 3~7 进行质谱和色谱行为的比对, 发现 M5-1、M5-4 和 M5-5 的色谱和质谱行为分别与化合物 4、6 和 7 相一致。

因此代谢物 M5-1 为原形药物 (1*S*)-位单加氧代谢物, M5-4 为原形药物 (2*R*)-位的单加氧代谢物, M5-5 为原形药物 (1*R*)-位单加氧代谢物。图 4 为推测的雷腾舒体外代谢途径。

5 雷腾舒体外代谢稳定性

体外代谢稳定性实验结果发现, 雷腾舒在大鼠肝

微粒体中的代谢速率要高于人肝微粒体。采用数据处理中描述的方法对得到的代谢稳定性数据进行处理, 计算得到的雷腾舒在大鼠肝微粒体中的清除半衰期为 30.2 min, 经过转化后计算得到的雷腾舒的大鼠肝脏固有清除率为 41.2 mL·kg⁻¹·min⁻¹。相同的方法计算得到的雷腾舒在人肝微粒体中的代谢半衰期为 893 min, 人肝脏的固有清除率为 0.973 mL·kg⁻¹·min⁻¹。

6 代谢物免疫抑制活性评价

为了考察雷腾舒经过代谢之后的活性变化, 评价了以上获得的几种雷腾舒的衍生物对 ConA 诱导的 T 细胞增殖和 LPS 诱导的 B 细胞增殖的抑制作用。从表 3 可以看出 7 个化合物中仅化合物 6 即 M5-4 展现出了弱的免疫抑制活性, 然而也不足原形药物活性的十分之一, 同时细胞毒性也较原形药物减小。

Table 3 Evaluation of cytotoxicity and immunosuppressive activity of (5*R*)-5-hydroxytriptolide and its derivatives. ^aCytotoxic concentration of the compound that reduces cell viability by 50%. ^bInhibitory concentration of the compound that reduces cell proliferation by 50%

Compound	CC ₅₀ /μmol·L ^{-1a}	IC ₅₀ / μmol·L ^{-1b}	
		T cell	B cell
(5 <i>R</i>)-5-Hydroxytriptolide	0.408 ± 0.014	0.105 ± 0.021	0.139 ± 0.017
1	>10	>10	>10
2	>10	>10	>10
3	>10	>10	>10
4	>10	>10	>10
5	>10	>10	>10
6	2.50 ± 0.22	1.30 ± 0.15	1.23 ± 0.10
7	>10	>10	>10

讨论

本研究采用体外肝细胞和肝微粒体对雷腾舒的体外代谢途径和代谢稳定性进行研究。实验中采用 5 个种属的肝细胞分别与雷腾舒进行孵化, 5 个种属的肝细胞中共检测到 4 个代谢物, 分别为 12,13-位环氧水解开环的代谢物 M1、谷胱甘肽结合物 M2 以及单氧化并谷胱甘肽结合物 M3-1 和 M3-2。

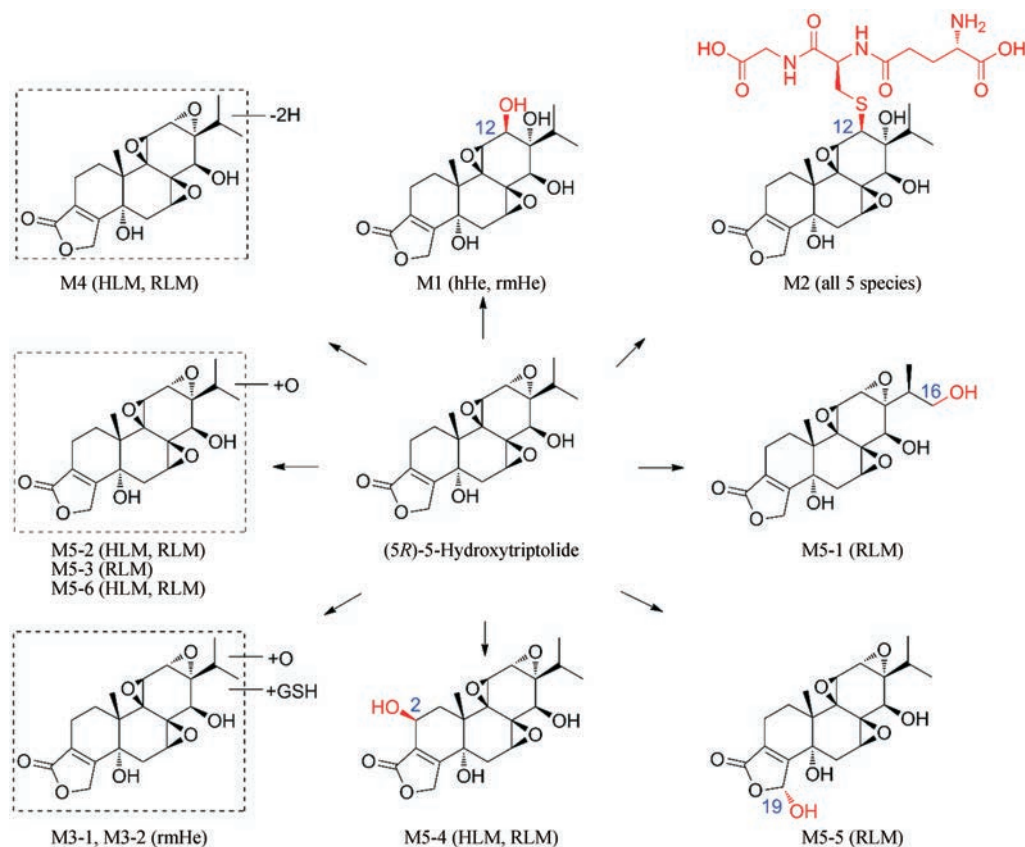


Figure 4 Proposed metabolic profile of (5R)-5-hydroxytriptolide *in vitro*. hHe: Human hepatocytes; rmHe: Rhesus monkey hepatocytes

通常谷胱甘肽结合物的生成往往意味着反应性代谢产物的存在^[14,15]。从质谱峰面积判断, M2的响应在5个种属的肝细胞孵育体系中都是最高的, 然而从紫外色谱图中则仅能检测到原形药物的吸收峰。由于该类化合物的质谱响应受其结构影响较大^[16], 因此紫外色谱峰面积更能准确反映代谢物之间量的多少。M2的质谱响应高, 是因为雷腾舒本身质谱响应差^[17], 结合谷胱甘肽之后, 使其质谱响应显著提高。本实验中, 紫外色谱图中仅能检测原形药物的吸收峰, 说明相对于原形药物的量, M2的生成量几乎可以忽略不计。

随后作者将雷腾舒与人或大鼠的肝微粒体进行孵育, 共检测到7个代谢物, 分别为脱氢代谢物M4和单氧化代谢物M5-1~M5-6。从紫外色谱中可以看到, 人肝微粒体中, M5-2生成量最高, 其次为M5-6, 而大鼠肝微粒体中M5-6的生成量最高, 且大鼠肝微粒体中雷腾舒的代谢速率高于人肝微粒体。当固有清除率低于肝血流量的20%时被认为是低清除率化合物, 而大于肝血流量的80%时则被认为是高清除率化合物^[18]。通过体外代谢速率计算预测了雷腾舒在大鼠($CL_{int} = 41.2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)和人($CL_{int} = 0.973 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)肝脏中的固有清除率, 发现雷腾舒在大鼠体内可能是中等清除率化合物 ($11 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} < CL_{int} <$

$44 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), 而在人体则可能是低清除率化合物 ($CL_{int} < 4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)^[18]。

为了确定各个代谢物的准确结构, 分别利用化学合成法和生物转化法获得了相关的对照品(化合物1~7), 并通过核磁共振和高分辨质谱确认其结构。本实验通过化学半合成法获得了5个可能的代谢物对照品(化合物1~5), 又通过大鼠肝原代细胞转化, 获得了2个代谢物对照品(化合物6和7)。由于雷腾舒缺乏特征性的二级碎片, 因此本实验中代谢物的比对主要以液相色谱保留时间和质谱检测到的准确分子质量作为判断标准, 最终确定了5个代谢物的准确结构(图4)。

作为雷公藤甲素的结构类似物, 雷腾舒与雷公藤甲素的代谢特征有诸多相似之处。体外研究中, 雷公藤甲素在人和大鼠肝微粒体中共检测到4种单氧化代谢物, 大鼠肝微粒体中的代谢物种类可以完全覆盖人肝微粒体中的代谢物^[19]。在大鼠体内, 雷公藤甲素的I相代谢物以单氧化、双氧化为主, 文献中已确证的单氧化位点包括(2R)-、15-、(16S)-和(16R)-等^[20], 而雷腾舒的单氧化位点也包括(2R)-和(16S)-等, 以及二者均有12,13-位环氧开环并结合谷胱甘肽的代谢物。文献中^[20]和本实验中, 雷公藤甲素和雷腾舒都有未确认的代谢物, 因此二者可能还有更多相同的代谢位点。

为了评价雷腾舒经过代谢后活性和毒性的改变,对比了雷腾舒和化合物1~7之间对淋巴细胞的毒性和免疫抑制活性的区别。化合物1~5和化合物7的 CC_{50} 和 IC_{50} 均大于 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,仅化合物6展现了微弱的细胞毒性和免疫抑制活性, CC_{50} 和 IC_{50} 相比于原形药物均显著升高。因此,雷腾舒可能是通过代谢失活和减毒,这与雷公藤甲素体内、外的代谢特征类似。多篇文献证实,雷公藤甲素无论在体内、体外均可以经过代谢减毒,一些诱导代谢的化合物可以显著减弱雷公藤甲素的毒性^[21,22]。

结论

雷腾舒在5种属肝细胞以及人和大鼠肝微粒体的代谢孵化体系中,共检测到5种代谢物,分别为环氧水解开环代谢产物(M1)、谷胱甘肽结合代谢产物(M2)、单氧化并谷胱甘肽结合代谢产物(M3-1和M3-2)、脱氢代谢产物(M4)和单氧化代谢产物(M5-1~M5-6)。通过与获得的代谢物对照品进行比对,确认了5个代谢物的结构,分别是12,13-位环氧开环代谢物M1,12-位谷胱甘肽结合代谢物M2,(16S)-、(2R)-和(19R)-单羟基化的代谢产物M5-1、M5-4和M5-5。其中,仅发现(2R)-位取代的代谢产物(M5-4)表现了弱的免疫抑制活性,不足原形药物的十分之一,毒性也显著下降。说明,雷腾舒经过代谢后,活性和毒性均显著下降。

致谢:周佳岚老师和唐崇壮博士生在肝细胞和微粒体实验中给予帮助,庞晓雁博士和王乐博士在大鼠原代肝细胞分离中给予指导和帮助。

References

- [1] Chen BJ. Triptolide, a novel immunosuppressive and anti-inflammatory agent purified from a Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook F [J]. *Leuk Lymphoma*, 2001, 42: 253-265.
- [2] Lin N, Liu CF, Xiao C, et al. Triptolide, a diterpenoid triepoxide, suppresses inflammation and cartilage destruction in collagen-induced arthritis mice [J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 73: 136-146.
- [3] Li XJ, Jiang ZZ, Zhang LY. Triptolide: progress on research in pharmacodynamics and toxicology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155: 67-79.
- [4] Xi C, Peng SJ, Wu ZP, et al. Toxicity of triptolide and the molecular mechanisms involved [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90: 531-541.
- [5] Cui J, Chen X, Su JC. Advanced progress of main pharmacology activities of triptolide [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2017, 42: 2655-2658.
- [6] Zhou ZL, Yang YX, Ding J, et al. Triptolide: structural modifications, structure-activity relationships, bioactivities, clinical development and mechanisms [J]. *Nat Prod Rep*, 2012, 29: 457-475.
- [7] Tang W, Zuo JP. Immunosuppressant discovery from *Tripterygium wilfordii* Hook F: the novel triptolide analog (5R)-5-hydroxytriptolide (LLDT-8) [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33: 1112-1118.
- [8] Wang L, Xu YP, Fu L, et al. (5R)-5-Hydroxytriptolide (LLDT-8), a novel immunosuppressant in clinical trials, exhibits potent anti-tumor activity *via* transcription inhibition [J]. *Cancer Lett*, 2012, 324: 75-82.
- [9] Xu Y, Zhang YF, Chen XY, et al. CYP3A4 inducer and inhibitor strongly affect the pharmacokinetics of triptolide and its derivative in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39: 1386-1392.
- [10] Xu HT, Tang HY, Yang Z, et al. Synthesis and biological evaluation of 20-hydroxytriptonide and its analogues [J]. *Tetrahedron*, 2014, 70: 3107-3115.
- [11] Xu HT, Tang HY, Feng HJ, et al. Divergent total synthesis of triptolide, triptonide, triptiolide, 16-hydroxytriptolide, and their analogues [J]. *J Org Chem*, 2014, 79: 10110-10122.
- [12] Naritomi Y, Terashita S, Kimura S, et al. Prediction of human hepatic clearance from *in vivo* animal experiments and *in vitro* metabolic studies with liver microsomes from animals and humans [J]. *Drug Metab Dispos*, 2001, 29: 1316-1324.
- [13] Davies B, Morris T. Physiological-parameters in laboratory-animals and humans [J]. *Pharm Res*, 1993, 10: 1093-1095.
- [14] Zhou L, Pang XY, Xie C, et al. Chemical and enzymatic transformations of nimesulide to GSH conjugates through reductive and oxidative mechanisms [J]. *Chem Res Toxicol*, 2015, 28: 2267-2277.
- [15] Crincoli CM, Patel NN, Harvison PJ. Formation of glutathione (GSH) conjugates from 3-(3,5-dichlorophenyl)-2,4-thiazolidinedione (DCPT) by rat liver microsomes [J]. *FASEB J*, 2007, 21: A813.
- [16] Deng P, Zhan Y, Chen XY, et al. Derivatization methods for quantitative bioanalysis by LC-MS/MS [J]. *Bioanalysis*, 2012, 4: 49-69.
- [17] Liu J, Chen XY, Zhang YF, et al. Derivatization of (5R)-hydroxytriptolide from benzylamine to enhance mass spectrometric detection: application to a phase I pharmacokinetic study in humans [J]. *Anal Chim Acta*, 2011, 689: 69-76.
- [18] Kerns EH, Di L. Part 3: Disposition, Metabolism, and Safety, Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods [M]. Oxford, UK: Elsevier, 2008.
- [19] Li W, Liu Y, He YQ, et al. Characterization of triptolide hydroxylation by cytochrome P450 in human and rat liver microsomes [J]. *Xenobiotica*, 2008, 38: 1551-1565.
- [20] Liu J, Li L, Zhou X, et al. Metabolite profiling and identification of triptolide in rats [J]. *J Chromatogr B*, 2013, 939: 51-58.
- [21] Ye XC, Li WY, Yan Y, et al. Effects of cytochrome P4503A inducer dexamethasone on the metabolism and toxicity of triptolide in rat [J]. *Toxicol Lett*, 2010, 192: 212-220.
- [22] Tai T, Huang X, Su YW, et al. Glycyrrhizin accelerates the metabolism of triptolide through induction of CYP3A in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 152: 358-363.