

瑞格非尼对人尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶活性抑制作用的体外研究

孙小雅¹, 葛广波², 唐 辉^{1*}, 王亚乔¹, 姚新成¹, 李 乐¹

(1. 石河子大学药学院, 新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆 石河子 832002;

2. 上海中医药大学, 上海 201203)

摘要: 应用体外人肝微粒体及重组人源代谢酶孵育体系考察了瑞格非尼 (regorafenib, REG) 对 12 种人尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (UGTs) 的抑制作用, 通过体外-体内外推 (IV-IVE) 预测 REG 与经过 UGT1A1 代谢消除药物共服引发药物-药物相互作用 (DDI) 的风险。以混合人肝微粒体 (HLM) 及重组人源 UGTs 作为酶源, 4-甲基伞形酮 (4-MU) 作为 UGTs 的非特异性探针底物, *N*-(3-羧丙基)-4-羟基-1,8-萘酰亚胺 (NCHN) 和 *N*-(正丁基)-4-(4-羟基苯基)-1,8-萘酰亚胺 (NPHN) 作为 UGT1A1 的特异性探针底物, 三氟拉嗪 (TFP) 作为 UGT1A4 的特异性探针底物, 评估 REG 对 12 种人 UGTs 的抑制作用。通过非线性回归并拟合曲线求得半数最大抑制浓度 (IC₅₀), Lineweaver-Burk 和 Dixon 作图法确定抑制类型, 二次作图法求得抑制动力学常数 (K_i), 并基于体外抑制动力学参数预测了 REG 抑制 UGT1A1 所引发 DDI 的潜在可能性。体外抑制实验表明, REG 对 UGT1A1、UGT1A7、UGT1A9 和 UGT2B7 具有较强的抑制作用, IC₅₀ 为 0.15~6.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, K_i 为 0.027~14 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。REG 可竞争性的抑制 UGT1A1 催化的 4-MU-*O*-葡萄糖醛酸化反应及 UGT1A1 催化的 NPHN-*O*-葡萄糖醛酸化反应, 而非竞争性的抑制 UGT1A1 催化的 NCHN-4-*O*-葡萄糖醛酸化反应, 对 UGT1A7、UGT1A9 和 UGT2B7 催化的 4-MU-*O*-葡萄糖醛酸化反应呈现混合型的抑制类型。口服治疗剂量的 REG (160 $\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$) 可导致 UGT1A1 代表性底物 NPHN 和 NCHN 的 AUC 分别增加 101%~302% 和 13%~109%。结果提示, REG 与主要经 UGT1A1 代谢的底物药物联合应用时, 可通过强效抑制 UGT1A1 进而影响其在机体内的代谢清除, 在临床使用过程中需要密切关注。

关键词: 瑞格非尼; 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶; 酶抑制; 药物-药物相互作用

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 11-1705-10

Inhibition of regorafenib against UDP-glucuronosyltransferases

SUN Xiao-ya¹, GE Guang-bo², TANG Hui^{1*}, WANG Ya-qiao¹, YAO Xin-cheng¹, LI Le¹

(1. Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resource and Utilization, Ministry of Education, Pharmacy School of Shihezi University, Shihezi 832002, China; 2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract: This study was designed to investigate the inhibitory effects of regorafenib (REG) on the catalytic activities of 12 kinds of human UGT isoforms and human liver microsomes (HLM) *in vitro*. The broader potential of REG to perpetrate drug-drug interactions (DDI) arising from UGT enzyme inhibition is predicted by *in vitro-vivo* extrapolation (IV-IVE). Fifty mixed HLM and 12 kinds of recombinant UGTs were utilized as enzyme sources to evaluation the inhibitory effects of REG against UGTs. 4-Methylumbelliferone (4-MU) as a nonselective substrate of UGTs except for UGT1A4, *N*-(3-carboxypropyl)-4-hydroxy-1,8-naphthalimide (NCHN) and *N*-butyl-4-(4-hydroxyphenyl)-1,8-naphthalimide (NPHN) as the specific fluorescent substrate of

收稿日期: 2017-05-15; 修回日期: 2017-07-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81260627, 81660641); 新疆生产建设兵团科技攻关及成果转化计划 (2016AD008); 八师石河子市科技计划项目 (2016HZ32).

*通讯作者 Tel: 86-993-2057878, Fax: 86-993-2057005, E-mail: Th_pha@shzu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0424

UGT1A1, and trifluoperazine (TFP) as the specific substrate of UGT1A4. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated *via* the nonlinear regression analysis using Graphpad Prism 6.0, the inhibition kinetic types were selected and evaluated based on the intersection location of Lineweaver-Burk plot and Dixon plot, and K_i values were determined by the second plot of slopes. The potential DDI risk based on UGT1A1 inhibition was also evaluated through the *in vitro* parameters. The results demonstrated that REG displayed strong inhibitory effects against UGT1A1, 1A7, 1A9, and 2B7. The IC_{50} values were from 0.15 to 6.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and K_i values from 0.027 to 14 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The REG exerted competitive inhibition against UGT1A1-mediated 4-MU-*O*-glucuronidation and UGT1A1-mediated NPHN-*O*-glucuronidation, while the inhibition of NCHN-4-*O*-glucuronide by REG was suited to noncompetitive inhibition in both HLM and recombinant UGT1A1. Likewise, REG exhibited a mixed efficacy in inhibition of UGT1A7-, UGT1A9-, and UGT2B7-catalyzed 4-MU-*O*-glucuronidation. The AUC ratio of UGT1A1 specific substrates NPHN and NCHN can be increased by 101% to 302% and 13% to 109%, respectively. These results suggest that much caution should be exercised when REG is co-administered with UGT1A1 substrates.

Key words: regorafenib; UDP-glucuronosyltransferases; enzyme inhibition; drug-drug interaction

瑞格非尼 (regorafenib, REG, 图 1) 是一种新型的口服小分子多靶点磷酸激酶抑制剂, 可有效阻断促进肿瘤血管生成和肿瘤细胞增殖的多种酶系^[1, 2], 包括血管内皮生长因子受体-1 (vascular endothelial growth factor receptor-1, VEGFR-1)、VEGFR-2、VEGFR-3、酪氨酸蛋白激酶受体-2 (TIE-2)、血小板衍生生长因子受体- β (platelet derived growth factor receptor- β , PDGFR- β)、原癌基因 c-Kit、酪氨酸蛋白激酶受体 RET 等^[3], 临床上对治疗转移性结直肠癌和胃肠间质瘤中具有非常理想的疗效^[4, 5]。

尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (UGTs) 是人体重要的 II 相代谢酶^[6], 其中尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1A1 (UGT1A1) 在维系内源物代谢平衡和外源物代谢清除中均扮演着非常重要的角色^[7, 8], 是机体负责代谢内源性毒物胆红素的唯一代谢酶, 同时还参与众多外源物的代谢清除, 包括抗癌药物依托泊甙、抗艾滋病药物雷特格韦等临床药物^[9], 对 UGT1A1 的强效抑制作用会导致上述药物药代动力学行为的改变, 进而增大临床发生 DDI 的风险。UGT1A1 表达/功能的异常偏低可导致胆红素代谢障碍进而引发高胆红素血症, 严重者会致死^[8]。药物对 UGT1A1 的抑制作用是引发胆红素代谢障碍和 DDI 的一个重要原因, 在多药联合使用时需密切关注。

目前已发现多种药物, 如 HIV 治疗药物阿扎那韦等、抗真菌药酮康唑等, 可通过强效抑制 UGT1A1 进而影响 UGT1A1 底物药物的代谢清除, 同时还可引发高胆红素血症及肝功能异常等症状^[10–12]。众所周知, UGT1A1 抑制剂的筛选与评价需借助相应的探针底物来实现。但由于 UGT1A1 与其他 UGT1A 酶的底物谱高度交叉, 其特异性探针底物严重匮乏。新近

发表的文献仅初步考察了 REG 对 UGTs 的抑制作用, 并采用传统的内源性底物胆红素和 β -雌二醇共同作为 UGT1A1 的探针底物, 借助复杂繁琐的 HPLC 构建了 UGT1A1 的酶活检测方法, 分别在单酶 (胆红素) 和微粒体 (β -雌二醇) 的层面测定了 REG 对 UGT1A1 的抑制动力学参数, 并根据体外孵育体系所获得的抑制动力学参数 (K_i) 预测了 REG 对人体中 UGT1A1 抑制所引发 DDI 的潜在可能性, 尝试从药代水平探讨 REG 在临床引发高胆红素血症的机制^[13–15], 此外, REG 对个别 UGT 酶亚型的抑制动力学也未见报道。本文应用体外人肝微粒体和重组人源代谢酶孵育体系研究了 REG 对 12 种人 UGTs 的抑制作用, 并通过体外-体内外推 (IV-IVE) 预测其与经过 UGT1A1 代谢消除药物共服引发 DDI 的风险, 为深入了解 REG 对 UGTs 的抑制特征及指导临床上科学合理高效用药, 尤其是可有效避免肿瘤治疗中多药联用引发的 DDI 等潜在安全隐患, 提高 REG 使用的安全性。

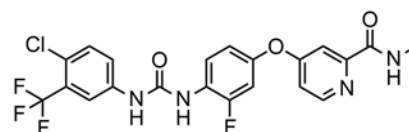


Figure 1 Chemical structure of regorafenib (REG)

材料与amp;方法

药品与试剂 瑞格非尼 (批号 F1502104, 纯度 $\geq 98\%$) 购于 Sigma-Aldrich 公司; *N*-(3-羧丙基)-4-羧基-1,8-萘酰亚胺 (NCHN, 纯度 $\geq 98\%$) 和 *N*-(正丁基)-4-(4-羧苯基)-1,8-萘酰亚胺 (NPHN, 纯度 $\geq 98\%$) 是由大连理工大学冯磊博士合成; NCHN-4-*O*-葡萄糖醛酸苷 (NCHNG, 纯度 $\geq 95\%$) 是由中国科学院大连化

学物理研究所药用资源研发组吕侠博士使用混合人肝微粒体和猴肝微粒体生物合成获得; NPHN-*O*-葡萄糖醛酸苷 (NPHNG, 纯度 $\geq 95\%$) 是由中国科学院大连化学物理研究所药用资源研发组吕侠博士使用混合豚鼠肝微粒体生物合成方法获得; 4-甲基伞形酮 (4-MU, 批号 90-33-5) 和 4-甲基伞形酮- β -*D*-葡萄糖醛酸苷 (4-MUG, 批号 6160-80-1) 购于东京化成工业株式会社, 纯度均为 98%; 三氟拉嗪 (TFP, 纯度为 98%)、尿苷-5'-二磷酸三钠盐 (UDPGA)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、聚氧乙烯十六烷基醚 (Brij 58)、氯化镁 (MgCl_2)、尼罗替尼、厚朴酚和雄酮均购于 Sigma-Aldrich 公司; 混合人肝微粒体 (HLM, $n = 50$) 购于上海瑞德肝脏疾病研究有限公司 (批号 YAO); 12 种商业化的重组人源 UGTs 包括 UGT1A1 (批号 456411)、1A3 (批号 456413)、1A4 (批号 456414)、1A6 (批号 456416)、1A7 (批号 456407)、1A8 (批号 456418)、1A9 (批号 456419)、1A10 (批号 456410)、2B4 (批号 456424)、2B7 (批号 456427)、2B15 (批号 456435) 和 2B17 (批号 456437) 均购于美国 BD 生物科学有限公司; 甲醇、乙腈、二甲基亚砜 (DMSO, 纯度大于 99.5%)、甲酸购自 Sigma-Aldrich 且均为色谱纯, 实验用水为 Millipore 纯化水, 其余试剂为分析纯。

仪器 多功能微孔板检测酶标仪 (Synergy H¹) 购于美国伯腾仪器有限公司; LC-30AT 超快速液相色谱仪 (UFLC) 购自日本岛津公司, 配备有一个系统控制器 CBM-20A、两个 LC-30AD 泵、一个 DGU-20A 真空脱气机、一个 SIL-30AC 自动进样器、一个 CTO-30A 柱温箱、一个 SPD-M 30A DAD 检测器, 一个 RF-20A 荧光检测器和岛津色谱工作站; 振荡恒温金属浴和低温高速离心机购于美国热电; KH-250SP 超声清洗器购于昆山禾创超声仪器有限公司; 精密分析天平和 pH 计购于北京赛多利斯科学仪器有限公司; XW-80A 涡旋混合器购于上海精科实业有限公司; Milli-Q 超纯水机购于美国 Millipore 公司; XB70 制冰机购于宁波格兰特制冷设备制造有限公司; XR-ODS C18 色谱柱 (2.1 mm \times 150.0 mm, 2.0 μm) 购于日本岛津公司。

检测条件 在参考已发表文献的基础上稍作调整^[16,17], 4-MUG 的色谱检测条件: 色谱柱为 XR-ODS C18 色谱柱 (2.1 mm \times 150.0 mm, 2.0 μm); 流动相为乙腈 (A) \sim 0.2% 甲酸水 (B), 梯度洗脱条件: 0 \sim 2 min, 90% B; 2 \sim 9 min, 90% \sim 25% B; 9 \sim 9.01 min, 25% \sim 5% B; 9.01 \sim 12 min, 5% B; 12.01 \sim 15 min, 5% \sim 90% B; 流速为 0.4 mL \cdot min⁻¹; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 检测

波长 317 nm; 进样量 6 μL ; TFP 的色谱检测条件: 色谱柱为 XR-ODS C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm \times 150.0 mm, 2.0 μm); 流动相为乙腈 (A) \sim 0.1% 三氟乙酸水溶液 (B), 梯度洗脱条件: 0 \sim 9 min, 70% \sim 50% B; 9 \sim 9.01 min, 50% \sim 25% B; 9.01 \sim 10 min, 25% \sim 5% B; 10 \sim 13 min, 5% B; 13.01 \sim 16 min, 5% \sim 70% B; 流速为 0.3 mL \cdot min⁻¹; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 254 nm; 进样量 6 μL ; NCHNG 检测条件: 多功能微孔板检测酶标仪测定 NCHN 及其代谢产物 NCHNG 的荧光强度, NCHN 的激发波长 450 nm, 发射波长 564 nm; NCHNG 的激发波长为 362 nm, 发射波长 450 nm, 能量均设置为 80; NPHNG 检测条件: 多功能微孔板检测酶标仪测定 NPHN 及其代谢产物 NPHNG 的荧光强度, NPHN 的激发波长 450 nm, 发射波长 564 nm; NPHNG 的激发波长为 370 nm, 发射波长 520 nm, 能量均设置为 100。

瑞格非尼对 UGTs 抑制作用的筛选 REG 作为 UGT 各亚型的抑制剂, 4-MU 作为 UGT1A1、1A3、1A6、1A7、1A8、1A9、1A10、2B4、2B7、2B15 和 2B17 的广谱探针底物, TFP 作为 UGT1A4 的特异性探针底物, 通过三点法初筛实验 (即 REG 终浓度设置为 1、10 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 考察 REG 对 UGTs 活性的抑制作用, 阴性对照组抑制剂用等量的 DMSO 替代, 孵育体系总体积 200 μL , 包括 REG、Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4, 50 mmol \cdot L⁻¹)、 MgCl_2 (5 mmol \cdot L⁻¹)、不同浓度的 4-MU、重组单酶和 UDPGA (2 mmol \cdot L⁻¹), DMSO 终浓度 1%。各样品涡旋混匀并置于恒温金属浴, 37 $^{\circ}\text{C}$ 预孵 3 min, 反应体系中每间隔 10 s 加入 10 μL UDPGA 起始反应, 孵育条件参考文献^[18], 详见表 1, 孵育结束后, 各加 200 μL 乙腈 (含 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 7-羟基香豆素作为内参) 终止反应, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、20000 $\times g$ 的条件下离心 20 min, 吸取 6 μL 用于 UFLC 分析。

瑞格非尼对 UGT1A1、UGT1A7、UGT1A9 和 UGT2B7 催化的 4-MU-*O*-葡萄糖醛酸化反应的抑制作用 基于上述初筛实验结果, 选取 REG 浓度为 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时、酶的残余活性小于 50% 的重组单酶 (UGT1A1、UGT1A7、UGT1A9 和 UGT2B7) 为酶源, 进一步评价 REG 分别对 4 种单酶催化的 4-MU-*O*-葡萄糖醛酸化反应的抑制动力学行为。整个孵育体系包括系列不同浓度的 REG, 其余操作同上, 阳性对照组选择各亚型相应的抑制剂作为对比。本实验参考已报道的文献, 选择尼罗替尼作为 UGT1A1 的阳性抑制剂, 厚朴酚作为 UGT1A7 和 UGT1A9 的特异性抑制剂, 雄酮作为 UGT2B7 的特异性抑制剂^[19-22]。结果

Table 1 The incubation conditions of twelve recombinant UGT isoforms

No.	Enzyme	Protein concentrations /mg·mL ⁻¹	4-Methylumbelliferone/μmol·L ⁻¹	Incubation time/min
1	UGT1A1	0.125	110	120
2	UGT1A3	0.05	1 200	120
3	UGT1A4	0.1	40	30
4	UGT1A6	0.025	110	30
5	UGT1A7	0.05	30	30
6	UGT1A8	0.025	750	30
7	UGT1A9	0.05	30	30
8	UGT1A10	0.05	30	120
9	UGT2B4	0.25	1 000	120
10	UGT2B7	0.05	350	120
11	UGT2B15	0.2	250	120
12	UGT2B17	0.5	2 000	120

采用 GraphPad Prism 6.0 进行非线性回归并拟合曲线, 绘制 REG 在 4 种重组单酶条件下的剂量-依赖性抑制曲线, 酶的残余活性为 50% 时所对应的横坐标 (即抑制剂的浓度) 为 IC₅₀ 值。通过测定的 IC₅₀ 值, 选择使酶的残余活性为 20%~80% 之间所对应的抑制剂浓度作为测定抑制作用常数 (K_i) 时所用抑制剂浓度的参考, 通过前期的动力学实验及参考已发表文献所得的 K_m ^[16,17], 底物浓度的选择范围为 1/3~3 K_m 之间。采用多个底物浓度和不同的抑制剂浓度测定 K_i , 由 Lineweaver-Burk 图和 Dixon 图判断其抑制作用类型。

瑞格非尼对 NCHN-4-O-葡糖醛酸化反应的抑制作用 鉴于目前缺乏 UGT1A7 和 UGT2B7 的特异性探针底物, 且 UGT1A9 的特异性底物异丙酚^[23]需要借助复杂的质谱检测, 考虑到 UGT1A1 的重要性, 本实验旨在评估 REG 在 HLM 和 UGT1A1 两种酶源条件下对 UGT1A1 的抑制作用, 测定其对 UGT1A1 的 IC₅₀ 和 K_i , 并确定了抑制类型。选择比率型荧光探针 NCHN 作为 UGT1A1 的特异性荧光探针底物^[24], 该探针具有特异性高、代谢产物单一、检测灵敏、可高通量筛选等优势, 孵育体系中 NCHN 的浓度参考前期的动力学条件, 设置在自身 K_m 附近 (40 μmol·L⁻¹), 以确保反应中代谢产物 NCHNG 的形成在所选择的孵育时间和蛋白浓度范围中处于线性。HLM 孵育体系中, 加入等体积 Brij 58 (0.1 mg·mg⁻¹ protein) 作为酶打孔剂, 并置于冰上打孔 20 min, HLM 和 UGT1A1 的蛋白浓度分别为 0.2 和 0.05 mg·mL⁻¹, 孵育时间分别为 30 和 60 min, 最后加入等体积乙腈终止反应, 样品在 4 °C, 20 000×g 的条件下离心 20 min, 吸取 200 μL

上清液于至 96 孔板中, 并放置多功能酶标仪中检测。

瑞格非尼对 NPHN-O-葡糖醛酸化反应的抑制作用 UGT1A1 具有多个配体结合位点^[16, 17], 且 UGT1A1 的抑制呈现底物依赖性, 以 4-MU 为底物难以准确反映 REG 对胆红素 (或其他 UGT1A1 底物) 代谢的抑制能力。为避免假阳性结果, 选用 off-on 型荧光探针 NPHN 作为 UGT1A1 的另一个特异性荧光探针底物^[25], 该底物与 NCHN 可分别结合在 UGT1A1 的两个主要配体结合位点, 且 NPHN 与胆红素的结合位点一致, 故 NPHN 与 NCHN 可作为位点特异性的探针底物, 表征 REG 与 UGT1A1 的结合位点及相互作用机制, 进而实现对 REG 的高内涵表征。孵育体系中 NPHN 的浓度参考前期的动力学条件, 设置在自身 K_m 附近 (5 μmol·L⁻¹), 以确保反应中代谢产物 NPHNG 的形成在线性范围内。孵育体系中, HLM 和 UGT1A1 的蛋白浓度分别为 0.2 和 0.1 mg·mL⁻¹, 孵育时间均为 60 min, 其余操作同上, 并按上述 NPHN 的检测条件进行检测。

体内药物相互作用风险预测 为了进一步评估 REG 对人体中 UGT1A1 抑制所引发 DDI 的潜在可能性。本实验采用人肝微粒体体外孵育体系所获得的抑制动力学参数 (K_i), 最大血浆浓度 (C_{max}) 用于模拟抑制剂在体内的浓度, 参考文献报道的 DDI 预测方法^[26], 预测结果以有无 REG 的条件下, 药物在体内的暴露量即药-时曲线下面积 (AUC) 的比值来表示:

$$\text{AUC ratio} = \frac{1}{f_{\text{hep}} \cdot \left(\frac{1/E_h}{(1/E_h - 1) \cdot (1 + I/K_i) + 1} \right) + (1 - f_{\text{hep}})} \quad (1)$$

公式 (1) 中, AUC ratio 表示代谢酶经抑制后, 药物暴露量的增加; f_{hep} 是肝脏清除率; E_h 是肝提取率; I 是人血浆中抑制剂的最大浓度; K_i (μmol·L⁻¹) 是抑制动力学常数。

数据处理 所有样品平行制备两份, 结果以均值±标准差表示。REG 对 UGTs 的抑制作用通过酶的残余活性表示, 即加与不加抑制剂至孵育体系中所产生的 4-MUG、NCHNG、NPHNG 或 TFGP 代谢产物的峰面积/荧光强度比值。对反应速率 V 和底物浓度进行双倒数作图, 线性回归拟合, 最终得到以底物浓度倒数 1/[S] 为横坐标, 1/[V] 为纵坐标的 Lineweaver-Burk 图。以系列不同的抑制剂浓度为横坐标, Lineweaver-Burk 图中回归直线的斜率为纵坐标, 进行二次线性回归, 得到直线的横截距即为 $-K_i$ 。使用 GraphPad Prism 6.0 软件中的非线性回归中的酶动力

学-抑制模块获得 IC_{50} 和 K_i 。

结果

1 瑞格非尼对 UGTs 抑制作用的筛选

单酶筛选实验如图 2 所示。结果表明, REG 的浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 仅对 UGT1A1、UGT1A7、UGT1A9 和 UGT2B7 呈现较强的抑制作用, 酶的残余活性百分比分别为阴性对照的 $16.2\% \pm 2.01\%$ (UGT1A1)、 $36.8\% \pm 4.03\%$ (UGT1A7)、 $12.3\% \pm 0.89\%$ (UGT1A9) 和 $36.1\% \pm 4.55\%$ (UGT2B7), 均小于 50%, 同等条件下, 对其他酶亚型几乎无抑制或抑制能力小于 50%。

此外, REG 的浓度为 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 仅对肝、肠中存在的 UGT1A1 呈现出非常强烈的抑制作用, 对肝中存在的 UGT1A9 呈现出较强的抑制作用, 而对其余酶亚型包括仅存于肠道中的 3 个主要酶亚型 (UGT1A7、UGT1A8 和 UGT1A10) 均呈现微弱或可以忽略的抑制作用, 以上结果表明, REG 在一定的浓度条件下, 对 UGT1A1 的抑制作用具有较好的选择性, 抑制谱较窄。

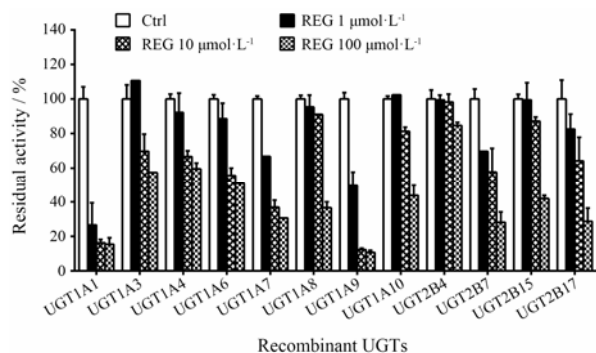


Figure 2 The inhibitory effects of REG (0, 1, 10, and $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the catalytic activities of 4-methylumbelliferone (4-MU)-*O*-glucuronidation by UGT1A1, 1A3, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10, 2B4, 2B7, 2B15, 2B17, and trifluoperazine (TFP)-*N*-glucuronidation by UGT1A4. Ctrl: Negative control

如图 3 所示, UGT1A1 的残余活性仅为阴性对照的 (18.5 ± 0.53)%, UGT1A7、UGT1A9、UGT1A10 和 UGT2B7 的残余活性分别为阴性对照的 (72.3 ± 3.10)%、(43.2 ± 8.12)%、(93.2 ± 5.15)% 和 (97.6 ± 3.50)%。结果表明, $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 REG 对仅在肠道或肝外组织中表达的 UGT1A7 和 UGT1A10 也呈现出可以忽略的抑制作用, 且对肝脏中含量最高的 UGT2B7 呈现微弱的抑制作用。

综上所述, 图 2 和图 3 的结果表明, REG 对 UGT1A1 的抑制作用选择性最好, 抑制谱窄, 对仅在

肠中存在的 3 种 UGTs (UGT1A7、UGT1A8 和 UGT1A10) 无抑制作用, 其余 8 种在肝中存在的主要酶亚型抑制较弱或可忽略 (UGT1A9 除外)。

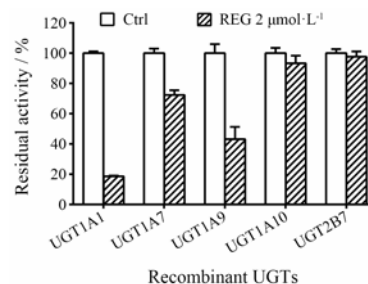


Figure 3 The inhibitory effects of REG ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the catalytic activities of 4-MU-*O*-glucuronidation by UGT1A1, 1A7, 1A9, and 2B7

2 瑞格非尼对 UGT1A1、UGT1A7、UGT1A9 和 UGT2B7 催化的 4-MU-O-葡萄糖醛酸反应的抑制作用

通过非线性拟合得到 REG 对 4-MU-*O*-葡萄糖醛酸反应的 IC_{50} 值分别为 0.15 ± 0.01 (UGT1A1)、 3.55 ± 0.49 (UGT1A7)、 1.03 ± 0.15 (UGT1A9) 和 6.6 ± 3.07 (UGT2B7) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 4 种特异性抑制剂对 4-MU-*O*-葡萄糖醛酸反应的 IC_{50} 值分别为 0.26 ± 0.02 (尼罗替尼, UGT1A1)、 0.73 ± 0.04 (厚朴酚, UGT1A7)、 0.057 ± 0.01 (厚朴酚, UGT1A9) 和 14.83 ± 2.95 (雄酮, UGT2B7) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结果显示, REG 对 UGT1A1、UGT1A7、UGT1A9 和 UGT2B7 催化的 4-MU-*O*-葡萄糖醛酸呈现较强的抑制作用, 对 UGT1A1 和 UGT1A9 的抑制作用非常强烈, IC_{50} 值小于 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 对 UGT1A1 的抑制作用大于 UGT1A1 阳性抑制剂尼罗替尼。

由 Lineweaver-Burk 图和 Dixon 图 (图 4) 可知, REG 对 UGT1A1 催化的 4-MU-*O*-葡萄糖醛酸反应呈现竞争性的抑制, 其 K_i 值为 $0.48 \pm 0.06 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对 UGT1A7、UGT1A9 和 UGT2B7 所催化的 4-MU-*O*-葡萄糖醛酸反应呈现混合型的抑制类型, 其 K_i 值分别为 2.13 ± 0.11 、 0.34 ± 0.18 和 $14.0 \pm 1.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3 瑞格非尼对 NCHN-4-O-葡萄糖醛酸反应的抑制作用

结果表明, REG 对 HLM 和 UGT1A1 所催化的 NCHN-4-*O*-葡萄糖醛酸反应的抑制作用很强 (IC_{50} 和 K_i 值均小于 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), IC_{50} 值如表 2 所示。由 Lineweaver-Burk 图和 Dixon 图 (图 5) 可知抑制类型, K_i 值见表 2。此外, REG 对 HLM 和 UGT1A1 催化的 NCHN-4-*O*-葡萄糖醛酸的 K_i 值小于 2 倍的差异, REG 对 UGT1A1 中 NCHN-4-*O*-葡萄糖醛酸和 4-MU-*O*-葡

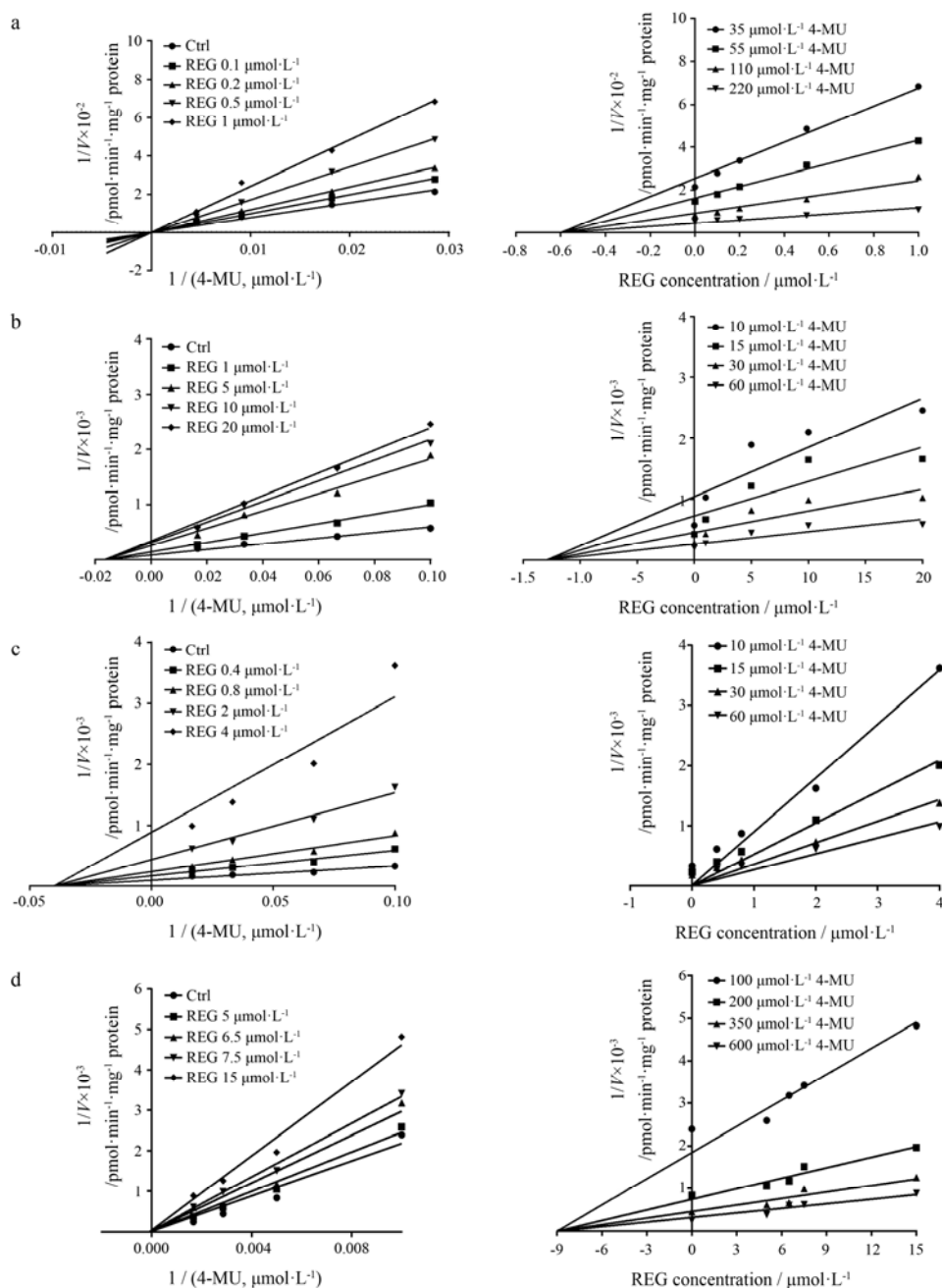


Figure 4 Lineweaver-Burk plots and Dixon plots of REG against 4-MU-*O*-glucuronidation in recombinant UGT1A1 (a), UGT1A7 (b), UGT1A9 (c) and UGT2B7 (d). Left: Lineweaver-Burk plots; Right: Dixon plots

Table 2 The inhibitory effects of REG on UGT1A1 activities determined by three representative probe substrates

Substrate	Enzyme	$IC_{50} / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$K_i / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Inhibition type	R^2
NCHN	HLM	0.26 ± 0.008	0.48 ± 0.01	Noncompetitive	0.98
NCHN	UGT1A1	0.25 ± 0.028	0.33 ± 0.05	Noncompetitive	0.98
NPHN	HLM	0.40 ± 0.017	0.048 ± 0.07	Competitive	0.99
NPHN	UGT1A1	0.17 ± 0.007	0.027 ± 0.12	Competitive	0.99
4-MU	UGT1A1	0.15 ± 0.009	0.48 ± 0.06	Competitive	0.99

糖醛酸化的 K_i 值也小于 2 倍的差异。由表 2 可知, REG 对 UGT1A1 两个代表性底物 (NCHN 与 4-MU) 展现出相似的抑制作用强度和不同的抑制作用类型。

4 瑞格非尼对 NPHN-*O*-葡糖醛酸化反应的抑制作用
结果表明, REG 对 HLM 和 UGT1A1 所催化的 NPHN-*O*-葡糖醛酸化反应的抑制作用很强 (IC_{50} 值

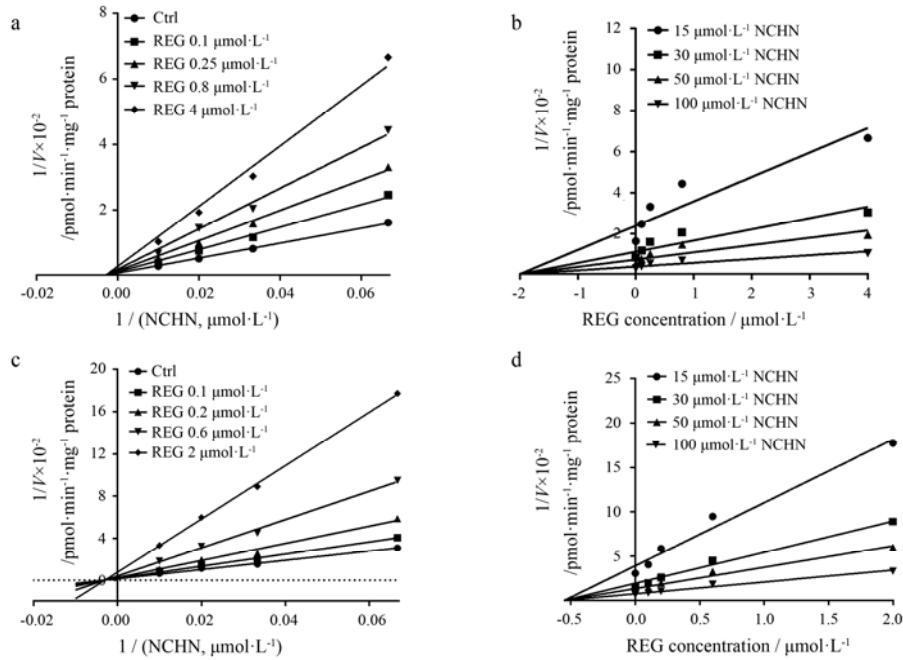


Figure 5 Lineweaver-Burk plots and Dixon plots of REG against *N*-(3-carboxy propyl)-4-hydroxy-1,8-naphthalimide (NCHN)-4-*O*-glucuronidation in both HLM (a and b) and recombinant UGT1A1 (c and d). Left: Lineweaver-Burk plots; Right: Dixon plots

小于 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, K_i 值小于 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, IC_{50} 值见表 2。且由 Lineweaver-Burk 图和 Dixon 图 (图 6) 可知抑制类型, K_i 值见表 2。此外, REG 对 HLM 和 UGT1A1 催化的 NPHN-*O*-葡糖醛酸化的 K_i 值小于 2 倍的差异, REG 对 UGT1A1 中 NPHN-*O*-葡糖醛酸化和 4-MU-*O*-葡糖醛酸化的 K_i 值大于 2 倍的差异。综上所述, 由表 2 可知, REG 对 UGT1A1 的 3 个代表性底物 (NCHN、

NPHN 和 4-MU) 展现出不同的抑制作用强度和不同的抑制作用类型。

5 体内药物相互作用风险预测

由表 3 可知, 参考文献报道的口服治疗剂量的 REG ($160 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$) 后^[15, 27], 其在人血浆中的 C_{max} 高达 $3.9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($8.08 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 由于 $I = C_{\text{max}} \times f_u$, $f_u = 0.1$ ^[15, 17], I 为 $0.81 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。以 NPHN (高亲和力底

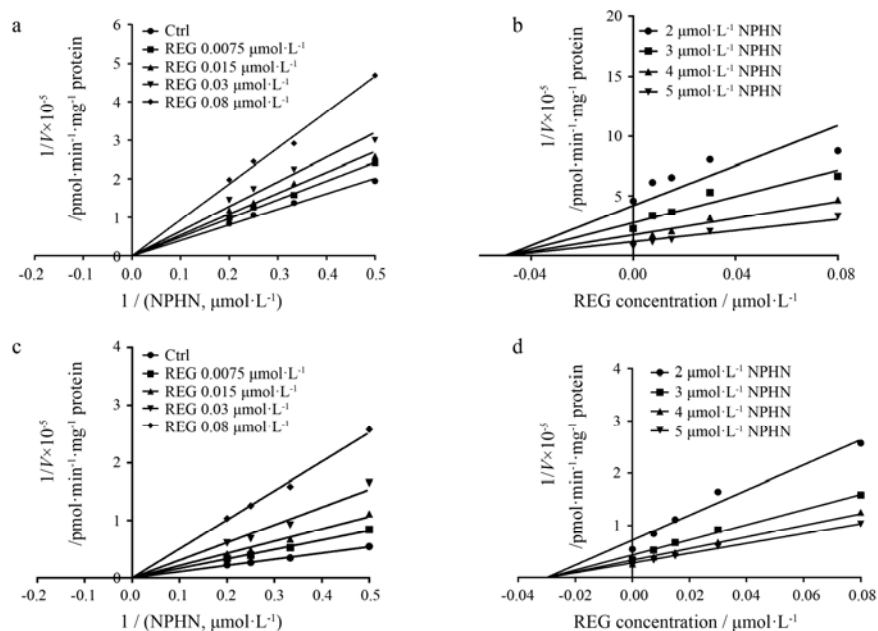


Figure 6 Lineweaver-Burk plots and Dixon plots of REG against *N*-butyl-4-(4-hydroxyphenyl)-1,8-naphthalimide (NPHN)-*O*-glucuronidation in both HLM (a and b) and recombinant UGT1A1 (c and d). Left: Lineweaver-Burk plots; Right: Dixon plots

Table 3 Prediction of the potential DDI risks *in vivo* based on the AUC ratios. a: E_h is the hepatic extraction ratio ranging from 0.1 to 0.9. b: f_{hep} is the percentage of hepatic clearance mediated by UGT1A1; The f_{hep} was set to the mean value of each UGT substrates. c: The maximum concentration of inhibitor (I) in human plasma was calculated as $f_u \times C_{\text{max}}$; The C_{max} of REG in humans was obtained from literature; f_u was 0.1. d: AUC ratios were calculated using Eq.(1) in materials and methods

Substrate	E_h^a	f_{hep}^b	$K_i / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$I^c / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	AUC ratio ^d	AUC increased/%
NPHN	0.1–0.9	0.8	0.048	0.81	2.01–4.02	101–302
NCHN	0.1–0.9	0.8	0.48	0.81	1.13–2.09	13–109

物) 作为 UGT1A1 的特异性探针底物, REG 对 HLM 中 NPHN-*O*-葡糖醛酸化的抑制作用非常强烈, $0.1 < [I]/K_i < 1$, AUC 增加了 101%~302%; 同时, 以 NCHN (低亲和力底物) 作为 UGT1A1 的另一个特异性底物, REG 对 HLM 中 NCHN-4-*O*-葡糖醛酸化也呈现较强的抑制作用, $0.1 < [I]/K_i < 1$, AUC 增加了 13%~109%。

综上所述, DDI 预测结果表明, 当 REG 与一些主要经 UGT1A1 代谢的底物联合应用时, 其在机体内的清除很可能会被抑制, 且前期实验基础已证明 NPHN 和胆红素的结合位点相同, 进一步提示当服用高剂量的 REG 后, 可通过强效抑制 UGT1A1 进而影响机体内胆红素的代谢清除, 同时还可引发急性肝损伤及肝功能异常等症状, 在临床使用过程中需要密切关注。

讨论

本研究证明了 REG 对 UGT1A1、UGT1A7、UGT1A9 和 UGT2B7 催化的 4-MU-*O*-葡糖醛酸化反应呈现出较强的抑制作用 ($\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 且对 UGT1A1 的抑制作用最强 ($\text{IC}_{50} < 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 通过对比 REG 对 UGT1A1 催化的 3 种代表性底物葡糖醛酸化反应的抑制动力学参数可知, UGT1A1 至少具有两个配体结合位点, 与之前文献报道的结果相吻合^[16,17]; 对于 UGT1A1、UGT1A7 和 UGT1A9, 其 $[I]/K_i$ 值大于 1, 提示有可能发生严重的 DDI, REG 与上述提到的几种酶的底物药物联合用药时, 临床使用过程中应密切监测患者的肝肾功能。

新近文献报道将胆红素和 β -雌二醇共同作为 UGT1A1 的特异性底物^[15], 预测体内因 REG 对 UGT1A1 的抑制而引发 DDI 的潜在可能性。而胆红素作为 UGT1A1 探针底物并不是十分理想, 它不仅化学稳定性差 (见光易分解), 而且与表达 UGTs 的肝微粒体、细胞、细胞浆广泛结合, 其代谢动力学参数 K_m 值会随着孵育体系中微粒体含量的改变而改变, 导致其检测误差大、准确度难以保证。其次, 单酶筛选体系无法真实的模拟复杂生物体系中的传质过程以及生物基质/非靶蛋白与配体间的相互作用, 为避

免胆红素的非特异性结合, 用单酶体系获得的抑制动力学参数去预测引发体内 DDI 的可能性尚不充分。再者, β -雌二醇还存在特异性不足、检测灵敏度低及无法实现高通量筛选等缺陷。综上所述, 迫切需要构建 UGT1A1 快速、高效、实用的抑制作用评价和风险预测体系, 其对多药联用的风险评控、揭示药物/草药的安全隐患和致毒物质基础以及减少 DDI 的发生率等具有重要意义。

本研究借助前期的实验基础, 采用兼具高选择性、高灵敏度的 NCHN 和 NPHN 作为 UGT1A1 的特异性荧光探针, 与传统的非特异性探针 4-MU 共同作为 UGT1A1 的特异性底物, 对 REG 的抑制作用进行综合评价。因 4-MU 与胆红素的结合位点并不吻合^[16], 若仅以 4-MU 为底物将难以准确反映 REG 对胆红素 (或其他 UGT1A1 底物) 代谢的抑制能力。更重要的是, 本方法克服了 UGT1A1 非荧光探针底物代谢产物多、选择性、测试通量低及灵敏性不佳等缺陷, 最终实现对 REG 的高内涵表征。在 DDI 预测中, 以 NPHN (高亲和力底物) 作为 UGT1A1 的特异性探针底物, REG 对 HLM 中 NPHN-*O*-葡糖醛酸化具有强烈抑制作用, 提示该药物存在潜在的抑制胆红素解毒的途径, 与文献所报道的 REG 会引起胆红素水平升高的现象正好吻合^[1–5], 以上结果再次证实了本实验选用与胆红素结合位点一致的特异性荧光探针底物 NPHN, 实现快速定量定性检测, 更具有实用性及推广性。

上述结果用于解释临床 DDI 及指导临床合理用药时, 将 DDI 的决定因素确定为药代属性中机体体系因素时, 应注意使用正确的药物与酶的比例量, 才能模拟真实体内情形。其次, UGT1A1 具有高度的基因多态性 (如 UGT1A1*28, 通常诊断为吉尔伯特综合征), 其会导致 UGT1A1 的低表达或者降低该酶的活性, 且活性具有明显的个体差异^[28,29]。换言之, 上述携带 UGT1A1*28 的个体会显现出受损的胆红素结合能力, 而高胆红素血症在肝脏胆红素结合能力降低的情况下更加显著, 因此, REG 对体内 UGT1A1 介导的胆红素代谢通路的抑制, 对于携带 UGT1A1*28

的个体可能会更容易呈现出高胆红素血症的易感性以及肝损伤等不良反应。同理, UGT1A7、UGT1A9 存在基因多态性, 特别是 UGT1A7*3 和 UGT1A9*3 也会向上述情况一样, 以上情形均使 REG 在体内形成抑制的可能性变得复杂。

综上所述, 本文系统研究了 REG 对人尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶体外活性抑制作用, 从药代的因素揭示了服用 REG 相关制剂后, 血中胆红素浓度急剧上升并引发急性肝损伤现象的机制。所采用的 UGT1A1 特异性荧光探针 NCHN 的相关检测方法已被推广至国内及欧美多个实验室, 使得 UGT1A1-小分子相互作用的研究进入到了高通量时代。上述研究中发现的 UGT1A1 强抑制剂等信息还可用于指导 REG 的临床科学合理用药, 尤其可有效避免肿瘤治疗中多药联用引发的 DDI 等潜在安全隐患。

References

- [1] Strumberg D, Scheulen ME, Schultheis B, et al. Regorafenib (BAY 73-4506) in advanced colorectal cancer: a phase I study [J]. *Br J Cancer*, 2012, 106: 1722–1727.
- [2] D'Alessandro R, Refolo MG, Lippolis C, et al. Reversibility of regorafenib effects in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 72: 869–877.
- [3] Li J. Research progress of new oral multikinase inhibitor regorafenib in the treatment of cancer [J]. *Chin Clin Oncol (临床肿瘤学杂志)*, 2014, 19: 385–390.
- [4] Wang Z, Xu J, Nie W, et al. Risk of hypertension with regorafenib in cancer patients: a systematic review and meta-analysis [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2014, 70: 225–231.
- [5] Carr BI, D'Alessandro R, Refolo MG, et al. Effects of low concentrations of regorafenib and sorafenib on human HCC cell AFP, migration, invasion, and growth *in vitro* [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228: 1344–1350.
- [6] Rowland A, Miners JO, Mackenzie PI. The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45: 1121–1132.
- [7] Wang XX, Hou J, Ning J, et al. Inhibition of sciadopitysin against UDP-glucuronosyltransferases [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 749–755.
- [8] Fujiwara R, Nguyen N, Chen S, et al. Developmental hyperbilirubinemia and CNS toxicity in mice humanized with the UDP glucuronosyltransferase 1 (UGT1) locus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 5024–5029.
- [9] Wen Z, Tallman MN, Ali SY, et al. UDP-glucuronosyltransferase 1A1 is the principal enzyme responsible for etoposide glucuronidation in human liver and intestinal microsomes: structural characterization of phenolic and alcoholic glucuronides of etoposide and estimation of enzyme kinetics [J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35: 371–380.
- [10] Goon CP, Wang LZ, Wong FC, et al. UGT1A1 mediated drug interactions and its clinical relevance [J]. *Curr Drug Metab*, 2016, 17: 100–106.
- [11] Krishna R, East L, Larson P, et al. Atazanavir increases the plasma concentrations of 1200 mg raltegravir dose [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2016, 37: 533–541.
- [12] Zhang N, Liu Y, Jeong H. Drug-drug interaction potentials of tyrosine kinase inhibitors *via* inhibition of UDP-glucuronosyltransferases [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 177–178.
- [13] Iacovelli R, Palazzo A, Procopio G, et al. Incidence and relative risk of hepatic toxicity in patients treated with anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors for malignancy [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2014, 77: 929–938.
- [14] Tlemsani C, Huillard O, Arrondeau J, et al. Effect of glucuronidation on transport and tissue accumulation of tyrosine kinase inhibitors: consequences for the clinical management of sorafenib and regorafenib [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2015, 11: 1–10.
- [15] Miners J O, Chau N, Rowland A, et al. Inhibition of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes by lapatinib, pazopanib, regorafenib and sorafenib: implications for hyperbilirubinemia [J]. *Biochem Pharmacol*, doi: 10.1016/j.bcp.2017.01.002.
- [16] Lü X, Wang XX, Hou J, et al. Comparison of the inhibitory effects of tolcapone and entacapone against human UDP-glucuronosyltransferases [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016, 301: 42–49.
- [17] Xin H, Qi XY, Wu JJ, et al. Assessment of the inhibition potential of licochalcone A against human UDP-glucuronosyltransferases [J]. *Food Chem Toxicol*, 2016, 90: 112–122.
- [18] Uchaipichat V, Mackenzie PI, Guo XH, et al. Human UDP-glucuronosyltransferases: isoform selectivity and kinetics of 4-methylumbelliferone and 1-naphthol glucuronidation, effects of organic solvents, and inhibition by diclofenac and probenecid [J]. *Drug Metab Dispos*, 2004, 32: 413–423.
- [19] Kim D, Zheng YF, Min JS, et al. *In vitro* stereoselective inhibition of ginsenosides toward UDP-glucuronosyltransferase (UGT) isoforms [J]. *Toxicol Lett*, 2016, 259: 1–10.
- [20] Uchaipichat V, Mackenzie PI, Elliot DJ, et al. Selectivity of substrate (trifluoperazine) and inhibitor (amitriptyline, androsterone, canrenoic acid, hecogenin, phenylbutazone, quinidine, quinine, and sulfipyrazone) “probes” for human UDP-glucuronosyltransferases [J]. *Drug Metab Dispos*, 2006a, 34:

- 449–456.
- [21] Ai LM, Zhu LL, Yang L, et al. Selectivity for inhibition of nilotinib on the catalytic activity of human UDP-glucuronosyltransferases [J]. *Xenobiotica*, 2014, 44: 320–325.
- [22] Zhu LL, Ge GB, Liu Y, et al. Potent and selective inhibition of magnolol on catalytic activities of UGT1A7 and 1A9 [J]. *Xenobiotica*, 2012, 42: 1001–1008.
- [23] Rowland A, Knights KM, Mackenzie PI, et al. The “albumin effect” and drug glucuronidation: bovine serum albumin and fatty acid-free human serum albumin enhance the glucuronidation of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A9 substrates but not UGT1A1 and UGT1A6 activities [J]. *Drug Metab Dispos*, 2008, 36: 1056–1062.
- [24] Lü X, Ge GB, Feng L, et al. An optimized ratiometric fluorescent probe for sensing human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 and its biological applications [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 72: 261–267.
- [25] Lü X. Screening, Characterization and Application of UGT1A1 Specific Fluorescent Probes (UGT1A1 特异性荧光探针的设计筛选、性能表征及应用研究) [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2016.
- [26] Kirby BJ, Unadkat JD. Impact of ignoring extraction ratio when predicting drug-drug interactions, fraction metabolized, and intestinal first-pass contribution [J]. *Drug Metab Dispos*, 2010, 38: 1926–1933.
- [27] Mross K, Frost A, Steinbild S, et al. A phase I dose-escalation study of regorafenib (BAY 73-4506), an inhibitor of oncogenic, angiogenic, and stromal kinases, in patients with advanced solid tumors [J]. *J Clin Cancer Res*, 2012, 18: 26–58.
- [28] Sim SC, Kacevska M, Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenomics of drug-metabolizing enzymes: a recent update on clinical implications and endogenous effects [J]. *Pharmacogenomics J*, 2013, 13: 1–11.
- [29] Udomuksorn W, Elliot DJ, Lewis BC, et al. Influence of mutations associated with Gilbert and Crigler-Najjar type II syndromes on the glucuronidation kinetics of bilirubin and other UDP-glucuronosyltransferase 1A substrates [J]. *Pharmacogenet Genom*, 2007, 17: 1017–1029.