

高原环境对格列喹酮药代动力学参数的影响

黄隆基, 张晓静, 罗 林, 牟宏芳, 李文斌, 王 荣

中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院药剂科 全军高原医学实验室, 甘肃兰州 730050

[摘要] **目的:**探讨高原低氧环境对格列喹酮体内药代动力学参数的影响。**方法:**将12只Wistar雄性大鼠随机分为平原组与高原组,分别灌胃给予6.3 mg/kg格列喹酮后采集血样。采用超快速液相色谱-串联质谱(UFLC-MS/MS)法测定大鼠血浆中格列喹酮浓度,并采用蛋白质印迹法测定大鼠肝组织中CYP2C9的表达。**结果:**与平原组比较,高原组格列喹酮体内达峰血药浓度增加,吸收速率常数减小,消除速率常数增大,吸收半衰期延长,消除半衰期缩短,平均滞留时间缩短,表观分布容积减小(均 $P<0.05$)。蛋白质印迹法结果显示,高原组肝组织中代谢酶CYP2C9表达显著上调,约为平原组的1.98倍(分别为 4.18 ± 0.06 和 2.13 ± 0.06 , $t=11.57$, $P<0.01$)。**结论:**高原低氧环境下,大鼠体内格列喹酮吸收减少、代谢加快,可能与大鼠肝组织中CYP2C9酶表达上调有关。



[关键词] 高原; 低压性低氧; 超快速液相色谱-串联质谱; 格列喹酮; 药代动力学; CYP2C9; 大鼠

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A

Effects of high-altitude environment on pharmacokinetic parameters of gliclazide in rats

HUANG Longji, ZHANG Xiaojing, LUO Lin, MU Hongfang, LI Wenbin, WANG Rong
(Department of Pharmacy, the 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of Chinese People's Liberation Army, Key Laboratory of the Plateau Medicine, Lanzhou 730050, China)

Corresponding author: WANG Rong, E-mail: wangrong-69@163.com, <https://orcid.org/0000-0001-9139-7311>

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of high-altitude hypoxia on the pharmacokinetics parameters of gliclazide. **Methods:** Twelve healthy male Wistar rats were randomly divided into plain group and high-altitude group with 6 rats in each group.

收稿日期: 2022-04-01 接受日期: 2022-05-30

基金项目: 国家科技重大专项(2018ZX09J18109-001); 国家自然科学基金(81673508, 82173738)

第一作者: 黄隆基, 工程师, 主要从事高原药代动力学研究; E-mail: 806576727@qq.com; <https://orcid.org/0000-0002-2381-2277>

通信作者: 王 荣, 主任药师, 教授, 博士生导师, 主要从事高原药理学研究; E-mail: wangrong-69@163.com; <https://orcid.org/0000-0001-9139-7311>

Blood samples were collected after intragastric administration of gliquidone (6.3 mg/kg). Ultra-fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UFLC-MS/MS) was used to determine the concentration of gliquidone in rat plasma samples. And the expression of CYP2C9 in rat liver tissues was determined by Western blotting. **Results:** Compared with the plain group, the peak concentration of gliquidone in the high-altitude rats was significantly increased, the absorption rate constant was decreased, the elimination rate constant and the absorption half-life were increased, the elimination half-life was shortened, the mean residence time and apparent volume of distribution were decreased (all $P < 0.05$). Western blotting showed that the expression of CYP2C9 was significantly up-regulated in the liver tissues of high altitude group rats, compared with the plain group (4.18 ± 0.06 vs. 2.13 ± 0.06 , $t = 11.57$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Under the high-altitude hypoxia environment, the absorption of gliquidone in rats was reduced and the metabolism was accelerated in rats, which may be related to the up-regulation of CYP2C9 expression in liver tissues.

[**Key words**] Plateau; Hypobaric hypoxia; Ultra-fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Gliquidone; Pharmacokinetics; CYP2C9; Rats

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2022, 51(4): 389-396.]

[**缩略语**] 无特定病原体(specific pathogen free, SPF);动物放射免疫沉淀试验(radio immunoprecipitation assay, RIPA);辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP);超快速液相色谱-串联质谱(ultra-fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UFLC-MS/MS);Tris缓冲液含0.1%吐温-20 (tris-buffered saline with Tween-20, TBST);相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)

高原在医学上通常指海拔高于2500 m的地区,主要有低压、低氧、强辐射、寒冷等特征,其中低氧是影响机体正常生命活动的主要因素^[1-3]。随着社会发展、旅游业的兴起及国防事业的需要,越来越多的人前往高原地区工作与生活^[4]。在高原缺氧条件下,药物的药代动力学特征发生改变,从而影响药物的吸收、分布、代谢和排泄^[5],因此研究药物在高原环境下的药代动力学变化具有重要意义。前期研究表明,普萘洛尔、呋塞米在急性高原低氧与慢性低氧环境下药代动力学均发生了显著性变化^[6],提示在高原环境下,需要修改给药方案以维持药物的疗效和安全性。糖尿病是一种以高血糖为其典型特征的慢性代谢性疾病,常见类型主要包括由 β -细胞破坏导致胰岛素绝对缺乏引起的1型糖尿病和胰岛素抵抗、胰岛素分泌不足引起的2型糖尿病^[7],其中2型糖尿病占多数^[8-10]。近年来,高原人群糖尿病患者数量逐渐增加^[11]。格列喹酮是第二代磺酰脲类药物,主要通过刺激胰岛 β -细胞释放内源性胰岛素发挥作用,

具有良好的疗效和安全性并且很少发生低血糖等不良反应^[10]。本研究主要考察高原环境对格列喹酮药代动力学的影响,同时对相关因素进行探讨,旨在为格列喹酮的高原合理用药提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

12只8~9周龄SPF级Wistar雄性大鼠,体重为(200 ± 20)g,购于辽宁长生生物技术有限公司(SCK2015-0001)。适应性喂养1周后,将大鼠随机分为平原组和高原组,每组各6只。平原组于中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院动物实验室(甘肃兰州,海拔1500 m)进行实验,高原组急进全军高原环境损伤重点实验室(玉树巴塘,海拔4010 m)24 h后开始实验。实验前两组大鼠均禁食不禁水12 h,然后灌胃给予6.3 mg/kg格列喹酮。

本实验通过中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院伦理委员会审查(2021KYLL189),且

均按照相关指导原则和规定进行。

1.2 试剂及仪器

格列喹酮(B20444,纯度至少98%)、硝苯吡啶(B24345,纯度至少98%)为上海源叶生物科技有限公司产品;格列喹酮分散片(国药准字H20080726)为江苏万高药业股份有限公司产品;高效RIPA裂解液(R0010)、蛋白酶抑制剂(P6730)为北京索莱宝科技有限公司产品;抗体CYP2C9(ab205718)、抗 β -actin(ab8226)为英国Abcam公司产品;HRP-山羊抗小鼠(BM3895)、HRP-山羊抗兔(BM3894)为武汉博士德生物工程有限公司产品;化学发光HRP底物(WBKLS0100)为美国Merck Millipore公司产品;聚偏二氟乙烯膜(0.22 μ mol/L)为德国Merck Millipore Sigma公司产品;乙腈(色谱纯)、甲酸(色谱纯)为德国Merck公司产品;灭菌注射用水(110128112)为西安京西双鹤药业有限公司产品。

UFLC-20A高效液相色谱仪为日本岛津公司产品;API3200三重四级杆串联质谱仪为美国Applied Biosystems公司产品;ChemiDocTM MP Imaging System为美国Bio-Rad公司产品;高速低温离心机(Microfuge 22R)为美国Beckman Coulter公司产品;涡旋混合器(QL-906)为海门市其林贝尔仪器制造有限公司产品;Mettler AE 240电子天平为上海梅特勒-托利多仪器有限公司产品。

1.3 大鼠血浆的采集和处理

分别于给药前及给药后5、10、15、20、30 min,1、2、4、6、8、12、24 h由眼眶后静脉丛取血0.2 mL于肝素润过的1.5 mL EP管中。4℃条件下2000 $\times$ g离心5 min,将获得的血浆标本置于-80℃保存。采用蛋白沉淀法处理大鼠血浆标本。具体方法如下:取大鼠血浆50 μ L于0.5 mL EP管中并加入25 μ L内标工作液,然后加入150 μ L乙腈,涡旋振荡60 s以沉淀血浆蛋白,6000 $\times$ g离心10 min后取上清液进样分析。

1.4 格列喹酮溶液和内标硝苯吡啶溶液的配制

格列喹酮溶液的配制:精密称取0.0020 g格列喹酮于10 mL容量瓶中,加入适量甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得浓度为0.2 mg/mL的格列喹酮储备液,置于4℃冰箱保存备用。由于硝苯吡啶在检测条件下与格列喹酮出峰位置相近,且均具有良好的响应值,本研究选择硝苯吡啶作为内标。硝苯吡啶溶液的配制:精密称取0.0020 g硝苯吡啶

于10 mL容量瓶中,加入适量甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得浓度为0.2 mg/mL的硝苯吡啶储备液。使用前用甲醇稀释成1 μ g/mL的内标工作液。

1.5 UFLC-MS/MS色谱和质谱条件

色谱条件:Shim-pack XR-ODS色谱柱(3.0 mm $\times$ 75 mm,2.0 μ m),流动相为乙腈-水(90:10,v/v),流速0.4 mL/min,进样量10 μ L,进样室温度25℃,运行时间4 min。

质谱条件:离子源采用电喷雾离子源,负离子模式检测,离子喷雾电压为-4500 V,温度为300℃。格列喹酮的碰撞诱导解离电压为-48.7 V,碰撞能量为-59.4 eV;硝苯吡啶的碰撞诱导解离电压为-19.0 V、碰撞能量为-21.0 eV,采用质谱多反应监测。格列喹酮和硝苯吡啶的监测反应质荷比分别为526.2 $\rightarrow$ 386.0和345.2 $\rightarrow$ 122.0。

1.6 方法学验证

1.6.1 专属性考察 大鼠空白血浆,加入2 μ g/mL格列喹酮对照品的空白血浆和大鼠灌胃给予格列喹酮2 h后血浆等标本处理方法见1.3,并将处理好的标本通过UFLC-MS/MS法进行分析,色谱和质谱条件见1.5。

1.6.2 线性考察 取配制好的格列喹酮储备液,以大鼠空白血浆为基质依次稀释为4000、2000、1000、500、250、100、50、25、10、5 ng/mL的标准曲线溶液,标本处理方法见1.3。采用UFLC-MS/MS法分析标本,色谱和质谱条件见1.5。以待测物格列喹酮浓度为横坐标(X),待测物格列喹酮峰面积与内标硝苯吡啶峰面积的比值为纵坐标(Y),经加权最小二乘法进行线性回归运算得格列喹酮在大鼠血浆中的标准曲线方程。

1.6.3 精密度和准确度考察 分别配制5、500、3000 ng/mL格列喹酮标准血浆溶液(质控标本)。质控标本按照1.3所述方法处理后采用UFLC-MS/MS法进行分析,色谱与质谱条件见1.5,每个浓度平行6份。在同一天和连续三天内测定质控标本,测定过程中加入随行标准曲线。根据标准曲线计算每份标本中格列喹酮的实际浓度进行方差分析,计算标本的日内、日间精密度(以RSD表示)及准确度。

1.6.4 回收率计算 分别配制5、500、3000 ng/mL的质控标本,按照1.3所述方法处理后进样分析,得待测物格列喹酮的峰面积为A1。同时,另取大

鼠空白血浆,按相同方法处理后向上清液中加入不同浓度的格列喹酮溶液使其终浓度为5、500、3000 ng/mL并进样分析,得待测物格列喹酮的峰面积为A2。回收率计算公式:回收率(%)=A1/A2×100%。

1.6.5 稳定性考察 分别配制5、500、3000 ng/mL的质控标本,考察格列喹酮在25℃保存12 h、-80℃反复冻融3次、-80℃保存10 d的稳定性,每个浓度平行3份,血浆标本处理方法见1.3。采用UFLC-MS/MS法分析标本以测定格列喹酮在不同保存条件下的稳定性,色谱与质谱条件见1.5。

1.6.6 基质效应 取大鼠空白血浆并按1.3方法处理后,配制成浓度分别为5、500、3000 ng/mL的格列喹酮溶液。同时用灭菌注射用水代替大鼠空白血浆配制成相同浓度的对照品溶液,加入内标。处理后的标本采用UFLC-MS/MS法进行分析,色谱与质谱条件见1.5。通过比较两种处理方式下峰面积的比值判断基质是否会对测定结果产生影响。

1.7 蛋白质印迹法检测模型鼠肝组织代谢酶

称取大鼠肝组织100.0 mg并加入适量RIPA裂解液及蛋白酶抑制剂后进行组织匀浆提取总蛋白,采用BCA法测定总蛋白浓度。通过SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(12%聚丙烯酰胺凝胶)分析组织蛋白质标本并将其转移至聚偏二氟乙烯膜。5%脱脂奶粉封闭2 h, CYP2C9抗体(1:1500)、 β -actin抗体(1:5000)4℃孵育过夜并加入HRP标记的二抗,室温孵育1 h。1×TBST洗条带3次,每次5 min,超敏电化学发光试剂曝光显影,使用Quantity One软件对蛋白条带行灰度值扫描分析。

1.8 统计学方法

将所得血药浓度-时间数据用WinNonlin 8.1

软件(一房室模型)计算药物代谢参数,实验数据均采用 GraphPad Prism 5.0分析处理。数据用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 方法学考察结果

2.1.1 专属性 对比分析大鼠空白血浆、加入2 μ g/mL格列喹酮对照品的空白血浆、给予格列喹酮2 h后血浆等标本的色谱图(图1)可见,血浆中杂质对格列喹酮和硝苯吡啶的测定无明显干扰,格列喹酮和硝苯吡啶的保留时间分别为1.37和1.18 min,表明该分析方法具有较强的专属性。

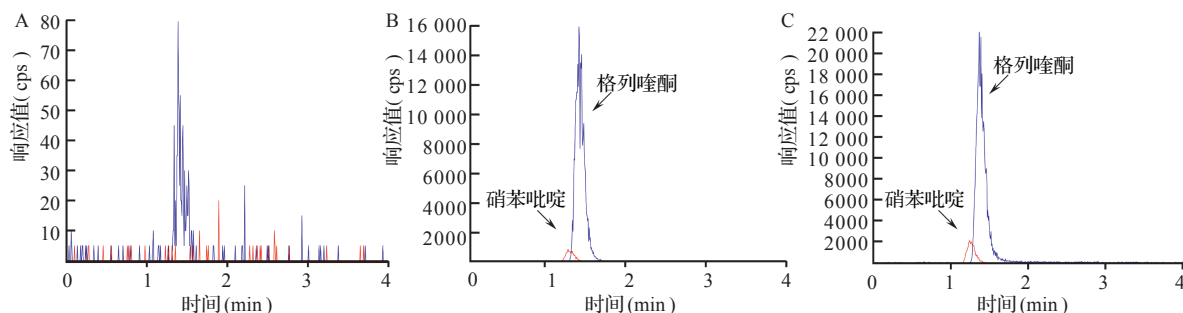
2.1.2 线性 以格列喹酮浓度为横坐标,其峰面积与内标峰面积比值为纵坐标,得格列喹酮在大鼠血浆中的标准曲线: $Y = 0.00675X + 0.117$ ($r = 0.9984$)。格列喹酮浓度在5~4000 ng/mL内线性关系良好,最低定量限为5 ng/mL(信噪比超过10)。

2.1.3 精密度和准确度 格列喹酮的日内、日间精密度(RSD值)均小于5%,准确度为98.73%~101.07%,符合方法学要求。见表1。

表 1 大鼠血浆中格列喹酮的日内、日间的精密度及准确度

Table 1 Intra-day and inter-day precisions and accuracy of gliquidone in rat plasma

		(%)			
格列喹酮浓度 (ng/mL)	<i>n</i>	日 内		日 间	
		精密度	准确度	精密度	准确度
5	6	4.95	100.63	3.81	99.87
500	6	1.23	100.23	1.01	101.07
3000	6	0.87	100.39	2.81	98.73



A:空白血浆色谱图;B:加入2 μ g/mL格列喹酮对照品和内标(1 μ g/mL硝苯吡啶)的空白血浆色谱图;C:大鼠灌胃给予格列喹酮2 h后的血浆色谱图。

图 1 大鼠血浆标本中格列喹酮和硝苯吡啶典型色谱图

Figure 1 Typical chromatograms of gliquidone and nifedipine in rat plasma samples

2.1.4 回收率 格列喹酮在5、500、3000 ng/mL浓度下的提取回收率分别是99.1%、99.3%、100.6%, RSD值分别是2.2%、0.9%、0.7%。说明本实验所建方法回收率高,符合方法学要求。

2.1.5 稳定性 格列喹酮乙腈溶液在25℃保存12 h的回收率为99.5%~100.3%,表明格列喹酮在乙腈溶液中具有良好的稳定性;格列喹酮在大鼠血浆中-80℃保存10 d、-80℃反复冻融3次的回收率为94.9%~100.7%,表明格列喹酮血浆标本在该保存条件下稳定,见表2。

表2 不同条件下格列喹酮的回收率

Table 2 Stability of gliquidone under different storage conditions

格列喹酮浓度 (ng/mL)	n	乙腈溶液	大鼠血浆	
		25℃保存 12 h	-80℃保存 10 d	-80℃反复 冻融3次
5	3	99.5 ± 2.8	100.7 ± 2.2	94.9 ± 4.5
500	3	99.6 ± 2.5	99.5 ± 0.7	100.1 ± 1.1
3000	3	100.3 ± 0.4	100.2 ± 0.3	100.0 ± 0.8

2.1.6 基质效应 格列喹酮在5、500、3000 ng/mL浓度下的平均基质效应分别是91.8%、94.7%、90.7%, RSD值分别是4.7%、7.5%、8.3%,均小于10%。说明在本条件下基质效应对测定结果的影响可忽略不计。

综上所述,本研究所建立的方法具有良好的线性、精密度、准确度、回收率和稳定性且基质效应低,表明格列喹酮在标本制备期间和分析过程中均具有良好的稳定性。

2.2 两组血浆格列喹酮药代动力学参数比较

WinNonlin 8.1软件(一房室模型)分析结果显示,大鼠血浆中格列喹酮在每个时间点的预测浓度和实测浓度非常接近(图2),表明本研究所用一室模型对数据拟合好。灌胃给药后,与平原组比较,格列喹酮在高原组体内达峰血药浓度增加,吸收速率常数减小,

消除速率常数增大,吸收半衰期延长,消除半衰期缩短,平均滞留时间缩短,表观分布容积减小(均 $P<0.05$),见表3。结果提示,在高原低氧环境下,格列喹酮吸收减少、代谢加快且在体内的滞留时间缩短。

2.3 两组肝组织CYP2C9表达比较

高原组肝组织中代谢酶CYP2C9表达显著上调,约为平原组的1.98倍(分别为 4.18 ± 0.06 和 2.13 ± 0.06 , $t=11.57$, $P<0.01$),见图3。结果提示,高原环境下大鼠体内CYP2C9的上调可能是引起格列喹酮药代动力学参数发生变化的原因。

3 讨论

高原低氧环境影响药物的吸收、分布、代谢和排泄过程[5]。高原地区患者按照说明书剂量服用药物,可能达不到预期治疗效果,甚至产生毒副作用。因此,研究高原地区患者的合理用药至关重要。

格列喹酮是临床上广泛使用的二代口服磺脲类降糖药,通过与胰岛β细胞膜上的特异性受体结合诱导产生适量胰岛素以降低血糖浓度。格列喹酮大部分代谢产物经胆汁从粪便排出,只有5%经肾脏排泄,因此其不会在肾功能不全患者体内产生积聚,是治疗2型糖尿病伴轻、中度肾病患者的首选药[12-13]。本研究建立了快速、灵敏、便捷的UFLC-MS/MS方法用于测定大鼠血浆中格列喹酮的浓度,该方法成功运用于分析格列喹酮在平原组和高原组体内的药代动力学特性。结果表明,

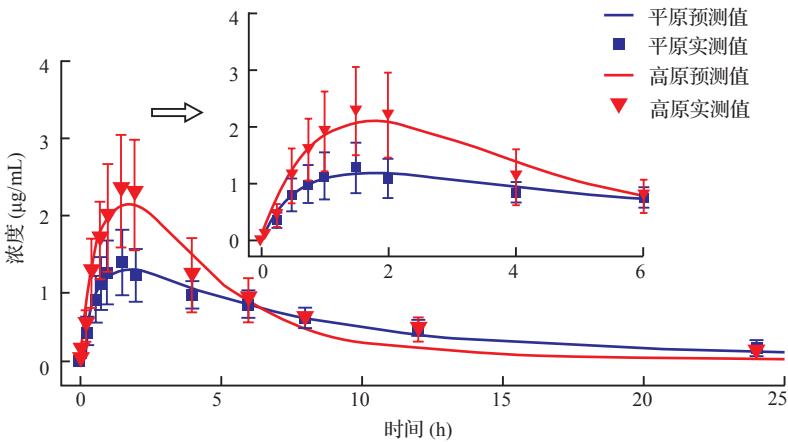


图2 平原组和高原组灌胃给予格列喹酮(6.3 mg/kg)的平均血药浓度-时间曲线图 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Figure 2 Plasma concentration-time profile of gliquidone after intragastric administration (6.3 mg/kg) in plain group and high-altitude group ($n=6, \bar{x} \pm s$)

表3 平原组和高原组血浆格列喹酮的药代动力学参数

Table 3 Pharmacokinetics parameters of gliquidone in plain group and high-altitude group rats

(x̄ ± s)						
组别	n	药时曲线下面积(h×μg/mL)	达峰时间(h)	达峰血药浓度(μg/mL)	吸收速率常数(1/h)	消除速率常数(1/h)
平原组	6	13.2 ± 3.5	1.9 ± 0.4	1.2 ± 0.3	1.6 ± 0.3	0.13 ± 0.06
高原组	6	12.5 ± 2.5	2.0 ± 0.6	2.2 ± 0.6	0.8 ± 0.3	0.50 ± 0.15
t值	—	0.375	0.372	3.339	4.460	5.011
P值	—	>0.05	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01

组别	n	吸收半衰期(h)	消除半衰期(h)	平均滞留时间(h)	表观分布容积(L/kg)	清除率(mL·h ⁻¹ ·kg ⁻¹)
平原组	6	0.47 ± 0.10	6.8 ± 3.8	10.6 ± 5.5	4.5 ± 1.5	513 ± 131
高原组	6	1.01 ± 0.28	1.5 ± 0.5	5.2 ± 3.5	1.8 ± 1.4	527 ± 108
t值	—	4.164	2.817	2.473	2.989	0.186
P值	—	<0.01	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

—:无相关数据。

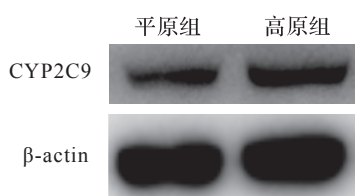


图3 平原组和高原组大鼠肝组织中代谢酶CYP2C9的表达

Figure 3 Expression of CYP2C9 in liver tissues of plain group and high-altitude group rats

高原低氧环境使格列喹酮在大鼠血浆清除率加快、消除半衰期缩短、平均滞留时间缩短、药时曲线下面积减小,表明糖尿病患者高原服用与平原相同剂量的格列喹酮后体内浓度降低,可能达不到相同的治疗效果。因此,高原地区糖尿病患者服用格列喹酮降血糖时应调整给药剂量以达到良好的治疗效果。

CYP450是肝脏最重要的药物代谢酶,临床常用药物中70%~80%可通过CYP450代谢^[14-16]。CYP2C9分别占肝脏CYP450含量、CYP2C含量的20%、50%^[16],介导15%~20%临床常用药物的代谢^[17-19]。研究报道,格列本脲、格列美脲、格列齐特或格列喹酮等磺酰脲类药物均通过CYP2C9在肝脏代谢^[20]。急进高原时,高原低氧环境使机体内血氧饱和度降低^[21-22],而CYP450是参与药物代谢反应的主要酶系且易受到氧浓度的影响^[23]。低氧环境下CYP450的活性和表达均会发生显著变化^[22-27],Valencia-Cervantes等^[28]体外研究实验

也表明,缺氧下调了Daoy细胞中CYP450的表达。本研究结果表明,急进高原24 h时,高原低氧环境显著上调大鼠肝组织中CYP2C9的表达。当代谢酶CYP2C9表达增加时,药物在体内代谢加快,吸收减少,这与高原环境下格列喹酮药代参数中药时曲线下面积降低结果一致。

综上所述,大鼠急进高原时肝组织中CYP2C9表达显著上调,格列喹酮在大鼠体内的代谢加快、吸收减少,建议患者高原环境下通过增加剂量的方式来达到类似治疗效果。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 霍妍,赵安鹏,李雪,等.急性高原病的动物模型研究现状[J].中国药理学通报,2021,37(1):26-30. HUO Yan, ZHAO Anpeng, LI Xue, et al. Animal models of acute plateau disease[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2021, 37(1): 26-30. (in Chinese)
- [2] 张娟玲,李向阳.高原低氧影响药物代谢的研究进展[J].药学报,2015,50(9):1073-1079. ZHANG Juanling, LI Xiangyang. A review of drug metabolism under hypoxia environment at high altitude[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2015, 50(9): 1073-1079. (in Chinese)
- [3] 袁雪纯,向大伟,敏琼,等.急进高原缺氧对大鼠肝脏孕烷X受体表达的影响[J].浙江大学学报(医学版),2019,48(6):603-608. YUAN Xuechun, XIANG Dawei, MIN Qiong, et al. Effects of acute hypoxia on expression of pregnane X receptor in liver tissues of rats exposed to high altitude[J]. Journal of Zhejiang University (Medi-

- cal Sciences), 2019, 48(6): 603-608. (in Chinese)
- [4] 王 昌, 贾正平, 李文斌, 等. UFLC-MS/MS法测定急进高原前后大鼠体内左氧氟沙星含量及其药代动力学差异[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2017, 46(2): 160-164.
WANG Chang, JIA Zhengping, LI Wenbin, et al. UFLC-MS/MS assay for pharmacokinetics of levofloxacin in rats after acute ascent to high altitude[J]. **Journal of Huazhong University of Science and Technology (Medical Sciences)**, 2017, 46(2): 160-164. (in Chinese)
- [5] ZHOU X, NIAN Y, QIAO Y, et al. Hypoxia plays a key role in the pharmacokinetic changes of drugs at high altitude[J]. **Curr Drug Metab**, 2018, 19(11): 960-969.
- [6] 李文斌, 王 荣, 谢 华, 等. 急进4010米高原对呋塞米药代动力学参数的影响[J]. 药学学报, 2012, 47(12): 1718-1721.
LI Wenbin, WANG Rong, XIE Hua, et al. Effects on the pharmacokinetics of furosemide after acute exposure to high altitude at 4010 meters in rats[J]. **Acta Pharmaceutica Sinica**, 2012, 47(12): 1718-1721. (in Chinese)
- [7] ASSOCIATION A D. 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes—2021[J]. **Diabetes Care**, 2021, 44(Suppl 1): S15-S33.
- [8] 徐亚明, 沈海欢. 格列喹酮联合阿卡波糖治疗老年糖尿病的疗效观察[J]. 糖尿病新世界, 2017, 20(7): 96-97.
XU Yaming, SHEN Haihuan. Efficacy of gliclazone combined with acarbose in the treatment of senile diabetes mellitus[J]. **Diabetes New World**, 2017, 20(7): 96-97. (in Chinese)
- [9] XU L, LI Y, DAI Y, et al. Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus: pharmacology and mechanisms[J]. **Pharmacol Res**, 2018, 130: 451-465.
- [10] MALAISSE W J. Gliquidone contributes to improvement of type 2 diabetes mellitus management[J]. **Drugs R D**, 2006, 7(6): 331-337.
- [11] 马杜娟, 罗 玮, 蒋艳萍, 等. 高原地区肥胖与2型糖尿病及其微血管并发症的研究进展[J]. 青海医药杂志, 2021, 51(3): 61-64.
MA Dujuan, LUO Wei, JIANG Yanping, et al. Research progress on obesity, type 2 diabetes and its microvascular complications at high altitude[J]. **Qinghai Medical Journal**, 2021, 51(3): 61-64. (in Chinese)
- [12] 于海云, 刘晶晶, 王红红. 反相高效液相色谱法测定格列喹酮片含量[J]. 中国药品标准, 2017, 18(4): 279-282.
YU Haiyun, LIU Jingjing, WANG Honghong. HPLC determination of the content of gliquidone tablets[J]. **Drug Standards of China**, 2017, 18(4): 279-282. (in Chinese)
- [13] ABE M, OKADA K, SOMA M. Antidiabetic agents in patients with chronic kidney disease and end-stage renal disease on dialysis: metabolism and clinical practice[J]. **Curr Drug Metab**, 2011, 12(1): 57-69.
- [14] WARING R H. Cytochrome P450: genotype to phenotype[J]. **Xenobiotica**, 2020, 50(1): 9-18.
- [15] HE F, LI Y, ZENG C, et al. Contribution of cytochrome P450 isoforms to gliquidone metabolism in rats and human[J]. **Xenobiotica**, 2014, 44(3): 229-234.
- [16] MANIKANDAN P, NAGINI S. Cytochrome P450 structure, function and clinical significance: a review[J]. **Curr Drug Targets**, 2018, 19(1): 38-54.
- [17] KUDZI W, DODOO A N, MILLS J J. Characterisation of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms in a Ghanaian population[J]. **BMC Med Genet**, 2009, 10(1): 124.
- [18] RENDIC S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data[J]. **Drug Metab Rev**, 2002, 34(1-2): 83-448.
- [19] HIRATSUKA M. Genetic polymorphisms and *in vitro* functional characterization of CYP2C8, CYP2C9, and CYP2C19 allelic variants[J]. **Biol Pharmaceutical Bull**, 2016, 39(11): 1748-1759.
- [20] HOLSTEIN A, HAHN M, PATZER O, et al. Impact of clinical factors and CYP2C9 variants for the risk of severe sulfonylurea-induced hypoglycemia[J]. **Eur J Clin Pharmacol**, 2011, 67(5): 471-476.
- [21] LUO B, WANG R, LI W, et al. Pharmacokinetic changes of norfloxacin based on expression of MRP2 after acute exposure to high altitude at 4300 m[J]. **Biomed Pharmacother**, 2017, 89: 1078-1085.
- [22] WANG R, SUN Y, YIN Q, et al. The effects of metronidazole on cytochrome P450 activity and Expression in rats after acute exposure to high altitude of 4300 m[J]. **Biomed Pharmacother**, 2017, 85: 296-302.
- [23] 白雪, 刘贵琴, 杨建鑫, 等. 肠道菌群介导高原低氧对药物代谢的调节[J]. 药学学报, 2021, 56(10): 2787-2796.
BAI Xue, LIU Guiqin, YANG Jianxin, et al. The effect of high-altitude hypoxia on drug metabolism is mediated by gut microbiota [J]. **Acta Pharmaceutica Sinica**, 2021, 56(10): 2787-2796. (in Chinese)
- [24] FRADETTE C, BATONGA J, TENG S, et al. Animal models of acute moderate hypoxia are associated with a down-regulation of CYP1A1, 1A2, 2B4, 2C5, and 2C16 and up-regulation of CYP3A6 and P-glycoprotein in liver[J]. **Drug Metab Dispos**, 2007, 35(5): 765-771.
- [25] 张娟玲. 高原低氧对药物代谢酶CYP1A2、CYP2C11、CYP2C22和CYP3A1活性和表达的影响[D]. 西宁: 青海大学, 2017.
ZHANG Juanling. The activity and expression of CYP1A2, CYP2C11, CYP2C22 and CYP3A1 in rats after exposure to high altitude hypoxia[D]. Xining: Qinghai University, 2017. (in Chinese)
- [26] 段雅彬, 朱俊博, 杨建鑫, 等. microRNA介导低氧对药物代谢酶和转运体的调控[J]. 药学学报, 2021,

- 56(1): 50-60.
DUAN Yabin, ZHU Junbo, YANG Jianxin, et al. Effect of hypoxia on drug metabolizing enzymes and transporters and the role of microRNA[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2021, 56(1): 50-60. (in Chinese)
- [27] 敏 琼, 封士兰, 鹿 辉, 等. 低氧对药物代谢酶和转运体的影响及其调控机制[J]. *生理学报*, 2019, 71(2): 336-342.
MIN Qiong, FENG Shilan, LU Hui, et al. Modulation of drug-metabolizing enzymes and transporters under hypoxia environment[J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2019, 71(2): 336-342. (in Chinese)
- [28] VALENCIA-CERVANTES J, HUERTA-YEPEZ S, AQUINO-JARQUÍN G, et al. Hypoxia increases chemoresistance in human medulloblastoma DAOY cells via hypoxia-inducible factor 1 α -mediated down-regulation of the CYP2B6, CYP3A4 and CYP3A5 enzymes and inhibition of cell proliferation[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(1): 178-190.
- [本文编辑 余 方 沈 敏]

· 学术动态 ·

谢安勇教授团队揭示BRCA1缺陷肿瘤特征性突变模式发生来源与机制

2022年7月25日,浙江大学医学院附属邵逸夫医院/转化医学研究院谢安勇教授团队在《自然·通讯》(*Nature Communication*)发表了题为“Nicks induce mutational signatures associated with BRCA1 deficiency”的研究论文(DOI: 10.1038/s41467-022-32011-x),揭示了单链缺刻与DNA复制偶联推动单末端DNA双链断裂(DSB)的形成,而该DNA损伤的异常修复是BRCA1缺陷肿瘤细胞中特征性突变模式形成的主要原因。

细胞正常代谢会产生内源性DNA损伤物质,诱导DNA损伤,其中包括大量的DNA单链断裂或单链缺刻——细胞内最主要的DNA损伤类型。若遇DNA复制叉,未修复的单链断裂极有可能转换为单末端DSB,而后的异常修复在肿瘤基因组不稳定性形成中的作用和贡献并未明确。为此,研究人员基于CRISPR系统开发了一种定点诱导单链缺刻、与复制偶联产生单末端DSB的方法,研究复制偶联单末端DSB的修复机制及BRCA1缺陷的影响。研究人员首先发现BRCA1缺陷导致复制偶联单末端DSB的同源重组修复缺陷,并倾向于推动复制叉滞后链与单链缺刻直接作用引起单末端DSB的长轨基因转化。其次,BRCA1缺陷细胞中复制偶联单末端DSB诱导的碱基增删频率增高,特别是11-80bp的删除产物,并提高微同源序列在接口的利用率,这与BRCA1缺陷肿瘤中的增删突变模式高度一致。此外,复制偶联单末端DSB诱导的染色体易位因BRCA1缺陷从无至有,甚至大量发生,并且在接口处展现出更长的碱基丢失,这也与BRCA1缺陷肿瘤易位突变模式相似。最后,BRCA1缺陷细胞中复制偶联单末端DSB诱导的约10 kb串联倍增频率增加,其形成机制包括双链链入侵模式和微同源序列介导的单链链入侵模式。而微同源序列介导的10 kb串联倍增也是BRCA1缺陷肿瘤的特征性突变模式之一。然而,利用CRISPR系统在BRCA1缺陷细胞中直接诱导双末端DSB,无论是碱基增删、易位还是微同源序列介导的串联倍增,其频率均未较BRCA1野生型细胞提高。

因此,该研究不仅帮助阐明了BRCA1在复制偶联单末端DSB修复中的作用,更重要的是,揭示了复制偶联单末端DSB的产生是BRCA1缺陷肿瘤突变模式的主要诱因而不是普遍认为的双末端DSB,同时揭示了复制偶联单末端DSB的异常修复机制。该研究提高了相关领域对BRCA1缺陷肿瘤特征性突变模式形成机制的理解,也将推动肿瘤突变模式发生机制在肿瘤精准诊疗中的临床应用。

冯依力和刘倩博士是论文第一作者。研究得到了国家自然科学基金和浙江省自然科学基金的支持。