

[文章编号] 1007-7669(2013)06-0419-08

细胞色素 P450 酶的时间依赖性抑制研究及其在新药研发中的作用

谢珊珊¹, 王 盼¹, 郭建军², 詹 彧², 卜海之², 陈西敬¹

(1. 中国药科大学 药物代谢研究中心, 江苏 南京 210009; 2. 苏州圣苏新药开发有限公司, 江苏 苏州 215104)

[关键词] 细胞色素 P450; 时间依赖性抑制; 生物转化; 构效关系; 机理性抑制; 药物相互作用; 临床预测

[摘要] 细胞色素 P450 酶介导绝大多数药物的体内代谢, 有些临床药物相互作用问题是由于药物对细胞色素 P450 酶的时间依赖性抑制引起的, 但在传统的体外抑制筛选方法中并未包括对时间依赖性抑制的评价方案。本文综述了药物时间依赖性抑制的研究意义及评价方法 (包括单点抑制法、IC₅₀ shift 筛选法、酶动力学实验法等), 并介绍如何利用所得体外数据进行临床预测。

[中图分类号] R96 [文献标志码] A

Research advances of time-dependent inhibition of cytochrome P450 enzymes in drug discovery and development

XIE Shan-shan¹, WANG Pan¹, GUO Jian-jun², ZHAN Yu², BU Hai-zhi², CHEN Xi-jing¹

(1. Center of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing JIANGSU 210009, China; 2. 3D BioOptima Co., Ltd., Suzhou JIANGSU 215104, China)

[KEY WORDS] cytochrome P450; time-dependent inhibition; biotransformation; structure-activity relationship; mechanism-based inactivation; drug interactions; clinical prediction

[ABSTRACT] Cytochrome P450 enzymes mediated the metabolism of the overwhelming majority of drugs. Some clinical drug interaction problems were due to the drugs caused by time-dependent inhibition (TDI) of cytochrome P450 enzymes. However, TDI study was not included in routine *in vitro* inhibition screening protocols. This article reviewed the significance and evaluation methods of TDI research. Meanwhile, an introduction on the strategies for clinical prediction using *in vitro* data was presented.

药物进入体内后的生物转化主要在肝脏内进行。肝脏内含有丰富的代谢酶系, 包括 相代谢酶 (主要催化氧化、还原和水解等反应) 和 相

代谢酶 (主要催化葡萄糖醛酸化、硫酸化、甲基化和乙酰化等反应)。在这些代谢酶中, 尤以细胞色素 (CYP) P450 酶超家族最为重要, 其参与各

[收稿日期] 2012-10-30 [接受日期] 2013-03-20

[基金项目] 苏州科学技术局姑苏创新创业领军人才基金资助 (XG0826)

[作者简介] 谢珊珊, 女, 硕士研究生, 主要研究药动学, E-mail: xsbrownie@163.com; 陈西敬, 男, 教授, 博士生导师, 主要研究药动学, Phn: 86-25-8327-1286, E-mail: chenxj-lab@hotmail.com; 卜海之, 男, 博士, 主要研究药动学, Phn: 86-512-6768-3273, E-mail: haizhi.bu@3dbiooptima.com

[责任作者] 陈西敬, 卜海之

种外源物(如药物、化学致癌物等)和内源物(如类固醇激素、脂肪酸等)在体内的代谢转换,以血红蛋白的形式存在于内质网和线粒体内。CYP超家族由多种类型的P450酶组成,目前市场上超过80%的药物主要由CYP1A2、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6及CYP3A代谢^[1]。某些外源性化合物会对P450酶活性产生一定的诱导或抑制作用,进而引起临床上的药物相互作用,使合用药物药效降低或造成血药浓度升高而产生不良反应。

药物对P450酶的抑制通常分为可逆性抑制(包括竞争性抑制、非竞争性抑制和反竞争性抑制)和不可逆性抑制。可逆性抑制剂以非共价键与酶(或酶-底物复合物)形成复合物,阻碍酶与底物之间酶促反应的正常进行,在除去抑制剂后,酶活性不受影响,能与底物继续进行正常酶促反应^[2]。在不可逆性抑制中,抑制剂对酶的抑制效应在除去抑制剂后不会即刻消失,而是呈现出时间依赖的特性。这种现象一般称之为时间依赖性抑制(time-dependent inhibition, TDI)。近来,发现一些临床药物相互作用问题是由药物的TDI特性引起的^[3-4],本文将围绕TDI的研究价值,新药候选化合物TDI评价方法及临床预测等主旨进行全面综述。

TDI的意义及研究的重要性 药物对P450酶产生TDI有多种机制,其中,机理性抑制(mechanism-based inhibition, MBI)是TDI最重要的机制,即抑制剂可经CYP介导转化成亲电性的反应性代谢物(reactive metabolite),这些反应性代谢物可与酶发生作用(主要以共价键结合形式)导致酶结构的变化而失活^[5]。MBI的产生需要先经过P450酶代谢的过程,因此抑制剂对P450酶的抑制作用需要一定时间,而体内合成新的P450酶也需要一定时间(一般需要4~7d)^[6],这样即使把抑制剂除去,其抑制作用还会存在一段时间。

与可逆性抑制相比,TDI会带来更严重的用药安全问题,因为许多需联合用药的药物也需长期用药,这势必会造成被抑制的CYP亚型被长期抑制,即使停用产生TDI的药物,其抑制作用仍会持续一段时间;同时,由于产生MBI的抑制剂同时也是P450酶的底物,当酶活性被抑制后,其自身代谢也会受到阻碍,造成在体内暴露量非平稳的增加^[7];此外,反应性代谢物对P450酶的共价修饰可能会导致半抗原的产生,可能会引起自体免疫反应,造成严重后果^[8]。

TDI所造成的影响不仅给患者带来严重的健康威胁,对制药企业也是巨大的挑战和威胁。目前,已有多种药物由于TDI而产生后果严重的药物相互作用,严重危害患者的健康,被限制使用,甚至不得不从市场上退出^[9,10],最著名的如抗高血压药米贝拉地尔(mibefradil),它是一种钙离子T和L通道阻滞剂^[11],上市后,出现了严重的不良反应。经研究发现,米贝拉地尔是一种时间依赖性的抑制剂,对CYP3A4产生不可逆性抑制,使合用的其他药物血药浓度大幅升高,以致产生毒性,甚至导致患者死亡。有些药物虽未被撤市,但也因TDI引起多种药物相互作用而被限制使用。临床发现吉非罗齐(gemfibrozil)会增强华法林的抗凝效应,导致严重的低凝血酶原血症及出血^[12],也有病例表明吉非罗齐与格列本脲合用,会导致低血糖症^[13]。研究表明,吉非罗齐是CYP2C9的机理性抑制剂^[14],而S-华法林及格列本脲在体内均主要由CYP2C9代谢^[9,15],从而造成了不良的药物相互作用。此外,吉非罗齐的葡萄糖醛酸结合物还是CYP2C8的强效时间依赖性抑制剂^[16]。

目前,降低药物相互作用特别是由TDI引起的药物相互作用的风险已得到有关监管部门的重视。在美国FDA 2012年最新发布的制药工业界指导原则中,已明确表示在标准的体外筛选实验中应加入对药物TDI的研究,并对TDI做了详细讨论^[17]。美国药物研究与制造商协会(PhRMA)于2009年针对药物代谢酶的TDI进行了专题讨论^[18],并发布了体外实验的工业白皮书。对药物的TDI进行广泛而深入的研究是非常有必要的,这不仅是对患者负责,也是对制药企业负责,针对发现的具有潜在TDI的药物及时进行调查,补充更新药品说明书,促进合理用药,是整个医疗体系的责任和应有的态度。

评价TDI的研究方法 传统的P450酶体外抑制试验通常采用直接抑制法,即将底物、P450酶、抑制剂同时孵育反应,测定抑制剂的IC₅₀值,这种方法适合于研究可逆性抑制剂,特别是竞争性抑制剂。然而,对不可逆性抑制剂来说,这种研究方法并不适用。以红霉素为例,它是一种广泛使用的大环内酯类抗生素,其稳态血药浓度低于以直接抑制法测得的其对CYP3A4的IC₅₀值,起初研究者据此认为红霉素不会与CYP3A的底物产生药物相互作用^[19,20],然而在临床应用中却发现红霉素可与CYP3A的底物发生广泛的药物相互作用,

是 CYP3A 介导的生物转化的强效抑制剂。经研究发现, 红霉素在体内由 CYP3A 介导产生的代谢物会与 P450 酶的亚铁血红素结合从而抑制酶的活性^[21]。由此可见, 对具有潜在 TDI 的化合物建立稳定可靠的体外筛选评价方法是很有必要的。

目前, 针对新药开发的不同阶段, 已有多种方法用来评价化合物的 TDI 潜力^[22-24]。在药物早期筛选阶段, 研究者倾向采用高通量、低成本的研究方法, 如单点抑制法、IC₅₀ Shift 筛选法等; 在后期阶段, 可进行系统的酶动力学实验, 获得化合物的 K_I 、 k_{inact} 等动力学参数, 以便进行临床推测。

1 单点抑制法 单点抑制法^[25]通常采用人肝微粒体作为孵育系统, 加入一定浓度的抑制剂, 在加或不加还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)的情况下于 37 °C 进行预孵育, 通常预孵育时间为 30 ~ 60 min, 同时设不含抑制剂的空白对照组, 预孵育后, 从中移取一部分至探针底物溶液中(含有 NADPH)进行孵育反应, 此孵育反应时间根据 P450 亚型及所用探针底物而不同。终止反应后, 测定孵育液中底物代谢物的生成量, 通过式(1)比较加和不加 NADPH 情况下酶活性的变化, 评价是否具有 TDI。

$$\% \text{ activity loss} = 100 \times \left[\left(\frac{A_{\text{activator}}}{A_{\text{vehicle}}} \right)_{- \text{NADPH}} - \left(\frac{A_{\text{activator}}}{A_{\text{vehicle}}} \right)_{+ \text{NADPH}} \right] \quad (1)$$

式(1)中 % activity loss 表示酶活性损失率, $(A_{\text{activator}}/A_{\text{vehicle}})_{- \text{NADPH}}$ 表示预孵不加 NADPH 时含抑制剂组与空白对照组的剩余酶活性之比, $(A_{\text{activator}}/A_{\text{vehicle}})_{+ \text{NADPH}}$ 表示预孵加 NADPH 时含抑制剂组与空白对照组的剩余酶活性之比。由于单点抑制法具有操作简单、计算简便、与实际结果相关性较好、通量高等优点, 特别适合于新药研究早期大量化合物的筛选。

2 IC₅₀ Shift 筛选法 与单点抑制法类似, IC₅₀ Shift 筛选法通常采用人肝微粒体作为孵育系统, 但设置了系列抑制剂浓度^[26-28], 在加或不加 NADPH 的情况下于 37 °C 进行预孵育, 预孵育时间一般为 30 min, 同时设不含抑制剂的空白对照组; 预孵育后, 加入含有 NADPH 的探针底物溶液, 终止反应后, 测定孵育液中底物代谢物的生成量, 计算在加或不加 NADPH 情况下 IC₅₀ 值, 比较 IC₅₀ 偏移倍数, 从而评价抑制剂是否为 TDI。图 1 是 IC₅₀ Shift 筛选法得到的理想曲线, 从中可看出

加 NADPH 条件下的 IC₅₀ 值与不加 NADPH 条件下相比, 大大减小。

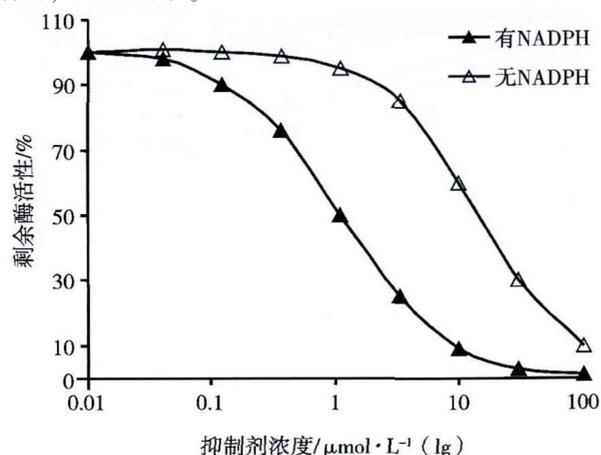


图 1 IC₅₀ Shift 法特征性曲线

BERRY 等^[29]通过用目前已知的 TDI 化合物对 IC₅₀ Shift 方法进行验证, 结果显示该方法能筛选出绝大多数具有 TDI 的化合物, 如地拉韦啉(delavirdine)对 CYP3A4 有不可逆抑制, 在不加 NADPH 情况下, 测得的 IC₅₀ 值为 53 μmol·L⁻¹, 在加 NADPH 的情况下, 测得的 IC₅₀ 值为 1.1 μmol·L⁻¹, 偏移了 48 倍; 帕罗西汀(paroxetine)对 CYP2D6 的 IC₅₀ 偏移约为 21 倍。IC₅₀ Shift 筛选法准确性较单点抑制法高, 同时可得出化合物作为可逆性抑制剂的 IC₅₀ 值, 是更常用的化合物筛选方法。

3 酶动力学实验 当药物开发到一定阶段, 需要进行较为深入的抑制研究时, 研究者常通过系统的酶动力学试验获得化合物的 K_I 、 k_{inact} 等动力学参数, 从而进行临床推测。抑制剂对 P450 酶的抑制速率与抑制剂浓度的关系可用式(2)表示:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{inact}} \times [I]}{K_I + [I]} \quad (2)$$

k_{obs} 表示表观抑制速率常数, k_{inact} 表示理论最大抑制速率, K_I 表示最大抑制速率一半时的抑制剂浓度, $[I]$ 表示抑制剂的浓度。通常的实验设计是设置一系列抑制剂浓度及预孵育时间点, 在每个时间点从预孵育液中移取一部分至含有探针底物的溶液中反应一定时间, 同时设不含抑制剂的空白对照, 测定底物代谢物的生成量。图 2 是将酶剩余活性百分比的自然对数与预温孵时间线性回归, 可得到 k_{obs} 值(斜率的负数), 从图中可知, TDI 是一种时间、浓度依赖性的过程, 随抑制剂浓度增大, 酶活性被抑制的速率也增大。图 3 反映了抑制速率常数与抑制剂浓度的关系, 之后按

Lineweaver-Burk 作图法, 即可求得 k_{inact} 及 K_I 值。

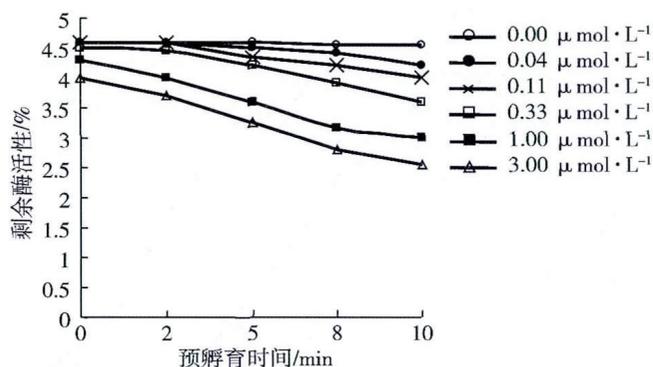


图 2 预孵育时间-酶活性-抑制剂浓度的关系

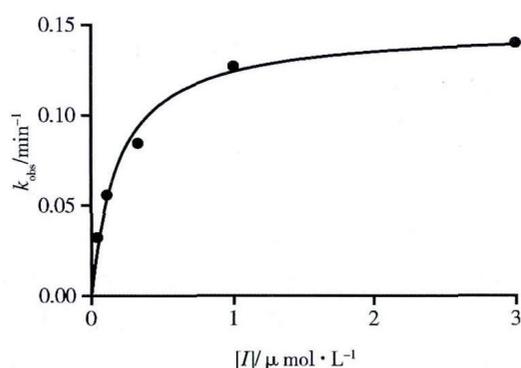


图 3 表观抑制速率常数 (k_{obs}) - 抑制剂浓度 ($[I]$) 曲线

酶动力学实验获得的结果最可靠, 但其实验设计较复杂, 需要分析测定的样本数量较多, 要处理大量数据, 通量不足。因此, 在化合物筛选阶段, 选用单点抑制法或 IC_{50} Shift 筛选法较为合适, 而酶动力学实验适合在化合物开发后期进行。

在 TDI 评价试验中, 研究者们选用了不同的孵育系统, 包括肝微粒体、肝细胞、基因重组 P450 酶系以及肝切片等^[30-32]。其中, 肝微粒体和肝细胞是最为常用的孵育系统。肝微粒体含有丰富的 P450 酶系, 且制备简单、便于储存和使用, 所得数据稳定、可靠, 但在评价体内药物相互作用时, 可能会高估药物相互作用发生的可能性^[33]。近年来, 随着细胞分离、培养技术的提高, 肝细胞也逐渐应用于药物相互作用的评价, 由于肝细胞具有非 CYP 介导的代谢途径且含有转运体, 其所得结果与临床实际情况吻合度较高, 但肝细胞制备技术较复杂, 且体外肝细胞活性维持时间较短, 不利于储存和反复使用。

在对具有 TDI 特性化合物的研究过程中, 有学者发现这些化合物具有某些结构上的相似处^[7], 许多具有 TDI 的化合物结构中会含有咪喃、噁吩、炔及胺等官能团, 如咪拉茶碱、炔雌醇、米非司酮等, 但并不是拥有这些官能团的化合物一定会

对 P450 酶产生时间依赖性抑制, 只能提供一定的参考价值, 其构效关系 (structure-activity relationship, SAR) 需要进一步的研究, 见表 1。

TDI 数据的临床预测 通过体内试验研究人体内的药物相互作用风险大、成本高, 因此通过体外数据对体内情况进行预测是最为理想的途径。成功的预测可以提高化合物筛选效率, 减少因临床试验失败造成的人力、物力和时间成本的浪费。

外源性化合物若对肝 P450 酶产生抑制作用, 则会造成由该 P450 酶亚型代谢的药物体内暴露量增加, 表现为 AUC 增大。这种抑制潜能可根据式 (3) 进行估算^[37]:

$$\frac{AUC_i}{AUC} = \frac{1}{\left(1 + \frac{f_m(P450)}{1 + \frac{k_{inact} \times [I]_{in vivo}}{K_I \times k_{deg}}}\right) + [1 - f_m(P450)]} \quad (3)$$

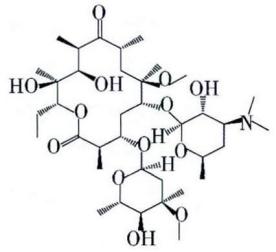
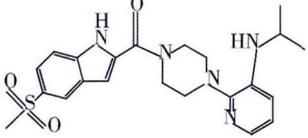
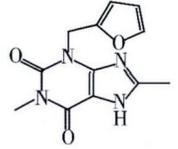
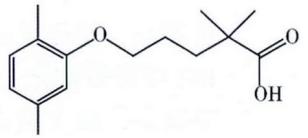
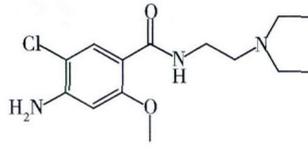
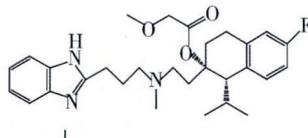
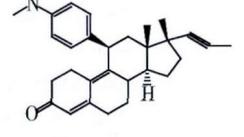
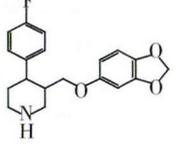
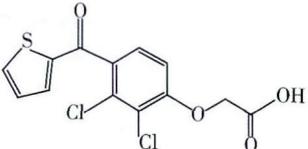
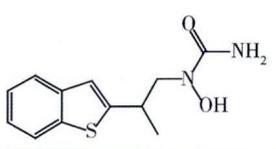
其中 AUC_i/AUC 表示由某一 P450 酶亚型代谢的药物与抑制剂同服时的体内暴露量与非同服对照之比, $f_m(P450)$ 表示被抑制的 P450 酶代谢途径对整个系统清除率的贡献率, k_{deg} 为被抑制的 P450 酶在体内的一级降解速率常数, $[I]_{in vivo}$ 为与被抑制的 P450 酶接触的抑制剂浓度。

需要注意的是, 由于 CYP3A 在小肠内含量丰富, 约占肠总 P450 酶的 70%^[38], 因此, 将抑制剂对肝脏和小肠部位 CYP3A 的影响合并考虑, 得到式 (4)^[25]:

$$\frac{AUC_i}{AUC} = \frac{1}{F_g + (1 - F_g) \times \frac{1}{1 + \frac{k_{inact} \times [I]_g}{k_{deg, CYP3A, gut} \times ([I]_g + K_I)}}} \times \frac{1}{\frac{f_m(CYP3A)}{1 + \frac{k_{inact} \times [I]_{in vivo}}{K_I \times k_{deg, CYP3A, hep}}} + [1 - f_m(CYP3A)]} \quad (4)$$

其中 F_g 表示抑制剂不存在时药物在小肠部位的口服生物利用度, $[I]_g$ 为小肠内抑制剂浓度, $f_m(CYP3A)$ 为肝 CYP3A 对药物整体清除率的贡献比率, $k_{deg, CYP3A, gut}$ 和 $k_{deg, CYP3A, hep}$ 分别表示 CYP3A 在小肠内和肝脏内的降解速率常数。从式 (3) 和 (4) 可以看出, 预测时的决定因子包括抑制剂体外的抑制能力 (K_I, k_{inact})、抑制剂的体内浓度 ($[I]_{in vivo}$)、P450 酶的降解/再生速率常数 (k_{deg})、受抑制 P450 酶对药物清除的贡献 ($f_m(P450)$) 及肠道代谢分数 (F_g , 对于通过 CYP3A 代谢的药物), 其中 $f_m(P450)$ 值及 k_{deg} 值均可从文献资料中获得^[39, 40],

表 1 几种典型 TDI 药物的结构及特性

序号	药品名	结构	抑制的 P450 亚型	$K_i/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$k_{\text{inact}}/\text{min}^{-1}$
1	克拉霉素 (clarithromycin)		CYP3A4	15.7 ^[34]	0.063 ^[34]
2	地拉韦啉 (delavirdine)		CYP3A4	5.2 ^[29]	0.056 ^[29]
3	呋拉茶碱 (furafylline)		CYP1A2	4.0 ^[27]	0.60 ^[27]
4	吉非罗齐 (gemfibrozil)		CYP2C8	29 ^[35]	0.072 ^[35]
5	甲氧氯普胺 (metoclopramide)		CYP2D6	21 ^[29]	0.028 ^[29]
6	米贝拉地尔 (mibefradil)		CYP3A4	0.13 ^[29]	0.042 ^[29]
7	米非司酮 (mifepristone)		CYP3A4	3.6 ^[22]	0.110 ^[22]
8	帕罗西汀 (paroxetine)		CYP2D6	0.94 ^[29]	0.074 ^[29]
9	替尼酸 (tienilic acid)		CYP2C9	1.1 ^[27]	0.46 ^[27]
10	齐留通 (zileuton)		CYP1A2	117 ^[36]	0.035 ^[36]

而 $[I]_{\text{in vivo}}$ 值不能直接测得, 但可用稳态血药浓度 (c_{max}), 稳态游离血药浓度 ($f_u \times c_{\text{max}}$) 或肝门静脉

游离血药浓度 ($c_{\text{max, u, inlet}}$) 进行估算, 肝门静脉游离血药浓度可根据式(5)^[41]进行估算:

$$c_{\max, u, \text{inlet}} = f_u \times \left(c_{\max} + \frac{D \times k_a \times F_a}{Q_h} \right) \quad (5)$$

其中 $c_{\max, u, \text{inlet}}$ 表示抑制剂肝门静脉游离血药浓度, f_u 表示抑制剂在血浆中的游离比率, D 表示抑制剂口服给药剂量, k_a 表示抑制剂口服吸收速率常数, F_a 表示口服生物利用度, Q_h 表示肝血流速率 ($1450 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), 对 CYP3A 来说, 通过吸收进入小肠上皮细胞的抑制剂浓度 $[I]_g$ 也要考虑在内, 定义如式 (6)^[42]:

$$[I]_g = \frac{D \times k_a \times F_a}{Q_g} \quad (6)$$

其中 Q_g 表示小肠总血流速率 ($248 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), 其他参数如前述。

此外, 在未得到 K_I 及 k_{inact} 数值的情况下, 也可通过 IC_{50} shift 筛选方法进行经验预测, 可参考式 (7) 及 (8)^[25]:

$$\frac{\text{AUC}_i}{\text{AUC}} = \frac{1}{1 + \frac{[I]_{\text{in vivo}}}{0.5 \times \text{IC}_{50}} + [1 - f_m(\text{P450})]} \quad (7)$$

$$\frac{\text{AUC}_i}{\text{AUC}} = \frac{1}{F_g + \left((1 - F_g) \times \frac{1}{1 + \frac{[I]_g}{0.5 \times \text{IC}_{50}}} \right)} \times \left[\frac{1}{1 + \frac{[I]_{\text{in vivo}}}{0.5 \times \text{IC}_{50}}} \right] + [1 - f_m(\text{CYP3A})] \quad (8)$$

对于 CYP3A, 式 (7)、(8) 中的 IC_{50} 是 IC_{50} shift 筛选法得到的预孵加 NADPH 情况下测得的 IC_{50} 值, 即 shifted IC_{50} , 其余变量与式 (3)、(4) 中的定义相同。

以上预测方法皆是基于式 (3), 属于静态模型法 (static model), 是非常经典的预测方法, 但也有其局限性。如静态模型法是假定抑制剂到达稳态, 而抑制剂浓度的短暂变化以及 CYP3A 酶活性、含量和降解速率的个体间差异均未能考虑在内, 此外静态模型法难以评价不同的给药方案对药物相互作用的影响。鉴于静态模型法的不足, 科学家们建立了 PBPK 模型法, 目前, 已有一些基于 PBPK 模型的成熟的商业软件可用于体外数据对体内情况的推测 (*in vitro* - *in vivo* extrapolation, IVIVE)。如 SimCyp population-based ADME simulator 是一种对化合物口服吸收、组织分布、代谢、排泄过程进行机械模拟得到的平台和数据库, 将临

床前研发阶段体外实验获得的实验数据、化合物的理化性质、人口统计学、生理学及遗传学信息整合起来, 可对体内较为复杂的吸收、分布、代谢、排泄过程, 特别是涉及药物相互作用、时间/剂量依赖性现象进行模拟预测^[43]。用户可根据要求输入所需数据, 软件会自动得出相应结果。

结语 一个新药的上市需经历漫长而严谨的研发过程, 临床药物相互作用是重要的评价标准, 若一种化合物临床上会与其他药物产生药物相互作用, 对于该化合物是非常不利的。因此, 越早了解一个新化合物可能的临床药物相互作用, 越能提高筛选效率, 使研究者及早进行结构改造或是终止研究, 节约成本。TDI 是引起药物相互作用的一个重要原因, 会导致严重的后果, 特别是对于某些需要长期给药, 联合用药的药物。体外实验因其通量高、成本低, 常用于新药开发阶段的早期筛选, 但传统的筛选方案中并未包括对化合物 TDI 特性的评价。因此, 对 TDI 机理进行更加深入的研究, 建立更高效、更可靠的评价方法是相关科研人员的重要任务。

[参考文献]

- [1] WIENKERS LC, HEATH TG. Predicting *in vivo* drug interactions from *in vitro* drug discovery data [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(10): 825-833.
- [2] MUKADAM S, TAY S, TRAN D, *et al.* Evaluation of time-dependent cytochrome p450 inhibition in a high-throughput, automated assay: introducing a novel area under the curve shift approach[J]. *Drug Metab Lett*, 2012, 6(1): 43-53.
- [3] ZHOU S, CHAN E, LIM LY, *et al.* Therapeutic drugs that behave as mechanism-based inhibitors of cytochrome P450 3A4 [J]. *Curr Drug Metab*, 2004, 5(5): 415-442.
- [4] ZHOU S, YUAN CHAN S, CHER GOH B, *et al.* Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 by therapeutic drugs[J]. *Clin Pharmacolinet*, 2005, 44(3): 279-304.
- [5] VANDENBRINK BM, ISOHERRANEN N. The role of metabolites in predicting drug-drug interactions: focus on irreversible cytochrome P450 inhibition [J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2010, 13(1): 66-77.
- [6] KALGUTKAR AS, OBACH RS, MAURER TS. Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 enzymes: chemical mechanisms, structure-activity relationships and relationship to clinical drug-drug interactions and idiosyncratic adverse drug reactions[J]. *Curr Drug Metab*, 2007, 8(5): 407-447.
- [7] ORR ST, RIPP SL, BALLARD TE, *et al.* Mechanism-based inactivation (MBI) of cytochrome P450 enzymes: structure activity relationships and discovery strategies to mitigate drug

- drug interaction risks[J]. *J Med Chem*, 2012, 55 (11): 4896-4933.
- [8] LI AP. A review of the common properties of drugs with idiosyncratic hepatotoxicity and the "multiple determinant hypothesis" for the manifestation of idiosyncratic drug toxicity[J]. *Chem Biol Interact*, 2002, 142(1-2): 7-23.
- [9] BAROZZI N, TETT SE. What happened to the prescribing of other COX-2 inhibitors, paracetamol and non-steroidal anti-inflammatory drugs when rofecoxib was withdrawn in Australia[J]. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2007, 16(11): 1184-1191.
- [10] KARIALAINEN MJ, NEUVONEN PJ, BACKMAN JT. Rofecoxib is a potent, metabolism-dependent inhibitor of CYP1A2: implications for *in vitro* prediction of drug interactions[J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34(12): 2091-2096.
- [11] WANDEL C, KIM RB, GUENGERICH FP, *et al.* Mibefradil is a P-glycoprotein substrate and a potent inhibitor of both P-glycoprotein and CYP3A *in vitro*[J]. *Drug Metab Dispos*, 2000, 28(8): 895-898.
- [12] DIXON DL, WILLIAMS VG. Interaction between gemfibrozil and warfarin: case report and review of the literature[J]. *Pharmacotherapy*, 2009, 29(6): 744-748.
- [13] AHMAD S. Gemfibrozil: interaction with glyburide[J]. *South Med J*, 1991, 84(1): 102.
- [14] WEN X, WANG JS, BACKMAN JT, *et al.* Gemfibrozil is a potent inhibitor of human cytochrome P450 2C9[J]. *Drug Metab Dispos*, 2001, 29(11): 1359-1361.
- [15] YIN OQ, TOMLINSON B, CHOW MS. CYP2C9, but not CYP2C19, polymorphisms affect the pharmacokinetics and pharmacodynamics of glyburide in Chinese subjects [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2005, 78(4): 370-377.
- [16] OQILVIE BW, ZHANG D, LI W, *et al.* Glucuronidation converts gemfibrozil to a potent, metabolism-dependent inhibitor of CYP2C8: implications for drug-drug interactions [J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34(1): 191-197.
- [17] US Food and Drug Administration. Guidance for Industry. Drug interaction studies-study design, data analysis, and implications for dosing and labeling recommendations[EB/OL]. (2012-02-01) [2012-10-29]. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM292362.pdf>
- [18] GRIMM SW, EINOLF HJ, HAIL SD, *et al.* The conduct of *in vitro* studies to address time-dependent inhibition of drug-metabolizing enzymes: a perspective of the pharmaceutical research and manufacturers of America[J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37(7): 1355-1370.
- [19] OLKKOLA KT, ARANKO K, LUURILA H, *et al.* A potentially hazardous interaction between erythromycin and midazolam [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1993, 53(3): 298-305.
- [20] GASCON MP, DAYER P. *In vitro* forecasting of drugs which may interfere with the biotransformation of midazolam[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 1991, 41(6): 573-578.
- [21] LARREY D, FUNCK-BRENTANO C, BREIL P, *et al.* Effects of erythromycin on hepatic drug-metabolizing enzymes in humans [J]. *Biochem Pharmacol*, 1983, 32(6): 1063-1068.
- [22] ZIMMERLIN A, TRUNZER M, FALLER B. CYP3A time-dependent inhibition risk assessment validated with 400 reference drugs[J]. *Drug Metab Dispos*, 2011, 39 (6): 1039-1046.
- [23] LI AP, DOSHI U. Higher throughput human hepatocyte assays for the evaluation of time-dependent inhibition of CYP3A4[J]. *Drug Metab Lett*, 2011, 5(3): 183-191.
- [24] WATANABE A, NAKAMURA K, OKUDAIRA N, *et al.* Risk assessment for drug-drug interaction caused by metabolism-based inhibition of CYP3A using automated *in vitro* assay systems and its application in the early drug discovery process[J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35(7): 1232-1238.
- [25] OBACH RS, WALSKY RL, VENKATKRISHNAN K. Mechanism-based inactivation of human cytochrome P450 enzymes and the prediction of drug-drug interactions[J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35(2): 246-255.
- [26] KAJBAF M, LONGHI R, FONTANA S. Evaluation of different approaches to identifying a higher throughput assay for time-dependent inhibition (TDI)[J]. *Drug Metab Lett*, 2011, 5(2): 104-113.
- [27] PERLOFF ES, MASON AK, DEHAL SS, *et al.* Validation of cytochrome P450 time-dependent inhibition assays: a two-time point IC₅₀ shift approach facilitates kinetic assay design [J]. *Xenobiotica*, 2009, 39(2): 99-112.
- [28] PARKINSON A, KAZMI F, BUCKLEY DB, *et al.* An evaluation of the dilution method for identifying metabolism-dependent inhibitors of cytochrome P450 enzymes[J]. *Drug Metab Dispos*, 2011, 39(8): 1370-1387.
- [29] BERRY LM, ZHAO Z. An examination of IC₅₀ and IC₅₀-shift experiments in assessing time-dependent inhibition of CYP3A4, CYP2D6 and CYP2C9 in human liver microsomes[J]. *Drug Metab Lett*, 2008, 2(1): 51-59.
- [30] GHANBARI F, ROWLAND-YEO K, BLOOMER JC, *et al.* A critical evaluation of the experimental design of studies of mechanism based enzyme inhibition, with implications for *in vitro*-*in vivo* extrapolation[J]. *Curr Drug Metab*, 2006, 7(3): 315-334.
- [31] ALBAUGH DR, FULLENWIDER CL, FISHER MB, *et al.* Time-dependent inhibition and estimation of CYP3A clinical pharmacokinetic drug-drug interactions using plated human cell systems[J]. *Drug Metab Dispos*, 2012, 40(7): 1336-1344.
- [32] KANAMITSU SI, ITO K, GREEN CE, *et al.* Prediction of *in vivo* interaction between triazolam and erythromycin based on *in vitro* studies using human liver microsomes and recombinant human CYP3A4[J]. *Pharm Res*, 2000, 17(4): 419-426.
- [33] CHEN Y, LIU L, MONSHOUWER M, *et al.* Determination of time-dependent inactivation of CYP3A4 in cryopreserved human hepatocytes and assessment of human drug-drug interactions[J]. *Drug Metab Dispos*, 2011, 39(11): 2085-2092.
- [34] XU L, CHEN Y, PAN Y, *et al.* Prediction of human drug-drug interactions from time-dependent inactivation of CYP3A4 in

- primary hepatocytes using a population-based simulator[J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37(12): 2330-2339.
- [35] BAER BR, DELISLE RK, ALLEN A. Benzylic oxidation of gemfibrozil-1-O-beta-glucuronide by P450 2C8 leads to heme alkylation and irreversible inhibition[J]. *Chem Res Toxicol*, 2009, 22(7): 1298-1309.
- [36] LU P, SCHRAG ML, SLAUGHTER DE, *et al.* Mechanism-based inhibition of human liver microsomal cytochrome P450 1A2 by zileuton, a 5-lipoxygenase inhibitor[J]. *Drug Metab Dispos*, 2003, 31(11): 1352-1360.
- [37] WANG YH, JONES DR, HALL SD. Prediction of cytochrome P450 3A inhibition by verapamil enantiomers and their metabolites[J]. *Drug Metab Dispos*, 2004, 32(2): 259-266.
- [38] 郭建军, 赵 华, 王晶晶. CYP介导的抑制性药物相互作用的体外定量预测[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2009, 14(8): 841-848.
- [39] OBACH RS, WALSKY RL, VENKATAKRISHNAN K, *et al.* The utility of *in vitro* cytochrome P450 inhibition data in the prediction of drug-drug interactions[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 316(1): 336-348.
- [40] WANG YH. Confidence assessment of the simcyp time-based approach and a static mathematic model in predicting clinical drug-drug interactions for mechanism-based CYP3A[J]. *Drug Metab Dispos*, 2010, 38(7): 1094-1104.
- [41] KANAMISU S, ITO K, SUGIYAMA Y. Quantitative prediction of *in vivo* drug-drug interactions from *in vitro* data based on physiological pharmacokinetics: use of maximum unbound concentration of inhibitor at the inlet to the liver[J]. *Pharm Res*, 2000, 17(3): 336-343.
- [42] ROSTAMI-HODJEGAN A, TUCKER GT. "In silico" simulations to assess the "in vivo" consequences of "in vitro" metabolic drug-drug interactions[J]. *Drug Discov Today Tech*, 2004, 1: 441-448.
- [43] JAMEI M, MARCINIAK S, FENG K, *et al.* The Simcyp population-based ADME simulator[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2009, 5(2): 211-223.

[文章编号] 1007-7669(2013)06-0426-07

缺血性脑损伤治疗新策略：促进血管新生和神经再生

丁利静, 石京山, 李 菲, 黄 彬, 杨丹莉, 龚其海

(遵义医学院 药理学教研室暨贵州省基础药理重点实验室, 贵州 遵义 563000)

[关键词] 脑缺血; 血管生成调节剂; 神经再生

[摘要] 缺血性脑损伤病因及发病机制仍不完全清楚。目前促进血管新生和神经再生在其发生和发展中的作用日益受到关注。本文综述了近年来关于促进血管新生和神经再生的研究进展, 旨在为将来研发缺血性脑损伤治疗药物提供新策略。

[中图分类号] R96

[文献标志码] A

New strategies for ischemic cerebral injury therapy: promoting angiogenesis and neurogenesis

DING Li-jing, SHI Jing-shan, LI Fei, HUANG Bin, YANG Dan-li, GONG Qi-hai

(Department of Pharmacology and the Key Laboratory of Basic Pharmacology of Guizhou Province, Zunyi)

[收稿日期] 2013-02-03 [接受日期] 2013-04-02

[基金项目] 国家自然科学基金(81060349), 贵州省科技厅联合资金(黔科合J字LKZ[2011]27号), 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-11-0927), 教育部创新团队(IRT1197)

[作者简介] 丁利静, 女, 硕士研究生, 主要从事神经药理学研究; 龚其海, 男, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事神经药理学研究, Phn: 86-852-860-9623, Fax: 86-852-860-9266, E-mail: gqh@zmc.edu.cn

[责任作者] 龚其海