

## 构建 LPS 诱导的急性炎症小鼠模型用于 IDO1 抑制剂药效动力学评价

施磊 郭磊磊 杨丹 杨青<sup>△</sup>

(复旦大学生命科学学院生物化学与分子生物学系 上海 200438)

**【摘要】 目的** 构建急性炎症小鼠模型用于吲哚胺 2, 3-双加氧酶 1(indoleamine 2,3-dioxygenase 1, IDO1)抑制剂的药效动力学评价。**方法** 采用尾静脉注射或腹腔注射给予小鼠脂多糖(lipopolysaccharide, LPS), 构建 IDO1 活性上调的急性炎症小鼠模型。模型小鼠灌胃给予 IDO1 抑制剂 L-1-甲基色氨酸(L-1-methyl-tryptophan, L-1-MT)或 TQ016, 给药后不同时间点取血, HPLC 检测小鼠血清中色氨酸(tryptophan, Trp)和犬尿氨酸(kynurenine, Kyn)含量, 计算 Kyn/Trp 比值。采用 IDO1 活性上调引起的 Trp 浓度降低、Kyn 浓度升高及 Kyn/Trp 比值增大, 来评价 IDO1 抑制剂 L-1-MT 和 TQ016 对急性炎症小鼠血清中上调的 IDO1 活性的抑制效果。**结果** 尾静脉注射 0.66 mg/kg LPS 或腹腔注射 5 mg/kg LPS 均显著上调小鼠血清中 IDO1 活性。100 mg/kg L-1-MT 在灌胃给药 4 h 后显著抑制模型小鼠血清中上调的 IDO1 活性。100 mg/kg TQ016 在灌胃给药 1、6、12、24 和 30 h 后均显著抑制模型小鼠血清中上调的 IDO1 活性。TQ016 呈剂量依赖性抑制模型小鼠血清中上调的 IDO1 活性。**结论** LPS 诱导的急性炎症小鼠模型适用于 IDO1 抑制剂的药效动力学评价。IDO1 抑制剂 TQ016 具有良好的 IDO1 活性抑制效果。

**【关键词】** IDO1 抑制剂; 脂多糖(LPS); 急性炎症; 小鼠模型; 药效动力学

**【中图分类号】** R965.1 **【文献标志码】** A **doi:**10.3969/j.issn.1672-8467.2022.02.014

## Establishment of LPS-induced acute inflammation mouse model for the pharmacodynamics evaluation of IDO1 inhibitor

SHI Lei, GUO Lei-lei, YANG Dan, YANG Qing<sup>△</sup>

(Department of Biochemistry, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China)

**【Abstract】 Objective** To establish an acute inflammation mouse model for the pharmacodynamics evaluation of IDO1 inhibitor. **Methods** Lipopolysaccharide (LPS) was administrated to mice through tail vein intravenous injection or intraperitoneal injection to establish an acute inflammation mouse model with up-regulated IDO1 activity. The model mice were gavaged with IDO1 inhibitor L-1-methyl-tryptophan (L-1-MT) or TQ016. The blood samples were collected at different time points after administration. The contents of tryptophan (Trp) and kynurenine (Kyn) in serum of mice were detected by HPLC and the ratio of Kyn/Trp was calculated. The effects of IDO1 inhibitors (L-1-MT and TQ016) on the up-regulated IDO1 activity resulting in the decrease of Trp concentration, increase of Kyn concentration and Kyn/Trp ratio were evaluated. **Results** Tail vein intravenous injection of 0.66 mg/kg LPS or intraperitoneal injection of 5 mg/kg LPS both could significantly up-regulate IDO1 activity in the serum of mice. L-1-MT (100 mg/kg) significantly inhibited up-regulated IDO1 activity in serum 4 h after intragastric administration. TQ016 (100 mg/kg) significantly inhibited the up-regulated IDO1 activity in serum 1, 6, 12, 24 or 30 h

after intragastric administration. TQ016 inhibited the up-regulated IDO1 activity in serum in a dose-dependent manner. **Conclusion** LPS induced acute inflammation mouse model is suitable for the pharmacodynamics evaluation of IDO1 inhibitors. IDO1 inhibitor TQ016 has a good inhibitory effect on IDO1 activity.

**【Key words】** IDO1 inhibitor; lipopolysaccharide (LPS); acute inflammation; mice model; pharmacodynamics

\* This work was supported by the Open Research Fund of State Key Laboratory of Genetic Engineering, Fudan University (SKLGE-2119).

吲哚胺 2,3-双加氧酶 1 (indoleamine 2,3-dioxygenase 1, IDO1) 是沿犬尿氨酸通路 (kynurenine pathway, KP) 分解代谢人体必需氨基酸色氨酸 (tryptophan, Trp) 生成犬尿氨酸 (kynurenine, Kyn) 等中间代谢物及终产物辅酶 NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) 的首个限速酶<sup>[1]</sup>。IDO1 在哺乳动物的中枢神经系统、附睾、肠、胸腺、呼吸道、脾脏等组织中均有表达<sup>[2]</sup>。KP 异常与神经退行性疾病、抑郁、心血管疾病和恶性肿瘤等疾病的病理机制密切相关,在上述疾病患者中 IDO1 高表达或过度活化伴 KP 上调多见<sup>[3-6]</sup>。阿尔兹海默症 (Alzheimer's disease, AD) 患者以及抑郁症患者血清中 IDO1 活性高于健康个体<sup>[7-8]</sup>; IDO1 活性与动脉粥样硬化的早期标志物颈动脉内膜/中层厚度 (intima media thickness, IMT) 呈显著正相关<sup>[9]</sup>。IDO1 高表达还与多种肿瘤的不良预后正相关<sup>[10]</sup>。近年,IDO1 在肿瘤免疫逃逸中的作用也受到关注。在肿瘤微环境中,高表达的 IDO1 消耗 Trp,蓄积 Kyn,诱导效应 T 细胞凋亡及功能障碍<sup>[11]</sup>,活化调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs)<sup>[12]</sup>,营造免疫抑制的微环境,进而造成肿瘤免疫逃逸。因此,IDO1 是 AD、抑郁、动脉粥样硬化、肿瘤等疾病治疗的重要靶标。

开发 IDO1 抑制剂靶向 IDO1 阻断 KP 是疾病治疗的重要策略。研究发现抑制 IDO1 可改善 AD 小鼠认知行为,具有一定的治疗作用<sup>[13]</sup>。IDO1 抑制剂 1-甲基色氨酸 (1-methyl-tryptophan, 1-MT) 可下调抑郁小鼠血清中 IDO1 活性,减轻抑郁行为<sup>[14]</sup>。IDO1 抑制剂在多种肿瘤小鼠模型中展现出良好的抗肿瘤作用。对黑色素瘤 B16 荷瘤小鼠连续 14 天腹腔注射 75 mg/kg IDO1 抑制剂 5I,肿瘤抑制率达到 75%<sup>[15]</sup>;灌胃给予 30 或 100 mg/kg IDO1 抑制剂 INCB024360 均能显著抑制大肠癌 CT26 荷瘤小鼠

的肿瘤生长<sup>[16]</sup>。多个 IDO1 抑制剂单用或联合其他药物用于癌症治疗的研究也已进入临床试验阶段,如 Indoximod、PF-06840003、Epcadostat、Nnavoximod、KHK2455 和 BMS-986205 等。

IDO1 抑制剂的研发必须开展药效动力学评价,即研究 IDO1 抑制剂对 KP 的阻断作用。有研究以 Kyn 水平的降低作为 IDO1 活性被抑制的衡量标准<sup>[15]</sup>,更多研究以 Kyn 与 Trp 的比值 (即 Kyn/Trp) 减小作为标准,后者能更准确地反映 IDO1 活性的改变。现有的用于 IDO1 抑制剂药效动力学评价的动物模型有 naïve 鼠<sup>[15]</sup>和荷瘤小鼠<sup>[17]</sup>。使用 naïve 鼠进行 IDO1 抑制剂药效动力学评价一般采用单次给药,故实验耗时短。但是 naïve 鼠处于正常生理状态,本底 IDO1 水平较低,使用抑制剂后引起 Kyn 浓度或  $(\text{Kyn}/\text{Trp}) \times 100$  的改变非常有限,不能准确反映 IDO1 抑制剂对 IDO1 活性的抑制效力。荷瘤小鼠的 IDO1 活性高于 naïve 鼠的 IDO1 活性,但用于 IDO1 抑制剂药效动力学评价实验周期较长。乳腺癌 4T1 荷瘤小鼠和肺癌 LLC 荷瘤小鼠用于实验需耗时 21 天和 18 天<sup>[18-19]</sup>。因此,有必要对现有的 IDO1 抑制剂药效动力学评价的动物模型进行改进,建立短时间内显著上调体内 IDO1 活性的动物模型,以提高实验效率和结果准确性。

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 可诱导炎症反应,通过激活 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路上调小鼠体内 IDO1 活性<sup>[20-21]</sup>。LPS 的给药方式主要有腹腔注射<sup>[22]</sup>、尾静脉注射<sup>[23]</sup>、鼻饲<sup>[24]</sup>等。本文选用昆明鼠及 C57BL/6 小鼠,通过尾静脉注射及腹腔注射两种不同的给药方式给予小鼠 LPS。造模以后,对模型小鼠灌胃给予 IDO1 抑制剂 TQ016,给药后不同时间点取血,HPLC 检测小鼠血清中 Kyn 和 Trp 含量,用  $(\text{Kyn}/\text{Trp}) \times 100$  反映 IDO1 活性。研究 LPS 诱导的炎症小鼠模型用于 IDO1 抑制剂药效动力学评价

的可行性,评价IDO1抑制剂TQ016的药效动力学。

## 材 料 和 方 法

**动物** 选取昆明鼠45只和C57BL/6鼠225只(5周龄,雌性,上海杰思捷实验动物有限公司),饲养过程及实验过程符合标准。

**试剂和药品** 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)(上海昌为医药辅料有限公司),L-1-MT、LPS(美国Sigma-aldrich公司),L-Trp、L-Kyn、色谱级甲醇、色谱级乙腈(阿拉丁试剂上海有限公司),TQ016、乙酸钠(上海文旻生化科技有限公司),冰醋酸(国药集团化学试剂有限公司),高氯酸(鑫源化工有限公司),小鼠饲料及垫料(上海斯莱克实验动物有限公司)。

**仪器和设备** 涡旋仪(美国Thermo Scientific公司),电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司),超声波细胞粉碎仪(宁波海曙科生超声设备有限公司),立式压力蒸汽灭菌锅(上海博讯实业有限公司),SW-CJ-1FD洁净工作台(苏州净安泰空气技术有限公司),Legend Micro 17R高速离心机(美国Thermo Scientific),高效液相色谱仪、C18柱(美国Agilent公司)。

### 溶液及药物配制

**LPS溶液** 配制0.9% NaCl溶液(生理盐水),用0.22  $\mu\text{m}$ 水相滤头过滤。将5 mg/mL LPS母液用生理盐水稀释后用于尾静脉注射和腹腔注射。

**0.5% CMC-Na溶液** 100 mL生理盐水经0.22  $\mu\text{m}$ 水相滤头过滤,50  $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热,称取0.5 g CMC-Na加入其中,完全溶解后于4  $^{\circ}\text{C}$ 保存。

**L-1-MT溶液** 称取34.2 mg L-1-MT置于4 mL EP管中,加入2 mL 0.5% CMC-Na溶液,于超声波细胞粉碎机中超声10 s,冰浴冷却,循环操作,直至L-1-MT完全溶解,补加0.5% CMC-Na溶液至3.8 mL,封口膜封口,于超声波清洗器中超声10 min,4  $^{\circ}\text{C}$ 保存。按小鼠体重18 g给药0.2 mL计算,剂量为100 mg/kg。

**TQ016溶液** 配制方法同L-1-MT。按小鼠体重20 g给药0.2 mL计算,剂量分别为25、50和100 mg/kg。

**炎症小鼠模型构建** 昆明鼠尾静脉注射0.66 mg/kg LPS,24 h后用于给药实验。C57BL/6小鼠腹腔注射5或8 mg/kg LPS,24 h后用于给药实验。

**小鼠给药** 昆明鼠随机分为4组:1个对照组和3个LPS造模组(给药剂量约为0.66 mg/kg)。对照组(5只)和LPS组(16只)灌胃给予0.5% CMC-Na, LPS+L-1-MT组(6只)和LPS+TQ016组(18只)分别灌胃给予100 mg/kg L-1-MT和100 mg/kg TQ016。各组小鼠于给药后40 min、2 h和4 h摘眼球取血。

C57BL/6小鼠随机分为5组:1个对照组和4个LPS造模组(给药剂量为5或8 mg/kg)。对照组(6只)、5 mg/kg LPS组(8只)和8 mg/kg LPS组(8只)灌胃给予0.5% CMC-Na,5 mg/kg LPS+L-1-MT组(8只)和8 mg/kg LPS+L-1-MT组(8只)灌胃给予100 mg/kg L-1-MT。各组小鼠于给药后4和12 h摘眼球取血。

C57BL/6小鼠随机分为3组:1个对照组和2个LPS造模组(给药剂量为5 mg/kg)。对照组(20只)和LPS组(21只)灌胃给予0.5% CMC-Na, LPS+TQ016组(27只)灌胃给予100 mg/kg TQ016。各组小鼠于给药后1、6、12、24和30 h摘眼球取血。

C57BL/6小鼠随机分为5组:1个对照组和4个LPS造模组(给药剂量为5 mg/kg)。对照组(20只)和LPS组(21只)灌胃给予0.5% CMC-Na, LPS+25 mg/kg TQ016组(26只)、LPS+50 mg/kg TQ016组(26只)和LPS+100 mg/kg TQ016组(26只)分别灌胃给予25、50和100 mg/kg TQ016。各组小鼠于给药后1、6、12、24和30 h摘眼球取血。

**小鼠血清制备** 小鼠全血室温静置1 h,4  $^{\circ}\text{C}$ 下900 $\times g$ 离心10 min,吸取上清,得粗血清。将粗血清按上述条件再次离心10 min,吸取上清,得纯血清。加入等体积5%高氯酸溶液,涡旋混匀30 s,室温静置15 min,室温下16 200 $\times g$ 离心10 min。取上清,加入1/2体积的色谱级甲醇,涡旋混匀2 min,室温下16 200 $\times g$ 离心10 min。取上清,用0.22  $\mu\text{m}$ 水系滤膜过滤,向标记好的内衬管中加入200  $\mu\text{L}$ 处理好的血清,4  $^{\circ}\text{C}$ 保存,待HPLC检测。

**HPLC检测条件** C18柱(250 nm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),柱温25  $^{\circ}\text{C}$ ,流动相为15 mmol/L乙酸-乙酸钠溶液(pH=3.6):乙腈=94:6,流速1 mL/min,进样量20  $\mu\text{L}$ 。检测波长:Trp为280 nm, Kyn为360 nm。

**统计学分析** 数据统计采用GraphPad Prism6.0软件,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 $t$

检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

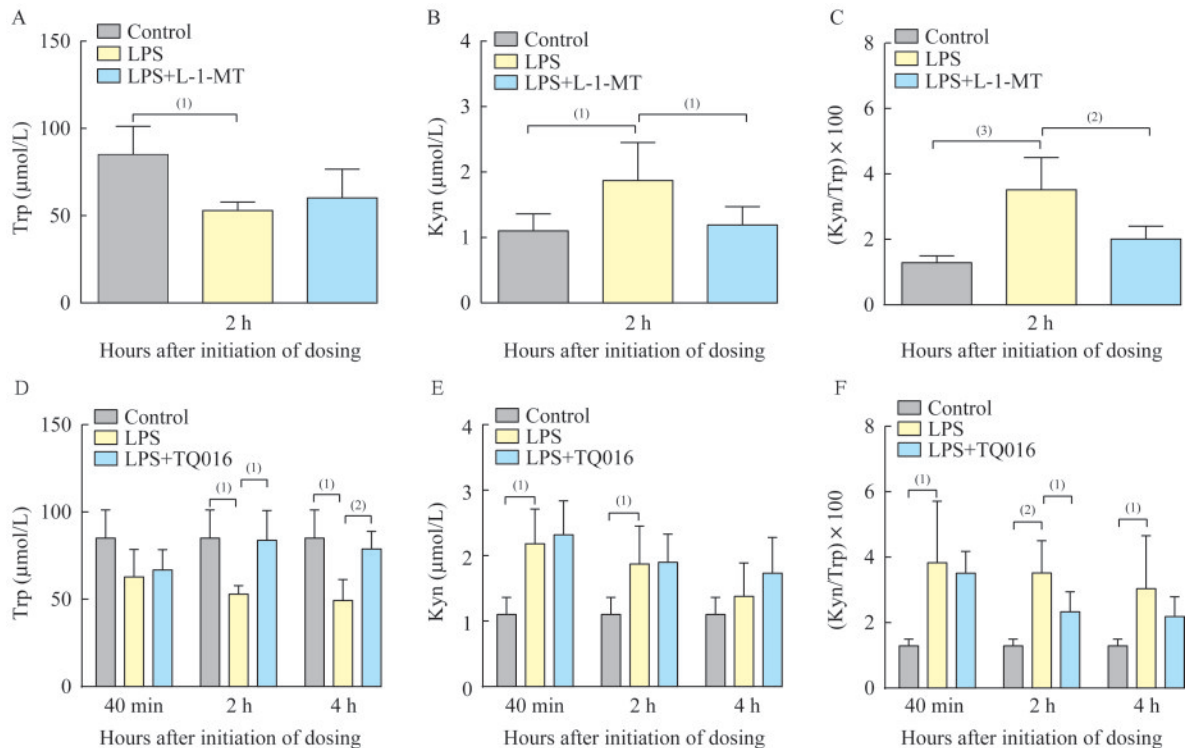
## 结 果

**尾静脉注射 LPS 小鼠的 IDO1 活性上调** 昆明鼠尾静脉注射 0.66 mg/kg LPS 造模 24 h 后用于给药实验(图 1)。模型小鼠血清中 Trp 含量下调(2 h:  $P = 0.0129$ , 4 h:  $P = 0.0227$ ), Kyn 含量[40 min:  $P = 0.0386$ , 2 h:  $F(4, 4) = 4.871$ ,  $P = 0.0263$ ]及 IDO1 活性上调[40 min:  $P = 0.0328$ , 2 h:  $P = 0.0021$ , 4 h:  $F(2, 11) = 3.941$ ,  $P = 0.0423$ ]。尾静脉注射 0.66 mg/kg LPS 可上调小鼠血清中 IDO1 活性, 造模成功。

**IDO1 抑制剂对尾静脉注射 LPS 小鼠 IDO1 活性的抑制作用** 模型小鼠灌胃给予 IDO1 抑制剂 L-1-MT 2 h 后, 被 LPS 下调的 Trp 含量略恢复(图 1A),

被 LPS 上调的 Kyn 含量 [ $F(4, 5) = 4.399$ ,  $P = 0.0300$ ] (图 1B) 和 IDO1 活性 [ $F(4, 5) = 6.377$ ,  $P = 0.0068$ ] (图 1C) 显著降低。说明 L-1-MT 在灌胃给药 2 h 后具有明显的 IDO1 活性抑制作用。

模型小鼠灌胃给予 IDO1 抑制剂 TQ016 40 min 后, 被 LPS 下调的 Trp 含量略恢复; 2、4 h 后, 被 LPS 下调的 Trp 含量显著上调[2 h:  $P = 0.0279$ , 4 h:  $F(3, 4) = 1.389$ ,  $P = 0.0052$ ] (图 1D)。TQ016 对 Kyn 含量无明显影响(图 1E)。模型小鼠灌胃给予 TQ016 40 min、2 h 和 4 h 后, 被 LPS 上调的 IDO1 活性降低且在 TQ016 灌胃 2 h 后差异有统计学意义 [ $F(4, 5) = 2.585$ ,  $P = 0.0353$ ] (图 1F)。尾静脉注射 0.66 mg/kg LPS 可构建 IDO1 活性上调的模型小鼠, IDO1 抑制剂 L-1-MT 和 TQ016 灌胃给药 2 h 后可显著抑制模型小鼠体内被 LPS 上调的 IDO1 活性。



Mice were challenged with LPS (0.66 mg/kg, iv) for 24 h. A-C: L-1-MT (100 mg/kg, ig); D-F: TQ016 (100 mg/kg, ig). Results were expressed as  $\bar{x} \pm s$  ( $n = 4-6$ /group at different time points). <sup>(1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>(2)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>(3)</sup>  $P < 0.001$ .

图 1 IDO1 抑制剂对尾静脉注射 LPS 小鼠血清中 IDO1 活性的抑制作用

Fig 1 Effects of IDO1 inhibitors on IDO1 activity in the serum of mice challenged with LPS

**腹腔注射 LPS 小鼠的 IDO1 活性上调** 与对照组相比, 腹腔注射 5、8 mg/kg LPS 均能下调 C57BL/6 小鼠血清中 Trp 含量(图 2A、2D), 上调 Kyn 含量(图 2B、2E)和显著上调 IDO1 活性[5 mg/kg LPS 组(图 2C): 4 h,  $F(3, 2) = 8.627$ ,  $P = 0.0119$ ; 12 h,  $F(2, 2) =$

1.214,  $P = 0.0208$ ; 8 mg/kg LPS 组(图 2F): 4 h,  $F(2, 2) = 37.900$ ,  $P = 0.0004$ ; 12 h,  $F(3, 2) = 11.010$ ,  $P = 0.0108$ ]。

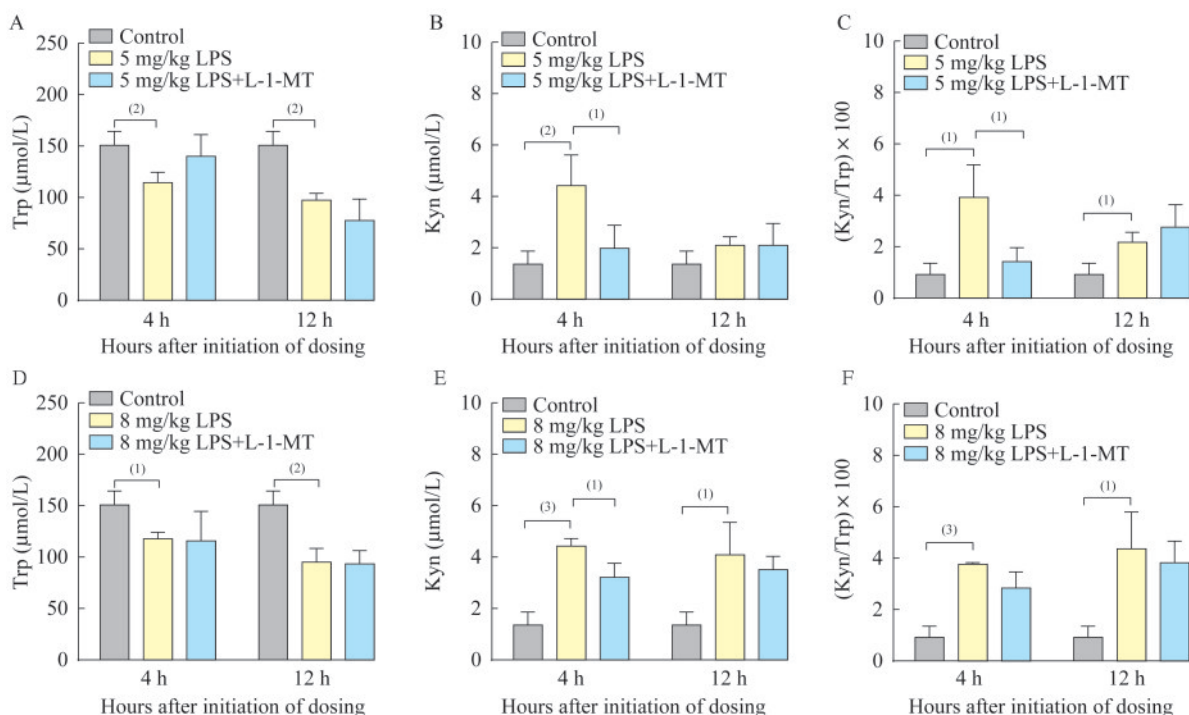
**L-1-MT 对腹腔注射 LPS 小鼠 IDO1 活性的抑制作用** 5 mg/kg LPS 造模组灌胃给予 L-1-MT 4 h



后,被LPS下调的Trp含量可恢复(图2A),被LPS上调的Kyn含量 $[F(3,3)=1.739, P=0.0169]$ (图2B)和IDO1活性 $[F(3,3)=5.417, P=0.0109]$ (图2C)显著降低。灌胃给予L-1-MT 12 h后,血清中Trp、Kyn含量和IDO1活性均无明显变化(图2A~2C),可能与L-1-MT的半衰期和药代动力学性质有关。

8 mg/kg LPS造模组灌胃给予L-1-MT 4 h后,

血清中Trp含量无明显变化(图2D),被LPS上调的Kyn含量显著降低 $[F(2,2)=3.647, P=0.0266]$ (图2E),被LPS上调的IDO1活性降低(图2F)。灌胃给予L-1-MT 12 h后,血清中Trp和Kyn含量以及IDO1活性均无明显变化(图2D~2F)。综合以上实验结果,我们选用5 mg/kg LPS腹腔注射用于评价TQ016的药效动力学。



Mice were challenged with LPS (5 or 8 mg/kg, ip) for 24 h. Mice were treated with L-1-MT (100 mg/kg, ig). Results were expressed as  $\bar{x} \pm s$  ( $n=3-4$ /group at different time points). <sup>(1)</sup>  $P<0.05$ , <sup>(2)</sup>  $P<0.01$ , <sup>(3)</sup>  $P<0.001$ .

图2 L-1-MT对腹腔注射LPS小鼠血清中IDO1活性的抑制作用

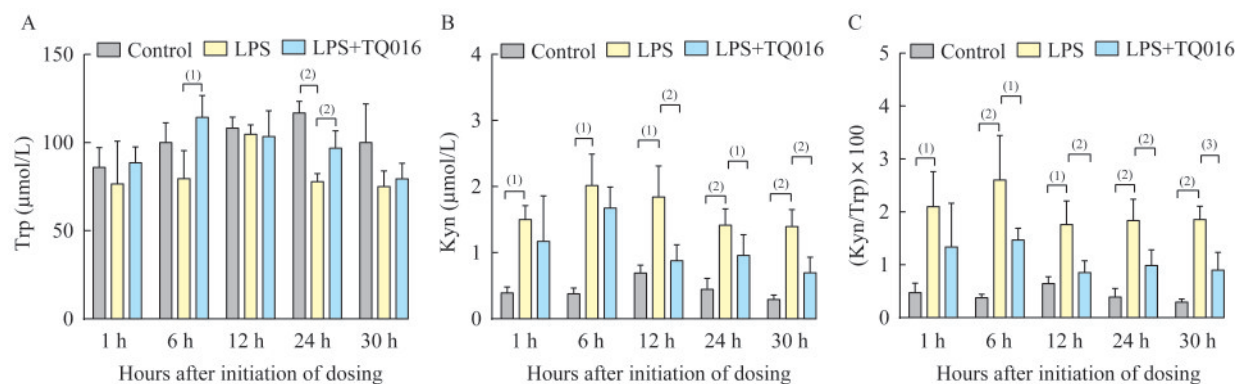
Fig 2 Effect of IDO1 inhibitor L-1-MT on IDO1 activity in the serum of mice challenged with LPS

**TQ016对腹腔注射LPS小鼠IDO1活性的抑制作用** 5 mg/kg LPS造模组小鼠在腹腔注射LPS 24 h后体重下降 $(1.57 \pm 0.57)$  g,对照组小鼠在腹腔注射生理盐水24 h后体重增加了 $(0.64 \pm 0.57)$  g。

与对照组小鼠相比,在给药后不同时间点,LPS造模组小鼠血清中Trp含量均下降(图3A),Kyn含量均显著增长(1 h:  $P=0.0428$ , 6 h:  $P=0.0194$ , 12 h:  $P=0.0194$ , 24 h:  $P=0.0053$ , 30 h:  $P=0.0035$ ) (图3B),IDO1活性在给药后1、6、12、24和30 h分别增长3.47、5.84、1.75、3.69和5.41倍,差异均有统计学意义(1 h:  $P=0.0147$ , 6 h:  $P=0.0033$ , 12 h:  $P=0.0147$ , 24 h:  $P=0.0030$ , 30 h:  $P=0.0030$ ) (图3C)。腹腔注射LPS小鼠灌胃给予TQ016后1、6、12、24和30 h,被LPS上调的IDO1活性分别下降36.67%、

43.46%、51.70%、45.90%和51.61%,在6、12、24和30 h差异有统计学意义[6 h:  $P=0.0159$ ; 12 h:  $F(3,4)=3.971, P=0.0052$ ; 24 h:  $F(3,5)=1.886, P=0.0048$ ; 30 h:  $F(5,4)=1.835, P=0.0005$ ] (图3C)。以上结果再次说明腹腔注射LPS用于上调小鼠血清中IDO1活性的可行性,此小鼠模型适用于IDO1抑制剂的药效动力学评价。IDO1抑制剂TQ016具有良好的IDO1活性抑制作用。

**不同剂量TQ016对腹腔注射LPS小鼠IDO1活性的抑制作用** 与对照组相比,LPS组小鼠血清中Trp含量下调(图4A),Kyn含量上调(图4B),IDO1活性显著上调(1 h:  $P=0.0090$ , 6 h:  $P=0.0014$ , 12 h:  $P=0.0377$ , 24 h:  $P=0.0061$ , 30 h:  $P=0.0021$ ) (图4C)。TQ016对LPS下调的Trp含量无明显影响



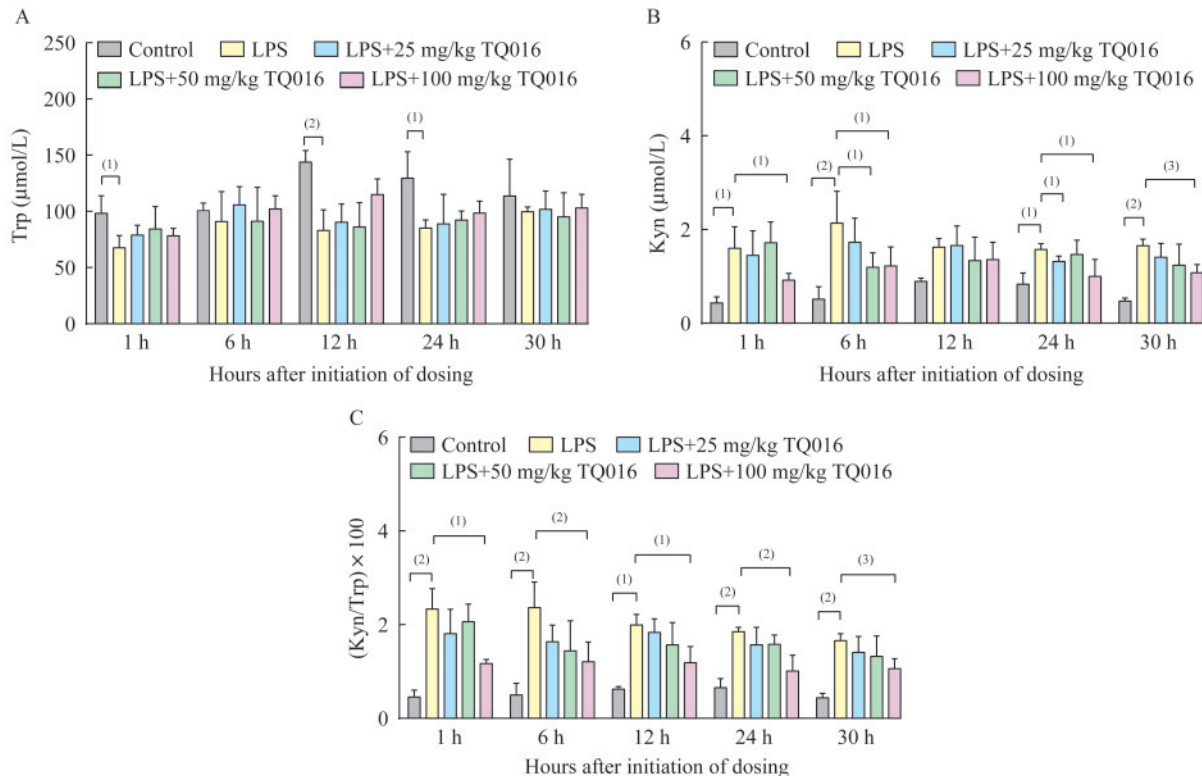
Mice were challenged with LPS (5 mg/kg, ip) for 24 h. Mice were treated with TQ016 (100 mg/kg, ig). Results were expressed as  $\bar{x} \pm s$  ( $n=4-6$ /group at different time points). <sup>(1)</sup>  $P<0.05$ , <sup>(2)</sup>  $P<0.01$ , <sup>(3)</sup>  $P<0.001$ .

图3 TQ016对腹腔注射LPS小鼠血清中IDO1活性的抑制作用

Fig 3 Effect of IDO1 inhibitor TQ016 on IDO1 activity in the serum of mice challenged with LPS

(图4A)。当TQ016为100 mg/kg时,灌胃给予1、6、24和30 h后,被LPS上调的Kyn含量显著降低[1 h:  $F(3, 3)=10.100$ ,  $P=0.030$  3; 6 h:  $F(3, 4)=2.812$ ,  $P=0.039$  4; 24 h:  $F(4, 3)=8.392$ ,  $P=0.0208$ ; 30 h:  $F(5, 4)=1.493$ ,  $P=0.000$  2](图4B)。不同剂量TQ016灌胃1、6、12、24和30 h后,被LPS上调的IDO1活性均不同程度下降且呈剂量效应。当

TQ016为100 mg/kg时,灌胃给予1、6、12、24和30 h后,被LPS上调的IDO1活性均显著降低[1 h:  $P=0.028$  6; 6 h:  $F(3, 4)=1.662$ ,  $P=0.008$  4; 12 h:  $F(4, 2)=2.290$ ,  $P=0.012$  4; 24 h:  $F(4, 3)=12.560$ ,  $P=0.002$  0; 30 h:  $F(5, 4)=2.114$ ,  $P=0.000$  5](图4C)。以上结果说明IDO1抑制剂TQ016具有良好的IDO1活性抑制作用并呈剂量效应。



Mice were challenged with LPS (5 mg/kg, ip) for 24 h. Mice were treated with different doses of TQ016 (25, 50 or 100 mg/kg, ig). Results were expressed as  $\bar{x} \pm s$  ( $n=3-6$ /group at different time points). <sup>(1)</sup>  $P<0.05$ , <sup>(2)</sup>  $P<0.01$ , <sup>(3)</sup>  $P<0.001$ .

图4 不同剂量TQ016对腹腔注射LPS小鼠血清中IDO1活性的抑制作用

Fig 4 Dose-dependent effect of TQ016 on IDO1 activity in the serum of mice challenged with LPS

## 讨 论

Naïve鼠用于IDO1抑制剂药效动力学评价一般采用单次给药,如naïve C57BL/6小鼠单次皮下注射100 mg/kg IDO1抑制剂5I,血清中Kyn含量从 $(1.10 \pm 0.17) \mu\text{mol/L}$ 下降到 $(0.45 \pm 0.20) \mu\text{mol/L}$ <sup>[15]</sup>,naïve C57BL/6小鼠单次灌胃给予50 mg/kg IDO1抑制剂INCB024360,血清中Kyn含量从给药前约 $1.50 \mu\text{mol/L}$ 下降到给药8 h后的 $0.50 \mu\text{mol/L}$ 左右<sup>[16]</sup>。因此,实验耗时短。但是,naïve鼠处于正常生理状态,本底IDO1活性较低。LPS可诱导炎症反应,上调小鼠体内IDO1活性。

本研究使用尾静脉注射和腹腔注射两种方式给予小鼠LPS。尾静脉注射需要将老鼠固定、鼠尾拉直,注射时的进针角度尽量平行于鼠尾。与尾静脉注射相比,腹腔注射相对容易操作。实验结果发现尾静脉注射0.66 mg/kg LPS或腹腔注射5 mg/kg LPS均可显著上调小鼠血清中IDO1活性,适用于造模。其中,LPS诱导前昆明鼠本底的Trp、Kyn含量以及 $(\text{Kyn/Trp}) \times 100$ 为80.00~90.00  $\mu\text{mol/L}$ 、1.00  $\mu\text{mol/L}$ 和1.30,诱导后为50.00~60.00  $\mu\text{mol/L}$ 、1.50~2.00  $\mu\text{mol/L}$ 和3.00~4.00。LPS诱导前C57BL/6小鼠本底Trp、Kyn含量以及 $(\text{Kyn/Trp}) \times 100$ 为100.00~150.00  $\mu\text{mol/L}$ 、0.30~1.30  $\mu\text{mol/L}$ 和0.30~0.90,诱导后为70.00~100.00  $\mu\text{mol/L}$ 、2.00~4.00  $\mu\text{mol/L}$ 和2.00~4.00。两种小鼠本底Trp、Kyn含量以及 $(\text{Kyn/Trp}) \times 100$ 相近,LPS可上调两种小鼠血清中IDO1活性。

与naïve鼠相比,LPS诱导的小鼠具有较高的IDO1活性。与构建荷瘤小鼠相比,使用LPS诱导小鼠实验操作简单易行,无需进行细胞培养、传代以及细胞皮下接瘤等实验操作,只需为小鼠尾静脉注射或腹腔注射LPS,即可短时间内显著上调小鼠血清中IDO1活性。实验耗时明显短于构建荷瘤小鼠所需时间,节省了大量的时间、人力成本。LPS将体内 $(\text{Kyn/Trp}) \times 100$ 从0.50左右上调至1.80~2.60,具有与荷瘤小鼠相当甚至较高的IDO1活性。因此,LPS诱导构建的急性炎症小鼠模型适用于IDO1抑制剂药效动力学评价。

接下来,我们评价了IDO1抑制剂L-1-MT和TQ016的药效动力学。采用尾静脉注射LPS造模

时,我们检测了IDO1抑制剂在短时间内(40 min、2 h、4 h)的药效动力学效果;采用腹腔注射LPS建模时,我们检测了L-1-MT在4、12 h的药效动力学效果,以及TQ016在长时间内( $\leq 30$  h)的药效动力学效果。实验结果发现L-1-MT和TQ016在灌胃给予2 h后对尾静脉注射LPS小鼠具有明显的IDO1活性抑制作用。与此类似,有研究表明naïve小鼠腹腔注射100 mg/kg IDO1抑制剂5I,给药后2.5 h达到最大的血清Kyn抑制效果<sup>[15]</sup>。腹腔注射LPS小鼠灌胃给予L-1-MT 4 h后,被LPS上调的IDO1活性显著下降;灌胃给予TQ016后1、6、12、24和30 h,被LPS上调的IDO1活性分别下降了36.67%、43.46%、51.70%、45.90%和51.61%(37%~50%),并且在6、12、24和30 h这些时间点具有显著性。一些处于临床试验阶段的IDO1抑制剂的动物水平的药效动力学研究也有报道,如口服20 mg/kg NLG919可将乳腺癌4T1荷瘤小鼠血清中IDO1活性下调50%左右<sup>[18]</sup>,腹腔注射80 mg/kg Epacadostat可将肺癌LLC荷瘤小鼠血清中IDO1活性下调50%左右<sup>[19]</sup>。本实验的结果表明TQ016和这些IDO1抑制剂具有水平相近的IDO1活性抑制作用。最后,我们选用25、50和100 mg/kg这3种不同的TQ016灌胃剂量。实验结果发现TQ016对LPS上调的小鼠血清中IDO1活性具有抑制作用并呈剂量效应。

综上,尾静脉注射0.66 mg/kg LPS或腹腔注射5 mg/kg LPS均可短时间内显著上调小鼠血清中IDO1活性。构建该动物模型仅需尾静脉注射或腹腔注射LPS,实验操作相较于构建荷瘤小鼠简单易行,实验耗时短,且LPS上调的IDO1活性与荷瘤小鼠IDO1活性相当。因此,LPS诱导的小鼠模型适用于IDO1抑制剂的药效动力学评价。利用该模型对IDO1抑制剂TQ016进行药效动力学评价,结果发现TQ016和目前处于临床试验的IDO1抑制剂具有相当的IDO1活性抑制作用,并呈剂量效应。本研究可为IDO1抑制剂的研究提供一个科学、高效的研究工具,有助于IDO1抑制剂的新药研发。

**作者贡献声明** 施磊 实验操作,数据统计和分析,论文构思和撰写。郭磊磊,杨丹 实验操作,数据收集。杨青 论文构思和撰写。

**利益冲突声明** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] ZHAI L, LADOMERSKY E, LENZEN A, *et al.* IDO1 in cancer: a gemini of immune checkpoints [J]. *Cell Mol Immunol*, 2018, 15(5): 447-457.
- [ 2 ] THEATE I, BAREN NVAN, PILOTTE L, *et al.* Extensive profiling of the expression of the indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 protein in normal and tumoral human tissues[J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3(2): 161-172.
- [ 3 ] CHATTERJEE P, ZETTERBERG H, GOOZEE K, *et al.* Plasma neurofilament light chain and amyloid-beta are associated with the kynurenine pathway metabolites in preclinical alzheimer's disease [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 186.
- [ 4 ] LIU G, CHEN S, ZHONG J, *et al.* Crosstalk between tryptophan metabolism and cardiovascular disease, mechanisms, and therapeutic implications [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 1602074.
- [ 5 ] PRENDERGAST GC, MALACHOWSKI WJ, MONDAL A, *et al.* Indoleamine 2, 3-dioxygenase and its therapeutic inhibition in cancer [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2018, 336: 175-203.
- [ 6 ] SUENTO WJ, KUNISAWA K, WULAER B, *et al.* Prefrontal cortex miR-874-3p prevents lipopolysaccharide-induced depression-like behavior through inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 expression in mice [J]. *J Neurochem*, 2020, 157(6): 1963-1978.
- [ 7 ] MADDISON DC, GIORGINI F. The kynurenine pathway and neurodegenerative disease [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 40: 134-141.
- [ 8 ] KIM H, CHEN L, LIM G, *et al.* Brain indoleamine 2, 3-dioxygenase contributes to the comorbidity of pain and depression [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(8): 2940-2954.
- [ 9 ] NIINISALO P, RAITALA A, PERTOVAARA M, *et al.* Indoleamine 2, 3-dioxygenase activity associates with cardiovascular risk factors: the Health 2000 study [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2008, 68(8): 767-770.
- [ 10 ] HORNYAK L, DOBOS N, KONCZ G, *et al.* The role of indoleamine-2, 3-dioxygenase in cancer development, diagnostics, and therapy [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 151.
- [ 11 ] MUNN DH, SHARMA MD, BABAN B, *et al.* GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2, 3-dioxygenase [J]. *Immunity*, 2005, 22(5): 633-642.
- [ 12 ] FALLARINO F, GROHMANN U, HWANG KW, *et al.* Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(12): 1206-1212.
- [ 13 ] LU X, HE S Y, LI Q, *et al.* Investigation of multi-target-directed ligands (MTDLs) with butyrylcholinesterase (BuChE) and indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibition: the design, synthesis of miconazole analogues targeting Alzheimer's disease [J]. *Bioorg Med Chem*, 2018, 26(8): 1665-1674.
- [ 14 ] O'CONNOR JC, LAWSON MA, ANDRE C, *et al.* Induction of IDO by bacille calmette-guerin is responsible for development of murine depressive-like behavior [J]. *J Immunol*, 2009, 182(5): 3202-3212.
- [ 15 ] YUE EW, DOUTY B, WAYLAND B, *et al.* Discovery of potent competitive inhibitors of indoleamine 2, 3-dioxygenase with *in vivo* pharmacodynamic activity and efficacy in a mouse melanoma model [J]. *J Med Chem*, 2009, 52(23): 7364-7367.
- [ 16 ] KOBLISH HK, HANSBURY MJ, BOWMAN KJ, *et al.* Hydroxyamidine inhibitors of indoleamine-2, 3-dioxygenase potently suppress systemic tryptophan catabolism and the growth of IDO-expressing tumors [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(2): 489-498.
- [ 17 ] FENG X, SHEN P, WANG Y, *et al.* Synthesis and *in vivo* antitumor evaluation of an orally active potent phosphonamidate derivative targeting IDO1/IDO2/TDO [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 168: 214-223.
- [ 18 ] GAO J, DENG F, JIA W. Inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase enhances the therapeutic efficacy of immunogenic chemotherapeutics in breast cancer [J]. *J Breast Cancer*, 2019, 22(2): 196-209.
- [ 19 ] FU R, ZHANG YW, LI HM, *et al.* Lw106, a novel indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 inhibitor, suppresses tumour progression by limiting stroma-immune crosstalk and cancer stem cell enrichment in tumour micro-environment [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(14): 3034-3049.
- [ 20 ] ZHANG B, WANG PP, HU KL, *et al.* Antidepressant-like effect and mechanism of action of honokiol on the mouse lipopolysaccharide (LPS) depression model [J]. *Molecules*, 2019, 24(11): 2035.
- [ 21 ] ZHANG J, YI S, LI Y, *et al.* The antidepressant effects of asperosaponin VI are mediated by the suppression of microglial activation and reduction of TLR4/NF- $\kappa$ B-induced IDO expression [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2020, 237(8): 2531-2545.
- [ 22 ] WANG Z, ZHOU Y, YU Y, *et al.* Lipopolysaccharide preconditioning increased the level of regulatory B cells in the spleen after acute ischaemia/reperfusion in mice [J]. *Brain Res*, 2018, 1701: 46-57.
- [ 23 ] TU GW, SHI Y, ZHENG YJ, *et al.* Glucocorticoid attenuates acute lung injury through induction of type 2 macrophage [J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 181.
- [ 24 ] ARROYO R, KHAN MA, ECHAIDE M, *et al.* SP-D attenuates LPS-induced formation of human neutrophil extracellular traps (NETs), protecting pulmonary surfactant inactivation by NETs [J]. *Commun Biol*, 2019, 2: 470.

(收稿日期:2021-05-11; 编辑:段佳)