

尼卡地平在人肝微粒体代谢的酶动力学

柳晓泉^{1*}, 赵 阳¹, 任亚丽¹, 王广基¹, 钱之玉²

(中国药科大学, 1. 药代研究中心, 2. 药理教研室, 江苏 南京 210009)

摘要: 目的 体外研究人肝微粒体中尼卡地平代谢的酶动力学及选择性的 CYP 酶抑制剂对其代谢的影响。方法 用人肝微粒体研究尼卡地平代谢的酶动力学, 探讨 CYP 酶的选择性抑制剂对其代谢的影响及参与其脱氢代谢的 CYP 酶。结果 结果表明 CYP3A 的抑制剂酮康唑可以显著地抑制尼卡地平的脱氢代谢, 使尼卡地平的代谢速率下降。CYP2E1 的抑制剂 DDC 仅在高浓度时抑制尼卡地平二氢吡啶环脱氢代谢, 而其他 CYP 特异性抑制剂对尼卡地平二氢吡啶环脱氢代谢没有明显的影响。结论 CYP3A 参与了尼卡地平的代谢, CYP3A 的抑制剂可能会与尼卡地平发生代谢相互作用, 从而降低尼卡地平的代谢速率。

关键词: 尼卡地平; 微粒体; 药代动力学

中图分类号: R963; R972.4

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2001)12-0891-03

尼卡地平是第 2 代二氢吡啶类钙通道拮抗剂, 可在不减弱心肌收缩力的情况下有效扩张全身和冠状动脉血管, 临床主要用于高血压和心绞痛等心血管疾病的治疗^[1,2]。尼卡地平口服吸收较快, 首过效应较强, 给药后主要在肝脏代谢并以代谢物的形式排出体外。但有关尼卡地平在人肝微粒体中的代谢及何种肝药酶参与其代谢, 国内外尚未见报道。本文旨在研究人肝微粒体中参与其代谢的 CYP 酶及哪些药物可能会与之发生代谢相互作用, 为临床安全合理用药提供依据。

材 料 与 方 法

仪器 岛津 LG-10AT 高效液相色谱仪, 岛津 SPD-10A 紫外检测器, HP 色谱工作站, Hypersil BDS C₁₈ 4.6 mm × 250 mm。

试剂与药品 尼卡地平由中国药科大学药剂教研室提供; 辅酶 II (NADP) 和葡萄糖-6-磷酸 (G-6-P) 为上海丽珠东风生物技术有限公司产品; 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PDH), 磺胺苯吡唑 (sulfaphenazole, Sulp), 反苯环丙胺 (tranylcypromine, Tra), 奎尼丁 (quinidine, Quin) 和 diethyldithiocarbamate (DDC) 购自

Sigma 公司; 酮康唑 (ketoconazole, Ket) 和非那西丁 (phenacetin, Pnt) 由南京第二制药厂提供。实验中所用甲醇和乙腈为 HPLC 级试剂, 正己烷和乙醚为市售优级纯试剂。

肝微粒体制备 人肝组织由金陵医院提供。取下肝组织后迅速放入 0 - 4 °C 冰浴中, 然后转入 - 70 °C 冰箱内保存备用。用差速离心法^[3]制备人肝微粒体, 首先将肝组织剪碎用 0.15 mol·L⁻¹ KCl - 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (PBS) 反复冲洗, 除去血红蛋白后加入上述 PBS 制成肝匀浆, 先将肝匀浆在 4 °C 下以 9 000 × g 离心 20 min, 取出上清液在 4 °C 下以 100 000 × g 离心 60 min, 得到粉红色沉淀即为所需的肝微粒体, 将沉淀物悬浮于含 30 % 甘油的 KCl-磷酸盐缓冲液中, 置 - 70 °C 冰箱内保存, 用 Lowry 法测定肝微粒体蛋白浓度。

温孵条件 按文献^[4]方法, 反应体系中含 NADP 0.5 mmol·L⁻¹, G-6-P 5.0 mmol·L⁻¹, G6PDH 1.0 u·mL⁻¹, MgCl₂ 5.0 mmol·L⁻¹, 肝微粒体 1.0 mg·mL⁻¹。尼卡地平用甲醇配制, 每次加入反应体系中的甲醇终浓度为 1 %。用 0.15 mol·L⁻¹ KCl - 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液将反应体系稀释成 1.0 mL, 于 37 °C 水浴中温孵振荡 30 min, 立即取出放入 - 30 °C 冰箱内终止反应。

色谱条件 根据文献^[5]报道的 HPLC 法, 加以改进, 流动相为甲醇 - 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液 (80:20); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 238 nm; 灵敏度 0.001 AUFS; 进样量 20 μL。

收稿日期: 2001-03-27.

基金项目: 国家自然科学基金 (39970862); 国家重点基础研究发展规划 (G1998051119) 资助项目。

作者简介: 柳晓泉 (1960 -), 男, 副教授。

* Tel: (025) 3271347, E-mail: Liuxq@Jlonline.com

样品处理 1.0 mL 肝微粒体温孵液中,加入 2 mol·L⁻¹ NaOH 200 μL,乙醚-正己烷(1:1)混合提取液 4 mL,混旋振荡 1 min,于 3 000 r·min⁻¹离心 5 min,取有机相 3 mL,于 50 °C 空气吹干,残留物用流动相 100 μL 溶解后进样。

代谢抑制 研究选择性的 CYP 酶抑制剂^[6]对尼卡地平代谢的影响。实验中所用的抑制剂为 Pnt (CYP1A2), Qui (CYP2D6), DDC (CYP2E1), Sul (CYP2C9), Tra(CYP2C19)及 Ket(CYP3A)。抑制实验中尼卡地平的浓度为 25 μmol·L⁻¹, Qui 的浓度为 2.5 - 20 μmol·L⁻¹, Pnt, Sul, DDC 和 Tra 的浓度为 12.5 - 100 μmol·L⁻¹, Ket 的浓度为 0.5 - 5 μmol·L⁻¹。

结 果

1 尼卡地平在人肝微粒体中代谢的酶动力学

1.1 温孵时间对尼卡地平代谢速率的影响 尼卡地平 (25 μmol·L⁻¹) 在人肝微粒体 (蛋白浓度为 1 mg·mL⁻¹) 中,经 37 °C 水浴温孵振荡 10 - 40 min,尼

卡地平呈线性消除。

1.2 肝微粒体蛋白浓度对尼卡地平代谢速率的影响 肝微粒体蛋白浓度在 0.5 - 2 mg·mL⁻¹ 的范围内,尼卡地平浓度为 25 μmol·L⁻¹,温孵时间为 30 min 时,尼卡地平呈线性消除。

1.3 底物浓度对尼卡地平代谢速率的影响 在肝微粒体温孵液中分别加入尼卡地平标准液,使尼卡地平的浓度分别为 3.125, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0 μmol·L⁻¹,经 37 °C 水浴温孵振荡 30 min,尼卡地平的消除在高浓度时 (> 50 μmol·L⁻¹) 不随底物浓度的增加而呈线性增加,呈饱和动力学的特性。

2 选择性的 CYP 酶抑制剂对尼卡地平代谢的影响

CYP3A 的特异性抑制剂 Ket 可以显著地抑制尼卡地平的脱氢代谢,同时降低尼卡地平的代谢速率, DDC 在高浓度时也可以抑制尼卡地平的脱氢代谢,而其他抑制剂对尼卡地平的脱氢代谢无明显的抑制作用,见图 1。

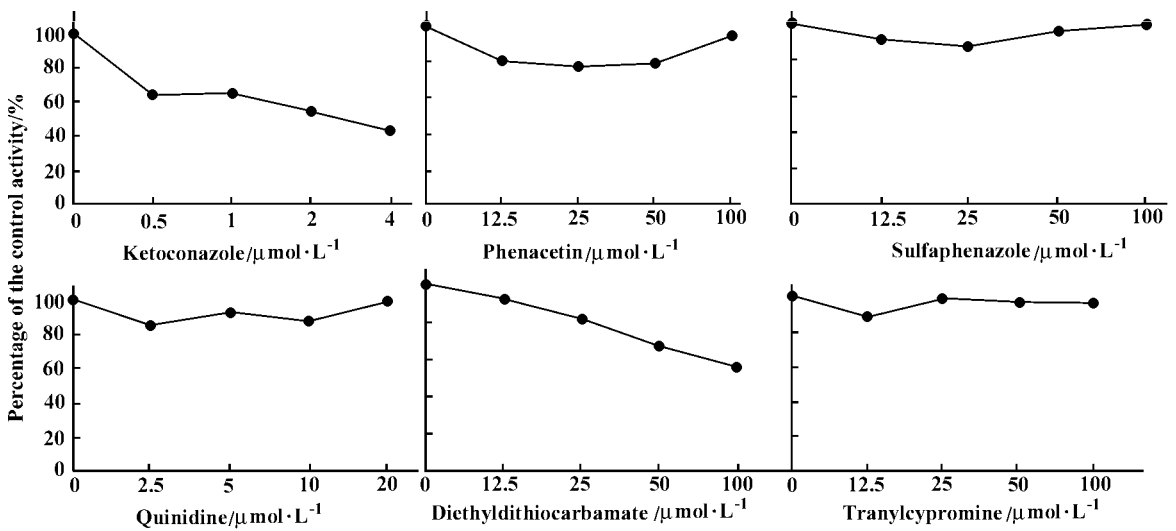


Figure 1 Effect of CYP450 selective inhibitors on the metabolic rate of nicardipine (25 μmol·L⁻¹) in human liver microsomes. The effects of each inhibitor were compared with the control group

讨 论

尼卡地平在人肝微粒体内被迅速代谢。尼卡地平与人肝微粒体在 37 °C 水浴中温孵振荡 10 - 40 min 呈线性消除。故本实验所选的温孵时间为 30 min。当肝微粒体蛋白浓度在 1 mg·mL⁻¹,温孵时间为 30 min 时,尼卡地平的消除呈线性增加,因此确定实验中肝微粒体蛋白浓度为 1 mg·mL⁻¹。当底物尼卡地

平浓度大于 50.0 μmol·L⁻¹ 时,尼卡地平的消除速率不随底物浓度的增加而呈线性增加,表现出明显的饱和特性。我们的研究结果表明 CYP3A 的特异性抑制剂 Ket 可抑制尼卡地平二氢吡啶环脱氢代谢物的形成,降低尼卡地平的代谢速率。DDC(CYP2E1) 仅在高浓度时 (> 25 μmol·L⁻¹) 抑制尼卡地平二氢吡啶环脱氢代谢物的形成,而其它选择性 CYP 酶的抑制剂 Pnt (CYP1A2), Sul (CYP2C9), Tra (CYP2C19) 和 Qui (CYP2D6) 对尼卡地平二氢吡啶环的脱氢代谢

物的形成无明显的影响。上述结果提示 CYP3A 参与了尼卡地平二氢吡啶环的脱氢代谢,这是尼卡地平代谢的一个关键步骤。由于药物间代谢的相互作用是影响药物在体内浓度水平的一个重要因素^[7]。因此抑制尼卡地平的上述的代谢途径将会降低其代谢速率,提高尼卡地平在体内的水平。提示 CYP3A 的抑制剂与尼卡地平之间存在着潜在的药物间的相互作用,前者可以降低尼卡地平的代谢速率,这一现象值得引起临床重视。

REFERENCES:

- [1] Ribas MM, Lozano R. The influence of nicardipine on patients with high risk of stroke [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1990, **16**(2):16 - 19.
- [2] Elkayam U. Calcium channel blockers in heart failure [J]. *Cardiology*, 1998, **89**(1):38 - 46.
- [3] Liu XQ, Yu XX, Wang EL, *et al.* Determination of nimodipine and its dehydrogenation metabolite in human liver microsome by HPLC and its metabolizing kinetics [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 2000, **35**(4):257 - 260.
- [4] Liu XQ, Ren YL, Qian ZY, *et al.* Enzyme kinetics and inhibition of nimodipine metabolism in human liver microsomes [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2000, **21**(8):690 - 694.
- [5] Li K, Zhang X, Yuan YS, *et al.* A high-performance liquid chromatographic method for the determination of nicardipine in plasma and its application to pharmacokinetics in humans [J]. *Bioned Chromatogr*, 1998, **12**(6):326 - 329.
- [6] Newton DJ, Wang RW, Lu AYH. Cytochrome P50 inhibitors evaluation of specificities in the *in vitro* metabolism of therapeutic agents by human liver microsomes [J]. *Drug Metab Dispos*, 1995, **23**(1):154 - 158.
- [7] Nakajima M, Inoue T, Shimada N, *et al.* Cytochrome P4502C9 catalyzes indomethacin O-demethylation in human liver microsomes [J]. *Drug Metab Dispos*, 1998, **26**(3):261 - 266.

ENZYME KINETICS OF NICARDIPINE METABOLISM IN HUMAN LIVER MICROSOMES

LIU Xiao-quan¹, ZHAO Yang¹, REN Ya-li¹, WANG Guang-ji¹, QIAN Zhi-yu²

(1. Center of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 2. Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the enzyme kinetics of nicardipine metabolism and the effects of selective CYP450 inhibitors on the metabolism of nicardipine in human liver microsomes. **METHODS** Human liver microsomes were used to perform enzyme kinetic studies. Various selective CYP inhibitors were used to investigate their inhibitory effects on the metabolism of nicardipine and the principal CYP isoform involved in dehydrogenation of nicardipine dihydropyridine ring. **RESULTS** The dehydrogenation of nicardipine was significantly inhibited by Ketoconazole. High level diethyldithiocarbamate was also shown to inhibit the above metabolism. While phenacetin, quinidine, sulfaphenazole and tranlycpromine showed little inhibitory effect on the dehydrogenation of nicardipine. **CONCLUSION** CYP3A was shown to be involved in nicardipine metabolism. CYP3A inhibitors and nicardipine may interact metabolically, thereby reducing the rate of nicardipine metabolism.

KEY WORDS: nicardipine; microsome; pharmacokinetics