

二氢吡啶类钙通道阻滞药对人肝微粒体中氯吡格雷代谢的抑制作用^Δ

王明丽^{1*}, 韩学诚², 夏宗玲¹(1.常州市第一人民医院药剂科, 江苏常州 213000; 2.常州市第二人民医院药剂科, 江苏常州 213000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)10-1349-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.10.17

摘要 目的:研究二氢吡啶类(DHPs)钙通道阻滞药硝苯地平、氨氯地平、非洛地平对人肝微粒体中氯吡格雷代谢的影响,为临床合理用药提供参考。方法:采用人肝微粒体体外代谢模型,将0.1、1、5、10、25、50、100、200 μmol/L的硝苯地平、氨氯地平、非洛地平分别与氯吡格雷(20 μmol/L)在人肝微粒体中进行共孵育,孵育15 min后加入5倍体积的含内标氯雷他定的冰乙腈溶液(内标终质量浓度为500 ng/ml)终止反应。沉淀蛋白后取上清液,采用超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS)法检测氯吡格雷的浓度,以不加DHPs药物为阴性对照计算各DHPs药物作用下氯吡格雷的代谢抑制率。结果:硝苯地平、氨氯地平、非洛地平对人肝微粒体中氯吡格雷的代谢均有一定程度的抑制作用,但200 μmol/L浓度时代谢抑制率仍不及50%,提示半数抑制浓度均大于200 μmol/L。结论:DHPs药物能抑制人肝微粒体中氯吡格雷的代谢,但抑制作用不强。提示DHPs药物不与氯吡格雷发生相互作用,不会影响两者临床联合使用。

关键词 二氢吡啶类;氯吡格雷;人肝微粒体;代谢;相互作用

Inhibitory Effects of Dihydropyridines on the Metabolism of Clopidogrel in Human Liver Microsomes

WANG Ming-li¹, HAN Xue-cheng², XIA Zong-ling¹(1.Dept. of Pharmacy, the First People's Hospital of Changzhou, Jiangsu Changzhou 213000, China; 2.Dept. of Pharmacy, the Second People's Hospital of Changzhou, Jiangsu Changzhou 213000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To research the effects of dihydropyridines (DHPs) including nifedipine, amlodipine and felodipine on the metabolism of clopidogrel by human liver microsomes and provide reference for rational use of drug. METHODS: *in vitro* human liver microsome metabolism models were used. The nifedipine, amlodipine and felodipine with concentrations of 0.1, 1, 5, 10, 25, 50, 100 and 200 μmol/L were respectively co-incubated with clopidogrel (20 μmol/L) in human liver microsomes. After 15 min co-incubation, ice acetonitrile solution of 5 times volume containing internal standard loratadine (final internal standard mass concentration was 500 ng/ml) was added to terminate the reaction. After protein precipitation, the concentration of clopidogrel was detected in the supernatant by ultra performance liquid chromatography-tandem mass (UPLC-MS) method. The metabolic inhibition rates of clopidogrel with DHPs drug were calculated on the basis of the negative control without DHPs drug. RESULTS: Nifedipine, amlodipine and felodipine had an inhibitory effect to some extent on the metabolism of clopidogrel in human liver microsomes. However, the metabolic inhibition rate was less than 50% when the drugs with the concentration of 200 μmol/L, which showed that their median inhibitory concentrations were more than 200 μmol/L. CONCLUSIONS: DHPs drug can inhibit the metabolism of clopidogrel in human liver microsomes, but the inhibition is not strong, which suggests that DHPs and clopidogrel will not interact with each other and clinical joint use of the both will not be affected.

KEYWORDS Dihydropyridines; Clopidogrel; Human liver microsomes; Metabolism; Interaction

肝微粒体酶又称肝药酶,主要存在于肝细胞内质网中。该系统中的主要酶为细胞色素P₄₅₀,又称为细胞色素P₄₅₀混合功能氧化酶系(简称CYP),是肝内最重要的药物代谢酶,参与绝大多数药物和部分内源性物质的体内代谢。其中,CYP3A4约占人肝脏中细胞色素酶总量的30%,该酶的活性容易受到抑制,导致底物药物的吸收增加或代谢变慢,加重毒副作用。

氯吡格雷是一种噁吩吡啶类衍生物,在体内主要经过

Δ 基金项目:常州市卫生科研项目(No.201006)

* 主任药师。研究方向:医院药学。电话:0519-68870874。E-mail:wangminglicz@163.com

CYP3A4/5、CYP2C19酶介导发生I相代谢反应^[1]。在临床上常用于冠心病、急性冠脉综合征尤其是经皮冠状动脉介入治疗(Percutaneous coronary intervention, PCI)后患者的抗血小板治疗,常与其他药物如血管紧张素转换酶抑制剂、钙通道阻滞药、他汀类药物联合用于降低心血管事情的发生率。但是这种多药联合使用在增加治疗作用的同时也增加了药物相互作用所致不良反应的发生率,尤其是当联合用药中有肝药酶的强抑制剂或诱导剂时。二氢吡啶类(DHPs)钙通道阻滞药硝苯地平、氨氯地平、非洛地平是较强的CYP3A4抑制剂^[2],常与氯吡格雷联合使用。本文主要研究硝苯地平、氨氯地平、非洛地平对人肝微粒体中氯吡格雷代谢的影响,为临床合理用药提

供参考。

1 材料

1.1 仪器

ACQUITY 型超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS)仪,包括四元泵、柱温箱、MassLynx V4.1 化学工作站、自动进样器(美国 Waters 公司);Eppendorf 5415R 型离心机(德国 Eppendorf 公司,离心半径:4.6 cm,下同);GL-88B 型旋涡器(海门其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.2 药品与试剂

氯吡格雷对照品(批号:100819-200601,纯度:99.5%)、氯雷他定对照品(批号:100615-201103,纯度:99.8%)、苯磺酸氨氯地平对照品(批号:100825-200501,纯度:99.9%)、非洛地平对照品(批号:100717-200503,纯度:99.6%)、硝苯地平对照品(批号:100338-200701,纯度:99.9%)、还原型谷胱甘肽(批号:140706-200702,纯度:99%)均来源于中国食品药品检定研究院;还原型辅酶 II (β -NAPDH, 罗氏试剂公司,批号:14175034);氯化钠(廊坊鹏彩精细化工有限公司,批号:20110723);乙腈(美国 Teida 公司,批号:1530430011);甲酸(美国 Teida 公司,批号:1607807139);其余试剂均为国产分析纯。

1.3 人肝微粒体

人肝微粒体(批号:SUBK)购自瑞德肝脏疾病研究(上海)有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与质谱条件

色谱柱:Agilent XDB C₁₈(50 mm×2.1 mm, 3.5 μ m);流动相:0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈溶液(B),梯度洗脱;进样量:7 μ l;离子源:电喷雾离子源(ESI);扫描方式:检测氯吡格雷及内标时采用正离子(ES⁺)模式;检测方式:多离子反应监测(MRM);干燥气:氮气;碰撞气:氩气;脱溶剂气温度:450 $^{\circ}$ C;离子源温度:140 $^{\circ}$ C;毛细管电压:32 kV(ES⁺)/3 kV(ES⁻);锥孔电压:35 V(ES⁺)/37 V(ES⁻);碰撞能量:2 eV(ES⁺)/1 eV(ES⁻)。流动相梯度洗脱时间安排见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱时间安排

Tab 1 Time arrangement of gradient elution of mobile phase

时间, min	流速, ml/min	A 相比例
0~0.5	0.4	75% A
0.5~1.5	0.2	50% A
1.5~2.5	0.2	0% A
2.5~3.0	0.4	75% A

2.2 体外代谢样品制备

取冷冻的人肝微粒体,解冻融化,轻轻摇匀,用新鲜制备的 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)将肝微粒体稀释成蛋白质量浓度为 0.5 mg/ml,向体系中加入含 5 mmol/L 还原型谷胱甘肽、100 mmol/L 氯化钠和 20 μ mol/L 氯吡格雷的二甲基亚砜(DMSO)溶液(控制 DMSO 终浓度小于 0.5%),孵育体系终体积为 100 μ l。于 37 $^{\circ}$ C 水浴摇床中预孵育 3 min,加 β -NAPDH (1 mmol/L)启动反应,孵育 15 min 后加内标氯雷他定的冰乙醇溶液(500 ng/ml),涡旋振荡 1 min,于 13 000 r/min 离心 15 min,取上清液采用 UPLC-MS 法进样测定。

2.3 色谱行为

取失活肝微粒体、失活肝微粒体+氯吡格雷、代谢后肝微粒体、代谢后肝微粒体+硝苯地平、代谢后肝微粒体+氨氯地

平、代谢后肝微粒体+非洛地平,除失活肝微粒体不加入内标外其余均加内标,按“2.2”项下方法处理后进样测定,记录色谱。结果在该色谱条件下,氯吡格雷及其代谢物和内标氯雷他定出峰情况及峰形良好,且所加入的 DHPs 药物不影响氯吡格雷的测定,空白微粒体中未见杂质峰干扰,色谱图见图 1。

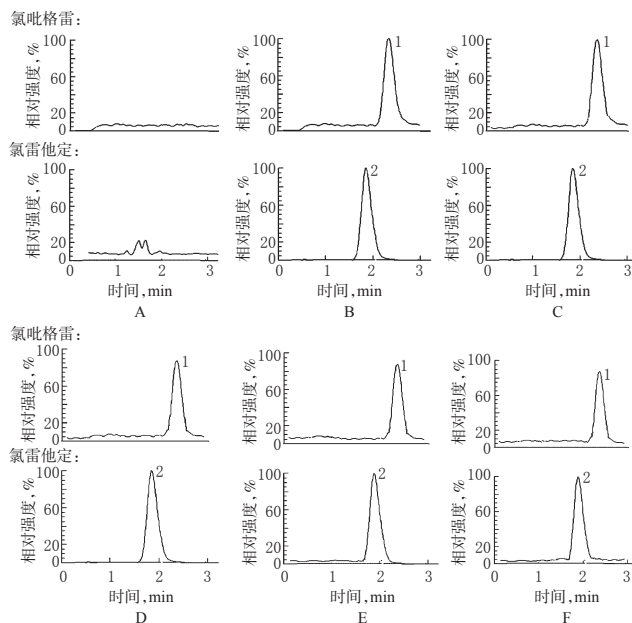


图 1 超高效液相色谱-质谱图

A. 失活肝微粒体; B. 失活肝微粒体+氯雷他定+氯吡格雷; C. 代谢后肝微粒体+氯雷他定; D. 代谢后肝微粒体+氯雷他定+硝苯地平; E. 代谢后肝微粒体+氯雷他定+氨氯地平; F. 代谢后肝微粒体+氯雷他定+非洛地平; 1. 氯吡格雷; 2. 氯雷他定

Fig 1 UPLC chromatography-mass spectrum

A. inactive liver microsomes; B. inactive liver microsomes+loratadine+clopidogrel; C. liver microsomes after metabolic reaction+loratadine; D. liver microsomes after metabolic reaction+loratadine+nifedipine; E. liver microsomes after metabolic reaction+loratadine+amlodipine; F. liver microsomes after metabolic reaction+loratadine+felodipine; 1. clopidogrel; 2. loratadine

2.4 标准曲线的绘制

取灭活的肝微粒体,解冻融化,轻轻摇匀,用 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)稀释成蛋白质量浓度为 0.5 mg/ml,向体系中加入含 5 mmol/L 的还原型谷胱甘肽、100 mmol/L 氯化钠和氯吡格雷的 DMSO 溶液,使氯吡格雷终浓度分别为 0.5、1、5、10、20、25 μ mol/L,体系终体积为 100 μ l,涡旋混匀;加内标氯雷他定的冰乙醇溶液 500 μ l(内标终质量浓度为 500 ng/ml),涡旋振荡 1 min,于 13 000 r/min 离心 15 min,取上清液进样测定。以氯吡格雷与内标峰面积的比值(y)为纵坐标、氯吡格雷质量浓度(x)为横坐标,进行线性回归分析,得回归方程为 $y = 6.033875x + 0.676812$ ($r^2 = 0.9935$),结果表明,氯吡格雷检测浓度的线性范围为 0.5~25 μ mol/L。

2.5 精密度与回收率试验

取灭活的肝微粒体,按“2.4”项下方法制备氯吡格雷终浓度分别为 2、10、22.5 μ mol/L 的样品,照“2.2”项下方法处理后进样测定。同日内重复测定 5 次,考察日内精密度;连续测定 3 d,考察日间精密度;同时计算方法回收率。另与相应浓度氯吡格雷对照品溶液的测定结果进行比较,计算提取回收率。

结果,低、中、高浓度样品的日内RSD为5.9%~3.6% ($n=5$), 日间RSD为6.7%~4.4% ($n=3$), 方法回收率为(95.8 ± 6.67)%~(103.9 ± 5.97)% ($n=3$), 提取回收率为(89.6 ± 7.23)%~(94.1 ± 5.76)% ($n=3$), 回收率的RSD均小于10%。

2.6 稳定性试验

取灭活的肝微粒体,按“2.4”项下方法制备氯吡格雷终浓度分别为2、10、22.5 μmol/L的样品,室温分别放置0、4、8、12、24 h,照“2.2”项下方法处理后进样测定。结果,峰面积RSD均小于10%,表明室温下24 h内氯吡格雷在生物样品中基本稳定。

2.7 氯吡格雷在人肝微粒体中最佳孵育条件的选择

为了更好地反映肝微粒体酶的催化活性,笔者进行了人肝微粒体外最佳孵育条件的选择,包括最佳反应时间和最佳肝微粒体蛋白浓度。取底物氯吡格雷浓度为20 μmol/L,微粒体蛋白质量浓度分别为0.3、0.5、0.8、1.0、1.2 mg/ml的溶液,分别按“2.2”项下方法处理,另各溶液分别孵育5、10、15 min后,进样测定峰面积,按内标法计算氯吡格雷的浓度。按公式计算氯吡格雷的代谢率和氯吡格雷在肝微粒体酶中的反应速度。代谢率(%) = $(M_0 - M_t) / M_0 \times 100\%$, $V = (M_0 - M_t) / t \times c$,式中, V 为反应速度, M_0 为反应前氯吡格雷的浓度, M_t 为反应 t 时间后氯吡格雷的浓度, t 为反应时间, c 为肝微粒体蛋白质量浓度。绘制代谢反应时间-代谢率曲线和肝微粒体蛋白质量浓度-反应速度曲线,结果见图2。

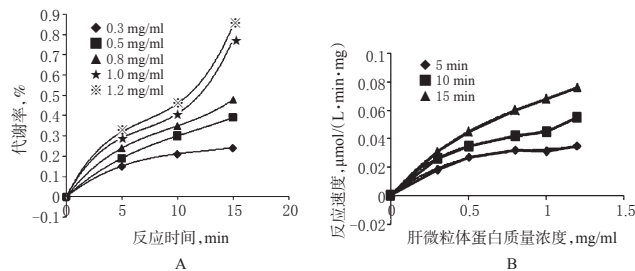


图2 代谢反应时间-代谢率曲线和肝微粒体蛋白质量浓度-反应速度曲线

A. 代谢反应时间-代谢率曲线; B. 肝微粒体蛋白质量浓度-反应速度曲线

Fig 2 Curve of metabolic response time-metabolic rate and curve of liver microsome protein concentration-reaction rate

A. curve of metabolic response time-metabolic rate; B. curve of liver microsome protein concentration-reaction rate

由图2显示,在代谢反应时间-代谢率曲线中,当蛋白质量浓度增加时,曲线的弯曲度变大;当蛋白质量浓度低于0.8 mg/ml时,曲线具有较好的线性。在肝微粒体蛋白质量浓度-反应速度曲线中,孵育15 min内反应曲线呈线性,考虑到测定的灵敏度和测定误差,笔者选择了0.5 mg/ml的蛋白质量浓度、15 min的孵育时间,来测定代谢抑制作用。

2.8 DHPs药物对氯吡格雷在人肝微粒体中代谢的抑制研究^[3-5]

分别测定硝苯地平、氨氯地平、非洛地平的浓度均为50 μmol/L时,对氯吡格雷在人肝微粒体中代谢的抑制作用,按“2.2”项下方法操作,测定氯吡格雷的峰面积,计算浓度。以未加入DHPs药物的人肝微粒体中的氯吡格雷代谢率为阴性对照,按100%计,计算DHPs药物存在下氯吡格雷的代谢抑制率(RI)。RI = $(MC - MD) / MC$,式中,RI为代谢抑制率;MC为阴性对照中氯吡格雷的代谢率;MD为DHPs药物存在时氯吡

雷的代谢率。3种DHPs药物对微粒体中氯吡格雷代谢的影响见图3。

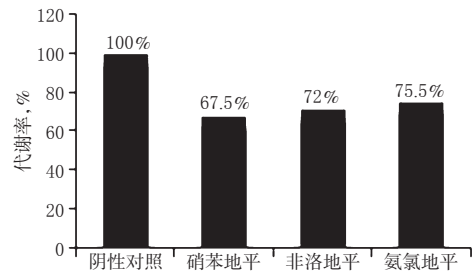


图3 3种DHPs药物对微粒体中氯吡格雷代谢的影响

Fig 3 Effects of 3 kinds of DHPs drug on the metabolism of clopidogrel in microsomes

在DHPs浓度为50 μmol/L条件下,如果代谢抑制率小于20%,说明几乎没有抑制作用;当代谢抑制率在20%~50%之间时,表示可能有一定的抑制作用;当代谢抑制率大于50%时,表示有较强的抑制作用。故当代谢抑制率大于20%时,均需要进一步计算半数抑制浓度(IC₅₀)^[6]。由图3可知,硝苯地平、氨氯地平、非洛地平对氯吡格雷的代谢抑制率在20%~50%之间,因此这3种DHPs药物对氯吡格雷的代谢可能均有抑制作用。

2.9 DHPs药物对人肝微粒体中氯吡格雷代谢的影响测定

分别测定硝苯地平、非洛地平、氨氯地平在0.1、1、5、10、25、50、100、200 μmol/L浓度时对氯吡格雷在人肝微粒体中的代谢抑制率。采用GraphPad Prism 5.0软件通过非线性最小二乘法回归分析进行抑制曲线拟合,并计算半数抑制浓度(IC₅₀)。不同浓度DHPs药物对微粒体中氯吡格雷代谢的影响见图4(图中X为所加入的DHPs药物浓度)。

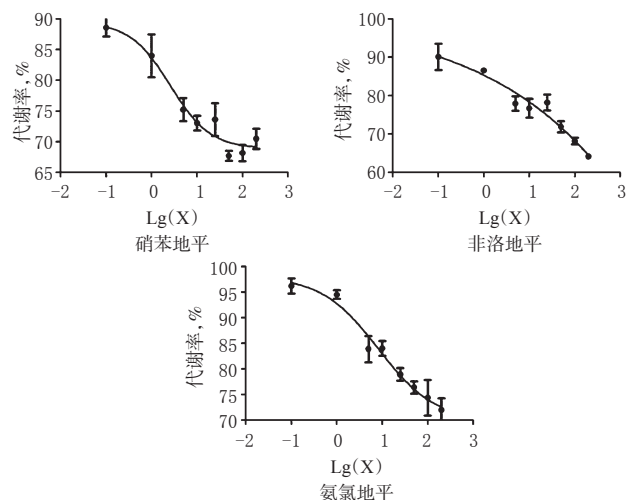


图4 不同浓度DHPs药物对微粒体中氯吡格雷代谢的影响

Fig 4 Effects of DHPs drug with different concentration on the metabolism of clopidogrel in microsomes

由图4可知,200 μmol/L的硝苯地平、非洛地平、氨氯地平对氯吡格雷的代谢抑制率(100% - 代谢率)仍不及50%,提示各药IC₅₀均大于200 μmol/L。

3 讨论

DHPs与氯吡格雷联用在临床上较为常见,而两者在体内皆经肝药酶CYP3A4代谢,尤其是DHPs药物。笔者通过研究

DHPs药物的构效关系与对CYP3A4抑制作用的关系^[2],发现硝苯地平、非洛地平、氨氯地平对CYP3A4酶的抑制作用强于其他DHPs药物,故在本试验中选择这3种药物作为抑制剂。

根据国家食品药品监督管理总局相关指南,体外CYP抑制试验要求测定IC₅₀时底物浓度应低于其米氏常数(K_m)值,因此设置孵育体系中氯吡格雷底物终浓度为20 μmol/L,并根据最佳孵育条件确定最佳孵育时间为15 min、最佳孵育蛋白质量浓度为0.5 mg/ml。

根据IC₅₀的大小可以初步了解药物对CYP抑制作用强弱^[7]:若IC₅₀小于1 μmol/L,则表明药物对该CYP抑制能力强;若IC₅₀大于50 μmol/L,则表明药物对该CYP抑制能力弱。在最佳孵育条件下,测定3种DHPs药物(硝苯地平、氨氯地平、非洛地平)对氯吡格雷代谢的抑制作用,通过软件拟合计算3种DHPs药物的IC₅₀均大于200 μmol/L,表明在人肝微粒体中DHPs药物对氯吡格雷的抑制作用较弱,在正常服用剂量下^[8-9],基本不影响其通过CYP3A4途径的代谢。由此可见,DHPs药物与氯吡格雷发生CYP3A4相关代谢性药物相互作用的可能性较低,这与美国心脏病学会2011年报道的纳入56 800例患者的大型临床研究结果一致,该研究也表明DHPs药物不影响氯吡格雷的临床疗效^[10]。而Siller-Matula JM等^[11]通过测定联合使用与未联合使用DHPs药物的两组患者血小板聚集度,阐明DHPs药物可降低氯吡格雷抗血小板疗效,并推测这种降低作用是由于DHPs药物对CYP3A4的抑制作用引起的,这一推论从笔者的研究结果看尚需商榷。

参考文献

- [1] Mega JL, Close SL, Wiviott SD, et al. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel[J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(4): 354.
- [2] Xia ZL, Wang ML, Zou SL, et al. Different effects of dihydropyridine calcium channel antagonists on CYP3A4 enzyme of human liver microsomes[J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2012, 37(3): 211.
- [3] Zahno A, Brecht K, Bodmer M, et al. Effects of drug inter-

actionson biotransformation and antiplatelet effect of clopidogrel in vitro[J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 161(2): 393.

- [4] Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, et al. Identification of the human cytochrome P₄₅₀ enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite[J]. *Drug Metab Dispos*, 2010, 38(1): 92.
- [5] Richter T, Mürdter TE, Heinkele G, et al. Inhibition of human CYP2B6 by clopidogrel and ticlopidine[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 308(1): 189.
- [6] Krippendorff BF, Lienau P, Reichel A, et al. Optimizing classification of drug-drug interaction potential for CYP450 iso-enzymes inhibition assays in early drug discovery[J]. *J Biomol Screen*, 2007, 12(1): 92.
- [7] 徐文, 孙术红, 刘涛, 等. 金银花提取物及主要活性成分对药物代谢酶CYP3A4的活性抑制作用的研究[J]. *中国执业药师*, 2012, 9(2): 3.
- [8] 房晶, 范国荣, 李霁, 等. 苯磺酸左旋氨氯地平血药浓度的LC-MS/MS法测定及其人体内手性转化可能性考察[J]. *第二军医大学学报*, 2012, 33(7): 763.
- [9] 余鹏, 程航, 刘智, 等. LC-MS/MS法测定人血浆中非洛地平的浓度[J]. *药物分析杂志*, 2012, 32(1): 35.
- [10] Olesen JB, Gislason GH, Charlott MG, et al. Calcium-channel blockers do not alter the clinical efficacy of clopidogrel after myocardial infarction[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2011, 57(4): 409.
- [11] Siller-Matula JM, Lang I, Christ G, et al. Calcium-channel blockers reduce the antiplatelet effect of clopidogrel [J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2008, 52(19): 1 557.

(收稿日期:2014-05-19 修回日期:2014-07-31)

(编辑:邹丽娟)

国家卫生计生委举办计划生育家庭发展工作培训班

本刊讯 为贯彻落实全国卫生计生工作会议精神,使各地全面了解计划生育家庭发展工作形势及思路,提高新时期做好计划生育家庭发展工作的能力和水平,2015年3月1日至2日,国家卫生计生委举办计划生育家庭发展工作培训班。国家卫生计生委副主任王培安就如何做好新形势下计划生育和家庭发展工作作了专题辅导报告。

王培安回顾了我国实行计划生育政策的背景、历程和取得的伟大成就,分析了当前我国人口发展面临的形势,介绍了计划生育政策法律体系,明确了促进我国人口长期均衡发展要完成的重点任务,并对扎实做好生育政策的调整和完善工作,以及如何做好新时期的计划生育家庭发展工作提出了具体的要求。王培安强调,计划生育家庭发展工作要按照国家经济社会民生发展的总体规划部署,紧密围绕卫生计生中心工作,以广大计划生育家庭的现实需求为出发点,发挥部门优

势,突出重点,履行职能,努力改善广大计划生育家庭民生。要集中精力做好“十三五”规划的研究制订工作,特别要把促进计划生育家庭发展和推进健康老龄化工作作为重点内容纳入规划,用改革的精神、创新的思路,立足新常态,谋划好“十三五”的工作。

此次培训还围绕出生人口性别比综合治理、计划生育利益导向政策与实践、家庭发展理论与实践、健康老龄化等相关内容,邀请了北京大学和中国社科院有关专家进行授课。全国31个省(区、市)卫生计生委,计划单列市、新疆生产建设兵团卫生计生委(人口计生委)分管家庭发展和健康老龄化工作的负责同志、家庭处(相关处室)负责人及相关工作人员,解放军、武警部队计划生育领导小组办公室负责同志,中直机关、中央国家机关人口计生委负责同志共计120余人参加了培训。