

生理药动学模型定量预测依诺沙星/ 环丙沙星对茶碱/咖啡因代谢的影响

贺小贝, 刘晓东*

(中国药科大学药物代谢动力学重点实验室, 南京 210009)

摘要 将依诺沙星/环丙沙星在混合人肝微粒体中与非那西丁共温孵, 以非那西丁的去乙酰反应表示 CYP1A2 的活性, 估算相应的酶动力学参数, 并建立基于机制性抑制生理药动学模型, 定量预测依诺沙星/环丙沙星与茶碱/咖啡因的体内相互作用。结果显示, 依诺沙星/环丙沙星为弱的 CYP1A2 可逆性抑制剂, 但在与 NADPH 预温孵的条件下, 依诺沙星/环丙沙星明显抑制非那西丁代谢, 且抑制呈 NADPH、预温孵时间、依诺沙星/环丙沙星浓度依赖性, 符合机制性抑制的特征, 进一步用建立的基于机制性抑制生理药动学能较好的模型预测依诺沙星/环丙沙星与茶碱/咖啡因的相互作用, 预测值与观察值基本吻合。

关键词 CYP1A2; 生理药动学模型; 机制性抑制; 药物相互作用

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2013)01-0077-08

Physiologically based pharmacokinetic model of mechanism-based inhibition of theophylline/cafeine by enoxacin/ciprofloxacin

HE Xiaobei, LIU Xiaodong*

Key Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract To characterize the mechanism-based inhibition of CYP1A2 activity by enoxacin (ENX) or ciprofloxacin (CPFX) and develop a physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model to predict the interactions between theophylline (TP) or caffeine (CAF) and enoxacin or ciprofloxacin using *in vitro* study from phenacetin. CYP1A2 activity in pooled human hepatic microsomes was assessed using phenacetin *O*-deethylation following incubation with ENX or CPFX, respectively. A PBPK model characterizing mechanism-based inhibition was developed to clarify the interaction between TP or CAF and ENX or CPFX. The results showed that ENX and CPFX themselves were weakly reversible inhibitors of CYP1A2 in pooled human hepatic microsomes, but following pre-incubation with NADPH system and ENX or CPFX in pooled human hepatic microsomes, the inhibitory effects on phenacetin *O*-deethylation were significantly enhanced. The inhibition was NADPH-, pre-incubation time-, and ENX or CPFX concentration-dependent, characterizing mechanism-based inhibition. The developed PBPK model for characterizing mechanism-based inhibition was successfully applied to predict the interaction between TP or CAF and ENX or CPFX. Enoxacin and ciprofloxacin are mechanism-based inhibitors of CYP1A2. The interactions between TP or CAF and ENX or CPFX may be predicted using PBPK model characterizing mechanism-based inhibition of CYP1A2 and *in vitro* study from phenacetin.

Key words CYP1A2; physiology-based pharmacokinetic mode; mechanism-based inhibition; drug-drug interaction

This study was supported by the Foundation of Graduate Students Research and Innovation Program of Jiangsu Province (No. CX10B-383Z); and the Program for Scientific and Technological Innovation Team of Universities of Jiangsu Province

* 收稿日期 2012-09-20 * 通信作者 Tel: 025-83271006 E-mail: xdlu@cpu.edu.cn

基金项目 江苏省普通高校研究生科研创新计划资助项目 (No. CX10B-383Z, 2010); 江苏省高等学校优秀科技创新团队资助项目

氟喹诺酮类药物由于其具有高效、安全、生物利用度高、给药方便等特点,已广泛应用于治疗各种感染性疾病。然而,随着该类物质逐渐广泛的临床使用,不良反应的报道日益剧增。已有的临床报道指出,依诺沙星(enoxacin, ENX)与茶碱(theophylline, TP)、咖啡因(caffeine, CAF)在临床合用时会引起严重的不良反应^[1-3]。同样有报道指出,环丙沙星(ciprofloxacin, CPM)可以明显升高咖啡因^[4]、茶碱^[5]、罗哌卡因^[6]、替扎尼定^[7]及氯氮平^[8-9]的血药浓度。然而,上述血药浓度升高的现象均发生在患者多次给药后,提示依诺沙星/环丙沙星的抑制作用可能属于机制性抑制。此外,本实验室前期研究发现,盐酸安妥沙星可抑制 CYP1A2 的典型底物茶碱^[10]和非那西丁^[11]的代谢,且抑制呈明显的时间、安妥沙星浓度及 NADPH 依赖性,这些结果也进一步提示,依诺沙星/环丙沙星对 CYP1A2 的抑制作用可能属于机制性抑制。

为了验证上述推测,本研究用非那西丁的去乙酰反应(图1),即生成对乙酰氨基酚的量,表征 CYP1A2 的酶活性,同时建立一种机制性抑制的生理模型,用以预测依诺沙星和环丙沙星与茶碱和咖啡因的体内相互作用,并与临床报道结果进行比较。

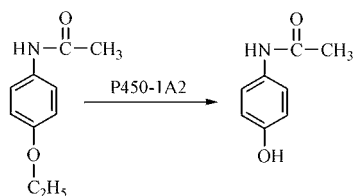


Figure 1 Deethylation reaction of phenacetin

1 材料

1.1 药品与试剂

混合人肝微粒体(瑞德肝脏疾病研究有限公司);葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADP^+ , 美国 Sigma 公司);非那西丁(武汉凯通精细化工有限公司);依诺沙星、环丙沙星、对乙酰氨基酚(中国药品生物制品检定所);甲醇(德国 Merck 公司);其余试剂均为市售分析纯,水为超纯水。

1.2 仪器

LC-10ADvp 高效液相色谱仪、AW120 精密天

平(日本岛津公司);SPD-10Avp 紫外检测器及 HW-2000 色谱工作站(南京千谱软件有限公司)。

2 方法

2.1 非那西丁在人肝微粒体中的去乙酰化反应

取人肝微粒体 20 μL (终浓度分别为 1 mg/mL),加入不同浓度的非那西丁溶液 20 μL ^[10](终浓度 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 500, 1 000, 2 000 $\mu\text{mol/L}$),与磷酸盐缓冲液(PBS)120 μL 混合,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预温孵 5 min。同时,还原型辅酶 II(NADPH)再生系统(0.5 mmol/L NADP^+ , 10 mmol/L 葡萄糖-6-磷酸,1.0 U/mL 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,10 mmol/L MgCl_2)也在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预温孵 5 min。将预温孵的 NADPH -再生系统 40 μL 加入到反应体系中(终体积 200 μL),启动反应,温孵 30 min^[12],取出样品,于冰浴上终止反应。

2.2 依诺沙星/环丙沙星对非那西丁在人肝微粒体中代谢的抑制

取人肝微粒体 20 μL (终浓度 1 mg/mL),加入不同浓度的依诺沙星/环丙沙星溶液(依诺沙星终浓度分别为 0, 17.8, 35.5, 71.1, 142.2, 284.3, 568.5, 1 137 $\mu\text{mol/L}$,环丙沙星终浓度分别为 0, 16.0, 32.1, 64.1, 128.1, 256.3, 512.5, 1 025 $\mu\text{mol/L}$)20 μL ,非那西丁溶液(终浓度 250 $\mu\text{mol/L}$)20 μL 与 PBS 100 μL 混合,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预温孵 5 min,与此同时, NADPH -再生系统也在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预温孵 5 min。将预温孵的 NADPH -再生系统 40 μL 加入到反应体系中(终体积 200 μL),启动反应,温孵 30 min,取出样品,于冰浴上终止反应。

同时考察不同预温孵时间下,依诺沙星/环丙沙星对非那西丁去乙酰化代谢的影响,即:取人肝微粒体 20 μL ,加入 NADPH -再生系统 40 μL 与 PBS 120 μL 混合,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预温孵 5 min,加入不同浓度的依诺沙星/环丙沙星溶液(依诺沙星终浓度分别为 0, 28.4, 56.9, 113.8, 227.5, 455.1 $\mu\text{mol/L}$;环丙沙星终浓度分别为 0, 25.6, 52.2, 102.5, 204.9, 410.0 $\mu\text{mol/L}$)20 μL 启动反应,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 中水浴预温孵 0, 5, 10, 20, 30 min 后,分别取样 40 μL ,加入到含有 250 $\mu\text{mol/L}$ 非那西丁的 NADPH -再生系统 160 μL 中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 30 min。取出样品,于冰浴上终止反应。

2.3 非那西丁去乙酰化代谢产物对乙酰氨基酚的含量测定

非那西丁在人肝微粒体温孵液中,经 CYP1A2 酶的去乙酰作用生成对乙酰氨基酚。样品制备及对乙酰氨基酚测定参照文献[10]。色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(45:55);流速和检测波长同文献[10]。人肝微粒体温孵液中对乙酰氨基酚在 0.2 ~ 5 μg/mL 范围内线性良好,回归方程为 $y = 92.57x - 8.508$ ($r = 0.997$)。高、中、低浓度的回收率分别为 84.3%、85.8% 和 86.3%。

2.4 酶动力学参数估算

非那西丁在人肝微粒体中生成的对乙酰氨基酚的速率可用米氏 (Michaelis-Menten) 方程(1)来表示。相应的酶动力学参数 K_m , V_{max} 可由 Lineweaver-Burk 双倒数曲线计算,参数 CL_{im} 通过 V_{max} 和 K_m 的比值得到。

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

式中: V 为反应速率, K_m 为米氏常数, V_{max} 为最大反应速率, $[S]$ 为底物非那西丁的浓度。

依诺沙星/环丙沙星对 CYP1A2 的可逆性抑制参数 IC_{50} 通过 Phoenix WinNonlin Version 6.1 (美国 Pharsight 公司) 计算。而机制性抑制参数参照文献^[11]报道的方法估算,根据方程(2)对机制性抑制的酶动力参数进行估算。

$$k_{obs} = k_{inact} \cdot I / (k_{app,i} + I) \quad (2)$$

式中 k_{obs} 为表观失活速率常数; k_{inact} 为最大失活速率常数; $k_{app,i}$ 为酶和依诺沙星/环丙沙星之间的表观解离速率常数; I 为依诺沙星/环丙沙星的浓度。将酶剩余活性(对乙酰氨基酚的生成速率)的对数对预温孵时间(0, 5, 10, 20, 30 min)作图,求出不同的 k_{obs} , 再将 k_{obs} 的倒数对依诺沙星/环丙沙星的浓度的倒数作图。 k_{inact} 为直线在 y 轴的截距的倒数, $k_{app,i}$ 为直线在 x 轴的截距的负倒数。

机制性抑制的生理药动学模型(图2),利用体外实验结果来预测人体内的药物相互作用,并做了如下假设:①茶碱/咖啡因和依诺沙星/环丙沙星均为口服给药;②茶碱/咖啡因和依诺沙星/环丙沙星主要通过肝脏和肾脏消除;③肝脏中只有游离的药物分子被肝脏代谢;④药物在胃肠道的吸收为一级动力学过程。

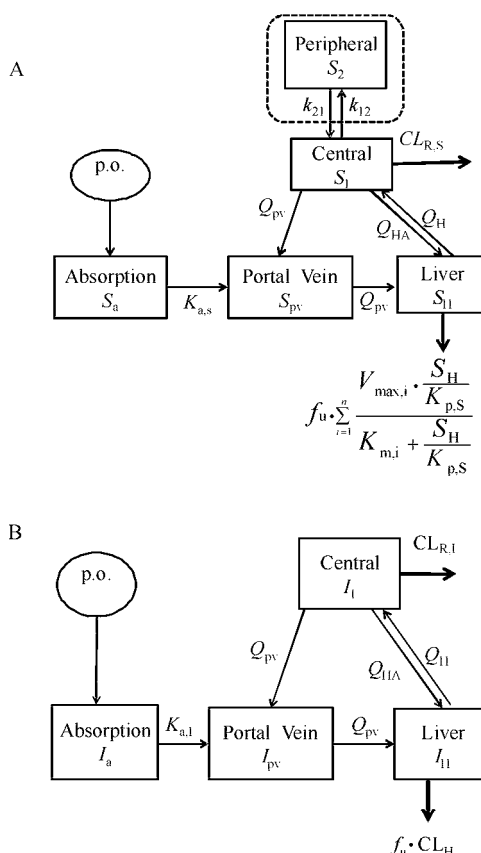


Figure 2 Physiologically based pharmacokinetics model for describing the time-profiles of theophylline (TP) or caffeine (CAF) (A), and enoxacin (ENX) or ciprofloxacin (CPFX) (B)

肝脏中的 CYP1A2 的活性用公式描述:

$$dE_{act}/dt = -(k_{inact} \cdot E_{act} \cdot f_{u,1} \cdot I_H / K_{p,1} / (k_{app,i} + f_{u,1} \cdot I_H / K_{p,1}) + k_{deg} (E_0 - E_{act})) \quad (3)$$

方程中的 k_{deg} 为酶解速率常数; $K_{p,1}$ 为依诺沙星/环丙沙星在肝脏中和血浆中浓度的比例; f_u 为依诺沙星/环丙沙星在血浆中的游离分数; I_H 为依诺沙星/环丙沙星在肝脏中的浓度; E_0 为 CYP1A2 在肝脏中总的含量。当 $t = 0$ 的时候, $E_{act} = E_0$, 在没有依诺沙星/环丙沙星存在的条件下, 肝脏中 CYP1A2 的含量保持稳定, CYP1A2 的降解速率 ($k_{deg} \cdot E_0$) 等于其合成速率, 并且这一过程不受依诺沙星/环丙沙星的影响。

茶碱/咖啡因在体内的速率方程:

$$V_H \cdot \frac{dS_H}{dt} = Q_{p,v} \cdot S_{p,v} + Q_{H,A} \cdot S_1 - Q_{H,L} \cdot \frac{S_H}{K_{p,S}} - \sum_{i=1}^n \frac{V_{max,i} \cdot f_{u,S} \cdot \frac{S_H}{K_{p,S}}}{K_{m,i} + \frac{S_H}{K_{p,S}}} \quad (n=3/4) \quad (4)$$

$$V_{\max,i} = V_{\max,i(0)} \cdot \frac{E_{\text{act},i}}{E_0} \quad (5)$$

$$V_{\text{abs}} = k_a \cdot \text{Dose} \cdot F_a \cdot e^{-k_a \cdot t} \quad (6)$$

$$V_{\text{pv}} \cdot \frac{dS_{\text{pv}}}{dt} = Q_{\text{pv}} \cdot S_1 + k_{a,s} \cdot S_a - Q_{\text{pv}} \cdot S_{\text{pv}} \quad (7)$$

如果房室模型为一房室则:

$$V_1 \cdot \frac{dS_1}{dt} = Q_H \cdot \frac{S_H}{K_{p,s}} - Q_{\text{HA}} \cdot S_1 - Q_{\text{pv}} \cdot S_1 - \text{CL}_{\text{R},s} \cdot S_1 \quad (8)$$

如果室模型为二房室则:

$$V_1 \cdot \frac{dS_1}{dt} = Q_H \cdot \frac{S_H}{K_{p,s}} - Q_{\text{HA}} \cdot S_1 + k_{12} \cdot S_2 \cdot V_2 - k_{21} \cdot S_1 \cdot V_1 - \text{CL}_{\text{R},s} \cdot S_1 \quad (9)$$

$$V_1 \cdot \frac{dS_1}{dt} = k_{21} \cdot S_1 \cdot V_1 - k_{12} \cdot S_2 \cdot V_2 \quad (10)$$

方程中的 V_H, V_{pv}, V_1 和 V_2 分别为肝脏、门静脉、中央室和外周室的容积; S_H, S_{pv}, S_1 和 S_2 分别为肝脏、门静脉、中央室和外周室的茶碱/咖啡因的浓度; $\text{CL}_{\text{R},s}$ 分别为茶碱/咖啡因的清除率; $K_{m,1}, K_{m,2}, K_{m,3}, V_{\max,1}, V_{\max,2}, V_{\max,3}$ 和 $E_{\text{act},1}, E_{\text{act},2}, E_{\text{act},3}$, 分别为茶碱在肝脏经 CYP1A2 代谢的主要产物 1-甲基黄嘌呤, 3-甲基黄嘌呤和 1,3-二甲基尿酸的 $K_m, V_{\max}, E_{\text{act}}$; $K_{m,1}, K_{m,2}, K_{m,3}, K_{m,4}, V_{\max,1}, V_{\max,2}, V_{\max,3}, V_{\max,4}$ 和 $E_{\text{act},1}, E_{\text{act},2}, E_{\text{act},3}, E_{\text{act},4}$, 分别为咖啡因在肝脏经 CYP1A2 代谢的主要产物次黄嘌呤, 茶碱, 可可碱, 1,3,7-三甲基尿酸的 $K_m, V_{\max}, E_{\text{act}}, V_{\max}$ 和 E_{act} ; Q_H 为肝血流速率; Q_{HA} 和 Q_{pv} 为肝动脉和门静脉的血流; k_{12} 和 k_{21} 分别为中央室和外周室茶碱/咖啡因的分布速率常数; V_{abs} 为茶碱/咖啡因的吸收速率; $K_{p,s}$ 为茶碱/咖啡因在肝内浓度和血内浓度的比值; $k_{a,s}$ 为茶碱/咖啡因的一级吸收速率常数; $F_{a,s}$ 为茶碱/咖啡因在胃肠道内的吸收分数。初始浓度设为 0。

依诺沙星/环丙沙星在体内的速率方程:

$$V_H \cdot \frac{dI_H}{dt} = Q_{\text{pv}} \cdot I_{\text{pv}} + Q_{\text{HA}} \cdot I_1 - Q_H \cdot \frac{I_H}{K_{p,1}} - f_{u,1} \cdot \text{CL}_{\text{H},1} \cdot \frac{I_H}{K_{p,1}} \quad (11)$$

$$V_{\text{pv}} \cdot \frac{dI_{\text{pv}}}{dt} = Q_{\text{pv}} \cdot I_1 + k_{a,1} \cdot I_a - Q_{\text{pv}} \cdot I_{\text{pv}} \quad (12)$$

$$V_{\text{abs}} = k_a \cdot \text{Dose} \cdot F_a \cdot e^{-k_a \cdot t} \quad (13)$$

$$V_1 \cdot \frac{dI_1}{dt} = Q_H \cdot \frac{I_H}{K_{p,1}} - Q_{\text{HA}} \cdot I_1 - Q_{\text{pv}} \cdot I_1 - \text{CL}_{\text{R},1} \cdot I_1 \quad (14)$$

方程中的 I_H, I_{pv}, I_1 和 I_a 分别为肝脏、门静脉、中央室和吸收室的依诺沙星/环丙沙星的浓度;

$\text{CL}_{\text{H},s}$ 和 $\text{CL}_{\text{R},s}$ 分别为依诺沙星/环丙沙星的肝脏和肾脏清除率; $K_{p,1}$ 为依诺沙星/环丙沙星在肝内浓度和血内浓度的比值; $k_{a,1}$ 为依诺沙星/环丙沙星的一级吸收速率常数; $F_{a,1}$ 为依诺沙星/环丙沙星在胃肠道内的吸收分数。用 MATLAB7 进行模型的拟合与预测。

3 结果

3.1 依诺沙星/环丙沙星在人肝微粒体中的抑制作用

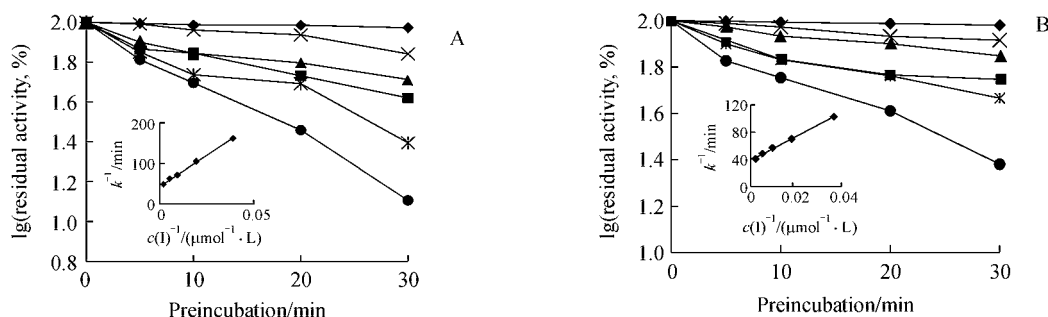
非那西丁在人肝微粒体中的浓度依赖性实验的动力学参数 K_m 和 V_{\max} 由 Lineweaver-Burk 双倒数曲线计算, 分别为 $(92.8 \pm 2.7) \mu\text{mol/L}$ 和 $(750 \pm 31.7) \text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

把依诺沙星/环丙沙星在人肝微粒体中与非那西丁共温孵, 主要来考察两者可逆性抑制的程度, 结果估算的 IC_{50} 分别为 $(279.3 \pm 10.7) \mu\text{mol/L}$ 和 $(388.3 \pm 4.0) \mu\text{mol/L}$ (表 1), 显示依诺沙星和环丙沙星在人肝微粒体中对非那西丁的抑制作用很弱。然而当依诺沙星/环丙沙星在人肝微粒体中与 NADPH-再生系统预温孵时显示, 依诺沙星和环丙沙星能显著抑制 CYP1A2 的活性, 抑制呈现出 NADPH、预温孵时间和依诺沙星/环丙沙星浓度依赖性 (图 3), 机制性抑制常数 k_{inact} 分别为 $(52.89 \pm 3.11) \mu\text{mol/L}$ 和 $(71.09 \pm 2.63) \mu\text{mol/L}$, $k_{\text{app},i}$ 分别为 $(0.028 \pm 0.001) \text{min}^{-1}$ 和 $(0.023 \pm 0.001) \text{min}^{-1}$, 依诺沙星/环丙沙星对 CYP1A2 的机制性抑制强度为其可逆性抑制强度 ($\text{IC}_{50}/k_{\text{inact}}$) 的 5 倍。提示依诺沙星和环丙沙星属于 CYP1A2 的不可逆性抑制剂。这与本实验室前期研究^[10-11]发现氟喹诺酮类药物 (安替沙星) 对 CYP1A2 的抑制存在较强的不可逆抑制是一致的。

Table 1 Parameters on the paracetamol formation rate in the presence of 250 mmol/L phenacetin ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Parameters	ENX	CPFX
$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol/L})$	279.3 ± 10.7	388.3 ± 4.0
$k'_{\text{app}}/(\mu\text{mol/L})$	52.89 ± 3.11	71.09 ± 2.63
$k_{\text{inact}}/(\text{min}^{-1})$	0.028 ± 0.001	0.023 ± 0.001
$k_{\text{inact}}/k'_{\text{app}}(\times 10^{-3})/(\text{L} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	0.53 ± 0.0026	0.32 ± 0.001

ENX: enoxacin; CPFX: ciprofloxacin



ENX (A) :—◆—0 μmol/L;—×—28.44 μmol/L;—▲—56.88 μmol/L;—■—113.76 μmol/L;—*—227.52 μmol/L;and —●—455.05 μmol/L
CPFX (B) :—◆—0 μmol/L;—×—25.62 μmol/L;—▲—51.25 μmol/L;—■—102.49 μmol/L;—*—204.99 μmol/L;and —●—410.07 μmol/L
Figure 3 Concentration- and time-dependent inactivation of phenacetin *O*-deethylation activity in human liver microsomes by enoxacin (ENX) (A) and ciprofloxacin (CPFX) (B). Percentage of activity remaining (related to time 0 in the presence of solvent alone) was plotted in the logarithmic scale determined from a single experiment. The insets show corresponding double-reciprocal plots of the inactivation rates and the inhibitor concentration.

3.2 生理药动力学模型定量预测依诺沙星/环丙沙星对茶碱/咖啡因代谢的影响

利用依诺沙星/环丙沙星机制性抑制 CYP1A2 活性的酶动力学参数、以及人体生理参数及依诺沙星、环丙沙星、茶碱和咖啡因的药代动力学参数

(表 2 和表 3), 对依诺沙星/环丙沙星在体内与茶碱/咖啡因的相互作用进行了预测, 并与临床报道进行比较。在模拟预测过程中, 发现茶碱选择一房室模型, 咖啡因选择二房室模型时, 拟合值与真实值的吻合程度较好, 预测更准确。

Table 2 Parameters of substrates and enzyme turnover used in the simulation

Parameter	TP	Reference	CAF	Reference	ENX	Reference	CPFX	Reference
PK of parameters								
f_u	0.56	[18]	0.59	[15]	0.33	[21]	0.5	[24]
$V/(mL)$	$V_1 = 16\ 114$ $V_2 = 8\ 051$	[10]	43\ 400	[16]	199\ 500	[22]	247\ 110	[25]
$CL_R/(mL/min)$	7.14	[10]	0.71	[17]	236.6	[22]	357	[25]
$CL_H/(mL/min)$	/	/	/	/	264.6	[23]	295	[25]
k_{12}/min	0.022\ 5	[10]	/	/	/	/	/	/
k_{21}/min	0.045	[10]	/	/	/	/	/	/
k_a	0.01	[10]	1	Assumed	0.006\ 7	[23]	0.030\ 7	[25]
F_a	1	Assumed	1	Assumed	1	Assumed	1	Assumed
K_p	0.69	[10]	1	Assumed	1	Assumed	1	Assumed
HLM protein per human/mg	/	/	/	/	87\ 791	[11]	87\ 791	[11]
$k_{deg}/(min^{-1})$	/	/	/	/	0.000\ 5	[11]	0.000\ 5	[11]
Physiological parameters								
$Q_H/(mL/min)$	1\ 450	[13]	1\ 450	[13]	1\ 450	[13]	1\ 450	[13]
$Q_{HA}/(mL/min)$	300	[13]	300	[13]	300	[13]	300	[13]
$Q_{pv}/(mL/min)$	1\ 150	[13]	1\ 150	[13]	1\ 150	[13]	1\ 150	[13]
V_H/mL	1\ 690	[13]	1\ 690	[13]	1\ 690	[13]	1\ 690	[13]
V_{pv}/mL	70	[14]	70	[14]	70	[14]	70	[14]
Parameters of enzyme kinetics								
$K_{m1}/(mmol/L)$	2.49	[20]	0.46	[19]	/	/	/	/
$K_{m2}/(mmol/L)$	16.08	[20]	0.31	[19]	/	/	/	/
$K_{m3}/(mmol/L)$	9.02	[20]	0.28	[19]	/	/	/	/
$K_{m4}/(mmol/L)$	/	/	0.41	[19]	/	/	/	/
$V_{max1}/(pmol/min/mg\ pro)$	19.51	[20]	570	[19]	/	/	/	/
$V_{max2}/(pmol/min/mg\ pro)$	54.33	[20]	27	[19]	/	/	/	/
$V_{max3}/(pmol/min/mg\ pro)$	225.84	[20]	53	[19]	/	/	/	/
$V_{max4}/(pmol/min/mg\ pro)$	/	/	41	[19]	/	/	/	/

Parameters k_{inact} and $k_{app,i}$ used for simulation are those in Table 1. TP; theophylline; CAF; caffeine

结果显示,预测的依诺沙星、环丙沙星、茶碱和咖啡因的血药浓度-时间曲线与文献报道值相吻合(图4、图5),提示选用的生理模型和参数的合理性。

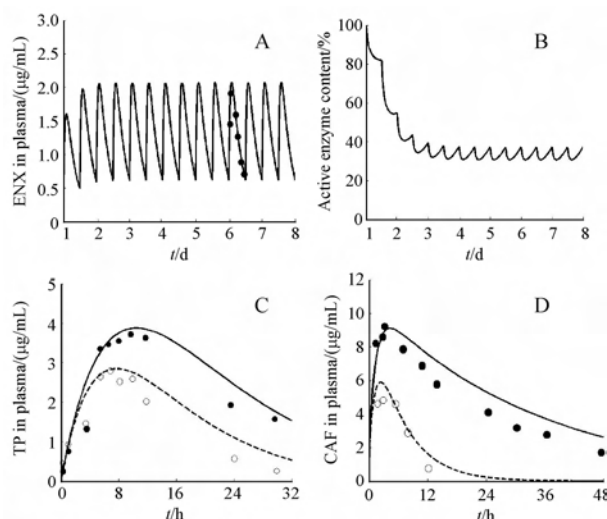


Figure 4 Comparison between the observed (point) and simulated (line) profiles of ENX concentration in blood (A)^[26], active CYP1A2 content in the liver (B), TP (C) and CAF (D) concentration in blood. Symbol: (○, dash line) TP or CAF alone; (●, solid line) Following ENX for 7 days, TP or CAF co-administration with ENX^[2,26]

参照依诺沙星、环丙沙星、茶碱和咖啡因的给药方案(表3)进一步考察依诺沙星/环丙沙星与茶碱/咖啡因的血药浓度变化,及肝脏中活性 CYP450 酶(主要 CYP1A2)的含量(初始状态即 $t=0$ 时,活性 CYP1A2 含量假定为 100)的变化。结果显示,依诺沙星/环丙沙星与 CYP1A2 的底物茶碱和咖啡

因合用时,底物的血药浓度显著增加(图4C、D/图5C、D)。

依诺沙星多剂量给药后(400 mg 口服,1 天 2 次,7 d),预测结果(图4B)显示 CYP1A2 的活性逐渐下降,在第 5 次给药后达到稳态,此时 CYP1A2 的活性仅为对照组的 32%,茶碱/咖啡因的浓度显著升高,与对照组相比,其 AUC 分别为对照组的 2.39 与 5.17 倍,与文献报道的比值 2.73 倍^[26] 与 5.72 倍^[2] 基本吻合。

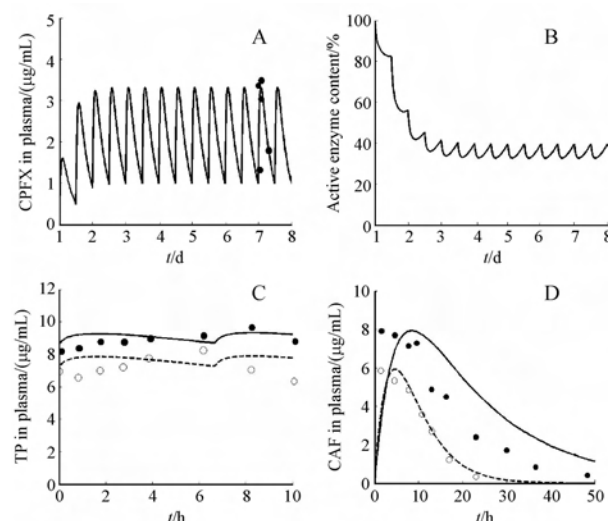


Figure 5 Comparison between the observed (point) and simulated (line) profiles of CPFX concentration in blood (A)^[28], active CYP1A2 content in the liver (B), and TP (C) or CAF (D) concentration in blood

Symbol: (○, dash line) TP or CAF alone; (●, solid line) Following CPFX for 7 days, TP/or CAF co-administration with CPFX^[27-28]

Table 3 Comparison between the observed and predicted AUC ratio

Inhibitor	Inhibitor dose regimen	Victim drug	Predicted	Observed	Reference
ENX	D2-D5; 200 mg, bid, po	CAF, D1, D5, 230 mg, po	2.01	2.76	[3]
ENX	D2-D5; 400 mg, bid, po	CAF, D1, D5, 230 mg, po	3.21	4.46	[3]
ENX	400 mg, bid, 5 doses	CAF, 200 mg, po	2.35	4.71	[29]
ENX	400 mg, bid, 7 doses	CAF, 230 mg, po	4.09	4.39	[29]
ENX	D1-D7; 400 mg, bid, po	CAF, D1-D5, 183 mg, po	5.17	5.72	[2]
ENX	D1-D7; 400 mg, bid, po	TP, D1, D5, 200 mg, po	2.39	2.73	[26]
ENX	400 mg, bid, 3 d	TP, 612 mg, po	2.62	1.65	[29]
ENX	400 mg, bid, 4 d	TP, 146 mg, po	2.21	2.71	[29]
ENX	400 mg, bid, 5.5 d	TP, 1200 mg, po	2.84	4.52	[29]
CPFX	750 mg, bid, po, 10 d	TP, 200 mg bid	1.49	1.86	[27]
CPFX	750 mg, bid, po, 7 d	CAF, D1-D5, 183 mg, po	2.20	2.74	[28]
CPFX	500 mg, bid, po, 4 d	TP, D1, D5, 200 mg, po	1.77	1.24	[4]
CPFX	D2-D5; 500 mg, bid, po	CAF, D1, D5, 183 mg, po	1.91	1.58	[3]
CPFX	D1-D5; 250 mg, bid, po	CAF, D1, 230 mg, po	1.34	1.46	[30]
CPFX	D1-D5; 200 mg, bid, po	TP, 100 mg, bid, po	1.12	1.27	[29]

po: peroral administration; bid: twice a day

环丙沙星多剂量给药后(750 mg 口服,1天2次,7d),预测结果(图5B)显示CYP1A2的活性逐渐下降,在第4次给药后达到稳态,此时CYP1A2的活性仅为对照组的34%,茶碱/咖啡因的浓度显著升高,与对照组相比,其AUC分别为对照组的1.49和2.20倍,与文献报道的比值1.86倍^[27]和2.74倍^[28]基本吻合。更多的预测结果列于表3,从表中预测值和真实值的比较,本研究能进一步发现此基于机制性抑制的生理模型的合理性。

4 讨论

依诺沙星/环丙沙星抑制CYP1A2的活性,升高人体内茶碱、咖啡因和替扎尼定的血药浓度^[1-9],不仅依诺沙星和环丙沙星有抑制CYP1A2代谢的现象,另一个临床常用氟喹诺酮类抗菌药培氟沙星^[2],也能抑制CYP1A2的代谢,升高茶碱的血药浓度,产生严重的不良反应,由我国自主研发的喹诺酮类抗菌药安妥沙星^[10,12],在临床上与茶碱合用时,也能一定程度升高血药浓度,而这些相互作用都发生在氟喹诺酮类抗菌药多剂量给药后。已有的大部分研究都是基于氟喹诺酮类可逆性抑制CYP1A2的活性^[31],但体外微粒体温孵试验发现,依诺沙星与环丙沙星的IC₅₀均大于100 μmol/L,属于弱的CYP1A2的可逆性抑制剂,即体内的依诺沙星/环丙沙星浓度远远小于能产生可逆性抑制作用的浓度,显然,可逆性抑制并不能充分解释临床的现象。

由于机制性抑制与可逆性抑制的机制上存在根本的区别,可逆性抑制剂的抑制作用强弱通常取决于抑制剂分子本身的亲脂性和分子中氮原子的孤对电子与血红蛋白结合的紧密程度。机制性抑制剂的抑制作用强弱不仅受到抑制剂浓度的影响,还受到温孵时间长短的影响,在体内,其受到给药剂量和用药时间长短的影响,即机制性抑制属于不可逆抑制,不符合饱和动力学的特征,时程依赖性的酶失活为其主要特征。本研究发现在没有NADPH存在时,依诺沙星/环丙沙星对非那西丁的代谢抑制作用很弱;当NADPH存在时,依诺沙星/环丙沙星对非那西丁代谢的抑制作用显著增强,抑制呈预温孵时间,依诺沙星/环丙沙星浓度依赖性,符合已报道的机制性抑制特征^[32]。

CYP1A2底物范围较广,除了临床常用药物茶

碱和咖啡因等,许多致癌物前体、内源性化合物包括甾体类化合物^[35]也是其底物。CYP1A2的机制性抑制剂如依诺沙星、环丙沙星等能升高上述化合物的血药浓度,对于治疗窗窄的药物而言,这种相互作用导致的血药浓度升高可能导致临床严重的不良反应,甚至危及患者生命,因此,对于临床上发生的由于机制性抑制导致的药物相互作用,须根据相互作用的机制设计合理的体外实验方案并根据其特征建立数学模型预测体内外相关性。本研究利用体外微粒体温孵实验所得的酶促动力学参数及文献报道的生理参数和药代动力学参数,建立了基于机制性抑制的生理药代动力学模型,并成功预测了人体内的依诺沙星/环丙沙星与茶碱及咖啡因的药物相互作用,得到与实际测得值较为接近的结果。综上所述,依诺沙星/环丙沙星为CYP1A2的机制性抑制剂,且建立的生理药代动力学模型能很好预测该现象。而这一研究结果对临床药物合用的合理化提供了参考。

参考文献

- [1] Wijnands WJ, van Herwaarden CL, Vree TB. Enoxacin raises plasma theophylline concentrations[J]. *Lancet*, 1984, **2**(8394): 108-109.
- [2] Kinzig-Schippers M, Fuhr U, Zaigler M, et al. Interaction of pefloxacin and enoxacin with the human cytochrome P450 enzyme CYP1A2[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1999, **65**(3): 262-274.
- [3] Harder S, Staib A H, Beer C, et al. 4-Quinolones inhibit biotransformation of caffeine[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 1988, **35**(6): 651-656.
- [4] Batty KT, Davis TM, Ilett KF, et al. The effect of ciprofloxacin on theophylline pharmacokinetics in healthy subjects[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1995, **39**(3): 305-311.
- [5] Nix DE, DeVito JM, Whitbread MA, et al. Effect of multiple dose oral ciprofloxacin on the pharmacokinetics of theophylline and indocyanine green[J]. *J Antimicrob Chemother*, 1992, **19**(2): 263-269.
- [6] Jokinen MJ, Olkkola KT, Ahonen J, et al. Effect of ciprofloxacin on the pharmacokinetics of ropivacaine[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2003, **58**(10): 653-657.
- [7] Granfors MT, Backman JT, Neuvonen M, et al. Ciprofloxacin greatly increases concentrations and hypotensive effect of tizanidine by inhibiting its cytochrome P450 1A2-mediated presystemic metabolism[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2004, **76**(6): 598-606.
- [8] Sandson NB, Cozza KL, Armstrong SC, et al. Clozapine case series[J]. *Psychosomatics*, 2007, **48**(2): 170-175.

- [9] Raaska K, Neuvonen PJ. Ciprofloxacin increases serum clozapine and *N*-desmethyleclozapine; a study in patients with schizophrenia [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2000, **56**(8): 585 – 589.
- [10] Zhu Q, Liao J, Xie L, *et al.* Mechanism-based inhibition of CYP1A2 by antofloxacin, an 8-NH₂ derivative of levofloxacin in rats [J]. *Xenobiotica*, 2009, **39**(4): 293 – 301.
- [11] Pan X, Wang P, Hu N, *et al.* A physiologically based pharmacokinetic model characterizing mechanism-based inhibition of CYP1A2 for predicting theophylline/antofloxacin interaction in both rats and humans [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2011, **26**(4): 387 – 398.
- [12] Kudo S, Umehara K, Hosokawa M, *et al.* Phenacetin deacetylase activity in human liver microsomes: distribution, kinetics, and chemical inhibition and stimulation [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, **294**(1): 80 – 88.
- [13] Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans [J]. *Pharm Res*, 1993, **10**(7): 1 093 – 1 095.
- [14] Kanamitsu SI, Ito K, Okuda H, *et al.* Prediction of *in vivo* drug-drug interactions based on mechanism-based inhibition from *in vitro* data; inhibition of 5-fluorouracil metabolism by (*E*)-5-(2-bromovinyl) uracil [J]. *Drug Metab Dispos*, 2000, **28**(4): 467 – 474.
- [15] Levy M, Zylber-Katz E. Caffeine metabolism and coffee-attributed sleep disturbances [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1983, **33**(6): 770 – 775.
- [16] McLean C, Graham TE. Effects of exercise and thermal stress on caffeine pharmacokinetics in men and eumenorrheic women [J]. *J Appl Physiol*, 2002, **93**(4): 1 471 – 1 488.
- [17] Newton R, Broughton LJ, Lind MJ, *et al.* Plasma and salivary pharmacokinetics of caffeine in man [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 1981, **21**(1): 45 – 52.
- [18] Björkman S. Prediction of drug disposition in infants and children by means of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling; theophylline and midazolam as model drugs [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2005, **59**(6): 691 – 704.
- [19] Campbell ME, Grant DM, Inaba T, *et al.* Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theophylline, and theobromine by polycyclic aromatic hydrocarbon-inducible cytochrome(s) P-450 in human liver microsomes [J]. *Drug Metab Dispos*, 1987, **15**(2): 237 – 249.
- [20] Liu L, Pan X, Liu HY, *et al.* Modulation of pharmacokinetics of theophylline by antofloxacin, a novel 8-amino-fluoroquinolone, in humans [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, **32**(10): 1 285 – 1 293.
- [21] Somogyi AA, Bochner F. The absorption and disposition of enoxacin in healthy subjects [J]. *J Clin Pharmacol*, 1988, **28**(8): 707 – 713.
- [22] Chang T, Black A, Dunkley A, *et al.* Pharmacokinetics of intravenous and oral enoxacin in healthy volunteers [J]. *J Antimicrob Chemother*, 1988, **21**(Suppl B): 49 – 56.
- [23] Wise R, Lockley R, Dent J, *et al.* Pharmacokinetics and tissue penetration of enoxacin [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1984, **26**(1): 17 – 19.
- [24] Gonzalez MA, Uribe F, Moisen SD, *et al.* Multiple-dose pharmacokinetics and safety of ciprofloxacin in normal volunteers [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1984, **26**(5): 741 – 744.
- [25] Bergan T, Dalhoff A, Rohwedder R. Pharmacokinetics of ciprofloxacin [J]. *Infection*, 1988, **16**(Suppl 1): 3 – 13.
- [26] Rogge MC, Solomon WR, Sedman AJ, *et al.* The theophylline-enoxacin interaction; I. Effect of enoxacin dose size on theophylline disposition [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1988, **44**(5): 579 – 587.
- [27] Niki Y, Soejima R, Kawane H, *et al.* New synthetic quinolone antibacterial agents and serum concentration of theophylline [J]. *Chest*, 1987, **92**(4): 663 – 669.
- [28] Mahr G, Sörgel F, Granneman GR, *et al.* Effects of temafloxacin and ciprofloxacin on the pharmacokinetics of caffeine [J]. *Clin Pharmacokinet*, 1992, **22**(Suppl 1): 90 – 97.
- [29] Janknegt R. Drug interactions with quinolones [J]. *J Antimicrob Chemother*, 1990, **26**(Suppl D): 7 – 29.
- [30] Stille W, Harder S, Mieke S, *et al.* Decrease of caffeine elimination in man during co-administration of 4-quinolones [J]. *J Antimicrob Chemother*, 1987, **20**(5): 729 – 734.
- [31] Fuhr U, Anders EM, Mahr G, *et al.* Inhibitory potency of quinolone antibacterial agents against cytochrome P450IA2 activity *in vivo* and *in vitro* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992, **36**(5): 942 – 948.
- [32] Zhou SF, Wang B, Yang LP, *et al.* Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2 [J]. *Drug Metab Rev*, 2010, **42**(2): 268 – 354.