

盐酸雷诺嗪在大鼠肝微粒体内代谢的性别差异

钟 皎, 柳晓泉*, 陈 燕, 赵小平, 王永升, 王广基

(中国药科大学药物代谢与动力学研究中心, 南京 210009)

摘要 目的: 用大鼠肝微粒体研究盐酸雷诺嗪代谢的性别差异及选择性 CYP 抑制剂对其代谢的影响。方法: 盐酸雷诺嗪分别与雌性或雄性大鼠的肝微粒体温孵, 抑制试验是在微粒体中先加入选择性抑制剂温孵 30 min 后, 再加入盐酸雷诺嗪温孵。温孵后的样品中加入内标咖啡因, 碱化后乙醚提取, 取上清液水浴挥干, 流动相溶解后采用梯度洗脱进行 HPLC 测定。结果: 盐酸雷诺嗪在大鼠肝微粒体内被迅速代谢为 6 个 相代谢产物, 雄性大鼠微粒体酶的代谢能力强于雌性大鼠。CYP3A 特异性抑制剂酮康唑 (Ket)、CYP1A2 特异性抑制剂 -萘黄酮 (-Naph) 和 CYP2D2 特异性抑制剂奎尼丁 (Qui) 可以明显地抑制肝微粒体中盐酸雷诺嗪的代谢, 其中 Ket 的抑制能力最强; 而二乙二硫氨基甲酸酯 (DDC) 和磺胺苯吡唑 (Sul) 对盐酸雷诺嗪的代谢无明显影响。结论: 研究提示盐酸雷诺嗪在雌雄大鼠肝微粒体内的代谢有极其显著性差异, 其主要原因是 CYP3A 酶在大鼠肝微粒体中具有性别差异性。

关键词 盐酸雷诺嗪; HPLC; 肝微粒体; 代谢; 抑制; 性别差异

中图分类号 R969.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000 - 5048(2006)05 - 0450 - 06

Gender difference in ranolazine metabolism in rat liver microsomes

ZHONG Jiao, LIU Xiao-quan, CHEN Yan, ZHAO Xiao-ping, WANG Yong-sheng, WANG Guang-ji

Center of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Aim: To study the gender difference in ranolazine metabolism and the effects of selective cytochrome P-450 (CYP450) inhibitors on the metabolism of ranolazine in rat liver microsomes. Methods: Ranolazine was incubated with male and female rat liver microsomes, respectively. 30 min incubation with selective CYP450 inhibitors was followed by the addition of ranolazine into the matrix. Caffeine was used as the internal standard. After alkalization, the aliquots were extracted by diethyl ether and determined by HPLC operated in the mode of gradient elution. Results: Ranolazine was rapidly metabolized to six phase metabolites in rat liver microsomes. The metabolism of ranolazine in male rat liver microsomes was more extensive than that in female ones. Ketoconazole (Ket), quinidine (Qui), and -Naphthoflavone (-Naph) had inhibitory effects on the metabolism of ranolazine. In particularly Ket shown the most significant action. It was further found that Sulfaphenazole (Sul) and diethyldithiocarbamate (DDC) had little or no inhibitory effects on ranolazine metabolism. Conclusion: The observed gender differences in ranolazine metabolism might be due to the different characteristics of CYP3A inherited in male and female rat liver microsomes.

Key words ranolazine; HPLC; liver microsomes; metabolism; inhibition; gender difference

This study was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2003AA2Z347A) and Key Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics of Jiangsu Province (No. BM2001201)

盐酸雷诺嗪是用于稳定型心绞痛治疗的新型药物, 是部分脂肪酸氧化酶 (pFOX) 抑制剂。其作用机制不同于传统的抗心绞痛药, 不是通过降低心

率和 (或) 血压直接减少心脏做功, 而是通过优化心肌能量供应的代谢而发挥作用^[1-4], 即盐酸雷诺嗪可减少脂肪酸氧化, 增加葡萄糖氧化。由它介导的

* 收稿日期 2006-03-31 * 通讯作者 Tel: 025 - 83271260 E-mail: liuxq@jlonline.com

基金项目 国家高技术研究发展计划 ("八六三" 计划) 资助项目 (No. 2003AA2Z347A); 江苏省药物代谢动力学重点实验室资助项目 (No. BM2001201)

代谢底物的转化,使心肌细胞的需氧量减少而不减少做功,这种转化还维持心肌局部缺血时糖酵解到葡萄糖氧化的偶联,从而减少组织酸中毒^[5]。盐酸雷诺嗪在大鼠体内的药代动力学具有明显的性别差异^[6]:口服盐酸雷诺嗪后雌性大鼠的 $t_{1/2}$ 和 AUC 分别是雄性大鼠的 4 倍和 3 倍,同样雌性大鼠胆汁、尿液、粪便中的药物浓度要远高于雄性大鼠的,这说明雌性大鼠在体内的消除能力要较雄性大鼠弱。本文旨在利用体外肝微粒体模型来研究盐酸雷诺嗪代谢的性别差异及 CYP 选择性抑制剂对其代谢的影响,从而来探讨造成其体内药代动力学过程存在显著性别差异的原因。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-2010C 高效液相色谱仪,SPD-M10Avp 紫外检测器,CLASS-VP 色谱工作站,LC/MS-2010 高效液相色谱-质谱联用仪(日本岛津公司);PHS-2C pH 计(上海天达仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

盐酸雷诺嗪(RAN,山东齐鲁制药有限公司);咖啡因(内标);辅酶(NADP,上海丽珠东风生物技术有限公司);葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Type V),葡萄糖-6-磷酸(G-6-P),奎尼丁(Qui),二乙二硫氨基甲酸酯(DDC),-萘磺酮(-Naph)、磺胺苯吡唑(Sul)和酮康唑(Ket)(Sigma 公司);考马斯亮兰蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);甲醇(色谱纯,美国 Merck 公司);其他试剂均为市售分析纯;水为超纯水。

1.3 动物

SD 大鼠,体重为 180~220 g。由东南大学医学院实验动物中心提供,动物许可证号:SYXK(苏)2002-0012。

2 方法

2.1 肝微粒体制备

大鼠颈椎脱臼处死后,将肝组织迅速置于 0~4 冰浴中。用差速离心法^[7]制备大鼠肝微粒体。将肝微粒体悬浮于含 30%甘油的 0.15 mol/L KCl-0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中,使用考马斯亮兰蛋白测定试剂盒测定肝微粒体蛋白浓度,并稀释至 5.5 mg/mL,分装后置 -70 保存。

2.2 温孵条件

按文献[8]方法,0.15 mol/L KCl-0.1 mol/L 磷酸盐缓冲体系中含 0.5 mmol/L NADP,5.0 mmol/L 葡萄糖-6-磷酸,1.0 U/mL 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,5.0 mmol/L MgCl₂,1.0 mg/mL 肝微粒体。反应体系 1.0 mL 中加入盐酸雷诺嗪使其终浓度为 80 μmol/L,于 37 水浴中温孵振荡 45 min,立即取出放入 -20 冰箱内终止反应。

2.3 样品处理

在肝微粒体温孵液 1.0 mL 中,加入内标(50 μg/mL)咖啡因 50 μL 振荡 10 s,加 0.1 mol/L Na₂CO₃ 350 μL 碱化,涡旋振荡 1 min,再加入乙醚 5 mL,涡旋振荡 2 min,3 500 r/min 离心 10 min,取上清液 4 mL 水浴挥干,流动相 100 μL 溶解后取 20 μL 进样。盐酸雷诺嗪与代谢物均用样品与内标峰面积比进行定量分析。

2.4 抑制实验

在肝微粒体温孵液(蛋白浓度为 1 mg/mL)中分别加入抑制剂,每个抑制剂分别使用 4 种浓度梯度 -Naph、Sul (12.5, 25, 50, 100 μmol/L),DDC (6.25, 12.5, 25, 50 μmol/L),Ket (0.5, 1, 2, 5 μmol/L),Qui (2.5, 5, 10, 20 mol/L),37 水浴温孵振荡 30 min 后,加入盐酸雷诺嗪于 37 水浴再温孵振荡 45 min,按“2.3 项”方法处理后检测。

2.5 色谱条件

汉邦 Lichrospher C₁₈柱(250 mm ×4.6 mm ID,5 μm),流动相 A:1 mmol/L 醋酸铵水溶液(用醋酸调节 pH 值至 4.3),流动相 B:甲醇。采用梯度洗脱,0~30 min:流动相 B 由 10%增加至 55%;30~40 min:流动相 B 由 55%增加至 90%;40~41 min:流动相 B 90%;41~42 min:流动相 B 由 90%增加至 100%;42~43 min:流动相 B 由 100%降至 10%,维持平衡 4 min 后进样,流速 1 mL/min;检测波长 271 nm;柱温 50 。

3 结果

3.1 盐酸雷诺嗪在雌雄大鼠肝微粒中的代谢

终浓度为 80 μmol/L 的盐酸雷诺嗪分别与雌雄大鼠肝微粒体温孵 45 min,色谱图见图 1。盐酸雷诺嗪与空白肝微粒体温孵液中的杂质峰及盐酸雷诺嗪代谢物峰达到良好分离。

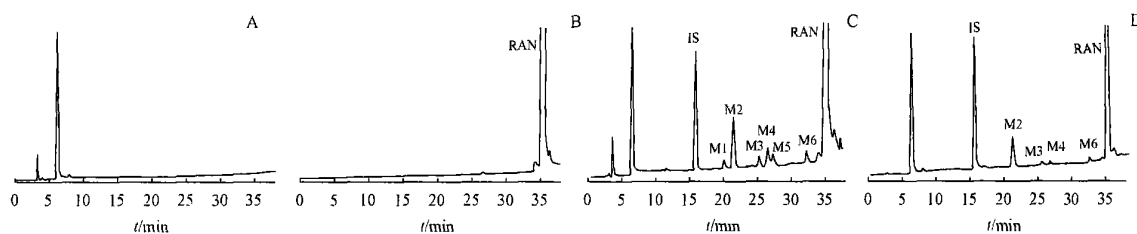


Fig. 1 HPLC chromatograms of (A) blank rat liver microsomes; (B) incubation of phosphate buffer spiked with ranolazine; (C) incubation of ranolazine with male rat liver microsomes; (D) incubation of ranolazine with female rat liver microsomes

3.2 盐酸雷诺嗪在大鼠肝微粒中代谢的性别差异

雄性大鼠微粒体温孵液提取进样后的高效液相色谱图上出现了 6 个代谢物峰, 即 $M_1, M_2, M_3, M_4, M_5, M_6$, 经 LC-MS 扫描其 $[M + Na]^+$ 分别为 202, 221, 466, 466, 466, 436。虽然雌性大鼠微粒体温孵液提取进样后的高效液相色谱图在只出现了 4 个代谢物峰 (M_2, M_3, M_4, M_6), 但经 LC-MS 扫描后发现具有与雄性大鼠相同的 6 个代谢物, 原因是雌性大鼠 M_1, M_5 代谢的量很少, 用高灵敏度的 LC-MS 才能检测得到。由于没有获得代谢物的标准品, 所以统一将盐酸雷诺嗪和其代谢物峰面积与内标峰面积比即 A_s/A_i 表示。由结果发现, 雌雄大鼠在代谢物的种类上相同且主代谢物 (M_2) 一致, 但是 M_1, M_2, M_3, M_4, M_5 在代谢物的量上存在显著性的性别差异。盐酸雷诺嗪在雄性大鼠肝微粒体内的代谢能力强于在雌性大鼠肝微粒体中的代谢能力 (见图 2)。

3.3 CYP450 抑制剂对盐酸雷诺嗪代谢的影响

5 种细胞色素 P450 的特异性抑制剂酮康唑 (Ket), 奎尼丁 (Qui), 二乙二硫氨基甲酸酯 (DDC), -萘磺酮和磺胺苯吡唑 (Sul) 对盐酸雷诺嗪的代谢影响分别见图 3 ~ 8。由图可知, Ket 和 Qui 均可以抑制 $M_1, M_2, M_3, M_4, M_5, M_6$ 的形成, 即抑制肝微粒体中盐酸雷诺嗪的代谢。-Naph 可以选择性抑制

M_1, M_2 的形成, 而 DDC 和 Sul 对盐酸雷诺嗪的代谢无明显影响。

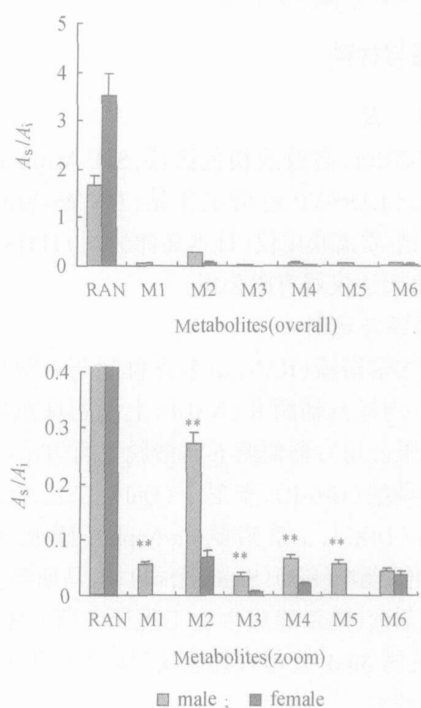


Fig. 2 Mean A_s/A_i of six metabolites and ranolazine after incubation of ranolazine with male and female rat liver microsomes, respectively ($n = 5$)
** $P < 0.01$ vs female group

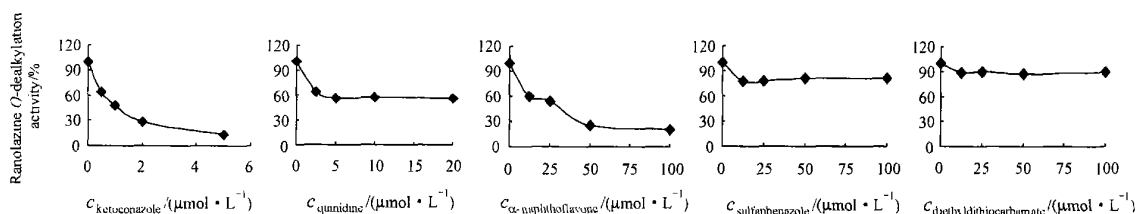


Fig. 3 Effect of CYP450 selective inhibitors on the form of M_1 in rat liver microsomes. Incubation of ranolazine alone was taken as control (100%)

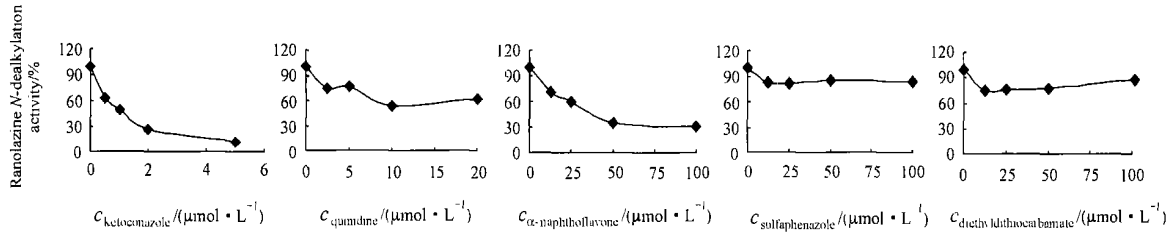


Fig. 4 Effect of CYP450 selective inhibitors on the form of M₂ in rat liver microsomes. Incubation of ranolazine alone was taken as control (100 %)

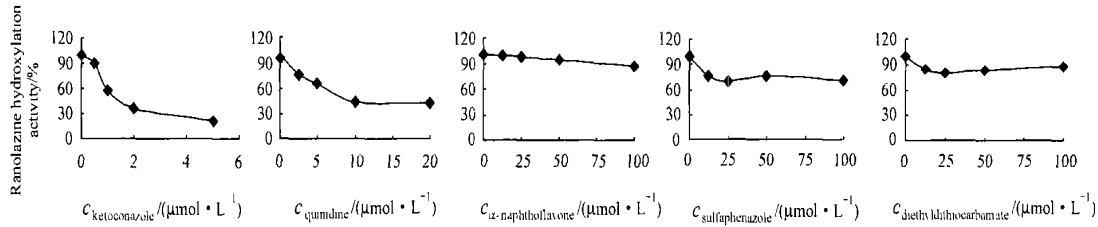


Fig. 5 Effect of CYP450 selective inhibitors on the form of M₃ in rat liver microsomes. Incubation of ranolazine alone was taken as control (100 %)

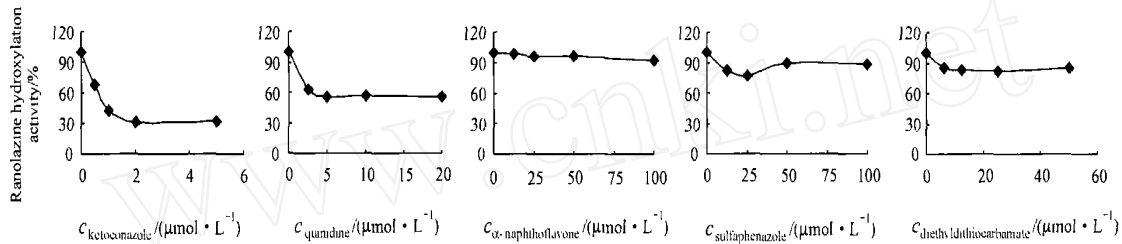


Fig. 6 Effect of CYP450 selective inhibitors on the form of M₄ in rat liver microsomes. Incubation of ranolazine alone was taken as control (100 %)

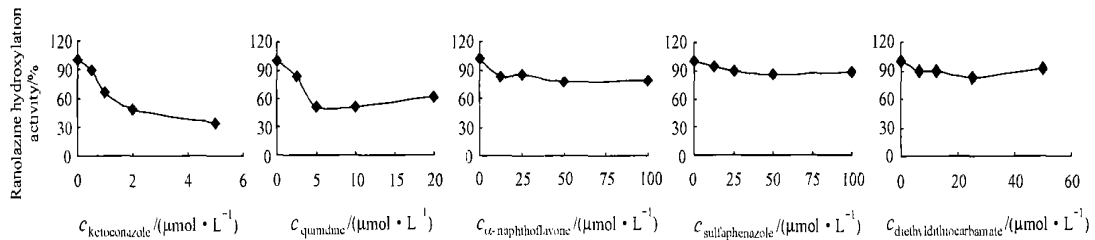


Fig. 7 Effect of CYP450 selective inhibitors on the form of M₅ in rat liver microsomes. Incubation of ranolazine alone was taken as control (100 %)

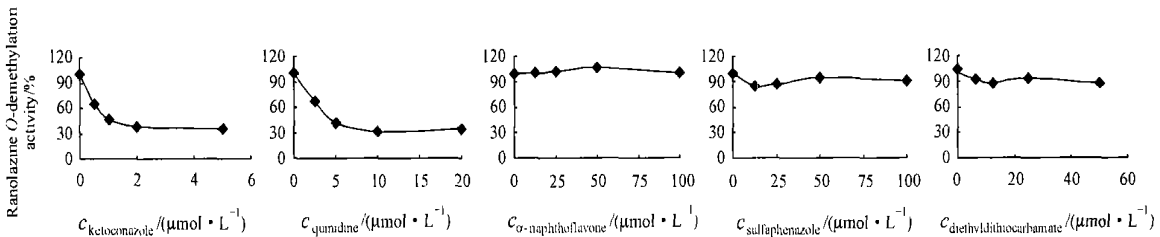


Fig. 8 Effect of CYP450 selective inhibitors on the form of M₆ in rat liver microsomes. Incubation of ranolazine alone was taken as control (100 %)

4 讨论

盐酸雷诺嗪在大鼠肝微粒体(蛋白浓度为 1 mg/mL)中,经 37 °C 水浴温孵振荡 15,30,45,60,90 min,发现 15~45 min 药物呈线性消除,当温孵时间大于 45 min,药物消除不呈线性;底物盐酸雷诺嗪

浓度为 20,40,80,120,160 μmol/L 时分别与大鼠肝微粒体温孵,结果当底物浓度大于 80 μmol/L 时,盐酸雷诺嗪的消除表现出饱和特性。故本实验选择温孵时间是 45 min,底物浓度为 80 μmol/L,肝微粒体蛋白浓度为 1 mg/mL。

盐酸雷诺嗪与大鼠的肝微粒体温孵后,被迅速

代谢为 6 个代谢物,雌雄大鼠所形成的代谢物一致,其质荷比与报道的人血浆内 6 个代谢物一致^[9-11],故我们根据人体内这 6 种代谢物的结构来判断 M_1, M_2 为脱羟基产物, M_3, M_4, M_5 为羟化产物, M_6 为脱甲基产物,其代谢途径见图 9, M_2 是雌雄大鼠微粒体中的主代谢产物。通过对未代谢的原

药和 6 个代谢物数据分析,发现原药和 M_1, M_2, M_3, M_4, M_5 的量在雌雄大鼠之间具有极其显著性差异,即盐酸雷诺嗪在雄性大鼠微粒体内的代谢能力要远强于在雌性大鼠微粒体中的代谢能力,这与盐酸雷诺嗪在大鼠体内的药代动力学研究结果一致。

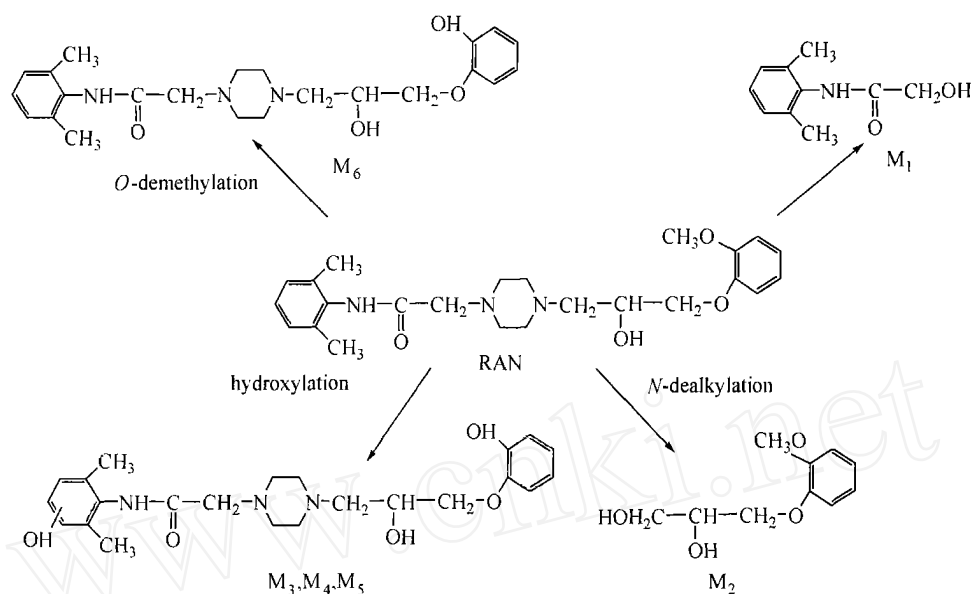


Fig. 9 Proposed metabolic route of ranolazine in rat liver microsomes

研究结果表明 CYP3A 的特异性抑制剂 Ket 和 CYP2D2 的特异性抑制剂 Qui 均可以抑制 $M_1, M_2, M_3, M_4, M_5, M_6$ 的形成(即抑制肝微粒体中盐酸雷诺嗪的代谢)。CYP1A2 的特异性抑制剂 -Naph 可以选择性的抑制 M_1, M_2 的形成,细胞色素 CYP2E1 的特异性抑制剂 DDC 和 CYP2C 的特异性抑制剂 Sul 对盐酸雷诺嗪的代谢无明显影响。因此可推断 CYP3A、CYP2D2 和 CYP1A2 共同参与了盐酸雷诺嗪的代谢。

由图 3 ~ 8 可以看出 CYP3A 的特异性抑制剂 Ket 抑制 M_1, M_2, M_3, M_4, M_5 形成的能力最强,因此可以判断 CYP3A 是盐酸雷诺嗪的主要代谢酶,对代谢物的形成影响最大,而 CYP3A 是雄性大鼠的特异性酶^[12,13],在雌性大鼠中浓度很低,因此 CYP3A 是 M_1, M_2, M_3, M_4, M_5 存在性别差异的关键因素,而 Ket 抑制 M_6 形成的能力与 Qui 相差不大并没有占主导作用,故 M_6 未表现出性别差异。

盐酸雷诺嗪的体外代谢试验与体内的药代动力学结果相符,CYP3A 酶的性别差异性造成了盐酸雷诺嗪在雄性大鼠体内的代谢快于雌性大鼠,因

此雄性大鼠体内药物的半衰期短,血药浓度低。故 CYP3A 酶的差异性可以认为是造成盐酸雷诺嗪在大鼠体内药代动力学存在性别差异的主要原因之一。

参考文献

- [1] Galinski MR, Black SC, Kigore KS, et al. Cardioprotective effects of ranolazine (RS-43285) in the isolated perfused rabbits heart [J]. *Cardiovasc Res*, 1994, **28** (8): 1 231 - 1 237.
- [2] McCormack JG, Barr RL, Wolff AA, et al. Ranolazine stimulates glucose oxidation in normoxic ischemic and reperfusion ischemic rat hearts [J]. *J Circulation*, 1996, **93** (1): 135 - 142.
- [3] Bagger JP, Botker HE, Thomassen A, et al. Effect of ranolazine on ischemic threshold, coronary sinus blood flow, and myocardial metabolites in coronary artery disease [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 1997, **11** (3): 479 - 484.
- [4] Pepine CJ, Wolff AA. A controlled trial with a novel anti-ischemic agent ranolazine, in chronic stable angina pectoris that responsive to conventional antianginal agents. Ranolazine study group [J]. *Am J Cardiol*, 1999, **84** (1): 46 - 50.
- [5] McCormack JG, Stanley WC, Wolff AA. Ranolazine: a novel metabolic modulator for the treatment of angina [J]. *Gen Pharmacol*, 1998, **30** (5): 639 - 645.

- [6] Liu XD, Xie L, Lang Y, *et al.* Gender difference in ranolazine pharmacokinetics in rats[J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2003, **28**(2):119 - 123.
- [7] Vonbahr C, Goth CG, Jansson H, *et al.* Drug metabolism in human liver *in vitro*: establishment of a human liver bank[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1980, **27**(6):711 - 725.
- [8] 赵 阳(Zhao Y), 柳晓泉(Liu XQ), 钱之玉(Qian ZY). 非洛地平在人肝微粒体内的代谢及抑制作用[J]. *中国药科大学学报(J China Pharm Univ)*, 2001, **32**(2):112 - 116.
- [9] Herron WJ, Eadie J, Penman AD. Estimation of ranolazine and eleven Phase metabolites in human plasma by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry with selected ion[J]. *J Chromatogr A*, 1995, **712**(1):55 - 60.
- [10] Penman AD, Eadie J, Herron WJ, *et al.* The characterization of the metabolites of ranolazine in man by liquid chromatography mass spectrometry[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1995, **9**(14):1 418 - 1 430.
- [11] Jerling M, Huan BL, Leung K, *et al.* Studies to investigate the pharmacokinetic interactions between ranolazine and Ketoconazole, Diltiazem, or Simvastatin during combined administration in healthy subjects[J]. *J Clin Pharmacol*, 2005, **45**(4):422 - 433.
- [12] Waxman DJ. Rat hepatic cytochrome P-450 isoenzyme 2c[J]. *J Biol Chem*, 1984, **259**(24):15 481 - 15 490.
- [13] Waxman DJ, Dannan GA, Guengerich FP. Regulation of rat hepatic cytochrome P-450: Age-dependent expression, hormonal imprinting, and xenobiotic inducibility of sex-specific isoenzymes[J]. *Biochemistry*, 1985, **24**(16):4 409 - 4 417.

校园信息 ·

2006年1~6月中国药科大学获得授权的专利题录

序号	发明人	发明名称	专利号
1	姚其正, 张志祥, 唐 锋, 华维一	抗肿瘤药甲氨蝶呤衍生物及其在药学上的用途	ZL03113040.2
2	朱丹妮, 郎素梅, 王秋娟, 余伯阳, 严永清	一种中药降血糖药及其制备方法	ZL 02138362.6
3	吴梧桐, 谭树华, 崔 莉, 李运曼	重组水蛭素的用途	ZL 03132224.7
4	徐云根, 王正勇, 王德传, 许仁裕, 印 霞, 华维一	3-吡啶乙酸盐酸盐的新制备方法	ZL ZL03112631.6
5	宗 莉, 尤启冬, 陈伶俐	一种制备布洛芬精氨酸盐的方法	ZL200410014369.4
6	郭建新, 平其能, 吕文莉	一种稳定性提高的灯盏花素注射剂及其制备方法	ZL 200410013845.0
7	巫冠中, 王广基	磺酰脲和磺酰硫脲衍生物在制备抗糖尿病药物中的用途	ZL200410014027.2
8	吴晓明, 徐进宜, 王秋娟	具有心血管活性的 N-芳基取代-1 H-吡咯衍生物	ZL200310106428.6
9	刘丽芳, 何 玲, 王宇新	芥子碱在制备防治老年性痴呆疾病药物中的应用	ZL200410064690.3
10	戴 岳, 王峥涛, 丁佐奇	东莨菪素在制备防治高尿酸血症药物中的应用	ZL200410065021.8

(孙立冰)