

## 环孢素A对银杏内酯B大鼠体内药动学的影响

王 磊, 李 宁, 韩德恩, 孙 伟, 高子栋, 陈西敬\*

(中国药科大学药物代谢与动力学研究中心, 江苏 南京 210009)

**摘要:** 研究环孢素 A (cyclosporine A, CyA) 对大鼠静脉注射中药成分银杏内酯 B (ginkgolide B, GB) 药动学的影响, 并进行作用机制研究。实验建立了测定大鼠血浆、脑组织和尿液中 GB 浓度的 LC-MS 方法, 研究了 CyA 对 GB 在大鼠体内血药浓度、脑分布和肾排泄的影响。结果表明静脉注射 CyA (10 及 20 mg·kg<sup>-1</sup>) 可以显著增加 GB 的 AUC<sub>0-360 min</sub> ( $P < 0.01$ ), 降低其 CL ( $P < 0.001$ ); 静脉注射 CYP3A 抑制剂伊曲康唑 (itraconazole, ICZ) 则对 GB 的药动学行为无影响。脑分布结果显示, 高、中、低剂量的 CyA 均可增加 GB 在脑中的浓度, 此作用具有浓度和时间依赖性, 在 5 min 时不同剂量的 CyA 均可显著增加 GB 在脑中的分布 ( $P < 0.001$ ), 但在 20 及 60 min 时仅高剂量 CyA 组可显著增加 GB 脑中的浓度 ( $P < 0.01$  及  $P < 0.001$ )。不同 P-gp 抑制剂均可减少 GB 的肾排泄, 其中 CyA (20 mg·kg<sup>-1</sup>) 组、维拉帕米 (verapamil, VER) 组及地高辛 (digoxin, DGX) 组 GB 8 h 累积排泄百分率分别为对照组的 34.8% ( $P < 0.001$ )、59.4% ( $P < 0.001$ ) 及 79.7% ( $P < 0.05$ ); 而 ICZ 组则无此作用。大鼠静脉给予 P-gp 抑制剂 CyA 可以显著提高 GB 的血药浓度, 减少肾脏对 GB 排泄且能增加 GB 在脑中的分布。

**关键词:** 银杏内酯 B; 环孢素 A; 药动学; P-糖蛋白; 脑分布; 肾排泄

中图分类号: R969

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 06-0632-08

## Effect of cyclosporine A on the pharmacokinetics of ginkgolide B in rats

WANG Lei, LI Ning, HAN De-en, SUN Wei, GAO Zi-dong, CHEN Xi-jing\*

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

**Abstract:** The paper is aimed to investigate the effect of cyclosporine A (CyA) on the pharmacokinetics of ginkgolide B (GB) in rats, and to look for the mechanism of the changes in pharmacokinetic behaviors of GB. GB concentration in plasma, brain homogenate and urine samples of rats was determined by LC-MS. Effects of CyA on plasma levels, brain distributions as well as urinary excretions after intravenous administration of GB were evaluated. CyA coadministered intravenously at 10 mg·kg<sup>-1</sup> or 20 mg·kg<sup>-1</sup> significantly increased AUC<sub>0-360 min</sub> ( $P < 0.01$ ) and decreased total CL of GB in rats. While coadministered CYP3A inhibitor itraconazole (ICZ) has no appreciable effect on the pharmacokinetic behavior of GB. CyA increased the brain uptake of GB in a dose-dependent manner. The brain distribution of GB was significantly increased at 5 min by different doses of CyA ( $P < 0.001$ ), while at 20 and 60 min only high dose of CyA could significantly increase the levels of GB in the brain ( $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ ). Different P-gp inhibitors CyA or verapamil (VER) or digoxin (DGX) decreased the urinary GB excretion, the urinary excretion of GB in 0–8 h were about 34.8% ( $P < 0.001$ ), 59.4% ( $P < 0.001$ ) and 79.7% ( $P < 0.05$ ) of the control, separately. No appreciable effect of ICZ was observed on urinary excretion of GB. Coadministration of P-gp inhibitors CyA could significantly increase the plasma level, accelerate the brain distribution and decrease the urinary excretion of GB.

收稿日期: 2008-11-24.

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2007AA02Z171); 国家自然科学基金资助项目 (30472060).

\*通讯作者 Tel: 86-25-83271286, E-mail: chen-lab@hotmail.com

**Key words:** ginkgolide B; cyclosporine A; pharmacokinetics; P-glycoprotein; brain distribution; renal excretion

银杏内酯 B (ginkgolide B, GB), 化学名为 7 $\beta$ ,11-二羟基银杏内酯, 是天然存在于银杏叶和果实中的一种天然血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF) 拮抗剂, 近年来的研究表明 GB 尚具有抗炎、抗过敏、抗休克、抗癌和神经保护等作用, 临床上主要用于心脑血管疾病的治疗<sup>[1,2]</sup>。也有报道<sup>[3,4]</sup> GB 可与环孢素 A (cyclosporine A, CyA) 合用, 减轻后者作为免疫抑制剂对器官移植患者的肾毒性。

转运体介导的药物相互作用可对相应底物在体内的药动学性质产生显著影响, CyA、维拉帕米等 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 抑制剂均可对 P-gp 的功能产生抑制作用<sup>[5]</sup>。由于这些药物在临床应用中与 GB 均有合用的可能性, 但其相互作用尚未见报道, 因此, 本文以 SD 大鼠为实验动物, 研究了 CyA 对 GB 在体内分布、排泄和药动学参数的影响, 为临床用药提供参考。

## 材料与方法

**药品与试剂** 银杏内酯 B (江苏鹏鹞药业有限公司, 纯度大于 99%; ginkgolide B, GB); 格列本脲 (glibenclamide; IS)、盐酸维拉帕米 (verapamil, VER)、地高辛 (digoxin, DGX)、伊曲康唑 (itraconazole, ICZ) 均购自中国药品生物制品检定所; 环孢素 A 购自江苏沃尔德实业有限公司 (纯度大于 99%); 甲醇 (色谱纯, 美国 Tedia 公司)。其余试剂均为市售分析纯。

**仪器** LC-MS-2010EV 液相色谱质谱连用仪 (日本岛津公司), 包括 LC-20AD 液相泵, CBM-20A 连接器, CTO-20A 柱温箱, SIL-20AC 自动进样器, LC-MS-2010 质谱分析仪, 具有二元梯度泵、在线真空脱气机、自动进样器、恒温柱箱、四级杆检测器、电喷雾 (ESI) 接口、MSD 检测器、岛津质谱工作站; 0412-1 离心机 (上海手术器械厂); XHF-1 高速分散器 (上海金达生化仪器有限公司)。

**动物** Sprague-Dawley 雄性大鼠, 体重 (240  $\pm$  20) g, 上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 动物合格证号: SCXK (沪) 200322002。

**生物样品处理** 生物样品 (血浆, 脑组织匀浆液或尿液) 50  $\mu$ L, 加入 2.5 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 10  $\mu$ L 后, 再加入内标格列本脲 (5  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>) 10  $\mu$ L, 待混匀后加入乙醚 1 mL, 涡旋振荡 5 min 后, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 精密吸取上清液 800  $\mu$ L 至离心管中,

50  $^{\circ}$ C 条件下氮气吹干后用流动相 1.0 mL 溶解残渣, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取上清液后 10  $\mu$ L 进样测定。

## 样品测定

生物样品测定的 LC-MS 条件<sup>[6,7]</sup> 色谱柱: Hypersil ODS (150 mm  $\times$  4.6 mm, 2.5  $\mu$ m), 大连伊利特科学仪器有限公司; 流动相: 甲醇-0.01% 氨水 (55 : 45); 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量: 10  $\mu$ L。质谱条件: 电喷雾离子化 (ESI), 采用选择性离子检测 (SIM), GB SIM 的离子是 [M-H]<sup>-</sup>,  $m/z$  423.10; 内标格列本脲 SIM 的离子是 [M-H]<sup>-</sup>,  $m/z$  492.10; 检测器电压为 1.60 kV; 干燥气体 (N<sub>2</sub>) 流速: 1.5 L·min<sup>-1</sup>; 干燥气体温度: 250  $^{\circ}$ C。

**标准曲线** 取空白血浆 40  $\mu$ L, 精密加入 GB 标准液 10  $\mu$ L, 使其质量浓度分别为 0.05, 0.10, 0.20, 0.50, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 及 20.0  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>, 按“生物样品处理”项下方法操作, 以样品峰面积与内标峰面积之比 ( $f$ ) 为纵坐标, 样品浓度 ( $c$ ) 为横坐标作线性回归, 得血浆中 GB 的标准曲线。取空白脑组织匀浆液 40  $\mu$ L, 精密加入 GB 液 10  $\mu$ L, 使其质量浓度分别为 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 和 10.0  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>, 按“生物样品处理”项下方法操作, 以样品峰面积与内标峰面积之比 ( $f$ ) 为纵坐标, 样品浓度 ( $c$ ) 为横坐标作线性回归, 得脑组织中 GB 的标准曲线。取空白尿样 40  $\mu$ L, 精密加入 GB 标准液 10  $\mu$ L, 使其浓度分别为 0.10, 0.20, 0.50, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 和 50.0  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>, 按“生物样品处理”项下方法操作, 以样品峰面积与内标峰面积之比 ( $f$ ) 为纵坐标, 样品浓度 ( $c$ ) 为横坐标作线性回归, 得尿液中 GB 的标准曲线。

**精密度、准确度及提取回收率** 按“标准曲线”项下方法制备分别为 0.1, 1.0 和 10.0  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 的 GB 对照品血浆、脑组织匀浆及尿液样品, 按“生物样品处理”项下方法操作, 1 d 内不同时间重复操作测定 5 次后计算得血浆、脑组织匀浆及尿液样品各自的日内精密度以及准确度 (将测定值与理论值比较), 不同浓度的对照品血浆、脑组织匀浆及尿液样品在不同天 (每天测定 1 次, 连续 5 d) 内测定后计算得其各自的日间精密度。计算 0.1, 1.0 和 10.0  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 对照品血浆、脑组织及尿液样品测得值与相应对照品溶液的测得值之比, 得 GB 提取回收率。

**GB 血浆稳定性** 按“标准曲线”项下方法制备质量浓度分别为 0.1, 1.0 和 10.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的对照品血浆各 11 份, 制备所得的对照品血浆加入 2.5  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸溶液 10  $\mu\text{L}$  后, 分别进行室温稳定性试验 (分别于室温条件下放置 0, 2, 4 和 8 h)、冷冻稳定性试验 (对照品血浆于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  分别冷冻放置 0, 3, 7, 14 d) 和冻融稳定性试验 (低、中、高对照品血浆各 3 份, 分别经过以下处理: 第 1 份配制后立即处理测定, 即冻融 0 次; 第 2 份于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷冻放置 3 d 后取出融化后处理并测定, 即冻融 1 次; 第 3 份于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷冻放置, 于第 3 天取出融化后继续冷冻放置至第 7 天, 然后取出融化后处理并测定, 即冻融 2 次), 按“生物样品处理”项下方法操作, 将测定的峰面积比代入标准曲线, 计算每份对照品血浆实测值之间的相对差异来评估样品的室温、冷冻及反复冻融稳定性。为了考察 GB 进样时稳定性, 将处理好的质量浓度分别为 0.1, 1.0 和 10.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的对照品血浆放入自动进样器中 ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), 各浓度在 12 h 内每 4 h 进样 1 次, 分析比较样品中 GB 浓度。

**GB 血浆的基质效应** 分别取 6 份大鼠空白血浆 40  $\mu\text{L}$ , 经液-液萃取处理后, 以 GB 及内标 (格列本脲) 混合溶解, GB 溶液质量浓度为 0.1, 1.0 和 10.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 内标溶液质量浓度为 5.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 进行 LC-MS 分析获得峰面积, 与混合溶液直接进样获得峰面积之比评价基质效应。

### GB 在大鼠体内的动物实验设计

**溶液的配制** 精密称取 GB、CyA、维拉帕米、地高辛、伊曲康唑原料药于不同 100 mL 量瓶中, 乙醇定容后超声溶解, 配置成质量浓度分别为 12.5 (GB), 25.0 (CyA), 7.5 (维拉帕米), 5.0 (地高辛) 及 25.0 (伊曲康唑)  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的母液。给药前取各自适量母液用注射用生理盐水稀释成质量浓度为 2.5 (GB), 5.0 (CyA), 1.5 (维拉帕米), 1.0 (地高辛) 及 5.0 (伊曲康唑)  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的溶液, 超声后供大鼠静注使用。静注体积分别为: 4.0 (GB), 4.0 (CyA 剂量为 20.0  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  时), 2.0 (CyA 为 10.0  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 1.0 (CyA 为 5.0  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 2.0 (维拉帕米), 2.0 (地高辛) 及 4.0 (伊曲康唑)  $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

**药动学研究** 雄性 SD 大鼠 25 只, 随机分成 5 组, 实验前禁食不禁水 12 h。对照组的大鼠尾静脉注射 GB; 实验组 I, II, III 预先尾静脉注射 CyA, 10 min 后尾静脉注射 GB; 实验组 IV 预先尾静脉注射伊曲康唑, 10 min 后尾静脉注射 GB。给药剂量<sup>[8,9]</sup>: GB 为 10  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , CyA 分别为 5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (实验组 I), 10

$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (实验组 II), 20  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (实验组 III), 伊曲康唑为 20  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (实验组 IV)。给予 GB 后开始计时, 分别于 2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 和 360 min 从眼眶取血。取出全血 150  $\mu\text{L}$ , 置肝素化试管中, 4 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 转移血浆 50  $\mu\text{L}$  至预先加有 2.5  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl 10  $\mu\text{L}$  的 1.5 mL 离心管, 置  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

**脑分布实验** 雄性 SD 大鼠 36 只, 随机分成 4 组, 实验前禁食不禁水 12 h。对照组的大鼠尾静脉注射 GB; 实验组预先通过尾静脉注射 CyA, 10 min 后尾静脉注射 GB。给药剂量: GB 为 10  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , CyA 分别为 5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (低剂量组), 10  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (中剂量组) 及 20  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (高剂量组)。给予 GB 后开始计时, 每组分别于 5, 20 和 60 min 股动脉放血处死 3 只大鼠 (每个时间点 3 只动物), 离心分离血浆并迅速取出脑组织吸干表面血液, 剪碎后称重并按 1:3 加入 2.5  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl 匀浆, 置  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

**肾排泄实验** 雄性 SD 大鼠 35 只, 随机分成 7 组。大鼠腹腔注射 20% 乌拉坦 (1  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 麻醉后, 背部固定于手术台上, 沿腹白线打开腹腔, 分离出两侧的输尿管, 插入聚乙烯管 (内径 0.58 mm)。对照组的大鼠尾静脉注射 GB; 实验组 I, II, III 预先尾静脉注射 CyA, 10 min 后尾静脉注射 GB; 实验组 IV, V, VI 则预先尾静脉分别注射维拉帕米, 地高辛及伊曲康唑, 10 min 后再静脉注射 GB。给药剂量: GB 为 10  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; CyA 分别为 5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (实验组 I), 10  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (实验组 II), 20  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (实验组 III); 维拉帕米为 3  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (实验组 IV); 地高辛为 2  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (实验组 V); 伊曲康唑为 20  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (实验组 VI)。给予 GB 后开始计时, 收集给药前及给药后 0~1, 1~2, 2~4, 4~8 h 的尿液, 用事先加有 2.5  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl 100  $\mu\text{L}$  的 1.5 mL 离心管收集尿液, 并记录尿液体积, 置  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

**数据处理** 应用 3P87 药代动力学软件 (由中国药理学学会数学药理委员会编制) 对药时曲线进行房室模型拟合, 求出药动学参数, 所得的药动学数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。用 SPSS 11.0 软件进行药动学参数的单因素方差统计分析。

## 结果

### 1 血浆样品中 GB 的 LC-MS 测定方法学考察

**1.1 方法的专属性** 在本实验条件下, GB 和内标均有良好的响应, 血浆样品提取后无杂质峰干扰样品和内标的测定, GB ( $m/z$  423.10) 和内标格列本脲

( $m/z$  492.10) 的保留时间分别约为 3.2 min 和 2.1 min (图 1)。说明该方法专属性较高。

**1.2 线性范围及灵敏度** 以样品浓度 ( $c$ ) 为横坐标, 样品峰面积与内标峰面积之比 ( $f$ ) 为纵坐标作线性回归, 得 GB 在血浆中的标准曲线回归方程为  $f = 2.009 9c - 0.020 4$ ,  $r^2 = 0.999 8$  ( $n = 9$ ), 线性范围为  $0.05 \sim 20.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。最低检测浓度为  $0.05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

**1.3 精密度、准确度及提取回收率** 当血浆 GB 质量浓度为 0.1, 1.0 和  $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 日内、日间精密度 (RSD) 均小于 10%, 准确度 (RE) 在  $-3.60\% \sim 10.0\%$  之间 (表 1); 提取回收率分别为  $(89.0 \pm 5.03)\%$ ,  $(84.2 \pm 3.1)\%$  和  $(98.6 \pm 9.2)\%$ 。可见该法可靠且重现性好。

**1.4 稳定性和基质效应考察** GB 因为其结构中存在内酯环, 所以其化学稳定性较差, 易水解, 在碱性条件下, 容易开环形成羧酸盐形式; 相反在酸性条件下, 易形成较稳定的闭环内酯形式<sup>[7]</sup>。在室温稳定性实验中也证实 GB 在碱性条件下不稳定, 未加酸血浆

(正常血浆  $\text{pH} = 7.35 \sim 7.45$ , 偏碱性) 样品 (质量浓度分别为  $0.1, 1.0$  和  $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 在室温放置 0, 2, 4 和 8 h 后, 高、中、低样品测得的平均质量浓度分别为  $6.73 \pm 2.51, 0.76 \pm 0.24$  及  $0.06 \pm 0.03 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 其 RSD 分别为 37.2%, 31.2% 及 58.2%。在研究 pH 对血浆 GB 稳定性影响实验中, 不同 pH 的血浆样品 (质量浓度为  $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 在室温放置 0, 2, 4 和 8 h 后测得的平均质量浓度分别为  $9.76 \pm 0.24$  (pH 5.0)、 $9.63 \pm 1.01$  (pH 6.0)、 $8.44 \pm 1.87$  (pH 7.0) 及  $6.73 \pm 2.51$  (pH 7.4)  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 其 RSD 分别为 2.4%, 10.5%, 22.1% 及 37.2%。实验结果表明: GB 在酸性条件下稳定, 当 pH 5.0 (50  $\mu\text{L}$  血浆样品中加入  $2.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl 10  $\mu\text{L}$ ) 时, 血浆样品的稳定性符合生物样品的测定要求, 故以 pH 5.0 进行样品稳定性实验。经考察血浆 GB 浓度测定在室温放置 8 h、反复冻融 2 次、 $-20^\circ\text{C}$  贮存 2 周和  $4^\circ\text{C}$  放置 12 h 等 4 种条件下, 其 RSD 分别为  $2.0\% \sim 4.8\%$ 、 $3.4\% \sim 12.3\%$ 、 $5.3\% \sim 15.5\%$ 、 $1.0\% \sim 4.1\%$ , 说明 GB 加酸后在各测定条件下均稳定。

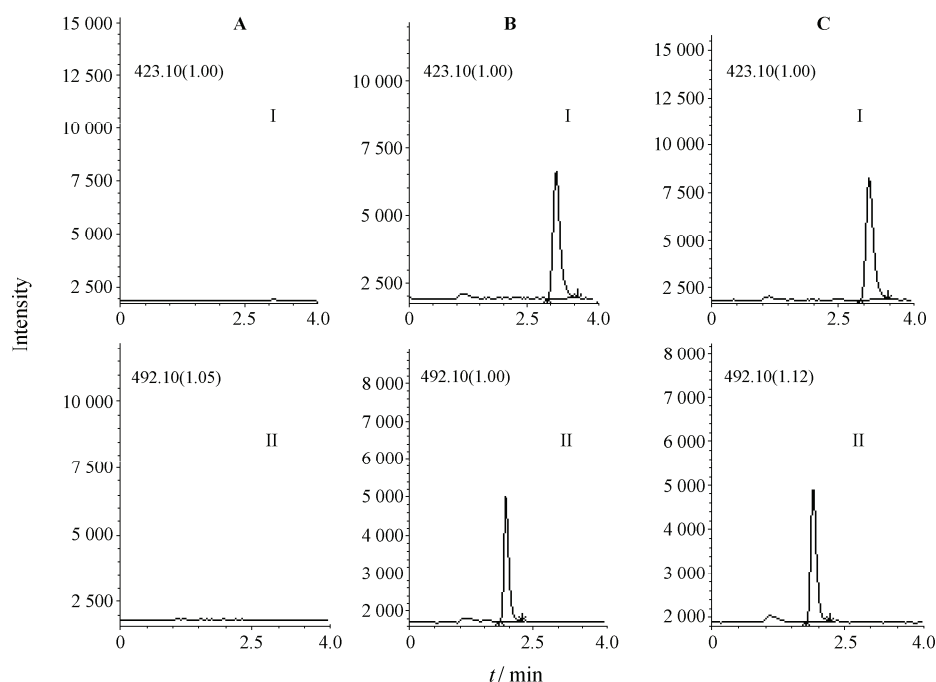
GB 及内标经液-液萃取处理后, 评价其基质效应均在  $90\% \sim 110\%$ , 表明本文的 LC-MS 条件可有效地避免大鼠血浆基质效应。

## 2 脑组织和尿液中 GB 的 LC-MS 测定方法学考察

GB 在脑组织匀浆中标准曲线的线性关系良好, 线性范围为  $0.01 \sim 10.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。以样品浓度 ( $c$ ) 为横坐标, 样品峰面积与内标峰面积之比 ( $f$ ) 为纵坐

**Table 1** Precision and accuracy for the analysis of GB in rat plasma.  $n = 3$

| Concentration / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ |       | RSD/%     |           | RE%   |
|--------------------------------------------------|-------|-----------|-----------|-------|
| Added                                            | Found | Intra-day | Inter-day |       |
| 0.1                                              | 0.11  | 2.12      | 9.96      | +10.0 |
| 1.0                                              | 0.99  | 3.47      | 3.87      | -1.0  |
| 10.0                                             | 9.64  | 3.73      | 0.96      | -3.6  |



**Figure 1** Typical chromatograms of ginkgolide B (GB) and glibenclamide (IS) in rat plasma by selective ion monitoring (SIM) mode. A: Blank plasma sample; B: Blank plasma spiked with GB at  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and IS at  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; C: Plasma sample obtained at 240 min after a single intravenous administration of  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  to rat. Peaks I and II refer to GB and IS, respectively

标作线性回归, 得标准曲线回归方程为  $f = 1.8138c - 0.0021$ ,  $r^2 = 0.9991$  ( $n = 10$ )。最低检测浓度为  $0.01 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 高、中、低 3 个浓度的日内、日间精密度的 RSD 均小于 10%, 回收率大于 50%, 符合生物样品的分析控制要求。

GB 在尿液中标准曲线的线性关系良好, 线性范围为  $0.01 \sim 50.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。以样品浓度 ( $c$ ) 为横坐标, 样品峰面积与内标峰面积之比 ( $f$ ) 为纵坐标作线性回归, 得标准曲线回归方程为  $f = 0.9706c - 0.01155$ ,  $r^2 = 0.9998$  ( $n = 9$ )。最低检测浓度为  $0.01 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 高、中、低 3 个浓度的日内、日间精密度的 RSD 均小于 10%, 回收率大于 50%, 符合生物样品的分析控制要求。

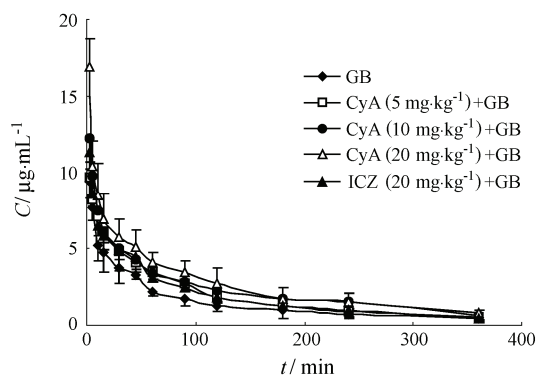
### 3 CyA 对 GB 药动学的影响

大鼠尾静脉注射 ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) GB 后的平均血药浓度-时间曲线见图 2, 经 3P87 程序进行数据处理, 大鼠静脉注射 GB 后的体内药动学过程均符合二房室模型, 主要药动学参数见表 2。从表中可以看出, 静脉注射高、中及低剂量的 CyA 均可增加 GB 的血药浓度水平, 减慢其消除过程; 而注射高剂量的伊曲康唑则未能对 GB 的药动学行为产生影响。高、中及低剂量 CyA 组的  $\text{AUC}_{0-360 \text{ min}}$  分别是对照组的 1.55 ( $P < 0.001$ ), 1.51 ( $P < 0.001$ ) 及 1.11 倍, 平均驻留时间 (MRT) 分别是对照组的 1.31, 1.27 及 1.07 倍, 而清除率 CL 则仅分别为对照组的 64% ( $P < 0.001$ ), 67% ( $P < 0.001$ ) 及 91%。

### 4 CyA 对 GB 脑分布的影响

在对照组大鼠中, GB 在脑部的浓度非常低, 尾静脉注射 GB ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 20 min 后脑部浓度仅为  $0.24 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。静脉给予不同剂量的 CyA 可以增加 GB 在大鼠脑部的分布(表 3)。静脉给予 CyA ( $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 后 5, 20 和 60 min 时脑中 GB 的浓度与对照组相比,

分别增加了 5.69, 6.01 及 2.73 倍 ( $P$  值均小于 0.001)。其他剂量的 CyA 也可以增加 GB 在脑部的分布水平, 但只有在 5 min 时的增加值才具有统计意义 ( $P < 0.001$ )。从脑中 GB 浓度与其对应时间点血药浓度的比值 ( $c_{\text{brain}}/c_{\text{plasma}}$ ) 也可以看出: 对照组各时间点  $c_{\text{brain}}/c_{\text{plasma}}$  值基本相似 ( $0.04 \sim 0.05$ ), 说明 GB 在大鼠脑和血浆中的分配比例稳定; CyA 可增加 GB 的透过, 此增加作用具有剂量依赖性。



**Figure 2** Plasma concentration-time profiles of GB after intravenous administration at a dose of  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  without and with different P-gp or CYP3A inhibitors in rats. P-gp or CYP3A inhibitors were administered intravenously 10 min prior to the administration of GB. CyA: Cyclosporine A; ICZ: Itraconazole.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 5 不同 P-gp 抑制剂对 GB 肾排泄的影响

大鼠尾静脉注射 GB ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 后在尿中 0~8 h 的累积排泄百分数见图 3。实验结果显示, 合用不同的 P-gp 抑制剂后, GB 在尿中的排泄量减少, 其中对照组 GB 8 h 累积排泄百分率为  $(39.32 \pm 8.87)\%$ ; CyA 高、中和低剂量组分别为  $(13.67 \pm 4.43)\%$ ,  $(19.64 \pm 2.21)\%$  和  $(30.29 \pm 3.86)\%$ ; 维拉帕米组为  $(23.34 \pm 3.89)\%$ , 地高辛组为  $(31.35 \pm 2.62)\%$ , 伊

**Table 2** Pharmacokinetic parameters of GB after intravenous administration at a dose of  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  without and with different P-gp or CYP3A inhibitors in rats

| Parameter                                                                        | GB               | GB + CyA ( $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) | GB + CyA ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) | GB + CyA ( $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) | GB + ICZ ( $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) |
|----------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| $t_{1/2\alpha} / \text{min}$                                                     | $3.7 \pm 3.0$    | $7.9 \pm 4.8$                                  | $5.6 \pm 2.8$                                   | $4.2 \pm 3.1$                                   | $2.8 \pm 1.2$                                   |
| $t_{1/2\beta} / \text{min}$                                                      | $92.3 \pm 27.8$  | $82.9 \pm 13.7$                                | $120.8 \pm 21.9$                                | $103.9 \pm 28.8$                                | $73.8 \pm 18.4$                                 |
| $\text{AUC}_{0-360 \text{ min}} / \text{min}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | $666.4 \pm 61.5$ | $732.1 \pm 68.1$                               | $1007.7 \pm 132.5^{***}$                        | $1036.1 \pm 162.2^{***}$                        | $697.4 \pm 94.8$                                |
| MRT / min                                                                        | $147.0 \pm 45.1$ | $157.7 \pm 30.1$                               | $186.5 \pm 49.7$                                | $193.0 \pm 33.7$                                | $132.4 \pm 36.1$                                |
| $V_z / \text{L}$                                                                 | $0.13 \pm 0.05$  | $0.16 \pm 0.04$                                | $0.14 \pm 0.03$                                 | $0.09 \pm 0.02$                                 | $0.18 \pm 0.03$                                 |
| CL / $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$                                             | $15.1 \pm 1.5$   | $13.7 \pm 1.2$                                 | $10.1 \pm 1.4^{***}$                            | $9.6 \pm 1.4^{***}$                             | $17.1 \pm 3.7$                                  |
| F / %                                                                            |                  | $109.9 \pm 10.2$                               | $151.2 \pm 19.9$                                | $155.5 \pm 24.3$                                | $104.7 \pm 14.2$                                |

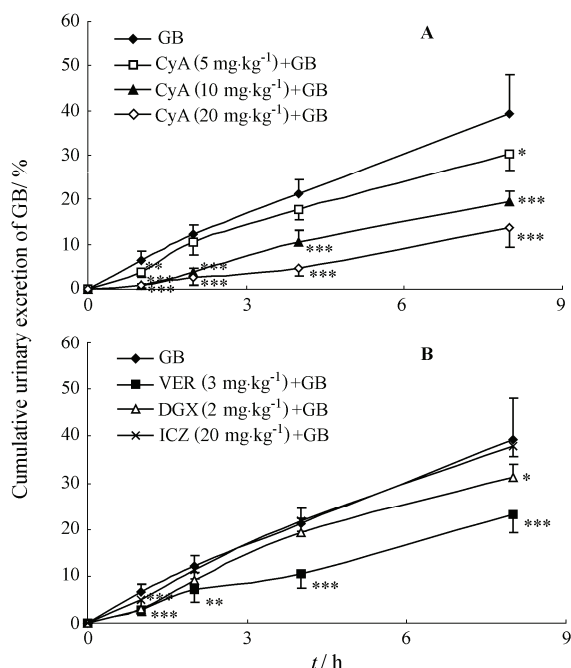
P-gp or CYP3A inhibitors were administered intravenously 10 min prior to the administration of GB.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\*\* $P < 0.001$  vs GB

**Table 3** Effect of different doses of CyA on the brain distribution of GB after intravenous administration of GB (10 mg·kg<sup>-1</sup>)

|        | Time                               | Brain concentration /μg·g <sup>-1</sup> | Plasma concentration /μg·mL <sup>-1</sup> | C <sub>brain</sub> /C <sub>plasma</sub> /mL·g <sup>-1</sup> |
|--------|------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 5 min  | GB                                 | 0.37 ± 0.15                             | 7.86 ± 0.38                               | 0.05 ± 0.02                                                 |
|        | GB + CyA (5 mg·kg <sup>-1</sup> )  | 1.21 ± 0.14***                          | 8.97 ± 0.23                               | 0.13 ± 0.02***                                              |
|        | GB + CyA (10 mg·kg <sup>-1</sup> ) | 1.42 ± 0.08***                          | 11.24 ± 1.51*                             | 0.13 ± 0.01**                                               |
|        | GB + CyA (20 mg·kg <sup>-1</sup> ) | 2.09 ± 0.22***                          | 11.52 ± 1.45**                            | 0.18 ± 0.02***                                              |
| 20 min | GB                                 | 0.24 ± 0.02                             | 5.59 ± 0.41                               | 0.04 ± 0.01                                                 |
|        | GB + CyA (5 mg·kg <sup>-1</sup> )  | 0.43 ± 0.22                             | 6.55 ± 0.56                               | 0.07 ± 0.03                                                 |
|        | GB + CyA (10 mg·kg <sup>-1</sup> ) | 0.57 ± 0.17                             | 7.27 ± 0.62*                              | 0.08 ± 0.02                                                 |
|        | GB + CyA (20 mg·kg <sup>-1</sup> ) | 1.45 ± 0.62**                           | 7.94 ± 0.81**                             | 0.18 ± 0.08*                                                |
| 60 min | GB                                 | 0.18 ± 0.02                             | 3.90 ± 0.27                               | 0.04 ± 0.01                                                 |
|        | GB + CyA (5 mg·kg <sup>-1</sup> )  | 0.24 ± 0.03                             | 4.48 ± 0.40                               | 0.06 ± 0.01                                                 |
|        | GB + CyA (10 mg·kg <sup>-1</sup> ) | 0.27 ± 0.02                             | 4.56 ± 0.70                               | 0.07 ± 0.01                                                 |
|        | GB + CyA (20 mg·kg <sup>-1</sup> ) | 0.48 ± 0.09***                          | 5.30 ± 0.47                               | 0.12 ± 0.02***                                              |

$n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs each control group

曲康唑组则为 (37.78 ± 2.18) %。统计结果显示: 高、中剂量 CyA 及维拉帕米均可显著降低 GB 8 h 的尿药排泄量 ( $P < 0.001$ ); 低剂量 CyA 及地高辛对 GB 8 h 的尿药排泄量也有明显的降低作用 ( $P < 0.05$ ); 而伊曲康唑组与对照组相比无显著性差异。



**Figure 3** Urinary excretion-time profiles of GB after intravenous administration at a dose of 10 mg·kg<sup>-1</sup> without or with different P-gp or CYP3A inhibitors in rats. P-gp or CYP3A inhibitors were administered intravenously 10 min prior to the administration of GB. A: Cyclosporine A (CyA) at different doses; B: Other P-gp or CYP3A inhibitors: verapamil (VER), digoxin (DGX), itraconazole (ICZ).  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control (GB)

## 讨论

MDR1 基因 (*ABCI*) 表达产物 P-gp 是人体药物处置中最重要的 ABC 族转运体, 其底物特异性广泛, 包括柔红霉素、紫杉醇、长春新碱等抗癌药; 那韦类 HIV 蛋白酶抑制剂; 免疫抑制剂 CyA; 钙拮抗剂维拉帕米; 强心药地高辛等临床广泛使用的药物<sup>[5, 10]</sup>。目前认为, P-gp 不仅与肿瘤细胞多药耐药机制有关, 它还能对底物药物的口服吸收、生物利用度、组织分布及消除过程产生显著影响<sup>[11]</sup>。P-gp 在体内分布广泛, 人体与药物处置相关的重要组织器官如肠道、肝脏、肾脏均有其表达。在肠道, P-gp 主要表达于绒毛端肠上皮细胞的刷状缘膜, 它可将药物从肠浆膜侧外排至肠腔侧, 限制药物的吸收<sup>[12]</sup>。分布于肝细胞胆管侧膜及肾近端小管细胞刷状缘膜的 P-gp 可以促进将血液循环中的药物外排到胆汁和尿液中, 加速药物的排泄<sup>[13]</sup>。在脑部, 血-脑屏障内皮细胞腔膜面侧存在的 P-gp 参与了其屏障作用, 限制了许多药物进入大脑<sup>[14]</sup>。近年来, 随着中草药日趋广泛应用, 与西药合用亦日趋增多, 由此产生的严重不良反应的报道亦随之增加。研究发现, 许多中草药能改变药物代谢酶及转运体的表达, 从而对与其合用药物的体内过程产生影响。P-gp 具有广泛的组织分布和底物特异性, 不同 P-gp 底物合用极易产生相互作用。目前, 一些常用中草药如贯叶连翘、人参、姜黄、水飞蓟等均能影响 P-gp 的活性, 因此对 P-gp 介导的药物相互作用的研究对指导临床合理用药有着极其重要的意义<sup>[15]</sup>。FDA 在其药物相互作用研究指导原则中建议, 在候选药物研发的早期就要进行是否为 P-gp 底物的研究, 以预防可能产生的相互作用, 提高用药的安全性<sup>[16]</sup>。



近年来的研究<sup>[17,18]</sup>表明 PAF 为 P-gp 的底物,并且 PAF 与肿瘤细胞多药耐药现象的发生有密切关系。Leusch 等<sup>[19]</sup>应用基因敲除动物模型研究发现 PAF 拮抗剂阿帕泛 (apafant, 抗凝药) 为 P-gp 底物。多种天然二萜内酯类化合物也是 P-gp 的底物,能直接与 P-gp 的核苷结合位作用,抑制 P-gp 的 ATP 酶活性,阻断 P-gp 介导的其他药物的外排<sup>[20,21]</sup>。GB 为天然二萜内酯类 PAF 拮抗剂,而它正作为主要治疗心、脑血管疾病的 I 类新药进行开发,故有必要考察其是否为 P-gp 的底物,从而对其进行安全性评价,预测它与其他药物间的相互作用,为临床合理用药提供参考。

本实验以 CyA、维拉帕米及地高辛为 P-gp 抑制剂,考察大鼠单剂量给予 P-gp 抑制剂后对单次给予 GB 药动学的影响,并对其机制进行分析。据文献<sup>[22]</sup>报道,GB 在大鼠体内主要经 CYP2D6 酶代谢,再由尿液、粪便排出体外,且尿液是其主要排泄途径。GB 在大鼠体内药动学研究结果表明,预先尾静脉注射给予 CyA ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  及  $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 可以显著性提高 GB 的血药浓度水平。肾排泄结果表明,合用 CyA 后 GB 的  $\text{AUC}_{0-360 \text{ min}}$  及绝对生物利用度的增加主要是由于 CyA 抑制了 GB 的肾排泄引起的。此抑制作用并不是因为合用 CyA 减少了肾血流量的原因,因为该剂量的 CyA ( $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 对菊粉清除率 (肾小球滤过率, GFR) 不能产生影响<sup>[23]</sup>。合用其他 P-gp 抑制剂如维拉帕米、地高辛也能抑制 GB 的肾排泄,说明此抑制作用是通过抑制肾 P-gp 而产生的。由于 CyA 为 P-gp 的非特异性抑制剂,它对 CYP3A 也有较强的抑制作用,为排除合用 CyA 后 GB 的药动学变化是因为 CyA 抑制 CYP3A 活性从而抑制 GB 代谢所产生的,本实验选择了伊曲康唑 (CYP3A 的强抑制剂)<sup>[16,24]</sup>为阳性对照药进行抑制 CYP3A 对 GB 药动学影响的研究,实验结果表明合用伊曲康唑与单用 GB 的药动学性质基本相似,其 8 h 累积肾排泄结果也与 GB 对照组相似,说明合用 CyA 后 GB 的药动学变化并不是由于 CyA 抑制 CYP3A 对 GB 代谢而产生的。GB 具有较好的脂溶性及合适的相对分子质量 (424.4),理论上应很容易透过血-脑屏障,但临床前药动学研究发现其很难进入大脑 ( $K_{\text{plasma,brain}} \ll 1$ )<sup>[6]</sup>。脑分布结果显示,高、中、低剂量的 CyA 均可增加 GB 在大鼠脑中的分布水平,此增加作用具有浓度时间依赖性,说明合用 P-gp 抑制剂可以通过抑制脑 P-gp 的外排增加 GB 在大鼠脑中的分布。

CyA 是一种强效的免疫抑制剂,在临床上广泛用于器官移植和免疫性疾病的治疗,常与 GB 合用来

增强免疫抑制作用,预防移植患者产生移植排斥反应,减轻 CyA 服用产生的肾毒性<sup>[3,4]</sup>。但目前的研究主要集中在 GB 对 CyA 药理及药动学性质的影响上,而未见 CyA 对 GB 药动学影响的报道。本实验首次研究了合用 CyA 对 GB 在大鼠体内药动学的影响,通过对合用 CyA 对 GB 药动学影响的解析,可以进一步阐释 CyA 与 GB 合用的药动学机制。本实验研究发现,合用 CyA 后可以显著减少 GB 的肾排泄,增加 GB 的脑分布,提高 GB 的血药浓度水平,延长 GB 在体内的停留时间,可以更有效地发挥 GB 的肾脏保护作用。在临床上,心血管治疗药物与治疗脑血管的药物常合用。许多心血管药物如钙拮抗剂维拉帕米、强心药地高辛及抗心律失常药奎尼丁等都是 P-gp 的底物或抑制剂<sup>[5]</sup>,因此临床 GB 与这些药物合用时应注意预防 P-gp 介导的药物相互作用。当 GB 与具有较窄治疗窗的药物如地高辛等合用时,可能会产生难以预计的后果,因此还需进一步的临床实验来确定合用可能产生的相互作用,以确保临床用药安全。

## 结论

大鼠静脉给予 P-gp 抑制剂 CyA 可以显著提高 GB 的血药浓度水平,这可能是由于 CyA 通过抑制 P-gp 功能而减少肾脏对 GB 排泄而引起的。此外, CyA 还可以抑制脑 P-gp 对 GB 的外排,增加 GB 在脑中的分布。

## References

- [1] Xia SH, Fang DC. Pharmacological action and mechanisms of ginkgolide B [J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120: 922–928.
- [2] MacIennan KM, Darlington CL, Smith PF. The CNS effects of *Ginkgo biloba* extracts and ginkgolide B [J]. Prog Neurobiol, 2002, 67: 235–257.
- [3] Pignol B, Henane S, Pirotzky E, et al. Potentiation of immunosuppressive action of cyclosporine A by platelet-activating factor antagonists: an approach of the mechanism of action of these drugs in the prevention of graft rejection [J]. Transplant Proc, 1988, 20: 259–265.
- [4] Bagnis C, Deray G, Dubois M, et al. Prevention of cyclosporin nephrotoxicity with a platelet-activating factor (PAF) antagonist [J]. Nephrol Dial Transplant, 1996, 11: 507–513.
- [5] Su CY. Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics and its clinical implications [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2005, 40: 673–679.
- [6] Chen WD, Liang Y, Xie L, et al. Pharmacokinetics of the ginkgo B following intravenous administration of ginkgo B emulsion in rats [J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30: 1–5.

- [7] Lv H, Wang GJ, Li H, et al. Sensitive and selective liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry analysis of ginkgolide B in dog plasma [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 40: 88–94.
- [8] Fanta S, Jönsson S, Backman JT, et al. Developmental pharmacokinetics of ciclosporin—a population pharmacokinetic study in paediatric renal transplant candidates [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2007, 64: 772–784.
- [9] Dong J, Yu X, Wang L, et al. Effects of cyclosporin A and itraconazole on the pharmacokinetics of atorvastatin in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29: 1247–1252.
- [10] Aszalos A. Drug-drug interactions affected by the transporter protein, P-glycoprotein (ABCB1, MDR1) II. Clinical aspects [J]. *Drug Discov Today*, 2007, 12: 838–843.
- [11] Hoffmann U, Kroemer HK. The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance [J]. *Drug Metab Rev*, 2004, 36: 669–701.
- [12] Gao K, Sun J, He ZG. Significant role of intestinal transporters in drug absorption [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2006, 41: 97–102.
- [13] Sun J, Sun YB, He ZG. Significant role of transporters in drug hepatobiliary transport [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2005, 40: 680–685.
- [14] Schinkel AH. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1999, 36: 179–194.
- [15] Pal D, Mitra AK. MDR- and CYP3A4-mediated drug-herbal interactions [J]. *Life Sci*, 2006, 78: 2131–2145.
- [16] Huang SM, Temple R, Throckmorton DC, et al. Drug interaction studies: study design, data analysis, and implications for dosing and labeling [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 81: 298–304.
- [17] Ernest S, Bello-Reuss E. Secretion of platelet-activating factor is mediated by MDR1 P-glycoprotein in cultured human mesangial cells [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1999, 10: 2306–2313.
- [18] Raggars RJ, Vogels I, van Meer G. Multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) secretes platelet-activating factor [J]. *Biochem J*, 2001, 357: 859–865.
- [19] Leusch A, Volz A, Müller G, et al. Altered drug disposition of the platelet activating factor antagonist apafant in *mdr1a* knockout mice [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2002, 16: 119–128.
- [20] Ferreira MJ, Gyémánt N, Madureira AM, et al. Inhibition of P-glycoprotein transport activity in a resistant mouse lymphoma cell line by diterpenic lactones [J]. *Anticancer Res*, 2005, 25: 3259–3262.
- [21] Molnár J, Gyémánt N, Tanaka M, et al. Inhibition of multidrug resistance of cancer cells by natural diterpenes, triterpenes and carotenoids [J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12: 287–311.
- [22] Wang DL, Liang Y, Chen WD, et al. Identification of ginkgolide B metabolites in urine and rat liver cytochrome P450 enzymes responsible for their formation *in vitro* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29: 376–384.
- [23] Huang ZH, Murakami T, Okochi A, et al. Expression and function of P-glycoprotein in rats with glycerol-induced acute renal failure [J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, 406: 453–460.
- [24] Ohno Y, Hisaka A, Suzuki H. General framework for the quantitative prediction of CYP3A4-mediated oral drug interactions based on the AUC increase by coadministration of standard drugs [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2007, 46: 681–696.