# 细胞色素 P450 CYP2C9 * 3对格列本脲和氯诺昔康中国人体药代动力学的影响

张逸凡[1], 陈笑艳[1], 郭颖杰[2], 司大勇[2], 周 慧[2], 钟大放[1,2*]

(1. 沈阳药科大学 药物代谢与药代动力学实验室, 辽宁 沈阳 110016;
2. 吉林大学 生命科学学院, 吉林 长春 130023)

**摘要**: **目的** 研究人体内细胞色素 P450 2C9酶突变等位基因 *CYP2C9 * 3*对格列本脲和氯诺昔康药代动力学的影响。**方法** 采用 PCR-RFLP方法对 83名无血源关系的受试者进行 *CYP2C9 * 3*等位基因的筛查,基因型为 *CYP2C9 * 1 / * 3* ($n = 7$)和 * 1 / * 1 ($n = 11$)的受试者分别参加了格列本脲和氯诺昔康的人体药代动力学试验。采用 LC/MS/MS法分别测定受试者口服格列本脲 (2.5 mg)和氯诺昔康 (8 mg)后不同时刻血浆中格列本脲和氯诺昔康的浓度。**结果** 两组受试者口服格列本脲后, *CYP2C9 * 1 / * 3*组 $AUC_{0-\infty}$显著增加,为 *CYP2C9 * 1 / * 1*组的 1.5倍, CL / *F*降低了 40%;两组受试者口服氯诺昔康后, *CYP2C9 * 1 / * 3*组 $AUC_{0-\infty}$亦显著增加,为 *CYP2C9 * 1 / * 1*组的 2.2倍, CL / *F*降低了 55%。**结论** CYP2C9酶的突变等位基因 *CYP2C9 * 3*对格列本脲和氯诺昔康的药代动力学有显著性影响。

**关键词**: 氯诺昔康; 格列本脲; 细胞色素 P450 CYP2C9; 药代动力学; 遗传多态性
**中图分类号**: R963; R969.1 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513 - 4870 (2005) 09 - 0796 - 04

# Impact of cytochrome P450 CYP2C9 variant allele CYP2C9 * 3 on the pharmacokinetics of glibenclamide and lornoxicam in Chinese subjects

ZHANG Yi-fan[1], CHEN Xiao-yan[1], GUO Ying-jie[2], SI Da-yong[2], ZHOU Hui[2], ZHONG Da-fang[1,2*]

(1. *Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;*
2. *College of Life Science, Jilin University, Changchun 130023, China*)

**Abstract: Aim** To investigate the impact of *CYP2C9 * 3* on the pharmacokinetics of glibenclamide and lornoxicam. **Methods** *CYP2C9 * 3* was measured in 83 non-related Chinese subjects by PCR-RFLP. The pharmacokinetics of lornoxicam and glibenclamide were investigated in 18 subjects (7 with *CYP2C9 * 1 / * 3* genotype and 11 with * 1 / * 1 genotype). Glibenclamide and lornoxicam in plasma were determined by the sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry, separately. **Results** After a single oral dose of 2.5 mg glibenclamide, $C_{max}$ was (70.0 ±11.5) μg · $L^{-1}$ in *CYP2C9 * 1 / * 3* subjects and (51.9 ±12.3) μg · $L^{-1}$ in * 1 / * 1 subjects. $AUC_{0-\infty}$ were (435 ±47) *vs* (287 ±95) μg · h · $L^{-1}$ (in * 1 / * 3 *vs* * 1 / * 1 subjects), and CL / *F* were (96 ±9.3) *vs* (160 ±51) mL · $min^{-1}$, respectively. Statistic analysis results indicated that glibenclamide $AUC_{0-\infty}$ was significantly higher (1.5-fold) and subsequently CL / *F* was significantly lower (40%) in *CYP2C9 * 1 / * 3* subjects than those in * 1 / * 1 subjects ($P < 0.01$). After a single oral dose of 8 mg lornoxicam, $C_{max}$ was (1.54 ±0.24) mg · $L^{-1}$ in *CYP2C9 * 1 / * 3* subjects and (1.19 ±0.37) mg · $L^{-1}$ in * 1 / * 1 subjects. $AUC_{0-\infty}$ were (14.9 ±2.2) *vs* (6.92 ±1.48) mg · h · $L^{-1}$ (in * 1 / * 3 *vs* * 1 / * 1 subjects), and CL / *F* were

**收稿日期**: 2004-10-20.
**基金项目**: 国家高技术研究发展计划 (863计划)资助项目 (2003AA2Z347C).
*通讯作者 Tel / Fax: 86 - 24 - 23902539, E-mail: zhongdf@china.com

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

(9.1 ±1.2) *vs* (20.1 ±4.6) mL · min$^{-1}$, respectively. Statistic analysis results indicated that lornoxicam $AUC_{0-\infty}$ was significantly higher (2.2-fold) and subsequently CL/*F* was significantly lower (55%) in *CYP2C9* * *1*/* *3* subjects than those in * *1*/* *1* subjects ($P$ <0.001). **Conclusion** *CYP2C9* * *3* greatly affects both the pharmacokinetic profiles of glibenclamide and lornoxicam. The elimination of these drugs significantly decreased in subjects with *CYP2C9* * *1*/* *3* genotype, especially lornoxicam.

**Key words:** lornoxicam; glibenclamide; CYP2C9; pharmacokinetics; polymorphism

细胞色素 P4502C9酶是细胞色素 P450酶家族中的重要成员,其含量约占肝微粒体 P450总量的 20%,催化了约 12%的临床常用药物[1]。*CYP2C9* 基因在人群中存在遗传多态性,较常见的等位基因有 *CYP2C9* * *1*, *CYP2C9* * *2*和 *CYP2C9* * *3*。体内及体外试验研究表明 *CYP2C9* * *2*和 *CYP2C9* * *3*会改变 CYP2C9酶对某些底物的催化活性, *CYP2C9* * *3* 更为明显[2]。其结果是延长药物的血浆消除半衰期,降低药物的清除率,对于一些治疗指数窄的药物,多次给药会增加不良反应发生的风险。

CYP2C9酶基因遗传多态性对药物的影响具有底物专属性,已有文献[2,3]报道 *CYP2C9* * *3*会降低华法林、苯妥英和一些降糖药如格列本脲、格列美脲的药物清除率,但亦有文献[4]报道同为 CYP2C9酶底物,非甾体抗炎药双氯芬酸则不受 CYP2C9酶基因型的影响。氯诺昔康为新型非甾体抗炎药,药代动力学个体差异较大[5]。体外试验表明 CYP2C9酶参加了该药的代谢反应[6]。为了探讨个体差异较大的原因,本试验研究了不同 CYP2C9酶基因型对该药药代动力学的影响,同时亦进行了格列本脲的药代动力学对照研究,对 CYP2C9基因型对两药药代动力学影响进行了比较。

## 材料与方法

**受试者的选择** 83名无血源关系的健康男性参加了 CYP2C9酶的基因型筛查,年龄在 19～24岁,无重大疾病史,也不常服用药物。该批受试者在进行本试验之前,已经进行过 *CYP2C9* * *13*等位基因的筛查[7]。基因型筛查后,有 18名受试者参加了格列本脲和氯诺昔康的药代动力学试验。这 18名受试者的年龄 (22.3 ±1.4)岁,身高 (171.1 ±3.6) cm,体重 (63.5 ±6.1) kg。在药代动力学试验前,受试者均接受全面体格检查,结果均属正常。所有参加基因型筛查和药代动力学试验的受试者均签署了书面的知情同意书,经辽宁省人民医院伦理委员会批准。

**CYP2C9酶基因型筛查** 取全血 300 μL,采用全血 DNA纯化系统 (华美公司,中国)提取全血 DNA。根据文献[2]报道 *CYP2C9* * *2*在东方人中罕见,因此未进行该等位基因筛查。*CYP2C9* * *3*等位基因的筛查参照文献 [8]报道的 PCR-RFLP方法,采用错配 PCR的方法引入 1个 Kpn 酶切位点。设计的引物为 5′-TGCACGAGGTCCAGAGGTAC-3′和 5′-CTATGAATTTGGGGACTTCG-3′。扩增序列 152 bp。PCR反应体系为 50 μL; Taq酶 1.5 U和其附带缓冲液 (宝生物公司,中国), dNTP 0.2 mmol · L$^{-1}$,正义和反义引物各 1.5 μmol · L$^{-1}$,全血 DNA 1 μL。PCR扩增出的 *CYP2C9* * *3*型错配序列可被 Kpn I 酶切断,形成 134 bp和 18 bp两个片断。切割产物 2.5%琼脂糖凝胶电泳 1 h检测。

**格列本脲的药代动力学试验** 受试者服药前均需空腹至少 10 h,试验当日早晨受试者空腹口服格列本脲片 2.5 mg(广东华南制药厂生产),用 20%葡萄糖水 250 mL吞服。4 h和 10 h统一进清淡饮食。为防止受试者服药后低血糖,0～4 h每隔 30 min给予 20%葡萄糖水 60 mL。受试者于服药前及服药后 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24和 36 h于前臂静脉取血 4.5 mL,立即移入经肝素处理的试管中, 3 500 r · min$^{-1}$离心 10 min,分离血浆后,于 -20 ℃冰箱中冷冻保存待测。

**氯诺昔康的药代动力学试验** 于格列本脲药代动力学试验结束 1周后进行试验。受试者服药前均需空腹至少 10 h,试验当日早晨受试者空腹口服氯诺昔康分散片 8 mg(北京上地新世纪生物医药研究所提供),用纯净水 250 mL送服。4 h和 10 h统一进清淡饮食。受试者于服药前及服药后 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 10, 13和 24 h于前臂静脉取血 4 mL。样品处理与格列本脲的药代动力学试验相同。

**格列本脲的血浆样品分析** 参照文献 [9]方法,建立了测定血浆中格列本脲的液相色谱-串联质谱法。格列本脲对照品由沈阳双鼎制药有限公司提供,含量 >99.5%。美国 Finnigan公司 TSQ型液相色谱-质谱-质谱联用仪,色谱柱为 Zorbax XDB $C_8$

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

柱。内标为格列齐特,提取溶剂为正己烷-二氯甲烷(1∶1, v/v),流动相为乙腈-水-甲酸(80∶20∶0.5)。大气压化学电离源(APCI)、选择反应监测(SRM)用于定量的离子反应为 m/z 494→369(格列本脲)和 m/z 324→127(格列齐特)。该方法的标准曲线线性范围为 0.5～500 μg·L$^{-1}$ ($r$ > 0.998),最低定量质量浓度为 0.5 μg·L$^{-1}$。在 1.0, 40和 400 μg·L$^{-1}$ 质量浓度下日间和日内精密度小于 5.4%,准确度在 98.3%～102.3%。

**氯诺昔康的血浆样品分析** 采用文献[9]中已报道的液相色谱-串联质谱法。氯诺昔康对照品由北京上地新世纪生物医药研究所提供,含量 >99.5%。该方法的标准曲线线性范围 2.0～1 600 μg·L$^{-1}$ ($r$ > 0.998),最低定量浓度为 2.0 μg·L$^{-1}$。在 5.0, 100和 1 000 μg·L$^{-1}$浓度下日间和日内精密度小于 7.0%,准确度在 98.1%～98.5%。

**药代动力学参数的计算与统计分析** 采用梯形法计算药-时曲线下面积(AUC),经半对数作图法,由消除相 4个浓度点计算消除速率常数($k_e$),药物血浆消除半衰期 $T_{1/2} = 0.693/k_e$; $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_t/k_e$, $C_t$是最后一个可测得浓度点的血药浓度。$CL/F = D/AUC_{0-\infty}$, $D$为给药剂量。

采用 $t$检验对不同基因型之间的药代动力学参数进行统计分析(AUC和 $C_{max}$在进行统计前需先进行对数转换)。

## 结果

### 1 CYP2C9酶基因型筛查结果

83名健康无血源关系的男性受试者中,有 7名受试者基因型为 *CYP2C9 * 1/ * 3*。*CYP2C9 * 3*的等位基因频率为 4.22%。其余受试者均为 *CYP2C9 * 1*的纯合子。7名基因型为 *CYP2C9 * 1/ * 3*和 11名(随机选择)基因型为 *CYP2C9 * 1/ * 1*的受试者参加了格列本脲和氯诺昔康的药代动力学试验。

### 2 格列本脲的药代动力学

图 1给出了基因型为 *CYP2C9 * 1/ * 3*和 ** 1/ * 1*的两组受试者口服格列本脲 2.5 mg后格列本脲的血药浓度-时间曲线。表 1为两组受试者的药代动力学参数。*CYP2C9 * 1/ * 3*组受试者 $AUC_{0-\infty}$为 ** 1/ * 1*组的 1.5倍, CL/F比 ** 1/ * 1*组降低了 40%。

### 3 氯诺昔康的药代动力学

图 2给出了基因型为 *CYP2C9 * 1/ * 3*和 ** 1/ * 1*的两组受试者口服氯诺昔康 8 mg后氯诺昔康的血药浓度-时间曲线。表 2为两组受试者的药代动力学参数。*CYP2C9 * 1/ * 3*组受试者 $AUC_{0-\infty}$为 ** 1/ * 1*组的 2.2倍, CL/F比 ** 1/ * 1*组降低了 55%。其血浆药物消除半衰期($T_{1/2}$)明显延长($P$ < 0.001)。

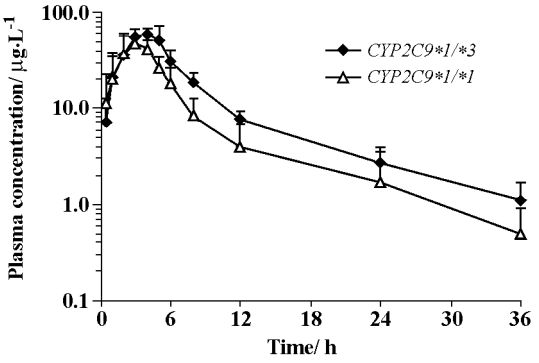


**Figure 1** Mean plasma concentration-time curves of glibenclamide in subjects with *CYP2C9 * 1/ * 1* genotype ($n$ = 11) and *CYP2C9 * 1/ * 3* genotype ($n$ = 7) after a single oral dose of 2.5 mg glibenclamide ($\bar{x} \pm s$)

**Table 1** Pharmacokinetic parameters of glibenclamide in different groups ($\bar{x} \pm s$)

| Parameter | *CYP2C9 * 1/ * 1* ($n$ = 11) | *CYP2C9 * 1/ * 3* ($n$ = 7) |
|---|---|---|
| $AUC_{0-t}$/μg·L$^{-1}$·h | 281 ±93 | 424 ±43** |
| $AUC_{0-\infty}$/μg·L$^{-1}$·h | 287 ±95 | 435 ±47** |
| $C_{max}$/μg·L$^{-1}$ | 52 ±12 | 70 ±12** |
| $T_{max}$/h | 3.0 ±0.6 | 3.7 ±1.0 |
| $T_{1/2}$/h | 6.2 ±2.3 | 6.7 ±2.0 |
| (CL/F)/mL·min$^{-1}$ | 160 ±51 | 96 ±9** |

** $P$ < 0.01 *vs CYP2C9 * 1/ * 1*

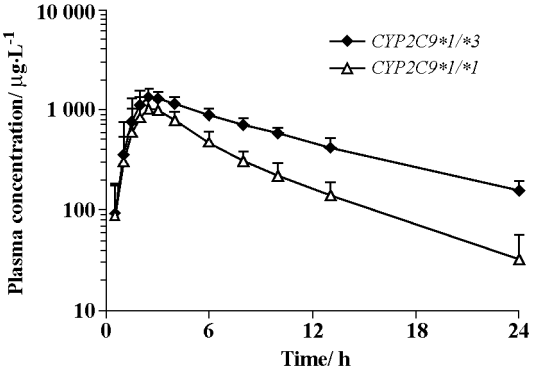


**Figure 2** Mean plasma concentration-time curves of lornoxicam in subjects with *CYP2C9 * 1/ * 1* genotype ($n$ = 11) and *CYP2C9 * 1/ * 3* genotype ($n$ = 7) after a single oral dose of 8 mg lornoxicam ($\bar{x} \pm s$)

### 4 安全性

临床试验在辽宁省人民医院进行。试验期间,由医生和护士对受试者进行临床监护,严格执行不

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

良反应报告制度。在整个试验过程中,未发现与两药物有关的不良反应,两药耐受性良好。

**Table 2** Pharmacokinetic parameters of lornoxicam in different groups ($\bar{x} \pm s$)

| Parameter | *CYP2C9* * *1* / * *1* ($n$ = 11) | *CYP2C9* * *1* / * *3* ($n$ = 7) |
|---|---|---|
| $AUC_{0-t}$ /mg · $L^{-1}$ · h | 6.7 ± 1.3 | 13.1 ± 1.7*** |
| $AUC_{0-\infty}$ /mg · $L^{-1}$ · h | 6.9 ± 1.5 | 14.9 ± 2.2*** |
| $C_{max}$ /mg · $L^{-1}$ | 1.19 ± 0.37 | 1.54 ± 0.24* |
| $T_{max}$ /h | 2.6 ± 0.4 | 2.6 ± 0.8 |
| $T_{1/2}$ /h | 4.8 ± 1.1 | 7.4 ± 1.0*** |
| (CL/*F*) /mL · $min^{-1}$ | 20.1 ± 4.6 | 9.1 ± 1.2*** |

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ *vs CYP2C9* * *1* / * *1*

## 讨论

西方人中约有三分之一人群携带有 *CYP2C9* * *2* 和 * *3*等位基因。在东方人中,*CYP2C9* * *2*罕见,本试验中 *CYP2C9* * *3*的基因频率为 4.22%,略高于文献[2]报道。近期本实验室在 1名氯诺昔康的慢代谢者身上发现了新的 *CYP2C9*突变等位基因 (*CYP2C9* * *13*),其等位基因频率为 1.06%[7]。该慢代谢者是 *CYP2C9* * *3*和 * *13*的杂合子,其对氯诺昔康的药物清除率约为正常人的 1/50[11]。为排除 * *13*的影响,本试验亦进行了 * *13*的筛查,在 18名参加药代动力学试验的受试中未发现 * *13* 的携带者。*CYP2C9* * *13*等位基因的发现增加了 CYP2C9酶代谢缺陷的频率。与 CYP2C19酶的遗传多态性不同,CYP2C9酶的代谢缺陷对底物的影响较大,可使药物清除率降低为正常的 1/10～1/20[1],因此,对于弱代谢者,使用华法林、苯妥英和降糖药的不良反应发生的风险可能更大。

本试验对同一批经过基因型筛查的受试者进行了格列本脲和氯诺昔康的药代动力学的比较研究。其结果表明,*CYP2C9* * *3*对格列本脲和氯诺昔康的药代动力学行为均有显著的影响。此结果与文献[3]中关于格列本脲的报道是一致的。但 *CYP2C9* * *3*对氯诺昔康药代动力学的影响则更为明显。在格列本脲试验中,*CYP2C9* * *1* / * *3*组受试者其格列本脲 $AUC_{0-\infty}$为 * *1* / * *1*组的 1.5倍,清除率降低了 40%;而同一批受试者,在氯诺昔康试验中,*CYP2C9* * *1* / * *3*组受试者氯诺昔康 $AUC_{0-\infty}$为 * *1* / * *1*组的 2.2倍,CL/*F*降低了 55%。这可能是由于氯诺昔康的代谢途径比较单一,主要代谢物 5 羟基氯诺昔康的生成由 CYP2C9酶介导,此条代谢途径占氯诺昔康总清除率的 95%以上[6]。而格列本脲的代谢途径则更复杂一些[12]。因此,*CYP2C9* * *3*的影响可能只是格列本脲药代动力学个体差异的部分原因。在 CYP2C9酶活性研究中,通常使用的体内试验探药为甲苯磺丁脲,但由于作为降糖药,其安全性是一个需要考虑的问题。氯诺昔康为新型非甾体抗炎药,其安全性要比降糖药高得多,且本试验结果表明,其药代动力学行为与 CYP2C9基因型有较好的相关性,可以较准确地预测 CYP2C9酶的活性,因此,该药可能更适合作为 CYP2C9酶的体内探药使用。

## References


[1] Zhou HH. *Pharmacogenetics* (遗传药理学) [M]. Beijing: Science Press, 2001. 87.

[2] Miners JO, Birkett DJ. Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1998, **45** (6): 525 - 538.

[3] Niemi M, Cascorbi I, Timm R, *et al* Glyburide and glimepiride pharmacokinetics in subjects with different *CYP2C9* genotypes [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2002, **72** (3): 326 - 332.

[4] Kirchheiner J, Meineke I, Steinbach N, *et al* Pharmacokinetics of diclofenac and inhibition of cyclooxygenases 1 and 2: no relationship to the CYP2C9 genetic polymorphism in humans [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2003, **55** (1): 51 - 61.

[5] Skjodt NM, Davies NM. Clinical pharmacokinetics of lornoxicam. A short half-life oxicam [J]. *Clin Pharmacokinet*, 1998, **34** (6): 421 - 428.

[6] Bonnabry P, Leemann T, Dayer P. Role of human liver microsomal CYP2C9 in the biotransformation of lornoxicam [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 1996, **49** (4): 305 - 308.

[7] Si DY, Guo YJ, Zhang YF, *et al* Identification of a novel variant of CYP2C9 allele in Chinese [J]. *Pharmacogenetics*, 2004, **14** (7): 465 - 469.

[8] Wang SL, Huang J, Lai MD, *et al* Detection of CYP2C9 polymorphism based on the polymerase chain reaction in Chinese [J]. *Pharmacogenetics*, 1995, **5** (1): 37 - 42.

[9] Moura MR, de Nucci G, Rath S, *et al* LC-APCI-MS-MS methodology for determination of glybenclamide in human plasma [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2004, **378** (2): 499 - 503.

[10] Zeng YL, Chen XY, Zhang YF, *et al* Determination of lornoxicam in human plasma by LC/MS/MS [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2004, **39** (2): 132 - 135.

[11] Zhang YF, Zhong DF, Si DY, *et al* Lornoxicam pharmacokinetics in relation to cytochrome P450 2C9 genotype [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2005, **59** (1): 14 - 17.

[12] Tiller PR, Land AP, Jardine I, *et al* Application of liquid chromatography-mass spectrometry analyses to the characterization of novel glyburide metabolites formed *in vitro* [J]. *J Chromatogr A*, 1998, **794** (1 - 2): 15 - 25.


© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.