

氯沙坦对 2 型糖尿病大鼠体内格列吡嗪药动学的影响

王雅兰, 马张庆

皖南医学院 药理教研室, 安徽 芜湖 241002

摘要: 目的 探讨氯沙坦对格列吡嗪在 2 型糖尿病大鼠体内药动学参数的影响。方法 以高糖高脂饲料喂养、ip 低剂量链脲佐菌素诱导 2 型糖尿病模型大鼠为研究对象, ig 氯沙坦片 5 mg/kg, 给药 1 h 后 ig 格列吡嗪 5 mg/kg, 于给药后 1、2、3、4、5、6、8、10、12 h 采集血浆样品, 采用 HPLC 法测定血浆中的格列吡嗪质量浓度, 绘制其血浆平均药物浓度-时间曲线; 计算格列吡嗪在大鼠体内的主要药动学参数。**结果** 与健康大鼠比较, 格列吡嗪在 2 型糖尿病大鼠体内消除半衰期明显延长 ($P < 0.05$)。在 2 型糖尿病大鼠中, 与单用格列吡嗪比较, 格列吡嗪的达峰浓度 (C_{max})、时量曲线下面积 (AUC) 明显增加 ($P < 0.05$), 达峰时间 (t_{max}) 明显减小 ($P < 0.05$)。**结论** 在糖尿病病理状态下, 格列吡嗪的药动学发生了一定的改变。联合用药时, 氯沙坦可明显提高格列吡嗪的血药浓度和生物利用度。

关键词: 氯沙坦; 格列吡嗪; 糖尿病大鼠; 药动学; 高效液相色谱

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2020)02-0216-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.02.005

Effect of losartan on pharmacokinetics of glipizide in type 2 diabetic rats

WANG Ya-lan, MA Zhang-qing

Department of Pharmacology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

Abstract: Objective To investigate the effect of losartan on pharmacokinetic parameters of glipizide in type 2 diabetes rats *in vivo*. **Methods** Type 2 diabetes model rats were induced by high sugar and fat feed and ip low-dose streptozotocin. Rats were ig administered with Losartan Tablets 5 mg/kg, then were ig administered with Losartan Tablets 5 mg/kg after 1 h. Plasma samples were taken at 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, and 12 h after administration. The concentrations of glipizide in plasma samples were determined by HPLC, and the average concentration time curve of glipizide in plasma was drawn. The main pharmacokinetic parameters of glipizide in rats were calculated. **Results** Compared with healthy rats, the elimination half-life of glipizide in type 2 diabetes rats was significantly prolonged ($P < 0.05$). In type 2 diabetes rats, the peak concentration (C_{max}) and the area under the curve (AUC) of glipizide were significantly increased ($P < 0.05$), and peak time (t_{max}) was significantly reduced compared with glipizide alone ($P < 0.05$). **Conclusion** The pharmacokinetics of glipizide has changed in the pathological state of diabetes. When they are combined, losartan can significantly increase the plasma concentration and bioavailability of glipizide.

Key words: losartan; glipizide; type 2 diabetes rat; pharmacokinetics; HPLC

近年来, 全球范围内糖尿病的发病率呈现持续上升的趋势, 其中 2 型糖尿病患者约占糖尿病总数的 90%, 使人们的健康受到了严重的威胁^[1]。2 型糖尿病是一种复杂的代谢性疾病, 主要表现为胰岛素抵抗增加、胰岛素分泌不足^[2-3], 随着病情的发展, 组织、血管损伤也将伴随发生, 导致严重的并发症, 其中高血压是 2 型糖尿病最常见的并发症之一^[4]。2 型糖尿病合并高血压患者需要同时服用降糖药和降

压药。格列吡嗪为第 2 代磺酰脲类口服降糖药, 因其疗效确切, 常用于治疗 2 型糖尿病, 并且其在体内经过 CYP2C9 代谢^[5-7]。氯沙坦是第 1 个应用于临床的血管紧张素 II 受体拮抗剂, 主要用于慢性高血压的治疗。氯沙坦钾口服吸收良好, 经首过代谢后形成羧酸型活性代谢 EXP3174 和其他无活性代谢物, 在人体内经过 CYP2C9 代谢为有药理活性的 5-羧基化代谢物 E-3174^[8]。糖尿病合并高血压患者常

收稿日期: 2019-11-27

基金项目: 安徽省科技攻关项目 (1501041157)

作者简介: 王雅兰, 女, 初级药师, 2017 级硕士研究生, 研究方向为定量药理学。E-mail: wangyalan8@163.com

*通信作者 马张庆, 男, 实验师, 硕士, 研究方向为定量药理学。E-mail: 405278305@qq.com

需长期给药。氯沙坦与格列吡嗪有合用指征，且氯沙坦与格列吡嗪在体内均通过 CYP2C9 代谢途径，故 2 种药物在代谢上有相互作用的可能，会影响药物在体内的药动学。本研究选用格列吡嗪与氯沙坦联用，观察其对大鼠体内格列吡嗪血药浓度的影响。

1 材料

1.1 药品与试剂

格列吡嗪对照品(上海源叶生物科技有限公司, 质量分数≥98%, 批号 T20N8T48705), 格列吡嗪片(天津药物研究院药业有限责任公司, 规格 2.5 mg/片, 批号 180903), 高氯酸(上海阿拉丁试剂有限公司, 批号 170318), 氯沙坦钾片(华润双鹤药业股份有限公司, 规格 50 mg/片, 批号 A1602001), 三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL)试剂盒(南京建成生物科技有限公司)。

1.2 仪器

Waters Acquity Arc 高效液相色谱仪 (Sample Manager FTN-R, Quaternary Solvent Manager-R, 2998 PDA Detector); 日立 CR22G II 高速冷冻离心机; 海尔 DW-40L278 低温保存箱。

1.3 动物

健康雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体质量为 (260±

10) g, 购买于南京青龙山实验动物中心, 动物生产许可证号 SCXK(浙)2019-0002。在皖南医学院动物房内饲养, 温度 (22±2) °C, 湿度 (50±10) %, 动物实验过程已通过皖南医学院动物伦理委员会的批准。

2 方法与结果

2.1 2型糖尿病大鼠模型的制备

2.1.1 操作 采用高脂高糖饮食进行大鼠喂养。饮食中猪油、蔗糖、胆固醇、蛋黄粉、普通饲料的比例为 10:10:1:5:74。在喂养 4 周以后禁食 12 h, ip 1% 链脲佐菌素溶液 (0.1 mmol/L, 柠檬酸缓冲液配制, pH 4.25) 50 mg/kg 诱导糖尿病, 3 d 后使用三诺血糖仪测定空腹血糖。糖尿病模型的标准: 空腹血糖 > 16.7 mmol/L。

2.1.2 口服葡萄糖耐量试验 各组大鼠空腹 12 h, 按 2 g/kg ig 50% 葡萄糖溶液, 分别测定在给予葡萄糖溶液后 0、30、60、120 min 血糖水平, 见表 1。结果表明符合糖尿病模型要求。

2.1.3 血液生化指标的测定 大鼠腹主动脉取血, 置于 10 mL 离心管中, 3 500 r/min 离心 15 min, 取上清液置于自动生化仪中测定总胆固醇、三酰甘油、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白水平, 结果见表 2。结果表明符合糖尿病模型要求。

表 1 口服葡萄糖耐量试验 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 1 Oral glucose tolerance test ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	血糖/(mmol·L ⁻¹)			
	0 h	0.5 h	1 h	2 h
对照	6.32±0.52	7.18±0.97	8.20±0.87	7.00±0.72
糖尿病	18.36±4.29*	21.86±4.54*	21.82±4.82*	19.94±5.52*

与对照组比较: *P<0.05

*P<0.05 vs control group

表 2 生化指标比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 2 Comparison on biochemical indexes ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	LDL/(mmol·L ⁻¹)	HDL/(mmol·L ⁻¹)
对照	1.69±0.04	1.61±0.11	0.60±0.02	0.91±0.01
糖尿病	2.89±0.07*	3.52±0.36*	1.71±0.25*	0.34±0.03*

与对照组比较: *P<0.05

*P<0.05 vs control group

2.2 分组和给药

SD 大鼠 50 只, 适应性喂养 1 周后, 随机选取 6 只作为对照组, 普通饲料喂养。其余大鼠按照 2

型糖尿病模型进行造模处理, 并将糖尿病大鼠随机分为模型组和氯沙坦组, 每组各 6 只。18 只大鼠禁食 12 h, 于第 2 天给药。氯沙坦组 ig 氯沙坦片

5 mg/kg^[9], 对照组、模型组 ig 同等体积的溶剂。各组大鼠于给药 1 h 后 ig 格列吡嗪 5 mg/kg^[10]。分别于给药后 1、2、3、4、5、6、8、10、12 h 经颈动脉采血 0.5 mL, 离心取血浆约 0.2 mL, 于 -20 °C 密封保存待测。

2.3 血样处理

精密吸取血浆 200 μL, 于 1.5 mL EP 管中, 加入 7% 高氯酸溶液 200 μL, 涡旋混匀 1 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 100 μL 进样分析。

2.4 色谱条件

Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 - 0.02 mol/L 磷酸二氢钾 (磷酸调 pH 2.5) (22 : 78); 紫外检测波长: 275 nm; 柱温: 30 °C; 体积流量: 0.8 mL/min; 进样体积: 20 μL。

2.5 专属性试验

取空白血浆、空白血浆 + 格列吡嗪对照品、血浆样品进行 HPLC 测定, 色谱图见图 1。结果表明血浆中内源性物质不干扰样品的测定, 格列吡嗪在当前色谱条件下的峰形良好, 附近无杂质峰, 其保留时间为 2.98 min。

2.6 标准曲线的制备

取格列吡嗪对照品约 10 mg, 精密称定, 置于

10 mL 量瓶中, 用乙腈 - 水 (60 : 40) 溶解并加至刻度, 配制成 1 mg/mL 标准储备液, 放置于 4 °C 冰箱保存待用。取格列吡嗪对照品溶液, 以大鼠空白血浆为稀释溶液, 配成含格列吡嗪 0.25、0.5、1、5、10、20、40 μg/mL 的血浆样品, 按照“血样处理”项下方法进行处理和分析。以格列吡嗪与内标峰面积比值与质控质量浓度进行线性回归, 其回归方程为 $Y=4\ 833.7X-1\ 575.3$ ($r=0.999\ 6$), 线性范围 0.125~40 μg/mL。

2.7 精密度试验

取大鼠空白血浆配制质量浓度分别为 0.25、1.00、10.00 μg/mL 格列吡嗪血浆样品, 每个质量浓度有 5 个样品, 处理并测定药物浓度, 连续测定 5 d。以测得值与理论值的比值计算日间、日内精密度试验的 RSD 值, 结果见表 3。

2.8 回收率试验

取大鼠空白血浆配制质量浓度分别为 0.25、1.00、10.00 μg/mL 格列吡嗪血浆样品, 每个质量浓度有 5 个样品, 处理后测定药物浓度。另用流动相配制质量浓度为 0.25、1.00、10.00 μg/mL 格列吡嗪溶液各 5 份, 进样分析。以血浆样品测定的峰面积除以同质量浓度的对照溶液峰面积计算回收率, 结果见表 4。

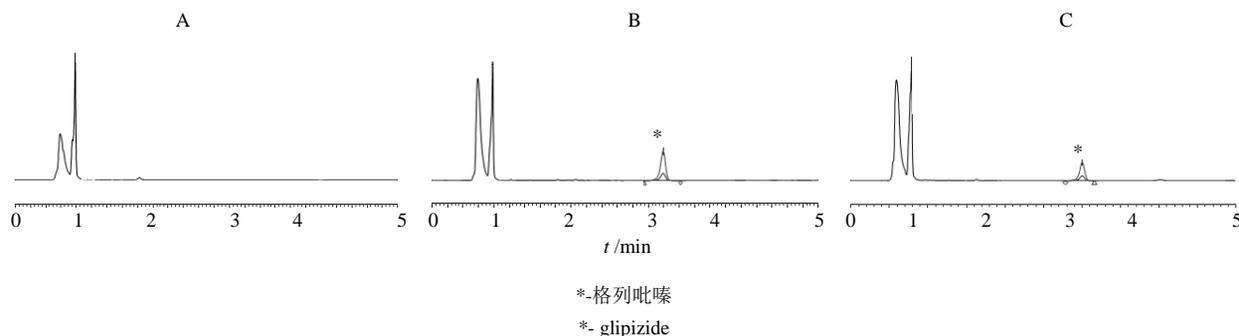


图 1 空白血浆 (A)、空白血浆 + 格列吡嗪 (B) 和血浆样品 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank plasma (A), blank plasma + glipizide (B), and plasma samples (C)

表 3 精密度试验结果 ($n=5$)

Table 3 Results of precision test ($n=5$)

质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	日内精密度		日间精密度	
	测定值/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD/%	测定值/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	RSD/%
0.25	0.25 ± 0.02	8.00	0.23 ± 0.02	8.70
1.00	1.02 ± 0.06	5.88	0.99 ± 0.09	9.09
10.00	9.90 ± 0.15	1.51	9.57 ± 0.24	2.51

表4 回收率试验结果 (n=5)
Table 4 Results of recovery test (n = 5)

质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	实测质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率/%	RSD/%
0.25	0.26±0.02	103.33	7.69
1.00	1.01±0.06	100.92	5.94
10.00	9.88±0.17	98.85	1.72

2.9 药时曲线和药动学参数

大鼠给药并采集血样,测定血浆中的格列吡嗪质量浓度,绘制其血浆平均药物浓度-时间曲线。用 DAS3.0 药动学软件对其参数进行统计分析,采用非房室模型计算药动学参数,计算格列吡嗪在大鼠体内的主要药动学参数,见图2、3。大鼠给药后吡嗪的主要药动力学参数见表5。可见与健康大鼠比较,格列吡嗪在2型糖尿病大鼠体内消除半衰期明显延长 ($P<0.05$)。在2型糖尿病大鼠中,与单用格列吡嗪比较,格列吡嗪的达峰浓度 (C_{max})、时量曲线下面积 (AUC) 明显增加 ($P<0.05$),达峰时间 (t_{max}) 明显减小 ($P<0.05$)。

3 讨论

药物最终的作用对象为病理人或动物,本研究以高糖高脂饲料喂养、低剂量链脲佐菌素制备糖尿病大鼠模型,考察氯沙坦对2型糖尿病大鼠体内格列吡嗪药动学的影响,对后续的临床研究更有指导意义。

本研究发现,格列吡嗪在健康大鼠和糖尿病大鼠中的药动学行为存在明显差异,与健康大鼠比较,

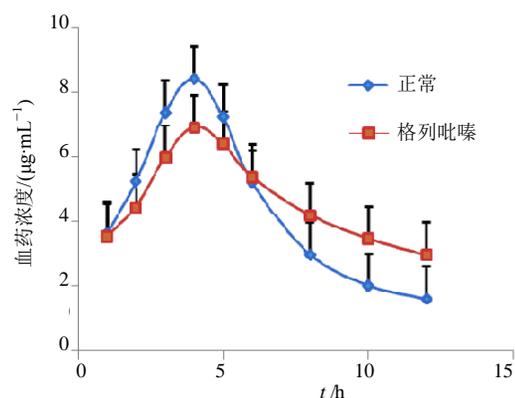


图2 格列吡嗪在正常大鼠和糖尿病大鼠体内的平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Mean plasma concentration - time curve of glipizide in normal and diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

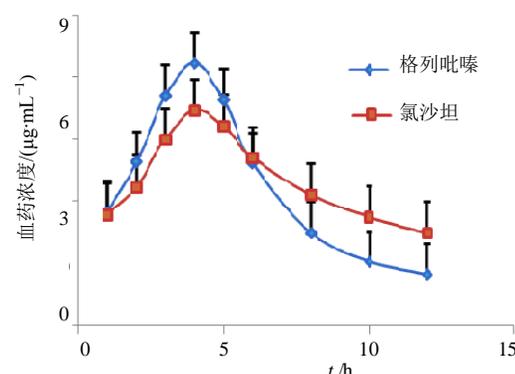


图3 糖尿病大鼠中格列吡嗪单用和联用氯沙坦的平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 3 Mean plasma concentration - time curve of glipizide in diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表5 大鼠灌胃给药后吡嗪的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 The main pharmacokinetic parameters of piperazine after ig administration in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	对照组	格列吡嗪组	氯沙坦组
$t_{1/2}$	h	3.48±1.07	6.02±0.75*	6.15±0.99*
t_{max}	h	3.83±0.37	4.17±0.37	3.11±0.47**
C_{max}	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	6.26±2.33	6.91±0.41	10.25±0.24**
AUC_{0-t}	$\text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	36.30±13.70	49.32±2.83	65.63±0.89**

与对照组比较: * $P<0.05$; 与格列吡嗪组比较: ** $P<0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; ** $P < 0.05$ vs glipizide group

格列吡嗪在2型糖尿病大鼠体内消除半衰期明显延长,表明格列吡嗪在糖尿病大鼠体内代谢减慢,造成此现象的原因可能是大鼠在糖尿病病理状态下,参与代谢的酶、转运体等发生了改变,从而影响了

药物的代谢状态^[11-13]。格列吡嗪在肝脏主要经过细胞色素 CYP2C9 代谢^[14],而氯沙坦在肝脏内也同样主要经过 CYP2C9 代谢^[15]。与糖尿病大鼠单用格列吡嗪组相比,联合用药组格列吡嗪的药动学发生明

显变化, 达峰时间 t_{\max} 缩短, 达峰浓度 C_{\max} 和生物利用度增加, 且都具有统计学意义 ($P < 0.05$)。推测是由于氯沙坦和格列吡嗪竞争同一代谢酶导致格列吡嗪的代谢减慢导致, 这与林淑等^[16]的研究结果一致。

与正常组相比, 2 型糖尿病大鼠机体血糖、血脂代谢明显异常, 表现为糖尿病大鼠的空腹血糖、相关血脂指标总胆固醇、三酰甘油、高密度脂蛋白显著高于正常组, 与文献报道一致^[17]。2 型糖尿病主要发病原因为胰岛素抵抗、胰岛素分泌不足^[18-19]。本研究根据文献报道, 采用高糖高脂饲料喂养 4 周使大鼠肥胖形成胰岛素抵抗, 并腹腔注射低剂量链脲佐菌素诱导 β 细胞凋亡, 破坏 β 细胞, 3 d 后空腹血糖大于 16.7 mmol/L 即造模成功^[20]。高热量饮食导致的肥胖使机体对胰岛素促进的葡萄糖摄取效率下降, 机体代偿性分泌过多胰岛素, 产生胰岛素抵抗^[21-22]。链脲佐菌素通过胰岛 β 细胞表面的葡萄糖转运蛋白 2 进入细胞内, 诱导 DNA 损伤和氧化应激, 导致 β 细胞坏死, 使机体内胰岛素分泌不足, 产生了高血糖, 进而引发了脂代谢的紊乱^[23-24]。目前国际上尚无统一的制备 2 型糖尿病动物模型的链脲佐菌素推荐剂量, 文献报道制备 2 型糖尿病大鼠模型的链脲佐菌素常用剂量为 50~70 mg/kg^[25-26]。本研究通过前期预实验最终确定链脲佐菌素剂量为 50 mg/kg 时, 糖尿病大鼠的成模率最高。

参考文献

- [1] Lalic N M, Katsiki N, Mitrakou A. Type 2 diabetes mellitus and the elderly: An update on drugs used to treat glycaemia [J]. *Current Vascul Pharmacol*, 2017, 15(1): 19-29.
- [2] Loscalzo J. Network medicine and type 2 diabetes mellitus: insights into disease mechanism and guide to precision medicine [J]. *Endocrine*, 2019, 66(3): 456-459.
- [3] 王雪萍, 李医明, 王 钊, 等. 原花青素类成分在防治 2 型糖尿病作用机制方面的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(20): 3866-3872.
- [4] Zidek W. Arterielle Hypertonie bei Menschen mit Diabetes; Arterial hypertension in people with diabetes [J]. *Der Kardiologe*, 2019, 13(Suppl 2): 239-248.
- [5] Amblee A, Liou D, Fogelfeld L. Combination of saxagliptin and metformin is effective as initial therapy in new onset type 2 diabetes mellitus with severe hyperglycemia [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101(6): 2528-35.
- [6] Adeshara K, Tupe R. Antiglycation and cell protective

actions of metformin and glipizide in erythrocytes and monocytes [J]. *Molecul Biol Rep*, 2016, 43(3): 195-205.

- [7] Del Prato S, Nauck M, Dur N-Garcia S, et al. Long-term glycaemic response and tolerability of dapagliflozin versus a sulphonylurea as add-on therapy to metformin in patients with type 2 diabetes: 4-year data [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2015, 17(6): 581-590.
- [8] Choi J S, Choi J S, Choi D H. Effects of licochalcon A on the pharmacokinetics of losartan and its active metabolite, EXP-3174, in rats [J]. *Pharmazie*, 2013, 68(11): 882-888.
- [9] 林 淑, 潘佩佩, 胡国新. 格列吡嗪和格列本脲对氯沙坦药动学的影响 [J]. *中国现代应用药理学*, 2017, 34(1): 89-92.
- [10] Anusha A, Narendar D, Krishna Murthy B, et al. Influence of single and multi dose treatment of glipizide on pharmacokinetics and pharmacodynamics of irbesartan in normal and hypertensive rats [J]. *High Blood Pressure Cardiovascul Prevent*, 2017, 24(2): 179-185.
- [11] 张立雯, 季 涛, 宿树兰, 等. 桑叶黄酮类和生物碱类成分在正常和糖尿病大鼠体内的药代动力学研究 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(21), 4218-4225.
- [12] Gravel S, Chiasson J L, Dallaire S, et al. Evaluating the impact of type 2 diabetes mellitus on CYP450 metabolic activities: protocol for a case-control pharmacokinetic study [J]. *BMJ Open*, 2018, 8(2): e020922.
- [13] Zhang X J, Liu S, Xing J P, et al. Effect of type 2 diabetes mellitus on flavonoid pharmacokinetics and tissue distribution after oral administration of *Radix Scutellaria* extract in rats [J]. *Chin J Nat Med*, 2018, 16(6): 418-427.
- [14] Tan B, Zhang Y F, Chen X Y, et al. The effects of CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of glipizide in Chinese subjects [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2010, 66(2): 145-151.
- [15] 杨 璐, 郭 涛, 庄雪梅, 等. CYP2C9*2 基因多态性对 CYP3A4 野生型健康回族受试者体内的氯沙坦及其活性代谢物 E-3174 的药动学影响 [J]. *中国药理学: 英文版*, 2018, 27(1): 22-29.
- [16] 林 淑, 潘佩佩, 胡国新. 格列吡嗪和格列本脲对氯沙坦药动学的影响 [J]. *中国现代应用药理学*, 2017, 34(1), 85-88.
- [17] 曾晓会, 卓俊城, 谢凯枫, 等. 二甲双胍治疗 II 型糖尿病大鼠的代谢组学研究 [J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(9), 1212-1220.
- [18] Kalin M F, Goncalves M, John-Kalarickal J, et al. *Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus* [M]. 2017: 267-277.
- [19] Sami W, Ansari T, Butt N S, et al. Effect of diet on type 2

- diabetes mellitus: A review [J]. *Int J Health Sci (Qassim)*, 2017, 11(2): 65-71.
- [20] Mehta B K, Singh K K, Banerjee S. Effect of exercise on type 2 diabetes associated cognitive impairment in rats [J]. *Int J Neurosci*, 2019, 129(3): 252-263.
- [21] Chao P C, Li Y, Chang C H, *et al.* Investigation of insulin resistance in the popularly used four rat models of type-2 diabetes [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101: 155-161.
- [22] Small L, Brandon A E, Turner N, *et al.* Modeling insulin resistance in rodents by alterations in diet: what have high-fat and high-calorie diets revealed? [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2018, 314(3): E251-E265.
- [23] Szkuldeshi T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in beta cells of the rat pancreas [J]. *Physiol Res*, 2001, 50(6): 537-546.
- [24] 魏蕊, 谷良标, 杨进, 等. 不同剂量链脲佐菌素对小鼠胰岛结构和主要细胞组成影响的研究 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2017, 25(12): 1112-1118.
- [25] 叶桐江, 郑博文, 赵琳, 等. 链脲佐菌素诱导1型糖尿病大鼠模型的最佳禁食时间与最优剂量 [J]. *兰州大学学报: 医学版*, 2019, 45(2): 52-55.
- [26] Liu M, Peng J, Tai N, *et al.* Toll-like receptor 9 negatively regulates pancreatic islet beta cell growth and function in a mouse model of type 1 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2018, 61(11): 2333-2343.