



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2013 년 2 월

석사학위 논문

**Effects of apigenin on the  
pharmacokinetics of nimodipine in rats**

조선대학교 대학원

약 학 과

서 규 화

# **Effects of apigenin on the pharmacokinetics of nimodipine in rats**

흰 쥐에서 아피제닌이 니모디핀의 약물동태에 미치는 영향

2013 년 2 월 25 일

조선대학교 대학원

약 학 과

서 규 화

# **Effects of apigenin on the pharmacokinetics of nimodipine in rats**

지도교수 이 원 재

이 논문을 약학 석사학위신청 논문으로 제출함

2012 년 10 월

조선대학교 대학원

약 학 과

서 규 화

# 서규화의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 신 상 미 (인)

위 원 조선대학교 교수 기 성 환 (인)

위 원 조선대학교 교수 이 원 재 (인)

2012 년 11 월

조선대학교 대학원

# CONTENTS

## LIST OF TABLES

## LIST OF FIGURES

## ABBREVIATIONS

<b>ABSTRACT.....</b>	<b>1</b>
----------------------	----------

<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>3</b>
-----------------------------	----------

<b>2. MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>5</b>
--------------------------------------	----------

2.1. Materials.....	5
---------------------	---

2.2. Animal studies.....	5
--------------------------	---

2.3. Drug administration.....	6
-------------------------------	---

2.4. HPLC assay.....	6
----------------------	---

2.5. CYP3A4 inhibition assay.....	7
-----------------------------------	---

2.6. Rhodamine-123 retention assay.....	8
---	---

2.7. Pharmacokinetic analysis.....	8
------------------------------------	---

2.8. Statistical analysis.....	9
--------------------------------	---

<b>3. RESULTS.....</b>	<b>10</b>
------------------------	-----------

3.1. Inhibition of CYP3A4.....	10
--------------------------------	----

3.2. Rhodamine-123 retention assay.....	10
3.3. Effect of apigenin on the pharmacokinetics of oral nimodipine...10	
3.4. Effect of apigenin on the pharmacokinetics of <i>i.v.</i> nimodipine...11	
<b>4. DISCUSSION.....</b>	<b>12</b>
<b>5. CONCLUSION.....</b>	<b>15</b>
<b>6. REFERENCES.....</b>	<b>23</b>
국문초록.....	28

## LIST OF TABLES

<b>Table 1.</b> Pharmacokinetic parameters of nimodipine after oral (16 mg/kg) administration of nimodipine with apigenin to rats (Mean $\pm$ S.D, n = 6) .....	21
<b>Table 2.</b> Pharmacokinetic parameters of nimodipine after intravenous (4 mg/kg) administration of nimodipine with apigenin to rats (Mean $\pm$ S.D, n = 6). .....	22



## LIST OF FIGURES

- Figure 1.** The structures of nimodipine (A), apigenin (B), nitrendipine (C) and ketoconazole (D).....16
- Figure 2.** Inhibitory effects of ketoconazole (A) and apigenin (B) on CYP3A4 activity. The experiment was done in duplicate, and the result is expressed as the percent of inhibition.....17
- Figure 3.** Rhodamine-123 retention. MCF-7/ADR cells were pre-incubated with apigenin for 30 min after incubation of MCF-7/ADR cells with 20  $\mu$ M Rho-123 for 90 min. Data represents mean  $\pm$  SD of 6 separate samples (significant versus the control MCF-7 cells,  $**P < 0.01$ ).....18
- Figure 4.** Mean plasma concentration-time profiles of nimodipine after oral (16 mg/kg) administration to rats without or with apigenin (1 or 10 mg/kg) (n = 6, each). Bars represent the standard deviation; (●) Oral administration of nimodipine (control, 16 mg/kg, only); (○) with 1 mg/kg apigenin, (▼) 10 mg/kg of apigenin.....19
- Figure 5.** Mean plasma concentration-time profiles of nimodipine after intravenous (4 mg/kg) administration to rats without or with apigenin (1 or 10 mg/kg) (n = 6, each). Bars represent the standard deviation; (●) *i.v.* administration of nimodipine (control, 4 mg/kg, only); (○) with 1 mg/kg apigenin, (▼) 10 mg/kg of apigenin.....20

## ABBREVIATIONS

CYP: Cytochrome P450

P-gp: P-glycoprotein

Rho-123: Rhodamine-123

*i.v.*: Intravenous

AUC: Area under the plasma concentration-time curve from time 0 to time infinity

$C_{\max}$ : Peak concentration

$T_{\max}$ : The time to reach peak plasma concentration

$t_{1/2}$ : Terminal half-life

AB: Absolute bioavailability

RB: Relative bioavailability

$CL_t$ : Total body clearance

# ABSTRACT

## Effects of apigenin on the pharmacokinetics of nimodipine in rats

Kyuhwa Seo

Advisor : Prof. Wonjae Lee, Ph.D.

College of Pharmacy,

Graduate School of Chosun University

The purpose of this study was to investigate the effect of apigenin on the pharmacokinetics of nimodipine in rats. Pharmacokinetic parameters of nimodipine were determined in rats after oral and *i.v.* administration of nimodipine with or without apigenin and also the effect of apigenin on the cytochrome P450 (CYP) 3A4 and P-glycoprotein (P-gp) activity were evaluated. Apigenin inhibited CYP3A4 and P-gp activity. Apigenin significantly increased the area under the plasma concentration-time curve (AUC) and peak plasma concentration ( $C_{max}$ ) of nimodipine. The absolute bioavailability (AB) of nimodipine with apigenin (10 mg/kg) was significantly ( $P < 0.05$ ) higher (46%) than that of the control group. In contrast, apigenin did not affect the intravenous pharmacokinetics of nimodipine. Based on these results, the increased bioavailability of nimodipine might be due to inhibition of CYP3A4 in the small intestine and/or in the liver and inhibition

of P-gp in the small intestine by apigenin. The increased bioavailability of nimodipine with apigenin might be due to an inhibition of the P-gp-mediated efflux transporter in the small intestine and CYP3A4 mediated metabolism in the small intestine and/or in the liver or to a reduction of total body clearance.

**Key words:** Nimodipine, Apigenin, Bioavailability, Pharmacokinetics, CYP3A4, P-gp, Rats

# 1. INTRODUCTION

칼슘채널차단제 (Calcium Channel Blocker)는 혈관이완작용이 있어 고혈압, 협심증 및 부정맥 치료에 널리 사용하고 있다 [1]. 이 약물들은 혈청 중 세포 외액에 있는 칼슘이 심근세포와 혈관 평활근 세포막을 통과하는 통로를 차단하고 심장근육과 혈관 평활근의 수축과정을 차단하여 심장 수축력을 감소시키고, 전신의 동맥과 관상동맥을 이완시키며, 또한 신혈관을 이완하여 신장으로 혈액 유입을 증가시키고 사구체 여과율과 나트륨 배설을 증가시켜 신장 혈압을 저하시킨다 [2].

니모디핀 (nimodipine)은 1,4-dihydropyridine 계 칼슘채널차단제로 [3] 지용성 약물이며 경구 투여 시 신속하게 흡수되나 간 초회 통과효과로 인해 생체이용률이 낮고 97-99% 단백결합을 하며, 빠르게 조직과 기관에 분포된다 [4-5]. 니모디핀은 간과 장관강막에 존재하는 Cytochrome P450 (CYP) 3A4 에 인하여 산화되어 pyridine 대사체로 대사된다 [6-8]. Fuhr et al 의 연구에 의하면 자몽 주스와 니모디핀을 동시 투여했을 때 니모디핀의 생체이용률을 51% 향상시켰다고 보고되었다 [9]. 또한 니모디핀은 P-당단백질 (P-glycoprotein)의 기질이기도 하다 [10].

플라보노이드 (Flavonoid) 중에서 아피제닌 (Apigenin)은 감귤류와 구아바에 존재하고 항산화, 항변이원성, 항염증, 항알레르기, 항종양과 항바이러스 작용을 포함하여 다양한 생물학적 활성을 나타낸다 [11-16]. 게다가 아피제닌은 CYP3A4 뿐만 아니라 P-당단백질 유출 펌프 (P-gp efflux transporter)도 상호작용을

하는 것으로 보고되었다 [17-19]. Nguyen et al 은 Panc-1 세포에서 vinblastine, P-당단백질 기질의 세포 축적이 상당히 증가했음을 보고하였으나 억제효과에 대해 약간 애매한 부분이 있다 [20]. Ho et al 는 CYP3A4 가 대사에 영향을 주는 것에 대해서 아피제닌의 매우 약한 억제 효과를 보고했지만 [19], 최근 CYP3A4 활동에 반하여 아피제닌의 강한 억제효과를 보고했다 [21]. 그러나 CYP 효소 활동의 억제에 대한 아피제닌의 효과는 결론에 이르지 못했다. 이런 이유로 아피제닌의 CYP3A4 에 대한 억제 효과는 CYP 억제 분석법을 사용하였다. 또한 P-당단백질 활성 억제효과는 항암제내성 유방암 세포인 MCF-7/ADR 에서 과다발현 (overexpression)하는 Rhodamine-123 보유 분석법을 이용하여 P-당단백질 활성 억제효과에 대해서 재평가를 시도했다.

순환기계 질환 치료 시 항산화작용이 있는 아피제닌과 항고혈압 제제가 병용투여되는 경우가 있다. 한국을 포함하여 동양에서는 녹차를 많이 음료수로 사용하고 있기 때문에 병용되는 경우가 많다. 특히 아피제닌을 칼슘채널 차단제인 니모디핀과 병용 투여 시 니모디핀의 약물동태에 영향을 미칠 것으로 사료되나 현재까지 아피제닌이 니모디핀의 약물동태에 미치는 영향에 대해 보고된 바가 없다.

그러므로 본 연구에서는 흰쥐에서 아피제닌을 니모디핀과 병용 경구 및 정맥 투여 시 니모디핀의 생체이용률 및 약물동태학적 파라미터와 CYP3A4 와 P-당단백질 활성억제에 미치는 영향을 검토하고자 하였다.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Materials

니모디핀 (nimodipine), 니트렌디핀 (nitrendipine, internal standard) 및 아피제닌 (apigenin)은 Sigma-Aldrich 사 (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. Ethyl acetate 는 JUNSEI 화학제품 (Kyoto, Japan)을, 박하유는 대흥약품 (Seoul, Republic of Korea), 그리고 methanol 은 Merck 사 (Darmstadt, Germany)의 HPLC 등급을 사용하였다.

HPLC 기기는 Shimadzu 사 (Kyoto, Japan)의 liquid chromatograph pump 는 LC-10AD, autoinjector 는 SIL-10A, UV-Vis detector 는 SPD-10A 를 사용하였으며, column 은 Hypersil ODS, 5  $\mu$ m, 150mm $\times$ 4.6mm 를 사용하였다. Syringe pump 는 Sage Instruments 사 (Boston, MA, USA)의 Model 341B 를 사용하였으며, vortex mixer 는 Scientific Industries 사 (Bohemia, N.Y., USA) 그리고 원심분리기는 미국 Abbot 사 (X-system, TM, USA)를 사용하였고, shaker 는 서린 (Seolin)사 (Seoul, Republic of Korea), Dry thermo bath 는 Eylea 사 (Tokyo, Japan)를 사용하였다.

### 2.2. Animal studies

일정한 조건에서 7-8 주 사육한 체중 280 g 전후의 Sprague-Dawley 계 웅성 흰 쥐를 1 군을 6 마리씩으로 하여, 물은 자유로이 공급하면서 24 시간 절식시킨 후 우측 대퇴동맥에 폴리에틸렌관 (PE50, Intramedic, Clay Adams, NJ, USA)을 삽입하여 혈액을 채취하였으며, 혈액응고를 방지하기 위해 관내에 주사용

생리식염수로 녹인 헤파린 (50 U/ml)을 주입하였다. 그리고 채취한 혈액량만큼의 생리식염수를 등속 주입 펌프로 보충해 주었다.

동물 연구 계획은 조선대학교 동물관리위원회의 승인을 받았다.

### **2.3. Drug administration**

대조군 (control, n = 6)은 니모디핀 16 mg/kg 을 물에 용해시켜 0.3 ml/rat 경구 투여 하였다. 정맥 투여는 니모디핀 4 mg/kg 를 주사용 생리식염수에 용해시켜 0.3 ml/rat 정맥 투여 하였다. 병용 투여군 (n = 6)은 아피제닌 1 및 10 mg/kg 을 각각 경구 투여 30 분 후 니모디핀을 경구 및 정맥 투여 하였다. 혈액은 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 및 24 h 에서 0.4 ml 를 채취하여 13,000 rpm 에서 5 분간 원심 분리 후 혈장 0.2 ml 를 취해 실험 전까지 -40°C 에 냉동 보관하였다.

### **2.4. HPLC assay**

혈장 중 니모디핀 분석은 Qian et al 의 방법을 수정하여 측정하였다 [22]. 혈장 0.2 ml 에 1 µg/ml 니트렌디핀 50 µl 와 ethyl acetate 5 ml 를 가하고 1 시간 동안 추출하였다. 이것을 1,000 rpm 에서 10 분 원심분리 한 다음 유기 용매 층 4.5 ml 를 다른 깨끗한 시험관으로 옮기고, 40°C에서 질소 가스로 날린 후 잔사에 65% methanol 을 0.3 ml 를 넣고 vortex mixer 로 3 분간 용해시킨 후 1,000 rpm 에서 10 분간 원심 분리하여 상층액 50 µl 를 HPLC 에 주입하였다.



HPLC 조건은 칼럼은 Hypersil ODS (5  $\mu$ m, 150 mm $\times$ 4.6 mm)을, mobile phase 는 methanol : water (65 : 35, v/v) 비율로 섞고 기포를 제거한 후 사용하였으며, 유속은 1.0 ml/min 으로 유지하고 파장은 238 nm 로 설정하였다.

실온에서 니트렌디핀은 7.6 min, 니모디핀은 9.1 min 에서 분리되었으며, 그 분리 정도가 양호하였다. 이 분석법으로 최소 10 ng/ml 까지 측정할 수 있으며 일내 및 일간 변동계수 (Coefficient of Variation)는 11.3% 보다 작았다.

## 2.5. CYP3A4 inhibition assay

인체의 CYP3A4 효소 활성의 억제효과평가는 Crespi et al 의 CYP inhibition assay kit 를 사용한 96-multiwell plate 에서 시행하였다 [23].

간단히 설명하자면 인간의 CYP 효소는 baculovirus 에 감염된 곤충세포를 통해 얻었다. CYP 기질은 potassium phosphate buffer 에서 1 pmol 의 CYP3A4 효소와 NADPH 생산 체계 (1.3  $\mu$ M NADP, 3.54 mM glucose 6-phosphate, 04 U/mL glucose 6-phosphate dehydrogenase 와 3.3 mM  $MgCl_2$ )의 반응 혼합물을 첨가한 것과 첨가하지 않은 것을 배양하였다. 반응은 stop solution 을 첨가한 후 45 분 후 종결되었다. 대사체의 농도는 여기파장 (excitation wavelength) 409 nm, 형광파장 (emission wavelength) 530 nm 로 설정하여 형광광도계 (spectrofluorometer)로 측정하였다. Positive control (1  $\mu$ M ketoconazole)은 같은 well plate 에서 시행되었고 99% 저해를 나타냈다. 모든 실험은 동일하게 수행하였고 결과는 저해 퍼센트로 표현하였다.

## 2.6. Rhodamine-123 retention assay

MCF-7/ADR cell 에 P-당단백질이 과다 발현되면 P-당단백질이 부족한 MCF-7 cell 에 비하여 P-당단백질 형광 기질인 Rhodamine-123 의 축적이 증가한다.

본 실험에서는 아피제닌을 전처리한 후 Rhodamine-123 의 형광 정도를 평가하였다. MCF-7/ADR cell 을 24-well plates 에 배양 후 배지를 Hanks' balanced salt solution 으로 바꾸고 37°C에서 30 분간 안정화시켰다. 이후 세포에 20  $\mu$ M 의 Rhodamine-123 을 첨가하여 90 분 동안 배양한 후 배지를 완전히 제거하였다. 세포는 차가운 인산완충액 (pH 7.0)으로 3 번 세척 후 lysis buffer 로 용해하였다. 세포 내 Rhodamine-123 형광은 여기파장 (excitation wavelength) 480 nm, 형광파장 (emission wavelength) 540 nm 으로 측정하였다. 형광 값은 각 시료의 총 단백질 함량으로 정규화 (normalized)하고 대조군 수치에 대한 비율로 표시하였다.

## 2.7. Pharmacokinetic analysis

약물동태학 분석은 non-compartmental pharmacokinetic analysis 로 WinNonlin software version 4.1 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA) computer program 을 이용하였다.

무한대까지의 혈중농도 곡선하면적 (area under the plasma concentration-time curve, AUC)은 trapezoidal rule 에 의한 오차를 줄이기 위해 WinNonlin 에 의해 계산하였다. 최고 혈중농도 ( $C_{max}$ )와 최고 혈중농도 도달시간 ( $T_{max}$ )은 실험동물 각 개체의 실제 측정치에서 구했으며, 소실속도정수 ( $K_{el}$ )는 배설상의 혈중농도의 regression 분석에 의해, 반감기 ( $t_{1/2}$ )는  $0.693/K_{el}$  로 구했다. 그리고 병용 투여군의 절대적 생체이용률 (AB)은  $AUC_{oral}/AUC_{i.v.} \times Dose_{i.v.}/Dose_{oral} \times$

100 으로 구했으며, 상대적 생체이용률 (RB)은 대조군 AUC 에 대한 병용 투여군의 AUC 의 백분율로 구했다.

## **2.8. Statistical analysis**

각 약물동태학적 파라미터의 유의성 검정은 one-way ANOVA 를 적용하여 대조군과 비교해  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  일 때 유의성 있는 차이가 있는 것으로 처리하였다.

### **3. RESULTS**

#### **3.1. Inhibition of CYP3A4**

CYP3A4 활성에 대한 아피제닌의 저해 효과는 Figure 2 에서 보여주고 있다. 아피제닌은 CYP3A4 효소의 활성을 저해하고 CYP3A4 에 대한 아피제닌의 50% 저해 농도값 ( $IC_{50}$ )은 1.8  $\mu$ M 이었다.

#### **3.2. Rhodamine-123 retention assay**

Figure 3 에서 보여주듯 MCF-7/ADR cell 에 P-당단백질이 overexpressing 되면 P-당단백질이 부족한 MCF-7 cell 에 비해 Rhodamine-123 의 축적이 감소함을 알 수 있다. 아피제닌을 병용할 투여할 때 농도 의존적으로 Rhodamine-123 의 cellular uptake 가 증가하였고, 특히 10-30  $\mu$ M 범위에서 통계학적으로 유의성 ( $P < 0.01$ )을 보였다. 이런 결과는 아피제닌이 P-당단백질의 활성을 농도 의존적 방법으로 유의성 있게 저해함을 암시한다.

#### **3.3. Effect of apigenin on the pharmacokinetics of oral nimodipine**

경구 투여한 니모디핀의 평균혈중농도 추이는 Figure 4 와 같았으며 약물동태학적 파라미터는 Table 1 과 같다.

혈중농도 곡선하면적 (AUC)는 대조군에서  $506 \pm 95$  ng·h/ml 이었으며, 아피제닌 병용 투여군 (1 및 10 mg/kg)에서 각각  $592 \pm 114$  과  $738 \pm 141$  ng·h/ml 이었으며, 아피제닌을 고농도 (10 mg/kg) 병용 투여한 군에서만

대조군에 비해 유의성있게 증가( $P < 0.05$ , 45.8%)되었다. 니모디핀의 최고 혈중농도 ( $C_{max}$ )는 대조군에서  $91 \pm 14$  ng/ml 이었으며, 아피제닌 (1 및 10 mg/kg) 병용 투여군에서는 각각  $97 \pm 15$  과  $105 \pm 16$  ng/ml 이었으며 아피제닌을 고농도 (10 mg/kg) 병용 투여한 군에서만 대조군에 비해 유의성있게 증가( $P < 0.05$ , 15.4%)되었다. 절대적 생체이용율 (AB)은 아피제닌 (10 mg/kg) 병용 투여군에서 유의성 ( $P < 0.05$ )있게 46% 증가되었다. 상대적 생체이용율 (RB)이 아피제닌 (1 및 10 mg/kg) 병용 투여군에서는 1.17-1.46 배 증가되었다. 니모디핀의 생물학적 반감기 ( $t_{1/2}$ )와 최고혈장농도 도달시간 ( $T_{max}$ )은 유의성이 없었다.

### **3.4. Effect of apigenin on the pharmacokinetics of intravenous nimodipine**

니모디핀의 평균혈중농도 추이는 Figure 5 와 같았으며 약물동태학적 파라미터는 Table 2 와 같다.

혈중농도 곡선하면적 (AUC)는 대조군에서  $572 \pm 117$  ng·h/ml 이었으며, 아피제닌 병용 투여군 (1 및 10 mg/kg)에서 각각  $601 \pm 124$  과  $648 \pm 130$  ng·h/ml 으로 약간의 증가를 보였으나 유의성은 없었다. 니모디핀의 전신클리어런스 (Total body clearance)는 약간 감소되었으나 유의성은 없었다. 또한 니모디핀의 생물학적반감기 ( $t_{1/2}$ )가 증가하였으나 유의성은 없었다.

## 4. DISCUSSION

니모디핀은 지용성 약물이며 경구 투여 시 신속하게 흡수되며 전신순환에 도달하기 전에 초회통과효과로 인해 생체이용률이 낮고 개체간 및 연령에 따라 차이도 크다 [3]. 이 약물은 소장과 간에서 주로 CYP3A4 에 의해 대사되어 pyridine 대사체로 대사된다 [6-8]. 또한 니모디핀은 P-당단백질의 기질이기도 하다 [10].

CYP3A4 활성화에 대한 아피제닌의 저해 효과는 Figure 2 에서 와 같이 아피제닌은 CYP3A4 효소의 활성을 농도 의존적 방법으로 저해하고 CYP3A4 에 대한 아피제닌 50% 저해 농도값 ( $IC_{50}$ )은 1.8  $\mu$ M 이었다.

Figure 3 에서 보여지듯 아피제닌을 병용 사용할 때 농도 의존적 방법으로 Rhodamine-123 의 세포내 축적이 증가하였고 10-30  $\mu$ M 에서 통계학적으로 유의성 ( $P < 0.01$ )을 보였다. 이 결과는 아피제닌이 P-당단백질의 활성을 유의성있게 저해함을 시사한다. 그러나 *in vitro* 에서 CYP3A4 및 P-당단백질의 활성 억제의 결과를 앞으로 *in vivo* 에서도 실험이 필요하다고 사료 된다.

아피제닌 병용 투여군에서 니모디핀의 혈장농도 곡선하면적 (AUC)과 최고 혈장농도 ( $C_{max}$ )가 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였는데 이는 Soambia et al 과 Choi et al 이 quercetin 이 P-당단백질의 배출작용을 억제한다는 보고와 Endicott et al 이 P-당단백질은 세포막과 장관막에서 배출작용을 한다고 보고한 것 같이 [24-26], 경구 투여된 아피제닌이 P-당단백질을 억제하여 니모디핀의 흡수를 증대시켜 니모디핀의 혈장농도가 높아진 것으로 사료되었다. 이런

결과는 Fuhr et al 이 자몽 주스 또는 모린을 니모디핀과 병용 경구 투여시 CYP3A4 의 대사를 억제하여 니모디핀의 생체이용률을 증가시켰다는 보고와 일치하였다 [9]. 또한 Zhang et al 이 보고한 니모디핀 AUC 값은 574.4 ng·h/ml 이고, 본 논문이 구한 AUC 값은 506 ng·h/ml 로 문헌 수치와 거의 일치하였다 [27].

정맥 투여 시 니모디핀의 평균 혈중농도 추이는 Figure 5 와 같았으며, 약물동태학적 파라미터는 Table 2 와 같이 아피제닌은 니모디핀의 약물동태학적 파라미터에 영향을 미치지 못하였다.

P-당단백질과 CYP3A4 는 소장점막상피세포에 함께 존재하고 있다 [30]. P-당단백질은 그의 기질을 소장 상피세포 내에서 장관 내로 유출시키는 단백질로서 기질 약물들이 장관에서 세포 내 재순환 하게 되며 CYP3A4 와의 접촉확률을 증가하여 CYP3A4 에 인한 대사를 촉진하여 흡수를 감소한다고 보고되었다 [12-15]. P-당단백질로 인해 항암약물을 포함한 많은 종류의 화합물들이 소장에서 유출되어 생체이용률이 감소된다고 보고되었다 [20]. 그리하여 니모디핀이 P-당단백질 및 CYP3A4 의 기질이므로 [28-29], 니모디핀의 장관에서의 흡수도 CYP3A 와 P-당단백질의 영향을 받는 것으로 사료된다. 때문에 아피제닌에 의한 소장에서 P-당단백질의 억제와 소장 및 간장에서 니모디핀의 대사효소인 CYP3A4 의 억제로 인하여 니모디핀의 흡수증가와 초회통과효과(대사)를 감소시켰기 때문인 것으로 예측된다.

본 실험에서 아피제닌은 니모디핀의 AUC 와  $C_{max}$  도 유의성 있게 증가하였으며 그 결과 니모디핀의 생체이용률을 유의성 있게 증가시켰다.

이상의 결과를 총괄하면 니모디핀은 인체와 유사한 대사를 초래하는 흰쥐에서 아피제닌으로 전처리 하였을 때 니모디핀의 생체이용률은 현저히 증가하였다. 임상실험에서도 더욱 확인연구가 필요하다고 사료되며, 아피제닌은 과일주스에 흔히 존재하는 물질로서 임상에서 빈용되는 니모디핀과 병용시 니모디핀의 약물동태학적 변화를 고려하는 것이 바람직하다고 사료된다.

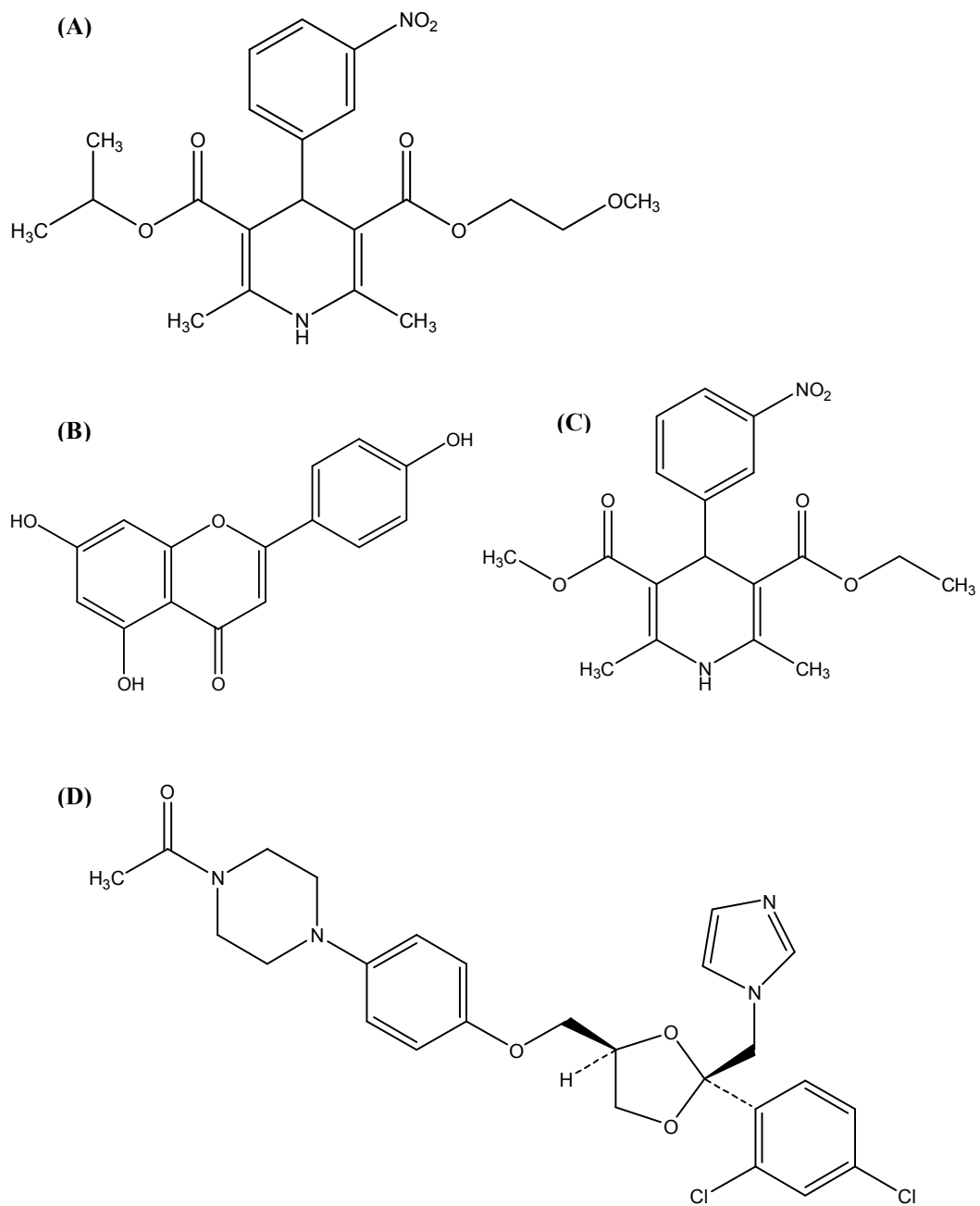


## 5. CONCLUSION

니모디핀과 아피제닌을 병용 투여 시 니모디핀의 생체이용률과 약물동태학적 파라미터의 변화를 검토한 결과는 다음과 같다.

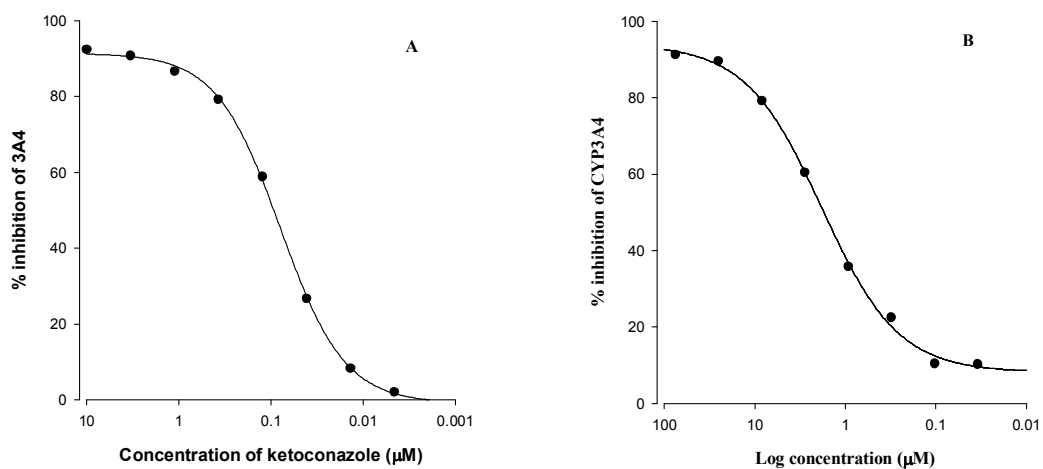
아피제닌은 P-당단백질과 CYP3A4 활성을 억제시켰으며, 혈장 농도곡선하면적 (AUC)과 최고혈중농도 ( $C_{max}$ )는 대조군에 비해 아피제닌 고농도 (10 mg/kg) 병용 경구 투여군에서 유의성 ( $P < 0.05$ )있게 증가시키므로 생체이용률은 대조군에 비해 병용 경구 투여군에서 1.17-1.46 배로 증가되었다.

결론적으로 아피제닌에 의한 니모디핀의 생체이용률이 유의성 있게 증가된 것은 아피제닌에 의한 소장에서 P-당단백질의 억제와 소장 및 간장에서 니모디핀의 대사효소인 CYP3A4 의 억제로 인하여 니모디핀의 흡수증가와 초회통과효과(대사)를 감소시켰기 때문인 것으로 예측된다.



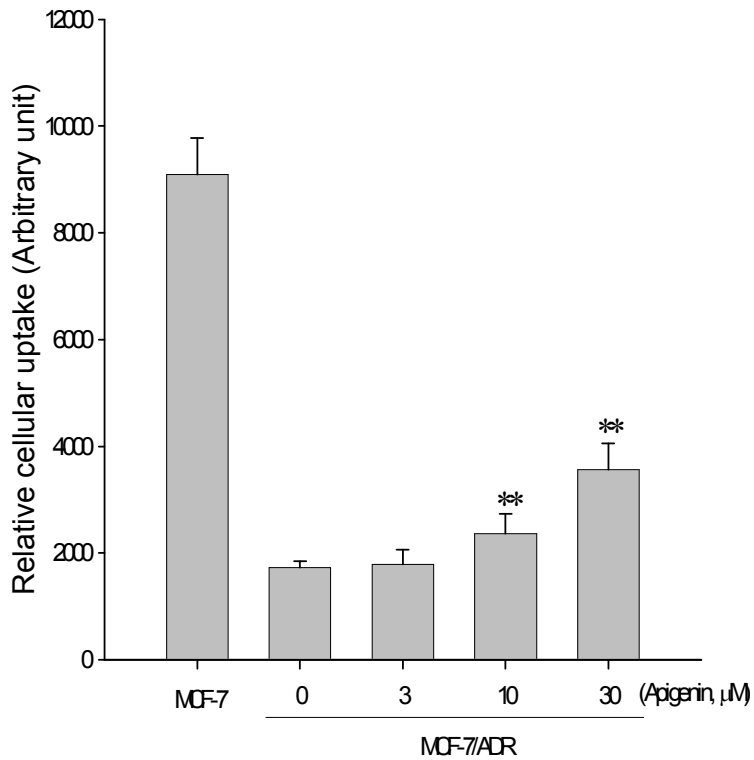
**Figure 1.**

The structures of nimodipine (A), apigenin (B), nitrendipine (C) and ketoconazole (D).



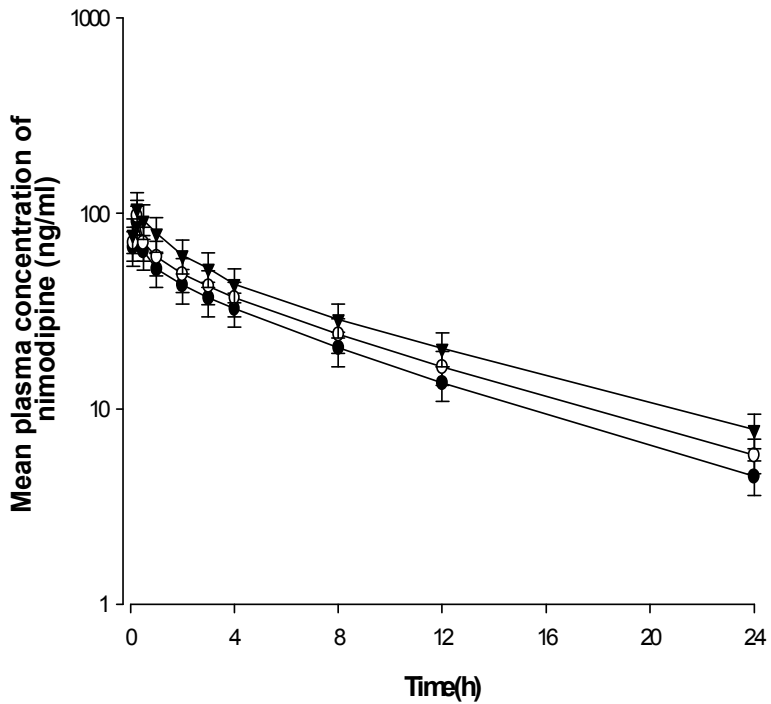
**Figure 2.**

Inhibitory effects of ketoconazole (A) and apigenin (B) on CYP3A4 activity. The experiment was done in duplicate, and the result is expressed as the percent of inhibition.



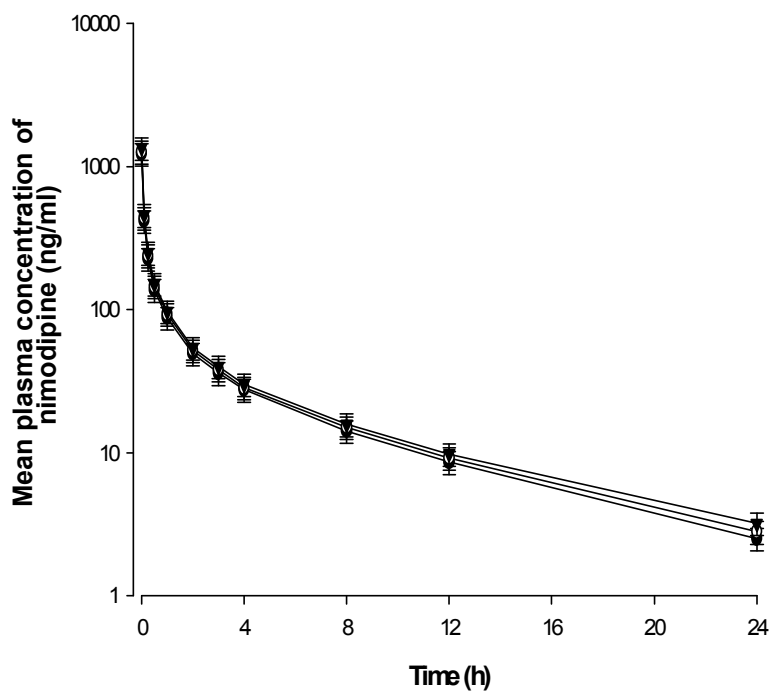
**Figure 3.**

Rhodamine-123 retention. MCF-7/ADR cells were preincubated with apigenin for 30 min after incubation of MCF-7/ADR cells with 20 μM Rho-123 for 90 min. Data represents mean ± SD of 6 separate samples (significant versus the control MCF-7 cells,  $^{***}P < 0.01$ ).



**Figure 4.**

Mean plasma concentration-time profiles of nimodipine after oral (16 mg/kg) administration to rats without or with apigenin (1 or 10 mg/kg) (n = 6, each). Bars represent the standard deviation; (●) Oral administration of nimodipine (control, 16 mg/kg); (○) with 1 mg/kg apigenin, (▼) 10 mg/kg of apigenin.



**Figure 5.**

Mean plasma concentration-time profiles of nimodipine after intravenous (4 mg/kg) administration to rats without or with apigenin (1 or 10 mg/kg) (n = 6, each). Bars represent the standard deviation; (●) Intravenous administration of nimodipine (control, 4 mg/kg); (○) with 1 mg/kg apigenin, (▼) 10 mg/kg of apigenin.

**Table 1.**

Pharmacokinetic parameters of nimodipine after oral (16 mg/kg) administration of nimodipine with apigenin to rats (Mean±S.D, n = 6)

Parameters	Control	Nimodipine+Apigenin	
		1 mg/kg	10 mg/kg
AUC (ng·h/ml)	506 ± 95	592 ± 114	738 ± 141*
C <sub>max</sub> (ng/ml)	91 ± 14	97 ± 15	105 ± 16*
T <sub>max</sub> (h)	0.25	0.25	0.25
t <sub>1/2</sub> (h)	7.1 ± 1.2	7.7 ± 1.2	8.3 ± 1.3
AB (%)	22.1 ± 4.0	25.8 ± 5.0	32.3 ± 6.0*
RB	100	117	146

\**P* < 0.05, Significant difference compared to the control.

AUC: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to time infinity,

C<sub>max</sub>, Peak concentration, T<sub>max</sub>: The time to reach peak plasma concentration, t<sub>1/2</sub>: Terminal half-life, AB: Absolute bioavailability, RB: Relative bioavailability.

**Table 2.**

Pharmacokinetic parameters of nimodipine after intravenous (4 mg/kg) administration of nimodipine with apigenin to rats (Mean±S.D, n = 6)

Parameter	Control	Nimodipine+Apigenin	
		1 mg/kg	10 mg/kg
AUC (ng·h/mL)	572 ± 117	601 ± 124	648 ± 130
CL <sub>t</sub> (mL/h/kg)	87 ± 17	83 ± 16	78 ± 17
t <sub>1/2</sub> (h)	6.8 ± 1.3	6.7 ± 1.4	7.1 ± 1.5
RB	100	105	113

AUC: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to time infinity,

CL<sub>t</sub>: Total body clearance, t<sub>1/2</sub>: Terminal half-life, RB: Relative bioavailability.



## 6. REFERENCES

1. Scholz H. Pharmacological aspects of calcium channel blockers. *Cardiovasc Drugs Ther* 1997; 10: 869-872.
2. Epstein M, Loutzenhiser RD. Effects of calcium antagonists on renal hemodynamics. *Am J Kidney Dis* 1990; 16: 10-14.
3. Kazda S, Garthoff B, Krause HP, Schlossmann K. Cerebrovascular effects of the calcium antagonistic dihydropyridine derivative nimodipine in animal experiments. *Arzneimittelforschung* 1982; 32: 331-338.
4. Maruhn D, Siefert HM, Weber H, Rämisch K, Suwelack D. Pharmacokinetics of nimodipine. I. communication: absorption, concentration in plasma and excretion after single administration of [<sup>14</sup>C] nimodipine in rat, dog and monkey. *Arzneimittelforschung* 1985; 35: 1781-1786.
5. Suwelack D, Weber H, Maruhn D. Pharmacokinetics of nimodipine, II. communication: absorption, concentration in plasma and excretion after single administration of [<sup>14</sup>C] nimodipine in rat, dog and monkey. *Arzneimittelforschung* 1985; 35: 1787-1794.
6. Ramsch KD, Ahr G, Tettenborn D, Auer LM. Overview on pharmacokinetics of nimodipine in healthy volunteers and in patients with subarachnoid hemorrhage. *Neurochirurgia* 1985; 28: 74-78.
7. Scherling D, Buhner K, Krause HP, Karl W, Wünsche C.

- Biotransformation of nimodipine in rat, dog, and monkey. *Arzneimittelforschung* 1991; 41: 392-398.
8. Guengerich FP, Brian WR, Iwasaki M, Sari MA, Bäärnhielm C, Berntsson P. Oxidation of dihydropyridine calcium channel blockers and analogues by human liver cytochrom P-450 IIIA4. *J Med Chem* 1991; 34: 1834-1844.
  9. Fuhr U, Maier-Bruggemann A, Blume H, Mück W, Unger S, Kuhlmann J, Huschka C, Zaigler M, Rietbrock S, Staib AH. Grapefruit juice increases oral nimodipine bioavailability. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1998; 36: 126-132.
  10. Zhang L, Liu XD, Xie L, Wang GJ. P-glycoprotein restricted transport of nimodipine across blood-brain barrier. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24: 903-906.
  11. Dixon RA, Steele CL. Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci* 1999; 4: 394-400.
  12. Yin Y, Gong FY, Wu XX, Sun Y, Li YH, Chen T, Xu Q. Anti-inflammatory and immunosuppressive effect of flavones isolated from *Artemisia vestita*. *J Ethnopharmacol* 2008; 120: 1-6.
  13. Nafisi S, Hashemi M, Rajabi M, Tajmir-Riahi HA. DNA Adducts with Antioxidant Flavonoids: Morin, Apigenin, and Naringin. *DNA and Cell Biology* 2008; 27: 433-442.
  14. Galati G, Moridani MY, Chan TS, O'brien PJ. Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: glutathione

- oxidation and conjugation. *Free Radical Biology & Medicine*. 2001; 30: 370-382.
15. Chuang CM, Monie A, Wu A, Hung CF. Combination of apigenin treatment with therapeutic HPV DNA vaccination generates enhanced therapeutic antitumor effects. *J Biomed Sci* 2009; 16: 49-60.
  16. Jeong GS, Lee SH, Jeong SN, Kim YC, Kim EC. Anti-inflammatory effects of apigenin on nicotine- and lipopolysaccharide-stimulated human periodontal ligament cells via heme oxygenase-1. *Int Immunopharmacol* 2009; 9: 1374-1380.
  17. Gates MA, Vitonis AF, Tworoger SS, Rosner B, Titus-Ernstoff L, Hankinson SE, Cramer DW. Flavonoid intake and ovarian cancer risk in a population-based case-control study. *Int J Cancer* 2009; 124: 1918-1925.
  18. Fukuda K, Ohta T, Oshima Y, Ohashi N, Yoshikawa M, Yamazoe Y. Specific CYP3A4 inhibitors in grapefruit juice: furocoumarin dimers as components of drug interaction. *Pharmacogenetics* 1997; 7: 391-396.
  19. Ho PC, Saville DJ, Wanwimolruk S. Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. *J Pharm Pharm Sci* 2001; 4: 217-227.
  20. Nguyen H, Zhang S, Morris ME. Effect of flavonoids on MRP1-mediated transport in Panc-1 cells. *J Pharm Sci* 2003; 92: 250-257.
  21. Kimura Y, Ito H, Ohnishi R, Hatano T. Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity. *Food Chem Toxicol*

2010; 48: 429-435.

22. Qian M, Gallo JM. High-performance liquid chromatographic determination of the calcium channel blocker nimodipine in monkey plasma. *J Chromatogr* 1992; 578: 316-320.
23. Crespi CL, Miller VP, Penman BW. Microtiter plate assays for inhibition of human, drug-metabolizing cytochromes P450. *Anal Biochem* 1997; 248: 188-190.
24. Soambia G, Ranellett FO, Panici PB, De Vincenzo R, Bonanno G, Frrandina G, Piantelli M, Bussa S, Rumi C, Ciantriglia M, Mancuso S. Quercetin potentiates the effect of adriamycin in a multidrug-resistant MCF-7 human breast-cancer cell line: P-glycoprotein as a possible target. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995; 36: 448-450.
25. Choi CH, Romiti N, Cervelli F, Tongiani R. Effect of flavonols on P-glycoprotein activity in cultured rat hepatocytes. *Life Sci* 1995; 57: 1741.
26. Endicott JA, Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein mediated multidrug resistance. *Ann Rev Biochem* 1989; 58: 137-171.
27. Zhang DM, He ZW, Liu XD, Li Y, Xie L, Wang GJ, Liu L. In-vivo and in-vitro studies on the effect of Huang-Lian-Jie-Du-Tang on nimodipine transport across rat blood-brain barrier. *J Pharm Pharmacol* 2007; 59: 1733-1738.
28. Reynolds JEF. *Martindale : The Extra Pharmacopeia*. Pharmaceutical Press London. 1993.

29. Sandstrom R, Karlsson A, Knutson L, Lennernas H. Jejunal absorption and metabolism of R/S-verapamil in humans. *Pharm Res* 1998; 15: 856-862.
30. Wacher VJ, Wu CY, Benet LZ. Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Mol Carcinog* 1995; 13: 129-134.

# 국 문 초 록

## 흰 쥐에서 아피제닌이 니모디핀의 약물동태에 미치는 영향

서 규 화

지도 교수 : 이 원 재

약학과

조선대학교 대학원

항고혈압제인 니모디핀과 항산화제의 병용 투여가 순환기계 질환 예방 및 치료를 위해서 처방되는 경우가 있으므로 이에 대한 상호작용을 알아보하고자, 흰 쥐에 니모디핀 (경구; 16 mg/kg, 정맥; 4 mg/kg)과 아피제닌 (1 및 10 mg/kg)을 병용 경구 투여한 후 니모디핀의 약물동태학적 변수 (parameter)들을 대조군과 비교 검토하였다.

아피제닌과 병용 투여시 니모디핀의 약물동태학적 변수는 유의성있게 변화하였다. 대조군에 비해 아피제닌 (10 mg/kg)과 병용 투여군에서 니모디핀의 혈장농도 곡선하면적 (AUC)과 최고 혈중농도 ( $C_{max}$ )는 각각 유의성 ( $P < 0.05$ ) 있게 증가되었다. 절대적 생체이용률 (AB)도 니모디핀 경구 투여 군에서 대조군에 비해 유의성 ( $P < 0.05$ , 46%) 있게 증가되었다. 니모디핀 정맥 투여군에서는 아피제닌이 약동학적 변수에는 거의 영향을 주지 못하였다.

본 연구에서 플라보노이드류인 아피제닌을 각각 고혈압치료제인 니모디핀과 병용 투여 하였을 때 경구 투여된 니모디핀의 생체이용률이 유의성 있게 증가된 것은 아피제닌에 의해서 주로 소장내 존재하는 P-당단백질 억제에 의한 니모디핀의 흡수 증가와 주로 소장내 존재하는 CYP3A4 억제에 의한 니모디핀의 초회통과효과 (대사)감소에 기인한 것으로 사료된다.

## Acknowledgements

아직은 미숙한 제가 학위를 취득할 수 있게 도움을 주신 많은 분께 글로서 감사의 말씀을 전하고자 합니다.

대학원에 입학해 좋은 연구 주제를 주시고 격려와 조언으로 지도해주신 최준식 교수님, 지난 2 년 동안 보살펴주신 이원재 교수님께 머리 숙여 감사드립니다. 부족한 저의 학위논문을 지적, 보완해주신 이원재 교수님, 기성환 교수님, 신상미 교수님께 감사드립니다.

학위 과정 마지막 학기에 만나 부담되었겠지만, 항상 자상하게 지도해주시고, 칭찬으로 용기를 북돋아 주신 신상미 교수님 진심으로 감사드립니다. 제게 다시 공부할 수 있는 의지를 심어주시고 동기 부여해주심에 교수님께 배울 앞으로의 시간이 설레기도 합니다.

학부 시절 지도해주신 고문주 교수님, 조성동 교수님 감사합니다. 그리고 김희정 교수님. 교수님은 제 생애 최고의 멘토입니다. 자주 못 뵈지만, 교수님께서 해주신 이야기들이 저를 바로잡고 힘낼 수 있게 해주셨어요. 제게 자신을 사랑하며 존중하고 아끼는 방법을 알려주셔서 감사합니다. 현서와 건우, 교수님 부부께서 언제나 건강하시길 기도할게요. 그리고 생화학실 랩짱 진아 언니. 선배인 근희 오빠. 제 투덜, 짜증 다 이겨내느라 고생 많지만, 앞으로도 비슷할 것 같은 느낌이랄까. 우리 자주 만나서 맛있는 것 먹고 수다 나눴어요. 언니는 건강해질 필요가 있으니 좋은 음식 많이 먹고, 언제나 주변인들 챙겨주기만 했던 언니가 배려있고 포근한 남편 만나길 바랄게요. 근희 오빠는 앞으로 고생길 열린 것 같지만 그게 또 해보면 그 안에서 보람도 있다고 느꼈어요. 오빠가 새롭게 선택한 도전에 박수를 보내며, 이제 자주 못 만날 것 같아 아쉽긴 하지만 항상 응원할게요. 쓴소리 듣고 싶을 때 연락하면 더욱 좋고요. 종종 시간 내서 언니랑 나 보러 와요.

그리고 우리 외신번역프로젝트팀. 그동안 이런 이유로 참여율이 낮아 죄송하고 앞으로는 꾸준히 일하겠습니다. 팀이 구성되고 시간이 지나면서 팀 색깔을 찾아가는 것 같아 뿌듯하기도 해요. 이 팀에 속하게 되면서 시야가



넓어지고, 다양한 분야의 글을 읽을 수 있어 기쁘기도 하고요. 스스로 부족함을 느끼면서 한 단계씩 성장할 수 있는 계기가 되었답니다.

기은 언니 올 하반기에 언니 덕분에 잘 먹고, 잘 지내고, 스트레스도 풀 수 있었어요. 언니는 정말 같이 일해보고 싶은 사람입니다. 언니가 지금 계획하고 있는 일들이 잘 이루어져 원하던 일을 하고 언니의 실력이 마음껏 발휘되었으면 해요. 더 나은 환경에서 즐겁게 일할 수 있길 바랍니다.

마지막으로 우리 부모님, 엄마. 아빠. 물가에 내놓은 아이처럼 불안하고 부족하게 느낄 수도 있겠지만 언제나 웃으며 응원해주시고, 원하는 방향과 달리 나가도 결국에는 제 선택을 믿어주셔서 감사합니다. 아빠 엄마께 큰 딸이지만, 부족한 딸이라는 생각에 죄송한 마음이 커요. 언제나 엄마 아빠의 사랑스러운 딸이 되고 싶었지만, 아직도 ‘아직은’이라는 생각만 듭니다. 혼자 나와 있어 염려가 크시겠지만 걱정하지 마세요. 항상 조심하고, 제가 할 일들 미루지 않고 잘할게요. 저 엄마 아빠께서 바르게 키워주셨잖아요. 내 동생 길주야. 시작은 조금 늦었지만 원하던 공부를 하는 것을 먼저 축하해. 언니가 고집부려서 미안함이 크지만 이제는 얼마든지 응원할게. 어리지만 사려 깊고 스스로 자제하는 마음이 안타까울 때도 많아. 활동적인 아이니까 밖으로 나가 놀기도 하고, 그게 어떤 감정이든 쌓아두지 말고 외부로 꺼내면 좋겠어. 혼자 해결하려 하지 말고 너에겐 가족이 있다는 것을 알아줬으면 해. 그리고 누나에겐 더 없는 천사이고, 기쁨인 우리 사랑하는 막내 원재야. 누나가 말로만 잘해주고 실상은 같이 하는 시간을 보내지 못해서 미안해. 그럼에도 밝고 사랑스럽게 자라줘서 고마워. 앞으로 우리 동생이 사랑을 베풀 줄 알고, 언제나 하고 싶은 일을 하면서 건강하게 자랐으면 좋겠어. 누나는 원재 옆에 있다는 거 잊지 말고, 나중에 원재가 학교 다 졸업하고 나서도 누나랑 친구처럼 대화하고 취미를 공유하며 지내고 싶어.

제가 하고 싶은 공부를 하고, 하고 싶은 일만 골라 할 수 있는 이유인 가장 큰 축복은 우리 가족이에요. 항상 내 편, 든든한 내 가족. 사랑합니다. 우리 가족이 아프지 않고 건강하게 지내는 것이 제겐 가장 큰 소원이예요.

새로운 공부를 하며 배운다는 것이 즐겁다는 생각이 들었습니다. 현실에 안주하지 않고, 자신을 발전시킬 수 있는 직업을 가진 겸손하고 꾸준한 사람이 되고 싶습니다.