

基于大鼠脑缺血再灌注损伤模型建立芍药内酯苷的 PK-PD 模型

巩仔鹏^{1,2,3,4}, 李梅^{1,2,3,4}, 胡建春^{1,2,3,4}, 吴林霖^{1,2,3,4}, 王爱民^{1,2,3,4}, 李勇军^{1,2,3,4}, 李月婷^{1,2,3,4*}

(1. 贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室, 贵州贵阳 550004; 2. 贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵州贵阳 550004; 3. 贵州医科大学药学院, 贵州贵阳 550004; 4. 国家苗药工程研究中心, 贵州贵阳 550004)

摘要 [目的] 建立芍药内酯苷的药动学-药效学(PK-PD)模型。[方法] 首先采用液质联用法测定大鼠脑缺血再灌注损伤模型给予辛芍组方后的不同时间点所得血浆样本中芍药内酯苷的药物浓度, 获得药时曲线; 同时采用试剂盒测定不同时间点所得血浆样本中的超氧化物歧化酶(SOD)和乳酸脱氢酶(LDH)含量, 获得时效曲线。然后用 WinNonLin 软件采用房室模型的分析方法对芍药内酯苷的药代动力学参数进行拟合, 获得 PK 参数。在此基础上, 固定相关的药代动力学参数, 对时效关系进行拟合, 得到相关的 PD 参数, 根据 PD 参数, 建立辛芍组方中芍药内酯苷的 PK-PD 模型。[结果] 当以 SOD 为药效指标时, 可得辛芍组方中芍药内酯苷的 PK-PD 模型为 $E = 21.04 + (7.16 \times Ce)/(Ce + 372.4)$; 当以 LDH 为药效指标时, 可得辛芍组方中代表成分芍药内酯苷的 PK-PD 模型为 $E = 216.83 - (37.31 \times Ce)/(Ce + 0.04)$ 。[结论] SOD 和 LDH 的浓度与芍药内酯苷的浓度存在一定的相关性。芍药内酯苷可通过提高 SOD、降低 LDH 发挥抗氧化作用来实现保护脑缺血再灌注损伤。

关键词 大鼠脑缺血再灌注损伤模型; 辛芍组方; 芍药内酯苷; PK-PD 模型

中图分类号 R927.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)27-0001-03

Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Link Model of Albiflorin Based on Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury Model Rats

GONG Zi-peng^{1,2,3,4}, LI Mei^{1,2,3,4}, HU Jian-chun^{1,2,3,4}, LI Yue-ting^{1,2,3,4*} et al (1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004; 2. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education), Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004; 3. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004; 4. National Engineering Research Center of Miao's Medicines, Guiyang, Guizhou 550004)

Abstract [Objective] The aim was to establish the pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model of albiflorin in Xinshao formula. [Method] Firstly, in order to get the drug-time curve of albiflorin in Xinshao formula in plasma collected from different time points of a disease model animal, whose concentration were determined by the method of UPLC-MS. At the same time, the content of SOD and LDH in the plasma samples of different time points were determined by the kit for time-effect curve. Then the pharmacokinetic software was used to fit the pharmacokinetic parameters of albiflorin with the compartmental model and to get PK parameters. After that, the pharmacokinetic parameters were fixed, and the time effect relationship were fitted to get the relevant PD parameters. According to the PD parameters, the PK-PD model of albiflorin had been established. [Result] When SOD was used as the index of efficacy, the PK-PD model of albiflorin was obtained as $E = 21.04 + (7.16 \times Ce)/(Ce + 372.4)$; When LDH was used as the index of efficacy, the PK-PD model of albiflorin was obtained as $E = 216.83 - (37.31 \times Ce)/(Ce + 0.04)$. [Conclusion] The PK-PD model of albiflorin in the formula showed that the concentration of SOD and LDH was correlated with the concentration of albiflorin. Albiflorin could protect cerebral ischemia reperfusion injury by increasing SOD and decreasing LDH.

Key words Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury Model Rats; Xinshao formula; Albiflorin; PK-PD model

药动学-药效学(PK-PD)模型是综合研究体内药动学过程与药效量化指标的动力学过程, 把药动学与药效学所描述的时间、药物浓度、药物效应三者间关系有机地结合在一起进行研究, 有助于更为全面和准确地了解药物的效应随剂量(浓度)及时间而变化的规律^[1-2]。它用于活性药物的筛选、新药的研究及药物作用机理的探讨等各方面, 不但减少人力物力耗费, 而且是实现新药开发、设计给药方案等最有效的工具^[3-4]。

“辛芍组方”由灯盏细辛、赤芍配伍组成, 为贵州少数民族经验方, 具有活血化瘀、通经活络的功效, 民间主要将其运用于预防和辅助治疗中风、偏瘫, 疗效显著。贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室前期发现芍药内酯苷是其有效成分之一, 但是关于芍药内酯苷的 PK-PD 模型的研究尚属空白。鉴于中药主要是用于病理状态下的机体, 因此研究中

药在病理状态下的 PK-PD 模型较正常状态更有意义且与临床更相关^[5]。为此, 贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室在建立大鼠脑缺血再灌注损伤模型的基础上, 建立了辛芍组方中芍药内酯苷的 PK-PD 模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器。 Waters Acquity UPLC 超高压液相-三重四级杆质谱联用仪(AcquityTM UPLC-TQD 系统, 包括二元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、电喷雾电离源、柱温箱等, MassLynx 4.1 质谱工作站); MTN-2800D 氮吹浓缩装置(天津奥特塞恩斯仪器有限公司); XYN-15LP 氮吹仪氮气发生器(上海析友分析仪器有限公司); 680 酶标仪(美国 Bio-Rad); Water purifier 实验室专用超纯水机(沃特水处理设备有限公司); 微量移液器(德国 Eppendorf 股份公司)。

1.1.2 试剂与药剂。 芍药内酯苷对照品(批号 20140321, 纯度 $\geq 98\%$)、葛根素对照品(内标, 批号 0752-9605, 纯度 $\geq 98\%$)均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯, 购自德国 Merck 公司; 蒸馏水购自广东省广州屈臣氏有限公司, 其余试剂均为分析纯。辛芍组方冻干粉针由贵州省药物制剂重点实验室提供(批号 20130527), 经测定, 芍药内酯苷的含量为 2.5 mg/g。

基金项目 国家自然科学基金项目(81260636); 贵州省优秀青年科技人才培养项目(黔科合人字[2015]11号); 贵州省民族药药效物质基础研究科技创新人才团队[贵州省高层次人才培养(百层次黔科合平台人才[2016]5613\5677)]; 贵州省中医药管理局项目(QZZY-2015-080)。

作者简介 巩仔鹏(1985—), 男, 安徽界首人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事中药药代动力学及其 PK-PD 结合模型研究。* 通讯作者, 讲师, 博士, 从事中药药效物质基础研究。

收稿日期 2017-08-28

1.1.3 试验动物。健康雄性SD大鼠,体重280~300 g,SPF级,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物许可证编号:SCXK(京)2012-0001。动物饲养于相对湿度(22±2)℃、相对湿度60%±10%的环境中,饲养管理均严格按照试验动物的要求及规则,试验前饲养7 d适应环境。

1.2 方法

1.2.1 辛芍组方中芍药内酯苷在脑缺血再灌注损伤模型大鼠体内的药代动力学研究。取10只280~300 g的雄性SD大鼠,禁食12 h,按0.35 g/kg的剂量腹腔注射10%水合氯醛麻醉。采用改良的Longa等^[6]的方法制备大鼠脑缺血再灌注损伤模型;待模型成功后,取脑缺血再灌注损伤模型大鼠,口服给予辛芍组方干预,每天2次,连续3 d。第4天于首次给药前以及给药后5、15、30、60、90、120、180、240、360、480、600、720 min通过插管采血0.2 mL于肝素化的EP管中,离心,取100 μL血浆,−80℃保存备用。

取100 μL血浆样品,加入50 μL 1%甲酸水和15 μL 0.5 μg/mL葛根素,涡混,再加入380 μL甲醇,涡混,超声15 min,12 000 r/min离心10 min,转移上清液至1.5 mL EP管中,于氮吹仪上30℃吹干,再加入150 μL 50%乙腈复溶,涡混,超声15 min,15 000 r/min离心10 min,取上清液进样。采用已建立的UPLC-MS/MS法测定不同时间点所得血浆中辛芍组方中代表成分芍药内酯苷的浓度,利用WinNonLin软件计算芍药内酯苷的主要药代动力学参数。

1.2.2 辛芍组方干预后药效动力学的研究。取“1.2.1”相同的血浆样本,用试剂盒测定不同时间点所得血浆中2种药效指标[超氧化物歧化酶(SOD)和乳酸脱氢酶(LDH)]的含量,结合“1.2.1”的血药浓度数据,绘制代表成分芍药内酯苷的血药浓度-时间和效应(分别以SOD和LDH为药效指标)时间曲线图。

1.2.3 辛芍组方中芍药内酯苷在效应室浓度的拟合。分别把“1.2.1”中的辛芍组方中代表成分芍药内酯苷的血药浓度-时间数据导入到WinNonLin软件,然后采用Semi-compartmental modeling工具对血药浓度-时间数据进行拟合,获得芍药内酯苷在效应室的浓度-时间数据,然后绘制芍药内酯苷的效应室浓度和效应(分别以SOD和LDH为药效指标)曲线。

1.2.4 辛芍组方中芍药内酯苷的PK-PD结合模型的建立。固定“1.2.1”中的芍药内酯苷的相关药代动力学参数,采用WinNonLin软件中的PK-PD model进行拟合,获得PK参数。对“1.2.1”中时间-效应(分别以SOD和LDH为药效指标)关系进行拟合,得到相关的PD参数,进而获得辛芍组方中芍药内酯苷的PK-PD结合模型的参数,建立其PK-PD结合模型。

2 结果与分析

2.1 辛芍组方中芍药内酯苷在脑缺血再灌注损伤模型大鼠体内的药代动力学研究 脑缺血再灌注损伤模型大鼠灌胃给予辛芍组方后,大鼠血浆中芍药内酯苷的血药浓度-时间关系经药动学隔室模型拟合后,发现其较符合单房室开放模

型。通过模型计算后发现血药浓度的实测值与计算所得的预测值基本一致。辛芍组方中芍药内酯苷的主要药代动力学参数如下:AUC_{0-t}为698.5,V/F为0.42,CL/F为0.045,K₀₁为128.680,K₁₀为0.107,K_{01_HL}为0.005,K_{10_HL}为6.430。

2.2 辛芍组方干预后的药效动力学研究 以SOD为药效指标,可得辛芍组方中芍药内酯苷在脑缺血再灌注损伤模型大鼠体内的血药浓度-时间和效应之间的变化如图1所示。

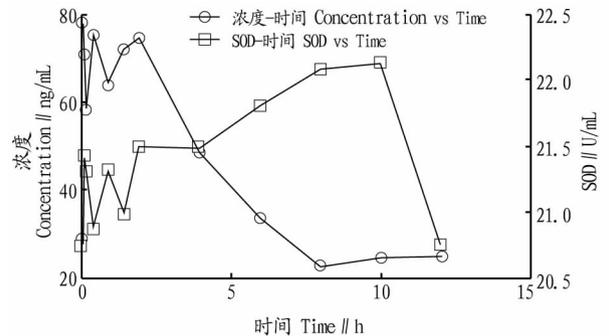


图1 辛芍组方中芍药内酯苷在脑缺血再灌注损伤模型大鼠体内的血药浓度-时间和效应(以SOD为药效指标)时间曲线($n=5$)

Fig. 1 Plasma concentration and effect time profiles of albiflorin after oral administration of Xinshao formula in cerebral ischemia-reperfusion injury model rats when SOD was used as the index of efficacy ($n=5$)

以LDH为药效指标,可得辛芍组方中芍药内酯苷在脑缺血再灌注损伤模型大鼠体内的血药浓度-时间和效应之间的变化如图2所示。

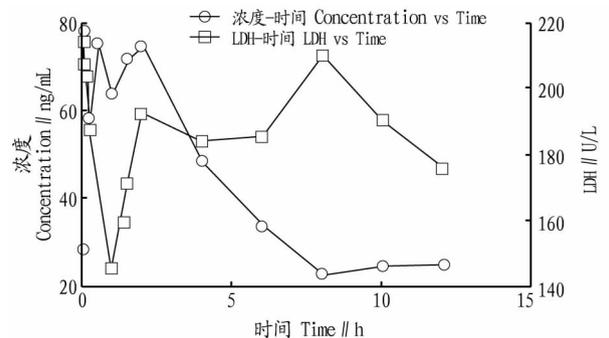


图2 辛芍组方中芍药内酯苷在脑缺血再灌注损伤模型大鼠体内的血药浓度-时间和效应(以LDH为药效指标)时间曲线($n=5$)

Fig. 2 Plasma concentration and effect time profiles of albiflorin after oral administration of Xinshao formula in cerebral ischemia-reperfusion injury model rats when LDH was used as the index of efficacy ($n=5$)

2.3 辛芍组方中芍药内酯苷在效应室浓度的拟合 以SOD为药效指标,可得辛芍组方中芍药内酯苷在效应室的效应-浓度变化如图3所示。

以LDH为药效指标,可得辛芍组方中芍药内酯苷在效应室的效应-浓度变化如图4所示。

2.4 辛芍组方中芍药内酯苷的PK-PD模型的建立 分别以SOD、LDH为药效指标时,得辛芍组方中芍药内酯苷的PK-

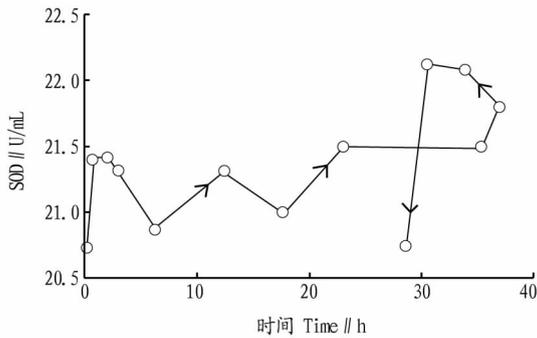


图3 辛芍组方中芍药内酯苷在脑缺血再灌注损伤模型大鼠体内的效应室浓度和效应(以 SOD 为药效指标)曲线($n=5$)

Fig.3 Concentration in effect compartment and effect profiles of albiflorin after oral administration of Xinshao formula in cerebral ischemia-reperfusion injury model rats when SOD was used as the index of efficacy($n=5$)

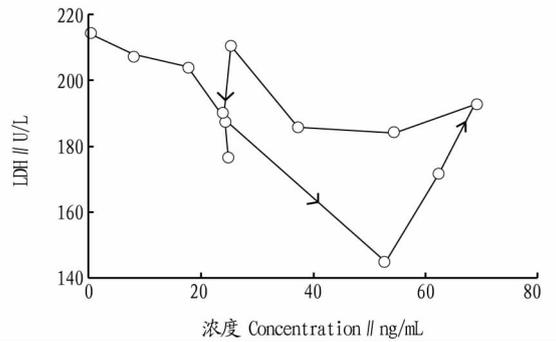


图4 辛芍组方中芍药内酯苷在脑缺血再灌注损伤模型大鼠体内的效应室浓度和效应(以 LDH 为药效指标)曲线($n=5$)

Fig.4 Concentration in effect compartment and effect profiles of albiflorin after oral administration of Xinshao formula in cerebral ischemia-reperfusion injury model rats when LDH was used as the index of efficacy($n=5$)

表1 辛芍组方中芍药内酯苷分别以 SOD、LDH 为药效指标的 PK - PD 参数

Table 1 PK-PD parameters of albiflorin following oral administration of Xinshao formula in rats when SOD and LDH were used as the index of efficacy

类别	SOD				LDH			
	E_{max}	EC_{50}	E_0	K_{e0}	I_{max}	IC_{50}	E_0	K_{e0}
预测值 Predicated value	7.163 6	372.415	21.048 13	0.202 434	287.315	370.307	214.541 8	2.896 68
标准偏差 SD	185.818 5	10 685.650	0.254 82	0.287 817	1 832.296	2 834.782	15.014 1	2.273 88
变异系数 CV	2 593.916 0	2 869.285	1.210 66	142.178 600	637.730	765.523	6.998 2	78.499 44
单变量计算上限 Upper limit of single variable calculation	-413.191 0	-23 800.400	20.471 68	-0.448 660	-3 938.010	-6 166.780	179.918 9	-2.346 94
单变量计算下限 Lower limit of single variable calculation	427.517 8	24 545.240	21.624 58	0.853 527	4 512.639	6 907.389	249.164 6	8.140 31

PD 参数见表 1。

根据辛芍组方中芍药内酯苷的 PK - PD 参数, 当以 SOD 为药效指标时, 可得辛芍组方中芍药内酯苷的 PK - PD 模型为:

$$E = 21.04 + (7.16 \times Ce) / (Ce + 372.4)$$

当以 LDH 为药效指标时, 可得辛芍组方中芍药内酯苷的 PK - PD 模型为:

$$E = 216.83 - (37.31 \times Ce) / (Ce + 0.04)$$

由以上 PK - PD 模型可以根据辛芍组方中芍药内酯苷的浓度推算出相对应的药效值, 也可以根据药效值推算相对应的浓度。

3 结论与讨论

如何选择量化的指标, 使之能够与中药组方有效成分之间具有显著的量效关系成为制约中药有效成分 PK - PD 模型建立的瓶颈。若药动学与药效学是同步变化的, 那么建立 PK - PD 模型就比较容易。但有时靶部位药物浓度与血药浓度并不一致, 药效的消长规律也不一定与血药浓度变化过程完全同步。因此, 研究药动学 - 药效学的相互关系, 建立两者的相关性模型, 对临床合理用药以及研究药物体内过程和作用机制具有重要意义。

该研究主要是以大鼠脑缺血再灌注损伤为研究对象, 采用 WinNonLin 软件中的 Semi - compartmental modeling 工具

对血药浓度 - 时间数据进行拟合, 获得辛芍组方中芍药内酯苷在效应室的浓度 - 时间数据, 进而可以使得辛芍组方中芍药内酯苷与药效指标之间呈现明显的量效关系, 最终建立辛芍组方中芍药内酯苷的 PK - PD 模型。辛芍组方中芍药内酯苷的 PK - PD 模型的结果表明, SOD 和 LDH 的浓度与芍药内酯苷的浓度存在一定的相关性。由此推测辛芍组方及其主要活性成分芍药内酯苷可通过提高 SOD、降低 LDH 发挥抗氧化作用来实现保护脑缺血再灌注损伤。通过辛芍组方中芍药内酯苷的 PK - PD 模型的建立, 揭示了辛芍组方的药效物质基础及其可能的作用机制。

参考文献

- [1] ABDEL-RAHMAN S M, KAUFFMAN R E. The integration of pharmacokinetics and pharmacodynamics: Understanding dose-response[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2004, 44(1): 111 - 136.
- [2] CSAJKA C, VEROTTA D. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling: History and perspectives[J]. J Pharmacokinetic Pharmacodyn, 2006, 33(3): 227 - 279.
- [3] 袁美燕, 吴虹. PK - PD 模型在中药药物代谢动力学中的应用[J]. 安徽中医学报, 2009, 28(5): 86 - 88.
- [4] 曹岗, 张云, 从晓东, 等. PK - PD 模型在中药药动学中的应用[J]. 中草药, 2009, 40(11): 1830 - 1834.
- [5] 巩仔鹏, 陈颖, 张瑞杰, 等. 疾病状态下的中药药代动力学研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 169 - 173.
- [6] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84 - 91.