

·药物动力学研究·

青藤碱在家兔体内药动-药效学结合研究

邵继征¹, 周莉玲², 周郁斌² (1. 广东食品药品职业学院, 广东 广州 510520; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 应用药动-药效(PK-PD)结合模型的研究方法考察类风湿性关节炎家兔体内青藤碱的药代动力学和药效动力学之间的关系。**方法** 家兔灌胃、经皮给药后, 分时采血, 采用反相高效液相色谱法测定青藤碱, 用酶联免疫法测定抗炎因子白细胞介素 1(IL-1)、一氧化氮(NO)、前列腺素 E₂(PEG-2)、肿瘤坏死因子 α(TNF-α) 的浓度, 用 WinLonLin 4.0.1 药动学软件拟合 PK-PD 模型, 并计算主要参数。**结果** 药理效应与药物浓度之间符合抑制性 S 型最大效应模型, 并得到相应的 PK-PD 模型参数。**结论** 建立了青藤碱在家兔体内的 PK-PD 结合模型, 得到了药理效应、药物浓度及时间三者之间的关系。

关键词: 青藤碱; 药代动力学; 药效动力学

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2013)06-0597-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.06.018

Study on Pharmacokinetic-pharmacodynamic Characteristics of Sinomenine in Rabbits

SHAO Jizheng, ZHOU Lilin, ZHOU Yubin (1. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520 Guangdong, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To explore the relationship between pharmacokinetic and pharmacodynamic (PK-PD) of sinomenine in rabbits with the combined PK-PD model. **Methods** The drug concentration in rabbit plasma was detected by HPLC, and the concentrations of interleukin 1(IL-1), nitric oxide (NO), PEG-2, and tumor necrosis factor alpha (TNF-α) in the same samples were determined by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). WinLonLin 4.0.1 was used to fit PK-PD model and to calculate the main parameters. **Results** The relationship between effect and drug concentration met the inhibitory Sigmoid-maximum effect (E_{max}) model and the PK-PD model parameters were obtained. **Conclusion** The PK-PD model of sinomenine, and the relationship of effect with drug concentration and medication time have been established successfully.

Keywords: Sinomenine; Pharmacokinetics; Pharmacodynamics

青藤碱(sinomenine, SN)是中药青风藤治疗风湿及类风湿性关节炎的主要有效成分。研究表明, 青藤碱能下调白细胞介素 1(IL-1)、一氧化氮(NO)、前列腺素 E₂(PEG-2)、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)、白细胞介素 6 (IL-6) 等细胞因子的水平, 是其治疗类

风湿性关节炎的重要作用机制^[1]。在青藤碱的相关研究中, 药代动力学和药效动力学往往是独立进行的, 忽视了两者的内在联系。药动学能反映药物在体内的动态变化规律, 但是, 药物的最终价值取决于药物的药理效应。因此, 只有将药动学和药效学结合

收稿日期: 2013-05-13

作者简介: 邵继征, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 中药新剂型与新技术的研究。Email: yg1110@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金(30672669); 广东省自然科学基金(10451052005005581)。

起来研究,了解药物的浓度与药效之间的定量关系,药动学的研究才具有实际的意义。

本文采用青藤碱灌胃给药和青藤碱凝胶剂经皮给药两种方式,在同一份血浆样品中测定药动学指标和药效学指标,拟合药物浓度及其效应经时过程的曲线,建立药物浓度、时间、药理效应三者之间的定量关系,为青藤碱的合理用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器 SK-1 型涡旋振荡器,金坛市富华仪器有限公司;XR205SM-DR 电子天平,瑞士 precisa 公司;3-18K 冷冻离心机,德国 Sigma 公司;RT-2100C 自动酶标仪,美国 RAYTO 公司;Summit P680 型高效液相色谱仪,包括 P682 泵、UVD170U 可变波长紫外检测器、Chromeleon 色谱工作站,德国 dionex 公司。

1.2 试剂及药品 家兔 IL-1、TNF- α 、PGE-2、NO 酶联免疫试剂盒,武汉中美科技有限公司;卵蛋白、弗氏完全佐剂,美国 Sigma 公司;青藤碱对照品,中国药品生物制品检定所,批号:0774-200206;乌拉坦,上海国药集团化学试剂有限公司;肝素钠,上海蓝季科技发展有限公司;甲醇色谱纯,美国默克公司。

1.3 动物 健康新西兰兔 12 只,雌雄各半,体质量 2.0~2.5 kg,由广州中医药大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK 粤 2003-0001,粤监证字 2007A016。分笼兔饲料喂养,自由饮水,动物房室温 26℃。

1.4 分组、造模与给药 家兔适应性喂养 7 d 后,用卵蛋白诱导家兔类风湿性关节炎模型^[2]。模型诱导成

功后,随机分为青藤碱灌胃组、青藤碱经皮给药组和模型组。用 8%BaS 溶液脱去经皮给药组家兔右腿膝关节部位的毛,清洗干净,作为给药部位,给予青藤碱凝胶剂 400 mg·kg⁻¹,灌胃给药组给予青藤碱混悬液 100 mg·kg⁻¹。

1.5 实验方法 将家兔以 20%乌拉坦生理盐水溶液麻醉,仰卧固定于手术台上,手术分离左后肢股动脉,插入留置针便于采血。各组于给药后 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 36, 48 h 由股动脉采血约 3 mL,置于肝素化试管中,每次取血后及时补充糖盐水。全血在 1000 g 的离心力,2℃~8℃ 的温度下离心 15 min,分离血浆。将每一份血浆样品分为两部分,一部分用于测定药动学指标,另一部分用于测定药效学指标,样品于 -20℃ 冷冻保存待测。

1.6 血浆的处理^[3] 取血浆 0.5 mL 置具塞离心管中,加入 0.01 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 0.25 mL,摇匀,精密加入氯仿 2 mL,漩涡混匀,3000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取氯仿层 1.5 mL,水浴氮气吹干,残渣以 100 μ L 甲醇溶解,取适量注入液相色谱仪进行分析。

1.7 测定青藤碱的液相色谱条件 色谱柱:大连依利特 Hypersil BDS 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相:甲醇-水-乙二胺(50:50:0.2);流速:1 mL·min⁻¹;检测波长:265 nm;柱温:室温。

2 结果

2.1 青藤碱样品色谱图 空白血浆、血浆对照品、血浆样品的液相色谱图见图 1。

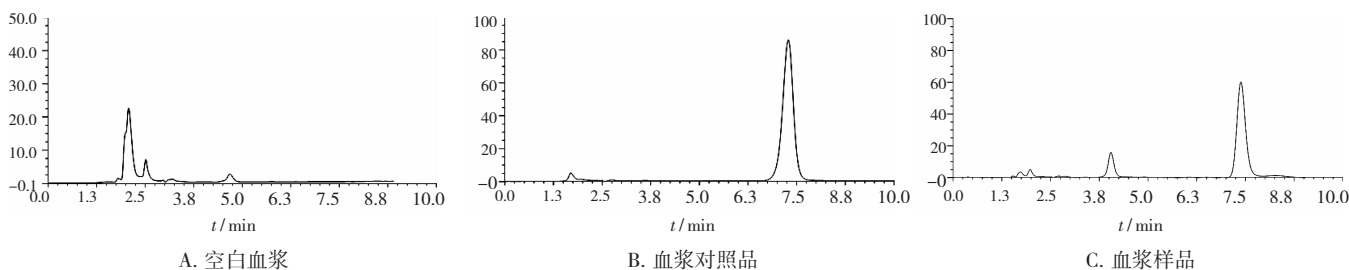


图 1 青藤碱HPLC色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms of sinomenine

2.2 药动学结果 将各组血药浓度对取样时间作图,见图 2。

从图 2 可以看出,青藤碱经皮给药后,1~2 h 即达到平稳释放,维持时间较长。青藤碱灌胃给药后,

迅速吸收入血,血浆药物浓度很快达到峰值,随后快速消除,维持作用时间较短。

2.3 药效学指标的检测结果 用于测定药效学指标的血浆按 ELISA 试剂盒说明书的方法进行处理后定量

测定, 结果见图 3。

2.4 青藤碱 PK-PD 结合模型的拟合 采用 WinNonLin 4.0.1 软件对各个药效学指标的 PK-PD 参数进行计算, 并分别进行了模型的拟合。从数据的变化趋势可以看出, 选择“抑制性 S 型最大效应模型”为最佳,

其公式为: $E=E_{\max} - \frac{(E_{\max}-E_0) C^n}{EC_{50}^n+C^n}$, 公式中 E 为效应, $E_{\max}$ 是最大的药效值, E_0 是药物浓度或药物剂量无穷大时药效指标的最小值, EC_{50} 是引起的效应达到最大效应一半时效应室中的药物浓度, n 为形状因子, 反映曲线的形状。

2.5 青藤碱经皮给药组情况 通过拟合得到青藤碱经皮给药后时间-药物浓度-药效曲线, 见图 4。由图 4 可以看出药动学及药效学的实测值与预测值拟合良好。各药效指标曲线图见图 5, PK-PD 结合模型参数见表 1。

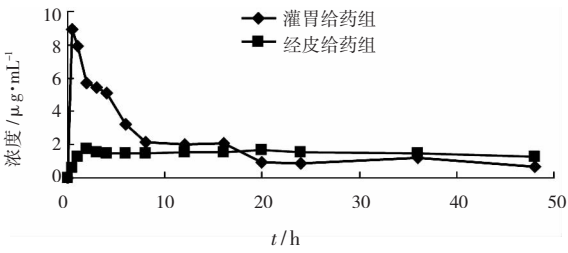


图 2 青藤碱浓度-时间曲线图
Figure 2 Concentration-time curves of SN in plasmas

表 1 经皮给药 PK-PD 结合模型参数

参数	IL-1	NO	PGE-2	PGE-2
$E_{\max}$	24.45	3.92	42.69	42.69
$EC_{50}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1.54	1.57	3.8×10^{-5}	3.8×10^{-5}
n	19.49	36.45	0.50	0.50
$K_{\text{el}}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.18	1.07	1.7×10^{-5}	1.7×10^{-5}
E_0	2.2×10^{-4}	2.2×10^{-4}	11.42	11.42

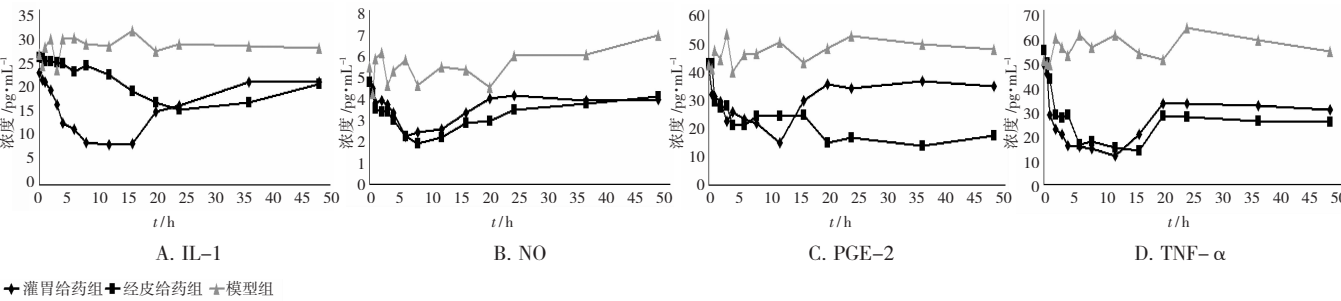


图 3 青藤碱药效-时间曲线图
Figure 3 Effect-time curves of SN in plasma

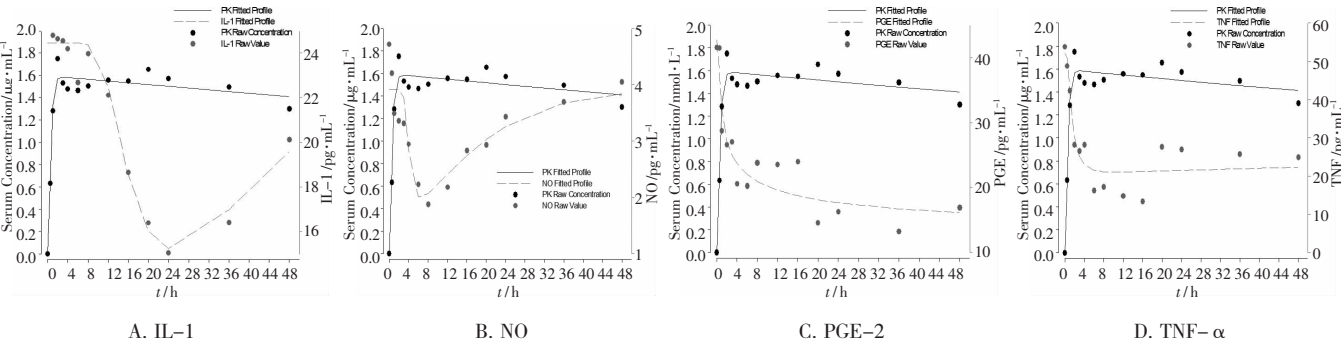


图 4 青藤碱经皮给药后药物浓度-药理效应-时间拟合曲线图
Figure 4 Concentration-effect-time curves after rabbits received 400 mg·kg⁻¹ SN with transdermal

在考察时间内, IL-1、NO、PGE-2、TNF-α 的最小值均出现在 10 h 以后, 明显滞后于药物浓度峰值的出现, 说明血浆与作用部位属于不同的房室, 血浆室与效应室之间存在着平衡的过程。

由图 5 可看出各个指标的滞后环的方向, IL-1、TNF-α、PGE-2 是顺时针滞后环, 而 NO 则是逆时针滞后环。
当 E_0 相对 $E_{\max}$ 比较小时, 可以将 E_0 忽略不计。

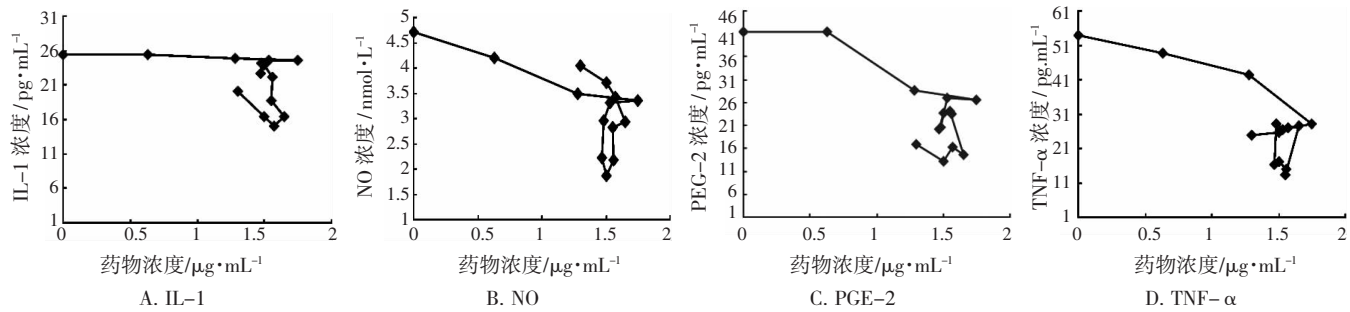


图5 青藤碱经皮给药后药物浓度-药理效应曲线图

Figure 5 Concentration-effect curves after rabbits received 400 mg·kg⁻¹ SN with transdermal

根据求得的参数得出青藤碱经皮给药后各个药效学指标的效应与药物浓度之间的定量方程, 分别如下:

$$\text{IL-1: } E = 24.45 \times \left(1 - \frac{C^{19.49}}{EC_{50}^{19.49} + C^{19.49}} \right);$$

$$\text{NO: } E = 3.92 \times \left(1 - \frac{C^{36.46}}{EC_{50}^{36.46} + C^{36.46}} \right)$$

$$\text{PGE-2: } E = 42.69 - \frac{31.27C^{0.5}}{EC_{50}^{0.5} + C^{0.5}};$$

$$\text{TNF-}\alpha: E = 52.02 \times \left(1 - \frac{C^{1.10}}{EC_{50}^{1.10} + C^{1.10}} \right)$$

2.6 青藤碱灌胃给药组情况 通过拟合得到青藤碱灌胃给药后时间-药物浓度-药效曲线, 见图6。由图6可以看出药动学及药效学的实测值与预测值拟合良好。各药效指标曲线见图7, PK-PD结合模型参数见表2。

表2 灌胃给药 PK-PD 模型参数

Table 2 The PK-PD parameters after orally administration

参数	IL-1	NO	PGE-2	TNF-α
E _{max}	21.24	4.12	40.08	48.07
EC ₅₀ /μg·mL ⁻¹	1.75×10 ⁻³	2.37×10 ⁻³	3.66×10 ⁻³	1.78×10 ⁻³
n	5.75	7.52	1.26	1.50
K _m /μg·mL ⁻¹	0.08	1.10	0.18	0.15
E ₀	5.04	0.95	0.27	2.19×10 ⁻³

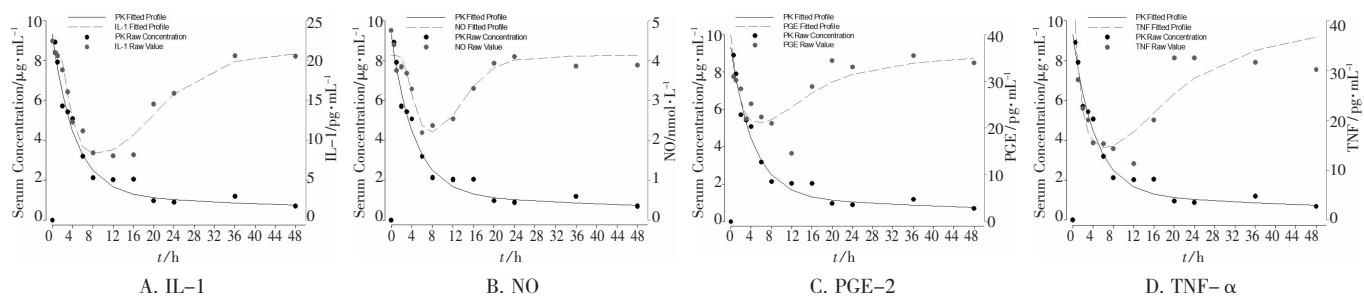


图6 灌胃给药后药物浓度-药理效应-时间拟合曲线图

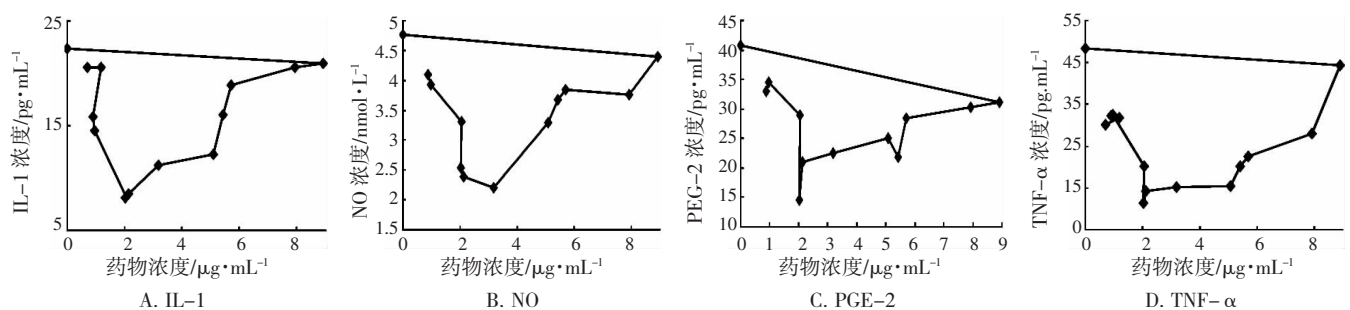
Figure 6 Concentration-effect-time curves after rabbits received 100 mg·kg⁻¹ dose of SN orally

图7 灌胃给药后药物浓度-药理效应曲线图

Figure 7 Concentration-effect curves after rabbits received 100 mg·kg⁻¹ dose of SN orally

在考察时间内, 药物浓度出现峰值的时间在 0.5 h 之前, 而 IL-1、NO、PGE-2、TNF- α 抑制率最大值出现在 10 h 以后, 由此说明药物浓度与药效之间也存在着非常明显的滞后现象, 血浆与作用效应部位属于不同的房室, 药物在血浆室与效应室之间存在着平衡的过程。且青藤碱灌胃给药后, 药动学与药效学的变化方向是不一致的, 药物浓度持续下降的过程中, 药效指标逐渐降低一段时间后出现持续上升的现象。由 E-C_p 曲线可以看出各个指标均呈顺时针滞后环。

根据药效学参数可以得到青藤碱灌胃给药后各个药效学指标的效应与药物浓度之间的定量方程, 分别如下:

$$\begin{aligned} \text{IL-1: } E &= 21.24 - \frac{16.2C^{5.75}}{EC_{50}^{5.75} + C^{5.75}}; \\ \text{NO: } E &= 4.12 - \frac{3.17C^{7.52}}{EC_{50}^{7.52} + C^{7.52}}; \\ \text{PGE-2: } E &= 40.08 - \frac{39.81C^{1.26}}{EC_{50}^{1.26} + C^{1.26}}; \\ \text{TNF-}\alpha: E &= 48.07 * (1 - \frac{C^{1.5}}{EC_{50}^{1.5} + C^{1.5}}) \end{aligned}$$

3 讨论

3.1 关于药效指标的检测 实验中除检测文中提到的 4 个指标之外, 还检测了致炎因子 IL-6, 但结果显示, 大部分血浆中 IL-6 的浓度在所用试剂盒检测限以下, 故未列出 IL-6 的浓度变化, 也未对该指标数据进行处理。曾有报道指出, 类风湿性关节炎模型动物血清中 IL-6 的浓度远远小于关节滑膜液中的浓度, 这可能是血浆中无法准确测定 IL-6 的一个重要原因。

3.2 经皮给药及灌胃给药 PK-PD 结合模型比较 结果表明, 青藤碱在家兔体内分布比较快, 各指标的效应峰值均滞后于血药浓度峰值, 说明药物是逐渐分布到效应室中的, 导致其效应峰值的出现慢于血药浓度峰值。

K_{eo} 是 PK-PD 参数中比较重要的一个参数, 它不仅反映药物从效应室消除的快慢, 还能够反映药物在中央室和效应室之间的平衡速率, 精确地表达血药浓

度与效应之间平衡的快慢^[4], K_{eo} 反映了药物滞后效应的强弱, K_{eo} 越小, 滞后效应越强。由结果可以看出, 当给药方式相同时, 各个药效指标的 K_{eo} 并不相同, 说明各个药效指标可能隶属于不同的效应室, 药物从中央室分布到各个药效学指标所对应的效应室的时间不同。

当给药方式不同时, 同一个药效指标的 K_{eo} 也不相同, 说明药物的吸收方式不同, 药物到达同一效应室的时间也不相同, 引起药物在中央室和效应室之间平衡快慢上的差异。

3.3 关于滞后现象发生的原因 很多药物存在着效应滞后于血药浓度的现象, 传统的房室模型已经不能解释这种现象。Sheiner 等^[5]提出效应室的概念, 将效应室应用于传统的房室模型中, 成功地解释了药效滞后现象, 弥补了传统房室模型的缺陷。

从实验结果可以看出, 各个药效指标出现的滞后现象是不同的, 分析其中的原因可能是: (1) 各个药效指标的效应室是不同的, 每个药效指标有其各自的效应室。药物从中央室向各个效应室分布的平衡过程所需的时间不同。(2) 药物与各个指标受体结合的活性不同, 活性大的, 滞后时间短; 活性小的, 滞后时间长。

参考文献:

- [1] 杨德森, 刘芳, 曾繁典, 等. 青藤碱对大鼠佐剂性关节炎治疗作用及机制的研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(17): 1361-1363.
- [2] Tominaga K, Alstergren P, Kurita H. Clinical course of an antigen-induced arthritis model in the rabbit temporomandibular joint[J]. J Oral Pathol Med, 1999, 28: 268-273.
- [3] 张先洲, 祝红达, 孟书舫, 等. 青藤碱凝胶兔体内经皮给药的药动学[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(12): 1512-1514.
- [4] Donati F, Varin F, Ducharme J, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of atracurium obtained with arterial and venous blood samples[J]. Chin Pharmacol Ther, 1991, 49: 515.
- [5] Sheiner LB, Stanaki DR, Voceh S, et al. Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamic application to D-tubocurarine[J]. Clin pharmacol Ther, 1979, 25: 358.

(编辑: 宋威)