·药物动力学研究·

肿节风总黄酮促进巨核细胞增殖的效应动力学研究

尚广彬，汤喜兰，廖清花，姜 丽，彭文虎，张启云，徐国良(江西中医药大学中医基础理论分化发展研究中心，江西 南昌 330004)

摘要：目的 探讨肿节风总黄酮对体外培养巨核细胞增殖的影响及其效应动力学。**方法** 肿节风总黄酮(0.39 g·kg^{-1})单次灌胃给予正常 SD 大鼠，给药后不同时间点采血制备含药血浆。采用兔抗大鼠血小板相关抗体建立大鼠骨髓巨核细胞增殖障碍模型，并将不同时间点的含药血浆作用于该模型，以巨核细胞数、细胞上清液中血小板生成素(TPO)、转化生长因子 -β1(TGF-β1)含量为效应指标，绘制时间 - 效应动力学曲线，计算相关动力学参数。**结果** 肿节风总黄酮含药血浆可以显著提升巨核细胞数，肿节风总黄酮对巨核细胞数、上清液中 TPO 及 TGF-β1 的效应半衰期分别为：495.52，665.13 和 537.46 min，达峰时间分别为：60，90 和 40 min，平均驻留时间分别为：224.60，242.37 和 231.10 min，其中巨核细胞数与 TPO 含量的效应曲线之间有较好的相关性，时间上稍有滞后现象。**结论** 肿节风总黄酮含药血浆可显著促进大鼠骨髓巨核细胞的增殖，可能与培养体系中 TPO 的浓度密切相关。

关键词： 肿节风总黄酮；巨核细胞；血小板生成素；转化生长因子 -β1；药效动力学
中图分类号： R285.5 **文献标志码：** A **文章编号：** 1003-9783(2014)03-0303-04
doi： 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.016

Pharmacodynamics of Plasma Containing Total Flavonoids from Herba Sarcandrae in Promoting Proliferation of Rat Bone Marrow Megakaryocytes

SHANG Guangbin, TANG Xilan, LIAO Qinghua, JIANG Li, PENG Wenhu, ZHANG Qiyun, XU Guoliang (Research Center for Differentiation and Development of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of plasma containing total flavonoids from Herba Sarcandrae(TFHS) on the proliferation of rat bone marrow megakaryocytes(BMM) and to explore its pharmacodynamics. **Methods** SD rats were administrated TFHS at the dose of 0.39 g/kg for one time. At various time points after administration, the plasma containing TFHS was collected. BMM proliferation disorder model was established by using rabbit anti-rat platelet associated antibody, and then was treated with the plasma containing TFHS. With megakaryocyte count, serum thrombopoietin (TPO) and transforming growth factor beta 1(TGF-β1) as the effectiveness parameters, the pharmacodynamics of TFHS was studied. The apparent parameters of pharmacodynamics were estimated based on the time-effect curve. **Results** The plasma containing TFHS could significantly promote the number of megakaryocytes. The main pharmacodynamics parameters of the number of megakaryocytes, the levels of TPO and TGF-β1 were as follows: half life period $t_{1/2}$ was 495.52, 665.13 and 537.46 min, peak time Tmax was 60, 90 and 40 min, mean residence time MRT(0-t) was 224.60, 242.37 and 231.10 min, respectively. There was a satisfactory correlation between

收稿日期： 2013-12-04
作者简介： 尚广彬，男，讲师，研究方向：中药药理。Email：shanggb107@126.com。通讯作者：徐国良，教授，研究方向：中药药代动力学研究。Email：xuguoliang6606@126.com。
基金项目： 国家自然科学基金(81260653，81001662)；江西省自然科学基金(20114BAB215039)；江西省教育厅项目(GJJ13582)；江西省卫生厅项目(2013A006)。

megakaryocyte count and TPO level，though mild retardation was shown in medication time. **Conclusion**　The plasma containing TFHS could significantly promote the proliferation of rat bone marrow megakaryocytes，which may be associated with the regulation of TPO level in the culture supernatants.

Keywords：Total Flavonoids from Herba Sarcandrae；Megakaryocytes；Thrombopoietin；Transforming growth factor-β1；Pharmacodynamics

肿节风(Herba Sarcandrae)为金粟兰科草珊瑚属植物 *Sarcandrg glabra*(Thunb) Nakai，是目前治疗血小板减少性疾病疗效显著的药物，已有药理实验[1-2]表明肿节风总黄酮(total flavonoids from Herba sarcandrae，TFHS)部位有抗免疫性血小板减少性紫癜的作用，能促进小鼠骨髓巨核系细胞的增殖。然而，肿节风总黄酮部位成分依然复杂，促巨核细胞增殖分化的有效成分不明，同时体内作用机理不清，难以用化学方法测定其血药浓度进行药物动力学研究。本研究通过建立大鼠骨髓巨核细胞增殖障碍模型，以巨核细胞数、血小板生成素(TPO)、转化生长因子-β1(TGF-β1)含量为药效指标，采用药理效应法研究肿节风总黄酮的药物动力学过程，计算相应的动力学参数，为临床合理使用肿节风总黄酮治疗血小板减少症提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 动物　SD 大鼠，清洁级，雄性，体质量为 250～300 g，湖南斯莱克景达实验动物有限公司，许可证号：SCXK(湘)2011-0003。日本大耳兔，清洁级，体质量为 2 kg，南昌龙平兔业有限公司，许可证号：SCXK(赣)2009-0001。

1.2 药物及试剂　肿节风总黄酮是本研究室前期制备[1]，纯度为 78.53 %。肿节风总黄酮含药血浆、兔抗大鼠血小板相关抗体及大鼠骨髓成纤维细胞无血清条件培养液均为自制。IMDM 培养基，美国 Gibco 公司；新生牛血清，杭州四季青生物工程材料研究所，批号：070331；马血清，北京索莱宝科技有限公司，批号：90090627；谷氨酰胺，北京索莱宝科技有限公司，批号：G8203；碘化乙酰胆碱，美国 Sigma 公司，批号：A5751；β-巯基乙醇，美国 Amresco 公司，批号：0482；TPO(批号：L130711279)和 TGF-β1(批号：L130711280)ELISA 试剂盒，美国 Life Science 公司。

1.3 仪器　Forma 3111 细胞培养箱，美国 Thermo Scientific 公司；CKX41 倒置相差显微镜，日本 Olympus 公司；MK3 酶标仪，美国 Thermo Scientific 公司。

1.4 兔抗大鼠血小板相关抗体的制备及检测　参考前期文献[1-2]，稍加改进。SD 大鼠，眼眶取血，肝素抗凝，800 $r\cdot min^{-1}$ 离心 10 min，取上层富含血小板血浆，3000 $r\cdot min^{-1}$ 离心 10 min 沉淀血小板。磷酸缓冲液(PBS)洗涤血小板 3 次，重悬血小板至 10^9 L^{-1}。将上述血小板悬液与等体积完全弗氏佐剂混合，制成完全弗氏佐剂抗原，在兔两后肢足垫、腹部及背部进行多点皮下注射，每只注射佐剂抗原 4 mL。首次注射后于 1，2，4 周，分别取上述相同浓度血小板悬液与不完全弗氏佐剂等体积混合制成不完全弗氏佐剂抗原，多点皮下注射增强免疫，每次每只 4 mL。第 5 周，颈总动脉取血，室温放置 1 h，置 4 ℃过夜，1500 $r\cdot min^{-1}$ 离心 20 min，将所得上清液进行红细胞吸附，ELISA 法检测兔抗大鼠血小板血清的效价，OD 值大于或等于阴性对照 2 倍者即为阳性。

1.5 肿节风总黄酮含药血浆的制备[3]　取 3 只大鼠，用肿节风总黄酮(0.39 $g\cdot kg^{-1}$)一次性灌胃，于给药后 10，20，40，60，90，120，150，180，240，360，480 min 眼眶取血，3000 $r\cdot min^{-1}$ 离心 10 min，分离并分别合并各时间点血浆，0.22 μm 滤膜过滤除菌，-80 ℃保存备用。以不给药的正常大鼠血浆为空白血浆对照。

1.6 大鼠骨髓巨核细胞的培养方法　无菌条件下取大鼠股骨和胫骨，用含 5 %马血清、0.045 %谷氨酰胺、10^{-5} $mol\cdot L^{-1}$ β-巯基乙醇、0.5 %牛血清白蛋白的 IMDM 培养液制备骨髓单细胞悬液，并以 1×10^7 mL^{-1} 接种于 24 孔培养板，每孔 1 mL(复孔中预先放入无菌盖玻片)。

1.7 分组、给药及效应指标检测　实验分为 4 组：正常组、模型组、空白血浆组、肿节风总黄酮 0.39 $g\cdot kg^{-1}$ 含药血浆组，肿节风总黄酮组又分为系列时间组。各组均加入大鼠骨髓成纤维细胞无血清条件培养液(30 %，*V/V*)；除正常组外，各组均加入 128 倍稀释

的兔抗大鼠血小板相关抗体，建立巨核细胞成熟障碍模型；空白血浆组和肿节风总黄酮组的血浆浓度均为 25 %(*V*/*V*)。每组设 3 个复孔，每孔 1 mL。37 ℃，5 % CO_2饱和湿度下培养，第 5 天半量换液。半量换液后 2 d，取复孔上清液按照 ELISA 说明书测定各组样品中 TPO 及 TGF-β1 的含量，并对复孔盖玻片上的细胞进行乙酰胆碱酯酶染色，显微镜下计数成熟巨核细胞数。

1.8 建立时间-效应曲线 以大鼠给药后不同时间点的肿节风总黄酮含药血浆作用于巨核细胞成熟障碍模型的成熟巨核细胞数、细胞上清液 TPO、TGF-β1 浓度作为大鼠服药后不同时间点药效学指标，绘制时间 - 效应曲线，计算各指标动力学参数。

1.9 统计学处理方法 计量数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示，采用 SPSS 13.0 软件，用单因素方差分析进行统计分析，组间比较采用 *t* 检验，$P<0.05$ 有统计学意义。各给药组效应指标 - 时间数据采用 WinNonlin 5.2 药代动力学软件按非房室模型进行处理，计算药动学参数。

2 结果

2.1 肿节风总黄酮含药血浆对大鼠骨髓巨核细胞增殖的影响 兔抗大鼠血小板相关抗体 ELISA 效价随着稀释倍数的增大，OD 值逐渐减小，效价逐渐降低。与阴性对照组比较，兔抗大鼠血小板相关抗体稀释 2048 倍仍然大于阴性对照组的 10 倍，本实验选择稀释 128 倍建立巨核细胞成熟障碍模型。与正常组比较，模型组能显著降低巨核细胞的增殖（$P<0.05$）；与空白血浆组比较，肿节风总黄酮 0.39 g·kg^{-1} 含药血浆 40，60，90，360 min 组均可显著促进大鼠骨髓巨核细胞的增殖($P<0.05$，$P<0.01$)，见表 1。

2.2 肿节风总黄酮含药血浆对大鼠骨髓巨核细胞培养上清液中 TPO 及 TGF-β1 含量的影响 见表 1。与正常组比较，模型组 TPO 含量显著增加($P<0.01$)，TGF-β1 含量显著降低（$P<0.01$）。与空白血浆比较，20，40，90，120 min 时间点肿节风总黄酮含药血浆使培养体系中 TPO 含量均有所升高，其中 90 min 时 TPO 含量升高有统计学意义($P<0.05$)。肿节风总黄酮含药血浆对培养体系中 TGF-β1 的药效方向欠明确，其中肿节风总黄酮 40 min 含药血浆可显著增加 TGF-β1 含量，与空白血浆组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

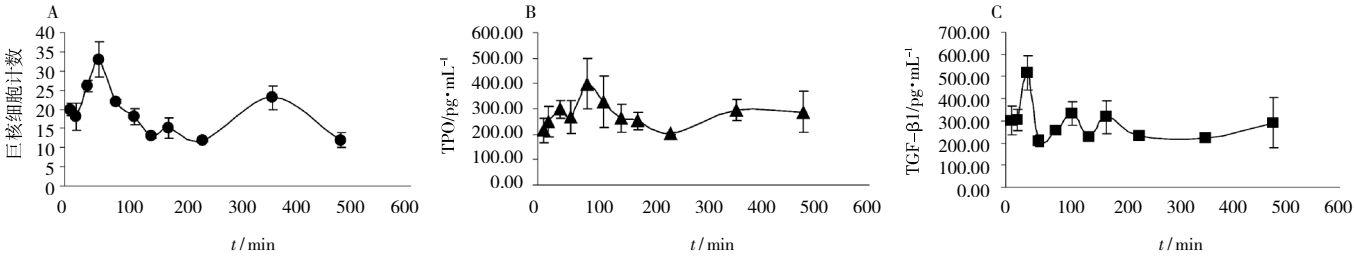
表 1 肿节风总黄酮不同时间点含药血浆对大鼠骨髓巨核细胞增殖及 TPO、TGF-β1的影响($\bar{x}\pm s$，n=3)

Table 1 Effect of serum containing Flavonoids Sarcandrae on proliferation and TPO, TGF-β1 levels of rat bone marrow megakaryocytes

组别	巨核细胞计数	TPO/pg·mL^{-1}	TGF-β1/pg·mL^{-1}
正常组	14.33 ± 1.53	339.38 ± 23.34	427.38 ± 40.27
模型组	9.00 ± 1.00$^{\#}$	564.14 ± 232.32$^{\#\#}$	231.07 ± 10.12$^{\#\#}$
空白血浆组	14.33 ± 3.06	295.18 ± 7.46	267.25 ± 61.64
肿节风 10 min 组	18.00 ± 1.73	214.76 ± 46.74	301.09 ± 65.49
肿节风 20 min 组	17.00 ± 3.61	319.73 ± 128.34	303.43 ± 48.25
肿节风 40 min 组	25.67 ± 1.53**	298.45 ± 35.52	515.82 ± 78.01*
肿节风 60 min 组	28.00 ± 4.58**	267.00 ± 65.36	291.04 ± 164.05
肿节风 90 min 组	22.50 ± 0.71*	397.49 ± 99.30*	256.53 ± 21.68
肿节风 120 min 组	15.67 ± 2.08	327.71 ± 102.70	330.90 ± 53.27
肿节风 150 min 组	12.67 ± 0.58	262.65 ± 56.02	226.38 ± 6.14
肿节风 180 min 组	13.00 ± 2.65	287.41 ± 77.42	316.83 ± 73.06
肿节风 240 min 组	15.33 ± 5.77	203.27 ± 4.66**	233.75 ± 19.80
肿节风 360 min 组	20.00 ± 3.00*	294.21 ± 40.48	221.69 ± 14.07
肿节风 480 min 组	10.00 ± 2.83	242.45 ± 96.43	351.67 ± 131.66

注：与正常组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与空白血浆组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

2.3 肿节风总黄酮对巨核细胞的药效动力学研究 各给药组效应指标 - 时间数据采用 WinNonlin 5.2 药代动力学软件按非房室模型进行处理，得出巨核细胞计数、上清液中 TPO 及 TGF-β1 浓度与不同时间点含药血浆的效应曲线，见图 1。并计算出相关的药效动学参数，见表 2。



A. 巨核细胞数；B. TPO 浓度；C. TGF-β1 浓度

图 1 肿节风总黄酮含药血浆促进巨核细胞增殖的时间-效应曲线

Figure 1 Pharmacodynamics-time profile of serum containing TFHS on proliferation of rat bone marrow megakaryocytes

表 2　肿节风总黄酮含药血浆对巨核细胞增殖的主要效应动力学参数

Table 2 Pharmacodynamics parameters of serum containing TFHS on proliferation of rat bone marrow megakaryocytes

效应参数	$t_{1/2}$/min	T_{max}/min	C_{max}/pg·mL^{-1}	MRT/min
巨核细胞数	495.52	60.00	28.00	224.60
TPO	665.13	90.00	397.49	242.37
TGF-β1	537.46	40.00	515.82	231.10

3 讨论

肿节风及其制剂在治疗特发性血小板减少性紫癜具有显著的疗效，同时，肿节风在骨髓巨核细胞成熟障碍、血小板减少性疾病中的研究也有较多的报道[4]。本研究结果表明，肿节风总黄酮含药血浆对大鼠骨髓巨核细胞增殖的促进作用和所采含药血浆时间点密切相关，其时间 - 效应曲线呈明显的双峰现象(见图 1 A)，其中 40~90 min 时间段肿节风总黄酮 0.39 g·kg^{-1} 含药血浆可显著促进大鼠骨髓巨核细胞的增殖。造成这种双峰效应的原因可能是肿节风总黄酮进入体内经过了肝肠循环，也可能是由肿节风总黄酮不同的效应成分分别起作用造成的。

在巨核细胞增殖、分化和成熟及产生血小板的过程中，受到多种细胞因子共同调控，这个调节网络中正调控因子 TPO 和负调控因子 TGF-β1 的作用最为显著[5-7]。虽然 TPO 主要由肝、肾部位和骨髓微环境中基质细胞合成，但近年的研究表明基质细胞表达 TPO 对调节巨核细胞和血小板数量更为关键，Nagahisa 等[8]在研究特发性血小板减少性紫癜时发现肝、肾的 TPO mRNA 表达水平并无明显提高，而在骨髓基质细胞中表达水平有明显提高，而且 TPO mRNA 的表达水平与巨核细胞数量呈正相关关系，提示基质细胞所合成分泌的 TPO 是生理及病理状况下调节巨核细胞增殖成熟的重要来源。本研究表明，90 min 时点的肿节风总黄酮含药血浆可显著增加大鼠骨髓巨核细胞培养体系中 TPO 的含量。同时，以体系中 TPO 含量为效应指标的动力学曲线和以巨核细胞数指标的效应动力学曲线的匹配程度较高，具有良好的相关性，只是在时间上稍有滞后，见图 1 A 和 B。这和临床研究结果相一致[9]，也显示巨核细胞周围微环境中的 TPO 对其增殖有重要的影响。

骨髓微环境中的 TGF-β1 主要由形态较小的巨核祖细胞、原巨核细胞和基质细胞分泌，TGF-β1 作用于巨核细胞，调节其增殖、分化和成熟。以巨核细胞培养体系中 TGF-β1 含量为指标的药效动力学研究结果显示，肿节风总黄酮的时间 - 效应曲线波折起伏，呈多峰现象，见图 1C。与以巨核细胞数指标的效应动力学曲线比较，不具有相关性。结合 TPO 的实验结果，肿节风总黄酮含药血浆可显著促进大鼠骨髓巨核细胞的增殖，该作用可能与其调控了骨髓巨核细胞培养体系中 TPO 含量的变化密切相关，但与 TGF-β1 的含量变化关联不强。

本研究所采用的药动学研究方法是生物效应法中的药理效应法，相对于传统的血药浓度法比较新颖，所测得的各项药动学参数能更真实地反映中药或复方中多种药物或多种成分的综合疗效与协同效应及体内动态变化，符合中医药的整体观原则[10]。药动学研究结果表明，肿节风总黄酮对以巨核细胞数、上清液中 TPO 为效应指标的消除半衰期($t_{1/2}$)为 495.52，665.13 min，平均驻留时间(MRT)分别为：224.60，242.37 min，说明药物消除慢，在体内驻留时间较长。但由于该结果是在离体的细胞培养体系中得到的，其结果还有待于进一步研究验证。

参考文献：

[1] 徐国良，肖兵华，陈奇，等. 肿节风及其分离部位对免疫性血小板减少性紫癜小鼠血小板的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2005，11(4)：33-36.

[2] 汤喜兰，黄立新，曾治君，等. 肿节风总黄酮对巨核系细胞体外扩增的作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志，2010，16(1)：79-82.

[3] 汤喜兰，黄立新，曾治君，等. 血小板相关抗体对巨核细胞增殖的实验研究[J]. 江西中医学院学报，2009，21(5)：58-60.

[4] 董伟，徐国良，张启云，等. 肿节风的药理作用及其在血小板减少性疾病中的应用[J]. 中药药理与临床，2013，29(01)：176-178.

[5] Chang Y，Bluteau D，Debili N，et al. From hematopoietic stem cells to platelets[J]. J Thromb Haemost，2007，5(Suppl. 1)：318-327.

[6] Matsumura I，Kanakura Y. Molecular control of megakaryopoiesis and thrombopoiesis[J]. Int J Hematol，2002，5(5)：473-483.

[7] 徐敏，武希润，王慧纬，等. TPO 对体外巨核细胞增殖、分化的影响[J]. 中国医疗前沿，2012，7(7)：3-4.

[8] Nagahisa H，Nagata Y，Ohnuki T，et al. Bone marrow stromal cells produce thrombopoietin and stimulate megakaryocyte growth and maturation but suppress proplatelet formation[J]. Blood，1996，87(4)：1309-1316.

[9] 郭新红，郝建萍，赵芳，等. TPO 和 TGF-β1 在特发性血小板减少性紫癜患者血清中的表达和意义[J]. 细胞和分子免疫学杂志，2011，27(10)：1132-1133.

[10] 吴晓洋，刘建勋. 中药药物动力学研究现状与评价[J]. 世界科学技术，2002，4(02)：26-30.

(编辑：梁进权)