

· 药物代谢 ·

基于UPLC-MS/MS和分子对接技术考察聚乙二醇400对黄芩苷药代动力学、抗炎作用的影响

杨七妹, 周明皓, 王鹏娇, 曹思源, 张硕, 杨盛刚, 张敏*, 高秀丽*

(贵州医科大学药用植物功效与利用国家重点实验室, 药学院, 微生物与生化药学工程中心, 实验动物中心, 贵阳 550025)

[摘要] 目的:考察药用辅料聚乙二醇400(PEG400)对黄芩苷药代动力学及抗炎作用的影响,利用分子对接技术初步探讨黄芩苷及其主要代谢物黄芩素6-O-β-D-葡萄糖醛酸苷(B6G)的抗炎作用。方法:大鼠随机分为2组,分别以水和PEG400为溶解基质,给大鼠灌胃相等剂量的黄芩苷水溶液(黄芩苷+水组)与黄芩苷PEG400溶液(黄芩苷+PEG400组),不同时间段血浆样品经处理后,利用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定大鼠血浆中黄芩苷及其主要代谢物B6G的浓度,运用DAS 3.2.2软件处理药代动力学参数;将小鼠随机分为空白组(生理盐水,20 mL·kg⁻¹),阿司匹林组(0.2 g·kg⁻¹),黄芩苷/黄芩苷+PEG400高、低剂量(3.0, 1.5 g·kg⁻¹)组,连续给药7 d,建立小鼠耳肿胀及足肿胀模型,计算肿胀度及肿胀抑制率。结果:药代动力学研究结果显示,与黄芩苷+水组相比,大鼠灌胃黄芩苷PEG400溶液后黄芩苷及B6G的血药浓度增加,药时曲线下面积(AUC_{0-∞})分别提高了2.36, 1.97倍,药峰浓度(C_{max})分别提高了2.12, 1.65倍;小鼠耳肿胀和足肿胀炎症模型结果表明,小鼠灌胃黄芩苷PEG400溶液后抗炎效果增强。此外,分子对接结果表明黄芩苷与B6G可以与多靶点蛋白[肿瘤坏死因子(TNF)-α, 白细胞介素(IL)-6, IL-1β, 前列腺素E₂(PGE₂), 核转录因子-κB(NF-κB)]位点结合,具有较高亲和力,且优于阳性药阿司匹林。结论:PEG400可提高黄芩苷及其主要代谢物B6G的血药浓度,且抗炎效果增强,黄芩苷与B6G可以与多种炎症因子及核转录因子靶点蛋白形成较强的氢键,推测黄芩苷及B6G共同发挥了抗炎作用。

[关键词] 黄芩苷; 黄芩素6-O-β-D-葡萄糖醛酸苷(B6G); 聚乙二醇400(PEG400); 生物利用度; 抗炎; 分子对接; 液质联用技术

[中图分类号] R857.3;R969.1;R28;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)22-0131-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211447

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210408.0949.002.html>

[网络出版日期] 2021-04-08 10:54

Investigation of Effect of Polyethylene Glycol 400 on Pharmacokinetics and Anti-inflammatory Effect of Baicalin Based on UPLC-MS/MS and Molecular Docking Techniques

YANG Qi-mei, ZHOU Ming-hao, WANG Peng-jiao, CAO Si-yuan, ZHANG Shuo,
YANG Sheng-gang, ZHANG Min*, GAO Xiu-li*

(State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, School of Pharmaceutical Sciences, Engineering Center of Microbiology and Biochemical Pharmacy, Experimental Animal Center, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of polyethylene glycol 400 (PEG400) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory effect of baicalin, and to preliminarily explore the anti-inflammatory effects of baicalin and its main metabolite baicalein 6-O-β-D-glucuronide (B6G) by molecular docking.

[收稿日期] 20210223(019)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160413);贵州省教育厅项目(黔科合KY字[2019]009)

[第一作者] 杨七妹,在读硕士,从事药物药效物质基础及质量研究,E-mail:2910962426@qq.com

[通信作者] *高秀丽,硕士,教授,从事药物药效物质基础及体内药物分析研究,E-mail:gaoxl@gmc.edu.cn;

*张敏,正高级实验师,从事药物质量控制及体内药物分析研究,E-mail:minzhang@gmc.edu.cn

Method: Rats were randomly divided into two groups with water and PEG400 as the dissolving matrix, and rats were administrated the equal dose of baicalin aqueous solution (baicalin+water group) and baicalin PEG400 solution (baicalin+PEG400 group). After the plasma samples were processed at different time periods, the concentrations of baicalin and B6G in rat plasma were determined by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), and pharmacokinetic parameters were processed by DAS 3.2.2 software. Mice were randomly divided into a blank group (normal saline, $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), aspirin group (dose of $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), baicalin/baicalin+PEG400 high and low dose ($3.0, 1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) groups, after continuous administration for 7 days, the mouse ear swelling and foot swelling models were established, and the swelling degree and swelling inhibition rate were calculated. **Result:** The pharmacokinetic study showed that compared with baicalin+water group, the plasma concentrations of baicalin and B6G increased after administration of baicalin PEG400 solution, and the area under the curve (AUC_{0-t}) increased by 2.36, 1.97 times, and the peak concentration (C_{max}) increased by 2.12, 1.65 times, respectively. The results of mouse ear and foot swelling inflammation models showed that the anti-inflammatory effect was enhanced after intragastric administration of baicalin PEG400 solution. In addition, molecular docking results showed that baicalin and B6G could site bind to multiple target proteins [tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6, IL-1 β , prostaglandin E_2 (PGE_2) and nuclear transcription factor- κB (NF- κB)] with higher affinity, which was superior to the positive drug aspirin. **Conclusion:** PEG400 can increase the plasma concentration of baicalin and its main metabolite B6G, and enhance the anti-inflammatory effect. Baicalin and B6G can form strong hydrogen bonds with various inflammatory factors and of nuclear transcription factors, it is speculated that baicalin and B6G jointly play an anti-inflammatory role.

[**Keywords**] baicalin; baicalin 6-*O*- β -*D*-glucuronide (B6G); polyethylene glycol 400 (PEG400); bioavailability; anti-inflammatory; molecular docking; liquid chromatography-mass spectrometry technology

药用辅料通常被视为惰性或在体内无活性的物质成分,但越来越多的研究表明药用辅料能够影响生物机体中的转运体或酶,从而影响口服药物的生物利用度^[1]。2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)收录的药用辅料有335种,其中包括药用辅料聚乙二醇(PEG)。PEG为常见多分散聚合物,相对分子质量有300,400,600,1 000,1 500,4 000,6 000 Da不等^[2],其具有提高药物溶解度和分散度的作用,又有良好的生物相容性,且能与药物结合形成聚合物,因此被广泛应用于多种药物制剂中,如滴丸、注射液、脂质和纳米粒等^[3]。《美国药典》XII版已将药用辅料PEG400作为软胶囊新的分散介质。此外,药物经PEG修饰后可以改善药物的溶解性和稳定性,进而提高药物的疗效^[4]。有研究表明,PEG400可以影响大鼠胃肠道中不同区域P-糖蛋白(P-gp)的蛋白表达量和信使核糖核酸(mRNA)水平^[5],还可作为尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UGT)2B7的抑制剂^[6],对人角膜上皮细胞的生长有一定促进作用^[7]。可见,药用辅料可以影响药物的吸收、分布、代谢和排泄过程。

黄芩为中国传统中药材,具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎等功效。其主要活性成分黄芩苷具有抗炎、抗病毒、抗菌、抗肿瘤、抗抑郁、保肝等活性^[8-13]。黄芩苷在体内存在肝肠循环,在肠道菌群作用下经 β -葡萄糖醛酸糖苷酶(GUS)水解为苷元黄芩素,该苷元又在肝肠部位经II相代谢酶UGT重新结合为黄芩苷或黄芩苷的异构体黄芩素6-*O*- β -*D*-葡萄糖醛酸苷(B6G)^[14]。但黄芩苷的口服生物利用度低^[15],极大地限制了临床应用。因此,提高其生物利用度,改善其体内吸收尤为关键,药用辅料或许能够成为解决该问题最有效的方法之一,在含有黄芩苷的中药复方制剂的制备过程中常加入PEG400,如清开灵注射液、茵栀黄软胶囊等,但其与主要成分黄芩苷的相互作用却鲜有报道。最新研究表明,黄芩苷对新型冠状病毒肺炎(COVID-19)有一定的抗炎作用^[16],其对小鼠足肿胀及耳肿胀炎症模型的治疗也有显著疗效^[17]。因此,本实验拟研究PEG400对大鼠体内黄芩苷的药代动力学和小鼠抗炎作用的增益效果,以期为PEG400在体内的作用机制研究提供实验依据。

本课题组前期研究表明 PEG400 可显著改变黄芩苷原型药物在大鼠体内的药代动力学行为^[18], 即药时曲线下面积(AUC_{0-t})和药峰浓度(C_{max})显著提高; 还有文献报道大鼠灌胃黄芩苷后, B6G 的血药浓度高于黄芩苷^[14]。因此, 本实验拟采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)考察 PEG400 对大鼠体内黄芩苷及其主要代谢物 B6G 的影响, 运用小鼠耳肿胀和足肿胀炎症模型探究 PEG400 与黄芩苷共同给药后对小鼠抗炎效果的影响, 并选择血浆中代谢物黄芩苷与 B6G 为关键活性成分(配体), 炎症因子[肿瘤坏死因子(TNF)- α , 白细胞介素(IL)-6, IL-1 β , 前列腺素 E₂(PGE₂)及核转录因子(NF)- κ B]为靶点, 应用分子对接技术初步探讨黄芩苷及 B6G 的抗炎作用。

1 材料

UltiMate 3000 型超高效液相色谱-TSQ Endura 型三重四极杆质谱仪(美国 Thermo Finnigan 公司), Allegra BHR 型超高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司), VXR basic Vibrax 型自动漩涡振荡器(德国 IKA 公司), D101 型氮吹仪(杭州蓝焰科技有限公司), AB104-N 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司), TB-215D 型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

黄芩苷、染料木素对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为 110715-201312, 110714-201216, 纯度均 \geq 98%), B6G 对照品(深圳爱拓化学有限公司, 批号 XB1616611901, 纯度 \geq 98%), 黄芩苷原料药(陕西昊辰生物科技有限公司, 批号 HQ190916, 纯度 \geq 90%), 氯化钠注射液(贵州科伦药业有限公司, 批号 E118101001), PEG400(西陇化工股份有限公司, 批号 141025), 二甲苯[重庆川东化工(集团)有限公司, 批号 20181101], 阿司匹林肠溶片(大同市利群药业有限责任公司, 批号 181201), 角叉菜胶(北京索莱宝科技有限公司, 批号 20160912), 水为屈臣氏饮用水, 甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

SPF 级雄性 SD 大鼠 12 只, 体质量(230 \pm 20) g; 昆明种小鼠 120 只, 体质量(20 \pm 2) g, 雌雄各半; 均由贵州医科大学实验动物中心提供[许可证号 SYXK(黔)2018-0001]。大鼠及小鼠严格按照实验动物护理和使用指南饲养。饲养温度(23 \pm 2) $^{\circ}$ C, 相对湿度(55 \pm 5)%, 光照循环 12 h, 自由饮水。实验前禁食 12 h。本实验所涉及动物的相关操作均在贵州医科大学实验动物伦理委员会的批准下进行, 批准

号 1711020, 并严格遵循相关准则。

2 方法

2.1 UPLC-MS/MS 检测条件

2.1.1 色谱条件 Thermo Hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.9 μ m), 流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~10 min, 10%~80%B; 10~11 min, 80%~10%B; 11~12 min, 10%B), 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流速 0.3 mL \cdot min⁻¹, 进样量 5 μ L。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI), 检测方式为正离子模式, 碰撞气为氩气(Ar), 辅助气为氮气(N₂), 离子源电压 3.5 kV, 毛细管电压 2.5 kV, 毛细管温度 375 $^{\circ}$ C, 雾化器温度 275 $^{\circ}$ C, 采用选择反应监测(SRM)模式进行测定, 黄芩苷和 B6G 的 m/z 447~271, 染料木素(内标)的 m/z 271~153。

2.2 溶液配制 精密称取适量的黄芩苷及 B6G 对照品, 加甲醇超声(300 W, 40 kHz)使溶解并定容于 5 mL 量瓶中, 得质量浓度分别为 1.20, 1.0 g \cdot L⁻¹ 的混合对照品储备液, 使用甲醇梯度稀释得到系列混合对照品溶液。精密称取一定量的染料木素对照品, 用甲醇稀释成 2 mg \cdot L⁻¹ 的内标溶液。

2.3 药代动力学研究 将 SD 大鼠随机分为黄芩苷+水组、黄芩苷+PEG400 组, 每组 6 只, 以黄芩苷剂量 168 mg \cdot kg⁻¹ 给大鼠灌胃相应混合溶液(药物与溶剂按 1:10 的比例加入相应体积的生理盐水或 PEG400)。分别于给药前及给药后 0.5, 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 16, 20 h 尾静脉取血, 离心(转速设定为 4 000 r \cdot min⁻¹, 时间 10 min, 离心半径 82 mm, 下同)分离血浆, 于 -80 $^{\circ}$ C 下保存备用。

2.4 血浆样品处理 将大鼠血浆样品置室温下解冻后取 100 μ L 于 5 mL 离心管中, 依次加入内标溶液 10 μ L 和 0.5 mol \cdot L⁻¹ 盐酸溶液 50 μ L, 涡旋混合 30 s, 加入乙酸乙酯 2 mL 后震荡 10 min 进行 2 次液-液萃取, 离心后得上清液, 将上清液于 40 $^{\circ}$ C 氮气下吹干, 用流动相[0.1% 甲酸水-乙腈(1:1)]200 μ L 复溶, 于 13 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min(离心半径 82 mm), 取上清液供 UPLC-MS/MS 分析。

2.5 标准曲线的绘制与方法学考察

2.5.1 专属性试验 取空白大鼠血浆、空白血浆+混合对照品+内标及大鼠口服黄芩苷水溶液后 2 h 的血浆样品, 按 2.4 项下方法进行预处理, 按 2.1 项下条件测定, 记录色谱图以考察该方法的专属性。

2.5.2 标准曲线及线性范围 精密吸取空白血浆 100 μ L, 分别加入黄芩苷与 B6G 系列对照品溶液各 6 份, 按 2.4 项下方法预处理, 按 2.1 项下条件测定,

以指标成分与内标的峰面积之比(Y)与质量浓度(X)进行线性回归,利用加权最小二乘法(权重为 $1/X^2$)分别求得黄芩苷与B6G的标准曲线。

2.5.3 精密度与准确度 按2.5.2项下方法分别配制低、中、高质量浓度黄芩苷($25, 500, 4\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)和B6G($15, 625, 5\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的大鼠血浆质控(QC)样品各6份,按2.4项下方法进行预处理,按2.1项下条件连续测定3 d,记录峰面积。根据随行标准曲线计算QC样品质量浓度,计算日内与日间精密度RSD与准确度RE。

2.5.4 萃取回收率与基质效应 取大鼠空白血浆,按2.5.2项下配制低、中、高质量浓度黄芩苷及B6G的QC样品溶液各6份,按2.4项下方法进行预处理,按2.1项下条件测定,记录峰面积(A)。另取空白血浆36份,每个质量浓度样品各6份,按2.4项下方法进行预处理,向上清液中分别加入低、中、高质量浓度的黄芩苷和B6G对照品溶液,按2.1项下条件测定,记录峰面积(B),按 $A/B\times 100\%$ 计算萃取回收率;取上述低、中、高质量浓度黄芩苷与B6G对照品溶液,按2.1项下条件测定,记录峰面积(C),按 $B/C\times 100\%$ 计算基质效应。

2.5.5 稳定性 按2.5.2项下配制低、中、高质量浓度黄芩苷及B6G的QC样品,按2.4项下方法进行处理,考察不同储存条件(室温放置12 h,4℃自动进样盘放置12 h,-80℃反复冻融3次及-80℃放置20 d)对样品稳定性的影响。

2.6 二甲苯致耳肿胀试验 取昆明种小鼠60只适应性喂养3 d,随机分为6组,每组10只,分别为阿司匹林组(给药剂量为 $0.2\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$),空白组(生理盐水, $20\ \text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),黄芩苷高、低剂量($3.0, 1.5\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组和黄芩苷+PEG400高、低剂量($3.0, 1.5\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,黄芩苷分别以水和PEG400为溶剂,每天给药1次,连续给药7 d,末次给药30 min后,在小鼠右耳内外两侧均匀涂布二甲苯 $20\ \mu\text{L}$ 致耳廓肿胀,致炎30 min后颈椎脱臼致死,沿耳廓基线剪下双耳,用直径为6 mm的打孔器在左右两耳同一部位打下耳片,分别称定耳片质量,计算小鼠耳廓的肿胀度和肿胀抑制率。计算公式分别为肿胀度=右耳质量(肿胀耳)-左耳质量(对照耳),肿胀抑制率=(空白组平均肿胀度-给药组平均肿胀度)/空白组平均肿胀度 $\times 100\%$ 。

2.7 角叉菜胶致足肿胀试验 取昆明种小鼠60只适应性喂养3 d,按2.6项下方法分组,每天给药1次,连续给药7 d。于末次给药30 min后每只小鼠以1%角叉菜胶(生理盐水配制) $50\ \mu\text{L}$ 皮下注射于

右后足趾部致炎,4 h后颈椎脱臼致死,沿脚踝处剪下左右后肢并称定质量,计算肿胀度和肿胀抑制率。计算公式分别为肿胀度=右后肢(肿胀肢)质量-左后肢(未注射肢)质量,肿胀抑制率=(空白组平均肿胀度-给药组平均肿胀度)/空白组平均肿胀度 $\times 100\%$ 。

2.8 分子对接 通过PubChem(pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)数据库下载活性成分的化学结构,并保存为SDF格式文件;根据文献[19-20]报道,选取5个靶点蛋白(TNF- α ,NF- κ B,IL-6,IL-1 β ,PGE $_2$)作为受体,通过RCSB PDB(<http://www.rcsb.org/>)数据库下载蛋白的晶体结构,采用AutoDockTool 1.5.6软件将靶点蛋白与活性成分进行分子对接,并选择阿司匹林作为阳性药进行分析,以结合能(binding energy)作为筛选条件,结合能越低,表明对接结果越好,通过比较活性成分与阳性药结合能的高低,评判其效果。

2.9 数据处理 采用DAS 3.2.2软件计算药代动力学参数;采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,两组之间均值比较采用 t 检验。所有实验数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示。 $P<0.05$ 表示数据差异有统计学意义。

3 结果

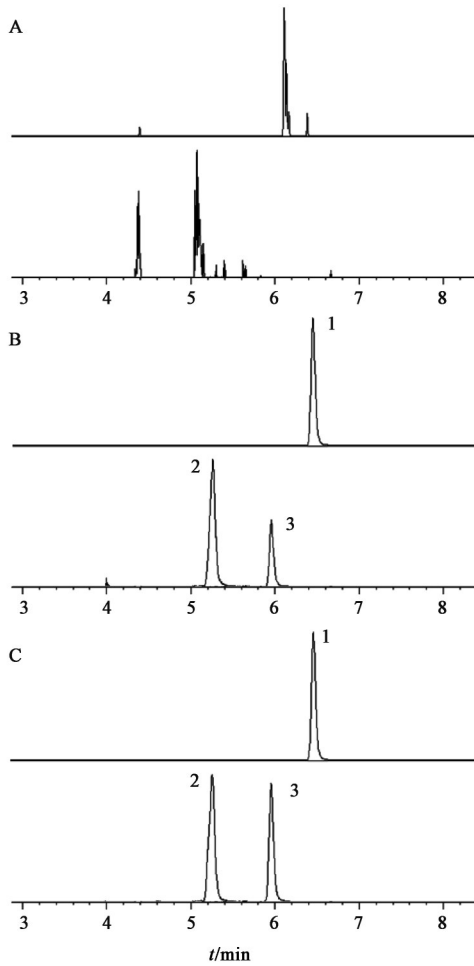
3.1 专属性 空白大鼠血浆、空白血浆+混合对照品+内标及大鼠口服黄芩苷水溶液后2 h的血浆样品的色谱图见图1。结果发现各分析物质色谱峰峰形良好,黄芩苷,B6G及内标染料木素的保留时间(t_r)分别为5.27,5.96,6.47 min,未见内源性物质对分析物质有明显干扰。

3.2 标准曲线及线性范围 黄芩苷与B6G线性回归方程分别为 $Y=0.057\ 1X-0.479\ 5$ ($R^2=0.998\ 1$), $Y=0.023\ 9X-0.256\ 0$ ($R^2=0.999\ 0$),线性范围分别为25~4 000,15~5 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,定量限分别为12,10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($S/N\geq 10$)。

3.3 精密度与准确度 2种待测物在低、中、高质量浓度的QC样品的日内和日间精密度RSD均 $<15\%$,RE处于-7.2%~11.2%,均符合生物样品的检测要求,见表1。

3.4 萃取回收率与基质效应 黄芩苷及B6G的平均萃取回收率与平均基质效应分别为82.71%~99.55%和83.21%~98.36%,RSD分别为2.8%~8.6%和2.1%~7.3%。表明该方法的平均萃取回收率符合生物样品的测定要求,且无明显基质效应。

3.5 稳定性 黄芩苷与B6G低、中、高质量浓度的QC样品放置室温12 h后RE处于-6.5%~-2.8%,



A. 空白血浆; B. 空白血浆+混合对照品+内标; C. 血浆样品; 1. 染料木素(内标); 2. 黄芩苷; 3. B6G

图1 大鼠口服黄芩苷水溶液2 h后血浆样品的UPLC

Fig. 1 UPLC of plasma samples of rats after oral administration of baicalin for 2 h

表1 大鼠血浆样品中B6G及黄芩苷UPLC-MS/MS分析的精密度和准确度考察(n=6)

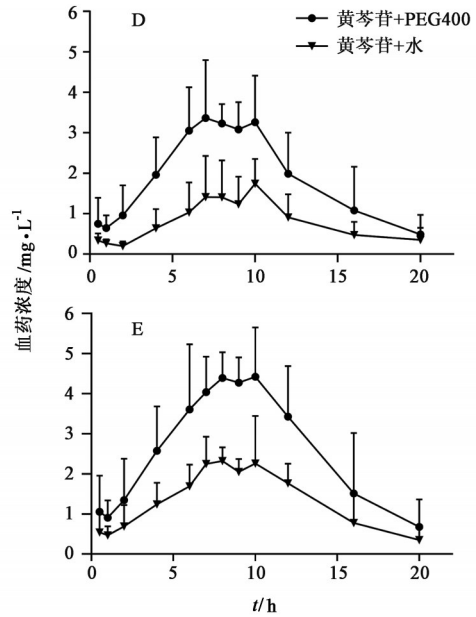
Table 1 Precision and accuracy of baicalin and B6G in rat plasma samples by UPLC-MS/MS (n=6) %

成分	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	日内		日间	
		精密度 RSD	准确度 RE	精密度 RSD	准确度 RE
黄芩苷	25	9.6	-7.2	8.2	-4.9
	500	3.6	5.2	4.1	3.3
	4 000	6.3	-5.4	2.9	6.2
B6G	15	10.2	11.2	9.7	-2.5
	625	8.6	-2.7	3.3	10.0
	5 000	5.2	4.5	5.6	9.8

RSD<9.2%; 4 °C 进样盘放置 12 h 后 RE 处于 -5.3%~3.1%, RSD<8.7%; -80 °C 反复冻融 3 次后的 RE 处于 -8.9%~-3.7%, RSD<9.5%; -80 °C 放置 20 d 后 RE 处于 -8.2%~-3.5%, RSD<10.3%。表明 4 种条件下

生物样品的稳定性良好。

3.6 药代动力学研究 大鼠灌胃黄芩苷后,黄芩苷及代谢物 B6G 都呈现双峰现象,这与文献[15]报道相一致,见图 2;药代动力学参数见表 2。结果发现与黄芩苷+水组相比,黄芩苷+PEG400 组中黄芩苷与 B6G 的 AUC_{0-t} 分别提高了 2.36, 1.97 倍,表明 PEG400 能提高黄芩苷及 B6G 的血药浓度。



D. 黄芩苷; E. B6G

图2 黄芩苷和 B6G 的平均血药浓度-时间曲线($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curves of baicalin and B6G ($\bar{x}\pm s, n=6$)

表2 大鼠血浆中黄芩苷和 B6G 的主要药代动力学参数($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Main pharmacokinetic parameters of baicalin and B6G in rat plasma ($\bar{x}\pm s, n=6$)

参数	黄芩苷+水组		黄芩苷+PEG400组	
	黄芩苷	B6G	黄芩苷	B6G
$C_{\text{max}}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	2.0±0.8	3.0±0.7	4.2±1.1 ²⁾	5.0±0.9 ¹⁾
t_{max}/h	9.7±1.6	8.0±1.7	8.5±1.4	8.5±1.6
$t_{1/2\alpha}/\text{h}$	5.6±5.2	3.3±1.1	3.8±2.6	3.9±2.4
$\text{AUC}_{0-t}/\text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	15.5±5.6	25.8±4.8	36.5±9.3 ¹⁾	50.8±11.9 ¹⁾
$\text{AUC}_{0-\infty}/\text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	20.0±10.0	28.0±7.6	40.5±14.2 ²⁾	56.5±19.0 ¹⁾
$V_z/\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$	69.0±40.1	28.7±4.1	21.5±7.5 ²⁾	16.4±5.2 ¹⁾
$\text{CL}_z/\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	10.2±4.7	6.3±1.5	4.6±1.6 ²⁾	3.3±1.1 ¹⁾

注:与黄芩苷+水组同成分比较¹⁾ $P<0.01$,²⁾ $P<0.05$ 。

3.7 对二甲苯致小鼠耳廓肿胀度的影响 与空白组比较,黄芩苷高、低剂量组和黄芩苷+PEG400 高、低剂量组及阿司匹林组小鼠耳廓肿胀均不同程度地被抑制,且随着药物浓度的增高,肿胀度呈现降低的趋势,其中阿司匹林组和黄芩苷+PEG400 高、

低剂量组差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$);与阿司匹林组比较,黄芩苷低剂量组差异有统计学意义($P<0.05$)。表明黄芩苷对小鼠耳肿胀有抑制作用,药用辅料PEG400与黄芩苷联合应用抑制作用更佳。见表3。

表3 PEG400对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响($n=10$)
Table 3 Effect of PEG400 on dimethylbenzene-induced ear swelling in mice ($n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	肿胀度($\bar{x}\pm s$) /mg	抑制率 /%
空白		8.1±2.3	-
阿司匹林	0.2	4.5±1.3 ¹⁾	44.4
黄芩苷高剂量	3.0	5.9±1.4	27.2
黄芩苷+PEG400高剂量	3.0	3.2±1.5 ²⁾	60.5
黄芩苷低剂量	1.5	6.8±1.1 ³⁾	16.0
黄芩苷+PEG400低剂量	1.5	4.4±1.3 ¹⁾	45.7

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与阿司匹林组比较³⁾ $P<0.05$ (表4同)。

3.8 对角叉菜胶致小鼠足肿胀度的影响 与空白组比较,黄芩苷高、低剂量组及黄芩苷+PEG400高、低剂量组及阿司匹林组小鼠足肿胀均可不同程度地被抑制,且随着药物浓度的增高,肿胀度呈现降低的趋势,其中黄芩苷高、低剂量组,黄芩苷+PEG400高、低剂量组及阿司匹林组差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$);与阿司匹林组比较,黄芩苷低剂量组及黄芩苷+PEG400低剂量组差异有统计学意义($P<0.05$)。表明黄芩苷对小鼠足肿胀有抑制作用,药用辅料PEG400与黄芩苷联合应用抑制作用更显著,见表4。

表4 PEG400对角叉菜胶致小鼠足肿胀的影响($n=10$)
Table 4 Effect of PEG400 on carrageenan-induced foot swelling in mice ($n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	肿胀度($\bar{x}\pm s$) /mg	抑制率 /%
空白		85.2±10.6	-
阿司匹林	0.2	38.6±13.3 ²⁾	54.7
黄芩苷高剂量	3.0	45.6±4.9 ²⁾	46.5
黄芩苷+PEG400高剂量	3.0	31.3±4.3 ²⁾	63.3
黄芩苷低剂量	1.5	64.6±8.6 ^{1,3)}	24.2
黄芩苷+PEG400低剂量	1.5	52.2±5.9 ^{2,3)}	38.7

3.9 活性成分与5种靶点蛋白的分子对接 通过多构象的对接结果,筛选出结合能最低的构象,由表5可知,黄芩苷及B6G均可以与TNF- α , NF- κ B,

IL-6, IL-1 β , PGE₂较好地结合,且两者对接结果均优于阳性药阿司匹林,黄芩苷与这几种靶蛋白的结合作用较B6G强,这2种成分均以与PGE₂和NF- κ B的对接结果为好。应用PyMOL 2.3.4软件分别对黄芩苷和B6G对接最好的靶点蛋白(NF- κ B, PGE₂)进行可视化分析,见图3。结果发现NF- κ B与黄芩苷, PGE₂与B6G均可以形成氢键,其中黄芩苷与NF- κ B的氨基酸残基ARG408, GLN479形成氢键, B6G与PGE₂的氨基酸残基CYS167, TYR208, ASN337形成氢键。表明NF- κ B, PGE₂与黄芩苷, B6G均有较好的结合。

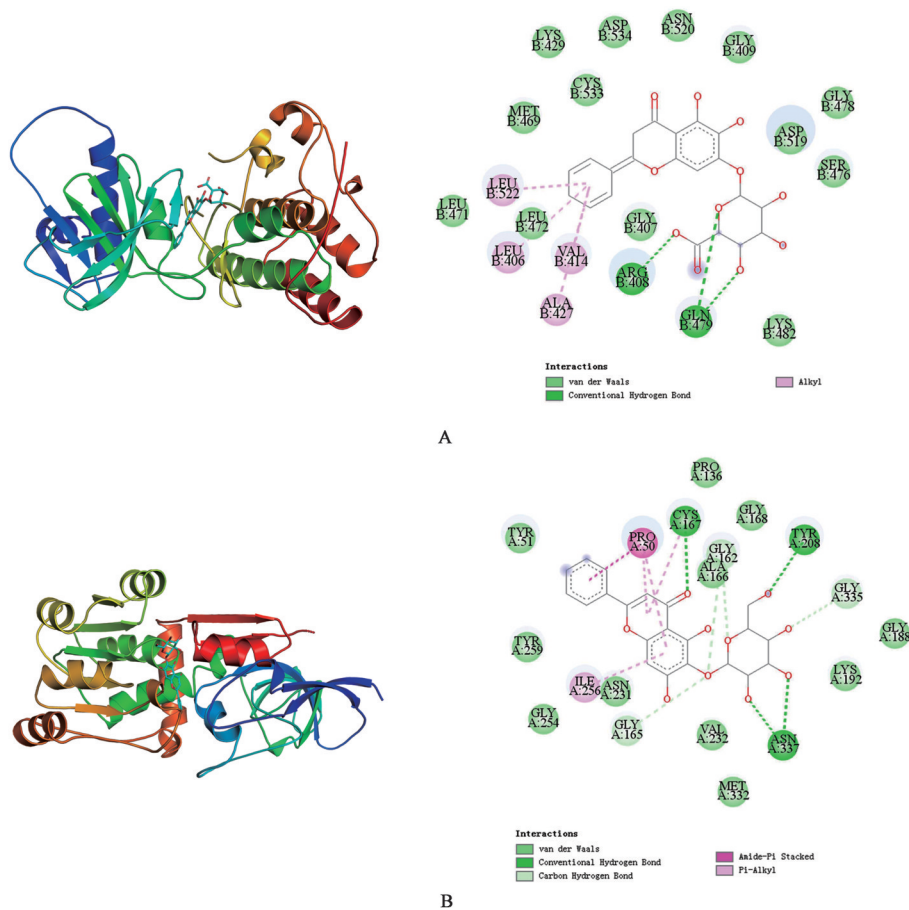
表5 黄芩苷, B6G及阳性药与各靶点的结合能
Table 5 Binding energies of baicalin, B6G and positive drug with each target kcal·mol⁻¹

靶点	黄芩苷	B6G	阿司匹林
TNF- α	-8.7	-8.8	-5.6
IL-6	-9.1	-8.3	-5.6
IL-1 β	-7.8	-7.5	-5.4
PGE ₂	-11.3	-10.8	-6.6
NF- κ B	-11.8	-10.3	-6.4

注:1 kcal=4.186 J。

4 讨论

本实验采用UPLC-MS/MS研究PEG400对黄芩苷及其主要代谢物B6G在大鼠血浆中的影响,结果表明大鼠灌胃黄芩苷PEG400溶液后,黄芩苷及B6G的血药浓度显著增加。本研究还建立了小鼠耳肿胀及足肿胀模型,探究PEG400对黄芩苷抗炎功效的影响,结果表明PEG400与黄芩苷共同给药后,改善了小鼠耳肿胀及足肿胀的炎症情况,表明黄芩苷的抗炎效果得到增强。结合大鼠药代动力学结果,推测小鼠体内可能也存在类似情况,即PEG400引起了黄芩苷药代动力学行为的变化,进而改善抗炎效果,但PEG400对黄芩苷抗炎作用影响的机制还需要进一步研究。此外,分子对接技术可以模拟筛选出治疗某种疾病的药物活性成分,具有快速、准确度高、缩短药物开发周期等优点,其是利用计算机技术,通过已知化学构型(配体)与大分子蛋白(受体)的典型靶向位点结合,筛选出活性位点低能结合模式的过程^[21]。B6G为黄芩苷的同分异构体,其抗炎作用机制可能与黄芩苷类似,故本文通过分子对接技术初步探讨了二者抗炎作用靶点是否一致,从而为PEG400对黄芩苷抗炎功效的协同作用提供佐证。



A.NF-κB与黄芩苷的最佳对接构象;B.B6G与PGE₂的最佳对接构象;GLY.甘氨酸;ARG.精氨酸;ASN.天冬酰胺;LEU.亮氨酸;ALA.丙氨酸;MET.蛋氨酸;VAL.缬氨酸;CYS.半胱氨酸;ASP.天冬氨酸;SER.丝氨酸;GLN.谷氨酰胺;ILE.异亮氨酸;TYR.酪氨酸;PRO.脯氨酸;LYS.赖氨酸

图3 靶点蛋白与黄芩苷, B6G的最佳对接构象

Fig. 3 Optimal docking conformations of target proteins with baicalin and B6G

黄芩苷具有抗炎作用,可抑制PGE₂的产生和一氧化氮合酶、环氧合酶-2(COX-2)基因的表达^[22-23]。炎症发生时,中性粒细胞释放TNF-α,IL-6,IL-1β和PGE₂等炎症因子参与机体防御反应,当细胞产生过量的炎症因子时会引起炎症反应,NF-κB在细胞炎症中起关键作用;PGE₂是花生四烯酸(AA)代谢途径中COX-2介导产生的重要炎症介质,能引起血管的扩张和通透性升高,以及白细胞渗出等炎症反应^[24]。在小鼠炎症模型中主要释放TNF-α,IL-6,IL-1β和PGE₂等炎症因子,因此,本文主要利用分子对接技术验证黄芩苷及B6G这2种活性成分与TNF-α,IL-6,IL-1β,PGE₂,NF-κB等靶点的结合活性^[19-20]。结果显示,黄芩苷及B6G与关键靶点蛋白的结合能均≤-5 kcal·mol⁻¹,说明血浆中这2种主要代谢物与上述靶点蛋白能较好地结合,提示B6G可能存在潜在的抗炎活性。此外,本课题组前期研究表明,B6G对HepG2细胞有良好的增殖抑制作

用^[25],说明其具有潜在的药理活性,后续的相关研究正在进行。

在PEG400的作用下,黄芩苷及其主要代谢物B6G的血药浓度及抗炎效果明显增加;通过对主要靶点蛋白进行分子模拟对接,其结果优于阳性药阿司匹林,但PEG400影响大鼠体内黄芩苷及B6G这2种代谢物的作用机制尚需进一步探索。本文研究结果显示,药用辅料在制剂中的作用不能忽略,可为药用辅料及黄芩苷等黄酮类中药新剂型设计提供一定的理论依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 王可欣. 中药常用辅料对转运体介导药物吸收的影响[J]. 科学时代, 2013(8):1-2.
[2] JOHNSON B M, CHARMAN W N, PORTER C J H. An *in vitro* examination of the impact of polyethylene glycol 400, pluronic P85, and vitamin E D-α-

- tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate on P-glycoprotein efflux and enterocyte-based metabolism in excised rat intestine [J]. *AAPS PharmSci*, 2002, 4(4):E40.
- [3] VIASALI D, FOWLER R, STOLNIK S. PEGylated nanomedicines: recent progress and remaining concerns [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2014, 11(1):139-154.
- [4] 杜梓萱, 王奕博, 高利利, 等. 接受液中聚乙二醇400体积分数对药物体外透皮试验的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(1):196-200.
- [5] YANG M, LIU D, MURDAN S. An animal's sex influences the effects of the excipient PEG400 on the intestinal P-gp protein and mRNA levels, which has implications for oral drug absorption [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 120:53-60.
- [6] WANG H J, HSIONG C H, HO S T, et al. Commonly used excipients modulate UDP-glucuronosyltransferase 2B7 activity to improve nalbuphine oral bioavailability in humans [J]. *Pharm Res*, 2014, 31(7):1676-1688.
- [7] 孙正太, 张晓峰, 夏蔚, 等. 聚乙二醇400对体外培养人角膜上皮细胞生长的影响[J]. *苏州大学学报: 医学版*, 2012, 32(2):211-215.
- [8] 朱亚南, 张硕, 张敏, 等. 聚乙二醇400对黄芩苷及其主代谢物胆汁排泄的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(10):88-93.
- [9] LI B Q, FU T, GONG W H, et al. The flavonoid baicalin exhibits anti-inflammatory activity by binding to chemokines [J]. *Immunopharmacology*, 2000, 49(3):295-306.
- [10] MOGHADDAM E, TEOH B T, SAM S S, et al. Baicalin, a metabolite of baicalein with antiviral activity against dengue virus [J]. *Sci Rep*, 2014, 4:5452.
- [11] 何谷良, 袁娉, 黄家望, 等. 黄芩苷体外对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌活性影响的研究[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(4):788-790.
- [12] JIA Y M, CHEN L R, GUO S J, et al. Baicalin induced colon cancer cells apoptosis through miR-217/DKK1-mediated inhibition of Wnt signaling pathway [J]. *Mol Biol Rep*, 2019, 46(2):1693-1700.
- [13] ZHANG R Y, MA Z X, LIU K L, et al. Baicalin exerts antidepressant effects through Akt/FOXG1 pathway promoting neuronal differentiation and survival [J]. *Life Sci*, 2019, 221:241-248.
- [14] AKAO T, SATO K, HE J X, et al. Baicalein 6-O- β -D-glucopyranuronoside is a main metabolite in the plasma after oral administration of baicalin, a flavone glucuronide of *Scutellariae Radix*, to rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2013, 36(5):748-753.
- [15] 邢杰. 黄芩苷在动物体内的吸收和代谢研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2005.
- [16] SINGH S, FLOREZ H. Coronavirus disease 2019 drug discovery through molecular docking [J]. *F1000Res*, 2020, 9:502.
- [17] 宁康健, 张婷婷. 黄芩苷对小鼠抗炎作用的研究[J]. *安徽科技学院学报*, 2012, 26(6):1-4.
- [18] 顾腾, 张硕, 张敏, 等. 菌群失调大鼠体内 PEG400 对黄芩苷和黄芩素药代动力学的影响[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(5):1034-1040.
- [19] 王燕珍, 王维峰, 安玉兰, 等. 补阳还五汤合四君子汤加减治疗中风后疲劳气虚血瘀证和抗氧化及抗炎的作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(23):131-136.
- [20] 姚诗清, 何斌, 孙蕊, 等. 复方黄藤合剂防治急性放射性肠炎疗效及对血清炎症因子的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(9):69-74.
- [21] CHEN K, LI T H, CAO T C. Tribe-PSO: a novel global optimization algorithm and its application in molecular docking [J]. *Chemometr Intell Lab Syst*, 2005, 82(1/2):248-259.
- [22] 张罗修, 王梦, 钱芸, 等. 丹参素、黄芩甙等对大鼠腹腔巨噬细胞产生 PGE₂ 及 TXB₂ 的影响[J]. *中药药理与临床*, 1990, 6(4):31-34.
- [23] CHEN Y C, SHEN S C, CHEN L G, et al. Wogonin, baicalin, and baicalein inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions induced by nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide [J]. *Biochem Pharmacol*, 2001, 61(11):1417-1427.
- [24] KALINSKI P. Regulation of immune responses by prostaglandin E₂ [J]. *J Immunol*, 2012, 188(1):21-28.
- [25] 朱亚南, 张硕, 张敏, 等. 大鼠胆汁中黄芩苷代谢物的分离、纯化及其对肝癌细胞 HepG2 增殖的影响研究[J]. *中国药房*, 2020, 31(7):800-805.

[责任编辑 刘德文]