

· 药物代谢 ·

## 微透析技术进行痰瘀互结型冠心病大鼠的 证治药动学研究探索

朱黎霞\*, 梁东辉

(南方医科大学珠江医院中医科, 广州 510282)

**[摘要]** **目的:**进行基于“实时、活体、动态、微创”特征的微透析采样技术的证治药动学探索性研究。**方法:**SD大鼠通过连续7周给予高脂饲料并结扎冠状动脉左前降支复制痰瘀互结型冠心病模型。正常组和痰瘀互结型冠心病组、丹参素高、低剂量组,每组各6只大鼠,提取物中丹参素的给药量为分别为25.3,50.6 mg·kg<sup>-1</sup>,进行正常和冠心病大鼠的证治药动学研究。单次灌胃给药后,血液微透析法活体、动态采样,高效液相色谱法检测微透析样品丹参素的浓度,采用非房室模型处理获得药动学参数。**结果:**模型组大鼠血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、血清肌酸磷酸激酶(CK)升高,高、中、低切变率下全血黏度升高,与正常组差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。获取了不同机能状态下丹参素的药动学特征。和正常组相比,痰瘀互结型冠心病大鼠丹参素达峰浓度( $C_{max}$ )增加,但无统计学意义;达峰时间( $T_{max}$ )缩短,零阶矩(AUC)、一阶矩曲线下面积(AUMC)增加,和正常组相比,结果具有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论:**本研究模式可为类似证治药动学研究做借鉴。

**[关键词]** 痰瘀互结型冠心病; 血液微透析; 丹参素; 证治药动学

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)16-0119-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014160119

## Syndrome and Treatment Pharmacokinetics Research and Exploration Based on Microdialysis Method about Coronary Heart Disease with Syndrome of Intermin-gled Phlegm and Blood Stasis

ZHU Li-xia\*, LIANG Dong-hui

(Zhujiang Hospital, South Medical University, Guangzhou 510282, China)

**[Abstract]** **Objective:** The syndrome and treatment pharmacokinetics model was carried out based on the ‘real-time, dynamic, minimally invasive, *in vivo*’ microdialysis sampling method. **Method:** The intermin-gled phlegm and blood stasis syndrome coronary heart disease SD rats model was replicated by feeding with high fat diet for 7 weeks combined with left anterior descending branch coronary artery ligation. The normal group and the model group were divided into high and low dose group with 6 rats in each group, the extract of Danshensu dosage was respectively 25.3, 50.6 mg·kg<sup>-1</sup>. The pharmacokinetics study was carried out on normal and coronary heart disease (CHD) rats by intragastric administration of different dose. The Danshensu concentration of microdialysis samples were detected with HPLC and the pharmacokinetic parameters was obtained using noncompartmental model. **Result:** The results showed that serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), creatine phosphokinase (CK) in the model group increased, blood viscosity of high, medium and low shear also increased. The results had highly statistically significant differences compared with the normal group ( $P < 0.01$ ). The results showed that Danshensu peak concentration increases, but without statistical significance, the peak time shorten,

**[收稿日期]** 20140529(009)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81302882)

**[通讯作者]** \*朱黎霞,主治中医师, Tel:020-61643456, E-mail: zhulx2007@163.com

area under the curve (AUC) and area under the first moment curve (AUMC) increases in CHD rats comparing with the normal group, the results were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** This study can be the reference for the similar research mode.

**[Key words]** phlegm and blood stasis type coronary heart disease; blood microdialysis; danshensu; syndrome and treatment pharmacokinetics

证为中医特有专业术语,是对疾病状态下整体功能状态的抽象概括。由于年龄、性别、气候、性格、生活习惯、遗传背景等方面的差异性,故在共同病理生理学基础的中医证型表现各异,所谓“辨证论治”就需要针对患者病情采取个体化治疗措施。药物-机体间的微观相互作用的差异性与宏观证型密切相关,故相同处方在不同证型上可能疗效各异。相同疾病证型不同,则药物的体内过程可能存在差异。证型差异因而带来的药物体内过程差异可称之为证治药动学。“证治药动学”理论和实践<sup>[1-2]</sup>对阐明方药-证型间的相关性具有重要的现实意义。目前国内多进行正常和病理动物的药动学研究,少有关于证型的药动学研究。

冠心病(CHD)是常见病和多发病,属于中医“厥心痛”、“真心痛”和“胸痹”的范畴。《中医病症诊断疗效标准》中将其分为痰瘀互结、痰凝心脉等6种证型<sup>[3]</sup>。随着生活水平的提高、饮食结构的改变、生活方式的转化,高脂血症患者日渐增多,痰瘀互结型比例日渐增加,且贯穿于冠心病的始终。痰瘀互结型是冠心病的常见证型,为本虚标实证。在冠心病的发病机制中,痰瘀为患既是脏腑功能失调的病理产物,又是致病因素,痰瘀为病贯穿于冠心病的发生发展过程中。加强对痰瘀互结型冠心病本质的认识具有重要意义<sup>[4]</sup>。

丹参是治疗冠心病的要药,丹参素为主要活性成分。本文以临床常见的痰瘀互结型冠心病为研究范例,复制痰瘀互结型冠心病大鼠模型,以丹参为模型药物,结合“活体、动态、微量、微创”采样特征的新型药动学研究手段-微透析采样技术,进行冠心病大鼠的证治药动学研究,挖掘不同机能状态下的指标成分丹参素的药动学参数异同,探索基于微透析技术的证治药动学研究模式。

## 1 材料

**1.1 仪器** DIONEX Summit P680 型液相色谱仪(包括 Summit P680A 四元泵,ASI-100 自动进样器,Chromleon 色谱工作站),AUW120D 型 1/10 万分析天平(日本岛津公司),KQ-500 型超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司),美国 BAS 公司微透析系

统:MD0100 型灌注器、MD1001 型灌注器推进泵、MD1002 型灌注器支架、MD1000 型流速控制器、CMA/20 Elite 型血液微透析探针(透析膜长度为 4 mm,分子截留值为 20 kD)。

**1.2 药品与试剂** 丹参素对照品(中国食品药品检定研究院,供含量测定用,批号 110855-200809),色谱甲醇(美国 Fisher 公司),肝素钠注射液(江苏万邦生化医药股份有限公司)。丹参水溶性提取物(自制,以丹参素为富集目标,经 HPLC-UV 测定,含量为  $101.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )。其余均为分析纯。

**1.3 动物** 健康雄性 SD 大鼠,清洁级,体重( $240 \pm 15$ ) g,广州中医药大学动物实验中心提供,合格证号 SCXK(粤)2008-0020。

**1.4 软件** Kinetica4.4.1 药动学软件(美国 Thermo Electron 公司),SPSS 18.0 软件(美国 SPSS 公司)。

## 2 方法与结果

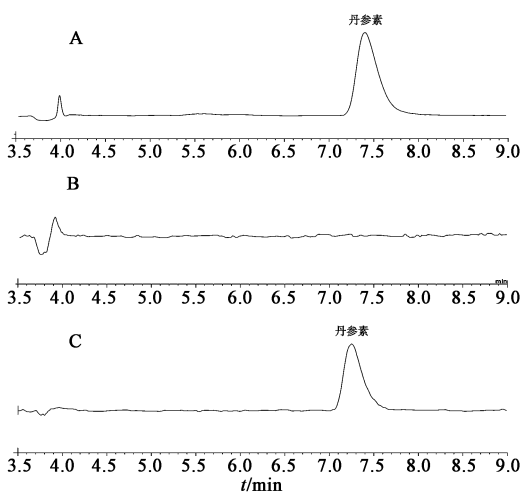
**2.1 血液微透析样品中丹参素分析方法的建立** Kromasil 100-5  $\text{C}_{18}$  (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱,流动相甲醇-水(10:90),流速  $1.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,柱温室温,检测波长 285 nm,进样体积为 15  $\mu\text{L}$ 。

### 2.2 方法学考察

**2.2.1 专属性试验** 大鼠植入血液微透析探针后以  $2 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  流速灌流空白 Ringer 液,连续收集 100  $\mu\text{L}$  做为空白,对空白透析液、对照品液与血液微透析样品进样分析。丹参素峰形良好,对照品出峰位置无杂质峰干扰,保留时间约为 7.1 min,分析方法专属性高。见图 1。

**2.2.2 线性关系** 精密称定丹参素对照品 9.64 mg,10 mL 容量瓶 Ringer 液定容,得质量浓度为  $0.964 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  母液。取丹参素母液配制成 9.64, 4.82, 2.41, 1.205, 0.60, 0.30, 0.15  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品溶液,均进样 15  $\mu\text{L}$  测定。以峰面积( $A, \text{mAU} \times \text{min}$ )为纵坐标,以浓度( $C, \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )为横坐标,计算回归方程为  $A = 11.291C - 0.105$  ( $R^2 = 0.9999$ ),丹参素在 0.15 ~ 9.64  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  呈良好线性关系。

**2.2.3 精密度试验** 取 9.64, 1.205, 0.30  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品溶液,1 日内连续进样 5 次,连续进样 5 d,



A. 对照品;B. 空白微透析样品;C. 微透析样品

图1 丹参素 HPLC 色谱

则高、中、低3个质量浓度下丹参素的日内、日间精密度良好, RSD均 $<2\%$ 。

**2.2.4 稳定性考察** 取 $9.64, 1.205, 0.30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  3个浓度丹参素溶液, 分别考察于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光放置8, 12, 24, 36, 48 h, 样品21 d内 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰冻以及冻融稳定性。结果表明 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 短期储存、反复3次冻融后的峰面积RSD均 $<2.0\%$ , 这表明微透析样品稳定性较好。

**2.2.5 体内回收率的稳定性试验** 大鼠植入血液微透析探针后不给予药物, 探针内分别灌流高、中、低3个质量浓度 $9.64, 1.205, 0.30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的丹参素Ringer液, 以 $2\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速灌流, 每20 min为间隔收集透析液, 连续灌流6 h, 测定透析液浓度。每个浓度4只大鼠, 根据式1计算体内回收率, 以其评价采样周期内体内回收率的稳定性和高、中、低灌流浓度下体内回收率的差异性。结果表明在采样周期内其体内相对回收率保持稳定, 高、中、低灌流浓度下体内回收率无显著性差异, 体内回收率无浓度依赖性, 采用微透析技术进行丹参素采样具有可行性。

## 2.3 大鼠血液微透析采样

### 2.3.1 痰瘀互结型冠心病大鼠模型的制备<sup>[5-6]</sup>

SD大鼠喂食高脂饲料(86%基础饲料、4%胆固醇、10%猪油、0.2%丙硫氧嘧啶)并以脂肪乳液灌胃, 连续7周, 第35天开胸结扎冠状动脉左前降支(LAD)。结扎后闭合胸腔, 缝合, 局部消毒, 连续5 d注射青、链霉素预防感染。

**2.3.2 动物分组与给药方法** SD大鼠分为正常组和痰瘀互结型冠心病组, 丹参素高、低剂量组每组各

6只大鼠。实验前取丹参提取物3 g溶于30 mL Ringer液得淡黄色澄清液体, 大鼠单次灌胃给药, 低、高剂量组分别按照 $2.5, 5 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量ig给药, 则丹参素的给药剂量分别为 $25.3, 50.6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

**2.3.3 血液微透析采样** 大鼠ip戊巴比妥麻醉后仰位固定, 分离右颈静脉, 眼科剪做V型切口, 将浸润肝素后的CMA/20探针植入右颈静脉内, 以 $2\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速灌流空白Ringer液平衡0.5 h。大鼠ig给药完毕作为零时间点开始采集样品。空白Ringer液灌流速度保持 $2\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , 每15 min收集1份微透析样品, 连续灌流6 h, 每份样品收集于100  $\mu\text{L}$  EP管内, 体积均为30  $\mu\text{L}$ ,  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待测。

**2.3.4 体内回收率的测定** 微透析采样结束后, 继续灌流2 h空白Ringer液, 然后更换以 $0.60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的丹参素Ringer液继续灌流2 h, 流速和收集方式同前, 其中前3份标本弃去, 后5份标本进样测定。以灌流液和透析液浓度差值与灌流液浓度比值为体内回收率进行微透析样品浓度校正。

**2.4 数据处理** 微透析样品浓度通过体内回收率校正后得到真实的血药浓度(即游离药物浓度), 计算见式1, 2。每个有效样本均进行自身体内回收率的校正。

$$\text{体内回收率} = \frac{\text{灌流液浓度} - \text{透析液浓度}}{\text{灌流液浓度}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{血药浓度} = \frac{\text{微透析样品浓度}}{\text{体内回收率}} \quad (2)$$

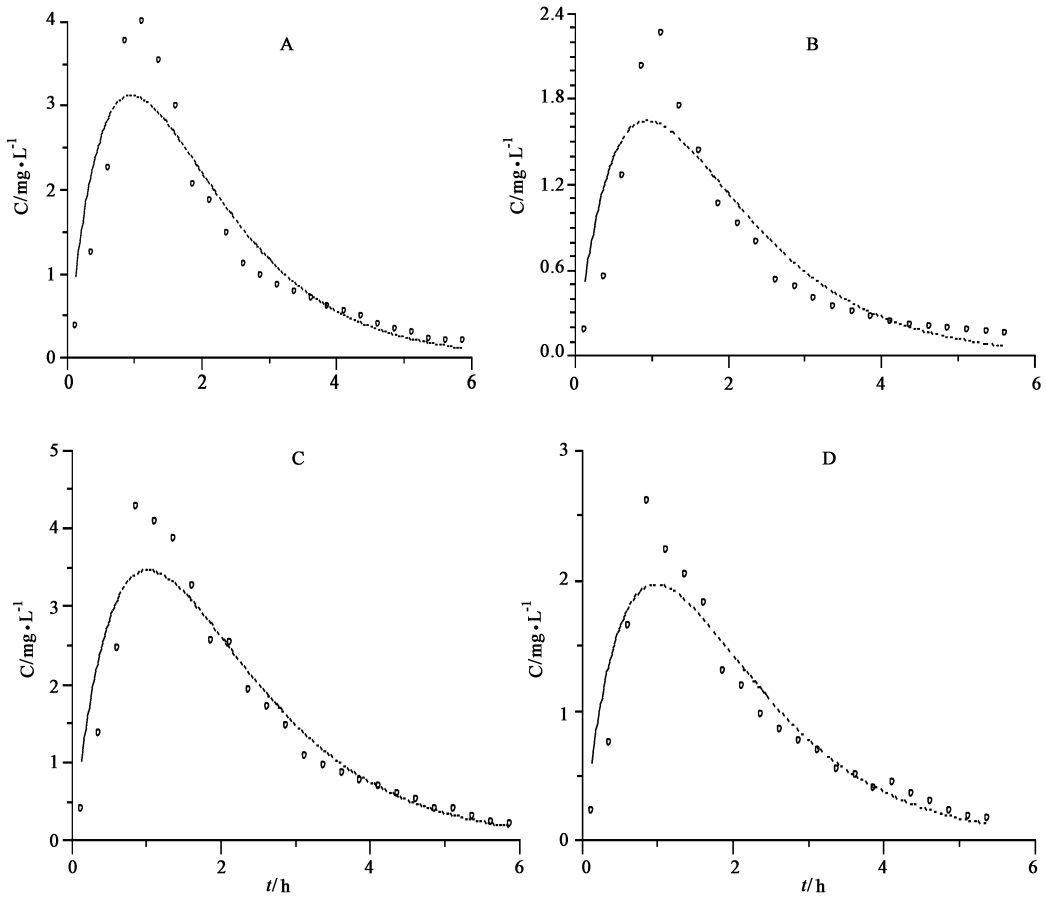
以丹参素微透析样品浓度对采样时间的中点作图, 平均血药浓度-时间曲线见图2, 采用Kinetic 4.4.1药动学软件非房室模型处理(Non Compartmental, Extravascular 模块), 计算药动学参数。药动学参数见表1。

药动学参数以 $\bar{x} \pm s$ 形式给出, 采用SPSS18.0软件中的Descriptives模块统计主要药动学参数( $C_{\max}$ ,  $T_{\max}$ , AUC, AUMC)。

均数间比较采用单因素方差分析(ANOVA),  $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。结果表明, 高、低剂量下, 冠心病大鼠组达峰浓度( $C_{\max}$ )高于正常组, 但差异无统计学意义; 达峰时间( $T_{\max}$ )缩短, 零阶矩(AUC<sub>tot</sub>)、一阶矩曲线下面积(AUMC)高于正常组, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

证是中医精华与特征的集中体现, 是系列宏观症状的集合, 不同证型微观指标上可能具有差异。疾病状态可能影响药动学参数, 同一种病不同证型间药动学参数也可能产生差异, 不同证型的药动学



A, B. 冠心病大鼠丹参素 50.6, 25.3 mg·kg<sup>-1</sup> 组; C, D. 正常大鼠丹参素 50.6, 25.3 mg·kg<sup>-1</sup> 组

图2 冠心病大鼠和正常大鼠丹参素药-时曲线图

表1 不同剂量丹参素在正常与冠心病两组大鼠的体内药动学参数 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

参数	丹参素 50.6 mg·kg <sup>-1</sup>		丹参素 25.3 mg·kg <sup>-1</sup>	
	正常大鼠	冠心病大鼠	正常大鼠	冠心病大鼠
$C_{max}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	3.99 ± 0.39	4.27 ± 0.57	2.26 ± 0.18	2.61 ± 0.36
$T_{max}/\text{h}$	1.25 ± 0.15	1.00 ± 0.15 <sup>1)</sup>	1.25 ± 0.22	1.00 ± 0.22 <sup>1)</sup>
$\text{AUC}_{\text{tot}}/\text{h}\cdot\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	8.06 ± 2.65	9.45 ± 1.60 <sup>1)</sup>	4.50 ± 1.23	5.25 ± 1.76 <sup>1)</sup>
$Lz/\text{h}^{-1}$	0.60 ± 0.11	0.64 ± 0.14	0.28 ± 0.09	0.61 ± 0.20
$\text{AUMC}_{\text{tot}}/\text{h}^2\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$	18.03 ± 3.42	21.50 ± 4.98 <sup>1)</sup>	12.08 ± 2.68	14.08 ± 4.72 <sup>1)</sup>
$t_{1/2}/\text{h}$	1.16 ± 0.20	1.09 ± 0.36	2.51 ± 0.55	1.14 ± 0.12
MRT/h	2.24 ± 0.32	2.28 ± 0.17	2.91 ± 0.43	2.28 ± 0.23
Clearance/ $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$	1 240.38 ± 340.57	1 058.67 ± 232.98	1 111.52 ± 251.74	1 904.13 ± 404.91
$Vz/\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$	2 081.1 ± 420.6	1 664.5 ± 511.5	4 024.9 ± 394.5	3 141.3 ± 179.6

注:与正常组大鼠比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

差异性研究——证治药动学在中医理论、证实质的揭示上具有积极意义。

证治药动学最佳研究对象是人,但由于伦理学制约,目前尚无法广泛开展,采用证候动物模型成为可行的选择。证是中医一系列宏观症状的组合与凝

炼,复制充分满足临床症状的证候动物模型存在现实困难,故冠心病目前公认的动物模型尚不多<sup>[6]</sup>。根据痰瘀互结型冠心病“痰”、“瘀”共存的本质,通过高脂饲料模拟“痰”,通过冠脉结扎模拟瘀血内停,所复制的动物模型具备了“痰”、“瘀”的要素和

实质。对模型大鼠进行血液生化、血液流变学等检查,显示造模后大鼠心肌严重缺血,血脂、心肌酶、血黏度显著升高,具有“浓”、“黏”、“凝”、“聚”的病理特点,符合 CHD 痰瘀互结证的诊断标准,与正常组大鼠具有统计学意义。

本文以证治药动学为切入点,以冠心病痰瘀互结证型为研究示例,丹参为模型药物,在国内率先将“实时、活体、动态、微创”特征的微透析采样技术<sup>[7]</sup>引入到证治药动学研究中。根据血液微透析技术的原理,所采集的为游离血药浓度。根据游离药物和药效具有直接相关性的特点,探索冠心病大鼠的证治药动学特征,获得了痰瘀互结型冠心病大鼠和正常大鼠的丹参素浓度-时间曲线。在数据处理上,鉴于房室模型严重依赖数据量的多少、优劣及采样时间点的设置,主观性较大,故采用非房室模型处理获得了药动学参数。结果表明,相比正常组,高、低剂量下丹参素在冠心病大鼠的达峰浓度增加,但无统计学意义;达峰时间提前,零阶矩(血药浓度时间曲线下面积, AUC)、一阶矩曲线下面积(AUMC)增加,相较于正常组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。研究结果表明,在痰瘀互结型冠心病大鼠模型中,指标成分丹参素生物利用度高于正常大鼠。

将微透析技术引入到证治药动学研究中,节约了实验动物,采样后可直接进样检测,避免生物样品前处理所带来的误差而提高了实验结果的可信度,所获得的药-时曲线更平滑、细腻。国内尚未见到基于微透析技术的证治药动学研究报道,本研究模式可供借鉴。

实验中痰瘀互结型冠心病动物死亡率较高,且微透析探针价格昂贵,故仅选取了冠心病单一证型。

在后续研究中,拟复制某一疾病多种证型的动物模型,阐明不同证型间经典方药体内过程的异同、区别与联系,挖掘药动学参数与证型的内在联系,从药动学角度阐释“证”的深刻内涵,则无疑更有意义。

因技术手段所限,包括作者在内,国内绝大多数都是在麻醉状态下进行大鼠的血液微透析采样,鉴于麻醉和清醒状态下生理机能的差异性,采用清醒小动物成为药动学的发展方向。在后续研究中,拟结合清醒动物活动装置,通过皮下包埋微透析导管而进行清醒、自由活动状态下的证治药动学研究,使结果更加符合真实情况。

#### [参考文献]

- [1] 黄熙,任平. 后证治药动学的医药创新——整体导向还原论研究[J]. 中医杂志,2013,54(5):365.
- [2] 黄熙,陈可冀.“证治药动学”新假说的理论与实践[J]. 中医杂志,1997,38(12):745.
- [3] 国家中医药管理局. 中医病症诊断疗效标准[S]. 南京:南京大学出版社,1994:18.
- [4] 朱丽红. 痰瘀互结型胸痹的实验研究——针药结合对高脂血症结合冠心病大鼠模型的作用及作用机制的研究[D]. 合肥:安徽中医学院,2006.
- [5] 朱丽红,汪克明,王宗殿,等. 冠心病痰瘀互结证动物模型复制方法的研究[J]. 广州中医药大学学报,2006,23(4):346.
- [6] 朱龙英,曹雪滨,何建成. 冠心病中医证候动物模型的建立及防治机理研究[J]. 中华中医药学刊,2009,27(11):2291.
- [7] 郭丽蓉,闫俊岭,黎艳刚,等. 乌头碱皮肤微透析体内回收率研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(1):44.

[责任编辑 聂淑琴]