

· 药物代谢 ·

醋柴胡小分子水溶性部位对甲氨蝶呤药物代谢动力学的影响

肖傅文¹, 胡巧红¹, 刘春萍², 赵瑞芝^{2,3*}

(1. 广东药学院药科学院, 广州 510006; 2. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510006;
3. 广东省中医药科学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:探讨 P-糖蛋白抑制剂醋柴胡小分子水溶性部位(MHE)对甲氨蝶呤药动学行为的影响。方法:SD 雄性大鼠分别灌胃甲氨蝶呤或甲氨蝶呤联合 MHE 后,于不同时间点眼眶静脉丛采血,利用 20% 高氯酸沉淀蛋白法处理血样,采用高效液相色谱法分析,非隔室模型估算药代动力学参数。结果:与单用组比较,联用组甲氨蝶呤药时曲线下面积 AUC_{0-t} 增加 16.6%, $AUC_{0-\infty}$ 增加 33.8%, 生物半衰期($t_{1/2}$)延长了 1.2 倍,平均驻留时间(MRT_{0-t})增加了 26.1%, 而药物清除率(CL)下降了 20.3%, 但 2 组的药代动力学参数无显著性差异。结论:MHE 具有增强甲氨蝶呤生物利用度的趋势,二者联合用药需要关注毒副反应的发生。

[关键词] 醋柴胡; 小分子水溶性部位; 甲氨蝶呤; 药物动力学; P-糖蛋白

[中图分类号] R969.1; R284.1; R945; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)16-0076-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015160076

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150702.1007.004.html>

[网络出版时间] 2015-07-02 10:07

Effect of Micromolecular Hydrophilic Extract from Vingar-baked Bupleuri Radix on Pharmacokinetics of Methotrexate XIAO Fu-wen¹, HU Qiao-hong¹, LIU Chun-ping², ZHAO Rui-zhi^{2,3*} (1. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Second Clinical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 3. Guangdong Provincial Academy of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of micromolecular hydrophilic extract (MHE, a P-glycoprotein inhibitor) from vingar-baked Bupleuri Radix on pharmacokinetics of methotrexate. **Method:** Sprague-Dawley male rats were orally administrated with methotrexate or that one combined with MHE respectively. Blood samples were collected from their eyes at different time point, treated with 20% perchloric acid protein precipitation method and then analyzed by HPLC. Pharmacokinetic parameters were evaluated by non-compartment model. **Result:** Compared with the group using methotrexate alone, AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, MRT_{0-t} , $t_{1/2}$ of the one combined with MHE increased by 16.6%, 33.8%, 26.1%, 120%, respectively; while CL decreased by 20.3%, but with no significant difference between their pharmacokinetic parameters. **Conclusion:** MHE can enhance bioavailability of methotrexate, and attention should be paid to toxic and side effects of their combined administration.

[Key words] vingar-baked Bupleuri Radix; micromolecular hydrophilic extract; methotrexate; pharmacokinetics; P-glycoprotein

甲氨蝶呤是叶酸合成拮抗剂,作用机制是抑制叶酸还原酶活性,令 DNA 与 RNA 的合成受阻,从而使细胞生长受抑制,临床用于治疗急性白血病、绒

毛膜上皮细胞癌、牛皮癣等,大剂量时对骨肉瘤、肺癌及卵巢癌等也有效^[1]。甲氨蝶呤分布于全身体液中,浓集于肝,经肾排泄^[2-3],长期使用具有较大

[收稿日期] 20141204(017)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30672668,81073063)

[第一作者] 肖傅文,在读硕士,从事中药新剂型及新技术的研究, Tel:18819499959, E-mail:xiaofwen@163.com

[通讯作者] * 赵瑞芝,博士生导师,研究员,从事中药新剂型及技术研究, Tel:13610241754, E-mail:13610241754@163.com

的毒性,且其为 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)底物^[4],故在 P-gp 过表达的肿瘤中会导致底物被泵出体外,产生耐药性而影响甲氨蝶呤临床疗效的发挥。醋柴胡小分子水溶性部位(MHE)是醋柴胡水提液经 80% 醇沉后的上清液通过饱和正丁醇萃取后的水溶性部位,前期研究发现该部位具有明显的抑制 P-gp 过表达 HEK293 细胞的 P-gp 活性,并显著降低其蛋白及基因表达^[5]。理论上, MHE 有可能通过抑制 P-gp 活性来提高其底物的血药浓度,从而增强甲氨蝶呤的药效。本实验拟通过比较甲氨蝶呤单用及其与 MHE 联用后在大鼠体内的药物代谢动力学参数差异,为二者在临床上的联合应用提供参考。

1 材料

1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), VG3 型涡旋震荡仪(德国 IKA 公司), G20 型台式离心机(河北省安新县白洋离心机厂), U9270-0001 型超低温冰箱(英国 New Brunswick Scientific 公司), Milli-Q 型纯水机(美国 Millipore 公司)。

醋柴胡饮片(康美药业有限公司,批号 120100341,经广东省中医院主管药师陈文亮鉴定为 *Bupleurum chinense* 的醋制品)。醋柴胡小分子水溶性部位(MHE,广东省中医院中药制剂实验室,生药质量浓度 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),甲氨蝶呤对照品(广州绿百草生物科技有限公司,批号 100138-201104),甲氨蝶呤片(上海信谊药厂有限公司,批号 120306),水为超纯水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

雄性 SD 大鼠 12 只, SPF 级, 体重 $(300 \pm 50) \text{ g}$, 购自南方医科大学实验动物中心,合格证号 SCXK(粤)2011-0015,通过了实验动物伦理委员会审查。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取甲氨蝶呤对照品,用含有 5% 甲醇的 0.1% 甲酸水溶液配成 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 贮存备用。

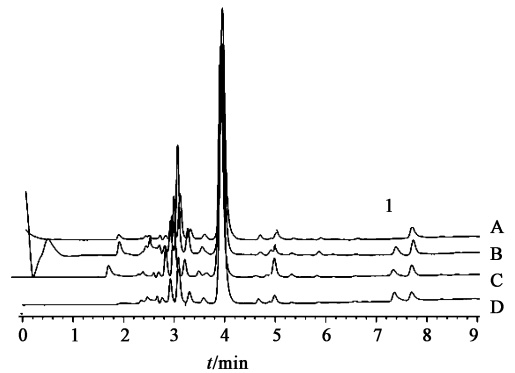
2.2 血浆样品的处理 取血浆样品 $100 \text{ } \mu\text{L}$,加入 20% 高氯酸 $50 \text{ } \mu\text{L}$,涡旋 20 s,于 $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,过 $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜,以 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清液,即可。

2.3 色谱条件 Diamonsil C_{18} (2) 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \text{ } \mu\text{m}$),流动相甲醇(A)-0.1% 甲酸水(B)梯度洗脱(0 ~ 8 min, 10% ~ 60% A; 8 ~ 10 min, 60% ~ 100% A),流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 302 nm,柱温 $27 \text{ }^\circ\text{C}$,进样量 $10 \text{ } \mu\text{L}$ 。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验 考察血浆样品加对照品前后

和给药后血浆处理样品色谱图,见图 1。结果显示血浆中内源性物质不干扰甲氨蝶呤的测定。



A. 空白血浆; B. 空白血浆 + 对照品; C. 联合给药后 1 h 的血浆样品; D. 单药给药 40 min 后的血浆样品; 1. 甲氨蝶呤

图 1 大鼠血浆中甲氨蝶呤 HPLC

Fig. 1 HPLC of methotrexate in rat plasma

2.4.2 线性范围及检测限 取空白血浆配制含有甲氨蝶呤质量浓度分别为 $0.0976, 0.195, 0.390, 0.781, 1.562, 3.125, 6.25, 12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血浆样品,按 2.2 项下方法处理,以峰面积对质量浓度进行线性范围及检测限考察,得标准曲线 $Y = 12.672X$ ($r = 0.9985$),线性范围 $0.0976 \sim 12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,检测限 $0.0976 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4.3 日间、日内精密密度与提取回收率 配制含甲氨蝶呤对照品质量浓度分别为 $0.195, 0.781, 6.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血浆样品,每个样品平行 5 次,按 2.2 项下方法处理,连续测定 3 d,结果日间、日内精密密度 RSD 均 $< 6.1\%$,提取回收率在 $77.5\% \sim 86.6\%$ 。

2.4.4 稳定性试验 通过考察低、中、高 3 个质控样品(质量浓度分别为 $0.195, 0.781, 6.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 在室温下 24 h, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱放置 8 h 及 3 次冷冻-溶解循环的稳定性,计算样品 RSD 均 $< 7.8\%$ 。

2.5 药物代谢动力学研究 将大鼠随机分组为甲氨蝶呤组和甲氨蝶呤联合 MHE 组,每组 6 只。实验前禁食 12 h,自由饮水。甲氨蝶呤由 5% 碳酸氢钠溶液溶解甲氨蝶呤片所得,给药剂量 $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。MHE 给药剂量 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。甲氨蝶呤联合 MHE 组分别按照 $10 \text{ } \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $7 \text{ } \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ 灌胃给药 MHE 和甲氨蝶呤,甲氨蝶呤组则按 $7 \text{ } \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ 灌胃给药甲氨蝶呤。灌胃后,10% 水合氯醛按 $10 \text{ } \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ 腹腔注射,分别于给药后 5, 10, 20, 40 min 和 1, 2, 3, 5, 7, 9 h 眼眶静脉丛取血 $500 \text{ } \mu\text{L}$ 置于抗凝管中,血样静置 2 h 后离心 ($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}, 10 \text{ min}$),吸取上清液于离心管中, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存待检,按 2.2 项下方法处

理血浆样品,参照 2.3 项下方法分析。采用 DAS2.1.1 药代动力学软件处理数据,利用非隔室模型估算药物代谢动力学参数,见表 1,经 SPSS 20 软件独立样本 *t* 检验分析。药-时曲线见图 2。通过统计分析发现,MHE 联用甲氨蝶呤组与单用组的药代动力学参数均无显著差异性。药时曲线下面积 AUC_{0-t} 增加 16.6%, $AUC_{0-\infty}$ 增加 33.8%,生物半衰期($t_{1/2}$)延长了 1.2 倍,平均滞留时间(MRT_{0-t})增加了 26.1%,而药物清除率(CL)下降了 20.3%,提示甲氨蝶呤联用 MHE 可延缓甲氨蝶呤达峰时间及消除速度,提高其生物利用度。

表 1 甲氨蝶呤单用或联用醋柴胡小分子水溶性部位后的药物代谢动力学参数($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of methotrexate or combination with MHE ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	甲氨蝶呤	甲氨蝶呤 + MHE
AUC_{0-t}	$mg \cdot h \cdot L^{-1}$	0.729 ± 0.258	0.850 ± 0.226
$AUC_{0-\infty}$	$mg \cdot h \cdot L^{-1}$	0.764 ± 0.288	1.022 ± 0.522
MRT_{0-t}	h	2.313 ± 0.302	2.916 ± 0.522
$t_{1/2}$	h	1.419 ± 0.246	3.093 ± 3.049
C_{max}	$mg \cdot L^{-1}$	0.199 ± 0.058	0.190 ± 0.037
CL	$L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	8.728 ± 2.940	6.958 ± 2.741

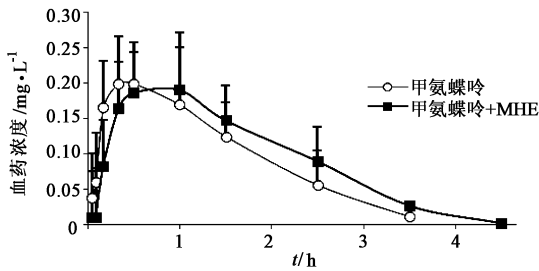


图 2 大鼠给予甲氨蝶呤或 MHE 联合甲氨蝶呤后的平均血药浓度-时间曲线($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig.2 Drug concentration-time profiles after orally administration with methotrexate or combined with MHE($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3 讨论

P-gp 是肿瘤多药耐药(MDR)基因表达的,由 1 280 个氨基酸组成的跨膜糖蛋白,通过三磷酸腺苷(ATP)供能将细胞内的药物“泵”出胞外,降低胞内药物浓度的一种能量依赖性的药物外运泵^[6],在肠黏膜细胞、肝胆管细胞腔面、肾近端小管等中有高表达^[7],可通过影响底物的吸收和消除来影响药物的生物利用度。MHE 联合甲氨蝶呤给药后,甲氨蝶呤出现了消除延缓及生物利用度提高的趋势,这为 MHE 通过抑制 P-gp 活性促进其底物甲氨蝶呤在体内吸收提供了一定的依据。

甲氨蝶呤不仅是 P-gp 的底物,还是有机阴离子

转运多肽(organic anion transporting polypeptides, OATP)2 的底物^[4]。前期体外试验发现 MHE 可抑制 OATP2 的活性,这可能是导致 2 组部分动力学参数变化不大的原因之一。Nguyen 等^[8]探讨了 P-gp 抑制剂槲皮黄酮对 P-gp 底物他林洛尔药物动力学的影响,由于他林洛尔同时还是 OATP1A2 和 OATP2A1 蛋白的底物,而槲皮黄酮也抑制后 2 种摄入蛋白,故导致 P-gp 对他林洛尔的药物动力学的影响减弱。本文中 MHE 给药剂量由 $0.1 g \cdot kg^{-1}$ 醋柴胡的临床剂量换算而来,MHE 浓度较低可能是造成其抑制作用较弱,药物动力学参数差异较小的另一个原因。

MHE 为醋柴胡水提取液中除去多糖和正丁醇部位后的水溶性小分子部位。前期研究显示该部位具有调节转运蛋白活性的作用,是醋柴胡作为引经药物介导的药物-药物相互作用的原因之一。本文研究结果提示合用柴胡及含柴胡复方制剂可延缓甲氨蝶呤的消除,影响其体内过程,临床上应关注合用后可能产生的毒副作用。

[参考文献]

- [1] 王芳.抗肿瘤药物甲氨蝶呤在体内分析方法进展[J].浙江中医学院学报,2002,26(5):74-76.
- [2] Balis F M, Blaney S M, McCully C L, et al. Methotrexate distribution within the subarachnoid space after intraventricular and intravenous administration [J]. Cancer Chemoth Pharm, 2000, 45(3):259-264.
- [3] Murakami Y, Yamazaki K, Sakauchi N, et al. A one-month repeated oral does toxicity study of methotrexate in unilaterally nephrectomized rats[J]. J Toxicol Sci, 1998, 23(5):681-699.
- [4] Shibayama Y, Takeda Y, Yamada K. Effect of methotrexate treatment on expression levels of organic anion transporter polypeptide 2, P-glycoprotein and bile salt export pump in rats [J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(3):493-496.
- [5] 冯丽敏,张娴,赵瑞芝.醋柴胡小分子水溶性部位抑制 Hek293-P-gp 细胞中 P-糖蛋白的外排作用[J].中国药理学通报,2013,29(12):1684-1688.
- [6] Lampidis T J, Kolonias D, Podona T, et al. Circumvention P-gp MDR as a function of anthracycline lipophilicity and charge [J]. Biochemistry, 1997, 36(9):2769-2785.
- [7] 缪海均,刘皋林. P-糖蛋白与药代动力学 [J]. 中国药房, 2002, 13(1):49-50.
- [8] Nguyen M A, Staubach P, Wolfram S, et al. Effect of single-dose and short-term administration of quercetin on the pharmacokinetics of talinolol in humans-implications for the evaluation of transporter-mediated flavonoid-drug interactions [J]. Eur J Pharm Sci, 2014, 61:54-60.

[责任编辑 刘德文]