

# 基于大鼠脑缺血再灌注损伤模型建立辛芍组方中灯盏乙素和芍药苷的 PK-PD 结合模型

巩仔鹏, 胡建春, 李梅, 陈亭亭, 吴林霖, 李月婷, 李勇军, 兰燕宇, 王永林, 王爱民\*  
(贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室, 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 药学院,  
国家苗药工程技术研究中心, 贵阳 550004)

**[摘要]** **目的:**建立辛芍组方中灯盏乙素和芍药苷的药代动力学-药效动力学(PK-PD)结合模型,为该组方的作用机制分析提供参考。**方法:**采用液质联用法测定大鼠脑缺血再灌注损伤模型给药后的不同时间点所得血浆样本中灯盏乙素和芍药苷的血药浓度,获得药时曲线;采用试剂盒测定不同时间点所得血浆样本中的 2 种药效指标超氧化物歧化酶(SOD)和乳酸脱氢酶(LDH)的浓度,获得时效曲线。采用 WinNonlin 6.4 软件中的房室模型法对 2 种代表成分的药代动力学参数进行拟合,获得 PK 参数。在此基础上,固定相关的药代动力学参数,对时效关系进行拟合,得 PD 参数;根据 PD 参数,建立辛芍组方中灯盏乙素和芍药苷的 PK-PD 结合模型。**结果:**当分别以 SOD, LDH 为药效指标时,得灯盏乙素的 PK-PD 模型分别为  $E = 21.08 + 5.49C_e / (C_e + 7368.24)$ ,  $E = 211.98 - 89.13C_e / (C_e + 2013.2)$ , 芍药苷的 PK-PD 模型分别为  $E = 20.02 + 1.58C_e / (C_e + 0.02)$ ,  $E = 216.83 - 37.31C_e / (C_e + 0.04)$ , 式中  $E$  为效应值,  $C_e$  为药物在效应室中的质量浓度。**结论:**SOD 和 LDH 的浓度与灯盏乙素、芍药苷的质量浓度存在一定的相关性。辛芍组方及其主要活性成分灯盏乙素和芍药苷可通过提高 SOD 浓度和降低 LDH 浓度来发挥抗氧化作用,进而达到保护脑缺血再灌注损伤的目的。

**[关键词]** 辛芍组方; 灯盏乙素; 芍药苷; 药代动力学-药效动力学模型; 超氧化物歧化酶; 乳酸脱氢酶

**[中图分类号]** R969.1; R945; R285.5; R284; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)01-0074-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.sjfx.2018010074

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171011.1353.014.html>

**[网络出版时间]** 2017-10-11 13:53

## Establishment of PK-PD Binding Model of Scutellarin and Paeoniflorin in Xinshao Formula Based on Model of Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Rats

GONG Zi-peng, HU Jian-chun, LI Mei, CHEN Ting-ting, WU Lin-lin, LI Yue-ting, LI Yong-jun,  
LAN Yan-yu, WANG Yong-lin, WANG Ai-min\*

(National Engineering Research Center of Miao's Medicines, School of Pharmacy, Engineering Research Center for Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics in Guizhou Province, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) binding model of scutellarin and paeoniflorin in Xinshao formula. **Method:** In order to get the drug-time curves of scutellarin and paeoniflorin from Xinshao formula in plasma collected from different time points of a disease model animal, whose concentrations were determined by UPLC-MS/MS. At the same time, two kinds of indexes [superoxide dismutase

**[收稿日期]** 20170801(016)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81260636);贵州省优秀青年科技人才培养项目(黔科合人字[2015]11号);贵州省民族药药效物质基础研究科技创新人才团队项目(黔科合平台人才[2016]5613);贵州省中医药管理局贵州省中医药、民族医药科学技术研究专项(QZZY-2015-080)

**[第一作者]** 巩仔鹏, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药药代动力学及其 PK-PD 结合模型研究, Tel:0851-86908468, E-mail: gzp4012607@126.com

**[通信作者]** \*王爱民, 教授, 硕士生导师, 从事中药药效物质基础及质量标准研究, Tel:0851-86908468, E-mail: gywam100@163.com

(SOD) and lactate dehydrogenase (LDH)] in the plasma samples of different time points were determined by the kit for time-effect curves. Then WinNonlin 6.4 software was used to fit the pharmacokinetic parameters of scutellarin and paeoniflorin with compartmental model and to get PK parameters. After that, the pharmacokinetic parameters were fixed, and the time effect relationship were fitted to get the relevant PD parameters. According to the PD parameters, the PK-PD models of two representative components in Xinshao formula were established. **Result:** When SOD was used as the index of efficacy, the PK-PD models of scutellarin and paeoniflorin were obtained as  $E = 21.08 + 5.49C_e / (C_e + 7368.24)$  and  $E = 20.02 + 1.58C_e / (C_e + 0.02)$ . When LDH was used as the index of efficacy, the PK-PD models of scutellarin and paeoniflorin were obtained as  $E = 211.98 - 89.13C_e / (C_e + 2013.2)$  and  $E = 216.83 - 37.31C_e / (C_e + 0.04)$ . **Conclusion:** The concentrations of SOD and LDH are correlated with the concentrations of scutellarin and paeoniflorin. The formula and its main active components (scutellarin and paeoniflorin) can protect cerebral ischemia reperfusion injury by increasing concentration of SOD and decreasing concentration of LDH.

**[Key words]** Xinshao formula; scutellarin; paeoniflorin; pharmacokinetic-pharmacodynamic model; superoxide dismutase; lactate dehydrogenase

药代动力学-药效动力学 (pharmacokinetic-pharmacodynamic, PK-PD) 结合模型是研究药物的体内过程、药物对机体的作用及二者之间关系的重要工具,将 PK-PD 结合模型应用于中药研究,可为阐明中药的药效物质基础及作用机制提供科学依据<sup>[1]</sup>。近年来,许多学者在中药 PK-PD 结合模型的构建方面做了很多探索性工作<sup>[2-4]</sup>,然而中药复杂体系的“多成分、多环节、多途径、多靶点”作用特点,决定了开展中药 PK-PD 结合模型的研究具有较大困难,并且存在以下问题,①忽略了疾病状态下的中药药代动力学研究,对疾病状态下中药 PK-PD 结合模型研究的意义认识不足;②目前中药 PK-PD 结合模型研究主要停留在单一活性成分和单一药效指标上,忽略了中药的多成分和多靶点的作用特点,关于多成分、多靶点的中药 PK-PD 结合模型研究较少。

辛芍组方为贵州少数民族民间验方,由灯盏细辛和赤芍配伍组成,具有通经活络、活血化瘀的功效,主要用于预防和辅助治疗中风、偏瘫,且疗效显著。课题组前期对辛芍组方的化学成分和组方合理性进行了系统研究<sup>[5-9]</sup>,结果表明辛芍组方可增强病灶组织抗氧化能力、增加脑血流量、抗脑缺血再灌注损伤作用明显;同时明确其有效组分中主要为黄酮类(灯盏乙素、灯盏甲素等),单萜苷类(芍药苷、芍药内酯苷、氧化芍药苷等)和酚酸类(没食子酸)化合物,并建立了基于多指标成分的组分质量控制方法<sup>[10]</sup>。但关于辛芍组方代表成分在疾病状态下的 PK-PD 结合模型的研究尚属空白,故本实验在前期建立脑缺血再灌注损伤大鼠模型的基础上,拟建

立辛芍组方中 2 种代表成分灯盏乙素和芍药苷的 PK-PD 结合模型,以期对辛芍组方的深层开发与利用提供理论基础。

## 1 材料

ACQUITY UPLC 型超高压液相-三重四级杆质谱联用仪和(美国 Waters 公司),MTN-2800D 型氮吹仪(天津奥特塞恩斯仪器有限公司),XYN-15LP 型氮吹仪氮气发生器(上海析友分析仪器有限公司),680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),RCT-3200A 型实验室专用超纯水机(四川沃特尔水处理设备有限公司),Research plus 型微量移液器(德国 Eppendorf 公司)。

灯盏乙素、芍药苷、葛根素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 20140523,20140425,0752-9605,纯度分别为  $\geq 98\%$ ,  $\geq 99\%$ ,  $\geq 98\%$ ),辛芍组方冻干粉针(由贵州省药物制剂重点实验室提供,批号 20130527,灯盏乙素和芍药苷的质量分数分别为  $4.1, 6.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )。

SPF 级健康雄性 SD 大鼠,体重  $280 \sim 300 \text{ g}$ ,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2012-0001。动物饲养于温度  $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ ,相对湿度  $(60 \pm 10)\%$  的环境中,饲养管理均严格按照实验动物的要求及规则,实验前饲养 1 周以适应环境。本文涉及的动物实验经贵州医科大学实验动物伦理委员会批准,批准号 1602003。

## 2 方法和结果

**2.1 药代动力学研究** 取 10 只 SD 大鼠,禁食 12 h,按剂量  $0.35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉。按文献[11]的方法进行改良后制备大鼠脑缺

血再灌注损伤模型;待模型成功后,取脑缺血再灌注损伤模型大鼠,按  $12.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  口服给予辛芍组方进行干预,每天 2 次,连续 3 d。第 4 天于首次给药前以及给药后 5, 15, 30 min, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 h 分别通过插管采血 0.35 mL, 置于肝素化的离心管中, 离心 ( $13\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 10 min), 取血浆 160  $\mu\text{L}$ , 于  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。取血浆样品 100  $\mu\text{L}$ , 加 1% 甲酸水 50  $\mu\text{L}$ ,  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素 15  $\mu\text{L}$ , 涡旋混合;加甲醇 380  $\mu\text{L}$ , 涡旋混合, 超声 15 min, 于  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 转移上清液至 1.5 mL 离心管中, 于氮吹仪上  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  吹干;加 50% 乙腈 150  $\mu\text{L}$  复溶, 涡旋混合, 超声 15 min,  $15\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上清液进样。

采用 UPLC-MS/MS 测定不同时间点血浆中灯盏乙素和芍药苷的质量浓度<sup>[12]</sup>, 利用 WinNonlin 6.4 软件计算二者的主要药代动力参数, 见表 1。结果表明脑缺血再灌注损伤模型大鼠灌胃给予辛芍组方后, 大鼠血浆中灯盏乙素和芍药苷的血药浓度-时间关系经药动学隔室模型拟合后, 发现其均较符合单房室开放模型。通过模型计算后发现血药浓度的实测值与预测值基本一致。

表 1 辛芍组方中灯盏乙素和芍药苷的主要药代动力学参数

Table 1 Main pharmacokinetic parameters of scutellarin and paeoniflorin after oral administration of Xinshao formula in rats

参数/单位	灯盏乙素	芍药苷
$AUC_{0-12} / \text{h} \cdot \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	16 663.300	6 621.270
$V / F / \text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.029	0.460
$CL / F / \text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.003	0.012
$K_{01} / \text{L} \cdot \text{h}^{-1}$	2.148	86.420
$K_{10} / \text{L} \cdot \text{h}^{-1}$	0.105	0.026
$K_{01\_HL} / \text{h}$	0.322	0.008
$K_{10\_HL} / \text{h}$	6.590	26.750

**2.2 辛芍组方干预后的药效动力学研究** 取 2.1 项下的血浆样本, 用试剂盒测定不同时间所得血浆中 2 种药效指标[超氧化物歧化酶(SOD)和乳酸脱氢酶(LDH)]的含量, 结合 2.1 项下的血药浓度数据, 分别绘制灯盏乙素和芍药苷的血药浓度-时间曲线和效应-时间曲线, 见图 1, 2。

**2.3 灯盏乙素和芍药苷在效应室质量浓度的拟合** 分别把 2.1 项下灯盏乙素和芍药苷的血药浓度-时间数据导入 WinNonlin 6.4 软件, 采用房室模型法对血药浓度-时间数据进行拟合, 获得灯盏乙素和芍药苷在效应室的质量浓度-时间数据, 绘制灯盏乙素和芍药苷的效应室质量浓度-效应曲线(分别以 SOD 和 LDH 为药效指标), 见图 3, 4。

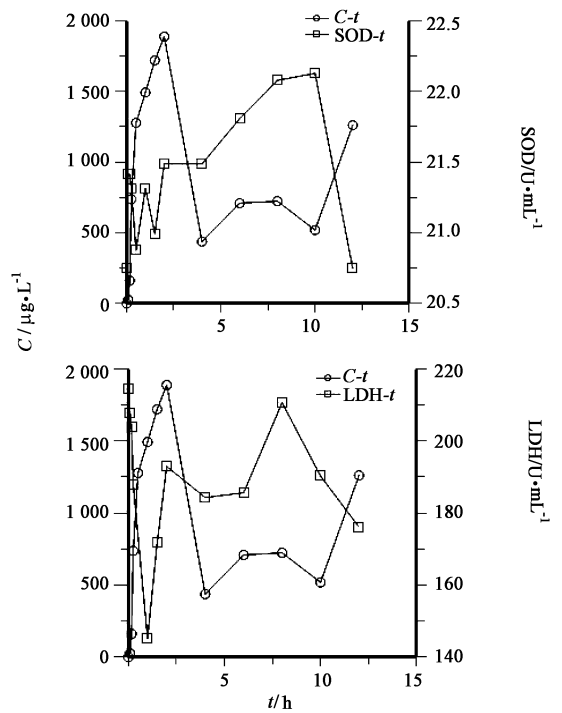


图 1 辛芍组方中灯盏乙素在脑缺血再灌注损伤模型大鼠体内的血药浓度-时间和效应-时间曲线 ( $n = 5$ )

Fig. 1 Plasma concentration and effect time profiles of scutellarin after oral administration of Xinshao formula in cerebral ischemia-reperfusion injury model rats ( $n = 5$ )

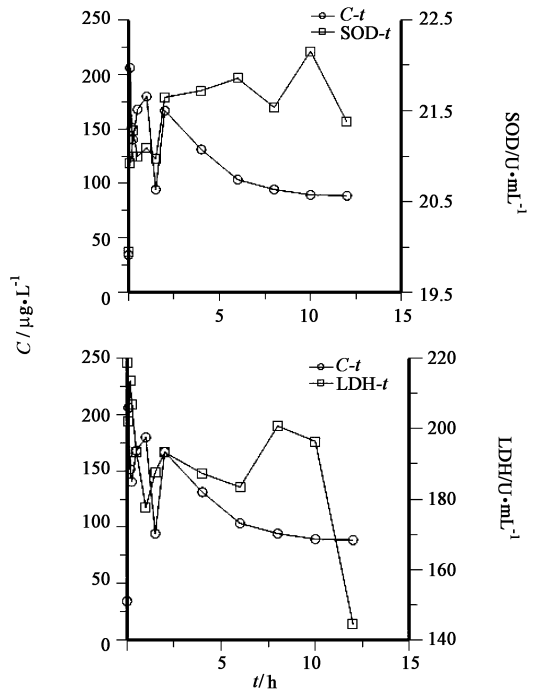


图 2 辛芍组方中芍药苷在脑缺血再灌注损伤模型大鼠体内的血药浓度-时间和效应-时间曲线 ( $n = 5$ )

Fig. 2 Plasma concentration and effect time profiles of paeoniflorin after oral administration of Xinshao formula in cerebral ischemia-reperfusion injury model rats ( $n = 5$ )

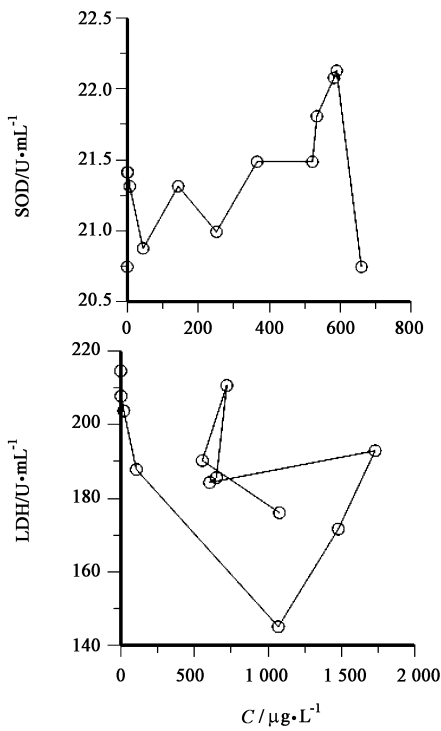


图 3 辛芍组方中灯盏乙素在脑缺血再灌注损伤模型大鼠体内的效应室质量浓度-效应曲线 ( $n=5$ )

Fig. 3 Concentration in effect compartment and effect profiles of scutellarin after oral administration of Xinshao formula in cerebral ischemia-reperfusion injury model rats ( $n=5$ )

**2.4 PK-PD 结合模型的建立** 固定 2.1 项下灯盏乙素和芍药苷的相关药代动力学参数, 采用 WinNonlin 6.4 软件中的 PK-PD 模型进行拟合, 获得 PK 参数; 对 2.2 项下时间-效应 (分别以 SOD 和 LDH 为药效指标) 关系进行拟合, 得相关 PD 参数; 进而获得辛芍组方中灯盏乙素和芍药苷的 PK-PD 结合模型的参数, 建立其 PK-PD 结合模型。

**2.4.1 灯盏乙素的 PK-PD 结合模型** 分别以 SOD,

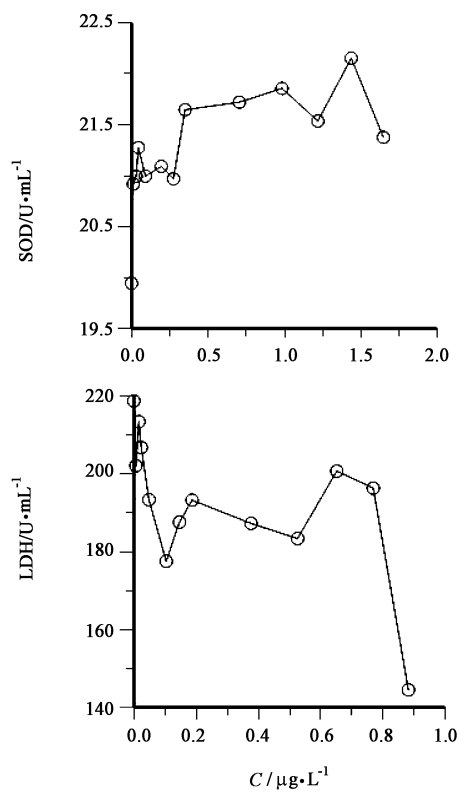


图 4 是辛芍组方中芍药苷在脑缺血再灌注损伤模型大鼠体内的效应室质量浓度-效应曲线 ( $n=5$ )

Fig. 4 Concentration in effect compartment and effect profiles of paeoniflorin after oral administration of Xinshao formula in cerebral ischemia-reperfusion injury model rats ( $n=5$ )

LDH 为药效指标时, 辛芍组方中灯盏乙素的 PK-PD 参数见表 2。当分别以 SOD, LDH 为药效指标时, 得灯盏乙素的 PK-PD 模型分别为  $E = 21.08 + 5.49C_e / (C_e + 7368.24)$ ,  $E = 211.98 - 89.13C_e / (C_e + 2013.2)$ , 式中  $E$  为效应值,  $C_e$  为药物在效应室中的质量浓度。

表 2 辛芍组方中灯盏乙素以 SOD 和 LDH 为药效指标的 PK-PD 参数

Table 2 PK-PD parameters of scutellarin after oral administration of Xinshao formula in rats when SOD and LDH as pharmacodynamic indexes

药效指标	参数/单位	预测值	标准偏差	变异系数	单变量计算上限	单变量计算下限
SOD	$E_{max}/U \cdot mL^{-1}$	5.486	101.768	1855.031	-221.269	232.241
	$EC_{50}/\mu g \cdot L^{-1}$	7368.236	154452.600	2096.195	-336776.000	351512.300
	$E_0/U \cdot mL^{-1}$	21.085	0.200	0.947	20.640	21.530
	$K_{e0}$	0.253	0.342	134.982	-0.509	1.015
LDH	$I_{max}/U \cdot L^{-1}$	89.128	164.846	184.953	-291.010	469.267
	$IC_{50}/\mu g \cdot L^{-1}$	2013.204	6479.437	321.847	-12928.500	16954.960
	$E_0/U \cdot L^{-1}$	211.983	14.287	6.740	179.037	244.928
	$K_{e0}$	9.998	25.505	255.107	-48.818	68.814

**2.4.2 芍药苷的 PK-PD 结合模型** 分别以 SOD, LDH 为药效指标时, 芍药苷的 PK-PD 参数见表 3。当分别以 SOD, LDH 为药效指标时, 得芍药苷的 PK-

PD 模型分别为  $E = 20.02 + 1.58C_e / (C_e + 0.02)$ ,  $E = 216.83 - 37.31C_e / (C_e + 0.04)$ , 式中  $E$  为效应值,  $C_e$  为药物在效应室中的质量浓度。

表 3 辛芍组方中药药苷以 SOD 和 LDH 为药效指标的 PK-PD 参数

Table 3 PK-PD parameters of paeoniflorin after oral administration of Xinshao formula in rats when SOD and LDH as pharmacodynamic indexes

药效指标	参数/单位	预测值	标准偏差	变异系数	单变量计算上限	单变量计算下限
SOD	$E_{max}/U \cdot mL^{-1}$	1.580	0.608	38.449	0.206	2.955
	$EC_{50}/\mu g \cdot L^{-1}$	0.021	49.989	233 461.000	-113.063	113.105
	$E_0/U \cdot mL^{-1}$	20.019	0.337	1.684	19.256	20.781
	$K_{e0}$	0.001	3.006	233 464.100	-6.798	6.801
	$I_{max}/U \cdot L^{-1}$	37.309	46.225	123.899	-67.261	141.879
LDH	$IC_{50}/\mu g \cdot L^{-1}$	0.041	153.502	372 405.600	-347.208	347.290
	$E_0/U \cdot L^{-1}$	216.827	15.514	7.155	181.731	251.924
	$K_{e0}$	0.001	2.400	372 280.500	-5.428	5.429

### 3 讨论

一般而言,建立 PK-PD 模型的关键是药效指标能够量化,而且通常具有明显量效关系的中药才能建立良好的 PK-PD 模型。然而,由于多数中药发挥作用都是通过多成分、多途径、多靶点产生的,中药组方就显得更为复杂。因此,如何选择可量化的指标,进而使之能够与中药组方有效成分之间具有显著的量效关系已成为制约代表成分 PK-PD 模型建立的瓶颈。值得注意的是,目前关于中药 PK-PD 结合模型的建立多数是在正常机体内进行的。但是不同的生理病理状态会对中药体内过程产生不同的影响,建立中药在病理状态下的 PK-PD 结合模型更为重要,且与临床更加紧密相关。

本研究主要是以大鼠脑缺血再灌注损伤模型为研究对象,通过 WinNonlin 6.4 软件中的半房室模型法对血药浓度-时间数据进行拟合,获得辛芍组方中代表成分在效应室的质量浓度-时间数据,进而可以使得辛芍组方中代表成分与药效指标之间呈现明显的量效关系,最终建立辛芍组方中 2 种代表成分的 PK-PD 结合模型。辛芍组方中灯盏乙素和芍药苷的 PK-PD 模型结果表明,SOD 和 LDH 的浓度与灯盏乙素和芍药苷的质量浓度存在一定的相关性。基于此,推测辛芍组方及其主要活性成分灯盏乙素和芍药苷可通过提高 SOD 浓度和降低 LDH 浓度来发挥抗氧化作用,进而达到保护脑缺血再灌注损伤的目的。通过辛芍组方中 2 种代表成分的 PK-PD 模型建立,揭示了辛芍组方的药效物质基础及其可能的作用机制。然而,辛芍组方的有效成分不仅包括灯盏乙素和芍药苷,还包括其他成分。而本文仅以灯盏乙素和芍药苷 2 种成分建立辛芍组方的 PK-PD 结合模型存在一定的局限性,后续将结合辛芍组方的多种有效成分来建立 PK-PD 结合模型,以便能更合理地揭示该组方发挥保护脑缺血再灌注损伤的作用机制。

### [参考文献]

- [1] 罗太敏,李晋奇,童荣生. 药代动力学-药效动力学结合模型在中药研究中的应用现状及展望[J]. 中华中医药杂志,2014,29(2):332-335.
- [2] 周惠芬,何昱,张宇燕,等. 川芎和黄芪有效部位组合给药后川芎嗉在脑缺血再灌注大鼠体内的 PK-PD 结合研究[J]. 中草药,2016,47(19):3463-3468.
- [3] 詹淑玉,邵青,李正,等. 生脉注射液中人参皂苷  $R_{g_1}$ ,  $R_{b_1}$  在心肌缺血大鼠体内的药理学-药效学结合研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(7):1300-1305.
- [4] 刘史佳,戴国梁,孙冰婷,等. 基于 PK-PD 模型研究雷公藤治疗类风湿关节炎生物靶标[J]. 中国中药杂志,2015,40(2):334-338.
- [5] 陆苑,张洁,兰燕宇,等. 灯盏细辛-赤芍组方配比及给药途径的脑保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(21):175-179.
- [6] 刘宗炎,董莉,董永喜,等. 灯盏细辛与赤芍配伍组方对  $H_2O_2$  致 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(5):180-183.
- [7] 王永林,黄勇,兰燕宇,等. 注射用辛芍冻干粉针药味配伍作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(7):38-40.
- [8] 苏红,王爱民,王永林,等. 注射用辛芍(冻干粉针)指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(15):1515-1517.
- [9] 何迅,李勇军,王爱民,等. 注射用辛芍(冻干粉针)与常用输液配伍稳定性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(5):9-11.
- [10] 郑林,牟景丽,黄勇,等. UPLC-MS/MS 法同时测定注射用辛芍中 7 种指标成分的含量[J]. 中国新药杂志,2014,22(1):105-109.
- [11] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke,1989,20(1):84-91.
- [12] LI Y T, LU Y, HU J C, et al. Pharmacokinetic comparison of scutellarin and paeoniflorin in sham-operated and middle cerebral artery occlusion ischemia and reperfusion injury rats after intravenous administration of Xin-Shao formula [J]. Molecules, 2016,doi:10.3390/molecules21091191.

[责任编辑 刘德文]