

以降酶法研究逍遥散在肝损伤大鼠的昼夜药动学

张宁¹, 夏珂¹, 李秋红¹, 陈曦^{2*}, 王业秋¹

(1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193)

[摘要] 目的: 研究昼夜给予逍遥散对肝损伤大鼠的药效动力学差异, 为肝病患者服用逍遥散提供时间依据。方法: 将大鼠 sc 40% CCl₄ 橄榄油溶液 2 mL·kg⁻¹ 每 2 d 1 次, 首次 sc 4 mL·kg⁻¹, 连续 12 d, 以 AST 降低量为药效指标, 分别于早 8 点和晚 8 点单次 ig 逍遥散, 通过测定降酶峰时、量效方程、时效方程, 运用 PKSolver 2.0 统计距分析模块求算相关药动学和药效学参数。结果: 逍遥散的降酶时-效曲线具有显著的双峰特性, 其 t_d , $t_{1/2(ED)}$, AUC, MRT 分别为 17.79 h, 3.73 h, 657.07 U·L⁻¹·h⁻¹, 6.23 h(昼) 和 24.30 h, 3.50 h, 810.19 U·L⁻¹·h⁻¹, 6.19 h(夜), 昼夜 t_d 和 AUC 经统计学比较具有显著性意义。结论: 逍遥散对肝损伤大鼠的药动学存在昼夜差异, 在休息期末, 活动期初(晚 8 点)给予逍遥散更为合理。

[关键词] 逍遥散; 药效动力学; 昼夜节律; 肝损伤

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0102-04

Enzyme-Reducing Action and Circadian Pharmacodynamics of Xiaoyao Powder on Liver Injury in Rats

ZHANG Ning¹, XIA Ke¹, LI Qiu-hong¹, CHEN Xi^{2*}, WANG Ye-qiu¹

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Peking Union Medical College Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China)

[Abstract] Objective: To study the enzyme-reducing action and pharmacodynamics of Xiaoyao powder on liver injury in rats in the morning and evening in order to provide chronomedication evidence for hepatopathies. **Method:** The liver injury rat model was developed by subcutaneous injection of forty percent carbon tetrachloride every two days. With the decrease of aspartate amino transferase as the parameter, the pharmacodynamics in the morning and evening of Xiaoyao powder was studied. The apparent parameters of pharmacodynamics were estimated based on the time-effect curve by PKSolver 2.0. **Result:** The time-effect curve of Xiaoyao powder shows characteristics of double peaks and can be described by statistical moment. The main pharmacodynamic parameters are as follows: $t_d = 17.79$ h(day), 24.30 h(night), $t_{1/2(ED)} = 3.73$ h(day), 3.50 h(night), AUC = 657.07 U·L⁻¹·h⁻¹(day), 810.19 U·L⁻¹·h⁻¹(night), MRT = 6.23 h(day), 6.19 h(night), respectively. **Conclusion:** Significant circadian rhythm of pharmacodynamics was found in rats when Xiaoyao powder was given at different times of the day. The findings suggest that the hepatic protection effect for liver injury of Xiaoyao powder in rats is better when given at the end of rest phase than other time session.

[Key words] Xiaoyao powder; pharmacodynamics; circadian rhythm; liver injury

研究表明, 许多中药复方药动学都存在着昼夜

节律^[1], 若能根据药动学的昼夜节律特点择时用药, 可进一步发挥中药复方的疗效, 降低不良反应。逍遥散出自《太平惠民和剂局方》, 临床上广泛用于各种肝病的治疗, 但仅属于个人经验, 其保肝实验研究也局限在药效及机理层面, 昼夜不同时间给药体内的吸收、分布、代谢、排泄等动态变化规律不清, 严重限制了其中医临床医疗效果。本文在发现逍遥散保

[收稿日期] 20100510(011)

[基金项目] 中国博士后科学基金(20100471122); 黑龙江省博士后资助经费(LBH-Z09003); 黑龙江省教育厅科学技术研究面上项目(11551465)

[通讯作者] * 陈曦, Tel: 010-62799771, E-mail: 91chenxi12@163.com

肝疗效存在昼夜差异及前期完成逍遥散在肝损伤大鼠体内药效动力学研究的基础上^[2],设计了逍遥散在肝损伤大鼠体内的昼夜药动学试验,从药动学层面探讨了逍遥散保肝疗效存在差异的可能原因,旨在验证在逍遥散保肝降酶择用药的合理性,为肝病患者优化逍遥散的临床给药方案提供时间依据。

1 材料

1.1 药物 处方饮片均购自北京同仁堂制药集团哈尔滨药店,经黑龙江中医药大学佳木斯学院陈孝忠副教授鉴定。遵照《太平惠民和剂局方》原文,逍遥散的制备方法为:准确称取柴胡 15 g,当归 15 g,白芍 15 g,白术 15 g,茯苓 15 g,甘草 7.5 g,于中草药粉碎机中粉碎成最粗粉,加水 1 500 mL 煮沸,保持沸腾 20 min,加入 5 g 煨姜和 5 g 薄荷,再保持沸腾煎煮 10 min,煎煮液过 5 层纱布,滤液浓缩至 2 g·mL⁻¹(按生药量计),经冷冻干燥制成粉末,临用前用蒸馏水配制成混悬液。

1.2 动物 清洁级 Wistar 大鼠,体重 180 ~220 g,雄性,6 ~8 周龄,购自黑龙江中医药大学 GLP 实验室,合格证号 SYXK(黑)2008-004。置于独立大小鼠送回风净化笼具中,分笼饲养,每笼饲养 5 只,在室温(22 ±2)的自然昼夜安静条件下适应 1 周,自由摄食和饮水,实验前每天抓取动物和抚摸动物 2 次,进行驯化,实验主要在 3 月份进行。

1.3 试剂 CCl₄,分析纯,沈阳化学试剂厂;甲醛,分析纯,沈阳市东华试剂厂;天门冬氨酸氨基转换酶试剂盒(AST)南京建成生物工程研究所。

1.4 仪器 FW135 型中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);MS-500A 型半自动生化分析仪(成都美生科技有限公司);DY89-型电动玻璃匀浆机(宁波市新芝生物科技股份有限公司);TGL-16G-C 型高速台式冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。

2 方法

2.1 大鼠造模 大鼠 sc 40% CCl₄ 橄榄油溶液 2 mL·kg⁻¹ 每 2 d 1 次,首次 sc 4 mL·kg⁻¹,连续 12 d。

2.2 降酶峰时的确定 3 只造模大鼠,于末次注射 CCl₄ 24 h 后眼眶取血 0.2 mL,同时早 8 点 ig 8.26 g·kg⁻¹ 逍遥散,每隔 30 min 取血,按试剂盒要求测定 AST 值,确定逍遥散降酶作用的最大值相应的时间点,另取 6 只造模大鼠在这个时间点的周围进一步选取时间点优化分别作为昼夜最大效应的时间点。

2.3 量效关系的确定 30 只造模大鼠,每组 3 只,

于末次注射 CCl₄ 24 h 后(早 8 点和晚 8 点)单次 ig 逍遥散 2.07, 4.13, 8.26(临床等效剂量), 16.52, 33.04 g·kg⁻¹,分别于给药前,效应测定眼眶取血 0.2 mL,常规分离血清,按试剂盒说明书测定 AST。以 AST 降低量(数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示)作为纵坐标,以剂量的自然对数做为横坐标分别得出昼夜自然对数剂量-效应方程。

2.4 时效关系的确定 12 只造模大鼠,每组 6 只,于末次 sc 注射 CCl₄ 24 h 后分别于早 8 点和晚 8 点单次 ig 逍遥散 8.26 g·kg⁻¹(临床等效剂量),于给药后 0, 0.17, 0.33, 0.5, 0.75, 1, 1.17, 1.33, 1.5, 1.67, 2, 2.25, 2.5, 2.83, 3.33, 4, 6, 8.5, 12 h 眼眶取血 0.2 mL,常规分离血清,按试剂盒说明书测定 AST。以 AST 降低量(数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示)的自然对数作为纵坐标,以时间做为横坐标,得出昼夜时间-效应消除方程和曲线,并用 PKSolver 2.0 软件分析其药效动力学参数。

2.5 时间-体存生物相当药量曲线 将昼夜时效关系试验中的各时间点的降酶效应(AST 降低量)分别代入昼夜剂量-效应方程,求出相应的剂量值作为体存生物相当药量,绘制时间-体存生物相当药量消除方程和曲线(数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示),并用 PKSolver 2.0 软件分析其药物动力学参数。

2.6 统计学处理 采用方差分析和 *t* 检验,SPSS18.0 软件处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,晚 8 点给药相比早 8 点给药相同指标以 *P* < 0.05 具有统计学意义。

3 结果

3.1 剂量-效应曲线及昼夜比较 逍遥散降酶作用的最大效应在 1 h 和 2.5 h,进一步优化效应最大点为 1 h, 2.83 h(昼), 0.75 h, 2.83 h(夜),夜峰 1 比昼峰 1 出现得早(图 1)。分别对昼夜 2 个效应最大时间建立量效关系,曲线上升斜率从 8.26 g·kg⁻¹ 到 16.52 g·kg⁻¹ 比此前斜率减小,33.04 g·kg⁻¹ 出现了剂量抑制,且峰 2 的这种抑制更为明显(图 2,表 1)。

3.2 时间-效应曲线 逍遥散降酶作用的时间效应曲线为见图 3,时间-效应消除方程见表 2。PKSolver 2.0 处理的各参数见表 3。

3.3 时间-体存生物相当药量曲线及昼夜比较 逍遥散降酶作用的时间-体存生物相当药量曲线见图 4,其消除方程见表 4。PKSolver 2.0 处理的各参数见表 5。

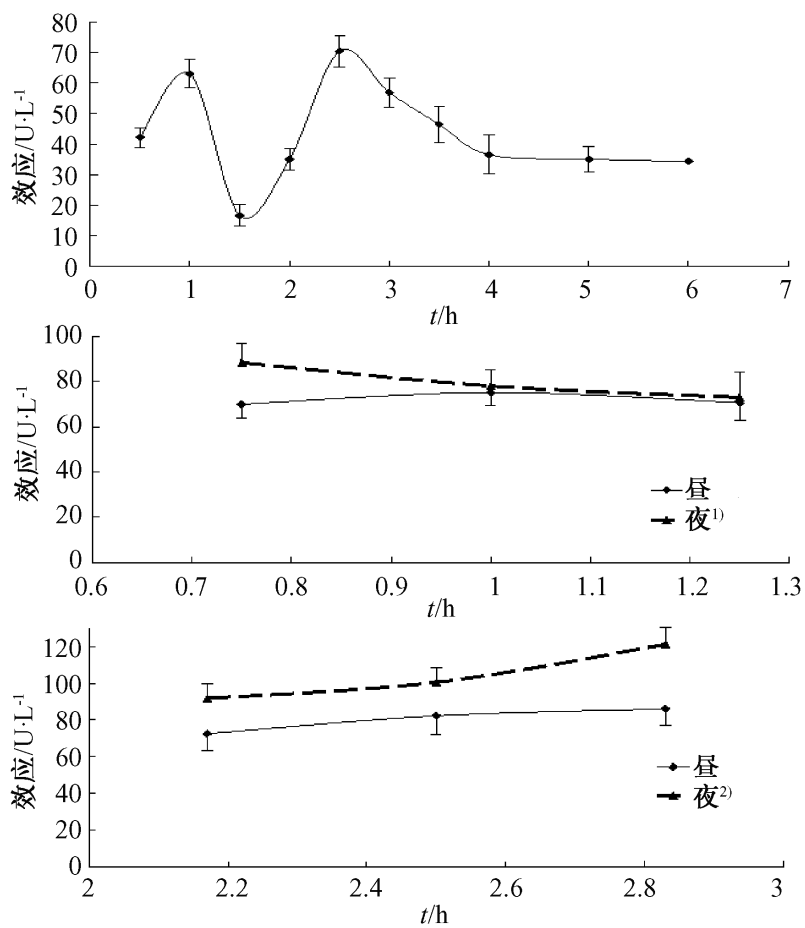


图1 逍遥散昼夜降酶作用最大效应的优化(均±s, n=3)
与昼给药组比较¹⁾ P<0.05, ²⁾ P<0.01(图2, 3同)

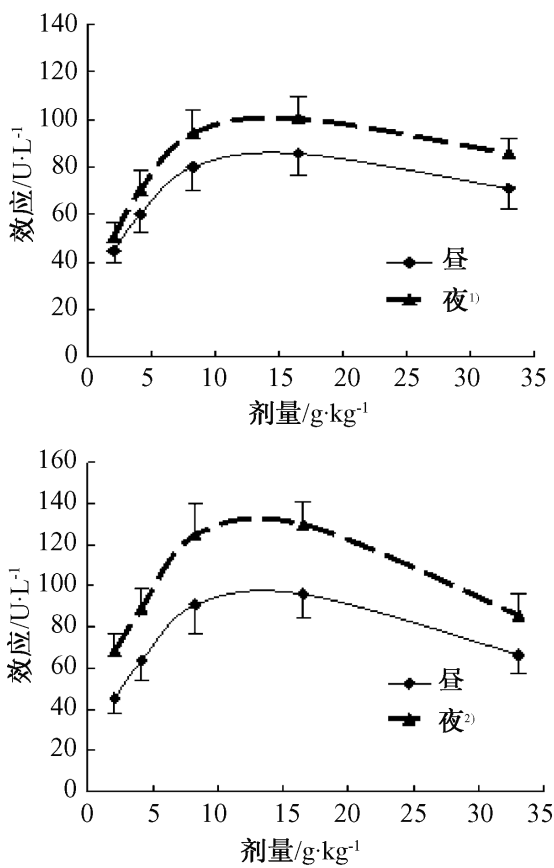


图2 逍遥散昼夜给药后1h(上), 2.83h(下)
降酶作用的剂量-效应曲线(均±s, n=3)

表1 逍遥散降酶作用的量-效方程(均±s, n=6)

时间	峰	量-效方程	最低起效剂量 $X_{min}/g \cdot kg^{-1}$	$E_{max}/U \cdot L^{-1}$
昼	1	$Y=25.55X+25.42(r=0.905)$	0.496	83.5 ± 7.8
昼	2	$Y=32.85X+20.01(r=0.873)$		95.4 ± 19.8
夜	1	$Y=31.43X+27.3(r=0.927)$	$0.115^{2)}$	$100.3 \pm 8.7^{2)}$
夜	2	$Y=40.76X+36.34(r=0.859)$		$128.6 \pm 13.7^{2)}$

注: $X_{min} = \ln^{-1} A/b$, A, b分别为量效方程中的截距和斜率。

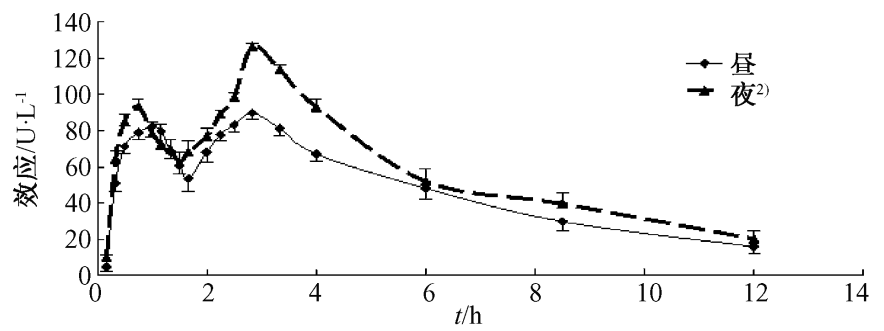


图3 $8.26 g \cdot kg^{-1}$ 逍遥散降酶作用的时间-
效应曲线及昼夜比较(均±s, n=6)

表2 逍遥散昼夜降酶作用的时-效消除方程及参数(均±s, n=6)

时间	峰	时-效消除方程	作用时 间/h	$t_{1/2}(ED)$ /h	E_{max} /U·L ⁻¹
昼	1	$Y=-0.676X+5.123(r=0.827)$			81.8 ± 6.1
昼	2	$Y=-0.188X+5.005(r=0.934)$	17.79	3.68	90.4 ± 7.3
夜	1	$Y=-0.506X+4.896(r=0.894)$			$95.2 \pm 3.6^{2)}$
夜	2	$Y=-0.199X+5.335(r=0.903)$	24.30 ²⁾	3.46	$127.4 \pm 6.7^{2)}$

注: 作用时间 = $1/K \ln X_0 - 1/K \ln X_{min}$

$t_{1/2}(ED) = 0.693/K$, $K = -1/b$, b分别为时效方程中的斜率。

表3 逍遥散昼夜降酶效应的PKSolver 2.0
非房室模型分析结果(n=6)

参数	单位	昼值	夜值
Lambda_z	h	0.186	0.198
$t_{1/2}$	h	3.733	3.495
T_{max}	h	2.833	2.833
C_{max}	U·L ⁻¹	89.774	126.534 ²⁾
Tlag	h	0	0
Clast_obs/ C_{max}	-	0.176	0.1593
AUC _{0-t}	U·L ⁻¹ ·h ⁻¹	572.182	708.577 ²⁾
AUC _{0-inf_obs}	U·L ⁻¹ ·h ⁻¹	657.073	810.194 ²⁾
AUC _{0-t/0-inf_obs}	-	0.871	0.875
AUMC _{0-inf_obs}	U·L·h ²	4091.289	5018.819 ²⁾
MRT _{0-inf_obs}	h	6.227	6.195
Vz/F_obs	$g \cdot kg^{-1} \cdot U^{-1} \cdot L^{-1}$	0.0133	0.0103
Cl/F_obs	$g \cdot kg^{-1} \cdot U^{-1} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$	0.0025	0.0020

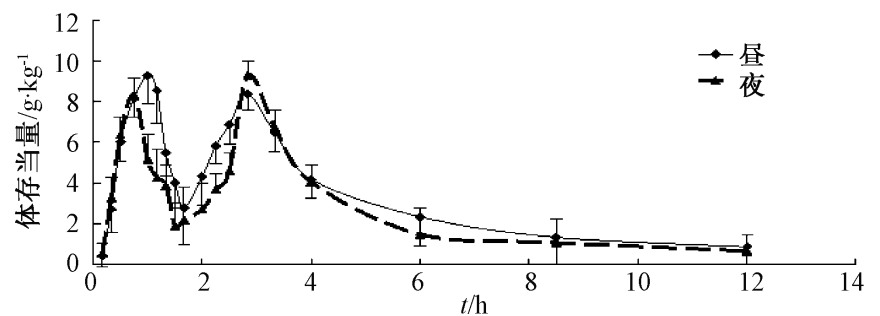


图4 $8.26 g \cdot kg^{-1}$ 逍遥散昼夜降酶作用的时间-体存
生物相当药量曲线(均±s, n=6)

表4 逍遥散昼夜降酶作用的体内生物相当药量的消除方程(n=6)

时间	峰	时-体存当量消除方程	$t_{1/2}(ED)$ /h
昼	1	$Y=-1.891X+4.220(r=0.745)$	
昼	2	$Y=-0.241X+2.552(r=0.823)$	2.88
夜	1	$Y=-7.823X+13.714(r=0.789)$	
夜	2	$Y=-0.279X+2.649(r=0.778)$	2.48 ¹⁾

注: $t_{1/2}(ED) = 0.693/K$, $K = -1/b$, b分别为时-体存当量消除方程中的斜率。

表 5 逍遥散昼夜降酶的体内生物相当药量 PKSolver 2.0
非房室模型分析结果 (n=6)

参数	单位	昼值	夜值
Lambda _z	h ⁻¹	0.193	0.133
t _{1/2}	h	3.598	5.221 ¹⁾
T _{max}	h	1	2.833
C _{max}	g·kg ⁻¹	9.276	9.305
Tlag	h	0	0
Clast _{obs} /C _{max}	-	0.095	0.072
AUC _{0-t}	g·kg ⁻¹ ·h	37.932	31.459
AUC _{0-inf_obs}	g·kg ⁻¹ ·h	42.512	36.543
AUC _{0-t/0-inf_obs}	-	0.892	0.861
AUMC _{0-inf_obs}	g·kg ⁻¹ ·h ²	228.366	220.788
MRT _{0-inf_obs}	h	5.372	6.042
Vz/F _{obs}	-	1.009	1.702 722 604 4
Cl/F _{obs}	h ⁻¹	0.194	0.226 034 889 04

4 讨论

本试验采用药理效应法研究复方的药动学,相对于传统的血药浓度法新颖。它以能定量反应出体内药物动态变化规律的药理效应为指标,不需要考虑复杂的化学成分。所测的药动学参数能更客观地反映复方中多种药物或多种成分的协同效应及体内动态变化规律,符合中医药的整体观原则,且研究对象是疾病状态,其体内的药动学过程与正常状态的药动学过程存在差异,对逍遥散用于肝损伤的临床治疗更具指导价值。

药动,药效的双峰现象有很多解释,如:肝肠循环、双部位吸收、胃肠循环、肠道菌群代谢、药物代谢、食物、小肠蠕动、口服片剂的不完全崩解、皮肤用药等、蛋白竞争。本实验明显排除;根据第二个峰和第一个峰的半衰期不一样,可能性不大;第二个峰较高,且出现时间为用药后 3 h,排除;经过了禁食处理,排除。因此,可能性比较大的有^[3]。由此笔者假设逍遥散有两个成分集合 A 与 B, A 代表了所有对时效关系中第一个峰有贡献的成分集(包括了原形和代谢物), B 代表了所有对时效关系中第二个峰有贡献的成分集(包括原形和代谢物),整体数据用 PKSolver 2.0 来进行非房室的分析和数据点的拟合^[4]。从药动学参数来看, A, B 在体内基本上是一室模型的特征,其中 A 的半衰期在 1 h 左右,属短半衰期成分集, B 的半衰期在 3h 左右,属中长半衰期成分集。B 的 AUC 大于 A 的 AUC,说明 B 可能是 A 的代谢成分集,属于经过肝代谢后活力升高的情况。从药效和药动参数来看,逍遥散具有吸收快,排泄慢,作用维持时间较长的特点。

昼夜吸收速率常数比较,夜晚大于白昼;时效曲

线下面积比较,夜晚大于白昼;作用期白昼为 17.8 h,夜晚为 24.3 h,夜晚大于白昼,且完全可以 1 天 1 次给药。以上结果说明肝损伤模型大鼠在休息期末,活动期初给予逍遥散保肝疗效发挥得更好。由于啮齿类动物跟人的生理活动节律相反,笔者推测导致逍遥散药动学昼夜差异的原因如下:大鼠夜晚胃排空速率和肠蠕动速率大于白昼^[5],导致了逍遥散昼夜吸收速率的差异。脂溶性成分在大鼠身上的吸收是夜晚较白昼快,而经气质联用检测逍遥散中含有大量脂溶性成分。吸收部位的血流量在大鼠身上是夜晚较高,白昼较低^[6],也可能导致逍遥散昼夜吸收速率差异。入血成分在分布早期于肝肾等血流丰富的器官分布较多,大鼠在夜晚的肝肾血流量均较白昼增多^[7],经高效液相色谱检测逍遥散入血成分较多。药物在血浆中以游离型与结合型 2 种形式存在,只有游离型药物才能被转运并具有药理活性,结合型只是药物暂时储存的一种形式,大鼠体内血浆蛋白的含量白昼高,夜晚低,且蛋白结合能力是白昼高,夜晚低^[8],导致逍遥散昼夜分布速率差异。将原型代谢成 B 的药酶活性是夜晚高,白昼低^[9],导致逍遥散代谢速率的差异。

[参考文献]

- [1] 刘启德,梁芙蓉,欧卫平,等.青藤碱时辰药代动力学研究[J].中药新药与临床药理,1995,6(1):23.
- [2] 夏珂,张宁,王业秋,等.昼夜给予逍遥散对肝损伤大鼠的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(7):369.
- [3] Ishida S, Sakiya Y, Ichikawa T, et al. Pharmacokinetics of glycyrrhetic acid, a major metabolite of glycyrrhizin in rats[J]. Chem Pharm Bull, 1985, 37(9):2509.
- [4] 张勇,周建平,霍芙蓉.基于 Excel 的药动学数据分析程序——PKSolver 1.0 的编写和验证[J].数理医药学杂志,2007,20(1):58.
- [5] R H Goo, J G Moore, E Greenberg et al. Circadian variation in gastric emptying of meals in humans [J]. Gastroenterology, 1987, 93(3):515.
- [6] K R Larsen, M T Dayton, J G Moore. Circadian rhythm in gastric mucosal blood flow in fasting rat stomach [J]. J Surgical Res, 1991, 51(4):275.
- [7] Bruguerolle B, Jadot G. Circadian changes in procainamide and N-acetylprocainamide kinetics in the rat [J]. J Pharm Pharmacol, 1985, 37(9):654.
- [8] Bruguerolle B, Valli M, Bouyard L, Jadot G, et al. Effect of the hour of administration on the pharmacokinetics of lidocaine in the rat [J]. Eur J Drug Metab Pharmacokin, 1983, 8(6):233.
- [9] P M Belanger, M Desgagne, B Bruguerolle. Temporal variations in microsomal lipid peroxidation and in glutathione concentration of rat liver [J]. Current Issue, 1991, 19(1):241.

[责任编辑 聂淑琴]