

半夏与钩藤生物总碱联合抗惊厥 作用及毒性反应的定量评价

张密, 李禄金, 吕映华, 郑青山*

(上海中医药大学药物临床研究中心计算药理学实验室, 上海 201203)

[摘要] 目的: 利用已发表的半夏生物总碱 (pinellia total alkaloid, PTA) 与钩藤生物总碱 (uncaria total alkaloid, UTA) 联合抗惊厥和毒性作用数据, 全面定量评价其相互作用和组方合理性。方法: 采用等效图法 (isobologram) 和计算机模拟技术, 定量评价不同强度 (0% ~99%) 有效剂量 (ED) 和致死剂量 (LD) 的相互作用, 并综合计算其获益指数 (BI) 和治疗指数 (TI)。结果: 3 个配比 (PTA : UTA = 1 : 4, 1 : 1, 4 : 1) 有协同作用趋势。由于最高剂量的有效率均低于 70%, 给参数计算和研究结论带来不确定性。PTA 和 UTA 按 4 : 1 联用的毒性呈现拮抗作用, 其它 2 个配比毒性拮抗作用不明确。基于 ED 和 LD 参数的综合分析, 3 个配比的 BI 均大于 1, 其中 4 : 1 配比的减毒增效作用明确, TI 增大。结论: PTA 和 UTA 按 4 : 1 给药后安全性和有效性提高, 呈现配伍优势。从方法学角度, 本研究可对同类实验的设计和提供分析参考。

[关键词] 等效图法; 药物相互作用; 半夏生物总碱; 钩藤生物总碱

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)04-095-05

Quantitative evaluation of the anticonvulsant effects and toxicity of pinellia total alkaloid and uncaria total alkaloid in combination in mice

ZHANG Mi, LI Lu-jin, LV Ying-hua, ZHENG Qing-shan*

(Department of Pharmacometrics, Center for Drug Clinical Research,
Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To make a comprehensive and quantitative evaluation of the interactions at different ratios between pinellia total alkaloid (PTA) and uncaria total alkaloid (UTA) based on the published data of anticonvulsant and toxicity in combinations. **Method:** The isobologram and a computer simulation have been used to analyze the interactions of the different levels ED and LD in the combinations. **Result:** Combinations in the three ratios (PTA : UTA = 1 : 4, 1 : 1, 4 : 1) show a synergistic trend. However, it is difficult to obtain accurate parameters because of the responses (ED, %) at the maximum dose are less than 70%. Combination in the ratio of PTA : UTA = 4 : 1 shows an antagonism in toxicity, and at other two ratios (1 : 4, 1 : 1) the combinations do not provide robust results. In the comprehensive efficacy and toxicity of quantitative parameters, the values of benefit index (BI) in all three ratios are more than 1. The ratio of PTA : UTA = 4 : 1 could reduce toxicity and increase efficacy. **Conclusions:** The combination at the ratio of PTA : UTA = 4 : 1 shows a significant advantage at the safety and efficacy. This study also provides the performance of methods for design and analysis.

[Key words] isobologram; drug interactions; pinellia total alkaloid; uncaria total alkaloid

半夏生物总碱 (PTA) 及钩藤生物总碱 (UTA) 均 具有抗惊厥作用, 有研究基于半数有效剂量 (ED₅₀)

[收稿日期] 2009-09-28

[基金项目] 国家科技支撑计划项目 (2008BAI51B03, 2009ZX09502-021); 上海市教委项目 (J50303, 2008GSP19-5); 上海市高校中医内科学 E-研究院 (E03008); 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金 (szy08058, szy08061) 资助

[通讯作者] * 郑青山, 博士, 教授, 博士生导师。研究方向: 临床药理与定量药理学。Tel: (021) 51323006, Fax: (021) 51322750; E-mail: zhengqscn@21cn.com

和半数致死剂量(LD₅₀)水平,分析了不同联用比例的药效学及其毒性相互作用^[1]。但以上结论不能推广到其它效应水平(如 ED₈₀, ED₉₀等)。本研究基于等效线图法理论,采用计算机模拟技术,对以上数据进行系统化定量评价,试图提取更多的信息,全面定量分析两药的联合作用。

1 方法

1.1 相互作用定量分析方法 等效图的建立:首先将两种药物单独使用达到预定反应(通常选用中效应点,实际应用时可选取 ED₈₀, ED₉₀等有代表性效应点)所需剂量值分别标于两坐标轴,连接两点即为等效线。再求出两药合用后达相同反应时的分量作为横纵坐标,若落在等效线上即为相加、低于等效线提示两药可能协同、高于等效线则提示两药可能拮抗^[2-5]。也可应用公式:

$$Q = \frac{d_1}{D_{x1}} + \frac{d_2}{D_{x2}}$$

上式中, d_1, d_2 分别是达到预定反应时 1 药、2 药的分量, D_{x1}, D_{x2} 分别是单独达到该反应时的剂量; $Q < 1$ 为协同性、 $Q > 1$ 为拮抗性、 $Q = 1$ 为相加性。为了考虑抽样误差或数据本身变异性,本研究绘制等效

线 95% CI 区间,如果 Q 值在区间内为相加性作用,高于此区间为拮抗,低于此区间为协同,但完全凭视图用肉眼判断。

1.2 获益指数和治疗指数计算方法 应用等效线图法求出的 Q 值,此时的 Q 值仅单方面表示 ED_x 或 LD_x 的变化,所以进一步引入计算药物联用的获益指数(benefit index, BI)和治疗指数^[6](therapeutic index, TI)。

$$BI = \frac{Q_{LD}}{Q_{ED}} \quad TI = \frac{LD_{50}}{ED_{50}}$$

Q_{ED} 为预定 ED 强度时的 Q 值, Q_{LD} 为预定 LD 强度时的 Q 值,公式 $BI > 1$ 时, BI 越大提示减毒、增效作用越强; TI 值越大提示用药安全性越好。

1.3 实验数据 实验数据来源见参考文献 1。ED 部分:昆明种小鼠(18 ~22 g) 500 只,随即分为 5 组(PTA UTA = 1 0, 0 1, 1 1, 1 4, 4 1),再随机分成 5 个亚组。电刺激小鼠耳部,考察不同剂量药物对抗电流导致的小鼠后足强直性痉挛,结果见表 1。LD 部分:昆明种小鼠(18 ~22 g) 400 只随机分为 5 组(PTA UTA = 1 0, 0 1, 1 1, 1 4, 4 1),再随机分成 4 个亚组,考察不同剂量药物小鼠致死率,结果见表 2。

表 1 半夏生物总碱(PTA)与钩藤生物总碱(UTA)不同配比和剂量(ig)对小鼠的抗惊厥作用($n=20$) /g·kg⁻¹

PTA (1 0)		UTA (0 1)		PTA + UTA (1 1)		PTA + UTA (1 4)		PTA + UTA (4 1)	
剂量	有效率 /%	剂量	有效率 /%	剂量	有效率 /%	剂量	有效率 /%	剂量	有效率 /%
0.072	0	0.072	0	0.036	0	0.045	0	0.045	0
0.144	30	0.144	20	0.072	20	0.090	20	0.090	10
0.288	40	0.288	40	0.144	40	0.180	30	0.180	30
0.576	50	0.576	50	0.288	50	0.360	50	0.360	50
0.864	50	0.864	50	0.576	60	0.720	60	0.720	70

表 2 半夏生物总碱(PTA)与钩藤生物总碱(UTA)不同配比和剂量(ig)对小鼠的急性毒性作用($n=20$) /g·kg⁻¹

PTA (1 0)		UTA (0 1)		PTA + UTA (1 1)		PTA + UTA (1 4)		PTA + UTA (4 1)	
剂量	致死率 /%	剂量	致死率 /%	剂量	致死率 /%	剂量	致死率 /%	剂量	致死率 /%
1.843	0	1.475	0	1.475	0	1.475	0	3.149	0
2.304	50	1.843	10	1.843	10	1.843	20	3.499	10
2.880	80	2.304	80	2.304	40	2.304	60	3.888	50
3.600	100	2.880	100	2.880	100	2.880	100	4.320	100

1.4 值计算方法 等效线图法中 ED 值、LD 值计算均采用 Bliss 法,由 DAS 2.1.1 软件(www.drugchina.net)完成。

2 结果

2.1 不同水平下 Q_{ED} 值的全面模拟 PTA 和 UTA 按 1 4, 1 1 联用,其 Q 值在 0% ~99% 的阳性率范围

内均小于 1,提示两药有协同作用的趋势。按 4 1 联用,在有效率低于 25% 时,呈现拮抗作用,随着效应水平的增加(>25%),逐渐表现为协同作用。由于此时 Q 值曲线图中未引入可信区间,即不考虑抽样误差,不甚严谨,见图 1。

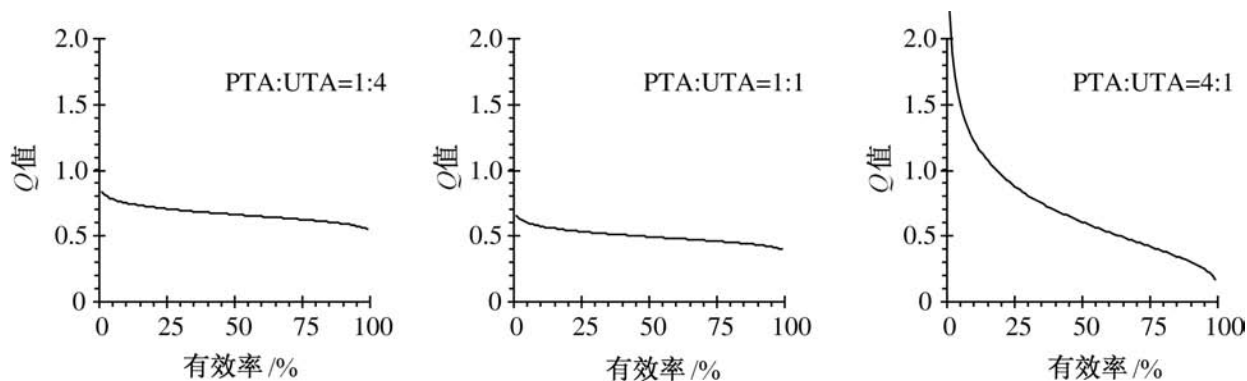


图 1 半夏生物总碱(PTA)与钩藤生物总碱(UTA)不同配比联用(ig)对小鼠的抗惊厥作用(0%~99%)及其相互作用定量分析(Q < 1 为协同性、Q > 1 为拮抗性、Q = 1 为相加性)

2.2 代表性 ED 效应点分析 选取 ED₅₀, ED₇₀, ED₈₀, ED₉₀, 4 个代表性的效应点进行分析。在 ED₅₀, C 点(PTA:UTA = 1:1) 在 95% CI 区间以下, 说明有明确的协同作用, 其余 2 个比例点(B, D) 处在 95% CI 区间内, 表现为相加性作用。其它效应(ED₇₀, ED₈₀, ED₉₀), 各配比的结果均在 95% CI 区间内, 表现为相加性作用, 见图 2。

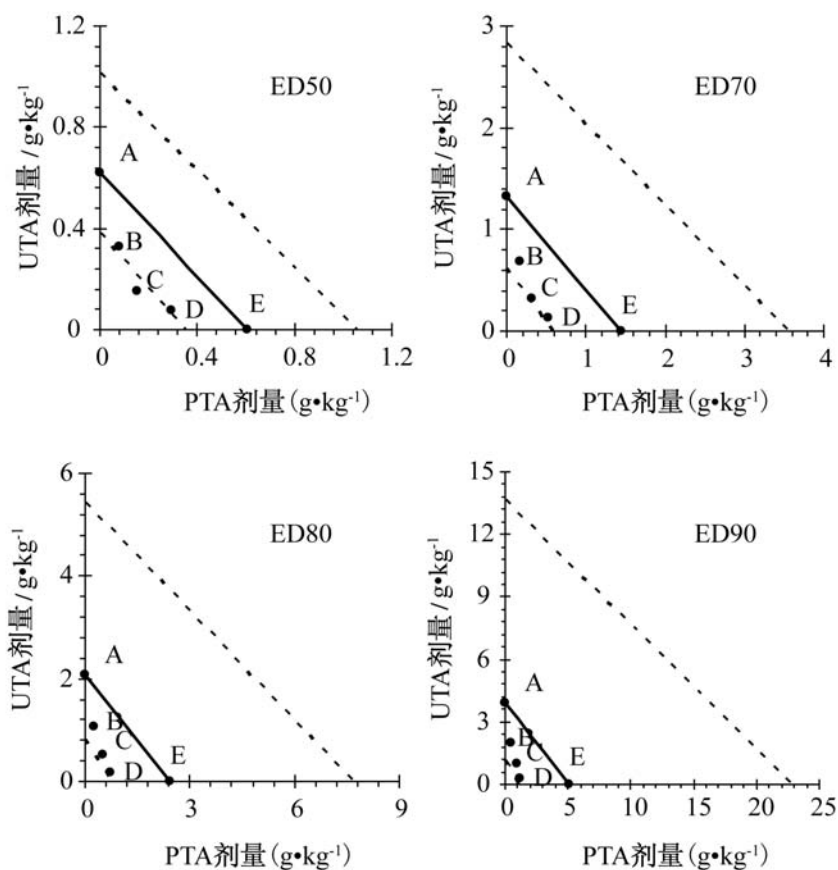


图 2 半夏生物总碱(PTA)与钩藤生物总碱(UTA)联用(ig)对小鼠抗惊厥作用的等效线图(PTA:UTA, B=1:4, C=1:1, D=4:1, 虚线间为 95% 可信区间)

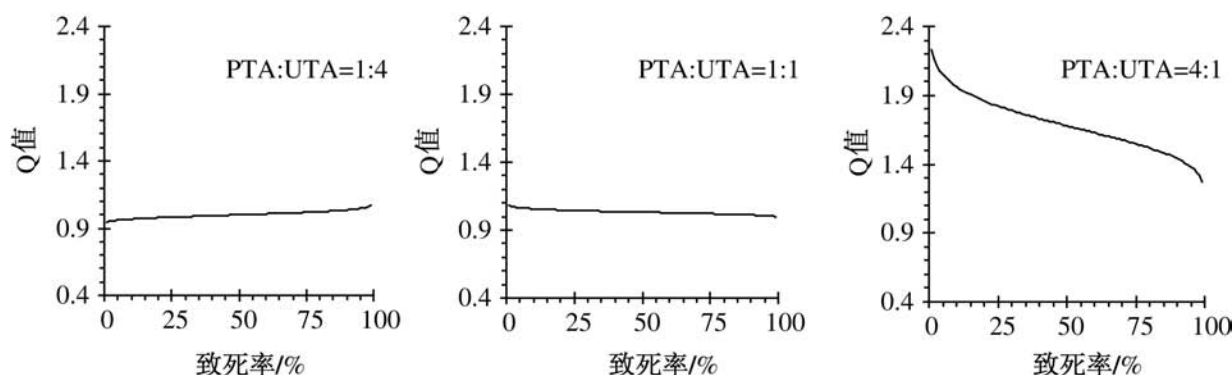


图 3 半夏生物总碱(PTA)与钩藤生物总碱(UTA)不同配比联用在小鼠(ig)的急性毒性作用(0%~99%)及其相互作用定量分析(Q < 1 为协同性、Q > 1 为拮抗性、Q = 1 为相加性)

2.3 不同水平 Q_{LD} 值的全面模拟 3 个配比中, 仅 PTA 和 UTA 按 4:1 联用在 0%~99% 的阳性率范围内联用系数 Q 均大于 1, 且随效应强度增大 Q 值呈减小趋势, 提示该配比两药有毒性拮抗作用, 但随着药物剂量增大毒性拮抗作用下降。其它两个配比(1:4, 1:1) Q 值均在 1 的周围, 表现为毒性相加作用。鉴于未引入可信区间, 因此该图仅作为相互作用的提示, 见图 3。

2.4 代表性 LD 反应点的分析 选取 LD₅₀, LD₇₀, LD₈₀, LD₉₀ 4 个代表性的效应点进行分析。PTA 和 UTA 按 4:1 联用时, 在选定强度上的作用点均在 95% CI 区间上, 表现出较强的毒性拮抗作用; 其余 2 个配比, 在各强度上的作用点均处在 95% CI 区间内, 表现为毒性相加性作用, 见图 4。

2.5 BI 值和 TI 值 结合有效率、死亡率数据对各配比联用药物的 Q_{ED} 及 Q_{LD} 进行全面求算。3 个配比药物在有效率 0%~99% 范围内, 获益指数 BI 均大于 1, 提示 3 种配比药物较两药单用时均有一定的减毒增效作用, 见图 5。但在 3 个配比中 PTA 和 UTA 按 4:1 方案联用的减毒增效作用十分明显, 使药物联用后的治疗指数大大提高, 见表 3。综合以上结果得出半夏与钩藤以 PTA:UTA = 4:1 配比联合使用后, 毒性拮抗作用明确、疗效有一定协同作用(接近等效线下限)、获益指数、治疗指数有较大的提高。

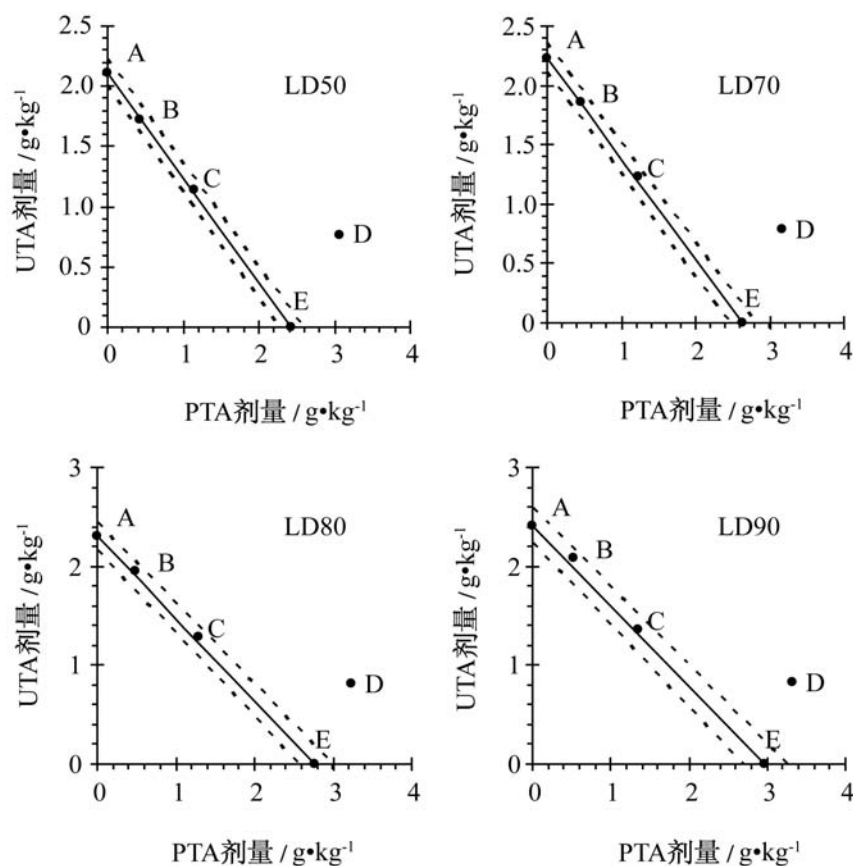


图 4 半夏生物总碱 (PTA) 与钩藤生物总碱 (UTA) 联用在小鼠 (ig) 的急性毒性作用的等效线图
(PTA:UTA, B=1:4, C=1:1, D=4:1, 虚线间为 95% 可信区间)

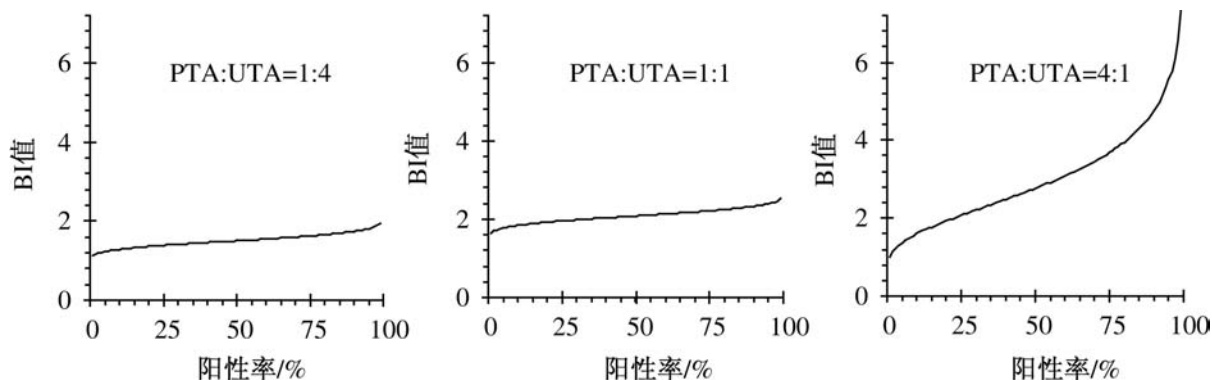


图 5 半夏生物总碱 (PTA) 与钩藤生物总碱 (UTA) 不同配比联用的获益指数 (BI) 动态变化

表 3 半夏生物总碱 (PTA) 与钩藤生物总碱 (UTA) 单用及按 4:1 联用时 ED₅₀, LD₅₀ 及治疗指数 (TI) /mg·kg⁻¹

药物	ED ₅₀ (95% CI)	LD ₅₀ (95% CI)	TI
PTA	605.9 (349.4 ~1050.8)	2420.3 (2573.1 ~2276.5)	4.0
UTA	620.9 (381.0 ~1011.7)	2107.9 (2214.9 ~2006.1)	3.4
PTA:UTA (4:1)	369.5 (262.0 ~521.0)	3838.4 (3940.8 ~3738.7)	10.4

3 讨论

应用等效图法分析实验数据时仅对 ED₅₀, LD₅₀ 进行分析, 所获信息有限, 临床指导意义不大。药物联用后的效应曲线及毒性曲线可能已发生转变, 此时仅用某一个反应点如 ED₅₀, LD₅₀ 已不能反应整体的疗效及毒性趋势, 而由此求得的 TI 值已不具代表性, 例如 ED₉₅, LD₅ 结合分析常被采用^[6]。原文献仅分析 ED₅₀, LD₅₀, 本研究分析了 ED₁ ~ ED₉₉ 和 LD₁ ~ LD₉₉ 的所有相互作用信息, 提取了更多有效信息。

在进行有效率及致死率实验时, 原则上要求最

高效应率不低于 70%、最低效应率不高于 30%, 以利于 ED, LD 的计算^[7]。本研究 5 个配比中, 仅有一个达到此要求, 其他仅为 50% ~ 60%, 导致等效线 95% 可信区间偏大, 不易获得协同或拮抗的结果。

药物联用应从安全性和有效性两个方面考虑。在 PTA:UTA = 4:1 配比中, 疗效方面虽未见明显协同, 但毒性拮抗作用明确, 其 BI 值和 TI 值均较大, 也提示本组合具有治疗学意义。

对此类药物相互作用的评价还可使用合并指数法、参数法等方法。其中合并指数法较适用于体外实验, 对原始数据质量要求较高, 本文数据难以成功应用合并指数法; 参数法计算药物相互作用理念跟等效线法不同, 后者的原理是在等效时比较合用后剂量的大小, 而前者是比较等剂量时效应的大小^[8]。基于等效图法分析优点是历史悠久, 结果表达较为直观, 国际较多见; 其缺点是没有严谨地考虑