

· 药物代谢 ·

炒莱菔子中芥子酸在大鼠体内的药代动力学及 PK-PD 相关性分析

李丽¹, 殷小杰¹, 李丽¹, 王岚¹, 贡磊磊², 梁日欣^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 首都医科大学 北京妇产医院, 北京 100026)

[摘要] **目的:** 研究炒莱菔子醇提取物中芥子酸在正常大鼠体内的药代动力学特征以及在哮喘大鼠病理状态下的药代动力学-药效动力学(PK-PD)相关性。**方法:** 正常大鼠分别单次灌胃低、中、高剂量(4.5, 9, 18 g·kg⁻¹)的炒莱菔子醇提取物, 利用UHPLC-MS/MS测定不同时间点血浆中芥子酸含量, 采用 DAS 3.2.8 软件进行数据分析以获取药代动力学参数; 采用腹腔注射卵清蛋白佐以氢氧化铝建立大鼠哮喘模型, 分别灌胃低、高剂量(4.5, 9 g·kg⁻¹)炒莱菔子醇提取物, 3 周后眼底静脉丛取血, 分离血浆和血清, UHPLC-MS/MS 测定不同时间点血浆中芥子酸含量, 利用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定血清中免疫球蛋白 E(IgE), 白细胞介素-5(IL-5), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)活性, 采用 DAS 3.2.8 软件进行 PK-PD 模型拟合以及数据分析。**结果:** 正常大鼠灌胃给予低、中、高剂量炒莱菔子醇提取物后, 血浆中芥子酸药峰浓度(C_{max})分别为(29.35 ± 10.32), (62.70 ± 27.47), (137.33 ± 40.95) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 药时曲线下面积(AUC_{0-t})分别为(92.83 ± 27.16), (240.74 ± 75.09), (633.95 ± 195.88) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$; 达峰时间(T_{max})分别为(2.58 ± 0.80), (3.00 ± 0), (5.50 ± 1.23) h; 与炒莱菔子醇提取物低剂量组比, 炒莱菔子醇提取物中、高剂量组的 AUC_{0-t} , 平均滞留时间(MRT_{0-t})均显著增加($P < 0.05$, $P < 0.01$); 芥子酸体内 AUC_{0-t} 在 4.5 ~ 18 g·kg⁻¹ 线性依赖性良好。哮喘大鼠分别灌胃低、高剂量炒莱菔子醇提取物后 0.083, 0.167 h, 与模型组比较, 血清中 IL-5, IgE, TNF- α 含量均有不同程度地降低($P < 0.05$, $P < 0.01$); 血浆中芥子酸 C_{max} 分别为(58.43 ± 27.94), (61.16 ± 18.79) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; AUC_{0-t} 分别为(188.75 ± 37.07), (247.90 ± 36.89) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$; AUC_{0-t} , 表观分布容积(V_z/F)和清除率(CL_z/F)均随剂量增加而增加, 最佳药动学模型拟合为血管外给药的一房室模型, PK-PD 模型可能适用于间接连接模型。**结论:** 哮喘大鼠体内芥子酸血药浓度与血清中 IL-5, IgE, TNF- α 含量存在一定的相关性, 给药剂量和机能状态(病理或生理状态)均会影响炒莱菔子中芥子酸在大鼠体内的药代动力学行为, 并与其平喘药效有一定的关联性。

[关键词] 炒莱菔子; 药代动力学-药效动力学; 芥子酸; 哮喘; 免疫球蛋白 E; 白细胞介素-5; 肿瘤坏死因子- α

[中图分类号] R2; R969.1; R28; C37; R943.1; O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)07-0109-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200446

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191105.1048.007.html>

[网络出版时间] 2019-11-06 09:00

Pharmacokinetics of Sinapic Acid from Stir-fried Raphani Semen in Rats and Its PK-PD Correlation Analysis

LI Li¹, YIN Xiao-jie¹, LI Li¹, WANG Lan¹, GONG Lei-lei², LIANG Ri-xin^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing 100026, China)

[Abstract] **Objective:** To study the pharmacokinetics of sinapic acid from stir-fried Raphani Semen in normal rats and the correlation between pharmacokinetics-pharmacodynamics (PK-PD) in asthma rats. **Method:** Normal rats received 4.5, 9, 18 g·kg⁻¹ of stir-fried Raphani Semen by oral administration, respectively. Blood was taken from ophthalmic venous plexus at different time points according to the experimental design, the plasma

[收稿日期] 20190705(002)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81473355)

[第一作者] 李丽, 硕士, 从事中药药理及药代动力学研究, Tel:010-64093145, E-mail:1050045898@qq.com

[通信作者] * 梁日欣, 博士, 研究员, 从事中药药理及药代动力学研究, Tel:010-64093145, E-mail:liangrixin2009@sina.com

concentration of sinapic acid was analyzed by UHPLC-MS/MS, and data analysis was performed using DAS 3.2.8 software to obtain the pharmacokinetic parameters. Rat asthma model was established by intraperitoneal injection of ovalbumin with aluminum hydroxide, and treated with ethanol extract of stir-fried Raphani Semen (low and high doses of 4.5, 9 g·kg⁻¹). After treatment for 3 weeks, taking blood at different time points, plasma and serum were separated. UHPLC-MS/MS was established for the determination of plasma concentration of sinapic acid, contents of interleukin-5 (IL-5), immunoglobulin E (IgE), tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum at different time points were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), DAS 3.2.8 software was used for PK-PD model fitting and data analysis. **Result:** After normal rats were administrated with low, medium and high doses of stir-fried Raphani Semen, the peak concentration (C_{max}) of sinapic acid in plasma were (29.35 \pm 10.32), (62.70 \pm 27.47), (137.33 \pm 40.95) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, its area under the curve (AUC_{0-t}) were (92.83 \pm 27.16), (240.74 \pm 75.09), (633.95 \pm 195.88) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$, its peak time (T_{max}) were (2.58 \pm 0.80), (3.00 \pm 0), (5.50 \pm 1.23) h, respectively. Compared with the low dose group, AUC_{0-t} and mean retention time (MRT_{0-t}) were all increased in the medium and high dose groups, showing statistical differences ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The linear relationship of AUC_{0-t} in sinapic acid was good within the dose range of 4.5-18 g·kg⁻¹. After treating with ethanol extract of stir-fried Raphani Semen for 0.083, 0.167 h, compared with the model group of asthmatic rats, serum levels of IL-5, IgE, TNF- α of the medication groups were decreased to different degrees ($P < 0.05$, $P < 0.01$). C_{max} of sinapic acid in the low and high dose groups were (58.43 \pm 29.94), (61.16 \pm 18.79) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, its AUC_{0-t} were (188.75 \pm 37.07), (247.90 \pm 36.89) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$, respectively. AUC_{0-t} , apparent volume of distribution (V_z/F) and clearance rate (CL_z/F) all increased significantly with the increase of dose. The best pharmacokinetic model of sinapic acid was fitted as a one-compartment model for extravascular administration, PK-PD model may be applicable to indirect connection model. **Conclusion:** The plasma concentration of sinapic acid is correlated with contents of IL-5, IgE and TNF- α , dosage and functional state (pathological or physiological state) can affect the pharmacokinetic behavior of sinapic acid from stir-fried Raphani Semen in rats, and it has a certain correlation with the anti-asthmatic effect.

[Key words] stir-fried Raphani Semen; pharmacokinetics-pharmacodynamics; sinapic acid; asthma; immunoglobulin E; interleukin-5; tumor necrosis factor- α

药代动力学-药效动力学(PK-PD)是结合药理学行为和药效学特征,同时阐述机体对药物的作用和药物对机体的作用,采用数学方法描述浓度(或剂量),时间和效应三者之间的关系。进行PK-PD模型研究有利于中药质量评价及临床给药方案制订、药效物质基础及其作用机制阐释,是中药现代化的重要研究领域之一^[1]。

莱菔子是十字花科植物萝卜的干燥成熟种子,性平,味辛、甘,具有祛痰平喘、消食除胀等功效^[2],临床上多配伍白芥子治疗痰饮咳喘等证。莱菔子入药多用炒制品,其含有丰富的硫苷类化合物,芥子酸是硫苷类化合物在相关代谢途径下分解形成的主要产物之一,具有平喘、抗氧化、抗癌等生物活性^[3-6]。目前,国内外关于炒莱菔子的研究主要集中在化学成分分析及消食行气、镇咳平喘等生物活性方面^[7-12],在生理及病理状态下的药代动力学特征尚未见报道。因此,本研究选择正常大鼠,灌胃给予

3个不同剂量的炒莱菔子醇提物,获取生理状态下药代动力学特征;在此基础上,以卵清蛋白佐以氢氧化铝造成大鼠哮喘作为病理模型,以炒莱菔子中含量相对较高且具有代表性的芥子酸成分作为药代标志物,获得病理状态下的炒莱菔子药代动力学特征,并以血清内免疫球蛋白(Ig)E,白细胞介素-5,肿瘤坏死因子- α 含量变化为效应指标,构建PK-PD模型,分析炒莱菔子中芥子酸血药浓度和哮喘细胞因子释放效应的相关性,为该药物的科学合理应用提供实验依据。

1 材料

LC-20-AD型超快速液相色谱仪(日本岛津公司),5500 TRAP型三重四级杆串联质谱仪[罗克韦尔自动化(中国)有限公司],Mix-3000型震荡混匀器(杭州米欧仪器有限公司),Mikro 220R型台式高速冷冻离心机(德国海蒂诗科学仪器有限公司),SavantTM SPD131DDA SpeedVacTM型真空离心浓缩仪

(美国赛默飞世尔科技公司), 402B 型超声雾化器(上海鱼跃医疗设备有限公司), BT25S 型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司], TDZ5-WS 型台式离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司), XT-2000i 型全自动五分类血液分析仪(日本希森美康公司), Multiskan FC 型酶标仪[赛默飞世尔(上海)仪器有限公司], SFG-02.500 型电热恒温鼓风干燥箱(黄石市恒丰医疗器械有限公司)。

炒莱菔子醇提取物(由中国中医科学院中药炮制研究中心李丽研究员提供, 芥子酸质量分数 $0.0648 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), 芥子酸对照品(上海源叶生物科技有限公司, 批号 S05M6Y1, 纯度 98%), 尼泊金丁酯(成都克洛玛生物科技有限公司, 批号 CHB161121, 纯度 > 98%), A5503 卵清蛋白[OVA, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司, 批号 SLBQ9036V], 氢氧化铝(国药集团化学试剂有限公司, 批号 20170619), 氯化钠注射液(石家庄四药有限公司, 批号 1807023205, 规格 500 mL/4.5 g); 大鼠白细胞介素-5(IL-5), IgE, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号分别为 20190318, 20190314, 20190314); 乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管(江苏大唐医疗器械有限公司, 批号 20180819), 甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

SPF 级雄性 Wistar 大鼠, 体质量 $(160 \pm 20) \text{ g}$, 购于斯贝福(北京)生物技术有限公司, 合格证号 SCXK(京)2016-0002, 饲养于温度 $(22 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$, 相对湿度 $(60 \pm 10)\%$ 的环境中。实验前禁食不禁水 12 ~ 16 h。本文涉及的动物实验均符合中国中医科学院中药研究所伦理委员会相关规定。

2 方法与结果

2.1 大鼠血浆中芥子酸 UHPLC-MS/MS 分析方法的建立

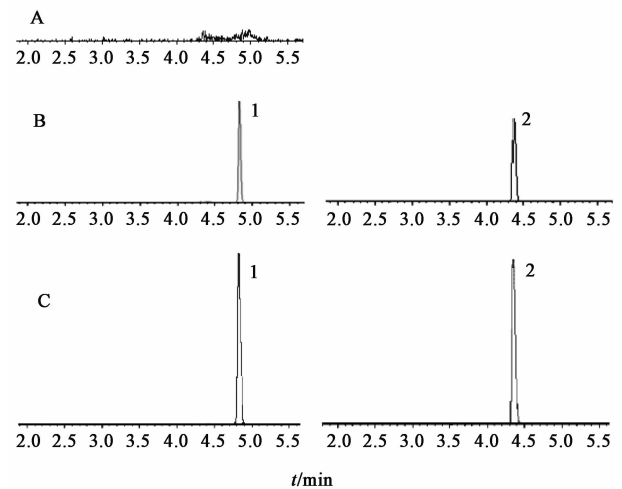
2.1.1 对照品溶液和质量控制(QC)样品的配制 精密称取适量芥子酸对照品, 加甲醇溶解并稀释, 得质量浓度分别为 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1 000, 5 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列对照品溶液, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冷藏备用。取尼泊金丁酯适量, 加甲醇稀释成 $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内标溶液。分别取配制好的低、中、高质量浓度(25, 350, $2\ 000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的对照品溶液 $100 \mu\text{L}$, 加入空白血浆和甲醇各 $100 \mu\text{L}$, 加入内标溶液 $100 \mu\text{L}$, 混匀, 震荡提取 30 min, 离心($13\ 200 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min, 下同), 各取上清液 $100 \mu\text{L}$ 配制低、中、高 3 个质量浓度的 QC 样品, 用于线性范围及方法学指标的考察。

2.1.2 色谱条件 Waters UPLC HSS T3 色谱柱($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}, 1.8 \mu\text{m}$), 流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 2 min, 5% ~ 20% B; 2 ~ 3 min, 20% ~ 100% B; 3 ~ 4.5 min, 100% B; 4.5 ~ 4.6 min, 100% ~ 5% B; 4.6 ~ 7 min, 5% B), 流速 $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量 $5 \mu\text{L}$, 柱温 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

2.1.3 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI), 负离子检测模式, 离子对选择芥子酸 m/z 223.1 ~ 164.1, 离子源温度 $580 \text{ }^\circ\text{C}$, 离子喷雾电压(IS) -4.5 kV , 气帘气(CUR)压力 206.843 kPa , 碰撞气(CAD)压力 $-1\ 379.5 \text{ Pa}$, 去簇电压(DP) -85 V , 射入电压(EP) -10 V , 碰撞室射出电压(CXP) -13 V , 雾化气(GS1)和辅助气(GS2)压力均为 $379\ 211.6 \text{ Pa}$ 。

2.1.4 血浆处理 取血浆 $100 \mu\text{L}$, 加入甲醇 $200 \mu\text{L}$, 加入内标溶液 $100 \mu\text{L}$, 混匀, 震荡提取 30 min, 离心。取上清液 $100 \mu\text{L}$ 进样检测。

2.1.5 特异性考察 对比分析空白血浆、空白血浆 + 对照品、给药后血浆样品的色谱图。结果表明该方法特异性较好, 芥子酸和内标化合物选择的检测离子对在空白血浆中没有干扰。见图 1。



A. 空白血浆; B. 空白血浆 + 对照品 + 内标; C. 供试品 + 内标; 1. 尼泊金丁酯(内标); 2. 芥子酸

图 1 炒莱菔子给药 30 min 后血浆样品的提取离子流

Fig.1 Extracted ion flow chromatograms of plasma samples after administration of stir-fried Raphani Semen for 30 min

2.1.6 线性范围及定量限考察 取系列质量浓度芥子酸对照品溶液 $100 \mu\text{L}$, 加入空白血浆和甲醇各 $100 \mu\text{L}$, 加入内标溶液 $100 \mu\text{L}$, 混匀, 震荡提取 30 min, 离心。各取上清液 $100 \mu\text{L}$ 进样检测, 获得标准曲线。以待测成分质量浓度为横坐标, 待测成分与内标峰面积的比值为纵坐标, 作线性回归, 考察其线

性范围并求得回归方程。根据待测物的峰高和噪音峰的峰高,按信噪比 $S/N = 10$ 计算定量限。结果得芥子酸回归方程 $Y = 566.18X - 2184.214 (R^2 = 0.9995)$, 线性范围 $10 \sim 5000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 定量限 $3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.1.7 准确度与精密度考察 按 2.1.1 项下方法配制 3 个低、中、高质量浓度的 QC 样品,各取 $100 \mu\text{L}$ 进样分析,连续 3 d。每个 QC 样品 1 d 内重复进样 5 次,连续 3 d,根据当日标准曲线计算日内、日间精密度以及准确度。结果芥子酸日内精密度的 RSD $1.1\% \sim 2.4\%$, 日间精密度的 RSD $1.6\% \sim 4.1\%$, 准确度在 $99.1\% \sim 107.3\%$, 符合生物样品分析方法的要求。

2.1.8 回收率与基质效应 取系列质量浓度的芥子酸对照品溶液 $100 \mu\text{L}$, 加入甲醇 $200 \mu\text{L}$, 加入内标溶液 $100 \mu\text{L}$, 混匀, 震荡提取 30 min , 离心。各取上清液 $100 \mu\text{L}$ 进样检测, 获得溶剂标准曲线。取 2.1.1 项下低、中、高 3 个质量浓度 QC 样品各 $100 \mu\text{L}$ 进样分析。每个 QC 样品 1 d 内重复测定 3 次, 根据当日溶剂标准曲线计算回收率、基质效应。结果芥子酸的回收率 $95.6\% \sim 107.5\%$, RSD

在 $0.8\% \sim 1.4\%$, 基质效应处于 $90.3\% \sim 103.2\%$ 。

2.1.9 稳定性考察 按 2.1.1 项下低、中、高 3 个质量浓度 QC 样品, 各取 $100 \mu\text{L}$ 进样分析。分别在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冷藏 24 h 和室温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 下放置 4 h , 再次进样分析, 考察样品稳定性。结果表明各条件下血浆样品稳定性良好, 待测化合物与内标物的峰面积比值的 RSD 均 $< 3.7\%$ 。

2.2 炒莱菔子在正常大鼠体内的药代动力学研究
大鼠适应性饲养 3 d 后, 按体质量随机分为 3 组。按低剂量组 $4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 中剂量组 $9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和高剂量组 $18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃相应浓度的炒莱菔子醇提物(相当于临床用量标准的 5, 10, 20 倍), 每组 6 只。分别于给药前 0 h 和给药后 0.083, 0.167, 0.333, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 6, 9 h 大鼠眼底静脉丛采血约 0.5 mL 于 EDTA 抗凝管中, $3250 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min , 分离上清得血浆, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。采用 UHPLC-MS/MS 测定血药浓度, 绘制药时曲线, 利用 DAS 3.2.8 软件计算主要药动学参数, 组间药动学参数运用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 药代动力学参数见表 1, 药时曲线见图 2。

表 1 正常大鼠给予炒莱菔子醇提物后芥子酸的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of sinapic acid in normal rat plasma after administration of ethanol extract of stir-fried Raphani Semen ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数/单位	炒莱菔子醇提物		
	低剂量组	中剂量组	高剂量组
T_{\max}/h	2.58 ± 0.80	3.00 ± 0	$5.50 \pm 1.23^{2,4)}$
$C_{\max}/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	29.35 ± 10.32	62.70 ± 27.47	$137.33 \pm 40.95^{2,4)}$
$T_{1/2}/\text{h}$	1.69 ± 1.63	1.74 ± 0.61	$4.18 \pm 2.29^{1,3)}$
$AUC_{0-\infty}/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$	92.83 ± 27.16	$240.74 \pm 75.09^{1)}$	$633.95 \pm 195.88^{2,4)}$
$V_z/F/L \cdot \text{kg}^{-1}$	1.51 ± 1.06	1.10 ± 0.40	1.74 ± 1.18
$CL_z/F/L \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.52 ± 0.35	0.45 ± 0.12	0.33 ± 0.12
$MRT_{0-\infty}/\text{h}$	2.57 ± 0.23	$3.64 \pm 0.70^{2)}$	$4.98 \pm 0.55^{2,4)}$

注:与炒莱菔子醇提物低剂量组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 4 同);与炒莱菔子醇提物中剂量组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

2.3 PK-PD 相关性分析

2.3.1 分组给药与造模^[13-19] 大鼠按体质量随机分为正常组、模型组、炒莱菔子低剂量组 ($4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和炒莱菔子高剂量组 ($9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 8 只。分组后第 1 天和第 8 天, 除正常组外, 其他各组分别腹腔注射 OVA 混悬液 (OVA 1 mg 和氢氧化铝干粉 100 mg 溶于 1 mL 生理盐水中) 1 mL 建立哮喘模型, 正常组用生理盐水代替。第 15 天, 用 1% OVA 溶液 (OVA 4.0 mg 溶于 400 mL 生理盐水中) 雾化吸入激发哮喘, 隔天 1 次, 每次 30 min , 到大

鼠开始出现呼吸困难、点头呼吸、甚至腹肌痉挛等症状为止, 雾化 2 周; 正常组采用等量生理盐水进行雾化。

2.3.2 给药与血样的采集 从第 15 天起, 雾化前 0.5 h 分别按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药, 正常组及模型组给予相同剂量的蒸馏水, 连续 3 周。第 36 天, 炒莱菔子低剂量组和高剂量组给药前 0 h 和给药后 0.083, 0.167, 0.5, 1, 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5, 9 h 大鼠眼眶静脉丛采集全血 1 mL ; 正常组和模型组大鼠眼眶静脉丛采集全血 1 mL 。

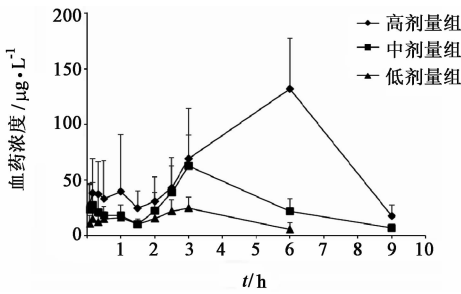


图 2 正常大鼠口服不同剂量炒莱菔子醇提物后芥子酸的药时曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Plasma concentration-time curves of sinapic acid in normal rats after oral administration of ethanol extract of stir-fried Raphani Semen ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.3.3 药效学指标的测定 取正常组、模型组大鼠全血 0.5 mL 放入 EDTA 抗凝管中,进行白细胞计数和分类检测。结果与正常组比较,模型组中白细胞总数、中性粒细胞及嗜酸性粒细胞数量均明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$),见表 2。取各组大鼠全血 0.5 mL 于 4 °C 静置 2 ~ 3 h, 3 250 r·min⁻¹ 离心

表 3 各组大鼠血清中 IL-5, IgE 和 TNF- α 含量的测定 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Serum levels of IL-5, IgE and TNF- α in rats from different groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	t/h	IL-5/ng·L ⁻¹	IgE/U·mL ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹
正常	-	170.29 ± 10.32 ²⁾	3.36 ± 1.80 ²⁾	218.77 ± 15.56 ²⁾
模型	-	255.95 ± 94.48	6.35 ± 0.84	300.49 ± 49.10
炒莱菔子高剂量	0.083	199.78 ± 40.00 ¹⁾	3.93 ± 1.78 ²⁾	244.84 ± 18.30 ¹⁾
	0.167	192.11 ± 47.15 ¹⁾	3.70 ± 1.19 ²⁾	238.82 ± 31.18 ¹⁾
	0.5	196.64 ± 46.97 ¹⁾	3.73 ± 0.59 ²⁾	243.66 ± 28.12 ¹⁾
	1	189.71 ± 64.71 ²⁾	3.54 ± 1.26 ²⁾	264.80 ± 30.30
	1.5	215.91 ± 52.53	4.25 ± 1.14 ²⁾	255.58 ± 46.89
	3	233.38 ± 57.47	4.68 ± 2.29 ¹⁾	250.00 ± 43.73 ¹⁾
	4.5	168.00 ± 58.49 ²⁾	4.88 ± 1.14 ¹⁾	266.82 ± 19.44
	6	195.79 ± 61.58 ¹⁾	5.15 ± 1.12	236.71 ± 14.93 ¹⁾
	7.5	215.27 ± 57.75	4.93 ± 0.57	233.02 ± 40.77 ²⁾
炒莱菔子低剂量	0.083	183.29 ± 12.27 ¹⁾	2.43 ± 0.30 ²⁾	214.36 ± 15.61 ²⁾
	0.167	195.81 ± 53.73 ¹⁾	2.62 ± 0.81 ²⁾	213.93 ± 46.45 ²⁾
	0.5	209.62 ± 30.52	4.05 ± 2.19 ¹⁾	209.06 ± 47.57 ²⁾
	1	212.64 ± 35.71	2.81 ± 1.09 ²⁾	206.59 ± 56.86 ²⁾
	1.5	185.39 ± 29.98 ¹⁾	3.44 ± 2.07 ²⁾	232.61 ± 53.92 ²⁾
	3	188.90 ± 57.55 ¹⁾	4.61 ± 1.85 ¹⁾	278.18 ± 43.79
	4.5	187.99 ± 33.16 ¹⁾	3.68 ± 1.59 ²⁾	260.04 ± 45.76
	6	210.66 ± 31.37	5.19 ± 1.95	261.35 ± 49.94
	7.5	207.88 ± 43.38	4.79 ± 1.84	274.23 ± 46.78
9	224.87 ± 51.66	6.07 ± 2.45	273.74 ± 51.07	

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

10 min,得血清,采用 ELISA 测定大鼠血清中 IgE, IL-5 和 TNF- α 的含量,见表 3。结果与正常组比较,模型组大鼠血清中 IL-5, IgE 和 TNF- α 含量显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,2 个给药组大鼠血清中 IL-5 含量在 0.083 ~ 0.167 h 明显降低 ($P < 0.05$), IgE 含量在 0.083 ~ 4.5 h 明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), TNF- α 含量在 0.083 ~ 0.5 h 明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$);表明炒莱菔子低、高剂量组均能通过降低 IL-5, IgE, TNF- α 含量来减少气道炎症,进而对哮喘起到一定的改善作用。

表 2 各组大鼠白细胞分类及计数 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 White blood cell count and its classification in rats from different groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$) $\times 10^9$ (个/L)

组别	白细胞总数	中性粒细胞数	嗜酸性粒细胞数
正常	12.17 ± 1.53	1.52 ± 0.38	0.08 ± 0.03
模型	15.78 ± 1.65 ²⁾	2.41 ± 0.90 ¹⁾	0.16 ± 0.07 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

2.3.4 药动学指标的测定 取炒莱菔子低、高剂量组大鼠全血 0.5 mL 放入 EDTA 抗凝管中, 3 250 r·min⁻¹ 离心 10 min, 得大鼠血浆样品, 采用 UHPLC-MS/MS 进行含量测定。采用 DAS 3.2.8 软件计算药代动力学参数, 药代动力学特征以统计矩参数表示, 见表 4, 药时曲线见图 3。

表 4 哮喘大鼠给予炒莱菔子醇提取物后芥子酸的药动学参数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 4 Pharmacokinetic parameters of sinapic acid in plasma of asthmatic rats after administration of ethanol extract of stir-fried Raphani Semen ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

参数/单位	炒莱菔子醇 提取物低剂量组	炒莱菔子醇 提取物高剂量组
$t_{1/2}/h$	1.97 ± 1.03	2.65 ± 0.97
$C_{max}/\mu g \cdot L^{-1}$	58.43 ± 27.94	61.16 ± 18.79
T_{max}/h	0.32 ± 0.21	0.36 ± 0.35
$AUC_{0-t}/\mu g \cdot L^{-1} \cdot h$	188.75 ± 37.07	247.90 ± 36.89 ²⁾
$V_z/F/L \cdot kg^{-1}$	0.72 ± 0.17	1.45 ± 0.49 ²⁾
$CL_z/F/L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	0.28 ± 0.07	0.39 ± 0.05 ²⁾
MRT_{0-t}/h	3.20 ± 0.42	3.59 ± 0.37 ¹⁾

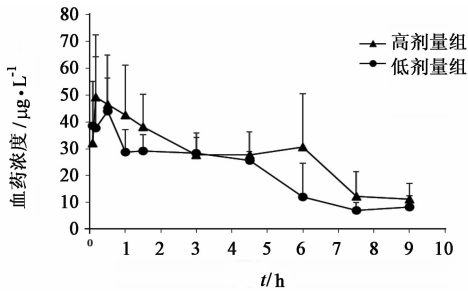


图 3 哮喘大鼠口服不同剂量炒莱菔子醇提取物后芥子酸的药时曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 3 Plasma concentration-time profiles of sinapic acid in asthmatic rats after administration of ethanol extract of stir-fried Raphani Semen ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

2.3.5 数据统计 采用 SPSS 19.0 软件进行实验数据统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异极具统计学意义。

2.3.6 PK-PD 模型拟合 根据血药浓度的平均值, 应用 DAS 3.2.8 软件对数据进行智能化分析, 以赤池信息量准则 (AIC) 值越小、残差平方和越小以及拟合度越大为判断标准, 并综合考虑兼顾各个指标以及模型的简单性, 确定最佳房室模型^[20-30]。以给药后的平均血药浓度为药代指标, 以大鼠血清中 IgE, IL-5, TNF- α 含量为药效指标, 在 PK 模型基础上建立 PK-PD 结合模型, 应用模型方程 $E = E_{max} \times$

$C^{\gamma}/(ED_{50}^{\gamma} + C^{\gamma})$ 进行分析, 式中 E 为药物效应值, E_{max} 为药物产生的最大效应值, γ 为形状因子, C 为药物浓度, ED_{50} 为最大药效的 50% 时所对应整合浓度值。结果发现炒莱菔子醇提取物中芥子酸最佳药动学模型拟合为血管外给药的一房室模型, 见表 5; 芥子酸与 IL-5, IgE, TNF- α 效应指标拟合度较好, 见表 6; 效应-浓度曲线见图 4。

表 5 炒莱菔子醇提取物中芥子酸的最佳房室模型评价

Table 5 Evaluation of the best compartmental model of sinapic acid in ethanol extract of stir-fried Raphani Semen

项目	芥子酸	
	炒莱菔子醇 提取物低剂量组	炒莱菔子醇 提取物高剂量组
房室数	1	1
权重系数	4	4
AIC	-5.424	-8.387
施贝氏判据 (SBC)	-3.911	-6.574
R^2	0.905	0.952

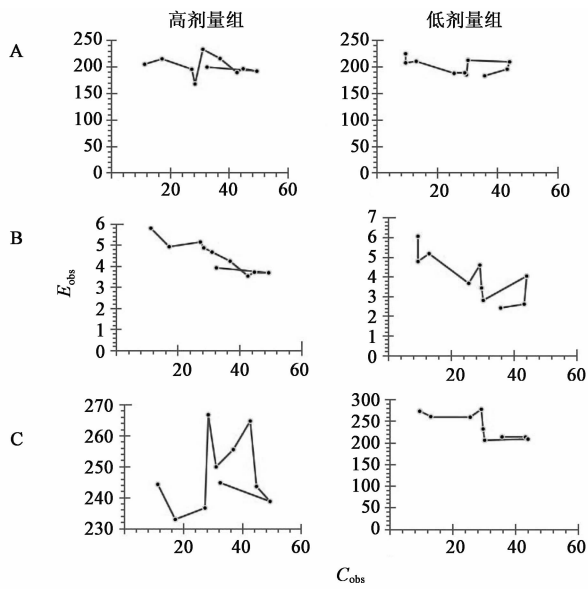
表 6 炒莱菔子醇提取物中芥子酸以 IL-5, IgE 和 TNF- α 含量为药效指标的 PK-PD 参数

Table 6 PK-PD parameters of sinapic acid in rats with levels of IL-5, IgE and TNF- α as pharmacodynamic indexes

药效指标	参数/单位	低剂量组	高剂量组
IL-5	$E_{max}/ng \cdot L^{-1}$	404.872	401.896
	$ED_{50}/mg \cdot L^{-1}$	18.801	11.901
	γ	0	-0.508
IgE	$E_{max}/U \cdot mL^{-1}$	8.283	9.045
	$ED_{50}/mg \cdot L^{-1}$	18.857	11.97
	γ	0.01	0.01
TNF- α	$E_{max}/ng \cdot L^{-1}$	491.272	491.523
	$ED_{50}/mg \cdot L^{-1}$	18.822	11.923
	γ	0	0.13

3 讨论

莱菔子多炒制后内服, 目前国内外尚无关于炒莱菔子生理状态和病理状态下的药代动力学研究。因此, 本文建立了 UHPLC-MS/MS 测定炒莱菔子中芥子酸含量的方法, 经考察其回收率和日内、日间精密密度等条件均符合生物样品测定的要求, 该方法简便灵敏, 适用于大鼠血浆中芥子酸的药代动力学研究。正常大鼠灌胃不同剂量炒莱菔子醇提取物 5 min 后, 血浆中可检测到芥子酸成分, 说明吸收比较快速。炒莱菔子醇提取物不同剂量组的芥子酸药时曲线下面积 (AUC_{0-t}), 平均滞留时间 (MRT_{0-t}), 药峰浓度 (C_{max}) 和达峰时间 (T_{max}) 均有所不同, 表明上述



E_{obs} ·实测药物效应值; C_{obs} ·实测药物浓度; A. IL-5; B. IgE; C. TNF- α
图 4 不同剂量炒莱菔子醇提物中芥子酸在哮喘大鼠体内的效应-浓度曲线 ($n = 8$)

Fig. 4 Concentration in effect compartment and effect profiles of sinapic acid after administration of ethanol extract of stir-fried Raphani Semen in asthma model rats with IL-5, IgE, TNF- α contents as indexes of efficacy ($n = 8$)

药代动力学特征与其剂量有一定的关系。以 AUC_{0-4} 为纵坐标, 芥子酸给药剂量为横坐标作线性拟合, 结果相关系数 (r) > 0.99 , 说明芥子酸体内 AUC_{0-4} 在 $4.5 \sim 18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 线性依赖性良好。芥子酸的药时曲线出现前低后高的双峰, 可能是由于莱菔子炒制后, 破坏了芥子酶活性, 保留了部分的硫代葡萄糖苷成分, 而随着时间的延长, 该类成分可能在胃肠道微生物作用下进行降解, 生成复杂的降解产物之一——芥子酸, 其发生再次吸收, 确切的发生机制尚需进一步考证。

不同的机能状态会对中药体内代谢产生不同的影响, 建立中药在病理状态下的 PK-PD 研究与临床密切相关。支气管哮喘是一种由多种炎性细胞、炎症介质、细胞因子引起的以可逆性的气道阻塞、气道高反应性和气道炎性反应为主要特征的气道慢性炎症性疾病, 其病理生理基础是气道慢性炎症。研究表明哮喘气道炎症一方面是由区域性的免疫调节机制紊乱引起, 即辅助性 T 细胞 (Th) 1/Th2 失衡。TNF- α 是哮喘炎症过程中重要启动因子, 参与了哮喘的发作; IL-5 能促进 B 淋巴细胞分化和增殖来协同 IL-4 合成 IgE, 促进气道内嗜酸细胞聚集和浸润, 是气道炎症持续存在的关键细胞因子^[31-38], 故本文以大鼠哮喘模型为研究对象, 选用了 TNF- α , IL-5,

IgE 为药效学指标, 建立了 PK-PD 结合模型, 描述了芥子酸“给药时间-药物浓度-药物效应”三者之间的相互关系。结果表明 TNF- α , IL-5 和 IgE 的浓度与芥子酸质量浓度存在一定的相关性, 推测炒莱菔子可通过降低炎性因子浓度来发挥平喘作用。由图 4 可知, 给药后多数时间点上的浓度和效应未显示出直接的对应关系, 即药物效应的变化并不与血药浓度同时或滞后发生, 说明其效应室可能不在血液, 但炒莱菔子能通过调节 IL-5, IgE 和 TNF- α 的含量, 从而减轻气道炎症来缓解哮喘症状, 提示 PK-PD 模型可能适用于间接连接、间接效应模型; 本文采用的 PK-PD 分析方法是将大鼠芥子酸血药浓度和药效指标结合在一起进行相关性研究, 通过建立效应室来连结, 由于 IL-5, IgE 和 TNF- α 含量的变化可能与作用部位药物浓度有关, 作用部位药物浓度消除, 药效也会随之消失, 时间的因素对其可能没有影响, 提示炒莱菔子的药效可能适用于软连接、非时间依赖 PK-PD 模型。

综上所述, 本文考察了生理状态及病理状态下大鼠口服炒莱菔子醇提物后芥子酸在体内的药代动力学特征, 并建立了炒莱菔子药效学与药代动力学同步分析的模型, 结果提示不同给药剂量、不同机能状态下均能影响炒莱菔子中芥子酸在体内的药代动力学行为, 这些药代动力学行为与其平喘药效紧密关联。然而, 哮喘病因及发病机制较为复杂, 本文仅以哮喘发病中炎症因子含量为指标进行药效动力学研究, 不够全面, 炒莱菔子平喘机制还有待进一步探讨。

[参考文献]

- [1] 王番, 宋颖, 白娟, 等. 药代动力学-药效学模型的应用进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34 (22): 2667-2670.
- [2] 张茜, 周洪雷, 朱立俏, 等. 莱菔子化学成分研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20 (4): 137-140.
- [3] 苏慧, 岳琳, 刘颖, 等. 芥子及莱菔子饮片炮制前后物质基础变化规律分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24 (7): 23-26.
- [4] 朱立俏, 张元元, 于绍华, 等. 莱菔子炮制前后 HPLC 指纹图谱及主要成分含量变化研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29 (5): 614-621.
- [5] RAISH M, AHMAD A, AHMAD A M, et al. Sinapic acid ameliorates bleomycin-induced lung fibrosis in rats [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 108 (1): 224-231.
- [6] 杨瑛洁, 李淑燕, 胡国伟, 等. 硫代葡萄糖苷的降解途径及其产物的研究进展 [J]. 西北植物学报, 2011, 31 (7): 1490-1496.
- [7] 马丛丛, 许继超, 韩领, 等. 芥子酸及其生物活性研究

- 进展[J]. 中国油脂, 2016, 41(5): 75-79.
- [8] SOTELO T, LEMA M, SOENGAS P, et al. *In vitro* activity of glucosinolates and their degradation products against brassica-pathogenic bacteria and fungi[J]. Appl Environ Microb, 2015, 81(1): 432-440.
- [9] GROSSER K, VAN DAM N M. A straightforward method for glucosinolate extraction and analysis with high-pressure liquid chromatography (HPLC) [J]. J Vis Exp, 2017, doi:10.3791/55425.
- [10] 王群, 孙忠迪, 刘梅, 等. 炒莱菔子中芥子碱对高血脂大鼠血脂水平的影响[J]. 医学研究杂志, 2013, 42(5): 60-62.
- [11] 刘晓舒, 裴晓琳, 王继鹏, 等. 咳必停镇咳祛痰平喘作用[J]. 中国公共卫生, 2018, 34(6): 830-833.
- [12] 裴星, 韩勇, 张占华, 等. 芥子酸对高糖诱导下大鼠血管平滑肌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(7): 1174-1179.
- [13] 周艳丽, 阮研硕, 劳文艳, 等. 哮喘动物模型的建立方法研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2017, 34(10): 931-936.
- [14] HE Y, LOU X H, JIN Z, et al. Mahuang decoction mitigates airway inflammation and regulates IL-21/STAT3 signaling pathway in rat asthma model [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 224: 373-380.
- [15] KIM S H, LEE Y C. Piperine inhibits eosinophil infiltration and airway hyper responsiveness by suppressing T cell activity and Th2 cytokine production in the ovalbumin-induced asthma model [J]. J Pharm Pharmacol, 2009, 61(3): 353-359.
- [16] 劳文艳, 阮研硕, 周艳丽, 等. 两种大鼠哮喘模型建立方法的比较[J]. 北京联合大学学报: 自然科学版, 2017, 31(3): 54-58.
- [17] 陈锡培, 苏妙珠, 蔡宇文. 止咳定喘汤对咳嗽变异性哮喘模型大鼠肺表面活性蛋白表达的影响[J]. 中医药导报, 2018, 24(13): 23-27.
- [18] 乡世健, 盛华芳, 吕亚梅, 等. 冬病夏治方穴位贴敷对哮喘豚鼠气道炎症及肠道菌群的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(9): 95-102.
- [19] 李海霞, 张勇华, 任晓丹, 等. 建立 RSV 联合 OVA 诱发幼年大鼠哮喘模型的方法[J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(12): 1371-1373.
- [20] GONG L L, XU H Y, WANG L, et al. Identification and evaluation of the chemical similarity of Yindan xinnaotong samples by ultra high performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry fingerprinting [J]. J Sep Sci, 2016, 39(3): 611-622.
- [21] 李涛, 王怡薇, 王彦礼, 等. 黄芩汤在大鼠发热状态下药效学及药代动力学特征研究[J]. 药学学报, 2014, 49(10): 1418-1425.
- [22] 陈立. 小承气汤类方物质基础、药效学和药代动力学比较研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2015.
- [23] 高小明, 杨瑞, 夏素霞, 等. 生脉注射液中人参皂苷 Re 在心绞痛患者体内的 PK-PD 相关性[J]. 药物评价研究, 2018, 41(7): 1241-1245, 1259.
- [24] 巩仔鹏, 胡建春, 李梅, 等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(1): 74-78.
- [25] 詹淑玉, 邵青, 李正, 等. 生脉注射液中人参皂苷 Rg₁, Rb₁ 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.
- [26] 王丽, 胡樱凡, 童东, 等. 黄连碱对内毒素发热大鼠解热作用的 PK-PD 研究[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(4): 552-556.
- [27] 龚小红, 周忆梦, 郑立, 等. 大黄治疗阳虚便秘模型大鼠的整合 PK/PD 研究[J]. 药学学报, 2018, 53(4): 561-566.
- [28] 陈璟, 吕志阳, 汪洁, 等. 银杏总内酯在脑缺血损伤模型大鼠体内的 PK-PD 研究[J]. 中草药, 2018, 49(4): 885-890.
- [29] 杨永茂. 大黄蒽醌保护肠粘膜屏障损伤的 PK-PD 结合模型研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2011.
- [30] 严龙. 中药仙茅在大鼠体内的 PK-PD 模型初探[D]. 曲阜: 曲阜师范大学, 2014.
- [31] 黄晖, 朱慧志, 刘璐, 等. 阳和平喘颗粒不同阶段干预对哮喘大鼠气道黏液高分泌及血清 IL-13 水平影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(2): 16-19, 225.
- [32] 张洁, 朱慧志, 刘向国, 等. 阳和平喘颗粒对哮喘模型大鼠血清 IL-4、IL-5 和 IL-13 的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(11): 2426-2428, 2463.
- [33] 姚欢, 刘璐, 朱慧志, 等. 阳和平喘颗粒早期和晚期干预对哮喘大鼠支气管肺泡灌洗液中白细胞介素-5 和白细胞介素-9 的影响[J]. 安徽中医药大学学报, 2017, 36(4): 63-66.
- [34] ARORA P, ANSARI S H, ANJUM V, et al. Investigation of anti-asthmatic potential of Kanakasava in ovalbumin-induced bronchial asthma and airway inflammation in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 197: 242-249.
- [35] 翟慧媛, 陈磊垚, 王东旭, 等. 钩薄过敏颗粒对咳嗽变异性哮喘大鼠肺泡灌洗液 IL-4、IL-5、IFN- γ 水平影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2016, 11(12): 1668-1671.
- [36] KOUADIO K, ZHENG K C, TOURE A A, et al. IL-4 and IL-5 secretions predominate in the airways of Wistar rats exposed to toluene diisocyanate vapor [J]. J Prev Med Public Health, 2014, 47(1): 57-63.
- [37] 徐增梅, 丁伟伟, 尹婷婷, 等. 麻芍平喘汤对支气管哮喘大鼠气道重塑及 IL-5、IL-13 影响研究[J]. 实用中医药杂志, 2014, 30(12): 1074-1075.
- [38] 吴文娟, 董晓斐, 李娇艳, 等. 咳喘宁雾化吸入对哮喘大鼠肺泡灌洗液白介素-5 与嗜酸性粒细胞的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2014, 34(1): 19-21, 33.

[责任编辑 刘德文]