

黄芩苷对角叉菜胶致热大鼠解热作用的 PK-PD 模型研究

于宜平, 张 艳, 李 红, 王 平*, 孟宪丽, 陈小睿, 曾 勇
成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

摘要: 目的 利用药动学-药效学 (PK-PD) 结合模型评价黄芩苷解热作用的强度和特点。方法 采用角叉菜胶复制大鼠炎症发热模型, ig 黄芩苷 (180 mg/kg) 后不同时间点采血、测量体温; 高效液相色谱-质谱 (HPLC-MS) 法测定黄芩苷血药浓度; 以 ADAPT 软件拟合基于作用机制的各 PK-PD 模型, 以拟合优度选取优势模型。结果 最终确定了含肝肠循环的双部位吸收 PK 模型和 Sigmoid I_{\max} PD 模型, 并以效应室抑制产热的方式联结了 PK 和 PD 模型。拟合结果表明, 黄芩苷解热作用的 I_{\max} 为 0.56 °C, PD 形状参数 (H) 为 10.67。结论 黄芩苷对抗角叉菜胶致热作用的量效关系范围窄, 效能低。

关键词: 黄芩苷; 药动学-药效学模型; 发热; 体温; 角叉菜胶

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)04-0527-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.04.014

Pharmacokinetic-pharmacodynamic study on antipyretic effects of baicalin on carrageenan-induced pyrexia of rats

YU Yi-ping, ZHANG Yan, LI Hong, WANG Ping, MENG Xian-li, CHEN Xiao-ru, ZENG Yong
College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective Pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modeling is used to characterize the antipyretic effects of baicalin (BA) in rats. **Methods** Twelve healthy male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into two groups, each with six. The rats in the first group were sc injected with carrageenan (1 mL per rat) alone to make the inflammation model. The rats in the second group were given BA (180 mg/kg) by ig administration after carrageenan injection. Body temperature was measured while orbital sinus blood sample was collected at different time points. The blood concentration of BA was determined by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. PK-PD modelings were fitted with ADAPT 5.1 software. The model with advantage was selected by the fitting goodness. **Results** The concentration-time curve was best and fitted by double-site absorption with enterohepatic circulaion of Pk model and the antipyretic responses of Sigmoid- I_{\max} PD model could be well confirmed. The PK and PD models were reconnected by the antipyretogenetic inhibition with effect compartment. The fitting results indicated that the I_{\max} of antipyretic effect by BA was 0.56 °C and shape parameter (H) for PD was 10.67. **Conclusion** The dose-effect relationship range in the antipyretic activity of BA on carrageenan-induced pyrexia of rats is narrow and its efficiency is low.

Key words: baicalin; pharmacokinetic-pharmacodynamic model; pyrexia; body temperature; carrageenan

黄芩苷 (baicalin, BA) 是一种具有抗炎、抗微生物等多种药理作用的黄酮类化合物^[1-2], 也是黄芩药材质量控制的指标成分。目前以黄芩苷为对象的药效学和药动学研究较多, 但对其作用于整体动物的药效学研究仍未见报道。药动学-药效学 (PK-PD) 结合模型可定量评价药物作用效能、量效关系和维持时间, 已成为评价药物作用特点和合理安排给药方案的重要工具。采用该方法, 对黄芩苷主要药效

作用的 PK-PD 过程进行考察, 不仅可获取其药动学相关参数以合理评价其作用特点, 也可为黄芩等中药材的相关研究提供参考。

全身炎症反应常伴有体温升高, 解热作用能直接反映药物抗炎的整体疗效, 也是中药清热药效研究的常见评价内容^[3]。本研究通过解析黄芩苷血药浓度与其对炎症大鼠解热作用的相互关系, 以定量评价黄芩苷在整体炎症动物体内的量效、效能及作用特点。

收稿日期: 2013-04-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81073118); 教育部高校博士点基金项目 (20105132120003); 四川省教育厅自然科学基金重点项目 (11ZA061)

作者简介: 于宜平 (1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药理与毒理。Tel: 15882482810 E-mail: articlewp@hotmail.com

*通信作者 王 平 Tel: 13551082520 E-mail: viviansector@aliyun.com

1 材料与仪器

1.1 药品与试剂

黄芩苷(质量分数 95%, 成都欧康植化科技有限公司, 批号 110602); 角叉菜胶(美国 Sigma 公司); 乙腈、甲醇(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 甲酸(色谱纯, 成都市科龙化工试剂厂); 羧甲基纤维素钠(CMC-Na, 分析纯, 成都市科龙化工试剂厂)。

1.2 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 12 只, 体质量 180~200 g, 购自四川省医学科学院实验动物研究所, 动物许可证号 SCXK(川) 2008-24。

1.3 仪器

岛津 HPLC-MS 2020 (ESI 接口), 色谱工作站(Labsolution 5.5), QL—901 涡旋混合仪(江苏海门市麒麟医用仪器厂), H2050R 台式高速冷冻离心机(湘仪离心机仪器有限公司), CP—124S 电子天平(北京赛多利斯有限公司)。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm); 流动相为 0.1% 乙酸铵溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱: 0~5 min, 25%~35% B; 5~5.5 min, 35% B; 5.5~6 min, 35%~25% B; 6~10 min, 25% B; 体积流量 0.4 mL/min, 柱温 40 °C, 进样量 5 μL; MS 检测条件为 SIM(-), *m/z* 444.95 (黄芩苷)、*m/z* 282.95 (大黄酸, 内标), 接口电压-4.5 kV, 其余参数采用调谐文件。

2.2 血浆样品预处理

血浆样品预处理方法参照文献方法^[4]加以改良: 精密移取 4.4 μg/mL 大黄酸甲醇溶液 10 μL, 氮气吹干, 加入待测血浆样品 50 μL, 混合涡旋 2 min, 再加入 500 μL 乙腈, 混合涡旋 1 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 氮气吹干, 流动相复溶 50 μL, 12 000 r/min 离心 10 min, 取 5 μL 进样测定。

2.3 动物实验

雄性 SD 大鼠 12 只, 随机分为模型组、黄芩苷组, 每组 6 只动物。大鼠提前 5 d, 每天测肛温 8 次, 使其适应操作。实验当日禁食不禁水 12 h, 控制室温 20~25 °C, 并在 1 h 内测肛温 2 次, 选取体温在 36.6~37.6 °C, 且体温波动在 0.3 °C 以内者, 取平均值作为给药前正常体温。黄芩苷组大鼠右后足趾 sc 1% 角叉菜胶生理盐水溶液 0.1 mL/只, 20 min 后 ig 给予黄芩苷 1% CMC-Na 混悬液 180 mg/kg^[5]; 模

型组注射角叉菜胶后, 20 min 后 ig 给予等体积 CMC-Na 溶液。分别于给药后 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 h 测定体温, 计算各时间点大鼠体温改变值(Δ*T*); 给药前和给药后 10、30 min, 1、1.5、3、5、6、8、10、12、24 h 于眼眶后静脉丛取血约 150 μL, 置于涂有肝素的试管中, 3 500 r/min 离心 10 min 分离血浆, 按“2.2”项下方法测定。

2.4 数据分析

PK-PD 模型拟合采用 ADAPT 5.1 软件^[6]进行。

2.4.1 PK 模型 黄芩苷血药浓度-时间曲线分别采用一、二、三房室、双部位吸收、含肝肠循环的双部位吸收法拟合, 以残差图、最小化信息量、参数估计值变异率为标准比较各模型拟合优度, 以拟合优度最高的模型与 PD 模型进行联结。

2.4.2 PK-PD 模型的建立 分析血药浓度与温度变化趋势, 参考文献方法^[7-9]建立多种联结模型。模型组和黄芩苷组所有实验数据聚集后同步拟合。以残差图、最小化信息量、参数估计值变异率为标准比较各模型拟合优度。

3 结果

3.1 药效学结果

两组大鼠造模前平均体温均为 36.96 °C, 无统计学差异。模型组注射角叉菜胶 1 h 后大鼠体温开始上升; 黄芩苷组与模型组各时间点 Δ*T* 比较无明显差异 ($P>0.05$), 但有一定减小趋势。

3.2 PK-PD 模型拟合结果

最终采用含肝肠循环的双部位吸收 PK 模型、Sigmoid I_{\max} PD 模型, 并以效应室抑制产热的方式联结了 PK 和 PD 模型, 形成最终 PK-PD 联合模型, 见图 1。

模型的系统状态微分方程组描述如下:

$$\text{当 } t \leq t_1 \text{ 时: } \frac{dx_1(t)}{dt} = K_{a1} \cdot x_2(t) - K_{e1} \cdot x_1(t) - K_{bi} \cdot x_1(t)$$

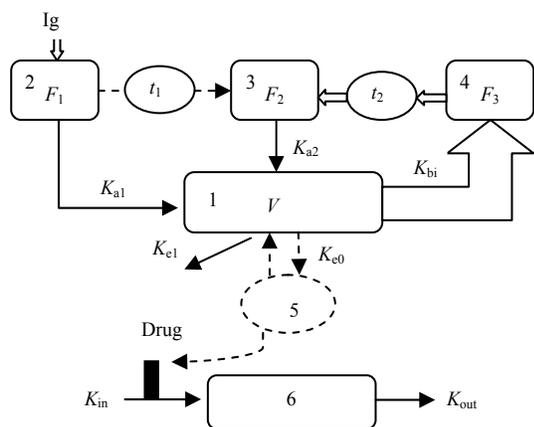
$$\frac{dx_2(t)}{dt} = -K_{a1} \cdot x_2(t)$$

$$\frac{dx_4(t)}{dt} = -K_{bi} \cdot x_1(t)$$

$$\text{当 } t_1 < t \leq t_2 \text{ 时: } \frac{dx_1(t)}{dt} = K_{a2} \cdot x_3(t) - K_{e1} \cdot x_1(t) - K_{bi} \cdot x_1(t)$$

$$\frac{dx_3(t)}{dt} = -K_{a2} \cdot x_3(t)$$

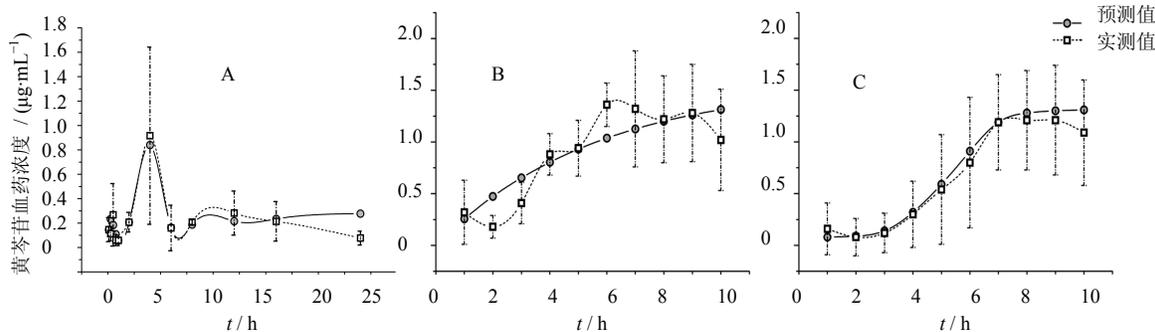
$$\frac{dx_4(t)}{dt} = -K_{bi} \cdot x_1(t)$$



1-中央室 2-吸收1室 3-吸收2室 4-肝肠循环室 5-效应室
6-体温变化室 Drug-药物抑制产热作用
1-central compartment; 2-first absorption compartment; 3-second absorption compartment; 4-enterohepatic circulation; 5-effect compartment; 6-temperature changing compartment; Drug-drug-inhibited pyretogenic action

图1 黄芩苷解热作用的PK-PD模型

Fig. 1 Antipyretic effect of BA for PK-PD models



A-PK 拟合效果; B-模型组体温变化拟合效果; C-治疗组体温变化拟合效果

A-PK fitting results; B-fitting results of body temperature in model group; C-fitting results of body temperature in treatment group

图2 PK-PD模型拟合结果

Fig. 2 Fitting results of PK-PD models

表1 黄芩苷解热作用PK-PD模型参数拟合结果

Table 1 Fitting parameters of antipyretic effect of BA on PK-PD models

参数	意义	单位	拟合值	SE / %	参数	意义	单位	拟合值	SE / %
V	表观分布容积	L	0.96	77.0	K_{e0}	速率常数	h^{-1}	0.67	53.1
K_{e1}	消除速率常数	h^{-1}	3.28	89.4	K_{in}	产热常数	$\Delta^{\circ}C \cdot h^{-1}$	0.28	83.72
t_1	滞后时间1	h	0.89	0.63	K_{out}	散热常数	h^{-1}	0.18	88.31
t_2	滞后时间2	h	5.91	13.61	I_{max}	效能	$^{\circ}C$	0.56	13.91
K_{a1}	吸收速率常数1	h^{-1}	3.58	41.36	IC_{50}	半数有效浓度	$ng \cdot mL^{-1}$	137.19	35.80
K_{a2}	吸收速率常数2	h^{-1}	0.84	150.3	H	形状参数	—	10.67	141.1
K_{bi}	胆排泄速率常数	h^{-1}	0.79	103.3	δ_{inter1}	药浓误差截踞	—	0.045	79.3
F_1	第1吸收室生物利用度	%	0.35	41.7	δ_{inter2}	温度误差截踞	—	0.19	29.1
F_2	第2吸收室生物利用度	%	25.82	92.1	δ_{slope1}	药浓误差斜率	—	0.39	81.4
F_3	肝肠循环利用度	%	11.64	112.1	δ_{slope2}	温度误差斜率	—	0.004 8	44.3
F	总生物利用度	%	26.08	—	$IC(6)$	初始温度变化	$\Delta^{\circ}C \cdot h^{-1}$	0.063	63.1

$$\text{当 } t > t_2 \text{ 时: } \frac{dx_1(t)}{dt} = K_{a2} \cdot x_3(t) - K_{e1} \cdot x_1(t) - K_{bi} \cdot x_1(t)$$

$$\frac{dx_3(t)}{dt} = -K_{a2} \cdot x_3(t) + F_3 \cdot x_4(t)$$

$$\frac{dx_4(t)}{dt} = -K_{bi} \cdot x_1(t)$$

$$\text{当所有的 } t: \frac{dx_5(t)}{dt} = K_{e0} \left[\frac{x_1(t)}{V} - x_5(t) \right]$$

$$\frac{dx_6(t)}{dt} = K_{in} \left(1 - \frac{I_{max} [x_5(t)]^H}{IC_{50}^H + [x_5(t)]^H} \right) - \frac{K_{in}}{IC(6)} \cdot x_6(t)$$

$IC(6)$ 为房室6在 $t=0$ 时的初值,在ADAPT程序编制中常使用 $K_{out}=K_{in}/IC(6)$ 以估算非药物引起的自调节作用。模型拟合的最终结果见图2,温度变化的PK-PD模型AIC值为-16.77,模型拟合较优。所得模型参数拟合结果见表1。

4 讨论

角叉菜胶致大鼠炎症模型^[10]通过引起前列腺素 E (PGE) 等致炎因子的生成和释放^[11]从而诱发全身发热。本实验中大鼠注射角叉菜胶后约 1 h 大鼠开始发热, 1~6 h 体温持续上升, 6~10 h 保持在较高温度, 10 h 后体温逐渐恢复正常。黄芩组于造模后 ig 给予黄芩苷, 以观察其对造模后体温上升的抑制作用。直观分析虽可见黄芩苷可减小体温上升幅度, 但仍无法对其药效学过程进行量化分析。本研究显示, 黄芩苷 ig 给药后在大鼠体内药时曲线呈现双峰或三峰, 该现象与相关研究结果一致^[12-13], 文献认为这可能与黄芩苷在胃肠道存在双吸收部位及黄芩苷的肠道代谢转化有关^[5,14]。更进一步的吸收机制研究^[15]表明, 大鼠 ig 黄芩苷后, 少量药物以原形在胃中迅速被吸收; 到达肠道后以苷元形式在小肠上部被吸收, 另部分药物可经肝肠循环被重新吸收; 从而在药时曲线中表现为双峰或三峰的现象。根据这一吸收机制, 采用含肝肠循环的双部位吸收划分了胃肠道的整个吸收过程^[16], 其中第一吸收室为一过性吸收, 在一定时间 t_1 前向中央室 1 转运, 其后不向中央室 1 输入药物。第 3 吸收室为肝肠循环贮存室, 一定时间 t_2 后向吸收室 2 释放药物, 其中有 F_3 比例的药物被重吸收。对以上过程, 参照文献方法^[16]建立了动力学方程, 在 ADAPT 软件中, 使用 FORTRAN 语言编制了相关程序。结果表明, 使用这一动力学模型对药时曲线的拟合效果较佳, 保证了效应室浓度计算时对中央室药物浓度的精度要求, 确保了 PK-PD 全模型拟合的准确度。

研究表明, 黄芩苷解热作用机制为对多种致热因子生成过程具有抑制作用^[17-18]。因此在效应室联结时, 从生理病理角度, 应将黄芩苷对体温室的作用加载于对产热因子 K_{in} 的抑制过程中。在模型拟合时, 比较了加载于 K_{in} 和散热因子 K_{out} 时的拟合效果, 结果表明以抑制产热的模型较佳。这一结果提示, PK-PD 建模应重视对作用机制的综合考虑, 以使相应模型参数具有较强的现实解释能力。

本研究求算出的黄芩苷解热效能值仅为 0.56 °C, 低于大黄 1.283 °C 的解热效能值^[19], 也远低于布洛芬 3 °C 的解热效能值^[20]。结果表明, 黄芩苷解热效果相对较差, 提示其相应的抗炎作用也应较弱, 其临床作用可能是弱的抗炎作用与其他药理作用如抗菌作用^[1,21-22]的整合效应。同时, 拟合结果所得形状参数 (H) 约为 10.67, 表明量效曲线斜率

较大, 坡度陡峭, 提示黄芩苷解热作用的量效关系范围可能较窄, 最小有效量与最大有效量间的差距小, 提示增大其用量对解热作用增强极其有限。

本研究结果表明, 黄芩苷解热作用的 IC_{50} 约为 137.79 ng/mL, 远低于其对炎症细胞模型中相关炎症因子抑制作用的 IC_{50} 。如文献报道黄芩苷在人脐静脉内皮细胞中抑制肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 分泌的 IC_{50} 为 1 071~4 329.8 ng/mL^[23], 为本实验所得 IC_{50} 的 7~31 倍。对大量药物检索发现, PK-PD 研究所得的 EC_{50} 或 IC_{50} 均远低于同作用机制指标细胞实验得到 IC_{50} 。如秦普生大鼠体内解热和抗炎作用 PK-PD 研究的 IC_{50} 分别为 4.24、4.13 μ g/mL^[7], 而细胞实验中抑制 IL-6 活性的 IC_{50} 大于 25.224 μ g/mL^[24]; 再如大黄在大鼠体内抑制 NO 的 IC_{50} 为 90.80 ng/mL^[19], 而对巨噬细胞株 RAW264.7 释放 NO 的 IC_{50} 约 19 100 ng/mL^[25], 约为动物中的 210 倍。究其原因, 可能与整体动物不同于细胞, 具有显著的机体系统内和系统间互相调节、相互影响作用, 并最终对生物信号的整合放大有关。这一现象也提示, 仅以细胞实验得到的 IC_{50} 进行药物筛选, 可能会造成广泛的漏筛现象, 应引起相应的重视。

综上所述, 本研究建立的黄芩苷 PK 模型对其药动学过程进行了精确刻画, PD 模型符合黄芩苷抗炎解热的相关作用机制, 整体模型定量评价了黄芩苷作用的效价强度、效能、量效关系范围, 为中药药理学研究提供了重要工具, 具有一定推广和应用价值。

参考文献

- [1] 张建春, 张 华, 施 瑛. 黄芩苷的研究近况 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(3): 247-249.
- [2] 黄志军. 黄芩苷药理作用进展研究 [J]. 天津药学, 2012, 24(3): 61-64.
- [3] 陈 奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1893.
- [4] 柳文媛, 余成霞, 冯 锋. LC-MS/MS 法同时测定大鼠血浆中黄芩素及黄芩苷浓度 [J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(2): 129-132.
- [5] 龚明涛, 虞丽芳, 陈庆华, 等. 大鼠灌胃黄芩苷及其苷元黄芩素的药动学研究 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 392-394.
- [6] Argenio D D Z, Schumitzky A, Wang X. ADAPT 5 User's Guide: Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Systems Analysis Software [M]. Los Angeles: Biomedical Simulations

- Resource, 2009.
- [7] Josa M, Urizar J P, Rapado J, *et al.* Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of antipyretic and anti-inflammatory effects of naproxen in the rat [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 297(1): 198-205.
- [8] Sukumaran S, Lepist E I, Dubois D C, *et al.* Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of methylprednisolone effects on iNOS mRNA expression and nitric oxide during LPS-induced inflammation in rats [J]. *Pharm Res*, 2012, 29(8): 2060-2069.
- [9] 黄芳, 陈渊成, 刘晓东. 板蓝根总生物碱中表告依春在发热大鼠体内的药动学-药效学结合模型研究 [J]. *中草药*, 2007, 38(10): 1514-1519.
- [10] 唐晓峰, 薛漫清, 王晖. 大鼠发热模型及发热机制的研究进展 [J]. *广东药学院学报*, 2009, 25(3): 323-327.
- [11] 肖百全, 朱少璇, 杨威, 等. 角叉菜胶致大鼠足肿胀模型探讨及其机制研究 [J]. *中国实用医药*, 2008, 3(23): 63-65.
- [12] 郭晓宇, 杨琳, 陈颖, 等. 黄芩素与黄芩苷大鼠体内药动学比较研究 [J]. *中国药学杂志*, 2008, 43(7): 524-526.
- [13] 张岩, 肇丽梅, 韩国柱. 清热合剂中黄芩苷在大鼠体内的药物动力学 [J]. *华西药理学杂志*, 2005, 20(3): 232-234.
- [14] Lu T, Song J, Huang F, *et al.* Comparative pharmacokinetics of baicalin after oral administration of pure baicalin, *Radix scutellariae* extract and Huang-Lian-Jie-Du-Tang to rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 110(3): 412-418.
- [15] 邢杰. 黄芩苷在动物体内的吸收和代谢研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2005.
- [16] 周怀梧, 沈佳庆, 何雁. 双部位吸收和肠肝循环并存的药动学模型及生物利用度 [J]. *数理医药学杂志*, 1994(1): 1-4.
- [17] Zeng L X, Dong J C, Yu W Q, *et al.* Baicalin attenuates inflammation by inhibiting NF-kappaB activation in cigarette smoke induced inflammatory models [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2010, 23(5): 411-419.
- [18] 万巧凤, 顾立刚, 殷胜骏, 等. 黄芩苷对FM1肺炎小鼠肺损伤的作用机制研究 [J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(2): 208-212.
- [19] 李红, 张艳, 于宜平, 等. 大黄解热作用与降低血浆一氧化氮作用的PK-PD研究 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(7): 53-58.
- [20] Anderson B J. Comparing the efficacy of NSAIDs and paracetamol in children [J]. *Paediatr Anaesth*, 2004, 14(3): 201-217.
- [21] 杜仲业, 陈一强, 孔晋亮, 等. 黄芩苷对金黄色葡萄球菌生物膜抑制作用的体外研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2012, 22(8): 1541-1543.
- [22] 张喜平, 周田美, 董晓勤, 等. 黄芩苷注射液体外抗菌作用实验研究 [J]. *医学研究杂志*, 2006, 35(8): 39-41.
- [23] Calixto J B, Campos M M, Otuki M F, *et al.* Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules [J]. *Planta Med*, 2004, 70(2): 93-103.
- [24] Kang B S, Chung E Y, Yun Y P, *et al.* Inhibitory effects of anti-inflammatory drugs on interleukin-6 bioactivity [J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24(6): 701-703.
- [25] 黄艺如. 中药材之炮制研究第二报炮制大黄对诱导型一氧化氮合成酶素之抑制作用 [D]. 台北: 台北医学大学生药学研究所, 2001.