

半夏泻心汤及其苦降药组促进胃肠动力的 PK-PD 研究

罗太敏¹, 李晋奇², 杨戈¹, 张德¹, 童荣生^{2*}

1. 天府新区人民医院, 四川 成都 610213

2. 四川省医学科学院·四川省人民医院, 四川 成都 610072

摘要: **目的** 探讨半夏泻心汤促进胃肠动力的物质基础、作用机制和配伍特点。**方法** 将实验分为半夏泻心汤组及苦降药组, 两组大鼠分别 ig 给予两组药物水提醇沉液, 于给药前 (0 h) 及给药后 0.083、0.167、0.25、0.333、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、9、24 h 股静脉采血, ELISA 法测 Cajal 间质细胞 (ICC) 中 KIT 蛋白、Ca²⁺ 及 ATP 酶的水平, 同时采用液质联用 (HPLC-MS) 法检测血清中黄芩苷、黄芩素、小檗碱、巴马汀的浓度, 采用 Winnonlin 软件进行药动学 (PK) - 药效学 (PD) 结合模型拟合。**结果** 半夏泻心汤及其苦降药组均能下调 ICC 中 Ca²⁺ 浓度及上调 ICC 中 ATP 酶的水平; 且对 ICC 内 KIT 蛋白水平无显著影响。半夏泻心汤及其苦降药组降低 Ca²⁺ 浓度的效应中巴马汀以有滞后时间三房室-Sigmoid $I_{\max}$ PK-PD 模型连接, 小檗碱、黄芩素以有滞后时间二房室-Sigmoid $I_{\max}$ PK-PD 模型连接。半夏泻心汤及其苦降药组上调 ATP 酶的效应中巴马汀以有滞后时间三房室-Sigmoid $E_{\max}$ PK-PD 模型连接, 小檗碱、黄芩素以有滞后时间二房室-Sigmoid $E_{\max}$ PK-PD 模型连接。**结论** 半夏泻心汤及其苦降药组促进胃肠动力的作用可能与其降低 ICC 内 Ca²⁺ 浓度、上调细胞 ATP 酶水平有关。ICC 内 Ca²⁺ 浓度的降低、ATP 酶水平的上调可能与半夏泻心汤及其苦降药组中巴马汀、小檗碱、黄芩素有关。半夏泻心汤在 PK 和 PD 方面均优于苦降药组, 体现出全方的配伍优势。

关键词: 半夏泻心汤; PK-PD 模型; Cajal 间质细胞; KIT 蛋白; Ca²⁺ 浓度; ATP 酶

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2015)06-0622-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.06.008

PK-PD Study on Banxia Xiexin Decoction and its bitter medicine group on effect of promoting gastrointestinal motility

LUO Tai-min¹, LI Jin-qi², YANG Ge¹, ZHANG De¹, TONG Rong-sheng²

1. Tianfu District People's Hospital, Chengdu 610213, China

2. Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China

Abstract: **Objective** To investigate the material basis, mechanism, and compatibility characteristics of Banxia Xiexin Decoction (BXD) in promoting the gastrointestinal motility. **Methods** The rats were divided into BXD group and bitter medicine group. Blood samples were collected before administration (0 h) and 0.083, 0.167, 0.25, 0.333, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 9, 24 h after administration by venous blood collection. ELISA method was used to detect the changes of KIT protein content, Ca²⁺ concentration, and ATP enzyme level at different time points in BXD group and bitter medicine group. HPLC-MS method was established for simultaneous determination of baicalin, baicalein, berberine, and palmatine in rat plasma. Winnonlin software was used to fit PK-PD model. **Results** In BXD and bitter medicine groups, the Ca²⁺ concentration was decreased and the ATP enzyme level was increased in ICC. BXD and bitter medicine containing serum had no significant effect on KIT protein. By fitting the berberine, baicalin, and palmatine of BXD group with Ca²⁺ concentration, to identify palmatine was connected to effect room with lag time three compartment-Sigmoid $I_{\max}$ PK-PD model. Berberine, baicalin were connected with lag time two compartment-Sigmoid $I_{\max}$ PK-PD model. By fitting the berberine, baicalin, palmatine of BXD group with ATP enzyme, to identify palmatine was connected to effect room with lag time three compartment-Sigmoid $E_{\max}$ PK-PD model. Berberine, baicalin were connected with lag time two compartment-Sigmoid $E_{\max}$ PK-PD model. **Conclusion** BXD and bitter medicine group in promoting gastrointestinal function may be related to the reduction of Ca²⁺ concentration and upregulation of ATP enzyme in ICC. The decreasing of Ca²⁺ concentration and increasing of ATP enzyme level

收稿日期: 2015-09-07

作者简介: 罗太敏, 研究方向为药理学。E-mail: 1029800870@qq.com

*通信作者 童荣生 E-mail: slxeyy@163.com

may be related to berberine, baicalin, and palmatine in BXD and its bitter medicine. PK and PD in BXD are superior to the bitter medicine group, which shows the advantages of full compatibility.

Key words: Banxia Xiexin Decoction; PK-PD model; ICC; KIT protein; Ca^{2+} concentration; ATP enzyme

半夏泻心汤出自医圣张仲景的《伤寒杂病论》，全方由辛开之半夏、干姜，苦降之黄芩、黄连，甘补之人参、甘草、大枣组成，具有平调寒热、消痞散结的功效，主治寒热错杂之痞证，临床上多用于治疗胃肠运动功能障碍性消化系统疾病^[1-3]。研究已证实 Cajal 间质细胞 (ICC) 与许多胃肠动力障碍性疾病有关，ICC 分布和功能的异常可能是胃肠道动力不良疾病的重要病因。因此研究半夏泻心汤与 ICC 的关系对于阐明半夏泻心汤调节胃肠动力的作用机制具有重大的意义。

Sheiner 等^[4]于 1979 年提出的药动学(PK)-药效学(PD)结合模型能较客观地阐明“血药浓度-效应-时间”之间的三维关系。将 PK-PD 结合模型应用于中药研究，对阐明中药的物质基础、作用机制及二者之间的关系具有重要意义。本课题组前期研究结果表明，半夏泻心汤有效药物组分主要为苦降药组^[5-6]。本实验在前期研究基础上，从 ICC 的角度出发，利用 PK-PD 结合模型，初步探讨半夏泻心汤全方药组及苦降药组促进胃肠动力的物质基础、部分作用机制及两者之间的关系。

1 材料

1.1 试剂与仪器

ZQ2000-LC-MS 分析仪 (美国 Waters 公司); XH-B 型旋涡混合器 (姜堰市康健医疗器具有限公司); KQ-500DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); MODEL-3 旋转蒸发器 (上海医械专机厂); 循环水真空泵 (北京中兴伟业仪器有限公司); 电子天平 PA2003 (上海天平仪器厂); Millipore 纯水仪; SW-CJ-1F1662 型超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); 相差倒置显微镜 (Germany, Leica); MCO-15A 型 CO_2 培养箱 (JAPAN, SANYO); Varioskan TM 型酶标仪 (美国 ThermoFisher); MLS-3020 型高压蒸汽灭菌锅 (日本三洋); SHHW21-600 型恒温水浴箱 (天津市泰斯特仪器有限公司)。

盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、黄芩苷、黄芩素、卡马西平对照品均购于中国食品药品检定研究院; Ca 试剂盒、ATP 酶试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; (Kit/SI/CD117) ELISA KIT 购自 Cusabio

公司。

1.2 药物

法半夏、干姜、黄芩、黄连、党参、炙甘草、大枣均为《中国药典》品种，均购于四川新荷花中药饮片有限公司，实验前由成都中医药大学药用植物学与中药鉴定教研室严铸云教授鉴定。

1.3 动物

SD 大鼠，雌雄各半，体质量 220~240 g，用于含药血清的采集; SPF 级 KM 小鼠，雌雄不拘，出生 12~15 d，用于 ICC 的分离、培养。均由成都中医药大学实验动物中心提供，生产许可证号: SCXK (川) 2008-11。

2 方法

2.1 样品制备

2.1.1 半夏泻心汤水提醇沉液的制备: 法半夏 120 g、干姜 90 g、黄芩 90 g、黄连 30 g、人参 90 g、炙甘草 90 g、大枣 40 枚，以 20 倍量水浸泡 60 min，煮沸后煎煮 40 min，过滤，再加 20 倍量水，煎煮 40 min，过滤，合并两次滤液，加 95% 食用乙醇，使含醇量达到 70%，静置 24 h，过滤，滤液回收乙醇，然后浓缩至相当于每毫升含 0.24 g 黄芩的半夏泻心汤水提醇沉液。

2.1.2 苦降药组水提醇沉液的制备: 黄芩 90 g、黄连 30 g，制备方法同 2.1.1。

2.2 分组与血样采集

将实验分为全方组与苦降药组，两组各取 90 只 SD 大鼠随机分为 15 个小组，每组 6 只，禁食不禁水 12 h，分别 ig 半夏泻心汤及苦降药组水提醇沉液，给药体积为 10 mL/kg。各组均于给药前 (0 h) 及给药后 0.083、0.167、0.25、0.333、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、9、24 h 股静脉采取全血，静置 24 h，3 500 r/min 离心 10 min，分离血清，备用。

2.3 色谱及质谱检测条件

色谱柱为 Phenomenex Gemini C₁₈ 110A (100 mm×2.00 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) -0.3% 甲酸水 (B); 梯度洗脱: 0~20 min, 20%~75% (A); 20~30 min, 75% (A); 30~35 min, 75%~20% (A); 35~40 min, 20% (A); 进样量 10 μL ; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 0.2 mL/min; ESI 正离子模式; 毛细管电

压 3.75 kV; 小檗碱、巴马汀、黄芩苷、黄芩素、卡马西平的锥孔电压分别为 39、35、29、53、33 V; 二级锥孔电压 1 V; 六级杆透镜电压 0.5 V; ESI 源温度 120 °C; 脱溶剂气温 300 °C; 脱溶剂气体积流量 750 L/h; 锥孔气体积流量 30 L/h。定量的 SIR 检测的分子离子峰为: 巴马汀 (m/z 352.31)、黄芩苷 (m/z 446.92)、小檗碱 (m/z 336.23)、黄芩素 (m/z 271.09)、卡马西平 (m/z 259.05)。

2.4 药动学研究

按照上述建立的 LC-MS 方法检测半夏泻心汤及苦降药组血清中黄芩苷、黄芩素、小檗碱、巴马汀的浓度。

2.5 ICC 的体外分离培养、鉴定

参照文献^[7-9]采用酶解法结合密度梯度离心法进行小肠 ICC 的体外分离培养, 鉴定。

2.5.1 ICC 的体外分离培养 取出生后 12~15 d 的 KM 小鼠禁食 12 h 后, 无菌的条件下, 取距离回盲部 5~8 cm 的小肠, 放入生理盐水 (青霉素-链霉素溶液 100×、两性霉素 B 0.25 mg/mL) 的培养皿中, 仔细剥离小肠系膜及血管, 用无菌注射器反复冲洗小肠内容物, 眼科剪剖开小肠, 载玻片刮除小肠黏膜层, 冲洗肌条 3~4 次, 沥干后将肌条剪碎至 1~2 mm³, 移入含 10 mL 的 II 型胶原酶溶液 (1.3 mg/mL) 的玻璃瓶中, 37°C 培养箱中消化 30 min, 期间取出吹打 1 次, 消化结束之后用 DMEM 培养基稀释消化酶, 将含细胞的滤液移入 15 mL 离心管, 1 500 r/min 离心 3 min 去上清液, 重悬细胞, 用巴氏吸管反复吹打后用 200 目筛网滤除大块组织, 将细胞悬液缓慢加入等体积小鼠淋巴细胞分离液中, 1 500 r/min 离心 5 min, 取液面交界细胞。

用 DMEM 高糖培养基 (含 15% FBS, 青霉素-链霉素溶液 100×、SCF 5 ng/mL), 将细胞浓度调整至 1×10^6 /mL, 接种到培养板内, 在 37°C, 5%CO₂ 的培养箱中培养。

细胞培养 24 h 之后首次换液, 冲去未贴壁细胞, 加入培养基继续培养, 以后 2~3 d 换液 1 次, 期间在相差倒置显微镜下观察细胞生长情况。

2.5.2 ICC 免疫荧光学鉴定 将细胞悬液接种至培养瓶内, 待细胞稳定培养后进行免疫荧光学检测。弃去培养瓶内的培养基, 50%丙酮在室温下固定 10 min, 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液 (PBS) 清洗 3 次, 每次 3 min, 10%山羊封闭血清室温下作用 30 min, 加入 c-kit 单克隆抗体 (1:100), 4°C 过夜, 再加入

羊抗大鼠 FITC 标记的二抗 (1:150), 室温作用 1 h, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min, 用 50%甘油封片; 荧光显微镜下观察细胞。

2.6 药效学指标的检测

将半夏泻心汤及苦降药组各个时间点的含药血清分别作用于 ICC, 严格按照试剂盒说明书操作, 采用 ELISA 法检测 KIT 蛋白、Ca²⁺及 ATP 酶的水平。

2.7 PK-PD 模型的建立

采用不同时间点大鼠血清中黄芩苷、黄芩素、小檗碱、巴马汀的浓度, 与相应时间点 ICC 中 KIT 蛋白水平、Ca²⁺浓度及 ATP 酶的水平, 进行 PK-PD 模型拟合。PK-PD 模型拟合采用 Winnonlin 软件进行分析。以 AIC 为主要拟合优度参数比较各模型优度, 选取最终用于联结的 PK 模型和 PD 模型。

3 结果

3.1 药动学结果

灌胃半夏泻心汤及苦降药组水提醇沉液后, 以非房室模型计算相应的药动学参数。苦降药组中黄芩苷、黄芩素、小檗碱、巴马汀在大鼠体内的 AUC_(0-∞)较半夏泻心汤均不同程度的下降, 其中, 黄芩素在大鼠体内的 AUC_(0-∞)较半夏泻心汤下降差异显著 ($P < 0.01$)。苦降药组中黄芩苷、小檗碱、巴马汀在大鼠体内的 C_{max}较半夏泻心汤均不同程度的下降, 其中小檗碱、巴马汀下降差异显著 ($P < 0.01$)。苦降药组中黄芩苷、小檗碱、巴马汀在大鼠体内的 t_{max}与半夏泻心汤相同, 黄芩素有缩短, 差异不显著。苦降药组中黄芩苷、黄芩素、巴马汀的 t_{1/2α}在大鼠体内较半夏泻心汤均不同程度的缩短, 其中黄芩素缩短差异显著 ($P < 0.01$)。见表 1。

3.2 药效学结果

给予半夏泻心汤及苦降药组含药血清后, 不同时间点 ICC 中 KIT 蛋白均有不同程度的升高趋势, 但与 0 h 比较, 差异不显著; 不同时间点 ICC 中 Ca²⁺均有不同程度的下降趋势, 与 0 h 比较, 差异显著 ($P < 0.01$); 不同时间点 ICC 中 ATP 酶均有不同程度的升高趋势, 与 0 h 比较, 差异显著 ($P < 0.05$)。通过对半夏泻心汤及其苦降药组上调 ATP 酶的各个时间点之间的比较, 发现 0.083、0.167、0.25、0.333、0.75、1、1.5、2、3、4、6、9、24 h 的 ATP 酶有显著性差异 ($P < 0.05$), 半夏泻心汤及其苦降药组对 KIT 蛋白、Ca²⁺浓度的效应各个时间点之间均无显著性的差异。结果见图 1、2。

表 1 半夏泻心汤及其苦降药组中黄芩苷、黄芩素、小檗碱、巴马汀的 PK 参数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Comparison on pharmacokinetic parameters of baicalin, baicalein, berberine, and palmatine in BXD and its bitter medicine groups ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	黄芩苷		黄芩素	
		半夏泻心汤	苦降药组	半夏泻心汤	苦降药组
$AUC_{(0-\infty)}$	$\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	5 076.843±661.18	3 065.285±411.265	313.031±44.065	115.629±15.308**
$C_{\max}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	1 027.172± 29	982.957± 58.953	54.457±13.689	58.275± 2.963
$T_{\max}$	h	0.250± 0	0.250± 0	0.792± 0.102	0.750± 0
$t_{1/2z}$	h	4.357± 0.691	4.026± 0.381	29.696± 3.617	3.749± 0.488**
参数	单位	小檗碱		巴马汀	
		半夏泻心汤	苦降药组	半夏泻心汤	苦降药组
$AUC_{(0-\infty)}$	$\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	12.604±3.228	11.089±2.816	23.289±20.439	7.671±0.673
$C_{\max}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	26.140±1.684	16.027±2.157**	14.788± 0.778	6.975±0.486**
$T_{\max}$	h	0.250±0	0.250±0	0.250± 0	0.250±0
$t_{1/2z}$	h	14.385±9.105	19.823±7.747	61.433±76.75	5.331±2.23

苦降药组与半夏泻心汤比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs BXD group

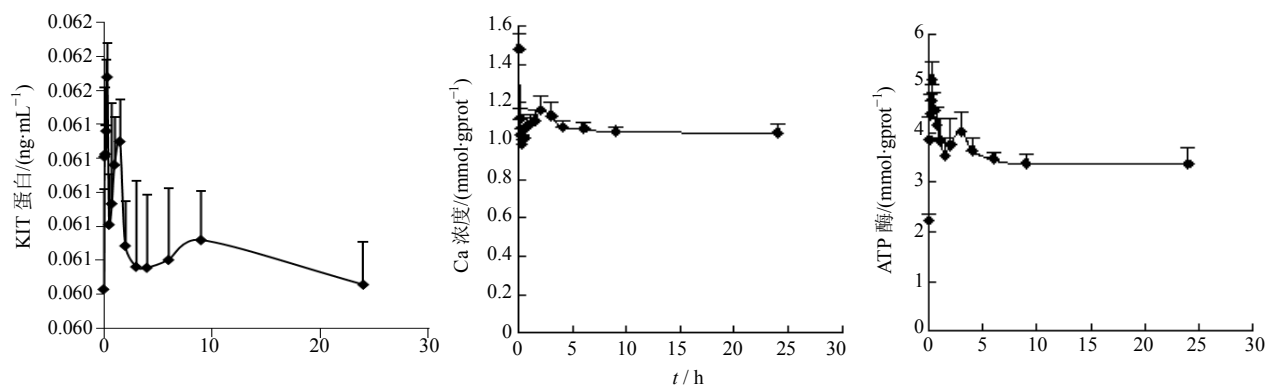


图 1 半夏泻心汤对 ICC 中 KIT 蛋白、 Ca^{2+} 浓度、ATP 酶的效应-时间曲线

Fig. 1 Effect-time curves of BXD on KIT protein, Ca^{2+} concentration, and ATP enzyme in ICC

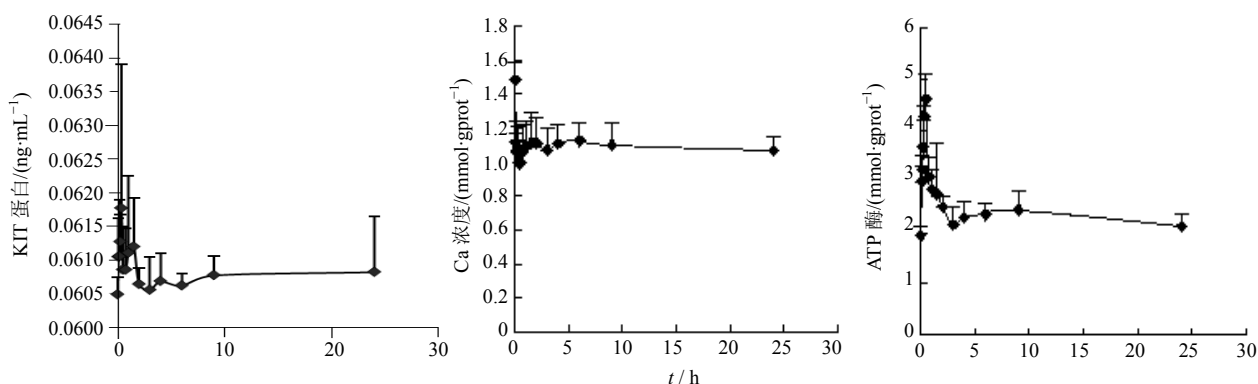


图 2 苦降药组对 ICC 中 kit 蛋白、 Ca^{2+} 浓度、ATP 酶的效应-时间曲线

Fig. 2 Effect-time curves of bitter medicine on KIT protein, Ca^{2+} concentration, and ATP enzyme in ICC

3.3 PK-PD 模型的拟合

3.3.1 半夏泻心汤组巴马汀、小檗碱、黄芩素与 Ca^{2+} 浓度的 PK-PD 模型拟合 根据 PK 及 PD 数据的拟合结果, 巴马汀选择 Sigmoid $I_{\max}$ 模型与三房室的

PK 模型进行连接, 小檗碱、黄芩素选择 Sigmoid $I_{\max}$ 模型与二房室的 PK 模型进行连接。巴马汀、小檗碱、黄芩素 PK-PD 模型的 AIC 值分别为-41.869、-45.853、-41.387; 模型拟合较优, 拟合参数见表 2。

表2 巴马汀、小檗碱、黄芩素与 Ca^{2+} 浓度 PK-PD 模型参数
Table 2 PK-PD model parameters of palmatine, berberine, and baicalcin with Ca^{2+} concentration

参数	单位	巴马汀	小檗碱	黄芩素
$I_{\max}$	$\text{mmol} \cdot \text{gprot}^{-1}$	1.479	1.261	1.478
IC_{50}	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	7.405	8.691	8.032
I_0	$\text{mmol} \cdot \text{gprot}^{-1}$	0.985	0.727	0.636
Gamma	—	1	0.079	0.009
K_{e0}	h^{-1}	1	0.002	0.001

以巴马汀、小檗碱、黄芩素血药浓度为 X 轴, 以 Ca^{2+} 浓度变化为 Y 轴, 建立血药浓度-效应曲线, 可见给药后 Ca^{2+} 浓度变化与巴马汀、小檗碱、黄芩素的浓度之间呈现出明显的滞后曲线, 结果见图 3。

3.3.2 半夏泻心汤组巴马汀、小檗碱、黄芩素与 ATP 酶的 PK-PD 模型拟合 根据 PK 及 PD 数据的拟合结果, 巴马汀选择 Sigmoid $E_{\max}$ 模型与三房室的 PK 模型进行连接, 小檗碱、黄芩素选择 Sigmoid $E_{\max}$

模型与二房室的 PK 模型进行连接。巴马汀、小檗碱、黄芩素 PK-PD 模型的 AIC 值分别为 5.707、13.027、21.283, 拟合参数见表 3。以巴马汀、小檗碱、黄芩素血药浓度为 X 轴, 以 ATP 酶变化为 Y 轴, 建立血药浓度-效应曲线, 可见给药后 ATP 酶水平变化与巴马汀、小檗碱、黄芩素的浓度之间呈现出明显的滞后曲线, 结果见图 4。

表3 巴马汀、小檗碱、黄芩素与 ATP 酶 PK-PD 模型参数
Table 3 PK-PD model parameters of palmatine, berberine, and baicalcin with ATP enzyme

参数	单位	巴马汀	小檗碱	黄芩素
$E_{\max}$	$\mu\text{molPi} \cdot \text{mgprot}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	28.186	33.946	31.136
EC_{50}	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	2.254	3.621	0.218
E_0	$\mu\text{molPi} \cdot \text{mgprot}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	2.344	2.858	2.241
Gamma	—	0.128	0.262	3.291
K_{e0}	h^{-1}	0.000	0.000	0.002

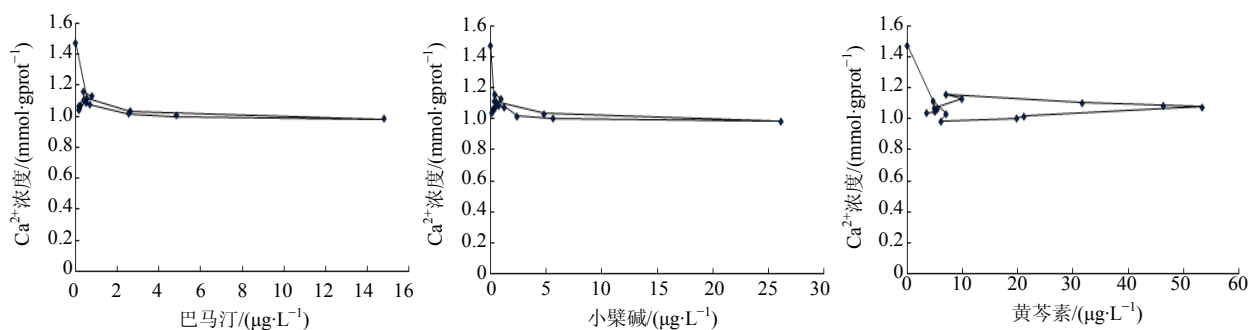


图3 半夏泻心汤组巴马汀、小檗碱、黄芩素与 Ca^{2+} 浓度的效应-浓度曲线

Fig. 3 Effect-concentration curves of palmatine, berberine, and baicalcin with Ca^{2+} concentration

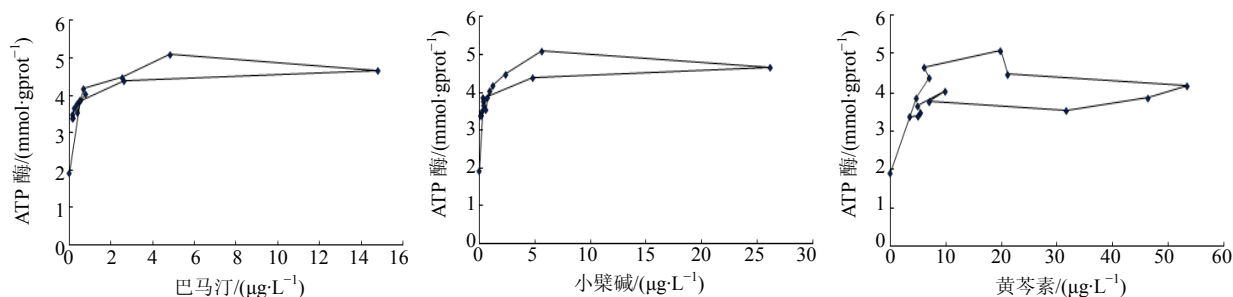


图4 半夏泻心汤组巴马汀、小檗碱、黄芩素与 ATP 酶的效应-浓度曲线

Fig. 4 Effect-concentration curve of palmatine, berberine and baicalcin with ATP enzyme

3.3.3 苦降药组巴马汀、小檗碱、黄芩素与 Ca^{2+} 浓度的 PK-PD 模型拟合 根据 PK 及 PD 数据的拟合结果, 巴马汀选择 Sigmoid $I_{\max}$ 模型与三房室的 PK 模型进行连接, 小檗碱、黄芩素选择 Sigmoid $I_{\max}$ 模型与二房室的 PK 模型进行连接。巴马汀、小檗

碱、黄芩素 PK-PD 模型的 AIC 值分别为 -25.156、-24.934、-47.660。模型拟合较优, 拟合参数见表 4。以巴马汀、小檗碱、黄芩素血药浓度为 X 轴, 以 Ca^{2+} 浓度变化为 Y 轴, 建立血药浓度-效应曲线, 可见给药后 Ca^{2+} 浓度变化与巴马汀、小檗碱、黄芩素

表4 巴马汀、小檗碱、黄芩素与 Ca^{2+} 浓度 PK-PD 模型参数

Table 4 PK-PD model parameters of palmatine, berberine, and baicalein with Ca^{2+} concentration

参数	单位	巴马汀	小檗碱	黄芩素
$I_{\max}$	$\text{mmol} \cdot \text{gprot}^{-1}$	1.272	1.271	1.480
IC_{50}	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	4.675	5.533	0.019
I_0	$\text{mmol} \cdot \text{gprot}^{-1}$	0.265	0.315	0.025
Gamma	—	0.206	0.126	0.421
K_{e0}	h^{-1}	0.004	0.023	0.000

的浓度之间呈现出明显的滞后曲线, 结果见图5。

3.3.4 苦降药组巴马汀、小檗碱、黄芩素与 ATP 酶

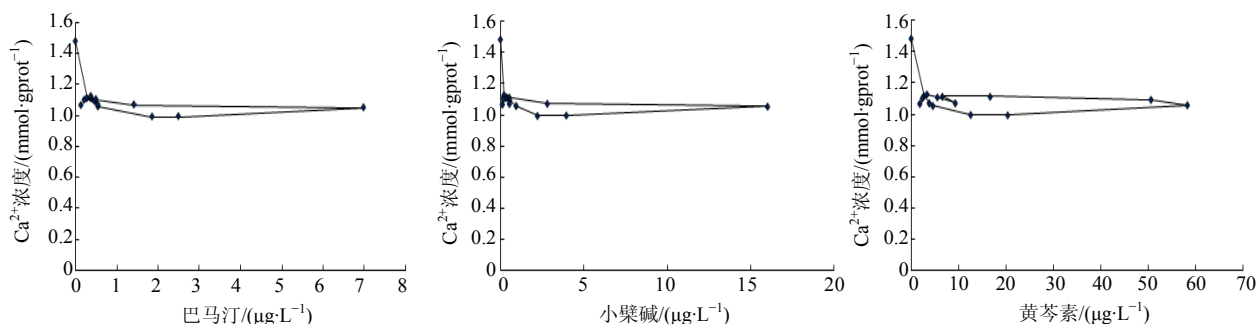


图5 苦降药组巴马汀、小檗碱、黄芩素与 Ca^{2+} 浓度的效应-浓度曲线

Fig. 5 Effect-concentration curves of palmatine, berberine, and baicalein with Ca^{2+} concentration

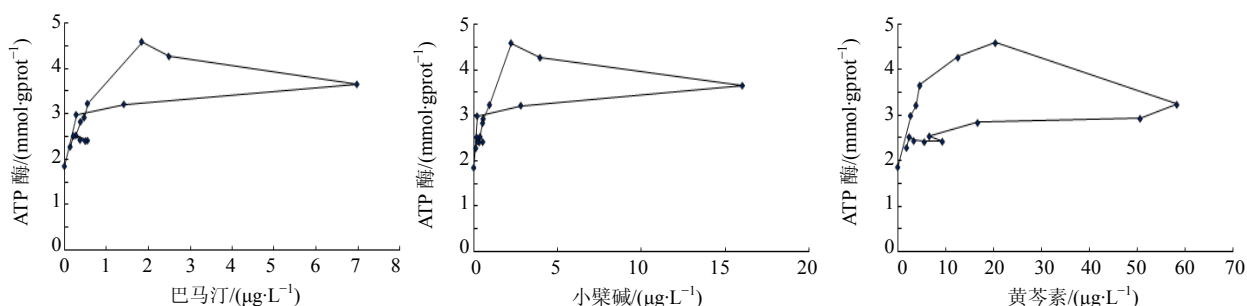


图6 苦降药组巴马汀、小檗碱、黄芩素与 ATP 酶的效应-浓度曲线

Fig. 6 Effect-concentration curves of palmatine, berberine, and baicalein with ATP enzyme

表5 巴马汀、小檗碱、黄芩素与 ATP 酶 PK-PD 模型参数

Table 5 PK-PD model parameters of palmatine, berberine, and baicalein with ATP enzyme

参数	单位	巴马汀	小檗碱	黄芩素
$E_{\max}$	$\mu\text{molPi} \cdot \text{mgprot}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	4.432	4.737	3.470
EC_{50}	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	0.157	0.056	0.002
E_0	$\mu\text{molPi} \cdot \text{mgprot}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	2.501	2.381	1.904
Gamma	—	156.932	3.889	11.692
K_{e0}	h^{-1}	0.064	0.023	0.000

4 讨论

半夏泻心汤出自《伤寒论》,系汉代张仲景的名方,现代医学主要用于治疗胃肠动力障碍性疾病,如反流性食管炎、胃炎,慢性胃炎合并胃、十二指

肠溃疡,功能性消化不良等,且疗效确切。ICC 是胃肠电节律活动产生的基础,是慢波的起搏点,有传递电兴奋和调节神经递质生物作用。国内外研究发现,ICC 的减少或功能改变可能是导致糖尿病胃轻瘫的原因之一^[10]。Streutker 认为 ICC 缺失是假性肠梗阻发生的原因^[11]。Jain 等^[12]发现慢性假性肠梗阻患者小肠壁 c-kit 阳性 ICC 消失。目前研究发现慢传输型便秘患者结肠 ICC 数量减少,其网络结构也被破坏;乙状结肠 c-kit mRNA 表达和 KIT 蛋白表达均明显降低^[13]。因此,ICC 作为胃肠动力研究的靶细胞具有重要意义,通过体外培养原代 ICC,可以更好排除体内神经体液因素的干扰,且实验因素可控,影响因素单一,可最大程度保持 ICC 原有

肠溃疡,功能性消化不良等,且疗效确切。ICC 是胃肠电节律活动产生的基础,是慢波的起搏点,有传递电兴奋和调节神经递质生物作用。国内外研究发现,ICC 的减少或功能改变可能是导致糖尿病胃轻瘫的原因之一^[10]。Streutker 认为 ICC 缺失是假性肠梗阻发生的原因^[11]。Jain 等^[12]发现慢性假性肠梗阻患者小肠壁 c-kit 阳性 ICC 消失。目前研究发现慢传输型便秘患者结肠 ICC 数量减少,其网络结构也被破坏;乙状结肠 c-kit mRNA 表达和 KIT 蛋白表达均明显降低^[13]。因此,ICC 作为胃肠动力研究的靶细胞具有重要意义,通过体外培养原代 ICC,可以更好排除体内神经体液因素的干扰,且实验因素可控,影响因素单一,可最大程度保持 ICC 原有

特性,是研究细胞功能以及相应细胞信号转导机制的基础。

药动学结果显示,苦降药组中黄芩苷、黄芩素、小檗碱、巴马汀在大鼠体内的 $AUC_{(0-\infty)}$ 较半夏泻心汤均不同程度的下降,苦降药组中黄芩苷、小檗碱、巴马汀在大鼠体内的 C_{max} 较半夏泻心汤均不同程度的下降,苦降药组中黄芩苷、黄芩素、巴马汀的 $t_{1/2z}$ 在大鼠体内较半夏泻心汤均不同程度的缩短。结果表明,半夏泻心汤中黄芩苷、黄芩素、小檗碱、巴马汀在正常大鼠体内的代谢与苦降药组比较,体现出全方的配伍优势。

在本实验中,在给予半夏泻心汤及苦降药组含药血清后,不同时间 ICC 中 KIT 蛋白差异无统计学意义。结果表明,在正常的胃肠动力情况下,半夏泻心汤及苦降药组对 ICC 中 KIT 蛋白的水平无显著影响。在给予半夏泻心汤及苦降药组含药血清后,监测到 ICC 细胞内 Ca^{2+} 浓度降低,提示在给予半夏泻心汤及苦降药组血清后,细胞内 Ca^{2+} 浓度降低从而通过抑制 ICC 钙超载,一方面抑制细胞损伤和凋亡,另一方面通过促进 ICC 起搏电流的产生和向平滑肌细胞传递信号,从而防治胃肠运动障碍。在给予半夏泻心汤及苦降药组含药血清后,均能上调 ICC 中 ATP 酶的水平,提示在给予半夏泻心汤及苦降药组含药血清后,ICC 中 ATP 酶水平升高,通过促进 ICC 能量代谢,进而调节细胞内外各种离子的变化及细胞信号传递的过程,从而调节胃肠运动。

在本实验中,通过对半夏泻心汤及苦降药组数据进行 PK、PD 拟合,显示黄芩苷 PK 模型 1、2、3 房室各权重有无滞后时间均拟合极差,原因可能是药时曲线有较明显的三峰现象,无法应用常见的房室模型进行计算,可能需要根据此化合物的动力学特性,采用肝肠循环或双吸收部位模型进行拟合。PD 实验结果表明,半夏泻心汤及苦降药组含药血清对 ICC 的 KIT 蛋白表达无明显影响,因此 KIT 蛋白可能不适合进行 PK-PD 模型拟合。根据 PK-PD 模型拟合得到的浓度-效应曲线,可以解释半夏泻心汤调节 ATP 酶及 Ca^{2+} 浓度的作用滞后于血药浓度的现象,这种滞后现象可能与药物分布、合成新活性物质、表达新的基因需要一定的时间有关^[34]。在本实验中,半夏泻心汤中巴马汀、小檗碱、黄芩素对

Ca^{2+} 浓度效应的 I_{max} 和苦降药组的 I_{max} 相差不大,但半夏泻心汤中巴马汀、小檗碱、黄芩素对 ATP 酶效应的 E_{max} 远大于苦降药组的 E_{max} ,提示半夏泻心汤上调 ATP 酶的效应优于苦降药组,体现全方配伍优势。

参考文献

- [1] 清·柯琴. 伤寒来苏集 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2006: 256.
- [2] 桂林罗哲初手抄. 桂林古本伤寒杂病论 (第2版) [M]. 南宁: 广西人民出版社, 1980: 82.
- [3] 金·成无己. 伤寒明理论 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1980: 62.
- [4] Sheiner L B, Stanski D R, Vozeh S, *et al.* Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamics application to dtubocurarine [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1979, 25(3): 358-371.
- [5] 徐菲飞, 李晋奇, 肖开春, 等. 半夏泻心汤调节胃肠动力的物质基础研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(3): 160-163.
- [6] 李晋奇, 童荣生, 肖开春, 等. 半夏泻心汤促进胃肠运动的有效部位筛选研究 [J]. 实用医院临床杂志, 2013, 10(6): 29-31.
- [7] Koh S D, Sanders K M, Ward S M. Spontaneous electrical rhythmicity incultured interstitial cells of cajal from the murine small intestine [J]. *J Physiol*, 1998, 513(1): 203-213.
- [8] 李春穴, 童卫东, 刘宝华, 等. Cajal 间质细胞的分离、培养方法探讨 [J]. 消化外科, 2004, 3(4): 267-269.
- [9] 刘勇, 齐清会. 大鼠胃 Cajal 间质细胞的分离和培养 [J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(4): 495-498.
- [10] 朱金照, 许其增. Cajal 间质细胞在胃肠动力疾病中的作用 [J]. 医学研究生学报, 2004, 17(6): 562-564.
- [11] Streutker C J, Huizinga J D, Campbell F. Loss of CD117 (c-kit) and CD34-positive ICC and associated CD34-positive fibroblasts defines a subpopulation of chronic intestinal pseudo-obstruction [J]. *Am J Surg Pathol*, 2003, 27(2): 228-235.
- [12] Jain D, Moussa K, Tandon M, *et al.* Role of interstitial cells of Cajal in motility disorders of the bowel [J]. *Am J Gastroenterol*, 2003, 98(3): 618-624.
- [13] 莫平, 童卫东, 崔明, 慢传输性便秘患者全结肠 Cajal 间质细胞的分布 [J]. 中华普通外科杂志, 2009, 24(3): 251-252.