

基于糖尿病肾病大鼠模型黄芪六一汤药效组分的PK-PD结合模型的建立

唐甜甜¹, 刘文^{1*}, 王群¹, 韩伟¹, 王洪鑫¹, 李和蓉², 张环²

1. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550025

2. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550025

摘要: 目的 建立黄芪六一汤药效组分(黄芪总皂苷、黄芪总黄酮、黄芪多糖、甘草酸组成, HLDC)抗糖尿病肾病的药动学(PK)-药效动力学(PD)结合模型, 阐明HLDC成分在糖尿病肾病大鼠体内的动态变化及与药效消长之间的相互关系。方法 采用高脂高糖饲料及尾iv链脲佐菌素(33 mg·kg⁻¹)方法建立糖尿病肾病大鼠模型。单次或多次ig HLDC(1.320 g·kg⁻¹)后, 采用HPLC-MS/MS测定不同时间点血浆中黄芪甲苷、芒柄花苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮和甘草酸6个入血原型成分的含量, 并采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测不同时间点血样中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血管内皮生长因子(VEGF)、白细胞介素-18(IL-18)等炎症因子水平, 获得时效曲线。并利用WinNonlin 8.2软件房室模型分析法拟合各成分的PK参数, 固定PK, 对时效关系进行拟合, 得到PD; 根据PD参数建立HLDC的PK-PD模型。结果 药动学结果显示, 与单次给药相比, 除了毛蕊异黄酮葡萄糖苷外, 多次给药后模型大鼠的各成分的达峰时间(t_{max})均提前; 各成分的 $t_{1/2}$ 均延后; 除了甘草酸、毛蕊异黄酮外, 各成分的AUC均升高。药效学结果显示, 药物质量浓度逐渐降低的同时, 药物的抑制作用先增大后减小, 除了单次给药组中的黄芪甲苷, TNF- α 、VEGF、IL-18的药物效应 t_{max} 均较血药浓度 t_{max} 长, 存在滞后效应。PK-PD结合模型显示, 单次及多次给药HLDC中6个成分的血药浓度与其药效数据均能较好地拟合。可通过黄芪甲苷等6个成分的血药浓度计算相应的药效值, 也可以根据药效值计算相应的血药浓度。结论 PK-PD模型构建结果符合Sigmoid-Emax模型, TNF- α 、VEGF、IL-18等炎症因子水平与HLDC中的黄芪甲苷等6个成分血药浓度有良好的相关性。HLDC活性成分发挥防治糖尿病肾病、显著改善肾功能的作用, 可能与抑制TNF- α 、VEGF、IL-18等炎症因子的分泌有关。

关键词: 黄芪六一汤组分; 糖尿病肾病; 药动学(PK)-药效动力学(PD); 黄芪甲苷; 炎症因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2024)08-1804-16

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.08.014

Establishment of PK-PD combination model of effective components of Huangqi Liuyi Decoction based on a diabetic nephropathy rat model

TANG Tiantian¹, LIU Wen¹, WANG Qun¹, HAN Wei¹, WANG Hongxin¹, LI Herong², ZHANG Huan²

1. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective The PK-PD binding model of effective component (total astragaloside, total flavonoids of astragalus, astragalus polysaccharide, and glycyrrhizic acid, HLDC) of Huangqi Liuyi Decoction against diabetic nephropathy was established, and the dynamic changes of HLDC component in diabetic nephropathy rats and the relationship between HLDC component and drug effect were clarified. **Methods** The rat model of diabetic nephropathy was established by high-fat and high-sugar feed and streptozotocin (33 mg·kg⁻¹) injected into the tail vein. After single or multiple oral administrations of HLDC (1.320 g·kg⁻¹), the plasma contents of astragaloside IV, ononin, formononetin, calycosin-7-O-beta-D-glucoside, calycosin and glycyrrhizic acid were determined by HPLC-MS/MS at different time points, and tumor necrosis factor- α (TNF- α), vascular endothelial growth factor (VEGF) and interleukin were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The pharmacokinetic (PK) parameters of each component were

收稿日期: 2024-03-25

基金项目: 贵州省卫生健康委科学技术基金项目(黔卫健函(2024)24号); 贵州省科技计划项目(黔科合基础-ZK[2023]一般416); 2023年度贵州中医药大学学术新苗项目(贵科合学术新苗[2023]-13号)

第一作者: 唐甜甜(1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药及民族药药物制剂及新剂型。E-mail: 2827875710@qq.com

*通信作者: 刘文, 教授, 博士生导师, 研究方向为药物新剂型与新技术。E-mail: liuwen16258@126.com

fitted by using WinNonlin 8.2 software, and the aging relationship was fitted to get PD. The PK-PD model of HLDC is established according to PD parameters. **Results** The results of pharmacokinetics showed that compared with a single administration, the $t_{\max}$ of each component of the model rats was advanced after repeated administration except calycosin-7-*O*-beta-*D*-glucoside. $T_{1/2}$ of each component was delayed. Except glycyrrhizic acid and calycosin, the AUC of all components increased. The pharmacodynamic results showed that the inhibitory effect of the drug increased first and then decreased while the drug concentration gradually decreased. Except for astragaloside IV, TNF- α , VEGF, and IL-18 in the single-dose group, the peak time of the drug effect was longer than that in the blood concentration, and there was a lag effect. PK-PD binding model showed that the blood concentration of six components in single and multiple doses of HLDC and their pharmacodynamic data could be well fitted. The corresponding drug effect value can be calculated by the blood concentration of six components such as astragaloside IV, and the corresponding blood concentration can also be calculated according to the drug effect value. **Conclusion** The results of the PK-PD model are by the Sigmoid-Emax model, and the levels of inflammatory factors such as TNF- α , VEGF, and IL-18 have a good correlation with the concentrations of six blood component drugs such as astragaloside IV in HLDC. The active components of HLDC play a role in preventing and treating diabetic nephropathy and significantly improving renal function, which may be related to inhibiting the secretion of inflammatory factors such as TNF- α , VEGF, and IL-18.

Key words: Huangqi Liuyi Decoction components; diabetic nephropathy; pharmacokinetics (PK) -pharmacokinetics (PD); astragaloside IV; inflammatory factor

糖尿病肾病是糖尿病常见的微血管并发症,临床表现为持续性水肿、蛋白尿、高血压、肾功能下降等,有30%~40%的糖尿病患者会出现糖尿病肾病,最终导致末期肾衰竭,早期诊断和治疗糖尿病肾病具有十分重大的意义^[1-4]。中药治疗糖尿病肾病已有上千年的历史,在改善糖尿病肾病客观指标及远期疗效方面都显示了其独特优势^[5-6]。黄芪六一汤始载于《太平惠民和剂局方》,由黄芪与甘草(6:1)组成,具有补益肺气、化生津液、滋养肾水的功效。黄芪能抑制肾间质纤维化形成,降低糖尿病肾病大鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-18(IL-18)、血管内皮生长因子(VEGF)水平,具有减缓糖尿病肾病发展进程的功效^[7-9];甘草可通过降糖、调脂及抗肾脏氧化应激等作用,起到防治糖尿病肾病的功效^[10]。有研究发现,黄芪六一汤具有降低糖尿病大鼠空腹血糖和糖化血红蛋白、抑制肾纤维化病变的作用^[11],临床应用前景广阔。但中药药效物质不明、作用机制不清、质量难以控制等问题,严重阻碍了其深层次研究及新药开发。

本课题组前期研究发现,由黄芪六一汤提取、分离出来的黄芪总皂苷、黄芪总黄酮、黄芪多糖、甘草酸所组成的黄芪六一汤组分(components of Huangqi Liuyi Decoction, HLDC)具有防治糖尿病肾病、显著改善肾功能的作用;并鉴定出HLDC中6个主要原型入血成分(黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、芒柄花苷、甘草酸),这6个成分可能是HLDC的主要活性成分^[12-15]。本实验开展HLDC在疾病模型状态下的药动学(PK)-药效

学(PD)结合模型研究,探讨HLDC活性成分在体内的动态变化及其与药效消长之间的关系,准确地评价HLDC在体内的动态变化和产生药效作用的实质,为阐明HLDC在体内发挥药效作用的物质基础和作用机制提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

AB5500液相色谱-质谱联用仪(美国ABSCIEX公司);AE240十万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);EL204万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);MTN-2800D氮吹浓缩装置(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);1530型酶标仪(赛默飞世尔科技公司);ZL-10TD冷冻干燥机(上海左乐仪器有限公司);移液枪(德国Eppendorf公司);Allegra64R低温高速离心机(美国BeckmanCoulter公司);KQ-300DE超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);VX-III型涡旋振荡器(北京藤锦医药科技有限公司);IMS-20制冰机(常熟市雪科电器有限公司);DW-86L626型-80℃超低温冰箱(青岛海尔特种电器有限公司);WP-UP-WF-30沃特浦超纯水仪(四川沃特水处理设备有限公司)。

1.2 药品与主要试剂

黄芪(批号170805、170823、170901)、甘草(批号170805、170823、170901),四川盛世锦荣药业有限公司。黄芪、甘草经贵州中医药大学谢军丽讲师鉴定分别为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根、豆科植物甘草 *Glyc-*

yrhiza uralensis Fisch. 干燥根和根茎。

黄芪甲苷(批号 C11965693, 质量分数 $\geq 98\%$)购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号 SC8050, 质量分数 $\geq 98\%$)、毛蕊异黄酮(批号 SC8040, 质量分数 $\geq 98\%$)、芒柄花苷(批号 SO8050, 质量分数 $\geq 98\%$)、芒柄花素(批号 SF8070, 质量分数 $\geq 98\%$)、甘草酸(批号 SG8070, 质量分数 $\geq 98\%$)均购自索莱宝生物科技有限公司; 葛根素(批号 SC8050, 质量分数 $\geq 98\%$)购自阿拉丁试剂有限公司; 4% 多聚甲醛(批号 23179318)购自 Biosharp 生物科技有限公司; TNF- α 、VEGF、IL-18 ELISA 试剂盒均购自江苏晶美生物科技有限公司; 链脲佐菌素(STZ, 批号 2230520002)购自索莱宝生物有限公司; 甲酸(美国 DIKMA 科技有限公司)、乙腈(美国 TEDIA 有限公司)、甲醇(美国 TEDIA 有限公司), 水为屈臣氏蒸馏水(广州屈臣氏食品有限公司), 其余试剂为分析纯。

1.3 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只, 体质量(300 $\pm$ 20)g, 购自长沙市天勤生物技术有限公司, 实验动物生产许可证号为 SCXK(湘)2022-0011。本研究动物实验方案通过贵州中医药大学动物伦理委员会的审查(编号 20230190), 研究中的动物实验严格按照批准的研究方案开展。大鼠饲养于通风良好, 温度 20~25 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50%~60% 环境下, 并进行 12 h 明暗循环, 按每笼 4 只分装, 由专人饲养管理, 自由饮水及饲料, 实验操作和处理严格遵循国际准则。

2 方法

2.1 HPLC-MS/MS 分析方法

2.1.1 色谱条件 色谱柱 ACQUITY HPLC BEH C_{18} (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm , Ireland), 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 体积流量 0.3 mL $\cdot\text{min}^{-1}$, 流动相为 A(水, 0.1% 甲酸水溶液)和 B(乙腈), 梯度洗脱: 0~0.5 min, 90% A; 0.5~1.5 min, 90% $\rightarrow$ 70% A; 1.5~3.0 min, 70% $\rightarrow$ 35% A; 3.0~5.0 min, 35% $\rightarrow$ 10% A; 5.0~6.5 min, 10% A; 6.5~7.0 min, 10% $\rightarrow$ 90% A; 7~8 min, 90% A。SCIEX 工作站, 正离子模式检测黄芪甲苷、芒柄花苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、甘草酸、葛根素(内标物)。

2.1.2 质谱条件 高效液相色谱-四级杆线性离子阱质谱联用仪(SCIEX QTRAP5500, Analyst Software 工作站), 电喷雾电离源(TurboIon Spray TM source), 扫描方式为多反应监测(MRM), 离子喷雾电压: 5.5 kV(正离子监测模式), 离子源温度:

550 $^{\circ}\text{C}$, 雾化气体: 氮气、379.21 kPa, Turbo Gas: 氮气、379.21 kPa, 气帘气体: 氮气、241.31 kPa。质谱数据采集及处理软件为 ABSCIEX 工作站。黄芪甲苷等 6 个指标成分及内标成分用于定量分析的监测离子见表 1。

表 1 HPLC-MS/MS 质谱条件参数

Table 1 Optimized mass parameters for HPLC-MS/MS

成分	Q1 Mass	MRM Transtion	裂解电压/V	碰撞电压/V
黄芪甲苷	807.4	807.2/624.5	168	67
芒柄花苷	431.1	431.1/269.1	81	19
芒柄花素	269.1	253.0/197.1	155	38
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	447.1	285.2/270.1	109	29
毛蕊异黄酮	285.5	225.1/137.2	151	37
甘草酸	824.4	648.4/454.4	160	23
葛根素	417.1	297.1/267.1	110	35

2.2 药物及主要溶液的制备

2.2.1 HLDC 的制备 据本课题组前期确定的 HLDC 制备工艺^[13], 运用大孔吸附树脂对黄芪总皂苷、总黄酮进行富集分离; 运用碱液萃取法对甘草酸进行分离, 采用水提醇沉法对黄芪多糖进行纯化。最终制得各提取物: 黄芪总皂苷(质量分数 72.15%, 其中含黄芪甲苷 2.75%)、黄芪总黄酮(质量分数 72.08%, 其中含毛蕊异黄酮葡萄糖苷 1.65%、毛蕊异黄酮 1.32%、芒柄花苷 0.89%、芒柄花素 0.31%)、黄芪多糖(质量分数 68.12%)、甘草酸(质量分数 81.09%), HLDC 按各成分在原方黄芪六一汤中的比例(3.6:1.4:8.7:1), 取适量混合均匀而成。

2.2.2 0.1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液的配制 A 液: 2.1 g 柠檬酸, 加入双蒸水配制 100 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用; B 液: 2.94 g 柠檬酸钠, 加入双蒸水配制 100 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用; A 液与 B 液 1:1(1:1.32) 混合, pH 计测定 pH 值: 4.2~4.5, 使用 0.22 μm 过滤器滤过, 现用现配。

2.2.3 STZ 溶液的制备 STZ 溶液配制方法: STZ 溶于 0.1 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 4.2) 柠檬酸-柠檬酸钠无菌缓冲液, 配制成 1% 的 STZ 溶液。STZ 在称取过程中注意避光, 且溶解后避免温度过高, 30 min 内注射完毕, 在避光冰浴环境下操作。

2.2.4 内标溶液及对照品溶液的制备 精密称取葛根素对照品适量至 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 得葛根素储备液, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 备用。精密称取黄芪甲苷、芒柄花苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮葡萄糖

糖苷、毛蕊异黄酮、甘草酸对照品适量至10 mL量瓶中,用甲醇定容,得黄芪甲苷、芒柄花苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、甘草酸对照品储备液。置于-20℃冰箱保存,备用。

2.2.5 肝素钠溶液的制备 精密称取0.05 g肝素钠粉末,用0.9%氯化钠溶液溶解、并定容至5 mL,摇匀,4℃保存。

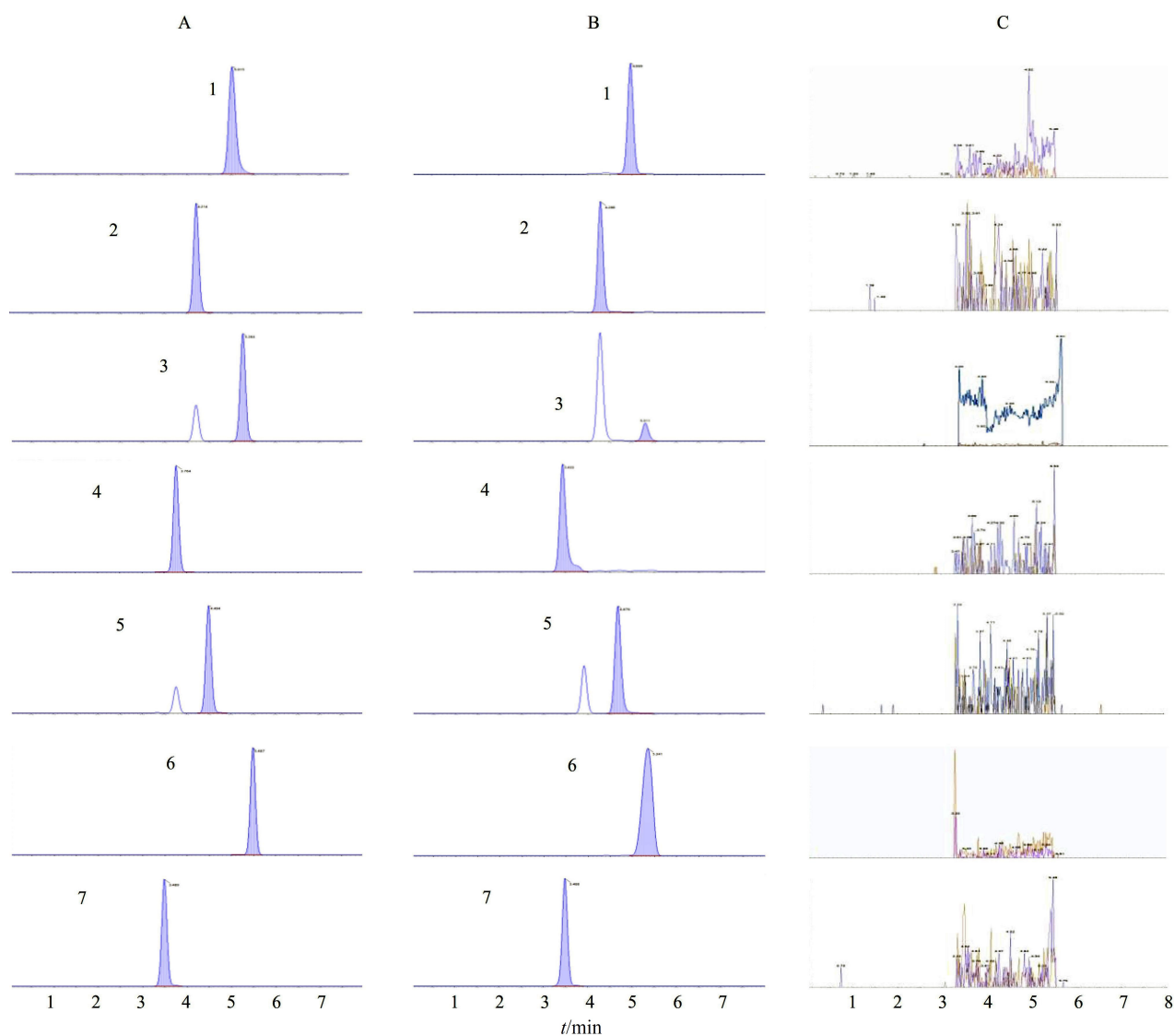
2.2.6 血浆样品处理 取100 μL血浆,置1.5 mL EP管中,补加甲醇50 μL,依次加入1%甲酸水50 μL、20 μL的内标溶液(葛根素625 ng·mL⁻¹),涡混,400 μL甲醇沉淀蛋白,涡旋5 min,60 kHz超声5 min,4℃、10 000 r·min⁻¹离心10 min,转移上清液,用氮吹仪在40℃下吹干。残渣用250 μL的

初始流动相超声溶解,4℃、10 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液HPLC-MS/MS进样分析。

2.3 方法学考察

根据《中国药典》2020年版四部“生物样品定量分析方法验证指导原则”,对大鼠ig给予HLDC后血浆中6个成分的定量测定方法的专属性、线性、准确度、精密度、回收率、基质效应和稳定性进行考察。

2.3.1 专属性 将黄芪甲苷、芒柄花苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、甘草酸对照品与葛根素内标溶液加入空白血浆中,按“2.2.6”项下方法处理,测定得色谱图图1-A;取大鼠给药30 min后的血浆样品,依法操作得相应色谱图图1-B;取大



1-黄芪甲苷;2-芒柄花苷;3-芒柄花素;4-毛蕊异黄酮葡萄糖苷;5-毛蕊异黄酮;6-甘草酸;7-葛根素(内标)。
1-astragaloside IV; 2-ononin; 3-formononetin; 4-calycosin-7-O-β-D-glucoside; 5-calycosin; 6-glycyrrhizic acid; 7-puerarin (internal standard).

图1 混合对照品溶液(A)、供试品溶液(B)、空白血浆(C)色谱图

Fig. 1 Chromatogram of mixed reference solution (A), test solution (B), and blank plasma (C)

鼠空白血浆,依法操作得相应色谱图图1-C。血浆中没有物质干扰待测物和内标的测定,专属性良好。

2.3.2 最低定量限和线性范围 取100 μL 大鼠空白血浆,加入50 μL 混合对照品溶液。按“2.2.6项”

下血浆样品处理方法进行前处理,以对照品浓度为横坐标,对照品与内标的峰面积比值为纵坐标,用加权最小二乘法作线性回归运算,其中各成分的最低定量限(LLOQ)为线性范围最低值。所得标准曲线见表2,结果显示各成分在测定范围内线性关系良好。

表2 6种成分的标准曲线及线性范围

Table 2 Calibration curve and LOQ of six components in mouse plasma

成分	线性方程	r^2	线性范围/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LLOQ/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
黄芪甲苷	$Y=0.0011X+0.0665$	0.9997	2.58~725.00	2.58
芒柄花苷	$Y=0.1085X+0.0088$	0.9995	0.15~45.15	0.15
芒柄花素	$Y=0.0600X+0.0529$	0.9994	0.02~58.25	0.02
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y=0.0345X+0.0114$	0.9992	0.05~81.45	0.05
毛蕊异黄酮	$Y=0.0104X+0.0063$	0.9992	0.25~62.80	0.25
甘草酸	$Y=0.0016X+0.0399$	0.9991	4.07~2865.00	4.07

2.3.3 精密度和准确度试验 取4种质量浓度的含黄芪甲苷(2.58、5.12、207.24、414.58 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、芒柄花苷(0.15、0.20、2.19、4.38 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、芒柄花素(0.02、0.05、4.89、9.78 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(0.05、0.15、9.22、18.43 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、毛蕊异黄酮(0.25、0.50、13.70、27.40 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、甘草酸(4.07、35.57、1273.00、2546.00 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)的血浆样品,按“2.2.6项”下血浆样品处理方法处理,每个样品日内连续进样3次,测定日内精密度,4种不同浓度样品连续测定3d,测定日间精密度。6个成分的日内和日间精密度RSD小于15.0%,准确度在85.89%~117.05%,该方法精确度与准确度良好。

2.3.4 基质效应和提取回收率 取100 μL 大鼠空白血浆,加入4种质量浓度(同“2.3.3项”)的含6个成分的混合对照品与内标溶液,按“2.2.6项”下血浆样品处理方法处理,分析峰面积得A;另取100 μL 大鼠空白血浆,除不加混合对照品溶液外,其他按“2.2.6项”下血浆样品处理方法处理,在离心后获得的上清液中加入4种质量浓度的混合对照品和内标溶液,氮气吹干,残留物以初始流动相150 μL 溶解,分析峰面积得B;另取上述4种浓度的混合对照品与内标溶液,氮气吹干,残留物以初始流动相150 μL 溶解,分析峰面积得C。计算提取回收率(A/B)、基质效应(B/C)。

6个成分的提取回收率为88.45%~111.68%,基质效应为86.53%~112.47%,提示该方法提取回收率良好,无明显基质效应,符合生物样品分析方法的要求。

2.3.5 稳定性的考察 取4种质量浓度的6个成分

的血浆样品。分别在室温(约25 $^{\circ}\text{C}$)下放置24h,冷冻(-20 $^{\circ}\text{C}$)48h和反复冻融3次后,按“2.2.6项”下血浆样品处理方法处理,进行HPLC-MS/MS分析。RSD值均小于15.0%,表明6个成分血样在3种条件下均具有良好的稳定性,符合生物样品分析方法要求。

2.4 糖尿病肾病大鼠模型的建立及评价

实验前30只雄性SD大鼠适应性喂养1周,期间自由进食和饮水^[16]。按照随机抽样的方法抽取对照组大鼠6只,余下大鼠用于造模。对照组大鼠给予常规基础饲料,造模组给予高糖高脂饲料喂养4周后[体质量为(300 $\pm$ 20)g],禁食不断水12h,麻醉后一次性快速尾iv STZ(33 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,注射前用柠檬酸缓冲液配制)^[17-18],对照组大鼠按同样操作iv相应体积的柠檬酸缓冲液。72h后随机眼眶采血,测定空腹血糖(FBG),以 $\text{FBG}\geq 11.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为糖尿病造模成功。模型组持续高脂高糖饲料喂养,同时随机监测大鼠血糖,7d后检测24h尿蛋白定量(24h U-Alb),当24h U-Alb $\geq 30\text{ mg}$,即为糖尿病肾病大鼠模型构建成功^[19-20]。眼眶取血0.5 mL,置于含肝素钠的EP管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 、3000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min分离血浆,采用全自动生化分析仪,按照试剂盒说明书检测对照及模型大鼠血浆中肾功能相关指标:血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),按照尿蛋白定量测试盒说明书操作测定24h U-Alb,并以酶联免疫吸附法(ELISA)测定对照及模型大鼠血浆中炎症因子水平(TNF- α 、VEGF、IL-18)。

2.5 HLDC 单次、多次给药后 6 个成分在糖尿病肾病模型大鼠体内的 PK 研究

将造模成功的大鼠依据随机数字法分为模型组、HLDC 单次给药组、HLDC 多次给药组, 每组 6 只, 以黄芪六一汤临床生药用量(黄芪 60 g、甘草 10 g)的 8 倍剂量($1.320\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)换算本实验的给药剂量。HLDC 单次给药组 ig 1 次, HLDC 多次给药组连续 ig 3 d, 每天 1 次。实验前均禁食不禁水 12 h, 于给药 0 min, 给药后 10、30 min 及 1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、24.0、48.0 h 时眼眶取血 0.5 mL, 置于含肝素钠的 EP 管中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 分离血浆, 取血浆 100 μL 用于药动学实验、150 μL 用于后续药效学实验, 于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 直至分析。PK 研究: 按“2.2.6”项血浆样品处理方法制备, 取上清液, 进样分析。

2.6 HLDC 单次、多次给药后 6 个成分在糖尿病肾病模型大鼠体内的 PD 研究

ELISA 法测定不同时间点单次给药组和多次给药组血浆样品中 TNF- α 、VEGF、IL-18 水平, 结合血药浓度数据, 分别以 TNF- α 、VEGF、IL-18 为药效指标, 分别把 HLDC 中黄芪甲苷、芒柄花苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮和甘草酸 6 个成分的血药浓度-时间-效应数据导入 WinNonlin 8.2 (Phoenix, 美国 Pharsight 公司) 软件中, 采用 XYPlot 工具获取血药浓度-时间-效应曲线图。

2.7 HLDC 中 6 个成分在效应室浓度的拟合

将 HLDC 中 6 个成分的单次、多次给药组血药浓度-时间数据导入 WinNonLin 软件, 采用 Seicompartmental modeling 工具对血药浓度-时间进行拟合, 获得 6 个成分在效应室的浓度-时间数据, 然后分别以 TNF- α 、VEGF、IL-18 为药效指标, 绘制效应室浓度-效应曲线。

2.8 HLDC 中 6 个成分 PK-PD 结合模型的建立

采用 WinNonlin8.2 软件, 以 6 种成分质量浓度

为 PK 指标, 以 TNF- α 、VEGF、IL-18 3 种细胞因子水平为 PD 指标, 通过将 PK 参数固定, 用 PK/Emax Model 对时间-效应关系进行拟合, 从而获得 HLDC 中 6 个活性成分的 PK-PD 结合模型的参数, 建立 PK-PD 结合模型, 将所得参数代入 PK-PD 模型, 即得单次及多次 HLDC 给药后 6 个成分的血药浓度与效应(TNF- α 、VEGF、IL-18)之间的定量方程。进而分析量和效应随着时间变化的规律, 推演量效之间的基本变化趋势^[21-22]。本研究建立了 HLDC 抗糖尿病肾病的 PK/PD 模型, 将药动学特征与 HLDC 的治疗效果联系起来。

2.9 统计学方法

采用 WinNonlin8.2 对实验数据进行拟合分析, 计算药动学参数, 记录达峰时间(t_{max})、达峰浓度(C_{max})、消除半衰期($t_{1/2}$)、药时曲线下面积(AUC)、表观分布容积(V_z/F)和清除率(CL/F)相关数据。所有数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS.26.0 软件进行 t 检验, 比较单次给药模型组和多次给药模型组的组间差异, 测定各时间点血样中待测物的浓度, 采用 GraphPad Prism8.0.1 绘制药-时曲线图。

3 结果

3.1 糖尿病肾病大鼠模型建立及评价

造模后有 6 只大鼠死亡, 随机检测模型组大鼠 FBG $\geq 11.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 24 h U-Alb $\geq 30\text{ mg}$, 如表 3 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠 FBG、Scr、BUN、TC、TG、LDL-C、24 h U-Alb、3 种细胞因子水平(TNF- α 、VEGF、IL-18)差异显著($P<0.01$), 均高于对照组大鼠, 表明糖尿病肾病模型构建成功, 有 18 只成模, 成模率为 75%。且与对照组大鼠比较, 模型组大鼠呈明显的多饮、多尿、多食、体质量下降等糖尿病“三多一少”症状, 后期出现不同程度的体毛黯淡、稀疏、精神萎靡、反应迟钝症状。

表 3 对照及模型大鼠相关生化指标的检测结果($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 3 Detection results of related biochemical indexes in control and model rats ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	FBG/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Scr/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	BUN/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	TG/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	TC/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
对照	5.74 $\pm$ 1.00	41.61 $\pm$ 8.02	14.06 $\pm$ 2.14	0.57 $\pm$ 0.07	0.55 $\pm$ 0.11
模型	16.52 $\pm$ 2.52**	74.52 $\pm$ 14.05**	28.82 $\pm$ 5.65**	2.11 $\pm$ 0.43**	1.67 $\pm$ 0.33**
组别	LDL-C/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	24 h U-Alb/($\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$)	TNF- α /($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	VEGF/($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-18/($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
对照	0.23 $\pm$ 0.04	19.23 $\pm$ 4.25	49.17 $\pm$ 3.29	47.43 $\pm$ 4.51	22.39 $\pm$ 2.59
模型	0.43 $\pm$ 0.09**	65.10 $\pm$ 8.07**	74.17 $\pm$ 5.80***	62.43 $\pm$ 5.87***	31.89 $\pm$ 4.14***

与对照组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ 。

** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group.

3.2 HLDC 单次、多次给药后 6 个成分在糖尿病肾病模型大鼠体内的 PK 研究

HLDC 单次或多次给药后, 6 个成分在大鼠体内的药-时曲线如图 2 所示。单次 ig 给予 HLDC 后,

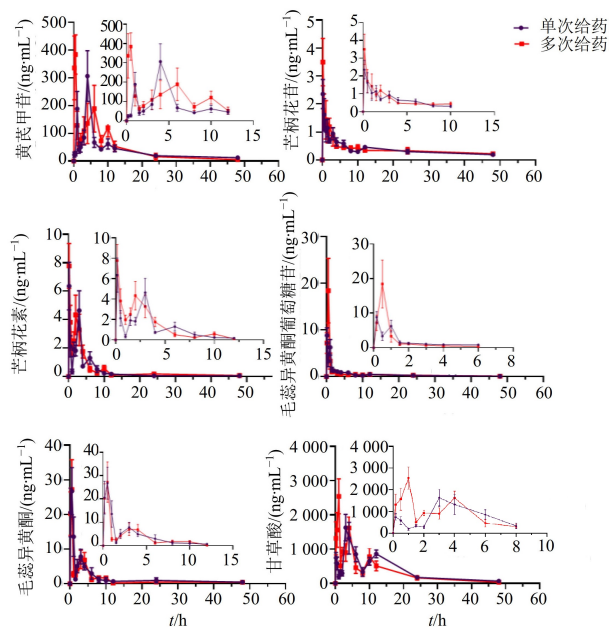


图 2 HLDC 单次、多次给药后 6 个成分在糖尿病肾病大鼠体内的药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Drug-time curves of six components in diabetic nephropathy rats after single and multiple administration of HLDC ($\bar{x} \pm s, n=6$)

在糖尿病肾病大鼠体内, 黄芪甲苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮和甘草酸的药-时曲线均为双峰或多峰, 芒柄花苷呈现单峰; 多次 ig 给予 HLDC 后, 在糖尿病肾病大鼠体内, 黄芪甲苷、芒柄花苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮和甘草酸的药-时曲线均为双峰或多峰; HLDC 单次给药组模型大鼠中 6 个成分的各时间点血药浓度大多低于多次给药模型组大鼠。

单次和多次 ig 给予 HLDC 后, 6 个成分在模型大鼠体内的药动学参数结果见表 4。结果显示, ig 给予 HLDC 后, 与单次给药相比, 多次给药的黄芪甲苷 $t_{1/2}$ 、 C_{max} 、 $AUC_{0 \sim t}$ 显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), MRT 显著降低 ($P < 0.01$); 芒柄花苷 C_{max} 显著升高 ($P < 0.05$); 芒柄花素 $t_{1/2}$ 、 AUC 、MRT、 V_z/F 显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), CL/F 显著降低 ($P < 0.05$); 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 t_{max} 、 C_{max} 、 $AUC_{0 \sim t}$ 显著升高 ($P < 0.05$); 毛蕊异黄酮 $t_{1/2}$ 、 V_z/F 显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), $AUC_{0 \sim t}$ 显著降低 ($P < 0.05$); 甘草酸 $t_{1/2}$ 、 C_{max} 、 V_z/F 显著升高 ($P < 0.01$), t_{max} 、 $AUC_{0 \sim \infty}$ 、MRT 显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.3 HLDC 单次、多次给药后 6 个成分在糖尿病肾病模型大鼠体内的 PD 研究

药效指标与药动学成分同步测定, 在大鼠血浆中检测了 TNF- α 、VEGF、IL-18 3 个药效指标, 其随时间浓度测定结果见图 3。从结果可知, 单次、多次

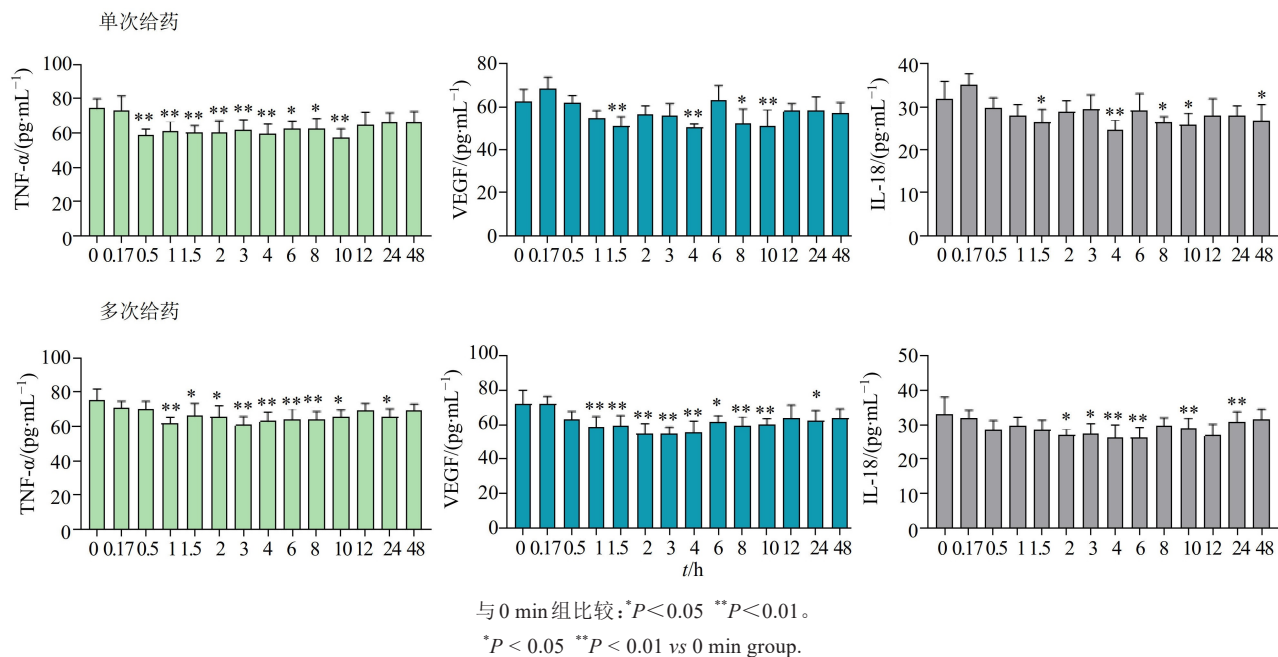
表 4 糖尿病肾病大鼠 HLDC 单次及多次给药后 6 个成分的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Pharmacokinetic parameters of six components in diabetic nephropathy rats after single and multiple administration of HLDC ($\bar{x} \pm s, n=6$)

成分	给药方式	$t_{1/2}/h$	t_{max}/h	$C_{max}/(ng \cdot mL^{-1})$	$AUC_{0 \sim t}/(h \cdot ng \cdot mL^{-1})$	$V_z/F (mL \cdot kg^{-1})$	$CL/F/(mL \cdot h \cdot kg^{-1})$	$MRT_{0 \sim t}/h$
黄芪甲苷	单次	8.62 $\pm$ 1.40	3.50 $\pm$ 1.22	308.99 $\pm$ 89.58	1 872.22 $\pm$ 161.16	217.46 $\pm$ 24.42	17.65 $\pm$ 1.67	12.96 $\pm$ 1.79
	多次	9.84 $\pm$ 1.57**	0.34 $\pm$ 0.18	426.13 $\pm$ 31.53*	2 196.14 $\pm$ 211.65*	221.93 $\pm$ 30.14	15.74 $\pm$ 1.43	9.79 $\pm$ 1.66**
芒柄花苷	单次	4.79 $\pm$ 0.78	0.23 $\pm$ 0.13	2.40 $\pm$ 0.54	18.16 $\pm$ 1.26	3 243.34 $\pm$ 605.93	468.29 $\pm$ 30.78	16.93 $\pm$ 0.77
	多次	4.98 $\pm$ 1.03	0.23 $\pm$ 0.13	3.51 $\pm$ 0.84*	18.86 $\pm$ 1.27	3 235.29 $\pm$ 788.31	447.00 $\pm$ 25.88	17.43 $\pm$ 1.00
芒柄花素	单次	3.57 $\pm$ 0.49	1.11 $\pm$ 1.46	6.81 $\pm$ 1.27	17.78 $\pm$ 1.00	2 402.18 $\pm$ 398.08	465.40 $\pm$ 26.33	7.05 $\pm$ 1.15
	多次	11.17 $\pm$ 2.69**	0.17 $\pm$ 0.00	7.78 $\pm$ 1.58	22.77 $\pm$ 2.79**	5 588.90 $\pm$ 786.55***	354.73 $\pm$ 47.58**	8.27 $\pm$ 0.60**
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	单次	12.27 $\pm$ 2.43	0.31 $\pm$ 0.34	8.94 $\pm$ 1.51	22.97 $\pm$ 2.56	47 666.33 $\pm$ 10 259.87	2 687.87 $\pm$ 257.33	10.40 $\pm$ 0.75
	多次	15.98 $\pm$ 3.43	0.50 $\pm$ 0.00*	18.43 $\pm$ 6.95*	26.52 $\pm$ 4.16*	52 433.22 $\pm$ 10 573.09	2 307.35 $\pm$ 342.45	9.71 $\pm$ 1.02
毛蕊异黄酮	单次	5.38 $\pm$ 2.29	0.53 $\pm$ 0.27	28.55 $\pm$ 6.39	81.90 $\pm$ 14.65	494.14 $\pm$ 205.66	63.39 $\pm$ 11.76	10.91 $\pm$ 2.65
	多次	9.25 $\pm$ 2.00*	0.45 $\pm$ 0.13	29.51 $\pm$ 6.62	65.35 $\pm$ 7.87*	1 004.77 $\pm$ 267.46**	74.92 $\pm$ 9.28	10.15 $\pm$ 2.49
甘草酸	单次	7.02 $\pm$ 0.55	3.33 $\pm$ 0.52	1 755.48 $\pm$ 443.46	18 154.44 $\pm$ 1 464.33	569.22 $\pm$ 42.72	56.37 $\pm$ 4.73	12.58 $\pm$ 0.90
	多次	9.64 $\pm$ 1.07**	0.92 $\pm$ 0.20**	2 634.43 $\pm$ 371.16**	16 511.50 $\pm$ 1 301.20	867.57 $\pm$ 114.35**	62.41 $\pm$ 4.82	10.51 $\pm$ 0.84**

与单次给药组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs single dose group.

图3 HLDC单次给药、多次给药后药效指标的经时变化($\bar{x} \pm s, n=6$)Fig. 3 Time-dependent changes of pharmacodynamic indexes after single and multiple administration of HLDC ($\bar{x} \pm s, n=6$)

给药组中各时间点的PD指标与给药前0 min相比,给药后随着时间变化先降低后慢慢升高。以TNF- α 、VEGF、IL-18为药效指标,HLDC中黄芪甲苷等6个成分在糖尿病肾病模型大鼠体内单次及多次给药后的血药浓度-时间-效应间的变化图如图4、5所示,在考察时间内,TNF- α 、VEGF、IL-18的最小值均出现在4 h以后,除了单次给药组中TNF- α 、VEGF、IL-18的效应达峰时间和黄芪甲苷血药浓度同时达峰外,TNF- α 、VEGF、IL-18的药物效应达峰时间均较其他成分的血药浓度达峰时间长,表明药物效应与药物浓度之间不存在线性对应关系,当给药后,药物浓度呈逐渐降低趋势,药物的抑制作用先增大后减小,说明药物效应与药物浓度之间都存在滞后效应。

3.4 HLDC单次及多次给药后6个成分在效应室浓度的拟合

以TNF- α 、VEGF、IL-18为药效指标,HLDC中黄芪甲苷等6个成分在糖尿病肾病模型大鼠体内单次及多次给药后在效应室的浓度-效应变化如图6、7所示。结果表明,单次给药后各个指标的滞后环的方向是逆时针滞后环,而多次给药后则是顺时针滞后环,成分结合药效指标后的效应室浓度-效应谱曲线表现为滞后环,即药理作用滞后于药物浓度^[19-23]。

3.5 PK/PD结合模型研究结果

为了阐明PK与PD之间的相关性,结合各成分

的药动学参数,分别建立糖尿病肾病大鼠单次给药及多次给药后HLDC中6个成分和3个药效指标的PK-PD结合模型。表5所示为PK-PD参数,其中 C_e 为效应室浓度, E 为给药后任意时间点的药物浓度, E_{max} 为药效描述的最大效应, K_{e0} 表示药物从效应室消除的一级速率常数,用来表征血药浓度与效应之间的时间过程,大小决定效应的滞后时间, K_{e0} 值越小,则药物效应滞后于血药浓度的时间越长; IC_{50} 为效应值达到最大抑制效果一半时效应室的药物浓度,其值大小反映药物活性及特性强弱, IC_{50} 值越小,药物活性及特异性越强,反之则越弱^[24-25]。

由PK/PD模型参数发现,以TNF- α 为药效指标时,单次给药组芒柄花苷和甘草酸的 K_{e0} 分别为0.92、1.41,多次给药后相应的 K_{e0} (0.36、1.20)降低;以VEGF为药效指标时,单次给药组芒柄花苷、毛蕊异黄酮糖苷和毛蕊异黄酮的 K_{e0} 分别为1.94、1.01、1.31,多次给药后相应的 K_{e0} (0.32、0.28、0.54)降低;以IL-18为药效指标时,多次给药后各成分相应的 K_{e0} 均增加。相较于单次给药组,除了芒柄花素、甘草酸和药效指标TNF- α 的 IC_{50} 值降低外,多次给药后各成分与3个药效指标的 IC_{50} 值均增加。

以TNF- α 为药效指标时,单次给药组中芒柄花苷、毛蕊异黄酮、甘草酸的 K_{e0} 值分别为0.92、0.97、1.41,较黄芪甲苷(0.13)、芒柄花素(0.09)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(9.49×10^{-2})大,滞后时间短;多次给药组中毛蕊异黄酮、甘草酸的 K_{e0} 值分别为1.04、1.20,

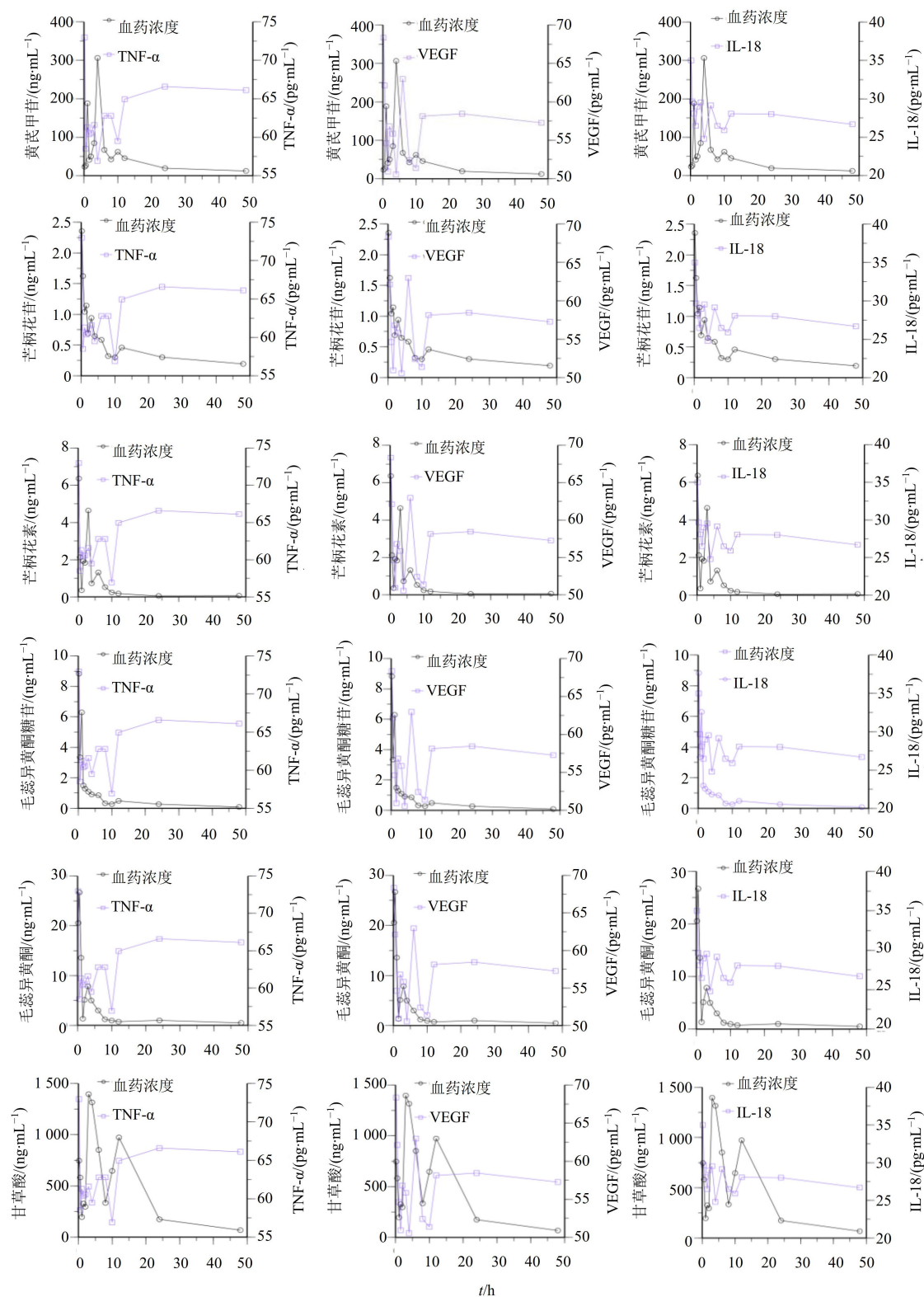


图4 单次给药后HLDC 6个成分在糖尿病肾病模型大鼠体内的血药浓度-时间和效应曲线($n=6$)

Fig. 4 Plasma concentration-time and effect curve of six components of HLDC in diabetic nephropathy model rats after single administration ($n=6$)

较黄芪甲苷(0.85)、芒柄花苷(0.36)、芒柄花素(0.09)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(9.29×10^{-2})大,滞后时间短。说明芒柄花苷、毛蕊异黄酮、甘草酸在

体内起活性的作用靶点可能为TNF- α ,并参与调节了炎症状态下TNF- α 的分泌,并与降低其分泌量有关。

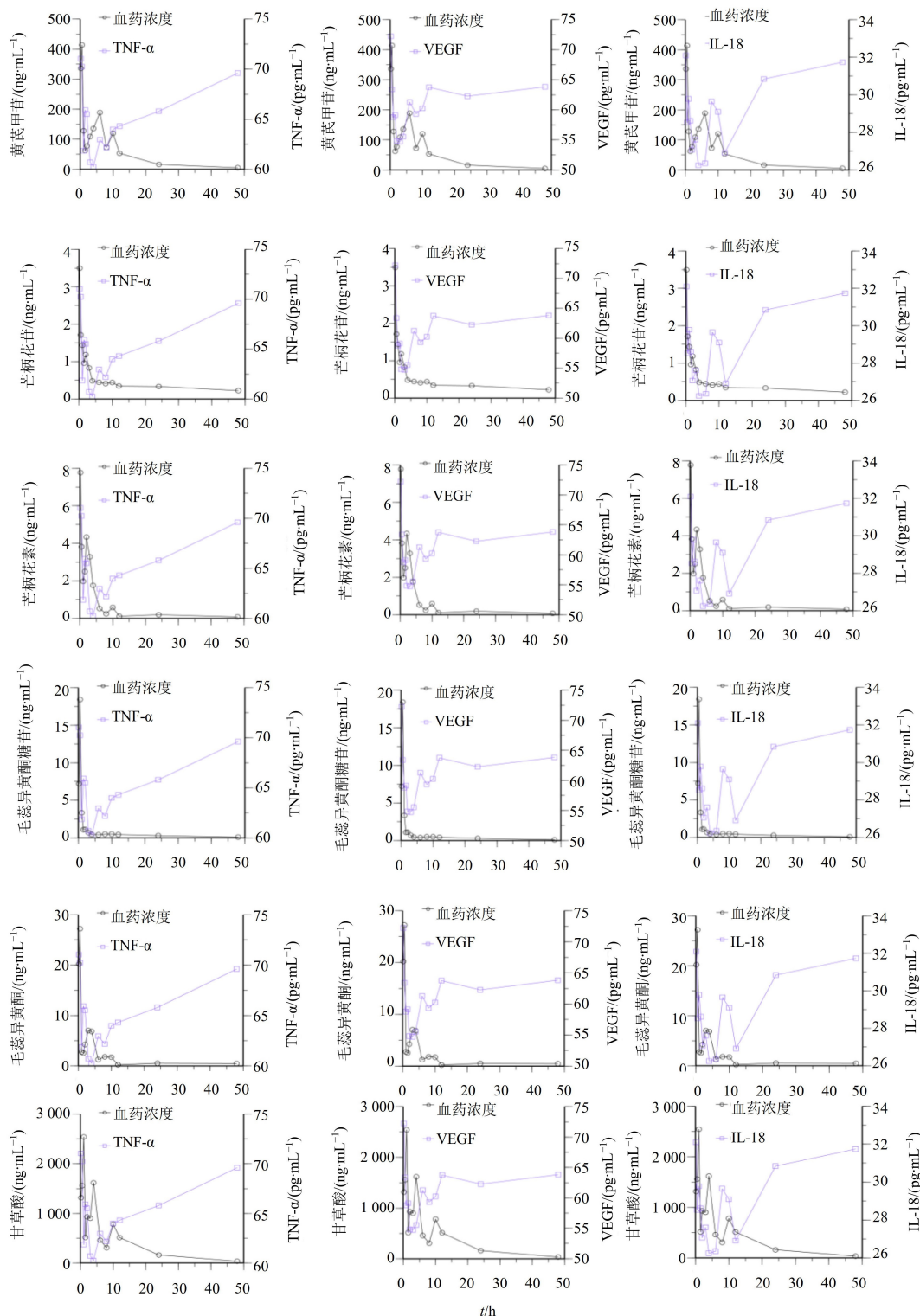


图5 多次给药后HLDC 6个成分在糖尿病肾病模型大鼠体内的血药浓度-时间和效应曲线($n=6$)

Fig. 5 Plasma concentration-time and effect curves of six components of HLDC in diabetic nephropathy model rats after repeated administration ($n=6$)

以VEGF为药效指标时,单次给药组中芒柄花苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、甘草酸 K_{e0} 值分别为0.94、1.01、1.31、1.15较黄芪甲苷(0.10)、芒柄花素(0.44)大,滞后时间短;多次给药组中黄芪

甲苷、芒柄花素、甘草酸 K_{e0} 值分别为0.90、0.71、1.43较芒柄花苷(0.32)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(0.28)、毛蕊异黄酮(0.54)大,滞后时间短。说明黄芪甲苷、芒柄花苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮葡萄糖

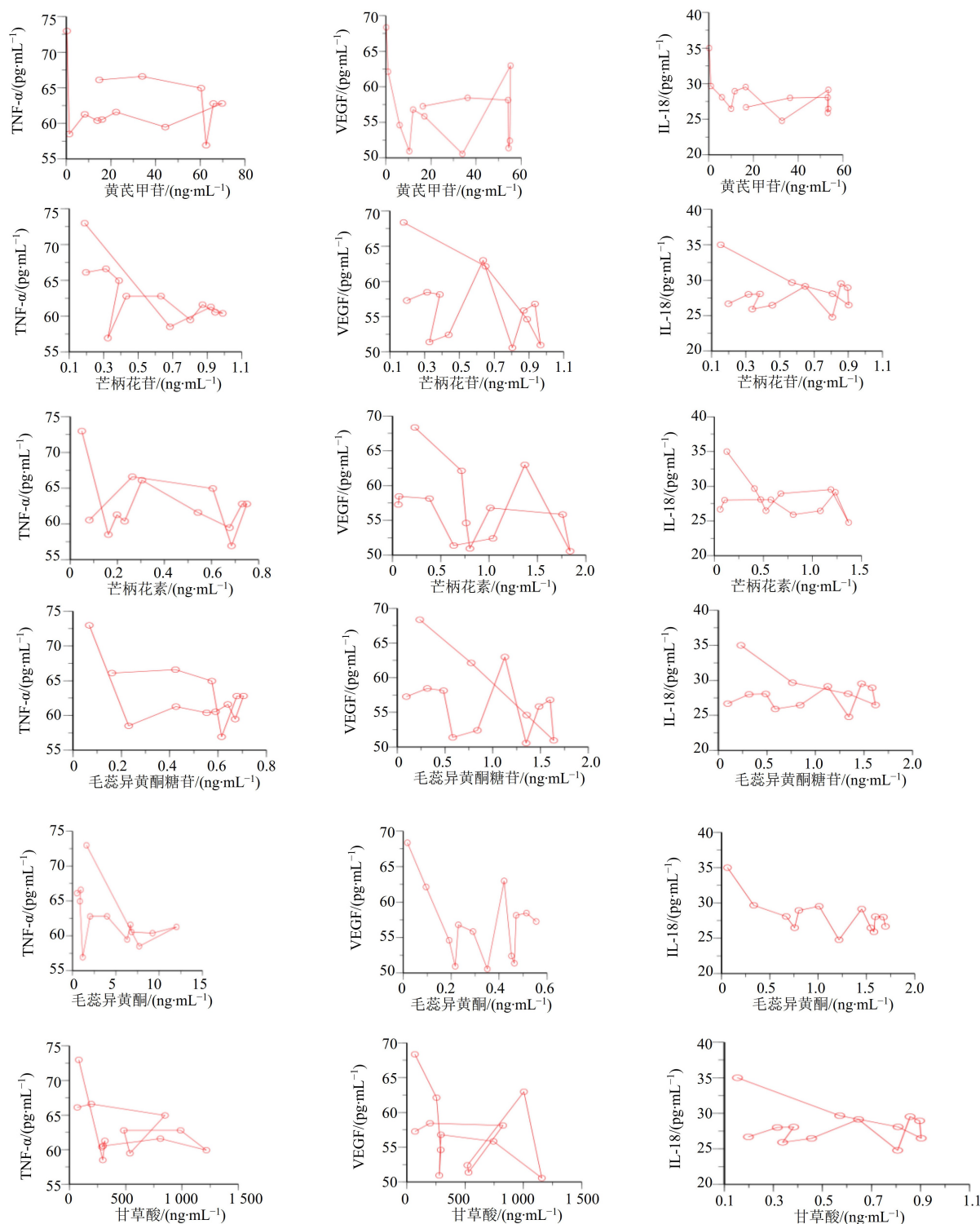


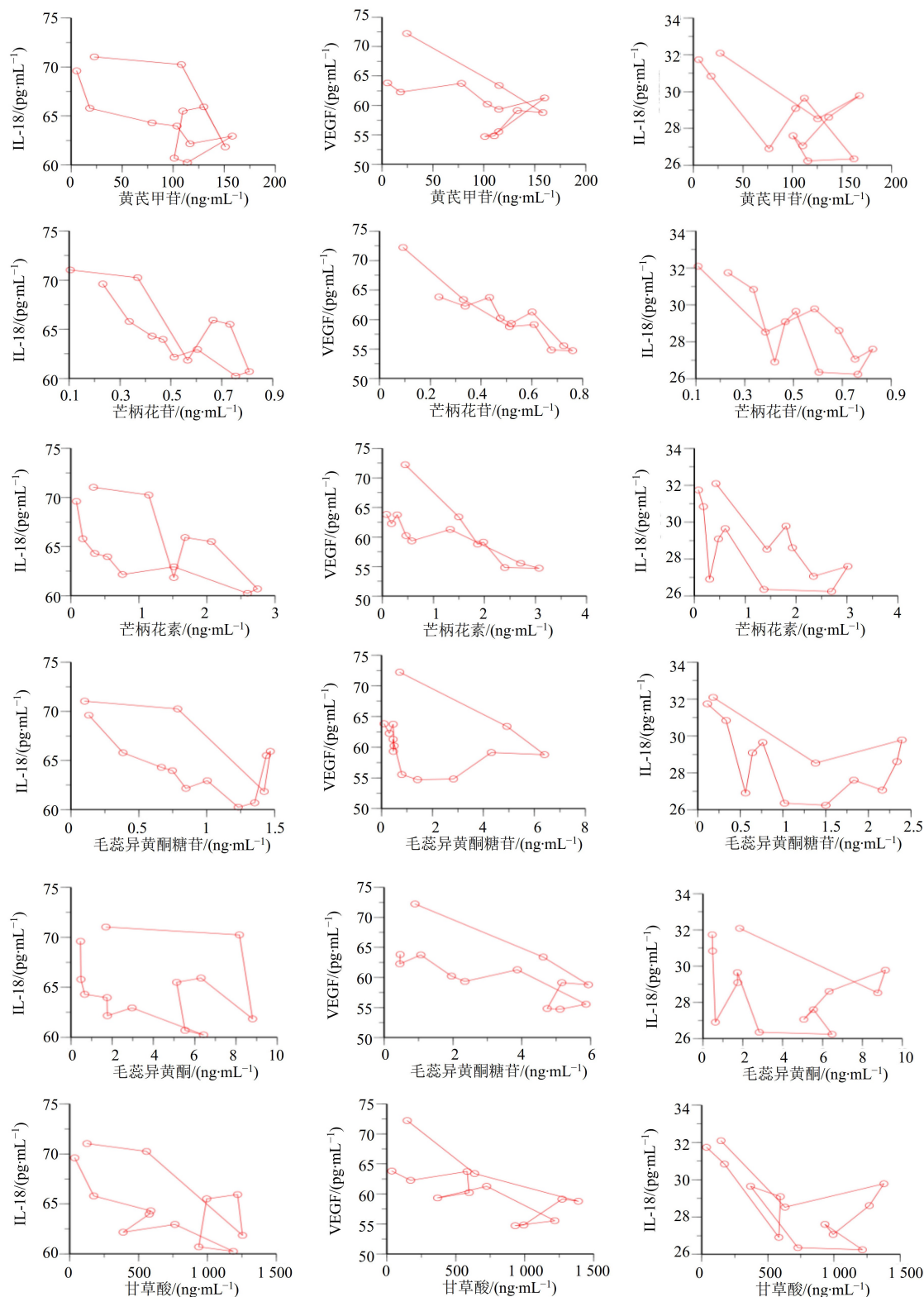
图6 单次给药组各成分血浆浓度-效应图($n=6$)

Fig. 6 Plasma concentration-effect diagram of each ingredient in a single dose group ($n=6$)

苷、毛蕊异黄酮、甘草酸在体内起活性的作用靶点可能为VEGF,并与降低其分泌量有关系。

以IL-18为药效指标时,单次给药组中毛蕊异黄酮、甘草酸 Ke_0 值分别为 1.04、1.19 较黄芪甲苷(0.09)、芒柄花苷(0.31)、芒柄花素(0.24)、毛蕊异

黄酮葡萄糖苷(0.31)大,滞后时间短、起效更快;多次给药组中除了毛蕊异黄酮糖苷(0.30),各成分的 Ke_0 值均较大,滞后时间更短。说明黄芪甲苷、芒柄花苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、甘草酸在体内起活性的作用靶点可能为IL-18,

图7 多次给药组各成分血浆浓度-效应图($n=6$)Fig. 7 Plasma concentration-effect diagram of each ingredient in multi-dose group ($n=6$)

并参与调节炎症状态下IL-18的分泌。

各组分效应室浓度与各效应值相关(PK/PD)的间接连接模型,采用 $E_{\max}$ 二房室模型拟合PK-PD模型符合Inhibitory Effect Sigmoid E_0 ,方

程如下: $E = E_0 \times [1 - Ce^{Gam} / (IC_{50}^{Gam} + Ce^{Gam})]$,将得到的各成分与3个药效指标相应的PK/PD参数带入方程,可得到血药浓度与效应之间的拟合药效学方程。结果见表6。

表5 单次、多次给药组PK-PD模型参数(n=6)
Table 5 PK-PD model parameters of single and multiple dose groups (n=6)

成分	参数	单次给药组			多次给药组		
		TNF-α	VEGF	IL-18	TNF-α	VEGF	IL-18
黄芪甲苷	E ₀	66.35	56.24	28.12	65.33	59.37	28.17
	Ke ₀	0.13	0.10	0.09	0.85	0.90	0.62
	IC ₅₀	8.68×10 ⁻⁵	1.97×10 ⁻³	3.14×10 ⁻³	5.85	2.80	3.25
	Gamma	-1.83	-2.66	-2.42	-3.66	-7.15	-7.49
芒柄花苷	E ₀	62.70	48.71	25.11	65.07	59.98	28.32
	Ke ₀	0.92	0.94	0.31	0.36	0.32	0.79
	IC ₅₀	2.12	1.27	0.64	3.79	5.00	3.80
	Gamma	2.58	1.81	2.44	4.12	5.64	4.01
芒柄花素	E ₀	62.51	48.82	24.75	32.56	20.11	10.01
	Ke ₀	0.09	0.44	0.24	0.09	0.71	0.67
	IC ₅₀	15.15	2.99	5.38×10 ⁻⁴	4.89	6.51	4.53
	Gamma	1.68	1.70	1.11	0.96	0.99	1.12
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	E ₀	62.66	58.88	29.10	55.15	49.59	23.81
	Ke ₀	9.49×10 ⁻²	1.01	0.31	9.29×10 ⁻²	0.28	0.30
	IC ₅₀	7.52	0.27	1.07×10 ⁻²	16.03	17.49	14.43
	Gamma	2.15	2.06	2.53	1.69	2.23	1.66
毛蕊异黄酮	E ₀	61.76	56.32	28.23	53.87	49.00	23.89
	Ke ₀	0.97	1.31	1.04	1.04	0.54	1.14
	IC ₅₀	5.34×10 ⁻⁴	3.66×10 ⁻⁵	6.60×10 ⁻⁵	0.20	0.25	6.77
	Gamma	-2.21	-1.68	-1.79	-0.51	0.30	-1.21
甘草酸	E ₀	61.86	56.35	28.21	64.55	59.83	28.18
	Ke ₀	1.41	1.15	1.19	1.20	1.43	1.41
	IC ₅₀	4.53	1.34	1.07	1.01	31.76	2.47
	Gamma	-2.29	-3.40	-3.88	-2.21	-3.19	-3.31

本研究通过HLDC单次及多次给药后PK研究,结果发现,与单次给药相比,多次给药后除了毛蕊异黄酮葡萄糖苷外,模型大鼠的各活性成分的 t_{max} 均提前;各成分 C_{max} 均增大、 $t_{1/2}$ 均延长;除了甘草酸、毛蕊异黄酮外,各活性成分的AUC均升高,多次给药后,活性成分大多有一定蓄积,导致AUC增加;除毛蕊异黄酮外,各活性成分的CL/F均降低。多次给药后整体上吸收总量增加、消除降低、作用时间延长,糖尿病肾病状态下,大鼠的肾功能遭到损伤,可能是药物排泄速度减慢的原因之一。说明药物在多次给药与单次给药的情况下药动学过程存在差异,且本研究考虑到临床用药为长期,故本实验模拟临床多次用药,具有临床用药参考价值。

由PK/PD模型参数发现,相较于单次给药组,多次给药后6个成分与3个药效指标的 Ke_0 和 IC_{50} 值增加,说明了多次给药后,药物效应滞后于血药浓度的时间短于单次给药的滞后时间,可能是多次给药后大鼠体内对药物产生了耐药性,则导致药物活

性及特异性减弱。根据各成分与3个药效指标 IC_{50} 值的变化观察到,黄芪甲苷、毛蕊异黄酮在6个成分中参与调节TNF-α、VEGF、IL-18药效指标表现出较为显著的抑制效果,毛蕊异黄酮葡萄糖苷对VEGF、IL-18的调节表现出较好的抑制作用,证明了HLDC通过多靶点、多指标、多成分协同作用的方式发挥疗效作用。进一步表明HLDC通过成分(黄芪甲苷、芒柄花苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、甘草酸)发挥了抗糖尿病肾病的药效作用,也可能是通过抑制糖尿病肾病大鼠中炎症因子TNF-α、VEGF、IL-18水平来发挥治疗炎症、改善肾功能的作用。

4 讨论

药动学、药效动力学是研究药物药效基础和作用机制常用的研究技术手段,也是药物探索的必经研究路程,但是基于中药的多成分、多靶点、多路径等特点,单一的药动学和药效学不足以说明药物与机体相互作用的复杂问题,随着研究技术手段和研

表 6 单次、多次给药组 PK-PD 模型
Table 6 PK-PD model of single and multiple dose groups

PK marker	PD marker	PK-PD 模型	
		单次给药	多次给药
黄芪甲苷	TNF- α	$E=66.35 \times \{1 - Ce^{-1.83} / [(8.68 \times 10^{-5})^{-1.83} + Ce^{-1.83}]\}$	$E=65.33 \times [1 - Ce^{-3.66} / (4.88^{-3.66} + Ce^{-3.66})]$
	VEGF	$E=56.24 \times \{1 - Ce^{-2.66} / [(1.97 \times 10^{-3})^{-2.66} + Ce^{-2.66}]\}$	$E=59.37 \times [1 - Ce^{-7.15} / (2.80^{-7.15} + Ce^{-7.15})]$
	IL-18	$E=28.12 \times \{1 - Ce^{-2.42} / [(3.14 \times 10^{-3})^{-2.42} + Ce^{-2.42}]\}$	$E=28.17 \times [1 - Ce^{-7.49} / (3.25^{-7.49} + Ce^{-7.49})]$
芒柄花苷	TNF- α	$E=62.70 \times [1 - Ce^{2.58} / (2.12^{2.58} + Ce^{2.58})]$	$E=65.07 \times [1 - Ce^{4.12} / (2.61^{4.12} + Ce^{4.12})]$
	VEGF	$E=48.71 \times [1 - Ce^{1.81} / (1.27^{1.81} + Ce^{1.81})]$	$E=59.98 \times [1 - Ce^{5.64} / (4.01^{5.64} + Ce^{5.64})]$
	IL-18	$E=25.11 \times [1 - Ce^{2.44} / (0.64^{2.44} + Ce^{2.44})]$	$E=28.17 \times [1 - Ce^{4.01} / (3.80^{4.01} + Ce^{4.01})]$
芒柄花素	TNF- α	$E=62.51 \times [1 - Ce^{1.68} / (15.15^{1.68} + Ce^{1.68})]$	$E=32.56 \times [1 - Ce^{0.96} / (4.89^{0.96} + Ce^{0.96})]$
	VEGF	$E=48.82 \times [1 - Ce^{1.70} / (2.99^{1.70} + Ce^{1.70})]$	$E=20.11 \times [1 - Ce^{0.99} / (3.76^{0.99} + Ce^{0.99})]$
	IL-18	$E=24.75 \times \{1 - Ce^{1.11} / [(5.38 \times 10^{-4})^{1.11} + Ce^{1.11}]\}$	$E=10.01 \times \{1 - Ce^{1.12} / [(5.38 \times 10^{-4})^{1.12} + Ce^{1.12}]\}$
毛蕊异黄	TNF- α	$E=62.66 \times [1 - Ce^{2.15} / (7.52^{2.15} + Ce^{2.15})]$	$E=55.15 \times [1 - Ce^{1.69} / (8.19^{1.69} + Ce^{1.69})]$
葡萄糖苷	VEGF	$E=58.88 \times [1 - Ce^{2.06} / (0.27^{2.06} + Ce^{2.06})]$	$E=49.59 \times [1 - Ce^{2.23} / (17.49^{2.23} + Ce^{2.23})]$
	IL-18	$E=29.10 \times \{1 - Ce^{2.53} / [(1.07 \times 10^{-2})^{2.53} + Ce^{2.53}]\}$	$E=23.81 \times [1 - Ce^{1.66} / (115.46^{1.66} + Ce^{1.66})]$
毛蕊异黄 酮	TNF- α	$E=61.76 \times \{1 - Ce^{-2.21} / [(5.34 \times 10^{-4})^{-2.21} + Ce^{-2.21}]\}$	$E=53.87 \times \{1 - Ce^{-0.15} / [(1.02 \times 10^{-6})^{-0.15} + Ce^{-0.15}]\}$
	VEGF	$E=56.32 \times \{1 - Ce^{-1.68} / [(3.66 \times 10^{-5})^{-1.68} + Ce^{-1.68}]\}$	$E=49.00 \times [1 - Ce^{0.30} / (0.25^{0.30} + Ce^{0.30})]$
	IL-18	$E=28.23 \times \{1 - Ce^{-1.79} / [(6.60 \times 10^{-5})^{-1.79} + Ce^{-1.79}]\}$	$E=23.89 \times [1 - Ce^{-1.21} / (10.26^{-1.21} + Ce^{-1.21})]$
甘草酸	TNF- α	$E=61.86 \times [1 - Ce^{-2.29} / (4.53^{-2.29} + Ce^{-2.29})]$	$E=64.55 \times [1 - Ce^{-2.21} / (1.01^{-2.21} + Ce^{-2.21})]$
	VEGF	$E=56.35 \times [1 - Ce^{-3.40} / (1.34^{-3.40} + Ce^{-3.40})]$	$E=59.83 \times [1 - Ce^{-3.19} / (37.01^{-3.19} + Ce^{-3.19})]$
	IL-18	$E=28.21 \times [1 - Ce^{-3.88} / (1.07^{-3.88} + Ce^{-3.88})]$	$E=28.18 \times [1 - Ce^{-3.31} / (1.07^{-3.31} + Ce^{-3.31})]$

究方法的多样性发展,联合 PK 和 PD 建立数学模型,能更加深入、全面的探索药物-疾病之间的关系。基于动物实验建立 PK-PD 模型是中药安全性和有效性研究的重要工具,对中药物质基础及作用机制研究具有重要意义^[26]。

大量研究表明,TNF- α 是由多种细胞合成分泌的细胞因子,具有多种生理功能,如调节免疫应答、促进细胞生长分化等。它会导致炎性细胞浸润,引起系膜细胞增生,对肾小球造成直接和间接损伤。过多的 TNF- α 还会导致肾脏固有细胞增殖,增加炎症介质的表达,进而损伤肾脏系膜;而 IL-18 是一种促炎性细胞因子,它能促进自由基生成,引起中性粒细胞聚集,增加促炎性因子的分泌,加重炎症反应,促炎性因子水平升高会影响血管内物质交换,增强白细胞黏附性,提高纤维蛋白原水平,严重影响微循环,损伤内皮血管。由于炎症刺激和肾小球受损,会导致缺氧、缺血,损伤血管内皮细胞,从而激发 VEGF 水平的表达,且 VEGF 与肾小球基底膜有很高的亲和力^[27-31]。因此,在本实验研究中,选择将 TNF- α 、VEGF、IL-18 作为 PD 的考察指标。

通过 WinNonlin 软件将血药浓度-时间-效应数据进行拟合,获得 HLDC 中 6 个成分在效应室的浓度-时间数据及 PK/PD 模型,结果发现,HLDC 中黄

芪甲苷等 6 个成分与 3 个药效指标(TNF- α 、VEGF、IL-18)能够较好地拟合,且均符合抑制型模型,6 个成分与药效指标之间呈现明显的、相似的量效关系,给药后,随着血药浓度逐渐降低的同时,药物的抑制作用先增大后减小。根据相应的 PK/PD 模型,由 HLDC 各成分的浓度推算出相对应的效应值,也可以根据效应值推算出各活性成分相应的浓度。

总体上观察,无论是单次还是多次给药,毛蕊异黄酮 IC₅₀明显小于毛蕊异黄酮葡萄糖苷,芒柄花素 Ke₀明显小于芒柄花苷。说明毛蕊异黄酮抗炎效果明显要强于毛蕊异黄酮葡萄糖苷,芒柄花苷的滞留时间短于芒柄花素。在实验中发现以及相关研究表明,分子结构中含葡萄糖苷的黄酮苷类成分,进入肠道后易与肠道菌群发生结合、裂解等代谢转化,影响其在机体内的吸收利用,毛蕊异黄酮葡萄糖苷及芒柄花苷进入体内后,会在肠道菌群的作用下被迅速代谢成苷元,少量经吸收进入体循环,故毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷进入体内后,可能通过转化为毛蕊异黄酮、芒柄花素等苷元,从而发挥药效作用^[32-33]。

本研究建立了 HLDC 中 6 个成分(黄芪甲苷、芒柄花苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、甘草酸)与 3 个药效指标(TNF- α 、VEGF、IL-18)

的PK-PD结合模型,揭示了HLDC发挥抗糖尿病肾病、保护肾功能作用的分子机制可能与抑制TNF- α 、VEGF、IL-18等炎症因子的分泌有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hou X Y, Du K R, Yang X J, et al. Progress in the study of chronic inflammatory mechanism of diabetic nephropathy [J]. Adv Clin Exp Med, 2022, 12(7): 6019-6025.
- [2] Appel G. Detecting and controlling diabetic nephropathy: What do we know? [J]. Cleve Clin J Med, 2013, 80(4): 209-217.
- [3] 余萍, 刘欢, 李刚. 基于数据挖掘技术对2型糖尿病肾病进展的影响因素分析 [J]. 中南药学, 2021, 19(4): 741-745.
Yu P, Liu H, Li G. Influence factors for type 2 diabetic nephropathy development by data mining technology [J]. Cent South Pharm, 2021, 19(4): 741-745.
- [4] 刘裔凯, 罗说明, 邓敏, 等. 糖尿病肾病诊断与治疗新进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(8): 688-691, 706.
Liu Y K, Luo S /s /y M, Deng M, et al. Progress in diagnosis and treatment of diabetic nephropathy [J]. Chin J Arterioscler, 2020, 28(8): 688-691, 706.
- [5] 张雪辰, 王镁. 中药药对治疗糖尿病肾病的药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(9): 228-234.
Zhang X C, Wang M. Research progress on pharmacological effect and clinical application of traditional Chinese medicinal pair in treatment of diabetic nephropathy [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2019, 25(9): 228-234.
- [6] 陈常云, 陈君, 李艳婷. 经方防治糖尿病肾病研究进展 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2019, 17(24): 133-135.
Chen C Y, Chen J, Li Y T. Research progress of classical prescription in preventing and treating diabetic nephropathy [J]. Chin Med Mod Distance Educ China, 2019, 17(24): 133-135.
- [7] Meng X, Wei M M, Wang D, et al. Astragalus polysaccharides protect renal function and affect the TGF- β /Smad signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. J Int Med Res, 2020, 48(5): 300060520903612.
- [8] Guo M F, Dai Y J, Gao J R, et al. Uncovering the mechanism of Astragalus membranaceus in the treatment of diabetic nephropathy based on network pharmacology [J]. J Diabetes Res, 2020, 2020: 5947304.
- [9] Wang H, Zhuang Z, Huang Y Y, et al. Protective effect and possible mechanisms of astragaloside IV in animal models of diabetic nephropathy: A preclinical systematic review and meta-analysis [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 988.
- [10] Cheng L, Cao S J, Qu M, et al. Licorice and its main components on the treatment of diabetes and its complications: A review of invivo and invitro studies [J]. Asian J Trad Med, 2019, 14(6): 280-294.
- [11] 温丽敏, 许燕玲, 李振, 等. 黄芪六一汤对2型糖尿病大鼠降糖作用的机制研究 [J]. 中药材, 2018, 4(3): 699-702.
Wen L M, Xu Y L, Li Z, et al. Study on the effects and mechanism of Astragalus liuyi decoction on type 2 diabetes mellitus rats [J]. J Chin Med Mater, 2018, 4(3): 699-702.
- [12] Wang Q, Wang Y L, Liu W, et al. Mechanisms underlying the differences in the pharmacokinetics of six active constituents of Huangqi liuyi decoction between normal and diabetic nephropathy mouse models [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 2481654.
- [13] Wang Q, Tang T T, Wu Z G, et al. Study on the liver Drug's dominant metabolic enzymes for six effective components of the Huang qi Liuyi Decoction [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1175896.
- [14] Wang Q, Shi Y, Wu Z G, et al. Effects of Huangqi liuyi decoction in the treatment of diabetic nephropathy and tissue distribution difference of its six active constituents between normal and diabetic nephropathy mouse models [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 934720.
- [15] 王群, 唐甜甜, 刘文, 等. 黄芪六一汤抗糖尿病肾病的药效组分筛选研究 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(4): 730-745.
Wang Q, Tang T T, Liu W, et al. Pharmacodynamic screening of active constituents of Huangqi Liuyi Decoction to against diabetic nephropathy [J]. Drug Res Eval, 2024, 47(4): 730-745.
- [16] Chen K, Yu B, Liao J. LncRNA SOX2OT alleviates mesangial cell proliferation and fibrosis in diabetic nephropathy via Akt/mTOR-mediated autophagy [J]. Mol Med, 2021, 27(1): 71.
- [17] Qiao S M, Liu R, Lv C J, et al. Bergenin impedes the generation of extracellular matrix in glomerular mesangial cells and ameliorates diabetic nephropathy in mice by inhibiting oxidative stress via the mTOR/ β -TrCP/Nrf2 pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2019, 145: 118-135.
- [18] Zhao Z Y, Gong S L, Wang S M, et al. Effect and mechanism of evodiamine against ethanol-induced gastric ulcer in mice by suppressing Rho/NF- κ B pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 28(1): 588-595.
- [19] Li H Z, Wang Y S, Su X H, et al. San-Huang-yi-Shen capsule ameliorates diabetic kidney disease through

- inducing PINK1/parkin-mediated mitophagy and inhibiting the activation of NLRP3 signaling pathway [J]. J Diabetes Res, 2022, 2022: 2640209.
- [20] 郑良璐, 王刚, 吴穹. 十八味诃子利尿丸对糖尿病肾病大鼠肾脏的保护作用 [J]. 中成药, 2023, 45(1): 264-267.
- Zheng L L, Wang G, Wu Q. Protective effect of Shibaweizi Diuretic Pill on kidney of diabetic nephropathy rats [J]. Chin Tradit Pat Med, 2023, 45(1): 264-267.
- [21] 殷瑶瑶, 姜宏卫, 张颖裕, 等. MicroRNA-206对糖尿病肾病大鼠肾损伤的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(1): 71-75.
- Yin Y Y, Jiang H W, Zhang Y Y, et al. Effects of microRNA-206 on renal injury in diabetic nephropathy rats [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2023, 39(1): 71-75.
- [22] 段凤阳, 宋纯东, 宋丹, 等. 雷公藤多苷对糖尿病肾病大鼠肾组织 NFAT2/COX-2 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(5): 16-23.
- Duan F Y, Song C D, Song D, et al. Effect of Tripterygium wilfordii polyglycoside on expression of NFAT2/COX-2 in kidney tissues of rats with diabetic nephropathy [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2023, 29(5): 16-23.
- [23] Zhu Y M, Fan Y Q, Cao X N, et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK/PD) modeling to study the hepatoprotective effect of Perilla Folium on the acute hepatic injury rats [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 313: 116589.
- [24] 黄丽平, 刘思佳, 姚雅琦, 等. 药动学-药效学(PK-PD)模型的研究方法及在中药领域中的优势与应用 [J]. 中草药, 2023, 54(2): 367-374.
- Huang L P, Liu S J, Yao Y Q, et al. Research methods of pharmacokinetic-pharmacodynamics(PK-PD)model and its advantages and application in traditional Chinese medicines [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(2): 367-374.
- [25] 潘洁, 王昌权, 李奎, 等. 基于大鼠类风湿性关节炎模型建立黑骨藤的 PK-PD 模型 [J]. 中草药, 2020, 51(20): 5194-5200.
- Pan J, Wang C Q, Li K, et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic link model of Periploca forrestii based on rheumatoid arthritis rat model [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(20): 5194-5200.
- [26] 兰昀羲, 胡宇, 黄巍, 等. 关于动物实验的 PK-PD 模型对中药研究的思考 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(2): 395-397.
- Lan Y X, Hu Y, Huang W, et al. Reflections on PK-PD model based on animal experiments for study of Chinese medicine [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2023, 34(2): 395-397.
- [27] He C Y, Liu L. Associations of polymorphisms in IL-6 and IL-18 with tuberculosis: Evidence from a meta-analysis [J]. Microb Pathog, 2020, 139: 103823.
- [28] Fotis L, Agrogiannis G, Vlachos I S, et al. Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 at the early stages of atherosclerosis in a rat model [J]. In Vivo, 2012, 26(2): 243-250.
- [29] 汪晶华, 刘茂东, 杨新军, 等. 西格列汀联合贝那普利治疗早期糖尿病肾病的效果及对血清 IL-6、IL-18、TGF- β 1 的影响 [J]. 临床误诊误治, 2021, 34(2): 30-34.
- Wang J H, Liu M D, Yang X J, et al. Therapeutic effect of sitagliptin combined with benazepril on early diabetic nephropathy and its effect on serum IL-6, IL-18 and TGF- β 1 [J]. Clin Misdiagnosis Mistherapy, 2021, 34(2): 30-34.
- [30] 都宾宾, 李松林, 朱俊霞, 等. 益气养阴化痰方加减治疗早期糖尿病肾病效果及对患者炎症指标和高凝状态的影响 [J]. 中国医药, 2023, 18(6): 902-906.
- Du B B, Li S L, Zhu J X, et al. Effect of modified Yiqi Yangyin Huayu recipe on early diabetic nephropathy and its influence on inflammatory indicators and hypercoagulability [J]. China Med, 2023, 18(6): 902-906.
- [31] 刘健胜. 慢性肾炎患儿治疗前后血清 IL-18、IL-10、TNF- α 和血浆 VEGF 水平的变化 [J]. 放射免疫学杂志, 2007, 20(6): 500-501.
- Liu J S. Changes of serum IL-18, IL-10, TNF- α and plasma VEGF levels after treatment in children with chronic nephritis [J]. J Radioimmunol, 2007, 20(6): 500-501.
- [32] 刘玲, 赵晓莉, 狄留庆, 等. 采用体外肠道菌群实验研究防风对黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷代谢的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2015, 31(2): 170-173.
- Liu L, Zhao X L, Di L Q, et al. Effects of Radix saposhnikoviae on metabolism of calycosin-7-O- β -D-glucoside in Radix astragali by intestinal flora experiment in vitro [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2015, 31(2): 170-173.
- [33] 张蔚, 江曙, 钱大玮, 等. 芒柄花苷与人体肠道细菌的相互作用研究 [J]. 药学学报, 2014, 49(8): 1162-1168.
- Zhang W, Jiang S, Qian D W, et al. The interaction between ononin and human intestinal bacteria [J]. Acta Pharm Sin, 2014, 49(8): 1162-1168.