

六味地黄汤中马钱子素小鼠体内药代动力学研究

谢跃生,张振清,阮金秀*

(军事医学科学院毒物药物研究所,北京 100850)

摘要:目的 研究六味地黄汤中马钱子素小鼠体内药代动力学。方法 高效液相色谱-紫外检测法。结果 六味地黄汤小鼠 ig 给药后,马钱子素的药代动力学模型为单室模型一级吸收,其药代动力学参数为 $K_a=0.04\text{ min}^{-1}$, $K_e=0.019\text{ min}^{-1}$, $T_{(\text{peak})}=42.4\text{ min}$, $t_{1/2k_a}=17.4\text{ min}$, $t_{1/2k_e}=35.75\text{ min}$ 。结论 此药代动力学参数可能是六味地黄汤中马钱子素受其他成分影响所致。

关键词: 六味地黄汤;马钱子素;药代动力学;高效液相色谱

中图分类号: R285.61 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)09-0817-03

Pharmacokinetic study of loganin in LIUWEI DIHUANG DECOCTION* in mice

XIE Yue-sheng, ZHANG Zhen-qing, RUAN Jin-xiu

(Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

Abstract **Object** To study the pharmacokinetics of loganin in LIUWEI DIHUANG DECOCTION (LWDHD) in mice. **Methods** HPLC-UV detection was used to determine the loganin levels in biological samples. **Results** After ig LWDHD in mice, the plasma concentration-time course fitted well to one-compartment model with the 1st order absorption and with the following pharmacokinetic parameters; $K_a=0.04\text{ min}^{-1}$, $K_e=0.019\text{ min}^{-1}$, $T_{(\text{peak})}=42.4\text{ min}$, $t_{1/2k_a}=17.4\text{ min}$, $t_{1/2k_e}=35.75\text{ min}$. **Conclusion** The pharmacokinetic parameters of loganin obtained in the study may be attributed to the effect of other constituents in the DECOCTION.

Key words LIUWEI DIHUANG DECOCTION (LWDHD); loganin; pharmacokinetics; HPLC

* LIUWEI DIHUANG DECOCTION is a Chinese decoction based on a classic recipe with the function of nourishing *yin* and tonifying the kidney.

六味地黄汤是滋阴补肾的经典名方,对人和动物的免疫功能有显著的调节作用^[1,2]。马钱子素是山茱萸的有效成分,具有明显的抗炎、调节免疫的功能^[3,4]。单体马钱子素在小鼠体内的药代动力学研究已经报道^[5]。本文对小鼠 ig 六味地黄汤后马钱子素的药代动力学进行了研究,为探讨中药复方药动学一般规律提供实验依据。

1 材料

1.1 药品:熟地黄、山茱萸、山药、泽泻、茯苓、丹皮均购于北京同仁堂药店,并由本所植化室鉴定。马钱子素由本所植化室提供,白色粉末,纯度 99%。六味地黄汤由本所中药药理室制备,相当于生药 1 g/mL 溶液。

1.2 仪器及试剂:HP1100 高效液相色谱仪,包括 HP1100 泵, HP1100 紫外检测器;美国光谱物理公

司 SP4600 积分仪;固相萃取 (SPE) 小柱 (1 mL/100 mg, Strate C₁₈-E, Phenomenex USA);振荡器 (T1670 Mixer, Thermolyne); LD5-2A 型医用离心机 (北京医用离心机厂);甲醇 (HPLC 级,邯郸四友生物医学技术有限公司);双蒸水;氯仿、高氯酸、氢氧化钾均为分析纯。

1.3 实验动物:昆明种小鼠,雄性, (20±2) g,由军事医学科学院实验动物中心提供。

2 实验方法

2.1 色谱条件:Phenomenex sphereclon ODS-2 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm, Phenomenex USA); YWG-C₁₈ 预柱;流动相:甲醇-水 (27:73);流速:0.8 mL/min;检测波长:240 nm。

2.2 血浆样品的制备:取小鼠血浆 0.2 mL,加入高氯酸 0.08 mL (1 mol/L),振荡混匀,离心 (3 000

* 收稿日期: 2002-03-07

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目 (No. G1999054401)

作者简介:谢跃生 (1971-),男,江西省兴国县人,讲师,硕士,1994年毕业于华北煤炭医学院临床医学专业,1994~1999年在华北煤炭医学院生化教研室任教,1999~2002年在军事医学科学院攻读药理专业研究生,研究方向为中药复方药动学。

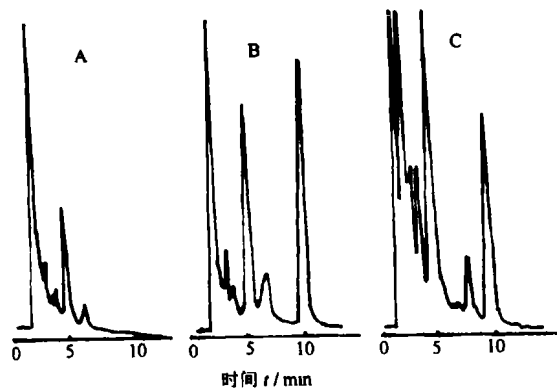
Tel (010) 66874610 E-mail: xieyusl@sohu.com

r/min) 10 min, 取上清用适量 KOH (1 mol/L) 调至中性, 加入氯仿 2 mL, 双蒸水 1 mL, 振荡混匀, 离心 (3 000 r/min) 10 min, 取出水相层并全部过 SPE 小柱, 用水 1 mL 洗涤, 甲醇 1 mL 洗脱, 收集甲醇, 于油浴 (70℃) 挥干, 残渣用流动相 50 μ L 溶解, 进样 20 μ L 分析。

2.3 给药及采血方法: 小鼠禁食过夜, 随机分组, 使每个时间点有 7 只动物。按生药 10 g/kg ig, 分别于给药后 0, 0.083, 0.167, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 h 采血, 置于肝素化的离心管内, 离心 (3 000 r/min) 10 min, 分离出血浆并于 -20℃ 冻存待测。

3 结果

3.1 色谱行为及专一性: 马钱子素与血浆内源性物质、六味地黄汤吸收入血的其他成分或代谢产物色谱峰均达到基线分离, 马钱子素的保留时间为 9.32 min, 其结果见图 1。



A 空白血浆 B 马钱子素+ 空白血浆 C 血样品

图 1 HPLC 图谱

3.2 血浆样品标准曲线: 取空白血浆 0.2 mL, 加入不同浓度马钱子素溶液, 使血浆终浓度为 10, 20, 40, 200, 1 000, 2 500, 5 000 ng/mL, 按血浆样品处理方法操作, 以马钱子素峰面积 (Y) 对马钱子素血浆浓度 (C) 作图, 得回归方程: $Y = 2\,732.7 + 164.3C$, $r = 0.9995$ 。

3.3 提取回收率和精密度试验: 配置 200, 1 000, 2 500 ng/mL 3 个浓度的马钱子素血浆样品, 按血浆样品处理方法操作, 计算提取回收率。日内及日间 RSD, 结果表明上述 3 个浓度下提取回收率为 69.8% ~ 71.3%, 日内及日间精密度 RSD 均小于 10%, 结果见表 1。

3.4 小鼠给药后马钱子素的药代动力学结果: 血药浓度-时间曲线见图 2。用 3P87 药代动力学计算机程序进行处理, 六味地黄汤中马钱子素在小鼠体内过程符合单室模型一级吸收, 药动力学参数见表 2。

表 1 马钱子素在血浆测定的回收率、

日内及日间精密度 ($n = 5$)

加入量 (ng/mL)	回收率 (%)	RSD (%)	
		日内	日间
200	69.8	5.3	9.0
1 000	71.2	3.1	7.9
2 500	71.3	2.2	9.2

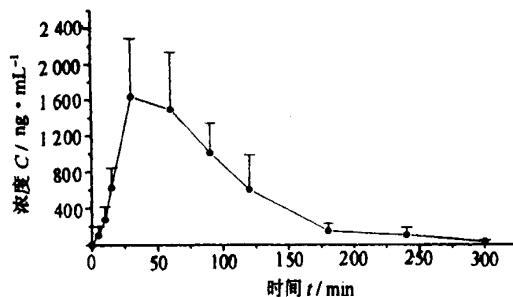


图 2 小鼠一次给药后血浆中马钱子素的平均血药浓度-时间曲线 ($n = 7, \bar{x} \pm s$)

表 2 小鼠 ig 六味地黄汤后马钱子素的药代动力学参数

参数	单位	数值
AUC	(μ g/mL) $\times$ min	165.20
$T_{(peak)}$	min	42.40
C_{max}	μ g/mL	1.60
$t_{1/2\alpha}$	min	17.40
$t_{1/2\beta}$	min	35.75
K_a	min^{-1}	0.04
K_e	min^{-1}	0.19

4 讨论

我们采用马钱子素单体血浆样品处理方法^[5], 能够分离六味地黄汤 ig 后小鼠血浆中的马钱子素, 但由于复方制剂吸收入血的成分较复杂, 给药后不同时间点血中经时成分谱有变化, 色谱峰较多, 内标没有合适的保留时间。采用外标法严格操作, 其回收率及准确性能满足实验要求, 故本实验采用外标法定量分析。

六味地黄汤中马钱子素小鼠体内过程符合单室模型一级吸收, 而单体马钱子素为二室模型一级吸收^[5]; 小鼠 ig 六味地黄汤和单体马钱子素后马钱子素的消除半衰期为 35.8 min 和 29.0 min, 表明六味地黄汤中马钱子素的消除速度变慢; 根据文献^[6] C_{max}/AUC 作为吸收速度指标, 本实验中六味地黄汤的 C_{max}/AUC 是单体马钱子素的 0.59 倍, 另 $T_{(peak)}$ 分别为 42.4 min 和 30 min, 表明六味地黄汤中马钱子素的吸收速度也变慢; 这些结果表明复方对马钱子素的药动力学有影响。中药复方药动学的研究应建立在有效成分药动力学研究的基础上, 复方中药的君臣佐使可明显影响彼此在体内化学成分的药动力学参数^[7], 本文证明复方中马钱子素与单体

马钱子素^[5]的药动学有差异,至于六味地黄汤的配伍组合对马钱子素的影响,我们正在研究中。

参考文献:

- [1] 马世平,杭秉茜,刘越,等. 六味地黄汤的免疫药理研究[J]. 现代应用药学, 1990, 7(3): 14-16.
- [2] 贾泰元. 六味地黄丸的免疫调节作用[J]. 中成药, 1994, 16(9): 34-35.
- [3] 赵武述,张玉琴,李洁,等. 山茱萸成分的免疫活性研究[J]. 中草药, 1990, 21(3): 113-116.
- [4] Mathad V T, Raj K, Bhaduri A P, *et al.* Studies on the pro-

file of immunostimulant activities of modified indoid glycosides [J]. Bioorg Med Chem, 1998, 6(5): 605-611.

- [5] 谢跃生,张振清,阮金秀. 小鼠血浆中马钱素的高效液相色谱测定法及药代动力学[J]. 药理学报, 2002, 37(7): 548-550.
- [6] Endreyi L, Fritsch S, Yan W. C_{max}/AUC is a clearer measure that C_{max} for absorption rates in investigations of bioequivalence [J]. Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol, 1991, 29: 394.
- [7] 黄熙,陈可冀,任平. “复方效应成分动力学”新假说的科学证据. 要素意义及前景[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(4): 250-252.

青蒿酯钠诱导人肿瘤细胞凋亡及其分子机制的探讨

杨小平,张星*

(中山医科大学肿瘤研究所,广东 广州 510016)

摘要: 目的 研究青蒿酯钠诱导人肝癌细胞凋亡作用及探讨青蒿酯钠诱导人肝癌细胞凋亡的分子机制。方法 肝癌细胞 (BEL-7402) 经药物处理后,用荧光显微镜、透射电镜和流式细胞仪分析诱导凋亡作用,采用 Western blot 检测 p53 p21 和 bc1-2 结果 与对照组相比,经青蒿酯钠处理后,肝癌细胞中 p53 p21 蛋白表达水平无明显变化,而 bc1-2 蛋白表达水平降低。结论 青蒿酯钠可诱导人肝癌细胞 (BEL-7402) 凋亡,其凋亡的分子机制是 p53 非依赖性的,即与 p53 p21 无关,而与凋亡调节基因 bc1-2 下调有关。

关键词: 青蒿酯钠;凋亡;基因

中图分类号: R286.91 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)09-0819-03

Induction of human tumor cell apoptosis by sodium artesunate and its molecular mechanism

YANG Xiao-ping, ZHANG Xing

(Cancer Institute, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510016, China)

Abstract **Object** To study the apoptosis induced by sodium artesunate (SA) in human liver cancer cells and its molecular mechanism. **Methods** Induction of the apoptosis was analyzed by fluorescent microscope, transmission electron micrograph and flow cytometry based on drug treated BEL-7402. Expressions of p53, p21 and bc1-2 were determined by Western blot. **Results** The expression level of p53 and p21 had no change remarkably, but the expression level of bc1-2 was reduced compared to that of the control group after the human liver cancer cells were treated by SA. **Conclusion** The apoptosis in human liver cancer cells (BEL-7402) may be induced by SA, the molecular mechanism of apoptosis may be p53-independent, that is no relative to p53 and p21. Otherwise, it is relative to bc1-2 down-regulation.

Key words sodium artesunate (SA); apoptosis; gene

青蒿酯钠为青蒿素类衍生物,是一种新型的抗癌药物。近年来发现青蒿酯钠有抗肿瘤作用,其対小鼠艾氏腹水癌细胞、人鼻咽癌细胞 (SUNE-1 和 CNE-1)、人宫颈癌细胞 (HeLa) 生长有明显的抑制作用^[1,2],我们已证明青蒿酯钠对人肝癌有体内外抗肿瘤作用^[3]。本实验旨在从诱导肿瘤细胞凋亡的角度来探讨青蒿酯钠抗肿瘤作用机制,并研究青蒿酯

钠对肝癌细胞中凋亡调控基因 p53 p21 和 Bcl-2 的影响,从而探讨青蒿酯钠诱导人肝癌细胞凋亡的分子机制。

1 材料和方法

1.1 药物与细胞系: 青蒿酯钠由广西桂林第二制药厂出品,系白色结晶,用前以 5% NaHCO₃ 助溶,用生理盐水配成相应浓度。肝癌细胞株 (BEL-7402) 由

* 收稿日期: 2001-12-08

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (970087)

作者简介: 杨小平 (1942-),女,广东人,研究员,1967年毕业于北京医学院医疗系,毕业后至 1979 年在北京中国医学科学院抗菌素研究所,1979 年至今在中山医科大学肿瘤防治中心,研究方向为肿瘤药理。Tel (020) 87765368-7340 E-mail yangxiaoping88@hotmail.com