

研究了 Glide 对接得分中的非特异性成分,通过对阴性配体的对接得分的研究,发现配体的分子特征描述符与非特异性得分具有高度相关性,建立了相关性方程,并以去除非特异成分后的分级评价作用作为选择性评价指标,在少量的阳性分子中得到了较好的验证,由于配体和受体的相互作用是非常复杂的,本研究结果的适用面还需要经过更大系统的验证。本研究以去除非特异性得分来提高虚拟筛选结果的可靠性,是非常有效的尝试^[5,11]。

本研究的另一个目的是利用理论方法研究植物成分的可能的作用机制。随着越来越多的植物成分结构的明确及受体结构的测定,以分子对接法进行研究具有很强的可行性^[3,11],不仅可以弥补动物药理实验方法的缺陷,也减少了人力和物力的投入,更重要的是可以帮助阐明中药作用的物质基础。

本研究选择抗炎的方向研究环烯醚萜可能的作用机制,得到了一些有意义的结果,环烯醚萜还具有多种生物活性,其广泛的作用还需要深入的研究。由于环烯醚萜结构比较简单,是一个非常有价值的片段结构,对于新药的研发具有重要的意义^[12]。

致谢:上海超算中心和华南理工大学网络计算中心提供支持。

参考文献:

[1] 万进,方建国. 环烯醚萜类化合物的研究进展 [J]. 医药导报, 2006, 25(6): 530-533.

[2] 符海霞,刘鹏,王玉丽,等. 甾体环烯醚萜类成分活性作用的虚拟评价 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 767-771.
 [3] 朱伟,陈可冀,徐俊杰. 计算机药物虚拟筛选技术在中医药领域中的应用前景 [J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(3): 263-266.
 [4] 李利华,赵蔡斌,闵锁田,等. 基于配体-受体理论的计算机辅助药物分子设计方法及应用 [J]. 西北药学杂志, 2007, 22(5): 282-285.
 [5] 陈正隆,徐为人,汤立达. 分子模拟的理论研究与实践 [M]. 北京:化学工业出版社, 2007.
 [6] Friesner R A, Banks J L, Murphy R B, et al. Glide: A new method for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy [J]. *Med Chem*, 2004, 47: 1739-1749.
 [7] Sherman W, Day T, Jacobson M P, et al. Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effect [J]. *Med Chem*, 2006, 49: 534-553.
 [8] Wang R, Fang X, Lu Y, et al. The PDBbind database: Collection of binding affinities for protein-ligand complexes with known three-dimensional structures [J]. *Med Chem*, 2004, 47: 2977-2980.
 [9] Cho A E, Guellar V, Berne B J, et al. Importance of accurate charges in molecular docking: quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM) approach [J]. *Comput Chem*, 2005, 26(9): 915-931.
 [10] Friesner R, Murphy R B. Extra precision glide: Docking and scoring Incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes [J]. *Med Chem*, 2006, 49: 6177-6196.
 [11] Krovat E M, Steindl T, Langer T. Recent advances in docking and scoring [J]. *Bentham Curr Comput-Aided Drug Design*, 2005, 1: 93-102.
 [12] Leroux V, Maigret B. Should structure-based virtual screening techniques be used more extensively in modern drug discovery? [J]. *Comput Appl Chem*, 2007, 1: 11-20.

川芎嗪在小鼠血、脑和肝中的药动学研究

王利胜,郭琦,韩坚,张英丰,陈秀娟*

(广州中医药大学中药学院,广东 广州 510006)

摘要:目的 研究川芎嗪在小鼠体内血、脑、肝中的药动学,比较川芎嗪微乳和水溶液在小鼠体内药动学特征。方法 川芎嗪微乳与其水溶液分别尾 iv 给药,用 HPLC 法测定不同时间点小鼠血、脑、肝中的川芎嗪质量浓度,用药动学软件对药时曲线数据进行拟合。结果 微乳组的主要药动学参数分别为血浆: t_{max} 2.50 min、 C_{max} 4.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、AUC 115.70 $\text{min} \cdot \mu\text{g}/\text{mL}$ 、MRT 20.88 min;脑: t_{max} 5.00 min、 C_{max} 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、AUC 259.51 $\text{min} \cdot \mu\text{g}/\text{mL}$ 、MRT 23.09 min;肝: t_{max} 5.00 min、 C_{max} 10.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、AUC 305.81 $\text{min} \cdot \mu\text{g}/\text{mL}$ 、MRT 21.88 min。水溶液组的主要药动学参数分别为血浆: t_{max} 2.50 min、 C_{max} 4.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、AUC 72.74 $\text{min} \cdot \mu\text{g}/\text{mL}$ 、MRT 12.54 min;脑: t_{max} 5.00 min、 C_{max} 4.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、AUC 130.19 $\text{min} \cdot \mu\text{g}/\text{mL}$ 、MRT 25.90 min;肝: t_{max} 2.50 min、 C_{max} 6.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、AUC 182.51 $\text{min} \cdot \mu\text{g}/\text{mL}$ 、MRT 23.03 min。结论 微乳改变了川芎嗪在小鼠血浆、脑、肝中药物学行为,提高了川芎嗪在脑、血、肝,特别是脑中的分布。

关键词:川芎嗪;微乳;药动学;HPLC

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)06-0935-04

* 收稿日期:2008-11-07

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30873443);广东省中医药局科研课题(2007337);广州中医药大学创新基金资助

作者简介:王利胜(1968—),男,副教授,博士,研究方向为中药制剂剂型与新技术研究、中药药理学、生物药剂学与药动学。

Tel: (020) 39358043 E-mail: wlls68@126.com

Pharmacokinetics of ligustrazine in blood, brain, and liver of mice

WANG Li-sheng, GUO Qi, HAN Jian, ZHANG Ying-feng, CHEN Xiu-juan

(College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract : Objective To study the pharmacokinetics of ligustrazine in blood, brain, and liver of mice. **Methods** Ligustrazine solution and microemulsion were iv administrated to caudal vein of mice. Ligustrazine concentration in plasma, brain, and liver was determined by HPLC method. The data were processed with the software. **Results** The main pharmacokinetic parameters of ligustrazine microemulsion were: plasma t_{max} 2.50 min, C_{max} 4.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AUC 115.70 min $\cdot\mu\text{g}/\text{mL}$, MRT 20.88 min; brain: t_{max} 5.00 min, C_{max} 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AUC 259.51 min $\cdot\mu\text{g}/\text{mL}$, MRT 23.09 min; liver: t_{max} 5.00 min, C_{max} 10.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AUC 305.81 min $\cdot\mu\text{g}/\text{mL}$, MRT 21.88 min. The main pharmacokinetic parameters of ligustrazine solution were: plasma t_{max} 2.50 min, C_{max} 4.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AUC 72.74 min $\cdot\mu\text{g}/\text{mL}$, MRT 12.54 min; brain: t_{max} 5.00 min, C_{max} 4.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AUC 130.19 min $\cdot\mu\text{g}/\text{mL}$, MRT 25.90 min; liver: t_{max} 2.50 min, C_{max} 6.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AUC 182.51 min $\cdot\mu\text{g}/\text{mL}$, MRT 23.03 min. **Conclusion** The microemulsion could alter the ligustrazine distribution in plasma, brain, and liver of mice, especially in brain.

Key words: ligustrazine; microemulsion; pharmacokinetics; HPLC

川芎嗪化学名为四甲基吡嗪,药理研究显示其有改善微循环、抑制血小板聚集、防止血栓形成、改善肾脏缺血及保护肾功能等作用^[1],已成为临床中治疗缺血性脑中风备受推崇的药物之一。但川芎嗪在脑内的分布并不高,为进一步提高川芎嗪对脑血管类疾病的治疗,现选用新的剂型-微乳作为其载体。微乳通常是由乳化剂、助乳化剂、油相和水相组成的澄明或带乳光的液体,是一种新型药物载体,可作为速释、缓释及靶向给药系统,提高药物的生物利用度^[2]。国内外文献未见川芎嗪微乳制剂的研究报道,本实验制备川芎嗪微乳并以川芎嗪水溶液作为对照,采用高效液相色谱法测定小鼠血、脑、肝中川芎嗪的浓度,分别考察自制川芎嗪微乳在小鼠血、脑、肝中的药动学行为,为进一步研究川芎嗪微乳打下基础。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂:川芎嗪(南京苏朗医药科技开发有限公司,批号 080220);盐酸川芎嗪、阿司匹林内标物对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110817-200305、100113-200302);川芎嗪微乳、川芎嗪水溶液(自制);甲醇、乙腈均为色谱纯。

1.2 仪器与色谱条件:

1.2.1 仪器:KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);XW-80A 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂);AU Y220 电子天平(广州湘仪机电设备有限公司);TGL-16B 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);微量移液器(上海求精生化试剂仪器有限公司);HPLC 仪:Summit P680A 泵,Summit PDA-100 二级管阵列检测器;

Chromleon 色谱工作站(美国 Dionex 公司)。

1.2.2 色谱条件:Hypersil ODS-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);甲醇-1.5% 冰醋酸溶液(45:55)为流动相;内标物为阿司匹林对照品;柱温:室温;体积流量:1 mL/min;紫外检测波长:279 nm;进样量:20 μL 。

1.3 动物:NIH 小鼠,雌雄不限,体质量(20 ± 2) g,由广州中医药大学动物中心提供(动物许可证号:粤监证字 2007A013)。

1.4 生物样品的处理方法

1.4.1 血浆样品的处理:取血浆于具塞塑料试管中离心,取上清 0.2 mL,定量加入 0.4 mL 混有内标物(3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的乙腈液提取,涡旋 2 min,15 000 r/min 离心 10 min,移取上清液(内标物质量浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$),即得。

1.4.2 脑、肝组织样品处理:取小鼠全脑(剥离软脑膜)及一叶肝脏(每次均在同一位置),用吸水纸蘸净残余血迹,分别精密称质量后加 5 倍量生理盐水,用玻璃匀浆器匀浆,得脑匀浆和肝匀浆。离心 30 min 后取上清液 0.2 mL,加 0.4 mL 混有内标物(3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的乙腈,涡旋 2 min,15 000 r/min 离心 30 min,取上清液(内标物质量浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$),即得。

1.5 小鼠体内药动学研究:取小鼠 84 只,随机分为川芎嗪微乳组和川芎嗪水溶液组各 42 只,每组各随机分为 7 个小组(每小组 6 只),每个小组分别对应 1 个时间点。小鼠 1 次性尾 iv 给药(川芎嗪给药剂量为 36 mg/kg),分别于给药后 2.5、5、10、20、45、60、90 min 取血。取血时先用肝素润湿小烧杯,摘除眼球取血。取血后立即取出小鼠脑和肝组织样

品。并按照 1.4 中方法处理样品,得到供试品溶液,并进行测定,将测得的峰面积以内标法计算血浆、脑、肝中川芎嗪的质量浓度。

1.6 体内分析方法的建立

1.6.1 标准曲线的制备:精密称量 12.5 mg 盐酸川芎嗪对照品,置于 100 mL 量瓶中,加乙腈溶解,稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液。取空白小鼠血浆、脑匀浆和肝匀浆上清液各 2 mL,加入盐酸川芎嗪对照品溶液适量,按 1.4 项下方法处理,制成 0.006 25、0.031 2、0.156、0.781、3.906、7.813 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液(内标物质量浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$),进样。以对照品与内标物峰面积比(Y)为纵坐标,对照品质量浓度(X)为横坐标进行线性回归,川芎嗪在血浆、脑和肝中的回归方程见表 1。结果表明,生物样品中川芎嗪质量浓度在 0.006 25 ~ 7.813 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与峰面积积分值呈良好线性关系。

表 1 川芎嗪在血浆、脑和肝中的回归方程

Table 1 Regresson equation of lignstrazine in plasma, brain, and liver of mice

样品	回归方程	r
血浆	$Y = 6.4562 X + 1.5303$	0.9985
脑	$Y = 6.6372 X + 0.5098$	0.9973
肝	$Y = 8.0380 X - 0.7121$	0.9964

1.6.2 方法学考察:本课题组前期研究结果证明该测定方法稳定可行^[3]。

1.7 数据处理:采用 PKanalyst 药代动力学处理软件处理,以 AIC (Akaike criteria)、SIC (Schwartz criteria) 最小准则,结合拟合度、相关系数等指标进行最佳房室模型的判别,同时进行非房室模型分析,并将微乳组与水溶液组在血、脑、肝中的各个药动学参数进行对比。

2 结果

小鼠体内药动学实验结果见图 1~3 及表 2。从尾 iv 2.5 min 后,开始取血检测血浆中川芎嗪的质量浓度。此时微乳组的血药浓度为 4.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$,水溶液组的血药浓度为 4.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$,最大血药浓度无显著差别。随着给药时间的延长,血药浓度逐渐下降,特别是在前 20 min 内下降速度最快,但是每个时间点的血药浓度微乳组均大于水溶液组。从统计距参数看,微乳组与水溶液组的 AUC 分别为 115.70、72.74 $\text{min} \cdot \mu\text{g}/\text{mL}$,微乳组大于水溶液组,说明微乳提高了川芎嗪在血中的浓度。

与血药浓度测定结果不同,脑药浓度高峰出现在 5 min,较血中慢,提示药物从静脉注射到透过血脑屏障到达脑部需要一定时间。其中水溶液组的脑

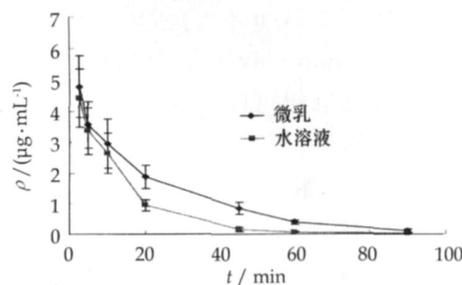


图 1 小鼠体内川芎嗪血药浓度经时曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Concentration-time curve of lignstrazine in plasma of mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

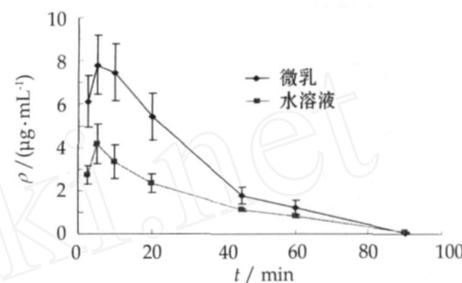


图 2 川芎嗪在小鼠脑中药物浓度经时曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Concentration-time curve of lignstrazine in brain of mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

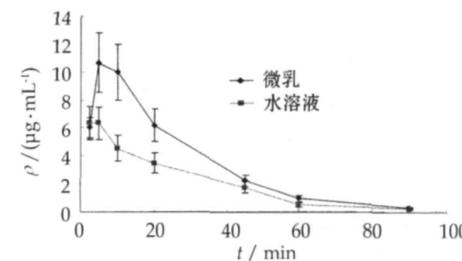


图 3 川芎嗪在小鼠肝中药物浓度经时曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 3 Concentration-time curve of lignstrazine in liver of mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表 2 川芎嗪微乳和川芎嗪水溶液在小鼠体内主要药动学参数 ($n=6$)

Table 2 Main pharmacokinetic parameters of lignstrazine microemulsion and solution in mice in vivo ($n=6$)

药动学参数	血		脑		肝	
	微乳	水溶液	微乳	水溶液	微乳	水溶液
t_{\max}/min	2.50	2.5	5.00	5.00	5.00	2.50
$C_{\max}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	4.79	4.42	7.81	4.14	10.66	6.33
$\text{AUC}/(\text{min} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	115.70	72.74	259.51	130.19	305.81	182.51
MRT/min	20.88	12.54	23.09	25.90	21.88	23.03
房室模型	二房室	一房室	一房室	一房室	一房室	一房室

药浓度 C_{\max} 为 4.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$,微乳组可达到 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$,较水溶液组明显增加,并且各个时间点微乳的脑药浓度均大于水溶液组,从曲线下面积看,微乳

组的 AUC 为 259.51 min · μg/mL, 水溶液组的 AUC 为 130.19 min · μg/mL, 微乳组较水溶液组显著增加, 说明微乳组可以显著提高川芎嗪在脑部的分布, 增加脑药量。

肝药浓度微乳组经时变化与脑药浓度类似, 药物浓度峰出现在 5 min, 水溶液组肝药浓度在 2.5 min, 水溶液达峰时间较微乳组快, 说明微乳在肝中有一定的缓释作用。比较肝药峰浓度, 微乳组为 10.66 μg/mL, 水溶液只有 6.33 μg/mL, 并且微乳组的 AUC 大于水溶液组, 提示微乳亦改变了川芎嗪药物在肝中的药动学, 增加了肝中的分布。

3 讨论

黄志力等^[4]通过对川芎嗪静注后大鼠组织中药物浓度经时变化的观察, 川芎嗪的肝脏摄取率最高, 其他依次为心脏、脾、脑、睾丸、肺、肾、肌肉、血浆, 其主要分布于血流丰富的大循环和组织, 脑内的分布不高。而本实验川芎嗪微乳与水溶液的比较证明了: 微乳可以改变川芎嗪在血、脑、肝的药动学行为, 分布均有所增加, 并且脑药分布提高明显。微乳增加了川芎嗪在血浆、脑、肝内浓集的倾向, 血浆中药物浓度增加说明周围组织中药物浓度会相对减少, 此时脑药浓度的显著提高可能是由于微乳中的油相组分增强了药物与脑组织的亲和性, 同时微乳属于纳米微粒载药体系, 可使微乳携带包裹于内相(油相)的药物迅速通过血脑屏障, 提高药物在脑内的分布^[5]。由以上结果预测, 川芎嗪微乳具有脑靶向性。川芎嗪常用于脑血管类疾病的治疗, 但脑内的分布

并不高, 所以今后对川芎嗪微乳脑靶向性研究具有十分重要的意义。

实验过程中, 由于小鼠的个体差异以及繁琐的样品前处理过程, 实验数据难免产生误差。而与传统的样品采集和处理技术相比, 微透析则较有优势^[6]: 微透析对取样部位的伤害很小, 几乎不影响组织中的生理过程, 得到的样品更能反映物质进入人体后的实际变化; 不改变组织细胞外液中的液体平衡, 既可以对同一组织进行长时间连续采样, 也可以对同一动物进行多个部位采样, 用较少的实验动物就可以得到足够的的数据, 避免了由于动物的个体差异所造成的实验误差; 其所得样品干净, 可以直接进行样品分析, 省去了繁琐的样品前处理步骤。所以在今后对川芎嗪微乳脑靶向的研究中可以利用微透析采样技术, 避免不必要的误差, 使实验结果更加可靠。

参考文献:

- [1] 舒冰, 周重建, 马迎辉, 等. 中药川芎中有效成分的药理作用研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22(9): 1043-1047.
- [2] Lawrence M J, Gareth D R. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2000, 45: 89-121.
- [3] 王利胜, 袁爱贤, 韩坚, 等. HPLC 法测定川芎嗪在小鼠血浆、脑、肝中的含量 [J]. 中国药房, 2008, 19(9): 654-656.
- [4] 黄志力, 桂常青, 孙瑞元. 盐酸川芎嗪在大鼠体内的分布 [J]. 中国药理学通报, 1994, 10(4): 297-299.
- [5] 全新勇, 黄春玉, 姚静, 等. 尼莫地平微乳在小鼠体内的分布及靶向性评价 [J]. 中国药科大学学报, 2002, 33(4): 293-296.
- [6] 韩冬, 班春林, 崔黎丽, 等. 微透析技术及在药学中的应用进展 [J]. 药学实践杂志, 2005, 23(3): 139-142.

丹参酮_A对大鼠细胞色素 P450 酶的诱导作用

和凡^{1,2}, 钟国平², 赵立子², 毕惠嫦², 黄民^{2*}

(1. 广州市妇女儿童医疗中心, 广东 广州 510120; 2. 中山大学药学院, 广东 广州 510080)

摘要:目的 研究丹参酮_A对大鼠细胞色素 P450 酶的诱导作用。方法 丹参酮_A 7、20、60、180 mg/(kg·d) 4 个剂量组, 雄性 SD 大鼠连续 ig 7 d, 取肝脏组织, 应用体外“cocktail”方法, 反转录-聚合酶链反应, 免疫印迹杂交方法分别检测 CYP450 酶活性、基因表达和蛋白表达的变化。结果 丹参酮_A 能显著诱导 CYP1A2 及 CYP2E1 的活性以及基因、蛋白表达, 且呈剂量依赖性; 高剂量组能增强 CYP2C19 的活性, 但对基因、蛋白表达没有影响; 对包括 CYP3A1 在内的其他亚型没有影响。结论 丹参酮_A 对大鼠多种 CYP450 亚型有诱导作用。

关键词:丹参酮_A; 细胞色素 P450 酶; 诱导

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)06-0938-05

* 收稿日期: 2008-08-11

基金项目: 广东省高等学校中药有效性与安全性重点实验室开放基金 (kf07007)

作者简介: 和凡(1978—), 男, 广东省广州市人, 主管药师, 博士研究生, 至今已在国内外发表论文 10 余篇, 主要从事药物代谢酶和临床药理学研究。Tel: (020) 81330652 E-mail: hefanyh@tom.com

* 通讯作者 黄民 E-mail: huangmin@mail.sysu.edu.cn