

## 补阳还五汤小鼠体内抗氧化作用的药效动力学研究

张继业<sup>1</sup>, 李亚楠<sup>2</sup>, 常春<sup>1</sup>, 杨范莉<sup>1</sup>, 杨广德<sup>1</sup>, 刘婷婷<sup>1</sup>, 林蓉<sup>2\*</sup>

1. 西安交通大学医学部药学院, 陕西 西安 710061

2. 西安交通大学医学部 药理系, 陕西 西安 710061

**摘要:** 目的 研究补阳还五汤(BHD)小鼠体内的药效动力学过程, 为临床合理用药提供参考。方法 测定小鼠 ig BHD 后肝脏组织中丙二醛(MDA)水平和超氧化物歧化酶(SOD)活性, 制备 BHD 含药血清, 并观察含药血清对小鼠空白肝匀浆内 MDA 水平和 SOD 活性的影响, 并进一步考察 BHD 对 MDA 及 SOD 活性影响的时效、量效关系, 估算相应的药效动力学参数。结果 BHD 整体给药及其含药血清均显著降低小鼠肝内 MDA 水平, 增强 SOD 的活性, 与对照组相比, 差异显著 ( $P < 0.05$ )。MDA 及 SOD 的整体和血清药理实验的时-效曲线均呈现明显的多峰现象, 相应药效动力学参数除效应达峰时间 ( $t_p$ ) 和效应呈现半衰期 [ $t_{1/2(Ka)}$ ] 比较接近外, 其余参数均具有明显差异 ( $P < 0.05$ )。结论 BHD 具有显著的抗氧化效应, 且药效强度较高, 作用时间长, 其单次给药的药效动力学模型为一室开放模型。

**关键词:** 补阳还五汤; 抗氧化; 药效动力学; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 血清药理学

中图分类号: R285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)01-0096-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.01.019

## Pharmacodynamics study on *in vivo* anti-oxidant action of Buyang Huanwu Decoction in mice

ZHANG Ji-ye<sup>1</sup>, LI Ya-nan<sup>2</sup>, CHANG Chun<sup>1</sup>, YANG Fan-li<sup>1</sup>, YANG Guang-de<sup>1</sup>, LIU Ting-ting<sup>1</sup>, LIN Rong<sup>2</sup>

1. School of Pharmacy, Health Science Center, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

2. Department of Pharmacology, Health Science Center, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

**Abstract: Objective** To study the *in vivo* pharmacodynamics characteristics of Buyang Huanwu Decoction (BHD) in mice, and to provide reference for rational clinical drug use. **Methods** The level of MDA and activity of SOD in liver tissue of mice were determined after ig treatment with BHD or its drug-containing serum. Further more, the time-effect and dose-effect relationship of BHD on MDA level and SOD activity were carried out. The parameters of pharmacodynamics were estimated based on the time-effect and dose-effect curves. **Results** Compared with control group, both BHD and its drug-containing serum could reduce MDA level, while raise SOD activity in the liver of mice ( $P < 0.05$ ). Time-effect curves both present multi-peak but most pharmacodynamics parameters showed significant differences ( $P < 0.05$ ), except  $t_p$  and  $t_{1/2(Ka)}$ . **Conclusion** BHD has obvious antioxidant effect and pharmacodynamics characteristics can be described as one-compartment model.

**Key words:** Buyang Huanwu Decoction; anti-oxidant; pharmacodynamics; MDA; SOD; serum pharmacology

补阳还五汤(BHD)出自清代王清任著《医林改错》,由黄芪、赤芍、川芎、当归、地龙、桃仁、红花7味中药组成。方中重用生黄芪以补元气,气行则血行,为君药;当归活血补血,为臣药;再配以赤芍、川芎、红花、桃仁等活血祛瘀之品,使瘀祛而不伤正;地龙长于通行经络,诸药合用共奏补气活血通络之功,是治疗气虚血瘀所致偏瘫的常用

方。现代药效学研究证实 BHD 药理作用广泛<sup>[1-3]</sup>,其中抗氧化<sup>[4]</sup>、保护心脑血管功效近几年关注较多<sup>[5-6]</sup>,临床上,常用于多种心脑血管疾病的治疗<sup>[7]</sup>。

本实验是在 BHD 药动学研究基础上<sup>[8]</sup>采用整体及血清药理学的方法<sup>[9-10]</sup>,以丙二醛(MDA)与超氧化物歧化酶(SOD)为抗氧化作用的指标,评价 BHD 在小鼠体内的药效动力学过程,明确

收稿日期: 2014-05-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072643, 81270347); 中央高校基本科研业务费(XJ08142011, XJ2011091)

作者简介: 张继业(1979—),男,副教授,主要从事药物剂型设计与新药研发。E-mail: zjy2011@mail.xjtu.edu.cn

\*通信作者 林蓉,教授。E-mail: linrong@mail.xjtu.edu.cn

其抗氧化作用的量-效关系与时-效关系, 获取相应的动力学参数, 为临床合理用药提供了依据。

## 1 材料

### 1.1 药材与试剂

BHD 处方饮片均购自北京同仁堂陕西分公司, 经西安交通大学药学专业牛晓峰教授鉴定, 均符合《中国药典》2010年版要求。BHD 按《医林改错·卷下·瘫痪论》古方比例(黄芪 120 g、归尾 3 g、赤芍 5 g、地龙 3 g、川芎 3 g、红花 3 g 和桃仁 3 g)组方。MDA 试剂盒(批号 20090711)、SOD 试剂盒(批号 20090703)均购自南京建成生物工程研究所; NaCl、冰醋酸、乙醚(分析纯, 西安化学试剂厂), 蒸馏水(自制)。

### 1.2 动物

SPF 级 ICR 小鼠, 体质量(22±2) g, 雌雄各半, 购自西安交通大学医学院实验动物中心, 实验动物使用许可证号 SYXK(陕)2007-003。

### 1.3 仪器

752 型分光光度计(上海光谱仪器有限公司), GENIUS 16K-R 高速冷冻离心机(长沙市鑫奥仪器仪表有限公司), EH<sub>2</sub>O 蒸馏水机(上海摩勒生物科技有限公司), SC-3616 低速离心机(合肥科大创新股份有限公司中佳分公司), XH-B 涡旋混合器(姜堰市康健医疗器具有限公司), HH-4 数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司), ANKE LQP-B-4 制冰机(上海安亭科学仪器厂), FJ-200 高速分散匀质机(上海标本模型厂)。

## 2 方法

### 2.1 BHD 冻干粉制备

取黄芪 120 g、归尾 3 g、赤芍 5 g、地龙 3 g、川芎 3 g、桃仁 3 g、红花 3 g, 沸水提取 3 次(加水量分别为 1 400、1 200、900 mL), 每次 30 min, 合并滤液约 2 000 mL, 经旋转蒸发器浓缩至约 300 mL, 冻干, 得 55.3 g BHD 冻干粉备用。

### 2.2 含药血清制备

健康小鼠, 随机分为 11 组, 禁食不禁水 12 h, 按体质量 ig 给予 BHD(20 g 冻干粉加适量蒸馏水定容至 50 mL, 成流浸膏状), 给药体积 0.5 mL/20 g(剂量为生药 30 g/kg, 相当于人临床用药剂量的 10 倍), 给药后 5、10、15、30、45、60、90、120、180、360 min, 取血, 分离血清, 冻存备用。

### 2.3 含药血清对肝组织 MDA 及 SOD 影响

健康小鼠禁食 12 h, 断头放血处死, 迅速取出

肝脏, 冰浴中用预冷的 4 ℃生理盐水洗去表面血污, 称质量, 以 1:9 比例加入生理盐水, 800×g 离心 10 min 取上清, 得肝匀浆, 备用。每支 2 mL EP 管中加入空白肝匀浆 1.5 mL 后加入 0.1 mL BHD 含药血清或空白血清, 按试剂盒方法测定肝组织中 MDA 水平及 SOD 活性, 计算 BHD 含药血清对 MDA 生成的抑制率及 SOD 活性提高率。

MDA 抑制率=(空白血清组 MDA 值-含药血清组 MDA 值)/空白血清组 MDA 值

SOD 活性提高率=(含药血清组 SOD 值-空白血清组 SOD 值)/空白血清组 SOD 值

### 2.4 BHD 整体给药对肝组织 MDA 及 SOD 影响

将“2.2”项下含药血清制备所用小鼠处死, 立即取出肝脏, 按“2.3”项操作测定肝组织中 MDA 水平及 SOD 活性, 计算 BHD 整体给药后对小鼠肝组织 MDA 生成的抑制率及 SOD 活性提高率。

### 2.5 药效动力学参数估算

时间-效应参数估算: 将上述整体及血清药效结果, 绘制 MDA 及 SOD 时间-效应曲线。计算效应消除速率常数( $K_e$ )、效应消除半衰期 [ $t_{1/2(K_e)}$ ]、效应呈现速率常数( $K_a$ )、效应呈现半衰期 [ $t_{1/2(K_a)}$ ]、效应维持时间( $t_m$ )、效应达峰时间( $t_p$ )。

### 2.6 剂量-效应参数估算

BHD 以生药剂量 3、12、21、30、39 g/kg(分别相当于人临床用药剂量的 1、4、7、10、13 倍)分别对小鼠 ig 给药, 根据时效曲线的达峰时间, 在给药后 90 min 时, 按“2.3”和“2.4”项方法测定 BHD 不同剂量整体给药及含药血清对小鼠肝组织 MDA 及 SOD 的影响, 以正常小鼠作为对照。以剂量对数和相应的抑制率或提高率求出量效方程, 计算最低起效剂量  $D_{\min} = \lg^{-1}(a/b)$ (a、b 分别为量效方程中的截距和斜率)。

### 2.7 数据处理

数据采用药效动力学参数估算软件 PKSolver 2.0 处理, 估算药效动力学参数; 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 结果采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析, 组间比较采用单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 对小鼠肝脏 MDA 的时间-效应关系

BHD 给药后小鼠肝脏 MDA 生成抑制率的时间-效应曲线见图 1, 含药血清对空白肝脏 MDA 生成抑制率的时间-效应曲线见图 2。

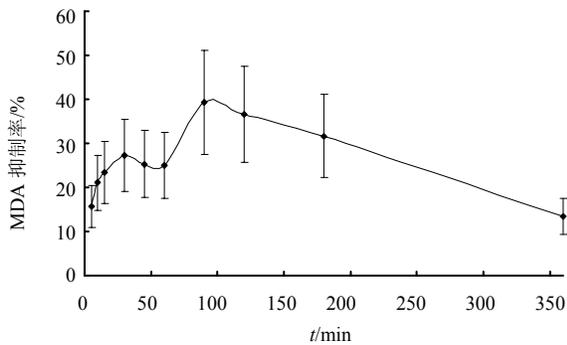


图 1 BHD 给药后对小鼠肝脏 MDA 抑制作用时间-效应曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 1 Inhibition time-effect curve of MDA level in liver tissue of mice after treatment with BHD ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

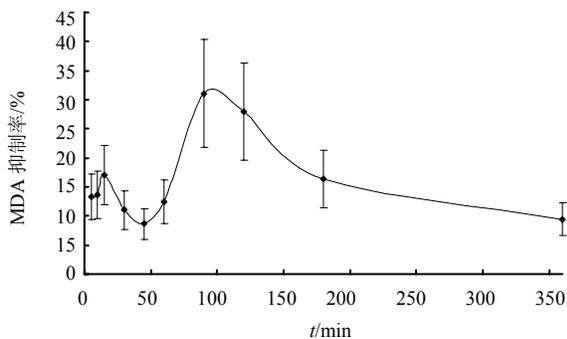


图 2 BHD 含药血清对空白肝脏 MDA 抑制作用时间-效应曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 2 Inhibition time-effect curve of MDA in blank liver tissue of mice treated with serum containing BHD ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

### 3.2 对小鼠肝脏 SOD 的时间-效应关系

BHD 给药后小鼠肝脏 SOD 活性提高率的时间-效应曲线见图 3, 含药血清对空白肝脏 SOD 活性提高率的时间-效应曲线见图 4。

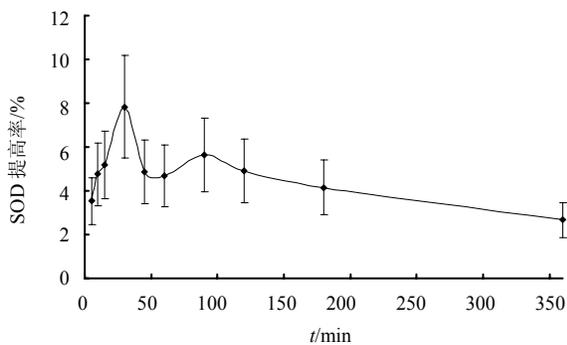


图 3 BHD 给药后对小鼠肝脏 SOD 活性提高作用时间-效应曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 3 Improvement time-effect curve of SOD activity in liver tissue of mice after treatment with BHD ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

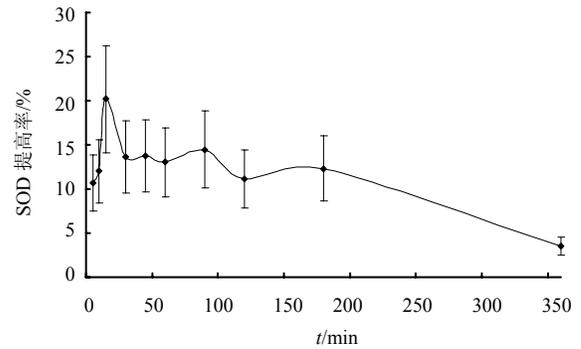


图 4 BHD 含药血清对空白肝脏 SOD 活性提高作用时间-效应曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 4 Improvement time-effect curve of SOD activity in blank liver tissue of mice treated with serum containing BHD ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

### 3.3 剂量-效应关系

给予不同剂量 BHD 后的小鼠含药血清对空白肝脏 MDA 生成具有明显抑制作用, 与空白血清组比较, 差异显著 ( $P < 0.05$ ); SOD 活性明显提高, 与空白血清组比较, 差异显著 ( $P < 0.05$ )。整体实验中, 给予不同剂量 BHD 小鼠肝脏中 MDA 水平受到明显抑制, 且 SOD 活性明显提高, 与对照组比较, 差异显著 ( $P < 0.05$ )。方程回归结果见表 1, 给药剂量-效应曲线见图 5 和 6。

表 1 量效关系回归结果 ( $n=3$ )

Table 1 Regression results of dose-effect relationship ( $n=3$ )

指标	样品	回归方程	$R^2$
MDA	整体实验	$Y=17.054 X-1.283 6$	0.998 3
	含药血清	$Y=14.905 X-3.888 3$	0.986 9
SOD	整体实验	$Y=9.048 6 X-1.276 3$	0.994 7
	含药血清	$Y=17.054 X-1.283 6$	0.998 2

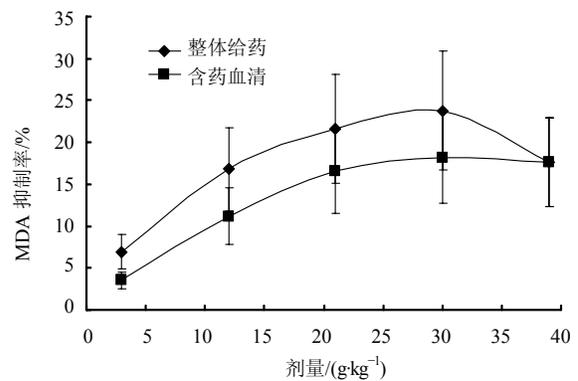


图 5 不同剂量 BHD 对小鼠肝脏 MDA 生成的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 5 Inhibition of BHD at different dosages on MDA level in liver of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

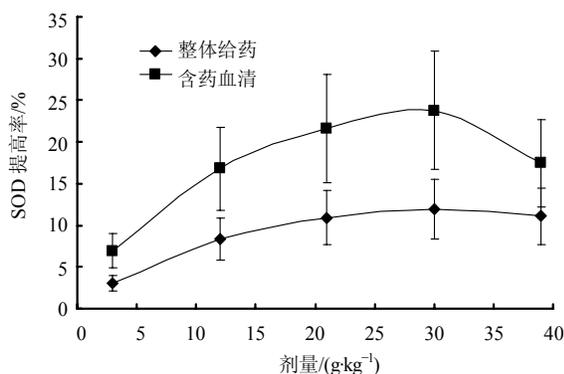


图6 不同剂量 BHD 对小鼠肝脏 SOD 活性的提高作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 6 Improvement of BHD at different dosages on SOD activity in liver of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

### 3.4 药效动力学参数

根据整体实验和血清药理学实验的时间-效应数据, 计算效应呈现相和消除相方程, 并推算各效应动力学参数, 结果见表 2 和 3, 时间-效应曲线整体趋势符合一室开放模型。

表 2 BHD 给药后 MDA 抑制率药效动力学参数 ( $n=10$ )  
Table 2 Pharmacodynamic parameters of inhibition on MDA level of mice after treatment with BHD ( $n=10$ )

参数	单位	整体给药	含药血清
D (给药剂量)	$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	30	30
$D_{\min}$	$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.89	1.71
$K_e$	$\text{min}^{-1}$	0.000 26	0.000 63
$K_a$	$\text{min}^{-1}$	0.143 7	0.104 1
$t_{1/2(K_e)}$	min	2 674.53	1 093.33
$t_{1/2(K_a)}$	min	4.82	6.66
$t_p$	min	44.05	49.29
$t_m$	min	621.73	276.11

表 3 BHD 给药后 SOD 提高率药效动力学参数 ( $n=10$ )  
Table 3 Pharmacodynamic parameters of improvement on SOD activity of mice after treatment with BHD ( $n=10$ )

参数	单位	整体给药	血清药理
D (给药剂量)	$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	30	30
$D_{\min}$	$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	1.17	0.89
$K_e$	$\text{min}^{-1}$	0.004 37	0.002 23
$K_a$	$\text{min}^{-1}$	0.109 8	0.169 0
$t_{1/2(K_e)}$	min	158.45	310.85
$t_{1/2(K_a)}$	min	6.31	4.10
$t_p$	min	30.58	25.94
$t_m$	min	201.15	375.68

## 4 讨论

单次 ig 给药后血清药理与整体药效实验结果表明 BHD 具有明显抑制小鼠肝组织过氧化脂质生成的作用 ( $P < 0.05$ ), 同时对小鼠肝组织 SOD 活性具有明显的提高作用 ( $P < 0.05$ )。MDA 及 SOD 的整体和血清药理实验的时-效曲线均呈现明显的多峰现象, 药物在实验动物体内药效的呈现和消除并不具有明显的界限, 但整体效应都呈现出先快速升高, 后慢慢降低的趋势, 与药物在体内的浓度变化过程基本一致。量效研究表明, 药效与药物浓度存在一定程度上的相关性。在一定浓度范围内, 随着剂量的增加, 药理效应呈现出升高的趋势, 但随着剂量的进一步增大, 药理效应反而减小, 说明 BHD 抗氧化药理作用的发挥存在着最适的药物浓度。超出药物的最适浓度可能会引起一定的其他效应 (如药物毒性反应及其他不良反应等), 干扰药效。这种关系也能够解释, 在时效曲线中给药后药理效应呈现出的多峰现象。BHD 抑制 MDA 生成的最低起效剂量整体实验为 0.89 g/kg, 血清药理学实验为 1.71 g/kg, SOD 活性提高的最低起效剂量整体实验为 1.17 g/kg, 血清药理学实验为 0.89 g/kg, 说明 BHD 在较低的剂量下即可产生药理效应。BHD 的时间-效应曲线符合一室开放模型。

从 BHD 抑制 MDA 水平、增强 SOD 活性研究的药效动力学参数来看, 整体实验和血清药理学实验除  $t_p$  和  $t_{1/2(K_a)}$  比较接近外, 其余参数均具有明显的差异 ( $P < 0.05$ ), 说明药物在体内和体外的作用存在一定的差异, 这与体内与体外的药物作用环境的差异直接相关。BHD 进入动物体内吸收较快, 能够比较迅速地进入血液循环, 产生药理效应。用数学“量”的角度解释了 BHD 血清药理与整体药效在抑制小鼠肝组织 MDA 生成和提高肝组织 SOD 活性作用。

综上所述, BHD 单次给药在体内作用时间较长, 产生药理效应比较迅速, 产生效应所需的剂量较低, 该方剂为起效较快、疗效好的中药复方制剂。

### 参考文献

- [1] 杨 晗, 王 飞, 王全林, 等. 补阳还五汤对肺纤维化大鼠肺组织 TGF-1/Smad3 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(24): 240-244.
- [2] 周 岚, 吴颖昕, 梅晓云. 补阳还五汤延缓大鼠胫前肌失神经肌萎缩的基因筛选 [J]. 中草药, 2014, 45(4): 516-522.

- [3] 朱立华, 蔡光先. 补阳还五汤促脑缺血后中晚期内源性神经再生的蛋白质组研究 [J]. 湖南中医杂志, 2013, 29(8): 121-124.
- [4] Wang L, Huang Y, Wu J, *et al.* Effect of Buyang Huanwu decoction on amino acid content in cerebrospinal fluid of rats during ischemic/reperfusion injury [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 86: 143-50.
- [5] Yang S H, Gao Q, Xing S L, *et al.* Neuroprotective effects of Buyang Huanwu decoction against hydrogen peroxide induced oxidative injury in Schwann cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(3): 1095-1101.
- [6] 贺琴, 张霞, 赵琴, 等. 补阳还五汤防治心血管病研究进展 [J]. 西南国防医药, 2013, 23(5): 570-571.
- [7] 李秀英. 补阳还五汤对冠心病心绞痛患者血凝及预后
- 的影响 [J]. 中国医药导报, 2012, 9(20): 87-93.
- [8] Zhang J Y, Yang G D, Lin R, *et al.* Determination of paeoniflorin, calycosin-7-O-b-D-glucoside, ononin, calycosin and formononetin in rat plasma after oral administration of Buyang Huanwu decoction for their pharmacokinetic study by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2011, 25(4): 450-457.
- [9] 邱明丰, 彭腾, 罗海燕, 等. 以血清药理学方法研究复方丹参缓释片的缓释作用 [J]. 中草药, 2008, 39(3): 411-413.
- [10] 宋珏, 路通, 谢林, 等. 以血清药理学方法研究黄连解毒汤对小鼠的药效动力学 [J]. 中草药, 2005, 36(5): 709-713.