

山蜡梅叶颗粒对慢性咽炎大鼠的药效学考察及药动学-药效学关联性分析

关志宇^{1,2}, 史伟民¹, 彭石根¹, 孙萍³, 王勇平^{1,2*}, 刘荣华^{1*}, 曾诗琦¹, 刘婧¹, 黄潇¹, 朱卫丰¹

1. 江西中医药大学, 江西南昌 330004

2. 江西佑美制药有限公司, 江西上饶 334000

3. 江中药业股份有限公司, 江西南昌 330004

摘要: 目的 研究山蜡梅叶颗粒活性成分对慢性咽炎模型大鼠的药效作用并建立药动学-药效学(pharmacokinetic-pharmacodynamic, PK-PD)结合模型, 构建山蜡梅叶颗粒活性成分的动态变化与其药效消长的对应关系。方法 利用氨水溶液诱导建立慢性咽炎大鼠模型。ig 给予山蜡梅叶颗粒, 并从行为学特征、咽部组织病理、血清炎症因子含量来考察其治疗效果。以山蜡梅叶颗粒中具有抗炎活性的6个入血成分(原儿茶酸、芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷、木犀草素、紫云英苷、异嗪皮啶)为药动学考察指标, 以血清中炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和IL-6水平作为药效学指标, 利用Phoenix WinNonlin软件构建PK-PD模型。结果 给予山蜡梅叶颗粒后, 大鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平较模型组有所降低, 咽部组织病理形态改善。建立的PK-PD模型提示山蜡梅叶颗粒抗慢性咽炎药效的发挥与其各成分和整合成分的血药浓度存在滞后现象。**结论** 山蜡梅叶颗粒具有明显的抗慢性咽炎作用, 可能与下调炎症因子水平有关。山蜡梅叶颗粒各成分及整合成分的血药浓度与药物效应值存在滞后现象, 这可能是因为山蜡梅叶颗粒中的有效成分进入机体内并不会马上作用于相应的靶点, 而是通过间接机制产生药理作用、受体存在耐受现象及受体被激活的时间存在延迟等。

关键词: 山蜡梅叶颗粒; 慢性咽炎; 整合药动学; 药效学; 原儿茶酸; 芦丁; 山柰酚-3-O-芸香糖苷; 木犀草素; 紫云英苷; 异嗪皮啶; TNF- α ; IL-1 β ; IL-6

中图分类号: R285.61 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)19-6336-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.19.015

Pharmacodynamics of *Chimonanthus nitens* Leaf Granules on rats with chronic pharyngitis and correlation analysis of pharmacokinetics and pharmacodynamics

GUAN Zhi-yu^{1,2}, SHI Wei-min¹, PENG Shi-gen¹, SUN Ping³, WANG Yong-ping^{1,2}, LIU Rong-hua¹, ZENG Shi-qi¹, LIU Jing¹, HUANG Xiao¹, ZHU Wei-feng¹

1. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Jiangxi Youmei Pharmaceutical Co., Ltd., Shangrao 334000, China

3. Jiangzhong Pharmaceutical Co., Ltd., Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To investigate the effects of active ingredients of *Chimonanthus nitens* Leaf Granules (山蜡梅叶颗粒, CNLG) on rats with chronic pharyngitis and establish a combined pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model to construct the dynamic changes of the active ingredients of CNLG and their pharmacodynamic effects. **Methods** A rat model of chronic pharyngitis was established by using ammonia solution induction, and rats were ig CNLG, therapeutic effect of CNLG was evaluated based on behavioral characteristics, pharyngeal tissue pathology and inflammatory factor levels in serum. PK-PD model was constructed by

收稿日期: 2023-05-03

基金项目: 国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项(2018ZX09721002); 江西省人事厅博士后科研项目(252591); 江西省研究生创新专项资金项目(YC2022-s849); 江西省三区人才专项项目; 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ211239); 江西中医药大学中药学一流学科科研项目(JXSYLXK-ZHYAO049); 江西中医药大学校级科技创新团队发展计划项目(CXTD-22004)

作者简介: 关志宇, 男, 博士后, 教授, 主要从事药物新制剂与生物药剂学研究。E-mail: yaoxueyuanc212@163.com

*通信作者: 刘荣华, 男, 博士, 教授, 主要从事天然产物活性物质基础研究。E-mail: rhl Liu@163.com

王勇平, 男, 工程师, 本科, 主要从事中药新剂型与新技术研究。E-mail: yongping 830414@163.com

using Phoenix WinNonlin software, using the six blood components (protocatechuic acid, rutin, kaempferol-3-O-rutinoside, luteolin, astragalin, isofraxidin) with anti-inflammatory activity in CNLG as PK indicators and levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 in serum as PD indicators. **Results** The levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels in serum were reduced and pathological morphology of pharyngeal tissue was improved after the administration of CNLG compared with model group. The established PK-PD model suggested that there was a lag between the anti-chronic pharyngitis efficacy of CNLG and the blood concentration of its components and integrated components. **Conclusion** CNLG has a significant anti-chronic pharyngitis effect, which may be related to the down-regulation of TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels. There was a lag between the blood concentration and drug effect values of each component and integrated component of CNLG. This may be due to the fact that the active ingredient in CNLG does not act on the target immediately, but through an indirect mechanism of pharmacological action, the receptor tolerance phenomenon and the delay in the activation of the receptor.

Key words: *Chimonanthus nitens* Leaf Granules; chronic pharyngitis; integrated pharmacokinetic; pharmacodynamic; protocatechuic acid; rutin; kaempferol-3-O-rutinoside; luteolin; astragalin; isofraxidin; TNF- α ; IL-1 β ; IL-6

慢性咽炎是一种常见疾病，发病部位为咽部黏膜、黏膜下层和淋巴组织，临床症状为咽部干痒、有异物感和烧灼感，其发病范围广、病程长、易复发^[1-3]。在我国由于饮食习惯、环境和抗生素滥用等原因，慢性咽炎的患病率已接近人口的 1/3^[4-5]，如此高的发病率不仅占用了大量的社会医疗资源，对我国人民的健康也带来了极其严重的影响。目前，临幊上普遍采用抗感染、抗酸、抗过敏的化学药来治疗慢性咽炎^[6]，但治愈率极低，且易产生耐药性^[7]。相比之下，中药由于具有不良反应小、多种治疗机制协同的特点^[8-9]，使得其在慢性咽炎的治疗中优势独特。

山蜡梅叶为蜡梅科植物山蜡梅 *Chimonanthus nitens* Oliv.的干燥叶，是江西道地药材，味苦性凉，辛凉解表，清热解毒^[10]，在临幊上常用于流行性感冒、咽痛咽炎的治疗^[11-13]。药动学-药效学 (pharmacokinetic-pharmacodynamic, PK-PD)结合模型研究能够将药物成分的血药浓度、药效数据和时间三者有机地整合^[14-16]，反映中药药效成分在体内的动态量-效关系^[17]。本研究以课题组前期研究确认的山蜡梅叶颗粒中具有抗炎活性的 6 个入血成分 (原儿茶酸、芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷、木犀草素、紫云英苷、异嗪皮啶) 为药动学考察指标，以血清中炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和 IL-6 水平作为药效学指标，首次建立了山蜡梅叶多药效成分与抗炎作用的 PK-PD 模型，并对山蜡梅叶治疗慢性咽炎效果进行了考察。为阐明山蜡梅叶药效物质基础、临床开发、剂型设计、质量控制等提供了参考，也为山蜡梅叶的科学合理用药提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠，体质量 (200±20) g，由江西中医药大学实验动物中心提供，许可证号 SCXK(赣)2018-0003，动物饲养于温度 25 ℃ 的实验室中，适应性饲养 1 周后用于实验。动物实验经江西中医药大学动物研究伦理委员会批准 (批准号 JZLLSC2019-0308)。

1.2 药品与试剂

山蜡梅叶颗粒 (国药准字号 Z20027113，批号 2105039) 由江西佑美制药有限公司提供；对照品芦丁 (批号 100080-201811，质量分数≥98%)、异嗪皮啶 (批号 110837-202009，质量分数≥98%) 购自中国食品药品检定研究院；对照品原儿茶酸 (批号 B21614，质量分数≥98%)、山柰酚-3-O-芸香糖苷对照品 (批号 B21133，质量分数≥98%)、木犀草素对照品 (批号 B20888，质量分数≥98%)、紫云英苷对照品 (批号 B21704，质量分数≥98%)、氯霉素内标 (批号 B24216，质量分数≥98%) 购自上海源叶生物科技有限公司；TNF- α 试剂盒 (批号 CK-31063)、IL-1 β 试剂盒 (批号 CK-E30206)、IL-6 试剂盒 (批号 CK-E30216) 购自上海源桔生物科技中心；甲醇 (批号 230320，色谱纯)、氨水 (批号 211008，分析纯) 购自西陇科学股份有限公司；乙腈 (批号 146210，质谱纯)、甲酸 (批号 100291，质谱纯) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.3 仪器

4500 型三重四级杆超高效液相串联质谱联用仪 (LC-MS/MS, 美国 Agilent 公司)；Spark 10M 型多功能酶标仪 (瑞士 Tecan 公司)；BF-2000 型氮气吹干仪 (八方世纪公司)；涡旋仪 (IKA 仪器设备有

限公司);高速冷冻离心机(美国Sigma公司);SJIA-5FE型冷冻干燥机(宁波双嘉仪器有限公司)。

2 方法

2.1 慢性咽炎大鼠模型建立、分组及给药

取健康SD雄性大鼠30只,正常饲养1周,按照随机分组方法分为正常组(6只)和造模组(24只),将配制好的氨水溶液转移至开喉剑喷雾器中,将其喷入造模组大鼠咽部^[18-19],每天10:00、15:00时各1次,3揿/次,持续4周。正常组喷等量生理盐水予以对照,操作方法与造模组一致。每天监测大鼠的进食、饮水和活动情况,咽部黏膜的形态、颜色及分泌物情况等。在造模阶段,若模型组大鼠较正常组毛色变黄,抓挠次数增加,模型组咽喉组织间质可见结缔组织明显增生,组织间质观察到血管显著的充血扩张,组织中有大量炎症细胞浸润,肌层纤维排列紊乱,则符合慢性咽炎动物模型特征^[7]。并与《中药新药临床研究指导原则》^[20]中诊断标准体征“咽部黏膜慢性充血,色暗红,血管扩张,或咽侧索肿大,咽黏膜增生肥厚,或树枝状充血,咽后壁淋巴滤泡增生,或干燥、萎缩、变薄,有分泌物附着”相近,判断为建模成功。

按照山蜡梅叶颗粒成人每日服用剂量,以体表面积转换公式计算^[21],确定大鼠的山蜡梅叶颗粒低、中、高给药剂量分别为3.0、4.5、6.0 g/kg。造模成功后将大鼠随机分为模型组和山蜡梅叶颗粒低、中、高剂量组,每组6只。山蜡梅叶颗粒溶于水后,每日ig给药1次,连续给药2周,正常组与模型组ig等体积生理盐水,各组操作相同。

2.2 血样采集

末次给药前大鼠禁食12 h,不禁水,分别于给药前和给药后15、30、45 min及1、1.5、2、4、6、8、12、24 h进行眼眶取血,每次取200 μL,取血时保持大鼠充足饮水,并对大鼠的生理状态进行观察,未发现其异常状态。取血后将血液分为2等份,1份12 000 r/min分离取血清。另1份置含EDTA的离

心管中,静置1 h,3500 r/min离心10 min,离心后取血浆样品。于-80 °C保存。

2.3 血浆样品处理方法

取血浆样品于4 °C解冻,分别精密吸取血浆样品40 μL于2 mL离心管中,加入102.4 ng/mL内标氯霉素溶液20 μL和甲醇60 μL,涡旋3 min。4 °C、12 000 r/min离心10 min,取上清液转移至离心管,氮气吹干,加80 μL 80%甲醇复溶,涡旋3 min,4 °C、12 000 r/min离心10 min,取上清液测定分析。

2.4 山蜡梅叶颗粒6个活性成分的LC-MS/MS分析方法建立及其血药浓度测定

2.4.1 色谱条件 Waters C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm),流动相为0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱:0~1.0 min, 20%~30% B; 1.0~3.5 min, 30%~35% B; 3.5~4.5 min, 35% B; 4.5~6.0 min, 35%~60% B; 6.0~6.5 min, 60%~95% B; 6.5~7.5 min, 95% B; 7.5~7.51 min, 95%~20% B; 7.51~8.5 min, 20% B;柱温30 °C;体积流量0.2 mL/min;进样量10.0 μL。

2.4.2 质谱条件 电喷雾离子源(electron spray ionization, ESI),多反应监测模式,正、负离子模式检测,质谱参数:加热气体积流量为10.0 L/min,加热模块温度为400 °C,雾化气体积流量为3.0 L/min,干燥气体积流量为10.0 L/min,DL温度为250 °C,接口温度为100 °C,检测器电压为1.92 kV。山蜡梅叶颗粒待测成分及内标的质谱参数见表1。

2.4.3 对照品溶液和内标溶液的制备 分别精密称取芦丁、木犀草素、原儿茶酸、紫云英苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、异嗪皮啶和氯霉素适量于洁净干燥的10 mL量瓶,加甲醇分别配制得到含芦丁0.497 mg/mL、木犀草素0.495 mg/mL、原儿茶酸0.504 mg/mL、紫云英苷0.518 mg/mL、山柰酚-3-O-芸香糖苷0.498 mg/mL、异嗪皮啶0.500 mg/mL的对照品溶液和含氯霉素0.512 mg/mL的内标溶液,均于4 °C下保存。

2.4.4 精密度与准确度考察 取20 μL大鼠空白血

表1 山蜡梅叶颗粒待测成分与内标的质谱参数

Table 1 Mass spectrum parameters of components to be tested and internal standard of *C. nitens* Leaf Granules

化合物	ESI模式	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	去簇电压/V	碰撞能量/eV
原儿茶酸	-	152.8	108.9	-66.0	-17.0
芦丁	-	609.1	300.0	-137.0	-45.0
山柰酚-3-O-芸香糖苷	-	593.2	284.0	-149.0	-49.0
木犀草素	-	285.0	132.9	-128.0	-40.0
氯霉素	-	320.9	151.8	-101.0	-22.0
紫云英苷	+	449.1	286.9	96.0	21.0
异嗪皮啶	+	223.1	162.0	86.0	34.0

浆,加入对照品溶液(原儿茶酸1.18、2.36、18.90、302.40 ng/mL,芦丁0.35、0.70、5.56、89.46 ng/mL,山柰酚-3-O-芸香糖苷1.40、2.80、22.41、358.56 ng/mL,木犀草素0.93、1.86、7.43、29.70 ng/mL,紫云英苷0.79、1.58、12.63、202.02 ng/mL,异嗪皮啶0.94、1.88、15.50、60.00 ng/mL),按照“2.3”项下方法处理样品,测定分析,考察日内及日间精密度和准确度。

2.4.5 线性范围与定量限考察 用移液枪分别吸取一定体积的原儿茶酸、芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷、木犀草素、紫云英苷和异嗪皮啶的母液,精密量取适量甲醇,得混合对照品溶液,用甲醇稀释成系列混合对照品溶液。分别精密吸取“2.2”项中空白组大鼠20 μL的血浆,加入系列混合对照品标准溶液及内标溶液各10 μL,按照“2.3”项下方法处理样品,按“2.4.1”和“2.4.2”项下方法测定分析。横坐标(x)为血药浓度,纵坐标(y)为对照品峰面积与内标峰面积比值,进行线性回归,建立标准曲线,确定各待测物的定量限。

2.4.6 专属性考察 取“2.2”项中的空白血浆样品、大鼠ig山蜡梅叶颗粒后的含药血浆样品和加入混合对照品溶液的空白血浆样品,按照“2.3”项下方法处理样品,测定分析。

2.4.7 稳定性考察 制备低、中、高3个质量浓度的血浆样品(原儿茶酸2.36、18.90、302.40 ng/mL,芦丁0.70、5.56、89.46 ng/mL,山柰酚-3-O-芸香糖苷2.80、22.41、358.56 ng/mL,木犀草素1.86、7.43、29.70 ng/mL,紫云英苷1.58、12.63、202.02 ng/mL,异嗪皮啶1.88、15.50、60.00 ng/mL),每个质量浓度平行制备6份,分别在室温条件下放置24 h、-80 °C条件下保存7 d、-80 °C条件下反复冻融3次实验,按照“2.3”项下方法处理样品,测定分析。

2.4.8 提取回收率考察 按“2.4.4”项中制备的低、中、高3个质量浓度的血浆样品,每个质量浓度平行制备6份,按照“2.3”项下方法处理样品,按“2.4.1”和“2.4.2”项下方法测定分析,计算各成分的提取回收率。

2.4.9 基质效应考察 按“2.5.4”项中制备的低、中、高3个质量浓度的血浆样品,每个质量浓度平行制备6份,按照“2.3”项下方法处理样品,按“2.4.1”和“2.4.2”项下方法测定分析。制备不含基质的样品(待测成分和内标的纯溶液),每个质量浓度6份样品,进样分析考察基质效应。

2.4.10 山蜡梅叶颗粒在慢性咽炎大鼠中的血药浓度测定 LC-MS/MS平台测定在不同时间点血浆中6个山蜡梅叶颗粒活性成分(原儿茶酸、芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷、木犀草素、紫云英苷、异嗪皮啶)的血药浓度,结合Phoenix WinNonlin软件计算药动学参数。

2.5 整合药动学评价

通过药-时曲线下面积($AUC_{0-\infty}$)自定义权重系数进行整合。根据拟合后的药动学参数,将6个成分的AUC求和,再将各成分在总AUC中的比例得到1个权重系数,计算公式如下。

$$\omega_j = AUC_{j0-\infty} / \sum_{L1}^{L6} AUC_{0-\infty} \quad (1)$$

$$\sum_{L1}^{L6} AUC_{0-\infty} = AUC_{0-\infty L1} + AUC_{0-\infty L2} + AUC_{0-\infty L3} + AUC_{0-\infty L4} + AUC_{0-\infty L5} + AUC_{0-\infty L6} \quad (2)$$

j 代表6个成分,即L1(原儿茶酸)、L2(芦丁)、L3(山柰酚-3-O-芸香糖苷)、L4(木犀草素)、L5(紫云英苷)、L6(异嗪皮啶), ω_j 表示各成分 $AUC_{0-\infty}$ 在总 $AUC_{0-\infty}$ 中所占比值,通过计算得到这6个成分对应的权重系数

代入公式(3)计算整合浓度, C_T 是经自定义权重系数校正得到的6个成分的整合浓度。

$$C_T = \omega_{L1} C_{L1} + \omega_{L2} C_{L2} + \omega_{L3} C_{L3} + \omega_{L4} C_{L4} + \omega_{L5} C_{L5} + \omega_{L6} C_{L6} \quad (3)$$

2.6 药效学考察

2.6.1 大鼠行为学观察 给药期间每日对各组大鼠的皮毛光泽度、活动情况、饮水情况、口腔分泌物情况、体质量变化进行观察并记录。

2.6.2 苏木素-伊红(HE)染色观察咽部组织病理变化 大鼠末次给药后禁食不禁水,眼眶取血后处死大鼠取其咽部组织,于大鼠环状软骨水平处剪断气管食管,从咽后壁开始向上分离,至腭帆水平切断组织摘取咽部黏膜及黏膜下组织放入中性多聚甲醛溶液中固定。固定状态良好后,严格按照病理实验室检查SOP程序进行修剪,脱水、包埋、切片、染色、封片,于显微镜下观察并拍照。

2.6.3 ELISA法检测血清中TNF-α、IL-1β和IL-6含量 取“2.2”项下各组大鼠血清,按照ELISA试剂盒说明书测定血清中TNF-α、IL-1β和IL-6的含量,作为后续PK-PD模型的药效学参数。

2.7 PK-PD相关性分析

建模方法参考周杰等^[22]的文献,并做出适当调整。计算血药浓度平均值,运用软件对药动学数据进行非房室分析,得到相关参数,然后以相关参数值为初始值,进行房室分析,确定最佳房室模型。以TNF-α、IL-1β和IL-6在各对应时间点下的水平为药效指标,分别以

对数线性、线性、 E_{max} 、和 S 型 E_{max} 药效学模型对山蜡梅叶抑制大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 表达进行拟合, 其中药效学效应值为模型组与给药组各时间点的药效值之差, 确定拟合值最优的药效学模型。固定药动学参数, 在药动学软件选中相应的药效学模型及输入相关参数; 获得山蜡梅叶中原儿茶酸、芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷、木犀草素、紫云英苷和异嗪皮啶的 PK-PD 结合模型参数, 构建 PK-PD 结合模型, 根据模型拟合公式所得的 E_0 、 EC_{50} 、Gamma 和 K_{el} 参数描述各组分和效应之间的关系。其中 E_0 为药物暴露量为 0 时的药物效应, E_{max} 为最大效应, EC_{50} 为达到 50% 最大效应对应的暴露量, Gamma 为 Hill 系数 (当 Gamma=1 时模型即为 E_{max} 模型), K_{el} 代表效应室药物消除速率常数。

3 结果

3.1 慢性咽炎大鼠造模结果

通过造模阶段观察和大鼠咽部组织 HE 染色结果比对均符合“2.1”项下的大鼠慢性咽炎造模标准。

3.2 山蜡梅叶颗粒 6 个有效成分的 LC-MS/MS 方法学考察结果

3.2.1 精密度与准确度 6 个成分的日内精密度均

小于 15%、日间精密度均小于 15%, 其日内准确度为 95.24%~108.69%、日间准确度为 98.45%~110.57%, 符合要求。

3.2.2 线性关系和定量限 各待测成分在大鼠血浆中的标准曲线方程、线性范围、定量限及相关系数见表 2, 结果表明其在一定范围内线性良好。

3.2.3 专属性 大鼠空白血浆中未检测到待测成分及氯霉素, 血浆中内源性物质不影响目标成分及内标的测定, 在本实验的色谱条件下, 7 个化合物分离效果良好, 原儿茶酸、芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷、木犀草素、紫云英苷、异嗪皮啶和氯霉素的保留时间分别为 2.74、3.32、3.58、6.83、3.60、4.57、5.94 min。表明本方法具有较好的专属性。

3.2.4 稳定性 通过考察待测样品在“2.4.7”实验条件下的测定结果, 各成分的精密度均小于 15%、准确度为 95.71%~111.76%, 符合要求。

3.2.5 提取回收率和基质效应 提取回收率和基质效应的结果如表 3 所示, 各成分提取回收率为 86.40%~98.61%, 基质效应为 80.87%~101.36%, 符合生物样本分析的规定。

表 2 山蜡梅叶颗粒待测成分的线性回归方程及定量限

Table 2 Linear regression equation and quantitative limit of components to be measured in *C. nitens* Leaf Granules

化合物	线性方程	r	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	定量限/(ng·mL ⁻¹)
原儿茶酸	$y=0.1153x-0.2545$	0.9953	1.18~604.80	1.18
芦丁	$y=0.0884x-0.1439$	0.9978	0.35~178.92	0.35
山柰酚-3-O-芸香糖苷	$y=0.0526x-0.3241$	0.9903	1.40~717.12	1.40
木犀草素	$y=0.0547x-0.0455$	0.9921	0.93~59.40	0.93
紫云英苷	$y=0.0137x-0.0741$	0.9917	0.79~404.04	0.79
异嗪皮啶	$y=0.0183x-0.0238$	0.9917	0.94~120.00	0.94

表 3 山蜡梅叶待测成分的提取回收率和基质效应 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Extraction recovery and matrix effect of components to be tested in *C. nitens* Leaf Granules ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

化合物	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	提取回收率/%	基质效应/%
原儿茶酸	2.36	94.13±3.17	92.46±5.78
	18.90	89.27±2.64	85.44±3.72
	302.40	86.71±3.21	82.16±2.24
	0.70	91.75±2.82	99.08±6.86
芦丁	5.59	90.20±1.66	88.53±3.45
	89.46	88.48±2.43	85.72±2.63
	2.80	98.61±7.28	101.36±2.80
	22.41	95.31±3.32	97.84±2.07
山柰酚-3-O-芸香糖苷	358.56	94.48±2.14	95.88±2.49
	1.86	88.60±2.67	91.52±2.37
	7.43	86.40±2.65	80.87±1.72
	29.70	98.06±2.41	93.73±0.98
木犀草素	1.58	87.43±3.44	91.44±4.38
	12.63	91.35±4.21	92.23±3.95
	202.02	96.68±5.47	97.78±3.16
	1.88	87.47±2.23	93.24±6.27
紫云英苷	15.50	93.78±4.58	94.57±4.63
	60.00	97.36±3.47	99.01±4.18
异嗪皮啶			

3.3 山蜡梅叶颗粒有效成分在慢性咽炎大鼠体内药动学研究结果

采用药动学软件对原儿茶酸、芦丁、山柰酚-3-

O-芸香糖苷、木犀草素、紫云英苷、异嗪皮啶进行分析，山蜡梅叶颗粒中6个活性成分的平均血浆浓度-时间曲线如图1所示，相应的药动学参数见表4。

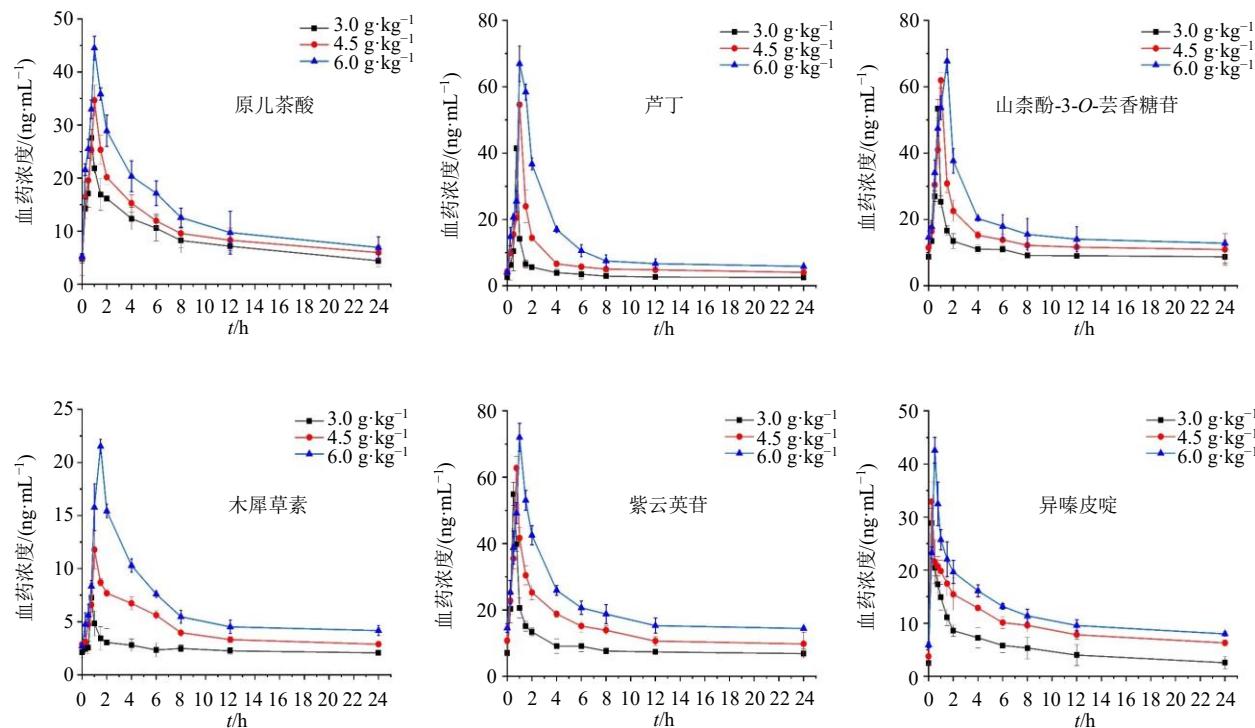


图1 慢性咽炎大鼠 ig 不同剂量山蜡梅叶颗粒后6种分析成分的平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Mean blood concentration-time curve of six analytical components after ig different doses of *C. nitens* Leaf Granules in rats with chronic pharyngitis ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表4 慢性咽炎大鼠 ig 山蜡梅叶颗粒后血浆中6个化合物的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Pharmacokinetic parameters of six compounds in plasma of rats with chronic pharyngitis after ig *C. nitens* Leaf Granules ($\bar{x} \pm s, n=6$)

成分	参数	$3.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$	$4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$	$6.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
原儿茶酸	$C_{\max}/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	28.04 ± 1.13	$34.16 \pm 1.56^{**}$	$45.25 \pm 3.67^{**}$
	T_{\max}/h	0.88 ± 0.14	$1.12 \pm 0.14^{*}$	$1.21 \pm 0.25^{**}$
	$t_{1/2}/\text{h}$	15.84 ± 1.25	$20.92 \pm 2.14^{**}$	$8.42 \pm 0.58^{**}$
	$AUC_{0-\infty}/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	200.43 ± 12.31	$249.89 \pm 20.54^{**}$	$254.62 \pm 20.27^{**}$
	$AUC_{0-\infty}/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	312.76 ± 31.65	$356.37 \pm 30.95^{*}$	$388.01 \pm 27.30^{**}$
	$MRT_{0-\infty}/\text{h}$	8.74 ± 0.28	9.25 ± 0.45	$10.27 \pm 1.43^{**}$
	$MRT_{0-\infty}/\text{h}$	20.83 ± 1.94	$29.35 \pm 4.08^{*}$	$36.28 \pm 3.87^{**}$
	$V_{z/F}/(\text{L} \cdot \text{kg}^{-1})$	$236.351.97 \pm 2.805.67$	$337.139.54 \pm 4.846.43^{**}$	$376.433.39 \pm 19.151.66^{**}$
	$CL_{z/F}/(\text{L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	$9.154.47 \pm 485.40$	$9.417.74 \pm 405.83$	$16.755.43 \pm 2.295.45^{**}$
	$C_{\max}/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	40.74 ± 2.76	$56.26 \pm 4.26^{**}$	$68.07 \pm 2.96^{**}$
芦丁	T_{\max}/h	0.72 ± 0.12	$1.08 \pm 0.13^{*}$	$1.33 \pm 0.20^{**}$
	$t_{1/2}/\text{h}$	13.78 ± 3.21	15.47 ± 2.62	$40.61 \pm 6.51^{**}$
	$AUC_{0-\infty}/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	92.22 ± 5.41	$145.62 \pm 14.84^{**}$	$189.61 \pm 42.35^{**}$
	$AUC_{0-\infty}/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	165.68 ± 27.07	$229.24 \pm 17.32^{**}$	$248.82 \pm 38.19^{**}$
	$MRT_{0-\infty}/\text{h}$	9.87 ± 0.55	10.52 ± 0.96	$7.87 \pm 0.42^{**}$
	$MRT_{0-\infty}/\text{h}$	38.06 ± 6.11	45.72 ± 9.16	$56.03 \pm 2.90^{**}$
	$V_{z/F}/(\text{L} \cdot \text{kg}^{-1})$	$474.771.79 \pm 31.552.91$	$523.393.64 \pm 24.998.09^{*}$	$549.039.28 \pm 29.377.42^{**}$
	$CL_{z/F}/(\text{L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	$22.173.31 \pm 1.686.99$	$21.323.82 \pm 2.076.94$	$26.398.22 \pm 2.960.99^{**}$

续表4

成分	参数	3.0 g·kg ⁻¹	4.5 g·kg ⁻¹	6.0 g·kg ⁻¹
山柰酚-3-O-芸香糖苷	$C_{\max}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	50.95±1.93	61.88±2.08**	65.55±3.70**
	T_{\max}/h	0.75±0.00	0.96±0.19*	1.42±0.13**
	$t_{1/2}/\text{h}$	16.13±4.09	23.50±1.17**	24.84±2.24**
	$AUC_{0-\infty}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$	259.01±14.21	307.32±20.33**	407.86±20.57**
	$AUC_{0-\infty}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$	434.81±43.18	553.02±31.44**	629.18±34.20**
	$MRT_{0-\infty}/\text{h}$	10.38±0.32	11.94±1.21**	9.50±0.61
	$MRT_{0-\infty}/\text{h}$	24.97±2.70	39.42±2.61**	38.95±2.12**
	$V_{z/F}/(\text{L}\cdot\text{kg}^{-1})$	245 030.50±29 214.74	237 739.56±20 425.97	294 295.41±31 158.60**
	$CL_{z/F}/(\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$	5 021.45±643.26	6 348.21±832.67*	7 377.62±1 216.67**
	$C_{\max}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	7.18±0.42	11.90±0.97**	21.72±4.95**
	T_{\max}/h	0.71±0.19	1.00±0.00**	1.42±0.10**
	$t_{1/2}/\text{h}$	5.28±0.80	6.21±0.59	7.52±0.96**
木犀草素	$AUC_{0-\infty}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$	58.12±5.47	77.54±5.49**	87.23±8.51**
	$AUC_{0-\infty}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$	92.90±353.28	125.96±13.88**	153.21±12.21**
	$MRT_{0-\infty}/\text{h}$	8.69±1.24	10.01±0.81	10.96±1.52**
	$MRT_{0-\infty}/\text{h}$	12.16±2.88	17.89±1.50**	21.89±3.35**
	$V_{z/F}/(\text{L}\cdot\text{kg}^{-1})$	309 517.60±50 576.50	347 161.84±28 251.94	384 342.37±47 265.97**
	$CL_{z/F}/(\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$	25 575.39±2 768.42	36 207.25±4 287.85**	39 972.39±2 961.09**
	$C_{\max}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	54.60±4.13	61.71±2.73**	74.17±4.35**
	T_{\max}/h	0.56±0.16	0.84±0.11*	1.22±0.24**
	$t_{1/2}/\text{h}$	6.97±0.97	9.17±0.52*	13.74±2.68**
	$AUC_{0-\infty}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$	217.92±21.83	256.25±53.56	309.35±95.62*
	$AUC_{0-\infty}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$	544.57±97.80	622.70±23.81*	644.59±37.08*
	$MRT_{0-\infty}/\text{h}$	8.37±0.92	9.50±0.54	11.92±1.93**
紫云英昔	$MRT_{0-\infty}/\text{h}$	17.90±1.68	21.02±1.66*	27.97±2.87**
	$V_{z/F}/(\text{L}\cdot\text{kg}^{-1})$	141 605.24±4 439.20	157 848.94±5 288.90**	173 104.30±5 864.57**
	$CL_{z/F}/(\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$	8 256.42±394.56	8 103.10±1 352.72	9 203.75±164.68
	$C_{\max}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	28.44±2.18	33.25±1.55**	42.59±1.90**
	T_{\max}/h	0.28±0.06	0.31±0.10	0.58±0.13**
	$t_{1/2}/\text{h}$	12.30±2.45	16.74±1.50**	22.06±1.91**
	$AUC_{0-\infty}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$	145.38±32.69	197.41±21.12**	250.32±23.20**
	$AUC_{0-\infty}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$	246.48±42.52	346.85±22.87**	396.86±22.38**
	$MRT_{0-\infty}/\text{h}$	8.54±0.64	9.56±0.89	11.88±1.00**
	$MRT_{0-\infty}/\text{h}$	18.07±1.17	19.71±1.90	26.51±5.72**
	$V_{z/F}/(\text{L}\cdot\text{kg}^{-1})$	355 825.48±1 183.70	364 673.66±3 047.12	391 577.65±27 911.09**
	$CL_{z/F}/(\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1})$	12 957.76±509.88	14 163.23±168.92**	15 299.92±230.68**

与3.0 g·kg⁻¹组比较: *P<0.05 **P<0.01*P<0.05 **P<0.01 vs 3.0 g·kg⁻¹ group

3.4 整合药动学结果

通过计算得到原儿茶酸、芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷、木犀草素、紫云英昔、异嗪皮啶的权重系数分别为低剂量组: 0.17、0.09、0.24、0.05、0.30、0.14; 中剂量组: 0.16、0.10、0.25、0.06、0.28、0.16; 高剂量组: 0.16、0.10、0.26、0.06、0.26、0.16。将各剂量组的权重系数代入公式(3)中计算各剂量组整合浓度。整合药动学的药-时曲线见图2, 药动学参数见表5。结果可见, 各个成分的药动学参数与整合药动学参数差异显著, 这表明任何单一成分的药动学行为均不能用于表征山蜡梅叶颗粒的整体药动学行为。

3.5 山蜡梅叶颗粒抗慢性咽炎药效学考察结果

3.5.1 大鼠行为学评价 模型组大鼠较正常组皮毛

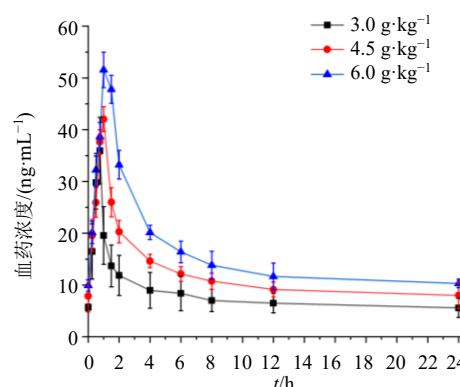


图2 山蜡梅叶颗粒多效应成分整合在慢性咽炎大鼠中的血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 2 Blood drug concentration-time curve of integration of multi-effect components of *C. nitens* Leaf Granules in rats with chronic pharyngitis ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

表5 山蜡梅叶颗粒多效应成分整合在慢性咽炎大鼠中的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 5 Pharmacokinetic parameters of integration of multi-effect components of *C. nitens* Leaf Granules in rats with chronic pharyngitis ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

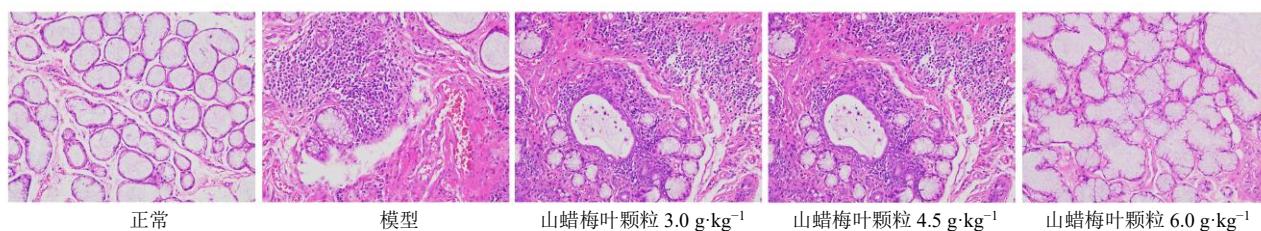
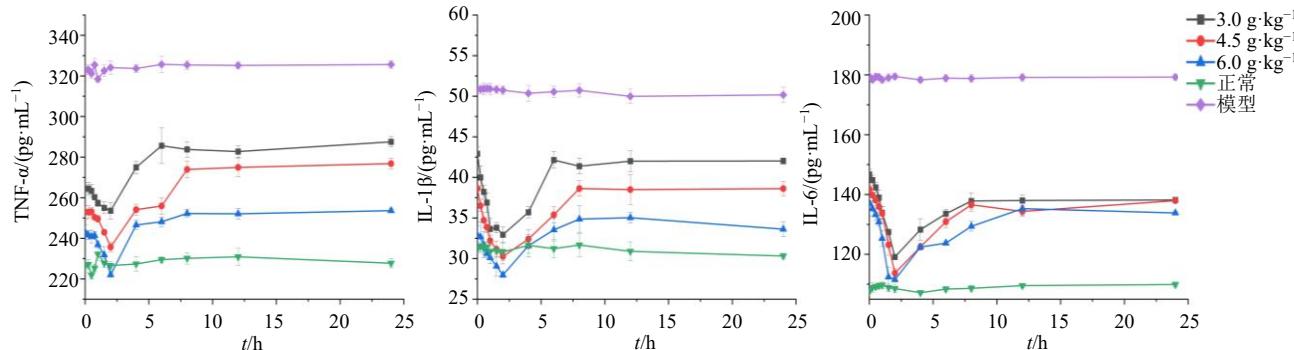
参数	$3.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$	$4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$	$6.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$C_{\max}/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	35.95 ± 2.14	42.04 ± 3.62	51.56 ± 3.91
T_{\max}/h	0.75 ± 0.13	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.61
$t_{1/2z}/\text{h}$	17.02 ± 1.25	14.96 ± 3.26	10.53 ± 2.16
$AUC_{0-\infty}/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	191.63 ± 12.33	282.86 ± 20.33	378.37 ± 22.64
$AUC_{0-\infty}/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	289.85 ± 12.65	395.32 ± 18.64	457.84 ± 26.48
$MRT_{0-\infty}/\text{h}$	9.55 ± 0.29	9.36 ± 0.78	9.10 ± 0.63
$MRT_{0-\infty}/\text{h}$	29.33 ± 2.74	26.61 ± 4.38	20.90 ± 3.61
$V_{z/F}/(\text{L} \cdot \text{kg}^{-1})$	$254.218.20 \pm 8.280.64$	$245.656.40 \pm 8.761.02$	$199.035.26 \pm 7.861.82$
$CL_{z/F}/(\text{L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	$10.350.28 \pm 5.569.21$	$11.383.08 \pm 6.600.38$	$13.105.10 \pm 6.202.38$

变黄，喷洒氨水后抓挠次数增加，摄食量略有减少，饮水次数和饮水量较之前增加，造模第7天开始，口腔分泌物增多，体质量呈现下降的趋势。对比模型组，给药组经山蜡梅叶颗粒ig给药后，上述情况有所改善，如饮水情况恢复正常、躁动情况减少、口腔分泌物减少，且给药组剂量越大，效果越显著。

3.5.2 HE染色对比 如图3所示，正常组大鼠咽部组织整体结构基本正常，与正常组相比，模型组咽部组织整体结构异常，组织间质可见结缔组织明显增生，血管明显充血扩张，大量炎症细胞浸润。山蜡梅叶颗粒高、中剂量组炎性情况有明显改善，中剂量组咽部组织整体结构轻度异常，组织腺泡排列不规则，可见部分腺泡增生，组织间质未见血管明显充血扩张，组织可见少量炎症细胞浸润。高剂

量组咽部组织整体结构基本正常，组织腺泡排列规则，腺泡有单层立方体腺细胞组成，组织未见腺体明显增生腺细胞和脱落坏死，组织间质未见明显充血扩张及炎症细胞浸润。低剂量组咽部组织整体结构异常，组织间质可见结缔组织明显增生，组织可见部分腺体扩张，上皮细胞脱落坏死，组织间质未见血管明显充血扩张，组织可见大量炎症细胞浸润。

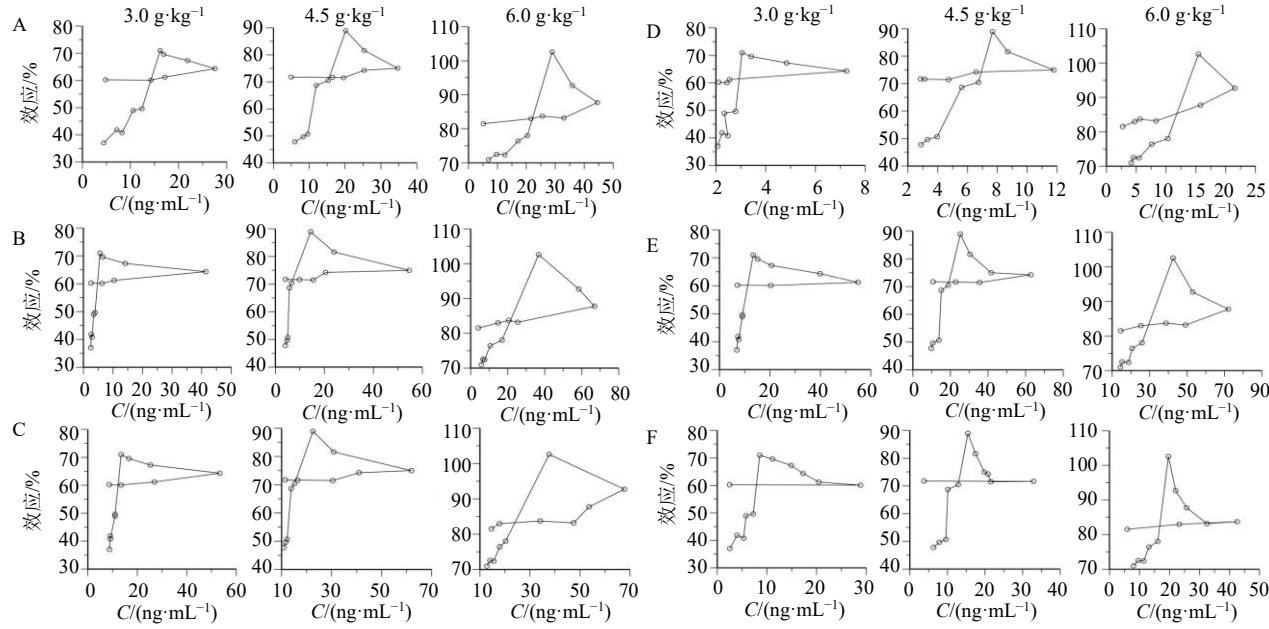
3.5.3 血清炎症因子水平 给药2周后，各组末次给药后不同时间点血清中TNF- α 、IL-1 β 和IL-6含量见图4。与正常组比较，模型组血清中TNF- α 、IL-1 β 和IL-6含量均明显升高；与模型组比较，各给药组血清中TNF- α 、IL-1 β 和IL-6含量均在0.24~2 h显著降低，且随着给药剂量的增大，血清中TNF- α 、IL-1 β 和IL-6含量均呈下降的趋势。

图3 各组大鼠咽部组织病理形态 (HE, $\times 200$)Fig. 3 Pathological morphology of pharyngeal tissue of rats in each group (HE, $\times 200$)图4 各组血清中TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的含量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 4 Contents of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in serum of each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.6 PK-PD 相关性分析结果

结合慢性咽炎大鼠低、中、高剂量组的药动学结果, 建立山蜡梅叶颗粒中 6 个成分和 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 药效指标的 PK-PD 结合模型。

3.6.1 山蜡梅叶颗粒中 6 个成分在慢性咽炎大鼠体



A-原儿茶酸 B-芦丁 C-山柰酚-3-O-芸香糖苷 D-木犀草素 E-紫云英苷 F-异嗪皮啶, 图 6、7 同
A-protocatechuic acid B-rutin C-kaempferol-3-O-rutinoside D-luteolin E-astragaloside F-isofraxidin, same as figs. 6, 7

图 5 不同剂量山蜡梅叶颗粒中 6 个成分在慢性咽炎大鼠体内与 TNF- α 的效应-浓度曲线 ($n = 6$)

Fig. 5 Concentration-effect curve of six components in *C. nitens* Leaf Granules extract at different doses with TNF- α in chronic pharyngitis rats ($n = 6$)

表 6 以 TNF- α 为药效指标时山蜡梅叶颗粒中 6 个成分的 PK-PD 参数 ($n = 6$)

Table 6 PK-PD parameters of six components in *C. nitens* Leaf Granules with TNF- α as efficacy index ($n = 6$)

成分	参数	3.0 g·kg⁻¹	4.5 g·kg⁻¹	6.0 g·kg⁻¹
原儿茶酸	E_0	50.35	63.52	78.87
	EC_{50}	15.33	11.96	45.56
	K_{e0}	1.64	1.32	1.23
	Gamma	8.93	5.46	13.90
芦丁	E_0	45.60	59.49	78.71
	EC_{50}	4.40	7.58	12.66
	K_{e0}	9.60	2.47	1.10
	Gamma	15.48	9.24	5.20
山柰酚-3-O-芸香糖苷	E_0	48.16	61.27	78.13
	EC_{50}	12.96	18.29	23.21
	K_{e0}	2.78	1.81	1.27
	Gamma	23.11	9.35	4.03
木犀草素	E_0	49.98	64.04	79.62
	EC_{50}	2.99	5.75	9.35
	K_{e0}	5.00	0.93	0.77
	Gamma	16.84	30.64	11.20
紫云英苷	E_0	45.45	61.04	78.73
	EC_{50}	10.80	21.43	80.75
	K_{e0}	6.75	1.57	1.02
	Gamma	12.65	7.70	9.17
异嗪皮啶	E_0	48.17	62.20	78.59
	EC_{50}	8.88	30.27	24.06
	K_{e0}	1.15	0.88	0.80
	Gamma	25.39	6.54	19.90

内与 TNF- α 的 PK-PD 结果 以 TNF- α 为药效指标, 可得到山蜡梅叶颗粒中 6 个成分在慢性咽炎大鼠体内的效应-浓度变化, 见图 5。将所得参数(表 6)代入 PK-PD 模型, 即得药物浓度与效应之间的定量方程。山蜡梅叶颗粒中原儿茶酸、芦丁、山柰酚-

3-O-芸香糖苷、木犀草素、紫云英苷、异嗪皮啶的PK-PD模型均为非抑制性效应模型，具体方程见表7。

由PK-PD模型可知，只要知道山蜡梅叶颗粒抗慢性咽炎活性成分的血药浓度和其药效值的其中一个，就能推算出另一个指标的相应数值，即由血药浓度可以推算出与之对应的药效值，反之，由药效值亦可推算出与之对应的血药浓度。由图5可知，效应-浓度曲线呈逆时针滞后环，这表示山蜡梅叶颗粒抗慢性咽炎活性成分进入机体内不会立即产生药效作用，会产生一定的滞后作用，即TNF- α 的达峰时间滞后于6个活性成分血药浓度的达峰时间。

3.6.2 山蜡梅叶颗粒中6个成分在慢性咽炎大鼠体

内与IL-1 β 的PK-PD结果 以IL-1 β 为药效指标，可得到山蜡梅叶颗粒中6个成分在慢性咽炎大鼠体内的效应-浓度变化，见图6。将所得参数（表8）代入PK-PD模型，即得药物浓度与效应之间的定量方程。以IL-1 β 为药效指标时，山蜡梅叶颗粒中6个主要成分的PK-PD模型均为非抑制性效应模型，具体方程见表9。

由图6可知，效应-浓度曲线呈逆时针滞后环，这表示山蜡梅叶颗粒抗慢性咽炎活性成分进入机体内不会立即产生药效作用，会产生一定的滞后作用，即IL-1 β 的达峰时间滞后于6个活性成分血药浓度的达峰时间。

表7 TNF- α 为药效指标时山蜡梅叶颗粒主要成分对应PK-PD定量方程

Table 7 Quantitative equation of PK-PD corresponding to main components of *C. nitens* Leaf Granules when TNF- α used as a pharmacodynamic indicator

成分	$3.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$	$4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$	$6.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
原儿茶酸	$E=50.35+25.71 \times 10^{8.93}/(15.33^{8.93}+10^{8.93})$	$E=63.52+23.11 \times 10^{5.46}/(11.96^{5.46}+10^{5.46})$	$E=78.87+60.20 \times 10^{13.90}/(45.56^{13.90}+10^{13.90})$
芦丁	$E=45.60+21.06 \times 10^{15.48}/(4.40^{15.48}+10^{15.48})$	$E=59.49+20.49 \times 10^{9.24}/(7.58^{9.24}+10^{9.24})$	$E=78.71+84.44 \times 10^{5.20}/(12.66^{5.20}+10^{5.20})$
山柰酚-3-O-芸香糖苷	$E=48.16+19.89 \times 10^{23.11}/(12.96^{23.11}+10^{23.11})$	$E=61.27+20.24 \times 10^{9.35}/(18.29^{9.35}+10^{9.35})$	$E=78.13+14.96 \times 10^{4.03}/(23.21^{4.03}+10^{4.03})$
木犀草素	$E=49.98+18.07 \times 10^{16.84}/(2.99^{16.84}+10^{16.84})$	$E=64.04+14.40 \times 10^{30.64}/(5.75^{30.64}+10^{30.64})$	$E=79.62+10.75 \times 10^{11.20}/(9.35^{11.20}+10^{11.20})$
紫云英苷	$E=45.45+20.77 \times 10^{12.65}/(10.80^{12.65}+10^{12.65})$	$E=61.04+20.82 \times 10^{7.70}/(21.43^{7.70}+10^{7.70})$	$E=78.73+41.86 \times 10^{9.17}/(80.75^{9.17}+10^{9.17})$
异嗪皮啶	$E=48.17+19.89 \times 10^{25.39}/(8.88^{25.39}+10^{25.39})$	$E=62.20+21.82 \times 10^{6.54}/(30.27^{6.54}+10^{6.54})$	$E=78.59+18.12 \times 10^{19.90}/(24.06^{19.90}+10^{19.90})$

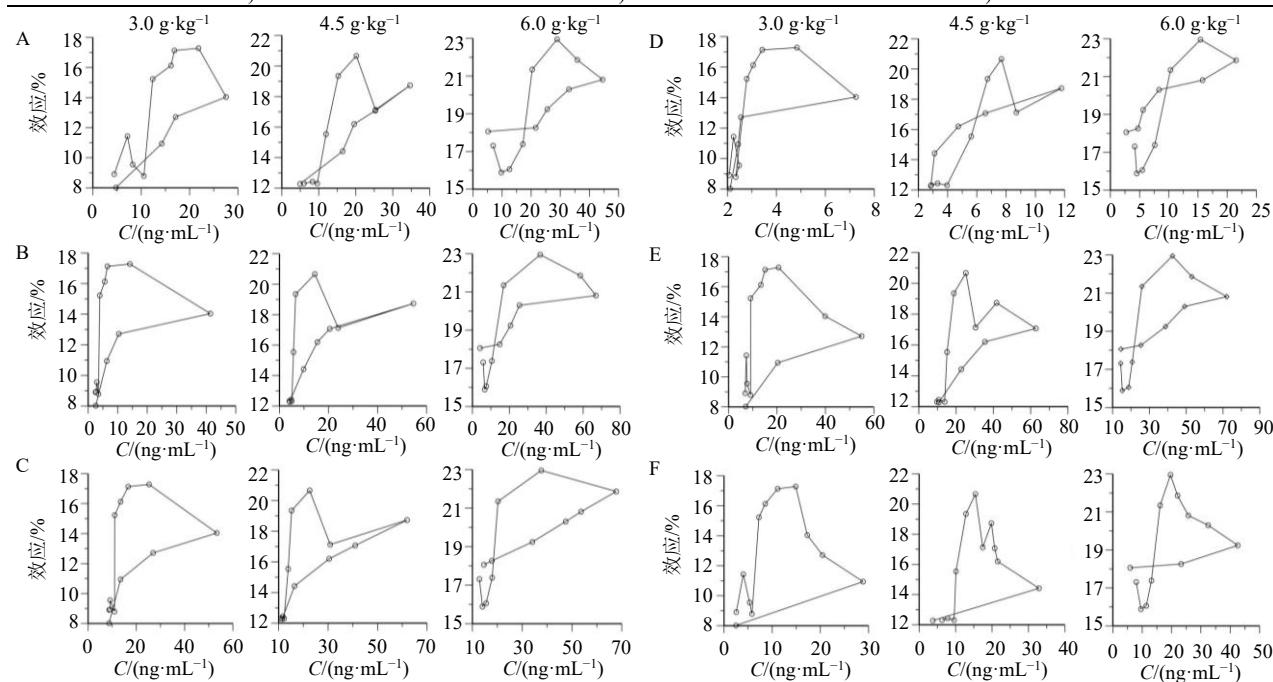


图6 不同剂量山蜡梅叶颗粒中6个成分在慢性咽炎大鼠体内与IL-1 β 的效应-浓度曲线 ($n=6$)

Fig. 6 Concentration-effect curve of six components in *C. nitens* Leaf Granules at different doses with IL-1 β in chronic pharyngitis rats ($n=6$)

表8 以IL-1β为药效指标时山蜡梅叶颗粒中6个成分的PK-PD参数(n=6)

Table 8 PK-PD parameters of six components in *C. nitens* Leaf Granules with IL-1β as efficacy index (n=6)

成分	参数	3.0 g·kg ⁻¹	4.5 g·kg ⁻¹	6.0 g·kg ⁻¹
原儿茶酸	E_0	10.05	13.42	17.81
	EC_{50}	12.55	12.87	20.72
	K_{e0}	1.64	1.32	1.23
	Gamma	29.62	9.74	10.33
芦丁	E_0	9.69	12.75	17.81
	EC_{50}	4.93	5.90	18.20
	K_{e0}	1.00	2.47	1.10
	Gamma	6.09	9.02	14.46
山柰酚-3-O-芸香糖苷	E_0	9.00	13.33	17.63
	EC_{50}	12.04	14.32	23.84
	K_{e0}	2.78	1.81	1.27
	Gamma	9.11	9.85	8.74
木犀草素	E_0	10.34	14.49	18.34
	EC_{50}	2.76	6.27	10.52
	K_{e0}	1.51	0.93	0.77
	Gamma	21.70	28.04	9.83
紫云英苷	E_0	9.35	13.33	17.81
	EC_{50}	14.43	16.34	27.53
	K_{e0}	0.76	1.58	1.02
	Gamma	3.75	9.33	10.48
异嗪皮啶	E_0	8.39	13.30	17.12
	EC_{50}	9.15	11.65	14.17
	K_{e0}	1.16	1.03	2.60
	Gamma	1.55	22.21	7.54

表9 IL-1β为药效指标时山蜡梅叶颗粒主要成分对应PK-PD定量方程

Table 9 Quantitative equation of PK-PD corresponding to main components of *C. nitens* Leaf Granules when IL-1β used as a pharmacodynamic indicator

成分	3.0 g·kg ⁻¹	4.5 g·kg ⁻¹	6.0 g·kg ⁻¹
原儿茶酸	$E=10.05+6.65\times10^{29.62}/(12.55^{29.62}+10^{29.62})$	$E=13.42+5.67\times10^{9.74}/(12.87^{9.74}+10^{9.74})$	$E=17.81+4.24\times10^{10.33}/(20.72^{10.33}+10^{10.33})$
芦丁	$E=9.69+6.45\times10^{6.09}/(4.93^{6.09}+10^{6.09})$	$E=12.75+5.44\times10^{9.02}/(5.90^{9.02}+10^{9.02})$	$E=17.81+4.29\times10^{14.46}/(18.20^{14.46}+10^{14.46})$
山柰酚-3-O-芸香糖苷	$E=9.00+7.13\times10^{9.11}/(9.59^{9.11}+10^{9.11})$	$E=13.33+5.26\times10^{9.85}/(14.32^{9.85}+10^{9.85})$	$E=17.63+4.73\times10^{8.74}/(23.84^{8.74}+10^{8.74})$
木犀草素	$E=10.34+6.54\times10^{21.70}/(2.76^{21.70}+10^{21.70})$	$E=14.49+5.80\times10^{28.04}/(6.27^{28.04}+10^{28.04})$	$E=18.34+4.85\times10^{9.83}/(10.52^{9.83}+10^{9.83})$
紫云英苷	$E=9.35+11.13\times10^{3.75}/(14.43^{3.75}+10^{3.75})$	$E=13.33+5.26\times10^{9.33}/(16.34^{9.33}+10^{9.33})$	$E=17.81+4.24\times10^{10.48}/(27.53^{10.48}+10^{10.48})$
异嗪皮啶	$E=8.39+6.39\times Ce^{1.55}/(9.15^{1.55}+10^{1.55})$	$E=13.30+5.72\times10^{22.21}/(11.65^{22.21}+10^{22.21})$	$E=17.12+3.97\times10^{7.54}/(14.17^{7.54}+10^{7.54})$

3.6.3 山蜡梅叶颗粒中6个成分在慢性咽炎大鼠体内与IL-6的PK-PD结果 以IL-6为药效指标, 可得到山蜡梅叶颗粒中6个成分在慢性咽炎大鼠体内的效应-浓度变化, 见图7。将所得参数(表10)代入PK-PD模型, 即得药物浓度与效应之间的定量方程。以IL-6为药效指标时, 山蜡梅叶颗粒中6个主要成分的PK-PD模型均为非抑制性效应模型, 具体

方程见表11。

由图7可知, 效应-浓度曲线呈逆时针滞后环, 这表示山蜡梅叶颗粒抗慢性咽炎活性成分进入机体内不会立即产生药效作用, 会产生一定的滞后作用, 即IL-6的达峰时间滞后于6个活性成分血药浓度的达峰时间。

3.6.4 基于整合药动学的PK-PD结果 分别以TNF-α、

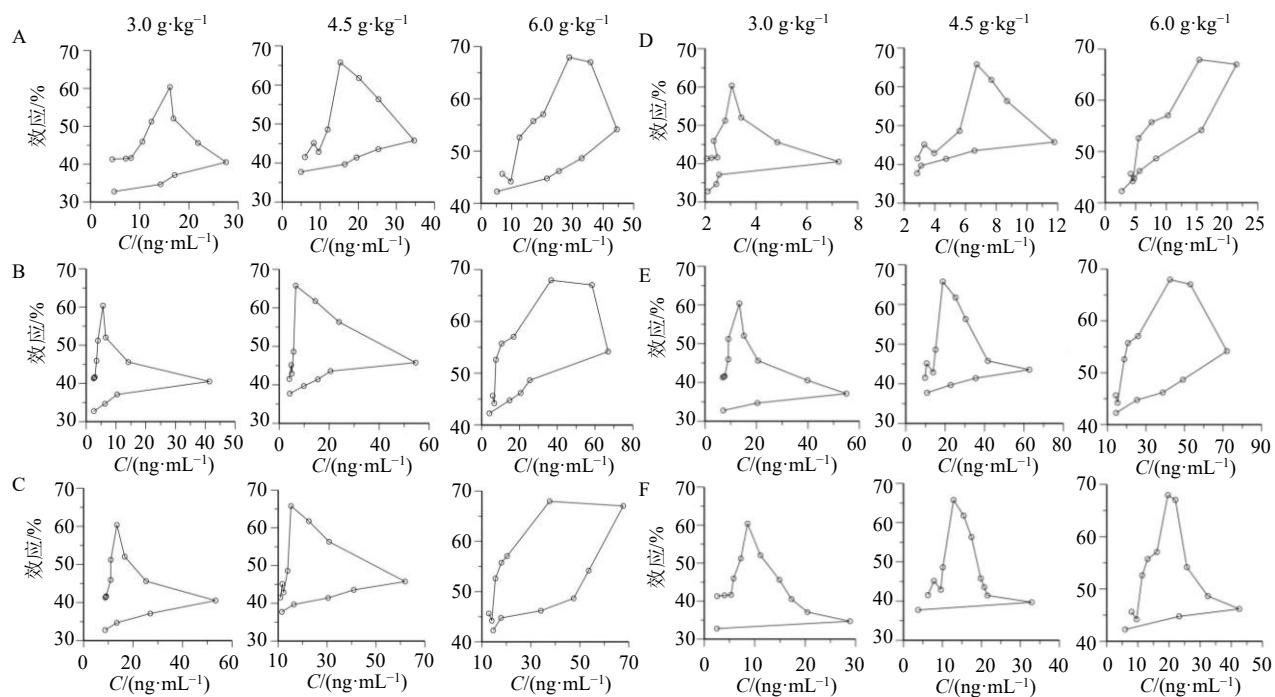
图7 不同剂量山蜡梅叶颗粒中6个成分在慢性咽炎大鼠体内与IL-6的效应-浓度曲线($n=6$)

Fig. 7 Concentration-effect curve of six components in *C. nitens* Leaf Granules at different doses with IL-6 in chronic pharyngitis rats ($n=6$)

表10 以IL-6为药效指标时山蜡梅叶颗粒中6个成分的PK-PD参数($n=6$)Table 10 PK-PD parameters of six components in *C. nitens* Leaf Granules with IL-6 as efficacy index ($n=6$)

成分	参数	$3.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$4.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$6.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$
原儿茶酸	E_0	38.54	41.75	43.12
	EC_{50}	22.35	14.09	15.16
	K_{e0}	0.94	0.90	1.23
	Gamma	2.51	2.30	1.75
芦丁	E_0	35.65	41.38	42.09
	EC_{50}	4.45	9.13	13.12
	K_{e0}	0.24	0.37	1.11
	Gamma	3.01	6.36	0.93
山柰酚-3-O-芸香糖苷	E_0	35.64	42.22	42.77
	EC_{50}	9.75	16.33	48.21
	K_{e0}	0.48	0.51	1.27
	Gamma	4.03	8.01	1.81
木犀草素	E_0	34.77	41.62	42.96
	EC_{50}	3.70	2.84	3.59
	K_{e0}	1.01	0.93	1.47
	Gamma	2.97	5.29	1.44
紫云英苷	E_0	35.56	41.49	42.89
	EC_{50}	7.95	19.35	16.29
	K_{e0}	0.36	0.58	1.02
	Gamma	4.21	12.61	1.73
异嗪皮啶	E_0	36.65	40.35	44.29
	EC_{50}	5.47	9.87	16.79
	K_{e0}	0.46	0.54	0.86
	Gamma	4.26	4.85	3.70

表 11 IL-6 为药效指标时山蜡梅叶颗粒主要成分对应 PK-PD 定量方程

Table 11 Quantitative equation of PK-PD corresponding to main components of *C. nitens* Leaf Granules when IL-6 used as a pharmacodynamic indicator

成分	$3.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$	$4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$	$6.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
原儿茶酸	$E=35.84+17.75 \times 10^{2.51}/(22.35^{2.51}+10^{2.51})$	$E=41.75+19.55 \times 10^{2.30}/(14.09^{2.30}+10^{2.30})$	$E=43.12+12.05 \times 10^{1.75}/(15.16^{1.75}+10^{1.75})$
芦丁	$E=35.65+17.69 \times 10^{3.01}/(4.45^{3.01}+10^{3.01})$	$E=41.38+23.91 \times 10^{6.36}/(9.13^{6.36}+10^{6.36})$	$E=42.09+30.05 \times 10^{0.93}/(13.12^{0.93}+10^{0.93})$
山柰酚-3-O-芸香糖苷	$E=35.64+14.20 \times 10^{4.03}/(9.75^{4.03}+10^{4.03})$	$E=42.22+19.07 \times 10^{8.01}/(16.33^{8.01}+10^{8.01})$	$E=42.77+13.30 \times 10^{1.81}/(48.21^{1.81}+10^{1.81})$
木犀草素	$E=34.77+28.94 \times 10^{2.97}/(3.70^{2.97}+10^{2.97})$	$E=41.62+38.23 \times 10^{5.29}/(2.84^{5.29}+10^{5.29})$	$E=42.96+10.96 \times 10^{1.44}/(3.59^{1.44}+10^{1.44})$
紫云英苷	$E=35.56+9.59 \times 10^{4.21}/(7.95^{4.21}+10^{4.21})$	$E=41.49+23.26 \times 10^{12.61}/(19.35^{12.61}+10^{12.61})$	$E=42.89+27.16 \times 10^{1.73}/(16.29^{1.73}+10^{1.73})$
异嗪皮啶	$E=36.65+5.94 \times 10^{2.26}/(5.47^{4.26}+10^{4.26})$	$E=40.35+14.74 \times 10^{4.85}/(9.87^{4.85}+10^{4.85})$	$E=44.29+17.82 \times 10^{3.70}/(16.79^{3.70}+10^{3.70})$

IL-1 β 及 IL-6 为药效指标, 可得到山蜡梅叶颗粒不同剂量组多效应成分在慢性咽炎大鼠体内的效应-浓度变化, 见图 8。分别以 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 为药效指标时, 将所得参数(表 12)代入 PK-PD 模型, 得到的多效应成分药物浓度与效应之间的定量方程如表 13 所示。

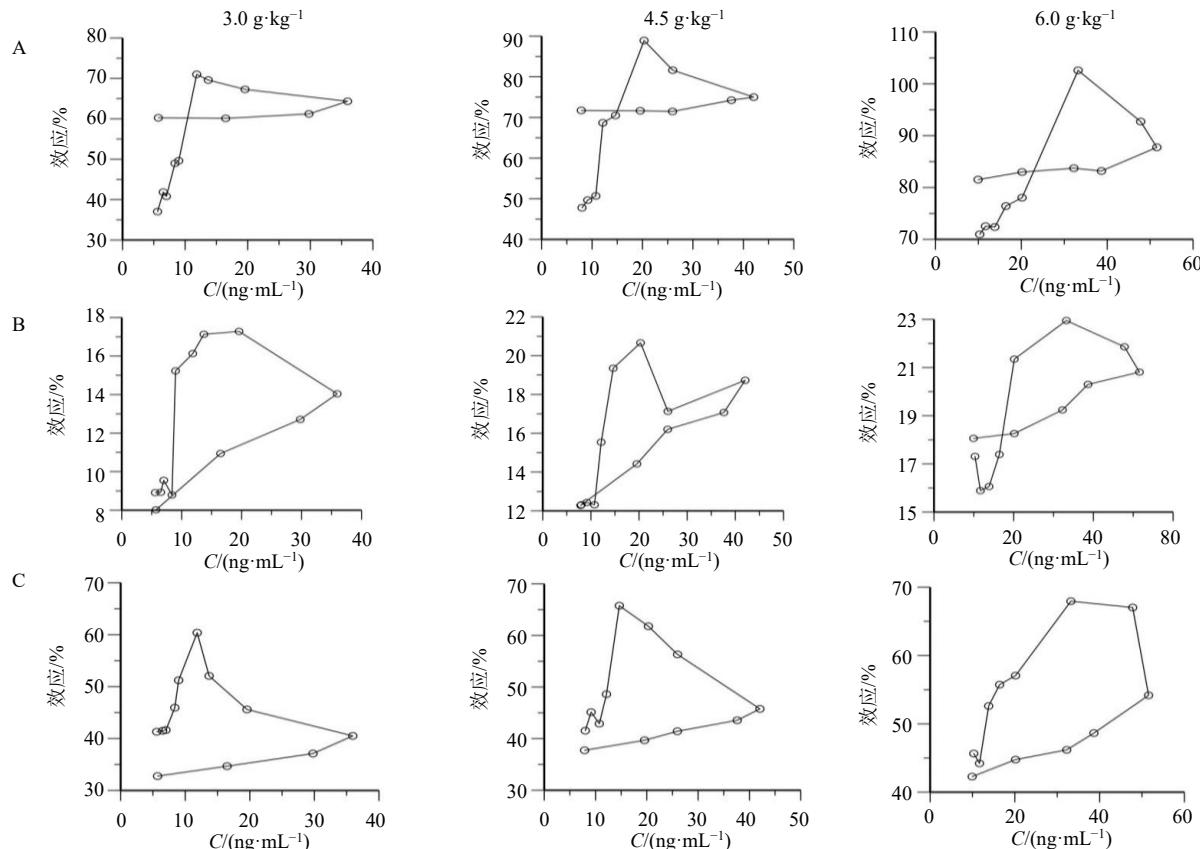
图 8 山蜡梅叶颗粒多效应成分整合在慢性咽炎大鼠内与 TNF- α (A)、IL-1 β (B) 和 IL-6 (C) 的药物浓度-效应曲线 ($n=6$)

Fig. 8 Integration of multiple effector components from *C. nitens* Leaf Granules in chronic pharyngitis rats and TNF- α (A), IL-1 β (B) and IL-6 (C) drug concentration response curve of IL-6 ($n=6$)

由图 8 可知, 整合成分与 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 均可拟合, 且效应-浓度曲线呈逆时针滞后环, 这表示山蜡梅叶颗粒抗慢性咽炎整合成分进入机体内不会立即产生药效作用, 会产生一定的滞后作用, 即 IL-1 β 的达峰时间滞后于整合成分血药浓度的达峰时间。

表 12 山蜡梅叶颗粒多效应成分整合与 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的 PK-PD 参数 ($n = 6$)Table 12 Integration of multi-effect components and PK-PD parameters for TNF- α , IL-1 β and IL-6 in *C. nitens* Leaf Granules ($n = 6$)

参数	3.0 g·kg ⁻¹			4.5 g·kg ⁻¹			6.0 g·kg ⁻¹		
	TNF- α	IL-1 β	IL-6	TNF- α	IL-1 β	IL-6	TNF- α	IL-1 β	IL-6
K_{e0}	1.06	1.06	0.46	1.06	1.46	0.54	1.02	1.02	1.02
EC ₅₀	13.29	10.94	10.23	16.42	13.61	13.87	25.19	21.38	58.51
Gamma	10.64	5.31	3.56	8.74	13.09	3.73	6.78	8.85	1.84
E_0	49.98	9.19	35.69	61.07	13.27	40.28	78.57	17.81	42.94

表 13 山蜡梅叶颗粒多效应成分整合对应各药效指标的 PK-PD 定量方程

Table 13 PK-PD quantitative equation for integration of multi-effect components corresponding to each pharmacodynamic index in *C. nitens* Leaf Granules

药效指标	3.0 g·kg ⁻¹	4.5 g·kg ⁻¹	6.0 g·kg ⁻¹
TNF- α	$E=49.98+19.31\times10^{10.64}/(14.17^{10.64}+10^{10.64})$	$E=61.07+21.31\times10^{8.74}/(16.42^{8.74}+10^{8.74})$	$E=78.57+41.55\times10^{6.78}/(25.19^{6.78}+10^{6.78})$
IL-1 β	$E=9.19+8.51\times10^{5.31}/(10.94^{5.31}+10^{5.31})$	$E=13.27+5.47\times10^{13.09}/(13.61^{13.09}+10^{13.09})$	$E=17.81+4.24\times10^{8.85}/(21.38^{8.85}+10^{8.85})$
IL-6	$E=35.69+13.91\times10^{3.56}/(10.23^{3.56}+10^{3.56})$	$E=40.28+25.47\times10^{3.73}/(13.87^{3.73}+10^{3.73})$	$E=42.94+19.69\times10^{1.84}/(58.51^{1.84}+10^{1.84})$

4 讨论

本研究通过氨水喷入大鼠咽部造成慢性咽炎模型，并对模型做出了评价，造模 2 周后，模型组大鼠出现频繁抓挠口咽、口腔分泌物增多、咽部 HE 染色切片呈现黏膜表层角质化，上皮脱落、坏死，血管充血扩张等病理状态。山蜡梅叶颗粒各剂量给药组大鼠的上述症状、行为均有所缓解。上皮组织脱落坏死情况，血管充血扩张，炎症细胞浸润现象有不同程度的改善。这表明山蜡梅叶颗粒对慢性咽炎具有明显治疗作用。另外，研究发现 ig 给药 2 周山蜡梅叶颗粒后，血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平均较模型组显著降低，提示这种抗慢性咽炎作用至少部分是通过下调促炎细胞因子介导的，表明山蜡梅叶颗粒能通过抑制炎性因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的分泌，减轻其对机体的损害，保护机体。

在考察了山蜡梅叶颗粒抗慢性咽炎药效作用后，采用 LC-MS/MS 对课题组前期研究确认的 6 个入血活性成分（原儿茶酸、芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷、木犀草素、紫云英苷、异嗪皮啶）在慢性咽炎大鼠中进行药动学研究，在 ig 给药山蜡梅叶颗粒后，各个成分被快速吸收，且消除较快。本研究首次对山蜡梅叶的 6 个主要活性成分在慢性咽炎大鼠中进行药动学研究，得出了其活性成分在慢性咽炎大鼠中的药动学规律，为深入探讨山蜡梅叶治疗慢性咽炎的作用机制以及相关制剂开发、质量标准制定提供了积极参考。

本研究以 6 个山蜡梅叶颗粒抗炎活性成分的血药浓度变化为药动学指标，以血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 炎症因子水平作为药效学指标，建立了 PK-PD 结合模型，描述了山蜡梅叶在慢性咽炎大鼠体内的“浓度-时间-效应”之间的关系。每个组分及整合成分的拟合结果表明山蜡梅叶颗粒的 PK-PD 模型可能适用于间接连接、间接效应模型。由药动学结果和 PK-PD 模型可知，山蜡梅叶颗粒的 6 个成分血药浓度达峰时间在 0.5~1.5 h，而其 3 种药物效应值的达峰时间较血药浓度达峰时间长，均出现了逆时针滞后环，说明各成分及整合成分的血药浓度并不是与药物效应值直接相关的，而是药物效应值滞后于血药浓度，产生了滞后效应，且这种滞后效应与剂量无关。造成这种现象的原因可能为药物进入机体内并不会马上作用于相应的靶点，而是药物在体内通过间接机制产生药理作用、受体存在耐受现象或受体被激活的时间存在延迟等，且效应室可能不在血液。另外， K_{e0} 为药物从效应室消除的一级速率常数，用来表征药物浓度与效应之间的时间过程^[21]，其大小决定效应的滞后时间，也表示药物从效应室消除的快慢和药物在中央室和效应室之间的平衡速率。整合药动学 PK-PD 模型结果显示，相比各成分的 K_{e0} 值，整合药动学 PK-PD 模型的 K_{e0} 值出现了不同程度的下降，这可能是各成分通过协同作用使药效滞后血药浓度的时间缩短，让药物效应更为直接。另外，3 种炎症因子水平为药效学参数，

EC₅₀值均为低、中、高剂量组依次上升，提示山蜡梅叶颗粒抗慢性咽炎的效果是呈剂量依赖的关系。总体来看，TNF- α 、IL-1 β 和IL-6炎症因子的浓度与各个成分的血药浓度存在一定的相关性，山蜡梅叶颗粒可能通过调节炎症因子的水平来达到抗慢性咽炎作用。结合PK-PD模型，可以推测山蜡梅叶颗粒这6个活性成分在体内抗慢性咽炎的作用靶点可能为TNF- α 、IL-1 β 和IL-6。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 赵燕恋, 苗芳芳, 杨继红, 等. 慢性咽炎的个体化治疗及临床意义 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2018, 32(13): 1006-1009.
- [2] Li Z C, Huang J L, Hu Z P. Screening and diagnosis of chronic pharyngitis based on deep learning [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2019, 16(10): 1688.
- [3] Murray R C, Chennupati S K. Chronic streptococcal and non-streptococcal pharyngitis [J]. *Infect Disord Drug Targets*, 2012, 12(4): 281-285.
- [4] Suvorkina A, Pukhlik S. Clinical and diagnostic features of chronic pharyngitis [J]. *Pharmacologyonline*, 2021, 24(3): 645-651.
- [5] Hangaard S, Helle T, Nielsen C, et al. Causes of misdiagnosis of chronic obstructive pulmonary disease: A systematic scoping review [J]. *Respir Med*, 2017, 129: 63-84.
- [6] 余琳静, 谢逸轩, 刘茜茜, 等. 基于中西医临床病症特点的慢性咽炎动物模型分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 118-123.
- [7] Zhang Y P, Yuan T H, Li Y S, et al. Network pharmacology analysis of the mechanisms of Compound Herba Sarcandrae (Fufang Zhongjiefeng) aerosol in chronic pharyngitis treatment [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 2783-2803.
- [8] Jin G Y, Jin L L. Chinese herbs for pharyngitis including COVID-19-related sore throat [J]. *Chin Med Nat Prod*, 2022, 2(4): e185-e192.
- [9] 王思佳, 陈世华, 黄佩蓓. 中药抗慢性咽炎作用机制研究进展分析 [J]. 陕西中医药大学学报, 2021, 44(6): 127-131.
- [10] 李治光, 卢建中, 陈杰, 等. 江西道地药材山蜡梅叶质量标准的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 836-838.
- [11] 吴艳秋, 刘宇灵, 林龙飞, 等. 山蜡梅叶化学成分、药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(11): 6599-6607.
- [12] 钟瑶, 万志超, 周蓝飞, 等. 针刀刺营法联合山蜡梅叶颗粒治疗急性咽炎的疗效观察 [J]. 江西中医药, 2022, 53(3): 55-57.
- [13] 田琳, 张立明, 董春晓. 山蜡梅叶颗粒治疗儿童急性上呼吸道感染疗效观察 [J]. 临床合理用药杂志, 2010, 3(12): 57.
- [14] 王锐, 于春峰, 卓雪群, 等. 基于PK-PD模型的独活凝胶贴膏经阳陵泉穴位给药治疗类风湿性关节炎研究 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(6): 3441-3444.
- [15] Derendorf H, Meibohm B. Modeling of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationships: Concepts and perspectives [J]. *Pharm Res*, 1999, 16(2): 176-185.
- [16] Breimer D D. PK/PD modelling and beyond: Impact on drug development [J]. *Pharm Res*, 2008, 25(12): 2720-2722.
- [17] 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.
- [18] 王艺, 张玲, 周家璇. 咽炎消合剂对慢性咽炎大鼠咽黏膜修复作用的研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2015, 24(15): 1600-1602.
- [19] 张娇, 蒋倩倩, 张伯言, 等. 基于AHP-CRITIC法正交优选乌甘袋泡茶提取工艺及抗炎作用研究 [J]. 中草药, 2020, 51(8): 2177-2184.
- [20] 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则(第一辑) [M]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 1993: 308.
- [21] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [22] 周杰, 张青, 陈艺, 等. 基于LPS诱导的体外炎症模型建立羊耳菊抗炎活性成分的PK-PD结合模型 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(23): 6308-6319.

[责任编辑 李亚楠]