

牡荆素-4'-O-葡萄糖苷在大鼠体内的首关效应研究[△]

吴成举^{1*}, 柴纪严¹, 张文洁²(1. 辽宁中医药大学教学实验中心, 沈阳 110032; 2. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116011)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)25-3491-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.25.11

摘要 目的: 研究牡荆素-4'-O-葡萄糖苷(VG)在大鼠体内的首关效应及其机制, 为其新药剂型研究提供依据。方法: 10只SD大鼠分为肝门静脉给药组和股静脉给药组, 分别于肠系膜上静脉iv VG、股静脉灌注VG, 通过测定VG在肝脏的AUC计算代谢率; 15只SD大鼠分为胃灌注组、肠灌注组和肝门静脉给药组, 分别于胃底、十二指肠灌注VG及肠系膜上静脉iv VG, 通过测定VG在胃、肠的AUC计算代谢率; 15只SD大鼠分为肠灌注组、股静脉给药组和生理盐水组, 在给药前10 min, 前2组大鼠灌注细胞色素P₄₅₀(CYP)3A与P糖蛋白(P-gp)的底物维拉帕米注射液(60 ml/kg), 生理盐水组大鼠灌注等体积生理盐水, 之后按照上述方法给药, 考察维拉帕米对VG肠吸收的影响。结果: VG在肝脏、胃、肠道的代谢率分别为54.9%、1.7%、91.9%; 灌注维拉帕米后, 肠灌注组大鼠VG的AUC表现出轻微的增加趋势。结论: 肝、肠首关作用是导致VG生物利用度低的主要因素, 初步判断VG是肠道CYP 3A和/或P-gp的底物。

关键词 牡荆素-4'-O-葡萄糖苷; 首关效应; 代谢率; CYP3A; P-糖蛋白; 大鼠

Study on the First-Pass Effects of Vitexin-4'-O-Glucoside in Rats *in vivo*

WU Chengju¹, CHAI Jiyan¹, ZHANG Wenjie²(1. Teaching and Experiment Center, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China; 2. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Liaoning Dalian 116011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the first-pass effect and mechanism of vitexin-4'-O-glucoside (VG) in rats so as to provide a basis for new drug development. METHODS: 10 SD rats were divided into a group of hepatic portal venous administration and a group of femoral venous administration, which respectively received VG iv at superior mesenteric vein and femoral vein, and then metabolic rate was calculated by finding out the AUC of VG in the rats' livers. 15 SD rats were divided into a group of gastric infusion, a group of intestinal infusion and a group of hepatic portal venous infusion, which respectively received VG by infusion at gastric fundus and duodenum and iv at superior mesenteric vein, and then metabolic rate was calculated by finding out the AUC of VG in the rats' stomachs and intestines. 15 SD rats were divided into a group of intestinal infusion, a group of femoral venous administration and a group of normal saline. At 10 min before administration, the former two groups were given by infusion verapamil injection (60 ml/kg), the substrate of CYP3A and P-glycoprotein (P-gp); and the group of normal saline were given by infusion of isometric normal saline, and then the rats were given VG as above to observe the effect of verapamil on intestinal absorption of VG. RESULTS: The metabolic rates of VG in the liver, stomach and intestine were 54.9%, 1.7% and 91.9% respectively. After infusion of verapamil, slight increase in AUC of VG was found in the rats in the group of intestinal infusion. CONCLUSIONS: The first-pass effects in the liver and intestine are the main factors related to the low bioavailability of VG. Based on preliminary judgment, VG is the substrate of intestinal CYP3A and/or P-gp.

KEYWORDS Vitexin-4'-O-glucoside; The first-pass effect; Metabolic rate; CYP3A; P-glycoprotein; Rats

- [8] Xu X, Cao Z, Cao B. Carbamylated erythropoietin protects the myocardium from acute ischemia/reperfusion injury through a PI3K/Akt-dependent mechanism[J]. *Surgery*, 2009, 146(3):506.
- [9] Dashkevich A, Hagl C, Beyersdorf F, et al. VEGF pathways in the lymphatics of healthy and diseased heart[J]. *Microcirculation*, 2016, 23(1):5.
- [10] Cubranić A, Redzovic A, Dobrila-Dintinjana R, et al. Mystery story about erythropoietin (Epo) and erythropoietin receptor (EpoR) are disguised?[J]. *Hepatology*, 2015, 62(139):585.
- [11] Bjornstad P, Truong U, Dorosz JL, et al. Cardiopulmonary dysfunction and adiponectin in adolescents with type 2 diabetes[J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, doi: 10.1161/JAHA.115.e002804.
- [12] Meredith IT, Tanguay JF, Kereiakes DJ, et al. Diabetes mellitus and prevention of late myocardial infarction after coronary stenting in the randomized dual antiplatelet therapy study[J]. *Circulation*, 2016, 133(18):1772.
- [13] Fiordaliso F, Chimenti S, Staszewsky L, et al. A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury[J]. *PNAS*, 2005, 102(6):2046.

△基金项目: 沈阳市科技计划项目(No.F13-194-9-00)

*高级实验师。研究方向: 生理药理与实验针灸。电话: 024-31207016。E-mail: 1935116200@qq.com

(收稿日期: 2016-03-28 修回日期: 2016-07-15)

(编辑: 邹丽娟)

山楂叶^[1-3]为蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. major N.E.Br. 或山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 的干燥叶, 收载于2015年版《中国药典》(一部)中^[4], 具有活血化瘀、理气通脉之功效, 用于改善气滞血瘀^[5-6]、胸闷憋气、心悸健忘^[7-9]、眩晕耳鸣等症^[10]。牡荆素-4'-*O*-葡萄糖苷(VG)是山楂叶中黄酮类的主要活性成分^[11], 但文献报道其生物利用度低^[12]。因此, 在本研究中笔者复制了大鼠肝脏和胃、肠道首关效应模型并进行相关研究, 以解释其口服生物利用度偏低的原因。此外, 肠道内细胞色素 P₄₅₀(CYP)3A 的代谢作用和 P 糖蛋白(P-gp)的外排作用也是影响药物吸收的主要因素之一^[13], 且已有文献报道黄酮类化合物中的某些成分是 CYP3A 和 P-gp 的底物。因此, 在本研究中笔者选择了这 2 种蛋白酶的共同底物, 同时也是诱导剂的维拉帕米^[14], 通过观察 VG 是否与维拉帕米产生竞争性抑制作用^[15], 确定 VG 是否是肠道 CYP 3A 和/或 P-gp 的底物, 为其新剂型的开发奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

1100 型高效液相色谱(HPLC)仪, 包括 G1310A 四元泵、G1312A 真空脱气机、G1314A 紫外-可见分光光度计(美国安捷伦公司); HH-S 水浴锅(上海永光明仪器设备厂); XYJ80-2 型离心机(金坛市金南仪器厂); TGL-16C 型高速台式离心机(江西医疗器械厂); XW-80A 型微型旋涡混合器(上海沪西分析仪器厂有限公司); ZDHW 型电子调温电热套(北京中兴伟业仪器有限公司); 动物手术器械、红外灯、微量取样器(上海荣泰生化工程有限公司)。

1.2 药物与试剂

VG 对照品(辽宁中医药大学实验中心实验室自制, 批号: 20150207, 纯度: >98%); 橙皮苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110721-200613, 纯度: >98%); 甲醇、乙腈(色谱纯, 天津市大茂化学试剂厂); 冰醋酸、乌拉坦均为分析纯; 纯化水(娃哈哈有限公司); 盐酸维拉帕米注射液(天津市中央药业有限公司, 批号: H12020051, 规格: 5 mg: 2 ml)。

1.3 动物

清洁级 SD 大鼠 64 只, ♂, 体质量(250~320)g, 由大连医科大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXX(辽)2008-0002。实验期间大鼠自由饮水, 给药前禁食不禁水 12 h。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品贮备液的制备 精密称取 VG 对照品(批号: 20150207)10 mg, 置于 10 ml 量瓶中, 用 5 ml 甲醇超声(功率: 180 W, 下同)溶解 10 min 后稀释至刻度, 摇匀, 即得质量浓度为 1 000 μg/ml 的对照品贮备液, 于 4 °C 冰箱保存, 备用。

2.1.2 内标贮备液的制备 精密称取橙皮苷 3.30 mg, 置于 10 ml 量瓶中, 用 5 ml 甲醇超声溶解 10 min 后稀释至刻度, 摇匀, 即得质量浓度为 330 μg/ml 的内标贮备液, 于 4 °C 冰箱保存, 备用。

2.1.3 空白生物样品的制备 随机取 SD 大鼠 24 只, 分成 4 组, 每组 6 只, 分别用于在股静脉、肝门静脉、胃、肠道部位的空白生物样品制备。实验前 12 h 禁食不禁水, ip 20% 乌拉坦麻醉, 行颈动脉插管术, 采集动脉血液, 离心(3 000 r/min, 离心半径 3.3 cm)15 min, 收集血浆, 将 6 只大鼠的血浆混合, 于 -20 °C

冰箱保存, 备用。

2.1.4 质控(QC)样品的制备 精密吸取 100 μl 空白血浆, 加入一定浓度的对照品溶液 50 μl, 按照“2.1.3”项下方法制备质量浓度分别为 1.25、10、80 μg/ml(低、中、高质量浓度)的 QC 样品, 于 4 °C 冰箱保存, 备用。

2.1.5 生物样品的预处理 分别取大鼠血浆 100 μl, 置于 2 ml 具塞离心试管中, 依次加入内标贮备液 30 μl、乙酸 10 μl、甲醇 0.5 ml, 涡旋混合 1 min, 按“2.1.3”项下方法离心 15 min, 取上清液, 于 50 °C 氮气流下吹干, 残渣加入流动相 100 μl 复溶, 涡旋溶解 1 min, 离心(10 000 r/min, 离心半径 3.3 cm)10 min, 取上清液 20 μl, 即得。

2.2 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Kromasil C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 预柱: Kromasil C₁₈(35 mm×8.0 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-乙腈-四氢呋喃-1% 冰醋酸水溶液(6:2:18:74, V/V/V/V); 检测波长: 330 nm; 流速: 1 ml/min; 柱温: 25 °C; 进样量: 20 μl; 内标: 橙皮苷。在上述色谱条件下, 取“2.1.1”~“2.1.3”项下各溶液进样测定, 结果理论板数以 VG 计不少于 3 000, 分离度 >2.0, 各成分达到基线分离。色谱图见图 1。

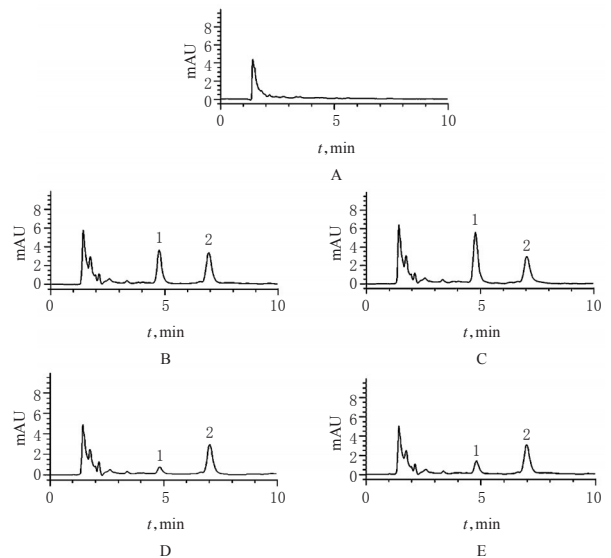


图 1 高效液相色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆加对照品及内标; C. 肝门静脉血浆样品; D. 肠道血浆样品; E. 胃血浆样品; 1. VG 对照品; 2. 内标

Fig 1 High performance liquid chromatogram

A. blank plasma; B. blank plasma added with reference substance and internal standard; C. plasma sample from the hepatic portal vein; D. plasma sample from the intestine; E. plasma sample from the stomach; 1. VG control; 2. internal standard

2.3 线性关系考察

精密吸“2.1.3”项下空白血浆 100 μl 共 7 份, 依次加入不同质量浓度 VG(1、2、4、10、20、40、100 μg/ml)贮备液 50 μl、内标贮备液 30 μl, 配制成血浆质量浓度为 0.5、1、2、5、10、20、50 μg/ml 的生物样品。按“2.1.5”项下方法处理生物样品, 按“2.2”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以 VG 质量浓度(x , μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得股静脉、肝门静脉样本回归方程均为 $y=0.160 5x+0.001 9$ ($r=0.999 6$), VG 质量浓度线性范围为 0.5~50 μg/ml; 胃、肠部位样本回归方程均

为 $y=0.1688x-0.0351$ ($r=0.9997$), VG 质量浓度线性范围为 $0.2\sim 20\ \mu\text{g/ml}$ 。

2.4 检测限(LOD)和定量限(LOQ)试验

将已知质量浓度的对照品贮备液无限稀释,精密吸取 $50\ \mu\text{l}$ 至 $100\ \mu\text{l}$ 的空白血浆中,按“2.1.5”项下方法处理样品,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,结果, VG 的检测限(信噪比为3)为 $0.18\ \mu\text{g/ml}$ 、定量限(信噪比为10)为 $0.06\ \mu\text{g/ml}$ 。

2.5 精密度试验

取低、中、高质量浓度 QC 样品,各 6 份,连续测定 3 d,以当日的标准曲线计算 QC 样品的浓度,考察方法精密度。结果,日内精密度 RSD 在 $6.77\%\sim 9.04\%$ 之间($n=6$),日间精密度 RSD 在 $2.90\%\sim 6.66\%$ 之间($n=6$)。

2.6 提取回收率试验

取 $100\ \mu\text{l}$ 空白血浆 18 份,除不加系列对照品溶液和内标贮备液外,按“2.1.5”项下方法操作,吸取上清液后加入系列对照品溶液 $50\ \mu\text{l}$ 和内标贮备液 $30\ \mu\text{l}$,涡旋混合, $50\ ^\circ\text{C}$ 氮气流下吹干。残留物以 $100\ \mu\text{l}$ 流动相溶解,按“2.1.3”项下方法离心 $10\ \text{min}$,取上清液,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。设定该处理方法得到数据的提取回收率为 100% 。另取低、中、高质量浓度的 QC 样本,各 5 份,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并与上述设定的提取回收率进行比较。结果显示, VG 的提取回收率为 $89.2\%\sim 99.0\%$, RSD 均小于 15% ($n=5$)。

2.7 VG 在大鼠体内的首关效应研究

2.7.1 VG 在肝脏的代谢率 10 只 SD 大鼠随机分为肝门静脉给药组和股静脉给药组,每组 5 只。各组大鼠 ip 20% 乌拉坦 $0.3\ \text{ml/kg}$ 。待大鼠轻微麻醉后,将其固定在手术台上,行颈动脉插管术,管内充满含 $80\ \text{u/ml}$ 肝素的生理盐水以防止血液凝固。肝门静脉给药组大鼠插管后立即剖开腹腔,开口约 $2\ \text{cm}$,找到肠系膜上静脉,通过肠系膜上静脉 iv VG $10\ \text{mg/kg}$,给药时间为 $5\ \text{min}$ 。随后立即行腹腔缝合手术,并在给药后 $0、3、5、10、15、20、30、50、80、120、180、240、330\ \text{min}$ 于颈动脉采血适量。按“2.1.3”项下方法离心 $15\ \text{min}$,收集血浆,于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中保存,待测。在整个实验过程中,大鼠始终于红外灯照射下维持正常体温,以确保实验的正常进行。在进行肝门静脉给药的同时,设计平行实验以减少实验误差,故同时在股静脉 iv 等体积生理盐水。股静脉给药组大鼠行动脉插管后,将大鼠一侧腿部皮肤打开,找到股静脉后灌注 VG $10\ \text{mg/kg}$,给药时间 $5\ \text{min}$,随后立即缝合,采血时间和平行实验设计同肝门静脉给药组大鼠。通过测定 VG 在肝脏的 AUC 和生物利用度(%),计算代谢率($\% = 1 - \text{生物利用度}$)。

各组大鼠于给药后 $5\ \text{min}$ 出现了血浆药物浓度的最高峰;于给药后 $20\ \text{min}$ 出现了双峰现象。VG 在肝脏的血药浓度-时间曲线见图 2,药动学参数见表 1。

结果,肝门静脉给药后, VG 在血浆中的生物利用度为 45.1% ,即肝脏对 VG 的代谢率为 54.9% 。

2.7.2 VG 在胃、肠道的代谢率 15 只 SD 大鼠随机分为胃灌注组、肠灌注组和肝门静脉给药组,每组 5 只,麻醉及插管方法同“2.7.1”项下方法。胃灌注组大鼠插管后剖开腹腔,开口约

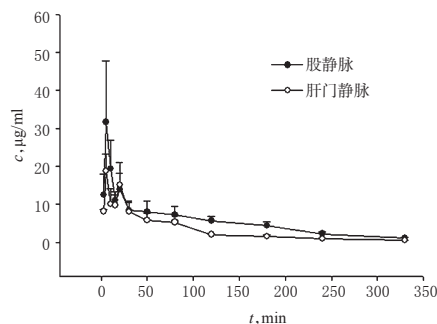


图 2 VG 在肝脏的血药浓度-时间曲线

Fig 2 Blood-time curve of VG concentration in liver

表 1 VG 在肝脏的药动学参数

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of VG in liver

组别	给药剂量,mg/kg	AUC _{0-∞} , μg·min/ml	生物利用度,%
股静脉给药组	10	1 866.5 ± 103.0	100.0
肝门静脉给药组	10	841.4 ± 11.9	45.1

为 $2\ \text{cm}$,找到胃后从胃底部灌注 VG $20\ \text{mg/kg}$,灌注时间为 $5\ \text{min}$,随后行腹部缝合术;肠灌注组大鼠插管后剖开腹腔,开口约为 $2\ \text{cm}$,找到十二指肠后从距离幽门端 $1\ \text{cm}$ 的位置灌注 VG $20\ \text{mg/kg}$,灌注时间为 $5\ \text{min}$,随后行腹部缝合术;肝静脉给药组大鼠处理方法同“2.7.1”项下方法。各组采血时间和平行实验设计同“2.7.1”项下方法。测定 VG 在胃、肠道的 AUC 和生物利用度,计算代谢率。

VG 在胃、肠道的血药浓度-时间曲线见图 3,药动学参数见表 2。

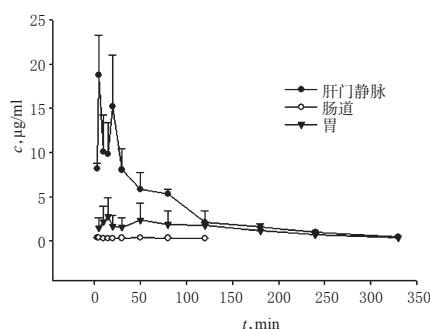


图 3 VG 在胃、肠道的血药浓度-时间曲线

Fig 3 Blood-time curve of VG concentration in stomach and intestine

表 2 VG 在胃、肠道的药动学参数

Tab 2 Pharmacokinetic parameters of VG in the stomach and intestine

组别	给药剂量,mg/kg	AUC _{0-∞} , μg·min/ml	生物利用度,%
肝门静脉给药组	10	838.8 ± 112.0	100.0
肠灌注组	20	135.6 ± 42.8	8.1
胃灌注组	20	164.4 ± 9.0	98.3

结果,与肝门静脉灌注组比较,胃、肠道灌注组大鼠的生物利用度分别为 98.3% 、 8.1% ,代谢率分别为 1.7% 、 91.9% 。

2.7.3 CYP 3A 与 P-gp 对 VG 肠吸收的影响 15 只 SD 大鼠随机分为肠灌注组、股静脉给药组和生理盐水组,每组 5 只。肠灌注组和生理盐水组大鼠于肠灌注 VG 前 $10\ \text{min}$ 先分别灌注盐酸维拉帕米注射液($60\ \text{ml/kg}$)与等体积生理盐水后,按

“2.7.2”项下方法处理;股静脉给药组大鼠于灌注VG前10 min先灌注盐酸维拉帕米注射液(60 ml/kg)后,按“2.7.1”项下方法处理。各组采血时间和平行实验设计同“2.7.1”项下方法。考察维拉帕米对VG药动学的影响。

各组大鼠加用盐酸维拉帕米后VG的血药浓度-时间曲线见图4。

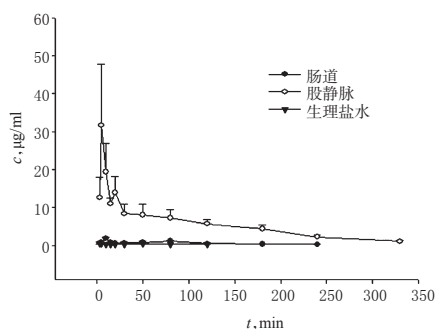


图4 各组大鼠灌注盐酸维拉帕米后VG的血药浓度-时间曲线
Fig 4 Blood-time curves of VG of the groups after infusion of verapamil

结合图2与图4可知,维拉帕米对股静脉给药组大鼠的VG药动学几乎不产生影响;与生理盐水组比较,肠灌注组大鼠VG的AUC表现出轻微的增加趋势,同时双峰现象的程度有所增加。

3 讨论

本研究探讨VG在大鼠肝门静脉、十二指肠以及胃中的代谢率,其给药剂量依据预实验得出,即大鼠肝门静脉给药剂量为10 mg/kg、十二指肠为20 mg/kg、胃为20 mg/kg。为研究肠道内CYP3A与P-gp对VG肠吸收的影响,根据动物与人临床用药换算原则,在VG给药前先给予盐酸维拉帕米注射液60 mg/kg。

本研究结果显示,肝脏、肠道、胃对VG的代谢率分别为54.9%、91.9%、1.7%,即肝首关作用和肠首关作用是导致VG生物利用度低的主要原因。另一方面,与生理盐水组比较,肠灌注组大鼠体内VG的AUC表现出轻微的增加趋势,同时双峰现象的程度有所增加,说明在一定程度上维拉帕米对VG起到了竞争性抑制的作用,据此初步判断VG是肠道CYP3A和/或P-gp的底物。因此,在临床应用中,可以考虑通过联合用药的方法增加VG的吸收率,以解决其口服生物利用度低的问题。

此外,本研究建立的HPLC法具有专属性,经证实可用于大鼠血浆中VG含量的测定。综上所述,肝首关作用和肠首关作用是导致VG生物利用度低的主要因素,初步判断VG是肠道CYP3A和/或P-gp的底物。本研究结果可为后续新药剂型的开发与利用提供一定的参考。

参考文献

- [1] 耿慧春,满莹,赵智勇.山楂叶化学成分和药理作用研究进展[J].中国现代医生,2009,47(26):12.
- [2] 代文婷,张毅,柏俊,等.山楂叶总黄酮分散片的处方研究[J].中国药房,2013,24(7):613.
- [3] 黄肖霄,牛超,高品一,等.山楂叶的化学成分[J].沈阳药科大学学报,2010,27(8):615.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:32.
- [5] 梁伟伟,严瑾,吴利花,等.山楂叶总黄酮对高血脂症大鼠脂代谢的影响[J].健康研究,2010,30(1):8.
- [6] 高英英,欧芹,魏晓东,等.山楂叶总黄酮对AS模型大鼠PPAR α , LXR, ABCA1, mRNA表达的影响[J].中国老年学杂志,2011,31(13):2502.
- [7] 刘俊芳,李昌俊,郑瑶,等.山楂叶总黄酮对大鼠脑缺血再灌注损伤保护作用的探讨[J].中国医院药学杂志,2011,31(10):832.
- [8] 王思源,徐秋阳,张文洁,等.山楂叶提取物治疗实验性大鼠脂肪肝药效研究[J].中华中医药杂志,2011,26(12):2955.
- [9] 张文洁,杨英,张辉.山楂叶提取物对高血脂大鼠的影响[J].辽宁中医杂志,2008,35(2):307.
- [10] Ying XX, Li HB, Chu ZY, et al. HPLC determination of malondialdehyde in ECV304 cell culture medium for measuring the antioxidant effect of vitexin-4"-O-glucoside[J]. Arch Pharm Res, 2008, 31(7):878.
- [11] Ying XX, Wang RX, Xu J, et al. HPLC determination of eight polyphenols in the leaves of Crataegus pinnatifida Bge. var. Major[J]. J Chromatogr Sci, 2009, 47(3):201.
- [12] Chen YH, Xu QY, Zhang WJ, et al. HPLC determination of vitexin-4"-O-glucoside in mouse plasma and tissues after oral and intravenous administration[J]. J Liq Chromatogr Relat Technol, 2014, 37(7):1052.
- [13] 黄伟,胡晓.细胞色素P₄₅₀ 3A4代谢机制有关方面的研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2015,20(2):223.
- [14] 李恩,李燕. P-糖蛋白对布格呋喃大鼠肠道吸收的影响[J].药学学报,2008,43(4):361.
- [15] 张远荣,蒋企洲.山楂叶黄酮的抗氧化作用[J].药学与临床研究,2011,19(3):287.

(收稿日期:2016-04-08 修回日期:2016-07-18)

(编辑:刘明伟)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊,欢迎投稿、订阅