

五酯胶囊/五味子酯甲和环磷酰胺联合给药对大鼠体内环磷酰胺药动学的影响研究^Δ

冯 格^{1,2*}, 翟健秀^{1,3}, 陈万生¹, 高守红¹, 张 凤^{1#}, 熊筱娟^{2#}(1.第二军医大学长征医院药材科, 上海 200003; 2.宜春学院化学与生物工程学院, 江西宜春 336000; 3.沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110015)

中图分类号 R969.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)03-0307-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.03.05

摘要 目的:研究五酯胶囊(WZC)/五味子酯甲(SchA)和环磷酰胺联合给药对大鼠体内环磷酰胺(CTX)药动学的影响。方法:36只大鼠随机分为CTX组(尾静脉注射CTX溶液300 mg/kg),CTX+WZC组(灌胃五酯胶囊300 mg/kg+尾静脉注射CTX溶液300 mg/kg),CTX+SchA低、中、高、极高剂量组(灌胃SchA 30、300、3 000、30 000 μg/kg+尾静脉注射CTX溶液300 mg/kg),每组6只。分别于给药前及给药后0.083、0.25、0.5、1、2、3、4、6、8、12、24、36、48 h自眼眶静脉丛取血0.3 mL,采用超高效液相色谱-串联质谱法测定大鼠血浆中CTX及其代谢产物[脱氯乙基环磷酰胺(DC-CTX)、4-酮基环磷酰胺(4-keto CTX)、羧基磷酰胺(CPM)]的质量浓度,绘制药-时曲线,并用DAS 2.0软件拟合药动学参数。结果:CTX组,CTX+WZC组,CTX+SchA低、中、高、极高剂量组大鼠血浆中DC-CTX的 c_{max} 分别为(22 167.85 ± 2 844.93)、(10 920.53 ± 1 490.89)、(18 951.29 ± 1 558.81)、(18 622.08 ± 791.19)、(18 515.20 ± 2 560.61)、(15 133.21 ± 1 305.07) μg/mL, $AUC_{0-48 h}$ 分别为(173 864.01 ± 65 342.21)、(100 996.98 ± 33 530.02)、(137 028.16 ± 45 975.19)、(131 650.18 ± 53 196.41)、(113 699.40 ± 34 131.36)、(110 773.27 ± 30 307.15) μg·mL/h;与CTX组比较,CTX+WZC组,CTX+SchA低、中、高、极高剂量组大鼠血浆中DC-CTX的 c_{max} 分别降低50.74%、14.51%、16.10%、16.48%、31.73%, $AUC_{0-48 h}$ 分别降低约42.23%、21.45%、24.63%、33.37%、36.55%,差异均有统计学意义($P < 0.05$), $t_{1/2}$ 、 t_{max} 等其余药动学指标无明显变化。结论:WZC与SchA均可在一定程度上降低DC-CTX的生成,表明二者可以抑制CTX毒性代谢途径进而减少毒性代谢产物氯乙醛的生成;但SchA对毒性代谢途径的抑制作用弱于WZC,且不存在剂量依赖性。

关键词 环磷酰胺;五酯胶囊;五味子酯甲;药动学;大鼠

Effects of Wuzhi Capsule/Schisantherin A Combined with Cyclophosphamide on the Pharmacokinetics of Cyclophosphamide in Rats

FENG Ge^{1,2}, ZHAI Jianxiu^{1,3}, CHEN Wansheng¹, GAO Shouhong¹, ZHANG Feng¹, XIONG Xiaojuan²(1.Dept. of Medicinal Materials, Shanghai Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2.College of Chemical and Biological Engineering, Yichun College, Jiangxi Yichun 336000, China; 3.School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110015, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of Wuzhi capsule/schisantherin A (SchA) combined with cyclophosphamide on the pharmacokinetics of cyclophosphamide (CTX) in rats. METHODS: A total of 36 rats were randomly divided into CTX group (via tail vein, iv, CTX solution 300 mg/kg), CTX+WZC group (ig, Wuzhi capsule 300 mg/kg+via tail vein, iv, CTX solution 300 mg/kg), CTX+SchA low-dose, medium-dose, high-dose and excessive high-dose groups (ig, SchA 30, 300, 3 000, 30 000 μg/kg+via tail vein, iv, CTX solution 300 mg/kg) with 6 rats in each group. Blood samples were collected from orbital venous plexus of rats before medication and 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 h after medication. UPLC-MS/MS method was applied for concentration determination of CTX and its metabolites [de-chloroethyl CTX (DC-CTX), 4-ketone CTX (4-keto CTX), carboxyl phosphamide (CPM)] in plasma of rats. The plasma concentration-time curve was obtained. The pharmacokinetic parameters were fitted by using DAS 2.0 software. RESULTS: The maximum plasma concentration (c_{max}) of DC-CTX in CTX group, CTX+WZC group, CTX+SchA low-dose, medium-dose, high-dose and excessive high-dose groups were (22 167.85 ± 2 844.93), (10 920.53 ± 1 490.89), (18 951.29 ± 1 558.81), (18 622.08 ± 791.19), (18 515.20 ± 2 560.61), (15 133.21 ± 1 305.07) μg/mL, respectively; the area under the curves ($AUC_{0-48 h}$) were (173 864.01 ± 65 342.21), (100 996.98 ± 33 530.02), (137 028.16 ± 45 975.19), (131 650.18 ± 53 196.41), (113 699.40 ± 34 131.36), (110 773.27 ± 30 307.15) μg·mL/h, respectively. Compared

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81573793);上海市临床药学重点专科建设项目(No.2016-40044-002)

* 硕士研究生。研究方向:临床药学。电话:021-60748767。E-mail:13636442918@163.com

#a 通信作者:主管药师,博士。研究方向:生药学、临床药学。电话:021-60748767。E-mail:fengzhang@smmu.edu.cn

#b 通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:天然药物活性成分研究与新药开发。电话:0795-3201986。E-mail:ycxxxj@163.com

with CTX group, c_{\max} of DC-CTX in CTX group, CTX+SchA low-dose, medium-dose, high-dose and excessive high-dose groups were decreased by 50.74%, 14.51%, 16.10%, 16.48%, 31.73%, respectively. $AUC_{0-48\text{ h}}$ were decreased by about 42.23%, 21.45%, 24.63%, 33.37%, 36.55%, respectively; with statistical significance ($P < 0.05$). The pharmacokinetic indexes as $t_{1/2}$, t_{\max} had no significant change. CONCLUSIONS: To some degree, both WZC and SchA can reduce the generation of DC-CTX, which indicates both of them can inhibit CTX toxicity metabolism pathway so as to reduce the generation of toxic metabolite chloroacetaldehyde. The inhibitory effect of SchA on toxicity metabolism pathway is weaker than that of WZC, and does not have a dose-dependent inhibitory effect.

KEYWORDS Cyclophosphamide; Wuzhi capsule; Schizander A; Pharmacokinetics; Rats

高剂量环磷酰胺(Cyclophosphamide, CTX)是常用于多发性骨髓瘤(Multiple myeloma, MM)治疗的自体外周血造血干细胞动员方案,但同时会引起严重的毒副作用,且大多与CTX代谢过程相关。CTX为前药,在体外无活性,进入体内后在细胞色素P₄₅₀(CYP)酶的作用下发挥作用,但在CYP3A4的作用下生成具有肾毒性和神经毒性的氯乙醛,同时会生成等物质的量的脱氯乙基环磷酰胺(Dechloroethylcyclophosphamide, DC-CTX)^[1]。由于CTX是前药,需要代谢才能产生活性成分磷酰胺氮芥,且目前尚无研究认为测定其血浆浓度能够完全反映CTX的药理活性。因此,大多数研究会检测其活性代谢通路上较为稳定的化合物4-酮基环磷酰胺(4-ketocyclophosphamide, 4-keto CTX)和羧基磷酰胺(Carboxyethylphosphoramidate, CPM)的含量,同时结合CTX的血药浓度水平反映CTX的活性转化的情况。五酯胶囊(Wuzhi capsule, WZC)是南五味子(即华中五味子)的提取物,本课题组前期及相关研究均表明其对CYP3A4具有抑制作用,且可以通过CTX联用WZC降低CYP3A4代谢通路中DC-CTX的生成从而降低毒性反应^[1-2]。五味子酯甲(Schisantherin A, SchA)是WZC中含量较高的成分之一,具有抑制肝窦内皮细胞功能及血管新生的活性,同时具有抗氧化功效,主要用于治疗慢性肝炎^[2]。

2015年版《中国药典》(一部)规定了SchA含量在南五味子中不得低于0.20%^[3],而WZC仅将五味子甲素作为其质量控制化合物。有关文献报道,SchA在WZC中含量较高,仅略低于五味子甲素,不同产地南五味子药材中SchA含量相差最高约5倍,在同一厂家出产的药品制剂中相差约2倍^[2],而SchA作为南五味子药材及WZC中对CYP3A4的抑制作用最强的化合物,其含量的高低对WZC产生的CYP3A4抑制作用可能有关联^[2]。除此以外,目前尚无文献考察SchA与CTX联合使用的研究,因此有必要考察SchA和CTX联合使用时对CTX毒性代谢产物生成的影响,为WZC的临床合理应用和二次开发提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

6460超高效液相色谱-质谱联用仪(UPLC-MS/MS, 美国Agilent公司);VX-200漩涡混合仪(美国Labnet公司);5810R低温高速离心机(德国Eppendorf公司)。

1.2 药品与试剂

DC-CTX(批号:D226400,纯度:96.0%)、CPM(批号:C181350,纯度:96.0%)、4-keto CTX(批号:O849900,纯度:98.0%)对照品均购自加拿大TRC公司;CTX对照品(美国Sigma-Aldrich公司,批号:079K1569,纯度:99.0%);替硝唑(TNZ)对照品(中国食品药品检定研究院,批号:10036-200703,纯度:98%);CTX粉针(德国Boxer公司,批号:5A047B,规格:每瓶0.2g);美司钠注射液(德国Baxter Oncology GmbH公司,批号:4A177A,规格:4.0 mL:0.4 g);WZC(四川禾正制药有限责任公司,批号:150912,规格:每粒含五味子甲素11.25 mg);SchA(上海长征医院制剂室自制,结构通过波谱鉴定,批号:20150716,纯度:99.0%);甲醇为色谱纯,其余为分析纯,水为纯化水。

1.3 动物

清洁级健康SD大鼠36只,♂,体质量(220±30)g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2007-0005。

2 方法与结果

2.1 动物分组及给药

36只大鼠随机分为CTX组[尾静脉注射CTX溶液(每0.2g CTX加生理盐水5 mL溶解所得溶液)300 mg/kg],CTX+WZC组(灌胃WZC 300 mg/kg+尾静脉注射CTX溶液300 mg/kg),CTX+SchA低、中、高、极高剂量组(灌胃SchA 30、300、3 000、30 000 μg/kg+尾静脉注射CTX溶液300 mg/kg),每组6只。各组大鼠灌胃给药15 min后注射给药。

2.2 血浆样品的采集及样品前处理

各组大鼠注射给药结束后1 h于尾静脉注射美司钠注射液(剂量为CTX剂量的1.4倍,根据预实验确定)进行CTX所致尿道损伤的保护,分别于给药后0.083、0.25、0.5、1、2、3、4、6、8、12、24、36、48 h自大鼠眼眶静脉丛取血约0.3 mL,置于1.5 mL肝素化的离心管中,混匀,离心(离心半径为10 cm,6 000 r/min)5 min,取上清液,−20 ℃冰箱中保存。血浆融化后,取30 μL,加生理盐水870 μL,涡旋30 s,取样品100 μL于1.5 mL离心管中,加入含内标TNZ(6 ng/mL)的乙腈溶液400 μL,涡旋1.5 min、混匀、离心(离心半径为6 cm,14 000 r/min)15 min,取100 μL上清液,加入10%乙腈溶液400 μL,涡旋30 s、

离心(离心半径为6 cm, 14 000 r/min)5 min, 取上清液, 进样测定。

2.3 大鼠血浆中CTX及其代谢产物方法学考察

大鼠血浆中CTX及其代谢产物CPM、4-keto CTX、DC-CTX的测定是基于课题组前期建立的方法^[1]。

2.3.1 色谱条件 色谱柱: Agilent poroshell SB-C₁₈ (75 mm×2.1 mm, 2.7 μm); 流动相: 10 mmol/L 醋酸铵溶液(A)-甲醇(B), 梯度洗脱(0~0.5 min, 10%~15% B; 0.5~0.6 min, 15%~30% B; 0.6~3.7 min, 30%~90% B); 流速: 0.25 mL/min; 柱温: 25 ℃; 进样量: 5 μL。

2.3.2 质谱条件 离子源参数: 电喷雾离子源(ESI); 鞘气流: 350 ℃, 12 L/min; 干燥气: 325 ℃, 10 L/min; 碰撞气压力: 40 psi (1 psi=6.895 kPa); 毛细管电压: 4 000 V; 监测模式: 多重反应离子监测(MRM)正离子模式; 离子通道: CTX[M+H]⁺ *m/z* 261.10→140.10, 毛细管出口电压(F): 135 V, 碰撞诱导解离电压(CE): 22 eV; CPM[M+H]⁺ *m/z* 293.10→221.10, F: 90 V, CE: 15 eV; 4-keto CTX[M+H]⁺ *m/z* 275.10→142.00, F: 125 V, CE: 27 eV; DC-CTX[M+H]⁺ *m/z* 199.20→78.00, F: 120 V, CE: 21 eV; 内标TNZ[M+H]⁺ *m/z* 248.10→121.10, F: 90 V, CE: 14 eV。

2.3.3 系统适用性试验 取“空白血浆+对照品”和“2.2”项下血浆样品, 按“2.3.1”“2.3.2”项下条件进样测定。结果, CTX、CPM、4-keto CTX、DC-CTX及内标TNZ的保留时间分别为3.29、2.20、2.75、2.35、2.38 min。UPLC-MS/MS图见图1。

2.3.4 线性关系考察 按照相关要求进行操作, 以待测物质量浓度为横坐标(*x*, μg/mL), 待测物与内标的峰面积比值为纵坐标(*y*)进行线性回归, 结果见表1。

2.3.5 方法学考察 按照相关要求进行操作。结果, CTX、CPM、4-keto CTX、DC-CTX稳定性试验(室温放置6 h; 9 ℃放置24 h; 常温、-20 ℃反复冻融3次; -20 ℃冻存15 d)的RSD<10% (*n*=6), 重复性试验的RSD<15% (*n*=6), 精密度试验的RSD<15% (*n*=6), 加样回收率为66.44%~96.66% (RSD<10%, *n*=6), 基质效应RSD<15% (*n*=6), 均符合相关规定。

2.4 大鼠血浆样品测定结果

大鼠按“2.1”项下方法分组及给药, 按“2.2”项下方法采样并处理后, 按“2.3.1”“2.3.2”项下条件进样测定。结果, CTX及其代谢产物在大鼠血浆中的药-时曲线见图2。

采用DAS 2.0药动学软件进行药动学分析, 结果见表2~表5。

由于毒性代谢产物氯乙醛生成量用等物质量生成的DC-CTX的量表示, 因此, DC-CTX血浆暴露量的减少表示联用药物对CTX侧链代谢的CYP3A4酶具有抑制作用, 使具有肾毒性的氯乙醛生成量减少^[1,4]。采用SPSS 20.0统计学软件对所得数据进行分析, 使用单因素方差分析法比较组间药动学参数的差异性。P<0.05表示差异有统计学意义。结果, 由表3可知, 与CTX组

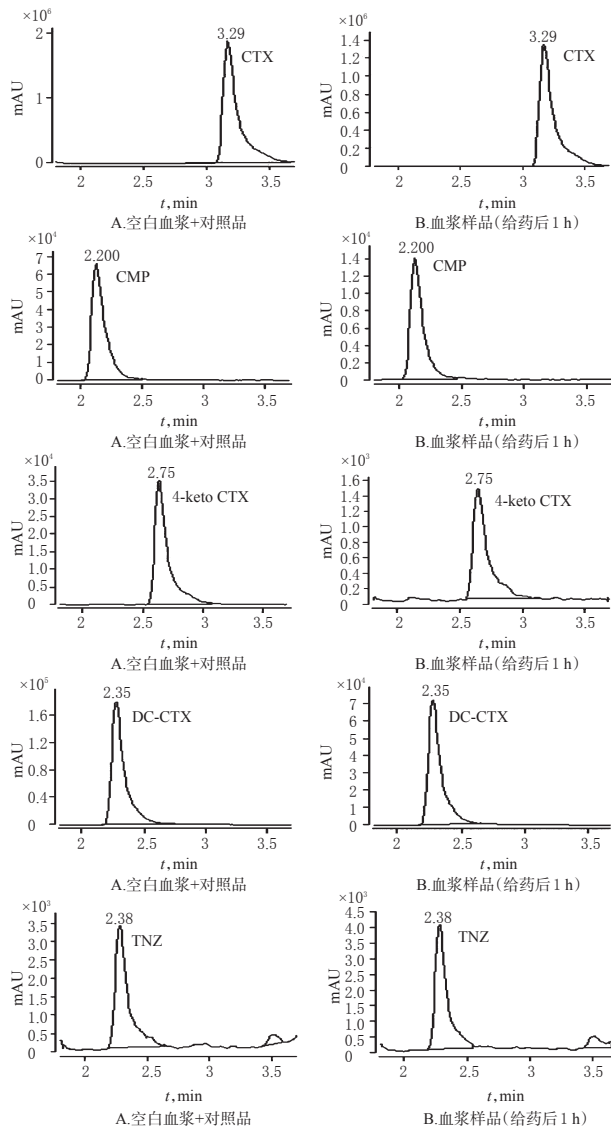


图1 CTX、CPM、4-keto CTX、DC-CTX及TNZ的UPLC-MS/MS图

Fig 1 UPLC-MS/MS of CTX, CPM, 4-keto CTX, DC-CTX and TNZ

表1 CTX、CPM、4-keto CTX和DC-CTX的回归方程与定量限

Tab 1 Regression equations and quantitation limits of CTX, CPM, 4-keto CTX and DC-CTX

测定成分	回归方程	线性范围, ng/mL	r	定量限, ng/mL
CTX	$y=0.174\ 559x-0.148\ 576$	20~4 000	0.994 9	20
DC-CTX	$y=0.193\ 938x-0.034\ 746$	5~1 000	0.989 6	5
4-keto CTX	$y=0.007\ 412x-0.003\ 614$	20~4 000	0.991 5	20
CPM	$y=0.048\ 573x-0.008\ 921$	20~4 000	0.994 3	20

比较, CTX+WZC组大鼠血浆中降低肾毒性指标的DC-CTX的 c_{max} 显著降低($P<0.05$), 即氯乙醛的量显著减少, 而在CTX+SchA低、中、高、极高剂量组DC-CTX的生成量虽有所降低, 但差异无统计学意义($P>0.05$), 从而表明, WZC与SchA均可在一定程度上抑制CTX毒性代谢途径, 但单体成分SchA对毒性代谢途径的抑制

作用不如含有多个木酯素成分的WZC效果显著。同时结果显示,在CTX+SchA高剂量组CTX及其代谢产物的

$t_{1/2}$ 较其他给药组显著增加,此情况可能是由于大鼠个体差异引起的,但具体原因有待进一步研究。

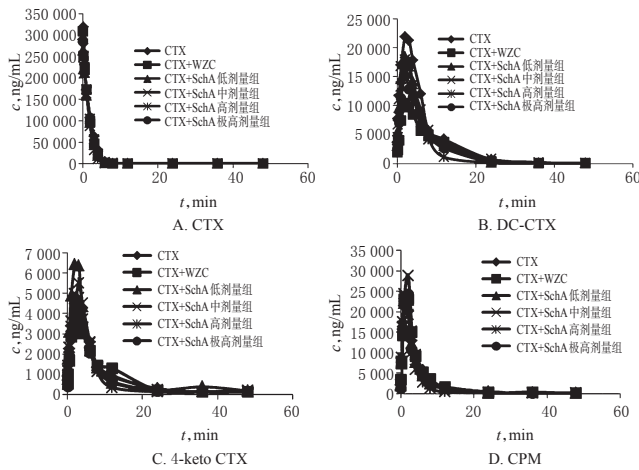


图2 各组大鼠血浆中CTX及其代谢产物的药-时曲线
Fig 2 The plasma concentration-time curves of CTX and its metabolites in plasma of rats

与CTX组比较,对于待测成分原药CTX、CTX与WZC或SchA联合给药组的 $t_{1/2}$ 均延长,其中CTX+SchA高剂量组及极高剂量组具有显著性差异($P<0.05$),说明WZC与SchA减缓了药物的消除,使药物在体内的作用时间延长;对于代谢产物DC-CTX的CL,联合给药组均表现为增加,其中WZC组有统计学差异($P<0.05$),说明WZC可促进毒性代谢产物在肾脏中的清除排泄,降低了药物对肾脏的损害,SchA可能有此作用,但由于无统计学差异,需要进一步研究加以验证。

3 讨论

本研究是在课题组研究的基础上进一步进行的研究^[1],课题组前期工作主要有:通过体外酶孵育细胞试验证实WZC及SchA对CYP3A4具有抑制作用,且通过对WZC的主要成分进行含量测定发现SchA含量相对较高,由此推测,SchA可能为WZC产生CYP3A4抑制作用的主要化合物;通过动物实验研究发现WZC与CTX合

表2 CTX在各组大鼠血浆中的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Pharmacokinetics parameters of CTX in plasma of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

药动学参数	CTX组	CTX+WZC组	CTX+SchA低剂量组	CTX+SchA中剂量组	CTX+SchA高剂量组	CTX+SchA极高剂量组
$t_{1/2}, h$	22.54 ± 12.53	40.77 ± 6.36	26.90 ± 9.14	25.22 ± 7.10	106.48 ± 19.12*	68.90 ± 74.26*
CL, L/(h·kg)	512.56 ± 62.09	572.54 ± 36.35	612.273 ± 69.57	376.35 ± 306.37	617.64 ± 34.70	557.66 ± 41.84
AUC _{0-48h} , ng·h/mL	583 252.53 ± 76 431.73	508 746.19 ± 30 753.44	469 295.56 ± 50 502.63	477 914.80 ± 735 475.51	442 429.63 ± 16 147.63	516 910.91 ± 38 110.65
AUC _{0-∞} , ng·h/mL	590 828.14 ± 68 653.98	525 343.46 ± 2 182.96	493 998.48 ± 53 111.90	478 866.78 ± 735 495.81	486 719.71 ± 26 615.27	539 903.25 ± 38 838.83
MRT, h	2.26 ± 0.48	1.99 ± 0.15	2.58 ± 0.49	2.20 ± 0.93	2.44 ± 0.58	2.11 ± 0.08
t_{max}, h	0.14 ± 0.10	0.08 ± 0.00	0.83 ± 0.00*	0.64 ± 0.34*	0.83 ± 0.00*	0.83 ± 0.00*
$c_{max}, ng/mL$	337 789.49 ± 44 853.19	308 351.92 ± 13 335.16	263 826.28 ± 18 479.21	433 692.68 ± 700 435.77	299 710.64 ± 20 994.54	286 178.9 ± 24 172.89

注:与CTX组比较, * $P<0.05$

Note: vs. CTX group, * $P<0.05$

表3 DC-CTX在各组大鼠血浆中的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 3 Pharmacokinetics parameters of DC-CTX in plasma of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

药动学参数	CTX组	CTX+WZC组	CTX+SchA低剂量组	CTX+SchA中剂量组	CTX+SchA高剂量组	CTX+SchA极高剂量组
$t_{1/2}, h$	16.18 ± 19.51	5.08 ± 0.68*	7.09 ± 3.46	6.01 ± 0.11	46.02 ± 69.86	5.82 ± 0.43
CL, L/(h·kg)	1 856.29 ± 589.40	3 259.89 ± 1 335.25*	2 378.89 ± 910.91	2 535.07 ± 997.18	2 704.65 ± 720.93	2 867.59 ± 921.02
AUC _{0-48h} , ng·h/mL	173 864.01 ± 65 342.21	100 996.98 ± 33 530.02	137 028.16 ± 45 975.19	131 650.18 ± 53 196.41	113 699.40 ± 34 131.36	110 773.27 ± 30 307.15
AUC _{0-∞} , ng·h/mL	175 175.58 ± 64 608.91	101 201.82 ± 33 619.06	137 601.73 ± 45 486.56	132 038.43 ± 53 638.52	116 718.70 ± 32 988.03	111 143.38 ± 30 557.90
MRT, h	6.25 ± 2.09	7.43 ± 1.25	6.02 ± 0.95	6.08 ± 2.65	5.12 ± 0.98	6.30 ± 0.90
t_{max}, h	2.33 ± 0.58	2.67 ± 1.16	2.00 ± 0.00	2.67 ± 0.58	2.00 ± 1.00	2.00 ± 0.00
$c_{max}, ng/mL$	22 167.85 ± 2 844.93	10 920.53 ± 1 490.89*	18 951.29 ± 1 558.81	18 622.08 ± 791.19	18 515.20 ± 2 560.61	15 133.21 ± 1 305.07

注:与CTX组比较, * $P<0.05$

Note: vs. CTX group, * $P<0.05$

表4 4-keto CTX在各组大鼠血浆中的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 4 Pharmacokinetics parameters of 4-keto CTX in plasma of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

药动学参数	CTX组	CTX+WZC组	CTX+SchA低剂量组	CTX+SchA中剂量组	CTX+SchA高剂量组	CTX+SchA极高剂量组
$t_{1/2}, h$	26.19 ± 27.45	10.60 ± 0.96	21.20 ± 8.39	11.79 ± 3.86	42.81 ± 36.83	18.66 ± 11.54
CL, L/(h·kg)	6 807.17 ± 1 132.33	7 967.81 ± 2 095.19	5 993.28 ± 1 362.08	8 125.94 ± 2 865.00	7 390.32 ± 2 670.66	8 622.09 ± 2 053.20
AUC _{0-48h} , ng·h/mL	40 557.48 ± 12 609.784	38 130.13 ± 9 761.18	45 119.29 ± 13 375.12	38 720.64 ± 12 717.94	37 842.78 ± 19 413.30	33 714.59 ± 7 284.70
AUC _{0-∞} , ng·h/mL	44 983.70 ± 8 232.59	39 465.76 ± 10 470.39	52 077.28 ± 13 370.70	39 798.03 ± 12 378.29	44 737.15 ± 17 554.25	36 216.30 ± 9 036.47
MRT, h	9.02 ± 1.44	9.58 ± 0.72	9.87 ± 0.63	9.08 ± 1.19	8.01 ± 0.90	9.15 ± 0.60
t_{max}, h	1.42 ± 1.01	2.00 ± 0.00	2.67 ± 1.16	2.33 ± 0.58	2.00 ± 1.00	2.00 ± 0.00
$c_{max}, ng/mL$	6 736.80 ± 4 051.34	3 838.55 ± 331.89*	6 548.54 ± 4 500.21	5 093.75 ± 729.22	5 897.69 ± 3 237.10	4 194.12 ± 621.74

注:与CTX组比较, * $P<0.05$

Note: vs. CTX group, * $P<0.05$

表5 CPM在各组大鼠血浆中的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)Tab 5 Pharmacokinetics parameters of CPM in plasma of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

药动学参数	CTX组	CTX+WZC组	CTX+SchA 低剂量组	CTX+SchA 中剂量组	CTX+ SchA 高剂量组	CTX+SchA 极高剂量组
$t_{1/2}, h$	8.51 ± 1.64	7.76 ± 1.75	9.45 ± 2.65	8.82 ± 1.05	25.62 ± 24.66	15.09 ± 12.68
CL, L/(h·kg)	2 834.45 ± 624.43	2 047.80 ± 786.77	2 847.10 ± 401.67	2 373.03 ± 807.30	3 494.51 ± 538.19	2 654.96 ± 395.99
AUC _{0-8h} , ng·h/mL	108 873.80 ± 26 958.90	166 106.43 ± 81 606.94	105 229.83 ± 16 631.09	138 844.67 ± 59 097.59	84 157.90 ± 15 877.63	112 884.42 ± 17 304.23
AUC _{0-∞} , ng·h/mL	109 902.76 ± 27 667.36	167 378.91 ± 81 717.46	106 904.37 ± 16 317.31	139 774.21 ± 58 925.79	87 351.14 ± 14 640.08	114 578.22 ± 15 929.22
MRT, h	5.49 ± 1.81	6.87 ± 2.01	5.64 ± 0.54	5.66 ± 0.82	5.36 ± 2.01	5.75 ± 0.88
t_{max}, h	1.67 ± 0.58	1.33 ± 0.58	1.67 ± 0.58	1.67 ± 0.58	1.00 ± 0.00	1.67 ± 0.58
$c_{max}, ng/mL$	21 821.15 ± 3 036.27	23 555.81 ± 1 929.35	23 906.08 ± 2 513.08	29 116.05 ± 13 481.90	23 809.00 ± 824.13	25 498.07 ± 3 083.07

并用药后 WZC 可降低 CTX 引起的肾毒性;建立了高剂量给药 CTX 后大鼠血浆中 CTX 及其代谢产物浓度的检测方法^[1-2]。基于以上,本研究通过动物实验探讨并确定 SchA 是否为 WZC 抑制 CTX 肾毒性代谢产物生成的物质基础,从而为 WZC 的临床合理用药和二次开发提供基础,实验方案对大鼠的给药剂量亦是基于前期工作基础设定:300 mg/kg 的 CTX 给药剂量是通过临床上多发性骨髓瘤(MM)患者高剂量冲击疗法常用量换算而得;300 mg/kg 的 WZC 给药剂量是前期实验证明该剂量单次给药对大鼠体内 CYP3A4 活性抑制最强,且对 CTX 侧链代谢抑制作用也最强^[1],该剂量下 SchA 的含量为 30 μg/kg,由此设定了 SchA 的最低给药剂量。而前期体外酶孵育细胞实验推导出 SchA 单个化合物发挥 CYP3A4 抑制作用的半数抑制浓度(IC₅₀)值为 300 μg/kg,参考最大给药剂量为 30 000 μg/kg,因此, SchA 与 CTX 联合用药后 CTX 药动学考察中, SchA 设置了低、中、高、极高剂量组,即 30、300、3 000、30 000 μg/kg 的给药剂量,该给药剂量设定的目的是通过不同剂量或不同组别间实验结果的对比分析,可以考察 SchA 的体内 CYP3A4 抑制作用,并与其制剂 WZC 进行比较。

本实验参考临床给药方案,对实验大鼠给予了美司钠注射液进行保护。实验结果表明, WZC 与 SchA 均可在一定程度上降低 DC-CTX 的生成,表明二者可以抑制 CTX 毒性代谢途径进而减少肾毒性代谢产物氯乙醛的生成;但 SchA 对毒性代谢途径的抑制作用不如 WZC 显著,且不存在剂量依赖性抑制效果,此与相关文献报道相似^[5-13]。由于 SchA 具有在南五味子或 WZC 中的木酯素含量相对较高、性质稳定、易于提取分离等特有的优势,所以对其进行研究还是很有价值的。同时结果显示,在 CTX+SchA 极高剂量组 CTX 及其代谢产物的 $t_{1/2}$ 较其他给药组显著延长,出现此情况的原因,可能是 SchA 在此剂量时对酶具有诱导作用^[7-9];或由于实验大鼠存在的个体差异对实验数据产生影响;或其他外在因素,具体缘由有待进一步研究。

综上所述,本研究首次考察了 SchA 和 CTX 联合使用时对 CTX 及其代谢产物药动学行为影响,通过联合用药实验确定了 SchA 对 CYP3A4 酶在一定程度上具有抑制作用,但不存在剂量依赖性抑制效果。由于 SchA 在南五味子提取物中含量相对较高且性质稳定,因此该成分有望被开发成为 CYP3A4 酶抑制剂,为 WZC 的二次开发提供基础;同时也为进一步对 WZC 对 CTX 减毒效

果的研究提供基础及参考依据,而笔者将在后续研究中对其他指标进行进一步研究。

参考文献

- [1] 陈力,熊筱娟,高守红,等. UHPLC-MS/MS 法测定大鼠血浆中环磷酸胺及其代谢物的浓度[J]. 第二军医大学学报, 2016, 37(9): 29-35.
- [2] 位华. 五酯胶囊的药代动力学及与他克莫司相互作用研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2010.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2015 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 244.
- [4] 杨乐. 常用抗肿瘤药物体内监测方法及环磷酸胺与酮康唑相互作用研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2014.
- [5] MACALLISTER SL, MARTIN-BRISAC N, LAU V, et al. Acrolein and chloroacetaldehyde: an examination of the cell and cell-free biomarkers of toxicity[J]. *Chem Biol Interact*, 2013, 202(1/3): 259-266.
- [6] 胡芳. 醋制对五味子成分及 CYP₄₅₀ 酶效应研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2011.
- [7] 陈倩, 吴育晶, 程能能, 等. 五味子提取物对大鼠肝 CYP3A 酶的双重作用[J]. 药学学报, 2010, 45(9): 1194-1198.
- [8] XIE HJ, LUNDGREN S, BROBERG U, et al. Effect of cyclophosphamide on gene expression of cytochromes P₄₅₀ and beta-actin in the HL-60 cell line[J]. *Eur J Pharmacol*, 2002, 449(3): 197-205.
- [9] 翟健秀, 刘志惠, 韩娜, 等. 五味子对 CYP₄₅₀ 活性的影响及其机制探讨[J]. 世界科学技术, 2015, 17(1): 52-54.
- [10] FAN X, JIANG Y, WANG Y, et al. Wuzhi tablet (Schisandra sphenanthera extract) protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity by inhibition of CYP-mediated bioactivation and regulation of NRF2-ARE and p53/p21 pathways[J]. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42(12): 1982-1990.
- [11] WEI H, SUN L, TAI Z, et al. A simple and sensitive HPLC method for the simultaneous determination of eight bioactive components and fingerprint analysis of Schisandra sphenanthera[J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 662(1): 97-104.
- [12] 宋平顺, 丁永辉, 赵建邦. 南五味子不同炮制品中五味子酯甲和五味子甲素含量的 HPLC 法测定中药材[J]. 中药材, 2008, 31(5): 652-654.
- [13] 吴育晶, 程能能, 胡卓汉, 等. 五味子及木脂素成分对肝 CYP3A 酶活性的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2007, 16(5): 267-271.

(收稿日期: 2017-04-23 修回日期: 2017-09-30)

(编辑: 刘明伟)