

盐酸小檗碱对大鼠体内他克莫司药动学的影响^Δ

杨远霞^{1*}, 钟克波², 潘兴³, 赵宏寰¹, 王黎青^{1,4#} (1.南方医科大学珠江医院药剂科, 广州 510282; 2.南方医科大学珠江医院肝胆外科, 广州 510282; 3.临沧市人民医院临床药学科, 云南临沧 677000; 4.中山大学附属第七医院药学部, 广东深圳 518107)

中图分类号 R969.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)05-0596-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.05.05

摘要 目的:研究盐酸小檗碱单次、多次给药对大鼠体内他克莫司药动学的影响,为两者联合用药提供参考。方法:将30只大鼠随机分为5组,每组6只,第1组大鼠单次灌胃他克莫司;第2组大鼠每日灌胃他克莫司2次,连续给药1周;第3组大鼠先单次灌胃盐酸小檗碱,5 min后单次灌胃他克莫司;第4组大鼠先每日灌胃他克莫司2次,连续给药1周,第8天时先灌胃盐酸小檗碱5 min后再灌胃他克莫司1次;第5组大鼠每日灌胃盐酸小檗碱2次,每次间隔5 min后相应灌胃他克莫司1次,连续给药8 d。盐酸小檗碱给药剂量均为200 mg/kg,他克莫司给药剂量均为0.945 mg/kg。末次灌胃他克莫司后0、5、15、30 min和1、2、3、4、6、8、12 h,分别从各组大鼠的眼眶后静脉丛取血约0.3 mL,采用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)测定大鼠全血中他克莫司的浓度,应用DAS 2.0软件进行药动学研究。结果:与第1组比较,第3组大鼠体内的他克莫司药动学参数 AUC_{0-12h} 、 $AUC_{0-\infty}$ 和 MRT_{0-12h} 显著降低($P < 0.05$),第4组大鼠体内他克莫司所有药动学参数差异均无统计学意义($P > 0.05$);与第2组比较,第4组大鼠体内他克莫司药动学参数 AUC_{0-12h} 显著降低、 CL_z 显著升高($P < 0.05$),第5组大鼠体内他克莫司所有药动学参数差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论:单次、多次灌胃盐酸小檗碱均对大鼠体内他克莫司的药动学有影响,表现在血药浓度有下降的趋势,需谨慎联用。

关键词 盐酸小檗碱;他克莫司;药动学;单次给药;多次给药;大鼠

Effects of Berberine Hydrochloride on the Pharmacokinetics of Tacrolimus in Rats

YANG Yuanxia¹, ZHONG Kebo², PAN Xing³, ZHAO Honghuan¹, WANG Liqing^{1,4} (1.Dept. of Pharmacy, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China; 2.Dept. of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China; 3.Dept. of Clinical Pharmacy, Lincang People's Hospital, Yunnan Lincang 677000, China; 4.Dept. of Pharmacy, the Seventh Affiliated Hospital of Sun Yat-san University, Guangdong Shenzhen 518107, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of berberine hydrochloride on the pharmacokinetics of tacrolimus in rats after single or multiple administration, and to provide reference for clinical combination therapy. METHODS: 30 rats were randomly divided into 5 groups, with 6 rats in each group: group one was treated with single administration of tacrolimus; group two was treated with tacrolimus intragastrically, twice a day, for consecutive 1 week; group three was treated with single administration of berberine hydrochloride, 5 min later given single administration of tacrolimus; group four was treated with tacrolimus intragastrically, twice a day, for consecutive 1 week, and then given tacrolimus intragastrically once 5 min after intragastric administration of berberine hydrochloride on the 8th day; group five was treated with berberine hydrochloride intragastrically, twice a day, and given tacrolimus intragastrically every 5 min, for consecutive 8 d. The doses of berberine hydrochloride and tacrolimus were 200 mg/kg and 0.945 mg/kg. The blood samples 0.3 mL were collected from posterior orbital venous plexus of rats 0, 5, 15, 30 min and 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 h after last intragastric administration of tacrolimus. The concentration of tacrolimus in rat whole blood was determined by LC-MS/MS. DAS 2.0 software was used for pharmacokinetic study. RESULTS: Compared with group one, the pharmacokinetic parameters AUC_{0-12h} , $AUC_{0-\infty}$ and MRT_{0-12h} of tacrolimus in rats were decreased significantly in group three ($P < 0.05$), while there was no statistical significance in all pharmacokinetic parameters of tacrolimus in group four ($P > 0.05$). Compared with group two, AUC_{0-12h} of tacrolimus was decreased significantly while CL_z was increased significantly in group four ($P < 0.05$); there was no statistical significance in all pharmacokinetic parameters of tacrolimus in group five ($P > 0.05$). CONCLUSIONS: Single and multiple intragastric administration of berberine hydrochloride has a certain effect on the pharmacokinetics of tacrolimus in rats, it shows that there is a downward trend in blood drug concentration and needs to be used with caution.

KEYWORDS Berberine hydrochloride; Tacrolimus; Pharmacokinetics; Single administration; Multiple administration; Rats

^Δ 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(No.81302846)

* 硕士研究生。研究方向:临床药学。E-mail: 306885236@qq.com

通信作者:副主任药师,博士。研究方向:临床药学。E-mail: wliqing2014@163.com

他克莫司(Tacrolimus)作为25元大环内酯类化合物,是一种可预防和/或治疗移植排斥的有效免疫抑制剂。由于他克莫司毒副反应较轻、免疫抑制作用较强,

已广泛应用于器官移植中^[1];但又由于其治疗窗窄、个体间药动学差异性大^[2],且价格相对昂贵又需要长期服用等特点,使其应用又受到一定限制。小檗碱(Berberine)又称黄连素,是一种异喹啉类的生物碱,可从黄连、黄柏、三颗针等植物中提取出来,具有抗感染、调节血脂、降血糖、抗心律失常等作用^[3],已作为抗炎、抑菌药物在临床应用多年,其疗效确切、不良反应轻微,且价格便宜。

较多文献均表明,小檗碱可抑制体内外细胞色素P₄₅₀(Cytochrome P₄₅₀ proteins, CYP)与P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)的活性^[4-6]。并且有研究^[7-8]发现,盐酸小檗碱能升高肾移植患者环孢素(Ciclosporin, CsA)的血药浓度。由于他克莫司与CsA均为肝药酶CYP3A4/CYP3A5及P-gp的底物,代谢途径相似,升高CsA血药浓度的药物通常也会升高他克莫司的血药浓度。长期使用他克莫司常常会引起患者血糖、血脂代谢紊乱等副作用^[9],而盐酸小檗碱有明确的治疗糖尿病、高血脂作用,这对盐酸小檗碱与他克莫司联合给药提供了参考^[10-11],而盐酸小檗碱与他克莫司也并不存在配伍禁忌,目前临床上也有盐酸小檗碱引起他克莫司血药浓度升高的个别案例报道^[12-14]。通过联合给药可以减少给药剂量、提高疗效、降低药物毒副作用^[15],这不仅有助于提高移植患者的存活率,减少药品的不良反应,并将大大减轻患者和社会的经济负担。鉴于此,本研究将通过健康大鼠来研究盐酸小檗碱单次、多次给药对他克莫司药动学的影响,探讨盐酸小檗碱对他克莫司是否存在相互作用,为其临床应用提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

ABSCIEX 5500 三重四级杆液质联用仪(美国 AbSCIEX 公司); Centrifuge 5415R 小型高速离心机(德国 Eppendorf 公司); HH-1 数显恒温水浴锅(美国 Buchi Switzerland 公司); XW-80A 漩涡振荡混合器(上海第一医学院仪器厂); AB204-N 十万分之一电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 集团); KQ-600DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

他克莫司标准品(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号:T-002-171217,纯度:>98%);子囊霉素标准品(上海同田生物技术股份有限公司,批号:18072532,纯度:>98%);他克莫司胶囊(杭州中美华东制药有限公司,批号:171163,规格:每粒0.5 mg);盐酸小檗碱片(东北制药集团沈阳第一制药有限公司,批号:2170440,规格:每片0.1 g);乙酸铵(批号:20180104)、硫酸锌(批号:20180107)均购于天津市福晨化学试剂厂;乙酸乙酯(天津市百世化工有限公司,批号:20180225);甲醇(批号:180320228B02)、乙腈(色谱纯,批号:180410402B22)均购于美国 BCR 国际贸易公司;纯净水为实验室自制双蒸水。

1.3 动物

SPF 级健康 SD 大鼠 30 只, ♂, 6~9 周龄,由南方医科大学实验动物中心提供,实验动物生产合格证号: SCXK(粤)2016-0041。将大鼠饲养于正常昼夜周期循环、温度为 18~22 ℃、相对湿度为 40%~70%的环境中,饲养期间大鼠自由饮食。适应性饲养 1 周后用于实验。

2 方法与结果

2.1 药液的制备

2.1.1 他克莫司溶液 取他克莫司胶囊 2 粒(共 1 mg),去掉胶囊壳后将内容物置于小烧杯中,加入 10 mL 蒸馏水溶解并制成 0.1 mg/mL 的混悬液,使用前摇匀。

2.1.2 盐酸小檗碱溶液 取盐酸小檗碱片 2 片(共 200 mg),置于小烧杯中,加入 10 mL 蒸馏水溶解并制成 20 mg/mL 的混悬液,使用前摇匀。

2.1.3 他克莫司标准品贮备液 精密称取他克莫司标准品 5.0 mg,置于 10 mL 量瓶中,用乙腈溶解并定容至刻度,摇匀,作为标准贮备液,置于-20 ℃冰箱保存,备用。

2.1.4 子囊霉素标准品(内标)溶液 精密称取子囊霉素标准品 5.0 mg,置于 10 mL 量瓶中,用乙腈溶解并定容至刻度,摇匀,内标溶液,置于-20 ℃冰箱中保存,备用。

2.2 动物分组、给药与取样

将 30 只大鼠随机分为 5 组,分别编号为 1~5 组,每组 6 只。给药如下:(1)第 1 组大鼠单独灌胃给药 1 次他克莫司;(2)第 2 组大鼠持续灌胃给药他克莫司 1 周,每日给药 2 次;(3)第 3 组大鼠单独灌胃盐酸小檗碱 1 次,5 min 后灌胃他克莫司 1 次;(4)第 4 组大鼠持续灌胃给药他克莫司 1 周,每日给药 2 次,在第 8 天灌胃给药盐酸小檗碱 5 min 后再灌胃他克莫司 1 次;(5)第 5 组大鼠持续灌胃给药他克莫司与盐酸小檗碱 1 周,每日给药 2 次,每次两药间隔 5 min 给药,在第 8 天再次灌胃盐酸小檗碱 5 min 后相继灌胃他克莫司 1 次。给药剂量:他克莫司均为 0.945 mg/kg(根据人临床用量换算而得),盐酸小檗碱均为 200 mg/kg(参考研究大鼠体内盐酸小檗碱与其他药物相互作用的剂量^[16-17])。以上 5 组大鼠分别在最后一次他克莫司灌胃给药后 0、5、15、30 min 和 1、2、3、4、6、8、12 h 从眼眶后静脉丛取血约 0.3 mL,置于含肝素的 1.5 mL 离心管中,置于冰箱-80 ℃保存,待测。

2.3 样品前处理

精密量取 200 μL 大鼠全血样品,置于 1.5 mL 离心管中,加入内标溶液 4 μL,旋涡混合 30 s,然后加入 0.1 mol/L 的蛋白沉淀剂 ZnSO₄溶液 400 μL,旋涡混合 1 min 后,再加入另一蛋白沉淀剂乙腈 400 μL,旋涡混合 1 min,静置 10 min,然后以 16 000 r/min 离心 10 min;将上层有机相转移至另一 1.5 mL 离心管中,加入 1.5 mL 乙酸乙酯,旋涡混合 1 min,静置 10 min,再以 16 000 r/min 离心 10 min;吸取上清液置于另一 1.5 mL 塑料离心管中,挥干;残渣用乙腈 200 μL 复溶,旋涡混合 1 min,然后再以 16 000 r/min 离心 10 min;取 100 μL 上清液加入进样

瓶中,进样 10 μL 进行分析。

2.4 检测条件

2.4.1 色谱条件 色谱柱: Synergi Fusion-RP C_{18} (50 mm \times 2 mm, 4 μm); 流动相: 乙腈-0.02 mol/L 乙酸铵 (95:5, V/V); 流速: 0.400 mL/min; 进样体积: 10 μL ; 分析时间: 7 min。

2.4.2 MS 条件 离子源: 电喷雾离子化源; 气帘气压力: 30.0 psi; 碰撞气压力: 高; 喷雾电压: 5 500 V; 雾化温度: 500 $^{\circ}\text{C}$; 雾化气压力: 50 psi; 辅助气压力: 50 psi; 去簇电压: 144.0 V; 入口电势电压: 10.0 V; 碰撞池出口电势: 10 V; 定量分析离子反应: 质荷比 (m/z) 821.5 \rightarrow 768.4 (他克莫司), m/z 792.5 \rightarrow 756.1 (子囊霉素)。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性 分别取大鼠空白全血、大鼠空白全血加入内标、大鼠空白全血加入他克莫司标准品与单独给药他克莫司 30 min 后的大鼠全血, 按“2.3”项下方法进行样品处理后, 按“2.4”项下条件进行检测。结果, 空白全血的内源性物质不干扰他克莫司和内标的测定, 获得的色谱图具有高度的专属性, 符合检测要求, 色谱图见图 1。

2.5.2 标准曲线与定量下限 取他克莫司标准贮备液适量, 用大鼠空白全血制备成质量浓度分别为 0.2、1、5、10、20、100、200 ng/mL 的他克莫司标准全血样品溶液, 按“2.3”项下方法处理后, 按“2.4”项下条件进行检测。以他克莫司与内标的峰面积之比为纵坐标 (y)、他克莫司的质量浓度为横坐标 (x) 作图, 采用最小二乘法绘制标准曲线。结果, 他克莫司的标准曲线为 $y=0.00176x+0.33891$ ($R^2=0.9990$)。结果表明, 他克莫司检测质量浓度的线性范围为 0.2~200 ng/mL, 定量下限为 0.2 ng/mL。

2.5.3 准确度和精密度 取他克莫司标准贮备液适量, 用大鼠空白全血制备成质量浓度分别为 0.5、15、150 ng/mL 的他克莫司标准全血样品, 按“2.3”项下方法处理后, 按“2.4”项下条件进行测定, 每个样品浓度同日内连续测定 5 次, 计算日内精密度 [以变异系数 ($\text{CV}, \%$) 表示] 和准确度; 连续 3 d 内每天进样, 每个质量浓度进行 5 个样本分析, 计算日间精密度和准确度。结果表明, 0.5、15、150 ng/mL 样品的日内和日间精密度以及准确度结果均符合生物样品分析要求。准确度和精密度试验结果见表 1。

2.5.4 提取回收率和基质效应 取他克莫司标准贮备液适量, 用大鼠空白全血制备成质量浓度为 0.5、15、150 ng/mL 的他克莫司质控样品, 每个质量浓度 5 个样本。分别按“2.3”项下方法处理后, 按“2.4”项下条件进行测定。另取聚乙烯离心管 15 支各加入空白全血 200 μL , 先按“2.3”项下方法处理后再加入低、中、高质量浓度 (0.5、15、150 ng/mL) 的他克莫司质控样品溶液和内标溶液, 按“2.4”项下条件进行测定。分别计算他克莫司的提取回收率和内标归一化的基质效应。结果表明, 0.5、15、150 ng/mL 的他克莫司质控样品提取回收率和基质效应

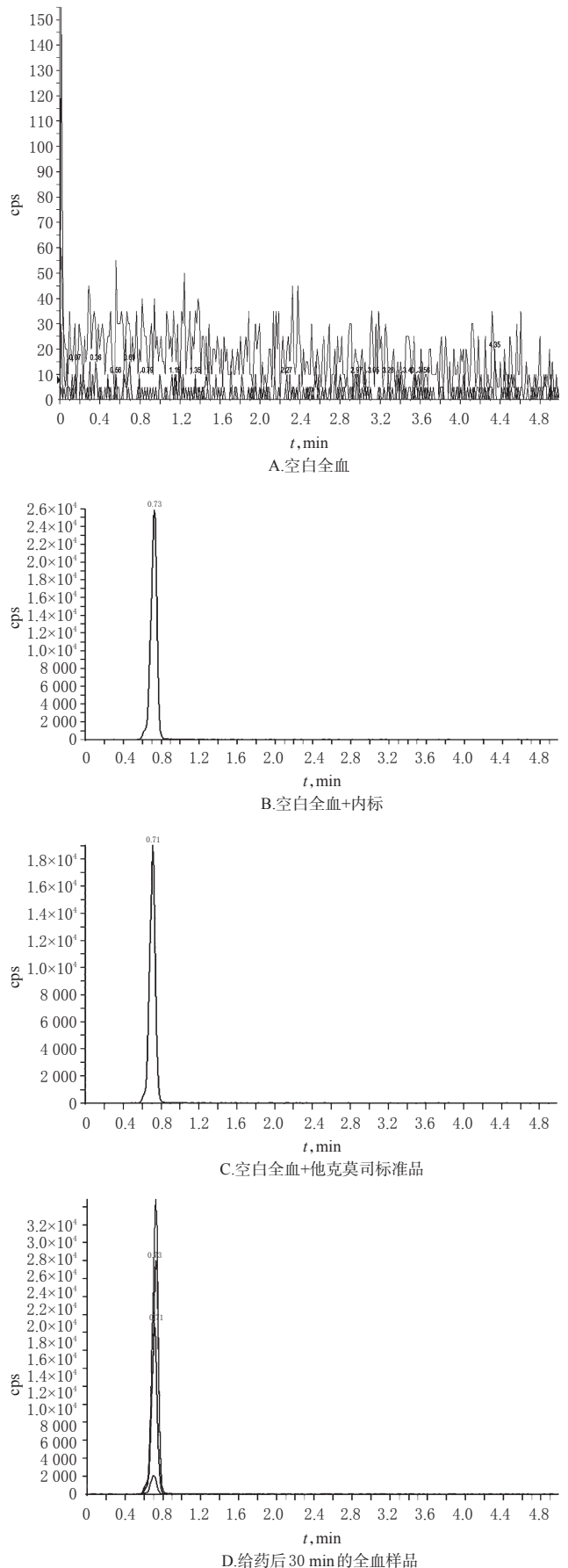


图 1 他克莫司典型色谱图

Fig 1 Representative chromatograms of tacrolimus

均符合生物样品分析要求。提取回收率和基质效应测定结果见表2。

表1 精密度与准确度试验结果(n=5)

Tab 1 Results of precision and accuracy tests(n=5)

| 样品质量浓度, ng/mL | 日内 | | | 日间 | | |
|---------------|---------------|--------|-------|---------------|--------|-------|
| | 实测质量浓度, ng/mL | 准确度, % | CV, % | 实测质量浓度, ng/mL | 准确度, % | CV, % |
| 0.5 | 0.509±0.02 | 101.8 | 4.12 | 0.506±0.02 | 101.2 | 3.56 |
| 15 | 15.24±0.88 | 101.6 | 5.77 | 15.39±0.64 | 102.6 | 4.13 |
| 150 | 151.4±1.79 | 109.3 | 1.18 | 149.84±2.69 | 99.89 | 1.79 |

表2 提取回收率和基质效应测定结果(% , n=5)

Tab 2 Results of extract recovery rate and matrix effect(% , n=5)

| 样品质量浓度, ng/mL | 提取回收率 | | 基质效应 | |
|---------------|-----------------|------|-----------------|------|
| | $\bar{x} \pm s$ | CV | $\bar{x} \pm s$ | CV |
| 0.5 | 87.51±1.34 | 2.22 | 86.91±2.24 | 2.99 |
| 15 | 89.32±2.85 | 4.81 | 88.65±3.35 | 4.48 |
| 150 | 91.40±2.53 | 1.74 | 93.14±2.87 | 1.30 |

2.5.5 稳定性 按“2.5.4”项下方法制备他克莫司终质量浓度为0.5、15、150 ng/mL的质控样品溶液,按“2.3”项下方法处理后,分别在室温下放置4、12 h以及在-80 °C条件下冻存3、7 d,然后按“2.4”项下条件进行测定,每个质量浓度5个样本,考察样品的室温和冻存稳定性。结果表明,0.5、15、150 ng/mL样品的稳定性结果均符合生物样品分析要求。稳定性试验结果见表3。

2.6 药动学研究

取“2.2”项下采集的给药不同时间后的全血样品,按照本文建立的方法测定其中他克莫司的浓度,绘制药-时曲线。采用DAS 2.0药动学软件计算药动学参数。用SPSS 22.0统计学软件对数据进行分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$

表4 大鼠体内他克莫司的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 4 The pharmacokinetic parameters of tacrolimus in rats($\bar{x} \pm s, n=6$)

| 参数 | 单次灌胃他克莫司(第1组) | 多次灌胃他克莫司(第2组) | 单次灌胃盐酸小檗碱+单次灌胃他克莫司(第3组) | 单次灌胃盐酸小檗碱+多次灌胃他克莫司(第4组) | 多次灌胃盐酸小檗碱+多次灌胃他克莫司(第5组) | P_1 | P_2 | P_3 | P_4 |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------|-------|-------|-------|
| t_{max}, h | 2.017±0.461 | 0.310±0.602 | 1.015±1.058 | 0.202±1.602 | 0.293±0.884 | 0.109 | 0.083 | 0.815 | 0.835 |
| $c_{max}, ng/mL$ | 43.593±40.353 | 34.733±22.321 | 48.993±48.119 | 42.387±38.264 | 18.163±5.256 | 0.869 | 0.989 | 0.281 | 0.341 |
| $t_{1/2}, h$ | 7.312±4.267 | 3.635±17.875 | 4.106±6.345 | 4.053±5.014 | 2.509±2.094 | 0.498 | 0.286 | 0.082 | 0.098 |
| $AUC_{0-12h}, ng \cdot h/mL$ | 233.616±143.901 | 287.300±82.456 | 87.590±36.248 | 212.515±298.101 | 78.969±40.996 | 0.028 | 0.376 | 0.623 | 0.006 |
| $AUC_{0-\infty}, ng \cdot h/mL$ | 747.623±497.096 | 686.264±392.662 | 142.020±35.369 | 353.813±547.827 | 88.831±51.938 | 0.037 | 0.412 | 0.053 | 0.121 |
| $CL_z, mL/(h \cdot kg)$ | 0.037±0.020 | 0.017±0.007 | 0.072±0.028 | 0.103±0.108 | 0.149±0.115 | 0.094 | 0.566 | 0.115 | 0.044 |
| MRT_{0-12h}, h | 6.179±0.728 | 5.641±0.375 | 2.751±1.363 | 4.581±3.256 | 4.697±2.405 | 0.013 | 0.186 | 0.485 | 0.072 |
| $MRT_{0-\infty}, h$ | 27.96±35.483 | 21.576±25.382 | 6.128±9.395 | 8.355±6.605 | 10.344±7.455 | 0.211 | 0.649 | 0.231 | 0.947 |

注: P_1 为第1、3组比较的统计值; P_2 为第1、4组比较的统计值; P_3 为第2、4组比较的统计值; P_4 为第2、5组比较的统计值

Note: P_1 is the statistical value of the group one and group three; P_2 is the statistic value of group one and group four; P_3 is the statistical value of the group two and group four; P_4 is the statistical value of the group two and group five

由表4可见,与第1组比较,第3组 AUC_{0-12h} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 MRT_{0-12h} 显著降低($P<0.05$);第1组与第4组比较、第2组与第4组比较,大鼠体内的他克莫司所有药动学参数差异均无统计学意义($P>0.05$);与第2组比较,第5组 AUC_{0-12h} 显著降低($P<0.05$), CL_z 显著升高($P<0.05$)。以上结果提示,单次给药盐酸小檗碱对单次给药他克莫

表3 稳定性试验结果(n=5)

Tab 3 Results of stability tests(n=5)

| 存放条件 | 样品质量浓度, ng/mL | 实测质量浓度($\bar{x} \pm s$), ng/mL | 偏差, % |
|-------------|---------------|----------------------------------|-------|
| 室温4 h | 0.5 | 0.50±0.02 | -0.6 |
| | 15 | 15.23±0.85 | 1.5 |
| | 150 | 147.92±7.53 | -1.4 |
| 室温12 h | 0.5 | 0.49±0.03 | -2.0 |
| | 15 | 14.73±0.40 | -1.8 |
| | 150 | 148.49±2.92 | -1.1 |
| -80 °C冻存3 d | 0.5 | 0.48±0.01 | -3.2 |
| | 15 | 14.52±0.70 | -3.2 |
| | 150 | 145.95±3.80 | -1.7 |
| -80 °C冻存7 d | 0.5 | 0.48±0.03 | -3.6 |
| | 15 | 14.84±0.24 | -1.1 |
| | 150 | 145.48±2.79 | -3.1 |

表示,当数据呈正态分布时采用t检验进行组间比较,如数据呈明显偏态分布时采用非参数秩和检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。药-时曲线见图2,药动学参数结果见表4。

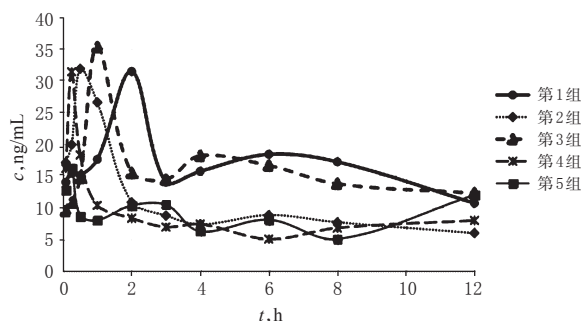


图2 大鼠体内他克莫司药-时曲线

Fig 2 The concentration-time curves of tacrolimus in rats

司的药动学影响,主要表现在 AUC 、 MRT 有所下降;而多次给药盐酸小檗碱对他克莫司药动学的影响主要表现为在 AUC 有所下降的同时 CL_z 表现出上升趋势。

3 讨论

3.1 全血样品处理方法的确定

他克莫司在体内广泛结合红细胞,血液与血浆浓度

比为15:1,这意味着作为他克莫司测定的合适基质是全血而不是血浆^[18]。目前,主要采取固相萃取、液-液萃取和在线样品净化3种方法进行样品预处理。本研究因实验用仪器型号原因,在线样品处理受到限制,故在预试验中对另外2种方法进行了比较。在样品前处理效果相同的情况下,考虑到液-液萃取较固相萃取简单、快速并经济实用,因此在本研究中选择了液-液萃取方法进行样品处理。由于他克莫司是脂溶性物质,易溶于二氯甲烷、乙酸乙酯,考虑到本研究中全血样品是先沉淀蛋白,吸取上层澄清液后再加入萃取溶剂,而密度较大的二氯甲烷在两相混合分层后处于下层,从而不便将其分离,因此选择了乙酸乙酯作为本研究的萃取溶剂。

3.2 内标的选取依据

正确的方法校准需要合适的内标。回顾发表用于他克莫司检测的LC-MS/MS方法,笔者发现使用的几种内标化合物分别有氘化他克莫司^[19]、子囊霉素^[20]、西罗莫司和坦索罗辛^[21]等。分析药物和内标的化学结构应相似,这有利于减少样品中除分析药物以外的其余组分对分析过程产生干扰,因此同位素标记的内标被认为是内标的首选^[22]。尽管如此,由于成本较低和/或更容易获得,分析过程中经常使用的是结构类似物内标,甚至是结构不相关的内标。此时,样品中除分析药物外的其余组分产生的干扰可能会影响分析的准确性,特别是在使用电喷雾电离时^[23]。而具有阳性钠或铵加合物的电喷雾电离恰好是检测他克莫司时几种方法中常见的电离模式^[19-20]。最新研究发现,在他克莫司监测中开发的LC-MS/MS方法中,作为内标使用的子囊霉素具有与氘化他克莫司相当的性能^[24]。因此笔者结合试验条件,在本研究中选择了子囊霉素作为内标进行检测。

3.3 盐酸小檗碱对大鼠体内他克莫司药动学的影响

本研究以健康大鼠为研究对象,采用不同的给药方案,研究盐酸小檗碱对他克莫司的药动学影响。从研究结果发现,单次给药盐酸小檗碱、多次给药盐酸小檗碱对大鼠体内的他克莫司药动学均有一定的影响,表现在血药浓度有下降的趋势,并不是升高血药浓度,这有可能是高剂量的他克莫司对CYP3A和P-gp的作用掩盖了盐酸小檗碱对CYP3A和P-gp的作用,使盐酸小檗碱的作用并未表达出来,如在研究五酯片与CsA联合给药时有报道也出现这种情况^[25]。而目前临床上他克莫司给药剂量用于不同器官移植、不同年龄阶段、基因表达不同的患者时是有所差异的,对此,笔者认为在之后的研究中可以通过调整他克莫司与盐酸小檗碱给药剂量来更好地探讨这两者的相互作用。

本研究提示,在联合盐酸小檗碱给药时,他克莫司的药动学会有所变化,需谨慎联合给药。但由于本次研究仅仅是在大鼠体内进行,实验动物数量较少,个体差异性比较大,存在一定局限性,故还需要更多的数据来验证该观点,且与人体内的药动学变化是否一致仍需进

一步研究。

参考文献

- [1] STAATZ CE, TETT SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2004, 43(10):623-653.
- [2] PATEL N, COOK A, GREENHALGH E, et al. Overview of extended release tacrolimus in solid organ transplantation[J]. *World J Transplant*, 2016, 6(1):144-154.
- [3] 李晖, 柴焯, 李新芳, 等. 黄连素临床新用途及其不良反应[J]. *武警医学*, 2008, 19(7):661-663.
- [4] GUO Y, CHEN Y, TAN ZR, et al. Repeated administration of berberine inhibits cytochromes P₄₅₀ in humans[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2012, 68(2):213-217.
- [5] QIU W, JIANG XH, LIU CX, et al. Effect of berberine on the pharmacokinetics of substrates of CYP3A and P-gp[J]. *Phytother Res*, 2009, 23(11):1553-1558.
- [6] CUI HM, ZHANG QY, WANG JL, et al. In vitro studies of berberine metabolism and its effect of enzyme induction on HepG2 cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 158(1):388-396.
- [7] WU X, LI Q, XIN H, et al. Effects of berberine on the blood concentration of cyclosporin A in renal transplanted recipients: clinical and pharmacokinetic study[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2005, 61(8):567-572.
- [8] 吴笑春, 李馨, 辛华雯, 等. 黄连素与环孢素A合用的药物经济学研究[J]. *华南国防医学杂志*, 2002, 16(1):8-11.
- [9] 史天陆, 孙言才, 沈爱宗, 等. 他克莫司临床不良反应与防治[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2009, 9(1):67-69.
- [10] ABD EA, GHAREEB DA, SARHAN EE, et al. In vitro biological assessment of Berberis vulgaris and its active constituent, berberine: antioxidants, anti-acetylcholinesterase, anti-diabetic and anticancer effects[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2013, 13(2):218-220.
- [11] KONG W, WEIJ, ABIDI P, et al. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins[J]. *Nat Med*, 2004, 10(12):1344-1351.
- [12] HOU Q, HAN W, FU X. Pharmacokinetic interaction between tacrolimus and berberine in a child with idiopathic nephrotic syndrome[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2013, 69(10):1861-1862.
- [13] 蔡明志, 陈凯, 范星, 等. 盐酸小檗碱引起他克莫司血药浓度升高1例分析[J]. *实用医药杂志*, 2014, 31(2):156-157.
- [14] 逢晓云, 沈金芳. 盐酸小檗碱致他克莫司血药浓度升高1例[J]. *中国药物警戒*, 2012, 2(10):640-641.
- [15] 冯格, 翟健秀, 陈万生, 等. 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[J]. *中国药房*, 2018, 29(3):307-311.
- [16] 常伟宇, 辛华雯, 唐霞, 等. 盐酸小檗碱对大鼠体内咪达唑仑及其代谢产物药动学的影响[J]. *医药导报*, 2016, 35

白头翁皂苷 B4 对肝癌细胞 Huh-7 及其荷瘤裸鼠肿瘤的抑制作用及机制研究^Δ

薛淑一^{1,2*}, 李明春^{2#}, 苗青², 周煜^{2,3} (1. 青岛大学药学院药理学系, 山东青岛 266021; 2. 中国人民解放军海军第九七一医院药剂科, 山东青岛 266071; 3. 大连医科大学药学院, 辽宁大连 116044)

中图分类号 R965; R735.7 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)05-0601-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.05.06

摘要 目的: 研究白头翁皂苷 B4(AB4) 对肝癌细胞 Huh-7 及其荷瘤裸鼠肿瘤的抑制作用及机制。方法: 将 Huh-7 细胞分为 AB4 给药组、阴性对照组(等体积培养液)、阳性对照组(5-氟尿嘧啶 50 μmol/L), 运用 MTT 法检测 0、3、6、12、25、50、100、200、400、800、1 600 μmol/L AB4 作用 Huh-7 细胞 12、24、36、48 h 的增殖抑制率, 计算半数抑制浓度(IC₅₀); 克隆形成试验评估 50 μmol/L AB4 作用 Huh-7 细胞 24 h 的克隆细胞数; 膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI) 染色检测 50 μmol/L AB4 作用 Huh-7 细胞 24 h 的细胞凋亡率; Western blot 法检测 50 μmol/L AB4 作用 Huh-7 细胞 24 h 后 B 细胞淋巴瘤 2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、胱天蛋白酶 3(Caspase-3)、活化胱天蛋白酶 3(Cleaved Caspase-3)、活化多腺苷二磷酸核糖聚合酶(Cleaved PARP) 等凋亡蛋白的表达。将荷瘤裸鼠随机分为阴性对照组(生理盐水)、阳性对照组(5-氟尿嘧啶 50 mg/kg) 和 AB4 低、中、高剂量组(25、50、100 mg/kg), 每组 3 只, 每天腹腔注射相应药物 1 次, 连续 19 d, 观察裸鼠肿瘤生长情况, 计算抑瘤率; 苏木精-伊红(HE) 染色观察肿瘤细胞形态变化。结果: AB4 对 Huh-7 细胞的增殖抑制率随给药浓度的增加而增加, 但 50 μmol/L 后增加不明显, 随作用时间的延长而增加, 但作用 24 h 后增加不明显, AB4 的 IC₅₀ 为 (56.76 ± 1.756) μmol/L。与阴性对照组比较, 50 μmol/L AB4 作用 Huh-7 细胞 24 h 的克隆细胞数明显减少、Bcl-2 蛋白表达明显减弱(P < 0.05), 细胞凋亡率和 Bax、Caspase-3、Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP 蛋白表达均明显增加(P < 0.05 或 P < 0.01), 且与阳性对照组差异无统计学意义。与阴性对照组比较, AB4 低、中、高剂量组和阳性对照组荷瘤裸鼠的瘤体体积明显减小(P < 0.05), 肿瘤细胞轮廓逐渐模糊, 出现核固缩、核质不清晰、核碎裂现象, 其抑瘤率分别为 25.93%、39.15%、46.26%、42.83%。结论: AB4 对 Huh-7 细胞及其荷瘤裸鼠均有抑制作用, 其机制可能与上调 Bax/Bcl-2 比例、活化 Caspase-3、裂解 PARP、诱导细胞发生凋亡有关。

关键词 白头翁皂苷 B4; 肝癌细胞 Huh-7; 荷瘤裸鼠; 抑制作用; 机制

- (4): 331-336.
- [17] 辛华雯, 吴笑春, 李馨, 等. 盐酸小檗碱及其与环孢素 A 合用对大鼠肝脏和小肠 CYP3A2 表达影响[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(5): 353-356.
- [18] STAATZ CE, TETT SE. Clinical pharmacokinetics of once-daily tacrolimus in solid-organ transplant patients[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2015, 54(10): 993-1025.
- [19] VALBUENA H, SHIPKOVA M, KLIESCHS M, et al. Comparing the effect of isotopically labeled or structural analog internal standards on the performance of a LC-MS/MS method to determine ciclosporin A, everolimus, sirolimus and tacrolimus in whole blood[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2016, 54(3): 437-446.
- [20] PARK JS, CHO HR, KANG MJ, et al. A rapid and sensitive method to determine tacrolimus in rat whole blood using liquid-liquid extraction with mild temperature ultrasonication and LC-MS/MS[J]. *Arch Pharm Res*, 2016, 39(1): 73-82.
- [21] RAMAKRISHNA NV, VISHWOTTAM KN, PURAN S, et al. Liquid chromatography-negative ion electrospray tandem mass spectrometry method for the quantification of tacrolimus in human plasma and its bioanalytical applications[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004, 805(1): 13-20.
- [22] SHIPKOVA M, SVINAROV D. LC-MS/MS as a tool for TDM services: where are we?[J]. *Clin Biochem*, 2016, 49(13/14): 1009-1023.
- [23] VAN EECKHAUT A, LANCKMANS K, SARRE S, et al. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(23): 2198-2207.
- [24] BODNAR-BRONIARCZYK M, PAWINSKI T, KUICKI PK. Isotope-labeled versus analog internal standard in LC-MS/MS method for tacrolimus determination in human whole blood samples-A compensation of matrix effects[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2019. DOI: 10.1016/j.jchromb.2018.11.026.
- [25] 薛新平. 五酯片对细胞色素 P₄₅₀ 3A 和 P-糖蛋白活性影响的研究[D]. 广州: 中山大学, 2010.

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81703768, 81803400); 山东省自然科学基金资助项目(No.ZR2018BH045)

* 药师, 硕士研究生。研究方向: 肿瘤药理学。电话: 0532-51872904。E-mail: xsy9401@163.com

通信作者: 主任药师, 教授, 硕士。研究方向: 时辰药理学。电话: 0532-51870086。E-mail: lmc401y@163.com

(收稿日期: 2018-11-28 修回日期: 2019-01-07)

(编辑: 林静)