

且白癜风组豚鼠的皮肤干燥,而白癜风凝胶组豚鼠的皮肤光滑,不干燥,说明凝胶可以防止皮肤干燥,而减少乙醇的刺激性。

[DOI] 10.3870/yddb.2010.01.006

[参考文献]

- [1] 国家食品药品监督管理局. 药物研究指导原则[M]. 北京:中国医药科技出版社,2005:73.
- [2] 龙子江,白玫,樊彦,等. 化学脱色法制备白癜风动物模型[J]. 安徽中医学院学报,1997,16(6):60-61.
- [3] 谢勇,盛国荣. 自制祛白酊对白癜风动物模型的实验研

- 究[J]. 皮肤病与性病,2002,24(1):2-3.
- [4] 何文,韩瑞玲,罗顺德. 8-甲氧补骨脂素脂质体凝胶对白癜风模型豚鼠的治疗[J]. 中国药房,2005,16(2):92-94.
- [5] 龙子江,吕晓英,樊彦,等. 消白灵片对白癜风模型动物血液中酪氨酸酶含量和血液流变学的影响[J]. 中国中医药科技,2001,8(1):40.
- [6] 黄芳芳,梁淑明,王来友,等. 补骨脂凝胶对实验性白癜风的疗效[J]. 中国医院药学杂志,2007,27(1):36-38.

川芎嗪对大鼠体外肝灌流液中非索非那定处置的影响

张如洪¹,张林枝²,揭金阶¹,王芳¹

(1. 武汉大学人民医院药学部,430060;2. 武汉大学药学院,430070)

[摘要] 目的 研究川芎嗪(TMP)对非索非那定在大鼠体外肝灌流(IPL)处置中的影响。方法 10只SD雄性大鼠随机分为给药组和对照组各5只。给药组灌服 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的TMP,对照组灌服0.9%氯化钠溶液,均连续14d,于第15天实施循环肝灌流手术,收集灌流液和胆汁。反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定灌流液和胆汁中非索非那定的浓度,3p97计算其主要药动学参数,并用SPSS11.5进行统计学分析。结果 给药组和对照组肝灌流液中 $AUC_{(0-60)}$ 分别为 $(95\ 016.35\pm 1\ 457.15)$, $(29\ 441.44\pm 675.16)\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$,总清除率(CL)分别为 (5.93 ± 0.19) , $(19.52\pm 0.51)\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,排入胆汁的非索非那定总量 $A_{e(0-60)}$ 分别为 $(77\ 559.93\pm 9\ 758.37)$, $(135\ 145.16\pm 16\ 211.82)\text{ ng}$,以及胆汁清除率(CL_b)分别为 (0.82 ± 0.24) , $(4.59\pm 1.17)\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,两组差异均有极显著性(均 $P<0.01$),但两组间的分布容积差异无显著性($P>0.05$)。结论 连续14d服用高剂量的TMP能显著改变P-糖蛋白(P-gp)底物非索非那定在大鼠肝脏的药动学参数,这可能与TMP下调P-gp的表达有关。

[关键词] 川芎嗪;非索非那定;色谱法,高效液相;P-糖蛋白

[中图分类号] R286;R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2010)01-0021-04

The Effect of Tetramethylpyrazine on Disposition of Fexfenadine in Isolated Perfused Rat Liver

ZHANG Ru-hong¹, ZHANG Lin-zhi², JIE Jin-jie¹, WANG Fang¹ (1. Department of Pharmacy, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China; 2. College of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430070, China)

ABSTRACT Objective To investigate the effect of tetramethylpyrazine(TMP) on disposition of fexfenadine in isolated perfusate of rat liver. **Methods** SD male rats were divided into two groups randomly: treatment group and control group (5 rats respectively). Rats were i. g. $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ tetramethylpyrazine suspension and the same volume of distilled water for consecutive 14 days. At the 15th day, rat livers were isolated and perfused in a recirculating system, and the both perfusate and bile was collected. The concentrations of fexfenadine in perfusate and bile were determined by RP-HPLC. The main pharmacokinetic(PK) parameters were calculated by 3p97 and statistic analysis was conducted by spss 11.5. **Results** The $AUC_{(0-60)}$ were $95\ 016.35\pm 1457.15$ and $29\ 441.44\pm 675.16\ (\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1})$, total clearance were 5.93 ± 0.19 and $19.52\pm 0.51(\text{mL}\cdot\text{min}^{-1})$, the total amount excreted into bile $A_{e(0-60)}$ were $77\ 559.93\pm 9\ 758.37$ and $135\ 145.16\pm 16\ 211.82\ (\text{ng})$, the biliary clearance CL_b were 0.82 ± 0.24 and $4.59\pm 1.17\ (\text{mL}\cdot\text{min}^{-1})$ for treatment group and control group, respectively. There was a significant difference between them ($P<0.01$), but not the volume of distribution $V(\text{mL})$.

Conclusion Administration of tetramethylpyrazine at a high dose for 14 consecutive days can significantly change the PK parameters of P-gp substrate fexfenadine in rat livers, which is likely related to down regulation of P-gp.

KEY WORDS Tetramethylpyrazine; Fexfenadine; HPLC; P-gp

近年来,随着对多药耐药(MDR)的研究增多,对MDR的机制也有了一定程度的认识。形成MDR的机

制很复杂,mdrl基因及其表达产物P-糖蛋白(P-glycoprotein,P-gp)的过度表达为主要因素^[1]。P-gp

位于细胞膜,是一个 ATP 依赖性的转运蛋白,具有将细胞内底物排出细胞的功能,是一个药物外排泵。P-gp 在人体内的分布较广,某些正常组织如肾、肠、胆管、大脑等均有表达。正常组织中 P-gp 的表达有着极为重要的意义:有助于调控人体内细胞的生长和死亡;有利于人体器官中毒素的排除;参与溶酶体中 pH 的调节^[2]。但是在某些病理情况下 P-gp 过度表达就会对其底物治疗药物的吸收产生较大的影响,从而限制了药物的疗效。

非索非那定 (fexofenadine, Fex) 是无镇静作用的第 3 代抗组胺药,临床上用于过敏性鼻炎及慢性特发性荨麻疹的治疗,具有较好的疗效^[3]。据报道,口服 Fex 在体内约有 95% 以原型药物排出,只有不到 5% 的药物被代谢^[4]。同时,越来越多体外实验和动物实验证明,Fex 是 P-gp 的特异性底物^[5,6]。这些性质使 Fex 在临床前研究成为一个评估 P-gp 活性的理想探针物。

川芎嗪 (tetramethylpyrazine, TMP) 是从中药川芎中分离得到的有效成分。TMP 的应用历史悠久,剂型开发成熟并为多种中药复方的组分之一,其临床应用广泛安全。大量的体外实验证明 TMP 具有逆转多药耐药的功能^[7-11],其体外逆转 MDR 的机制多与 P-gp 相关,但在体内的情况尚没有具体的报道。本次实验选用 Fex 为探针药物,研究长期应用 TMP 对大鼠肝脏 P-gp 的影响。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Agilent 1100 series HPLC (美国 Agilent 公司,四元泵, DAD 检测器);恒流泵 (上海沪西分析仪器厂);XW280A 旋涡混合器 (上海医科大学仪器厂);微量注射泵 (保定兰格恒流泵有限公司);真空抽滤器 (河南巩义仪器厂);磁力搅拌器 (江苏金坛市医疗仪器厂);水浴锅 (江苏金坛市医疗仪器厂);TG328A 型电子分析天平 (上海天平仪器厂)。

1.2 药品 TMP (武汉远城科技发展有限公司,产品编号: X6025); Fex (Sigma 公司,纯度 99.8%,批号: 0601211);牛磺胆酸钠 (Sigma 公司);戊巴比妥钠 (上海知行化工厂)。

1.3 试剂 乙腈、甲醇为色谱纯;醋酸、乙酸乙酯为分析纯;磷酸二氢钾、氯化钠、碳酸氢钠、氯化钾、一水葡萄糖、二水氯化钙、七水硫酸镁均为分析纯。

1.4 动物 雄性 SD 大鼠,体质量 (280 ± 30) g,由武

汉大学医学院实验动物中心提供 (SPF 级)。

2 方法

2.1 动物模型 SD 大鼠 12 只随机分为两组:给药组和对照组。给药组每天灌服 TMP 30 mg · kg⁻¹,对照组灌服同剂量的 0.9% 氯化钠溶液,均连续 14 d,于第 15 天进行灌流手术。灌流手术前禁食不禁水 12 h。

2.2 肝灌流液的配置 灌流液是不含牛血清清蛋白的 Krebs-Henseleit 缓冲液,含氯化钠 111.83 mmol · L⁻¹,碳酸氢钠 24.88 mmol · L⁻¹,氯化钾 4.74 mmol · L⁻¹,七水硫酸镁 1.19 mmol · L⁻¹,磷酸二氢钾 1.19 mmol · L⁻¹,二水氯化钙 2.50 mmol · L⁻¹,牛磺胆酸钠 8.33 × 10⁻³ mmol · L⁻¹,葡萄糖 16.50 mmol · L⁻¹。用 16.13% 磷酸二氢钾溶液调节 pH 值至 7.4 ~ 8.0,70 °C 加热析出沉淀后,用孔径 0.45 μm 滤膜真空过滤,再用 16.13% 磷酸二氢钾溶液调节 pH 值至 7.30 ~ 7.35。

2.3 离体肝灌流手术和样品 大鼠腹腔注射戊巴比妥钠 50 mg · kg⁻¹ 麻醉,麻醉后进行手术^[12]。“工腹腔”字形剪开,上翻外皮露出腹腔脏器,一次进行各部操作:①分离出胆管,行胆管插管术;②将注入导管插入门静脉,开动蠕动泵,注入灌流液;③用手术线结扎肾静脉和肝动脉;④剪开胸腔,将导管插入下腔静脉,使形成循环肝脏灌流。用不含药物的空白灌流液单向灌流 10 min,将肝脏中残留物除尽后,利用三通管切换到含约 2 μg · mL⁻¹ Fex 的灌流液循环灌流,灌流速度为 25 mL · min⁻¹。分别于 0, 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min 收集灌流液 1 mL,每间隔 10 min 收集胆汁,灌流液和胆汁样品于 -20 °C 保存待测。

2.4 色谱条件 色谱柱: EPS C₁₈ (100A5U, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 和预柱 C₁₈ (Alltech Associates, USA),柱温 25 °C,流动相为 0.024 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 (用磷酸溶液调节 pH 值至 3.4) - 乙腈 (58 : 42, V/V),流速: 1 mL · min⁻¹,检测波长为 225 nm,进样量为 100 μL。

2.5 样品的处理 灌流液和胆汁样品于室温下解冻,灌流液样品离心,取上清液 100 μL 进样分析;胆汁用空白灌流液稀释 300 倍后涡旋离心,取上清液 100 μL 进样分析。

2.6 标准曲线的制备 精确称取干燥恒重的 Fex 10 mg 置于 100 mL 量瓶中,纯化水溶解定容至刻度,配成浓度为 100 μg · mL⁻¹ 的储备液。精密量取适量的 Fex 储备液用空白的灌流液稀释,使浓度分别为 50, 100, 500, 1 000, 1 500, 2 000 和 2 500 ng · mL⁻¹,以 Fex 的浓度 (C) 和峰面积 (A) 建立回归方程: A =

[收稿日期] 2009-04-02

[作者简介] 张如洪 (1969 -),男,湖北荆州人,副教授,博士,研究方向:药代动力学。电话:027-88041919-88807, E-mail: rhzhang@whu.edu.cn。

0.159 2C - 2.521 6, $R^2 = 0.999 8$, 此方程适用于检测灌流液中 F_{ex} 。由于胆汁中 F_{ex} 浓度较高, 因此需另外配置标准曲线: $A = 151.17C - 22.141$, $R^2 = 1$, $0.05 \sim 100.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性良好, 最低定量限为 $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($S/N \geq 10$)。

2.7 统计学方法 灌流液样品数据采用 3p97 计算药动学参数, 并用 SPSS11.5 软件对药动学参数进行分析处理。胆汁的药动学参数的计算方法为: 平均胆汁排泄率 = 各时间段 F_{ex} 排泄量/时间, 胆汁清除率 $CL_b = A_{e(0-60)}/AUC_{(0-60)}$, $A_{e(0-60)}$ 为 0 ~ 60 min F_{ex} 排入胆汁的总量, $AUC_{(0-60)}$ 为 0 ~ 60 min 灌流液中 F_{ex} 浓度对时间的曲线下面积, 所有数据均用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

3 结果

3.1 肝活性检测结果 灌流过程中肝脏呈粉红色, 灌流速度约维持在 $25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 灌流液中氧饱和度维持在 $6 \sim 8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值维持在 $7.2 \sim 7.35$, 胆汁流速 $> 5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 所有指标均在正常范围内。

3.2 灌流液中 F_{ex} 的测定结果 采用建立的 RP-HPLC 方法检测肝灌流液中的 F_{ex} , 测得的 F_{ex} 浓度见表 1, 所有数据用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, F_{ex} 浓度-时间曲线见图 1。

表 1 非索非那定在肝灌流液中的浓度

Tab. 1 F_{ex} concentration in liver perfusate $\bar{x} \pm s, n = 5$

时间/ min	对照组/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	给药组/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
0	1 915.28 \pm 43.68	1 876.71 \pm 30.59
1	1 804.80 \pm 11.77	1 781.00 \pm 44.11
3	1 605.70 \pm 23.75	1 666.90 \pm 37.02
5	1 342.39 \pm 21.60	1 553.53 \pm 29.80
10	997.81 \pm 17.06	1 378.68 \pm 32.11
20	526.61 \pm 13.85	1 182.40 \pm 60.51
30	246.33 \pm 18.47	1 019.45 \pm 47.53
40	129.48 \pm 10.43	872.83 \pm 36.96
50	84.38 \pm 7.06	686.21 \pm 12.06
60	60.05 \pm 6.25	556.75 \pm 23.17

3.3 胆汁中 F_{ex} 的检测结果 胆汁样品按照前面介绍的方法处理并检测, 各时间段 F_{ex} 在胆汁中平均排

表 2 非索非那定在大鼠肝脏中的主要药动学参数

Tab. 2 Main pharmacokinetic parameters of F_{ex} in rat liver

组别	V/ mL	$AUC_{(0-60)}/$ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	$CL/$ ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)	$A_{e(0-60)}/$ ng	$CL_b/$ ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)
给药组	294.82 \pm 7.33	95 016.35 \pm 1 457.15 ^{*1}	5.93 \pm 0.19 ^{*1}	77 559.93 \pm 9 758.37 ^{*1}	0.82 \pm 0.24 ^{*1}
对照组	295.60 \pm 4.69	29 441.44 \pm 675.16	19.52 \pm 0.51	135 145.16 \pm 16 211.82	4.59 \pm 1.17

与对照组比较, ^{*1} $P < 0.01$

Compare with control group, ^{*1} $P < 0.01$

泄率见图 2。

3.4 F_{ex} 在大鼠肝脏的药动学参数 依照数据处理方法得到大鼠肝脏的药动学参数见表 2。

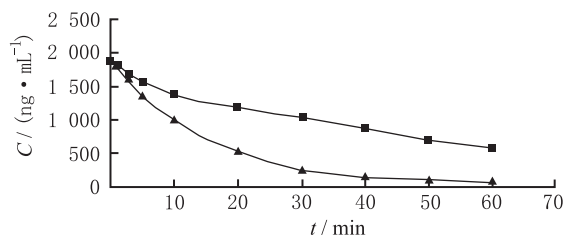


图 1 非索非那定在肝灌流液中平均浓度-时间曲线

▲ 对照组; ■ 给药组

Fig. 1 Mean concentration-time curves of F_{ex} in liver perfusate

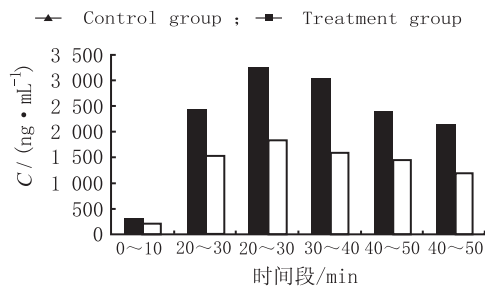


图 2 对照组和给药组的平均胆汁排泄率

■ 对照组; □ 给药组

Fig. 2 Mean biliary excretion rate of F_{ex} in the control group and treatment group

■ Control group; □ Treatment group

4 讨论

笔者在本实验中应用肝脏灌流技术考察长期应用 TMP 对 P-gp 特异性底物 F_{ex} 在大鼠肝脏中药动学参数的影响。作为一种体外研究方法, 肝脏灌流具有独特的优势。它同时兼备体外实验和整体动物实验的优点, 能解决在其他的体外肝代谢模型或整体动物实验中不能得到满意解决的难点问题, 该方法已被广泛应用于药物研究^[13]。TMP 临床给药剂量范围较广, 依照人体给药剂量经种属换算后选择了一个在安全给药范围内的较高剂量 ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 并设立空白对照组与 TMP 组考察长期服用 TMP 对大鼠肝脏中 P-gp 的影响。

通过组内配对样本 t 检验考察 Fex 在两组大鼠肝脏中药动学参数的差异,结果显示:肝灌流液中给药组 $AUC_{(0-60)}$ 高于对照组,总清除率 (CL)、排入胆汁的 Fex 总量 ($A_e(0-60)$) 以及胆汁清除率 (CL_b) 都低于对照组,差异有极显著性 ($P < 0.01$),但两组间的表观分布容积 (V) 差异无显著性,这与文献报道的结果相符合^[14]。P-gp 在肝表面向胆小管腔的腔膜面上表达较丰富,在药物转运过程中可识别其底物将其排入胆汁,因此 P-gp 表达的高低可影响其底物在体内的药动学。TMP 在体内快速经胃壁吸收,在血管丰富的组织特别是肝脏,其滞留时间较长,同时 TMP 存在肝肠循环,TMP 经胆汁排入肠道内后,部分药物又重新吸收进入肝脏^[15],经过这样反复的循环,增加了肝脏与 TMP 的接触时间。结合体外实验可以推断 TMP 可能下调了肝脏中的 P-gp 的表达,影响其底物 Fex 在肝脏中的药动学,这样就能解释本次研究中给药组和对照组之间药动学参数差异有显著性的原因。此外,由于 Fex 在体内仅有不到 5% 的药物被代谢,可以忽略 CYP3A 对 Fex 药动学的影响。

另外,笔者在本实验中只是考察了连续 14 d 服用 TMP 对大鼠肝脏 P-gp 的影响,但对脑、肠等其他器官 P-gp 的影响尚未研究,这是本实验的不足之处。总之,本次研究证明了连续服用高剂量的 TMP 能下调大鼠肝脏 P-gp 的表达,显著影响 Fex 在肝脏中的药动学。至于不同剂量对 P-gp 表达的影响以及是否具有剂量依赖性还需进一步研究。

[DOI] 10.3870/yydb.2010.01.007

[参考文献]

- [1] LI L, PAN Q R, SUN M, *et al.* Dibenzocyclooctadiene ligands—A class of novel inhibitors of multidrug resistance-associated protein 1 [J]. *Life Sci*, 2007, 80:741–748.
- [2] ASTRID A R, RICKY W J. A role for P-glycoprotein regulating cell growth and survival [J]. *Clin Appl Immunol Rev*, 2003, 2(4):31–47.
- [3] ANTHONY M. Fexofenadine [J]. *Durgs*, 1998, 55(2):269–274.
- [4] SHRIRAM M P, KUMAR A R, MUSMADE P, *et al.* A

simple and rapid high performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the estimation of fexofenadine in rat plasma—Application to preclinical pharmacokinetics [J]. *Talanta*, 2008, 8(5):338–346.

- [5] CVETKOVIC M, LEAKE B, FROMM M F, *et al.* OATP and P-glycoprotein transporters mediate the cellular uptake and excretion of fexofenadine [J]. *Drug Metab*, 1999, 27:866–871.
- [6] PERLOFF M D, VON MOLTKE L L, GREENBLATT D J. Fexofenadine transport in Caco-2 cells: inhibition with verapamil and ritonavir [J]. *J Clin Pharmacol*, 2002, 42(11):1269–1274.
- [7] ZHOU C G, SHEN P, CHENG Y Y. Quantitative study of the drug efflux kinetics from sensitive and MDR human breast cancer cells [J]. *Biochem Biophys Acta*, 2007, 17(6):1011–1020.
- [8] 杨 岚, 杨平地, 梁 蓉, 等. 川芎嗪联合环孢霉素 A 逆转白血病多药耐药的研究 [J]. *癌症*, 2000, 19(4):304–306.
- [9] 梅 英, 石毓君, 左国庆, 等. 川芎嗪逆转 HepG2/ADM 细胞多药耐药性的体外研究 [J]. *中国中药杂志*, 2004, 29(10):970–973.
- [10] 李建华, 杨佩满. 川芎嗪逆转 K562/ADM 细胞多药耐药性的研究 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2001, 10(15):1405–1407.
- [11] 戚晓敏, 单根法, 张辅贤, 等. 川芎嗪逆转肺癌细胞株多药耐药性的研究 [J]. *上海第二医科大学学报*, 2003, 23(1):31–33.
- [12] WANG J, NATION R L, EVANS A M. Isolated rat kidney perfused with dextran and bovine serum albumin, a stable model for investigating renal drug handling [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2004, 49:105.
- [13] 毕惠嫦, 陈 孝, 黄 民. 肝脏灌注技术及其在药物研究中的应用进展 [J]. *中国药理学通报*, 2004, 20(9):968–971.
- [14] 刘晓磊, 唐 靖, 宋 娟, 等. 川芎嗪对大鼠灌服环孢素 A 药动学的影响 [J]. *药科学报*, 2006, 41(9):882–887.
- [15] 孙寒静, 吴 伟, 陈宏珪, 等. 川芎嗪的药动学研究状况 [J]. *中药新药与临床药理*, 2002, 13(1):61–63.

关于调整《医药导报》2010 年定价的启事

近年来,在广大读者、作者的大力支持下,《医药导报》稿源充裕,稿件质量明显提高。经报新闻出版部门备案,《医药导报》每期内芯由 96 个页码逐步增加至 128 个页码。与此同时,本刊内芯用纸逐年改善,印刷、装帧成本不断上涨,其成本核算远远超出目前的定价。鉴于此,编辑部一方面努力提高期刊质量和服务质量,另一方面决定从 2010 年起,每期定价调整为 15.00 元,全年定价 180.00 元(含邮资),诚盼广大读者、作者一如既往地支持我们,继续订阅 2010 年《医药导报》。