

艾可清颗粒不同给药方式对大鼠高效抗逆转录病毒治疗中齐多夫定药代动力学的影响

陆珍珍^{1,2} 苏齐鉴² 马家宝² 唐丹慧³ 宋 策² 符林春¹

摘要 **目的** 研究艾可清颗粒不同给药方式对大鼠高效抗逆转录病毒治疗 (highly active antiretroviral therapy, HAART) 中齐多夫定 (zidovudine, AZT) 药代动力学的影响。**方法** 将 36 只大鼠分为 3 组进行灌胃给药: I 组采用 HAART, 即拉米夫定 (3TC, 31.5 mg/kg) 加 AZT (31.5 mg/kg) 加依非韦伦 (EFV, 63.0 mg/kg); II 组在 HAART 给药同时给予艾可清颗粒 (525 mg/kg); III 组在 HAART 治疗后间隔 120 min 后给予等量艾可清颗粒。采用液质联用法分别测定各组大鼠给予 HAART 前及给药后 0.5、1、2、3、4、6、8、10、12 h 时 AZT 血药浓度; 采用 DAS 2.0 软件计算药物半衰期 ($t_{1/2}$)、达峰浓度时间 (T_{max})、药物达峰浓度 (C_{max})、从 0 ~ t 时间内的血药浓度 - 时间曲线下面积 (AUC_{0-t}) 及药物清除率 (plasma clearance rate, CL) 等药代动力学参数。**结果** AZT 的回归方程线性关系良好, 精密性、回收率、稳定性都得到确定。II 组、III 组血药浓度曲线高于 I 组, 3 组 $t_{1/2}$ 、 T_{max} 、 C_{max} 、 $AUC_{0-12 h}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 及 CL 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 艾可清颗粒联合 HAART 可提高 AZT 最高血药浓度。

关键词 艾可清颗粒; 齐多夫定; 药代动力学; 高效液相色谱质谱联用

Pharmacokinetic Effect of Aikeqing Granule by Different Medication Ways on Zidovudine in HAART of Rats LU Zhen-zhen^{1,2}, SU Qi-jian², MA Jia-bao², TANG Dan-hui³, SONG Ce², and FU Lin-chun¹ 1 Institute of Tropical Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510405); 2 Ruikang Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning (530011); 3 Pharmacy College, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning (530011)

ABSTRACT **Objective** To study pharmacokinetic effect of Aikeqing Granule (AG) by different medication ways on zidovudine (AZT) in highly active antiretroviral therapy (HAART) of rats. **Methods** Totally 36 rats were administered with corresponding medications by gastrogavage, group I [HAART: AZT 31.5 mg/kg + 3TC 31.5 mg/kg + Efavirenz (EFV) 63.0 mg/kg], group II (HAART + AG 525 mg/kg), group III (HAART and AG 525 mg/kg after a 2-h interval). Drug concentrations of AZT were determined by high performance liquid chromatography-mass spectroscopy (HPLC-MS) before HAART, and at 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 h after HAART, respectively. Pharmacokinetic parameters [such as $t_{1/2}$, T_{max} , C_{max} , AUC_{0-t} , plasma clearance rate (CL)] were calculated by DAS 2.0 Software. **Results** The equation of linear regression of AZT was good, with the precision, coefficient of recovery, and stability definitely confirmed. AUC in group II and III was larger than that of group I. There was no statistical difference in $t_{1/2}$, T_{max} , C_{max} , $AUC_{0-12 h}$, or $AUC_{0-\infty}$ among groups ($P > 0.05$). **Conclusion** AG combined HAART could enhance the C_{max} of AZT.

KEYWORDS Aikeqing Granule; Zidovudine; pharmacokinetics; high performance liquid chromatography-mass spectroscopy

中西医联合治疗人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 已有多年历史, 但目前联

合高效抗逆转录病毒治疗 (highly active antiretroviral therapy, HAART) 和中药之间的相互作用报道较

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No. 81173436); 国家自然科学基金资助项目 (No. 81360258)

作者单位: 1. 广州中医药大学热带医学研究所 (广州 530405); 2. 广西中医药大学附属瑞康医院 (南宁 530011); 3. 广西中医药大学药学院 (南宁 530011)

通讯作者: 符林春, Tel: 020-36585633, E-mail: fulc01@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.12.1501

少,主要关注的作为肝细胞色素 P450 酶系统代谢的药物如依非韦伦(Efavirens, EFV)等^[1,2],P450 酶系以外代谢的 HAART 药物与中药间的相互作用尚未见报道。本研究以 SD 大鼠为实验动物,研究非 P450 酶系代谢的 HAART 药物齐多夫定(Zidovudine, AZT)是否受中药制剂艾可清颗粒的影响,以期为临床用药提供参考。

材料与方法

1 动物 SD 大鼠 36 只,SPF 级,4~7 周龄,雌雄各半,体重 200~300 g,广西医科大学动物实验中心提供,动物合格证:SCXK(桂)2009-0002。所有大鼠饲养于清洁级动物实验室,自由进食。

2 药物、试剂及仪器 AZT(东北制药集团沈阳第一制药有限公司生产,批号:130405);拉米夫定(Lamivudine, 3TC,安徽贝克生物制药有限公司,批号:130105);EFV(加拿大 TRC 公司,批号:1-HBN-185-1);艾可清颗粒由熟附子、淫羊藿、干姜、甘草、红参、茯苓、丹参、紫草组成(广州中医药大学热带医学研究所监制,批号:Q1310014),AZT 对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100672200401,纯度:99.2%),内标物为替米沙坦(中国食品药品检定研究院,批号:100629-200401,纯度 99.3%),乙腈、甲醇(色谱纯,Merck),甲酸(98%,Merck),实验用水为超纯水(Milli-Q 超纯水系统,美国),Varian 320 高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪(Agilent 公司,美国),Varian ws 数据采集分析工作站;SK-1 快速混匀器(金坛市医疗仪器厂);Sigma 3K30 高速冷冻离心机(Sigma-Aldrich,德国);HSC-12A 氮吹仪(天津市威仪科技发展有限公司)。

3 分组及 AZT 血药浓度测定 36 只 SD 大鼠按随机数字表法分为 I、II、III 3 组,每组 12 只。I 组给予 HAART 灌胃;II 组在 HAART 给药同时灌胃艾可清颗粒;III 组给予 HAART 灌胃 120 min 后灌胃艾可清颗粒。根据 HAART 及艾可清颗粒临床给药折算,计算 HAART 3 个药物大鼠给药剂量分别为:AZT 31.5 mg/kg,3TC 31.5 mg/kg,EFV 63 mg/kg,艾可清颗粒 525 mg/kg。4 个药物碎成粉末,分别用蒸馏水超声溶解为 60 mL 溶液,给药前摇匀,以 6.3 mL/kg 给药灌胃。给药前及给药后 0.5、1、2、3、4、6、8、10、12 h 眼眶采血 0.4 mL,离心取上清液应用液质联用法测定 AZT 含量。

3.1 色谱条件 色谱柱:Luna C18(100 mm × 4.6 mm, 3 μm);流动相:A(0.3% 甲酸-水):B

(0.3% 甲酸-甲醇)=20:80,流量:0.2 mL/min,柱温:35 ℃,分析时间为每个样品 15 min,流动相用 0.22 μm 的滤膜过滤。进样量 20 μL,采用自动进样方式。

质谱条件:电喷雾电离(electrospray ionization, ESI),采用正电荷检测模式。离子源条件为温度:50 ℃,喷雾针电压:4 500 V,检测器电压:1 200 V,干燥气(N₂)温度 300 ℃,雾化气压力:55 psi,干燥气压力:20 psi。扫描方式为多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM);用于定量的替米沙坦(内标)、AZT、3TC、EFV 的离子反应对分别为 515.2/276.0、268.2/127.0、230.1/112.2、316.2/244.2;毛细管电压分别为 45、55、110、55 V;碰撞能分别为 -45、-8、-10、12 V;扫描时间分别为 100、200、200、200 ms。

3.2 标准品配制及标准曲线 分析物和内标采用 50% 甲醇配成 1.0 mg/mL 的储液,保存于 -20 ℃ 冰箱。标准品储液配制:将 1.0 mg/mL 的储液采用 50% 甲醇配成以下浓度系列储液:0、10、50、250、500、600、1 000、1 600、2 000、4 000、6 400、8 000、16 000、24 000、28 800、32 000、64 000 μg/L。混合标准品(AZT、3TC、EFV)含量比为 1:1:1,内标储液 100 μg/L。精密移取空白血浆 96 μL 于 2 mL 离心管中,精密加入内标液 4 μL,旋涡混匀,按 1:8 比例加入 800 μL 甲醇,加入各浓度的标准混合液各 100 μL,得到各浓度点的标准血浆样品。4 ℃,12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液 37 ℃ 氮气吹干,样品加入流动相 80 μL 充分溶解后,4 ℃,12 000 r/min 离心 10 min 吸取上清,进样分析。以浓度为横坐标,各药峰面积与内标峰面积比值为纵坐标绘制标准曲线,并进行线性回归运算。

3.3 精密度测定 按 3.2 方法制备低、中、高质量浓度的 AZT 工作液,测定日内精密度(6 次)和日间精密度(3 天)。

3.4 回收率计算 按 3.2 方法制备低、中、高浓度的 EFV 不同含药血浆 6 份,以含药血浆中 EFV 的峰面积与未经提取的相同质量浓度 EFV 标准工作液峰面积比较,计算平均提取回收率,每个质量浓度计算 3 次。

3.5 稳定性测定 取样品室温放置 24 h,考察室温稳定性;反复冻融 3 次,考察冻融稳定性;-80 ℃ 放置 14 天,考察长期稳定性。

4 药代动力学实验 以 DAS 2.0 版药代动力学程序软件计算药动学参数药物半衰期($t_{1/2}$)、达峰浓度的时间(T_{max})、药物达峰浓度(C_{max})、从 0~12 h,从 0~无穷大时间内的血药浓度-时间曲线下面积

($AUC_{0-12\text{ h}}$, $AUC_{0-\infty}$) 及药物清除率(plasma clearance rate, CL)。

5 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,3 组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Dunnet-*t* 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 色谱分离图(图 1) 分别取空白血浆、空白血浆 + 内标、空白血浆 + AZT + 内标、大鼠给药后血样按方法 3.2 处理后进样测定,可见血浆中内源性物质不干扰内标样品的色谱分析。

2 标准曲线绘制 按方法 3.2 获得 AZT 标准曲线为 $y = 0.1286x - 0.0430$ ($R^2 = 0.099$),线性范围为 $0.5 \sim 30.0 \mu\text{g/mL}$,最低检测浓度为 $0.010 \mu\text{g/mL}$ 。

3 精密度、回收率及稳定性评价 日内精密度 RSD (relative standard deviation) 分别为 1.6%、6.5% 和 6.7%,日间精密度 RSD 分别为 8.3%、7.1% 和 5.2%。低、中、高质量浓度的 EFV 平均提取回收率分别为 96.5%、97.7%、98.4%。3 种储藏条件下低、中、高质量浓度样品的相对偏差均在 (± 10)% 以

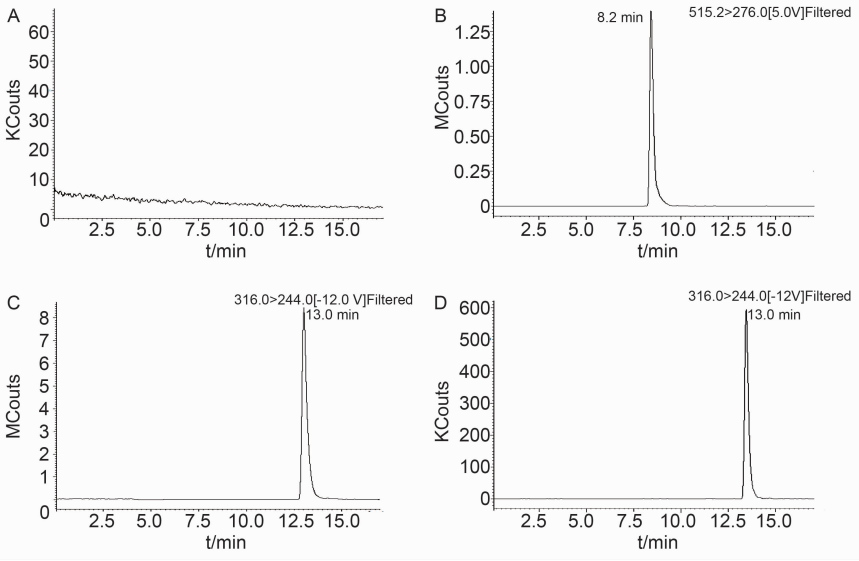
内,RSD $< 8.5\%$,表明血浆样品在测定条件下稳定性良好。

4 AZT 药时曲线和药代动力学参数(图 2、表 1) 3 组 AZT 平均药时曲线结果表明,II、III 组药时曲线较 I 组高。I、II、III 组 $t_{1/2}$ 、 T_{max} 、 C_{max} 、 $AUC_{0-12\text{ h}}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 及 CL 比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

讨 论

HAART 是同时使用 3 个以上抗逆转录病毒药物阻断 HIV 在人体的复制,从而抑制 HIV 病毒,恢复受损的免疫系统。由于抗逆转录病毒药物之间也存在相互作用,配伍需谨慎。本研究根据国际上关于抗病毒药物之间及其他药物间配伍的相关信息(<http://www.hiv-druginteractions.org/>) 及国家免费抗病毒治疗指南^[3] 中联合抗病毒药物的信息,选用 3TC/AZT/EFV 这一经典药物组合的方案,对大鼠进行灌胃给药,模拟人体用药。

AZT 是 80 年代第一个批准上市用于 HIV 治疗的核苷类抗逆转录病毒药物,其抗 HIV 病毒复制环节及药物毒性与其他核苷类药物相似,常被用来代表这类药物阐述体内的作用及不良反应^[4]。



注:A 为空白血浆色谱图;B 为空白血浆 + 内标色谱图;C 为空白血浆 + AZT + 内标色谱图;D 为给药血样处理后 AZT 色谱图

图 1 AZT 专属性图

表 1 3 组 AZT 药代动力学参数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	$t_{1/2}$ (h)	T_{max} (h)	C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	$AUC_{0-12\text{ h}}$ ($\mu\text{g/mL} \cdot \text{h}$)	$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/mL} \cdot \text{h}$)	CL ($\mu\text{g/mL} \cdot \text{h}$)
I	12	3.03 ± 1.26	0.75 ± 0.27	14.21 ± 23.52	27.10 ± 18.73	38.33 ± 10.53	29.26 ± 8.82
II	12	2.56 ± 0.67	0.87 ± 0.52	17.21 ± 1.63	36.16 ± 21.07	39.16 ± 20.07	31.31 ± 10.24
III	12	3.05 ± 2.05	0.67 ± 0.25	25.21 ± 27.60	36.16 ± 21.07	40.79 ± 20.09	25.46 ± 10.19

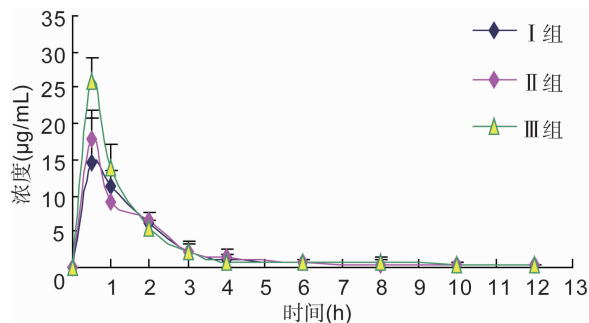


图2 3组大鼠 AZT 药时曲线

中药是否会降低 HAART 药物在体内的血药浓度,诱导 HIV 对西药的耐药及交叉耐药^[5],是临床医生最为担心的问题。从本研究的药时曲线上看,联用艾可清颗粒的Ⅱ、Ⅲ组 AZT 血药浓度高于单纯 HAART 组,各组药代动力学参数比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),提示艾可清颗粒并未减弱 AZT 的血药浓度。

既往研究表明,AZT 抗 HIV 的效果取决于细胞内 AZT 的浓度^[6,7]。2011 年法国多中心人体研究结果首次报道,血浆中 AZT 平均浓度为 0.11 mg/L (0.10 ~ 0.18 mg/L),对应细胞内浓度为 0.17 mg/L (0.11 ~ 0.24 mg/L),相关系数为 $r = 0.35$, $P = 0.006$ ^[8]。因此,艾可清使 AZT 浓度增加,有可能增强体内 AZT 抗 HIV 病毒的效果。

贾珍容等^[9]研究了大鼠体外细胞 AZT 浓度与肝细胞损害的相关性,结果发现,血浆 AZT 浓度 ≥ 3.3 mmol/L 时会导致大鼠肝细胞破裂肝功能损坏。本研究中 3 组 AZT 平均血药浓度最高为 $(25.22 \pm 27.60) \mu\text{g/mL}$ 远低于上述文献中提到的引起毒性作用的剂量,因此不影响艾可清与 AZT 联用。与其他核苷类抗逆转录病毒类似,AZT 长期用药会导致线粒体毒性,表现为脂肪重新分布、肌肉炎症、血脂代谢异常、肝损害甚至乳酸中毒等^[10],发病机制尚不明确,较多的报道为 AZT 诱导氧化应激、直接抑制线粒体生物能量的机械和 L-肉碱的线粒体消耗及细胞凋亡^[11,12],研究也发现植物中的一些抗氧化剂如白藜芦醇会减轻此类毒性反应^[13]。临床研究发现,艾可清颗粒联合 HAART 治疗有增效减毒的作用^[14],由于中药理化性质和药理活性多样性,可能通过各种途径改变药物体内的过程包括抗氧化作用,减轻西药体内的毒副反应。

综上所述,从药代动力学分析,艾可清颗粒联合使用 HAART 可提高 AZT 最高血药浓度,而药时曲线上 AZT 的血药浓度升高是否提示临床上艾可清的“增效”作用,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 陈军,张丽军,姚亚敏,等. 唐草片对 HIV 感染者中依非韦伦药代动力学无显著影响[J]. 中国艾滋病性病杂志, 2012, 18(10): 645-647.
- [2] Yao YM, Mu J, Sun J, et al. Effect of the Tang herb on the pharmacokinetics of lopinavir in rats [J]. J Chin Pharmac Sci, 2014, 3(1): 8-32.
- [3] 张福杰,王玉,王建主编. 国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册[M]. 第3版. 北京:人民卫生出版社, 2012:17-18.
- [4] D'Andrea G, Brisidelli F, Bozzi A. AZT: an old drug with new perspectives [J]. Curr Clin Pharmacol, 2008, 3(1): 20-37.
- [5] Veronique M, Tamara BM, Jacques T, et al. The dual role of pharmacogenetics in HIV treatment: mutations and polymorphisms regulating antiretroviral drug resistance and disposition [J]. Pharmac Rev, 2012, 64(3): 803-833.
- [6] Bazzoli C, Jullien V, Le Tiec, et al. C intracellular pharmacokinetics of antiretroviral drugs in HIV-infected patients, and their correlation with drug actions [J]. Clin Pharmacokinet, 2010, 49(1): 17-45.
- [7] Moore JD, Acosta EP, Johnson VA, et al. Intracellular nucleoside triphosphate concentrations in HIV-infected patients on dual nucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy [J]. Antivir Ther, 2007, 12(6): 981-986.
- [8] Bazzoli C, Bénéch H, Rey E, et al. Joint population pharmacokinetic analysis of zidovudine, lamivudine, and their active intracellular metabolites in HIV patients [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(7): 3423-3431.
- [9] 贾珍容,邱银生,王大菊,等. 齐多夫定对原代大鼠肝细胞毒性作用研究 [J]. 药物不良反应杂志, 2009, 11(2): 91-95.
- [10] Chariot P, Drogou I, de Lacroix-Szmania I, et al. Zidovudine-induced mitochondrial disorder with massive liver steatosis, myopathy, lactic acidosis, and mitochondrial DNA depletion [J]. J Hepatol, 1999, 30(1): 156-160.
- [11] Scruggs ER, Dirks Naylor AJ. Mechanisms of zidovudine-induced mitochondrial toxicity and myopathy [J]. Pharmacology, 2008, 82(2): 83-88.
- [12] Banerjee A, Abdelmegeed MA, Jang S, et al. Zidovudine (AZT) and hepatic lipid accumulation: implication of inflammation, oxidative and endoplasmic reticulum stress mediators [J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76850.
- [13] Gao RY, Mukhopadhyay P, Mohanraj R, et al. Resveratrol attenuates azidothymidine-induced cardiotoxicity by decreasing mitochondrial reactive oxygen species generation in human cardiomyocytes [J]. Mol Med Rep, 2011, 4(1): 151-155.
- [14] 张清仲,符林春,岑玉文,等. 艾可清治疗 HIV/AIDS 的研究进展 [J]. 中药新药和临床药理, 2010, 21(1): 98-100.

(收稿:2015-01-20 修回:2015-08-17)