

· 基础研究 ·

# UPLC-QTOF-MS 法探讨温肾清毒方对大鼠生殖器官中依非韦伦浓度的影响

陆珍珍<sup>1</sup> 王绍龙<sup>1</sup> 钟鹏程<sup>2</sup> 赵江月<sup>1</sup> 阮志<sup>1</sup> 李庆波<sup>1</sup> 符林春<sup>2</sup>

**摘要** 目的 探索温肾清毒方“艾可清”对大鼠生殖器官中依非韦伦浓度 (EFV) 的影响。方法 24 只雄性 SD 大鼠随机分为 4 组, EFV+ 高剂量艾可清组、EFV+ 低剂量艾可清组、EFV 组及空白组, 每组 6 只。大鼠灌胃给药 7 天后处死; 腹腔静脉采血, 取上清液; 取前列腺、睾丸、附睾、膀胱组织, 按组织和 4 ℃ 双蒸水 1:2 比例配置匀浆液。超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱分析 (UHPLC-QTOF/MS) 检测血清和匀浆中 EFV 响应浓度。结果 空白组无离子响应。EFV 组、EFV+ 高剂量组、EFV+ 低剂量组各组内血浆和组织中离子响应浓度比较差异无统计学意义 (均  $P>0.05$ ); 3 个组的血浆的 EFV 浓度比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 但是 EFV+ 高剂量艾可清组及 EFV+ 低剂量艾可清组组织中 EFV 浓度高于 EFV 组 ( $P=0.018$ )。各组组织和血浆中 EFV 的分布如下: EFV+ 低剂量组 > EFV+ 高剂量组 > EFV 组。结论 艾可清能够提高大鼠生殖器官组织中 EFV 浓度。

**关键词** 人类免疫缺陷病毒; 艾可清; 依非韦伦; 浓度; 生殖系统; 大鼠; 中西医结合

**Effect of Wenshen Qingdu Recipe on Efavirenz Concentration in Reproductive Organs of Rats by UPLC-QTOF-MS Method** LU Zhen-zhen<sup>1</sup>, WANG Shao-long<sup>1</sup>, ZHONG Peng-cheng<sup>2</sup>, ZHAO Jiang-yue<sup>1</sup>, RUAN Zhi<sup>1</sup>, LI Qing-bo<sup>1</sup>, and FU Lin-chun<sup>2</sup> 1. Guangxi Center for Disease Control and Prevention, Nanning (530028); 2. Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (530405)

**ABSTRACT Objective** To explore effect of Wenshen Qingdu Recipe “Aikeqing” (AKQ) on the concentration of efavirenz (EFV) in reproductive organs of rats. **Methods** Twenty-four male sprague Dawley (SD) rats were divided into 4 groups, i.e., the EFV+high dose AKQ group, EFV+low dose AKQ group, EFV group and control group, 6 in each group. The rats were sacrificed after 7 days of intragastric administration, and the blood was collected from abdominal vein and supernatant was obtained. The organs (prostate, testis, epididymis and bladder) were mashed and prepared as homogenate according to the proportion of tissue and 4 ℃ double distilled water in a ratio of 1:2. The concentration of EFV in serum and homogenate was detected with ultra-performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC–QTOF-MS). **Results** There was no ionic response in the control group. There was no significant difference ionic response concentrations in plasma and tissue in EFV group, EFV+high AKQ dose group and EFV+low dose AKQ group, Similarly, there was no significant difference in plasma EFV concentration among the three groups ( $P>0.05$ ). Whereas, compared with the EVF group, EFV concentration in tissues were increased in EFV+high dose AKQ group and EFV+low AKQ dose group ( $P=0.018$ ). It showed higher concentration for EFV+low dose AKQ group versus EFV+high dose AKQ group, following by EVF group. **Conclusion** AKQ could increase the concentration of EFV in the reproductive organs of rats.

**KEYWORDS** human immunodeficiency virus; Aikeqing; efavirenz; concentration; reproductive organ; rats; integrated Chinese and Western medicine

基金项目: 广西艾滋病防治研究重点实验室开放课题项目 (No. gklapt201702); 广西自然科学基金项目 (No. 2020GXNSFAA238044)

作者单位: 1. 广西疾病预防控制中心 (南宁 530028); 2. 广州中医药大学科技创新中心 (广州 530405)

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

DOI: 10. 7661/j. cjm. 20211021. 250

依非韦伦 (Efavirenz, EFV) 在我国是抗逆转录病毒一线治疗的骨干药<sup>[1]</sup>。研究表明,非核苷类逆转录酶抑制剂 (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTIs) 在生殖道中浓度低于血液中浓度,EFV 在男性生殖道中的浓度仅为血液中浓度的 3%~10%<sup>[2-4]</sup>。由于 EFV 的药效与其药物浓度相关,低于有效浓度可以导致 HIV 的耐药<sup>[5-7]</sup>。在有限的报道中,精液中和血液中的毒株序列和毒株耐药位点不完全一致<sup>[8-10]</sup>。究其原因,与生殖道器官,包括膀胱、睾丸、附睾、储精囊、前列腺、阴茎、尿道、龟头形成的特殊“屏障”有关系<sup>[11,12]</sup>。

既往研究中,发现部分中药能够影响大鼠体内抗病毒药物的浓度<sup>[13]</sup>。那么对于一些有“温肾”作用的中药,或许会影响生殖系统中 EFV 的浓度。为证实笔者的想法,本研究以雄性大鼠为实验动物,分组给药,采用分析速度快、灵敏度高和专属性强的高效液相色谱四极杆飞行时间质谱分析 (ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UHPLC-QTOF/MS) 技术,观察温肾清毒方“艾可清”对大鼠生殖系统中 EFV 浓度的影响。

## 材料与方 法

1 动物 SD 大鼠,SPF 级,4~7 周龄,体重 250-300g,饲养于广西医科大学实验动物中心,动物合格证:SCXK 桂 (2009-0002)。研究通过广西疾控中心实验动物伦理审核 (No. 20180005)。

2 药物 依非韦伦 (EFV, 600 mg/片,浙江华海药业股份有限公司,批号 1251C18059),温肾清毒方 (广东一方制药有限公司监制,批号 Q1512026) 组成:黄芩 10 g 黄柏 6 g 淫羊藿 10 g 虎杖 15 g 丹参 10 g 茯苓 10 g 红参 5 g 淡附片 6 g 干姜 3 g 甘草 3 g。

3 试剂及仪器 乙腈 (色谱纯,批号:1.00030.4008)、甲酸 (色谱纯,批号:1.06007.4008),均为美国 Merck 公司;水为 Milli-Q 超纯水;超高效液相色谱仪-四极杆飞行时间质谱仪 (UHPLC-QTOF/MS, 美国 Waters 公司),配有电喷雾离子源 (Electrospray Ionization, ESI),数据采集和数据处理软件为 Masslynx 4.1;SK-1 快速混匀器 (金坛市医疗仪器厂);Sigma 3k30 高速冷冻离心机 (德国,西格玛奥德里奇);HSC-12A 氮吹仪 (天津市威仪科技发展有限公司)。

4 色谱条件 色谱柱:ACQUITY HSS T3

(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm);流动相:A 0.1% 甲酸-水溶液, B 乙腈;梯度洗脱,流动相 B 比例变化如下:0~4.2 min, 10%~40%; 4.2~7.0 min, 40%~65%; 7.0~9.0 min, 65%~85%; 9.0~10.0 min, 85%~95%; 10.0~13.0 min, 95%~95%; 13.0~13.1 min, 95%~100%; 13.1~15.0 min, 10%; 进样体积:3 μL;流速:0.5 mL/min;柱温:35 °C。

5 质谱条件 电喷雾 ESI 离子源,在 MSE 模式下采用负离子扫描的方式进行采集,雾化气和脱溶剂气均为氮气,碰撞气为氩气。毛细管电压为 2 700 V,脱溶剂气流量 800 L/h,脱溶剂气温度 350 °C;气帘气体积流量 50 L/h,锥孔电压 40 V,补偿电压 80 V;离子源温度 120 °C;质量数扫描范围 100~1 200 m/z。低能量碰撞能:6 V;高能量碰撞能:25~45 V;

## 6 样品制备

6.1 标准品溶液的配制 分别取 EFV 标准品适量,精密称定,用适量甲醇溶解,再用 50% 甲醇水溶液稀释至刻度,配成 1.0 mg/mL 的储备液,于 4 °C 冷冻保存,使用前用 50% 甲醇水溶液稀释。

6.2 样本溶液的配制 (1) 取 EFV 片剂去掉包衣,研钵中研碎,研磨使之成粉末状,称取适量加 50% 甲醇配置浓度为 6 mg/mL 的混悬液,灌胃容积为 63 mg/kg。(2) 取艾可清粉末适量,精密称定,加 50% 甲醇配置浓度为 50 mg/mL 的混悬液,给药方法:灌胃给药,灌胃容积:5 mL/kg。

7 生物样本的制备 24 只大鼠编号,按随机数字法分为 4 组,即 EFV+ 高剂量艾可清、EFV+ 低剂量艾可清、EFV 组及空白组,每组 6 只。(1) 血清样本的取得:根据《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)<sup>[14]</sup> 计算艾可清的剂量,以成人 (60 kg) 计算大鼠的等效剂量,成人 EFV 63 mg/kg,艾可清 (低剂量 850 mg/kg,高剂量 2550 mg/kg,分别相当于成人剂量的 10、30 倍)。各组灌胃给药。连续喂药 7 天,第 8 天灌胃,按照之前的研究结果,取最高血药浓度时间即灌胃后 4~5 h 电击处死<sup>[13]</sup>,腹腔静脉采血离心,以 3 000 r/min 的速率离心分离,取上清液,存于 -20 °C 待测。血清样本的处理:将上述方法取得的上清液常温溶解后,移取血浆样品 200 μL 于 2 mL 离心管中,加入 1.5 mL 甲醇,旋涡混匀,4 °C,14 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液于 37 °C 氮气吹干,样品加入流动相 100 μL 充分溶解后,4 °C,14 000 r/min 离心 10 min,取上清进样,即得,样本进样量 2 μL。(2) 泌尿系统组织样本的取得:大鼠

电击处死，快速将取前列腺、睾丸、附睾、膀胱取出，用 4℃ 生理盐水漂洗，除去血液、滤纸拭干，放置 -40℃ 冰箱保存待用。精密称量前列腺、睾丸、附睾、膀胱组织，按组织和 4℃ 双蒸水 1:2 比例配置匀浆液，将匀浆完毕后获得的组织匀浆液保存至 -40℃ 冰箱中；将组织匀浆液与甲醇按 1:3 的比例配置溶液，涡旋 8 min，超声溶解 20 min，14 000 r/min 离心 10 min，取上清液，吸取上清液于 37℃ 氮气吹干，样品加入流动相 100 μL 充分溶解后，4℃，14 000 r/min 离心 10 min，取 2 μL 直接进入 UPLC-QTOF-MS 测定。

8 数据采集处理 供试品溶液按 2.2 项中 LC-MS 条件进行分析检测，利用 Waters Masslynx 4.1 软件完成数据采集与处理。将全扫描模式的一级高分辨质谱数据通过 Masslynx 软件中分子特征查找功能，对血浆及组织样品中所含的 EFV 化合物进行查找。通过精确分子量、二级质谱数据、标准品进行比对，确定血浆及组织样品中所含的 EFV 化合物与 EFV 对照品为同一化合物。通过离子响应强度与积分面积，得到血浆及组织样品中所含的 EFV 化合物的相对浓度。

9 统计学方法 以 SPSS 23.0 进行比较分析。EFV 浓度比较，数据以  $\bar{x} \pm s$  表示，同一组的血浆、组织 EFV 浓度比较使用配对 *t* 检验，不同组的血浆、组织中 EFV 浓度非正态分布，使用 *Friedman Test* 非参数检验比较组间差异，*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

### 结 果

1 大鼠一般情况 正常饲料喂养，每天定点药物灌胃，观察到第 8 天，4 个组的大鼠均正常进食，活跃，无死亡大鼠。

2 各组大鼠血浆和泌尿组织中 EFV 水平比较 (表 1、2，图 1) EFV 在色谱图中的保留时间为 7.21 min，不同给药组灌胃 8 天后，在血浆、前列腺、睾丸、附睾、膀胱组织中均可检测到 EFV

原药。结果显示：空白组无离子响应；各组的血浆和组织中离子响应浓度比较差异无统计学意义 (均 *P* > 0.05)；EFV+ 高剂量艾可清组及 EFV+ 低剂量艾可清组组织中 EFV 浓度高于 EFV 组 (*P* = 0.018)。将各组 6 只大鼠的组织液、血浆液分别混匀进行检测，不同给药组比较，组织和血浆中 EFV 的分布如下：EFV+ 低剂量艾可清组 > EFV+ 高剂量艾可清组 > EFV 组。

表 2 各组依非韦伦的平均离子响应强度

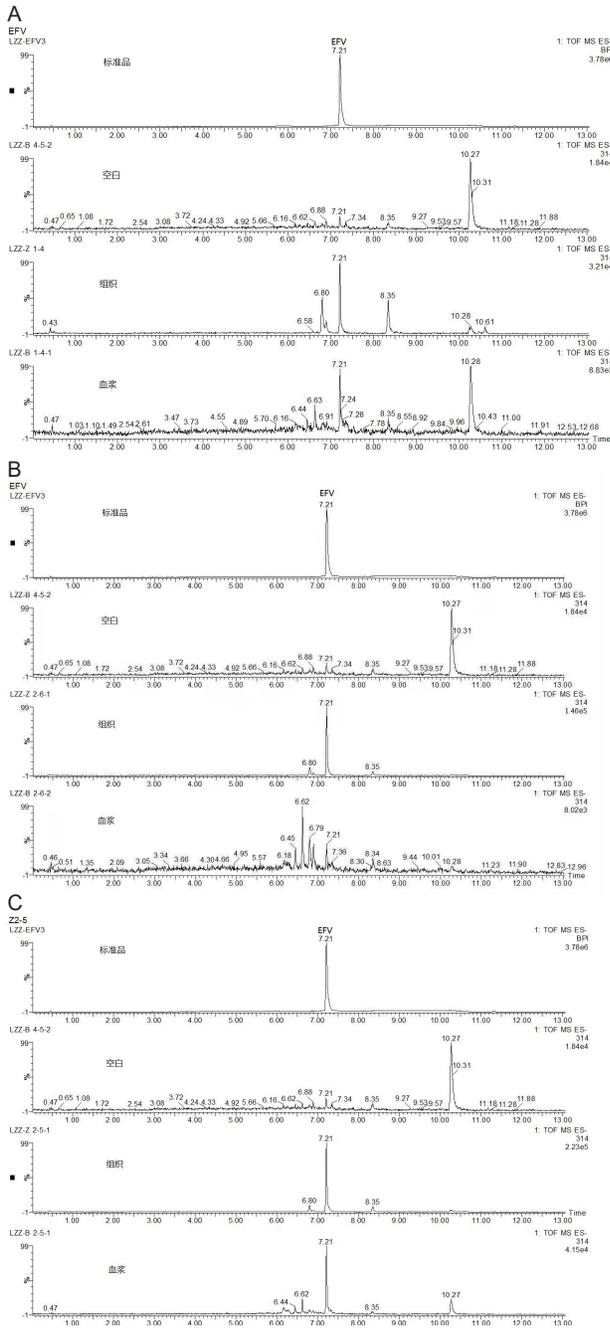
组别	n	离子响应强度		
		空白	组织	血浆
EFV	6	N/A	3.21 E4	8.83 E3
EFV+ 高剂量艾可清	6	N/A	1.46 E5	8.02 E3
EFV+ 低剂量艾可清	6	N/A	2.23 E5	4.15 E4

### 讨 论

温肾清毒方即“艾可清”，是广州中医药大学热带医学研究所根据我国传统医药医理，在长期实验研究和临床观察的基础上，精选出由熟附子、淫羊藿、茯苓、红参、虎杖、黄芩、丹参、干姜及甘草等 10 味中药组成、已经公开使用的专利配方<sup>[15]</sup>。该方由特定的药物组合物制剂对猴艾滋病病毒感染恒河猴所致艾滋病模型猴的实验治疗作用，药物组合物制剂具有治疗人类艾滋病的用途，给予 HIV 感染者或艾滋病患者本药物组合物制剂，能够缓解病症，包括稳定或者提升 HIV 病毒感染者和艾滋病患者的 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞计数水平，缓解临床症状体征、改善生存质量<sup>[16,17]</sup>。方中附子、干姜配伍有温阳通脉之功效；淫羊藿甘温入肾，温肾壮阳，补益阳气，顾卫正气；虎杖、黄芩和丹参苦寒，能清热解毒，活血止痛。纵观全方，“温肾清毒”，以温补肾阳同时温凉并用，攻补兼施，标本兼治。艾可清方剂具有补益脾肾、清热解毒的功效。早期大鼠实验研究发现联合使用艾可清加高效抗逆转录病毒治疗 (highly active antiretroviral therapy, HAART) 组的 EFV 显示更高的血液峰浓度和药物曲线下面积<sup>[13]</sup>。因此，笔者推测艾可清“温

表 1 不同给药组之间、同一给药组织和血浆的依非韦伦浓度比较

组别	n	浓度 (μg/mL)			t	P 值
		空白	组织	血浆		
EFV	6	N/A	0.72 ± 0.28	2.99 ± 2.15	-1.57	0.116
EFV+ 高剂量艾可清	6		4.46 ± 2.6	6.57 ± 0.87	-1.34	0.180
EFV+ 低剂量艾可清	6	N/A	4.92 ± 4.11	8.58 ± 0.65	-1.34	0.180
$\chi^2$			8.00	4.00		
P 值			0.018	0.135		



注: A 为 EFV 组; B 为 EFV+ 高剂量艾可清组; C 为 EFV+ 低剂量艾可清组

图 1 不同给药组样品典型 EFV 提取离子流色谱图

肾清毒”的功效,可能是通过对“肾”—“生殖系统”的滋补调养,生殖系统中的改变有可能比血液中改变更为显著。本研究发现联合使用艾可清,能够提高大鼠生殖系统中 EFV 的药物浓度,证实了笔者的猜想,即艾可清“温肾清毒”的功效,可能是通过对“肾”—“生殖系统”的滋补调养,生殖系统中的改变比血液中改变更为显著。

黏膜组织是一个特殊的动态微环境,药物在组织中分布受多种调控途径的影响,包括旁分泌、自分泌

和内分泌信号,这些影响药物蛋白质结合、膜药物转运体活性和内源性激素从而影响不同药物、不同个体药物浓度分布的差异。对于 NNRTI 类包括 EFV,生殖系统中低浓度,主要原因是 EFV 在血浆中绝大部分与血浆蛋白结合,结合率达 60%~99.9%,导致非蛋白结合的、能够透过细胞膜和上皮细胞中的药物分子较少<sup>[18]</sup>。此外,EFV 的药物浓度和药物效应个体因素较多,包括性别、年龄、病理因素、遗传因素。近年来临床研究表明,遗传因素是导致药物代谢个体差异和种族差异的主要因素<sup>[19-21]</sup>: EFV 代谢的主要酶系是细胞色素 CYP2B6,其中 CYP2B6 的基因多样性是影响 EFV 血药浓度的独立因素,约三分之一的个体存在不同的基因差异。CYP2B6\*6 (G516T 和 A785G) 者和 CYP2B\*9 (G516T) 携带者的 EFV 血药浓度较高。在艾可清药物物质浓度的研究中,发现该药物能够抑制肝脏药物 CYP 酶系统的作用,提示艾可清化学成分可能影响体内抗病毒药物的代谢环节,包括 CYP 酶系统,引起抗病毒药物浓度的变化<sup>[22]</sup>。从 EFV 响应浓度标准差上可见,EFV 的浓度个体差异非常明显,与之前进行的大鼠实验结果类似<sup>[13]</sup>,再次证实不同个体的差别。EFV 半衰期较长,本研究在大鼠服药 1 周后采样,此时血液和组织中 EFV 的浓度较为稳定,采血时间选择当日灌药后血浆最高浓度的时间点,由于“生殖器屏障”存在,生殖器组织中 EFV 的浓度最高点会比血浆浓度最高点延后,此时进行血浆-生殖器浓度比较,生殖器的 EFV 比血浆中的高,更能说明是中药干预影响的效果。本研究还发现高剂量艾可清组比较低剂量艾可清组,并未随着中药给药量的增加使得 EFV 的浓度更高,具体机制需进一步探究。

本研究局限性是样本量偏少。此外,EFV 的浓度个体差异非常明显,最好能进行同一个体干预前后的对比分析,但是本研究由于的大鼠生殖器官采样只能一次,采用相关样本进行比较会存在一定的统计学偏差,下一步应该争取进行人体精液样本的前后对比研究来证实。

综上,本研究提示联合使用艾可清能够提高大鼠生殖系统中 EFV 的药物浓度,具体机制需要进一步阐明,也需要进行真实人体研究来进一步证实。

(致谢: 本研究在开展实施过程中,得到广西疾控中心中心副主任赵鹏主任医师、广西疾控中心毒理所李彬主任医师、广西疾控中心毒理所所长张清宏主任医师的大力支持和帮助,在此一并致谢!

利益冲突: 无。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 李太生, 王福生, 高福. 中国艾滋病诊疗指南 (2018 版) [J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2018, 45 ( 6 ): 361–378.
- [ 2 ] Matusali G, Dereuddre-Bosquet N, Le Tortorec A, et al. Detection of simian immunodeficiency virus in semen, urethra, and male reproductive organs during efficient highly active antiretroviral therapy. [J]. *J Virol*, 2015, 89 ( 11 ): 5772–5787.
- [ 3 ] Duwal S, Seeler D, Dickinson L, et al. The utility of efavirenz-based prophylaxis against HIV infection: a systems pharmacological analysis [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 13 ( 10 ): 199.
- [ 4 ] Devanathan AS, Cottrell ML. Pharmacology of HIV cure: site of action. [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2021, 109 ( 4 ): 841–855.
- [ 5 ] Cheney L, Barbaro JM, Berman JW. Antiretroviral drugs impact autophagy with toxic outcomes. [J]. *Cells*, 2021, 15, 10 ( 4 ): 909.
- [ 6 ] Lewis JM, Volny-Anne A, Waitt C, et al. Dosing antiretroviral medication when crossing time zones: a review [J]. *AIDS*, 2016, 30 ( 2 ): 267–271.
- [ 7 ] Jackson KM, Alphonse O, Neoline N, et al. Influence of efavirenz pharmacokinetics and pharmacogenetics on neuropsychological disorders in Ugandan HIV-positive patients with or without tuberculosis: a prospective cohort study [J]. *Bmc Infectious Diseases*, 2013, 13 ( 1 ): 261.
- [ 8 ] Rami K, Daniel B, Ronald JB, et al. HIV-1 RNA levels and antiretroviral drug resistance in blood and non-blood compartments from HIV-1-infected men and women enrolled in AIDS clinical trials group study A5077 [J]. *PloS One*, 2014, 9 ( 4 ): e93537.
- [ 9 ] Hiransuthikul A, Wongkanya R, Sirivichayakul S, et al. Discordance in drug-resistance mutations between blood plasma and semen or rectal secretion among newly diagnosed HIV-1-infected Thai MSM [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2018, 34 ( 7 ): 626–628.
- [ 10 ] Rami K, Daniel B, Bosch RJ, et al. HIV-1 RNA levels and antiretroviral drug resistance in blood and non-blood compartments from HIV-1-infected men and women enrolled in AIDS clinical trials group study A5077 [J]. *PloS One*, 2014, 9 ( 4 ): e93537.
- [ 11 ] Laurent H, Giulia M, Nathalie DR. Origins of HIV-infected leukocytes and virions in semen [J]. *J Infect Dis*, 2014, 210 ( suppl 3 ): S622–S630.
- [ 12 ] Houzet L, Pérez-Losada M, Matusali G, et al. Seminal SIV in chronically-infected cynomolgus macaques is dominated by virus originating from multiple genital organs [J]. *J Virol*, 2018, 92 ( 14 ): e00133–18.
- [ 13 ] 陆珍珍. 常用艾滋病中药对广西 HAART 疗效和耐药分析 HIV 耐药分析 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [ 14 ] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范 (2003 年版) [S]. 北京: 卫生部卫生法与监督司编印, 2003, 223–224.
- [ 15 ] Zhang GH, Han JB, Zhu L, et al. Ai ke qing decreases viral loads in SHIV89.6-infected Chinese rhesus macaques [J]. *Chin Med*, 2016, 1 ( 11 ): 31.
- [ 16 ] 李钱锋, 符林春, 谭行华, 等. 艾可清连续治疗 24 个月 HIV 感染者的疗效分析 [J]. *中国艾滋病性病*, 2018, 24 ( 10 ): 966–969.
- [ 17 ] 左小庭, 符林春, 谭行华, 等. 艾可清连续 60 个月治疗 HIV/AIDS 的效果 [J]. *广东医学*, 2017, 38 ( 8 ): 1280–1283.
- [ 18 ] Cottrell ML, Srinivas N, DM Kashhuba A. Pharmacokinetics of antiretrovirals in mucosal tissue [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2015, 11 ( 6 ): 893–905.
- [ 19 ] Langmia IM, Just KS, Yamoune S, et al. CYP2B6 functional variability in drug metabolism and exposure across populations-implication for drug safety, dosing, and individualized therapy [J]. *Front Genet*, 2021, 12 ( 12 ): 692234
- [ 20 ] Maseng MJ, Tawe L, Thami PK, et al. Association of CYP2B6 genetic variation with efavirenz and nevirapine drug resistance in HIV-1 patients from Botswana [J]. *Pharmgenomics Pers Med*, 2021, 14: 335–347
- [ 21 ] Chamnanphon M, Sukprasong R, Gaedigk A, et al. Influence of SULT1A1\*2 Polymorphism on plasma efavirenz concentration in Thai HIV-1 patients [J]. *Pharmgenomics Pers Med*, 2021, 14: 915–926.
- [ 22 ] 卢元媛. 基于液相色谱质谱联用技术对方剂中药艾可清化学成分及其调节细胞色素 P450 酶作用的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.

(收稿: 2020-05-22 在线: 2021-11-10)

责任编辑: 汤 静