

头孢曲松改变丹红注射液酚酸类成分在大鼠体内药动学行为和抗凝血抗血栓药效的研究

张倩^{1,2}, 居文政², 郭建明¹, 李建萍¹, 姚毅², 唐志书³, 赵步长⁴, 段金廛^{1*}

(1. 南京中医药大学, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏省方剂高技术研究重点实验室, 江苏南京 210046; 2. 南京中医药大学附属医院, 江苏南京 210029; 3. 陕西中医药大学, 陕西咸阳 712000; 4. 步长制药有限公司, 陕西西安 710000)

摘要: 基于临床数据挖掘结论, 选取常见的丹红注射液与头孢曲松钠联合用药方案, 设计实验考察在雄性成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠体内, 连续 7 天尾静脉给予丹红注射液后, 继续联合使用头孢曲松钠 7 天, 对丹红注射液中的酚酸类成分 *p*-香豆酸、丹酚酸 D、迷迭香酸和丹酚酸 B 的药动学行为, 以及抗血栓、抗凝血和抗血小板药效的影响。运用 UHPLC-TQ-MS 测定血药浓度后, 用 DAS 3.2.8 计算丹红注射液中酚酸类成分在丹红注射液单用药组与联合用药组的药动学参数, 并比较两组在 90% 置信区间最高血药浓度 C_{max} 和药时曲线下面积 AUC_{0-t} 的生物等效性。结果显示: 与单用药组相比, 联合用药组的 *p*-香豆酸、丹酚酸 D、迷迭香酸和丹酚酸 B 的 C_{max} 不等效; 丹酚酸 D、迷迭香酸和丹酚酸 B 的 AUC_{0-t} 不等效, 而各成分的 t_{max} 没有显著性差异 ($P>0.05$)。体内抗凝血实验结果显示: 与单用药组比较, 联合用药组的国际化标准比值 (INR) 显著升高 ($P<0.01$), 凝血酶原时间 (PT)、凝血酶时间 (TT)、活化部分凝血活酶时间 (APTT) 显著增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而纤维蛋白原 (FIB) 值没有显著差异; 抗血栓结果显示大鼠体内血清血栓素 B_2 (TXB₂) 水平在联合用药组内极显著降低 ($P<0.01$); 而抗血小板结果没有显著性差异。综上结果表明: 头孢曲松钠可能通过改变丹红注射液中的酚酸类成分在大鼠体内的药动学和药效学, 增强丹红注射液的抗凝血和抗血栓作用。以上动物实验均通过南京中医药大学动物伦理审查。

关键词: 丹红注射液; 头孢曲松钠; 中西药相互作用; 药动学; 抗血栓; 抗凝血; 抗血小板

中图分类号: R969 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)04-0701-09

Influence of ceftriaxone on pharmacokinetics, anticoagulation and antithrombotic effects of phenolic acids from Danhong injection in rats

ZHANG Qian^{1,2}, JU Wen-zheng², GUO Jian-ming¹, LI Jian-ping¹, YAO Yi², TANG Zhi-shu³, ZHAO Bu-chang⁴, DUAN Jin-ao^{1*}

(1. Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of TCM Formulae, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 2. The Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 3. Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712000, China; 4. Buchang Pharma, Xi'an 710000, China)

Abstract: Danhong injection (DHI) and ceftriaxone sodium were used in combination based on their experimental uses in clinic. This study was designed to investigate the impact of ceftriaxone on pharmacokinetics and

收稿日期: 2018-10-30; 修回日期: 2018-12-21.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 资助项目 (2011CB505300, 2011CB505303); 国家科技重大专项资助项目 (2015ZX09501004001006); 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (81803795); 江苏省中医药管理局科技项目 (YB2017018); 江苏省自然科学基金面上项目 (BK20181504); 江苏省自然科学基金青年科学基金项目 (BK20180823).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-25-85811916, E-mail: dja@njucm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0984

pharmacodynamics of the phenolic acids from DHI. After administration of DHI for 7 d, ceftriaxone (CFTX) was combined with DHI for the next 7 d in adult male Sprague-Dawley (SD) rats. All the drugs were administered through caudal vein. UHPLC-TQ-MS was applied in determining the plasma concentration of *p*-coumaric acid (*p*-CA), salvianolic acid D (SaD), rosmarinic acid (RA) and salvianolic acid B (SaB). The pharmacokinetic parameters of the combination group or the Danhong injection alone group were calculated by statistical moment method, C_{\max} and the average of the area under the curve AUC_{0-t} using 90% confidence interval of the bioequivalence and bioavailability degree module in DAS 3.2.8 statistic software. The results showed that C_{\max} of *p*-CA, SaD, RA and SaB were unqualified within 90% confidence intervals for bioequivalence statistics. And the results showed that AUC_{0-t} of SaD, RA and SaB within 90% confidence intervals for bioequivalence statistics were unqualified. There were no significant difference in the t_{\max} ($P>0.05$). The results of anticoagulation *in vivo* showed that the international normalized ratio (INR), prothrombin time (PT), thrombin time (TT) and activated partial thromboplastin time (APTT) were significantly increased when combined with CFTX ($P<0.05$ or $P<0.01$). The results in antithrombotic effects revealed that the thromboxane B_2 (TXB₂) level in serum was significantly decreased ($P<0.01$) in the combination group compared with Danhong injection alone. However, there was no significant difference in antiplatelet effects. These results suggest that CFTX may enhance the anticoagulation and antithrombotic effects of DHI through altering pharmacokinetics and pharmacodynamics in SD rats.

Key words: Danhong injection; ceftriaxone sodium; herb-drug interaction; pharmacokinetics; antithrombotic effect; anticoagulation; antiplatelet

随着社会老龄化进程加快,多药治疗已经成为现在医学治疗的主要模式,因此带来潜在的中西药相互作用已经成为合理用药的关注点^[1]。据一项回顾性研究30 397例住院患者的医嘱发现:心血管疾病用药和抗菌药物是使用率最高的药物^[2]。尤其是老年人,机体免疫较弱,并发基础疾病较多,住院期间常见并发细菌感染,因此同一疗程中同时出现这两类药物的几率较高^[3-7]。在中国,活血化瘀类中药注射剂已成为治疗心脑血管疾病的重要补充用药,43.46%的心血管病患者用药模式以中西药结合为主,其中以丹红注射液(Danhong injection, DHI)为代表^[8]。

DHI活血化瘀、通脉舒络的疗效确切,在临床上已被广泛应用于治疗如冠心病、缺血性脑梗塞等多种心脑血管疾病,并已形成了临床应用专家共识^[9]。但在其临床联合用药方面的研究报道,除了与阿司匹林药物的相互作用外^[10-13],仍相对较少。

本课题组前期对江苏省中医院2013~2015年住院患者医嘱信息进行回顾性研究发现:DHI常与头孢类抗菌药物联合用药,其中以三代头孢菌素头孢曲松(ceftriaxone, CFTX)为代表^[14],1 233名同时使用DHI和抗菌药物的患者中有179名患者使用了CFTX。而文献^[15]报道DHI与头孢类抗菌药物联合用药可能发生不良反应,且在江苏省不良反应监测中心收集的DHI不良反应报告中,存在与CFTX联合用药的情况。前期文献^[16]报道CFTX血清白蛋白结合率较高,而DHI中的酚酸类成分如丹酚酸D、迷迭香酸、紫草酸和丹酚酸B等血清白蛋白结合率也较高^[17-19],两药联用可能

会竞争性结合血清白蛋白,发生药动学相互作用。更有文献^[20]报道,CFTX因能与华法林竞争性结合血清白蛋白,而增加华法林的抗凝功效。因此本研究在前期临床数据统计的基础上,设计联合用药方案,考察CFTX对DHI在成年雄性SD大鼠体内药动学和抗血栓、抗凝血及抗血小板药效的影响。

材料与方法

药品和试剂 DHI(步长制药有限公司,批号16091002),注射用头孢曲松钠(上海罗氏公司,批号SH1843),*p*-香豆酸(*p*-CA,含量≥98%,南京元宝山色谱有限公司,批号151228),丹酚酸D(SaD,含量≥98%,成都曼思特生物科技有限公司,批号16031810),迷迭香酸(RA,含量≥98%,中国食品药品检定研究院,批号111871-201505),丹酚酸B(SaB,含量≥98%,中国食品药品检定研究院,批号111562-201515),内标(internal standard, IS)氯霉素(LMS,含量≥98%,中国食品药品检定研究院,批号111562-201515),色谱纯乙腈(ACN)购于美国天地公司;甲酸购自德国默克公司。超纯水由纯水制备系统Milli-Q Direct-Q5制备。血栓烷素 B_2 (TXB₂)、大鼠血小板膜糖蛋白IIb/IIIa(GP IIb/IIIa)、大鼠P选择素(P-selectin / CD62p)、大鼠血管性血友病因子(vWF)ELISA试剂盒,购自南京金益佰公司(规格96T),生产批号分别为jeb-13505、jeb-13951、jeb-13755、jeb-13388。

仪器和设备 Acquity™ UHPLC-TQ-MS,配备ESI离子源和MassLynx 4.1质谱工作站软件(Waters公司),

美国), STA-R Evolution 全自动血凝仪 (Stago 公司, 法国), PerkinElmer EnSpire 多功能酶标仪 (Thermo Fisher 公司, 美国)。

实验动物 雄性 SD 大鼠 40 只, 体重 230 ± 15 g, 购自南通大学 (动物生产许可证号 SCXK-2014-0001), 饲养温度 22 ± 2 °C, 相对湿度 $50\% \pm 20\%$, 标准大鼠饲料自由饮食, 适应饲养 7 d 后开始每天固定时间给药, 在药动学实验前 24 h 禁食。所有动物实验均通过南京中医药大学动物伦理审查。

实验设计与给药方案 临床 CFTX 和 DHI 给药方式主要为静脉滴注, 由于大鼠静脉滴注给药存在较大难度, 因此本实验给药采用尾静脉注射。临床给药剂量 CFTX $1.0 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$, DHI $40.0 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$ 。由于 CFTX 和 DHI 都是开瓶后室温条件 6 h 内稳定^[21,22], 因此所用药物均为现配现用。用 0.9% 灭菌氯化钠溶液 (生理盐水) 配制 CFTX ($50.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 而 DHI 开瓶现用。按临床统计数据设计联合用药方式: DHI 最常见用药天数为 14 d, CFTX 最常见用药天数为 7 d, 两者常见联合用药时间为 7 d, 因此选择 7 d 作为联合用药时间进行研究, 即先使用 DHI 7 d, 从第 8 d 起联合使用 CFTX 7 d。联合给药方式为序贯给药, 在静脉注射 CFTX 后, 立即静脉注射 DHI。

雄性 SD 大鼠随机分为 3 组, 每组 8 只: DHI 单独用药组设置为 1 组 (DHI 14 d), DHI 联合用药组分别为 2 组 (DHI 联用 CFTX 14 d + 7 d), 另设 3 组 (空白对照)。根据实验动物和人单位面积给药量相等的原则, 按人平均体重 70 kg 计算, 按公式计算大鼠的给药剂量, 得到 CFTX 的剂量应为 $90.0 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$, DHI 的剂量为 $4.16 \text{ mL} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 。第 1~7 d, 第 1 组和第 2 组尾静脉注射 DHI, 第 3 组尾静脉注射生理盐水; 第 8~14 d, 第 1 组尾静脉注射 DHI, 第 2 组给药 CFTX 和 DHI, 第 3 组继续尾静脉注射生理盐水。为减少给药体积对血药浓度的影响, 生理盐水用于补充 DHI 单独用药组和空白对照组不足的药物体积。

第 13 d 晚上禁食, 第 14 d 给药前从大鼠的眼眶取全血 0.5 mL, 以 9:1 的比例加入枸橼酸钠抗凝剂, 用全自动血凝仪测定国际化标准比值 (INR)、凝血酶原时间 (PT)、凝血酶时间 (TT)、活化部分凝血活酶时间 (APTT) 和纤维蛋白原 (FIB)。第 14 d 在给药前 0 min 和给药后的 5、10、15、20、30、40 min, 1、1.5 和 2 h 从眼眶采血 0.25 mL, 加入肝素化的 1.5 mL EP 管中, $4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清得血浆, -30 °C 保存。第 15 d 大鼠处死前, 腹主动脉取血 3 mL 后置室温放置 4 h, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清得血清, -80 °C 保存, 第 16 d 用 ELISA 试剂盒测定 TXB_2 、GP IIb/IIIa、

CD62p、vWF。

UHPLC-TQ-MS 测定大鼠血浆中 DHI 酚酸类成分的浓度 超高效液相色谱柱选用 Waters BEH C18 柱 ($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$), 流动相为 0.4% 甲酸水溶液 (A) ($4:1\ 000$, $0.104 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 ACN (B), 梯度洗脱设置如下: 0~2.0 min ($5\% \sim 20\%$ B), 2.0~5.0 min ($20\% \sim 95\%$ B), 5.0~5.5 min ($95\% \sim 95\%$ B), 5.5~6.0 min ($95\% \sim 5\%$ B)。流速设置为 $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 35 °C, 自动进样体积 $2 \mu\text{L}$, 进样温度设置 4 °C。

质谱分析采用负离子 (ESI⁻) 和多反应监测 (MRM) 模式。检测参数设置为: 毛细管电压 3.0 kV , 源温 150 °C, 脱溶剂气温度 500 °C, 锥孔气流量 $50 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, 干燥气流速度 $1\ 000 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, 碰撞气流量 $0.15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。各待测酚酸成分的保留时间 (t_R) 和质谱条件参数见表 1。

Table 1 The retention time (t_R) and the optimal detection parameters of *p*-coumaric acid (*p*-CA), salvianolic acid D (SaD), rosmarinic acid (RA) and salvianolic acid B (SaB) in Danhong injection (DHI) and IS (ESI⁻)

Compound	t_R /min	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone /V	Collision /eV
<i>p</i> -CA	2.28	163.2	119.3	20	13
SaD	2.37	417.6	197.5	20	18
RA	2.63	359.5	161.5	20	20
SaB	3.21	717.6	519.2	25	20
LMS (IS)	3.12	320.8	151.9	25	18

血浆样品前处理方法 取血浆样品 $50 \mu\text{L}$, 加入 LMS (IS) 溶液 $10 \mu\text{L}$, 涡旋 30 s 混匀, 再加入 ACN $150 \mu\text{L}$ 沉淀蛋白, 涡旋 3 min 混匀后 4 °C、 $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清 $170 \mu\text{L}$, 40 °C 氮气吹干后, 用 50% ACN 溶液 $50 \mu\text{L}$ 复溶, 涡旋 1 min 混匀, 4 °C、 $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清 $2 \mu\text{L}$ 进样。

标准溶液配制和质控 (QC) 样品配制 精密称量 *p*-CA、SaD、RA、SaB 对照品适量, 用 50% ACN 溶解, 从各对照品储备液中取 1.0 mL 混匀, 得到混合对照品储备溶液, 使终质量浓度分别为 50.05 、 47.51 、 120.01 和 $268.75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。IS 溶液称取适量 LMS 对照品, 用 50% ACN 溶解, 使终质量浓度为 $9.93 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。进一步将混合对照品储备液梯度稀释成对照品工作液。

血浆标准溶液的配制 取空白血浆 $50 \mu\text{L}$, 加入各对照品工作液 $10 \mu\text{L}$ 和 LMS (IS) 溶液 $10 \mu\text{L}$, 涡旋 30 s 混匀, 再加入 ACN $150 \mu\text{L}$, 涡旋 3 min 混匀后 4 °C、 $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清 $170 \mu\text{L}$, 40 °C 氮气吹干后, 用 50% ACN 溶液 $50 \mu\text{L}$ 复溶, 涡旋 1 min 混匀, 4 °C、 $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清 $2 \mu\text{L}$ 进样。各待测成分的血浆标准溶液浓度范围分别为: *p*-CA $0.02 \sim 10.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,

RA 0.047~24.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, SaD 0.15~9.50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, SaB 0.10~53.75 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

QC 对照品溶液的配制 精密称取适量 *p*-CA、SaD、RA、SaB 对照品并用 50% ACN 溶解, 得到混合对照品溶液, 再稀释成定量下限 (LLOQ)、低 (L)、中 (M)、高 (H) 的质控对照品溶液。

QC 样品溶液的配制 取适量 *p*-CA、SaD、RA、SaB 混合对照品溶液, 稀释成 5 倍定量下限 (LLOQ)、低 (L)、中 (M)、高 (H) 4 个 QC 浓度的质控对照品溶液。取空白血浆 50 μL , 加入稀释好的各浓度质控对照品溶液 10 μL 和 LMS (IS) 溶液 10 μL , 涡旋 30 s 混匀, 再加入 ACN 150 μL , 涡旋 3 min 混匀后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清 170 μL , 40 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干后, 用 50% ACN 溶液 50 μL 复溶, 涡旋 1 min 混匀, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清 2 μL 进样。

空白基质处理后再加对照品的配制 取空白血浆 50 μL , 加入 LMS (IS) 溶液 10 μL , 涡旋 30 s 混匀, 再加入 ACN 150 μL , 涡旋 3 min 混匀后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清 170 μL , 40 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干后, 加入 50% ACN 溶液 40 μL 复溶, 再加入稀释好的各浓度质控对照品溶液 10 μL , 涡旋 1 min 混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清 2 μL 进样。

全自动凝血仪测定凝血四项 取加入枸橼酸钠抗凝的全血样本, 按照全自动凝血仪使用说明进样, 测定 INR、PT、TT、APTT 和 FIB。

ELISA 试剂盒测定血小板指标 次日取血清样本解冻至室温, 按照 TXB₂、GP IIb/IIIa、CD62p、vWF 的 ELISA 试剂盒说明书操作步骤进行操作, PerkinElmer EnSpire 多功能酶标仪 450 nm 检测样本吸光度, 计算指标浓度。

统计学分析 血浆样品中药物的 PK 参数分析和生物等效性分析采用 DAS 3.2.8 软件 (中国药理学学会), 显著性分析采用 SPSS 22 ANOVA 分析或非参数检验, $P < 0.05$ 表示有显著性差异, $P < 0.01$ 表示有极显著性差异。绘图软件采用 GraphPad Prism 6。

结果

1 方法学实验

结果表明, 血浆内源性物质不干扰样品测定, 待测

成分与 LMS (IS) 的保留时间互不干扰, 如图 1 所示, 说明该分析方法的专属性较好。

进样血浆标准溶液, 以待测样品目标化合物峰面积与内标峰面积的比值对血浆中 *p*-CA、SaD、RA、SaB 的浓度进行线性回归, 得到血浆中各成分的线性回归方程如表 2 所示, 线性关系良好。

精密度与准确度按照质控样品项下分别制备 LLOQ 和 LQC、MQC 和 HQC 4 个质控样品, 平行 5 份, 每个样品连续进样 5 针, 分别测定日内和日间精密度及准确度, 结果显示: *p*-CA、SaD、RA 和 SaB 的日内、日间精密度 RSD 均 $< 14.86\%$, 准确度在 $84.84\% \sim 91.36\%$ ($n = 5$), 表明该分析方法的精密度与准确度较好。

提取回收率结果显示: *p*-CA、SaD、RA 和 SaB 的提取回收率在 $86.13\% \sim 93.71\%$, 表明该样品前处理方法提取回收率较好。基质效应按照方法项下分别制备 LQC、MQC 和 HQC 的混合对照品溶液和 QC 样品, 平行 5 份进样, 结果根据内标归一化公式计算, 显示基质效应在 $87.34\% \sim 92.42\%$, 表明该样品前处理方法基质影响较小。稳定性实验结果表明含药血浆在室温 8 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 24 h、7 d 和 -30°C 下 30 d 条件下, 反复冻融 3 次的稳定性较好。

2 DHI 中各成分的药时曲线和 PK 参数

第 14 d 大鼠尾静脉注射给予 DHI 溶液后, 血浆中各酚酸类成分的药时曲线见图 2, PK 参数见表 3、表 4。

3 DHI 中酚酸类成分的生物等效性分析

运用 DAS 3.2.8 生物等效性模块计算在 90% 置信区间, 联合用药组与单用药组各酚酸类成分的 C_{max} 和 AUC_{0-t} 是否在 $80\% \sim 125\%$ 内, 结果如表 4 所示。 *p*-CA 的 C_{max} 显示不等效, 但 AUC_{0-t} 等效; 而 RA、SaD、SaB 的 C_{max} 、 AUC_{0-t} 在 90% 置信区间的生物等效性统计结果均显示不等效。而联合用药组和单用药组各成分的 t_{max} 没有显著性差异。RA、SaD 和 SaB 均为 DHI 的主要药效成分。大鼠体内 PK 实验结果表明: DHI 使用 7 d 后, 再与 CFTX 联用 7 d, 将显著增加 DHI 的药效成分 RA、SaD 和 SaB 在大鼠体内的最高血药浓度和体内暴露量, 这将可能会影响 DHI 的药效。由于抗凝血、抗血栓和抗血小板是 DHI 的主要功效, 因此本文进一步考察了 CFTX 与 DHI 联合用药对 SD 大鼠体内抗凝血、抗血栓和抗血小板药效的影响。

Table 2 The linear regression calibration and LLOQ of the components in DHI

Compound	Linear regression calibration	Correlation coefficient/ r^2	Linearity range/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	LLOQ/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
<i>p</i> -CA	$Y = 3.5156x - 0.5174$	0.9982	0.02 - 10.00	0.02
SaD	$Y = 0.0142x - 0.0012$	0.9993	0.15 - 9.50	0.15
RA	$Y = 0.0356x + 0.0011$	0.9974	0.047 - 24.00	0.047
SaB	$Y = 0.0078x - 0.0007$	0.9975	0.10 - 53.75	0.10

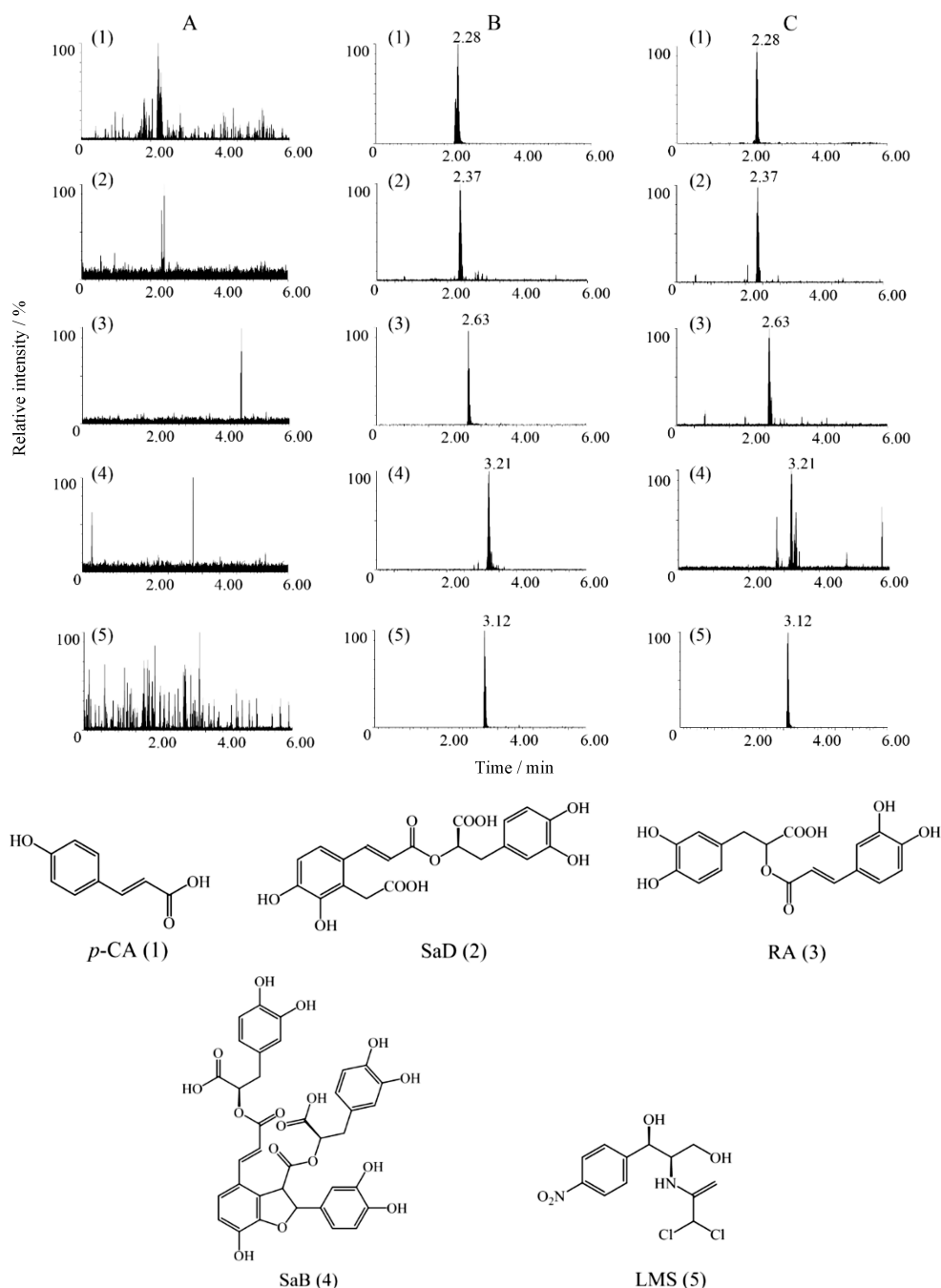


Figure 1 Total ion chromatogram (TIC) of *p*-CA, SaD, RA, SaB in DHI in negative mode. A: Blank plasma; B: Plasma standards and IS; C: Plasma samples

4 CFTX对DHI体内抗凝血、抗血栓和抗血小板功能的影响

SD大鼠体内抗凝血结果见图3A~E显示: 联合用药组与单用DHI组比较, 大鼠体内INR值升高21.27% ($P < 0.01$), PT、TT、APTT分别显著增加8.75% ($P < 0.05$)、31.23% ($P < 0.01$)和24.54% ($P < 0.01$), 而FIB没有显著性差异。表明在DHI-14 d的治疗过程中加入CFTX后, 可显著增加DHI在大鼠体内的抗凝血作用。

体内抗血栓结果如图3F显示: 联合用药组与DHI-

14 d组比较, 大鼠体内血清TXB₂水平降低43.48% ($P < 0.01$), 表示在DHI-14 d的治疗过程中加入CFTX, 并联用7 d后, CFTX可显著增加DHI在大鼠体内的抗血栓功效。

血小板膜蛋白CD62p和GP IIb/IIIa是血小板被激活时的表达在血小板膜表面的特异性蛋白, 在血小板静息状态下是不表达的, 因此两者可作为血小板活化的特异性标志物。而vWF是由内皮细胞和巨噬细胞合成, 储存在血管内皮细胞的W-P小体和血小板颗粒

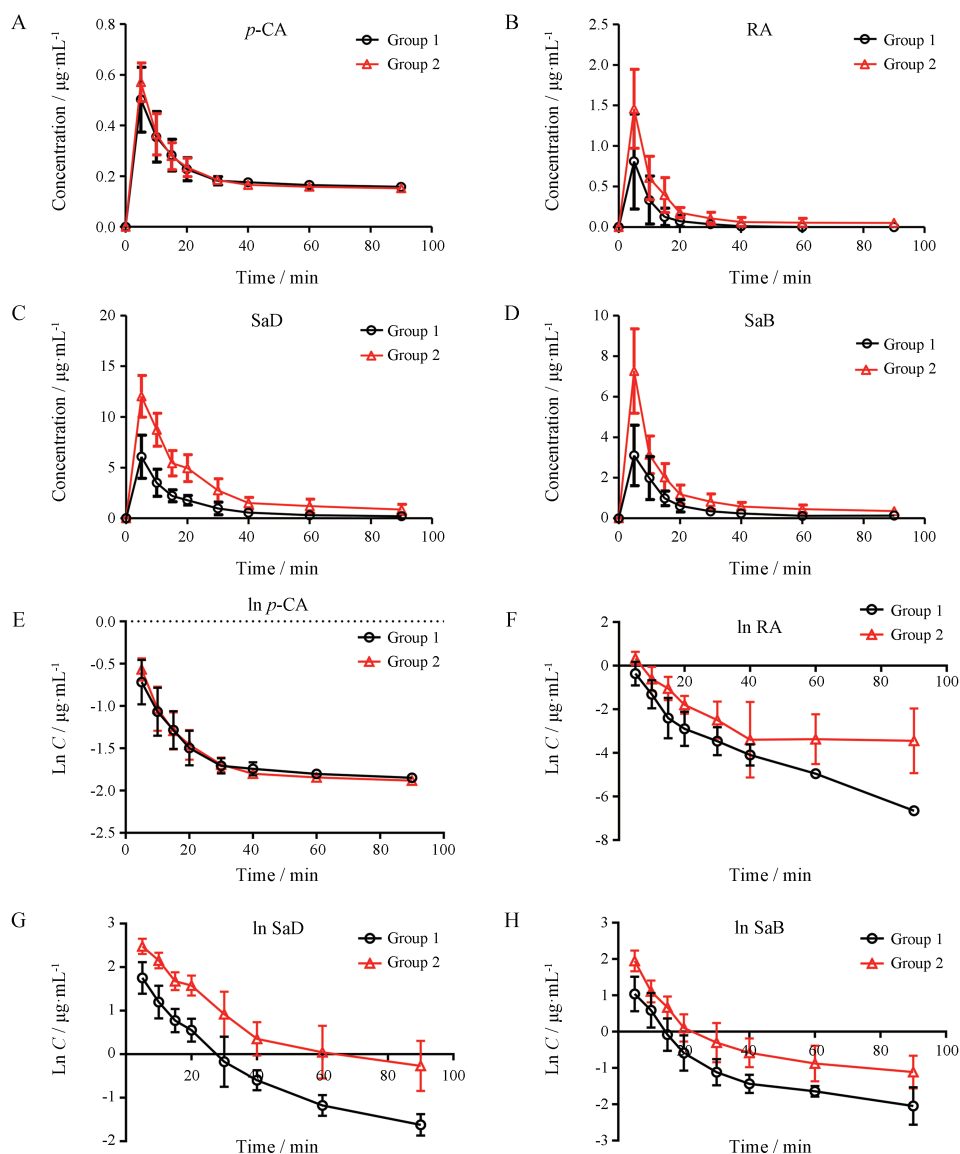


Figure 2 The concentration-time curve of the phenolic acids in DHI ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$). A: The concentration-time curve of *p*-CA in Group 1 (DHI-14 d) and Group 2 (DHI+CFTX-14 d+7 d); B: The concentration-time curve of RA in Group 1 (DHI-14 d) and Group 2 (DHI+CFTX-14 d+7 d); C: The concentration-time curve of SaD in Group 1 (DHI-14 d) and Group 2 (DHI+CFTX-14 d+7 d); D: The concentration-time curve of SaB in Group 1 (DHI-14 d) and Group 2 (DHI+CFTX-14 d+7 d); E-H: The ln concentration-time curve of *p*-CA, RA, SaD and SaB in Group 1 (DHI-14 d) and Group 2 (DHI+CFTX-14 d+7 d)

中,可同时与胶原纤维和血小板结合的中介。可以结合活化的血小板的vWF受体上,黏附在胶原纤维上,形成血栓,得以止血。SD大鼠体内抗血小板结果如图3中G-I所示: DHI+CFTX-14d+7d组与DHI-14d组比较,大鼠体内血清CD62p、GPIIb/IIIa和vWF水平有下降趋势,表示在DHI-14d的治疗过程中第8d加入CFTX联用,有增加DHI抗血小板药效的趋势。

讨论

中药注射剂临床应用的安全性一直被密切关注,其联合用药现象十分复杂,并受到严格监管,大部分品种限于二级及以上医院住院部和ICU被明确诊断有

相应适应症的患者^[23]。DHI用于心脑血管疾病患者,而这类患者多为老年人,机体免疫功能较低,并发疾病频繁,住院期间并发感染的几率高,常见与抗菌药物联用^[4]。在DHI不良反应的医嘱中,也常见DHI与抗菌药物联用。然而DHI与抗菌药物的药物相互作用研究相对浅显,多见于考察体外两药配伍后形成不溶性微粒^[15],但是临床输液已禁止这种配伍形式,因此与体外相互作用相比,体内相互作用的研究更贴合临床实际情况。

Li等^[24]已对DHI在不同物种体内的处置过程进行了系统的研究,结果表明DHI给药后,丹参素、SaD、紫草酸和*p*-CA在大鼠血中暴露水平较高,连续7d静脉

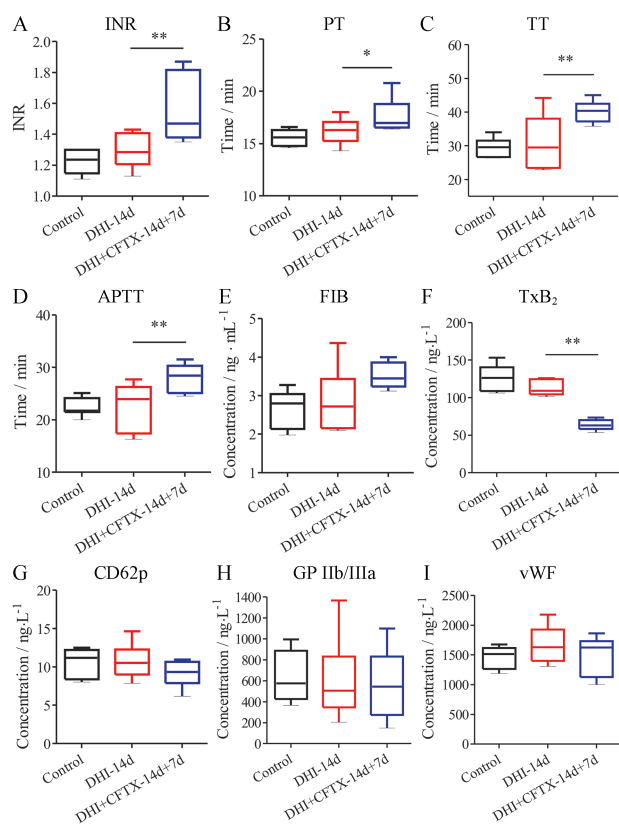


Figure 3 The influence of anticoagulation, antithrombosis and antiplatelet effects of DHI by CFTX on SD rats ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Group 1 (DHI-14d). INR: International normalized ratio; PT: Prothrombin time; TT: Thrombin time; APTT: Activated partial thromboplastin time; FIB: Fibrinogen; TXB₂: Thromboxane B₂; CD 62p: P-selectin; GP IIb/IIIa: Platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa; vWF: von Willebrand factor

输注, 这些成分在体内没有明显蓄积。本实验结果也与此接近。但由于在本实验设计中, CFTX对丹参素和紫草酸在大鼠体内血药浓度的影响并不显著; 且在后期实验中进一步考察CFTX对丹参素和紫草酸尿液排泄的影响, 发现CFTX对丹参素和紫草酸的排泄也没有显著影响, 因此丹参素和紫草酸的体内过程没有体现在本文的实验结果中。

本次PK实验结果表明: 在SD大鼠体内, 与单用药组相比, 联合用药组DHI中RA、SaD和SaB的 C_{max} 和体内暴露量显著增加, 生物等效性统计结果显示在90%置信区间不等效。这可能与CFTX和DHI中有效成分竞争性结合血清白蛋白及竞争性抑制肾脏摄入型转运体——有机阴离子转运蛋白OAT1和OAT3有关。

DHI中的RA、SaB和SaD主要经过尿液排泄, 其中SaD主要以原形排泄, 而RA和SaB是在经历II相代谢后, 再经过尿液排泄。但是在静脉注射DHI后4h内, 有相当的成分来不及被代谢, 就随着大鼠尿液被排

泄了, 这点在后期检测尿液中药物成分时已经得到了证实。在尿液排泄的过程中, 只有与蛋白结合的药物才能通过肾脏摄入型转运体进入肾小管上皮细胞, CFTX、RA、SaD和SaB都是蛋白结合率较高的化合物, 根据文献报道, 除SaD目前没有研究外, CFTX、RA和SaB都能够抑制OAT1和OAT3。在体外HEK293-hOAT1和HEK293-hOAT3细胞中, CFTX的抑制常数分别为0.23和4.39 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ [25], RA的抑制常数为0.35和0.55 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 而SaB的抑制常数为22.2和19.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ [26]。由于CFTX在体内血药浓度高于DHI中的任何一种成分, 且体内消除缓慢, 很可能会与DHI中的RA和SaB竞争性抑制OAT1和OAT3, 影响RA和SaB的尿液排泄, 进一步影响RA和SaB的血药浓度。但具体机制仍需进一步实验研究。

而药效实验结果表明: CFTX还可增强DHI抗凝血和抗血栓的作用。DHI对高脂血症模型大鼠有显著的抗凝血、抗血栓和抗血小板作用[27], 并有广泛的抗炎作用, 能够有效降低脂多糖刺激引起的系统性炎症反应模型大鼠血清中iNOS、COX-2、IL-1 β 、IL-6、MCP-1和TNF- α 的水平[28], 其中RA、SaD和SaB都是DHI抗炎系统炎症反应的主要成分[29]。本实验结果表明: DHI联合使用CFTX能够显著降低SD大鼠血清TXB₂水平, 表现出增强抗血栓作用, 这可能与CFTX协同DHI干预COX-2途径生成TXB₂有关。CFTX与DHI联用也有降低IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平的趋势, 但没有显著性差异, 因此这部分实验结果没有在本文中体现, 出现这些结果的原因可能与本实验所用的健康SD大鼠有关。具体机制仍需进一步实验研究。

综上所述, 在健康大鼠体内, CFTX既能在PK方面增加DHI中酚酸类成分RA、SaB和SaD的血药浓度和体内暴露量, 又能在PD方面协同DHI增强抗凝血和抗血栓的作用。但由于疾病模型和健康大鼠存在差异, 因此该结论是否适用于疾病模型大鼠, 仍需设计实验验证。虽然通过前期文献考察, CFTX和DHI在大鼠和人体内的过程比较接近, 但大鼠与人仍存在种属差异, 因此两者联用在人体内是否可能出现和大鼠体内相似的PK和PD结果, 也有必要开展相关临床研究, 以保证患者的联合用药安全。

References

- [1] Peng B, Li JR, He R. The research status of herb-drug interactions [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med (世界科学与技术-中药现代化), 2010, 12: 260-264.
- [2] Gurwitz JH, Field TS, Harrold LR, et al. Incidence and preventability of adverse drug events among older persons in the ambu-

- latory setting [J]. JAMA, 2003, 289: 1107-1116.
- [3] Ning DX, Yang XY, Liu NA, et al. Hospital infection in 326 patients with cardiovascular disease: analysis and tactics [J]. Chin J Nosocomiol (中华医院感染学杂志), 2006, 16: 152-153.
- [4] Kuang YT, Xu J, He HS. Incidence of nosocomial infections in department of cardiovascular medicine of tertiary hospitals in Hangzhou [J]. Chin J Nosocomiol (中华医院感染学杂志), 2013, 23: 310-312.
- [5] Wang YY, Kou JL, Gao Y, et al. Species and antibiotics resistance of pathogens isolated from hospitalized senile patients with cardiovascular disease [J]. Chin J Nosocomiol (中华医院感染学杂志), 2011, 21: 2112-2114.
- [6] Li Y, Zuo YL. Risk factors for pulmonary infections in patients with cardiovascular diseases [J]. Chin J Nosocomiol (中华医院感染学杂志), 2012, 22: 2050-2052.
- [7] Wang FY. Causes and countermeasures for pulmonary infections in hospitalized patients with cardiovascular diseases [J]. Chin J Nosocomiol (中华医院感染学杂志), 2013, 23: 1012.
- [8] Li GH, Jiang HY, Xie YM, et al. Analysis of traditional Chinese medicine syndrome, traditional Chinese medicine and western medicine in 84697 patients with coronary heart disease based on big data [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2014, 39: 3462-3468.
- [9] Chinese Academy of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine brain and mind Tongzhi Specialized Committee, Chinese Medical Doctor Association Expert Committee on Integrated Traditional Chinese and Western Medicine. Consensus of Chinese experts on clinical application of Danhong Injection [J]. Chin J Integr Med (中国中西医结合杂志), 2018, 38: 389-397.
- [10] Li JP, Guo JM, Huan YQ, et al. The mixture of *Salvia miltiorrhiza-Carthusus tinctorius* (Danhong injection) alleviates low-dose aspirin induced gastric mucosal damage in rats [J]. Phytomedicine, 2016, 23: 662-671.
- [11] Wang YY, Xu QS. Effects of Danhong Injection on antiplatelet and gastric mucosal injury of aspirin in patients with coronary heart disease [J]. Shandong Med J (山东医药), 2018, 34: 44-47.
- [12] Li XL, Zhang F, Li WX, et al. Interaction between Danhong injection and aspirin based on human liver microsome CYP 1A2 [J]. Chin J New Drug (中国新药杂志), 2018, 27: 1034-1039.
- [13] Tang JF, Zhang F, Li WX, et al. Interactions between Danhong injection and aspirin based on CYP 2C9 isoform enzyme [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2018, 40: 1700-1704.
- [14] Zhang Q, Ju WZ, Guo JM, et al. Rationality analysis of clinical application of Danhong injection in affiliated hospital of Nanjing University of Chinese medicine from 2013 to 2014 [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2016, 41: 748-754.
- [15] Li JP, Guo JM, Duan JA, et al. Literature study of drug combination type and incompatibility of Traditional Chinese Medicine injections [J]. Chin J Pharmacov (中国药物警戒), 2014, 11: 432-438.
- [16] Popick AC, Crouthamel WG, Bekersky I. Plasma protein binding of ceftriaxone [J]. Xenobiotica, 1987, 17: 1139-1145.
- [17] Zhang Q, Dai GL, Ju WZ, et al. Determination of binding rates of human plasma protein with seven bioactive components in Danhong injection [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2017, 33: 712-719.
- [18] Shao X, Ai N, Xu DH, et al. Exploring the interaction between *Salvia miltiorrhiza* and human serum albumin: insights from herb-drug interaction reports, computational analysis and experimental studies [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2016, 161: 1-7.
- [19] Jing CJ, Chen XH, Liu X, et al. Determination of the binding rate of rat plasma protein with salvianolic acid B [J]. Acta Pharm Sin (药理学学报), 2010, 45: 343-346.
- [20] Thomas RC, Stephanie B. Elevated international normalized ratio values associated with concomitant use of warfarin and ceftriaxone [J]. Am J Health-Syst Pharm, 2011, 68: 1603-1605.
- [21] Yu J, Yang LH, Hu CQ, et al. Degradation test of ceftriaxone sodium and structure identification of its degradation products [J]. Central South Pharm (中南药学), 2014, 12: 106-109.
- [22] Li JP, Liu Y, Guo JM, et al. A comprehensive strategy to evaluate compatible stability of Chinese medicine injection and infusion solutions based on chemical analysis and bioactivity assay [J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 1-12. DOI:10.3389/fphar.2017.00833.
- [23] Ministry of Human Resources and Social Security of the People's Republic of China. Drug catalogue of National Basic Medical Insurance, Industrial Injury Insurance and Birth Insurance (2017) [EB/OL]. Beijing, 2017 [2017-02-21]. http://www.mohrss.gov.cn/SYRlzyshbzb/shehuibaozhang/zcwj/yiliao/201702/t20170223_266775.html.
- [24] Li MJ, Wang FQ, Huang YH, et al. Systemic exposure to and disposition of catechols derived from *Salvia miltiorrhiza* roots (Danshen) after intravenous dosing Danhong injection in human subjects, rats, and dogs [J]. Drug Metab Dispos, 2015, 43: 679-690.
- [25] Michio T, Ellappan B, Shinichi N, et al. Interaction of human organic anion transporters with various cephalosporin antibiotics [J]. Eur J Pharmacol, 2002, 438: 137-142.
- [26] Wang L, Jurgen V, Douglas HS. Cumulative organic anion transporter-mediated drug-drug interaction potential of multiple components in *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) preparations [J]. Pharm Res, 2014, 31: 3503-3514.
- [27] Fan HJ, Li M, Yu L, et al. Effects of Danhong injection on platelet aggregation in hyperlipidemia rats [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 212: 67-73.
- [28] Gao LN, Cui YL, Wang QS, et al. Amelioration of Danhong injection on the lipopolysaccharide-stimulated systemic acute inflammatory reaction via multi-target strategy [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 149: 772-782.
- [29] Jiang XQ, Lv B, Li P, et al. Bioactivity-integrated UPLC/Q-TOF-MS of Danhong injection to identify NF- κ B inhibitors and anti-inflammatory targets based on endothelial cell culture and network pharmacology [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 174: 270-276.