基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001300

丹参酮对左氧氟沙星在盆腔炎模型大鼠子宫组织中分布的影响

汤成泳[1],孔令希[1],罗 成[2],周远大[1],邱 峰[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院药学部,重庆 400016;2. 中航工业三六三医院药学部,成都 600041)

【摘 要】**目的**:探讨丹参酮对左氧氟沙星在盆腔炎模型大鼠子宫组织中分布的影响。**方法**:选取 96 只盆腔炎模型大鼠,随机分为实验组和对照组,每组 48 只,实验组肌注丹参酮(8 mg/kg),对照组肌注相同体积生理盐水;1 h 后,2 组动物均按 80 mg/kg 灌服左氧氟沙星(Levofloxacin,LVFX),于灌服 LVFX 后的 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、4.0、8.0、12.0 h 不同时间点,2 组动物分别处死大鼠 6 只,采集血浆和子宫组织。高效液相色谱法法测定血浆和子宫组织中 LVFX 浓度,DAS2 计算药动学参数。**结果**:实验组和对照组血浆与子宫组织血药浓度-时时间曲线均为二室模型,主要药动学参数列举如下:血浆中峰浓度 C_{max} 分别为(14.341 ± 1.551) μg/mL 和(12.780 ± 1.062) μg /mL,子宫组织中 C_{max} 分别为(13.910 ± 1.704) μg/mL 和(11.671 ± 1.134) μg /mL(P<0.05);血浆中达峰时间 t_{max} 分别为(1.329 ± 0.269) h 和(1.249 ± 0.264) h,子宫组织中 t_{max} 分别为(1.419 ± 0.380) h,(1.280 ± 0.270) h;血浆中药物的半衰期 $t_{1/2\beta}$ 分别为(6.284 ± 1.132) h 和(5.442 ± 2.590) h,子宫组织中 $t_{1/2\beta}$ 分别为(7.920 ± 2.802) h 和(3.894 ± 1.595) h(P<0.05);血浆中曲线下面积 AUC_{0-t} 分别为(62.667 ± 4.516) μg·h/mL 和(55.693 ± 3.138) μg·h/mL(P<0.05),子宫组织中 AUC_{0-t} 分别为(55.518 ± 11.709) μg·h/mL 和(40.374 ± 2.892) μg·h/mL(P<0.05)。**结论**:丹参酮能明显增加盆腔炎模型大鼠子宫组织中左氧氟沙星的分布。

【关键词】丹参酮;左氧氟沙星;盆腔炎模型;高效液相色谱法

【中图分类号】R965;R-332 【文献标志码】A 【收稿日期】2017-03-01

Effect of Tanshinone on distribution of Levofloxacin in uterine tissues of pelvic inflammatory rat models

Tang Chengyong[1], Kong Lingxi[1], Luo Cheng[2], Zhou Yuanda[1], Qiu Feng[1]

(1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Department of Pharmacy, the China Aviation Industrial 363 Hospital)

【Abstract】***Objective***: To study the effect of tanshinone on distribution of levofloxacin in uterine tissues of pelvic inflammatory rats model. ***Methods***: Totally 96 rats in pelvic inflammatory model were randomly divided into experimental group and control group with 48 rats in each. Experimental group received tanshinone(8 mg/kg) while rats in the control group were administered with the same volume of saline. After 1 h, rats in both groups were given levofloxacin orally(80 mg/kg). Six rats in both groups were sacrificed for collecting plasma and uterine tissues respectively at the time points of 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 8.0 and 12.0 hour post the administration of levofloxacin. Concentrations of levofloxacin in plasma and uterine tissues were determined by high performance liquid chromatography(HPLC) and the pharmacokinetics parameters were calculated with DAS2 software program. ***Results***: The concentration curves based on drug-time in experimental and control group both fitted two-compartment model. The main pharmacokinetics parameters in plasma and uterine tissues were listed as follows: C_{max} were (14.341 ± 1.551) μg/mL and (12.780 ± 1.062) μg/mL for plasma, (13.910 ± 1.704) μg/mL and(11.671 ± 1.134) μg/mL(P<0.05) for uterine tissues. t_{max} were (1.329 ± 0.269) h and (1.249 ± 0.264) h for plasma, (1.419 ± 0.380) h and (1.280 ± 0.270) h for uterine tissues. $t_{1/2\beta}$ were (6.284 ± 1.132) h and (5.442 ± 2.590) h for plasma, (7.920 ± 2.802) h and(3.894 ± 1.595) h(P<0.05) for uterine tissues. AUC_{0-t} were (62.667 ± 4.516)μg·h/mL and (55.693 ± 3.138) μg·h/mL(P<0.05) for plasma, (55.518 ± 11.709) μg·h/mL and (40.374 ± 2.892) μg·h/mL(P<0.05) for uterine tissues. ***Conclusion***: Tanshinone can increase the distribution of Levofloxacin in the uterine tissues of pelvic inflammatory rat models.

【Key words】tanshinone; levofloxacin; pelvic inflammatory model; high performance liquid chromatography

作者简介:汤成泳,Email:tcyongwzj@163.com,

研究方向:新药开发及药代动力学。

通信作者:邱 峰,Email:qiufeng.cn@outlook.com。

基金项目:重庆市教委科学技术研究资助项目(编号:KJ1400220)。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170609.1104.010.html (2017-06-09)

盆腔炎性疾病（pelvic inflammatory disease，PID）是妇产科常见的病种之一，近年来发病率呈现逐年上升趋势，主要是由病原菌侵入盆腔内部脏器、子宫及周围结缔组织或周围组织所致[1]。慢性盆腔炎常反复发作，严重影响妇女的生殖健康。文献表明，左氧氟沙星（levofloxacin，LVFX）是目前治疗盆腔炎效果较佳的抗菌药物[2]，它是氧氟沙星的旋光异构体，可通过抑制细菌脱氧核糖核酸（DNA）旋转酶的活性，阻止细菌 DNA 复制发挥作用，具有抗菌作用强、抗菌谱广的特点，适用于敏感菌引起的轻、中度的泌尿生殖系统感染，尤其是盆腔炎感染[3]。

丹参（*Salvia miltiorrhiza Bunge*）为唇形科鼠尾草属多年生草本植物，文献报道[4]，丹参中丹参酮ⅡA 是其主要有效成分之一，具有抗炎抑菌、抗氧化、抗凝、促纤溶以及扩张血管，改善微循环的作用，临床上应用于消化性溃疡[5]、宫颈糜烂[6]、痤疮[7]及各种外科感染和脓性感染，如骨关节化脓性感染、蜂窝织炎、乳腺炎、丹毒等[8]。

慢性盆腔炎疗程通常较长，长期使用抗菌药物易导致菌群失调或耐药，使治疗药效减弱，病情复发。近来有报道采用中西医结合，在应用抗生素的基础上联合使用含有丹参酮的中药配方或丹参酮注射液，通过活血行气，散瘀止痛以增强疗效[9-10]。

但是联合使用丹参酮注射液是否影响抗生素如左氧氟沙星在血液中的浓度及其在盆腔组织的分布尚不清楚，因此认为有必要从药动学方面探讨联合用药的依据。本文中采用盆腔炎模型大鼠为研究对象，观察丹参酮对左氧氟沙星在模型大鼠血浆中的浓度及在子宫组织中分布的影响，以探讨其抗菌药物疗效的增强是否与影响抗菌药物在组织中分布有关。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物与试剂 丹参酮ⅡA 磺酸钠（丹参酮）注射液，上海第一生化药业有限公司生产，国药准字 H31022558，规格 2 mL:10 mg，肌注；盐酸左氧氟沙星片（商品名：来立信），规格：200 mg/片，批号：080313，浙江医药股份有限公司新昌制药厂生产；左氧氟沙星标准品，中国药品生物制品检定所出品，批号：130455-200604，纯度：97.3%；环丙沙星（ciprofloxacin，CF，内标），上海制药二厂生产，批号：910910，纯度 95.5%；甲醇（分析纯），重庆川东化工有限公司生产，批号：20101101；四丁基溴化铵（分析纯），中国医院上海化学试剂站生产，批号：980420；二氯甲烷（色谱纯），安徽时联特种溶剂股份有限公司生产，批号：6603BT03；ATCC25922 标准菌株，浓度 6×10^9 CFU/mL，重庆医科大学附属第一医院传染科实验室提供。

1.1.2 仪器 日本岛津 LC-20A 高效液相色谱系统；BP61 型电子天平（德国 Sartorius 公司）；GF-1 型高速分散器（江苏其林医用仪器厂）；SK-1 快速混匀器（江苏中大仪器厂）；B160A 型医用高速台式离心机（河北省安新县白洋离心机厂）。

1.1.3 动物 健康合格 SD 雌性大鼠 100 只，质量 180~200 g，由重庆医科大学实验动物中心提供，合格证号 SCXK（渝）2012-0002。

1.2 方 法

1.2.1 大鼠急性盆腔炎模型的建立 参照文献[11-12]，选取 180~200 g 雌性 SD 大鼠 100 只，3%戊巴比妥钠 30 mg/kg ip 麻醉，常规消毒，开腹，暴露子宫、卵巢，用 4 号针分别经子宫分叉处进针，机械损伤子宫内膜组织，然后向卵巢方向每只大鼠的子宫内缓慢注入 ATCC25922 标准菌株，浓度为 6×10^9 CFU/mL 菌液 0.2 mL，注毕分层缝合关腹，消毒术区。术后第 4 天，可见子宫腔扩大，浆膜面肿胀、充血，损伤部位颜色暗红式充血，卵巢出现个别白色脓点，经鉴定造模成功。

1.2.2 色谱条件 色谱柱：Amethyst C18-H 柱（100 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：0.008 mol/L 甲醇-0.5 mol/L 磷酸盐缓冲液-四丁基溴化铵（25:75:4，V/V/V）；流速：0.4 mL/min；检测波长：290 nm；柱温：40 ℃；进样量：40 μL；内标：环丙沙星。

1.2.3 样品采集 将建模成功的 96 只大鼠，按完全随机分组法分为丹参酮实验组和对照组，每组 48 只。丹参酮组动物按 0.8 mL/kg 肌注丹参酮注射液（8 mg/kg）；对照组按相同体积肌注生理盐水。1 h 后实验组和对照组动物均按 80 mL/kg 体质量灌服左氧氟沙星溶液。于给药后 0.25、0.5、1、1.5、2、4、8 和 12 h 8 个时间点各处死大鼠 6 只，采集血液 5 mL 和子宫组织（约 2 g）。前者肝素抗凝、离心、取血浆；后者称质量，制成匀浆液 5 mL。均放置于-20 ℃冰箱备用。

1.2.4 样品处理 分别取血浆、子宫组织匀浆上清液 500 μL，均加入 33.6 μg/mL 的内标 CF 20 μL，涡旋 10 s 混匀后，加入 4 mL 二氯甲烷，涡旋提取 1 min，3 000 r/min 离心 5 min，静置分层，取下层有机相 3 mL，于 50 ℃水浴中氮气吹干，100 μL 流动相复溶，进样 40 μL。

1.3 统计分析方法

采用 DAS2 软件计算药动学参数，SPSS 13.0 统计软件进

行统计分析，数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，组间行 t 检验，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 色谱行为

在本实验的色谱条件下，血浆、子宫组织中 LVFX 与内标 CF 二者峰形良好，且二者不受内源性物质干扰，分离度良好（R>1.5），见图 1。

2.2 标准曲线、线性关系、最低定量浓度

在空白血浆和空白子宫组织匀浆液中添加 LVFX 使其浓度分别为：17.900、8.950、4.475、2.238、1.120、0.560、0.280、0.140 μg/mL 和 7.160、3.580、1.790、0.895、0.448、0.224、0.112、0.056 μg/mL，按样品处理项下操作测定，所得数据经回归，得血浆、子宫组织匀浆标准曲线方程。血浆 LVFX 峰面积/CF 面积 Y_1 与 LVFX 浓度 X_1 的关系为：Y_1=3.323 $1X_1$−0.332 6，在 0.140~17.900 μg/mL 范围内线性关系良好，r=0.999 5；子宫组织匀浆 LVFX 峰面积/CF 面积 Y_2 与 LVFX 浓度 X_2 的关系为：Y_2=3.023 $5X_2$−0.342 7，在 0.056~7.160 μg/mL 范围内线性关系良好，r=0.999 2。

2.3 检测限与定量限

在空白血浆和空白子宫组织匀浆液中分别添加 LVFX 使其浓度约为 1.0 μg/mL，按“2.4”项下操作测定，记录峰面积，以信噪比 3:1 和 10:1 分别计算出二者的检测限和定量限。结果测得血浆中 LVFX 的检测限和定量限分别为 0.042 μg/mL 和 0.140 μg/mL，子宫组织中 LVFX 的检测限和定量限分别为 0.017 μg/mL 和 0.056 μg/mL。

2.4 回收率与精密度

按照样品处理项下操作，取 8.950、2.238、0.280 μg/mL 高、中、低 3 个浓度血浆样品，及 3.580、0.895、0.224 μg/mL 高、中、低 3 个浓度子宫组织匀浆样品，每个浓度各 5 份，评价本法测定血浆和子宫组织匀浆中 LVFX 含量的回收率和

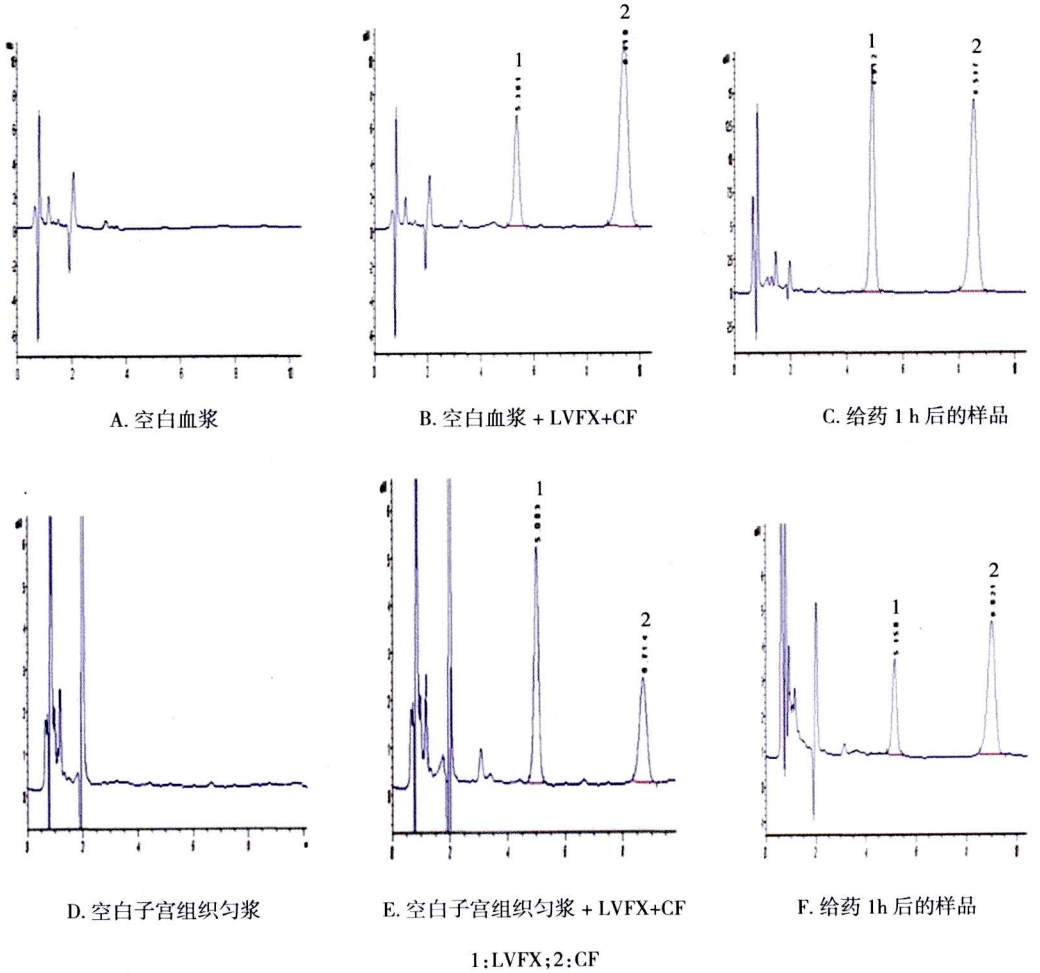


图 1 血浆、子宫组织匀浆中 LVFX 色谱图

Fig.1 Chromatograms of LVFX in rat plasma and uterine samples

日内(每个浓度 1 d 内测 5 次)、日间(每个浓度连续测 5 d，每天测 1 次)相对标准差(RSD)见表 1。

表 1 血浆和子宫组织匀浆中 LVFX 的回收率及日内、日间精密度测定结果($\bar{x}\pm s$,n=5)

Tab.1 Intra-day and inter-dayprecision and recovery rate of LVFX in rats plasma and uterine samples($\bar{x}\pm s$,n=5)

组织	加入浓度 (μg/mL)	RSD(%) 日内	RSD(%) 日间	回收率(%)
血浆	8.950	0.618	5.958	98.088±5.840
	2.240	1.702	7.215	100.020±7.208
	0.280	6.765	5.156	98.168±5.059
子宫组织匀浆	3.580	6.980	9.874	96.848±9.561
	0.895	3.084	3.106	98.438±3.049
	0.224	5.672	5.150	101.234±8.047

2.5 冻融稳定性

将高、中、低 3 个浓度(8.950、2.238、0.280 μg/mL)的血浆和(3.580、0.895、0.224 μg/mL)子宫组织匀浆样品，反复冷冻，融化，再按样品处理项下操作，测定 3 次，考察其冻融稳定性。结果表明反复冻融测定 LVFX 的 RSD 值均在 15%以下，表明该测定方法稳定性良好，不受样品反复冻融的影响，结果见表 2。

表 2 冻融稳定性考察结果($\bar{x}\pm s$,n=3)

Tab.2 Results of stability from freezing test($\bar{x}\pm s$,n=3)

加入浓度(μg/mL) 血浆	加入浓度(μg/mL) 子宫	实测浓度(μg/mL) 血浆	实测浓度(μg/mL) 子宫	RSD(%) 血浆	RSD(%) 子宫
8.950	3.580	9.060±0.541	3.530±0.118	6.693	5.962
2.240	0.895	2.274±0.130	0.917±0.045	9.665	5.711
0.280	0.224	0.283±0.025	0.229±0.011	10.608	8.930

2.6 左氧氟沙星药-时浓度数据

实验组(丹参酮+LVFX)与对照组(单剂 LVFX)二者血浆、子宫组织匀浆的浓度-时间曲线如图 2、3。

2.7 药动学参数

实验组与对照组血浆、子宫组织匀浆浓度-时间数据采用计算机 DAS2 软件程序自动拟合，结果表明二者灌服左氧氟沙星后的药-时数据均符合二室药动学模型，有关药动学参数见表 3。由表 3 知，两组之间血浆中 LVFX 的药动学参数除药-时曲线下面积 AUC 外，其他均无统计学差异，血浆中实验组和对照组 AUC_{0-t} 分别为(62.667±4.516) μg·h/mL 和(55.693±3.138) μg·h/mL(P<0.05)。子宫组织中 LVFX 的药代动力学参数如达峰浓度 C_{max} 和药-时曲线下面积 AUC_{0-t} 均有显著差异。实验组与对照组 C_{max} 分别为(13.910±1.704) μg/mL 和(11.671±1.134) μg/mL(P<0.05)；AUC_{0-t} 分别为(55.518±11.709) μg·h/mL 和(40.374±2.892) μg·h/mL(P<0.05)。

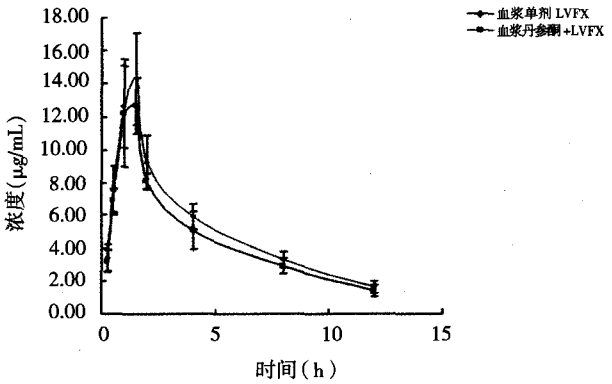


图 2 大鼠血浆平均药物浓度-时间曲线(n=6)

Fig.2 Plasma concentration-time curves of LVFX in rats (n=6)

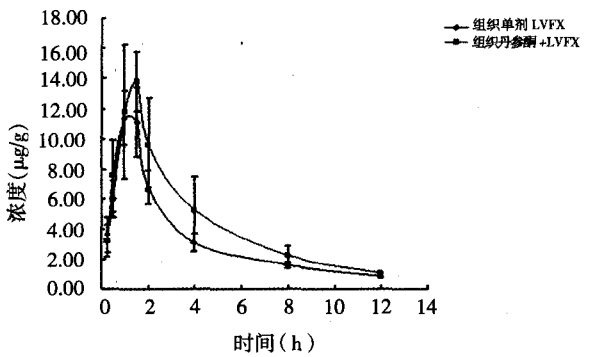


图 3 大鼠子宫组织平均药物浓度-时间曲线(n=6)

Fig.3 Uterine tissue concentration-time curves of LVFX in rats (n=6)

3 讨 论

文献报道[13]，左氧氟沙星的测定方法，微生物法、沉淀法存在专属性差、误差偏大等缺点。本研究采取高效液相色谱法，以二氯甲烷一次性萃取，流动相采取低浓度甲醇配以较高浓度的磷酸盐缓冲液与四丁基溴化铵，避开了生物组织中杂质对药物峰的影响，分离度高，峰形好，因此本法操作简单，稳定可靠，可应用于生物样本测定。

本实验以大鼠盆腔炎模型为对象，用 HPLC 法检测其血液及子宫组织中左氧氟沙星的浓度，考察丹参酮对左氧氟沙星在盆腔炎模型大鼠子宫组织中浓度的影响，进而从药动学方面探讨联合应用丹参酮和左氧氟沙星是否具有临床意义。本实验结果表明，血液中两组间 AUC_{0-t} 虽有差异，但 C_{max} 值未见显著增高，提示丹参酮对盆腔炎模型大鼠血液中左氧氟沙星的浓度影响不大。而模型大鼠丹参酮Ⅱ

表 3 大鼠口服左氧氟沙星后的药代动力学参数（$\bar{x} \pm s, n=6$）

Tab.3 Pharmacokinetic parameters of LVFX after oral administration in rats（$\bar{x} \pm s, n=6$）

参数	血浆		t 值	P 值	子宫组织		t 值	P 值
	对照组	实验组			对照组	实验组		
$t_{1/2\beta}$/h	5.442 ± 2.590	6.284 ± 1.132	0.667	0.267	3.894 ± 1.595	7.920 ± 2.802[a]	2.792	0.019
t_{max}/h	1.249 ± 0.264	1.329 ± 0.269	0.475	0.328	1.280 ± 0.270	1.419 ± 0.380	0.667	0.267
C_{max}/μg/mL	12.780 ± 1.062	14.341 ± 1.551	1.857	0.061	11.671 ± 1.134	13.910 ± 1.704[a]	2.446	0.029
CL/L/(kg·h)	1.262 ± 0.174	1.108 ± 0.122	1.620	0.083	1.748 ± 0.115	1.423 ± 0.376	1.848	0.062
AUC_{0-t}/μg·h/mL	55.693 ± 3.138	62.667 ± 4.516[a]	2.546	0.026	40.374 ± 2.892	55.518 ± 11.709[a]	2.808	0.019
$AUC_{0-\infty}$/μg·h/mL	63.004 ± 3.381	71.283 ± 6.310[a]	2.586	0.025	45.869 ± 2.890	60.764 ± 12.503[a]	2.595	0.024

注：与对照组相比，a：$P<0.05$

A配伍左氧氟沙星在子宫组织中的 C_{max} 和 AUC_{0-t} 分别为（13.910 ± 1.704）μg/g 和（55.518 ± 11.709）μg·h/mL，与单用左氧氟沙星（11.671 ± 1.134）μg/g 和（40.374 ± 2.892）μg·h/mL 相比均有统计学差异（$P<0.05$）。同时药物半衰期 $t_{1/2\beta}$ 显著增加，分别为（3.894 ± 1.595）h 和（7.920 ± 2.802）h（$P<0.05$）。该结果表明，丹参酮能明显提高盆腔炎大鼠子宫组织中左氧氟沙星的浓度，增加其在子宫组织中的分布，这可能与其提高抗炎作用相关。本研究推测可能由于是盆腔炎组织中血流差，盆腔黏性积液增多，使得组织中的药物浓度很难达到有效治疗浓度，而丹参酮具有活血化瘀、扩张血管、改善外周血液循环、促进微循环血液流通，增加毛细血管网的功效，因此有效提高药物在盆腔炎组织中的浓度。同时丹参酮能抑制炎症细胞和细菌的增殖，增加吞噬细胞数量，提高吞噬能力，增加炎性组织供氧、促进新陈代谢，有利于炎性产物吸收，减轻由于淤血、水肿所致的张力性疼痛[14]，加快药物从血液向组织的转运，获得更高临床疗效。

该结果提示丹参酮与左氧氟沙星的联用在盆腔炎的治疗中有重要的临床意义。本研究从药动学角度积极探索盆腔炎的药物联用，为临床用药提供一定的理论支持。

参 考 文 献

[1] 黄春梅. 盐酸左氧氟沙星治疗妇科盆腔炎的疗效分析[J]. 心理医生杂志，2012,8(2):296-270.

[2] 强烈应，史小四，徐 丽，等. 盐酸左氧氟沙星用于妇科盆腔炎疗效观察及安全性评价[J]. 现代中西结合杂志，2009,18(32):3939-3942.

[3] 闵蓉平. 盐酸左氧氟沙星治疗 126 例盆腔炎疗效及安全性分析[J]. 吉林医学，2011,32(27):5714.

[4] 梁 勇，羊裔明，袁淑兰. 丹参酮药理作用及临床应用研究进展[J]. 中草药，2000,31(4):304-306.

[5] 张向荣，潘卫三，胡 军. 丹参对消化性溃疡的研究概况[J]. 中草药，2000,31(8):附 11.

[6] 季宇彬. 中药有效成分药理作用与应用[M]. 哈尔滨：黑龙江科学技术出版社，1995:112-118.

[7] 周 华，沈永年，吴绍熙. 丹参酮治疗痤疮及对皮脂和丙酸杆菌敷的影响[J]. 中华皮肤科杂志，1992,25(1):3.

[8] 刘 娟，刘 颖. 丹参药理活性成分研究进展[J]. 辽宁中医学院学报，2010,12(7):15-17.

[9] 廖建容. 替硝唑联合丹参酮治疗慢性盆腔炎 106 例疗效观察[J]. 世界最新医学信息文摘，2013,13(12):187.

[10] 廖文平. 药物治疗慢性盆腔炎临床分析[J]. 中国医药导报，2013,15(8):1409-1410.

[11] 赵 琳，宋殿荣. 盆腔炎性疾病实验模型的研究进展[J]. 医学综述，2013,19(10):1787~1790.

[12] 吴在德，吴肇汉. 外科学[M]. 6 版，北京：北京人民卫生出版社，2003:709-710.

[13] 孙春华，李可欣，曹国颖. 健康受试者口服 Levofloxacin 的药代动力学研究[J]. 中国药房，1995,6(11):23.

[14] 李建恒，乔亚君，侯力峰，等. 丹参脂溶性有效成分丹参酮研究进展[J]. 河北大学学报（自然科学版），2015,35(2):217-224.

（责任编辑：方 济）