# 黄芪甲苷在正常小鼠与2型糖尿病肾病 db/db 小鼠体内分布差异的比较研究

石　亚[1],刘　文[1*],王永林[2],巩仔鹏[2],王　群[1],李勇军[2],金　阳[1],姚晓艳[1]

[1]贵州中医药大学药学院,贵阳 550025;[2]贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室,贵阳 550004

**摘　要**:为研究黄芪甲苷(Astragaloside IV,AS-Ⅳ)在正常小鼠(db/m)和2型糖尿病肾病(db/db)小鼠体内的组织分布差异,为AS-Ⅳ抗2型糖尿病肾病的临床运用及新药研发提供实验依据。以尾静脉注射给予2型糖尿病肾病(db/db)和正常小鼠(db/m)小鼠AS-Ⅳ,剂量为8 mg/kg。于15 min、2 h、4 h时处死小鼠,收集心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠、脑、肌肉组织,采用HPLC-MS/MS法测定各组织中AS-Ⅳ含量,对比AS-Ⅳ在正常及病理状态下,在各组织中的分布差异。在2型糖尿病肾病状态下,AS-Ⅳ在肝、脾、肺、肾组织中浓度分别为349.72±70.72、370.69±45.46、5 830.65±581.75、4 290.63±485.34 ng/mL;正常状态下,AS-Ⅳ在肝、脾、肺、肾组织中浓度分别为202.47±47.96、267.92±41.24、4 725.80±867.51、2 354.55±256.11 ng/mL,在2型糖尿病肾病状态下,AS-Ⅳ在肝、脾、肺、肾组织中浓度显著高于其在正常组织中浓度($P<0.05$)。静脉注射给药后,肺、肾、心、胃、脾是其主要分布器官,其中在肺、肾组织中浓度最高;病理状态下,AS-Ⅳ组织分布发生了一定改变,为AS-Ⅳ防治2型糖尿病肾病的临床合理应用及开发提供实验依据。

**关键词**:黄芪甲苷;2型糖尿病肾病;高效液相色谱-质谱联用仪;组织分布

**中图分类号**:R932　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1001-6880(2019)10-1712-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.10.007

# Study on the difference of astragaloside IV distribution between normal mice and db/db mice with type 2 diabetic nephropathy

SHI Ya[1],LIU Wen[1*],WANG Yong-lin[2],GONG Zi-peng[2],WANG Qun[1],LI Yong-jun[2],JIN Yang[1],YAO Xiao-yan[1]

[1]*School of Pharmacy,Guizhou University of Traditional Chinese Medicine,Guiyang 550025,China*;

[2]*Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics in Guizhou Province,Guizhou Medical University,Guiyang 550004,China*

**Abstract**:To study Astragaloside Ⅳ(AS-Ⅳ) in normal mice (db/m) and type 2 diabetic nephropathy (db/db) mice in vivo tissue distribution difference,the purpose of this study was to provide experimental basis for the clinical application of AS-Ⅳ against type 2 diabetic nephropathy and new drugs research and development. Normal mice (db/m) and type 2 diabetic nephropathy (db/db) mice were injected intravenously with AS-Ⅳ 8mg/kg dose,the mice were killed at 15 min,2 h and 4 h,to collect heart,liver,spleen,lung,kidney,stomach,intestine,brain,muscle tissues. The content of AS-Ⅳ in each tissues were determined by HPLC-MS/MS,and the distribution of AS-Ⅳ in each tissues under normal and pathological conditions was compared. In type 2 diabetic nephropathy,the concentrations of AS-Ⅳ in liver,spleen,lung and kidney were 349.72±70.72,370.69±45.46,583.65±581.75,4290.63±485.34 ng/mL. In the normal state,the concentrations of AS-IV in liver,spleen,lung and kidney were 202.47±47.96,267.92±41.24,472.80±867.51,234.55±256.11 ng/mL,respectively. The concentration of AS-Ⅳ in liver,spleen,lung and kidney was significantly higher than that in normal tissues($P<0.05$). After intravenous injection,lung,kidney,heart,stomach and spleen were the main distribution organs,and the concentration was the highest in lung and kidney. Under the pathological condition,the tissue distribution of AS-Ⅳ changed to a certain extent,which provided an experimental basis for the clinical rational application and development of AS-Ⅳ in the prevention

收稿日期:2019-06-03　　接受日期:2019-09-24

基金项目:贵州省国内一流建设学科项目(中药学)(GNYL[2017]008-7号)

*通信作者 Tel:86-851-86823742;E-mail:liuw136@163.com

天然产物研究与开发

and treatment of type 2 diabetic nephropathy.

**Key words**: Astragaloside Ⅳ; type 2 diabetic nephropathy; HPLC-MS/MS; tissue distribution

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)最严重的微血管并发症之一,随着病情不断的进展,直至发展为肾脏衰竭,严重威胁人们的健康[1],肾病的常规治疗主要为给予血管紧张素转换酶抑制剂/血管紧张素受体阻滞剂药物。然而,常规治疗未显示对肾足细胞的预防,也未显示抑制肾小管细胞凋亡和肾纤维化的优点。因此,越来越多的研究人员考虑中医疗法,以弥补肾病常规治疗的不足。长期以来,中药已应用于临床上各种不同疾病的治疗,黄芪已被中医广泛使用数千年,国内外研究表明,黄芪具有保护肾脏、治疗慢性肾脏疾病的作用[2-4],黄芪甲苷(AS-Ⅳ)是其主要活性成分之一,具有抗炎、抗氧化、降血糖、抑制纤维化等作用[5-8],已有文献报道 AS-Ⅳ对慢性肾脏疾病具有保护和治疗作用[9-12],在肾病的治疗中具有广阔的应用前景。

目前,AS-Ⅳ在正常大鼠体内的药代动力学及组织分布已有研究,但其在 2 型糖尿病肾病(db/db)小鼠体内组织分布尚未有相关报道,而糖尿病肾病状态下,动物发生了许多生理及病理上的变化,药物在各组织中的分布行为也可能发生变化[13]。课题组在前期研究中发现,AS-Ⅳ在正常及 2 型糖尿病肾病(db/db)小鼠体内的药代动力学参数 AUC、$T_{1/2}$、MRT、$CL_Z/F$、$V_Z/F$ 具有显著性差异,且 AS-Ⅳ在 2 型糖尿病肾病(db/db)小鼠体内的生物利用度高于其在正常小鼠体内,为进一步考察 AS-Ⅳ在正常与病理生物体体内在不同组织内的分布差异,根据前期实验所得 AS-Ⅳ药时曲线结果,选取尾静脉注射给予 AS-Ⅳ后 15 min、2 h、4 h 三个时间点对 AS-Ⅳ在正常与 2 型糖尿病肾病(db/db)小鼠体内各组织分布情况进行对比研究,探讨 2 型糖尿病肾病病理状态下,AS-Ⅳ在体内的分布情况,为 AS-Ⅳ在 2 型糖尿病肾病的临床应用及新药研发提供实验依据,AS-Ⅳ、地高辛分子结构式见图 1。

## 1　仪器与材料

### 1.1　仪器

AB Sciex QTRAP 5500 型液相质谱联用仪(美国 sciex 公司),KQ-300DE 型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司),EL204 型电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司),MTN-2800D 型氮吹浓缩装置(天津奥特塞恩斯仪器有限公司),VX-III 多管涡混振荡器(广州航信科学仪器有限公司),IMS-20 全自动制冰机(常熟市雪科电器有限公司),Allegra 64R 型低温高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司),组织匀浆器(墨西哥 BioSpec Products 公司)。

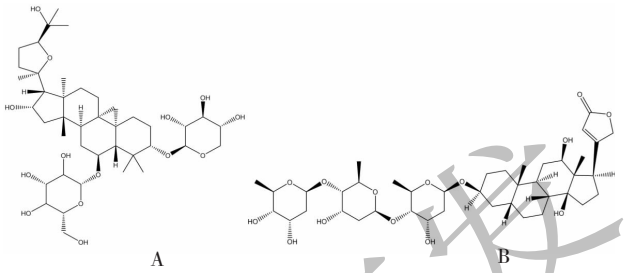



**图 1　AS-Ⅳ、地高辛分子结构式**

Fig. 1　The structures of all the analytes

注:AS-Ⅳ;B 地高辛。Note: A. Astragaloside Ⅳ; B. Digoxin.

### 1.2　材料

黄芪甲苷(AS-Ⅳ,中国食品药品检定研究院,批号 201717,纯度≥97%),地高辛(Digoxin,中国食品药品检定研究院,批号 201717,纯度≥98%),甲酸(美国 DIKMA 科技有限公司)、乙腈(美国 TEDIA 有限公司)、甲醇(美国 TEDIA 有限公司),水为屈臣氏蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司),其余试剂均为分析纯。

### 1.3　动物

本实验采用 db/db 小鼠(动物品种品系[T002407] BKS-Lepr$^{em2Cd479}$/Nju),购买于南京大学模式动物研究所,SPF 级,合格证号为 201806848,许可证号为 SCXK(苏)2018-0008,雌雄各半。db/db 小鼠由于瘦素受体点突变从而导致瘦素信号通路障碍,因此导致小鼠出现肥胖、胰岛素抵抗、高血糖等症状,12 周龄时可出现糖尿病肾病等并发症,实验直接购买 12 周龄 db/db 小鼠,适应性喂养一周后,开始实验。以 db/m 小鼠为正常对照组,均饲养于贵州医科大学实验动物中心 SPF 级实验室,动物在实验之前 12 h 禁食不禁水。

2 型糖尿病肾病 db/db 小鼠和 db/m 正常小鼠肾组织常规固定、脱水透明、石蜡包埋切片后,Masson 染色,光学显微镜下对肾组织病理形态学观察。

天然产物研究与开发

## 2 方法与结果

### 2.1 方法

#### 2.1.1 对照品溶液和内标溶液的配制

精密称取 AS-Ⅳ和地高辛,加入甲醇,超声使其完全溶解,配制成浓度为 0.5 mg/mL 的储备液,实验前用 50% 的甲醇溶液稀释到相应的浓度,所有溶液于 4 ℃条件下保存。

#### 2.1.2 HPLC-MS/MS 分析条件

ACE Excel 2 $C_{18}$-AR(100 mm × 2.1 mm,2 μm,USA)色谱柱,流动相乙腈(B)-0.1% 甲酸水溶液(A)梯度洗脱(0 ~ 0.6min,90% A;0.6 ~ 2 min,90% A→70% A;2 ~ 6 min,70% A→35% A;6 ~ 8 min,35% A→10% A;8 ~ 9 min,10% A→10% A;9 ~ 9.1 min,10% A→90% A;9.1 ~ 12 min,90% A)流速 0.4 mL/min,柱温 25 ℃,进样量 1 μL。

采用正离子模式扫描;气帘气 35 psi;离子源温度 550 °C;压力 4 500 V,AS-Ⅳ *m/z*:807.4/627.4;DP 168 V;CXP 16 V,地高辛 *m/z*: 825.3/649.5;DP 80 V;EP 10 V;CE 53ev;CXP 53 V。

#### 2.1.3 AS-IV 注射样品溶液的制备

精密称取一定量 AS-Ⅳ,加入生理盐水,超声使其完全溶解,配制浓度为 2 mg/mL 的 AS-Ⅳ注射溶液。

#### 2.1.4 给药方案与样品采集

动物在实验之前 12 h 禁食不禁水,模型 db/db 小鼠与正常 db/m 小鼠各 18 只,分别随机分为 3 组,每组 6 只。全部小鼠以 8 mg/kg 剂量尾静脉注射给药后,分别于 15 min、2 h、4 h 处死小鼠,迅速取心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠、脑、肌肉等组织,用生理盐水冲洗净后,于-80 ℃的条件下保存待处理。

#### 2.1.5 组织样本预处理

各组织解冻后,剪成小块,加入 5 倍量的生理盐水,3 000 rpm 高速匀浆 2 min,组织匀浆液于 6 000 rpm 离心 10 min 得上清液,精密移取上清液 500 μL,精密加入 0.502 mg/mL 地高辛内标溶液 10 μL,120 μL 的 1% 的甲酸溶液,涡混 1 min,加入 2 mL 的甲醇溶液,涡混 5 min,超声 5 min,在 4 ℃的环境下以 12 000 rpm 离心 10 min,分离上清液,37 ℃氮气流下挥干。残留物用 50% 甲醇 500 μL 复溶,涡流 5 min,超声 20 min,在 4 ℃的环境下以 12 000 rpm 离心 10 min,取上清液进行 HPLC-MS/MS 检测分析。

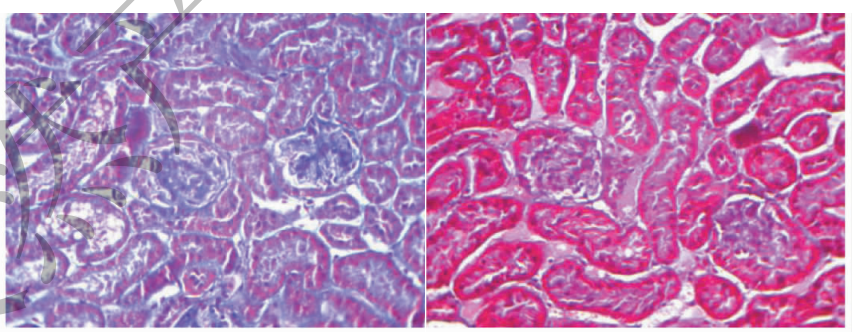
#### 2.1.6 方法学考察

以肺、心、肾为代表性组织,根据 2018 年 FDA 生物分析方法学验证指南[14]对检测方法进行验证。验证内容包括专属性、线性范围、最低定量限、精密度、准确度、回收率、基质效应和稳定性。

### 2.2 结果

#### 2.2.1 2 型糖尿病肾病 db/db 小鼠和 db/m 正常小鼠肾脏病理形态学比较

与 db/m 正常小鼠比较,2 型糖尿病肾病(db/db)小鼠的肾小球基底膜及肾小管间质可见大量胶原纤维,并且明显多于正常组,说明有胶原纤维沉积,肾纤维化明显,如图 2 所示。



A B

**图 2 2 型糖尿病肾病 db/db 小鼠和 db/m 正常小鼠肾脏病理形态学观察(Masson, × 400)**

Fig. 2 Pathomorphological observation of kidney in db/db mice and db/m normal mice and type 2 diabetic nephropathy (Masson, × 400)

注:A. 2 型糖尿病肾病 db/db 小鼠;B. db/m 正常小鼠。Note: A. Type 2 diabetic nephropathy db/db mice; B. db/m normal mice.

#### 2.2.2 专属性考察

取 500 μL 大鼠空白组织匀浆液(以肺为代表),按“2.1.5 组织样品处理方法”项下方法操作(不加内标),获得空白组织样品 A 色谱图;将一定浓度对照品溶液和地高辛内标加溶液入空白组织匀浆液,依同法操作,获得 B 色谱图;取大鼠给药后的

天然产物研究与开发

组织匀浆液,依法操作得 C 色谱图,结果见图 3,地高辛在 4.59 min 时出峰,AS-Ⅳ 5.04 min 时出峰,各组织中没有物质干扰待测物和内标的测定,专属性良好;地高辛、AS-Ⅳ的 MRM 离子质谱图如图 4 所示。

2.2.3　定量下限和标准曲线

精密吸取 100 μL 系列不同浓度的 AS-Ⅳ对照溶液,分别加入到空白小鼠肺、肾、脾、心、胃、小肠、肝、脑、肌肉组织匀浆中。按“2.1.5”项的方法前处理后检测,以对照品浓度为横坐标,对照品与内标的峰面积比值为纵坐标,用加权最小二乘法作线性回归运算,所得标准曲线见表 1,各成分在测定范围内线性关系良好,以线性范围的最低浓度作为 AS-Ⅳ的定量下限。

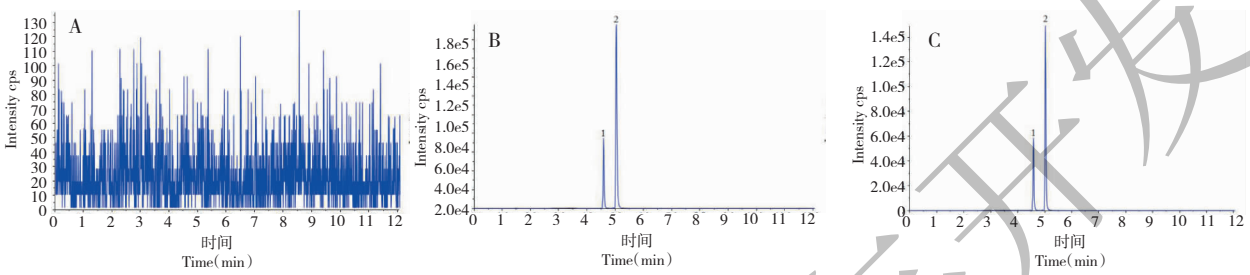



**图 3　肺组织 HPLC-MS/MS 色谱图**

Fig. 3　HPLC-MS/MS chromatogram of lung tissue

注:肺空白组织色谱图(A);肺空白组织+内标(地高辛)+AS-Ⅳ色谱图(B);注射给药后 15 min 肺部组织色谱图(C);1. 地高辛;2. AS-Ⅳ。Note:lung blank tissue chromatogram(A);lung blank tissue + internal standard (Digoxin) + Astragaloside Ⅳ chromatogram(B);Lung tissue chromatogram 15 min after injection(C);1. Digoxin;2. Astragaloside Ⅳ.

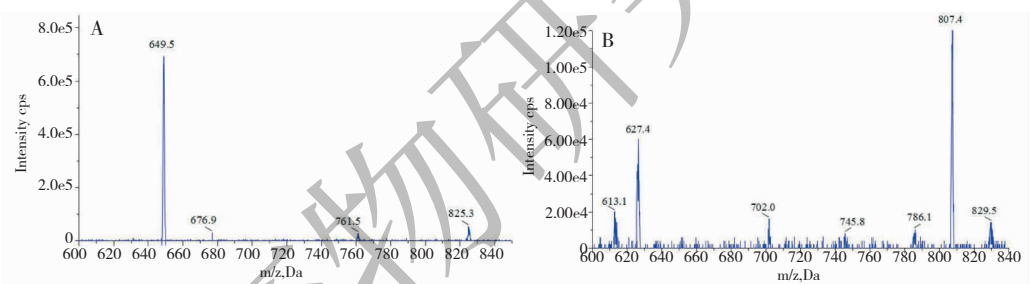



**图 4　地高辛、AS-Ⅳ的 MRM 离子质谱图**

Fig. 4　MRM ion mass spectrometry of Digoxin and AS- Ⅳ

注:A. 地高辛的 MRM 离子质谱图;B. AS-Ⅳ的 MRM 离子质谱图。

Note:A. MRM ion mass spectrometry of Digoxin;B. MRM ion mass spectrometry of AS- Ⅳ.

**表 1　组织中 AS-Ⅳ的标准曲线及线性范围**

Table 1　Standard curves and linear ranges of Astragaloside Ⅳ in tissue

| 组织 Tissue | 线性方程 Linear equation | $R^2$ | 线性范围 Linear rang(ng/mL) | LOQ (ng/mL) |
|---|---|---|---|---|
| 肺 Lung | $Y = 0.001\,3X + 0.1\,701$ | 0.999 2 | 25 ~ 8 000 | 25 |
| 肾 Kidney | $Y = 0.001X + 0.1\,326$ | 0.999 4 | 25 ~ 6 000 | 25 |
| 脾 Spleen | $Y = 0.001\,6X + 0.2\,227$ | 0.999 1 | 25 ~ 2 000 | 25 |
| 心 Heart | $Y = 0.001\,1X + 0.1\,079$ | 0.999 1 | 25 ~ 2 000 | 25 |
| 胃 Stomach | $Y = 0.001\,3X + 0.1\,303$ | 0.999 4 | 25 ~ 2 000 | 25 |
| 小肠 Small intestine | $Y = 0.001X + 0.0\,582$ | 0.999 2 | 10 ~ 1 000 | 10 |
| 肝 Liver | $Y = 0.001\,5X + 0.2\,223$ | 0.999 1 | 20 ~ 1 250 | 20 |
| 脑 Brain | $Y = 0.002\,2X + 0.035$ | 0.999 4 | 10 ~ 133.33 | 10 |
| 肌肉 Muscle | $Y = 0.002\,9X + 0.0\,246$ | 0.999 2 | 10 ~ 133.33 | 10 |

天然产物研究与开发

2.2.4 精密度和准确度试验

对低、中、高(100、400、2 000 ng/mL)三个 AS-Ⅳ浓度的小鼠肺、心、肾组织匀浆液的日内精密度和日间精密度进行了考察,结果表明 AS-Ⅳ日内精密度和日间精密度 RSD 值均小 15%,准确度范围相对误差(RE)为-4.42% ~11.83%,结果显示该方法准确、可靠、重现性好,结果见表 2。

2.2.5 基质效应和提取回收率

取低、中、高(100、400、2 000 ng/mL)三个 AS-Ⅳ浓度的小鼠肺、心、肾组织匀浆样品各 6 份,分析峰面积得 A。肺、心、肾组织匀浆样品离心后获得的上清液中加入低、中、高(100、400、2 000 ng/mL)三个浓度的 AS-Ⅳ样品分析峰面积得 B。取低、中、高(100、400、2 000 ng/mL)三个浓度的 AS-Ⅳ分析峰面积得 C,提取回收率 = A/B,基质效应 = B/C,结果显示,AS-Ⅳ提取回收率在 87.95% ~97.95%,基质效应在 86.39% ~97.70%,地高辛基质效应在 93.29% ~104.86%,结果表明,测定方法提取回收率良好,无基质干扰,结果见表 2。

**表 2 AS-Ⅳ的精密度、准确度、提取回收率、基质效应及地高辛的基质效应(%)($\bar{x} \pm s$, $n=6$)**

Table 2 Precision, accuracy, extraction recovery and matrix effect of Astragaloside Ⅳ and matrix effect of Digoxin ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

| 组织 Tissue | 浓度 Concentration (ng/mL) | 日内 Within-day | | 日间 Inter-day | | 提取回收率 Extraction recovery (%) | AS-Ⅳ基质效应 AS-Ⅳ matrix effect(%) | 地高辛基质效应 Digoxin matrix effect(%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 准确度 Accuracy RE | 精密度 Precision (%) | 准确度 Accuracy RE | 精密度 Precision (%) | | | |
| 肺 Lung | 2 000 | 8.37 | 7.42 | 1.86 | 4.85 | 94.75 ±4.81 | 97.70 ±4.30 | 94.79 ±7.09 |
| | 400 | -2.21 | 5.01 | -3.50 | 8.26 | 94.52 ±5.22 | 95.25 ±3.50 | 104.86 ±9.51 |
| | 100 | 6.61 | 3.03 | -0.64 | 7.40 | 88.84 ±4.87 | 84.74 ±8.03 | 102.24 ±11.81 |
| 心 Heart | 2 000 | 7.93 | 6.01 | 0.87 | 11.83 | 96.62 ±3.12 | 94.19 ±8.33 | 101.38 ±10.12 |
| | 400 | 2.57 | 6.60 | 3.77 | 5.79 | 91.79 ±2.81 | 95.55 ±3.97 | 98.85 ±12.05 |
| | 100 | 5.48 | 6.48 | 0.70 | 10.34 | 88.71 ±3.88 | 87.37 ±2.76 | 97.15 ±7.53 |
| 肾 kidney | 2 000 | 3.83 | 6.37 | -1.55 | 5.72 | 97.95 ±7.45 | 96.38 ±5.26 | 93.29 ±7.12 |
| | 400 | 3.01 | 5.02 | -3.67 | 7.94 | 91.40 ±4.94 | 95.88 ±6.99 | 96.29 ±14.67 |
| | 100 | 2.43 | 4.83 | -4.42 | 8.53 | 87.95 ±5.93 | 86.39 ±8.38 | 100.65 ±13.39 |

2.2.6 稳定性的考察

取低、中、高(100、400、2 000 ng/mL)三个 AS-Ⅳ浓度的肺、心、肾组织匀浆样品。考察样品在室温下放置 24 h,冷藏(-80 ℃)48 h 和冻融三次的稳定性,结果表明样品在各种情况下均稳定,结果见表 3。

**表 3 AS-Ⅳ在肺、心、肾中的稳定性($\bar{x} \pm s$, $n=6$)**

Table 3 Stability of Astragaloside Ⅳ in lung, heart and kidney($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

| 组织 Tissue | 浓度 Concentration (ng/mL) | 室温 24 h Room temperature 24 h | | -80 ℃保存 48 h Store at -80 ℃ for 48 h | | 冷冻-解冻循环 Freeze-thaw cycle | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 检测浓度 Detection concentration (ng/mL) | RSD (%) | 检测浓度 Detection concentration (ng/mL) | RSD (%) | 检测浓度 Detection concentration (ng/mL) | RSD (%) |
| 肺 Lung | 2 000 | 2 182.51 ±151.62 | 6.95 | 2 037.99 ±98.79 | 4.85 | 2 180.29 ±153.51 | 7.04 |
| | 400 | 392.80 ±21.51 | 5.48 | 386.46 ±31.92 | 8.26 | 391.31 ±19.58 | 5.00 |
| | 100 | 106.59 ±3.99 | 3.74 | 101.27 ±9.77 | 9.64 | 99.67 ±4.50 | 4.52 |
| 心 Heart | 2 000 | 1 020.92 ±136.74 | 13.39 | 1 008.74 ±119.29 | 11.83 | 983.20 ±97.93 | 9.96 |
| | 400 | 387.30 ±13.13 | 3.39 | 389.88 ±8.66 | 2.22 | 395.35 ±15.53 | 3.93 |
| | 200 | 103.22 ±7.15 | 6.93 | 100.70 ±10.42 | 10.34 | 102.44 ±4.69 | 4.58 |
| 肾 Kidney | 2 000 | 948.95 ±95.40 | 4.90 | 1 957.37 ±104.99 | 5.36 | 2 032.95 ±196.16 | 9.65 |
| | 400 | 394.36 ±42.15 | 10.69 | 385.85 ±30.64 | 7.94 | 385.21 ±29.45 | 7.65 |
| | 100 | 101.08 ±2.67 | 2.64 | 97.43 ±8.74 | 8.97 | 93.98 ±5.77 | 6.14 |

天然产物研究与开发

2.2.7　AS-Ⅳ的组织分布研究

以 8 mg/kg 剂量 AS-Ⅳ尾静脉注射给予正常小鼠(db/m)和2型糖尿病肾病模型(db/db)小鼠 AS-Ⅳ,于 15 min、2 h、4 h 等不同时间点处死小鼠,收集心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠、脑、肌肉等组织,按“2.1.5 项”下组织样本预处理方法处理,“2.1.2 项”下 HPLC-MS/MS 条件测定,结果见表4。

**表4　AS-Ⅳ在小鼠体内的分布情况($\bar{x} \pm s$, $n=6$)**

Table 4　Distribution of Astragaloside Ⅳ in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

| 组织 Tissue | 正常 15 min Control 15 min (ng/mL) | 模型 15 min Model 15 min (ng/mL) | 正常 2 h Control 2 h (ng/mL) | 模型 2 h Model 2 h (ng/mL) | 正常 4 h Control 4 h (ng/mL) | 模型 4 h Model 4 h (ng/mL) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 肝 Liver | 202.47 ± 47.96 | 349.72 ± 70.72* | 85.64 ± 13.16 | 132.97 ± 18.34* | 30.79 ± 5.65 | 56.55 ± 6.92** |
| 心 Heart | 305.57 ± 41.03 | 391.44 ± 20.34** | 483.16 ± 58.54 | 748.34 ± 77.40** | 68.38 ± 12.34 | 62.78 ± 14.65 |
| 脾 Spleen | 267.92 ± 41.24 | 370.69 ± 45.46** | 412.68 ± 48.37 | 625.19 ± 63.36** | 66.71 ± 15.30 | 92.26 ± 8.64* |
| 肺 Lung | 4 725.80 ± 867.51 | 5 830.65 ± 581.75** | 1 611.61 ± 216.24 | 2 213.49 ± 306.55** | 255.59 ± 38.32 | 416.18 ± 97.04** |
| 肾 Kidney | 2 354.55 ± 256.11 | 4 290.63 ± 485.34** | 1 429.28 ± 335.93 | 2 025.81 ± 198.84** | 223.13 ± 34.23 | 387.55 ± 56.21** |
| 胃 Stomach | 517.92 ± 116.60 | 778.62 ± 221.13* | 251.55 ± 58.80 | 333.80 ± 43.67* | 75.69 ± 11.33 | 93.66 ± 12.37 |
| 小肠 Small intestine | 208.76 ± 16.12 | 247.24 ± 49.37 | 369.71 ± 56.04 | 330.76 ± 74.43 | 34.76 ± 7.62 | 39.97 ± 7.73 |
| 脑 Brain | BLQ | BLQ | 25.37 ± 5.83 | 29.76 ± 5.89 | 20.93 ± 3.56 | 26.59 ± 2.41 |
| 肌肉 Muscle | 30.52 ± 6.40 | 33.89 ± 8.33 | 43.23 ± 6.15 | 53.90 ± 11.90 | 28.93 ± 2.96 | 35.27 ± 11.50 |

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$, BLQ:低于定量限 10 ng/mL。

Note: Compared with the normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, BLQ: lower than the quantitative limit of 10 ng/mL.

单次尾静脉注射 8 mg/kg AS-Ⅳ后,AS-Ⅳ在正常小鼠体内不同时间点各个器官中的分布情况为:15 min:肺 > 肾 > 胃 > 心 > 脾 > 小肠 > 肝 > 肌肉,2 h:肺 > 肾 > 心 > 脾 > 小肠 > 胃 > 肝 > 肌肉 > 脑,4 h:肺 > 肾 > 胃 > 心 > 脾 > 小肠 > 肝 > 肌肉 > 脑,AS-Ⅳ在二型糖尿病肾病模型 db/db 小鼠体内不同时间点各个器官中的分布情况为:15 min:肺 > 肾 > 胃 > 心 > 脾 > 肝 > 小肠 > 肌肉,2 h:肺 > 肾 > 心 > 脾 > 胃 > 小肠 > 肝 > 肌肉 > 脑,4 h:肺 > 肾 > 胃 > 脾 > 心 > 肝 > 小肠 > 肌肉 > 脑。

同时研究发现,AS-Ⅳ在正常及2型糖尿病肾病 db/db 小鼠体内分布均较广,但浓度偏低;且在大脑中能检测出 AS-Ⅳ,说明 AS-Ⅳ静脉注射给药后,能通过血脑屏障。给药 15 min,2 h,4 h 时,AS-Ⅳ在肺、肾、心、胃、脾等组织中浓度较高;其中在肺、肾组织中浓度最高,在小肠、肝、肌肉、脑等组织中浓度较低,且在正常及模型小鼠肺、肾、心、胃、脾等组织中的浓度约为在小肠、肝、肌肉、脑等组织中浓度的 5 ~300 倍,部分组织中的 AS-Ⅳ浓度随时间的延长而逐步降低。

从 AS-Ⅳ在正常与病理状态下各组织分布状况及含量分析得知,机体处于2型糖尿病肾病状态,可显著影响 AS-Ⅳ在体内的分布。AS-Ⅳ对肺、肾组织分布具有一定靶向性。单次尾静脉注射给药后,病理状态下,给药 15 min 时,AS-Ⅳ在肺、肾、心、胃、脾、肝等组织中含量较正常状态下高($P<0.05$, $P<0.01$),病理状态下,各组织对 AS-Ⅳ亲和力较正常高;给药 2 h 时,AS-Ⅳ在肺、肾、脾、心、胃、肝等组织中含量较正常状态下高($P<0.05$, $P<0.01$),病理状态下,AS-Ⅳ分布较正常状态下广;给药 4 h 时,AS-Ⅳ在肝、脾、肺、肾组织中含量均较正常状态下高($P<0.05$, $P<0.01$),AS-Ⅳ在病理状态下的药物消除能力降低;成分在体内存留时间延长,结果说明病理状态下有可能存在药物蓄积趋势。

## 3　讨论

药物进入机体后会随循环系统运送至各组织中,由于药物的理化性质以及体内各组织的生理特征差异,药物在生物体内分布存在差异[15],会直接影响到药物的治疗效果、蓄积、毒副反应。因此,研究 AS-Ⅳ在各组织中的分布特点,特别是肾病变病理组织中的分布特点,有利于 AS-Ⅳ抗糖尿病肾病相关药物制剂的研发和改进,使药物最大限度地作用于靶器官,提高临床疗效。

本研究表明 AS-Ⅳ在正常与病理状态下各组织分布状况存在着一定的差异。糖尿病肾病病理状态下,AS-Ⅳ在肝、脾、肺、肾浓度显著高于在正常组织中,在正常及糖尿病肾病病理状态下 AS-Ⅳ在各组织中的分布有着较大的差异,可能是由于,病理状态

天然产物研究与开发

下各个脏器中转运体的表达和功能会发生改变,从而影响药物在体内的处置过程发生明显改变[16],同时,糖尿病肾病状态下,鼠的肾功能遭到损伤,可能也是导致 AS-Ⅳ在正常及病理状态下体内分布出现差异的原因之一。

尾静脉注射给药后,AS-Ⅳ在小鼠的各组织中分布较广泛,主要分布在肺中,其次是肾,原因可能为:一方面黄芪为补气药,主归肺经,其次药物进入机体后会随循环系统运送至各组织中,生理上,肺为脏腑之华盖,百脉之所朝会,全身的血液都通过百脉流经于肺,而肾脏是药物排泄的主要排泄器官,原形药物及其代谢产物通过肾由尿液排出;由于肺与肾生理特征的差异,一定程度上会影响到 AS-Ⅳ在各器官内的分布,这可能是导致 AS-Ⅳ在肺中分布多于肾的原因。肺气虚损可以导致肾气衰弱;肾阴不足,精气不能上滋于肺,而致肺肾两虚,同时,黄芪具有补益肺气的功效,已有文献报道,AS-Ⅳ对肺损伤有保护作用,因此,AS-Ⅳ在肺中分布多于肾,对肾病的防治也有着积极的意义。同时,脑中有少量的 AS-Ⅳ分布,说明 AS-Ⅳ可通过血脑屏障,且病理状态下,有助于 AS-Ⅳ通过血脑屏障,本研究对 AS-Ⅳ的临床合理运用及新药的研发奠定了坚实的理论基础。

**参考文献**


1 Huo BB, Bai L, Zhang X, et al. Protective effect of different combinations of chinese recipe of stasis-removing-and-collaterals-dredging on the kidney of diabetic nephropathy rats and its effect on the expression of p-cadherinin the glomerular [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2017, 29: 1558-1562.

2 Wang XL, Gao YB, Tian NX, et al. Astragaloside IV improves renal function and fibrosis via inhibition of miR-21-induced podocyte dedifferentiation and mesangial cell activation in diabetic mice[J]. Drug Des Devel Ther, 2018, 12: 2431-2442.

3 Fries JW, Sandstrom DJ, Meyer TW, et al. Glomerular hypertrophy and epithelial cell injury modulate progressive glomerulosclerosis in the rat[J]. Lab Invest, 1989, 60: 205-218.

4 Kim JM, Wu H, Green G, et al. CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility [J]. Science, 2003, 300: 1298-1300.

5 Ji CL, Luo YM, Zou C, et al. Effect of astragaloside IV on indoxyl sulfateinduced kidney injury in mice via attenuation of oxidative stress[J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2018, 19: 53-62.

6 Wang FG, Zhao Y, Chen SX, et al. Astragaloside IV alleviates ammonia-induced apoptosis and oxidative stress in bovine mammary epithelial cells[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20: 600-613.

7 Lu WS, Li S, Guo WW et al. Effects of Astragaloside IV on diabetic nephropathy in rats[J]. Genet Mol Res, 2015, 14: 5427-5434.

8 Su Y, Chen QQ, Ma K et al. Astragaloside IV inhibits palmitate-mediated oxidative stress and fibrosis in human glomerular mesangial cells via downregulation of CD36 expression [J]. Pharmacol Rep, 2019, 71: 319-329.

9 Ji CL, Luo YM, Zou C, et al. Effect of astragaloside IV on indoxyl sulfate-induced kidney injury in mice via attenuation of oxidative stress[J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2018, 19: 53-61.

10 Sun HL, Wang WJ, Han PX, et al. Astragaloside IV ameliorates renal injury in db/db mice[J]. Sci Rep, 2016, 6: 32545-32554.

11 Wang ZS, Xiong F, Xie XH, et al. Astragaloside IV attenuates proteinuria in streptozotocin-induced diabetic nephropathy via the inhibition of endoplasmic reticulum stres[J]. BMC Nephrol, 2015, 16: 44-52.

12 Xu WJ, Shao XH, Tian L, et al. Astragaloside IV ameliorates renal fibrosis via the inhibition of mitogen-activated protein kinases and antiapoptosis *in vivo* and *in vitro*[J]. J. Pharmacol Exp Ther, 2014, 350: 552-562.

13 Liu X, Tang DQ, Yin XX, et al. Study on pharmacokinetics of rutin in normal and diabetic nephropathy rats[J]. J Xuzhou Med Univ(徐州医学院学报), 2009, 29: 708-712.

14 U. S. Department of health and human services, food and drug administration, center for drug evaluation and research (CDER), center for veterinary medicine (CVM). Guidance for industry: bioanalytical method validation[S]. May, 2018.

15 Li Y, Yang DD, Zhu CY. Impact of Sodium-[8-(2-Hydroxybenzoyl) amino]-caprylate on intestinal permeability for notoginsenoside $R_1$ and salvianolic acids in Caco-2 cells transport and rat pharmacokinetics [J]. Molecules, 2018, 23: 2990-3003.

16 An J, Hu FD, Wang CH, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of five active ingredients of Eucommiae cortex in normal and ovariectomized mice by UHPLC-MS/MS[J]. Xenobiotica, 2016, 46: 793-804.


天然产物研究与开发