

structures and thermodynamic aspects of sublimation and solubility processes [J]. Cryst Eng Comm, 2012, 14(24): 8577-8588.

- [10] SUROV A O, SOLANKO K A, BOND A D, et al. Crystal architecture and physicochemical properties of felodipine solvates [J]. Cryst Eng Comm, 2013, 15(30): 6054-6061..

- [11] SUROV A O, SOLANKO K A, BOND A D, et al. Diversity of felodipine solvates: structure and physicochemical properties [J]. Cryst Eng Comm, 2015, 17(22): 4089-4097.

- [12] SHELDRICK G M. A short history of SHELX [J]. Acta Cryst A, 2008, 64(1): 112-122.

收稿日期: 2016-02-22

LC-MS/MS 测定肝移植患者体内他克莫司和五酯胶囊主要成分的方法学建立及应用

王伟^a, 朱声挥^b, 郭闻渊^c, 滕飞^c, 位华^{a*}, 陈万生^{a*} (上海长征医院, a.药材料, b.实验诊断科, c.器官移植科, 上海 200001)

摘要: 目的 建立应用 LC-MS/MS 同时测定移植患者体内他克莫司和五酯胶囊主要成分的方法, 并应用所建立的方法研究肝移植患者体内各待测物的药动力学特征。方法 患者全血样本经前处理后进样, 应用 LC-MS/MS 检测他克莫司、五味子甲素、五味子酯甲、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酚的浓度, 同时进行方法学验证。应用所建立的方法, 测定肝移植患者服用他克莫司和五酯胶囊后多个时间点的血药浓度, 研究其主要成分的药动力学过程。结果 患者全血样本中 6 种待测物专属性好, 在各自线性范围内标准曲线符合要求, 日内、日间精密度均 $<15\%$, 提取回收率与基质效应范围在 80%~120%, 样本稳定性好。结论 该方法专属性强、灵敏度高、快速准确, 适用于移植患者体内他克莫司、五味子甲素、五味子酯甲、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酚的血药浓度分析与测定。

关键词: 他克莫司; 五酯胶囊; LC-MS/MS; 肝移植患者; 药动力学

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)07-0854-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.07.005

Simultaneous Determination of Tacrolimus and Five Main Compounds of Wuzhi Capsule in Liver Transplant Patients' Whole Blood by LC-MS/MS

WANG Wei^a, ZHU Shenghui^b, GUO Wenyuan^c, TENG Fei^c, WEI Hua^{a*}, CHEN Wansheng^{a*} (Shanghai Changzheng Hospital, a. Department of Pharmacy, b. Department of Laboratory Test, c. Department of Organ Transplantation, Shanghai 200001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a LC-MS/MS analytical method for simultaneous determination of tacrolimus and five compounds of Wuzhi capsule in liver transplant recipients' whole blood and to study the pharmacokinetic characteristic of the analytes in liver transplant patients. **METHODS** The zinc sulfate was added to whole blood to lyse the blood cells, and then the sample was deposited by methanol. The upper layer was injected into the LC-MS/MS. Then a LC-MS/MS method was established for the determination of tacrolimus, schisandrin, schisandrol B, schisantherin A, deoxyshisandrin and schisanhenol. **RESULTS** The calibration curve of six compounds showed a good linear relationship. The intra and inter day precisions and accuracy met the requirements and the extraction recovery was all right. **CONCLUSION** This method is accurate, precise, sensitive and specific to be suitable for concentration of therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic study of tacrolimus, schisandrin, schisandrol B, schisantherin A, deoxyshisandrin and schisanhenol.

KEY WORDS: tacrolimus; Wuzhi capsule; LC-MS/MS; liver transplant patients; pharmacokinetics

他克莫司又名 FK506, 是一种新型的钙调磷酸酶抑制剂, 具有强大的免疫抑制作用^[1]。近年来,

已成为肝脏、心脏、肾脏及骨髓移植患者首选的免疫抑制药物^[2]。但他克莫司治疗窗狭窄, 口服生

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81303113); 上海市卫生局中医药科研基金课题(12401906300)

作者简介: 王伟, 女, 硕士生 Tel: 18210506692 E-mail: wangwei2165@126.com 共同第一作者: 朱声挥, 男 Tel: 13321868611 E-mail: 578576344@qq.com *通信作者: 位华, 女, 博士, 主管药师 Tel: (021)81886190 E-mail: wh7975@163.com 陈万生, 男, 博士, 主任药师 Tel: (021)81886190 E-mail: chenwansh@126.com

物利用度低,个体间药动学差异很大。有些移植患者即使大剂量服用他克莫司仍不能达到有效血药浓度。

五酯胶囊是中药南五味子经醇提获得的脂溶性活性部位,主要成分为五味子酯甲、五味子甲素、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酚等^[3],具有保肝降酶的作用。

笔者所在医院器官移植中心在临床实践中发现肝移植患者在服用保肝中药五酯胶囊改善肝功能的同时,他克莫司血药浓度有所提高。文献中也曾报道五酯胶囊可显著提高他克莫司的药物浓度,并且安全有效^[4-6]。临床中两药合用,提高了他克莫司的药物浓度,降低了移植术后排斥反应的发生,减少了他克莫司所造成的肝、肾毒性等,节约了医疗成本,取得了较好的治疗效果。因此,临床中两药合用非常普遍。本研究建立了应用 LC-MS/MS 同时测定移植患者体内他克莫司和五酯胶囊主要成分的方法,进行方法学验证,并将该方法应用于肝移植患者体内他克莫司和五酯胶囊主要成分的药动学研究,为深入研究移植患者体内他克莫司与五酯胶囊的相互作用奠定基础。

1 试药与仪器

1.1 药品与试剂

他克莫司对照品(大连美仑生物技术有限公司,批号:20130901,纯度>95%);子囊霉素对照品(大连美仑生物技术有限公司,批号:20130817,纯度>95%);五味子甲素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110764-201111,纯度:99.5%);五味子酯甲(上海同田生物技术股份有限公司,批号:10666/2011,纯度:98%);五味子醇甲(中国食品药品检定研究院,批号:110857-201412,纯度:99.4%);五味子醇乙(中国食品药品检定研究院,批号:131119-201311,纯度>98%);五味子酚(北京北研磐绿生物技术有限公司,批号:130423,纯度>98%);甲醇(美国默克公司,色谱纯);醋酸铵、硫酸锌均为分析纯;实验用水为蒸馏水。

1.2 仪器

安捷伦 1290-6460 型三重四极杆串联质谱仪(美国 Agilent 公司),配有电喷雾离子源(ESI)及 MassHunter Version B.06.00 工作软件;Agilent 1290 Infinity 超高效液相色谱系统,配有 G4220A 二元泵、G4212A DAD 检测器、G1316C 柱温箱及

G4226A 自动进样器。BSA124S-CW 天平(德国 Sartorius 公司);CPA225D 天平(德国 Sartorius 公司);Vortex-5 涡旋混合器(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司);ScanVac 真空浓缩仪(Gene Company Limited);Eppendorf AG 22331 Hamburg 高速离心机(德国 Eppendorf 公司)。

2 方法与结果

2.1 条件

2.1.1 色谱条件 采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 3.5 μm),柱温为 55℃,流动相 A 为 10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵-0.1% 甲酸水溶液,流动相 B 为 10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵-0.1% 甲酸甲醇溶液;流速为 0.25 mL·min⁻¹;进样量为 10 μL;梯度洗脱程序:0~2 min, 80%→100% B, 2~3.5 min, 100% B, 3.5~5 min, 100%→80% B。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾电离源(ESI),扫描方式为多反应监测模式(MRM),正离子模式,离子源温度 325℃,气体流速 10 L·min⁻¹,雾化气压力 137.9 kPa,鞘气温度 325℃,鞘气流速 12 L·min⁻¹,毛细管电压 4 000 V,喷嘴电压 300 V,待分析成分及内标的最优 MRM 参数见表 1。

表 1 各成分及内标的质谱参数

Tab. 1 Mass spectrum parameters of ingredients and internal standard

待测物	中间离子	产物离子	传输能量/V	碰撞能量/eV
他克莫司	821.4	768.3	190	15
五味子酯甲	554.2	415.2	105	10
五味子醇甲	450.2	369.1	90	35
五味子醇乙	434.2	368.1	90	20
五味子甲素	417.2	316.0	165	20
五味子酚	430.2	340.0	165	17
子囊霉素(内标)	814.5	604.5	160	35

2.2 全血样品预处理

100 μL 肝移植患者全血中加入 10 μL 5 ng·mL⁻¹ 子囊霉素(内标),涡旋混匀 30 s,再加入 200 μL 0.1 mol·L⁻¹ 的硫酸锌溶液,涡旋混匀 30 s,再加入 300 μL 甲醇,涡旋混匀 1 min,静置 10 min 后,15 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液进样。

2.3 溶液的配制

2.3.1 系列对照品溶液 分别精密称取他克莫司、五味子甲素、五味子酯甲、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酚对照品适量,用甲醇配成单一对照品储备液。精密量取他克莫司储备液适量,

用甲醇稀释成 60, 30, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液。精密量取五味子甲素、五味子酯甲、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酚各单一对照品适量, 配制每 1 mL 分别含五味子甲素、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酚各 100 ng, 以及五味子酯甲 600 ng 的混合对照品储备液适量; 再精密称取混合对照品储备液适量, 用甲醇稀释成五味子甲素、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酚系列浓度为 100, 50, 25, 5, 2.5, 0.5, 0.25, 0.1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 五味子酯甲系列浓度为 600, 300, 150, 30, 15, 3, 1.5, 0.6 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.3.2 内标溶液 精密称取子囊霉素适量, 用甲醇溶解成每 1 mL 含子囊霉素 2 mg 的内标储备液,

再逐步用甲醇稀释成 5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标溶液, 备用。

2.3.3 硫酸锌溶液 精密称取 0.298 g 硫酸锌于 10 mL 量瓶中, 加水定容, 即得 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸锌溶液。

2.4 方法学验证

2.4.1 专属性试验 取人空白全血 100 μL , 按“2.2”项下方法操作, 得空白全血色谱图(图 1A); 精密称取 100 μL 0.2 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 他克莫司、五味子甲素、五味子醇乙、五味子酚对照品溶液和 0.6 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 五味子酯甲对照品溶液, 依次加入 1.5 mL 离心管中, 挥干后加入 100 μL 空白全血, 然后按“2.2”项下方法操作, 得到色谱图(图 1B); 服用两药后移植患者的全血, 按“2.2”项下方法操作, 得到实测样本的色谱图(图 1C)。

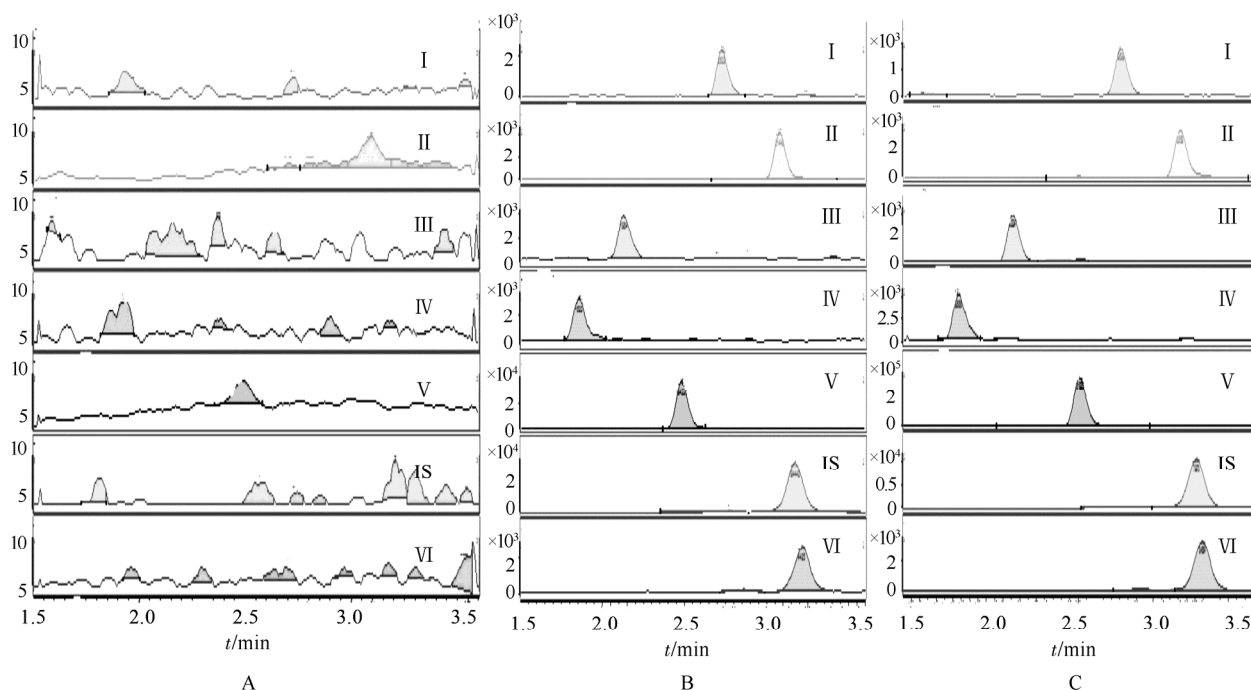


图 1 全血样本的液相色谱图

A-空白全血; B-加定量下限浓度的待测物对照品后的空白全血; C-服药后的患者血样; I-五味子酚; II-五味子甲素; III-五味子醇乙; IV-五味子醇甲; V-五味子酯甲; VI-他克莫司; IS-内标。

Fig. 1 Chromatograms of whole blood samples

A-blank whole blood sample; B-whole blood sample spiked with six analytes at LLOQ; C-patients' blood; I-schisanhenol; II-deoxyshisandrin; III-schisandrol B; IV-schisandrin; V-schisantherin A; VI-tacrolimus; IS-ascomycin.

2.4.2 标准曲线与定量下限 精密称取 100 μL 五味子甲素、五味子酯甲、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酚的系列对照品溶液, 依次加入到 1.5 mL 离心管中, 再相应加入 100 μL 他克莫司系列对照品溶液, 挥干后加入空白全血, 配制成他克莫司 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 30, 60 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 五味子甲素、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子

酚 0.1, 0.25, 0.5, 2.5, 5, 25, 50, 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 五味子酯甲 0.6, 1.5, 3, 15, 30, 150, 300, 600 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列样本。按“2.2”项下方法操作, 进行测定。以待测物浓度为横坐标(X), 待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标(Y), 用加权($1/X^2$)最小二乘法进行回归运算, 得相应的回归方程, 结果见表 2。

表 2 标准曲线与线性范围

Tab. 2 Calibration curves and dynamic rang

待测物	回归方程	线性范围/ ng·mL ⁻¹	r	LLOQ/ ng·mL ⁻¹
他克莫司	$Y=1.604\ 543X-0.003\ 837$	0.2~60	0.998	0.2
五味子酯甲	$Y=17.568\ 936X-0.031\ 420$	0.6~600	0.998	0.6
五味子醇甲	$Y=0.564\ 343X+3.862\ 123$	0.1~100	0.996	0.1
五味子醇乙	$Y=0.594\ 689X-5.975\ 869$	0.1~100	0.998	0.1
五味子甲素	$Y=15.083\ 961X-0.036\ 802$	0.1~100	0.998	0.1
五味子酚	$Y=4.744\ 207X-0.013\ 548$	0.1~100	0.997	0.1

2.4.3 精密度与准确度 取空白全血配制低、中、高浓度的质量控制样本,按“2.2”项下方法操作,

表 3 精密度与准确度结果(n=6)

Tab. 3 Results of accuracy and precision(n=6)

待测物	理论浓度/ ng·mL ⁻¹	日内			日间		
		实测值/ng·mL ⁻¹	RSD/%	相对误差/%	实测值/ng·mL ⁻¹	RSD/%	相对误差/%
他克莫司	0.5	0.45	4.11	-11.38	0.45	3.28	-9.69
	5	4.52	0.90	-9.65	4.32	4.63	-13.53
	30	29.91	2.39	-0.29	27.89	3.87	-7.03
五味子酯甲	1.5	1.67	2.35	11.33	1.65	6.43	9.97
	30	37.45	2.15	-8.51	34.16	4.99	13.86
	300	286.56	2.76	-4.48	279.23	2.95	-6.92
五味子醇甲	0.25	0.25	9.18	1.39	0.23	6.756	-5.19
	5	4.37	2.36	-12.60	4.28	1.92	-14.48
	50	48.52	2.13	-2.96	47.12	2.61	-5.76
五味子醇乙	0.25	0.25	5.95	-0.70	0.23	6.21	-6.99
	5	4.41	3.30	-11.82	4.25	4.19	-14.93
	50	49.03	1.97	-1.94	47.42	2.94	-5.16
五味子甲素	0.25	0.24	4.62	-2.91	0.23	5.05	-8.20
	5	4.75	1.89	-4.91	4.57	3.50	-8.51
	50	48.21	2.48	-3.58	47.03	1.61	-5.93
五味子酚	0.25	0.23	1.21	-6.70	0.22	3.49	-10.06
	5	4.77	1.56	-4.67	4.42	6.89	-11.66
	50	49.64	2.10	-0.71	46.55	5.75	-6.89

2.4.5 样本稳定性考察 按“2.4.2”项下方法制备低、中、高浓度的质量控制样本,加入空白全血,考察全血样本的稳定性,包括室温(25℃)放置 4 h 的短期稳定性,-20℃冷冻条件下保存 30 d 的长期稳定性,3 次冻融循环后的稳定性,以及样本处理后在室温下放置 24 h 的稳定性。稳定性结果见表 5。

2.5 应用

收集 2014 年 6 月—2015 年 2 月在第二军医大学附属长征医院器官移植科接受同种异体肝移植的患者血样进行药动力学研究。该试验以保障受试者权益为前提,试验方案经长征医院伦理委员会

每一浓度进行 6 样本分析,连续测定 3 d,并与标准曲线同时进行,计算质量控制样本测得的浓度,与配置浓度对照,计算方法的准确度与精密度,结果见表 3。

2.4.4 提取回收率和基质效应 将质控样本经前处理(按“2.2”项下方法操作)后的测定结果与空白全血经前处理后再加入待测组分后进样测定的结果比较,考察待测物及内标的提取回收率。将空白全血前处理后再加待测组分的测定结果与同浓度对照品溶液的测定结果进行比较,考察基质效应,结果见表 4。

批准后实施,试验纳入的患者均知情同意。共收集 15 名患者的血标本,其中男性 11 例,女性 4 例。患者平均年龄 51.7 岁。患者术后均采用以他克莫司为基础的免疫抑制治疗方案,并在术后早期(术后 30 d 内)加服五酯胶囊。给药方案如下:他克莫司和五酯胶囊均每 12 h 给药 1 次(即 6:00 和 18:00 服药),每次给药剂量分别为 2, 11.25 mg。试验当天患者 18:00 同时服用他克莫司和五酯胶囊后,于服药即刻(0 h)、0.5, 1, 2, 4, 8, 12 h 从 upper 肢静脉采血 2 mL,置于含 EDTA 的抗凝管中,于-20℃保存并在适当时候测定。各待测物质药动力学参数见表 6。

表 4 提取回收率和基质效应

Tab. 4 Extract recovery and matrix effect

待测物	浓度/ ng·mL ⁻¹	提取回收率		基质效应	
		平均值/%	RSD/%	平均值/%	RSD/%
他克莫司	0.5	94.93	3.97	104.33	3.96
	5	93.15	1.82	102.88	1.82
	30	95.26	1.02	107.66	1.02
五味子酯甲	1.5	85.61	0.38	87.81	0.38
	30	97.63	0.39	77.76	0.39
	300	92.42	0.83	91.69	0.83
五味子醇甲	0.25	82.39	1.86	66.73	6.34
	5	88.73	2.33	55.35	2.35
	50	90.72	0.96	64.46	0.96
五味子醇乙	0.25	96.72	1.58	63.70	1.59
	5	93.39	1.15	63.63	1.15
	50	96.75	0.88	62.72	0.88
五味子甲素	0.25	88.46	2.48	85.09	2.43
	5	89.45	1.21	70.29	1.20
	50	93.37	0.71	79.91	0.72
五味子酚	0.25	88.94	1.06	114.36	1.050
	5	99.46	1.56	97.30	1.55
	50	89.05	0.96	104.45	0.96
子囊霉素	10	98.28	2.03	103.10	4.32

表 5 待测物在患者全血中的稳定性

Tab. 5 Stability of analetes in patients' whole blood

待测物	理论浓度/ ng·mL ⁻¹	短期稳定性		长期稳定性		冻融稳定性		样本处理后稳定性	
		实测浓度	偏差/%	实测浓度	偏差/%	实测浓度	偏差/%	实测浓度	偏差/%
他克莫司	0.5	0.48	-4.11	0.48	-4.42	0.46	-7.26	0.45	-9.78
	5	4.53	-9.29	4.49	-10.24	4.53	-9.21	4.50	-9.93
	30	30.17	0.58	27.70	-7.66	29.82	-0.59	26.59	-11.33
五味子酯甲	1.5	1.55	3.42	1.52	1.64	1.54	2.86	1.50	0.09
	30	31.31	4.35	30.98	3.26	31.01	3.36	31.19	3.99
	300	282.79	-5.73	269.46	-10.18	277.75	-7.41	255.17	-14.94
五味子醇甲	0.25	0.26	4.28	0.23	-8.81	0.26	0.43	0.23	-8.78
	5	4.51	-9.76	4.44	-11.20	4.43	-11.48	4.48	-10.34
	50	49.22	-1.55	48.97	-2.07	51.03	2.05	45.03	-9.95
五味子醇乙	0.25	0.25	-1.51	0.24	-4.81	0.24	-5.23	0.25	-0.79
	5	4.45	-10.95	4.46	-10.84	4.49	-10.02	4.52	-9.66
	50	50.19	0.388	49.10	-1.80	51.68	3.35	46.58	-6.83
五味子甲素	0.25	0.24	-3.94	0.24	-4.12	0.23	-4.34	0.23	-6.54
	5	4.90	-2.05	4.83	-3.49	4.80	-3.93	4.85	-3.01
	50	42.90	-14.21	51.29	2.58	52.46	4.92	48.31	-3.38
五味子酚	0.25	0.24	-3.79	0.241	-3.79	0.24	-3.55	0.23	-7.14
	5	4.91	-1.82	4.88	-2.39	4.87	-2.62	4.93	-1.27
	50	49.34	-1.32	49.09	-1.81	51.74	3.47	45.09	-9.82

表 6 肝移植患者体内各待测物药动学参数

Tab. 6 The mean pharmacokinetic parameters of the analetes in liver transplant recipients

参 数	他克莫司	五味子酯甲	五味子醇甲	五味子醇乙	五味子甲素	五味子酚
$C_{max}/ng·mL^{-1}$	17.78±11.92	58.50±16.00	3.98±2.52	10.79±6.63	3.00±2.56	1.25±0.31
T_{max}/h	3.58±3.32	2.50±1.50	1.82±0.65	1.64±1.18	1.88±1.35	1.36±0.63
$t_{1/2}/h$	16.59±24.24	4.55±1.78	4.00±2.69	7.66±2.27	5.13±2.25	6.91±1.98
MRT/h	24.65±34.38	6.09±0.79	7.28±4.91	11.44±3.24	8.09±4.42	11.23±3.69
$AUC_{0-4}/ng·h·mL^{-1}$	112.87±48.09	437.10±251.41	16.17±6.69	61.93±23.50	11.75±6.46	9.05±2.97
$AUC_{0-∞}/ng·h·mL^{-1}$	242.58±114.91	619.10±237.76	20.18±6.08	93.59±32.12	14.83±6.81	15.59±4.30

3 结论

本研究首次建立了应用 LC-MS/MS 同时测定移植患者体内他克莫司、五味子甲素、五味子酯甲、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酚的方法,该方法简便快捷,灵敏度高,专属性强,具有良好的精密度和准确度,适合临床样本的分析与测定。

本实验中测定样本为全血而非血浆主要是因为他克莫司与红细胞结合率很高,仅少部分游离在血浆中,全血浓度显著高于血浆^[7]。因此,为实现他克莫司与五酯胶囊主要成分的同时测定,需采用全血样本。本实验中全血样本首先经硫酸锌处理,使血细胞破裂,继而用甲醇蛋白沉淀,去除了全血中复杂基质的干扰,取得了较好的效果。

笔者前期选择了沃特世 UPLC BEH C₁₈ 色谱柱和安捷伦 Poroshell 120 SB-C₁₈ 色谱柱进行实验,结果均不理想,待测物他克莫司和内标子囊霉素峰形有拖尾现象。使用安捷伦 Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱进行样本分析的结果较好。

以往文献曾报道移植患者体内他克莫司血药浓度的测定方法^[8-9], 也有文献报道五酯胶囊或五味子木脂素成分在动物或健康志愿者体内的药动学研究^[3,10-11], 但未见报道同时测定移植患者体内他克莫司与五酯胶囊的血药浓度的文章, 临床中他克莫司与五酯胶囊联合应用非常普遍, 且两药的相互作用是近年来的研究热点^[4,12]。因此, 建立同时测定移植患者体内他克莫司、五味子甲素、五味子酯甲、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酚的血药浓度的方法, 对进一步深入研究五酯胶囊对他克莫司的影响具有重要意义。

REFERENCES

- [1] WALLEMACQ P E, REDING R. Tacrolimus, a novel immunosuppressant in organ transplantation: clinical, biomedical, and analytical aspects [J]. Clin Chem, 1993, 39(11 Pt 1): 2219.
- [2] KUYPERS D R. Immunosuppressive drug monitoring-what to use in clinical practice today to improve renal graft outcome [J]. Transpl Int, 2005, 18(2): 140-150.
- [3] WEI H, MIAO H, YUN Y, et al. Validation of an LC-MS/MS method for quantitative analysis of the five bioactive components of Wuzhi capsule in human plasma samples [J]. Ther Drug Monit, 2014, 36(6): 781-788.
- [4] HUAWEN X, XIAOCHUN W, QING L, et al. Effects of *Schisandra sphenanthera* extract on the pharmacokinetics of tacrolimus in healthy volunteers [J]. Br J Clin Pharmacol, 2007(64): 469-475.
- [5] PAVAN M, CHAUDHARI A P, RANGANTH R. Altered bioavailability of tacrolimus following intravenous administration of tigecycline [J]. Am J Kidney Dis, 2011, 57(2): 354.
- [6] PAGE R L, MUELLER S W, LEVI M E, et al. Pharmacokinetic drug-drug interactions between calcineurin inhibitors and proliferation signal inhibitors with antimicrobial agents: implications for therapeutic drug monitoring [J]. J Heart Lung Transplant, 2011, 30(2): 124-135.
- [7] STAATZ C E, TETT S E. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation [J]. Clin Pharmacokinet, 2004, 43(10): 623-653.
- [8] XIA L F, XUE F, LIU L, et al. HPLC-MS/MS determination of blood tacrolimus concentrations in early liver transplant recipients [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2010, 30(9): 1672-1675.
- [9] LIU X X, HU S S, CHEN Z J, et al. Determination of tacrolimus in whole tandem mass spectrometry and its study in liver transplant patients blood by liquid chromatographic-application in the pharmacokinetic [J]. Pharm Clin Res(药学与临床研究), 2013, 21(4): 329-333.
- [10] WANG Q, WANG Y, SONG X M, et al. Simulations determination of six lignans compounds in rat plasma and pharmacokinetics by UHPLC-MS/MS [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2014, 36(2): 266-271.
- [11] LI H L, JI D, MAO C Q, et al. Rapid determination of three lignans in the fruits of *Schisandra chinensis* by LC-MS methods and analysis of their pharmacokinetics in rat plasma [J]. Chin Pharm Bull(中国药理学通报), 2013, 29(9): 1313-1317.
- [12] WEI H, TAO X, DI P, et al. Effects of traditional Chinese medicine Wuzhi capsule on pharmacokinetics of tacrolimus in rats [J]. Drug Metab Dispos, 2013, 41(7): 1398-403.

收稿日期: 2015-11-20

迷迭香酸减少 RhoA 的表达抑制宫颈癌细胞的转移能力的研究

滕淑静^{1,2}, 宋旭日¹, 涂剑², 罗岚¹, 柳宁¹ (1. 岳阳职业技术学院药理教研室, 湖南 岳阳 414000; 2. 南华大学药物药理研究所, 湖南 衡阳 421000)

摘要: 目的 研究迷迭香酸对宫颈癌细胞转移能力的抑制作用及其可能机制。方法 用 1, 5 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的迷迭香酸分别处理宫颈癌细胞, 通过 Transwell 小室法检测细胞的转移能力、半定量 RT-PCR 法检测细胞 RhoA mRNA 的表达、免疫荧光法检测 RhoA 蛋白的表达情况。结果 5, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的迷迭香酸可以抑制宫颈癌细胞的转移($P<0.01$), 而且 2 组细胞表达 RhoA 明显减少($P<0.05$)。结论 迷迭香酸可以抑制宫颈癌细胞的转移能力, 其作用机制可能与减少细胞 RhoA 的表达有关。

关键词: 迷迭香酸; 宫颈癌; 转移; RhoA

中图分类号: R285.4

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)07-0859-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.07.006

基金项目: 湖南省教育厅科研项目(13C980)

作者简介: 滕淑静, 女, 硕士, 讲师 Tel: 18974060199 E-mail: 1318048464@qq.com