ISSN 1672-2981
CN43-1408/R

- 科技部中国科技论文统计源期刊
- 中国科技核心期刊
- 美国CA、波兰IC收录期刊
- 中国核心期刊（遴选）数据库收录期刊

中南药学

第十九卷 第八期

第1511~1756页

二〇二一年八月

CENTRAL SOUTH PHARMACY

中南药学

ZHONGNAN YAOXUE

2021年8月 第19卷 第8期
Volume 19 Number 8 August 2021

- 哈蟆油与青蛙油蛋白质组学差异分析
- 褪黑素联合紫杉醇对卵巢癌SKOV3细胞增殖抑制及凋亡作用的相关机制研究
- 基于钙敏感受体分子表达水平探讨大鼠脂肪组织胰岛素抵抗发病机制
- 从心力衰竭治疗理念变化看血管紧张素受体脑啡肽酶抑制剂研究进展

ISSN 1672-2981
9 771672 298217 08>

2021/8

中南药学审稿专家

（按姓名笔画排序）

丁劲松　丁　骁　丁莉坤　丁惠萍　于海洋　马恩龙　马瑞娟　王　玉　王立辉　王永军
王亚平　王　成　王　刚　王启斌　王　玮　王明仲　王春江　王　珊　王　亮　王莉宁
王　峰　王淑梅　王　颖　王　静　文　锐　方平飞　尹　桃　尹　焯　孔令提　孔维军
邓远雄　邓桂明　邓　晟　甘　勇　左笑丛　卢海儒　申月明　田雪松　白　勇　冯宇飞
冯炜炜　冯　星　冯素香　边　原　吕永宁　朱运贵　朱荣华　朱　虹　朱　斌　伍参荣
向大雄　刘小伟　刘艺平　刘文虎　刘文辉　刘玉峰　刘世坤　刘芳群　刘丽华　刘应蛟
刘　宏　刘茂柏　刘　畅　刘建平　刘剑敏　刘　娜　刘晓慧　刘高峰　刘海林　刘梦扬
刘　敏　刘塔斯　刘雁鸣　刘　斌　刘新义　刘　韶　江俊麟　江翊国　汤正义　汤海峰
许　喆　孙平华　孙　进　孙国祥　孙晓慧　孙铁民　严建业　劳海燕　苏　丹　苏玉文
苏薇薇　杜恩明　李文龙　李向平　李　芬　李　玲　李顺祥　李语玲　李晓宇　李晓晖
李健和　李　娟　李乾斌　李　爽　李湘平　李新刚　杨志平　杨　波　杨树龙　杨星钢
杨献文　肖轶雯　肖贵南　肖　雪　肖朝江　吴昊姝　吴　甜　邱玉玲　邱　宏　何江江
何　艳　何鸽飞　余自成　谷福根　邹　娟　宋　程　张　川　张　永　张毕奎　张　岗
张纯刚　张　凭　张相林　张龚之　张顺芝　张　俐　张洪文　张　峻　张程亮　陆晓彤
陈　力　陈卫东　陈　平　陈四保　陈西敬　陈志永　陈志高　陈　英　陈勇川　陈　琦
陈富超　陈　鹏　奉建芳　范国荣　林丽美　林坚涛　林　菁　杭永付　易著文　罗开忠
罗　兰　罗　聪　金　卓　金　锐　金鹏飞　周冬初　周　权　周志旭　周艳钢　周　晋
郑杭生　郑稳生　屈　建　孟宪生　赵龙山　赵立波　赵志刚　赵春杰　赵　亮　赵家宏
赵　娣　赵瑞芝　赵　鹏　胡彦武　胡　楠　柳　芳　柳鹏程　段现来　段宣初　姜志平
姜　茹　姜　敏　姜翠敏　姜德建　娄月芬　宫　建　祝德秋　贺　敏　秦红岩　秦绪军
袁　成　袁红梅　袁志翔　袁　易　莫斌斌　贾王平　贾素洁　夏彬彬　夏道宗　原永芳
原海燕　柴　琴　倪　赞　徐文峰　徐必学　徐　珽　徐　萍　徐　硕　高会乐　高利臣
高德民　郭代红　郭　韧　郭怀忠　郭姗姗　郭海彪　郭　智　郭源源　唐　芳　黄云峰
黄　勋　黄胜阳　黄振鹏　梅升辉　曹仕鹏　曹　伟　曹　玲　曹　蔚　龚力民　常福厚
麻兵继　章越凡　梁光平　寇龙发　隋　峰　巢志茂　彭文兴　彭再梅　彭　亮　葛宇清
董亚琳　董得时　董德刚　蒋云生　蒋利和　蒋受军　蒋学华　蒋孟良　蒋德旗　韩晓芳
覃　丽　程汝滨　程　军　程忠哲　傅　强　舒　畅　鲁　琼　温金华　谢元林　谢　诚
谢奕丹　蒙光义　睢大筧　蔡　宇　蔡洪鲲　蔡骅琳　裴　奇　廖端芳　廖德华　谭红胜
谭胜蓝　谭朝阳　肇丽梅　翟　青　缪明星　黎　苏　颜　苗　潘卫三　潘宏春　樊启猛
薄　涛　魏高文

中南药学
ZHONGNAN YAOXUE

月刊　2003 年 4 月创刊　第 19 卷　第 8 期（总第 187 期）　2021 年 8 月 20 日出版

顾问
周宏灏　饶健

主编 / 社长
李焕德

编辑部主任
邬志娟

主管单位
湖南省食品药品监督管理局

主办单位
湖南省药学会

编辑：中南药学编辑委员会
地址：长沙市人民中路 139 号中南大学湘雅二医院内
出版：中南药学杂志社
发行：湖南省报刊发行局
印刷：长沙建华印务有限公司
订阅：全国各地邮局
定价：每期 20.00 元，全年 240.00 元
邮编：410011
电话：（0731）82258487/84895602
传真：（0731）82258487
邮发代号：42-290
投稿网址：http://znyx.cbpt.cnki.net
E-mail：znyxzz2003@vip.163.com
广告经营许可证：4300004000764
中国标准连续出版物号
ISSN 1672-2981
CN43-1408/R

2021 年版权归《中南药学》编辑部所有

本刊声明：
本刊已入编中国知网等数据库，其收录论文作者著作权使用费与本刊稿酬一并支付。凡不同意编入数据库的稿件，请在来稿时声明。

除非特别声明，本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点。

目　次

研究论文

（1511）哈蟆油与青蛙油蛋白质组学差异分析 …… 董颖，张鹤，张玉尧，等

（1519）褪黑素联合紫杉醇对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖抑制及凋亡作用的相关机制研究 …… 朱雯婷，陈亦清，刘晓敏，等

（1524）基于网络药理学的福建野鸦椿果三萜抗肝纤维化的药效机制研究 …… 蒋佩佳，洪译，谭洋，等

（1532）包载姜黄素的羧甲基化白及多糖 - 壳聚糖聚电解质复合膜对大鼠口腔溃疡的治疗作用研究 …… 王玉蓉，巨佳，王济，等

（1537）基于 UHPLC-Q-exactive obitriap MS 的延胡索醋制前后化学成分分析 …… 李振雨，丁青，吕渭升，等

（1543）脑心通通过抑制 TRPM7 抗神经元氧糖剥夺 / 复氧损伤 …… 马妍，吴丹，张伟，等

（1548）法匹拉韦的合成工艺研究…… 魏天航，徐明杰，郭建超，等

（1552）孟鲁司特钠口腔崩解片的制备和质量评价研究 …… 孙钦勇，冯中，高帆俐，等

（1558）基于钙敏感受体分子表达水平探讨大鼠脂肪组织胰岛素抵抗发病机制 …… 阚玉娜，谢佳明，简白羽，等

（1563）HPLC-Q-TOF-MS/MS 法分析防己茯苓汤的化学成分 …… 刘杨，杨玉佩，沈冰冰

（1569）通痹胶囊通过 NF-κB 信号通路缓解弗氏完全佐剂所致大鼠炎性痛的作用机制 …… 张倩，闫国强，张俊艳，等

（1575）盐酸左氧氟沙星缓释片的制备及药物释放影响因素的考察 …… 郑红，宋立倩，房东阳

（1581）人参皂苷 Rh_3 联合多西他赛抑制 PC3 肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭 …… 孟佳佳，王丹丹，王陈萍

（1586）甘草次酸抑制幽门螺杆菌诱导的 Th17 炎性反应研究 …… 于卫华，郑倩婧，马翠

（1590）UPLC-MS/MS 法同时测定人血浆中 5 种抗真菌药物的血药浓度 …… 姚远，卢伟，吕光辉

（1595）六味地黄提取物及其联合顺铂对人肝癌 BEL-7402 细胞迁移和血管新生因子基因表达的影响 …… 周牡娜，刘检，石雕，等

《中南药学》杂志第四届编委会

主编
李焕德

副主编
王　玉　尹　桃　向大雄　刘世坤
刘芳群　孙国祥　孙铁民　苏薇薇
余自成　张毕奎　张相林　赵志刚
潘卫三

编委（按姓氏笔画排列）
丁劲松　马恩龙　王　玉　王　珊
王立辉　王永军　王淑梅　文晓柯
方平飞　尹　桃　甘　勇　左笑丛
卢海儒　冯　星　吕永宁　朱运贵
朱荣华　向大雄　刘　浏　刘　韶
刘世坤　刘芳群　刘茂柏　刘建平
刘高峰　刘塔斯　刘雁鸣　汤海峰
孙　进　孙国祥　孙树森　孙铁民
劳海燕　苏薇薇　李　昕　李　玲
李文莉　李向平　李运曼　李顺祥
李晓宇　李健和　李焕德　杨星钢
杨献文　肖贵南　何江江　余自成
谷福根　张　弋　张　俐　张　峻
张毕奎　张庆华　张相林　张洪文
陆晓彤　陈　力　陈　琦　陈卫东
陈西敬　陈孝治　陈勇川　武新安
范国荣　林厚文　金鹏飞　周　权
屈　建　孟宪生　赵立波　赵志刚
姜　玲　姜翠敏　姜德建　娄月芬
祝德秋　秦红岩　袁　成　袁　易
夏道宗　原永芳　徐　珽　徐　萍
徐必学　郭怀忠　唐　芳　曹　玲
常福厚　巢志茂　彭文兴　董亚琳
董得时　蒋云生　蒋孟良　傅　强
温金华　睢大筵　裴月湖　谭桂山
肇丽梅　翟　青　潘卫三　魏高文

青年编委（按姓氏笔画排列）
丁　骁　于海洋　王　刚　王　亮
孔维军　边　原　刘　宏　刘剑敏
刘梦扬　孙平华　孙晓慧　苏　丹
杜恩明　李　娟　李文龙　李语玲
李新刚　杨志平　肖　雪　肖朝江
邱玉玲　张　凭　张纯刚　张程亮
陈富超　罗　聪　金　锐　周志旭
赵　亮　赵　娣　贺　敏　胡　楠
徐　硕　徐文峰　高利臣　郭　韧
郭海彪　郭源源　梅升辉　龚力民
梁光平　寇龙发　蒋德旗　韩晓芳
程汝滨　舒　畅　谢　诚　谢奕丹
蒙光义　廖德华

编辑：邬志娟　彭金飞　李　科
陆窈窈

（1600）阿胶对去卵巢小鼠学习记忆及海马 Aβ 影响的研究
…… 张晓双，白黎明，白璐

（1604）一种氨肽酶 N 抑制剂抑酶活性检测试剂盒的开发
…… 周奕婷，徐鑫悦，宋吉亮，等

（1608）知母配方颗粒中 4 种成分在大鼠体内的药动学研究
…… 朱琳，毛梦倩，刘亮亮，等

（1613）黄芪增益方对小鼠免疫功能的影响
…… 田俊娜，王婷婷，王双，等

（1618）马里苷通过调控自噬保护糖尿病 db/db 小鼠心肌损伤
…… 祖力皮亚·阿布拉，李甜，兰怡，等

药物分析与检验

（1624）牛蒡根提取物指纹图谱研究…… 吴琼，马群，胡北，等

（1629）临时用重组人干扰素 α-2b 鼻腔喷雾剂的配制和稳定性考察
…… 阮丽梅，倪晓燕，吕凤文，等

（1634）HPLC-FLD 法测定不同产地林蛙卵和林蛙油中雌二醇的含量
…… 刘芳馨，王月洁，许佳明，等

（1637）高效液相色谱法测定拉莫三嗪片中的有关物质
…… 姜金生，石笑弋，刘轶，等

（1643）离子色谱法测定硫酸阿米卡星注射剂中抗氧剂和硫酸盐的含量
…… 袁力，梅芊，刘英

（1648）超高效液相色谱 - 串联质谱法测定东北红豆杉中 7 种黄酮的含量
…… 彭波，李洪权，柏玉冰

（1653）高效液相色谱法检测医疗美容产品中 9 种酰胺类局麻药
…… 沈心，顾晓风，周震宇

（1656）X 射线荧光光谱法快速比较黄精根茎及须根有害元素含量
…… 唐敏，韩伟丹，王丽君，等

（1661）复方感冒灵颗粒多指标成分测定方法的建立及综合质量评价
…… 章泽恒，李鹏辉，曾文文，等

（1666）高效液相色谱法同时测定骨炎消方中 8 种有效成分的含量
…… 李田洋，杨婷婷，张琪，等

综述

（1670）从心力衰竭治疗理念变化看血管紧张素受体脑啡肽酶抑制剂研究进展 …… 陈晨，刘梅，罗敏，等

（1675）抗过敏中药的活性物质研究及临床应用
…… 余学英，吴子龙，陈芳，等

（1680）光叶巴豆化学成分及其药理活性研究进展
…… 韩正枝，曹碧霞，刘荣

（1685）肺吸入制剂非临床药代动力学研究的一般策略
…… 陈美玲，黄亚军，姜德建，等

（1690）黄精多糖的含量影响因素及其抗糖尿病作用研究进展
…… 王雪芹，黄勇，叶方，等
（1695）达原饮的临床应用与药理作用研究进展
…… 刘爽，晋臻，刘海林，等

医院药学

（1700）基于美国 FAERS 数据的索磷布韦维帕他韦与艾尔巴韦格拉瑞韦不良事件安全警戒研究 …… 王娜，夏暄，周月阳，等
（1706）基于 FAERS 数据库的阿仑单抗不良事件信号挖掘与分析
…… 赵尹瑜，谢昊，曹明浩，等
（1711）基于 FAERS 数据库的美洛昔康不良反应信号挖掘研究
…… 谢昊，李若菲，丁紫嫣，等
（1716）阿米替林片合理应用评价标准的建立及应用
…… 曹迪，程军，司福国
（1721）骨科围手术期抗凝药物及氨基己酸合理使用评价
…… 叶鸣，赵磊，方佳，等
（1725）注射用烟酰胺药品不良反应分析… 景天闯，张丹，范晶晶，等

药物与临床

（1729）不同剂量替加环素治疗碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌医院获得性肺炎的有效性和安全性研究 …… 陈凡，林敏，胡述立，等
（1733）基于 CYP3A4 和 CYP2C19 酶活性探究伏立康唑与 COVID-19 潜在抗病毒药物间的相互作用 …… 宋文彬，李兴德，张阳，等

药事管理

（1738）某儿童医院住院药房闭环流程模块化改造的实践
…… 王园书，赵耀，刘思婷
（1743）本院静脉用药集中调配中心信息化管理与流程优化的效果评价
…… 陈晓旭，聂春杰，葛艳慧，等

药品不良反应

（1748）哌拉西林他唑巴坦致药物超敏反应综合征 1 例… 雷海波，刘湘
（1751）1 例卡瑞利珠单抗致中毒性表皮坏死松解症并文献复习
…… 何琳，陈适，夏陈英，等
（1754）1 例阿昔莫司诱发的 G-6-PD 缺乏患者发生急性溶血性贫血的分析 …… 钟延峰，王晓珍，郭春钰

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*246*zh*P*20.0*50*2021-8
本期责任编辑：邬志娟，陆窈窈，彭金飞，李科
英文编辑：周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 19, Number 8 August 20 2021

Consultant
ZHOU Hong-hao, RAO Jian

Editor-in-Chief
LI Huan-de

Chief of Editorial Office
LI Huan-de

Chief of Editorial Department
WU Zhi-juan

Directed by
Food and Drug Administration of Hunan Province

Edited by
Editorial Board of Central South Pharmacy (139 Middle Renmin Road, Changsha, China)

Tel
(0731) 822584871/84895602

Fax
(0731) 82258487

Website of Authors
http://znyx.cbpt.cnki.net

E-mail
znyxzz2003@vip.163.com

Published by
Central South Pharmacy Publishing House

Advertisement Publishing Certification
4300004000764

CONTENTS IN BRIEF

(1511) Differential proteomics in oviducts of Chinese brown frogs and *Rana nigromaculata* …… *DONG Ying, ZHANG He, ZHANG Yu-yao, et al*

(1519) Effect of melatonin combining paclitaxel on the proliferation and apoptosis of SKOV3 cell in ovarian cancer
…… *ZHU Wen-ting, CHEN Yi-qing, LIU Xiao-min, et al*

(1524) Network pharmacology of triterpenoids from the fruits of *Euscaphis fukienensis* Hsu. against liver fibrosis
…… *JIANG Pei-jia, HONG Yi, TAN Yang, et al*

(1532) Curcumin-loaded polyelectrolyte composite membrane and its therapeutic effect on oral ulcers in rats
…… *WANG Yu-rong, JU Jia, WANG Ji, et al*

(1537) Chemical constituents in Corydalis Rhizoma before and after vinegar processing based on UHPLC-Q-exactive obitriap MS
…… *LI Zhen-yu, DING Qing, LYU Wei-sheng, et al*

(1543) Naoxintong protects cortical neuron cells from oxygen-glucose deprivation/reoxygenation induced injury through inhibiting TRPM7
…… *MA Yan, WU Dan, ZHANG Wei, et al*

(1548) Synthesis process of favipiravir
…… *WEI Tian-hang, XU Ming-jie, GUO Jian-chao, et al*

(1552) Preparation and quality evaluation of montelukast sodium orally disintegrating tablets ……*SUN Qin-yong, FENG Zhong, GAO Fan-li, et al*

(1558) Mechanism of insulin resistance based on calcium-sensitive receptor molecular expression and PI3K/AKT signaling pathway
…… *KAN Yu-na, XIE Jia-ming, JIAN Bai-yu, et al*

(1563) Chemical constituents of Fangji Fuling decoction by HPLC-Q-TOF-MS/MS …… *LIU Yang, YANG Yu-pei, SHEN Bing-bing*

(1569) Mechanism of Tongbi capsules relieving inflammatory pain induced by Freund's complete adjuvant through NF-κB signaling pathway in rats
…… *ZHANG Qian, YAN Guo-qiang, ZHANG Jun-yan, et al*

(1575) Preparation of levofloxacin hydrochloride sustained-release tablets and influence factors of drug release
…… *ZHENG Hong, SONG Li-qian, FANG Dong-yang*

(1581) Ginsenoside Rh_3 combined with docetaxel inhibits the proliferation, migration and invasion of PC3 cells
…… *MENG Jia-jia, WANG Dan-dan, WANG Chen-ping*

Postal code
42-290

Printed by
Changsha city Kaifu district Shanjun printing Factory

Publish
Editorial Office of Central South Pharmacy

Subscribe
Post office nationwide for subcription please contact the Publishing House of our journal

Price
￥ 20.00 an issue
￥ 240.00 a year

CSSN
ISSN 1672-2981
CN43-1408/R

Copyright 2021 by the Central South Pharmacy

All articles published represent the opinions of the authors, do not reflect the official policy of the Editorial Board, unless this is clearly specified.

(1586) Inhibition of glycyrrhetinic acid on Th17 responses induced by *H. pylori* ……*YU Wei-hua, ZHENG Qian-jing, MA Cui*

(1590) Simultaneous determination of 5 antifungal drugs in human plasma by UPLC-MS/MS …… *YAO Yuan, LU Wei, LYU Guang-hui*

(1595) Effect of Liuwei Dihuang extract and its combination with cisplatin on the gene expression of migration and angiogenesis factors in human hepatoma BEL-7402 cells ……*ZHOU Mu-na, LIU Jian, SHI Diao, et al*

(1600) Effect of Asini Corii Colla on learning and memory and Aβ in the hippocampus of ovariectomized mice
…… *ZHANG Xiao-shuang, BAI Li-ming, BAI Lu*

(1604) Development of detection kit of inhibitory activity of aminopeptidase N inhibitor …… *ZHOU Yi-ting, XU Xin-yue, SONG Ji-liang, et al*

(1608) Pharmacokinetics of 4 components in dispensing granules of *Anemarrhenae Rhizoma* in rats
…… *ZHU Lin, MAO Meng-qian, LIU Liang-liang, et al*

(1613) Immunomodulatory effect of Huangqi Zengyi formula on mice
…… *TIAN Jun-na, WANG Ting-ting, WANG Shuang, et al*

(1618) Marein protects myocardial injury in diabetic db/db mice by regulating the autophagy …… *Zulipiya • Abula, LI Tian, LAN Yi, et al*

(1624) HPLC fingerprints of the extract of *Arctium lappa* L. root
…… *WU Qiong, MA Qun, HU Bei, et al*

(1629) Preparation and stability of recombinant human interferon α-2b nasal spray for temporary use … *RUAN Li-mei, NI Xiao-yan, LYU Feng-wen, et al*

(1634) Determination of estradiol in eggs and oil of *Rana Dybowskii* by HPLC-FLD
…… *LIU Fang-xin, WANG Yue-jie, XU Jia-ming, et al*

(1637) Determination of related substances in lamotrigine tablets by HPLC
…… *JIANG Jin-sheng, SHI Xiao-yi, LIU Yi, et al*

(1643) Determination of antioxidants and sulfate in amikacin sulfate injections by ion chromatography …… *YUAN Li, MEI Qian, LIU Ying*

(1648) Simultaneous determination of 7 flavones in *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. by UHPLC-MS/MS …… *PENG Bo, LI Hong-quan, BAI Yu-bing*

(1653) Determination of 9 amide local anesthetics in medical beauty products by high performance liquid chromatography
…… *SHEN Xin, GU Xiao-feng, ZHOU Zhen-yu*

(1656) Rapid determination of hazardous elements in rhizome and fibrous root of *Polygonatum sibiricum* Red by X-ray fluorescence spectrometry
…… *TANG Min, HAN Wei-dan, WANG Li-jun, et al*

(1661) Multiple content determination of compoumd Ganmaoling granules and comprehensive quality evaluation
…… *ZHANG Ze-heng, LI Peng-hui, ZENG Wen-wen, et al*

(1666) Simultaneous determination of 8 effective components in Guyanxiao prescription by HPLC …… *LI Tian-yang, YANG Ting-ting, ZHANG Qi, et al*

(1670) Research progress in angiotensin receptor-neprilysin inhibitor from the changing perspective of heart failure treatment
…… *CHEN Chen, LIU Mei, LUO Min, et al*

(1675) Active substances in antiallergic traditional Chinese medicine
……*YU Xue-ying, WU Zi-long, CHEN Fang, et al*

(1680) Research progress on chemical constituents and pharmacological effect of *Croton laevigatus* …… *HAN Zheng-zhi, CAO Bi-xia, LIU Rong*

(1685) Non-clinical pharmacokinetics of lung inhalation preparations
…… *CHEN Mei-ling, HUANG Ya-jun, JIANG De-jian, et al*

(1690) Influence factors on the content of polygonatum polysaccharide and its anti-diabetes mechanism
…… *WANG Xue-qin, HUANG Yong, YE Fang, et al*

(1695) Research progress in clinical application and pharmacological effect of Dayuan decoction …… *LIU Shuang, JIN Zhen, LIU Hai-lin, et al*

(1700) Security alert of sofosbuvir/velpatasvir and elbasvir/grazoprevir adverse drug events based on FAERS
…… *WANG Na, XIA Xuan, ZHOU Yue-yang, et al*

(1706) Data mining and analysis of adverse events signals of alemtuzumab based on FAERS database … *ZHAO Yin-yu, XIE Hao, CAO Ming-hao, et al*

(1711) Adverse drug reaction signal mining of meloxicam based on FAERS database …… *XIE Hao, LI Ruo-fei, DING Zi-yan, et al*

(1716) Evaluation criteria for the rational use of amitriptyline tablets
…… *CAO Di, CHENG Jun, SI Fu-guo*

(1721) Rational use of anticoagulants and aminocaproic acid in orthopedic perioperative period …… *YE Ming, ZHAO Lei, FANG Jia, et al*

(1725) Adverse drug reactions induced by nicotinamide for injection
…… *JING Tian-chuang, ZHANG Dan, FAN Jing-jing, et al*

(1729) Efficacy and safety of different doses of ticacycline for hospital acquired pneumonia induced by carbapenem resistant klebsiella pneumoniae
…… *CHEN Fan, LIN Min, HU Shu-Li, et al*

(1733) Drug-drug interaction between voriconazole and potential anti-2019-nCoV candidates based on the CYP3A4 and CYP2C19 enzyme activity
…… *SONG Wen-bin, LI Xing-de, ZHANG Yang, et al*

(1738) Modularized transformation of close-loop management in the inpatient pharmacy of a children's hospital
…… *WANG Yuan-shu, ZHAO Yao, LIU Si-ting*

(1743) Evaluation of PIVAS information management and process optimization
…… *CHEN Xiao-xu, NIE Chun-jie, GE Yan-hui, et al*

研究论文

哈蟆油与青蛙油蛋白质组学差异分析

董颖[1]，张鹤[2*]，张玉尧[2]，潘黛安[2]，魏星华[3*]，赵大庆[2]（1. 鲁西南医院有限公司，山东 聊城 252300；2. 长春中医院大学附属医院，长春 130021；3. 吉林省科普服务中心，长春 130021）

摘要：目的 筛选哈蟆油和青蛙油中的差异蛋白质，发现这些蛋白质与高膨胀度和临床功效相关。**方法** 采用 iTRAQ 结合质谱技术建立哈蟆油和青蛙油蛋白质组数据库，通过比较两个蛋白质组数据库，对筛选的差异蛋白质进行 Gene Ontology 功能注释和生物信息学分析。**结果** 通过比较青蛙油与哈蟆油中蛋白质定量的数据，共筛选出 55 个差异蛋白质，其中 40 个上调蛋白，15 个下调蛋白。哈蟆油中有 15 个含量较高的差异蛋白质，主要参与免疫调节、生长发育等过程；青蛙油中有 40 个含量较高的差异蛋白质，主要参与糖代谢、能量代谢、应激反应、生长发育等过程。**结论** 哈蟆油中含量较高的 15 个差异蛋白质可作为哈蟆油区别于青蛙油的重要活性成分，同时哈蟆油具有较高的膨胀度与其含有大量的黏蛋白类成分密切相关。

关键词：哈蟆油；青蛙油；蛋白质组学；膨胀度；黏蛋白
中图分类号：R282.5 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1511-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.001

Differential proteomics in oviducts of Chinese brown frogs and *Rana nigromaculata*

DONG Ying[1], ZHANG He[2*], ZHANG Yu-yao[2], PAN Dai-an[2], WEI XING-hua[3*], ZHAO Da-qing[2] (1. *Southwestern Lu Hospital*, *Liaocheng Shandong* 252300; 2. *Affiliated Hospital of Changchun University of Chinese Medicine*, *Changchun* 130021; 3. *Jilin Popular Science Service Center*, *Changchun* 130021)

Abstract: Objective To screen differentially expressed proteins from the proteomics database of oviducts of Chinese brown frogs (OCB) and *Rana nigromaculata* (ORN), and determine the relationship between these differentially expressed proteins and high expansion and clinical efficacy. **Methods** The proteomics databases of OCB and ORN were established with iTRAQ technology combined with MS. The differentially expressed proteins were screened, and analyzed with GO annotation and bioinformatics. **Results** Totally 55 differential proteins were identified, including 40 up-regulating and 15 down-regulating proteins. In the OCB, highly expressed 15 proteins mainly involved in the immunomodulation and development, and the antifreeze ingredients were mainly mucin in the OCB. The proteins involving sugar metabolism and energy metabolism and structural glycoproteins were maily in the ORN. **Conclusion** Highly expressed 15 proteins in the OCB, can be used to tell ORN from OCB. Exceptional swelling capacity of OCB is closely related to the large amount of mucins.

Key words: oviducts of Chinese brown frog; oviducts of *Rana nigromaculata*; proteomics; swelling capacity; mucin

基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（No.81503243）；吉林省科技发展计划项目（No.20190101010JH）。
作者简介：董颖，女，硕士，中药师，主要从事中药临床药效研究，E-mail：571124939@qq.com *通信作者：张鹤，女，博士，副研究员，主要从事中药有效成分研究，E-mail：13843148162@163.com；魏星华，男，硕士，工程师，主要从事食品安全功效研究，E-mail：v_stars@163.com

哈蟆油为蛙科动物中国林蛙 *Rana temporaria chensinensis* David 雌蛙的输卵管，为滋补药材，具有补肾益精、健脾益胃、滋阴补肾、润肺生津等功效。中国林蛙的输卵管呈不规则弯曲，位于腹腔中下位两侧，全长呈现粗细不均匀，近肺根段较细，中段渐渐加粗，近子宫段输卵管较粗且略扁，其长度一般为体长的 4 ～ 8 倍，质量为体质量的 20% ～ 26%[1]；呈现乳白色或黄白色，干品偶带有灰白色薄膜状的干皮，呈脂肪样光泽，手摸有滑腻感，质硬且易断；有特殊的油脂气味和腥味，味微甘，嚼之有黏滑感；膨胀度大于 55；其主要成分为蛋白质，含量约占 50% 以上 [2]。常见的伪品黑斑蛙的输卵管（青蛙油）外观性状为不规则弯曲，中间灰黑色瓣膜，管径均一，透明；白色或黄白色，有脂肪样光泽；质脆易碎，手摸之稍有油脂状润滑感；味辛辣，嚼之麻嘴、黏牙；膨胀度大于 55；其主要成分为蛋白质，含量约为 47.5%[3]。在目前的研究中，伪品青蛙油与正品哈蟆油性状上相似，不易区别，但通过显微、薄层色谱等方法可以进行鉴别 [4]。至今研究显示哈蟆油中特异性的成分仅有 1- 甲基海因，但目前在青蛙油中也发现含有该成分 [5]。本研究采用 iTRAQ 技术和质谱分别建立和比较哈蟆油和青蛙油的蛋白质组数据库，筛选两个种属蛙在冬眠前输卵管中蛋白组成的差异。

1 材料

1.1 样品采集

哈蟆油的基源动物为中国林蛙长白山亚种，保护地域为吉林省长白山区域。林蛙采于吉林省蛟河市前进乡（东经 127°40'18.4"，北纬 43°54'20.9"）、永吉县北大湖镇（东经 126°30'14"，北纬 43°27'53"）、舒兰市上营镇（东经 127°15'43.9"，北纬 44°8'25.2"）、桦甸市红石砬子镇（东经 127°6'26.5"，北纬 42°57'17.7"）、集安市清河村（东经 125°55'58.2"，北纬 41°25'59.5"）和安图县三道湾镇（东经 129°10'19.5"，北纬 43°9'29.2"），海拔在 500 ～ 1000 米。黑斑蛙（青蛙）采自于吉林省永吉县北大湖镇（东经 126°30'14"，北纬 43°27'53"）和吉林市（东经 126°25'17"，北纬 44°4'40"）两个地区，海拔在 100 ～ 300 米。中国林蛙和黑斑蛙均经长春中医药大学药学院肖井雷副教授鉴定为正品。

1.2 仪器与试药

Q Exactive 质谱仪（Thermo 公司）；AKTA Purifier 100 蛋白纯化仪、数控 600V 电泳仪（通用 GE Healthcare 公司）；5430R 型低温高速离心机、真空离心浓缩仪（德国 Eppendorf 公司）；胰蛋白酶（Promega 公司）；iTRAQ Reagent-8plex Multiplex Kit（美国 AB SCIEX 公司）；丁香酚（Sigma，纯度：98%，批号：E2069）。

2 方法 [6-7]

2.1 林蛙和黑斑蛙的输卵管（蛙油）摘取

分别取活蛙，沿腹部正中线解剖，取出输卵管，去除筋膜、肉、卵等杂物，用蒸馏水反复清洗至呈乳白色或黄白色，置于阴凉干燥处晾干，研钵研磨成粉末。哈蟆油样品：5 个产地各取 10 只混合后准确称量 100 mg 后混匀；青蛙油样品：两个产地分别取 10 只混合，准确称量 100 mg，混匀。

2.2 蛙油中蛋白质的提取和含量测定

两个蛙油样品各准确称取 10.0 mg，分别加入 1 mL SDT 裂解液，匀浆后沸水浴 5 min，超声破碎 10 min，14 000 g 室温离心 45 min，取上清液，－ 80 ℃保存。考马斯亮蓝法测定两个蛙油样品中蛋白质的含量，哈蟆油蛋白质的质量浓度分别为 8.83 μg • μL^{-1} 和 7.09 μg • μL^{-1}，青蛙油蛋白质的质量浓度为 6.59 μg • μL^{-1}。

2.3 iTRAQ 定量分析

每份样品各取 250 μg，胰酶消化，酶解后的肽段用 8 标 iTRAQ 试剂中的 113、114 和 115 进行标记。采用二维液相（纳升流速 HPLC 液相系统 Easy nLC 和强阳离子交换液相色谱）进行分离，每份样品经分离后用 Q-Exactive 质谱仪进行分析 [8]。

2.4 哈蟆油与青蛙油差异蛋白质筛选

对哈蟆油蛋白质组数据库中 1220 个蛋白质组在样本哈蟆油 113（A）/REF 和 114（B）/REF 与青蛙油 115（C）/REF 中的定量信息进行差异分析，筛选条件为比值＞ 1.5（或比值＜ 0.67），且 P ＜ 0.05。

2.5 生物信息学分析

2.5.1 Gene Ontology（GO）功能注释分析　在 GO 注释过程中，Blast 2 GO 通过比较目标序列和比对序列的相似性、GO 条目来源的可靠性和 GO 有向无环图的结构，将 map 过程中提取的 GO 功能条目中符合条件的条目注释给目标蛋白质。

2.5.2 WEGO 注释分析　利用 WEGO 软件对鉴定到的差异蛋白质的细胞学组件、生物学途径和分子功能完成 GO 注释，比较青蛙油（C/REF）与哈蟆油（$\overline{AB}$/REF）差异蛋白质进行 WEGO 分析。对 GO 2 层次进行汇总。

2.5.3 KEGG 通路注释　利用 KAAS（KEGG automatic annotation server）数据库将目标蛋白质

序列与 KEGG GENES 数据库中的两栖纲蛋白质序列进行比对，通过同源 / 相似蛋白质的 KO 号注释到相关 KEGG 通路上。

3　结果

3.1　青蛙油与哈蟆油差异蛋质白质筛选结果

对青蛙油与哈蟆油中蛋白质定量的数据进行差异比较，筛选出差异表达蛋白质总数为 55 个，其中上调的蛋白质数为 40 个（见表 1），下调的蛋白质数为 15 个（见表 2）。

表 1　青蛙油与哈蟆油相比上调的蛋白质

Tab 1　Up-regulated proteins in the proteomics database of OCB compared with that of ORN

序号	转录组序列号	Nr 数据库序列号	蛋白质名称	$\overline{AB}$ 相对表达量	C 相对表达量	C/$\overline{AB}$ 比值	C/$\overline{AB}$ 比值差异性
1	Unigene17880_B	gi|56118893|	guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-14（GNA14）	0.579	2.691	4.648	＜ 0.001
2	Unigene77382_OR	gi|58332284|	plasma alpha-*L*-fucosidase（FUCA2）	0.804	2.907	3.616	＜ 0.001
3	Unigene69528_OR	gi|52345774|	1，2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase（ADI1）	0.672	2.336	3.476	＜ 0.001
4	Unigene70397_OR	gi|148226545|	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit beta（HADHB）	0.217	0.677	3.120	＜ 0.001
5	Unigene62048_OR	gi|71895705|	galactose-1-phosphate uridylyltransferase（GALT）	1.535	4.082	2.659	＜ 0.001
6	Unigene77343_OR	gi|213982963|	cytoplasmic aconitate hydratase（ACO1）	0.838	2.178	2.599	＜ 0.001
7	Unigene3365_OR	gi|32450590|	MGC64358 protein	1.217	3.047	2.505	＜ 0.001
8	Unigene82637_B	gi|296473637|	LUC7-like	0.640	1.552	2.425	＜ 0.001
9	Unigene38123_OR	gi|148223271|	adenosine deaminase 2（ADA2）	0.444	1.070	2.410	＜ 0.001
10	Unigene67985_OR	gi|297693365|	Predicted：LOW QUALITY PROTEIN：ATP-dependent RNA helicase DDX55-like	0.936	2.242	2.395	＜ 0.001
11	Unigene97234_B	gi|77735861|	vacuolar protein sorting-associated protein 29（VPS29）	0.776	1.821	2.347	＜ 0.001
12	Unigene75968_B	gi|289583671|	ribosomal protein S26（RPS26）	0.801	1.878	2.345	＜ 0.001
13	Unigene50343_OR	gi|147898618|	*L*-lactate dehydrogenase A chain（LDHA）	0.453	1.056	2.334	＜ 0.001
14	Unigene76948_OR	gi|47498044|	serine——tRNA ligase，cytoplasmic（SARS1）	0.792	1.839	2.323	＜ 0.001
15	Unigene58602_B	gi|62858963|	inositol monophosphatase 1（IMPAL1）	0.766	1.769	2.311	＜ 0.001
16	Unigene5136_OR	gi|301630583|	Predicted：hemopexin-like（HPX）	0.654	1.398	2.139	＜ 0.001
17	Unigene91797_B	gi|226372602|	proteasome subunit alpha type-3（PSMA3）	0.953	1.974	2.071	＜ 0.001
18	Unigene24338_B	gi|77404252|	collagen alpha-1（I）chain（COL1A1）	0.237	0.486	2.055	＜ 0.001
19	Unigene72309_OR	gi|50979136|	sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1（ATP1A1）	0.613	1.236	2.016	＜ 0.001
20	Unigene22925_B	gi|37805193|	MGC68756 protein	0.384	0.766	1.997	0.001
21	Unigene92697_B	gi|113931584|	acetoacetyl-CoA synthetase（AACS）	0.717	1.420	1.980	0.001
22	Unigene93795_B	gi|33416782|	MGC68898 protein	1.320	2.610	1.977	0.001
23	Unigene39477_OR	gi|114631485|	Predicted：similar to SFLQ611 isoform 1	0.691	1.357	1.965	0.001
24	Unigene82392_B	gi|52346014|	serine/arginine-rich splicing factor 3（SRSF3）	0.763	1.447	1.898	0.001
25	Unigene97158_B	gi|301615727|	Predicted：mitochondrial inner membrane protein-like（IMMT）	0.904	1.699	1.880	0.001
26	Unigene73620_OR	gi|46576971|	nuclear pore complex protein Nup93（NUP93）	0.536	1.001	1.868	0.008
27	Unigene101362_B	gi|301611116|	Predicted：filamin-B-like（FLNB）	0.886	1.609	1.816	0.003
28	Unigene71686_OR	gi|147900660|	nicotinamide phosphoribosyltransferase S homeolog（NAMPT）	1.252	2.269	1.813	0.008
29	Unigene84500_B	gi|147902246|	microsomal glutathione *S*-transferase 3 S homeolog（MGST3）	0.572	1.034	1.808	0.003
30	Unigene55012_OR	gi|163916462|	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase type-2（HSD17B10）	1.686	3.038	1.802	0.008
31	Unigene98509_B	gi|218847780|	collagen alpha-1（III）chain（COL3A1）	1.008	1.811	1.797	0.004
32	Unigene96230_B	gi|226372004|	probable signal peptidase complex subunit 2（SPCS2）	0.819	1.444	1.764	0.002
33	Unigene73351_OR	gi|301781804|	Predicted：UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase isoform X1（UDP2）	0.732	1.282	1.753	0.003
34	Unigene99359_B	gi|55742254|	purine nucleoside phosphorylase（PNP）	0.569	0.976	1.715	0.025
35	Unigene35063_OR	gi|134023731|	phosphoglucomutase-1（PGM1）	1.700	2.892	1.701	0.021
36	Unigene23899_OR	gi|296203999|	Predicted：heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like isoform 1（HNMPA1）	0.983	1.670	1.699	0.017
37	Unigene63942_B	gi|52345470|	serine/arginine-rich splicing factor 5（SRSF5）	0.535	0.903	1.688	0.020
38	Unigene53057_OR	gi|45360483|	high mobility group protein B2（HMGB2）	1.123	1.870	1.666	0.035
39	Unigene21771_OR	gi|156717484|	proteasome subunit alpha type-5（PSMA5）	0.810	1.341	1.657	0.041
40	Unigene74855_OR	gi|156717352|	kinesin heavy chain（KIF）	0.641	1.041	1.625	0.043

表 2 青蛙油与哈蟆油相比下调的蛋白质

Tab 2 Down-regulated proteins in the proteomics database of OCB compared with that of ORN

序号	转录组序列号	Nr 数据库序列号	蛋白质名称	$\overline{AB}$ 相对表达量	C 相对表达量	C/$\overline{AB}$ 比值	C/$\overline{AB}$ 比值差异性
1	Unigene23627_B	gi|301773364|	Predicted：a-kinase anchor protein 13-like（AKAP13-like）	4.674	0.165	0.035	0.002
2	Unigene90547_B	gi|301622521|	Predicted：IgGFc-binding protein（FcγBP）	1.695	0.338	0.199	0.013
3	Unigene95813_B	gi|113931624|	novel aldo-keto reductase family 1 c protein（PGFS）	2.547	0.676	0.265	0.019
4	Unigene62752_OR	gi|46329514|	LOC398139 protein	1.809	0.482	0.266	0.019
5	Unigene50328_B	gi|301613162|	Predicted：IgGFc-binding protein-like（FcγBP-like）	4.192	1.117	0.266	0.017
6	Unigene70903_OR	gi|301614105|	Predicted：mucin-5B（MUC5B）	1.013	0.303	0.299	0.030
7	Unigene35972_B	gi|118091320|	Predicted：similar to mucin（MUC）	3.318	1.072	0.323	0.024
8	Unigene31388_B	gi|301613160|	Predicted：mucin-5AC-like（MUC5AC-like）	4.003	1.344	0.336	0.036
9	Unigene13794_B	gi|301621493|	Predicted：lamin-B2（Lmnb2）	1.489	0.504	0.338	0.033
10	Unigene52017_B	gi|4038587|	mucin，partial（MUC）	2.875	0.996	0.346	0.035
11	Unigene43346_B	gi|73973027|	Predicted：similar to Cysteine-rich secretory protein-2 precursor isoform 3（CRISP3）	2.723	0.978	0.359	0.036
12	Unigene44876_OR	gi|226372482|	CD63 antigen	1.455	0.523	0.359	0.037
13	Unigene73441_OR	gi|224050926|	Predicted：similar to mCG142254（MUC5B）	3.011	1.134	0.377	0.043
14	Unigene80997_B	gi|148726782|	annexin A5（ANXA5）	1.011	0.395	0.391	0.042
15	Unigene40032_OR	gi|120538599|	LOC100036845 protein	1.854	0.732	0.395	0.042

3.2 青蛙油中含量较高的差异蛋白质（上调蛋白）

从表 1 可以看出，青蛙油与哈蟆油比（C/$\overline{AB}$）上调的蛋白质种类较多，分布较广。40 个上调蛋白主要参与能量代谢、糖代谢、应激反应、生长发育、生物合成、细胞骨架形成、氧化还原和免疫调节等过程。

参与能量代谢过程的蛋白质包括羟酰基辅酶 A 脱氢酶三官能多酶复合体亚基β（HADHB）、乙酰辅酶 A 合成酶（AACS）、乌头酸水合酶（ACO1）、烟酰胺磷酸核糖转移酶 s 同源体（NAMPT）和羟酰辅酶 A 脱氢酶Ⅱ型（HSD17B10）等。参与糖代谢的蛋白质包括半乳糖 -1- 磷酸尿苷酰转移酶（GALT）、血浆 a-*L*- 岩藻糖苷酶（FUCA2）和磷酸葡萄糖变位酶（PGM1）等。参与应激反应的蛋白质包括鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 a 亚基 14（GNA14）、*L*- 乳酸脱氢酶 A 链（LDHA）、血红素结合蛋白（HPX）和蛋白酶体亚基α-3 型（PSMA3，PSMA5）等。参与生长发育相关的蛋白质包括 LUC7-like、核孔复合物蛋白（NUP93）和高速泳动族蛋白 B2（HMGB2）等。参与生物合成的蛋白质包括核糖体蛋白（RPS26）、不均一核核糖核蛋白质 A1 样亚型 1（HNMPA1）和丝氨酸转运 RNA 连接酶（SARS1）等。参与细胞骨架形成的蛋白质包括细丝蛋白（FLNB）和驱动蛋白重链（KIF）等。参与氧化还原的蛋白质包括 1，2- 二羟基 -3- 酮 -5- 甲基硫戊烯双加氧酶（ADI1）和微粒体谷胱甘肽 s- 转移酶 3 S 同源体（MGST3）等。参与免疫调节相关的蛋白质包括腺苷脱氨酶 2（ADA2）。

3.3 哈蟆油中含量较高的差异蛋白质（下调蛋白）

从表 2 可以看出，青蛙油与哈蟆油比（C/$\overline{AB}$）下调的蛋白质有 15 个，其中参与免疫调节的蛋白质包括 a 激酶锚定蛋白 13-like（AKAP13-like）、免疫球蛋白 Fc 段连接蛋白（FcγBP 和 FcγBP-like）、黏蛋白（MUC5B，MUC-5AC-like，MUC，MUC，partical）、CD63 抗原（CD63 antigen）等。参与细胞骨架形成的蛋白质包括膜联蛋白（ANXA5）和核纤层蛋白 B2（Lmnb2）。参与生殖发育的蛋白质包括醛固酮还原酶家族 1c 蛋白（PGFS）和类似于富含半胱氨酸的分泌蛋白 -2 前体亚型 3（CRISP3）。

3.4 WEGO 注释分析结果

3.4.1 细胞组分分析 从图 1 细胞组分中可以看出青蛙油与哈蟆油比较差异蛋白质表达体现在细胞、细胞器、膜、大分子复合体、膜封闭腔和胞外区，分别占所有差异蛋白质的 34%、23%、16%、16%、8% 和 3%。

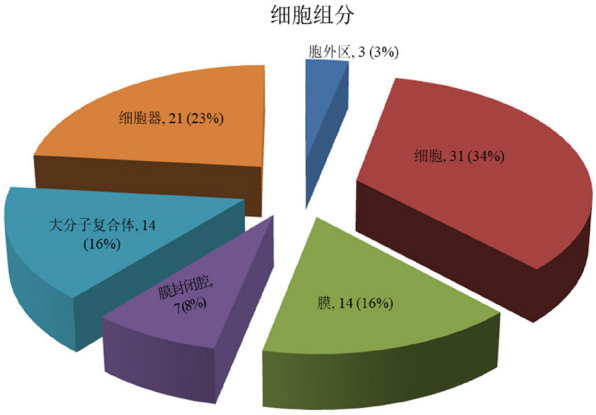


图 1 差异蛋白质细胞组分分析

Fig 1 Cellular components of differentially expressed proteins

3.4.2 分子功能分析 从图 2 分子功能中可以看出催化活性、结合功能、结构分子活性、酶调节活性、化学引诱物活性、载体活性、核酸结合转录因子活性、抗氧化活性和分子转导活性是青蛙油与哈蟆油差异蛋白质比较集中的 9 类功能，其中催化活性和结合功能类蛋白质最多，分别占所有差异蛋白质的 43% 和 42%。

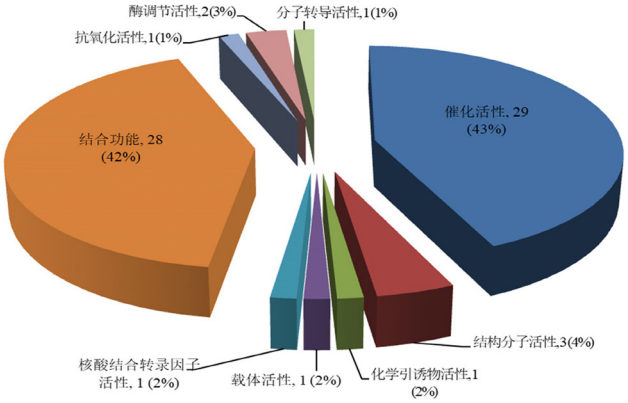


图 2 差异蛋白质分子功能分析

Fig 2 Molecular function of differentially expressed proteins

3.4.3 生物学途径分析 从图 3 生物学途径中可以看出繁殖、免疫系统过程、代谢过程、细胞过程、信号、多组织过程、发育过程、生长过程、位移运动、单组织过程、刺激反应、定位、多生物过程、生物调节和细胞成分组织 / 生物合成是青蛙油与哈蟆油差异蛋白质比较集中的 15 个生物学途径，其中参与代谢过程、细胞过程、单组织过程和生物调节的蛋白质数量较多，分别占所有差异蛋白质的 21%、19%、12% 和 10%。

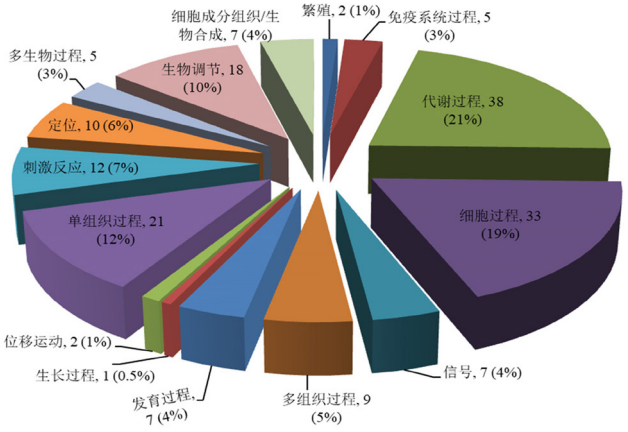


图 3 差异蛋白质生物学途径分析

Fig 3 Biological process of differentially expressed proteins

3.5 青蛙油与哈蟆油差异蛋白质 KEGG 代谢通路分析

青蛙油与哈蟆油的差异蛋白质总数为 55 个，其中 29 个差异蛋白质 map 到 77 条 KEGG 信号 / 代谢通路中；在这 29 个差异蛋白质中，27 个上调蛋白 map 到 76 条 KEGG 信号通路中，两个下调蛋白 map 到 8 条 KEGG 信号通路中。

与哈蟆油蛋白质数据比，青蛙油中含量较高（即上调）的 27 个差异蛋白质中钠 / 钾离子转运 ATP 酶亚基 α1 肽（ATP1A1）参与 cGMP-PKG 信号通路（cGMP-PKG signaling pathway）、唾液分泌（salivary secretion）、心肌细胞肾上腺素能信号转导（adrenergic signaling in cardiomyocytes）、胰岛素分泌（insulin secretion）、甲状腺激素合成（thyroid hormone synthesis）等 16 个代谢过程；PGM1 参与糖酵解 / 糖异生途径（glycolysis/gluconeogenesis）、磷酸戊糖途径（pentose phosphate pathway）、半乳糖代谢（galactose metabolism）、嘌呤代谢（purine metabolism）等 7 个代谢过程；Ⅰ型胶原蛋白 a1 链（COL1A1）参与焦点黏连（focal adhesion）、ECM 受体相互作用（ECM-receptor interaction）、血小板活化（platelet activation）等 6 个代谢过程；ACO1 参与三羧酸循环（citrate cycle）、乙醛酸和二羧酸代谢（glyoxylate and dicarboxylate metabolism）、原核生物固碳过程（carbon fixation pathways in prokaryotes）、碳代谢（carbon metabolism）等 6 个代谢过程；HADHB 参与脂肪酸降解（fatty acid degradation），脂肪酸伸长（fatty acid elongation），缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解（valine，leucine and isoleucine degradation），苯甲酸降解（benzoate degradation）和脂肪酸代谢（fatty acid metabolism）等 5 个代谢过程；LDHA 参与糖酵解 / 糖异生途径（glycolysis/gluconeogenesis）、半胱氨酸和甲硫氨酸代谢（cysteine and methionine metabolism）、丙酮酸代谢（pyruvate metabolism）、丙酸代谢（propanoate metabolism）等 4 个代谢过程。

在差异蛋白质富集分析中发现，半乳糖代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢（amino sugar and nucleotide sugar metabolism）均富集到 3 个差异蛋白质（GALT、PGM1、UDP2）。糖酵解 / 糖异生途径富集到两个差异蛋白质 LDHA 和 PGM1。嘌呤代谢（purine metabolism）富集到两个差异蛋白质 PNP 和 PGM1。半胱氨酸和甲硫氨酸代谢富集到两个差异蛋白质 ADI1 和 LDHA。缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解富集到两个差异蛋白质 HADHB 和 HSD17B10。

哈蟆油中含量较高（即下调）的两个差异蛋白质包括 LOC398139 protein，CD63 antigen。其

中 LOC398139 protein 参与三羧酸循环（citrate cycle）、乙醛酸和二羧酸代谢（glyoxylate and dicarboxylate metabolism）、原核生物固碳过程（carbon fixation pathways in prokaryotes）、氧代羧酸代谢（2-oxocarboxylic acid metabolism）和氨基酸生物合成（biosynthesis of amino acids）等 6 个代谢过程。CD63 antigen 参与溶酶体（lysosome）和癌症过程蛋白聚糖（proteoglycans in cancer）等两个代谢过程。

其他差异蛋白质在 KEGG 代谢通路中未被注释到。

4 讨论与结论

4.1 青蛙油中含量较高的差异蛋白质与环境、生长发育的关系

成年黑斑蛙常栖息于稻田、池塘、湖泽、河滨、水沟内或水域附近的草丛中。一般 10 月开始冬眠，钻入向阳的坡地或离水域不远的田地、沟埂、塘埂土层 30 ～ 40 cm 深处穴居冬眠，次年 4 月后出蛰 [9]。冬眠前青蛙油中含量较高的差异蛋白质（即上调成分）与黑斑蛙平时的栖息环境、冬眠环境可能存在密切关系。

鸟嘌呤核苷酸结合蛋白（GNA14）是在膜结合受体和细胞内效应器之间起信号传递作用，可水解 GTP 生成 GDP，具有 GTP 酶活性，在哺乳动物细胞中 G 蛋白和其受体形成一个最普遍的信号系统，在哺乳动物的各种组织中均有表达，如脑、心脏、胚胎等组织。参与调节感官感知 [10]、细胞生长、激素的分泌和释放 [11]、防御物质的信号传导 [12] 及脂肪体中能源物质的使用 [13]。有研究表明，在低氧或缺氧的胚胎中 GNA14 高表达，可调节高血压和内皮细胞的功能 [14-15]。因此认为 GNA14 在蛙冬眠过程中调节机体机能，适应环境方面起到重要作用。

血红素结合蛋白（HPX）是肝脏合成的一种急性时相反应蛋白，在血浆中与游离的血红素结合能力最强，广泛参与机体多种生理和病理过程。机体内游离的血红素是有害的，可以破坏脂质双分子层，促进低密度脂蛋白转化成具有细胞毒性的氧化产物 [16]，还可以插入红细胞膜，缩短红细胞的寿命，加速溶血的发生 [17]，HPX 可以结合和转运有毒的游离血红素至肝脏而发挥解毒作用。Grinberg 等 [18] 研究发现 HPX 与血红素结合后，血红素诱导的氧自由基明显减少，过氧化活性下降 80% ～ 90%，脂质过氧化活性也显著降低，进而达到抗氧化的作用。目前研究结果显示 HPX 还具有维持体内铁的稳态 [19]、保护神经 [20] 等功能。在黑斑蛙冬眠过程中，高含量的 HPX 降解机体产生的毒素 - 血红素，同时起到抗氧化的作用。

羟酰基辅酶 A 脱氢酶三官能多酶复合体亚基 β（HADHB）是一种具有多功能的膜结合型蛋白酶，可以催化 3 种酶活性（长链烯酰辅酶 A 水合酶、长链 3- 羟烷基辅酶 A 脱氢酶和长链 3- 酰基辅酶 A 硫解酶），参与脂肪酸和脂质代谢过程，在线粒体中参与长链脂肪酸的 β 氧化过程产生能量 [21-22]。ACO1 也称乌头酸酶，广泛分布于动植物和微生物中，在肝脏、肾脏、肌肉、前列腺中含量特别高。在三羧酸循环中，ACO1 为催化柠檬酸和异柠檬酸之间相互转换的辅酶 [23]。GALT 具有催化、连接活性，参与半乳糖代谢过程 [24]。在 KEGG 代谢通路中，笔者发现 ATP1A1、PGM1、ACO1、HADHB、GALT 和 LDHA 是青蛙油中重要的差异蛋白质，主要参与体内的各种糖代谢、糖异生、氨基酸代谢、脂肪代谢等代谢过程。

综合以上青蛙油中差异的蛋白结构、活性特点可以看出，部分蛋白质是参与胚胎细胞生长、发育的重要物质基础，部分蛋白质在蛙冬眠过程中提供能量，是维持生命活动的重要成分，为冬眠期和翌年的排卵期做准备。

4.2 哈蟆油中含量较高的差异蛋白质的特点与环境、生长发育的关系

中国林蛙冬眠期主要在水下，这个特点是中国林蛙所特有的，其他种类的蛙一般都在泥土中冬眠。同时在东北中国林蛙最早结束冬眠，比黑斑蛙、蟾蜍等蛙类早 20 ～ 30 d。本文通过比较青蛙油与哈蟆油蛋白质组学的差异，发现哈蟆油中蛋白成分差异主要为 a- 激酶锚定蛋白 13 类似蛋白、免疫球蛋白 Fc 段连接蛋白和黏蛋白，且此 3 类成分在哈蟆油中表达量较高，对哈蟆油的功能活性起到至关重要的作用。

a- 激酶锚定蛋白 13 类似蛋白（AKAP13-like），AKAP13 包含两个重要的结构域（PKA 结构域和 GEF 结构域），在许多信号传导中发挥着重要的作用，能激活 GTP 酶 Rho，水解 GTP 为 GDP。AKAP13 可将 PKA、PKD、PKC 多蛋白复合物锚定于细胞骨架肌动蛋白 [25-26]，在 PKD 和 Rho 通路中起着整合 cAMP 信号的作用；AKAP13 将 PKD 与其上游激活因子 PKC 连接，PKC 磷酸化 PKD，使其激活，而 PKA 磷酸化 AKAP13，

促进激活的 PKD 从 AKAP 复合物平台上游离出来。AKAP13 在多个器官和组织中高表达，如脾、胸腺、外周血白细胞、骨路肌和睾丸；胎盘和肺中适度表达；而在肝、脑、小肠、结肠和前列腺癌中没有或者少量表达[27]。目前研究显示 AKAP13 通过 GEF 作用，参与心肌肥大的形成[28]。邢修业[29]研究 AKAP13 在小鼠卵泡发育中的作用，发现 AKAP13 基因敲除杂合型小鼠的生殖能力降低，表明 AKAP13 可能通过作用于 FSHR 信号通路下游效应分子参与并影响 FSHR 信号通路，进而在小鼠卵泡发育中起至关重要的作用。免疫球蛋白 Fc 段连接蛋白（IgGFc binding protein，Fc*γ*BP）主要在胎盘和结肠的上皮细胞表达，作为黏膜的组成部分，维持黏膜的结构。Fc*γ*BP 类似黏蛋白，具有黏蛋白的结构特点，同时具有免疫球蛋白连接的活性，在黏膜免疫系统和炎症中具有重要的作用[30]。Kobayashi 等[31]报道 Fc*γ*BP 存在于血清中，在各种自身免疫性疾病的患者中高水平表达。黏蛋白（mucin）是分布在各种管腔内表面的高分子量糖蛋白，对上皮细胞起到重要的保护和润滑的作用，黏蛋白中的糖链在维持蛋白质的稳定、抵抗蛋白酶水解、防止抗体识别等方面发挥重要的作用[32]。近年来，发现黏蛋白还参与细胞增殖的调控、受精，上皮细胞的分化、更新，调节细胞黏附、细胞信号转导等过程[33]。Mucin2、Mucin-5AC 和 Mucin-5B 属于凝胶形成型的黏蛋白，具有形成凝胶的能力，结构中包含半胱氨酸富含区域，经二硫键连接形成二聚体，因此其分子量较高不溶于水[34]。人类 Mucin2（包含 5179aa）有超过 100 个不同寡糖修饰后形成的糖蛋白[35]，糖分子产生一个高度异构的黏蛋白凝胶层，形成一个天然的防御机制，在肠道内，带电的糖链能有效地控制水分子，形成一个稳定的环境保护半透膜[36]。Mucin-5B 主要在呼吸道黏膜腺体的黏液细胞中表达，在舌下腺高度表达，在颌下腺、子宫内膜、胆囊和胰腺也有表达，有助于唾液和宫颈黏液的润滑和弹性的作用。在胃和呼吸道上皮细胞中 Mucin-5AC 通过结合吸入的微生物和微粒，随后被黏液系统清除，来保护黏膜，防止感染和化学损伤[36]。当卵子通过输卵管时即被腺体所分泌的胶状物所包裹，为卵提供丰富的营养物质，此类胶状物多为黏蛋白[37]，因林蛙刚出蛰后，温度较低、缺乏食物等为其提供营养物质，输卵管作为重要的生殖器官，分泌大量的胶状物质，达到保护卵子的作用。以上结果提示在哈蟆油中高表达的蛋白质主要参与免疫调节、细胞骨架形成、生殖发育等过程。

哈蟆油本身具有高的膨胀度与其含有大量的、多种类型的凝胶型黏蛋白密切相关。黏蛋白凝胶的程度会受到各种因素的影响，包括黏蛋白自身分子量大小、糖基侧链长短、聚合度和浓度以及外界因素如 pH、离子强度的变化等。由于黏蛋白和免疫球蛋白 Fc 段连接蛋白都包含大量的糖链结构，对于哈蟆油膨胀的能力具有重要的影响。

4.3 结论

中国林蛙与黑斑蛙的生活习性不同导致哈蟆油与青蛙油中蛋白质含量的差异，本研究通过比较青蛙油与哈蟆油蛋白质组数据库的差异，筛选到差异表达蛋白质 55 个，其中上调的蛋白质数为 40 个，下调的蛋白质数为 15 个。哈蟆油中含量较高的 15 差异蛋白质主要参与免疫调节、细胞骨架形成和生殖发育等过程；而青蛙油中含量较高的 40 个差异蛋白质主要参与能量代谢、糖代谢、应激反应、生长发育、生物合成、细胞骨架形成、氧化还原和免疫调节等过程；其中 AKAP13-like、Fc*γ*BP、MUC5AC-like、MUC、MUC5B 等 15 个高表达的蛋白质可作为哈蟆油区别于青蛙油的重要蛋白质，同时哈蟆油的特异性膨胀度可能与含量较高的黏蛋白类密切相关，本文的研究结果为进一步研究哈蟆油的功效成分奠定基础。

参考文献

[1] 崔岩，侯晓东，崔春月，等 . 中国林蛙油鉴别方法研究进展及建议 [J]. 林业实用技术，2007（10）：37-39.

[2] 范玉林，崔香顺，姚玉霞，等 . 哈士蟆油成分研究的进展 [J]. 吉林农业大学学报，1996，18（3）：105-111.

[3] 吴晓春 . 哈蟆油的真伪辨析 [J]. 时珍国医国药，2005，16（11）：1131-1133.

[4] 刘娟，刘爽，刘程诚 . 哈蟆油的真伪鉴别 [J]. 黑龙江医药科学，2009，32（2）：20-21.

[5] 张嵩，王维宁，陈芳芳，等 . 哈蟆油与类似品和伪品的质量评价 [J]. 沈阳药科大学学报，2012，29（12）：951-958.

[6] 魏星华，王铭，张玉尧，等 . 应用 iTRAQ 结合 2DLC-MS/MS 技术分析哈蟆油与伪品蛙油的差异蛋白质组 [J]. 辽宁中医杂志，2019，46（3）：472-475.

[7] 宿文杰，张鹤，李江丹，等 . 哈蟆油与蟾蜍油蛋白质组学数据分析 [J]. 中国农学通报，2020，36（26）：126-135.

[8] 刘靖宇，江玉姬，谢宝贵，等 . 应用 iTRAQ 结合 2DLC-MS/MS 技术分析草菇同核和异核菌丝蛋白质组 [J]. 食用菌学报，2012，19（1）：1-12，105.

[9] 周英 . 黑斑蛙养殖与管理技术 [J]. 农业工程技术，2020，

40（14）：85，87.
[10] Laue M，Maida R，Redkozubov A. G-protein activation，identification and immunolocalization in pheromone-sensitive sensilla trichodea of moths [J]. Cell Tissue Res，1997，288（1）：149-158.
[11] Rafaeli A，Gileadi C. Down regulation of pheromone biosynthesis：Cellular mechanisms of pheromonostatic responses [J]. Insect Biochem Molec，1996，26（96）：797-807.
[12] Shimabukuro M，Xu J，Sugiyama M，et al. Signal transduction for cecropin B gene expression in adherent hemocytes of the Silkworm，*Bombyx mori* [J]. Appl Entomol Zool，1996，31（1）：135-143.
[13] Horst D J van der，Vroemen SF，Marrewij WJA van，et al. Metabolism of stored reserves in insect fat body：Hormonal signal transduction implicated in glycogen mobilization and biosynthesis of the lipophorin system [J]. Comp Biochem Physiol B：Biochem Mol Biol，1997，117（4）：463-474.
[14] Semenza GL，Jiang BH，Leung SW，et al. Hypoxia response elements in the aldolase A，enolase 1，and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1 [J]. J Biol Chem，1996，271（51）：32529-32537.
[15] Jiang YZ，Wang K，Li Y，et al. Transcriptional and functional adaptations of human endothelial cells to physiological chronic low oxygen [J]. Biol Reprod，2013，88（5）：9-15.
[16] Klaudia J，Marian V. Importance of iron chelation in free radical-induced oxidative stress and human disease [J]. Curr Pharm Design，2011，17（31）：3460-3473.
[17] Wagener FA，Eggert A，Boerman OC，et al. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase [J]. Blood，2001，98（6）：1802-1811.
[18] Grinberg LN，O'Brien PJ，Hrkal Z. The effects of heme-binding proteins on the peroxidative and catalatic activities of hemin [J]. Free Radical Biol Med，1999，27（s 1-2）：214-219.
[19] Vanacore R，Eskew JD，Sung L，et al. Safe coordinated trafficking of heme and iron with copper maintain cell homeostasis：Modules from the hemopexin system [J]. Biometals，2019，32（3）：355-367.
[20] Jing CR，Wenpei L，Regan RF. Hemopexin decreases hemin accumulation and catabolism by neural cells [J]. Neurochem Int，2012，60（5）：488-494.
[21] Carpenter K，Pollitt RJ，Middleton B. Human liver long-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase is a multifunctional membrane-bound beta-oxidation enzyme of mitochondria [J]. Biochem Bioph Res Co，1992，183（2）：443-448.
[22] Taylor WA，Mejia EM，Mitchell RW，et al. Human trifunctional protein alpha links cardiolipin remodeling to beta-oxidation [J]. PLoS One，2012，7（11）：e48628.
[23] Korge P，Ping P，Weiss JN. Reactive oxygen species production in energized cardiac mitochondria during hypoxia/reoxygenation：Modulation by nitric oxide [J]. Circ Res，2008，103（8）：873-880.
[24] 宋亚军 . 口服牛奶、葡萄糖及丙烯酰胺对断奶雌性大鼠生长发育及卵泡发育的影响 [D]. 南京：南京农业大学，2008.
[25] Carnegie GK，Smith FD，Mcconnachie G，et al. AKAP-Lbc nucleates a protein kinase d activation scaffold [J]. Mol Cell，2004，15（6）：889-899.
[26] Diviani D，Baisamy L，Appert-Collin A. AKAP-Lbc：A molecular scaffold for the integration of cyclic AMP and Rho transduction pathways [J]. Eur J Cell Biol，2006，85（7）：603-610.
[27] Rubino D，Driggers P，Arbit D，et al. Characterization of Brx，a novel Dbl family member that modulates estrogen receptor action [J]. Oncogene，1998，16（19）：2513-2526.
[28] Appert-Collin A，Cotecchia S，Nenniger-Tosato M，et al. The A-kinase anchoring protein（AKAP）-Lbc-signaling complex mediates alpha1 adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy [J]. P Natl Acad Sci USA，2007，104（24）：10140-10145.
[29] 邢修业 . AKAP13 在小鼠卵泡发育中的作用研究 [D]. 济南：山东大学，2013.
[30] Harada N，Iijima S，Kobayashi K，et al. Human IgGFc binding protein（FcγBP）in colonic epithelial cells exhibits mucin-like structure [J]. J Biol Chem，1997，272（24）：15232-15241.
[31] Kobayashi K，Yagasaki M，Harada N，et al. Detection of Fcgamma binding protein antigen in human sera and its relation with autoimmune diseases [J]. Immunol Lett，2001，79（3）：229-235.
[32] 贺欣，张目涵，路瑶，等 . 黏蛋白在肠黏膜屏障中的保护调节机制 [J]. 医学综述，2017，23（1）：1-5.
[33] 郭慧，邓文星，张映 . 糖蛋白的研究进展 [J]. 生物技术通报，2009（3）：16-19.
[34] 彭志红，汪荣泉 . 粘蛋白研究进展 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志，2010，19（10）：952-955.
[35] Larsson JMH，Hasse K，Henrik S，et al. A complex，but uniform O-glycosylation of the human MUC2 mucin from colonic biopsies analyzed by nanoLC/MSn [J]. Glycobiology，2009，19（7）：756-766.
[36] Rama B，Turner BS. The biology of mucus：Composition，synthesis and organization [J]. Adv Drug Delivey Rev，2018，124：3-15.
[37] Mondéjar I，Acuna OS，Izquierdo-Rico MJ，et al. The oviduct：Functional genomic and proteomic approach [J]. Reprod Domest Anim，2012，47（Suppl 3）：22-29.

（收稿日期：2020-12-22；修回日期：2021-03-18）

褪黑素联合紫杉醇对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖抑制及凋亡作用的相关机制研究

朱雯婷[1]，陈亦清[1]，刘晓敏[1]，洪晔[1]，袁中文[1]，刘圣曜[2*]（1. 广州医科大学附属第三医院药学部，广州 510150；2. 广州医科大学附属第二医院骨科，广州 510260）

摘要：目的 探讨褪黑素联合紫杉醇体内外对卵巢癌的抑制作用及作用机制。**方法** 褪黑素联合紫杉醇作用于 SKOV3 细胞后，通过 MTT 法和细胞克隆形成实验检测褪黑素联合紫杉醇对人卵巢癌 SKOV3 细胞增殖的影响，流式细胞仪、Hoechst 33258 染色和蛋白质印迹检测细胞凋亡，Western blot 检测细胞中 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达。建立 SKOV3 细胞移植瘤模型小鼠，通过 Ki-67 和 TUNEL 染色法检测褪黑素联合紫杉醇对肿瘤组织增殖和凋亡的影响。**结果** 褪黑素可以增加紫杉醇对卵巢癌 SKOV3 细胞的细胞毒性，抑制 SKOV3 细胞增殖并诱导细胞凋亡。体内结果显示褪黑素联合紫杉醇可有效抑制肿瘤的生长并诱导肿瘤细胞凋亡。**结论** 褪黑素联合紫杉醇比单一用药治疗卵巢癌的效果好，值得进一步研究。

关键词：褪黑素；紫杉醇；卵巢癌；增殖；凋亡
中图分类号：R737.31 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1519-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.002

Effect of melatonin combining paclitaxel on the proliferation and apoptosis of SKOV3 cell in ovarian cancer

ZHU Wen-ting[1], CHEN Yi-qing[1], LIU Xiao-min[1], HONG Ye[1], YUAN Zhong-wen[1], LIU Sheng-yao[2*] (1. *Department of Pharmacy*, *The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University*, *Guangzhou* 510150; 2. *Department of Orthopedics*, *The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University*, *Guangzhou* 510260)

Abstract: Objective To determine the inhibition effect and mechanism of the combination of melatonin and paclitaxel on ovarian cancer. **Methods** The effect of melatonin combining with paclitaxel on the proliferation of SKOV3 cells was observed by MTT assay and colony for ming assay. Cell apoptosis was detected by flow cytometry and Hoechst 33258 staining. Western blot was used to detect the expression of Bax and Bcl-2 protein in SKOV3 cells. Moreover, The proliferation and apoptosis of tumor cells was observed in SKOV3 xenograft model mice. **Results** Melatonin increased the cytotoxicity of paclitaxel in ovarian cancer SKOV3 cells, inhibited the cell proliferation and induced apoptosis. In addition, melatonin combining with paclitaxel markedly inhibited the tumor growth and induced the apoptosis of tumor cells in vivo. **Conclusion** The combined treatment with melatonin and paclitaxel significantly enhanced the chemotherapeutic effect as compared with those treated with melatonin or paclitaxel alone.

Key words: melatonin; paclitaxel; ovarian cancer; proliferation; apoptosis

卵巢癌是一种高死亡率的妇科肿瘤，严重威胁妇女的健康。目前卵巢癌的一线化疗药物主要有紫杉醇（paclitaxel，PTX）和顺铂，这些药物具有较好的抗肿瘤活性，但是对正常组织有一定

基金项目：国家自然科学基金委员会青年项目（No. 81803689）；广州医科大学附属第三医院 2018 年度博士启动科研项目（No. 2018B06）；广州市卫生健康科技项目（No. 20201A011096）。
作者简介：朱雯婷，女，博士，主管药师，主要从事抗肿瘤药物纳米载体的构建及应用，E-mail：zhuwenting456@126.com *通信作者：刘圣曜，男，博士，主治医师，主要从事骨肿瘤研究，E-mail：liushengyao12@163.com

的毒副作用，且易产生耐药[1]。因此，联合其他药物治疗卵巢癌可能是一种新的有效手段。

褪黑素（melatonin，Mel）是一种主要由松果体产生的激素，可用于治疗多种疾病，包括神经退行性疾病、癌症、病毒感染等[2-3]。褪黑素对于乳腺癌、膀胱癌、结直肠癌、宫颈癌等具有细胞毒作用，特别是对激素依赖性肿瘤具有重要作用[4-5]。可能与其作用多种信号通路相关，例如Akt/mTOR通路，增加活性氧的产生，线粒体或内质网应激效应等[6-7]。新的研究表明，褪黑素联合化疗药物可以增强药物抗肿瘤效果[8]。但褪黑素是否能增强紫杉醇对卵巢癌的化疗效果至今未见报道。因此，探讨褪黑素联合紫杉醇体内外治疗卵巢癌的作用有重要的临床意义。

1 材料

褪黑素（纯度＞95%，MB1475）、紫杉醇（MB1178）（大连美仑生物技术公司）。Bax抗体（50599-2-lg）、Bcl-2（12789-1-AP）兔抗人单克隆抗体（武汉三鹰生物技术有限公司），Ki-67兔抗人单克隆抗体（ab16667，Abcam公司）。甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）兔抗人单克隆抗体（AB-P-R001，杭州贤致生物），辣根过氧化物酶（Horseradish Peroxidase，HRP）标记山羊抗兔IgG（CW0103，康为世纪公司），细胞凋亡检测试剂盒（C1062M）、Hoechst 33258染色液（C1017）、BCA试剂盒（P0012S）（上海碧云天生物科技有限公司）。

人卵巢癌细胞株SKOV3细胞（广州医科大学附属第三医院）用含有10%胎牛血清的DMEM高糖培养基，于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养。6～8周雌性BALB/c裸鼠20只，体质量18～20 g[珠海百试通生物科技有限公司，动物合格证号：SCXK（粤）2020-0051]。

倒置荧光显微镜（TE2000-S）、正置荧光显微镜（Ni-u）（日本尼康公司），活细胞显微激光扫描成像系统（A1，日本尼康公司），凝胶成像系统（Bio-Rad Model 680），流式细胞仪（Thermo Fisher，Life Science）。

2 方法

2.1 细胞增殖和形态观察

用不同浓度的紫杉醇或褪黑素联合紫杉醇作用于SKOV3细胞，处理48 h后，使用倒置荧光显微镜观察细胞形态，并通过噻唑蓝（MTT）法检测细胞存活率，在490 nm波长处测定吸光度值。

通过细胞克隆实验检测褪黑素联合紫杉醇对SKOV3细胞增殖的影响，SKOV3细胞接种于6孔板中，密度为1×10^3个/孔。实验分成4组，分别为空白组，褪黑素（200 μg·mL^{-1}）组，紫杉醇（20 μg·mL^{-1}）组，褪黑素（200 μg·mL^{-1}）联合紫杉醇（20 μg·mL^{-1}）处理组，每孔药液量为2 mL。7 d后，用结晶紫对形成的集落进行染色并定量。

2.2 细胞凋亡检测

用流式细胞仪和Hochest 33258染色检测药物对SKOV3细胞凋亡的影响。将1×10^4个/孔SKOV3细胞接种于6孔板中（Hochest 33258染色实验取洁净盖玻片置于6孔板），分别用单独的褪黑素（200 μg·mL^{-1}）、紫杉醇（20 μg·mL^{-1}）或两药联合处理48 h。

流式检测细胞凋亡实验参考细胞凋亡检测试剂盒进行如下操作：48 h后将细胞消化并离心收集，用PBS洗涤细胞两遍，加入195 μL Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞，加入5 μL Annexin V-FITC轻轻混匀，加入10 μL碘化丙啶染色液轻轻混匀，室温孵育20 min后，上机进行检测。

Hoechst 33258染色实验进行如下操作：在6孔板中加入0.5 mL的固定液固定10 min，用PBS洗3遍，加入0.5 mL Hoechst 33258染色液染色5 min，再用PBS洗3遍，每次3 min，在载玻片上滴一滴抗荧光淬灭封片液，盖上贴有细胞的盖玻片，用活细胞显微激光扫描成像系统进行观察。

2.3 蛋白质印迹分析

药物处理后的SKOV3细胞用含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液裂解30 min提取蛋白，BCA试剂盒进行蛋白浓度测定。上样后用SDS-PAGE胶分离、转膜。使用5%的牛奶进行封闭，用不同一抗4 ℃孵育过夜（GAPDH，稀释比例1∶2000，Bax稀释比例1∶1000，Bcl-2稀释比例1∶1000），TBST洗涤3次，然后在室温下孵育HRP标记山羊抗兔IgG的二抗（稀释比例1∶5000），最后在PVDF膜上滴加Ecl发光液（Millipore，USA）用凝胶成像系统进行显影。

2.4 体内抗肿瘤作用

在BALB/c裸鼠右背部皮下注射100 μL SKOV3细胞悬液（5×10^6个）和100 μL基质胶混合液。约10 d后，当肿瘤体积大于100 mm^3时，将裸鼠随机分为4组，分别接受生理盐水，褪黑素（25 mg·kg^{-1}），紫杉醇（20 mg·kg^{-1}），褪黑素与紫杉醇联合腹腔注射给药。每两日给药一次，并测量肿瘤的体积，肿瘤体积的计算公式＝长×宽^2/2，给药6次后，处死裸鼠收集肿瘤组织称重，并拍照。

将石蜡包埋的肿瘤切片脱蜡至水，苏木精-伊红染色法（Hematoxylin-Eosin staining，HE）观

察肿瘤组织形态和结构。染色后，在正置荧光显微镜随机取不同的视野拍照。

2.5 免疫组化

肿瘤切片脱蜡至水，用 pH 6.0 的柠檬酸缓冲液在 90 ℃热修复 30 min，冷却至室温，参考兔 / 鼠通用型 Streptavidin-HRP 试剂盒（CW2069，康为世纪）说明书步骤如下：切片用内源性过氧化物酶封闭液室温孵育 10 min，PBS 充分洗涤，羊血清室温孵育 10 min，甩干后用一抗（Ki-67 稀释比例 1∶200）4 ℃下孵育过夜，PBS 洗 3 遍，每次 3 min。然后在室温下与生物素标记羊抗兔 / 鼠二抗工作液孵育 10 min，再滴加适量 HRP 标记的链霉亲和素，室温孵育 10 min，最后，加适量的二氨基联苯胺（Dia minobenzidine，DAB）显色工作液染色 3 min。脱水透明封片在正置荧光显微镜，随机取 3 个视野进行拍照。

2.6 TUNEL 荧光法染色

肿瘤石蜡切片脱蜡至水。参考原位末端转移酶标记技术（TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling，TUNEL）一步法细胞凋亡检测试剂盒（KGA7071，凯基生物）说明书步骤如下：用 Proteinase K 工作液在 37 ℃反应 30 min，PBS 漂洗 3 次。放入湿盒中，每张切片滴加配制好的 TdT 酶反应液，37 ℃处理 45 min，再用 PBS 漂洗 3 次。每个样本上滴加 50 μL Streptavidin-FITC 标记液，37 ℃避光反应 30 min，最后用含 DAPI 染色液的抗荧光淬灭封片，在活细胞显微激光扫描成像系统观察细胞凋亡。

2.7 统计分析

使用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。数据采用平均值 ± 标准差表示。对各组数据进行方差齐性检验，方差齐，多组均数间比较采用单因素方差分析，组间比较用 LSD 法，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 褪黑素联合紫杉醇对 SKOV3 细胞的增殖的抑制作用

褪黑素联合紫杉醇对卵巢癌 SKOV3 细胞的毒性结果，如图 1A 所示，用 200 μg • mL^{-1} 的褪黑素处理 SKOV3 细胞 48 h，细胞形态正常，而褪黑素与 20 μg • mL^{-1} 紫杉醇联合处理 48 h 后，细胞形态发生变化，且细胞数量显著减少。紫杉醇对细胞的毒性具有浓度依赖性，通过 SPSS 软件非线性回归拟合计算得出，紫杉醇作用 48 h 的 IC_{50} 为 28 μg • mL^{-1}，而用 200 μg • mL^{-1} 褪黑素联合不同浓度的紫杉醇会增加对 SKOV3 细胞的细胞毒性，IC_{50} 降为 13.46 μg • mL^{-1}，差异有统计学意义（$P < 0.05$）（见图 1C）。

细胞克隆实验验证褪黑素联合紫杉醇对卵巢癌细胞增殖的影响，结果如图 1B 所示。与紫杉醇单药处理组相比，褪黑素联合紫杉醇处理组能明显减少人卵巢癌细胞 SKOV3 的克隆集落数，计算每组克隆集落数，如图 1D 所示，褪黑素联合紫杉醇组克隆集落数显著低于褪黑素单药组（$P < 0.001$），紫杉醇单药组（$P < 0.05$），说明两药联合能更好地抑制 SKOV3 细胞增殖。

3.2 褪黑素联合紫杉醇诱导卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡作用

褪黑素和紫杉醇对 SKOV3 细胞凋亡的影响结果见图 2。图 2A 显示空白未处理组的凋亡率仅为（3.19±0.43）%，褪黑素处理 48 h 后，凋亡率为（5.36±0.90）%，紫杉醇组的凋亡率为（14.99±1.41）%，褪黑素和紫杉醇联合使用时的细胞凋亡率约为（26.5±2.12）%，与单药物组相比差异有统计学意义（见图 2C，$P < 0.01$，$P < 0.001$）。此外，Hoechst 33258 染色结果显示，在两药联合药物处理组中，细胞核出现明显的固缩，或呈碎块状，说明两药联合能明显增加细胞的凋亡。Bax 和 Bcl-2 是凋亡途径中的重要蛋白，如图 2D 所示，褪黑素和紫杉醇联合处理组中 Bcl-2/Bax 的比例与空白组和单药处理组相比明显更低。

3.3 褪黑素联合紫杉醇对移植瘤的抑制作用

SKOV3 移植瘤裸鼠模型观察褪黑素联合紫杉醇的体内抗肿瘤作用。图 3A 肿瘤的生长曲线的结果显示，两药联合组的肿瘤生长缓慢，显示出较强的抗肿瘤效果。与单药组相比，差异有统计学意义。图 3B 是给药结束后每组取出的肿瘤组织的代表图，紫杉醇组的肿瘤体积小于生理盐水组，而两药联合组的体积明显小于紫杉醇组。将各组的肿瘤组织取出来进行称重，瘤重结果如图 3C 所示，褪黑素联合紫杉醇组的质量小于褪黑素组单药组 [（0.148±0.02 g）*vs*（0.717±0.06）g，$P < 0.001$] 和紫杉醇单药组 [（0.148±0.02 g）*vs*（0.308±0.07）g，$P < 0.01$]。图 3D 中肿瘤组织的 HE 染色结果表明，生理盐水组中的肿瘤细胞成簇生长，并且结构紧凑且正常，褪黑素和紫杉醇单药组显示局部缺血和缺氧坏死，而联合治疗组的缺血性坏死部分更大。

3.4 褪黑素联合紫杉醇对移植瘤 Ki-67 与瘤组织细胞凋亡的影响

药物对荷瘤裸鼠肿瘤细胞增殖情况的影响如图 4A 所示。生理盐水组肿瘤组织 Ki-67 的表达水平最高（81.6±6.8）%，紫杉醇治疗组 Ki-67 表达

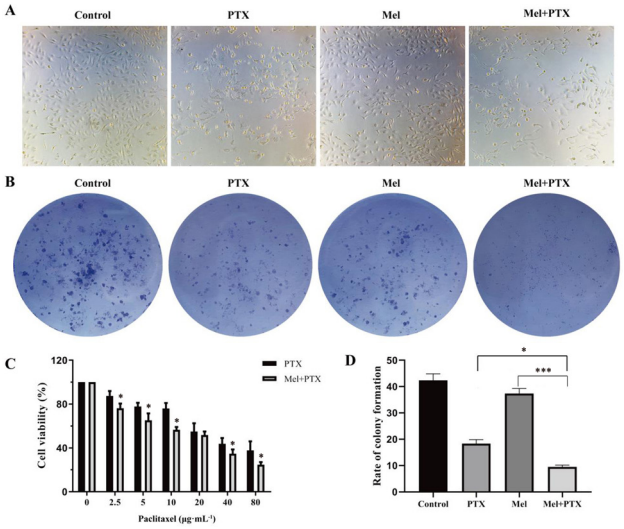


图 1 褪黑素联合紫杉醇对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖的影响

Fig 1 Effect of melatonin combined with paclitaxel on proliferation of ovarian cancer SKOV3 cells

A. 细胞形态（cell morphology，20×）；B. 细胞克隆实验（cell clone experiment）；C. 细胞存活率（cell viability）；D. 克隆形成率（clone formation rate）

注（Note）：与褪黑素联合紫杉醇处理组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$（Compared with the melatonin combined with paclitaxel treatment group，$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$）。

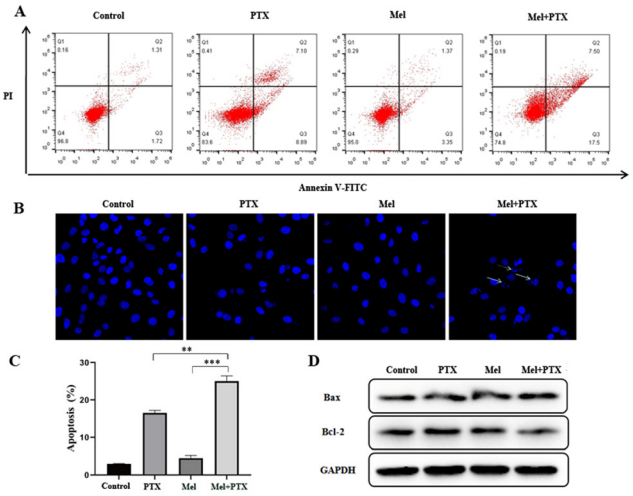


图 2 褪黑素联合紫杉醇对卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡的影响

Fig 2 Effect of melatonin combined with paclitaxel on apoptosis of ovarian cancer SKOV3 cells

A. 流式细胞仪检测细胞凋亡（apoptosis was detected by flow cytometry）；B.Hoechst 33258 染色（40×）（Hoechst 33258 staining）；C. 细胞凋亡的统计（the statistics of apoptosis）；D. Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达（Bax and Bcl-2 protein expression）

注（Note）：与褪黑素联合紫杉醇组相比，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$（Compared with the melatonin combined with paclitaxel group，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）。

下降，而褪黑素联合紫杉醇组 Ki67 阳性细胞数（20.3±4.5）% 明显低于褪黑素单药组（60.3±7.1）%（$P < 0.001$）和紫杉醇单药处理组（31.0±2.6）%

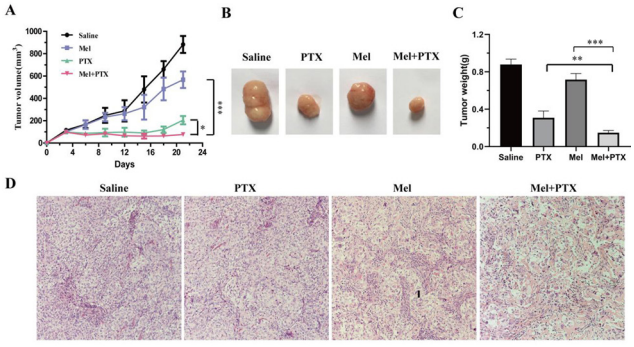


图 3 褪黑素联合紫杉醇在 SKOV3 移植瘤模型中的抗肿瘤作用

Fig 3 Anti tumor effect of melatonin combined with paclitaxel on SKOV3 xenograft tumor model

A. 肿瘤生长曲线（tumor growth curve）；B. 不同药物处理组的肿瘤大体代表图（the gross representation of tumor in different drug treatment groups）；C. 肿瘤质量统计图（statistical chart of tumor weight）；D. HE 染色（HE staining，20×）

注（Note）：与褪黑素联合紫杉醇处理组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$（Compared with the melatonin combined with paclitaxel treatment group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）。

（$P < 0.05$）（见图 4B），表明两药联合对细胞增殖的抑制作用强于单药治疗组。

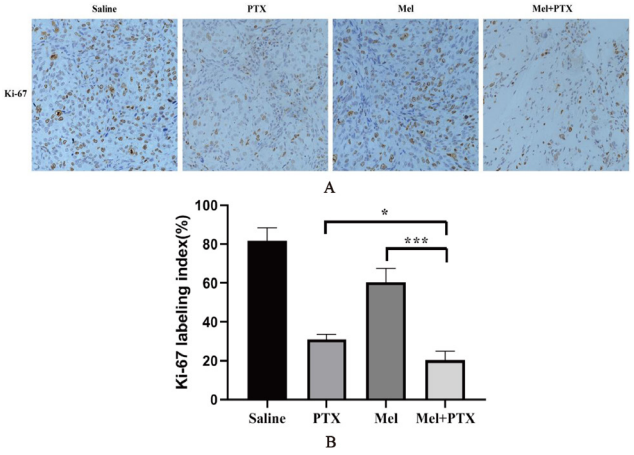


图 4 Ki-67 染色检测褪黑素联合紫杉醇对卵巢癌 SKOV3 移植瘤模型细胞增殖的影响（40×）

Fig 4 Effect of melatonin combined with paclitaxel on the proliferation of SKOV3 cells detected by Ki-67 staining（40×）

A.Ki-67 免疫组化图片（Ki-67 immunohistochemistry）；B.Ki-67 阳性率（Ki-67 labeling index）

注（Note）：与褪黑素联合紫杉醇处理组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$（Compared with the melatonin combined with paclitaxel treatment group，$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$）。

TUNEL 染色检测药物作用后对裸鼠肿瘤组织细胞凋亡的影响。如图 5 所示，生理盐水组和褪黑素组几乎没有绿色荧光点的存在，而紫杉醇组和褪黑素联合紫杉醇治疗组绿色荧光明显增多，且两药联合组的荧光明显强于紫杉醇单药治疗组，表明褪黑素的加入可以明显增强紫杉醇引起的细胞凋亡。

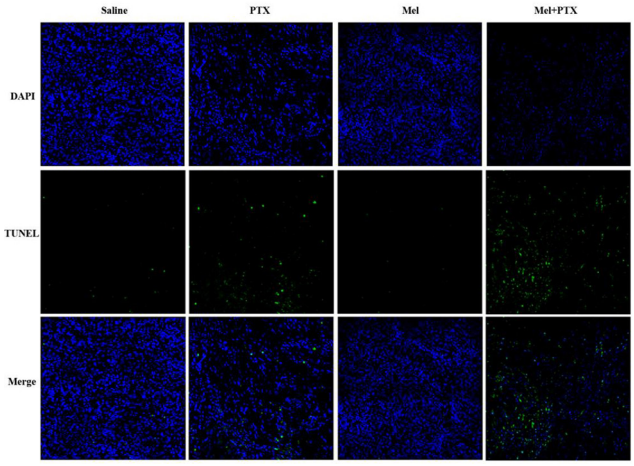


图 5　TUNEL 染色检测褪黑素联合紫杉醇对卵巢癌 SKOV3 移植瘤模型细胞凋亡的影响（20×）

Fig 5　Effect of melatonin combined with paclitaxel on the proliferation of SKOV3 cells detected by TUNEL staining（20×）

4　讨论

褪黑素在多种癌症具有显著的抑制作用。褪黑素可抑制肿瘤有氧糖酵解、细胞增殖、转移相关的细胞信号通路，并克服了肿瘤的多药耐药[9-11]。例如，褪黑素可通过降低组蛋白脱乙酰基酶 9 的表达来抑制非小细胞肺癌的生长并促进细胞凋亡[12]；通过下调 ZNF746 调节的 MMP-9/MMP-2 通路来抑制膀胱癌的增殖、迁移和侵袭[13]。

实验表明在联合给药组中 SKOV3 卵巢癌细胞的增殖被显著抑制，Ki-67 的阳性率低于单药组。因此，可以推断两种药物的联合可以起到抑制肿瘤增殖的协同作用。此外，联合给药可显著诱导卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡。Bcl-2 是一种膜蛋白，主要位于线粒体的外膜上，诱导 caspase-3/-9 的释放。该家族中的蛋白表现出促凋亡或抗凋亡活性，其中 Bcl-2/Bax 比值可作为确定细胞凋亡易感性的标志物[14]。本研究发现褪黑素联合紫杉醇通过在体外下调 Bcl-2/Bax 比值来诱导卵巢癌细胞凋亡。体内 TUNEL 染色结果进一步说明褪黑素增强了紫杉醇对卵巢癌细胞的促凋亡作用。

研究发现，褪黑素和化疗药物的联合不仅能极大地增强药物对肿瘤细胞的疗效，而且可以降低化疗的副作用[15]。例如，化学疗法引起的神经性疼痛是癌症治疗中常见的毒副作用，褪黑素作为一种有效抗氧化剂可通过降低氧化应激，减少由化疗药物紫杉醇引起的线粒体损伤和神经性疼痛[16]。综上所述，褪黑素一种安全有效的化疗增敏剂，与紫杉醇的联合疗法具有良好的临床应用前景。

参考文献

[1] Kuroki L，Guntupalli SR. Treatment of epithelial ovarian cancer [J]. BMJ，2020，371：m3773.

[2] Xu D，Liu L，Zhao Y，et al. Melatonin protects mouse testes from palmitic acid-induced lipotoxicity by attenuating oxidative stress and DNA damage in a SIRT1-dependent manner [J]. J Pineal Res，2020，69（4）：e12690.

[3] 马领然，周迪，吕子阳，等. 褪黑素改善高脂饮食小鼠认知障碍的可能机制探讨[J]. 中南药学，2020，175（8）：1323-1328.

[4] Kong X，Gao R，Wang Z，et al. Melatonin：A potential therapeutic option for breast cancer [J]. Trends Endocrinol Metab，2020，31（11）：859-871.

[5] Iravani S，Eslami P，Dooghaie MA，et al. The role of melatonin in colorectal cancer [J]. J Gastrointest Cancer，2020，51（3）：748-753.

[6] Chen YT，Huang CR，Chang CL，et al. Jagged2 progressively increased expression from stage Ⅰ to Ⅲ of bladder cancer and melatonin-mediated downregulation of Notch/Jagged2 suppresses the bladder tumorigenesis via inhibiting PI3K/AKT/mTOR/MMPs signaling [J]. Int J Biol Sci，2020，16（14）：2648-2662.

[7] Anderson G. Melatonin and cocaine：Role of mitochondria，immunity，and gut microbiome [J]. Braz J Psychiatry，2020，42（4）：452-453.

[8] Fernandez-Gil BI，Guerra-Librero A，Shen YQ，et al. Melatonin enhances cisplatin and radiation cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma by stimulating mitochondrial ROS generation，apoptosis，and autophagy [J]. Oxid Med Cell Longev，2019，2019：7187128.

[9] 陈亦清，朱雯婷，李振华，等. 褪黑素对卵巢癌 SKOV3 细胞侵袭、迁移和血管生成的影响[J]. 中南医学科学杂志，2020，48（4）：389-394.

[10] Zare H，Shafabakhsh R，Reiter RJ，et al. Melatonin is a potential inhibitor of ovarian cancer：Molecular aspects [J]. J Ovarian Res，2019，12（1）：26.

[11] Liu K，Song J，Yan Y，et al. Melatonin increases the chemosensitivity of diffuse large B-cell lymphoma cells to epirubicin by inhibiting P-glycoprotein expression via the NF-κB pathway [J]. Transl Oncol，2021，14（1）：100876.

[12] Ma Z，Liu D，Di S，et al. Histone deacetylase 9 downregulation decreases tumor growth and promotes apoptosis in non-small cell lung cancer after melatonin treatment [J]. J Pineal Res，2019，67（2）：e12587.

[13] Chen YT，Yang CC，Shao PL，et al. Melatonin-mediated downregulation of ZNF746 suppresses bladder tumorigenesis mainly through inhibiting the AKT-MMP-9 signaling pathway [J]. J Pineal Res，2019，66（1）：e12536.

[14] Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins [J]. J Cell Mol Med，2003，7（3）：249-257.

[15] Lee JH，Yun CW，Han YS，et al. Melatonin and 5-fluorouracil co-suppress colon cancer stem cells by regulating cellular prion protein-Oct4 axis [J]. J Pineal Res，2018，65（4）：e12519.

[16] Galley HF，Mccormick B，Wilson KL，et al. Melatonin limits paclitaxel-induced mitochondrial dysfunction in vitro and protects against paclitaxel-induced neuropathic pain in the rat [J]. J Pineal Res，2017，63（4）：e12444.

（收稿日期：2021-05-27；修回日期：2021-07-13）

基于网络药理学的福建野鸦椿果三萜抗肝纤维化的药效机制研究

蒋佩佳[1]，洪译[1]，谭洋[1]，周峰[1]，肖锦仁[1*]，裴刚[1, 2*]（1. 湖南中医药大学药学院，长沙 410208；2. 湖南省中药饮片标准化与功能工程技术中心，长沙 410208）

摘要：目的 研究福建野鸦椿果三萜类成分（EFT）抗肝纤维化的作用，并通过网络药理学探讨其治疗肝纤维化的作用机制。**方法** 通过皮下注射四氯化碳建立肝纤维化小鼠模型，造模成功后给予 EFT（5.12 mg • 10 g^{-1}）灌胃进行干预，以秋水仙碱（0.1 mg • kg^{-1}）作为阳性对照。给药 6 周后采集小鼠血清和肝组织样本，观察肝组织病理变化，测量血清中的肝酶 / 功能指标，以及透明质酸和层粘连蛋白水平。参考文献筛选出 EFT，运用 SWISS 数据库对 EFT 预测的作用靶点进行整合。通过 HPO、DRUGBANK、OMIM 数据库，筛选肝纤维化疾病作用靶点。在 STRING 数据库中导入以上数据，对 EFT 靶点与肝纤维化疾病相关靶点进行蛋白质相互作用分析，借助 Cytoscape 3.7.2 软件构建 EFT 活性成分 - 作用靶点网络，并通过 DAVID 数据库对其结果进行信号通路和生物途径分析，得出 EFT 抗肝纤维化相应的作用机制。**结果** 动物实验结果表明，EFT 干预后可显著改善肝纤维化小鼠的肝组织结构，并恢复肝酶 / 功能指标水平，降低血清中透明质酸和层粘连蛋白的浓度。网络药理学分析得出福建野鸦椿果对肝纤维化的治疗作用可能是通过干预机体叉头转录因子信号通路，过氧化物酶体增殖物激活受体，Toll 样受体信号通路，胰岛素抵抗、血管内皮生长因子信号通路、沙门氏菌感染相关信号通路来实现的。**结论** 本研究表明三萜可能是福建野鸦椿果治疗肝纤维化的物质基础。网络药理学分析展现了 EFT 活性成分治疗肝纤维化的复杂网络，并为深入研究福建野鸦椿果提供科学依据。

关键词：福建野鸦椿果；三萜；肝纤维化；网络药理学
中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1524-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.003

Network pharmacology of triterpenoids from the fruits of *Euscaphis fukienensis* Hsu. against liver fibrosis

JIANG Pei-jia[1], HONG Yi[1], TAN Yang[1], ZHOU Feng[1], XIAO Jin-ren[1*], PEI Gang[1, 2*] (1. *School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha* 410208; 2. *Hunan Engineering Technology Center for Standardization and Function for Chinese Herbal Medicine*, *Changsha* 410208)

Abstract: Objective To determine the anti-liver fibrosis effect of triterpenoids from the fruits of *Euscaphis fukienensis* Hsu. (EFT) , and its mechanisms based on network pharmacology. **Methods** The liver fibrosis model was estalished by injecting carbon tetrachloride subcutaneously. EFT (5.12 mg • 10 g^{-1}) by gavage was performed, and colchicine (0.1 mg • kg^{-1}) was used as the positive control. After the weeks treatment, the serum and liver tissue samples of mice were collected. Hepatic histology was observed, and hepatic enzymes/function indicators and the levels of hyaluronic acid and laminin in the serum were measured. SWISS database was used to integrate the predicted targets of the triterpenoid compositions from the fruits of *Euscaphis fukienensis* Hsu.. HPO, DRUGBANK, and OMIM databases were collected to screen the targets of liver fibrosis. The above were was imput to STRING database to

基金项目：国家自然科学基金资助面上项目（No.81874424）；湖南中医药科研计划重点项目（No.201805）；湖南中医药大学中药一流学科资助。

作者简介：蒋佩佳，女，硕士研究生，主要从事中药有效成分及作用机制研究，E-mail：971151951@qq.com *__通信作者__：肖锦仁，女，副教授，主要从事中药有效成分及作用机制的研究，E-mail：109004774@qq.com；裴刚，男，教授，主要从事中药有效成分及作用机制的研究，E-mail：hntcmpg@163.com

analyze the protein interactions. Cytoscapy 3.7.2 software was used to build the network of triterpenoid active ingredients-action targets. DAVID database was used to analyze the signal pathway and biological pathway of the potential mechanism of EFT treatment for liver fibrosis. **Results** EFT significantly improved the liver tissue structures in mice with liver fibrosis, restored the level of liver enzymes/function indicators, and reduced the concentration of fibrin in the serum. Network pharmacological analysis showed that the therapeutic effect of EFT on the liver fibrosis may be through the intervention of FoxO signaling pathway, PPAR signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, insulin resistance, VEGF signaling pathway and *Salmonella* infection. **Conclusion** EFT can ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis, indicating triterpenoids may be the material basis of the fruits of EFT for liver fibrosis. Network pharmacology exhibits a complex network of triterpenoid ingredients from EFT for liver fibrosis, and provides a scientific basis for further research.

Key words: fruit of *Euscaphis fukienensis* Hsu.; triterpenoid; liver fibrosis; network pharmacology

肝纤维化（liver fibrosis）是肝脏对各种病因所致慢性肝损伤的过度修复反应，是以胶原为主的细胞外基质（extra cellular matrix，ECM）在肝内的过度沉积，导致的肝脏结构改变和肝功能丧失[1]。据报道，肝纤维化的发病率和病死率在全世界范围内居高不下，并呈逐年增高的趋势[1]。在医学上肝纤维化被认为是可逆性病变，因此，有效控制肝纤维化环节对预防肝硬化及肝癌的发生有重要的意义[2-3]。

福建野鸦椿果（*Euscaphis fukienensis* Hsu.）为省沽油科野鸦椿属福建野鸦椿的成熟果实，在我国南方大部分地区都可采集，主要分布于福建，常作为园林绿化植物大面积种植，资源十分丰富[4]。在我国南方地区，福建野鸦椿果的水提物经常被用来治疗肝炎和肝纤维化[5-6]，但是其物质基础和作用机制尚未明确。本课题组前期从福建野鸦椿果中分离得到了多个化合物[3，7]，其中齐墩果酸、熊果酸等三萜类成分有大量关于抗肝纤维化的活性报道[8-15]，推测三萜可能是其抗肝纤维化的有效成分。因此本实验研究福建野鸦椿果三萜类（EFT）化合物对肝纤维化小鼠的影响。

网络药理学基于系统生物学和经典药理学等多学科理论，提供了一种多角度分析药物干预疾病作用靶点及机制的系统方法[16-17]。故本研究应用网络药理学分析方法，对 EFT 抗肝纤维化的药效机制进行分析和预测，为该药物抗肝纤维化药效和机制的研究提供了依据。

1 材料

1.1 仪器

电热恒温鼓风干燥箱（DHG-9030A，上海一恒科技有限公司）；超声波清洗器（SB25-12D，宁波心芝科技股份有限公司）；旋转蒸发仪（RE-501A）、循环水式真空泵（SHZ-D）（巩义市予华有限责任公司）；电子分析天平（AY220，日本 SHIMADZU）；超级生化分析仪（日本日立）；超级化学发光免疫分析仪（美国 Thermo）。

1.2 试药

福建野鸦椿果于 2016 年采集于福建省三明市，经湖南中医药大学药学院中药鉴定教研室周小江教授鉴定为省沽油科野鸦椿属福建野鸦椿的成熟果实。阳离子交换树脂、大孔吸附树脂 D101（长沙承禹化工有限公司）；有机试剂（EtOH、$CHCl_3$ 等，AR，天津恒兴试剂有限公司）；蒸馏水为自制；血清谷丙转氨酶（ALT）测定试剂盒（批号：C052-a）、谷草转氨酶（AST）测定试剂盒（批号:B014）、白蛋白（ALB）测定试剂盒（批号：C008-a）、总胆红素（TBIL）测定试剂盒（批号：C004-g）（中国长春汇利生物技术有限公司）；血清透明质酸（HA）定量评估试剂盒（批号：CSB-E04805h）、层粘连蛋白（LN）定量评估试剂盒（批号：CSB-E04644h）（美国 CUSABIO）。

1.3 实验动物

SPF 级昆明小鼠（14.0 ～ 18.0 g），雌雄各半 [湖南斯莱克景达实验动物有限公司，许可证编号：SCXK（湘）2011-0005]。饲养于湖南中医药大学实验动物中心 [许可证编号：SYXK（湘）2013-0003]。

1.4 数据库及软件

通用蛋白质数据库 UniProt（https：//www.uniprot.org/），有机小分子生物活性数据库 Pubchem（https：//pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/），Swiss Target Prediction 数据库（http：//www.swisstargetprediction.ch/），治疗靶标数据库 TTD（http：//bidd.nus.edu.sg/BIDD-Databases/TTD/TTD.asp），HPO 数据库（https：//hpo.jax.org/），药物银行数据库 DRUGBANK（https：//www.drugbank.ca/），在线人类孟德

尔遗传数据库 OMIM（https：//omim.org/），蛋白质互作平台 STRING V 11.0（https：//string-db.org/），生物学信息注释数据库 DAVID V 6.8（https：//david.ncifcrf.gov/），网络拓扑属性分析软件 Cytoscape 3.7.2（http：//cytoscape.org/）。

2 方法

2.1 动物实验方法

2.1.1 EFT 的制备 取干燥福建野鸦椿果 1000 g，粉碎，加 2000 mL 95% 乙醇加热回流提取 60 min，提取 3 次，合并提取液，回收乙醇，得浓缩液。将浓缩液过大孔树脂 D-101 色谱柱（柱体积约 2000 mL），水洗后依次用 50% 和 70% 乙醇梯度洗脱，收集 70% 乙醇的洗脱部分，减压回收溶剂，蒸至浸膏，得 EFT 14.0 g，于 4 ℃保存备用。取适量 EFT 溶解，参照杨洁等 [18] 的方法，利用紫外分光光度计测定 EFT 中三萜的含量。

2.1.2 动物造模及给药处理 小鼠适应性喂养 1 周后，参照文献方法诱导肝纤维化的生成进行 [5-6]。具体操作如下：除空白组外，其余各组小鼠腹腔皮下注射 40% 四氯化碳（CCl_4）溶液（溶于花生油）0.1 mL/10 g，每 5 日干预一次，共 6 周，首次干预剂量加倍。空白组于相同时间点，采用相同给药方式注射等剂量花生油。

造模结束后，空白组和模型组中的小鼠按照体重，每日灌胃生理盐水 0.1 mL • 10 g^{-1}。阳性组每日灌胃秋水仙碱 0.1 mg • kg^{-1}。EFT 组每日灌胃 EFT 5.12 mg • 10 g^{-1}。每只小鼠的给药体积为 0.2 mL/10 g，共给药 6 周。最后一次给药后，各组小鼠禁食不禁水 24 h，眼眶取血分离血清，用于肝功能指标和纤维化因子的检测。取血后将小鼠颈部脱臼处死，沿腹部正中线剪开小鼠腹部，取出肝脏，用于病理切片的检测。

2.1.3 肝组织病理学观察 肝组织经 10% 甲醛固定，蜡块包埋，切成 4 μm 厚的切片，HE 染色，100 倍光学显微镜下 DMR ＋ Q550 图像分析仪观察肝纤维化形成情况。

2.1.4 肝功能及纤维化生化指标的检测 在室温下凝结 20 min 后，将血液离心 10 min（3000 r•min^{-1}），并收集上清液。检测 ALT、AST、ALB 和 TBIL 水平。用 ELISA 法检测血清 HA 和 LN。将含有 40 μL 稀释剂的 10 μL 样品添加到平板中，振动 30 s，37 ℃孵育 30 min，用洗液洗涤 5 次，添加 100 μL 酶标记液，重复孵育和洗涤操作，添加发光底物，并按说明书通过超级化学发光免疫分析仪进行检测。

2.1.5 统计分析方法 实验数据以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用 SPSS 19.0 软件处理数据，各项指标多组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA）并继以最小显著差（LSD-t）检验比较组间差异，以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2.2 网络药理学方法

2.2.1 药物和疾病靶点的筛选 查阅野鸦椿属相关文献 [7]，以目前福建野鸦椿果中分离并鉴定结构的三萜化合物为对象，在 Pubchem 数据库中获取这些成分的 SMILE 式。将三萜活性成分的 SMILE 式输入 SWISS 数据库中获取其作用靶点，并将靶点数据进行去重整合 [16-17，19]。经过去重整合后，将靶点名称输入 UniProt 数据库，获得其相应靶点的人源的靶点基因名称及其 ID。在 HPO、DRUGBANK、OMIM 数据库中，以 “liver fibrosis” 和 “hepatic fibrosis” 为关键词对肝纤维化相关靶点进行检索 [20]。

2.2.2 交互网络的构建和分析 将 EFT 成分、药物靶点、疾病靶点输入 STRING 数据库，选定物种为人，进行蛋白互作分析。将蛋白互作分析结果（tsv 格式）导入 Cytoscape 3.7.2 绘制相互作用网络，运用软件自带的 Tools 分析功能，分析得到度值（degree centrality，DC）、介度中心性（betweenness centrality，BC）、接近中心性（closeness centrality，CC），将 DC ≥ 2 倍中位数、BC 和 CC ≥ 1 倍中位数的靶点作为重要靶点 [19，21]。

2.2.3 生物过程与通路分析 在 DAVID 数据库中输入 “2.2.2” 项所得的重要靶点，选定物种为人，进行基因本体论（GO）分析和 KEGG 通路富集分析 [20，22]。设定阈值 $P < 0.05$，收集 P 值前列的生物过程和通路，通过 GraphPadPrism8.0 软件进行绘图后，然后进行解析说明 [21]。

3 结果

3.1 EFT 对小鼠肝纤维化的影响

经检测，EFT 含量为（98.15±1.30）%。如表 1 所示，与空白组相比，模型组小鼠的血清 ALT、AST、TBIL 显著升高，ALB 显著降低，说明 CCl_4 导致了肝功能的损伤。同时，血清中的纤维化因子 HA 和 LN 含量均显著升高，表明模型组小鼠组织中出现了纤维化改变。肝组织病理变化如图 1，空白组可见正常的肝组织结构，肝细胞排列整齐规则。模型组肝细胞高或中度浊肿变性，形成大小不等椭圆形肝细胞结缔组织构成假小叶，结节周围纤维组织沉积增生，显示出明显的纤维化特征，表明造模成功。

与模型组相比，阳性对照组血清中的肝功能和纤维化因子指标均明显改善；同时，肝脏病变减轻，肝小叶结构基本完整，仅有少量肝细胞轻度浊肿，纤维间隔变窄，脂肪空泡的形成明显降低。与模型组相比，EFT 组血清中的肝功能和纤

表 1 EFT 对肝纤维化小鼠血清 ALT，AST，ALB，TBIL，HA 及 LN 的影响 (Mean±SEM)

Tab 1 Effect of EFT on serum ALT，AST，ALB，TBIL，HA and LN levels (Mean±SEM)

组别	ALT/（U·L^{-1}）	AST/（U·L^{-1}）	ALB/（g·L^{-1}）	TBIL/（μmol·L^{-1}）	HA/（μg·L^{-1}）	LN/（μg·L^{-1}）
空白组	120.97±1.88	50.10±0.56	34.84±1.12	2.77±0.92	123.03±4.22	23.32±0.95
模型组	241.25±3.00**	124.13±1.62**	23.91±1.41**	12.75±0.82**	243.30±7.14**	43.34±1.76**
阳性对照组	148.89±3.42$^{\#\#}$	68.25±1.75$^{\#\#}$	28.79±0.84$^{\#\#}$	6.39±0.92$^{\#\#}$	154.88±4.18$^{\#\#}$	29.54±2.25$^{\#\#}$
EFT 组	151.07±4.10$^{\#\#}$	69.63±1.39$^{\#\#}$	32.41±1.15$^{\#\#}$	7.66±0.61$^{\#\#}$	152.35±4.92$^{\#\#}$	30.25±1.47$^{\#\#}$

注：与空白组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

Note：*vs* control group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；*vs* model group，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$.

维化因子指标均明显改善；从病理切片结果可知，与阳性对照组类似，经过 EFT 干预后，小鼠肝脏的病变减轻，肝小叶结构基本保持完整，纤维间隔明显减少，脂肪空泡也有一定程度减少，这表明 EFT 对 CCl_4 所诱导的小鼠肝纤维化模型有良好的干预作用。

3.2 EFT 靶点和肝纤维化相关靶点的预测

福建野鸦椿果中的 21 个三萜类化学成分如表 2 所示，共得到 140 个化合物作用靶点，肝纤维化疾病相关靶点 96 个。将以上获得的靶点用来构建“成分 - 靶点 - 疾病”网络 [23]。

3.3 EFT 活性成分 - 作用靶点网络构建

使用 Cytoscape 3.7.2 软件构建福建野鸦椿果三萜类成分 - 作用靶点网络图，如图 2 所示，共有 161 个节点，1413 条边，其中黄色代表活性成分，绿色代表作用靶点 [24]。从图中可以明显看出：每个 EFT 成分均可作用于多个靶点，每个作用靶点同时与多个活性成分相关；从而体现出 EFT 类活性成分在发挥治疗作用的网络关系特点，并且不同成分可通过相同靶点加强治疗作用 [25]。

3.4 EFT 活性成分 - 靶点 - 肝纤维化网络构建

通过计算每个蛋白的拓扑性质寻找福建野鸦椿果治疗肝纤维化作用的关键靶点，最后获得 33 个主要节点，绘制其互作图 [26]。图 3 中黄色代表 EFT 类有效成分，绿色代表药物靶点，蓝色代表疾病靶点，红色代表共同靶点，连线表示靶点之间的相关性 [16，21，25]。

3.5 生物过程与通路分析

从生物过程（biological progress，BP）分析中可以看出与靶点相关的生物过程（见图 4），涉及 DNA 模板转录、RNA 聚合酶Ⅱ对转录的正调节作用、细胞对缺氧的反应、葡萄糖稳态、凋亡过程负调控、细胞对过氧化氢的反应、I-κB 激酶 / NF-κB 信号转导的负调控、内皮细胞增殖的正调控、Smad 蛋白信号转导、炎症反应负调节等生物过程。

从分子功能（molecular function，MF）分析中可以看出与靶点相关的分子功能，靶点具备能和 DNA 结合转录激活剂，RNA 聚合酶Ⅱ特异性、类固醇激素受体活性、RNA 聚合酶Ⅱ顺式调控区序列特异性 DNA 结合、锌离子结合、DNA 结合转录因子活性、核心启动子序列特异性 DNA 结合、染色质结合、甾体结合、序列特异性 DNA 结合、核受体活性等结合的分子功能。

从细胞成分（cellular component，CC）分析中可以看出与靶点相关的细胞成分，靶点主要分布于细胞中核染色质、核常染色质、细胞核、细胞器膜等部位 [20，23-24]。

通过对福建野鸦椿果治疗肝纤维化的 33 个关键靶点进行 KEGG 通路富集分析，得到 8 条主要的生物信号通路，按 *P* 值由小到大排序的前列，选取与肝纤维化相关的 6 条通路：叉头转录因子信号通路（FoxO signaling pathway）、过氧化物酶体增殖物激活受体（PPAR signaling pathway）、Toll 样受体信号通路（Toll-like receptor signaling pathway）、胰岛素抵抗（insulin resistance）、血管内皮生长因子信号通路（VEGF signaling pathway）、沙门氏菌感染（*Salmonella* infection）（见图 5）。

4 讨论

4.1 EFT 对小鼠肝纤维化的干预作用

在前期工作中本课题组用福建野鸦椿果水提物和 EFT 做了小鼠的急性毒性实验，发现在小鼠最大耐受量下，各器官实质均无明显损伤。为了将药物的治疗效果最大化，我们提高灌胃量进行给药，开展后续实验。本实验在建立 CCl_4 诱导的小鼠肝纤维化模型后，通过观察 HE 染色后的病理切片，发现 EFT 能够明显抑制 CCl_4 所造成的肝损伤和纤维化病变。血清 ALT、AST、ALB 和 TBIL 的含量是临床评估肝功能常用的指标。在本次实验中，EFT 的干预对这些指标变化的逆转作用显著。HA、LN 是肝脏纤维组织主要基质成分，其血清中的含量可反映肝纤维化严重程度，EFT 的干预同样能够降低其含量。综上，本研究明确了 EFT 对 CCl_4 所诱导的小鼠肝纤维化的干预作用。

4.2 网络药理学预测构建 EFT 活性成分 - 靶点 - 肝纤维化网络

采用网络药理学的方法对 EFT 作用肝纤维化的机制进行预测，野鸦椿属植物在化学成分上有

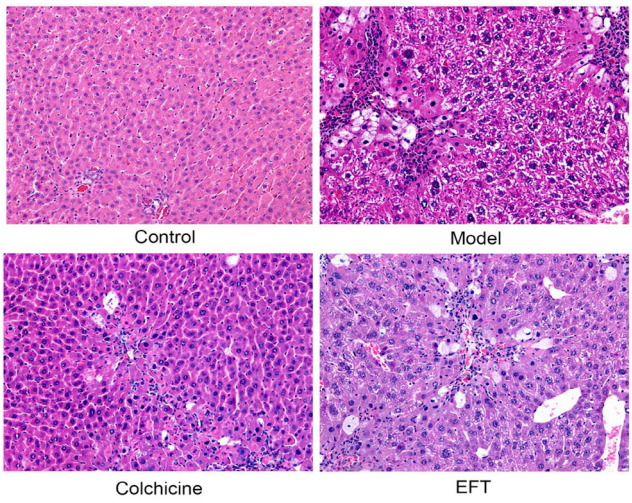


图 1 HE 染色显示肝组织炎症情况（100×）

Fig 1 HE stain for liver tissue inflammation（100×）

着高度的一致性[4]，故本研究筛选出了野鸦椿属植物中共 21 个三萜成分，构建了福建野鸦椿果“三萜活性成分 - 作用靶点”网络图，共获得 140 个靶点。福建野鸦椿果“活性成分 - 靶点 - 肝纤维化”靶点互作图分析得到 33 个关键靶点，在一定程度上反映出它们之间存在复杂交错的相互关系，并非独自发挥作用。GO 分析结果表明，福建野鸦椿果治疗肝纤维化涉及细胞过程和代谢过程等生物过程，涉及核染色质、核常染色质、细胞核、细胞器膜等细胞组分，有酶、受体、蛋白质等多种物质的参与，是一个复杂的网络。从 KEGG 通路分析中可以看出，福建野鸦椿果治疗肝纤维化涉及多条复杂的信号通路。

福建野鸦椿果 21 种活性成分中熊果酸、齐墩

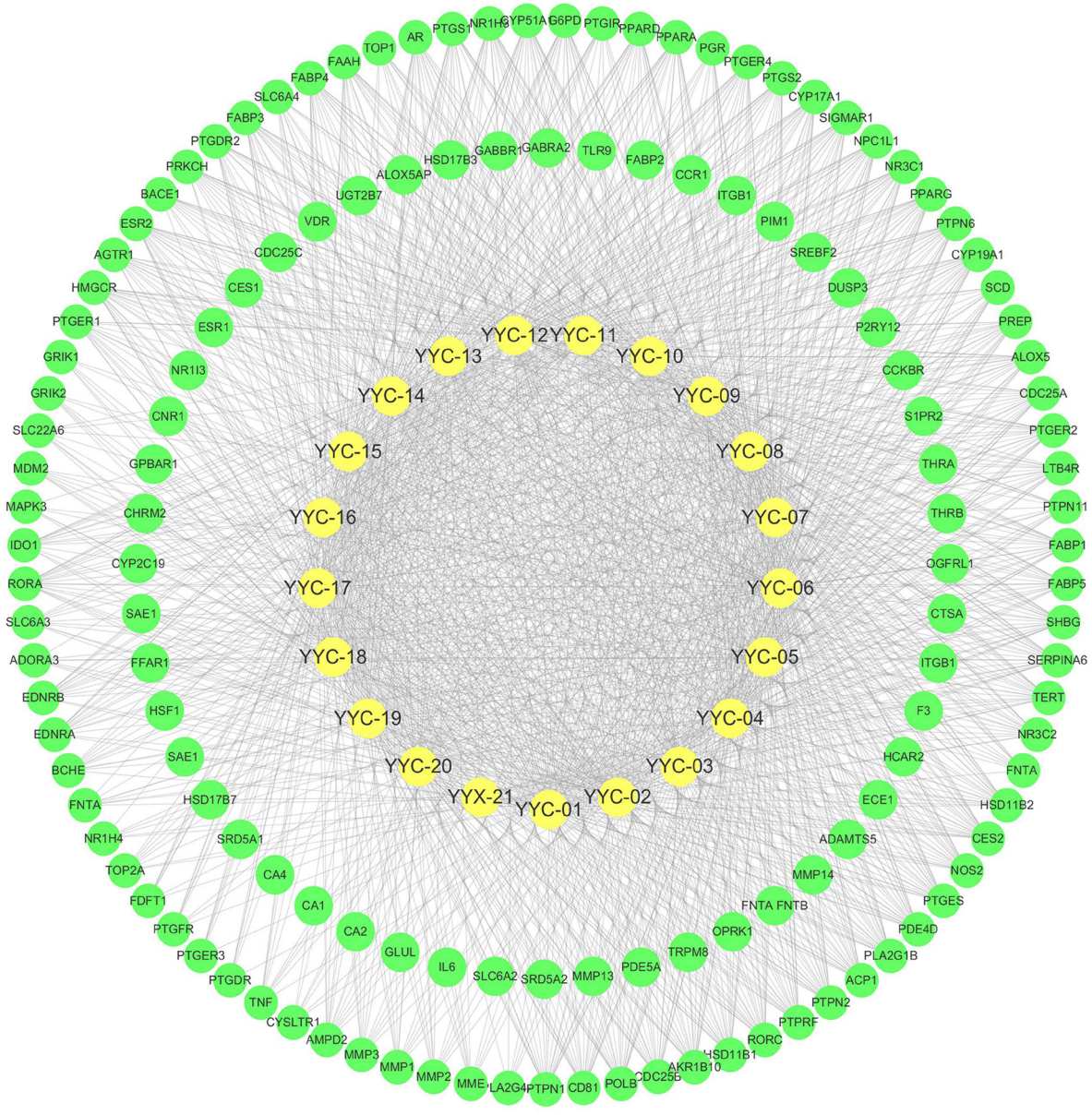


图 2 EFT 活性成分 - 作用靶点网络图

Fig 2 “Compound-target” network diagram of EFT

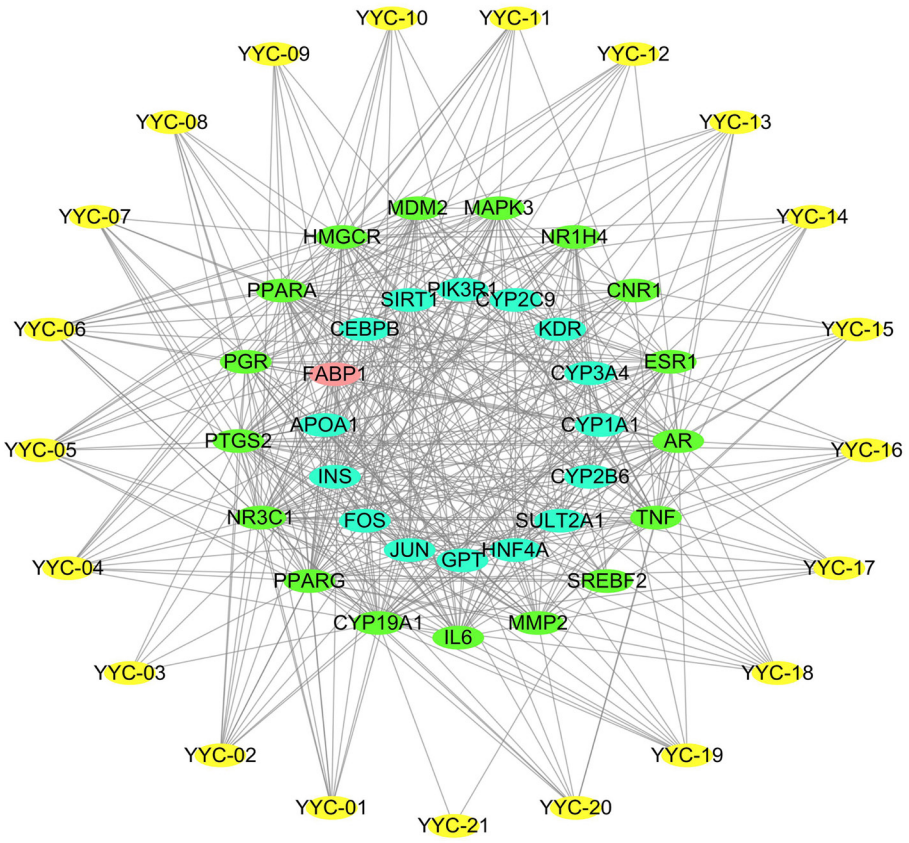


图 3 EFT 抗肝纤维化的成分 - 靶点 - 疾病交互网络

Fig 3 “Compound-target-disease” network diagram of EFT against liver fibrosis

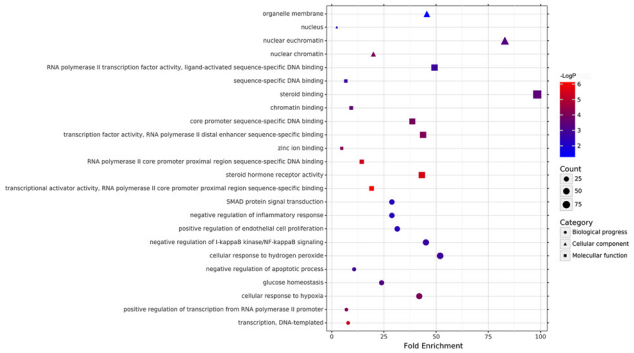


图 4 EFT 活性成分治疗肝纤维化的 GO 分析

Fig 4 GO analysis for the analgesic targets of EFT against liver fibrosis

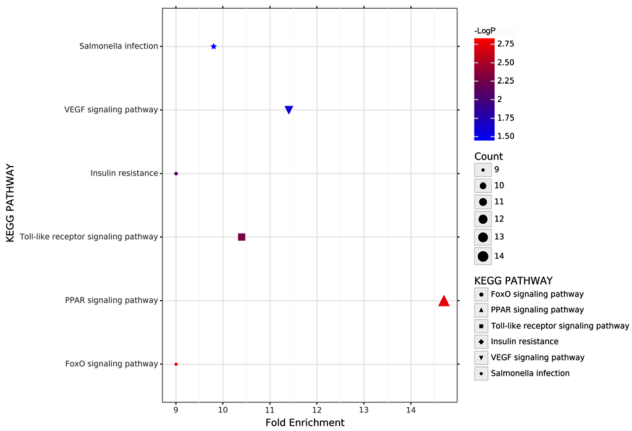


图 5 EFT 成分抗肝纤维化的 KEGG 通路分析

Fig 5 KEGG pathway of EFT against liver fibrosis

果酸、山楂酸、坡模酸、常春藤皂苷元连接较多靶点数。这些成分所连接的 140 个靶点中，PGR、HMGCR、CYP19A1、NR3C1、AR、PPARA、PPARG、PTGS2、MAPK3、TNF、IL-6 等度值较大，是福建野鸦椿果治疗肝纤维化的主要作用靶点。其中 TNF 和 IL-6 度值显著，更因其炎症因子的身份而颇受关注。TNF 和 IL-6 是主要由巨噬细胞主要分泌的一类促炎因子，其产生能够促进巨噬细胞进一步向促炎型转化，损伤肝实质细胞，激活肝星状细胞，促进肝纤维化发展 [2]。福建野鸦椿果中的熊果酸和齐墩果酸具有抗氧化作用，可通过提高肝损伤后的多种抗氧化酶活性，降低 TNF-α、IL-6 等炎性因子水平，阻滞肝纤维化形成 [8-11]。邓莉等 [14] 报道齐墩果酸能抑制 TNF-α 诱导的成纤维细胞样滑膜细胞炎症因子 IL-6 及 IL-1β 的产生。王颖等 [13] 发现山楂酸在 CCl_4 诱导的炎症性肝损伤的模型中能显著降低肝组织中 TNF-α 和 IL-1β 表达。以上研究表明福建野鸦椿果的抗肝纤维化作用可能与其对巨噬细胞的作用有关。巨噬细胞是肝内最主要的免疫细胞，具有高度的可塑性和异质性，可针对不同的刺激信号作出应答，在不同微环境下可分化成表型和功能迥异的

表 2 EFT 编号与化合物名称对照表

Tab 2 Number and compound name of EFT

序号	中文名称	英文名称
YYC-01	苦瓜酸	momordic acid
YYC-02	熊果酸	ursolic acid
YYC-03	白桦脂酸	betulinic acid
YYC-04	坡模酸	pomonic acid
YYC-05	山楂酸	maslinic acid
YYC-06	齐墩果酸	oleanic acid
YYC-07	野鸦椿酸 A	euscaphic acid A
YYC-08	野鸦椿酸 B	euscaphic acid B
YYC-09	野鸦椿酸 C	euscaphic acid C
YYC-10	野鸦椿酸 D	euscaphic acid D
YYC-11	野鸦椿酸 E	euscaphic acid E
YYC-12	野鸦椿酸 F	euscaphic acid F
YYC-13	野鸦椿酸	euscaphic acid
YYC-14	委陵菜酸	tormentic acid
YYC-15	—	23-aldehydepomolic acid
YYC-16	铁冬青酸	rotundic acid
YYC-17	—	rotungenic acid
YYC-18	马钱子酸	vergatic acid
YYC-19	常春藤皂苷元	hederagenin
YYC-20	阿江榄仁酸	arjunic acid
YYC-21	无羁萜	friedeline

不同类型，释放促炎因子或抗炎因子[27-29]。在肝纤维化启动的早期炎性反应期，巨噬细胞在 LPS、IFN-γ 等诱导下，主要表现为 M1 型，高表达和分泌促炎细胞因子 IL-1β、IL-6、IL-12、TNF-α 等，并高表达 CD68、CD40 等表面抗原提呈分子，而抗炎细胞因子 IL-10、IL-22 等的分泌量较低[2，30]。这些促炎因子可迅速作用于肝星状细胞（hepatic stellate cell，HSC），促进静息状态的 HSC 增殖，并向肌原纤维母细胞或肌成纤维样细胞转变，合成并释放 ECM，从而启动肝纤维化[28，31-32]。

4.3 EFT 抗肝纤维化作用的相关信号通路

KEGG 分析结果将 EFT 抗肝纤维化作用的机制指向其对 Toll 样受体（Toll-like receptor，TLR）信号传递的调控[33]。TLR 是巨噬细胞所表达多种模式识别受体之一，包括 TLR2、TLR4、TLR9 等，这些受体可以对 LPS 等病原体成分进行识别，并进行炎症信号的传递。TLR4 是 Toll 样家族中的一员，作为重要的模式识别受体，能够识别内源性的 HMGB1，促进 TNF-α 和 IL-1β 的产生，从而传递炎症信号，加重肝损伤[34-35]。当 TLR4 被抑制之后，下游炎症因子理论上应该会减少。通过查阅文献发现，EFT 中熊果酸、齐墩果酸等化合物能够对 TLR 信号通路的传递进行抑制[28，30]。PPAR 是 TLR 信号传递的重要调控因子，PPARA 与 PPARG 同属于过氧化物酶体增生激活受体家族，其活化对肝纤维化具有重要的调节作用[30，36]。在生理状态下，巨噬细胞的 TLR 信号由于 PPAR 的负调控而无法向下游传递，一系列炎症基因的表达处于抑制状态[30，37-38]。但在肝损伤过程中 PPAR 会出现表达量减少和功能异常，这被认为与肝脏炎症介质的释放和纤维化的进展有关[39]。张扬武等[15]发现熊果酸能够抑制 HSC-T6 细胞增殖，降低 ECM 分泌，该机制可能与上调 PPAR-γ 表达有关。

脂肪酸结合蛋白（fatty acid-binding protein，FABP1）是药物和疾病共有的作用靶点，对肝细胞中脂类代谢和脂类链接起重要作用，其活性的改变与肝纤维化、脂肪肝、肝硬化以及肝癌的发生发展过程密切相关[40]。肝型脂肪酸结合蛋白 FABP1 主要表达于肝脏，对肝细胞中脂类代谢和脂类链接起重要作用，并且 FABP1 的活性改变与肝纤维化、脂肪肝、肝硬化以及肝癌的发生发展过程密切相关，血液中 FABP1 的浓度可预测肝损伤程度，FABP1 有望成为肝细胞损伤早期的生物标志物，当肝脏受到轻微损伤时，肝小叶中央区域的肝细胞会迅速响应，大量释放 FABP1[41-43]。

叉头转录因子（forkhead box protein O，FoxO）中研究最多的是 FoxO1 和 FoxO3，它们广泛参与了肝纤维化病变的各个阶段[36]。研究表明，FoxO1 和 FoxO3 可通过诱导 HSC 中 *p27* 基因的表达，使 HSC 的细胞周期阻滞，抑制 HSC 增殖[44-45]。此外，这两个蛋白能够抑制抗凋亡因子 IL-1β- 转换酶抑制蛋白（cellular homolog FLICE-like inhibitory protein，c-flip）的表达，激活 caspase-8 和 caspase-3，导致活化的 HSC 凋亡[45-46]。机体中血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）在正常情况下水平很低，只是维持正常的血管密度和通透性[47]。当肝纤维化发生时，局部病变组织出现缺氧，HSC 活化，引起 VEGF 水平升高，VEGF 的转录激活最终会诱导血管生成[36，48]。Jaroszewicz 等[49]提出，VEGF 血清和受体水平反映了肝功能损害的程度。

本实验明确了 EFT 成分的抗肝纤维化活性，并通过网络药理学的方法预测了福建野鸦椿果发挥抗肝纤维化作用可能的作用靶点及通路。将动物实验与网络药理学相结合，初步揭示了福建野鸦椿果治疗肝纤维化的作用机制，为其抗肝纤维化机制的阐明奠定基础，同时也为其他网络药理学工作的开展提供借鉴。

参考文献

[1] 曾志萍，郭津生 . 肝纤维化发生机制及治疗研究进展 [J]. 世界华人消化杂志，2017，25（7）：569-575.

[2] Fagone P，Mangano K，Pesce A，et al. Emerging therapeutic targets for the treatment of hepatic fibrosis [J]. Drug Discov Today，2016，21（2）：369-375.
[3] 向德标 . 福建野鸡椿籽中化学成分及其抗氧活性研究 [D]. 长沙：湖南中医药大学，2015.
[4] 葛玉珍 . 野鸦椿资源及其利用 [J]. 中国野生植物资源，2004，23（5）：24-25.
[5] 钟飞，高辉 . 野鸦椿果实水提物对急性酒精性肝损伤的保护作用 [J]. 怀化学院学报，2012，30（2）：29-31.
[6] 刘迪栋，文旭，汤勇，等 . 野鸦椿水提物对大鼠慢性肝纤维化的影响 [J]. 当代医学，2013，19（15）：39-41.
[7] 满兴战，谭洋，裴刚 . 中国野鸦椿属植物化学成分及药理活性研究进展 [J]. 天然产物研究与开发，2018，31（4）：171-178.
[8] 张明发，沈雅琴 . 齐墩果酸和熊果酸保肝药理作用的研究进展 [J]. 抗感染药学，2012，9（1）：13-19.
[9] Chai J，Du X，Chen S，et al. Oral administration of oleanolic acid，isolated from Swertia mussotii Franch，attenuates liver injury，inflammation，and cholestasis in bile duct-ligated rats [J]. Int J Clin Exp Med，2015，8（2）：1691-1702.
[10] Ma JQ，Ding J，Zhang L，et al. Protective effects of ursolic acid in an experimental model of liver fibrosis through Nrf2/ARE pathway [J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol，2015，39（2）：188-197.
[11] Yang Y，Zhao Z，Liu Y，et al. Suppression of oxidative stress and improvement of liver functions in mice by ursolic acid via LKB1-AMP-activated protein kinase signaling [J]. J Gastroen Hepatol，2015，30（3）：609-618.
[12] 陈夏虹 . 齐墩果酸抑制 HMGB1-TLR4- 中性粒细胞正反馈环减轻小鼠肝缺血再灌注损伤 [D]. 重庆：重庆医科大学，2016.
[13] 王颖，蔡永青，黄明春，等 . 山楂酸对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用及机制研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2016，21（8）：854-858.
[14] 邓莉，冯健，何成松 . 齐墩果酸抑制肿瘤坏死因子 -α 诱导的成纤维细胞样滑膜细胞炎症因子表达及其机制研究 [J]. 天然产物研究与开发，2018，30（7）：1138-1142.
[15] 张扬武，罗伟生，陈姗，等 . 枇杷叶熊果酸对大鼠肝星状细胞增殖抑制作用及对 PPAR-γ、TGF-β_1 表达的影响 [J]. 中国药理学通报，2017，33（4）：517-521.
[16] 李泮霖，苏薇薇 . 网络药理学在中药研究中的最新应用进展 [J]. 中草药，2016，47（16）：2938-2942.
[17] 刘志强，王博龙 . 中药网络药理学药效成分筛选与靶标预测的研究进展 [J]. 中成药，2019，41（1）：177-184.
[18] 杨洁，戚进，余伯阳 . 不同产地夏枯草中总三萜及总酚酸的含量测定 [J]. 海峡药学，2015，8（27）：29-31.
[19] 张彦琼，李梢 . 网络药理学与中医药现代研究的若干进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志，2015，29（6）：883-892.
[20] 盛蕾，刘元月，胡丹，等 . 柴胡疏肝散治疗卒中后抑郁的网络药理学研究 [J]. 中草药，2018，49（15）：58-64.
[21] 李跃文，王博龙 . 二至丸抗肝纤维化活性成分 - 靶点 - 通路的网络预测 [J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（11）：201-205.
[22] 鄢海燕，邹纯才 . 瓜蒌中三萜及其苷类成分的网络药理学研究 [J]. 国际药学研究杂志，2018，45（4）：288-294.
[23] 王珂欣，高丽，周玉枝，等 . 基于网络药理学的苦参碱抗肝癌作用及机制研究 [J]. 药学学报，2017，52（6）：888-896.
[24] 苏真真，张新庄，曹亮，等 . 银翘解毒软胶囊主要活性成分的网络药理学研究 [J]. 中国新药杂志，2017，26（15）：62-67.
[25] 贾皓，庞晓丛，赵赢，等 . 远志治疗阿尔茨海默病的网络药理学作用机制 [J]. 中国新药杂志，2018，27（4）：398-404.
[26] Zhao YL，Wei SZ，Ming N，et al. A network pharmacology approach to discover active compounds and action mechanisms of San-Cao Granule for treatment of liver fibrosis [J]. Drug Des Devel Ther，2016，19（10）：733-776.
[27] Fagone P，Mangano K，Pesce A，et al. Emerging therapeutic targets for the treatment of hepatic fibrosis [J]. Drug Discov Today，2015，21（2）：369-375.
[28] 袁园，吴晓东，龙安予 . 熊果酸对脓毒症模型大鼠肺损伤的保护作用及对 HMGB1/TLR4/NF-κB 通路的影响 [J]. 中医学报，2019，34（3）：555-558.
[29] 鱼康康，施光峰，李宁 . 巨噬细胞与肝纤维化 [J]. 上海医药，2019，40（5）：17-20.
[30] Heymann F，Tacke F. Immunology in the liver-from homeostasis to disease [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol，2016，13（2）：88-110.
[31] 甘达凯，朱萱 . 肝巨噬细胞的生物学特性及其与肝纤维化发生、发展关系的研究进展 [J]. 山东医药，2017，57（40）：103-105.
[32] 董育玮，陆伦根 . 巨噬细胞：肝脏纤维化形成和降解的中心调控者 [J]. 肝脏，2013，18（1）：51-96.
[33] 文皑巍，曹文富 . Toll 样受体信号通路在肝纤维化机制中的作用 [J]. 华西医学，2015，30（4）：779-782.
[34] Kanuri G，Ladurner R，Skibovskaya J，et al. Expression of toll-like receptors 1-5 but not TLR 6-10 is elevated in livers of patients with non-alcoholic fatty liver disease [J]. Liver International，2015，35（2）：562-570.
[35] Li X，Jin Q，Yao Q，et al. Quercetin attenuates the activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in mice through modulation of HMGB1-TLR2/4-NF-κB signaling pathways [J]. Toxicol Lett，2016，2（261）：1-12.
[36] 高衍义，薛敬东 . 中医药治疗肝纤维化的概述 [J]. 中医药导报，2015，21（23）：112-114.
[37] 付晓霞，王爱民 . PPARγ 对肝纤维化相关信号转导途径的影响 [J]. 临床消化病杂志，2011，23（5）：319-320.
[38] Povero D，Panera N，Eguchi A，et al. Lipid-induced hepatocyte-derived extracellular vesicles regulate hepatic stellate cell via microRNAs targeting PPAR-γ [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol，2015，1（6）：646.
[39] 马晶晶 . PPARγ 功能与疾病关系研究进展 [J]. 中国药理学通报，2012，28（5）：601-604.
[40] 王南南，徐力致，王亚平 . 肝型脂肪酸结合蛋白研究进展 [J]. 生命科学，2012，27（22）：31-36.

[41] Mukai T，Egawa M，Takeuchi T，et al. Silencing of FABP1 ameliorates hepatic steatosis，inflammation，and oxidative stress in mice with nonalcoholic fatty liver disease [J]. Febs Open Bio，2017，7（7）：1009-1016.
[42] 张英 . CBR1 和 FABP1 在联苯双酯抗大鼠肝纤维化中的作用 [D]. 石家庄：河北医科大学，2015.
[43] Wang GQ，Bonkovsky HL，Lemos AD，et al. Recent insights into the biological functions of liver fatty acid binding protein [FABP1] [J]. J Lipid Res，2015，56（12）：2238-2247.
[44] Lopez-sanchez I，Ying D，Roh YS，et al. GIV/Girdin is a central hub for profibrogenic signalling networks during liver fibrosis [J]. Nat Commun，2014，21（5）：4451.
[45] Ao L，Wang J，Wu M，et al. The inhibition of activated hepatic stellate cells proliferation by arctigenin through G_0/G_1 phase cell cycle arrest：Persistent p27 Kip1 induction by interfering with PI3K/Akt/FOXO3a signaling pathway [J]. Eur J Pharmacol，2015，15（747）：71-87.
[46] 廖丹，钱波，徐敏 . FoxO1 转录因子与肝纤维化的关系研究进展 [J]. 中国医药导报，2019，16（13）：54-57.
[47] Salum GM，Badereldin NG，Ibrahim MK，et al. Vascular endothelial growth factor expression in hepatitis c virus-induced liver fibrosis：A potential biomarker [J]. J Interferon Cytokine Res，2017，37（7）：310-316.
[48] Kwon SH，Jeong SW，Jang JY，et al. Cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in chronic hepatitis，cirrhosis and hepatocellular carcinoma [J]. Clin Mol Hepatol，2012，18（3）：287-294.
[49] Jaroszewicz J，Januszkiewicz M，Flisiak R，et al. Circulating vascular endothelial growth factor and its soluble receptors in patients with liver cirrhosis：Possible association with hepatic function impairment [J]. Cytokine，2008，44（1）：14-21.

（收稿日期：2020-12-23；修回日期：2021-03-17）

包载姜黄素的羧甲基化白及多糖 - 壳聚糖聚电解质复合膜对大鼠口腔溃疡的治疗作用研究

王玉蓉[1, 2]，巨佳[1]，王济[1]，赵慧雯[1]，林瑶[1]，黄静[1]，薛晓娟[1]，冯斌[1]，成黎霏[1*]（1. 军事口腔医学国家重点实验室，国家口腔疾病临床医学研究中心，陕西省口腔生物工程技术研究中心，第四军医大学口腔医院 药剂科，西安 710032；2. 陕西中医药大学，陕西 咸阳 712046）

摘要：目的 考察包载姜黄素（Cur）的羧甲基化白及多糖 - 壳聚糖（CMBSP-CS）聚电解质复合膜对大鼠口腔溃疡的治疗作用。**方法** 用冰醋酸化学灼烧法对大鼠进行造模；观察大鼠体质量变化以及创面愈合情况；常规 HE 染色观察各组大鼠溃疡组织病理变化，ELISA 法检测各组大鼠血清和组织中 TNF-α、IL-6、IL-1β 含量。**结果** 药膜组能够改善模型大鼠体质量下降的情况；药膜组口腔溃疡处的黏膜皮层修复最快，溃疡部位炎症细胞浸润明显减少；与模型组相比，药膜处理显著降低了口腔溃疡大鼠溃疡区和血清中 TNF-α、IL-6、IL-1β 的含量（$P < 0.05$）。**结论** 包载 Cur 的 CMBSP-CS 聚电解质复合膜可明显加快大鼠口腔溃疡的愈合，减轻炎症反应程度。

关键词：姜黄素；聚电解质复合膜；羧甲基化白及多糖；壳聚糖；口腔溃疡
中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1532-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.004

Curcumin-loaded polyelectrolyte composite membrane and its therapeutic effect on oral ulcers in rats

WANG Yu-rong[1, 2], JU Jia[1], WANG Ji[1], ZHAO Hui-wen[1], LIN Yao[1], HUANG Jing[1], XUE Xiao-juan[1], FENG Bin[1], CHENG Li-fei[1*] (1. *State Key Laboratory of Military Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Shaanxi Engineering Research Center for Dental Materials and Advanced Manufacture*, *Department of Pharmacy*, *Hospital of Stomatology*, *The Fourth Military Medical University*, *Xi'an* 710032; 2. *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046)

作者简介：王玉蓉，女，硕士研究生，主要从事中药药剂学研究，E-mail：2995296639@qq.com *通信作者：成黎霏，女，主管药师，主要从事口腔药学与口腔新制剂研究，E-mail：clf1102@163.com

Abstract: Objective To determine the effect of curcumin-loaded carboxymethyl *Bletilla striata* polysaccharide-chitosan (CMBSP-CS) drug-loaded polyelectrolyte composite membranes on the healing of oral ulcer in rats. **Methods** The weight change and wound healing were observed. HE staining method was used to observe the histopathological changes of gastric ulcer, and ELISA method was used to detect the content of TNF-α, IL-6, and IL-1β in the serum and tissues of each group of rats. **Results** The model was established successfully. The drug membrane group improved the weight loss of the model rats. In the drug membrance group, the mucosal cortex was repaired fastest, and the infiltration of inflammatory cells at the ulcer was significantly reduced. Compared with the model group, the content of TNF-α, IL-6 and IL-1β in the ulcer area and the serum of rats was significantly decreased by drug membrane treatment ($P < 0.05$). CMBSP-CS drug-loaded polyelectrolyte composite membrane coated with curcumin had a therapeutic effect on the oral ulcer in rats by significantly accelerating the healing of oral ulcer and reducing the inflammation. **Conclusion** CMBSP-CS drug-loaded polyelectrolyte composite membrane containing currumin can significantly accelerate the healing of rat oral ulcers and reduce inflammation.

Key words: curcumin; polyelectrolyte composite membrane; carboxymethyl *Bletilla striata* polysaccharide; chitosan; oral ulcer

口腔溃疡属于中医中口疡、口疮的范畴[1]，是一种常发生于口腔黏膜的溃疡性损伤病症，通常具有自发性和复发性[2]。口腔溃疡会导致疼痛，严重影响患者饮食和说话，降低患者的生活质量[3-4]。

姜黄素（curcumin，Cur）是从姜科植物姜黄的干燥根茎中提取的主要有效成分。研究发现其具有抗炎、抗病毒、抗感染等药理活性，且不良反应少[5]。近几年有研究表明 Cur 对口腔疾病牙周炎[6]和口腔溃疡[7]等有显著效果。但因其几乎不溶于水，生物利用度低，限制了其临床应用。

本课题组前期采用生物可降解性的白及多糖（*Bletilla striata* polysaccharide，BSP）和壳聚糖（chitosan，CS）为原材料，通过醚化法[8]对 BSP 进行羧甲基化改性，改性后的 BSP 与带正电的 CS 通过静电作用[9]形成聚电解质复合物，制备了用于治疗口腔溃疡的载有 Cur 的羧甲基化白及多糖 - 壳聚糖（CMBSP-CS）聚电解质复合膜。

本研究采用冰醋酸灼伤化学方法[10]建立大鼠口腔溃疡模型，通过 HE 染色法考察前期制备的包载 Cur 的 CMBSP-CS 载药聚电解质复合膜[11]对大鼠口腔溃疡愈合的影响，通过 ELISA 法检测各组大鼠血清和组织中 TNF-α、IL-6、IL-1β 含量的变化，以期明确 CMBSP-CS 对大鼠口腔溃疡的治疗作用及其可能的作用机制，为该制剂的应用研发提供依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 72 只，体质量（200±20）g [第四军医大学实验动物中心，动物合格证号：SCXK（军）2012-0007]。

1.2 试药

包载 Cur 的 CMBSP-CS 载药聚电解质复合膜 [实验室自制，平均厚度为（74.0±2.0）μm，载药量为 95.41%，体外累积释放度可达 93.78%]，空白膜（实验室自制）；大鼠 TNF-α ELISA 试剂盒（F18960）、IL-6 ELISA 试剂盒（F1887）、IL-1β ELISA 试剂盒（F1917）、BCA 试剂盒（W1117）（上海西唐生物科技有限公司）；山羊封闭血清（中杉金桥）；Triton（Sigma 公司）；NP-40 裂解液、P0413F（上海碧云天）；醋酸（批号：190522，富宇精细化工）；生理盐水（批号：190506，山东科伦）；水为纯化水（实验室自制）；水合氯醛、多聚甲醛（国药集团化学试剂有限公司）。

1.3 仪器

DW-86L386 － 80 ℃超低温冰箱（海尔）；Leica RM2125RTS 石蜡切片机（德国徕卡）；AX-84 光学显微镜（日本 Olympus）；DENLEY DRAGON Wellscan MK3 酶标仪、Wellwash 4 MK2 洗板机（芬兰 Thermo）；PYX-DHS，400^2×500 数字显示隔水式电热恒温培养箱（上海跃进医疗器械厂）；TGL-168、11-07 离心机（上海安亭科学仪器厂）；20 ～ 200 μL 移液枪（Thermo labsystems）；XW-80A 漩涡混合器（上海青浦沪西仪器厂）；DHG-9023A 电热恒温鼓风干燥箱（上海精宏实验设备有限公司）；0.1 ～ 50 mL 连续分液器

（TOMOS LIFE SCIENCE Group）；高通量组织研磨器（宁波新芝）。

2 方法

2.1 动物模型的建立

将 72 只雄性大鼠放在昼夜交替、温湿度分别为（24±2）℃和 40% ～ 60% 的房间适应性饲养 1 周后称重，随机分成正常组、模型组、空白膜组和药膜组，每组 18 只。模型组、空白膜组和药膜组用 10% 水合氯醛溶液按照 0.3 mL/100 g 腹腔注射给药用于麻醉，将直径为 5 mm 的脱脂棉球塞入内径为 0.5 cm 的移液枪枪头中，用 50 μL 50% 醋酸溶液浸润后垂直紧贴于大鼠下唇口腔黏膜表面处，持续按压 60 s 后移除棉球并用 5 mL 生理盐水连续冲洗，以此建立大鼠口腔溃疡模型。正常组则使用生理盐水代替，其余操作不变。造模 24 h 后，观察大鼠造模区局部黏膜的情况，如果形成约为 0.5 cm 的溃疡，且周围有充血、红肿和假膜则表明溃疡成功形成 [12-13]。

2.2 给药方法

大鼠在给药前，采用 10% 的水合氯醛腹腔麻醉，将空白复合膜与 CMBSP-CS 载药聚电解质复合膜裁剪为 0.5 cm^2 大小备用，给药时贴于大鼠口腔溃疡患处，轻压 20 s 以保证膜剂与患处贴合紧密。造模成功当日开始给药，每日给药一次，连续给药 7 d。正常组与模型组麻醉后不做处理。用药后 2 h 内禁食禁水，其余时间自由进食进水 [12]。

2.3 大体观察

造模成功后观察动物外观、精神及一般状况的变化，肉眼观察各组溃疡愈合程度，每日测量并记录大鼠体质量的变化。

2.4 大鼠溃疡局部组织和血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量测定

各组于造模成功后第 3 日和第 7 日各随机选取 6 只动物眼眶取血后处死。待血液凝固后，4000 r • min^{-1} 离心 5 min，分离血清，分装保存于－ 80 ℃备用。药膜组、空白膜组和模型组切取溃疡组织黏膜，正常组切取正常黏膜，用预冷的生理盐水冲洗组织以去除残留血液，将黏膜剪碎后置于 EP 管中称重后加入 NP-40 裂解液，用细胞超微粉碎机对黏膜进行充分粉碎。将粉碎得到的组织匀浆置于高速离心机中 4 ℃、5000 r • min^{-1} 离心 20 min 后用移液器移取上清液后分装保存于－ 80 ℃冰箱中备用，按 ELISA 试剂盒说明书操作进行上清液中 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量的测定。

2.5 溃疡组织病理学观察

各组于造模成功后第 3 日与第 7 日各随机选取 3 只大鼠处死取得黏膜标本后，将黏膜标本用生理盐水冲洗干净后立即放入 4% 多聚甲醛溶液进行固定，用石蜡对组织进行包埋后，连续 4 μm 切片，HE 染色，然后在光学显微镜下观察分析。

2.6 统计分析

应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两两比较采用 LSD-t 检验，$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。Sigma Plot 12.5 软件作出图像分析。

3 结果

3.1 CMBSP-CS 载药聚电解质复合膜对口腔溃疡愈合的作用

3.1.1 大体观察 对大鼠精神状况、毛发和运动的观察采用盲法进行，观察结果显示，正常组大鼠反应灵敏，背毛光泽，二便和活动正常；模型组大鼠反应迟钝，口唇边潮湿，流口水，毛发粗糙分叉，大便偏稀；给药组反应灵敏，背毛光泽，活动正常。

3.1.2 体质量变化 造模第 3 日，与正常组比较，模型组、药膜组与空白膜组大鼠体质量变化显著降低（$P < 0.05$）；与模型组相比，药膜组体质量变化显著升高（$P < 0.05$）。说明醋酸处理使大鼠产生疼痛与不适导致了大鼠体质量下降，给予一次药膜能够减少大鼠的体质量下降。

第 4 日，与模型组相比，药膜组大鼠体质量变化显著升高（$P < 0.05$），与正常组相比差异无统计学意义。结果提示，给予两次药膜处理能够使大鼠体质量变化恢复到正常水平。第 5 日，与模型组相比，空白膜组大鼠体质量变化有显著上升趋势，与正常组相比差异无统计学意义（$P < 0.05$）。

第 6 ～ 8 日，各组大鼠体质量间差异均无统计学意义，提示实验开始 6 d 后口腔溃疡对大鼠体质量的影响消失（见图 1）。

3.1.3 创面愈合情况 成功建模后第 3、5、7 日分别观察各组大鼠口腔溃疡情况（观察前用纯净水冲洗各组溃疡处，去除药膜等残留物以便观察）。结果显示，正常大鼠各时间点口腔黏膜表面光滑，无水肿，无充血现象（见图 2A ～ C）；建模后第 3 日，模型组、空白膜组和药膜组造模区黏膜水肿，形成黄白色假膜（见图 2D、G、J）。建模后第 5 日，空白膜组黄白色假膜变薄（见图 2H）；药膜组黄白色假膜已经完全脱落，肿胀程度减轻，组织周围充血减轻（见图 2K）；建模后第 7 日，模型组黄白色假膜未完全脱落（见图 2F）；空白膜组黄白色假膜完全脱落（见图 2I）；药膜组有明显

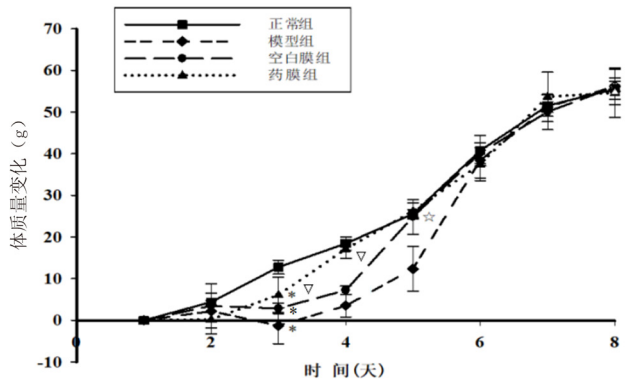


图 1　各组大鼠体质量变化（$\bar{x}\pm s$，$n=18$）

Fig 1　Changes in body mass of rats in each group（$\bar{x}\pm s$，$n=18$）

注：与正常组比较，$^{*}P<0.05$；与药膜组比较，$^{☆}P<0.05$；与模型组比较，$^{▽}P<0.05$。

Note：Compared with the normal group，$^{*}P<0.05$；compared with the drug film group，$^{☆}P<0.05$；compared with the model group，$^{▽}P<0.05$.

的愈合现象，肿胀现象基本消失，周围组织充血消失（见图 2L）。结果表明，药膜组口腔溃疡愈合速度最快，说明载药复合膜治疗能够明显加速口腔溃疡的愈合；其次为空白膜组，说明膜材中的 CMBSP-CS 对口腔溃疡的愈合有一定的促进作用；最后为模型组，验证了口腔溃疡具有自愈性。



图 2　不同处理组大鼠口腔溃疡发展过程

Fig 2　Development of oral ulcers in rats in different treatment groups

3.2　组织病理学观察

由图 3 可知，正常组大鼠口腔黏膜上皮完整连续，无血管充血和炎性细胞浸润等病理改变（见图 3A、B）。造模成功后第 3 日，除正常组外，其余各组大鼠黏膜皮层、棘层、基底层均破坏消失，固有层直接暴露，细胞出现空泡变性，溃疡部位有大量的炎性细胞浸润，同时有少量的红细胞外渗（见图 3C、E、G）；第 7 日，模型组基底细胞层开始呈现修复反应，但炎性细胞浸润依旧明显（见图 3D）；空白膜组有新的肉芽组织产生，但仍有明显的炎性细胞浸润（见图 3F）；药膜组溃疡部位棘层、基底层逐渐修复，炎症细胞浸润明显减少，黏膜组织结构趋于完整（见图 3H）。结果表明，药膜组口腔溃疡愈合速度最快，其次为空白膜组，说明载药复合膜治疗能够明显加速口腔溃疡的愈合，膜材中的 CMBSP-CS 对口腔溃疡的愈合也有一定的促进作用。

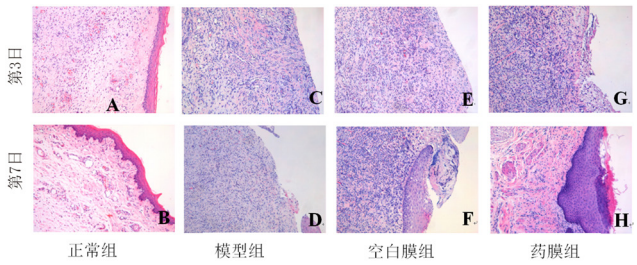


图 3　口腔黏膜 HE 染色图片（100×，$n=3$）

Fig 3　HE staining picture of oral mucosa（100×，$n=3$）

3.3　大鼠口腔溃疡组织和血清中炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 的检测

由图 4 可知，造模成功后第 3 日，与正常组相比，模型组、空白膜组、药膜组口腔溃疡组织和血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 的含量显著增加（$P<0.05$）造模成功后第 7 日，与正常组相比，模型组、空白膜组、药膜组口腔溃疡组织和血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 的含量仍显著增加（$P<0.05$），但与第 3 日比较含量有所下降；与模型组相比，药膜组与空白膜组口腔溃疡组织和血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 的含量显著下降（$P<0.05$），其中药膜组效果显著优于空白膜组（$P<0.05$）。结果显示，给予 6 次药膜处理对大鼠溃疡组织和血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量减少的影响最为显著，其次为空白膜组，最后是模型组，结果也表明口腔溃疡具有自愈性。

4　讨论

本研究以醋酸化学灼伤建立的创伤性口腔溃疡大鼠模型为实验对象，通过大体观察、创面愈合情况及组织病理学观察评价 CMBSP-CS 载药聚电解质复合膜与空白膜对口腔溃疡的治疗作用，研究结果显示 CMBSP-CS 载药复合膜及空白膜对口腔溃疡均有一定的治疗作用，载药复合膜的效果最为明显，说明空白膜可以协同 Cur 一同起到治疗口腔溃疡的作用，载药复合膜是一个药辅合一的制剂，具有很高的临床应用价值。研究中观察到 CMBSP-CS 载药聚电解质复合膜能够减少口腔溃疡大鼠的体质量下降，推测载药复合膜可能产生了一定的镇痛效果，Cur 是中药姜黄中的有效成分之一，《中国药典》中记载："姜黄可用于胸胁刺痛，闭经，徵瘕，风湿肩臂疼痛，跌扑肿

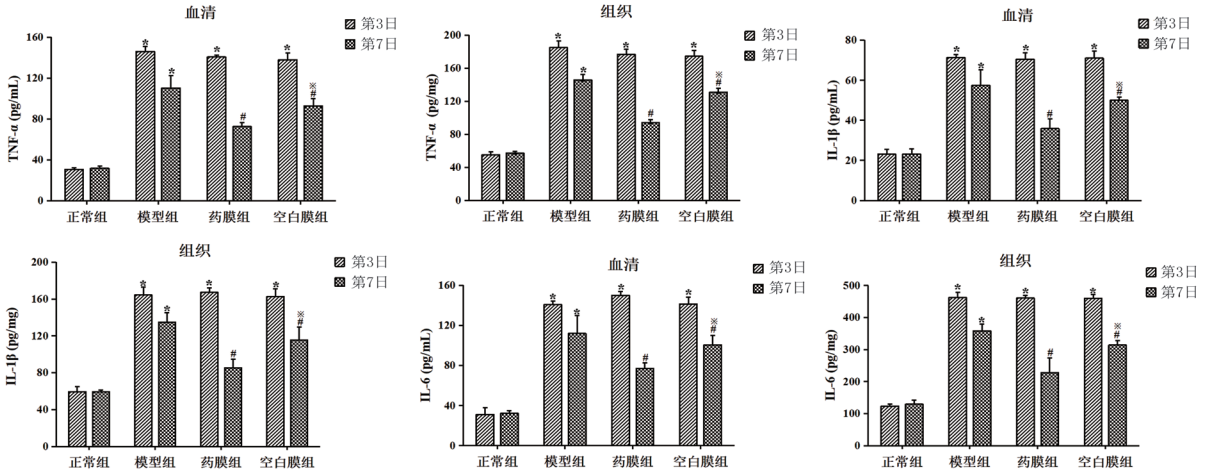


图 4 大鼠口腔溃疡组织和血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 的含量（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Fig 4 Content of TNF-α、IL-1β、IL-6 in rat oral ulcer tissue and serum（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

注：与正常组相比，$^{*}P<0.05$；与模型组相比，$^{\#}P<0.05$；与药膜组相比，$^{※}P<0.05$。

Note：Compared with the normal group，$^{*}P<0.05$；compared with the model group，$^{\#}P<0.05$；compared with the drug film group，$^{※}P<0.05$.

痛”。说明可能与 Cur 的镇痛作用有关；多次给予空白复合膜能够使大鼠体质量变化恢复到正常水平，这可能与膜材中 CMBSP-CS 的抗炎、抗菌作用及 CS 提高免疫力等作用有关。

本研究还通过大鼠口腔溃疡组织和血清中炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-1β 的检测对 CMBSP-CS 载药聚电解质复合膜的口腔溃疡治疗作用机制进行了初步探索，结果表明 CMBSP-CS 载药聚电解质复合膜可明显降低口腔溃疡组织中炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平[14-18]，从而减少炎症的发生，但是其分子免疫机制和对口腔溃疡中其他因子的影响尚不清楚。下一步课题组将围绕其是否具有镇痛作用及具体的作用机制继续进行研究。

参考文献

[1] 时小红，文乾钧，彭茜茜，等 . 复发性口腔溃疡的发病特征及其微生态干预疗效 [J]. 解放军医学杂志，2018，43（9）：92-96.

[2] 徐勤业，何克新 . 复发性口腔溃疡免疫学因素的研究进展 [J]. 广西医学，2007，29（2）：224-225.

[3] Cui RZ，Bruce AJ，Rogers RS. Recurrent aphthous stomatitis [J]. Clin Dermatol，2016，34（4）：475-481.

[4] 李源媛，王新文 . 复发性口腔溃疡的治疗研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2011，17（11）：280-283.

[5] 苗淑涵，高晋生 . 姜黄素药理作用的研究进展 [J]. 光明中医，2017，32（15）：2284-2287.

[6] 肖长杰 . 姜黄素对大鼠实验性牙周炎的作用及相关机制研究 [D]. 济南：山东大学，2018.

[7] Deshmukh RA，Bagewadi AS. Comparison of effectiveness of curcumin with triamcinolone acetonide in the gel form in treatment of minor recurrent aphthous stomatitis：A randomized clinical trial [J]. Int J Pharm Investig，2014，4（3）：138-141.

[8] Silva DA，Paula RCM，Feitosa JPA，et al. Carboxymethylation of cashew-tree exudates polysaccharide（Article）[J]. Carbohyd Polym，2004，58（2）：163-171.

[9] Gierszewska M，Ostrowska-Czubenko J，Chrzanowska E. pH-responsive chitosan/alginate polyelectrolyte complex membranes reinforced by tripolyphosphate [J]. Eur Pol Ym J，2018，101：282-290.

[10] 赵锐帆 . 盐酸米诺环素对大鼠口腔溃疡治疗作用的研究及单向释放膜的制备 [D]. 西安：陕西中医药大学，2017.

[11] 王玉蓉，冯斌，巨佳，等 . 羧甲基化白及多糖 - 壳聚糖载姜黄素聚电解质复合膜的制备及其表征 [J]. 中草药，2020，51（4）：978-985.

[12] 崔银峰，方贤浩 . 活性芦荟缓释药膜对大鼠创伤性口腔溃疡模型的治疗作用 [J]. 延边大学医学学报，2012，35（3）：167-169.

[13] 林晶 . 活性芦荟缓释药膜对复发性口疮动物模型的研究 [D]. 延吉：延边大学，2013.

[14] 李晓荣，张晓丽，李映红，等 . 丹栀逍遥散对复发性口腔溃疡模型相关细胞因子的影响 [J]. 深圳中西医结合杂志，2010，20（4）：201-203.

[15] 邹玉红，杨静，陈春华 . 复发性口腔溃疡患者血清中 TNF-α、IL-2，6 与免疫功能的相关性 [J]. 海南医学院学报，2015，21（9）：1299-1301.

[16] Ficarra G，Baroni G，Massi D. Pyostomatitis vegetans：Cellular immune profile and expression of IL-6，IL-8 and TNF-alpha [J]. Head Neck Pathol，2010，4（1）：1-9.

[17] Eguia-Del Valle，Martinez-Conde-Llamosas R，Lopez-Vicente J，et al. Salivary levels of tumournecrosis factor-alpha in patients with recurrent aphthous stomatitis [J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal，2011，16（1）：33-36.

[18] 姬延平，苏军，陈学军 . 慢性牙周炎治疗前后龈沟液及血清中 IL-1β、IL-6 的表达水平 [J]. 中国社区医师，2014，30（9）：93-94.

（收稿日期：2020-10-31；修回日期：2021-04-08）

基于 UHPLC-Q-exactive obitriap MS 的延胡索醋制前后化学成分分析

李振雨[1, 2]，丁青[1, 2]，吕渭升[1, 2]，官永河[1, 2]，魏梅[1, 2]，孙冬梅[1, 2]，霍文杰[1]，邓韬[1]，秦升[3]（1. 广东一方制药有限公司，广东 佛山 528244；2. 广东省中药配方颗粒企业重点实验室，广东 佛山 528244；3. 中国中药控股有限公司，广东 佛山 528303）

摘要：目的 采用超高效液相色谱 - 四级杆 - 静电轨道阱高分辨质谱（UHPLC-Q-exactive obitriap MS）对延胡索醋制前后的差异成分进行鉴别和分析。**方法** 采用 Hypersil GOLD C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.9 μm）色谱柱，以乙腈为流动相 A，0.2% 氨水 -5 mmol • L^{-1} 甲酸铵溶液为流动相 B，梯度洗脱；柱温 40 ℃；流速 0.4 mL • min^{-1}；进样量 2 μL；高分辨质谱采用电喷雾电离源，正、负离子模式扫描，扫描范围为 50 ～ 750 Da，二级质谱碰撞能量分别为 20、40 和 60 EV。采用 Compound Discoverer 2.1 软件对化学成分进行鉴别，并应用多维统计学分析延胡索醋制前后化学成分含量的变化。**结果** 延胡索醋制前后共有 65 个化学成分发生明显变化，共鉴定出其中 53 个化合物，除 *L*-（＋）- 精氨酸、*D-L*- 色氨酸、*N-α*- 乙酰 -*L*- 精氨酸和 sanjoinenine 外，其余均为生物碱；延胡索醋制后 17 个化合物含量显著降低（$P < 0.05$），48 个化合物含量显著升高（$P < 0.05$）。**结论** 延胡索醋制后一些化学成分的含量和比例产生明显的变化，从而增强延胡索在某些方面的临床疗效。

关键词：延胡索；醋制；超高效液相色谱 - 四级杆 - 静电轨道阱高分辨质谱；化学成分
中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1537-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.005

Chemical constituents in Corydalis Rhizoma before and after vinegar processing based on UHPLC-Q-exactive obitriap MS

LI Zhen-yu[1, 2], DING Qing[1, 2], LYU Wei-sheng[1, 2], GUAN Yong-he[1, 2], WEI Mei[1, 2], SUN Dong-mei[1, 2], HUO Wen-jie[1], DENG Tao[1], QIN Sheng[3] (1. *Guangdong E-fong Pharmaceutical Co. Ltd*, *Foshan Guangdong* 528244; 2. *Guangdong Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula*, *Foshan Guangdong* 528244; 3. *China Traditional Chinese Medicine Holdings Co. Limited*, *Foshan Guangdong* 528303)

Abstract: Objective To identify and analyze different components in Corydalis Rhizoma before and after vinegar preparation by ultra high performance liquid chromatography (UHPLC)-Q-exactive obitriap MS. **Methods** UHPLC was performed on Hypersil GOLD C_{18} (2.1 mm×100 mm, 1.9 μm) column with acetonitrile as the mobile phase A and 0.2% ammonia water-5 mmol • L^{-1} ammonium formate solution as the mobile phase B with gradient elution. The column temperature was 40 ℃, the flow rate was 0.4 mL • min^{-1}, and the injection volume was 2 μL. The high resolution mass spectrometry adopted electrospray ionization source, with positive and negative ion mode scanning at 50 ～ 750 Da. The collision energies of the secondary mass spectra were 20, 40 and 60 EV, respectively. Compound discoverer 2.1 software was used to identify the chemical components, and multi-dimensional statistical analysis was used to analyze the change in chemical components Corydalis Rhizoma before and after vinegar processing. **Results** Totally 65 chemical components in Corydalis Rhizoma changed significantly before and after vinegar processing and 53 compounds were

基金项目：广东省省级科技计划项目（No.2018B030323004）；广东特支计划”科技创业领军人才项目（No.2017TY04R197）。
作者简介：李振雨，男，硕士研究生，主管中药师，主要从事中药饮片及中药配方颗粒研究，E-mail：1083656123@qq.com

identified. Except *L*- (＋)-arginine, *D*-*L*-tryptophan, *N*-*α*-acetyl-*L*-arginine and sanjoinenine, the rest were alkaloids. The content of 17 compounds decreased significantly ($P < 0.05$), while that of 48 compounds increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** The content and proportion of some chemical components in Corydalis Rhizoma change significantly after processing with vinegar.

Key words: Corydalis Rhizoma; vinegar processing; UHPLC-Q-exactive obitriap MS; chemical component

延胡索为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎，具有活血、行气、止痛的作用[1]，临床常以醋制品组方入药[2]。现代药理学研究表明，延胡索醋制后具有增强镇痛、解痉、抗炎及活血化瘀的功效[3-5]。延胡索主要有效成分为生物碱类，有研究认为，酸入肝经，延胡索醋制原理是利用醋酸与生物碱相结合成盐，促进生物碱的溶出，从而增强镇痛效果[6-8]。也有研究显示，醋制增效可能与延胡索醋制后有效成分的生物利用度增加有关[9]。另有研究报道，延胡索醋制后，饮片本身所含生物碱类成分含量的增加是醋制增效的原因之一[10-11]。目前对延胡索醋制前后化学成分变化的研究与分析主要集中在对生物碱含量的变化上，如陈昆南等[12]采用超高效液相色谱 - 串联四极杆飞行时间质谱（ACQUITY UPLCTM I-Class Xevo G2-XS Q-TOF MS） 法快速鉴定醋法炮制前后延胡索化学成分的差异，结果共发现 28 个延胡索生物碱成分，除黄连碱、隐品碱醋制后含量降低以外，其余生物碱类成分均有所升高，尤其是延胡索甲素、四氢黄连碱、小檗碱、二氢血根碱、去氢海罂粟碱等。中药药效的发挥是多成分多靶点综合作用的结果，对于延胡索醋制前后化学成分变化的研究并不全面，也阻碍了延胡索醋制药理作用的进一步研究。

随着科技的发展，液质联用技术已成为研究中药复杂体系的重要手段之一，尤其在代谢组学的研究中发挥重要作用[13]。Q-exactive obitriap MS（四级杆 - 静电轨道阱质谱）具有高分辨率、高灵敏度、高质量精度的特点，通过对离子的检测，实现对复杂中药成分快速、全面的筛查和检测[14]。加上 Compound Discoverer 软件的多种数据处理功能和模块化设计，能够将仪器的定性和定量分析能力有机统一，结合软件自带多元统计学分析，使分析结果更可靠[15]。本次研究，采用超高效液相色谱 - 质谱（UHPLC-Q-exactive obitriap MS）对延胡索醋制前后的成分差异进行鉴别和分析，为进一步阐述延胡索的醋制理论提供有益参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Thermo Dionex Ultimate 3000 超高效液相色谱仪、Thermo Scientific Q-exactive obitriap MS、Compound Discoverer 2.1 质谱分析软件（美国赛默飞公司）；万分之一分析天平（ME204E）、百万分之一分析天平（XP26）（梅特勒 - 托利多公司）；数控超声波清洗器（KQ500D，昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 试药

乙腈、甲酸铵（含量≥ 99.0%）、氨水（色谱级）（默克股份有限公司），水为超纯水（实验室自制）。延胡索药材（批号：G1905058，采自陕西省汉中市城固县三合镇，经广东一方制药有限公司魏梅主任中药师鉴定为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang 的干燥块茎）。延胡索饮片：取延胡索药材，拣去杂质，大小分档，切成 2 ～ 4 mm 厚片。醋延胡索饮片：取延胡索饮片，用相当于饮片量 20% 的米醋拌匀，闷透，置炒制容器内，炒干，取出，放凉，切成 2 ～ 4 mm 厚片。药材与饮片经广东一方制药有限公司质量中心检定合格，符合《中国药典》2020 年版一部各项规定。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

取延胡索和醋延胡索饮片粉末（过三号筛）约 0.6 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入稀乙醇 25 mL，称定重量，超声处理（功率 200 W，频率 40 kHz）30 min，放冷，再称定重量，用稀乙醇补足减失重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.2 分析条件

2.2.1 色谱条件 采用 Hypersil GOLD C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.9 μm）色谱柱，以乙腈为流动相 A，0.2% 氨水 -5 mmol • L^{-1} 甲酸铵溶液为流动相 B，梯度洗脱（0 ～ 2 min，5% ～ 10%A；2 ～ 20 min，10% ～ 25%A；20 ～ 26 min，

25% ～ 98%A；26 ～ 28 min，98%A）；柱温为 40 ℃；流速为 0.4 mL • min^{-1}；进样量为 2 μL。

2.2.2 质谱条件　采用电喷雾离子源（HESI），喷雾电压为 3.5 kV/3.2 kV（＋ / －），干燥器温度为 350 ℃，毛细管温度为 320 ℃；鞘气流速为 50 arb；辅助气流速为 15 arb；正、负离子模式下分别扫描采集，扫描质量范围为 50 ～ 750 *m/z*；一级扫描分辨率 70 000 FWHM，二级扫描分辨率 17 500 FWHM；二级碰撞能量分别为 20、40 和 60 eV；S-lens 电压 50 V。

2.3 数据处理分析

取“2.1”项下供试品溶液进行分析，采集所有样品的色谱图和多级质谱图，采用 Compound Discoverer 2.1 质谱分析软件对提取色谱峰的一级和二级质谱进行解析，确定目标成分的精确分子量，质量数偏差及加合物离子信息，对 dd-MS^2 二级质谱模式下的碰撞能量分别设置为 20、40 和 60 eV 获取相应成分的二级质谱图，通过与 mzCloud 标准数据库不同碰撞能量下的二级质谱数据库进行比对，根据数据库的搜索和打分情况，对未知成分进行鉴别和确证；采用多元统计学对醋制前后的离子数据进行主成分分析（PCA）和正交偏最小二乘法 - 判别分析（OPLS-DA），绘制化学成分含量差异火山图，以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义，分析醋制前后延胡索化学成分的变化。

3 结果

3.1 UHPLC-Q-exactive obitriap MS 鉴别分析

分别采集正、负离子扫描模式下的总离子流图（TIC 图）见图 1，结果显示，负离子扫描模式下色谱峰出峰数目少，正离子扫描模式下色谱峰数目不仅多，且分离效果良好，查阅相关文献和经 mzCloud 数据库自动匹配分析，共分离鉴定出 53 个化合物，分别为生物碱、环肽和氨基酸类成分，见表 1。

目前已从延胡索中分离的生物碱不少于 70 种，依基本母核的不同分为原小檗碱类、阿朴啡类、原阿片类、异喹啉类及其他类型生物碱[16-18]。本研究从延胡中鉴定出 15 个原小檗碱类生物碱，如延胡索乙素，保留时间为 17.937 min，正离子扫描模式下的准分子离子峰为 *m/z* 356.1855 [M ＋ H]$^+$，二级质谱可见 *m/z* 192.1019、205.1089 和 150.0676 的特征离子；药根碱保留时间为 14.453 min，正离子扫描模式下的准分子离子峰为 *m/z* 338.1384 [M ＋ H]$^+$，二级质谱可见 *m/z* 323.1150、294.1122 和 279.0888 的特征离子；巴马汀保留时间为 18.259 min，正离子扫描模式下的准分子离子峰为 *m/z* 352.1541 [M ＋ H]$^+$，二级质谱可见 *m/z* 336.1228 和 308.1279 的特征离子。原阿片碱保留时间为 12.328 min，正离子扫描模式下的准分子离子峰为 *m/z* 354.1333 [M ＋ H]$^+$，二级质谱可见 *m/z* 336.1227、75.0700、189.0784 和 149.0598 的特征离子。从延胡索中提取并鉴定出 13 个阿朴啡类生物碱，如海罂粟碱，保留时间为 15.551 min，正离子扫描模式下的准分子离子峰为 *m/z* 356.2357 [M ＋ H]$^+$、二级质谱可见 *m/z* 325.2145、310.1298、294.1235 和 279.1520 的特征离子。从延胡索中提取并鉴定出 7 个原阿片类生物碱，如别隐品碱，其保留时间为 14.120 min，正离子扫描模式下的准分子离子峰为 *m/z* 370.1649 [M ＋ H]$^+$，二级质谱可见 *m/z* 352.1543、290.0937 和 188.0707 的特征离子。从延胡索中提取并鉴定 2 个异喹啉类生物碱，如二氢白屈菜红碱，保留时间 25.787 min，正离子模式下的准分子离子峰为 *m/z* 350.1380 [M ＋ H]$^+$，二级质谱可见 *m/z* 334.1060、319.1180 和 290.0844 的特征离子。

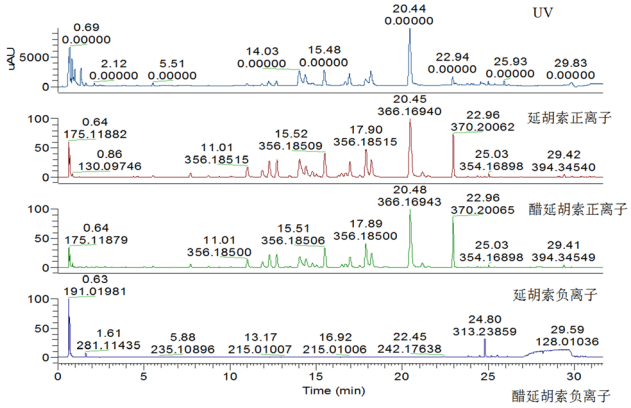


图 1　延胡索醋制前后正、负离子扫描模式下总 TIC 图

Fig 1　Total TIC of Corydalis Rhizoma before and after vinegar processed in positive and negative ion scanning mode

另外，从延胡索中鉴定出其他类型生物碱 12 个，并鉴定出 *L*-（＋）- 精氨酸、*D*-*L*- 色氨酸、*N*-*α*- 乙酰 -*L*- 精氨酸和 sanjoinenine，其中 sanjoinenine 首次在延胡索中发现，正离子扫描模式下的准分子离子峰为 *m/z* 489.2624 [M ＋ H]$^+$，二级质谱可见 *m/z* 360.2282、344.1969、131.0491 和 91.0542 的特征离子，部分代表性化合物的二级质谱图见图 2。

3.2 延胡索醋制前后离子数据主成分分析（PCA）

软件自动对延胡索和醋延胡索正、负离子数据进行主成分分析，结果见图 3，QC 样品聚合度非常好，证明整个样品采集过程中仪器状态很稳

表 1 四级杆 - 静电轨道阱高分辨质谱分析延胡索醋制前后已知成分含量变化表

Tab 1 Content of known components in Corydalis Rhizoma before and after vinegar processing by UHPLC-Q-exactive obitriap MS

序号	化合物名称	保留时间 /min	实测 *m/z*	分子式	CYHS/YHS		
					含量比	校正后 *P* 值	含量
1	taxilamine	16.368	369.1572	$C_{21}H_{23}NO_5$	0.16	＜ 0.001	降低
2	二氢白屈菜红碱	25.787	349.1309	$C_{21}H_{19}NO_4$	0.49	0.002	降低
3	sanjoinenine	24.457	489.2624	$C_{29}H_{35}N_3O_4$	0.21	＜ 0.001	降低
4	norcularidine	15.277	313.1312	$C_{18}H_{19}NO_4$	0.62	0.003	降低
5	蓝堇灵	23.132	351.1103	$C_{20}H_{17}NO_5$	0.67	0.010	降低
6	黄连碱	14.096	319.084	$C_{19}H_{13}NO_4$	0.74	0.002	降低
7	3- 乙酰吗啡	4.449	327.1466	$C_{19}H_{21}NO_4$	0.77	0.002	降低
8	异波尔定	14.837	327.1830	$C_{20}H_{25}NO_3$	0.81	0.034	降低
9	luguine	23.865	335.0789	$C_{19}H_{13}NO_5$	0.81	0.021	降低
10	四氢药根碱	13.507	341.1622	$C_{20}H_{23}NO_4$	0.84	0.015	降低
11	lirioferine 同分异构体	12.767	341.1622	$C_{20}H_{23}NO_4$	0.84	0.017	降低
12	卡文定碱	25.078	353.1618	$C_{21}H_{23}NO_4$	0.85	0.040	降低
13	紫堇碱	10.254	371.1729	$C_{21}H_{25}NO_5$	0.86	0.045	降低
14	别隐品碱	14.120	369.1570	$C_{21}H_{23}NO_5$	0.87	0.061	无明显差异
15	紫堇球碱	11.054	355.1777	$C_{21}H_{25}NO_4$	0.88	0.039	降低
16	*N*- 甲基去氢小檗碱	16.539	353.1622	$C_{21}H_{23}NO_4$	0.88	0.045	无明显差异
17	lirioferine 同分异构体	10.089	341.1623	$C_{20}H_{23}NO_4$	0.89	0.097	无明显差异
18	yuanamide	23.849	381.1572	$C_{22}H_{23}NO_5$	0.89	0.063	无明显差异
19	异紫堇球碱	11.93	355.1777	$C_{21}H_{25}NO_4$	0.89	0.060	无明显差异
20	choline	0.711	103.0996	$C_5H_{13}NO$	0.89	0.049	降低
21	ethylmorphine 同分异构体	4.637	313.1675	$C_{19}H_{23}NO_3$	0.90	0.101	无明显差异
22	ethylmorphine 同分异构体	7.749	313.1673	$C19H_{23}NO_3$	0.91	0.101	无明显差异
23	原阿片碱	12.328	353.1257	$C_{20}H_{19}NO_5$	0.92	0.138	无明显差异
24	紫堇定	7.096	207.0894	$C_{11}H_{13}NO_3$	0.94	0.222	无明显差异
25	延胡索乙素	17.937	355.1778	$C_{21}H_{25}NO_4$	0.95	0.389	降低
26	隐品碱	15.068	369.1936	$C_{22}H_{27}NO_4$	0.97	0.438	无明显差异
27	药根碱	14.453	337.1309	$C_{20}H_{19}NO_4$	0.97	0.914	无明显差异
28	13- 甲基去氢延胡索胺	17.006	351.1466	$C_{21}H_{21}NO_4$	0.97	0.331	无明显差异
29	海罂粟碱	15.551	355.1778	$C_{21}H_{25}NO_4$	0.97	0.429	无明显差异
30	蓝堇灵	13.864	351.1102	$C_{20}H_{17}NO_5$	0.97	0.615	无明显差异
31	金黄紫堇碱	8.802	327.1466	$C_{19}H_{21}NO_4$	0.98	0.582	无明显差异
32	yuanamide	14.751	381.1571	$C_{22}H_{23}NO_5$	0.99	0.831	无明显差异
33	lirioferine 同分异构体	9.437	341.1623	$C_{20}H_{23}NO_4$	1.00	0.917	无明显差异
34	巴马汀	18.259	351.1466	$C_{21}H_{21}NO_4$	1.04	0.910	无明显差异
35	秋水仙碱	23.192	399.1679	$C_{22}H_{25}NO_6$	1.04	0.609	无明显差异
36	四氢刻叶紫堇明碱	14.897	337.1309	$C_{20}H_{19}NO_4$	1.07	0.582	无明显差异
37	lirioferine 同分异构体	11.977	341.1623	$C_{20}H_{23}NO_4$	1.10	0.244	无明显差异
38	四氢小檗碱	21.220	339.1466	$C_{20}H_{21}NO_4$	1.11	0.351	无明显差异
39	延胡索甲素	23.005	369.1934	$C_{22}H_{27}NO_4$	1.14	0.402	无明显差异
40	小檗碱	18.062	335.1153	$C_{20}H_{17}NO_4$	1.15	0.134	无明显差异
41	去氢紫堇球碱	16.771	351.1466	$C_{21}H_{21}NO_4$	1.17	0.197	无明显差异
42	四氢黄连碱	23.037	323.1152	$C_{19}H_{17}NO_4$	1.20	0.061	升高
43	lirioferine 同分异构体	11.311	341.1623	$C_{20}H_{23}NO_4$	1.20	0.068	升高
44	去氢延胡索甲素	20.512	365.1622	$C_{22}H_{23}NO_4$	1.28	0.031	升高
45	*L*-（＋）- 精氨酸	0.658	174.1115	$C_6H_{14}N_4O_2$	1.37	0.275	升高
46	*N*-*α*- 乙酰 -*L*- 精氨酸	0.737	216.1219	$C_8H_{16}N_4O_3$	1.87	0.001	升高
47	羟吗啡酮	0.756	301.1269	$C_{17}H_{19}NO_4$	7.33	＜ 0.001	升高
48	荷叶牡丹碱	20.512	365.1622	$C_{22}H_{23}NO_4$	13.66	＜ 0.001	升高
49	二氢小檗碱	25.434	337.131	$C_{20}H_{19}NO_4$	14.73	＜ 0.001	升高
50	狮足草碱	19.600	327.1831	$C_{20}H_{25}NO_3$	31.83	＜ 0.001	升高
51	*D*-*L*- 色氨酸	3.703	204.0898	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	32.57	＜ 0.001	升高
52	水苏碱	3.193	143.0945	$C_7H_{13}NO_2$	14.44	＜ 0.001	升高
53	二氢血根碱	17.014	333.0997	$C_{20}H_{15}NO_4$	2.99	＜ 0.001	升高

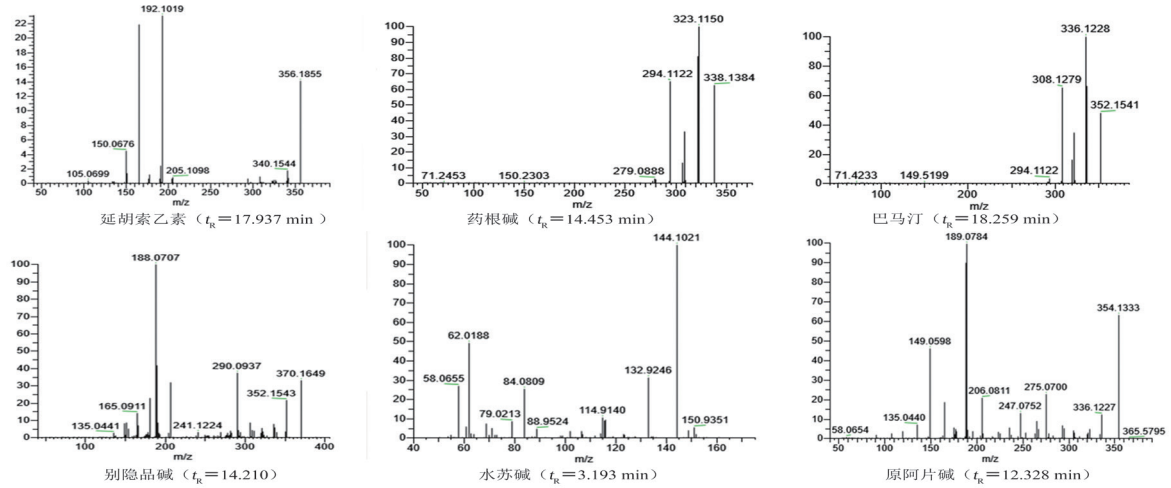


图 2　部分化合物二级质谱图

Fig 2　Secondary mass spectrometry of some compounds

定，负离子数据延胡索和醋延胡索集中在一起，说明两者负离子数据差异较小，正离子数据延胡索、醋延胡索各自聚为一类，分为两组，表明正离子数据延胡索和醋延胡索样品之间差异明显，说明延胡索醋制前后化学成分存在明显的变化。此外，主成分分析结果显示，选择正离子扫描模式进行生品和醋制品的对比研究，对延胡索醋制后的差异标志物更有意义。

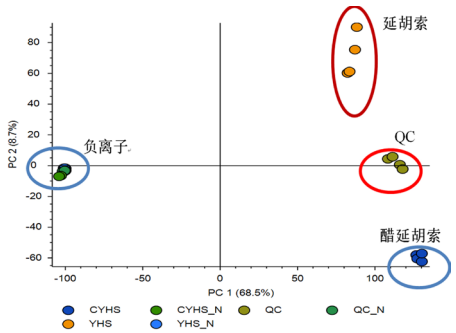


图 3　延胡索醋制前后在正、负离子 PCA 分析结果

Fig 3　PCA analysis of positive and negative ions of Corydalis Rhizoma before and after vinegar processing

3.3　延胡索醋制前后离子数据 OPLS-DA 分析

对正离子扫描模式下的延胡索、醋延胡索数据进行 OPLS-DA 分析，根据变量投影重要度（VIP）＞ 1 和 P ＜ 0.05 筛选出含量变化有显著差异的化合物，以 log2fold change 为横坐标，－ log10（P-value）为纵坐标，绘制火山图，分析对差异贡献最大的化合物，见图 4。结果显示，延胡索醋制前后共有 65 个化学成分的含量产生明显的变化（VIP ＞ 1，P-value ＜ 0.05），其中 17 个化学成分醋制后含量降低（P ＜ 0.05），48 个化学成分醋制后含量升高（P ＜ 0.05），已鉴定的 53 个化合物中，醋制后 taxilamine、二氢白屈菜红碱和 sanjoinenine 含量降低 50% ～ 80%，狮足草碱、*D*-*L*- 色氨酸、二氢小檗碱，水苏碱、羟吗啡酮和荷叶牡丹碱含量升高 7 ～ 33 倍。

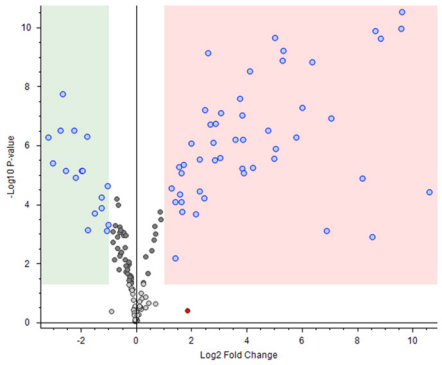


图 4　延胡索醋制前后成分差异性分析火山图

Fig 4　Volcano plot of different chemical compositions in Corydalis Rhizoma before and after vinegar processing

4　讨论

延胡索中的生物碱主要为叔胺碱和季铵碱，季铵碱易溶于水、碱水、乙醇和甲醇，而叔胺碱难溶于水，易溶于乙醇、甲醇，因此，在供试品溶液制备过程中，以“峰面积 / 称样量”为指标，分别考察了水、稀乙醇、70% 乙醇、甲醇、浓氨试液 - 甲醇（1∶20）对延胡索、醋延胡索中化学成分的提取效果，结果显示，以稀乙醇为溶剂，对主要色谱峰的提取效果最佳。分别考察了超声和回流两种提取方式，结果显示，两种提取方法对主要色谱峰的提取效果并无明显差异，因此，选择超声提取。另外，考察了不同的超声时间，分别为 15、30、45 和 60 min，结果显示，超声提取 30 min 后，随着超声时间延长，主要色谱峰的含量并无明显差异，因此，将超声时间定为 30 min。由于质谱只允许使用挥发性的酸、碱及

缓冲盐，因此，流动相的选择考察了乙腈 -1% 醋酸（氨水调 pH 至 6.0），乙腈 -0.1% 醋酸（三乙胺调 pH 至 6.0）和乙腈 -0.2% 氨水（5 mmol • L^{-1} 甲酸铵），结果显示，以乙腈 -0.2% 氨水（5 mmol • L^{-1} 甲酸铵）为流动相，色谱峰的整体分离效果最好。延胡索主要有效成分为生物碱类，含氮化合物更容易黏附或加合氢正离子，在正离子扫描模式下容易检出分子离子峰。而负离子源适合酸性化合物，由于酸性化合物更容易轰击掉氢正离子，如酸、酚类化合物，因此，在负离子扫描模式下延胡索和醋延胡索总离子流图色谱峰出峰数目少。

采用 Compound Discoverer 软件中的数据库以及 mzCloud 在线二级数据库，从延胡索中分离鉴定出 53 个化合物，主要为生物碱，另有氨基酸和多肽类，其中 sanjoinenine 系首次从延胡索中分离鉴定，被称为酸枣仁环肽，是酸枣仁的有效成分之一。质谱定量结果显示，延胡索醋制后一些化学成分的含量产生明显的变化，部分生物碱类成分含量降低明显，少数生物碱类成分含量有所增加，尚有部分生物碱的含量无明显变化，这与陈昆南等 [12] 的研究存在一定的差异，由于醋制有个受热过程，而延胡索含有多种结构母核相似的生物碱，推测延胡索在醋制过程中不同类型的生物碱存在一定的转化，从而增强延胡索在某些方面的临床疗效。另外，延胡索醋制后一些氨基酸含量明显增加，推测可能由于醋制过程提供的酸性环境，加速多肽的水解转化，从而使一些氨基酸的含量增加。另外，尚有一些含量增加非常明显的未知成分，可能是在醋制过程中产生，具体结构和药理作用尚未明确，有待于进一步研究和挖掘。

本研究采用 UHPLC-Q-exactive obitriap MS 法对延胡索醋制前后的成分变化进行较全面的表征，为进一步阐述延胡索的醋制理论提供有益参考。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：145-146.

[2] 冯向东，王戈，刘直臻，等 . 高效液相色谱法同时测定元胡止痛片中 6 种活性成分的含量 [J]. 中南药学，2019，17（2）：243-246.

[3] 李荣，蔡青青，牛彦兵，等 . 生、熟延胡索饮片药理作用的对比研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20（19）：133-137.

[4] 季光琼 . 醋制延胡索对其入肝经作用的影响研究 [D]. 武汉：湖北中医药大学，2014.

[5] 陈琪瑶，张金莲，刘艳菊，等 . 延胡索醋制前后对血瘀模型大鼠血液流变学的影响 [J]. 中国医院药学杂志，2016，36（11）：901-905.

[6] 邹节明，王力生，云强 . 延胡索生物碱溶出规律的研究 [J]. 中草药，2002，33（5）：35-36.

[7] 李小芳，罗庆洪，任文 . 延胡索炮制前后生物碱含量测定及镇痛作用的对比研究 [J]. 湖南中医药导报，2001，7（5）：253-255.

[8] 王海秀，杨惠敏 . 延胡索醋制原理解析 [J]. 中国药物与临床，2007，7（3）：167.

[9] 顾雪竹，游修琪，李先端，等 . 醋制增效理论试验研究Ⅱ——延胡索生品醋制品中延胡索乙素在大鼠血浆及脏器中分布的比较研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2010，16（10）：36-38.

[10] 陈东东，毛坤军，李祥，等 . HPLC 法比较延胡索炮制前后 7 个生物碱成分的含量 [J]. 药物分析杂志，2015，35（9）：1591-1595.

[11] 孙萍萍，郭正红，杨武德，等 . 生 / 醋延胡索饮片及配方颗粒的指纹图谱研究及 5 种生物碱的含量测定 [J]. 中国药房，2020，31（20）：2462-2468.

[12] 陈昆南，傅红燕，王长军 . 基于 UPLC/Q-TOF MS 技术对延胡索醋法炮制前后化学成分的研究 [J]. 化学研究与应用，2019，31（9）：1618-1622.

[13] 章斌，娄子洋 . 液质联用技术在中药代谢物及代谢组学研究中的应用分析 [J]. 第二军医大学学报，2011，32（6）：658-662.

[14] 曾彬，刘红梅，刘晓梅，等 . UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术在中药分析中的应用 [J]. 中药材，2020，43（9）：2313-2319.

[15] 张静娴，胡青，于泓，等 . HILIC/ESI-Orbitrap HRMS 法结合 Compound Discoverer 软件快速智能化鉴定瓜蒌皮注射液中的化学成分 [J]. 药学学报，2018，53（10）：1705-1712.

[16] 冯自立，赵正栋，刘建欣 . 延胡索化学成分及药理活性研究进展 [J]. 天然产物研究与开发，2018，30（11）：2000-2008.

[17] 杨鑫宝，杨秀伟，刘建勋 . 延胡索物质基础研究 [J]. 中国中药杂志，2014，39（1）：20-27.

[18] 李凤琴，周琼，马林，等 . 延胡索化学成分的分离和结构鉴定 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（1）：211-216.

（收稿日期：2021-01-27；修回日期：2021-03-05）

脑心通通过抑制 TRPM7 抗神经元氧糖剥夺 / 复氧损伤

马妍[1]，吴丹[2]，张伟[2]，梁嘉钰[2]，李斌[1]（1. 天津中医药大学第二附属医院，天津　300150；2. 天津中医药大学，天津　301617）

摘要：目的　观察脑心通对神经元氧糖剥夺 / 复氧（OGD/R）损伤作用及其对 TRPM7 表达的影响。**方法**　以原代培养的胎鼠大脑皮层神经元（CNC）作为实验对象，用倒置相差显微镜下观察 CNC 的形态，采用免疫荧光法对微管相关蛋白 2（MAP2）染色，进行 CNC 纯度鉴定；建立 OGD/R 损伤模型，采用脑脊液药理学的给药方法，分别采用 CCK-8、LDH 检测试剂盒检测神经元细胞活力及 LDH 释放量，并用 RT-PCR 法检测 TRPM7 mRNA 的表达水平。**结果**　成功培养原代神经元，纯度符合实验要求；脑心通含药脑脊液对正常培养的 CNC 无明显损伤作用，10% 脑心通含药脑脊液可提高正常培养 CNC 的细胞活力。成功建立神经元 OGD/R 模型，各剂量脑心通含药脑脊液均可明显提高神经元 OGD/R 损伤后的细胞活力（$P < 0.01$），5% ～ 20% 脑心通含药脑脊液可明显降低神经元 OGD/R 损伤后 LDH 的释放量（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。OGD/R 组神经元内 TRPM7 mRNA 的表达水平较对照组明显升高（$P < 0.01$）；脑心通含药脑脊液各组均可明显降低神经元 OGD/R 损伤后 TRPM7 的 mRNA 的表达水平（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。**结论**　脑心通可通过抑制非谷氨酸受体依赖途径中的 TRPM7 mRNA 表达从而减轻神经元 OGD/R 损伤。

关键词：脑心通；神经元；氧糖剥夺 / 复氧；TRPM7
中图分类号：R285.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)08-1543-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.006

Naoxintong protects cortical neuron cells from oxygen-glucose deprivation/reoxygenation induced injury through inhibiting TRPM7

MA Yan[1], WU Dan[2], ZHANG Wei[2], LIANG Jia-yu[2], LI Bin[1] (1. *Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 300150; 2. *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617)

Abstract: Objective　To determine the effect of Naoxintong on cortical neuron cells (CNC) with oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) induced injury and on the expression of TRPM7. **Methods**　The CNC from primarily cultured fetal mice were used as the experimental subjects, and the morphology of CNC was observed under inverted phase contrast microscope. Microtubules associated protein 2 (MAP2) were stained by immunofluorescence to test the purity of CNC. The OGD/R induced neuron injury model was established and treated with cerebrospinal fluid pharmacology. CCK-8 and LDH detection kits were used to detect the cell viability and LDH release, and the expression level of TRPM7 mRNA was detected by RT-PCR. **Results**　The primary CNCs were successfully cultured and their purity met the experimental requirements. Cerebrospinal fluid containing Naoxintong (BNC) had no obvious damage effect on normally cultured CNCs. 10% BNC improved the cell viability of the cultured CNCs. Neuron OGD/R model was successfully established. All doses of BNC significantly increased the cell viability of neurons with OGD/R injury ($P < 0.01$), and 5% ～ 20% BNC significantly reduced the LDH release after the OGD/R injury ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The expression level of TRPM7 mRNA in the neurons of the OGD/R group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.01$). The mRNA expression level of TRPM7 after the OGD/R injury was significantly decreased in the BNC groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$).

作者简介：马妍，女，主治医师，主要从事脑血管病的中西医结合治疗，E-mail：realcrow@qq.com

Conclusion Naoxintong can reduce neuronal OGD/R injury by inhibiting the expression of TRMP7 mRNA in non glutamate receptor dependent pathway.

Key words: Naoxintong; cortical neuron cell; oxygen-glucose deprivation/reoxygenation; TRPM7

目前，中风已成为成人致残的首要原因，是仅次于冠心病的全球第二大致死原因，其中缺血性卒中约占 80%[1]。中医药对缺血性中风的治疗效果肯定 [2]，脑心通胶囊作为上市多年的中成药，由黄芪、赤芍、丹参、当归、川芎、桃仁、红花、乳香（制）、没药（制）、鸡血藤、牛膝、桂枝、桑枝、地龙、全蝎、水蛭等 16 味药组成，其可益气活血、化瘀通络，用于气虚血瘀、脉络瘀阻所致中风、冠心病等。脑心通具有抑制炎症因子释放、抗氧化及凋亡、神经保护等作用 [3]，关于脑心通胶囊治疗中风方面研究目前集中在临床和动物方面，其体外及深入机制研究较少。

脑缺血后神经损伤的机制，除神经元缺血缺氧后 Na^+-K^+-ATP 酶活性降低，细胞去极化，释放兴奋性氨基酸，引发兴奋性氨基酸受体介导的 Na^+和 Ca^{2+}内流外，非谷氨酸机制在脑缺血后离子失衡及细胞死亡中也起到了相当重要的作用 [4]，如瞬时受体电位通道（TRP）[5-6]、酸敏感离子通道（ASICs）[7] 等。其中 TRPM 是一种非特异性阳离子通道，其成员 TRPM2 和 TRPM7 在脑缺血过程中与 Ca^{2+}失衡导致的细胞损伤甚至细胞死亡关系密切 [8]。随着缺氧时间延长，谷氨酸释放造成的 Ca^{2+}浓度升高不再是主要原因，而 TRPM7 成为 Ca^{2+}内流的主要通道，其开放与一氧化氮（NO）介导的活性氧（ROS）大量生成有关 [9]。

基于以上研究现状，本研究以原代培养大脑皮层神经元为研究对象，建立氧糖剥夺 / 复氧（oxygen-glucose deprivation/reoxygenation，OGD/R）损伤模型，由于中药复方用于离体实验存在诸多问题，本研究采用脑脊液药理学的给药方法，观察脑心通的神经保护作用以及对 TRPM7 的影响，以期为脑心通治疗缺血性脑卒中提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

Wistar 大鼠，体质量（180±20）g [天津中医药大学实验动物中心，SCXK（津）2009-0004]；大耳白家兔，体质量（2±0.2）kg [天津市工程所实验动物中心，SCXK（津）2010-0002]。

1.2 试药

DMEM/F12 培养基、DMEM 无糖培养基、B-27、胰酶（不含 EDTA）、D-hank’s 溶液（美国 Gibco）；胎牛血清、青霉素 / 链霉素、PBS 溶液（美国 Hyclone）；DAPI 溶液（即用型）、多聚赖氨酸（索来宝）；微管相关蛋白 2（MAP2）- 抗（兔源）、Anti-rabbit IgG（H ＋ L）、F（ab）2Fragment（Alexa Fluor. 488Conjugate）（美国 CST）；Triton X-100、DSMO（美国 Sigma）；CCK-8 检测试剂盒（日本同仁化学研究所）；LDH 检测试剂盒（南京建成公司）；Trizol（美国 Invitrogen）；反转录第一链 cDNA 合成试剂盒、FastStart Universal SYBR Green Master（Rox）（瑞士 Roche）；脑心通胶囊超微粉（陕西步长集团，用超纯水配制成质量浓度为 0.262 g • mL^{-1} 的溶液备用）。TRPM7 的 PCR 引物委托上海生工生物技术有限公司设计合成，引物序列（Forward primer：5’-CAGAGCACGAT-GTCCTGAGA-3’；Reverse primer：5’-GCAAATGT-GAGCTTCTGTGC-3’）。

2 方法

2.1 神经元原代培养

将怀孕 16 ～ 17 d 的 Wistar 孕鼠脱臼处死，无菌条件下剪开腹腔分离串珠状子宫，取出胎鼠、分离胚胎大脑，剔除软脑膜及大血管，得到胚胎大脑皮层。将其剪成约 1 mm×1 mm×1 mm 的组织块，加入 0.25% 的胰蛋白酶 37 ℃消化、温和吹打、过滤，滤液 800 r • min^{-1} 离心，弃上清，将细胞用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基重悬，调整细胞密度为 1×10^6 • mL^{-1}，接种于预先包被 0.01% 多聚赖氨酸的培养板中。接种 4 h 后置换为无血清 DMEM/F12 完全培养基（含 2% B-27，0.5% 双抗）。隔一日半量换液一次。7 d 后用于实验。

2.2 原代神经元鉴定 [MAP2 免疫荧光染色]

将原代培养的胎鼠大脑皮层神经元（cortical neuron cell，CNC）以 1×10^6 • mL^{-1} 密度接种于 24 孔板中 7 d，每孔加入 4% 的多聚甲醛固定、晾干后置于－ 20 ℃冰箱备用。实验时每孔加入 0.5% Triton-100 15 min 后加入以 1∶50 比例稀释的 MAP2 一抗（兔源）。4 ℃冰箱中 12 h 过夜。加入 1∶1000 比例稀释的荧光二抗（抗兔），37 ℃避光孵育后加入 DAPI 工作液，室温避光孵育 10 min 后，置于荧光倒置显微镜下观察拍片。

2.3 脑心通含药脑脊液（BNC）的制备

将大耳白家兔随机分为脑心通组及空白组，

按照人与家兔剂量换算后的给药剂量 [0.262 g/（kg·d）]，予脑心通组家兔以脑心通胶囊超微粉水溶液灌胃，每日一次，连续 3 d。空白组不予特殊处理。于脑心通组最后一次灌胃 2 h 后采集两组家兔脑脊液：将家兔耳缘静脉注射空气处死，取侧卧位置于手术台，充分暴露出枕骨大孔。清除毛发，暴露颈部皮肤，酒精消毒后剪开皮肤，钝性分离肌肉组织，将 1 mL 注射器适量地抽取负压，于枕骨粗隆下约 1 cm 处进针，向家兔鼻尖的方向缓慢刺入。当见到无色透明的液体流入注射器时固定针头，缓慢抽取脑脊液。将抽取的脑脊液汇集注入离心管内，3000 r·min^{-1} 离心 15 min，过滤除菌，分装，置于－ 80 ℃冰箱内冻存备用。

2.4 分组及处理

CNC 以 1×10^6 个·mL^{-1} 密度接种于 96 孔板，将其随机分为正常组、空白脑脊液组、不同剂量脑心通含药脑脊液组。

实验前正常组置换为 DMEM/F12 培养基；空白脑脊液组置换为含 20% 空白脑脊液的 DMEM/F12 培养基；脑心通含药脑脊液各组置换为含有不同剂量脑心通脑脊液的 DMEM/F12 培养基，根据参考文献 [10-11] 分别设置剂量梯度为 2.5%、5%、10%、15%、20%；为排除空白脑脊液的影响，用空白脑脊液将脑心通含药脑脊液各组补足至每组脑脊液总百分比均为 20%（即 2.5% 脑心通含药脑脊液组培养基中含有 17.5% 空白脑脊液、5% 脑心通含药脑脊液组培养基中含 15% 空白脑脊液，以此类推），各组均培养 6 h。

RT-PCR 实验中取以 1×10^6 个·mL^{-1} 密度接种于 6 孔板的 CNC，分为正常组、模型组、不同剂量脑心通含药脑脊液组。正常组及模型组培养基中均含有 20% 空白脑脊液以排除干扰，不同剂量脑心通含药脑脊液各组均以空白脑脊液补足。

2.5 神经元 OGD/R 模型的建立

CNC 以 1×10^6 个·mL^{-1} 密度接种，以氧糖剥夺 12 h/ 复氧 4 h、氧糖剥夺 9 h/ 复氧 3 h、氧糖剥夺 6 h/ 复氧 2 h、氧糖剥夺 4 h/ 复氧 2 h 四种不同氧糖剥夺 / 复氧时间进行实验，另设正常组，每组设 8 个平行孔。正常组：开始实验后将培养基置换为加葡萄糖（4500 mg·L^{-1}）的无糖 DMEM 培基，按照不同 OGD/R 总时长分别继续培养 16、12、8、6 h；OGD/R 组：开始实验后将培养基置换为用 1 mmol·L^{-1} HCl 调节成 pH 值为 6.4 ～ 6.8 的无糖 DMEM 酸性培基，将培养板放入缺氧小室中进行不同时长的缺氧。氧糖剥夺结束后取出培养板，将培养基置换为加葡萄糖的无糖 DMEM 培基，于 CO_2 培养箱以不同时长复氧孵育。

2.6 CCK-8 法检测 CNC 细胞活力

每孔加入 CCK-8 与 DMEM/F12 混合液（比例为 1∶10）100 μL，避光孵育 2 h，于酶标仪 450 nm 波长处测定吸光度值。

2.7 LDH 试剂盒检测 CNC 细胞膜损伤情况

留取氧糖剥夺和复氧后的细胞培养液混合，按照 LDH 试剂盒说明书操作。每孔依次加入氧化型辅酶 Ⅰ、2，4- 二硝基苯肼、0.4 mol·mL^{-1} NaOH 溶液等试剂，于酶标仪 450 nm 波长处测定吸光度值。

2.8 RT-PCR 法检测 TRPM7 mRNA 的表达水平

将 CNC 按 “2.3” “2.4” 项下方法处理后加入 Trizol，反复吹打至细胞全部脱落、破裂，提取细胞总 RNA，用紫外分光光度法检测 RNA 样品的浓度及纯度，后按照试剂盒说明书，反转录合成 cDNA，制备反应体系，应用实时定量 PCR 仪分析，进行扩增反应、数据分析。

2.9 统计学处理

实验数据以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，用 SPSS 17.0 进行统计学处理，多组间比较采用单因素方差分析方法，$P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。方差不齐时用 Tamhanes’ s h2 统计方法。

3 结果

3.1 CNC 形态结构观察

倒置相差显微镜下观察 CNC 的形态，接种后 4 h 初贴壁时，已有部分 CNC 长出细小突触；1 d 后，CNC 立体感增强，周边有光晕，大部分 CNC 长出突起；3 d 时，CNC 胞体增大，以多级 CNC 为主，连结成稀疏的网络；5 d 时，CNC 胞体明显增大，突起增粗、增长，交结成网；7 d 时，CNC 有明显立体感，分支连接成网，胞体增大，部分聚集成团（见图 1）。当 CNC 受到 OGD/R 损伤后，胞体皱缩，胞浆呈空泡状，轮廓模糊，突起损伤，出现溶解现象（见图 2A）。

3.2 MAP2 免疫荧光染色鉴定神经元

MAP2 是组成神经元细胞骨架的重要组成成分，是神经元轴突的标志物，MAP2 免疫荧光染色后，可见 90% 以上细胞胞浆呈阳性（见图 2B）。结果表明该实验方法获得的细胞为神经元，纯度符合实验要求。

3.3 脑心通含药脑脊液对正常培养神经元细胞活力、LDH 释放量的影响

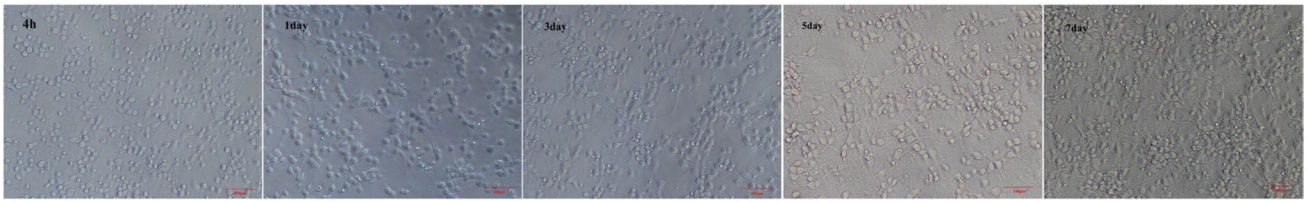


图 1 神经元培养不同时间的生长情况（200×）

Fig 1 Growth of CNC cultured for different time（200×）

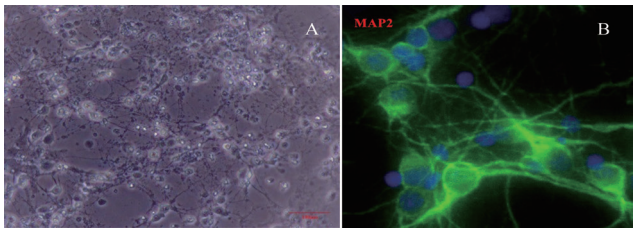


图 2 神经元缺氧 9 h/ 复氧 3 h 损伤后的情况（A）及神经元 MAP2 免疫荧光染色（B）(200×）

Fig 2 CNC injured after 9 h hypoxia and 3 h reoxygenation（A）, and the immunofluorescence staining of MAP2 of CNC（B）(200×）

10% 脑心通含药脑脊液可显著提高正常培养 CNC 的细胞活力（$P < 0.05$），其他各组有提高 CNC 细胞活力的趋势（见图 3A）；各剂量脑心通含药脑脊液对 CNC 的 LDH 释放量无明显影响（见图 3B）。以上说明脑心通含药脑脊液对正常培养的 CNC 无明显损伤作用，10% 脑心通含药脑脊液可提高正常培养 CNC 的细胞活力。

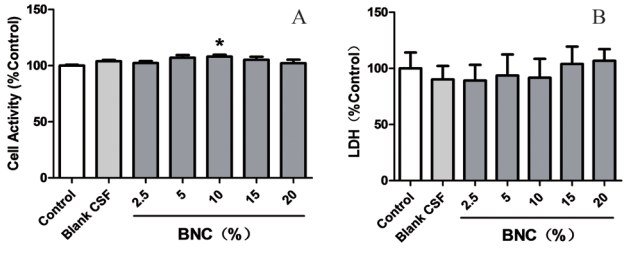


图 3 脑心通含药脑脊液对正常培养 CNC 细胞活力（A）及 LDH 含量（B）的影响

Fig 3 Effect of BNC on cell activity（A）and content of LDH（B）of normal cultured CNC

注（Note）：与对照组相比，$^{*}P < 0.05$（Compared with the control group，$^{*}P < 0.05$）。

3.4 神经元 OGD/R 模型的建立

如图 4 所示，OGD/R 各实验组 CNC 的细胞活力均明显降低（$P < 0.01$），其中氧糖剥夺时间是决定细胞损伤程度的关键。根据 OGD/R 后 CNC 损伤程度，确定 OGD/R 模型条件为氧糖剥夺 4 h/ 复氧 2 h。

3.5 脑心通含药脑脊液对神经元 OGD/R 损伤后细胞活力、LDH 释放量的影响

与正常组相比，OGD/R 组 CNC 细胞活力明显下降（$P < 0.01$）(见图 5A），LDH 释放量明显

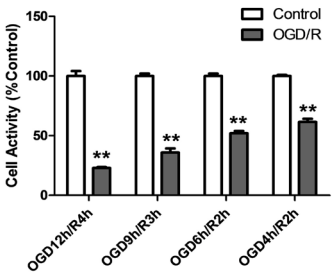


图 4 不同氧糖剥夺、复氧时间对 CNC 细胞活力的影响

Fig 4 Effect of different oxygen-glucose deprivation and reoxygenation time on the viability of CNC cells

注（Note）：与对照组相比，$^{**}P < 0.01$（Compared with the control group，$^{**}P < 0.01$）。

增加（$P < 0.01$）(见图 5B）；各剂量脑心通含药脑脊液均可明显提高神经元 OGD/R 损伤后的细胞活力（$P < 0.01$）(见图 5A），5% ～ 20% 脑心通含药脑脊液可明显降低神经元 OGD/R 损伤后 LDH 的释放量（$P < 0.05$，$P < 0.01$）(见图 5B）。可见脑心通含药脑脊液具有抗神经元 OGD/R 损伤的作用。

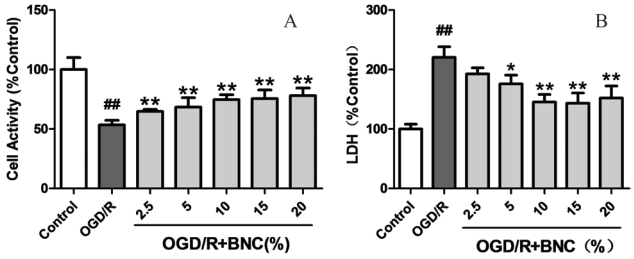


图 5 不同剂量脑心通含药脑脊液对神经元 OGD/R 损伤后细胞活力（A）及 LDH 释放量（B）的影响

Fig 5 Effect of different doses of BNC on cell viability（A）and LDH release（B）of CNC after OGD/R injury

注（Note）：与对照组相比，$^{\#\#}P < 0.01$；与 OGD/R 组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$（Compared with the control group，$^{\#\#}P < 0.01$；compared with the OGD/R group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）。

3.6 脑心通含药脑脊液对神经元 OGD/R 损伤后 TRPM7 mRNA 表达的影响

综合以上实验结果，确定了神经元 OGD/R 模型条件为氧糖剥夺 4 h/ 复氧 2 h，选取本实验的脑心通含药脑脊液给药低、中、高剂量（分别为 2.5%、5% 和 10%）。如图 6 所示，神经元 OGD/R 损伤后，OGD/R 组神经元内 TRPM7 mRNA 的表达水平较对

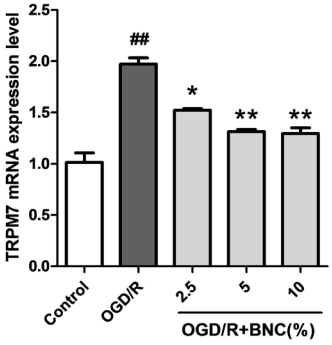


图 6 脑心通含药脑脊液对神经元 OGD/R 损伤后 TRPM7 mRNA 表达的影响

Fig 6 Effect of BNC on TRPM7 mRNA expression after OGD/R injury in CNC

注（Note）：与对照组相比，$^{\#\#}P < 0.01$；与 OGD/R 组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$（Compared with the control group，$^{\#\#}P < 0.01$；compared with the OGD/R group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）。

照组明显升高（$P < 0.01$）；脑心通含药脑脊液各组均可明显降低神经元 OGD/R 损伤后 TRPM7 的 mRNA 的表达水平（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。

4 讨论

原代培养神经元在体外实验中具有优势[12]。OGD/R 模型是较接近体内情况的一种实验模型[13-14]，可更好地模拟脑缺血再灌注的体内变化情况。脑脊液药理学方法具有避免血清对神经元的毒害作用、解决药物通过血脑屏障问题等优势[15-17]。

脑缺血可导致 ATP 生成减少、离子泵紊乱、离子失衡、谷氨酸释放、神经元内钙超载，进而引发氧化应激、炎症反应等一系列瀑布样病理变化，最终导致细胞的凋亡和死亡[18]。谷氨酸受体依赖和非谷氨酸受体依赖的途径均可导致钙超载[19]，既往对谷氨酸依赖性钙超载途径研究占据主要地位[20]，然而谷氨酸受体阻断剂在临床中的应用并不理想[21]。实验研究发现，OGD 时间延长至 1.5 h 时，谷氨酸受体阻断剂已不能发挥神经元保护作用，细胞死亡的原因主要是由于通过非特异性的阳离子通道导致的钙超载，其在脑缺血后离子失衡及细胞死亡中也发挥着相当重要的作用[20，22-23]。目前发现的非谷氨酸受体依赖钙超载的机制主要包括 ASICs[6]、TRP[5]、ATP 敏感性钾通道（KATP）[24]、半通道[25]等。

TRP 通道家族是一大类非特异性阳离子通道的集合，其中 TRPM 是其一类亚族，TRPM2 和 TRPM7 与脑缺血迟发性的钙超载密切相关[20]。TRPM7 在缺血缺氧时脑损伤和神经元细胞死亡中起关键作用[26]。用 SiRNA 抑制 TRPM7 的表达，可以明显抑制 OGD 3 h 以上的 Ca^{2+} 内流[5]，并阻止 ROS 介导的一系列反应。目前，最有效和特异的 TRPM7 抑制剂是 waixenicin A，可减轻脑缺血缺氧损伤，TRPM7 是一种新兴的药物靶点[26]。本研究发现脑心通通过抑制非谷氨酸受体依赖途径中的 TRPM7 表达从而减轻神经元 OGD/R 损伤。为脑心通治疗缺血性脑卒中提供了实验依据和初步探索方向。

参考文献

[1] Wang H，Naghavi M，Allen C，et al. GBD 2015 mortality and causes of death collaborators（2016）global，regional，and national life expectancy，all-cause mortality，and cause-specific mortality for 249 causes of death，1980—2015：A systematic analysis for the global burden of disease study 2015 [J]. Lancet，2016，388（10053）：1459-1544.

[2] 李晓琼，林荣清，杨璧璘，等 . 中医药治疗缺血性中风研究新进展 [J]. 辽宁中医药大学学报，2019，21（11）：145-147.

[3] 马妍，翟婷，华声瑜 . 脑心通治疗缺血性脑卒中基础研究及临床应用现状 [J]. 中南药学，2017，15（8）：1080-1085.

[4] Besancon E，Guo S，Lok J，et al. Beyond NMDA and AMPA glutamate receptors：Emerging mechanisms for ionic imbalance and cell death in stroke [J]. Trends Pharmacol Sci，2008，29（5）：268-275.

[5] Aarts M，Iihara K，Wei W L，et al. A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death [J]. Cell，2003，115（7）：863-877.

[6] Sun HS，Jackson MF，Martin LJ，et al. Suppression of hippocampal TRPM7 protein prevents delayed neuronal death in brain ischemia [J]. Nat Neurosci，2009，12（10）：1300-1307.

[7] Pignataro G，Simon RP，Xiong ZG. Prolonged activation of ASIC1a and the time window for neuroprotection in cerebral ischaemia [J]. Brain，2007，130（Pt 1）：151-158.

[8] Aarts MM，Tymianski M. TRPMs and neuronal cell death [J]. Pflugers Arch，2005，451（1）：243-249.

[9] Aarts M，Iihara K，Wei WL，et al. A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death [J]. Cell，2003，115（7）：863-877.

[10] 秦秀德，郭家奎，韩舰华，等 . 中药脑脊液药理学应用研究进展 [J]. 中华中医药杂志，2013，28（8）：2377-2381.

[11] WuYQ，Jing ZW，Qin XD，et al. Qingnaoyizhi decoction suppresses the formation of glial fibrillary acidic protein-positive cells in cultured neural stem cells by inhibiting the Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway [J]. J Tradit Chin Med，2015，35（1）：69-76.

[12] 姜茜，姜玉武，王静敏，等 . 一种改进的大鼠皮层神经元原代培养方法及其性质鉴定 [J]. 北京大学学报（医学版），2009，41（2）：212-216.

[13] Goldberg MP，Strasser U，Dugan LL. Techniques for assessing neuroprotective drugs in vitro [J]. Int Rev Neurobiol，1997，40：69-93.

[14] Goldberg MP，Choi DW. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture：Calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury [J]. J Neurosci，1993，13（8）：3510-3524.
[15] Iwama H，Amagaya S，Ogihara Y. Effect of shosaikoto，a Japanese and Chinese traditional herbal medicinal mixture，on the mitogenic activity of lipopolysaccharide：A new pharmacological testing method [J]. J Ethnopharmacol，1987，21（1）：45-53.
[16] 梅建勋 . 中药神经保护作用的离体实验研究——“中药脑脊液药理学”实验方法的提出 [D]. 天津：天津中医学院，2000.
[17] 闫晨，康立源 . 中药脑脊液药理学方法研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志，2009，25（3）：257-259.
[18] Dirnagl U，Iadecola C，Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke：An integrated view [J]. Trends Neurosci，1999，22（9）：391-397.
[19] Alim I，Teves L，Li R，et al. Modulation of NMDAR subunit expression by TRPM2 channels regulates neuronal vulnerability to ischemic cell death [J]. J Neurosci，2013，33（44）：17264-17277.
[20] Besancon E，Guo S，Lok J，et al. Beyond NMDA and AMPA glutamate receptors：Emerging mechanisms for ionic imbalance and cell death in stroke [J]. Trends Pharmacol Sci，2008，29（5）：268-275.
[21] Davis SM，Lees KR，Albers GW，et al. Selfotel in acute ischemic stroke：Possible neurotoxic effects of an NMDA antagonist [J]. Stroke，2000，31（2）：347-354.
[22] Aarts MM，Tymianski M. TRPMs and neuronal cell death [J]. Pflugers Arch，2005，451（1）：243-249.
[23] Tymianski M. Emerging mechanisms of disrupted cellular signaling in brain ischemia [J]. Nat Neurosci，2011，14（11）：1369-1373.
[24] Sun HS，Feng ZP，Miki T，et al. Enhanced neuronal damage after ischemic insults in mice lacking Kir6.2-containing ATP-sensitive K^+ channels [J]. J Neurophysiol，2006，95（4）：2590-2601.
[25] Thompson RJ，Jackson MF，Olah ME，et al. Activation of pannexin-1 hemichannels augments aberrant bursting in the hippocampus [J]. Science，2008，322（5907）：1555-1559.
[26] Zhang Y，Zhang H，Feustel PJ，et al. DCPIB，a specific inhibitor of volume regulated anion channels（VRACs），reduces infarct size in MCAo and the release of glutamate in the ischemic cortical penumbra [J]. Exp Neurol，2008，210（2）：514-520.
[27] Sun HS，Horgen FD，Romo D，et al. Waixenicin A，a marine-derived TRPM7 inhibitor：A promising CNS drug lead [J]. Acta Pharmacologica Sinca，2020，41（12）：1519-1524.

（收稿日期：2021-01-05；修回日期：2021-04-02）

法匹拉韦的合成工艺研究

魏天航[1]，徐明杰[1]，郭建超[1]，甲宗青[1]，苗雪凤[2]，王西龙[1*]（1. 山东道箴医药科技有限公司，山东 潍坊 261000；2. 山东道一医药科技有限公司，山东 东营 257000）

摘要：目的 优化法匹拉韦的合成工艺。**方法** 以廉价易得的丙二酸二乙酯为起始原料，依次经溴代、氨基取代、环合、硝化、催化氢化、重氮化、引入氟原子等反应合成法匹拉韦。**结果** 所得法匹拉韦经 HPLC 检测纯度为 99.96%，总收率为 27.5%，产物结构经 MS、^{1}H-NMR、IR 确证。**结论** 该原料经济、易得，制得的法匹拉韦纯度高；工艺安全可行，适于工业化生产。

关键词：广谱抗病毒药物；法匹拉韦；合成工艺
中图分类号：R914 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1548-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.007

Synthesis process of favipiravir

WEI Tian-hang[1], XU Ming-jie[1], GUO Jian-chao[1], JIA Zong-qing[1], MIAO Xue-feng[2], WANG Xi-long[1*] (1. *Shandong Harway Pharma Tech Co., Ltd., Weifang Shandong* 261000; 2. *Shandong Doye Pharma Co., Ltd*, *Dongying Shandong* 257000)

Abstract: Objective To optimize the synthetic process of favipiravir for industrial production. **Methods** Cheap and easily available diethyl malonate was used as the starting material. Favipiravir

作者简介：魏天航，男，硕士研究生，主要从事药物合成研究，E-mail：1534776100@qq.com *通信作者：王西龙，男，硕士研究生导师，主要从事新药的合成与工艺优化研究，E-mail：xlw_ecust@126.com

was successfully synthesized through bromination, amino substitution, cyclization, nitration, catalytic hydrogenation, and diazotization to introduce fluorine atoms. **Results** The purity of favipiravir determined by HPLC was 99.96%, and the total yield was 27.5%. The structure of favipiravir was confirmed by MS, ^{1}H-NMR and IR. **Conclusion** The raw materials of the process are easy to obtain, and the obtained favipiravir has high purity. The process is safe and feasible, which is suitable for industrial production.

Key words: broad-spectrum antiviral drug; favipiravir; synthetic technology

法匹拉韦（favipiravir，见图 1）是一种新型 RNA 依赖的 RNA 聚合酶（RdRp）抑制剂，属于广谱抗流感病毒药物 [1-3]，由富士胶片集团富山化学工业株式会社开发，于 2014 年 3 月在日本批准上市 [4]。除流感病毒外，其还对多种 RNA 病毒表现出良好的抗病毒作用，如埃博拉病毒、沙粒病毒、狂犬病毒等 [5-7]。

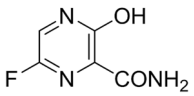


图 1 法匹拉韦结构式

Fig 1 Structure of favipiravir

本文在查阅相关文献后，对法匹拉韦的合成工艺进行了研究与改进，以期获得更加适合工业化生产的合成工艺路线。文献报道的法匹拉韦的合成路线主要有以下三种：

① 以 3- 羟基吡嗪 -2- 酰胺为起始原料，经硝化、氯代、氟代、水解、氧化等五步反应得到目标产物 [8]，如图 2 所示，该路线起始原料价格较贵不易得，路线中氯代试剂采用三氯氧磷，淬灭处理时与水剧烈反应，极易发生安全事故；工艺采用双氧水进行氧化反应，双氧水遇铁极易分解爆炸，对反应设备及储存设备要求较为苛刻；该路线中氯代及氟代中间体对人体皮肤具有极强的灼伤性，极大地限制了该工艺路线的放大生产。

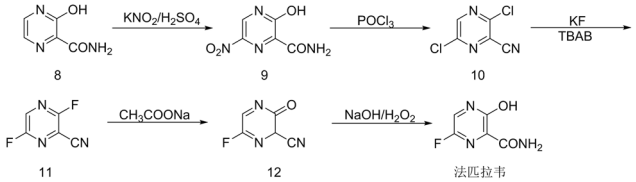


图 2 法匹拉韦的合成路线 1

Fig 2 Synthetic route 1 of favipiravir

② 以 2- 氨基丙二酰胺为起始原料，如图 3 所示，经环合、溴代、氯代、氟代、水解、浓硫酸水解酰胺等六步反应得到目标产物 [9-10]，该路线起始原料廉价易得，但氯代试剂仍选用三氯氧磷，后处理存在安全隐患；该路线依然没有避开具有灼伤性的氯代及氟代中间体，限制了工业化生产。

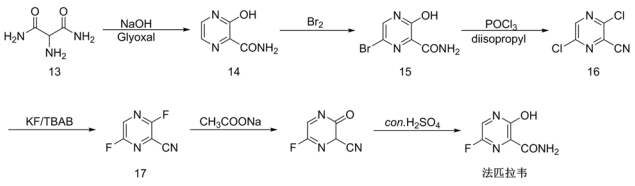


图 3 法匹拉韦的合成路线 2

Fig 3 Synthetic route 2 of favipiravir

③ 以 3- 氨基吡嗪 -2- 羧酸为起始原料，如图 4 所示，经酯化、溴代、重氮化引入甲氧基、Buchwald-Hartwing 反应、氨酯交换、重氮化、三甲基氯硅烷催化水解等七步反应得到目标产物 [11-12]，该工艺路线冗长，收率较低，且两次用到重氮化反应，在 Buchwald-Hartwing 反应时用到昂贵的有机钯为催化剂且无法回收套用，成本较高。

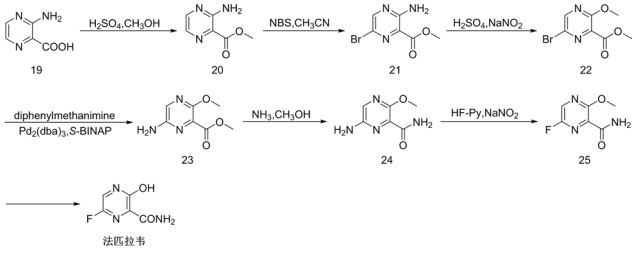


图 4 法匹拉韦的合成路线 3

Fig 4 Synthetic route 3 of favipiravir

为克服上述路线中的缺点，本研究对法匹拉韦的合成工艺路线进行了改进。本文以廉价易得的丙二酸二乙酯（**2**）为起始原料，如图 5 所示，经溴代反应得到 2- 溴丙二酸二乙酯（**3**），与氨气进行氨酯交换、取代反应得到 2- 氨基丙二酰胺（**4**），碱性条件下与乙二醛扣环得到 3- 羟基吡嗪 -2- 酰胺的钠盐（**5**），再经混酸硝化、Pd/C 催化氢化，最后经重氮化引入氟等六步反应得到目标产物法匹拉韦。

1 材料

HPLC 谱采用 U3000 高效液相色谱仪（美国

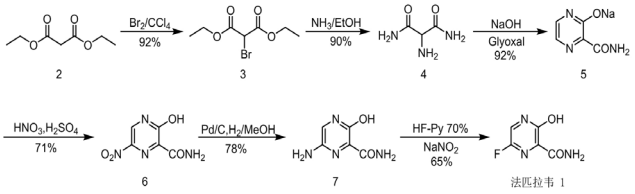


图 5　法匹拉韦的合成路线

Fig 5　Synthetic route of favipiravir

赛默飞，Chromeleon 7 色谱工作站）测定；NMR 谱采用 AVANCE NEO 400 核磁共振分析仪（瑞士 Bruker）测定；ESI-MS 谱采用 Q Exactive 质谱仪（Q Exactive Plus LCMS，美国赛默飞）测定；JE1002 型电子天平（上海恒勤仪器设备有限公司）；薄层层析板用 GF-254 型荧光板（上海旭泊实业有限公司）；合成所用原料及试剂均为化学纯或分析纯，HPLC 所用试剂为色谱纯，起始原料丙二酸二乙酯（纯度：99%，上海润泰医药科技有限公司）。

2　方法

2.1　2- 溴丙二酸二乙酯的制备（**3**）

将 400.0 g 丙二酸二乙酯和 600 mL 四氯化碳加到 5000 mL 四口烧瓶中，缓慢升温至 70 ～ 75 ℃，打开紫外灯，控制温度在 70 ～ 75 ℃，通过恒压滴液漏斗缓慢滴加溴素的四氯化碳溶液（410.0 g 溴素溶解在 1600 mL 四氯化碳中），滴加速度根据反应瓶中红色褪去速度来确定，滴加结束后，在 70 ～ 75 ℃下继续搅拌 5 h，取样通过 TLC 确认反应结束，降温至 20 ～ 25 ℃，加入 1000 mL5% 碳酸钠水溶液，搅拌 20 min，静置分层，有机相减压浓缩至无溶剂蒸出。

将上述残留液体转移至 1000 mL 精馏塔中，减压精馏，得到 547.4 g 无色油状产品，收率为 92.0%。ESI-MS *m/z*：240.0 $[M + H]^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：1.20 ～ 1.24（m，6H，-CH_3），4.19 ～ 4.25（m，4H，-CH_2-），5.55（s，1H，-CH-）。

2.2　2- 氨基丙二酰胺的制备（**4**）

将 700.0 g 无水乙醇加到 2000 mL 四口烧瓶中，缓慢降温并控制在 0 ～ 10 ℃，将 160 g 氨气慢慢通至四口烧瓶中，配制成液氨的乙醇溶液，控制温度在 0 ～ 10 ℃下，通过恒压滴液漏斗缓慢滴加中间体 **3** 的乙醇溶液（226.5 g 中间体 **3** 溶解在 200 mL 无水乙醇中），滴加结束后，缓慢升温至 30 ～ 35 ℃，搅拌反应 20 h，取样通过 TLC 确认反应结束，缓慢降温至 0 ～ 5 ℃，搅拌 1 ～ 2 h，过滤，得到黄色固体。

将上述黄色固体加到 450 mL 工艺水中，在 20 ～ 25 ℃下搅拌 40 ～ 60 min，缓慢降温至 0 ～ 5 ℃，搅拌 1 ～ 2 h，过滤，并用 110 mL 工艺水淋洗滤饼，将滤饼置于鼓风干燥箱中，于 55 ℃下干燥，得到 99.6 g 黄色固体，收率为 90%。ESI-MS *m/z*：118.1 $[M + H]^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：2.15（s，2H，-NH_2），3.75（s，1H，-CH-），7.25（s，2H，-$CONH_2$），7.43（s，2H，-$CONH_2$）。

2.3　3- 羟基吡嗪 -2- 酰胺钠盐的制备（**5**）

将 380 mL 工艺水和 84.5 g 氢氧化钠加到 2000 mL 四口烧瓶中，搅拌至固体全部溶解，降温并控制在 － 5 ～ 5 ℃，加入 200.0 g 中间体 **4**，搅拌 20 ～ 30 min，缓慢滴加 300.0 g 40% 的乙二醛水溶液，搅拌 40 ～ 60 min，缓慢升温至 20 ～ 25 ℃，并搅拌反应 3 h，取样通过 TLC 确认反应结束，缓慢降温至 － 5 ～ 5 ℃，搅拌 1 ～ 2 h，过滤，将滤饼置于鼓风干燥箱中，于 55 ℃下干燥，得到 298.0 g 产品，收率为 92%。ESI-MS *m/z*：162.1 $[M + H]^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：7.16 ～ 7.17（d，J ＝ 4.0 Hz，1H，-CONH-），7.30（d，1H，Ar-H），7.85（d，1H，Ar-H），10.94 ～ 10.95（d，J ＝ 4.0 Hz，1H，-CONH-）。

2.4　3- 羟基 -6- 硝基吡嗪 -2- 酰胺的制备（**6**）

将 53.0 g 浓硫酸（质量分数 98%）加到 100 mL 四口烧瓶中，降温至 － 5 ～ 0 ℃，之后分批次加入 10.0 g 中间体 **5**，搅拌至全部溶解，控制温度在 － 5 ～ 0 ℃下，缓慢滴加 4.76 g 浓硝酸（质量分数 68%），滴加结束后，缓慢升温至 20 ～ 25 ℃，搅拌 2.0 ～ 3.0 h，取样通过 TLC 确认反应结束，将反应液淬灭到 70 mL 冰水中，在 10 ～ 15 ℃下搅拌 1.0 ～ 2.0 h，过滤，用 20 mL 水淋洗滤饼，得到湿固体滤饼，硫酸水溶液用于制备聚合硫酸铁。

在上述固体滤饼加到 40 mL 甲醇中，升温至回流，在回流状态下搅拌 2.0 ～ 3.0 h，缓慢降温至 20 ～ 25 ℃，在搅拌 1 ～ 2 h，过滤，将滤饼置于鼓风干燥箱中，于 55 ℃下干燥，得到 9.4 g 黄色固体，收率为 71%。ESI-MS *m/z*：183.1 $[M-H]^-$。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：8.06（s，1H，-CONH-），8.32（s，1H，-CONH-），8.97（s，1H，Ar-H）

2.5　6- 氨基 -3- 羟基吡嗪 -2- 酰胺的制备（**7**）

将 3.0 g 中间体 **6** 和 192 g 甲醇加到 500 mL 高压反应釜中，用氮气置换 3 次，加入 0.3 g

5% 湿钯碳催化剂，依次用氮气置换 3 次、用氢气置换 3 次，调整温度至 45 ～ 50 ℃、压力至 30 ～ 40 psi，并在此温度和压力搅拌反应 10 h，取样通过 TLC 确认反应结束，过滤除去钯碳催化剂，浓缩滤液，得到黑色固体，钯碳催化剂可以回收套用。

将上述黑色固体加到 30 mL 丙酮中，缓慢升温至回流，并在回流状态下搅拌 1 ～ 2 h，缓慢降温至 20 ～ 25 ℃，搅拌 30 ～ 50 min，过滤，将滤饼置于真空干燥箱中，于 45 ℃下干燥，得到 1.96 g 棕褐色固体，收率为 78%。ESI-MS *m/z*：153.1 $[M-H]^-$。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：6.00（s，2H，Ar-NH_2），7.55（s，1H，-CONH-），7.82（s，1H，-CONH-），8.48（s，1H，Ar-H）

2.6　法匹拉韦的制备（**1**）

在氮气保护下，将 8.0 g 中间体 **7** 和 60 mL 70% 氢氟酸吡啶溶液加到 100 mL 四口烧瓶中，缓慢降温至－ 20 ～－ 15 ℃，在氮气保护下，加入 7.5 g 亚硝酸钠，搅拌反应 1 h；缓慢升温至 20 ～ 25 ℃，搅拌 2 ～ 3 h。反应结束后，缓慢加入 24 mL 去离子水，用 40 mL 醋酸异丙酯萃取，分层，有机相用 16 mL 饱和食盐水洗涤，浓缩有机相，得到黄色固体。

将上述黄色固体加到 30 mL 乙醇中，缓慢升温至回流，并在回流状态下搅拌 1 ～ 2 h，缓慢降温至 20 ～ 25 ℃，搅拌 30 ～ 50 min，过滤，将滤饼置于真空干燥箱中，于 55 ℃下干燥，得到 5.3 g 白色固体，收率为 65%，经 HPLC 检测纯度 99.96%，单杂小于 0.05%。ESI-MS *m/z*：156.0 $[M-H]^-$；^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：8.50～8.52（d，J＝8.0 Hz，2H，-$CONH_2$），8.75（s，1H，Ar-H），13.41（s，1H，Ar-OH）

3　结果与讨论

本文的起始原料廉价易得，第一步溴代反应生成的溴化氢经碱液吸收后生成溴化钠，处理后可额外获得经济效益；第二步氨气与酯发生氨酯交换，同时取代溴原子得到中间体 **4**，反应结束后直接降温抽滤，操作简单，母液回收后固体残渣可进一步提取溴素，实现了闭环；第三步碱性条件下与乙二醛扣环，得到中间体 **5**，反应完毕降温后直接抽滤即可，操作简便；第四步经混酸硝化，得到中间体 **6**，淬灭打浆抽滤即可，母液经脱色后用于制备聚合硫酸铁；第五步氢化还原，催化剂采用 Pd/C，反应清洁且后处理简单，回收后的 Pd/C 可直接套用至下批反应，解决了贵金属钯成本高的问题；最后一步经重氮化引入氟，经纯化后 HPLC 检测纯度可达 99.96%，单个杂质均在 0.05% 以下。

本文工艺路线与现有报道合成路线相比，避免了三氯氧磷、双氧水等危险试剂的使用，反应条件温和、后处理简单，规避了强灼伤性氯代中间体的产生，工艺过程中产生的相关产物能够充分利用，进一步转化为经济效益，工艺总收率为 27.5%，所得法匹拉韦纯度高、工艺经济、安全可行，工业化生产与现有工艺相比具有较大优势。

参考文献

[1] 赵旭，周辛波，钟武，等 . 抗病毒药物——法匹拉韦 [J]. 临床药物治疗杂志，2015，13（4）：16-20.

[2] 黄玉梅，徐志 . 法匹拉韦的合成及临床应用进展 [J]. 国外医药（抗生素分册），2020，41（5）：361-369.

[3] 赵一玫，孙新宇，陈力，等 . 法匹拉韦的合成 [J]. 中国药物化学杂志，2020，30（3）：142-144，148.

[4] 王皖 . 法匹拉韦及赛红霉素中间体的合成研究 [D]. 衡阳：南华大学，2015.

[5] 王先堃，孙娜，陈志海 . 法匹拉韦抗病毒治疗研究进展 [J]. 中国新药杂志，2019，28（15）：1824-1827.

[6] 杨柳 . 法匹拉韦的合成工艺研究 [D]. 济南：济南大学，2016.

[7] Dionna S，Bailey KW，Vest Z，et al. Favipiravir（T-705）protects against peracute Rift Valley fever virus infection and reduces delayed-onset neurologic disease observed with ribavirin treatment [J]. Antiviral Res，2014，104：84-92.

[8] 王皖，刘敏，肖新荣，等 . 法匹拉韦的合成 [J]. 国际药学研究杂志，2015，42（2）：220-224.

[9] Egawa H，Furuta Y，Sugita J，et al. Novel pyrazine derivatives or salts thereof，pharmaceutical compositions containing the derivatives or the salts and intermediates for the preparation of both：WO，20010904434 [P]. 2001-02-14.

[10] Hara T，Norimatsu N，Kurushima H，et al. Method for producing dichloropyrazine derivative：U. S. 8586741 [P]. 2013-11-19.

[11] 邓玉晓，张宁，赵思太，等 . 法匹拉韦的合成工艺优化 [J]. 食品与药品，2020，22（2）：139-142.

[12] Furuta Y，Egawa H. Nitrogenous heterocyclic carboxamide derivatives or salts thereof and antiviral agents comprising both：KR，20017001690 [P]. 2006-05-31.

（收稿日期：2021-12-16；修回日期：2021-03-03）

孟鲁司特钠口腔崩解片的制备和质量评价研究

孙钦勇，冯中，高帆俐，杨斌，张贵民*（鲁南制药集团股份有限公司，国家手性制药工程技术研究中心，山东 临沂 273400）

摘要：目的 对冷冻干燥技术制备孟鲁司特钠口腔崩解片的处方和工艺进行优化并对自研制剂进行溶出相似性评价。**方法** 通过单因素实验和 Box-Behnken 效应面法对孟鲁司特钠口腔崩解片的辅料种类、用量和冻干工艺进行考察和优化，并以外观性状、崩解时限、水分和口感等为指标，对自研制剂的质量进行初步评价。参照《中国药典》2020 年版溶出度测定方法，用 HPLC 法对孟鲁司特钠在 4 种溶出介质中的溶出行为进行评价。**结果** 确定孟鲁司特钠口腔崩解片的处方为：孟鲁司特钠 10 mg、甘露醇 9 mg、麦芽糖糊精 3 mg、交联聚维酮 3 mg、明胶 8 mg、阿斯帕坦 1 mg、薄荷香精 0.2 mg。自研孟鲁司特钠口腔崩解片与原研孟鲁司特钠咀嚼片溶出行为相似。**结论** 该处方及工艺合理稳定，为后续孟鲁司特钠口腔崩解片的研究开发奠定了基础。

关键词：孟鲁司特钠；冷冻干燥法；口腔崩解片；崩解时限；体外溶出
中图分类号：R94 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1552-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.008

Preparation and quality evaluation of montelukast sodium orally disintegrating tablets

SUN Qin-yong, FENG Zhong, GAO Fan-li, YANG Bin, ZHANG Gui-min* (*Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., National Chiral Pharmaceuticals Engineering and Technology Research Center, Linyi Shandong* 273400)

Abstract: Objective To prepare montelukast sodium orally disintegrating tablets by using freeze-drying technology, and to optimize its formulation and process and evaluate the dissolution similarity of the tablets. **Methods** Single factor experiments and the Box-Behnken design method were used to determine the type and dosage of the tablet excipients and optimize its freeze-drying process. The appearance characteristics, disintegration time, moisture content and taste of the tablets were evaluated. The dissolution behaviors of the tablets in 4 dissolution media were evaluated by HPLC according to the dissolution determination method of Chinese Pharmacopoeia 2020. **Results** Formulation of the tablets was determined as follows: montelukast sodium 10 mg, mannitol 9 mg, maltodextrin 3 mg, crospovidone 3 mg, gelatin 8 mg, aspartame 1 mg, and peppermint flavor 0.2 mg. The dissolution behaviors of the self-developed tablets were similar to those of the original drugs. **Conclusion** The formulation and process are reasonable and stable for further research and development of the tablets.

Key words: montelukast sodium; freeze drying method; orally disintegrating tablet; disintegration time; in vitro dissolution

孟鲁司特钠（montelukast sodium），作为新一代非甾体抗炎药，可选择性地拮抗白三烯与其受体结合，抑制白三烯的致炎活性。孟鲁司特钠于 1988 年由美国默克公司申请上市，临床主要用于治疗哮喘及支气管炎等。目前孟鲁司特钠市售剂型有片剂、咀嚼片和颗粒剂。但在哮喘急性发作期，患者因处于气阻状态而服药不便，且哮喘患者多为老人、儿童等吞咽能力较弱的群

作者简介：孙钦勇，男，硕士，主要从事新药研究与开发，E-mail：zhiji505863@126.com *通信作者：张贵民，男，研究员，主要从事新药研究与开发，E-mail：lunanzhangguimin@163.com

体[1-3]。冻干口腔崩解片因其富含孔隙及可溶性基质而具有崩解迅速和口感良好的优势，可大幅提高患者服药顺应性。部分药物可以通过舌下黏膜吸收，避开药物首过效应，提高生物利用度[4-6]。本实验采用冷冻干燥技术制备 10 mg 规格的孟鲁司特钠口腔崩解片，优化其处方与工艺，并与孟鲁司特钠咀嚼片参比制剂进行溶出曲线对比，对本法制得的孟鲁司特钠口腔崩解片进行初步质量评价。

1 材料

1.1 仪器

XS204 型电子分析天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）；HH-ZK2 智能数显多功能油水浴锅（郑州豫华仪器制造有限公司）；RO 10 磁力搅拌器（德国 IKA 公司）；Seven Compact S210 型 pH 计（瑞士 Mettler Toledo 公司）；BME-100LX 高剪切混合乳化机（上海威宇机电有限公司）；片剂硬度仪（美国 Logan）；LYOBETA MINI 2P 型冻干机（西班牙 Telstar 公司）；HX204 型卤素水分测试仪（瑞士 Mettler Toledo 公司）；Distek 2500 型系列智能溶出仪（美国 Distek 公司）；UltiMate 3000 型高效液相色谱仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）。

1.2 试药

孟鲁司特钠对照品（美国 USP 标准品，含量：100.0%，批号：G0L231）；孟鲁司特钠咀嚼片（参比制剂，MSD Merck 公司，规格：4 mg，批号：H006461）；孟鲁司特钠原料药（山东新时代药业有限公司，含量：99.0%，批号：RS-190501）；甘露醇（美国 Merck KGaA 公司）；明胶（美国 NutraSweet）；麦芽糖糊精（江苏维多股份有限公司）；交联聚维酮（国药集团化学试剂有限公司）；阿斯帕坦（湖北信康医药化工有限公司）；薄荷香精（上海昌为医药辅料技术有限公司）；三氟乙酸（北京化学试剂公司）；乙腈（德国 Fisher Scientific 公司）；水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 孟鲁司特钠口腔崩解片的初步制备方法

通过参考其他市售冻干崩解片的处方，初步确定孟鲁司特钠片所需辅料种类，包括赋形剂甘露醇、黏合剂明胶、崩解剂交联聚维酮（PVPP）、矫味剂阿司帕坦及少量薄荷香精，采用冷冻干燥技术进行制备，试制工艺如下：① 将 8 mg 的明胶置于 50 mL 烧杯中，加入适量纯化水，经 60 ℃水浴加热溶解后备用；② 称取孟鲁司特钠原料药 10 mg、甘露醇 15 mg、交联聚维酮 3 mg，置于 100 mL 剪切杯中使之混合均匀，加少量纯化水搅拌使其全部溶解；③ 将①加入到②中，搅拌均匀，采用高剪切混合乳化机进行乳化（3000 r • min $^{-1}$，5 min），用纯化水定容至 40 g，搅拌均匀，再进行第二次剪切（3000 r • min $^{-1}$，5 min）；④ 将上述药液转移至 250 mL 脱气瓶内，于常温下磁力搅拌，并进行抽真空脱气至无气泡；⑤ 用移液枪将药液注入泡罩中，每片 400 μL，－ 60 ℃预冻 5 min，最后经真空干燥，分装，得孟鲁司特钠口腔崩解片共 100 片[7]。

2.2 孟鲁司特钠口腔崩解片的评价指标

2.2.1 外观性状 观察其外观是否平整饱满，色泽是否均一。取出片剂，观察铝窝上是否有药品黏壁。

2.2.2 崩解时限 参照《中国药典》2020 年版四部建立本研究崩解时限测定方法，取自研孟鲁司特钠口腔崩解片，置两端开口且一端包封的 26 目筛网（孔径约 688 μm）的玻璃管（直径 1.5 cm、长 10 cm）中，将玻璃管固定，其下放一容器接收废液，用刻度滴管量取 37 ℃水 1 mL，在距筛网高度 5 cm 处，于 30 s 内匀速滴加于片面上，滴加同时计时，观察崩解情况，1 min 内应崩解完全，另量取 37 ℃水 1 mL 冲洗，应全部通过筛网。每个处方测定 6 片，记录崩解时间并计算平均值[8]。

2.2.3 硬度 用片剂硬度测定仪测定自研片的硬度。

2.2.4 口感 选 3 名志愿者进行评价，温水漱口，将自研片置于舌上，待药片完全崩解后漱口，记录志愿者的口感评价。

2.2.5 水分测定 取孟鲁司特钠口腔崩解片，按《中国药典》2020 年版四部通则 0832 水分测定法第一法 Karl Fischer 法进行测定，平均含水量不得超过 5.0%[9]。

2.2.6 再分散性 取孟鲁司特钠口腔崩解片 1 片，置纯化水中，振摇观察溶液状态。

2.3 孟鲁司特钠口腔崩解片辅料筛选

在预实验中发现孟鲁司特钠冷冻干燥过程中会形成塌陷，其可能原因为孟鲁司特钠水溶性较好，冷冻过程中形成低共熔混合物，在处方中加入冻干保护剂可有效解决上述问题，现对处方中冻干保护剂、黏合剂种类，矫味剂的用量进行筛选[10]。

2.3.1 冻干保护剂的筛选 冻干保护剂可使药物有效成分在冻干过程及冻干结束后储运阶段保护冻干片的药效。本实验从常用的乳糖、葡萄糖和麦芽糖糊精中筛选出合适的冻干保护剂，并设置不加冻干保护剂制备的冻干片作空白对照。固定单片中主药孟鲁司特钠用量为 10 mg，并添加

30% 的甘露醇、5% 明胶和 25% 交联聚维酮，改变冻干保护剂的种类及用量，结果见表 1。

表 1 冻干保护剂的筛选

Tab 1 Screening of freeze-dried protective agents

类型	外观	崩解时限 /s	硬度 /N
空白	部分塌陷，白色疏松饼状物	15	15.9
乳糖	外观平整饱满，表面有裂纹，白色疏松饼状物	13	14.5
葡萄糖	表层有些许裂纹及脱落，白色疏松饼状物	12	12.6
麦芽糖糊精	外观平整饱满，白色疏松饼状物	18	16.7

由实验结果可知，空白对照组塌陷不成型，加入 5% 冻干保护剂可改善片型，考察的 3 种冻干保护剂中，麦芽糖糊精明显优于其他两种，其对片型的改善最为明显，且在符合崩解时限小于 30 s 要求的同时，对冻干片的机械强度有了更大的加强作用。故本实验选择麦芽糖糊精为冻干保护剂，辅助赋形剂甘露醇调节孟鲁司特钠冻干口崩片的成型。

2.3.2 基质 / 黏合剂的筛选 拟考察明胶、黄原胶、阿拉伯胶 3 种常用的黏合剂，将上述黏合剂分别在水中溶胀溶解（其中明胶需要在 60 ℃水中加热使其完全溶解）后将溶液稀释至 50 mL，分置于容积为 0.5 mL 的模具中，按照“2.1”项下方法制备孟鲁司特钠冻干片，结果见表 2。

表 2 黏合剂的筛选

Tab 2 Screening of adhesives

类型	外观	崩解时限 /s	硬度 /N
明胶	外观平整饱满，白色疏松饼状物	13	16.1
黄原胶	外观平整饱满，白色疏松饼状物	20	19.4
阿拉伯胶	部分有裂纹，微黄色疏松饼状物	12	17.3

因后续需要对黏合剂的用量进行进一步确定，故使用黄原胶有崩解时限超限的可能；使用阿拉伯胶制成的冻干片片型和色泽都略次于明胶，阿拉伯胶还有导致过敏反应的风险，相比较而言，明胶是由动物的胶原蛋白水解制得，易于吸收的同时安全性高。故本实验选择明胶作为黏合剂，其所需浓度在后续过程中进一步研究。

2.3.3 阿司帕坦用量考察 用矫味剂和芳香剂来改善冻干口腔崩解片的口感是一种简单易行的手段。本研究采用在冻干制剂中应用最广泛的矫味剂阿司帕坦和芳香剂薄荷香精来改善冻干口腔崩解片的口感，此种方法经验证安全性较高，且阿斯帕坦甜度约为蔗糖的 180 倍，无需大量添加便可掩盖药物的不良气味，对药物的其他性质影响较小。本实验固定单片中主药孟鲁司特钠用量为 10 mg，并添加 30% 的甘露醇、5% 麦芽糖糊精、5% 明胶和 25% 交联聚维酮，对阿斯帕坦的用量进行考察，结果见表 3。

表 3 阿司帕坦用量考察

Tab 3 Aspartame dosage

用量 /%	外观	崩解时限 /s	口感
1.5	外观平整饱满，白色疏松饼状物	13	微苦，有异味，无砂砾感
2.0	外观平整饱满，白色疏松饼状物	14	微苦，无砂砾感
2.5	外观平整饱满，白色疏松饼状物	15	无苦味，无异味，无砂砾感
3.0	外观平整饱满，白色疏松饼状物	15	无苦味，无异味，无砂砾感

由结果可知，阿司帕坦用量增加药物苦味逐渐被掩盖，达到 2.5% 以上时已经察觉不到苦味，但是阿司帕坦的代谢物苯丙氨酸会对中枢神经系统造成一定损害，因此，选择自研片中阿司帕坦的用量为 2.5%，即单片中阿司帕坦的添加量为 1 mg。

2.4 Box-Behnken 效应面法优化处方

按照“2.1”项下方法制备孟鲁司特钠口腔崩解片。由预实验结果可知，孟鲁司特钠自研药在水中溶解迅速，口服生物利用度达 60% 左右 [10]，但其机械强度太小，无法满足片型及硬度的要求，为制得片型良好且崩解时限符合要求的孟鲁司特钠口腔崩解片，对主要处方因素即赋形剂甘露醇、冻干保护剂麦芽糖糊精、崩解剂 PVPP 和黏合剂明胶的用量进行考察。

设置甘露醇和麦芽糖糊精的质量比（A）、PVPP 用量（B）和明胶用量（C）为考察因素，每因素设三水平，因素水平见表 4，以自研片的崩解时限（Y_1）和硬度（Y_2）为评价指标，同时设置 Y_1 最大限度为 30 s，取最小值；设置 Y_2 范围为 15 ～ 20 N，在此范围内取最大值，并且让两个指标产生交互，最后用 Design-Expert 8.06 软件对结果进行多元回归分析从而获得实验最优值和相应的实验条件。响应面图见图 1，各因素对自研片崩解时限和硬度的影响结果见表 5。

表 4 Box-Behnken 设计因素水平表

Tab 4 Factor and level for Box-Behnken design

因素	水平		
	－1	0	1
A	2∶1	3∶1	4∶1
B/%	5	7.5	10
C/%	20	30	40

表 5　各因素对自研片崩解时限的影响

Tab 5　Effect of various factors on dissolution

序号	A	B	C	Y_1/s	Y_2/N
1	－1	－1	0	18.8	23.5
2	0	0	0	7.1	12.8
3	0	0	0	7.8	12.5
4	0	0	0	6.8	10.6
5	0	0	0	8.2	10.1
6	0	1	1	17.8	15.9
7	1	1	0	20.1	25.3
8	1	0	1	18.6	14.4
9	1	0	－1	12.3	18.7
10	0	－1	1	19.2	21.9
11	0	－1	－1	14.3	16.7
12	0	0	0	6.9	12.8
13	－1	0	1	20.2	21.1
14	－1	1	0	21.8	23.9
15	0	1	－1	15.1	18.9
16	1	－1	0	21.3	22.7
17	－1	0	－1	13.1	16.8

采用多元回归分析得到的回归拟合方程为：

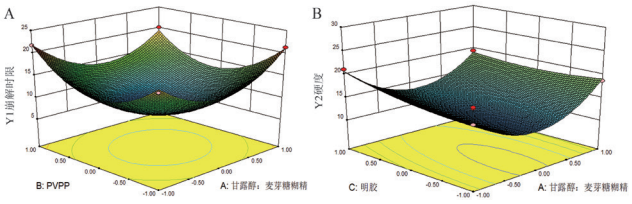


图 1　Y_1 对 AB 的单位响应面图（A）和 Y_2 对 AC 的三维响应面图（B）

Fig 1　Y_1 three-dimensional response surface plots（A）for AB and Y_2 three-dimensional response surface plots（B）for AC

$$Y_1 = 123.25 - 34.22A - 14.45B - 0.95C - 0.42AB - 0.02AC - 0.02BC + 6.29A^2 + 1.10B^2 + 0.02C^2$$

$$Y_2 = 127.75 - 37.07A - 11.97B + 0.45C + 0.22AB - 0.09AC + 0.08BC + 6.37A^2 + 0.92B^2 - 0.03C^2$$

二项式模型拟合的 P 值均小于 0.0001，该方法精密度良好，建立的模型可预测实验结果，能应用于自研片的处方优化筛选。最终获得处方中各辅料用量的最优解见表 6。

表 6　Box-Behnken 效应面法拟合结果

Tab 6　Fitting results by Box-Behnken response surface method

No.	甘露醇:麦芽糖糊精	PVPP/%	明胶 /%	Y_1 崩解时限 /S	Y_2 硬度 /N	满意度	油水交互性
1	3.85	8.84	23.15	12.9005	19.2973	0.544	0.599

以片剂硬度和崩解时限为指标计算得该模拟所得最优处方为：孟鲁司特钠 10 mg、甘露醇 7.41 mg、麦芽糖糊精 4.52 mg、PVPP 3.01 mg、明胶 7.87 mg、阿斯帕坦 1 mg、薄荷香精 0.2 mg。根据上述结果结合其他因素综合考虑，最终确定单片孟鲁司特钠口腔崩解片的处方为：孟鲁司特钠 10 mg、甘露醇 9 mg、麦芽糖糊精 3 mg；PVPP 3 mg、明胶 8 mg、阿斯帕坦 1 mg、薄荷香精 0.2 mg。

2.5　冻干工艺优化

冻干口腔崩解片由于其富有孔隙及可溶性基质故可迅速崩解。冻干工艺对于冻干品的质量具有重要影响，本实验在处方组成确定的基础上对冻干曲线进行考察，结果如表 7 所示。冻干曲线 3 冻干时出现塌陷现象，推测是由于一次干燥温度设置太高，导致产品中途融化，复水性较差。采用冻干曲线 1 和冻干曲线 2 制备的成品较好，且质量上无明显差异。但冻干曲线 1 采用－40 ℃上料，届时板层结霜造成上料困难。综合考虑最终选取冻干曲线 2 作为最后的冻干工艺。

表 7　冻干曲线考察结果

Tab 7　Freeze-drying curve

冻干工艺	外观	崩解时间 /s	水分 /%	硬度 /N
冻干曲线 1：－40 ℃上料，维持 60 min，由－40 ℃升至－5 ℃（120 min）维持 60 min，由－5 ℃升至 30 ℃（60 min）维持 120 min，压力升测试合格出料	色泽均匀，片型平整饱满	12	2.0	19.3
冻干曲线 2:室温上料，全速降温降至－40 ℃（约 50 min）维持 60 min，由－40 ℃升至－5 ℃（120 min）维持 60 min，由－5 ℃升至 30 ℃（60 min）维持 120 min，压力升测试合格出料	色泽均匀，片型平整饱满	10	1.9	20.6
冻干曲线 3：－40 ℃上料，维持 60 min，由－40 ℃升至 10 ℃（120 min）维持 60 min，由 10 ℃升至 30 ℃（60 min）维持 120 min，压力升测试合格出料	白色粉末	19	23.1	－

2.6　处方和工艺验证

按照前期摸索出的处方称取孟鲁司特钠及相应辅料，按照“2.1”项下方法制备孟鲁司特钠口腔崩解片 3 批（批号分别为 201006、201007、201008，每批 100 片），检测孟鲁司特钠口腔崩解片的各项指标，结果见表 8。3 批样品的各项指标均符合要求，验证了该处方及工艺的可行性。

2.7　色谱条件

表 8 验证试验结果

Tab 8 Verification test

批号	外观性状	崩解时限 /s	硬度 /N	口感	水分 /%	再分散性
201006	外观平整饱满，白色疏松饼状物	9.6	19.4	无苦味，无异味，无砂砾感	1.7	呈均匀半透明液体
201007	外观平整饱满，白色疏松饼状物	8.7	18.2	无苦味，无异味，无砂砾感	1.9	呈均匀半透明液体
201008	外观平整饱满，白色疏松饼状物	8.9	17.8	无苦味，无异味，无砂砾感	2.0	呈均匀半透明液体

色谱柱为 Kromasil C_{18} 柱（4.6 mm×50 mm，1.8 μm）；流速 1.2 mL • min $^{-1}$；柱温 25 ℃；检测波长 238 nm；进样量 25 μL，流动相及线性梯度洗脱程序见表 9，记录色谱图 [11]。

表 9 流动相及梯度洗脱条件

Tab 9 Mobile and gradient elution

时间 /min	A.0.15% 三氟乙酸水溶液 /%	B. 0.15% 三氟乙酸乙腈溶液 /%
0	60	40
3	60	40
16	49	51
16.1	60	40
26	60	40

2.8 *溶出度方法学考察*

孟鲁司特钠溶解度属于 BSC Ⅰ类药物，据溶解性实验结果表明，孟鲁司特钠在 0.5%SDS 水溶液中易溶，但在 pH 1.0 ～ 6.8 的水溶液中几乎不溶或不溶 [11]。因此本实验分别配制 0.5%SDS 水溶液、0.1 mol • L $^{-1}$HCl 溶液（浓盐酸 8.5 mL 和 SDS 5 g，加水至 1 L）、pH 4.0 乙酸盐缓冲液（54.4 g 醋酸钠、92 mL 冰醋酸、5 g SDS，加水至 1 L）、pH 6.8 磷酸盐缓冲溶液（磷酸二氢钾 6.8 g、氢氧化钠 0.9 g、SDS 5 g，加水至 1 L），在这 4 种溶出介质中考察自研片和参比制剂的溶出度。由于孟鲁司特钠原料药进口注册标准 JX20100276 项下规定溶出介质为 0.5%SDS，故采用该介质进行方法学验证。

2.8.1 专属性考察 按照处方量制备孟鲁司特钠口崩片空白片，取空白片 1 片，置于 100 mL 量瓶中，加 0.5%SDS 溶解并稀释至刻度，摇匀，作为空白辅料储备液；精密量取 10 mL 置于 100 mL 量瓶，用溶出介质稀释至刻度，即得空白辅料溶液。按照“2.7”项下色谱条件分别对溶出介质、空白辅料溶液和供试品溶液进行测定，结果显示辅料与溶出介质对主成分的测定均无干扰，该方法专属性较好。

2.8.2 线性关系考察 取孟鲁司特钠对照品约 20 mg，精密称定，置 200 mL 量瓶中，加 0.5%SDS 溶解并稀释至刻度，摇匀，作对照品储备液。从对照品储备液中分别量取 2、6、10、12、20 mL 溶液置 100 mL 量瓶中，用溶出介质稀释至刻度，摇匀，制得含孟鲁司特钠 1.998、5.994、9.990、11.988、19.980 μg•mL $^{-1}$ 的对照品溶液，照“2.7”项下色谱条件进样，记录峰面积，以峰面积（A）对质量浓度（C）进行线性回归，得回归方程为：$A = 3.52\times10^{4}C - 3.14\times10^{3}$，$R^2 = 0.9998$，表明孟鲁司特钠在 1.998 ～ 19.98 μg • mL $^{-1}$ 内与峰面积线性关系良好（$n = 6$）。

2.8.3 精密度考察 取“2.8.2”项下质量浓度为 9.990 μg • mL $^{-1}$ 的孟鲁司特钠对照品溶液适量，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，连续进样 6 次，记录对照品峰面积，结果峰面积 $RSD = 0.51\%$，表明仪器精密度良好。

2.8.4 回收试验 取孟鲁司特钠对照品适量，精密称定，以 0.5%SDS 稀释，将其制备成含 80%、100%、120% 样品浓度的溶液各 3 份，并加入处方量等比例的空白辅料，用 0.5%SDS 稀释至刻度，摇匀，过滤。取该药液的续滤液作为供试品溶液，取质量浓度为 9.990 μg • mL $^{-1}$ 的对照品溶液作为对照。按“2.7”项下色谱条件测定，并计算回收率，结果显示低、中、高质量浓度的样品平均回收率分别为 97.68%、99.43%、98.62%，RSD 分别为 0.09%、0.08%、0.11%（$n = 3$）。

2.8.5 滤膜吸附性实验 按照“2.9.1”项下方法，取供试品溶液适量，分成两份，一份用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，分别弃去初滤液 1、2、4、6 mL，取续滤液进样，一份经离心后取上清液进样。结果显示弃去 1、2、4、6 mL 初滤液的过滤样品和离心后的样品相比，主峰面积分别为离心所得上清液的 99.53%、99.46% 和 99.59%，说明滤膜对样品溶液的吸附可忽略不计。

2.9 *溶出度曲线考察*

2.9.1 溶出度测定方法 按照《中国药典》2020 年版四部附录溶出度测定方法第二法桨法，取 12 片样品，分别以“2.8”项下 4 种溶出介质各 900 mL 为溶出介质，转速为 50 r • min $^{-1}$，依法操作 [9]。于 1、3、5、10、15、20、30 min 各取样 10 mL，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液作供试品溶液，并补充相同温度、相同体积的溶出介质。

另取孟鲁司特钠对照品适量精密称定，用溶出介质溶解并稀释至质量浓度约为 10 μg • mL $^{-1}$ 对照品溶液，取上述供试品及对照品溶液各 10 μL，照“2.7”项下色谱条件测定，按外标法计算出每个时间点的溶出量，并绘制孟鲁司特钠的溶出曲线。最后计算自研片在各个时间点的累积释放度。

2.9.2 溶出曲线相似性评价　取自研制剂（201006 批）与参比制剂照“2.9.1”项下方法分别考察自制制剂与参比制剂的溶出度，结果见表 10，绘制这 4 种溶出介质下的溶出曲线结果见图 2。由结果可知，参比制剂与自研制剂在 15 min 内平均溶出度均大于 85%，推定两者溶出行为相似且都属于速释制剂。选择 pH 6.8 磷酸缓冲溶液模拟口腔中性环境，测定 3 批自研制剂在其中的溶出行为，结果见表 11。由结果可知，自研孟鲁司特钠口崩片制剂工艺稳定，批间差异小。

表 10　参比制剂和自研制剂 (201006 批) 在不同介质中的累积溶出度 (n = 12)

Tab 10　Cumulative dissolution of original preparation and self-developed preparation (201006) in different media (n = 12)

溶出介质	样品	累积溶出度 /%							结论
		1 min	3 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	
0.5% 的 SDS	参比制剂	5.8	25.4	51.5	76.1	86.5	91.1	96.7	相似
	自研制剂	11.3	40.6	62.3	81.9	89.6	93.2	98.4	
pH 1.2 盐酸溶液	参比制剂	45.4	69.2	86.3	91.9	95.9	98.4	101.1	相似
	自研制剂	32.5	72.6	90	93.2	95.6	96.5	98.1	
pH 4.5 醋酸缓冲溶液	参比制剂	26.5	45.4	63.1	79.9	90.5	96.9	99.7	相似
	自研制剂	36.6	54.8	66.7	84.8	91.5	95.5	100.8	
pH 6.8 磷酸缓冲溶液	参比制剂	14.6	56.7	76.1	87.8	89.9	91.4	98.3	相似
	自研制剂	28.8	62.6	79.2	91.4	93.3	94.8	95.4	

表 11　3 批自研制剂在 pH 6.8 磷酸缓冲溶液中的累积溶出度 (n = 12)

Tab 11　Cumulative dissolution of 3 batches of self-developed agents in pH 6.8 phosphate buffer solution (n = 12)

批号	累积溶出度 /%						
	1 min	3 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min
201006	36.6	54.8	66.7	84.8	91.5	95.5	100.8
201007	37.7	57.1	65.9	84.1	90.6	94.1	99.9
201008	35.8	56.5	63.1	85.9	91.5	95.8	100.1
RSD/%	2.60	2.13	2.90	1.07	0.57	0.95	0.47

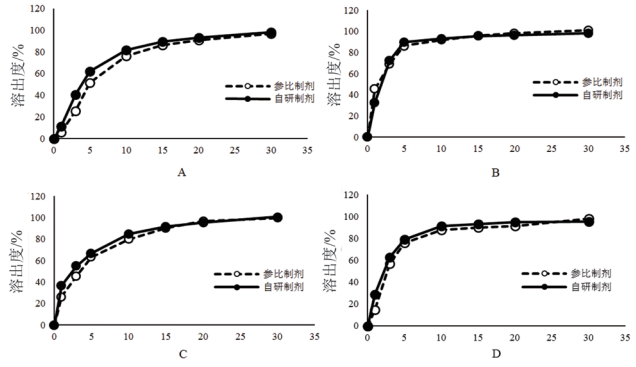


图 2　自研制剂与参比制剂在 4 种溶出介质下的溶出曲线（n = 12）

Fig 2　Dissolution curve of self-made and reference listed drug in the 4 dissolution media（n = 12）

A. 0.5%SDS（0.5%SDS）；B. pH 1.2 盐酸溶液（pH 1.2 hydrochloric acid solution）；C. pH 4.5 醋酸缓冲溶液（pH 4.5 acetic acid buffer solution）；D. pH 6.8 磷酸缓冲溶液（pH 6.8 phosphate buffer solution）

3　讨论

本实验参考了其他市售的冻干口腔崩解片成熟的处方及工艺对孟鲁司特钠片进行开发，甘露醇和麦芽糖糊精都可以作为冻干保护剂，起到冻干赋形的效果，但单用甘露醇药片成形性不好，难以从泡罩中取出，故本实验采用甘露醇:麦芽糖糊精＝3∶1 的配比，甘露醇和麦芽糖糊精作为冻干保护剂性能优越，其口感均较好，微甜无沙砾感，甘露醇有一定的抗氧化活性，麦芽糖糊精还具备一定的黏性，可减少明胶的用量 [12]。根据文献记载，PVPP 作为崩解剂具有很好的水合能力和毛细管活性，遇水迅速溶胀使药片发生崩解，前期实验表明，药片的崩解时间随 PVPP 用量变多，其崩解时间由快变慢，综合考虑药片的口感、崩解时间与机械强度，确定 PVPP 的用量在 8% 左右为宜 [13]。

本研究制备的孟鲁司特钠口腔崩解片在片重和包装形式上参考了日本杏林制药开发的孟鲁司特钠口腔崩解片。一般来说，片剂的崩解时限越小，其机械强度也随之减小，由前期实验可知药片的硬度至少达到 15 N 才能满足该制剂储运方面的需求 [14]。采用单因素分析和 Box-Behnken 效应面法对孟鲁司特钠片处方进行筛选优化，最终制得了质量符合预期的产品。

由溶出实验可知，自研制剂和参比制剂的体外溶出行为相似。后续将对孟鲁司特钠片进行体内药动学研究，并对自研制剂的稳定性和安全性进行考察，验证该处方及工艺的重现性，判断该制剂是否能通过仿制药一致性评价。

参考文献

[1] 刘锋，钟丽球 . 孟鲁司特钠药理作用及临床应用研究 [J]. 临床合理用药杂志，2017，10（12）：83-84.

[2] Liu DX，Li YQ. Montelukast sodium combined with budesonide in the treatment of children with bronchiolitis and its impact on inflammatory factor [J]. J Pediatr Pharm，2017，23（6）：27-30.

[3] Olah I，Lasher J，Regdon G，et al. Evaluating superdisin-tegrants for their performance in orally disintegrating tablets containing lysozyme enzyme [J]. J Drug Deliv Sci Technol，2019，49（2）：396-404.

[4] Yildlz S，Aytekin E，Yavuz B，et al. Development and evaluation of orally disintegrating tablets comprising taste-masked mirtazapine granules [J]. Pharm Dev Technol，2018，23（5）：488-495.
[5] 张芃，杨晓艳 . 盐酸小檗碱微囊口腔崩解片的制备与质量评价 [J]. 中南药学，2015，13（2）：150-154.
[6] 李聘，檀丽萍，吴茜，等 . 冻干型口腔崩解片的研究进展 [J]. 中国药师，2020，23（11）：2253-2257.
[7] 何朝星，何函星，王影，等 . 孟鲁司特钠口腔崩解片的制备及比格犬体内生物等效性研究 [J]. 中国药学杂志，2018，53（13）：1088-1092.
[8] 李聘，郭杏梅，孙腾跃，等 . 奥氮平口腔崩解片的制备与体外溶出评价研究 [J]. 中南药学，2020，18（11）：1831-1837.
[9] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：114.
[10] 顾大业 . 孟鲁司特钠口腔崩解片的制备工艺及质量研究 [D]. 合肥：安徽中医药大学，2015.
[11] 王静，寻明金，朱冬青，等 . HPLC 法测定孟鲁司特钠起始物料 1-（巯甲基）环丙基乙酸中的有关物质 [J]. 中南药学，2020，18（4）：647-650.
[12] 朱强，邓蓝进，陈永建，等 . 盐酸多奈哌齐口崩片的溶出曲线相似性研究 [J]. 中南药学，2015，13（5）：487-489.
[13] 蔡双霜，黄华 . 辛伐他汀口腔崩解片崩解评价方法的考察 [J]. 重庆医科大学学报，2009，34（10）：1394-1396.
[14] 王金 . 吲达帕胺冻干口腔崩解片的研制 [D]. 石家庄：河北医科大学，2008.

（收稿日期：2021-01-09；修回日期：2021-03-08）

基于钙敏感受体分子表达水平探讨大鼠脂肪组织胰岛素抵抗发病机制

阚玉娜[1]，谢佳明[1]，简白羽[2]，马立威[2]，陈哲[2]，王文豹[2]，刘吉成[2*]（1. 黑龙江中医药大学，哈尔滨 150040；2. 齐齐哈尔医学院，黑龙江 齐齐哈尔 161006）

摘要：目的 探讨高脂饮食诱导胰岛素抵抗（IR）发病过程中，钙敏感受体（CaSR）是否经由 PI3K/AKT 信号通路发挥作用。**方法** 将 48 只雄性 Wistar 大鼠随机分为模型组和空白组，每组 24 只，模型组大鼠灌胃脂肪乳，空白组灌胃等量生理盐水，分别于 2、4、6、8 周处死 6 只大鼠，检测空腹血糖值（FBG）及空腹胰岛素水平（FINS）；应用免疫组化观察脂肪组织中 CaSR 分布情况；采用实时定量 PCR（RT-q-PCR）和免疫印迹法检测 CaSR 在脂肪组织中的基因、蛋白及磷酸化 AKT 表达水平。**结果** 连续灌胃脂肪乳 2、4、6、8 周后，与空白组比较，8 周模型组大鼠中 FBG 和 FINS 的水平显著上升，6、8 周模型组大鼠胰岛素敏感指数（ISI）显著降低；大鼠脂肪组织 CaSR 基因表达水平均降低，且第 6 周与 8 周时差异具有统计学意义；与 2 周模型组比较，4、6、8 周模型大鼠组织中磷酸化 AKT（T308、S473）与 CaSR 蛋白表达水平均呈降低趋势，且在 8 周时差异具有统计学意义。**结论** CaSR 可能经由 PI3K/AKT 信号通路参与高脂饮食诱导大鼠 IR 发展过程，提示 CaSR 可能在 2 型糖尿病的发病机制中发挥重要作用。

关键词：高脂饮食；胰岛素抵抗；钙敏感受体；PI3K/AKT 信号通路
中图分类号：R587，R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1558-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.009

Mechanism of insulin resistance based on calcium-sensitive receptor molecular expression and PI3K/AKT signaling pathway

KAN Yu-na[1], XIE Jia-ming[1], JIAN Bai-yu[2], MA Li-wei[2], CHEN Zhe[2], WANG Wen-bao[2], LIU Ji-cheng[2*] (1. *Heilongjiang University of Chinese Medicine*, *Harbin* 150040; 2. *Qiqihar Medical Institute*, *Qiqihar Heilongjiang* 161006)

Abstract: Objective To determine whether calcium-sensitive receptor (CaSR) is involved in the development of insulin resistance (IR) in rats fed a high-fat diet via PI3K/AKT signaling pathway.

基金项目：黑龙江省中医药管理局科技计划项目（No.ZHY2020-179）。
作者简介：阚玉娜，女，博士研究生，主要从事中西医结合基础方面的研究，E-mail：kanyuna@163.com *通信作者：刘吉成，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药抗肿瘤作用机制方面的研究，E-mail：jicliu@126.com

Methods Totally 48 male Wistar rats were randomly divided into a model group and a control groups (n = 24). The model groups were fed with fat emulsion via gavage. The control group were fed with the same amount of normal saline. Six model rats were sacrificed at 2, 4, 6 and 8 weeks. Fasting blood glucose (FBG) and fasting insulin (FINS) were detected. The distribution of CaSR in the adipose tissues was detected by immunohistochemistry. Real-time quantitative PCR (RT-q-PCR) and Western blot were performed to determine the expression of CaSR gene, CaSR protein and p-AKT protein in the adipose tissues. **Results** After 2, 4, 6 and 8 weeks, compared with the control groups, the levels of FBG and FINS were both significantly increased in the 8 weeks model group, the insulin sensitivity index was decreased in the 6 weeks and 8 weeks model groups, and the expression level of CaSR gene in the adipose tissues were significantly decreased in the 6 weeks and 8 weeks model groups. Compared with the 2 weeks model group, the expression of p-AKT (T308/S473) and CaSR protein in the adipose tissues were significantly decreased in the 8 weeks model group. **Conclusion** CaSR is associated with the development of IR in rats with a high-fat diet via PI3K/AKT signaling pathway, suggesting the role of CaSR in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus.

Key words: high-fat diet; inlulin resistance; calcium-sensitive receptor; PI3K/AKT signaling pathway

糖尿病（DM）是一种常见的代谢性疾病，其特征是血糖水平异常升高，这可能会导致多系统并发症，包括糖尿病性酮症酸中毒，肾衰竭，心血管损害甚至死亡。2015 年，全世界约有 4.15 亿人患有糖尿病，到 2040 年，预计将超过 6.4 亿 [1]，90% 为 2 型糖尿病（T2DM）[2]。胰岛素抵抗（IR）是 T2DM 的主要原因，是指其靶细胞对胰岛素敏感性降低或丧失，导致葡萄糖耐受性降低，动脉高血压，以及葡萄糖和脂质代谢紊乱，最终导致多种并发症，例如非酒精性脂肪肝疾病、心血管疾病和代谢紊乱 [3-4]。因此，改善 IR 已成为治疗 T2DM 的主要策略。IR 是推动 T2DM 发生的重要机制，在生理条件下，胰岛素刺激葡萄糖进入肝脏，骨骼肌和脂肪组织维持葡萄糖稳态，IR 时胰岛素无法激活葡萄糖转运，促进脂质吸收，并抑制脂肪分解。

磷脂酰肌醇 3 激酶 / 蛋白激酶 B（PI3K/AKT）信号通路是胰岛素信号转导的主要途径，主要调节葡萄糖转运、β 细胞存活、胰岛素基因转录等过程，该通路障碍都会导致 IR[5]。胰岛素与胰岛素受体（InsR）结合时，胰岛素受体底物（IRS）酪氨酸磷酸化后被激活，随后激活 PI3K/AKT 信号通路，参与胰岛素的代谢调节 [6]。

钙敏感受体（CaSR）是不可或缺的膜蛋白，属于 G 蛋白偶联受体 C 家族。CaSR 可在脂肪组织中表达 [7]，CaSR 激动剂使 AKT 活性显著增强，其抑制剂可抑制 AKT 活性 [8]。当 CaSR 被激活时，可以使 PI3K/Akt 信号通路激活，提示 CaSR 与 PI3K/Akt 信号通路密切相关 [9]。

1 材料

1.1 实验动物

Wistar 雄性大鼠 48 只，体质量（200±20）g [黑龙江中医药大学动物实验中心，合格证号编号：SCXK（鲁 -2009-0007）]。分笼饲养，房间温度（22±2）℃，相对湿度（50±5）%，空气新鲜，通风良好，按时更换垫料，不限制摄食和饮水。

1.2 试药

胆固醇、果糖、蔗糖和谷氨酸钠（上海惠世生化试剂有限公司）；丙硫氧嘧啶（美国 Sigma 公司）；Tween 80（天津市进丰化工有限公司）；丙二醇（天津市化学试剂六厂）；葡萄糖（天津基准化学试剂有限公司）；75% 乙醇（山东利尔康医疗科技股份有限公司）；苦味酸（西陇化工股份有限公司）；甲醛（天津永晟精细化工有限公司）；二甲苯、无水乙醇、盐酸（北京化工厂）；氨水（西陇科学股份有限公司）；低熔石蜡、高熔石蜡（上海华永石蜡有限公司）；ELISA 试剂盒（南京生物试剂公司）；Trizol Reagen（Invitrogen 公司）；AccuPower RocketScript RT PreMix、AccuPower GreenStar qPCR PreMix 试剂盒（Bioneer 公司）；蛋白裂解液（碧云天生物有限公司）；蛋白预染 Marker（美国 Thermo 公司）；CaSR、β-actin 抗体（美国 Abcam 公司）；AKT、p-AKT（S473）、p-AKT（T308）抗体（美国 CST 公司）。

1.3 仪器

梯度 PCR 仪（Bio-RAD S1000）、Real-time PCR 仪（Bio-RAD CFX96）、电泳仪（Bio-RAD）、半干转膜仪（Bio-RAD）、Bio-RAD 凝胶成像系统（Universal Hood Ⅱ）；微量台式低温离心机（Thermo 有限公司）；紫外分光光度计（日本岛

津有限公司）。

2 方法

2.1 分组与建模

脂肪乳的制备：猪油（20%）、胆固醇（5%）、蔗糖（5%）、果糖（5%）、丙硫氧嘧啶（1%）、谷氨酸钠（1%）、食用盐（6%）、Tween 80（20%）和丙二醇（30%）配成脂肪乳。

雄性 Wistar 大鼠 48 只，随机分为模型组和空白组，每组 24 只，于第 2、4、6、8 周分别处死 6 只。模型组大鼠灌胃脂肪乳（10 mL·kg^{-1}），1 次·d^{-1}，空白组灌胃等量蒸馏水。

2.2 观测指标与标本采集

2.2.1 大鼠一般情况观察 观察大鼠行为表现，测量体质量。

2.2.2 空腹血糖（FBG） 各组大鼠末次灌胃脂肪乳后禁食，不禁水，12 h 后经尾静脉取血，用血糖仪测定大鼠 FBG。

2.2.3 空腹胰岛素（FINS） 将动物麻醉后，腹主动脉取血 4 mL，静置 30 min，4 ℃、3500 r·min^{-1} 离心 15 min 后，取上清液 1 mL，－20 ℃保存，按酶联免疫试剂盒说明书方法进行检测。根据 FBG 和 FINS 的值，计算胰岛素敏感指数（ISI）：ISI ＝ ln[1/（FBG×INS）]。

2.2.4 免疫组化检测脂肪组织 CaSR 表达 将经多聚甲醛固定液浸泡的大鼠脂肪组织标本，切成 2 mm×3 mm×4 mm 大小的组织块，用 0.1 mmol·L^{-1} PBS 漂洗后，使用不同浓度乙醇脱水，包埋，蜡块在室温下自然冷却凝固；修块后用石蜡切片机切片，与标本垂直方向连续切片，厚 5 μm，间断集片，将组织切片粘贴于经过 10% 多聚赖氨酸处理过的载玻片上。贴片，60 ℃烘烤 60 min，在切片组织上滴加按 1∶1000 比例配制的 CaSR 抗体，4 ℃过夜，检测。

2.2.5 实时荧光定量 PCR（RT-q-PCR）检测脂肪组织 CaSR mRNA 的表达量 取冰冻组织在研钵中用液氮研磨成为粉末状小颗粒，并将研磨好的组织转入 l.5 mL 离心管中，全程冰上操作，按照 Trizol 试剂盒提取脂肪组织中总 RNA，按逆转录试剂盒合成 cDNA，引物由哈尔滨赛拓生物有限公司设计合成，按照实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书在荧光定量 PCR 仪上测定。

2.2.6 蛋白印迹法（Western blot）检测脂肪组织 CaSR 蛋白表达水平及蛋白激酶（AKT）活性 取冻存的脂肪组织在研钵中用液氮研磨成粉末状小颗粒，加入蛋白裂解液提取蛋白；电泳分离；将蛋白转移到 PVDF 膜上，封闭 1 h，用 TBST 清洗 3 次，每次 5 min，加入相应的一抗（1∶1000）4 ℃过夜；加入稀释好的二抗（1∶1000），室温轻摇 1 h，TBST 洗膜 3 次（5 min/ 次），采用化学发光显影观察结果。

2.3 统计方法

采用 SPSS 17.0 软件进行数据处理和分析，所有实验数据均以平均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况

空白组大鼠皮毛有光泽，活动敏捷，摄食量及摄水量均无明显变化，体质量增加，差异无统计学意义；模型组大鼠皮毛无光泽，精神萎靡，灵敏性下降，行动缓慢、摄水量及尿量增加，第 6 周和 8 周时，与空白组比较，模型组大鼠体质量增加（$P < 0.05$），见图 1A。

3.2 各组大鼠 FBG、FINS、ISI

由图 1B、C 可见，模型组大鼠 FBG 水平随着灌胃脂肪乳时间增加而增加，其中第 4、6、8 周时，与相应空白组比较，差异具有统计学意义（$P < 0.05$，$P < 0.01$）；FINS 表达水平随着造模时间延长而增加，到第 8 周时，与空白组比较，差异具有统计学意义（$P < 0.01$）；由图 1D 可见，与空白组比较，模型组大鼠 ISI 在第 6 周、第 8 周时与空白组比较差异具有统计学意义（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。

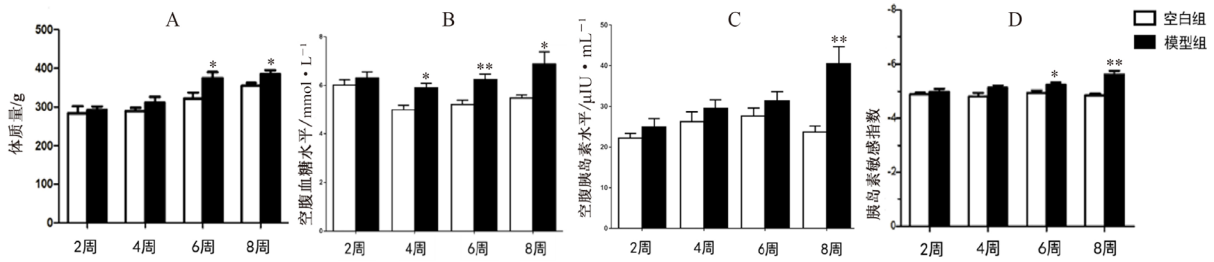


图 1 大鼠体质量（A）、空腹血糖（B）、空腹胰岛素（C）、胰岛素敏感指数（D）的变化

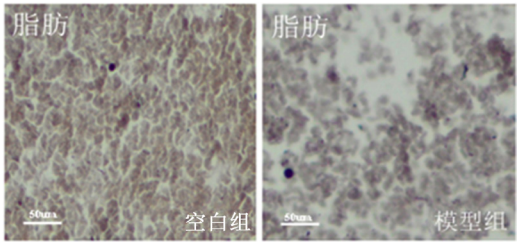
Fig 1 Change of body mass（A）and expression level of fasting blood glucose（B），fasting insulin（C），and insulin sensitivity index（D）in rats

注：与空白组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

Note：Compared with the blank group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$.

3.3 脂肪组织中 CaSR 免疫组化检测

第 2 周时，空白组与模型组大鼠脂肪组织中均可见 CaSR 表达（棕色），与空白组比较，模型组脂肪组织内 CaSR 表达水平下降，见图 2。



A B

图 2 第 2 周时空白组（A）与模型组（B）大鼠脂肪组织中 CaSR 的表达水平

Fig 2 Expression level of CaSR in adipose tissue of the control group（A）and the model group（B）at the second week

3.4 CaSR 在脂肪组织中 mRNA 的表达

如图 3 所示，在脂肪组织中，与空白组比较，模型组 CaSR mRNA 表达水平下调，且随着脂肪乳灌胃时间的增加而呈下降趋势，在第 6 周、第 8 周两组之间差异具有统计学意义（$P < 0.05$）。

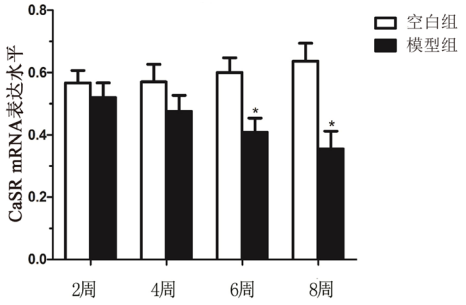


图 3 脂肪组织 CaSR mRNA 的表达

Fig 3 Expression level of CaSR mRNA in adipose tissue

注：与空白组比较，$^{*}P < 0.05$。

Note：Compared with the blank group，$^{*}P < 0.05$.

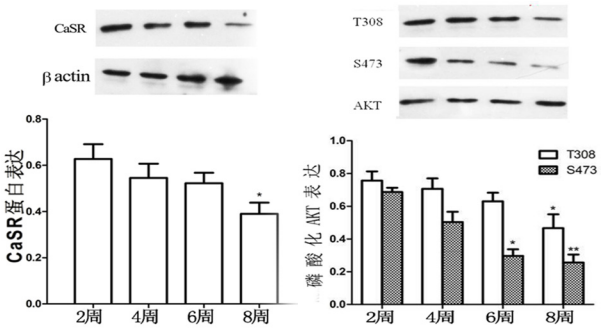
3.5 大鼠脂肪组织中 CaSR 的蛋白表达水平

如图 4A 所示，在脂肪组织中，各模型组 CaSR 蛋白表达随着脂肪乳灌胃时间的增加而呈下降趋势，与第 2 周时比较，第 8 周时 CaSR 蛋白表达显著降低（$P < 0.05$）。

3.6 大鼠脂肪组织中 AKT 活性

如图 4B 所示，在脂肪组织中，各模型组 AKT 活性随着灌胃脂肪乳时间的增加而呈下降趋势，与第 2 周时模型组比较，第 8 周时的磷酸化 AKT（T308）差异具有统计学意义（$P < 0.05$）；与第 2 周时比较，第 6 周、第 8 周的模型组磷酸化 AKT（S473）的差异具有统计学意义（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。

4 讨论



A B

图 4 模型组大鼠脂肪组织 CaSR 蛋白的表达（A）及 AKT 活性（B）

Fig 4 Expression level of CaSR protein（A）and AKT activity（B）in adipose tissue of the model group

注：与第 2 周模型组比较，$^{*}P < 0.05$。

Note：Compared with the model group at the second week，$^{*}P < 0.05$.

本研究为模拟高脂饮食对人类健康的影响，采用分周给予大鼠脂肪乳，与空白组比较，第 8 周时模型组大鼠体质量、FINS、FBG 和 ISI 存在显著差异，提示第 8 周时大鼠产生 IR。

Li 等[10]研究表明，AKT 的活性被 NPS2390（CaSR 抑制剂）抑制，而 $GdCl_3$（CaSR 激动剂）能增强 AKT 活性，同时发现 CaSR 的生理效应与 PI3K/AKT 信号通路密切相关。研究表明，高脂饮食诱导的大鼠肝脏和肌肉中，可能通过抑制 CaSR，降低 PI3K/AKT 信号通路中 AKT 活性，导致 IR[11]。刘笑男等[12]研究表明，CaSR 可在脂肪细胞中表达，$GdCl_3$ 可增加 AKT 活性，当调节 CaSR 分子表达水平时，可增强 AKT 活性，改善 IR。研究提示，IR 时 CaSR 可能参与 PI3K/AKT 信号通路。

IR 是指身体目标器官或组织对胰岛素的敏感性丧失和胰岛素无法促进葡萄糖吸收，脂肪量增加通常会引起胰岛素抵抗，这是与肥胖有关的代谢性疾病（如代谢综合征和 T2DM）的关键因素[13]。CaSR 在人脂肪细胞中激活，可使促炎细胞因子白介素 6（IL-6），趋化因子 C-C 基序配体 2（CCL2），白介素 1β（IL-1β）和肿瘤坏死因子 α（TNF-α）的表达升高[14]。此外，CaSR 活化可刺激脂肪细胞的增殖和促炎性细胞因子表达，促使内脏脂肪生成增加[15-16]。在本研究中，采用免疫组化法检测 IR 大鼠脂肪组织中 CaSR 表达水平显著降低；采用 RT-qPCR 检测到高脂饮食诱导 IR 大鼠的脂肪组织中 CaSR mRNA表达显著降低；Western blot 结果表明，给予脂肪乳 2、4、6、8 周后 CaSR 蛋白表达量显著降低；在高脂饮食诱导大鼠 IR 过程中，CaSR 从基因到蛋白水平均呈现降

低趋势，且与血糖及胰岛素水平呈负相关，推测 CaSR 可能在 IR 发生发展过程中发挥重要作用。

PI3K/AKT 信号通路在细胞生存过程中发挥重要作用，如葡萄糖稳态、脂质代谢、蛋白质合成、细胞增殖和生长等。AKT 主要表达在骨骼肌，脂肪和肝脏等胰岛素敏感组织中[17-18]。AKT 通过两个关键的磷酸化过程激活，磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1（PDK1）将激酶结构域中的苏氨酸 308（T308）磷酸化，启动激活过程，随后通过 mTOR 复合物 2（mTORC2）在羧基末端调节域中的丝氨酸 473（S473）进行磷酸化，完全激活 AKT[19-21]。AKT 还参与细胞周期调节及葡萄糖转运中胰岛素的调节。在高脂饮食喂养第 2、4、6 和 8 周后，模型组中磷酸化 AKT（T308 和 S473）显著降低，提示高脂饮食诱导的 IR 中 PI3K/AKT 信号通路受到抑制。

5 结论

本研究证明了 CaSR 在大鼠脂肪组织中的表达，脂肪乳诱导的 IR 大鼠中，CaSR 分子表达水平被抑制，可能导致 PI3K/AKT 信号通路中 AKT 活性被抑制，提示 CaSR 可能经由 PI3K/AKT 信号通路，参与高脂饮食可诱导大鼠 IR 发展过程。因此，CaSR 可作为 IR 治疗新的靶点，为研究 IR 发生发展的潜在分子机制提供新的方向。

参考文献

[1] Papatheodorou K，Banach M，Bekiari E，et al. Complications of diabetes 2017 [J]. J Diabetes Res，2018，2018：1-4.

[2] DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2（non-insulin dependent）diabetes mellitus：A balanced overview [J]. Diabetologia，1992，35（4）：389-397.

[3] Cornier MA，Dabelea D，Hernandez TL，et al. The metabolic syndrome [J]. Endocr Rev，2008，29（7）：777-822.

[4] Sacerdote A，Dave P，Lokshin V，et al. Type 2 diabetes mellitus，insulin resistance，and vitamin D [J]. Curr Diab Rep，2019，19（10）：101-112.

[5] Saltiel AR. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes [J]. Cell，2001，104（4）：517-529.

[6] 方玲，张琪，魏恩韬，等. 基于 PI3K/Akt 信号通路的中医药改善胰岛素抵抗的研究进展 [J]. 中国医药导报，2018，15（23）：26-29.

[7] Bravo-Sagua R，Pamela M，Ximena D，et al. Calcium sensing receptor as a novel mediator of adipose tissue dysfunction：Mechanisms and potential clinical implications [J]. Front Physiol，2016，7（395）：1-7.

[8] Li HX，Kong FJ，Bai SZ，et al. Involvement of calcium-sensing receptor in oxLDL-induced MMP-2 production in vascular smooth muscle cells via PI3K/Akt pathway [J]. Mol Cell Biochem，2012，362（1-2）：115-122.

[9] Zhao W，Zhang Z，Zheng L，et al. Calcium-sensing receptor activating ERK1/2 and PI3K-Akt pathways to induce the proliferation of osteosarcoma cells [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol，2020，47（3）：517-519.

[10] Li GW，Xing WJ，Bai SZ，et al. The calcium-sensing receptor mediates hypoxia-induced proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells through MEK1/ERK1，2 and PI3K pathways [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol，2011，108（3）：185-193.

[11] Xie J，Jiang Y，Kan Y，et al. Calcium-sensing receptor is involved in the pathogenesis of fat emulsion-induced insulin resistance in rats [J]. Mol Med Rep，2015，12（2）：2043-2048.

[12] 刘笑男，李嘉欣，韩东卫，等. 花旗泽仁抑制 IR-3T3-L1 脂肪细胞的分子机制研究 [J]. 中南药学，2020，18（12）：1957-1961.

[13] Yoshino J，Patterson BW，Klein S. Adipose tissue CTGF expression is associated with adiposity and insulin resistance in humans [J]. Obesity（Silver Spring），2019，27（6）：957-962.

[14] Cifuentes M，Fuentes C，Tobar N，et al. Calcium sensing receptor activation elevates proinflammatory factor expression in human adipose cells and adipose tissue [J]. Mol Cell Endocrinol，2012，361（1-2）：24-30.

[15] Rocha G，Villalobos E，Fuentes C，et al. Preadipocyte proliferation is elevated by calcium sensing receptor activation [J]. Mol Cell Endocrinol，2015，412：251-256.

[16] Villarroel P，Reyes M，Fuentes C，et al. Adipogenic effect of calcium sensing receptor activation [J]. Mol Cell Biochem，2013，384（1-2）：139-145.

[17] Abeyrathna P，Su Y. The critical role of Akt in cardiovascular function [J]. Vascul Pharmacol，2015，74：38-48.

[18] Krycer JR，Sharpe LJ，Luu W，et al. The Akt-SREBP nexus：Cell signaling meets lipid metabolism [J]. Trends Endocrinol Metab，2010，21（5）：268-276.

[19] Zhang J，Yu XH，Yan YG，et al. PI3K/Akt signaling in osteosarcoma [J]. Clin Chim Acta，2015，444：182-192.

[20] Sarbassov DD，Guertin DA，Ali SM，et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex [J]. Science，2005，307（5712）：1098-1101.

[21] Liu P，Gan W，Chin YR，et al. PtdIns（3，4，5）P3-dependent activation of the mTORC2 kinase complex [J]. Cancer Discov，2015，5（11）：1194-1209.

（收稿日期：2020-12-19；修回日期：2021-03-02）

HPLC-Q-TOF-MS/MS 法分析防己茯苓汤的化学成分

刘杨[1, 3]，杨玉佩[3]，沈冰冰[2, 3*]（1. 湖南省药品检验研究院，长沙　410001；2. 湖南省中医药研究院 中药研究所，长沙　410013；3. 湖南中医药大学，长沙　410208）

摘要：目的　运用高效液相色谱 - 四极杆 - 飞行时间串联质谱法（HPLC-Q-TOF-MS/MS）对防己茯苓汤的化学成分进行快速分析与鉴定。**方法**　采用 Agilent Zorbax SB-C_{18}（4.6 mm×250 mm，5 μm）色谱柱，以 0.1% 甲酸水 - 甲醇为流动相，梯度洗脱，进样量 5 μL，流速 1.0 mL·min^{-1}，柱后分流检测，分流比 10∶1，柱温 30 ℃。采用电喷雾离子源，在正负两种模式下进行质谱检测与分析。**结果**　通过分析目标化合物的分子离子峰和二级质谱特征碎片离子，并且结合对照品裂解规律以及相关文献资料，共鉴定了其中 36 个化合物，包括 7 个生物碱类，13 个萜类化合物，11 个黄酮类化合物等。**结论**　运用 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术可快速分析鉴定复方防己茯苓汤的主要化合物类型，对复方的质量控制及药效物质基础的进一步研究具有重要意义。

关键词：防己茯苓汤；高效液相色谱 - 四级杆 - 飞行时间串联质谱法；化学成分
中图分类号：R284　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)08-1563-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.010

Chemical constituents of Fangji Fuling decoction by HPLC-Q-TOF-MS/MS

LIU Yang[1, 3], YANG Yu-pei[3], SHEN Bing-bing[2, 3*] (1. *Hunan Institute for Drug Control*, *Changsha* 410001; 2. *Institute of Chinese Materia Medica*, *Hunan Academy of Chinese Medicine*, *Changsha* 410013; 3. *Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha* 410208)

Abstract: Objective　To rapidly analyze and identify the main chemical constituents of Fangji Fuling decoction by ultra performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry (HPLC-Q-TOF-MS/MS). **Methods**　The analysis was performed on Agilent Zorbax SB-C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with 0.1% formic acid and methanol as the mobile phase in gradient elution. The column temperature was 30 ℃ , the flow rate was 1.0 mL·min^{-1}, the injection volume was 5 μL，and the detection wavelength was 254 nm. The positive and negative electrospray ionization sources were used to determine the chromatographic effluent. **Results**　Totally 36 compounds were identified, including 7 alkaloids, 13 terpenoids and 11 flavonoids etc., by analyzing the molecular ion peaks of the target compound and the characteristic fragment ions of MS/MS, and combining the reference substance fragmentation law and related literature. **Conclusion**　The main chemical components of compound Fangji Fuling decoction can be rapidly analyzed and identified by HPLC-Q-TOF-MS/MS, which is of great significance to the further research of quality control and the material basis of the medicinal effect.

Key words: Fangji Fuling decoction; HPLC-Q-TOF-MS/MS; chemical constituent

防己茯苓汤是由防己、黄芪、桂枝、茯苓和甘草五味中药组成，来源于《金匮要略》中的水气病脉证篇，具有益气健脾、温阳利水之功效。现代临床主要用于治疗由脾心阳虚湿盛所致之水肿、慢性充血性心力衰竭、尿毒症和系统性红斑狼疮等[1-3]；也有在此方基础上进行加减味的复方，用于治疗肾病综合征、乳腺癌、帕金森等疾病[4-5]。但是有关复方防己茯苓汤全成分的化学分析报道

作者简介：刘杨，男，主管药师，主要从事药物质量控制，E-mail：liuyang611@hotmail.com　*通信作者：沈冰冰，男，助理研究员，主要从事中药及制剂质量控制研究，E-mail：shenbingbing24@126.com

较少，因此采用现代中药分析技术手段对其开展化学成分的研究迫在眉睫。其中，HPLC-Q-TOF-MS/MS 具有高分辨、高灵敏度等特点，可快速获得目标物的分子离子峰和特征碎片离子，从而对复方中不同类型的化合物进行定性分析[6-7]。本研究首次采用 HPLC-Q-TOF-MS/MS 对防己茯苓汤的化学成分进行分析与鉴定，以期为复方的质量控制以及药效物质的深入研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1290 infinity 超高效液相色谱仪、Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF-LC-MS/MS 质谱仪（美国安捷伦公司）；Mettler Toledo AL204 型电子天平、Mettler Toledo XPE105 型电子天平（梅特勒 - 托利多仪器有限公司），KM-500DB 型中文液晶台式超声波清洗器（昆山美美超声仪器有限公司）。

1.2 试药

乙腈色谱纯（德国 Merck 公司），甲酸 [色谱纯，阿拉丁试剂（上海）有限公司]，水为纯净水 [华润怡宝饮料（中国）有限公司]，其余试剂均为分析纯。中药材防己、黄芪、桂枝、茯苓和甘草均购自湖南省自然堂中药饮片有限公司，经湖南省中医药研究院中药研究所助理研究员沈冰冰鉴定为防己科植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 的干燥根，豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus*（Fisch.）Bge. var. *mongholicus*（Bge.）Hsiao 的干燥根，樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝，多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos*（Schw.）Wolf 的干燥菌核，豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根。粉防己碱（纯度≥ 99.6%，批号：110711-201810）、防己诺林碱（纯度≥ 98.3%，批号：110793-201807）、去甲异波尔定（纯度≥ 96.9%，批号：111825-201201）、黄芪甲苷（纯度≥ 96.9%，批号：110781-201717）、甘草苷（纯度≥ 93.1%，批号：111610-201607）、毛蕊异黄酮苷（纯度≥ 98.1%，批号：111920-201606）（对照品，中国食品药品检定研究院）。

2 方法

2.1 溶液的配制

2.1.1 供试品溶液的制备 按防己茯苓汤处方比例（30∶30∶30∶40∶20）取防己、黄芪、桂枝、茯苓和甘草五味中药，分别按以下 3 种方法进行制备：方法一加水 600 mL 煎煮 2 h；方法二加 75% 甲醇 600 mL 回流提取 2 h；方法三加 75% 甲醇 600 mL 超声提取（功率：500 W，频率：40 kHz）30 min。分别提取完成后，过滤，减压浓缩至适量，定容至 100 mL。摇匀，过 0.22 μm 微孔滤膜，即可。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称量对照品粉防己碱 5.16 mg，防己诺林碱 5.23 mg，去甲异波尔定 5.05 mg，黄芪甲苷 5.11 mg，甘草苷 5.03 mg，毛蕊异黄酮苷 5.27 mg，75% 甲醇超声溶解，定容至 25 mL 量瓶中。于 4 ℃ 冰箱中避光保存，备用。进样前过微孔滤膜。

2.2 色谱和质谱条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C_{18}（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 A 为 0.1% 甲酸水，B 为甲醇，梯度洗脱（0 ～ 7 min，2%B；7 ～ 25 min，2% ～ 30%B；25 ～ 40 min，30% ～ 35%B；40 ～ 48 min，38%B；48 ～ 60 min，38% ～ 72%B；60 ～ 80 min，72%B；80 ～ 85 min，72% ～ 100%B），进样量 5 μL，流速 1.0 mL • min^{-1}，柱后分流检测，分流比为 10∶1；柱温 30 ℃。

2.2.2 质谱条件 离子化方式电喷雾离子化（ESI），在正、负离子模式分别采集，干燥气温度 320 ℃，干燥气体积流量为 8.0 L • min^{-1}，鞘气温度 350 ℃，毛细管电压 3.5 kV，碎片电压 145 V，碰撞能量分别采用 5、10、20、30、40 eV，质量数范围为 *m/z* 50 ～ 1200。

3 结果与分析

3.1 不同制备方法的对比

对 3 种不同制备方法的样品分别进行 HPLC-Q-TOF-MS 检测分析，得到总离子流图（TIC）如图 1 所示。通过对比分析色谱峰的数目以及制备方法的时间，最终确定采用方法三进行制备。

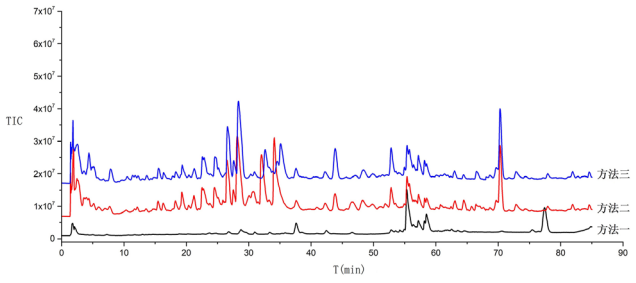


图 1 3 种不同制备方法的 TIC 图

Fig 1 Total ion chromatogram of 3 different preparation methods

3.2 成分鉴定

对方法三得到的防己茯苓汤进一步进行 HPLC-Q-TOF-MS/MS 分析，分别得到正负离子模式下的总离子流图，结果如图 2 所示。结合对

照品裂解规律以及相关文献资料对目标化合物进行分析鉴定，最终确定了 36 个化合物，包括 7 个生物碱类，13 个萜类化合物，11 个黄酮类化合物，见表 1。

3.2.1 生物碱类　所有生物碱类化合物均来自植物粉防己，主要类型有双苄基异喹啉类、原小檗碱类和阿朴啡类生物碱等[9]。研究发现该类化合物只出现在正离子模式下，其中双苄基异喹啉类是头对头双二苯醚双苄基四氢异喹啉类，这类成分的结构特征主要是尾部的二苯醚键

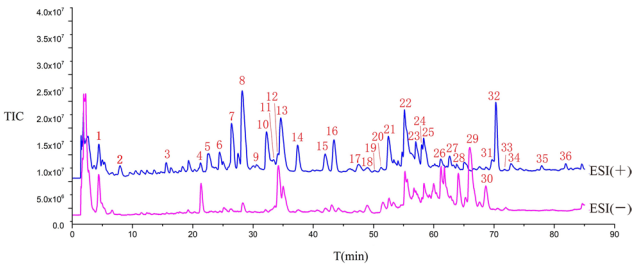


图 2　防己茯苓汤在正负模式下的 TIC 图

Fig 2　Total ion chromatogram of Fangji Fuling decoction in positive ion mode and negative ion mode

表 1　防己茯苓汤的化学成分的 HPLC-Q-TOF-MS/MS 鉴定

Tab 1　Identification of chemical constituents of Fangji Fuling decoction by HPLC-Q-TOF-MS/MS

编号	保留时间 / min	分子离子峰	分子式	碎片离子	误差	化合物名称	来源	参考文献
1	4.429	215.0177 [M ＋ Na]$^+$	$C_6H_8O_7$	175[M ＋ H-H_2O]$^+$	4.19	枸橼酸	甘草	[8]
2	7.881	365.1085[M ＋ Na]$^+$	$C_{12}H_{22}O_{11}$	203[M ＋ Na-Glc]$^+$	6.84	蔗糖	黄芪	[8]
				185[M ＋ Na-Glc-H_2O]$^+$			甘草	
3	12.416	166.0882[M ＋ H]$^+$	$C_9H_{11}NO_2$	120[M ＋ H-COOH]$^+$	8.43	苯丙氨酸	黄芪	[11]
				103[M ＋ H-COOH-NH_3]$^+$				
4	21.303	233.0444[M ＋ Na]$^+$	$C_{10}H_{10}O_5$	215[M ＋ Na-H_2O]$^+$	7.72	对羟基苄基丙二酸	甘草	[12]
				189[M ＋ Na-CO_2]$^+$				
5	24.504	342.1723[M ＋ H]$^+$	$C_{20}H_{23}NO_4$	327[M ＋ H-CH3]$^+$	5.26	异紫堇定碱	防己	[9]
				310[M ＋ H-H_2O]$^+$				
				299[M ＋ H-C_2H_5N]$^+$				
6	25.071	328.1568[M ＋ H]$^+$	$C_{19}H_{21}NO_4$	310[M ＋ H-H_2O]$^+$	5.79	波尔定碱或异波尔定碱	防己	[9]
				285[M ＋ H-C_2H_5N]$^+$				
7	26.422	314.1363[M ＋ H]$^+$	$C_{18}H_{19}NO_4$	296[M ＋ H-H2O]$^+$	－ 9.23	去甲异波尔定	防己	[9]
				285[M ＋ H-C_2H_5N]$^+$				
8	28.173	342.1698[M ＋ H]$^+$	$C_{20}H_{23}NO_4$	327[M ＋ H-CH_3]$^+$	－ 2.05	紫堇定碱	防己	[9]
				310[M ＋ H-H_2O]$^+$				
				299[M ＋ H-CH_3N]$^+$				
9	30.657	607.2801[M ＋ H]$^+$	$C_{37}H_{38}N_2O_6$	576[M ＋ H-CH_5N]$^+$	－ 1.15	表千金藤碱	防己	[10]
				379[M ＋ H-$C_{15}H_{16}O_2$]$^+$ 190，174，160				
10	32.291	609.2961[M ＋ H]$^+$	$C_{37}H_{40}N_2O_6$	578[M ＋ H-CH_5N]$^+$	－ 0.66	防己诺林碱	防己	[10]
				381[M ＋ H-$C_{15}H_{16}O_2$]$^+$ 190，174，160				
11	33.441	441.1152 [M ＋ Na]$^+$	$C_{21}H_{22}O_9$	257[M ＋ H-Glc]$^+$	－ 2.27	甘草苷	甘草	[13]
				163[M ＋ H-Glc-C_6H_6O]$^+$				
				137[M ＋ H-Glc-C_8H_8O]$^+$				
12	34.075	457.1096[M ＋ Na]$^+$	$C_{21}H_{22}O_{10}$	273[M ＋ H-Glc]$^+$	－ 3.28	五羟基 - 甘草苷	甘草	[13]
				153[M ＋ H-Glc-C_8H_8O]$^+$				
13	34.659	623.3088[M ＋ H]$^+$	$C_{38}H_{42}N_2O_6$	592[M ＋ H-CH_5N]$^+$	－ 5.29	粉防己碱	防己	[10]
				395[M ＋ H-$C_{15}H_{16}O_2$]$^+$ 190，174，160				
14	37.460	469.1093[M ＋ Na]$^+$	$C_{22}H_{22}O_{10}$	285 [M ＋ H-Glc]$^+$	3.83	毛蕊异黄酮苷	黄芪	[11]
				255[M ＋ H-Glc-CH_2O]$^+$				
				137[M ＋ H-$C_{15}H_{18}O_7$]$^+$				
15	41.928	441.1148 [M ＋ Na]$^+$	$C_{21}H_{22}O_9$	419[M ＋ H]$^+$	－ 3.14	异甘草苷	甘草	[14]
				257[M ＋ H-Glc]$^+$				
				163[M ＋ H-Glc-C_6H_6O]$^+$				
				109[M ＋ H-Glc-$C_9H_8O_2$]$^+$				
16	43.032	573.1603 [M ＋ Na]$^+$	$C_{26}H_{30}O_{13}$	551[M ＋ H]$^+$	3.31	芹糖异甘草苷	甘草	[14]
				419[M ＋ H-Apiose]$^+$				
				257[M ＋ H-Apios-Glc]$^+$				

续表 1

编号	保留时间 / min	分子离子峰	分子式	碎片离子	误差	化合物名称	来源	参考文献
17	47.531	453.1162[M ＋ Na]$^+$	$C_{22}H_{22}O_9$	269[M ＋ H-Glc]$^+$ 137[M ＋ H-$C_{15}H_{18}O_7$]$^+$	5.29	4'- 甲氧基异黄酮 -7- 葡萄糖苷	黄芪	[17]
18	48.981	501.3192[M ＋ H]$^+$	$C_{30}H_{44}O_6$	483[M ＋ H-H_2O]$^+$ 465[M ＋ H-2H_2O]$^+$ 325[M ＋ H-$C_8H_{16}O_4$]$^+$	－ 4.79	茯苓新酸 E	茯苓	[15]
19	50.232	441.1147[M ＋ Na]$^+$	$C_{21}H_{22}O_9$	257[M ＋ H-Glc]$^+$ 137[M ＋ H-Glc-C_8H_8O]$^+$	－ 3.40	新甘草苷	甘草	[14]
20	51.316	441.1152[M ＋ Na]$^+$	$C_{21}H_{22}O_9$	257[M ＋ H-Glc]$^+$ 163[M ＋ H-Glc-C_6H_6O]$^+$ 137[M ＋ H-Glc-C_8H_8O]$^+$	－ 2.27	新异甘草苷	甘草	[14]
21	52.450	515.3401[M ＋ H]$^+$	$C_{31}H_{46}O_6$	497[M ＋ H-H_2O]$^+$ 479[M ＋ H-2H_2O]$^+$ 325[M ＋ H-$C_9H_{18}O_4$]$^+$	5.43	茯苓新酸 D	茯苓	[15]
22	55.151	485.3224[M ＋ H]$^+$	$C_{30}H_{44}O_5$	467[M ＋ H-H_2O]$^+$ 449[M ＋ H-2H_2O]$^+$ 325[M ＋ H-$C_8H_{16}O_3$]$^+$	－ 8.86	茯苓新酸 B	茯苓	[15]
23	57.035	527.3756[M ＋ H]$^+$	$C_{33}H_{50}O_5$	509[M ＋ H-H_2O]$^+$ 467[M ＋ H-$C_2H_4O_2$]$^+$ 371[M ＋ H-$C_9H_{16}O_2$]$^+$ 293	3.79	去氢茯苓酸	茯苓	[16]
24	58.002	529.3906[M ＋ H]$^+$	$C_{33}H_{52}O_5$	511[M ＋ H-H_2O]$^+$ 469[M ＋ H-$C_2H_4O_2$]$^+$ 373[M ＋ H-$C_9H_{16}O_2$]$^+$ 295	2.46	茯苓酸	茯苓	[16]
25	58.369	469.3649[M ＋ H]$^+$	$C_{31}H_{48}O_3$	451[M ＋ H-H_2O]$^+$ 293	－ 7.03	去氢齿孔酸	茯苓	[16]
26	61.348	171.0429 [M ＋ Na]$^+$	$C_9H_8O_2$	131[M ＋ H-H_2O]$^+$ 103[M ＋ H-H_2O-CO]$^+$	4.09	桂皮酸	桂枝	[13]
27	62.604	257.0793[M ＋ H]$^+$	$C_{15}H_{12}O_4$	163[M ＋ H-C_6H_6O]$^+$ 137[M ＋ H-C_8H_8O]$^+$	－ 8.17	甘草素	甘草	[14]
28	63.788	861.4639[M ＋ Na]$^+$	$C_{44}H_{70}O_{15}$	797[M ＋ H-C_2H_2O]$^+$ 605[M ＋ H-Xyl-$C_4H_4O_2$]$^+$ 437[M ＋ H-2Xyl-$C_4H_4O_2$]$^+$ 125	3.13	astrasieversianin Ⅱ	黄芪	[11]
29	65.055	845.3883[M ＋ Na]$^+$	$C_{42}H_{62}O_{16}$	647[M ＋ H-$C_6H_8O_6$]$^+$ 471[M ＋ H-$C_{12}H_{16}O_{12}$]$^+$ 263，209	－ 6.27	甘草酸	甘草	[14]
30	68.556	807.4488[M ＋ Na]$^+$	$C_{41}H_{68}O_{14}$	623[M ＋ H-Glc]$^+$ 437[M ＋ H-Glc-Xyl-3H_2O]$^+$ 125	－ 2.35	黄芪皂苷 Ⅳ	黄芪	[11]
31	69.574	301.0734[M ＋ H]$^+$	$C_{16}H_{12}O_6$	271[M ＋ H-CH_2O]$^+$ 177[M ＋ H-$C_7H_8O_2$]$^+$	7.30	红车轴草素	黄芪	[17]
32	70.291	307.0590[M ＋ Na]$^+$	$C_{16}H_{12}O_5$	255[M ＋ H-CH_2O]$^+$ 137[M ＋ H-$C_9H_8O_2$]$^+$	2.60	毛蕊异黄酮	黄芪	[11]
33	71.791	849.4589[M ＋ Na]$^+$	$C_{43}H_{70}O_{15}$	785[M ＋ H-C_2H_2O]$^+$ 635[M ＋ H-Xyl-C_2H_2O]$^+$ 437[M ＋ H-Xyl-Glc-C_2H_2O]$^+$ 125	－ 2.71	黄芪皂苷Ⅱ	黄芪	[11]
34	72.925	891.4714[M ＋ Na]$^+$	$C_{45}H_{72}O_{16}$	827[M ＋ H-C_2H_2O]$^+$ 635[M ＋ H-Xyl-$C_4H_4O_2$]$^+$ 437[M ＋ H-Xyl-Glc-$C_4H_4O_2$]$^+$ 125	－ 0.45	黄芪皂苷 Ⅰ	黄芪	[11]
35	77.910	823.4146 [M ＋ H]$^+$	$C_{42}H_{62}O_{16}$	647[M ＋ H-$C_6H_8O_6$]$^+$ 471[M ＋ H-$C_{12}H_{16}O_{12}$]$^+$	3.64	甘草皂苷 K_2 或其异构体	甘草	[13]
36	81.829	825.4380[M ＋ H]$^+$	$C_{42}H_{64}O_{16}$	649[M ＋ H-$C_6H_8O_6$]$^+$ 473[M ＋ H-$C_{12}H_{14}O_{12}$]$^+$ 289	0.85	甘草皂苷 J_2 或其异构体	甘草	[13]

是 C-3" 与 C-4"' 连接，头部是 C-7 与 C-8' 连接，其质谱裂解特点就是双苄基的裂解。化合物 **10** 和 **13** 的分子离子峰分别为 609.2961[M ＋ H]$^+$、623.3088[M ＋ H]$^+$，双苄基的丢失生成特征离子 *m/z* 381 和 *m/z* 395，另外还有 *m/z* 190、*m/z* 174、*m/z* 160 等碎片离子的出现，具体裂解规律如图 3

所示。对比对照品，确定化合物分别为粉防己碱和防己诺林碱。

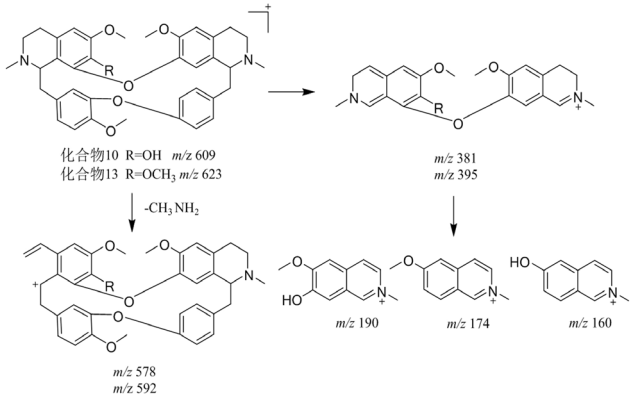


图 3　粉防己碱和防己诺林碱的质谱裂解途径

Fig 3　Fragmentation pathway of tetrandrine and fangchinoline

阿朴啡类生物碱根据 N 上是否有甲基，会产生 M-43 或 M-29 的特征碎片离子峰，并且会出现失去一系列取代基（-OCH_3，-CH_3，-OH）的离子峰。化合物 **5** 和 **8** 的分子离子峰为 342$[M+H]^+$，比较两者二级质谱裂解均出现 299$[M+H\text{-}C_2H_5N]^+$，327，324 和 310 等碎片离子，如图 4 所示。对比文献和保留时间确定化合物 **5** 和 **8** 分别为异紫堇定碱、紫堇定碱 [10]。化合物 **6** 具有和紫堇定碱一致的裂解规律，只是分子离子峰 328.1568$[M+H]^+$相差 14 Da，故确定该化合物为波尔定碱或异波尔定碱。而化合物 **7** 产生了 N 上没有甲基的 M-29 特征碎片离子，对比对照品，确定化合物为去甲异波尔定。

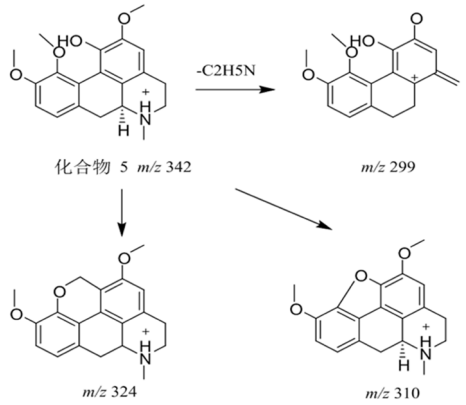


图 4　紫堇定碱的质谱裂解途径

Fig 4　Fragmentation pathway of corydine

3.2.2　三萜类　复方中的三萜主要来源于茯苓、黄芪和甘草。其中，茯苓中的三萜主要是羊毛甾烷型三萜酸，根据 3、4 位是否开环及碳碳双键的位置主要分为四大类 [15]：羊毛甾 -8 烯型（Ⅰ型）、羊毛甾 -7，9（11）- 二烯型（Ⅱ型）、3，4 开环 - 羊毛甾 -8 烯型（Ⅲ型）和 3，4 开环 - 羊毛甾 -7，9（11）- 二烯型（Ⅳ型）。分子离子峰在正负模式下都有较强的响应，主要以 $[M-H]^-$、$[M+H]^+$ 等形式存在。在二级质谱下，其裂解主要是由于 C-3、C-16 和 C-17 位上取代基的断裂引起的，并且 3，4 开环类化合物与 C-1 位相连的键极易断裂。化合物 **24** 在 ESI（＋）模式下响应较高，会丢失碳 3、16、17 位上的取代基，生成相应的碎片离子峰 469$[M+H\text{-}C_2H_4O_2]^+$、511$[M+H\text{-}H_2O]^+$、373$[M+H\text{-}C_9H_{16}O_2]^+$，最终产生 *m/z* 295 的Ⅰ型特征离子；而化合物 **23** 和 **25** 产生的是Ⅱ型特征离子 *m/z* 293，如图 5 所示，对照文献 [16] 确定化合物 **24**、**23** 和 **25** 分别为茯苓酸、去氢茯苓酸和去氢齿孔酸。另外，化合物 **18**，**21** 和 **22** 都属于Ⅳ型，在 ESI（＋）模式下，17 位上的取代基丢失并同时失去一分子 H_2O 得到Ⅳ型特征离子 *m/z* 325，对照文献 [15] 确定分别为茯苓新酸 E、茯苓新酸 D 和茯苓新酸 B。

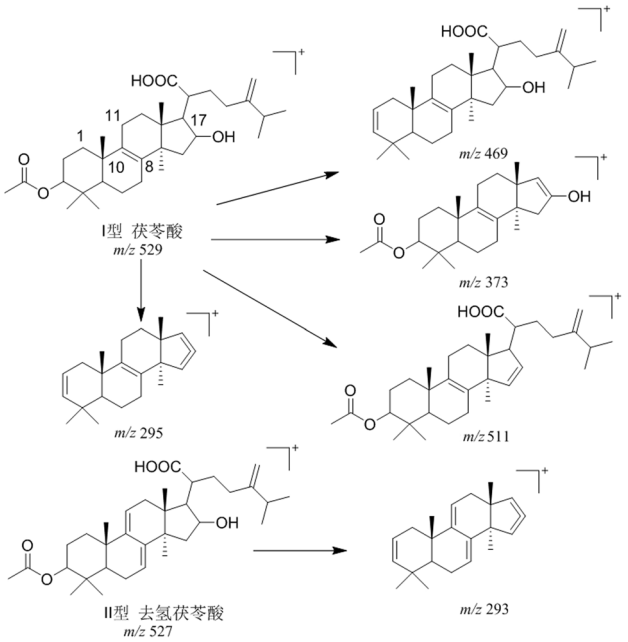


图 5　茯苓Ⅰ型和Ⅱ型三萜的质谱裂解途径

Fig 5　Fragmentation pathway of pachymic acid（type Ⅰ）and dehydropachymic acid（type Ⅱ）

黄芪是一类较特殊的环阿屯烷型三萜皂苷，与羊毛甾烷型的差别在于 C-10 位的甲基和 C-9 位脱氢形成三元环 [18]。化合物 **30** 分子离子峰 807.4488$[M+Na]^+$会连续丢失一分子葡萄糖和一分子木糖，形成环黄芪醇骨架离子 437 $[M+H\text{-Glc-Xyl-}3H_2O]^+$，然后与 17 位相连的 E 环会断裂生成 *m/z* 125 特征碎片离子，这与对照品黄芪甲苷的裂解途径一致。此外，化合物 **28**、**33** 和 **34** 也均产生了 *m/z* 437 和 *m/z* 125，对照参考文献 [11] 和保留时间分别确定为 astrasieversianin Ⅱ、黄芪皂苷 Ⅱ和黄芪皂苷Ⅰ。

甘草中的三萜主要是齐墩果烷型，在 ESI（＋）模式下主要以 $[M + Na]^+$、$[M + H]^+$形式存在。在二级质谱裂解过程中，主要是糖键的连续性断裂以及取代基的丢失。化合物 **29** 的分子离子峰为 845.3883$[M + Na]^+$，在 ESI（＋）模式下会连续失去两分子葡萄糖醛酸生成 647$[M + H\text{-}C_6H_8O_6]^+$ 和 471$[M + H\text{-}C_{12}H_{16}O_{12}]^+$，然后母核的 C 环发生 RDA 裂解，生成 *m/z* 263 和 *m/z* 209 两个特征碎片离子，从而确定化合物为甘草酸。化合物 **35** 和 **36** 的分子离子峰分别为 823.4146 $[M + H]^+$和 825.4380$[M + H]^+$，也会连续失去两个葡萄糖醛酸，得到 *m/z* 471 和 *m/z* 473 的骨架离子，但其具体取代位置无法确定，对照文献 [12] 确定化合物 **35** 和 **36** 为甘草皂苷 K_2 和 J_2 或其异构体。

3.2.3 黄酮类 黄芪中的化合物 **14**、**17**、**31** 和 **32** 都属于异黄酮类化合物。研究发现该类化合物在 ESI（＋）模式下丰度较大，出现 $[M + Na]^+$和 $[M + H]^+$分子离子峰，并且其裂解规律与黄酮类差别不大，主要是 C 环的 RDA 裂解。化合物 **14** 的分子离子峰 469.1093$[M + Na]^+$，失去一分子葡萄糖形成母核 285$[M + H\text{-}Glc]^+$，然后 4' 位的 $-OCH_3$ 容易丢失形成 *m/z* 255，最后发生 RDA 裂解形成 *m/z* 137 的特征碎片例子。其裂解途径与对照品一致，故确定为毛蕊异黄酮苷。

甘草中的黄酮主要包括黄烷酮类、二氢黄酮类、查尔酮类等类型。黄烷酮类化合物主要是 C 环的 RDA 裂解和 B 环的断裂；而二氢黄酮类中 A 环和 B 环间连接的各个键都肯可能会裂解，从而产生相应的碎片离子。化合物 **11** 在 ESI（＋）模式下响应较高，发生 RDA 裂解产生 *m/z* 137 的特征碎片离子峰，另外还出现 257$[M + H\text{-}Glc]^+$，163$[M + H\text{-}Glc\text{-}C_6H_6O]^+$等离子峰，如图 6 所示，通过与甘草苷对照品的裂解途径对比，确定该化合物为甘草苷。化合物 **15**、**19** 和 **20** 是甘草苷的同分异构体。化合物 **15** 的分子离子峰为 441.1148 $[M + Na]^+$，失去一分子葡萄糖 $[M + H\text{-}Glc]^+$后，A 环发生裂解得到二氢黄酮类的特征离子 *m/z* 109，对照文献 [14] 确定化合物为异甘草苷。根据极性大小与保留时间，化合物 **19** 与 **20** 分别确定为新甘草苷和新异甘草苷。化合物 **16** 与异甘草苷的裂解规律一致，仅多了个失去芹糖的离子峰 419$[M + H\text{-}Apiose]^+$，因此确定该化合物为芹糖异甘草苷。

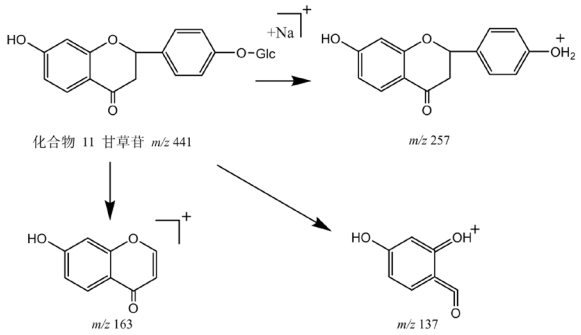


图 6 甘草中甘草苷的质谱裂解途径

Fig 6 Fragmentation pathway of liquiritin

4 讨论

本试验考察了 3 种不同制备方法，最终采用 75% 甲醇超声提取法，并且首次对防己茯苓汤的化学成分进行 HPLC-Q-TOF-MS/MS 快速分析。研究发现各成分在 ESI（＋）模式的响应较强，所以本试验主要针对正模式下的质谱裂解规律进行了分析总结，最终对比对照品以及相关参考文献，共鉴定了 36 个化合物，包括 7 个生物碱类，13 个萜类化合物，11 个黄酮类化合物。其中，来源于防己的有 7 个，茯苓有 6 个，黄芪有 9 个，甘草有 11 个，桂枝有 1 个，且大部分化合物都是各自中药的特征成分。但是来源于桂枝的较少，可能与其主要成分是挥发油有关。另外，质谱解析过程中也存在大量同分异构体，在无对照品的支撑下无法确定，需要其他手段进一步深入研究。本试验运用 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术方法，对复方防己茯苓汤的主要化学成分进行了详细研究，这对复方的质量控制及药效物质基础的进一步研究具有重要意义。

参考文献

[1] 赵婷，梅鲜鲜，王俏，等 .《金匮要略》防己汤类方治疗痹证的探讨及后世发挥 [J]. 浙江中西医结合杂志，2018，6（28）：511-512，515.

[2] 李宏妍 . 防己茯苓汤煎膏剂的制备工艺与质量标准研究 [D]. 哈尔滨：黑龙江中医药大学，2011.

[3] 王妙，陆曙 . 防己茯苓汤对慢性心衰（心气阳虚证）患者干预的临床观察 [J]. 中国中医急症，2015，24（2）：355-357.

[4] 张因彪，陈新日，李静，等 . 加味防己茯苓汤联合空气压力波治疗乳腺癌根治术后上肢水肿的研究 [J]. 四川中医，2018，36（12）：170-172.

[5] 何勇，惠小珊，崔显勋，等 . 张金生教授运用防己茯苓汤加减治疗帕金森病经验 [J]. 中医临床研究，2018，10（36）：5-7.

[6] 邵怡，杨玉佩，李家宇，等 . HPLC-Q-TOF-MS/MS 分析防风芍药汤水煎液的化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（8）：54-59.

[7] 黄小龙，沈冰冰，梁雪娟，等 . HPLC-Q-TOF-MS/MS 快速鉴别吴茱萸中的生物碱类成分 [J]. 中国实验方剂学

杂志，2019，25（19）：102-108.
[8] 陈萌 . 防己黄芪汤的化学成分及其体内代谢研究 [D]. 太原：山西大学，2018.
[9] Hee-Jung S，Ji K，Kang L，et al. Simultaneous determination of structurally diverse compounds in different fangchi species by UHPLC-DAD and UHPLC-ESI-MS/MS [J]. Molecules，2013，18（5）：5235-5250.
[10] Xiao J，Song N，Lu T，et al. Rapid characterization of TCM Qianjinteng by UPLC-QTOF-MS and its application in the evaluation of three species of *Stephania* [J]. J Pharmaceut Biomed，2018，156：284-296.
[11] 于泓，胡青，孙健，等 . 基于超高效液相色谱 - 四极杆 - 飞行时间质谱技术的黄芪注射液中化学成分分析 [J]. 世界中医药，2019，14（4）：40-48.
[12] 张宁，高霞，周宇，等 . UPLC-Q-TOF-MS/MS 快速分析杏贝止咳颗粒化学成分 [J]. 中国中药杂志，2018，43（22）：81-91.
[13] 袁鹏飞，张雯，徐风，等 . 高效液相色谱 / 电喷雾 - 离子阱 - 飞行时间质谱联用法分析桂枝汤的化学成分 [J]. 中国医院用药评价与分析，2018，18（2）：145-151.
[14] 赵艳敏，刘素香，张晨曦，等 . 基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术的甘草化学成分分析 [J]. 中草药，2016，47（12）：2061-2068.
[15] Jin J，Zhou R，Xie J，et al. Insights into triterpene acids in fermented mycelia of Edible Fungus *Poria cocos* by a comparative study [J]. Molecules，2019，24（7）：1331-1341.
[16] 方潇，丁晓萍，陈林霖，等 . 茯苓皮中三萜类化学成分的 HPLC-LTQ-Orbitrap 分析 [J]. 时珍国医国药，2019，30（9）：2117-2121.
[17] 张纲，胡雪娇，姜国志，等 . 液质联用分析黄芪注射液中的有机小分子化学成分 [J]. 中国现代中药，2016，18（4）：410-414.
[18] 董小萍，罗永明 . 天然药物化学 [M]. 北京：中国医药科技出版社，2015.

（收稿日期：2020-12-30；修回日期：2021-03-03）

通痹胶囊通过 NF-κB 信号通路缓解弗氏完全佐剂所致大鼠炎性痛的作用机制

张倩[1]，闫国强[1]，张俊艳[1]，金颖慧[1]，丁洪青[1]，尹忠英[2]，董晶晶[1]，李宝芬[1]，郭煊[1]（1. 河北省沧州中西医结合医院，河北 沧州 061000；2. 沧县医院，河北 沧州 061000）

摘要：目的 探讨通痹胶囊缓解大鼠炎性痛的作用机制。**方法** 以弗氏完全佐剂制备大鼠炎性痛模型，通痹胶囊（375、750、1500 mg·kg^{-1}）灌胃治疗，观察大鼠体质量、爪水肿、机械缩足反射阈值及热缩足反射阈值的变化；采用酶联免疫吸附（ELISA）法检测大鼠脊髓组织中肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）、白细胞介素 -1（IL-1）、白细胞介素 -6（IL-6）的表达水平；蛋白免疫印迹法检测大鼠脊髓组织中 NF-κB/P65、IκBα、IKKβ 的蛋白表达。**结果** 通痹胶囊能够明显升高弗氏完全佐剂所致炎性痛大鼠机械缩足反射阈值及热缩足反射阈值（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）；降低大鼠脊髓组织中 TNF-α、IL-1、IL-6 的表达水平，抑制 NF-κB/P65、IκBα、IKKβ 的蛋白表达（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。**结论** 通痹胶囊具有明显的抗炎镇痛作用，其作用机制可能为抑制 NF-κB 信号通路的激活。

关键词：通痹胶囊；炎性痛；肿瘤坏死因子 -α；白细胞介素 -1；白细胞介素 -6；NF-κB 信号通路
中图分类号：R286 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1569-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.011

Mechanism of Tongbi capsules relieving inflammatory pain induced by Freund's complete adjuvant through NF-κB signaling pathway in rats

ZHANG Qian[1], YAN Guo-qiang[1], ZHANG Jun-yan[1], JIN Ying-hui[1], DING Hong-qing[1], YIN Zhong-ying[2], DONG Jing-jing[1], LI Bao-fen[1], GUO Xuan[1] (1. *Hebei Cangzhou Hosptial of Integrated TCM-WM*, *Cangzhou Hebei* 061000; 2. *Cangxian Hosptial*, *Cangzhou Hebei* 061000)

基金项目：河北省中医药管理局中医药科研计划项目（No.2019273）。
作者简介：张倩，女，硕士，主管中药师，主要从事中药新剂型研究，E-mail：hahaniqian@163.com

Abstract: Objective To determine the mechanism of Tongbi capsules in relieving inflammatory pain in rats. **Methods** The inflammatory pain model of rat was prepared with Freund's complete adjuvant, and the model rats were treated with Tongbi capsules (375, 750, and 1500 mg • kg^{-1}) by gavage. The changes in the weight, paw edema, mechanical withdrawal threshold and thermal withdrawal latency of the rats were observed. The expression levels of tumor necrosis factor-*α* (TNF-*α*), interleukin-1 (IL-1) and interleukin-6 (IL-6) in the spinal cord of rats were detected by ELISA. The expression of NF-*κ*B/P65, I*κ*B*α* and IKK*β* in the spinal cord of rats were detected by Western blot. **Results** Tongbi capsules significantly increased the mechanical withdrawal threshold and thermal withdrawal latency of the inflammatory pain in the model rats ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expression levels of TNF-*α*, IL-1, IL-6 and NF-*κ*B/P65, I*κ*B*α*, IKK*β* were decreased in the spinal cord tissue ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Tongbi capsules have obvious anti-inflammatory and analgesic effect, whose mechanism may be inhibiting the activation of NF-*κ*B signaling pathway.

Key words: Tongbi capsule; inflammatory pain; TNF-*α*; IL-1; IL-6; NF-*κ*B signaling pathway

炎性痛是临床疼痛症状中最重要的类型[1]，它是指生物源或化学源性炎症刺激神经系统所致的疼痛，组织损伤、伤害性刺激等均可导致炎性痛的发生，其在临床上一般表现为炎性因子的释放，局部组织红、肿、热、痛和功能障碍等，并伴有自发性疼痛、痛觉过敏和痛觉超敏等[2-3]。而严重的疼痛或是长期的慢性疼痛，会极大地影响患者的生活质量，造成患者睡眠障碍、情绪低落甚至抑郁等。由于炎性痛发病机制的复杂性，行之有效的治疗手段仍然十分缺乏。与使用广泛的非甾体抗炎药、选择性 COX-2 抑制剂等镇痛药物相比，中药复方具有不良反应少、疗效持久、患者依从性好等诸多优势，在临床上发挥了不可替代的治疗效果。通痹胶囊由秦艽、香附、羌活等 15 味中药组成，能够祛风湿、通经络、止痹痛，临床上用于类风湿关节炎的治疗[4]，其对类风湿关节炎患者的疼痛症状具有明显的改善作用，为进一步阐释通痹胶囊的抗炎镇痛作用，本文拟通过对弗氏完全佐剂诱导的疼痛模型大鼠机械缩足反射阈值及热缩足反射阈值的测定，观察通痹胶囊的止痛效果；通过对炎性因子及相关蛋白的测定，初步探讨通痹胶囊抗炎镇痛的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 雌性大鼠 48 只（河北医科大学实验动物中心），许可证号：SCXK（冀）2013-1-003，体质量（200±20）g，在湿度 50% ～ 60%、（24±2）℃的环境中自由摄食、饮水。

1.2 试药

通痹胶囊（河北省沧州中西医结合医院，批号：180508，规格：0.3 g/ 粒）；雷公藤多苷片（远大医药黄石飞云制药有限公司，批号：20170102，规格：10 mg/ 片）；注射用弗氏完全佐剂（美国 Sigma 公司）；肿瘤坏死因子 -*α*（TNF-*α*）、白细胞介素 -1（IL-1）、白细胞介素 -6（IL-6）酶联免疫吸附试验（ELISA）检测试剂盒（深圳达科为生物技术有限公司）；BCA 蛋白定量试剂盒（北京方程生物科技有限公司）；兔抗鼠 NF-*κ*B/P65、NF-*κ*B 抑制蛋白 *α*（I*κ*B*α*）、I*κ*B 激酶 *β*（IKK*β*）多克隆抗体（美国 Proteintech Group 公司）；山羊抗兔二抗（美国 Biofine 公司）；兔抗鼠 *β*-actin 抗体（美国 Immunoway 公司）。

1.3 仪器

电动组织匀浆器（美国 Fluka 公司）；SZ61TRC-1LST 型解剖镜（日本 fineOlympus 公司）；电泳仪（美国 Bio-Rad 公司）；Von Frey 测痛仪（美国 Stoelting 公司）；PE34 冷热盘测痛仪（美国 IITC 公司）；MultiSkan3 全自动酶标分析仪（美国 Thermo 公司）。

2 方法

2.1 动物模型的制备[5]

大鼠适应性喂养 1 周后，在右后肢足底中部皮下注射 100 μL 的弗氏完全佐剂制备炎性痛模型。

2.2 分组与给药

正常组 8 只，40 只炎性痛模型大鼠随机分为 5 组，即模型组，通痹胶囊低、中、高剂量组与雷公藤多苷片组，造模后第 8 日开始按通痹胶囊低剂量组 [375 mg/（kg • d）]、中剂量组 [750 mg/（kg • d）]、高剂量组 [1500 mg/（kg • d）]（分别相当于临床成人剂量的 2、4、8 倍），雷公藤多

苷片组 [10 mg/（kg・d）] 进行灌胃治疗 4 周，每日 1 次。正常组、模型组给予相同体积生理盐水。

2.3　检测指标与方法

2.3.1　体质量及爪水肿　分别于造模前 1 日和造模后第 7 日、14 日、21 日、28 日和 35 日测量大鼠的体质量，采用游标卡尺测大鼠注射足的掌心和爪后跟的厚度，游标卡尺读数精确到 0.02 mm。

2.3.2　机械缩足反射阈值（mechanical withdrawal threshold，MWT）的测定　造模后第 7 日、14 日、21 日、28 日和 35 日，将环境温度维持在 20 ～ 25 ℃、湿度 46% ～ 52%，大鼠适应环境 15 min 后，将其置于金属网格笼中（20 cm×20 cm×20 cm），采用 Von Frey 纤维毛刺激大鼠右后肢足底中部，记录出现缩足反应时的读数，并参照陈志新等 [6] 的方法计算 50%MWT。

2.3.3　热缩足反射阈值（thermal withdrawal latency，TWT）的测定　造模后第 7 日、14 日、21 日、28 日和 35 日，完成 MWT 的测定后，启动足底热痛仪并将温度调至 55 ℃，待稳定后，将大鼠放入仪器内，记录大鼠出现缩足、舔足等反应的时间。为防止烫伤大鼠，测定时间上限为 30 s，每只大鼠测定 3 次，每次间隔 10 min，取平均值。

2.3.4　大鼠脊髓组织中 TNF-α、IL-1、IL-6 的表达　大鼠以水合氯醛 400 mg・kg^{-1} 腹腔注射麻醉后处死。快速取出脊髓 L_4 ～ L_5 段，混悬于 PBS 中，于 4 ℃ 1000 r・min^{-1} 离心 15 min，ELISA 试剂盒检测炎症疼痛大鼠脊髓背角组织中 TNF-α、IL-1 和 IL-6 等细胞因子的表达。

2.3.5　大鼠脊髓组织中 NF-κB/P65、IκBα、IKKβ 蛋白的表达　大鼠末次给药后完成行为学检测后颈椎脱臼处死，快速取出大鼠 L_4 ～ L_6 脊髓组织，用 RIPA 蛋白抽提试剂进行组织蛋白提取，匀浆器匀浆后于 4 ℃ 1000 r・min^{-1} 离心 15 min，取上清液即为提取的总蛋白，用 BCA 法检测各样本总蛋白浓度，并调整一致。沸水中灭活蛋白 5 min，行 SDS-PAGE，转膜，加 NF-κB/P65、IκBα、IKKβ 一抗，室温孵育 10 min，4 ℃ 过夜，TBST 洗模 3 min×5 次。加 HRP 标记的二抗（均为 1∶10 000），室温封闭 2 h，TBST 洗模 3 min×6 次。ECL 发光试剂盒显色，凝胶成像仪下拍照，分析蛋白表达情况。

2.4　统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理和分析，实验数据以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间用单因素方差分析，组间样本均数比较采用 t 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　对体质量及爪水肿的影响

造模前、后及给药后各组大鼠体质量均无明显差异，见表 1。各组大鼠在造模前，足后跟及掌心厚度无明显差异；造模后，模型组大鼠注射足后跟及掌心厚度明显增加，与正常组相比差异有统计学意义（$P < 0.01$）；经给药治疗 28 d 后，通痹胶囊组及雷公藤多苷片组均能显著降低注射足后跟及掌心厚度（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$），见表 2、3。

表 1　通痹胶囊对炎性痛大鼠体质量的影响（$\bar{x}\pm s$，$n = 8$）

Tab 1　Effect of Tongbi capsule on the body mass of inflammation pain rats（$\bar{x}\pm s$，$n = 8$）

组别	剂量 /[mg/（kg・d）]	造模前 /g	造模后 /g	给药后 /g			
				14 d	21 d	28 d	35 d
正常组	/	198.50±9.89	217.38±11.64	240.63±9.52	268.38±9.41	291.75±10.31	331.88±11.32
模型组	/	199.50±11.19	216.88±10.27	242.00±15.73	261.38±17.20	286.13±15.68	319.25±23.86
通痹胶囊组	375	204.50±12.68	222.00±12.64	246.13±12.28	271.00±11.72	293.75±11.31	330.63±13.31
	750	203.13±12.21	218.25±13.58	243.13±12.64	264.63±11.61	287.75±12.19	329.38±12.76
	1500	208.25±11.32	224.75±8.48	249.50±12.96	272.63±11.89	294.63±13.44	327.63±16.55
雷公藤多苷片组	10	199.50±11.64	221.13±6.81	236.38±13.17	264.75±13.71	298.38±17.17	326.63±17.74

3.2　对 MWT 的影响

与正常组相比，造模后第 7 日，模型组、通痹胶囊各剂量组及雷公藤多苷片组 MWT 明显缩短（$P < 0.01$）；与模型组相比，造模后第 14 日，中、高剂量通痹胶囊组 MWT 相对提高（$P < 0.05$，$P < 0.01$），造模后第 21 日、28 日及 35 日，通痹胶囊各剂量组及雷公藤多苷片组 MWT 均明显提高（$P < 0.01$），见图 1。

3.3　对 TWL 的影响

与正常组相比，造模后第 7 日，模型组、通痹胶囊各剂量组及雷公藤多苷片组 TWL 明显缩短（$P < 0.01$）；与模型组相比，造模后第 14 日、21 日、28 日及 35 日，通痹胶囊各剂量组及雷公藤多苷片组 TWL 均明显提高（$P < 0.01$），见图 2。

表 2　通痹胶囊对炎性痛大鼠注射足后跟厚度的影响 ($\bar{x}\pm s$，$n=8$)

Tab 2　Effect of Tongbi capsule on injection heel thickness in inflammatory pain rats ($\bar{x}\pm s$，$n=8$)

组别	剂量 / [mg/（kg・d）]	造模前 /mm	造模后 /mm	给药后 /mm			
				14 d	21 d	28 d	35 d
正常组	/	4.77±0.14	4.79±0.14	4.78±0.15	4.77±0.14	4.75±0.15	4.76±0.15
模型组	/	4.73±0.14	6.23±0.49$^{▲▲}$	6.21±0.49	6.23±0.45	6.14±0.36	6.08±0.34
通痹胶囊组	375	4.82±0.16	6.25±0.21$^{▲▲}$	6.05±0.27	5.72±0.21*	5.41±0.23**	5.35±0.19**
	750	4.81±0.22	6.26±0.27$^{▲▲}$	6.02±0.22	5.70±0.29*	5.38±0.30**	5.20±0.27**
	1500	4.86±0.13	6.34±0.29$^{▲▲}$	5.72±0.36*	5.25±0.17**	5.03±0.22**	4.97±0.21**
雷公藤多苷片组	10	4.76±0.15	6.17±0.27$^{▲▲}$	6.01±0.27	5.47±0.13**	5.15±0.09**	5.08±0.14**

注：与正常组比较，$^{▲▲}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

Note：*vs* the nomal group，$^{▲▲}P<0.01$；*vs* the model group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$.

表 3　通痹胶囊对炎性痛大鼠注射足掌心厚度的影响 ($\bar{x}\pm s$，$n=8$)

Tab 3　Effect of Tongbi capsule on injection palm thickness in inflammatory pain rats ($\bar{x}\pm s$，$n=8$)

组别	剂量 / [mg/（kg・d）]	造模前 /mm	造模后 /mm	给药后 /mm			
				14 d	21 d	28 d	35 d
正常组	/	3.27±0.13	3.26±0.13	3.27±0.12	3.26±0.11	3.25±0.11	3.24±0.10
模型组	/	3.22±0.13	7.80±0.23$^{▲▲}$	7.97±0.19	7.91±0.19	7.88±0.17	7.83±0.16
通痹胶囊组	375	3.31±0.16	7.99±0.32$^{▲▲}$	7.83±0.32	7.68±0.31	7.55±0.29*	7.59±0.22*
	750	3.34±0.17	7.86±0.38$^{▲▲}$	7.59±0.41*	7.40±0.37**	7.18±0.34**	6.84±0.38**
	1500	3.28±0.08	7.97±0.22$^{▲▲}$	7.63±0.23**	7.07±0.18**	6.81±0.16**	6.52±0.13**
雷公藤多苷片组	10	3.19±0.05	8.05±0.29$^{▲▲}$	7.93±0.28	7.61±0.31*	7.31±0.26**	7.10±0.29**

注：与正常组比较，$^{▲▲}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

Note：*vs* the nomal group，$^{▲▲}P<0.01$；*vs* the model group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$.

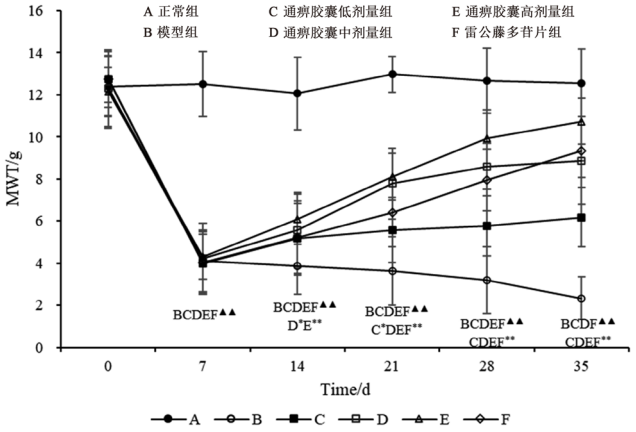


图 1　通痹胶囊对炎性痛大鼠机械缩足反射阈值的影响

Fig 1　Effect of Tongbi capsule on MWT in inflammatory pain rats

注：与正常组比较，$^{▲▲}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

Note：*vs* the nomal group，$^{▲▲}P<0.01$；*vs* the model group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$.

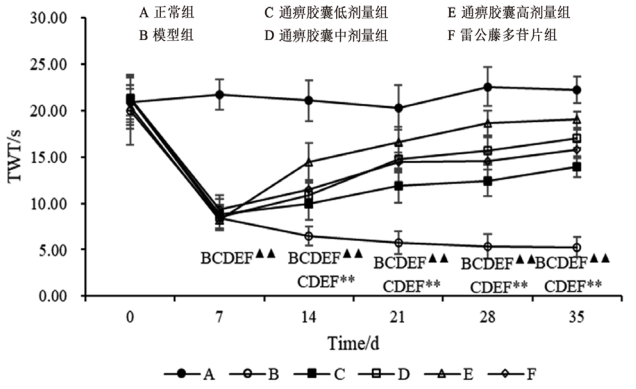


图 2　通痹胶囊对炎性痛大鼠热缩足反射阈值的影响

Fig 2　Effect of Tongbi capsule on TWL in inflammatory pain rats

注：与正常组比较，$^{▲▲}P<0.01$；与模型组比较，$^{**}P<0.01$。

Note：*vs* the nomal group，$^{▲▲}P<0.01$；*vs* the model group，$^{**}P<0.01$.

3.4　ELISA 法检测大鼠脊髓组织中 TNF-α、IL-1、IL-6 的表达水平

由表 4 可知，模型组大鼠脊髓组织中 TNF-α、IL-1、IL-6 的含量较正常组明显升高（$P<0.01$）；与模型组比较，通痹胶囊低剂量组能够降低大鼠脊髓组织中 IL-6 的含量（$P<0.05$）、中剂量组可降低 TNF-α 和 IL-6 的含量（$P<0.01$）、高剂量组及雷公藤多苷片组均可显著降低大鼠脊髓组织中 TNF-α、IL-1 和 IL-6 的含量（$P<0.01$）。

3.5　对大鼠脊髓组织中 NF-κB/P65、IκBα、IKKβ 蛋白表达的影响

由图 3 可知，模型组大鼠脊髓组织中 NF-κB/P65、IκBα、IKKβ 蛋白表达明显高于正常组（$P<0.01$）；与模型组相比，通痹胶囊各剂量组及雷公藤多苷片组治疗后均能明显抑制 NF-κB/P65 及 IκBα 的蛋白表达（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），通痹胶囊中、高剂量组及雷公藤多苷片组均能明显抑制 IKKβ 的蛋白表达（$P<0.01$）。

表 4　通痹胶囊对炎性痛大鼠脊髓组织中 TNF-α、IL-1、IL-6 含量的影响 ($\bar{x}\pm s$，$n=8$)

Tab 4　Effect of Tongbi capsule on the levels of TNF-α，IL-1，and IL-6 in the spinal tissue ($\bar{x}\pm s$，$n=8$)

组别	剂量 /[mg/（kg・d）]	TNF-α/（pg・mL^{-1}）	IL-1/（pg・mL^{-1}）	IL-6/（pg・mL^{-1}）
正常组	/	50.96±2.12	36.24±5.38	43.46±3.57
模型组	/	108.13±4.04$^{▲▲}$	87.80±6.10$^{▲▲}$	97.94±4.47$^{▲▲}$
通痹胶囊组	375	109.99±6.43	86.61±7.11	91.61±4.05*
	750	88.74±7.43**	86.30±6.85	80.67±2.80**
	1500	78.88±2.47**	67.08±3.39**	68.23±3.83**
雷公藤多苷片组	10	72.97±4.84**	68.51±5.01**	82.81±3.43**

注：与正常组比较，$^{▲▲}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

Note：*vs* the nomal group，$^{▲▲}P<0.01$；*vs* the model group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$.

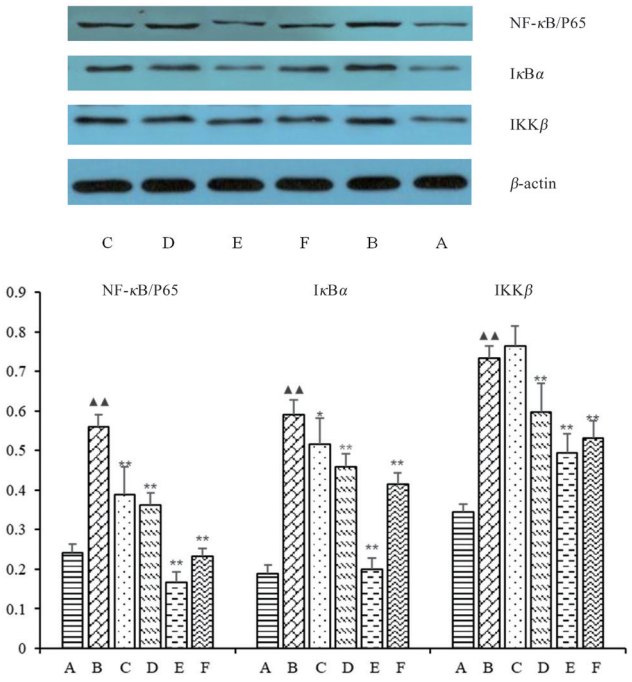


图 3　通痹胶囊对炎性痛大鼠脊髓组织中 NF-κB/P65、IκBα、IKKβ 蛋白表达的影响

Fig 3　Effect of Tongbi capsule on the protein expression of NF-κB/P65，IκBα and IKKβ in the spinal cord tissue in inflammatory pain rats

A. 正常组（the nomal group）；B. 模型组（the model group）；C. 通痹胶囊低剂量组（the low-dose group of Tongbi capsule）；D. 通痹胶囊中剂量组（the medium-dose group of Tongbi capsule）；E. 通痹胶囊高剂量组（the high-dose group of Tongbi capsule）；F. 雷公藤多苷片组（the tripterygium glycosides table group）

注：与正常组比较，$^{▲▲}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

Note：*vs* the nomal group，$^{▲▲}P<0.01$；*vs* the model group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$.

4　讨论

目前，可用于建立炎性痛模型的方式有很多种，有用于急性或亚急性炎症模型建立的福尔马林模型和角叉菜胶模型，用于慢性炎性痛模型建立的弗氏佐剂模型、蜂蜜毒模型以及松节油模型等[7]，其中弗氏佐剂炎性痛模型是目前最常用的经典炎性痛模型[8]。该模型通过在大鼠或小鼠的足底皮下注射弗氏佐剂，使注射部位发生炎症反应，并伴随较长时间的痛觉过敏，从而模拟人持续性或慢性炎性疼痛。本文在大鼠足底皮下注射弗氏完全佐剂后，模型大鼠患足出现红肿现象，并有脓液产生，注射足后跟和掌心厚度明显增加，MWT 和 TWT 均显著降低。给药治疗后，通痹胶囊能够明显改善注射足肿胀现象，提高炎性痛大鼠 MWT、延长其 TWT 潜伏期，提示通痹胶囊对弗氏完全佐剂诱导的慢性炎性痛具有较好的缓解作用。

类风湿关节炎等炎性痛类疾病往往与组织损伤所导致的炎症反应有关[9-10]，因此，控制炎症的发展是减轻炎性疼痛症状的有效措施之一[11-13]。当机体受到损伤发生炎症时，炎症组织释放或合成炎性介质，激活受体，使痛觉感受器兴奋而产生痛觉。NF-κB 作为转录因子，在真核细胞中起到调节核转录的作用，如细胞因子、免疫受体、黏附因子等基因的表达均受 NF-κB 的调节，不仅如此，NF-κB 还在炎症、细胞增殖与分化等多种生理和病理过程中发挥重要作用，是炎症反应的关键信号通路[14]。

激活的 NF-κB 通路能够促进炎性痛的形成[14-16]，在正常的生理状态下，NF-κB 与其抑制蛋白 IκB 结合在一起，核定位序列被覆盖，从而无法以活性的形式存在于胞浆中。一旦细胞受损或在炎症因子 TNF-α、IL-1、IL-6 等刺激下，IκB 的氨基末端高度保守的丝氨酸残基被 IκB 激酶（IKK）激活后，发生磷酸化，并被快速降解，使得 NF-κB 从结合状态变为游离状态，激活后进入细胞核，与 DNA 特定位点结合调节基因的转录[17]。NF-κB 通路的激活，可以诱导 TNF-α、IL-1、IL-6 等细胞因子的生成，而这些炎性因子又同时是 NF-κB 的活化剂，可进一步激活 NF-κB 的活性，促使炎症反应进一步扩大，导致疼痛的不断加重[18-19]。IKKβ/IκBα/NF-κB 信号转导途径

是调控炎性痛发生发展的重要通路，抑制其活性，可有效缓解炎性痛症状。

本研究结果显示，通痹胶囊能够显著降低炎性痛大鼠脊髓组织中炎性因子 TNF-α、IL-1、IL-6 的含量，抑制 IKKβ、IκBα 及 NF-κB 的蛋白表达，其缓解弗氏完全佐剂所致炎性痛的作用机制可能为抑制 NF-κB 信号通路的激活。

参考文献

[1] Natalia RN，Jyothi M，Jordan BK，et al. Cost-effectiveness of treatment options for neuropathic pain：A systematic review [J]. Pharmacoeconomics，2019，37（5）：669-688.

[2] Watanabe S，Iwai T，Tanabe M. Intraplantar injection of sialidase reduces mechanical allodynia during inflammatory pain [J]. J Pharmacol Sci，2017，133（1）：49-52.

[3] Jahangirvand M，Yazdi F，Moradi M，et al. Intra-accumbal orexin-1 receptors are involved in antinociception induced by stimulation of the lateral hypothalamus in the formalin test as an animal model of persistent inflammatory pain [J]. Iran J Pharm Res，2016，15（4）：851-859.

[4] 张倩，金颖慧，张俊艳，等 . 通痹胶囊对佐剂性关节炎大鼠 p38MAPK/NF-κB 信号通路的影响 [J]. 中南药学，2019，17（12）：2039-2043.

[5] 王静，陈泽峰，和春霞，等 . 花青素对完全弗氏佐剂诱导慢性炎性痛的镇痛作用及其机制 [J]. 中国应用生理学杂志，2018，34（5）：476-480.

[6] 陈志新，文先杰，曾因明，等 . 鞘内和侧脑室内注射米贝地尔对慢性坐骨神经松结扎大鼠痛阈的影响 [J]. 中国药理学通报，2006，22（5）：571-575.

[7] 林可可 . 青藤碱对不同炎性痛模型的镇痛作用研究 [D]. 咸宁：湖北科技学院，2020.

[8] Muley MM，Krustev E，McDougall JJ. Preclinical assessment of inflammatory pain [J]. CNS Neurosci Ther，2016，22（2）：88-101.

[9] 李熳，施静，王丽娜，等 . 电针对大鼠足背炎性痛病灶局部 P 物质、IL-1β 免疫反应性的影响 [J]. 针刺研究，2004，29（1）：49-53.

[10] Aquino ABD，Cavalcante-Silva LHA，Matta CBBD，et al. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of aspidosperma tomentosum（Apocynaceae）[J]. Sci World J，2013，https：//doi.org/10.1155/2013/218627.

[11] Manchope MF，Calixto-Campos C，Coelho-Silva L，et al. Naringenin inhibits superoxide anion-induced inflammatory pain：Role of oxidative stress，cytokines，Nrf-2 and the NO-cGMP-PKG-KATP channel signaling pathway [J]. PLoS One，2016，11（4）：e0153015.

[12] Ruiz-Miyazawa KW，Pinho-Ribeiro FA，Zarpelon AC，et al. Vinpocetine reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and neutrophil recruitment in mice by targeting oxidative stress，cytokines and NF-κB [J]. Chem Biol Interact，2015，237（7）：9-17.

[13] Yuri LG，Victor F，Talita PD，et al. Repurposing of the nootropic drug vinpocetine as an analgesic and anti-inflammatory agent：Evidence in a mouse model of superoxide anion-triggered inflammation [J]. Mediators Inflamm，2019，2019：6481812，doi：10.1155/2019/6481812.

[14] 彭蓓 . NF-κB 对炎性痛及其脊髓炎症因子表达的调节 [D]. 长沙：中南大学，2009.

[15] Liu ZF，Miao GS，Wang JN，et al. Resolvin D1 inhibits mechanical hypersensitivity in sciatica by modulating the expression of nuclear factor-κB，phospho-extracellular signal-regulated kinase，and pro-and antiinflammatory cytokines in the spinal cord and dorsal root ganglion [J]. Anesthesiology，2016，124（4）：934-944.

[16] Wang ZC，Li LH，Bian C，et al. Involvement of NF-κB and the $CX3CR_1$ signaling network in mechanical allodynia induced by tetanic sciatic stimulation [J]. Neurosci Bull，2018，34（1）：64-73.

[17] 许森 . G 蛋白偶联受体 MrgprD 促进脂多糖（LPS）诱发炎性痛的作用及机制研究 [D]. 南京：南京师范大学，2018.

[18] 王依慰，刘清珍，陈春龙，等 . 白藜芦醇通过降低 NF-κB p65 乙酰化缓解大鼠神经病理性疼痛 [J]. 中国药理学通报，2016，32（1）：89-93.

[19] Victor F，Felipe AP，Larissa SF，et al. The specialised pro-resolving lipid mediator maresin 1 reduces inflammatory pain with a long-lasting analgesic effect [J]. Br J Pharmacol，2019，176（11）：1728-1744.

（收稿日期：2020-12-04；修回日期：2021-01-14）

盐酸左氧氟沙星缓释片的制备及药物释放影响因素的考察

郑红，宋立倩，房东阳（乐普制药科技有限公司，浙江　台州　318000）

摘要：目的　制备盐酸左氧氟沙星骨架缓释片，考察影响其在体外溶出释放的因素，并探索其在体内的药动学参数。**方法**　利用单因素实验设计，考察影响盐酸左氧氟沙星缓释片在体外溶出释放的因素，以自制缓释片与一级动力学模型的相关系数作为评价指标，采用正交实验设计优化盐酸左氧氟沙星处方。**结果**　羟丙甲基纤维素的种类和用量、乙基纤维素的用量均对药物的体外释放有显著的影响。自制盐酸左氧氟沙星缓释片可以在 12 h 内缓慢释放，自制片的体外释放行为符合一级动力学释放模型。以市售片作为参比制剂，以自制片为受试制剂，比较两种不同片剂在 Beagle 犬体内的药动学参数，结果表明，自制片的 C_{max} 降低，t_{max} 显著延长。**结论**　自制片具有良好的缓释特性和体内药动学特征。

关键词：盐酸左氧氟沙星；缓释片；药动学；体外释放；正交设计

中图分类号：R94　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)08-1575-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.012

Preparation of levofloxacin hydrochloride sustained-release tablets and influence factors of drug release

ZHENG Hong, SONG Li-qian, FANG Dong-yang (*Lepu Pharmaceutical Technology Co., Ltd, Taizhou Zhejiang* 318000)

Abstract: Objective　To prepare levofloxacin hydrochloride sustained-release matrix tablets and determine the factors of drug dissolution in vitro and pharmacokinetic parameters in vivo. **Methods**　The single factor inspection test was used to determine the key factors for the drug release. The correlation coefficient between the self-made sustained-release tablets and the first-order kinetic model was taken as the evaluating index, and orthogonal experiment was designed to optimize the formulation of levofloxacin hydrochloride. **Results**　The type and amount of hydroxypropyl methyl cellulose as well as the amount of ethyl cellulose had significant effect on the drug dissolution in vitro. The release of self-made levofloxacin hydrochloride sustained-release tablets within 12 h conformed to the first-order kinetic model. The commercially available tablets as were used as reference preparation while the self-made tablets as test preparation. The plasma concentration of two tablets in the Beagle dogs was compared. C_{max} of the self-made tablets was lower while the t_{max} was more prolonged than those of the commercial tablets. **Conclusion**　The self-made tablets possess good sustained-release and pharmacokinetic characteristics.

Key words: levofloxacin hydrochloride; sustained-release tablet; pharmacokinetics; in vitro release; orthogonal design

左氧氟沙星（Levo）是第三代氟喹诺酮类抗菌药物，它是氧氟沙星的 *L* 型 - 光学活性异构体，Levo 的抑菌活性是外旋体的 2 倍，是其右旋体的 8 ～ 128 倍 [1]。与氧氟沙星相比，Levo 对需氧的革兰氏阳性球菌抑菌活性更强，对非典型病原体作用更强，且口服后吸收速度快，在全身组织均有分布，具有较高的生物利用度，作用更加长效，用药安全性高 [2]。其作用机制是通过抑制细菌 DNA 旋转酶的活性，阻止细菌 DNA 的合成和复制而导致细菌死亡 [3]。Levo 适用于敏感菌感染，对较深部位的感染疗效更好。在临床上，Levo 主要用于治疗呼吸、泌尿、生殖系统及

作者简介：郑红，女，工程师，主要从事药物制剂研发工作，E-mail：Zzhenghong@163.com

皮肤软组织等轻至重度感染[4]。目前，国内市场上市的 Levo 制剂主要有注射剂、片剂和胶囊剂，暂无市售的缓控释制剂。另外，Levo 是一种浓度依赖性抗菌药物[5]，其对各类细菌的最低抑菌浓度（*MIC*）值均较低[6]，革兰氏阳性菌的 *MIC* 在 0.06 ～ 64 mg • L^{-1}，革兰氏阴性菌的 *MIC* 在 0.05 ～ 16 mg • L^{-1}。

缓释制剂相比普通制剂，可以有效控制药物释放，更长时间维持 Levo 的有效浓度，延长药物与细菌的接触时间，更好的发挥药效；并明显减少每日服药次数，增强患者的顺应性；而普通制剂因不能控制药物释放在释药过程中容易产生较大的血药浓度波动——“峰谷”效应，引起患者的不良反应，严重者甚至可能死亡[7]。因此，将 Levo 制备成缓释片可以使血药浓度更加平稳，增强 Levo 在临床使用中的耐受性、安全性及顺应性。

因此，本实验选择盐酸左氧氟沙星（Levo-HCl）为模型药物，以羟丙甲基纤维素（HPMC）、乙基纤维素（EC）、微晶纤维素（MCC）、乳糖（Lac）为主要辅料，制备 Levo-HCl 缓释片。在临床，根据患者的体质，成人患者的 Levo-HCl 片每日用量在 300 ～ 600 mg，因此本文拟制备剂量为 300 mg 的 Levo-HCl 缓释片。

1 材料

1.1 仪器

FB7015 分析天平（上海舜宇恒平科学仪器有限公司）；TDP 型单冲压片机（上海天翔健台制药机械有限公司）；RC-8DS 型药物溶出度测定仪（天津市国铭医药设备有限公司）；UV-9100 型紫外 - 可见分光光度计（上海元析分析仪器公司）；LC-100 高效液相色谱仪（辉世仪器设备有限公司）。

1.2 试药

环丙沙星对照品（中国食品药品检定研究院，纯度：99%，批号：130451-201904）；盐酸左氧氟沙星原料药（质量分数：99.8%，郑州艾克姆有限公司）；盐酸左氧氟沙星片（广东彼迪药业有限公司同，规格：100 mg/ 片，批号：20180512）；Levo-HCl 缓释片（自制）；HPMC、EC（上海卡乐康公司）；MCC（郑州艾克姆有限公司）；Lac（天津市大茂试剂厂）；硬脂酸镁（天津市大茂试剂厂）。

2 方法

2.1 Levo-HCl 释放度测定

按照《中国药典》2020 年版通则 0931 第一法释放度测定法，取 6 片自制 Levo-HCl 缓释片，溶出温度控制为（37.0±0.5）℃，转速为 50 r • min^{-1}，溶出介质为 900 mL 盐酸溶液。在 0.5、1、2、4、6、8、10、12 h 分别取溶液 5 mL，并即时补充恒温溶出介质 5 mL，用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液稀释适当倍数，利用紫外 - 可见分光光度法，在 294 nm 的波长处测定样品吸光度，计算释放度。

2.2 Levo-HCl 缓释片的制备

按处方量称取 Levo-HCl（过 100 目筛）、HPMC（过 80 目筛）、EC（过 80 目筛）、MCC（过 80 目筛）、Lac（过 80 目筛）并充分混合 30 min，加入黏合剂（60% 乙醇水溶液）适量，制备软材，过 20 目筛，所制成的湿颗粒于 40 ℃烘箱中干燥 2 h，过 20 目筛整粒，再加入硬脂酸镁适量，充分混合 30 min。分别称取 500 mg 混合物料进行压片，得到片剂，调整片剂的硬度在 6 ～ 8 kg，片重为 490 ～ 500 mg。

2.3 单因素考察

2.3.1 不同种类的 HPMC 对药物释放的影响 其他组分不变时，按表 1 中 F1、F2、F3 处方进行称量，考察不同种类的 HPMC（HPMC K4M、HPMC K15M、HPMC K100M）对片剂中药物释放的影响。

2.3.2 不同用量的 HPMC 对药物释放的影响 其他组分不变时，按表 1 中 F1、F4、F5 处方进行称量，考察不同用量的 HPMC（含量分别是 5%、15%、25%）对片剂中药物释放的影响。

2.3.3 不同用量的 EC 对药物释放的影响 其他组分不变时，按表 1 中 F4、F6、F7、F8 处方进行称量，考察不同用量的 EC（含量分别是 0%、5%、10%、15%）对片剂中药物释放的影响。

2.3.4 不同比例的 MCC 与 Lac 对药物释放的影响 其他组分不变时，按表 1 中 F7、F9、F10 处方进行称量，考察不同比例的 MCC 与 Lac（MCC 与 Lac 比例分别是 2∶1、1∶1、1∶2）对片剂中药物释放的影响。

2.4 正交设计法优化处方工艺

在单因素考察的基础上，将影响 Levo-HCl 缓释片释放行为的关键因素，利用正交实验表[8]，以自制缓释片与一级动力学释放行为拟合的相关系数（r^2）（n = 6）作为评价指标，评价处方的优劣。

2.5 最优处方重现性考察

按照最优处方工艺制备 3 批 Levo-HCl 缓释片，对片剂的外观、机械性质分别进行测定；按照

表 1 盐酸左氧氟沙星缓释片处方 (%)

Tab 1 Formulation of levofloxacin hydrochloride sustained-release tablets (%)

处方	Levo-HCl	HPMC K100M	HPMC K15M	HPMC K4M	EC	MCC	Lac
F1	60	25	0	0	5	5	5
F2	60	0	25	0	5	5	5
F3	60	0	0	25	5	5	5
F4	60	15	0	0	5	10	10
F5	60	5	0	0	5	15	15
F6	60	15	0	0	0	12.5	12.5
F7	60	15	0	0	10	7.5	7.5
F8	60	15	0	0	15	5	5
F9	60	15	0	0	10	10	5
F10	60	15	0	0	10	5	10

“2.1”项下方法测定片剂中药物的体外释放度，并将释放度与一级动力学的相关系数作为评价指标，采用相似因子 f_2 法对 3 批自制制剂进行批间相似性评价，以考察处方、工艺的重现性和稳定性。

2.6 Beagle 犬体内药物动力学研究

2.6.1 样品的采集 采用双周期交叉给药的实验方案，将 8 只健康 Beagle 犬作为受试的实验动物。禁食 12 h 后给药，随机分为两组，空腹抽取空白血 4 mL。其中参比制剂为市售普通片，每次给药 3 片（每片 100 mg，以 $C_{18}H_{20}FN_3O_4$ 计）；受试制剂为自制缓释片，每次给药一片（每片 300 mg，以 $C_{18}H_{20}FN_3O_4$ 计），均用 50 mL 温开水送服。服药 4 h 后统一给食并自由饮水，分别于 0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、8、10、12、16、24 h 于前肢静脉取血 3 mL 置肝素抗凝管内，3500 r • min^{-1} 离心 15 min。取上层血浆，将样品放置于－20 ℃冰箱中冷冻保存备用。

2.6.2 血浆样品的处理与测定 用 1.5 mL 离心管精密称取空白血浆 0.45 mL，精密加入质量浓度为 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 μg • mL^{-1} 的 Levo-HCl 溶液（精密称取 Levo-HCl 适量，将样品倒于 100 mL 棕色量瓶中，用 HCl 溶解并稀释至刻度，摇匀，即得）50 μL。加入环丙沙星内标溶液（精密称取环丙沙星对照品约 30 mg，将样品倒于 50 mL 棕色量瓶中，用无水乙醇溶解并稀释到刻度，摇匀即得）50 μL，涡旋混匀后加入 5% 的高氯酸 0.5 mL，涡旋 1 min，离心 2 次，转速为 12 000 r • min^{-1}，每次 10 min，取上清液 20 μL，进样测定，记录样品的色谱图和峰面积[9]。质量浓度 C 为横坐标，主药与内标的峰面积比 S 为纵坐标，线性拟合得回归方程 $S = 0.0586C + 0.0021$，$r^2 = 0.9908$，线性范围为 0.25 ～ 32.0 μg • mL^{-1}。以 $S/N = 10$ 计算，定量限为 40 μg • mL^{-1}。

用 1.5 mL 离心管精密称取含药血浆 0.5 mL，按“2.6.2”项下方法操作，记录样品的色谱图，计算各时间点的血药浓度，并用 DAS 2.0 软件程序计算药动学参数。

3 结果

3.1 HPMC 种类对药物释放的影响

选择不同种类的 HPMC 制备片剂，其累计释放情况见图 1。

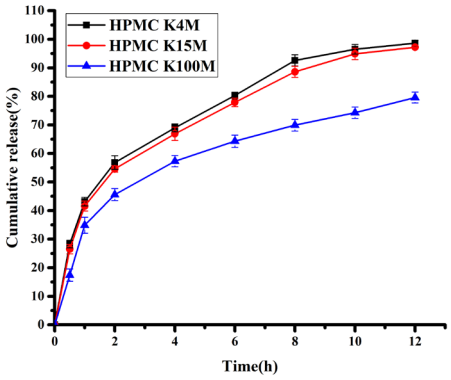


图 1 HPMC 种类对药物释放的影响（$n = 6$）

Fig 1 Effect of types of HPMC on drug release（$n = 6$）

由图 1 可见，不同种类的 HPMC 对药物释放速度的影响十分显著，不同种类的 HPMC 对于片剂的缓释效果排名如下：HPMC K100M ＞ HPMC K15M ＞ HPMC K4M。这是因为不同型号的 HPMC 黏度不同，随着 HPMC 黏度的增大，吸水后形成的凝胶层强度增大，凝胶层的骨架溶蚀速率减慢，药物释放速度明显下降，实验结果与相关文献报道的结果一致[10]。另外，在释放的初期（前 2 h），3 种缓释材料所呈现的释放曲线行为极为相似，推测与药物溶解度较大与没有充足的时间形成凝胶骨架有关。另外，片剂在 2 h 时释放大于 50%，推测产生“突释”现象与药物具有良好的溶解度有关。综合考虑，选择在处方中加入 HPMC K100M 作为缓释材料。

3.2 不同用量的 HPMC K100M 对药物释放的影响

选择不同用量的 HPMC K100M 制备片剂，其累计释放结果见图 2。由图 2 可见，不同用量的 HPMC K100M 对于药物释放速率有明显的影响，HPMC K100M 用量越多，片剂吸水后形成的凝胶层越厚，强度越大，骨架的溶蚀速率越慢，药物释放速度越慢。当 HPMC 含量为 5% 时，药物在 8 h 释放超过 90%，药物释放过快；当

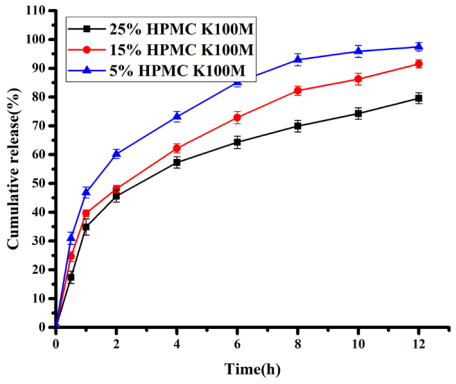


图 2 不同 HPMC K100M 含量对药物释放的影响（n = 6）

Fig 2 Effect of different amounts of HPMC K100M on the drug release（n = 6）

HPMC 含量为 25% 时，药物在 12 h 时释放 80%，药物释放不完全，而且后期释放速度明显下降，药物无法完全释放。综合考虑，选择在处方中加入 15% 的 HPMC K100M。

3.3 不同用量的 EC 对药物的释放的影响

选择不同用量的 EC 制备片剂，其累计释放结果见图 3。由图 3 可知，不同用量的 EC 对于药物释放有显著的影响。EC 在处方中的作用是减少孔道形成。当不加 EC 时，药物释放的最快，随着 EC 的用量增多，由 HPMC K100M 形成的凝胶层的孔道变少，药物的释放减缓。当 EC 含量为 10% 和 15% 时，片剂的溶出曲线相似，证明 EC 超过 10% 时，对于片剂的释放影响极小。综合考虑，在处方中 EC 的含量为 10%。

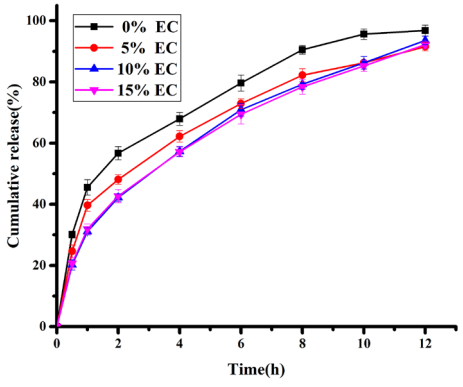


图 3 不同 EC 含量对药物释放的影响（n = 6）

Fig 3 Effect of different amounts of EC on the drug release（n = 6）

3.4 不同比例的 MCC 与 Lac 对药物释放的影响

选择不同比例的 MCC 与 Lac 制备片剂，其累计释放结果见图 4。由图 4 可知，MCC 与 Lac 在处方中起到填充剂的作用，MCC 与 Lac 比例的改变对于片剂的释放影响不大，仅有细微差距。综合考虑，选择填充剂 MCC 与 Lac 的比例为 1∶1。

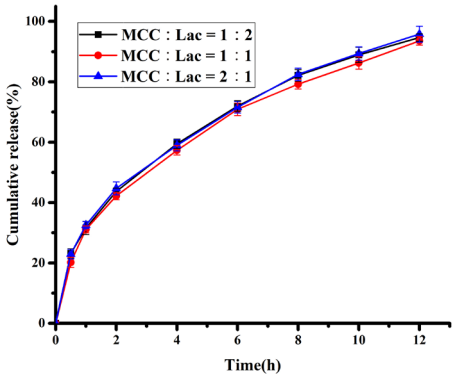


图 4 不同 MCC 与 Lac 比例对药物释放的影响（n = 6）

Fig 4 Effect of different ratio of MCC∶Lac on the drug release（n = 6）

3.5 正交实验结果

根据单因素考察结果，HPMC 种类和用量、EC 用量对释放影响较大。最终选择 HPMC K100M 用量（A）、EC 用量（B）两个关键因素进行正交实验设计，按照正交设计表进行实验（见表 2），进行两因素三水平正交实验，结果见表 3。

表 2 盐酸左氧氟沙星缓释片正交实验因素水平表

Tab 2 Factor and level of orthogonal experimental for levofloxacin hydrochloride sustained-release tablets

水平	因素	
	A. HPMC K100M/%	B. EC/%
1	5	0
2	15	5
3	25	10

表 3 正交实验分析结果（n = 6）

Tab 3 Orthogonal experimental design（n = 6）

编号（No.）	HPMC K100M（A）/%	EC（B）/%	r^2
1	5	0	0.7069
2	5	5	0.8289
3	5	10	0.8763
4	15	0	0.9121
5	15	5	0.9293
6	15	10	0.9751
7	25	0	0.8439
8	25	5	0.7824
9	25	10	0.7110
K_1	2.4121	2.4629	
K_2	2.9065	2.5406	
K_3	2.3373	2.5624	
R	0.4792	0.0995	

通过极差分析结果可知，两种因素对体外药物累计释放的影响大小排序为：A > B，主要是因为 HPMC K100M 是一种水溶性材料并且黏度较大，是缓释片形成凝胶骨架的主要材料，HPMC K100M 的用量直接决定着凝胶层的厚度与

强度，控制药物的释放。而 EC 是一种不溶于水的材料，对于片剂起到调节释放的作用，主要通过控制扩散路径的多少、大小进而改变药物的释放速率，EC 的用量对于药物的释放具有一定的影响。通过直观分析法对实验结果进行处理，得到最优处方组成为 A_2B_3，即 HPMC K100M 的处方用量为 15%，EC 的处方用量为 10%。

3.6　最优处方、工艺重现性考察

基于正交设计实验得到的最优化处方为 Levo-HCl 60%，HPMC K100M 15%，EC 10%，MCC 7.5%，Lac 7.5%。以最优处方为基础，制备 3 批 Levo-HCl 缓释片，所制备的片剂外观光泽，表面规整，机械性能（包括硬度、脆碎度）符合药典规定，片剂的含量差异性较小，符合固体制剂相关要求。

将 3 批自制缓释片进行体外释放度实验，结果见图 5。采用 f_2 相似因子法对 3 批自制制剂进行批间相似性评价，结果见表 4。3 批自制 Levo-HCl 缓释片的体外释放曲线相似性良好，f_2 均大于 50。3 批自制片在 0 ～ 12 h 内药物呈现缓慢释放的趋势，证明所得到的优化处方合理可靠，工艺稳定，重现性良好。

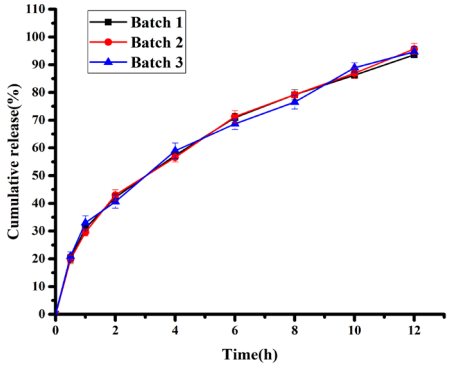


图 5　最优处方 3 批制剂体外释放曲线（n = 6）

Fig 5　Release profile of 3 batches of optimized formulation (n = 6)

表 4　最优处方 3 批制剂体外释放 f_2 (n = 6)

Tab 4　f_2 of 3 batches of optimized formulation (n = 6)

批次因素	相似因子（f_2）
Batch 1 *vs* Batch 2	89.61
Batch 1 *vs* Batch 3	83.10
Batch 2 *vs* Batch 3	77.09

3.7　Levo-HCl 缓释片在 Beagle 犬体内药动学研究

3.7.1　药动学参数及计算　将平均血药浓度（C）对时间（t）作图，结果如图 6 所示；采用 DAS 2.0 药物动力学软件对不同时间点的血药浓度数据进行非隔室模型拟合，计算主要药动学参数，结果如表 5 所示。

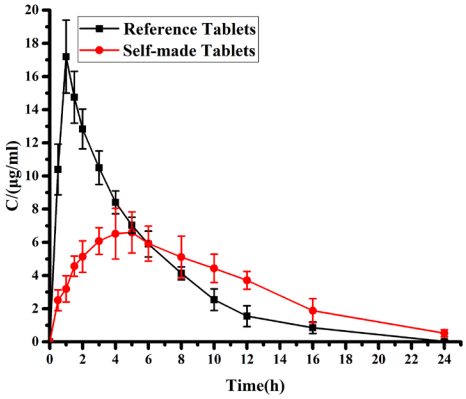


图 6　Levo-HCl 缓释片平均血药浓度 - 时间曲线（n = 8）

Fig 6　Mean plasma concentration-time curve of levofloxacin hydrochloride sustained-release tablet (n = 8)

表 5　Levo-HCl 缓释片主要药动学参数 ($\bar{x}$±s，n = 8)

Tab 5　Main pharmacokinetic parameters of levofloxacin hydrochloride sustained-release tablet ($\bar{x}$±s，n = 8)

制剂	$AUC_{0\to t}$/（mg·h·mL^{-1}）	$AUC_{0\to\infty}$/（mg·h·mL^{-1}）	t_{max}/h	C_{max}/（mg·mL^{-1}）
自制制剂	80.755±5.58	84.627±6.34	5±1.18	6.6±1.95
参比制剂	88.147±7.75	90.856±5.69	1±0.49	17.2±1.28

3.7.2　体内外实验相关性评价　生物利用度是考察药物制剂质量是否合格的重要指标之一，但生物利用度的测定要求较高，常需要在人体内进行实验研究，无法作为一般产品的质量控制手段。而体外释放在很大程度上可以反映药物在体内吸收情况，但需证明其合理性，即体外释放度与生物利用度具有良好的相关性。根据查阅相关文献可知 [11-12]，可以通过拟合处理体外累计释放度与体内吸收分数（F_a）得到两者相关性。

体内吸收分数主要根据给予某种制剂后测定血药浓度 - 时间的数据得到（见表 6），根据 Wagner-Nelson 方程计算，公式如下：

$$F_a = (C_i + K_e AUC_{0\to t}) / K_e AUC_{0\to\infty} \times 100\%$$

其中 C_i 为 t 时间下的血药浓度；K_e 为消除速率常数。

采用表 7 中自制缓释片体外释放百分率（F_r）与 F_a 进行线性回归，可得回归方程为 F_a = 1.1106F + 0.1397（R^2 = 0.9906），结果表明 F 与 F_a 具有良好的相关性，体外释放度可以在一定程度上反映药物在体内的吸收情况。

3.7.3　相对生物利用度计算　以非隔室模型统计结果中的 $AUC_{0\to t}$ 数据，计算与参比制剂同剂量的 Levo-HCl 缓释片的相对生物利用度（F）。

相对生物利用度计算公式如下 [13]：

$$F = [AUC_{0\to t(T)}/D_T]/[AUC_{0\to t(R)}/D_R] \times 100\%$$

其中，T、R 分别代表受试片和参比缓释片。

表 6 盐酸左氧氟沙星缓释制剂的血药浓度 ($\bar{x}\pm s$，$n=8$)

Tab 6 Plasma concentration of levofloxacin hydrochloride sustained-release preparation ($\bar{x}\pm s$，$n=8$)

时间 /h	自制制剂 /（μg·mL^{-1}）	参比制剂 /（μg·mL^{-1}）
0	0	0
0.5	2.51±0.62	10.39±1.53
1	3.19±0.72	17.2±2.21
1.5	4.56±0.61	14.75±1.56
2	5.14±0.91	12.84±1.2
3	6.08±0.80	10.5±1.01
4	6.52±1.5	8.41±0.69
5	6.6±1.2	7.03±0.48
6	5.93±1.06	5.9±0.78
8	5.11±1.26	4.13±39
10	4.43±0.85	2.54±0.65
12	3.71±0.53	1.55±0.63
16	1.88±0.72	0.85±0.35
24	0.52±0.21	0.03±0.01

表 7 盐酸左氧氟沙星缓释制剂药物释放体内外相关性

Tab 7 Drug release of levofloxacin hydrochloride sustained-release tablets in vitro and in vivo

参数	释放时间 /h					
	2	4	6	8	10	12
F/%	42.18	57.32	70.9	79.22	86.25	93.55
F_a/%	37.69	51.45	65.93	77.36	82.23	95.44

经计算可知，自制 Levo-HCl 缓释片对市售片 Beagle 犬体内的平均相对生物利用度为 91.61%。

4 结论

本文的模型药物为 Levo-HCl，通过正交设计制备具有良好缓释能力的凝胶骨架片。采用单因素实验确定了影响药物释放的重要因素，并以自制片与一级动力学释放行为的相关系数作为评价指标，采用正交实验设计对处方工艺进行优化，最佳处方组成为 Levo-HCl 60%、HPMC K100M 15%、EC 10%、MCC 7.5%、Lac 7.5%。最终自制 Levo-HCl 缓释片在 12 h 内呈现一级药动学释放特征，可降低血药浓度波动。同时自制片在 Beagle 犬的药动学研究结果表明，自制 Levo-HCl 缓释片与市售普通片相比，具有缓释效果，相对生物利用度为 91.61%。

参考文献

[1] 聂鲁，刘连奇，周辛波 . 喹诺酮类抗菌药物发展历程与临床应用 [J]. 临床药物治疗杂志，2019，17（7）：12-16.

[2] 邹卫 . 左氧氟沙星的不良反应 [J]. 中国医院药学杂志，2003，23（12）：767.

[3] 郭卫红 . 左氧氟沙星的药理与临床 [J]. 实用医技杂志，2003，10（10）：1027-1028.

[4] 郭青梅，郭伟，程素芳 . 左氧氟沙星的临床应用 [J]. 现代中西医结合杂志，2005，14（22）：3023-3024.

[5] Mayer NE. Evaluation of post-antibiotic effects of antipseudomonal antibiotics using an automated system [J]. APMIS，2000，108（4）：261-266.

[6] Appelbaum PCHPA. The fluoroquinolone antibacterials：Past，present and future perspectives [J]. Int J Antimicrob Agents，2000，16（1）：5-15.

[7] 潘裕生，张金梁，崔梦锁 . 盐酸美金刚缓释片的制备及其药物释放影响因素考察 [J]. 中南药学，2020，18（9）：1449-1454.

[8] 单悌超，宫先卫，冯宝宝 . 奥沙西罗亲水凝胶骨架片制备及体外释药特性研究 [J]. 中国生化药物杂志，2008，29（3）：175-178.

[9] 刘灵晔，李娟，曹蓓 . 盐酸左氧氟沙星片在建康人体内的药代动力学和生物等效性研究 [J]. 药学与临床研究，2020，2：89-92.

[10] 胡霞敏，魏曼 . 盐酸普拉克索缓释骨架片的制备 [J]. 中南药学，2016，14（11）：1198-1201.

[11] 李跃男，王雨薇，朱志红 . 抗心绞痛药盐酸曲美他嗪单层渗透泵控释片的制备及其释药影响因素的考察 [J]. 中南药学，2016，14（3）：225-229.

[12] 岳鹏 . 卷积法在体内外相关性研究中的应用 [J]. 药学学报，2009，44（1）：19-24.

[13] 刘华 . 生物利用度与生物等效性评价的统计方法 [D]. 武汉：华中科技大学，2004.

（收稿日期：2020-12-10；修回日期：2021-01-26）

人参皂苷 Rh_3 联合多西他赛抑制 PC3 肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭

孟佳佳，王丹丹，王陈萍*（南通市第三人民医院临床药学部，江苏　南通　226003）

摘要：目的　研究人参皂苷 Rh_3 联合多西他赛对前列腺癌（PCa）细胞系 PC3 细胞增殖、迁移和侵袭的影响。**方法**　用 WST-1 法分别测人参皂苷 Rh_3 和多西他赛不同浓度处理 24 h PC3 肿瘤细胞的活力；人参皂苷 Rh_3 和多西他赛分别单独和联合处理 PC3 细胞后，用细胞划痕方法测 PC3 肿瘤细胞的迁移能力；Transwell 法检测 PC3 肿瘤细胞的侵袭能力；Western blot 法测 PC3 肿瘤细胞 EMT 相关标记蛋白 E-cadherin 和 N-cadherin 的表达水平。**结果**　不同浓度人参皂苷 Rh_3 和多西他赛处理 PC3 肿瘤细胞 24 h，细胞活力不断下降，呈剂量依赖性。人参皂苷 Rh_3（10 μmol·L^{-1}）和多西他赛（2 nmol·L^{-1}）处理 24 h 和 48 h，均能显著抑制 PC3 细胞的迁移（$P < 0.05$），但人参皂苷 Rh_3 联合多西他赛抑制 PC3 细胞迁移效果更明显（$P < 0.01$）；人参皂苷 Rh_3 和多西他赛干预 24 h 后均能显著抑制 PC3 细胞侵袭（$P < 0.05$），两者联合作用效果更好（$P < 0.01$）。人参皂苷 Rh_3 和多西他赛均能促进 E-cadherin 的表达，并抑制 N-cadherin 表达（$P < 0.05$）。**结论**　人参皂苷 Rh_3 联合多西他赛抑制 PC3 肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭，可能是通过介导上皮 - 间质转化发挥作用。

关键词：PC3 细胞；人参皂苷 Rh_3；多西他赛；增殖；迁移；侵袭；上皮 - 间质
中图分类号：R73，R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)08-1581-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.013

Ginsenoside Rh_3 combined with docetaxel inhibits the proliferation, migration and invasion of PC3 cells

MENG Jia-jia, WANG Dan-dan, WANG Chen-ping* (*Department of Clinical Pharmacology*, *the Third Affiliated Hospital of Nantong University*, *Nantong Jiangsu* 226003)

Abstract: Objective　To determine the effect of ginsenoside Rh_3 combined with docetaxel on the proliferation, migration and invasion of PC3 tumor cells. **Methods**　WST-1 method was used to measure the proliferation of PC3 cells treated with different concentrations of ginsenoside Rh_3 or docetaxel for 24 hours. After PC3 cells were treated with Rh_3 and docetaxel alone or in combination, the cell wound healing test was used to determine the migration of PC3 cells. The Transwell method was used to test the invasion of PC3 cells. The protein expression levels of E-cadherin and N-cadherin related to EMT in the PC3 cells were measured by Western blot. **Results**　PC3 cells were treated with different concentrations of ginsenoside Rh_3 and docetaxel for 24 hours, and the cell activity decreased in a dose-dependent manner. Ginsenoside Rh_3 (10 μmol·L^{-1}) and docetaxel (2 nmol·L^{-1}) respectively inhibited the migration of PC3 cells for 24 hours and 48 hours ($P < 0.05$) respectively; but combination of ginsenoside Rh_3 with docetaxel worked better ($P < 0.01$). Both ginsenoside Rh_3 and docetaxel treatment inhibited the invasion of PC3 cells ($P < 0.05$), but the combination worked better ($P < 0.01$). Both ginsenoside Rh_3 and docetaxel promoted the protein expression of E-cadherin and inhibited the expression of N-cadherin ($P < 0.05$). **Conclusion**　Both ginsenoside Rh_3 and docetaxel inhibit the proliferation, migration and invasion of PC3 cells, possibly by mediating the epithelial-mesenchymal transition.

Key words: PC3 cell; ginsenoside Rh_3; docetaxel; proliferation; migration; invasion; epithelial-mesenchyme

作者简介：孟佳佳，女，硕士，主管药师，主要从事药理学研究，E-mail：815581650@qq.com　*通信作者：王陈萍，女，硕士，主管药师，主要从事药理学研究，E-mail：18806295769@163.com

前列腺癌（prostate cancer，PCa）是常见的男性泌尿生殖系统的恶性肿瘤，在西方国家中PCa位居男性新发恶性肿瘤的第1位，病死率在恶性肿瘤中居第3位[1]。我国PCa的发病率呈现逐年上升的趋势，已成为我国男性常见的恶性肿瘤之一[2]。目前对PCa缺乏安全有效的治疗措施。

多西他赛（docetaxel）属于第二代紫杉醇类化疗药物，能减轻PCa患者的症状，提高生存率和生活质量，但其产生的不良反应和耐药性不可忽视[3]。然而，在治疗PCa中，多西他赛与药物最佳联合及最小不良反应的治疗方案仍然缺乏。

人参在中国已有数千年的食用和药用历史，经常被用于预防和治疗多种疾病，是非常宝贵的补品。人参皂苷是人参的主要药理活性成分，因其广泛的生物活性而闻名。人参皂苷有几种不同的化合物，包括Rb_1、Rb_2、Rc、Rd、Re、Rf、Rg_1、Rg_2、Rg_3、Rh_1、Rh_2、Rh_3等。其中最常研究的人参皂苷为Rg_3、Rg_1、Rb_1、Rh_1、Re和Rd[3]。有研究表明，某些人参皂苷，例如Rg_1、Rg_2、Rg_3和Rh_2具有诱导凋亡，抑制增殖或抑制迁移的抗肿瘤活性[4-5]。由于人参皂苷Rh_3是稀有的人参皂苷之一，因此对其生物活性了解甚少。

本研究旨在评价人参皂苷Rh_3联合多西他赛化疗对PC3前列腺肿瘤细胞的细胞增殖、迁移和侵袭的影响。

1 材料

1.1 肿瘤细胞

人前列腺癌细胞PC3（中国科学院上海细胞库），复苏后接种于F-12K培养基、10%胎牛血清和1%青链霉素混合液组成的培养液中，37 ℃、5% CO_2条件下常规培养。

1.2 仪器

酶标仪（德朗公司，DR-200Bs）；细胞培养箱（赛默飞世尔科技公司，150iC02）；生物净化工作台（苏州苏洁净化设备公司，VS-1300U）；离心机（德国Eppendorf公司，5424r）；4 ℃、－20 ℃和80 ℃超低温冰箱（海尔公司）；移液器（德国Eppendorf公司）；显微镜（OPTEC公司，TP510）；电泳槽（北京百晶生物，BG-transBLOT）；Transwell小室（353097，Falcon），细胞培养瓶（Corning公司，25 cm^2）；培养皿（Corning公司，100 mm^2），1.5 mL EP管（AXYGEN，MCT-150-C）。

1.3 试药

多西他赛（批号：D107320，规格：10 mg，上海阿拉丁生化科技股份有限公司），人参皂苷Rh_3（批号：89007，规格：20 mg，北京中科质检生物技术有限公司），WST-1细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒（批号：C0036，碧云天生物技术有限公司），Matrigel（批号：354234，BD），结晶紫染色液（批号：C0121）、BCA蛋白浓度测定试剂盒（批号:P0012S）、HRP标记二抗（批号:A0201）（碧云天生物技术有限公司），E-cadherin抗体（批号：20874-1，00082672，Proteintech），N-cadherin抗体（批号：A01577-2，15D39，博士德），GAPDH抗体（批号：60004-1，0004237，Proteintech）。

2 方法

2.1 细胞活力检测

使用WST-1细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒分别检测人参皂苷Rh_3和多西他赛对PC3细胞活力的影响。在96孔板每孔加入100 μL（2000个）PC3细胞，人参皂苷Rh_3实验组分别加入0、5、10、20、40、80、160和320 μmol·L^{-1}人参皂苷Rh_3[6-7]；多西他赛实验组分别加入0、1、2、4、8、16、32和64 nmol·L^{-1}的多西他赛（用二甲基亚砜配制）[8-9]。0浓度组为阴性对照组，加入等体积溶剂。培养24 h后，每孔加入10 μL WST-1溶液，孵育2 h，把96孔板置于摇床上摇动1 min，在450 nm测定吸光度（*A*值）。细胞增殖抑制率＝（1－实验组平均*A*值/阴性对照组平均*A*值）×100%。

2.2 细胞划痕方法

PC3肿瘤细胞常规方法扩增细胞数量，用胰酶消化，制备1×10^6个·mL^{-1}细胞悬液，将500 μL细胞悬液加入预先放置隔板的24孔板中，实验分为对照组、人参皂苷Rh_3组（Rh_3组，10 μmol·L^{-1}）、多西他赛组（Doc组，2 nmol·L^{-1}）、人参皂苷Rh_3和Doc联合用药组（Rh_3＋Doc组），细胞培养箱中孵育24 h，取出隔板，拍摄所形成划痕的初始宽度。加入干预药物后继续培养24 h和48 h后拍摄划痕宽度。

2.3 细胞侵袭实验-Transwell法

同“2.2”项下方法分组，用预冷的基础培养基稀释Matrigel，并取40 μL加入预冷的Transwell小室中；将PC3肿瘤细胞制成2×10^5个·mL^{-1}含干预药物的单细胞悬液，取200 μL体积细胞悬液加入Transwell小室。下室加入500 mL完全培养基，细胞培养箱中培养24 h后取出Transwell小室，4%多聚甲醛溶液固定25 min，0.1%结晶紫染色30 min，晾干后包被基底膜，显微镜拍照后进行细胞记数。

2.4　Western blot 法

同“2.2”项下方法分组，收集各组细胞，提取总蛋白质，用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒对蛋白浓度进行测定，严格按照试剂盒说明书进行操作。制备电泳胶，在上样孔加入 10 μL 蛋白和蛋白电泳 marker，电泳并转 PVDF 膜，封闭后。分别加 E-cadherin 抗体（1∶10 000），N-cadherin 抗体（1∶1000），GAPDH 抗体（1∶20 000），孵育过夜，继续孵育 HRP 标记的二抗，HRP-ECL 发光法进行分析并扫描。

2.5　统计学方法

数据采用 SPSS 19.0 统计软件分析，计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间差异比较采用方差分析或 t 检验，$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　人参皂苷 Rh_3 和多西他赛抑制 PC3 肿瘤细胞增殖

人参皂苷 Rh_3 和多西他赛处理 PC3 细胞 24 h 的细胞增殖抑制率，结果见表 1。随着人参皂苷 Rh_3、多西他赛的浓度增大，PC3 细胞增殖抑制率逐渐升高。根据浓度梯度和细胞抑制率结果，后续实验 Rh_3 和多西他赛分别选择 10 μmol·L^{-1} 和 2 nmol·L^{-1} 浓度进行处理。

表 1　人参皂苷 Rh_3 和多西他赛对 PC3 细胞增殖抑制率 (24 h)

Tab 1　Inhibition rate of PC3 cell proliferation by ginsenoside Rh_3 and docetaxel (24 h)

人参皂苷 Rh_3 浓度 /（μmol·L^{-1}）	抑制率 /%	多西他赛浓度 /（nmol·L^{-1}）	抑制率 /%
5	27.76±5.92	1	10.88±7.52
10	43.65±6.09	2	22.11±7.20
20	46.91±3.16	4	40.04±6.49
40	52.58±3.01	8	49.72±2.97
80	53.83±6.76	16	54.59±4.4
160	64.95±3.59	32	58.60±5.41
320	66.54±3.73	64	62.27±3.41

3.2　人参皂苷 Rh_3 和多西他赛抑制 PC3 肿瘤细胞迁移

划痕法测细胞的迁移能力结果见图 1。结果显示，细胞愈合 24、48 h，与对照组比较，人参皂苷 Rh_3 组和多西他赛组明显抑制 PC3 细胞迁移（$P<0.05$，$P<0.01$），两者联合处理效果更佳（$P<0.01$）。

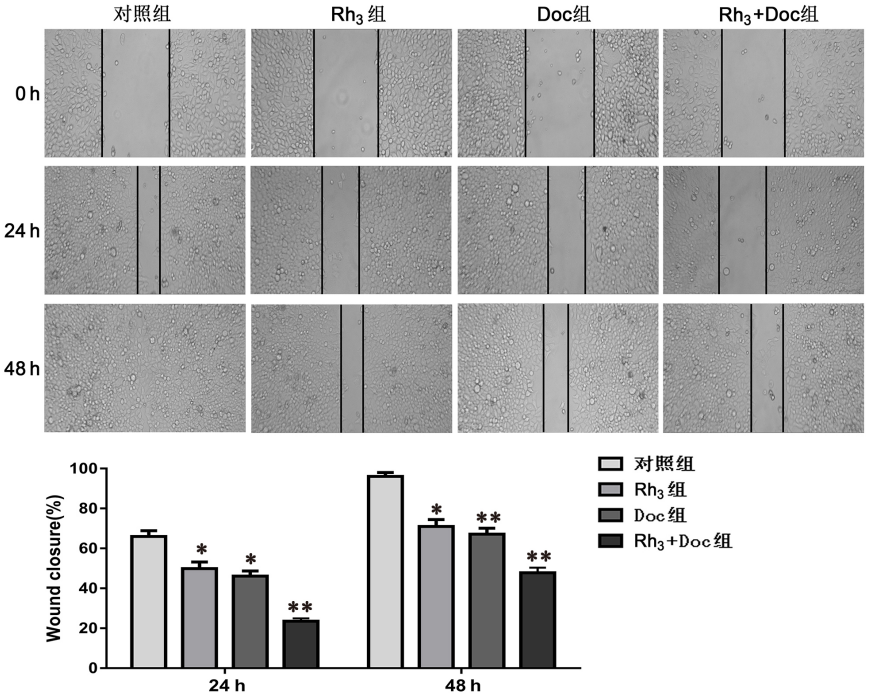


图 1　人参皂苷 Rh_3 和多西他赛对 PC3 细胞迁移的影响（100×）

Fig 1　Effect of ginsenoside Rh_3 and docetaxel on PC3 cell migration（100×）

注：与对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

Note：Compared with the control group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$.

3.3　人参皂苷 Rh_3 和多西他赛抑制 PC3 肿瘤细胞侵袭

通过 Transwell 法测细胞的侵袭能力。结果显示，人参皂苷 Rh_3 和多西他赛组 PC3 细胞数量明显少于对照组，表明人参皂苷 Rh_3 和多西他赛明显抑制细胞侵袭（$P<0.05$），联合处理组效果更好（$P<0.01$）（见图 2）。

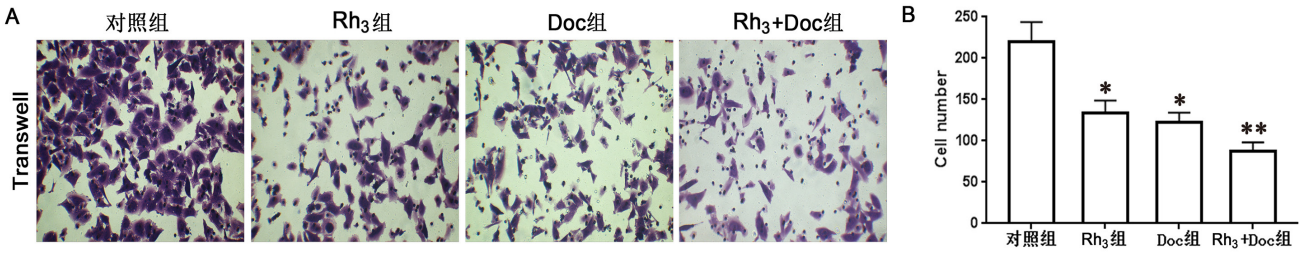


图 2 人参皂苷 Rh_3 和多西他赛对 PC3 细胞侵袭的影响（100×）

Fig 2 Effect of ginsenoside Rh_3 and docetaxel on the invasion of PC3 cells（100×）

注：与对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

Note：Compared with the control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$.

3.4 人参皂苷 Rh_3 和多西他赛抑制 PC3 肿瘤细胞上皮 - 间质转化

E-cadherin 为上皮标记蛋白，N-cadherin 为间质标记蛋白，通过 Western blot 法检测两者表达水平，进一步说明肿瘤细胞的迁移和侵袭能力及其分子机制。结果显示，人参皂苷 Rh_3 和多西他赛均能上调 E-cadherin 蛋白表达水平和下调 N-cadherin 蛋白表达水平（$P < 0.05$），两药联用作用效果更为显著（$P < 0.01$）（见图 3）。

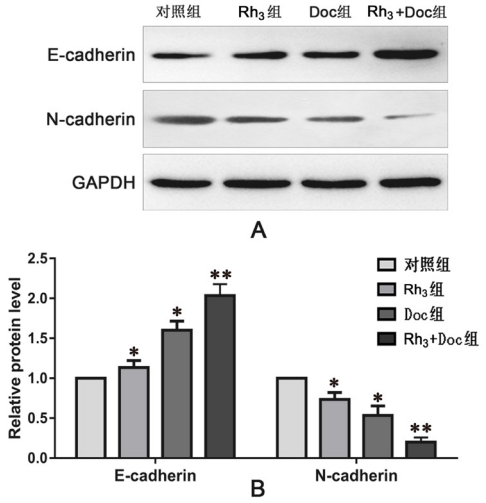


图 3 人参皂苷 Rh_3 和多西他赛对 PC3 细胞上皮 - 间质关键蛋白 E-cadherin 和 N-cadherin 表达水平的影响

Fig 3 Effect of ginsenoside Rh_3 and docetaxel on the expression of E-cadherin and N-cadherin in PC3 cells

注：与对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

Note：Compared with the control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$.

4 讨论

PCa 是临床泌尿外科常见的恶性肿瘤，中晚期 PCa 的发病率逐年升高。多数 PCa 患者确诊时已为中晚期，经过内分泌治疗后，逐渐发展为去势抵抗前列腺癌（castration-resistant prostate cancer，CRPC），化疗是 CRPC 的重要治疗手段 [9]。紫杉类药物被认为是治疗 PCa 最有效的化疗药物。多西他赛为紫杉醇的半合成衍生物，虽然已广泛应用于 PCa 患者的辅助化疗和 CRPC 的治疗 [10]，但绝大多数患者在用药过程中出现药物耐药现象和不良反应 [5, 11]。因此，寻求一种新的有效的治疗 PCa 方法是有必要的。

人参皂苷是人参中最重要和最主要的药理活性成分，研究表明，人参皂苷 Rg_1、Rg_2、Rg_3 和 Rh_2 具有诱导细胞凋亡、抑制增殖或抑制迁移的抗肿瘤活性 [3, 12]。人参皂苷 Rh_3 在人参属药材中含量很低，为稀有的人参皂苷，但其制备工艺已得到大幅提升，为人参皂苷 Rh_3 的研究和应用提供了极大地便利 [13]。

人参皂苷 Rh_3 通过抑制乙酰胆碱酯酶（AChE）活性、增加脑源性神经营养因子表达和 cAMP 反应元件结合蛋白激活来保护记忆受损 [14]。人参皂苷 Rh_3 通过调节 5'- 单磷酸腺苷激活的蛋白激酶信号通路在小胶质细胞中发挥抗炎作用 [15]。它通过激活 Nrf2 来保护视网膜色素上皮细胞和视网膜神经节细胞免受紫外线的伤害 [16]。人参皂苷 Rh_3 可以抑制紫外线照射角质形成的细胞中 GM-CSF 表达 [17]。人参皂苷 Rh_3 具有良好的抗肿瘤活性。在白血病中，人参皂苷 Rh_3 使 HL-60 细胞周期阻滞在 G_1/S 期，并诱导细胞分化为形态和功能性的粒细胞 [18]。人参皂苷 Rh_3 能够抑制人结肠癌细胞和卵巢癌细胞增殖并促进细胞凋亡 [5, 19]。

本研究结果发现，人参皂苷 Rh_3 能够明显抑制 PC3 细胞的增殖、迁移和侵袭。表明人参皂苷 Rh_3 是一种潜在的抗 PCa 细胞侵袭的药物。人参皂苷 Rh_3 抑制 N-cadherin 表达，促进了 E-cadherin 表达，表明其可能抑制了上皮 - 间质转化（epithelial-mesenchymal transition，EMT）。EMT 在生命正常发育的各个阶段以及在肿瘤细胞发生的一系列表型和分子变化中非常常见 [20]。对于许多肿瘤细胞的侵袭和转移而言，EMT 是关键的早期事件，而 E-cadherin 的表达下调则是 EMT 的标志之一 [20-21]。E-cadherin 转录表达抑制受很

多因素影响，包括锌指蛋白的 Snail/Slug 家族、Twist、ZEB1、SIP1 等因子[22]。因此，人参皂苷 Rh_3 抑制 PC3 肿瘤细胞迁移和侵袭的上游调控分子机制是后期研究的方向。

综上，人参皂苷 Rh_3 可能通过调节 EMT 过程抑制 PCa 细胞的转移和侵袭能力，临床治疗中，人参皂苷 Rh_3 不论是单独使用或联合化疗药物使用均具有应用前景。但是，由于本研究限于 PCa 细胞的体外结果，后期还需要进行深入的分子机制研究，为人参皂苷 Rh_3 运用于 PCa 临床治疗打下坚实的基础。

参考文献

[1] Chung I，Lee I，Park J，et al. Inhibitory mechanism of Korean Red Ginseng on GM-CSF expression in UVB-irradiated keratinocytes [J]. J Ginseng Res，2015，39（4）：322-330.

[2] Center MM，Jemal A，Lortet-Tieulent J，et al. International variation in prostate cancer incidence and mortality ratesl [J]. Eur Uro，2012，61（6）：1079-1092.

[3] 吴广圳，李建一，徐迎坤，等 . 多西他赛治疗前列腺癌的耐药机制研究进展 [J]. 泌尿外科杂志（电子版），2019，11（2）：7-12.

[4] Quan K，Liu K，Wan Q，et al. Rapid preparation of rare ginsenosides by acid transformation and their structure-activity relationships against cancer cells [J]. Sci Rep，2015，5：8598.

[5] Luo Y，Zhang P，Zeng HQ，et al. Ginsenoside Rg_3 induces apoptosis in human multiple myeloma cells via the activation of Bcl-2-associated X protein [J]. Mol Med Rep，2015，12（3）：3557-3562.

[6] 丛中一，林双甦，丛登立，等 . 人参皂苷 Rh_3 对人结肠癌细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 中国老年学杂志，2010，30（18）：2644-2646.

[7] Cong Z，Zhao Q，Yang B，et al. Ginsenoside Rh_3 inhibits proliferation and induces apoptosis of colorectal cancer cells [J]. Pharmacology，2020，105（5-6）：329-338.

[8] Karanika S，Karantanos T，Kurosaka S，et al. GLIPR1-△ TM synergizes with docetaxel in cell death and suppresses resistance to docetaxel in prostate cancer cells [J]. Mol Cancer，2015，14：122.

[9] Zhang Y，Jin Z，Zhou H，et al. Suppression of prostate cancer progression by cancer cell stemness inhibitor napabucasin [J]. Cancer Med，2016，5（6）：1251-1258.

[10] 管考鹏 . 去势抵抗性前列腺癌药物治疗现状与进展 [J]. 中国肿瘤临床，2020，47（8）：384-387.

[11] Fitzpatrick JM，Wit RD. Taxane mechanisms of action：Potential implications for treatment sequencing in metastatic castration-resistant prostate cancer [J]. Eur Urol，2014，65（6）：1198-1204.

[12] Zheng M，Zhou NK，Ma LJ，et al. Inhibitory effects of the active constituents of ginseng stems and leaves on lung cancer nci-h1650 cells [J]. Biomed Res India，2015，26（5）：646-650.

[13] 陈小春，戴柱，傅荣昭 . 稀有人参皂苷 Rh_3 及 Rk2 的制备及结构确认 [J]. 江西化工，2019，12（2）：1-4.

[14] Kim EJ，Jung IH，Le TKV，et al. Ginsenosides Rg5 and Rh_3 protect scopolamine-induced memory deficits in mice [J]. J Ethnopharmacol，2013，146（1）：294-295.

[15] Lee YY，Park JS，Lee EJ，et al. Anti-inflammatory mechanism of ginseng saponin metabolite Rh_3 in lipopolysaccharide-stimulated microglia：Critical role of 5'-adenosine monophosphate activated protein kinase signaling pathway [J]. J Agric Food Chem，2015，63（13）：3472-3480.

[16] Tang CZ，Li kR，Qing Y，et al. Activation of Nrf2 by Ginsenoside Rh_3 protects retinal pigment epithelium cells and retinal ganglion cells from UV [J]. Free Radic Biol Med，2018，117（4）：238-246.

[17] Chung I，Lee J，Park YS，et al. Inhibitory mechanism of Korean Red Ginseng on GM-CSF expression in UVB-irradiated keratinocytes [J]. J Ginseng Res，2015，39（4）：322-330.

[18] Kim YS，Dong SK，Kim，S. Ginsenoside Rh_2 and Rh_3 induce differentiation of HL-60 cells into granulocytes：Modulation of protein kinase C isoforms during differentiation by ginsenoside Rh_2 [J]. Int J Biochem Cell Biol，1998，30（3）：327-338.

[19] 尉文功，朱宝成，金红梅 . 人参皂苷 Rh_3 对人卵巢癌细胞 SKOV-3 的抑制作用研究 [J]. 哈尔滨医科大学学报，2018，52（1）：15-18.

[20] Thompson EW，Newgreen DF，Tarin D. Carcinoma invasion and metastasis：A role for epithelial-mesenchymal transition [J]. Cancer Res，2005，65（14）：5991-5995.

[21] Cardiff RD. Epithelial to mesenchymal transition tumors：Fallacious or snail’s pace? [J]. Clin Cancer Res，2005，11（24）：8534-8537.

[22] Barrallo-Gimeno A，Nieto MA. The snail genes as inducers of cell movement and survival：Implications in development and cancer [J]. Development，2005，132（14）：3151-3161.

（收稿日期：2021-01-05；修回日期：2021-03-08）

甘草次酸抑制幽门螺杆菌诱导的 Th17 炎性反应研究

于卫华，郑倩婧，马翠（空军军医大学第一附属医院消化内镜中心，西安 710032）

摘要：目的 探讨甘草次酸对幽门螺杆菌诱发的慢性胃炎的作用机制。**方法** 采用幽门螺杆菌感染法制备小鼠慢性胃炎模型，检测甘草次酸对模型小鼠胃黏膜组织、巨噬细胞、单核细胞中炎性因子（IL-6、TGF-β、IL-1β、IL-10、BAFF）的表达和 Th17 细胞应答的影响。**结果** 甘草次酸处理后，幽门螺杆菌感染小鼠胃黏膜组织、体外巨噬细胞、单核细胞中炎性因子 IL-6、TGF-β、IL-1β、IL-17、BAFF 水平均显著降低，而抑炎因子 IL-10 水平则明显升高（$P < 0.05$）；同时，甘草次酸对促 Th17 因子的抑制作用可被 rBAFF 削弱，而被 BAFF 单抗处理加强（$P < 0.05$）。**结论** 甘草次酸可通过抑制 BAFF 激活的 Th17 免疫反应发挥降低幽门螺杆菌诱发的慢性胃炎炎性反应的作用。

关键词：甘草次酸；幽门螺杆菌；慢性胃炎；Th17；BAFF
中图分类号：R966 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1586-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.014

Inhibition of glycyrrhetinic acid on Th17 responses induced by *H. pylori*

YU Wei-hua, ZHENG Qian-jing, MA Cui (*Digestive Endoscopy Center, the First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an* 710032)

Abstract: Objective To determine the inhibition mechanism of glycyrrhetinic acid on the chronic gastritis induced by *H. pylori*. **Methods** The mouse model was prepared with *H. pylori* infection. The expression changes of inflammatory factors (IL-6, TGF-β, IL-1β, IL-10 and BAFF) in the macrophages/monocytes in vitro and Th17 cell response in the gastric mucosa in vivo were tested after glycyrrhetinic acid treatment. **Results** After glycyrrhetinic acid treatment, the levels of inflammatory factors (IL-6, TGF-β, IL-1β, IL-10 and BAFF) in the gastric mucosa in vivo and in macrophages/monocytes infected by *H. pylori* were significantly reduced, while the level of anti-inflammatory factor IL-10 was significantly increased ($P < 0.05$). Meanwhile, the inhibitory effect of glycyrrhetinic acid on pro-Th17 factor was weakened by rBAFF whereas strengthened by BAFF monoclonal antibody ($P < 0.05$). **Conclusion** Glycyrrhetinic acid can reduce the inflammatory response in chronic gastritis induced by *H. pylori* by inhibiting BAFF-activated Th17 responses.

Key words: glycyrrhetinic acid; *H. pylori*; chronic gastritis; Th17; BAFF

幽门螺杆菌是一种常见的革兰氏阴性菌，具有很高的感染率[1]，其感染主要发生在胃部黏膜中，存活时间较长，且不易根除，是引发人类慢性胃炎的重要病因之一，其中 Th17 细胞免疫反应等与幽门螺杆菌感染及病理反应的发生密切相关[2-3]。我国医药人员通过中医药方式治疗幽门螺杆菌诱发的慢性胃炎病症取得了显著效果[4-5]，然而由于中药制剂成分复杂，其作用机制并不清楚。

中药甘草对于幽门螺杆菌的抑制和清除效果已有报道，其主要成分甘草次酸是一种已知的三萜类化合物，具有抗炎、抗病毒等多种药理作用[6-7]。本研究拟以幽门螺杆菌感染的慢性胃炎小鼠模型及体外 Th17 细胞模型为研究对象，分析甘草次酸对幽门螺杆菌诱发慢性胃炎的作用及机制，为甘草治疗慢性胃炎提供佐证。

1 材料

1.1 实验动物与细胞

SPF 级雄性 C57Bl/6 小鼠，4 周龄，体质量 19 ～ 21 g [合格证号：SYXK（陕）2020-004，空军军医大学实验动物中心]；RAW 264.7 巨噬细胞由本

作者简介：于卫华，女，主治医师，主要从事消化内科常见病的研究，E-mail：zhouyeping999@sina.com

中心实验室保存；外周血单核细胞分离自正常小鼠。

1.2 试药

甘草次酸（纯度：98%，批号：G0149，Sigma 公司）；ELISA 试剂盒（Invitrogen 公司）；WST-8 试剂盒（碧云天生物技术研究所）；流式细胞仪（Becton-Dickinson 公司）；青霉素 / 链霉素（批号：15140148）、胎牛血清（FCS，批号：26400044）、RPMI 1640 培养基（批号：C11875500BT）（Gibco 公司）；anti-CD28 抗体（北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司）；anti-CD3 抗体（Abcam 公司）；重组 鼠 BAFF（rBAFF）（Enzo Life Sciences 公 司）；BAFF 抗体（Adipogen 公司）。

2 方法

2.1 小鼠模型制备与处理

采用幽门螺杆菌感染法制备小鼠模型[8]。$CagA^+$/$VacA^+$幽门螺杆菌株接种于含 5%FCS 的布鲁氏肉汤中，37 ℃振荡培养 2 d。将 0.5 mL 幽门螺杆菌悬液（1×10^8 菌 • mL^{-1}）用钢导管接种于 C57Bl/6 小鼠（6 周龄）胃部，继续喂养 4 周，制备模型。

模型小鼠随机分为模型组和处理组，每组 8 只。处理组：小鼠每日尾静脉注射甘草次酸悬液（8.0 mg • kg^{-1}），持续 1 周；模型组：注射等量生理盐水；另设未处理的正常小鼠为对照组（8 只）。各组末次给药后禁食 24 h，断头处死，剖腹取胃，收集胃黏膜组织，使用 PBS 缓冲液对胃黏膜组织进行冲洗后，按 1 g 组织加 9 mL PBS 匀浆液对组织匀浆，进行后续检测。

2.2 细胞培养与处理

RAW 264.7 巨噬细胞于 37 ℃条件下培养于含 10%FCS、100 U • mL^{-1} 青霉素 / 链霉素的 DMEM 培养基中。采用密度梯度离心法自正常小鼠外周血分离获得外周血单核细胞，然后通过磁性细胞分选试剂盒从其中分离纯化出 $CD4^+$ T 细胞（纯度达 93% 以上），培养于含 10% FCS 和青霉素 / 链霉素（100 U • mL^{-1}）的 RPMI 1640 培养基中；将单核细胞于含 IL-4（50 ng • mL^{-1}）和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子（100 ng • mL^{-1}）的培养基中培养 6 d，每 3 日更换新鲜培养基，收集获得 DC 细胞；将 $CD4^+$ T 细胞培养液中添加 0.1 μg • mL^{-1} anti-CD28、0.5 μg • mL^{-1} anti-CD3 抗体，共培养 3 d 后收集获得 Th17 细胞。上述获得的 Th17 细胞、巨噬细胞、DC 细胞、$CD4^+$ T 细胞分别与幽门螺杆菌（MOI = 0.5）于 37 ℃共培养 12 h，更换新鲜培养基，加入 75 ng • mL^{-1} 甘草次酸（DMSO 溶解后使用培养液稀释至所需浓度）培养 24 h，收集上清液进行后续分析。各细胞悬液中加入 rBAFF（50 ng • mL^{-1}）或 BAFF 抗体（1 μg • mL^{-1}）培养 24 h，收集上清液进行检测，评价 BAFF 功能。

2.3 ELISA 试剂盒法检测炎性因子

采用 ELISA 试剂盒法分别检测各组小鼠胃黏膜组织或培养的细胞上清液中 IL-6、TGF-β、IL-1β、IL-10、IL-17、BAFF 因子水平。

2.4 流式细胞术检测

$CD4^+$ T 细胞处理 24 h 后，调整细胞密度至 1×10^6 个 • mL^{-1}，加入 FITC-IL-17 抗体染色，进行流式细胞分析。

2.5 统计分析

数据分析采用 SPSS 22.0 软件，计量资料以均数 ± 标准差表示，多组间比较采用单因素方差分析，两组比较用 t 检验，$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 甘草次酸对幽门螺杆菌诱导的慢性胃炎小鼠炎性因子水平的影响

与对照组相比，模型小鼠胃黏膜组织中及幽门螺杆菌感染的巨噬细胞上清液中促 Th17 炎性因子 IL-6、TGF-β、IL-1β 水平均显著升高，而抑炎因子 IL-10 水平则明显降低（$P < 0.01$），见图 1；与模型组相比，甘草次酸处理组中 IL-6、TGF-β、IL-1β 水平则明显下降，IL-10 水平显著上升（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。

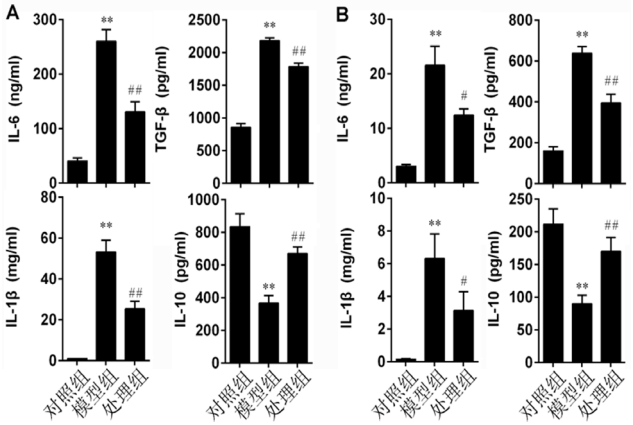


图 1 甘草次酸对幽门螺杆菌诱导的慢性胃炎中炎性因子的影响

Fig 1 Effect of glycyrrhetinic acid on the inflammatory factor in *H. pylori*-induced chronic gastritis

A. 胃黏膜组织（gastric mucosa tissues）；B. 巨噬细胞上清液（supernatant of macrophages）

注：与对照组比较，$^{**}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note：Compared with the control group，$^{**}P < 0.01$；compared with the model group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$.

3.2 甘草次酸对幽门螺杆菌诱导的慢性胃炎中 Th17 细胞反应水平的影响

与对照组相比，模型小鼠胃黏膜组织及幽门螺杆菌感染的 CD4$^+$T 细胞上清液中 IL-17 水平均显著升高（$P < 0.01$）；与模型组相比，处理组中 IL-17 水平则明显下降（$P < 0.01$），见图 2；同时处理组 CD4$^+$T 细胞中 IL-17$^+$细胞占比也较模型组显著减少（$P < 0.01$）。

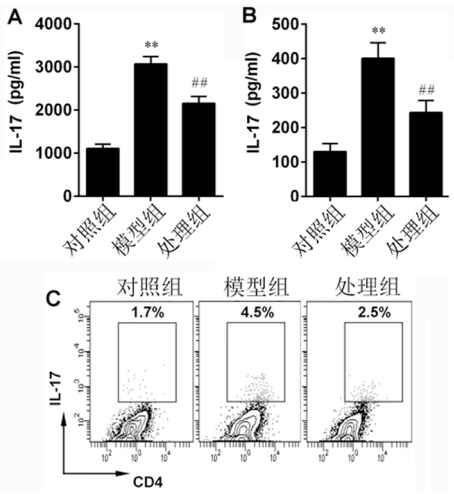


图 2 甘草次酸对幽门螺杆菌诱导的慢性胃炎中 Th17 细胞反应的影响

Fig 2 Effect of glycyrrhetinic acid on Th17 in *H. pylori*-induced chronic gastritis

A. 小鼠胃黏膜组织（gastric mucosa tissues of mice）；B. CD4$^+$T 细胞上清液（supernatant of CD4$^+$T）；C. CD4$^+$T 细胞中 IL-17$^+$细胞占比（proportion of IL-17$^+$ cells in CD4$^+$T cells）

注：与对照组比较，$^{**}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note：Compared with the control group，$^{**}P < 0.01$；compared with the model group，$^{\#\#}P < 0.01$.

3.3 甘草次酸对幽门螺杆菌诱导的慢性胃炎中 BAFF 因子表达的影响

与对照组相比，模型小鼠胃黏膜组织中及幽门螺杆菌感染的 DC 细胞、CD4$^+$T 细胞上清液中 BAFF 因子水平均显著升高；与模型组相比，处理组中 BAFF 因子水平则明显下降（$P < 0.01$），见图 3。

3.4 甘草次酸对 BAFF 诱导的促 Th17 因子的影响

在幽门螺杆菌感染的巨噬细胞和单核细胞中，重组 rBAFF 处理可显著上调促 Th17 因子 IL-6、TGF-β、IL-1β 水平，相反 BAFF 单抗处理则会下调其水平（$P < 0.05$），见图 4；甘草次酸对促 Th17 因子的抑制作用可被 rBAFF 削弱，被 BAFF 单抗处理加强（$P < 0.05$）。

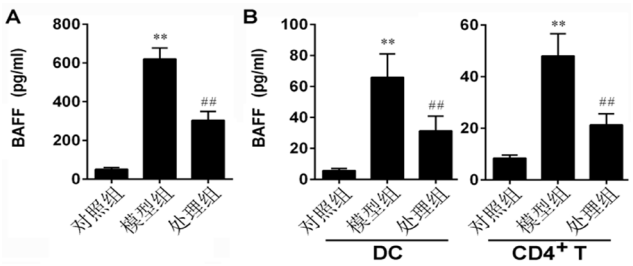


图 3 甘草次酸对幽门螺杆菌诱导的慢性胃炎中 BAFF 因子的影响

Fig 3 Effect of glycyrrhetinic acid on BAFF in *H. pylori*-induced chronic gastritis

A. 小鼠胃黏膜组织（gastric mucosa tissues of mice）；B. DC、CD4$^+$T 细胞上清液（supernatant of DC and CD4$^+$T infected by *H. pylori*）

注：与对照组比较，$^{**}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note：Compared with the control group，$^{**}P < 0.01$；compared with the model group，$^{\#\#}P < 0.01$.

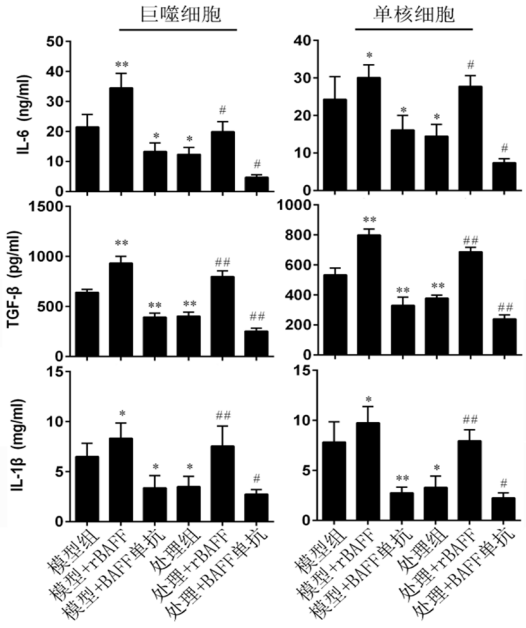


图 4 甘草次酸对 BAFF 诱导的促 Th17 因子的影响

Fig 4 Effect of glycyrrhetinic acid on pro-Th17 cytokines induced by BAFF

注：与模型组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与处理组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note：Compared with the model group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；compared with the treatment group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$.

4 讨论

甘草次酸为中药材甘草的主要成分之一，属于三萜化合物的一种[9]。研究表明，甘草在传统中医药治疗慢性胃炎及其他消化系统类疾病中发挥着重要作用，其中甘草次酸等成分在幽门螺杆菌等胃肠道病原菌的抑制作用中扮演着关键角色[10-12]，然而，其在幽门螺杆菌诱发的慢性胃炎中的药理作用及调控机制鲜有报道。本实验从 T 细胞免疫反应的角度探讨了甘草次酸对幽门螺杆菌感染引发的炎性反应的作用机制。

T 细胞免疫反应有助于清除细菌引发的组织感染症状，其中 Th1 型反应即与幽门螺杆菌相关疾病有关，这类细胞反应负责清除细菌，同时也会造成受感染组织发生损伤[13]。近年来研究发现，

Th17细胞免疫反应也与幽门螺杆菌感染有关[14]。Th17是能分泌IL-17炎性因子的辅助性T细胞，由$CD4^+$T细胞分化而来。然而Th17细胞与Th1反应相反，其有利于细菌的生长，从而加速了幽门螺杆菌感染引起的病理反应[15-17]。本研究发现幽门螺杆菌感染后，$CD4^+$T细胞向Th17细胞分化频率增加，胃黏膜中IL-17分泌量增加，而甘草次酸则能显著抑制Th17细胞的活化和IL-17的产生。

B细胞活化因子BAFF是来源于TNF家族的关键细胞因子，多由单核细胞、树突状细胞分泌合成，在B细胞的生存和发育中起着至关重要的作用[18]。BAFF可由幽门螺杆菌诱导表达，Munari等[19]研究发现BAFF在幽门螺杆菌阳性患者胃黏膜中高度表达。既往证据表明，高表达的BAFF也是Th17细胞产生和分化的关键促进因子[20]。BAFF能激活单核细胞、树突状细胞中TGF-β、IL-1β炎性因子的产生，而后者对于Th17细胞的诱导分化具有显著促进作用[21]。本研究发现，在幽门螺杆菌感染的小鼠和体外DC细胞、$CD4^+$T细胞上清液中BAFF因子均呈高水平表达态势，而甘草次酸则能明显降低BAFF水平，并可减少幽门螺杆菌感染的巨噬细胞和单核细胞中BAFF诱导的促Th17因子IL-6、TGF-β、IL-1β的产生，从而发挥抑制Th17细胞反应的作用。

综上所述，本文以幽门螺杆菌感染的慢性胃炎小鼠模型及体外Th17细胞模型为研究对象，证实了甘草次酸对幽门螺杆菌诱发慢性胃炎中Th17细胞反应具有抑制作用，其机制可能与甘草次酸抑制BAFF炎性因子的产生及减少促Th17因子的产生作用有关。该结果为中药甘草及甘草次酸用于慢性胃炎的治疗提供了实验依据。

参考文献

[1] Malfertheiner P，Megraud F，O'Morain CA，et al. Management of helicobacter pylori infection——the maastricht V/Florence consensus report [J]. Gut，2016，66（1）：6-30.

[2] Takahiro K，Masanori I，Tomoyuki B，et al. Clinical significance of reddish depressed lesions observed in the gastric mucosa after helicobacter pylori eradication [J]. Digestion，2018，98（1）：48-55.

[3] Victoria SL，Khoon LL，Cassandra H，et al. Persistent helicobacter pylori specific Th17 responses in patients with past *H. pylori* infection are associated with elevated gastric mucosal IL-1β [J]. PLoS One，2012，7（6）：e39199.

[4] 陶飞宝，叶旭星，何钦，等 . 慢性胃炎Hp感染、胃黏膜改变与中医证型的相关性 [J]. 浙江中西医结合杂志，2019，29（6）：473-475.

[5] 梁艺钟，林德荣，郭绍举，等 . 中药治疗脾胃虚弱型幽门螺杆菌相关性慢性胃炎的疗效分析 [J]. 中国现代医学杂志，2019，29（16）：103-107.

[6] 王志琪，邹龙 . 甘草与其他药物相互作用的研究概况 [J]. 中南药学，2011，9（11）：857-857.

[7] 何丹，刘凤琴，李焕德 . 甘草解毒作用研究进展 [J]. 中南药学，2009，47（12）：927-931.

[8] 张荣光，段广才，范清堂，等 . 幽门螺杆菌感染的昆明小鼠模型的建立 [J]. 中华医学杂志，2006，86（12）：857-859.

[9] 刘彬 . 甘草酸及甘草次酸的药理学研究进展 [J]. 现代药物与临床，2006，21（3）：100-104.

[10] 邢晓娟 . 半夏泻心汤合芍药甘草汤治疗慢性胃炎 [J]. 吉林中医药，2006，26（3）：30-31.

[11] 张正伟 . 益胃汤合芍药甘草汤治疗胃阴亏虚型慢性胃炎60例 [J]. 中医研究，2014，27（9）：33-34.

[12] Cao DH，Jiang J，You LL，et al. The protective effects of glycyrrhetinic acid on helicobacter pylori-Infected gastric mucosa in mongolian gerbils [J]. Biomed Res Int，2016，2016：4943793.

[13] Bimczok D，Clements RH，Waites KB，et al. Human primary gastric dendritic cells induce a Th1 response to *H. pylori* [J]. Mucosal Immunol，2010，3（3）：260-269.

[14] Serelli-Lee V，Ling KL，Ho C，et al. Persistent helicobacter pylori specific Th17 responses in patients with past *H. pylori* infection are associated with elevated gastric mucosal IL-1β [J]. PLoS One，2012，7（6）：e39199.

[15] Zhang JY，Liu T，Guo H，et al. Induction of a Th17 cell response by helicobacter pylori urease subunit B [J]. Immunobiology，2011，216（7）：800-810.

[16] Lina TT，Pinchuk IV，House J，et al. CagA-Dependent downregulation of B7-H2 expression on gastric mucosa and inhibition of Th17 responses during helicobacter pylori infection [J]. J Immunol，2013，191（7）：3838-3846.

[17] Li B，Chen L，Sun H，et al. Immunodominant epitope-specific Th1 but not Th17 responses mediate protection against Helicobacter pylori infection following UreB vaccination of BALB/c mice [J]. Sci Rep，2015，2015（5）：14793.

[18] Fabienne M，Pascal S，Paul R，et al. BAFF and APRIL：A tutorial on B cell survival [J]. Annu Rev Immunol，2003，21（1）：231-264.

[19] Munari F，Fassan M，Capitani N，et al. Cytokine BAFF released by helicobacter pylori-infected macrophages triggers the Th17 response in human chronic gastritis [J]. J Immunol，2014，193（11）：5584-5594.

[20] Zhou XH，Xia ZX，Lan Q，et al. BAFF promotes Th17 cells and aggravates experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. PLoS One，2011，6（8）：e23629.

[21] Chen M，Lin X，Liu Y，et al. The function of BAFF on T helper cells in autoimmunity [J]. Cytokine Growth Factor Rev，2014，25（3）：301-305.

（收稿日期：2021-01-04；修回日期：2021-03-10）

UPLC-MS/MS 法同时测定人血浆中 5 种抗真菌药物的血药浓度

姚远[1]，卢伟[2]，吕光辉[2*]（1. 十堰市太和医院（湖北医药学院附属医院）儿科，湖北 十堰 442000；2. 十堰市太和医院（湖北医药学院附属医院）药学部，湖北 十堰 442000）

摘要：目的 建立 UPLC-MS/MS 法同时测定血浆中 5 种抗真菌药物（氟康唑、伏立康唑、伊曲康唑、泊沙康唑和卡泊芬净）的浓度，并应用于临床治疗药物监测。**方法** 在 50 μL 血浆样品中加入内标，甲醇沉淀蛋白后用流动相稀释并进样分析。采用 C_{18} 色谱柱（2.1 mm×50 mm，1.7 μm），0.1% 甲酸水溶液 - 乙腈溶液为流动相，梯度洗脱，流速为 0.3 mL • min^{-1}，柱温为 40 ℃；采用电喷雾离子化源（ESI），正离子多反应监测模式扫描分析。**结果** 氟康唑的线性范围为 0.80 ～ 40.0 μg • mL^{-1}，其他 4 种抗真菌药物的线性范围约为 0.20 ～ 12.00 μg • mL^{-1}，*r* 均大于 0.99；各浓度的批内和批间 *RSD* 均小于 6.8%；提取回收率在 91.06% ～ 106.7%，方法准确度在 91.57% ～ 103.4%，基质效应范围为 92.17% ～ 103.2%。收集 56 例临床中侵袭性真菌感染并接受伏立康、氟康唑和卡泊芬净唑治疗的患者，研究结果显示伏立康唑的血药谷浓度在 0.54 ～ 8.19 μg • mL^{-1}，氟康唑血药谷浓度在 5.33 ～ 15.21 μg • mL^{-1}，卡泊芬净血药谷浓度在 1.58 ～ 9.12 μg • mL^{-1}，患者个体差异较大。**结论** 该方法准确可靠，操作简便，重复性好，适用于快速检测人血浆中 5 种抗真菌药物的血药浓度测定。

关键词：超高效液相色谱 - 质谱法；抗真菌药物；血药浓度
中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1590-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.015

Simultaneous determination of 5 antifungal drugs in human plasma by UPLC-MS/MS

YAO Yuan[1], LU Wei[2], LYU Guang-hui[2*] (1. *Department of Pediatrics*, *Shiyan Taihe Hospital* (*Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine*), *Shiyan Hubei* 442000; 2. *Department of Pharmacy*, *Shiyan Taihe Hospital* (*Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine*), *Shiyan Hubei* 442000)

Abstract: Objective To simultaneous determine 5 antifungals (fluconazole, voriconazole, itraconazole, posaconazole and caspofungin) in human plasma by UPLC-MS/MS for clinical therapeutic drug monitoring. **Methods** The serum samples (50 μL) were precipitated with methanol after adding the internal standard. The chromatographic separation was performed on C_{18} column (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) with water (containing 0.1% formic acid) as the mobile phase A and acetonitrile as the mobile phase B. The flow rate was 0.3 mL • min^{-1}. Positive electrospray ionization source was used together with multiple reaction monitoring. **Results** The linear concentration range of the calibration curves for fluconazole was 0.80 ～ 40.0 μg • mL^{-1}, tand that for other 4 antifungals were 0.20 ～ 12.00 μg • mL^{-1}, with *r* all higher than 0.99. The *RSD*s of the precision were less than 6.8%. The average recovery of the 5 antifungals were at 91.06% ～ 106.7%. The accuracy ranged from 91.57% ～ 103.4%. The matrix effect ranged from 92.17% ～ 103.2%. The 56 patients receiving antifungal therapy were collected from ICU, Department of Hemotology, Nephrology and Pneumology. The trough blood concentration of voriconazole, fluconazole and caspofungin

作者简介：姚远，男，主管医师，主要从事临床医师工作，E-mail：1083947919@qq.com *__通信作者__：吕光辉，男，主管药师，主要从事医院药学工作，E-mail：lvguanghui0725@163.com

ranged 0.54 ～ 8.19, 5.33 ～ 15.21, and 1.58 ～ 9.12 μg • mL^{-1}, respectively. **Conclusion** The method is accurate, reliable, simple and repeatable, which is suitable for the determination of blood concentrations of 5 antifungals in human plasma.

Key words: UPLC-MS/MS; antifungal; plasma concentration

研究表明，接受骨髓移植、器官移植以及免疫抑制剂治疗的患者是真菌感染的高发人群[1]。此外，肿瘤、艾滋病、侵入性置管以及广谱抗菌药物的使用是侵袭性真菌感染的主要危险因素[2]。现阶段抗真菌药物主要包括唑类、棘白菌素类和多烯类，临床上全身给药的代表药物有伏立康唑、泊沙康唑、伊曲康唑、氟康唑和卡泊芬净[3]。

唑类抗真菌药物体内代谢特征存在个体差异，如氟康唑在肾功能不全患者或中枢神经系统真菌感染患者体内暴露量会显著增加[4]；不同剂型的伊曲康唑生物利用度差异很大（胶囊和口服液生物利用度分别为 55% 和 70%）[5]；伏立康唑为非线性药动学特征，血药浓度差异很大[6]；泊沙康唑在药动学方面也存在显著差异[7]。卡泊芬净为棘白菌素类抗真菌药，具有抗菌谱广、交叉耐药少以及安全性高等特点，是肝功能受损患者抗真菌药物的首选；但卡泊芬净体内药动学过程受诸多因素影响，表观分布容积改变、多器官功能衰竭以及药物间相互作用等均会导致体内血药浓度个体间差异增大，肝损伤、低白蛋白血症等同样会影响卡泊芬净血药浓度[8]。抗真菌药物也会与其他联用药物产生相互作用[9]。因此，对抗真菌药物在特殊人群中开展治疗药物监测（therapeutic drug monitoring，TDM）在药物选择和给药方案的制订中具有重要的意义。本研究选取临床中常见的抗真菌药物作为研究对象，建立同时测定 5 种抗真菌药物的 UPLC-MS/MS 方法，为抗真菌药物药动学 / 药效学（pharmacokinetics/pharmacodynamics，PK/PD）研究以及临床合理用药提供帮助。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters Acquity 超高效液相色谱仪、XEVO TQ 串联质谱仪 [沃特世科技（上海）有限公司]，纯水仪（GWAUN1，北京普析通用仪器有限责任公司），分析天平 [AUW120D，岛津（上海）实验器材有限公司]，涡旋混合器（VORTEX-6，海门市其林贝尔仪器制造有限公司），冷冻高速离心机（5427R，Eppendorf 公司）。

1.2 试药

伏立康唑（批号：20190522，纯度＞ 98.0%，山东西亚化学股份有限公司），泊沙康唑（批号：K24J10M91205，纯度≥ 99.0%）、氟康唑（批号：J09M6B1，纯度≥ 98.0%）（上海源叶生物科技有限公司），伊曲康唑（批号：100631-201402，纯度：99.2%）、卡泊芬净（批号：B22D7R27470，纯度≥ 98.0%）、替硝唑（批号：100336-201704，纯度：99.5%）（中国食品药品检定研究院）；乙腈（批号：JA031530）、甲醇（批号：L1084007014）（色谱级，Merck KGaA 公司），甲酸（色谱级，批 号：095342，MREDA TECHNOLOGY INC），水为自制超纯水。空白血浆由本院输血科提供，患者血浆来自本院各病区和检验科。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 分别精密称取伏立康唑、泊沙康唑、伊曲康唑、氟康唑和卡泊芬净对照品适量，用甲醇 - 二甲基亚砜（50∶50，*V/V*）混合溶液溶解，配成质量浓度分别为 1.02、1.10、1.21、4.01 和 1.20 mg • mL^{-1} 的对照品储备液。取适量储备液，用甲醇稀释成质量浓度分别为 102.0、110.0、121.0、401.0 和 120.0 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。取混合对照品溶液，用甲醇稀释成系列质量浓度工作溶液（伏立康唑：10.2、5.1、2.04、1.02、0.51 和 0.204 μg • mL^{-1}，泊沙康唑：11.00、5.50、2.20、1.10、0.55 和 0.22 μg • mL^{-1}，伊曲康唑：12.10、6.05、2.42、1.21、0.605 和 0.242 μg•mL^{-1}，氟康唑：40.10、20.05、8.02、4.01、2.005 和 0.802 μg•mL^{-1}，卡泊芬净：12.00、6.00、2.40、1.20、0.60 和 0.24 μg • mL^{-1}）。同时采用甲醇配制质控样品溶液，氟康唑质控样品质量浓度为 32.08、6.42、1.28 μg • mL^{-1}，其他化合物质控样品质量浓度约为 8.0、1.6、0.32 μg • mL^{-1}，所有溶液置于 4 ℃保存备用。

2.1.2 内标工作液 精密称取替硝唑对照品，加入甲醇 - 二甲基亚砜（*V/V*，50∶50）混合溶液溶解，配制成质量浓度为 1.0 mg • mL^{-1} 的内标储备液。取适量储备液，采用甲醇将替硝唑稀释至

质量浓度为 1.0 μg • mL^{-1} 的内标工作液。

2.1.3　质控样品配制　分别精密量取“2.1.1”项下质控溶液 50 μL，氮气吹干，加入空白人血浆 50 μL，涡旋 2 min，制成高、中、低 3 个浓度的质控样品。

2.2　色谱和质谱条件

2.2.1　色谱条件　采用 Waters C_{18} 色谱柱（2.1 mm×50 mm，1.7 μm）；流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液，B 为乙腈溶液，梯度洗脱（0 → 0.5 min，10%B；0.5 → 3.0 min，10% → 90%B；3.0 → 4.0 min，90%B；4.0 → 4.5 min，90% → 10%B；4.5 → 5.0 min，90%B）；流速为 0.3 mL • min^{-1}；柱温为 40 ℃；进样体积为 5 μL。

2.2.2　质谱条件　采用电喷雾离子源，正离子扫描方式，多反应监测模式，脱溶剂温度为 400 ℃，脱溶剂气流速为 800 L • h^{-1}，毛细管电压为 3.0 kV，化合物质谱检测参数见表 1。

2.3　血浆样品处理

取 50 μL 血浆，加入 50 μL 内标工作液，涡旋 30 s，加入 150 μL 甲醇，涡旋 2 min，14 000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液 100 μL，加入 900 μL 初始流动相，涡旋 2 min，取 5 μL 进样分析。

表 1　5 种化合物和内标的质谱检测参数

Tab 1　Mass parameters of 5 compounds and internal standard

化合物	离子对 /（*m/z*）	锥孔电压 /V	碰撞电压 /V	保留时间 /min
伏立康唑	350.2/176.1	20	34	3.51
伊曲康唑	705.3/392.3	50	35	3.92
泊沙康唑	701.4/127.0	50	60	3.72
氟康唑	307.2/238.0	26	16	1.72
卡泊芬净	547.6/137.2	25	20	1.96
替硝唑（IS）	248.1/120.9	30	16	2.45

2.4　方法学考察

2.4.1　专属性　取 6 份不同来源的空白人血浆，加入“2.1.1”项下混合对照品质控溶液，并将空白血浆、空白血浆＋质控溶液按照“2.3”项下方法处理后进样。结果显示，不同来源的空白血清在相应色谱峰保留时间内均无干扰峰，方法特异性良好，各化合物色谱图见图 1。

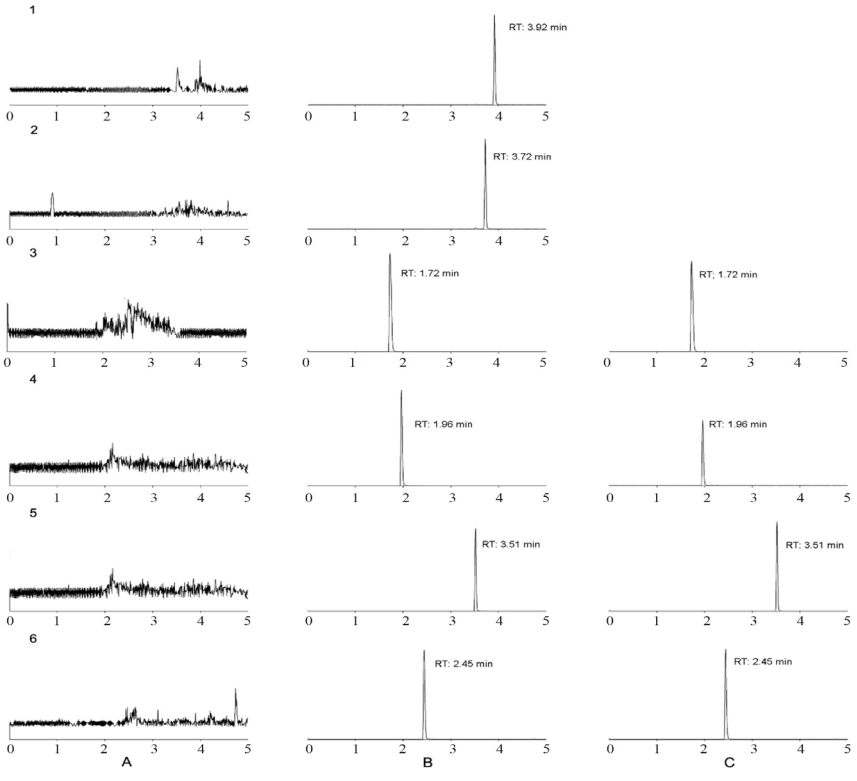


图 1　各成分及内标色谱图

Fig 1　Multiple reactin monitoring chromatograms of compounds and the internal standards

A. 空白血浆（blank plasma）；B. 空白血浆＋混合对照品（5 μg • mL^{-1}）＋内标（替硝唑：1.0 μg • mL^{-1}）（blank plasma ＋ mixed reference solution ＋ IS）；C. 含药血浆样品（medicated plasma sample）；1. 伊曲康唑（itraconazole）；2. 泊沙康唑（posaconazole）；3. 氟康唑（fluconazole）；4. 卡泊芬净（caspofungin）；5. 伏立康唑（voriconazole）；6. 替硝唑（tinidazole）

2.4.2　标准曲线和线性范围　取 50 μL 空白血浆，分别加入 50 μL“2.1.1”项下混合对照品梯度溶液和 50 μL 内标工作液，按“2.3”项下条件处理，取 5 μL 进样。以待测物与内标峰面积比（*Y*）对质量浓度（*X*）作线性回归，结果见表 2。

表 2 5 种化学成分的回归方程、线性范围及相关系数

Tab 2 Linear equation，linearity and correlation coefficient of 5 compounds

化合物	回归方程	线性范围 /（ng•mL^{-1}）	r
伏立康唑	$Y=3.563X-0.1810$	0.20 ～ 10.20	0.9997
伊曲康唑	$Y=0.0465X-0.0083$	0.24 ～ 12.10	0.9987
泊沙康唑	$Y=0.0429X-0.0048$	0.22 ～ 11.00	0.9998
奥硝唑	$Y=0.6783X+0.4240$	0.80 ～ 40.10	0.9992
卡泊芬净	$Y=0.3563X+0.0769$	0.24 ～ 12.00	0.9993

2.4.3 精密度和准确度 取高、中、低 3 个浓度的质控样品，按照“2.3”项下方法于同日内制备质控样品，每个浓度平行制备 5 份，连续制备 3 d并进行测定，计算准确度、日内精密度和日间精密度，结果见表 3。

表 3 5 种化合物在血浆中的精密度和准确度（n = 5）

Tab 3 Precision and accuracy of 5 compounds in the plasma (n = 5)

化合物	质控浓度 /（μg•mL^{-1}）	精密度 /%		准确度 /%
		日内	日间	
伏立康唑	8.16	2.55	2.47	95.67
	1.63	2.26	3.38	94.33
	0.33	0.46	1.88	102.30
伊曲康唑	9.68	6.27	4.85	93.23
	1.94	5.81	5.61	95.19
	0.39	3.38	3.82	97.27
泊沙康唑	8.80	6.27	4.30	96.78
	1.76	3.57	3.23	97.23
	0.35	3.59	3.12	103.40
氟康唑	32.08	4.56	2.67	91.57
	6.42	3.89	3.78	95.65
	1.28	5.11	4.11	93.45
卡泊芬净	9.60	3.90	3.12	94.12
	1.92	3.12	1.78	97.23
	0.38	4.55	4.22	102.70

2.4.4 提取回收率和基质效应 按照“2.3”项下方法分别制备高、中、低 3 个浓度的质控样品，按“2.2”项下色谱条件进样分析，以对照品和内标峰面积的比值作为 A_1；取空白血浆按照“2.3”项下方法处理后加入 3 个浓度的质控溶液，使之浓度与 A_1 的理论浓度相同，以对照品和内标峰面积的比值作为 A_2；3 个浓度的质控溶液按照样品前处理方法进行处理，使之与 A_1 的理论浓度一致，进样分析，以对照品和内标峰面积的比值作为 A_3。A_1/A_2 比值为提取回收率，A_2/A_3 比值为基质效应，结果见表 4。

2.4.5 稳定性 配制高、中、低浓度质控样品，分别考察短期稳定性（室温放置 6 h）、进样器中稳定性（4 ℃）、－ 20 ℃冻融循环 3 次和长期稳定性（－ 20 ℃放置 14 d）。结果见表 5。

2.5 临床应用

表 4 5 种化合物在血浆中的基质效应和回收率（n = 5）

Tab 4 Matrix effect and recovery of 5 compounds in the plasma (n = 5)

化合物	质控浓度 /（μg•mL^{-1}）	基质效应 /%	回收率 /%
伏立康唑	8.16	95.12±3.33	91.06±6.17
	1.63	96.62±2.12	92.20±2.31
	0.33	97.33±3.12	92.04±1.31
伊曲康唑	9.68	96.12±5.11	102.00±4.37
	1.94	94.52±4.11	95.99±4.45
	0.39	101.2±2.09	106.7±2.74
泊沙康唑	8.80	95.77±3.12	99.22±9.70
	1.76	97.12±4.02	96.47±2.38
	0.35	96.41±3.12	91.36±4.42
氟康唑	32.08	97.12±0.89	92.09±5.77
	6.42	92.17±5.10	97.11±4.01
	1.28	97.88±2.01	94.34±3.41
卡泊芬净	9.60	94.33±4.03	94.78±8.67
	1.92	94.51±1.77	95.87±1.89
	0.38	103.20±1.59	101.60±5.12

表 5 5 种化合物在不同条件下的稳定性（n = 5）

Tab 5 Stability of 5 compounds at different storage condition (n = 5)

化合物	质控浓度 /（μg•mL^{-1}）	*RSD*/%			
		室温	冻融	长期	进样器
伏立康唑	8.16	2.5	5.5	4.9	3.4
	1.63	3.0	4.9	3.2	3.3
	0.33	4.6	6.0	2.9	4.1
伊曲康唑	9.68	4.1	5.0	3.4	2.9
	1.94	3.9	3.9	2.2	3.0
	0.39	3.0	5.0	4.3	3.0
泊沙康唑	8.80	2.2	3.0	4.0	2.0
	1.76	4.0	4.1	4.7	3.9
	0.35	3.9	4.2	4.3	4.1
氟康唑	32.08	4.3	3.9	3.1	4.0
	6.42	2.0	5.0	2.3	3.1
	1.28	2.1	5.8	3.1	4.4
卡泊芬净	9.60	3.3	5.1	4.1	4.0
	1.92	2.7	3.2	2.9	3.2
	0.38	4.0	5.7	2.6	3.2

本研究采用建立的方法测定了 2019 年 6 月—2020 年 6 月在本院 ICU、血液科、肾病内科和呼吸科等病区中部分侵袭性真菌感染的患者使用抗真菌药物后体内药物浓度。共收集到 56 例样本（男性 25 例，女性 31 例），其中伏立康唑 32 例，氟康唑 10 例，卡泊芬净 14 例。研究结果显示，32 例使用伏立康唑治疗的患者中谷浓度最小值为 0.54 μg • mL^{-1}，最大值为 8.91 μg • mL^{-1}，平均谷浓度为（3.84±2.14）μg • mL^{-1}；10 例使用氟康唑治疗的患者中谷浓度最小值为 5.33 μg • mL^{-1}，最大值为 15.21 μg • mL^{-1}，平均谷浓度为（9.83±3.11）μg • mL^{-1}；14 例使用卡泊芬净治疗的患者中谷浓度最小值为 1.58 μg • mL^{-1}，最大

值为 9.12 μg·mL^{-1}，平均谷浓度为（5.56±2.41）μg·mL^{-1}。从检测结果可以看出，3 种抗真菌药物在严重侵袭性真菌感染的患者中个体药动学差异较大，需密切监测血药浓度。

3 讨论

随着抗真菌药物在临床中的广泛应用，出现了越来越多耐药菌以及与抗真菌药物相关的不良反应[10]。近年来抗真菌药物 PK/PD 研究概念逐渐被应用于临床[11-12]，PK/PD 研究的最终目的是寻找最佳给药剂量，优化给药方案。抗真菌药物 PK 研究最重要的内容是监测该类药物在患者体内的药物浓度，因此建立快速高效的血药浓度监测方法是开展 PK/PD 研究的基础。

抗真菌药物血药浓度测定方法有免疫法、色谱法（HPLC）和质谱法（MS）。目前，只有伏立康唑能够采用免疫法进行检测，其他抗真菌药物尚无商业试剂盒上市。HPLC 法分析时间较长，操作复杂。随着检测技术的提高，LC-MS 法在治疗抗真菌药物监测中广泛使用，其特异性高、运行时间短并可以同时测定分析多种化学结构。本试验采用 UPLC-MS 联用技术能够在 5 min 内同时测定 5 种常见抗真菌药物的含量，具有很高的检测效率；同时本方法只需 50 μL 的血浆样品，样本需求量少，可提高监测的依存性。通过对方法特异性、线性关系、回收率等方面的验证，该方法可确保 5 种抗真菌药物浓度的快速准确检测。

由于受医疗机构抗菌药物的品种和品规限制，本研究中纳入的 56 样本中未使用泊沙康唑和伊曲康唑，但这两种药物检测方法的建立对其 TDM 的研究同样具有重要意义。从 32 例使用伏立康唑的患者监测结果中可以看出，其体内药动学个体差异较大。伏立康唑的疗效与体内药物浓度具有很强的相关性，其推荐的治疗浓度范围为 1.0 ～ 5.5 μg·mL^{-1}，浓度过高发生严重不良反应的可能性大大增加；卡泊芬净安全性较其他抗真菌药物高，关于人体内推荐药物浓度的研究较少，有研究报道卡泊芬净的血药谷浓度应维持在 1 μg·mL^{-1} 以上[13]。氟康唑作为上市最早的三唑类抗真菌药，具有口服和注射两种给药途径，目前不推荐氟康唑进行常规的 TDM 监测；有研究显示抗真菌治疗时氟康唑血药谷浓度在 10 ～ 15 μg·mL^{-1} 时治疗效果较好，同时不良反应较少[14]。本试验发现，3 种抗真菌药物在严重感染患者中药物浓度差异较大，可能与患者疾病和合并用药情况有关，特别是在严重肝功能受损和低蛋白血症患者中，其药物浓度明显增加。对 56 例严重侵袭性真菌感染患者抗菌药物体内药物浓度结果的分析发现，在这类人群中开展抗真菌药物浓度监测对提高患者用药安全和疗效具有很好的促进作用。

参考文献

[1] Tuite NL，Lacey K. Overview of invasive fungal infections [J]. Methods Mol Biol，2013，968：1-23.

[2] Rivosecchi RM，Samanta P，Demehin M，et al. Pharmacokinetics of azole antifungals in cystic fibrosis [J]. Mycopathologia，2018，183（1）：139-150.

[3] Campoy S，Adrio JL. Antifungals [J]. Biochem Pharmacol，2017，133：86-96.

[4] Davis MR，Nguyen MH，Donnelley MA，et al. Tolerability of long-term fluconazole therapy [J]. J Antimicrob Chemother，2019，74（3）：768-771.

[5] Sánchez CR，Zalesak S，Pich AA，et al. Population pharmacokinetics of itraconazole solution after a single oral administration in captive lesser flamingos（Phoeniconaias minor）[J]. J Vet Pharmacol Ther，2019，42（1）：1-6.

[6] Luong ML，Al-Dabbagh M，Groll AH，et al. Utility of voriconazole therapeutic drug monitoring：a meta-analysis [J]. J Antimicrob Chemother，2016，71（7）：1786-1799.

[7] Chen L，Wang Y，Zhang T，et al. Utility of posaconazole therapeutic drug monitoring and assessment of plasma concentration threshold for effective prophylaxis of invasive fungal infections：a meta-analysis with trial sequential analysis [J]. BMC Infect Dis，2018，18（1）：155-165.

[8] Yang Q，Zhang T，Zhao D，et al. Factors influencing caspofungin plasma concentrations in kidney transplant patients with high incidence of invasive fungal infections [J]. J Clin Pharm Ther，2020，45（1）：72-80.

[9] Niwa T，Imagawa Y，Yamazaki H，et al. Drug interactions between nine antifungal agents and drugs metabolized by human cytochromes P450 [J]. Curr Drug Metab，2014，15（7）：651-679.

[10] Benitez LL，Carver PL. Adverse effects associated with long-term administration of azole antifungal agents [J]. Drugs，2019，79（8）：833-853.

[11] 黄滔敏，程能能 . 抗真菌药 PK/PD 研究进展 [J]. 上海医药，2015，36（1）：18-29.

[12] 王柠柠，梁武，颜苗，等 . 在本院患者中建立伏立康唑群体药物代谢动力学模型的初步探索 [J]. 中南药学，2015，13（11）：1174-1177.

[13] Gómez-López A. Antifungal therapeutic drug monitoring：focus on drugs without a clear recommendation [J]. Clin Microbiol Infect，2020，26（11）：1481-1487.

[14] Righi E，Carnelutti A，Baccarani U，et al. Treatment of candida infections with fluconazole in adult liver transplant recipients：is TDM-guided dosing adaptation helpful? [J]. Transpl Infect Dis，2019，21：e13113.

（收稿日期：2020-12-03；修回日期：2020-01-07）

六味地黄提取物及其联合顺铂对人肝癌 BEL-7402 细胞迁移和血管新生因子基因表达的影响

周牡娜[1]，刘检[2]，石雕[3]，刘蓉[1]，邹自征[1]，欧阳方丹[1*]（1. 益阳医学高等专科学校，湖南 益阳 413000；2. 湖南中医药大学第一附属医院，长沙 410000；3. 湖南省直中医医院，湖南 株洲 412000）

摘要：目的 观察六味地黄提取物及其联合顺铂对人肝癌 BEL-7402 细胞一般形态学和细胞迁移的影响，并探讨其对血管新生因子基因表达水平的影响。**方法** 以人肝癌细胞 BEL-7402 为研究模型，分为对照组、顺铂（1 mg·mL^{-1}）组、六味地黄提取物（100 mg·mL^{-1}）组、联合用药（六味地黄提取物 100 mg·mL^{-1}＋顺铂 1 mg·mL^{-1}）组。细胞划痕法观察细胞迁移的影响；Western blot 法与 RT-PCR 法检测各组细胞血小板反应素（TSP）、金属蛋白酶 -2 组织抑制因子（TIMP2）、血管内皮生长因子（VEGF）、血管素 -2（Ang-2）蛋白及其 mRNA 表达水平。**结果** 与对照组相比，各干预组 BEL-7402 细胞两侧细胞间距明显加大，无细胞向划痕处迁移生长，且死亡细胞显著增加；各干预组 BEL-7402 细胞 TSP、TIMP2 蛋白和 mRNA 表达水平显著升高（$P < 0.05$），VEGF、Ang-2 蛋白和 mRNA 表达显著降低（$P < 0.05$）；与六味地黄提取组和顺铂组比较，联合用药组 BEL-7402 细胞 TSP、TIMP2 蛋白和 mRNA 表达水平显著升高（$P < 0.05$），VEGF、Ang-2 蛋白和 mRNA 表达水平显著降低（$P < 0.05$）。**结论** 六味地黄提取物及其联合顺铂对 BEL-7402 细胞迁移生长具有明显的抑制作用，并可能通过促进细胞中 TSP、TIMP2 的 mRNA 表达，抑制 VEGF、Ang-2 的 mRNA 表达来抑制血管新生。

关键词：六味地黄提取物；细胞迁移；血管新生因子基因表达

中图分类号：R286 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1595-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.016

Effect of Liuwei Dihuang extract and its combination with cisplatin on the gene expression of migration and angiogenesis factors in human hepatoma BEL-7402 cells

ZHOU Mu-na[1], LIU Jian[2], SHI Diao[3], LIU Rong[1], ZOU Zi-zheng[1], OUYANG Fang-dan[1*] (1. *Yiyang Medical College*, *Yiyang Hunan* 413000; 2. *The First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine*, *Changsha* 410000; 3. *Hunan Hospital of Traditional Chinese Medicine*, *Zhuzhou Hunan* 412000)

Abstract: Objective To observe the effect of Liuwei Dihuang extract (LDE) and its combination with cisplatin on the general morphology and migration of human hepatocellular BEL-7402 cells, and on the gene expression of angiogenesis factors. **Methods** Human hepatoma BEL-7402 cells were divided into a control group, a cisplatin (1 mg·mL^{-1}) group, an LDE (100 mg·mL^{-1}) group and a combination (LDE 100 mg·mL^{-1} + cisplatin 1 mg·mL^{-1}) group. The protein and mRNA expression levels of TSP, TIMP2, VEGF and Ang-2 were detected by Western blot and RT-PCR. **Results** Compared with the control group, the distance between cells on both sides of BEL-7402 cells in each intervention group was increased. No cells migrated to the scratch, and the dead cells obviously increased. The expression levels of TSP and TIMP2 protein and mRNA in BEL-7402 cells in each intervention group were significantly increased ($P < 0.05$), and the protein and mRNA

基金项目：湖南省教育厅优秀青年课题（No.17B272）；湖南省医药卫生科研计划（No.C2016125）。

作者简介：周牡娜，女，硕士，讲师，主要从事中药有效成分研究，E-mail：891271805@qq.com *通信作者：欧阳方丹，女，硕士，副教授，主要从事生物化学与分子生物学研究，E-mail：250632678@qq.com

expression levels of VEGF and Ang-2 were decreased ($P < 0.05$). Compared with the LDE group and the cisplatin group, the protein and mRNA expression levels of TSP and TIMP2 in BEL-7402 cells in the combination group were also increased ($P < 0.05$), while the protein and mRNA expression levels of VEGF and Ang-2 were decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** LDE and its combination with cisplatin inhibit the migration and growth of BEL-7402 cells, and inhibit the angiogenesis of BEL-7402 cells by promoting the mRNA expression levels of TSP and TIMP2, and inhibiting the mRNA expression levels of VEGF and Ang-2.

Key words: Liuwei Dihuang extract; cell migration; tumor angiogenesis factorgene expression

由于恶性肿瘤性质类型各异、累及的组织和器官不同、病期不同以及现在诊断技术的局限，大多数恶性肿瘤患者在确诊时已为中晚期，手术治疗无法实现，因而治疗药物的研发十分必要[1]。目前中医药治疗肿瘤的临床研究正进入循证医学、个体化、规范化的时代，因其有降低毒副作用、减轻症状或延长带瘤生存期等特点得到了广泛认可[2]。顺铂是临床治疗中常用的化疗药物，但顺铂产生的肾毒性、耳毒性、耐药性等在临床上不可避免，近年来以顺铂为核心联合用药的“增效减毒”研究较多[3]，而六味地黄具有改善肾功能、抗氧化、改善免疫功能、消除自由基、抗肿瘤等作用[4]。研究发现六味地黄丸能够对放疗具有增效减毒的作用[5]，同时通过减少诱发肿瘤炎症因子的生成，调节免疫力，增强抗癌基因和抑制原癌基因表达等来发挥抗肿瘤作用[6]。本文通过观察六味地黄提取物及其联合顺铂对人肝癌 BEL-7402 一般形态学和细胞迁移的影响，并探讨其对血管新生因子基因表达水平的影响，阐述其抗肿瘤的可能机制，为临床治疗肝癌提供参考依据。

1 材料

1.1 六味地黄药材

六味地黄由熟地黄（玄参科植物地黄干燥块根，益阳三和中药饮片有限公司）24 g，山萸肉（山茱萸科植物山茱萸果肉，三湘中药饮片有限公司）12 g，山药（薯蓣科植物薯蓣干燥根茎，永靛中药饮片有限公司）12 g 及泽泻（泽泻科植物泽泻的干燥块茎，三湘中药饮片有限公司）、牡丹皮（毛茛科植物牡丹干燥根皮，三湘中药饮片有限公司）、茯苓（多孔菌科真菌茯苓干燥菌核，博世康中医药有限公司）各 9 g 组成，经湖南省直中医医院药学部主管药师石雕鉴定以上中药饮片均符合用药标准。

1.2 仪器及试药

CO_2 培养箱（美国 Thermo 公司）；胎牛血清、胰蛋白酶、1640 培养基（Gibco 公司）；血管内皮生长因子（VEGF）、血管素 -2（Ang-2）、血小板反应素（TSP）、金属蛋白酶 -2 组织抑制因子（TIMP2）人抗体（武汉博士德公司）；顺铂（齐鲁制药有限公司，规格：10 mg，批号：8C0214B02）。

1.3 细胞株

人肝癌 BEL-7402 细胞（Procell）。

2 方法

2.1 六味地黄提取物的制备

按“1.1”项下药材量打粉过筛后称取粉末 25 g，用 60% 乙醇 50 mL 浸润 6 h，超声（25 Hz，60 ℃）提取 40 min，过滤，滤渣用 60% 乙醇 50 mL 提取 40 min，过滤，合并滤液，挥干乙醇，定容至 25 mL，制备成生药含量为 1 g • mL^{-1} 的提取物待用。作用于细胞前，先用培养基稀释至 500 mg • mL^{-1}，再用 0.22 μm 微孔滤膜过滤，灭菌，并用培养基稀释至所需的药物浓度。

2.2 初筛六味地黄提取物给药浓度

调整 BEL-7402 细胞密度至 5000 个 / 孔接种于 96 孔培养板，静置培养 24 h，设置六味地黄提取物质量浓度梯度（500、400、300、200、100、50、25、12.5 mg • mL^{-1}，即 C1 ～ C8），另设对照组，合计 9 组，每组 3 个复孔。待细胞充分贴壁后，加入不同质量浓度六味地黄提取物，正常组则加入等体积的培养液。分别继续培养 48 h、72 h 后，每孔加入完全培养基 180 μL、CCK8 溶液 20 μL，孵育 4 h 后用酶标仪于 450 nm 波长下测定各孔吸光度值（A），并计算各组细胞的相对抑制率。

2.3 观察 BEL-7402 细胞的一般形态学

胰蛋白酶溶液消化 BEL-7402 细胞后接种于 6 孔细胞培养板中，每组设置 3 个复孔。培养至细胞完全贴壁后，顺铂（1 mg • mL^{-1}）组、六味地黄提取物（100 mg • mL^{-1}）组、联合用药（六味

地黄提取物 100 mg • mL^{-1} ＋顺铂 1 mg • mL^{-1}）组加入相应药物，对照组加入等量培养液。分别处理 48 h 后，倒置显微镜下观察细胞生长状态及形态学。

2.4 细胞划痕法检测 BEL-7402 细胞迁移能力

将对数生长期细胞用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化后，调整至适宜密度，接种于 6 孔细胞培养板，每组设置 3 个复孔。培养至细胞完全贴壁后，弃掉孔内液体，换成无血清基础培养基过夜，次日采用 200 μL 规格的枪头，同时用直尺比着均匀划出“十”字，PBS 润洗 3 次，加入低血清（含 5%FBS）培养基，除对照组给予等量培养液外，其余各组加入相应药物，继续培养 48 h 后，对各孔“十”字的四个边进行观察，并拍照记录细胞生长及迁移情况，随机选取 10 个视野进行计数，并计算细胞迁移率。

2.5 Western blot 法检测 VEGF、Ang-2、TSP、TIMP2 蛋白表达

按“2.3”项下方法培养后收集细胞，加入 RIPA 细胞裂解液和含 1%PMSF 蛋白酶抑制剂混合液，于 4 ℃条件下裂解 2 h，12 000 r • min^{-1} 离心 15 min，吸取上清液，分装备用。采用 BCA 法进行蛋白（TSP、TIMP2、VEGF、Ang-2）含量测定，依据蛋白分子质量大小选择适宜的电泳浓缩胶和分离胶。待上样缓冲液和蛋白样品混匀、变性后，进行上样、电泳、转模、封闭后，加入一抗稀释液（VEGF、Ang-2、TSP、TIMP2），孵育过夜（4 ℃），加入二抗缓冲液（HRP 标记），室温振摇孵育 1 h，通过定量分析和蛋白印迹成像系统进行扫描，计算各蛋白目标蛋白条带与内参蛋白条带的光密度比值以表示目标蛋白的相对表达量。

2.6 RT-PCR 法检测 VEGF、Ang-2、TSP、TIMP2 基因水平

将细胞用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化后，调整至适宜密度，接种于 6 孔细胞培养板，每组设置 3 个复孔。培养至细胞完全贴壁后，各干预组加入对应的药物，对照组加入等量培养液。37 ℃、5%CO_2 培养箱培养 48 h，吸弃培养基，PBS 润洗 2 次，采用 Trizol 法（4 ℃，60 min）提取细胞总 RNA，按照逆转录试剂盒转录合成 cDNA，以 real-time PCR 仪进行扩增，用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法检测目标基因 mRNA 的相对表达量。

2.7 统计学处理方法

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，SPSS 20.0 软件统计分析，组间比较采用单因素方差分析，并用 LSD-t 检验进行两两比较，$P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

3 结果

3.1 六味地黄提取物给药浓度初筛结果

不同质量浓度六味地黄提取物对 BEL-7402 细胞均具有明显的抑制作用，质量浓度为 100 mg • mL^{-1} 作用 48 h 后的平均细胞抑制率更接近 50%，结果见图 1，故选择质量浓度为 100 mg • mL^{-1} 作用时间 48 h 进行后续实验。

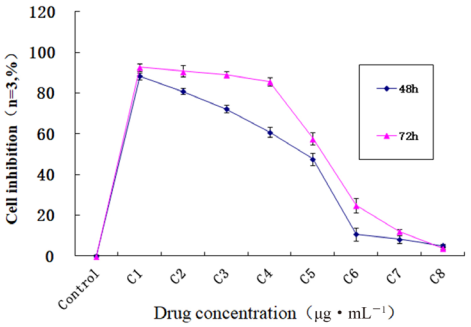


图 1 不同浓度六味地黄提取物对 BEL-7402 细胞的影响

Fig 1 Effect of different concentrations of Liuwei Dihuang extracts on BEL-7402 cells

3.2 对 BEL-7402 细胞一般形态学的影响

对照组细胞生长状态良好，细胞分布均匀，胞质均匀透亮，胞核清晰。与对照组比较，六味地黄提取物组、顺铂组、联合用药组细胞干预 48 h 后均可见贴壁细胞减少，部分细胞变圆变小，细胞间距增大，脱落浮于培养液中；联合用药组可见有较多待脱落细胞。结果见图 2。

3.3 对 BEL-7402 细胞迁移能力的影响

与对照组比较，细胞划痕面积愈合率顺铂组为（35.6±3.5）%、六味地黄提取物组为（42.6±2.8）%、联合用药组为（28.4±4.2）%，细胞迁移能力均下降，两侧细胞间距明显加大，无细胞向划痕处迁移生长，且死亡细胞显著增加。结果见图 3。

3.4 对细胞 TSP、TIMP2、VEGF 及 Ang-2 蛋白表达水平的影响

与对照组比较，六味地黄提取物组、顺铂组、联合用药组 BEL-7402 细胞内 TSP、TIMP2 蛋白表达水平显著升高，VEGF、Ang-2 蛋白表达水平显著降低；与六味地黄提取组和顺铂组比较，联合用药组细胞内 TSP、TIMP2 蛋白表达水平显著升高，VEGF、Ang-2 蛋白表达水平显著降低。结果见图 4。

3.5 对细胞 TSP、TIMP2、VEGF 及 Ang-2 基因表达水平的影响

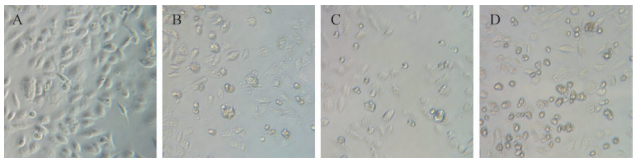


图 2 各组对 BEL-7402 细胞形态学的影响（100×）

Fig 2 Effect of each group on the morphology of BEL-7402 cells（100×）

A. 对照组（control group）；B. 六味地黄提取物组（Liuwei Dihuang extract group）；C. 顺铂组（cisplatin group）；D. 联合用药组（combination group）

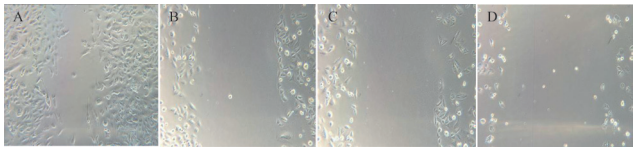


图 3 各组对 BEL-7402 细胞迁移的影响（100×）

Fig 3 Effect of each group on the migration of BEL-7402 cells（100×）

A. 对照组（control group）；B. 六味地黄提取物组（Liuwei Dihuang extract group）；C. 顺铂组（cisplatin group）；D. 联合用药组（combination group）

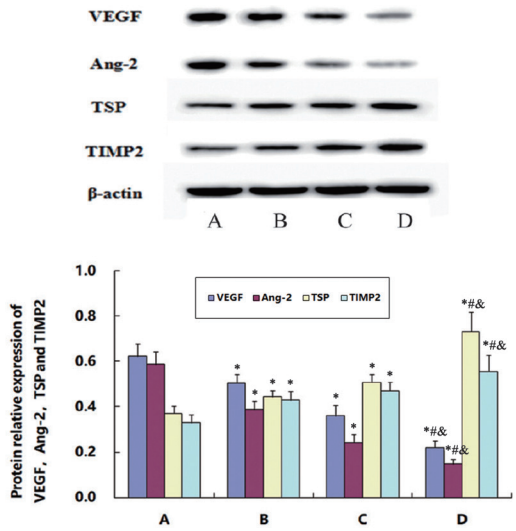


图 4 各组细胞内 VEGF、Ang-2、TSP 及 TIMP2 蛋白表达水平（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig 4 Protein expression of VEGF，Ang-2，TSP，and TIMP2 in each group（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

A. 对照组（control group）；B. 六味地黄提取物组（Liuwei Dihuang extract group）；C. 顺铂组（cisplatin group）；D. 联合用药组（combination group）

注：与对照组比较，$^{*}P<0.05$；与六味地黄提取物组比较，$^{\#}P<0.05$；与顺铂组比较，$^{\&}P<0.05$。

Note：Compared with the control group，$^{*}P<0.05$；compared with the Liuwei Dihuang extract group，$^{\#}P<0.05$；compared with the cisplatin group，$^{\&}P<0.05$.

与对照组比较，六味地黄提取物组、顺铂组、联合用药组细胞内 TSP、TIMP2 mRNA 表达水平显著升高，VEGF、Ang-2 mRNA 表达水平显著降低；与六味地黄提取组和顺铂组比较，联合组细胞内 TSP、TIMP2 mRNA 表达水平显著升高，VEGF、Ang-2 mRNA 表达水平显著降低，结果见图 5。

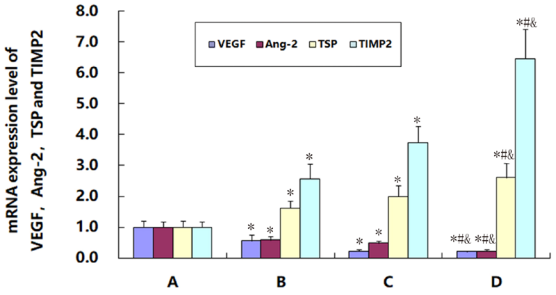


图 5 各组细胞内 VEGF、Ang-2、TSP 及 TIMP2 基因表达情况（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig 5 Gene expression of VEGF，Ang-2，TSP，and TIMP2 in each group（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

A. 对照组（control group）；B. 六味地黄提取物组（Liuwei Dihuang extract group）；C. 顺铂组（cisplatin group）；D. 联合用药组（combination group）

注：与对照组比较，$^{*}P<0.05$；与六味地黄提取物组比较，$^{\#}P<0.05$；与顺铂组比较，$^{\&}P<0.05$。

Note：Compared with the control group，$^{*}P<0.05$；compared with the Liuwei Dihuang extract group，$^{\#}P<0.05$；compared with the he cisplatin group，$^{\&}P<0.05$.

4 讨论

目前，每年全球新增肝癌患者 30 万～100 万例[7]，中国占全世界发病人数的 50% 以上[8]。血管新生是指从已经存在的毛细血管网上再大量生成新生血管的过程，新生血管为无限增殖的细胞提供充足的养料和氧气[9]。当肿瘤生长到 1～2 mm 时，肿瘤内部就会有新生血管的生成，以维持肿瘤细胞对氧气和营养物质的需要，新生血管已成为一个具有肿瘤治疗前景的靶点[10]。新生血管功能和结构的不完整可促进肿瘤细胞的增殖、浸润和远处转移[11]。新生血管是肿瘤生长、转移的基础。肿瘤细胞的无限增殖和迁移是肝癌相关死亡的重要原因。细胞划痕实验结果显示，与对照组比较，各用药组 BEL-7402 细胞间距明显加大，无细胞向划痕处迁移生长，且死亡细胞显著增加，其中联合用药组的抑制细胞迁移作用更为明显，提示六味地黄提取物及其联合顺铂对 BEL-7402 细胞迁移生长具有明显的抑制作用。

肿瘤新生血管形成过程与促血管生成因子和抗血管生成因子正负调节失衡有关，血管系统被激活，导致血管生长过度或退化，新生血管是肿瘤发生和发展中一个重要的病理特征。VEGF 是一种同源二聚体糖蛋白，是调控血管生成的重要表达因子，VEGF 表达上调可促进血管内皮细胞有丝分裂、新生血管生成。此外，VEGF 还可以

自分泌的形式促进肿瘤细胞生长[12]。肿瘤组织的缺氧、缺血、*ras*基因突变等生物因子的变化也会影响 VEGF 的表达等[13]。Ang-2 主要呈点状分布，仅局限在内皮细胞和相关的外周细胞中，通过抑制 Ang-1 活化程度，形成内分泌调节环路以维持血管生长、退化的动态平衡。Ang-2 的表达增加可促进肿瘤血管新生和新的毛细血管再建及形成[14]。有研究表明，Ang-2 在肿瘤组织中呈高表达[15]。本实验结果显示，与对照组比较，各干预组细胞内 VEGF、Ang-2 蛋白和 mRNA 表达水平显著降低；与六味地黄提取组和顺铂组比较，联合用药组细胞内 VEGF、Ang-2 蛋白和 mRNA 表达水平显著降低。这提示六味地黄提取物及其联合顺铂可能通过抑制 VEGF、Ang-2 mRNA 表达，继而下调 VEGF、Ang-2 蛋白表达水平来抑制血管新生。血小板反应蛋白（TSP）能够抑制内皮细胞的增殖及迁移、抑制内皮细胞管状结构形成，是一种有效的抗血管新生活性的分泌蛋白。研究发现，TSP 可通过影响抑制基质金属蛋白酶的转化成有活性的形式以及通过结合 CD_{36} 和 CD_{148} 受体，抑制肝癌细胞迁移和新生血管生成[16]。基质金属蛋白酶（MMPs）是目前发现的唯一能分解纤维类胶原的酶，以无活性的酶原形式分泌，在细胞外基质重塑的部位易于诱导表达。TIMP 是 MMPs 的内源性特异性抑制因子[17]。MMP2 是明胶酶，能特异性的降解基膜中的Ⅳ型胶原，促进肿瘤的转移，TIMP2 是 MMP2 的抑制剂，属于非糖基化蛋白，它以共价键的形式与 MMP2 相结合成 1∶1 复合体，对血管新生具有重要的调节作用，被证实可抑制多种癌症的恶性转移过程[18]。本研究结果显示，与对照组比较，各用药组中 TSP、TIMP2 的蛋白和 mRNA 表达水平均显著升高；与顺铂组和六味地黄提取物组比较，联合用药组中 TSP、TIMP2 的蛋白和 mRNA 表达水平均显著升高。这提示六味地黄提取物及其联合顺铂可能通过促进 TSP、TIMP2 mRNA 表达，继而上调 TSP、TIMP2 蛋白表达水平发挥抑制抗血管新生的作用。

综上，六味地黄提取物及其联合顺铂对 BEL-7402 细胞迁移生长具有明显的抑制作用，并可能通过促进 BEL-7402 细胞 TSP、TIMP2 的 mRNA 表达水平，抑制 VEGF、Ang-2 的 mRNA 表达水平来抑制肝癌细胞血管新生。本研究从基因表达水平研究六味地黄提取物抗肿瘤的机制，为其临床抗肿瘤提供了参考依据，后续将进一步通过体内动物实验探究六味地黄提取物联合顺铂抗肿瘤的作用机制。

参考文献

[1] 邵莹莹，尹双双，王恺龙，等 . 中药生物碱类成分的抗肿瘤药理作用研究进展 [J]. 中南药学，2019，17（9）：1460-1465.

[2] 于凤，王林林 . 中医药治疗鼻咽癌研究进展 [J]. 中医眼耳鼻喉杂志，2019，9（2）：99-101.

[3] 黄磊，邹日昌，宋嘉琪，等 . EGCG 联合顺铂抑制骨肉瘤 MG-63 细胞增殖、侵袭及迁移作用的实验研究 [J]. 天然产物与研究，2020，11（10）：2101-2114.

[4] 吴相文 . 六味地黄的作用机理与临床应用 [J]. 辽宁中医药大学学报，2009，11（2）：19-20.

[5] 石金凤，许丽萍，王秀增，等 . 六味地黄丸联合 5-Fu 对抑制人胃癌裸鼠移植瘤的增效作用 [J]. 中国医学工程，2015，23（9）：1-5.

[6] 段锦龙，邓博，贾立群 . 六味地黄丸防治肿瘤的研究进展 [J]. 中华中医药学刊，2017，35（9）：2339-2331.

[7] Chen W，Zheng R，Baade PD，et al. Cancer statistics in China，2015 [J]. CA Cancer J Clin，2016，66（2）：115-132.

[8] Mc Glynn KA，Petrick JL，London WT. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma：An emphasis on demographic and regional variability [J]. Clin Liver Dis，2015，19（2）：223-238.

[9] Hanahan D，Weinberg RA. Hall mark of cancer：The next generation [J]. Cell，2011，144（2011）：646-674.

[10] 杨霞，杨中汉，周倜，等 . 肿瘤血管新生抑制因子的研究进展 [J]. 生命科学，2020，50（10）：1055-1067.

[11] Petrovic N. Targeting angiogenesis in cancer treatments：Where do we stand?[J]. J Pharm Pharma Sci，2016，19（2）：226-238.

[12] Costache MI，Ioana M，Iordache S，et al. VEGF expression in pancreatic cancer and other malignancies：A review of the literature [J]. Rom J Intern Med，2015，53（3）：199-208.

[13] Edatt L，Poyyakkara A，Raji GR，et al. Role of sirtuins in tumor angiogenesis [J]. Front in Oncol，2020，9：1516.

[14] Korhonen EA，Lampinen A，Giri H，et al. Tie 1 controlsangiopoietin function in vascular remodeling and inflammation [J]. J Clin Invest，2016，126（9）：3495-3510.

[15] Chen Y，Wu Y，Zhang X，et al. Angiopoietin-2（Ang-2）is a useful serum tumor marker for liver cancer in the Chinese population [J]. Clin Chim Acta，2018，478：18-27.

[16] 薛建锋，庞志刚，刘超，等 . 血小板反应蛋白 -1 及其受体 CD 36 在肝细胞性肝癌中的表达及意义 [J]. 中国病理生理杂志，2006，22（2）：376-379.

[17] 刘林，李弘，任卫琼，等 . 天麻芎苓止眩片对自发性高血压大鼠血压及血管重塑的影响 [J]. 中国现代应用药学，2020，37（4）：414-419.

[18] 严正强，陈铁定，陈力，等 . 茶多酚对人前列腺癌 PC-3M 细胞侵袭力的影响 [J]. 浙江医学，2017，39（12）：946-951.

（收稿日期：2020-12-29；修回日期：2021-03-05）

阿胶对去卵巢小鼠学习记忆及海马 Aβ 影响的研究

张晓双[1]，白黎明[1]，白璐[2]（1. 陕西中医药大学，陕西 咸阳 712046；2. 西安市第一医院药学部，西安 710002）

摘要：目的 考察阿胶对去卵巢小鼠学习记忆及海马 Aβ 的影响。**方法** 成年雌性小鼠切除双侧卵巢后 45 d，将小鼠随机分为假手术组，模型组，阿胶高（16 g·kg^{-1}）、中（8 g·kg^{-1}）、低（4 g·kg^{-1}）剂量组和阳性对照组（0.4 mg·kg^{-1}），每组 10 只，连续灌胃给药 30 d。Morris 水迷宫检测小鼠学习记忆能力，ELISA 法检测血清雌二醇（E_2）的含量，HE 染色观察海马 CA1 区病理组织形态学，免疫组织化学法检测海马 CA1 区 Aβ 的表达。**结果** 阿胶高剂量组第 3、4 日潜伏期与模型组相比明显缩短，阿胶高、中剂量组站台穿越次数明显增加；阿胶高、中剂量组小鼠血清 E_2 浓度明显升高，阿胶高、中剂量组神经细胞核固缩减少，神经元变性程度减轻，完整锥体细胞数明显增多；阿胶高、中剂量组可减少海马 CA1 区 Aβ 阳性细胞数，阿胶高、中剂量组海马 Aβ 阳性细胞积分光密度显著减少。**结论** 阿胶能够改善去卵巢小鼠学习记忆的能力，可能与其神经元保护作用和减少 Aβ 沉积有关。

关键词：阿胶；去卵巢小鼠；雌激素；学习记忆

中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1600-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.017

Effect of Asini Corii Colla on learning and memory and Aβ in the hippocampus of ovariectomized mice

ZHANG Xiao-shuang[1], BAI Li-ming[1], BAI Lu[2] (*Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046; 2. *Department of Pharmacy*, *the First Hospital of Xi'an*, *Xi'an* 710002)

Abstract: Objective To determine the effect of Asini Corii Colla on learning and memory and Aβ in ovariectomized mice. **Methods** Forty-five days after the bilateral ovariectomy, adult female mice were randomly divided into a sham operation group, a model group, Asini Corii Colla high-dose (16 g·kg^{-1}), medium-dose (8 g·kg^{-1}), low-dose (4 g·kg^{-1}) group and a positive control (Estradiol valerate) group (0.4 mg·kg^{-1}), with 10 mice in each group. Morris water maze was used to detect the learning and memory ability. ELISA was used to detect the content of serum estradiol (E_2). HE staining was used to observe the pathological morphology of hippocampal CA1 region, and immunohistochemical method was used to detect the expression of Aβ in hippocampal CA1 region. **Results** The latency of the third and fourth day of the high-dose Asini Corii Colla group was obviously shorter than that of the model group. The number of platform crossings in the high-dose and medium-dose Asini Corii Colla groups was significantly increased. The serum E_2 concentration of mice in the high and middle dose groups increased significantly, while the nuclear pyknosis decreased, the neuronal degeneration reduced and the number of intact pyramidal cells increased significantly. Asini Corii Colla high and middle dose groups reduced the number of Aβ positive cells in hippocampal CA1 area. Asini Corii Colla high and middle dose groups decreased the intergral optical density of hippocampal Aβ positive cells significantly. **Conclusion** Asini Corii Colla can improve the learning and memory ability of ovariectomized mice, which may be related to the neuroprotective effect and the decrease in Aβ deposition.

Key words: Corii Colla Asini; ovariectomized mice; estrogen; learning and memory

---

基金项目：陕西省教育厅重点实验室科研计划项目（编号：18JS027）；陕西省中医药管理局项目资助（编号：15-ZY007）。

作者简介：张晓双，女，博士，副教授，主要从事中药药效学及毒理学研究，E-mail：sxzyxyzxs@126.com

阿胶是马科动物驴及其他驴皮经煎煮浓缩制成的固体胶[1]，其性甘，平，归肺、肝、肾经，阿胶的药理作用广泛，有抗氧化、抗疲劳、提高免疫力、促进造血、抑制癌细胞、止血等作用。两千多年来，阿胶在中国作为一种保健食品和传统中药被广泛地应用于养生和临床治疗，常治疗妇科疾病如阴道出血、痛经、崩漏、不孕、月经先期、复发性流产、多囊卵巢综合征、宫颈癌等[2]。本课题组前期研究发现阿胶 16 g • kg^{-1} 能提高正常小鼠的子宫系数，提高小鼠血清雌二醇（E_2）含量，降低小鼠血清促黄体生成素（LH）和促卵泡素（FSH）的含量，使小鼠子宫内膜增厚，子宫腔增大，腺体数目增多，表明阿胶对正常小鼠具有一定的雌激素样作用[3]。流行病学数据显示，女性绝经后阿尔茨海默病（AD）的发病率是同龄男性的 1.5 ～ 3 倍[4-5]，并且随着绝经后雌激素的减少，AD 的发生率增加。临床上雌激素替代疗法能显著改善绝经期妇女 AD 的相关症状[6]，但会给患者增加患肿瘤的风险，从天然药物中寻找有效的 AD 防治药物是目前研究的热点。本实验在前期研究基础上，考察阿胶对去卵巢小鼠学习记忆的影响。

1 材料

1.1 试药

阿胶（兰州佛慈制药股份有限公司，批号：19A55）；戊酸雌二醇片（补佳乐，批号：283A，法国拜耳公司）；Mouse ELISA E_2 kit（96t，森贝伽生物科技有限公司，批号：20191225）；HE 染色试剂盒（江苏凯基生物技术股份有限公司，批号：20190810）；免疫组化试剂盒（康为世纪生物科技有限公司，批号：40113）；Aβ1-40 抗体（艾博抗贸易有限公司，批号：GR91656-18）。

1.2 动物

雌性未孕小鼠，体质量（20±2）g [成都达硕实验动物有限公司，实验动物生产许可证号：SCXK（川）2015-030]。

1.3 仪器

GB-204 电子天平（瑞士梅特勒）；Forma-86 ℃ ULT Freezer（美国热电 Forma）；KDC-160HR 高速冷冻离心机（安徽科大创新股份有限公司）；Morris 水迷宫视频分析系统（上海吉量软件科技有限公司）；德国 Leica DM4000B LED 智能型生物显微镜（德国 Leica）；BI-2000 医学图像分析系统（成都泰盟科技有限公司）。

2 方法

2.1 造模及分组及给药

选取健康雌性未孕小鼠，小鼠腹腔注射戊巴比妥钠溶液 35 mg • kg^{-1} 麻醉。将小鼠腹位固定，在躯干下 1/3，离开脊柱两侧各 1 ～ 2 cm 处作纵形切口，长约 1 cm，用镊子拉出脂肪团，找到卵巢，结扎子宫角，剪去卵巢及余线。假手术组只切除卵巢附近的脂肪，不切除卵巢，将组织推回腹腔，缝合切口。腹腔注射青霉素，每日 1 次，连续一周。逐只进行阴道涂片检查，每日 1 次，选取连续 5 d 为间情期小鼠供实验用。造模成功的小鼠按体质量随机分成模型对照组、阿胶高剂量组（16 g • kg^{-1}）、阿胶中剂量组（8 g • kg^{-1}）、阿胶低剂量组（4 g • kg^{-1}）和阳性对照组戊酸雌二醇片（0.4 mg • kg^{-1}）组，每组 10 只，给药体积 20 mL • kg^{-1}，假手术组给予等体积生理盐水，连续灌胃 30 d。

2.2 指标检测

2.2.1 Morris 水迷宫[4] 在给药结束前 5 d，开始进行 4 d 的 Morris 水迷宫的定向航行实验，记录从入水至找到安全平台的时间即逃避潜伏期，测试时间限定为 90 s，超过者以 90 s 计；空间探索实验行为测试第 5 日撤除平台，在站台的相邻象限将小鼠面向池壁放入水中，以原平台所在的Ⅱ象限作为目标区，记录 90 s 时限内各组小鼠在原平台Ⅱ象限游泳时间与总游泳时间的比值和各组小鼠准确穿过原平台所在位置的次数。

2.2.2 ELISA 法测定血清 E_2 的水平 末次灌胃 24 h 后，摘眼球取血，室温静置 30 min 后 3000 r • min^{-1} 离心 15 min，分离血清，ELISA 法测定血清 E_2 的水平。

2.2.3 HE 染色观察海马神经元的形态 Morris 水迷宫测试结束后，各组小鼠腹腔注射 10% 水合氯醛溶液 0.1 mL/10 g 麻醉，快速开胸暴露心脏，将穿刺针通过左心室进入升主动脉，剪开右心耳，快速灌注 37 ℃生理盐水将血液冲干净后，缓慢灌注新鲜配制的 4 ℃含 4% 多聚甲醛的 0.1 mol • L^{-1} 的磷酸缓冲液，断头剥离颅骨，在洁净冰盘上完整取出大脑，在 4% 多聚甲醛的磷酸缓冲液中固定，4 ℃保存，制备石蜡切片。HE 染色，观察海马神经元的细胞形态。

2.2.4 免疫组化法检测海马 CA1 区 Aβ 的表达 参照 Aβ 试剂盒说明书，按常规 SABC 法进行，DAB 显色，苏木素复染。以细胞膜或细胞浆着色为棕黄色定为阳性细胞。

2.3 统计方法

采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行统计分析。所有数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用 t 检验。

3　结果

3.1　阿胶对去卵巢小鼠 Morris 水迷宫结果的影响

定向航行实验中，各组之间第 1、2 日的潜伏期未见明显差异。模型组小鼠第 3、4 日的潜伏期较假手术组明显延长（$P < 0.01$）。与模型组相比，阳性对照组、阿胶高剂量组小鼠第 3、4 日的潜伏期明显缩短（$P < 0.05$）。空间探索实验，各组小鼠Ⅱ象限时间（%）差异无统计学意义。模型组站台穿越次数是 0，与假手术组比较差异有统计学意义（$P < 0.01$）。与模型组比较，阳性对照组，阿胶高、中剂量组站台穿越次数明显增加（$P < 0.01$）。结果见表 1 和图 1。

表 1　阿胶对去卵巢小鼠 Morris 水迷宫定向航行实验和空间探索实验的影响（$\bar{x}\pm s$，$n = 10$）

Tab 1　Effect of Asini Corii Colla on Morris water maze directional navigation experiment and space exploration experiment in ovariectomized mice（$\bar{x}\pm s$，$n = 10$）

组别	剂量	逃避潜伏期 /s				空间探索实验	
		第 1 日	第 2 日	第 3 日	第 4 日	Ⅱ象限时间 /%	站台穿越次数 / 次
假手术组	—	76.46±22.58	67.69±25.32	48.26±23.48	35.69±18.51	26.94±14.21	1.50±1.00
模型组	—	77.84±20.18	74.25±26.54	72.16±26.48$^{\#\#}$	67.59±26.35$^{\#\#}$	22.84±15.44	0.00±0.00$^{\#\#}$
阳性对照组	0.4 mg • kg^{-1}	79.60±25.18	64.51±22.28	57.42±28.14*	48.88±26.87*	24.95±8.33	1.10±0.89**
阿胶高剂量组	16 g • kg^{-1}	75.15±30.46	65.62±33.85	59.45±38.72*	53.31±33.29*	20.37±9.09	1.29±0.59**
阿胶中剂量组	8 g • kg^{-1}	75.61±18.12	71.18±22.73	66.11±30.06	59.52±25.65	24.56±9.51	1.43±0.64**
阿胶低剂量组	4 g • kg^{-1}	80.82±19.33	75.39±22.65	70.50±23.44	64.52±25.28	21.10±11.33	0.4±1.00

注（Note）：与假手术组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$（Compared with the sham operation group，$^{\#\#}P < 0.01$；compared with the model group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）。

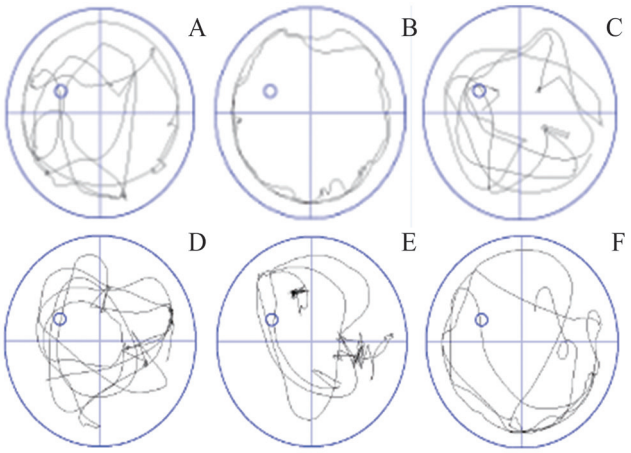


图 1　阿胶对去卵巢小鼠 Morris 水迷宫空间探索实验轨迹图

Fig 1　Experimental trace of Asini Corii Colla on Morris water maze in ovariectomized mice

A. 假手术组（sham operation group）；B. 模型组（model group）；C. 阳性对照组（postive control group）；D. 阿胶高剂量组（high-dose Asini Corii Colla group）；E. 阿胶中剂量组（medium-dose Asini Corii Colla group）；F. 阿胶低剂量组（low-dose Asini Corii Colla group）

3.2　阿胶对去卵巢小鼠血清 E_2 激素水平的影响

与假手术组相比，模型组小鼠血清 E_2 水平明显降低（$P < 0.01$）；与模型组相比，阿胶高、中剂量组和阳性对照组小鼠血清 E_2 水平明显升高（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。结果见表 2。

表 2　阿胶对去卵巢小鼠血清 E_2 激素水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n = 10$）

Tab 2　Effect of Asini Corii Colla on the serum E_2 hormone level in ovariectomized mice（$\bar{x}\pm s$，$n = 10$）

组别	剂量	E_2/（ng • L^{-1}）
假手术组	—	52.20±10.57
模型组	—	20.20±4.87$^{\#\#}$
阳性对照组	0.4 mg • kg^{-1}	78.20±16.54**
阿胶高剂量组	16 g • kg^{-1}	33.30±4.00**
阿胶中剂量组	8 g • kg^{-1}	29.80±9.82*
阿胶低剂量组	4 g • kg^{-1}	25.60±6.70

注（Note）：与假手术组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$（Compared with the sham operation group，$^{\#\#}P < 0.01$；compared with the model group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）。

3.3　阿胶对去卵巢小鼠海马 CA1 区组织形态学的影响

假手术组海马 CA1 区可见紧密排列的锥体细胞，神经细胞核仁、核膜清晰，胞浆染色正常；模型组海马 CA1 区锥体细胞排列紊乱，部分神经元脱失，神经元大小不一，形态改变，呈三角形或不规则形，核固缩，模糊不清，部分细胞皱缩呈细梭形；阳性对照组、阿胶高、中剂量与模型组相比，神经细胞核固缩减少，神经元变性程度减轻，完整锥体细胞数明显增多。结果见图 2。

3.4　阿胶对去卵巢小鼠海马 Aβ 的表达的影响

假手术组海马阳性细胞较少，染色较淡，模型组海马 Aβ 阳性细胞较多。与模型组比较，阳性对照组和阿胶高剂量海马 Aβ 阳性细胞减少，结果见图 3。

3.5　图像分析结果显示

与假手术组比较，模型组海马 Aβ 阳性细胞积分光密度（IOD）显著增加（$P < 0.01$）。与模型组比较，阳性对照组，阿胶高、中剂量组海马 Aβ 阳性细胞 IOD 显著减少（$P < 0.01$，$P < 0.05$）。结果见表 3。

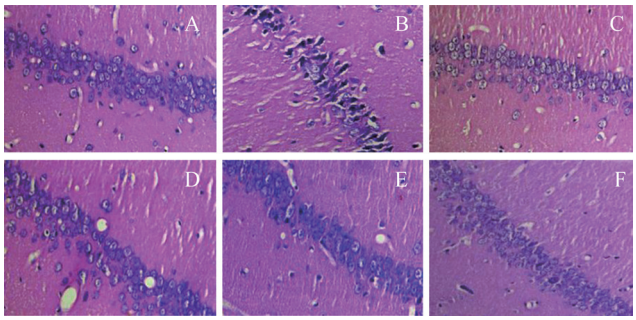


图 2　阿胶对去卵巢小鼠海马组织形态学的影响（HE，200×）

Fig 2　Effect of Asini Corii Colla on histomorphology of hippocampus in ovariectomized mice（HE，200×）

A. 假手术组（sham operation group）；B. 模型组（model group）；C. 阳性对照组（postive control group）；D. 阿胶高剂量组（high-dose Asini Corii Colla group）；E. 阿胶中剂量组（medium-dose Asini Corii Colla group）；F. 阿胶低剂量组（low-dose Asini Corii Colla group）

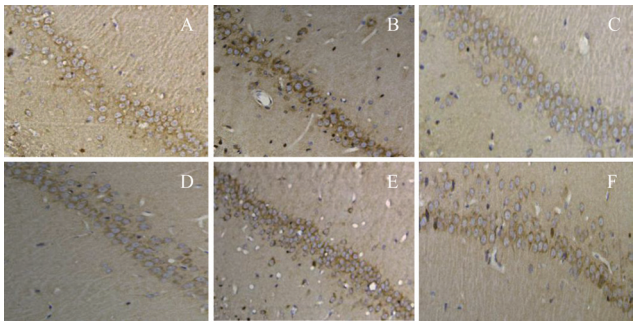


图 3　阿胶对去卵巢小鼠海马 Aβ 表达的影响（免疫组化，200×）

Fig 3　Effect of Asini Corii Colla on Aβ expression in hippocampus of ovariectomized mice（immunohistochemistry，200×）

A. 假手术组（sham operation group）；B. 模型组（model group）；C. 阳性对照组（postive control group）；D. 阿胶高剂量组（high-dose Asini Corii Colla group）；E. 阿胶中剂量组（medium-dose Asini Corii Colla group）；F. 阿胶低剂量组（low-dose Asini Corii Colla group）

4　结论

雌激素是人体内重要的类固醇激素，雌激素主要包括 E_2，其次为雌酮和雌三醇，E_2 的生理功效最强，雌激素在体内含量的变化影响生殖系统、中枢神经系统、心血管系统、免疫系统、骨骼系统等的生理代谢过程[7]。卵巢是雌激素的主要来源，妇女进入绝经期后，体内雌激素水平将会快速下降，导致更年期综合征、骨质疏松症、AD 和心血管疾病等。更年期妇女采用雌激素替代疗法来治疗或预防这些绝经期易出现的症状。但长期应用雌激素易产生高血压、水肿等不良反应，并增加乳腺癌及子宫内膜癌等妇科肿瘤的发病危险。因此人们一直致力于寻求雌激素替代物，期望这种替代物既能发挥雌激素对心脑血管等系统的保护作用，缓解更年期综合征，又能避免上述不良反应，这类物质即被称为选择性雌激素受体调节剂[8]。

表 3　阿胶对去卵巢小鼠海马 Aβ 阳性细胞积分光密度（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Tab 3　Effect of Asini Corii Colla on integral optical density of Aβ positive cells in the hippocampus of ovariectomized mice（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	剂量	IOD
假手术组	—	38.28±8.37
模型组	—	$75.50\pm10.23^{\#\#}$
阳性对照组	0.4 mg·kg^{-1}	$55.18\pm9.18^{**}$
阿胶高剂量组	16 g·kg^{-1}	$53.58\pm11.32^{**}$
阿胶中剂量组	8 g·kg^{-1}	$62.38\pm12.65^{*}$
阿胶低剂量组	4 g·kg^{-1}	67.28±12.82

注（Note）：与假手术组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$（compared with the sham operation group，$^{\#\#}P<0.01$；compared with the model group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$）。

女性绝经后体内雌激素分泌减少会带来许多生理、心理上的变化[9]。流行病学数据显示，围经期女性存在较高的 AD 患病率，而且随着绝经后雌激素的减少，AD 的发生率越高。雌激素对于 AD 有积极的影响，雌激素能够促进脑内神经细胞轴突、树突的生长、突触的形成，雌激素可促进长时程增强而促进学习记忆，雌激素具有抗兴奋性氨基酸毒性、增加大脑皮质血流量和提高大脑葡萄糖的利用率，雌激素可减少神经细胞的凋亡并且可以防止毒性 Aβ 片段的产生等[10-11]。去卵巢所致动物模型和雌激素信号通路常用于 AD 的发病机制及抗 AD 药物的药效与机制研究[12]。

阿胶属于胶类药材，为动物的皮熬制而成的明胶类物质。从阿胶中检测和分离出来的成分主要包括氨基酸、蛋白质 / 明胶、多糖、挥发性物质、无机物等。阿胶以滋阴补血、补虚止血为见长，适用于血虚萎黄，眩晕心悸、肌痿无力，心烦不眠，虚风内动，肺燥咳嗽，劳嗽咯血，便血崩漏，妊娠胎漏等病症[13]。本次实验结果表明，阿胶能够改善去卵巢 AD 小鼠的学习记忆能力，高剂量组作用比较显著，可能与其神经元保护作用和减少 Aβ 沉积有关。其作用机制还待进一步研究。

参考文献

[1] 杜怡波，樊慧蓉，阎昭 . 阿胶的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 天津医科大学学报，2018，24（3）：267-270.

[2] 白雅黎，韦宇，朱向东，等 . 阿胶的量效关系及其临床应用 [J]. 吉林中医药，2004，32（12）：100-103.

[3] 刘颖，胡锐，张晓双，等 . 阿胶对正常雌性小鼠雌激素样作用研究 [J]. 山东中医，2018，37（8）：681-683.

[4] PikeCJ，CarrollJC，RosarioER，et al. Protective actions of sexsteroid hormones in Alzheimer’sdisease [J]. Front Neuroendocrinol，2009，30（2）：239-258.

[5] 杨华，屈秋民，韩建峰，等 . 女性阿尔茨海默病与雌激素水平的关系 [J]. 西安交通大学，2006，7（6）：609-614.

[6] Sherwin BB. Estrogen and cognitive aging in women [J]. Neuroscience，2006，138（3）：1021-1026.
[7] 吴小霞，周则卫 . 雌激素的研究进展 [J]. 医药导报，2008，27（10）：1234-1237.
[8] 赵元，郑红霞，徐颖，等 . 中药植物雌激素的研究进展 [J]. 中国中药杂志，2017，42（18）：743-487.
[9] 邹寿涛，秦健 . 结合雌激素与苯草昔芬联合应用于绝经期综合征的临床研究进展 [J]. 中南药学，2015，13（10）：1065-1067.
[10] Nilsen J. Estradiol and neuro degeneative oxidative stress [J]. Front Neuroendocrinol，2008，29（4）：463-475.
[11] Shumaker SA，Legault C，Rapp SR，et al. Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women：The women's health initiative memory study：Arandomized controlled trial [J]. JAMA，2003，289（20）：2651-2662.
[12] 田方泽，畅洪昇，周静洋，等 . 去卵巢所致老年痴呆模型的研究探讨 [J]. 世界科学技术（中医药现代化），2014，16（6）：1406-1410.
[13] 魏珍珍，方晓艳，苗明三 . 胶类中药的特点及现代研究分析 [J]. 中国现代应用药学，2019，36（14）：1842-1849.
（收稿日期：2020-11-20；修回日期：2020-12-20）

一种氨肽酶 N 抑制剂抑酶活性检测试剂盒的开发

周奕婷，徐鑫悦，宋吉亮，李玉天，葛彬彬，王森森，房春燕，王学健*（潍坊医学院药学院，山东 潍坊 261053）

摘要：目的 开发一种能准确、特异地评价目标化合物对人氨肽酶 N 的抑酶活性检测试剂盒。**方法** 验证试剂盒准确度、精密度、稳定性等性能指标，同时通过与同类的传统试剂盒进行米氏常数的评价确认该试剂盒的灵敏度。**结果** 精密度验证，试剂盒的 CV = 4.29% 符合 CV < 15% 的要求；准确度验证中，标准化残差 δ^* = 1.747 落在（－2，2）区间以内，在 95% 置信度内是正常实验点，数据准确可靠；酶源稳定性良好；线性范围宽，96 孔板中氨肽酶 N 在加入量 120 μL 时还能呈现良好的线性关系；该试剂盒米氏常数低于传统试剂盒，说明灵敏度高。**结论** 所开发的试剂盒主要的性能指标表现良好，能准确测定化合物对人源氨肽酶 N 的抑酶活性，其检测成本和可靠性优于现有上市产品，具有推广应用及开发价值。

关键词：氨肽酶 N；检测试剂盒；性能评估；抑酶活性
中图分类号：TH77，R563.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1604-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.018

Development of detection kit of inhibitory activity of aminopeptidase N inhibitor

ZHOU Yi-ting, XU Xin-yue, SONG Ji-liang, LI Yu-tian, GE Bin-bin, WANG Sen-sen, FANG Chun-yan, WANG Xue-jian* (*College of Pharmacy*, *Weifang Medical Institute*, *Weifang Shandong* 261053)

Abstract: Objective To develop a kit to accurately evaluate the inhibitory effect of target compounds against human aminopeptidase N (APN). **Methods** The accuracy, precision, stability and other performance indicators of the kit were verified and the sensitivity of the kit was confirmed through evaluating the K_m with similar traditional kit. **Results** According to the precision verification, CV = 4.29% of this kit met the requirement of CV < 15%. In the accuracy verification, the standardized residual δ^* = 1.747 fell within the (− 2, 2) interval, which was a normal experimental point

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81503108）；国家级大学生创新创业训练计划项目（No. 201910438027X）。
作者简介：周奕婷，女，主要从事药学相关研究，E-mail：2574848951@qq.com *通信作者：王学健，男，副教授，主要从事抗肿瘤药理研究，E-mail：wangxuejian @wfmc.edu.cn

within 95% confidence. Therefore, the data were accurate and reliable. The enzyme source showed good stability. The linear range was wide. A good linearity was shown when 120 μL APN enzyme was added into the 96-well plate. K_m of this kit was lower than the traditional kit, indicating high sensitivity. **Conclusion** The main indicators of this kit perform well, which can accurately determine the inhibitory activity of the compound against human APN. The cost and reliability of the test are superior to the market products.

Key words: aminopeptidase N; detection kit; performance evaluation; inhibitory activity

氨肽酶 N（aminopeptidase N，APN）是半静息态肝癌干细胞的生物标志物[1]，增强 APN 表达能促进肝癌干细胞存活。普通肝癌细胞单用化疗药氟尿嘧啶（5-fluorouracil，5-FU）处理，APN 上调，随之产生耐药性，合用 APN 抑制剂乌苯美司（ubenimex）能明显增强 5-FU、顺铂、阿霉素的细胞毒作用，减少肝癌肿瘤干细胞球形成[2-3]，提示靶向抑制 APN 对于肝癌耐药可能具有良好的治疗效果。另外，APN 在肿瘤转移方面也发挥着重要作用[4]，因此该蛋白是一个很好的抗肿瘤治疗靶点[5]。

目前已有多个实验室从事小分子氨肽酶 N 抑制剂的合成[6-8]，因此检测目标化合物对氨肽酶 N 的抑酶活性是必不可少的步骤。而原有的氨肽酶 N 抑制剂抑酶活性检测试剂盒的酶源是从猪肾小体中提取的氨肽酶，已有文献表明，使用该试剂盒测定化合物抑酶活性不能准确反映对人源氨肽酶 N 的抑制作用[9]。同时该试剂盒价格昂贵（Sigma，L6007），使用成本较高。因此本课题组开发了一种全新的方法，以人源的氨肽酶 N 作为酶源，用于测定化合物的抑酶活性。我们从多种肿瘤细胞匀浆筛选到人白血病 K562 细胞匀浆对 APN 底物的催化能力最弱，使用该细胞以慢病毒过表达 APN，并筛选到单克隆细胞株（K562-APN），以该细胞匀浆作为酶源用于化合物抑酶活性评价[10]。本文主要对该试剂盒的精密度、准确度、稳定性等进行检测，评价该试剂盒能否用于氨肽酶 N 抑制剂的抑酶活性测定。

1 仪器与试药

多功能读板机 SpectraMax M5（Molecular Devices），超声细胞破碎仪（南京宁凯仪器有限公司），DNP-9082 电热恒温培养箱（上海精宏实验设备有限公司），HH-2 数显电子恒温水浴锅（常州国华电器有限公司），离心机（Eppendorf）。*L*-亮氨酰对硝基苯胺（Sigma，L9125），K562 细胞株（中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库），乌苯美司（Sigma），Hyclone 1640 液体培养基（美国 Hyclone 公司），Excell 新生牛血清（上海依科赛生物制品有限公司）。

2 方法

2.1 精密度测定

以人白血病 K562-APN 细胞匀浆为酶源，*L*-亮氨酰对硝基苯胺为底物，测定乌苯美司对氨肽酶 N 抑制作用的 IC_{50}。重复测定 3 次，用变异系数来评价。向 96 孔板中分别加入 90 μL 氨肽酶 N 溶液和不同浓度梯度的乌苯美司溶液（25、50、100、200、400 μmol • L^{-1}），37 ℃孵育 5 min 后，加入 10 μL 底物溶液。设置 100% 组（只加酶和底物），用磷酸盐缓冲液补足体积至 140 μL。37 ℃孵育 1 h，用多功能读板机测定 405 nm 处的吸光度值，通过酶活力变化评价乌苯美司对氨肽酶 N 的抑制作用，计算半数抑制浓度 IC_{50}。重复测定 3 次，取平均值和标准偏差，计算变异系数。

$$抑制率=（OD_{100\%组}-OD_{抑制剂组}）/OD_{100\%组}\times100\%$$

2.2 准确度测定

在 96 孔板中加入 10 μL 底物，再分别加入 0、20、40、60、80、100 μL 氨肽酶 N，测量读取吸光度。以氨肽酶 N 加入量为横坐标，吸光度为纵坐标，通过线性方程计算出氨肽酶 N 加入量为 10、30、50、70、90 μL 时的理论值。再另外加入 10 μL 底物，分别加入 10、30、50、70、90 μL 氨肽酶 N，孵育后，读取吸光度，重复测定 3 次，取平均值，测得的吸光度为实际值，计算准确度。

2.3 稳定性测定

取四管氨肽酶 N，置于－ 20 ℃冰箱，分别反复冻融 0、10、20、30 次，冻融后加入底物，37 ℃孵育后测定吸光度，重复进行 3 次，取平均值，用 $U=[\triangle A/(0.01t)]\times D$ 计算酶活力。

U 为酶活力；$\triangle A$ 为反应时间内吸光度值的变化；t 为反应时间（min）；D 为稀释倍数，即提取的总酶液为反应系统内酶液的倍数。

2.4 线性范围测定

在 96 孔板中加入 10 μL 底物，再分别加入 0、

20、40、60、80、100、120 μL 氨肽酶 N，用磷酸盐缓冲液补足体积至 120 μL，加入底物 37 ℃孵育后，测定 405 nm 处的吸光度，重复测定 3 次，取平均值。

2.5 K_m 值测定

将 10 μL 不同浓度的底物和 10 μL 氨肽酶 N 加入 96 孔板，使底物的工作浓度分别为 1.6、0.8、0.4、0.2、0.1、0.05 mmol • L^{-1}，37 ℃恒温孵育 5 min。设置实验组和对照组，对照组不含氨肽酶 N，用磷酸盐缓冲液补足体积至 100 μL，设置多功能读板机孵育温度为 37 ℃，每分钟测一次吸光度，共测 15 min，即 15 组数据。根据 Lineweaver-Burk 公式计算：

$1/V = K_m/V_m \cdot 1/[S] + 1/V_m$

$1/V$ 为酶促反应速度的倒数；K_m 为米氏常数；$1/[S]$ 为底物浓度的倒数；V_m 为最大反应速度。

3 结果

3.1 精密度

重复测定 3 次乌苯美司对 APN 酶活的抑制率，测得 IC_{50} 的均值为 77.41，标准偏差为 3.32。变异系数 CV 为 4.29%（＜ 15%），说明 3 组数据间变化小，试剂盒的重现性良好。

3.2 准确度

以测得的实际吸光度与理论吸光度做差。残差分别为 $\triangle A_1 = 0.0102$，$\triangle A_2 = 0.0037$，$\triangle A_3 = 0.0122$，$\triangle A_4 = 0.011$，$\triangle A_5 = 0.0023$。残差均值 $\triangle A = 0.0079$，残差标准偏差为 0.0045，标准化残差 δ^* ＝残差的均值 / 残差的标准差＝ 1.747，δ^* 遵从标准正态分布 N（0，1）。实验点的标准化残差落在（－ 2，2）区间以内，可在 95% 置信度将其判为正常实验点，参与回归直线拟合。以上数据表明，该试剂盒的准确度好，能保证后续实验数据的准确可靠性。

3.3 稳定性

对试剂盒所用酶源的稳定性进行评价，取四管氨肽酶 N 于－ 20 ℃冰箱，分别反复冻融 0、10、20、30 次后测定酶活性，重复测定 3 次。在反复冻融 5 次后酶活力开始有所下降，反复冻融 30 次后酶活力下降了 28.1%，且在冻融 20 ～ 30 次后酶活力趋于稳定，说明酶源的稳定性良好。结果见图 1。

3.4 线性范围

以“2.4”项下测得的吸光度作图，线性拟合后所得回归方程 $Y = 0.0026X + 0.0285$，$R^2 = 0.9827$。结果表明氨肽酶 N 加入量在 0 ～ 120 μL 表现出良好的线性相关，见图 2。

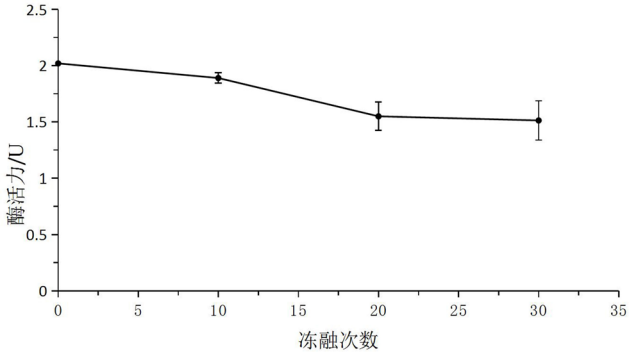


图 1 氨肽酶 N 反复冻融对酶活力的影响

Fig 1 Effect of repeated freezing and thawing on the enzyme activity of aminopeptidase N

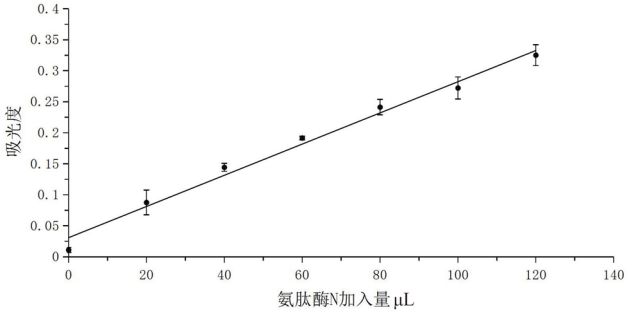


图 2 酶法测定氨肽酶 N 的线性范围

Fig 2 Enzymatic determination of the linearity of aminopeptidase N

3.5 米氏常数 K_m

K_m 是酶促反应最大速度一半时底物的浓度，K_m 越小说明酶与底物的亲和力越大。为了进一步确认该试剂盒提供的酶源与底物的亲和力，本研究采用 Lineweaver-Burk 双倒数法测定该酶的 K_m 值。通过检测 405 nm 处不同底物浓度孔每分钟的吸光度值，计算每个浓度的反应速率，见图 3。以底物浓度的倒数 $1/[S]$ 作为横坐标，反应速率的倒数 $1/V$ 为纵坐标作图，线性拟合所得直线与横坐标 $1/[S]$ 交点为 $-1/K_m$，见图 4。商品化试剂盒的 K_m 为 0.295 mmol • L^{-1}，而该试剂盒的 K_m 值为 0.121 mmol • L^{-1}，表明该试剂盒提供的酶与底物的亲和力更大。

4 讨论

由于当前商品化的氨肽酶 N 抑酶活性测定试剂盒价格昂贵，且所用酶源是从猪肾小体中提取，因此所测数据不能准确反应化合物对人源氨肽酶 N 的抑制作用 [9]。

本文对课题组开发的试剂盒的各项参数进行了测定，实验结果表明变异系数 $CV = 4.29\%$ 符合 $CV < 15\%$ 的要求，说明该试剂盒具有良好的精确度，能保证后续开展实验的合理可靠性 [11]。在准确度实验中，标准化残差 $\delta^* = 1.747$，δ^* 遵从标准正态分布 N（0，1），落在（－ 2，2）区间以

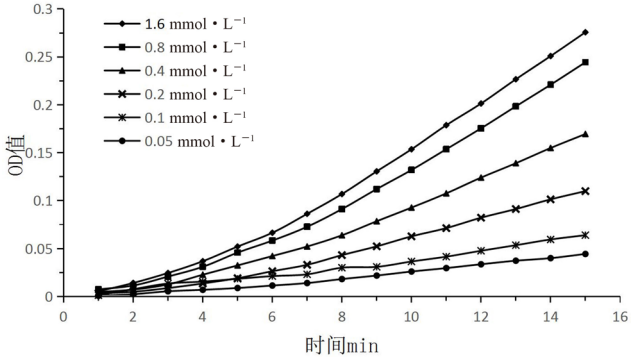


图 3　不同浓度底物的反应速率

Fig 3　Reaction rate of different concentrations of substrate

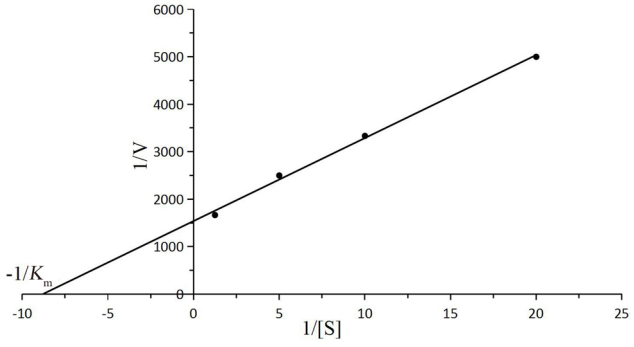


图 4　氨肽酶 N 对 L-Leu-P-nitroanilide 的动力学常数

Fig 4　Kinetic constants of aminopeptidase N on L-Leu-P-nitroanilide

内，在 95% 置信度内是正常试验点，说明数据准确可靠[12-13]。酶作为一种生物催化剂，能够以较少的量进行快速有效的反应，同时其反应有最适温度及 pH，因此酶的保藏温度都是低温保藏。而在长时间的使用过程中常会进行反复冻融，加之沉降作用，会导致后续酶促效率的降低，本研究结果表明，氨肽酶 N 于－ 20 ℃冰箱和室温反复冻融 5 次后酶活力开始下降，冻融 20 ～ 30 次后酶活力趋于稳定，酶活力反复冻融 30 次后下降 28.1%，稳定性良好。验证试剂盒的生物参考区间的结果表明，当底物为 10 μL，氨肽酶 N ≤ 120 μL 时测定的结果是可靠的。K_m 结果表明该试剂盒提供的酶与底物的亲和力更大，能更准确反映化合物对人源氨肽酶 N 的抑酶活性。

以上评价数据表明本课题组开发的试剂盒，能准确测定化合物对人源氨肽酶 N 的抑酶活性。同时 K562 细胞为悬浮培养细胞，适合大规模培养，能够大量得到酶源，成本低廉。本试剂盒的抑酶活性评价方法，已开始在小范围应用，数据可靠，反馈良好，具备推广应用及开发价值。

参考文献

[1] Haraguchi H，Ishii H，Mimori K，et al. CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells [J]. J Clin Invest，2010，120（9）：3326-3339.

[2] Zhang J，Fang CY，Qu MH，et al. CD13 inhibition enhances cytotoxic effect of chemotherapy agents [J]. Front Pharmacol，2018，9：1042.

[3] Dou CH，Fang CY，Zhao Y，et al. BC-02 eradicates liver cancer stem cells by upregulating the ROS-dependent DNA damage [J]. Int J Oncol，2017，51（6）：1775-1784.

[4] Guzman-Rojas L，Rangel R，Salameh A，et al. Cooperative effects of aminopeptidase N（CD13）expressed by nonmalignant and cancer cells within the tumor microenvironment [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2012，109（5）：1637-1642.

[5] Yamanaka C，Wada H，Eguchi H，et al. Clinical significance of CD13 and epithelial mesenchymal transition（EMT）markers in hepatocellular carcinoma [J]. Jpn J Clin Oncol，2018，48（1）：52-60.

[6] Cao JY，Zhao W，Zhao CL，et al. Development of a Bestatin-SAHA hybrid with dual inhibitory activity against APN and HDAC [J]. Molecules，2020，25（21）：4991.

[7] Pascual I，Valiente PA，García G，et al. Discovery of novel non-competitive inhibitors of mammalian neutral M1 aminopeptidase（APN）[J]. Biochimie，2017，142：216-225.

[8] Cao JY，Zang J，Kong XJ，et al. Leucine ureido derivatives as aminopeptidase N inhibitors using click chemistry. Part II [J]. Bioorg Med Chem，2019，27（6）：978-990.

[9] Wang XJ，Zhang L，Yang KH，et al. The Effect of Different Species Aminopeptidase N Structure on the Activity Determination of APN Inhibitor [J]. Biol Pharm Bull，2010，33（10）：1658-1665.

[10] Liu HJ，Wang XJ，Yang HL，et al. New method for detecting the suppressing effect of enzyme activity by aminopeptidase N inhibitor [J]. Chem Pharm Bull，2019，67（2）：155-158.

[11] 温冬梅，张秀明，吴剑杨，等 . 应用 CLSI EP5-A2 文件评价生化检测系统的精密度性能 [J]. 检验医学与临床，2010，7（19）：2096-2098.

[12] 高祖新，陈华钧，黄志远 . 概率论与数理统计 [M]. 南京：南京大学出版社，1995：50-54.

[13] 陆晓华，施文赵 . 化学计量学 [J]. 自然杂志，1992，15（4）：286-289.

（收稿日期：2020-12-28；修回日期：2021-02-25）

知母配方颗粒中 4 种成分在大鼠体内的药动学研究

朱琳，毛梦倩，刘亮亮，刘珏玲*（山西卫生健康职业学院，山西 晋中 030619）

摘要：目的 建立 HPLC-MS/MS 法同时测定大鼠血浆中新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 BⅡ和知母皂苷 AⅢ的含量，并用于知母配方颗粒与饮片提取物在健康大鼠体内的药动学行为的比较。**方法** 采用 Phenomenex Kinetex C_{18}（75 mm×2.1 mm，2.6 μm）色谱柱，水（0.1% 甲酸）-甲醇（0.1% 甲酸）为流动相，梯度洗脱，流速为 0.4 mL·min^{-1}，柱温为 30 ℃。质谱检测器采用电喷雾离子源，在负离子模式下进行多反应监测。**结果** 知母配方颗粒与饮片提取物中新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 BⅡ和知母皂苷 AⅢ的药动学参数差异无统计学意义。**结论** 知母配方颗粒与饮片提取物具有生物等效性，为知母颗粒的临床合理用药提供了参考。

关键词：知母配方颗粒；HPLC-MS/MS；药动学；生物等效性
中图分类号：R286 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1608-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.019

Pharmacokinetics of 4 components in dispensing granules of *Anemarrhenae Rhizoma* in rats

ZHU Lin, MAO Meng-qian, LIU Liang-liang, LIU Jue-ling* (*Shanxi Health Vocational College*, *Jinzhong Shanxi* 030619)

Abstract: Objective To establish an HPLC-MS/MS method to simultaneously determine neomangiferin, mangiferin, timosaponin BⅡ and timosaponin AⅢ in rat blood plasma, and to evaluate the pharmacokinetics and bioequivalence of *Anemarrhenae Rhizoma* granules and pieces. **Methods** The chromatographic separation was performed on Phenomenex Kinetex C_{18} column (75 mm×2.1 mm, 2.6 μm) at 30 ℃ . The mobile phase was composed of 0.1% formic acid water and 0.1% formic acid methanol with gradient elution at a flow rate of 0.4 mL·min^{-1}. The detection was performed in multiple reaction-monitoring mode with turbo ion spray source in the negative ion. **Results** Good linearity over the investigated concentration ranges was observed. The absolute recovery, matrix effect and stability of the four analytes were all satisfactory. No significant difference in the pharmacokinetic parameters of neomangiferin, mangiferin, timosaponin BⅡ and timosaponin AⅢ was observed between the two groups. **Conclusion** The granules and pieces of the *Anemarrhenae Rhizoma* are bioequivalent, which provides an experimental basis for the rational use of *Anemarrhenae Rhizoma* granules.

Key words: *Anemarrhenae Rhizoma* granule; HPLC-MS/MS; pharmacokinetics; bioequivalence

知母为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge. 的干燥根茎，始载于《神农本草经》，是常用中药复方的组成部分[1]。现代药理研究表明，知母提取物具有抗肿瘤、抑制血小板聚集、改善阿尔茨海默病症状、降脂、抗动脉粥样硬化、降血糖作用[2-8]。知母中的活性成分主要有甾体皂苷类、双苯吡酮类、木脂素类、黄酮类、多糖类等[9-13]，其中皂苷类成分像知母皂苷 BⅡ、知母皂苷 AⅢ被证实是治疗阿尔茨海默病、抗凝血、抗血栓以及抗癌的重要活性物质[4, 6]。知母配方颗粒是本实验室课题组将知母饮片经水提醇沉、减压浓缩、冻干、制粒等工艺优化后制备而成的。然而，中药制剂的生产过程受多环节、多因素的影响，容易造成标准化程度不高、体内过程有差

作者简介：朱琳，女，硕士，主要从事中药质量控制、药动学研究，E-mail：zhulin5122@163.com *通信作者：刘珏玲，女，硕士，主要从事中药质量控制、药动学研究，E-mail：liujueling2015@163.com

异等问题，进而导致临床药效的差异[14-15]。等效性研究是评价新剂型质量的重要方式，即通过测定血药浓度的方法来比较不同的制剂对药物吸收的影响，以及药物不同制剂之间的差异，以此来推测其临床治疗效果差异的可接受性。

本研究采用 HPLC-MS/MS 法同时测定大鼠血浆中新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 BⅡ和知母皂苷 AⅢ 4 种成分的血药浓度，并比较健康大鼠给予配方颗粒与饮片提取物后 4 种成分的药动学行为差异，初步评价知母配方颗粒的生物等效性特征，为其临床合理用药及后续研究提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Exion LC AC 液相系统串联 4000 Tripe Quad 质谱仪（美国 AB Sciex 公司）；XPE 105 十万分之一电子天平（瑞士梅特斯 - 托利多公司）；Sorvall ST 8R 高速冷冻离心机（美国 Thermo Scientific 公司）；AutoVap S60 型多样品浓缩氮吹仪（美国 ATR 公司）；Analyst V1.5.2 工作站（美国 AB Sciex 公司）。

1.2 试药

新芒果苷（批号：20190319）、芒果苷（批号：20181013）、知母皂苷 BⅡ（批号：20190219）、知母皂苷 AⅢ（批号：20190423）（纯度≥ 98%，成都克洛玛生物科技有限公司）；磺胺甲噁唑（批号：100025-201505，纯度≥ 98%，中国食品药品检定研究院）；甲醇、乙腈、甲酸（色谱纯，德国 Fisher Scientific 公司）；纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司）。知母购于国大药房晋中分店，经山西卫生健康职业学院生药教研室杨翠玲副教授鉴定为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge. 的干燥根茎。

1.3 动物

雄性 SD 大鼠 12 只，体质量（200±20）g[山西卫生健康职业学院动物实验中心，许可证号：SCXK（晋）2019-0001]。饲养于普通环境中，室温 20 ～ 30 ℃，相对湿度 30% ～ 70%，室内光照明暗交替 12 h，普通饲料投喂，自由饮用净化水。

2 方法

2.1 色谱条件与质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Phenomenex Kinetex C_{18}（75 mm×2.1 mm，2.6 μm），流动相为水（0.1% 甲酸，A）- 甲醇（0.1% 甲酸，B），梯度洗脱（0 ～ 1 min：90% ～ 68%A；1 ～ 5 min：68% ～ 25%A；5 ～ 7 min：25% ～ 10%A；7 ～ 8 min：10%A），流速 0.4 mL • min^{-1}，进样量 2 μL，柱温 30 ℃。

2.1.2 质谱条件 电喷雾电离源（ESI 源），负离子方式扫描；离子喷雾电压－ 4500 V，离子源温度 500 ℃；真空度（10 e^{-5}）3.0 Torr；GS1、GS2 与 CUR 均为氮气，压力分别为 40、40 和 20 psi；扫描方式为多反应监测（MRM）；待测物离子通道及各参数数据见表 1。

表 1 待测物和内标的质谱条件

Tab 1 Mass spectrometry condition of analyte and IS

组分	母离子 /（*m/z*）	子离子 /（*m/z*）	去簇电压 /V	射入电压 /V	碰撞电压 /V	射出电压 /V
新芒果苷	583.0	330.8	－ 110	－ 10	－ 38	－ 12
芒果苷	421.1	331.0	－ 85	－ 10	－ 32	－ 8
知母皂苷 BⅡ	919.1	757.0	－ 91	－ 10	－ 49	－ 8
知母皂苷 AⅢ	739.5	577.5	－ 162	－ 8	－ 40	－ 6
磺胺甲噁唑（IS）	252.1	155.9	－ 55	－ 10	－ 21	－ 9

2.2 系列混合对照品溶液的制备

分别取新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 BⅡ和知母皂苷 AⅢ对照品适量，精密称定，加甲醇适量，制成质量浓度为 1.0、3.0、3.0、1.0 mg • mL^{-1} 的待测物储备液。分别精密量取各储备液适量，用甲醇稀释成含新芒果苷（0.01、0.02、0.1、0.2、0.4、1.0 μg • mL^{-1}），芒果苷（0.1、0.2、1.0、2.0、4.0、10.0 μg•mL^{-1}），知母皂苷 BⅡ（0.1、0.2、1.0、2.0、4.0、10.0 μg • mL^{-1}）和知母皂苷 AⅢ（0.01、0.02、0.1、0.2、0.4、1.0 μg • mL^{-1}）的系列混合对照品溶液，4 ℃冰箱内保存，备用。

2.3 内标溶液的配制

取磺胺甲噁唑对照品适量，精密称定，加甲醇制成质量浓度为 1.0 mg • mL^{-1} 的储备液。再精密量取储备液适量，加甲醇稀释成质量浓度为 10.0 μg•mL^{-1} 的内标对照品溶液，4 ℃冰箱保存，备用。

2.4 大鼠灌胃给药溶液的制备

知母饮片：取知母饮片约 60 g，称定，加入 10 倍量 30% 乙醇，浸泡 30 min，回流提取 1 h，过滤，滤渣再加 8 倍量 30% 乙醇，回流提取 1 h，过滤，合并两次提取液，减压浓缩至 0.95 g • mL^{-1}，备用。

知母配方颗粒：取实验室自制配方颗粒适量，

加水溶解，制成质量浓度为 0.95 g • mL^{-1}（知母饮片含量）的溶液，备用。

2.5 血浆样品的采集

知母饮片组和配方颗粒组大鼠各 6 只，给药前禁食 12 h，期间自由饮水。两组分别灌胃给予知母饮片和配方颗粒灌胃液。于口服给药前和给药后 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、4、6、8、10、12、24、36 h 大鼠眼眶静脉取血约 0.5 mL，置于经肝素处理的离心试管中，摇匀后静置 30 min，低速（4000 r • min^{-1}）离心 5 min，取上层血浆，于－80 ℃冰箱中冻存待测。

2.6 血浆样品的预处理

取大鼠空白血浆 100 μL 置 1.5 mL EP 管中，加甲醇 10 μL，内标溶液 10 μL，涡旋混合 30 s 后，加乙腈 100 μL，涡旋混合 3 min，离心（12 000 r • min^{-1}）5 min，取上清液置另一 1.5 mL EP 管中，氮气流吹干，残渣加初始比例流动相 100 μL 复溶，涡旋 1 min，离心（12 000 r • min^{-1}）5 min，取上清液，进样分析。

2.7 方法学考察

2.7.1 专属性 分别取 6 份不同来源的大鼠空白血浆 100 μL，按“2.6”项下方法操作（不加内标溶液），进样 2 μL，得空白血浆样品色谱图（见图 1a）；取线性最低点的标准溶液和内标溶液加入空白血浆，按“2.6”项下方法操作，得模拟血浆样品色谱图（见图 1b）：新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 BⅡ、知母皂苷 AⅢ和 IS 的保留时间分别为 2.56、3.98、5.06、6.78 和 3.67 min；取大鼠灌胃给予知母配方颗粒 6.0 h 后的血浆样品，按“2.6”项下方法操作，得给药后血浆样品色谱图（见图 1c）。结果表明，内源性物质以及代谢物不干扰血浆中待测物和 IS 的测定，方法专属性良好。

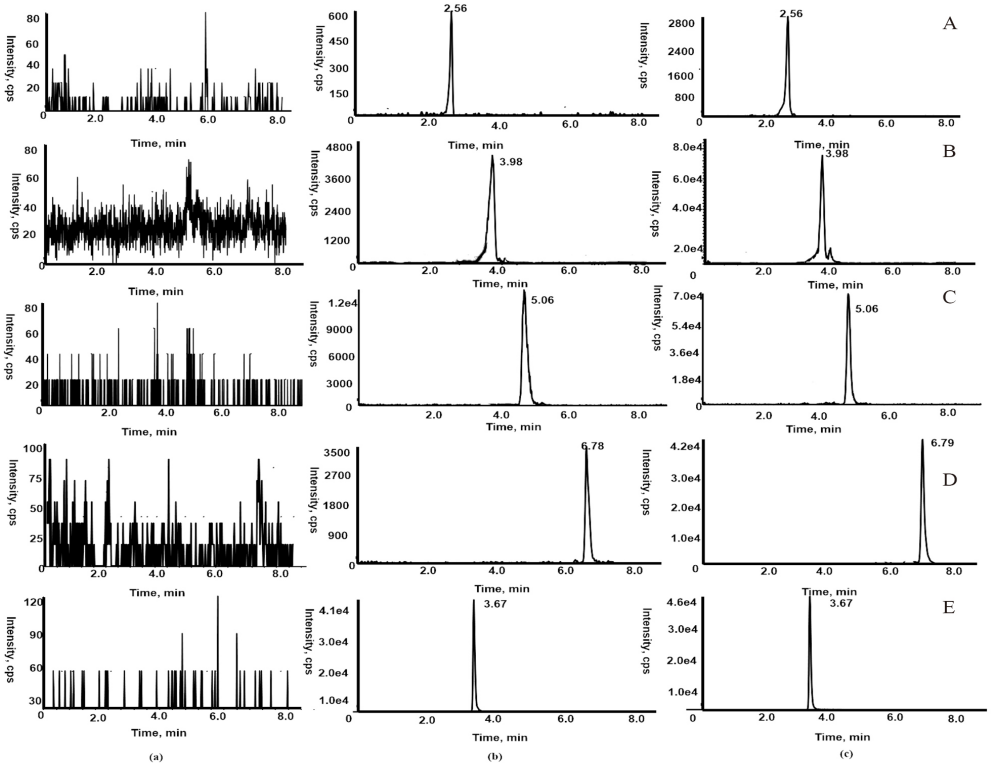


图 1 空白血浆（a）、空白血浆加待测物和内标（b）、给药 6 h 后血浆加内标（c）的色谱图

Fig 1 Chromatogram of a blank plasma sample（a），blank plasma spiked with analytes and IS（b）and plasma sample 6 h after the oral administration of *Anemarrhenae Rhizoma* granules（c）

A. 新芒果苷（neomangiferin）；B. 芒果苷（mangiferin）；C. 知母皂苷 BⅡ（timosaponin BⅡ）；D. 知母皂苷 AⅢ（timosaponin AⅢ）；E. 磺胺甲噁唑（sulfamethoxazole）

2.7.2 标准曲线与定量限 取大鼠空白血浆 100 μL，加入待测物标准系列溶液 10 μL，制备模拟血浆生物样品，除不加甲醇外，其余按“2.6”项下方法操作，每一浓度进行双样本分析，进样 2 μL，记录色谱图。待测物与内标峰面积比值为标准曲线纵坐标 y，待测物质量浓度（ng • mL^{-1}）为横坐标 x，用加权（$w = 1/x^2$）最小二乘法进行回归运算，求得各组分标准曲线，结果见表 2。

2.7.3 精密度和准确度 取大鼠空白血浆 100 μL，制备定量限、低、中、高 4 个浓度（新芒果苷、知母皂苷 AⅢ的浓度分别为 1.0、2.5、12.5、80.0 ng • mL^{-1}；芒果苷、知母皂苷 BⅡ的浓度为

表 2　新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 BⅡ和知母皂苷 AⅢ的标准曲线参数和定量下限

Tab 2　Linearity and LLOQ of neomangiferin，mangiferin，timosaponin BⅡ and timosaponin AⅢ

组分	回归方程	r^2	线性范围 /（ng • mL^{-1}）	定量下限 /（ng • mL^{-1}）
新芒果苷	$y = 8.58\times10^{-5}x + 1.94\times10^{-4}$	0.9968	1.0 ～ 100.0	1.0
芒果苷	$y = 3.02\times10^{-4}x - 2.05\times10^{-3}$	0.9950	10.0 ～ 1000.0	10.0
知母皂苷 BⅡ	$y = 3.93\times10^{-4}x - 2.05\times10^{-3}$	0.9956	10.0 ～ 1000.0	10.0
知母皂苷 AⅢ	$y = 2.94\times10^{-5}x + 1.11\times10^{-4}$	0.9949	1.0 ～ 100.0	1.0

10.0、25.0、125.0、800.0 ng•mL^{-1}）的质控（QC）样品，每一浓度平行 6 份，连续 3 个分析批进样分析（不小于两天），计算 QC 样品浓度。结果表明，4 种成分的日内和日间准确度的 RE 分别小于 10.3% 和 12.2%，日内和日间精密度的 *RSD* 分别小于 11.4% 和 13.3%，符合相关要求。

2.7.4　提取回收率　取大鼠空白血浆上清液 100 μL，平行制备低、中、高 3 个浓度的 QC 样品各 6 份进行分析，获得相应峰面积 *A*；另取空白血浆 100 μL，按“2.6”项下方法操作（不加内标溶液），向获得的上清液中加入低、中、高浓度的混合对照品溶液和内标溶液各 10 μL，涡旋混合 3 min 后于氮气流下吹干，以 100 μL 初始流动相复溶。取 2 μL 上清液进样，获得相应峰面积 *B*。以峰面积比值（*A*/*B*）计算提取回收率。结果表明，各待测物提取回收率在 80.2% ～ 116.6%，*RSD* ＜ 2.0%，符合相关要求。

2.7.5　基质效应　取不同来源的大鼠血浆样品 100 μL，除不加内标溶液外，按“2.6”项下方法操作，向获得的样品中加入低、中、高 3 个浓度的混合对照品溶液 10 μL 和内标溶液 10 μL，涡旋混合 3 min 后于氮气流下吹干，以 100 μL 初始流动相复溶，离心，取 2 μL 上清液进样，获得相应峰面积；另取相应浓度的混合对照品溶液 10 μL 和内标溶液 10 μL，涡旋混合 3 min 后于氮气流下吹干，以 100 μL 初始流动相复溶，取 2 μL 上清液进样，获得相应峰面积，上述每一浓度平行 6 份。计算基质效应，各待测物基质效应稳定，在 78.9% ～ 109.7%，*RSD* ＜ 15%。

2.7.6　样品稳定性　取大鼠空白血浆 100 μL，制备低、高 2 个浓度（新芒果苷、知母皂苷 AⅢ的质量浓度分别为 2.5、80.0 ng • mL^{-1}；芒果苷、知母皂苷 BⅡ的质量浓度为 25.0、800.0 ng•mL^{-1}）的 QC 样品，平行制备 3 份，考察样品在 − 80 ℃冻藏 1 个月、3 次冻融循环、室温放置 24 h 以及自动进样器放置（4 ℃）8 h 的稳定性。结果各待测物在上述条件下稳定性良好，*RSD* 均＜ 10%。

2.8　样品测定和数据处理

血浆样品按“2.6”项下方法处理后分析测定。同时制备不少于当批样品总数 5% 的 QC 样品（含低、中、高 3 个浓度），将 QC 样品均匀穿插于待测样品中于同一批进样分析。由 QC 样品决定此分析批数据是否可用。采用非房室模型分别处理上述血药浓度测定数据，求算药动学参数（Phoenix WinNonlin 8.1）。其中达峰时间 t_{max} 和峰浓度 C_{max} 为实测值；梯形法计算药时曲线下面积 *AUC*；以血药浓度对时间作半对数曲线，以消除相最后 4 点进行线性拟合，计算半衰期 $t_{1/2}$。

将得到的主要药动学参数（$AUC_{0\sim t}$、$AUC_{0\sim\infty}$、C_{max}）经对数转换后应用 SPSS 20.0 进行独立样本 *t* 检验，其余参数（t_{max}、$t_{1/2}$）应用 SPSS 20.0 进行非参数检验，新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 BⅡ和知母皂苷 AⅢ 4 种成分的平均血药浓度 - 时间曲线见图 2，主要药动学参数见表 3。

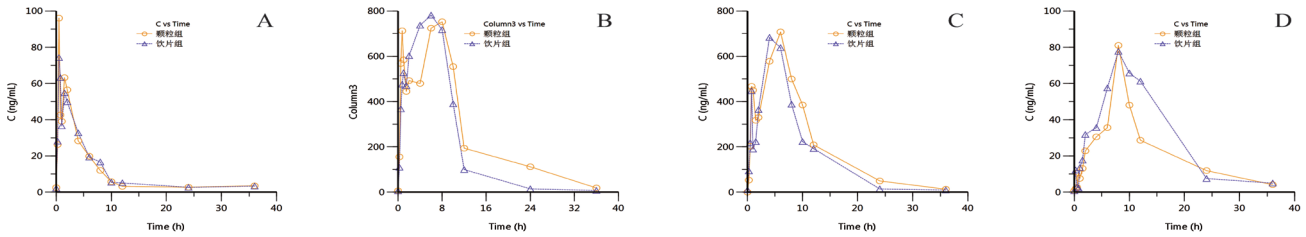


图 2　知母配方颗粒和饮片中 4 种成分在大鼠体内平均血药浓度 - 时间曲线（n = 6）

Fig 2　Mean plasma concnetration-time curve of 4 active ingredient in the *Anemarrhenae Rhizoma* granules and pieces in rats（n = 6）

A. 新芒果苷（neomangiferin）；B. 芒果苷（mangiferin）；C. 知母皂苷 BⅡ（timosaponin BⅡ）D. 知母皂苷 AⅢ（timosaponin AⅢ）

3　讨论

3.1　HPLC-MS/MS 条件的优化

新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 BⅡ和知母皂苷 AⅢ在电喷雾离子源正负离子检测模式下均有响应，但在正离子模式下响应较低，因此选择负离子检测。考察乙腈与甲醇作为有机相，结果用甲醇作为有机相时，各待测物的响应值较大，且背景噪音小，因此选择甲醇作为有机相。当流动

表 3 灌胃给药后知母配方颗粒与饮片后各成分的药动学参数 (Mean±SD，n = 6)

Tab 3 Pharmacokinetic parameters of 4 components in rat plasma after the oral administration of *Anemarrhenae Rhizoma* granules and pieces (Mean±SD，n = 6)

组分	剂型	$AUC_{0\sim t}$/（ng·h·mL^{-1}）	$AUC_{0\sim\infty}$/（ng·h·mL^{-1}）	C_{max}/（ng·mL^{-1}）	$t_{1/2}$/h	t_{max}/h
新芒果苷	颗粒	365.87±93.85	411.17±80.27	96.12±9.35	8.19±2.08	0.54±0.10
	饮片	380.28±137.79	438.12±143.59	87.84±8.735	13.21±6.51	0.58±0.14
芒果苷	颗粒	9253.25±2227.85	9561.74±2033.83	819.63±94.37	8.75±6.62	6.91±5.34
	饮片	7594.89±1032.99	7664.00±1027.79	831.57±161.50	6.18±2.94	5.33±1.15
知母皂苷 BⅡ	颗粒	7396.07±2180.61	7491.50±2175.66	707.94±86.08	5.14±0.27	6.00±0.00
	饮片	6265.28±509.20	6328.73±522.68	724.31±77.05	4.82±0.08	4.67±1.15
知母皂苷 AⅢ	颗粒	847.54±209.78	882.69±229.91	81.05±16.30	9.25±3.43	8.00±0.00
	饮片	1085.78±478.86	1134.45±510.69	78.74±18.65	6.20±1.32	7.33±1.15

相中加入甲酸后，色谱行为明显改善，随着甲酸含量的增加，各待测物的响应逐渐降低，最终选择 0.10% 甲酸浓度。

3.2 血浆样品处理方法的考察

血浆样品预处理中本研究考察了沉淀蛋白法和液液萃取法对各成分的影响，发现不同萃取剂下的提取效率都不是很好，而采用乙腈沉淀蛋白时较有效除去内源性杂质，且提取回收率较高，之后又考察了乙腈比例对提取率的影响，结果发现当空白血浆与乙腈比例为 1∶1 时，回收率最高，因此选择乙腈（1∶1）沉淀蛋白法进行血浆样品预处理。

3.3 药动学结果

方差分析结果表明，健康大鼠分别灌胃给予知母配方颗粒和饮片提取物后，4 种有效物质的药动学参数均无显著性差异；经双单侧检验法分析，知母配方颗粒和饮片各成分的 *AUC* 比值在 0.80 ～ 1.25，即 ln0.80 ≤ lnAUCT/AUCR ≤ ln1.25，该置信区间在 [ln0.80 ～ ln1.25]，认为在 90% 的置信度下，两种剂型 *AUC* 具有生物等效性；知母配方颗粒和饮片各成分的 C_{max} 比值在 0.70 ～ 1.43，即 C_{max} 比值为 ln0.70 ≤ lnC_{max}T/C_{max}R ≤ ln1.43，该置信区间在 [ln0.70 ～ ln1.43]，可以认为在 90% 的置信度下，两种剂型 C_{max} 具有生物等效性，实验表明新剂型和古方剂型之间生物等效，辅料和制备工艺对药方中有效成分无明显影响。

此外，芒果苷、知母皂苷 BⅡ在两组大鼠体内均呈现双峰现象。双峰现象在一定程度上可延长药物在体内的作用时间，有一定的药理学意义，但更明确的作用机制有待进一步深入研究。

本研究建立了同时测定大鼠血浆中新芒果苷、芒果苷、知母皂苷 BⅡ和知母皂苷 AⅢ4 种成分的 HPLC-MS/MS 方法，并对健康大鼠分别灌胃给予知母配方颗粒和饮片后 4 种化合物的药动学行为进行了比较，结果表明，配方颗粒与饮片之间具有生物等效性，为知母配方颗粒的工业化生产及临床合理用药提供了一定的参考。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：222-223.

[2] 刘歌，王辉，赵振彪 . 知母功用本草考证及现代药理认识 [J]. 辽宁中医药大学学报，2018，20（12）：191-194.

[3] 刘顺，邹恺平，董辰，等 . 基于网络药理学的黄柏 - 知母药对药效物质基础及作用机制研究 [J]. 中南药学，2020，18（1）：147-153.

[4] 刘艳平 . 知母皂苷成分的药理活性及作用机制研究进展 [J]. 药学实践杂志，2018，36（1）：24-29.

[5] Kim KM，Im A，Kim SH，et al. Timosaponin A III inhibits melanoma cell migration by suppressing COX-2 and in vivo tumor metastasis [J]. Cancer Sci，2016，107（2）：181-188.

[6] 陆文铨，邱彦，庞涛，等 . 知母皂苷 B-Ⅱ抑制人肺癌 A549 细胞增殖和迁移的机制研究 [J]. 中国药房，2016，27（10）：1346-1349.

[7] 陈笑南，张国伟 . 知母抗糖尿病的研究进展 [J]. 医学研究与教育，2014，31（5）：85-88.

[8] 朱建成，钟静君，张国改，等 . 基于知母多糖干预的 T2DM 大鼠红细胞磷脂代谢组学判别模型构建及药理标志物筛选 [J]. 广东药科大学学报，2017，33（3）：299-304.

[9] 贾小舟，张子东，何建鑫，等 . 知母多糖的研究进展 [J]. 中医药信息，2020，37（2）：111-115.

[10] 孙兴欢，张宇伟，黄雪峰 . 知母的化学成分及药效研究进展 [J]. 海峡药学，2015，27（3）：7-10.

[11] Ji D，Huang ZY，Fei CH，et al. Comprehensive profling and characterization of chemical constituents of rhizome of anemarrhena asphodeloides bge [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci，2017，1060：355-366.

[12] 吉星，冯毅凡 . 知母中皂苷类成分研究进展 [J]. 中草药，2010，41（4）：680-683.

[13] 雷霞，董文婷，笔雪艳，等 . 知母各化学拆分组分的抗炎及免疫调节活性 [J]. 中药材，2015，38（9）：1904-1907.

[14] 欧水平，郑小翠，王森，等 . 清胰煎剂与颗粒中 4 种成分在大鼠体内的药动学比较 [J]. 医药导报，2021，40（1）：30-34.

[15] 谢平，余文静，陈丹，等 . 三叶青藤叶配方颗粒大鼠体内药代动力学生物等效性评价 [J]. 药物分析杂志，2020，40（11）：2017-2032.

（收稿日期：2021-03-19；修回日期：2021-05-12）

黄芪增益方对小鼠免疫功能的影响

田俊娜[1]，王婷婷[2]，王双[1]，赵思俊[2*]，朴晋华[2*]，张蕨[2]（1. 山西中医药大学，山西 晋中 030619；2. 山西省食品药品检验所，太原 030031）

摘要：目的 探讨黄芪增益方对小鼠免疫功能的保健作用。**方法** 小鼠分别经口灌胃黄芪增益方、匹多莫德 3 周后，用环磷酰胺制备免疫低下模型小鼠，继续灌胃黄芪增益方、匹多莫德 1 周，测定脾脏、胸腺指数观察药物对小鼠免疫器官的影响。采用碳廓清法检测单核 - 巨噬细胞功能，迟发型变态反应、淋巴细胞转化实验测定药物对小鼠免疫功能的影响，HE 染色法检测模型小鼠脾脏、胸腺、胸骨骨髓的病理，ELASA 法检测小鼠血清中免疫球蛋白 A（lgA）、白介素 -4（IL-4）。**结果** 与模型组、阳性对照组比较，黄芪增益方可显著提高免疫抑制小鼠外周血白细胞、淋巴细胞、嗜中性白细胞数（$P < 0.05$，$P < 0.01$）；提高胸腺指数和脾脏指数（$P < 0.01$）；增强淋巴细胞增殖能力（$P < 0.05$）；改善免疫器官与胸骨骨髓的免疫功能；显著上调血清 lgA 及细胞因子 IL-4；提高小鼠的单核 - 巨噬细胞吞噬能力（$P < 0.05$）；抑制小鼠迟发型变态反应的耳肿胀系数（$P < 0.05$）。**结论** 黄芪增益方可改善小鼠免疫状态，增强免疫功能。

关键词：黄芪增益方；免疫功能；迟发型变态反应
中图分类号：R286 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1613-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.020

Immunomodulatory effect of Huangqi Zengyi formula on mice

TIAN Jun-na[1], WANG Ting-ting[2], WANG Shuang[1], ZHAO Si-jun[2*], PIAO Jin-hua[2*], ZHANG Hong[2] (1. *Shanxi University of Chinese Medicine*, *Jinzhong Shanxi* 030619; 2. *Shanxi Institute for Food and Drug Control*, *Taiyuan* 030031)

Abstract: Objective To dertermine the prtective effect of Huangqi Zengyi formula on the immune function of mice. **Methods** After 3 weeks of oral administration of Huangqi Zengyi formula and pidomod, immunocompromised mouse models were prepared with cyclophosphamide. After another week of oral administration of Huangqi Zengyi formula and pidomod, the spleen and thymus indexes were measured to determine the effect of the drugs on the immune organs of these mice. Carbon clearance assay was used to detect the function of monocyte macrophage, delayed allergy and lymphocyte transformation test were used to determine the effect of drugs on the immune function of the mice. The pathological changes in the spleen, thymus and sternal bone marrow of the model mice were detected by HE staining. IGA and IL-4 in the serum of the mice were detected by ELASA. **Results** Compared with the model group and the positive control group, Huangqi Zengyi formula significantly increased the number of leukocytes, lymphocytes and neutrophils in the peripheral blood of immunosuppressed mice ($P < 0.05$, $P < 0.01$); increased the thymus and spleen indexes ($P < 0.01$); enhanced the lymphocyte proliferation ($P < 0.05$); improve the immune function of immune organs and sternal bone marrow; up-regulated the serum LGA and cytokine IL-4; increased the phagocytosis ability of the monocytes and the macrophages ($P < 0.05$); and inhibited the ear swelling in mice with delayed allergic reaction in mice ($P < 0.05$). **Conclusion** Huangqi Zengyi formula can improve the immunity and enhance the immune function of mice.

Key words: Huangqi Zengyi formula; immune function; delayed allergy

基金项目：山西省中药现代化关键技术研究振东专项基金（No.2016ZD0503）。

作者简介：田俊娜，女，硕士研究生，主要从事中药质量控制与分析，E-mail：13453135362@163.com ***通信作者：**赵思俊，男，副主任药师，主要从事中药药理与毒理研究，E-mail：zsj4429731@163.com；朴晋华，女，主任药师，硕士研究生导师，主要从事中药质量评价与中药生物活性研究，E-mail：marypiao@126.com。

免疫力是人体自身的一种防御机制，是人体识别和消灭外来入侵异物，清除衰老、死亡、病变细胞的能力，对维持生理生命活动具有十分重要的意义[1-3]。免疫力低下会诱导多种疾病的发生，严重影响人们的身体健康[4-5]。黄芪增益方是在六味地黄汤基础上化裁重组，去其“三泄”，取其“三补”，加黄芪[6]和党参[7]，强化其增强免疫功能而制成的复方中药。本文通过小鼠腹腔注射环磷酰胺[8]制备免疫低下模型小鼠，评价黄芪增益方对小鼠的免疫功能的保健作用。

1 材料

1.1 仪器

HEMAET 950FS 五分类动物血液分析仪（美国 DREM），YJ13B-G 煎药机（北京东华原医疗设备有限公司），ZC/LS-25A 电动耳肿打耳器（上海洛维生物科技有限公司），TU-1901 双光束紫外可见分光光度计（北京普析通用仪器有限责任公司），涡旋混匀器（德国 IKA）。

1.2 试药

黄芪增益方，按黄芪 - 党参 - 熟地黄 - 山茱萸 - 山药 = 3∶3∶4∶2∶2 的比例称取中药饮片，加 10 倍量水煎煮两次，每次 1 h，合并滤液，85 ℃浓缩至 1 g（生药）• mL^{-1}，得黄芪增益方水提液。经紫外分光光度计，采用蒽酮 - 硫酸法，得出方中多糖含量为 65.72%。

匹多莫德分散片（北京金城泰尔制药有限公司，批号：190706），注射用环磷酰胺（山西普德药业有限公司，批号：04200501），2，4- 二硝基氟苯（DNFB，麦克林，批号：C10654004），印度墨汁（Phygene，批号：20200710），小鼠免疫球蛋白 A（lgA）及小鼠白介素 4（IL-4）ELASA 试剂盒（武汉默沙克生物科技有限公司，批号：202012、202012）。

1.3 实验动物

SPF 级 ICR 小鼠，雄性，240 只，体质量 18 ～ 22 g [斯贝福（北京）生物技术有限公司，合格证号 110324200101980161]，饲养于 SPF 级动物室，环境温度控制在 20 ～ 25 ℃，相对湿度 40% ～ 70%，12 h 明暗交替，小鼠可自由摄食饮水。

2 方法

2.1 模型的制备与分组给药

取小鼠 90 只，分为 6 组，即空白组，模型组，阳性药组，黄芪增益方高、中、低剂量组，每组 15 只。空白组与模型组以纯化水 10 mL/（kg • d）灌胃；阳性组以匹多莫德分散片 0.12 g/（kg • d）灌胃，高剂量组以 9.6 g（生药）• kg^{-1}、中剂量组 4.8 g（生药）• kg^{-1}、低剂量组 2.4 g（生药）• kg^{-1} 灌胃，灌胃体积 10 mL /（kg • d），连续给药 4 周。在第 3 周后开始腹腔注射环磷酰胺 80 mg/（kg • d）造模，空白组动物腹腔注射 0.9% 氯化钠注射液 10 mL/（kg • d），每日一次，连续 3 d，制备免疫功能低下模型小鼠。造模期间，连续给药，直至给药结束。

2.2 观察指标及检测方法

2.2.1 外周血白细胞数量的测定　给药 4 周后，从小鼠眼内眦静脉采血于抗凝管中，送全自动血细胞分析仪测定白细胞、淋巴细胞、嗜中性粒细胞数量。

2.2.2 小鼠脏器指数的计算　实验结束后，称取各组小鼠体重后，拉颈处死小鼠，取脾脏和胸腺，滤纸吸取表面残留血液、水分，称量脾脏、胸腺重量，计算脏器指数。小鼠胸腺指数＝胸腺质量（mg）/ 体质量（g）；小鼠脾脏指数＝脾脏质量（mg）/ 体质量（g）。

2.2.3 小鼠脾淋巴细胞增殖能力　取小鼠脾脏，无菌操作，制成单细胞悬液，用 Hank’s 液洗细胞 2 次，每次离心 10 min（1000 r • min^{-1}），取 1 mL RPMI1640 细胞完全培养液悬浮细胞，调整细胞浓度至 3×10^6 个 • mL^{-1}。将细胞悬液加入 24 孔培养板中，每孔 1 mL，每只小鼠脾细胞设置两个复孔，一孔加 75 μL ConA 液（终浓度 7.5 μg • mL^{-1}），另一孔作为空白对照，37 ℃ 5%CO_2 培养 72 h。培养结束前 4 h，每孔轻轻吸去上清液 0.7 mL，加入 0.7 mL 不含小牛血清的 RPMI1640 培养液，同时加入 MTT（5 mg • mL^{-1}）50 μL，继续培养 4 h。培养结束后，每孔加入 1 mL DMSO，充分震荡，使紫色结晶完全溶解。然后分装到 96 孔培养板中，每孔分装 3 孔作为平行样，用酶标仪，在 570 nm 波长处，测定光密度值（*OD*）。用加 ConA 孔的 *OD* 减去不加 ConA 孔的 *OD* 代表淋巴细胞增殖能力，分别比较各组与空白对照组的 *OD* 差值的情况。

2.2.4 小鼠组织病理　取各组脾脏、胸腺、骨髓组织用固定液固定，石蜡包埋、切片，HE 染色，显微镜下观察小鼠脾脏、胸腺、胸骨骨髓病理变化。

2.2.5 小鼠血清中 lgA、IL-4 的测定　采用 ELASA 试剂盒，严格按照说明书操作，检测血清中 lgA、IL-4 的含量。

2.2.6 对正常小鼠单核 - 巨噬细胞功能的影响　取 ICR 小鼠，随机分为空白组，阳性药组，黄芪增益方高、中、低剂量组，每组 15 只，给药剂量同

“2.1”项下。给药 4 周后，称取小鼠体质量，从小鼠尾静脉注入 0.1%Na_2CO_3 稀释的印度墨汁（1∶25，0.1 mL/10 g）。2、10 min 后分别从内眦静脉丛取血 20 μL，并立即将其加到 2 mL 0.1%Na_2CO_3 溶液中，用紫外分光光度计在 600 nm 波长处测定其光密度值（*OD*），分别记为 OD_1 和 OD_2，以 0.1%Na_2CO_3 溶液作空白对照，计算校正系数（*K*），$K=(\lg OD_1-\lg OD_2)/(t_2-t_1)$。将小鼠处死，取肝脏和脾脏，用滤纸吸干脏器表面血污，称质量。以吞噬指数表示小鼠碳廓清的能力，吞噬指数＝体质量/（肝质量＋脾质量）×$K^{1/3}$。

2.2.7　对正常小鼠迟发型变态反应的作用　取 ICR 小鼠，分为空白组，阳性药组，模型组，黄芪增益方高、中、低剂量组，每组 15 只，给药剂量同“2.1”项下。给药 3 周后，将小鼠腹部脱毛，范围约 3 cm×3 cm、用 DNFB 溶液 50 μL 均匀涂抹致敏造模。5 d 后，取 10 μL DNFB 溶液（10 mg·mL^{-1}）均匀涂抹于小鼠右耳（两面）进行攻击，攻击后 24 h 后颈椎脱臼处死小鼠，剪下左右耳壳。用打孔器取下直径 8 mm 的耳片，称重，以左右耳重量之差作为肿胀度。

2.3　*统计学方法*

采用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行分析，结果用均数 ± 标准差表示，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义，方差齐且呈正态分布的计量资料采用单因素方差分析（One-Way ANOVA），组间有差异者进一步采用 Dunnet-*t* 检验分析，其他计量资料采用秩和检验两两比较等非参数检验（本实验中脾淋巴细胞方差不齐，采用非参数检验）。

3　结果

3.1　*对免疫功能低下小鼠的影响*

3.1.1　一般情况　空白组小鼠精神状态良好，活动自如，毛色光滑；模型组小鼠蜷缩，活动不佳，毛色欠佳，粗糙，蓬松；与模型组相比，黄芪增益方各剂量组和阳性对照组小鼠精神状态较好，明显优于模型组，毛色较光滑。

3.1.2　对小鼠外周血白细胞数量的影响　与空白组相比，模型组白细胞、淋巴细胞、嗜中性粒细胞数量显著降低（$P<0.01$）；与模型组相比，黄芪增益方高剂量组、阳性组白细胞、淋巴细胞、嗜中性粒细胞数量均显著升高（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），黄芪增益方中剂量嗜中性粒细胞数量显著升高（$P<0.01$），提示黄芪增益方可上调免疫功能低下小鼠的外周血细胞增强细胞免疫（见图 1）。

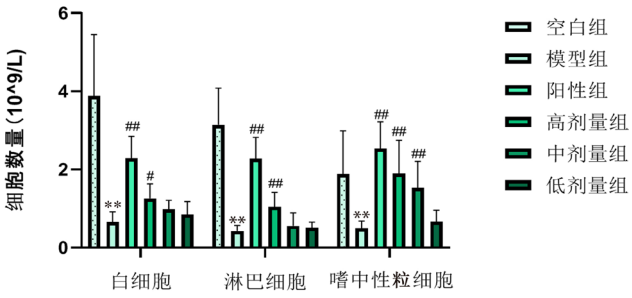


图 1　黄芪增益方对免疫抑制小鼠外周血细胞的影响

Fig 1　Effect of Huangqi Zengyi formula on the peripheral blood cells of immunosuppressive mice

注：与空白组比较，$^{**}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

Note：Compared with the blank group，$^{**}P<0.01$；compared with the model group，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$.

3.1.3　对小鼠脏器指数的影响　由图 2 可知，模型组脾脏指数、胸腺指数明显低于空白组（$P<0.01$），环磷酰胺可使小鼠免疫功能受到抑制，提示免疫低下模型小鼠制备成功。与模型组相比，黄芪增益方高剂量组脾脏指数、胸腺指数显著升高（$P<0.01$），说明其可促进免疫低下小鼠免疫器官的发育。

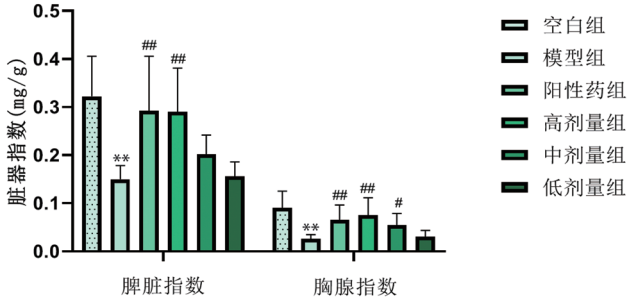


图 2　黄芪增益方对小鼠脏器指数的影响

Fig 2　Effect of Huangqi Zengyi formula on the organ index

注：与空白组比较，$^{**}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

Note：Compared with the blank group，$^{**}P<0.01$；compared with the model group，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$.

3.1.4　对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响　由图 3 可以看出，模型组小鼠脾淋巴细胞增殖能力显著低于空白组（$P<0.01$）；与模型组相比，高剂量组脾淋巴细胞转化能力显著提高（$P<0.01$），提示黄芪增益方可能增强免疫低下小鼠的细胞免疫功能。

3.1.5　对小鼠组织病理的影响　生物光学显微镜下观察各组织病理变化，见图 4 ～ 6。脾脏空白组白髓与红髓分布均匀，而模型组红髓偏多，且出现空泡状。与模型组相比，黄芪增益方各剂量组白髓显著增多，且分布均匀，说明淋巴细胞增多。空白组可见胸腺细胞分布均匀，未发现组织细胞病变坏死，而模型组胸腺组织稀疏，胸腺

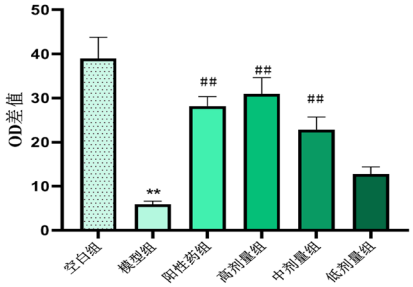


图 3 黄芪增益方对免疫抑制小鼠脾淋巴细胞转化的影响

Fig 3 Effect of Huangqi Zengyi formula on the splenic lymphocyte transformation in immunosuppressive mice

注：与空白组比较，$^{**}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note：Compared with blank group，$^{**}P < 0.01$；compared with the model group，$^{\#\#}P < 0.01$.

细胞减少。与模型组相比，黄芪增益方各剂量组胸腺细胞显著增多。骨髓空白组可见骨髓细胞分布均匀，而模型组骨髓细胞明显稀疏。与模型组相比，黄芪增益方各剂量组胸骨骨髓细胞明显增多，提示黄芪增益方可改善免疫抑制小鼠免疫器官脾、胸腺与骨髓的免疫功能。

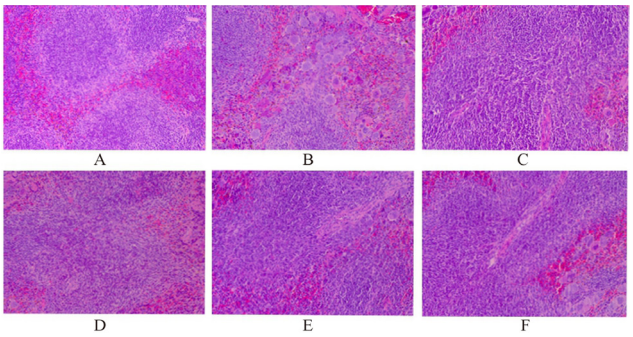


图 4 黄芪增益方对小鼠脾脏病理形态影响（HE，200×）

Fig 4 Effect of Huangqi Zengyi formula on the pathomorphology of spleen in mice（HE，200×）

A. 空白组（blank group）；B. 模型组（model group）；C. 阳性药组（positive medicine group）；D. 高剂量组（high dose group）；E. 中剂量组（middle dose group）；F. 低剂量组（low dose group）

3.1.6 对小鼠血清中 lgA、IL-4 的调节作用 与空白组相比，模型组血清中细胞因子 lgA、IL-4 含量显著降低（$P < 0.05$）。与模型组比较，除低剂量组之外，其余各剂量组 lgA、IL-4 均上调（$P < 0.01$），提示黄芪增益方可通过上调免疫低下小鼠血清体液因子的含量，增强体液免疫功能（见表 1）。

3.2 对正常小鼠单核 - 巨噬细胞功能的影响

与空白组相比，阳性药组，黄芪增益方高、中剂量组吞噬指数显著升高（$P < 0.01$），结果见图 7，提示黄芪增益方可能通过促进小鼠巨噬细胞的吞噬能力，提高机体固有免疫应答。

3.3 对小鼠迟发型变态反应的抑制作用

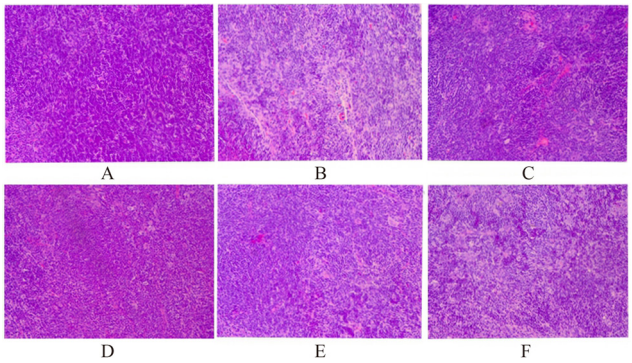


图 5 黄芪增益方对小鼠胸腺病理形态影响（HE，200×）

Fig 5 Effect of Huangqi Zengyi formula on the pathomorphology of the thymus in mice（HE，200×）

A. 空白组（blank group）；B. 模型组（model group）；C. 阳性药组（positive medicine group）；D. 高剂量组（high dose group）；E. 中剂量组（middle dose group）；F. 低剂量组（low dose group）

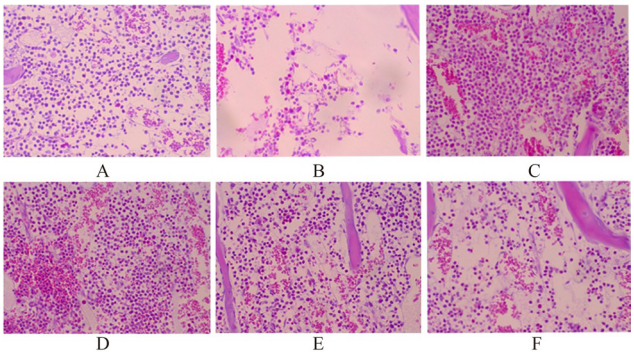


图 6 黄芪增益方对小鼠胸骨骨髓病理形态影响（HE，400×）

Fig 6 Effect of Huangqi Zengyi formula on the pathomorphology of the sternal bone marrow in mice（HE，400×）

A. 空白组（blank group）；B. 模型组（model group）；C. 阳性药组（positive medicine group）；D. 高剂量组（high dose group）；E. 中剂量组（middle dose group）；F. 低剂量组（low dose group）

表 1 黄芪增益方对小鼠细胞因子 lgA、IL-4 水平的影响

Tab 1 Effect of Huangqi Zengyi formula on the level of cytokines lgA and IL-4 in mice

组别	lgA/（ng·mL^{-1}）	IL-4/（pg·mL^{-1}）
空白组	252.47±32.95	258.94±37.57
模型组	107.87±28.90*	108.85±24.60*
阳性药组	248.45±30.46$^{\#\#}$	238.41±45.78$^{\#\#}$
高剂量组	221.33±46.83$^{\#\#}$	225.37±41.84$^{\#\#}$
中剂量组	206.53±29.08$^{\#\#}$	219.08±40.40$^{\#\#}$
低剂量组	151.20±38.76	161.20±38.77

注：与空白组比较，$^{*}P < 0.05$；与模型组比较，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note：Compared with the blank group，$^{*}P < 0.05$；compared with the model group，$^{\#\#}P < 0.01$.

与空白组相比，模型组小鼠耳廓肿胀度明显升高（$P < 0.01$），与模型组相比，黄芪增益方高、中剂量组对耳肿胀度有明显抑制作用（$P < 0.01$），提示黄芪增益方具有增强免疫的作用，结果见图 8。

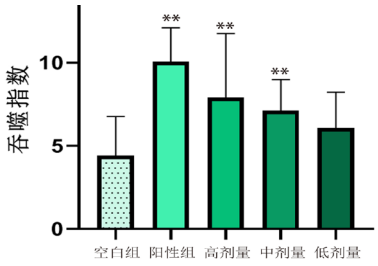


图 7　黄芪增益方对正常小鼠巨噬细胞吞噬细胞的影响

Fig 7　Effect of Huangqi Zengyi formula on the phagocytes of macrophages in normal mice

注：与空白组比较，$^{**}P < 0.01$。

Note：Compared with the blank group，$^{**}P < 0.01$.

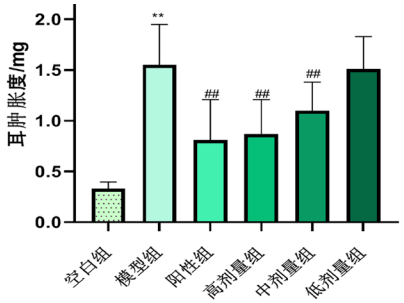


图 8　黄芪增益方对小鼠的迟发型变态反应的抑制作用

Fig 8　Effect of Huangqi Zengyi formula on the delayed allergic in mice

注：与空白组比较，$^{**}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note：Compared with the blank group，$^{**}P < 0.01$；compared with the model group，$^{\#\#}P < 0.01$.

4　讨论

免疫系统包括免疫器官、免疫细胞和免疫分子，共同发挥作用保护人体免受病原体的侵害[9]。胸腺和脾脏是主要的免疫器官，在产生和维持免疫细胞中起着至关重要的作用[10-12]。巨噬细胞是机体抗病原生物入侵的第一道防线，吞噬病原生物并将抗原信息呈递给 T 细胞激活适应性免疫反应[13]。淋巴细胞是免疫系统中的重要细胞，在人体的外周血和淋巴液中循环，促进机体的体液免疫与细胞免疫，参与抗癌的重要细胞[14-15]。

2020 年版《允许保健食品声称的保健功能目录 非营养素补充剂（征求意见稿）》中关于增强免疫力功能部分新增，可采用免疫功能低下的模型动物进行实验，因此本实验采用免疫低下模型与正常小鼠进行实验，采用腹腔注射环磷酰胺建议免疫低下模型[16-18]。在脾淋巴细胞转化实验中，对 ConA 液浓度进行了预试，分别采用终质量浓度为 4、5、6、7.5、8、9、10、11 μg • mL^{-1}，结果表明，7.5 μg • mL^{-1} 是刺激脾淋巴细胞增殖的最佳浓度。

本文探讨了黄芪增益方对小鼠免疫功能的调节作用，结果表明，连续给药 4 周后，免疫低下模型小鼠外周血白细胞、淋巴细胞、嗜中性粒细胞数显著升高，且胸腺、脾脏指数显著升高；脾淋巴细胞转化能力显著提高；HE 染色结果表明黄芪增益方可改善免疫器官与胸骨骨髓的免疫功能；ELASA 实验表明黄芪增益方可显著提高细胞因子 lgA、IL-4 的表达；黄芪增益方对非特异免疫也具有很好的效果，可显著提高免疫抑制小鼠的单核 - 巨噬细胞吞噬能力；在细胞免疫中，随着黄芪增益方剂量的增大，小鼠耳肿胀度呈现显著降低趋势；说明黄芪增益方可增强小鼠的免疫调节作用。

综上所述，黄芪增益方可从多方面改善免疫状态，增强机体免疫效果，但其作用机制还需进一步进行深入的探究。

参考文献

[1] 田瑞雪，孙耀宗，姚有昊，等 . 槲皮素对免疫低下小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国现代医药杂志，2019，21（9）：13-16.

[2] 秦安琦，赵应艳，李吉盛，等 . 青钱柳提取物对环磷酰胺致免疫低下小鼠免疫功能的调节作用 [J]. 海峡药学，2019，31（9）：39-43.

[3] 李先亮 . 平衡的免疫力是健康的本质 [J]. 人口与健康，2020，（9）：91-94.

[4] Brodin P，Davis MM. Human immune system variation [J]. Nat Rev Immunol，2017，17（1）：21-29.

[5] 刘美怡，钱深思，容蓉，等 . 后天继发性免疫低下动物模型研究及其在中医证候模型的应用进展 [J/OL]. 中国实验动物学报：1-10[2020-08-27 16：29].

[6] He JY，Ma N，Zhu S，et al. The genus Codonopsis（Campanulaceae）：A review of phytochemistry，bioactivity and quality control [J]. J Nat Med，2015，69（1）：1-21.

[7] Tao YG，Huang XF，Wang JY，et al. Exploring molecular mechanism of huangqi in treating heart failure using network pharmacology [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2020，2020：6473745.

[8] Noh EM，Kim JM，Lee HY，et al. Immuno-enhancement effects of *Platycodon grandiflorum* extracts in splenocytes and a cyclophosphamide-induced immunosuppressed rat model [J]. BMC Complement Altern Med，2019，19（1）：322.

[9] Shanti A，Teo J，Stefanini C. In vitro immune organs-on-chip for drug development：A review [J]. Pharmaceutics，2018，10（4）：278.

[10] Kim S，Shah SB，Graney PL，et al. Multiscale engineering of immune cells and lymphoid organs [J]. Nat Rev Mater，2019，4（6）：355-378.

[11] Tajima A，Pradhan I. Restoration of thymus function with bioengineered thymus organoids. Curr [J]. Stem Cell Rep，2016，2（2）：128-139.

[12] Gosselin EA，Eppler HB，Bromberg JS，et al. Designing natural and synthetic immune tissues [J]. Nat Mater，2018，17（6）：484-498.

[13] Morsink MAJ，Willemen NGA，Leijten J，et al. Immune

organs and immune cells on a chip：An overview of biomedical applications [J]. Micromachines（Basel），2020，11（9）：849.
[14] Ganusov VV，Auerbach J. Mathematical modeling reveals kinetics of lymphocyte recirculation in the whole organism [J]. PLoS Comput Biol，2014，10（5）：e1003586.
[15] Waldman AD，Fritz JM，Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy：From T cell basic science to clinical practice [J]. Nat Rev Immunol，2020，20（11）：651-668.
[16] 钟金凤，方热军 . 环磷酰胺免疫抑制机制及在动物模型上的应用 [J]. 中国免疫学杂志，2016，32（10）：1541-1546.
[17] Zhou Y，Chen X，Yi R，et al. Immunomodulatory effect of tremella polysaccharides against cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice [J]. Molecules，2018，23（2）：239.
[18] 蔡琨，王晓敏，张波等 . 仙茅多糖对环磷酰胺所致免疫低下小鼠免疫功能的影响 [J]. 中华中医药杂志，2016，31（12）：5030-5034.

（收稿日期：2021-01-02；修回日期：2021-04-07）

马里苷通过调控自噬保护糖尿病 db/db 小鼠心肌损伤

祖力皮亚·阿布拉[1]，李甜[2]，兰怡[3]，克迪热亚·卡迪尔[4]，宋志鹏[4]，张博翔[2]，张雁潮[2]，彭小雨[2]，毛新民[1, 5*]（1. 新疆医科大学中医学院，乌鲁木齐 830000；2. 新疆医科大学基础学院，乌鲁木齐 830000；3. 新疆医科大学附属中医医院，乌鲁木齐 830000；4. 新疆医科大学药学院，乌鲁木齐 830000；5. 新疆维吾尔自治区中西医重点学科，乌鲁木齐 830000）

摘要：目的 研究马里苷对 2 型糖尿病 db/db 小鼠心肌细胞损伤的保护作用及作用机制。**方法** 24 只 db/db 小鼠随机分为模型组、阳性对照组（盐酸二甲双胍，280 mg·kg^{-1}）和实验组（马里苷，50 mg·kg^{-1}），另取 6 只 db/m 小鼠作为正常对照组。每周检测小鼠体质量，检测第 0、4、6、8 周各组小鼠空腹血糖；药物干预 8 周后，检测总胆固醇、三酰甘油、空腹胰岛素，心肌组织自噬相关蛋白（LC3-Ⅱ/Ⅰ和 p62）的表达水平，观察心肌组织病理变化，心肌超微结构和自噬小体。**结果** 与正常组比较，模型组心肌纤维肥大、肿胀、排列紊乱、细胞间质增多，心肌组织 p62 蛋白表达水平显著升高，LC3-Ⅱ/Ⅰ显著降低，自噬小体数量减少，表明自噬被抑制，心肌组织损伤。马里苷干预后心肌纤维结构清晰、排列整齐而紧密、无明显肥大、细胞间质少，心肌组织 p62 蛋白表达水平显著降低，LC3-Ⅱ/Ⅰ显著升高，自噬小体数量增加，促进自噬，发挥心脏保护作用。**结论** 马里苷通过调控自噬保护 db/db 小鼠的心肌损伤。

关键词：马里苷；糖尿病；心肌组织；自噬
中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1618-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.021

Marein protects myocardial injury in diabetic db/db mice by regulating the autophagy

Zulipiya·Abula[1], LI Tian[2], LAN Yi[3], Kedireya·Kadier[4], SONG Zhi-peng[4], ZHANG Bo-xiang[2], ZHANG Yan-chao[2], PENG Xiao-yu[2], MAO Xin-min[1, 5*] (1. *College of Traditional Chinese Medicine*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830000; 2. *College of Basic Medicine*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830000; 3. *Affiliated Traditional Chinese Medicinal Hospital of Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830000; 4. *College of Pharmacy*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830000; 5. *Key Discipline of Traditional Chinese and Western Medicine*, *Xinjiang Uygur Autonomous Region*, *Urumqi* 830000)

基金项目：新疆维吾尔自治区高校科研计划（No.XJEDU2020Y021）；国家级大学生创新创业训练计划（No.202010760011）；新疆维吾尔自治区自然科学基金（No.2018D01C181）。
作者简介：祖力皮亚·阿布拉，女，硕士研究生，主要从事糖尿病药理与新药研发工作，E-mail：1678126337@qq.com *__通信作者__：毛新民，男，博士研究生导师，教授，主要从事糖尿病药理与新药研发工作，E-mail：mxm3277@139.com

Abstract: Objective To determine the protective effect and mechanism of marein on the myocardial cell injury in mice with type 2 diabetic db/db. **Methods** Totally 24 db/db mice were randomly divided into a model group, a metformin group (280 mg • kg^{-1}) and a marein group (50 mg • kg^{-1}) respectively. Six db/m mice were chosen as the normal control group. The body mass of the mice was measured weekly and the fasting blood glucose of the mice in each group was measured at 0, 4, 6 and 8 weeks. After 8 weeks of drug administration, all mice group were tested for serum biochemical indicators, including total cholesterol, triglyceride and fasting insulin and protein expression of autophagy related protein LC3-Ⅱ/Ⅰ and p62. The pathological changes of myocardial tissue, myocardial ultrastructure and autophagomes were observed. **Results** Compared with the db/m normal group, the model group showed myocardial fiber hypertrophy, swelling, disordered arrangement and increased intercellular substances; the expression of p62 proteins was significantly increased, and the expression of LC3-Ⅱ/Ⅰ level was reduced. The number of autophagosomes was decreased, indicating inhibited autophagy and damaged myocardial tissue. After the intervention of marein, the myocardial fiber structure was clear, and the arrangement was neat and tight, without obvious hypertrophy. The intercellular substance was small, the expression of p62 proteins was significantly reduced. While the LC3-Ⅱ/Ⅰ and the number of autophagosomes increased, which indicated that marein promoted autophagy and played a protective role in the heart. **Conclusion** Marein may protect against myocardial injury in db/db mice by regulating the autophagy.

Key words: marein; diabetic; myocardial; autophagy

糖尿病是以细胞因子介导炎症反应诱导胰岛 β 细胞功能障碍，引起胰岛素抵抗或进行性分泌不足的以血糖、血脂、蛋白质代谢紊乱为特征的代谢性疾病 [1]。其中 2 型糖尿病（type 2 diabetes mellitus，T2DM）在糖尿病类型中最为常见，主要表现特征有高血糖、胰岛素分泌缺陷、胰岛素抵抗和高胰岛素血症等。心血管病变的加速发展是 2 型糖尿病主要致死致残的主要原因之一 [2]。寻找新的靶点或药物对糖尿病患者的心肌病变进行预防和治疗具有重要临床意义。

目前，糖尿病心肌病变的机制不清。自噬是真核生物细胞内普遍存在的一种自稳机制，它通过溶酶体降解来消除细胞中多余和受损的结构，以维持细胞正常生理功能，从而适应各种不良刺激 [3]。自噬在维持心脏功能和形态中起着重要作用。心肌细胞自噬不仅是心肌细胞正常的生理反应，同时还参与心脏功能紊乱、心肌纤维化、心肌肥大等心肌损伤过程，调控心肌细胞自噬对心肌功能紊乱发挥积极作用 [4]。

两色金鸡菊（*Coreopsis tinctoria* Nutt）又名昆仑雪菊，为菊科金鸡菊属的野生草本植物，始载于《新华本草纲要》[5]，其头状花序入药，具有降血糖、降血脂、降压、软化血管、抑制细菌生长的功效，是防治糖尿病、冠心病等疾病的特殊药食两用的草药 [6]。研究发现，两色金鸡菊富含黄酮类化合物 [7]。马里苷（marein）是黄酮类化合物的主要活性成分之一，为查尔酮主要的葡萄糖苷 [8]，其具有良好的降血糖 [9]、调血脂、降血压 [10] 等功效。本课题组前期研究已证实，两色金鸡菊的活性成分通过降血糖、抗氧化应激等发挥保护肾脏、肝脏的作用，但对心脏保护作用的机制仍有待于研究。因此，本实验研究两色金鸡菊中马里苷对 2 型糖尿病 db/db 小鼠心肌细胞损伤的保护作用及作用机制。

1 材料

1.1 动物

5 ～ 6 周龄，SPF 级雄性 db/db 小鼠 24 只，雄性 db/m 小鼠 6 只，体质量 22 ～ 35 g [江苏卡文斯实验动物有限公司，实验动物生产许可证号：SCXK（苏）2016-0010]。本实验所用 db/db 和 db/m 小鼠及实验饲养条件均符合国家科学技术委员会制订的《实验动物管理条例》。

1.2 试药

马里苷由本课题组提取（新疆医科大学药学院从两色金菊中提取，HPLC 法测定纯度为 99%），盐酸二甲双胍片（中美上海施贵宝制药有限公司，批号：H20023370），小鼠胰岛素（INS）ELISA 试剂盒（江苏酶标生物科技有限公司，批号：MB-3315B 48T），苏木素（Biosharp life Science，批号：69090030），BCA 蛋白浓度测定试剂盒（Thermo，批号：RH237562），聚丙烯酰胺凝

胶（SDS-PAGE）凝胶试剂盒（北京索莱宝有限公司，批号：20190708），抗 LC3Ⅱ/Ⅰ单克隆抗体（批号：4108S）、抗 P62 单克隆抗体（批号：39749S）（美国 Cell-Technology 公司），GAPDH（批号：GA003-R）、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG（H＋L）二抗（批号：IH-0011）（北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司）。

1.3 仪器

卓越精采血糖仪（瑞士 Roche 公司），STS-2 型脱色摇床（上海琪特分析仪器有限公司），Axio-ObserverZ1 倒置显微镜（德国 ZEISS），Benchmark PLUS 全波长酶标仪、156-8001 型垂直电泳槽、Gel-DocXR ＋凝胶成像分析系统（美国 Bio-Rad 公司）。

2 方法

2.1 分组与给药

db/db 小鼠 24 只，按体质量和空腹血糖值（FBG）随机分为模型组、阳性对照组（盐酸二甲双胍 280 mg·kg^{-1}）和实验组（马里苷，50 mg·kg^{-1}）[11-12]，每组 6 只；选取同来源的 db/m 小鼠 6 只设为正常对照组。各组灌胃给药，每日 1 次，连续 8 周，模型组和正常对照组给予相应的等体积的羧甲基纤维素钠（CMC-Na）溶液。

2.2 小鼠体质量和 FBG 检测

观察各组小鼠的精神状态、活动情况，记录大鼠摄食、饮水情况，注意小鼠皮毛色泽的变化等；给药后每周检测小鼠体质量；在给药干预的第 0、4、6、8 周，小鼠禁食不禁水，尾静脉采血，用血糖仪检测各组小鼠 FBG。

2.3 生化检测 TC 和 TG 含量

各组小鼠用药物干预 8 周后，禁食 12 h 不禁水，眼眶取血，37 ℃放置 30 min，3000 r·min^{-1} 离心 10 min，分离血清。采用生化仪检测血清中 TC、TG 含量。

2.4 ELISA 检测血清胰岛素含量

采用 ELISA 法按试剂盒说明测定血清胰岛素水平。

2.5 HE 染色观察小鼠心肌组织病理形态改变

小鼠颈脉脱臼处死，迅速提取小鼠心脏，用遇冷的生理盐水冲洗干净，吸水纸吸干多余的水分，即得心肌组织。取心肌组织，用 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h 后，脱水，石蜡包埋，切片，HE 染色，脱水透明，封固，在光镜下观察小鼠心肌组织形态学改变。

2.6 透视电镜观察自噬小体

剪取约 1 mm^2 小块左心室组织置于 2.5% 戊二醛固定，用 PBS 清洗，用四氧化锇固定液固定 2 h 后弃固定液，用乙醇逐级脱水，包埋切片，使用透视电镜观察心肌细胞自噬体。

2.7 蛋白免疫印迹法（Western blot）检测分析

将冷存的心肌组织解冻，取 50 mg 组织研磨，加入预冷的含 1% 蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液 500 μL，裂解 30 min，匀浆，离心 10 min（4 ℃ 12 000 r·min^{-1}），取上清液，并用 BCA 蛋白试剂盒测定蛋白浓度；通过电泳，转膜，封闭，抗体孵育，显色成像。以 GAPDH 为内参，检测微管关联蛋白 1A 和 1B（LC3）、SQSTM1 蛋白（p62）的表达。

2.8 统计学分析

数据采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析处理，结果采用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA），当 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 马里苷对 db/db 小鼠 FBG 和体质量的影响

正常对照组小鼠 FBG 和体质量稳定。与正常对照组比较，模型组小鼠 FBG 和体质量明显升高；与模型组相比较，实验组 FBG 和体质量无明显变化（见图 1）。

3.2 马里苷对小鼠 TC、TG 及胰岛素水平的影响

正常对照组小鼠 TC、TG 及胰岛素水平稳定。模型组小鼠较正常对照组小鼠血清中 TC、TG 及胰岛素水平显著升高（$P < 0.01$）；与模型组比较，实验组 TC、TG 及胰岛素水平显著降低（$P < 0.01$），说明马里苷可改善 db/db 小鼠血脂异常和胰岛素抵抗（见表 1）。

表 1 马里苷对 TC、TG 及胰岛素水平的影响（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Effect of marein on the level of TC，TG and insulin（$\bar{x}\pm s$）

组别	TC/（mmol·L^{-1}）	TG/（mmol·L^{-1}）	胰岛素 /（mU·L^{-1}）
正常对照组	1.82±0.52	1.43±0.15	30.11±1.71
模型组	10.19±1.52$^{\#\#}$	7.70±1.36$^{\#\#}$	36.70±0.85$^{\#\#}$
阳性对照组	7.62±1.25**	5.86±0.59**	25.93±3.99**
实验组	6.10±1.31**	4.74±1.47**	29.21±3.29**

注（Note）：与正常对照组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组比较，$^{**}P < 0.01$（Compared with the normal control group，$^{\#\#}P < 0.01$；compared with the model group，$^{**}P < 0.01$）。

3.3 小鼠心肌组织形态学变化

心肌组织 HE 染色结果显示，与正常对照组比较，模型组小鼠心肌纤维肥大、肿胀明显、可见部分心肌纤维断裂及局部炎细胞浸润、细胞间质明显增多。阳性对照组和实验组小鼠心肌纤维无明显肥大、肿胀、心肌间质正常（见图 2）。

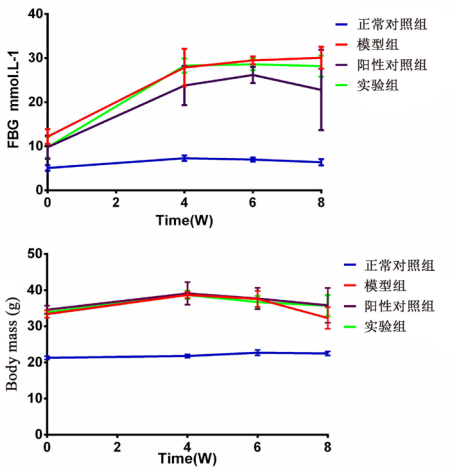


图 1　马里苷对空腹血糖、体质量的影响

Fig 1　Effect of marein on fasting glucose and body mass

3.4　透射电镜观察心肌组织超微结构和自噬小体

透射电镜检测显示，正常对照组小鼠显示连续规则的肌节并构成肌原纤维，线粒体分布于肌原纤维之间，自噬小体形成；而模型组小鼠出现肌原纤维断裂、肌原原纤维紊乱、线粒体排列紊乱，自噬小体数量减少；马里苷干预后上述情况有所改善，且自噬小体数量有所增加（见图 3）。

3.5　马里苷对心肌组织自噬指标 p62 和 LC3-Ⅱ/Ⅰ蛋白表达的影响

自噬对心脏功能及结构的维持至关重要，在应激状态下自噬的激活可以通过降解、循环代谢产物产生能量来维持心肌细胞存活。Western blot 结果显示，与正常对照组比较，模型组小鼠心肌组织 p62 蛋白表达水平显著升高（$P < 0.01$），LC3-Ⅱ/Ⅰ表达水平显著降低（$P < 0.01$），表明心肌细胞自噬被抑制；马里苷干预后，小鼠心肌组织 p62 表达水平显著降低（$P < 0.01$），LC3-Ⅱ/Ⅰ表达水平显著升高（$P < 0.05$），表明马里苷可以促进心肌细胞自噬（见图 4）。

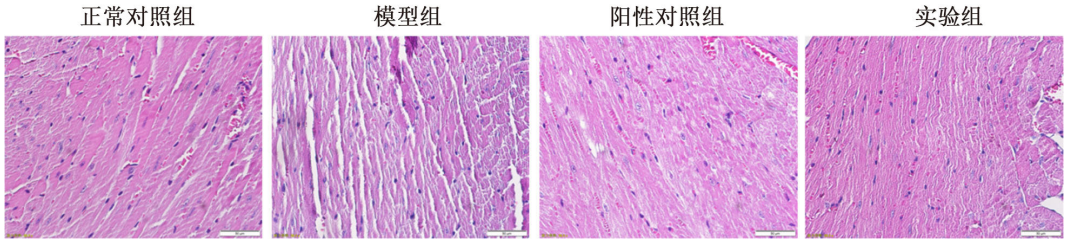


图 2　马里苷对 db/db 小鼠心肌组织病理学的影响（HE，400×）

Fig 2　Effect of marein on the myocardial histopathology in db/db mice（HE，400×）

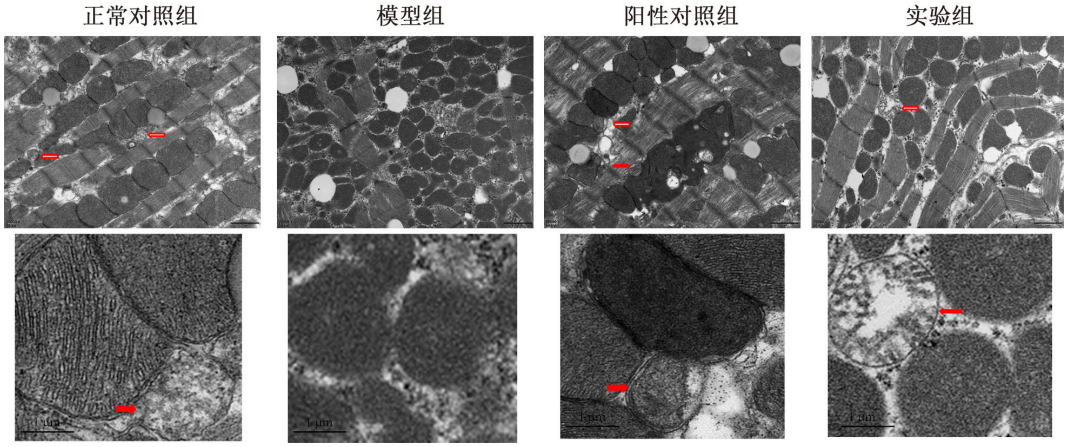


图 3　马里苷对心肌超微结构和自噬小体的影响

Fig 3　Effect of marein on the myocardial ultrastructure and autophagosomes

4　讨论

据流行病学调查统计，2019 年全球糖尿病患病率为 9.3%（4.63 亿人），到 2030 年预测患病率将上升到 10.2%（5.78 亿），到 2045 年将上升到 10.9%（7 亿）[13]。在 2 型糖尿病患者中，患有心血管疾病的数量逐日上升 [14]。1972 年临床首次发现与 2 型糖尿病有关的心肌病患者，并推测患者心肌病变由弥漫性心肌纤维化、心肌肥大和糖尿病性微血管引起的 [15]。

马里苷为两色金鸡菊黄酮类化合物主要有效成分之一。马里苷具有抗氧化 [16] 和较好的自由基清除能力 [17]，且可以改善高血糖引起的胰岛素抵抗，抑制细胞凋亡 [12]。本研究发现，马里苷药物干预后，糖尿病小鼠 TC、TG 和胰岛素水平显著降低。课题组前期研究发现，两色金鸡菊黄酮有效成分，在高糖诱导的 HUVEC 细胞损伤模型

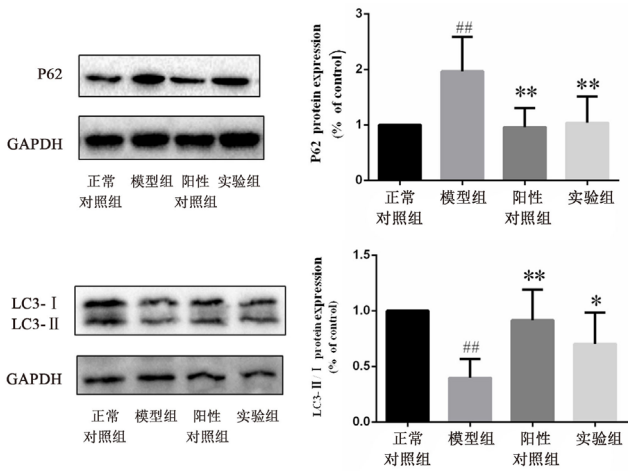


图 4 马里苷对 db/db 小鼠心肌自噬的影响

Fig 4 Effect of marein on the myocardial autophagy in db/db mice

注（Note）：与正常对照组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组比较，$^{**}P < 0.01$（Compared with the normal control group，$^{\#\#}P < 0.01$；compared with the model group，$^{**}P < 0.01$）。

中，通过促进自噬，从而发挥对 HUVEC 内皮细胞损伤的保护作用 [18]。本实验采用 db/db 糖尿病动物模型，探讨两色金鸡菊黄酮主要有效成分马里苷通过调控自噬对糖尿病 db/db 小鼠心肌细胞损伤的保护作用。

自噬是一种自我降解的过程，在平衡机体发育所需能量和调节营养等方面至关重要。自噬可以清除错误折叠或聚集的蛋白、受损的细胞器（包括线粒体、内质网、过氧化物酶体等）以及细胞内病原体，被认为是自我保护过程。自噬在癌症、糖尿病、神经变性、心肌病、肝病、感染性疾病与自身免疫性疾病等疾病的预防和治疗过程中发挥关键的作用 [19]。Sybers 等 [20] 在 1976 年发现了心肌细胞内存在自噬现象，心肌细胞自噬失调导致心肌功能紊乱、心肌纤维化、心肌肥大、心力衰竭和过早死亡等 [4]。自噬是维持心肌细胞大小以及整体心脏结构和功能的一种稳态机制，在衰竭心脏中通过上调自噬从而使心肌细胞免受血流动力学应激的影响 [21]。自噬障碍可以引起心肌肥大、压力超负荷心力衰竭、缺血性心肌病及糖尿病心肌病等 [22]。自噬的调控机制很复杂，它是由多种信号通路及其调控因子共同介导完成的。微管关联蛋白 1A 和 1B（microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3，LC3）是一种可溶性蛋白，分布在哺乳动物组织中，是哺乳动物 *Atg8* 基因的同源物，主要定位在前自噬泡和自噬泡膜的表面，是自噬体特异性标志蛋白 [23]。LC3 前体加工形成 LC3-Ⅰ，经泛素化修饰后通过 Atg7/Atg3 与自噬体膜表面的磷脂酰乙醇胺（PE）结合形成 LC3-Ⅱ，LC3-Ⅰ转变到 LC3-Ⅱ是自噬启动的标志，由 LC3-Ⅱ/Ⅰ反映自噬表达水平 [24-25]。p62 是一种多域蛋白，也是哺乳动物选择性自噬的载体蛋白 [26]，p62 可与定位在自噬小体内膜上的 LC3-Ⅱ形成复合体，从而削弱 LC3-Ⅱ的活性，同时，p62 蛋白本身又受自噬调节的作用，其表达与自噬活性成负相关 [27]。研究发现，高糖缺氧诱导的人脐静脉内皮细胞中，自噬相关蛋白 LC3 表达下调，p62 表达上调，高糖缺氧条件下，自噬功能受损，上调自噬可以降低凋亡率，保护细胞受损 [28]。本实验研究发现，模型组中，LC3-Ⅱ/Ⅰ的表达显著降低，p62 的表达显著升高，自噬小体数量减少，自噬被抑制，心肌肌原纤维断裂，心肌纤维肥大、肿胀、排列紊乱，心肌结构发生病理性改变；马里苷干预后，LC3-Ⅱ/Ⅰ的表达显著升高，p62 的表达显著降低，自噬小体数量增加。提示马里苷可促进自噬，改善心肌组织结构，保护心肌细胞损伤。

综上所述，本实验首次探讨马里苷对糖尿病 db/db 小鼠心肌细胞的保护作用，并初步证实马里苷通过促进自噬，改善心肌组织结构，保护心肌细胞损伤，但其具体机制有待进一步研究。

参考文献

[1] 魏秋芳，王惠霞 . 黄芪总黄酮多靶点调控治疗糖尿病及其并发症的研究进展 [J]. 中南药学，2020，18（8）：1348-1356.

[2] 李婉娇，李强 . 糖尿病性心肌病的发病机制及治疗方法研究进展 [J]. 中华老年多器官疾病志，2019，18（7）：536-539.

[3] 朱金秀，吴盛鄴，胡佐祺，等 . 自噬在糖尿病心肌病发病机制中的作用研究进展 [J]. 实用心电学杂志，2021，30（1）：64-67.

[4] Kobayashi S，Liang Q. Autophagy and mitophagy in diabetic car-diomyopathy [J]. Biochim Biophys Acta，2015，1852（2）：252-261.

[5] 张媛，屠鹏飞 . 两色金鸡菊头状花序的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志，2012，37（23）：3581-3584.

[6] 毛新民，卢伟，李琳琳，等 . 两色金鸡菊化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国药物应用与监测，2014，11（4）：235-239.

[7] 时晓娟，魏颖，王东超，等 . 两色金鸡菊干预代谢综合征活性成分研究现状 [J]. 中华中医药学刊，2015，33（8）：1843-1845.

[8] Jiang B，Le L，Liu H，et al. Marein protects against methylglyoxal-induced apoptosis by activating the AMPK pathway in PC12 cells [J]. Free Radical Res，2016，50（11）：1173-1187.

[9] Jiang B，Le L，Zhai W，et al. Protective effects of ma-

rein on high glucose-induced glucose metabolic disorderin HepG2 cells [J]. Phytomedicine，2016，23（9）：891-900.
[10] 张婷，李慧芳，吕博，等 . 新疆两色金鸡菊提取物抗脂质过氧化及对糖尿病小鼠的保护作用 [J]. 中国药理学通报，2016，32（9）：1272-1278.
[11] Yao L，Li L，Li X，et al. The anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of Coreopsis tinctoria Nutt on high-glucose-fat diet and streptozotocin-induced diabetic renal damage in rats. [J]. BMC Complement Altern Med，2015，15（9）：314-318.
[12] Guo Y，Ran Z，Zhang Y，et al. Marein ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting renal sodium glucose transporter 2 and activating the AMPK signaling pathway in db/db mice and high glucose-treated HK-2 cells [J]. Biomed Pharmacother，2020，131（11）：110684.
[13] Shelley S，Jill B，Pauline H，et al. Exploring the prevalence of undiagnosed prediabetes，type 2 diabetes mellitus，and risk factors in adolescents：A systematic review [J]. J Pediatr Nurs，2020，50（11）：94-104.
[14] Roberts AW，Clark AL，Witte KK. Review article：Left ventricular dysfunction and heart failure in metabolic syndrome and diabetes without overt coronary artery disease-do we need to screen our patients? [J]. Diabetes Vasc Dis Re，2009，6（3）：153-163.
[15] Rubler S，Dlugash J，Yuceoglu YZ，et al. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis [J]. Excerpta Medica，1972，30（6）：595-602.
[16] 刘菁 . 两种两色金鸡菊活性成分对胰岛细胞保护作用及小分子敲除初步探索 [D]. 乌鲁木齐：新疆医科大学，2017.
[17] 张婷 . 新疆两色金鸡菊总黄酮化学成分及其生物活性研究 [D]. 石河子：石河子大学，2017.
[18] 李卉 . 新疆两色金鸡菊对糖尿病视网膜病变的影响及分子机理研究 [D]. 乌鲁木齐：新疆医科大学，2017.
[19] Onorati AV，Dyczynski M，Ojha R，et al. Targeting autophagy in cancer [J]. Cancer，2018，124（16）：3307-3318.
[20] Sybers HD，InGwall J，DeLuca M. Autophagy in cardic myocyte [J]. Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab，1976，12：453-463.
[21] 徐洁，王君，谭欣同，等 . 食源性黄酮类化合物调控自噬干预疾病的研究进展 [J]. 食品工业科技，2020，41（16）：326-333.
[22] Delbridge LMD，Mellor KM，Taylor DJ，et al. Myocardial stress and autophagy：Mechanisms and potential therapies [J]. Nat Rev Cardiol，2017，14（7）：412-425.
[23] 吕晓希，胡卓伟 . 自噬流的检测方法 [J]. 药学学报，2016，51（1）：45-51.
[24] Pankiv S，Clausen TH，Lamark T，et al. P62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitatc degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy [J]. J Biol Chem，2007，282（33）：24131-24145.
[25] Tanida I，Ueno T，Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy [J]. Biochem Cell Biol，2004，36（12）：2503-2518.
[26] 魏慧丽 . 1，25- 二羟维生素 D_3 通过 β-catenin/TCF4/GSK-3β/mTOR 通路介导自噬干预糖尿病心肌病研究 [D]. 重庆：重庆医科大学，2017.
[27] 郝卯林，楼国强，刘秀洁，等 . 细胞自噬在大鼠缺血 / 再灌注肺损伤中的调控作用 [J]. 中国应用生理学杂志，https://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1339.R.20210422.0935.001.html.
[28] 范文斯，王亚斌，韩东，等 . 自噬参与高糖缺氧诱导的人脐静脉内皮损伤机制的实验研究 [J]. 心脏杂志，2017，29（4）：377-381，404.

（收稿日期：2021-05-01；修回日期：2021-06-10）

药物分析与检验

牛蒡根提取物指纹图谱研究

吴琼，马群，胡北，崔亚玲，何静，王卓，许子华*（北部战区总医院，沈阳 110016）

摘要：目的 研究不同产地牛蒡根药材的高效液相色谱（HPLC）指纹图谱，为其质量控制提供依据。**方法** 采用 HPLC 法测定湖北、安徽、江西、辽宁、山东等 9 个产地的 14 批市售牛蒡根药材，色谱条件为安捷伦 ZORBAX SB-C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱，乙腈 -0.04% 磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱，检测波长 330 nm，流速 1.0 mL·min^{-1}，柱温 35 ℃，检测时间 60 min。**结果** 牛蒡根提取物中所含成分的各色谱峰均得到了有效分离，在测定的 14 批药材中，以 3，5- 二咖啡酰奎宁酸对照品为参照峰建立了牛蒡根的 HPLC 指纹图谱共有模式图，不同产地的样品相似度均在 0.9 以上，有 11 个共有峰，确定为特征指纹峰。**结论** 该 HPLC 指纹图谱具有可靠性，可为进一步研究制订牛蒡根的质量标准提供依据。

关键词：牛蒡根；指纹图谱；3，5- 二咖啡酰奎宁酸；高效液相色谱法
中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1624-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.022

HPLC fingerprints of the extract of *Arctium lappa* L. root

WU Qiong, MA Qun, HU Bei, CUI Ya-ling, HE Jing, WANG Zhuo, XU Zi-hua* (*General Hospital of Northern Theater Comman*, *Shenyang* 110016)

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprints of the extract of *Arctium lappa* L. root from different origins, and to provide a basis for the identification and quality control of *Arctium lappa* L. root. **Methods** HPLC was used to determine 14 batches of commercially available *Arctium lappa* L. root from 9 areas in Hubei, Anhui, Jiangxi, Liaoning, Shandong, and other provinces. Agilent ZORBAX SB-C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μm) chromatographic column was used. Acetonitrile-0.04% phosphoric acid solution was used as the mobile phase for gradient elution, the detection wavelength was 330 nm, the flow rate was 1.0 mL·min^{-1}, the column temperature was 35 ℃ , and the detection time was 60 min. **Results** The chromatographic peaks of the components in the extract of *Arctium lappa* L. root were well separated. Among the 14 batches of medicinal materials measured, 3, 5-dicaffepyridinequinic acid was used as the reference peak to establish a common pattern of HPLC fingerprints of the extract of *Arctium lappa* L. root. The similarity of fingerprint of all samples was above 0.9, and 11 common peaks were found, which were identified as characteristic fingerprint peaks. **Conclusion** The HPLC fingerprint established by this method is reliable, which provides a basis for further research and quality standard of extract of *Arctium lappa* L. root.

Key words: *Arctium lappa* L. root; fingerprint spectrum; 3, 5-dicaffeoylquinic acid; high performance liquid chromatography

牛蒡根，又称恶实根，为菊科牛蒡属植物牛蒡 *Arctium lappa* L. 的肉质直根，牛蒡主要分布于广西、山东、安徽、辽宁、湖北、浙江等地，有去热、消肿的功效[1]，常用于感冒、头痛、咳

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81673328）；辽宁省自然科学基金项目（No.20180550807）。
作者简介：吴琼，女，硕士，主管药师，主要从事中药质量控制及中药药理方向研究，E-mail：wuqiongbaby@126.com *通信作者：许子华，男，硕士，主管药师，主要从事中药质量标准与药物代谢方向研究，E-mail：xuzihua-668585@163.com

嗽、咽喉肿痛等疾病。中药是以多组分多靶点的作用方式对机体代谢网络综合作用而产生结果，因此用中药的指纹图谱来结合指标成分含量对中药材进行质量控制，既可量化、综合性地阐述中药的特征，又可以弥补单一有效成分定量控制模式的缺陷[2]。中药成分复杂，分离和测定均有一定的难度，因此能否选择主要的药物成分进行准确的分析，直接关系到对于该中药质量的评价[3]。并且考虑到实际应用的情况，成分是否可测又是指标成分选择的前提[4]。近年来，随着多种多样的仪器分析技术的出现，以及其在天然产物结构鉴定中的应用，牛蒡根中发现了越来越多的绿原酸类化合物[5]，目前主要发现的已分离出来的化合物有 1，5- 二咖啡酰 -3- 苹果酰奎尼酸、3，5- 二咖啡酰 -1-（2- 咖啡酰 -4- 苹果酰甲酯）- 奎尼酸、3，5- 二咖啡酰 -1-（2- 咖啡酰 -4- 苹果酰）- 奎尼酸等[6]。有药理学研究表明，该类化合物具有明显的神经保护、抗癌、抗菌、抗氧化、降血脂及免疫调节等作用[7-14]。笔者通过文献检索发现，目前对牛蒡根药材质量控制标准研究尚不完整，对其化学成分的测定方法和指纹图谱研究尚浅。

中药指纹图谱是一种综合的、宏观的、可量化的手段，可反映中药化学成分的整体组成和特征。为进一步完善牛蒡根药材质量评价体系，本研究参考相关文献[15-16]，采用高效液相色谱（HPLC）法建立了 14 批牛蒡根药材的 HPLC 指纹图谱，得到能够标示其特性的共有色谱峰图谱，为牛蒡根药材的应用及其内在质量的均一性提供全面的质量控制依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

岛津 LC-16 系列高效液相色谱仪（SPD-16 型紫外检测器、LC-16 型泵、SIL-16 型进样器、CTO-16 型柱温箱）（日本岛津仪器有限公司）；Shimadzu AUW 120 D 十万分之一分析天平（日本 Shimadzu 公司）；2012 版中药色谱指纹图谱相似度评价系统（国家药典委员会）；KQ3200 型超声波清洗器（昆山超声仪器有限公司，150 W，40 kHz）；Agilent ZORBAX SB-C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）（安捷伦）。

1.2 试药

3，5- 二咖啡酰奎宁酸对照品（HPLC 纯度，四川省维克奇生物科技有限公司，批号：wkq20020403，纯度≥ 98%）；甲醇、乙腈（色谱纯，Sigma 公司）；磷酸（分析级，天津永大化学试剂有限公司）；95% 乙醇（美华公司，沈阳市辽河化工厂）；双蒸水为自制。

14 批牛蒡根药材，产地分别为辽宁、山东、安徽、浙江、江西、吉林、广西、河北、湖北。将各产地编号为 S1 ～ S14，其中，S1（批号：191115）、S2（批号：191001）产地为安徽；S3（批号：191026）、S4（批号：20191103）产地为广西；S5（批号：191225）产地为河北；S6（批号：191101）、S7（批号：191201）产地为湖北；S8（批号：191210）产地为吉林；S9（批号：191210）产地为江西；S10（批号：20200326）产地为辽宁；S11（批号：200301）、S12（批号：200115）、S13（批号：200322）产地为山东；S14（批号：200325）产地为浙江。药材购于辽宁九州通医药有限公司、亳州三峰中药饮片有限公司。经北部战区总医院药检室何静副主任药师鉴定为菊科植物牛蒡 *Arctium lappa* L. 的干燥块根。

2 方法与结果

2.1 HPLC 色谱条件

色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为 0.4% 磷酸水溶液（A）- 乙腈（B），梯度洗脱（0 ～ 25 min，10% → 15%B；25 ～ 35 min，15% → 20%B，35 ～ 60 min，20% → 30%B）；流速 1.0 mL • min^{-1}；检测波长 330 nm；柱温 35 ℃；检测时间为 60 min；进样量：10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取适量 3，5- 二咖啡酰奎宁酸对照品，精密称定，置于棕色量瓶中，加入少量甲醇，振摇使溶解，后加甲醇定容至刻度，制成每 1 mL 含有 3，5- 二咖啡酰奎宁酸 45 μg 的溶液，即得对照品溶液。

2.2.2 牛蒡根提取物的制备 称取各产地的牛蒡根药材适量置于圆底烧瓶中，加入 10 倍量 55% 乙醇溶液浸泡过夜，次日回流提取，每次 2 h，共 2 次，合并提取液并过滤，分产地合并提取液。将各产地的提取液分别加热浓缩至含药材 1 g • mL^{-1}，4 ℃冰箱保存。

2.2.3 供试品溶液的制备 取浓缩后的提取液 4 mL，置 10 mL 棕色量瓶中，加入甲醇定容，静置 24 h，取上清液，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.3 指纹图谱

2.3.1 精密度试验 取牛蒡根提取物（S6）样

品溶液，按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，记录色谱图，将图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价体系》（2012 版），计算相似度，相似度均为 1.000。以 6 号峰的保留时间（t_R）和峰面积（A）为参照，计算得其他各共有峰相对于 6 号峰的 t_R 和 A，结果显示指纹图谱中 11 个共有峰的相对保留时间、相对峰面积的 *RSD* 值分别小于 0.24%、3.7%，表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取牛蒡根提取物（S6）样品溶液，按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样，按“2.1”项下色谱条件记录色谱图。将其导入《中药色谱指纹图谱相似度评价体系》（2012 版），得到各个样品的相似度，结果显示相似度均大于 0.999。以 6 号峰的相对保留时间（t_R）和相对峰面积（A）为参照，计算得其他各共有峰相对于 6 号峰的 t_R 和 A 的 *RSD* 值分别小于 0.32%、5.5%，表明牛蒡根提取物供试品溶液在常温下 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取牛蒡根提取物（S6）样品溶液，按照“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样，记录色谱图。将图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价体系》（2012 版），得到各个样品的相似度，结果显示均大于 0.999，以 6 号峰的相对保留时间（t_R）和相对峰面积（A）为参照，计算得其他各共有峰相对于 6 号峰的 t_R 和 A 的 *RSD* 分别小于 0.090%、5.0%，表明该种分析方法的重复性良好。

2.3.4 指纹图谱建立 取 14 批不同产地的药材，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，根据“2.1”项下色谱条件进样测定，记录 HPLC 色谱图，样品的色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》（2012 版）软件进行分析，以中位数法生成对照图谱，时间窗宽度为 0.1 min，经多点校正、自动匹配后生成牛蒡根提取物指纹图谱的共有模式如图 1，对照指纹图谱见图 2。

2.3.5 共有峰的标定 通过对 14 批牛蒡根提取物中的共有峰进行比对分析，利用《中药色谱指纹图谱相似度评价体系》（2012 版）的数据匹配功能，在对照指纹图谱上标定共有峰，牛蒡根提取物 HPLC 指纹图谱共有 11 个共有峰。同时与对照品色谱图（见图 3）比对，可确认 6 号峰为 3，5- 二咖啡酰奎宁酸。选择出峰时间适中、峰面积较大、对称性较好的 6 号峰作为参照峰（S），分

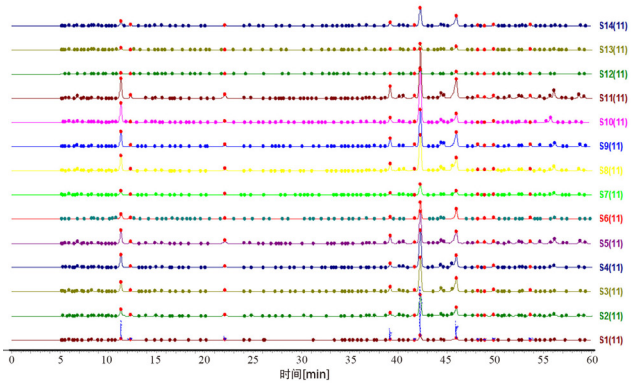


图 1 14 批次牛蒡根提取物的指纹图谱

Fig 1 HPLC fingerprints of 14 batches of *Arctium lappa* L. root

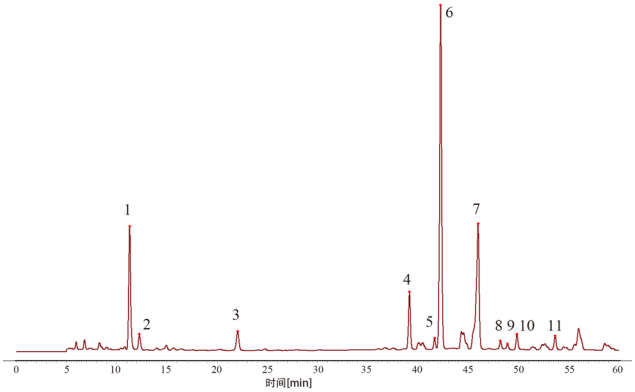


图 2 牛蒡根提取物 HPLC 对照指纹图谱

Fig 2 Common HPLC model fingerprint of *Arctium lappa* L. root

别计算其他各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果见表 1 和表 2。

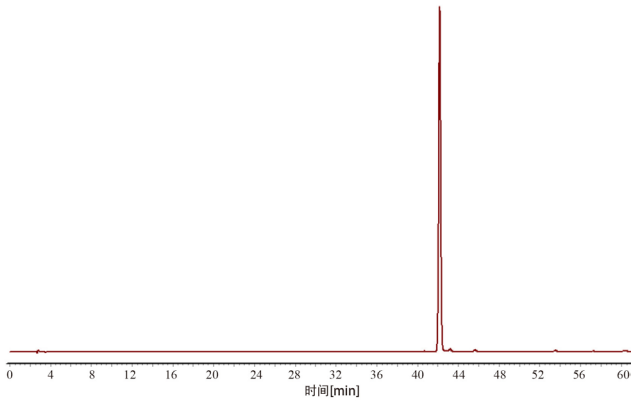


图 3 对照品 3，5- 二咖啡酰奎宁酸的色谱图

Fig 3 HPLC chromatogram of 3，5-dicaffeoylquinic acid

2.3.6 相似度评价 将各个批次的牛蒡根提取物指纹图谱分别导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》（2012 版）软件，对各批次样品的指纹图谱与对照图谱进行相似度评价。从图 1 可以看出 14 批牛蒡根药材的整体图貌基本一致。14 个产地的牛蒡根药材的相似度达到了 0.966，有较好的相似性，见表 3。

表 1　牛蒡根提取物共有峰的相对保留时间

Tab 1　Relative retention time of common peaks of *Arctium lappa* L. root

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	*RSD*/%
1	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.20
2	0.28	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	1.20
3	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.17
4	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.02
5	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.02
6	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
7	1.09	1.09	1.09	1.09	1.09	1.09	1.09	1.09	1.09	1.09	1.09	1.09	1.09	1.09	0.02
8	1.14	1.15	1.15	1.15	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	0.33
9	1.16	1.18	1.16	1.16	1.16	1.15	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16	0.55
10	1.18	1.19	1.18	1.18	1.18	1.18	1.18	1.18	1.18	1.18	1.18	1.18	1.18	1.18	0.24
11	1.27	1.27	1.27	1.27	1.27	1.27	1.27	1.27	1.27	1.27	1.27	1.27	1.27	1.27	0.05

表 2　牛蒡根提取物共有峰的相对峰面积

Tab 2　Relative peak areas of common peaks of *Arctium lappa* L. root

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	*RSD*/%
1	0.331	0.286	0.240	0.308	0.380	0.293	0.341	0.376	0.378	0.325	0.372	0.248	0.310	0.238	16.08
2	0.084	0.051	0.046	0.035	0.061	0.113	0.099	0.056	0.055	0.019	0.056	0.091	0.097	0.049	41.81
3	0.129	0.059	0.049	0.046	0.113	0.083	0.126	0.087	0.073	0.040	0.105	0.070	0.071	0.054	37.11
4	0.186	0.142	0.132	0.095	0.239	0.133	0.201	0.181	0.207	0.092	0.236	0.128	0.135	0.164	29.31
5	0.009	0.029	0.033	0.022	0.037	0.064	0.023	0.041	0.052	0.015	0.046	0.048	0.118	0.017	68.88
6	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
7	0.572	0.509	0.474	0.374	0.600	0.719	0.540	0.482	0.540	0.197	0.625	0.617	0.590	0.734	25.34
8	0.022	0.025	0.031	0.015	0.040	0.033	0.035	0.032	0.057	0.007	0.045	0.030	0.067	0.027	46.73
9	0.012	0.015	0.010	0.008	0.029	0.049	0.026	0.026	0.035	0.005	0.034	0.045	0.083	0.010	75.77
10	0.047	0.052	0.049	0.044	0.046	0.074	0.060	0.048	0.048	0.023	0.052	0.073	0.073	0.068	26.37
11	0.041	0.040	0.038	0.019	0.058	0.080	0.052	0.045	0.073	0.001	0.066	0.080	0.101	0.055	48.66

表 3　牛蒡根提取物相似度

Tab 3　Similarity of *Arctium lappa* L. root

样品	相似度	样品	相似度
S1	0.997	S8	0.999
S2	0.999	S9	0.998
S3	0.997	S10	0.966
S4	0.993	S11	0.994
S5	0.995	S12	0.991
S6	0.984	S13	0.991
S7	0.997	S14	0.981

2.3.7　系统聚类分析　分别将 14 批牛蒡根提取物样品的 HPLC 指纹图谱中各自的共有峰的峰面积数据导入 SPSS 17.0 统计分析软件，采用组间联接法，以欧式平方距离作为分类的依据，对样品进行聚类分析，结果见图 4。当欧氏距离大于 10 时，14 批牛蒡根药材主要被聚为两类，Ⅰ类包括 S1 ～ S9、S11 ～ S14，各个批次的样品相似度较高（0.981 ～ 0.999），产地包括山东、安徽、浙江、江西、吉林、广西、河北、湖北，Ⅱ类为 S10（辽宁产地，相似度 0.966）。表明这 14 批样品不完全相同，存在一定差异，但差异不大（整体在 0.966 以上）。

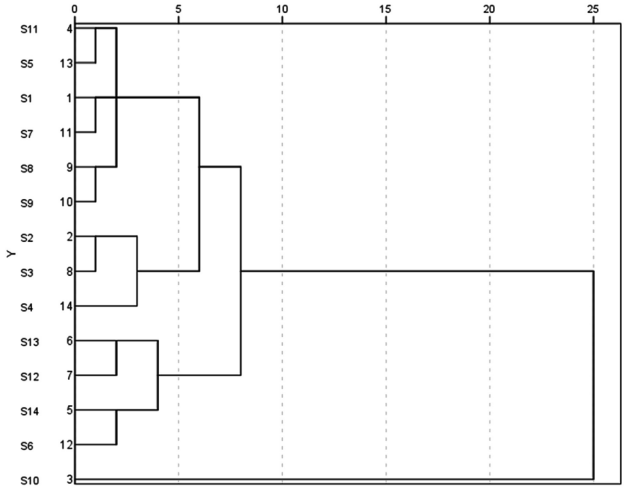


图 4　14 批药材指纹图谱聚类分析的树状图

Fig 4　Dendrogram of hierarchical clustering analysis of 14 batches of samples

3　讨论

本研究对牛蒡根检测的色谱条件进行了选择及优化，分别考察了甲醇 / 水、乙腈 / 水、甲醇 / 磷酸水、乙腈 / 磷酸水不同比例洗脱溶剂对 HPLC 色谱图的影响，结果显示乙腈 -0.4% 磷酸水为较优溶剂；并进行了全波长扫描，结果显示 330 nm 下色谱峰的数量较多，峰面积较大且分离

度较好，故选择 330 nm 作为检测波长。

对提取方法进行考察，比较了提取溶剂（水、甲醇、乙醇）和不同浓度乙醇（55% 乙醇、65% 乙醇、75% 乙醇）溶液的提取效果。发现以 55% 的乙醇溶液为溶剂加热回流提取 120 min，提取效果最优。同时比较了多种流动相的比例对于牛蒡根提取物的分离效果，结果表明使用乙腈（B）-0.4% 磷酸水（A）梯度洗脱：0 ～ 25 min，10% ～ 15%B；25 ～ 35 min，15% ～ 20%B；35 ～ 60 min，20% ～ 30%B，并使用 Agilent ZORBAX SB-C_{18} 色谱柱可以使样品中各组分得到良好的分离，且保留时间适中。该方法简洁方便，易于操作，还可减少对色谱仪的损耗，可准确测定牛蒡根药材中的指标成分。

指纹图谱中 11 个共有峰相对保留时间的 *RSD* 值均小于 1.2%，表明本文建立的指纹图谱研究方法为一种稳定的共有模式，可以作为牛蒡根药材品质评价的方法。14 批样品相对峰面积 *RSD* 值较大，说明各批样品间组分含量差异较大，提示牛蒡根的品质与其产地密切相关，需对牛蒡根化学成分进行含量测定，阐明药材品质与产地之间的关系，进一步为临床使用牛蒡根提供依据。

从相似度分析结果可知，除 S10（辽宁）外，其他相似度均在 0.98 以上，说明不同产地的牛蒡根药材存在一定差异，但差异不大。同时从聚类分析结果可知，14 批牛蒡根药材聚为两类，区域特征不明显，与相似度分析结果相一致，说明牛蒡根药材质量稳定。

HPLC 在检测中药等物质中有很高的的应用价值，可以清晰指认分离药物中的各类活性物质 [17]。本文通过建立牛蒡根药材的 HPLC 指纹图谱，9 个产地的牛蒡根药材的图谱整体外形相近，且相似度也达到了 0.966 以上，有较好的相似性。所建立的指纹图谱，共有峰数目达到 11 个，且分离度较好、保留时间合适，相邻色谱峰之间的分离度较高，色谱峰强度也较大，且根据方法学的验证结果均满足要求。综上可采用 HPLC 法对牛蒡根药材进行质量把控，并对牛蒡根药材进行综合宏观分析，可促进牛蒡根药材及其相关制剂的研发并对其质量的控制得到全面提高。

参考文献

[1] 孟楣，廖自荣，周建理 . 牛蒡根的生药学研究 [J]. 基层中药杂志，2000，14（4）：27-28.

[2] 陈素娥，孙红，朱琳，赵龙山 . 茯苓药材高效液相色谱指纹图谱及多指标成分定量研究 [J]. 中南药学，2020，18（9）：1507-1512.

[3] 刘素香，白雪，刘毅，等 . 马鞭草 HPLC 指纹图谱建立及指标性成分的测定 [J]. 中草药，2016，47（12）：2069-2073.

[4] 张铁军，白钢，陈常青，等 . 基于“五原则”的复方中药质量标志物（Q-marker）研究路径 [J]. 中草药，2018，49（1）：1-13.

[5] Jaiswal R，Kuhnert N. Identification and characterization of five new classes of chlorogenic acids in burdock（*Arctium lappa* L.）roots by liquid chromatography/ tandem mass spectrometry [J]. Food Funct，2011，2（1）：63-71.

[6] 高欢，刘文武，蒋晓文，等 . 牛蒡根化学成分研究 [J]. 中草药，2020，51（4）：912-917.

[7] 白俊鹏，胡晓龙，蒋晓文，等 . 牛蒡根中咖啡酸类化学成分及其神经保护活性研究 [J]. 中草药，2015，46（2）：163-168.

[8] 林学政，柳春燕，陈靠山，等 . 不同地域牛蒡叶绿原酸的含量及其抑菌实验 [J]. 天然产物研究与开发，2004，16（4）：328-331.

[9] Lin SC，Lin CH，Lin CC，et al. Hepatoproecctive effects of *Arctitun lappa* L. on live injuries induced by carbon tetrachloride [J]. J Biomed Sci，2002，9：401-409.

[10] Kardosova A，Ebringerva A，Alfoldi J，et al. A biologically activefructan from the roots of *Arctitun lappa* L [J]. Int J Biol Macromol，2003，33（1-3）：135-140.

[11] 陈世雄，陈靠山 . 牛蒡根化学成分及活性研究进展 [J]. 食品与药品，2010，12（7）：281-285.

[12] Chen HM，Xu AL，Huang CW，et al. Study of the effectand functional mechanism of Niu Bangzi on reducing the bloodlipoprotein level of the expermiental hyperlipidemic rats [J]. China Archives Tradit Chin Med，2010，28（3）：626-627.

[13] 李谦 . 探讨牛蒡根治疗疏风散热的效果 [J]. 智慧健康，2017，3（16）：80-81.

[14] Rebai O，Belkhir M，Fattouch S，et al. Phytochemicals from mulberry extract（Morus sp.）：Antioxidant and neuroprotective potentials [J]. J Appl Pharm Sci，2017，7（1）：217-222.

[15] 李焕荣，崔健，宋玉环 . 不同产地的金银忍冬中绿原酸、异绿原酸的含量测定 - 双波长薄层扫描法 [J]. 吉林中医药，1989（2）：33，39-40.

[16] 金蓉鸾，叶玉兰，单文坱 . 双波长薄层层析扫描法测定金银花中异绿原酸和绿原酸的含量 [J]. 南京药学院学报，1980（1）：15-18.

[17] Ok HE，Lee SY，Chun HS. Occurrence and simultaneous determination of nivalenol and deoxynivalenol and deoxynivalenol in rice and bran by HPLC-UV detection and immunoaffinity cleanup [J]. Food Control，2018，8（7）：53-59.

（收稿日期：2020-11-02；修回日期：2020-12-25）

临时用重组人干扰素 α-2b 鼻腔喷雾剂的配制和稳定性考察

阮丽梅[1]，倪晓燕[2]，吕凤文[1]，陆静金[1]，戴根苗[1]，程钢[1*]（1. 安徽医科大学第一附属医院药剂科，国家中医药管理局中药化学三级实验室，合肥　230022；2. 安徽安科生物工程（集团）股份有限公司，合肥　230088）

摘要：目的　考察重组人干扰素 α-2b 注射液配制成鼻腔喷雾剂后的稳定性，为一线医务人员防护新型冠状病毒肺炎提供保障。**方法**　在无菌条件下将 3 批重组人干扰素 α-2b 注射液与 0.9% 氯化钠注射液混合配制成浓度为 1.0×10^6 IU·mL^{-1} 的溶液，装入鼻腔喷雾装置，制成鼻腔喷雾剂；依据《中国药典》2015 年版四部测定在不同的温度下 [（5±3）℃、（25±2）℃、（37±2）℃）] 以及在振摇、冻融、模拟使用等影响因素下样品的外观、pH 值、无菌、生物学活性。**结果**　样品在（5±3）℃和（25±2）℃条件下保存 3 个月、在（37±2）℃条件下保存 1 个月，外观、pH 值、无菌、生物学活性均无明显变化，符合质量标准；在振摇 14 d、冻融 4 次及模拟使用后 2 个月后的外观、pH 值、无菌、生物学活性均无明显变化，符合质量标准。**结论**　该制剂稳定性良好，可作为新型冠状病毒肺炎预防用药在短期内供医务人员使用。

关键词：新型冠状病毒肺炎；重组人干扰素 α-2b；鼻腔喷雾剂；稳定性；预防用药
中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)08-1629-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.023

Preparation and stability of recombinant human interferon α-2b nasal spray for temporary use

RUAN Li-mei[1], NI Xiao-yan[2], LYU Feng-wen[1], LU Jing-jin[1], DAI Gen-miao[1], CHENG Gang[1*] (1. *Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Grade Three Pharmaceutical Chemistry Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Hefei* 230022; 2. *Anhui Anke Biotechnology (Group) Co, Ltd, Hefei* 230088)

Abstract: Objective　To determine the stability of nasal spray prepared by recombinant human interferon α-2b injection, and to ensure the safety for the front-line medical staff against corona virus disease 2019 (COVID-19). **Methods**　Three batches of recombinant human interferon α-2b injections were respectively filled into borosilicate glass vials, diluted to 1.0×10^6 IU·mL^{-1} with physiological solution of sodium chloride, and sealed with spray pumps under aseptic conditions. The appearance, pH value, sterility and biological activity of the nasal spray were detected at (5±3)℃, (25±2)℃, and (37±2)℃ under shaking, freezing and thawing, and simulated conditions according to the requirements in Chinese Pharmacopoeia (Vol Ⅳ, 2015 Edition). **Results**　The appearance, pH value, sterility, and biological activity of the nasal spray met the quality standards after storage at (5±3)℃ and (25±2)℃ for 3 months and at (37±2)℃ for 1 month, without obcious change. After repeated shaking for 14 d, freezing and thawing 4 times and simulation test for 2 months, no obvious changes in appearance, pH value, sterility and biological activity were found, which met the standard. **Conclusion**　The spray is stable and can be used as a preventive drug for medical staff against COVID 19 in a short time.

Key words: COVID-19; recombinant human interferon α-2b; nasal spray; stability; preventive drug

新型冠状病毒肺炎（corona virus disease 2019，COVID-19），简称“新冠肺炎”[1]，传播迅速，潜伏时间长，主要传播途径为呼吸道飞沫传播及密切接触传播[2-3]。为了减少新型冠状病毒（SARS-

基金项目：安徽省临床重点专科建设项目（卫科教秘（2017）529 号）。
作者简介：阮丽梅，女，主管药师，主要从事医院药学工作，E-mail：rlm13721100109 @163.com　*通信作者：程钢，男，副主任药师，主要从事医院药品质量控制工作，E-mail：13865919702@163.com

CoV-2）的传播，应加强直接接触患者一线医务人员的防护，在采用物理防控措施的基础上，使用其他防护措施也是必要的。根据国家卫生健康委《新型冠状病毒肺炎诊疗方案》（试行第 7 版）推荐，目前用于 COVID-19 的抗病毒治疗主要有 α-干扰素（α-IFN）、洛匹那韦、利托那韦（LPVr）及利巴韦林等 [4]。其中重组人干扰素 α-2b（rhIFNα-2b，以下简称 IFNα-2b）具有广谱抗病毒、抑制细胞增殖以及提高免疫功能等作用。有研究表明 α-干扰素的抗病毒机制可以预防病毒感染，持续用药，可能会起到类似疫苗的作用，而使用干扰素喷雾剂可阻断呼吸道病毒的快速传播，起到预防作用 [5-6]。国外研究报告了 SARS-CoV-2 对重组人干扰素 α 和 β（IFNα/β）的敏感性，证明了 IFNα/β 在抑制 SARS-CoV-2 感染方面的潜在功效 [7]，并推荐使用低剂量的 IFNα-2b 在鼻腔喷雾（每日 2 次，每次 0.5×10^6 IU），配合羟氯喹口服（每日 50 ～ 100 mg），用于临床一线医务人员，以预防 COVID-19[8]。目前国内已上市的 IFNα-2b 喷雾剂没有鼻腔喷雾剂型，一般为皮肤科外用喷雾剂，适用于由病毒引起的初发或复发性皮肤单纯疱疹，并不能直接喷于鼻咽部 [9-10]。基于此，我们考虑配制 IFNα-2b 鼻腔喷雾剂为医护人员提供药物预防，本研究以 α- 干扰素雾化方案为基础，参考国内外多项鼻腔喷雾剂的相关文献 [8，11-13]，确定了制剂的处方和用法，利用临床常用的 IFNα-2b 注射液和 0.9% 氯化钠注射液配制临时用喷雾溶液，灌封于鼻腔用喷雾装置中，并考察喷雾剂的稳定性，旨在为临床一线医护人员预防 COVID-19 提供安全保障。

1 试药与仪器

1.1 试药

IFNα-2b 注射液 [安徽安科生物工程（集团）股份有限公司，规格：每支 3.0×10^6 IU，批号：20191230、20200206-1、20200206-2]，0.9% 氯化钠注射液（中国大冢制药有限公司，规格：100 mL，批号：19110722），人羊膜成纤维细胞（WISH）、水疱性口炎病毒（VSV）株 [安徽安科生物工程（集团）股份有限公司]，硫乙醇酸盐流体培养基（FTM，批号：20191021，青岛高科技工业园海博生物技术有限公司），胰酪大豆胨液体培养基（TSB，批号：20191030，青岛高科技工业园海博生物技术有限公司）。

1.2 仪器

生物安全柜（SW-CJ-1F 型，苏州净化设备有限公司），隔水式培养箱（GHP9080，上海一恒科学仪器有限公司），恒温培养箱（FYL-YS-50LK，北京福意联电器有限公司），CO_2 培养箱（HERAcell vios 160i，Thermo Scientific），倒置显微镜（XDS-1B，重庆光电仪器有限公司），pH 计（FE20，MettlerToledo），光吸收读板机（SpectraMax 190，Molecular Devices），多剂量鼻腔喷雾泵 [规格：每喷 100 μL，万通（苏州）定量阀系统有限公司]，无菌喷雾剂玻璃瓶 [规格：10 mL，万通（苏州）定量阀系统有限公司]。

2 方法

2.1 鼻腔喷雾剂的制备

无菌条件下操作，取 IFNα-2b 注射液（3.0×10^6 IU∶1 mL）3 支，以一次性无菌注射器吸取并注入无菌喷雾剂玻璃瓶中，再加入 0.9% 氯化钠注射液 6 mL，装入鼻腔喷雾泵，拧紧密封，并盖上防污罩，在瓶身贴上标签，共制作 3 批，批号标注为 A、B、C，分别对应 IFNα-2b 注射液批号 20191230、20200206-1、20200206-2。

2.2 稳定性考察

2.2.1 储存温度试验 将批号为 A、B、C 的 3 批样品分别于（5 ±3）℃（以下简称 5 ℃）、（25±2）℃（以下简称 25 ℃）、（37±2）℃（以下简称 37 ℃），相对湿度（60±10）% 条件下避光贮存，分别于 0 d、7 d、14 d、1 个月、2 个月、3 个月，按考察项目取样检测。

2.2.2 振摇试验 将 3 批样品于 5 ℃条件下避光贮存，置于摇床上振摇，振动幅度为 ±10°，振动频率为 80 $r\cdot min^{-1}$。分别于 0、7、14 d 按考察项目取样检测。

2.2.3 冻融试验 将 3 批样品于（－ 20±5）℃放置 48 h 完全冷冻，再置于 5 ℃放置 48 h 完全解冻，为一个冻融循环，分别于 2 次、4 次冻融后按考察项目取样检测。

2.2.4 模拟使用试验 将 3 批样品各取适量，模拟正常使用，每日 4 次，每次 3 喷，连续使用 5 d，使用完毕后放置于 5 ℃保存。分别于开始使用后的第 1 日、5 日、1 个月、2 个月各取 11 支样品，按考察项目取样检测。

2.3 考察项目

依据《中国药典》2015 年版三部分别进行外观、pH 值、无菌、生物学活性检测。

2.3.1 外观性状 手持样品容器颈部于遮光板边缘处，轻轻旋转和翻转容器，以明视距离（通常为 25 cm）分别于黑色和白色背景下用目检视。质量标准：应为澄明液体，无肉眼可见异物。

2.3.2 pH 值 根据《中国药典》2015 年版第四部

通则 0631 进行检测。质量标准：pH 应为 6.5 ～ 7.5。

2.3.3　无菌　根据《中国药典》2015 年版第四部 1101 无菌检查法，采用薄膜过滤法处理样品。质量标准：应无菌生长。

2.3.4　生物学活性　根据《中国药典》2015 年版第三部第一法细胞病变抑制法（CPE），以中国食品药品检定研究院颁发的干扰素标准品校正。根据干扰素可以保护人羊膜细胞免受水泡性口炎病毒破坏的作用，用结晶紫对存活的 WISH 细胞染色，于波长 570 nm 处测定其吸光度，可得到干扰素对 WISH 细胞的保护效应曲线，以此测定干扰素生物学活性。质量标准：应为标示量的 80% ～ 150%，标示量为每瓶 900 万 IU/9 mL。

3　结果

3.1　不同储存温度考察结果

A、B、C 3 批样品 0 个月的生物学活性分别为标示量的 111%、111% 和 108%，于 5 ℃、25 ℃存放 3 个月、于 37 ℃存放 1 个月，3 批样品生物学活性（%）在 108% ～ 137%，其他各项指标检测结果也均符合质量标准要求，表明本品在 5 ℃、25 ℃条件下可存放 3 个月、于 37 ℃条件下可存放 1 个月，见表 1。

表 1　3 批 IFN*α*-2b 鼻腔喷雾剂在不同温度下储存不同时间的稳定性

Tab 1　Stability of 3 batches of IFN*α*-2b nasal spray stored at different temperatures and time

检测项目	批号	储存时间														
		0 d	7 d			14 d			1 个月			2 个月			3 个月		
			5 ℃	25 ℃	37 ℃	5 ℃	25 ℃	37 ℃	5 ℃	25 ℃	37 ℃	5 ℃	25 ℃	37 ℃	5 ℃	25 ℃	37 ℃
外观	A	合格	—	合格	合格	—	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	—	合格	合格	—
	B	合格	—	合格	合格	—	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	—	合格	合格	—
	C	合格	—	合格	合格	—	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	—	合格	合格	—
pH 值	A	6.71	—	6.75	6.72	—	6.67	6.72	6.73	6.57	6.68	6.75	6.87	—	6.81	6.71	—
	B	6.72	—	6.70	6.68	—	6.62	6.68	6.75	6.52	6.58	6.76	6.68	—	6.80	6.68	—
	C	6.70	—	6.72	6.70	—	6.61	6.70	6.72	6.51	6.54	6.77	6.61	—	6.72	6.65	—
无菌	A	合格	—	合格	合格	—	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	—	合格	合格	—
	B	合格	—	合格	合格	—	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	—	合格	合格	—
	C	合格	—	合格	合格	—	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	—	合格	合格	—
生物学活性 /%	A	111	—	120	124	—	116	124	126	137	113	119	117	—	116	111	—
	B	111	—	108	106	—	113	106	108	102	105	107	106	—	106	104	—
	C	108	—	110	105	—	109	105	104	103	99	103	103	—	102	103	—

注（Note）：“—”表示未做检测（not detected）。

3.2　振摇试验考察结果

3 批样品振摇试验 14 d，期间检测各项指标，生物学活性（%）在 102% ～ 126%，其他各项检测结果均符合质量标准要求，表明振摇条件下本品至少能保存 2 周，见表 2。

表 2　3 批 IFN*α*-2b 鼻腔喷雾剂在振摇条件下的稳定性

Tab 2　Stability of 3 batches of IFN*α*-2b nasal spray under vibration conditions

检测项目	批号	储存时间 /d		
		0	7	14
外观	A	合格	合格	合格
	B	合格	合格	合格
	C	合格	合格	合格
pH 值	A	6.71	6.72	6.72
	B	6.72	6.77	6.72
	C	6.70	6.71	6.70
无菌	A	合格	—	合格
	B	合格	—	合格
	C	合格	—	合格
生物学活性 /%	A	111	102	126
	B	111	106	104
	C	108	101	106

注（Note）：“—”表示未做检测（not detected）。

3.3　冻融试验考察结果

3 批样品在第 2、4 次冻融循环后检测各项指标，生物学活性（%）在 100% ～ 137%，其他各项检测结果均符合质量标准要求，表明冻融 4 次后本品稳定性良好，见表 3。

3.4　药品模拟使用后 5 ℃储存稳定性

3 批样品模拟使用 5 d 后、5 ℃存放 2 个月，结果生物学活性在 99% ～ 115%，其他各项检测结果均符合质量标准要求，表明模拟使用后本品仍能保存 2 个月，见表 4。

4　讨论

4.1　研究目的和意义

在疫情期间，国家卫生健康委发布了系列方案、指南、通知等，根据医务人员接触 COVID-19 患者可能性及其暴露风险，提出分级防护措施 [14]。但防护重点侧重于物理隔离，比如戴口罩，穿隔离衣，戴护目镜等，药物预防则主要集中于中药汤剂 [15]，西药预防未特别强调。*α*-2 型干扰素作为广谱抗病毒药，是《新型冠状病毒肺炎诊疗方案》1 ～ 7 版推荐的主要治疗药物之一，推荐用法是大

表 3 3 批 IFN*α*-2b 鼻腔喷雾剂冻融 4 次的稳定性

Tab 3 Stability of 3 batches of IFN*α*-2b nasal spray freeze-thaw 4 times

检测项目	批号	冻融循环 / 次		
		0	2	4
外观	A	合格	合格	合格
	B	合格	合格	合格
	C	合格	合格	合格
pH 值	A	6.71	6.74	6.90
	B	6.72	6.73	6.67
	C	6.70	6.7	6.63
无菌	A	合格	合格	合格
	B	合格	合格	合格
	C	合格	合格	合格
生物学活性 /%	A	111	103	137
	B	111	100	102
	C	108	102	100

表 4 3 批 IFN*α*-2b 鼻腔喷雾剂模拟使用后 5 ℃储存的稳定性

Tab 4 Stability of 3 batches of IFN*α*-2b nasal spray stored at 5 ℃ after the simulated test

检测项目	批号	储存时间				
		0 天	1 d	5 d	1 个月	2 个月
外观	A	合格	合格	合格	合格	合格
	B	合格	合格	合格	合格	合格
	C	合格	合格	合格	合格	合格
pH 值	A	6.71	6.72	6.75	6.85	6.87
	B	6.72	6.71	6.78	6.66	6.70
	C	6.70	6.69	6.73	6.56	6.64
无菌	A	合格	合格	合格	合格	合格
	B	合格	合格	合格	合格	合格
	C	合格	合格	合格	合格	合格
生物学活性 /%	A	111	107	115	112	109
	B	111	101	106	100	102
	C	108	99	102	98	100

剂量雾化吸入（5.0×10^6 IU/ 次，每日 2 次），吸入的药物颗粒沉积于气道和肺部发挥疗效。关于 *α*-2 型干扰素作为鼻腔预防用药，在鼻腔发挥疗效，则鲜有推荐报道，究其原因，是因为美国 20 世纪 80 年代临床试验证实 *α*-2 型干扰素对鼻黏膜有刺激作用（干黏膜、结痂、血涕等）[16-18]，从而限制了喷雾剂作为呼吸道病毒感染预防用药的使用，至今美国 FDA 未批准该剂型上市，中国亦然。而近期较多的研究表明，小剂量应用 IFN*α*-2b 鼻腔喷雾，可有效防治各类病毒性上呼吸道疾病，包括预防 COVID-19[8, 19]，且不良反应并不明显。医院药学人员因地制宜，于静配中心生物安全柜内无菌操作，用 IFN*α*-2b 注射液和 0.9% 氯化钠注射液配制临时用鼻腔喷雾剂，在保证关键质量的前提下，可迅速供给一线医务人员使用。

4.2 喷雾剂处方与用法的思考

国内对 IFN*α*-2b 鼻腔喷雾剂的剂量和安全性相关研究集中于 2003 年 SARS 疫情之后，在参考国外报道的基础上，陈清团队 [11-13] 进行了大样本（＞ 4000 人）的随机对照试验，成人日剂量 1.8×10^6 IU，每日用药 2 次，每次两侧鼻腔、咽喉各一喷，连续使用 5 d，结果不良反应轻微，且均为可逆性反应，未出现血涕和严重不良反应报告，这可能与使用剂量低、用药时间短有关 [12]。本次 COVID-19 疫情发生之后，有国外研究再次推荐使用低剂量 IFN*α*-2b 鼻腔喷雾预防 COVID-19[8]，日剂量 1.0×10^6 IU，每日鼻内喷雾 2 次，既可减轻由 SARS-CoV-2 引起的感冒症状，又可最大程度地降低 IFN*α*-2b 的不良反应。

本试验在参照国内外研究的基础上，将喷雾剂的处方定为：IFN*α*-2b 注射剂 3 支（3.0×10^6 IU/ 支）与 0.9% 氯化钠注射液 6 mL 混合配制而成，相当于喷雾剂中 IFN*α*-2b 的含量为 1.0×10^6 IU • mL^{-1}；用 0.9% 氯化钠作溶剂是为了维持渗透压，保持等渗状态 [20]。推荐用法为：每日 2 ～ 3 次，每次两侧鼻腔各 1 喷、咽喉 2 喷，以每喷量 100 μL 计，相当于日剂量 0.8×10^6 ～ 1.2×10^6 IU，与文献预防推荐量（日剂量 1.0×10^6 IU）接近 [8]；使用时间为 5 d，达到预防效果的同时避免严重不良反应。适用人群为临床一线健康和有轻度呼吸道病毒感染症状的医务人员。从本院医务人员的使用情况反馈来看，用药耐受性良好，未发生严重不良反应，用药人员均未发生呼吸道病毒感染（包括 COVID-19）。

4.3 稳定性考察结果分析

由于 IFN*α*-2b 注射剂处方中含有人血白蛋白，为生物制剂，对各种环境条件的改变较敏感，本试验考察了样品在不同温度下储存的稳定性，在 5 ℃条件下稳定性良好，至少可保存 3 个月；在 25 ℃和 37 ℃条件下也可以保存一段时间，提示在临床使用中即使忘记放入冰箱冷藏，短时间内也依旧安全有效；通过冻融试验和振摇试验表明样品在极端环境下储存和颠簸的运输过程中依然可以保持良好的稳定性；模拟使用 5 d 后的稳定性考察表明，用药结束后于 5 ℃放置 2 个月，各项检测指标均未发生较大变化，说明喷雾装置的密闭性良好，能充分防止微生物和细菌的进入，在必要时可继续使用。

4.4 制剂的优点与展望

鼻喷雾剂的处方通常包括原药、防腐剂、稳定剂、抗氧化剂及缓冲剂等辅料，但是有的药用辅料有一定的毒性，可能会对制剂安全性产生影响 [21-22]，而本试验配制的鼻喷雾剂直接用 0.9% 氯化钠注射液稀释而成，未添加其他

辅料，可以避免辅料的毒副作用；国内上市的2种IFNα喷雾剂商品名为捷抚（IFNα-2b，10 mL：1.0×10^6 IU，120喷/瓶）和运德素（IFNα-1b，5 mL：0.25×10^6 IU），规格剂量小，即使可以临时替代使用，但要达到1.0×10^6 IU的日剂量，需要喷120喷（用完整瓶）或以上，临床不易接受。而本次试验配制的规格（9 mL：9.0×10^6 IU）每日只需喷8～12喷，一瓶能保证5～7 d用量，使用方便。试验采用的无菌喷雾装置易于在市场上购得，利用医院静脉配置中心的无菌条件即可完成配制，不需要其他特殊设备，操作简单，现配现用，特别适合新冠疫情等临时性突发公共事件下对药物特殊剂型的需求。

有研究表明，在治疗COVID-19时，干扰素雾化吸入可以产生气溶胶污染空气，增加医护人员和患者交叉感染的风险[23-24]，而本试验配制的喷雾剂与雾化吸入相比，不受使用环境及雾化设备的限制，患者依从性好，不易产生气溶胶污染环境。但其能否在轻症COVID-19患者的治疗中代替雾化吸入治疗，从而减少交叉感染，需要继续深入研究。当然，IFNα-2b鼻喷雾剂在预防中还缺乏相关的临床研究，其有效性和安全性还需要进一步验证。

参考文献

[1] 国家卫生健康委 . 国家卫生健康委关于新型冠状病毒肺炎暂命名事宜的通知 [EB/OL].（2020-02-07）[2020-04-09]. http：//www. nhc. gov. cn/yzygj/s7653p/202002/18c1bb43965a4492907957875de02ae7. shtml.

[2] 国务院应对新型冠状病毒感染肺炎疫情联防联控机制关于做好新冠肺炎疫情常态化防控工作的指导意见 [J]. 中国公共卫生管理，2020，36（3）：284，441.

[3] 索继江，闫中强，刘运喜，等 . 新型冠状病毒肺炎医院感染现状及预防控制策略与措施探讨 [J]. 中华医院感染学杂志，2020，30（6）：811-816.

[4] 国家卫生健康委，国家中医药管理局 . 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案（试行第七版）的通知 [EB/OL].（2020-03-03）[2020-04-09]. http：//www. nhc. gov. cn/xcs/zhengcwj/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989. shtml.

[5] 段招军，张丽兰，谢志萍，等 . 不同型别重组人干扰素在细胞培养上抗SARS病毒的研究 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志，2003，17（3）：205-208.

[6] 程永庆，刘金毅，林福玉，等 . 重组人干扰素α1b与新型冠状病毒肺炎防治 [J]. 中国生物工程杂志，2020，40（1/2）：71-77.

[7] Mantlo E，Bukreyeva N，Maruyama J，et al. Antiviral activities of type Ⅰ interferons to SARS-CoV-2 infection [J]. Antivir Res，2020，179：104811.

[8] Alexander Y，Charlotte Y，Bing Y. Use of hydroxychloroquine and Interferon alpha-2b for the Prophylaxis of COVID-19 [J]. Med Hypotheses，2020，144：109802.

[9] 高凌云 . 重组人干扰素-α的局部治疗及临床应用进展 [J]. 中国临床医生杂志，2018，46（7）：767-769.

[10] 曹琳，张磊，田莉，等 . 重组人干扰素α2b喷雾剂的抗病毒药效评价及临床观察 [J]. 中国医药生物技术，2011，6（5）：336-340.

[11] 于德宪，陈清，张丽兰，等 . 重组人干扰素α-2b喷雾剂预防SARS等呼吸道病毒感染的人群试验研究 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志，2005，19（3）：216-219.

[12] 陈清，张丽兰，于德宪，等 . 重组人干扰素α-2b喷雾剂人群试验的安全性评价 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志，2005，19（3）：211-215.

[13] Gao LL，Yu SY，Chen Q，et al. A randomized controlled trial of low-dose recombinant human interferons alpha-2b nasal spray to prevent acute viral respiratory infections in military recruits [J]. Vaccine，2010，28（28）：4445-4451.

[14] 李春辉，黄勋，蔡虻，等 . 新冠肺炎疫情期间医疗机构不同区域工作岗位个人防护专家共识 [J]. 中国感染控制杂志，2020，19（3）：199-213.

[15] 秦裕辉，胡方林，葛金文 . 新冠系列方预防新型冠状病毒感染用方探讨 [J]. 湖南中医药大学学报，2020，40（2）：129-133.

[16] Hayden FG，Mills SE，Johns ME. Human tolerance and histopathologic effects of long-term dministration of intranasal interferon-alpha 2 [J]. J Infect Dis，1983，148（5）：914-921.

[17] Hayden FG，Mills SE，Johns ME，et al. Tolerance and nasal histopathologic effects of long-term，low-dose intranasal recombinant interferon alpha-2A（Roferon-A）[J]. Antiviral Res，1987，8（3）：139-149.

[18] Hayden FG，Gwaltney JrJ M，Johns ME. Prophylactic efficacy and tolerance of low-dose intranasal interferon-alpha 2 in natural respiratory viral infections [J]. Antiviral Res，1985，5（2）：111-116.

[19] 申昆玲，尚云晓，张贺，等 . 重组人干扰素α2b喷雾剂（假单胞菌）治疗儿童急性上呼吸道感染有效性和安全性多中心随机对照临床研究 [J]. 中国实用儿科杂志，2019，34（12）：1010-1016.

[20] 潘家华，杨泽玉，潘家严，等 . 重组人干扰素α2b口咽部喷雾治疗疱疹性咽峡炎的有效性和安全性多中心随机对照研究 [J]. 中华实用儿科临床杂志，2020，35（4）：279-284.

[21] 翁琳琳，唐黎明，陈桂良 . 吸入给药制剂的质量控制及其安全性研究进展 [J]. 药物分析杂志，2013，33（5）：724-729.

[22] 江荣高，王立青，王春龙，等 . 添加剂对喷雾干燥干扰素α-2b稳定机制的研究 [J]. 中国药学杂志，2008，43（11）：841-844

[23] 倪忠，罗凤鸣，王吉梅，等 . 针对新型冠状病毒肺炎患者的雾化吸入治疗的建议 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志，2020，19（2）：120-124.

[24] 张友谊，祝静，窦梦娟，等 . 面罩雾化吸入在新型冠状病毒肺炎患者治疗中的护理经验分享 [J]. 临床医学研究与实践，2020，5（S1）：56-57，60.

（收稿日期：2020-12-02；修回日期：2021-02-20）

HPLC-FLD 法测定不同产地林蛙卵和林蛙油中雌二醇的含量

刘芳馨[1]，王月洁[1]，许佳明[1]，李季泽[1]，赵寰宇[1]，徐阳[2]，鲍慧玮[1*]（1. 长春中医药大学药学院，长春 130117；2. 白城医学高等专科学校药学系，吉林 白城 137000）

摘要：目的 建立 HPLC-FLD 法测定林蛙卵和林蛙油中雌二醇的含量。**方法** 采用 Extend C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱；流动相为甲醇 - 水（55∶45，*V/V*）；流速为 1.0 mL·min^{-1}；柱温为 40 ℃；荧光检测器激发波长为 282 nm，发射波长为 315 nm；进样量为 20 μL。**结果** 雌二醇质量浓度在 0.22 ～ 21.68 μg·mL^{-1} 内与峰面积呈良好的线性关系（r = 0.9999）；精密度、重复性和稳定性均良好（*RSD* < 2.0%），平均加样回收率为 100.4%（*RSD* 为 1.4%）。**结论** 该方法操作简单、准确、易重复，可用于林蛙卵和林蛙油中雌二醇的含量测定。

关键词：林蛙卵；林蛙油；高效液相色谱 - 荧光检测法；雌二醇
中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1634-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.024

Determination of estradiol in eggs and oil of *Rana Dybowskii* by HPLC-FLD

LIU Fang-xin[1], WANG Yue-jie[1], XU Jia-ming[1], LI Ji-ze[1], ZHAO Huan-yu[1], XU Yang[2], BAO Hui-wei[1*] (1. *College of Pharmacy*, *Changchun University of Chinese Medicine*, *Changchun* 130117; 2. *Department of Pharmacy*, *Baicheng Medical College*, *Baicheng Jilin* 137000)

Abstract: Objective To determine the content of estradiol in eggs and oil of *Rana Dybowskii* by HPLC-FLD. **Methods** The Extend C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column was used with mobile phase consisting of methanol-water (55: 45, *V/V*). The flow rate was 1.0 mL·min^{-1} and the column temperature was 40 ℃. The fluorescence detector excitation wavelength was 282 nm, and the emission wavelength was 315 nm. The injection volume was 20 μL. **Results** There was a good linearity between the estradiol concentration and the peak area at 0.22 － 21.68 μg·mL^{-1} (r = 0.9999). The precision test, repeatability test and stability test were all good (*RSD* < 2.0%), and the average recovery was 100.4% (*RSD* = 1.4%). **Conclusion** This method is simple, accurate and repeatable, and can be used to determine the content of estradiol in eggs and oil of *Rana Dybowskii*.

Key words: egg of *Rana Dybowskii*; oil of *Rana Dybowskii*; HPLC-FLD; estradiol

中国林蛙（*Rana temporaria chensinensis* David）是一种广泛分布于中国东北的两栖动物[1]，是我国传统名贵补品，最早记载于《饮片新参》[2-3]，性凉、味咸、入肺肾经，具有养肺滋肾的功效。中国林蛙中雌蛙输卵管干燥后取其脂肪状物即为林蛙油，去油后残留大量副产物，如林蛙卵等。林蛙卵和林蛙油中含有丰富的蛋白质、维生素、脂肪酸等营养成分[4-6]，具有降血脂、抑制血小板聚集、抗自由基等作用，林蛙油被称为“软白金”“林中之宝”“动物人参”“北方燕窝”[7-9]。

雌二醇（estradiol，E_2，结构见图 1）是林蛙卵和林蛙油中最具代表性的甾体类激素[10]，它可以缓解因为年龄增长、机体功能下降而导致的雌激素分泌不足[11-12]，此外，雌激素还能影响机体的代谢、促进子宫的蛋白质合成等[13]。由于雌二醇具有荧光吸收特性，因此本文建立 HPLC-FLD 法测定不同产地林蛙卵和油中雌二醇的含量，为林蛙卵和林蛙油的安全食用、产品研发提供参考。

1 材料

1.1 试药

基金项目：2019 年度长春中医药大学科学研究发展基金项目。
作者简介：刘芳馨，女，硕士，实验师，主要从事中药药效成分研究，E-mail：1136244403@qq.com *通信作者：鲍慧玮，女，硕士，实验师，主要从事中药药效成分研究，E-mail：baohuiwei@163.com

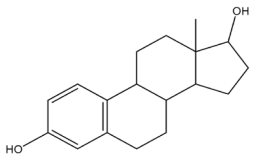


图 1 雌二醇化学结构式

Fig 1 Chemical structure of estradiol

东北地区林蛙油和林蛙卵，从各中药材市场购买，由长春中医药大学中药鉴定教研室肖井雷副教授鉴定为蛙科动物中国林蛙 *Rana temporaria chensinensis* David 雌蛙的干燥输卵管和卵，来源见表 1。雌二醇对照品（批号：100182-201205，含量以 98% 计，中国食品药品检定研究院）。

甲醇 [色谱纯，赛默飞世尔科技（中国）有限公司]；磷酸（分析纯，北京化工厂）；纯净水（杭州娃哈哈股份有限公司）。

1.2 仪器

Agilent LC1100 高效液相色谱仪，配备 FLD 检测器（美国安捷伦公司）；鼎力 DFY-500（摇摆式）多功能高速中药粉碎机（温州顶力医疗器械有限公司）；DHG-9123A 型电热恒温干燥箱（上海精宏实验设备有限公司）；KQ-250 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；旋转蒸发仪（上海申生科技有限公司）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Extend C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为甲醇 - 水（55∶45，*V*/*V*）；流速 1.0 mL • min^{-1}；柱温为 40 ℃；荧光检测器激发波长为 282 nm，发射波长为 315 nm；进样量为 20 μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取雌二醇对照品 5.42 mg，加甲醇超声溶解并稀释至 250 mL 量瓶，摇匀，备用；精密吸取 1 mL，加甲醇稀释至 10 mL，制得 2.168 μg • mL^{-1} 雌二醇的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

分别取干燥的林蛙油和林蛙卵样品，粉碎，过 100 目筛，称取粉末约 2 g，加入 20 mL 甲醇超声（250 W，40 kHz）提取 30 min，过滤，重复操作 2 次，合并滤液后 60 ℃旋转浓缩至 5 mL，制得林蛙油和林蛙卵供试品溶液。

2.4 系统适应性试验

将雌二醇对照品溶液、林蛙油和林蛙卵供试品溶液按照 “2.1” 项下色谱条件进行分析，得到色谱图见图 2。其中，在与对照品溶液色谱图相应的位置上，供试品溶液有相同保留时间的色谱峰，而且待测成分色谱峰与相邻色谱峰均分离完全，理论塔板数以雌二醇计算均大于 3000。

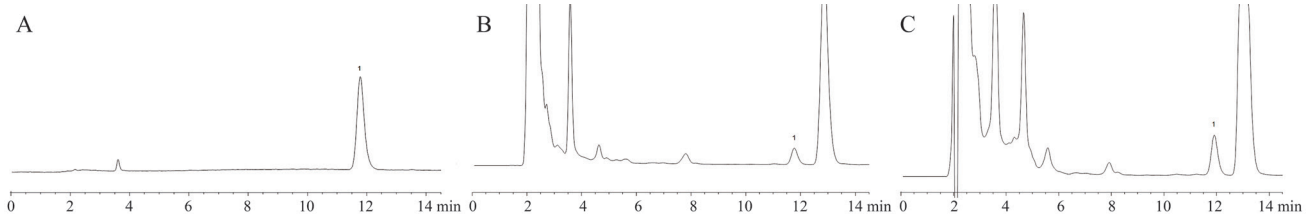


图 2 林蛙油和林蛙卵的 HPLC-FLD 色谱图

Fig 2 HPLC-FLD chromatogram of oil and eggs of *Rana Dybowskii*

A. 对照品（reference）；B. 林蛙油（oil of *Rana Dybowskii*）；C. 林蛙卵（eggs of *Rana Dybowskii*）；1. 雌二醇（estradiol）

2.5 方法学试验

2.5.1 线性关系考察 分别精密移取 “2.2” 项下雌二醇对照品溶液 0.1、0.5、1、2.5、5、10 mL，加甲醇至 10 mL，制得 6 个不同质量浓度的雌二醇对照品溶液，按照 “2.1” 项下色谱条件进样分析。以雌二醇浓度为横坐标（*X*），色谱峰面积为纵坐标（*Y*）进行线性回归，得到回归方程为 $Y = 523.6X - 61.66$（$r = 0.9999$），表明雌二醇质量浓度在 0.22 ～ 21.68 μg • mL^{-1} 与峰面积呈良好的线性关系。

2.5.2 精密度试验 将雌二醇对照品溶液按 “2.1” 项下色谱条件重复进样 6 次，记录色谱峰面积。计算雌二醇色谱峰面积的 *RSD* 值为 0.67%，表明仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 将林蛙卵供试品溶液室温放置，分别于 0、2、4、6、8、12 h 时按照 “2.1” 项下色谱条件进行分析，记录色谱峰面积。计算雌二醇色谱峰面积的 *RSD* 值为 1.5%，表明林蛙卵供试品溶液在 12 h 内具有良好的稳定性。

2.5.4 重复性试验 取批号为 JY20180901 的林蛙卵样品，按照 “2.3” 项下方法制备 6 份供试品溶液，在 “2.1” 项下色谱条件进样分析，记录色谱峰面积。计算雌二醇的平均含量为 7.058 μg • g^{-1}，*RSD* 值为 1.7%，表明该方法具有良好的重复性。

2.5.5 加样回收试验 取批号为 JY20180901 的林蛙卵样品 6 份，粉碎，每份约 1 g，置 100 mL 具塞锥形瓶中，精密加入质量浓度为 7.12 μg • mL^{-1} 的雌二醇对照品溶液 1 mL，再按照

“2.3”项下方法制备，在“2.1”项下色谱条件进样分析，记录色谱峰面积。计算雌二醇的平均加样回收率为 100.4%，*RSD* 值为 1.4%，表明该方法具有良好的准确度。

2.6 样品含量测定

称取 9 个批次的林蛙卵和林蛙油样品各约 2 g，分别制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进行测定，结果见表 1。

表 1 林蛙中雌二醇含量 (μg·g^{-1}，n = 3)

Tab 1 Estradiol content in *Rana Dybowskii* (μg·g^{-1}，n = 3)

编号	批号	来源	林蛙油	林蛙卵
S1	JY20181101	吉林 靖宇	2.090	7.055
S2	JY20181102	吉林 靖宇	1.234	9.186
S3	JY20181103	吉林 靖宇	3.178	6.994
S4	HD20181101	吉林 桦甸	4.099	7.838
S5	HD20181102	吉林 桦甸	1.147	11.002
S6	HD20181103	吉林 桦甸	1.365	6.024
S7	XB20181101	辽宁 新宾	0.903	9.113
S8	XB20181102	辽宁 新宾	1.008	5.750
S9	XB20181103	辽宁 新宾	3.072	10.802

3 讨论

林蛙卵和林蛙油中主要含有的激素类成分为乙酸雄甾酮、前列腺素、美屈孕酮、雌二醇等，其中雌二醇含量较高[10]，且具有良好的药效作用。本文建立 HPLC-FLD 法测定林蛙卵和林蛙油中雌二醇的含量，并对不同产地 9 批林蛙卵和林蛙油样品进行测定，发现不同批次样品中雌二醇含量差异比较大，且总体雌二醇含量较低。虽然动物药的差异性较大，但是建立的含量测定方法仍可快速、稳定地检测出雌二醇的含量，可作为监控林蛙卵和林蛙油中雌激素水平及评价林蛙卵和林蛙油质量的依据。

本试验曾考察了色谱柱型号（Extend C_{18} 色谱柱、Alltima C_{18} 色谱柱、Agilent TC C_{18} 色谱柱），流动相体系（甲醇 - 水、乙腈 - 水），色谱柱温度（30、35、40、45 ℃）和流速（1.0、1.5、2.0 mL·min^{-1}）对雌二醇色谱峰分离度、峰形、出峰时间的影响[14-16]，结果采用本研究色谱条件时得到的色谱峰峰形最佳，与相邻色谱峰分离最完全，且出峰时间适中，适合作为林蛙卵和林蛙油中雌二醇检测的色谱条件。

在检测器和检测波长选择时，对比了荧光检测器和紫外检测器，紫外检测器较为常用，但是对于一些具有荧光的物质，荧光检测器的灵敏度更高，更适用于一些较低含量的荧光物质，故本试验选择荧光检测器测定林蛙油和林蛙卵中含量较低的雌二醇。采用 HPLC-FLD 法测定雌二醇，并对激发波长和发射波长进行筛选，最终发现荧光检测器激发波长为 282 nm，发射波长为 315 nm，测定效果较好，雌二醇色谱峰有较高吸收，与附近色谱峰分离较好。

在供试品提取方法选择时，分别考察超声提取法、回流提取法、浸渍提取法，其中超声提取法和回流提取法提取效果最佳，而超声提取法在提取效率方面更具优势。随后考察不同提取溶剂，例如甲醇、95% 乙醇、无水乙醇等，最终发现甲醇提取效果最佳，干扰较少。

参考文献

[1] 柴秋泉 . 浅谈长白山林蛙 [J]. 吉林蔬菜，2016（Z1）：55-57.

[2] 逯通，周博宇，孟令仪，等 . 人参、林蛙油的营养功效研究进展 [J]. 中国卫生工程学，2019，18（6）：958-960.

[3] 张傲，张悦，陈缘，等 . 东北林蛙油研究进展 [J]. 养殖与饲料，2020（1）：68-71.

[4] 刘俊梅，吴世玉，王丹洋，等 . 林蛙卵营养成分和保健功能的研究进展 [J]. 食品研究与开发，2018，39（11）：220-224.

[5] 韩子晗，孙尧，杨富雅，等 . 林蛙卵油的提取、成分分析及抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技，2020，41（11）：60-65.

[6] 陈宁宁，常雷，岑欣桉，等 . 东北林蛙卵油脂肪酸成分分析及其氧化稳定性研究 [J]. 吉林农业大学学报，2020，42（1）：96-102.

[7] 郭宪一，范红艳 . 林蛙油的药理作用研究进展 [J]. 吉林医药学院学报，2020，41（3）：209-211.

[8] 王春清，郑华艳，吕树臣，等 . 中国林蛙卵的药理作用及开发利用 [J]. 黑龙江畜牧兽医，2016（2）：131-132.

[9] Zhao CH，Zhao C，Ye HQ，et al. Hypolipidemic activity of low-cholesterol ovum oil of Rana chensinensis and phytosterol（stigmasterol）in rats [J]. J ZHEJIANG UNIV-SCB，2019，20（7）：613-616.

[10] 康岚 . 林蛙油中雌激素成分的分析及其药理作用研究 [D]. 长春：长春中医药大学，2015.

[11] 康岚，李娜，姜大成 . 林蛙油的雌激素样作用研究 [J]. 现代食品科技，2015，31（8）：25-30，24.

[12] 赵宏宇，王玉，刘新宇，等 . 林蛙油提升雌激素的机制研究 [J]. 食品工业科技，2019，40（19）：296-300.

[13] 王哲，康岚，朱键勋，等 . 林蛙油中雌激素的化学成分及药理作用研究 [J]. 吉林中医药，2014，34（10）：1009-1010.

[14] 王荪璇，妙苗，王发，等 . HPLC-FLD 法测定雌三醇栓中雌三醇的含量 [J]. 中南药学，2019，17（12）：2139-2141.

[15] 阚微娜，杨宏伟 . 高效液相色谱法 - 荧光检测器测定复方氨基酸注射液中铝元素含量 [J]. 中国现代应用药学，2020，37（21）：2633-2636.

[16] 邹林有，胡娜，王煜伟，等 . HPLC-FLD 法测定青藏高原 4 种茶薰子叶片中游离脂肪酸 [J]. 分析试验室，2020，39（10）：1183-1187.

（收稿日期：2020-12-16；修回日期：2021-03-04）

高效液相色谱法测定拉莫三嗪片中的有关物质

姜金生[1, 3]，石笑弋[2]，刘轶[2*]，欧阳冬生[3, 4]，陈俊[1]，陈开义[1]，胡杰[1]（1. 三金集团湖南三金制药有限责任公司，湖南　常德　415001；2. 湖南省药品检验研究院（湖南药用辅料检验检测中心），长沙　410001；3. 中南大学湘雅医院临床药理研究所，长沙　410001；4. 复杂基质样本生物分析湖南省重点实验室，长沙　410000）

摘要：目的　建立高效液相色谱法测定拉莫三嗪片中的有关物质。**方法**　色谱柱为 Kromasil C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相 A 为甲醇，流动相 B 为 0.5% 三乙胺溶液（用磷酸调节 pH 值至 4.5），梯度洗脱；检测波长为 230 nm；流速为 0.8 mL·min^{-1}；柱温为 40 ℃；进样体积为 20 μL。**结果**　已知杂质与主成分及其他未知杂质均能有效分离，各杂质的线性相关系数均大于 0.999，平均回收率在 90% ～ 108%。以拉莫三嗪为参比，杂质 B、杂质 C 的校正因子分别为 2.7、1.4。**结论**　该方法专属性强、灵敏度高、准确度和重复性好，方法简单、经济，可用于拉莫三嗪片有关物质的检查。

关键词：拉莫三嗪片；有关物质；校正因子；高效液相色谱法
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)08-1637-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.025

Determination of related substances in lamotrigine tablets by HPLC

JIANG Jin-sheng[1, 3], SHI Xiao-yi[2], LIU Yi[2*], OU-YANG Dong-sheng[3, 4], CHEN Jun[1], CHEN Kai-yi[1], HU Jie[1] (1. *Sanjin Group*, *Hunan Sanjin Pharmaceutical Co.*, *Ltd.*, *Changde Hunan* 415001; 2. *Hunan Institute for Drug Control* (*Hunan Pharmaceutical Excipients Testing and Inspection Center*), *Changsha* 410001; 3. *Department of Clinical Pharmacology*, *Xiangya Hospital*, *Central South University*, *Changsha* 410001; 4. *Hunan Key Laboratory for Bioanalysis of Complex Matrix Samples*, *Changsha* 410000)

Abstract: Objective　To determine the related substances in lamotrigine tablets by HPLC. **Methods** Kromasil C_{18} column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used. Mobile phase A was methanol and mobile phase B was 0.5% triethylamine solution (diluting phosphoric acid to pH 4.5) with gradient elution. The detection wavelength was 230 nm, the flow rate was 0.8 mL·min^{-1}, and the column temperature was 40 ℃. **Results**　The impurities and main components were well separated with good linearity (r > 0.999). The recoveries were at 90% ～ 108%. The correction factors of impurity B and impurity C were 2.7 and 1.4. **Conclusion**　The method is specific, accurate, sensitive, reliable, simple and economical, which is suitable for the determination of related substances in lamotrigine tablets.
Key words: lamotrigine tablet; related substance; correction factor; HPLC

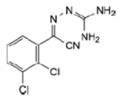
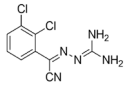
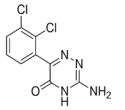
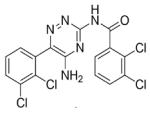
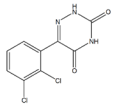
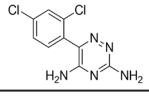
拉莫三嗪（lamotrigine）是新一代的抗癫痫药，在临床上可单独使用也可联合使用治疗癫痫，疗效显著，基本上没有致畸性。临床上拉莫三嗪还可用于双相情感障碍的治疗，安全性较好[1]。在合成拉莫三嗪原料药中可能引入工艺杂质，比如 2，3-二氯苯甲酰氯、2，3-二氯苯甲酰氰、2，3-二氯苯甲酸（拉莫三嗪杂质 I，文中称为杂质 B）等，在拉莫三嗪制剂储存过程中可能产生一些降解杂质，如 2，3-二氯苯甲酸（杂质 B）、3-氨基 -6-（2，3-二氯苯基）-1，2，4-三嗪 -5-（4H）-

基金项目：复杂基质样本生物分析湖南省重点实验室（No.2017TP1037）；湖南省复杂基质样本生物分析国际科技创新合作基地（No.2019CB1014）；湖南省重点领域研发计划（No.2019SK2241）；湖南省创新创业技术投资专项（No.2019GK5020）；长沙市科技计划项目（No.kh1902002）。
作者简介：姜金生，男，在读博士研究生，主要从事药物质量研究与安全性评价，E-mail：2664386041@qq.com　*通信作者：刘轶，女，主要从事药品质量标准研究，E-mail：1124655@qq.com

酮（杂质 C）、6-（2，3- 二氯苯基）-1，2，4- 三嗪 -3，5-（2H，4H）- 二酮（杂质 E）等（见表 1）。目前关于这些杂质检测方法的文献报道不多[2-3]，且各国药典与国内标准对杂质的命名各不相同。

表 1 拉莫三嗪片有关物质

Tab 1 Related impurity in lamotrigine tablets

简称	EP9.0/USP41	化学命名	结构式
杂质 A_1（缩合物）	EP 杂质 C；USP 未收载	（2*Z*）-2- 氰基 -（2，3- 二氯苯基）-2 胍亚胺基乙腈	
杂质 A_2（缩合物的顺反异构体）	EP 杂质 B；USP 未收载	（2*E*）-2- 氰基 -（2，3- 二氯苯基）-2 胍亚胺基乙腈	
杂质 B_1（工艺杂质 1）	/	2，3- 二氯苯甲酰氯	
杂质 B	EP 杂质 E；USP 杂质 B	2，3- 二氯苯甲酸	
杂质 C	EP 杂质 A；USP 杂质 C	3- 氨基 -6-（2，3- 二氯苯基）-1，2，4- 三嗪 -5-（4H）- 酮	
杂质 D	EP 杂质 F；USP 杂质 D	*N*-[5- 氨基 -6-（2，3- 二氯苯基）-1，2，4- 三嗪 -3- 基]-2，3- 二氯苯甲酰胺	
杂质 E	EP 杂质 D；USP 未收载	6-（2，3- 二氯苯基）-1，2，4- 三嗪 -3，5-（2H，4H）- 二酮	
杂质 F（工艺杂质 2）	/	2，3- 二氯苯甲酰氰	
杂质 G（拉莫三嗪异构体）	EP 杂质 G；USP 未收载	6-（2，4- 二氯苯基）-1，2，4- 三嗪 -3，5- 二胺	

英国药典（BE2018）[4] 与欧洲药典（EP9.0）[5] 中拉莫三嗪原料药与片剂的检测方法相同，均采用两个不同的液相色谱方法分别测定拉莫三嗪的有关物质，美国药典（USP41）[6] 对拉莫三嗪原料药与片剂的有关物质采用不同的液相色谱方法分别偏重于工艺杂质与降解杂质的检测。黄诺哲等 [7] 在 EP9.0 的基础上，把 150 mm 长度的色谱柱改为 250 mm 色谱柱同步改变洗脱持续时间并采用双波长的高效液相色谱方法，该方法虽能同时检测杂质 B、杂质 C、杂质 D，但对 BP 药典中杂质 G 与某氧化降解杂质的分离度不理想，工艺杂质 2，3- 二氯苯甲酰氰、2，3- 二氯苯甲酰氯和可能的降解杂质 E 未见检测报道。Emami 等 [8] 以高效液相色谱等度洗脱的方法能同时检测杂质 C 和杂质 D，但对杂质 B、杂质 E 以及工艺杂质等未能有效检出。文献采用以甲醇 -0.5% 三乙胺溶液（用磷酸调节 pH 值至 4.0）为流动相的高效液相色谱等度洗脱法对拉莫三嗪片进行有关物质检测 [2-3]，与企业标准 [9-10] 一样，由于流动相 pH 值相同，杂质 B 与拉莫三嗪主峰分离不好，杂质 D 与杂质 E 出峰时间在 100 min 左右，不能有效对拉莫三嗪有关物质进行同时检测。

本文在企业标准 YBH0245 2014[9]、WS1-（X-119）-2012Z[10]、YBH04392010[11] 的基础上结合国内外拉莫三嗪相关质量标准以及文献报道 [2-7]，参照《中国药典》2020 年版四部 [12]、《化学药物质量控制分析方法验证技术指导原则》[13] 和《化学药物杂质研究技术指导原则》[14]，进一步开发出能同时检测可能的工艺杂质和降解杂质的高效液相色谱方法，并对主要控制杂质进行相对保留时间和校正因子研究，为拉莫三嗪原料药与制剂的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

MS205DU 十万分之一电子天平（Mettler Toledo 公司）；LC-20A 岛津高效液相色谱仪（日

本岛津公司）；PHSJ-4F pH 计（上海仪电科学仪器股份有限公司）。

1.2　试药

拉莫三嗪片（批号：181208、181209、181210，自制）；拉莫三嗪对照品（批号：100775-201902，中国食品药品检定研究院，纯度：99.7%）；杂质 B（拉莫三嗪杂质 I）对照品（批号：510086-201401，中国食品药品检定研究院，供有关物质检测用）；拉莫三嗪杂质 C 对照品（批号：F3L329，USP，供有关物质检测用）；2，3-二氯苯甲酰氯（批号：170037，自制）；2，3-二氯苯甲酰氰（杂质 F，批号：1703007，自制）；缩合物（杂质 A_1，批号：10901-1806005y，自制）；拉莫三嗪杂质 D 对照品（批号：F1H279，USP，供有关物质检测用）；拉莫三嗪杂质 E 对照品（批号：L2011011，U.K，供有关物质检测用）；甲醇（色谱纯，TEDIA）、磷酸（色谱纯）、三乙胺（色谱纯）、盐酸（分析纯）、氢氧化钠（分析纯）、30% 过氧化氢（分析纯）（国药集团化学试剂有限公司）；纯化水（自制）。

2　方法

2.1　色谱条件

色谱柱为 Kromasil C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 A 为甲醇，流动相 B 为 0.5% 三乙胺溶液（用磷酸调节 pH 值至 4.5），梯度洗脱（见表 2）；流速为 0.8 mL·min^{-1}；检测波长为 230 nm；柱温为 40 ℃；进样量为 20 μL。

表 2　梯度洗脱程序

Tab 2　Gradient elution program

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	34	66
25	34	66
50	90	10
55	90	10
60	34	66
70	34	66

2.2　溶液配制

2.2.1　供试品溶液　取本品细粉适量（相当于拉莫三嗪约 20 mg），精密称定，置于 50 mL 量瓶中，加入稀释液（甲醇 -0.1 mol·L^{-1} 盐酸溶液＝20∶80，*V/V*）适量，制成每 1 mL 中约含拉莫三嗪 0.4 mg 的溶液，摇匀，作为供试品溶液。

2.2.2　对照溶液　精密量取供试品溶液适量，加稀释液定量稀释制成每 1 mL 中约含拉莫三嗪 0.8 μg 的溶液，作为对照溶液。

2.2.3　空白溶剂　以稀释液作为空白溶剂。

2.2.4　对照品储备溶液　分别称取拉莫三嗪、杂质 B、杂质 C、杂质 D、杂质 E、杂质 A_1、杂质 F 自制对照品适量，精密称定，加甲醇适量溶解，再以稀释液稀释成适当浓度的溶液，作为对照品储备溶液。

2.2.5　系统适用性溶液　取拉莫三嗪约 10 mg，加适量 6 mol·L^{-1} 氢氧化钠溶液，置 90 ℃加热约 1 h，用 6 mol·L^{-1} 盐酸溶液中和，再加入 10 mL 杂质 B 对照品溶液（精密称取杂质 B 对照品适量，加甲醇溶解并稀释成 0.1 mg·mL^{-1}）和杂质 E 对照品溶液约 2 mL（精密称取杂质 E 对照品适量，加甲醇溶解并稀释成 0.1 mg·mL^{-1}），用稀释液稀释至每 1 mL 中约含拉莫三嗪 0.4 mg、杂质 B 0.04 mg、杂质 E 0.008 mg 的混合溶液，作为系统适用性溶液。

2.3　专属性试验

2.3.1　系统适用性试验　取系统适应性溶液及空白溶剂，空白辅料溶液按“2.2.1”项下方法制备，进样测定，记录色谱图，杂质 B、拉莫三嗪、杂质 C、杂质 E 依次出峰，分离度符合要求，拉莫三嗪理论塔板数不低于 5000，杂质 B 峰相对保留时间约为 0.8，与拉莫三嗪峰分离度达到 1.5，相对保留时间 1.0 ～ 2.0 的杂质 C（主要降解杂质）的相对保留时间约为 1.7，系统适应性良好（见图 1）。

取杂质 A_1、杂质 D、杂质 F 对照品储备液用稀释液稀释至适当浓度后按“2.1”项下条件测定，结果各杂质出峰时间分别约为 46.61、48.96、50.36 min，分离度均大于 6.5，能较好地检测分离。

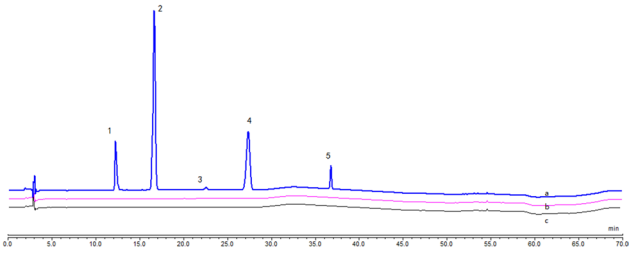


图 1　系统适应性色谱图

Fig 1　Chromatogram of system suitability test

a. 系统适用性溶液（system suitability solution）；b. 空白辅料溶液（excipient solution）；c. 空白溶剂（blank solution）；1. 杂质 B（impurity B）；2. 拉莫三嗪（lamotrigine）；3. 未知杂质（unknown impurity）；4. 杂质 C（impurity C）；5. 杂质 E（impurity E）

2.3.2　破坏性试验

① 未破坏：取拉莫三嗪片（规格：50 mg，批号：181208）按“2.2.1”项下方法配制未破坏溶液。

② 酸、碱破坏：分别取本品粉末适量（约相当于拉莫三嗪 20 mg），精密称定，分别加入 1

mL 6 mol • L^{-1} 盐酸溶液或 6 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液，90 ℃水浴加热分别约 3 h（酸破坏）和 1 h（碱破坏），放冷至室温，取 6 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液或 6 mol • L^{-1} 盐酸溶液中和，加稀释液溶解并稀释成每 1 mL 约含拉莫三嗪 0.4 mg 的溶液，滤过，取续滤液作酸、碱降解样品溶液；称取处方量空白辅料，同法配制，作为空白辅料降解溶液。

③ 氧化破坏：取本品粉末适量（约相当于拉莫三嗪 20 mg），精密称定，加入 30% 过氧化氢溶液 1 mL，90 ℃水浴加热约 1 h，放置室温，加稀释液溶解并稀释成每 1 mL 约含拉莫三嗪 0.4 mg 的溶液，滤过，取续滤液作氧化降解样品溶液；称取处方量空白辅料，同法配制，作为空白辅料降解溶液。

④ 光照、高温破坏：分别取本品粉末适量，分别置 105 ℃烘烤 8 h、（4500±500）Lx 强度下光照 3 d，精密称取细粉适量（约相当于拉莫三嗪 20 mg），加适量稀释液溶解并稀释成每 1 mL 中约含拉莫三嗪 0.4 mg 的溶液，滤过，取续滤液即得光照、高温降解样品溶液；称取处方量空白辅料，同法配制，作为空白辅料降解溶液。

取上述各溶液，按“2.1”项下色谱条件进样，记录色谱图。结果空白辅料不干扰主成分峰、特定杂质峰的检测。拉莫三嗪峰与杂质 B 和杂质 C 分离较好。在高温、光照条件下，拉莫三嗪片较稳定，在酸、碱、氧化条件下所产生杂质均能与主峰良好分离，不干扰本品有关物质的测定（见图 2）。

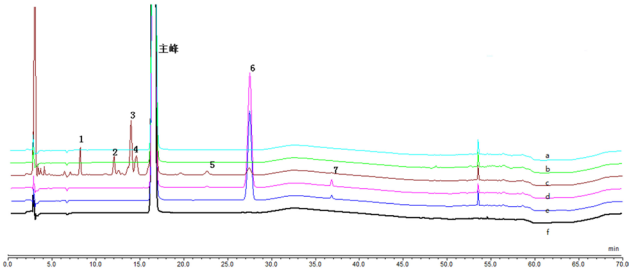


图 2 样品破坏性试验色谱图

Fig 2 Chromatogram of sample destruction test

a. 光破坏（destroyed by light）；b. 高温破坏（destroyed by heat）；c 氧化破坏（destroyed by oxidation）；d. 碱破坏（destroyed by alkali）；e. 酸破坏（destroyed by acid）；f. 未破坏样品（sample undestroyed）；1. 未知杂质（unknown impurity）；2. 杂质 B（impurity B）；3. 未知杂质（unknown impurity）；4. 未知杂质（unknown impurity）；5. 未知杂质（unknown impurity）；6. 杂质 C（impurity C）；7. 杂质 E（impurity E）

2.4 相对保留时间

分别精密移取对照品储备液适量，加稀释液稀释成每 1 mL 约含杂质 B、杂质 C 和拉莫三嗪均为 0.5 μg 的混合液。对杂质 B、杂质 C 相对拉莫三嗪的保留时间在不同色谱柱 [Welch、thermo、Agela、Kromasil C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）] 进行研究，杂质 B 相对拉莫三嗪主峰保留时间（RRT）较稳定，均为 0.8；杂质 C 相对拉莫三嗪 RRT 在 1.5 ～ 1.7，其中 Agela 色谱柱和 Kromasil 色谱柱的 RRT 均为 1.7。考虑到不同色谱柱对杂质 C 的相对保留时间有一定的影响，对同一品牌（Kromasil）不同批次填料（色谱柱 1 和色谱柱 2）及不同序列号的色谱柱（色谱柱 2 和色谱柱 3）进行试验，结果杂质 B 和杂质 C 的相对保留时间都较稳定，相对拉莫三嗪主峰 RRT 约为 0.8、1.7，同时以系统适应性溶液按“2.3.1”项下条件进行杂质定位与验证。

2.5 线性关系与校正因子

根据“2.4”项下不同色谱柱考察结果，以 Kromasil 色谱柱考察杂质 B、杂质 C 的校正因子。分别精密移取对照品储备液适量，稀释成一系列浓度的混合对照品溶液，取 3 根不同色谱柱按“2.1”项下色谱条件进样，结果杂质 B、杂质 C 与拉莫三嗪质量浓度在 0.5 ～ 5 μg • mL^{-1} 与峰面积呈较好的线性关系，计算拉莫三嗪相对于杂质 B、杂质 C 的校正因子 F（$F = K_{杂质线性斜率}/K_{拉莫三嗪线性斜率}$），结果杂质 B 的平均校正因子为 2.7，杂质 C 的平均校正因子为 1.4，结果见表 3。

2.6 定量限和检测限

取“2.2.4”项下对照品储备溶液，精密移取对照品储备液适量，再用稀释液稀释成适当浓度的对照品溶液，照“2.1”项下方法进样。以信噪比（S/N）= 3 为检测限，以 S/N = 10 为定量限，结果拉莫三嗪、杂质 B、杂质 C 的定量限分别为 3.9、9.1、10.6 ng；检测限分别为 1.3、2.7、3.3 ng。

2.7 稳定性试验

取“2.2”项下供试品溶液和对照溶液于室温下放置，另取杂质 B、杂质 C 对照品适量，精密称定，加适量甲醇溶解并用稀释液稀释成每 1 mL 约含 0.8 μg 杂质 B 和 2 μg 杂质 C 的混合溶液，于室温下放置。供试品溶液于 0、2、4.5、7、9.5、14、17.5、26 h 按“2.1”项下色谱条件分别进样；对照溶液于 0、2、4.5、7、9.5、17.5、23.5、26 h 分别进样测定，杂质 B 和杂质 C 的混合溶液于 0、2、4.5、6、8、10.5、13、19.5 h 分别进样测定。结果供试品溶液、对照溶液放置 26 h，拉莫三嗪峰面积 *RSD* 分别为 0.050%、1.7%，稳定性均较好。杂质 B、杂质 C 溶液放置 19.5 h，峰面积 *RSD* 分别

表 3　杂质 B、杂质 C 和拉莫三嗪线性关系考察结果

Tab 3　Linearity of impurity B，impurity C and lamotrigine

Kromasil C_{18}	成分	线性范围 /（μg・mL^{-1}）	线性方程	*r*	*F*
色谱柱 1	拉莫三嗪	0.51 ～ 5.08	$y = 1.5238x + 0.0072$	0.9997	/
	杂质 B	0.62 ～ 6.24	$y = 0.5737x + 0.0240$	0.9996	2.7
	杂质 C	0.48 ～ 4.82	$y = 1.0895x + 0.0414$	0.9996	1.4
色谱柱 2	拉莫三嗪	0.50 ～ 5.03	$y = 1.4619x + 0.0644$	0.9997	/
	杂质 B	0.49 ～ 4.87	$y = 1.5405x + 0.0708$	0.9978	2.7
	杂质 C	0.47 ～ 4.73	$y = 1.3993x + 0.0431$	0.9975	1.4
色谱柱 3	拉莫三嗪	0.50 ～ 5.03	$y = 1.4592x + 0.0172$	1.0000	/
	杂质 B	0.49 ～ 4.87	$y = 0.5640x - 0.0479$	0.9993	2.6
	杂质 C	0.47 ～ 4.73	$y = 1.0574x - 0.0626$	0.9993	1.4

为 0.90%、0.60%，稳定性均较好。

2.8　精密度与准确度

2.8.1　精密度试验　按“2.2”项下方法配制供试品溶液和对照溶液各 6 份，另取对照品储备溶液适量，分别加稀释液稀释成每 1 mL 含杂质 B 约 0.8 μg、杂质 C 约 2 μg 的对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，结果供试品溶液拉莫三嗪、对照溶液拉莫三嗪、对照品溶液中杂质 B 和杂质 C 的保留时间和峰面积 *RSD* 均小于 2.0%，表明仪器精密度良好。

2.8.2　中间精密度试验　由不同操作人员在不同时间和不同仪器分别按“2.8.1”项下方法测定，结果各成分峰面积 *RSD* 均小于 2.0%，表明本法的中间精密度较好。

2.8.3　杂质回收试验与重复性　称取 9 份拉莫三嗪片细粉（约相当于拉莫三嗪 20 mg），置 50 mL 量瓶中，加适量稀释液溶解，再分别加每 1 mL 含杂质 B 约 0.8 μg，杂质 C 约 2 μg 的对照品溶液 1、2、3 mL（相当于杂质对照品溶液浓度的 50%、100%、150%），各 3 份，加入稀释液稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液作为供试品溶液。按“2.1”项下色谱条件进样检测，计算回收率并考察方法的重复性，结果各已知杂质回收率均满足 0.1% 杂质限度的回收率范围（90% ～ 108%），回收率及重复性 *RSD* 均在 5% 以内，说明该方法的准确度及重复性较好。

2.9　耐用性试验

2.9.1　相对保留时间耐用性　取每 1 mL 含杂质 B 约 0.8 μg、杂质 C 约 2 μg、杂质 E 0.4 μg 的对照品溶液，对流动相比例、柱温、流速、盐浓度、pH 值、色谱柱进行适当调整，考察方法的耐用性。结果表明主峰和各杂质峰均能达到良好的分离效果；杂质 C 的相对保留时间主要受流动相的比例、柱温、流动相 pH 值的影响，杂质 B 的相对保留时间受的影响均较少。从耐用性试验的数据看，杂质 B 和杂质 C 的相对保留时间均较稳定，结果见表 4。

表 4　耐用性试验结果汇总

Tab 4　Summary of durability test

色谱条件		拉莫三嗪		杂质 B			杂质 C		
		t_R/min	分离度	t_R/min	RRT	分离度	t_R/min	RRT	分离度
初始条件		15.537	8.02	12.205	0.79	—	26.325	1.69	17.49
流动相比例	36：64	13.750	7.24	11.008	0.80	—	22.683	1.65	16.85
	32：68	17.875	9.08	13.712	0.77	—	30.853	1.73	21.40
柱温 /℃	35	17.040	8.33	13.232	0.78	—	29.920	1.76	19.64
	45	14.238	7.93	11.268	0.79	—	23.275	1.63	16.28
流速 /（mL・min^{-1}）	1.0	12.623	7.93	9.895	0.78	—	21.448	1.70	17.39
	1.2	10.623	7.46	8.320	0.78	—	18.120	1.71	16.35
盐浓度 /%	0.45	15.857	8.43	12.212	0.77	—	26.920	1.70	17.33
	0.55	15.498	7.75	12.178	0.79	—	26.135	1.69	16.93
pH 值	4.4	16.263	6.99	13.203	0.81	—	28.552	1.76	18.67
	4.6	16.537	9.05	12.658	0.77	—	27.877	1.69	17.07
色谱柱	Kromasil	15.522	7.50	12.162	0.78	—	26.108	1.68	16.98
	Agela	16.150	7.58	12.363	0.77	—	27.043	1.67	17.48

2.9.2　校正因子重现性　在确定好杂质 B 和杂质 C 相对保留时间的基础上进行了校正因子的研究。对比了 3 个实验室的方法学验证与校正因子复核数据，发现在拟定的液相色谱条件下，流动相种类和初始比例、检测波长、盐浓度、经系统适应性溶液验证后的仪器状态和色谱柱对校正因子的赋值没有

明显影响，该方法的校正因子重现性主要受流动相 pH 值以及实验员称量对照品的细微偏差的影响，但各实验室计算所得的校正因子数值均未高于本方法拟定的值，数据显示杂质 B 和杂质 C 校正因子在流动相 pH 值 4.45 ～ 4.55 内相对稳定。

2.10 *有关物质的检查*

照“2.1”项下方法，对 3 批拉莫三嗪片长期稳定性（22 个月）考察样品进行有关物质的测定，按“2.2”项下方法配制供试品溶液、对照溶液、空白溶液进样测定，计算各杂质的含量、其他单个杂质的含量和杂质总量。结果 3 批样品的杂质检查均符合规定，见表 5。

表 5 拉莫三嗪片中有关物质的检测结果 (%，校正因子法)

Tab 5 Determination of related substances in lamotrigine tablets (%，calibration factor method)

批号	杂质 B	杂质 C	最大未知单杂	总杂
181208	未检出	0.01	0.03	0.04
181209	未检出	0.01	0.01	0.02
181210	未检出	0.01	0.05	0.06

3 讨论

3.1 *流动相 pH 值的考察*

前期研究中发现流动相为甲醇 -0.5% 三乙胺溶液（用磷酸调节 pH 值至 3.0 ～ 5.0）时，拉莫三嗪与杂质 B 分离度随流动相 pH 值增加而增大，流动相调节 pH 值至 4.2 ～ 5.0 时拉莫三嗪与杂质 B 的分离度在 5.61 ～ 13.08，本文选择 pH 4.5 作为本方法流动相 pH 值，能有效分离拉莫三嗪主峰与杂质 B，且该 pH 值条件下色谱柱的耐受性较好。

3.2 *检测波长的考察*

通过对氧化降解样品进行 DAD 全波长扫描，发现在 230 nm 波长处检测的杂质个数较多且基线平稳，结合各已知杂质的紫外扫描图，优选 230 nm 作为本品有关物质的检测波长。

3.3 *破坏试验方法的考察*

拉莫三嗪在常规的高温、光照条件下，未见明显的杂质产生，说明拉莫三嗪在常规环境中相对较稳定。拉莫三嗪在加酸或碱的同时置 90 ℃水浴中高温破坏，能生成杂质 C 和少量的杂质 E，氧化降解虽然能够同时产生杂质 C、杂质 B 和少量的杂质 E，但产生杂质 C、杂质 B 的量较少且氧化降解的产物复杂。本研究中以拉莫三嗪 10 mg 加 6 mol • L^{-1} NaOH 溶液 1 ～ 5 mL 置 90 ℃水浴 30 ～ 90 min 降解产生杂质 C，放冷后用 6 mol • L^{-1} HCl 溶液中和，并加杂质 B 对照品溶液的方法来制备系统适用性溶液，从而节省了从国外购买杂质 C 的时间和成本。该系统适用性溶液可用于杂质 B 和杂质 C 相对保留时间的验证，进而用于拉莫三嗪原料药和制剂的有关物质分析。黄诺哲等 [7] 取拉莫三嗪加 30% 过氧化氢溶液 3 mL 在 80 ℃水浴 15 min，色谱图显示可能氧化降解产生了少量的杂质 D，本研究取拉莫三嗪加 30% 过氧化氢溶液 1 mL 在 90 ℃水浴 1 h，在约 49 min 杂质 D 出峰处未见明显出峰或低于检测限，而在约 37 min 处检出了少量的杂质 E。本研究与文献报道不同 [7]，可能是由于氧化降解试验方法或者液相色谱检测方法不同引起的。

3.4 *杂质含量的限定*

拉莫三嗪片长期稳定性样品的检测数据显示杂质 C 有增长趋势，从 0 个月时的未检出到 22 个月时检出 0.01%，但未检出杂质 E，最大单杂 0.05%，总杂质 0.06%，均符合企业制订的质量标准和国外药典标准，即杂质 B（相对保留时间约 0.8）按校正后的峰面积计算（乘以校正因子 2.7），不得大于对照溶液主峰面积（0.2%）；杂质 C（相对保留时间约 1.7）按校正后的峰面积计算（乘以校正因子 1.4），不得大于对照溶液主峰面积的 2.5 倍 (0.5%)；其他单个杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积（0.2%）；各杂质峰面积的和按校正后的峰面积计算不得大于对照溶液主峰面积的 3.75 倍 (0.75%)。

3.5 *本研究的不足*

本试验中氧化降解还产生了 4 个未知杂质，文献报道 [7] 氧化降解未知杂质，可能是 3，5- 二氨基 -6-（2，3- 二氯苯基）-2- 氧基 -1，2，4- 三嗪或 3，5- 二氨基 -6-（2，3- 二氯苯基）-4- 氧基 -1，2，4- 三嗪。本方法分离检测到的 4 个未知氧化降解杂质有待进一步的 LC-MS/MS 结构确证。拉莫三嗪虽然在 60 ℃以内的条件下仍较稳定 [7]，但在加强酸或强碱或 30% 双氧水情况下并 90 ℃水浴破坏试验中，可产生少量的杂质 E，考虑到该杂质有降解途径，后续将对杂质 E 进行质量标准制订的研究。此外，基于企业生产检验实际考虑，本研究未对影响杂质 B 和杂质 C 相对保留时间和校正因子的流动相比例、柱温、流动相 pH 值进行更广泛、更深入的耐用性与验证研究。

3.6 *小结*

综上所述，本方法专属性强，能有效分离和检测样品中可能的工艺杂质和降解杂质，采用相对保留时间和校正因子来定量相关杂质，可应用于拉莫三嗪片和拉莫三嗪原料药中有关物质的质量控制。

参考文献

[1] 王应谈，卢喆，寻广磊 . 拉莫三嗪在精神科临床应用的研究进展 [J]. 精神医学杂志，2019，32（6）：475-480.
[2] 夏锦辉，王琳 . 拉莫三嗪片有关物质测定方法研究 [A]// 环渤海第一届暨天津市第十九届色谱学术报告会论文集 [C]. 天津：2010.
[3] 陈司汉，邓俊丰，江晓玲 . HPLC 法测定拉莫三嗪片的含量 [J]. 北方药学，2014，11（7）：2-3.
[4] 英国药典 2018. Vol Ⅱ[S]. 2018：76-78.
[5] 欧洲药典 9.0. Vol Ⅲ[S]. 2017：2873-2874.
[6] 美国药典 41-NF 36[S]. 2018：2333-2335.
[7] 黄诺哲，黄莹，严全鸿 . HPLC 法测定拉莫三嗪中的有关物质 [J]. 药物分析杂志，2020，40（3）：495-501.
[8] Emami J，Ghassami N，Ahmadi F. Development and validation of a new HPLC method for determination of lamotrigine and related compounds in tablet formulations [J]. Pharmaceut Biomed Anal，2006，40（4）：999-1005.
[9] YBH02452014. 国家食品药品监督管理局药品标准 [S]. 2014.
[10] WS1-（X-119）-2012Z. 国家食品药品监督管理局药品标准 [S]. 2012.
[11] YBH04392010. 国家食品药品监督管理局药品标准 [S]. 2010.
[12] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：480-483.
[13] HGPH5-1. 化学药物质量控制分析方法验证技术指导原则 [S]. 2005：1-12.
[14] HGPH3-1. 化学药物杂质研究技术指导原则 [S]. 2005：3-9.

（收稿日期：2021-04-22；修回日期：2021-06-22）

离子色谱法测定硫酸阿米卡星注射剂中抗氧剂和硫酸盐的含量

袁力，梅芊，刘英*（河南省食品药品检验所，郑州 450018）

摘要：目的 建立离子色谱法测定硫酸阿米卡星注射剂中抗氧剂和硫酸盐含量。**方法** 采用 Dionex IonPac AS11-HC（4 mm×250 mm，9 μm）色谱柱，以氢氧化钾溶液为淋洗液进行梯度洗脱，流速 1.2 mL·min^{-1}，抑制电流 179 mA，电导检测器，检测器温度 35 ℃，柱温 30 ℃，乙醛作稳定剂。**结果** 3 种抗氧剂和硫酸根的峰面积与质量浓度的线性关系良好（r > 0.9998），加样回收率为 98.0% ～ 101.5%。**结论** 本法操作简便，精密度和准确度高，重复性好，可用于硫酸阿米卡星注射剂中抗氧剂和硫酸盐含量的控制。

关键词：离子色谱法；抗氧剂；硫酸盐；硫酸阿米卡星注射剂
中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1643-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.026

Determination of antioxidants and sulfate in amikacin sulfate injections by ion chromatography

YUAN Li, MEI Qian, LIU Ying* (*Henan Institute of Food and Drug Control, Zhengzhou* 450018)

Abstract: Objective To establish an ion chromatography method to determine the content of antioxidants and sulfate in amikacin sulfate injections. **Methods** The Dionex IonPac AS11-HC (4 mm×250 mm, 9 μm) column was used and gradient elution was conducted with potassium hydroxide solution at 1.2 mL·min^{-1}. Conductivity detector was used with the suppressor current at 179 mA, the detector temperature was 35 ℃ and the column temperature was 30 ℃ . Acetaldehyde was added into the samples to stabilize sulfite. **Results** Three antioxidants and sulfate showed good linearity (r > 0.9998) within the test concentration. The recovery was at 98.0% ～ 101.5%. **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, which can be used to determine the content of antioxidants and sulfate in amikacin sulfate injections.

Key words: ion chromatography method; antioxidant; sulfate; amikacin sulfate injection

作者简介：袁力，男，主管药师，主要从事药品质量分析与微生物检验研究，E-mail：329245147@qq.com *通信作者：刘英，女，主任药师，主要从事抗菌药物质量分析与控制研究，E-mail：ying_leaf@263.net

阿米卡星（amikacin）又称丁胺卡那霉素，属于半合成氨基糖苷类抗菌药物。由 Hamao Umezawa 于 1957 年发现，1972 年由日本 Bristol-Banyu 公司合成制得[1]，1981 年开始在国内生产[2-3]。

硫酸阿米卡星和硫酸阿米卡星注射液均收载于《中国药典》2020 年版[4]、美国药典 USP43[5]、英国药典 BP2020[6-7]、欧洲药典 EP10.0[8] 与日本药典 JP17[9]，注射用硫酸阿米卡星收载于《中国药典》2020 年版[4] 与日本药典 JP17[9]。现行版各国药典均未对硫酸阿米卡星注射剂中抗氧剂和硫酸盐的含量进行检查与控制，仅美国药典会编组起草的亚硫酸氢钠质量标准草案中采用离子色谱法对硫酸根离子、其他单杂及总杂进行了考察[10]。阿米卡星分子中含有多个氨基与羟基，易被氧化，在制剂生产过程中除需充氮灌装外，还需加入抗氧剂进行保护。《中国药典》2020 年版规定[11] 配制注射剂时，可根据需要加入适宜的附加剂，常用的抗氧剂有亚硫酸钠、亚硫酸氢钠和焦亚硫酸钠等。由于该类抗氧剂可诱发接触性皮炎、抑制尿激酶纤溶蛋白活性及转氨酶升高等不良反应[12]，因此有必要对硫酸阿米卡星注射剂中抗氧剂的加入量进行考察。另外，通过对比发现，国内外质量标准对硫酸阿米卡星分子式中硫酸个数 *n* 的规定不同：《中国药典》2020 年版为 1.8[4]，USP43[5]、BP2020[6]、EP10.0[8] 和 JP17[9] 为 2，故有必要对国内硫酸阿米卡星注射剂中硫酸根离子含量进行检测，进而计算出硫酸摩尔数，并与原研制剂相比较，探讨硫酸盐个数的合理性。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Dionex ICS-5000$^+$离子色谱仪（美国赛默飞世尔科技有限公司），XPE205 电子天平 [梅特勒 - 托利多仪器（上海）有限公司]，Milli-Q 去离子水发生装置（美国 Millipore 公司）。

1.2 试药

焦亚硫酸钠（批号：SLCB1169，纯度≥ 99%）、无水亚硫酸钠（批号：MKCL1969，纯度≥ 98.0%）、亚硫酸氢钠（批号：MKCF8714，以 SO_2 计，纯度≥ 58.5%）、无水硫酸钠（批号：SLCF5860，纯度≥ 99.0%）（Sigma-Aldrich）；40% 乙醛（天津市大茂化学试剂厂，批号：20191116），经标定的硫酸滴定液（0.051 21 mol • L^{-1}）。

1.3 样品

2020 年国家药品评价性抽验代表性样品：77 批次硫酸阿米卡星注射液，涉及 28 个生产企业，规格均为 2 mL/0.2 g（20 万单位）；10 批次注射用硫酸阿米卡星，涉及 4 个生产企业，规格均为 0.2 g/ 支（20 万单位）。

调研收集硫酸阿米卡星原料 8 批次，涉及 3 个生产企业。

原研制剂：硫酸阿米卡星注射液（日医工株式会社，规格为 2 mL/200 mg，批号：220800），注射用硫酸阿米卡星（日医工株式会社，规格：200 mg/ 支，批号：221000）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Dionex IonPac AS11-HC（4 mm×250 mm，9 μm）和预柱 Dionex IonPac AG11-HC（4 mm×50 mm，13 μm），抑制器：Dionex ADRS 600（4 mm），抑制电流：179 mA，电导检测器，流速：1.2 mL • min^{-1}，进样量：25 μL，柱温：30 ℃，检测器温度：35 ℃，抑制器温度：25 ℃，淋洗液：氢氧化钾溶液，采用表 1 的程序进行梯度洗脱。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution

时间 /min	氢氧化钾浓度 /（mmol • L^{-1}）
0	15
13.0	15
13.1	60
18.0	60
18.1	15
25.0	15

2.2 溶液的配制

2.2.1 稀释剂（空白溶剂） 量取 40% 乙醛溶液 2 mL，置 1000 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，即得。

2.2.2 空白辅料溶液 综合各企业提供的制剂处方比例，除不加入焦亚硫酸钠、亚硫酸氢钠与无水亚硫酸钠外，分别称取辅料适量，用稀释剂溶解制得。

2.2.3 系统适用性溶液 称取亚硫酸氢钠和无水硫酸钠适量，置 100 mL 量瓶中，用稀释剂溶解并定容至刻度，摇匀，即得。

2.2.4 供试品溶液 精密称取硫酸阿米卡星原料、注射用硫酸阿米卡星，量取硫酸阿米卡星注射液适量，分别用稀释剂稀释制成约含阿米卡星 0.5 mg • mL^{-1} 的溶液。

2.2.5 对照品储备液 精密称取焦亚硫酸钠、亚硫酸氢钠与无水亚硫酸钠各适量，分别用稀释剂溶解并制成约 0.18 mg • mL^{-1} 的溶液，作为各抗氧剂的对照品储备液；4.9203 mg • mL^{-1} 的硫酸滴

定液（以 SO_4^{2-} 计）作为硫酸盐的对照品储备液。

2.3　专属性

取“2.2”项下各溶液按“2.1”项下条件测定，结果空白辅料和稀释剂均不干扰抗氧剂及硫酸根的测定，亚硫酸根与硫酸根分离度为 2.2，分离良好，典型离子色谱图见图 1。

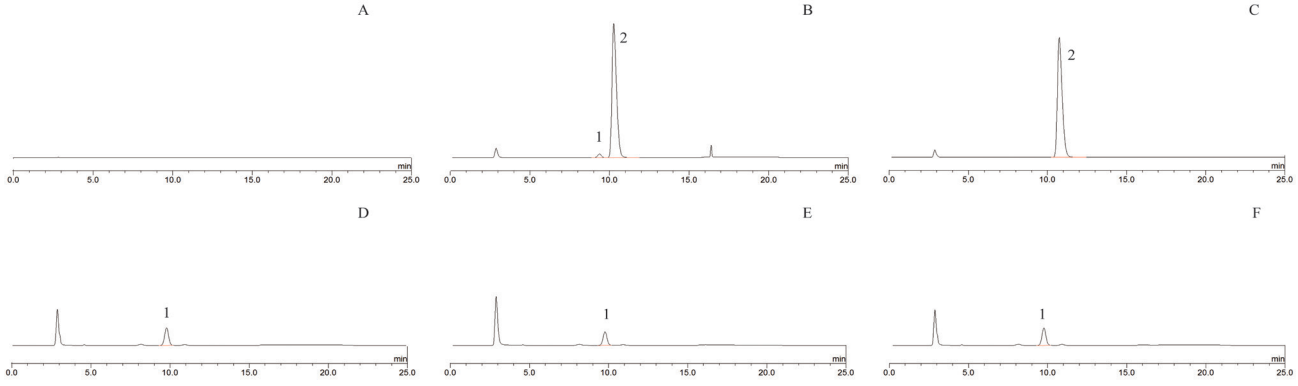


图 1　阿米卡星典型离子色谱图

Fig 1　Typical ion chromatogram of amikacin

A. 空白溶剂（blank solvent）；B. 供试品溶液（sample solution）；C. 硫酸盐对照品溶液（reference solution of sulfate）；D. 焦亚硫酸钠对照品溶液（reference solution of sodium metabisulfite）；E. 亚硫酸钠对照品溶液（reference solution of sodium sulfite）；F. 亚硫酸氢钠对照品溶液（reference solution of sodium bisulfite）；1. 亚硫酸根（sulfite）；2. 硫酸根（sulfate）

2.4　线性关系与检测限、定量限

精密量取“2.2.5”项下各对照品储备液适量，分别加稀释剂制成系列对照品溶液进样，以峰面积对分析物质量浓度用最小二乘法进行线性回归。结果表明，各分析物在其线性范围内与峰面积线性关系均良好。取上述各系列对照品溶液用稀释剂分别逐级稀释，进样 25 μL，以信噪比（*S/N*）为 10∶1 时的浓度作为定量限，*S/N* 为 3∶1 时的浓度作为检测限。结果见表 2。

表 2　阿米卡星线性关系、检测限和定量限

Tab 2　Regression equation and the limit of detection and quantitation of amikacin

化合物	线性范围 /（μg • mL^{-1}）	回归方程	相关系数	检测限 /ng	定量限 /ng
焦亚硫酸钠	0.4477 ～ 15.0436	$y = 0.0938x - 0.0058$	0.9999	1.12	3.35
亚硫酸钠	2.5965 ～ 20.0553	$y = 0.0707x - 0.0141$	1.000	0.25	2.96
亚硫酸氢钠	1.9798 ～ 53.9700	$y = 0.0920x - 0.0116$	0.9998	0.99	2.96
硫酸根	0.0492 ～ 0.2460	$y = 200.7x + 0.5415$	0.9999	—	0.012

注（Note）：“—”表示未计算（“—” means no calculated）。

2.5　精密度试验

2.5.1　进样精密度　取质量浓度约 9 μg • mL^{-1} 的 3 种抗氧剂和质量浓度约 0.16 mg • mL^{-1} 的硫酸根对照品溶液，分别连续进样 6 次，记录峰面积，结果焦亚硫酸钠、亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、硫酸根峰面积的 *RSD* 分别为 0.97%、0.70%、1.2%、0.15%，表明方法的精密度良好。

2.5.2　重复性　取同一批号硫酸阿米卡星注射液 6 支，精密量取适量，用稀释剂稀释，制成约含阿米卡星 0.5 mg • mL^{-1} 的溶液；取同一批号注射用硫酸阿米卡星 6 瓶，各精密称取适量，用稀释剂稀释成约含阿米卡星 0.5 mg • mL^{-1} 的溶液。分别进样，测定峰面积，计算含量，结果见表 3，表明方法重复性良好。

2.6　回收试验

2.6.1　抗氧剂回收率　综合各企业处方比例，除 3 种抗氧剂外，称取硫酸阿米卡星原料和其他辅料，置 500 mL 量瓶中，加稀释剂溶解并稀释至刻度，作为回收率底液。分别精密称取焦亚硫酸、无水亚硫酸钠、亚硫酸氢钠，用上述回收率底液溶解并稀释制成高、中、低 3 个水平的样品，平行 3 份，测定并计算其回收率，结果焦亚硫酸钠的高、中、低浓度的平均回收率为 98.0%、99.5% 和 99.7%，*RSD* 为 0.47%、1.3% 和 1.3%（$n = 3$）；亚硫酸钠的高、中、低浓度的平均回收率为 101.5%、98.9% 和 100.3%，*RSD* 为 0.46%、0.40% 和 0.38%（$n = 3$）；亚硫酸氢钠的高、中、低浓度的平均回收率为 99.3%、98.9% 和 99.1%，*RSD* 为 1.4%、0.55% 和 1.4%（$n = 3$），表明方法回收率均良好。

表 3 重复性试验结果 (n = 6)

Tab 3 Repeatability test (n = 6)

序号	企业 1 注射液		企业 2 注射液		企业 3 注射液		企业 4 注射液	
	焦亚硫酸钠 / (μg·mL^{-1})	硫酸盐 / (mg·mL^{-1})	亚硫酸钠 / (μg·mL^{-1})	硫酸盐 / (mg·mL^{-1})	亚硫酸氢钠 / (μg·mL^{-1})	硫酸盐 / (mg·mL^{-1})	抗氧剂	硫酸盐 / (g·g^{-1})
1	8.0666	0.1644	7.8349	0.1692	8.1149	0.1608	—	0.2173
2	8.1099	0.1669	7.8391	0.1693	8.1532	0.1614	—	0.2206
3	8.1300	0.1660	7.8404	0.1693	8.0787	0.1607	—	0.2147
4	8.0655	0.1648	7.9972	0.1706	8.0372	0.1610	—	0.2161
5	8.1036	0.1647	7.8707	0.1694	8.0394	0.1608	—	0.2171
6	8.1057	0.1663	7.9037	0.1693	8.0574	0.1608	—	0.2168
平均值	8.0969	0.1655	7.8810	0.1695	8.0801	0.1609	—	0.2171
RSD/%	0.32	0.62	0.80	0.31	0.57	0.15	—	0.91

注（Note）：“—”表示未检出（“—”means undetected）。

2.6.2 硫酸根回收率 综合各企业处方比例，称取硫酸阿米卡星原料和辅料，置 25 mL 量瓶中，加稀释剂溶解并稀释至刻度，作为回收率母液。精密量取硫酸滴定液适量，用上述回收率母液稀释制成高、中、低 3 个水平的样品，平行 3 份，将测得峰面积代入其线性回归方程中，结果高、中、低浓度的平均回收率分别为 99.3%、100.7% 和 99.6%，*RSD* 分别为 0.66%、0.17% 和 0.15%（n = 3），表明方法回收率良好。

2.7 溶液稳定性

取“3.3.2”项下溶液，在室温下放置 0、2、4、6、8、10、12 h，测定峰面积，结果焦亚硫酸钠、亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、硫酸根的峰面积 *RSD* 分别为 0.90%、1.2%、1.6% 和 0.40%，表明本方法测定的供试品溶液在室温下放置 12 h 稳定。

2.8 样品测定

取“2.2.4”项下供试品溶液进样测定，计算含量。结果样品中焦亚硫酸钠、亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、硫酸盐含量分别为 0.67 ～ 8.54 μg·mL^{-1}，2.51 ～ 18.06 μg·mL^{-1}，2.10 ～ 26.76 μg·mL^{-1} 和 0.15 ～ 0.19 mg·mL^{-1}。

3 讨论

3.1 方法学研究

本研究收集的国产硫酸阿米卡星注射液涉及 28 个生产企业，共含有 3 种抗氧剂，且不同企业的处方中仅包含其中一种抗氧剂，故方法学研究根据添加抗氧剂的不同，各选择一个企业的样品作为代表性的供试品溶液；国产注射用硫酸阿米卡星涉及 4 个生产企业，硫酸阿米卡星原料涉及 3 个生产企业，其中“3.3.2”项下表中列举企业 4 的注射用硫酸阿米卡星属于原料直接分装，且该原料来源于上述 3 个原料企业之一，故企业 4 的产品既作为原料的代表，又作为制剂的代表，未另外选择原料进行方法学研究。目前，离子色谱法已广泛应用于医药食品行业中，对离子型化合物的测定快速、准确、灵敏[13-14]。本文建立了离子色谱法测定硫酸阿米卡星注射剂中抗氧剂和硫酸盐的含量，与比色法和碘量法相比，操作简便，准确度、灵敏度高，为药品质量标准的完善提供了基础，并能够对企业在生产过程中违规添加抗氧剂进行有效监督。

3.2 稀释剂的选择

亚硫酸氢根、亚硫酸根在水溶液中不稳定，极易氧化为硫酸根[15]。试验发现，亚硫酸根水溶液的峰面积在 2 h 内约降低 8%，说明需要添加有效且不干扰测定的稳定剂进行保护。文献中多使用甲醛的稀水溶液[16-18]，经试验对比，最终选择安全有效的 0.08% 乙醛（*V/V*）作为稳定剂。

3.3 硫酸根的检测限

因本实验室的去离子水中含有微量硫酸根离子，无法去除，导致稀释剂中检出硫酸根，浓度约为检测限水平，故“3.2”项下硫酸根的检测限未进行计算。由于样品中硫酸根含量较高，稀释剂中所含的微量硫酸根离子不影响样品的测定。

3.4 系统适用性溶液的选择

综合各企业处方，硫酸阿米卡星注射剂共含有 3 种抗氧剂（焦亚硫酸钠、亚硫酸氢钠与无水亚硫酸钠），三者在水溶液中均以亚硫酸根的形式存在，且不同企业的处方中仅包含其中一种抗氧剂。故系统适用性溶液仅选择一种在水溶液中可形成亚硫酸根的化合物与硫酸钠进行制备，以考察 SO_3^{2-} 峰与 SO_4^{2-} 峰的分离度。

3.5 抗氧剂含量结果分析

抗氧剂对制剂稳定性的保护作用表明其使用的必要性，但出于安全性考虑，《中国药典》2020 年版通则规定注射剂中抗氧剂浓度的上限为 0.2%

（*W/V*）[11]，WHO 亦将焦亚硫酸钠和其他亚硫酸盐的每日可接受摄入量定为 7.0 mg·kg^{-1}（以 SO_2 计）[19]。采用建立的方法测得本次收集的硫酸阿米卡星注射剂样品中抗氧剂的含量均低于其处方量，亦低于 WHO 的规定，表明产品使用抗氧剂无违规添加现象，但对于该产品中添加抗氧剂合理处方量的评估有待进一步研究，最终达到既能保证制剂的稳定性，又可将抗氧剂的用量降至最低 [18]，以最大限度地减少其对人体健康所产生的损害。

3.6　硫酸盐个数的合理性

硫酸的个数会影响产品的 pH 值，从而可能影响产品的质量。国内外质量标准对硫酸阿米卡星分子式中硫酸个数 *n* 的规定不同，采用建立的方法测定硫酸阿米卡星原料和注射用硫酸阿米卡星中的硫酸盐，结果国内原料和制剂中硫酸的个数 *n* 为 1.8 ～ 2.1，日本原研制剂中硫酸的个数 *n* 为 1.7。在 pH 值的标准设置方面，《中国药典》2020 年版规定应为 3.5 ～ 5.5，属于偏酸性，而日本药典 JP17 规定应为 6.0 ～ 7.5，略偏中性，故 pH 值规定的范围不同导致了中国和日本的硫酸阿米卡星制剂中硫酸的个数差异。一般来说，药品溶液接近中性，临床使用时顺应性更好，刺激性小。另外在试验中发现，硫酸阿米卡星在偏酸性条件下会引起降解杂质的增加。因此，对于硫酸阿米卡星中的硫酸个数的规定合理性、硫酸个数与 pH 值相关性以及对产品质量的关联影响均有待进一步深入研究。

参考文献

[1] Kawaguchi H，Naito T，Nakagawa S，et al. BB-K8，a new semisynthetic aminoglycoside antibiotic [J]. J Antibiot（Tokyo），1972，25（12）：695-708.

[2] 胡昌勤，刘炜 . 抗生素微生物检定法及其标准操作 [M]. 北京：气象出版社，2004.

[3] アミカシン硫酸塩 . 日本独立行政法人医药品医疗器械综合机构 [EB/OL]. https：//www. pmda. go. jp/PmdaSearch/iyakuSearch/[2020-12-01].

[4] 中国药典 2020 年版 . 二部 [S]. 2020：1591-1595.

[5] The United States Pharmacopoeia 43th Edition [S]. Rockville MD：The United States Pharmacopoeia Convention，2018（Ⅱ）：220-222.

[6] The British Pharmacopoeia 2020 [S]. British Pharmacopoeia Commission：2019（Ⅰ）：140-143.

[7] The British Pharmacopoeia 2020 [S]. British Pharmacopoeia Commission：2019（Ⅲ）：132-133.

[8] The European Pharmacopoeia 10.0 [S]. Strasbourg：European Directorate for the Quality of Medicines& HealthCare，2019：1815-1816.

[9] The Japanese Pharmacopoeia XVII [S]. Ministry of Health，Labour and Welfare，2017：1255-1257.

[10] 彭琳，刘雁鸣，龙海燕，等 . 离子色谱法测定药用辅料亚硫酸氢钠中的杂质 [J]. 中国药师，2014，11（17）：1862-1864.

[11] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：3.

[12] 吕秋军，曹萍 . 药用辅料的不良反应及其安全性管理 [J]. 药物不良反应杂志，2010，12（6）：410-414.

[13] Simth GB，Dimichele L，Colwell LF，et al. Autooxidation of simvastatin [J]. Tetrahedron，1993，49（21）：4447.

[14] 陆兴，胡容峰，谈恒山，等 . 高效液相色谱法测定辛伐他汀分散片的含量及其有关物质 [J]. 中国医院药学杂志，2007，27（2）：188.

[15] 赵述强，赵卫，陈达，等 . 离子色谱 - 抑制电导法测定硫酸奈替米星注射液中亚硫酸氢钠的含量 [J]. 药物生物技术，2017，24（6）：498-502.

[16] 杜明荦，仲平，杭太俊 . 离子色谱法测定盐酸多巴酚丁胺注射液中亚硫酸氢钠含量 [J]. 药物分析杂志，2012，32（10）：1835-1830.

[17] 杨丽珍，杨伟峰，石云峰 . 离子色谱法测定盐酸阿扎司琼氯化钠注射液中亚硫酸氢钠的含量 [J]. 中国现代应用药学，2013，10（30）：1116-1119.

[18] 齐麟，李文东，刘照振，等 . 离子色谱法测定硫酸奈替米星注射液中抗氧剂亚硫酸钠的含量 [J]. 中国药学杂志，2017，20（52）：1792-1794.

[19] Macholz R. Evaluation of certain food additives and contaminants. Thirtienth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives [S]. World Health Organization，1987：Technical Report Series 751.

（收稿日期：2020-12-08；修回日期：2021-01-14）

超高效液相色谱 - 串联质谱法测定东北红豆杉中 7 种黄酮的含量

彭波[1]，李洪权[2]，柏玉冰[1*]（1. 湖南中医药大学第一附属医院，长沙 410007；2. 株洲市食品药品检验所，湖南 株洲 412000）

摘要：目的 建立超高效液相色谱 - 串联质谱法同时测定东北红豆杉中银杏双黄酮、金松双黄酮、槲皮素、山柰酚、二氢槲皮素、二氢山柰酚和芦丁 7 种黄酮的含量。**方法** 以 50% 甲醇超声提取；采用 Welch Xtimate C_{18}（4.6 mm×150 mm，5 μm）色谱柱，以水（A）- 乙腈（B）为流动相系统梯度洗脱，流速 0.8 mL • min $^{-1}$，柱温 30 ℃。采用电喷雾离子源，进行负离子扫描。**结果** 银杏双黄酮、金松双黄酮、槲皮素、山柰酚、二氢槲皮素、二氢山柰酚和芦丁质量浓度分别在 0.140 ～ 14.0、0.208 ～ 20.8、0.001 30 ～ 0.130、0.005 00 ～ 0.500、0.002 50 ～ 0.250、0.0220 ～ 2.20 和 0.320 ～ 32.0 μg • mL $^{-1}$ 内与峰面积线性关系良好，平均回收率分别为 98.9%、100.7%、99.0%、99.3%、98.8%、101.7% 和 100.1%。**结论** 本法高效、准确，可用于东北红豆杉中上述 7 种黄酮含量的测定。

关键词：超高效液相色谱 - 串联质谱法；东北红豆杉；黄酮；含量测定
中图分类号：R917 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1648-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.027

Simultaneous determination of 7 flavones in *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. by UHPLC-MS/MS

PENG Bo[1], LI Hong-quan[2], BAI Yu-bing[1*] (1. *The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha* 410007; 2. *Zhuzhou Institute for Food and Drug Control*, *Zhuzhou Hunan* 412000)

Abstract: Objective To establish an UHPLC-MS/MS method to determine the content of 7 flavones (ginkgetin, sciadopitysin, quercetin, kaempferol, dihydroquercetin, dihydrokaempferol, and rutin) in *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc.. **Methods** *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. was extracted with 50% methanol by ultrasonic method. Chromatographic separation was performed on Welch Xtimate C_{18} column (4.6 mm×150 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of water (A) and acetonitrile (B) with gradient elution. The flow rate was 0.8 mL • min $^{-1}$. The column temperature was 30 ℃ . The mass spectra obtained by the electrospray ionization were performed under the negative ion mode. **Results** Ginkgetin, sciadopitysin, quercetin, kaempferol, dihydroquercetin, dihydrokaempferol and rutin showed good linearity at 0.140 － 14.0, 0.208 － 20.8, 0.001 30 － 0.130, 0.005 00 － 0.500, 0.002 50 － 0.250, 0.0220 － 2.20 and 0.320 － 32.0 μg • mL $^{-1}$. The average recovery of them was 98.9%, 100.7%, 99.0%, 99.3%, 98.8%, 101.7% and 100.1%, respectively. **Conclusion** The method is efficient and accurate, which can be used for the determination of 7 flavones in *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc..

Key words: ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc.; flavone; content determination

东北红豆杉（*Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc.）又名紫杉，是红豆杉科红豆杉属植物[1]，在我国主要分布于长白山系[2]。成分研究表明东北红豆杉含有紫杉烷、黄酮、甾体、木质素[3]等成分；

基金项目：株洲市科技计划基金资助项目（【2019】45 号）。
作者简介：彭波，男，主要从事药品质量管理，E-mail：36214223@qq.com *通信作者：柏玉冰，女，硕士研究生，主要从事食药品质量管理，E-mail：1024495239@qq.com

药理活性研究表明东北红豆杉有抗肿瘤[4-5]、降血糖[6]、抗氧化[7]等药理作用。

目前，关于东北红豆杉的研究大多围绕其紫杉烷类成分的抗肿瘤活性[8-9]。但还有研究表明其黄酮类成分也有很好的生物活性[10-11]，如槲皮素[12]、山柰酚[13]和芦丁[14]的抗肿瘤活性，银杏双黄酮对高糖致微血管内皮细胞炎症反应的保护作用[15]，金松双黄酮对尿苷二磷酸葡糖醛酸转移酶的抑制作用[16]，二氢槲皮素的心脏保护作用[17]以及二氢山柰酚对脂质沉积的抑制作用[18]等。

基于这些黄酮类功效成分对东北红豆杉进行质量评价，对其建立含量测定方法则显得尤为重要。Gai 等[19]测定了金松双黄酮、银杏双黄酮和槲皮素成分的含量。目前尚未发现山柰酚、二氢槲皮素、二氢山柰酚和芦丁 4 种成分含量测定的相关报道，更未发现对这 7 种成分同时测定的相关报道。

目前中药材中黄酮类成分的含量测定方法有比色法、薄层色谱法、紫外可见分光光度法、高效液相色谱法及液相色谱 - 串联质谱法等[20]。而鉴于本法测定成分多达 7 种，对检测效率和准确性的要求均较高，超高效液相色谱 - 串联质谱（UHPLC-MS/MS）具有基于质荷比分析而几乎不依赖于各峰之间的分离度（同分异构体除外），分析时间短，灵敏度高等特点[21]。本研究基于 UHPLC-MS/MS 法建立东北红豆杉中 7 种黄酮成分的含量测定方法，以期为基于黄酮类成分对东北红豆杉进行质量评价提供技术帮助。

1 材料

1.1 药材

东北红豆杉，获取途径为自采、网购和药材市场采购，样品信息见表 1。所有批次药材经株洲市食品药品检验所胡冠宇主管药师鉴定均为红豆杉科红豆杉属植物东北红豆杉的带叶枝条或全株。所有批次药材（全株则剪取带叶枝条）均经粉碎后过 4 号筛，备用。

1.2 试药

银杏双黄酮（纯度：98.0%，批号：PRF9110505）、金松双黄酮（纯度：98.0%，批号：PRF9110541）、二氢槲皮素（纯度：98.0%，批号：BP1367）和二氢山柰酚（纯度：98.0%，批号：SBP00122）（对照品，成都普瑞法科技开发有限公司）；槲皮素（纯度：97.4%，批号：100081-200907）、山柰酚（纯度：95.9%，批号：110861-200808）和芦丁（纯度：90.5%，批号：100080-200707）（对照品，中国食品药品检定研究院）。甲酸、乙酸铵（分析纯，国药集团化学试剂有限公司），乙腈、甲醇（色谱纯，霍尼韦尔有限公司）。

1.3 仪器

电子天平（XSE 205DV，0.01 mg，梅特勒托利多仪器有限公司）；超声波仪（HNS-SY-150，40 kHz，400 W，北京恒奥德仪器仪表有限公司）；Agilent 1290 Infinity Ⅱ超高效液相色谱仪（安捷伦科技有限公司）；QTRAP 4500 三重四极杆质谱（上海爱博才思分析仪器有限公司）等。

表 1 东北红豆杉样品信息

Tab 1 Information of *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. samples

批号	来源	样品性状	采集方式	采集时间
YP20200328	吉林省榆树市	带叶枝条	自采	2020-03-28
YP20200514	黑龙江省大庆市	带叶枝条	自采	2020-05-14
YP20200606	黑龙江省哈尔冰市	带叶枝条	自采	2020-06-06
YP20200711	诺耕官方旗舰店	全株	网购	2020-07-11
YP20200712	星科诚官方旗舰店	全株	网购	2020-07-12
YP20200818	河北安国	带叶枝条	药材市场采购	2020-08-18
YP20200912	湖南廉桥	带叶枝条	药材市场采购	2020-09-12
YP20200925	成都荷花池	带叶枝条	药材市场采购	2020-09-25

2 方法与结果

2.1 色谱 - 质谱条件

2.1.1 色谱条件 采用 Welch Xtimate C_{18}（4.6 mm×150 mm，5 μm）色谱柱，以水（A）- 乙腈（B）为流动相，梯度洗脱（0～6 min，90%→65%A；6～8 min，65%→45%A；8～14.5 min，45%→30%A；14.5～20 min，30%A→10%A；20～20.5 min，10%→90%A；20.5～22 min，90%A），流速 0.8 mL·min^{-1}，采集时间 22 min，柱温 30 ℃，进样量 2 μL。

2.1.2 质谱条件 电离源：电喷雾电离源（ESI）；离子模式：通过比较正、负离子模式下各成分分子离子峰信号强度，选择负离子模式；扫描模式：多反应监测（MRM）；离子源温度、电喷雾电压、气帘气及离子源气等参数则选择仪器默认参数，其中离子源温度为 550 ℃，电喷雾电压为－4500 V，气帘气为 35.0 psi，离子源气 1 为 55 psi，离子源气 2 为 55 psi；去簇电压和碰撞能量，根据信号强度曲线，选择各成分分子离子峰信号最强时所显示数值，详见表 2。

表 2 7 种黄酮的保留时间及质谱参数

Tab 2 Retention time and UHPLC-MS/MS parameters of the 7 flavones

化合物	离子模式	母离子 /（*m/z*）	子离子 /（*m/z*）	去簇电压 /V	碰撞能量 /e	保留时间 /min
银杏双黄酮	—	565.2	533.0	− 170	− 38	15.64
金松双黄酮	—	579.1	547.0	− 170	− 37	19.69
槲皮素	—	301.1	150.9	− 114	− 26	11.10
山柰酚	—	285.2	117.0	− 118	− 47	12.01
二氢槲皮素	—	303.0	125.0	− 120	− 30	6.43
二氢山柰酚	—	287.1	124.9	− 118	− 45	8.15
芦丁	—	609.3	299.9	− 160	− 48	5.03

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品储备溶液 精密称取不同质量的银杏双黄酮、金松双黄酮、槲皮素、山柰酚、二氢槲皮素、二氢山柰酚和芦丁对照品，置 25 mL 量瓶中，加甲醇溶解并定容至刻度，摇匀，即得。经含量折算后，得各对照品的质量浓度分别为 1.40、1.04、1.30、5.00、2.50、2.20、3.20 mg • mL $^{-1}$。对照品总离子流和提取离子色谱图见图 1。

2.2.2 供试品溶液 取红豆杉粉末（批号：YP20200328，粉碎后过 4 号筛），精密称取细粉 1.0 g，置具塞锥形瓶中，精密加入 50% 甲醇 40 mL，称量，超声（400 W，40 kHz）提取 20 min，静置至室温，再称量，用 50% 甲醇补足减失的量，摇匀，滤过，取续滤液作为供试品溶液。东北红豆杉样品总离子流和提取离子色谱图见图 2。

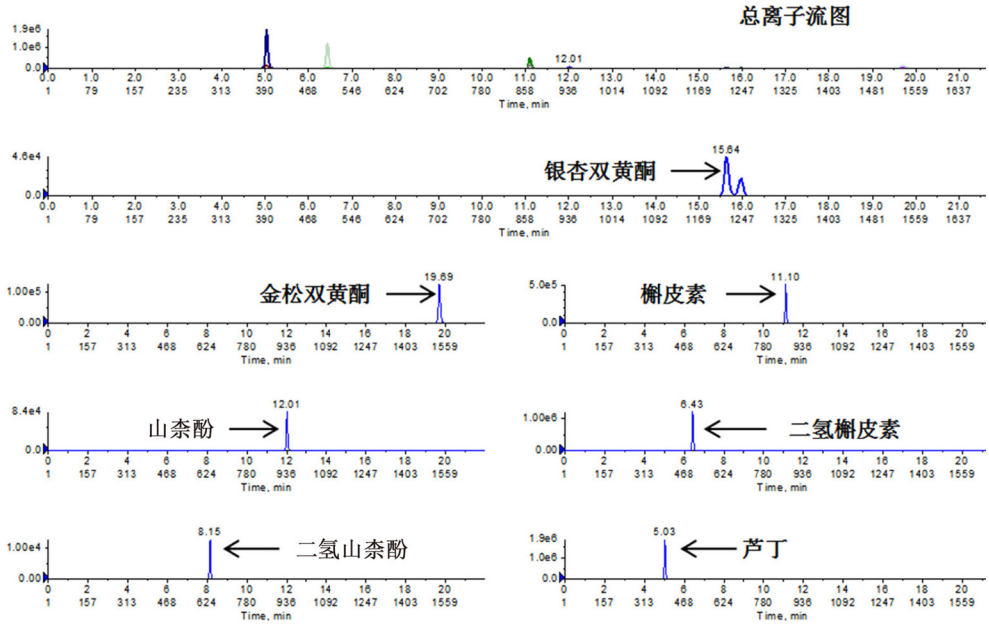


图 1 混合对照品总离子流和提取离子色谱图

Fig 1 Total ion current chromatogram and extracted ion chromatogram of mixture reference

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 精密量取混合对照品储备溶液适量，用 50% 甲醇稀释得系列浓度的混合对照品溶液（银杏双黄酮：0.140 ～ 14.0 μg • mL $^{-1}$；金松双黄酮：0.208 ～ 20.8 μg • mL $^{-1}$；槲皮素：0.001 30 ～ 0.130 μg • mL $^{-1}$；山柰酚：0.005 00 ～ 0.500 μg • mL $^{-1}$；二氢槲皮素：0.002 50 ～ 0.250 μg • mL $^{-1}$；二氢山柰酚：0.0220 ～ 2.20 μg • mL $^{-1}$；芦丁：0.320 ～ 32.0 μg • mL $^{-1}$），进样测定，以质量浓度 *C*（μg • mL $^{-1}$）为横坐标，峰面积 *A* 为纵坐标，计算 7 种成分的线性回归方程，结果见表 3，7 种成分在各自线性范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.2 精密度试验 取混合对照品溶液，连续进样 6 次，记录各成分峰面积并计算相对标准偏差（*RSD*）。结果银杏双黄酮、金松双黄酮、槲皮素、山柰酚、二氢槲皮素、二氢山柰酚和芦丁峰面积的 *RSD* 分别为 0.76%、0.86%、0.72%、0.89%、0.84%、0.73% 和 0.76%，表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 取同一批样品（批号：YP20200328）6 份，按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，记录各成分峰面积并计算 *RSD*。结果银杏双黄酮、金松双黄酮、槲皮素、山柰酚、二氢槲皮素、二氢山柰酚和芦丁峰面积的 *RSD* 分别为 1.1%、1.7%、1.0%、1.8%、1.3%、1.9% 和 1.3%，表明该方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一批样品供试品溶液（批号：YP20200328），分别于 0、2、4、8 和 12 h 进样分析，记录各成分峰面积并计算 *RSD*。结果银杏双黄酮、金松双黄酮、槲皮素、山柰酚、二氢槲皮素、二氢山柰酚和芦丁峰面积的 *RSD* 分别为 2.1%、2.1%、1.3%、1.4%、1.6%、1.5% 和

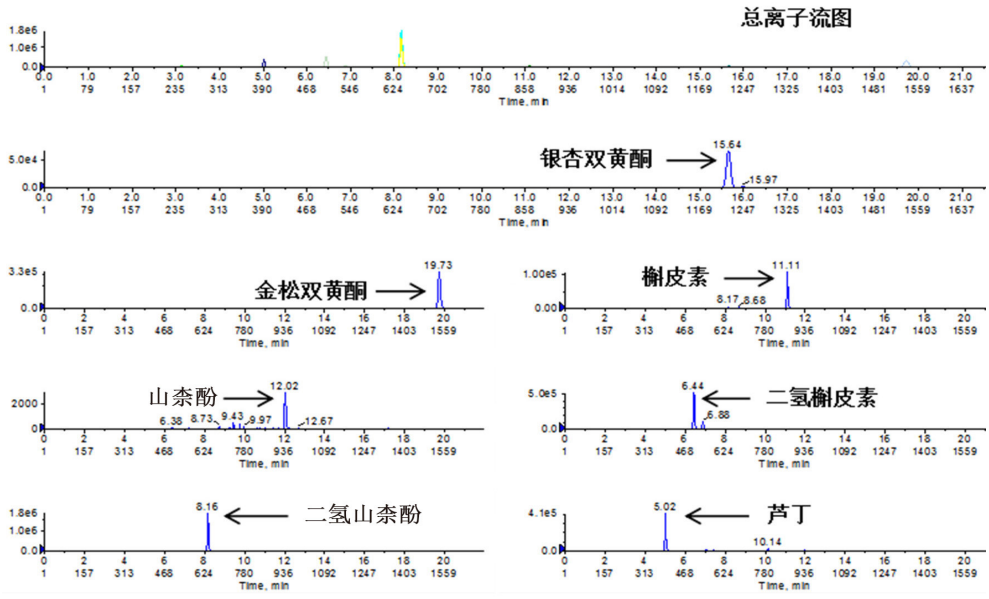


图 2 东北红豆杉样品总离子流和提取离子色谱图

Fig 2 Total ion current chromatogram and extracted ion chromatogram of *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. sample

表 3 线性关系结果 (n = 7)

Tab 3 Linear regression of the 7 compounds (n = 7)

成分	回归方程	r	线性范围 /（μg • mL^{-1}）
银杏双黄酮	$Y = 2.633\times10^{6}X - 2195\times10^{4}$	0.9999	0.140 ～ 14.0
金松双黄酮	$Y = 1.516\times10^{6}X - 7630\times10^{4}$	0.9997	0.208 ～ 20.8
槲皮素	$Y = 6.750\times10^{6}X - 2625\times10^{3}$	0.9998	0.001 30 ～ 0.130
山柰酚	$Y = 1.125\times10^{6}X + 2350\times10^{3}$	0.9996	0.005 00 ～ 0.500
二氢槲皮素	$Y = 5.779\times10^{6}X - 1228\times10^{4}$	0.9995	0.002 50 ～ 0.250
二氢山柰酚	$Y = 1.073\times10^{6}X + 1559\times10^{4}$	0.9995	0.0220 ～ 2.20
芦丁	$Y = 8.521\times10^{5}X - 3849\times10^{3}$	1.000	0.320 ～ 32.0

1.7%，表明供试品溶液 12 h 内稳定性良好。

2.3.5 加样回收试验 取已知含量的样品（批号：YP20200328）6 份，每份约 0.5 g，精密称定，分别加入适量对照品溶液后，按“2.2.2”项下方法制备供试溶液，进样分析，计算加样回收率，结果银杏双黄酮、金松双黄酮、槲皮素、山柰酚、二氢槲皮素、二氢山柰酚和芦丁的平均回收率为 98.9%、100.7%、99.0%、99.3%、98.8%、101.7% 和 100.1%，*RSD* 分别为 1.0%、2.4%、1.7%、1.8%、1.7%、1.1% 和 2.3%，表明本方法回收率良好。

2.4 样品测定

精密称取 8 批次不同批号的东北红豆杉各两份，分别按照“2.2.2”项下的方法制备供试品溶液，按照“2.1”项下条件进样测定，计算 7 种成分含量，结果见表 4。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备条件优化

本研究考察了不同的提取溶剂（30% 甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇），提取体积（30、40、50 mL），提取时间（10、20、30 min），以 7 种黄酮的峰面积大小为判断依据，确定当用 40 mL 50% 甲醇提取 20 min 时，7 种黄酮的峰面积均达到最大值。

3.2 色谱条件优化

3.2.1 色谱柱的选择 比较了两种色谱柱，Welch Xtimate C_{18}（4.6 mm×150 mm，5 μm）和 Thermo Acclaim 120 C_{18}（4.6 mm×150 mm，5 μm），以 7 种黄酮的分子离子峰的保留性和峰形等因素为判断依据，结果两款色谱柱均获得了较为合适的保留时间和较好的峰形。但使用 Thermo Acclaim 120 C_{18} 柱时，二氢槲皮素和二氢山柰酚稍有前延峰。因此，选择 Welch Xtimate C_{18} 色谱柱。

3.2.2 流动相的选择 比较了乙腈 - 水、乙腈 -0.1% 甲酸水溶液和乙腈 - 含 10 mmol • L^{-1} 乙酸铵的 0.1% 甲酸水溶液 3 种流动相系统。结果，当选择乙腈 -0.1% 甲酸水溶液时，二氢槲皮素出现前延峰；当选择乙腈 - 水和乙腈 - 含 10 mmol • L^{-1} 乙酸铵的 0.1% 甲酸水溶液时，峰形均对称，且各峰均完全分离。进一步对 3 种不同流动相系统下的 7 种黄

表 4 8 批次样品中 7 种黄酮的含量 (μg·g^{-1}，n = 2)

Tab 4 Contents of the 7 flavones in 8 batches of samples (μg·g^{-1}，n = 2)

批号	银杏双黄酮	金松双黄酮	槲皮素	山柰酚	二氢槲皮素	二氢山柰酚	芦丁
YP20200328	1.315 11	10.556 49	0.002 75	0.396 46	0.024 76	0.223 61	10.324 38
YP20200514	4.457 15	15.117 32	0.002 67	0.547 73	0.027 84	0.547 78	12.414 87
YP20200606	1.979 22	12.997 45	0.005 34	0.455 79	0.089 76	0.203 75	11.861 67
YP20200711	2.469 30	16.618 38	0.003 44	0.643 79	0.028 58	0.678 44	10.552 46
YP20200712	1.048 37	8.441 91	0.006 77	0.118 67	0.046 55	0.594 03	16.727 45
YP20200818	1.148 75	8.249 75	0.001 44	0.654 99	0.044 77	0.577 48	8.555 46
YP20200912	1.029 03	11.648 89	0.003 19	0.124 48	0.158 77	0.305 66	6.240 47
YP20200925	0.874 40	10.447 62	0.005 23	0.217 86	0.116 77	0.844 50	10.116 78

酮成分的峰面积进行比较，发现当选择乙腈 - 水时各成分峰面积均最大。

3.3 总结

本研究建立了东北红豆杉中银杏双黄酮、金松双黄酮、槲皮素、山柰酚、二氢槲皮素、二氢山柰酚、芦丁 7 种黄酮类成分的 UHPLC-MS/MS 含量测定方法，其中山柰酚、二氢槲皮素、二氢山柰酚和芦丁的含量测定方法在东北红豆杉中均为首次建立。本法为基于黄酮类成分对东北红豆杉进行质量评价提供了技术支持。

参考文献

[1] Kozyrenko MM，Artyukova EV，Chubar EA. Genetic diversity and population structure of *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. ex Endl.（*Taxaceae*）in Russia according to data of the nucleotide polymorphism of intergenic spacers of the chloroplast genome [J]. Russ J Genet，2017，53（8）：865-874.

[2] 杨玉林，宋学东，董京祥，等 . 红豆杉属植物资源及其世界分布概况 [J]. 森林工程，2009，25（3）：5-10.

[3] 曹聪梅，李作平，史清文，等 . 东北红豆杉的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 天然产物研究与开发，2006，18（2）：330-342.

[4] Elansary H，Szopa A，Kubica P，et al. Phenolic compounds of catalpa speciosa，*Taxus cuspidate*，and *Magnolia acuminata* have antioxidant and anticancer activity [J]. Molecules，2019，24（3）：412-425.

[5] Fischer MM，Cancilla B，Yeung VP，et al. WNT antagonists exhibit unique combinatorial antitumor activity with taxanes by potentiating mitotic cell death [J]. Sci Adv，2017，3（6）：90-101.

[6] 王甜甜，云旭龙，孙梦迪，等 . 东北红豆杉枝叶不同提取部位降血糖作用研究 [J]. 中国妇幼健康研究，2016，27（1）：228-230.

[7] Bajpai VK，Baek KH. Characterization of microwave extracted essential oil from taxus cuspidata stem and determination of its phenolic content，antioxidant and free radical scavenging activities [J]. J Essent Oil Bear Pl，2016，19（5）：1051-1065.

[8] Byung K，Oh-Kyoung K，Ho C，et al. Taxanes in the treatment of advanced gastric cancer [J]. Molecules，2016，21（5）：651-660.

[9] Mody MD，Gill HS，Saba NF. The evolving and future role of taxanes in squamous cell carcinomas of the head and neck：A review [J]. JAMA Otolaryngol，2016，142（9）：898-905.

[10] 姜萍，陈华芳，黄海斌，等 . 东北红豆杉枝叶总黄酮超声波辅助提取及其抗氧化活性 [J]. 林产化学与工业，2017，37（6）：131-138.

[11] 张学玉，曲玮，梁敬钰 . 红豆杉属植物化学成分及药理作用研究进展 [J]. 海峡药学，2011，23（6）：5-9.

[12] 黎敏，杨武斌，米本中，等 . 槲皮素抗癌作用机制相关研究报道 [J]. 中药药理与临床，2018，34（2）：131-134.

[13] 张雅雯，邵东燕，师俊玲，等 . 山柰酚生物功能研究进展 [J]. 生命科学，2017，29（4）：86-91.

[14] Ganeshpurkar A，Saluja AK. The pharmacological potential of rutin [J]. Saudi Pharm J，2017，25（2）：149-164.

[15] 郭丽，路青瑜，张启云 . 银杏双黄酮对高糖致微血管内皮细胞炎症反应的保护作用及机制研究 [J]. 中国药理学通报，2020，36（10）：1463-1469.

[16] 王欣欣，侯洁，宁静，等 . 金松双黄酮对尿苷二磷酸葡糖醛酸转移酶的抑制作用 [J]. 药学学报，2016，51（5）：749-755.

[17] Shu ZP，Yang YN，Yang L，et al. Cardioprotective effects of dihydroquercetin against ischemia reperfusion injury by inhibiting oxidative stress and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis via the PI3K/Akt pathway [J]. Food Funct，2019，10（1）：203-215.

[18] 顾业芸，周启程，公欣华，等 . 二氢山柰酚衍生物调控 AMPK/PGC-1α 通路抑制棕榈酸诱导的 C2C12 成肌分化细胞脂质沉积 [J]. 第三军医大学学报，2017，39（16）：1606-1611.

[19] Gai QY，Jiao J，Wang X，et al. Simultaneous determination of taxoids and flavonoids in twigs and leaves of three *Taxus* species by UHPLC-MS/MS [J]. J Pharmaceut Biomed，2020，189（17）：113456-113464.

[20] 张岩，曹国杰，张燕，等 . 黄酮类化合物的提取以及检测方法的研究进展 [J]. 食品研究与开发，2008，29（1）：154-158.

[21] 胡明珠，孟宪双，王春，等 . 质谱在高通量快速检测技术的应用研究进展 [J]. 分析测试学报，2018，37（2）：127-138.

（收稿日期：2020-10-10；修回日期：2020-12-10）

高效液相色谱法检测医疗美容产品中 9 种酰胺类局麻药

沈心，顾晓风，周震宇*（苏州市药品检验检测研究中心，江苏 苏州 215014）

摘要：目的 建立同时定量测定医疗美容产品中 9 种酰胺类局麻药（普鲁卡因胺、*N*-去丁基布比卡因、甲哌卡因、阿替卡因、丙胺卡因、利多卡因、罗哌卡因、地布卡因、布比卡因）的高效液相色谱法。**方法** 色谱柱为 Waters XBridge C_{18}（4.6 mm×250 mm，5 μm），以磷酸盐缓冲液（pH 7.50）为流动相 A，乙腈为流动相 B，梯度洗脱，检测波长为 215 nm。**结果** 9 种酰胺类局麻药在各自线性浓度范围内与峰面积线性关系良好，相关系数均大于 0.99，定量限在 0.62 ～ 0.80 μg • mL^{-1}，检测限在 0.31 ～ 0.40 μg • mL^{-1}。**结论** 本法简便、快速、准确，为医疗美容产品中酰胺类局麻药的检测提供了有效的方法和技术。

关键词：高效液相色谱法；医疗美容产品；酰胺类局麻药
中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1653-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.028

Determination of 9 amide local anesthetics in medical beauty products by high performance liquid chromatography

SHEN Xin, GU Xiao-feng, ZHOU Zhen-yu* (*Suzhou Institute for Drug Control*, *Suzhou Jiangsu* 215104)

Abstract: Objective To determine 9 amide local anesthetics [procainamide, *N*-(2, 6-dimethylphenyl) piperidine-2-carboxamide, meperidine, articaine, procaine, lidocaine, ropivacaine, dibucaine, bupivacaine] in medical beauty products by high performance liquid chromatography. **Methods** The determination was performed on Waters XBridge C_{18} column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with phosphate buffer as the mobile phase A and acetonitrile as the mobile phase B in gradient elution. The detection wavelength was at 215 nm. **Results** The calibration curves of targets showed good linearity (r > 0.99). The limit of quantification was 0.62 ～ 0.80 μg • mL^{-1} and the detection limits was at 0.31 ～ 0.40 μg • mL^{-1}. **Conclusion** The method is simple and accurate, which can be used to effectively determine amide local anesthetics added in medical beauty products.

Key words: high performance liquid chromatography; medical beauty product; amide local anesthetics

利多卡因、普鲁卡因、阿替卡因等是我国目前广泛使用的酰胺类局麻药，具有显著的镇痛作用，且起效快、作用强、持续时间长，主要用作临床医疗产品[1-3]。然而，随着社会经济的发展和人们生活水平的提高，美容行业逐渐兴起，此类局麻药可能被添加于晒后修复、祛斑祛痘等功能性化妆品中，通过皮肤吸收发挥镇静、抗皱抗衰老功效，但化妆品在使用过程中长期直接与人体接触，若含有此类物质会危害人体健康安全[4-6]。一些不法美容院为了达到在医疗美容过程中减轻人体肌肤疼痛或不适的目的，忽视顾客的身体健康，使用一些价格低廉、无合格证书生产批文的麻醉药品，此类产品中麻醉成分含量不可控，具有中枢神经毒性和心血管毒性，由于人体肌肤毛细管丰富，易被吸收并迅速进入血液循环，对人体健康造成严重危害，风险性极大[7-8]。因此，我国《化妆品安全技术规范》（2015 年版）[9]、欧盟化妆品法规及东盟化妆品指令[10]中均明确将普鲁卡因等局麻药列为化妆品中禁用组分。

目前文献报道的局麻药高效液相色谱测定法多局限于单种或者 4 种目标组分的检测[3，11-12]。基于此，本文建立同时定量测定 9 种酰胺类局麻

作者简介：沈心，女，主要从事药物分析研究，E-mail：15720800913@163.com *通信作者：周震宇，男，副主任药师，主要从事药物分析研究，E-mail：zhou_198209@163.com

药（普鲁卡因胺、*N*-去丁基布比卡因、甲哌卡因、阿替卡因、丙胺卡因、利多卡因、罗哌卡因、地布卡因、布比卡因）的高效液相色谱分析方法，检测范围全面、操作简便、成本低、适用性强、有利于方法的推广，可用于医疗美容产品中酰胺类局麻药的检测，以期为市场监督管理提供技术支撑。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent Technologies 1260 Infinity Ⅱ高效液相色谱仪（Agilent Open Lab Acquisition CDS 2.4 工作站）；METTLER TOLEDO XSE205DU 电子天平（梅特勒）。

1.2 试药

盐酸普鲁卡因（批号：C10589495，纯度：99.0%，麦克林）；*N*-去丁基布比卡因（批号：7-ECGW-135-1，纯度：98.0%）、盐酸甲哌卡因（批号：36SKB-BI，纯度：98.0%）、盐酸丙胺卡因（批号：3SRKC-HF，纯度：98.0%）、盐酸布比卡因（批号：ZXXLC-AF，纯度：98.0%）对照品（TCI）；阿替卡因（批号：L1820009，纯度：99.0%）、地布卡因（批号：G1825214，纯度：99.0%）对照品（阿拉丁）；盐酸利多卡因对照品（批号：1-TGG-11-1，纯度：99.0%，TRC）；盐酸罗哌卡因对照品（批号：100866-201302，纯度：94.5%，中国食品药品检定研究院）。样品均来源于苏州市市场监督抽查。乙腈为色谱纯，水为超纯水，其他试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Waters XBridge C_{18}（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 A 为 5 mmol·L^{-1} 磷酸二氢钠溶液 -15 mmol·L^{-1} 磷酸氢二钠溶液（pH 7.5），流动相 B 为乙腈；流速：1.0 mL·min^{-1}；检测波长：215 nm；柱温：35 ℃；进样量：10 μL；梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

Tab 1 Condition of gradient elution

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
5.00	85.0	15.0
25.00	40.0	60.0
30.00	30.0	70.0
40.00	85.0	15.0
50.00	85.0	15.0

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 称取盐酸丙胺卡因、盐酸布比卡因、盐酸甲哌卡因、盐酸罗哌卡因、盐酸利多卡因、*N*-去丁基布比卡因、地布卡因、阿替卡因、盐酸普鲁卡因胺对照品各约 100 mg，精密称定，置 100 mL 量瓶中，加入适量甲醇超声使溶解，放冷，用甲醇稀释至刻度，摇匀，即得 9 种酰胺类局麻药的混合对照品储备液（1 mg·mL^{-1}）。取混合对照品储备液，用甲醇逐级稀释成系列浓度的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取样品约 1 g，精密称定，置 100 mL 量瓶中，加入适量甲醇，置 40 ℃水浴中加热 5 min 使溶解，放冷，用甲醇稀释至刻度，摇匀，用微孔滤膜（0.45 μm）滤过。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 取空白基质（空白样品）约 1 g，精密称定，置 100 mL 量瓶中，加入适量甲醇，置 40 ℃水浴中加热 5 min 使溶解，放冷，用甲醇稀释至刻度，摇匀，用微孔滤膜（0.45 μm）滤过。

2.3 专属性试验

取对照品溶液（0.05 mg·mL^{-1}）、供试品溶液、阴性样品溶液以及空白溶剂（甲醇），按“2.1”项下色谱条件进行测定。对照品溶液中 9 种待测酰胺类局麻药均达到基线分离，各理论板数均不低于 5000，空白溶剂以及阴性样品溶液对测定均无干扰，阳性样品中检测出 3 种酰胺类局麻药（见图 1）。

2.4 标准曲线、检测限和定量限

取“2.2.1”项下混合对照品储备液及系列对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件进行测定，记录色谱峰面积响应值（*A*），以对照品溶液质量浓度（*C*）为横坐标，*A* 值为纵坐标进行线性回归。另取对照品溶液（0.004 mg·mL^{-1}），用甲醇逐级稀释，同法测定，分别按 3 倍和 10 倍信噪比计算各组分的检测限和定量限，结果见表 2。

2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品储备液，用甲醇稀释成浓度为 0.04 mg·mL^{-1} 的对照品溶液，重复进样测定 6 次，测得峰面积 *RSD* 在 0.15% ～ 0.32%，表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取阳性样品，平行制备 6 份供试品溶液，结果显示样品含普鲁卡因胺、丙胺卡因、利多卡因 3 种酰胺类局麻药，各组分含量的 *RSD* 在 1.1% ～ 2.8%，表明该方法具有良好重复性。

2.7 稳定性试验

取“2.5”项下对照品溶液，分别于室温下放置 0、6、10、12、24 h 后，进样测定，结果显示 9 种酰胺类局麻药峰面积的 *RSD* 均小于 1.1%，说明该溶液在 24 h 内基本稳定。

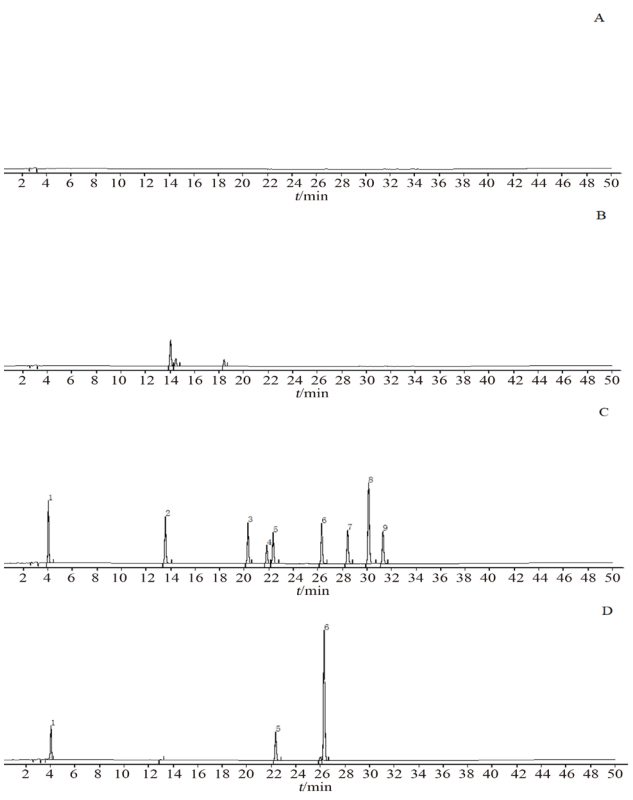


图 1　空白溶剂（A）、阴性样品溶液（B）、对照品溶液（C）及供试品溶液（D）典型色谱图

Fig 1　Chromatogram of blank solvent（A），negative sample solution（B），reference solution（C）and sample solution（D）

1. 普鲁卡因胺（procainamide）；2. *N*-去丁基布比卡因[*N*-（2，6-dimethylphenyl）piperidine-2-carboxamide]；3. 甲哌卡因（mepivacaine）；4. 阿替卡因（articaine）；5. 丙胺卡因（prilocaine）；6. 利多卡因（lidocaine）；7. 罗哌卡因（ropivacaine）；8. 地布卡因（dibucaine）；9. 布比卡因（bupivacaine）

2.8　回收试验

取约 1 g 空白样品作为空白基质，精密称定，共 9 份，分别置 100 mL 量瓶中，按低、中、高 3 个浓度分别加入“2.2.1”项下的混合对照品储备液（1.0、5.0、10.0 mL），加入适量甲醇，于 40 ℃水浴上加热 5 min 使其充分溶解，放冷，用甲醇稀释至刻度，摇匀，按“2.1”项下色谱条件进行测定，按外标法计算回收率，9 种酰胺类局麻药平均回收率在 93.4% ～ 105.7%，*RSD* ≤ 5.7%，在亲水性基质中的平均回收率为 92.4% ～ 102.1%，*RSD* ≤ 5.2%，符合测定要求。

2.9　实际样品检测

对 10 批医疗美容产品进行检测分析，结果显示，仅 1 批样品中检出利多卡因、普鲁卡因胺和丙胺卡因 3 种酰胺类局麻药，分别为 24.81、3.91、6.65 mg • g^{-1}，其余样品均未检出。

3　讨论

3.1　流动相 pH 的选择

考察不同 pH 值（7.0、7.5、8.0、8.5、9.0）的流动相对待测组分色谱峰形和分离效果的影响，结果显示，当 pH 值高于或者低于 7.5 时，均不能获得满意的分离效果；当 pH 值为 7.5 时，各组分在峰形和分离效果上均较为理想。因此，确定流动相 pH 值为 7.5。

3.2　色谱柱的选择

比较 3 种不同填料的色谱柱 Phenomenex Gemini C_{18} 110A（4.6 mm×250 mm，5 μm）、Agilent ZORBAX Extend C_{18}（4.6 mm×250 mm，5 μm）、Waters XBridge C_{18}（4.6 mm×250 mm，5 μm）对色谱行为的影响，结果显示，使用 Phenomenex Gemini C_{18} 110A、Agilent ZORBAX Extend C_{18} 色谱柱，色谱峰均会出现不同程度的拖尾，峰形较差，使用 Waters XBridge C_{18} 色谱柱结果理想。因此，选择使用 Waters XBridge C_{18}（4.6 mm×250 mm，5 μm）色谱柱作为试验用色谱柱。

表 2　9 种酰胺类局麻药的线性关系

Tab 2　Regression equation，LOD and LOQ of 9 amide local anesthetics

组分	回归方程	线性范围 /（μg • mL^{-1}）	*r*	LOQ /（μg • mL^{-1}）	LOD/（μg • mL^{-1}）
普鲁卡因胺	$A = 36.79C - 3.00$	3.08 ～ 77.02	1	0.62	0.31
N-去丁基布比卡因	$A = 24.82C + 103.49$	4.02 ～ 1004.01	0.99	0.80	0.40
甲哌卡因	$A = 24.53C + 102.25$	3.51 ～ 878.41	0.99	0.70	0.35
阿替卡因	$A = 11.44C + 5.44$	3.94 ～ 984.56	1	0.79	0.39
丙胺卡因	$A = 20.65C + 54.37$	3.53 ～ 881.62	0.99	0.71	0.35
利多卡因	$A = 25.80C + 103.43$	3.47 ～ 866.67	0.99	0.69	0.35
罗哌卡因	$A = 23.82C + 58.98$	3.45 ～ 862.11	0.99	0.69	0.34
地布卡因	$A = 38.36C + 608.24$	3.94 ～ 986.04	0.99	0.79	0.39
布比卡因	$A = 23.389C + 57.62$	3.60 ～ 899.17	0.99	0.72	0.36

3.3　小结

本研究以市场抽检医疗美容产品为研究对象，建立了同时测定 9 种酰胺类局麻药的高效液相色谱方法。选择临床常用酰胺类局麻药作为待测物，对《化妆品安全技术规范》（2015 年版）中规定的 7 种禁用组分作出补充，建议将本研究中目标组分（普鲁卡因胺、*N*-去丁基布比卡因、甲哌卡因、阿

替卡因、丙胺卡因、利多卡因、罗哌卡因、地布卡因、布比卡因）均列为禁用组分，且相比于已报道的色谱 - 质谱联用法 [13-14]，本方法成本低，同时优化样品前处理过程，操作简便，更利于方法的普及，可为市场监督管理提供有力的技术支持。

参考文献

[1] 李士通，庄心良 . 局部麻醉药 [M]. 上海：世界图书出版公司，2009：5.

[2] 刘晓锋，黄克建，林翠梧，等 . 局部麻醉药检测方法研究进展 [A]// 中国化学会 . 公共安全中的化学问题研究进展（第二卷）[M]. 2011：405-409.

[3] 张晓楠，张延凤，张贵和 . 高效液相色谱法同时测定人血浆中的丁卡因、普鲁卡因、利多卡因和布比卡因 [J]. 中国临床药学杂志，1999，8（S1）：52-53.

[4] 田玉平，顾玲玲 . 气相色谱 - 质谱联用法测定乳液化妆品中的苯唑卡因 [J]. 上海计量测试，2015，42（5）：10-11.

[5] 许银玉 . 化妆品中激素的危害与检测 [J]. 化工管理，2018（16）：38-39.

[6] 金焱 . FDA 警告局部用麻醉剂的不良事件 [J]. 国外药讯，2007（7）：41.

[7] 李玲，王生俊 . 局麻药的不良反应 [J]. 北方药学，2010，7（4）：26-27.

[8] 国家药典委员会 . 临床用药须知 • 化学药与生物制品卷 [S]. 2005：79.

[9] 国家食品药品监督管理总局 . 化妆品安全技术规范 [S]. 2015：78，289-293.

[10] 郭项雨，翟俊峰，马龙华，等 . 热解吸 - 电晕放电电离 - 离子迁移谱法现场快速筛查化妆品中 5 种禁用组分 [J]. 色谱，2019，37（2）：237-238.

[11] 欧阳晓玫，牟建平，滕宝霞，等 . 高效液相色谱法测定林可霉素利多卡因凝胶中盐酸利多卡因含量 [J]. 分析测试技术与仪器，2019，25（1）：39-42.

[12] 葛雪飞，陈丽红，王旭敏 . 交联透明质酸钠凝胶中盐酸利多卡因的 HPLC 测定 [J]. 广州化工，2017，45（17）：117-118.

[13] 王鼎乾，卜媛媛，李进 . 超高效液相色谱 - 四极杆飞行时间质谱联用仪快速筛查化妆品中 7 种禁用局部麻醉药 [J]. 今日药学，2019，29（11）：745-748.

[14] 王欢，胡磊，周明昊 . 固相萃取与液相色谱质谱联用技术测定化妆品中 7 种局部麻醉药 [J]. 科技广场，2017，40（9）：30-34.

（收稿日期：2020-12-24；修回日期：2021-03-05）

X 射线荧光光谱法快速比较黄精根茎及须根有害元素含量

唐敏[1]，韩伟丹[2]，王丽君[1]，赵丹[1]，徐芳辉[1*]（1. 益阳医学高等专科学校，湖南 益阳 413000；2. 北京安科慧生科技有限公司，北京 065500）

摘要：目的 利用 X 射线荧光光谱法快速检测黄精根茎及须根之间有害元素含量的差异，为黄精须根资源利用所面临的问题提供科学依据。**方法** 选取鸡头黄精根茎、须根及其须根附着背景土壤各 6 批，样品干燥粉碎后压片制样，采用 X 射线荧光光谱仪对其样品进行检测。**结果** 黄精根茎和须根之间多种元素含量存在显著性差异，须根 Cu、As、Pb、Cd 等有害元素的含量均明显超过根茎部位。**结论** 黄精须根中有害元素含量较根茎部位高，存在潜在的质量安全风险，须根作为新资源利用应谨慎对待；该方法具有操作简单、快速便捷、多元素同时分析等优势，可用于中药质量控制过程中元素分析研究。

关键词：黄精；根茎；须根；元素分析；X 射线荧光

中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1656-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.029

Rapid determination of hazardous elements in rhizome and fibrous root of *Polygonatum sibiricum* Red by X-ray fluorescence spectrometry

TANG Min[1], HAN Wei-dan[2], WANG Li-jun[1], ZHAO Dan[1], XU Fang-hui[1*] (1. *Yiyang Medical College*, *Yiyang Hunan* 413000; 2. *Beijing Ancoren Technology Co., Ltd*, *Beijing* 065500)

基金项目：湖南省普通高校青年骨干教师培养项目（编号：202001）。

作者简介：唐敏，男，博士，主要从事中药作用物质基础研究，E-mail：286045370@qq.com *通信作者：徐芳辉，女，硕士，教授，主要中药质量分析研究，E-mail：389099110@qq.com

Abstract: Objective To rapidly detect the content of hazardous elements in rhizome and fibrous root of *Polygonatum sibiricum* Red by X-ray fluorescence spectrometer, and to provide scientific basis for the utilization of fibrous root resources of Polygonatum. **Methods** Six groups of rhizome, fibrous root and soil attached to the roots of *Polygonatum* Red were selected. The samples were dried, crushed, and pressed into tablet preparations, and then detected by X-ray fluorescence spectrometer. **Results** There were significant differences in the cotent of elements between the rhizome and fibrous root. The content of Cu, As, Pb and Cd in the fibrous root was significantly higher than those in the rhizome. **Conclusion** The content of hazardous elements is higher in the fibrous root than in the rhizome, which indicates a potential quality and safety risk. X-ray fluorescence is rapid, simple, convenient, and can be used to control the quality of traditional Chinese medicine.

Key words: *Polygonatum sibiricum* Red; rhizome; fibrous root; elemental analysis; X-ray fluorescence

黄精的药用部位是滇黄精 *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl、黄精 *Polygonatum sibiricum* Red（又名鸡头黄精）和多花黄精 *Polygonatum. Cyrtonema*. Hua 的根茎 [1]，其须根一般都舍弃而未被利用，有研究表明多花黄精的须根有类似于其根茎的药效学作用 [2]，所以黄精须根有望被作为新资源进行开发利用。近年来，黄精药用价值和营养保健等价值不断被挖掘，其市场需求逐年增加 [3]，这也就导致了黄精资源的供需矛盾。随着 3 种黄精基原植物蕴藏量的急剧下降 [4]，须根的开发利用受到了广泛关注。但也存在一定的问题，例如多花黄精须根的灰分含量不符合药典标准 [5]，推测可能是由于须根与土壤接触面积大，矿物质沉积更多所致 [6]。此外，2020 年版《中国药典》实施以来，有害元素的检测成为食品和药品质量安全保障的主要控制方面之一，比较黄精须根和根茎之间有害元素含量差异的研究尤为必要，同时还可为黄精须根各元素富集作用以及元素转移能力的研究提供科学依据。

目前，有害元素定量分析常用原子荧光光度法、原子吸收光谱和电感耦合等离子体质谱进行检测 [7]，其灵敏度高、精密度好，但对前处理要求高，周期较长，分析费用高，获得的元素信息有限 [8-10]。X 射线荧光（X-ray fluorescence，XRF）光谱技术是一种利用样品对 X 射线的吸收来测定样品中元素的方法 [11]，其原理是随样品中元素及其含量的变化来进行定性或定量。目前，XRF 光谱技术因测定快速、测量范围广、操作简单、检测效率高、样品预处理简单、非破坏性以及谱线简单等优点，广泛应用于土壤、茶叶、材料等方面 [12]，同时也可用于中药的检测 [13]。XRF 可同时定性和定量测定检测样本内的多种元素，而且简单快捷，特别适合于复杂样品，因此越来越被重视，应用也越来越广泛 [14]。本研究采用高灵敏度 X 射线荧光光谱仪（PHECDA-PRO）分析黄精根系附着的背景土壤、药用部位根茎以及须根中有害元素及其他元素的含量，研究黄精须根作为新资源利用是否存在有害元素含量超标的安全风险。

1 材料与方法

1.1 仪器及试药

高灵敏度 X 射线荧光光谱仪（PHECDA-PRO，北京安科慧生公司）；769YP-15A 粉末压片机（天津市科器高新技术公司）；101-0 电热鼓风干燥箱（北京科伟永兴仪器有限公司）；A11 basic 破碎机（德国 IKA 公司）；AM420 行星式球磨仪（北京蚂蚁源科学仪器有限公司）。NCS141993 多元素标准溶液（100 μg·mL^{-1}，钢研纳克检测技术股份有限公司）；硼酸（纯度≥ 99.5%，北京现代东方科技发展有限公司）。

1.2 样品制备

6 批新鲜黄精样品，采自湖南益阳，采样时连同黄精植株地下部分的背景土壤一并采集，经益阳医学高等专科学校中药教研室徐芳辉老师鉴定为鸡头黄精 *Polygonatum sibiricum* Red（编号 1、2、3、4、5、6），留样保存在益阳医学高等专科学校中药教研室。将鸡头黄精根茎与须根分离，清洗干净，根茎切片后与须根置于烘箱中，65 ℃条件下烘干，烘干后用破碎机破碎成粉末，进一步用球磨机磨成细粉，过 80 目筛，取样 3 g 在压力 20 吨保压 1 min 条件下进行压片，完成制样（过程见图 1）。土壤样品取 200 g 放入破碎机中进行破碎，过筛（50 目），去除非代表性样品（如石子、其他植物须根等），继续均匀破碎，过 80 目筛得到土壤供试样品，混匀装入密封袋中，保存备用。分别取土壤样品 5 g 左右放入样品杯中，手动压实，完成制样，编号后置干燥器内保存，待测。

土壤质控样品（治金部天津地质研究院）；黄

芪质控样品（地球物理地球化学勘察研究所）。

1.3 样品检测

选取土壤质控样品（GSS-24）和黄芪质控样品（GBW10028）进行质控测定，测试时间 8 min/个，采用 Fast FP 算法作为分析方法。土壤和药材的仪器条件分别见表 1 及表 2。

表 1 土壤元素检测条件

Tab 1 Instrument operating conditions for the elements of soil

能量段	元素	管电压 /keV	管电流 /uA	测量时间
Mid-energy	Fe，Co，Cu，Zn，Ga，As，Pb，	40	50 ～ 300	80 s×2 times
High-energy	Se，Br，Rh，Sr，Y，Zr，Ag，Cd，In，Sn，Ba，La，Ce	70	50 ～ 170	90 s×2 times
Low-energy	Ti，V，Cr，Mn，Ni	15	50 ～ 170	100 s×1 time

表 2 鸡头黄精根茎、须根元素检测条件

Tab 2 Instrument operating conditions for the elements in rhizome and fibrous root of *Polygonatum sibiricum* Red

能量段	元素	管电压 /keV	管电流 /uA	测量时间
Mid-energy	Fe，Cu，Zn，Ga，As，Pb，Se	29	50 ～ 300	80 s×2 times
High-energy	Br，Rh，Sr，Y，Zr，Ag，Cd，In，Sn，Ba，La，Ce	70	50 ～ 170	90 s×2 times
Low-energy	Ca，P，S，Cl，Ti，V，Cr，Mn，Ni，Co	15	50 ～ 170	60 s×1 time

1.4 统计分析

实验数据以平均值表示，数据处理软件为 Graphpad prism 软件，采用 *t* 检验进行分析，$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。层次聚类分析加主成分分析采用 Simca-P 软件。

2 结果与分析

2.1 准确度试验

选取土壤质控样品（GSS-24）和黄芪药材质控样品（GBW10028）进行测定（暂无鸡头黄精药材质控样品），土壤和药材质控样品平行检测 3 次，检测结果见表 3。质控土壤样本的测定值与标准值之间的相差相对较小，质控药材样品的测定值与标准值之间的相差较大，可能是质控药材样本中组织之间元素含量差异大而造成的元素分布均匀性不高造成的。

表 3 土壤和药材质控样品部分元素含量检测结果 (mg·kg^{-1}，$n = 3$)

Tab 3 Determination of some elements in soil and medicinal materials quality control samples (mg·kg^{-1}，$n = 3$)

种类	元素	标准认定值	XRF 测定值	Er	种类	元素	标准认定值	XRF 测定值	Er
土壤质控样品	Cd	0.106	0.095	－10.38	黄芪质控样品	Cd	0	0	/
	As	15.80	15.57	－1.46		As	0.570	0.796	39.65
	Pb	40.00	39.05	－2.37		Pb	1.440	1.21	－15.98
	Cu	28.00	27.66	－1.216		Cu	8.500	10.74	26.35
	CaO	34.0	38.1	12.06		Ca	2.60	2.739	5.35
	Fe_2O_3	497	491.3	－1.15		Fe	1131	1021	－9.72
	Zn	81.00	77.86	－3.88		Zn	22.30	23.39	4.89
	K_2O	248	246	－0.80		K	70	80	14.29
	P	414.0	381.6	－7.82		Cl	420	437	4.05
	S	20.0	18.8	－6		S	19	21	10.53
	Cr	62.00	63.66	2.68		Cr	2.200	2.786	26.64
	Ni	24.00	25.05	4.38		Ni	2.260	2.148	－4.96
	Mn	717.0	699.2	－2.49		Mn	33	39	18.18

2.2 重复性试验

取 1 号鸡头黄精根茎部位作为样品压片 6 份，Cu、As、Pb、Cd 元素含量的 *RSD* 分别是 8.1%、14.3%、11.9%、6.6%，结果显示方法重复性较好（＜ 15%）。

2.3 精密度试验

取 1 号鸡头黄精根茎压片，平行检测 6 次，Cu、As、Pb、Cd 元素含量的 *RSD* 分别为 4.8%、11.3%、9.5%、6.6%，结果显示仪器精密度较好（＜ 15%）。

2.4 校准曲线的测定

选取 5 个土壤质控样品 GBW（E）07004、GBW（E）07003、GBW07409、GSS-13、GSS-16，依次完成测试，用于土壤样品检测校准曲线的制订；取适量 100 μg·mL^{-1} NCS141993 多元素标准溶液稀释制成质量浓度梯度为 0、0.2、0.5、1.0、2.0、5 μg·mL^{-1} 的溶液，依次完成测试，用于药材样品检测校准曲线的制订，其中 Cu、As、Pb、Cd 元素的校准曲线见表 4。

2.5 鸡头黄精样品检测

测试过程中鸡头黄精样品出峰情况及峰形拟合情况见图 2，可见元素出峰明显，且峰形拟合较好，背景扣除合理。

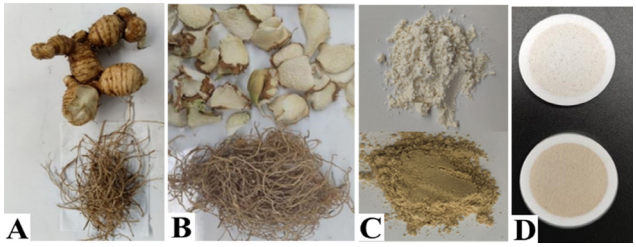


图 1　鸡头黄精样品制备过程

Fig 1　Sample preparation process of *Polygonatum sibiricum* Red

表 4　Cu、As、Pb、Cd 元素的校准曲线

Tab 4　Calibration curve for the Cu，As，Pb and Cd

元素	土壤		药材	
	校准曲线	r^2	校准曲线	r^2
Cu	$y = 1.029x - 3.565$	0.9997	$y = 0.8777x - 6.0655$	0.9980
As	$y = 0.9300x - 1.636$	0.9996	$y = 0.8733x - 0.0515$	0.9998
Pb	$y = 0.8984x + 1.569$	0.9995	$y = 1.213x + 0.1091$	0.9991
Cd	$y = 0.8903x - 0.1185$	0.9989	$y = 1.194x - 0.0192$	0.9981

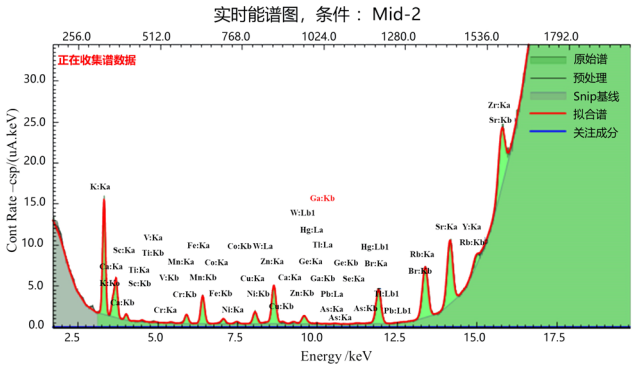


图 2　鸡头黄精样品谱图

Fig 2　Spectrogram of elements in the samples

鸡头黄精样品及背景土壤中的 Cu、As、Pb、Cd 4 种有害元素结果比较见图 3。鸡头黄精非药用部位须根中 4 种元素的含量均显著高于用药部位根茎。考虑到根茎和须根对土壤中有害元素的富集情况，列出了背景土壤中的 4 种有害元素，结果显示鸡头黄精根茎的 Cu、As、Pb、Cd 均显著低于背景土壤，但须根中的 Cu 和 Cd 的含量超出了背景土壤，说明须根对 Cu 和 Cd 元素的富集比较强。

对鸡头黄精根茎和须根 32 种元素的 XRF 检测数据进行聚类分析，层次聚类分析（见图 4A）结果显示根茎组和须根组能明显区分开来，形成两簇，包括 Cu、As、Pb、Cd 等多种元素在须根组中呈加强趋势。使用主成分分析（PCA）对根茎组和须根组进行降维分析发现（见图 4B），两个不同部位组之间存在明显差异，其趋势结果与热图一致，说明鸡头黄精须根中多种元素含量高于根茎部位。

2020 年版《中国药典》规定限值 Cu 为 20

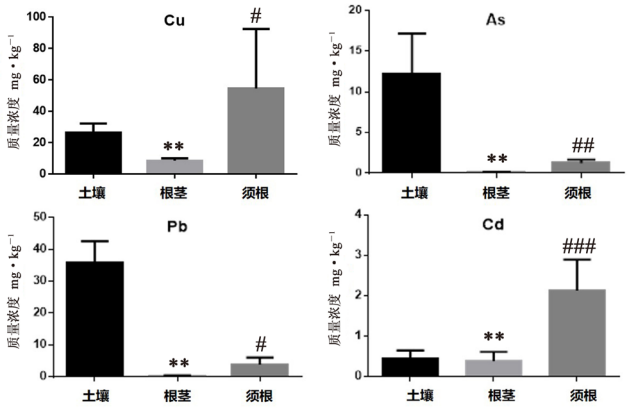


图 3　各供试品中 Cu、As、Pb、Cd 的比较

Fig 3　Cu，As，Pb，Cd in samples

注（Note）：与背景土壤比较，$^{**}P < 0.01$；与根茎比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.005$（Compared with the background soil，$^{**}P < 0.01$；compared with fibrous root，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$）。

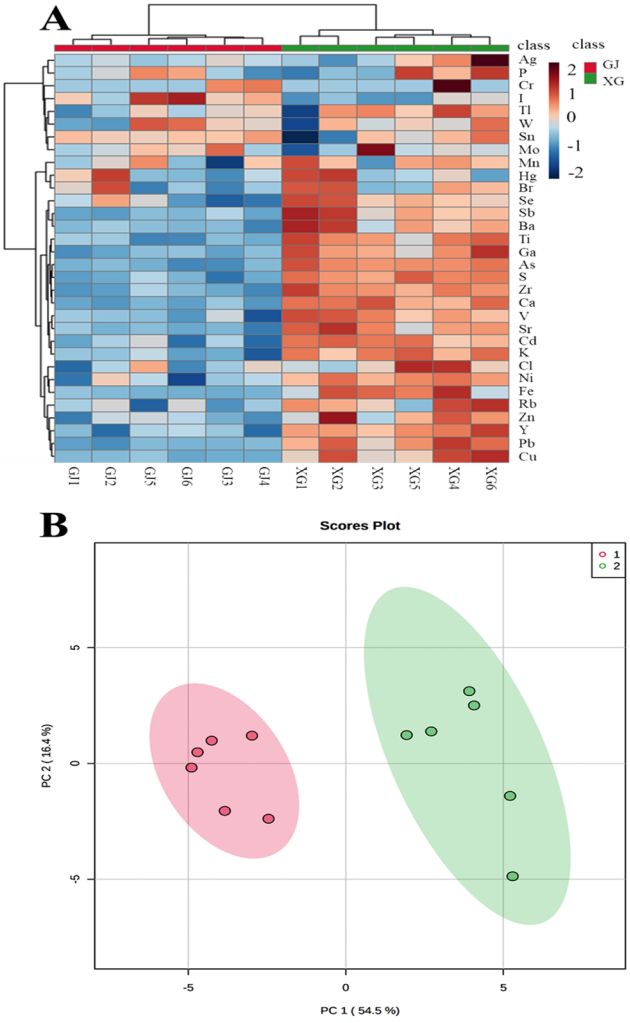


图 4　鸡头黄精根茎和须根元素含量的层次聚类分析（A）及主成分分析（B）图

Fig 4　Clustering（A）and PCA（B）analysis of element contents in rhizome and fibrous root of *Polygonatum sibiricum* Red

注（Note）：GJ 代表根茎，XG 代表须根（GJ represents rhizome，XG represents fibrous root）。

mg • kg^{-1}、As 为 2 mg • kg^{-1}、Pb 为 5 mg • kg^{-1}、Cd 为 1 mg • kg^{-1}。结合测试数据发现，6 批鸡头黄精根茎样品中 As、Pb、Cu、Cd 均在限值以内，满足要求。但须根的 Cu、Cd 均超过限值，1 号须根样品 As 超标，4 号须根样品 Pb 超标，表明鸡头黄精须根存在 Cu 和 Cd 含量明显超标情况，同时 As 和 Pb 存在超标的潜在风险。值得注意的是，被检测的样品土壤中 Cd 含量虽没有超出风险管控限值，鸡头黄精根茎部位也未有超出药典检测限值，但鸡头黄精须根样品中表现出明显的 Cd 含量超标。

3 讨论

随着黄精需求量的逐渐增大，黄精的价格逐年攀升，其药材资源量匮乏问题日益凸显。黄精的须根属于非药用部位，但其所含成分及药效与药用部位根茎极其相似，有可能被作为新资源加以开发利用。考虑到须根对重金属元素的富集可能高于其他器官，如胡萝卜须根 Cd 含量明显高于其块根含量 [15]，黄精须根的有害元素含量分析显得尤为必要。本研究结果显示鸡头黄精须根的有害元素含量明显高于根茎，其中全部须根样品 Cu、Cd 均超过限值，部分须根样品 As、Pb 超出限值，所以鸡头黄精须根存在潜在的安全风险，在作为新资源开发时须持谨慎态度。在本试验中，由于有害重金属元素 Hg 在药材质控样品黄芪中没有检出，且 XRF 对 Hg 元素的检测稳定性不强，所以本研究中 Hg 检测结果未被列出分析，但会在后续的研究中结合原子吸收光谱和电感耦合等离子体质谱对其进行检测分析。本研究结果还显示多种元素在土壤样本中的均一性大于药材样本，推测其原因与药材中不同组织对各元素富集的能力强弱有关。

在药材样品制备过程中，粉末颗粒粗细程度对实验结果影响较大，建议用球磨机处理药材粉末以达到较好的均匀性。为了防止其他外部金属元素干扰，本实验过程中采用了陶瓷刀作为破碎工具组件，虽然暂无相关报道，但在以后的研究中也会对该因素进行考察。XRF 光谱法检测过程中，样品处理阶段无需微波消解，直接粉末制样，可为中药材质量实时分析提供一种快速的检测手段 [16]。

参考文献

[1] 中国药典 2015 版 . 一部 [S]. 2015：319.

[2] 王曙东，费建红，宋炳生 . 黄精根茎与须根的药效学研究 [J]. 中草药，2002，33（6）：531-533.

[3] 任仙樱 . 中药材黄精产业化经营发展的研究 [D]. 合肥：安徽农业大学，2016.

[4] 苏文田，刘跃钧，蒋燕锋，等 . 黄精产业发展现状与可持续发展的建议 [J]. 中国中药杂志，2018，43（13）：2831-2835.

[5] 陈怡，姚云生，陈松树，等 . 多花黄精不同龄须根药材质量研究 [J]. 山地农业生物学报，2019，38（6）：61-63，79.

[6] 郑礼胜，牛永涛，李丽丽，等 . 白术主根及须根的品质比较 [J]. 中草药，2009，40（S1）：262-265.

[7] 韩旭，骆骄阳，刘秋桃，等 . 矿物药中重金属与有害元素的形态及价态研究进展 [J]. 中国中药杂志，2015，40（23）：4552-4559.

[8] 牟锟 . 微波消解 - 原子吸收光谱法、原子荧光光谱法测定锌精矿中锌、镉及汞含量 [D]. 石河子：石河子大学，2014.

[9] 许兰淑，周金池 . 原子吸收光谱法测定环境及食品样品中痕量元素的样品前处理方法的研究进展 [J]. 理化检验（化学分册），2016，52（2）：244-248.

[10] 陈波，刘洪青，邢应香 . 电感耦合等离子体质谱法同时测定地质样品中锗硒碲 [J]. 岩矿测试，2014，33（2）：192-196.

[11] Gazulla MF，Rodrigo M，Vicente S，et al. Methodology for the determination of minor and trace elements in petroleum cokes by wavelength-dispersive X-ray fluorescence（WD-XRF）[J]. Xray Spectrom，2010，39（5）：321-327.

[12] 方萍，邹雯，史先肖，等 . X 射线荧光光谱法快速测定防风中的金属元素含量 [J]. 药物分析杂志，2017，37（7）：1280-1285.

[13] Anna F，Marzanna K，Marcin C，et al. Elemental analysis of medicinal herbs and dietary supplements [J]. Anal Lett，2015，48（16）：2626-2638.

[14] Marguí E，Queralt I，Hidalgo M. Application of X-Ray fluorescence spectrometry to determination and quantitation of metals in vegetal material [J]. Trends Analyt Chem，2009，28（3）：362-372.

[15] 汤惠华 . 厦门市常见蔬菜镉的累积特性及其污染调控措施研究 [D]. 厦门：厦门大学，2012.

[16] 孙琳，梁鹏晨，严铸云，等 . 六种钙类矿物药元素谱的 X 射线荧光光谱法无标样分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（9）：70-76.

（收稿日期：2021-04-24；修回日期：2021-07-20）

复方感冒灵颗粒多指标成分测定方法的建立及综合质量评价

章泽恒[1]，李鹏辉[2]，曾文文[2]，陈开义[3]，吴艳[2]，佘延骄[3]，彭艳梅[2*]（1. 湖南省药品审评认证与不良反应监测中心，长沙 410013；2. 湖南省中医药研究院，长沙 410013；3. 三金集团湖南三金制药有限责任公司，湖南 常德 415000）

摘要：目的 建立 HPLC 法测定复方感冒灵颗粒中对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏、蒙花苷的含量。**方法** 对乙酰氨基酚采用 Welchrom C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相水（含 0.5% 磷酸和 0.4% 三乙胺溶液）- 乙腈（94∶6）；流速 1.0 mL • min^{-1}；检测波长 244 nm；柱温 30 ℃。咖啡因和马来酸氯苯那敏采用 Sepax Amethyst C_{18}-H 色谱柱（250 mm×4.6mm，5 μm）；流动相水（含 0.5% 磷酸和 0.4% 三乙胺溶液）- 乙腈（93∶7）；流速 1.0 mL • min^{-1}；检测波长 264 nm；柱温 30 ℃。蒙花苷采用 Welchrom C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相甲醇 - 水 - 冰醋酸（26∶23∶1）；流速 1.0 mL • min^{-1}；检测波长 334 nm；柱温 30 ℃。**结果** 4 种成分在各自对应的线性浓度范围内与峰面积线性关系良好（r 均≥ 0.9991）；平均回收率在 97.08% ～ 104.37%，*RSD* 在 0.50% ～ 3.8%。10 批复方感冒灵颗粒的综合评价函数 f 值在－ 5.76 ～－ 5.26，*RSD* 为 3.7%。**结论** 该方法准确、重复性良好，可用于复方感冒灵颗粒中 4 种成分含量的测定，综合质量评价表明 10 批次复方感冒灵颗粒质量稳定可控。

关键词：复方感冒灵颗粒；高效液相色谱；含量测定；综合质量评价
中图分类号：R917 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1661-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.030

Multiple content determination of compoumd Ganmaoling granules and comprehensive quality evaluation

ZHANG Ze-heng[1], LI Peng-hui[2], ZENG Wen-wen[2], CHEN Kai-yi[3], WU Yan[2], SHE Yan-jiao[3], PENG Yan-mei[2*] (1. *Hunan Center for Drug Evaluation and ADR Monitoring, Changsha* 410013; 2. *Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha* 410013; 3. *Sanjin Group Hunan Sanjin Pharmaceutical Co. Ltd., Hunan Changde* 415000)

Abstract: Objective To establish an HPLC method to determine the content of paracetamol, caffeine, chlorpheniramine maleate and linarin in compound Ganmaoling granules. **Methods** Welchrom C_{18} column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used to detected paracetamol with water (containing 0.5% phosphoric acid and 0.4% triethylamine)-acetonitrile (94∶6) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL • min^{-1}, the detection wavelength was 244 nm, and the column temperature was 30 ℃. Sepax Amethyst C_{18}-H column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used to detected caffeine and chlorpheniramine maleate with water (containing 0.5% phosphoric acid and 0.4% triethylamine)-acetonitrile (93∶7) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL • min^{-1}, the detection wavelength was 264 nm, and the column temperature was 30 ℃. Welchrom C_{18} column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used to detected linarin with methanol-water-glacial acetic acid (26∶23∶1) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL • min^{-1}, the detection wavelength was 334 nm, and the column temperature was 30 ℃. **Results** All the 4 components showed good linearity. The average recovery was at 97.08% － 104.37%, *RSD* was at 0.50% － 3.8% (n ＝ 9). The f value of comprehensive evaluation function of 10 batches compound Ganmaoling granules was

基金项目：2020 年湖南省自然科学基金项目（No.2020JJ9041）；2021 年湖南省中医药管理局一般课题（No.2021098）。
作者简介：张泽恒，男，副主任中药师，主要从事药品生产研制的核查工作，E-mail：719563428@qq.com *通信作者：彭艳梅，女，博士，研究员，主要从事中药新药研究，E-mail：271853145@qq.com

between －5.76 ～ －5.26, and *RSD* was 3.7%. **Conclusion** The method is accurate and repeatable, which can be used for the determination of 4 components in compound Ganmaoling granules. Comprehensive quality of the 10 batches of samples is stable and controllable.

Key words: compound Ganmaoling granule; HPLC; content determination; comprehensive quality evaluation

复方感冒灵颗粒由山银花、野菊花、三叉苦、五指柑、南板蓝根、岗梅 6 味中药和对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏 3 种化药制成的中西药复方制剂，具有辛热解表、清热解毒的作用，主要用于治疗感冒发热、头痛、咳嗽等症状。现行药品标准中仅以薄层和滴定法对成品进行质量控制[1]，未对方中所含主要化学成分进行定性定量分析，且滴定法操作步骤相对繁琐，重现性差，难以全面准确地控制该药品质量。

目前针对复方感冒灵颗粒中 3 种化药成分含量的分析研究较多，或检测 1 种[2]或同时检测 3 种[3-6]，但由于对乙酰氨基酚含量远远高于咖啡因和马来酸氯苯那敏，同时检测易引起相对误差。本研究通过分析制剂处方中各有效成分[2-7]，着眼于对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏和野菊花的指标性成分蒙花苷，将标示量较高的对乙酰氨基酚和咖啡因、马来酸氯苯那敏分开检测，将中药成分蒙花苷单独检测，建立 3 种定量分析方法，并对高效液相色谱法进行方法学验证，通过综合质量评价分析方法，对连续 10 批大生产的复方感冒灵颗粒含量检测数据进行统计分析，以考察成品质量的稳定性，该方法可为复方感冒灵颗粒的质量控制提供有益思路。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent Technologies 1260 Infinity Ⅱ 高效液相色谱仪（美国安捷伦公司）；LC-20AT 型高效液相色谱仪（日本岛津公司）；XPE-105 电子分析天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）；Quintix224-1CN 电子分析天平 [赛多利斯科学仪器（北京）有限公司]；TD2102 电子天平（余姚市金诺天平仪器有限公司）；HH 恒温水浴锅（江苏金坛市中大仪器厂）；SB-5200D 超声波清洗机（宁波新芝生物科技有限公司）。

1.2 材料

蒙花苷（批号：111528-201710，含量：96.6%）、对乙酰氨基酚（批号：100018-201610，含量：99.9%）、咖啡因（批号：171215-201512，含量：99.9%）、马来酸氯苯那敏（批号：100047-201507，含量：99.7%）（对照品，中国食品药品检定研究院）；乙腈、甲醇（色谱纯，美国 Sigma 公司）；水为怡宝纯净水；其余试剂均为分析纯。复方感冒灵颗粒（批号为 200501 ～ 200510，规格：14 g/ 袋，三金集团湖南三金制药有限责任公司）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 对乙酰氨基酚 色谱柱：Welchrom C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：水（含 0.5% 磷酸和 0.4% 三乙胺溶液）- 乙腈（94∶6）；流速：1.0 mL·min^{-1}；检测波长：244 nm；柱温：30 ℃；进样量：20 μL。理论板数按对乙酰氨基酚峰计算应不低于 3000。

2.1.2 咖啡因和马来酸氯苯那敏 色谱柱：Sepax Amethyst C_{18}-H（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：水（含 0.5% 磷酸和 0.4% 三乙胺溶液）- 乙腈（93∶7）；流速：1.0 mL·min^{-1}；检测波长：264 nm；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。理论板数按马来酸氯苯那敏峰计算应不低于 4000。

2.1.3 蒙花苷 色谱柱：Welchrom C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇 - 水 - 冰醋酸（26∶23∶1）；流速：1.0 mL·min^{-1}；检测波长：334 nm；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。理论板数按蒙花苷峰计算应不低于 3000。

2.2 对照品溶液的制备

2.2.1 对乙酰氨基酚 精密称取对乙酰氨基酚对照品适量，加水制成 103.2966 μg·mL^{-1} 的对照品储备液，再稀释得 41.3186 μg·mL^{-1} 的对照品溶液。精密量取对照品储备液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 置 5 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，作为系列对照品溶液。

2.2.2 咖啡因和马来酸氯苯那敏

① 咖啡因：精密称取咖啡因对照品适量，加流动相制成 106.4934 μg·mL^{-1} 的对照品储备液。分别精密量取咖啡因对照品储备液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 置 5 mL 量瓶中，加流动相稀释至刻度作为系列对照品溶液。

② 马来酸氯苯那敏：精密称取马来酸氯苯那敏对照品适量，加流动相制成 45.1442 μg • mL^{-1} 的对照品储备液。分别精密量取马来酸氯苯那敏对照品储备液 1.0、2.0、3.0、5.0、7.0、10.0 mL 置 10 mL 量瓶中，加流动相稀释至刻度，作为系列对照品溶液。

另外，精密称取咖啡因、马来酸氯苯那敏对照品适量，加流动相制成质量浓度分别为 44.6553、40.1791 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.2.3 蒙花苷　精密称取蒙花苷对照品适量，加甲醇制成 135.4332 μg • mL^{-1} 的对照品储备液，再稀释得到 27.0886 μg • mL^{-1} 的对照品溶液。分别精密量取对照品储备液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 置 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，作为系列对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 对乙酰氨基酚　取本品适量，研细，取约 5.0 g，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加入流动相适量，超声（300 W，40 kHz）处理 10 min，取出放冷，加流动相定容至刻度，摇匀，滤过，精密量取续滤液 2 mL 置 50 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.3.2 咖啡因和马来酸氯苯那敏　取本品适量，研细，取约 2 g，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加入流动相适量，超声（300 W，40 kHz）处理 30 min，取出，放冷，加流动相定容至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.3.3 蒙花苷　取本品适量，研细，取约 1.0 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 25 mL，称定重量，超声（300 W，40 kHz）处理 30 min，取出放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.4 阴性样品溶液的制备

按复方感冒灵颗粒处方和制备工艺分别制备缺对乙酰氨基酚、缺咖啡因和马来酸氯苯那敏、缺野菊花的阴性样品，并分别按“2.3”项下方法制成 3 种阴性样品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性　分别取对乙酰氨基酚、咖啡因和马来酸氯苯那敏、蒙花苷的对照品溶液，供试品溶液，阴性样品溶液，按“2.1”项下色谱条件进行测定，结果见图 1，表明 3 种测定方法下阴性样品均无干扰。

2.5.2 线性范围　精密吸取“2.2”项下 4 种线性溶液，按“2.1”项下色谱条件进行测定，记录各峰面积。以对照品质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标进行线性回归，得回归方程，结果见表 1。

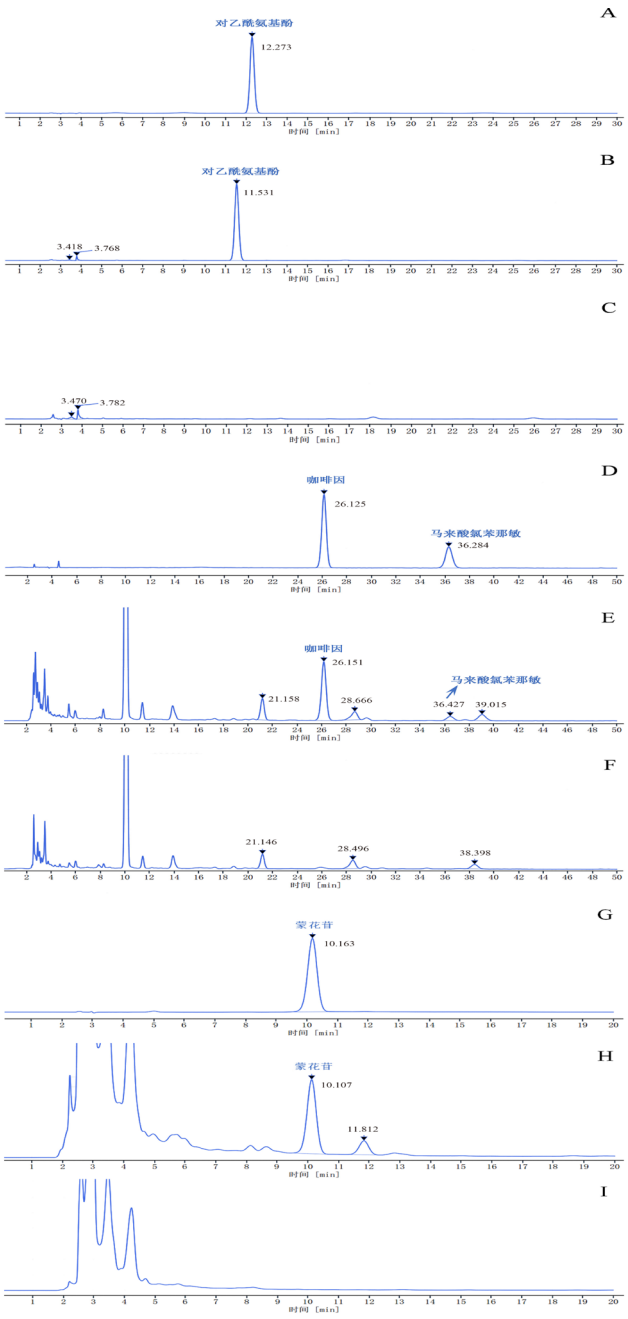


图 1　复方感冒颗粒专属性考察结果

Fig 1　Specificity inspection of compound Ganmaoling granule

A、D、G. 对照品（reference substance）；B、E、H 供试品（test substance）；C、F、I. 阴性样品（negative sample）

表 1　4 种指标成分的线性范围考察结果

Tab 1　Linearity of 4 index components

成分	回归方程	相关系数	线性范围 /（μg • mL^{-1}）
对乙酰氨基酚	$Y = 85.30X + 21.03$	1.000	10.33 ～ 103.30
咖啡因	$Y = 30.65X + 5.668$	1.000	10.65 ～ 106.49
马来酸氯苯那敏	$Y = 12.74X - 2.004$	1.000	4.51 ～ 45.14
蒙花苷	$Y = 9.413X + 10.24$	0.9991	6.77 ～ 67.72

2.5.3 精密度 取复方感冒灵颗粒供试品适量，按“2.3”项下方法制备 3 种供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，连续进样 6 次，记录各峰面积，计算得到对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏、蒙花苷峰面积 *RSD* 分别为 0.71%、0.38%、0.81%、0.76%，表明仪器精密度良好。

2.5.4 重复性 按“2.5.3”项下方法制备供试品溶液 6 份并测定。结果对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏、蒙花苷含量平均值分别为 10.76、0.85、0.19、0.52 mg•g^{-1}，*RSD* 分别为 1.8%、1.1%、3.5%、0.42%，表明方法重复性良好。

2.5.5 中间精密度 按“2.5.3”项下方法制备供试品溶液 6 份并测定，考察不同设备、不同日期、不同分析人员条件下的中间精密度。结果 12 份供试品的对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏、蒙花苷含量平均值分别为 10.74、0.85、0.18、0.53 mg•g^{-1}，*RSD* 分别为 0.23%、0.72%、6.8%、2.0%，表明方法中间精密度良好。

2.5.6 稳定性 取“2.5.3”项下各供试品溶液，分别于 0、2、4、6、8 h 进行测定，记录各峰面积。结果对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏、蒙花苷峰面积 *RSD* 分别为 0.32%、0.45%、0.85%、0.20%，说明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

2.5.7 加样回收试验

① 对乙酰氨基酚：取同一批号已知含量的复方感冒灵颗粒 9 份，按样品中已知含量的 50%、100%、150% 加入对照品适量，按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液（取样量减半），进样测定。

② 咖啡因、马来酸氯苯那敏、蒙花苷：分别配制质量浓度为 1283.715、285.5408、474.4992 μg•mL^{-1} 的咖啡因、马来酸氯苯那敏、蒙花苷对照品溶液。取同一批号已知含量的复方感冒灵颗粒 9 份，按样品中已知含量的 50%、100%、150% 加入对照品溶液适量，按“2.3”项下方法制备各供试品溶液（取样量减半），进样测定。

结果对乙酰氨基酚低、中、高浓度的平均加样回收率分别为 100.67%（*RSD* = 0.85%）、98.02%（*RSD* = 1.6%）、97.08%（*RSD* = 0.63%）；咖啡因低、中、高浓度的平均加样回收率分别为 104.37%（*RSD* = 0.71%）、104.03%（*RSD* = 0.81%）、104.25%（*RSD* = 0.80%）；马来酸氯苯那敏低、中、高浓度的平均加样回收率分别为 100.92%（*RSD* = 3.2%）、102.61%（*RSD* = 1.9%）、102.16%（*RSD* = 0.50%）；蒙花苷低、中、高浓度的平均加样回收率分别为 102.01%（*RSD* = 3.8%）、100.14%（*RSD* = 1.8%）、97.30%（*RSD* = 0.96%）。

2.6 样品含量测定结果

取 10 批复方感冒灵颗粒，制备供试品溶液，进样测定，记录各峰面积，计算样品中对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏、蒙花苷的含量，结果见表 2。

表 2 10 批复方感冒灵颗粒的含量测定结果 (mg•g^{-1}，*n* = 2)

Tab 2 Content determination of 10 batches of compound Ganmaoling granules (mg•g^{-1}，*n* = 2)

批号	对乙酰氨基酚	咖啡因	马来酸氯苯那敏	蒙花苷
200501	11.96	0.90	0.18	0.60
200502	11.99	0.91	0.19	0.57
200503	11.93	0.91	0.18	0.54
200504	11.99	0.87	0.19	0.54
200505	11.83	0.90	0.18	0.59
200506	11.87	0.88	0.18	0.54
200507	12.06	0.86	0.19	0.56
200508	12.68	0.86	0.18	0.60
200509	12.78	0.87	0.18	0.52
200510	12.74	0.87	0.18	0.51

复方感冒灵颗粒规格为 14 g/ 袋，其中对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏的标示量分别为 168 mg、11.998 mg、2.674 mg。从表 2 的结果可知，实测每袋含对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏的均值为 170.57 mg、12.38 mg、2.58 mg，分别为标示量的 101.53%、103.21%、96.48%。符合标准中对乙酰氨基酚、咖啡因应为标示量的 85% ～ 115%、马来酸氯苯那敏应为标示量的 80% ～ 120% 的要求。标准中规定每袋含蒙花苷不得少于 3.96 mg，从表 2 的 10 批含量测定结果可知，实测每袋蒙花苷含量在 7.07 ～ 8.46 mg，均符合要求。

2.7 综合质量评价分析

采用 SPSS 18.0 软件，将对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏和蒙花苷含量测定结果进行主成分分析 [8-9]，提取特征值≥ 1 的前两个主成分，方差的累积贡献率达到 73.547%，说明能代表原始数据大部分的信息。主成分的主要信息见表 3，X_1 ～ X_4 分别代表对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏、蒙花苷的含量。

根据特征向量，得到两个主成分的线性组合表达式为：

$$Z_1 = -0.812X_1 + 0.853X_2 - 0.033X_3 + 0.636X_4$$

$$Z_2 = -0.423X_1 - 0.109X_2 + 0.978X_3 - 0.054X_4$$

再以每个主成分的贡献率作为权数，构建综合评价函数：

$$f = 0.460\,32Z_1 + 0.275\,15Z_2$$

表 3　主成分的特征值、方差累积贡献率和特征向量值

Tab 3　Eigenvalue，variance accumulated contribution rate，and eigenvector of principal component analysis

主成分	特征值	方差的贡献 /%	方差的累积贡献率 /%	特征向量			
				X_1	X_2	X_3	X_4
1	1.841	46.032	46.032	− 0.812	0.853	− 0.033	0.636
2	1.101	27.515	73.547	− 0.423	− 0.109	0.978	− 0.054

将每个样品的主成分得分计算出后，代入综合评价函数，计算 *f* 值。10 批复方感冒灵颗粒 *f* 值分别为 − 5.32、− 5.34、− 5.32、− 5.36、− 5.26、− 5.30、− 5.39、− 5.69、− 5.76、− 5.74，均值为 − 5.45，*RSD* 为 3.7%。综合质量评价函数结果表明 10 批大生产复方感冒灵颗粒质量稳定可控。

3　讨论

3.1　流速的选择

分别在 0.9、1.0、1.1 mL • min $^{-1}$（柱温均为 30 ℃）流速下进行耐用性考察，结果表明流速对 3 种含量测定方法均无明显影响，因此流速均选择液相的普适条件 1.0 mL • min $^{-1}$。

3.2　柱温的选择

分别在 25、30、35 ℃（流速均为 1.0 mL•min $^{-1}$）柱温下进行耐用性考察，结果表明柱温对蒙花苷、对乙酰氨基酚含量测定无明显影响，而在 35 ℃时，马来酸氯苯那敏与杂质峰分不开，因此柱温选择液相的普适条件 30 ℃。

3.3　小结

本研究建立了复方感冒灵颗粒中对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏和蒙花苷 4 种指标成分含量测定方法，方法学考察表明专属性、重现性、稳定性等均较好，以这 4 种指标成分检测数据作为评价依据，采用客观赋权评价法进行综合质量评价分析，根据指标之间的相关关系和各项指标的变异系数来确定权重，避免人为的主观因素干扰，能更加客观地评价复方感冒灵颗粒的整体质量 [10-11]。

参考文献

[1] ZGB2017-38. 复方感冒灵颗粒（复方感冒灵茶）[S]. 北京：国家食品药品监督管理局，2017.

[2] 曾环思，钟彩妮 . 复方感冒灵颗粒中马来酸氯苯那敏的定量分析方法研究 [J]. 现代医药卫生，2013，29（7）：981-982，985.

[3] 张黎莉，吴昱景 . 双波长 HPLC 法同时测定感冒灵胶囊中对乙酰氨基酚、马来酸氯苯那敏、咖啡因 3 种化学药物和野菊花指标性成分蒙花苷的含量 [J]. 海峡药学，2016，28（7）：57-61.

[4] 廖文榕 . HPLC 法同时测定感冒灵颗粒中对乙酰氨基酚、咖啡因和马来酸氯苯那敏的含量 [J]. 海峡药学，2015，27（3）：76-78.

[5] 韩正洲，吴曙光，李琼娅，王静 . HPLC 测定感冒灵颗粒中对乙酰氨基酚、咖啡因和马来酸氯苯那敏的含量 [J]. 中国药学杂志，2010，45（3）：228-230.

[6] 谷亦平，乔戈，杨园 . HPLC 法测定感冒灵颗粒和复方感冒灵颗粒中对乙酰氨基酚、咖啡因和马来酸氯苯那敏含量 [J]. 药物分析杂志，2021，41（2）：338-344.

[7] 郭巧生，房海灵，申海进 . 不同产地野菊花中绿原酸、咖啡酸和蒙花苷含量 [J]. 中国中药杂志，2010，35（9）：1160-1163.

[8] 王丹丹，闫艳，张福生，等 . 远志药材 UPLC 指纹图谱及多指标性成分测定方法的建立 [J]. 中草药，2018，49（5）：1150-1159.

[9] 万燕晴，李震宇，李科，等 . 蒙古黄芪药材多指标综合评价研究 [J]. 山西医科大学学报，2015，46（3）：234-239.

[10] 彭锐，吴大章，卫莹芳，等 . 川党参药材质量化学成分多指标综合评价研究 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2009，11（2）：274-277.

[11] 潘雯婷，张丽艳，李燕，等 . 主成分分析法对贵州石吊兰药材的综合评价研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18（20）：78-80.

（收稿日期：2020-09-30；修回日期：2021-06-07）

高效液相色谱法同时测定骨炎消方中 8 种有效成分的含量

李田洋[1]，杨婷婷[1]，张琪[1]，王宝娟[2]，郑曙光[2*]（1. 贵州中医药大学，贵阳 550025；2. 贵州中医药大学第一附属医院，贵阳 550002）

摘要：目的 建立 HPLC 法同时测定骨炎消方中原儿茶酸、绿原酸、原儿茶醛、咖啡酸、表儿茶素、柚皮苷、淫羊藿苷、茴芹内酯的含量。**方法** 采用 AgilentSB-C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱，乙腈（A）-0.1% 磷酸水溶液（B）为流动相，梯度洗脱；进样量 10 μL；流速 0.8 mL·min^{-1}；检测波长 270 nm；柱温 28 ℃。**结果** 原儿茶酸、绿原酸、原儿茶醛、咖啡酸、表儿茶素、柚皮苷、淫羊藿苷和茴芹内酯在各自质量浓度范围内与峰面积线性关系良好（$r \geqslant 0.9993$）；平均加样回收率在 97.4% ～ 100.4%，*RSD* 在 0.72% ～ 2.9%。**结论** 该方法准确稳定，重复性好，可用于骨炎消方的质量控制。

关键词：高效液相色谱法；骨炎消方；含量测定
中图分类号：R917 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1666-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.031

Simultaneous determination of 8 effective components in Guyanxiao prescription by HPLC

LI Tian-yang[1], YANG Ting-ting[1], ZHANG Qi[1], WANG Bao-juan[2], ZHENG Shu-guang[2*] (1. *Guizhou University of Traditional Chinese Medicine*, *Guiyang* 550025; 2. *The First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine*, *Guiyang* 550002)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of protocatechuic acid, chlorogenic acid, protocatechualdehyde, caffeic acid, epicatechin, naringin, icariin, and pimpinellin in Guyanxiao prescription. **Methods** AgilentSB-C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column was used. The mobile phase consisted of acetonitrile (A)-0.1% phosphoric acid aqueous solution (B) with gradient elution, the sample injection volume was 10 μL, the volume flow was 0.8 mL·min^{-1}, the detection wavelength was 270 nm, and the column temperature was 28 ℃. **Results** Protocatechuic acid, chlorogenic acid, protocatechualdehyde, caffeic acid, epicatechin, naringin, icariin and pimpinellin had good linearities within respective ranges ($r \geqslant 0.9993$). The average recovery was 97.4% ～ 100.4%, and the *RSD* was 0.72% ～ 2.9%. **Conclusion** The method is accurate, stable, and reproducible, which can be used for the quality control of Guyanxiao prescription.

Key words: HPLC; Guyanxiao prescription; content determination

骨炎消方为贵州中医药大学第一附属医院临床经验方，由狗脊、透骨香、飞龙掌血、蜘蛛香、大血藤、小血藤、黑骨藤、鸡血藤、伸筋草、骨碎补、杜仲、淫羊藿等 12 味药材组成，具有消肿止痛、祛风除湿、舒筋活络、通气散血的功效。临床常用来治疗骨性关节炎、股骨头坏死等疾病，疗效显著[1-4]。方中大血藤、小血藤、黑骨藤、鸡血藤为藤本类植物，苗医认为这类植物细长蔓延与人体的筋脉相似，大都具有舒通筋脉和通气散血的作用[5]。鸡血藤具有补血的功用[6]，为软骨提供所必须的物质；杜仲、狗脊能补肾强骨，狗脊还可祛风除湿；蜘蛛香、透骨香能祛风除湿、表出毒邪，使机体祛除“外毒内乱”，恢复正常的状态，蜘蛛香还能理气和中、调理脾胃，使气血能够得到不断的

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81660823，No.81960914）。
作者简介：李田洋，男，在读硕士研究生，主要从事中医基础理论方面的研究，E-mail：asdxx@qq.com *通信作者：郑曙光，男，硕士研究生导师，教授，主要从事中医基础理论方面的研究，E-mail：332126632@qq.com

补充；飞龙掌血、伸筋草舒筋活络、祛风除湿、消肿解毒；淫羊藿、骨碎补补肾强骨，活血止痛。诸药合用，既能调节内乱，排除毒素又能打通筋脉，提供气、血，达到治愈疾病的目的。

本课题组前期已进行骨炎消方制备工艺及临床疗效研究[7-9]，尚未见其有效成分含量测定的报道。为了更有效地控制骨炎消方的质量，提高临床疗效，本研究建立 HPLC 法同时测定骨炎消方中原儿茶酸、绿原酸、原儿茶醛、咖啡酸、表儿茶素、柚皮苷、淫羊藿苷、茴芹内酯等 8 种成分的含量，以期为骨炎消方的质量评价提供科学依据，同时为民族民间验方药物制剂的进一步研发提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪（美国安捷伦公司）；超声波清洗器（上海乔跃电子有限公司，JOYN-10A）；水浴锅（上海双捷实验设备有限公司，DRHH-S8）；万分之一天平（梅特勒 - 托利多上海有限公司，ME204E）；十万分之一天平（日本岛津公司，ADW120D）；循环水式多用真空泵（郑州科达机械仪器设备有限公司，SHZ-111）。

1.2 试药

狗脊（批号：190501）、大血藤（批号：190301）、小血藤（批号：190601）、鸡血藤（批号：200301）、伸筋草（批号：190701）、骨碎补（批号：200401）、杜仲（批号：200501）、淫羊藿（批号：191101）饮片（购自贵州同济堂中药饮片有限公司、贵阳德昌祥药业有限公司、贵阳同仁堂药店）；飞龙掌血、蜘蛛香、黑骨藤、透骨香均（购自贵阳市万东桥药材市场），以上药材均经贵州中医药大学药学院王波讲师鉴定为正品。原儿茶酸（批号：H21J9Z64031）、绿原酸（批号：Y20A11K111541）、原儿茶醛（批号：TO1013FB14）、咖啡酸（批号：W16O10B100366）、表儿茶素（批号：K19J9R66088）、柚皮苷（批号：24N9Z75896）、淫羊藿苷（批号：T05D9B76755）、茴芹内酯（批号：Y01025SB14）对照品（上海源叶生物科技有限公司，纯度≥ 98%）；乙腈（色谱纯，TEDIA 天地试剂公司）；甲醇（色谱纯）、磷酸（优级纯）（国药集团化学试剂有限公司）；水为纯净水（杭州娃哈哈集团）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 AgilentSB-C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）为色谱柱，乙腈（A）-0.1% 磷酸水溶液（B）为流动相，梯度洗脱（0 ～ 15 min，18%A；15 ～ 16 min，19%A；16 ～ 30 min，33%A；30 ～ 33 min，35%A；35 ～ 50 min，48%A），流速：0.8 mL·min^{-1}；检测波长：270 nm；柱温：28 ℃。在此条件下，8 种成分分离度较好（见图 1）。

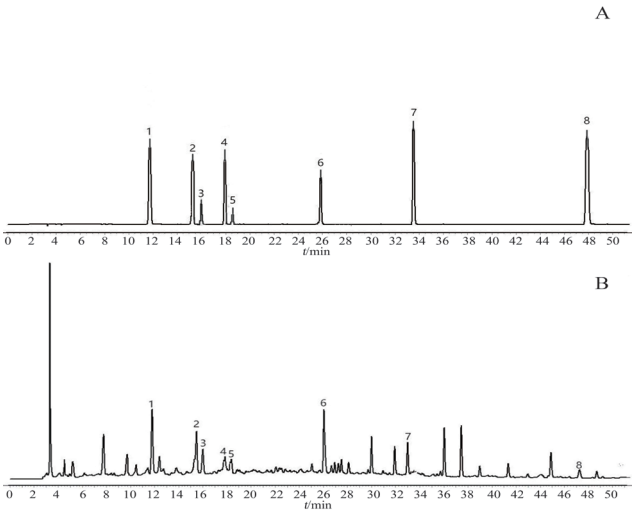


图 1 混合对照品溶液（A）和供试品溶液（B）的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of reference solution (A) and sample solution (B)

1. 原儿茶酸（protocatechuic acid）；2. 绿原酸（chlorogenic acid）；3. 原儿茶醛（protocatechualdehyde）；4. 咖啡酸（caffeic acid）；5. 表儿茶素（epicatechin）；6. 柚皮苷（naringin）；7. 淫羊藿苷（icariin）；8. 茴芹内酯（pimpinellin）

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取原儿茶酸、绿原酸、原儿茶醛、咖啡酸、表儿茶素、柚皮苷、淫羊藿苷、茴芹内酯对照品适量，用甲醇溶解并稀释成质量浓度分别为 0.382、0.264、0.182、0.292、0.16、0.298、0.494、0.846 mg·mL^{-1} 的对照品储备液，精密吸取各对照品储备液 1.0 mL，置 25 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，即得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

称取 12 味药材各 15 g，加 8 倍量水，浸泡 2 h 后煎煮 1 h，滤过，保留滤液Ⅰ；药渣再加入 6 倍量的水，煎煮 2 次，每次 0.5 h，滤过，得滤液Ⅱ；将滤液Ⅰ和滤液Ⅱ合并，搅拌，使其混合均匀后加热浓缩成浸膏，制作成浸膏干粉备用。取骨炎消浸膏干粉 2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇25 mL，称定重量，超声提取30 min，取出，放冷至室温，用甲醇补足减失的重量，摇匀，用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密称取对照品原儿茶酸 4.012 mg、绿原酸 3.134 mg、原儿茶醛 2.216 mg、咖啡酸2.564 mg、表儿茶素 1.786 mg、柚皮苷3.467

mg、淫羊藿苷 5.751 mg、茴芹内酯 6.847 mg，置于 50 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀。分别精密吸取上述混合对照品溶液 1、2、4、6、8、10 mL 置 10 mL 量瓶中加甲醇至刻度，摇匀。按“2.1”项下色谱条件测定，记录峰面积，以质量浓度（*X*）为横坐标，以峰面积（*Y*）为纵坐标进行线性回归，得回归方程，结果表明各化合物在相应范围内与峰面积线性关系良好，见表 1。

表 1 各种成分的线性关系

Tab 1 Linearity of various constituents

化学成分	回归方程	*r*	线性范围 /（μg • mL^{-1}）
原儿茶酸	$y = 153.3x + 4646.2$	0.9996	8.024 ～ 80.24
绿原酸	$y = 96.42x + 2157.1$	0.9995	6.268 ～ 62.68
原儿茶醛	$y = 284.8x + 4542.6$	0.9993	4.432 ～ 44.32
咖啡酸	$y = 43.30x + 879.5$	0.9998	5.128 ～ 51.28
表儿茶素	$y = 407.8x + 2418.5$	0.9995	3.572 ～ 35.72
柚皮苷	$y = 187.3x + 5060.9$	0.9998	6.034 ～ 69.34
淫羊藿苷	$y = 73.45x + 2691.5$	0.9995	11.5 ～ 115.0
茴芹内酯	$y = 71.66x + 3193.7$	0.9997	13.69 ～ 136.9

2.4.2 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μL，按“2.1”项下色谱条件连续测定 6 次，计算原儿茶酸、绿原酸、原儿茶醛、咖啡酸、表儿茶素、柚皮苷、淫羊藿苷、茴芹内酯色谱峰峰面积的 *RSD*（$n = 6$）分别为 1.5%、0.76%、1.6%、1.4%、1.5%、1.4%、1.4%、1.5%，表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取供试品溶液，分别于 0、4、8、12、24、48 h 进样，测得原儿茶酸、绿原酸、原儿茶醛、咖啡酸、表儿茶素、柚皮苷、淫羊藿苷、茴芹内酯色谱峰峰面积 *RSD* 分别为 1.9%、1.7%、1.4%、1.1%、1.9%、0.51%、1.3%、0.18%，表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 取同一批供试品 6 份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得原儿茶酸、绿原酸、原儿茶醛、咖啡酸、表儿茶素、柚皮苷、淫羊藿苷、茴芹内酯含量的 *RSD* 分别为 1.3%、1.5%、1.8%、1.2%、0.79%、1.9%、0.81%、2.9%，表明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收试验 精密称定同一批骨炎消方浸膏粉粉末 6 份，各约 1 g，分别精密加入混合对照品溶液（原儿茶酸 1.1005 mg • mL^{-1}、绿原酸 0.9546 mg•mL^{-1}、原儿茶醛 0.4112 mg•mL^{-1}、咖啡酸 0.1708 mg • mL^{-1}、表儿茶素 0.1597 mg • mL^{-1}、柚皮苷 0.9963 mg • mL^{-1}、淫羊藿苷 0.8225 mg•mL^{-1}、茴芹内酯 0.1224 mg•mL^{-1}）各 1 mL，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，计算回收率，结果 8 种成分的平均回收率在 97.4% ～ 100.4%，*RSD* 在 0.72% ～ 2.9%，符合方法学要求。

2.4.6 样品的含量测定 按“2.3”项下方法制备 6 批供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，记录各成分的峰面积，计算含量，结果见表 2。

表 2 各成分含量测定结果 (mg • g^{-1}，$n = 6$)

Tab 2 Content determination of various constituent (mg • g^{-1}，$n = 6$)

批次	原儿茶酸	绿原酸	原儿茶醛	咖啡酸	表儿茶素	柚皮苷	淫羊藿苷	茴芹内酯
1	1.2138	0.9857	0.4231	0.1763	0.1642	1.1326	0.8875	0.1189
2	1.1789	1.0213	0.4678	0.1627	0.1769	1.2043	0.7896	0.0994
3	1.1688	1.1034	0.4421	0.1579	0.1809	1.1387	0.6992	0.0897
4	1.1987	0.9785	0.4318	0.1653	0.1735	0.9871	0.8139	0.1023
5	1.2013	0.9912	0.4265	0.1568	0.1566	1.1264	0.7683	0.1165
6	1.2254	0.1035	0.3982	0.1811	0.1677	1.0046	0.8238	0.1264

根据《中国药典》2020 年版一部 [10] 相关药材质量标准与 6 批药材测得结果，暂定每 1 g 骨炎消方浸膏中含原儿茶酸不少于 1.15 mg、绿原酸不少于 0.95 mg、原儿茶醛不少于 0.38 mg、咖啡酸不少于 0.15 mg、表儿茶素不少于 0.15 mg、柚皮苷不少于 0.95 mg、淫羊藿苷不少于 0.68 mg、茴芹内酯不少于 0.085 mg。

3 讨论

3.1 指标成分的确定

骨炎消方为民间收集的验方，对其研究主要集中在临床应用 [8-9] 及单味药材的报道 [11-17]，尚未建立质量控制标准。骨炎消方中狗脊、杜仲、伸筋草、蜘蛛香、黑骨藤含有的苯丙素类（绿原酸、咖啡酸）和酚类化合物（原儿茶酸、原儿茶醛）具有抗炎、抗风湿、镇痛作用 [11, 14, 18-21]；大血藤、透骨香具有良好的抗炎、止血、镇痛作用，其主要活性成分为绿原酸 [22-24]；鸡血藤中主要药效成分为黄酮类（表儿茶素），具有抗关节炎、改善血液循环等药理作用 [25]。骨碎补指标成分柚皮苷有抗炎、改善骨代谢作用，可促进成骨细胞增殖分化 [26]；淫羊藿中的淫羊藿苷可调节骨代谢平衡以增强骨密度及强度，同时可促进微血管修复

以改善股骨头局部血供[27]；飞龙掌血中丰富的香豆素类（茵芹内酯）成分对风湿性关节痛、出血等有良好的治疗作用[28]。结合骨炎消方临床上主要用于治疗骨性关节炎、类风湿关节炎、股骨头坏死等疾病，因此，选取原儿茶酸、绿原酸、原儿茶醛、咖啡酸、表儿茶素、柚皮苷、淫羊藿苷、茵芹内酯作为指标成分。

3.2 色谱条件优化

本研究考察了甲醇 -0.1% 磷酸 - 水、乙腈 -0.1% 磷酸水和乙腈 - 水的流动相体系及 25 ℃、28 ℃和 30 ℃三个柱温，当流动相为乙腈 -0.1% 磷酸水，柱温为 28 ℃时，分离度好，峰形好，基线稳定。比较了 30% 甲醇、60% 甲醇、90% 甲醇和甲醇的提取效果，结果甲醇提取效率高，杂质干扰小，峰形良好。研究了检测波长为 210 nm、254 nm、270 nm 和 310 nm 的色谱峰情况，当波长为 270 nm 时色谱峰分离情况良好，基线较平稳。

3.3 小结

本研究首次建立了 HPLC 法同时测定骨炎消方中原儿茶酸、绿原酸、原儿茶醛、咖啡酸、表儿茶素、柚皮苷、淫羊藿苷、茵芹内酯的含量，结果准确可靠，重复性好，可用于骨炎消方及其相关制剂的质量控制与评价。

参考文献

[1] 王兴桂，王政，郑曙光，等 . 苗药组方熏洗对家兔早期膝骨关节炎模型软骨细胞 Bax、Bcl-2 影响的实验研究 [J]. 中华中医药杂志，2014，29（2）：632-635.

[2] 王兴桂，郑曙光，周汉华，等 . 贵州苗族熏蒸疗法对早期 KOA 家兔软骨组织 IL-1、TNF-α 蛋白表达的影响 [J]. 贵阳中医学院学报，2017，39（6）：38-42，47.

[3] 郑曙光，徐航，薛林山 . 苗医熏蒸疗法治疗早期股骨头坏死 [J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18（9）：270-272.

[4] 齐健彤，郭玲，郑曙光 . 骨炎消巴布剂对小鼠抗炎作用实验研究 [J]. 亚太传统医药，2014，10（23）：12-13.

[5] 王世彪，郁俊文，张建军，等 . 骨痹威灵丸治疗骨性关节炎临床研究 [J]. 中国中医骨伤科杂志，2004，12（3）：43-44.

[6] 李运景 . 鸡血藤、大血藤考证 [J]. 中药材，2002，25（9）：669-671.

[7] 徐剑，郑曙光 . 正交试验优化骨炎消巴布剂的基质处方 [J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18（24）：39-41.

[8] 郑曙光，荣志斌，施文甫，等 . 苗药熏蒸验方对兔早期激素性股骨头坏死骨组织变化的影响 [J]. 中国药房，2012，23（27）：2506-2509.

[9] 王琳，王宝娟，郑曙光 . 骨炎消对 KOA 家兔滑膜组织病理学形态及炎性因子表达的影响 [J]. 亚太传统医药，2020，16（2）：12-16.

[10] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：20-21，172-173，184-185，235，267-268，340-341，385.

[11] 杨慧洁，吴琦，杨世海 . 金毛狗脊化学成分与药理活性研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2010，16（15）：230-234.

[12] 洪雅丹，张凌风，潘娉娉，等 . HPLC 法同时测定淫羊藿 - 骨碎补药对中 7 种成分 [J]. 中成药，2019，41（6）：1316-1321.

[13] 刘开萍，杨军，程盛勇，等 . HPLC 法同时测定蜘蛛香中 7 种成分含量 [J]. 中药材，2018，41（4）：922-924.

[14] 杨波，张建锋 . 苗药黑骨藤研究进展 [J]. 中国现代中药，2019，21（8）：1122-1126.

[15] 房士明，方刚，刘睿，等 . 飞龙掌血化学成分的研究进展 [J]. 国际药学研究杂志，2016，43（2）：239-248.

[16] 荆彦民，马瑞丽 . HPLC 同时测定大血藤中绿原酸、咖啡酸和香草酸的含量 [J]. 中国现代应用药学，2016，33（5）：592-595.

[17] 谢红，杨娟，王道平，等 . 透骨香药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中成药，2011，33（4）：549-552.

[18] 谢美萍，李兰，鲁安琪，等 . 狗脊中的酚酸及其苷类成分 [J]. 中草药，2016，47（2）：194-199.

[19] 任琴，徐康平，刘阳，等 . 伸筋草的化学成分研究 [J]. 中南药学，2020，18（3）：466-469.

[20] 冯晗，周宏灏，欧阳冬生 . 杜仲的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2015，20（6）：713-720.

[21] 付洋，程盛勇，郁林娜，等 . 一测多评法测定蜘蛛香中 9 个成分的含量 [J]. 药物分析杂志，2019，39（9）：1666-1672.

[22] 廖娜，黄光伟，唐红艳，等 . 大血藤醇提物抗炎镇痛和止血活性研究初探 [J/OL]. 广西植物：1-6[2021-02-25]. http：//kns. cnki. net/kcms/detail/45.1134. q. 20200902.1603.002. html.

[23] 何婷，赵怡程，李鹏跃，等 . 滇白珠抗炎镇痛活性部位的化学成分研究 [J]. 中草药，2017，48（17）：3469-3474.

[24] 陈青凤，刘佳，乔里，等 . 一测多评法测定透骨香中儿茶素、白珠树苷、滇白珠苷 A 的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19（18）：126-130.

[25] 刘晓艳，徐嵬，杨秀伟，等 . 鸡血藤黄酮类化学成分的分离与鉴定 [J]. 中国中药杂志，2020，45（6）：1384-1392.

[26] 谌顺清，梁伟，张雪妹，等 . 骨碎补化学成分和药理作用研究进展 [J/OL]. 中国中药杂志：1-12[2021-02-25]. https：//doi. org/10.19540/j. cnki. cjcmm. 20210222.602.

[27] 章晓云，李华南，陈跃平 . 淫羊藿苷防治股骨头坏死分子机制研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志，2020，26（11）：1694-1699.

[28] 周威，孙文博，曾庆芳，等 . 飞龙掌血的药学研究进展 [J]. 中华中医药杂志，2018，33（8）：3515-3522.

（收稿日期：2021-01-29；修回日期：2021-03-16）

综述

从心力衰竭治疗理念变化看血管紧张素受体脑啡肽酶抑制剂研究进展

陈晨[1, 2]，刘梅[2]，罗敏[1]，徐珽[1, 2*]（1. 四川大学华西医院临床药学部（药剂科），成都 610041；2. 四川大学华西药学院，成都 610041）

摘要：随着对心力衰竭的认识不断加深，其治疗理念也从传统的强心利尿扩血管理论发展到以阻断肾素 - 血管紧张素 - 醛固酮系统和交感神经系统为主的神经内分泌理论。本文旨在通过介绍心力衰竭治疗理念的变化，对心力衰竭治疗新药——血管紧张素受体脑啡肽酶抑制剂进行综述。

关键词：心力衰竭；治疗理念；血管紧张素受体脑啡肽酶抑制剂；沙库巴曲缬沙坦
中图分类号：R541.6 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1670-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.032

Research progress in angiotensin receptor-neprilysin inhibitor from the changing perspective of heart failure treatment

CHEN Chen[1, 2], LIU Mei[2], LUO Min[1], XU Ting[1, 2*] (1. *Department of Pharmacy*, *West China Hospital*, *Sichuan University*, *Chengdu* 610041; 2. *West China School of Pharmacy*, *Sichuan University*, *Chengdu* 610041)

Abstract: With the continuous understanding of heart failure, the treatment perspective of heart failure has also developed from raditional theory of cardiotonic, diuretic and vasodilative therapies to the neuroendocrine theory of blocking the renin-angiotensin-aldosterone system and the sympathetic nervous system. The article aims to expound the latest heart failure treatment drugs, angiotensin receptor-neprilysin inhibitor, through introducing the change in the treatment perspective of heart failure.

Key words: heart failure; treatment perspective; angiotensin receptor-neprilysin inhibitor; sacubitril/valsartan

心力衰竭（heart failure，HF）是指由各种原因造成心脏结构和功能的异常改变，使心脏收缩和 / 或舒张功能发生障碍，从而引起的一组复杂临床综合征 [1]，是各种心脏疾病的终末阶段。在《中国心力衰竭诊断与治疗指南》2018 年版中，依据左心室射血分数，心力衰竭可分为射血分数降低的心力衰竭（heart failure with reduced ejection fraction，HFrEF），射血分数保留的心力衰竭（heart failure with preserved ejection fraction，HFpEF）以及介于两者之间的射血分数中间值的心力衰竭（heart failure with mid-range ejection fraction，HFmrEF）。最新发表的流行病学数据显示，心力衰竭患者约占心血管疾病总人数的 5%[2]，中国 35 岁以上居民的心力衰竭患病率为 1.3%，现有心力衰竭患者约 890 万人 [3]，与 2000 年调查结果相比心力衰竭患者人数增加约 500 万 [4]。除此之外，心力衰竭还是全球唯一呈增长趋势的心脏疾病，对医疗保健造成了巨大压力 [5]。一项针对中国心力衰竭患者的横断面调查显示，心力衰竭相关药物的治疗费用约占患者每

基金项目：中国药学会科技开发中心科普项目（No.HX-H2004055）。
作者简介：陈晨，男，硕士研究生，主要从事药物应用与评价研究，E-mail：754192654@qq.com *通信作者：徐珽，男，主任药师，主要从事医院药学、临床药学及循证药学研究，E-mail：tingx2009@163.com

月收入的 10% ～ 20%[6]，同时中国也是中低收入发展中国家心力衰竭治疗费用最高的国家，占全球成本的 5.01%[5]。

中国老龄化社会进程的加速，势必会导致心力衰竭发病率升高，社会负担进一步加重。心力衰竭尤其是慢性心力衰竭（chronic heart failure，CHF）已成为影响中老年患者生活质量的重大因素，也是目前备受关注的心血管疾病之一。

半个世纪以来，心力衰竭的治疗理念发生了多次转变。从 20 世纪 50 年代提出的“肾脏灌注受损导致水钠潴留的心肾模式”，到 70 年代提出的“负荷增加的血液动力学异常模式”，再到 90 年代得益于临床研究的突破从而发展形成的“神经内分泌过度激活模式”[7]。本文将重点介绍“神经内分泌过度激活模式”下最新的心力衰竭治疗药物——血管紧张素受体脑啡肽酶抑制剂（angiotensin receptor-neprilysin inhibitor，ARNI），以期通过增加对 ARNI 类药物的认识，指导临床合理用药。

为了更加系统且全面地检索沙库巴曲缬沙坦在心力衰竭治疗领域的相关文献。笔者对 PubMed、CNKI、VIP 和 WangFang 等数据库进行检索，中文检索词为“心衰”“心力衰竭”“治疗理念”“血管紧张素受体脑啡肽酶抑制剂”“沙库巴曲缬沙坦”，英文关键词为“heart failure”“treatment concept”“angiotensin receptor-neprilysin inhibitor”“ARNI”“sacubitril/valsartan”，并进行总结分析，现综述如下。

1 心力衰竭治疗理念

不论是“肾脏灌注受损导致水钠潴留的心肾模式”，还是“负荷增加的血流动力学异常”理论，对于心力衰竭的解释都局限于症状[8]，随着研究的不断深入，医学工作者发现心力衰竭尤其是慢性心力衰竭与神经内分泌系统的过度激活密不可分。对心力衰竭治疗的认识也从强心利尿扩血管发展到了阻断肾素 - 血管紧张素 - 醛固酮系统（renin-angiotensin-aldosterone system，RASS）和交感神经系统（sympathetic nervous system，SNS）的神经内分泌过度激活理论。目前心力衰竭治疗的主要问题是心肌损伤后的心脏重塑[9]。血管紧张素转换酶抑制剂（ang-converting enzyme inhibitors，ACEI）、血管紧张素Ⅱ（AngⅡ）受体阻滞剂（angiotensin receptor blocker，ARB）和醛固酮受体拮抗剂（mineralocorticoid receptor antagonists，MRA）具有阻断 RASS 系统的作用，而β受体阻滞剂可以抑制 SNS 效应，除此之外，上述药物还可在一定程度上逆转心室重构，因此联合应用 ACEI/ARB，MRA 以及β受体阻滞剂成为了心力衰竭治疗的“金三角”[8]。

目前研究发现，在 RASS 和 SNS 系统过度激活的同时，其他系统如激肽系统（kallikrein-kinins system，KKs）和利钠肽系统（natriuretic peptides，NPs）也相应激活，并在一定程度上发挥拮抗 RASS 和 SNS 系统的作用[10]。

1.1 KKs 与心力衰竭治疗

激肽的治疗效果主要体现在其以舒张血管为主的生物学效应。研究表明激肽可在心力衰竭加重时促进一氧化氮（NO）和前列环素（PGI_2）形成，发挥保护心脏的作用[11]，这使其成为了潜在的心力衰竭治疗药物研究靶点。激肽主要在发挥生物效应的组织部位合成[10]，且在肾脏、心脏和主动脉中浓度较高[12]，这可能是激肽发挥局部治疗作用的基础。KKs 系统和 RASS 系统间存在交叉，一些研究表明血管紧张素转化酶（Ang-converting enzyme，ACE）对缓激肽的亲和力似乎比血管紧张素Ⅰ（AngⅠ）更强，且抑制缓激肽的降解比抑制 AngⅡ的形成可起到更加明显的降压作用[13]。因此增加激肽浓度来对抗 RASS 系统具有广阔的前景。ACE 和中性肽链内切酶（neutral endopeptidase，NEP）均为 KKs 的分解酶，因此有研究尝试联合应用 ACE 抑制剂和 NEP 抑制剂，以期产生互补作用。IMPRESS 试验表明在心力衰竭患者中，奥马曲拉（omapatrilat，ACE/NEP 双重抑制剂）相较于 ACE 抑制剂取得了更佳的疗效，但在随后的试验中并未得到验证[14]。早期的 OVERTURE 研究，虽然证明了奥帕曲拉可以降低心力衰竭患者的住院率和死亡率，但与 ACE 抑制剂相比并不能降低原发性临床事件的风险[15]，且加重了患者的干咳、水肿等症状[16]，这可能是由于 ACE 和 NEP 抑制剂阻断了激肽的降解，导致激肽聚集后产生炎症反应[17]。这些风险限制了奥帕曲拉在临床上的进一步推广。

1.2 NPs 与心力衰竭治疗

在心力衰竭发生时，NPs 除了具有扩张血管作用外，还可以起到对抗心室重构和改善脉管系统等作用。NPs 主要通过两种途径被清除[18]：① 受体介导的内吞清除途径；② 酶代谢途径：主要经 NEP 酶代谢清除。在心力衰竭期间，NPs 系统也处于激活状态，但由于机体存在的 NEP 酶等能迅速降解包括缓激肽和利钠肽在内的多种内源肽，使 NPs 系统不足以对抗 RASS 和 SNS 系统。因此通过使用脑啡肽酶抑制剂（neprilysin inhibitor，NEPI）抑制 NEP 酶活性，降低 NPs 的降解，提高利钠肽水平成为了关注的焦点。

2 ARNI 与心力衰竭治疗

NEPI 作为非特异性受体拮抗剂，在心血管系

统中可发挥多种作用。NEPI 在抑制脑啡肽酶降解、提升 NPs 浓度的同时也会导致 AngⅡ水平升高 [19]，因此单独应用 NEPI 的疗效是不明确。既往研究发现单用 NEPI 降压作用短暂，对于严重心力衰竭患者没有显著的疗效 [19]。基于 NPs 和 ARB 的机制，ARNI 沙库巴曲缬沙坦应运而生，其前体药物沙库巴曲可以抑制脑啡肽酶，增强 NPs 系统作用，同时在一定程度上减缓了激肽的降解，增强了 KKs 系统的作用，除此之外缬沙坦可以有效阻断 RASS 系统，并拮抗 AngⅡ受体从而发挥治疗心力衰竭的作用 [20]（见图 1）。与基于 KKs 系统研发的奥马曲拉相比，沙库巴曲缬沙坦由于使用 ARB 替代了 ACEI，降低了激肽聚集而导致的严重的安全性问题，在临床上得到了更多的关注。

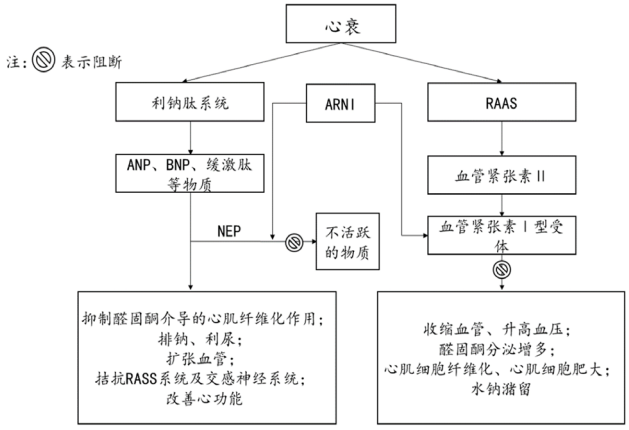


图 1 沙库巴曲缬沙坦作用机制

Fig 1 Mechanism of sacubitril/valsartan

2.1 ARNIs 在 HFrEF 患者中的应用

随着沙库巴曲缬沙坦的诞生，为了更好地对其疗效进行评估，心力衰竭治疗领域最大且最具代表性的全球多中心临床研究 PARADIGM-HF 被启动，该研究对比了在 HFrEF 患者中应用沙库巴曲缬沙坦与依那普利的临床疗效，结果显示，沙库巴曲缬沙坦组心血管死亡率为 13.3%，比依那普利组（16.5%）降低 20%（*RR* ＝ 0.80，95%*CI*：0.73 ～ 0.87，*P* ＜ 0.001），心力衰竭住院风险为 12.8%，比依那普利组（15.6%）降低 21%（*RR* ＝ 0.79，95%*CI*：0.71 ～ 0.89，*P* ＜ 0.001），在改善心力衰竭症状的同时并未增加安全性问题 [21]。该研究明确了心力衰竭患者应用沙库巴曲缬沙坦的获益，也因此奠定了 ARNI 药物在 HFrEF 患者中的一线治疗的地位。

除此之外一系列真实世界研究也为 ARNI 在 HFrEF 患者中的应用提供了支持。Mazza 等 [22] 设计的前瞻性试验中沙库巴曲缬沙坦组患者不论是在纽约心脏协会（NYHA）分级、左室射血分数（LVEF）还是肾小球滤过率（eGFR）水平等方面较对照组均显著改善。在患者生活质量方面，PARASAIL 试验表明沙库巴曲缬沙坦可显著提高患者基线水平，延缓生活质量恶化 [23]。此外 TRANSITION 试验探究了 HFrEF 患者使用沙库巴曲缬沙坦治疗的安全性和耐受性。结果显示患者对沙库巴曲缬沙坦有良好的耐受性 [24]。

基于 PARADIGM-HF 试验，在 2017 年版由美国心脏病学会（American College of Cardiology，ACC）、美国心脏协会（American Heart Association，AHA）以及美国心力衰竭学会（Heart Failure Society American，HFSA）发布的心力衰竭管理指南中推荐对于 NYHA Ⅱ或Ⅲ级、能够耐受 ACEI 或 ARB 的慢性症状者，以 ARNI 替代 ACRI 或 ARB，以进一步降低发病率和死亡率（推荐等级Ⅰ，推荐级别 B-R）[25]，2018 年中华医学会心血管病分会发布的心力衰竭指南也新增了对于 ARNI 类药物的推荐意见，推荐内容与上述基本一致（推荐等级Ⅰ，推荐级别 B）[1]。

2.2 ARNI 在 HFpEF 患者中的应用

PARAMOUNT 试验是一项为期 36 周的随机双盲多中心对照研究，旨在探究沙库巴曲缬沙坦治疗 HFpEF 患者的有效性和安全性。12 周时沙库巴曲缬沙坦组的 NT-proBNP 水平与基线相比下降了 23%（12 周：605 pg • mL^{-1}，基线：783 pg • mL^{-1}），缬沙坦组 NT-proBNP 下降了 3.1%（12 周：835 pg • mL^{-1}，基线：862 pg • mL^{-1}），两组之间具有显著差异（*RR* ＝ 0.77，95%*CI*：0.64 ～ 0.92，*P* ＝ 0.005），但在 36 周时沙库巴曲缬沙组 NT-proBNP 降低情况（36 周：496 pg • mL^{-1}，基线：763 pg • mL^{-1}）与缬沙坦组（36 周：607 pg • mL^{-1}，基线：822 pg • mL^{-1}）相比差异无统计学意义（*RR* ＝ 0.85，95%*CI*：0.65 ～ 1.09，*P* ＝ 0.20）[26]。为了更好地确定 ARNI 对于 HFpEF 患者的治疗作用，一项更大规模的 PARAGON-HF 研究被启动，共纳入了 4822 名过去 6 个月内左室射血分数（LVEF）≥ 45% 的患者，在主要结局方面，虽然从数值上看沙库巴曲缬沙坦组较缬沙坦组的 3 年心力衰竭住院或心血管死亡率降低了（沙库巴曲缬沙坦组：690 例心力衰竭住院和 204 例心血管死亡事件；缬沙坦组：797 例心力衰竭住院和 212 例心血管死亡事件），但两者之间差异无统计学意义（*RR* ＝ 0.87，95%*CI*：0.75 ～ 1.01，*P* ＝ 0.06）[27]，通过事后研究发现 ARNI 组中女性患者较男性患者住院率降低了 33%，且对于近期住院且存在临床进展的高风险患者，沙库巴曲缬沙坦的相对和绝对收益都比缬沙坦大 [28]。因此为了确认 ARNI 在 HFpEF 患

者中的应用情况，需要开展更多的高质量研究。

2.3 ARNI 在 HFmrEF 患者中的应用

目前对于 HFmrEF 患者的临床特征认识尚不完全，仅部分针对 HFrEF 和 HFpEF 患者进行的前瞻性随机对照试验中纳入了少量的 HFmrEF 患者。在 PARAGON-HF 试验中对于射血分数低于 57% 的患者，沙库巴曲缬沙坦较缬沙坦展现出了更佳的疗效 [27]。一些观察性研究同样显示 ARNI 能使 HFmrEF 患者获得更好的预后 [29-30]。虽然 HFmrEF 患者可能从 ARNIs 治疗中获益，但仍需要专门针对 HFmrEF 患者的高质量研究来明确 ARNI 的作用。

2.4 ARNI 在急性失代偿性心力衰竭（acute decompensated heart failure，ADHF）患者中的应用

PIONEER-HF 试验探究了 ADHF 患者使用 ARNI 的获益情况。通过观察纳入研究的 881 名患者 NT-proBP 变化情况判断 ARNI 疗效，结果表明沙库巴曲缬沙坦较依那普利可显著降低患者第 4 周和第 8 周 NT-proBP 的水平。同时在低血压、血管性水肿和高钾血症等方面两组差异没有统计学意义 [31]。在 2019 年版的欧洲心脏病学会（European Society of Cardiology，ESC）心力衰竭协会的专家共识中对于新发心力衰竭或 ADHF 患者，ARNI 获得了一线用药推荐 [32]。

2.5 ARNI 在心力衰竭合并其他疾病中的应用

2.5.1 肾功能损伤 ARB 可以同时扩张出球小动脉和入球小动脉，对于没有基础肾脏疾病的 HFrEF 患者，ARB 可以降低尿蛋白的排泄，减缓终末期肾疾病的进展 [33]。但 ARB 药物对出球小动脉的扩张大于入球小动脉，因此可导致肾损伤患者 eGFR 降低，血清肌酐增加，治疗中断 [34]。而利钠肽可在扩张入球小动脉的同时收缩出球小动脉 [35]，与 ARB 联用可以拮抗 ARB 的扩张不均匀现象。基于 PARADIGM-HF 试验，研究人员收集了 HFrEF 患者的 eGFR 和尿蛋白 / 肌酐比值（UACR）数据，结果显示与依那普利相比，HFrEF 患者使用沙库巴曲缬沙坦能显著延缓 eGFR 下降，且这种获益不受患者合并的糖尿病、高血压等疾病以及心力衰竭程度的影响 [36]。2019 年一项基于真实世界的研究招募了 466 例沙库巴曲缬沙坦组和 466 例接受标准无 ARNI 治疗的心力衰竭患者，随访 15 个月，研究人员对比了两组在心血管死亡率和心力衰竭再住院率等方面的各项指标，结果表明对于不同慢性肾疾病分期的患者沙库巴曲缬沙坦治疗组比接受标准无 ARNI 治疗组的疗效更好 [37]。虽然有研究发现 ARNI 对糖尿病患者的肾脏保护作用可能与利钠肽对肾脏足细胞的保护作用有关 [38]，但 ARNI 使肾损伤患者获益的具体机制依然需要长期的研究来证明。

2.5.2 肝功能损伤 心力衰竭患者由于肝静脉压力增加以及心输出量减少导致肝内静脉血液回流障碍，常出现肝淤血症状，进而出现慢性肝损伤。随着对 ARNI 研究的不断深入，ARNI 应用于心力衰竭合并肝损伤患者引起了研究人员的关注。在一项与肝损伤有关试验中，研究人员分析了 HFrEF 患者的肝功能指标，与依那普利组相比，沙库巴曲缬沙坦组肝功能常规测量值均显著改善 [39]，提示对于心力衰竭合并肝损伤患者沙库巴曲缬沙坦可能是较 ACEI 更佳的选择。

2.5.3 糖尿病 在心力衰竭患者中，血糖异常是常见的，但目前心力衰竭与糖尿病发展之间的关系尚不清楚，通常心力衰竭患者都存在一定的胰岛素抵抗现象 [40]。对于心力衰竭合并糖尿病的患者，其发生心血管不良事件的风险更高 [41]，PARADIGM-HF 试验已经证实了沙库巴曲缬沙坦可以使 HFrEF 患者获得更多收益，且这种获益与血糖水平无关 [21]。对于糖尿病合并 HFrEF 患者，沙库巴曲缬沙坦较 ACEI 能更加显著地降低血糖，且这种优势在研究人员随访的 3 年内持续存在。而对于非糖尿病患者，沙库巴曲缬沙坦未导致血糖降低。沙库巴曲缬沙坦的选择性降糖作用引起了研究人员的关注，在一项对比 ARNI 和氨氯地平治疗肥胖性高血压患者疗效的研究中，研究人员发现 ARNI 具有改善胰岛素敏感性和脂肪动员的作用 [42]。除此之外，ARNI 似乎还可以通过增加胰高血糖素样肽 -1（glucagon-like peptide-1，GLP-1）水平对血糖控制产生有益影响 [43]。

虽然上述研究大多并非高质量的随机对照试验，但其结果显示 ARNI 与 ACEI/ARB 相比可使特殊人群获得更多收益，为后续开展相关临床试验提供了基础。

3 小结与展望

心力衰竭治疗理念是随着医学对心力衰竭病理生理的研究而不断变化的。以沙库巴曲缬沙坦为代表的 ARNI 类药物为心力衰竭治疗带来了新的机遇，其在降低患者住院率和死亡率，改善心脏重构和肾损伤方面都显示出了较大的优势。但以 ACEI/ARB，MRA 和 β 受体阻滞剂为代表的金三角方案依然是心力衰竭患者治疗的首选方案。ARNI 在各种心力衰竭类型以及合并多种疾病情况下的获益依然有待进一步的研究来证明。

参考文献

[1] 王华，梁延春 . 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018 [J]. 中华心血管病杂志，2018，46（10）：760-789.

[2] Hessel FP. Overview of the socio-economic consequences of heart failure [J]. Cardiovasc Diagn Ther，2021，11（1）：254-262.
[3] Hao G，Wang X，Chen Z，et al. Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in China：The china hypertension survey，2012—2015 [J]. Eur J Heart Fail，2019，21（11）：1329-1337.
[4] 顾东风，黄广勇，吴锡桂，等 . 中国心力衰竭流行病学调查及其患病率 [J]. 中华心血管病杂志，2003，31（1）：3-6.
[5] Cook C，Cole G，Asaria P，et al. The annual global economic burden of heart failure [J]. Int J Cardiol，2014，171（3）：368-376.
[6] Jackson JD，Cotton SE，Bruce Wirta S，et al. Burden of heart failure on patients from China：Results from a cross-sectional survey [J]. Drug Des Devel Ther，2018，12：1659-1668.
[7] 魏敏杰 . 临床药理学 [M]. 2 版 . 北京：人民卫生出版社，2014：296-297.
[8] 刘瑞闪 . 血管紧张素受体—脑啡肽酶抑制剂在心力衰竭治疗中的研究进展与思考 [D]. 重庆：重庆医科大学，2020.
[9] 徐明，吴昊迪，王猛，等 . 心力衰竭中心脏重塑的相关机制探讨 [J]. 中国病理生理杂志，2012，28（11）：2007.
[10] Cyr M，Lepage Y，Blais C，et al. Bradykinin and des-Arg（9）-bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol，2001，281（1）：H275-H283.
[11] Prasad A，Husain S，Schenke W，et al. Contribution of bradykinin receptor dysfunction to abnormal coronary vasomotion in humans [J]. J Am Coll Cardiol，2000，36（5）：1467-1473.
[12] Hamid S，Rhaleb IA，Kassem KM，et al. Role of kinins in hypertension and heart failure [J]. Pharmaceuticals（Basel），2020，13（11）：347.
[13] Su JB. Different cross-talk sites between the renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems [J]. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst，2014，15（4）：319-328.
[14] Rouleau JL，Pfeffer MA，Stewart DJ，et al. Comparison of vasopeptidase inhibitor，omapatrilat，and lisinopril on exercise tolerance and morbidity in patients with heart failure：IMPRESS randomised trial [J]. Lancet，2000，356（9230）：615-620.
[15] Packer M，Califf RM，Konstam MA，et al. Comparison of omapatrilat and enalapril in patients with chronic heart failure：the Omapatrilat Versus Enalapril Randomized Trial of Utility in Reducing Events（OVERTURE）[J]. Circulation，2002，106（8）：920-926.
[16] Zanchi A，Maillard M，Burnier M. Recent clinical trials with omapatrilat：New developments [J]. Curr Hypertens Rep，2003，5（4）：346-352.
[17] Sharma JN. The kallikrein-kinin system：From mediator of inflammation to modulator of cardioprotection [J]. Inflammopharmacology，2005，12（5-6）：591-596.
[18] Potter LR. Natriuretic peptide metabolism，clearance and degradation [J]. FEBS J，2011，278（11）：1808-1817.
[19] Bayes-Genis A，Morant-Talamante N，Lupon J. Neprilysin and natriuretic peptide regulation in heart failure [J]. Curr Heart Fail Rep，2016，13（4）：151-157.
[20] 郭静 . 沙库巴曲缬沙坦治疗慢性心力衰竭的临床效果 [J]. 中国现代药物应用，2021，15（4）：114-116.
[21] Seferovic JP，Claggett B，Seidelmann SB，et al. Effect of sacubitril/valsartan versus enalapril on glycaemic control in patients with heart failure and diabetes：A post-hoc analysis from the PARADIGM-HF trial [J]. Lancet Diabetes Endo，2017，5（5）：333-340.
[22] Mazza A，Townsend DM，Torin G，et al. The role of sacubitril/valsartan in the treatment of chronic heart failure with reduced ejection fraction in hypertensive patients with comorbidities：From clinical trials to real-world settings [J]. Biomed Pharmacother，2020，130：110596.
[23] Haddad H，Bergeron S，Ignaszewski A，et al. Canadian real-world experience of using sacubitril/valsartan in patients with heart failure with reduced ejection fraction：Insight from the PARASAIL study [J]. CJC Open，2020，2（5）：344-353.
[24] Wachter R，Senni M，Belohlavek J，et al. Initiation of sacubitril/valsartan in haemodynamically stabilised heart failure patients in hospital or early after discharge：Primary results of the randomised TRANSITION study [J]. Eur J Heart Fail，2019，21（8）：998-1007.
[25] Jessup M，Drazner MH，Book W，et al. 2017 ACC/AHA/HFSA/ISHLT/ACP Advanced Training Statement on Advanced Heart Failure and Transplant Cardiology（Revision of the ACCF/AHA/ACP/HFSA/ISHLT 2010 Clinical Competence Statement on Management of Patients With Advanced Heart Failure and Cardiac Transplant）：A Report of the ACC Competency Management Committee [J]. J Am Coll Cardiol，2017，69（24）：2977-3001.
[26] Solomon SD，Zile M，Pieske B，et al. The angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 in heart failure with preserved ejection fraction: a phase 2 double-blind randomised controlled trial [J]. The Lancet，2012，380（9851）：1387-1395.
[27] Solomon SD，Mcmurray JJV，Anand IS，et al. Angiotensin-neprilysin inhibition in heart failure with preserved ejection fraction [J]. N Engl J Med，2019，381（17）：1609-1620.
[28] Vaduganathan M，Claggett BL，Desai AS，et al. Prior heart failure hospitalization，clinical outcomes，and response to sacubitril/valsartan compared with valsartan in HFpEF [J]. J Am Coll Cardiol，2020，75（3）：245-254.
[29] 王国坤 . 沙库巴曲缬沙坦钠片对射血分数中间值心力衰竭患者疗效及预后的影响分析 [J]. 海峡药学，2019，31（11）：176-177.
[30] 陈存芳，贾博，江珊，等 . 沙库巴曲缬沙坦治疗射血分数中间值心力衰竭患者的疗效及预后 [J]. 中国新药与临床杂志，2020，39（2）：88-92.
[31] Velazquez EJ，Morrow DA，Devore AD，et al. Angiotensin-neprilysin inhibition in acute decompensated heart failure [J]. N Engl J Med，2019，380（6）：539-548.
[32] Seferovic PM，Ponikowski P，Anker SD，et al. Clinical practice update on heart failure 2019：Pharmacotherapy，

procedures，devices and patient management. An expert consensus meeting report of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology [J]. Eur J Heart Fail，2019，21（10）：1169-1186.
[33] Bakris GL，Agarwal R，Chan JC，et al. Effect of Finerenone on albuminuria in patients with diabetic nephropathy：A randomized clinical trial [J]. JAMA，2015，314（9）：884-894.
[34] Brenner BM，Cooper ME，De Zeeuw D，et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy [J]. N Engl J Med，2001，345（12）：861-869.
[35] Endlich K，Steinhausen M. Natriuretic peptide receptors mediate different responses in rat renal microvessels [J]. Kidney Int，1997，52（1）：202-207.
[36] Damman K，Gori M，Claggett B，et al. Renal effects and associated outcomes during angiotensin-neprilysin inhibition in heart failure [J]. JACC Heart Fail，2018，6（6）：489-498.
[37] Chang HY，Feng AN，Fong MC，et al. Sacubitril/valsartan in heart failure with reduced ejection fraction patients：Real world experience on advanced chronic kidney disease，hypotension，and dose escalation [J]. J Cardiol，2019，74（4）：372-380.
[38] Uijl E，T Hart DC，Roksnoer LCW，et al. Angiotensin-neprilysin inhibition confers renoprotection in rats with diabetes and hypertension by limiting podocyte injury [J]. J Hypertens，2020，38（4）：755-764.
[39] Suzuki K，Claggett B，Minamisawa M，et al. Liver function and prognosis，and influence of sacubitril/valsartan in patients with heart failure with reduced ejection fraction [J]. Eur J Heart Fail，2020，22（9）：1662-1671.
[40] Colosia AD，Palencia R，Khan S. Prevalence of hypertension and obesity in patients with type 2 diabetes mellitus in observational studies：A systematic literature review [J]. Diabet Metab Syndr Obes，2013，6：327-338.
[41] 麦尔耶姆·瓦热斯，罗心平，周鹏 . 糖尿病与心力衰竭：2 型糖尿病是心力衰竭的独立危险因素？[J]. 心血管病学进展，2020，41（7）：681-683.
[42] Jordan J，Stinkens R，Jax T，et al. Improved insulin sensitivity with angiotensin receptor neprilysin inhibition in individuals with obesity and hypertension [J]. Clin Pharmacol Ther，2017，101（2）：254-263.
[43] Nougue H，Pezel T，Picard F，et al. Effects of sacubitril/valsartan on neprilysin targets and the metabolism of natriuretic peptides in chronic heart failure：A mechanistic clinical study [J]. Eur J Heart Fail，2019，21（5）：598-605.

（收稿日期：2021-01-05；修回日期：2021-03-04）

抗过敏中药的活性物质研究及临床应用

余学英[1]，吴子龙[2]，陈芳[1]，常明泉[1*]（1. 十堰市太和医院（湖北医药学院附属医院），湖北 十堰 442000；2. 湖北医药学院，湖北 十堰 442000）

摘要：中药用于治疗过敏性疾病具有疗效肯定、安全、不良反应少、复发率低的优点。氧化苦参碱、蛇床子素、荆芥挥发油、黄芩苷、地肤子总皂苷、木犀草素、苜蓿素、芍药苷、白鲜皮水提物、辛夷醇提物、麻黄素等是常用抗过敏中药中的主要活性物质，主要用于皮肤科、呼吸科、耳鼻喉科等。本文综述了抗过敏中药的研究现状，为新制剂的研发提供参考。

关键词：中药；抗过敏；活性物质；临床应用
中图分类号：R286 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1675-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.033

Active substances in antiallergic traditional Chinese medicine

YU Xue-ying[1], WU Zi-long[2], CHEN Fang[1], CHANG Ming-quan[1*] (1. *Taihe Hospital*, *Hubei University of Medicine*, *Shiyan Hubei* 442000; 2. *Hubei Medical College*, *Shiyan Hubei* 442000)

Abstract: Some traditional Chinese medicine for allergy has the advantages of definite curative effect, safety, fewer adverse reactions and low recurrence rate. Oxymatrine, osthol, Schizonepeta tenuifolia essential oil, baicalin, total saponins of Kochia scoparia, luteolin, alfalfa, paeoniflorin, aqueous extract

基金项目：湖北省科技进步奖励（No. 2019J-244-2-086-068）；湖北省科技厅成果项目（No. EK2016D150088001938）。
作者简介：余学英，女，副主任药师，主要从事医院药学工作，E-mail：907622985@qq.com *通信作者：常明泉，男，主任药师，主要从事医院药学工作，E-mail：907622985@qq.com

of cortex dictamni, alcohol extract of Magnolia, ephedrine and so on are the main active substances in commonly used anti allergic traditional Chinese medicine. These herbs are commonly used in Department of Dermatology, Respiratory, and ENT. This paper reviewed the research status of antiallergic traditional Chinese medicine to provide reference for new preparations.

Key words: Chinese medicine; antiallergic; active substance; clinical application

变态反应也称为超敏反应，临床常见的皮肤瘙痒红肿、过敏性鼻炎、哮喘等都属于变态反应，根据其免疫机制可分为Ⅰ～Ⅳ型[1]，随着免疫学研究的不断发展，人们对变态反应及其药理机制的研究更加深入。长期以来，人们在日常生活和劳动中发现了多种具有抗变态反应的食用和药用植物，虽然对这些天然植物中的活性物质的研究还存在一定局限性，但对它们的药效学研究揭示了部分作用原理[2-3]。本文围绕抗过敏中药活性物质的提取、药理研究、临床应用现状进行综述。

1 抗过敏中药活性物质提取工艺研究

常用抗过敏中药见表 1。氧化苦参碱和苦参碱是苦参中的主要抗过敏活性物质，目前，对苦参的提取工艺改进主要是优化提取效率、提高氧化苦参碱和苦参碱的转移率[4-6]。煎煮法、浸渍法是传统溶剂提取法，微波、超声波、超临界、树脂吸附提取法是近年探索应用较多的一些提取方法，这些提取方法各有其特点：浸渍法对活性物质的破坏最少，树脂吸附法可选择性地分离苦参碱与杂质，微波提取法、超声波提取法、超临界流体萃取法属于绿色提取技术，可大幅度提高苦参的提取效率[7]。对蛇床子挥发油提取，采用挥发油提取器蒸馏装置提取效果最好。蛇床子原料的产地不同，所提取的挥发油质量具有较大差异[8]。有研究采用 3 种不同提取方法提取荆芥挥发油，结果发现其含量、性状具有明显差异，冷浸法提取的荆芥挥发油含量最高，为油状浸膏；超声法提取的荆芥挥发油含量次之，为黄绿色油状浸膏；蒸馏法提取荆芥挥发油得油率最低，为淡黄色油状液体[9-10]。应用 HPLC-ELSD 法[11]对来自国内 8 省不同产地地肤子皂苷Ⅰc 的含量进行比较，虽然检测结果均符合《中国药典》2015 年版规定，但不同海拔、纬度种植品含量具有显著差异，其中以陕西、吉林、山东 3 省最优。

表 1 常用抗过敏中药

Tab 1 Common antiallergic herbs

药材	抗过敏活性成分	主要药理作用	适应证
苦参	苦参碱、氧化苦参碱	抑制组胺释放、抗炎、抗过敏	湿疹、特应性皮炎、荨麻疹、阴道炎
蛇床子	蛇床子素	阻滞肌细胞的 Ca^{2+} 通道，减少 Ca^{2+} 内流	湿疹、疥疮、滴虫性阴道炎
荆芥	挥发油	抑制组胺释放、抗炎、抗过敏	荨麻疹、湿疹、特应性皮炎
黄芩	黄芩苷	抗炎、抗过敏、抗氧化	荨麻疹、湿疹、特应性皮炎、光敏性皮肤病
地肤子	地肤子总皂苷	抑制肥大细胞脱颗粒及抑制组胺释放	湿疹、疥疮、脚癣、霉菌性阴道炎
紫苏	木犀草素	阻断 PI3K/AKT 信号通路，抑制嗜碱性肥大细胞脱颗粒	荨麻疹、湿疹
竹叶	苜蓿素	抗过敏、抗炎、抗氧化、免疫调节	过敏性哮喘
白芍	芍药苷	抗过敏、抗炎、抗氧化	荨麻疹、湿疹、黄褐斑
白鲜皮	白鲜皮水提物	减少组胺释放、降低毛细血管通透性	荨麻疹、湿疹、体癣
辛夷	辛夷醇提物	抑制肥大细胞脱颗粒、抑制炎症因子产生	过敏性鼻炎
麻黄	麻黄素	抑制嗜酸性粒细胞浸润、降低毛细血管充血	过敏性鼻炎、过敏性哮喘

2 抗过敏中药活性物质药理作用机制研究

中药抗过敏具有多环节、多效应、双向调节、不良反应少等优点。黄芩中主要抗过敏活性物质为黄芩苷，其他活性物质包括黄芩素及黄酮类化合物，这些物质具有抗过敏、抗菌消炎、抗氧化等多重药理作用[12]。黄芩苷溶解性差、生物利用度低、口服吸收难，但外用效果较好。地肤子醇提物能抑制肥大细胞脱颗粒及抑制组胺的释放，同时也能拮抗由 5- 羟色胺（5-HT）导致的豚鼠回肠收缩，其总皂苷对Ⅰ型、Ⅳ型变态反应能产生显著的抑制作用，而对抑制肥大细胞脱颗粒及抑制组胺释放的作用要强于 5-HT 导致的豚鼠回肠收缩；醇提时乙醇浓度增加，地肤子总皂苷含量相对提高，但其对不同自由基的清除能力不随之增强[13]。有研究显示不同浓度木犀草素对 β-Hex 和重组人 TNF-α 蛋白的释放呈剂量依赖性，随着木犀草素浓度的增加，蛋白激酶 B 磷酸化水平明显下降，木犀草素可能通过阻断 PI3K/AKT 信号

途径抑制大鼠嗜碱性肥大细胞活化脱颗粒，从而抑制过敏反应[14]。在致敏大鼠动物气道炎症反应中病理变化主要特征是肥大细胞、嗜酸性粒细胞、B 细胞浸润引起的呼吸道过度分泌黏液、水肿、痉挛、EPI 脱落，研究发现苜蓿素 5 mg·kg^{-1} 和 10 mg·kg^{-1} 均能显著降低大鼠血中白细胞和嗜酸性粒细胞数目，对过敏介质组胺产生显著的拮抗作用，抑制气道炎症，消除症状[15]。加味过敏煎是在防风、细辛基础上加用蝉蜕、白鲜皮、牡丹皮等中药，药理研究证明该方剂通过拮抗组胺降低 IgE、抑制肥大细胞脱颗粒及改变 CD4 ＋ T 细胞亚群的分化发挥止痒、抗过敏、抗炎作用，可从多靶点、多路径、多层次体现其抗过敏功效[16]。白鲜皮提取物可治疗小鼠过敏性皮炎，其作用机制与抑制肥大细胞功能及拮抗组织胺有关，可通过减少组织胺的释放抑制皮肤蓝染，降低毛细血管通透性改善过敏反应引起的皮肤炎症[17]。小青龙汤加味鼻泰滴鼻剂由辛夷、细辛、麻黄等 10 味中药组成，主要功效为清风热、通鼻窍，能抑制大鼠肥大细胞脱颗粒、降低变应性鼻炎（AR）模型小鼠血清中 IL-4 水平、减少 IgE 的合成，从而发挥抗过敏作用[18]。防风、黄芪、白术是玉屏风口服液的组成药物，其抗炎和抗过敏作用确切，能抑制 IgE、炎性介质及中和变应原的产生，通过改善鼻腔通气功能对 AR 小鼠症状产生改善作用[19]。荆芥的一体化加工方法与传统加工方法比较，不仅含量优于传统加工方法，而且抗过敏、抗炎效果也有一定提高，一体化加工得到的化合物对二硝基氯苯（DNCB）所致小鼠变态反应模型的抑制效果更好，对致炎小鼠血清中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 的抗炎作用整体上优于传统加工工艺[20]。以麻黄、细辛二味中药组成的小青龙汤改良方剂具有多靶点抗过敏效果，对应用卵蛋白致敏的 AR 大鼠模型鼻中隔组织有显著影响，细辛高剂量组、麻黄等效剂量组、细辛等效剂量组 3 个用药组大鼠病理症状明显改善，表现在毛细血管充血、嗜酸性粒细胞浸润现象改善，对黏膜皮损具有一定程度修复，作用强度为细辛高剂量组＞麻黄等效剂量组＞细辛等效剂量组，从 IFN-γ、IL-4、LTC_4 比较 3 个用药组无显著差异，麻黄、细辛对 AR 大鼠均是通过抑制 LTC_4、调节 TH1/TH2 平衡、升高 IFN-γ 水平、降低 IL-4 达到改善症状、治疗的目的[21]。由炙麻黄、防风、杏仁等 12 味中药组成的祛风解痉方药在改善哮喘小鼠气道炎症、降低呼吸道阻力、缓解炎性细胞浸润效果方面呈剂量依赖性，用药后能显著改善呼吸波上升与下降支之间的斜度，作用机制主要是通过抑制气道炎症、降低 IL-10、TGF-β 的分泌，从而降低小鼠的气道阻力、通畅呼吸、消除哮喘症状[22]。

3 抗过敏中药在临床中的应用

3.1 皮肤科

近年来，过敏性皮肤病的发病率逐渐升高，其病程迁延、复发率高、难以在短期内痊愈，西药治疗该病常采用各种激素、抗组胺药物、免疫抑制剂，在发挥治疗作用的同时也会产生诸如嗜睡、头晕、乏力等不良反应。中药治疗有其独特优势，大多数具有抗变态反应作用的中药及其制剂具有抗菌消炎、抗病毒的药理作用，且不良反应少，临床应用安全[23]。

应用防风、蛇床子等中药熏洗联合妙思乐润肤霜治疗儿童特应性皮炎，疗程结束后特应性皮炎皮损评分指数（SCORAD）、视觉模拟评分法（VAS）评分与治疗前比较差异均有统计学意义（$P < 0.05$），皮脂含量提高 24.2%、经皮水分丢失（TEW）降低 42.4%，角质层含水量增加 280.9%，总有效率达 95.71%，药液的温热效应可软化皮损部位角质，有利于抗菌消炎活性物质的局部吸收，对毛细血管、微循环产生改善效应，辅助应用妙思乐润肤霜保湿润肤，抑制水分经皮丢失，该方法治疗儿童特应性皮炎对皮肤屏障功能的改善效果显著[24]。以白鲜皮、地肤子、当归等 7 味中药组成的润燥祛风汤口服治疗特应性皮炎 20 d 后临床总有效率达到 92.5%，治疗组皮肤瘙痒、皮损面积、皮损程度评分分别比对照组低 89.0%、44.5%、44.7%，不良反应比对照组低 85.7%，临床疗效显著，使用安全[25]。中药外用洗剂陆续应用于湿疹的治疗，郑慕雄等[26]用中药止痒洗剂外洗治疗湿疹，配合左西替利嗪片口服、曲安奈德霜外用，治疗组比对照组总有效率提高 9%，并且治疗组的止痒起效时间、止痒持续时间明显优于对照组，复发率明显降低，治疗湿疹的效果明显优于对照组。口服中药除湿丸、外喷耳净散联合治疗外耳湿疹同样取得肯定疗效，所收集病例经过 2 周治疗后有效率达到 92.4%、随访复发率 14.9%[27]。耳净散直接作用于皮损部位，发挥收敛、吸附作用，对抑制炎性渗出效果好，控制复发率较西药有明显优势[27]。

3.2 呼吸科

临床上比较常见的呼吸道过敏反应主要有花

粉症、过敏性咳嗽、过敏性哮喘等，其中过敏性哮喘的危害性相对较大，发病率逐年升高。研究发现，中药制剂对于变态反应性哮喘有比较显著的疗效[28]，中药制剂在呼吸科中的应用逐渐受到重视，主要应用剂型有汤剂、合剂、口服液等。

麻杏石甘汤[29]、咳喘平合剂[30]均具有抗过敏反应、镇咳平喘、化痰、提高患者免疫力等功效，常用于治疗咳嗽、支气管哮喘等病症，其主药麻黄有驱寒、平喘的功效，对气管哮喘等过敏性疾病具有明显的疗效。中药素有穴位贴敷治疗慢性病的传统，王健等[31]探索应用中药贴敷肚脐，加用布地奈德雾化吸入治疗慢性阻塞性肺疾病，经过 1 周应用后患者生活质量有较大幅度提高，其有效改善了老年患者的呼吸困难症状。贴敷治疗是应用中医穴位经络原理，药物经过脐穴位吸收后通过小肠进入全身循环，避免口服用药的首过效应的一种治疗方法。温肺化饮汤是以炙麻黄、桂枝、干姜等 10 味中药组成的方剂，巴迎莹等[32]应用布地奈德福莫特罗粉作为基础用药，在此基础上服用温肺化饮汤治疗过敏性哮喘，两个疗程后治疗组总有效率比对照组高 18.0%，肺活量（FVC）、最大呼气流量（PEF）、最大呼气容积（FEV1）、FEV1/FVC 分别比对照组高 15.4%、9.3%、14.1%、8.4%，T 淋巴细胞亚群 CD3 ＋、CD4 ＋、CD4 ＋ /CD8 ＋均较治疗前提高，白细胞介素 4（IL-4）、IL-10、IL-13 和 IL-17 水平均较治疗前显著降低，胸闷、气短、咳嗽等临床症状明显减少。该汤剂中的活性物质麻黄素、*β*- 细辛醚、白芍苷等能改善哮喘患者气道通气效果、消除气道炎症、提高免疫力、抑制组胺释放，从而减轻或消除哮喘症状。

3.3 耳鼻喉科

随着现代科技在中药研究开发中的应用，适用于五官科的制剂发展较快，抗过敏中药单方或复方制剂在耳鼻喉科中的应用受到重视，疗效显著持久，不良反应少。应用剂型主要有喷剂、滴剂、口服液等。

以荆芥、防风、苍耳子为主组成的鼻炎方[33]对过敏性鼻炎症状、生活质量、控制复发都具有良好的改善作用。在鼻吸入激素、氯雷他定治疗的基础上给予鼻炎方口服，经过 4 周治疗，鼻嗜酸性粒细胞阳离子蛋白（ECP）水平明显降低，治疗组总有效率较对照组高 14.1%，应用鼻炎方治疗的患者无论在症状改善积分或生活质量积分方面均优于对照组，治疗组复发 1 例（2.27%），对照组复发 6 例（13.95%）。加味玉屏风汤是在玉屏风组方基础上增加辛夷、蝉衣等 7 味中药组成的汤剂，秦勇等[34]以此药配合粉尘螨滴剂舌下含服治疗 AR 临床总有效率最终达到 93.33%，治疗 12 个月后治疗组患者喷嚏、流涕、鼻塞、鼻痒、症状评分（TNSS）和药物评分（TMS）积分与对照组比较分别降低 43.3%、72.5%、86.3%、89.9%、52.5%、212.5%，不良反应发生率比对照组低 66.0%。说明加味玉屏风汤能有效改善临床症状，且用药安全。儿童鼻窦炎患者不适宜手术，一般采用保守治疗，患儿有鼻塞、流脓涕、头昏头痛、记忆力减退等症状，临床用苍耳子鼻腔冲洗液每日冲洗 1 次，配合应用具有抗菌消炎的药物口服治疗不仅可以减少服药次数，克服儿童的恐惧心理，还可缩短治疗时间，降低医疗费用，临床应用中未出现不良反应[35]。

4 结语

中药用于治疗过敏性疾病逐渐受到人们的重视，目前已知的常用抗过敏中药活性物质主要有苦参碱、氧化苦参碱、蛇床子素、荆芥挥发油、黄芩苷、地肤子总苷、木犀草素、苜蓿素、芍药苷、白鲜皮水提物、辛夷醇提物、麻黄素等。随着其在临床中的应用，多种具有过敏特性的疾病得到有效治疗，一些制剂对于治疗过敏性疾病效果显著，不良反应少，复发率低，为疾病的治愈提供了新的治疗方法和路径。抗过敏中药在皮肤科、呼吸科、耳鼻喉科的临床应用不仅可以用作治疗，也可以用作预防保健。根据临床需要应进一步筛选出安全、有效、优效的中药活性物质开发相应制剂。相信随着中药现代化和生物、药理技术的进一步发展，其活性物质会越来越明确，作用机制会越来越清晰。中药在保持自身优势的前提下不断应用现代科技研究发掘新制剂，必将在医疗卫生和大健康领域为人类健康作出更大贡献。

参考文献

[1] Jorg T，李俊达，高金明 . 从转化角度谈表观遗传学与变态反应性疾病 [J]. 中华临床免疫和变态反应杂志，2018，12（5）：565-574.

[2] 王化龙，李振虎，徐砚通 . 中药治疗过敏性疾病的药理作用研究进展 [J]. 中草药，2015，46（10）：1542-1555.

[3] 连晨蕾，丛慧，吴雅清，等 . 抗过敏天然产物研究进展 [J]. 中国药学杂志，2017，52（12）：997-1004.

[4] 何前松，冯泳，杜洪志，等 . 多指标评价苦参洗液的提取工艺研究 [J]. 中药材，2018，41（6）：1436-1439.

[5] 姚众，张贵云，张丽萍，等 . 响应面法优化超临界二氧

化碳萃取苦参碱工艺技术 [J]. 山西农业科学，2020，48（7）：1135-1139.
[6] 拉巴次旦，纪鹏，赵年寿，等 . 苦参碱类生物碱提取工艺优化及纯化方法 [J]. 动物医学进展，2021，42（3）：119-122.
[7] 朱缨，谈如蓝，吴芝园，等 . 山东产蛇床子挥发油化学物质研究 [J]. 中国药业，2016，25（11）：31-34.
[8] 蒲秀峰，胥顺堂，蔺新雅 . 不同提取方法对紫苏叶、荆芥、广藿香中挥发油的影响 [J]. 甘肃科技，2019，35（22）：143-147.
[9] 王凤，温桃群，桑文涛，等 . 荆芥挥发油化学成分及药理作用研究现状 [J]. 中南药学，2017，15（3）：312-318.
[10] 闫梦茹，张文博，罗国平，等 . 地肤子抑菌活性物质筛选 [J]. 化学与生物工程，2019，36（2）：28-31.
[11] 吴小燕，方丽红，吕伟旗，等 . 地肤子中地肤子皂苷Ⅰc 含量变异规律与优良种质筛选 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（6）：183-188.
[12] 马玲玲，孙燕 . 中药黄芩药理作用的研究进展 [J]. 沈阳医学院学报，2016，18（2）：115-117.
[13] 王静，侯令，张华，等 . 地肤子乙醇提取物对自由基清除能力的对比研究 [J]. 陕西科技大学学报，2017，35（3）：148-152，165.
[14] 余洁，骆晓蓉 . 木犀草素对肥大细胞脱颗粒影响及机制的研究 [J]. 中国免疫学杂志，2016，32（8）：1153-1156.
[15] 刘利艳，邱宇安，武乐，等 . 苜蓿素抗变态反应作用 [J]. 广东医学，2018，39（6）：811-815.
[16] 龙声志，文昌晖，朱海燕，等 . 加味过敏煎对荨麻疹小鼠皮肤肥大细胞脱颗粒的影响 [J]. 中医杂志，2019，60（4）：322-326.
[17] 赵夏，马晓晨 . 白鲜皮提取物抗过敏反应研究 [J]. 中医学报，2019，34（3）：568-571.
[18] 蔡超，郭少晨，王融冰，等 . 小青龙汤加味滴鼻剂对变应性鼻炎模型小鼠的影响 [J]. 河南中医，2015，35（12）：2927-2929.
[19] 赵梅珍 . 玉屏风口服液对变应性鼻炎小鼠水通道蛋白 5 表达的影响 [J]. 中国实用医药，2019，14（18）：196-197.
[20] 钱岩，于生，单鸣秋，等 . 基于化学成分和药理效应的荆芥传统分段加工与一体化加工工艺比较 [J]. 中国中药杂志，2016，41（11）：2081-2086.
[21] 邵利洁，唐方 . 麻黄、细辛对过敏性鼻炎大鼠作用机制的研究 [J]. 中医药信息，2019，36（5）：47-49.
[22] 樊长征，苗青，崔云，等 . 祛风解痉方药对哮喘模型小鼠气道高反应性及气道炎症的影响 [J]. 环球中医药，2019，12（11）：1640-1644.
[23] 邱洞仙，边莉，燕晶晶 . 玉屏风散在变态反应性皮肤病治疗中的应用进展 [J]. 河北中医药学报，2018，33（5）：56-60.
[24] 朱杰，陈君 . 中药熏洗联合妙思乐润肤霜治疗儿童特应性皮炎临床研究 [J]. 新中医，2020，52（6）：85-87.
[25] 张琳 . 润燥祛风汤治疗特应性皮炎的临床观察 [J]. 中国实用医药，2018，13（29）：105-107.
[26] 郑慕雄，杨易，邱洁 . 中药外洗治疗湿疹 200 例临床疗效观察 [J]. 中医临床研究，2017，9（27）：54-56.
[27] 艾建伟，徐景利，盖建青，等 . 中药除湿丸联合耳净散内外合治外耳湿疹的疗效评价 [J]. 中华耳科学杂志，2017，15（4）：471-474.
[28] 廖源，赵重博，宋艺君，等 . 基于网络药理学的乌梅 - 防风药对治疗过敏性哮喘作用机制研究 [J]. 中南药学，2020，18（1）：138-143.
[29] 任晓婷，徐炎，孙丽平 . 麻杏石甘汤现代研究进展及展望 [J]. 吉林中医药，2020，40（8）：1106-1109.
[30] 杨召意，崔红，杨丽君 . 咳喘平合剂治疗婴幼儿喘息临床疗效的回顾性分析 [J]. 临床和实验医学杂志，2020，19（15）：1622-1626.
[31] 王健，程建军 . 中药穴位贴敷联合布地奈德雾化吸入治疗慢性阻塞性肺疾病的疗效及对患者生活质量的影响 [J]. 中国医师杂志，2019，21（2）：277-279.
[32] 巴迎莹，姚惠青，谭烨 . 温肺化饮汤治疗支气管哮喘临床疗效及对炎症因子和免疫功能的影响 [J]. 河北中医，2018，40（12）：1793-1797.
[33] 张文芳，田爱平 . 自拟鼻炎方治疗过敏性鼻炎的疗效观察 [J]. 世界中西医结合杂志，2019，14（11）：1591-1595.
[34] 秦勇，叶宝祥，刘一贞，等 . 舌下含服粉尘螨滴剂结合中药加味玉屏风汤治疗变应性鼻炎的临床研究 [J]. 河北医学，2017，23（2）：200-204.
[35] 夏艳崇 . 苍耳子散鼻腔冲洗联合黏液溶解药及抗生素在儿童慢性鼻炎 - 鼻窦炎的疗效观察 [J]. 中医眼耳鼻喉杂志，2019，9（4）：197-198.

（收稿日期：2021-02-03；修回日期：2021-04-17）

光叶巴豆化学成分及其药理活性研究进展

韩正枝[1, 2]，曹碧霞[1, 2]，刘荣[1, 2*]（1. 甘肃省精细化工重点实验室，兰州 730020；2. 甘肃省化工研究院有限责任公司，兰州 730020）

摘要：光叶巴豆为大戟科巴豆属植物，具有通经活血、散结消肿、退热止痛之功效，常用于治疗跌打损伤、骨折、疟疾、胃痛等症。本文对光叶巴豆植物的化学成分和药理活性进行了系统的总结和分析，为该药用植物资源的深入研究和综合开发提供科学依据。

关键词：光叶巴豆；萜类；抗菌活性；药理作用

中图分类号：O629.9，R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1680-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.034

Research progress on chemical constituents and pharmacological effect of *Croton laevigatus*

HAN Zheng-zhi[1, 2], CAO Bi-xia[1, 2], LIU Rong[1, 2*] (1. *Gansu Key Laboratory of Fine Chemical Industry*, *Lanzhou* 730020; 2. *Gansu Chemical Industry Research Institute Co. Ltd.*, *Lanzhou* 730020)

Abstract: *Croton laevigatus* is a genus of euphorbiaceae croton, which has the functions of promoting blood circulation, relieving swelling, relieving fever and pain. It is often used in the treatment of falls, fractures, malaria, stomachache and other diseases. In this paper, the chemical constituents and pharmacological activities of *Croton laevigatus* were systematically summarized and analyzed. It provides scientific basis for the in-depth research and comprehensive development of the medicinal plant resources.

Key words: *Croton laevigatus*; terpenoid; antimicrobial activity; pharmacological effect

大戟科巴豆属植物大约有 1300 多种，主要分布于热带和亚热带地区[1]。巴豆属植物是结构多样性代谢产物的重要来源，具有重要的生物活性[2-3]。许多巴豆属植物被证明对癌症、糖尿病、便秘、发热、高血压等有一定的疗效[4-5]。光叶巴豆（大戟科）是中国特有的巴豆属植物[6]，主要分布于云南、广东和海南三省，具有通经活血、散结消肿、退热止痛之功效，在中国傣族医学中被称为宝龙，长期以来被傣族人用来治疗骨折、疟疾和胃痛等疾病[6-7]。本文对光叶巴豆的化学成分、药理活性以及分离的色谱条件进行综述，以期为光叶巴豆的进一步开发研究奠定基础，也为相似类型化合物色谱分离条件的选择提供参考。

1 光叶巴豆中的化学成分[8-24]

研究表明二萜及其内酯、多酚类（鞣质）是巴豆属植物的主要化学成分，其他成分还包括三萜、黄酮及生物碱[5-7]。光叶巴豆的主要成分为半日花烷型二萜、松香烷型二萜、克罗烷型二萜、西松烷型二萜、其他类型的二萜类化合物、黄酮类化合物和单萜苷类化合物等。

1.1 半日花烷型二萜

半日花烷型二萜是目前从光叶巴豆中分离出数量较多的二萜类化合物，Huang 等[8]从云南光叶巴豆乙醇提取物中分离得到 17 个半日花烷型二萜，其中 16 个为新化合物；Liu 等[9]从海南光叶巴豆的乙醇提取物中分离得到 7 个半日花烷型二萜，其中 6 个为新化合物（化合物 **18** ～ **23**）。化合物见表 1 和图 1。

1.2 松香烷型二萜类化合物

Song 等[10]从云南光叶巴豆乙醇提取物中分离得到 12 个单体化合物，其中 7 个为松香烷型二萜，均为新化合物。化合物见表 2 和图 2。

基金项目：甘肃省科技厅科研计划项目（No.18ZD2WA002）。

作者简介：韩正枝，男，硕士研究生，助理工程师，主要从事天然药物化学研究，E-mail：hzztdcq@163.com *通信作者：刘荣，男，工程师，主要从事天然药物化学研究，E-mail：271888226@qq.com

表 1　光叶巴豆中的半日花烷型二萜类化合物

Tab 1　Labdane-type diterpenoids in *Croton laevigatus*

化合物	化合物名称	参考文献
1	crotonlaevin A	[8]
2	crotonlaevin B	[8]
3	crotonlaevin C	[8]
4	crotonlaevin D	[8]
5	crotonlaevin E	[8]
6	crotonlaevin F	[8]
7	crotonlaevin G	[8]
8	crotonlaevin H	[8]
9	crotonlaevin I	[8]
10	15-hydroxylabda-7，13（*E*）-diene-17，12-olide	[8]
11	crotonlaevin J	[8]
12	crotonlaevin K	[8]
13	crotonlaevin L	[8]
14	crotonlaevin M	[8]
15	crotonlaevin N	[8]
16	crotonlaevin O	[8]
17	crotonlaevin P	[8]
18	3*α*-acetoxy-*ent*-labda-8（17），12*E*，14-triene-18-ol	[9]
19	3*α*-hydroxy-*ent*-labda-8（17），12*E*，14-triene-18-oic acid	[9]
20	18-hydroxy-*ent*-labda-8（17），12*E*，14-triene-3-one	[9]
21	18-acetoxy-*ent*-labda-8（17），12*E*，14-triene-3*α*-ol	[9]
22	3*α*，18-dihydroxy-15，16-dinorlabda-8（17），11*E*-diene-13-one	[9]
23	15，12-epoxy-*ent*-labda-8（17），12，14-triene-3*α*，18-diol	[9]
24	3*α*-hydroxy-*ent*-labda-8（17），12*E*，14-triene-18-ol	[9]

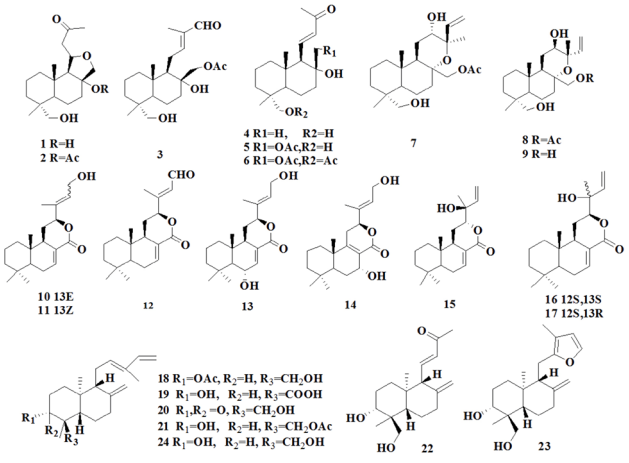


图 1　光叶巴豆中的半日花烷型二萜类化合物

Fig 1　Labdane-type diterpenoids in *Croton laevigatus*

1.3　克罗烷型二萜类化合物

克罗烷型二萜也是从光叶巴豆中分离得到数量较多的化合物，Wang 等 [11] 从海南光叶巴豆的乙醇提取物中分离得到 2 个新克罗烷型二萜；李昌松等 [12] 从云南光叶巴豆根的乙醇提取物中分离得到 7 个单体化合物，其中 4 个为克罗烷型二萜，均为首次从光叶巴豆中分离得到；Zhang 等 [13] 从广东省光叶巴豆的乙醇提取物中分离得到 14 个单体化合物，其中 8 个为克罗烷型二萜。化合物见表 3 和图 3。

表 2　光叶巴豆中的松香烷型二萜类化合物

Tab 2　Abietane-type diterpenoids in *Croton laevigatus*

化合物	化合物名称	参考文献
25	crotolaevigatone A	[10]
26	crotolaevigatone B	[10]
27	crotolaevigatone C	[10]
28	crotolaevigatone D	[10]
29	crotolaevigatone E	[10]
30	crotolaevigatone F	[10]
31	crotolaevigatone G	[10]

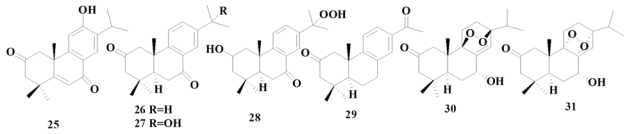


图 2　光叶巴豆中的松香烷型二萜类化合物

Fig 2　Abietane-type diterpenoids in *Croton laevigatus*

1.4　西松烷型二萜类化合物

Zou 等 [17] 从云南光叶巴豆的甲醇提取物中分离得到 7 个化合物，其中 6 个为新的西松烷型二萜类化合物（见表 4 和图 4）。

1.5　其他类型的二萜类化合物

Li 等 [18] 从海南省的光叶巴豆乙醇提取物中分离得到 5 种海松烷型二萜，其中 1 个为新化合物，命名为 Crolaevinoid A；Zhang 等 [13] 从广东光叶巴豆中分离得到 14 个化合物，其中 2 个为 halimane 型二萜，2 个为 laevinane 型二萜。化合物见表 5 和图 5。

1.6　其他类型的化合物

光叶巴豆中的成分除了二萜目前还分离得到其他类型的化合物，如黄酮类、单萜苷类、苯及其衍生物等（见表 6）。

2　药理活性

Liu 等 [9] 从光叶巴豆中提取分离得到 7 种化合物，并以齐墩果酸为阳性对照对蛋白酪氨酸磷酸酶 1B（PTP1B）的抑制作用进行评价，发现化合物 **19** 和化合物 **24** 的抑制能力较强，其 IC_{50} 值分别为 4.11 μg • mL^{-1} 和 8.33 μg • mL^{-1}。

Song 等 [10] 从光叶巴豆中提取分离得到 12 种化合物，并以阿霉素为对照对其抗癌细胞增殖作用进行评价，发现化合物 **26** 和化合物 **31** 有微弱

表 3 光叶巴豆中的克罗烷型二萜类化合物

Tab 3 Clerodane-type diterpenoids in *Croton laevigatus*

化合物	化合物名称	参考文献
32	laevinoid A	[11]
33	laevinoid B	[11]
34	laevigatbenzoate（1）	[12]
35	crolaevinoid C	[13]
36	crolaevinoid D	[13]
37	crolaevinoid E	[13]
38	crolaevinoid F	[13]
39	furocrotinsulolide A	[13-14]
40	3，4，15，16-diepoxy-cleroda-13（16），14-diene-12，17-olide	[13，15]
41	crotonolides E	[13，16]
42	crotonolides F	[13，16]
43	levatin	[22]
44	croverin	[22]
45	crovatin	[22]
46	sonderianial	[22]

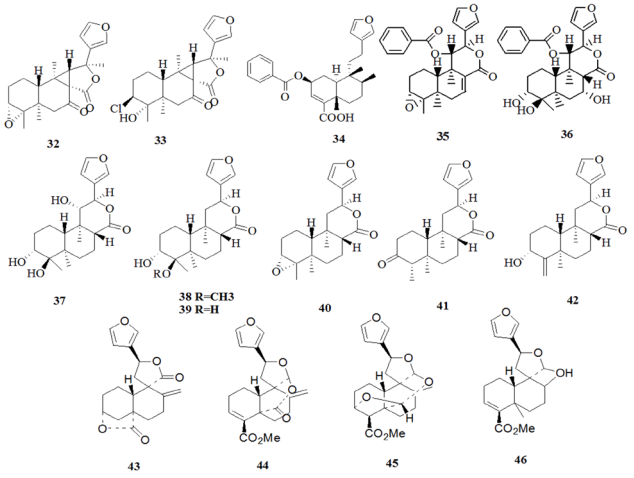


图 3 光叶巴豆中的克罗烷型二萜类化合物

Fig 3 Clerodane-type diterpenoids in *Croton laevigatus*

表 4 光叶巴豆中的西松烷型二萜类化合物

Tab 4 Cembrane-type diterpenoids in *Croton laevigatus*

化合物	化合物名称	参考文献
47	laevigatlactones A	[17]
48	laevigatlactones B	[17]
49	laevigatlactones C	[17]
50	laevigatlactones D	[17]
51	laevigatlactones E	[17]
52	laevigatlactones F	[17]
53	neocrotocembraneic acid	[17]

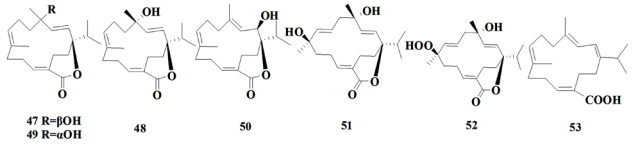


图 4 光叶巴豆中的西松烷型二萜类化合物

Fig 4 Cembrane-type diterpenoids in *Croton laevigatus*

表 5 光叶巴豆中的其他类型二萜类化合物

Tab 5 Other diterpenoids in *Croton laevigatus*

化合物	化合物名称	参考文献
54	crolaevinoids A	[13]
55	crolaevinoids B	[13]
56	crolaevinoid G	[13]
57	crolaevinoid H	[13]
58	crolaevinoid A	[18]
59	macrophypene D	[18-19]
60	macrophypene B	[18-19]
61	isopimara-7，15-dien-3-ol	[18，20]
62	4-epi-sandaracopimaric acid	[18，21]
63	16α，17-dihydroxy-*ent*-kaurane	[10]

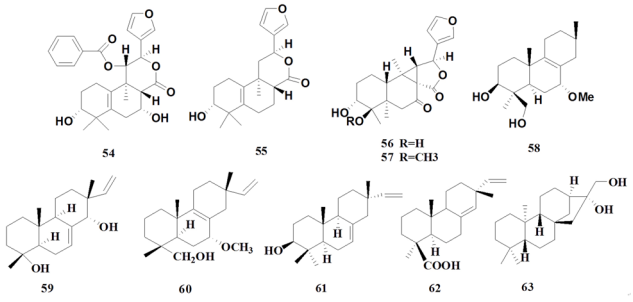


图 5 光叶巴豆中其他类型的二萜类化合物

Fig 5 Other diterpenoids in *Croton laevigatus*

表 6 光叶巴豆中的其他类型化合物

Tab 6 Other compounds in *Croton laevigatus*

化合物	化合物名称	参考文献
64	棕榈酸（palmic acid）"	[22]
65	反式肉桂酸（transeinn-amic acid）	[22]
66	苯甲酸（benzoic acid）	[22]
67	3-（4"-hydroxy-3"，5"-dimethoxyphenyl）propylbenzoate	[23]
68	dihydrodehydrodiconiferyl alcohol-*D*-glucoside	[23]
69	myrsinionoside C	[23]
70	alangionoside J	[23]
71	isorhamnetin	[24]
72	kaempferol 3-*O*-*L*-arabinoside	[24]
73	isorhamnetin-3-*O*-（6-*O*-*E*-caffeoyl）-*D*-galactopyranoside	[24]
74	kaempferol	[24]
75	quercetin	[24]
76	isorhamnetin-3-*O*-rutinoside	[24]
77	kaempferol-3-*O*-*D*-galactoside	[24]
78	kaempferol-3-*O*-rutinoside	[24]
79	kaempferol-3-*O*-*L*-rhamnopyranosyl-（12）-*D*-galactopyranoside	[24]
80	kaempferol-3-*O*-*L*-rhamnopyranosyl-（12）-[-*L*-rhamnopyranosyl-（16）]-*D*-galactopyranoside（mauritianin）	[24]
81	kaempferol-3-*O*-*D*-glucopyranosyl-（13）-[-*L*-rhamnopyranosyl-（12）]-[-*L*-rhamnopyranosyl-（16）]-*D*-galactopyranoside	[24]
82	hexyl *Z*-ferulate	[10]
83	hexyl *E*-ferulate	[10]

的抗 A549 和 MDA-MB-231 细胞增殖作用，对 A549 细胞的 IC_{50} 值分别为 21.2、25.6 μmol•L^{-1}，对 MDA-MB-231 细胞的 IC_{50} 值分别为 33.4、32.7 μmol • L^{-1}，化合物 **63** 对 A549 细胞有明显的抑制活性，IC_{50} 值为 9.8 μmol • L^{-1} [10]。

Zhang 等 [13] 从光叶巴豆中提取分离得到 14 种化合物，并以槲皮素为对照对所有化合物的 NO 抑制作用进行评价，发现化合物 **39** 和化合物 **40** 能显著抑制 NO 的产生，IC_{50} 值分别为（10.6±0.8）μmol • L^{-1} 和（6.0±1.0）μmol • L^{-1} [13]。

邹国安等 [22-25] 从光叶巴豆中提取分离得到 8 种化合物，并对化合物的细胞毒活性进行评价，发现化合物 **34** 和化合物 **48** 对人宫颈癌细胞有弱的细胞毒活性，IC_{50} 值分别为 45.4 μmol • L^{-1} 和 38.4 μmol • L^{-1}。

Fan 等 [26] 从巴豆属植物越南巴豆中分离得到了一种结构较新颖的高度重排的双桥螺旋形二萜 Crokonoid A，其对 HL-60 和 A-549 具有显著的细胞毒性，IC_{50} 值分别为（1.24±0.56）μmol • L^{-1} 和（1.92±0.60）μmol • L^{-1}。

Zhang 等 [27] 从巴豆属植物中分离得到两对大环二萜异构体 mangelonoids A 和 mangelonoids B，推测了其生源合成途径，其中（－）-mangelonoid A 对 NF-κB 有抑制作用，其 IC_{50} 值为（7.27±1.30）μmol • L^{-1}。

3 化合物色谱分离条件和单晶培养条件

随着技术的发展，一些常规的天然产物提取方法如：硅胶柱层析、大孔树脂、葡聚糖凝胶色谱等不能满足学科发展需要，半制备型高效液相色谱越来越多被使用于单体化合物的分离。以下对分离光叶巴豆中化合物所应用的半制备型高效液相色谱条件进行分析总结 [9-10, 13]，见表 7。为了对类似化合物单晶培养条件的选择提供一定的指导，特将来自光叶巴豆并成功培养单晶的单体化合物及其培养条件进行整理，见表 8。

单晶培养对于化合物结构和绝对构型的确定

表 7 部分化合物高效液相色谱分离条件

Tab 7 HPLC chromatographic conditions of some compounds

化合物	仪器型号	检测器型号	柱型号及参数	色谱条件	保留时间 /min	参考文献
35	岛津 LC-20AT	SPD-M20A PDA 检测器	YMC-pack ODS-A（250 mm×10 mm，S-5 mm，12 nm）	3 mL • min^{-1}，MeCN/H_2O，70∶30	7.0	[13]
36	岛津 LC-20AT	SPD-M20A PDA 检测器	YMC-pack ODS-A（250 mm×10 mm，S-5 mm，12 nm）	3 mL • min^{-1}，MeCN/H_2O，70∶30	9.8	[13]
38	岛津 LC-20AT	SPD-M20A PDA 检测器	YMC-pack ODS-A（250 mm×10 mm，S-5 mm，12 nm）	3 mL • min^{-1}，MeCN/H_2O，70∶30	14.4	[13]
57	岛津 LC-20AT	SPD-M20A PDA 检测器	YMC-pack ODS-A（250 mm×10 mm，S-5 mm，12 nm）	3 mL • min^{-1}，MeCN/H_2O，70∶30	8.9	[13]
33	岛津 LC-20AT	SPD-M20A PDA 检测器	YMC-pack ODS-A（250 mm×10 mm，S-5 mm，12 nm）	3 mL • min^{-1}，MeCN/H_2O，70∶30	11.4	[13]
37	岛津 LC-20AT	SPD-M20A PDA 检测器	YMC-pack ODS-A（250 mm×10 mm，S-5 mm，12 nm）	3 mL • min^{-1}，MeOH/H_2O，85∶15	15.6	[13]
41	岛津 LC-20AT	SPD-M20A PDA 检测器	YMC-pack ODS-A（250 mm×10 mm，S-5 mm，12 nm）	3 mL • min^{-1}，MeOH/H_2O，85∶15	17.6	[13]
29	安捷伦 1260	G1365D VWD 检测器（254 nm）	安捷伦 ZORBAX SB-C_{18}（9.4 mm×250 mm，5 μm）	1.5 mL • min^{-1}，CH_3CN-H_2O，45∶55	18.6	[10]
25	安捷伦 1260	G1365D VWD 检测器（254 nm）	安捷伦 ZORBAX SB-C_{18}（9.4 mm×250 mm，5 μm）	1.5 mL • min^{-1}，MeOH-H_2O，75∶25	27.8	[10]
31	安捷伦 1260	G1365D VWD 检测器（254 nm）	安捷伦 ZORBAX SB-C_{18}（9.4 mm×250 mm，5 μm）	1.5 mL • min^{-1}，MeOH-H_2O，75∶25	21.50	[10]
28	安捷伦 1260	G1365D VWD 检测器（254 nm）	安捷伦 ZORBAX SB-C_{18}（9.4 mm×250 mm，5 μm）	1.5 mL • min^{-1}，CH_3CN-H_2O，65∶35	25.50	[10]
30	安捷伦 1260	G1365D VWD 检测器（254 nm）	安捷伦 ZORBAX SB-C_{18}（9.4 mm×250 mm，5 μm）	1.5 mL • min^{-1}，CH_3CN-H_2O，65∶35	26.3	[10]
19	Waters 1525	Waters 2489 UV/visible detector	YMC Pack ODS-A（S-5 μm，250 mm×10 mm，Kyoto，Japan）	3.0 mL • min^{-1}，CH_3CN-H_2O，55∶45	15.6	[9]

续表 7

化合物	仪器型号	检测器型号	柱型号及参数	色谱条件	保留时间 /min	参考文献
20	Waters 1525	Waters 2489 UV/visible detector	YMC Pack ODS-A（S-5 μm，250 mm×10 mm，Kyoto，Japan）	3.0 mL·min^{-1}，CH_3CN-H_2O，55∶45	16.4	[9]
21	Waters 1525	Waters 2489 UV/visible detector	YMC Pack ODS-A（S-5 μm，250 mm×10 mm，Kyoto，Japan）	3.0 mL·min^{-1}，CH_3CN-H_2O，55∶45	20.1	[9]
18	Waters 1525	Waters 2489 UV/visible detector	YMC Pack ODS-A（S-5 μm，250 mm×10 mm，Kyoto，Japan）	3.0 mL·min^{-1}，CH_3CN/H_2O，60∶40	14.3	[9]
22	Waters 1525	Waters 2489 UV/visible detector	YMC Pack ODS-A（S-5 μm，250 mm×10 mm，Kyoto，Japan）	3.0 mL·min^{-1}，CH_3CN/H_2O，60∶40	15.8	[9]
23	Waters 1525	Waters 2489 UV/visible detector	YMC Pack ODS-A（S-5 μm，250 mm×10 mm，Kyoto，Japan）	3.0 mL·min^{-1}，CH_3CN/H_2O，60∶40	14.7	[9]
24	Waters 1525	Waters2489 UV/visible detector	YMC Pack ODS-A（S-5 μm，250 mm×10 mm，Kyoto，Japan）	3.0 mL·min^{-1}，CH_3CN/H_2O，60∶40	15.3	[9]

表 8 部分化合物单晶培养条件

Tab 8 Culture condition of some compounds in single crystal

化合物	培养条件	参考文献
32	石油醚 - 丙酮（室温）	[11]
33	石油醚 - 丙酮（室温）	[11]
35	石油醚 - 丙酮（室温）	[13]
48	石油醚 - 乙酸乙酯（室温）	[17]
56	石油醚 - 丙酮（室温）	[13]

有重要意义，Zou 等[17]在石油醚 - 乙酸乙酯体系中成功培养出化合物 **48** 的单晶。Wang 等[11]在石油醚 - 丙酮体系中成功培养出化合物 **32** 和化合物 **33** 的单晶。Zhang 等[13]在石油醚 - 丙酮体系中成功培养出化合物 **56** 和 **35** 的单晶。

4 结语和展望

光叶巴豆化学成分复杂多样，在抗癌、酶的抑制等方面活性较好，具有较大开发潜力。目前对光叶巴豆成分研究中单体化合物活性研究尚不成熟，应该向多方面拓展并进一步深入研究。对自光叶巴豆中分离得到的量大但活性表现不强的化合物进行衍生，研究其衍生物的应用，或将为药物分子及其先导化合物的发现提供更好的依据。

参考文献

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会 . 中国植物志 [M]. 北京：科学出版社，1992.

[2] Ngadjui BT，Abegaz BM，Keumedjio F，et al. Diterpenoids from the stem bark of *Croton zambesicus* [J]. Phytochemistry，2002，60（4）：345-349.

[3] Vigor C，Fabre N，Fouraste I，et al. Neoclerodane diterpenoids from *Croton eluteria* [J]. J Nat Prod，2002，65（8）：1180-1182.

[4] Gao XH，Xu YS，Fan YY，et al. Cascarinoids A-C，a class of diterpenoid alkaloids with unpredicted conformations from *Croton cascarilloides* [J]. Org Lett，2018，20（1）：228-231.

[5] 吴新安，赵毅民 . 巴豆属植物化学成分及药理作用研究进展 [J]. 天然产物研究与开发，2004，16（5）：467-472.

[6] 江苏新医学院 . 中药大辞典 [M]. 上海：上海人民出版社，1997.

[7] Chen YY，Yang KX，Yang X，et al. New cytotoxic tigliane diterpenoids from *Croton caudatus* [J]. Planta Medica，2016，82（8）：729-733.

[8] Huang HL，Qi FM，Yuan JC，et al. Labdane-type diterpenoids from *Croton laevigatus* [J]. RSC Adv，2014，4：39530-39540.

[9] Liu MN，Zhang MM，Li JY，et al. Six new diterpenoids from *Croton laevigatus* [J]. J Asian Nat Prod Res，2018，20（10）：909-919.

[10] Song JT，Liu XY，Li AL，et al. Cytotoxic abietane-type diterpenoids from twigs and leaves of *Croton laevigatus* [J]. Phytochem Lett，2017，22：241-246.

[11] Wang GC，Zhang H，Liu HB，et al. Laevinoids A and B：Two diterpenoids with an unprecedented backbone from *Croton laevigatus* [J]. Org Lett，2013，15（18）：4880-4883.

[12] 李昌松，赵俊凌，张丽霞，等 . 光叶巴豆根的化学成分研究 [J]. 中成药，2011，33（10）：1740-1742.

[13] Zhang JS，Tang YQ，Huang JL，et al. Bioactive diterpenoids from *Croton laevigatus* [J]. Phytochemistry，2017，144：151-158.

[14] Graikou K，Aligiannis N，Chino L，et al. Chemical constituents from *Croton insularis* [J]. Helv Chim Acta，2006，37（9）：2654-2660.

[15] Pudhom K，Sommit D. Clerodane diterpenoids and a trisubstituted furan from *Croton oblongifolius* [J]. Phytochem Lett，2011，4（2）：147-150.

[16] Liu CP，Xu JB，Zhao JX，et al. Diterpenoids from *Croton laui* and their cytotoxic and antimicrobial activities [J]. J Nat Prod，2014，77（4）：1013-1020.

[17] Zou GA，Ding G，Su ZH，et al. Lactonecembranoids from *Croton laevigatus* [J]. J Nat Prod，2010，73（4）：

792-795.
[18] Li MY，Han ZZ，Liu LF，et al. Isopimarane-type diterpenoids from *Croton laevigatus* [J]. Nat Prod Res，2019，34（20）：2976-2980.
[19] Xu J，Sun YH，Wang MC，et al. Bioactive diterpenoids from the leaves of *Callicarpa macrophylla* [J]. J Nat Prod，2015，78（7）：1563-1569.
[20] Sebastien B，Chiara B，Bernard T. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus* [J]. Phytochemistry，2004，65（8）：1165-1171.
[21] Sy LK，Brown GD. Abietane diterpenes from *Illicium angustisepalum* [J]. J Nat Prod，1998，61（7）：907-912.
[22] Zou GA，Zhang HW，Yang JS，et al. Laevigatbenzoate from *Croton laevigatus* Vahl [J]. J Nat Med，2011，65：391-394.
[23] Zou GA，Aisa HA，Zhang HW，et al. Chemical composition of *Croton laevigatus* [J]. Chem Nat Compd，2012，47（6）：993-994.
[24] Zou GA，Aisa HA，Zhang HW，et al. Flavonoids from *Croton laevigatus* [J]. Chem Nat Compd，2012，48（4）：687-688.
[25] 邹国安 . 光叶巴豆、毛叶巴豆化学成分研究 [D]. 北京：中国协和医科大学，2009.
[26] Fan YY，Shi SQ，Deng GZ，et al. Crokonoids A-C，a highly rearranged and dual-bridged spiro diterpenoid and two other diterpenoids from *Croton kongensis* [J]. Org Lett，2020，22（3）：929-933.
[27] Zhang WY，Zhao JX，Li S，et al. Mangelonoids A and B，two pairs of macrocyclic diterpenoid enantiomers from *Croton mangelong* [J]. Org Lett，2018，20（13）：4040-4043.

（收稿日期：2020-11-06；修回日期：2020-12-30）

肺吸入制剂非临床药代动力学研究的一般策略

陈美玲，黄亚军，姜德建，王小青*（湖南省药物安全评价研究中心，新药药效与安全性评价湖南省重点实验室，湖南普瑞玛药物研究中心有限公司，长沙 410331）

摘要：肺吸入制剂是近年来发展较快的一种新兴剂型，因其无首过效应、可降低毒副作用等特点受到青睐。肺吸入制剂的非临床药代动力学（PK）研究主要包括整体动物 PK 研究和体外 PK 研究。在进行整体动物 PK 研究时需对动物种属的选择、给药准确性的监测、体内暴露量的检测等多加关注；体外 PK 研究主要包括离体脏器、酶系、细胞试验等研究。本文就国内外对肺吸入制剂非临床 PK 研究评价方法进行简要综述。

关键词：肺吸入制剂；非临床；药代动力学研究
中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1685-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.035

Non-clinical pharmacokinetics of lung inhalation preparations

CHEN Mei-ling, HUANG Ya-jun, JIANG De-jian, WANG Xiao-qing* (*Hunan Research Center for Safety Evaluation of Drugs*, *Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs*, *Hunan Prima Drug Research Center Co.*, *Ltd*, *Changsha* 410331)

Abstract: As a rapidly developing new dosage form in recent years, lung inhalation preparations, owing to almost non-first-pass effect, fewer toxic and side effects, have been increasingly favored. The non-clinical pharmacokinetic (PK) studies of lung inhalation preparations mainly include in vivo and in vitro studies. In the vivo PK studies, more attention should be paid to the selection of animal species, monitoring of doses, and determination of drug exposure. In vitro PK mainly includes isolated organs, metabolic enzymes, and cell experiments. This article briefly reviewed the non-clinical PK studies of lung inhalation preparations home and abroad.

Key words: lung inhalation preparation; non-clinical; pharmacokinetic study

作者简介：陈美玲，女，硕士，助理研究员，主要从事新药临床前药代动力学研究，E-mail：chenmeiling@hnse.org *通信作者：王小青，女，博士，助理研究员，主要从事新药临床前药理与安全性评价研究，E-mail：wangxiaoqing@hnse.org

肺部给药也称吸入给药，是指运用特殊的装置，将药物通过呼吸运输至肺部，发挥局部或全身作用的一种给药方式[1-2]。与其他给药途径比较，因肺泡表面积大，膜通透性高，肺部酶活性低，肺吸入制剂药代动力学（pharmacokinetic，PK）具有以下特征：① 药物吸收迅速，无肝脏首过效应；② 药物在非靶器官的分布较低，可减少或避免药物对机体的毒副反应[3-7]。近年来，随着肺吸入制剂的快速发展，针对肺吸入制剂 PK 研究的评价方法和手段也有了长足的进步。本文结合目前国内外相关研究进展，对肺吸入制剂非临床 PK 研究的一般策略进行综述，为肺吸入制剂的研究开发提供支持。

1 肺吸入制剂非临床 PK 研究的一般考虑

常用的肺吸入制剂主要包括定量吸入剂、干粉吸入剂、雾化吸入剂等[8-9]。定量吸入剂又称气雾剂，是指将药物与抛射剂装于耐压密闭容器中，借抛射剂将内容物喷出使用的制剂；干粉吸入剂又称粉雾剂，是指将药物或与载体的混合物置于吸入装置内，通过患者自主吸入的一种制剂；雾化吸入剂又称喷雾剂，是指将药物或与辅料置于特制装置中，借助手动泵压力、高压气体或超声振动将内容物释出使用的制剂。

与常规制剂不同的是，肺吸入制剂进入循环系统主要有两条途径：第一条为部分药物经肺部吸入后，经过黏液层、上皮细胞、基底膜、间质组织吸收入血；第二条为其余部分药物沉积于口腔，通过吞咽至胃肠道吸收入血。药物在肺部吸收的方式包括被动扩散、主动转运、细胞旁路转运、淋巴细胞吞噬等，一般来说，药物雾化后的粒径大小和理化性质对吸收方式及吸收部位有较大影响，如脂溶性较大的药物吸收方式主要为被动扩散[10-11]。

对于治疗肺部疾病的肺吸入制剂，其有效性主要取决于沉积在肺部的药物量，而其安全性需要考虑两个方面，包括局部安全性和全身安全性。由于肺部药物代谢与肝肠代谢存在较大差异，肺部酶活性普遍较低，且表达模式也不同，因此需要特别关注药物在肺部代谢物的暴露量、药物间的相互作用、以及药物是否可被肺部代谢酶活化等，以更好地评估其治疗效果或毒性反应。

2 肺吸入制剂非临床 PK 研究的关注点

2.1 动物种属的选择

肺吸入制剂的非临床 PK 研究一般采用健康、成年的动物进行。在考虑与人体 PK 性质相关性的前提下，尽可能选择与毒理学和药效学研究相同的动物。创新性药物应选用两种或两种以上的动物，其中一种为啮齿类动物，另一种为非啮齿类动物。其他药物，可选用一种动物，建议首选非啮齿类动物。大鼠是肺吸入制剂非临床 PK 研究中最常用的动物，尤其在研发初期，可用于候选药物的筛选、剂量设计等。例如，孙杰等[12]利用大鼠考察吸入与注射给予妥布霉素后体内药物的分布情况及毒性反应。非人灵长类动物（如食蟹猴）因其与人类在免疫学和解剖学上的相似性，也被用于开展一些特殊吸入制剂（如生物大分子）的非临床 PK 研究。有研究显示，与啮齿类动物相比，猕猴吸入给予西妥昔单抗时生物利用度更低[12-13]。此外，小鼠、兔等实验动物也可用于肺吸入制剂的非临床 PK 研究。

2.2 给药准确性的监测

为了确保在吸入给药时递送药物的准确性，在给药期间需对药物递送剂量、递送均一性和稳定性及空气动力学粒径分布进行监测[14-20]。在非临床研究阶段，通常在正式给药前需对雾化生成方法及含量检测方法进行考察和验证。

2.2.1 递送剂量的监测[21-24] 肺吸入制剂的非临床 PK 研究通常采用吸入染毒暴露系统进行。对吸入染毒系统进行参数设定，调整气溶胶流量及稀释气流量，可雾化产生不同浓度的药物颗粒。通过采样瓶或合适的滤膜采集一定时间内任意雾化通道雾化后的气溶胶颗粒（一般连续多次采集）并通过高效液相色谱仪等方法检测采样瓶或滤膜中的药物浓度，换算成气溶胶中的药物浓度，即可获得一定雾化时间内的药物剂量。对于液体制剂（气雾剂和喷雾剂），通常采用高效液相色谱法、气相色谱法等方法检测有效成分的含量。对于无挥发性的单一化合物，可采用称重法进行气溶胶浓度的检测。经济合作与发展组织（OECD）对液体和固体型气溶胶浓度的允许偏差为 ±20%[13]。

2.2.2 递送稳定性和均一性的考察 肺吸入制剂在吸入染毒系统持续雾化一定时间后，通过间断采样和检测，可考察持续雾化的稳定性。通过对雾化通道进行分通道采样，采集多个通道的样品进行检测，可考察各雾化通道间的均一性。对于多层的小动物单浓度口鼻动态暴露吸入染毒系统，还需对各层雾化通道进行分通道采样和检测，以考察各层雾化通道间的均一性。雾化后各时间点和各通道的药物浓度均应在目标浓度的

±20% 范围内。

2.2.3 空气动力学粒径分布的监测 气溶胶中药物颗粒的粒径分布是影响药物在呼吸道和肺部沉积的关键参数，因此，空气动力学粒径分布是给药过程中质量控制的重要指标之一。测试方法主要有碰撞法、激光衍射法和飞行时间粒径分析法，前两种方法较为常用 [25]。临床上，FDA 建议采用至少两种原理的检测方法进行空气动力学粒径分布的研究，且其中一种必须采用多级碰撞法。碰撞法是目前吸入制剂体外粒度分析最经典的方法，也是美国和欧洲药典评价吸入制剂体外粒度分布推荐使用的方法。比如《中国药典》收载的双层液体碰撞器，美国、欧洲药典收载的 Andersen 多级撞击器、Marple miler 多级撞击器等。近年来，新一代多级惯性碰撞器使用普遍，质量中值空气动力学直径和标准偏差等常用来作为评价参数。

2.3 体内暴露量的检测

生物样品的分析方法包括色谱法、免疫学法、放射性同位素标记法和微生物学方法等。其中色谱法包括高效液相色谱法、气相色谱法和色谱 - 质谱联用法；免疫学法包括放射免疫分析法、荧光免疫分析法、酶免疫分析法等。由于生物样本药物浓度低、样品量少、内源性物质干扰多且个体差异大，应根据药物的性质、生物样品中药物的浓度选择不同的检测方法。

进行组织分布研究时，除采集心、肝、脾、肾、脑等主要组织器官外，还需关注呼吸系统组织器官如鼻咽（含鼻甲）、喉部（含会厌）、主气管、支气管、肺脏及肺灌洗液中药物的分布。胡文晋等 [26] 在研究雾化吸入羟基喜树碱后药物在肺癌小鼠中的组织分布中发现，肝脏、心脏、肾脏在给药 30 min 后总碱药物达到峰值，其中肝内浓度最高，而肾和心的总碱分别占肝内峰浓度的 33.8% 和 74.2%。

在血浆 PK 和组织分布的研究中也会广泛运用到微透析技术，不仅可以减少实验动物的剖杀，而且微透析的样品无需匀浆，样品中不含大分子物质，无需前处理，可极大地节约时间成本 [27-28]。例如，任亚超 [28] 在盐酸氨溴索干粉吸入剂的研究中利用微透析技术得出盐酸氨溴索干粉吸入剂能被运输到靶部位，与静脉给药相比，可达到更高的局部活性、持续更长的时间。

在进行药动学参数计算时，因为吸入制剂给药途径特殊，需先按实验动物体质量计算每分钟通气量 $RMV = 0.608\ m^{0.852}$（m 是实验动物的体质量，单位为 kg），再计算实际给药剂量 $D =$（给药时长 × 气溶胶中药物浓度 × 通气量 ×IF）/ 平均体质量（IF 为可吸入颗粒的百分数，当气溶胶中有 90% 以上的颗粒粒径小于 7 μm 时，$IF = 1$），最后用实际给药剂量计算药动学参数 [29]。常见药动学参数详见表 1。

表 1 常见药动学参数汇总

分类	参数	定义和意义
吸收	吸收分数（F_a）	药物在血管外给药的方式下，吸收入血的药物占总给药量的比例，描述了药物的吸收程度
	绝对生物利用度（F）	药物在血管外给药的方式下，吸收入血且能被利用的药物占总给药量的比例，描述了药物可被利用的程度
	肝提取率（E_h）	药物经由循环系统流经肝脏后被肝脏代谢掉的比例，通常用来描述肝首过代谢的严重程度
	平均吸收时间（MAT）	药物在血管外给药的方式下，吸收入血的平均时间，描述了药物被吸收的速率
	吸收速率常数（K_a）	理论上为 MAT 的导数，描述了药物被吸收的速率
分布	稳态表观分布容积（Vd_{ss}）	稳态下体内药物总量与血药浓度的比值，描述了药物的组织内分布程度
	分布清除率（CL_d）	从中央房室向外周房室分布的清除率，可用来描述药物的分布速率
消除	系统清除率（CL_s）	药物在循环系统中的清除率，在一级动力学过程的前提下、理论上为药物在机体内的绝对消除速率与血药浓度的比值，用来描述药物的清除速率
	消除速率常数（K_{el}）	理论上等于 0.693/ 消除半衰期，用来描述药物的消除速率
	末端半衰期（$t_{1/2}$）	由曲线末端的血药浓度点拟合得到的半衰期，在“曲线末端仅具有消除这一因素”的假设下，末端半衰期等于消除半衰期
总体	达峰时间（t_{max}）	达峰浓度处的时间点
	达峰浓度（C_{max}）	药时曲线中的最高浓度点
	平均驻留时间（MRT）	药物在体内的平均停留时间；如为血管外给药，则也包括吸收过程中所消耗的时间
	AUC	药时曲线中的曲线下面积（C-t），通常用来描述体内循环系统中的暴露量
	$AUMC$	药时曲线中的曲线下面积（$C \times t$-t），本身不具备实际意义，是用来计算 MRT 和 Vd_{ss} 等参数的数据来源

3 体外 PK 研究方法的应用

整体动物 PK 研究固然能较为全面、系统地对肺吸入制剂进行评价，但其需要配套的动物设施设备、吸入染毒系统，且费时费力。在研发早期

或因条件受限，无法开展系统的非临床 PK 研究的情况下，研究者们也会运用体外方法进行研究。

3.1 离体脏器的应用

在研究相关机制时，更多地会采用动物离体脏器。例如，Eriksson 等 [30] 利用大鼠离体肺单向灌注模型（IPRL）研究沙丁胺醇、沙美特罗等十余种药物的离体渗透性，采用计算机模拟技术建立生理吸收模型，并与体外细胞模型结合，经校正后用于预测药物肺部吸收。此外，在研究药物肺部渗透能力时，也会用到蟾蜍。例如，Chen 等 [31] 利用离体蟾蜍肺构建给药池 - 肺 - 接收池模型，研究脂质体的渗透能力。

3.2 酶系的应用

肺部药物代谢酶主要分布在Ⅱ型细胞中，种类齐全，含量低，主要是细胞色素 P450（CYP），其大部分位于 Clara 细胞的内质网上，且具有底物特异性 [32]。肺部药物代谢与肝肠代谢存在较大差异，肺部酶活性普遍较低，且表达模式也不同。肺部常见的 CYP 酶为 CYP1B1、CYP2B6、CYP2E1、CYP2J2、CYP3A5 和 CYP1A1，而肝脏中常见的 CYP 酶为 CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 与 CYP3A4。比如，CYP3A4 在肝脏中活性最高，而在肺组织较低。同时，因为肺部的代谢能力低，局部代谢产物难清除，新药研究过程中需关注肺部局部代谢物之间的毒性风险和相互作用，如可利用肺 S9 筛选候选药物。肺部代谢酶还可活化部分药物，使其治疗效果更佳，如肺部酯酶可将丙酸倍氯米松代谢为更有效的 17- 倍氯米松单丙酸酯 [33]。

3.3 细胞学的应用

Calu-3 细胞是一种非小细胞肺癌细胞，经培养可形成极化的单层细胞，细胞与细胞之间形成紧密连接，具有分泌黏液和表达囊性纤维化跨膜转导调节因子、各种离子通道等功能，无论是形态学还是功能上都与人体呼吸道上皮细胞类似。因此，Calu-3 细胞成为筛选肺吸入制剂的强大工具。肺癌细胞，如 A549 细胞，既可作为抗肿瘤药物的靶细胞用于肺吸入制剂的药效学研究，又因其无限增殖、性状稳定等特点而被广泛用于细胞药物 PK 研究。细胞模型的广泛应用，对肺吸入药物的作用机制、吸收转运途径、大分子药物的吸入有效性及细胞毒性等研究提供了较大便利 [34-35]。

4 结语

非临床 PK 研究在药物研发早期的有效性和安全性评价中有着举足轻重的作用，对于肺吸入制剂这种特殊的给药剂型，尽早开展 PK 研究尤为重要。在欧盟，大多数的肺吸入制剂均以 PK 研究为基础而获批 [36]。在涉及到前药或改变给药途径的前药时，需特别关注前药是否可以在呼吸系统转化成原药；在进行组织分布研究时，除常规的主要脏器外，还需重点关注呼吸系统组织器官如鼻咽（含鼻甲）、喉部（含会厌）、主气管、支气管、肺脏及肺灌洗液中的药物分布；在进行代谢研究时，需关注药物是否被肺部药物代谢酶所代谢，从而影响其生物利用度，并为代谢产物及其途径的鉴定设计提供参数。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 二部 [S]. 2010：附录 I L.

[2] Cazzola M，Matera MG. Bronchodilators：Current and future [J]. Clin Chest Med，2014，35（1）：191-201.

[3] 杨文智，宁黎丽，罗俊永，等 . 供雾化器用的液体制剂（溶液型）仿制药药学研发一般考虑 [J]. 中国新药杂志，2019，28（18）：25-27.

[4] 董爱琴，徐泳 . 肺部吸入给药系统研究进展 [J]. 江西医药，2007，42（1）：82-85.

[5] 曾肖肖 . 2- 甲氧基雌二醇干粉吸入剂的研究 [D]. 郑州：郑州大学，2014.

[6] 朱凤昌，王爱国，刘丽宏，等 . 局部作用经口吸入制剂呼吸用药生物等效性国际指导原则对比分析 [J]. 中国药学杂志，2020，55（24）：2078-2084.

[7] 徐景娜，周学海，杨敏，等 . 肺部吸入制剂的研究概况 [J]. 药物评价研究，2019，42（12）：2305-2308.

[8] Dhand R. Inhaled drug therapy 2016：The year in review [J]. Respir Care，2017，62（7）：978-996.

[9] 萧惠来 . FDA 发布的“改变剂型和改变给药途径药品非临床安全性评价指导原则”介绍 [J]. 药物评价研究，2016，39（2）：171-174.

[10] Patton JS，Byron PR. Inhaling medicines：delivering drugs to the body through the lungs [J]. Nat Rev Drug Discov，2007，6（1）：67-74.

[11] Patton JS. The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery [J]. Proc Am Thorac Soc，2004，1（4）：338-344.

[12] 孙杰，石劲敏，翁琳琳，等 . 妥布霉素吸入与注射给药后在大鼠体内的分布 [J]. 中国医药工业杂志，2015，46（8）：871-875.

[13] Phuong NL，Khoa ND，Inthavong K，et al. Particle and inhalation exposure in human and monkey computational airway models [J]. Inhal Toxicol，2018，30（11-12）：416-428.

[14] 孔颖，李宁，卢杨，等 . 肺吸入制剂的药代动力学评价手段研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2019，24（5）：595-600.

[15] OECD（2009）. Test No. 403：Acute Inhalation Toxicity，OECD Guidelines for the Testing of Chemicals，Section 4[EB/OL]. https：//doi. org/10.1787/9789264070608-en.（2009-09-07）[2021-03-15] https：//doi. org/10.1787/

9789264070608-en.

[16] FDA. Draft guidance on budesonide [EB/OL].（2012-09-01）[2021-03-15]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/Budesonide_Inhalation_Sus_20929_RC_09-12.pdf.

[17] FDA. Metered dose inhaler（MDI）and dry powder inhaler（DPI）drug products-quality considerations [EB/OL].（2018-04-01）[2021-03-15]. https://www. fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/metered-dose-inhaler-mdi-and-dry-powder-inhaler-pidrug-products-quality-considerations.

[18] EMA. Guidance on the pharmaceutical quality of inhalation and nasal products [EB/OL]. (2006-10-01)[2021-03-15]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-pharmaceutical-qualityinhalation-nasal-products_en.pdf.

[19] EMA. Quality of medicines questions and answers：Part 2[EB/OL].（2018-12-11）[2021-03-15].https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/scientific-guidelines/qa-quality/quality-medicinesquestions-answers-part-2#specific-types-of-product -orally-inhaled-products-section.

[20] 周学海，张成飞，杨敏，等 . 肺部吸入制剂评价方法研究进展 [J]. 中草药，2019，42（9）：1891-1895.

[21] Pan YP，Wang YS. Atmospheric wet and dry deposition of trace elements at 10 sites in Northern China [J]. Atmos Chem Physics，2015，15（20）：951-972.

[22] Santiago JL，Martilli A，Martin F. On dry deposition modelling of atmospheric pollutants on vegetation at the microscale：Application to the impact of street vegetation on air quality [J]. Bound-Lay Meteorol，2017，162（3）：451-474.

[23] Guo XY，Ji HB，Li C，et al. The sources of trace element pollution of dry depositions nearby a drinking water source [J]. Environ Sci Pollut Res，2017，24（4）：3829-3842.

[24] 王诗太，金勇，李克，等 . 醇类溶剂对电子烟雾化气溶胶粒径分布的影响 [J]. 中国烟草学报，2017，23（6）：31-35.

[25] 胡军华 . 碰撞法和激光衍射法评价雾化吸入剂粒径及分布的影响因素 [D]. 广州：华南理工大学，2015.

[26] 胡文晋，胡巍，张超，等 . 雾化吸入羟基喜树碱在肺癌小鼠体内药动学和组织分布 [J]. 中国医院药学杂志，2013，33（2）：103-107.

[27] 余自成，陈红专 . 微透析技术在药物代谢和药代动力学研究中的应用 [J]. 中国临床药理学杂志，2001，17（1）：76-80.

[28] 任亚超 . 盐酸氨溴索干粉吸入剂的研究 [M]. 沈阳：沈阳药科大学，2008.

[29] 任俊明，郭永清 . 机械通气相关性肺损伤大鼠模型的建立与评价 [J]. 中国当代医药，2016，23（6）：11-14.

[30] Eriksson J，Sjogren E，Thorn H，et al. Pulmonary absorption-estimation of effective pulmonary permeability and tissue retention of ten drugs using an ex vivo rat model and computational analysis [J]. Eur J Pharm Biopharm，2018，124：1-12.

[31] Yang ZJ，Chen XY，Huang WH，et al. Liposomes prolong the therapeutic effect of anti-asthmatic medication via pulmonary delivery [J]. Int J Nanomedicine，2012，7：1139-1148.

[32] 年华，马明华，徐玲玲，等 . 细胞色素 P450 酶与药物代谢的研究进展与评价 [J]. 中国医院用药评价与分析，2010，10（11）：964-967.

[33] 黎翊君 . 丹参总酚酸肺部吸入给药的评价研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2018.

[34] Macvinish LJ，Cope G，Ropenga A，et al. Chloride transporting capability of Calu-3 epithelia following persistent knockdown of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator，CFTR [J]. Bri J Pharmacol，2010，150（8）：1055-1065.

[35] 胡晓 . 聚合物纳米胶束经肺部给药后缓释、吸收与转运机制研究 [D]. 北京：北京协和医学院，2014.

[36] EMA. Questions & answers：positions on specific questions addressed to the Pharmacokinetics Working Party（PKWP）[EB/OL].（2016-07-22）[2021-03-15]. http: / / www. ema. europa. eu /docs/ en_GB /document_library / Scientific_guideline /2009 /09 /WC500002963. pdf.

（收稿日期：2020-10-06；修回日期：2021-05-17）

黄精多糖的含量影响因素及其抗糖尿病作用研究进展

王雪芹[1]，黄勇[2]，叶方[1*]，卢伟[1]，黄良永[1]，王永慧[1]（1. 十堰市太和医院（湖北医药学院附属医院），湖北 十堰 442000；2. 湖北医药学院，湖北 十堰 442000）

摘要：黄精在中医中用于治疗消渴症，黄精多糖是其主要的化学成分和活性成分。现代药理学研究证明黄精多糖具有显著的降血糖效果，可降低糖尿病并发症发生的风险并改善其症状，保护受糖尿病并发症损伤的重要器官。而黄精多糖的含量受品种、产地、生长环境、炮制方法等因素的影响，本文对黄精多糖的含量影响因素及其抗糖尿病作用机制进行综述，为黄精多糖在抗糖尿病方面的研究和应用提供参考。

关键词：黄精多糖；影响因素；糖尿病；糖尿病并发症
中图分类号：R286 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1690-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.036

Influence factors on the content of polygonatum polysaccharide and its anti-diabetes mechanism

WANG Xue-qin[1], HUANG Yong[2], YE Fang[1*], LU Wei[1], HUANG Liang-yong[1], WANG Yong-hui[1] (1. *Department of Pharmacy*, *Taihe Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine*, *Shiyan Hubei* 442000; 2. *Hubei University of Medicine*, *Shiyan Hubei* 442000)

Abstract: Polygonati Rhizoma is a traditional Chinese medicine for diabetes. Polygonatum polysaccharide is the main chemical component and bioactive ingredient. Modern pharmacological studies have confirmed that polygonatum polysaccharide may significantly decrease the blood glucose levels, prevent and treat diabetes complications, and protect vital organs. Since the polygonatum polysaccharide content is affected by its varieties, places of origin, growth environment, processing methods and other factors, this article summarizes the anti-diabetes mechanisms and influence factors of polygonatum polysaccharide to provide reference for the prevention and treatment of diabetes.

Key words: polygonatum polysaccharide; influence factor; diabetes mellitus; diabetes complication

糖尿病是一种慢性代谢性疾病，严重危害人类健康。据推测，2030 年全球糖尿病患病人数将增至 4.3 亿[1]，其中 2 型糖尿病患病人数也在不断增加[2]。目前用于治疗糖尿病的药物主要包括注射用胰岛素和口服化学降糖药，胰岛素的给药途径不方便且易导致低血糖，长期口服化学降糖药可能会对胃肠道、皮肤、神经及肝胆等造成伤害[3]。中药作用缓和、持久、不良反应一般较少，能从整体上治疗和防治慢性进展性疾病，且有研究表明中药提取物对糖尿病所致的器官损伤具有保护作用[4]。因此，开发高效低毒的抗糖尿病中药具有良好发展前景。

黄精是用于治疗消渴症的传统中药，为百合科植物滇黄精（*Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.）、黄精（*Polygonatum sibiricum* Red.）或多花黄精（*Polygonatum cyrtonema* Hua）的根茎[5-6]。现代研究证明，黄精具有降血糖、抗衰老、免疫调节等多种药理活性[7-8]，而黄精多糖是其抗糖尿病的主要活性成分之一[9]。本文对黄精多糖的含量影响因素及抗糖尿病作用进行综述，为黄精资源的合理利用提供参考。

1 黄精多糖含量的影响因素

药用植物有效成分的含量通常会受到品种、生态环境以及加工方法等多种因素的影响。

1.1 产地和品种差异对多糖含量的影响

查阅相关文献[10-24]，汇总了全国 14 个省份黄

基金项目：武当山中医药资源开发及在重大疾病防治中的应用（No. FDFR201616）。
作者简介：王雪芹，女，硕士，主要从事中药质量研究，E-mail：403297000@qq.com *通信作者：叶方，男，主任药师，副教授，主要从事中药资源开发与药品质量控制研究，E-mail：yxwen8801129@sina.com

精多糖的含量，发现不同产地、不同品种黄精多糖的含量均有差异（见表 1）。黄精以安徽九华山出产的多糖含量最高，为 17.79%[12]；多花黄精以贵州贵阳出产的多糖含量最高，为 19.79%[15]；滇黄精以贵州绥阳出产的多糖含量最高，为 45.56%[15]。说明黄精品种差异、产地差异均会对黄精多糖的含量产生影响，但其相关性还需进一步研究。

表 1 不同产地黄精药材中多糖含量的比较

Tab 1 Content of polygonatum polysaccharide from different areas

产地	多花黄精 /%	黄精 /%	滇黄精 /%
江西	2.23 ～ 13.37		
贵州	3.77 ～ 19.79	15.52	0.82 ～ 45.56
安徽	4.90 ～ 13.21	12.11 ～ 17.79	
浙江	5.35 ～ 16.35		
广西	4.29 ～ 7.17		
云南	6.26	4.0 ～ 7.0	3.12 ～ 14.28
重庆	6.85		
湖南	6.62 ～ 8.05		
湖北	6.24		
四川	7.23		
山东	8.04 ～ 10.10	10.75 ～ 12.56	
广东	14.09		
河南	15.24	4.47 ～ 12.36	
陕西		7.98 ～ 10.74	

1.2 生长年份对多糖含量的影响

黄精为多年生植物，随着生长年限的增加，黄精多糖的含量也不断发生变化。黄精多糖从种苗开始富集量逐年增高，第 3 年达到峰值，到第 4 年开始下降，但到第 5 年又开始上升，第 10 年生再次下降 [21，25-27]。多花黄精多糖的富集规律与黄精相近，也是在第 3 年达到最高，随后逐年下降 [28]。相关研究还发现一年中黄精多糖含量在地上部分完全枯萎时（10 月底）达到最高峰。从黄精多糖的富集规律看，虽然在第 3 年和第 9 年黄精多糖含量较高，但随着生长年限的增加，黄精的单节重量下降，且节龄大的黄精局部腐烂，组织松散，品质不佳，而 3 年生黄精的多糖含量及品质稳定，因此综合考虑多糖含量及单节重量，建议将黄精的最佳采收期确定为 3 年。

1.3 生长环境对多糖含量的影响

不同的生长环境对植物中次生代谢产物的富集都会产生影响，研究发现生长环境中水分、光照强度、海拔高度以及林型分类等都是影响黄精多糖富集的因素。贾向荣等 [29] 研究了土壤中水分对黄精多糖含量的影响，发现田间持水量为 50% 及 75% 时最适合黄精多糖的累积。沈琼桃等 [30] 研究了海拔高度 150 ～ 1200 m 对黄精多糖含量的影响，发现多糖的含量随海拔的升高而降低，以海拔 150 ～ 600 m 内黄精长势较好，多糖含量较高。倪天宇等 [23] 研究发现不同生长环境下黄精多糖的含量差异较大，以锥栗林中生长的黄精多糖含量较高，其他由高到低顺序依次为毛竹林、常绿阔叶林、大田、针阔混交林。有研究比较了林型及郁闭度对黄精多糖含量的影响，发现毛竹林、苹果林等阔叶林下黄精多糖含量较高，针叶林（杉木林、马尾松林）及大田（玉米地）较低；光照强度以 40% 透光率遮阳网最低，郁闭度为 0.4 ～ 0.6 时多糖含量最高，郁闭度高于 0.8 时多糖累积效果最差，说明黄精虽为喜阴植物，但生长发育需要适度散射光 [25，31]。综合各种生长环境分析，海拔梯度为 150 ～ 600 m、田间持水量为 50% 及 75%、郁闭度为 0.4 ～ 0.6 的毛竹林或阔叶林下的生长环境有利于黄精多糖的累积。

1.4 炮制对多糖含量的影响

中草药经过炮制后，可以达到增效减毒、改变药性的作用。黄精作为传统中药，生制兼用，炮制后黄精的麻味减少，可减轻对咽喉的刺激，改善口感，并增强补益作用，这可能与炮制过程中化学成分的变化有关 [32-34]。黄精经过炮制后其多糖的含量会发生改变，多数研究表明黄精清蒸后，多糖的含量会降低 [10，14，18]；个别研究认为清蒸后多糖的含量升高 [35]，出现这种差异的原因还需进一步研究。

炮制时间及炮制次数也是影响多糖含量的因素，含量随炮制时间及次数的增加而降低 [36-40]。考察九蒸九晒法炮制黄精时，有研究表明当蒸晒次数为 1 ～ 5 时，多糖含量与蒸晒次数成正比；当蒸晒次数为 6 ～ 9 时，多糖含量与蒸晒次数成反比 [41]。而现行药典以多糖的含量作为黄精的质量评价指标，说明并不是蒸晒次数越多，黄精的品质越佳，因此建议将黄精生品及炮制品的药理作用进行深入研究，明确各类黄精药材的药理活性成分，确定各类黄精药材的含量测定指标。

此外，炮制过程中添加的辅料对多糖的含量也有影响，含量依次为黑豆制 6.26%、蔓荆子制 5.94%、（黑豆＋姜＋蜜）制 5.66%、（黑豆＋蜜＋酒）制 4.44%、九蒸九晒法制 3.6%、黄酒单次蒸制 3.54%、熟地黄制 2.95%[35]，说明辅料在黄精炮制过程中可能会影响化学成分的分解转化。

2 黄精多糖的抗糖尿病作用研究

《中国药典》2020 版记载黄精用于治疗“内热消渴”[6]。而消渴症有多饮、多尿、多食的特征，与糖尿病的症状相似，近年来研究发现黄精多糖是黄精抗糖尿病的活性成分，其不仅能够降低血糖，还能提高糖尿病小鼠的胸腺、脾脏、肝脏指数，对机体起到一定的保护作用 [42]。

2.1 黄精降血糖作用机制研究

2.1.1 升高胰岛素的水平 胰岛素是机体中调节血糖的重要物质，当机体血糖浓度偏高时，能够快速降低血糖，使体内血糖浓度达到平衡。贾璐等[43]发现对高脂饲料诱导的糖尿病小鼠以 500 mg·kg^{-1} 黄精多糖水溶液（25 g·L^{-1}）每日灌胃 1 次，连续给药 8 周，可降低其空腹血糖值，提高胰岛素受体表达，升高血浆胰岛素及 C 肽水平，并能抑制高血糖环境下的高氧化应激状态。有研究对链脲佐菌素（STZ）诱导的糖尿病小鼠以黄精多糖 4 mL/（kg·d）每日灌胃 2 次，连续给药 8 周，得出同样的结果，并认为其作用机制可能是通过减少胰岛细胞凋亡，下调 Caspase-3 蛋白的表达实现的[44-45]。

2.1.2 抑制 α-葡萄糖苷酶 α-葡萄糖苷酶在糖的催化反应中起着重要作用，抑制 α-葡萄糖苷酶可延缓碳水化合物的吸收，降低餐后血糖。高英等[46]研究了黄精多糖对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用，发现将黄精醇提物进行分离纯化分段后，不同分子量（M）黄精多糖对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性不同，抑制活性由强到弱依次为 M 为 2000 ～ 14 000（含单—葡萄糖）的多糖、M ＞ 50 000（含甘露糖和葡萄糖两种单糖）的多糖、M 为 14 000 ～ 50 000（含甘露糖、葡萄糖、半乳糖三种单糖）的多糖、M ＜ 2000（含阿拉伯糖和葡萄糖两种单糖）的多糖，并且其降血糖活性的强弱也与抑制 α-葡萄糖苷酶活性的强弱一致，其中 M 值在 2000 ～ 14 000 的多糖对四氧嘧啶诱导的糖尿病小鼠降血糖作用最强，说明黄精多糖组成不同对糖苷酶的影响也有差异，这是未来在相关制剂研发过程中要注意的问题。

2.2 黄精多糖对糖尿病器官损伤的保护作用

2.2.1 眼保护作用 糖尿病眼病是糖尿病常见的并发症，可致糖尿病患者视力减退甚至失明[47]。王艺等[48]研究了黄精多糖对 STZ 诱导的糖尿病大鼠眼保护作用，发现以黄精多糖低（200 mg•kg^{-1}）、中（400 mg•kg^{-1}）、高（800 mg•kg^{-1}）剂量每日 1 次灌胃给药，可使糖尿病大鼠血糖降低，延缓其眼部毛细管扩张、视网膜内出血等并发症的发生，延后和降低糖尿病白内障的发病时间及发病率。其作用机制可能与黄精多糖抑制糖基化终产物，改善糖脂代谢，提高糖耐量有关。

2.2.2 大脑保护作用 糖尿病脑病（diabetic encephalopathy，DE）是由糖尿病引起的以认知功能和运动功能障碍为特征的并发症[49-50]。糖尿病并发症发生的关键因素之一是糖基化终产物受体[51-52]，抑制其表达可防治糖尿病脑组织损伤。吴燊荣等[53]研究了黄精多糖对 STZ 诱导的糖尿病小鼠脑组织糖基化终产物受体 mRNA 表达的影响，发现以 2 mL/（kg·d）[相当于生药 20 g/（kg·d）] 的黄精多糖每日灌胃 1 次，连续给药 12 周后，其大脑组织的糖基化终产物受体 mRNA 的表达低于模型组，说明黄精多糖对高血糖及糖基化终产物所致的脑组织损伤具有保护作用。

2.2.3 心脏保护作用 糖尿病心肌病（diabetic cardiomyopathy，DCM）是糖尿病引发的一种以心肌纤维化为主要特征的慢性心肌病变。张忠英等[54]研究发现对 STZ 诱导的糖尿病大鼠连续灌胃黄精多糖（250、500、1000 mg·kg^{-1}）12 周后，与生理盐水灌胃组相比，心肌组织中的骨形态发生蛋白 -7（BMP-7）和 Smad7 表达明显升高，转化生长因子 β_1（TGF-β_1）和 Smad 2/3 表达明显减少，心肌组织病变得到明显改善，其作用机制可能与促进心肌组织中 BMP-7 表达，影响 TGF-131/Smads 信号通路有关。

Toll 样受体是一类在天然免疫反应中有重要作用的受体，主要表达于炎性细胞与微生物识别有关的受体家族。陈婷婷等[55]研究发现对 STZ 诱导的糖尿病大鼠连续灌胃黄精多糖（250、500、1000 mg·kg^{-1}）12 周后，其心肌组织中的 Toll 受体 4 以及炎症因子核转录因子（NF-κB）、巨噬细胞移动抑制因子（MIF）的表达均较生理盐水灌胃组低，且黄精多糖组的左室舒张末压（LVEDP）以及左室开始收缩至左室内压上升速率峰值时间（t-dp/dtmax）明显下降，左心室收缩压（LVSP）明显升高，心功能得到改善，并且黄精多糖（1000 mg·kg^{-1}）组的血糖、三酰甘油（TG）、总胆固醇（TC）、低密度脂蛋白（LDL）均明显降低，高密度脂蛋白（HDL）升高，其作用机制可能与其降低血糖、血脂、抑制炎性反应有关。

2.2.4 肾脏保护作用 糖尿病肾病（diabetic nephropathy，DN）是糖尿病严重的微小血管并发症，最终可导致终末期肾衰竭（end-stage renal disease，ESRD）。付婷婷等[56]研究发现对 STZ 诱导的糖尿病肾病大鼠以黄精多糖 250、500、1000 mg·kg^{-1} 连续灌胃 12 周后，与蒸馏水组相比，黄精多糖组的血糖及 24 h 尿蛋白明显降低，肾脏组织中 TGF-β_1、内皮素 -1（ET-1）、Ⅰ型胶原蛋白（Col-I）表达减少，肾脏病变改善，其作用机制可能与黄精多糖降血糖、抑制纤维化因子有关。

2.2.5 肝脏保护作用 糖尿病肝损伤主要是由于糖脂代谢紊乱导致糖原和脂质在肝脏堆积及肝微血管病变，最终形成脂肪肝甚至肝硬化。赵

宏丽等[57]发现对 STZ 诱导的糖尿病大鼠以黄精多糖（120、240、480 mg·kg^{-1}）连续灌胃 8 周后，黄精多糖 480、240 mg·kg^{-1} 组的空腹血糖（FBG）、TG、TC、LDL-C、游离脂肪酸（FFAs）水平均降低，高密度脂蛋白（HDL-C）水平升高，肝细胞脂肪变性减少，说明黄精多糖可减轻糖尿病大鼠的肝细胞脂肪变性，其作用机制可能与黄精多糖减少固醇调节元件结合蛋白 1c（SREBP-1c）以及硬脂酰辅酶 A 去饱和酶（SCD-1）蛋白的表达有关。黄精多糖还能提高糖尿病小鼠血清和肝脏中超氧化物歧化酶（T-SOD）和谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）活性，降低丙二醛（MDA）含量，改善肝功能[42]。

3 结论与展望

3.1 黄精多糖含量受多种因素影响

黄精多糖是黄精抗糖尿病的有效成分，其含量是评价黄精质量的重要指标，但品种、产地、生长环境、生长年限、炮制方法等不同均会影响黄精多糖的含量，进而影响黄精临床使用的有效性和安全性。根据目前的研究情况分析，有利于黄精中多糖累积的适宜生长环境应该是海拔 150 ～ 600 m、郁闭度为 0.4 ～ 0.6、田间持水量为 50%、75% 的毛竹林或阔叶林下。民间一般认为药材的生长年限越长，价值越高，但超过一定的生长年限，黄精根茎会老化腐烂，组织松散，重量变轻，品质变差，因此建议黄精的种植年限为 3 年。总之，应该综合考虑黄精的植物学特性、生化特性，将其种植于适宜的生长环境中，才能获得品质较佳的黄精药材[58]。另外有研究发现黄精的愈伤组织中多糖含量与鲜黄精相近[59]，未来或可将多糖含量较高的黄精品种进行组织培养以获取黄精多糖。

过去有观点认为黄精的炮制应该九蒸九晒，但研究发现炮制次数与黄精多糖的含量并不成正相关，并且炮制会改变黄精多糖的相对分子质量分布、药理活性[60]，因此需根据用药目的选择适宜的炮制方法。

3.2 黄精多糖可防治糖尿病并发症

糖尿病并发症直接影响糖尿病患者生活质量，而黄精多糖可直接降低血糖，改善糖尿病糖脂代谢紊乱，减轻糖尿病并发症的症状，延缓并发症的发生，起到保护糖尿病引起的眼睛、心脏、肾脏等重要机体器官损伤的作用。目前尚未有以黄精多糖为主要成分的抗糖尿病药物，未来可对黄精多糖进行深入研究，根据作用效果研制成单方或以其为主要成分的复方制剂用于糖尿病的治疗。

参考文献

[1] Shaw JE，Sicree RA，Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. [J]. Diabetes Res Clin Prac，2010，87（1）：4-14.

[2] Karl SJ，David S，Filip KK，et al. What is on the horizon for type 2 diabetes pharmacotherapy?-An overview of the antidiabetic drug development pipeline [J]. Expert Opin Drug Discov，2020，15（11）：1253-1265.

[3] 金菊庆 . 降糖药致不良反应 359 例分析 [J]. 中国药房，2014，25（10）：920-922.

[4] 何康婧，高增平，王晓雪，等 . 基于 PI3K/Akt/mTOR 自噬信号通路研究雷公藤多苷片对糖尿病肾病大鼠肾脏损伤的保护作用 [J]. 中南药学，2020，18（6）：905-909.

[5] 王民，陈玉芹 . 常用降糖中药的药理分析 [J]. 中国医药指南，2015，13（10）：223-224.

[6] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：319-320.

[7] 侯慧 . 黄精的化学成分及药理作用研究探讨 [J]. 黑龙江科技信息，2014（7）：78.

[8] 董治程，谢昭明，黄丹，等 . 黄精资源、化学成分及药理作用研究概况 [J]. 中南药学，2012，10（6）：450-453.

[9] 张庭廷，夏晓凯，陈传平，等 . 黄精多糖的生物活性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2006，12（7）：42-45.

[10] 杨华坤 . 不同产地黄精饮片中黄精多糖含量的比较 [J]. 医药前沿，2019，9（18）：198.

[11] 王晓丹，田芳，史桂云，等 . 不同产地黄精中多糖含量的比较 [J]. 泰山医学院学报，2008，29（9）：657-658.

[12] 黄赵刚，刘志荣，夏泉，等 . 不同产地黄精中多糖含量的比较 [J]. 时珍国医国药，2003，14（9）：526-527.

[13] 何晓梅，李超，李永忠，等 . 不同产地黄精多糖含量测定及其体外抗氧化活性研究 [J]. 皖西学院学报，2018，34（5）：89-92.

[14] 钱枫，左坚，潘国石，等 . 安徽产主要黄精品种的多糖含量测定和比较 [J]. 甘肃中医学院学报，2011，28（1）：61-63.

[15] 洪迪清，王世清，高晨曦，等 . 黔产黄精的多糖含量测定 [J]. 中国当代医药，2009，16（11）：76-77.

[16] 焦劼，陈黎明，孙瑞泽，等 . 不同产地黄精主要化学成分比较及主成分分析 [J]. 中药材，2016，39（3）：519-522.

[17] 朱新焰，孙信梅，杜春华，等 . 滇黄精与轮叶黄精多糖的组织化学及含量测定研究 [J]. 中华中医药学刊，2020，38（1）：61-64.

[18] 毕研文，杨永恒，宫俊华，等 . 黄精和多花黄精中多糖及薯蓣皂苷元的含量测定 [J]. 长春中医药大学学报，2010，26（5）：649-650.

[19] 孙婷婷，张红，刘建峰，等 . 陕西产黄精不同炮制品中多糖含量分析 [J]. 中国药师，2016，19（2）：232-234.

[20] 王彩步，段宝忠 . 云南不同种植基地滇黄精中多糖含量测定分析 [J]. 大理大学学报，2018，3（2）：14-17.

[21] 姜武，王声淼，叶传盛，等 . 浙产多花黄精最适采收期及初加工试验 [J]. 浙江农业科学，2020，61（4）：697-701.

[22] 曾婷，周芳，汤嫣然，等 . 紫外 - 可见分光光度法测定多花黄精多糖含量 [J]. 应用海洋学学报，2018，34（9）：167-169.

[23] 倪天宇，罗晓朦，张春椿，等 . 不同生境下多花黄精化学成分比较 [J]. 中成药，2020，42（11）：2948-2953.

[24] 沈登锋，李元春，周和锋，等 . 不同种源黄精块茎

的营养成分分析[J]. 浙江农业科学，2020，61（11）：2253-2254，2259.
[25] 黄云鹏，王邦富，范繁荣，等 . 林分类型及郁闭度对多花黄精根茎多糖含量的影响[J]. 中国农学通报，2016，32（10）：102-105.
[26] 张普照，王俊儒，龚月桦，等 . 多年生黄精不同龄节物质累积和多糖分布特征[J]. 西北植物学报，2007，27（2）：384-387.
[27] 潘德芳，吕杨，陈伟民，等 . 紫外可见分光光度法测定不同年份黄精中多糖含量[J]. 安徽农业科学，2011，39（10）：5790，5795.
[28] 苏文田，谢建秋，潘心禾，等 . 多花黄精多糖与浸出物的时空变异规律[J]. 中国中药杂志，2019，44（2）：270-273.
[29] 贾向荣，焦劼，马存德，等 . 不同土壤水分含量对黄精生长及多糖含量影响[J]. 中药材，2017，40（9）：2007-2012.
[30] 沈琼桃，黄云鹏，王邦富，等 . 海拔梯度对多花黄精生长及多糖含量的影响[J]. 福建林业科技，2016，43（3）：157-160.
[31] 毕研文，杨永恒，宫俊华，等 . 光照强度对泰山黄精生长特性及产量的影响[J]. 中国农学通报，2008，24（9）：315-319.
[32] 钟凌云，龚千锋，张的凤，等 . 黄精炮制研究现状分析[J]. 中药材，2007，30（12）：1618-1621.
[33] 姜程曦，洪涛，熊伟 . 黄精产业发展存在的问题及对策研究[J]. 中草药，2015，46（8）：1247-1250.
[34] 苏文田，刘跃钧，蒋燕锋，等 . 黄精产业发展现状与可持续发展的建议[J]. 中国中药杂志，2018，43（13）：2831-2835.
[35] 周改莲，李健，徐梦云，等 . 广西产多花黄精不同炮制工艺研究[J]. 中国民族民间医药杂志，2018，27（10）：34-37.
[36] 贺海花，杨云，王爽，等 . 不同蒸制方法和时间对黄精中多糖含量的影响[J]. 中药材，2009，32（6）：861-862.
[37] 瞿昊宇，冯楚雄，谢梦洲，等 . 不同炮制方法对黄精多糖含量的影响[J]. 湖南中医药大学学报，2015，35（12）：53-55.
[38] 杨圣贤，杨正明，陈奕君，等 . 黄精“九蒸九制”炮制过程中多糖及皂苷的含量变化研究[J]. 湖南师范大学学报（医学版），2015，12（5）：141-144.
[39] 朱新焰，丛琨，石亚娜，等 . 不同初加工方法对黄精品质的影响研究[J]. 中国药房，2019，30（18）：2537-2541.
[40] 刘明研，冯亚娟，黄秋正，等 . 蒸制时间对滇黄精色泽、可溶性成分及糖含量的影响[J]. 食品工业科技，2019，40（5）：37-41，47.
[41] 胡叶青，胡云飞，吴其国 . 九华黄精九蒸九晒炮制过程中总多糖的含量变化研究[J]. 佛山科学技术学院学报（自然科学版），2019，37（6）：58-62.
[42] 公惠玲，尹艳艳，李卫平，等 . 黄精多糖对四氧嘧啶诱导的糖尿病小鼠血糖和抗氧化作用的影响[J]. 安徽医科大学学报，2008，43（5）：538-540.
[43] 贾璐，石洁，段志倩，等 . 黄精多糖对高脂饲料诱发糖尿病小鼠糖代谢功能的影响[J]. 中国医药导报，2017，14（8）：24-28.
[44] 李友元，邓洪波，张萍，等 . 黄精多糖对糖尿病模型小鼠糖代谢的影响[J]. 中国临床康复，2005，9（27）：90-91.
[45] 公惠玲，李卫平，尹艳艳，等 . 黄精多糖对链脲佐菌素糖尿病大鼠降血糖作用及其机制探讨[J]. 中国中药杂志，2009，34（9）：1149-1153.
[46] 高英，叶小利，李学刚，等 . 黄精多糖的提取及其对 α- 葡萄糖苷酶抑制作用[J]. 中成药，2010，32（12）：2133-2137.
[47] 陈亮，刘天亮 . 糖尿病眼病的药物治疗及其预防[J]. 药物流行病学杂志，2010，19（3）：176-178.
[48] 王艺，彭国庆，陈迪，等 . PSP 对 STZ 诱导的糖尿病大鼠眼保护作用的临床动态观察[J]. 国际眼科杂志，2016，16（3）：428-434.
[49] Summers WK. Alzheimer’s disease，oxidative injury，and cytokines[J]. J Alzheimers Dis，2005，6（6）：651-657.
[50] Gustavo TD-G，Alejandro D，María EP，et al. Diabetic encephalopathy：Beneficial effects of supplementation with fatty acids ω3 and nordihydroguaiaretic acid in a spontaneous diabetes rat model[J]. Lipids Health Dis，2019，18（1）：1-15.
[51] 王科，吕红彬，代艳，等 . 糖尿病视网膜病变神经细胞凋亡与晚期糖基化终产物受体基因多态性的相关性研究[J]. 东南大学学报（医学版），2017，36（6）：954-957.
[52] 汪琼，金国玺，裴晓艳，等 . 血清可溶性晚期糖基化终产物受体与 2 型糖尿病肾病的相关性研究[J]. 齐齐哈尔医学院学报，2017，38（23）：2732-2735.
[53] 吴燊荣，李友元，邓洪波，等 . 黄精多糖对糖尿病鼠脑组织糖基化终产物受体 mRNA 表达的影响[J]. 中国药房，2004，15（10）：596-598.
[54] 张忠英，王国贤，陈婷婷，等 . 黄精多糖对糖尿病大鼠心肌纤维化的影响[J]. 中国公共卫生，2016，32（6）：807-810.
[55] 陈婷婷，王国贤，付婷婷，等 . 黄精多糖对 I 型糖尿病大鼠心肌炎症的保护作用[J]. 中药药理与临床，2015，31（4）：86-90.
[56] 付婷婷，王国贤，陈婷婷，等 . 黄精多糖对糖尿病肾病大鼠肾脏的保护作用[J]. 中药药理与临床，2015，31（4）：123-126.
[57] 赵宏丽，许燕，赵红岩，等 . 黄精多糖对 2 型糖尿病大鼠 SREBP-1c 和 SCD-1 蛋白表达的影响[J]. 中药药理与临床，2015，31（1）：106-109.
[58] 雷云仙 . 多花黄精的特征特性及林下栽培技术[J]. 现代农业科技，2020（22）：54-55，59.
[59] 李莺，齐建红 . 不同黄精材料中多糖含量的比较[J]，安徽农业科学，2011，39（4）：2082，2084.
[60] 万晓莹，刘振丽，宋志前，等 . 黄精炮制前后多糖的相对分子质量分布和免疫活性比较[J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（15）：83-90.

（收稿日期：2020-12-21；修回日期：2021-01-28）

达原饮的临床应用与药理作用研究进展

刘爽，晋臻，刘海林，梁翠，陈宇，王松*（重庆两江新区第一人民医院药剂科，重庆　401121）

摘要：达原饮是治疗瘟疫初起邪伏膜原的要方，也是治疗湿邪内伏膜原证的要方。临床上通过加减化裁，可用于治疗重症急性呼吸综合征（SARS）、新型冠状病毒肺炎（COVID-19）、肝炎、发热等疾病。现代研究表明达原饮具有抗病毒、解热、抗炎等药理作用。本文主要对达原饮临床应用以及药理作用进行综述，为其进一步研究与开发利用提供参考。

关键词：达原饮；新型冠状病毒肺炎；临床应用；药理作用

中图分类号：R289.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)08-1695-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.037

Research progress in clinical application and pharmacological effect of Dayuan decoction

LIU Shuang, JIN Zhen, LIU Hai-lin, LIANG Cui, CHEN Yu, WANG Song* (*Department of Pharmacy, the First People's Hospital of Chongqing Liangjiang New Area, Chongqing* 401121)

Abstract: As the representative prescription for treating evil hidden in the membrane-source, Dayuan decoction can also treat syndrome of pathogens invasion of pleurodiaphragmatic spaces. Clinically, it has been used for SARS, COVID-19, hepatitis, fever, and other diseases. Modern research showed that Dayuan decoction had antiviral, antipyretic, anti-inflammatory and other pharmacological effects. The main clinical application and pharmacological action of Dayuan decoction were summarized in this paper, which provided reference for the further research, development and utilization.

Key words: Dayuan decoction; COVID-19; clinical application; pharmacological effect

达原饮见于明代医家吴又可所著《瘟疫论》，由槟榔、厚朴、草果、知母、芍药、黄芩、甘草 7 味药组成，为瘟疫初起邪伏膜原而设，具有开达膜原、辟秽化浊的功能。吴又可在解释达原饮方义时说："槟榔能消能磨，除伏邪，为疏利之药，又除岭南瘴气；厚朴破戾气所结；草果辛烈气雄，除伏邪盘踞；三味协力，直达其巢穴，使邪气溃败，速离膜原，是以为达原也。"[1]。本方传统用于温疫或疟疾，邪伏膜原，憎寒壮热，胸闷呕恶，头痛烦躁，脉弦数，舌苔垢腻等症。后世医家多有化裁变化，以适应疾病变化等特点。近年来，诸多学者对达原饮进行了进一步研究，本文对有关达原饮的临床应用和药理作用研究文献进行归纳总结，为今后达原饮的深入研究与开发利用提供参考。

1　达原饮临床应用研究

达原饮是瘟疫初起，治疗湿邪内伏膜原证的要方，症见舌苔白腻或白苔粗厚或白苔如积粉，提示了湿浊壅盛的病机，符合瘟疫秽浊毒邪伏于膜原的特点，故均可使用达原饮进行治疗。达原饮的现代临床应用也十分广泛范围，对内、外、妇、儿等多个学科都有确切的疗效，治疗范围囊括病毒引起的重症急性呼吸综合征（SARS）、新型冠状病毒肺炎（COVID-19）、肝炎以及诸多类型的发热等疾病。

1.1　治疗病毒引起的疾病

1.1.1　治疗传染性非典型肺炎　2002 － 2003 年的传染性非典型肺炎 SARS 的发生，使邪伏"膜原"的发病学说及达原饮运用又重新引起人们的重视，由此达原饮在抗击 SARS 中起到了积极的防治作用[2]。张伯礼认为在 SARS 发病 1 ～ 7 d 内，以发热、肌肉疼痛为主，病机为湿热疫毒，

基金项目：重庆市技术创新与应用发展专项面上项目（No.cstc2019jscx-msxmX0096）。

作者简介：刘爽，女，硕士研究生，主要从事中药学研究工作，E-mail：314817880@qq.com　*通信作者：王松，男，主管药师，主要从事医院药学研究工作，E-mail：742419205@qq.com

侵袭机体，蕴着于肺卫，有恶寒的应早用截断方药，控制病情发展，疏利湿浊，解肌透热，可采用达原饮合升降散加减治疗[3]。2003 年 1—4 月，广州中医药大学第二附属医院共收治了 112 例 SARS 患者，经中西医结合治疗，除 7 例死亡外，其余 105 例均治愈出院。在邓铁涛、任继学、焦树德等全国著名中医学专家的指导下摸索出了 SARS 的中医证候规律，并形成了一套中西医结合的治疗方案，其中，将达原饮应用于 SARS 中期病机为邪伏膜原的患者[4]。

1.1.2 治疗 COVID-19 COVID-19 属于中医疫病范畴，马家驹等[5]学者分析认为具有强烈传染性的 COVID-19 属湿热类温病范畴，病位以上焦膜原、肺为主，全程贯穿着湿毒淫肺、壅肺、闭肺等病机。

国家卫生健康委于 2020 年 1 月 22 日发布了《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案（试行第三版）》（下称诊疗方案），首次在中医治疗中将达原饮推荐用于湿邪郁肺证的治疗。在后续的《诊疗方案》第四、五、六、七、八版中均推荐使用达原饮作为基础方加减运用治疗初期寒湿郁肺证。宗阳等[6]利用网络药理学和分子对接技术探寻达原饮治疗 COVID-19 的活性化合物为槲皮素、山柰酚、黄芩素等，与 COVID-19 推荐用药的亲和力相似。活性化合物能通过与血管紧张素转换酶Ⅱ（ACE2）结合作用于 PTGS2、HSP90AA1、ESR1 等靶点调节多条信号通路，可能对 COVID-19 有治疗作用。

丁瑞丛等[7]选用达原饮为基础灵活加减运用治疗 COVID-19 的患者时发现，其可缩短患者发热时间，减轻肺部炎症，改善不适症状。

1.1.3 治疗肝炎 王礼凤等[8]认为新加达原饮方（草果、苍术、槟榔、黄芩、白芍、叶下珠、厚朴、柴胡、丹参、姜黄、僵蚕、灵芝、甘草、蝉蜕）紧扣慢性乙型肝炎的发病机制，推测其抗乙型肝炎病毒的机制可能是通过激发机体免疫应答完成的，在经过 12 周疗程后，20 例慢性乙型肝炎患者肝功能基本恢复正常，HBeAg 及 HBV-DNA 水平持续下降。不仅如此，达原饮还能明显改善干扰素治疗丙肝流感样副作用[9]。

1.1.4 治疗流感 临床上因病毒感染而发热的病例，有相当一部分为湿热内蕴，表现出一系列邪伏少阳及阳明的症状。黄健等[10]以柴胡达原饮（柴胡、生枳壳、川厚朴、青皮、黄芩、桔梗、草果、槟榔、荷梗、炙甘草）治疗的 100 例流感患者均于 3 d 内体温恢复正常，头痛恶寒、肌肉关节酸痛等症状基本消失，调养 3 ～ 5 d 后全部恢复正常，疗效显著。黄晶等[11]使用柴胡达原饮（柴胡、半夏、桔梗、枳壳、厚朴、焦山楂、苍术、槟榔、黄芩、连翘、金银花、甘草）治疗冬季流感患儿，对照组使用磷酸奥司他韦颗粒治疗，治疗后发现使用柴胡达原饮治疗的患儿，不良反应发生率较低，咳嗽及扁桃体肿大等症状缓解较快。

1.1.5 治疗艾滋病 在中医病症分类中，艾滋病属于疫病范畴。徐立然团队[12]运用伏气学说分析其发病机制，针对艾滋病患者发热，呕吐等临床表现，创立柴藿达原饮（醋北柴胡、广藿香、薏苡仁、炒槟榔、滑石粉、知母、黄芩、甘草），据大量课题回访发现，柴藿达原饮在治疗艾滋病相关并发症以及提高患者免疫应答上具有相当惊人的临床疗效。徐茜等[13]回顾性分析了 200 例艾滋病患者，比较服用达原饮加减方前后患者的体征积分、主要症状积分和 CD4 ＋ T 细胞计数的变化，发现达原饮加减方可改善患者的生活质量、临床症状体征，对患者免疫功能有一定的稳定和恢复作用。

1.2 *治疗发热*

发热是感染性或非感染性疾病触发的一种保守系统反应，它通过上调体温调定点引起体温升高。现代临床研究表明，达原饮化裁对感染性发热、湿热型发热、持续性发热、高热等多种类型的发热都具有较好的疗效。

岳培荣[14]采用达原饮加减（邪传太阳加羌活，邪传少阳加柴胡，邪传阳明加葛根）治疗湿热郁遏型感染性疾病患者 84 例，对照组 32 例患者采用解热镇痛、抗菌消炎等对症处理。结果对照组治愈率为 93.75%，而治疗组治愈率为 97.68%。另有学者使用达原饮加减（邪传少阳加柴胡；邪传太阳加羌活；邪传阳明，发热重恶寒轻者加葛根；邪传入里，出现腹泻、便秘，苔黄者加大黄；舌无苔者或舌苔出现白燥或黄燥者禁用）治疗 42 例病毒感染性发热患者，总有效率高达 100%[15]。

邪伏膜原证为湿热秽浊之邪居于中焦气分的一个特殊证候[16]。皇甫明者等[17]以“邪伏膜原”为着入点，以开达膜原、清热祛湿行气为原则，以达原饮、升降散加减治疗湿热中阻型发热，每获良效。另在用新达原饮治疗湿热发热的 66 例患者中，治愈 54 例（81.8%），有效 8 例（12.1%），无效 4 例（6.1%），有效率 93.9%[18]。

冯治中[19]应用达原饮化裁（往来寒热，其形

如疟者加柴胡；高热兼烦躁者加生石膏；舌苔黄厚腻者加薏苡仁、滑石；食滞纳呆者加焦山楂；大便干结不通者加生大黄）治疗持续性发热患者 230 例，有效率也高达 97.39%。此外，长期发热临床多数较为棘手，王鹏等[20]利用达原饮加减治疗长期发热每获良效。林邦强[21]使用新加达原饮（达原饮加青蒿、柴胡、葛根；高热不退，汗多，口渴引饮加生石膏；热盛烦躁，便干结，舌苔变黑生刺加大黄）治疗 64 例肠伤寒高热患者，临床治愈 48 例（75.0%）、显效 8 例（12.5%）、有效 5 例（7.8%）、无效 3 例（4.7%），有效率 95.3%。

恶性肿瘤患者至少有 2/3 在病程中伴有发热症状，表现为发热无规律，呈间歇性或持续状态。申建中[22]使用达原饮加减方（脾虚气弱，加黄芪、百合、生山药；肝郁气滞，加郁金、佛手、当归；湿热蕴结，加黄柏、苍术、虎杖；阴虚火旺者，去厚朴，加地骨皮、玄参、麦冬、秦艽）治疗 42 例癌性发热患者，与萘普生片治疗的 40 例作比较，结果显示治疗组有效率 73.8%，优于对照组的 37.5%。也有学者利用达原饮加减（槟榔、柴胡、青蒿、厚朴、草果、地骨皮、生地、知母、白芍、黄芩、甘草）＋萘普生和萘普生组治疗湿热型癌性发热，对比发现前者能够明显改善患者的临床症状、提高生活质量，有效治疗湿热型癌性发热，且作用缓和、平稳、临床毒副作用小，耐受性好[23]。

发热是儿科疾病常见症状之一，张士卿善用达原饮组方治疗小儿发热及反复发热，他认为达原饮组方正好切合小儿发热的常见病因、病机[24-25]。张学强等[26]则认为小儿发热多为内有湿食积滞，外兼六淫等邪气袭表，内外合邪，郁遏阳气，正邪相争，故而发热自汗、日晡益甚、腹胀厌食、头身疼痛、红舌苔白厚，脉数。方选达原饮辨证加减，切中病机，方证相符，药证相应，效如桴鼓。

有研究报道[27]采用达原饮加减（气虚加补中益气汤，血虚加四物汤合当归补血汤，阳虚加四逆汤，失眠者加交泰丸，自汗者加玉屏风散，纳差者加焦三仙，大便不通者加生白术，全瓜蒌，大便溏泄者加生山楂）治疗术后、感染治愈后功能性低热患者 32 例。与对照组比较（32 例，口服柴胡口服液、生脉饮口服液，有效率 81.3%），治疗组痊愈 24 例，显效 5 例，有效 1 例，无效 2 例，有效率 93.8% 效果更优。

1.3 *治疗荨麻疹*

荨麻疹病因复杂，大多数患者不能找到确切原因。有研究运用达原饮加减（槟榔、厚朴、知母、草豆蔻、芍药、黄芩、甘草、柴胡、荆芥、防风）治疗慢性荨麻疹与西药（西替利嗪＋雷尼替丁）对照，发现采用达原饮加减近期疗效与西药相近，但观察期内复发率远低于对照组[28]。

1.4 *治疗小儿厌食证*

小儿厌食症的主要病位在脾胃，病机为湿热盘伏，脾胃不和，与达原饮的功效吻合，郭亚雄以湿热盘于中焦膜原为切入点，太阴脾土湿困、阳明胃热不能受纳为辨证关键，运用达原饮治疗小儿厌食症，获效甚多，证明达原饮理气、燥湿、清热对小儿厌食有一定疗效[29-30]。除此之外，有医家将达原饮应用于儿科临床中因湿热导致的各种疾病，在治疗小儿上呼吸道感染、小儿肺炎支原体感染、小儿肠系膜淋巴结炎中均有较好的疗效[31]。

1.5 *治疗失眠*

杨东东等[32]发现达原饮（槟榔、厚朴、草果、知母、木香、杏仁、通草；伴有心悸，加用柏子仁；伴有纳差，腹胀，加用茯苓，砂仁；伴有易怒，情绪不稳时，加用柴胡、黄芩）治疗湿阻三焦型失眠具有良好疗效，在经过 1 个月治疗后，服用达原饮（32 例）在防止病情反复、减少不良反应方面作用明显优于服用艾司唑仑（32 例）。

1.6 *其他疾病*

达原饮化裁还可用于肺脓肿、肾病、早期 2 型糖尿病、盆腔炎性疾病的治疗。研究表明在西医常规治疗的基础上应用达原饮加减（黄芩、槟榔、厚朴、草果、金银花、蒲公英、地龙、蝉蜕；高热口渴，加生石膏、栀子；痰壅气急，加葶苈子、海蛤壳；脓液偏多，不易排出，加薏苡仁、桔梗；胸胁疼痛剧烈，加广郁金、当归；出现水饮，加生牡蛎、丝瓜络；久则气虚，加党参、黄芪）治疗肺脓肿患者 23 例，有效率 95.65%[33]。高祥福认为凡伏邪致病，留于膜原，盘踞不去，表现为湿热证型的慢性肾病皆可选用达原饮治疗，且立竿见影，肌酐速降，有效延缓病情进展[34]。

有研究报道，早期 2 型糖尿病以清热养阴为本，兼夹湿邪者，见气滞胸闷、呕逆胀满为主证者，可尝以柴胡达原饮化裁以升降气机通三焦之气[35]。有学者运用达原饮加味治疗湿浊型 2 型糖尿病，显效 4 例，有效 14 例，无效 3 例，有效率为 86%[36]。临床上盆腔炎性疾病也多以湿热型居多，达原饮化裁还可用于湿热内蕴型盆腔炎性疾病后遗症，这为从邪伏膜原的角度治疗盆腔炎

性疾病提供了依据[37]。

此外，戎兆赢等[38]借助于利用中药系统药理学数据库与分析平台（TCMSP）获取达原饮的839种化学成分，从中筛选出可能的活性化合物，分析发现达原饮可能是通过影响CD36、CCL3、CFTR等靶点，调控钙信号通路、补体和凝血级联途径、Hippo信号通路、ABC转运蛋白等通路，治疗疟疾、癌症和感染性疾病。

2 达原饮药理作用研究

目前对于达原饮的药理学和药效学研究相对较少，主要有抗病毒、保肝、解热、抗炎等药理作用，对于肺损害亦有良好的修复作用。

2.1 抗病毒的作用

王礼凤等[39]以转染乙型肝炎病毒（HBV）DNA全基因的HepG2.2.15细胞株为对象，发现新加达原饮在其细胞培养中可有效地抑制HBsAg和HBeAg的分泌，结果表明新加达原饮在体外有显著的抗HBV的效果，且毒性较低。另有文献研究指出新加达原饮可以通过增强慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞（DCs）的功能而发挥抗HBV的作用，可以用于慢性乙型肝炎的治疗[40]。

2.2 保肝的作用

赵冰洁[41]在研究加味达原饮对湿热证大鼠急性肝损伤的防治作用中发现，加味达原饮能显著降低D-氨基半乳糖（D-GalN）及四氯化碳（CCl_4）所致的肝细胞损伤，改善急性肝损伤大鼠肝组织的病理变化，缩小病变面积，减轻肝细胞病变程度，具有一定的保肝降酶作用。其保肝作用可能与减轻机体脂质过氧化、提高机体抗氧化酶水平，增强机体清除自由基能力有关。

2.3 解热的作用

任慧玲等[42]研究发现达原饮可能是通过抑制外周肝组织炎症反应和降低内源性炎症细胞因子的分泌而产生解热效应，其解热机制与降低血清中白介素-6（IL-6）、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）水平，降低肝组织中髓过氧化物酶（MPO）活性有关。安潇[43]用流感病毒制作家兔病毒性发热的模型，证实新方达原饮能有效对抗病毒性发热，退热效果可能是通过降低脑脊液中前列腺素E_2（PGE_2）而达到的，药理作用机制与非甾体抗炎药（NSAIDs）相似，但解热后体温未见反弹而NSAIDs有反弹。

2.4 抗炎的作用

任慧玲[44]发现达原饮水提物、水提醇沉上清液、达原饮水提醇沉上清液洗脱4、5部分可减轻脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤的肺部水肿，减轻肺组织损伤。在探讨药理机制过程中发现其能降低肺泡灌洗液（BALF）中蛋白质的含量，降低促炎因子（TNF-α、IL-6和IL-1β）的含量，上调抑炎因子（IL-10）的含量。姜欣等[45]基于膜原理论探讨柴胡达原饮对大肠杆菌性腹膜炎大鼠血清及腹腔灌洗液促炎及抗炎因子的影响，实验结果发现柴胡达原饮能够升高腹腔内促炎因子TNF-α水平，降低血清TNF-α水平，同时能够升高血清及腹腔灌洗液中抗炎因子IL-10、PGE_2水平，调控促炎及抗炎因子之间的平衡，从而论证柴胡达原饮抗腹膜炎症的有效性。

3 总结与展望

综上所述，达原饮在古今疫病防治、肝炎、发热及荨麻疹、小儿厌食症、失眠等疾病治疗的过程中具有重要作用。然而，对于达原饮的研究报道多局限于临床应用，物质基础研究也侧重于方中单味药，复方研究仅对少数活性成分含量测定方面的报道，而这些成分是否能够代表达原饮的全部功效，还有待商榷。虽然近年偶见达原饮的药理作用的报道，但许多潜在的药理活性还有待研究，还有更多的作用机制亟待阐释。

参考文献

[1] 肖培根 . 新编中药志（第 2 卷）[M]. 北京：化学工业出版社，2002.
[2] 包琳，马健 . 达原饮防治传染性疾病展望 [J]. 中国中医急症，2010，19（2）：263，287.
[3] 张伯礼 . 中医对非典的认识和治疗 [J]. 天津科技，2003，30（3）：12.
[4] 汪少颖 . 中医界“请缨”战“非典”——中西医结合防治非典有优势 [J]. 天津中医药，2003，20（3）：26-28.
[5] 马家驹，陈明，王玉光 . 新型冠状病毒肺炎中医证治述要 [J]. 北京中医药，2020，39（2）：95-101.
[6] 宗阳，丁美林，贾可可，等 . 基于网络药理学和分子对接法探寻达原饮治疗新型冠状病毒（2019-nCoV）肺炎活性化合物的研究 [J]. 中草药，2020，51（4）：836-844.
[7] 丁瑞丛，龙清华，刘玲 . 运用达原饮治疗新型冠状病毒肺炎的体会 [J]. 中医杂志，2020，61（17）：1481-1484，1511.
[8] 王礼凤，宋春蓉，曹宁，等 . 新加达原饮治疗慢性乙型肝炎的临床研究 [J]. 云南中医学院学报，2015，38（6）：61-63.
[9] 李素娟，王怀宝 . 达原饮对干扰素治疗丙肝流感样副作用的干预研究 [J]. 中医学报，2011，26（8）：978-979.
[10] 黄健，闫莉莉 . 柴胡达原饮治疗流行性感冒 100 例观察 [J]. 内蒙古中医药，2005，24（5）：26-27.
[11] 黄晶，张卫东，张锦 . 柴胡达原饮在冬季小儿流行性感冒治疗中的有效性及安全性分析 [J]. 检验医学与临床，

2020，17（20）：3018-3020.
[12] 郭娅娅，徐立然，吴少天，等 . 基于伏气学说探讨柴藿达原饮防治艾滋病的效应机制 [J]. 时珍国医国药，2019，30（7）：1677-1688.
[13] 徐茜，陈亦洋，李影，等 . 基于伏邪理论“达原饮加减”治疗艾滋病的临床疗效回顾性分析 [J]. 中国社区医师，2019，35（10）：111-112.
[14] 岳培荣 . 中医药治疗感染性发热病 84 例 [J]. 河南中医学院学报，2006，21（123）：50-51.
[15] 高蓉，柳涌 . 达原饮治疗病毒感染性发热 42 例 [J]. 中国中医急诊，2007，16（11）：1357.
[16] 张宏瑛 . 吴又可与俞根初对邪伏膜原治疗方法之比较 [J]. 江西中医药，2009，40（4）：7-8.
[17] 皇甫明者，张新，曹志群 . 基于“邪伏膜原”理论治疗发热 [J]. 中医药通报，2016，15（1）：44-45.
[18] 高飞，郝娜，王友苏，等 . 新达原饮颗粒治疗湿热发热 66 例分析 [J]. 中医药学刊，2003，21（4）：618.
[19] 冯治中 . 化裁达原饮治疗持续性发热 230 例 [J]. 中国中医药现代远程教育，2008，6（12）：1523.
[20] 王鹏，孙玉信 . 孙玉信教授运用达原饮加减治疗长期发热经验 . [J]. 中国临床研究，2013，5（1）：49，52.
[21] 林邦强 . 新加达原饮治疗肠伤寒高热 64 例 [J]. 河北中医，2003，25（12）：924.
[22] 申建中 . 达原饮加减治疗癌性发热 42 例临床观察 [J]. 江苏中医药，2010，42（4）：36.
[23] 张伟 . 达原饮加减治疗湿热型癌性发热的临床疗效观察 [D]. 济南：山东中医药大学，2014.
[24] 王小荣，张弢，刘光炜，等 . 张士卿教授运用达原饮治疗小儿发热验案举隅 [J]. 中国儿科杂志，2015，11（5）：6-7.
[25] 李小芹，史正刚，段金宏 . 张士卿教授治疗小儿反复发热经验介绍 [J]. 中国儿科杂志，2017，13（1）：9-11.
[26] 张学强，翟文生，高旭光，等 . 达原饮在小儿发热性疾病中的运用经验 [J]. 广西中医药，2020，43（6）：63-64.
[27] 李明晓 . 达原饮加减治疗术后、感染治愈后功能性低热 32 例临床观察 [J]. 中华医学，2020，36（12）：92-94.
[28] 杨瑞海，林少健 . 达原饮加减治疗慢性荨麻疹疗效观察 [J]. 辽宁中医杂志，2004，31（3）：223.
[29] 刘雅楠，郭亚雄 . 达原饮治疗小儿厌食症的方药探讨 [J]. 现代中医药，2018，38（1）：73-75.
[30] 赵小星，郭亚雄 . 郭亚雄运用达原饮治疗小儿厌食症经验 [J]. 江西中医药，2017，48（461）：29-30.
[31] 林霜霜，杨雨蒙 . 达原饮治疗儿科疾病验案举隅 [J]. 中医儿科杂志，2020，16（4）：80-82.
[32] 杨东东，陈寒冰 . 达原饮治疗失眠的临床观察 [J]. 四川中医，2010，28（6）：74-75.
[33] 曾仕富，左明晏 . 达原饮加减治疗肺脓肿 23 例 [J]. 中国中医急症，2012，21（11）：1865-1866.
[34] 李蓓，黄昊，蔡嘉缘，等 . 高祥福运用达原饮治疗慢性肾脏病经验 [J]. 浙江中医杂志，2020，55（8）：562.
[35] 王松松，李光善，林兰 . 柴胡达原饮加减治疗早期 2 型糖尿病个案分析 [J]. 内蒙古中医药，2019，2（2）：32-34.
[36] 鹿根启 . 达原饮加味治疗湿浊型 2 型糖尿病 21 例 [J]. 河南中医，2010，30（12）：1233-1234.
[37] 张萌，张弛，孙芮，等 . 邪伏膜原理论指导盆腔炎性疾病后遗症辨治临床价值探讨 [J]. 现代中医临床，2020，27（1）：59-62.
[38] 戎兆赢，杨健，王玉林，等 . 系统药理学对方剂达原饮的物质基础及作用机制研究 [J]. 中国医院药学杂志，2019，39（12）：1227-1233.
[39] 王礼凤，李长秦，冯海杲，等 . 新加达原饮对 HepG2.2.15 细胞表达 HBsAg、HBeAg 的影响 [J]. 时珍国医国药，2013，24（7）：1604-1605.
[40] 王礼凤，宋春蓉，曹宁，等 . 新加达原饮对慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞的影响 [J]. 中国中医药信息杂志，2016，23（8）：24-27.
[41] 赵冰洁 . 加味达原饮对急性肝损伤湿邪内蕴证模型大鼠的治疗作用研究 [D]. 成都：成都中医药大学，2011.
[42] 任慧玲，严彪，梁之桃，等 . 达原饮解热作用研究及 UPLC-Q-TOF /MS 分析 [J]. 中成药，2015，37（1）：131-137.
[43] 安潇 . 新方达原饮抗病毒性发热的实验研究 [D]. 济南：山东中医药大学，2002.
[44] 任慧玲 . 达原饮对脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤的治疗作用 [D]. 苏州：苏州大学，2016.
[45] 姜欣，徐竞男，高飞，等 . 柴胡达原饮对大肠杆菌性腹膜炎大鼠血清及腹腔灌洗液 TNF-α、IL-10、PGE2 的影响 [J]. 北京中医药大学学报，2018，41（12）：983-987.

（收稿日期：2020-12-30；修回日期：2021-02-09）

医院药学

基于美国 FAERS 数据的索磷布韦维帕他韦与艾尔巴韦格拉瑞韦不良事件安全警戒研究

王娜[1, 2]，夏暄[1, 2]，周月阳[1, 4]，陈晨[2, 3]，杜明[1*]（1. 四川大学华西口腔医院药剂科，成都 610041；2. 四川大学华西药学院，成都 610041；3. 四川大学华西医院临床药学部（药剂科），成都 610041；4. 四川大学华西公共卫生学院，成都 610041）

摘要：目的 挖掘索磷布韦维帕他韦片、艾尔巴韦格拉瑞韦片上市后的不良事件信号，为临床安全用药提供参考。**方法** 提取 FAERS 数据库 2017 年第一季度至 2020 年第三季度共 15 个季度的不良事件报告数据，利用报告比值比法和联合综合标准法对索磷布韦维帕他韦片、艾尔巴韦格拉瑞韦片的不良事件信号进行分析。**结果** 筛选得到索磷布韦维帕他韦片 172 个信号，信号累计 23 个系统器官；艾尔巴韦格拉瑞韦片 85 个信号，信号累及 21 个系统器官。信号均集中于全身性疾病及给药部位各种反应、各类神经系统疾病、胃肠系统疾病等。其中索磷布韦维帕他韦片的不良事件中肾淤血信号强度最高，且头痛、胃食管反流病等不良事件的报告频次占比均大于 0.5%。而艾尔巴韦格拉瑞韦片的不良事件中直肠穿孔的信号强度最高，且恶心、食欲减退等不良事件的信号频次占比大于 0.5%。**结论** 索磷布韦维帕他韦片和艾尔巴韦格拉瑞韦片不良事件累及系统器官分布类似，但在肾脏毒性、消化系统疾病和神经系统疾病等不良事件方面的差异值得进一步关注。

关键词：索磷布韦维帕他韦片；艾尔巴韦格拉瑞韦片；比例失衡法；数据挖掘
中图分类号：R730.6 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1700-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.038

Security alert of sofosbuvir/velpatasvir and elbasvir/grazoprevir adverse drug events based on FAERS

WANG Na[1, 2], XIA Xuan[1, 2], ZHOU Yue-yang[1, 4], CHEN Chen[2, 3], DU Ming[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *West China School/Hospital of Stomatology*, *Sichuan University*, *Chengdu* 610041; 2. *West China School of Pharmacy*, *Sichuan University*, *Chengdu* 610041; 3. *Department of Pharmacy*, *West China Hospital*, *Sichuan University*, *Chengdu* 610041; 4. *West China School of Public Health*, *Sichuan University*, *Chengdu* 610041)

Abstract: Objective To conduct data-mining of sofosbuvir/velpatasvir and elbasvir/grazoprevir adverse event signals after their marketing and to provide a reference for safe clinical medication. **Methods** The adverse event report data of 15 quarters (the first quarter of 2017 to the third quarter of 2020) were collected from the food and drug administration adverse event reporting system database. We used reporting odds ratio and the medicines and healthcare products Regulatory Agency methods to analyze the adverse event signals of sofosbuvir/velpatasvir and elbasvir/grazoprevir. **Results** Totally 172 signals of sofosbuvir/velpatasvir were detected, involving 23 systems and organs; 85 signals of elbasvir/grazoprevir were detected, involving 21 system organ classes. The majority of signals included systemic diseases and various reactions at the site of administration, nervous

基金项目：四川省科技厅项目（No.2019JDR0163）。
作者简介：王娜，女，主要从事临床药学研究，E-mail：scuwangna1999@163.com *通信作者：杜明，女，主管药师，主要从事临床药学研究，E-mail：86955770@qq.com

system disorders and gastrointestinal disorders. Among the signals of sofosbuvir/velpatasvir, kidney congestion was the strongest, and the report rate of headaches and gastroesophageal reflux diseases was over 0.5%. Among the signals of elbasvir/grazoprevir, the rectal perforation was the strongest, and the reported rate of nausea and poor appetite was over 0.5%. **Conclusion** The systems and organs involved in the adverse events of sofosbuvir /velpatasvir and elbasvir/grazoprevir are relatively similar, but the difference in adverse events such as the renal toxicity, gastrointestinal disorders and nervous system disorders between the two drugs needs further attention.

Key words: sofosbuvir/velpatasvir; elbasvir/grazoprevir; proportional imbalance method; data mining

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒（hepatitis C virus，HCV）引起的、以肝脏病变为主的传染性疾病，表现为急性和慢性病毒性肝炎，其中慢性丙肝可发展成肝纤维化、肝硬化甚至肝细胞癌[1]。HCV 全球感染率约为 2% ～ 3%，我国约有 4000 万人感染 HCV，占总人口的 3.2%[2]。

近年来，丙型肝炎的治疗从以干扰素为基础的治疗发展为全口服治疗。新型直接抗病毒药物通过靶向不同的 HCV 非结构蛋白抑制病毒的复制，根据作用的靶蛋白不同，DAAs 分为 HCV 非结构蛋白 3/4A（non-structural 3/4A，NS3/4A）抑制剂、HCV 非结构蛋白 5B（non-structural 5B，NS5B）抑制剂和 HCV 非结构蛋白 5A（non-structural 5A，NS5A）抑制剂[3]。其中索磷布韦维帕他韦片于 2016 年 6 月经美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）批准上市，2018 年 5 月由国家药品监督管理局批准上市，用于治疗基因型 HCV-Ⅰ～Ⅵ的慢性 HCV 感染患者，其成分索磷布韦为 NS5B 抑制剂，维帕他韦是 NS5A 抑制剂。艾尔巴韦格拉瑞韦片于 2016 年 1 月在美国获准使用，2018 年 4 月在我国批准上市，治疗基因型 HCV-Ⅰ，Ⅳ的慢性 HCV 感染患者，其中艾尔巴韦是 NS5A 抑制剂，格拉瑞韦为 NS3/4A 抑制剂。索磷布韦维帕他韦片与艾尔巴韦格拉瑞韦片适应证相似，且临床试验结果显示两种药物治疗结束后 12 周，血清或血浆 HCV-RNA 阴性率均可达 100%，同时两种药物均被 FDA 黑框警告称既往或当前感染乙肝病毒（hepatitis B virus，HBV）的丙肝患者，使用这两种药物存在 HBV 再激活甚至导致严重的肝脏问题并死亡的风险[4]。因此，两种药物的安全性亟需进一步评估与比较。

本研究基于 FAERS 数据对索磷布韦维帕他韦片与艾尔巴韦格拉瑞韦片的安全性进行对比分析，利用报告比值比法（reporting odds ratio，ROR）和联合综合标准法（The Medicines and Healthcare products Regulatory Agency，MHRA）定量挖掘索磷布韦维帕他韦片和艾尔巴韦格拉瑞韦片安全警戒信号，以期优化患者治疗方案、预防和应对药物不良反应。

1 数据与方法

1.1 研究数据

以 FDA 批准药品及不良反应公众数据库中索磷布韦维帕他韦片（商品名：Epclusa；通用名：sofosbuvir/velpatasvir）和艾尔巴韦格拉瑞韦片（商品名：Zepatier；通用名：elbasvir/grazoprevir）为检索词，提取 FAERS 2017 年第一季度至 2020 年第三季度共 15 个季度的不良事件数据，导入软件 MySQL 中，并根据个人信息记录（DEMO）数据表对患者信息进行去重，限定检索以索磷布韦维帕他韦片和艾尔巴韦格拉瑞韦片为“首要怀疑（Primary Suspect，PS）”的不良事件报告。

1.2 方法

目前常用的药品不良反应检测方法是比例失衡法，其主要包括 ROR 法和 MHRA 法，具体算法基于比例失衡法四格表。ROR 法检测阈值为：报告数≥ 3，ROR 的 95% 置信区间（confidence interval，*CI*）下限＞ 1；MHRA 法检测阈值为：报告数≥ 3，比例报告比值（PRR）≥ 2，卡方值≥ 4。满足以上条件即生成一个信号[5-6]。本研究参照《ICH 国际医学用语词典》（Medical Dictionary for Regularly Activities，MedDRA）[7] 中药物不良反应术语集首选术语（Preferred Terms，PT）编码提取 FAERS 不良事件数据，并将 PT 映射到相应的系统器官（system organ class，SOC）中进行归类，对收集到的 ADE 报告，按照信号强度（ROR 值）选取前 10 的 PT 以挖掘关联性强的不良事件。同时选择信号频次占比大于 0.5% 的 PT 进行 χ^2 检验分析索磷布韦维帕他韦片和艾尔巴韦格拉瑞韦片不良事件报告频次差异。计数资料采用例数和构成比描述，通过 Microsoft Excel 2016 和 SPSS 22.0 完成。

2 结果

2.1 不良事件报告病例基本特征

在删除重复报告后，获得 PS 药物为索磷布韦维帕他韦片的药物不良事件（adverse drug event，ADE）共 16 961 例，报告数 7332 份；PS 药物为艾尔巴韦格拉瑞韦片的 ADE 为 5945 例，报告数 2550 份。ADE 报告病例基本特征详见表 1，其中索磷布韦维帕他韦片和艾尔巴韦格拉瑞韦片的不良事件报告男女比分别为 1.36 和 1.19；年龄分布以 18 ～ 64 岁为主；报告者以消费者为主；报告国家集中于美国。严重不良事件占比索磷布韦维帕他韦片为 22.21%，艾尔巴韦格拉瑞韦片为 18.67%，其中两药均以导致住院或住院时间延长为主，而索磷布韦维帕他韦片导致死亡的不良事件占比更高。

表 1 索磷布韦维帕他韦片、艾尔巴韦格拉瑞韦片不良事件报告的基本信息

Tab 1 Primary information of sofosbuvir/velpatasvir and elbasvir/ grazoprevir related ADE

维度	索磷布韦维帕他韦片			艾尔巴韦格拉瑞韦片		
	亚类	报告例数 /*n*	构成比 /%	亚类	报告例数 /*n*	构成比 /%
性别	男性	4130	56.33	男性	1202	47.14
	女性	3035	41.39	女性	1008	39.53
	不清楚	167	2.28	不清楚	340	13.33
年龄段	＜ 18 岁	32	0.44	＜ 18 岁	1	0.04
	18 ～ 64 岁	4120	56.19	18 ～ 64 岁	1204	47.22
	≥ 65 岁	776	10.58	≥ 65 岁	337	13.22
	不清楚	2404	32.79	不清楚	1008	39.53
报告者	医师	1156	15.77	医师	429	16.82
	消费者	2594	35.38	消费者	1314	51.53
	其他健康专家	1424	19.42	其他健康专家	492	19.29
	药师	1484	20.24	律师	1	0.04
	不清楚	674	9.19	药师	306	12.00
				不清楚	8	0.35
报告国家（前五）	美国	6006	88.87	美国	2098	91.38
	加拿大	323	4.78	法国	68	2.96
	意大利	169	2.50	意大利	66	2.87
	日本	162	2.40	加拿大	35	1.52
	英国	98	1.45	德国	29	1.14
严重不良事件	死亡	426	5.81	死亡	94	3.69
	危及生命	78	1.06	危及生命	34	1.33
	导致住院或住院时间延长	1028	14.02	导致住院或住院时间延长	317	12.43
	致残	96	1.31	致残	28	1.10
	需要干预以防永久性伤残	1	0.01	需要干预以防永久性伤残	3	0.12

2.2 不良事件安全警戒信号累及的系统器官

按照 MedDRA 的 SOC 进行分类合并，结果显示索磷布韦维帕他韦片的 ADE 信号共 172 个，来自 7419 例次报告，涉及 23 个 SOC；艾尔巴韦格拉瑞韦片共 85 个 ADE 信号，来自 2867 例次报告，涉及 21 个 SOC。

索磷布韦维帕他韦片和艾尔巴韦格拉瑞韦片均集中于全身性疾病及给药部位各种反应，各类神经系统疾病，胃肠系统疾病等。其中，两药新的 ADE 信号均主要集中于胃肠系统疾病（见表 2）。

2.3 ROR 值前 10 位不良事件报告及信号情况

按照 ROR 值降序排序，排除肝硬化相关疾病、产品问题、各类检查、操作并发症等与药物无关的信号，获得排名前 10 的 ADE 信号（见表 3）。索磷布韦维帕他韦片信号强度排名前三的 ADE 信号为肾淤血、冷球蛋白血症、乙型肝炎再激活；艾尔巴韦格拉瑞韦片信号强度排名前三的 ADE 信号包括直肠穿孔、感染性滑囊炎、头痛。

2.4 两药常见不良事件的报告频次比较

报告频次占比大于 0.5% 的不良事件包括神经系统疾病、消化道反应等。由表 4 可知，嗜睡、胃食管反流病、孕产妇在妊娠过程中的暴露等仅在索磷布韦维帕他韦片中，而睡眠质量差、腹泻、呕吐等仅在艾尔巴韦格拉瑞韦片中。

对两药报告频次占比均大于 0.5% 的不良事件进行 χ^2 检验，可见头痛、恶心、食欲减退、丙型肝炎的报告频次差异具有统计学意义（$P < 0.01$）。

3 讨论

本文通过挖掘 FAERS 数据库得到的索磷布韦维帕他韦片与艾尔巴韦格拉瑞韦片 ADE 信号与 FDA 说明书信息基本一致，说明书中警告的乙肝病毒再激活和常见的 ADE 如头痛、恶心、疲乏等均被检测到，证实本研究可信。

3.1 信号关联性强且说明书未提及的 ADE

由表 3 可知，索磷布韦维帕他韦片中，关联

表 2 索磷布韦维帕他韦片、艾尔巴韦格拉瑞韦片相关不良事件累及的系统和器官

Tab 2 Sofosbuvir/velpatasvir and elbasvir/grazoprevir ADE signals and involved systems and organs

SOC	索磷布韦维帕他韦片			艾尔巴韦格拉瑞韦片		
	信号数 / 个	累计不良事件 / 例次	未在药品说明书中提及的信号数 / 个	信号数 / 个	累计不良事件 / 例次	未在药品说明书中提及的信号数 / 个
全身性疾病及给药部位各种反应	10	1704	8	9	761	6
各类神经系统疾病	10	1559	7	5	454	2
胃肠系统疾病	21	1210	15	17	819	11
各类损伤、中毒及操作并发症	14	929	14	4	158	4
精神病类	16	627	11	8	223	4
感染及侵染类疾病	9	247	7	5	142	4
肝胆系统疾病	14	222	5	5	38	0
各类检查	19	216	13	6	41	3
代谢及营养类疾病	4	168	4	3	87	3
各种手术及医疗操作	18	160	18	1	3	1
良性、恶性及性质不明的肿瘤（包括囊状和息肉状）	7	143	7	1	14	1
肾脏及泌尿系统疾病	6	64	6	3	20	3
皮肤及皮下组织类疾病	4	40	3	5	38	2
耳及迷路类疾病	1	32	1	—	—	—
各种肌肉骨骼及结缔组织疾病	5	29	5	3	22	3
产品问题	2	16	2	2	12	2
眼器官疾病	1	12	1	2	7	2
血管与淋巴管类疾病	3	11	3	1	8	1
生殖系统及乳腺疾病	3	10	3	1	5	1
血液及淋巴系统疾病	2	7	2	1	3	1
社会环境	1	6	1	—	—	—
心脏器官疾病	1	4	1	1	6	1
呼吸系统、胸及纵隔疾病	1	3	1	2	6	2
合计	172	7419	138	85	2867	57

表 3 索磷布韦维帕他韦片、艾尔巴韦格拉瑞韦片 ROR 值居前 10 位的不良事件

Tab 3 PT of the top 10 ROR related to sofosbuvir/velpatasvir and elbasvir/grazoprevir

No.	索磷布韦维帕他韦片			艾尔巴韦格拉瑞韦片		
	PT（按信号强度计）	95%*CI* 下限		PT（按信号强度计）	95%*CI* 下限	
		ROR	PRR		ROR	PRR
1	肾淤血 *	13.89	13.89	直肠穿孔 *	16.11	16.12
2	冷球蛋白血症 *	8.44	8.44	感染性滑囊炎 *	12.16	12.16
3	乙型肝炎再激活	7.92	7.92	头痛	6.43	6.08
4	头痛	6.80	6.41	咽部炎症 *	6.39	6.39
5	疲乏	6.16	5.75	精力增加 *	3.56	3.56
6	阴道疾病 *	5.51	5.51	高血压危象 *	3.32	3.32
7	精力增加 *	4.09	4.09	情绪改变	2.77	2.77
8	肾小球滤过率降低 *	3.96	3.96	粪便松软 *	2.69	2.69
9	消化不良 *	3.86	3.84	粪便变色 *	2.67	2.67
10	失眠 *	3.50	3.46	食欲减退 *	2.57	2.55

注（Note）：* 表示未在说明书中出现的 PT（*means PT not shown in the instruction）。

性最强的新的 ADE 是肾淤血。研究者报告了使用索磷布韦治疗后导致肾病综合征的病例，可能的机制为索磷布韦恢复了由于慢性病毒感染而被抑制的适应性和先天性免疫反应，导致急性细胞排斥反应和复发性自身免疫疾病 [8-10]。而肾病综合征的常见并发症为肾静脉血栓，提示索磷布韦维帕他韦片肾淤血 ADE 的可能性。因此临床使用索磷布韦维帕他韦片应密切监测肾功能。

艾尔巴韦格拉瑞韦片关联性最强的 ADE 为直肠穿孔。Jacobson 等 [10] 研究结果显示该药可导致结肠炎不良反应，结肠炎病变多自直肠开始，因此广泛结肠炎可并发急性直肠穿孔。同时 Kumada 等 [11] 临床试验证实该药严重不良反应包括大肠息肉、结直肠腺癌（发生率＜ 5%），Zamor 等 [12] 研究发现该药导致直肠出血的发生率为 0.3%，以上均提示临床使用该药应考虑结直肠疾病发生的可能性。

3.2 信号频次占比较高的 ADE 事件

神经系统中，信号频次占比＞ 0.5% 的不良事件包括易激惹、嗜睡、头痛、记忆受损等。其中头痛的信号频次占比索磷布韦维帕他韦片高于艾尔巴韦格拉瑞韦片且差异有统计学意义，同时在两药的随机临床对照试验中 [13]，头痛的不良反应发生率前者为 17.26%，后者为 14.16%，与本研究结果相符。Yang 等 [14] 研究也表示索磷布韦神经精神 ADE 的发生率远高于空白对照组，提

表 4 索磷布韦维帕他韦片、艾尔巴韦格拉瑞韦片报告频次占比大于 0.5% 的不良事件

Tab 4 PT with more than 0.5% reporting frequency related to sofosbuvir/velpatasvir and elbasvir/grazoprevir

类型	药物 PT	索磷布韦维帕他韦片			艾尔巴韦格拉瑞韦片			χ^2	P
		报告例次	占比 /%	ROR	报告例次	占比 /%	ROR		
神经系统疾病	头痛	1218	16.61	6.80	422	16.55	6.43	435	＜ 0.01
	失眠	286	3.90	3.50	122	4.78	4.01	3.732	0.057
	抑郁	117	1.60	1.68	44	1.73	1.61	0.199	0.65
	嗜睡 *	114	1.55	1.77	—	—	—	—	—
	记忆受损	97	1.32	1.87	—	—	—	—	—
	易激惹 *	53	0.72	2.48	18	0.71	1.98	0.008	1
	睡眠质量差	—	—	—	16	0.63	4.65	—	—
消化道反应	恶心	631	8.61	2.82	289	11.33	3.59	16.67	＜ 0.01
	腹部不适	155	2.11	2.65	62	2.43	2.76	0.887	0.347
	食欲减退 *	138	1.88	1.73	76	2.98	2.57	10.77	0.002
	消化不良 *	116	1.58	3.86	27	1.06	2.10	3.633	0.067
	胃食管反流病 *	51	0.70	1.73	—	—	—	—	—
	腹泻	—	—	—	166	6.51	2.17	—	—
	呕吐 *	—	—	—	85	3.33	1.63	—	—
	便秘 *	—	—	—	65	2.55	2.42	—	—
	上腹痛	—	—	—	50	1.96	1.93	—	—
	腹胀 *	—	—	—	20	0.78	1.32	—	—
全身性疾病	疲乏	1399	19.08	6.16	531	20.82	6.47	3.656	0.059
	流感样疾病 *	54	0.74	1.82	25	0.98	2.13	1.419	0.245
特殊人群	孕产妇在妊娠过程中的暴露 *	77	1.05	2.43	—	—	—	—	—
感染及侵染类疾病	丙型肝炎 *	180	2.45	43.04	122	4.78	80.34	34.65	＜ 0.01

注（Note）：* 表示未在说明书中出现的 PT（*means PT not shown in the instruction）。

示存在神经系统疾病风险的丙肝患者选用艾尔巴韦格拉瑞韦片可能更佳。

消化系统中，便秘、腹泻、呕吐等事件为艾尔巴韦格拉瑞韦片常见 ADE，在两药的随机临床对照试验中 [15]，艾尔巴韦格拉瑞韦片腹泻的不良反应发生率为 6.78%，索磷布韦维帕他韦片为 0%。同时恶心和食欲减退的信号频次占比索磷布韦维帕他韦片低于艾尔巴韦格拉瑞韦片且差异具有统计学意义，提示消化系统疾病患者选择索磷布韦维帕他韦片可能是更佳选择。但是胃食管反流患者在使用该药时应注意观察是否存在呕吐、反酸、烧心等症状，以防疾病进一步恶化。

在全身性疾病中，疲乏和流感样疾病均与两药具有一定的关联性，其中流感样疾病未在说明书中提及。然而多个临床研究均发现流感样疾病属于索磷布韦等 DAAs 药物的主要 ADE[15-17]，与本研究结果一致。同时在两个药物的随机临床对照试验中 [18]，疲乏和流感样疾病的报告频率只有索磷布韦＞ 10%，提示临床使用索磷布韦维帕他韦片应更加注意避免流感样疾病不良事件的发生。

在特殊人群中，索磷布韦维帕他韦片报告频次占比较高的 ADE 为孕产妇在妊娠过程中的暴露，但暂无研究证明索磷布韦维帕他韦片影响妊娠。Chappell 等 [19] 研究发现索磷布韦 - 雷迪帕韦不影响妊娠结局，同时有研究认为妊娠期间的 HCV 传播至少占 1/3[20]，因此妊娠期间使用索磷布韦 - 雷迪帕韦可降低产前传播风险，其益处超过胎儿药物暴露的风险。但索磷布韦维帕他韦片与试验药物成分部分不同，且缺乏维帕他韦对妊娠结局影响的研究。因此妊娠期妇女应根据个体情况权衡利弊，判断是否使用索磷布韦维帕他韦片，以保证最大的临床效益和最小的风险结局。

由表 3 可知，索磷布韦维帕他韦片相比艾尔巴韦格拉瑞韦片更易引起 HBV 再激活。HBV 和 HCV 共感染患者，由 HCV 的核心蛋白、NS2 和 NS5A 蛋白等介导 [21-23] 抑制 HBV 复制。当 HCV 被清除后，该抑制作用解除，出现 HBV 快速复制，即 HBV 再激活。本研究结果显示，丙型肝炎的信号频次占比索磷布韦维帕他韦片明显低于艾尔巴韦格拉瑞韦片且差异具有统计学意义，说明索磷布韦维帕他韦片抑制 HCV 效果更佳，导致 HBV 更易被激活，与前述机制吻合。因此，HBV 和 HCV 共感染患者应谨慎使用索磷布韦维帕他韦片。

3.3 研究局限性

利用数据库开展对 ADE 信号的探索仍需提高和改进：① FAERS 数据库为自发呈报数据库，存

在漏报误报重复报的可能性。② 本研究挖掘到的不良事件信号仅表示研究药物与该信号存在统计学的关联性，但在临床选用药物时仍需进一步的临床试验研究。③ 本研究挖掘到索磷布韦维帕他韦片 172 个不良反应信号，来自 7332 名患者；艾尔巴韦格拉瑞韦片 85 个不良反应信号，来自 2550 名患者。两种药物不良事件报告的患者数量相差较大，对结果的统计具有一定影响。④ 报告国家集中于美国、法国、意大利等欧美国家，缺少亚洲人群相关安全性数据，提示对索磷布韦维帕他韦片和艾尔巴韦格拉瑞韦片的安全性分析结果在我国普及性有待进一步研究。⑤ 本研究未对老年人和儿童等特殊人群进行分析，数据显示儿童不良事件报告占比不到 1%，老年人仅有约 10%。因此，特殊人群使用该药应注重药物安全性的监测。

综上所述，基于美国 FAERS 数据库的分析结果，从上市后用药安全性的角度对索磷布韦维帕他韦片、艾尔巴韦格拉瑞韦片的不良事件信号进行比较，得到不良事件累及的主要系统较为一致，展示了相关的 ADE 信号和频次间的差异，为临床治疗丙型肝炎提供一定的参考，以推进临床合理用药。

参考文献

[1] 王艳 . 丙型病毒性肝炎流行特征及感染预防 [J]. 医学信息，2020，33（5）：45-48.

[2] 唐立红，杨桂淇，陈洁晶，等 . 丙型肝炎流行病学及临床检验技术研究进展 [J]. 实验与检验医学，2019，37（4）：553-556.

[3] Kim DY，Ahn SH，Han KH. Emerging therapies for hepatitis C [J]. Gut Liver，2014，8（5）：471-479.

[4] Feld JJ，Jacobson IM，Hezode C，et al. Sofosbuvir and velpatasvir for HCV genotype 1，2，4，5，and 6 infection [J]. N Engl J Med，2015，373（27）：2599-2607.

[5] 赵科，孔金霞，钟雯，等 . 基于美国 FDA 不良事件报告系统数据库的帕博利珠单抗不良反应信号挖掘研究 [J]. 中南药学，2020，18（3）：359-363.

[6] 黄琳，陈力，赵劲松，等 . 基于真实世界数据的碘普罗胺不良反应信号挖掘研究与分析 [J]. 中南药学，2020，18（2）：322-326.

[7] Tieu C，Breder CD. A critical evaluation of safety signal analysis using algorithmic standardised MedDRA queries [J]. Drug Saf，2018，41（12）：1375-1385.

[8] Murakami N，Ding Y，Cohen DJ，et al. Recurrent membranous nephropathy and acute cellular rejection in a patient treated with direct anti-HCV therapy（ledipasvir/sofosbuvir）[J]. Transpl Infect Dis，2018，20（5）：e12959.

[9] Sise ME，Wisocky J，Rosales IA，et al. Lupus-like immune complex-mediated glomerulonephritis in patients with hepatitis C virus infection treated with oral，interferon-free，direct-acting antiviral therapy [J]. Kidney Int Rep，2016，1（3）：135-143.

[10] Jacobson IM，Lawitz E，Kwo PY，et al. Safety and efficacy of elbasvir/grazoprevir in patients with hepatitis C virus infection and compensated cirrhosis：An integrated analysis [J]. Gastroenterology，2017，152（6）：1372-1382.

[11] Kumada H，Suzuki Y，Karino Y，et al. The combination of elbasvir and grazoprevir for the treatment of chronic HCV infection in Japanese patients：A randomized phase Ⅱ/Ⅲ study [J]. J Gastroenterol，2017，52（4）：520-533.

[12] Zamor PJ，Vierling J，Ghalib R，et al. Elbasvir/grazoprevir in black adults with hepatitis C virus infection：A pooled analysis of phase 2/3 clinical trials [J]. Am J Gastroenterol，2018，113（6）：863-871.

[13] U.S. National Library of Medicine. CinicalTrials.gov-[DB/OL]. https：//clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT02786537，2020-11-24/2021-06-10.

[14] Yang HJ，Ryoo JY，Yoo BK. Meta-analysis of the efficacy and safety of sofosbuvir for the treatment of hepatitis C virus infection [J]. Int J Clin Pharm，2015，37（5）：698-708.

[15] Abdel-Moneim A，Abood A，Abdel-Gabaar M，et al. Effectiveness of sofosbuvir/pegylated-interferon plus ribavirin in treatment of hepatitis C virus genotype 4 patients [J]. Clin Exp Hepatol，2018，4（3）：191-196.

[16] Lawitz E，Mangia A，Wyles D，et al. Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection [J]. N Engl J Med，2013，368（20）：1878-1887.

[17] Jacobson IM，Gordon SC，Kowdley KV，et al. Sofosbuvir for hepatitis C genotype 2 or 3 in patients without treatment options [J]. N Engl J Med，2013，368（20）：1867-1877.

[18] Sperl J，Horvath G，Halota W，et al. Efficacy and safety of elbasvir/grazoprevir and sofosbuvir/pegylated interferon/ribavirin：A phase Ⅲ randomized controlled trial [J]. J Hepatol，2016，65（6）：1112-1119.

[19] Chappell CA，Scarsi KK，Kirby BJ，et al. Ledipasvir plus sofosbuvir in pregnant women with hepatitis C virus infection：A phase 1 pharmacokinetic study [J]. Lancet Microbe，2020，1（5）：e200-e208.

[20] Mok J，Pembrey L，Tovo PA，et al. When does mother to child transmission of hepatitis C virus occur? [J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed，2005，90（2）：F156-F160.

[21] Chen SY，Kao CF，Chen CM，et al. Mechanisms for inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by hepatitis C virus core protein [J]. J Biol Chem，2003，278（1）：591-607.

[22] Dumoulin FL，von Dem BA，Li J，et al. Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines [J]. Virology，2003，305（2）：260-266.

[23] Pan Y，Wei W，Kang L，et al. NS5A protein of HCV enhances HBV replication and resistance to interferon response [J]. Biochem Biophys Res Commun，2007，359（1）：70-75.

（收稿日期：2021-05-19；修回日期：2021-07-09）

基于 FAERS 数据库的阿仑单抗不良事件信号挖掘与分析

赵尹瑜[1, 2, 3]，谢昊[1, 2, 3]，曹明浩[1, 2, 3]，陈晨[1, 2, 3]，陈力[1, 2*]（1. 四川大学华西第二医院药学部/循证药学中心，成都 610041；2. 出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室，成都 610041；3. 四川大学华西药学院，成都 610041）

摘要：目的 通过对阿仑单抗不良事件（AEs）进行信号挖掘与分析，为临床合理用药提供依据。**方法** 通过提取美国食品药品监督管理局不良事件报告系统数据库中 2016 年第一季度至 2020 年第四季度共 20 个季度的 ASCII 数据，采用比例失衡法中的报告比值比法和综合标准法对阿仑单抗 AEs 报告进行挖掘分析。**结果** 检测到首要怀疑药物为阿仑单抗的 AEs 报告共 10 237 份，对数据进行分析处理后得到有效信号 930 个，主要集中在胃肠系统疾病、各类神经系统的损害、全身性疾病及给药部位各种反应等器官系统分类。**结论** 本研究获得的 AEs 信号与阿仑单抗说明书和文献研究基本一致，证明本研究的可靠性。在临床应用过程中，应重点进行尿液分析和肌酐监测，防止出现泌尿系统严重的 AEs。

关键词：阿仑单抗；信号挖掘；药物不良事件
中图分类号：R969.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1706-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.039

Data mining and analysis of adverse events signals of alemtuzumab based on FAERS database

ZHAO Yin-yu[1, 2, 3], XIE Hao[1, 2, 3], CAO Ming-hao[1, 2, 3], CHEN Chen[1, 2, 3], CHEN Li[1, 2*] (1. *Department of Pharmacy/Evidence-Based Pharmacy Center, West China Second Hospital of Sichuan University, Chengdu* 610041; 2. *Key Laboratory of Birth Defects and Related Disease of Women and Children, Sichuan University, Ministry of Education, Chengdu* 610041; 3. *School of Pharmacy, West China, Sichuan University, Chengdu* 610041)

Abstract: Objective To provide reference for clinical rational drug use by mining and analyzing the adverse event (AE) signals of alemtuzumab. **Methods** ASCII data from the first quarter of 2016 to the fourth quarter of 2020 in the US FDA adverse event reporting system database were collected, The report odds ratio and medicines and healthcare products regulatory agency were used to mine and analyze the AE reports. **Results** Totally 10 237 single of AE reports were detected, 930 of which were effective signals after data analysis and processing, mainly focusing on gastrointestinal diseases, various nervous system damage, systemic diseases and various reactions of drug delivery sites. **Conclusion** Common ADR signals and systems involved in this study are consistent with the instructions. In clinical application, we should pay attention to urine analysis and creatinine monitoring to prevent serious AEs of the urinary system.

Key words: alemtuzumab; signal mining; adverse event

多发性硬化症（multiple sclerosis，MS）是中枢神经系统最常见的脱髓鞘疾病，由于中枢神经系统的任何部位都可受累，因此该病表现多样，常见症状包括疲劳、头晕、肢体麻木、行走困难、胃肠道功能障碍、膀胱功能障碍、认知功能障碍等。流行病学资料显示该疾病在儿童期发病率较低，青春期迅速增加，在 25 ～ 35 岁达到高峰[1-2]，是引起中青年人神经性运动障碍最常见的疾病[3-4]，也是除创伤外导致年轻人残疾最常见的原因。目前该病的发病机制未明，较公认的

基金项目：四川省科技厅项目（No.2019JDR0163）。
作者简介：赵尹瑜，女，主要从事临床药学工作，E-mail：1024663735@qq.com *通信作者：陈力，男，副主任药师，主要从事临床药学与医院合理用药研究，E-mail：13674852@qq.com

是由反应性 T、B 细胞介导的自身免疫性反应所致，并直接针对髓鞘抗原 [5]。

2014 年美国食品药品监督管理局（FDA）已批准阿仑单抗用于有复发性 MS 患者的治疗。阿仑单抗是一种针对单核细胞和淋巴细胞表面 CD52 的单克隆抗体，阿仑单抗结合 CD52 后可启动抗体依赖细胞介导的细胞毒效应和补体依赖的细胞毒效应，导致淋巴细胞裂解，使机体很快进入严重淋巴细胞减少状态。1 个疗程治疗可耗竭 T、B 和 NK 细胞，尤其是 CD4 ＋ T 细胞 [6]。

目前国内对于阿仑单抗研究较少，安全性研究缺乏。本次研究主要通过对美国 FDA 不良事件报告系统（FDA adverse event reporting system，FAERS）收集到的数据进行挖掘，并对阿仑单抗可疑药品不良事件（AEs）信号进行整合分析，为国内临床合理用药提供参考。

1　资料与方法

1.1　数据来源

本次研究选择 FAERS 数据库中 2016 年第一季度至 2020 年第四季度共 20 个季度的美国信息交换标准代码（American Standard Code for Information Interchange，ASCII）[7]。将数据导入软件 MySQL5.7，以人口统计和管理信息（demographic and administrative information，DEMO）表 [8] 中患者的信息数据为依据，对重复数据进行筛重。

1.2　数据筛选

以 FDA 批准药品及不良反应公众数据库（public dashboard）中药品名称为标准，采用阿仑单抗的通用名（阿仑珠单抗）和商品名（LEMTRADA，CAMPATH，MABCAMPATH）为关键检索词进行模糊查询，筛选出报告。

1.3　数据分析

本研究同时应用基于比例失衡法四格表的报告比值比（reporting odds ratio，ROR）法和综合标准法（healthcare products regulatory agency，MHRA）分别计算 ROR、比例报告比值（proportional reporting ratio，PRR）和卡方（χ^2），筛选潜在 AEs 信号，获取首要怀疑药物的目标 AEs 报告数及 AEs 发生的背景数等数据。ROR 法中 95%*CI* 下限＞ 1 且报告数不少于 3 例的事件和 MHRA 法中 PRR ＞ 2、χ^2 ＞ 4 且报告数不少于 3 例的事件定义为 AE 信号 [9]，所有统计分析采用 Microsoft Excel 2016 软件完成。

1.4　数据标准化

FAERS 不良事件数据采用国际医学科学组织理事会《国际医学用语词典》（MedDRA）中首选语（preferred terms，PT）进行编码 [10]。本研究中的 AEs 采用 MedDRA 药品不良反应术语集的首选系统器官分类（system organ class，SOC）和 PT。在 MedDRA 官方网站（https：//www.meddra.org/）下载并运行网站提供的 MedDRADesktop Browsers，将需要汉化的 PT 英文名导入，则系统自动输出中英文映射表，本文中 SOC 和 PT 的中英文表达均按照该映射表。

2　结果

2.1　药物不良事件报告的基本情况

共下载 AEs 背景信号共 24 484 338 个，其中首要怀疑药物为阿仑单抗 AEs 报告 10 237 份。其中患者男女比为 0.43∶1，女性占多数。在已知年龄的患者中，中位年龄为 44 岁，平均年龄为 41.63 岁。报告基本信息见表 1。

表 1　阿仑单抗相关不良事件报告基本信息 (n ＝ 10 237)

Tab 1　Information of reported AEs for alemtuzumab (n ＝ 10 237)

信息	分类	报告例数	构成比 /%
性别	女性	6016	58.77
	男性	2572	25.12
	不清楚	1649	16.11
年龄段 / 岁	＜ 18	190	1.86
	18 ～ 64	7103	69.39
	≥ 65	303	2.96
	不清楚	2641	25.80
报告国家（前六）	美国	5170	50.50
	加拿大	838	8.19
	德国	761	7.43
	英国	561	5.48
	意大利	352	3.44
	西班牙	338	3.30
年份	2016	1752	17.11
	2017	1824	17.82
	2018	2311	22.58
	2019	2680	26.18
	2020	1670	16.31
报告者职业	消费者	3786	36.98
	医师	3302	32.26
	其他健康专家	2384	23.29
	保健专业人士	537	5.25
	药师	198	1.93
	律师	7	0.07
	不清楚	23	0.22

2.2　不良事件信号挖掘结果

应用 ROR 法和 MHRA 法对获得的 10 237 份 AEs 进行分析，共获得具有统计学意义的信号 965 个，排除各种手术及医疗操作、社会环境等与药物无关的信号 35 个，最终获得 930 个信号 PT。阿仑单抗报告数、PRR 和 ROR 值前 30 位的信号 PT（剔除原发疾病相关 PT，如多发性硬化复发、步态障碍、肌无力等）见表 2。报告数多代表该 AEs 报告率高，而 PRR 和 ROR 值大代表该 AEs

与药物的统计学意义上关联性更强[11]。将检出的信号 PT 与阿仑单抗 FDA 说明书对比，结果显示新的 AEs 较多，表明说明书中的 AEs 有待完善。

2.3 累及的器官、系统分布情况

表 2 阿仑单抗 AEs 报告数及信号强度排名前 30 位 PT

Tab 2 Top 30 PT of alemtuzumab AEs frequency and signals strength

排序	报告数 PT	报告例数	95%*CI* 下限（ROR）	排序	信号强度 PT	报告例数	95%*CI* 下限（ROR）
1	发热	1503	2.65	1	抗肾小球基底膜抗体	13	305.32
2	淋巴细胞计数降低	989	21.43	2	粒细胞百分比	17	353.60
3	尿路感染	965	3.09	3	点彩状嗜碱细胞增多症 *	11	252.92
4	白细胞计数降低	813	4.12	4	肾上腺出血性梗死 *	3	77.15
5	血小板计数降低	697	3.81	5	毛细血管再充盈试验 *	3	77.15
6	免疫性血小板减少性紫癜 *	645	65.17	6	游离三碘甲状腺原氨酸	3	77.15
7	挫伤 *	554	3.20	7	乳糜指数评分 *	13	229.18
8	荨麻疹	527	1.95	8	尿亚硝酸盐	13	203.62
9	胸部不适 *	500	2.97	9	甲状腺刺激性免疫球蛋白	18	222.17
10	寒战	450	2.45	10	抗肾小球基底膜抗体阳性	6	123.67
11	心动过速	446	3.16	11	血非结合胆红素减少 *	7	126.66
12	尿异常	446	58.35	12	抗肾小球基底膜疾病	10	149.77
13	中性粒细胞减少症	433	1.99	13	李斯特菌检测阳性	8	129.41
14	淋巴细胞减少症	431	16.00	14	尿亚硝酸盐检出	151	245.15
15	血红蛋白降低	399	2.16	15	中幼粒细胞百分比升高 *	26	172.27
16	血小板减少症	395	2.14	16	尿胆红素降低 *	11	125.23
17	白细胞减少症	389	4.32	17	CD4 淋巴细胞百分比降低	18	149.54
18	尿中带血	385	10.64	18	尿胆红素 *	7	96.94
19	带状疱疹 *	371	3.13	19	尿晶体检出 *	236	238.79
20	心率升高 *	365	2.17	20	细菌学检验	126	212.35

注（Note）：* 为说明书中未提及的不良事件（* means AEs not mentioned in the instruction）。

使用 MedDRA 系统器官分类 SOC 对 930 个有信号的 AEs 进行分类，结果显示，阿仑单抗的 AEs 涉及 24 个 SOC。930 个 AEs 以 SOC 分类的信号数和 AEs 报告数的分布情况，见表 3。AEs 发生频数较高的 SOC 为各类检查、胃肠系统疾病、各类神经系统疾病、全身性疾病及给药部位各种反应、肾脏及泌尿系统疾病等，提示阿仑单抗对这些器官系统的损害风险更高。各类检查分类项下多数 PT 与肾脏及泌尿系统疾病相关，故取报告数前 30 名单独列表，见表 4。

表 3 阿仑单抗 AEs 信号累及器官系统

Tab 3 System and organ involved AEs signals of alemtuzumab

器官系统分类（SOC）	信号数 PT	报告例数	报告数构成比 /%
各类检查	314	14 655	29.66
胃肠系统疾病	28	5559	11.25
各类神经系统疾病	83	4846	9.81
全身性疾病及给药部位各种反应	29	4624	9.36
感染及侵染类疾病	146	4041	8.18
血液及淋巴系统疾病	46	3349	6.78
肾脏及泌尿系统疾病	45	2243	4.54
皮肤及皮下组织类疾病	24	1809	3.66
各种肌肉骨骼及结缔组织疾病	19	1588	3.21
内分泌系统疾病	22	1219	2.47
呼吸系统、胸及纵隔疾病	26	1075	2.18
心脏器官疾病	11	873	1.77
各类损伤、中毒及操作并发症	20	839	1.70
血管与淋巴管类疾病	13	709	1.43
免疫系统疾病	15	664	1.34
生殖系统及乳腺疾病	15	310	0.63
良性、恶性及性质不明的肿瘤（包括囊状和息肉状）	29	242	0.49
眼器官疾病	12	210	0.42
肝胆系统疾病	9	182	0.37
代谢及营养类疾病	7	152	0.31
耳及迷路类疾病	3	96	0.19
妊娠期、产褥期及围产期状况	2	67	0.14
各种先天性家族性遗传性疾病	7	34	0.07
精神病类	5	30	0.06

3 讨论

阿仑单抗是一种抗 CD52 单抗，与治疗 MS 的其他药物相比，在降低复发率方面非常有效，并且在一些研究中已被证明可改善残疾[12-14]。但阿仑单抗的 AEs 也不容忽视。

3.1 常见 AEs 信号分析

阿仑单抗（商品名为 Lemtrada）在 FDA 中提交的最新修订说明书（2020 年 10 月）中提及的 AEs，如发热、寒战、中性粒细胞减少、血小板减少等在本研究中均被检出。本研究发现，阿仑单抗的 AEs 主要集中在各类检查（29.66%，14 655/49 416），胃肠系统疾病（11.25%，5559/49 416），各类神经系统疾病（9.81%，4846/49 416），全身性疾病及给药部位各种反应（9.36%，4624/49 416）。虽然侵袭类疾病报告数仅占 8.18%（4041/59 416），但阿仑单抗的使用已经导致了许多相对不

表 4 各类检查项下与肾脏、泌尿系统疾病有关指标报告数排名前 30 位 PT

Tab 4 Top 30 PT of the indexes related to kidney and urinary system of various examination items

排序	报告数 PT	报告例数	95%*CI* 下限（ROR）
1	尿中带血	385	10.64
2	尿白细胞阳性	310	109.21
3	尿液分析异常	242	36.92
4	尿晶体检出 *	236	238.79
5	尿白细胞酯酶阳性	225	147.34
6	尿红细胞阳性	220	104.44
7	尿酮体存在 *	206	69.42
8	尿沉渣检出	191	154.96
9	尿蛋白检出	172	19.97
10	尿亚硝酸盐检出	151	245.15
11	尿培养阳性	132	103.07
12	尿血红蛋白检出	93	170.34
13	尿比重降低	61	184.50
14	尿红细胞	51	82.99
15	尿糖检出 *	50	25.35
16	尿中尿胆原增加 *	44	101.26
17	尿管型	44	75.62
18	尿 pH 升高 *	42	105.42
19	尿比重升高	40	167.00
20	肾小球滤过率降低	39	1.50
21	尿排出量降低	28	1.48
22	尿白细胞	21	25.57
23	尿胆红素存在 *	20	40.78
24	尿蛋白	19	8.83
25	尿中检出细胞	17	75.05
26	尿肌酐升高	17	22.93
27	尿白蛋白阳性	17	18.40
28	尿草酸盐增加 *	15	75.56
29	抗肾小球基底膜抗体	13	305.32
30	尿亚硝酸盐	13	203.62

注（Note）：* 为说明书中未提及的不良事件（* means AEs not mentioned in the instruction）。

太常见感染的发生，如泛红细胞炎（可能由对阿仑单抗的过敏反应引发）[15]、李斯特菌脑膜炎 [16]、巨细胞病毒感染和肺诺卡氏菌 [17]。临床试验中最常见的感染是鼻咽炎、上呼吸道感染、尿路感染、疱疹病毒感染、鼻窦炎和流感 [13-14]。其原因可能与阿仑单抗导致长期严重的淋巴细胞减少，影响体液和细胞介导的免疫反应有关 [18]。由于使用阿仑单抗治疗导致疱疹病毒感染风险增加，一项临床试验引入了在阿仑单抗第 1 日和每个治疗周期 1 个月内口服抗疱疹药物的预防性治疗 [19]。

阿仑单抗在使用过程中可能会出现头痛、皮疹、发烧、恶心、呕吐和肌肉疼痛等输液相关反应，均是细胞因子释放综合征的一部分；虽然在反复输液的过程中，其发生率和严重程度都会降低 [20]，但仍应密切关注其输液相关反应。

说明书 AEs 中涉及的所有器官系统，本次研究均检出一定信号数量的 AEs，并检出新出现 AEs 的器官系统如各类损伤、中毒及操作并发症、生殖系统及乳腺疾病、眼器官疾病、耳及迷路类疾病等，可为说明书 AEs 的完善提供参考。

3.2 新的信号和累及器官系统

肾脏及泌尿系统疾病中，新的有意义的信号包括尿晶体检出（ROR 值＝ 238.79）、尿酮体存在（ROR 值＝ 69.42），均属于信号强度前 20 位。将各类检查中与肾脏、泌尿系统有关的指标进行筛选后，所得指标类型占比 16.24%（51/314），报告数占比 22.06%（3233/14 655），这些信号提示阿仑单抗可能存在肾脏及泌尿系统尚未被充分认识的安全性问题，而 FDA 说明书中没有详细说明，只提及阿仑单抗治疗数月至数年后可能出现肾小球肾病症状。加拿大卫生部 2020 年 6 月发布公告称，在接受阿仑单抗（商品名为 MabCampath）治疗的 B 细胞慢性淋巴细胞白血病（B-CLL）患者中，有严重且致命的不良事件报告，其中包括肾小球肾炎 [21]。一项临床研究中观察到 4 例（0.3%）肾小球肾炎。肾病伴随着血清肌酐、血尿和 / 或蛋白尿的增加，在治疗结束后的 4 ～ 39 个月内发展。这可能与自身免疫性肾病有关 [22]。因此在治疗期间应对临床显著变化的血肌酐及异常的镜检尿液分析进行监测，在今后临床用药中充分关注。

未在说明书中出现的 AEs 信号累及器官系统 7 个，新的且有意义的 SOC 包括各类损伤、中毒及操作并发症，生殖系统及乳腺疾病，眼器官疾病，耳及迷路类疾病，妊娠期、产褥期及围产期状况，各种先天性家族性遗传性疾病。有关阿仑单抗对妊娠影响的数据仍然有限，已知阿仑单抗能穿过胎盘，对胎儿有危险 [19]。Oh 等 [23] 进行怀孕前接受 12 mg 或 24 mg 阿仑单抗的临床试验发现，正常活产是最常见的结局，先天性异常或出生缺陷的风险没有增加。接受阿仑单抗治疗患者的自然流产率与普通人群和未接受治疗的 MS 患者的自然流产率相当，并且在阿仑单抗暴露一年内妊娠的妇女，其自然流产的风险没有增加。现有的数据仍然不足以确定阿仑单抗对胎儿的风险，需要更进一步的研究。

3.3 研究局限性

本研究仍存在一定的局限性，如阿仑单抗 AEs 报告数与挖掘后得到的相关性在关联方面存在一定程度的差异，例如发热、尿路感染、白细胞计数降低等报告数量多，但相关性差，这可能与 ROR 法和 MHRA 法挖掘 AEs 的局限性有关；此外，FAERS 数据库中 AEs 报告主要来源于美国，由于人种、地域等差异，结果应用于中国时

可能存在一定偏差，因此应结合临床实际情况合理用药；由于 FAERS 是自发呈报系统，收集的阿仑单抗 AEs 报告可能不全，有漏报、误报的可能性，即使样本量足够大，比例失衡法仍存在一定的局限性 [9]，且呈报的 AEs 和药品之间因果关系并不能完全保证，如本次研究检出较多与各类神经系统疾病的信号，与原发疾病 MS 相关，无法判断其与药物的直接相关性。尽管本研究对术语进行了标准化，也不能完全排除由于数据的模糊、不规范引起的分析偏差。

4 结论

本研究对 FAERS 数据库 2016—2020 年阿仑单抗的 AEs 数据进行回顾性分析，利用实际患者用药的数据发掘潜在的且未被说明书收录的 AEs，在一定程度上弥补了上市前药品临床试验的不足，为临床安全用药提供了参考。本研究获得的 AEs 信号与阿仑单抗说明书和文献研究基本一致。虽然检出较多各类神经系统疾病的相关信号，但由于与原发疾病相关，难以推断其明确的因果关系。研究还检出较多的与肾脏及泌尿系统相关的各类检查指标与疾病，在临床应用过程中，应重点进行尿液分析和肌酐监测，防止出现泌尿系统严重的 AEs 后果。本次研究获得了相对更加真实完整的药品安全信息，可为临床用药提供参考，促进临床合理用药。

参考文献

[1] Ascherio A，Munger K. Epidemiology of multiple sclerosis：From risk factors to prevention——an update [J]. Semin Neurol，2016，36（2）：103-114.

[2] Howard J，Trevick J，Younger DS. Epidemiology of multiple sclerosis [J]. Neurol Clin，2016，34（4）：919-939.

[3] Orton SM，Wald L，Confavreux C，et al. Association of UV radiation with multiple sclerosis prevalence and sex ratio in France [J]. Neurology，2011，76（5）：425-431.

[4] Ramagopalan SV，Handel AE，Giovannoni J，et al. Relationship of UV exposure to prevalence of multiple sclerosis in England [J]. Neurology，2011，76（16）：1410-1414.

[5] 蒋丽阳，刘文东，袁峰泉，等 . 多发性硬化症的药物治疗进展 [J]. 医学理论与实践，2017，30（15）：2212-2214.

[6] 王静，阿仑单抗治疗多发性硬化的系统评价 [D]. 南宁：广西医科大学，2014.

[7] 包旭 . 美国 OpenFDA 公众健康项目介绍 [J]. 中国执业药师，2015，12（10）：18-22.

[8] Chen C，Bw A，Cyza B，et al. Immune-related adverse events associated with immune checkpoint inhibitors：An updated comprehensive disproportionality analysis of the FDA adverse event reporting system [J]. Int Immunopharmacol，2021，95（2）：107498.

[9] 陈力，吴邦华，闫康 . 比例失衡法在贝伐珠单抗药品不良反应信号挖掘中的应用 [J]. 中南药学，2018，16（2）：174-178.

[10] Tieu C，Breder C. A critical evaluation of safety signal analysis using algorithmic standardised meddra queries [J]. Drug Safety，2018，41（12）：1375-1385.

[11] Evans SJ，Waller PC，Davis S. Use of proportional reporting ratios（PRRs）for signal generation from spontaneous adverse drug reaction reports [J]. Pharmacoepidemiol Drug Saf，2001，10（6）：483-486.

[12] Bourdette D，Yadav V. Alemtuzumab versus interferon beta-1a in early multiple sclerosis [J]. Curr Neurol Neurosci Rep，2009，9（5）：341-342.

[13] Cohen JA，Coles AJ，Arnold AJ，et al. Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis：A randomised controlled phase 3 trial [J]. The Lancet，2012，380（9856）：1819-1828.

[14] Coles AJ，Twyman CL，Arnold DL，et al. Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy：A randomised controlled phase 3 trial [J]. The Lancet，2012，380（9856）：1819-1828.

[15] Nirosen V，Louise R，San XS，et al. Pancolitis a novel early complication of Alemtuzumab for MS treatment [J]. Mult Scler Relat Disord，2016（7）：83-84.

[16] Rau D，Lang M，Harth A，et al. Listeria meningitis complicating alemtuzumab treatment in multiple sclerosis——report of two cases [J]. Int J Mol Sci，2015，16（7）：14669-14676.

[17] Brownlee WJ，Chataway J. Opportunistic infections after alemtuzumab：New cases of norcardial infection and cytomegalovirus syndrome [J]. Mult Scler J，2017，23（6）：876-877.

[18] Jeffrey J，Stan D. Infectious complications of multiple sclerosis therapies：Implications for screening，prophylaxis，and management [J]. Open Forum Infect Dis，2018，5（8）：174.

[19] Guarnera C，Bramanti P，Mazzon E. Alemtuzumab：A review of efficacy and risks in the treatment of relapsing remitting multiple sclerosis [J]. Therap Clin Risk Manag，2017（default）：871-879.

[20] Nerrant E，Thouvenot E，Castelnovo G. Severe bradycardia：An unreported adverse infusion-associated reaction（IAR）with alemtuzumab [J]. Rev Neurol，2017，173（3）：175-176.

[21] 加拿大警示阿仑单抗的噬血细胞性淋巴组织细胞增生症、中风和肾小球性肾炎风险 [J]. 中国处方药，2020，18（9）：3.

[22] Lemtrada. LEMTRADA REMS Program Overview [WB/OL]. Available from：https：//www. lemtradarems. com/Docs/Pdf/LEMTRADA_REMS_Program_Overview. pdf. Accessed August 1.2015.

[23] Oh J，Achiron A，Celius EG，et al. Pregnancy outcomes and postpartum relapse rates in women with RRMS treated with alemtuzumab in the phase 2 and 3 clinical development program over 16 years [J]. Mult Scler Relat Disord，2020，43：102146.

（收稿日期：2021-01-19；修回日期：2021-03-22）

基于 FAERS 数据库的美洛昔康不良反应信号挖掘研究

谢昊[1, 2, 3]，李若菲[1, 2, 3]，丁紫嫣[1, 2, 3]，陈且昕[1, 2, 3]，陈力[1, 2*]（1. 四川大学华西第二医院药学部/循证药学中心，成都 610041；2. 出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室，成都 610041；3. 四川大学华西药学院，成都 610041）

摘要：目的 通过对美洛昔康不良反应信号的挖掘分析，为临床合理安全用药提供依据。**方法** 采用比例失衡法中的报告比值比法（ROR）和比例报告比值法（PRR）对美国 FDA 不良事件报告系统（FAERS）中美洛昔康 2015 年第一季度至 2020 年第二季度共 22 个季度的不良反应报告进行数据挖掘及分析。**结果** 检索得到 8147 个以美洛昔康为首要怀疑药品的不良反应作为研究原始数据，对数据进行分析处理后得到 203 个有效信号，主要集中在各种肌肉骨骼及结缔组织疾病、全身性疾病及给药部位各种反应、胃肠系统疾病等方面。信号强度前 20 位的首选术语中未在说明书中出现的信号 15 个，未在说明书中出现的信号累及器官系统 5 个。**结论** 美洛昔康临床应用时，应特别注意对胃肠道系统、全身性疾病的监测，关注药物相互作用，同时尽量避免在患有心血管疾病的患者中使用。

关键词：美洛昔康；比例失衡法；不良反应信号
中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1711-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.040

Adverse drug reaction signal mining of meloxicam based on FAERS database

XIE Hao[1, 2, 3], LI Ruo-fei[1, 2, 3], DING Zi-yan[1, 2, 3], CHEN Qie-xin[1, 2, 3], CHEN Li[1, 2*] (1. *Department of Pharmacy/Evidence-Based Pharmacy Center, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu* 610041; 2. *Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children, Sichuan University, Ministry of Education, Chengdu* 610041; 3. *West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu* 610041)

Abstract: Objective To provide the basis for rational drug use through the mining and analysis of adverse drug reaction signals of meloxicam. **Methods** The reporting odds ratio method and proportional reporting ratio method were used to mine and analyze the adverse reaction reports of meloxicam from the first quarter of 2015 to the second quarter of 2020, in the FDA adverse events reporting system. **Results** Totally 8147 adverse drug reactions with meloxicam as the primary suspected drug were retrieved as the original data. After analyzing and processing the data, 203 effective signals were obtained, involving various musculoskeletal and connective tissue diseases, systemic diseases and various reactions of drug administration sites, gastrointestinal system diseases and so on. In the top 20 strong signals, 15 did not appear in the instructio; 5 organs and systems did not appear in the instruction as well. **Conclusion** In the clinical application of meloxicam, special attention should be paid to the monitoring of the gastrointestinal system, systemic diseases, and to drug interactions. The use of meloxicam in patients with cardiovascular diseases should be avoided.

Key words: meloxicam; measure of disproportionality; adverse drug reaction signal

类风湿关节炎是严重威胁人类健康的多发病、常见病，为一种慢性炎症免疫性疾病，在 65 岁以上的人群中发病率高达 10%[1]，其致残率在 60% 以上，严重影响着患者的生活质量和身心健康[2]。

非甾体抗炎药通过抑制环氧化酶（cyclooxygenase，COX）的活性发挥作用，环氧化酶包

基金项目：四川省科技厅项目（No.2019JDR0163）。
作者简介：谢昊，男，主要从事临床药学工作，E-mail：15884599290@163.com *通信作者：陈力，男，副主任药师，主要从事临床药学与医院合理用药工作，E-mail：13674852@qq.com

括 COX-1、COX-2。美洛昔康属非甾体抗炎药，对 COX-2 具有一定选择性，主要用于治疗骨关节炎、类风湿关节炎[3]。美洛昔康作为选择性 COX-2 抑制剂，其消化道损害显著低于非选择性的非甾体抗炎药，但其对于心血管事件的不良影响尚不明确[4-6]。美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）于 2015 年 7 月要求加强除阿司匹林以外的非甾体抗炎药增加心脏病发作和脑卒中风险的安全性警告，非甾体抗炎药的安全性报告持续更新。据报道，美洛昔康有致过敏性休克[7]、重症药疹[8]、阴道出血[9]等说明书中未提到的情况发生，说明书药品不良反应（adverse drug reaction，ADR）内容有待补充。随着非甾体抗炎药的广泛应用，其可能引起的严重 ADR 逐渐受到重视。2004 年的“万络”（罗非昔布）事件，因引起的心血管药物不良事件（adverse drug events，ADE），罗非昔布累计在全球范围内导致约 6 万人死亡。自 2004、2005 年罗非昔布和伐地昔布因会增加心血管风险而相继撤市后[10-11]，FDA 再未批准过 COX-2 抑制剂。而作为同是选择性 COX-2 抑制剂的美洛昔康，其存在一定的潜在风险，应引起警惕。

美洛昔康最早由勃林格殷格翰公司开发研制，并于 1996 年在德国首先上市，上市后两年销量便超过 3 亿，随后于 2000 年在美国批准上市，2002 年在中国批准上市。2020 年 2 月其注射液（静脉）获得 FDA 批准，用于治疗中度或重度疼痛，成为在美国上市的首个可供注射的选择性 COX-2 抑制剂。在中国，美洛昔康仍主要以片剂形式使用，其静脉注射制剂尚未在中国上市，对美洛昔康 ADR 的研究可为美洛昔康静脉注射剂的发展提供安全依据。

目前国内尚无美洛昔康 ADR 信号挖掘的研究报道。本文基于 FDA 不良事件报告系统（FDA adverse events reporting system，FAERS）对美洛昔康的 ADR 进行信号挖掘，使用最新的 ADE 报告，更新和完善该药的 ADR 数据。

1 资料与方法

1.1 数据来源

数据来源于 FAERS 数据库，选择能公开免费获取的 2015 年第一季度至 2020 年第二季度共 22 个季度的 ASCII 与 XML 数据[12]。将首要怀疑药物引起的 ADE 共 24 359 117 个，根据个人信息记录（DEMO）表进行去重处理后，导入 MySQL 5.7 进行分析。

1.2 数据筛选

以 FDA 批准 ADR 公众数据库（public dashboard）中药品名称为标准，采用美洛昔康的通用名“MELOXICAM”和商品名“MOBIC”为关键检索词进行模糊匹配，删除重复数据，筛选出美洛昔康为首要怀疑药物的报告，最终得到 8147 个 ADE 作为研究原始数据。对患者个人信息去重处理，得到 2040 份报告。导出美洛昔康用药患者结局表，对数据进行去重处理，得到 1212 份患者结局信息。

1.3 数据分析

目前比较成熟的 ADR 信号挖掘方法包括报告比值比法（reporting odds ratio，ROR）、比例报告比值法（proportional reporting ratio，PRR）等。ROR 和 PRR 发现信号能力好，具有较高的可信度和灵敏度[13-14]，因而本研究采用这两种方法。本研究基于比例失衡法四格表进行信号挖掘，获取首要怀疑药物为美洛昔康的目标 ADE 报告数及发生背景等数据，计算 ROR 和 PRR 的值[15]。

ROR 法检测标准判定：报告数≥ 3，ROR 的 95% 置信区间（confidence interval，*CI*）下限＞ 1 提示信号；PRR 法检测标准判定：报告数≥ 3，PRR 值＞ 2，卡方值＞ 4 提示信号。满足以上条件即生成一个信号[16]，有信号则提示 ADE 与美洛昔康之间存在统计学上的关联性。所有统计分析采用 Microsoft Excel 2016 软件。

1.4 数据处理

采用国际药品注册协议（International Conference on Harmonization，ICH）国际医学用语词典（Medical Dictionary for Regular Activities，MedDEA）的首选系统器官分类（system organ class，SOC）和首选术语（preferred term，PT）对 ADE 进行分类和表达。删除与药物无关的信号，得到最终的信号 PT。

2 结果

2.1 ADE 报告的基本情况

2015 年第一季度至 2020 年第二季度的 ADE 背景信号共 24 359 117 个，其中首要怀疑药物为美洛昔康的 ADE 报告共 2040 份，ADE 共 8147 个。其中患者男女比为 0.43，女性占多数。在已知年龄的患者中，中位年龄为 62 岁，平均年龄为 58.90 岁。性别、年龄的不清楚信息较多，因此关于性别、年龄组成的分析意义不大。报告者主要为消费者，占 45.78%。报告国家前 6 位分别是美国、加拿大、英国、日本、澳大利亚、意大利，美国报告数占 66.32%。2015—2019 年分别报告 235、382、315、364、500 例，大致呈上升趋势，可能与美洛昔康的使用增多有关。报告基本信息见表 1。

表 1　美洛昔康相关不良事件报告基本信息 (n = 2040)

Tab 1　Information of reported ADE of meloxicam (n = 2040)

信息	分类	报告例数	构成比 /%
性别	男性	464	22.75
	女性	1079	52.89
	不清楚	497	24.36
年龄段 / 岁	＜ 18	27	1.32
	18 ～ 64	580	28.43
	≥ 65	422	20.69
	不清楚	1011	49.56
报告国家（前六）	美国	1353	66.32
	加拿大	335	16.42
	英国	47	2.30
	日本	38	1.86
	澳大利亚	32	1.57
	意大利	27	1.32
年份	2015	235	11.52
	2016	382	18.73
	2017	315	15.44
	2018	364	17.84
	2019	500	24.51
	2020	239	11.72
	不清楚	5	0.24
报告者职业	消费者	934	45.78
	医师	434	21.28
	其他健康专家	384	18.82
	药师	194	9.51
	不清楚	94	4.61

2.2　不良反应信号分析结果

对获得的 ADE 报告进行数据分析，得到 225 种以美洛昔康为首要怀疑对象的信号 PT，对其进行筛除，排除产品问题、各类损伤、中毒及手术并发症等与药物无关的信号 22 个，最终获得 203 种信号 PT。表 2 列出了报告数前 20 位，即报告率较高的 ADE，表 3 列出了 PRR 和 ROR 值前 20 位，即信号较强的 ADE，PRR 值和 ROR 值各自的前 20 位 PT 完全一致。

将检出的信号 PT 与原研药莫比可（美洛昔康片）中国上市说明书对比，结果显示新的 ADE 较多。报告数前 20 位的首选术语中未在说明书中出现的信号共计 11 个，信号强度前 20 位的首选术语中未在说明书中出现的信号共计 15 个，为进一步研究更新说明书中 ADR 提供可能。

2.3　各系统器官分类的 ADR 信号数及 ADE 报告数

根据设置的信号条件筛选，共获得 203 个有信号的 ADE。使用 MedDRA 系统器官分类 SOC 对有信号的 ADE 进行分类，结果显示，美洛昔康有信号的 ADE 涉及 19 个 SOC，表 4 为各 SOC 的信号数和 ADE 报告数的情况。203 个信号中，ADE 报告主要集中在各种肌肉骨骼及结缔组织疾病，全身性疾病及给药部位各种反应，胃肠系统疾病，皮肤及皮下组织类疾病，各类检查，眼器官疾病，呼吸系统、胸及纵隔疾病。未在说明书中出现的 ADR 信号累及器官系统 5 个。

表 2　报告数前 20 的首选术语

Tab 2　Top 20 ADR signals of meloxicam

排序	PT	报告例数	95%*CI* 下限（ROR）
1	关节痛 *	128	2.00
2	肢体疼痛 *	112	2.13
3	外周肿胀	109	3.18
4	关节肿胀	104	5.21
5	药物不耐受 *	87	4.71
6	肌肉骨骼强直 *	81	5.22
7	类风湿关节炎 *	68	3.06
8	骨骼肌肉疼痛 *	64	4.64
9	药物相互作用	60	2.32
10	腹部不适	59	1.90
11	纤维肌痛 *	48	11.27
12	肌无力 *	40	1.89
13	速发过敏反应	38	4.45
14	干眼	36	4.77
15	滑膜囊肿 *	34	33.50
16	自杀既遂	34	2.58
17	皮疹瘙痒	34	3.71
18	腱鞘炎 *	33	59.69
19	肿胀	32	1.73
20	强直性脊柱炎 *	31	15.63

注（Note）：* 为说明书中未提及的 ADR（* means ADR not mentioned in the instruction）。

表 3　信号强度前 20 的首选术语

Tab 3　Top 20 ADR signals of meloxicam

排序	PT	报告例数	95%*CI* 下限（ROR）
1	缺血性胃炎	7	603.55
2	食管黏膜撕裂 *	6	438.80
3	脊柱后侧凸 *	11	233.05
4	人类白细胞抗原标志物研究阳性 *	11	208.98
5	滑液分析 *	10	191.47
6	脊椎 X 线检查异常 *	3	94.20
7	胃黏膜肥大	7	119.41
8	消化性溃疡穿孔	4	53.46
9	肌筋膜疼痛综合征 *	11	77.48
10	狭窄性腱鞘炎 *	10	71.83
11	类风湿肺 *	16	69.38
12	水中毒	6	48.73
13	指（趾）炎 *	12	58.36
14	起止点病 *	24	68.09
15	固定皮疹	18	55.83
16	腱鞘炎 *	33	59.69
17	过度活动综合征 *	8	38.01
18	结晶性肾病变 *	5	28.39
19	骶髂关节炎 *	17	41.19
20	逆行性遗忘 *	3	20.70

注（Note）：* 为说明书中未提及的 ADR（* means ADRs not mentioned in the instruction）。

2.4　患者结局信息

2040 例中，有 89（4.36%）例死亡，86（4.22%）

表 4 SOC 项下美洛昔康 ADR 检测

Tab 4 Systems and organs involving ADR signals of meloxicam

器官系统分类（SOC）	信号数（PT）	报告例数	报告数构成比 /%
各种肌肉骨骼及结缔组织疾病 *	44	1182	37.95
全身性疾病及给药部位各种反应	17	462	14.83
胃肠系统疾病	41	404	12.97
皮肤及皮下组织类疾病	11	162	5.20
各类检查 *	17	145	4.65
眼器官疾病	8	136	4.37
呼吸系统、胸及纵隔疾病	8	106	3.40
各类神经系统疾病	10	78	2.50
免疫系统疾病	5	74	2.38
感染及侵染类疾病 *	8	70	2.25
肝胆系统疾病	5	63	2.02
精神病类	4	55	1.77
代谢及营养类疾病 *	6	51	1.64
肾脏及泌尿系统疾病	7	44	1.41
心脏器官疾病	4	41	1.32
血液及淋巴系统疾病	4	17	0.55
血管与淋巴管类疾病	2	11	0.35
内分泌系统疾病 *	1	10	0.32
耳及迷路类疾病	1	4	0.13

注（Note）：* 为说明书中未提及的器官系统分类（* means SOC not mentioned in the instruction）。

例出现危及生命的情形，470（23.04%）例住院或住院延长，60（2.94%）例出现残疾，23（1.13%）例出现需要干预防止的永久性损害或损伤，811（39.75%）患者出现其他重要医学事件。

3 讨论

美洛昔康作为可选择性抑制 COX-2 的非甾体抗炎药，具有较强的解热镇痛抗炎作用，并且相较其他非选择性非甾体抗炎药，其具有较低的胃肠道和肾脏毒副作用，主要用于类风湿关节炎、骨关节炎等疾病的治疗 [17]。然而长期应用选择性 COX-2 抑制剂有增加心血管事件风险的可能，但目前众多试验尚未形成统一的结论，仍需进一步研究证实 [18]。使用美洛昔康时，应关注其心血管等方面存在的潜在风险，并且应倾向于不多于 10 d 的短期治疗，采用短期低剂量治疗方法，对患者心血管方面的生命体征进行定期监测 [19]。

3.1 ADR 发生的器官及系统特点

原研药莫比可（美洛昔康片）中国上市说明书中提及的 ADR，如过敏反应、皮疹、瘙痒、胃溃疡、十二指肠溃疡等，均为有信号的 ADR。本研究发现，美洛昔康的 ADE 主要集中在各种肌肉骨骼及结缔组织疾病（37.95%，1182/3115），全身性疾病及给药部位各种反应（14.83%，462/3115），胃肠系统疾病（12.97%，404/3115）。心血管系统存在一定数量 ADR 信号，虽然信号数、报告例数以及信号 PRR 和 ROR 值相对较低，但是 ADR 程度较为严重，美洛昔康在心血管方面的风险也应该警惕。一项 Meta 分析显示，美洛昔康使用者的出血性脑卒中的风险显著升高 [20]。值得注意的是，美洛昔康对患者的肝肾功能也存在一定的损害风险。

美洛昔康通过抑制 COX 的活性而减少前列腺素的合成发挥作用。药物胃肠系统疾病是非甾体抗炎药临床最常见的 ADE，非甾体抗炎药可以抑制 COX-1 的活性，而 COX-1 对于保护胃肠黏膜发挥着重要作用 [21]。选择性的 COX-2 抑制剂，相比于传统的非甾体抗炎药，对于胃肠道的损害大大减少。然而本研究中美洛昔康的胃肠系统疾病的 ADE 报告数较多（12.97%，404/3115），这可能与美洛昔康对 COX 的选择性不强有关。

与原研药莫比可（美洛昔康片）中国上市说明书对比，说明书中，常见 ADR 集中在神经系统疾病与胃肠道疾病，包括头痛、腹痛、消化不良、腹泻、恶心、呕吐。而本次研究发现报告数较多、PRR 和 ROR 值较高的各种肌肉骨骼及结缔组织疾病在说明书中几乎未被提及。但由于美洛昔康主要用于类风湿关节炎、骨关节炎的治疗，本研究无法判断肌肉骨骼及结缔组织相关 ADE 是否由美洛昔康直接引起。说明书 ADR 中涉及的所有器官系统，本次研究均检出一定信号数量的 ADE，并检出新出现 ADE 的器官系统如感染及侵染类疾病、代谢及营养类疾病、内分泌系统疾病等，可为说明书 ADR 的完善提供参考。

3.2 新的信号和累及器官系统

报告数前 20 位和信号强度前 20 位且未在说明书中出现的信号中，排除与原发疾病相关的信号，新的有意义的信号包括食管黏膜撕裂（ROR 值＝ 438.80）、结晶性肾病变（ROR 值＝ 28.39）、逆行性遗忘（ROR 值＝ 20.70）。这些信号提示美洛昔康可能存在尚未被充分认识的安全性问题，在今后临床用药中需要充分关注。食管黏膜撕裂可能与美洛昔康抑制前列腺素形成，降低其对消化道黏膜起保护作用或导致恶心呕吐，腹压升高引起撕裂有关 [22]；而结晶性肾病变可能与美洛昔康具有剂量依赖量的促尿酸排泄作用有关 [22]。临床前研究发现，美洛昔康可能通过抑制炎症反应和氧化应激，打破慢性炎症造成的氧化应激 - 炎症反应 - 慢性脑损伤的恶性循环，对中枢神经系统产生保护作用 [23-24]，然而由于其抑制中枢的炎症反应和氧化应激，也可能打破其正常平衡，此机制可能与逆行性遗忘有关。

未在说明书中出现的 ADR 信号累及器官系统 5 个，新的且有意义 SOC 包括感染及侵染类疾病、代谢及营养类疾病、内分泌系统疾病。美洛昔康可能因为抑制机体正常的炎症反应导致机体保护

作用下降，感染几率升高。可能由于其抑制肾脏前列腺素的形成以及其肝损害作用引起机体代谢排泄的异常[22]。由于比例失衡法具有较高的灵敏性，容易出现假阳性，内分泌系统疾病的信号数、报告例数、背景数很低，可能为假阳性结果。

3.3 严重不良事件

纳入研究的 2040 名患者中，有 1212 名患者存在较为严重的结局，包括死亡、危及生命、住院或住院延长、残疾、需要干预防止的永久性损害或损伤以及其他重要医学事件，符合严重 ADE 判断标准，但以上患者结局并不一定与美洛昔康的使用存在直接的因果关系。较多患者出现较严重结局可能与美洛昔康应用人群年龄普遍偏大有关，高龄患者易因各种其他因素出现以上结局，也可能与原发疾病的不良进展有关。

信号 PT 报告数前 20 出现“自杀既遂”的严重 ADE，但美洛昔康主要用于患者的消炎止痛治疗，因此推断“自杀”可能与患者难以忍受所罹患疾病的疼痛有关，无法判断两者的直接因果关系。在本研究中心血管相关 ADE 发生率虽然不高，但均较为严重（如心脏停搏），在临床应用仍应关注其潜在风险，进行定期监测。

3.4 药物相互作用

本研究挖掘到美洛昔康“药物相互作用”的信号，并且报告数位于前 10 位，提示美洛昔康与其他药物联合使用时易因药物相互作用产生 ADE。原研药莫比可（美洛昔康片）中国上市说明书中提到，美洛昔康与多种药物合用时，有增加相关 ADE 的风险。美洛昔康广泛地与血浆蛋白结合（99%）[25]，在肝脏中主要通过 CYP2C9 酶代谢[26]，因此血浆蛋白结合率高或有 CYP2C9 酶抑制或诱导作用的药物理论上与其均存在一定相互作用，增加相关 ADE 风险。如伏立康唑可通过增加美洛昔康血药浓度，增加相关 ADE 风险，可能是由于其抑制了 CYP2C9 酶活性[27]。

此外，药物还可从其他方面影响美洛昔康。如伊曲康唑可显著降低美洛昔康的血药浓度，可能是通过损害其胃肠道吸收[27]。美洛昔康与去氨加压素合用，由于其减弱前列腺素对抗利尿激素活性的正常抑制作用，可能增加低钠血症的风险[28]。

3.5 研究局限

本研究仍存在一定的局限性。FAERS 数据库中 ADE 报告主要来源于美国，分析结果更加适用于美国的美洛昔康临床应用，由于人种、地域等差异，当结果应用于中国时可能存在一定偏差。由于 FAERS 是自发呈报系统，收集的美洛昔康 ADE 报告可能不全，有漏报、误报的可能性，且呈报的 ADE 和药品之间因果关系并不能完全保证，如本次研究检出较多的信号与原发疾病相关，无法判断其与药物的直接相关性。尽管本研究对术语进行了标准化，也不能完全排除由于数据的模糊、不规范引起的分析偏差。此外，由于 FAERS 数据库信息收集的有限，美洛昔康与其他药物之间的相互作用无法进行具体分析。

4 结论

本次研究对 FAERS 数据库 2015—2020 年美洛昔康的 ADR 报告进行了较为全面的分析，结果显示，美洛昔康作为选择性 COX-2 抑制剂，在胃肠道系统仍检出较多 ADR 信号。而虽然检出较多的肌肉骨骼及结缔组织相关信号，但由于多集中于原发疾病，难以推断其与药物之间的因果关系。在美洛昔康的临床应用过程中，应重点关注胃肠道系统和全身性疾病，进行 ADR 监测，并针对药物相互作用制订合适的用药方案。同时为防止出现严重 ADR 后果，对患有心血管疾病的患者使用时应慎重。

参考文献

[1] van Walsem A，Pandhi S，Nixon RM，et al. Relative benefit-risk comparing diclofenac to other traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors in patients with osteoarthritis or rheumatoid arthritis：A network meta-analysis [J]. Arthritis Res Ther，2015，17（1）：66.

[2] 张晓荧，方圣博，王心怡，等 . 180 例类风湿关节炎非甾体抗炎药物应用合理性和安全性评价 [J]. 药学与临床研究，2018，26（4）：311-313.

[3] Khalil NY，Aldosari KF. Meloxicam [J]. Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol，2020，45：159-197.

[4] 陈玺 . 非甾体类消炎药不良反应的相关研究 [J]. 中国实用医药，2010，5（2）：11-13.

[5] 黄慧炳 . 口服非甾体抗炎药治疗类风湿性关节炎成本和效果 [J]. 智慧健康，2020，6（8）：67-68，80.

[6] Chen YF，Jobanputra P，Barton P，et al. Cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs（etodolac，meloxicam，celecoxib，rofecoxib，etoricoxib，valdecoxib and lumiracoxib）for osteoarthritis and rheumatoid arthritis：A systematic review and economic evaluation [J]. Health Technol Assess，2008，12（11）：1-278.

[7] 马昭霞 . 美洛昔康致过敏性休克及抢救 1 例 [J]. 中国社区医师（综合版），2005（15）：31.

[8] 薛竞 . 美洛昔康致重症药疹、类白血病反应及肝炎 [J]. 药物不良反应杂志，2007（2）：90.

[9] 魏明秀 . 美洛昔康致阴道出血一例 [J]. 药学服务与研究，2007（6）：454.

[10] Mukherjee D，Nissen SE，Topol EJ. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors [J]. JAMA，2001，286（8）：954-959.

[11] Mukherjee D. Selective cyclooxygenase-2（COX-2）inhibitors and potential risk of cardiovascular events [J]. Biochem

Pharmacol，2002，63（5）：817-821.
[12] 包旭 . 美国 OpenFDA 公众健康项目介绍 [J]. 中国执业药师，2015，12（10）：18-22.
[13] 代菲，舒丽芯，储藏，等 . 简述分析几种信号监测方法在药物不良事件中的应用 [J]. 药学实践杂志，2012，30（5）：380-383.
[14] Hauben M，Zhou X. Quantitative methods in pharmacovigilance：Focus on signal detection [J]. Drug Saf，2003，26（3）：159-186.
[15] 孔金霞，白雪霏，谢昊，等 . 基于 FAERS 的非索非那定药品不良反应信号挖掘研究 [J]. 中南药学，2020，18（7）：1137-1142.
[16] Evans SJ，Waller PC，Davis S. Use of proportional reporting ratios（PRRs）for signal generation from spontaneous adverse drug reaction reports [J]. Pharmacoepidemiol Drug Saf，2001，10（6）：483-486.
[17] 李健和，胡焰，易利丹，等 . 美洛昔康制剂的研究开发及临床应用进展 [J]. 中国药房，2013，24（2）：162-167.
[18] 王宁，秦明照 . 选择性环氧化酶 -2 抑制剂与心血管事件风险 [J]. 心血管病学进展，2013，34（2）：170-173.
[19] 王楠，毛璐 . 选择性 COX-2 抑制剂引发心血管事件研究进展 [J]. 中国药物警戒，2012，9（10）：625-628.
[20] Ungprasert P，Matteson EL，Thongprayoon C. Nonaspirin nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of hemorrhagic stroke：A systematic review and meta-analysis of observational studies [J]. Stroke，2016，47（2）：356-364.
[21] Cooper C，Chapurlat R，Al-Daghri N，et al. Safety of oral non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs in osteoarthritis：What does the literature say? [J]. Drugs Aging，2019，36（Suppl 1）：15-24.
[22] 王平，顾振纶 . 新型非甾体抗炎药——美洛昔康 [J]. 中国新药与临床杂志，2000，19（6）：499-501.
[23] Stei P，Kruss B，Wiegleb J，et al. Local tissue tolerability of meloxicam，a new NSAID：Indications for parenteral，dermal and mucosal administration [J]. Br J Rheumatol，1996，35（Suppl 1）：44-50.
[24] 李钟勇，张鹏 . 美洛昔康对老年痴呆模型大鼠学习记忆能力及脑组织 SOD，MAO-B，MDA 的影响 [J]. 中国现代应用药学，2011，28（2）：99-103.
[25] Schmid J，Busch U，Heinzel G，et al. Pharmacokinetics and metabolic pattern after intravenous infusion and oral administration to healthy subjects [J]. Drug Metab Dispos，1995，23（11）：1206-1213.
[26] Chesné C，Guyomard C，Guillouzo A，et al. Metabolism of meloxicam in human liver involves cytochromes P4502C9 and 3A4 [J]. Xenobiotica，1998，28（1）：1-13.
[27] Hynninen VV，Olkkola KT，Bertilsson L，et al. Voriconazole increases while itraconazole decreases plasma meloxicam concentrations [J]. Antimicrob Agents Chemother，2009，53（2）：587-592.
[28] Bojdani E，Chen A，Buonocore S，et al. Meloxicam-desmopressin drug-drug interaction producing hyponatremia [J]. Psychiatry Res，2019，279：284-286.

（收稿日期：2020-12-05；修回日期：2021-01-14）

阿米替林片合理应用评价标准的建立及应用

曹迪，程军，司福国（蚌埠市第三人民医院药学部，安徽 蚌埠 233000）

摘要：目的 建立阿米替林片合理应用评价标准，评价其应用合理性，为临床合理使用提供参考。**方法** 以药品说明书为框架，依据循证医学证据建立阿米替林片合理应用评价标准。采用回顾性分析方法，收集某三甲医院 2020 年 1 月 1 日—2020 年 6 月 31 日开具的阿米替林片门诊处方，按照评价标准进行点评。**结果** 538 张处方中，无适应证用药占 48.3%，用法用量符合率仅为 24.9%，2 张处方存在禁忌证用药，1 张处方存在潜在的药物相互作用。**结论** 依据合理应用评价标准，发现该院阿米替林片使用总体欠合理，应采取积极的干预措施规范阿米替林片的使用。同时，合理应用评价标准为阿米替林片超说明书用药院内备案提供了重要参考。

关键词：阿米替林；合理用药；评价标准
中图分类号：R969.3，R95 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1716-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.041

Evaluation criteria for the rational use of amitriptyline tablets

CAO Di, CHENG Jun, SI Fu-guo (*Department of Pharmacy*, *the Third People's Hospital of Bengbu*, *Bengbu Anhui* 233000)

基金项目：蚌埠市第四周期临床药学重点专科（编号：蚌卫教 [2013]11）。
作者简介：曹迪，男，主要从事医院药学工作，E-mail：94006719@qq.com

Abstract: Objective To evaluate criteria for the rational use of amitriptyline tablets and their clinical application to provide reference for clinical medication. **Methods** Evaluation criteria were established with reference to drug instructions and evidence of evidence-based medicine. The outpatient prescriptions of amitriptyline tablets were collected from January 1, 2020 to June 31st, 2020 in a tertiary hospital and rationality retrospectively analyzed according to the evaluation criteria. **Results** A total of 538 prescriptions of amitriptyline tablets were studied. The rate of indication of amitriptyline tablets was only 48.3% and that of usage and dosage was 24.9%. There were contraindications in 2 prescriptions. Potential drug-drug interactions were found in 1 prescription. **Conclusion** The rationality of amitriptyline tablets use needs improvement and intervention. The evaluation criteria for rational use of amitriptyline tablets provide an important reference for the management of off label drug use in hospitals.

Key words: amitriptyline tablet; rational drug use; evaluation criteria

阿米替林片是一种三环类抗抑郁药，镇静作用强，用于各种抑郁症的治疗，有循证医学证据证明阿米替林片可以用于带状疱疹后神经痛、头痛、纤维肌痛等疾病的治疗[1-3]。而在临床实践过程中发现阿米替林片使用广泛，并且存在不合理用药情况。目前，国内尚未有阿米替林片合理应用评价标准，为此，本文通过循证医学方法建立阿米替林片合理应用评价标准，为处方点评中阿米替林片使用合理性评价提供参考。

1　资料与方法

1.1　资料来源

通过医院合理用药软件调取蚌埠市第三人民医院 2020 年 1 月 1 日—2020 年 6 月 31 日开具的阿米替林片门诊处方。使用回顾性调查方法，分析所有患者的处方信息，包括年龄、临床诊断、给药途径、用法用量、联合用药等，如果处方中合并多种诊断疾病，通过与处方医师沟通，征询临床实际情况，记录与阿米替林片治疗目的相关的疾病。

1.2　基于循证医学证据建立合理应用评价标准

由本院临床药师及高年资调剂药师组成阿米替林片专项处方点评小组，以本院使用的阿米替林片药品说明书（生产厂家：湖南洞庭药业股份有限公司）为基础，参照原研药说明书（厂家：山德士制药有限公司）[4]，结合国内外国际权威学协会或组织发布的指南、共识，诊疗规范[1-3，5-9]，查阅《马丁代尔药物大典》（原著第 37 版）及《新编药物学》（第 18 版），初步建立阿米替林片合理应用评价标准。随后咨询相关临床使用科室具有高级职称的临床医师，结合临床治疗实际情况，按照科学、合理、实用的原则进行修改完善，使评价依据客观、准确。以上循证医学证据通过检索维普、中国知网、万方、PubMed、Cochrane 数据库、药智网等获得。评价标准见表 1。评价标准中超说明书用药推荐级别参考 Micromedex 数据库的 Thomsom 分级系统，见表 2。

2　结果

2.1　阿米替林片使用情况

共收集阿米替林片门诊处方 538 张，涉及 18 个科室。其中前三位科室分别是心理门诊 218 张、神经内科 197 张、皮肤科 77 张。538 张处方中男性 183 张，女性 355 张。患者平均年龄（52.2±18.6）岁，患者年龄分布如下：14 ～ 20 岁 30 张，21 ～ 40 岁 131 张，41 ～ 60 岁 169 张，61 ～ 90 岁 208 张。

2.2　用药合理性评价

本次调查中，适应证合理处方 278 张，其中超说明书用药 94 张，占 33.8%。超说明书用药中带状疱疹后神经痛 72 张，头痛 17 张，糖尿病伴有并发症 5 张（咨询医师，诊断应为糖尿病周围神经痛）。用法用量与说明书、指南及共识符合率为 24.9%。结果见表 3。

3　讨论

3.1　有循证医学证据的超适应证用药

本研究调查发现，有循证医学证据的超说明书用药占适应证合理处方的 33.8%，其中以带状疱疹后神经痛、头痛最为多见。《带状疱疹后神经痛诊疗中国专家共识》[1] 及《德国皮肤病学会带状疱疹临床指南》[5] 均收录阿米替林片用于治疗带状疱疹后神经痛。阿米替林通过阻断感觉神经元上的 Na^+ 通道，增加突触间隙中的去甲肾上腺素（NA）和 5- 羟色胺（5-HT），激活 α_2 受体等多种途径产生抗神经痛作用，有效改善患者的临床症状[10]。《马丁代尔药物大典》（第 37 版）及中国、美国、加拿大[2，7，9] 等相关指南均收录了阿米替林用于头痛的治疗。其机制可能与下调 5- 羟色胺受体，抑制 Na^+ 通道，抑制氨基丁酸转运蛋白，激活氨基丁酸受体，直接增加氨基丁酸水平等有关[11]。

表 1 阿米替林片合理应用评价标准

Tab 1 Evaluation criteria for rational use of amitriptyline tablets

评价指标	评价依据	评价结果
适应证 [1-3，5-9]	说明书适应证： ① 治疗各种抑郁症，特别是焦虑性或激动性抑郁症 超说明书适应证： ② 纤维肌痛（Class Ⅰ、Class Ⅱ b、Category B）；③ 治疗预防头痛（Class Ⅱ a、Class Ⅱ b、Category B）；④ 肠易激综合征（Class Ⅱ a、Class Ⅱ b、Category B）；⑤ 治疗和预防带状疱疹后遗神经痛（Class Ⅱ a、Class Ⅱ b、Category B）；⑥ 糖尿病、术后、创伤或肿瘤相关性神经病理性疼痛（Class Ⅱ a、Class Ⅱ a、Category B）	0：符合①或②或③或④或⑤或⑥ 1：不符合①和②和③和④和⑤和⑥或禁忌证用药
禁忌证 [4]	① 严重心脏病、近期有心肌梗死发作史；② 癫痫；③ 青光眼；④ 尿潴留；⑤ 甲状腺机能亢进；⑥ 肝功能损害；⑦ 对三环类药物过敏	
用法用量 [1-3，5-9]	① 抑郁：口服，成人初始剂量 25 mg，一日 2 ～ 3 次，然后根据病情和耐受情况逐渐增加至一日 150 ～ 250 mg，一日 3 次，最高日剂量不超过 300 mg；② 纤维肌痛：口服，每日睡前 25 ～ 50 mg；③ 头痛：睡前服用，每次 25 ～ 75 mg；④ 治疗和预防带状疱疹后遗神经痛：首剂睡前服用，每次 12.5 ～ 25 mg，每日最大剂量 150 mg；⑤ 糖尿病、术后、创伤或肿瘤相关性神经病理性疼痛：起始 10 ～ 25 mg • d^{-1}，维持 10 ～ 100 mg • d^{-1}	0：抑郁符合①或纤维肌痛符合②或头痛符合③或治疗和预防带状疱疹后神经痛符合④或糖尿病、术后、创伤或肿瘤相关性神经病理性疼痛符合⑤ 1：抑郁不符合①或纤维肌痛不符合②或头痛不符合③或治疗和预防带状疱疹后神经痛不符合④或糖尿病、术后、创伤或肿瘤相关性神经病理性疼痛不符合⑤
用药疗程	未明确规定	
药物相互作用 [4]	① 与舒托必利合用，有增加心律失常的危险，严重可致尖端扭转心律失常；② 与中枢神经系统抑制药合用，合用药的作用被增强；③ 与单胺氧化酶抑制剂合用，可发生高血压；④ 与 5- 羟色胺能药物（如氟西汀、曲马多等）或单胺氧化酶抑制剂合用，可致 5- 羟色胺综合征；⑤ 与肾上腺素受体激动药合用，可引起严重高血压与高热；⑥ 与抗惊厥药合用，可降低抗惊厥药物的作用；⑦ 与阿托品类合用，不良反应增加；⑧ 与氟西汀、氟伏沙明合用，增加两者血药浓度，出现惊厥，不良反应增加	0：符合①和②和③和④和⑤和⑥和⑦和⑧ 1：不符合①或②或③或④或⑤或⑥或⑦或⑧
儿童用药 [4]	① 6 岁以下儿童禁用，6 岁以上儿童酌情减量	0：符合① 1：不符合①
不良反应监测 [4]	① 治疗初期可能出现胆碱能反应，如多汗、口干等；② 中枢神经系统反应，如嗜睡、眩晕等；③ 偶见骨髓抑制、中毒性肝损害、癫痫发作、心脏毒性等；④ 发生相关不良反应，及时处理并填写 ADR 报表上报	0：符合①和②和③和④ 1：不符合①或②或③或④

注（Note）：0 为合理，1 为不合理（0：resonal；1：unresonal）。

表 2 Micromedex 数据库 Thomsom 分级系统

Tab 2 Thomsom classification system of Micromedex database

有效等级		推荐等级		证据等级	
Class Ⅰ	治疗有效	Class Ⅰ	推荐使用	Category A	包括随机对照试验的荟萃分析，多个、设计良好、大规模的随机临床试验
Class Ⅱ a	证据支持有效	Class Ⅱ a	大多数情况下推荐	Category B	结论冲突的随机对照试验，非随机研究
Class Ⅱ b	有效性具有争议	Class Ⅱ b	在某些情况下推荐使用	Category C	专家意见或共识，个案报道或系列案例
Class Ⅲ	治疗无效	Class Ⅲ	不推荐使用	No evidence	没有证据

3.2 适应证不适宜

适应证不适宜处方中，阿米替林片用于睡眠障碍及失眠比较突出，经咨询医师，睡眠障碍均为单纯失眠患者。在美国、英国临床上低剂量的阿米替林用于失眠的长期治疗也广泛存在 [12-13]。绝大多数医师认为阿米替林与苯二氮䓬类药物相比耐受性、依赖性的问题更少，因此，更倾向于经验使用小剂量的阿米替林治疗失眠。但阿米替林与苯二氮䓬类药物相比，白天的嗜睡和镇静作用更强，也更易引起老年患者体位性低血压、跌倒等情况的出现 [14]。检索 Cochrane library 发现一篇关于抗抑郁药物治疗成人失眠的系统性评价，但评价未搜集到阿米替林治疗成人失眠的相关临床研究，作者结论为没有证据表明阿米替林能用于单纯失眠患者的治疗 [15]。另外，《中国成人失眠诊断与治疗指南》（2017 版）中也指出，阿米替林能减少慢波睡眠、快动眼睡眠，但不良反应多，可作为抑郁障碍伴有失眠患者的二线治疗药物，

表 3 阿米替林片不合理用药统计

Tab 3 Statistics of irrational use of amitriptyline tablets

不合理用药类型	处方数 / 张	构成比 /%	问题处方张数
无适应证用药	260	48.3	睡眠障碍（210）、失眠（7）、耳鸣（5）、耳源性眩晕（4）、神经炎（4）、糜烂性胃炎（3）、慢性萎缩性胃炎（1）、慢性胃炎（1）、帕金森病（3）、皮疹（2）、周围神经病（2）、宫颈残端恶性肿瘤（2）、冠状动脉性心脏病（2）、肝功能不全（1）、肱二头肌长头肌腱炎（1）、肋间神经炎（1）、前庭性眩晕（1）、瘙痒症（1）、神经官能症（1）、湿疹（1）、头晕（1）、无牙牙槽嵴萎缩（1）、心律失常（1）、支气管哮喘（1）、周围血管疾病（1）、椎 - 基底动脉供血不足（1）、自主神经功能紊乱（1）
禁忌证用药	2	0.4	肝功能损害（1）、心力衰竭（1）
用法用量不适宜	404	75.1	抑郁 25 mg qn（123）、25 mg qd（15）、12.5 mg qn（6）、12.5 mg qd（1）；头痛 12.5 mg qn（5）、12.5 mg qd（5）、tid 12.5 mg（1）、bid 25 mg（1）；25 mg qn（149）、12.5 mg qn（67）、25 mg qd（28）、12.5 mg qd（3）
药物相互作用	1	0.2	曲马多（1）

但不推荐用于单纯失眠的治疗 [16]。因此，目前阿米替林片用于单纯失眠的治疗无循证医学证据支持。阿米替林片在消化科用于糜烂性胃炎、慢性萎缩性胃炎、慢性胃炎的治疗也较多，通过与医师沟通，他们认为患者可能伴有焦虑、抑郁等精神疾病。通过查询相关数据库，未检索到阿米替林用于糜烂性胃炎、慢性萎缩性胃炎、慢性胃炎伴有焦虑、抑郁等精神疾病的治疗的相关权威指南及高质量的随机对照试验（RCT）、临床对照试验（CCT）研究，仅发现 Micromedex 循证医学数据库推荐阿米替林用于肠易激综合征的治疗，有效等级、推荐等级、证据等级分别为 Class Ⅱa、Class Ⅱb，Category B。因此，单纯的糜烂性胃炎、慢性萎缩性胃炎、慢性胃炎使用阿米替林片治疗，循证医学证据不足。另外，有 5 例耳鸣、4 例耳源性眩晕患者使用了阿米替林片，经检索阿米替林片没有用于耳源性眩晕相关文献报道。美国耳鼻咽喉头颈外科学会制定的《耳鸣临床应用指南》[17] 明确指出相关临床研究并没有证明抗抑郁药治疗耳鸣的受益大于损害，且耳鸣被列为所有抗抑郁药物的较罕见的不良反应，故不推荐将抗抑郁药用于耳鸣的治疗，因此，耳鸣、耳源性眩晕使用阿米替林片治疗，循证医学证据不足。

3.3 用法用量不适宜

阿米替林片用法用量与说明书或指南符合率仅为 24.9%。用法用量不适宜主要表现为抑郁患者 25 mg qd 或 25 mg qn 给药。给药频次和日剂量均小于说明书规定用法用量，而阿米替林及其代谢物去甲替林血药浓度与抗抑郁治疗效果密切相关 [18]，25 mg qd 或 25 mg qn 给药无法达到有效血药浓度和预期的治疗效果，建议医师严格按照说明书给药。

3.4 禁忌证用药

2 例禁忌证用药分别是肝功能损害和心力衰竭患者使用阿米替林片，阿米替林主要通过肝脏细胞色素 P450 酶中 CYP2C19 与 CYP2D6 代谢，肝功能损害会减缓阿米替林的代谢，增加其血药浓度，增加不良反应 [19]。同时，阿米替林使用过程中也有造成中毒性肝损害的报道 [20]，因此肝功能损害患者禁用。另外，阿米替林能够干扰去甲肾上腺素的再摄取，直接抑制心肌，从而导致 Q-T 间期延长、心肌缺血、尖端扭转型心律失常等严重的心脏毒性，特别是药物过量或者有心脏疾病的患者更易发生 [21-22]。因此，严重心脏病、近期有心肌梗死发作史的患者禁止使用。

3.5 存在药物相互作用

本次调查发现药物相互作用 1 例，为阿米替林片和曲马多联合使用。阿米替林能阻断 5- 羟色胺在神经末梢的再摄取，曲马多也能抑制神经元突触对去甲肾上腺素及 5- 羟色胺的再摄取，两者联合使用可能会造成严重的 5- 羟色胺综合征。检索相关数据库，发现 1 例 79 岁女性抑郁、坐骨神经痛患者，长期服用阿米替林片，在联合使用曲马多片后的 3 d，出现神志不清、幻觉，入院治疗，终因低血压、心动过缓、休克死亡 [23]。提示医师开具阿米替林片时应避免与 5- 羟色胺能药物（如氟西汀、曲马多等）及单胺氧化酶抑制剂合用。

4 结语

本研究通过建立合理应用评价标准，对本院阿米替林片临床应用合理性进行评价，发现临床用药中存在无适应证用药、用法用量不适宜、禁忌证用药及潜在的药物相互作用等不合理情况，可能是由于医师未能熟练掌握药品使用方法，以及对超说明书用药循证医学证据的药品使用相关内容缺乏关注所致。本院已将阿米替林片合理应用评价标准应用

于每月一次的处方点评工作中，并且通过更新合理用药软件数据库，实现对门诊医师、调剂药师工作站相关问题电子处方用药预警。同时，临床药师在相关科室加强阿米替林片合理用药知识宣传，并依据循证医学证据持续对阿米替林片合理应用评价标准进行更新。本研究仅调查了本院门诊处方，样本量有限，具有一定的局限性，但对安全、合理用药有一定的指导意义。

参考文献

[1] 于生元，万有，万琪，等 . 带状疱疹后神经痛诊疗中国专家共识 [J]. 中国疼痛医学杂志，2016，22（3）：161-167.

[2] Silberstein SD，Holland S，Freitag F，et al. Evidence-based guideline update：Pharmacologic treatment for episodic migraine prevention in adults：Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Headache Society [J]. Neurology，2012，78（17）：1337-1345.

[3] Fitzcharles MA，Ste-Marie PA，Goldenberg DL，et al. 2012 Canadian Guidelines for the diagnosis and management of fibromyalgia syndrome：Executive summary [J]. Pain Res Manag，2013，18（3）：119-126.

[4] 山德士制药有限公司 . 阿米替林片 [Z]. 2018.

[5] Gross G，Schöfer H，Wassilew S，et al. Herpes zoster guideline of the German Dermatology Society（DDG）[J]. J Clin Virol，2003，26（3）：277-289.

[6] 朱谦，樊碧发，张达颖，等 . 周围神经病理性疼痛诊疗中国专家共识 [J]. 中国疼痛医学杂志，2020，26（5）：321-328.

[7] 中华医学会疼痛学分会头面痛学组，中国医师协会神经内科医师分会疼痛和感觉障碍专委会 . 中国偏头痛防治指南 [J]. 中国疼痛医学杂志，2016，22（10）：721-727.

[8] 中国医师协会神经内科医师分会疼痛和感觉障碍专委会 . 糖尿病性周围神经病理性疼痛诊疗专家共识 [J]. 中国疼痛医学杂志，2018，24（8）：561-567.

[9] Pringsheim T，Davenport W，Mackie G. Canadian Headache Society Prophylactic Guidelines Development Group. Canadian Headache Society guideline for migraine prophylaxis [J]. Can J Neurol Sci，2012，39（2 Suppl 2）：S1-59.

[10] 张明，杨洋，白楠 . 阿米替林治疗带状疱疹后遗神经痛的文献计量分析 [J]. 中国药物应用与监测，2018，15（3）：177-180.

[11] 郑安海，周冀英 . 阿米替林预防性治疗偏头痛的研究进展 [J]. 重庆医学，2013，42（24）：2925-2928.

[12] Everitt H，McDermott L，Leydon G，et al. GPs' management strategies for patients with insomnia：A survey and qualitative interview study [J]. Br J Gen Pract，2014，64（619）：e112-119.

[13] Morlock RJ，Tan M，Mitchell DY. Patient characteristics and patterns of drug use for sleep complaints in the United States：Analysis of National Ambulatory Medical Survey data，1997—2002 [J]. Clin Ther，2006，28（7）：1044-1053.

[14] 王赛，刘琛，张兰，等 . 中国老年人潜在不适当用药判断标准（2017 年版）[J]. 药物不良反应杂志，2018，20（1）：2-8.

[15] Everitt H，Baldwin DS，Stuart B，et al. Antidepressants for insomnia in adults [J]. Cochrane Database Syst Rev，2018，5（5）：CD010753.

[16] 张鹏，李雁鹏，吴惠涓，等 . 中国成人失眠诊断与治疗指南（2017 版）[J]. 中华神经科杂志，2018，51（5）：324-335.

[17] 贺璐，王国鹏，彭哲，等 . 耳鸣临床应用指南 [J]. 听力学及言语疾病杂志，2015，23（2）：116-139.

[18] Ulrich S，Läuter J. Comprehensive survey of the relationship between serum concentration and therapeutic effect of amitriptyline in depression [J]. Clin Pharmacokinet，2002，41（11）：853-876.

[19] Hicks JK，Sangkuhl K，Swen JJ，et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guideline（CPIC）for CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and dosing of tricyclic antidepressants：2016 update [J]. Clin Pharmacol Ther，2017，102（1）：37-44.

[20] 王志义，徐作国，隋忠庆 . 53 例阿米替林的不良反应 / 事件分析 [J]. 中国药物警戒，2012，9（12）：754-756.

[21] Nezafati MH，Vojdanparast M，Nezafati P. Antidepressants and cardiovascular adverse events：A narrative review [J]. ARYA Atheroscler，2015，11（5）：295-304.

[22] Kassim T，Mahfood Haddad T，Rakhra A，et a. A case of amitriptyline-induced myocarditis [J]. Cureus，2018，10（6）：e2840.

[23] Kitson R，Carr B. Tramadol and severe serotonin syndrome [J]. Anaesthesia，2005，60（9）：934-935.

（收稿日期：2020-12-09；修回日期：2021-01-22）

骨科围手术期抗凝药物及氨基己酸合理使用评价

叶鸣[1]，赵磊[1]，方佳[1]，谢家欣[2]，朱和平[1*]（1. 芜湖市中医医院药剂科，安徽　芜湖　241000；2. 皖南医学院药学院，安徽　芜湖　241000）

摘要：目的　建立骨科围手术期抗凝药物及氨基己酸合理使用评价标准（DUE），评价骨科围手术期合理用药情况。**方法**　以 Caprini 血栓风险评估模型及氨基己酸注射液药品说明书为基础，参照相关指南和专家共识，建立骨科围手术期抗凝药物及氨基己酸 DUE 标准。采用回顾性研究方法，纳入 2020 年 1 月至 12 月骨科出院患者手术类型为“闭合复位内固定术”“髋关节置换术”或“膝关节镜成形术”的病例共 156 例，收集患者入院治疗所有病例资料，并对患者围手术期抗凝药物及氨基己酸用药进行合理性评价。**结果**　156 份病例，其中抗凝药物给药时机不适宜 19 例（12.18%），氨基己酸使用时间过长 22 例（14.1%），不适宜使用氨基己酸 2 例（1.28%），未使用抗凝药物 19 例（12.18%），抗凝药物使用时间较短 2 例（1.28%）。**结论**　骨科围手术期抗凝药物及氨基己酸合理使用有待进一步提升。

关键词：骨科；围手术期；抗凝药物；氨基己酸
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)08-1721-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.042

Rational use of anticoagulants and aminocaproic acid in orthopedic perioperative period

YE Ming[1], ZHAO Lei[1], FANG Jia[1], XIE Jia-xin[2], ZHU He-ping[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *Wuhu Hospital of Traditional Chinese Medicine*, *Wuhu Anhui* 241000; 2. *Department of Pharmacy*, *Wannan Medical College*, *Wuhu Anhui* 241000)

Abstract: Objective　To establish the evaluation criteria for the rational use of anticoagulants and aminocaproic acid in orthopedic perioperative period, and to evaluate the rational use of drugs. **Methods**　Based on Caprini thrombus risk assessment model and instructions of aminocaproic acid injection, and with reference to relevant guidelines and expert consensus, the drug use evaluation standard of anticoagulants and aminocaproic acid in orthopedic perioperative period was established. A total of 156 patients diagnosed as with “closed reduction and internal fixation” “hip arthroplasty” or “knee arthroscopic plasty” were selected discharged from Orthopedics Department of a hospital from January to December 2020. The data of all patients were collected. The rationality of anticoagulants and aminocaproic acid in perioperative period was evaluated. **Results**　Among the 156 medical records, 19 (12.18%) had unsuitable anticoagulant administration, 22 (14.1%) used aminocaproic acid for too long, 2 (1.28%) had unsuitable aminocaproic acid, 19 (12.18%) did not use anticoagulant drugs, and 2 (1.28%) had short use of anticoagulants. **Conclusion**　The rational use of anticoagulants and aminocaproic acid in the orthopedic perioperative period needs improvement.

Key words: orthopaedics; perioperative period; anticoagulant; aminocaproic acid

骨科围手术期需根据具体情况合理使用抗凝药物和止血剂，以防止静脉血栓栓塞症（venous thromboembolism，VTE）的发生以及失血量过多造成的不良事件。VTE 包括深静脉血栓形成（deep vein thrombosis，DVT）和肺动脉血栓栓塞症（pulmonary thromboembolism，PTE），骨科手

基金项目：2020 年省级自然科学重点研究项目（No. KJ2020A0879）。
作者简介：叶鸣，女，硕士，主要从事临床药学工作，E-mail：47470897@qq.com　*通信作者：朱和平，男，副主任药师，主要从事药事管理工作，E-mail：953525230@qq.com

术后 VTE 高发是骨科预后差的重要因素 [1]。研究指出，国外髋关节置换术后 DVT 总发生率为 42% ～ 57%，膝关节置换术后 DVT 总发生率为 41% ～ 85%，髋部周围骨折手术后 DVT 总发生率为 46% ～ 60%[2]。因此，提高对 VTE 风险的认识，并采取相应的预防措施，具有重要的临床实践意义。骨科大手术存在大量骨性渗血，会造成围手术期有效循环血量丢失 [3]。氨基己酸是一种抗纤溶药物，且临床证明具有良好的疗效和安全性 [4]；本院骨科手术主要使用氨基己酸作为药物类止血剂，合理运用抗凝药物及氨基己酸是降低骨科术后血栓和出血不良事件发生风险的手段，现就骨科抗凝药物及氨基己酸合理使用进行评价。

1 资料来源

利用电子病例系统回顾性收集本院 2020 年 1 月至 12 月骨科出院患者 1024 份病历，排除标准：① 合并凝血功能异常；② 合并严重肝、肾功能不全；③ 对抗凝药物或氨基己酸过敏；④ 术后相关检验数据缺失者；⑤ 同时双侧骨折。其中手术类型为“闭合复位内固定术”“髋关节置换术”和“膝关节镜成形术”的病例共 156 例，收集患者入院治疗所有病历资料。

2 方法

2.1 病历登记表及合理用药评价表的制订

病历登记表包括：① 基本信息，包括姓名、体重、年龄、体质指数（BMI）、入院时间、出院时间、疾病史、用药史等；② 检验指标，包括 D- 二聚体、凝血指标、生化等；③ 用药信息，包含药名、用法用量、给药途径、用药起止时间等；④ 疗效及不良反应；⑤ 合理性评价表的因素包含用药适应证、药物遴选、给药时机、用法用量、给药途径、用药疗程。

2.2 用药合理性评价标准的制订

参考《中国骨科手术加速康复围手术期氨甲环酸与抗凝血药应用的专家共识》[5]、《中国普通外科围手术期血栓预防与管理指南》[6]、《深静脉血栓形成的诊断和治疗指南（第三版）》[7]、《中国骨科大手术静脉血栓栓塞症预防指南》[8] 等制订合理性评价标准（下称“标准”），见表 1。

表 1 抗凝药物及氨基己酸用药合理性评价标准

Tab 1 Rationality evaluation of anticoagulants and aminocaproic acid

出血风险 [9]	VTE 风险等级	预防措施	止血措施
1. 严重的活动性出血（脑、消化道、泌尿系统或其他部位等）	低风险（Caprini 1～2 分）	可仅应用一般预防和物理预防措施；机械预防措施，建议使用间歇充气加压装置（IPC）	单次应用氨基己酸在手术切开皮肤前 15 ～ 30 min，剂量为 2 ～ 4 g；手术 3 h 以上在关闭切口前追加 1 次（2 ～ 4 g）[10]；使用时间不得超过术后 2 d[11-13]；过去有血管栓塞者忌用 [10]
2. 3 个月以内发生脑血管事件（脑梗死、脑出血）	中等风险（Caprini 3 ～ 4 分），不伴高出血风险	术后 12 h 出血停止者开始应用抗凝血药，7 ～ 14 d，患者术后 VTE 风险仍高抗凝血药物可延长至 15 ～ 35 d	
3. 严重的凝血功能障碍；肝功能衰竭			
4. 10 d 以内消化道出血病史；合并消化道溃疡、消化道恶性肿瘤等	中等风险（Caprini 3 ～ 4 分），伴高出血风险	使用 IPC	
5. 3 个月以内神经系统（颅内、脊髓）手术病史			
6. 3 个月以内发生颅内创伤性疾病；10 d 以内心肺复苏病史	高风险（Caprini ≥ 5 分），不伴高出血风险	术后 8 h 出血停止者开始应用抗凝血药，7 ～ 14 d，术后 VTE 风险仍高的患者抗凝血药物可延长至 15 ～ 35 d	
7. 10 d 以内的重大非血管手术或创伤病史			
8. 未获良好控制的高血压患者：收缩压≥ 180 mmHg，舒张压≥ 110 mmHg	高风险（Caprini ≥ 5 分），伴高出血风险	使用 IPC，直至出血风险消失可启用药物预防	
9. 颅内肿瘤；近期眼外科手术病史			

2.3 数据统计

采用 EXCEL 软件对数据进行录入和处理。

3 结果

3.1 患者基本情况

对患者的基本状况（年龄、基础疾病）、手术类型及时长进行了统计，具体见表 2。

3.2 抗凝药物与氨基己酸使用分布

156 例病例，根据 Caprini 风险评估将患者分为 VTE 风险低、中、高危，结合患者出血风险对患者抗凝药物与氨基己酸使用情况进行统计。结果见表 3。收集资料发现术前 30 min 使用氨基己酸患者，手术时长＞ 3 h 均未术中追加。后续还需加强与临床沟通，根据氨基己酸药代动力学特点，合理使用氨基己酸及抗凝药物从而达到止血与抗凝平衡。

3.3 抗凝药物与氨基己酸不合理使用情况

根据患者 Caprini 风险评估及出血风险评估对抗凝药物及氨基己酸使用合理性进行分析，结果见表 4。各类型手术抗凝药物及氨基己酸使用还存在一定问题，需进一步管控。

3.4 抗凝药物与氨基己酸使用术后情况分析

根据点评结果进行分组，并对术后结局进行收集，合理组 109 例，不合理组 47 例，两组均无严重

表 2　患者基本情况

Tab 2　Baseline information of patients

项目	项目分类	例数 /*n*	构成比 /%
年龄 / 岁	0 ～ 40	29	18.59
	41 ～ 60	49	31.41
	61 ～ 74	50	32.05
	≥ 75	28	17.95
手术时长 /min	＜ 45	20	12.82
	≥ 45	136	87.18
基础疾病	高血压	34	21.79
	心脑血管疾病	19	12.18
	消化道疾病	6	3.85
	糖尿病	5	3.21
	其他	16	10.26
	无	76	48.72
手术类型	髋关节置换术	46	29.49
	闭合复位内固定术	68	43.59
	膝关节镜手术	42	26.92

表 3　抗凝药物和氨基己酸使用分布 (*n*)

Tab 3　Usage distribution of anticoagulants and aminocaproic acid (*n*)

药物	使用情况	VTE 风险分层		
		低	中	高
抗凝药物	低分子肝素钠	0	3	3
	依诺肝素钠	19	41	22
	低分子肝素钙	1	11	6
	利伐沙班	1	3	2
	未使用	22	20	2
氨基己酸	仅术前 30 min 使用（手术时长＞ 3 h，术中追加使用）	1（0）	1（0）	2（0）
	术前、术后均使用	2	6	5
	术后使用	16	31	6
	未使用	24	40	22

不良事件，如术后 DVT、术后出血延长，但不合理组存在其他不良事件 2 例，为 D- 二聚体升高，住院时间延长。

4　讨论

4.1　骨科围手术期止血治疗的必要性

骨科大手术特指人工全髋关节置换术、人工全膝关节置换术和髋部周围骨折手术 [8]。骨科大手术存在大量骨性渗血，若不及时纠正极易影响患者术后康复，甚至危及生命。股骨干骨折、粗隆间骨折多采用闭合复位内固定术，隐形失血量高达 600 ～ 800 mL，采取措施减少失血是有必要的。膝关节镜手术是目前膝关节滑膜炎的主要手术治疗手段，但滑膜血管丰富，切除后容易出血，增加关节腔积血的发生率。临床上可通过患肢大腿根部上止血带、骨蜡封闭截骨面、自体血回输、输血及局部或静脉给予止血剂等方法减少术中、术后出血 [14-17]，需要根据患者手术部位及患者自身情况选择合适的止血方式。氨基己酸是一种抗纤溶药物，通过阻断纤溶酶与纤维蛋白原及纤维蛋白结合而发挥抗纤溶作用 [18]，由于其在心脏手术中有良好的疗效及安全性，被采用在骨科大手术中来减少围手术期的失血量、降低输血率和并发症发生率 [4，19]。

4.2　骨科围手术期抗凝治疗的必要性及抗凝药物种类

骨科大手术后 VTE 主要预防抗凝药物有普通肝素、低分子肝素、Xa 因子抑制剂（如磺达肝癸钠，利伐沙班等）。目前临床应用较多的是低分子肝素，相比于普通肝素，出血风险较低。磺达肝癸钠常规使用剂量不会影响凝血时间，无需监测活化部分凝血活酶时间（APTT），该药主要通过肾脏代谢清除，故肾功能不全患者应调整剂量并谨慎使用。新型的口服抗凝药物如利伐沙班，高选择性地直接抑制 Xa 因子，具有起效快、治疗安全范围宽、药物间相互作用小、多次给药后无蓄积等特点 [8]。本文中 156 例患者使用的抗凝药物为低分子肝素钠、依诺肝素钠、低分子肝素钙及利伐沙班。

表 4　抗凝药物与氨基己酸不合理使用情况 (*n*)

Tab 4　Irrational use of anticoagulants and aminocaproic acid (*n*)

手术类型	病例数	不合理数	抗凝药物给药时机不适宜	氨基己酸使用时间过长	不适宜使用氨基己酸	未使用抗凝药物	抗凝时间较短
髋关节置换术	46	9	8	4	0	1	0
闭合复位内固定术	68	27	11	13	2	11	0
膝关节镜手术	42	11	0	5	0	7	2

4.3　Caprini 血栓风险评估模型在骨科围手术期中的应用

目前，Caprini 血栓风险评估模型是中华医学会推荐的外科手术患者的 DVT 风险评估模型 [6]，其应用效果已得到临床普遍认可。在临床实践中，可以根据患者的 Caprini 评分、危险度分级采取相应的预防措施 [20]。Caprini 风险评估分为低、中、高危。低危患者可仅应用一般预防和物理预防措施；中危患者不伴高危出血风险术后 12 h 出血停止则开始启动抗凝治疗，伴高危出血风险则使用物理预防措施如 IPC；高危患者不伴高危出血风险术后 8 h 出血停止开始启动抗凝治疗，伴高危出血风险则开始使用 IPC，直至出血风险消失可启用药物预防。骨科手术患者围手术期通过 Caprini 血栓风险评估及出血风险评估，更好地应用止血剂与抗凝药物，能够达到既可减少患者出血量、降低输血率，同时减少患者发生 VTE 的风险达到止血与抗凝的平衡，保障医疗安全 [5]。

4.4　典型不合理病例分析

4.4.1 髋关节置换术不合理病例分析 一例典型病例 72 岁高龄女性患者，既往有高血压、脑梗死，血凝指标及肾功能正常，D- 二聚体未测，行全髋关节置换术，术前未使用氨基己酸预防出血，术后患者未使用抗凝药物预防治疗。临床药师对该患者进行 Caprini 风险评估，患者属于高危血栓风险，存在出血风险，需要出血风险消失后启动抗凝药物治疗，存在未使用抗凝药物不合理现象。

一例典型病例 79 岁女性，既往有糖尿病，术后使用氨基己酸止血治疗 3 d，术后 24 h 才启动抗凝治疗。根据评分患者属于高危，应在术后 8 h 出血停止开启抗凝治疗。氨基己酸使用时间较长会增加患者血栓风险，故需进一步加强监管。

4.4.2 闭合复位内固定术不合理病例分析 一例 70 岁男性患者，行左股骨粗隆骨折闭合复位内固定术，既往体健，血凝指标、D- 二聚体及肾功能正常，术后 48 h 予以依诺肝素钠注射液 4000 IU qn 抗凝治疗，根据 Caprini 风险评估，患者为高危血栓风险，无出血风险，故抗凝预防措施应在术后 8 h 后开始启动，术后 48 h 给药时机不适宜。

另一例 91 岁女性患者，既往高血压、心脏支架植入病史 10 余年，长期服用抗血小板药物，患者血凝指标及肾功能正常，术前 D- 二聚体 1840 ng • mL^{-1}，术前予以依诺肝素钠注射液 4000 IU qd 预防抗凝治疗 6 d 后行右股骨粗隆骨折闭合复位内固定术，术后 8 h 继续抗凝治疗。患者为高危血栓风险，存在出血风险，手术当日术前 12 h 内未停止使用依诺肝素钠，这样会增加出血风险，同时术后未评估患者出血情况而直接 8 h 后启动抗凝治疗，存在给药时机不适宜情况。

13 例患者氨基己酸使用时间较长，均在术后予以氨基己酸 2 g qd ivgtt 止血治疗 3 d 及以上。氨基己酸是一种抗纤维蛋白溶解药，在血中以游离状态存在，不与血浆蛋白结合，在体内维持时间短，不代谢，给药后 12 h，有 40% ～ 60% 以原形从尿中迅速排泄。多项研究表明手术切开皮肤前 15 ～ 30 min，剂量为 2 ～ 4 g。手术 3 h 以上在关闭切口前追加 1 次（2 ～ 4 g），即可达到有效止血效果[11-13]，无需术后使用 3 d 以上。

4.4.3 膝关节镜手术不合理病例分析 2 例典型病例是有基础疾病高龄患者同时 Caprini 风险评估为中、高风险，术后及时抗凝治疗，但抗凝治疗仅 3 d，存在抗凝治疗时间较短现象。

4.5 小结

本研究对骨科围手术期抗凝药物及氨基己酸合理使用进行点评，分析不同风险患者合理使用抗凝药物及氨基己酸的时机及尺度，发现本院骨科患者术后使用抗凝药物仍存在不合理的地方，如在不适宜的时间使用抗凝药物，未使用抗凝药物等，后续还需密切与临床沟通，个体化给予患者抗凝药物及止血剂，减少患者术后发生并发症风险。

参考文献

[1] Huang Z，Xie X，Li L，et al. Intravenous and topical tranexamic acid alone are superior to tourniquet use for primary total knee arthroplasty：A prospective，randomized controlled trial [J]. J Bone Joint Surg Am，2017，9（24）：2053-2061.

[2] Falck-Ytter Y，Francis CW，Johanson NA，et al. Prevention of VTE in orthopedic surgery patients：Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis，9th ed：American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines [J]. Chest，2012，141（Suppl）：e278S-S325.

[3] Love JN，O’Mara MDS. Freiberg’s disease in the emergency department [J]. J Emerg Med，2010（384）：23-25.

[4] Harley BJ，Beaupre LA，Jones CA，et al. The effect of epsilon aminocaproic acid on blood loss in patients who undergo primary total hip replacement：A pilot study [J]. Can J Surg，2002，45（3）：185-190.

[5] 周宗科，黄泽宇，杨惠林，等 . 中国骨科手术加速康复围手术期氨甲环酸与抗凝血药应用的专家共识 [J]. 中华骨与关节外科杂志，2019，12（2）：81-88.

[6] 刘凤林，张太平 . 中国普通外科围手术期血栓预防与管理指南 [J]. 消化肿瘤杂志（电子版），2016，8（2）：57-62.

[7] 李晓强，张福先，王深明 . 深静脉血栓形成的诊断和治疗指南（第三版）[J]. 中国血管外科杂志（电子版），2017，9（4）：250-257.

[8] 田伟 . 中国骨科大手术静脉血栓栓塞症预防指南 [J]. 中华骨科杂志，2016，36（2）：65-71.

[9] Beyth RJ，Milligan PE，Gage BF. Risk factors for bleeding in patients taking coumarins [J]. Cur Hematol Rep，2002，1（1）：41-49.

[10] 氨基己酸说明书 [Z]. 扬州中宝药业股份有限公司 .

[11] Churchill JL，Puca KE，Meyer ES，et al. Comparison of ε-aminocaproic acid and tranexamic acid in reducing postoperative transfusions in total hip arthroplasty [J]. J Arthroplasty，2016，31（12）：2795-2799.

[12] Churchill JL，Puca KE，Meyer E，et al. Comparing ε-aminocaproic acid and tranexamic acid in reducing postoperative transfusions in total knee arthroplasty [J]. J J Knee Surg，2017，30（5）：460-466.

[13] Boese CK，Centeno L，Walters RW. Blood conservation using tranexamic acid is not superior to epsilon-aminocaproic acid after total knee arthroplasty [J]. J Bone Joint Surg Am，2017，99（19）：1621-1628.

[14] Kim KJ，Park YJ，Cho CS. Bilateral Freiberg disease [J]. J Clin Rheumatol，2011，17（4）：224-229.

[15] Tsuda E，Ishibeshi Y，Yamamoto Y，et al. Osteochondral autograft transplantation for advanced stage Freiberg disease in adolescentathletes：A report of 3 cases and surgical procedures [J]. Am J Sports Med，2011（3911）：2470-2475.

[16] Lee HJ，Kim Jw，Min WK. Operative treatment of Freiberg disease using extra-articular dorsal closing-wed ge osteotomy：Technical tip and clinical outcomes in 13 patients [J]. Foot Ankle Int，2013，34（1）：111-116.
[17] 桂鉴超，王黎明 . 蒋逸秋，等 . 关节镜下跖趾关节成形术治疗跖趾关节炎 [J]. 中国骨与关节损伤杂志，2010，25（4）：363-364.
[18] 陈旺，冯硕，张羽，等 . 氨甲环酸和 ε- 氨基已酸减少全膝关节围置换期失血有效和安全性的 Meta 分析 [J]. 中国组织工程研究，2021，25（15）：2430-2436.
[19] Chauhan S，Gharde P，Bisoi A，et al. A comparison of aminocaproic acid and tranexamic acid in adult cardiac surgery [J]. Ann Card Anaesth，2004，7：40-43.
[20] 徐留海，曾勇，黄卫，等 . 基于 Caprini 血栓风险模型评估膝关节镜手术患者深静脉血栓形成的风险性 [J]. 中国组织工程研究，2016，20（17）：2474-2480.

（收稿日期：2021-02-25；修回日期：2021-04-18）

注射用烟酰胺药品不良反应分析

景天闯[1]，张丹[2]，范晶晶[1]，魏简汇[1]，冯文华[1]（1. 南阳市中心医院，河南　南阳　473000；2. 南阳市食品药品检验所，河南　南阳　473000）

摘要：目的　分析注射用烟酰胺药品不良反应（ADR）发生的特点和规律，促进临床合理用药。**方法**　对 2018 年 1 月—2020 年 12 月河南省上报国家药品不良反应监测系统的 80 例注射用烟酰胺药品不良反应进行分析。**结果**　共计纳入 ADR 病例 80 例，其中新的 ADR 28 例（35.00%），50 岁以上 66 例（82.50%），29 例（36.25%）存在超适应证用药，49 例（61.25%）ADR 发生于输注过程中，ADR 累及系统 / 器官以皮肤及其附件、全身性反应、消化系统、神经系统、心血管系统最常见。**结论**　临床药师应掌握注射用烟酰胺 ADR 发生特点，提醒医师严格按照说明书要求用药，用药过程中密切监护，减少 ADR 对患者造成的损害。

关键词：注射用烟酰胺；药品不良反应；合理用药；药学监护
中图分类号：R969.3，R977.2　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)08-1725-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.043

Adverse drug reactions induced by nicotinamide for injection

JING Tian-chuang[1], ZHANG Dan[2], FAN Jing-jing[1], WEI Jian-hui[1], FENG Wen-hua[1] (1. *Nanyang Central Hospital*, *Nanyang Henan* 473000; 2. *Nanyang Institute of Food and Drug Control*, *Nanyang Henan* 473000)

Abstract: Objective　To analyze the general information and clinical characteristics of adverse drug reactions (ADR) induced by nicotinamide for injection to promote rational drug use. **Methods**　Totally 80 reported ADRs in Henan Province between January 2018 and December 2020 were analyzed retrospectively. **Results**　Totally 80 cases were collected, among which 28 (35.00%) were new ADRs, 66 (82.50%) over 50 years old, 29(36.25%) with off-label use, and 49 (61.25%) occurred in the course of intravenous infusion. Injury of the skin, systematic injury, digestive system, nervous system, and cardiovascular system were the common clinical manifestations. **Conclusion**　Clinical pharmacists should be aware of the characteristics of ADR induced by nicotinamide for injection, which should be used strictly in accordance with the instructions and monitored closely during the course of nicotinamide injection to reduce possible injuries to patients.

Key words: nicotinamide; adverse drug reaction; rational drug use; pharmaceutical care

基金项目：河南省医学科技攻关计划联合共建项目（No.LHGJ20191459）。
作者简介：景天闯，男，硕士，主管药师，主要从事临床药学及个体化用药工作，E-mail：pfjtc123@126.com

烟酰胺又称尼克酰胺，是烟酸的酰胺化合物，属于 B 族维生素类药物，为辅酶Ⅰ和辅酶Ⅱ的组成部分，参与体内的代谢过程，为脂类代谢、组织呼吸的氧化作用和糖原分解所必需，但无扩张血管作用。研究表明，烟酰胺可能在皮肤病[1]、肿瘤[2]、感染和脓毒症[3]、血液透析高磷血症[4]、中枢神经系统疾病[5]、先兆子痫[6]、急性肝损伤[7]等方面发挥作用。近年来，注射用烟酰胺在临床上应用越来越多，其引起的不良反应也逐渐增多，为探讨烟酰胺注射制剂 ADR 发生规律及特点，本文通过对 2018 年 1 月—2020 年 12 月河南省上报国家药品不良反应监测系统的 80 例注射用烟酰胺 ADR 报告进行整理、统计、分析，为临床安全、合理用药提供参考。

1 研究对象

对 2018 年 1 月—2020 年 12 月河南省上报国家药品不良反应监测系统的注射用烟酰胺 ADR 报告进行整理，剔除重复报告，共纳入关联性评价为可能、很可能、肯定的不良反应报告共 80 例。

2 统计方法

提取相关 ADR 信息，包括报告类型、性别、年龄、原患疾病、用法用量、ADR 发生时间、累及系统 / 器官、临床表现、ADR 处理及转归、关联性评价等，利用 Excel 进行数据整理及分析，并对不合理用药情况进行评价。所有 ADR 报告均按照《药品不良反应报告和监测管理办法》（卫生部令第 81 号）[8] 中的关联性评价标准及新的、严重 ADR 判定标准执行。

3 结果

3.1 ADR 因果关系评价、程度分级及转归

80 例报告中，ADR 关联性评价为“可能”28 例（35.0%），“很可能”47 例（58.75%），“肯定”5 例（6.25%）。

已知一般的报告 43 例，占 53.75%；新的一般报告 25 例，占 31.25%；已知严重报告 9 例，占 11.25%；新的严重报告 3 例，占 3.75%。严重报告合计 12 例，占 15%；新的报告合计 28 例，占 35%。说明注射用烟酰胺说明书 ADR 信息更新比较滞后，如皮疹、恶心、头晕、寒战、发热构成比较高的不良反应，说明书均无相关描述。严重不良反应主要表现为寒战、高热、心悸、心律失常、大面积皮疹、潮红、瘙痒、呼吸困难等。

ADR 处理措施：① 仅采取停药，80 例报告中，30 例患者仅采取停药处理；② 采取停药并给予对症治疗，43 例患者采取停药并给予对症治疗，对症治疗措施有使用炉甘石洗剂、速效救心丸、糖皮质激素、抗组胺药、解热镇痛药、止吐药、保肝药，更换输液器、溶媒冲管、吸氧等；③ 未停药仅给予对症治疗，6 例患者仅给予减慢滴速处理；④ 不详 1 例。ADR 转归为痊愈的有 34 例（42.50%），好转的有 45 例（56.25%），不详 1 例（1.25%）。

3.2 患者性别与年龄

80 例患者中男 33 例（41.25%），女 47 例（58.75%），男女性别比为 1∶1.42。年龄最小 4 岁，最大 91 岁，其中 50 岁以上病例报告最多，占 82.50%，见表 1。发生严重 ADR 的病例年龄分布为 4 ～ 10 岁 1 例，40 ～ 49 岁 2 例，50 ～ 59 岁 4 例，60 ～ 91 岁 5 例。本次统计有儿童 2 例、老人 43 例，而药品说明书关于儿童和老年用药均记载未进行该试验且无可靠参考文献。

表 1 患者性别与年龄分布

Tab 1 Distribution of patients' gender and age

年龄 / 年	男	女	合计	构成比 /%
4 ～ 10	2	0	2	2.50
30 ～ 39	2	3	5	6.25
40 ～ 49	3	4	7	8.75
50 ～ 59	11	12	23	28.75
60 ～ 91	15	28	43	53.75
合计	33	47	80	100.00

3.3 原患疾病情况

80 例 ADR 报告中，51 例（63.75%）原患疾病符合药品说明书适应证，29 例（36.25%）不符合说明书适应证，详见表 2。

表 2 原患疾病情况分析

Tab 2 Original disease

	原患疾病	例数	构成比 /%
符合说明书适应证	冠心病	46	57.50
超说明书适应证	心律失常	5	6.25
	脑梗死	5	6.25
	心肌梗死 / 心力衰竭 / 胸痛	3	3.75
	2 型糖尿病	3	3.75
	乳腺癌 / 食管癌 / 多发性骨髓瘤	3	3.75
	肺部感染	2	2.50
	先天性心脏病	2	2.50
	高血压	2	2.50
	脑供血不足	2	2.50
	面神经麻痹	2	2.50
	甲亢	1	1.25
	肝囊肿	1	1.25
	癫痫	1	1.25
	食欲不振	1	1.25
	农药中毒	1	1.25

3.4 药品用法用量

80 例报告中，给药途径均为静脉滴注给药，给药频次均为每日一次，给药剂量 50 mg 8 例（10%），100 mg 21 例（26.25%），150 mg 8 例（10%），200 mg 26 例（32.5%），共 63 例低于说明书要求的 300 ～ 400 mg（78.75%）。5% 葡萄糖注射液作为溶媒 20 例（25%），0.9% 氯化钠作为溶媒 31 例（38.75%），溶媒品种与说明书推荐 10% 葡萄糖溶液不一致共 51 例（63.75%）；溶媒剂量在 100 ～ 200 mL 20 例（25%），低于推荐的 250 mL。6 例（7.5%）存在滴速过快现象，减慢滴速后 ADR 好转。注射用烟酰胺与其他药物（胰岛素 2 例、杏芎氯化钠注射液 1 例）混合后同瓶输注 3 例（3.75%）。

3.5　ADR 发生时间

80 例报告中有 49 例 ADR 发生在输注过程中（61.25%），其中以用药 30 min 内最为集中（37.50%），最短的是 2 min，最长的为用药 8 d 后出现。用药结束后至 24 h 有 12 例（15.00%），有 19 例发生在连续用药 1 d 以上（23.75%）（见表 3）。

表 3　ADR 发生时间分布

Tab 3　Distribution of occurrence time of ADR

发生时间		例数	构成比 /%
输液过程中	≤ 10 min	13	16.25
	11 ～ 20 min	9	11.25
	21 ～ 30 min	8	10.00
	31 ～ 60 min	2	2.50
	具体不详	17	21.25
输液后	用药结束后～ 24 h	12	15.00
	连续用药 1 ～ 5 d	15	18.75
	连续用药 5 d 以上	4	5.00

3.6　ADR 累及系统 / 器官及临床表现

80 例报告共涉及 ADR 累及系统 / 器官及临床表现 144 例次。ADR 最多见的是皮肤及其附件损害 58 例次，其次是全身性反应 20 例次，消化系统 19 例次，神经系统 18 例次，心血管系统 16 例次（见表 4）。

表 4　ADR 累及系统 / 器官及临床表现

Tab 4　Systems/organs involved in ADRs and clinical manifestations

累及系统 / 器官	临床表现 / 例次	例次	构成比 /%
皮肤及其附件	皮疹（19）、潮红（13）、瘙痒（24）、丘疹（1）、红斑疹（1）	58	40.28
全身性反应	麻木伴烧灼感（1）、意识模糊（1）、血压下降（1）、大汗（2）、抽搐（1）、水疱（1）、寒战（6）、发热（6）、过敏性休克（1）	20	13.89
消化系统	恶心（9）、肝功能异常（1）、上腹部不适（3）、呕吐（3）、腹痛（3）	19	13.19
神经系统	头晕（8）、头痛（5）、头胀（2）、头昏（1）、双下肢麻木（1）、烦躁（1）	18	12.50
心血管系统	心律失常（2）、心悸（6）、胸闷（5）、心绞痛（1）、心脏不适（2）	16	11.11
输液反应	注射部位疼痛（2）、麻木（1）、针刺感（1）、肿胀（1）	5	3.47
视觉系统	视物模糊（1）、眼压升高（1）	2	1.39
呼吸系统	呼吸困难（2）	2	1.39
其他系统	唇肿胀（1）、血糖升高（1）、颈部发紧（1）、背部疼痛（1）	4	2.78

4　讨论

4.1　原患疾病

烟酰胺本身 ADR 并不多见，但以烟酰胺注射剂上市后，给药途径和适应证均有所改变，根据注射用烟酰胺说明书，其主要用于防治烟酸缺乏的糙皮病、冠心病、病毒性心肌炎、风湿性心肌炎及少数洋地黄中毒等伴发的心律失常，有防止心脏传导阻滞的作用。本次统计发现 ADR 原患疾病中，脑梗死、2 型糖尿病、恶性肿瘤、肺部感染、先天性心脏病、高血压等超适应证用药高达 36.25%，说明临床上普遍存在注射用烟酰胺超适应证用药现象，不但增加了患者的经济负担，而且带来潜在安全隐患。临床药师应对医嘱进行审核，并告知医师严格按照说明书批准的适应证用药，保障患者用药经济、安全、有效。此外，建议临床应用注射用烟酰胺用于冠心病、病毒性心肌炎、心律失常等时先检测尿中烟酸正常代谢产物 *N*- 甲基烟酰胺与二吡啶酮的含量 [9]，低于参考范围时方可使用，从而做到精准治疗，避免滥用。

4.2　用法用量

烟酰胺注射制剂说明书均推荐一次 300 ～ 400 mg，一日一次，加入 10% 葡萄糖溶液 250 mL 静脉滴注。然而统计发现，注射用烟酰胺在临床普遍存在给药剂量偏低现象，80 例 ADR 中，给药剂量低于标准剂量有 63 例，占 78.75%，剂量偏低可能达不到治疗效果。25% 病例选择 5% 葡萄糖注射液作为溶媒，38.75% 的病例选择 0.9% 氯化钠作为溶媒，63.75% 病例存在溶媒选择不当，文献报道 [10] 溶媒 pH 为 3 或 9 时会促进烟酰胺分解生成烟酸，增加 ADR 发生率，5% 葡萄糖注射液 pH 为 3.2 ～ 6.5；而心脏病患者选择 0.9% 氯化钠作溶媒可能会加重水钠潴留，加重患者病情，因此选择 5% 葡萄糖注射液或 0.9% 氯化钠注射液均不适宜。25% 病例存在溶媒剂量偏低

现象，溶媒用量偏低会导致药物浓度偏高，增加ADR风险。6例存在滴速过快现象，减慢滴速后ADR好转，主要引起的ADR为瘙痒（3例）、皮疹（1例）、注射部位疼痛（1例）、恶心（1例）。注射用烟酰胺与其他药物混合后同瓶输注3例，混合输注后可能会引起药物相互作用，增加ADR风险。因此，临床药师应告知临床在应用注射用烟酰胺时严格按照说明书推荐的给药剂量、溶媒品种、溶媒剂量给药，避免滴速过快，禁与其他药物同瓶混合输注，保障用药安全。

4.3 ADR发生时间

注射用烟酰胺相关不良反应主要发生在输注过程中，占61.25%，其中以用药30 min内最为集中，因此在输注过程中，临床药师及相关人员应严密监测并及时处理相关ADR，输注结束后要注意观察，一旦发现及时对症治疗。

4.4 ADR临床表现

本次研究中，ADR累及系统/器官以皮肤及其附件（40.28%）、全身性反应（13.89%）、消化系统（13.19%）、神经系统（12.50%）、心血管系统（11.11%）多见。累及皮肤及其附件的ADR主要表现为皮疹、潮红、瘙痒等；全身性反应主要表现为寒战、发热、大汗、过敏性休克等；消化系统ADR主要表现为恶心、呕吐、上腹部不适、腹痛等；神经系统ADR主要表现为头晕、头痛、头胀等;心血管系统ADR主要表现为心悸、胸闷、心律失常、心脏不适等。文献报道[11]摄入过量的烟酰胺后可能会促进糖尿病、帕金森病及肝损伤的发展，本次ADR统计发现高血糖1例，肝损伤1例，无帕金森患者用药情况，可能与样本量不足有关。烟酰胺摄入过多可能与癌症、帕金森病进展有关[12]，烟酰胺本身会抑制多聚ADP-核糖聚合酶（PARP），可保护基因组完整性，烟酰胺水平升高会改变细胞能量代谢，同时会改变细胞的甲基化代谢并影响DNA和蛋白质的甲基化，导致细胞转录组和蛋白质组发生变化[13]。临床药师应对上述ADR保持高度关注，加强药学监护，尤其是严重的和新的ADR，治疗过程中密切监测，并在使用前与医师、患者进行充分沟通，保障患者用药安全。

综上所述，临床上在应用注射用烟酰胺时普遍存在超适应证用药、用法用量不合理现象，建议临床严格按照说明书要求规范使用，同时老人、儿童应谨慎使用，必要时加强药学监护。注射用烟酰胺说明书中ADR描述较为简单，有较多新的和一些严重ADR在药品说明书中并未载明，呼吁注射用烟酰胺生产企业及时修订补充说明书中ADR项下内容，保障患者用药安全。

参考文献

[1] Forbat E，Al-Niaimi F，Ali FR. Use of nicotinamide in dermatology [J]. Clin Exp Dermatol，2017，42（2）：137-144.

[2] Buqué A，Bloy N，Kroemer G，et al. Possible mechanisms of cancer prevention by nicotinamide [J]. Br J Pharmaco，2021，178（10）：2034-2040.

[3] 程丽婷，陈涛，刘亚君，等 . 烟酰胺防治感染和脓毒症的研究进展 [J]. 中华危重病急救医学，2020，32（7）：877-879.

[4] 季思思，刘毅，陈瑞聪，等 . 烟酰胺治疗维持性血液透析患者高磷血症的有效性 [J]. 中华肾脏病杂志，2015，31（6）：429-433.

[5] Fricker RA，Green EL，Jenkins SI，et al. The influence of nicotinamide on health and disease in the central nervous system [J]. Int J Tryptophan Res，2018，11（3）：1-11.

[6] Takahashi N，Li F，Fushima T，et al. Vitamin B3 nicotinamide：A promising candidate for treating preeclampsia and improving fetal growth [J]. Tohoku J Exp Med，2018，244（3）：243-248.

[7] 许娟娟 . 烟酰胺减轻对乙酰氨基酚所致急性肝损伤的机制研究 [D]. 重庆：重庆医科大学，2019.

[8] 中华人民共和国卫生部，国家食品药品监督管理局 . 药品不良反应报告和监测管理办法 [S]. 卫生部令第81号，2011.

[9] 李达 . 烟酰胺与代谢综合征关系的研究 [D]. 沈阳：中国医科大学，2013.

[10] 丛远华，朱沁，冯春波 . 高含量烟酰胺与AA2G复配体系的水溶液的稳定性研究 [J]. 化学与生物工程，2019，36（11）：52-57，63.

[11] Rolfe HM. A review of nicotinamide：Treatment of skin diseases and potential side effects [J]. J Cosmet Dermatol，2014，13（4）：324-328.

[12] Williams AC，Hill LJ. Nicotinamide and demographic and disease transitions：Moderation is best [J]. Int J Tryptophan Res，2019，12（3）：1-18.

[13] Hwang ES，Song SB. Possible adverse effects of high-dose nicotinamide：Mechanisms and safety assessment [J]. Biomolecules，2020，10（5）：687.

（收稿日期：2021-02-15；修回日期：2021-05-02）

药物与临床

不同剂量替加环素治疗碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌医院获得性肺炎的有效性和安全性研究

陈凡[1]，林敏[2]，胡述立[3]，邓体瑛[1]，胡松[1*]（1. 武汉市第一医院药学部，武汉　430022；2. 武汉职业技术学院计算机技术与软件工程学院，武汉　430074；3. 武汉市第一医院重症医学科，武汉　430022）

摘要：目的　探索不同剂量替加环素的联合用药治疗碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌（CRKP）医院获得性肺炎（HAP）的疗效和不良反应，为临床抗感染治疗提供依据。**方法**　选取某院 2019 年 1 月—2020 年 12 月 CRKP 感染且使用替加环素联合治疗的 HAP 患者 59 例，分为替加环素常规剂量联合抗菌药物组和加倍剂量联合抗菌药物组，对其临床资料进行回顾性分析。**结果**　两组间临床治愈率（31.3% *vs* 40.7%）、病原菌清除率（28.1% *vs* 37.0%）、不良反应发生率（28.1% *vs* 40.7%）差异均无统计学意义；两组患者治疗后 PLT 均显著下降（$P < 0.05$），组间比较差异无统计学意义。Logistic 回归分析显示，APACHEⅡ评分和联合美罗培南治疗显著影响临床治愈率（$P < 0.05$）。**结论**　加倍剂量替加环素联合治疗 CRKP 引起的 HAP 较正常剂量并无优势，替加环素联合美罗培南可提高疗效，同时需要防范替加环素的消化道不良反应和对凝血功能的影响。

关键词：替加环素；碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌；医院获得性肺炎；有效性；安全性
中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2021)08-1729-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.044

Efficacy and safety of different doses of ticacycline for hospital acquired pneumonia induced by carbapenem resistant klebsiella pneumoniae

CHEN Fan[1], LIN Min[2], HU Shu-Li[3], DENG Ti-ying[1], HU Song[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *Wuhan First Hospital*, *Wuhan* 430022; 2. *School of Computer Technology and Software Engineering*, *Wuhan Polytechnic University*, *Wuhan* 430074; 3. *Department of Intensive Care Unit*, *Wuhan First Hospital*, *Wuhan* 430022)

Abstract: Objective　To determine the efficacy and adverse reactions of combination of different doses of ticacycline for hospital acquired pneumonia (HAP) induced by carbapenem resistant klebsiella pneumonia (CRKP), and to provide reference for clinical anti-infection treatment. **Methods**　Fifty-nine patients with HAP who were infected with CRKP and treated with tegecycline combination therapy from January 2019 to December 2020 were selected and divided into a routine dose combining antibiotics group and a double dose combining antibiotics group. Their clinical data were retrospectively analyzed. **Results**　There was no statistical difference in the clinical cure rate (31.3% *vs* 40.7%), the pathogen clearance rate (28.1% *vs* 37.0%), and the incidence of adverse drug reactions (28.1% *vs* 40.7%) in routine dose combining antibiotics group and a double dose combining antibiotics group. Platelet in both groups was significantly decreased after the treatment ($P < 0.05$), without statistical difference in the two groups. Logistic regression analysis showed that the APACHE Ⅱ score and combined meropenem therapy significantly influenced the clinical cure rate ($P < 0.05$). **Conclusion**　Double dose of ticecycline combining meropenem for HAP caused by CRKP has no advantage over the routine dose. The combination of ticecycline and meropenem can improve the curative effect. Meanwhile, it is important to prevent the side effects in the digestive tract by ticecycline and its effect on the coagulation function.

作者简介：陈凡，男，硕士，主管药师，主要从事临床药学方面的研究，E-mail：251181479@qq.com　*通信作者：胡松，男，硕士，主任药师，主要从事医院药事管理方面的研究，E-mail：huyaoshi@sina.com

Key words: tigecycline; carbapenem resistant klebsiella pneumoniae; hospital acquired pneumonia; efficacy; security

医院获得性肺炎（hospital acquired pneumonia，HAP）是我国发病率最高的院内获得性感染，由于致病菌耐药严重，治疗难度大、住院时间长，在我国平均全因死亡率高达 22.3%[1-2]。我国流行病学资料显示，HAP 患者呼吸道病原菌分离率较高的是鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌和金黄色葡萄球菌等，随着抗菌药物的广泛使用，细菌耐药率也随之升高，特别是不动杆菌和肺炎克雷伯菌，2018 年对美罗培南耐药率已高达 73.9% 和 26.3%[3-4]。重症监护室（ICU）患者 HAP 发病率和耐药菌检出率更高，特别是碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌（CRKP）[5-6]。CRKP 感染治疗困难，病死率高，常需要联合使用不同种类的抗菌药物，而在我国替加环素在碳青霉烯类耐药革兰氏阴性菌（CRE）的治疗中仍然占有重要地位 [7]。目前我国关于大剂量替加环素治疗 CRKP 所致 HAP 的研究仍然不多，现将本院 ICU 收治的相关病例做回顾性研究，探索不同剂量替加环素的联合用药对 CRKP 所致 HAP 患者的有效性和安全性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本院重症监护室 2019 年 1 月 1 日—2020 年 12 月 31 日收治的 59 例 CRKP 感染所致 HAP 患者，入组标准：① 经合格的深部痰或纤支镜标本病原学检测确定为 CRKP 感染，CRKP 均对替加环素敏感，病原菌药敏测定按照体外药敏操作规程，结果分为敏感、中介和耐药 [8]；② 所纳入患者均符合我国 2018 年版《中国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关性肺炎诊断和治疗指南》HAP 的诊断标准，呼吸机相关性肺炎（VAP）属于 HAP 的范畴 [1]；③ 所有患者均使用替加环素（江苏豪森药业集团有限公司，规格：50 mg/ 瓶）联合其他抗菌药物治疗，疗程≥ 7 d。

1.2 研究方法

1.2.1 数据资料 回顾性统计分析患者一般资料：包括年龄、性别、基础疾病、急性生理学及慢性健康状况评分（APACHEⅡ评分）、HAP 发病天数、用药前后凝血指标等；实验室生化指标：肝肾功能、微生物培养结果及药敏等；患者用药情况：替加环素用法用量及疗程、联合使用抗菌药物、不良反应发生情况等。

1.2.2 替加环素治疗方案及分组 根据替加环素使用剂量将患者分为两组：常规剂量联合抗菌药物组（负荷剂量 100 mg 静脉滴注，维持剂量 50 mg ivgtt q12 h）和加倍剂量联合抗菌药物组（负荷剂量 200 mg 静脉滴注，维持剂量 100 mg ivgtt q12 h）。加倍剂量联合抗菌药物组在用药前均与患者或家属签署超说明书用药知情同意书。联合治疗方案分为 3 种：替加环素联合美罗培南、替加环素联合头孢哌酮舒巴坦和替加环素联合其他药物（哌拉西林他唑巴坦、阿米卡星、头孢他啶等）。主要联用方案中美罗培南（Sumitomo Dainippon Pharma Co.，Ltd.，规格：0.5 g/ 瓶）用法：1.0 g ivgtt q8 h；头孢哌酮舒巴坦（辉瑞制药有限公司，规格：1.5 g/ 瓶，头孢哌酮∶舒巴坦＝2∶1）用法：3 g ivgtt q8 h。

1.2.3 疗效判断 依据《抗菌药物临床试验技术指导原则》对替加环素联合其他抗菌药物抗感染治疗结束后患者临床疗效进行评估，根据症状、体征、影像学和实验室检查等结果评估分为临床治愈和临床无效；微生物学疗效根据治疗结束后感染部位标本培养原致病菌结果阴性和仍为阳性分为清除和未清除 [9]。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。计量资料采用均值 ± 标准差表示，组间比较采用独立样本 t 检验或秩和检验；计数资料以百分比表示，采用 χ^2 检验。$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

59 例患者中男性 42 例（71.2%），女性 17 例（28.8%），年龄 37 ～ 88 岁，平均（67.9±13.3）岁；患者 HAP 住院至发病时间 3 ～ 13 d，平均（5.8±2.1）d；合并基础疾病（高血压、糖尿病、冠心病、慢性阻塞性肺疾病）患者 48 例（81.4%）。APACHEⅡ评分 10 ～ 39 分，平均（24.1±7.8）分。所有患者中替加环素常规剂量联合抗菌药物组 32 例（54.2%），加倍剂量联合抗菌药物组 27 例（45.8%），主要联合使用抗菌药物为美罗培南 25 例（42.4%）、头孢哌酮舒巴坦 18 例（30.5%）、其他抗菌药物 16 例（27.1%）；在此基础上联合使用抗真菌药物 32 例（54.2%）。替加环素使用疗程 7 ～ 24 d，平均（12.3±4.1）d，同时行有创机械通气治疗患者 39 例（66.1%）。所有指标在两组间比较差异无统计学意义（$P > 0.05$）。详细结果见表 1。

表 1　患者临床特征

Tab 1　Clinical characteristics of patients

项目	总例数（n＝59）	常规剂量联合抗菌药物组（n＝32）	加倍剂量联合抗菌药物组（n＝27）	t/χ^2	P
男性 /[n（%）]	42（71.2）	25（78.1）	17（63.0）	1.641	0.200
年龄 / 岁	67.9±13.3	67.3±13.5	68.6±13.2	0.367	0.715
基础疾病 /[n（%）]	48（81.4）	26（81.2）	22（81.5）	0.097	0.754
APACHE Ⅱ评分 / 分	24.1±7.8	23.9±9.2	24.2±5.7	0.156	0.876
发病时间 /d	5.8±2.1	5.5±2.0	6.1±2.3	－1.022	0.311
替加环素疗程 /d	12.3±4.1	11.9±4.2	12.7±3.9	0.326	0.456
PLT/（$\times10^9 \cdot L^{-1}$）	194.6±52.5	185.1±48.6	205.9±55.7	－1.529	0.132
基础肾功能正常 /[n（%）]	48（81.3）	27（84.4）	21（77.8）	0.420	0.516
基础肝功能正常 /[n（%）]	53（89.8）	30（93.8）	23（85.2）	1.175	0.278
混合感染 /[n（%）]	41（69.5）	22（68.8）	19（70.4）	0.018	0.892
抗真菌治疗 /[n（%）]	32（54.2）	18（56.3）	14（51.9）	0.114	0.735
联合美罗培南 /[n（%）]	25（42.4）	10（31.3）	15（55.6）	3.542	0.059
联合头孢哌酮舒巴坦 /[n（%）]	18（30.5）	11（34.3）	7（25.9）	0.493	0.482
有创机械通气 /[n（%）]	39（66.1）	22（68.8）	17（63.0）	0.218	0.639

2.2　微生物学疗效

患者抗感染治疗结束后总体病原菌清除率 32.2%（19/59），其中替加环素常规剂量联合抗菌药物组 CRKP 清除率 28.1%（9/32），和加倍剂量联合抗菌药物组清除率 37.0%（10/27）比较差异无统计学意义（χ^2 ＝ 0.532，P ＝ 0.465）。

2.3　临床疗效及安全性分析

59 例患者临床治愈率 35.6%，住院期间全因死亡率 44.1%。替加环素相关不良反应发生率 33.9%，均为腹泻。以上指标在两组之间差异均无统计学意义（P ＞ 0.05），具体情况见表 2。对患者用药前后血小板总数（PLT）进行统计分析显示，使用替加环素后常规剂量联合抗菌药物组和加倍剂量联合抗菌药物组患者 PLT 均下降（P ＜ 0.001），但在两组间差异无统计学意义（P ＞ 0.05）。用药后 PLT 下降发生时间平均 8 d，中位时间 9 d。

表 2　患者转归 [n(%)]

Tab 2　Outcomes of patients [n(%)]

分组	临床治愈	全因死亡	不良反应
常规剂量联合抗菌药物组（n＝32）	10（31.3）	15（46.9）	9（28.1）
加倍剂量联合抗菌药物组（n＝27）	11（40.7）	11（40.7）	11（40.7）
总例数（n ＝ 59）	21（35.6）	26（44.1）	20（33.9）

2.4　临床治愈相关因素 Logistic 回归分析

以临床治愈为因变量，纳入性别、年龄、APACHE Ⅱ评分等构建多因素 Logistic 回归方程。结果显示，APACHE Ⅱ评分越低临床治愈率越高（OR ＝ 1.318，95%CI 1.063 ～ 1.635，P ＝ 0.012）；替加环素联合美罗培南方案可显著提高临床治愈率（OR ＝ 0.015，95%CI 0.001 ～ 0.374，P ＝ 0.011）。具体见表 3。

3　讨论

3.1　不同剂量替加环素联合抗菌药物治疗 CRKP 所致 HAP 的有效性

本研究显示，以替加环素为基础的联合抗感染方案治疗 CRKP 所致 HAP 的总体临床治愈率为 35.6%，病原菌清除率 32.2%，与文献报道相近；同时总体全因死亡率 44.1%，略高于文献报道[10-11]，可能因本研究纳入的患者 APACHE Ⅱ评分和混合感染比例均明显高于文献纳入病例。

目前关于大剂量替加环素治疗多重耐药菌感染有效性和安全性的报道仍存在争议[11]，有研究显示对于 CRKP 所致 HAP/VAP 的治疗，常规剂量替加环素疗效欠佳，而高剂量则显现了更好的效果[12-14]。本研究表明，在年龄、合并基础疾病、APACHE Ⅱ评分等常规资料差异没有统计学意义的患者中，加倍剂量联合抗菌药物组相对于常规剂量联合抗菌药物组在病原学清除率、临床治愈率和全因死亡率方面差异无统计学意义。分析原因，与既往研究纳入患者不同，本项研究所纳入患者均为重症 CRKP 感染患者，且年龄较高（平均 67.9 岁），APACHE Ⅱ评分平均（24.1±7.8）分，69.5% 患者为混合感染，66.1% 患者需要有创呼吸机通气支持治疗，均提示患者较差的预后[15-16]。替加环素的药动学 / 药效学（pharmacokinetics/pharmacodynamics，PK/PD）研究表明[17-18]，HAP 患者 APACHE Ⅱ评分与替加环素 $fAUC_{0\sim24\,h}/MIC$ 值成显著负相关，因为疾病严重程度对替加环素分布和血药浓度的影响，较高的 APACHE Ⅱ评分患者难以达到 PK/PD 目标值，也增加了治疗难度。影响临床结局的因素较多，关于 CRKP 感染的重症患者大剂量替加环素的体内 PK 特点也需要进一步研究。

3.2　不同剂量替加环素联合抗菌药物治疗 CRKP 所致 HAP 的安全性

已有文献报道替加环素会导致凝血功能异常、消化道症状和肝功能损伤等不良反应[19-20]，

表 3 临床治愈影响因素 Logistic 回归分析

Tab 3 Logistic regression analysis of influencing factors for clinical treatment

项目	B	SE（B）	Wald χ^2	*OR*	95%*CI*	*P*
性别（男 / 女）	－1.250	1.187	1.108	0.278	0.028 ～ 2.938	0.293
年龄 / 岁	0.023	0.053	0.194	1.024	0.923 ～ 1.135	0.659
是否有基础疾病	－0.353	1.410	0.063	0.702	0.044 ～ 11.139	0.802
APACHE Ⅱ评分	0.276	0.110	6.318	1.318	1.063 ～ 1.635	0.012
发病时间 /d	0.311	0.210	2.195	1.364	0.905 ～ 2.057	0.138
替加环素疗程 /d	0.118	0.131	0.811	1.125	0.871 ～ 1.453	0.368
是否替加环素常规剂量	0.976	1.013	0.928	2.653	0.364 ～ 19.315	0.335
基础 PLT/（$\times10^9 \cdot L^{-1}$）	0.001	0.006	0.039	1.001	0.989 ～ 1.014	0.844
是否基础肾功能正常	0.648	1.037	0.391	1.912	0.251 ～ 14.581	0.532
是否基础肝功能正常	－1.010	1.293	0.610	0.364	0.029 ～ 4.591	0.435
是否混合感染	0.505	1.010	0.250	1.657	0.229 ～ 12.005	0.617
是否抗真菌治疗	0.377	0.935	0.163	1.459	0.234 ～ 9.109	0.686
是否联合美罗培南	－4.198	1.641	6.547	0.015	0.001 ～ 0.374	0.011
是否联合头孢哌酮舒巴坦	－2.018	1.435	2.313	0.113	0.007 ～ 1.877	0.128
是否有创机械通气	－1.096	0.952	1.325	2.994	0.463 ～ 19.363	0.250

与文献一致，本研究中患者发生明确与替加环素使用相关的不良反应为腹泻，且不同剂量组患者发生率差异无统计学意义，多数患者在停药并给予益生菌、蒙脱石散等对症处理后可好转。对患者 PLT 统计显示，在使用不同剂量替加环素后，PLT 均有显著降低，提示在使用替加环素期间应密切监测患者凝血指标，防范出血事件。

3.3 临床治愈率的影响因素

临床治愈相关因素 Logistic 回归分析显示，患者 APACHEⅡ评分和联合美罗培南治疗显著影响临床治愈率。APACHEⅡ评分是重症医学科常用的预后评估工具，能较好地预测疾病病死率和危险程度 [15-16]，在本研究亦得到证实。对于 CRKP 感染引起的 HAP，我国指南推荐联合用药，主要治疗药物包括替加环素、多黏菌素和头孢他啶阿维巴坦，联合治疗药物包括磷霉素、碳青霉烯类和阿米卡星等 [1]。因本院无多黏菌素和头孢他啶阿维巴坦，故多使用以替加环素为基础的联合治疗方案。本研究结果显示，替加环素与美罗培南的联合治疗方案可提高 CRKP 所致 HAP 患者的临床治愈率。

本研究回顾性分析了不同剂量替加环素联合其他抗菌药物治疗 59 例 CRKP 所致 HAP 重症患者的有效性和安全性，结果显示加倍剂量替加环素相对于常规剂量在临床治愈和病原学清除等方面并无获益；在治疗期间患者消化道症状和凝血功能异常发生率较高，需要密切监测和积极处理。本研究的局限性在于样本量小，是单中心的回顾性研究，难免存在病例选择的偏倚，导致两组存在异质性，因此需要更多大样本多中心研究来进一步证实替加环素在 HAP 患者治疗中的价值。

参考文献

[1] 中华医学会呼吸病学分会感染学组 . 中国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关性肺炎诊断和治疗指南（2018 年版）[J]. 中华结核和呼吸杂志，2018，41（4）：255-280.

[2] 刘又宁，曹彬，王辉，等 . 中国九城市成人医院获得性肺炎微生物学与临床特点调查 [J]. 中华结核和呼吸杂志，2012，35（10）：739-746.

[3] Chung DR，Song JH，Kim SH，et al. High prevalence of multidrug-resistant nonfermenters in hospital-acquired pneumonia in Asia [J]. Am J Respir Crit Care Med，2011，184（12）：1409-1417.

[4] 胡付品，郭燕，朱德妹，等 . 2018 年 CHINET 中国细菌耐药性监测 [J]. 中国感染与化疗杂志，2020，20（1）：1-10.

[5] 王沁雪，黄敏 . 基于替加环素的联合用药治疗多重耐药革兰阴性菌肺部感染的临床效果 [J]. 江苏医药，2019，45（10）：1020-1024.

[6] 陈亚男，刘菁，李爱民，等 . 基于多学科诊疗模式降低重症监护病房碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌感染的效果评价 [J]. 中华临床感染病杂志，2020，13（3）：182-188.

[7] 刘又宁 . 我国下呼吸道感染相关研究结果对国外权威指南的挑战 [J]. 中华结核和呼吸杂志，2017，40（1）：1-4.

[8] 王辉，俞云松，王明贵，等 . 替加环素体外药敏试验操作规程专家共识 [J]. 中华检验医学杂志，2013，36（7）：584-587.

[9] 《抗菌药物临床试验技术指导原则》写作组 . 抗菌药物临床试验技术指导原则 [J]. 中国临床药理学杂志，2014，30（9）：844-856.

[10] 段炜，范沁林，刘勇 . 替加环素对 NICU 碳青霉烯耐药菌致院内获得性肺炎抗感染疗效的回顾性分析 [J]. 中华肺部疾病杂志（电子版），2019，12（3）：315-320.

[11] 贾雪冬，乔政维，李玉芳，等 . 大剂量替加环素治疗耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌肺炎（CRKP）的疗效和安全性 [J]. 国外医药（抗生素分册），2020，41（1）：64-67.

[12] Ni W，Li G，Zhao J，et al. Use of Monte Carlo simulation to evaluate the efficacy of tigecycline and minocycline for the treatment of pneumonia due to carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae [J]. Infect Dis，2018，50（7）：507-513.

[13] De Pascale G，Montini L，Pennisi M，et al. High dose tigecycline in critically ill patients with severe infections due to multidrug-resistant bacteria [J]. Crit Care，2014，18（3）：R90.
[14] 宋雨，杨伟，马淑，等 . 替加环素对高龄广泛耐药革兰阴性杆菌医院获得性肺炎疗效及安全性分析 [J]. 中国病案，2019，20（4）：87-91.
[15] 唐玮欣，余雪涛，陈兰春，等 . 重症肺炎患者 PCT、CRP、APACHEⅡ评分与病原菌及预后的关系 [J]. 中国实用医药，2020，15（1）：20-22.
[16] 张玉江，张巧，任之栋，等 . PSI、APACHEⅡ和 SOFA 三种评分对医院获得性肺炎预后的评估价值 [J]. 中华肺部疾病杂志（电子版），2019，12（3）：285-288.
[17] 司徒冰，郑培英，王颖，等 . 替加环素治疗泛耐药鲍曼不动杆菌所致医院获得性肺炎的 PK/PD 研究 [J]. 中国新药杂志，2018，27（10）：1153-1158.
[18] Bhavnani SM，Rubino CM，Hammel JP，et al. Pharmacological and patient-specific response determinants in patients with hospital-acquired pneumonia treated with tigecycline [J]. Antimicrob Agents Chemother，2012，56（2）：1065-1072.
[19] 刘晓东，谢思宁，菅凌燕，等 . 替加环素不良反应的文献计量分析 [J]. 中国新药杂志，2017，26（19）：2364-2368.
[20] 徐银丽，祁慧，江翊国，等 . 替加环素治疗对重症患者凝血功能的影响 [J]. 中国药物应用与监测，2020，17（1）：6-9.

（收稿日期：2021-02-20；修回日期：2021-04-02）

基于 CYP3A4 和 CYP2C19 酶活性探究伏立康唑与 COVID-19 潜在抗病毒药物间的相互作用

宋文彬，李兴德，张阳，毛盼盼，宋沧桑*（昆明医科大学附属甘美医院 昆明市第一人民医院药学部，昆明 650024）

摘要：随着新型冠状病毒肺炎（COVID-19）在全球持续蔓延，尤其是重症和危重症患者病毒感染后常合并真菌感染并可能合并使用多种治疗药物。作为广谱抗真菌药物，伏立康唑是治疗侵袭性真菌感染的常用药物之一。由于其药物代谢酶 CYP2C19 和 CYP3A4 存在基因多态性，当与这两种酶的底物、诱导剂或抑制剂联合应用时，药物相互作用可能会影响药物治疗的疗效并诱发不良反应，因此探讨 CYP2C19 和 CYP3A4 代谢酶基因多态性与 CYP2C19 潜在抗病毒治疗药物相互作用具有一定的临床意义。

关键词：新型冠状病毒肺炎；伏立康唑；CYP2C19；CYP3A4；洛匹那韦 / 利托那韦；瑞德西韦
中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1733-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.045

Drug-drug interaction between voriconazole and potential anti-2019-nCoV candidates based on the CYP3A4 and CYP2C19 enzyme activity

SONG Wen-bin, LI Xing-de, ZHANG Yang, MAO Pan-pan, SONG Cang-sang* (*Department of Pharmacy*, *Kunming First People's Hospital*, *Calmette Hospital Affiliated to Kunming Medical University*, *Kunming* 650024)

Abstract: With the ongoing spread of COVID-19 worldwide, fungal infections in patients with severe COVID-19 are common and need multi-medications treatment. As a broad-spectrum antifungal agent, voriconazole is the substrate of CYP3A4 and CYP2C19 and strong inhibitor. Extensive drug-drug interactions between voriconazole and concomitant agents may interfere the therapeutic efficacy and induce serious adverse effects. For individuals with COVID-19 and invasive fungal co-infection, it's imperative to explore cytochrome P450 polymorphism and potential drug-drug interactions.

Key words: COVID-19; voriconazole; CYP2C19; CYP3A4; lopinavir/ritonavir; remdesivir

基金项目：云南省医疗卫生单位内设研究机构科研项目（No. 2017NS087）。

作者简介：宋文彬，男，硕士，主管药师，主要从事器官移植专业临床药师，E-mail：iwbsong@outlook.com *通信作者：宋沧桑，女，硕士，教授，主要从事临床药学和临床药理学研究，E-mail：songcs163@163.com

新型冠状病毒肺炎（Coronavirus Disease-2019，COVID-19）自爆发以来，以其强传染性已在全球多个国家和地区蔓延，造成上亿人感染，数百万人死亡。根据美国 FDA 网站最新数据显示，截至 2020 年 11 月 30 日，有 40 种以上的抗病毒药物正在接受抗新型冠状病毒（SARS-CoV-2）临床疗效的研究，瑞德西韦是目前唯一被美国 FDA 正式批准的抗 SARS-CoV-2 的药物 [1-3]。根据中国新型冠状病毒肺炎诊疗方案（试行第八版）、美国国立卫生研究院（National Institutes of Health，NIH）公布的关于新型冠状病毒肺炎治疗指南以及相关文献报道，目前列入抗 SARS-CoV-2 的药物还包括洛匹那韦 / 利托那韦、阿比多尔、利巴韦林和法匹拉韦等 [4]。

重症和危重症患者以及合并基础疾病的患者往往需要合并使用多种治疗药物。由于多数药物经肝细胞色素 P450 酶代谢，再以原形或代谢产物的方式经肾排泄，合并使用多种药物使药物相互作用的风险增加，导致部分药物的暴露量增加或降低，从而导致药物毒性或治疗失败，对疾病的治疗和患者的康复造成一定威胁。

大约有 19% 的 COVID-19 患者会发展至重症和危重症，约 5% 的患者需要入住 ICU[5]，对于危重症患者（需要机械通气或长期住院的患者）具有较高风险进展为包括侵袭性曲霉菌在内的继发性感染 [6]。合并真菌感染可进一步加重患者的死亡率 [7]。对于侵袭性曲霉菌感染的起始治疗，美国感染病学会（IDSA）指南（2016 年）推荐使用伏立康唑作为起始抗真菌治疗药物 [8]。伏立康唑是 CYP3A4、CYP2C19 和 CYP2C9 的底物，同时又是这些酶的抑制剂 [9]。合并使用伏立康唑和这 3 种酶的其他底物药物的患者往往需要调整这些药物的剂量和 / 或给药频次 [10]。

1 伏立康唑的代谢酶与代谢型

伏立康唑作为第二代三唑类广谱抗真菌药物，临床广泛应用于曲霉菌和假丝酵母菌等真菌感染 [10-11]。伏立康唑在体内约 75% 通过 CYP2C19、CYP3A4 和 CYP2C9 代谢，25% 经黄素单加氧酶（flavin-containing monooxygenase，FMO）代谢，见表 1[12]。CYP2C19 可将伏立康唑代谢为伏立康唑 *N*- 氧化物（主要代谢途径）[13]，而 CYP3A 可将伏立康唑 -4- 甲基羟基化 [14-15]。伏立康唑的药代动力学和药效学因 *CYP2C19* 基因多态性、年龄、肝功能、合并用药和炎症等存在较大的个体内和个体间差异 [16]。*CYP2C19* 具有高度基因多态性（single nucleotide polymorphisms，SNPs），目前已鉴定出 30 多个变异的等位基因，根据是否携带 CYP2C19 增强活性的等位基因 **17* 和主要无功能等位基因 **2* 和 **3*，可将 CYP2C19 划分为超快代谢型（**1/*17*）、快代谢型（**1/*1*）、中间代谢型（**1/*2* 和 **1/*3*）和弱代谢型（**2/*2*，**2/*3* 和 **3/*3*）[17]。根据 Barter 等 [18] 的研究，中国 *CYP2C19* 弱代谢型人群（13%）显著高于高加索人（2.4%）。在标准剂量下，弱代谢型患者的药 - 时曲线下面积显著高于正常代谢型，从而加重药物的肝毒性、视觉幻觉和脑病 [17，19]。研究表明，对于 *CYP2C19* 弱代谢型患者，CYP3A4 作为伏立康唑的主要代谢酶参与伏立康唑的 4- 甲基羟基化 [15，20-22]。另外，当成年人静脉给药剂量大于 3 mg•kg^{-1}（每 12 h 给药一次）时，伏立康唑表现出饱和非线性药代动力学特征 [23]，因此，即便在标准给药方案下伏立康唑也表现出较大的个体间差异 [24]。

表 1 CYP3A4、CYP2C19 和 CYP2C9 与伏立康唑代谢的相互作用

Tab 1 Interactions between voriconazole metabolism and CYP3A4, CYP2C19 and CYP2C9

项目	CYP3A4	CYP2C19	CYP2C9
人类肝微粒体水平	＋＋＋	＋	＋
基因多态性	＋＋	＋＋＋	＋＋
伏立康唑的诱导效应	－	ND	ND
伏立康唑的抑制效应	＋＋	＋＋	＋＋＋
对伏立康唑的代谢活性	＋＋	＋＋＋	＋

注（Note）：ND ＝尚未确定；＋表示低；＋＋表示中；＋＋＋表示高；－表示无（ND：not determined；＋：low；＋＋：medium；＋＋＋：high；－：none）。

美国国立卫生研究院（National Institutes of Health，NIH）在 COVID-19 治疗指南中推荐对所有入住 ICU 的患者常规监测正常使用或超说明书使用的药物以及合并用药的相互作用 [23]。本文着重探讨伏立康唑代谢酶 CYP3A 和 *CYP2C19* 基因多态性与 COVID-19 潜在抗病毒药物间的相互作用，为保证治疗效果、理解药物相互作用和规避不良反应提供支持。

2 伏立康唑与抗病毒药物相互作用

2.1 伏立康唑与瑞德西韦相互作用

瑞德西韦属于核苷类广谱抗病毒前体药物，瑞德西韦可扩散至细胞内转化为活性代谢物三磷酸酯发挥抗病毒效应 [24]。体外实验证实，瑞德西韦是 CYP2C8、CYP2D6 或 CYP3A4 酶以及 P- 糖蛋白或有机阴离子转运体（organic anion transporting polypeptides 1B1，OATP1B1）的底物，是 CYP3A4 和 OATP1B1 的弱抑制剂 [25]，一般不推荐瑞德西韦与强诱导剂（如利福平、卡马西平）联合应用 [23，26]。NIH 在 COVID-19 治疗指南中指出，当瑞德西韦与 CYP2C8、CYP2D6 或 CYP3A4 等酶的强抑制剂合用时不会显著影响瑞德西韦的浓度 [25]。

需要注意的是，注射用伏立康唑和瑞德西韦

均含有磺丁基醚β-环糊精钠（sulfobutylether-beta-cyclodextrin sodium，SBECD）[25]，由于SBECD主要通过肾小球滤过排出体外，对于肾功能不全的患者可能导致SBECD在体内蓄积，动物研究表明蓄积的SBECD可导致肝坏死和肾小管阻塞[27]。虽然目前未在人体研究中发现类似毒性反应，但是临床不推荐伏立康唑用于肌酐清除率小于50 mL·min^{-1}的患者，也不推荐瑞德西韦用于肌酐清除率小于30 mL·min^{-1}的患者[25]。因此，在合并急性肾损伤（AKI）和中重度肾功能不全的患者中合并使用瑞德西韦和伏立康唑时要评估风险获益。

另外，COVID-19患者中有2%～11%的患者有肝脏并发症，14%～53%的病例报告在疾病进展期间丙氨酸氨基转移酶（ALT）和天冬氨酸氨基转移酶（AST）的水平异常[28]。并且入院存在肝细胞型或混合型肝功能异常的COVID-19患者更易进展为重症，风险比分别为2.73（95% *CI* 1.19～6.3）和4.44（95% *CI* 1.93～10.23）[29]。伏立康唑在起始治疗时会导致11%～19%的患者一过性转氨酶升高[30]，瑞德西韦同样有导致肝酶升高的病例报道[31-32]，因此有必要监测两药联用时肝功能的变化。同时使用多种经肝脏代谢的抗病毒药物会进一步加重肝脏负担而导致预后不良。两种药物联合应用剂量调整见表2。

表2 COVID-19抗病毒药物与伏立康唑相互作用

Tab 2 Interaction between anti-2019-nCoV medications and voriconazole

抗病毒药物	作用机制	代谢酶	与伏立康唑相互作用	剂量推荐
瑞德西韦	RNA依赖的RNA聚合酶抑制剂	CYP2C8、CYP2D6、CYP3A4、OATP1B1	相互作用较弱，两药均含有磺丁基醚β-环糊精钠，CrCl＜50 mL·min^{-1}不推荐使用	伏立康唑：负荷剂量6 mg·kg^{-1}，q12 h（第1日），维持剂量4 mg·kg^{-1}，q12 h；瑞德西韦：第1日200 mg，100 mg至第5日或至出院
洛匹那韦/利托那韦	天冬氨酸蛋白酶抑制剂	CYP3A4	CYP2C19超快、快和正常代谢型患者：伏立康唑代谢加快；CYP2C19慢代谢型患者：伏立康唑代谢速率减慢	大剂量不推荐两药联用，小剂量联用时权衡利弊，同时监测伏立康唑血药浓度
阿比多尔	抑制病毒与质膜以及病毒与内吞囊泡膜之间的膜融合	CYP3A4	未见明确报道	无需调整
利巴韦林	①干扰病毒核酸复制；②干扰天然鸟苷酸依赖的RNA加帽；③抑制肌苷单磷酸脱氢酶	不是CYPP450酶的底物	无相互作用	无需调整
法匹拉韦	RNA依赖的RNA聚合酶抑制剂	不是CYPP450酶的底物，CYP2C8的抑制剂	无明显相互作用	无需调整

2.2 伏立康唑与洛匹那韦/利托那韦相互作用

洛匹那韦是一种人类免疫缺陷病毒（HIV）天冬氨酸蛋白酶抑制剂，通过阻断Gag-Pol聚蛋白的分裂，诱导产生未成熟的、无感染力的病毒颗粒，利托那韦作为CYP3A4的底物和抑制剂可增加洛匹那韦的血浆半衰期[33]。利托那韦是CYP1A2和CYP2C9的中效诱导剂、CYP2C19的强效诱导剂，可使3种酶的活性分别增加43%、29%、100%[34]；同时其是目前已知的CYP3A4中时间依赖性最强的抑制剂[35]，可通过与CYP3A4载脂蛋白上的Lys257共价结合使CYP3A4失活[35]。

伏立康唑与高剂量的利托那韦合用时，对于CYP2C19超快代谢、快代谢以及正常代谢型患者，伏立康唑主要通过CYP2C19代谢，当合并使用利托那韦后，CYP2C19因受到利托那韦诱导效应，将加快伏立康唑的代谢失活，从而降低伏立康唑的血药浓度；对于CYP2C19慢代谢型患者，伏立康唑将主要通过CYP3A4代谢[15，20]，当与利托那韦合用后因CYP3A4酶活性受到利托那韦抑制，将导致伏立康唑的代谢速率减慢，从而增加伏立康唑的血药浓度，增加不良反应的发生率和严重程度。

高剂量的利托那韦（400 mg q12 h）可显著改变伏立康唑（负荷剂量400 mg q12 h第1日，维持剂量200 mg q12 h）的C_{max}和$AUC\tau$[达稳态后给药间隔期（τ）内的药时曲线下面积]，而反过来，伏立康唑对利托那韦的浓度变化影响较小。另外，伏立康唑和洛匹那韦/利托那韦均有可能导致QT间期延长[36]，整体上不推荐大剂量利托那韦与伏立康唑合用，小剂量（100 mg q12 h）利托那韦与伏立康唑合用仅适用于对患者的风险获益进行评估后证明使用伏立康唑合理的情况下应用。

2.3 伏立康唑与阿比多尔相互作用

阿比多尔是俄罗斯化学制药研究所于1987年合成的吲哚衍生物，它通过抑制病毒与质膜之间以及病毒与内吞囊泡膜之间的膜融合阻止病毒侵入宿主细胞发挥抗病毒作用[37-38]。阿比多尔主要通过肝

脏和小肠代谢，其中 CYP3A4 是其主要代谢酶 [39]，伏立康唑作为 CYP3A4 的抑制剂，推测可能会对阿比多尔的代谢产生影响，但目前尚未见相关报道。

2.4 伏立康唑与利巴韦林相互作用

利巴韦林作为嘌呤核苷类似物具有广谱抗病毒作用 [40]。利巴韦林主要通过 3 种途径发挥抗病毒作用：干扰 RNA 或 DNA 病毒复制；干扰天然鸟苷酸依赖的 RNA 加帽阻止 RNA 降解；直接抑制肌苷单磷酸脱氢酶进而抑制鸟苷酸的生成 [41]。利巴韦林治疗 COVID-19 一般不单独应用，与单独应用洛匹那韦 / 利托那韦相比，联合干扰素 β-1b 和洛匹那韦 / 利托那韦可有效缩短病毒转阴的时间 [4, 42]。利巴韦林不是 CYP450 酶的底物和抑制剂，与伏立康唑不存在相互作用。

2.5 伏立康唑与法匹拉韦相互作用

法匹拉韦是由日本富山化学（富士胶片集团）开发并于 2014 年批准的用于治疗流感的前体药物，研究证实法匹拉韦对包括 COVID-19 在内的多种 RNA 病毒有效 [43]。法匹洛韦属于嘌呤核酸类似物，通过转化为法匹拉韦三磷酸核糖有效抑制病毒 RNA 依赖性 RNA 聚合酶发挥抗病毒作用 [44]。法匹洛韦并不经过 CYPP450 酶代谢，但是对 CYP2C8 具有抑制作用 [45]。由于伏立康主要通过 CYP2C19、CYP3A4 和 CYP2C9 代谢，因此伏立康唑和法匹拉韦无明显相互作用。

3 小结

对于合并真菌感染的重症和危重症 COVID-19 患者死亡率明显高于非合并感染患者 [46-47]。伏立康唑作为广谱抗真菌药物临床应用广泛，同时作为多种药物代谢酶的底物和抑制剂对合并使用的抗病毒药物的代谢也存在着广泛的相互作用。另外，COVID-19 患者合并使用的其他药物，以及患者的特殊病理状态（如炎症因子风暴等）和干预措施（如气管插管、体外膜肺氧合和血液透析等）均会对体内药物代谢产生影响。因此，在用药前了解伏立康唑的代谢特征及其与抗病毒药物的相互作用，可规避不良事件和不良结局的发生，给患者带来潜在获益。

参考文献

[1] Johns Hopkins University. COVID-19 Map - Johns Hopkins Coronavirus Resource Center [EB/OL].（2021-01-13）[2021-01-13]. https：//coronavirus. jhu. edu/map. html.

[2] FDA. Coronavirus Treatment Acceleration Program（CTAP）| FDA [EB/OL]. https：//www. fda. gov/drugs/coronavirus-covid-19-drugs/coronavirus-treatment-acceleration-program-ctap.（2020-12-31）[2021-01-13].

[3] FDA. FDA Approves First Treatment for COVID-19 | FDA[EB/OL]. https：//www. fda. gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-treatment-covid-19.（2020-10-22）[2021-01-13].

[4] 国家卫生健康委员会，国家中医药管理局 . 新型冠状病毒肺炎诊疗方案（试行第八版）[J]. 中华临床感染病杂志，2020，13（5）：321-328.

[5] Wu Z，Mcgoogan JM. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019（COVID-19）outbreak in China：Summary of a report of 72314 cases from the Chinese center for disease control and prevention [J]. JAMA，2020，323（13）：1239-1242.

[6] Lescure FX，Bouadma L，Nguyen D，et al. Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe：A case series [J]. Lancet Infect Dis，2020，20（6）：697-706.

[7] Pemán J，Ruiz-Gaitán A，García-Vidal C，et al. Fungal co-infection in COVID-19 patients：Should we be concerned? [J]. Rev Iberoam Micol，2020，37（2）：41-46.

[8] Patterson TF，Thompson GR，Denning DW，et. al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis：2016 Update by the Infectious Diseases Society of America [J]. Clin Infect Dis，2016，63（4）：e1-e60.

[9] Groll AH，Townsend R，Desai A，et al. Drug-drug interactions between triazole antifungal agents used to treat invasive aspergillosis and immunosuppressants metabolized by cytochrome P450 3A4 [J]. Transpl Infect Dis，2017，19（5）：e12751.

[10] Pemán J，Salavert M，Cantón E，et al. Voriconazole in the management of nosocomial invasive fungal infections [J]. Ther Clin Risk Manag，2006，2（2）：129-158.

[11] Murayama N，Imai N，Nakane T，et al. Roles of CYP3A4 and CYP2C19 in methyl hydroxylated and N-oxidized metabolite formation from voriconazole，a new anti-fungal agent，in human liver microsomes [J]. Biochem Pharmacol，2007，73（12）：2020-2026.

[12] Yanni SB，Annaert PP，Augustijns P，et al. Role of flavin-containing monooxygenase in oxidative metabolism of voriconazole by human liver microsomes [J]. Drug Metab Dispos，2008，36（6）：1119-1125.

[13] Barbarino JM，Obeng AO，Klein TE，et al. PharmGKB summary：Voriconazole pathway，pharmacokinetics [J]. Pharmacogenet Genom，2017，27（5）：201-209.

[14] Schulz J，Kluwe F，Mikus G，et al. Novel insights into the complex pharmacokinetics of voriconazole：A review of its metabolism [J]. Drug Metab Rev，2019，51（3）：247-265.

[15] Murayama N，Imai N，Nakane T，et al. Roles of CYP3A4 and CYP2C19 in methyl hydroxylated and *N*-oxidized metabolite formation from voriconazole，a new anti-fungal agent，in human liver microsomes [J]. Biochem Pharmacol，2007，73（12）：2020-2026.

[16] Espinoza N，Galdames J，Navea D，et al. Frequency of the CYP2C19*17 polymorphism in a Chilean population and its effect on voriconazole plasma concentration in immunocompromised children [J]. Sci Rep，2019，9（1）：1-6.

[17] Dean L. Voriconazole Therapy and CYP2C19 Genotype [M]. Medical Genetics Summaries，National Center for Biotechnology Information（US），2012.

[18] Barter ZE，Tucker GT，Rowland-Yeo K. Differences in

cytochrome P450-mediated pharmacokinetics between Chinese and Caucasian populations predicted by mechanistic physiologically based pharmacokinetic modelling [J]. Clin Pharmacokinet，2013，52（12）：1085-1100.
[19] Liu Y，Qiu T，Liu Y，et al. Model-based voriconazole dose optimization in Chinese adult patients with hematologic malignancies [J]. Clin Ther，2019，41（6）：1151-1163.
[20] Hyland R，Jones BC，Smith DA. Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the *N*-oxidation of voriconazole [A]//Drug Metabolism and Disposition [C]. Drug Metab Dispos，2003，31（5）：540-547.
[21] Moriyama B，Obeng AO，Barbarino J，et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium（CPIC）Guidelines for CYP2C19 and voriconazole therapy [J]. Clin Pharmacol Ther，2017，102（1）：45-51.
[22] Hoenigl M，Duettmann W，Raggam RB，et al. Potential factors for inadequate voriconazole plasma concentrations in intensive care unit patients and patients with hematological malignancies [J]. Antimicrob Agents Chemother，2013，57（7）：3262-3267.
[23] COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Coronavirus Disease 2019（COVID-19）Treatment Guidelines [EB/OL]. National Institutes of Health，2020.（2020）[2020-08-16]. https：//covid19treatmentguidelines. nih. gov/.
[24] Gordon CJ，Tchesnokov EP，Woolner E，et al. Remdesivir is a direct-acting antiviral that inhibits RNA-dependent RNA polymerase from severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 with high potency [J]. J Biol Chem，2020，295（20）：6785-6797.
[25] European Medicines Agency. Summary on compassionate use-Remdesivir Gilead [EB/OL].（2020）[2020-08-19]. https：//www. ema. europa. eu/en/documents/other/summary-compassionate-use-remdesivir-gilead_en. pdf.
[26] Bishara D，Kalafatis C，Taylor D. Emerging and experimental treatments for COVID-19 and drug interactions with psychotropic agents [J]. Ther Adv Psychopharm，2020，DOI：10.1177/2045125320935306.
[27] Luke DR，Tomaszewski K，Damle B，et al. Review of the basic and clinical pharmacology of sulfobutylether-*β*- cyclodextrin（SBECD）[J]. J Pharm Sci，2010，99（8）：3291-3301.
[28] Zhang C，Shi L，Wang FS. Liver injury in COVID-19：Management and challenges [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol，2020，5（5）：428-430.
[29] Cai Q，Huang D，Yu H，et al. COVID-19：Abnormal liver function tests [J]. J Hepatol，2020，73（3）：566-574.
[30] Grayson ML，Cosgrove SE，Crowe S，et al. Kucers' the use of antibiotics：A clinical review of antibacterial，antifungal，antiparasitic，and antiviral drugs [M]. Seventh Edition. Boca Raton：CRC Press，2017：2823-2842.
[31] Zampino R，Mele F，Florio LL，et al. Liver injury in remdesivir-treated COVID-19 patients [J]. Hepatol Int，2020，14（5）：881-883.
[32] Leegwater E，Strik A，Wilms EB，et al. Drug-induced liver injury in a COVID-19 patient：Potential interaction of remdesivir with P-glycoprotein inhibitors [J]. Clin Infect Dis，2020，72（7）：1256-1258.
[33] Abbvie. Prescribing Information of Kaletra（lopinavir/ritonavir）capsules，liquid filled for oral use [EB/OL]. [2020-06-21]. www. fda. gov/medwatch.
[34] Yeh RF，Gaver VE，Patterson KB，et al. Lopinavir/ritonavir induces the hepatic activity of cytochrome P450 enzymes CYP2C9，CYP2C19，and CYP1A2 but inhibits the hepatic and intestinal activity of CYP3A as measured by a phenotyping drug cocktail in healthy volunteers [J]. J Acquir Immune Defic Syndr，2006，42（1）：52-60.
[35] Rock BM，Hengel SM，Rock DA，et al. Characterization of ritonavir-mediated inactivation of cytochrome P450 3A4 [J]. Mol Pharmacol，2014，86（6）：665-674.
[36] Liu J，Shah SK，Basu-Ray I，et al. QT prolongation in HIV-positive patients：Review article [J]. Indian Heart J，2019，71（6）：434-439.
[37] Boriskin Y，Leneva I，Pecheur EI，et al. Arbidol：A broad-spectrum antiviral compound that blocks viral fusion [J]. Curr Med Chem，2008，15（10）：997-1005.
[38] Panisheva EK，Mikerova NI，Nikolaeva IS，et al. Synthesis and antiviral activity of 5-oxyindole derivatives [J]. Pharm Chem J，1988，22（12）：901-904.
[39] Deng P，Zhong D，Yu K，et al. Pharmacokinetics，metabolism，and excretion of the antiviral drug arbidol in humans [J]. Antimicrob Agents Chemother，2013，57（4）：1743-1755.
[40] Snell NJC. Ribavirin-Current status of a broad spectrum antiviral agent [J]. Expert Opin Pharmacother，2001，2（8）：1317-1324.
[41] Graci JD，Cameron CE. Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses [J]. Rev Med Virol，2006，16（1）：37-48.
[42] Hung IFN，Lung KC，Tso EYK，et al. Triple combination of interferon beta-1b，lopinavir–ritonavir，and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19：An open-label，randomised，phase 2 trial [J]. The Lancet，2020，395（10238）：1695-1704.
[43] Shiraki K，Daikoku T. Favipiravir，an anti-influenza drug against life-threatening RNA virus infections [J]. Pharmacol Ther，2020，209：107512.
[44] Du Y，Chen X. Favipiravir：Pharmacokinetics and concerns about clinical trials for 2019-nCoV infection [J]. Clin Pharmacol Ther，2020，108（2）：242-247.
[45] Agrawal U，Raju R，Udwadia ZF. Favipiravir：A new and emerging antiviral option in COVID-19 [J]. Med J Armed Forces India，2020，76（4）：370-376.
[46] White PL，Dhillon R，Cordey A，et al. A national strategy to diagnose Coronavirus Disease 2019——associated invasive fungal disease in the ICU [J]. Clin Infect Dis，2020，DOI：10.1093/cid/ciaa1298.
[47] Bartoletti M，Pascale R，Cricca M，et al. Epidemiology of invasive pulmonary aspergillosis among intubated patients with COVID-19：A prospective study [J]. Clin Infect Dis，2020，DOI：10.1093/cid/ciaa1065.

（收稿日期：2020-10-21；修回日期：2021-03-05）

药事管理

某儿童医院住院药房闭环流程模块化改造的实践

王园书，赵耀，刘思婷*（南京医科大学附属儿童医院，南京 210008）

摘要：目的 探讨本院住院药房药品信息闭环流程模块化改造的实践效果。**方法** 介绍本院住院药房药品调剂信息闭环化改造的建设情况，收集流程改造前后的运行数据，评价住院药房改造前后的调剂模式及成效；调剂流程改造中引入多模块化管理理念设计出适用于不同病区的 3 种调剂进阶流程，评价模块化理念对住院药房调剂工作模式多样性的意义。**结果** 本院在经过药品调剂信息闭环化改造后，住院药房差错率大幅下降，整体调剂效率相对提高。改造后相对于改造前同期内差由 0.25% 下降至 0.026%，人均每日调配耗时下降 9.14%，单条医嘱调配耗时下降 4.19%；进阶调剂流程评价结果：①内差数（进阶调剂流程 1 ＞进阶调剂流程 2 ＞进阶调剂流程 3）；②单条医嘱均耗时（进阶调剂流程 2 ＞进阶调剂流程 1 ＞进阶调剂流程 3）。**结论** 本院药品调剂流程信息闭环改造后，改变了传统的药品调剂模式，大幅降低差错率，3 种模块调剂流程较好地适应了不同病区的需求，提高了整体调剂效率，实现从医嘱开具到患者用药的大闭环。

关键词：住院药房；闭环化改造；模块化
中图分类号：R95 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1738-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.046

Modularized transformation of close-loop management in the inpatient pharmacy of a children's hospital

WANG Yuan-shu, ZHAO Yao, LIU Si-ting* (*Children's Hospital of Nanjing Medical University*, *Nanjing* 210008)

Abstract: Objective To evaluate the modularized transformation of close-loop management of medication in the inpatient pharmacy of our hospital. **Methods** The medication close-loop transformation in the inpatient pharmacy was introduced. Working models and performance before and after the transformation data were analyzed and compared. Three drug dispensing processs were designed by multi-module management to make it suitable for different inpatient wards. The multi-module management in the drug dispensing was evaluated. **Results** After the close-loop modification the error rate of drug dispensing was decreased significantly, and the overall dispensing efficiency improved. The error rate was reduced from 0.25% to 0.026%, the daily allocation time per capita was reduced by 9.14%, and the allocation time for each order was reduced by 4.19%. Evaluation of 3 advanced transfer processes: ① error rate (process 1 ＞ process 2 ＞ process 3); ② time of dispensing for each order (process 2 ＞ process 1 ＞ process 3). **Conclusion** After the modification of medication close-loop management in the inpatient pharmacy, the traditional working model of drug dispensing is changed, and error rate is greatly reduced. Various modularized drug dispensing processes help adapt to the needs of different wards, improve the overall dispensing efficiency, and realize the close-loop from doctors' order to patients' medication.

Key words: inpatient pharmacy; close-loop transformation; modularization

基金项目：江苏省药学会 - 天晴医院药学基金（No.Q202001）。
作者简介：王园书，女，药师，主要从事药学研究，E-mail：wang.90.good@163.com *通信作者：刘思婷，女，硕士，主管药师，主要从事药学、中药学研究，E-mail：sayasy006@sina.com.cn

闭环管理起源于戴明环 PDCA 理论，是综合闭环系统、管理的封闭原理、管理控制和信息系统等形成的一种管理方法[1-3]。随着医院医疗质量的提高，患者安全意识的增强和医院信息化的发展，闭环管理已广泛应用于医疗行业，成为了医院药学学科建设的一项重点工作内容。本院药品闭环流程改造，是以闭环管理为基本理念，利用信息化手段，将医嘱开具、审核、调配、运送、使用各个环节首尾相连，实现全流程可追溯闭环化管理模式，其中包括药品调剂闭环、药品配送闭环、护士执行医嘱闭环以及患者用药闭环等，从而实现医师开具正确的药品，在正确的时间按照正确的途径、正确的剂量用于正确的患者的大闭环[4-6]。

医院药品调剂流程的固化是国内各级医院普遍存在的现象，通过引进各种设备仪器等智能化手段，虽然可以对流程进行一定程度的优化修订，但随之而来的各种耗材、维保、预算等，严重制约了药房的前进，其中专科、社区医院的情况尤其突出。2018 年 11 月，本院住院药房通过对闭环管理思路的研究，结合本院实际情况，将面临的一系列复杂、固化的问题进行拆解分析，根据软硬件需求、必要程度进行系统分类，在医院信息科协助下开发出众多功能模块，根据调剂客观情况进行特色化模块间衔接，彻底解决了流程固化的难题，模块化流程改进手段自此成为本院药品闭环管理核心工具。2019 年初，病区专属化模块流程改进已在临床各病区全面执行，应用有限的资源，实现了药品管理的全程可视、可控、良性循环发展。2019 年 6 月，本院通过了互联互通五乙现场评审；同年 12 月，通过了国家电子病历五级现场评审。现就药品模块化流程改造在本院住院药房的应用与实践做一经验探讨。

1　药品调剂闭环

1.1　审方系统建设

本院审方系统是以药品说明书为合理用药知识库的基础，儿科药品品规稀缺，且不同发育周期的患儿个体差异较大，需要更加严格的剂量把控，因此本院在对药品说明书、相关指南文献进行筛选、梳理、整合后，制订符合儿科用药特性的审方规则。前置审方系统以“事前干预，事后回顾”的方式对医嘱开具进行干预审核。“事前干预”为医师录入医嘱，合理用药系统根据本院建立的审方规则自动审查判断，通过者直接发送至护士端，由护士发送至药房；未通过者审方药师可通过审方系统直接与医师端“一对一”交互，医师如听取建议则修改医嘱，不听取建议需双签确认或重新录入医嘱，医师不在线还设有自动提醒和留言功能。同时前置审方系统支持多种移动终端（如平板电脑、移动治疗车等），可在病区或药房任意位置实现医嘱审核、交互等所有功能。“事后回顾”为审方药师回看已审核医嘱，对已审医嘱进行回顾总结，针对部分特殊患儿（如新生儿或体重异常患儿）的超说明书用法进行收集和讨论。审方具体流程见图 1。

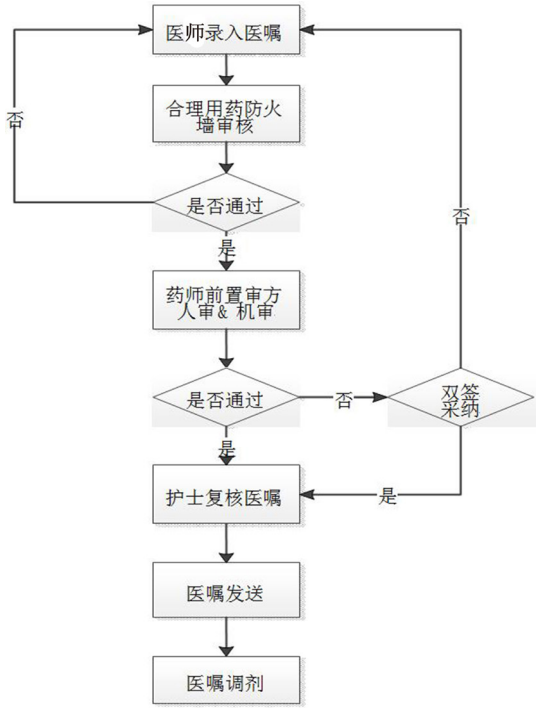


图 1　审方流程图

Fig 1　Process of prescription checking system

1.2　药品调剂流程建设

1.2.1　药品货位条码化改造　本院是一所大型综合三级甲等儿童医院。住院药房承担所有住院患儿的药品调配工作，共有药品 760 余种，品种繁多且存在大量“一品多规”“看似”“听似”的药品。过去调剂药品主要依靠打印传统摆药单人工取药，难免发生错误。药品条码化赋予每个药品货位专属的二维码，通过 PDA 扫描识别可获得包括药品药名、规格、剂型、批号、数量等信息，帮助药师快速、准确地找到调剂药品，大幅提升调剂正确率；同时每一次 PDA 扫描识别二维码的记录同时上传至 HIS 药品闭环追溯系统，医师、护士、药师均可在追溯系统里直接查看，使医、药、护三方及时有效地掌握药品调剂状态与信息，有效提高整体医疗效率与沟通效率。

1.2.2　药品调剂流程改造　住院药房旧的药品调剂流程为：药师确认医嘱→打印药品摆药单→药

师货架取药→复核→人工封条封箱→物流交接→病区护士签收。改造后住院药房药品调剂流程为：药师确认医嘱→汇总云端摆药单→ PDA 扫码下架药品→打印单剂量标签→分装→药品复核装箱→物流扫码交接→护士扫码签收、核对→临用前扫患者腕带匹配信息→护士扫码执行。旧的药品调剂流程打印摆药单耗费大量纸质物资，调剂、复核、物流、签收等环节全部为纯人工模式，无法保证药品调剂的准确性和及时性。新调剂流程省去打印摆药单这一环节，通过汇总云端摆药单和二维码识别等技术，实现从药品下架到物流签收、护士签收执行等一系列环节的信息化管理，使药品调剂全程清晰、透明且可多方随时查看交互，保障临床用药的安全性和可追溯性。

1.2.3 药品单剂量分装 本院住院药房过去的调配方式为按照汇总摆药单批量取药、摆药，由于一次性摆药量较大往往给药师复核及护士复核、排药带来较大困难。新调剂流程增加了药品单剂量分装这一环节，对所有调剂药品按照床号、患者、单次使用药品进行分装，打印单剂量标签贴于分包袋上，单剂量标签上印有患者床号、年龄、药品品名、规格、剂量、频次等信息，每张单剂量标签有唯一二维码，用于药师复核、装箱及护理签收、执行等多个环节。口服医嘱采用全自动片剂分包机进行单剂量分包，包药袋上除印有患者及药品信息也增加了二维码可供扫描签收。

1.2.4 智能药柜的应用 本院引入三台大型一体化智能药柜，投放于三个定点病区试用，其由药柜、触摸屏、针剂储药屉、摄像头等组成，与医院 HIS 信息系统对接，医嘱审核通过后智能药柜自动对医嘱进行筛选、分层，对药柜发送医嘱和指令，护士可直接操作触摸屏选择医嘱快速取药。同时配有一台全自动毒麻药柜投放于麻醉手术室，用于毒性、麻醉药品的发放。麻醉医师通过指纹认证或用户名登录，输入麻醉药品数量自动出药并全程监控记录，麻醉医师在 HIS 手麻系统输入患儿住院号记账，HIS 系统截取患者和医嘱信息自动打印电子麻醉处方，药师核对麻醉处方和空药瓶，录指纹进行补药。

2 特色药品调剂模块组合流程

本院为大型三甲儿童医院，拥有呼吸、血液、肿瘤、感染、新生儿等众多特色专科，住院药房为应对不同专科的特殊药品供应需求，在有限的人力基础上，合理应用信息化管理系统，将药品调剂各环节模块化，通过增减模块设计出适用于不同病区的多种调剂流程方案。

2.1 基础调剂流程

基础流程为本院调剂主流程，即药师确认医嘱→汇总云端摆药单→货架取药→药品整理装箱→药品转运→病区护士扫码签收、核对→临用前扫患者腕带匹配信息→护士扫码执行。

2.2 进阶调剂流程

进阶流程是为适应不同药品供应需求在主流程的基础上通过增减模块设计而成。模块分为拓展和附加两种，拓展模块为需增加硬件设备支持的模块类型，附加模块为不需增加硬件可直接优化流程的模块类型。

拓展模块 A：PDA 扫码下架；附加模块 B：打印单剂量标签、单剂量分装。

拓展模块 C：病区智能药柜；附加模块 D：物流扫码交接。

2.2.1 进阶调剂流程Ⅰ 进阶调剂流程Ⅰ由主流程＋拓展模块 A ＋附加模块 D 组成，见图 2。此种调剂模块组合在保证药品信息闭环的基础上，精简药师操作程序，仅为 PDA 扫码下架和药品复核装箱两个步骤。

2.2.2 进阶调剂流程Ⅱ 进阶调剂流程Ⅱ由主流程＋拓展模块 A ＋附加模块 B ＋附加模块 D 组成，见图 2。进阶调剂流程Ⅱ相比进阶调剂流程Ⅰ增加了附加模块 B（打印单剂量标签和单剂量分装）。单剂量标签清楚呈现患者信息与服药信息，药师按照单剂量标签信息逐床逐顿分拣包装，护士不再分拣摆药，直接扫患者手环匹配患者和药品信息。

2.2.3 进阶调剂流程Ⅲ 进阶调剂流程Ⅲ由主流程＋拓展模块 C 组成，见图 2。药师端只需确认医嘱，护士端便可在病区智能药柜自行取药并执行；少数不在智能药柜的药品由药师按照主流程进行常规发药。

2.3 进阶流程评价

2.3.1 模块评价

① 拓展模块 A：药品使用 PDA 识别下架，优点为可大幅提高药品调剂品种准确性，缺点为无法降低调剂数量差错。

② 附加模块 B：打印单剂量标签、单剂量分装。优点为逐床逐顿的精准分装模式可在降低调剂品种差错的同时降低调剂数量差错，弥补拓展模块 A 的不足。缺点为单剂量分装所需人力增加，调剂耗时延长。

③ 拓展模块 C：病区智能药柜，药师确认医嘱后医嘱直接传至病区智能药柜工作站，护士在实时监控下登录选取医嘱，即可按医嘱顺序自动

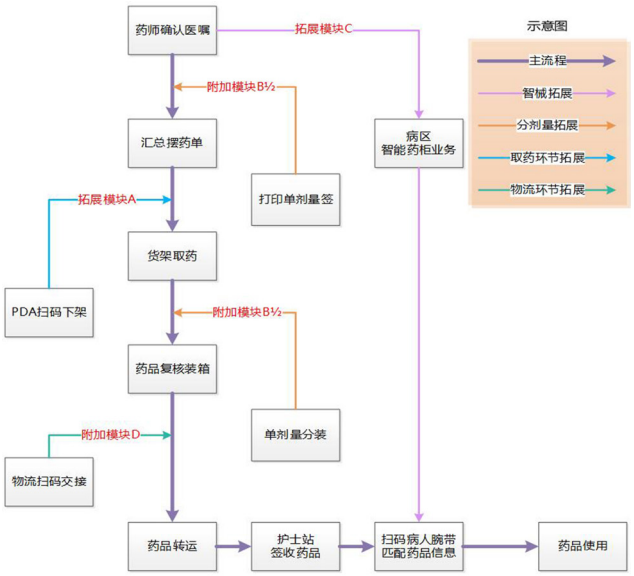


图 2　模块化调剂流程

Fig 2　Process of modularized drug distribution

取药。优点为步骤精简，快速高效。缺点为需要药师定期加药和维护盘点，加药和维护盘点耗时较长。

④ 附加模块 D：物流扫码交接，优点为物流运输和交接全程可追溯，缺点为增加扫码步骤，延长物流环节耗时。

2.3.2　流程评价　进阶调剂流程 1、进阶调剂流程 2 与进阶调剂流程 3 均实现药品闭环。

对 2019 年 2—6 月实施进阶调剂流程 1、进阶 2、3 的病区进行内差（不出门差错或被病区复核发现错）率、单条医嘱均耗时（从确认医嘱到药品使用时间）进行数据汇总分析，具体见表 1。

表 1　进阶调剂流程调配内差率与耗时

Tab 1　Dispensing error rate and time consumption of 3 modularized drug distribution processes

调剂流程	实施病区数 / 个	内差率 /%	日均调配总耗时 /min	单条医嘱调配均耗时 /min
进阶调剂流程 1	10	0.17	1325	2.03
进阶调剂流程 2	4	0.06	468	2.21
进阶调剂流程 3	4	0.03	235	1.78

数据显示，内差率：进阶调剂流程 1 ＞进阶调剂流程 2 ＞进阶调剂流程 3；单条医嘱均耗时：进阶调剂流程 2 ＞进阶调剂流程 1 ＞进阶调剂流程 3。

3　结果

3.1　发药内差率降低

2019 年 2 月药品闭环流程完成改造后，住院药房开始实施新调剂流程，“发药品种差错”和“发药数量差错”大幅降低。2018 年 2—6 月住院药房调配医嘱 1 152 000 条，改造后 2019 年 2—6 月住院药房调配医嘱 1 218 560 条，处方调配内差（不出门差错或被病区复核发现错）对比见图 3，结果显示改造后内差率由 0.25% 降低至 0.026%。

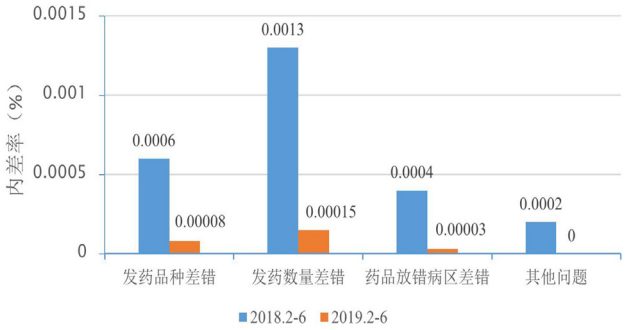


图 3　改造前（2018 年 2—6 月）与改造后（2019 年 2—6 月）处方调配内差对比

Fig 3　Dispensing error rate before the transformation and after the transformation

3.2　整体调剂效率提高

2019 年 2 月改造后实施针对不同类型病区采用不同模块组合的调剂模式，基础调剂模块组合应用于外科、呼吸科等病区，进阶调剂模块组合应用于内科病区，特殊应急调剂模块组合应用于重症监护、感染科等病区。2018 年 2—6 月与 2019 年 2—6 月住院药房调配医嘱数据见表 2。结果显示药品闭环流程改造后人均每日调配耗时和单条医嘱均耗时分别比 2018 年 2—6 月改造前减少 9.14% 和 4.19%，住院药房整体调剂效率提高。

表 2　2018 年 2—6 月与 2019 年 2—6 月调配数据对比

Tab 2　Dispensing data of Feb—June 2018 and Feb—June 2019

时间段	日均调配医嘱数 / 条	日均调配人数 / 人	人均调配医嘱数 / 条	日均调配总耗时 /min	人均调配耗时 /min	单条医嘱均耗时 /min
2018 年 2—6 月	8308	8	115.13	1984	248.00	2.15
2019 年 2—6 月	8560	9	109.56	2028	225.33	2.06

4　讨论

本院住院药房通过信息闭环流程改造，改变了传统的药品调剂模式，实现药品调剂闭环、药品配送闭环、护士执行医嘱闭环以及患者用药闭环，最终实现从医嘱开具到患者用药的大闭环，从而实现了药学服务过程可规范、质量可保证、成效可追溯[7]。

由于儿科的特殊性，本院住院药房以模块化思维为主导，通过增减不同模块可适应不同病区的工作需要，实现药品调剂的全流程互联可控、

可追溯。实践证明以模块化思维设计出的 3 个进阶调剂流程均可大幅降低差错率，从整体上提高工作效率。其中，进阶调剂流程 3 内差数和单条医嘱均耗时均为最少，即正确率与效率均最高，为最优流程，但其实施需要价格昂贵的硬件设备和信息系统的支持；进阶调剂流程 2 虽内差数少，但人力增加，单条医嘱均耗时最长，即正确率高但效率低；进阶调剂流程 1 内差数最多，单条医嘱均耗时多于进阶调剂流程 3 而少于进阶调剂流程 2，即正确率最低、效率中等。需要关注的是模块的效能与人力成本成正相关，本院针对不同病区特性启用最适宜的调剂流程，以模块化分析创造优势，多流程并用减弱人力增加和耗时延长的弱势。在应用中可需根据实际情况不断摸索、改进，制订出高准确率、效率适中的闭环调剂流程。

随着医疗水平不断发展，医院工作量不断增加，建立快速、安全、高效的药品供应保障系统是医院药品管理的共识，也是业务工作发展的迫切需求 [8-11]。本院通过闭环改造和调剂流程模块化设计已取得较好成果，充分发挥了科技优势，提高了工作效率和质量，促进了药学服务水平的发展。但值得注意的是，现阶段我国医疗机构院内药品追溯体系暂时无法与药品电子监管码实现对接，而药品院内追溯体系在保障患者用药安全及医院药品高效管理方面发挥着重要作用 [12]。因此，在今后的信息建设工作中将结合各部门内部药品供应特色构建自己的院内药品编码体系，使药品的源头追溯和最小包装精准追溯得以实现。

参考文献

[1] 高维，刘震，侯幸赟，等 . 住院药房信息化建设及药学服务实践 [J]. 中国临床药理学杂志，2018，34（3）：380-381.

[2] 董军，李军，刘东洋 . HIMSS 评审促进医院信息化建设 [J]. 中国卫生质量管理，2016，23（3）：1-3.

[3] 何晓光 . 信息化建设在医院药学中的作用 [J]. 中国当代医药，2014，21（10）：174-175.

[4] 孟群，李岳峰，董方杰，等 . 区域卫生信息互联互通标准化成熟度测评方法与应用 [J]. 中国卫生信息管理杂志，2017，14（6）：758-764.

[5] 景慎旗，张小亮，缪姝妹，等 . 医院信息互联互通标准化成熟度测评实践与思考 [J]. 中国数字医学，2017，12（2）：5-8.

[6] 王衍洪 . 本院药品管理系统的构建和应用 [J]. 中国药房，2007，18（13）：993-996.

[7] 范小飞，郭道华，范国荣，等 . 临床药师在消化科病房开展闭环式药学服务模式的探讨及案例分析 [J]. 中南药学，2020，18（17）：1754-1758.

[8] 王作君，车秀云，韦平，等 . 医院药学信息化管理路径与效果评价 [J]. 中国药房，2018，29（9）：1162-1166.

[9] 王亚洲 . 基于 HIMSS 6 级评审的药品闭环管理系统和药学决策支持系统的建设 [J]. 药学与临床研究，2019，27（3）：233-236.

[10] 华小黎，廖婧，蔡雪峰，等 . 信息技术在医院用药全程化管理中的应用与实践 [J]. 中国药师，2014，15（4）：690-691.

[11] HAWC. Barriers to the reporting of medication administration errors and near misses：An interview study of nurses at a psychiatric hospital [J]. J Psychiatr Ment Hlt，2014，21（2）：797-805.

[12] 马大中 . 药品电子监管码系统在制药企业中的实施和应用体会 [J]. 中国药业，2014，12（10）：18-20.

（收稿日期：2020-12-28；修回日期：2021-04-15）

本院静脉用药集中调配中心信息化管理与流程优化的效果评价

陈晓旭，聂春杰，葛艳慧，杜书章*（郑州大学第一附属医院，郑州 450000）

摘要：目的 探讨本院 PIVAS 智能化及信息化管理的持续优化措施。**方法** 采用回顾性分析，总结本院 PIVAS 信息化、智能化实践中影响工作效率及差错率的问题，并对智能化贴签、排药、分拣及病区电话沟通等流程进行优化，对比优化前后的工作效率、差错率及科室整体资源配置。**结果** 优化后，PIVAS 信息流向更简单，设备运行更稳定；智能化贴签、排药、分拣流程每条医嘱用时分别降至（3.30±0.06）s、（5.44±0.12）s、（2.33±0.13）s，相应差错率分别降至（0.029±0.002）%、（0.039±0.016）%、（0.013±0.002）%；核对与配液差错率分别降至（0.028±0.001）%、（0.073±0.006）%。在病区实现了患者输液信息全程追溯，明显减少电话咨询，还药师更多精力于专业工作。整体上，在优化科室工作时间段的同时，工作效率提升 25.68%。**结论** PIVAS 智能化是医院药学发展的重要趋势之一，持续改进 PIVAS 信息化、智能化管理，是进一步降低患者静脉用药风险，提升药学服务水平的重要手段。

关键词：静脉用药集中调配中心；智能化；持续优化；工作效率；差错率
中图分类号：R95 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2021)08-1743-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.047

Evaluation of PIVAS information management and process optimization

CHEN Xiao-xu, NIE Chun-jie, GE Yan-hui, DU Shu-zhang* (*First Affiliated Hospital of Zhengzhou University*, *Zhengzhou* 450000)

Abstract: Objective To determine the practice and effect of information and intelligent management of PIVAS in our hospital. **Methods** We retrospective summarized the problems affecting the work efficiency and error rate in the information and intelligent management of practice of PIVAS. The process of intelligent labeling, drug arrangement and sorting were optimized. The work efficiency, error rate and overall department resource allocation before and after the optimization were compared. **Results** After the optimization, the process was more flexible, the information transfer flow direction was clearer; the time labeling, drug dispensing and sorting was decreased to (3.30±0.06) s, (5.44±0.12) s and (2.33±0.13) s; the corresponding error rate was decreased to (0.029±0.002)%, (0.039±0.016)% and (0.013±0.002)% respectively; the error rate of checking and mixing was reduced to (0.028±0.001)% and (0.073±0.006)%. In addition, the information traceability was realized, which significantly reduced telephone consultation of pharmacists. On the whole, the overall work efficiency was improved by 25.68%, and the working hours of PIVAS optimized. **Conclusion** Intelligent PIVAS is a important trend in the development of hospital pharmacy, which helps further reduce the risk of intravenous drug use and improve pharmaceutical care in the information modernization and intelligent management of PIVAS.

Key words: pharmacy intravenous admixture service; intelligentization; continuous optimization; work efficiency; error rate

静脉用药集中调配中心（pharmacy intravenous admixture services，PIVAS）近年来在国内发展迅速，秉承“以患者为中心”的药学服务理念，PIVAS 在保障患者安全合理用药方面发挥重要作用[1-2]。PIVAS 工作流程繁杂、易发生差错，若差错未及时发现，可能造成严重后果[3]。PIVAS 各

基金项目：河南省医学科技攻关计划项目（编号：LHGJ20190277）。
作者简介：陈晓旭，女，硕士，主管药师，主要从事医院药学、循证医学研究，E-mail：xiaoxuC_hust@163.com *通信作者：杜书章，男，主任药师，主要从医院药学、药物经济学研究，E-mail：dushuzhang911@163.com

流程具有工作重复率高的特点，使得信息化、智能化在提升 PIVAS 工作效率及工作质量中具有较大优势[4-7]。

为提升 PIVAS 工作质量及效率，2017 年本院郑东院区引进一系列智能设备，如智能贴签系统（简称贴签机）、智能药物存储系统（简称智能药柜）、智能分拣系统（简称分拣机）、智能物流运输系统、掌上电脑（PDA）等，拟建立智能化 PIVAS。另外，本院还引入了 PIVAS 安全用药信息管理平台（information management platform of drug safety in PIVAS，PIVAS-IM），用于医嘱审核与信息管理，初步实现了本院郑东院区 PIVAS（简称本院 PIVAS）的信息化与智能化，主要工作流程与信息传递如图 1 所示。信息化、智能化管理实现了本院 PIVAS 统排、统配的工作模式，在一定程度上解放了人力，但在实践中发现，由于软、硬件兼容性差、信息流向复杂，常出现设备故障、数据异常等严重问题，且设备故障需要依赖工程师解决，耗时长，PIVAS 工作人员常常需要加班。因此急需优化医嘱信息处理，提高各设备稳定性，实现工作效率与工作质量的提升。现将本院 PIVAS 信息化、智能化实践中遇到的问题及优化措施介绍如下。

1 干预背景

收集本院 2017 年 8 月—2018 年 5 月 PIVAS 差错登记本、设备故障登记表、电话咨询记录本、PIVAS 排班表及岗位说明等资料。回顾性总结本院 PIVAS 信息化、智能化实践中存在主要问题，报道如下。

1.1 医嘱统排计算时间长，设备故障率高、智能贴签排药效率低

如图 1 所示，贴签机与智能药柜分别接收 PIVAS-IM 医嘱，贴签机根据批次 - 溶媒名称 - 药品名称的顺序运算生成统排号；智能药柜按照药品名称统排后匹配贴签机生成的统排号。整个过程，医嘱信息流向复杂，统排速度慢，设备常发生蓝屏、死机、数据飘移等故障。主要原因：① 贴签机与智能药柜内存空间小，运算速度慢；② 贴签机、智能药柜保留历史医嘱，进一步减少内存，降低运算速度；③ 智能药柜需匹配贴签机生成的统排号，一旦贴签机故障，智能药柜也无法正常运行；④ 药品摆放顺序与取药顺序不一致，增加了取药人员的无效走动。

1.2 分拣机工作效率低、易出错

本院智能分拣系统主要采用二维码识别、格栅式履带传输。工作人员将输液标签朝上放在传输带上，红外探头识别二维码后，相应科室篮筐位置处的拨片将液体拨入筐中并计数[8]。影响差错率及工作效率原因如下：① 拨片长度大于 100 mL 规格溶媒的长度，50 mL/100 mL 规格的溶媒质量轻、体积小，若与前一袋液体距离较近时，易被连带拨入同一筐中，发生串科；② 受红外探头扫描灵敏度及标签二维码识别率的限制，若标签粘贴不平整或位置不佳时，会扫描失败；③ 分拣机接收医嘱后，不能实时更新，无法识别后期更改状态的医嘱，产生系统数量与实际数量不一致的情况。

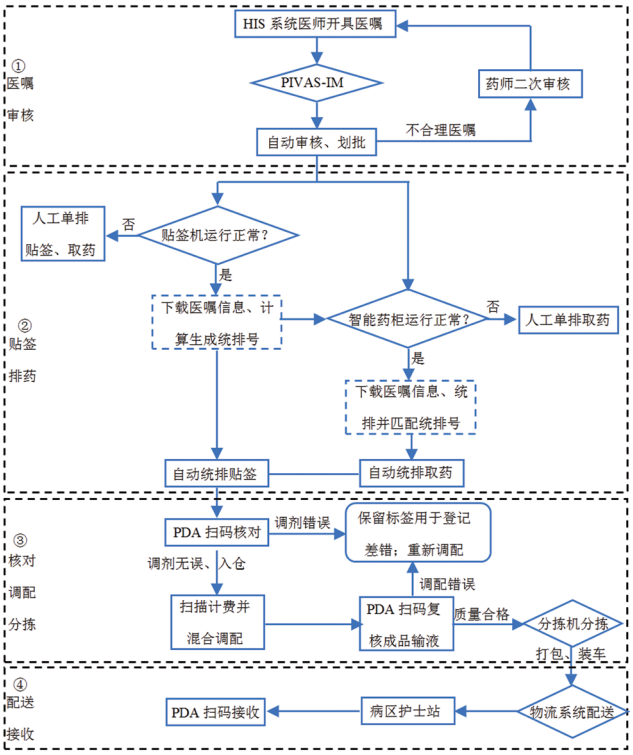


图 1 优化前 PIVAS 的工作流程及信息传递

Fig 1 Flow chart of PIVAS information transfer before the optimization

1.3 核对、调配过程易出错

本院 PIVAS 引入 PDA 及洁净区电脑，用扫码替代人工签字。洁净区电脑类似 PDA，可内嵌于操作台，与扫描枪相比，提高洁净层级，缩短操作动线。在核对、调配、成品复核环节，工作人员核对后扫码，扫描成功会显示绿色文本框“扫描成功”，若扫描失败会显示红色文本框“扫描失败”。实践中出错的主要原因：① 核对人员速度较快时，界面信息一闪而过，不能及时看到异常信息；② 调配仓中无线网络环境差，洁净区电脑反应慢，常出现数据回传失败，有时配液人员调配完毕才发现药品显示停嘱。

1.4 病区咨询电话多，处理纠纷耗时长

电话交流是 PIVAS 与临床科室的主要沟通方

式。病区电话主要是护士询问药品是否配制、药品何时送达、药品是否可退、药品输注条件及 PIVAS 错误追责等，还有少数是医师询问用药方案、药物申领等问题。长时间通话影响医嘱审核进程，降低整体工作效率[9]。且一旦出现输液相关责任纠纷，常需要借助监控查因，耗时长。

例如：2018 年 3 月，本院肿瘤病区 12 点致电反应，某患者的注射用泮托拉唑（商品名：韦迪）为浅褐色。病区护士认为是 PIVAS 人员的配液失误，要求 PIVAS 重新调配。查询 PIVAS-IM 操作记录，找到相应配液人员及配液时间，调取相应监控，观察配液流程无误；计算从配液到病区接收时间为 38 min，而从病区接收至护士致电间隔约 3.5 h（该药品稳定性差，要求配置后 4 h 内输注）。最终查明是护士未及时为患者输液导致，损失应由该病区承担，整个过程花费大量精力与时间。

2 干预措施

2.1 优化贴签、排药流程的医嘱信息处理

研发 PIVAS-IM 自定义医嘱统排计算功能；用 PIVAS-IM 备份医嘱记录，贴签机与智能药柜只存储当日医嘱，减少内存消耗；采用医嘱信息传递模式互斥原则，灵活切换人工与智能模式，若设备故障，可即刻启动人工统排模式。

2.2 优化分拣机功能、加强人员培训

培训分拣人员知晓分拣机原理，放置液体时注意间隔，使两袋液体至少保持一个拨片的长度；分拣机增加一个红外探头，变为双扫描模式增加扫描覆盖率；优化贴签机的标签设计，增大标签二维码面积，提高识别率；将 PIVAS-IM 查询页面嵌入分拣机，直接从 PIVAS-IM 获取医嘱实时状态，便于识别更改批次、停嘱等信息。

2.3 优化 PDA 与洁净区电脑的提醒功能

添加震动提醒，将单纯的视觉提醒变为视觉与触觉的双重提醒，避免药师错过提醒；用颜色区分不同种类异常提醒，如药品停嘱为红色警示框；更改批次为紫色警示框；无法计费为黄色警示框等，便于药师快速区分；添加流程限制功能：即前一流程未操作则不能进行当前操作（如图 2），如：未扫描“核对”的医嘱在扫描“配液”时，红色警示“该药品未核对”。

对洁净区电脑的优化同 PDA，添加不同颜色区分异常提醒；添加流程限制功能，未核对的医嘱无法进行配液扫描和计费；将洁净区计算机的无线网络改为有线传输，加快设备反应速度。

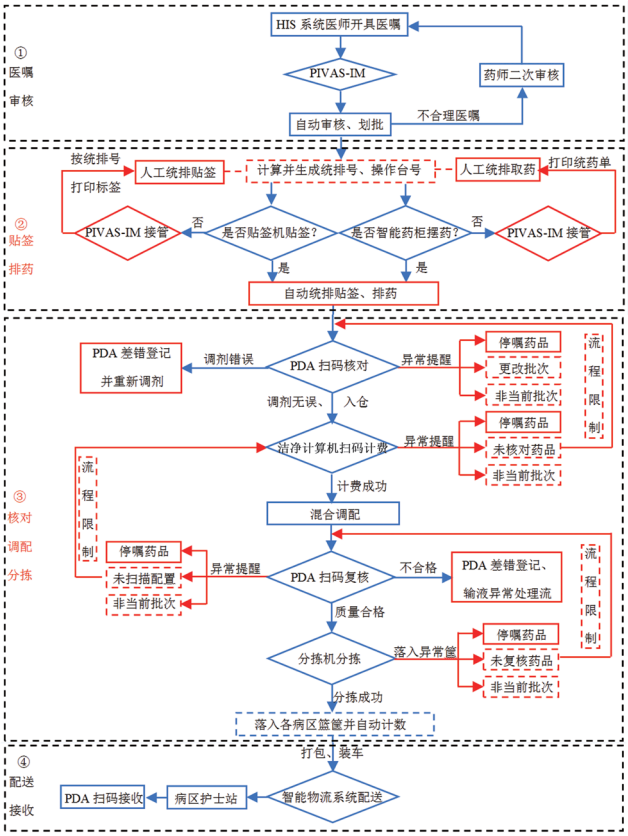


图 2 优化后的 PIVAS 信息流向及工作流程图（注：红色部分为优化部分）

Fig 2 Flow chart of PIVAS information flow and procedure after the optimization (Note: the red part is the optimized part)

2.4 减少病区电话咨询

信息处理流程优化后，各流程数据反馈给 PIVAS-IM，使得本院 PIVAS 全流程可追溯。为减少病区电话问询，我们研发病区护士站 PIVAS-IM 信息追溯系统，并在页面显示输液相关信息（如成品输液有效期、保存条件、输注条件等）（见图 3）。另外，将 PIVAS-IM 信息追溯系统信息同步到 PDA，扫描标签即可实现患者输液信息的移动查询（见图 4）。

2.5 效果评价与数据分析

从 PIVAS-IM 导出 2017 年 8 月—2019 年 12 月期间医嘱各流程的数据明细，选取各流程优化前、后 3 ～ 5 个月的数据样本进行统计分析。采用 SPSS 软件，数据以 $\bar{x}\pm SE$ 表示，采用配对 t 检验，$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 干预效果

3.1 智能化贴签、排药流程

3.1.1 信息处理与工作效率变化 优化后，PIVAS-IM 负责医嘱统排，减轻了对智能设备的依赖性。贴签机、智能药柜与 PIVAS-IM 兼容性良好，信息流向简单（如图 2）。优化前（2017 年

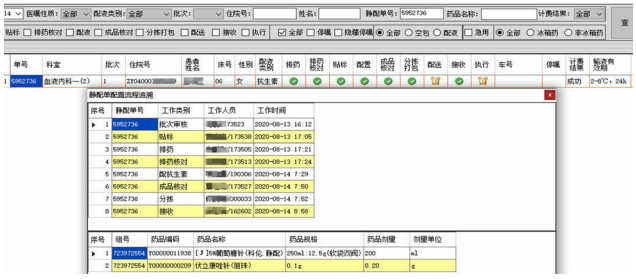


图 3 PIVAS-IM 智能信息追溯系统界面示例

Fig 3 Example of interface of intelligent information traceability system



图 4 PDA 智能信息追溯系统界面示例

Fig 4 Example of interface of PDA intelligent information traceability system

8—12 月），贴签机统排耗时约 15 min，优化后，PIVAS-IM 一键统排仅需 1 ～ 2 s；优化前贴签机故障（数据丢失、蓝屏、死机、数据重复等）共发生 27 次，智能药柜数据漂移（与贴签机统排号匹配失败、医嘱数量不一致）、卡机等共计发生 31 次；优化后一年多未再发生设备故障及数据异常。

分别以 2017 年 8—12 月及 2018 年 1—5 月作为对照组与优化组，取第 1 批医嘱的贴签、排药数据进行统计分析。与对照组相比，优化组耗时缩短（$P < 0.01$），差错率降低（$P < 0.01$），详见表 1。

3.1.2 不同批次智能贴签与人工贴签的对比 本院 PIVAS 根据住院患者输液执行时间及输液顺序，在保证输液稳定性和及时配送的前提下将配液划分为 6 个批次。为进一步探讨智能贴签的影响因素、优化人力资源配置，本文对优化后不同批次智能贴签及人工统排贴签耗时进行对比，各组抽取 2000 张医嘱，结果见表 2。

表 1 优化前后智能贴签、排药情况对比

Tab 1 Intelligent labeling and drug dispensing before and after the optimization

组别	贴签			排药		
	贴签耗时 /（张 • s^{-1}）	样本量 /n	差错率 /%	排药耗时 /（张 • s^{-1}）	样本量 /n	差错率 /%
对照组	7.02±0.16	37 425	0.338±0.058	8.88±0.16	50 193	0.230±0.033
优化组	3.30±0.06*	37 483	0.029±0.002*	5.44±0.12*	50 156	0.039±0.016*

注（Note）：与对照组比较，*$P < 0.01$（*vs* the control group，*$P < 0.01$）.

表 2 不同批次智能贴签与人工贴签情况对比

Tab 2 Intelligent labeling and manual labeling for different batches

批次	平均医嘱数	贴签耗时 /（张 • s^{-1}）
第 1 批	284	3.04±0.16*
第 2 批	264	4.06±0.26#*
第 3 批	88	5.35±0.29#*
第 4 批	15	11.74±0.42#*
第 5 批	16	10.43±0.30#*
第 6 批	73	4.33±0.31#*
人工统排贴签		6.33±0.14#

注：与第 1 批相比，#$P < 0.01$；与人工贴签组相比，*$P < 0.01$。

Note：*vs* batch 1 group，#$P < 0.01$；*vs* manual labeling group，*$P < 0.01$.

3.2 智能分拣流程

以 2017 年 8—12 月、2019 年 1—4 月作为对照组（$n = 10\,419$）与优化组（$n = 10\,790$），结果优化组分拣耗时由（4.28±0.20）s 缩短至（2.33±0.13）s（$P < 0.01$）；差错率由（0.111±0.018）% 降低至（0.013±0.002）%（$P < 0.01$）。

3.3 核对及配液流程

以 2017 年 8—12 月及 2019 年 1—4 月作为对照组与优化组，PDA 及洁净电脑功能优化后，未再出现停嘱医嘱配液的状况。与对照组相比，调配前核对差错率由（0.139±0.020）% 降至（0.028±0.001）%，（$P < 0.01$）；配液差错率由（0.126±0.015）% 降至（0.073±0.006）%（$P < 0.05$）。

3.4 病区电话咨询

优化后，病区实现患者输液信息即时查询，护士电话问询大大减少。以 2018 年 1—5 月和 2019 年 8—12 月作为对照组与优化组，与对照组相比，优化组日均电话量由 43 降至 11（$P < 0.01$）。

3.5 PIVAS 整体工作效率

以 2017 年 8—12 月与 2019 年 8—12 月作为对照组和优化组，统计 PIVAS 每日科室整体工作时间段，在岗人数及日工作量，以日工作量除以 PIVAS 在岗人员工作总时长作为人均每小时工作量。与对照组相比，优化组人均每小时工作量提升约 25.68%（$P < 0.01$），见表 3。

4 讨论

“统排、统配”是提升 PIVAS 工作效率、节约药品及耗材的重要工作模式[10]，前几年，PIVAS 常借助打印统药单、人工标签排序等方式实现[10-12]。随着信息化发展，市面上大多贴签机可统排贴签。但智能设备内存小、统排运算模式固定、速度慢，往往不能满足需求。智能贴签、排

表 3 优化前后工作效率与人力资源配置

Tab 3 Efficiency and human resource allocation before and after the optimization

组别	科室工作时间段	各岗位时长 /h	在岗人数 / 人	平均日工作量	人均每小时工作量 /h
对照组	6：00—20：00	7.5	10	793	10.57
优化组	6：15—19：00	7.5	11	1096	13.28*

注：与对照组比较，*$P < 0.01$。

Note：*vs* the control group，*$P < 0.01$.

药也是该研究优化的重点，相比于智能设备，PIVAS-IM 强大的搜索引擎和服务器，更适合医嘱数据运算与存储，优化后，PIVAS-IM 实现了医嘱自定义统排，利用 PIVAS-IM 将统排取药顺序与药品摆放顺序设为一致，减少药师无效走动，进一步提升排药效率与准确度。我们在分析中发现智能贴签效率与各批次的医嘱数量和溶媒种类有关。如表 2 所示，第 6 批医嘱数量虽然与第 3 批相近，但第 6 批主要是抗菌药物时间针，溶媒种类较单一（大多为 100 mL 0.9% 氯化钠注射液）；第 3 批主要为化疗药，溶媒种类多，而每次更换溶媒，贴签机都要减速停止，因此第 6 批耗时比第 3 批明显缩短。对于医嘱量少且需频繁更换溶媒的第 4/第 5 批，智能贴签速度甚至比人工慢；因此后期采用人工与智能贴签灵活结合，进一步提升整体效率、优化资源配置。这些结果也提示，对于工作量较小的 PIVAS，如仅调配化疗药及肠外营养的 PIVAS，购买贴签设备时需权衡花费与收益。

优化分拣机功能及标签设计，明显提升了分拣效率及准确率，与智能物流运输系统搭配使得配送更及时。本院 PIVAS 内部设立三个智能物流运输站点，任意科室分拣完毕，可即时通过物流小车配送至病区，而无需等待数个病区分拣完毕一起人工配送，节省人力并缩短成品输液存放时间。但目前尚未实现智能物流系统与 PIVAS-IM 的信息对接，若配送异常，需要借助物流系统软件查询。

PDA、洁净区电脑及二维码技术是实现 PIVAS 全流程可追溯的必要条件 [13-14]。异常提醒功能的强化与流程限制，明显降低了差错率。病区 PIVAS-IM 信息追溯系统与 PDA 输液信息移动查询功能可解决大部分护士的电话咨询，明显减少电话数量，还药师更多精力于专业工作。但目前本院尚未实现 PIVAS-IM 与移动护理信息对接，PIVAS-IM 无法获取患者输液的执行时间。实现 PIVAS-IM 与移动护理信息对接，保障患者及时输液、监控患者输液全过程，是下一步亟待解决的重点。

工作效率的提升，使本院 PIVAS 在保证输液按时送达病区的情况下，1 批配液开始时间推后 15 min，优化了上班时间段。另外，优化后，PIVAS-IM 接管统排计算，审方人员审核医嘱（15：00—16：00）结束后一键操作，无需受制于贴签机、智能药柜，贴签、排药与核对工作可同时进行，进一步优化了 PIVAS 工作时间段。

综上，智能化程度越高，对设备的依赖性就越强，一旦设备故障影响巨大，且我国 PIVAS 信息化、智能化处于快速发展阶段，市面上信息化软件与智能设备尚无统一标准，兼容性欠缺，很多设备在购入后直接应用并不能满足需求。因此，在实践过程中，不断总结问题并持续优化，使设备稳定运行，做好人机互动，探索出适合医院的工作模式，是为患者安全用药及医院药事管理提供支持的重要手段。

参考文献

[1] 梁瑞欣，周景威，郭明汶，等 . 静脉药物配置中心在临床安全用药中的作用 [J]. 北方药学，2019，16（12）：170-171.

[2] 李新燕，秦宗玲，王喆，等 . 医院静脉用药调配中心的自动化系统建设与实践 [J]. 中国医院药学杂志，2019，39（11）：1194-1197.

[3] 庞国勋，赵建群，靳会欣，等 . 信息系统优化在细胞毒药物全流程调配中的应用 [J]. 中南药学，2020，18（7）：1238-1242.

[4] 邱季，潘爱红，邓婷婷，等 . 本院静脉用药调配中心成品输液标签的设计升级 [J]. 中国药房，2020，31（3）：368-372.

[5] 黄继勋，陈凯霞 . 本院静脉用药集中调配中心自动化智能建设与实践 [J]. 中国药房，2017，28（34）：4839-4842.

[6] 赵耀，彭霄霞，仇锦春，等 . 某三甲医院静脉用药集中调配中心智能化、信息化、均质化建设的实践 [J]. 中国医院药学杂志，2019，39（17）：1808-1811.

[7] 陆青，韦鸿雁，张婷，等 . 静脉用药调配中心医嘱联合审查系统的设计与实现 [J]. 中南药学，2020，18（2）：314-317.

[8] 连玉菲，尚清，段宝京，等 . DS8000 智能分拣系统在我院 PIVAS 的应用效果 [J]. 中国药房，2017，28（7）：933-937.

[9] 李相成，赵杉杉，刘丽洁，等 . 医院静脉用药调配中心电话通信服务的优化及提升措施研究 [J]. 安徽医药，2020，11（24）：2320-2324.

[10] 冯跃平，李国春，伍伦玲，等 . 我院 PIVAS 排药流程对比研究 [J]. 临床医药文献杂志，2017，4（73）：14290-14292.

[11] 宋晓青，宋岐，张杰，等 . 品管圈在提高本院 PIVAS 排药速度中的应用实践 [J]. 中国药房，2018，1（29）：17-21.

[12] 苏艳，米文杰，杨海苓，等 . 静脉药物配置中心集中排药模式应用观察 [J]. 山东医药，2010，50（10）：110-111.

[13] 耿魁魁，吴凤芝，李民，等 . 掌上电脑全程扫描状态下静脉用药调配中心工作模式的转变 [J]. 中国药业，2019，28（1）：93-95.

[14] 郑碧容 . 静脉用药调配中心智能化与信息化的应用 [J]. 海峡药学，2018，30（12）：289-291.

（收稿日期：2020-12-27；修回日期：2021-04-25）

药品不良反应

哌拉西林他唑巴坦致药物超敏反应综合征 1 例

雷海波，刘湘（湘潭市中心医院药学部，湖南 湘潭 411100）

关键词：哌拉西林他唑巴坦；超敏反应综合征；药物不良反应
中图分类号：R969.3 **文献标识码**：B **文章编号**：1672-2981(2021)08-1748-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.048

哌拉西林他唑巴坦是由哌拉西林和他唑巴坦组成的复方制剂，对厌氧菌、多种革兰氏阳性菌以及阴性菌均有较强的抗菌作用[1]，不良反应有过敏反应、皮肤反应、消化道反应、中枢神经系统症状、肝毒性、肾毒性及二重感染等[2]。药物超敏反应综合征（drug induced hypersensitivity syndrome，DIHS）是一种临床少见且可危及生命的严重药物不良反应。国外有关于哌拉西林他唑巴坦致 DIHS 的报道[3-6]，但国内尚未见报道。现本文通过对 1 例患者应用哌拉西林他唑巴坦引起 DIHS 的病例进行分析和总结，为今后临床指导合理用药提供参考，避免严重不良反应的发生。

1 病例资料

患者，男，48 岁，因“左侧肢体无力 18 d，发热 1 d”于 2020 年 7 月 13 日入院。患者于 2020 年 6 月 24 日因“无明显诱因突发左侧肢体乏力”就诊于南昌大学第二附属医院，当时神志清楚，无恶心呕吐，无肢体抽搐，后出现神志障碍，口吐白沫，予完善头部 CT 示右侧基底节区脑出血。在该院予血肿穿刺引流术，脱水降颅压、补液、哌拉西林他唑巴坦抗感染（6 月 27 日—7 月 12 日，4.5 g ivgtt q8 h）、止血护胃、降压、留置胃管及尿管等治疗后，患者病情好转，神志清楚，能理解家属语言，于 7 月 12 日转入湘潭市第六人民医院康复治疗。转院后晚上患者出现发热，体温 37.5 ℃，有咳嗽咳痰，痰不能自行咳出，7 月 13 日体温 38.0 ℃，为求进一步诊治来本院就诊，收治住院。自起病来，患者精神差，睡眠不好，鼻饲流质及留置导尿，体重未监测。7 月 14 日肺部 CT 示双肺炎症。

既往史：有高血压病史；否认“糖尿病、冠心病”病史；否认肝炎、结核等传染病史；否认食物药物过敏史。

入院查体：体温 37.8 ℃，脉搏 98 次 • min^{-1}，呼吸 21 次 • min^{-1}，血压 171/113 mmHg（1 mmHg = 0.133 kPa）。神志模糊，不能对答，双肺呼吸音粗，双肺可闻及湿啰音，未闻及胸膜摩擦音。双下肢无水肿。全身皮肤未见皮疹。其余神经体征未见异常。

血常规：白细胞计数（WBC）17.73×10^9 • L^{-1} ↑，嗜中性粒细胞（NE）% 87.9% ↑，嗜酸性粒细胞（EO）% 0.1% ↓；肝功能：谷丙转氨酶（ALT）94.5 U • L^{-1} ↑，谷草转氨酶（AST）113.6 U • L^{-1} ↑；C- 反应蛋白（CRP）23.05 mg • L^{-1} ↑。

入院诊断：① 脑出血（右侧基底节区）；② 肺部感染；③ 高血压 3 级（很高危）。

治疗经过：入院当日继续予以哌拉西林他唑巴坦钠（4.5 g ivgtt q8 h，湖南科伦制药有限公司，批号 A2010021）抗感染治疗，并予以苯磺酸左旋氨氯地平片降压、兰索拉唑肠溶片护胃、还原型谷胱甘肽护肝、肠内营养混悬液（TPF）补充营养、氯化钾维持水电解质平衡等对症支持治疗。7 月 25 日患者体温最高 37.8 ℃，颈部、上胸部、腹部及双上肢出现大片红色小丘疹，双下肢无水肿。7 月 26 日无发热，间断咳嗽，无明显咳痰，皮疹同前，复查血常规：WBC 2.15×10^9 • L^{-1} ↓，NE% 33.4% ↓，EO% 11.2% ↑；肝功能：ALT 882.0 U • L^{-1} ↑，AST 885.9 U • L^{-1} ↑；CRP 14.01 mg • L^{-1} ↑；肺部 CT 示双肺少许炎症。上述指标提示 WBC 下降、EO 显著升高，肝功能转氨酶明显升高，感染较前好转。临床医师考虑不能用单纯药疹和药物性肝炎解释，请皮肤科、感染科、临床药学科会诊。经多学科会诊，考虑哌拉西林他唑巴坦引起的 DIHS 可能性大，建议停用哌拉西林他唑巴坦及其他可疑肝损害药物（贝那普利片），同时对症支持治疗。临床医师采纳了多学科会诊意见，

作者简介：雷海波，男，硕士，副主任药师，主要从事临床药学与药理学，E-mail：282600571@qq.com

7 月 26 日予以停用哌拉西林他唑巴坦，给予复方黄柏液涂剂局部外用，升白细胞（利可君片 20 mg po tid、鲨肝醇片 20 mg po tid），护肝（多烯磷脂酰胆碱 456 mg ivgtt qd、还原型谷胱甘肽 1.8 g ivgtt qd）等对症治疗。停用哌拉西林他唑巴坦后，7 月 27 日患者无发热，间断咳嗽，无明显咳痰，颈部可见皮疹，部分融合，其余皮疹较前消退，复查血常规：WBC $3.21\times10^{9}\cdot L^{-1}$ ↓，NE% 17.1% ↓，EO% 13.1% ↑；肝功能：ALT 1242.1 $U\cdot L^{-1}$ ↑，AST 881.5 $U\cdot L^{-1}$ ↑；CRP 14.01 $mg\cdot L^{-1}$ ↑。7 月 28 日患者皮疹基本消退，复查血常规：WBC $5.32\times10^{9}\cdot L^{-1}$，NE% 39.4% ↓，EO% 10.3% ↑；肝功能：ALT 817.1 $U\cdot L^{-1}$ ↑，AST 306.2 $U\cdot L^{-1}$ ↑，其他基本正常。8 月 2 日患者皮疹已基本消退，当日血常规：WBC $6.21\times10^{9}\cdot L^{-1}$，NE% 48.9% ↓，EO% 5.0%；肝功能：ALT 164.1 $U\cdot L^{-1}$ ↑，AST 45.7 $U\cdot L^{-1}$ ↑，患者病情好转，WBC、EO 恢复正常，肝功能指标趋于好转，8 月 3 日患者转康复科继续治疗。20 d 后随访，患者一般状况好，未再复发。

2 讨论

2.1 诊断

DIHS 是一种迟发性潜在致命的多器官系统特异性药物反应，以全身发疹性麻疹样皮疹、淋巴结肿大（≥ 2 个部位）、内脏器官受累（通常是肝脏和肾脏，也可能出现心肌炎、间质性肺炎、肾炎）、发热（体温高于 38 ℃）、血液学检查结果包括 WBC 增多或降低，伴 EO 增多（≥ $1.5\times10^{9}\cdot L^{-1}$）为特征，多见于成人，其发病率为 1/1000 ～ 1/10 000，死亡率高达 10% ～ 20%，肝功能衰竭被认为可能是首要死亡原因 [7-10]。众所周知，DIHS 是一种长期疾病，即使在停止治疗后，也会频繁复发，再次接触同一种药物可能会在 24 h 内出现症状，停药后症状可能会持续数周甚至数月 [11]。

药物热与一般感染性发热不同，通常在给药的 7 ～ 10 d 后发生，其一般是持续的高热（38.9 ～ 40 ℃），患者发热虽高，但一般情况尚好，有些患者出现不伴有药疹的单纯性药物热，也有伴有药疹的药物热（皮疹呈多形性对称性分布，并伴有瘙痒或烧灼感），少数患者也可出现周身不适、消化系症状、头痛、肌肉关节疼痛等，停用致敏药物后，药物热可自行缓解 [12]。

本病例的特点为：① 使用哌拉西林他唑巴坦钠 29 d 后颈部、上胸部、腹部及双上肢出现大片红色小丘疹；② 患者有发热（最高体温 38.0 ℃）；③ 肝功能明显受损（ALT 为正常值 2 倍以上）；④ 实验室检查示 WBC、NE、EO 升高；⑤ 停用诱发药物，给予升白、护肝等对症治疗 2 d 后，EO 又升高，肝功能进一步受损，9 d 后患者病情有所好转、症状有所改善。回顾本案例病史，哌拉西林他唑巴坦虽可致药物热，但该患者的用药史和临床表现符合 DIHS 诊断标准，可排除药物热。

2.2 关联性评价

对于 DIHS，使用致敏药物与发病之间的间隔是 2 ～ 6 周（平均 3 周），其潜伏期较长，患者皮疹出现数日前，常出现瘙痒和发热的前驱症状，体温可波动在 38 ～ 40 ℃，持续数周 [10]。查阅国内外文献，有报道称使用贝那普利后出现皮疹或肝损害，但未见贝那普利引起 DIHS 的报道 [13]。国外有关于哌拉西林他唑巴坦致 DIHS 的报道 [3-6]，但国内尚未见报道。国内有 1 例报道哌拉西林钠他唑巴坦钠致重症药疹（伴随 WBC 下降、EO 轻度升高）[14]。有研究报道患者使用哌拉西林他唑巴坦 16 d 后导致 DIHS，停用抗菌药物后 72 h 内 EO 和肝酶开始下降，1 周后恢复正常，皮疹也明显好转 [4]。回顾本案例病史，该患者使用哌拉西林他唑巴坦发生 DIHS 和好转的时间与文献报道相符，同时根据诺氏药物不良反应评估量表 [15] 进行评分（见表 1），该病例得分为 6 分，提示 DIHS 与哌拉西林他唑巴坦钠的关联性评价为“很可能”。

表 1 诺氏药物不良反应评估量表

相关问题	问题分值			该病例得分情况
	是	否	未知	
1. 该 ADR 先前是否有结论项报告	＋1	0	0	＋1
2. 该 ADR 是否在使用可疑药物后发生的	＋2	－1	0	＋2
3. 该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂后得到缓解	＋1	0	0	＋1
4. 该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复使用	＋2	－1	0	＋0
5. 是否存在其他原因能单独引起该 ADR	－1	＋2	0	＋0
6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现	－1	＋1	0	＋0
7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度	－1	0	0	＋0
8. 该 ADR 是否随剂量增加而加重，或随剂量减少而缓解	＋1	0	0	＋1
9. 患者是否暴露于同种或同类药物并出现过类似反应	＋1	0	0	＋0
10. 是否存在任何客观证据证实该反应	＋1	0	0	＋1
总分值				6 分

2.3 治疗

根据患者的病情轻重程度和 DIHS 多样化

的临床表现，对患者的治疗需遵循个体化原则。DIHS 治疗首先要停止使用致敏药物，对临床症状较轻的患者建议使用糖皮质激素 [口服泼尼松 1.0 mg/（kg·d）或其他同等剂量的糖皮质激素，如果患者临床症状加重，可予以甲泼尼龙 0.5 ～ 1.0 mg/（kg·d）冲击治疗 3 d]，如症状继续无改善或不适宜用糖皮质激素治疗的患者，考虑使用大剂量静脉注射免疫球蛋白 [一般剂量为 0.2 ～ 0.4 mg/（kg·d）]、免疫抑制剂、抗病毒治疗等改善临床症状 [16]。但也有报道认为，由于 DIHS 发病与病毒感染再激活有关，糖皮质激素有可能引起病毒感染扩散加重病情，故仍存在争议 [17]。本例患者因临床症状较轻，停用可疑导致引起 DIHS 的药物，使用升白、护肝药物等对症治疗后，临床症状和实验室检查结果均明显好转，20 d 后随访，患者一般状况好，未再复发。

2.4 机制

目前，关于 DIHS 的发病机制还未完全了解，可能与药物解毒途径受损、免疫反应异常、潜在病毒再激活、遗传易感性和 CD8 ＋ T 细胞介导等因素有关 [18]。查阅国内外文献，尚未报道与哌拉西林他唑巴坦致超敏反应确切相关的作用机制。

综上所述，如果患者在使用药物的过程中出现 DIHS 的相关症状，要及时停用可疑药物，早期发现后遗症并进行相应的处理有助于改善预后，同时对 DIHS 患者进行长期随访是非常重要的。

参考文献

[1] 徐伟立，刘林，杨晓峰，等 . 哌拉西林 / 他唑巴坦治疗小儿先天性巨结肠肠炎的疗效观察 [J]. 中国药师，2016，19（10）：1938-1940.

[2] Scheetz MH，McKoy JM，Parada JP，et al. Systematic review of piperacillin-induced neutropenia [J]. Drug Saf，2007，30（4）：295-306.

[3] Kim TI，Jeong KH，Shin MK，et al. Piperacillin/tazobactam-associated hypersensitivity syndrome with overlapping features of acute generalized exanthematous pustulosis and drug-related rash with eosinophilia and systemic symptoms syndrome [J]. Ann Dermatol，2016，28（1）：98-101.

[4] Jurado-Palomo J，Cabañas R，Prior N，et al. Use of the lymphocyte transformation test in the diagnosis of DRESS syndrome induced by ceftriaxone and piperacillin-tazobactam：Two case reports [J]. J Investig Allergol Clin Immunol，2010，20（5）：433-436.

[5] Fahim S，Jain V，Victor G，et al. Piperacillin-tazobactam-induced drug hypersensitivity syndrome [J]. Cutis，2006，77（6）：353-357.

[6] Cabañas R，Muñoz L，López-Serrano C，et al. Hypersensitivity to piperacillin [J]. Allergy，1998，53（8）：819-820.

[7] Wu X，Yang F，Chen S，et al. Clinical，viral and genetic characteristics of drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms（DRESS）in Shanghai，China [J]. Acta dermato-venereologica，2017，98（4）：401-405.

[8] Wang L，Mei XL. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms：Retrospective analysis of 104 cases over one decade [J]. Chin Med J（Engl），2017，130（8）：943-949.

[9] Sasidharanpillai S，Sabitha S，Riyaz N，et al. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms in children：A prospective study [J]. Pediatr Dermatol，2016，33（2）：e162-e165.

[10] 宋志强，郝飞 . 药物超敏反应综合征诊治专家共识 [J]. 中华皮肤科杂志，2018，51（11）：787-790.

[11] Sharpe A，Mourad BM，Hardwick J，et al. Oxacillin-induced drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms（DRESS）[J]. Am J Case Rep，2019，20：345-348.

[12] Yaita K，Sakai Y，Masunaga K，et al. A retrospective analysis of drug fever diagnosed during infectious disease consultation [J]. Int Med，2015，55（6）：605-608.

[13] 周振华，王文渊 . 盐酸贝那普利的临床应用与不良反应探讨 [J]. 海峡药学，2019，31（8）：211-213.

[14] 石平荣，李凯，段逸群，等 . 药物超敏反应综合征发病机制及治疗的研究进展 [J]. 国际皮肤性病学杂志，2006（2）：117-120.

[15] Listed NA. Suggested definitions and relationships among medication misadventures，medication errors，adverse drug events，and adverse drug reactions [J]. Am J Health Syst Pharm，1998，55（2）：165-166.

[16] 朱扣柱，陈艳华，洪远，等 . 注射用哌拉西林钠他唑巴坦钠致小儿重症药疹 1 例 [J]. 中国药物警戒，2019，16（9）：568-569.

[17] Shiohara T，Kano Y. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms（DRESS）：Incidence，pathogenesis and management [J]. Expert Opin Drug Saf，2017，16（2）：139-147.

[18] Walsh SA，Creamer D. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms（DRESS）：A clinical update and review of current thinking.[J]. Clin Exp Dermatol，2011，36（1）：6-11.

（收稿日期：2020-11-30；修回日期：2021-03-04）

1 例卡瑞利珠单抗致中毒性表皮坏死松解症并文献复习

何琳[1]，陈适[1]，夏陈英[1]，边原[2*]（1. 成都市金牛区人民医院，成都 610007；2. 四川省医学科学院·四川省人民医院，成都 610072）

关键词：卡瑞利珠单抗；中毒性表皮坏死松解症；不良反应
中图分类号：R969.3 **文献标识码**：B **文章编号**：1672-2981(2021)08-1751-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.049

随着肿瘤免疫治疗的快速发展，特别是免疫检查点抑制剂（immune checkpoint inhibitors，ICIs）在多种恶性肿瘤治疗中取得的突破性进展，让很多实体瘤患者有了新的希望。然而，诸多免疫相关不良反应（immune-related adverse events，irAEs）问题的出现，给临床治疗带来了新的困扰。卡瑞利珠单抗是一种具有自主知识产权、独特结构和功能的国产 ICIs，已陆续获得了治疗多种肿瘤的适应证。除了常见的 irAEs，如皮疹、转氨酶升高等不良反应之外，反应性皮肤毛细血管增生症（reactive cutaneous capillary endothelial proliferation，RCCEP）的不良反应较为独特，但转归较好[1]。卡瑞利珠单抗致中毒性表皮坏死松解症（toxic epidermal necrolysis，TEN）严重皮肤不良反应的相关报道罕见，本文报道了 1 例患者使用卡瑞利珠单抗后出现 TEN 的发生发展，并进行分析，为临床提供参考。

1 病史概要

患者女性，58 岁，47 kg。因“右肺腺癌 T4N3M1b Ⅳ期”第二次化疗入院，入院查体：T 36.4 ℃，P 111 次·min^{-1}，R 21 次·min^{-1}，BP 100/81 mmHg（1 mmHg = 0.133 kPa）。体型消瘦，轮椅推入病房，端坐位张口呼吸，右侧颈部近血管旁扪及一质硬物，压痛明显，双肺呼吸音粗，闻及湿啰音，呼气末可闻及少许哮鸣音，心前区可见一穿刺引流管；全身皮肤黏膜无异常；否认药物过敏史。完善相关检查，入院诊断为：① 右肺恶性肿瘤；② 重度营养不良伴消瘦。

药物治疗过程：2019 年 11 月 13 日行白蛋白紫杉醇 400 mg d1 + 卡铂 450 mg d1 化疗，联合卡瑞利珠单抗 200 mg 免疫治疗。11 月 13 日至 11 月 19 日每日一次给予参麦注射液 100 mL 溶于 250 mL 5% 葡萄糖注射液中静脉滴注，中 / 长链脂肪乳注射液 250 mL 静脉滴注，复方氨基酸注射液（18AA）250 mL 静脉滴注支持治疗；11 月 17 日至 11 月 21 日因出现血小板降低，治疗性予以注射用重组人白介素 -11 1.5 mg 溶于 1 mL 灭菌用水，皮下注射，每日一次。

2019 年 11 月 18 日患者出现皮肤瘙痒，11 月 19 日发展为全身红斑、胸背部大片皮疹伴瘙痒，心电监护心率 120 ～ 130 次·min^{-1}，给予地塞米松注射液、异丙嗪注射液和氯雷他定片抗过敏治疗。11 月 20 日患者全身大片皮疹，范围较前日扩大，眼睑、口腔及外阴红斑、糜烂面，躯干四肢暗红斑片，胸背出现大疱，破裂伴渗出，皮温升高。心电监护提示心率 169 次·min^{-1}，R 24 次·min^{-1}，BP 109/67 mmHg，SaO_2 98%，辅助检查：白细胞计数 2.79×10^9·L^{-1} ↓，淋巴细胞数 0.619×10^9·L^{-1} ↓，嗜酸性粒细胞数 0.006×10^9·L^{-1} ↓，嗜酸性粒细胞比率 0.2% ↓，超敏 C 反应蛋白 42.60 mg·L^{-1} ↑，血红蛋白 95 g·L^{-1} ↓，血小板计数 71×10^9·L^{-1} ↓。降钙素原 0.25 ng·mL^{-1} ↑。生化：总蛋白 45.2 g·L^{-1} ↓，白蛋白 23.5 g·L^{-1} ↓，肌酐 30.7 μmol·L^{-1} ↓，估算肾小球滤过率 120.66 mL·min^{-1}，钾 3.26 mmol·L^{-1} ↓，钠 132.9 mmol·L^{-1} ↓。呼吸九联检、G 实验、GM 实验未见明显异常。皮肤科及临床药师会诊考虑：TEN。建议甲泼尼龙琥珀酸钠抗炎，口服依巴斯汀和氯雷他定片加强抗过敏治疗；同时，保护胃黏膜和维持水电解质平衡等，医师采纳建议。

2020 年 11 月 21 日患者全身皮损持续加重，转上级医院完善相关辅检及细胞免疫、体液免疫和抗核抗体谱检查等，11 月 21 日～ 25 日期间，积极抗炎冲击治疗 TEN，同时抗感染、抑酸、止痛、维持水电解质平衡等对症支持。11 月 25 日患者呈嗜睡、呼之不应状，专科查体：头部、面部、躯干皮损严重。患者张口困难，口腔、口膜及唇

基金项目：国家临床重点专科建设项目（No.30305030698）；四川省医学科学院·四川省人民医院科研基金（No.2018LY09）。
作者简介：何琳，女，硕士研究生，主要从事临床药学工作，E-mail：sxhl0508@163.com *通信作者：边原，男，硕士研究生导师，主要从事临床药学工作，E-mail：85778860@qq.com

边缘大量暗红色烂面，头部、面颈部、躯干双上肢、会阴部大面积表皮剥脱，糜烂面基底潮红，伴大量渗液，双下肢见散在红斑、丘疹，触痛明显，双眼分泌物增多、浑浊。11 月 26 日患者基础情况继续恶化，11 月 27 日患者再次病危抢救，11 月 30 日，家属要求自动出院，外院继续治疗。

2 讨论

2.1 不良反应关联性评价

患者入院否认药物过敏史，查体时未见皮肤黏膜有异常，在院期间饮食无特殊，治疗过程中出现新发皮疹并迅速加重，主要考虑为药品不良反应所致。患者入院前后使用药物品种较多，如何找准可疑药物，避免二次暴露引起的伤害，除了常用的药品不良反应关联性评价标准，针对 TEN 的可疑药品评估，ALDEN（Algorithm of drug causality for epidermal necrolysis）评分具有较高的针对性和可靠性 [2]。ALDEN 评分判定结果分为五级：极不可能（＜ 0 分），不可能（0 ～ 1 分），可能（2 ～ 3 分），极有可能（4 ～ 5 分），非常极有可能（≥ 6 分），怀疑药物引发 TEN 时普遍采用该评分。但 ALDEN 评分系统也有一定的局限性，比如对中草药及中成药的评价方面缺乏循证数据支持 [3]。因此，本例 TEN 患者可疑药品的排查我们结合了传统药品不良反应关联性评价和 ALDEN 评分的方法，从药品使用时间、皮疹出现时间及相关报道提示药物致 TEN 风险的可能性分析，免疫抑制剂卡瑞利珠单抗与这次不良反应发生的关联性为极有可能。

患者 2019 年 11 月 13 ～ 19 日所用药物：参麦注射液、中 / 长链脂肪乳注射液和复方氨基酸注射液（18AA），通过检索 CNKI、万方、维普和 PubMed 等数据库，结合药品说明书和患者既往用药史，经药品不良反应关联性评价，判断上述药品与本次 TEN 发生的相关性为不可能。对患者化疗药物白蛋白紫杉醇、卡铂和卡瑞利珠单抗及重组人白介素 -11 进行 ALDEN 评分，最终卡瑞利珠单抗以总得分 4 分被判断与本例 TEN 的相关性为极有可能，详见表 1。

表 1 ALDEN 评分标准 [2] 及对可疑药品的 ALDEN 评分比较

指标	ALDEN 评分细则	ALDEN 评分	白蛋白紫杉醇	卡铂	卡瑞利珠单抗	注射用重组人白介素 -11
开始使用药物日期到线索日之间相隔的时间	5 ～ 28 d	＋ 3	3	3	3	
	29 ～ 56 d	＋ 2				
	1 ～ 4 d	＋ 1				
	＞ 56 d	－ 1				
	线索日当日或之后才开始使用药物	－ 3				－ 3
	过去曾经使用过相同药物且发生过敏反应时：1 ～ 4 d（＋ 3）；5 ～ 56 d（＋ 1）					
评估在线索日内时药物是否仍存在体内	在线索日时药物仍持续使用，或是药物停用时间点和线索日之间相隔的时间小于药物半衰期的 5 倍	0		0	0	0
	药物停用时间点和线索日之间相隔的时间大于药物半衰期的 5 倍，但患者有肝 / 肾功能异常或怀疑有药物相互作用存在	－ 1				
	药物停用时间点和线索日之间相隔的时间大于药物半衰期的 5 倍，并且患者无肝 / 肾功能异常和药物相互作用存在	－ 3	－ 3			
再度重新使用相同药物 / 过去曾经使用同一成分或类似药物的反应情况	再度重新使用相同药物引起 SJS/TEN	＋ 4				
	再度重新使用类似药物引起 SJS/TEN，或是再度重新使用相同药物引起其他非 SJS/TEN 的过敏反应	＋ 2				
	再度重新使用类似药物引起其他非 SJS/TEN 的过敏反应	＋ 1				
	过去从未使用相同药物	0			0	0
	过去曾经使用相同或类似药物但无过敏反应发生	－ 2	－ 2	－ 2		
在 SJS/TEN 进展过程中，是否仍持续使用该药物	停药或不清楚	0	0	0	0	
	仍持续使用该药未造成症状恶化	－ 2				－ 2
该药物在过往历史中的恶名度	高风险药物	＋ 3				
	风险已确定但属于低风险药物	＋ 2				＋ 2
	监测中的药物	＋ 1	＋ 1		＋ 1	
	未知	0				
	无相关性证据的药物	－ 1		－ 1		
可疑药物不止一个	若可疑药物不止一个，只要其中一个药物前五项加和的总分大于正 3 分（不含 3 分），则所有其他可疑药物的分数皆要扣 1 分后才是最后的总分	－ 1				
	总分值		－ 1	0	4	－ 3

2.2 TEN 的特点及常用治疗药物

TEN 是一种严重且少见的急性皮肤黏膜系

统疾病，死亡率高达 45%。常发生于初次用药后 7 ～ 21 d，长半衰期药物的引发和致死风险更高。临床主要表现为广泛的表皮剥脱、坏死，黏膜糜烂，全身累及面积＞ 30%。组织学表现为表皮不同程度或全层坏死及水疱形成。该疾病进展迅速，会累及全身各系统，因此，一直是临床重点关注的药源性疾病之一 [4]。TEN 的发生机制与患者遗传易感性、致敏药物异常代谢、细胞免疫介导和细胞因子作用等密切相关。患者的预后与病情的严重程度相关，普遍采用 Scorten 评分评估预后，评分越高，死亡率越高。治疗强调及时停用和避免再次使用可疑药物，并积极进行对症支持治疗 [5]。

目前，临床上最常用的治疗药物有糖皮质激素、静脉注射用丙种球蛋白（IVIG）、环孢素和抗肿瘤坏死因子（TNF-α）单克隆抗体等 [6]。糖皮质激素是主要治疗药物，强调早期和足量 [1 ～ 2 mg/（kg • d）] 使用，必要时可采用冲击治疗方案，控制病情后逐渐减量，以避免糖皮质激素可能导致的感染加重、表皮再生延迟、消化道溃疡和电解质紊乱等。IVIG 制剂因含有阻断角质形成细胞凋亡的抗体，有病例和回顾性报道认为其治疗 TEN 有效。通常予患者 IVIG 40 g • d^{-1}，应用 3 ～ 7 d，至皮损控制。环孢素 A 通过强效抑制活化 CD8 ＋ T 细胞功能及颗粒溶素、颗粒酶 B、穿孔素释放，并通过抑制表皮细胞 NF-κB 发挥抗凋亡作用。有研究显示应用环孢素 [＜ 3 mg/（kg • d）] 的患者较应用 IVIG 及系统应用激素的患者死亡率低 [7]。然而，一项大样本回顾性分析环孢素 A 的治疗对患者表皮剥脱停止进展时间、表皮 - 黏膜再生时间、疾病进展时间及死亡率均与支持治疗组之间无显著性差异 [8]。生物制剂抗 TNF-α 单克隆抗体通过有效阻断表皮剥脱的进程，可有效治疗 TEN[9]。一项前瞻性、随机、对照研究证实依那西普能够显著降低根据 Scorten 评分，预测 TEN 患者的死亡率，并与既往支持治疗组死亡率具有显著性差异，且相比于甲泼尼龙治疗组消化道不良反应发生比例明显降低 [10]。

2.3 ICIs 致 irAE 皮肤毒性的机制及治疗

既往报道与 TEN 有关的药物主要包括非甾体抗炎药、抗菌药和抗惊厥药。随着抗肿瘤治疗中 ICIs 的广泛使用，已有 Nivolumab 单抗在治疗淋巴瘤、黑色素瘤中引起 TEN 严重皮肤不良反应的个案报道，ICIs 已成为引起 TEN 的又一类值得关注的药品。皮肤不良反应作为 ICIs 最常见的 irAE 之一，其确切发生机制仍不清楚。有研究认为可能是因为 ICIs 用药后引起 CD4 ＋ /CD8 ＋ T 细胞再激活，自身免疫系统发生变化，角质形成细胞广泛坏死的关键因子表达上调，从而活化细胞凋亡程序，促使角质形成细胞死亡。免疫组化研究也显示 ICIs 相关的皮疹、史蒂文斯•约翰逊综合征（SJS）/ TEN 患者的基因表达谱有炎性趋化因子（CXCL9、CXCL10、CXCL11）的上调、细胞毒性因子（PRF1，GZMB）和促凋亡分子（FASLG）。使用抗 PD-1（programmed death-1，PD-1）可显著增加淋巴细胞和角质形成细胞中 PD-L1（programmed cell death protein-1 ligand）的表达，PD-L1 的上调导致对 CD8 ＋ T 细胞的免疫反应减慢，真皮 - 表皮交界处的 CD8 ＋细胞聚集以及表皮内 CD8 ＋胞吐作用促使角质形成细胞凋亡加速 [11-12]。

ICIs 引起的 TEN 属于 4 级 irAEs，患者应永久停用免疫检查点抑制剂，多国癌症支持治疗协会（MASCC）对其治疗建议每日静脉注射甲泼尼龙 1 ～ 2 mg/（kg • d），对全身性皮质类固醇无反应或不能缓解毒性反应者，应考虑 IVIG[如 1 g/（kg • d）×3 d] 治疗或者环孢菌素 [3 ～ 6 mg/（kg•d）] 直到毒性反应缓解后 4 ～ 6 周逐渐减量，视情况进行抗感染治疗，同时对皮肤伤口和液体电解质等进行管理 [13]。

卡瑞利珠单抗是我国自主研发的人源化 PD-1，用于至少经过二线系统化疗的复发或难治性经典型霍奇金淋巴瘤患者的治疗。最新修订的说明书适应证包括：用于既往接受过索拉非尼治疗和 / 或含奥沙利铂系统化疗的晚期肝细胞癌患者的治疗；联合培美曲塞和卡铂用于表皮生长因子受体（EGFR）基因突变阴性和间变性淋巴瘤激酶（ALK）阴性的、不可手术切除的局部晚期或转移性非鳞状非小细胞肺癌（NSCLC）的一线治疗和既往接受过一线化疗后疾病进展或不可耐受的局部晚期或转移性食管鳞癌患者的治疗。作为一个新上市的国产 PD-1，卡瑞利珠单抗在临床疗效及不良反应等的数据仍在不断积累中。本文报道了 1 例Ⅳ期肺腺癌患者接受卡瑞利珠单抗免疫治疗后发生 TEN 的发生发展，并对 TEN 的相关文献进行分析，以期为临床安全用药提供参考。

参考文献

[1] 中国临床肿瘤学会抗肿瘤药物安全管理专家委员会，中国临床肿瘤学会免疫治疗专家委员会 . 卡瑞利珠单抗致反应性皮肤毛细血管增生症临床诊治专家共识 [J]. 临床肿瘤学杂志，2020，25（9）：840-848.

[2] Sassolas B，Haddad C，Mockenhaupt M，et al. ALDEN，an algorithm for assessment of drug causality in

Stevens-Johnson Syndrome and toxic epidermal necrolysis: Comparison with case-control analysis [J]. Clin Pharmacol Ther，2010，88（1）：60-68.
[3] 刘敏，李忠东 . 实例探讨药物引起 SJS 或 TEN 的评分方法——Naranjo 评分与 ALDEN 评分比较 [J]. 中国药物应用与监测，2014，11（4）：247-249.
[4] Lerch M，Mainetti C，Terziroli Beretta-Piccoli B，et al. Current perspectives on stevens-johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis [J]. Clin Rev Allergy Immunol，2018，54（1）：147-176.
[5] 余晓玲，晋红中 . 中毒性表皮坏死松解型药疹 [J]. 中国医学文摘 - 皮肤科学，2016，33（6）：693-699.
[6] White KD，Abe R，Ardern-Jones M，et al. SJS/TEN 2017：Building multidisciplinary networks to drive science and translation [J]. J Allergy Clin Immunol Pract，2018，6（1）：38-69.
[7] 付萌 . 重症大疱性药疹临床进展 [J]. 皮肤病与性病，2018，40（5）：655-657.
[8] Poizeau F，Gaudin O，Le Cleach L，et al. Cyclosporine for epidermal necrolysis：Absence of beneficial effect in a retrospective cohort of 174 patients-exposed/unexposed and propensity score-matched analyses [J]. J Invest Dermatol，2018，138（6）：1293-1300.
[9] Saw S，Lee HY，Ng QS. Pembrolizumab-induced Stevens-Johnson syndrome in non-melanoma patients [J]. Eur J Cancer，2017，81：237-239.
[10] Wang CW，Yang LY，Chen CB，et al. The Taiwan Severe Cutaneous Adverse Reaction（TSCAR）Consortium. Randomized，controlled trial of TNF-α antagonist in CTL-mediated severe cutaneous adverse reactions [J]. J Clin Invest，2018，128（3）：985-996.
[11] Vivar KL，Deschaine M，Messina J，et al. Epidermal programmed cell death-ligand 1 expression in TEN associated with nivolumab therapy [J]. J Cutan Pathol，2017，44（4）：381-384.
[12] Goldinger SM，Stieger P，Meier B，et al. Cytotoxic cutaneous adverse drug reactions during anti-PD-1 therapy [J]. Clin Cancer Res，2016，22（16）：4023-4029.
[13] Choi J，Anderson R，Blidner A，et al. Multinational Association of Supportive Care in Cancer（MASCC）2020 clinical practice recommendations for the management of severe dermatological toxicities from checkpoint inhibitors [J]. Support Care Cancer，2020，28（12）：6119-6128.

（收稿日期：2020-12-02；修回日期：2021-02-01）

1 例阿昔莫司诱发的 G-6-PD 缺乏患者发生急性溶血性贫血的分析

钟延峰[1]，王晓珍[2]，郭春钰[3*]（1. 赣州市皮肤病医院，江西 赣州 341000；2. 会昌县人民医院，江西 赣州 342600；3. 赣南医学院第一附属医院，江西 赣州 341000）

关键词：阿昔莫司；急性溶血性贫血；G-6-PD 酶缺乏；不良反应
中图分类号：R969.3 **文献标识码**：A **文章编号**：1672-2981(2021)08-1754-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2021.08.050

1 病例资料

患者，男，29 岁，身高 180 cm，体质量 85 kg，BMI 29.07 kg·m^{-2}。1 个月前曾于本院行包皮手术，术后创面恢复不佳，体检发现血糖异常，具体不详，未进行干预。为求进一步诊治前来本院门诊就诊，复查空腹血糖 16.92 mmol·L^{-1}↑，餐后 2 h 血糖 21.39 mmol·L^{-1}↑；三酰甘油（TG）12.65 mmol·L^{-1}↑，胆固醇 7.22 mmol·L^{-1}↑，极低密度脂蛋白 3.12 mmol·L^{-1}↑；尿葡萄糖 4＋；糖化血红蛋白 10.5%↑。门诊诊断为 2 型糖尿病、高脂血症，遂收入内分泌科。患者近一月来多尿、多饮、多食，体质量减轻 8 kg 左右。既往体健，否认糖尿病等慢性病史，否认肝炎等传染病史，否认药物过敏史、食物过敏史。入院后给予皮下持续泵入门冬胰岛素注射液，初始剂量：基础量 14 u、早中晚各 7 u，并同时口服吡格列酮二甲双胍片 15 mg/500 mg po bid 控制血糖，阿昔莫司胶囊 0.25 g po tid 降脂治疗。入院时血分析及肝功能结果示：白细胞 5.15×10^{9}·L^{-1}，红细胞 6.41×10^{12}·L^{-1}↑，血红蛋白 151 g·L^{-1}，网织红细胞百分率 2.98%↑，网织红细胞绝对值 191×10^{9}·L^{-1}↑，丙氨酸氨基转移酶（ALT）

作者简介：钟延峰，男，主管药师，主要从事临床药学工作，E-mail：zhongyanfeng12345@126.com *通信作者：郭春钰，女，主任药师，主要从事临床药学工作，E-mail：947760201@qq.com

（速率法）50 U·L^{-1}↑，天门冬氨酸氨基转移酶（AST）（速率法）18 U·L^{-1}，总胆红素（TBil）（酶法）17.9 μmol·L^{-1}，直接胆红素（DBil）5.3 μmol·L^{-1}，间接胆红素（IBil）12.6 μmol·L^{-1}，余无特殊异常。

入院第 1 日，患者末梢血糖监测值：随机 21.9 mmol·L^{-1}↑，午餐后 2 h 20.0 mmol·L^{-1}↑，晚餐后 2 h 17.1 mmol·L^{-1}↑。入院第 2 日空腹血糖 12.7 mmol·L^{-1}↑，调整胰岛素剂量为基础量 16 u，早中晚各 8 u，考虑患者体型肥胖，排除甲状腺疾病和胰腺炎病史及家族史，加用利拉鲁肽注射液 0.6 mg ih qd，每日 21：00 注射。第 4 日患者血糖较前平稳，但仍未达标，增加利拉鲁肽注射液剂量到 1.2 mg ih qd。第 8 日，患者出现眼巩膜黄染、皮肤发黄，尿液呈浓茶色。临床考虑药物导致此症状的可能性较大，立即停用相关药物（吡格列酮二甲双胍片、利拉鲁肽注射液及阿昔莫司胶囊），并给予水飞蓟宾胶囊 20 mg po tid，碳酸氢钠注射液 125 mL ivd bid，并抽血急查肝功能，急查的肝功能提示：ALT 58 U·L^{-1}↑，AST 30 U·L^{-1}，TBil 96.7 μmol·L^{-1}↑，DBil 17.6 μmol·L^{-1}↑，IBil 79.1 μmol·L^{-1}↑，对比入院时肝功能指标正常，可排除肝病病因，继续完善相关检查，血分析：白细胞 5.04×10^{9}·L^{-1}，红细胞 4.81×10^{12}·L^{-1}，血红蛋白 116 g·L^{-1}↓，平均血红蛋白量 24.4 pg↓，网织红细胞百分率 4.31%↑，网织红细胞绝对值 207.3×10^{9}·L^{-1}↑；尿液分析＋，尿沉渣定量：酮体＋＋，尿胆原＋＋，葡萄糖＋，蛋白质＋－，考虑为急性溶血导致。完善贫血三项查铁蛋白 937 ng·mL^{-1}↑，查葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶（G-6-PD） 为 179 U·L^{-1}↓，COOMB’S 试验：抗人 IgG（－），抗人 C' 3（－），排除免疫性因素。第 10 日患者巩膜、皮肤黄染情况好转，患者此次急性溶血不良反应考虑很可能是阿昔莫司导致，于是加用利拉鲁肽注射液 0.6 mg ih qd、吡格列酮二甲双胍片 15 mg/500 mg po bid。第 13 日复查肝功能：ALT 48 U·L^{-1}↑，AST 25 U·L^{-1}，TBil 27.4 μmol·L^{-1}↑，DBil 9.4 μmol·L^{-1}↑；白细胞 5.43×10^{9}·L^{-1}；红细胞 4.99×10^{12}·L^{-1}；血红蛋白 122 g·L^{-1}；网织红细胞绝对值 267.00×10^{9}·L^{-1}↑；网织红细胞百分率 5.35%↑，第 14 日患者空腹血糖 6.7 mmol·L^{-1}、早餐后 2 h 血糖 8.1 mmol·L^{-1}，血糖控制平稳，黄疸消退，溶血症状消失，患者好转出院。

2 讨论

2.1 关联性评价

患者青年，既往无基础性疾病，在服用可疑药物的第 8 日出现巩膜黄染、皮肤发黄、尿呈浓茶色，复查肝功能对比入院时肝功能指标正常，可排除肝病病因，完善相关检查，排除免疫性因素，停用阿昔莫司胶囊并给予对症处理后相关症状明显缓解，且其余药物继续使用，未再发生类似症状，根据诺氏评估量表[1]，患者结果总分为 6 分，如表 1 所示，提示溶血性贫血很可能与阿昔莫司相关。

表 1 诺氏评估量表

相关问题	问题打分值		
	是	否	未知
1. 该 ADR 先前是否有结论性报告	－	－	0
2. 该 ADR 是否是在使用可疑药物后发生的	＋2	－	－
3. 该 ADR 是否在停药或应用抗剂后得到缓解	＋1	－	－
4. 该 ADR 是否在再次使用可药物后重复出现	－	－	0
5. 是否存在其他原因能单独引起该 ADR	－	＋2	－
6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现	－	－	0
7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度	－	－	0
8. 该 ADR 是否随剂量增加而加重，或随剂量减少而缓解	－	－	0
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应	－	－	0
10. 是否存在任何客观证据证实该反应	＋1	－	－
总分		6	

2.2 阿昔莫司的不良反应情况

阿昔莫司为新型烟酸衍生物，可使血浆 TG 明显降低，HDL2 升高，除能用于Ⅱb、Ⅲ和Ⅳ型高脂血症外，也适用于高 Lp（a）血症及 2 型糖尿病伴有高脂血症患者[2]。阿昔莫司由于结构的改变，其不良反应较烟酸明显降低[3-4]。药品说明书记载的不良反应主要有皮肤血管扩张、胃肠道反应及头痛和局部或全身过敏反应（如皮疹、荨麻疹、斑丘疹、唇水肿、哮喘样呼吸困难、低血压等），同时服用烟酸与他汀类药物，肌肉毒性的风险将增加。通过搜索相关数据信息，阿昔莫司有致肝损害的不良反应[5-7]，未见有急性溶血性贫血的相关不良反应报道。

2.3 阿昔莫司导致急性溶血性贫血的发生机制

此次诱发的急性溶血性贫血与患者自身 G-6-PD 缺乏相关，患者 3 个月后来院复查，血糖、血脂控制可，其中 G-6-PD 值 115 U·L^{-1}，进一步明确 G-6-PD 缺乏。G-6-PD 是磷酸戊糖途径一步反应的关键酶，其代谢产生的还原性辅酶Ⅱ（NADPH）是重要的辅酶，可将氧化型谷胱甘肽

（GSSG）还原成还原型谷胱甘肽（GSH），GSH 是红细胞中重要的抗氧化物质，可保护红细胞免受氧化物质的侵害[8]。G-6-PD 缺乏导致机体抗氧化应激能力下降从而促使绝大多数 G-6-PD 缺乏，患者平时无临床表现，但在一定条件下，比如食过蚕豆或某些氧化性药物时（如伯氨喹啉型药物、磺胺药、解热镇痛药等），或合并感染时，或糖尿病酮症酸中毒时，都能诱发溶血，出现贫血、黄疸、血红蛋白尿症状[9]。据文献报道，G-6-PD 缺乏的糖尿病患者在服用磺酰脲类降糖药（如格列美脲、格列苯脲等）后会发生溶血[10]。

查阅相关文献[10-12]，阿昔莫司的结构中含有氮氧键，有一定的氧化性，故存在诱发患者发生急性溶血性贫血的可能。该患者体型肥胖，阿昔莫司胶囊的用量为 0.25 g po tid，为正常的用药剂量。目前仅有高脂血症患者口服阿昔莫司治疗后出现了皮肤、巩膜黄染的报道[7, 13]，未见诱发急性溶血的不良反应报道，也未见合并其他基础疾病患者使用阿昔莫司后出现急性溶血性贫血的情况，故在临床应用阿昔莫司时应关注该类不良反应。

2.4 ADR 的预防和监护

当前，国内外尚未报道阿昔莫司引发的急性溶血不良反应，临床工作中不易重视，一旦发生急性溶血，须立即停用可疑药物并积极的给予对症处理，建议同时检测 G-6-PD 活性。通过此篇很可能为阿昔莫司诱发的急性溶血性贫血不良反应的病例分析报告，提醒医师在选用阿昔莫司降脂治疗前应给予更周密的考量，譬如询问患者是否存在 G-6-PD 缺乏，是否因食用过蚕豆出现过敏等情况，从而避免出现急性溶血药品不良反应。针对明确为 G-6-PD 缺乏的糖尿病患者，应密切监测血糖、血脂、血分析、尿分析等，严格控制血糖，同时避免氧化剂的摄入，积极控制感染，以减少急性溶血不良事件的发生。

参考文献

[1] 陈静静，钱佩佩，曹凯，等 . 我国药品不良反应关联性评价方法与诺氏评估量表法的对比与分析 [J]. 中国药事，2020，34（8）：988-992.

[2] 杨宝冯，苏定冯 . 药理学 [M]. 8 版 . 北京：人民卫生出版社，2013：249.

[3] Sirtori CR，Gianfranceschi G，Sirtori M，et al. Reduced triglyceridemia and increased high density lipoprotein cholesterol levels after treatment with acipimox，a new inhibitor of lipolysis [J]. Atherosclerosis，1981，38（3-4）：267-271.

[4] 徐文炜，熊玉清 . 国产和进口阿昔莫司人体药代动力学及生物等效性研究 [J]. 中国临床药理学杂志，2001，17（1）：64-67.

[5] Lee WM. Assessing causality in drug-induced liver injury [J]. J Hepatol，2000，33（6）：1003-1005.

[6] 张晓春，陈登明 . 阿昔莫司的不常见不良反应 [J]. 中国当代医药，2009，16（12）：188.

[7] Wang YP，Shi B，Chen YX，et al. Drug-induced liver disease：An-8-year study of patients from one gastroenterological department [J]. J Dig Dis，2009，10（3）：195-200.

[8] 缪丽燕，马满玲，吴德沛，等 . 临床药物治疗学血液系统疾病 [M]. 北京：人民卫生出版社，2017：55-58.

[9] 刘皋林，吕迁洲，张健 . 药源性疾病 [M]. 北京：人民卫生出版社，2019：143-147.

[10] 齐翠娟，平凡，肖新华 . 葡萄糖 6 磷酸酶缺乏症合并糖尿病患者的临床及分子遗传学研究 [J]. 中国糖尿病杂志，2016，24（12）：1116-1119.

[11] 赵志全 . 阿昔莫司的制备方法：中国，1651417 [P]. 2004-12-15.

[12] 张贵民，肖月华，王洪刚，等 . 阿昔莫司的合成 [J]. 中国医药工业杂志，2009，40（10）：724-725.

[13] 骆雷鸣，叶平，朱启伟，等 . 辛伐他汀联合阿昔莫司治疗混合型高脂血症的疗效与安全性研究 [J]. 药物不良反应杂志，2007，9（3）：158-161.

（收稿日期：2020-12-25；修回日期：2021-03-04）

致 谢

中南大学湘雅二医院
江苏恒瑞医药股份有限公司
长沙市中心医院

副理事长及单位

曾春辉　湖南天士力民生药业有限公司总经理
黎鸠鸠　湖南一格制药有限公司总经理

常务理事及单位

刘若辉　湖南千金湘江药业股份有限公司总经理
欧阳荣　湖南中医药大学第一附属医院药学部主任
雷艳青　湖南省脑科医院药学部主任
周玉生　南华大学附属第二医院副院长
李　专　长沙市第三医院副院长
田其学　湖南省中医药研究院附属医院药剂科主任
袁群莉　华润湖南瑞格医药有限公司副总经理
阳　波　南华大学附属第一医院药学部主任

理事及单位

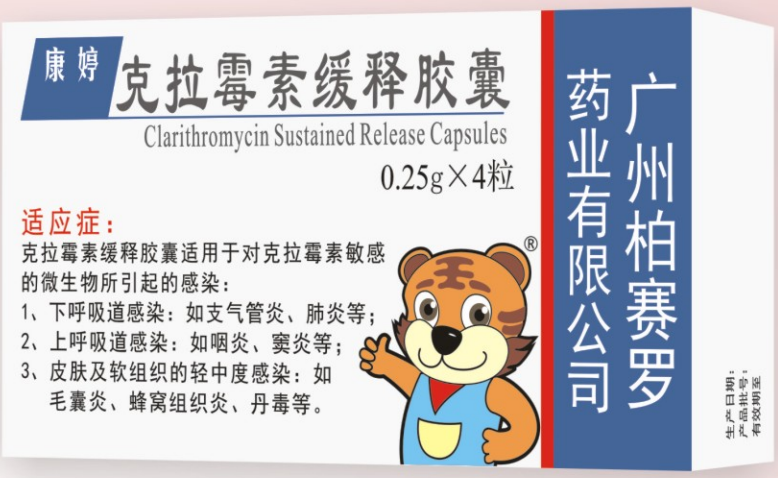
周运奇　湖南五洲通药业有限责任公司董事长
杨贞皓　湖南省湘中制药有限公司总经理
刘　湘　湘潭市中心医院药学部
曾　强　岳阳市一人民医院党委书记
吴吉明　常德市第一人民医院副院长
谭东辉　湘南学院附属医院院长
肖政辉　湖南省儿童医院副院长
李　勇　南华大学附属南华医院临床药学科主任
林承雄　湖南怀仁大健康产业发展有限公司董事长
何　毅　株洲市中心医院副院长
彭　宏　新邵县人民医院院长

诚招
代理商

广州柏赛罗药业有限公司克拉霉素缓释胶囊，布洛芬缓释胶囊，多西环素胶囊招商，各位朋友成功介绍一个经销商代理我公司的药品，邀请到广州参加学术会议，如果成功介绍省级经销商，邀请到美国参加学术会议。

全国中标价：

克拉霉素缓释胶囊4粒26元、8粒52元；
盐酸多西环素胶囊12粒23元；
布洛芬缓释胶囊20粒4元。



克拉霉素缓释胶囊

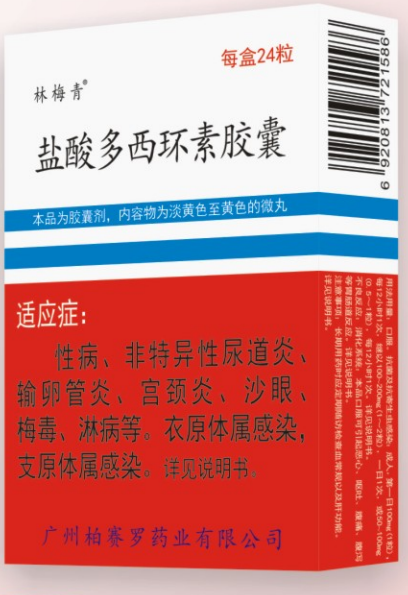
规格：250mg×4粒、8粒
批准文号：国药准字H20051661



柏赛罗® 布洛芬缓释胶囊

规格：0.3g×10粒、20粒
批准文号：国药准字H20043148

批发价3.65元/盒



林梅青盐酸多西环素胶囊（微丸）

适应症：支原体属感染。衣原体属感染，包括性病、淋巴肉牙肿、非特异性尿道炎、输卵管炎、宫颈炎及沙眼、淋病、梅毒。立克次体病，如流行性斑疹伤寒、地方性斑疹伤寒、洛矶山热、恙虫病和 Q 热。

规格：100mg×12粒、20粒、24粒
批准文号：国药准字H20013375

清远贝氏纳米药业有限公司
地址：广东清远高新区6号区厂房
联系电话：0763-3218029
13112298138

广州柏赛罗药业有限公司
地址：广州市花都区新华镇东秀一横路9号
联系电话：020-86868704

粤药广审（文）第241121-01452号
★ 本广告仅供医学药学等专业人士阅读 ★
● 禁忌及不良反应见药品说明书

国内统一刊号：CN43-1408/R　广告经营许可证：4300004000764　邮发代号：42-290　定价：20.00元/册