◆ 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
◆ 科技期刊世界影响力指数收录期刊

ISSN 1672-2981
CN 43-1408/R

中南药学

ZHONGNAN YAOXUE

2022年4月 第20卷 第4期
Volume 20 Number 4 April 2022

CENTRAL
SOUTH
PHARMACY

◆ 阿戈美拉汀自微乳给药系统的制备和体外质量评价
◆ 狭叶重楼中一个新的环胆甾烷醇型甾体皂苷
◆ 克服顺铂耐药性的新型Pt(Ⅳ)前药研究进展
◆ 降脂药理学有什么新进展？整合基础研究和临床研究以改善患者治疗结果

4
2022

ISSN 1672-2981
04
9 771672 298224

中南药学 第二十卷 第四期 第719~964页 二〇二二年四月

中国科技核心期刊

（中国科技论文统计源期刊）

收录证书

CERTIFICATE OF SOURCE JOURNAL
FOR CHINESE SCIENTIFIC AND TECHNICAL PAPERS AND CITATIONS

中南药学

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐，贵刊被收录为“中国科技核心期刊”（中国科技论文统计源期刊）。

特颁发此证书。

中国科学技术信息研究所
Institute of Scientific and Technical Information of China
北京复兴路 15 号 100038　　www.istic.ac.cn

2021年12月

证书编号：2020-G599-2463
有效期至：2022年12月

中南药学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊　2003 年 4 月创刊　第 20 卷　第 4 期（总第 195 期）　2022 年 4 月 20 日出版

顾问

周宏灏

主编

李焕德

社长

张毕奎

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 25.00 元，全年 300.00 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

email：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

2022 年版权归《中南药学》编辑部所有

目　次

研究论文

（719）阿戈美拉汀自微乳给药系统的制备和体外质量评价 ……黄燕飞，张强，张雪，等

（727）淫羊藿富集部位微乳的制备及质量评价 ……兰海，刘欣妍，郭子右，等

（736）狭叶重楼中一个新的环胆甾烷醇型甾体皂苷 ……胡晋铭，汤海峰，陆云阳，等

（744）具柄重楼的甾体皂苷类成分研究 ……田韵远，陆云阳，刘杨，等

（751）巴西海木提取物抗生殖系统氧化损伤活性研究 ……常馨月，米晓，董明然，等

（759）基于蛋白互作和关键作用靶点的网络药理学研究白花败酱草治疗溃疡性结肠炎的作用机制及实验验证 ……李晓晨，王帅，李天娇，等

（766）姜黄素对 HepG2 裸鼠移植瘤的抑制作用及对瘤体组织中 NLRP3、IL-1β 表达的影响 ……左清平，黄娟娟，张顺芝，等

（772）罗欧咳祖帕复方的血清药物化学研究 ……陈悦，闫俊林，刘佳倪，等

（779）基于普鲁士蓝纳米花 / 电化学还原石墨烯复合修饰玻碳电极伏安检测血清中多巴胺的浓度 ……夏用恢，李广利，胡长平

（785）青紫颗粒对 Arthus 反应动物模型皮肤损害的保护作用及机制研究 ……丰晨然，赵一颖，苗丰，等

（793）响应面法优化改性明胶软胶囊囊壳制备工艺 ……付慧敏，乔子桐，张纯刚，等

（799）黄连 - 干姜对糖尿病大鼠脑脊液中主要生物标志物动态变化干预作用的研究 ……陈旭，周游，刘琳，等

（805）阿魏酸通过调节 GSK-3β 减轻阿尔茨海默样变化 ……许英，陈玲，张兰，等

（812）注射用复合辅酶渗透压摩尔浓度考察与肌肉刺激实验研究 ……吴森，吕晓君，韩玮，等

《中南药学》杂志第五届编委会

主编

李焕德

副主编（按姓氏笔画排列）

王　玉　向大雄　刘　韶　刘芳群
孙国祥　孙铁民　苏薇薇　张毕奎
范国荣　赵志刚　原永芳　潘卫三

编委（按姓氏笔画排列）

丁劲松　于海洋　马恩龙　王　玉
王　珊　王立辉　王永军　王淑梅
文晓柯　方平飞　尹　桃　邓银华
左美玲　左笑丛　卢海儒　史志华
冯　星　边　原　吕永宁　朱运贵
向大雄　刘　韶　刘芳群　刘茂柏
刘建平　刘高峰　刘塔斯　刘雁鸣
汤海峰　孙　进　孙平华　孙国祥
孙铁民　劳海燕　苏薇薇　李　昕
李　勇　李文龙　李文莉　李顺祥
李晓宇　李健和　李湘平　杨志平
杨星钢　杨献文　肖　雪　肖贵南
何江江　何鸽飞　余自成　谷福根
张　俐　张　峻　张毕奎　张洪文
陈　力　陈　琦　陈　碧　陈卫东
陈西敬　陈勇川　武新安　范国荣
金鹏飞　周　权　屈　建　孟宪生
赵立波　赵志刚　姜德建　娄月芬
宫　建　祝德秋　秦红岩　袁　成
袁　易　贾素洁　夏道宗　原永芳
徐　珽　徐　萍　徐必学　高利臣
郭　韧　郭怀忠　郭建军　唐　芳
曹　玲　常福厚　巢志茂　彭文兴
董亚琳　董得时　蒋孟良　傅　强
温金华　谢　诚　谢奕丹　睢大筼
肇丽梅　翟　青　黎　敏　颜　苗
潘卫三　魏高文

（817）基于网络药理学和体外实验探讨复方苦参注射液抗非小细胞肺癌的作用机制研究 …… 颜渊鸳，章波

（823）基于 LC-MS 法分析宁夏贺兰山野生酸枣不同部位化学成分 …… 梁雨璐，李忆红，雷艳，等

（833）基于 UHPLC-Q-Exactive/MS 及多元统计分析识别栀子果实不同部位差异化学成分 …… 李忆红，梁雨璐，张洁，等

（841）小儿柴胡退热栓的解热作用研究 …… 王莉博，刘泽干，雷攀，等

（845）黄藤素的生物药剂学分类系统分类属性研究 …… 温艳艳，马一丹，黄山，等

（850）丹皮酚醇质体凝胶的成型工艺优化及经皮渗透性研究 …… 王睿，郭东艳，翟秉涛，等

（856）黄芪多糖诱导细胞自噬抑制食管癌 EC109 细胞增殖的研究 …… 常明智，张思雨，郝艳娇，等

综述

（863）克服顺铂耐药性的新型 Pt（Ⅳ）前药研究进展 …… 孙蒙琪，陈西敬，赵娣

（871）酵母微胶囊包埋新技术及药效评价的研究进展 …… 贾丽娟，戴智强，高青青，等

（877）药用植物中萜类化合物改善胆汁淤积性肝损伤的作用及机制研究进展 …… 袁若兰，张议文，沈佳妍，等

（888）胃癌干细胞作为胃癌治疗靶点的研究进展 …… 李扬波，董卫国

药物分析与检验

（893）液相色谱 - 质谱法分析磷酸芦可替尼中强制降解后的产物 …… 刘发贵，孙丽霞，李敏，等

（898）基于指纹图谱和多指标成分含量测定的枳壳与枳实药材质量差异性研究 …… 童培珍，李国卫，何嘉莹，等

（905）醋酸钠林格注射液与包材中抗氧剂的相容性研究 …… 邹宇，刘杨，刘亚威，等

（910）山豆根药材 UPLC-UV 指纹图谱及 3 种成分含量测定研究 …… 南俊伶，王超众，闫广利，等

（915）UPLC-PDA 测定胆木中异长春花苷内酰胺含量 …… 侯倩煜，李飞宇，陈燕艳，等

（919）化妆品中 10 种 α- 羟基酸的高效液相色谱检测及质谱确证 …… 郑梅，贾昌平

青年编委（按姓氏笔画排列）

丁　骁　于世慧　王　刚　王　洪
王春江　方伟进　孔维军　朱志红
刘　宏　刘丽华　刘宏飞　刘剑敏
刘梦扬　孙　逸　孙万阳　孙丙军
孙晓慧　苏　丹　杜恩明　李　娟
李语玲　李新刚　肖朝江　吴成军
邱玉玲　何　艳　邹振兴　张　凭
张妙红　张纯刚　张程亮　陈国宁
陈富超　罗　聪　金　锐　周志旭
赵　亮　赵　娣　胡　楠　姜　雷
贾王平　徐　硕　徐文峰　郭海彪
黄　芳　梅升辉　龚力民　梁光平
寇龙发　蒋跃平　蒋德旗　韩立峰
韩晓芳　韩晓鹏　程汝滨　舒　畅
曾贵荣　蒙光义　廖德华　潘　昊
魏　博

编辑：邬志娟　彭金飞　李　科
陆窈窈

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。

焦点评论

（924）降脂药理学有什么新进展？整合基础研究和临床研究以改善患者治疗结果 ……Peter E. Penson

医院药学

（926）铬用于 2 型糖尿病辅助治疗的有效性和安全性评价 …… 孙洁雨，王彪，徐敏，等

（934）老年共病多重用药抗胆碱能负担与营养不良发生的影响因素分析 …… 徐梦琪，秦侃

（939）处方前置审核在辅助药临床合理运用中的作用 …… 申青，韩勇，周逸梦，等

（945）受试者用药依从性影响因素及药学干预效果分析 …… 钟绍金，陈晓亮，邱英麒，等

药品不良反应

（949）755 例质子泵抑制剂致新的和严重的药品不良反应报告分析 …… 周秀丽，刘宝生，宫凯凯，等

（955）司库奇尤单抗不良反应文献分析 …… 冀召帅，毛乾泰，艾超

（960）硝苯地平致内镜下结肠息肉术后多发出血 3 例 …… 黄春华，张巍巍，赵新闻

（963）鱼精蛋白致过敏性休克 1 例 …… 刘欣，胡益杏，鲁虹

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*246*zh*P*25.0*40*2022-4

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 20, Number 4 April 20 2022

Consultant
ZHOU Hong-hao

Editor-in-Chief
LI Huan-de

Chief of Editorial Office
ZHANG Bi-kui

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) 82258487/84895602

Fax
(0731) 82258487

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

Email
znyxzz2003@vip.163.com

Published by
Central South Pharmacy Publishing House

Advertisement Publishing Certification
4300004000764

CONTENTS IN BRIEF

(719) Preparation and quality evaluation of self-microemulsifying drug delivery systems for agomelatine
····· *HUANG Yan-fei, ZHANG Qiang, ZHANG Xue, et al*

(727) Preparation and quality evaluation of microemulsion of epimedii folium enrichment fraction
····· *LAN Hai, LIU Xin-yan, GUO Zi-you, et al*

(736) A new cyclocholestanol-type steroidal saponin from *Paris polyphylla* var. *stenophylla*
····· *HU Jin-ming, TANG Hai-feng, LU Yun-yang, et al*

(744) Steroidal saponins from *Paris fargesii* var. *petiolate*
····· *TIAN Yun-yuan, LU Yun-yang, LIU Yang, et al*

(751) Antioxidant activity of *Trichilia catigua* A. Juss. against damage in the reproductive system
····· *CHANG Xin-yue, MI Xiao, DONG Ming-ran, et al*

(759) Mechanism and experimental validation of *Patrinia villosa* Juss. for ulcerative colitis by network pharmacology based on protein interactions and key action targets
····· *LI Xiao-chen, WANG Shuai, LI Tian-jiao, et al*

(766) Inhibitory effect of curcumin on transplanted tumor of HepG2 cells in nude mice and on the expression of NLRP3 and IL-1*β* in tumor tissue
····· *ZUO Qing-ping, HUANG Juan-juan, ZHANG Shun-zhi, et al*

(772) Serum pharmacochemistry of Loki zupa compound
····· *CHEN Yue, YAN Jun-lin, LIU Jia-ni, et al*

(779) Voltammetric detection of dopamine in the serum with Prussian blue nanoflower/electrochemically reduced graphene oxide modified glassy carbon electrode
····· *XIA Yong-hui, LI Guang-li, HU Chang-ping*

(785) Protect effect of Qingzi granules on skin damage in animal models with Arthus response and related mechanism of action
····· *FENG Chen-ran, ZHAO Yi-ying, MIAO Feng, et al*

(793) Optimization of preparation of modified gelatin soft capsule shell by response surface methodology
····· *FU Hui-min, QIAO Zi-tong, ZHANG Chun-gang, et al*

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
￥ 25.00 an issue
￥ 300.00 a year

CSSN
ISSN 1672-2981
CN43-1408/R

Copyright 2022 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.

(799) Effect of coptis-dried ginger on the dynamic changes of main biomarkers in the cerebrospinal fluid of diabetic rats ····· *CHEN Xu, ZHOU You, LIU Lin, et al*

(805) Ferulic acid reduces Alzheimer-like changes by modulating GSK-3*β* pathway ····· *XU Ying, CHEN Ling, ZHANG Lan, et al*

(812) Osmolarity and muscle stimulation test of coenzyme complex for injection ····· *WU Sen, LYU Xiao-jun, HAN Wei, et al*

(817) Mechanism of compound Kushen injection against non-small cell lung cancer based on network pharmacology and in vitro experiment ····· *YAN Yuan-yuan, ZHANG Bo*

(823) Chemical constituents from different parts of wild sour jujube at Helan Mountains in Ningxia based on LC-MS ····· *LIANG Yu-lu, LI Yi-hong, LEI Yan, et al*

(833) Identification of chemical components in different parts of Gardeniae fructus based on UHPLC-Q-Exactive/MS and multivariate statistical analysis ····· *LI Yi-hong, LIANG Yu-lu, ZHANG Jie, et al*

(841) Antipyretic effect of *Xiaoer Ch*aihu Tuire suppository ····· *WANG Li-bo, LIU Ze-gan, LEI Pan, et al*

(845) BCS classification attributes of palmatine ····· *WEN Yan-yan, MA Yi-dan, HUANG Shan, et al*

(850) Optimization of molding process and transdermal permeability of gel loaded with ethosomes containing paeonol ····· *WANG Rui, Guo Dong-yan, ZHAI Bing-tao, et al*

(856) Astragalus polysaccharide inhibits the proliferation of esophageal cancer EC109 cells by inducing cell autophagy ····· *CHANG Ming-zhi, ZHANG Si-yu, HAO Yan-jiao, et al*

(863) Research progress in new Pt (Ⅳ) prodrugs to overcome cisplatin resistance ····· *SUN Meng-qi, CHEN Xi-jing, ZHAO Di*

(871) Research progress of embedding technology, therapeutic efficacy in yeast microencapsulation ····· *JIA Li-juan, DAI Zhi-qiang, GAO Qing-qing, et al*

(877) Research progress in the effect and mechanism of medicinal plants derived terpenoids on cholestatic liver injury ····· *YUAN Ruo-lan, ZHANG Yi-wen, SHEN Jia-yan, et al*

(888) Research progress in gastric cancer stem cells as therapeutic targets of gastric cancer ····· *LI Yang-bo, DONG Wei-guo*

(893) Identification of forced degradation compounds in ruxolitinib phosphate by liquid chromatography-mass spectrometry ····· *LIU Fa-gui, SUN Li-xia, LI Min, et al*

(898) Quality difference in *Aurantii Fructus* and *Aurantii Fructus Immatutus* based on fingerprint analysis and multi-index content determination ····· *TONG Pei-zhen, LI Guo-wei, HE Jia-ying, et al*

(905) **Compatibility of sodium acetate ringer injection with antioxidants in packing materials** ····· *ZOU Yu, LIU Yang, LIU Ya-wei, et al*

(910) **UPLC-UV fingerprint of Sophora Tonkinensis and content determination of three components** ····· *NAN Jun-ling, WANG Chao-zhong, YAN Guang-li, et al*

(915) **Content determination of isovincoside lactone in *Nauclea officinalis* Pierrc ex Pitard by UPLC-PDA** ····· *HOU Qian-yu, LI Fei-yu, CHEN Yan-yan, et al*

(919) **Determination and verification of 10 α-hydroxy acids in cosmetics by high performance liquid chromatography and mass spectrometry** ····· *ZHENG Mei, JIA Chang-ping*

(926) **Systematic review of the efficacy and safety of chromium for adjuvant treatment in type 2 diabetes mellitus** ····· *SUN Jie-yu, WANG Biao, XU Min, et al*

(935) **Anticholinergic burden in the elderly with comorbidity and multiple medication and influencing factors for malnutrition** ····· *XU Meng-qi, QIN Kan*

(939) **Pre-prescription review system in the clinicial rational use of adjuvant drugs** ····· *SHEN Qing, HAN Yong, ZHOU Yi-meng, et al*

(949) **755 new and serious adverse drug reaction reports of proton pump inhibitors** ····· *ZHOU Xiu-li, LIU Bao-sheng, GONG Kai-kai, et al*

(955) **Literature analysis of adverse drug reactions induced by secukinumab** ····· *JI Zhao-shuai, MAO Qian-tai, AI Chao*

研究论文

阿戈美拉汀自微乳给药系统的制备和体外质量评价

黄燕飞[1, 2]，张强[1, 2]，张雪[2, 3]，程泽能[1, 2, 3*]（1. 徐州医科大学药学院，江苏　徐州　221000；2. 湖南慧泽生物医药科技有限公司，长沙　410000；3. 中南大学湘雅药学院，长沙　410000）

摘要：目的　使用星点设计 - 效应面法制备阿戈美拉汀自微乳并对其进行质量评价。**方法**　通过考察阿戈美拉汀在不同辅料中的溶解度、油相与表面活性剂混合的相容性，绘制三元相图，确定处方所用辅料；运用星点设计 - 效应面优化法确定最终处方中辅料的比例。通过考察阿戈美拉汀自微乳的粒径稳定性（不同介质、不同稀释倍数、不同时间）、溶出试验，以及在不同影响因素 [高温 60 ℃、光照（4500±500）lx、避光 25 ℃] 下的含量变化，进行体外质量评价。**结果**　阿戈美拉汀自微乳处方：油相 Peceol 50 mg，Labrafil M1944CS 50 mg，表面活性剂 RH40 320 mg，助表面活性剂 Transcutol HP 80 mg，阿戈美拉汀 25 mg。分散得到粒径为（17.62±0.39）nm 的微乳，以不同稀释倍数（1∶10、1∶50、1∶100、1∶200）和不同放置时间（0、3、6 h）在 pH 1.0、pH 4.5、pH 6.8、水四种介质中考察，粒径均稳定，5 min 溶出大于 85%，且该制剂在高温、强光条件下含量未发生变化。**结论**　本文研制出的阿戈美拉汀自微乳较稳定，有利于进一步开发。

关键词：阿戈美拉汀；自微乳给药系统；三元相图；星点设计 - 效应面法；溶出
中图分类号：R944.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0719-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.001

Preparation and quality evaluation of self-microemulsifying drug delivery systems for agomelatine

HUANG Yan-fei[1, 2], ZHANG Qiang[1, 2], ZHANG Xue[2, 3], CHENG Ze-neng[1, 2, 3*] (1. *School of Pharmacy*, *Xuzhou Medical University*, *Xuzhou Jiangsu* 221000; 2. *Hunan Huize Bio-pharmaceutical Co.*, *Ltd.*, *Changsha* 410000; 3. *Xiangya School of Pharmaceutical Sciences*, *Central South University*, *Changsha* 410000)

Abstract: Objective To prepare agomelatine self-microemulsion by central composite design-response surface methodology and evaluate its quality. **Methods** The solubility of agomelatine in different excipients, compatibility of oil phase and emulsifier mixture were examined with ternary phase diagram to determine the excipients. The proportion of excipients in the final formulation was settled by central composite design-response surface methodology. The in vitro stability of droplet size (in different media, at different dilution ratios and different time), the dissolution test and the content changes under different influence factors [including 60 ℃ , (4500±500) lx light, 25 ℃ dark] were determined to evaluate the quality of agomelatine self-microemulsion. **Results** The optimized formulation was composed of Peceol 50 mg, Labrafil M1944CS 50 mg, RH40 320 mg, Transcutol HP 80 mg and agomelatine 25 mg. The microemulsions with particle size of (17.62±0.39) nm were obtained after dispersion. The microemulsions were constantly stable at pH 1.0, pH 4.5, pH 6.8 and water at different dilution ratios (1∶10, 1∶50, 1∶100 and 1∶200) and at different time (0, 3, and 6 h). The dissolution was more than 85% at 5 min. The content of the preparation did not change under high temperature and strong light. **Conclusion** Stable agomelatine self-microemulsions are prepared, which is beneficial to further

作者简介：黄燕飞，女，硕士研究生，主要从事新制剂研究，email：huangyanfei0iris@icloud.com　*通信作者：程泽能，男，教授，博士，主要从事生物药剂学和药物动力学研究，email：chengzn@csu.edu.cn

development.

Key words: agomelatine; self-microemulsifying drug delivery system; ternary phase diagram; central composite design-response surface methodology; dissolution

近年来，抑郁症的患病率大幅增加[1]，阿戈美拉汀通过激活褪黑素受体（melatonin receptor，MT_1 和 MT_2）以及拮抗 5-羟色胺受体（$5\text{-}HT_{2c}$），在发挥抗抑郁疗效的同时兼具调节生物节律的作用，且不良反应小，现已成为抗抑郁的一线用药[2]。但阿戈美拉汀是生物药剂学分类（biopharmaceutics classification system，BCS）Ⅱ类药物（低溶解、高渗透），其首过效应大，口服绝对生物利用度低于 5%，增大剂量会增加肝损伤的风险[3]。因此，急需找寻一种能提高阿戈美拉汀生物利用度、降低首过作用的制剂，从而可以通过降低给药剂量，达到减轻肝损伤的目的。

自微乳给药系统（self-microemulsifying drug delivery system，SMEDDS）是由油相、乳化剂（表面活性剂）和助乳化剂（助表面活性剂）组成的不含水的固体或液体制剂，口服后遇体液自发形成 100 nm 以下的 *O/W* 型微乳。SMEDDS 不仅可以增加水难溶性药物的溶解度，而且可以通过增加药物淋巴途径的吸收[4-6]，降低首过效应。目前市场上已有的自微乳产品包括诺华制药的环孢素 A（Neoral），艾伯维公司的利托那韦（Norvir），瑞典罗氏的沙奎那韦（Fortovase），葛兰素史克的安瑞那韦（Agenerase）等[7]，这些均表明自微乳具有良好的市场空间。目前暂未有将阿戈美拉汀制成自微乳的相关文献，且与已发表的将阿戈美拉汀超声乳化制成的纳米乳相比[8]，自微乳无需借助超声等外力作用，更有利于工业放大生产，且自微乳中不存在水，可以存储更长时间。本研究以星点设计 - 效应面法优化自微乳[9-10]，期望获得受外界环境影响较小，体外溶出快且粒径稳定的阿戈美拉汀自微乳，为工业化开发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

BSA224S-CN 型电子分析天平（德国赛多利斯）；Agilent 1200 高效液相色谱仪，包括四元泵，VWD 型紫外检测器（安捷伦）；FE28 型 pH 计（瑞士梅特勒）；FADT-800RC 型自动溶出仪（上海富科思）；THZ-92A 型气浴恒温振荡器（上海博迅医疗生物仪器）；DHG-9140A 型电热鼓风干燥箱（上海一恒科学仪器）；LS-4000UVL 型光照稳定性试验箱（北京天星科仪）；SHH-500SD-2T 型药品稳定性试验箱（重庆永生）；纳米粒度电位仪（英国马尔文）；透射电子显微镜（日本日立）。

1.2 试药

阿戈美拉汀（原料药，北京海步医药，批号：1712004，纯度：99%）；阿戈美拉汀自微乳胶囊（自制样品）；0 号胶囊（苏州胶囊）；单油酸甘油酯（Peceol）、中链甘油三酯（Labrafac lipophile WL1349）、油酰聚氧乙烯甘油酯（Labrafil M1944CS，简称 1944cs）、辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯（Labrasol）、二乙二醇单乙醚（Transcutol HP）均为法国 Gattefosse 赠送产品；辛酸癸酸单双甘油酯（Capmul MCM）（美国 Abitec）、聚氧乙烯氢化 40 蓖麻油（RH40）（德国 BASF）；Tween 80（山东瑞生药用辅料）；PEG400（江西益普生药业）；丙二醇（湖北葛店人福）；乙醇、甲醇、乙腈（HPLC 级，美国 ACS）；磷酸二氢钾、磷酸（AR 级，国药集团）。

2 方法与结果

2.1 HPLC-UV 含量测定色谱条件

色谱柱：中谱红 AQ-C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 A∶B（35∶65）（流动相 A：2.27 g 磷酸二氢钾于 1.0 L 水中，磷酸调 pH 至 2.5；流动相 B：甲醇）；检测波长 230 nm；流速 1.0 $mL \cdot min^{-1}$；柱温 50 ℃；进样量 10 μL。

2.2 溶解度筛选

测定阿戈美拉汀在不同油相、表面活性剂、助乳化剂中的溶解度。试验方法：称取 1 g 辅料，置于刻度离心管中，投入过量药物，涡旋使药物充分分散，水浴超声 30 min，空气浴摇床（25 ℃，100 $r \cdot min^{-1}$）平衡 48 h，确保有药物沉淀。4000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 15 min，取上清液测定含量，计算溶解度，结果见表 1。

2.3 相容性试验

根据阿戈美拉汀溶解度结果，选择溶解度较大的辅料，油相（Capmul MCM、Peceol），表面活性剂（Labrasol、RH40、Tween 80），助表面活性剂（Transcutol HP）进行处方相容性考察。将油相和表面活性剂按质量比 1∶1、1∶2、1∶3 充分混合，取 100 μL 加入至 10 mL 的 37 ℃纯化水中，

表 1　药物在不同辅料中的溶解度 (25 ℃，100 r・min^{-1})

Tab 1　Solubility of agomelatine in different adjuncts (25 ℃，100 r・min^{-1})

	辅料	溶解度 /（mg・g^{-1}）
油相	Peceol	48.61
	Labrafac lipophile WL1349	18.85
	Labrafil M1944CS（1944cs）	38.50
	Capmul MCM	87.69
表面活性剂	Labrasol	105.98
	RH40	72.03
	Tween 80	82.25
助乳化剂	Transcutol HP	119.94
	PEG400	94.55
	丙二醇	78.55

在 100 r・min^{-1} 的空气浴摇床上进行震荡使其发生乳化，在 550 nm 下测定其吸光度（A），计算透光率（T）($A = -\lg T$，即 $T = 10^{-A} \times 100\%$）[9]。当 $T > 90\%$，优选相应油相和表面活性剂。

以成乳后的色泽和乳化时间为考察指标，记录乳化情况 [11]：Ⅰ.迅速分散乳化（≤ 1 min），形成澄清或微微泛蓝的微乳；Ⅱ.迅速分散乳化（≤ 2 min），形成蓝白色微乳；Ⅲ.分散乳化稍慢（≤ 3 min），形成亮白色奶状乳剂；Ⅳ.分散乳化慢（> 3 min），呈暗灰白色，外观略带油状；Ⅴ.分散乳化困难，无法形成均一体系。

由表 2 可知，油相 Capmul MCM 相较 Peceol 更容易被乳化，表面活性剂 Labrasol、RH40 乳化 Capmul MCM 的时间均在 1 min 以内；但 Labrasol 无论与哪种油相何种比例（1∶1、1∶2、1∶3），体系均呈乳白色，因此 Capmul MCM∶Labrasol 评价为Ⅱ，而 RH40 乳化的体系澄清，因此：Capmul MCM∶RH40 ＝ 1∶2、1∶3 评价为Ⅰ；Tween 80 为表面活性剂时，时间则需要 3 min 以上，且出现结块未完全乳化等问题。因此，表面活性剂确定为 RH40。

在试验中发现，当油相为 Peceol 时，乳化均较困难，而当 Peceol∶1944cs ＝ 1∶1 作为混合油相时，比单纯用 Peceol 更易被乳化。因此在试验中进一步补充了 Peceol∶1944cs ＝ 1∶1 与表面活性剂 Labrasol、RH40、Tween 80 的相溶性考察的相关数据（见表 2），表 2 中 $T > 90\%$ 有两个处方，即当 Capmul MCM 为油相时，Capmul MCM∶RH40 ＝ 1∶3，T 为 98.213%；当 Peceol∶1944cs ＝ 1∶1 作为油相时，（Peceol∶1944cs ＝ 1∶1）∶RH40 ＝ 1∶3，T 为 97.098%。这两个处方体系均呈澄清微微泛蓝光，满足要求。

综上，选用 Capmul MCM、RH40、Transcutol HP 作为处方 1，Peceol、1944cs、RH40、Transcutol HP 作为处方 2，做进一步考察。

2.4　三元相图绘制

将表面活性剂 RH40 与助表面活性剂 Transcutol HP 先按质量比 9∶1、8∶2、7∶3、6∶4、5∶5、4∶6、3∶7、2∶8、1∶9 充分混匀组成混合表面活性剂，再将处方 1、2 中油相与混合表面活性剂按质量比 1∶9、2∶8、3∶7、4∶6、5∶5 进行复配。分别移取 100 μL，缓慢加入 10 mL 纯化水中（37 ℃空气浴，100 r・min^{-1}），取乳化后的溶液，采用纳米粒度仪测定乳滴的粒径及多分散指数（PDI）。

分别以油相、表面活性剂、助表面活性剂为三元相图三角形的三个顶点，在不含药（空白乳）和含药（载药乳）的基础上（药物的存在有时会影响三元相图的结果 [12]），用 Origin 2019b 软件绘制三元相图。纳入标准为：乳化时间＜ 2 min，色泽澄清或者泛蓝光，粒径＜ 100 nm。满足上述要求的，在三元相图上记录相应的点，结果见图 1。

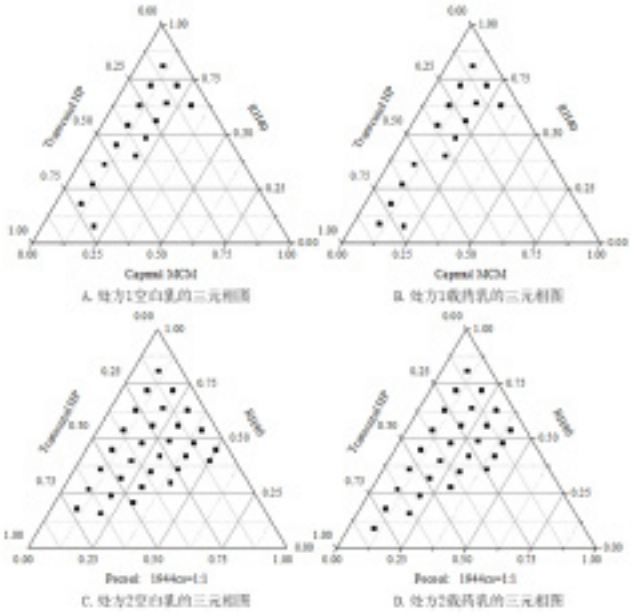


图 1　处方 1 和 2 的空白乳和载药乳的三元相图

Fig 1　Ternary phase diagrams of the blank and drug-loaded SMEDDS for formulae 1 and 2

由图 1 结果显示，发现溶解度较大（处方 1）的作为处方其形成三元相图的面积反而小于溶解度较低（处方 2）的三元相图面积，且阿戈美拉汀的添加一定程度上会影响三元相图的分布范围，综上，由 Peceol、1944cs、RH40、Transcutol HP 组成的空白乳和载药乳微乳区域面积均较大，因此选用处方 2 进行下一步优化。

表 2 油相与表面活性剂的相容性 (n = 3)

Tab 2 Compatibility of oil phase with surfactant (n = 3)

序号	样品	吸光度（A）（WL550.0）	透光率（T）/%	评价
1	Capmul MCM：Labrasol = 1：1-Avg	2.272	0.534	Ⅱ
2	Capmul MCM：Labrasol = 1：2-Avg	2.235	0.582	Ⅱ
3	Capmul MCM：Labrasol = 1：3-Avg	1.510	3.088	Ⅱ
4	Capmul MCM：RH40 = 1：1-Avg	0.171	67.464	Ⅱ
5	Capmul MCM：RH40 = 1：2-Avg	0.064	86.286	Ⅰ
6	Capmul MCM：RH40 = 1：3-Avg	0.008	98.213	Ⅰ（√）
7	Capmul MCM：Tween 80 = 1：1-Avg	0.888	12.930	Ⅳ
8	Capmul MCM：Tween 80 = 1：2-Avg	0.437	36.579	Ⅳ
9	Capmul MCM：Tween 80 = 1：3-Avg	0.332	46.605	Ⅳ
10	Peceol：Labrasol = 1：1-Avg	1.167	6.806	Ⅱ
11	Peceol：Labrasol = 1：2-Avg	2.512	0.308	Ⅱ
12	Peceol：Labrasol = 1：3-Avg	2.449	0.355	Ⅱ
13	Peceol：RH40 = 1：1-Avg	2.302	0.499	Ⅴ
14	Peceol：RH40 = 1：2-Avg	0.747	17.912	Ⅴ
15	Peceol：RH40 = 1：3-Avg	0.380	41.677	Ⅳ
16	Peceol：Tween 80 = 1：1-Avg	2.430	0.371	Ⅴ
17	Peceol：Tween 80 = 1：2-Avg	1.200	6.314	Ⅴ
18	Peceol：Tween 80 = 1：3-Avg	1.191	6.436	Ⅴ
19	（Peceol：1944cs = 1：1）：Labrasol = 1：1-Avg	2.735	0.184	Ⅴ
20	（Peceol：1944cs = 1：1）：Labrasol = 1：2-Avg	2.824	0.15	Ⅳ
21	（Peceol：1944cs = 1：1）：Labrasol = 1：3-Avg	2.556	0.278	Ⅲ
22	（Peceol：1944cs = 1：1）：RH40 = 1：1-Avg	1.812	1.543	Ⅱ
23	（Peceol：1944cs = 1：1）：RH40 = 1：2-Avg	0.050	89.095	Ⅰ
24	（Peceol：1944cs = 1：1）：RH40 = 1：3-Avg	0.013	97.098	Ⅰ（√）
25	（Peceol：1944cs = 1：1）：Tween 80 = 1：1-Avg	2.498	0.318	Ⅴ
26	（Peceol：1944cs = 1：1）：Tween 80 = 1：2-Avg	1.593	2.553	Ⅴ
27	（Peceol：1944cs = 1：1）：Tween 80 = 1：3-Avg	0.962	10.913	Ⅴ

备注（Note）：Avg. 平均值（Average）；√. 透光率＞ 90%（T ＞ 90%）。

2.5 星点设计 - 效应面优化法优化 Agm-SMEDDS 处方

在三元相图所得结果的基础上，以影响阿戈美拉汀自微乳性质最大的 [即油相的质量占比 W_{oil}（X_1）和表面活性剂与助表面活性剂质量之比 K_m（X_2）] 作为考察因素，X_1 的范围为三元相图得出的初步范围，即 10% ～ 40%，X_2 的范围为 0.25 ～ 9，采用 Design Expert 12.0 软件，以两因素五水平进行星点设计，以微乳的平均粒径（Y_1）、PDI（Y_2）和载药量（Y_3）为评价指标，因素和水平见表 3。

表 3 星点设计的因素和水平

Tab 3 Factor and level of the central composite design

因素	水平				
	－1.414	－1	0	1	1.414
W_{oil}/%（X_1）	10	14.4	25	35.6	40
K_m（X_2）	0.25	1.53	4.625	7.72	9

按处方比例精密称取油相、表面活性剂、助乳化剂，投入过量药物，涡旋使药物充分分散，水浴超声 30 min，空气浴摇床（25 ℃，100 r • min^{-1}）平衡 48 h，确保有药物沉淀，10 000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液即得阿戈美拉汀自微乳（Agm-SMEDDS）预浓缩液。精密称取预浓缩液 0.1 g 于 10 mL 量瓶，加入 37 ℃的纯化水定容至刻度摇匀，10 000 r • min^{-1} 高速离心 10 min，上清液用 0.22 μm 滤膜滤过 [13]，量取续滤液 1 mL，加入 9 mL 稀释剂（乙醇∶乙腈＝1∶4）稀释并混匀，按“2.1”项下方法测定 Agm-SMEDDS 的载药量，结果见表 4。

根据市售的阿戈美拉汀片剂为 25 mg/ 片以及溶解度结果，将 25 mg/525 mg 作为 Agm-SMEDDS 的规格，精密称取阿戈美拉汀原料药，按处方比例称取相应辅料，超声溶解药物，移取 100 μL，用水稀释 100 倍，其平均粒径和 PDI 结果见表 4。

在 Design Expert 12.0 软件中输入相应结果，根据软件推荐对平均粒径、PDI、载药量进行线性或多项式模型拟合，其中校正相关系数 R^2 和显

表 4　星点设计的试验和结果

Tab 4　Design and results of central composite design

序号	X_1/%	X_2	平均粒径 /nm	PDI	载药量 /（mg·g^{-1}）
1	14.4	1.53	17.04	0.160	86.05
2	35.6	1.53	93.12	0.466	121.23
3	14.4	7.72	17.19	0.129	120.74
4	35.6	7.72	91.76	0.307	110.44
5	10.0	4.625	15.78	0.077	126.05
6	40.0	4.625	111.14	0.438	115.05
7	25	0.245	309.78	0.359	61.32
8	25	9	20.57	0.187	123.08
9	25	4.625	23.08	0.236	124.49
10	25	4.625	23.88	0.256	116.99
11	25	4.625	23.60	0.257	119.14
12	25	4.625	24.60	0.251	120.33
13	25	4.625	20.60	0.194	121.77

著性水平（P）均满足要求，结果具有统计学意义（$P < 0.05$），对应的拟合方程如下：

$Y_1 = 23.15 + 33.71X_1 - 102.25X_2 - 0.3775X_1X_2 + 5.27X_1^2 + 56.13X_2^2 + 101.95X_1^2X_2 + 3.95X_1X_2^2$，$R^2 = 0.9124$，$P = 0.0210$；

$Y_2 = 0.2552 + 0.1243X_1 - 0.0542X_2 - 0.0320X_1X_2$，$R^2 = 0.9640$，$P < 0.0001$；

$Y_3 = 120.54 - 3.89X_1 + 21.84X_2 - 11.37X_1X_2 + 0.8130X_1^2 - 13.36X_2^2 - 15.86X_1^2X_2 + 10.11X_1X_2^2$，$R^2 = 0.9872$，$P = 0.0002$。

在软件上，将油相的质量占比 W_{oil}（X_1）和表面活性剂与助表面活性剂质量之比 K_m（X_2）分别对 Agm-SMEDDS 的平均粒径、PDI 和载药量进行二维等高线图和三维效应面图绘制，相应结果见图 2 ～ 4。

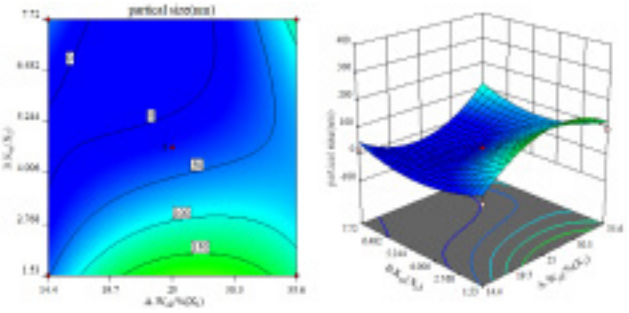


图 2　Agm-SMEDDS 平均粒径的二维等高线图和三维效应面图

Fig 2　Response surface graph（2D and 3D）of the partical size of Agm-SMEDDS

由图 2 可知，当油相质量占比 W_{oil}（X_1）一定时，Agm-SMEDDS 的平均粒径随着表面活性剂与助乳化剂质量之比 K_m（X_2）的增加先减小再增大；而当 K_m 小于 5 时，平均粒径随着 W_{oil} 的增加先增大后减小，当 K_m 大于 5 时，平均粒径随着 W_{oil} 先减小后增大。由图 3 可知，Agm-SMEDDS 的 PDI

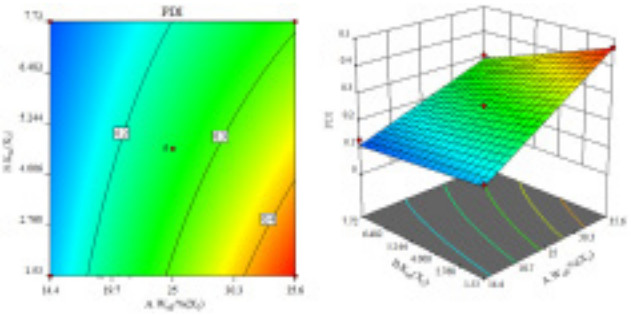


图 3　Agm-SMEDDS 的 PDI 的二维等高线图和三维效应面图

Fig 3　Response surface graph（2D and 3D）of the drug loading of Agm-SMEDDS

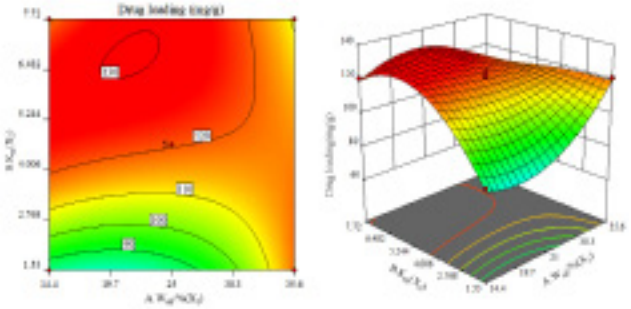


图 4　Agm-SMEDDS 载药量的二维等高线图和三维效应面图

Fig 4　Response surface graph（2D and 3D）of the drug loading of Agm-SMEDDS

随着 W_{oil} 增大而增大，随着 K_m 的增大而减小。由图 4 可知，当 W_{oil} 和 K_m 均较低时，Agm-SMEDDS 的载药量较低；而当 K_m 大于 5 时，载药量均较高。

综上，以油相质量占比 W_{oil}（X_1）最大、粒径 < 100 nm、PDI < 0.2、载药量最大为标准，进行最优处方筛选，优选三个解决方案：

① $X_1 = 20.007$，$X_2 = 4.355$，$Y_1 = 15.78$，$Y_2 = 0.200$，$Y_3 = 120.354$；

② $X_1 = 19.714$，$X_2 = 4.070$，$Y_1 = 23.134$，$Y_2 = 0.200$，$Y_3 = 117.873$；

③ X_1 = 16.523，X_2 = 7.72，Y_1 = 15.78，Y_2 = 0.127，Y_3 = 123.513。

根据实际可操作性和表面活性剂比例不宜过高（X_1 定为 20，K_m 定为 4），因此推测最优处方为（Peceol：1944cs = 1：1）的质量占比为 20%，RH40 为 64%，Transcutol HP 为 16%，进行下一步试验。

2.6 最优处方验证

按照最优处方（Peceol：1944cs：RH40：Transcutol HP = 10%：10%：64%：16%）制备 3 批 Agm-SMEDDS 制剂，以“2.5”项下方法测定其平均粒径、PDI 与载药量，观察实测值是否在预测范围内，结果见表 5。结果表明，制剂处方测定值与软件的预测值相比差距较小，说明所建立的数学模型具有良好的预测性。

表 5 星点设计 - 效应面优化法的验证试验（$\bar{x}\pm s$，n = 3）

Tab 5 Verification experiment of central composite design and response surface optimization method（$\bar{x}\pm s$，n = 3）

评价指标	预测值	实测值
平均粒径 /nm	15 ～ 23	17.62±0.39
PDI	＜ 0.2	0.067±0.050
载药量 /（mg • g^{-1}）	117 ～ 120	121.10±1.43

2.7 透射微观形态

取 Agm-SMEDDS 100 μL，缓慢加入 10 mL 纯化水中（100 r • min^{-1}），形成澄清透明的阿戈美拉汀微乳液。取微乳液适量，滴在覆有支持膜的铜网上，静置 10 min 后用滤纸吸去多余液体，再滴加 2% 的磷钨酸溶液，负染 5 min，自然挥干，在透射电镜下观察，结果 Agm-SMEDDS 经稀释后的乳滴主要呈圆球形，分布比较均匀（见图 5）。

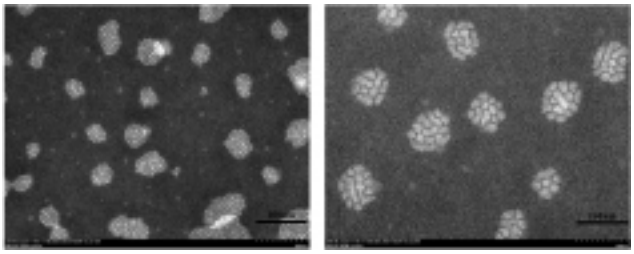


图 5 Agm-SMEDDS 的投射电镜图

Fig 5 Transmission electron microscopy of Agm-SMEDDS

2.8 粒径分布与 Zeta 电位

取 Agm-SMEDDS 100 μL，缓慢加入 10 mL 纯化水中（100 r • min^{-1}），形成澄清透明的阿戈美拉汀微乳液。取微乳液适量，采用激光粒度分析仪测定空白自微乳和载药自微乳的平均粒径和 Zeta 电位，粒径成正态分布，Zeta 电位值为（－ 0.969±9.27）mV，见图 6。

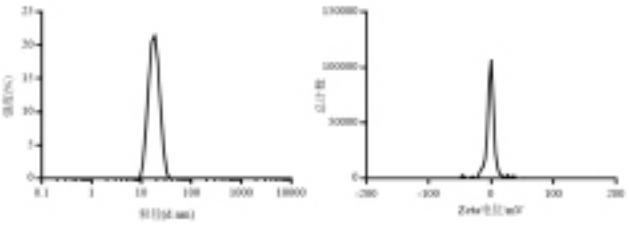


图 6 Agm-SMEDDS 的粒径分布与 Zeta 电位

Fig 6 Droplet size and Zeta potential of Agm-SMEDDS

2.9 浊点测定

移取 200 μL 自微乳浓缩液缓慢加入 20 mL 蒸馏水中（37 ℃空气浴，缓慢搅拌），梯度升温（2 ℃ • min^{-1}），溶液出现浑浊时的温度即为浊点温度。

在试验中发现，当溶液体系低于 60 ℃时，溶液的外观无明显变化，2 ℃ • min^{-1} 梯度升温时，溶液从澄清到微微泛蓝光，再到出现蓝白色浑浊，浊点温度约为 72 ℃，此温度明显高于 37 ℃，表明自微乳进入胃肠道后不会发生相分离，不会影响药物的释放及吸收。

2.10 不同介质及稀释倍数下的稳定性

移取适量自微乳浓缩液，按 1：10、1：50、1：100、1：200 的比例用 pH 1.0、pH 4.5、pH 6.8、纯化水稀释乳化（37 ℃空气浴，100 r • min^{-1}），考察其对自微乳乳滴粒径和多分散指数 PDI 的影响，结果均无明显影响，见图 7。

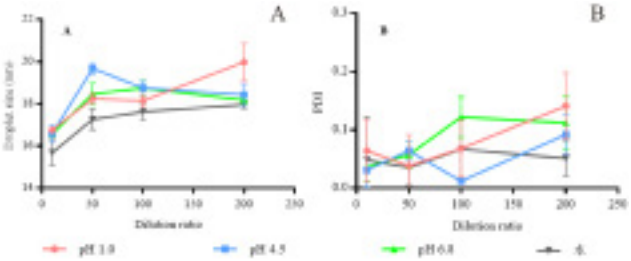


图 7 不同介质及稀释倍数对自微乳乳滴粒径（A）和多分散指数 PDI（B）的影响

Fig 7 Effect of different medium with different dilution ratios on droplet size（A）and polydispersion index（PDI）（B）of self-microemulsion

2.11 不同介质及放置时间下的粒径稳定性

移取 100 μL 自微乳浓缩液，按 1：100 的比例用 pH 1.0、pH 4.5、pH 6.8、纯化水稀释乳化（37 ℃空气浴，100 r • min^{-1}），考察放置 0、3、6 h 对自微乳乳滴粒径的影响，结果见表 6。各试验条件下自微乳乳滴粒径变化情况较小，且 6 h 后依旧未观察到制剂有分层、浑浊和沉淀等现象（见图 8），表明制备的 Agm-SMEDDS 较稳定。

表 6　不同介质中不同放置时间的粒径稳定性

Tab 6　Stability of droplet size in different media at different time

介质	粒径 /nm		
	放置 0 h	放置 3 h	放置 6 h
pH 1.0	18.15±0.27	18.23±0.45	18.11±0.27
pH 4.5	18.76±0.33	18.41±0.25	18.28±0.18
pH 6.8	16.75±0.17	18.38±0.04	18.29±0.39
水	17.62±0.050	18.37±0.14	18.61±0.07

A　　B

图 8　制备 0 h（A）和 6 h（B）后微乳的外观

Fig 8　Appearance of microemulsion prepared after 0 h（A）and 6 h（B）

2.12　溶出试验

取阿戈美拉汀原料药 25 mg 和阿戈美拉汀自微乳 525 mg（规格 525 mg 中含原料药 25 mg）分别填入 0 号胶囊中，再放入沉降篮中，照溶出度与释放度测定法（《中国药典》2020 年版第四部通则 0931 第二法）[14]，以 pH 1.0、pH 4.5、pH 6.8、水各 500 mL 为溶出介质，转速 100 r • min^{-1}，水浴温度（37±0.5）℃，依法操作，在 5、10、15、20、30、45、60、90、120、150、180、240 min，分别取样 5 mL，0.22 μm 微孔滤膜滤过并即时补充相同温度相同体积的溶出介质，取续滤液在 230 nm 处用 HPLC-UV 法测定含量，计算溶出度。

如图 9 所示，阿戈美拉汀以纳米乳滴的形式存在的自微乳相较于原料药，在 pH 1.0、pH 4.5、pH 6.8、水中溶出均很快，5 min 内平均溶出度＞85%，而原料药溶出较慢，在桨法 100 r • min^{-1}，4 h 才能溶出完全。溶出介质无浮油、无沉淀，说明乳滴没有发生破乳，药物没有析出。

2.13　制剂影响因素考察

按照最优处方制备的 Agm-SMEDDS 制剂（Peceol ∶ 1944cs ∶ RH40 ∶ Transcutol HP ＝ 10%∶10%∶64%∶16%，规格为 25 mg/525 mg），其专属性色谱图见图 10，放置在高温（60 ℃）、光照 [（4500±500）lx]、避光（25 ℃）条件下，分别于 0、5、10、30 d 测定该制剂中药物的含量，结果见表 7。

图 10 中稀释剂为乙醇 - 乙腈＝1∶4，空白辅料为 Peceol-1944cs-RH40-Transcutol HP ＝ 10%∶10%∶64%∶16%，对照品为用稀释剂溶解的原料药，样品为最优处方制备的 Agm-SMEDDS 制剂，稀释剂及空白辅料在主峰处无干扰。

如表 7 所示，Agm-SMEDDS 制剂受高温和强光影响较小，0、5、10、30 d 测定该制剂含量未发生明显变化，表明该制剂较稳定。

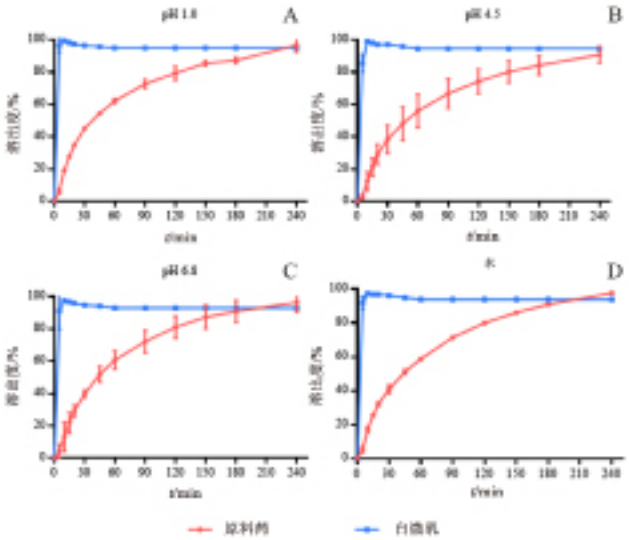


图 9　阿戈美拉汀原料药和自微乳在 pH 1.0（A）、pH 4.5（B）、pH 6.8（C）、水（D）的溶出结果

Fig 9　Dissolution of agomelatine API and self-microemulsion in pH 1.0（A），pH 4.5（B），pH 6.8（C）and water（D）

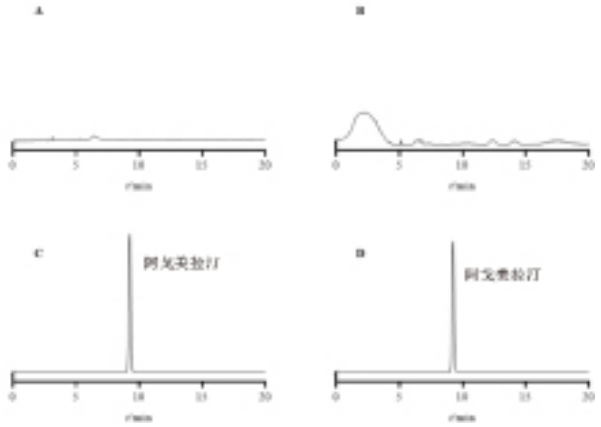


图 10　Agm-SMEDDS 制剂的专属性色谱图

Fig 10　Chromatograms of Agm-SMEDDS

A. 空白溶剂（稀释剂）（blank solvent）；B. 空白辅料（blank excipient）；C. 对照品（standard solution）；D. Agm-SMEDDS（sample solution）

表 7　不同条件下不同放置时间阿戈美拉汀含量变化 (%，n ＝ 3)

Tab 7　Agomelatine content change under different factors at different time (%，n ＝ 3)

时间 /d	影响因素		
	高温（60 ℃）	光照（4500±500）lx	避光（25 ℃）
0	97.77	97.77	97.78
5	97.54	97.66	96.60
10	98.78	97.34	98.20
30	98.12	97.52	97.23

3　讨论

在本研究的三元相图试验中发现，当选择溶解度大的辅料作为处方的成分时，其形成的微乳面积

并不是最大的，而微乳面积越大制剂越稳定，可见部分已报道文献中仅仅依靠溶解度筛选自微乳处方并不是较理想的方式。溶解度大的辅料，包括油相、表面活性剂、助表面活性剂，若选择溶解度较大的油相，可能会面临该油相不易被表面活性剂所乳化的问题，而溶解度相对较小的其他油相更易被乳化，从而溶解度较大的油相其形成微乳面积并不一定是最大的；若选择溶解度较大的表面活性剂和助表面活性剂，它们存在一定的亲水性，药物在形成自微乳的过程中会面临析出风险，则制剂的粒径就不满足要求，微乳面积也会减小。因此，在选择制剂处方时，需要结合油相、表面活性剂、助乳化剂的综合作用来考察。在进行星点设计效应面时，将阿戈美拉汀溶解于处方中进行设计，而非单纯的空白辅料，是考虑到药物的存在[12]会影响粒径和PDI的结果，从而干扰最终处方的筛选，选择与市售的阿戈美拉汀片剂相同剂量（25 mg）的药物进行试验，更能反映真实的需求。

本文考察了制备的Agm-SMEDDS在pH 1.0、pH 4.5、pH 6.8、水的不同稀释倍数1∶10、1∶50、1∶100、1∶200下的粒径稳定性，没有考察1∶500、1∶1000[15]的稀释倍数，是因为在人体内平均胃液量为50 mL，且乳化时间在2 min以内，在如此短的时间内人体无法拥有相应稀释倍数的环境，考察高比例稀释倍数并没有太大的意义。放置0、3、6 h，分散后依旧可以形成平均粒径约为20 nm、PDI小于0.2的微乳。较低的PDI值表明较难发生奥斯特瓦尔德熟化[16]，纳米乳液粒径分布紧密，稳定性较好。与其他文献相比，本文开展的溶出试验不仅考察了水介质，还进行了pH 1.0、pH 4.5、pH 6.8，能更好地反映阿戈美拉汀自微乳在不同pH的溶出情况，更接近人体的胃肠道环境。溶出介质无浮油无沉淀，说明乳滴没有发生破乳，药物包裹在乳滴中，一方面可以增大药物的溶解度，另一方面可以减少胃肠道酶的代谢[17]，增加淋巴转运，且制剂所含的辅料已为药用级辅料，该制剂在高温、强光条件下含量也未发生变化，这些均有利于制剂后期的工业化开发。但其体内行为有待进一步研究。

参考文献

[1] Kassebaum NJ，Arora M，Barber RM，et al. Global，regional，and national disability-adjusted life-years（DALYs）for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy（HALE），1990—2015：a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 [J]. Lancet，2016，388（10053）：1603-1658.

[2] 李凌江，马辛 . 中国抑郁障碍防治指南 [M]. 2 版 . 北京：中华医学电子音像出版社，2015.

[3] 洪武，司天林，李凌江，等 . 阿戈美拉汀治疗抑郁症临床应用专家建议 [J]. 中国新药与临床杂志，2018，37（11）：601-607.

[4] Li F，Hu R，Wang B，et al. Self-microemulsifying drug delivery system for improving the bioavailability of huperzine A by lymphatic uptake [J]. Acta Pharm Sin B，2017，7（3）：353-360.

[5] Sato Y，Joumura T，Nashimoto S，et al. Enhancement of lymphatic transport of lutein by oral administration of a solid dispersion and a self-microemulsifying drug delivery system [J]. Eur J Pharm Biopharm，2018，127：171-176.

[6] Patel MH，Sawant KK. Self microemulsifying drug delivery system of lurasidone hydrochloride for enhanced oral bioavailability by lymphatic targeting：in vitro，Caco-2 cell line and in vivo evaluation [J]. Eur J Pharm Sci，2019，138：105027-105027.

[7] Holm R. Bridging the gaps between academic research and industrial product developments of lipid-based formulations [J]. Adv Drug Deliv Rev，2019，142：118-127.

[8] Ahmed S，Gull A，Alam M，et al. Ultrasonically tailored，chemically engineered and “QbD”enabled fabrication of agomelatine nanoemulsion；optimization，characterization，ex-vivo permeation and stability study [J]. Ultrason Sonochem，2018，41：213-226.

[9] 吴伟，崔光华 . 星点设计 - 效应面优化法及其在药学中的应用 [J]. 国外医学（药学分册），2000，27（5）：292-298.

[10] 邱颖，朱玲，孙晓英 . 星点设计 - 效应面优化法与正交设计和均匀设计的比较及其在药剂研究中的应用 [J]. 海峡药学，2011，23（2）：18-20.

[11] Liu J，Wang Q，Omari-Siaw E，et al. Enhanced oral bioavailability of bisdemethoxycurcumin-loaded self-microemulsifying drug delivery system：formulation design，in vitro and in vivo evaluation [J]. Int J Pharm，2020，590：119887-119887.

[12] Liu CS，Chen L，Hu YN，Et al. Self-microemulsifying drug delivery system for improved oral delivery and hypnotic efficacy of ferulic acid [J]. Int J Nanomedicine，2020，15：2059-2070.

[13] 张然，杨冰，廖茂梁，等 . 双氢青蒿素自微乳给药系统的制备及其评价 [J]. 中草药，2021，52（5）：1291-1302.

[14] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：132-137.

[15] Liao H，Gao Y，Lian C，et al. Oral absorption and lymphatic transport of baicalein following drug-phospholipid complex incorporation in self-microemulsifying drug delivery systems [J]. Int J Nanomedicine，2019，14：7291-7306.

[16] Yilmaz E，Borchert HH. Design of a phytosphingosine-containing，positively-charged nanoemulsion as a colloidal carrier system for dermal application of ceramides [J]. Eur J Pharm Biopharm，2005，60（1）：91-98.

[17] Suchaoin W，Bernkop-Schnürch A. Nanocarriers protecting toward an intestinal pre-uptake metabolism [J]. Nanomedicine，2017，12（3）：255-269.

（收稿日期：2021-07-10；修回日期：2021-10-08）

淫羊藿富集部位微乳的制备及质量评价

兰海，刘欣妍，郭子右，刘玉娟，李婷婷，李鑫，梅凯，吴清*（北京中医药大学中药学院，北京 102488）

摘要：目的　制备淫羊藿富集部位微乳并对其进行质量评价，为该富集部位的后续研究与开发奠定基础。**方法**　以淫羊藿富集部位主要成分朝藿定 A_1、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷为指标，通过饱和溶解度法筛选对指标成分溶解度大的油相、表面活性剂、助表面活性剂种类；通过伪三元相图法确定油相种类以及表面活性剂和助表面活性剂的质量比 K_m；以上述 5 种指标成分的皮肤渗透量、表皮滞留量及真皮滞留量为指标，通过电导率法和伪三元相图法确定微乳类型与区域；以粒径和多分散指数（PDI）为指标，采用 D- 最优混料设计法优化淫羊藿富集部位微乳处方；通过稳定性试验确定微乳载药量；采用 Franz 扩散池法考察微乳的体外经皮渗透和皮肤滞留情况。**结果**　最终确定微乳类型为 *O/W* 型；优选得到的处方为油酸（OA）- 辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯 - 二乙二醇单乙基醚 - 水（2∶13.77∶6.88∶77.35）；载药量为 3%；微乳中朝藿定 A_1、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 及淫羊藿苷的促透比分别为 3.589、8.975、11.094、14.558、9.063，微乳中上述 5 种成分的 24 h 皮肤累积滞留量均显著高于药物溶液。**结论**　淫羊藿富集部位微乳的制备工艺简单、稳定性好，可以显著增加药物的皮肤渗透能力和皮肤滞留量。

关键词：淫羊藿；伪三元相图；微乳；体外经皮渗透；皮肤滞留；朝藿定；淫羊藿苷
中图分类号：R944.1，R28　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0727-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.002

Preparation and quality evaluation of microemulsion of epimedii folium enrichment fraction

LAN Hai, LIU Xin-yan, GUO Zi-you, LIU Yu-juan, LI Ting-ting, LI Xin, MEI Kai, WU Qing* (*School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488)

Abstract: Objective To prepare microemulsion of epimedii folium enrichment fraction and evaluate its quality and to lay the foundation for the follow-up research and development of this enrichment fraction. **Methods** The main components (epimedin A_1, epimedin A, epimedin B, epimedin C, and icariin) were taken as indexes to screen the oil phase, surfactant and cosurfactant with high solubility to index components by solubility experiment. The oil phase and the mass ratio of surfactant to cosurfactant (K_m) were further determined by pseudo-ternary phase diagram. The skin penetration, epidermis retention and dermis retention of the above 5 components were taken as indexes to determine the type and region of microemulsion with conductivity and pseudo-ternary phase diagram. The particle size and PDI were used as the indexes to optimize the formulation of microemulsion with the D-optimal mixture design method. The drug loading in the microemulsion was determined by stability test. Franz diffusion cell method was used to determine the transdermal penetration and skin retention of microemulsion in vitro. **Results** The type of microemulsion was *O/W* type; the optimal microemulsion formulation was oleic acid-Labrasol-Transcutol P-water at 2∶13.77∶6.88∶77.35. The drug loading was 3%; the penetration enhancement ratios of epimedin A_1, epimedin A, epimedin B, epimedin C and icariin in the microemulsion were 3.589, 8.975, 11.094, 14.558 and 9.063, respectively. The 24-hour accumulative skin retention of the 5 components in microemulsion was

基金项目：北京市自然科学基金面上项目（No.7192109）。
作者简介：兰海，男，硕士研究生，主要从事中药新剂型与新技术研究，email：lanhai_master@163.com　*通信作者：吴清，女，教授，博士研究生导师，主要从事中药新剂型与新技术研究，email：qwu@vip.sina.com

significantly higher than that in the solution of epimedii folium enrichment fraction. **Conclusion** The preparation process of microemulsion is simple and stable. The microemulsion can significantly increase the skin permeability and skin retention of the drug.

Key words: epimedii folium; pseudo-ternary phase diagram; microemulsion; transdermal penetration in vitro; skin retention; epimedin; icariin

化疗所致周围神经病变（chemotherapy-induced peripheral neuropathy，CIPN）是化疗药物对周围神经或自主神经损伤产生的一系列神经功能紊乱的病变，以周围神经系统毒性最为常见，CIPN 常见的临床表现为四肢末端麻木、疼痛或感觉异常 [1]。近年来，中医药在改善 CIPN 方面发挥了重要作用，具有多成分、多靶点的特点 [2]，中医临床通过中药泡洗、熏蒸、贴敷等外治手段治疗 CIPN，取得了一定效果 [3-4]。

淫羊藿，性温，味辛、甘，归肝、肾经，能够补肾助阳，强筋骨，祛风湿 [5]。现代研究表明，淫羊藿及其主要活性成分淫羊藿苷等可以改善周围神经损伤，促进周围神经再生 [6-8]。试验室前期研究表明，淫羊藿中的朝藿定与淫羊藿苷类成分对奥沙利铂所致的周围神经损伤具有明显的保护作用 [9]，并且采用大孔吸附树脂法，从淫羊藿中富集得到了对奥沙利铂所致的周围神经损伤具有保护作用的朝藿定与淫羊藿苷部位 [10]。

微乳是由水相、油相、表面活性剂和助表面活性剂组成的单一的光学各向同性和热力学稳定的分散体系 [11]，具有促进药物透皮吸收、提高药物稳定性、增加难溶性药物溶解度等优点 [12-13]。皮肤神经纤维的受损是 CIPN 的病理学关键 [14-15]，因此，本研究拟制备包载淫羊藿富集部位的微乳，通过经皮给药，使药物直接作用于皮肤中的神经纤维，发挥神经保护作用，为淫羊藿富集部位治疗或预防 CIPN 的研究与开发奠定基础。

1 材料

UltiMate 3000 型高效液相色谱仪（美国 Thermo 公司），BT125D 型电子分析天平 [赛多利斯科学仪器（北京）有限公司]，TK-20B 型药物透皮扩散试验仪（上海锴凯科技贸易有限公司），ZNCL-S-5D 型多点智能磁力搅拌器（河南爱博特科技发展有限公司），DDS-11A 型电导率仪（上海越平科学仪器有限公司），BZF50 型真空干燥箱（上海 Boxun 公司），Zetasize Nano ZS 纳米粒径仪（英国马尔文公司）。

对照品朝藿定 A_1、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷（批号分别为 140147-77-9、110623-72-8、110623-73-9、110642-44-9、110642-44-9，纯度均≥98%）和聚氧乙烯氢化蓖麻油（EL，Polyoxy 35 castor oil，批号：Y19O7S23172）（上海源叶生物科技有限公司），淫羊藿富集部位（自制 [12]），油酸（OA）、肉豆蔻酸异丙酯（IPM）（上海麦克林生化科技有限公司，批号分别为 C10005653、C10571215），棕榈酸异丙酯（IPP，Alfa Aesar 公司，批号：10173585），中链甘油三酸酯（Miglyol 812N）、聚氧乙烯氢化蓖麻油 RH40（Cremophor RH40）（北京凤礼精求商贸有限责任公司，批号分别为 151111、2822716860），聚山梨酯 80（Tween 80，Sigma-Aldrich 公司，批号：WXBB1118V），司盘 80（Span 80）、聚乙二醇 400（PEG400）（天津市光复精细化工研究所，批号分别为 20150417、20160604），辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯（Labrasol）、二乙二醇单乙基醚（Transcutol P）（批号分别为 175459、159651，Gattefosse 公司），丙二醇（PG，北京北化精细化学品有限责任公司，批号：20140821），磷酸盐缓冲液（PBS，Biotopped 公司），甲醇、乙腈（Sigma，色谱纯），水（杭州娃哈哈集团有限公司）。

雄性 SD 大鼠，5 周龄，体质量 160 ～ 180 g [斯贝福（北京）试验动物科技有限公司，许可证号：SCXK（京）2016-0002]。

2 方法与结果

2.1 体外透皮试验中指标成分含量测定方法

2.1.1 色谱条件与系统适应性试验 Merck LiChrospher100 RP-18 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相乙腈（A）- 水（B）（25∶75），柱温 30 ℃，流速 1 mL • min^{-1}，进样量 10 μL，检测波长 270 nm。此色谱条件下，朝藿定 A_1、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷的分离度均＞ 1.5，理论塔板数均＞ 6000（见图 1）。

2.1.2 溶液的配制 ① 混合对照品储备液的制备：取朝藿定 A_1、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷对照品适量，精密称定，用甲醇配制质量浓度分别为 53.94、58.20、145.20、150.61、

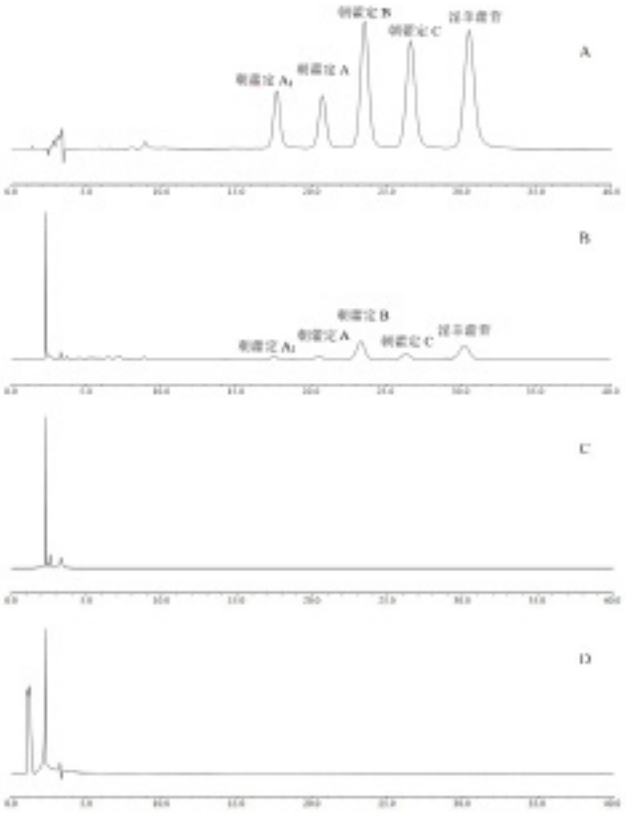


图 1　淫羊藿富集部位微乳的 HPLC 图

Fig 1　HPLC of microemulsion of epimedii folium enrichment fraction

A. 混合对照品（mixed control）；B. 样品接收液（sample receiving fluid）；C. 空白微乳（blank microemulsion）；D. 空白接收液（blank receiving）

136.57 μg • mL^{-1} 的混合对照品储备液；② 样品接收液的制备：取淫羊藿富集部位微乳的透皮接收液，过 0.22 μm 微孔滤膜，摇匀，即得；③ 空白微乳溶液的制备：取空白微乳约 50 mg，置于 10 mL 量瓶中，用甲醇溶解并稀释制得；④ 空白接收液的制备：取空白皮肤的接收液，过 0.22 μm 微孔滤膜，摇匀，即得。

2.1.3　线性范围考察　精密吸取“2.1.2”项下混合对照品储备液适量，用甲醇稀释至刻度，得一系列浓度的混合对照品溶液，进样分析。以响应值为纵坐标，质量浓度为横坐标，进行线性回归，得回归方程分别为 $Y_{朝藿定A_1} = 0.315X + 0.0038$，$r^2 = 0.9996$；$Y_{朝藿定A} = 0.3029X + 0.0033$，$r^2 = 0.9995$；$Y_{朝藿定B} = 0.3307X - 0.0006$，$r^2 = 0.9995$；$Y_{朝藿定C} = 0.2961X - 0.0019$，$r^2 = 0.9995$；$Y_{淫羊藿苷} = 0.4031X - 0.0033$，$r^2 = 0.9991$。线性范围分别为 0.11 ～ 5.39 μg • mL^{-1}，0.12 ～ 5.82 μg • mL^{-1}，0.29 ～ 14.52 μg • mL^{-1}，0.30 ～ 15.06 μg • mL^{-1}，0.27 ～ 13.66 μg • mL^{-1}。

2.1.4　精密度与加样回收率考察　配制低、中、高三个质量浓度的混合对照品，即含朝藿定 A_1（0.27，1.08，5.39 μg • mL^{-1}）、朝藿定 A（0.29，1.16，5.82 μg • mL^{-1}）、朝藿定 B（0.73，2.90，14.52 μg • mL^{-1}）、朝藿定 C（0.75，3.01，15.06 μg • mL^{-1}）及淫羊藿苷（0.68，2.73，13.66 μg • mL^{-1}），连续进样 6 次，计算日内精密度；连续进样 3 d，计算日间精密度；平行称取已知朝藿定 A_1、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 及淫羊藿苷含量的样品 6 份，并加入约等于被测成分含量的对照品，制备供试品溶液，进样测定，计算加样回收率，结果 5 种成分日内及日间的 *RSD* 值均小于 5%，加样回收率均在 95% ～ 105%，表明方法精密度、加样回收率良好。取体外透皮接收液（取大鼠腹部皮肤用 Franz 扩散池夹紧，角质层朝向供给池，真皮层朝向接收池，供给池加入去离子水，接收池加入 2% Transcutol P PBS 溶液作为接收液，温度设置为 37 ℃，收集 12 h 后的接收液）配制成混合物溶液，质量浓度分别为 1.08、1.16、2.90、3.01、2.73 μg • mL^{-1}，分别于 0、6、12、24、36、48 h 进样测定，结果朝藿定 A_1、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 及淫羊藿苷的 *RSD* 值均小于 5%，表明 5 种成分在 48 h 内稳定，皮肤渗出物对 5 种成分含量测定无影响。

2.2　饱和溶解度法筛选油相、表面活性剂及助表面活性剂

按文献[10]方法制备淫羊藿富集部位，富集部位中朝藿定 A_1、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷含量分别为 1.63%、2.52%、16.36%、5.51%、14.46%。淫羊藿富集部位的饱和溶解度不易测定，因此，以淫羊藿富集部位主要成分朝藿定 A_1、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷为指标，通过测定淫羊藿富集部位在不同溶剂中溶解达饱和时这 5 种成分的溶解量筛选辅料。分别加入过量的淫羊藿富集部位于 1 mL 无水乙醇、Transcutol P、PG、PEG 400、Labrasol、Tween 80、Span 80、Cremophor RH40、Polyoxy 35 castor oil、OA、IPP、IPM 和 Miglyol 812 N 中，涡旋 5 min，超声 10 min，32 ℃ 恒温水浴振荡器中平衡 48 h，整个过程始终保持有固体药物存在。平衡后的样品以 10 000 r • min^{-1} 离心 10 min，上清液经甲醇适当稀释，过 0.45 μm 微孔滤膜，按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，结果见表 1。结果显示，淫羊藿富集部位及其主要成分在助表面活性剂 Transcutol P 和表面活性剂 Labrasol 中溶解量较大，但几乎不溶于油相。因此，本课题选择 Labrasol 为表面活性剂，Transcutol P 为助表面活性剂，进一步筛选油相。

表 1 淫羊藿富集部位在不同溶剂中饱和溶解时 5 种成分的溶解量 (n = 3)

Tab 1 Solubility of 5 components of epimedii folium enrichment fraction during saturated dissolution in different solvents (n = 3)

类别	溶剂	溶解量 /（g·L^{-1}）				
		朝藿定 A_1	朝藿定 A	朝藿定 B	朝藿定 C	淫羊藿苷
助表面活性剂	无水乙醇	0.66±0.01	0.80±0.01	4.28±0.02	1.62±0.01	3.23±0.04
	Transcutol P	3.73±0.09	4.68±0.02	26.04±0.11	9.87±0.02	19.89±0.06
	PG	1.81±0.04	2.25±0.01	12.57±0.02	4.75±0.04	9.64±0.03
	PEG 400	1.23±0.01	1.48±0.01	8.24±0.01	3.13±0.04	6.34±0.02
表面活性剂	Labrasol	0.18±0.01	0.23±0.01	1.23±0.01	0.46±0.01	0.93±0.01
	Tween 80	0.06±0.01	0.08±0.01	0.41±0.01	0.17±0.01	0.34±0.01
	Span 80	—	—	0.05±0.01	—	0.05±0.01
	Cremophor RH40	0.06±0.01	0.08±0.01	0.40±0.01	0.18±0.01	0.38±0.01
	Polyoxy 35 castor oil	0.03±0.01	0.03±0.01	0.12±0.01	0.07±0.01	0.13±0.01

2.3 油相的进一步筛选

微乳区域面积越大，形成的微乳越稳定。因此，采用室温下水滴定法绘制伪三元相图，考察油相（IPM、IPP、OA、Miglyol 812 N）对微乳区域的影响。固定表面活性剂和助表面活性剂的质量比 K_m = 2，其与油相按质量比 9∶1、8∶2、7∶3、6∶4、5∶5、4∶6、3∶7、2∶8、1∶9 混合，总质量为 3 g，置于磁力搅拌器，同时逐滴加入蒸馏水，记录当体系突然由浑浊变为澄清、透明或由澄清、透明变浑浊时的临界水质量，并计算体系中各成分的质量百分比绘制伪三元相图，结果见图 2。油相为 OA 时形成的微乳区域最大，因此固定油相为 OA。

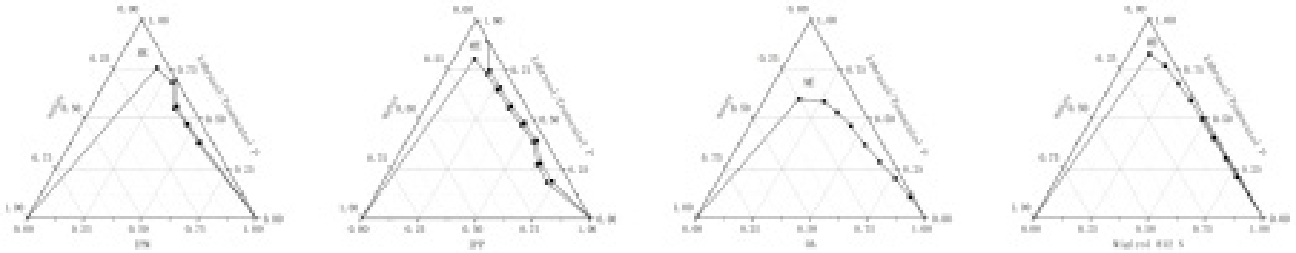


图 2 淫羊藿富集部位微乳不同油相的伪三元相图

Fig 2 Pseudo-ternary phase diagram of microemulsion of epimedii folium enrichment fraction with different oil phases

2.4 K_m 值的确定

以 OA 为油相，Labrasol 为表面活性剂，Transcutol P 为助表面活性剂，改变表面活性剂和助表面活性剂的比值，使 K_m = 1、2、3，并按照“2.3”项下方法绘制伪三元相图，考察不同的 K_m 值对微乳区域的影响。结果见图 3，当 K_m = 2 时形成微乳区域最大，故确定 K_m = 2。

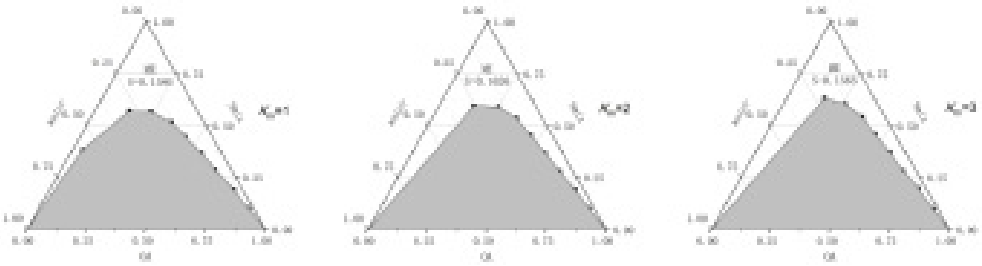


图 3 淫羊藿富集部位微乳不同 K_m 值的伪三元相图

Fig 3 Pseudo-ternary phase diagrams of microemulsion of epimedii folium enrichment fraction with different K_m values

2.5 微乳类型与区域的确定

2.5.1 不同类型微乳体外透皮及滞留研究 微乳可分为水包油（*O/W*）、双连续（Bi-continuous）、油包水（*W/O*）3 种类型，微乳的类型与药物的皮肤渗透效果有关。因此，探究不同微乳类型对目标成分的皮肤渗透和滞留效果的影响，进一步优选微乳类型。综合上述考察，选择以 OA 为油相、Labrasol 为表面活性剂、Transcutol P 为助表面活性剂、且 K_m = 2，油相与混合表面活性的质量比为 1∶9 制备微乳，采用透皮扩散试验仪进

行体外透皮及滞留试验。除去毛发及皮下组织的雄性 SD 大鼠腹部皮肤固定于接收室与扩散室之间，扩散室分别给予 2 mL 载药量为 3% 的不同含水量微乳或淫羊藿富集部位药物溶液（PG 为溶剂），接收室以含 2% Transcutol P 的 PBS 溶液为接收液，水浴温度为（37±0.1）℃，磁力搅拌转速为 200 r • min^{-1}。24 h 后移取接收液 1 mL，过 0.22 μm 微孔滤膜后采用高效液相色谱仪测定。

体外透皮试验结束后，用 PBS 洗净皮肤上的残留制剂，用显微镊小心分离表皮层和真皮层。将表皮层和真皮层分别剪成小块，加入 70% 乙醇于组织研磨器中研磨，研磨液超声 1 h，4000 r • min^{-1} 离心 20 min，上清液过 0.22 μm 微孔滤膜后采用高效液相色谱仪测定。

单位面积 24 h 累积透过量和皮肤中药物滞留量分别按下式进行计算：

$$Q_{24} = (C_{24} \times V_R)/A \quad (1)$$

$$Q_s = (C_s \times V_s)/A \quad (2)$$

式中，Q_{24} 为单位面积 24 h 累积透过量（μg•cm^{-2}），Q_s 为皮肤中药物滞留量（μg•cm^{-2}），C_{24} 为 24 h 时接收液药物浓度，C_s 为皮肤研磨液中药物浓度，V_R 为接收室体积（8 mL），V_s 为研磨液体积，A 为扩散池有效扩散面积（3.14 cm^2）。不同含水量微乳的处方组成及微乳类型见表 2。微乳及药物溶液的 Q_{24} 见图 4。结果显示，对于朝藿定及淫羊藿苷 5 种成分，不同类型微乳的 24 h 累积透过量均随微乳的含水量增加而增大，说明微乳类型影响 5 种成分的皮肤渗透效果，并且不同类型微乳的透过量均大于药物溶液，其中 *O/W* 型微乳 ME 80/20 中 5 种成分的 Q_{24} 最大。

表 2　不同类型淫羊藿富集部位微乳的处方组成

Tab 2　Formulation composition of microemulsion of epimedii folium enrichment fraction with different types

处方	含水量 /%	油相质量分数 /%	表面活性剂与助表面活性剂质量分数 /%	载药量 /%	微乳类型
ME 20/80	20	8	72	3	*W/O*
ME 40/60	40	6	54	3	Bi-continuous
ME 60/40	60	4	36	3	Bi-continuous
ME 80/20	80	2	18	3	*O/W*

微乳及药物溶液的单位面积 24 h 累积表皮滞留量及累积真皮滞留量分别见图 4B 及图 4C。不同类型微乳中 5 种成分的表皮滞留量接近且无统计学差异，但均大于药物溶液的表皮滞留量，说明不同类型微乳制剂均能促进 5 种成分在表皮中的滞留，但微乳类型对 5 种成分的表皮滞留影响不大。不同类型微乳中 5 种成分的真皮滞留量均大于药物溶液，说明不同类型微乳均能促进 5 种成分的真皮滞留。综合不同类型微乳对 5 种成分的皮肤渗透、表皮滞留及真皮滞留促进效果可知，*O/W* 型微乳促进 5 种成分的皮肤渗透及真皮滞留效果最好，所以确定微乳类型为 *O/W* 型。

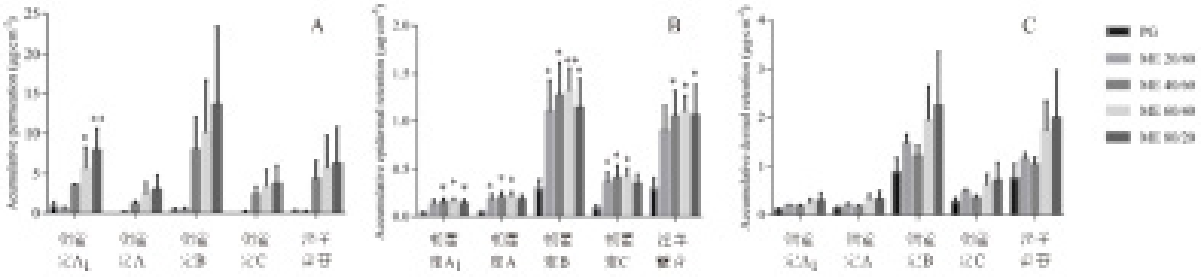


图 4　不同类型淫羊藿富集部位微乳 5 种成分的单位面积 24 h 累积透过量（A）、累积表皮滞留量（B）、累积真皮滞留量（C）（$n = 3$）

Fig 4　24-hour accumulative permeation（A），accumulative epidermal retention（B）and dermal retention（C）of 5 components of microemulsion of different types epimedii folium enrichment fraction with（$n = 3$）

注（Note）：与药物溶液相比，$^*P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$（Compared with the drug solution，$^*P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）。

2.5.2　*O/W* 微乳区域的确定　电导率对微乳类型及相行为的转变敏感，通过测定电导率，建立电导率 - 含水量曲线来确定微乳类型 [16]。建立油相与混合表面活性剂不同质量比时的电导率 - 含水量曲线，确定形成 *O/W* 型微乳的临界值及其区域。结果显示，当油相与混合表面活性的质量比为 2∶8 时不能形成 *O/W* 型微乳；当油相与混合表面活性的质量比为 1∶7、1∶8、1∶9 时形成 *O/W* 型微乳的临界含水量分别为 71.32%、75.20%、78.21%，其电导率 - 含水量曲线见图 5；参照伪三元相图得到 *O/W* 型微乳区域（见图 6），确定 3 种组分的取值范围为：混合表面活性剂为 18% ～ 25%，油相为 2% ～ 4%，水相为 71% ～ 80%。

2.6　D- 最优混料设计优选微乳处方

2.6.1　D- 最优混料设计　根据“2.5.2”项下确定的水相（A）、混合表面活性剂（B）、油相（C）组分取值范围，以微乳的粒径及 PDI 为评价指标，固定载药量为 3%，采用 D- 最优混料设计，进一步

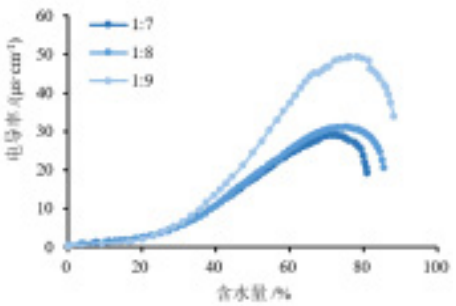


图 5 油相与混合表面活性剂质量比对淫羊藿富集部位微乳电导率 - 含水量曲线的影响

Fig 5 Effect of the mass ratio of oil phase to mixed surfactant on the conductivity-water content curve of microemulsion of epimedii folium enrichment fraction

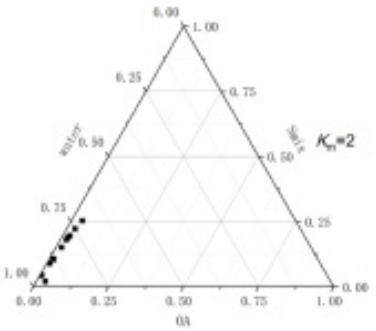


图 6 *O/W* 型淫羊藿富集部位微乳的区域

Fig 6 Region of *O/W* microemulsion of epimedii folium enrichment fraction

优化微乳处方，试验设计及测定结果见表 3。

表 3 D- 最优混料试验设计及结果

Tab 3 D-optimal mixture test design and results

No.	A. 水相 /%	B. 混合表面活性剂 /%	C. 油相 /%	粒径 /nm	PDI
1	75.30	21.57	3.13	97.1	0.457
2	74.50	23.50	2.00	34.06	0.294
3	77.36	20.64	2.00	35.89	0.267
4	72.62	25.00	2.38	43.9	0.396
5	75.77	20.23	4.00	287.9	0.281
6	77.36	20.64	2.00	33.85	0.239
7	72.62	25.00	2.38	45.96	0.418
8	75.30	21.57	3.13	90.42	0.449
9	73.87	22.13	4.00	182.5	0.304
10	79.29	18.00	2.71	85.1	0.456
11	71.29	24.71	4.00	114.1	0.299
12	78.05	19.26	2.69	66.48	0.296
13	75.30	21.57	3.13	97.21	0.544
14	79.29	18.00	2.71	82.08	0.433
15	72.74	23.51	3.75	100.1	0.287
16	77.01	18.99	4.00	469.6	0.230

2.6.2 数据模型拟合及响应面分析 运用 Design Expert 11.1 软件，以水相（A）、混合表面活性剂（B）、油相（C）为影响因素，分别以粒径（Y_1）和 PDI（Y_2）为评价指标，对试验结果进行模型拟合，拟合结果显示粒径（Y_1）和 PDI（Y_2）分别符合特殊四次模型（Special Quartic model）和二次模型（Quadratic model），其拟合方程分别为：$Y_1 = 133.27A + 191.20B + 20699.26C - 560.53AB - 23\,012.45AC - 26\,933.38BC + 16\,595.83A^2BC + 31\,265.11AB^2C - 100\,000ABC^2$，$R^2 = 0.9996$，$P < 0.0001$，失拟值 $P = 0.1589$；$Y_2 = 0.2204A + 0.3085B - 11.72C + 0.0315AB + 15.53AC + 15.30BC$，$R^2 = 0.7487$，$P = 0.0083$，失拟值 $P = 0.069$，说明模型拟合良好。根据回归分析结果，绘制粒径及 PDI 的自变量与响应值关系的二维等高线和三维响应图（见图 7），结果显示混合表面活性剂含量越高，油相含量越低，微乳的粒径越小；粒径分布更均匀（即 PDI 小）的两个区域分别是水相含量较高、油相含量较低的区域和水相含量较低、油相含量较高的区域。PDI 随着油相含量的增加呈现先增大后减小的趋势，提示粒径的均匀分布主要取决于水相和油相的合理配比。

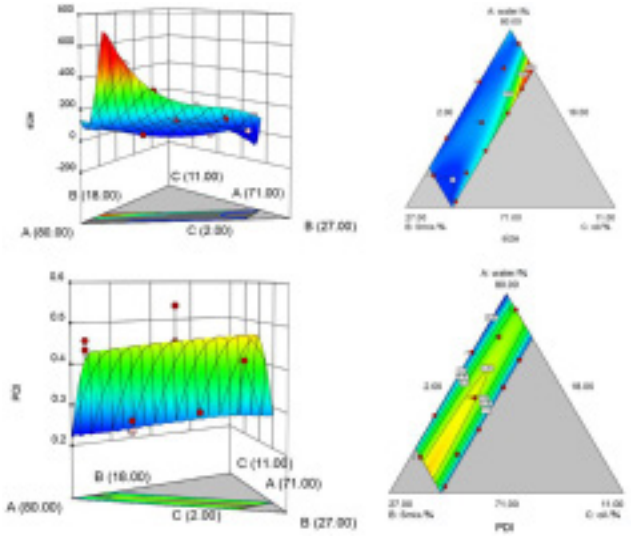


图 7 淫羊藿富集部位微乳的粒径及 PDI 三维响应面及二维等高线图

Fig 7 Three-dimensional response surface and two-dimensional contour map of particle size and PDI of microemulsion of epimedii folium enrichment fraction

2.6.3 最优处方及验证 以最小粒径及最小 PDI 为优化指标，预测最佳处方为水（77.35%）、表面活性剂 Labrasol（13.77%）、助表面活性剂 Transcutol P（6.88%）、OA（2%），所得微乳粒径为 33.85 nm、PDI 为 0.253。按照优化处方进行验证，重复 3 次，结果实际粒径为（34.93±0.76）nm，PDI 为（0.254±0.023），预测值与实际值偏差分别为 3.19%、0.40%，均小于 5%，说明方程

预测准确性良好。

2.7　微乳载药量考察

2.7.1　不同载药量微乳的粒径及 PDI 检测　预试验发现，当载药量达到 13%（*w/w*）时微乳不能完全溶解淫羊藿富集部位，故选择载药量为 1%、3%、5%、7%、9%、11%、12% 的微乳进一步考察。取未经稀释的不同载药量微乳检测粒径及 PDI，结果表明，载药量为 1%、3%、5% 的微乳粒径分别为（48.22±0.36）、（34.41±1.53）、（34.06±0.94）nm，PDI 分别为（0.241±0.002）、（0.243±0.029）、（0.364±0.021）。当载药量≥ 5% 时，PDI 大于 0.3，表明载药量≥ 5% 的微乳放置后可能出现不稳定、粒径增大的现象。因此，选择 1%、3%、5% 的载药量进行进一步考察。

2.7.2　长期稳定性研究　将载药量为 1%、3% 和 5% 的微乳室温放置，分别在制备后的第 0、1、3 个月测定其粒径及 PDI。第 3 个月，载药量为 1% 的微乳粒径和 PDI 分别为（58.91±0.83）nm、（0.232±0.008），载药量为 3% 的微乳粒径和 PDI 分别为（41.13±0.33）nm、（0.278±0.003），载药量为 5% 的微乳粒径和 PDI 分别为（44.07±0.20）nm、（0.412±0.004）。PDI 在载药量为 1% 和 3% 时无明显变化且小于 0.3，表明粒径分布均匀；但载药量为 5% 时，PDI 明显增大，说明当微乳载药量为 5% 时，长时间室温放置不稳定。因此，最终确定淫羊藿富集部位微乳载药量为 3%。

2.8　质量评价

2.8.1　体外透皮试验　最优处方制备的淫羊藿富集部位微乳及游离药物溶液的体外透皮试验操作同“2.5.1”项，于 2、4、6、8、10、20、22 和 24 h 移取接收液 0.4 mL，同时补加等温等体积的新鲜接收液，样品经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，进入液相检测，计算药物稳态透皮速率、累积透过量及滞后时间。

单位面积药物的累积透过量按下式计算：

$$Q = (C_n \times V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times V_i)/A \quad (3)$$

其中，Q（μg • cm^{-2}）为单位面积累积透过量，V 为扩散池的体积（8 mL），V_i 为每次取样体积，C_n 和 C_i 分别为第 n 次和第 i 次取样时接收液中药物浓度，A 为扩散面积（3.14 cm^2）。以累积透过量对时间作图，所得直线部分的斜率即为稳态透皮速率（J_{ss}，μg • cm^{-2} • h^{-1}），直线部分的反向延长线与 X 轴的交点即为滞后时间（T_{lag}，h）。

微乳的药物促透比（enhancement ratio，ER）按下式公式计算：

$$ER = (J_{ss\ of\ formulation})/(J_{ss\ of\ control}) \quad (4)$$

淫羊藿富集部位微乳和药物溶液中淫羊藿富集部位主要成分朝藿定 A_1、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 及淫羊藿苷的渗透动力学曲线和透皮参数分别见图 8 及表 4。由结果可知，在不同时间点，微乳中朝藿定 A_1、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 及淫羊藿苷的皮肤渗透量均大于药物溶液，促透比分别为 3.589、8.975、11.094、14.558、9.063，说明将淫羊藿富集部位包载于微乳中能促进其皮肤渗透。

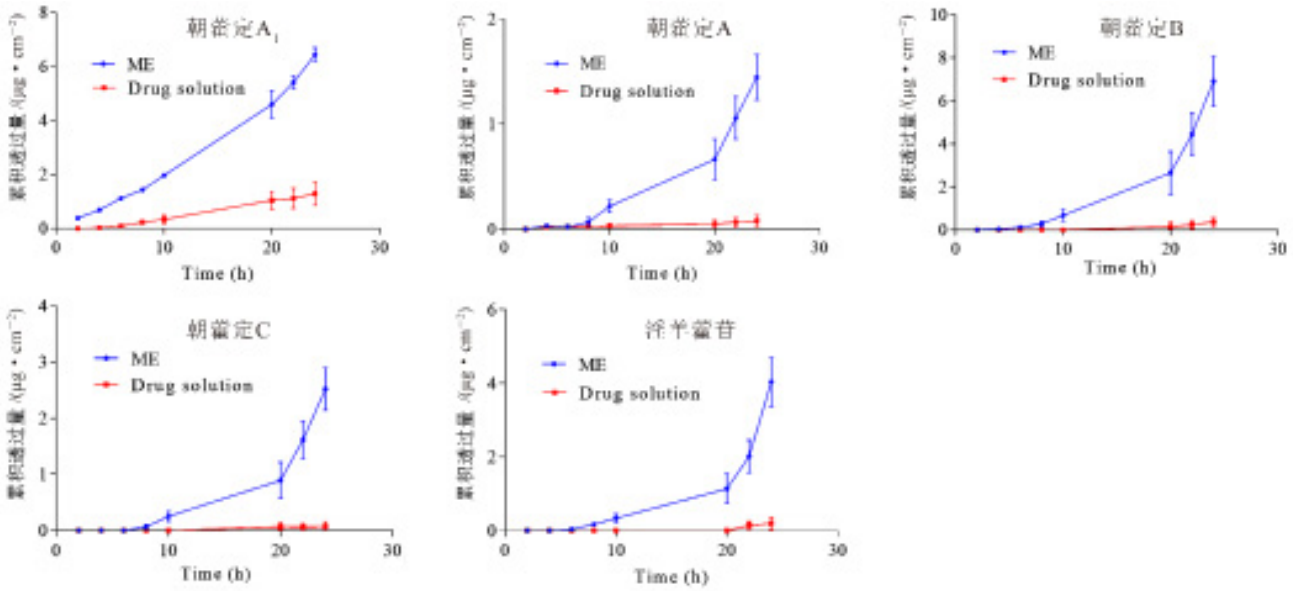


图 8　淫羊藿富集部位微乳及药物溶液中 5 种成分的体外渗透动力学曲线（$n = 3$）

Fig 8　Osmotic kinetics curve in vitro of 5 components in the microemulsion and drug solution（$n = 3$）

表 4 淫羊藿富集部位微乳及药物溶液中 5 种成分的体外透皮参数 (n = 3)

Tab 4 Transdermal parameters in vitro of 5 components in the microemulsion and drug solution (n = 3)

成分	处方	Q_{24}/（μg·cm^{-2}）	J_{ss}/（μg·cm^{-2}·h^{-1}）	T_{lag}/h	ER
朝藿定 A_1	药物溶液	1.290±0.441	0.075±0.004	3.548±0.329	—
	微乳	6.444±0.246***	0.270±0.015***	1.802±0.051	3.589
朝藿定 A	药物溶液	0.079±0.051	0.007±0.001	3.396±1.266	—
	微乳	1.444±0.215***	0.061±0.021**	4.825±0.301	8.975
朝藿定 B	药物溶液	0.371±0.197	0.025±0.001	5.455±0.619	—
	微乳	6.922±1.157***	0.275±0.103**	5.217±0.262	11.094
朝藿定 C	药物溶液	0.070±0.041	0.007±0.001	5.145±0.949	—
	微乳	2.518±0.377***	0.100±0.037**	5.428±0.309	14.558
淫羊藿苷	药物溶液	0.204±0.165	0.016±0.003	5.486±0.680	—
	微乳	4.040±0.665***	0.144±0.053**	5.340±0.182	9.063

注（Note）：与药物溶液相比，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$（Compared with the drug solution，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）。

2.8.2 体外皮肤滞留试验 体外透皮试验结束后，PBS 洗净皮肤上的残留制剂，将皮肤剪成小块，进行组织研磨后进样测定，计算单位面积药物的皮肤滞留量。淫羊藿富集部位微乳及药物溶液中 5 种成分的 24 h 皮肤滞留量见图 9，微乳中 5 种成分的累积滞留量均显著高于药物溶液，说明将淫羊藿富集部位包载于微乳中能提高药物滞留在皮肤中的量，并且 5 种成分的累积滞留量的大小与淫羊藿富集部位中初始含量有关，含量越大，滞留量越大。

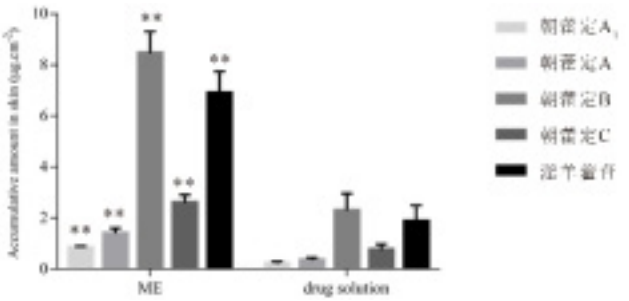


图 9 淫羊藿富集部位微乳及药物溶液中 5 种成分的 24 h 皮肤滞留量（n = 3）

Fig 9 24-hour skin retention of 5 components in microemulsion and drug solution（n = 3）

注（Note）：与药物溶液相比，$^{**}P < 0.01$（Compared with the drug solution，$^{**}P < 0.01$）。

3 讨论

皮肤是人体最大的器官，含有丰富的神经纤维，包括表皮神经末梢、真皮层的神经丛和存在于汗腺、毛囊中的神经等[17]。CIPN 中，远端轴突最先受损，使得四肢末端麻木疼痛症状以“袜子和手套”型分布发展，并且表皮神经纤维的丢失与疼痛行为直接相关，这是 CIPN 的病理学关键[14-15]。将药物包载于微乳中可以显著增加药物的皮肤滞留量，药物滞留在皮肤中可以作为储库，持续的向皮肤深层提供药物，使药物直接作用于皮肤神经纤维、远端轴突，发挥神经保护作用，促进受损神经再生，有利于治疗 CIPN 并预防其发展。中医临床常使用中药泡洗、熏蒸、贴敷等外治手段治疗 CIPN，但传统治疗手段存在使用不方便、疗效不稳定等问题，本研究制备的淫羊藿富集部位微乳具有使用方便、有效成分明确的特点，对治疗 CIPN 和提高化疗患者的生存质量具有十分重要的意义。

淫羊藿中含有黄酮类、木脂素类、多糖、生物碱类、苯酚苷、挥发油、微量元素等成分，其中黄酮类是主要药效成分，研究表明黄酮类成分具有提高性功能、抗骨质疏松、保护神经系统、预防心血管疾病等作用[18]。文献报道淫羊藿是中医治疗周围神经损伤的临床常用药[19]，且淫羊藿中发挥神经保护作用的主要活性成分主要是朝藿定与淫羊藿苷等黄酮类成分[6-8]。此外，2020 年版《中国药典》将朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 及淫羊藿苷作为淫羊藿饮片的质量控制指标成分。因此本文选择朝藿定 A_1、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 及淫羊藿苷 5 种成分作为透皮试验的评价指标。

微乳的类型影响药物的皮肤渗透及滞留效果，研究表明微乳的透皮和滞留量随微乳含水量的增加而增加[20-21]，促进效果强弱为：O/W > Bi-continuous > W/O，O/W 型微乳透皮和皮肤滞留效果较好，可能是由于含水量的增加加强了皮肤的水合作用，降低了角质层的屏障作用，使药物更易透过皮肤。目前，未见研究报道微乳类型对中药复杂多成分的皮肤渗透及滞留的影响，本研究比较了不同类型微乳对淫羊藿富集部位 5 种成分的经皮促透和皮肤滞留影响，可为包载中药多成

分的微乳类型的选择提供一定指导。然而在本研究中，5 种成分在不同类型的微乳中均表现出相似的渗透和滞留特性，可能是由于 5 种成分的油水分配系数（log*P* 值）相似，因此，需要进一步研究不同类型微乳对 log*P* 值差异较大的多种成分经皮促透和皮肤滞留的影响，这将对包载中药复杂成分的微乳类型的选择提供更科学的指导。

微乳类型的判断依据于微乳在相转变过程中的理化性质变化 [22]，判断微乳类型的常用方法有电导率法、差式扫描量热法、小角 X 衍射法、核磁共振法等。电导率法的优势在于微乳电导的变化与其类型变化关系理论明确、操作简单、结果精确 [23-24]。本研究通过建立电导率 - 含水量曲线图更准确、清晰地判断了微乳类型变化的临界点。

参考文献

[1] Kerckhove N，Collin A，Condé S，et al. Long-term effects，pathophysiological mechanisms，and risk factors of chemotherapy-induced peripheral neuropathies：a comprehensive literature review [J]. Front Pharmacol，2017，8（86）：1-17.

[2] 孟晶，朱静 . 中药防治化疗所致周围神经病变的研究进展 [J]. 南京中医药大学学报，2018，34（6）：634-638.

[3] 孙焱，李丹，曹雯，等 . 奥沙利铂相关周围神经病变的中医药外治进展 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2019，21（7）：1488-1494.

[4] 柯丹丹，贾立群，娄彦妮 . 奥沙利铂致周围神经病变的中医外治研究进展 [J]. 中日友好医院学报，2014，28（1）：56-58.

[5] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：341.

[6] Kou YH，Wang ZY，Wu ZH，et al. Epimedium extract promotes peripheral nerve regeneration in rat [J]. J Peripher Nerv Syst，2014，19（3）：271-272.

[7] 彭晴，刘涛，余昌胤，等 . 淫羊藿次苷Ⅱ对大鼠坐骨神经损伤后功能恢复和神经再生的影响 [J]. 中国医药导报，2016，13（5）：12-16.

[8] Chen B，Niu SP，Wang ZY，et al. Local administration of icariin contributes to peripheral nerve regeneration and functional recovery [J]. Neural Regen Res，2015，10（1）：84-89.

[9] Lin HM，Lin LF，Xia ZZ，et al. Neuroprotective effects and UPLC-Q-TOF/MS-based active components identification of external applied a novel Wen-Luo-Tong microemulsion [J]. Artif Cell Nanomed Biotechnol，2018，46（8）：1981-1991.

[10] 兰海，刘欣妍，余玲，等 . 大孔树脂纯化淫羊藿中朝藿定与淫羊藿苷工艺研究 [J]. 中草药，2020，51（17）：4473-4481.

[11] 李干佐，张正全 . 微乳液理论及其应用 [M]. 北京：石油工业出版社，1995.

[12] 刘筱雅，江昌照，高文彦，等 . 微乳和基于微乳的经皮给药制剂的研究进展 [J]. 中国医药工业杂志，2020，51（4）：442-449.

[13] 康荣荣，杨苏芳，韩萌，等 . 微乳在经皮给药系统中的应用 [J]. 中南药学，2014，12（3）：253-258.

[14] Zheng H，Xiao WH，Bennett GJ. Mitotoxicity and bortezomib-induced chronic painful peripheral neuropathy [J]. Exp Neurol，2012，238（2）：225-234.

[15] Bennett GJ，Guo KL，Wen HX，et al. Terminal arbor degeneration（TAD）：a novel lesion produced by the antineoplastic agent，paclitaxel [J]. Eur J Neurosci，2011，33（9）：1667-1676.

[16] 陈丽华，赵小婷，吴德智，等 . 电导率法筛选微乳处方及对其相行为的研究 [J]. 中国药学杂志，2011，46（1）：40-43.

[17] 吴仲敏，杨通河 . 表皮神经纤维密度与小纤维感觉神经病 [J]. 西部医学，2008，20（6）：1303-1305.

[18] Chen XJ，Tang ZH，Li XW，et al. Chemical constituents，quality control，and bioactivity of epimedii folium（Yinyanghuo）[J]. Am J Chinese Med，2015，43（5）：1-52.

[19] 周岚，梅晓云 . 中药促周围神经再生的研究进展 [J]. 中国中药杂志，2011，36（1）：77-80.

[20] Naoui W，Bolzinger MA，Fenet B，et al. Microemulsion microstructure influences the skin delivery of an hydrophilic drug [J]. Pharm Res，2011，28（7）：1683-1695.

[21] Hoppel M，Ettl H，Holper E，et al. Influence of the composition of monoacyl phosphatidylcholine based microemulsions on the dermal delivery of flufenamic acid [J]. Int J Pharm，2014，475（1-2）：156-162.

[22] 张凯，廖德华，戴伟，等 . 微乳微结构转变与相应参数变化的研究进展 [J]. 中南药学，2013，11（3）：201-203.

[23] 向大位，唐甜甜，彭金飞，等 . 电导率 - 含水量曲线法与目测法确定 *O/W* 型微乳成型临界值的比较 [J]. 药学学报，2010，45（8）：1052-1056.

[24] 李得堂，张丽娟，唐洪梅，等 . 电导率 - 含水量曲线法测 *O/W* 型微乳的稳定性 [J]. 华西药学杂志，2016，31（2）：191-193.

（收稿日期：2021-10-19；修回日期：2022-01-20）

狭叶重楼中一个新的环胆甾烷醇型甾体皂苷

胡晋铭，汤海峰*，陆云阳，刘杨，田韵远，樊培（空军军医大学药学系中药与天然药物学教研室，西安 710032）

摘要：目的 研究狭叶重楼的皂苷类化学成分，为拓宽重楼属植物的药用资源提供科学依据。**方法** 采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、反相硅胶柱色谱和半制备高效液相色谱等方法，从狭叶重楼 70% 乙醇提取物的乙酸乙酯萃取部位和正丁醇萃取部位分离化合物，通过波谱分析和化学手段鉴定化学结构。**结果** 分离得到 7 个甾体皂苷类成分，分别鉴定为 26-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖基 -3*β*，16*α*，26- 三羟基 -（23*R*，25*R*）-16，23- 环胆甾烷醇 -5，17（20）- 二烯 -22- 酮 -3-*O*-*α*-*L*- 呋喃阿拉伯糖基 -（1 → 4）-[*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 2）]-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷（**1**）、重楼皂苷 H（**2**）、重楼皂苷Ⅵ（**3**）、偏诺皂苷元 -3-*O*-*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 4）-[*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 2）]-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷（**4**）、重楼皂苷Ⅶ（**5**）、26-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖基 -17，22- 二羟基 -（25*R*）- 呋甾 -5- 烯 -3-*O*-*α*-*L*- 呋喃阿拉伯糖基 -（1 → 4）-[*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 2）]-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷（**6**）和 26-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖基 -17，22- 二羟基 -（25*R*）- 呋甾 -5- 烯 -3-*O*-*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 4）- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 4）-[*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 2）]-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷（**7**）。**结论** 化合物 **1** 为新化合物，是具有罕见骨架结构的环胆甾烷醇型甾体皂苷，为首次从重楼属植物中发现，化合物 **4**、**6** 和 **7** 为首次从狭叶重楼中分离得到。

关键词：狭叶重楼；甾体皂苷；环胆甾烷醇型
中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)04-0736-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.003

A new cyclocholestanol-type steroidal saponin from *Paris polyphylla* var. *stenophylla*

HU Jin-ming, TANG Hai-feng*, LU Yun-yang, LIU Yang, TIAN Yun-yuan, FAN Pei (*Department of Chinese Materia Medica and Natural Medicines, School of Pharmacy, Air Force Medical University, Xi'an* 710032)

Abstract: Objective To determine the saponin constituents from the rhizomes of *Paris polyphylla* var. *stenophylla* to enrich the resource of the plants from genus *Paris*. **Methods** The compounds from the ethyl acetate fraction and *n*-butanol fraction of 70% ethanol extraction were isolated and purified by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, ODS column chromatography and semi-preparative HPLC. Their structures were identified by spectral analysis and chemical methods. **Results** Seven steroidal saponins were isolated and identified as 26-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl-3*β*, 16*α*, 26-trihydroxy- (23*R*, 25*R*)-16, 23-cyclocholest-5, 17 (20)-dien-22-one-3-*O*-*α*-*L*-arabinofuranosyl- (1 → 4)-[*α*-*L*-rhamnopyranosyl- (1 → 2)] -*β*-*D*-glucopyranoside (**1**), paris saponin H (**2**), polyphyllinⅥ (**3**), pennogenin-3-*O*-*α*-*L*-rhamnopyranosyl-(1 → 4)-[*α*-*L*-rhamnopyranosyl- (1 → 2)] -*β*-*D*-glucopyranoside (**4**), polyphyllinⅦ (**5**), 26-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl-17, 22-dihydroxy- (25*R*)-furost-5-en-3-*O*-*α*-*L*-arabinofuranosyl- (1 → 4)-[*α*-*L*-rhamnopyranosyl- (1 → 2)] -*β*-*D*-glucopyranoside (**6**) and 26-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl-17, 22-dihydroxy-

基金项目：国家自然科学基金面上项目（No.81973192）；陕西省重点研发计划（No.2020SF-311，No.2021ZDLSF04-07）。
作者简介：胡晋铭，男，硕士，主要从事天然药物化学研究，email：18752781636@163.com *__通信作者：__汤海峰，男，教授，主任药师，博士研究生导师，主要从事天然药化研究和中药、海洋药物开发，email：tanghaifeng71@163.com

(25*R*)-furost-5-en-3-*O*-*α*-*L*-rhamnopyranosyl-(1 → 4)-*O*-*α*-*L*-rhamnopyranosyl- (1 → 4)-*O*-[*α*-*L*-rhamnopyranosyl-(1 → 2)] -*β*-*D*-glucopyranoside (**7**), respectively. **Conclusion** Compound **1** is a new cyclocholestanol-type steroidal saponin with a rare skeleton, which has been firstly found from genus *Paris*. Compounds **4**, **6** and **7** have been isolated from the plant for the first time.

Key words: *Paris polyphylla* var. *stenophylla*; steroidal saponin; cyclocholestanol-type

中药重楼（Paridis Rhizoma）为百合科植物云南重楼和七叶一枝花两个品种的干燥根茎[1]。重楼属植物在中国大陆地区分布有 20 个种，10 余种变种，根据实地调查和查阅资料后发现，除少数稀有种外，几乎所有品种均在实际市场流通中作为重楼使用。研究表明，重楼属植物的主要有效成分为甾体皂苷，总称为重楼皂苷，具有止血、抑菌、镇痛、镇静和免疫调节等多种生理和药理活性[2]，其中，重楼皂苷Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅵ、Ⅶ和 H 等对肺癌、宫颈癌、肝癌等 10 余种癌症的肿瘤细胞的生长有显著抑制作用[3-6]。随着市场对中药重楼需求量的增加，大规模的采集使得野生药材急剧减少，资源严重破坏。陕西省安康市北依秦岭，南靠巴山，具有适宜的地理与气候条件，是狭叶重楼（*Paris polyphylla* Smith var. *stenophylla* Franch）的重要产区。目前关于狭叶重楼化学成分的研究报道有限，仅从四川产狭叶重楼中分离鉴定了 5 种已知的重楼皂苷[7]。为了明确狭叶重楼的药效物质基础，为其开发利用提供理论依据，本文对其根茎 70% 乙醇提取物的乙酸乙酯和正丁醇萃取部位开展了化学研究，共分离得到 7 个甾体皂苷 **1** ～ **7**（见图 1）。其中化合物 **1** 为新化合物，属于重楼属植物中少见的胆甾烷醇型甾体皂苷，其苷元具有 6/6/6/5/5 五环稠合胆甾烷骨架，具有这一新颖骨架的环胆甾烷醇型甾体皂苷在天然界中较为罕见，亦是首次在本属植物中发现；化合物 **4**、**6** 和 **7** 为首次从狭叶重楼中分离得到。

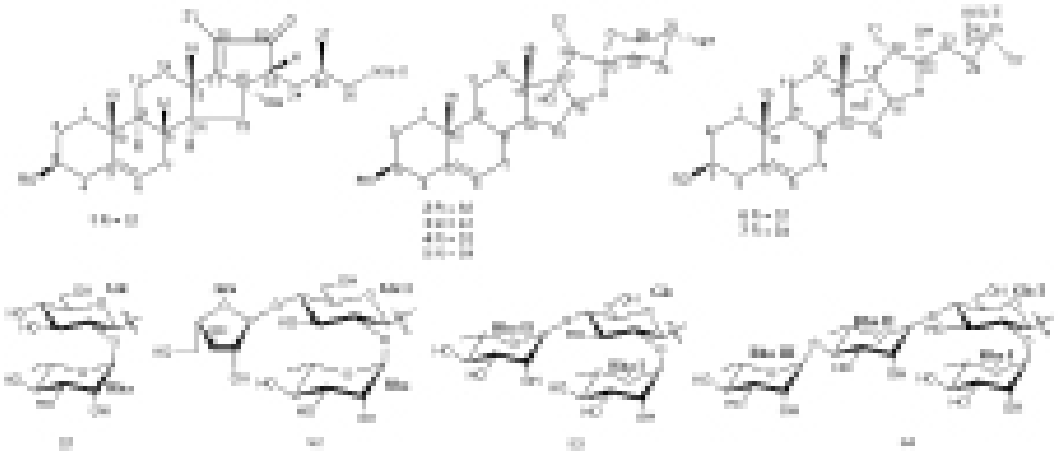


图 1　甾体皂苷 **1** ～ **7** 的结构式

Fig 1　Structures of steroidal saponins **1** － **7**

1　材料

Quatrro 质谱仪（Waters 公司）；Bruker AVANCE 800 型核磁共振波谱仪（Bruker 公司）；Gilson 2050 高效液相色谱仪 [配 YMC-Pack R&D ODS-A 半制备色谱柱（20 mm×250 mm，5 μm）]、ODS C_{18} 柱（Pharmacia 公 司）；Sephadex LH-20 凝 胶（GE 公司）；薄层色谱用硅胶 G、柱色谱硅胶（100 ～ 200 目、200 ～ 300 目，青岛海洋化工厂）；电子天平（精度：0.0001 g，赛多利斯科学仪器有限公司）；低温冷却循环泵（DLSB-40 型，陕西爱信仪器有限公司）；隔膜真空泵（V-100 型，瑞士 BUCHI 公司）；旋转蒸发仪（N-1300 型）、电热恒温水浴锅（OSB-2100 型）（上海爱朗仪器有限公司）；电热鼓风干燥箱（DHG-924OA 型，上海一恒科学仪器有限公司）；色谱纯甲醇、乙腈（天津科密欧公司）；氘代试剂（Merck 公司）；显色剂（10% 硫酸 / 乙醇）；其他试剂均为分析醇。

药材于 2020 年 8 月采自陕西省安康市镇坪县，经空军军医大学药学系中药与天然药物学教研室汤海峰教授鉴定为狭叶重楼（*Paris polyphylla* Smith var. *stenophylla* Franch）的根茎，药材标本（编号：20200805）保存在该教研室标本室。

2 提取与分离

狭叶重楼的干燥根茎 1.9 kg，粉碎后用 70% 乙醇浸泡过夜，回流提取 5 次，每次 2 h，减压回收溶剂得到浸膏 484.4 g。将浸膏加入 6 L 蒸馏水分散后，用等体积石油醚萃取 3 次脱脂，再先后用等体积乙酸乙酯和水饱和正丁醇分别萃取 3 次，减压回收得乙酸乙酯部位 6.85 g 和正丁醇部位 65.96 g。乙酸乙酯部位和正丁醇部位分别用硅胶柱色谱分离，用 $V_{二氯甲烷}$：$V_{甲醇}$：$V_{水}$（50：1：0 ～ 65：35：5）为洗脱剂梯度洗脱，合并后从乙酸乙酯部位得到 6 个部分（Fr.A ～ Fr.F），从正丁醇部位得到 12 个部分（Fr.1 ～ Fr.12）。

Fr.E（1.97 g）经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱（洗脱剂为 $V_{甲醇}$：$V_{水}$＝4：1）除去杂质，再经 ODS C_{18} 柱色谱，$V_{甲醇}$：$V_{水}$（2：8 ～ 10：0）为洗脱剂梯度洗脱，得到 Fr.E-1 ～ Fr.E-6。Fr.E-6 通过半制备高效液相色谱分离纯化（流速 10 mL•min^{-1}，检测波长 206 nm；以下均相同），48% 乙腈洗脱得到化合物 **2**（460.0 mg，t_R ＝ 19.5 min）和化合物 **3**（20.3 mg，t_R ＝ 22.5 min）。Fr.5（2.57 g）经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱（洗脱剂为甲醇）除去杂质，再经 ODS C_{18} 柱色谱分离，$V_{甲醇}$：$V_{水}$（4：6 ～ 10：0）为洗脱剂梯度洗脱，得到 Fr.5-1 ～ Fr.5-7。Fr.5-5 经过半制备 HPLC 分离纯化，40% 乙腈洗脱得到化合物 **4**（80.8 mg，t_R ＝ 24.0 min）。Fr.6（7.18 g）经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱（洗脱剂为甲醇）除去杂质，再经 ODS C_{18} 柱色谱，$V_{甲醇}$：$V_{水}$（2：8 ～ 10：0）为洗脱剂梯度洗脱，得到 Fr.6-1-1 ～ Fr.6-1-8。Fr.6-1-6 经半制备 HPLC 反复分离纯化，40% 乙腈洗脱得到化合物 **5**（213.7 mg，t_R ＝ 24.1 min）。Fr.8（6.28 g）经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱（洗脱剂为 $V_{甲醇}$：$V_{水}$＝4：1）除去杂质，再经 ODS C_{18} 柱色谱，$V_{甲醇}$：$V_{水}$（2：8 ～ 10：0）为洗脱剂梯度洗脱，得到 Fr.8-1-1 ～ Fr.8-1-4。Fr.8-1-3 经半制备 HPLC 反复分离纯化，20% 乙腈洗脱得到化合物 **1**（5.1 mg，t_R ＝ 24.5 min）和化合物 **6**（7.7 mg，t_R ＝ 28.5 min）。Fr.9（4.32 g）经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱（洗脱剂为 $V_{甲醇}$：$V_{水}$＝4：1）除去杂质，再经 ODS C_{18} 柱色谱，$V_{甲醇}$：$V_{水}$（2：8 ～ 10：0）为洗脱剂梯度洗脱，得到 Fr.9-1-1 ～ Fr.9-1-6。Fr.9-1-5 经半制备 HPLC 反复分离纯化，20% 乙腈洗脱得到化合物 **7**（3.6 mg，t_R ＝ 30.2 min）。

3 结构鉴定

化合物 **1**：白色无定形粉末，[α] － 116.5°（*c* 0.05，MeOH），Liebermann-Burchard 和 Molish 反应均呈阳性，提示该化合物可能为皂苷类化合物。UV（MeOH）λ_{max}（logε）238（3.09），198（2.76）nm；IR（KBr）ν_{max} 3430，2935，1702，1660，1450 cm^{-1}，提示有 α，β- 不饱和酮结构的存在。ESI-MS 显示其准分子离子峰为 *m/z* 1053 [M+Na]$^+$ 和 1029 [M-H]$^-$；从 HR-ESI-MS 的准分子离子峰 *m/z* 1029.4893 [M-H]$^-$（$C_{50}H_{77}O_{22}$，计算值为 1029.4912），结合 NMR 数据，可推断出其分子式为 $C_{50}H_{78}O_{22}$。

分析化合物 **1** 的 ^{13}C-NMR 和 DEPT 谱，发现其共有 50 个碳信号，其中 27 个碳信号归属于苷元部分。^{1}H-NMR（800 MHz，C_5D_5N）显示高场区有 5 个甲基氢信号 δ_H 1.86（s）、1.49（s）、1.15（d，J ＝ 6.6 Hz）、1.81（d，J ＝ 6.2 Hz）和 1.11（s），分别与 δ_C 9.0、16.1、17.6、19.2 和 19.9 信号相对应。进一步分析表明：化合物 **1** 的结构中包含 1 个三取代双键（δ_H 5.36；δ_C 122.1，δ_C 141.4）、1 个四取代双键（δ_C 128.7 和 182.6）、1 个酮羰基（δ_C 212.8）、3 个季碳（δ_C 37.7、44.5 和 83.4）。通过 2D-NMR（^{1}H-^{1}H COSY、HSQC、HMBC、TOCSY 和 NOESY）对苷元部分的碳氢信号进行分析并归属，结果见表 1。在 HMBC 谱中，H_3-19（δ_H 1.10）和 C-5（δ_C 141.4）有远程相关信号，H-6（δ_H 5.36）与 C-4（δ_C 39.4）、C-8（δ_C 32.5）存在远程相关，同时 H-6（δ_H 5.36）与 H-7（δ_H 1.98）在 ^{1}H-^{1}H COSY 谱中相关，表明三取代双键为 $\Delta^{5(6)}$。此外，HMBC 谱显示 H_3-27（δ_H 1.15）与 C-24（δ_C 29.7）、C-25（δ_C 32.3）和 C-26（δ_C 77.1）有远程相关，结合 ^{1}H-^{1}H COSY 谱中 H-23/H_2-24、H_2-24/H-25、H-25/H_2-26 和 H-25/H_3-27 的相关信号，可证明侧链的存在。在 HMBC 谱中可观察到 H-23（δ_H 2.48）与 C-16（δ_C 83.4）、C-22（δ_C 212.8）和 C-25，以及 H_3-21（δ_H 1.86）与 C-17（δ_C 182.6）、C-20（δ_C 128.7）和 C-22 的远程相关，说明苷元存在一个具有 α，β- 不饱和酮基的五元环并与上述侧链相连。在 NOESY 谱中，H_3-18（δ_H 1.49）/H-8（δ_H 1.71）、H-8/Hβ-15（δ_H 2.00）和 Hβ-15/H-23 相关峰表明 H-23 是 β 构型；Hβ-15/H-23 的 NOE 相关亦提示 OH-16 为 α 构型。通过 H_2-26 化学位移值（δ_H 4.07 和 3.75）的差值（$\Delta\delta_H$ ＝ 0.32 ＜ 0.48），可以确定 25 位碳为 *R* 构型 [8]。化合物 **1** 的苷元部分波谱数据与文献 [9] 报道的 ypsiyunnoside A 苷元部分基本一致，从而确定其苷元亦为 3β，16α，26- 三羟基 -（23*R*，25*R*）-16，23- 环胆甾烷醇 -5，17（20）- 二烯 -22- 酮。

取化合物 **1** 1.0 mg 用 2 mL（2 mol•L^{-1}）三氟乙酸水解，按文献方法[10-11]，将所得单糖制备成三甲基硅醚化 *L*- 半胱氨酸衍生物，并用标准糖衍生物作对照，进行 GC 分析，确定化合物 **1** 的糖基组成为 *D*- 葡萄糖（Glc）、*L*- 鼠李糖（Rha）和 *L*- 阿拉伯糖（Ara），组成比为 2∶1∶1。在 ^{13}C-NMR 谱中显示 4 个糖的端基碳信号 δ_C 100.7、102.4、105.8 和 110.1，与 ^{1}H-NMR 谱中的端基氢信号 δ_H 4.99（d，J = 7.7 Hz，Glc Ⅰ）、6.33（br s，Rha）、4.88（d，J = 7.8 Hz，Glc Ⅱ）和 5.96（d，J = 1.9 Hz，Ara）分别对应。由 Glc Ⅰ和 Glc Ⅱ的端基氢偶合常数可知 2 个葡萄糖形成的苷键均为 β 构型；根据 Ara 的端基氢偶合常数可以推断呋喃阿拉伯糖的苷键构型为 α 构型；Rha 的端基氢信号与其 C-3（δ_C 73.3）和 C-5（δ_C 70.0）信号在 HMBC 谱中强相关，可知其形成的苷键为 α 构型。通过对 2D-NMR 解析，归属了 4 个糖基的碳氢信号（见表 1）。在 HMBC 谱中，Glc Ⅰ H-1 与苷元 C-3（δ_C 78.5）存在远程相关峰，说明 Glc Ⅰ连接于苷元 C-3 位；Rha H-1 与 Glc Ⅰ C-2（δ_C 77.9）的远程相关以及 Ara H-1 与 Glc Ⅰ C-4（δ_C 77.5）的远程相关表明 Rha 和 Ara 分别连接于 Glc Ⅰ的 C-2 和 C-4 位；Glc Ⅱ与 C-26 的远程相关信号表明 Glc Ⅱ连接于苷元 C-26 位。NOESY 谱的相关信号进一步验证了上述糖链结构（见图 2）。综上所述，确定化合物 **1** 的结构为 26-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖基 -3*β*，16*α*，26- 三羟基 -（23*R*，25*R*）-16，23- 环胆甾烷醇 -5，17（20）- 二烯 -22- 酮 -3-*O*-*α*-*L*- 呋喃阿拉伯糖基 -（1 → 4）-[*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 2）]-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷，经 SciFinder 检索，其为一新化合物。皂苷 **1** 的苷元为 6/6/6/5/5 五环稠合胆甾烷骨架，具有这一新颖骨架的皂苷仅在云南丫蕊花[9]和吉林延龄草[12]中各报道了 1 个，这是首次在重楼属植物中发现。

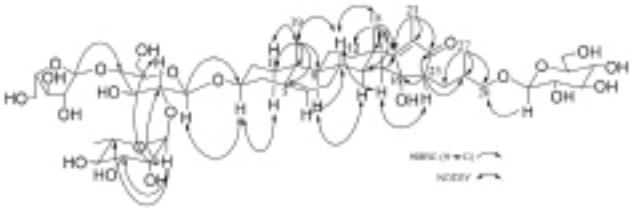


图 2　化合物 **1** 重要的 HMBC 和 NOESY 相关

Fig 2　Key HMBC and NOESY correlations of compound **1**

化合物 **2**：白色无定形粉末，Liebermann-Burchard 和 Molish 鉴定反应均呈阳性，表明该化合物可能是皂苷类化合物。ESI-MS 显示其准分子离子峰 *m/z* 893 [M+Na]$^+$ 和 869 [M-H]$^-$，提示其相对分子质量为 870，结合 NMR 数据推断其分子式为 $C_{44}H_{70}O_{17}$。^{13}C-NMR 和 DEPT 谱分析表明，该化合物的 44 个碳信号中有 27 个归属于苷元部分。在化合物 **2** 的 ^{1}H-NMR 谱（800 MHz，C_5D_5N）高场区显示有 5 个甲基氢信号 δ_H 1.26（d，J = 6.8 Hz），1.00（s），0.76（d，J = 4.7 Hz），1.75（d，J = 5.9 Hz）和 1.11（s），与 ^{13}C-NMR 谱（200 MHz，C_5D_5N）中 δ_C 10.4、17.8、18.0、19.2 和 20.1 信号分别对应。化合物 **2** 的 NMR 谱中还存在 3 个季碳信号（δ_C 37.7、45.7 和 90.8）、1 个半缩醛碳特征信号（δ_C 110.5）和 1 组三取代烯烃信号（δ_H 5.36；δ_C 141.4，122.5）。在 HMBC 谱中，H_3-19（δ_H 1.11）和 C-5（δ_C 141.4）有远程相关信号，烯烃质子 δ_H

表 1　化合物 1 的 ^{1}H-NMR (800 MHz) 和 ^{13}C-NMR (200 MHz) 数据 (in C_5D_5N)

Tab 1　^{1}H-NMR (800 MHz) and ^{13}C-NMR (200 MHz) data of compound 1 (in C_5D_5N)

No.	δ_C	δ_H mult.（J in Hz）	No.	δ_C	δ_H mult.（J in Hz）
1	38.0	1.80 m，1.05 m	3-*O*-sugar		
2	30.6	2.13 m，1.91 m	Glc Ⅰ-1	100.7	4.99 d（7.7）
3	78.5	3.90 m	2	77.9	4.25 m
4	39.4	2.81 m	3	78.2	4.30 m
5	141.4	—	4	77.5	4.38 m
6	122.1	5.36 br s	5	77.2	3.81 m
7	32.2	1.98 m，1.60 m	6	61.9	4.32 m，4.26 m
8	32.5	1.71 m	Ara-1	110.1	5.96 d（1.9）
9	50.9	1.01 m	2	83.2	4.89 m
10	37.7	—	3	78.4	4.88 m
11	21.1	1.58 m	4	87.2	4.90 m
12	36.1	2.12 m，1.49 br s	5	63.0	4.29 m，4.20 m
13	44.5	—	Rha-1	102.4	6.33 br s
14	54.2	1.12 m	2	73.0	4.83 m
15	38.8	2.31 dd（7.8，12.9） 2.00 d（12.3）	3	73.3	4.65 m
16	83.4	—	4	74.6	4.40 m
17	182.6	—	5	70.0	4.99 m
18	16.1	1.49 s	6	19.2	1.81 d（6.2）
19	19.9	1.11 s	26-*O*-sugar		
20	128.7	—	Glc Ⅱ-1	105.8	4.88 d（7.8）
21	9.0	1.86 s	2	75.8	4.07 m
22	212.8	—	3	79.1	4.26 m
23	57.9	2.48 dd（3.7，10.2）	4	72.1	4.24 m
24	29.7	2.42 dd（3.5，10.1） 2.01 m	5	79.0	3.95 m
25	32.3	2.54 m	6	63.3	4.58 m，4.38 m
26	77.1	4.07 d（2.6） 3.75 dd（6.2，9.6）			
27	17.6	1.15 d（6.6）			

5.36 与 C-8（δ_C 33.0）之间的远程相关信号，同时 H-6（δ_H 5.36）与 H-7（δ_H 1.95）在 ^{1}H-^{1}H COSY 谱中相关，表明三取代双键为 $\Delta^{5(6)}$。通过 2D-NMR 分析归属了化合物 **2** 的碳信号（见表 2）和氢信号，经与文献对照，确定其苷元是常见的偏诺皂苷元[13]。

按与化合物 **1** 相同的方法，对化合物 **2** 进行酸水解及衍生，GC 分析表明其糖基为 *L*-Rha、*L*-Ara 和 *D*-Glc（1∶1∶1）。NMR 谱中显示 3 个糖的端基氢和端基碳信号 [δ_H 4.91（d，J = 7.2 Hz，Glc H-1），5.86（br s，Ara H-1），6.17（d，J = 5.7 Hz，Rha H-1）;δ_C100.6（Glc C-1），110.1（Ara C-1），102.4（Rha C-1）]。通过 HMBC 谱分析确定了糖的连接方式：Glc H-1 与苷元 C-3（δ_C 78.7）的远程相关信号表明 Glc 连接于 C-3 位，Rha H-1 与 Glc C-2（δ_C 78.2）的远程相关以及 Ara H-1 与 Glc C-4（δ_C 77.8）的远程相关，表明 Rha 和 Ara 分别连接于 Glc 的 2 位和 4 位，与化合物 **1** 的 3 位糖链相同，核磁数据亦基本一致。将化合物 **2** 的波谱数据与重楼皂苷 H[14] 对照，基本一致，从而确定化合物 **2** 为重楼皂苷 H。

化合物 **3**：白色无定形粉末，Liebermann-Burchard 和 Molish 反应均呈阳性，表明该化合物可能是皂苷类化合物。ESI-MS 显示其准分子离子峰为 *m/z* 761 [M+Na]$^+$ 和 737 [M-H]$^-$，提示其相对分子质量为 738，结合 NMR 数据推断其分子式为 $C_{39}H_{62}O_{13}$。通过与化合物 **2** 对照，发现两者苷元部分的 NMR 数据基本一致，如 4 个甲基信号 [δ_H 1.24（d，J = 6.6 Hz），0.97（s），0.69（d，J = 4.2 Hz）和 1.10（s）；δ_C 10.3、17.6、17.8 和 20.0]、3 个季碳信号（δ_C 37.6、45.6 和 90.6）、1 个半缩醛碳特征信号（δ_C 110.3）和 1 组三取代烯烃信号（δ_H 5.30；δ_C 141.3，122.3）等，从而确定化合物 **3** 的苷元亦为偏诺皂苷元，且在苷元 3 位与糖连接成苷。化合物 **3** 的 ^{13}C-NMR 谱中，比化合物 **2** 少一组五碳糖信号，根据 Glc C-4 的化学位移值（δ_C 72.3），推断葡萄糖的 C-4 位未连接阿拉伯糖。

按与化合物 **1** 相同的方法，对化合物 **3** 进行酸水解及衍生，经 GC 分析表明其糖基为 *D*-Glc 和 *L*-Rha（1∶1）。NMR 谱中显示 2 个糖的端基氢和端基碳信号 [δ_H 5.03（d，J = 7.2 Hz，Glc H-1），6.39（br s，Rha H-1）；δ_C100.8（Glc C-1），102.6（Rha C-1）]。通过 HMBC 谱分析确定了糖的连接方式：Glc H-1 与 C-3（δ_C 78.4）的远程相关信号表明 Glc 连接于苷元 C-3 位，Rha H-1 与 Glc C-2（δ_C 78.3）的远程相关，表明 Rha 连接于 Glc 的 2 位。将化合物 **3** 的波谱数据与文献对照[15]，基本一致，从而确定化合物 **3** 为重楼皂苷Ⅵ。

化合物 **4**：白色无定形粉末，Liebermann-Burchard 和 Molish 反应均呈阳性，表明该化合物可能是皂苷类化合物。ESI-MS 显示其准分子离子峰为 *m/z* 907 [M+Na]$^+$ 和 883 [M-H]$^-$，提示其相对分子质量为 884，结合 NMR 数据推断其分子式为 $C_{45}H_{72}O_{17}$。通过与化合物 **3** 对照，发现两者苷元部分的 NMR 数据基本一致，如 4 个甲基信号 [δ_H 1.25（d，J = 7.2 Hz），0.98（s），0.71（d，J = 5.8 Hz）和 1.10（s）；δ_C 10.4、17.7、17.9 和 20.0]、3 个季碳信号（δ_C 37.7、45.7 和 90.7）、1 个半缩醛碳特征信号（δ_C 110.4）和 1 组三取代烯烃信号 [δ_H 5.33（br d，J = 3.0 Hz）；δ_C 141.3，122.4] 等，从而确定化合物 **4** 的苷元亦为偏诺皂苷元，且在苷元 3 位与糖连接成苷。化合物 **4** 的 ^{13}C-NMR 谱中，比化合物 **3** 多出一组甲基五碳糖信号。

按与化合物 **1** 相同的方法，对化合物 **4** 进行酸水解及衍生，经 GC 分析表明其糖基为 *L*-Rha 和 *D*-Glc（2∶1）。NMR 谱中显示 3 个糖的端基氢和端基碳信号 [δ_H 4.94（d，J = 7.0 Hz，Glc H-1），6.38（br s，Rha Ⅰ H-1），5.85（br s，Rha Ⅱ H-1）;δ_C 100.8（Glc C-1），102.6（Rha Ⅰ C-1），103.4（Rha Ⅱ C-1）]。通过 HMBC 谱分析确定了糖的连接方式：Glc H-1 与 C-3（δ_C 78.6）的远程相关信号表明 Glc 连接于苷元 C-3 位，Rha Ⅰ H-1 与 Glc C-2（δ_C 78.4）以及 Rha Ⅱ H-1 与 Glc C-4（δ_C 79.1）的远程相关，表明 Rha Ⅰ和 Rha Ⅱ分别连接于 Glc 的 2 位和 4 位。将化合物 **4** 的波谱数据与文献对照[16]，基本一致，从而确定化合物 **4** 为偏诺皂苷元 -3-*O*-*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 4）-[*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 2）]-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷，为首次从狭叶重楼中分离得到。

化合物 **5**：白色无定形粉末，Liebermann-Burchard 和 Molish 反应均呈阳性，表明该化合物可能是皂苷类化合物。ESI-MS 显示其准分子离子峰为 *m/z* 1069 [M+Na]$^+$ 和 1045 [M-H]$^-$，提示其相对分子质量为 1046，结合 NMR 数据推断其分子式为 $C_{52}H_{86}O_{21}$。通过与化合物 **4** 对照，其苷元部分的 NMR 信号基本一致，可以确定化合物 **4** 的苷元亦为偏诺皂苷元。化合物 **5** 的 ^{13}C-NMR 谱中比化合物 **4** 多了一组甲基五碳糖信号，根据 Rha Ⅱ C-4 的化学位移值（δ_C 81.0）提示该

糖基与 Rha Ⅱ 的 C-4 位相连接。通过 2D-NMR 分析归属了化合物 **5** 的所有碳氢信号，重要的 ^{1}H-NMR（800 MHz，C_5D_5N）信号如下：δ_H 0.99，1.11（each 3H，s），0.74（3H，d，J = 5.7 Hz），1.26（3H，d，J = 7.1 Hz），1.75（3H，d，J = 5.6 Hz，Rha Ⅰ H-6），1.55（3H，d，J = 5.9 Hz，Rha Ⅱ H-6），1.57（3H，d，J = 5.7 Hz，Rha Ⅲ H-6），3.86（1H，m，H-3），5.36（1H，br d，J = 3.0 Hz，H-6），4.94（1H，d，J = 7.1 Hz，Glc H-1），6.30（1H，s，Rha Ⅰ H-1），5.76（1H，s，Rha Ⅱ H-1），6.19（1H，s，Rha Ⅲ H-1）；^{13}C-NMR 数据见表 2。

按与化合物 **1** 相同的方法，对化合物 **5** 进行酸水解及衍生，经 GC 分析表明其糖基为 *L*-Rha 和 *D*-Glc（3∶1）。根据 HMBC 谱分析确定了其糖链的结构：Glc H-1 与 C-3（δ_C 78.9）的远程相关信号表明 Glc 连接于苷元 C-3 位，Rha Ⅰ H-1 与 Glc C-2（δ_C 78.9）以及 Rha Ⅱ H-1 与 Glc C-4（δ_C 78.6）的远程相关，表明 Rha Ⅰ 和 Rha Ⅱ 分别连接于 Glc 的 2 位和 4 位，Rha Ⅲ H-1 与 Rha Ⅱ C-4 的相关信号表明 Rha Ⅲ 连接于 Rha Ⅱ 的 4 位。因此，确定了化合物 **5** 的结构为重楼皂苷Ⅶ，波谱数据与文献报道基本一致[17]。

化合物 **6**：白色无定形粉末，Liebermann-Burchard 和 Molish 反应均呈阳性，表明该化合物可能是皂苷类化合物。ESI-MS 显示其准分子离子峰为 *m/z* 1073 $[M+Na]^+$ 和 1049 $[M-H]^-$，提示其相对分子质量为 1050，结合 NMR 数据推断其分子式为 $C_{50}H_{82}O_{23}$。在 ^{1}H-NMR（800 MHz，C_5D_5N）高场区存在 5 个甲基氢信号 δ_H 1.40（d，J = 7.0 Hz），0.91（d，J = 6.2 Hz），1.02（s），1.79（d，J = 6.0 Hz）和 1.10（s），与 ^{13}C-NMR 中的 δ_C 11.0，17.8，18.0，19.2 和 19.9 信号对应。NMR 分析表明化合物 **6** 的结构中存在 3 个季碳（δ_C 37.6、45.7 和 91.3）、1 个三取代双键（δ_H 5.30；δ_C 141.3，δ_C 122.4）和 1 个半缩醛季碳（δ_C 110.1）。在 HMBC 谱中，H_3-19（δ_H 1.10）和 C-5（δ_C 141.3）的远程相关信号，以及烯烃质子与 C-8（δ_C 32.6）的远程相关信号，同时 H-6（δ_H 5.30）与 H-7（δ_H 1.91）在 ^{1}H-^{1}H COSY 谱中相关，表明三取代双键为 $\Delta^{5(6)}$。与化合物 **2** 对照，发现 $\delta_{C\text{-}26}$ 位移了＋8.4，说明 F 环开环，该化合物为 3 位和 26 位连糖的呋甾烷醇型甾体皂苷。通过 H_2-26 化学位移值（δ_H 3.97 和 3.64）的差值（$\Delta\delta_H$ = 0.33 < 0.48），可以确定 25 位碳为 *R* 构型。

按与化合物 **1** 相同的方法，对化合物 **6** 进行酸水解及衍生，经 GC 分析表明其糖基为 *D*-Glc、*L*-Ara 和 *L*-Rha（2∶1∶1）。NMR 谱中显示 4 个糖的端基氢和端基碳信号 [δ_H 4.96（d，J = 7.2 Hz，Glc Ⅰ H-1），4.84（d，J = 7.8 Hz，Glc Ⅱ H-1），5.94（d，J = 1.5 Hz，Ara H-1），6.30（d，J = 3.9 Hz，Rha H-1）；δ_C 100.8（Glc Ⅰ C-1），105.4（Glc Ⅱ C-1），102.4（Rha C-1），110.1（Ara C-1）]。通过 HMBC 谱分析确定了糖的连接方式：Glc Ⅰ H-1 与 C-3（δ_C 78.6）的远程相关信号表明 Glc Ⅰ 连接于苷元 C-3 位，Glc Ⅱ H-1 与 C-26（δ_C 75.8）的远程相关信号表明 Glc Ⅱ 连接于苷元 C-26 位，Rha H-1 与 Glc Ⅰ C-2（δ_C 77.9）以及 Ara H-1 与 Glc Ⅰ C-4（δ_C 77.6）的远程相关，表明 Rha 和 Ara 分别连接于 Glc Ⅰ 的 2 位和 4 位。与文献[18]报道的化合物的波谱数据进行对照，基本一致，从而确定化合物 **6** 为 26-*O*-*β*-*D*-吡喃葡萄糖基-17，22-二羟基-（25*R*）-呋甾-5-烯-3-*O*-*α*-*L*-呋喃阿拉伯糖基-（1→4）-[*α*-*L*-吡喃鼠李糖基-（1→2）]-*β*-*D*-吡喃葡萄糖苷，为首次从狭叶重楼植物中得到。

化合物 **7**：白色无定形粉末，Liebermann-Burchard 和 Molish 反应均呈阳性，表明该化合物可能是皂苷类化合物。ESI-MS 显示其准分子离子峰为 *m/z* 1233 $[M+Na]^+$ 和 1209 $[M-H]^-$，提示其相对分子质量为 1210，结合 NMR 数据推断其分子式为 $C_{57}H_{94}O_{27}$。通过与化合物 **6** 对照，发现两者苷元部分的 NMR 数据一致，重要的 ^{1}H-NMR（800 MHz，C_5D_5N）信号如下：δ_H 1.02，1.10（each 3H，s），1.02（3H，d，J = 4.2 Hz），1.40（3H，d，J = 6.9 Hz），1.79（3H，d，J = 6.0 Hz，Rha Ⅰ H-6），1.61（3H，d，J = 6.0 Hz，Rha Ⅱ H-6），1.62（3H，d，J = 5.8 Hz，Rha Ⅲ H-6），3.86（1H，m，H-3），5.30（1H，br d，J = 4.2 Hz，H-6），4.96（1H，d，J = 6.4 Hz，Glc Ⅰ H-1），4.84（1H，d，J = 7.8 Hz，Glc Ⅱ H-1），6.43（1H，s，Rha Ⅰ H-1），5.87（1H，s，Rha Ⅱ H-1），6.32（1H，s，Rha Ⅲ H-1）；^{13}C-NMR 数据见表 2。因此确定化合物 **7** 亦为双糖链呋甾烷型甾体皂苷。

按与化合物 **1** 相同的方法，对化合物 **7** 进行酸水解及衍生，经 GC 分析表明其糖基为 *D*-Glc 和 *L*-Rha，组成比为 2∶3。根据 HMBC 谱分析可确定苷元 3 位和 26 位的寡糖基分别为 Rha Ⅲ-（1→4）-Rha Ⅱ-（1→4）-[Rha Ⅰ（1→2）]-Glc Ⅰ- 和 Glc Ⅱ-。对照文献报道[19]，确定化合物 **7**

的结构为 26-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖基 -17，22- 二羟基 -（25*R*）- 呋甾 -5- 烯 -3-*O*-*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 4）- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 4）-[*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 2）]-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷，为首次从狭叶重楼植物中分离得到。

表 2 化合物 2 ～ 7 的 ^{13}C-NMR 数据 (200 MHz，in C_5D_5N)

Tab 2 ^{13}C-NMR data of compounds 2 － 7 (200 MHz，in C_5D_5N)

编号	化合物						编号	化合物					
	2	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**		**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
1	38.2	38.0	38.1	38.3	38.0	38.0	15	32.4	32.3	32.4	32.5	32.8	32.4
2	30.7	30.7	30.7	30.9	30.7	30.6	16	90.6	90.5	90.5	90.7	90.9	90.9
3	78.7	78.4	78.6	78.9	78.6	78.5	17	90.8	90.6	90.7	91.0	91.3	91.3
4	39.5	39.5	39.5	39.7	39.4	39.4	18	17.8	17.6	17.7	18.0	18.0	17.9
5	141.4	141.3	141.3	141.5	141.3	141.2	19	20.1	20.0	20.0	20.2	19.9	19.9
6	122.5	122.3	122.4	122.6	122.4	122.3	20	45.4	45.3	45.3	45.5	44.0	44.0
7	33.1	32.9	33.0	33.2	33.0	33.0	21	10.4	10.3	10.4	10.6	11.0	11.0
8	33.0	32.8	32.9	33.1	32.6	32.6	22	110.5	110.3	110.4	110.7	111.9	111.8
9	50.8	50.7	50.7	50.9	50.8	50.8	23	32.7	32.6	32.6	32.8	37.4	37.4
10	37.7	37.6	37.7	37.9	37.6	37.6	24	29.4	29.3	29.4	29.5	28.5	28.5
11	21.6	21.4	21.5	21.7	21.5	21.5	25	31.0	30.9	31.0	31.2	34.8	34.7
12	32.7	32.6	32.6	32.8	32.5	32.8	26	67.4	67.2	67.3	67.5	75.8	75.7
13	45.7	45.6	45.7	45.9	45.7	45.6	27	18.1	17.8	17.9	18.2	17.8	17.7
14	53.6	53.5	53.6	53.8	53.5	53.5							
3-*O*-sugar	Glc Ⅰ	Glc	Glc	Glc Ⅰ	Glc Ⅰ	Glc Ⅰ		Rha	Rha	Rha Ⅰ	Rha Ⅰ	Rha	Rha Ⅰ
1	100.6	100.8	100.8	101.0	100.6	100.8	1	102.4	102.6	102.6	102.8	102.4	102.7
2	78.2	78.3	78.4	78.9	77.9	78.4	2	72.9	73.1	73.0	73.1	73.0	73.0
3	78.1	80.1	78.5	78.3	78.2	78.2	3	73.2	73.3	73.3	73.5	73.3	73.3
4	77.8	72.3	79.1	78.6	77.6	78.1	4	74.5	74.6	74.6	74.6	74.6	74.6
5	77.1	78.8	77.4	77.6	77.2	77.5	5	70.0	70.0	70.1	70.2	70.0	70.0
6	61.9	63.1	61.8	61.9	61.9	61.7	6	19.2	19.2	19.2	19.3	19.2	19.1
	Ara		Rha Ⅱ	Rha Ⅱ	Ara	Rha Ⅱ					Rha Ⅲ		Rha Ⅲ
1	110.1		103.4	102.9	110.1	102.7	1				103.9		103.8
2	83.3		73.1	73.5	83.2	73.4	2				73.2		73.1
3	78.4		73.2	73.8	78.4	73.8	3				73.4		73.3
4	87.0		74.4	81.0	87.1	80.9	4				74.5		74.5
5	63.1		70.9	69.0	63.0	68.8	5				71.0		70.9
6			19.0	19.6		19.4	6				19.1		18.9
26-*O*-sugar					Glc Ⅱ	Glc Ⅱ							
1					105.4	105.4							
2					75.7	75.7							
3					79.1	79.1							
4					72.2	72.2							
5					79.0	79.0							
6					63.3	63.3							

4 结果与讨论

中药重楼的市场需求逐年增加，致使其资源紧缺，因此，除了少数稀有种外，几乎所有重楼属植物均在实际市面流通中作为中药重楼使用。狭叶重楼与药典收载的两种重楼植物同为重楼（*Paris polyphylla*）的变种，亦在民间有大量应用。鉴于此，有必要对其化学成分开展系统研究，为其作为中药重楼的替代基源植物提供科学依据。本文所报道的 7 个甾体皂苷成分包括 1 个环胆甾烷醇型、4 个异螺甾烷醇型和 2 个呋甾烷醇型皂苷，其中 1 个为新化合物、3 个为首次从狭叶重楼中分离得到的化合物。胆甾烷醇型皂苷属于较为少见的甾体皂苷，在重楼属植物中亦较少发现，而胆甾烷醇型皂苷化合物 **1** 的骨架结构

更为罕见，具有这一新颖骨架的皂苷为首次从本属植物中得到，从化学分类学角度可能具有一定意义。生源途径分析认为[9]，可能是由具有 3*β*，26-二羟基-（25*R*）-胆甾-5，17（20）-二烯-16，22-二酮苷元的皂苷通过 23，16-醇醛缩合而形成了化合物 **1** 中具有 *α*，*β*-不饱和酮基团的环戊烷结构（E 环），因此，有必要进一步寻找该前体皂苷在狭叶重楼中是否存在。

据文献报道[6，20-21]，以偏诺皂苷元为苷元的皂苷 **2** ～ **5** 对多种肿瘤细胞都具有显著的抑制作用，本课题组进行初步的活性筛选亦发现它们具有抗胶质瘤活性，这说明民间使用狭叶重楼作为重楼药材具有一定合理性，为陕产狭叶重楼作为中药重楼的药用资源补充提供了理论依据，值得对这些成分进行进一步的活性研究。此外，除本文中报道的化合物，狭叶重楼中还含有丰富的皂苷成分，亦可能含有新的活性成分，未来将对其开展进一步的化学和药理活性研究，以明确狭叶重楼治疗疾病的物质基础，为其合理开发和利用提供科学依据。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：271-272.

[2] 王跃虎，牛红梅，张兆云，等 . 重楼属植物的药用价值及其化学物质基础 [J]. 中国中药杂志，2015，40（5）：833-839.

[3] Chen M，Ye K，Zhang B，et al. Paris saponin Ⅱ inhibits colorectal carcinogenesis by regulating mitochondrial fission and NF-*κ*B pathway [J]. Pharmacol Res，2019，139：273-285.

[4] Hsieh MJ，Chien SY，Lin JT，et al. Polyphyllin G induces apoptosis and autophagy cell death in human oral cancer cells [J]. Phytomedicine，2016，23（13）：1545-1554.

[5] Liu X，Sun Z，Deng J，et al. Polyphyllin Ⅰ inhibits invasion and epithelial-mesenchymal transition via CIP2A/PP2A/ERK signaling in prostate cancer [J]. Int J Oncol，2018，53（3）：1279-1288.

[6] Yuan YL，Jiang N，Li ZY，et al. Polyphyllin Ⅵ induces apoptosis and autophagy in human osteosarcoma cells by modulation of ROS/JNK activation [J]. Drug Des Devel Ther，2019，13：3091-3103.

[7] 尹鸿翔，薛丹，白楠，等 . 狭叶重楼的主要甾体皂苷类化学成分的分离及鉴定 [J]. 四川大学学报（医学版），2008，39（3）：485-488.

[8] Agrawal PK. Assigning stereodiversity of the 27-Me group of furostane-type steroidal saponins via NMR chemical shifts [J]. Steroids，2005，70（10）：715-724.

[9] Chen Y，Si YA，Ni W，et al. Ypsiyunnosides A-E，five new cholestanol glycosides from *Ypsilandra yunnanensis* [J]. Nat Prod Bioprospect，2016，6（3）：173-82.

[10] Wang Y，Zhang CL，Liu YF，et al. Two new lupane saponins from *Schefflera kwangsiensis* [J]. Phytochem Lett，2016，18：19-22.

[11] 樊培，陆云阳，刘杨，等 . 巴山重楼的皂苷类化学成分研究 [J]. 中南药学，2021，19（5）：794-800.

[12] Qi XJ，Si YA，Chen Y，et al. Cytotoxic steroidal saponins from *Trillium kamtschaticum* [J]. Bioorg Med Chem Lett，2017，27：2267-2273.

[13] Gajdus J，Kaczyński Z，Kawiak A，et al. Isolation and identification of cytotoxic compounds from the rhizomes of *Paris quadrifolia* L [J]. Pharmacogn Mag，2014，10（Suppl 2）：S324-333.

[14] 刘杨，华栋，王夏茵，等 . 金线重楼的皂苷成分研究 [J]. 中南药学，2015，13（1）：40-43.

[15] 文彦诗，耿圆圆，王军民，等 . 滇重楼须根中的化学成分 [J]. 西部林业科学，2015，44（6）：51-54.

[16] 王羽，张彦军，高文远，等 . 滇重楼的抗肿瘤活性成分研究 [J]. 中国中药杂志，2007（14）：1425-1428.

[17] 黄贤校，高文远，满淑丽，等 . 北重楼的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志，2009，34（14）：1812-1815.

[18] Zhao Y，Kang LP，Liu YX，et al. Steroidal saponins from the rhizome of *Paris polyphylla* and their cytotoxic activities [J]. Planta Med，2009，75（4）：356-363.

[19] Nohara T，Miyahara K，Kawasaki T. Steroid saponins and sapogenins of underground parts of *Trillium Kamtschaticum*. Pall Ⅱ. Pennogenin-and kryptogenin-3-*O*-glycosides and related compounds [J]. Chem Pharm Bull，1975，23：872-885.

[20] Xu XH，Li T，Fong CMV，et al. Saponins from Chinese medicines as anticancer agents [J]. Molecules，2016，21：1326.

[21] 钱芳芳，阙祖俊，田建辉，等 . 重楼皂苷的抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. 癌症进展，2018，16（14）：1709-1712.

（收稿日期：2022-01-02；修回日期：2022-02-20）

具柄重楼的甾体皂苷类成分研究

田韵远，陆云阳，刘杨，胡晋铭，李天怡，汤海峰*（空军军医大学药学系中药与天然药物学教研室，西安 710032）

摘要：目的 首次研究具柄重楼根茎的甾体皂苷类成分。**方法** 采用硅胶柱色谱、反相 ODS 柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱和半制备高效液相色谱等方法，从具柄重楼根茎 70% 乙醇提取物的正丁醇萃取部位分离化合物，通过波谱分析和化学手段鉴定化学结构。**结果** 分离得到 7 个甾体皂苷类成分，分别鉴定为 protogracillin（**1**）、dichotomin（**2**）、parisyunnanoside A（**3**）、saponin Th（**4**）、26-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖基 -3*β*，26- 二羟基 -（25*R*）- 胆甾 -5，17（20）- 二烯 -16，22- 二酮 -3-*O*-*α*-*L*- 呋喃阿拉伯糖基 -（1 → 4）-[*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 2）]-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷（**5**）、parispseudoside C（**6**）和 ypsiyunnoside A（**7**）。**结论** 化合物 **1** ～ **7** 均为首次从具柄重楼中分离得到，化合物 **5** ～ **7** 为重楼属植物中少见的胆甾烷醇型甾体皂苷，且化合物 **7** 的苷元具有罕见的骨架结构，为首次在重楼属植物中发现。

关键词：具柄重楼；甾体皂苷；呋甾烷醇型；胆甾烷醇型

中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)04-0744-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.004

Steroidal saponins from *Paris fargesii* var. *petiolate*

TIAN Yun-yuan, LU Yun-yang, LIU Yang, HU Jin-ming, LI Tian-yi, TANG Hai-feng* (*Department of Chinese Materia Medica and Natural Medicines, School of Pharmacy, Air Force Medical University, Xi'an* 710032)

Abstract: Objective To determine the saponin constituents in the rhizomes of *Paris fargesii* var. *petiolate* for the first time. **Methods** Compounds from the *n*-butanol fraction of 70% ethanol extraction were isolated and purified by column chromatographies of silica gel, ODS, Sephadex LH-20 and semi-preparative HPLC, and their structures were identified by spectroscopic analysis and chemical methods. **Results** Seven steroidal saponins were isolated and identified as protogracillin (**1**), dichotomin (**2**), parisyunnanoside A (**3**), saponin Th (**4**), 26-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl-3*β*, 26-dihydroxy-(25*R*)-cholest-5, 17 (20)-dien-16, 22-dione-3-*O*-*α*-*L*-arabinofuranosyl- (1→4)-[*α*-*L*-rhamnopyranosyl-(1 → 2)] -*β*-*D*-glucopyranoside (**5**), parispseudoside C (**6**) and ypsiyunnoside A (**7**), respectively. **Conclusion** Compounds **1** ～ **7** have been obtained from *Paris fargesii* var. *petiolate* for the first time. Compounds **5** ～ **7** are cholesteranol-type saponinsrarely seen in genus *Paris*, and the aglycone of compound **7** possesses a rare skeleton firstly found in the genus.

Key words: *Paris fargesii* var. *petiolate*; steroidal saponin; furostanol-type; cholesteranol-type

中药重楼为百合科（Liliaceae）重楼属云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* 或七叶一枝花 *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* 的干燥根茎，具有清热解毒、消肿止痛和凉肝定惊的功效，常用于疔疮痈肿、咽喉肿痛、虫蛇咬伤、跌打损伤、惊风抽搐等证[1]，是著名中成药云南白药胶囊、痛血康胶囊、热毒清片等的主要组成药材。重楼属多种植物在民间作为中药重楼使用，均富含甾体皂苷类成分。据 2021 年统计已从该属植物中发现 176 种甾体皂苷，其中异螺甾烷醇型 82 种、螺甾烷醇型 38 种、呋甾烷醇型 29 种、变型螺甾烷醇型 12 种、胆甾烷醇型 8 种和 C_{25} 为非手性碳

基金项目：国家自然科学基金面上项目（No.81973192）；陕西省重点研发计划（No.2020SF-311，No.2021ZDLSF04-07）。

作者简介：田韵远，女，硕士，主要从事天然药物化学研究，email：tianyunyuan6861@163.com *通信作者：汤海峰，男，教授，主任药师，博士研究生导师，主要从事天然药化研究和中药、海洋药物开发，email：tanghaifeng71@163.com

的其他类甾体皂苷 7 种 [2]。药理研究发现，重楼的主要药效物质即为甾体皂苷，亦总称为重楼皂苷，具有抗肿瘤、抗菌、抗心肌缺血、抗氧化、免疫调节、止血和溶血等多方面药理和生物活性，现代临床上常用于炎症和肿瘤的治疗 [3]。

具柄重楼（*Paris fargesii* Franch.var. *petiolate*）属于南重楼组植物球药隔重楼的变种，主要分布于我国西南各省区，如江西、广西、贵州和四川，在陕西凤县、柞水县、镇坪县等地亦有分布，多生于海拔 1150 ～ 2270 m 阴湿的阔叶林下 [4-6]。具柄重楼具有较高的药用价值，其根茎粗壮，在陕西多地与中药重楼同名等效使用，但其药效物质基础尚不甚清楚 [7-8]。程虎印等 [9] 用 HPLC 法对陕产具柄重楼的化学成分进行分析，表明其含有重楼皂苷Ⅰ、Ⅱ、Ⅵ、Ⅶ等成分，总含量达到 2015 年版《中国药典》标准。但是，尚未见对具柄重楼化学成分分离鉴定的研究报道。本课题组长期从事重楼属植物化学成分和抗肿瘤活性的研究 [10-11]，明确具柄重楼的药效物质基础，为其开发利用提供理论依据，本文首次对具柄重楼根茎的化学成分进行研究，共分离鉴定了 7 个甾体皂苷 **1** ～ **7**（见图 1），均为首次从具柄重楼中发现。其中，化合物 **5** ～ **7** 为重楼属植物中少见的胆甾烷醇型甾体皂苷；化合物 **7** 的苷元具有 6/6/6/5/5 五环稠合胆甾烷骨架，具有这一新颖骨架的胆甾烷醇型甾体皂苷在天然界中较为罕见 [12-13]，亦是首次从本属植物中得到。

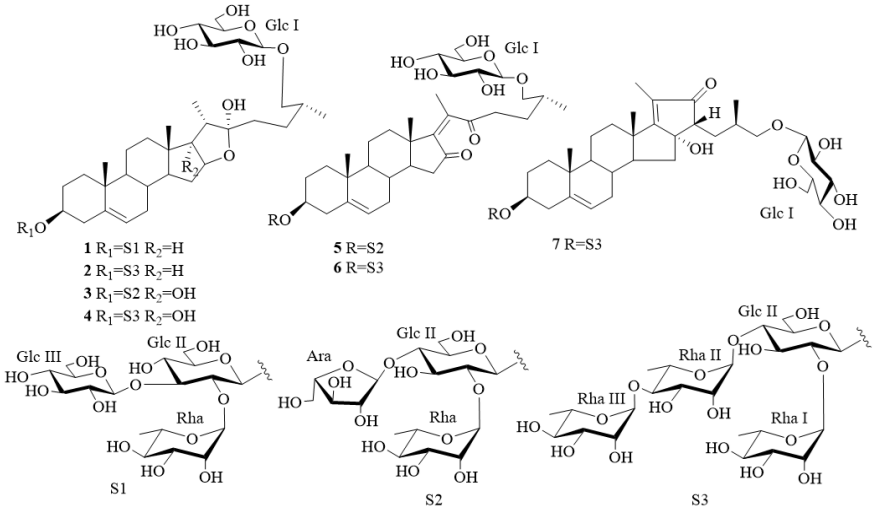


图 1　化合物 **1** ～ **7** 的结构式

Fig 1　Structures of compounds **1** － **7**

1　材料

Quatrro Micro 质谱仪（Micromass 公司）；Bruker AVANCE 800 型核磁共振波谱仪（Bruker 公司）；戴安 P680 高效液相色谱仪（P680 系列单泵、UV-VS 检测器、CHROMELON 工作站）[配 YMC-Pack R&D ODS-A 半制备色谱柱（20 mm×250 mm，5 μm）]；Agilent GC-6820 气相色谱仪 [配 HP-5 弹性石英毛细管柱（30 m×0.32 mm，0.25 μm），氢火焰离子化检测器]；Sephadex LH-20 凝胶（GE 公司）；柱色谱硅胶（100 ～ 200 目、200 ～ 300 目）、薄层色谱用硅胶 H、预制硅胶板 G（青岛海洋化工厂）；ODS C_{18} 柱、氘代试剂、RP-18 高效薄层预制板（Merck 公司）。色谱纯甲醇（天津科密欧公司）；对照品 *L*- 阿拉伯糖、*L*- 鼠李糖（上海蓝季生物，纯度≥ 99%）和 *D*- 葡萄糖（Sigma 公司，纯度≥ 99%）；显色剂（20% 硫酸 / 乙醇溶液）；其他试剂均为分析纯。

药材于 2019 年 9 月采自陕西省安康市镇坪县，经空军军医大学药学系中药与天然药物学教研室汤海峰教授鉴定为具柄重楼 [*Paris fargesii* Franch.var. *petiolate*（Baker ex C.H.Wright）Wang et Tang] 的根茎，药材标本（No.20190903）保存于该教研室标本室。

2　提取与分离

取干燥粉碎的药材 1.89 kg 用 70% 乙醇浸泡过夜，回流提取 5 次，每次 2 h，减压回收溶剂得浸膏 746.09 g。浸膏用适量的水分散后，以等体积石油醚萃取 3 次，再用等体积的水饱和正丁醇萃取 5 次，减压回收正丁醇层得总皂苷 205.84 g。所得总皂苷经硅胶柱色谱分离，用 $V_{二氯甲烷}$：$V_{甲醇}$：$V_{水}$（100：1：0 ～ 63：35：5）为洗脱剂梯度洗脱，合并得到 8 个部分（Fr.1 ～ Fr.8）。选取 Fr.6（4.13 g），经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱（洗脱剂为甲

醇）除去水溶性杂质得 Fr.6-2（3.64 g），再经 ODS 反相硅胶柱色谱，以 $V_{甲醇}$∶$V_{水}$（20∶80 ～ 80∶20）为洗脱剂梯度洗脱，分离得到 5 个组分 Fr.6-2-1 ～ Fr.6-2-5。Fr.6-2-2（518.2 mg）以 20% 乙腈为流动相，通过半制备 HPLC（流速 10 mL•min^{-1}，检测波长 206 nm；以下色谱条件均相同）分离得到化合物 **5**（3.1 mg，t_R = 48.8 min）。Fr.6-2-3（2.7 g）以 20% 乙腈为流动相，通过半制备 HPLC 分离得到 Fr.6-2-3-1 ～ Fr.6-2-3-8 和化合物 **3**（98.5 mg，t_R = 51.8 min）；Fr.6-2-3-2（138.0 mg）、Fr.6-2-3-6（43.8 mg）和 Fr.6-2-3-8（496.9 mg）分别经过半制备 HPLC 分离纯化，以 20% 乙腈洗脱，各得到化合物 **4**（12.1 mg，t_R = 32.2 min）、化合物 **6**（8.0 mg，t_R = 42.5 min）和化合物 **7**（28.0 mg，t_R = 21.8 min）。Fr.6-2-4（208.2 mg）以 25% 的乙腈为流动相，经过半制备 HPLC 分离纯化得到化合物 **1**（11.4 mg，t_R = 9.4 min）和化合物 **2**（4.5 mg，t_R = 48.1 min）。

3 结构鉴定

化合物 **1**：白色无定形粉末，Liebermann-Burchard 和 Molish 反应呈阳性，表明该化合物可能是皂苷类。ESI-MS 显示其准分子离子峰 *m/z* 1087 $[M+Na]^+$ 和 1063 $[M-H]^-$，提示其相对分子质量为 1064，结合 NMR 数据推断其分子式为 $C_{51}H_{84}O_{23}$。化合物 **1** 的 NMR 谱显示 δ_H 0.91（s，H_3-18），1.08（s，H_3-19），1.36（d，J = 7.2 Hz，H_3-21）和 1.00（d，J = 6.4 Hz，H_3-27）处的 4 个甲基氢信号，以及对应的碳信号 δ_C 17.0，19.9，17.0 和 18.0；δ_H 5.35（br s）处的烯烃信号和对应的三取代烯烃碳信号 δ_C 122.4（C-6），141.2（C-5）；以及 1 个典型的 22-OH 呋甾烷醇信号 δ_C 111.2（C-22），这表明化合物 **1** 的苷元具有呋甾烷醇的骨架 [14]。在 HMBC 谱中，H-4（δ_H 2.81）、H-7（δ_H1.90）与 C-5、C-6 分别存在远程相关信号，表明双键位于 5（6）位。在 NOESY 谱中，H_3-19β/H-1b（δ_H 1.76）和 H-1a（δ_H 0.98）/H-3（δ_H 3.97）的 NOE 相关峰表明 3-OH 是 β 构型 [15]。通过 H_2-26 化学位移值差 $\delta_{Ha} - \delta_{Hb}$ = 3.96 − 3.64 = 0.32 < 0.48，可以确定 C_{25} 为 *R* 构型 [16]。苷元的 ^{13}C-NMR（200 MHz，C_5D_5N）数据见表 1。综合以上分析，并与文献对照 [14] 确定化合物 **1** 的苷元为（25*R*）- 呋甾 -5- 烯 -3β，22α，26- 三醇。

取化合物 **1**（1.5 mg）用 2 mL 2 mol • L^{-1} 三氟乙酸水解，按文献方法 [11, 17] 将所得单糖制备三甲基硅醚化 *L*- 半胱氨酸衍生物，以标准糖衍生物作对照，进行 GC 分析，表明化合物 **1** 的单糖组成为 *D*- 葡萄糖（Glc）和 *L*- 鼠李糖（Rha）（3∶1）。在 ^{1}H-NMR 谱（800 MHz，C_5D_5N）中显示 4 个糖基的端基氢信号 δ_H 4.84（d，J = 8.0 Hz，Glc Ⅰ），4.97（d，J = 7.2 Hz，Glc Ⅱ），5.14（d，J = 8.0 Hz，Glc Ⅲ） 和 6.41（br s，Rha）。在 HSQC 谱中可找到各端基氢所对应的端基碳信号 δ_C 105.4，100.4，105.1 和 102.7。由葡萄糖端基氢的耦合常数（J > 7.0 Hz）可知葡萄糖形成的苷键为 β 构型；鼠李糖的端基氢信号为单峰，根据其 C-5 化学位移（δ_C 70.1），可知其形成的苷键为 α 构型 [18-19]。在 HMBC 谱中，Glc Ⅱ C-1 与苷元 C-3 存在远程相关，说明 Glc Ⅱ连接于苷元 C-3 位；Rha H-1 与 Glc Ⅱ C-2 存在远程相关，Glc Ⅲ H-1 与 Glc Ⅱ C-3 存在远程相关，表明 Rha 和 Glc Ⅲ分别连接于 Glc Ⅱ的 2 位和 3 位；Glc Ⅰ H-1 与苷元 C-26 存在远程相关，说明 Glc Ⅰ连接在苷元 C-26 位。糖基部分的 ^{13}C-NMR 数据见表 2。将化合物 **1** 的波谱数据与已知化合物 protogracillin[14] 对照，基本一致，从而确定了化合物 **1** 的结构，为 26-*O*-β-*D*- 吡喃葡萄糖基 -3β，22α，26- 三羟基 -（25*R*）- 呋甾 -5- 烯 -3-*O*-β-*D*- 吡喃葡萄糖基 -（1 → 3）-[α-*L*- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 2）]-β-*D*- 吡喃葡萄糖苷。

化合物 **2**：白色无定形粉末，Liebermann-Burchard 和 Molish 反应呈阳性，表明该化合物可能是皂苷类化合物。ESI-MS 显示其准分子离子峰 *m/z* 1217 $[M+Na]^+$ 和 1193 $[M-H]^-$，提示其相对分子质量为 1194，结合 NMR 数据推断其分子式为 $C_{57}H_{94}O_{26}$。在化合物 **2** 的 ^{1}H-NMR 谱（800 MHz，C_5D_5N）高场区 δ_H 1.07，0.91，1.36 和 1.01 处可见归属于苷元部分的 4 个甲基信号，在 δ_H 5.32 处可见 1 个烯氢宽单峰信号。在化合物 **2** 的 ^{13}C-NMR 谱（200 MHz，C_5D_5N）中，可见 1 对烯碳信号 δ_C 122.3 和 141.3，1 个半缩醛碳信号 δ_C 111.2。这些都是呋甾烷醇甾体皂苷元的特征信号。化合物 **2** 的苷元部分碳谱信息与化合物 **1** 一致，表明化合物 **2** 的苷元亦为（25*R*）- 呋甾 -5- 烯 -3β，22α，26- 三醇。将化合物 **2** 按照与化合物 **1** 相同的方法酸水解后制备成单糖衍生物，通过 GC 分析表明其糖基为 *D*- 葡萄糖和 *L*- 鼠李糖（2∶3）。NMR 谱中显示 5 个糖的端基氢和端基碳信号 [δ_H 4.84（d，J = 8.0 Hz，GlcⅠ），4.98（d，J = 7.2 Hz，Glc Ⅱ），6.42（br s，Rha Ⅰ），5.87（br s，Rha Ⅱ），6.32（br s，Rha Ⅲ）；δ_C 105.4（GlcⅠ），100.8（Glc Ⅱ），102.7（Rha Ⅰ），102.7（Rha Ⅱ），103.8（Rha Ⅲ）]。通过 HMBC 谱分析，表明 Glc Ⅱ与苷元的 3 位连接，Rha Ⅰ和 Rha Ⅱ分别连接于 Glc Ⅱ的 2 位和 4 位，Rha

Ⅲ与 Rha Ⅱ的 4 位连接，GlcⅠ与苷元的 26 位连接。因此确定化合物 **2** 的结构为 26-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖基 -3*β*，22*α*，26- 三羟基 -（25*R*）- 呋甾 -5- 烯 -3-*O*-*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 4）-*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基 -（1→4）-[*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基 -（1→2）]-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷，即已知化合物 dichotomin，波谱数据与文献报道一致 [20]。

化合物 **3**：白色无定形粉末，Liebermann-Burchard 和 Molish 反应呈阳性，表明该化合物可能是皂苷类化合物。ESI-MS 显示其准分子离子峰 *m/z* 1073 $[M+Na]^+$ 和 1049 $[M-H]^-$，提示其相对分子质量为 1050，结合 NMR 数据推断其分子式为 $C_{50}H_{82}O_{23}$。化合物 **3** 苷元部分的碳谱信号与化合物 **1** 的信号基本一致，不同之处在于化合物 **3** 的 C-16 和 C-17 信号分别向低场位移至 δ_C 90.9 和 91.4，表明化合物 **3** 的 C-17 位连有羟基，按照生源途径，该羟基应为 *α* 构型 [10]。综上分析，确定化合物 **3** 的苷元为（25*R*）- 呋甾 -5- 烯 -3*β*，17*α*，22*α*，26- 四醇。按与化合物 **1** 相同的方法对化合物 **3** 进行酸水解及衍生，经 GC 分析表明其糖基为 *D*- 葡萄糖、*L*- 鼠李糖和 *L*- 阿拉伯糖（Ara）（2∶1∶1）。由阿拉伯糖 C-1、C-2、C-4 和 C-5 的化学位移值可知，该糖为呋喃型，且所形成的苷键为 *α* 构型 [21]。通过 2D NMR 分析归属了化合物 **3** 的所有碳氢信号，重要的 ^{1}H-NMR（800 MHz，C_5D_5N）信号如下：δ_H 0.97（3H，s，H_3-18），1.10（3H，s，H_3-19），1.40（3H，d，J = 7.2 Hz，H_3-21），1.02（3H，d，J = 6.4 Hz，H_3-27），5.30（1H，br s，H-6），4.84（1H，d，J = 8.0 Hz，GlcⅠ H-1），4.97（1H，d，J = 8.0Hz，GlcⅡ H-1），6.28（1H，br s，Rha H-1），5.93（1H，br s，Ara H-1）；苷元和糖基部分的 ^{13}C-NMR（200 MHz，C_5D_5N）数据分别见表 1 和表 2。根据 HMBC 谱分析，可确定苷元 3 位和 26 位的糖链分别为 Ara（1 → 4）-[Rha（1 → 2）]-GlcⅡ- 和 GlcⅠ-。因此，鉴定化合物 **3** 的结构为 26-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖基 -3*β*，17*α*，22*α*，26- 四羟基 -（25*R*）- 呋甾 -5- 烯 -3-*O*-*α*-*L*- 呋喃阿拉伯糖基 -（1 → 4）-[*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 2）]-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷，即已知化合物 parisyunnanoside A，波谱数据与文献报道一致 [21-22]。

化合物 **4**：白色无定形粉末，Liebermann-Burchard 和 Molish 反应呈阳性，表明该化合物可能是皂苷类化合物。ESI-MS 显示其准分子离子峰 *m/z* 1233 $[M+Na]^+$ 和 1209 $[M-H]^-$，提示其相对分子质量为 1210，结合 NMR 数据推断其分子式为 $C_{57}H_{94}O_{27}$。与化合物 **3** 对照，发现两者苷元部分的碳谱数据一致，确定化合物 **4** 的苷元亦为（25*R*）- 呋甾 -5- 烯 -3*β*，17*α*，22*α*，26- 四醇。按与化合物 **1** 相同的方法，对化合物 **4** 进行酸水解及衍生，经 GC 分析表明化合物 **4** 的单糖组成为 *D*- 葡萄糖和 *L*- 鼠李糖（2∶3）。通过 2D NMR 分析归属了化合物 **4** 的所有碳氢信号，重要的 ^{1}H-NMR（800 MHz，C_5D_5N）信号如下：δ_H 0.91（3H，s，H_3-18），1.10（3H，s，H_3-19），1.40（3H，d，J = 7.2 Hz，H_3-21），1.02（3H，d，J = 6.4 Hz，H_3-27），5.30（1H，br s，H-6），4.84（1H，d，J = 7.2 Hz，GlcⅠ H-1），4.96（1H，d，J = 7.2 Hz，GlcⅡ H-1），6.42（1H，br s，Rha Ⅰ H-1），5.86（1H，br s，Rha Ⅱ H-1），6.31（1H，br s，Rha Ⅲ H-1）；^{13}C-NMR（200 MHz，C_5D_5N）数据见表 1 和表 2。化合物 **4** 的糖基部分碳谱数据与化合物 **2** 一致，通过 HMBC 谱分析进一步确认了其糖链结构。与文献 [21] 报道的化合物 saponin Th 的波谱数据进行对照，基本一致，从而确定了化合物 **4** 的结构，即 26-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖基 -3*β*，17*α*，22*α*，26- 四羟基 -（25*R*）- 呋甾 -5- 烯 -3-*O*-*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 4）-*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 4）-[*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 2）]-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷。

化合物 **5**：白色无定形粉末，Liebermann-Burchard 和 Molish 反应呈阳性，表明该化合物可能是皂苷类化合物。ESI-MS 显示其准分子离子峰 *m/z* 1053 $[M+Na]^+$ 和 1029 $[M-H]^-$，提示其相对分子质量为 1030，结合 NMR 数据推断其分子式为 $C_{50}H_{78}O_{22}$。^{1}H-NMR 谱（800 MHz，C_5D_5N）显示 3 个单峰甲基氢信号 δ_H 0.96（H_3-18），1.08（H_3-19），2.00（H_3-21）和 1 个双峰甲基氢信号 δ_H 1.01（J = 6.4 Hz，H_3-27），以及 1 个烯氢信号 δ_H 5.30（br s）。在 ^{13}C-NMR 谱（200 MHz，C_5D_5N）中观察到对应的 4 个甲基碳信号 δ_C 17.2，19.8，16.2，17.9 和 2 个三取代烯碳信号 δ_C 121.9，141.4。此外，碳谱中尚存在 2 个四取代烯碳信号 δ_C 143.1，146.2；2 个季碳信号 δ_C 37.5，43.9 和 2 个羰基碳信号 δ_C 206.2，211.0。在 HMBC 谱中，H-4（δ_H 2.82）和 H-7（δ_H 1.77）与 C-5（δ_C 141.4）和 C-6（δ_C 121.9）均存在远程相关信号；H_3-18 分别与 C-12（δ_C 36.5）、C-13（δ_C 43.9）、C-14（δ_C 50.9）和 C-17（δ_C 143.1）存在远程相关信号；H_3-21 分别与 C-17、C-20（δ_C 146.2）和 C-22（δ_C 211.0）存在远程相关信号；C-15（δ_C 38.4）与 C-14 和 C-16（δ_C 206.2）存在远程相关信号。这些 HMBC 相关表明在化合物 **5** 的苷元中，2 个双键分别位于 5（6）和 17（20）位，2 个羰基分别位于 16

和 22 位。通过 H_2-26 化学位移值差 $\delta_{Ha} - \delta_{Hb} = 3.98 - 3.62 = 0.36 < 0.48$，可以确定 C_{25} 为 *R* 构型[14]。综合以上分析，并与文献对照[23]，推定化合物 **5** 的苷元为（25*R*）-胆甾 -5，17（20）-二烯 -16，22-二酮 -3*β*，26-二醇。将化合物 **5** 按照与化合物 **1** 相同的方法酸水解后制备成单糖衍生物，通过 GC 分析表明化合物 **5** 的单糖组成为 *D*-葡萄糖、*L*-鼠李糖和 *L*-阿拉伯糖（2∶1∶1）。化合物 **5** 的糖基部分碳谱数据与化合物 **3** 一致，通过 HMBC 谱分析进一步确认了其糖链结构。将化合物 **5** 的波谱数据与文献[23]报道数据对照，确定化合物 **5** 为已知化合物 26-*O*-*β*-*D*-吡喃葡萄糖基 -3*β*，26-二羟基 -（25*R*）-胆甾 -5，17（20）-二烯 -16，22-二酮 -3-*O*-*α*-*L*-呋喃阿拉伯糖基 -（1→4）-[*α*-*L*-吡喃鼠李糖基 -（1→2）]-*β*-*D*-吡喃葡萄糖苷。

化合物 **6**：白色无定形粉末，Liebermann-Burchard 和 Molish 反应呈阳性，表明该化合物可能是皂苷类化合物。ESI-MS 显示其准分子离子峰 *m/z* 1213 $[M+Na]^+$ 和 1189 $[M-H]^-$，提示其相对分子质量为 1190，结合 NMR 数据推断其分子式为 $C_{57}H_{90}O_{26}$。在化合物 **6** 的 ^{1}H-NMR 谱（800 MHz，C_5D_5N）高场区 δ_H 0.97，1.07，2.00 和 1.01 处可见归属于苷元部分的 4 个甲基信号，在 δ_H 5.31 处可见 1 个烯氢宽单峰信号。在化合物 **6** 的 ^{13}C-NMR 谱（200 MHz，C_5D_5N）中，可见两对烯碳信号分别位于 δ_C 121.9，141.4 和 143.1，146.2，2 个羰基碳信号分别位于 δ_C 206.3 和 211.1。比较化合物 **6** 与化合物 **5** 苷元部分的碳信号，发现两者基本一致，表明化合物 **6** 的苷元亦为（25*R*）-胆甾 -5，17（20）-二烯 -16，22-二酮 -3*β*，26-二醇[23]。将化合物 **6** 按照与化合物 **1** 相同的方法酸水解及衍生，通过 GC 分析表明化合物 **6** 的单糖组成为 *D*-葡萄糖和 *L*-鼠李糖（2∶3）。化合物 **6** 的糖基部分碳谱数据与化合物 **2** 和化合物 **4** 一致，通过 HMBC 谱分析进一步确认了其糖链结构。将化合物 **6** 的波谱数据与文献[12]报道的化合物 parispseudoside C 进行比较，基本一致，从而确定了其结构，即 26-*O*-*β*-*D*-吡喃葡萄糖基 -3*β*，26-二羟基 -（25*R*）-胆甾 -5，17（20）-二烯 -16，22-二酮 -3-*O*-*α*-*L*-吡喃鼠李糖基 -（1→4）-*α*-*L*-吡喃鼠李糖基 -（1→4）-[*α*-*L*-吡喃鼠李糖基 -（1→2）]-*β*-*D*-吡喃葡萄糖苷。

化合物 **7**：白色无定形粉末，Liebermann-Burchard 和 Molish 鉴定反应呈阳性，表明该化合物可能属于皂苷类。ESI-MS 显示其准分子离子峰 *m/z* 1213 $[M+Na]^+$ 和 1189 $[M-H]^-$，提示其相对分子质量为 1190，结合 NMR 数据推断其分子式为 $C_{57}H_{90}O_{26}$，对应于 13 个不饱和度。化合物 **7** 的 NMR 谱显示有 4 个甲基氢信号 δ_H 1.48（s，H_3-18），1.10（s，H_3-19），1.87（s，H_3-21），1.14（d，$J = 6.4$ Hz，H_3-27）和对应的碳信号 δ_C 16.2，19.9，9.1，17.7；1 个烯氢信号 δ_H 5.38（br s），一组三取代烯烃碳信号 δ_C 122.2（C-6），141.5（C-5），一组四取代烯烃碳信号 δ_C 182.7（C-17），128.8（C-20）；1 个羰基信号 δ_C 212.9（C-22）；3 个连氧碳信号 δ_C 77.1（C-26），78.5（C-3）和 83.5（C-16）。^{1}H-NMR（800 MHz，C_5D_5N）和 ^{13}C-NMR（200 MHz，C_5D_5N）中显示有 5 个糖的端基氢信号：δ_H 4.87（d，$J = 8.0$ Hz，GlcⅠH-1），5.00（d，$J = 7.2$ Hz，GlcⅡH-1），6.41（br s，RhaⅠH-1），5.85（br s，RhaⅡH-1）和 6.30（br s，RhaⅢH-1），以及对应的端基碳信号 δ_C 105.8，100.9，102.8，102.8 和 103.8。比较化合物 **7** 和化合物 **6** 的 NMR 谱，发现化合物 **7** 的结构中少了 1 个羰基和 1 个亚甲基，而多了 1 个连氧季碳（δ_C 83.5）和 1 个次甲基（δ_H 2.47，δ_C 57.9），其他结构基本一致。化合物 **7** 的分子中 1 个羰基、2 个双键和 5 个单糖基占了 8 个不饱和度，所剩下的 5 个不饱和度提示其苷元为五环结构，因此，推测化合物 **7** 可能是化合物 **6** 的 23，16-醇醛缩合产物。^{1}H-^{1}H COSY 和 HMBC 谱可证实这一推测。在 ^{1}H-^{1}H COSY 谱中，存在 H-26a（δ_H 4.06）/H-25（δ_H 2.53）、H-26b（δ_H 3.75）/H-25、H-25/H-24a（δ_H 2.40）、H-25/H-24b（δ_H 1.99）、H-25/H_3-27（δ_H 1.14）和 H-24b/H-23（δ_H 2.47）相关峰，结合 H-25/C-23（δ_C 57.9）的 HMBC 相关，表明化合物 **7** 中多出的次甲基位于 C-23 位。在 HMBC 谱中，H_3-21 与 C-17、C-20 和 C-22，H-23 与 C-16 和 C-22，H_2-24 与 C-16 和 C-22 的远程相关峰，表明化合物 **7** 苷元的 E 环为具有 *α*，*β*-不饱和酮结构的环戊烷，双键位于 17（20）位。在 NOESY 谱 中，H_3-18/H-8、H-8/H_β-15（δ_H 2.00）和 H_β-15/H-23 相关峰表明 H-23 为 *β* 构型；H_β-15/H-23 的 NOE 相关亦提示 OH-16 为 *α* 构型[12]。将化合物 **7** 按照化合物 **1** 相同的方法酸水解后制备成单糖衍生物，通过 GC 分析表明化合物 **7** 的糖基组成为 *D*-葡萄糖和 *L*-鼠李糖（2∶3）。通过 2D NMR 谱图分析，进一步确定化合物 **7** 的苷元 3 位和 26 位所连接的糖链结构与化合物 **6** 相同，糖基部分的 ^{13}C-NMR 数据见表 2。对照文献，化合物 **7** 的波谱数据与已知化合物 ypsiyunnoside A 一致[12]，从而确定了其结构，即 26-*O*-*β*-*D*-吡喃葡萄糖基 -3*β*，16*α*，26-三羟基 -（23*R*，25*R*）-

16，23-环胆甾-5，17（20）-二烯-22-酮-3-*O*-*α*-*L*-吡喃鼠李糖基-（1→4）-*α*-*L*-吡喃鼠李糖基-（1→4）-[*α*-*L*-吡喃鼠李糖基-（1→2）]-*β*-*D*-吡喃葡萄糖苷。皂苷化合物 **7** 的苷元为 6/6/6/5/5 五环稠合胆甾烷骨架，生源途径分析认为，可能是由 parispseudoside C（皂苷化合物 **6**）通过 23，16-醇醛缩合而形成了皂苷化合物 **7** 中具有 *α*，*β*-不饱和酮基团的环戊烷结构（E 环）。具有这一新颖骨架的皂苷仅分别从云南丫蕊花[12]和吉林延龄草[13]中各报道了 1 个，这是首次在重楼属植物中发现。

表 1　化合物 1 ～ 7 苷元部分的 ^{13}C-NMR 数据 (200 MHz，C_5D_5N)

Tab 1　^{13}C-NMR data of the aglycones of compounds 1 － 7 (200 MHz，C_5D_5N)

编号	化合物						
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
1	38.0	37.7	38.1	38.0	37.6	37.7	38.1
2	30.6	30.7	30.7	30.7	30.6	30.6	30.7
3	78.2	78.6	78.7	78.5	78.5	78.5	78.5
4	39.2	39.5	39.5	39.5	39.2	39.4	39.5
5	141.2	141.3	141.3	141.3	141.4	141.4	141.5
6	122.4	122.3	122.5	122.4	121.9	121.9	122.2
7	32.8	32.8	33.0	32.8	32.2	32.2	32.3
8	32.2	32.1	32.7	32.6	31.2	31.3	32.5
9	50.8	50.8	50.8	50.8	50.3	50.4	51.0
10	37.6	37.6	37.7	37.6	37.5	37.6	37.7
11	21.6	21.6	21.6	21.5	21.3	21.4	21.3
12	40.4	40.4	32.8	33.0	36.5	36.5	36.2
13	41.2	41.3	45.7	45.6	43.9	43.9	44.6
14	57.1	57.1	53.6	53.5	50.9	51.0	54.3
15	33.0	33.0	32.5	32.5	38.4	38.5	38.9
16	81.6	81.6	90.9	91.0	206.2	206.3	83.5
17	64.2	64.3	91.4	91.3	143.1	143.1	182.7
18	17.0	16.9	17.8	18.0	17.2	17.2	16.2
19	19.9	19.9	20.0	19.9	19.8	19.4	19.9
20	41.3	41.2	44.1	44.0	146.2	146.2	128.8
21	17.0	17.0	11.1	11.1	16.2	16.3	9.1
22	111.2	111.2	120.0	111.9	211.0	211.1	212.9
23	37.7	37.9	37.5	37.4	39.3	39.4	57.9
24	28.8	28.8	28.6	28.5	28.4	28.5	29.8
25	34.8	34.8	34.8	34.7	33.9	33.9	32.3
26	75.8	75.8	75.8	75.8	75.6	75.6	77.1
27	18.0	17.9	18.4	17.8	17.9	18.0	17.7

4　结果与讨论

中药重楼的市场需求逐年增加，而重楼属植物生长周期长，自然更替缓慢，致使重楼资源紧缺[24-25]。具柄重楼在陕西具有一定的资源分布，且在陕西多地与中药重楼等效替用，但未见对其化学成分分离鉴定的报道[7-8]，因此，有必要开展其化学成分的研究工作，为其作为中药重楼的替代基原植物提供科学依据。在预实验中，通过

表 2　化合物 1 ～ 7 糖基部分的 ^{13}C-NMR 数据 (200 MHz，C_5D_5N)

Tab 2　^{13}C-NMR data of the sugar moieties of compounds 1 － 7 (200 MHz，C_5D_5N)

编号	化合物						
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
	Glc Ⅰ	Glc Ⅰ	Glc Ⅰ	Glc Ⅰ	Glc Ⅰ	Glc Ⅰ	Glc Ⅰ
1	105.4	105.4	105.4	105.4	105.4	105.4	105.8
2	75.7	75.7	75.7	75.7	75.7	75.7	75.8
3	79.1	79.1	79.1	79.1	79.1	79.1	79.1
4	72.2	72.1	72.2	72.2	72.2	72.2	72.2
5	79.0	79.0	79.0	79.0	79.0	79.0	79.0
6	63.3	63.3	63.3	63.3	63.3	63.3	63.3
	Glc Ⅱ	Glc Ⅱ	Glc Ⅱ	Glc Ⅱ	Glc Ⅱ	Glc Ⅱ	Glc Ⅱ
1	100.4	100.8	100.7	100.8	100.7	100.9	100.9
2	77.5	78.4	78.0	78.4	78.0	78.5	78.5
3	90.0	78.2	78.2	78.2	78.2	78.2	78.3
4	70.1	78.2	77.7	78.2	77.5	78.3	78.3
5	78.4	77.5	77.2	77.5	77.2	77.5	77.5
6	63.0	61.7	62.0	61.7	61.9	61.8	61.8
	Glc Ⅲ	Rha Ⅰ	Rha	Rha Ⅰ	Rha Ⅰ	Rha Ⅰ	Rha Ⅰ
1	105.1	102.7	102.5	102.7	102.4	102.8	102.8
2	75.5	73.0	73.0	73.0	73.0	73.0	73.1
3	78.2	73.4	73.3	73.4	73.3	73.4	73.4
4	72.0	74.5	74.2	74.6	74.6	74.6	74.6
5	79.2	70.1	70.1	70.1	70.0	70.1	70.1
6	62.9	19.1	19.2	19.4	19.2	19.8	19.2
	Rha	Rha Ⅱ	Ara	Rha Ⅱ	Ara	Rha Ⅱ	Rha Ⅱ
1	102.7	102.7	110.2	102.7	110.1	102.7	102.8
2	73.0	73.8	83.3	73.8	83.2	73.8	73.4
3	73.3	73.3	78.4	73.3	78.4	73.4	73.8
4	74.6	80.9	87.1	80.9	87.2	80.9	80.9
5	70.1	68.8	63.1	68.8	63.0	68.9	68.9
6	19.2	19.4		19.2		18.9	19.0
		Rha Ⅲ		Rha Ⅲ		Rha Ⅲ	Rha Ⅲ
1		103.8		103.8		103.8	103.8
2		73.1		73.1		73.2	73.2
3		73.3		73.4		73.4	73.4
4		74.6		74.5		74.5	74.5
5		71.0		71.0		70.9	71.0
6		19.0		18.9		19.2	19.4

TLC 与对照品比较，发现具柄重楼总皂苷的一个部分（Fr.6）不含有常见的重楼皂苷成分（如重楼皂苷Ⅰ、Ⅱ、Ⅵ、Ⅶ等），为了发现结构较为新颖的甾体皂苷类成分，以阐释具柄重楼化学成分的特征性，并希望能找到新结构的活性成分，本文前期对 Fr.6 进行了较为系统的分离鉴定。所报道的 7 个甾体皂苷成分包括 4 个呋甾烷醇类和 3 个胆甾烷醇类皂苷，这是首次对具柄重楼开展的化学研究，所有化合物均为首次从该植物中发现。胆甾烷醇类皂苷属于较为少见的甾体皂苷，在重楼属植物中亦较少发现。胆甾烷醇类皂苷化合物 **7** 的苷元具有罕见的骨架结构，具有这一新

颖骨架的皂苷为首次从本属植物中得到。虽然有文献报道 F 环开环的甾体皂苷生物活性较弱或无[21，26]，但亦有研究发现呋甾烷醇类皂苷拥有潜在的抗肿瘤细胞增殖和抗炎等生物活性[27-29]，因此，值得对这些成分做进一步的活性筛选。此外，在对具柄重楼总皂苷其他部分的预实验中，已发现含有较大量的已知重楼皂苷活性成分，亦可能含有新的活性成分，将进一步对这些部分开展化学和药理活性研究，以明确具柄重楼治疗疾病的物质基础，为其开发和利用提供科学依据。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：271-272.

[2] Ding YG，Zhao YL，Zhang J，et al. The traditional uses，phytochemistry，and pharmacological properties of *Paris* L.（Liliaceae）：a review [J]. J Ethnopharmacol，2021，278：114293.

[3] Wei JC，Gao WY，Yan XD，et al. Chemical constituents of plants from the genus *Paris* [J]. Chem Biodivers，2014，11（9）：1277-1297.

[4] 程虎印，颜永刚，刘亮亮，等 . 陕产重楼属南重楼组药用植物分布新记录调查研究 [J]. 中国中医药信息杂志，2018，25（3）：1-6.

[5] 中国科学院中国植物志编辑委员会 . 中国植物志 [M]. 15 卷 . 北京：科学出版社，1978：88-96.

[6] 中国科学院西北植物研究所 . 秦岭植物志（第一卷·第一册）[M]. 北京：科学出版社，1976：353-354.

[7] 王跃虎，牛红梅，张兆云，等 . 重楼属植物的药用价值及其化学物质基础 [J]. 中国中药杂志，2015，40（5）：833-839.

[8] 杨德全，杨勤，周浓 . 多基源重楼的质量等同性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20（3）：91-94.

[9] 程虎印，杨哲，程江雪，等 . 陕产具柄重楼的生药学研究 [J]. 中医药导报，2019，25（7）：39-44.

[10] Liu Y，Wang M，Liu K，et al. New steroidal saponins from the rhizomes of *Paris vietnamensis* and their cytotoxicity [J]. Molecules，2018，23（3）：588.

[11] 樊培，陆云阳，刘杨，等 . 巴山重楼的皂苷类化学成分研究 [J]. 中南药学，2021，19（5）：794-800.

[12] Chen Y，Si YA，Ni W，et al. Ypsiyunnosides A-E，five new cholestanol glycosides from *Ypsilandra yunnanensis* [J]. Nat Prod Bioprospect，2016，6（3）：173-182.

[13] Qi XJ，Si YA，Chen Y，et al. Cytotoxic steroidal saponins from *Trillium kamtschaticum* [J]. Bioorg Med Chem Lett，2017，27：2267-2273.

[14] Challinor VL，Piacente S，De Voss JJ. NMR assignment of the absolute configuration of C-25 in furostanol steroidal saponins [J]. Steroids，2012，77（6）：602-608.

[15] Qin XJ，Zhang LJ，Zhang Y，et al. Polyphyllosides A-F，six new spirostanol saponins from the stems and leaves of *Paris polyphylla* var. *chinensis* [J]. Bioorg Chem，2020，99：103788.

[16] Agrawal PK. Dependence of ^{1}H NMR chemical shifts of geminal protons of glycosyloxy methylene（H_2-26）on the orientation of the 27-methyl group of furostane-type steroidal saponins [J]. Magn Reson Chem，2004，42（11）：990-993.

[17] Wang Y，Zhang CL，Liu YF，et al. Two new lupane saponins from *Schefflera kwangsiensis* [J]. Phytochem Lett，2016，18：19-22.

[18] Tian XR，Feng JT，Tang HF，et al. New cytotoxic triterpenoid saponins from the whole plant of *Clematis lasiandra* Maxim [J]. Fitoterapia，2013，90：233-239.

[19] Kasai R，Okihara M，Asakawa J，et al. ^{13}C NMR study of α-anomeric and β-anomeric pairs of *D*-mannopyranosides and *L*-rhamnopyranosides [J]. Tetrahedron，1979，35：1427-1432.

[20] Lee HJ，Watanabe B，Nakayasu M，et al. Novel steroidal saponins from *Dioscorea esculenta*（Togedokoro）[J]. Biosci Biotechnol Biochem，2017，81（12）：2253-2260.

[21] Zhao Y，Kang LP，Liu YX，et al. Steroidal saponins from the rhizome of *Paris polyphylla* and their cytotoxic activities [J]. Planta Med，2009，75（4）：356-363.

[22] Wang J，Li D，Ni W，et al. Molecular networking uncovers steroidal saponins of *Paris tengchongensis* [J]. Fitoterapia，2020，145：104629.

[23] Zhao Y，Kang LP，Liu YX，et al. Three new steroidal saponins from the rhizome of *Paris polyphylla* [J]. Magn Reson Chem，2007，45（9）：739-744.

[24] 程虎印，刘亮亮，程江雪，等 . 华阴市产重楼属药用植物生态特点及资源状况调查 [J]. 中国现代应用药学，2017，34（5）：674-680.

[25] 成莉，甄艳，陈敏，等 . 扩大重楼药用资源研究进展 [J]. 中国中药杂志，2015，40（16）：3121-3124.

[26] Jing S，Wang Y，Li X，et al. Chemical constituents and antitumor activity from *Paris polyphylla Smith* var. *yunnanensis* [J]. Nat Prod Res，2017，31（6）：660-666.

[27] Wang Y，Yi X，Xiang L，et al. Furostanol saponins from Chinese onion induce G2/M cell-cycle arrest and apoptosis through mitochondria-mediate pathway in HepG2 cells [J]. Steroids，2019，148：11-18.

[28] Zhang RS，Liu YY，Zhu PF，et al. Furostanol saponins from *Asparagus cochinchinensis* and their cytotoxicity [J]. Nat Prod Bioprospect，2021，11（6）：651-658.

[29] Xie Y，Hu D，Zhong C，et al. Anti-inflammatory furostanol saponins from the rhizomes of *Smilax china* L [J]. Steroids，2018，140：70-76.

（收稿日期：2021-12-29；修回日期：2022-01-14）

巴西海木提取物抗生殖系统氧化损伤活性研究

常馨月[1]，米晓[1]，董明然[1]，王同瑾[1]，胡美赓[1]，沈俊宇[2]，路娟[1*]，陈曦[1*]（1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所，北京　100193；2. FITOTERAPIA BIOTECH LTDA公司，巴西　01040–000）

摘要：目的　考察巴西海木提取物对生殖系统氧化损伤的影响，初步探究其作用机制。**方法**　采用水和不同比例（50%、70%及95%）乙醇溶液浸提巴西海木树皮，得到4种粗提物；依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取不同比例醇提物，得到9种有机相组分，共得到13种巴西海木提取物TCE-1～TCE-13。以小鼠睾丸支持细胞（TM4）增殖率变化为指标考察各提取物的细胞毒作用；采用H_2O_2处理TM4细胞建立氧化损伤模型，以细胞存活率及氧化指标超氧化物歧化酶（SOD）活力、丙二醛（MDA）含量和谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）活力变化为指标，邻苯二甲酸二（2-乙基己基）酯（DEHP）处理雄性小鼠建立生殖系统氧化损伤模型，造模后灌胃给予300、600、900 mg·kg^{-1} 50%粗提乙酸乙酯组分（TCE-6）28 d后，以睾丸组织氧化指标变化验证TCE-6药效。最后通过实时荧光定量PCR（qRT-PCR）检测相关基因的表达情况，初步探究其作用机制。**结果**　细胞毒性实验结果表明95%粗提物（TCE-4），50%粗提石油醚组分（TCE-5）、正丁醇组分（TCE-7），70%粗提石油醚组分（TCE-8）、正丁醇组分（TCE-10）以及95%粗提石油醚（TCE-11）、正丁醇组分（TCE-13）对TM4细胞具有杀伤作用。50%粗提物（TCE-2）、TCE-6以及70%粗提乙酸乙酯组分（TCE-9）给药组显著提高氧化损伤后TM4细胞存活率，TCE-6组SOD、GSH-Px活力显著提高、MDA含量显著下降（$P < 0.01$）。900 mg·kg^{-1} TCE-6处理后能显著提高氧化损伤模型小鼠睾丸组织内SOD、GSH-Px活力，降低MDA含量（$P < 0.05$）。qRT-PCR结果表明，900 mg·kg^{-1} TCE-6处理后提高了核因子E2相关因子2（*Nrf2*）、超氧化物歧化酶2（*SOD2*）及超氧化物歧化酶3（*SOD3*）mRNA的表达（$P < 0.05$）。**结论**　TCE-6可能通过上调SOD酶家族表达和调节Nrf2信号通路发挥抗生殖系统氧化损伤作用，具有开发为生殖系统损伤治疗药物的潜力。

关键词：巴西海木；生殖系统；抗氧化活性
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0751-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.005

Antioxidant activity of *Trichilia catigua* A. Juss. against damage in the reproductive system

CHANG Xin-yue[1], MI Xiao[1], DONG Ming-ran[1], WANG Tong-jin[1], HU Mei-geng[1], SHEN Jun-yu[2], LU Juan[1*], CHEN Xi[1*] (1. *Institute of Medicinal Plant Development*, *Peking Union Medical College*, *Chinese Academy of Medical Sciences*, *Beijing* 100193; 2. *FITOTERAPIA BIOTECH LTDA*, *Brazil* 01040-000)

Abstract: Objective To determine the antioxidant effect of *Trichilia catigua* A. Juss. extract on the reproductive system and its mechanism. **Methods** Four crude extracts were obtained by extracting the bark of *Trichilia catigua* A. Juss. with water and ethanol at different proportions (50%, 70% and 95%). Nine organic phase components were extracted from alcohol extracts with petroleum ether, ethyl acetate and 1-butanol at different proportions. Totally 13 *Trichilia catigua* A. Juss. extracts (TCE-1～TCE-13) were obtained. The cytotoxicity of the extract was evaluated by the proliferation rate of TM4 cells. The TM4 cells were treated with H_2O_2 to establish oxidative damage model. The cell viability and

基金项目：中国医学科学院医学与健康科技创新工程（No.2016-I2M-3-015）。
作者简介：常馨月，女，硕士研究生，主要从事中药药理学研究，email：2797184983@qq.com　*__通信作者：__陈曦，男，研究员，主要从事中药血清药化学研究，email：chenxi@implad.ac.cn；路娟，女，副研究员，主要从事中药分析研究，email：jlu@implad.ac.cn

oxidation index superoxide dismutase (SOD) activity, malondialdehyde (MDA) content and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity were used as indicators. Male mice were treated with bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) to establish a reproductive system oxidative damage model. After the model establishment, and 28 days of intragastric administration of 300, 600 and 900 mg • kg^{-1} 50% crude ethyl acetate (TCE-6), the effect of TCE-6 was evaluated by the changes of testicular tissue oxidation index. Finally, the expression of related genes was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) to explore the mechanism of protection efficacy. **Results** The toxicity test showed that 95% crude extract (TCE-4), 50% crude petroleum ether component (TCE-5) and 1-butanol component (TCE-7), 70% crude petroleum ether component (TCE-8) and 1-butanol component (TCE-10), 95% crude petroleum ether component (TCE-11) and 1-butanol component (TCE-13) could kill TM4 cells. 50% crude extract (TCE-2), 50% crude extract ethyl acetate component (TCE-6) and 70% crude extract ethyl acetate component (TCE-9) improved the activity of TM4 cells after the oxidative damage. TCE-6 (900 mg • kg^{-1}) significantly increased the activities of SOD and GSH-Px in the testicular tissue of oxidative damage model mice, and decreased the content of MDA ($P < 0.05$). qRT-PCR indicated that 900 mg • kg^{-1} TCE-6 treatment improved the expression of *Nrf2*, *SOD2* and *SOD3* mRNA ($P < 0.05$). **Conclusion** TCE-6 may play an antioxidant role in the reproductive system by up-regulating the expression of SOD enzyme family and regulating Nrf2 signaling pathway, which might be a potential treatment for reproductive system damage.

Key words: *Trichilia catigua* A. Juss.; reproductive system; antioxidant activity

多项研究强调了诱发精子质量下降和睾丸功能损伤的因素，其中环境诱因和生活方式对男性生殖健康产生了较大影响[1-3]。邻苯二甲酸二（2-乙基己基）酯（DEHP）是应用最广泛的增塑剂之一，可通过饮水、饮食、皮肤接触（化妆品）和呼吸进入人体，具有雌激素样作用，影响生物体内激素的正常分泌，对人体健康造成不同程度的危害[4-5]。

楝科植物巴西海木（*Trichilia catigua* A. Juss.）是主产于南美洲的一种小型灌木，作为巴西传统药物常用于缓解疲劳、压力和壮阳。以巴西海木为原料的保健品“Catuama”在巴西商业化应用已有 20 余年的历史[6]。现代药理研究表明巴西海木具有显著的抗炎、抗菌[7-9]及抗氧化作用[10-14]：巴西海木的乙酸乙酯组分可有效抑制鱼藤酮引发的神经细胞 SH-SY5Y 氧化损伤；抑制缺血再灌注引起的氧化损伤等，且在健康的人类志愿者中没有出现毒副作用[15]。研究表明，巴西海木树皮的醇提物中含有绿原酸、原花青素 B_2、花青素 C_1、表儿茶素、儿茶素、黄烷 -3 醇、*β*-谷甾醇、豆甾醇和莰烯醇等化合物[16-18]，其中黄酮类化合物和酚类也被认为是其抗氧化活性的基础[19]。巴西海木在民间医学中广泛用于治疗阳痿等生殖系统疾病，而目前现代药理学研究主要集中在神经系统的抗氧化作用，生殖系统相关作用及机制报道较少，故本研究以生殖系统为切入点进行研究。本研究利用 H_2O_2 致 TM4 细胞氧化损伤模型初步筛选出巴西海木对于细胞氧化损伤具有保护作用的提取物；建立 DEHP 致雄性小鼠生殖系统氧化损伤模型，进一步对筛选出的提取物进行药效评价；通过 qRT-PCR 研究相关基因的表达情况，初步探究其生殖系统保护作用机制，为巴西海木的开发利用提供依据。

1 材料

1.1 仪器

AB265-S 电子分析天平（瑞士 METTLER TOLEDO 公司），Infinite M1000 多功能连续波长酶标仪（瑞士 TECAN 公司），B25-12DT 型超声波清洗器（宁波新芝生物科技股份有限公司），SC-3610 低速离心机（安徽中科中佳科学仪器有限公司），MCO-15AC 二氧化碳培养箱（三洋电机株式会社），IX51 型荧光倒置显微镜（日本 OLYMPUS 公司），NanoDrop 2000 分光光度计（美国 Thermo Fisher Scientific 公司），LightCycler 480 实时系统（瑞士 Roche 公司）。

1.2 试药

巴西海木树皮由 FITOTERAPIA BIOTECH LTDA 公司于巴西东北巴伊亚州采集得到。由中国医学科学院药用植物研究所云南分所李海涛研究员鉴定为楝科巴西海木（*Trichilia catigua* A. Juss.）的树皮。

30% 过氧化氢溶液（北京化工厂），胎牛血清（FBS，德国 PAN Seratech 公司），Cell counting

kit-8（CCK-8，日本 DOJINDO/ 同仁化学），无水乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇（分析纯，天津北联精细化学品开发有限公司），水溶性维生素 E（VE，Trolox）、磷酸盐缓冲液（PBS）、二甲基亚砜（DMSO）、马血清（HS）(索莱宝生物科技有限公司)，Trypsin-EDTA（0.25%）、DMEM/F12 培养基（上海英潍捷基贸易有限公司），总蛋白定量测定试剂盒、总超氧化物歧化酶（SOD）测定试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）测定试剂盒、丙二醛（MDA）测定试剂盒（南京建成科技有限公司），兔抗 Nrf2（bs-1074R）、SOD2（bs-20667R）、SOD3 抗体（bs-3895R）（Bioss），RNAiso Plus（9108-9109）、Prime Script RT Master Mix（RR036A）、TB Green Premix Ex Taq（RR82WR）(日本 TaKaRa BIO 株式会社)。

1.3　细胞培养

TM4 小鼠睾丸支持细胞（北京协和细胞资源中心），采用含 5%HS ＋ 2.5%FBS 的 DMEM/F12 培养基，在 37 ℃含 5%CO_2 的培养箱中培养。每日换液，细胞生长到对数生长期时，传代（比例为 1∶6）并开展实验，实验用细胞控制在 10 代以内。

1.4　实验动物

健康雄性 SPF 级 ICR 小鼠（18 ～ 22 g），由北京华阜康生物科学有限公司提供，实验动物许可证号：SLXD-20210507012。动物实验均经中国医学科学院药用植物研究研究所动物伦理委员会批准，并按照美国国立卫生研究院的指南进行。饲养条件：温度（23±2）℃，相对湿度（55±5）%，光暗周期同昼夜周期，所有小鼠正式实验前均适应性喂养一周。

2　方法与结果

2.1　巴西海木提取物的制备 [20-21]

2.1.1　巴西海木提取物制备方法　取巴西海木树皮粉末 100 g 各 4 份，以料液比＝1∶10 分别加入蒸馏水，50%、70%、95% 乙醇溶液 1000 mL，充分搅拌后冷浸两次，每次 24 h，过滤，合并两次浸出液，旋蒸浓缩后 60 ℃下烘干。取 50% 粗提物、70% 粗提物以及 95% 粗提物干燥粉末各 5 g，加 300 mL 蒸馏水震荡使其均匀分散在水溶液中，依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取，收集得到相应萃取液组分后再次进行旋蒸烘干。巴西海木树皮粉末 13 种提取物代号见表 1。

2.1.2　巴西海木提取物制备结果　使用水及 50%、70% 及 95% 乙醇溶液粗提得到 4 种巴西海木粗提物（TCE-1 ～ TCE-4）；不同浓度醇提物经石油醚、乙酸乙酯及正丁醇依次萃取得到 9 种组分（TCE-5 ～ TCE-13），共 13 种提取物。称定干燥，以生药量计算各提取物得率，结果见表 2。

表 1　巴西海木树皮 13 种提取物对应代号

Tab 1　Corresponding codes of 13 extracts from bark of *Trichilia catigua* A. Juss.

代号	提取物	代号	提取物
TCE-1	水提物	TCE-8	70% 醇提物石油醚组分
TCE-2	50% 醇提物	TCE-9	70% 醇提物乙酸乙酯组分
TCE-3	70% 醇提物	TCE-10	70% 醇提物正丁醇组分
TCE-4	95% 醇提物	TCE-11	95% 醇提物石油醚组分
TCE-5	50% 醇提物石油醚组分	TCE-12	95% 醇提物乙酸乙酯组分
TCE-6	50% 醇提物乙酸乙酯组分	TCE-13	95% 醇提物正丁醇组分
TCE-7	50% 醇提物正丁醇组分		

表 2　巴西海木 13 种提取物得率

Tab 2　Yield of 13 extracts from *Trichilia catigua* A. Juss.

提取物	得率 /%	提取物	得率 /%
TCE-1	21.33	TCE-8	2.31
TCE-2	26.58	TCE-9	3.88
TCE-3	25.32	TCE-10	4.03
TCE-4	24.27	TCE-11	1.81
TCE-5	2.87	TCE-12	3.33
TCE-6	4.21	TCE-13	3.62
TCE-7	4.38		

2.2　巴西海木提取物对 TM4 细胞增殖率的影响

2.2.1　方法　使用 DMSO 分别溶解 13 种提取物配制成 160 μg • mL^{-1} 的含药溶液，使用完全培养基逐级稀释，分别得到质量浓度为 160、80、40、20、10、5 μg • mL^{-1} 的溶液。取对数生长期的 TM4 细胞悬液 100 μL（1×10^5 个 • mL^{-1}）接种于 96 孔板，培养 24 h，细胞生长至 80% 融合时吸去原有培养基，给药组加入不同质量浓度待测含药溶液各 100 μL，对照组加入完全培养基 100 μL，继续孵育 24 h。24 h 后吸去原有培养基，加入 100 μL 10%CCK-8 稀释液，反应 1 h 后，450 nm 波长处测定 *OD* 值，计算细胞增殖率。

细胞增殖率（%）＝（测定组 *OD* 值－空白组 *OD* 值）/（对照组 *OD* 值－空白组 *OD* 值）× 100% － 1。

2.2.2　结果　由图 1 可知，TCE-4、TCE-5、TCE-7、TCE-8、TCE-10、TCE-11、TCE-13 可降低细胞增殖率，对 TM4 细胞有明显杀伤作用，故不进行后续药效评价。给予 5 ～ 160 μg • mL^{-1} TCE-1、TCE-2、TCE-3、TCE-6、TCE-9、TCE-12 后 TM4 细胞增殖，可用于后续抗氧化损伤药效实验。

2.3　过氧化氢损伤条件的确定 [22]

2.3.1　方法　取 30%H_2O_2 溶液 18 μL 加至 10 mL 基础培养基中配制成 18 000 μmol • L^{-1} 的 H_2O_2 母液，分别精密移取 1000、833、667、500、333、167、56 μL H_2O_2 溶液后加基础培养基稀释至 10 mL，得到 1800、1500、1200、900、600、300、

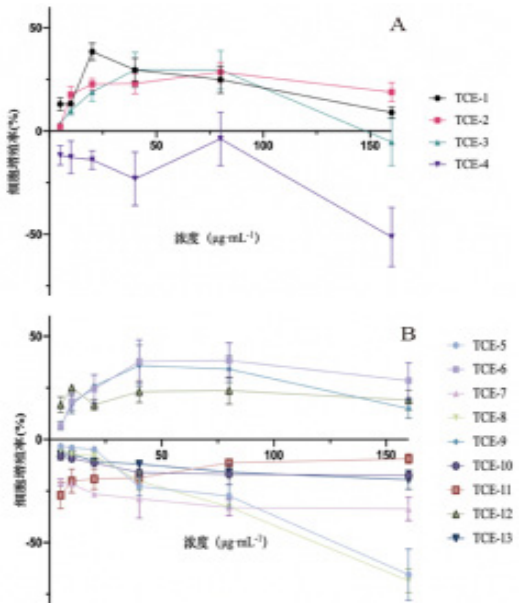


图 1 不同提取物对细胞增殖率的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Fig 1 Effect of different extracts on the cell proliferation rate（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

100 μmol • L^{-1} H_2O_2 溶液。按照“2.2”项下方法将细胞接种培养 24 h 后弃去上清培养基，加入终浓度为 100、300、600、900、1200、1500、1800 μmol • L^{-1} H_2O_2 各 200 μL 分别作用 2 h、4 h 后，测定 *OD* 值，计算细胞存活率。倒置显微镜下观察细胞形态、细胞数量的变化，确定细胞存活率降至 50% ～ 60% 的 H_2O_2 浓度及作用时间。细胞存活率按下式计算：

细胞存活率（%）=（测定组 *OD* 值－空白组 *OD* 值）/（对照组 *OD* 值－空白组 *OD* 值）×100%。

2.3.2 结果 由图 2 可知，H_2O_2 对于细胞的损伤程度随着 H_2O_2 浓度的升高和损伤时间的延长而增强。在 600 μmol•L^{-1} 的浓度下作用 2 h 和 4 h 后，TM4 细胞存活率均为 50% ～ 60%，故确定 H_2O_2 损伤 TM4 条件为 600 μmol • L^{-1} H_2O_2 损伤 2 h。图 3 显示该损伤条件下 TM4 细胞形态发生明显变化，细胞板上黏着减少，细胞数量减少约 33%。

2.4 巴西海木提取物对氧化损伤 TM4 细胞存活率的影响

2.4.1 方法 细胞分为空白对照组，模型组，阳性药组（VE 组），水提物组，给药组（TCE-1、TCE-2、TCE-3、TCE-6、TCE-9、TCE-12），其中 VE 组给药浓度为 20 μg • mL^{-1}[23]，各给药组给药浓度分别为 20、40、80 μg • mL^{-1}。按照“2.2.1”项下方法接种细胞培养 24 h，除对照组外，其余各组吸去原有培养基并用 PBS 冲洗后加入 200 μL 600 μmol • L^{-1} 的 H_2O_2 损伤 2 h。2 h 后弃去上清并用 PBS 冲洗残余 H_2O_2 溶液，给药组加入含药培养基，阳性药组加入 VE 溶液，模型组及对照组加入基础培养基继续培养，24 h 后按照“2.2.1”项下方法测定 *OD* 值，按“2.3.1”项下公式计算各组细胞存活率。

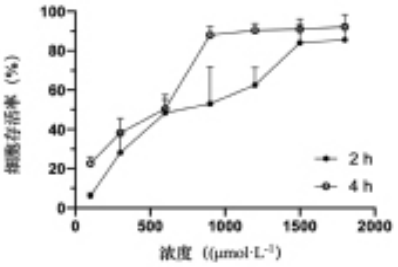


图 2 不同浓度 H_2O_2 分别作用 2 h、4 h 后细胞存活情况（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig 2 Cell viability after treatment with different concentrations of H_2O_2 for 2 h and 4 h（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

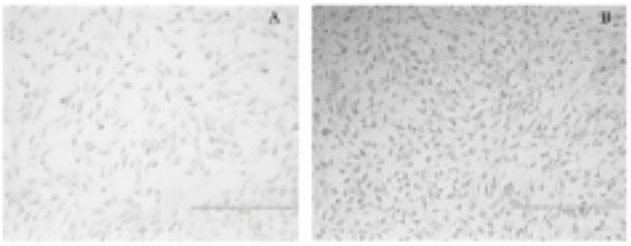


图 3 600 μmol • L^{-1} H_2O_2 损伤 2 h 后（A）及空白对照组（B）的细胞形态（×20）

Fig 3 Cell morphology of the group after 600 μmol • L^{-1} H_2O_2 injury for 2 h（A）and blank control group（B）(×20)

2.4.2 结果 如图 4 所示，给予 600 μmol • L^{-1} H_2O_2 损伤 2 h 后，与空白对照组相比，模型组细胞存活率降低约 50%；与模型组相比，给药组细胞存活率均有一定提高。TCE-1、TCE-2、TCE-3、TCE-6、TCE-9、TCE-12 均有一定的抗氧化损伤作用，给予 80 μg • mL^{-1} TCE-2、TCE-6、TCE-9 可显著提高 TM4 细胞存活率（$P<0.01$），明显抑制 H_2O_2 诱导的 TM4 细胞存活率降低的损伤情况。后续对这 3 个提取物进行研究。

2.5 TM4 细胞氧化指标变化

2.5.1 方法 细胞分为对照组，模型组，VE 组，给药组（TCE-2、TCE-6、TCE-9）。其中 VE 组给药浓度为 20 μg • mL^{-1}，给药组给药浓度为 80 μg • mL^{-1}，按照“2.4.1”项下方法损伤细胞并给药。给药 24 h 后去除含药培养基，PBS 洗涤细胞后，收集细胞，加入细胞裂解液，冰上裂解 30 min，4 ℃、12 000 r • min^{-1} 离心 15 min，收集上清液，BCA 法测定蛋白浓度，按照试剂盒检测 SOD、MDA 和 GSH-Px 的含量，计算公式如下：

SOD 抑制率（%）=［（$OD_{对照组}-OD_{对照空白组}$）－（$OD_{测定组}-OD_{测定空白组}$）］/（$OD_{对照组}-OD_{空白组}$）×100%。

SOD 活力（U•mgprot^{-1}）= SOD 抑制率 /50%× 反应体系 / 稀释倍数 / 待测样本蛋白含量

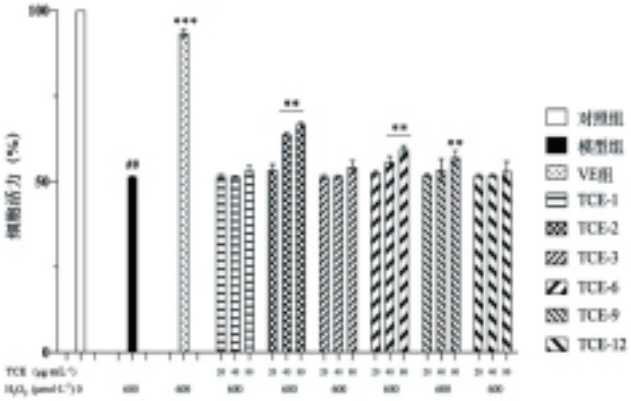


图 4　不同组别 TM4 细胞存活率变化（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig 4　Changes of the viability of TM4 cells in each group（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

注（Note）：与对照组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$（Compared with the control group，$^{\#\#}P<0.01$；compared with the model group，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$）。

MDA（nmol • mgprot^{-1}）＝（$OD_{测定组}$－$OD_{空白组}$）/（$OD_{标准组}$－$OD_{空白组}$）× 标准品浓度 / 样本蛋白含量

GSH-Px 酶活力（U•mgprot^{-1}）＝（$OD_{非酶管}$－$OD_{酶管}$）/（$OD_{标准管}$－$OD_{空白管}$）× 标准浓度 × 稀释倍数 / 反应时间 / 取样量 / 蛋白含量

2.5.2　结果　如图 5 所示，与空白对照组比，模型组 SOD 和 GSH-Px 的活力显著降低，MDA 含量升高（$P<0.01$）；与模型组比，80 μg • mL^{-1} TCE-9 可显著提高 GSH-Px 的活力（$P<0.01$），80 μg • mL^{-1} TCE-6 可显著提高 SOD 和 GSH-Px 的活力，降低 MDA 含量（$P<0.01$）。表明 TCE-6 可显著抑制 H_2O_2 造成 TM4 细胞氧化损伤，可进一步进行体内药效实验。

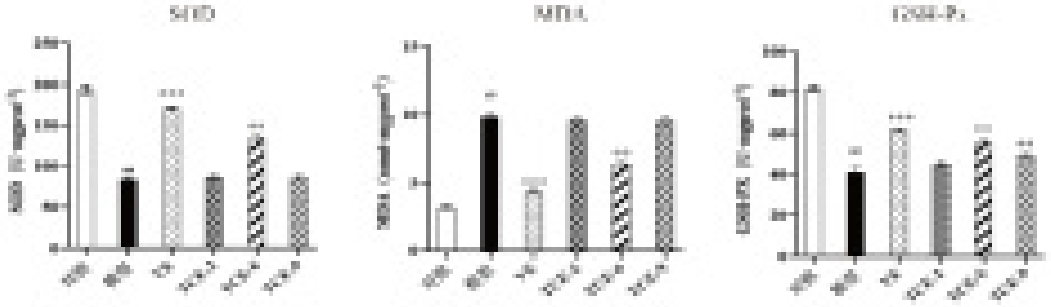


图 5　各组 SOD 活力、MDA 含量、GSH-Px 活力的变化（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Fig 5　Changes of SOD activity，MDA content and GSH-Px activity in each group（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

注（Note）：与对照组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$（Compared with the control group，$^{\#\#}P<0.01$；compared with the model group，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$）。

2.6　小鼠睾丸组织氧化指标变化

2.6.1　方法　小鼠随机分为对照组，赋形剂组，模型组，左卡尼汀组，VE 组及 TCE-6 低、中、高剂量给药组（L-TCE-6、M-TCE-6 和 H-TCE-6），每组 12 只。除对照组及赋形剂组外，各组给予 2.5 mg • kg^{-1} DEHP 灌胃 7 d 制备雄性小鼠氧化损伤模型。DEHP 灌胃结束后，对照组给予蒸馏水，赋形剂组给予玉米油，左卡尼汀组给予 500 mg • kg^{-1} 左卡尼汀，VE 组给予 100 mg • kg^{-1} VE，TCE-6 低、中、高剂量给药组（L-TCE-6、M-TCE-6 和 H-TCE-6）分别给予 300、600、900 mg • kg^{-1} TCE-6，连续灌胃给药 28 d。末次给药后，禁食过夜。第 29 日处死小鼠后完整地取出睾丸样本，剥去周围的脂肪和结缔组织。按照检测试剂盒说明书要求，分别检测各组睾丸组织中 SOD、GSH-Px 活力及 MDA 含量。

2.6.2　结果　如图 6 所示，与对照组相比，DEHP 睾丸组织匀浆中 SOD、GSH-Px 活力显著降低，MDA 含量显著升高（$P<0.01$）；与模型组相比，给予 M-TCE-6 组 SOD、GSH-Px 活力显著升高（$P<0.05$）；H-TCE-6 组 SOD、GSH-Px 活力显著升高，MDA 含量显著降低（$P<0.05$）。结果表明 TCE-6 可通过降低 MDA 含量，提高 SOD 和 GSH-Px 活力起到抗氧化损伤作用。

2.7　氧化相关基因相对表达量的测定

2.7.1　方法　于冰上取“2.6.1”项下收集的睾丸组织样本，根据 RNAiso Plus 试剂盒说明提取总 RNA，测定总 RNA 的浓度和纯度，然后反转录为 cDNA。合成的 cDNA 进行 qRT-PCR 分析。采用 LightCycler 480 实时系统进行聚合酶链反应并测量 mRNA 的相对表达量。反应条件 95 ℃ 30 s，随即 40 个循环聚合酶链反应，循环温度方案：95 ℃ 5 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s。循环结束后，95 ℃温育 5 s，60 ℃温育 1 min，之后保持 95 ℃。以 *Gapdh* 作为内参基因、氧化相关基因 *Nrf2*、*SOD2*、*SOD3* 的引物序列见表 3。

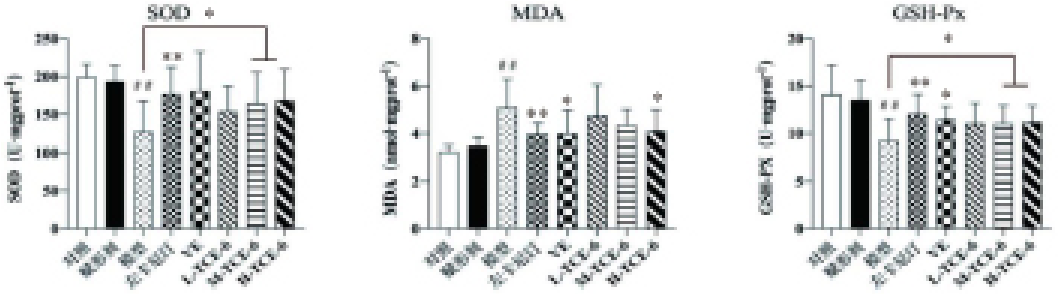


图 6 各组 SOD 活力、MDA 含量、GSH-Px 活力变化（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

Fig 6 Changes of SOD activity，MDA content and GSH-Px activity in each group（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

注（Note）：与对照组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$（Compared with the control group，$^{\#\#}P<0.01$；compared with the model group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$）。

表 3 qRT-PCR 分析基因引物序列

Tab 3 Primers analyzed by qRT-PCR

基因	物种	正向序列（5'-3'）	反向序列（3'-5'）
Gapdh	小鼠	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
Nrf2	小鼠	TAGATGACCATGAGTCGCTTGC	GCCAAACTTGCTCCATGTCC
SOD2	小鼠	CAGACCTGCCTTACGACTATGG	CTCGGTGGCGTTGAGATTGTT
SOD3	小鼠	CCTTCTTGTTCTACGGCTTGC	TCGCCTATCTTCTCAACCAGG

2.7.2 结果 通过 qRT-PCR 检测 3 个关键氧化相关基因表达水平（见图 7）。与对照组相比，DEHP 诱导后 *Nrf2*、*SOD2* 及 *SOD3* mRNA 相对表达水平显著下降（$P<0.01$）；与模型组比较，给予 600、900 mg • kg^{-1} TCE-6 可显著上调 *Nrf2*、*SOD2* 及 *SOD3* mRNA 相对表达水平（$P<0.05$）；300 mg • kg^{-1} TCE-6 可显著上调 *Nrf2* 和 *SOD2* mRNA 相对表达水平（$P<0.05$）。结果提示，TCE-6 可能通过调节 *Nrf2*、*SOD2* 及 *SOD3* mRNA 的表达发挥抗生殖系统氧化损伤活性。

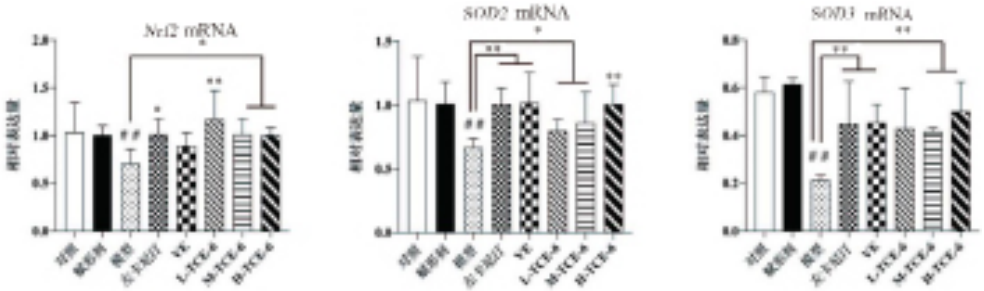


图 7 TCE-6 对氧化相关基因的相对表达量的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

Fig 7 Effect of TCE-6 on the relative expression of oxidation-related genes（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

注（Note）：与对照组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$（Compared with the control group，$^{\#\#}P<0.01$；compared with the model group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$）。

2.8 数据处理

实验数据采用 SPSS 25.0 版统计软件进行处理，计量资料以均值 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用单因素方差分析，以 $P<0.05$ 作为差异具有统计学意义。所有数据作图均由 GraphPad Prism 6.0 软件生成。

3 讨论

3.1 模型选择依据

H_2O_2 诱导是目前最为常用的细胞氧化损伤造模方式。H_2O_2 易穿透细胞膜，可与细胞内 Fe^{2+} 反应产生高毒性的羟自由基，也可通过氧化蛋白质、DNA 等产生过量自由基或引发脂质过氧化损伤导致组织损伤和细胞死亡[24-25]。TM4 细胞是位于生精小管内的一种细胞，为生殖细胞提供生存和减数分裂过程中所需的营养，维持 TM4 细胞的稳态对于精子的发生及正常功能有着至关重要的作用。因此药物对 TM4 细胞所产生的作用，可直接反映该药作用于生殖系统的效果，TM4 细胞存活率变化对于巴西海木药效部分的筛选具有重要意义。故本实验采用 H_2O_2 诱导 TM4 细胞氧化损伤模型筛选巴西海木提取物。经研究表明，TCE-6 可以显著提高 H_2O_2 损伤后的细胞存活率以及 SOD、GSH-Px 活力；显著降低 MDA 含量，故筛选出 TCE-6 进行后续动物模型药效评价。

多项研究表明，邻苯二甲酸盐可以诱导睾丸组织氧化应激，导致生殖细胞 DNA 损伤和线粒体功能受损，降低与睾酮合成相关的基因活性，导致睾丸组织功能和精子发育受损[26-28]。DEHP 对男性生殖健康具有较强的毒性作用，通过干扰生殖内分泌系统，降低精子活力，减少精子数量，导致睾丸等实质器官萎缩和形态异常[4-5，29]，引发氧化应激是其产生生殖系统毒性的主要机制。基于 DEHP 的危害及机制，本实验采用 DEHP 诱导的雄性小鼠生殖损伤模型验证 TCE-6 的药效活性。

3.2　抗氧化活性研究结果

随着对氧化应激的深入研究，已确定其与许多疾病密切相关，例如各种炎症损伤、中风[30]以及男性不育症[31-32]等。当机体发生氧化应激时，会驱动一系列病理反应，所产生的活性氧类与抗氧化系统失衡。对于生殖系统而言，这种失衡会导致生殖细胞损伤，睾丸能量供应受阻，从而对生殖系统产生实质伤害[33-35]。MDA 是脂质过氧化产物，其含量的大小可反映机体内脂质过氧化的程度，间接地反映出细胞和组织损伤的程度[36]。SOD 和 GSH-Px 是抗氧化防御系统的重要组成部分，能够清除机体内过多的 MDA，具有保护细胞和组织的作用，其活力的高低间接反映了组织抗氧化应激能力[37]。DEHP 诱导后睾丸组织中 MDA 含量显著提高，GSH-Px 和 SOD 活力显著降低，说明睾丸组织产生脂质过氧化，且不能有效清除活性氧自由基，睾丸组织发生氧化损伤。

目前药理学研究证实巴西海木提取物在神经系统上具有较好的抗氧化损伤活性，对于氧化标志物 SOD、MDA 以及谷胱甘肽（GSH）、氧化谷胱甘肽（GSSG）、过氧化氢酶（CAT）和蛋白质羰基（PCGs）水平均有改善作用[5-9]。本研究以生殖系统为切入点探究其抗氧化活性，检测了氧化与抗氧化反应的标志物。结果表明 900 $mg \cdot kg^{-1}$ TCE-6 可通过降低睾丸组织 MDA 含量，提高 SOD 和 GSH-Px 活力，调节睾丸组织抗氧化酶水平，抑制睾丸组织脂质过氧化损伤。

qRT-PCR 研究相关基因的活性发现给药后 *Nrf2*、*SOD2* 和 *SOD3* mRNA 表达水平显著提高。激活 SOD 酶活性途径可促进 SOD 的抗氧化酶的生成，调控氧化物质水平，减少 ROS 的产生，调节 O^{2-} 水平[38]，从而减少氧化应激损伤，维持组织的正常功能。Nrf2 是抗氧化防御过程中主要的调节剂，可调节下游抗氧化酶的表达，维持生物体内氧化 / 抗氧化水平的平衡，其含量受到上游 KELCH 样 ECH 关联蛋白 1（Keap1）等信号分子介导的泛素化或者蛋白酶体途径的调节。静息状态下，Nrf2 与胞质中的 Keap1 相结合，处于非活性状态；当机体处于氧化应激状态时，Nrf2 与 Keap1 解偶联后转入核内，与抗氧化反应元件（ARE）结合，激活下游抗氧化蛋白基因的表达，以减少氧化损伤[39-42]。TCE-6 可能通过促进睾丸组织内 Keap1-Nrf2 偶联体解离，增加 Nrf2 核转位及表达，进而激活下游 SOD、GSH-Px 等抗氧化酶转录，增强抗氧化损伤能力。

3.3　总结与不足

本研究表明 TCE-6 具有较好的抗生殖系统氧化损伤活性。通过 H_2O_2 损伤 TM4 细胞模型筛选出 TCE-6 作为其抗生殖系统氧化损伤的活性部位，通过 DEHP 损伤雄性小鼠模型验证了该部分体内抗生殖系统损伤活性，并发现该活性可能是通过上调 SOD 酶家族表达和调节 Nrf2 信号通路实现的。但由于睾丸组织行使功能的机制复杂多变，由氧化应激介导的细胞凋亡和线粒体能力代谢失衡有可能协同氧化应激共同损伤睾丸组织[43]，本研究结果不能完全推论出巴西海木的作用机制。因此，下一步将深入探究巴西海木抗凋亡以及维护线粒体功能等的作用，综合评价其生殖系统的保护作用机制。

参考文献

[1] Safe S. Clinical correlates of environmental endocrine disruptors [J]. Trends Endocrinol Metab，2005，16（4）：139-144.

[2] Merzenich H，Zeeb H，Blettner M. Decreasing sperm quality：a global problem? [J]. BMC Public Health，2010，10（1）：1-5.

[3] Street ME，Angelini S，Bernasconi S，et al. Current knowledge on endocrine disrupting chemicals（EDCs）from animal biology to humans，from pregnancy to adulthood：highlights from a national italian meeting [J]. Int J Mol Sci，2018，19（6）：1647.

[4] Farombi EO，Abarikwu SO，Adedara IA，et al. Curcumin and kolaviron ameliorate di-n-butylphthalate-induced testicular damage in rats [J]. Basic Clin Pharmacol，2010，100（1）：43-48.

[5] Muczynski V，Lecureuil C，Messiaen S，et al. Cellular and molecular effect of MEHP involving LXR*α* in human fetal testis and ovary [J]. PLoS One，2012，7（10）：e48266.

[6] Antunes E，Gordo WM，de Oliveira JF，et al. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by the herbal medicine Catuama and its constituents [J]. Phytother Res，2001，15（5）：416-421.

[7] Longhini R，Lonni AA，Sereia AL，et al. Trichilia catigua：therapeutic and cosmetic values [J]. Rev Bras Farmacogn，2017，27（2）：254-271.

[8] Manabe H，Sakagami H，Ishizone H，et al. Effects of Catuaba extracts on microbial and HIV infection [J]. In Vivo，1992，6（2）：161-165.

[9] Pizzolatti MG，Venson AF，Smânia AJ，et al. Two epimeric flavalignans from Trichilia catigua（Meliaceae）with antimicrobial activity [J]. Z Naturforsch C J Biosci，2002，57（5-6）：483-488.

[10] Andrade D，Oliveria DMD，Barreto G，et al. Effects of

the extract of Anemopaegma mirandum（Catuaba）on Rotenone-induced apoptosis in human neuroblastomas SH-SY5Y cells [J]. Brain Res，2008，1198（none）：188-196.

[11] Kamdem JP，Waczuk EP，Kade IJ，et al. Catuaba（Trichilia catigua）prevents against oxidative damage induced by in vitro ischemia-reperfusion in rat hippocampal slices [J]. Neurochem Res，2012，37（12）：2826-2835.

[12] Godinho J，de Sa-Nakanishi AB，Moreira LS，et al. Ethyl-acetate fraction of Trichilia catigua protects against oxidative stress and neuroinflammation after cerebral ischemia/reperfusion [J]. J Ethnopharmacol，2018，221：109-118.

[13] Godinho J，de Oliveira RMW，de Sa-Nakanishi AB，et al. Ethyl-acetate fraction of Trichilia catigua restores long-term retrograde memory and reduces oxidative stress and inflammation after global cerebral ischemia in rats [J]. Behav Brain Res，2018，337：173-182.

[14] Martins NO，de Brito IM，Araújo SSO，et al. Antioxidant，anticholinesterase and antifatigue effects of Trichilia catigua（catuaba）[J]. BMC Complement Altern Med，2018，18（1）：172.

[15] Oliveira CH，Moraes ME，Moraes MO，et al. Clinical toxicology study of an herbal medicinal extract of Paullinia cupana，Trichilia catigua，Ptychopetalum olacoides and Zingiber officinale（Catuama）in healthy volunteers [J]. Phytother Res，2010，19（1）：54-57.

[16] Kamdem JP，Olalekan EO，Hassan W，et al. Trichilia catigua（Catuaba）bark extract exerts neuroprotection against oxidative stress induced by different neurotoxic agents in rat hippocampal slices [J]. Ind Crops Prod，2013，50：625-632.

[17] Sereia AL，Longhini R，Lopes GC，et al. Capillary electrophoresis as tool for diastereomeric separation in a Trichilia catigua fraction [J]. Phytochem Anal，2017，28（3）：144-150.

[18] Tang W，Hioki H，Harada K，et al. Antioxidant phenylpropanoid-substituted epicatechins from Trichilia catigua [J]. J Nat Prod，2007，70（12）：2010-2013.

[19] Kamdem JP，Stefanello ST，Boligon AA，et al. In vitro antioxidant activity of stem bark of Trichilia catigua Adr. Juss [J]. Acta Pharmaceut，2012，62（3）：371-382.

[20] 王会，刘汇，张楠茜，等 . 核桃楸叶降血糖和抗氧化有效部位的筛选及其成分分析 [J]. 中国现代中药，2019，21（3）：312-315，322.

[21] 姚晓长，蒋梅香，刘阳，等 . 藤石松乙酸乙酯部位的化学成分研究 [J]. 中南药学，2021，19（12）：2536-2540

[22] 潘长伟，赵峰，郎宏鑫，等 . 过氧化氢诱导人皮肤成纤维细胞衰老模型的建立 [J]. 解剖科学进展，2019，25（2）：193-195，199.

[23] 刘晓东，杨广育，赵玉琴，等 . 体外测试肿瘤化疗敏感性指标的研究 [J]. 实用肿瘤学杂志，1992（3）：39-40.

[24] Lin MT，Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases [J]. Nature，2006，443（7113）：787-795.

[25] Rhee SG. H_2O_2，a necessary evil for cell signaling [J]. Science，2006，312（5782）：1882-1883.

[26] Barakat R，Lin PP，Rattan S，et al. Prenatal exposure to DEHP induces premature reproductive senescence in male mice [J]. Toxicol Sci，2017，156（1）：96-108.

[27] Barakat R，Seymore T，Lin PP，et al. Prenatal exposure to an environmentally relevant phthalate mixture disrupts testicular steroidogenesis in adult male mice [J]. Environ Res，2019，172：194-201.

[28] Yeung BH，Wan HT，Law AY，et al. Endocrine disrupting chemicals：multiple effects on testicular signaling and spermatogenesis [J]. Spermatogenesis，2011，1（3）：231-239.

[29] Grande SW，Andrade AJ，Talsness CE，et al. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-（2-ethylhexyl）phthalate（DEHP）：reproductive effects on adult female offspring rats [J]. Toxicology，2007，229（1-2）：114-122.

[30] Bolaños JP，Moro MA，Lizasoain I，et al. Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke：therapeutic implications [J]. Adv Drug Deliver Rev，2009，61（14）：1299-1315.

[31] Agarwal A，Virk G，Ong C，et al. Effect of oxidative stress on male reproduction [J]. World J Mens Health，2014，32（1）：1-17.

[32] Lavranos G，Balla M，Tzortzopoulou A，et al. Investigating ROS sources in male infertility：a common end for numerous pathways [J]. Reprod Toxicol，2012，34（3）：298-307.

[33] Iliadou PK，Tsametis C，Kaprara A，et al. The sertoli cell：novel clinical potentiality [J]. Hormones（Athens），2015，14（4）：504-514.

[34] Hai Y，Hou J，Liu Y，et al. The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis [J]. Semin Cell Dev Biol，2014，29：66-75.

[35] 朱文祥 . 氧化应激和内质网应激在镉抑制小鼠睾丸间质细胞睾酮合成中的作用 [D]. 合肥：安徽医科大学，2019.

[36] Huang F，Sheng XX，Zhang HJ. DUSP26 regulates podocyte oxidative stress and fibrosis in a mouse model with diabetic nephropathy through the mediation of ROS [J]. Biochem Biophys Res Commun，2019，515：410-416.

[37] 刘理静，钱红，尹辉明，等 . 中华猕猴桃果仁非饱和脂肪酸通过激活 Keap1/Nrf2 信号通路增强肺纤维化大鼠抗氧化能力 [J]. 细胞与分子免疫学杂志，2016，32（4）：479-483.

[38] Schram S，Chuang D，Schmidt G，et al. Mutant SOD1 prevents normal functional recovery through enhanced glial activation and loss of motor neuron innervation after peripheral nerve injury [J]. Neurobiol Dis，2019，124：469-478.

[39] Li W，Kong AN. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response [J]. Mol Carcinogen，2009，48：91-104.

[40] 张静艳，郭科东，金明，等 . 牛膝和白芍配伍对帕金森病肝阳上亢证小鼠的协同神经保护作用及机制研究 [J]. 中南药学，2021，19（11）：2269-2275.

[41] Papaiahgari S，Yerrapureddy A，Hassoun PM，et al. EGFR-activated signaling and actin remodeling regulate cyclic stretch-induced NRF2-ARE activation [J]. Am J Resp Cell Mol，2007，36（3）：304.

[42] Uruno A，Motohashi H. The Keap1-Nrf2 system as an in vivo sensor for electrophiles [J]. Nitric Oxide，2011，25（2）：153-160.

[43] 张亦凡 . 圣草酚的体外抗氧化活性及诱导肝癌细胞凋亡的研究 [D]. 咸阳：西北农林科技大学，2013.

（收稿日期：2021-12-02；修回日期：2022-01-20）

基于蛋白互作和关键作用靶点的网络药理学研究白花败酱草治疗溃疡性结肠炎的作用机制及实验验证

李晓晨[1]，王帅[1, 2, 3]，李天娇[1, 2, 3]，赵琳[1*]，包永睿[1, 2, 3*]，孟宪生[1, 2, 3]（1. 辽宁中医药大学药学院，辽宁　大连　116600；2. 辽宁省中药多维分析专业创新技术中心，辽宁省现代中药研究工程实验室，辽宁　大连　116600；3. 辽宁省现代中药研究工程实验室，辽宁　大连　116600）

摘要：目的　利用网络药理学方法研究白花败酱草治疗溃疡性结肠炎的作用机制并对其进行实验验证。**方法**　通过中药系统药理学数据库与分析平台数据库（TCMSP）以及相关文献获取白花败酱草活性成分及其对应靶点；通过 Gene Cards、OMIM、Drug Bank 数据库对结肠炎的作用靶点进行筛选；将预测靶点与疾病靶点取交集，筛选出共同靶点即关键靶点，采用 String 数据库和 Cytoscape 3.7.2 软件构建药物疾病交集靶点 PPI 网络；以自由饮用葡聚糖硫酸钠建立的溃疡性结肠炎小鼠为模型，以小鼠疾病活动指数（DAI）、苏木精 - 伊红染色的小鼠结肠组织病理变化为评价指标，明确白花败酱草治疗溃疡性结肠炎的药理药效作用；采用 Western blot 和 ELISA 法检测不同组别治疗的小鼠结肠组织中 PI3K/AKT 信号通路中 PI3K 和 AKT 蛋白表达水平以及 TNF-α、IL-6 水平，明确白花败酱草作用机制。**结果**　通过网络药理学分析获得 12 个活性成分和 169 个潜在靶点，这些靶点参与的信号通路主要与 PI3K/AKT 信号通路有关，且 AKT 是其中潜在的核心靶点。动物实验结果显示，白花败酱草可明显下调 PI3K/AKT 信号通路中 P13K 和 AKT 蛋白水平以及抑制 TNF-α 和 IL-6 炎症因子的释放。**结论**　本研究明确了白花败酱草治疗溃疡性结肠炎的作用机制，可为其临床应用提供参考依据。

关键词：白花败酱草；网络药理学；结肠炎；作用机制；PI3K/AKT 信号通路
中图分类号：R282.7，R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0759-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.006

Mechanism and experimental validation of *Patrinia villosa* Juss. for ulcerative colitis by network pharmacology based on protein interactions and key action targets

LI Xiao-chen[1], WANG Shuai[1, 2, 3], LI Tian-jiao[1, 2, 3], ZHAO Lin[1*], BAO Yong-rui[1, 2, 3*], MENG Xian-sheng[1, 2, 3] (1. *College of Pharmacy*, *Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, *Dalian Liaoning* 116600; 2. *Liaoning Multi-dimensional Analysis of Traditional Chinese Medicine Technical Innovation Center*, *Dalian Liaoning* 116600; 3. *Liaoning Modern Traditional Chinese Medicine Research Engineering Laboratory*, *Dalian Liaoning* 116600)

Abstract: Objective To determine the mechanism of ulcerative colitis treatment by *Patrinia villosa* Juss. based on network pharmacology. **Methods** The active components and their corresponding targets were obtained by pharmacological database, analysis platform database and related literatures. The targets of colitis were screened by Gene Cards, OMIM and Drug Bank databases. The intersection of predicted targets and disease targets was selected to screen out the common target, namely the key target. The PPI network of drug disease intersection target was constructed with String database and Cytoscape 3.7.2 software. The mice with ulcerative colitis established by drinking sodium dextran sulfate freely were used as the model, and the disease activity index (DAI) and the pathological

作者简介：李晓晨，女，在读硕士研究生，主要从事药物分析与药物制剂研究，email：215153259@qq.com　*通信作者：赵琳，男，硕士，副教授，主要从事中药制剂及质量控制研究，email：zhao3lin@126.com；包永睿，男，博士，正高级实验师，主要从事中药化学物质组学及作用机制整合研究，email：byr1026@163.com

changes of colonic tissues stained with hematoxylin and eosin were used as the evaluation indexes to dertermine the pharmacodynamic effect of *Patrinia villosa* Juss. on ulcerative colitis. Western blot and ELISA were used to detect the protein expression levels of PI3K and AKT in PI3K/AKT signaling pathway and the levels of TNF-*α* and interleukin-6 in the colon tissues of mice treated in different groups to clarify the mechanism of *Patrinia villosa* Juss.. **Results** Twelve active components and 169 potential targets were obtained through network pharmacology. These targets were mainly involved in PI3K/AKT signaling pathway, and AKT was the potential core target. Animal experimentals showed that *Patrinia villosa* Juss. significantly down-regulated the levels of PI3K and AKT proteins in the PI3K/AKT signaling pathway and inhibited the release of TNF-*α* and IL-6 inflammatory factors. **Conclusion** The mechanism of *Patrinia villosa* Juss. for ulcerative colitis is clarified, which also provides reference for its clinical application.

Key words: *Patrinia villosa* Juss.; network pharmacology; ulcerative colitis; mechanism of action; PI3K/AKT pathway

溃疡性结肠炎（ulcerative colitis，UC）是一种常见的反复发作的慢性疾病，常表现为腹痛、腹泻、便秘、便血以及炎症等。目前广泛认为肠黏膜损伤是引发 UC 的主要原因之一。近年来，UC 发病率逐年攀升，其治疗药物主要包括美沙拉秦、盐酸小檗碱、柳氮磺胺吡啶、氨基水杨酸、糖皮质类激素等。临床治疗中发现长时间使用上述药物常会伴随着多种不良反应的发生，且停药后复发率较高，给患者带来极大的困扰 [1-6]。

近年来，大量研究显示中医药在临床治疗中疗效好、毒性低 [7]。因此，从中医药角度出发寻找治疗 UC 新药是一种可行的方法。UC 的中医病名为“休息痢”，目前认为脾气虚弱为其基本病机，湿热之邪是其主要致病因素，瘀血阻滞是久病不愈的重要原因。白花败酱草 [*Patrinia villosa*（Thunb.）Juss.] 系败酱科植物，药用其全草，味辛，性寒，始载于《神农本草经》，被《本草纲目》中记载为治肠痈之要药，主要含有黄酮类、酚酸类以及皂苷类化合物，具有清热解毒，利湿排脓，活血化瘀，镇心安神的功效，临床上常用于治疗阑尾炎，痈肿疮毒，肠炎，UC，慢性胃炎，肿瘤等 [8-9]。已有文献表明，败酱草在临床使用、体外实验等都具有显著的疗效，毒副作用及复发率均相对较低 [5-6，10-11]。本研究采用网络药理学的研究方法，构建“潜在活性成分 - 作用靶点 - 疾病”网络对白花败酱草治疗 UC 靶点进行全面预测并探讨其作用机制；并在此基础上，利用自由饮用葡聚糖硫酸钠（DSS）建立的 UC 小鼠模型对其中筛选出的重要途径进行实验验证，深入探讨白花败酱草治疗 UC 的作用机制，为其进一步临床应用奠定基础。

1 材料

1.1 相关数据库

中药系统药理学数据库与分析平台（TCM-SP）[12]，有机小分子生物活性数据库（PubChem），蛋白质数据库（UniProt）[13]，GeneCard 数据库，OMIM 数据库，Drugbank 数据库，String 数据库 [14]，DAVID 数据库。

1.2 试药

白花败酱饮片 [经辽宁中医药大学许亮教授鉴定为白花败酱 *Patrinia villosa*（Thunb.）Juss. 的干燥全草]；质谱级甲醇、乙腈（德国 Merck KGaA 公司）；质谱级甲酸（美国 Thermo 公司，批号：141831A）；纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司）；美沙拉秦缓释颗粒（上海爱的发制药有限公司）；葡聚糖硫酸钠盐（Meilunbio 公司，批号：S0925A）；TNF-*α* 酶联免疫吸附测定试剂盒（上海科兴有限公司，批号：21071230N）；IL-6 酶联免疫吸附测定试剂盒（上海科兴有限公司，批号：21071233N）；Kodak X 胶片（美国柯达公司）；RIPA 裂解液（ambion 生物科技有限公司）；PMSF 蛋白酶抑制剂、6×protein loading buffer（北京全式金生物技术有限公司）；三羟甲基氨基甲烷（Tris）、甘氨酸（Glycine）、十二烷基磺酸钠（SDS）、BCA 蛋白浓度测定试剂盒（上海索莱宝生物科技有限公司）；SDS-PAGE 凝胶快速配置试剂盒、飞克特超敏 ECL 发光液（大连美仑生物科技有限公司）；双色预染蛋白 Marker（Proteintech，Cat：PL00001）；兔抗 AKT 多克隆抗体（Proteintech，Cat：10176-2-Ap）；兔抗

PI3 Kinase p85（Signaling，Cat：#4292）；兔抗 Beat Actin 多克隆抗体（Proteintech，Cat：20536-1-Ap）；HRP-conjugated Affinipuer Goat anti-Rabbit IgG（H＋L）（Proteintech，Cat：SA00001-2）。

1.3　动物

SPF 级 C57BL/6 雌性小鼠，体质量（20±2）g [辽宁长生生物技术有限公司，许可证编号：SCXK（辽）2020-0001]。

1.4　仪器

旋转蒸发仪（美国 SENCO 公司）；Sartorius CP225D 电子分析天平（北京赛多利斯天平有限公司）；CV200 吉艾姆真空离心浓缩仪（北京吉艾姆科技有限公司）；组织脱水机（日本樱花：VIP6 AI）；BM450A 包埋机、冻台（派斯杰）；PH60 病理切片机（Lecia）；PH60 组织漂烘仪（派斯杰）；GHP-9160 烤箱（上海恒一）；YA0170 载玻片（Solarbio）；3DHISTECH P250 FLASH 全景扫描仪（3DHISTECH）；CM1900 冰冻切片机（Lecia）；酶标仪（美国 Molecular Drvices 公司）；通用电泳仪（美国 BD 公司）。

2　方法与结果

2.1　网络药理学

2.1.1　药物与疾病交集靶点预测　应用 TCMSP 数据库平台与白花败酱草相关文献[15]，以口服生物利用度（OB）≥ 30%、药物相似性（DL）≥ 0.18 为条件，筛选出活性较高的成分共 12 种，检索并分析其对应靶点信息；利用 UniProt 数据库，规范相应蛋白靶点，得到 169 个药物作用靶点，建立药效成分潜在作用靶点库，并构建可视化网络图，见图 1。应用 GeneCards、OMIM、DrugBank 数据库搜索 UC 的作用靶点，获取相关基因 1234 个，构建疾病靶标库；将所得靶点信息取交集，获得药物与疾病的交集靶点 98 个。

2.1.2　交互网络的构建和富集分析　将药材、疾病交集靶点输入蛋白交互作用网站 String，生物种类选择“Homo sapiens”，最小相互作用阈值设置“medium confidence”（＞ 0.4），其他参数选择默认值，即可得到 PPI 网络，将结果进一步美化，得到交集蛋白 PPI 网络图[16]，其中苏氨酸蛋白激酶（AKT1）的 degree 值为 82，在所有靶点中排列第一，表明其在整个 PPI 网络中占据重要地位。网络图包含 98 个节点，2028 条相互作用，见图 2；以节点大小和颜色用于反映 degree 值的大小，选取 degree 值排列前 20 的靶点绘制棒棒

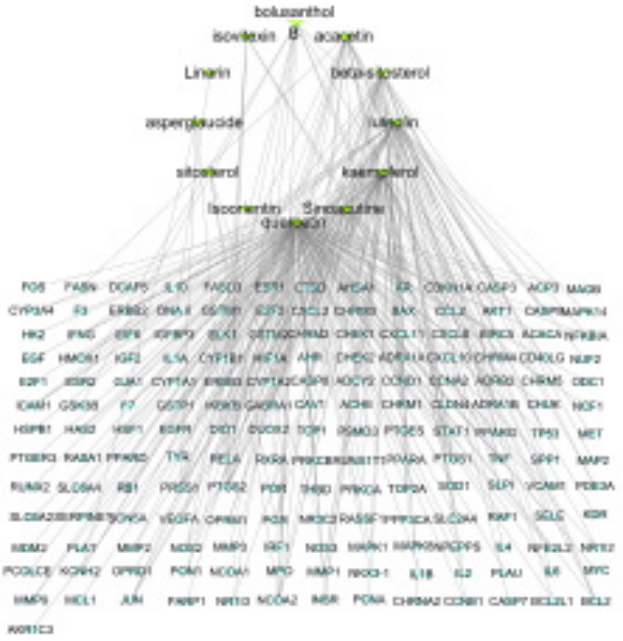


图 1　白花败酱草治疗 UC 的“活性成分 - 靶点”网络图

Fig 1　”Active component-target”network diagram of *Patrinia villosa* Juss. in treating ulcerative colitis

糖图，探究潜在靶基因功能，见图 3；利用 String 和 DAVID 数据库对潜在基因进行功能、通路富集分析，见图 4 ～ 6，结果中除人类癌症相关通路外，磷脂酰肌醇 -3- 激酶（PI3K）/ 丝氨酸激酶（AKT）信号通路排列第一，可能是白花败酱草治疗 UC 的关键靶点及关键通路。已证实 AKT 是 PI3K 下游的直接靶蛋白，主要负责由 PI3K 始动的生物信息转导，位点被磷酸化后，结合在细胞膜上的 AKT 被完全激活，其首要的功能就是激活 NF-κB，并诱导其释放大量的炎性因子如 IL-6 和 TNF-α 等[17]。

2.1.3　统计学处理　采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行分析，数据以（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用单因素方差分析统计，$P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2.2　动物实验验证

2.2.1　白花败酱草药液制备　精密称取白花败酱药材粗粉约 100.0 g，精密加入 10 倍量的 70% 乙醇，加热回流提取 3 次，每次 2 h，合并提取液，减压浓缩至 0.1 g•mL^{-1} 生药浓度的浸膏溶液[18]，过滤除菌分装，4 ℃保存备用。根据人体每日推荐剂量 15.0 g/70.0 kg 计算，设置白花败酱草给药组进行小鼠灌胃实验，每日 0.039 g/20.0 g。

2.2.2　实验分组及干预方式　32 只 C57BL/6 雌性小鼠喂养一周后，随机分为空白组、模型组、阳性药组、白花败酱草给药组，每组 8 只。空白组

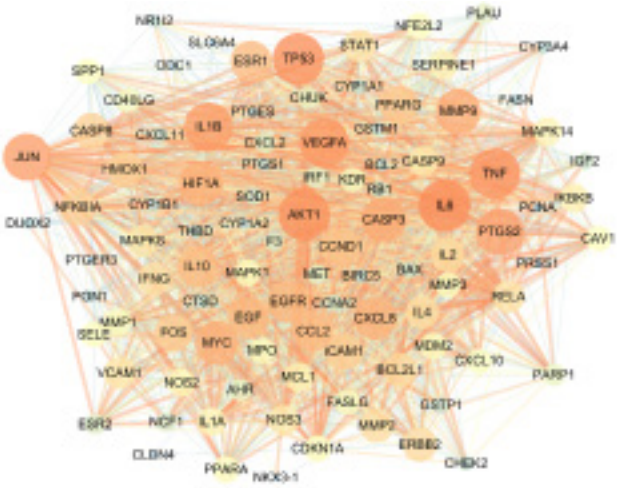


图 2 蛋白质 - 蛋白质相互作用（PPI）网络图

Fig 2 Protein-protein interaction network

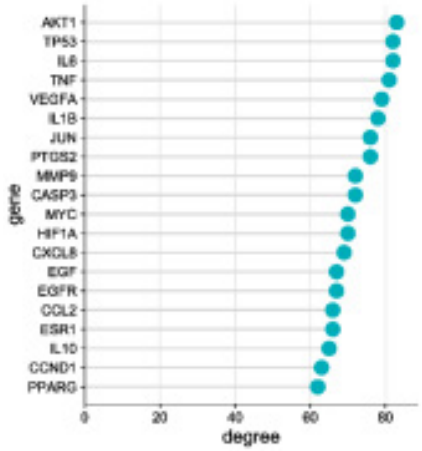


图 3 度值排名前 20 的相关靶点

Fig 3 Top 20 related targets in degree value

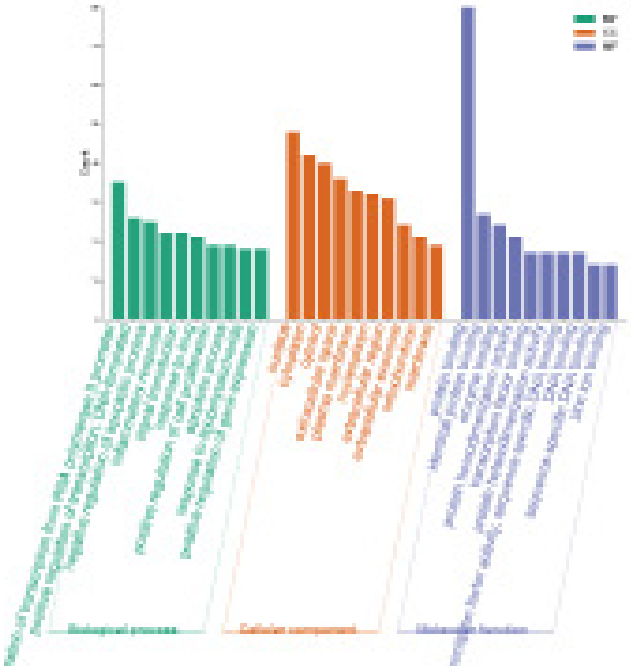


图 4 BP、CC、MF 三方面功能富集分析图

Fig 4 Functional enrichment analysis of BP，CC，and MF

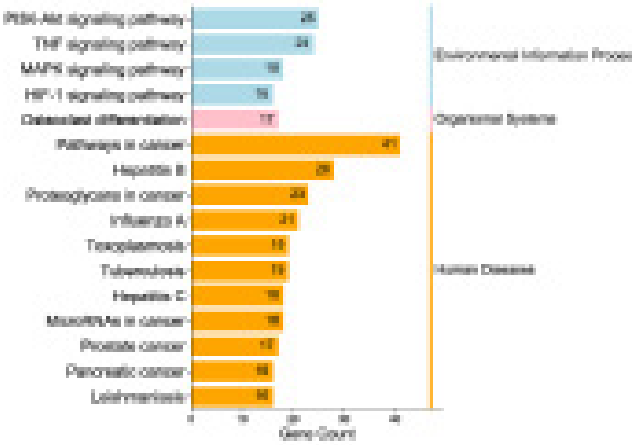


图 5 通路富集分析图

Fig 5 Enrichment analysis diagram of pathway

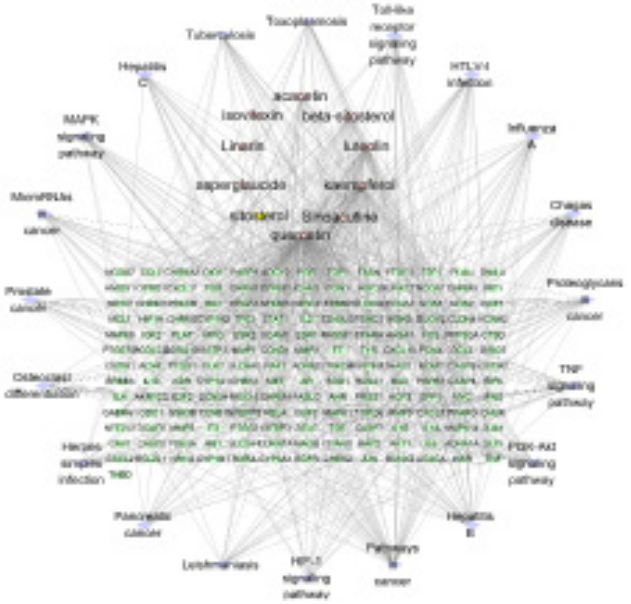


图 6 活性成分 - 靶点 -KEGG 通路网络图

Fig 6 Network of active ingredient-target-KEGG pathway

每日自由饮用自来水，其余组小鼠自由饮用 3.5% DSS 溶液 7 d，建立 UC 小鼠模型，一周后饮用自来水。造模成功后，白花败酱草给药组灌胃白花败酱草提取液，阳性对照组小鼠按美沙拉秦缓释颗粒临床用量给予灌胃，空白组、模型组小鼠灌胃等体积蒸馏水，连续灌胃 10 d。

2.2.3 疾病活动指数（disease activity index，DAI）评价及各组小鼠一般情况 实验期间观察小鼠体质量、大便性状和便血情况，按照三项得分进行 DAI 评分，DAI ＝（体质量得分＋大便性状得分＋便血得分）/3，详细评分标准见表 1[19]。采用 DSS 溶液诱导的 UC 小鼠模型与人类 UC 最为相似[20]。根据观察小鼠的体质量、大便性状，隐血、便血情况及组织学形态，符合炎症的组织病理改变，提示造模成功。与空白组小鼠相比，模型组能够

引起 UC 小鼠的体质量减轻及总 DAI 指数显著升高（$P < 0.01$），经给药组干预后，给药组小鼠体质量呈现上升趋势、总 DAI 指数呈现显著的下降趋势（$P < 0.01$）。表明白花败酱草与阳性药物有相同作用，能有效改善 UC 小鼠体质量减轻、缓解 UC 小鼠的症状（$P < 0.01$，见图 7）。

表 1　DAI 评分标准

Tab 1　DAI scoring criteria

DAI 评分 / 分	体质量减轻	粪便稠度	粪便隐血
0	0	正常	无
1	1% ～ 5%	—	—
2	5% ～ 10%	稀便	隐血
3	10% ～ 20%	—	—
4	20% 以上	腹泻	肉眼可见血便

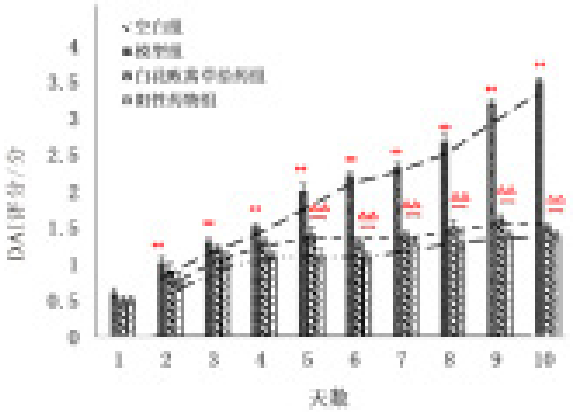


图 7　各组小鼠 DAI 评分结果

Fig 7　DAI score of mice in each group

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

Note：Compared with the blank group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；compared with the model group，$^{\triangle}P < 0.05$，$^{\triangle\triangle}P < 0.01$.

2.2.4　样本采集及病理学结果　最后一次灌胃 24 h 后，禁食，小鼠摘眼球取血，室温下静置 30 min 后，3000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液分装，－ 80 ℃保存待测。取小鼠结肠组织，用生理盐水清洗后滤纸吸干，各组小鼠取部分结肠组织，4% 多聚甲醛固定后，进行石蜡包埋，切片脱蜡，用苏木精和伊红染色，脱水封片，观察结肠组织形态。其余各组小鼠结肠组织液氮速冻，－ 80 ℃保存，备用。与空白组相比，模型组小鼠出现结肠黏膜炎症，个别部位黏膜上皮明显变薄，大量炎症细胞浸润。与模型组相比，白花败酱草给药组小鼠及阳性药物组小鼠结肠隐窝结构基本完整，炎性浸润较模型组小鼠明显减轻，上皮细胞排列较为紧密，提示白花败酱草与阳性药物具有相同治疗作用，结果见图 8。

2.2.5　Western blot 检测小鼠结肠组织中 PI3K、AKT 蛋白表达水平　每组小鼠随机抽取 3 只样本，取部分结肠组织，加入含有 PMSF 的 RIPA 裂解液，冰上研磨至无明显颗粒状，离心后吸取蛋白溶液，充分变性，置－ 20 ℃保存，备用。严格按照抗体说明书操作，检测小鼠结肠组织中 PI3K、AKT 蛋白表达水平，并用 Image J 软件进行定量分析。结果表明，与空白组比较，模型组小鼠结肠组织 PI3K、AKT 蛋白表达显著升高（$P < 0.01$）。与模型组比较，白花败酱草给药组与阳性药给药组小鼠结肠组织 PI3K、AKT 蛋白水平均下调（$P < 0.01$）。结果见图 9。

2.2.6　ELISA 法检测各组小鼠血清 TNF-α、IL-6 含量　将稀释后的标准品和每组随机抽取的 3 只待测小鼠血清样品依次加入 ELISA 酶标板中，每孔 100 μL，每组设置 3 个复孔，严格按照试剂盒说明书操作，使用酶标仪在 450 nm 波长处检测各孔的光密度（*OD* 值）。根据所测标准品 *OD* 值与浓度绘制标准曲线，计算各组细胞上清液中 TNF-α、IL-6 的水平。结果表明与空白组比较，模型组大鼠血清 IL-6、TNF-α 含量升高（$P < 0.01$）；与模型组比较，白花败酱草给药组与阳性药物组 TNF-α 和 IL-6 水平明显降低（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。IL-6 是一种多功能细胞因子，在机体免疫应答、炎症等过程中具有调节作用，在 UC 的发生和发展过程中，其表达水平

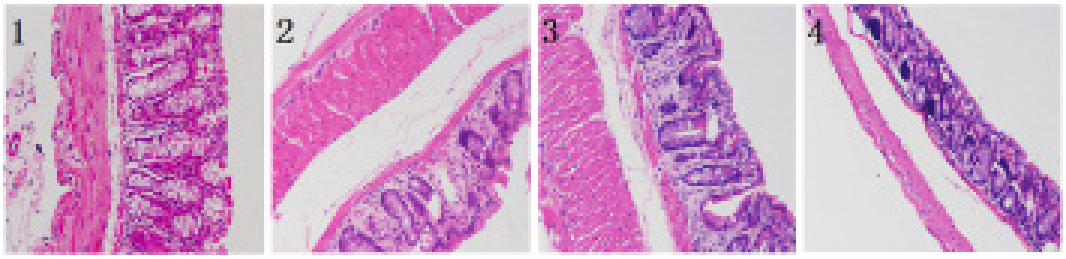


图 8　不同组组织病理学结果图（×200）

Fig 8　Histopathdogy of different groups（×200）

1. 空白组（blank group）；2. 模型组（model group）；3. 白花败酱草给药组（*Patrinia villosa* Juss. group）；4. 阳性药物组（positive drug group）

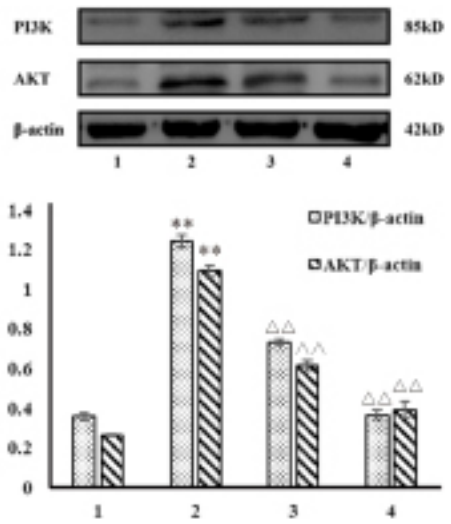


图 9 各组小鼠结肠组织中 PI3K、AKT 蛋白表达

Fig 9 PI3K and AKT protein expression in colon tissues of mice in each group

1. 空白组（blank group）；2. 模型组（model group）；3. 白花败酱草给药组（*Patrinia villosa* Juss. group）；4. 阳性药物组（positive drug group）

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

Note：Compared with the blank group，$^{**}P < 0.01$；compared with the model group，$^{\triangle\triangle}P < 0.01$.

与 UC 严重程度成正相关[21-22]；TNF-α，可促进活化血小板因子释放，产生氧自由基等，对肠黏膜造成伤害[23]。相关文献表明，IL-6、TNF-α 的水平与 UC 病情具有较大的相关性[24]。基于以上结果，推测白花败酱草可能通过调控 PI3K/AKT 信号通路，抑制促炎因子 IL-6、TNF-α 的释放，达到治疗 UC 的目的。结果见表 2。

表 2 不同组 ELISA 实验结果

Tab 2 ELISA for different groups

组别	TNF-α/（pg·mL^{-1}）	IL-6/（pg·mL^{-1}）
空白组	326.59±15.92	90.52±3.38
模型组	512.46±15.82**	116.35±2.68**
白花败酱草给药组	435.00±9.98$^{\triangle\triangle}$	102.29±1.42$^{\triangle\triangle}$
阳性药物组	416.74±10.58$^{\triangle}$	98.78±1.44$^{\triangle}$

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

Note：Compared with the blank group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；compared with the model group，$^{\triangle}P < 0.05$，$^{\triangle\triangle}P < 0.01$.

3 讨论与结论

本研究利用网络药理学分析方法研究白花败酱草治疗 UC 的活性成分、作用靶点及相关通路，并在此基础上利用 UC 小鼠模型，对其中筛选出的关键通路 PI3K/AKT 信号通路进行验证，初步解析白花败酱草治疗 UC 的作用机制。

通过对白花败酱草中潜在活性成分 - 作用靶点 - 疾病网络进行分析，关键化学成分主要为槲皮素、山柰酚、木犀草素、异牡荆素、青风藤碱、谷甾醇等。相关文献表明，槲皮素能提高组织 PI3K、AKT 表达，阻滞细胞周期，抑制细胞增殖能力，从而起到抗炎的作用[25-26]；山柰酚通过下调 PI3K、AKT 的表达促进细胞凋亡[27]；木犀草素、异牡荆素主要通过降低炎症转录因子活性，抑制促炎因子 TNF-α、IL-6 的释放，从而发挥抗炎作用[28-30]；青风藤碱则可以减少促炎因子 TNF-α、IL-6 的释放[31]；谷甾醇可抑制巨噬细胞 IL-6 活性，减少 TNF-α 等炎性因子的分泌[32-34]。提示白花败酱草通过多成分、多靶点激活 PI3K/AKT 信号通路，发挥治疗 UC 的作用。

综上，通过对白花败酱草网络药理学的分析及其干预 UC 模型小鼠的动物实验验证，明确白花败酱草治疗 UC 的药理药效及作用机制，为其进一步临床应用及开发奠定基础。

参考文献

[1] 吴笑，夏俊东，方珂，等 . 溃疡性结肠炎中西医治疗临床研究进展 [J]. 中西医结合研究，2021，13（2）：118-121.

[2] Zhong WL，Lu XL，Shi HT，et al. Distinct microbial populations exist in the mucosa-associated microbiota of diarrhea predominant irritable bowel syndrome and ulcerative colitis [J]. J Clin Gastroenterol，2019，53（9）：660-672.

[3] 杨小冰，金明玉，吴小禾，等 . 膳食营养素与炎症性肠病关系研究进展 [J]. 食品科学，2019，40（9）：309-315.

[4] Cleynen I，Boucher G，Jostins L，et al. Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes：a genetic association study [J]. Lancet，2016，387（10014）：156-167.

[5] 黄家福 . 败酱芩连方治疗慢性非特异性溃疡性结肠炎临床观察 [J]. 河北中医，2009，31（10）：1475-1476.

[6] 周志军，王威 . 薏苡附子败酱散对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎患者的临床疗效观察：附 80 例报告 [J]. 中国中西医结合急救杂志，2017，24（4）：419-422.

[7] 张声生，沈洪，郑凯，等 . 溃疡性结肠炎中医诊疗专家共识意见（2017）[J]. 中华中医药杂志，2017，32（8）：3585-3589.

[8] 吉林省中医中药研究所 . 长白山植物志 [M]. 长春：吉林人民出版社，1980：1069.

[9] 崔文燕，刘素香，宋晓凯，等 . 黄花败酱草和白花败酱草的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究，2016，39（3）：482-488.

[10] 牛明了，甄欢欢 . 败酱草为主治疗溃疡性结肠炎 38 例临床观察 [J]. 新中医，2012，44（12）：55-56.

[11] 韩亮，刘昌辉 . 败酱草对溃疡性结肠炎大鼠结肠 TNF-α、IL-1β 及 IL-10 表达的干预作用 [J]. 今日药学，

2013，23（2）：78-80.

[12] Ru JL，Li P，Wang JA，et al. TCMSP：a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. Cheminformatics，2014，6（1）：13.

[13] UniProt Consortium. UniProt：the universal protein knowledgebase in 2021 [J]. Nucleic Acids Research，2021，49（D1）：480-D489.

[14] Szklarczyk D，Gable AL，Nastou KC，et al. The STRING database in 2021：customizable protein-protein networks，and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets [J]. Nucleic Acids Res，2021，49（D1）：D605-D612.

[15] 刘伟，刘洋成，王嘉琪，等 . 白花败酱草乙醇部位化学成分研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报（自然科学版），2020，36（6）：660-664.

[16] 段贤春，黄石，彭代银，等 . 网络药理学在中药复方研究中的应用 [J]. 中国药理学报，2020，36（3）：303-308.

[17] 朱磊，沈洪，顾培青，等 . 黄芩苷对溃疡性结肠炎模型大鼠炎性反应、凋亡的影响及与 PI3K/AKT 通路的关系 [J]. 中华中医药杂志，2017，32（9）：4001-4004.

[18] 魏一萌，王帅，孟宪生，等 . 基于 SMMC-7721 肝癌细胞生长抑制的两种败酱草药效比较及提取方法研究 [J]. 中国医药科学，2013，3（11）：35-37.

[19] Azuma YT，Nishiyama K，Matsuo Y，et al. PPARα contributes to colonic protection in mice with DSS-induced colitis [J]. Int Immunopharmacol，2010，10（10）：1261-1267.

[20] 张忠，程富胜，贾宁，等 . 小鼠溃疡性结肠炎模型的建立及病理组织学比较 [J]. 中国实验动物学报，2012，20（6）：69-72.

[21] 邹仪，胡晓蕾 . 吗替麦考酚酯联合美沙拉嗪治疗溃疡性结肠炎的疗效及对患者血清 TNF-α，IL-6，IL-8 的影响 [J]. 中国中西医结合消化杂志，2018，26（11）：911-914.

[22] 孙文佳，王曦 . 炎症小体在溃疡性结肠炎发病机制中的作用 [J]. 中华医学杂志，2016，96（24）：1957-1960.

[23] 李毅，刘艳，闫曙光，等 . 调肠经典三方对 UC 大鼠结肠细胞因子 IL-17、IL-23、IL-6、IL-10 及 TNF-α 的影响 [J]. 现代中西医结合杂志，2017，26（9）：920-924.

[24] 于仁芳，孔晓 . 外周血及结肠黏膜 TNF-α、IL-6 和 IL-2 在溃疡性结肠炎患者中的表达 [J]. 中国急救医学，2018，38（22）：183.

[25] Yang L，Liu Y，Wang M，et al. Quercetin-induced apoptosis of HT-29 colon cancer cells via inhibition of the AKT-CSN6-Myc signaling axis [J]. Mol Med Rep，2016，14（5）：4559-4566.

[26] 刘鸣昊，张丽慧，马庆亮，等 . 槲皮素对非酒精性脂肪性肝炎大鼠的影响 [J]. 中成药，2019，41（8）：1820-1825.

[27] 赵明智，张磊，周丹，等 . 山奈酚调控 PI3K/AKT/GSK-3β 信号通路促进人炎性乳腺癌 SUM190 细胞株凋亡的研究 [J]. 广西医科大学学报，2019，36（6）：872-877.

[28] 罗涵，郭平，周其全 . TLR4/NF-kB 在低氧暴露下大鼠肠道粘膜屏障功能损伤及细菌移位中的作用研究 [C]. 2012.

[29] Clarke TB，Francella N，Huegel A，et al. Invasive bacterial pathogens exploit TLR-mediated downregulation of tight junction components to facilitate translocation cross the epithelium [J]. Cell Host Microbe，2011，9（5）：404-414.

[30] 乔倩，雅凤，庞小红，等 . 异牡荆素对硫代乙酰胺诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用及其机制 [J]. 广西医科大学学报，2020，37（3）：388-392.

[31] Chen DP，Wong CK，Leung PC，et al. Anti-inflammatory activities of Chinese herbal medicine sinomenine and Liang Miao San on tumor necrosis factor-α-activated human fibroblast-like synovioeytes in rheumatoid arthritis [J]. J Ethnopharmacol，2011，137（1）：457-468.

[32] Valerio M，Awad AB. β-sitosterol down-regulates some pro-inflammatory signal transduction pathways by increasing the activity of tyrosine phosphatase shp-1in J774A. 1 murine macrophages [J]. Int Immunopharmacol，2011，11（8）：1012-1017.

[33] Choi JN，Choi YH，Lee JM，et al. Anti-inflammatory effects of β-sitosterol-β-D-glucoside from trachelospermum jasminoides（apocynaceae）in lipopolysaccharide-stimulated raw 264.7 murine macrophages [J]. Nat Prod Res，2012，26（24）：2340-2343.

[34] Liz R，Zanatta L，Dos reis GO，et al. Acute effect of β-sitosterol on calcium uptake mediates anti-inflammatory effect in murine activated neutrophils [J]. J Pharmacol，2013，65（1）：115-122.

（收稿日期：2021-12-10；修回日期：2022-02-18）

姜黄素对 HepG2 裸鼠移植瘤的抑制作用及对瘤体组织中 NLRP3、IL-1β 表达的影响

左清平，黄娟娟，张顺芝，何鸽飞*（长沙市第一医院药剂科，长沙 410005）

摘要：目的 探究姜黄素对 HepG2 细胞裸鼠移植瘤的抑制作用以及对瘤体组织中 NLRP3、IL-1β 表达的影响。**方法** 将 50 只 BALB/c-nu 裸鼠随机分为模型组，姜黄素低、中、高剂量组及顺铂组，每组 10 只。采用裸鼠成瘤实验观察姜黄素对人肝癌细胞 HepG2 裸鼠移植瘤生长的抑制作用，TUNEL 实验比较肝癌细胞凋亡情况，比较各组裸鼠肿瘤组织微血管密度，qRT-PCR 法及 Western blot 法比较裸鼠肿瘤组织中 NLRP3、IL-1β mRNA 及蛋白的相对表达量。**结果** 与模型对照组相比，不同剂量姜黄素干预后裸鼠的肿瘤质量和体积均显著减少（$P < 0.05$），高剂量姜黄素裸鼠肿瘤质量和体积减少最为明显（$P < 0.05$）。与模型对照组相比，姜黄素低、中、高剂量组和顺铂组裸鼠肝癌细胞凋亡指数均显著增加（$P < 0.05$），凋亡指数排序为姜黄素高剂量组＞中剂量组＞低剂量组（$P < 0.05$）。姜黄素低、中、高剂量组和顺铂组裸鼠的微血管数目较模型对照组裸鼠显著减少（$P < 0.05$）。与模型对照组相比，不同浓度姜黄素干预后裸鼠肿瘤组织中的 NLRP3、IL-1β mRNA 和蛋白相对表达量均呈不同程度降低（$P < 0.05$），且姜黄素浓度越高，裸鼠肿瘤组织中 NLRP3、IL-1β mRNA 和蛋白相对表达量表达降低越显著（$P < 0.05$）。**结论** 姜黄素抗肝细胞癌的作用机制可能与促进肝癌细胞凋亡及调控 NLRP3、IL-1β 表达水平相关。

关键词：姜黄素；HepG2 肝癌细胞；裸鼠；肿瘤生长；NLRP3；IL-1β
中图分类号：R285.5 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)04-0766-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.007

Inhibitory effect of curcumin on transplanted tumor of HepG2 cells in nude mice and on the expression of NLRP3 and IL-1β in tumor tissue

ZUO Qing-ping, HUANG Juan-juan, ZHANG Shun-zhi, HE Ge-fei* (*Department of Pharmacy*, *Changsha First Hospital*, *Changsha* 410005)

Abstract: Objective To determine the inhibitory effect of curcumin on HepG2 cell transplanted tumor in nude mice and its effect on the expression of NLRP3 and IL-1β. **Methods** Fifty BALB/c-nu nude mice were randomly divided into a model control group, 3 curcumin (low, medium and high dose) groups, and a cisplatin group (10 rats in each group). The inhibitory effect of curcumin on the growth of transplanted tumor of human hepatoma cell HepG2 in nude mice was observed by nude mouse tumorigenesis experiment. The apoptosis of hepatoma cells was compared by TUNEL experiment; the microvessel density of tumor tissue in nude mice was compared; NLRP3 and IL-1β protein and relative expression in the tumor tissue of nude mice were compared by Western blot and qRT-PCR. **Results** Compared with the model control group, the mass and volume of tumor in the nude mice were significantly decreased after different doses of curcumin ($P < 0.05$). The mass and volume of tumor in the nude mice with high doses of curcumin were decreased most ($P < 0.05$). Compared with the model control group, the apoptosis index of HCC cells in the low dose, medium dose, high dose groups and the cisplatin group was significantly increased ($P < 0.05$), and the order of apoptosis index was high dose group ＞ medium dose group ＞ low dose group ($P < 0.05$). The number of microvessels

基金项目：长沙市自然科学基金项目（No.kq2014006）；湖南省自然科学基金项目（No.2021JJ40619）。
作者简介：左清平，女，硕士，主管药师，主要从事肝病机制研究，email：zqpcssyyy@126.com *通信作者：何鸽飞，女，主任药师，主要从事临床药学研究，email：326366726@qq.com

in low, medium and high dose groups and cisplatin groups was significantly decreased compared with that in the model control group ($P < 0.05$). Compared with the model control group, the mRNA and relative protein expression levels of NLRP3 and IL-1β in the tumor tissue of nude mice were decreased after different concentrations of curcumin ($P < 0.05$). The higher the curcumin concentration, the more significant the decrease of NLRP3 and IL-1β in nude mouse tumor tissue was ($P < 0.05$). **Conclusion** The mechanism of curcumin against hepatocellular carcinoma may be related to promoting the cell apoptosis in hepatocellular carcinoma and regulating the expression levels of NLRP3 and IL-1β.

Key words: curcumin; HepG2 cell; nude mouse; tumor growth; NLRP3; IL-1β

肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）在消化系统恶性肿瘤中不仅恶性程度高，且极易转移、复发，患者 5 年内的生存率极低 [1]。目前治疗 HCC 的方法一般为手术切除、肝移植、肝动脉介入栓塞化疗、射频消融等，以上治疗方法在临床疗效欠佳，因此寻找新的治疗方法是临床一直以来的研究热点 [2]。姜黄素（curcumin）为姜黄的重要活性成分之一，具有抗氧化、抗炎、降血脂、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤等多种生物学作用 [3]。研究发现姜黄素在抗肿瘤方面疗效显著，对乳腺癌、胃癌、甲状腺癌等多种癌症中的肿瘤细胞的生长均有明显的抑制作用 [4]。姜黄素可抑制肿瘤组织血管新生，动物实验发现姜黄素及其衍生物双去甲氧基姜黄素能抑制肺癌和胰腺癌的生长和转移，减少肿瘤组织微血管数目 [5]。此外，姜黄素具有明显的抗炎作用，可下调白细胞介素（IL）-1β、IL-6 等炎症细胞因子的表达，抑制机体的炎症反应，抑制肿瘤的进展 [6]。NLR 家族是启动的炎症体形成的主要感受器蛋白，且拥有众多的活化信号，其中神经中枢内 Nod 样受体蛋白 3（Nod-like receptor protein 3，NLRP3）的活性信号最为广泛多样，其可以在众多病原体或非病原体来源刺激物刺激下活化，参与炎症相关疾病的发展 [7]。NLRP3 表达上调能够通过激活下游多种炎症信号通路促进、加剧炎性细胞对肝脏组织的浸润 [8]。有研究显示，IL-1β 的上升能够通过加剧体内急性炎性反应，对机体的免疫损伤过程产生不同程度的影响 [9]。已有多篇文献报道，IL-1β 可能在肝癌进展过程中具有重要的促进作用，由于 IL-1β 同时也是炎症体活化的重要产物，因此推测炎性小体功能失调可能在肝癌的进展中具有重要作用 [10]。本研究旨在探究姜黄素对人肝癌裸鼠原位种植瘤生长及 NLRP3 和 IL-1β 表达的影响。

1　材料与方法

1.1　细胞株与培养

HepG2 肝癌细胞株（上海中科院细胞库，批号：ZYK20201015）。将 HepG2 细胞常规置于含 10% 胎牛血清、青霉素、链霉素的 RPMI 1640 培养液中，37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养，胰蛋白酶对细胞进行消化传代，每 3 日换液传代 1 次。

1.2　实验动物

选用湖南斯莱克景达实验动物有限公司购买的 BALB/c-nu 型雌性裸鼠 53 只，SPF 级，体质量为 15 ～ 20 g，5 周龄。小鼠均统一饲养在 SPF 级动物房内，温度恒定 23 ～ 25 ℃，相对湿度为 40% ～ 60%，自由饮水，食用 60 ℃辐射灭菌饲料。

1.3　试药与仪器

姜黄素（上海阿拉丁试剂有限公司，批号：ST20200211）；RPMI 1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶（GIBCO 公司）；荧光定量 PCR 试剂盒（Ambion 公司）；原位细胞凋亡检测试剂盒（Promag 公司）；兔抗人 NLRP3、IL-1β 单克隆一抗（美国 Epitomics 公司）。

1.4　人肝癌 HepG2 细胞皮下种植瘤模型的建立

取对数生长期的人肝癌 HepG2 细胞，消化、离心后用 PBS 溶液洗涤，重悬细胞，调整为 5×10^6 个 • mL^{-1} 的细胞悬液，将其置于 EP 管中。取 3 只裸鼠，其颈部皮下作为接种部位，酒精消毒接种部位，用 1 mL 注射器吸取 100 μL HepG2 细胞悬液，分别接种于裸鼠颈部皮下，1 周左右出现肉眼可见肿瘤；3 周肿瘤生长至 0.8 cm×1.0 cm×1.2 cm 时处死荷瘤裸鼠，无菌条件下剥离瘤体，放入培养液中剔除结缔组织，将肿瘤组织分割成碎块（1 mm×1 mm×1 mm）。麻醉 50 只裸鼠，对手术部位的皮肤消毒后，沿右肋缘下作 1 cm 的横切口，暴露肝右叶；用眼科剪在肝实质剪出长、深同约 2 mm 的切口，将 1 块 HepG2 组织碎块植入切口内，缝合将其固定，当活动无出血后，缝合逐层关腹。手术全过程均在超净工作台中完成。

1.5　动物分组和给药

肿瘤移植后的第 3 日，将 50 只 BALB/c 裸鼠随机分为模型对照组，姜黄素低、中、高剂量组，顺铂组，每组 10 只。模型对照组给予腹腔注射生理盐水干预，每只裸鼠 0.2 mL；顺铂组给予腹腔注射 2 mg•kg^{-1} 顺铂干预治疗；姜黄素低、中、高剂量组分别给予 25、50、100 mg • kg^{-1} 姜黄素溶液腹腔注射；所有裸鼠均每 3 日给药 1 次，共连续给药 7 次。

1.6 肿瘤抑制率比较

末次给药 3 d 后颈椎脱臼处死裸鼠，完全剥离瘤体组织，测量肿瘤最长径、最短径，称量肿瘤，计算肿瘤体积抑制率和肿瘤重量抑制率。

1.7 TUNEL 检测肝癌细胞凋亡指数

给药结束后 2 d，颈椎脱臼处死部分裸鼠，完全剥离原位种植瘤，瘤块以最大面对剖，取其 1/2，剖成 2 ～ 3 mm 厚度的薄片，固定于福尔马林溶液中，石蜡包埋组织，并用切片机切成 4 μm 的薄片，检测切片中肿瘤细胞的凋亡指数；凋亡细胞为棕黄色，蓝紫色为阴性细胞。选每张切片组织的 10 个高倍视野，随机取 2000 个肿瘤细胞阳性细胞计数，计数时避开肿瘤坏死区，计算凋亡指数。

1.8 免疫组化检测 CD31 表达并计算微血管密度（MVD）

CD31 用来标记血管内皮细胞，阳性细胞被染成棕黄色。MVD 计数方法：只要出现血管内皮细胞或内皮细胞群染成棕色，并且与邻近微血管、肿瘤细胞或其他结缔组织分开的为一条血管。先在 ×100 视野下选取 3 个血管高密度的区域。再在 ×200 镜计数每个区域的血管数量，作为此肿瘤的微血管密度。

1.9 qRT-PCR 检测 NLRP3、IL-1β mRNA 表达

取肿瘤组织在冰上研磨，将组织制成匀浆后离心，取上清液并测定总 RNA，置于－ 80 ℃冰箱中保存。采用 cDNA 逆转录试剂盒对 RNA 样品进行转录。转录条件：预变性 93 ℃，2 min，1 个循环；变性 93 ℃，1 min，退火 55 ℃，1 min，延伸 72 ℃，1 min，40 个循环。用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算相对表达量，引物序列见表 1。

1.10 Western blot 检测 NLRP3、IL-1β 蛋白表达

分别取各组裸鼠肿瘤组织，研磨后将组织裂解，离心组织后收集上清液，提取总蛋白。取 5 组裸鼠的蛋白样品转至 PVDF 膜上，脱脂奶粉封闭蛋白样品 1 h，在样品中加入一抗，孵育样品过夜（4 ℃）。加入二抗后用 TBST 溶液清洗，凝胶成像并分析。

表 1 基因引物序列信息

Tab 1 Gene primer sequence information

基因		引物序列
NLRP3	F	5'-CTTCCTTTCCAGTTTGCTGC-3'
	R	5'-TCTCGCAGTCCACTTCCTTT-3'
IL-1β	F	5'-TCTTTGAAGTTGACGGACCC-3'
	R	5'-TGAGTGATACTGCCTGCCTG-3'
β-actin	F	5'-GATCCTCCAGCAACTGACTG-3'
	R	5'-CTCTCAGCTGTGATGGTTCC-3'

1.11 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计学软件对实验数据进行统计学分析，单因素方差比较分析多组间的数据，t 检验比较两组间的结果，$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素对各组裸鼠肿瘤体积和质量的影响

与模型对照组相比，姜黄素低、中、高剂量组裸鼠的肿瘤质量和体积均呈梯度减少（$P < 0.05$）；高剂量组裸鼠肿瘤质量和体积较顺铂组相比无明显的差异（$P > 0.05$）。

与模型对照组相比，姜黄素低、中、高剂量组裸鼠的瘤重抑制率和瘤体积抑制率均呈梯度增加，且高剂量组裸鼠的瘤重抑制率和瘤体积抑制率最高；姜黄素高剂量组与顺铂组裸鼠瘤重抑制率和瘤体积抑制率无显著的差异，见表 2。

表 2 各组裸鼠肿瘤质量和体积比较 ($\bar{x}\pm s$，$n = 10$)

Tab 2 Tumor mass and volume of nude mice in each group ($\bar{x}\pm s$，$n = 10$)

组别	平均瘤重 /g	瘤重抑制率 /%	平均瘤体积 /mm^3	瘤体积抑制率 /%
模型对照组	2.01±0.20	－	2011.42±387.61	－
姜黄素低剂量组	1.75±0.15^a	21.55	1839.45±367.83^a	20.41
姜黄素中剂量组	1.42±0.13^{ab}	30.13	1527.64±345.27^{ab}	31.47
姜黄素高剂量组	1.23±0.11^{abc}	42.22	1121.17±314.64^{abc}	44.35
顺铂组	1.25±0.09^{abc}	43.64	1017.53±310.15^{abc}	45.12

注：与模型对照组相比，$^aP < 0.05$；与姜黄素低剂量组相比，$^bP < 0.05$；与姜黄素中剂量组相比，$^cP < 0.05$。

Note：Compared with the model control group，$^aP < 0.05$；compared with the low dose group，$^bP < 0.05$；compared with the middle dose group，$^cP < 0.05$.

2.2 姜黄素对肝癌细胞凋亡的影响

肝癌细胞的细胞核中央呈圆形，均为棕黄色，细胞形态无缺失。模型对照组细胞大部分形态正常，少量细胞核内有着色情况；除模型对照组外，其余 4 组均有肿瘤细胞凋亡，显微镜下可见凋亡细胞核内呈棕黄色，细胞核呈高度凝聚

（见图 1）。与模型对照组相比，姜黄素低、中、高剂量组和顺铂组裸鼠肝癌细胞凋亡指数均显著增加（$P < 0.05$）；凋亡指数排序为高剂量组＞中剂量组＞低剂量组（$P < 0.05$），高剂量组裸鼠细胞凋亡指数和顺铂组相比无统计学差异（$P > 0.05$），见表 3。

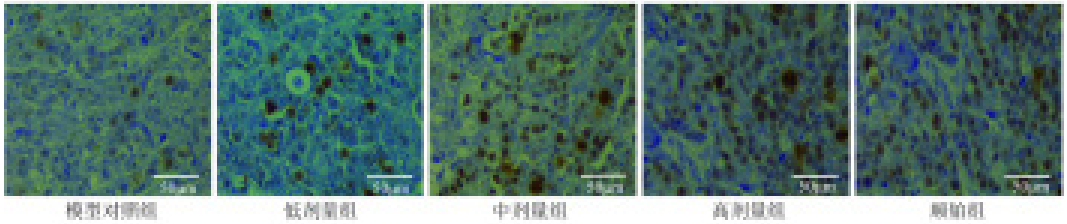


图 1　各组肿瘤细胞凋亡情况（×400）

Fig 1　Apoptosis of tumor cells in each group（×400）

表 3　各组裸鼠肿瘤细胞凋亡指数比较（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

Tab 3　Tumor cell apoptosis index in nude mice in each group（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

组别	凋亡指数 /%
模型对照组	1.23±0.54
姜黄素低剂量组	5.67±1.02[a]
姜黄素中剂量组	8.92±1.46[ab]
姜黄素高剂量组	15.33±2.17[abc]
顺铂组	16.01±2.21[abc]

注：与模型对照组相比，[a]$P < 0.05$；与姜黄素低剂量组相比，[b]$P < 0.05$；与姜黄素中剂量组相比，[c]$P < 0.05$。

Note：Compared with the model control group，[a]$P < 0.05$；compared with the low dose group，[b]$P < 0.05$；compared with the middle dose group，[c]$P < 0.05$.

2.3　姜黄素对肝癌微血管密度的影响

姜黄素低、中、高剂量组及顺铂组裸鼠肿瘤的微血管数目较模型组均有不同程度的减少，且呈逐渐递减趋势，高剂量组＜中剂量组＜低剂量组（$P < 0.05$）；高剂量组和顺铂组裸鼠间微血管数量差异无统计学意义（$P > 0.05$），见图 2。

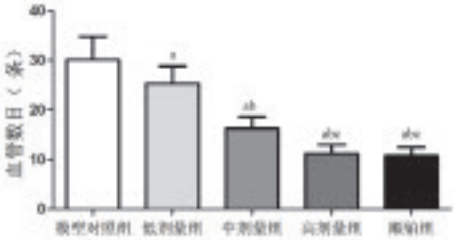


图 2　各组裸鼠微血管数目比较

Fig 2　Number of microvessels in nude mice in each group

注：与模型对照组相比，[a]$P < 0.05$；与低剂量组相比，[b]$P < 0.05$；与中剂量组相比，[c]$P < 0.05$。

Note：Compared with the model control group，[a]$P < 0.05$；compared with the low dose group，[b]$P < 0.05$；compared with the middle dose group，[c]$P < 0.05$.

2.4　姜黄素对 NLRP3、IL-1β mRNA 表达的影响

姜黄素低、中、高剂量组及顺铂组裸鼠组织中 NLRP3、IL-1β mRNA 表达较模型对照组均不同程度的减少（$P < 0.05$）；低、中剂量组裸鼠肿瘤组织中 NLRP3、IL-1β mRNA 表达高于高剂量组和顺铂组（$P < 0.05$）；高剂量组和顺铂组裸鼠肿瘤组织中 NLRP3、IL-1β mRNA 表达无显著差异（$P > 0.05$），见图 3。

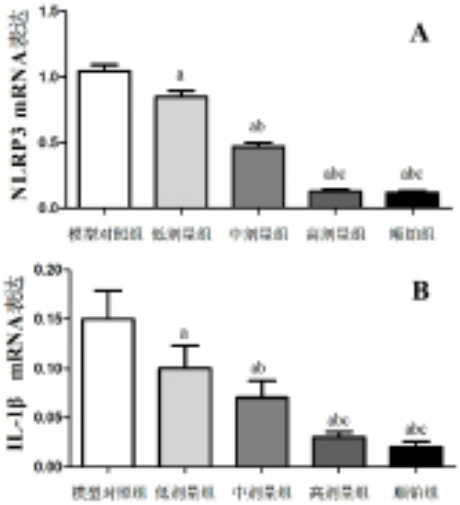


图 3　各组裸鼠肿瘤组织中 NLRP3（A）、IL-1β（B）mRNA 表达情况

Fig 3　NLRP3（A）and IL-1β（B）mRNA expression in tumor tissues of nude mice in each group

注：与模型对照组相比，[a]$P < 0.05$；与低剂量组相比，[b]$P < 0.05$；与中剂量组相比，[c]$P < 0.05$。

Note：Compared with the model control group，[a]$P < 0.05$；compared with the low dose group，[b]$P < 0.05$；compared with the middle dose group，[c]$P < 0.05$.

2.5　姜黄素对 NLRP3、IL-1β 蛋白表达的影响

与模型对照组相比，中、高剂量组和顺铂组裸鼠肿瘤组织中 NLRP3、IL-1β 蛋白表达均呈不同程度减少，且呈逐渐递减趋势，高剂量组和顺铂组裸鼠肿瘤组织中 NLRP3、IL-1β 蛋白表达明显低于低剂量组和中剂量组（$P < 0.05$）；且高剂量组和顺铂组裸鼠肿瘤组织中 NLRP3、IL-1β 蛋白表达无显著差异（$P > 0.05$），见图 4。

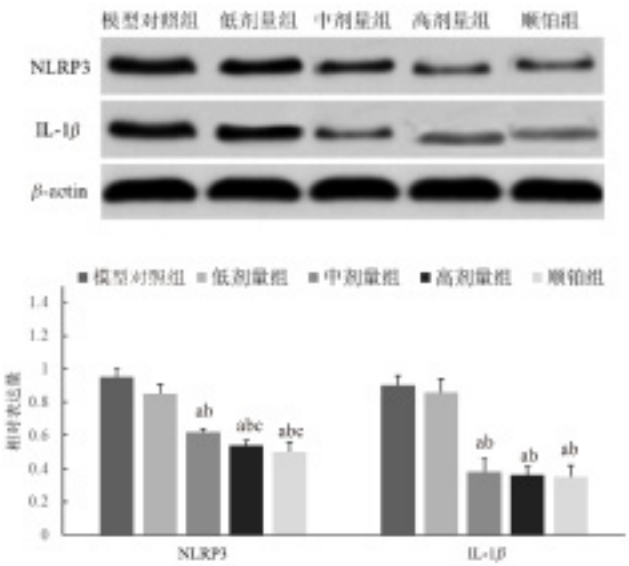


图 4 各组裸鼠肿瘤组织中 NLRP3、IL-1β 蛋白表达情况

Fig 4 Expression of NLRP3 and IL-1β proteins in tumor tissues of nude mice in each group

注：与模型对照组相比，$^{a}P < 0.05$；与低剂量组相比，$^{b}P < 0.05$；与中剂量组相比，$^{c}P < 0.05$。

Note：Compared with the model control group，$^{a}P < 0.05$；compared with the low-dose group，$^{b}P < 0.05$；compared with the middle-dose group，$^{c}P < 0.05$.

3 讨论

中国是肝癌大国，全球每年一半以上的新发肝癌病例发生在中国。在我国所有消化道恶性肿瘤中，肝癌是死亡率最高的肿瘤之一[11]。肝癌诊断后生存期常小于 6 个月，生存期 5 年以上者仅为 5% ～ 9%。手术治疗是目前根治肝癌的主要方法，对于中晚期的肝癌患者不能进行手术时，临床上提倡综合治疗[12]。近年来，许多单味中药中的提取物已被证实具有显著的抗肿瘤活性。有学者研究发现，中药可通过多靶点、多环节及多效应抗肿瘤，且疗效显著，不仅对患者的生活质量有明显的改善，还能一定程度地延长患者的生存期[13]。姜黄素来源丰富，广泛存在于姜科植物姜黄、莪术、郁金中，在不同的细胞类型中表现出不同的效应，诱导效应产生的分子机制也不尽相同。目前国内外研究普遍认为姜黄素的抗肿瘤作用机制可能主要与抑制肿瘤细胞的生长和增殖、诱导肿瘤细胞凋亡有关，而且是通过抑制核转录因子的活性，调控癌基因、抑癌基因蛋白和凋亡调控蛋白的表达等途径抑制肿瘤细胞的生长和增殖，诱导肿瘤细胞凋亡[14]。姜黄素对大肠癌、膀胱癌、前列腺癌及乳腺癌等肿瘤的化学防护作用已得到部分证实[15]。

焦亡又称细胞炎性坏死，是一种程序性细胞死亡，表现为细胞不断膨胀增大直至细胞膜破裂，导致细胞内容物经由焦亡孔释放进而激活强烈的炎症反应[16]。焦亡与细胞凋亡有着共同的特征，包括 DNA 断裂、核浓缩、caspase 依赖性和 Annexin V 染色阳性。然而不同于凋亡，细胞焦亡发生得更快，并会伴随着大量促炎症因子的释放。细胞发生焦亡时，细胞会发生肿胀，在细胞破裂之前，细胞上形成凸出物，之后细胞膜上形成孔隙，使细胞膜失去完整性，释放内容物，引起炎症反应，此时，细胞核位于细胞中央，随着形态学的改变，细胞核固缩，DNA 断裂[17]。NLRP3 及 IL-1β 作为焦亡通路的关键蛋白在肝癌细胞的增殖、转移、诊断和预后中发挥重要作用[18]。研究发现，NLRP3、ASC、Caspase-1 和 IL-1β 在肝癌实质细胞中的表达显著低于癌旁组织，且成正相关。肝癌发生时，NLRP3 表达明显下调，随着肝癌进展，NLRP3 炎症组分的表达水平与肝癌患者的病理分级和临床分期成负相关[19]。另有研究表明，肝癌细胞在缺氧条件下发生上皮间质转化，导致 NLRP3、Caspase-1 激活，进而促进炎性因子释放导致肝癌细胞的侵袭和转移[20]。此外，炎性细胞因子 IL-1β 可通过促进 *ST3Gal IV* 和 *FUT I* 基因的表达，从而促进肝癌的转移[21]。因此，基于焦亡相关基因开发靶向药物或筛选治疗药物可能是肝癌治疗的新策略。

本研究比较了不同浓度的姜黄素对制备的裸鼠肝移植瘤模型中肿瘤的影响，结果显示与模型对照组相比，姜黄素低、中、高剂量组裸鼠的肿瘤质量和体积均明显减小，说明姜黄素对肝癌有抑制作用，姜黄素低、中、高剂量组裸鼠肝癌细胞凋亡指数高于模型对照组，可见姜黄素对肿瘤细胞凋亡有促进作用，且呈浓度依赖性。曹聪等[22]研究证实，不同浓度的姜黄素均可抑制肝癌耐药细胞 HepG2/ADM 的增殖。在 5、10、20、40 μg • mL^{-1} 姜黄素作用下 HepG2/ADM 细胞的增殖抑制率随着药物浓度的增加而增加。

肝内 MVD 可作为肝癌患者无病生存率预测因子。因此对肝癌的血管生成进行有效的抑制也是治疗肝癌的重要途径，抑制血管生成也成为肝癌药物研发重要的策略之一[23]。本研究结果显示，姜黄素可降低 MVD，减少血管生成，抑制肝癌细胞生长，姜黄素浓度越高效果越明显。NLRP3 作为炎性小体，其能影响到体内的炎症信号通路的激活，进而激活下游炎症因子，促进肝脏间质细胞纤维化改变[24]。IL-1β 能够促进肝

脏的炎性损伤，同时还能调控树突状 T 淋巴细胞的功能，影响到免疫细胞的功能活性[25]。不同浓度姜黄素干预移植瘤裸鼠后肿瘤组织中 NLRP3、IL-1β 表达均明显被抑制，且随姜黄素浓度增加，蛋白抑制效果越显著，提示姜黄素对肝癌组织中 NLRP3、IL-1β 表达有明显抑制作用，抑制炎性反应，进而对肝癌进行改善。董德嘉等[26]研究证实，结论检测 NLRP3、IL-1β mRNA 表达水平有助于了解酒精性肝硬化的病变肝组织炎症活动度、肝损伤程度及纤维化程度，对临床诊断具有一定的指导意义。

综上所述，姜黄素可抑制 HepG2 裸鼠移植瘤的生长，对肿瘤组织中 NLRP3、IL-1β 表达有显著抑制作用。

参考文献

[1] Citores MJ，Lucena JL，Fuente S，et al. Serum biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation [J]. World J Hepatol，2019，11（1）：50-64.

[2] Guan Z，Tan J，Gao W，et al. Circular RNA hsa_circ_0016788 regulates hepatocellular carcinoma tumorigenesis through miR - 486/CDK4 pathway [J]. J Cell Physiol，2018，234（1）：500-508.

[3] Wu X，Huang Z，Yee LW，et al. Perioperative and long-term outcomes of laparoscopic versus open liver resection for hepatocellular carcinoma with well-preserved liver function and cirrhotic background：a propensity score matching study [J]. Surg Oncol，2019，33（1）：206-215.

[4] 左清平，张顺芝，刘世坤 . 姜黄素抑制 NF-κB 信号对人肝癌 HepG2 细胞株增殖的影响 [J]. 中南药学，2015，13（4）：348-351.

[5] 金月，金明光，魏来，等 . 姜黄素对人舌癌 Tca8113 细胞增殖周期及凋亡的影响 [J]. 中国实验诊断学，2019，23（12）：131-132.

[6] 林凯玲，薛艳 . NLRP3 炎性小体与慢性炎症相关疾病的研究进展 [J]. 中国临床新医学，2020，13（7）：733-737.

[7] 陆佳伟，刘效谷，张文波 . LncRNA 及 miRNA 对 NLRP3 炎症小体信号的调控机制及其在相关疾病中的意义 [J]. 实用医学杂志，2020，36（22）：122-125.

[8] 祝佳佳，许海柱，贾维 . NLRP3 炎性小体在肺部疾病中的研究进展 [J]. 临床肺科杂志，2021，26（4）：594-598.

[9] 陈霞，杨磊，王丽，等 . 血清呼吸道解脲支原体感染诱发呼吸窘迫综合征患儿血清肿瘤坏死因子 -α，白介素 -1β，白介素 -6 水平变化及其临床意义 [J]. 中国医学前沿杂志，2020，12（3）：121-124.

[10] 孔德龙，崔洁 . NLRP3 炎症小体在肝疾病中的作用 [J]. 中国比较医学杂志，2018，28（8）：129-134.

[11] Wang F，Mubarik S，Zhang Y，et al. Long-term trends of liver cancer incidence and mortality in China 1990-2017：a joinpoint and age-period-cohort analysis [J]. Int J Environ Res Public Health，2019，16（16）：2878.

[12] Nakajima M，Tokumitsu Y，Shindo Y，et al. The recent development of the surgical treatment for hepatocellular carcinoma [J]. Appl Sci，2021，11（5）：2023.

[13] 陈兰玉，胡凯文 . 基于 PD-1/PD-L1 信号通路中医药改善肿瘤免疫抑制微环境研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志，2020，27（2）：140-142.

[14] 蒋烈浩，殷珂欣，葛明华 . 姜黄素抗肿瘤作用及相关机制的研究进展 [J]. 江苏医药，2018，44（7）：108-112.

[15] 郑传秋，宋乐乐，王钧平，等 . 姜黄素联合吡柔比星对膀胱癌细胞作用的研究 [J]. 潍坊医学院学报，2019，41（1）：37-38，44.

[16] Wei Q，Mu K，Li T，et al. Deregulation of the NLRP3 inflammasome in hepatic parenchymal cells during liver cancer progression [J]. Lab Invest，2014，94：52-62.

[17] Deng QT，Geng Y，Zhao LY，et al. NLRP3 inflammasomes in macrophages drive colorectal cancer metastasis to the liver [J]. Cancer Lett，2019，442：21-30.

[18] Li P，Liu Y，He Q. Anisodamine suppressed the growth of hepatocellular carcinoma cells，induced apoptosis and regulated the levels of inflammatory factors by inhibiting NLRP3 inflammasome activation [J]. Drug Des Devel Ther，2020，14：1609-1620.

[19] Chen ZH，He M，Chen JH，et al. Long non-coding RNA SNHG7 inhibits NLRP3-dependent pyroptosis by targeting the miR-34a/SIRT1 axis in liver cancer [J]. Oncol Lett，2020，20：893-901.

[20] Wei Q，hu R，Zhu JY，et al. E2-induced activation of the NLRP3 inflammasome triggers pyroptosis and inhibits autophagy in HCC cells [J]. Oncol Res，2019，27：827-834.

[21] Xie WH，Ding JX，Xiao X，et al. Hepatitis B virus X protein promotes liver cell pyroptosis under oxidative stress through NLRP3 inflammasome activation [J]. Inflamm Res，2020，69：683-696.

[22] 曹聪，黄桂柳，黄赞松，等 . 姜黄素对肝癌耐药细胞 HepG2/ADM 的增殖和阿霉素耐药性的影响 [J]. 广西医学，2020，42（8）：976-980.

[23] 马薇，张书勤，魏柏，等 . HDGF、VEGF 与肝肿瘤组织 MVD 水平的关系及对肝癌病人预后的影响 [J]. 蚌埠医学院学报，2018，43（2）：178-180.

[24] 向国艳，樊佳，叶震璇，等 . NLRP3 炎性小体及其上游激活蛋白 GSDMD 在原发性胆汁性肝硬化中的表达 [J]. 国际检验医学杂志，2019，40（17）：2049-2052，2057.

[25] 李延领，周英发 . 慢性乙型病毒性肝炎患者血清 CXCL-13 与 IL-1β，IL-6 表达及意义 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志，2019，33（4）：372-375.

[26] 董德嘉，卢海波，吴伟，等 . NLRP3、IL-1βmRNA 表达水平与酒精性肝硬化发病相关性及作用机制分析 [J]. 肝脏，2019，24（3）：265-267.

（收稿日期：2021-12-21；修回日期：2022-02-25）

罗欧咳祖帕复方的血清药物化学研究

陈悦，闫俊林，刘佳倪，李莉*，康金森*（新疆医科大学药学院，乌鲁木齐 830011）

摘要：目的 运用中药血清药物化学方法初步分析罗欧咳祖帕复方的入血成分，初步揭示罗欧咳祖帕复方在体内的药效物质基础。**方法** 采用 UHPLC-QE-MS 技术，利用 XCMS 以及 SIMCA 软件对数据进行基础分析，对第一主成分进行 OPLS-DA 建模分析，并利用 7 折交叉验证和置换检验对模型有效性进行验证，筛选出显著差异的代谢物，从而初步鉴定罗欧咳祖帕复方中的主要入血成分。**结果** 通过对罗欧咳祖帕复方提取物、含药血清、空白血清的总离子流图和二级碎片离子信息进行对比分析，在罗欧咳祖帕复方给药大鼠血清中分析推测得到 28 个移行成分，包括 18 个原形成分和 10 个代谢产物。**结论** 初步鉴定出罗欧咳祖帕复方在血清中的移行成分，提示这些入血成分可能是罗欧咳祖帕复方在体内发挥作用的活性成分，有助于阐明其药效物质基础和作用机制。

关键词：罗欧咳祖帕复方；含药血清；UHPLC-QE-MS；药物化学
中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)04-0772-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.008

Serum pharmacochemistry of Loki zupa compound

CHEN Yue, YAN Jun-lin, LIU Jia-ni, LI Li*, KANG Jin-sen* (*School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi* 830011)

Abstract: Objective To analyze the constituents of Loki zupa compound absorbed into the blood by serum pharmacochemical method in traditional Chinese medicine, and to reveal the pharmacological material basis of Loki zupa compound in vivo. **Methods** Constituents absorbed into the blood were rapidly identified by UHPLC-QE-MS. Basic data analysis and first principal component OPLS-DA modeling analysis were conducted and the effectiveness of the model was verified by 7-fold cross validation and permutation test. The constituents were analyzed by XCMS and SIMCA software, and the main constituents of Loki zupa compound absorbed into the blood were identified. **Results** After comparing the total ion flow diagram and secondary fragment ion information of Loki zupa compound extract, medicated serum and blank serum, totally 28 transitional components absorbed into the blood were detected in the serum of rats administered Loki zupa compound administered rats, 18 of which were prototype constituents and the other 10 were metabolites. **Conclusion** The transitional components of Loki zupa compound in the rat serum are identified, suggesting that these constituents are active in Loki zupa compound in vivo, and help clarify the pharmacodynamic material basis and mechanism.

Key words: Loki zupa compound; medicated serum; UHPLC-QE-MS; pharmacochemistry

罗欧咳祖帕是用于治疗哮喘的经典药方，具有温肺平喘、止咳化痰作用。该方由神香草、鸢尾根组成，目前的研究集中在罗欧咳祖帕复方中的单味药材的物质基础，其中神香草（*Hyssopus cuspidatus* Boriss）化学成分包括挥发油[1-3]、黄酮类[4-5]、萜类及酚酸类等[6-8]，鸢尾根（*Iris halophila* Pall）化学成分包括黄酮类和挥发油等[9-11]，这些成分具有抗氧化活性[10]、抗炎作

基金项目：国家重点研发计划项目（No.2018YFC1708303）。
作者简介：陈悦，女，在读硕士研究生，主要从事分子药理学与新药研发，email：cycy778@163.com *__通信作者：__康金森，男，博士，副教授，主要从事分子药理学与新药研发，email：20807655@qq.com；李莉，女，教授，主要从事天然药物分析，email：llxjmu@163.com

用[11-14]、抗菌、降血脂、降血压[14]等作用。但缺乏对于复方本身的物质基础的系统研究，中药复方成分多且复杂，有些化学成分在体外药理活性强，但是生物利用度低，在体内很难达到有效治疗浓度，有些成分则经过肠内菌或者肝脏代谢以代谢产物发挥作用[15]。因此，为探究罗欧咳祖帕复方在体内的潜在活性成分，采用血清药物化学研究方法，利用 UHPLC-QE-MS 技术，对罗欧咳祖帕复方后的血中移行成分进行鉴定，为罗欧咳祖帕复方进一步研究开发提供实验依据。

1　材料

1.1　仪器

超高效液相 1290 UPHLC（Agilent）；高分辨质谱 Q Exactive Focus、离心机 Heraeus Fresco17（Thermo Fisher Scientific）；天平 BSA124S-CW（Sartorius）；研磨仪 JXFSTPRP-24（上海净信科技有限公司）；纯水仪明澈 D24 UV（Merck Millipore）；超声仪 YM-080S（深圳市方奥微电子有限公司）；色谱柱 ACQUITY UPLC BEH C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）（Waters）。

1.2　试药

神香草药材（新疆维吾尔药业有限责任公司，批号：Y1911044），鸢尾根药材（新疆恩萨尔维吾尔医药饮片药业有限公司，批号：190523），神香草药材经新疆医科大学天然药物教研室帕丽达·阿不力孜教授鉴定为唇形科神香草属植物硬尖神香草的全草，喜碱鸢尾根药材经新疆医科大学天然药物教研室丛媛媛教授鉴定为鸢尾科鸢尾属植物喜碱鸢尾的根部，标本现均存于新疆医科大学中心实验室；甲醇（批号：67-56-1）、乙腈（批号：75-05-8）、甲酸（批号：64-18-6）（CNW Technologies）；*L*-2-氯苯丙氨酸（批号：103616-89-3，上海恒柏生物科技有限公司）。

1.3　实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠，体质量 180 ～ 220 g [新疆医科大学动物实验中心，实验动物生产许可证号：SCXK（新）2018-0002]。

2　方法

2.1　罗欧咳祖帕复方提取物样品的制备

按照临床用药的配伍比例（具体比例保密），采用水煎煮法制备复方罗欧咳祖帕粗提物，加入乙醇至含醇量为 70%，室温下静置，将提取液过滤减压浓缩成浸膏，干燥后获得罗欧咳祖帕复方提取物粉末[16]。称取 100 mg 样本，加入 500 μL 提取液 [甲醇:水＝4：1，内标（*L*-2-氯苯丙氨酸）质量浓度为 10 μg·mL^{-1}] 以及两个小钢珠；涡旋 30 s 后 45 Hz 研磨 240 s，冰水浴超声 1 h；－ 40 ℃静置 1 h 后，将样本 4 ℃、12 000 r·min^{-1} 离心 15 min；取出上清液过 0.22 μm 滤膜至进样瓶中检测。

2.2　含药血清样品的制备

取 SD 大鼠 10 只，适应性喂养 1 周后，随机分成空白组和给药组，空白组 4 只，给药组 6 只。给药前 12 h 禁食、自由饮水，给药组大鼠灌胃罗欧咳祖帕复方提取物药液（生药 3.185 g·kg^{-1}），空白组大鼠灌胃等量蒸馏水，给药量均为 1 mL/100 g，连续给药 3 d，早、晚各给药 1 次。末次给药 1 h 后，腹主动脉取血，静置 2 h，4 ℃、3000 r·min^{-1} 离心 10 min，收集血清得到空白血清和含药血清样品，取 400 μL 血清样本，加入 40 μL 盐酸（2 mol·L^{-1}）；涡旋 1 min，4 ℃ 静置 15 min；重复涡旋静置 4 次后，加入 1.6 mL 乙腈；涡旋 5 min，12 000 r·min^{-1} 离心 5 min，取上清液 1800 μL 氮吹干；加入 150 μL 80% 甲醇（内标质量浓度为 10 μg·mL^{-1}）复溶，涡旋 5 min，12 000 r·min^{-1}（离心力 13 800 g，半径 8.6 cm）离心 5 min；取 120 μL 上清液到进样瓶中检测[17]。

2.3　分析条件

2.3.1　色谱条件　采用 UPHLC 进行分析。柱温为 55 ℃，流速为 500 μL·min^{-1}，进样体积为 5 μL。流动相 0.1% 甲酸水溶液（A）-0.1% 甲酸乙腈水溶液（B）梯度洗脱（0 ～ 11 min，15% ～ 75%B；11 ～ 12 min，15% ～ 98%B；12 ～ 14 min，98%B；14 ～ 14.1 min，98% ～ 15%B；14.1 ～ 16 min，15%B；18 ～ 25 min，100%B；25 ～ 30 min，5%B）。

2.3.2　质谱条件　鞘气：45 Arb，辅助气：15 Arb，离子传输管温度：400 ℃，Full MS 分辨率：70 000，MS/MS 分辨率：17 500，NCE 模式时，所用碰撞能为阶梯能量：15、30、45 eV，喷雾电压：4.0 kV（正离子模式）或－ 3.6 kV（负离子模式）。

2.4　数据处理

使用 XCMS 软件将质谱原始数据导入，进行保留时间矫正、峰识别、峰提取、峰积分、峰对齐等，利用自建二级质谱数据库及相应裂解规律匹配法对含有 MS/MS 数据的峰进行物质鉴定。使用 SIMCA 软件对数据进行对数（LOG）转换加 UV 格式化处理。

3　结果与讨论

3.1　成分分析

比较相同色谱、质谱条件下罗欧咳祖帕复方

提取物、罗欧祖帕复方含药血清、空白血清的图谱（见图 1 ～ 2），发现在正、负离子同时扫描的模式下，从罗欧咳祖帕复方含药血清中共检测比对出 385 个主要入血化学成分。

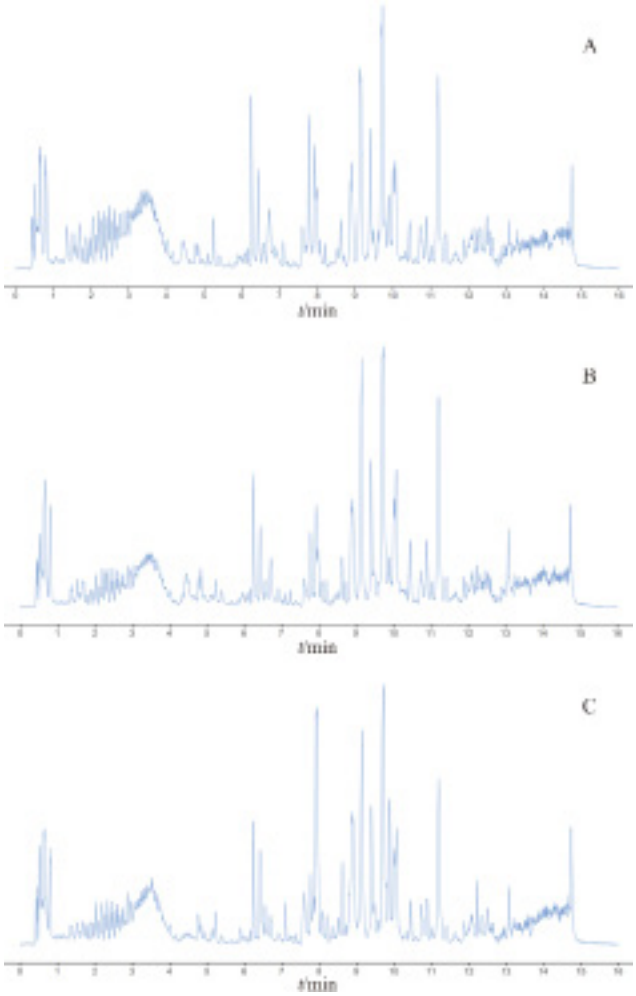


图 1 罗欧咳祖帕正离子模式 TIC 图

Fig 1 TIC diagram of positive ion mode of Loki zupa

A. 复方提取物（Loki zupa compound extract）；B. 复方含药血清（serum containing Loki zupa compound）；C. 空白血清（blank serum）

3.2 正交偏最小二乘法 - 判别分析（OPLS-DA）

采用 OPLS-DA 法[18]进行分析，结果见图 3 ～ 4。可以看出，两组样本区分非常显著，样本全部处于 95% 置信区间内。

3.3 置换检验分析

置换检验结果如图所示（见图 5 ～ 6）。原模型 R^2Y 非常接近 1，说明建立的模型符合样本数据的真实情况；原模型 Q^2 非常接近 1，说明如果有新样本加入模型，会得到近似的分布情况；置换检验随机模型的 Q^2 值均小于原模型的 Q^2 值；Q^2 的回归线与纵轴的截距小于零；同时随着置换保留度逐渐降低，置换的 Y 变量比例增大，随机模型的 Q^2 逐

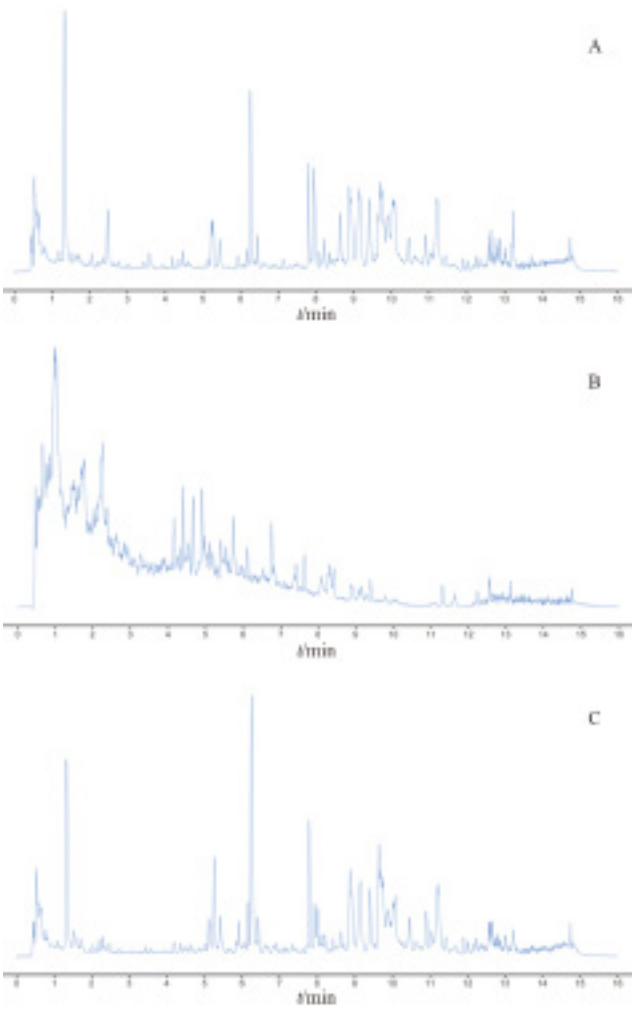


图 2 罗欧咳祖帕负离子模式 TIC 图

Fig 2 TIC diagram of negative ion mode of Loki zupa

A. 空白血清（blank serum）；B. 复方提取物（Loki zupa compound extract）；C. 复方含药血清（serum containing Loki zupa compound）

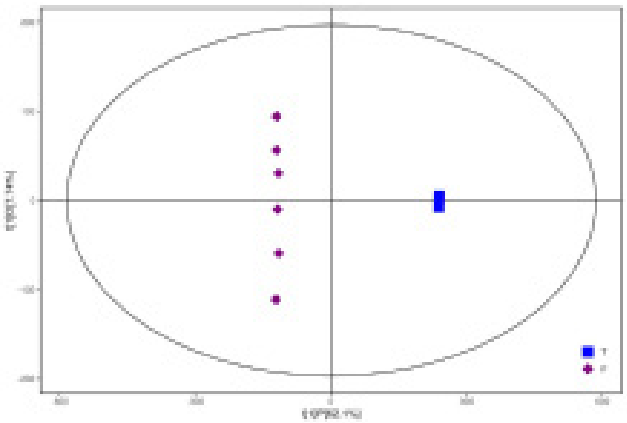


图 3 复方含药血清组（F）对复方提取物组（T）的 OPLS-DA 分析

Fig 3 OPLS-DA analysis of compound medicated serum group（F）to compound extract group（T）

渐下降，说明原模型可以明确解释两组样本之间的差异，具有良好的稳健性（复方含药血清组对复方提取物组 $R^2Y = 0.91$，$Q^2 = -0.68$；复方含药血

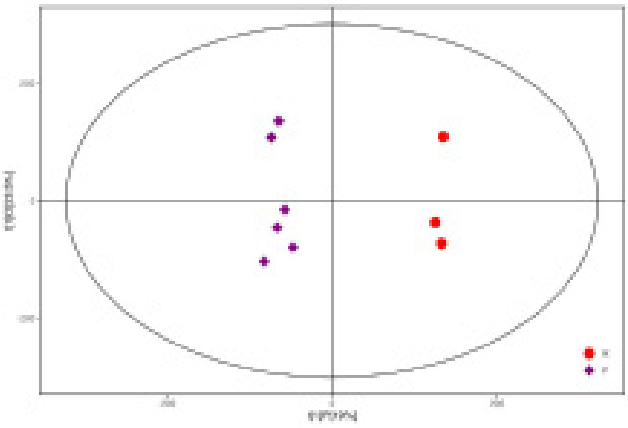


图 4　复方含药血清组（F）对空白血清组（K）的 OPLS-DA 分析

Fig 4　OPLS-DA analysis of compound medicated serum group（F）to blank serum group（K）

清组对空白血清组 $R^2Y = 0.97$，$Q^2 = -0.2$），不存在过拟合现象。

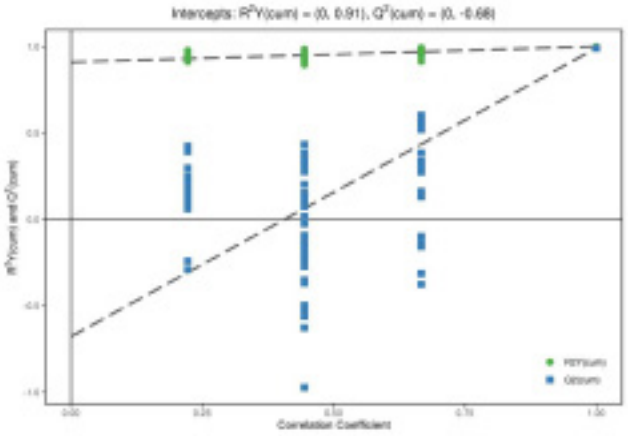


图 5　复方含药血清组对复方提取物组的置换检验分析

Fig 5　Replacement test of compound medicated serum group to compound extract group

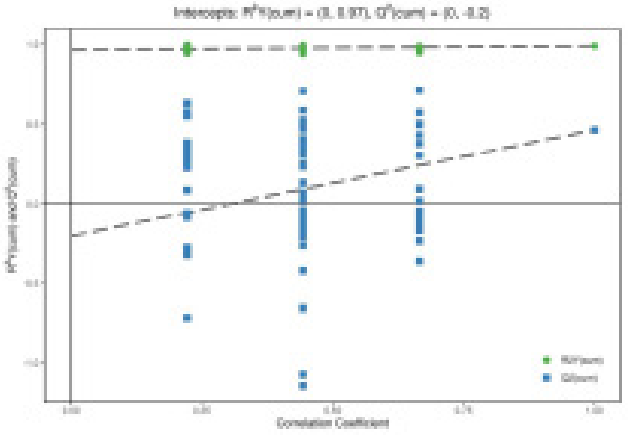


图 6　复方含药血清组对空白血清组的置换检验分析

Fig 6　Replacement test analysis of compound medicated serum group to blank serum group

3.4　差异代谢物分析

采用多元变量统计方法进行分析[19]。

本研究选择的筛选标准为 Student's *t* 检验的 *P* 值小于 0.05，同时 OPLS-DA 模型第一主成分的变量投影重要度大于 1，以火山图可视化方式表示（见图 7 ～ 8），蓝色代表下调差异代谢物，红色代表上调差异代谢物，灰色代表无显著变化代谢物。正离子模式下的复方含药血清组对复方提取物组共筛选到 323 个差异代谢物；其中 45 个上调差异代谢物，如 deoxynivalenol、spermine、acetylcarnitine、alpha-linolenic acid、*L*-isoleucin、lysine 等；278 个下调差异代谢物，如一枝蒿甲素、三尖杉碱、滨蓟黄素、白射干素、京尼平苷、山柰酚等；正离子模式下的复方含药血清组对空白血清组共筛选到 19 个差异代谢物；其中 12 个上调差异代谢物，如 12- 羟基茉莉酸、pipecolic acid 等；7 个下调差异代谢物，如黄曲霉素 B_1、7，8- 二羟基黄酮等；负离子模式下的复方含药血清组对复方提取物组共筛选到 248 个差异代谢物；其中 56 个上调差异代谢物，如香草酸、松香酸、云杉素等；192 个下调差异代谢物，如乙酰丁香酮、香草醛、水杨酸甲酯等；负离子模式下的复方含药血清组对空白血清组共筛选到 22 个差异代谢物，其中 17 个上调差异代谢物，如高良姜素、棕矢车菊素、异鼠李素、柳穿鱼黄素、鸢尾黄酮乙素等。这些差异代谢物共 33 类：分别为 miscellaneous（其他类）、flavonoids（黄酮类）、terpenoids（萜类）、alkaloids（生物碱）、iridoids（环烯醚萜类）、phenylpropanoids（苯丙素类）、lipids（脂质类）、steroids（甾体类）、amino acid derivatives（氨基酸衍生物）、sesquiterpenoids（倍半萜类）等。

3.5　入血成分分析

对代谢组的定性定量结果进行 OPLS-DA 分析、单变量统计分析和多元变量统计分析（multivariate analysis，MVA）后筛选出显著差异的代谢物，基于样本中物质碎裂产生的二级谱图同数据库谱图比对给出谱图相似度得分值，并对差异化合物进行筛选后初步鉴定罗欧咳祖帕复方中的主要入血成分（见表 1 及表 2）。在正、负离子同时扫描的模式下从罗欧咳祖帕复方含药血清中共鉴定出 28 个主要入血化学成分，其中 18 个为原形成分，包括高良姜素、棕矢车菊素、异鼠李素、4- 羟基苯甲酸酯、双氢青蒿素、鸢尾黄酮乙素、癸二酸、亚油酸、中亚阿魏二醇香草酸酯、苯丙酮酸、pipecolic acid、testolactone、7-hydroxy-3-（3-hydroxy-4-methoxyphenyl）-6-methoxychromen-

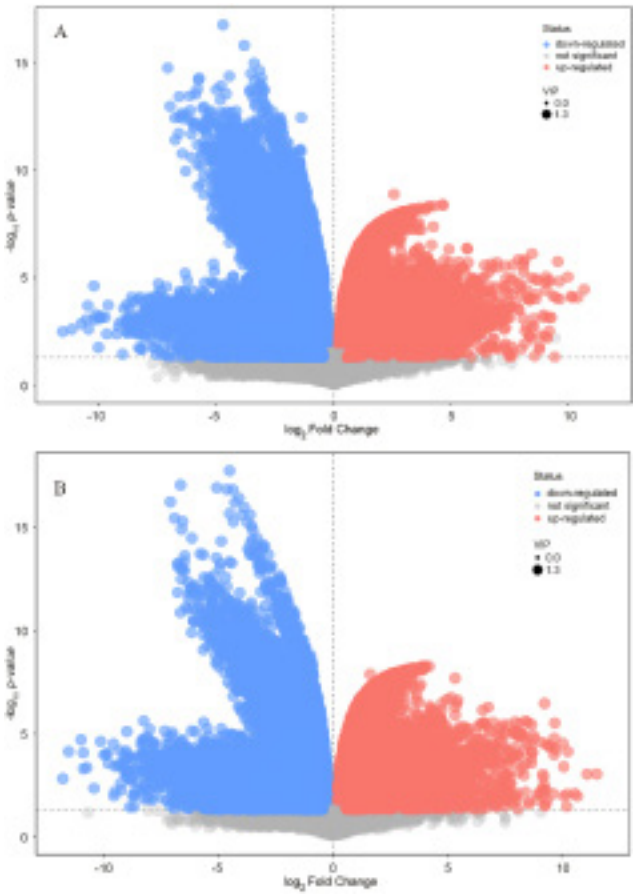


图 7 正离子模式（A）和负离子模式（B）下复方含药血清组对复方提取物组的差异代谢物分析火山图

Fig 7 Analysis Volcano plot of differential metabolites between compound medicated serum group and compound extract group in positive ion mode（A）and negative ion mode（B）

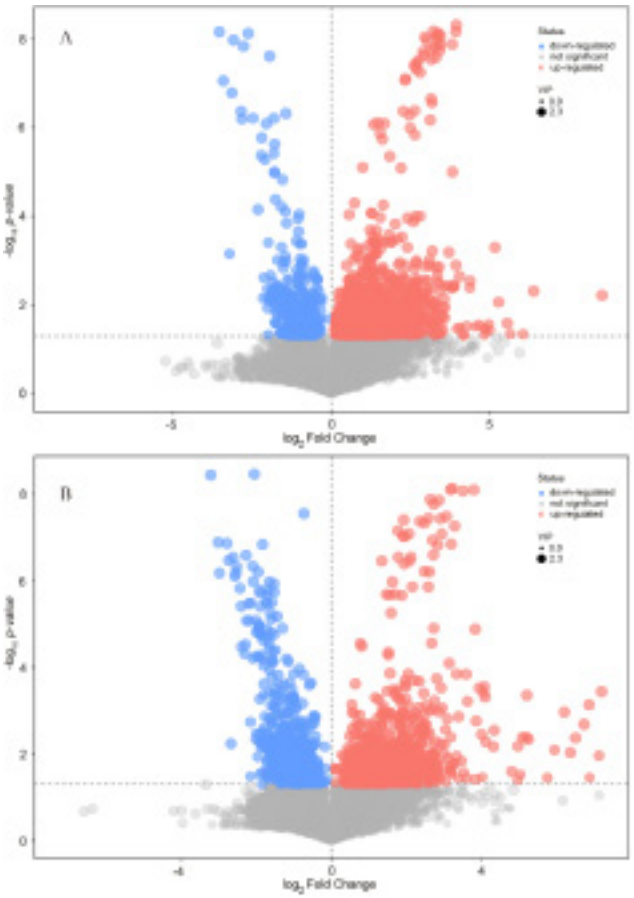


图 8 正离子模式（A）和负离子模式（B）下复方含药血清组对空白血清组的差异代谢物分析火山图

Fig 8 Analysis Volcano plot of differential metabolites between compound medicated serum group and blank serum group in positive ion mode（A）and negative ion mode（B）

4-one、（3*E*）-4-（1，2，4-trihydroxy-2，6，6-trimethylcyclohexyl）-3-buten-2-one、azuleno（5，6-c）furan-1（3H）-one，4，4a，5，6，7，7a，8，9-octahydro-3，4，8-trihydroxy-6，6，8-trimethyl-、5-hydroxy-2-（3-hydroxy-4-methoxyphenyl）-7-[3，4，5-trihydroxy-6-[（3，4，5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl）oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-4-one、牡荆苷、海柯皂苷元，10 个为代谢产物，包括柳穿鱼黄素、异棕榈酸、petunidin-3-*O*-beta-glucopyranoside、（一）-茉莉酸、12-羟基茉莉酸、肌酸、白坚木卡品、（2*S*，3*S*，4*S*，5*R*，6*S*）-3，4，5-trihydroxy-6-[5-hydroxy-2-（4-hydroxyphenyl）-6-methoxy-4-oxochromen-7-yl]oxyoxane-2-carboxylic acid、kaempferol-3-*O*-glucuronoside、tricin。

4 讨论

本实验建立了 UHPLC-QE-MS 法对罗欧咳祖帕复方含药血清进行检测，具有离子传输效率高、灵敏度高、重复性高等优点。

本实验在建立 UHPLC-QE-MS 法的基础上，采用 XCMS 及 SIMCA 软件进行数据采集和化合物谱库比较鉴定，可对中药复方复杂化学体系进行快速筛选鉴定，通过对罗欧咳祖帕复方提取物、含药血清、空白血清的质谱信息、保留时间、精确相对分子量以及自建二级质谱数据库比对初步检测出主要成分，并且通过 OPLS-DA 分析、单变量统计分析和多元变量统计分析统计代谢组化合物信息，筛选出差异化合物。上述方法共初步鉴定出 18 种原形入血成分，10 种代谢产物，主要包括黄酮类、萜类、生物碱类等成分，这些化合物种类分布广泛，具有多种生物活性及丰富的药用价值，是研究天然产物和开发新药的重要来源。

然而基于 QE 的非靶标代谢组学并不能最终确定复方中的入血成分，还需进一步采用对照品比对来明确复方药效物质，其次本实验结果是在正常动物体内的表现，其于疾病动物体内的表现是

表 1　正离子模式下化学成分

Tab 1　Chemical composition in positive ion mode

序号	英文名称	中文名称	分子式	类别	*m/z*	保留时间 /s	MS^2 score	相对含量均值
1	creatine	肌酸	$C_4H_9N_3O_2$	有机酸及其衍生物	132.0768	32.375	0.9485	0.0008
2	7-hydroxy-3-（3-hydroxy-4-methoxy-phenyl）-6-methoxychromen-4-one		$C_{17}H_{14}O_6$	黄酮类	315.0861	330.344	1	8.4100×10^{-5}
3	pipecolic acid		$C_6H_{11}NO_2$	生物碱	130.0864	753.183	0.9382	7.6313×10^{-5}
4	tricin		$C_{17}H_{14}O_7$	黄酮类	331.0816	276.899	1	2.7453×10^{-5}
5	（－）-12-hydroxyjasmonic acid	12- 羟基茉莉酸	$C_{12}H_{18}O_4$	茉莉酸类	209.1171	443.296	0.8547	1.1873×10^{-5}
6	（3*E*）-4-（1，2，4-trihydroxy-2，6，6-trimethylcyclohexyl）-3-buten-2-one		$C_{13}H_{22}O_4$	萜类	225.1485	148.402	0.8186	7.9270×10^{-6}
7	azuleno（5，6-c）furan-1（3H）-one，4，4a，5，6，7，7a，8，9-octahydro-3，4，8-trihydroxy-6，6，8-trimethyl-		$C_{15}H_{22}O_5$	萜类	283.1519	84.601	0.9402	7.0917×10^{-6}
8	testolactone		$C_{19}H_{24}O_3$	萜类	301.1802	413.968	0.6625	5.4793×10^{-6}
9	aspidocarpine	白坚木卡品	$C_{22}H_{30}N_2O_3$	生物碱	371.2360	452.780	0.7586	2.5648×10^{-6}
10	apigenin-8-C-glucoside	牡荆苷	$C_{21}H_{20}O_{10}$	黄酮类	433.1133	98.615	0.9309	2.5359×10^{-6}
11	hecogenin	海柯皂苷元	$C_{27}H_{42}O_4$	萜类	431.3136	725.352	0.8715	2.1893×10^{-6}
12	5-hydroxy-2-（3-hydroxy-4-methoxyphe-nyl）-7-[3，4，5-trihydroxy-6-[（3，4，5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl）oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-4-one		$C_{28}H_{26}O_{15}$	黄酮类	609.1813	130.425	0.7707	2.1333×10^{-6}

表 2　负离子模式下化学成分

Tab 2　Chemical composition in negative ion mode

序号	英文名称	中文名称	分子式	类别	*m/z*	保留时间 /s	MS^2 score	相对含量均值
1	4-hydroxybenzoate	4- 羟基苯甲酸酯	$C_7H_6O_3$	苯甲酸及其衍生物	137.0243	146.660	0.9793	4.7425×10^{-4}
2	iristectorigenin B	鸢尾黄酮乙素	$C_{17}H_{14}O_7$	黄酮类	329.0669	248.653	0.9681	1.3178×10^{-4}
3	jaceosidin	棕矢车菊素	$C_{17}H_{14}O_7$	黄酮类	329.0669	294.564	1	4.1356×10^{-5}
4	phenylpyruvic acid	苯丙酮酸	$C_9H_8O_3$	Benzenoids	163.0399	88.216	0.8249	3.7815×10^{-5}
5	petunidin-3-*O*-beta-glucopyranoside		$C_{22}H_{23}O_{12}$	黄酮类	477.1046	171.707	0.9004	3.3969×10^{-5}
6	isopalmitic acid	异棕榈酸	$C_{16}H_{32}O_2$	脂肪酸类	255.2330	599.739	0.9608	3.1154×10^{-5}
7	（－）-12-hydroxyjasmonic acid	12- 羟基茉莉酸	$C_{12}H_{18}O_4$	茉莉酸类	225.1131	84.985	0.6558	2.9350×10^{-5}
8	linoleic acid	亚油酸	$C_{18}H_{32}O_2$	脂肪酰类	279.2329	567.281	0.9312	2.4932×10^{-5}
9	jasmonic acid	（－）- 茉莉酸	$C_{12}H_{18}O_3$	脂肪酸类	209.1183	361.314	0.6614	2.3968×10^{-5}
10	（2*S*，3*S*，4*S*，5*R*，6S）-3，4，5-trihydroxy-6-[5-hydroxy-2-（4-hydroxyphenyl）-6-methoxy-4-oxochromen-7-yl]oxyox-ane-2-carboxylic acid		$C_{22}H_{20}O_{12}$	黄酮类	475.0876	157.784	0.8268	1.6484×10^{-5}
11	kaempferol-3-*O*-glucuronoside		$C_{21}H_{18}O_{12}$	黄酮类	461.0725	157.841	0.6052	1.4277×10^{-5}
12	jaeschkeanadiol	中亚阿魏二醇香草酸酯	$C_{15}H_{26}O_2$	萜类	237.1857	482.834	0.9296	1.2823×10^{-5}
13	sebacic acid	癸二酸	$C_{10}H_{18}O_4$	脂肪酰类	201.1130	457.850	0.9587	1.2093×10^{-5}
14	pectolinarigenin	柳穿鱼黄素	$C_{17}H_{14}O_6$	黄酮类	313.0718	174.850	0.9893	8.6960×10^{-6}
15	galangin	高良姜素	$C_{15}H_{10}O_5$	黄酮类	269.0452	228.242	1	7.3647×10^{-6}
16	dihydroartemisinin	双氢青蒿素	$C_{15}H_{24}O_5$	萜类	283.1547	114.043	0.9749	5.0920×10^{-6}
17	isorhamnetin	异鼠李素	$C_{16}H_{12}O_7$	黄酮类	315.0514	249.286	1	2.7647×10^{-6}

否有差异，需开展进一步的研究。但上述入血成分也初步揭示其可能为罗欧咳祖帕复方在体内发挥药效的物质基础，可为其后续研究开发提供实验依据。

参考文献

[1] 祖丽菲亚·吾斯曼，努尔江·肉孜，买吾拉尼江·依孜布拉，等 . 维药神香草挥发油与超临界 CO_2 流体萃取物化学成分的比较研究 [J]. 新疆医科大学学报，2015，38（7）：823-827.

[2] 郝宇薇，刘婧怡，姚婷玉，等 . 硬尖神香草挥发油提取工艺研究 [J]. 湖北中医药大学学报，2018，20（3）：37-40.

[3] Venditti A，Bianco A，Frezza C，et al. Essential oil composition，polar compounds，glandular trichomes and biological activity of hyssopus officinalis subsp. aristatus（Godr.）Nyman from central Italy [J]. Ind Crops Prod，2015，77（9）：353-363.

[4] Hajdari A，Giorgi A，Beretta G，et al. Phytochemical and sensorial characterization of hyssopus officinalis subsp. aristatus（godr.）Nyman（Lamiaceae）by GC-MS，HPLC-UV/DAD，spectrophotometric assays and e-nose with aid of chemometric techniques [J]. Eur Food Res Technol，2018，244（18）：1313-1327.

[5] 魏敏，孙璇 . RP-HPLC 同时测定硬尖神香草中 4 种成分含量 [J]. 中国实验方剂学杂志，2016，22（11）：77-79.

[6] 刘丹，方进波，朱小涛，等 . 神香草倍半萜类化学成分研究 [J]. 中草药，2019，50（5）：1049-1054.

[7] 戎晓娟，严欢，韩阳，等 . 神香草水提物的主成分分析及含量测定 [J]. 中国药房，2015，26（6）：808-810.

[8] 戎晓娟，康雨彤，袁凤娟，等 . 神香草抗哮喘有效部位定性定量研究 [J]. 药物分析杂志，2018，38（8）：1437-1441.

[9] Huang L，Ma W，Liu Y，et al. Three new phenol compounds from Iris dichotoma Pall [J]. Helv Chim Acta，2012，95（6）：1033-1036.

[10] 李小飞 . 喜碱鸢尾根抗氧化活性成分的研究 [D]. 乌鲁木齐：新疆大学，2007.

[11] 卞娅，刘孟生，张丽媛，等 . 射干、鸢尾不同部位 6 种活性成分定量分析及抗炎作用初探 [J]. 中国中药杂志，2018，43（1）：119-122.

[12] Fatima A，Siddique YH. Role of flavonoids in neurodegenerative disorders with special emphasis on tangeritin [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets，2019，18（8）：581-597.

[13] 董一筱，张钊，陈乃宏 . 三萜类化合物的神经药理作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志，2019，33（10）：860.

[14] 高佳琪，焦顺刚，马瑾煜，等 . 丁香属植物中萜类成分研究进展 [J]. 中国中药杂志，2020，45（10）：2343-2352.

[15] 许海玉，黄璐琦，卢鹏，等 . 基于体内 ADME 过程和网络药理学的中药现代研究思路 [J]. 中国中药杂志，2012，37（2）：142-145.

[16] 李玮，李莉，王晓梅，等 . 复方罗欧咳祖帕中总多酚总黄酮的含量测定与抗氧化活性研究 [J]. 新疆医科大学学报，2021，44（7）：842-845.

[17] Dunn WB，Broadhurst D，Begley P，et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry [J]. Nat Protoc，2011，6（7）：1060-1083.

[18] Trygg J，Wold S. Orthogonal projections to latent structures（O-PLS）[J]. J Chemom，2002，16（3）：119-128.

[19] Saccenti E，Hoefsloot HC，Smilde AK，et al. Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data [J]. Metabolomics，2014，10（3）：361-374.

（收稿日期：2021-12-08；修回日期：2022-02-15）

基于普鲁士蓝纳米花 / 电化学还原石墨烯复合修饰玻碳电极伏安检测血清中多巴胺的浓度

夏用恢[1, 2]，李广利[3]，胡长平[1*]（1. 中南大学湘雅药学院药理学系，长沙　410078；2. 株洲市食品药品检验所，湖南　株洲　412011；3. 湖南工业大学生命科学与化学学院，湖南　株洲　412007）

摘要：目的　制备一种基于普鲁士蓝纳米花 / 电化学还原石墨烯复合纳米材料（PB/ErGO）修饰的电化学传感器（玻碳电极，GCE），用于人血清样品中多巴胺浓度的检测。**方法**　采用扫描电镜、X- 射线粉末衍射、循环伏安法、电化学阻抗谱对修饰材料的表面形貌、微观结构和电化学性能进行表征。系统优化富集时间、富集电位、底液 pH 等电化学检测条件。采用差分脉冲伏安法（DPV）对人血清中多巴胺的浓度进行定量检测。**结果**　扫描电镜和 X- 射线粉末衍射证实成功制备了 PB/ErGO 复合纳米材料。PB/ErGO 显著增大了电极的电化学活性面积，降低了电荷传递电阻。PB/ErGO/GCE 的阳极峰电流约为裸电极的 53 倍，表明 PB/ErGO 对多巴胺氧化表现出协同增敏效应。最佳检测条件为富集时间 240 s，富集电位 0 V，pH 7.0。PB/ErGO/GCE 动态响应范围为 0.5 ～ 50 μmol • L^{-1}，检出限为 0.06 μmol • L^{-1}，且成功实现了人血清样品中多巴胺浓度的检测。**结论**　PB/ErGO/GCE 具有低成本，高灵敏度，优异的重复性、再现性和选择性等优点，在生物样本中痕量多巴胺检测上具有实际应用前景。

关键词：普鲁士蓝；电化学还原；石墨烯；多巴胺；血清
中图分类号：O657　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0779-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.009

Voltammetric detection of dopamine in the serum with Prussian blue nanoflower/electrochemically reduced graphene oxide modified glassy carbon electrode

XIA Yong-hui[1, 2], LI Guang-li[3], HU Chang-ping[1*] (1.*Department of Pharmacology*, *School of Pharmaceutical Sciences, Central South University*, *Changsha* 410078; 2. *Zhuzhou Institute for Food and Drug Control*, *Zhuzhou Hunan* 412011; 3. *College of Life Sciences and Chemistry*, *Hunan University of Technology*, *Zhuzhou Hunan* 412007)

Abstract: Objective To develop an electrochemical sensor (glassy carbon electrode, GCE) based on Prussian blue nanoflower/electrochemically reduced graphene composite nanomaterials (PB/ErGO) to detect dopamine concentration in human serum samples. **Methods** The surface morphology, microstructure and electrochemical properties of the modified materials were characterized by scanning electron microscopy, X-ray powder diffraction, cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. The electrochemical detection parameters including accumulation time, accumulation potential and pH were optimized systematically. Differential pulse voltammetry (DPV) technique was used to quantitatively analyzed dopamine concentration in human serum. **Results** Scanning electron microscopy images and X-ray powder diffraction confirmed the successful preparation of PB/ErGO nanocomposites. PB/ErGO significantly increased the electrochemically active area and reduced the charge transferred resistance. The anodic peak current of dopamine at the PB/ErGO/GCE was about 53 times than that of the bare electrodes, demonstrating a synergistic enhancement effect of PB/ErGO on dopamine oxidation. The optimal accumulation time was 240 s,

作者简介：夏用恢，女，在职硕士研究生，主管药师，主要从事药物分析研究，email：Sunnyxia0710@163.com　*通信作者：胡长平，男，教授，主要从事药理学研究，email：huchangping@csu.edu.cn

accumulation potential was 0 V, and pH 7.0. Moreover, PB/ErGO/GCE displayed a wide dynamic response range of 0.5 ～ 50 μmol • L $^{-1}$ with a low limit of detection of 0.06 μmol • L $^{-1}$, which was successfully used to detect the dopamine concentration in human serum samples. **Conclusion** PB/ErGO/GCE has obvious advantages of low cost, high sensitivity, excellent repeatability, reproducibility as well as selectivity, and application prospect in trace detection of dopamine in biological samples.

Key words: Prussian blue; electro-reduced; graphene; dopamine; serum

多巴胺作为一种重要的儿茶酚类神经递质，在中枢神经、心血管、肾脏、激素等生理功能调节中起着重要的作用[1]。多巴胺水平异常可能引发帕金森病等多种神经精神类疾病，严重危害人体健康。因此，发展低成本、高灵敏度的多巴胺检测方法对疾病的预防和诊断具有重要意义。目前多巴胺的主要测定方法包括荧光法[2]、色谱法[3-4]、电化学发光法[1，5]等。这些方法尽管可靠，但往往需要昂贵的仪器设备、预处理步骤烦琐耗时。电化学分析法具有成本低、响应快速、灵敏度高、设备简单便携等优点[6-8]，已广泛用于多巴胺等生物活性分子的检测。由于多巴胺常与抗坏血酸和尿酸共存于血清和中枢系统细胞外液中，且三者在裸电极上的氧化峰电位接近，因此多巴胺电化学检测容易受到干扰[9-10]。金属纳米粒子[11]、碳纳米管[12-13]、石墨烯[14-16]等纳米材料能显著提升电极的选择性，已成为解决干扰问题的主要方法。普鲁士蓝（Prussian blue，PB）是一种混合价态的铁化合物，具有无毒、成本低、电化学性能优异等特点，在分子磁体、电致变色器件、电催化、能量转换等领域应用广泛[17]。目前，基于普鲁士蓝 / 石墨烯复合材料电化学检测多巴胺水平的方法尚未见报道。本文拟发展基于普鲁士蓝纳米花 / 电化学还原石墨烯复合材料修饰玻碳电极（Prussian blue nanoflower/ electrochemically reduced graphene oxide modified glassy carbon electrode，PB/ ErGO/GCE），以期利用 PB 与电化学还原石墨烯的协同增敏作用以提高多巴胺的电化学传感性能。

1 材料

铁氰化钾 [K_3Fe（CN）$_6$]、亚铁氰化钾 [K_4Fe（CN）$_6$]、无水磷酸二氢钠、无水磷酸氢二钠、氯化钾、盐酸、*N*，*N*-二甲基甲酰胺（DMF）等试剂均为分析纯（国药化学试剂有限公司）；盐酸多巴胺（分析纯，上海阿拉丁生化股份有限公司）；氧化石墨烯（GO，南京先丰纳米材料有限公司）；所有溶液均用超纯水（电阻率为 18.2 MΩ • cm $^{-1}$）配制。人血清样品由株洲市人民医院提供。

2 方法

2.1 普鲁士蓝纳米花合成

PB 采用低共熔溶剂辅助水热合成法[18]。具体合成步骤如下：准确称取 0.0320 g K_3Fe（CN）$_6$ 加入 100 mL 烧杯，在烧杯中分别加入 5 mL 超纯水、5 mL 盐酸和 25 mL DMF，磁力搅拌至完全溶解。将上述混合液转移至 100 mL 聚四氯乙烯内纯不锈钢反应釜中，80 ℃下水热处理 24 h。待反应结束后，取出水热反应釜，自然条件下冷却至室温，将反应溶液以 8000 r • min $^{-1}$ 转速离心，得到的产物依次用超纯水、无水乙醇、超纯水洗涤 3 次后，置于 80 ℃的烘箱干燥过夜，即可得到花状结构的 PB。将 10 mg PB 分散于 10 mL 超纯水中，超声 30 min，即可得到 1 mg • mL $^{-1}$ 的 PB 分散液。

2.2 PB/GO 复合材料制备

将 10 mg GO 分散于 10 mL 超纯水中，超声 30 min，得到分散均匀的 GO 分散液（质量浓度为 1 mg • mL $^{-1}$）。将上述制得的 PB 分散液和 GO 分散液按体积比 1∶10 进行混合，超声分散 30 min，即得 PB/GO 复合材料分散液。

2.3 PB/ErGO 复合修饰电极制备

分别使用 0.3 μm 和 0.05 μm Al_2O_3 抛光粉将玻碳电极（GCE）[高仕睿联（天津）光电科技有限公司] 表面抛光至镜面，然后将电极分别置于超纯水、无水乙醇、超纯水中超声 1 min，并置于红外灯下干燥备用。采用滴涂法制备 PB/GO/GCE，再经电化学还原法将 GO 还原即可制得 PB/ErGO/GCE。具体制备方法如下：用移液枪移取 5 μL PB/GO 分散液，滴涂于 GCE 表面，置于红外灯下干燥，即得 PB/GO/GCE。采用恒电位法还原，将 PB/GO/GCE 在－ 1.5 V 还原电位还原 120 s，即可制得 PB/ErGO/GCE。

2.4 电化学测量

所有电化学实验均在 CHI 660E 电化学工作站（上海辰华）进行。电化学测试采用标准三电极体系，以裸电极或修饰电极为工作电极，铂电极为对电极，饱和甘汞电极为参比电极。采用循

环伏安法和电化学阻抗谱表征 PB/ErGO/GCE 的电化学性能。采用差分脉冲伏安法（differential pulse voltammetry，DPV）定量检测人血清中多巴胺的含量。

3　结果与讨论

3.1　形貌及微观结构表征

图 1 为 PB、GO 及 PB/GO 的扫描电镜图谱。PB 呈现分散且均匀的花状结构，直径在 500 ～ 800 nm（见图 1A）。GO 呈薄层弯曲绵延起伏状态，表面具有褶皱结构（见图 1B）。图 1C 可以清楚地看到 GO 絮状薄层覆盖包裹 PB，表明成功合成了 PB/GO。

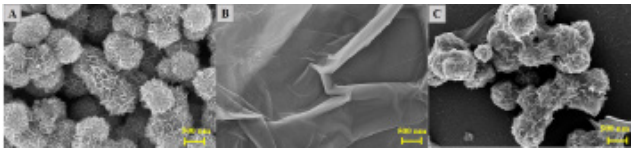


图 1　PB（A）、GO（B）及 PB/GO（C）的扫描电镜图谱

Fig 1　Scanning electron microscopy images of PB（A），GO（B），and PB/GO composites（C）

图 2为 PB、GO 及 PB/GO 的 X- 射线粉末衍射图谱。GO 在 2θ 为 9.82°　处出现明显的衍射峰，这归属于（001）晶面。PB 在 2θ 为 17.49°　、24.87°　、35.50°　、39.66°　、43.80°　、50.79°　、54.18°　、57.49°　处出现明显的衍射峰，分别对应（200）、（220）、（400）、（420）、（422）、（440）、（600）和（620）晶面，与 PB 标准卡（JCPDS NO.73-0687）吻合。PB/GO 的 X- 射线粉末衍射图谱中可以清楚地看到 GO 和 PB 的特征衍射峰，表明 PB/GO 复合材料成功合成，PB/GO 复合材料中 PB 的特征衍射峰变弱，这主要是由于 PB 与 GO 的质量比为 1∶10，大量存在的 GO 部分掩盖了 PB 的特征衍射峰所致。

3.2　电化学性能表征

图 3A 为 GCE、ErGO/GCE、PB/GCE 和 PB-ErGO/GCE 在 5 mmol • L^{-1} $K_3Fe(CN)_6$、$K_4Fe(CN)_6$ 和 0.1 mol • L^{-1} KCl 混合液中的循环伏安曲线。GCE、ErGO/GCE、PB/GCE 和 PB/ErGO/GCE 的还原峰电流值依次增加，分别为 95.34、140.6、146.2、175.2 μA。根据 Randles-Sevcik 方程，可计算 GCE、PB/GCE、ErGO/GCE 和 PB/ErGO/GCE 的电化学活性面积分别为 0.0814、0.125、0.119、0.149 cm^2。PB/ErGO/GCE 表面活性面积最大，能为多巴胺的电化学氧化提供更多的吸附位点和催化活性位点。此外，还检测了不同电极在 5 mmol • L^{-1} $K_3Fe(CN)_6$、$K_4Fe(CN)_6$ 和 0.1 mol • L^{-1} KCl 混合液中的电化学阻抗谱，见图

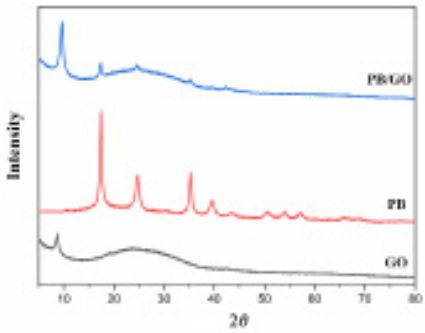


图 2　PB、GO 及 PB/GO 的 X- 射线粉末衍射图谱

Fig 2　X-ray powder diffraction patterns of PB，GO，and PB/GO composites

3B。从图中可以看，所有电极的阻抗谱均由半圆和直线组成。高频区的半圆部分受电子传输控制，其直径相当于电极表面的电子转移阻抗（R_{ct}）；低频区的直线部分受扩散控制。显然，裸电极的半圆最大，R_{ct} 最大。修饰 PB 或 ErGO 后，电极的 R_{ct} 显著降低。PB/ErGO/GCE 的半圆半径最小，R_{ct} 最低，表明 PB/ErGO 能显著降低电子在多巴胺与电极表面之间的传输阻力，从而提高 PB/ErGO 的电化学传感性能。

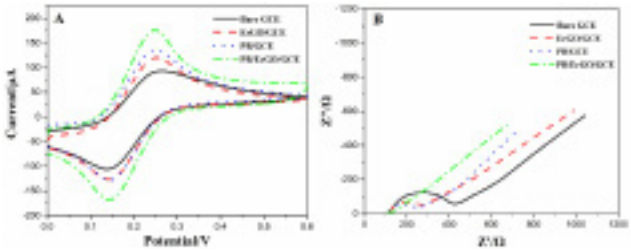


图 3　不同电极在 5 mmol • L^{-1} $K_3Fe(CN)_6$、$K_4Fe(CN)_6$（1∶1）和 0.1 mol • L^{-1} KCl 混合溶液中的循环伏安曲线（A）和电化学阻抗谱（B）

Fig 3　Cyclic voltammetry（A）and electrochemical impedance spectroscopy（B）of different electrodes in a mixed solution of 5 mmol • L^{-1} $K_3Fe(CN)_6$，$K_4Fe(CN)_6$（1∶1）and 0.1 mol • L^{-1} KCl

3.3　多巴胺在修饰电极上的电化学行为

图 4 为 1.0 μmol • L^{-1} 多巴胺在不同电极上的 DPV 曲线。多巴胺在裸电极上的阳极峰非常微弱，响应峰电流最小（i_{pa} = 0.398 mA）。在 PB/GCE 上，多巴胺的阳极峰电流显著增大，约为裸电极的 8 倍（i_{pa} = 3.139 mA），这主要是由于 PB 对多巴胺具有优异的催化性能。在 ErGO/GCE 上，多巴胺的阳极峰电流约为裸电极的 12 倍（i_{pa} = 4.916 mA），这主要是由于 ErGO 具有高的比表面积和优异的导电性等性能，有效增强了电化学活性面积，降低了电子传输阻力。而且 ErGO 与多巴胺的 π-π 相互作用进一步增强了多巴胺在电极表面的吸附能力。在 PB/ErGO/GCE 上，多巴胺的响应峰电

流高达 21.29 mA，约为裸电极的 53 倍，表明 PB 和 ErGO 对多巴胺的氧化具有协同催化效应。

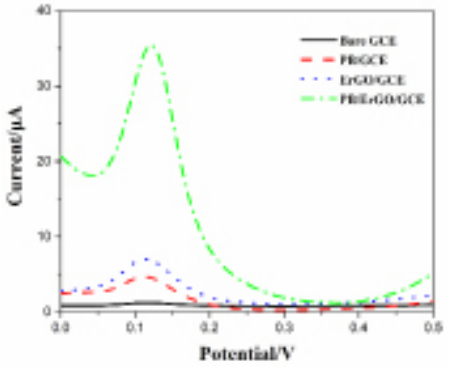


图 4 1.0 μmol • L^{-1} 多巴胺在不同电极上的 DPV 曲线

Fig 4 DPV curve for 1.0 μmol • L^{-1} dopamine recorded at various electrodes

3.4 多巴胺测定条件优化

3.4.1 富集条件优化 首先检测了富集时间对多巴胺阳极响应峰电流的影响。如图 5A 所示，随着富集时间的不断延长，多巴胺阳极峰电流逐渐增大；富集时间为 240 s 时，多巴胺阳极峰电流最大；继续延长富集时间，多巴胺阳极峰电流基本不变，表明多巴胺在 PB/ErGO/GCE 表面吸附达到饱和，故最佳富集时间为 240 s。在最佳富集时间 240 s 下，进一步检测富集电位对多巴胺阳极峰电流的影响。如图 5B 所示，当富集电位从－0.3V 正移至 0 V，多巴胺阳极峰电流不断增大；当富集电位进一步正移，多巴胺阳极峰电流反而下降，故最佳富集电位为 0 V。

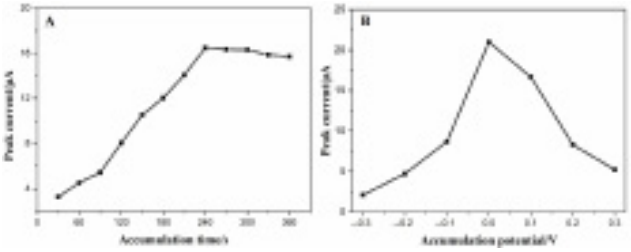


图 5 富集时间（A）和富集电位（B）对 1.0 μmol • L^{-1} 多巴胺阳极峰电流的影响

Fig 5 Effect of accumulation time（A）and accumulation potential（B）on the anodic peak current of 1.0 μmol • L^{-1} dopamine

3.4.2 底液 pH 优化 图 6A 为多巴胺在底液 pH 3.0 ～ 8.0 的 DPV 曲线，随着底液 pH 不断增大，多巴胺的阳极峰不断往负电位方向移动，表明质子（H^+）参与多巴胺的电化学氧化过程。当底液 pH 从 3.0 增加 7.0，多巴胺阳极峰电流随 pH 增大而增大；当底液 pH 大于 7.0，继续增大 pH，多巴胺阳极峰电流却降低（见图 6B）。因此，最适底液 pH 为 7.0，接近于生物体液的 pH，有利于血清、尿液等生物样本的检测。多巴胺阳极峰电位（E_{pa}）与底液 pH 呈良好的线性关系（见图 6C），线性回归方程为 E_{pa}（V）＝－ 0.481pH ＋ 0.535（R^2 ＝ 0.9972）。该方程的斜率接近于能斯特方程理论值（－ 0.0592 V/pH），表明多巴胺在 PB/ErGO/GCE 的电化学氧化过程为等电子等质子过程。

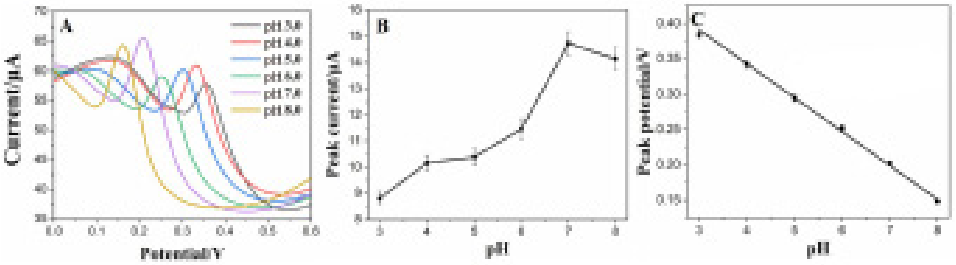


图 6 不同底液 pH 下多巴胺在 PB/ErGO/GCE 的 DPV 曲线（A）及多巴胺阳极峰电流（B）、峰电位与 pH 关系（C）图

Fig 6 DPV curve of dopamine in different pH buffer solution（A）and relationship between pH and anodic peak current（B）or peak potential（C）of dopamine

3.4.3 扫速优化 为了探究多巴胺在 PB/ErGO/GCE 的氧化机制，记录了不同扫速下多巴胺的循环伏安曲线。如图 7A，随着扫速的增加，阳极峰电流（i_{pa}）和阴极峰电流（i_{pc}）均增大。i_{pa}、i_{pc} 均与扫速（v）呈良好的线性关系，表明多巴胺在 PB/ErGO/GCE 上主要受吸附控制。而且多巴胺的阳极峰电位（E_{pa}）随着扫速的增加向正电位方向移动，阴极峰电位（E_{pc}）则负移。E_{pa}、E_{pc} 均与扫速的自然对数（ln$v$）呈良好的线性关系，线性回归方程分别为 E_{pa} ＝ 0.0228ln$v$ ＋ 0.245（R^2 ＝ 0.9821）和 E_{pc} ＝ 0.0119ln$v$ ＋ 0.098（R^2 ＝ 0.9883）。对于吸附控制的准可逆过程，结合 Lavrion[19] 方程可计算电子转移数（n）约为 2.0。因此，多巴胺在 PB/ErGO/GCE 的氧化为 2 电子 2 质子转移过程，其机制如图 8 所示。

3.5 线性范围和检出限

在最佳检测条件下，采用 DPV 对多巴胺进行定量测定。如图 9A 所示，多巴胺浓度为 0.5 ～ 50 μmol • L^{-1} 时，随着多巴胺浓度的增加，多巴胺阳极峰电流（i_{pa}）随浓度（C）的增加

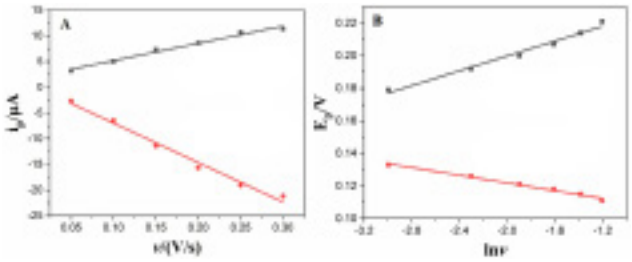


图 7　多巴胺峰电流（A）及峰电位（B）与扫速的线性关系图

Fig 7　Linearity between the peak current（A）and peak potential（B）of dopamine and napierian logarithm of scanning rate

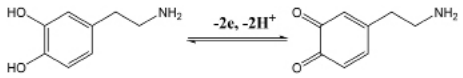


图 8　多巴胺在 PB/ErGO/GCE 上的电化学氧化还原机制

Fig 8　Electrochemical redox mechanism of dopamine on PB/ErGO/GCE

而不断增大。而且多巴胺阳极峰电流与浓度的自然对数呈良好的线性关系（见图 9B），其线性回归方程可表示 i_{pa}（μA）＝16.30ln$C$＋22.40（R^2＝0.9963）。检出限为 0.06 μmol・L^{-1}。PB/ErGO/GCE 的传感性能与文献报道[20-24]的修饰电极相当（见表 1），表明该电极具有较大的应用前景。

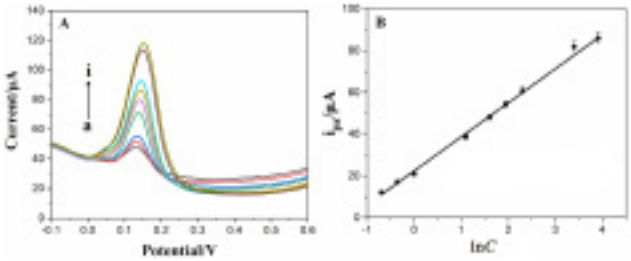


图 9　不同浓度多巴胺在 PB/ErGO/GCE 上的 DPV 曲线（A）及多巴胺阳极峰电流与浓度自然对数的线性关系图（B）

Fig 9　DPV curve of different concentration dopamine at PB/ErGO/GCE（A）and linearity between anodic peak current of dopamine and napierian logarithm of their concentration（B）

a→i：0.5、0.7、1、3、5、7、10、30、50 μmol・L^{-1}。

表 1　PB/ErGO/GCE 的传感性能与文献报道比较

Tab 1　Sensing performance between the PB/ErGO/GCE and previously reported electrodes

修饰电极	检测方法	线性范围 /（μmol・L^{-1}）	检出限 /（μmol・L^{-1}）	参考文献
MnO_2 / 壳聚糖复合修饰金电极	计时电流法	0.10 ～ 12.0	0.04	[20]
ZnO 修饰碳浆电极	差分脉冲伏安法	0.1 ～ 20	0.03	[21]
Cu_2O/ 石墨烯复合修饰玻碳电极	循环伏安法	0.3 ～ 1.4；2 ～ 20	0.055	[22]
Mn_3O_4 修饰石墨电极	差分脉冲伏安法	10 ～ 70	0.1	[23]
多壁碳纳米管 /Fe_2O_3 复合修饰石墨电极	方波脉冲伏安法	3.2 ～ 31.8	0.36	[24]
PB/ErGO/GCE	差分脉冲伏安法	0.5 ～ 50	0.06	本文

3.6　重复性、再现性和选择性

为考察电极的重复性，同一电极 PB/ErGO/GCE 连续 7 次测量 1 μmol・L^{-1} 多巴胺的响应峰电流，结果相对标准偏差（*RSD*）为 5.6%，表明 PB/ErGO/GCE 具有良好的重复性。为考察电极的再现性，采用相同方法制备的 5 根 PB/ErGO/GCE 平行测量 1 μmol・L^{-1} 多巴胺的响应峰电流，其 *RSD* 为 3.2%，表明该修饰电极具有优异的再现性。尿酸、抗坏血酸常与多巴胺共存于血清等生物体液中，且它们的氧化峰电位相近，容易对多巴胺的检测产生干扰。为考察 PB/ErGO/GCE 的选择性，分别测定 1 μmol・L^{-1} 多巴胺在 100 倍浓度的尿酸与抗坏血酸共存下的响应峰电流，实验结果表明，在 100 倍浓度尿酸与抗坏血酸共存下，相对误差均低于 5.0%，表明 PB/ErGO/GCE 具有优异的选择性。

3.7　实际样品检测

使用 PB/ErGO/GCE 检测人血清中的多巴胺浓度以验证修饰电极的实用性。将 4 份人血清样品用 0.1 μmol・L^{-1} PBS（pH ＝ 7.0）稀释 10 倍，得到待测的人血清样品。采用 DPV 定量测定人血清样品中多巴胺浓度，检测结果见表 2。1 号血清样品多巴胺浓度为 0.64 μmol・L^{-1}。2 ～ 4 号人血清样品均未出现多巴胺响应峰电流，表明未检出多巴胺。加标回收试验中的回收率为 95.5% ～ 100.6%，表明 PB/ErGO/GCE 能精确检测实际样品中多巴胺的浓度。

表 2　人血清中多巴胺浓度测定 (n ＝ 3)

Tab 2　Detection of dopamine concentration in human serum samples (n ＝ 3)

样品	浓度 /（μmol・L^{-1}）	加入量 /（μmol・L^{-1}）	回收量 /（μmol・L^{-1}）	回收率 /%	*RSD*/ %
血清 1	0.64	0.50	1.120	96.0	4.9
血清 2	未检出	1.0	1.006	100.6	3.3
血清 3	未检出	5.0	4.776	95.5	2.4
血清 4	未检出	10	9.875	98.8	1.0

4　结论

本文制备了一种基于 PB/ErGO 复合纳米材料的多巴胺电化学传感器，成功实现了人血清中多巴胺浓度的检测。PB/ErGO 显著增大了多巴胺的电化学活性面积，促进了电子在电极表面与多巴胺之间的传递。PB/ErGO 对多巴胺的电化学氧化表现出明显的协同增敏效应，极大地提高了多巴胺的电化学响应。PB/ErGO/GCE 对多巴胺表

现出优异的传感性能，动态响应范围为 0.5 ～ 50 μmol • L^{-1}，检出限为 0.06 μmol • L^{-1}。PB/ErGO/GCE 能准确检测人血清中多巴胺的含量，回收率为 95.5% ～ 100.6%。鉴于其具有低成本，高灵敏度，优异的重复性、再现性和稳定性等优点，PB/ErGO/GCE 在生物样品中多巴胺的痕量检测上具有实际应用前景。

参考文献

[1] Li L，Liu H，Shen Y，et al. Electrogenerated chemiluminescence of Au nanoclusters for the detection of dopamine [J]. Anal Chem，2011，83（3）：661-665.

[2] Wang H Y，Sun Y，Tang B. Study on fluorescence property of dopamine and determination of dopamine by fluorimetry [J]. Talanta，2002，57（5）：899-907.

[3] Carrera V，Sabater E，Vilanova E，et al. A simple and rapid HPLC-MS method for the simultaneous determination of epinephrine，norepinephrine，dopamine and 5-hydroxytryptamine：application to the secretion of bovine chromaffin cell cultures [J]. J Chromatogr B，2007，847（2）：88-94.

[4] Guan CL，Ouyang J，Li QL，et al. Simultaneous determination of catecholamines by ion chromatography with direct conductivity detection [J]. Talanta，2000，50（6）：1197-1203.

[5] Chen L，Lu L，Mo Y，et al. Electrogenerated chemiluminescence of anatase TiO_2 nanotubes film [J]. Talanta，2011，85（1）：56-62.

[6] Li Q，Xia Y，Wan X，et al. Morphology-dependent MnO_2/nitrogen-doped graphene nanocomposites for simultaneous detection of trace dopamine and uric acid [J]. Mater Sci Eng C，2020，109：110615.

[7] Li Q，Wu JT，Liu Y，et al. Recent advances in black phosphorus-based electrochemical sensors：a review [J]. Anal Chim Acta，2021，1170：338480.

[8] 孙瑶 . 2- 氨基酚在预阳极化碳糊电极的电化学行为及其含量测定 [J]. 中南药学，2020，18（5）：853-856.

[9] 李冲，贾丽萍，马荣娜，等 . 聚乙烯亚胺功能化石墨烯修饰电极同时测定抗坏血酸、多巴胺、尿酸和色氨酸 [J]. 高等学校化学学报，2015，36（7）：1282-1290.

[10] 张雷，林祥钦 . 单分子层 γ- 氨基丁酸共价修饰玻碳电极同时测定多巴胺、尿酸和抗坏血酸 [J]. 高等学校化学学报，2003，24（4）：591-594.

[11] Ulubay Ş，Dursun Z. Cu nanoparticles incorporated polypyrrole modified GCE for sensitive simultaneous determination of dopamine and uric acid [J]. Talanta，2010，80（3）：1461-1466.

[12] Bi H，Li Y，Liu S，et al. Carbon-nanotube-modified glassy carbon electrode for simultaneous determination of dopamine，ascorbic acid and uric acid：the effect of functional groups [J]. Sens Actuators B Chem，2012，171：1132-1140.

[13] Yang S，Li G，Yin Y，et al. Nano-sized copper oxide/multi-wall carbon nanotube/Nafion modified electrode for sensitive detection of dopamine [J]. J Electroanal Chem，2013，703：45-51.

[14] Liu M，Chen Q，Lai C，et al. A double signal amplification platform for ultrasensitive and simultaneous detection of ascorbic acid，dopamine，uric acid and acetaminophen based on a nanocomposite of ferrocene thiolate stabilized Fe_3O_4@ Au nanoparticles with graphene sheet [J]. Biosens Bioelectron，2013，48：75-81.

[15] Lian Q，He Z，He Q，et al. Simultaneous determination of ascorbic acid，dopamine and uric acid based on tryptophan functionalized graphene [J]. Anal Chim Acta，2014，823：32-39.

[16] Wu D，Li Y，Zhang Y，et al. Sensitive electrochemical sensor for simultaneous determination of dopamine，ascorbic acid，and uric acid enhanced by amino-group functionalized mesoporous Fe_3O_4@graphene sheets [J]. Electrochim Acta，2014，116：244-249.

[17] Eryigit M，Temur E，Ozer TO，et al. Electrochemical fabrication of Prussian blue nanocube-decorated electroreduced graphene oxide for amperometric sensing of NADH [J]. Electroanalysis，2019，31（2）：1-9.

[18] Li J，Jiang J，Zhao D，et al. Novel hierarchical sea urchin-like Prussian blue@palladium core-shell heterostructures supported on nitrogen-doped reduced graphene oxide：facile synthesis and excellent guanine sensing performance [J]. Electrochim Acta，2020，330：135196.

[19] Laviron E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems [J]. J Electroanal Chem Interfacial Electrochem，1979，101（1）：19-28.

[20] Huang Y，Cheng C，Tian X，et al. Low-potential amperometric detection of dopamine based on MnO_2 nanowires/chitosan modified gold electrode [J]. Electrochim Acta，2013，89：832-839.

[21] Reddy S，Swamy BEK，Chandrashekar BN，et al. Cationic surfactants-assisted synthesis of ZnO nanoparticles and their modified carbon paste electrode for electrochemical investigation of dopamine [J]. Anal Bioanal Electrochem，2012，4（2）：186-196.

[22] Zhang F，Li Y，Gu Y，et al. One-pot solvothermal synthesis of a Cu_2O/graphene nanocomposite and its application in an electrochemical sensor for dopamine [J]. Microchim Acta，2011，173（1-2）：103-109.

[23] Gao W，Ye S，Shao M. Solution-combusting preparation of mono-dispersed Mn_3O_4 nanoparticles for electrochemical applications [J]. J Phys Chem Solid，2011，72（9）：1027-1031.

[24] Adekunle AS，Agboola BO，Pillay J，et al. Electrocatalytic detection of dopamine at single-walled carbon nanotubes-iron（Ⅲ）oxide nanoparticles platform [J]. Sens Actuators B Chem，2010，148（1）：93-102.

（收稿日期：2022-01-05；修回日期：2022-02-10）

青紫颗粒对 Arthus 反应动物模型皮肤损害的保护作用及机制研究

丰晨然[1]，赵一颖[1]，苗丰[1]，董琳琳[1]，畅洪昇[1]，张艳菊[2]，靳钰媛[1]，尹纪元[1]，藏晨晨[1]，孙文燕[1*]，王晓玲[2*]（1.北京中医药大学中药学院中药药理系，北京　102488；2. 国家儿童医学中心 首都医科大学附属北京儿童医院，北京 100045）

摘要：目的　观察青紫颗粒对 Arthus 反应大鼠、兔皮肤损伤的保护作用并探讨其作用机制。**方法**　通过肌内注射卵蛋白 - 弗氏完全或不完全佐剂，皮内注射 1% 卵蛋白溶液，复制 Arthus 反应大鼠和家兔模型。采用卵蛋白 - 弗氏完全佐剂致敏，1% 卵蛋白溶液攻击，复制 Arthus 反应兔模型。观察抗原攻击后皮肤反应程度、局部红肿斑点最大直径，检测血清 IgA、IgG、CIC 等指标的含量，并观察皮肤病理改变。**结果**　在抗原攻击后 4 h，青紫颗粒低剂量可减小大鼠背部斑点直径；抗原攻击后 24 h，中、高剂量可减小背部斑点直径，中剂量可减轻皮肤反应程度。青紫颗粒各剂量可降低大鼠血清 IgA、IgG、NO 含量；中、高剂量可降低 CIC 含量；高剂量可降低血清 IL-6、TNF-α 含量。青紫颗粒各剂量可减轻大鼠皮肤组织静脉血管淤血扩张、出血情况。在抗原攻击后 2、3、4、5 h，青紫颗粒高剂量可减小兔背部皮肤斑点直径；高、低剂量可减轻皮肤反应程度。青紫颗粒中剂量可降低兔血清 IgG 含量，中、低剂量组可降低血清 CIC 含量。青紫颗粒各剂量组均可减轻兔皮肤血管扩张，低剂量组可缓解皮肤水肿。**结论**　青紫颗粒对 Arthus 反应动物模型皮肤损害具有一定保护作用，该作用可能与其降低血清 IgA、IgG、CIC、IL-6、TNF-α、NO 水平有关。

关键词：青紫颗粒；过敏性紫癜；Arthus 反应；皮肤损伤；免疫球蛋白；循环免疫复合物
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0785-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.010

Protect effect of Qingzi granules on skin damage in animal models with Arthus response and related mechanism of action

FENG Chen-ran[1], ZHAO Yi-ying[1], MIAO Feng[1], DONG Lin-lin[1], CHANG Hong-sheng[1], ZHANG Yan-ju[2], JIN Yu-yuan[1], YIN Ji-yuan[1], ZANG Chen-chen[1], SUN Wen-yan[1*], WANG Xiao-ling[2*] (1. *Department of Chinese Materia Medica Pharmacology*, *School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488; 2. *National Children's Medical Center*, *Beijing Children's Hospital Affiliated to Capital Medical University*, *Beijing* 100045)

Abstract: Objective To determine the protect effect of Qingzi granules on skin damage in rats and rabbits with Arthus response and related mechanism of action. **Methods** The Arthus response rat and rabbit model was established by intramuscular injection of ovalbumin-Freund complete or incomplete adjuvant and intradermal injection of 1% ovalbumin solution. The degree of skin reaction at different time points after the antigen attack was observed, and the maximum diameter of swelling and the serum levels of IgA, IgG, CIC, and so on were detected, and the skin pathological changes were examined. **Results** Qingzi granules low-dose decreased the diameter of the back swollen spots at 4 h after antigen attack in rats. Qingzi granules at middle and high-dose significantly decreased the diameter of the back swollen spots at 24 h after the antigen attack. Qingzi granules at middle dose

基金项目：重大新药创制科技重大专项项目（No.2018ZX09721003-002-001）。
作者简介：丰晨然，女，硕士研究生，主要从事中药抗炎与免疫药理学研究，email：438731543@qq.com　*通信作者：孙文燕，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事中药防治免疫性疾病的药理学研究及中药毒理学研究，email：sunwy@bucm.edu.cn；王晓玲，女，主任药师，副教授，硕士研究生导师，主要从事临床药学及临床药理研究，email：wangxiaoling@bch.com.cn

reduced the skin reaction. All doses of Qingzi granules lowered the serum levels of IgA, IgG and NO in rats; Qingzi granules middle and high-dose decreased the serum level of CIC; while high-dose decreased the serum levels of IL-6 and TNF-*α*. All doses of Qingzi granules alleviated the nuclear fragmentation, venous congestion, vasodilation and expansion, and hemorrhage in rats. At 2, 3, 4, and 5 hours after the antigen attack, Qingzi granules high-dose decreased the diameter of swollen spots on the back in rabbits; while high and low-dose reduced the skin reaction. Qingzi granules middle-dose lowered the serum IgG level in rabbits, and middle and low-dose decreased the serum CIC content. All doses of Qingzi granules alleviated the skin vasodilation, and low-dose Qingzi granules relieved the skin edema in rabbits. **Conclusion** Qingzi granules can alleviate the skin damage in rats and rabbits with Arthus response, and its mechanism of action may be related to reducing the levels of IgA, IgG, CIC, IL-6, TNF-*α* and NO.

Key words: Qingzi granule; Henoch-Schonlein purpura; Arthus response; skin damage; immunoglobulin; circulating immunocomplex

过敏性紫癜（Henoch-Schonlein purpura，HSP）是一种侵犯皮肤及其他器官细小动脉和毛细血管的过敏性血管炎。该病临床自发性皮肤症状在一定程度上是血管性变态反应的外在表现[1]。Arthus反应属于Ⅲ型变态反应，由免疫球蛋白A（IgA）、免疫球蛋白M（IgM）、免疫球蛋白G（IgG）介导，其形成需抗原的持续存在；抗原与相应的抗体结合形成免疫复合物，在一定条件下沉积全身或局部血管壁基底膜、组织间隙，通过激活补体、中性粒细胞或血小板，造成沉积部位炎症的产生[2]；兔、大鼠、豚鼠均可发生Arthus反应[3]。青紫合剂是北京儿童医院院内制剂，由“青紫汤”经加减化裁而来，具有祛风解毒、凉血消斑的功效。方中君药青黛清热解毒，凉血消斑；紫草气味苦寒，而色紫入血，故清理血分之热。臣药白芷解表散风，通窍止痛，消肿排脓；丹参活血，凉血消痈。佐使药绵马贯众清热解毒；北寒水石清热泻火，利窍消肿；茵陈清热利湿；威灵仙可祛风湿，通经络。青紫颗粒是青紫合剂经改剂型制备的颗粒剂。前期研究表明青紫颗粒对卵蛋白所致大鼠肾损伤有保护作用[4]，本研究通过建立以皮肤为主的HSP模型，探究青紫颗粒对皮肤损害的干预作用。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠，4周龄，雌雄各半，雄性体质量90～140 g，雌性体质量90～115 g [维通利华（北京）实验动物技术有限公司，许可证号为SCXK（京）2016-0006]。普通级日本大耳白兔，雌雄各半，体质量1.7～2 kg [昌扬西山养殖场（北京）实验动物技术有限公司，许可证号为SCXK（京）2016-0007]。实验动物饲养于SPF级动物房，实验前适应性饲养7 d，实验期间保持环境相对湿度约为42%，温度为24 ℃，光照/黑暗周期为12 h。

1.2 试药

青紫颗粒（由青黛、紫草、茵陈、丹参、白芷、北寒水石、威灵仙、茵陈、绵马贯众组成，北京中医药大学中药制药系提供，1 g相当于生药2.5 g，4～6岁儿童日用量为37.8 g生药）；青紫合剂（首都医科大学附属北京儿童医院提供，1 mL含生药0.89 g，2～6岁儿童日用量为53.4 g生药，批号：20201001）；醋酸地塞米松片（新乡市常乐制药有限责任公司，批号：1911056）；芦丁片（山西云鹏制药有限公司，批号：D180702）；卵蛋白（百诺威生物科技有限公司，批号：RH42844）；弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂（Sigma，批号：1002749695）；循环免疫复合物（CIC）、IgA、IgG、一氧化氮（NO）测定试剂盒及白介素6（IL-6）、肿瘤坏死因子*α*（TNF-*α*）放免试剂盒（北京华英生物技术研究所，批号：50087，HY-756，10105，HY-10116，HY-60018）。

1.3 仪器

白光/偏振光/荧光显微镜（日本NIKON公司）；扫描仪（3D HISTECH Pannoramic，匈牙利）；激光共聚焦拍照软件（Eclipse C2，Nikon，Tokyo，日本）；3D扫描分析软件（3D HISTECH Quant center）；图像分析软件（Image-Pro Plus 6.0）；莱卡全自动脱水机（ASP200S）；莱卡自动包埋机（EG1150C）；莱卡半自动石蜡切片机（RM2245）；莱卡自动染色封片工作站（LEICA AUTO STAINER XL）；莱卡脱水机（LEICA ASP300）；全自动放免计数仪（西安核仪器厂XH-6020）；全波长酶标仪（Bio Tek Epoch）。

2　方法

2.1　青紫颗粒对大鼠 Arthus 反应的干预作用

2.1.1　模型的建立与分组给药　SPF 级 SD 大鼠，雌雄各半，随机分为正常组，模型组，地塞米松组，芦丁片组，青紫颗粒高、中、低剂量组。参照《药理实验方法学》[5] 配制卵蛋白 - 弗氏不完全佐剂和卵蛋白 - 弗氏完全佐剂：卵蛋白溶于生理盐水配制为 0.5 g • L^{-1} 的溶液，与等量弗氏完全佐剂混悬制成卵蛋白 - 弗氏完全佐剂，与等量弗氏不完全佐剂混悬制成卵蛋白 - 弗氏不完全佐剂。

大鼠前 3 周肌内注射卵蛋白 - 弗氏完全佐剂，后 3 周注射卵蛋白 - 弗氏不完全佐剂，每只 0.5 mL，每周 1 次，正常组注射等量生理盐水。末次致敏当日按照正常组，模型组，地塞米松组（0.55 mg • kg^{-1}），芦丁片组（12.05 mg • kg^{-1}），青紫颗粒高（18.32 g • kg^{-1}）、中（9.16 g • kg^{-1}）、低（4.58 g•kg^{-1}）剂量组给药，每组 12 只。按 4 ～ 6 岁儿童临床用量计算等效剂量。青紫颗粒等效剂量设为中剂量，2 倍量为高剂量，1/2 量为低剂量。均灌胃给药，连续给药 14 d，正常组、模型组给予等量溶媒。给药第 13 日背部备皮，第 14 日给药 1 h 后进行抗原攻击，于背部皮内注射 1% 卵蛋白溶液（生理盐水配制），每点注射量为 0.2 mL，共 3 点，正常组于背部皮内注射等量的生理盐水。

2.1.2　皮肤反应观察　抗原攻击后 2、4、6、8、24 h 观察每点局部红肿斑点的最大直径，求其平均值。反应的程度分级根据 Bena-cerraf 氏标准分级 [5]：“＋＋＋”表示 2 h 或 5 h 明显充血、出血，呈融合状，24 h 明显出血性变色；“＋＋”表示 2 h 或 5 h 中度充血出血，呈斑块状，24 h 中度出血性变色；“＋”表示 2 h 或 5 h 轻度充血、出血，24 h 轻度出血性变色；“－”表示 2 h 或 24 h 无反应，各组综合评分为每组样本平均反应程度的平均值。

2.1.3　血清中 IgA、IgG、CIC、IL-6、TNF-α、NO 的含量检测　大鼠腹主动脉取血，3000 r • min^{-1} 离心 10 min，收集血清，－ 80 ℃保存。按试剂盒说明书，散射比浊法检测血清 IgA、IgG、CIC 含量，放射免疫法检测血清 IL-6、TNF-α 含量，硝酸还原酶法检测血清 NO 含量。

2.1.4　皮肤组织病理学观察　大鼠皮肤 10% 多聚甲醛固定，石蜡包埋，常规切片，HE 染色，在光镜下观察皮肤组织病理学改变。

2.2　青紫颗粒对兔 Arthus 反应的干预作用

2.2.1　模型的建立与分组给药　普通级日本大耳白兔，雌雄各半，随机分为正常组，模型组，地塞米松组（0.263 mg • kg^{-1}），芦丁片组（5.78 mg • kg^{-1}），青紫颗粒高（8.79 g • kg^{-1}）、中（4.39 g • kg^{-1}）、低（2.20 g • kg^{-1}）剂量组，青紫合剂组（6.98 mL • kg^{-1}）。参照《药理实验方法学》[5]，将卵蛋白溶于生理盐水，配制成 20 mg • mL^{-1} 的卵蛋白溶液，按卵蛋白和弗氏完全佐剂 1∶1 的比例用注射器双推法完全乳化。每只兔每周肌内注射 1 mL 卵蛋白 - 弗氏完全佐剂，正常组注射等量生理盐水，共 4 次。末次致敏当日按各自剂量给药。按 4 ～ 6 岁儿童临床用量计算家兔等效剂量。青紫颗粒等效剂量设为中剂量，取 2 倍量为高剂量，1/2 量为低剂量。分别灌胃给药，连续给药 10 d，正常组与模型组给予等量溶媒。各组于给药第 9 日背部备皮，第 10 日给药后 1 h 后进行抗原攻击，于背部皮内注射生理盐水配制的 1% 卵蛋白溶液，每点注射量为 0.2 mL，共 5 点，正常组注射等量生理盐水。

2.2.2　皮肤反应观察　抗原攻击后 2、3、4、5、8、12、24 h 观察每点局部红肿斑点情况，并测量每个斑点的最大直径。反应的程度分级见“2.1.2”。

2.2.3　兔血清 IgA、IgG、CIC 检测　兔心脏取血，3000 r • min^{-1} 离心 10 min，取血清，按试剂盒说明书采用散射比浊法检测血清 IgA、IgG、CIC 的含量。

2.2.4　皮肤组织病理学观察　取兔皮肤，用 10% 多聚甲醛固定，石蜡包埋，沿着斑点直径切片，HE 染色，光镜下观察病理改变。

2.3　统计学方法

所有数据以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用 SPSS 20.0 统计软件处理。若各组数据服从正态分布且方差齐，采用单因素方差分析，两组比较采用 q 检验；若不服从正态分布或方差不齐，采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。背部皮肤反应程度评级采用 Ridit 分析。

3　结果

3.1　青紫颗粒对大鼠 Arthus 反应的干预作用

3.1.1　对 Arthus 反应大鼠背部红肿斑点直径、皮肤反应程度的影响　抗原攻击后 2 h，各组大鼠背部均未出现红肿现象。抗原攻击后 4 h，青紫颗粒低剂量组、地塞米松组、芦丁片组大鼠背部斑点直径小于模型组（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。抗原攻击后 6 h，模型组斑点颜色加深，但局部斑点直径变小；与模型组相比，青紫颗粒各剂量组红肿程度降低，地塞米松组、芦丁片组红肿直径明显小于模型组（$P < 0.01$）。抗原攻击后 8 h，模型组斑点颜色持续加深，呈中度出血性变色，各组局部斑点直径增加，地塞米松组、芦丁片组大鼠斑点直径小于模型组（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。抗原攻击后 24 h，模型组呈中度出血性变色，各给药组呈轻度出

血性变色，青紫颗粒中、高剂量组，地塞米松组，芦丁片组斑点直径明显小于模型组（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$），结果见表1。模型组2 h或5 h中度充血、出血，呈斑块状；24 h中度出血性变色。各给药组2 h或5 h轻度充血、出血，24 h轻度出血性变色，反应程度等级较模型组低，其中青紫颗粒中剂量组、地塞米松组反应程度轻于模型组（$P < 0.05$）。结果见表2，24 h皮肤斑点见图1。

表 1 青紫颗粒对 Arthus 反应大鼠局部斑点直径的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effect of Qingzi granules on the diameter of the swollen spots on the back in the rats with Arthus response ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量	不同时间点斑点直径 /mm				
			2 h	4 h	6 h	8 h	24 h
模型组	11	—	—	8.04±2.59	7.55±2.58	8.10±2.61	6.33±1.58
地塞米松组	11	0.55 mg • kg^{-1}	—	3.64±2.89**	3.22±3.17**	3.10±3.07**	0.57±1.06**
芦丁片组	11	12.05 mg • kg^{-1}	—	2.53±2.54**	2.21±2.60**	2.25±2.55**	1.45±1.37**
青紫颗粒高剂量组	11	18.32 g • kg^{-1}	—	7.66±2.53	7.14±3.15	7.25±3.20	2.23±2.06**
青紫颗粒中剂量组	11	9.16 g • kg^{-1}	—	6.45±2.16	6.54±2.18	6.20±2.09	3.23±2.44*
青紫颗粒低剂量组	11	4.58 g • kg^{-1}	—	4.62±2.13*	4.57±2.88	5.93±2.68	5.66±3.77

注：与模型组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

表 2 青紫颗粒对 Arthus 反应大鼠背部皮肤反应程度的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effect of Qingzi granules on the degree of skin reaction in the rats with Arthus response ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量	平均反应程度					综合评分
			−	+	++	+++	++++	
正常组	12	—	12	0	0	0		0
模型组	11	—	0	2	7	2		2.0±0.63$^{▲▲}$
地塞米松组	11	0.55 mg • kg^{-1}	1	9	1	0		1.00±0.45*
芦丁片组	11	12.05 mg • kg^{-1}	0	10	1	0		1.09±0.30
青紫颗粒高剂量组	11	18.32 g • kg^{-1}	0	7	4	0		1.36±0.50
青紫颗粒中剂量组	11	9.16 g • kg^{-1}	1	9	1	0		1.00±0.45*
青紫颗粒低剂量组	11	4.58 g • kg^{-1}	0	8	3	0		1.27±0.47

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

Note：Compared with the normal group，$^{▲▲}P < 0.01$；compared with the model group，$^{*}P < 0.05$.

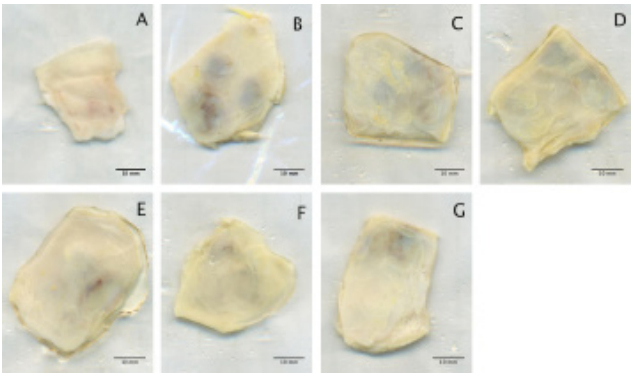


图 1 青紫颗粒对 Arthus 反应大鼠背部皮肤斑点的影响

Fig 1 Effect of Qingzi granules on the back swollen spots in the Arthus response rats

A. 正常组（normal group）；B. 模型组（model group）；C. 地塞米松组（dexamethasone group）；D. 芦丁片组（rutin tablet group）；E. 高剂量组（high-dose group）；F. 中剂量组（middle-dose group）；G. 低剂量组（low-dose group）

3.1.2 对 Arthus 反应大鼠血清 IgA、IgG、CIC 含量的影响 与正常组相比，模型组血清 IgA、IgG、CIC 含量显著升高（$P < 0.01$）。与模型组相比，青紫颗粒各剂量组、芦丁片组及地塞米松组血清 IgA、IgG 含量下降（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$），青紫颗粒高、中剂量组，芦丁片组及地塞米松组血清 CIC 含量下降（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。结果见图 2。

3.1.3 对 Arthus 反应大鼠血清 IL-6、TNF-α、NO 水平影响 与正常组相比，模型组血清 IL-6、TNF-α、NO 含量显著升高（$P < 0.01$）。与模型组相比，青紫颗粒高剂量组、芦丁片组、地塞米松组血清 IL-6、TNF-α 含量降低（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$），青紫颗粒各剂量组、芦丁片组、地塞米松组血清 NO 含量显著降低（$P < 0.01$）。结果见图 2。

3.1.4 对 Arthus 反应大鼠皮肤组织病理学的影响 正常组大鼠表皮未见明显异常，结构完整，部分可见轻度增厚；鳞状上皮细胞形态结构正常、排列紧密；真皮层胶原纤维含量丰富，可见毛囊皮脂腺等附属器官，未见明显炎症。模型组多见表皮层增厚，少量鳞状上皮细胞胞质空泡化，多数胶原纤维丰富，排列规则；部分皮肤局部可见少量上皮细胞坏死及核碎裂，真皮层与皮下组织可见大量水肿，肥大细胞浸润，出血，并伴有细胞成分增多，静脉血管可见淤血扩张。各给药组可见部分表皮增厚，真皮层少量肥大细胞浸润，个别可见细胞成分增多，实质细胞坏死，核碎裂；静脉血管淤血扩张、出血情况较模型组减轻。结果见图 3。

3.2 青紫颗粒对兔 Arthus 反应的干预作用

3.2.1 青紫颗粒对 Arthus 反应兔背部斑点直径、皮肤反应程度的影响 正常组兔背部未出现红肿现象。抗原攻击后 2 h，各组兔背部均出现红肿现象；抗原攻击后 2、3、4、5 h，青紫颗粒高剂量组

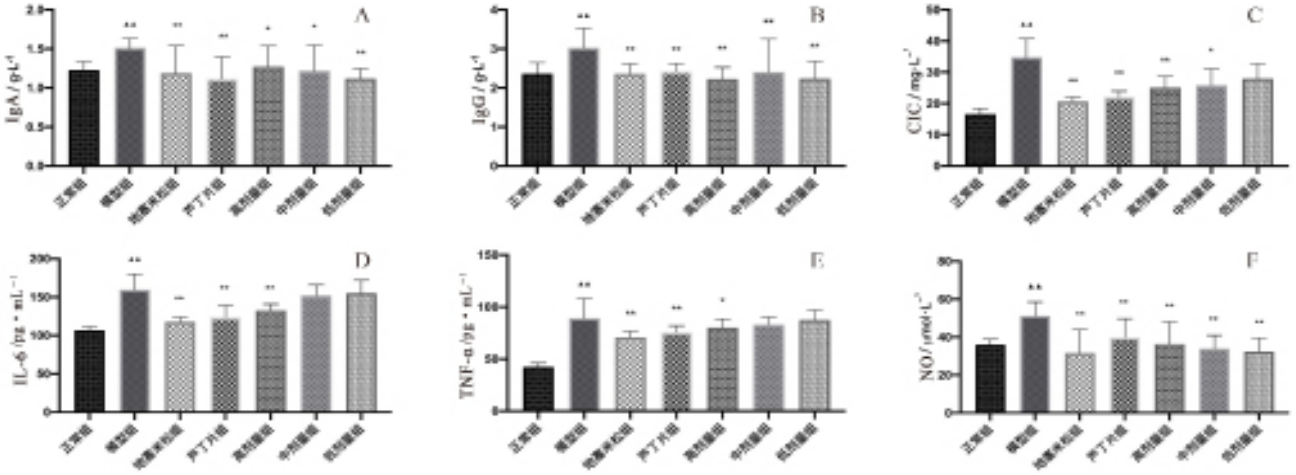


图 2　青紫颗粒对 Arthus 反应大鼠血清 IgA（A）、IgG（B）、CIC（C）、IL-6（D）、TNF-α（E）、NO（F）水平的影响

Fig 2　Effect of Qingzi granules on serum IgA（A），IgG（B），CIC（C），IL-6（D），TNF-α（E），NO（F）level in the Arthus response rats

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

Note：Compared with the normal group，▲▲$P < 0.01$；compared with the model group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$.

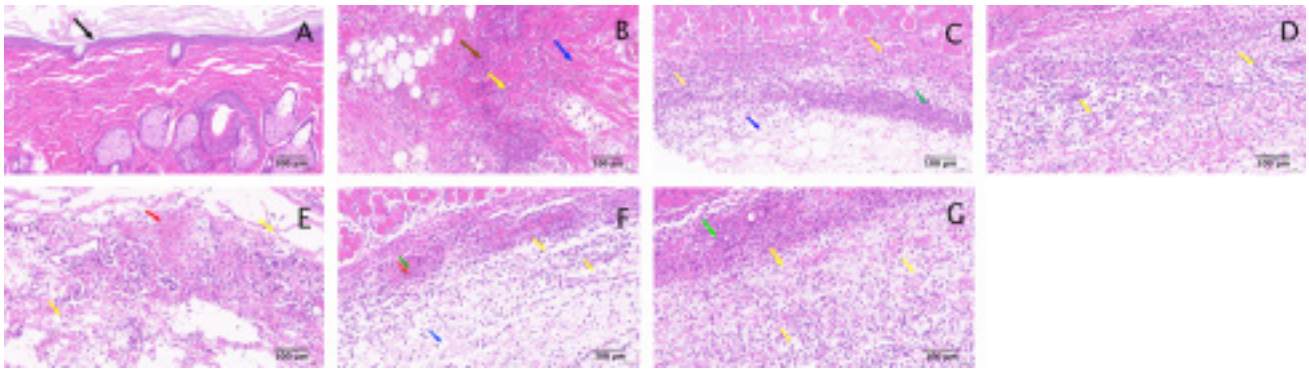


图 3　青紫颗粒对 Arthus 反应大鼠皮肤组织病理的影响（HE 染色，×200）

Fig 3　Effect of Qingzi granules on skin tissue histopathology in the Arthus response rats（HE，×200）

A. 正常组（normal group）；B. 模型组（model group）；C. 地塞米松组（dexamethasone group）；D. 芦丁片组（rutin tablet group）；E. 高剂量组（high-dose group）；F. 中剂量组（middle-dose group）；G. 低剂量组（low-dose group）

注（Note）：黑色箭头示表皮层增厚，黄色箭头示炎性细胞浸润，棕色箭头示实质细胞坏死，蓝色箭头示结缔组织排列疏松，绿色箭头示核碎裂，红色箭头示局部出血（Black arrow shows epidermal thickening. Yellow arrow shows inflammatory cell infiltration. Brown arrow indicates parenchymal cell necrosis. Blue arrow shows loose arrangement of connective tissue. Green arrow shows nuclear fragmentation，and red arrow shows local bleeding）。

兔背部斑点直径小于模型组（$P < 0.05$），结果见表 3。模型组在抗原攻击后 2 h 或 5 h 背部皮肤中度充血、出血，呈斑块状；抗原攻击后 24 h，出现中度出血性变色。与模型组相比，青紫颗粒高、低剂量组，芦丁片组，地塞米松组，青紫合剂组兔背部皮肤反应程度评分均显著降低（$P < 0.01$），结果见表 3 及表 4，24 h 兔背部斑点见图 4。

3.2.2　青紫颗粒对 Arthus 反应兔血清 IgA、IgG、CIC 的影响　与正常组相比，模型组兔血清 IgA、IgG、CIC 含量显著升高（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）；与模型组相比，地塞米松组兔血清 IgA 含量降低（$P < 0.05$），青紫颗粒中剂量组、青紫合剂组兔血清 IgG 含量显著降低（$P < 0.01$），青紫颗粒中、低剂量组，地塞米松组兔血清 CIC 含量显降低（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。结果见图 5。

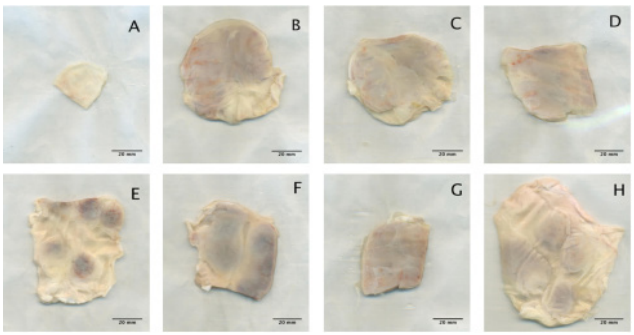


图 4　青紫颗粒对 Arthus 反应兔背部皮肤斑点的影响

Fig 4　Effect of Qingzi granules on the back swollen spots in the Arthus response rabbits

A. 正常组（normal group）；B. 模型组（model group）；C. 地塞米松组（dexamethasone group）；D. 芦丁片组（rutin tablet group）；E. 高剂量组（high-dose group）；F. 中剂量组（middle-dose group）；G. 低剂量组（low-dose group）；H. 青紫合剂组（Qingzi mixture group）

表 3 青紫颗粒对 Arthus 反应兔背部皮肤斑点直径的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Effect of Qingzi granules on the diameter of the back swollen spots in the Arthus response rabbits at different time points after the antigen attack ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量	不同时间点斑点直径 /mm						
			2 h	3 h	4 h	5 h	8 h	12 h	24 h
正常组	6	—	0	0	0	0	0	0	0
模型组	6	—	16.98±5.62	19.98±2.16	20.86±1.37	21.36±2.81	19.77±2.26	20.54±2.10	21.41±4.30
地塞米松组	6	0.263 mg • kg^{-1}	15.18±7.50	19.2±1.94	18.87±2.21	19.75±1.80	19.74±3.77	19.98±2.28	20.21±1.41
芦丁片组	5	5.78 mg • kg^{-1}	17.17±0.57	17.29±2.18	18.80±1.10	18.39±1.12	19.43±2.25	20.96±3.16	22.69±3.69
青紫颗粒高剂量组	6	8.79 g • kg^{-1}	14.11±7.53*	16.05±6.19*	16.51±6.02*	17.13±6.28*	18.73±4.39	19.23±5.36	19.17±7.31
青紫颗粒中剂量组	4	4.39 g • kg^{-1}	16.65±4.58	18.78±2.40	19.43±0.64	20.07±0.48	20.48±0.74	23.60±5.98	23.4±5.26
青紫颗粒低剂量组	5	2.20 g • kg^{-1}	18.52±1.55	18.71±1.36	20.70±1.55	19.05±2.12	20.72±2.88	20.80±6.00	23.22±5.14
青紫合剂组	5	6.98 mL • kg^{-1}	15.58±3.34	19.1±1.16	21.36±2.17	20.19±1.32	19.76±2.99	19.79±2.51	21.14±3.70

注：与模型组比较，$^{*}P < 0.05$。

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

表 4 青紫颗粒对 Arthus 反应兔背部皮肤反应程度的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Effect of Qingzi granules on the degree of skin reaction in the Arthus response rabbits ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量	平均反应程度				综合评分
			—	+	++	+++	
正常组	6	—	6	0	0	0	0
模型组	6	—	0	0	5	1	2.17±0.41
地塞米松组	6	0.263 mg • kg^{-1}	0	3	3	0	1.5±0.55**
芦丁片组	5	5.78 mg • kg^{-1}	0	4	1	0	1.2±0.45**
青紫颗粒高剂量组	6	8.79 g • kg^{-1}	0	4	2	0	1.33±0.52**
青紫颗粒中剂量组	4	4.39 g • kg^{-1}	0	1	3	0	1.75±0.5
青紫颗粒低剂量组	5	2.20 g • kg^{-1}	0	4	1	0	1.2±0.45**
青紫合剂	5	6.98 mL • kg^{-1}	0	4	1	0	1.2±0.45**

注：与模型组比较，$^{**}P < 0.01$。

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

3.2.3 皮肤组织病理学观察 正常组兔皮肤表皮层结构完整，鳞状上皮细胞形态结构正常、排列紧密，真皮层胶原纤维含量丰富，可见毛囊皮脂腺等附属器官，未见明显炎症。模型组真皮层底部可见重度水肿，结缔组织排列疏松，部分伴有静脉血管淤血扩张，可见大量淋巴细胞、中性粒细胞与巨噬细胞浸润，真皮层顶部可见大量出血，伴有较大量的胶原纤维溶解。各给药组部分可见重度水肿，伴有大量淋巴细胞、中性粒细胞与巨噬细胞浸润，实质细胞坏死，核碎裂及静脉血管淤血扩张。与模型组相比，各给药组在血管扩张方面均减轻，青紫合剂组皮肤出血有所减轻，青紫颗粒低剂量组、芦丁片组、青紫合剂组皮肤水肿有所缓解。结果见图 6。

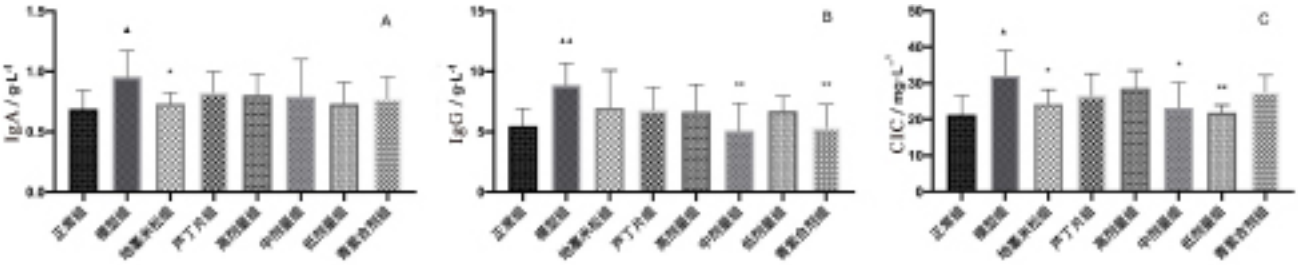


图 5 青紫颗粒对 Arthus 反应兔血清 IgA（A）、IgG（B）、CIC（C）水平的影响

Fig 5 Effect of Qingzi granules on serum IgA（A），IgG（B），CIC（C）level in the Arthus response rabbits

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

Note：Compared with the normal group，$^{▲}P < 0.05$，$^{▲▲}P < 0.01$；compared with the model group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$.

4 讨论

HSP 的发生与免疫反应、红细胞血管外溢、血管壁纤维素样坏死、血小板微血管炎和间质水肿等有关 [6]。抗原进入机体刺激浆细胞，产生抗体，与抗原结合形成免疫复合物，主要为 IgA 免疫复合物 [7]。过多的免疫复合物不易被巨噬细胞清除，而促进释放 5-羟色胺、组胺等血管活性物质，增加血管壁通透性，造成组织水肿。免疫复合物在血管壁或肾小球膜上沉积，产生过敏毒素，使中性粒细胞在沉积处聚集，并释放蛋白水解酶，局部组织血管损伤加剧，沉积在黏膜小血管，引起出血 [8]。因此 HSP 的发病机制为可溶性免疫复合物引起的Ⅲ型超敏反应 [6]。本实验中以皮肤损伤为主的 HSP 模型是根据Ⅲ型超敏反应中局部免疫复合物引起的 Arthus 反应构建的 [9]。实验性 Arthus 反应可采用具有循环抗体的免疫动物，以相应的抗原肌内注射、皮下注射引起 [10]。SD 大鼠、日本大耳白兔是具有循环抗体的免疫动物，经过小剂量抗原反复刺激，少量抗原持续进入体内致敏，但未发生过敏反应；当再次皮内

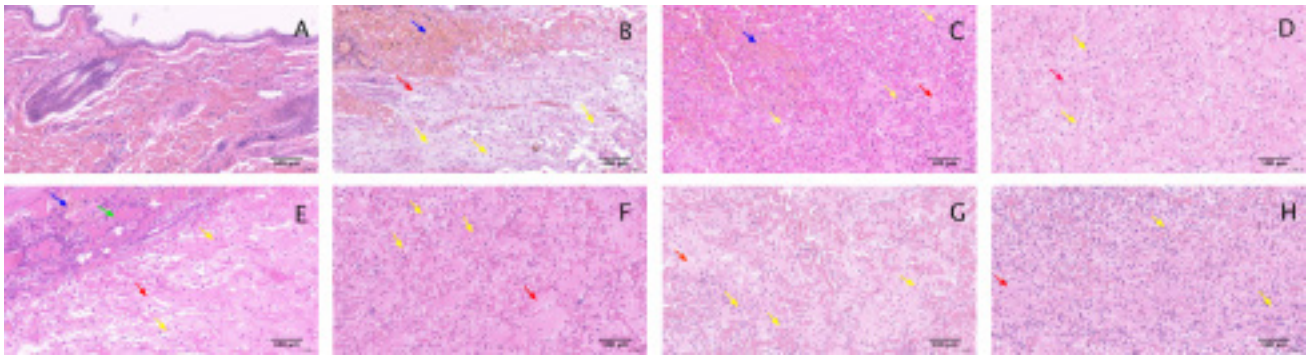


图 6　青紫颗粒对 Arthus 反应兔皮肤组织病理的影响（HE 染色，×200）

Fig 6　Effect of Qingzi granules on skin tissue histopathology in the Arthus response rabbits（HE，×200）

A. 正常组（normal group）；B. 模型组（model group）；C. 地塞米松组（dexamethasone group）；D. 芦丁片组（rutin tablet group）；E. 高剂量组（high-dose group）；F. 中剂量组（middle-dose group）；G. 低剂量组（low-dose group）；H. 青紫合剂组（Qingzi mixture group）

注（Note）：黄色箭头示中性粒细胞与巨噬细胞浸润；蓝色箭头示真皮层顶部可见大量出血；红色箭头示伴有较大量的胶原纤维溶解；绿色箭头示肌层多见肌纤维坏死，核碎裂或溶解（Yellow arrow shows neutrophil and macrophage infiltration. Blue arrow shows a large amount of bleeding at the top of the dermis. Red arrow shows that a large amount of collagen fiber dissolution is accompanied；Green arrow shows that muscle fiber necrosis，nuclear fragmentation or dissolution are common in the muscle layer）。

注射抗原攻击后，局部血管中弥散的大量抗原与血液中的抗体结合形成免疫复合物沉积于血管壁，触发皮肤炎症反应，表现与 HSP 皮肤症状相近，为局部皮肤水肿、出血和坏死，通常伴有血栓形成而造成局部组织的缺血、损伤。大鼠发生 Arthus 反应时，肌内注射卵蛋白的次数比兔多，但 Arthus 反应的皮肤症状不如兔剧烈，这可能与大鼠体内不易形成沉淀素有关 [2]。本研究建立的 Arthus 反应大鼠、兔模型主要表现为皮肤损伤，可在一定程度上模拟皮肤型 HSP。

在 HSP 的发病过程中，IgA 发挥重要作用，欧洲抗风湿病联盟会议已将活检示皮肤或肾小球基底膜上 IgA 类免疫复合物沉积作为诊断 HSP 主要标准之一 [11]。体液免疫功能紊乱，B 淋巴细胞克隆活化，血清中 IgA 水平增高，使机体清除功能障碍，IgA 及 IgA 免疫复合物沉积于血管，形成 CIC[12]。由于 CIC 长时间游离于血液和其他体液中，可随血流沉积在某些部位的毛细血管壁或嵌合在肾小球基底膜上，造成局部组织的损伤和炎症。刘明月等 [12] 研究发现，在 HSP 患者血清中循环的 IgA 型抗中性粒细胞胞质抗体以及 IgA 型类风湿因子表达增多，证实 IgA、CIC 在 HSP 发病中起关键作用。本实验结果显示模型组血清 IgA 及 CIC 水平明显高于正常组，青紫颗粒各剂量均可降低大鼠血清 IgA 水平，青紫颗粒高、中剂量均可降低大鼠血清 CIC 水平，青紫颗粒中、低剂量均能降低兔血清 CIC 水平。提示青紫颗粒对 Arthus 反应过程中血清 IgA、CIC 含量升高有干预作用。

IgG 是体内最主要的抗体，具有抗病毒、抗菌及免疫调节的作用，免疫复合物中存在的 IgG 可能与系膜细胞上的 Fc-γ 受体结合 [13]，在促进免疫复合物沉积方面发挥作用。临床研究表明，HSP 患者在治疗后 IgG 水平明显下降至正常，说明随着 T 淋巴细胞功能的恢复，B 淋巴细胞的失控和组织炎症因子的异常分泌得到有效的控制，因此血清 IgG 也可作为 HSP 活动期的临床观察指标 [14]。本实验结果显示模型组血清 IgG 水平高于正常组，青紫颗粒各剂量组均可降低大鼠血清 IgG 水平，青紫颗粒中剂量组可降低兔血清中 IgG 含量，表明青紫颗粒对 Arthus 反应过程中血清 IgG 含量升高有抑制作用。

T 淋巴细胞功能的改变、细胞因子与炎症介质的参与在 HSP 发病中发挥重要作用。TNF-α 在免疫及炎症损伤中具有重要地位，能使凝血因子Ⅷ、纤溶酶原激活物抑制剂 -1、血栓素、内皮素含量上升，最终引起凝血和微循环障碍，导致血管内皮细胞坏死 [15]，并与 IgA 协同作用引起血管炎症 [16]。Besbas 等 [17] 报道 HSP 患者急性期血清促炎细胞因子 TNF-α 的水平明显增加。本实验结果显示，模型组大鼠血清 TNF-α 水平明显高于正常组，青紫颗粒高剂量可降低 TNF-α 水平，提示青紫颗粒对 Arthus 反应过程中血清 TNF-α 含量升高有一定抑制作用。IL-6 是一种促炎因子，刺激血管内皮细胞，释放大量的白细胞趋化因子，使白细胞和内皮细胞相黏附，导致内皮细胞受损，同时生成氧自由基，引发细胞变性、坏死 [18]。此外，IL-6 可促进 B 淋巴细胞增殖及分化，通过刺激 B 细胞分泌大量抗体，导致体液免疫反应的发生，形成大量免疫复合物沉积于血管壁，激活补体级联反应，破坏血管壁的完整性，进一步加重血管损伤程度 [19]。临床研究报道 HSP 患者急性期

血清促炎细胞因子 IL-6 的含量显著增加[20]。本实验结果显示，模型组血清 IL-6 水平明显高于正常组，青紫颗粒高剂量能降低 IL-6 含量。

NO 是一种胞间信使信号，可介导多种炎症发生，主要由 iNOS 催化产生。NO 可介导细胞毒作用，使血管内皮细胞受损，进而促使免疫复合物的沉积，还可以诱导多种炎性细胞因子的产生[21]。NO 水平升高加重毛细血管损伤及肾脏进行性损害[22]。临床研究发现，HSP 肾炎患者体内 NO 水平显著升高，检测 NO 水平对 HSP 患者病情判断、疗效及预后评价具有一定的指导意义[23]。本实验结果显示青紫颗粒各剂量均可明显降低大鼠血清 NO 水平。

临床报道显示，HSP 皮肤组织病理学特征包括影响浅表小血管的白细胞破坏性血管炎，血管壁被中性粒细胞浸润，中性粒细胞部分退化并形成核碎片，真皮乳头水肿，乳头下血管丛及末梢血管扩张、充血、内皮细胞肿胀，管壁周围组织纤维蛋白样变性，红细胞外渗。本研究结果显示，Arthus 反应大鼠、兔皮肤出现表皮层增厚，少量鳞状上皮细胞胞质空泡化，上皮细胞坏死及核碎裂，真皮层与皮下组织可见大量水肿，炎性细胞浸润，细胞成分增多，静脉血管淤血扩张等现象，这与 HSP 皮肤组织病理学特征相近。青紫颗粒可减轻大鼠皮肤静脉血管淤血扩张、出血，减轻兔皮肤水肿、实质细胞坏死、核碎裂及静脉血管淤血扩张。

综上，青紫颗粒在改善 HSP 动物模型背部皮肤反应程度及组织病理学损伤方面具有较好的药效，该作用可能与其降低血清 IgA、IgG、CIC、IL-6、TNF-α、NO 水平，减轻皮肤组织静脉血管淤血扩张、出血、水肿等有关，但确切的作用机制有待进一步研究。

参考文献

[1] Li YH，Sui XL，Zhu H，et al. Reply to the letter：“Can such an animal model truly represent Henoch-Schonlein purpura?”[J]. Arch Dermatol Res，2018，310（6）：535-536.

[2] 周汉良，卞如濂 . 兔与大鼠 Arthus 反应的研究 [J]. 浙江医科大学学报，1988，17（3）：112-114.

[3] Benacerraf B，Kabat EA. A quantitative study of the Arthus phenomenon induced passively in the guinea pig [J]. J Immunol，1950，64（1）：1-19.

[4] 苗丰，董琳琳，丰晨然，等 . 青紫颗粒抑制卵蛋白致过敏性紫癜大鼠血清免疫复合物保护肾组织作用 [J]. 中南药学，2020，18（5）：756-760.

[5] 徐叔云，卞如濂，陈修 . 药理实验方法学 [M]. 3 版 . 北京：人民卫生出版社，2002：920-921，1416-1417.

[6] 李彦红，朱华，隋小龙，等 . 初步探讨过敏性紫癜兔模型的构建 [J]. 中国实验动物学报，2013，21（5）：36-41，103-104.

[7] 罗晓燕，彭子湖，陈静思，等 . IgA Fc 受体 Fc-αRI 在过敏性紫癜患儿中的表达及意义 [J]. 重庆医科大学学报，2017，42（12）：1556-1560.

[8] Saulsbury FT. Henoch-Schonlein purpura [J]. Curr Opin Rheumatol，2010，22（5）：598-602.

[9] 张雅绚 . 过敏性紫癜动物模型制作与加味紫草汤对 Arthus 反应作用的实验研究 [D]. 沈阳：辽宁中医药大学，2006.

[10] 王辉，李万里，张昌菊 . 医学免疫学实验指导 [M]. 西安：世界图书出版公司西安公司，2008：36.

[11] Ozen S，Pistorio A，Iusan SM，et al. EULAR/PRINTO/PRES criteria for Henoch-Schonlein purpura，childhood polyarteritis nodosa，childhood Wegener granulomatosis and childhood Takayasu arteritis：Ankara 2008. Part Ⅱ：Final classification criteria [J]. Ann Rheum Dis，2010，69（5）：798-806.

[12] 刘明月，唐雪梅 . 儿童过敏性紫癜治疗研究进展 [J]. 中国实用儿科杂志，2015，30（9）：676-680.

[13] Suwanichkul A，Wenderfer SE. Differential expression of functional Fc-receptors and additional immune complex receptors on mouse kidney cells [J]. Mol Immunol，2013，56（4）：369-379.

[14] 林晓燕，周建锋，晁鹏丽，等 . 淋巴细胞亚群及免疫球蛋白在儿童过敏性紫癜的意义 [J]. 标记免疫分析与临床，2016，23（10）：1172-1176.

[15] 金惠铭，刘清行，曹翔，等 . TNF-α 引起的微血管内皮细胞功能障碍及其细胞分子机制 [J]. 微循环学杂志，2000（3）：5-6.

[16] Todd DJ，Helfgott SM. Serum sickness following treatment with rituximab [J]. J Rheumatol，2007，34（2）：430-433.

[17] Besbas N，Saatci U，Ruacan S，et al. The role of cytokines in Henoch Schonlein purpura [J]. Scand J Rheumatol，1997，26（6）：456-460.

[18] 田红妮，马苗苗 . 中医辨证联合西医治疗儿童过敏性紫癜的临床疗效及对血清中 IL-6、IL-8、IL-12、IL-18 的影响研究 [J]. 贵州医药，2020，44（11）：1696-1698.

[19] 靳垚，史长松，刘炜，等 . 不同剂量丙种球蛋白对急性免疫性血小板减少症患儿血清白细胞介素 -6 和白细胞介素 -10 及自然杀伤细胞表达的影响 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志，2020，34（5）：466-469.

[20] Purevdorj N，Mu Y，Gu YJ，et al. Clinical significance of the serum biomarker index detection in children with Henoch-Schonlein purpura [J]. Clin Biochem，2018，52（undefined）：167-170.

[21] 滕海麟，吴福根，杨晓卫，等 . 过敏性紫癜患儿血清中血管内皮生长因子与一氧化氮水平变化及意义 [J]. 中国全科医学，2010，13（2）：150-152.

[22] 杨文东，刘俊健，李红，等 . 过敏性紫癜患儿治疗前后 TNF-α、NO 水平变化及意义 [J]. 临床荟萃，2001，16（8）：362-363.

[23] 李思平 . 小儿过敏性紫癜血清因子的表达研究 [J]. 现代中西医结合杂志，2013，22（21）：2324-2325.

（收稿日期：2021-09-19；修回日期：2021-09-29）

响应面法优化改性明胶软胶囊囊壳制备工艺

付慧敏[1]，乔子桐[1]，张纯刚[1*]，郭勇[2]，程岚[1*]（1. 辽宁中医药大学药学院，辽宁　大连　116620；2. 神威药业集团有限公司，石家庄　051430）

摘要：目的　制备改性明胶软胶囊囊壳，并对其进行处方优化。**方法**　在单因素试验确定的优化范围基础上，以甲醛处理后胶片的崩解时间、胶片的弹性模量和硬度作为考察指标，对囊壳的改性剂琥珀酸酐添加量，甘油添加量，胶液 pH 进行 Box-Behnken 响应面处方分析，优化制备工艺。**结果**　得到最佳制备工艺条件为：琥珀酸酐添加量为明胶的 5.5%，甘油添加量为明胶的 35%，胶液 pH 为 5.20，得到的改性明胶软胶囊囊壳具有优异的抗甲醛性能，且力学性能良好，可以延缓软胶囊的交联老化现象。**结论**　本研究通过响应面分析法将囊壳的力学特性和抗醛特性结合起来，分析试验指标与多个试验因素间的回归关系，研究函数的响应面和等高线来选择试验设计中的最优化条件，为琥珀酰明胶软胶囊的制备奠定了理论基础。

关键词：软胶囊；改性明胶；琥珀酸酐；抗甲醛；工艺优化

中图分类号：R943　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0793-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.011

Optimization of preparation of modified gelatin soft capsule shell by response surface methodology

FU Hui-min[1], QIAO Zi-tong[1], ZHANG Chun-gang[1*], GUO Yong[2], CHENG Lan[1*] (1. *College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian Liaoning* 116620; 2. *Shineway Pharmaceutical Group Co., Ltd, Shijiazhuang* 051430)

Abstract: Objective To prepare modified gelatin soft capsule shell and optimize its formulation. **Methods** Based on the optimization range determined by single factor experiment, the Box-Behnken response surface method was used to analyze the amount of succinic anhydride, glycerin and pH of the capsules, with the disintegration time after formaldehyde treatment, elastic modulus and hardness of the film as the investigation indexes to optimize the preparation. **Results** The optimum conditions were as follows: the amount of succinic anhydride was 5.5% that of gelatin, glycerol was 35% that of gelatin, and the pH of glue solution was 5.20. The modified gelatin soft capsule shell under this condition showed excellent formaldehyde resistance and good mechanical properties, which might delay the cross-linking aging of the soft capsules. **Conclusion** In this study, the mechanical properties and formaldehyde resistance properties of the capsule shell are combined by response surface analysis, the regression relationship between test indexes and multiple test factors was analyzed, and the response surface and contour lines of the function were studied to select the optimal conditions in the test design, which laid a theoretical foundation for succinyl gelatin soft capsules.

Key words: soft capsule; modified gelatin; succinic anhydride; formaldehyde resistance; process optimization

基金项目：国家重点研发计划（No.2018YFC1706903）；国家自然科学基金资助项目（No.81503257）；辽宁省博士启动基金（No.201501098）；辽宁省自然科学基金指导计划项目（No.2019-ZD-0968）；中医脏象理论及应用国家教育部重点实验室一般项目（No. zyzx1809）；沈阳市中青年科技创新人才项目（No.RC200204）。

作者简介：付慧敏，女，硕士，主要从事中药新剂型、新技术及体内药物分析研究，email：1198688083@qq.com　*通信作者：张纯刚，男，博士，副教授，主要从事中药新剂型、新技术及体内药物分析研究，email：gaogaoii123@163.com；程岚，女，博士，教授，主要从事中药新剂型、新技术及体内药物分析研究，email：sychenglan@163.com

软胶囊剂型的出现，无疑从稳定性、精准剂量等方面给医药、保健品及功能食品行业带来了革命性的变革[1]。然而在生产和储存环节，软胶囊也会面临一些挑战，比如高温高湿的保存条件；药物活性成分或营养产品中含有醛类；内容物较为复杂（如复合维生素、多种矿物质、金属离子或是以上成分的混合物等）[2-3]，这些因素可能会使软胶囊囊壳材料 - 明胶发生交联而产生对软胶囊稳定的负面影响。虽然许多研究工作者试图利用其他材料来替代明胶，但目前，软胶囊的生产主要采用旋转冲模法，这就要求非明胶替代材料具有与明胶极为相似的凝胶特性[4]，至今仍没有一种物质可以完全替代明胶，就我国目前的国情而言，以明胶作为软胶囊囊壳材料的现状短期内不会改变，所以研究能够延缓老化、生产适用性好的明胶是当务之急。

氨基是明胶发生交联反应的主要结合位点[5]，本试验在不替换软胶囊囊壳主要成分——明胶的基础上，对明胶进行改性，通过琥珀酸酐与明胶中的氨基的反应，增加氨基封闭率，降低明胶中游离氨基含量，从而减少明胶软胶囊的交联现象，改善软胶囊剂型的稳定性，以期开发安全有效、工艺简单、质量可控的软胶囊以适应临床治疗需要。

1 材料

1.1 试药

琥珀酸酐、氢氧化钠（国药集团化学试剂有限公司）；明胶、巧克力棕、苋菜红、甘油（神威药业集团有限公司）；盐酸 [利安隆博华（天津）医药化学有限公司]；甲醛（丹东市龙海试剂厂）；纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司）。

1.2 仪器

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器（巩义市予华仪器有限责任公司）；FA1004 精密电子天平（天津天马衡基仪器有限公司）；pHS-25 型试验室 pH 计（上海今迈仪器仪表公司）；JK-BJ-II 崩解时限仪（上海精学科学仪器有限公司）；CT3 质构仪（美国博勒飞公司）；WGLL-230BE 电热鼓风干燥箱（天津市泰斯特仪器有限公司）；数显千分测厚规（浙江德清盛泰芯电子科技有限公司）；透析袋 MD44（北京索莱宝科技有限公司）。

2 方法

2.1 改性明胶的制备

精密称取 20.00 g 明胶置于 500 mL 烧杯中，加入 100 mL 纯净水，在 45 ℃下搅拌溶解，160 r • min^{-1} 搅拌 1 h。随后将一定剂量的琥珀酸酐在搅拌下逐步加入到明胶溶液中，继续搅拌 1 h，同时用 1 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液维持反应体系的 pH 在 9 ～ 10。待两者完全反应，用 1 mol • L^{-1} 盐酸溶液调节胶液的 pH 至 6。将改性明胶溶液移入透析袋，在蒸馏水中透析 36 h，取出，于 40 ℃下鼓风干燥，得到改性明胶。

2.2 明胶胶片的制备

精密称取纯净水、浓缩色素溶液和处方量的甘油投入烧杯中，160 r • min^{-1} 搅拌均匀，加热至 70 ℃，待 30 min 后加入明胶，继续搅拌 1 h，至胶液无气泡，趁热倒入宽为 100 mm 的方形培养皿内，冷却至室温。于 30 ℃温度下鼓风干燥 6 h，揭下，得到厚度约为 0.5 mm 的胶皮，保存在干燥器中，待用。

2.3 囊壳评价指标的测定方法

2.3.1 甲醛处理后崩解时间的测定　制备不同质量浓度的甲醛溶液，将大小为 20 mm×15 mm×0.5 mm 的未改性方形胶片在甲醛溶液内放置 15 min 后取出擦干，参照《中国药典》2020 年版第四部 0921 崩解时限检查法对胶片崩解时限进行测定[6]。平行测定 3 次，取平均值，甲醛质量浓度为 0、5.55、11.1、16.65、22.2、27.75、33.3、38.85、44.4、49.95 mg • mL^{-1} 时的崩解时间分别为 1 min 14 s、3 min 24 s、5 min 15 s、12 min 43 s、29 min 15 s、59 min 7 s、80 min 32 s、105 min 53 s、＞ 2 h、＞ 2 h。最终选择未改性胶片崩解时限超过 2 h 的 44.4 mg • mL^{-1} 甲醛作为囊壳甲醛处理后崩解时间评价指标的处理浓度。

2.3.2 弹性模量的测定　将厚度均匀、完整的胶片裁剪成长条，宽为 4 mm，工作部分长度为 3 mm，两端分别夹在质构仪的上下拉伸探头 DGF 上，设定相应参数，拉伸速度 1.5 mm • s^{-1}，在质构仪上定速拉伸，直至胶片被拉断，得到拉伸过程的应力应变曲线，弹性阶段的应力与应变的比值即为弹性模量，单位为 N • mm^{-2}，平行 3 次试验，取平均值（注：在进行力学性能测试之前，要先将胶片在室温、35% 相对湿度环境下放置 24 h）。

2.3.3 硬度的测定　将厚度均匀、完整的胶片裁剪为大小为 15 mm×15 mm×0.5 mm 的方形胶片，固定在质构仪的菲林夹具 FSF 上，使用直径为 0.1 cm 的穿刺探头以 1.5 mm • s^{-1} 的速度向胶片进行穿刺试验，直至胶片被刺破，得到负荷与距离变化曲线，曲线的峰值代表胶皮的硬度，单位为 g。平行 3 次试验，取平均值（注：在进行力学性能测试之前，要先将胶片在室温、35% 相对湿度环境下放置 24 h）。

2.4 单因素试验设计

在预试验的基础上，分别探讨改性剂琥珀酸酐添加量，甘油添加量，胶液 pH 对改性明胶胶

片甲醛处理后崩解时间、胶片弹性模量、硬度的影响。

2.5　响应面优化试验设计

在单因素试验的基础上，利用 Design-Expert 8 软件的 Box-Behnken 试验设计原理，以明胶胶片甲醛处理后崩解时间、胶片弹性模量、硬度响应值作为考察指标，进行三因素三水平试验，试验因素水平编码见表 1。通过数据分析，建立数学回归模型，预测响应值，确定改性明胶胶片配方的最优条件。

表 1　响应面因素与水平

Tab 1　Factor and level for response surface

水平	因素		
	A 改性剂添加量 /%	B 甘油添加量 /%	C 胶液 pH
－1	3	30	4
0	5	35	5
1	7	40	6

2.6　数据分析

由于胶片甲醛处理后崩解时间越短越好，胶片弹性模量和硬度越接近初始制备的明胶胶片的力学性能指标越好（按照明胶 - 甘油 - 水为 1∶5.2∶4 的比例制作明胶胶片，进行胶片的拉伸和穿刺试验，确定软胶囊囊壳的最佳力学性能数据：$y_{弹性模量佳}$＝ 14.16 N • mm^{-2}，$y_{硬度佳}$＝ 1950.75 g），故以各指标的最佳值为参照将数据进行归一化，获得响应值 a，b，c，各个指标响应值公式如下：

甲醛处理后崩解时间响应值 $a = y_{min}/y_i$

弹性模量响应值 $b = y_{佳}/(y_{佳} + |y_i - y_{佳}|)$

硬度响应值 $c = y_{佳}/(y_{佳} + |y_i - y_{佳}|)$

3　结果与分析

3.1　单因素试验结果

3.1.1　改性剂添加量对改性明胶胶片的影响　改性剂添加量对改性明胶胶片的影响见图 1。随着改性剂添加量的增多，改性明胶中可与甲醛发生“希夫碱”反应 [7] 的游离氨基的含量减少，改性胶片的甲醛处理后崩解时间有不同程度的降低。且随着改性剂添加量的增大，改性胶片的弹性模量、硬度均有所下降，这可能是由于氨基的封闭导致明胶净负电荷增加，减弱了明胶分子因氨基和羰基之间的引力而聚集的程度，使分子在改性明胶 - 水 - 甘油复合物中形成了较弱的网状结构 [8-9]。

3.1.2　甘油添加量对改性明胶胶片的影响　甘油添加量对改性明胶胶片的影响见图 2。随着甘油添加量的增加，甘油大量插入明胶大分子链间，明胶的羟基、氨基、羧基形成分子间氢键，削弱大分子链间以及分子内的相互作用，增大了

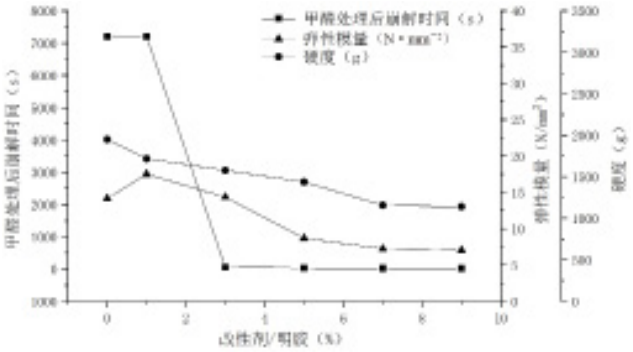


图 1　改性剂添加量对明胶胶片甲醛处理后崩解时间、弹性模量和硬度的影响

Fig 1　Influence of modifier dosage on the disintegration time，elastic modulus and hardness of gelatin film after formaldehyde treatment

大分子链的移动性 [10]，导致改性明胶胶片的硬度、弹性模量呈现规律性下降。当甘油添加量在 30% ～ 40% 时，可保证改性明胶与市售明胶胶片力学性能相近。甘油添加量对甲醛处理后改性明胶胶片崩解时间的影响差距不明显。

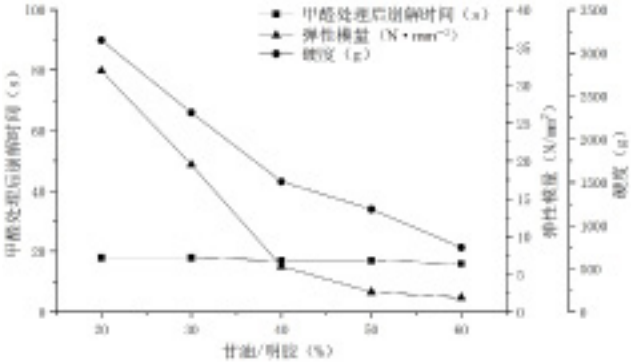


图 2　甘油添加量对明胶胶片甲醛处理后崩解时间、弹性模量和硬度的影响

Fig 2　Effect of glycerol content on the disintegration time，elastic modulus and hardness of gelatin film after formaldehyde treatment

3.1.3　胶液 pH 对改性明胶胶片的影响　胶液 pH 对改性明胶胶片的影响见图 3。明胶分子中的氨基和羧基在过酸条件（即低 pH 环境）下所带电荷下降，明胶分子间的氨基和羧基的吸引力弱 [11]，导致改性明胶胶片的硬度、弹性模量呈现规律性下降，这与罗锦杰 [12] 的研究结果一致。胶液 pH 对甲醛处理后改性明胶胶片崩解时间的影响差距不明显。

3.2　响应面试验结果

3.2.1　响应面试验设计与结果　在单因素试验基础上，利用 Design-ExpertV 8.0.6 软件中 Box-Behnken 响应面分析法进行设计。试验设置 17 个试验（析因试验 12 个，中心试验 5 个），用以分析试验误差。选取改性剂添加量（A），甘油添加量（B），胶液 pH（C）作为自变量，将胶片甲醛

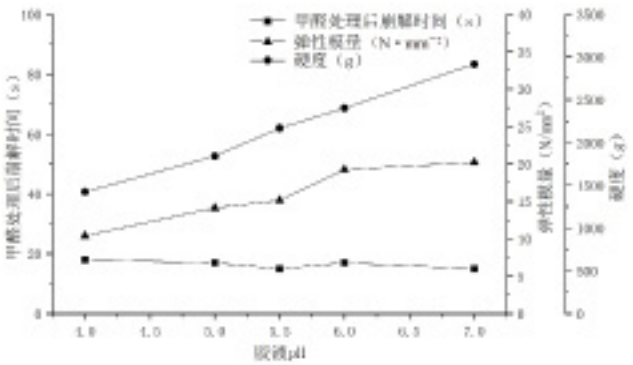


图 3 胶液 pH 对明胶胶片甲醛处理后崩解时间、弹性模量和硬度的影响

Fig 3 Effect of pH on the disintegration time，elastic modulus and hardness of gelatin film after formaldehyde treatment

处理后崩解时间、胶片弹性模量、硬度归一化后作为响应值，进行响应面分析，详见表 2。

表 2 响应面试验设计与结果

Tab 2 Response surface test design and results

序号	A 改性剂添加量 /%	B 甘油添加量 /%	C 胶液 pH	甲醛处理后崩解时间响应值 *a*	弹性模量响应值 *b*	硬度响应值 *c*
1	5	35	5	0.905	0.998	0.995
2	5	35	5	0.864	0.932	0.929
3	5	35	5	0.950	0.958	0.945
4	5	35	5	0.731	0.901	0.955
5	5	35	5	0.864	0.965	0.992
6	5	40	4	0.543	0.588	0.647
7	5	40	6	0.633	0.681	0.866
8	5	30	4	0.528	0.791	0.824
9	5	30	6	1.000	0.443	0.613
10	3	35	6	0.115	0.562	0.736
11	3	35	4	0.198	0.864	0.835
12	3	30	5	0.194	0.545	0.702
13	3	40	5	0.168	0.914	0.977
14	7	35	6	0.950	0.792	0.913
15	7	35	4	0.211	0.603	0.624
16	7	40	5	0.760	0.614	0.723
17	7	30	5	0.792	0.841	0.799

3.2.2 回归模型的建立和方差分析 在单因素试验的基础上，以甲醛处理后崩解时间归一值为响应值进行优化试验。利用 Design-ExpertV 8.0.6 软件对表 2 数据进行分析，得到各因素与响应值之间的多元二次回归模型：$a = 0.86 + 0.25A - 0.051B + 0.15C - 1.500\times10^{-3}AB + 0.21AC - 0.095BC - 0.35A^2 - 0.038B^2 - 0.15C^2$。回归模型 $F = 22.92$，$P = 0.0002$，说明本法可靠。表 3 中，失拟项 $P = 0.3841 > 0.05$，表明该方程对试验拟合情况好，试验误差小，失拟项模型选择合适；$R^2 = 0.9672$，$R^2_{Adj} = 0.9250$，说明试验结果有 92.50% 受试验因素影响，模型试验误差小，试验预测值与实际值拟合较好。

表 3 响应值 *a* 回归模型的方差分析结果

Tab 3 Variance analysis of response value *a* regression model

来源	平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值
模型	1.57	9	0.17	22.92	0.0002
A	0.52	1	0.52	68.20	＜ 0.0001
B	0.021	1	0.021	2.76	0.1406
C	0.19	1	0.19	24.36	0.0017
AB	9.000×10^{-6}	1	9.000×10^{-6}	1.182×10^{-3}	0.9735
AC	0.17	1	0.17	22.19	0.0022
BC	0.036	1	0.036	4.79	0.0648
A^2	0.50	1	0.50	66.18	＜ 0.0001
B^2	6.209×10^{-3}	1	6.209×10^{-3}	0.82	0.3965
C^2	0.093	1	0.093	12.18	0.0101
残差	0.053	7	7.613×10^{-3}		
失拟项	0.027	3	8.843×10^{-3}	1.32	0.3841
纯误差	0.027	4	6.690×10^{-3}		
总和	1.62	16			

由表 3 可知，模型的一次项 *A*、*C*，二次项 *AC*、A^2、C^2 对甲醛处理后崩解时间响应值影响极显著（$P < 0.01$），各因素对甲醛处理后崩解时间响应值的影响依次为 $A > C > B$。各因素交互作用对甲醛处理后崩解时间响应值影响的响应面图和等高线图见图 4，结合表 3 可知，*AC* 交互作用对甲醛处理后崩解时间响应值影响极显著（$P < 0.01$），其他因素间的交互作用不显著。

在单因素试验的基础上，以弹性模量归一值为响应值进行优化试验。利用 Design-ExpertV 8.0.6 软件对表 2 数据进行分析，得到各因素与响应值之间的多元二次回归模型：$b = 0.95 - 4.375\times10^{-3}A + 0.022B - 0.046C - 0.15AB + 0.12AC + 0.11BC - 0.071A^2 - 0.15B^2 - 0.17C^2$。回归模型 $F = 40.60$，$P < 0.0001$，说明本法可靠。表 4 中，失拟项 $P = 0.4741 > 0.05$，表明该方程对试验拟合情况好，试验误差小，失拟项模型选择合适；$R^2 = 0.9812$，$R^2_{Adj} = 0.9570$，说明试验结果有 95.70% 受试验因素影响，模型试验误差小，试验预测值与实际值拟合较好。

由表 4 可知，模型的一次项 *C*，二次项 *AB*、*AC*、*BC*、A^2、B^2、C^2 对弹性模量响应值影响极显著（$P < 0.01$）；各因素对弹性模量响应值的影响依次为 $C > B > A$。各因素交互作用对弹性模量响应值影响的响应面图和等高线图见图 5，结合表 4 可知，*AB*、*AC*、*BC* 交互作用对弹性模量响应值影响均极显著（$P < 0.01$）。

在单因素试验的基础上，以硬度归一值为响

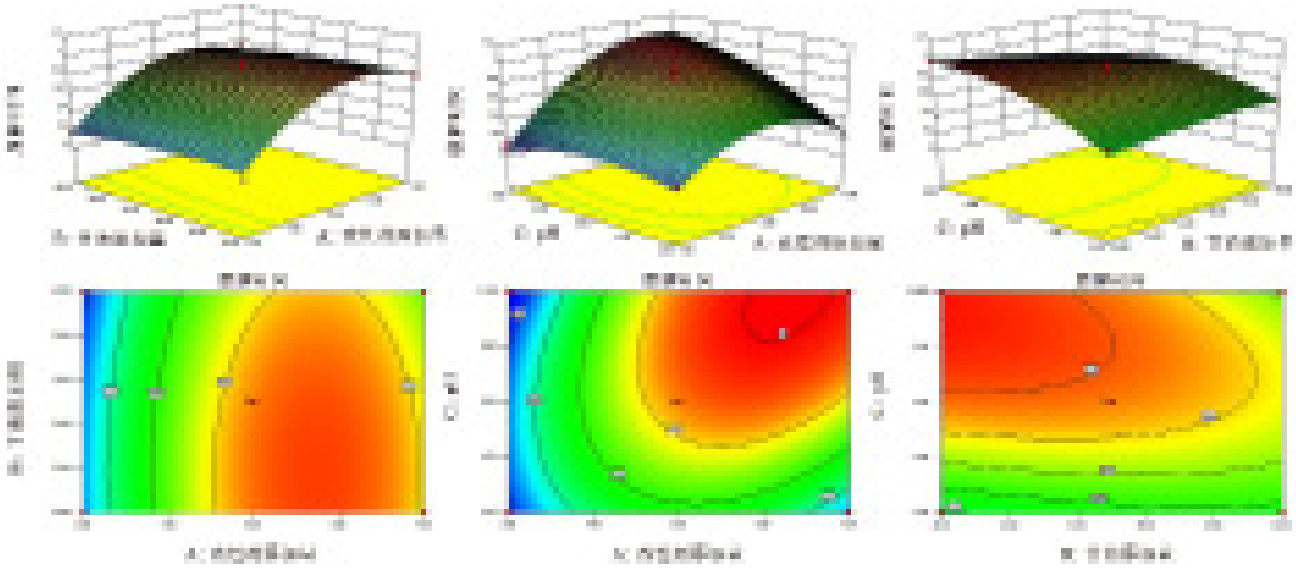


图 4　各因素交互作用对甲醛处理后崩解时间的响应面图和等高线图

Fig 4　Response surface plot and contour plot of interaction of various factors on disintegration time after formaldehyde treatment

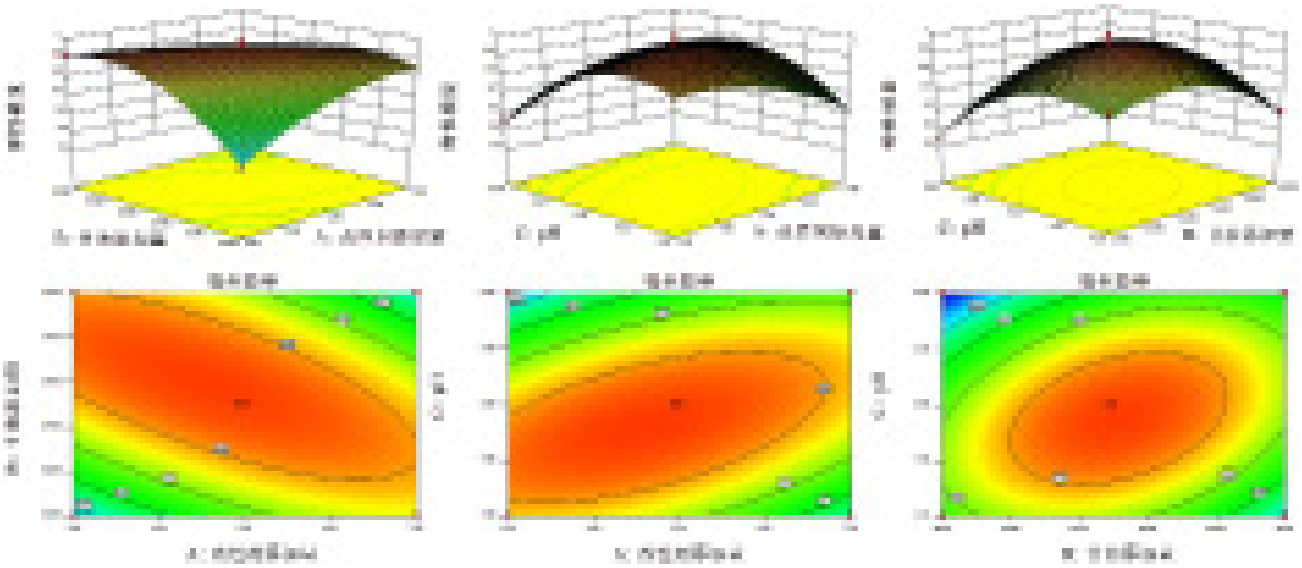


图 5　各因素交互作用对胶片弹性模量的响应面图和等高线图

Fig 5　Response surface plot and contour plot of interaction of various factors on elastic modulus of film

表 4　响应值 *b* 回归模型的方差分析结果

Tab 4　Variance analysis of response value *b* regression model

来源	平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值
模型	0.49	9	0.054	40.60	< 0.0001
A	1.531×10^{-4}	1	1.531×10^{-4}	0.11	0.7450
B	3.916×10^{-3}	1	3.916×10^{-3}	2.93	0.1307
C	0.017	1	0.017	12.66	0.0092
AB	0.089	1	0.089	66.43	< 0.0001
AC	0.060	1	0.060	45.09	0.0003
BC	0.049	1	0.049	36.37	0.0005
A^2	0.021	1	0.021	16.06	0.0051
B^2	0.096	1	0.096	71.72	< 0.0001
C^2	0.13	1	0.13	95.53	< 0.0001
残差	9.084×10^{-3}	7	1.337×10^{-3}		
失拟项	4.043×10^{-3}	3	1.348×10^{-3}	1.01	0.4741
纯误差	5.315×10^{-3}	4	1.329×10^{-3}		
总和	0.50	16			

应值进行优化试验。利用 Design-ExpertV 8.0.6 软件对表 2 数据进行分析，得到各因素与响应值之间的多元二次回归模型：$c = 0.96 - 0.024A + 0.034B + 0.025C - 0.088AB + 0.097AC + 0.11BC - 0.062A^2 - 0.10B^2 - 0.12C^2$。回归模型 $F = 18.62$，$P = 0.0004$，说明本法可靠。表 5 中，失拟项 $P = 0.1516 > 0.05$，表明该方程对试验拟合情况好，试验误差小，失拟项模型选择合适；$R^2 = 0.9599$，$R^2_{Adj} = 0.9083$，说明试验结果有 90.83% 受试验因素影响，模型试验误差小，试验预测值与实际值拟合较好。

由表 5 可知，模型的一次项 *B*，二次项 *AB*、*AC*、*BC*、B^2、C^2、A^2 对硬度响应值影响显著（$P < 0.05$），各因素对硬度响应值的影响依次为

表 5 响应值 *c* 回归模型的方差分析结果

Tab 5 Variance analysis of response value *c* regression model

来源	平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值
模型	0.27	9	0.030	18.62	0.0004
A	4.560×10^{-3}	1	4.560×10^{-3}	2.82	0.1372
B	9.453×10^{-3}	1	9.453×10^{-3}	5.84	0.0463
C	4.901×10^{-3}	1	4.901×10^{-3}	3.03	0.1254
AB	0.031	1	0.031	19.03	0.0033
AC	0.038	1	0.038	23.25	0.0019
BC	0.046	1	0.046	28.56	0.0011
A^2	0.016	1	0.016	9.91	0.0162
B^2	0.043	1	0.043	26.65	0.0013
C^2	0.065	1	0.065	40.30	0.0004
残差	0.011	7	1.619×10^{-3}		
失拟项	7.923×10^{-3}	3	2.641×10^{-3}	3.10	0.1516
纯误差	3.409×10^{-3}	4	8.522×10^{-4}		
总和	0.28	16			

$B > C > A$。各因素交互作用对硬度响应值影响的响应面图和等高线图见图 6，结合表 5 可知，*AB*、*AC*、*BC* 交互作用对硬度响应值影响均极显著（$P < 0.01$）。

3.2.3 响应面优化及验证 得到改性明胶囊壳的最佳理论条件为：酸酐添加量为明胶的 5.51%，甘油添加量为明胶的 35.10%，胶液 pH 为 5.21。在此条件下预测的响应值分别为 $a = 0.940$，$b = 0.935$，$c = 0.959$。结合实际生产条件，确定最佳工艺条件为：酸酐添加量为明胶的 5.5%，甘油添加量为明胶的 35%，胶液 pH 为 5.20。在此条件下进行 5 次平行验证试验，测得甲醛处理后崩解时间为 20.00 s，胶片弹性模量为 14.64 $N\cdot mm^{-2}$，硬度为 2035.85 g，实际响应值分别为 $a = 0.950$，$b = 0.967$，$c = 0.958$，与理论预测值相比，相对误差分别为 1.06%、3.42%、0.10%。接近理论模型预测值，说明该模型对试验结果拟合情况好，误差小，可以利用响应面法对改性明胶囊壳制备工艺进行预测与分析。未改性胶片与改性胶片实物图片见图 7。

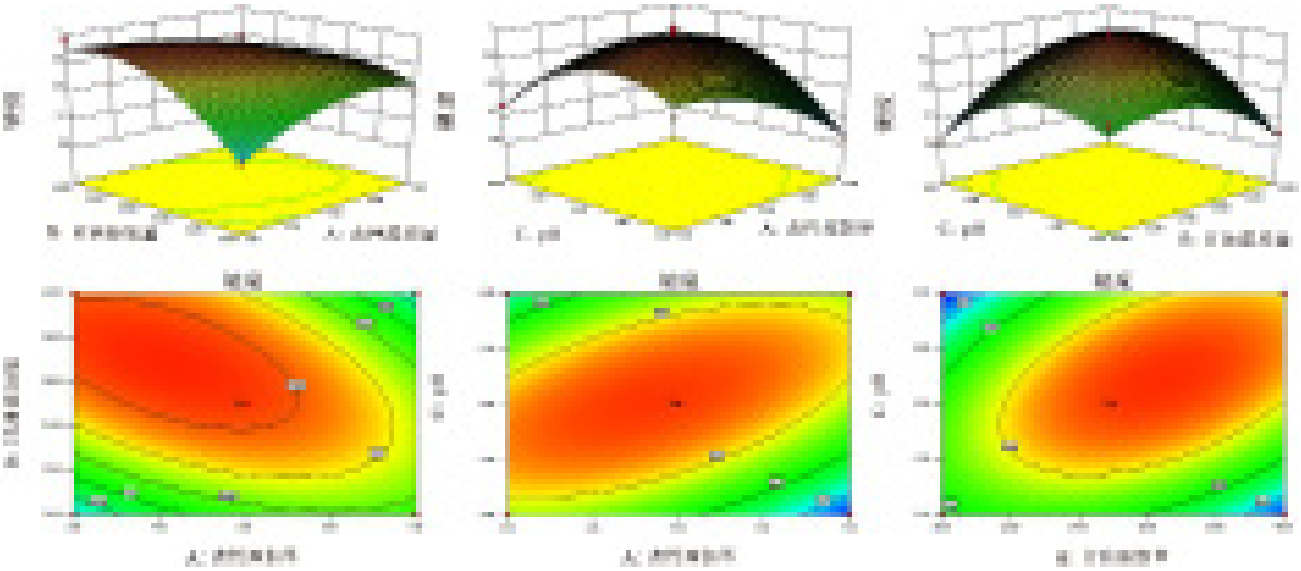


图 6 各因素交互作用对胶片硬度的响应面图和等高线图

Fig 6 Response surface plot and contour plot of interaction of various factors on film hardness

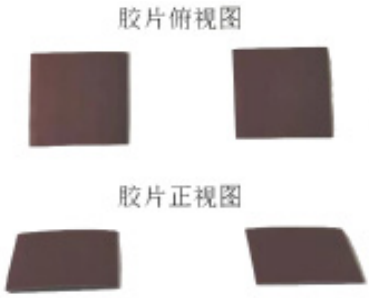


图 7 未改性胶片（左）与改性胶片（右）实物图片

Fig 7 Physical picture of unmodified（left）and modified（right）film

4 讨论

软胶囊老化现象主要是由囊壳成分明胶发生交联反应引起老化导致的，是明胶分子中的氨基酸（主要是赖氨酸和精氨酸）自氧化交联和外界（一般指内容物）引入的低分子醛类物质交联这两种反应综合作用的结果，后者对软胶囊崩解的影响较大，具体表现为软胶囊囊壳内壁出现一层只能溶胀而不能溶解的膜状物质，导致软胶囊在储存期崩解或溶出迟缓，本试验通过对明胶进行酰化改性，减少明胶的交联位点，增强了明胶软胶囊的稳定性。为延缓软胶囊老化研究提供了一种可行的思路与方法，为琥珀酰明胶软胶囊的制备奠定了理论基础。

参考文献

[1] 帅放文，章家伟，王向峰，等 . 新型羟丙基淀粉空心胶囊替代明胶胶囊的可行性研究 [J]. 中南药学，2015，13（8）：827-831.

[2] 霍晋涛，周洋，程鹏 . 一种软胶囊及其制备方法 [P]. 中国：CN101596174，2009-12-09.

[3] Bharate SS，Vishwakarma RA. Impact of preformulation on drug development [J]. Expert Opin Drug Del，2013，10（9）：1239-1257.

[4] 曾建成，黄朝霞，吴晓春，等 . 非明胶软胶囊囊材研究进展 [J]. 现代食品科技，2012，28（9）：1266-1271.

[5] 刘建平，马旭，朱家壁 . 评价软胶囊中明胶交联反应的相关指标间的相关性及影响因素 [J]. 药学学报，2005，40（3）：279-284.

[6] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：129-130.

[7] Mu C，Guo J，Li X，et al. Preparation and properties of dialdehyde carboxymethyl cellulose crosslinked gelatin edible films [J]. Food Hydrocolloid，2012，27（1）：22-29.

[8] 赵国华，王光慈，陈宗道，等 . 改性对玉米蛋白质功能性质和结构的影响（Ⅱ）酰化 [J]. 中国粮油学报，2000，15（4）：16-19.

[9] Shimokawa Y，Hayakawa E，Takahashi K，et al. Pharmaceutical formulation analysis of gelatin-based soft capsule film sheets using near-infrared spectroscopy [J]. J Drug Deliv Sci Tec，2018，48：174-182.

[10] 徐幸，童群义 . 基于明胶硬胶囊性能评价的明胶—普鲁兰复合膜研究 [J]. 食品与机械，2019，35（5）：137-143.

[11] 钟乐，肖乃玉，翟万京 . 响应面优化明胶 - 壳聚糖可食性复合膜的制备 [J]. 包装工程，2017，38（19）：98-103.

[12] 罗锦杰，林华庆，陈琼，等 . 植物软胶囊的处方优化及加速稳定性考察 [J]. 中国医药工业杂志，2017，48（2）：215-219.

（收稿日期：2021-11-29；修回日期：2021-12-29）

黄连 - 干姜对糖尿病大鼠脑脊液中主要生物标志物动态变化干预作用的研究

陈旭，周游*，刘琳，王冬雪（哈尔滨商业大学药学院，哈尔滨　150010）

摘要：目的　探究黄连 - 干姜对糖尿病大鼠脑脊液中的 Aβ42、p-tau、Ach 含量动态变化的影响。**方法**　腹腔注射 1% STZ 55 mg • kg^{-1} 复制大鼠糖尿病模型，将糖尿病大鼠按照血糖和体质量随机分成模型组、黄连 - 干姜组、二甲双胍组，连续给药 75 d，并动态监测各组糖尿病大鼠空腹血糖；每隔 15 d 应用小脑延髓池穿刺法采集脑脊液，用酶联免疫吸附法动态测定各组药物对大鼠脑脊液中的 Aβ42、p-tau、Ach 含量变化，以及建模 75 d 大鼠后脑组织内 Aβ42 的含量。**结果**　与空白组比较，模型组大鼠空腹血糖显著升高，模型稳定；大鼠脑脊液中 Aβ42 的含量不断下降，在用药 30 d 时含量显著降低；脑脊液中 Ach 的含量在用药 30、60、75 d 均较低；脑脊液中 p-tau 的含量在用药 60、75 d 时显著升高；脑组织中 Aβ42 的含量显著增加。而黄连 - 干姜对此变化趋势具有调节作用，与模型组比较，黄连 - 干姜组大鼠用药 60、75 d 空腹血糖显著降低；脑脊液中 Aβ42 的含量在用药 30、60、75 d 显著升高；脑脊液中 Ach 的含量在用药 30 d 显著升高；脑组织中 Aβ42 的含量显著减少。**结论**　黄连 - 干姜可改善糖尿病大鼠空腹血糖，降低脑组织中 Aβ42 的含量，提高脑脊液中 Aβ42、Ach 的含量。

关键词：糖尿病；黄连 - 干姜；小脑延髓池穿刺法；脑脊液；生物标志物

中图分类号：R286　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0799-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.012

Effect of coptis-dried ginger on the dynamic changes of main biomarkers in the cerebrospinal fluid of diabetic rats

CHEN Xu, ZHOU You*, LIU Lin, WANG Dong-xue (*School of Pharmaceutical Sciences*, *Harbin University of Commerce*, *Harbin* 150010)

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81673871）；哈尔滨商业大学 2020 年研究生创新科研资金项目（No.YJSCX2020-683HSD）。

作者简介：陈旭，女，硕士研究生，主要从事中药防治重大疾病研究，email：2440733193@qq.com　*通信作者：周游，女，副教授，主要从事中药防治重大疾病研究，email：zhouyou1199@163.com

Abstract: Objective To determine the effect of Coptis-dried ginger on the dynamic changes of Aβ42, p-tau and Ach content in the cerebrospinal fluid of diabetic rats. **Methods** The rats were intraperitoneally injected 1% STZ 55 mg • kg^{-1} to create a diabetic model. The diabetic rats were randomly divided into a model group, a Coptis-dried ginger group and a metformin group according to their blood glucose and body weight. The rats were administered continuously for 75 d, and the fasting blood glucose of each group was dynamically monitored. At the same time, the cerebrospinal fluid was collected every 15 d, and the changes of Aβ42, p-tau and Ach content in the cerebrospinal fluid of rats treated by drugs in each group, as well as the content of Aβ42 in the brain tissue 75 d after the model establishment were determined dynamically by ELISA. **Results** Compared with the control group, fasting blood glucose was significantly increased in model group and the model was stable. The content of Aβ42 in cerebrospinal fluid of rats decreased continuously, and decreased significantly after 30 d of medication. The content of Ach in cerebrospinal fluid was low at 30, 60 and 75 d. The content of p-tau in cerebrospinal fluid increased significantly at 60 and 75 d after the treatment. The content of Aβ42 in brain tissue was significantly increased. Compared with the model group, fasting blood glucose of rats in Coptis-dried ginger group was significantly decreased at 60 and 75 d after the treatment. The content of Aβ42 in cerebrospinal fluid increased significantly at 30, 60 and 75 d after the treatment. Ach content in cerebrospinal fluid increased significantly 30 d after the treatment. The content of Aβ42 in brain tissue was significantly decreased. **Conclusion** Coptis-dried ginger can decrease the fasting blood glucose and Aβ42 content in the brain tissue and increase the content of Aβ42 and Ach in the cerebrospinal in diabetic rats.

Key words: diabetes; Coptis-dried ginger; cerebellomedullary cistern puncture; cerebrospinal fluid; biomarker

据国际糖尿病联盟统计，2021 年全球 20 ～ 79 岁人群的糖尿病患病率高达 10.5%（5.366 亿人），保守预测到 2045 年其发病率将上升至 12.2%[1]。糖尿病发病过程中会引起不同程度的认知损害[2]，脑脊液中的主要生物标志物如β-淀粉样蛋白（amyloid β-protein，Aβ）、tau 蛋白、乙酰胆碱（acetylcholine，Ach）等[3-4]，参与机体众多的生理功能，与认知障碍的发生发展密切相关[5]。本文通过改良小脑延髓池穿刺法对糖尿病大鼠脑脊液进行连续采集，测定脑脊液中 Aβ42、p-tau、Ach 的含量，为明确黄连 - 干姜的药物作用提供基础。

1 材料

1.1 动物

雄性 Wistar 大鼠 60 只，8 ～ 10 周龄，体质量（200±20）g [北京维通利华实验动物技术有限公司，许可证号：SCXK（京）2012-0001]。动物分组分笼饲养于 12 h 明暗交替的环境中，温度为 18 ～ 21 ℃，相对湿度为（50±5）%。实验动物采用标准饲料喂养，实验期间可自由摄食、饮水。

1.2 试药

黄连、干姜（哈尔滨世一堂药材公司），经哈尔滨商业大学药用植物教研室张德连教授鉴定分别为毛茛科植物黄连（*Coptis chinensis* Franch.）的干燥根茎、姜科植物姜（*Zingiber officinale Rosc*.）的干燥根茎；链脲佐菌素（streptozotocin，STZ，北京博爱科贸有限公司 Sigma 分装，批号：S0130）；葡萄糖测定试剂盒（长春汇力，批号：050411）；盐酸二甲双胍片（澳大利亚艾华大药厂，批号：A108R，规格：每片含盐酸二甲双胍 0.5 g）；Ra Ach ELISA 试剂盒、Ra Aβ42 ELISA 试剂盒、Ra p-tau ELISA 试剂盒 [上海蓝基（BG）生物科技有限公司]。

1.3 仪器

一次性使用静脉输液针（江西洪达医疗器械集团有限公司）；标准型单臂脑立体定位仪（型号 68001，深圳市瑞沃德生命科技有限公司）；酶标分析仪（型号 RT-6000，RAYTO 公司）。

2 方法

2.1 模型复制

2.1.1 缓冲液的配制 A 液：2.10 g 柠檬酸（分子量 210.14）溶于 100 mL 无菌注射用水，配制成 0.1 mol • L^{-1} 柠檬酸溶液；B 液：2.94 g 柠檬酸钠（分子量 294.10）溶于 100 mL 无菌注射用水，

配制成 0.1 mol • L^{-1} 柠檬酸钠溶液；取 A 液 57 mL、B 液 43 mL（按 1∶1.32），将两者混合，测定 pH 值，调节 pH 值为 4.2 ～ 4.5，0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，置于 4 ℃冰箱备用。

2.1.2　腹腔注射 STZ 溶液　动物适应性饲养 1 周后，禁食不禁水 16 h，以冰缓冲液将 STZ 粉末溶解，避光操作，配制 1% 的 STZ 溶液，现用现配。模型组按照给药剂量 55 mg • kg^{-1} 腹腔注射，冰上避光操作，15 min 内注射完毕；对照组腹腔注射相同剂量缓冲液。注射 STZ 72 h 后检测血糖，选择空腹血糖≥ 16.7 mmol•L^{-1} 的动物纳入实验。

2.2　分组与给药

2.2.1　药液制备　黄连 - 干姜水煎液：取黄连、干姜（质量比 2∶1）加水浸泡 30 ～ 45 min，煎煮两次，合并滤液（按黄连计，10 g • mL^{-1}），放入 4 ℃冰箱中备用，在 7 d 内使用。

二甲双胍药液制备：盐酸二甲双胍片剂研成细粉，用蒸馏水配制成质量浓度为 3.76 mg • mL^{-1} 的溶液，4 ℃保存，在 3 d 内使用。灌胃前将药液放至常温后使用。

2.2.2　动物分组　模型组大鼠依据血糖随机分为模型组（n = 12）、黄连 - 干姜组（n = 12）、二甲双胍组（n = 11）和对照组（n = 10）。对照组与模型组以蒸馏水灌胃；黄连 - 干姜组给予黄连 - 干姜水煎液，每日给药剂量为 2.24 g • kg^{-1}；二甲双胍组给予 3.76 mg • mL^{-1} 二甲双胍药液，每日给药剂量为 75.20 mg • kg^{-1}，给药容积均为 1 mL/100 g。以上各组每日灌胃两次，给药 75 d。

2.3　空腹血糖测定

实验前更换垫料，禁食 16 h，自由饮水。大鼠乙醚麻醉，眼底静脉丛取血 0.5 mL，肝素抗凝，离心（3000 r•min^{-1}，10 min），吸取上清液，采用葡萄糖氧化法测定血糖，按试剂盒说明书进行操作。

2.4　酶联免疫吸附法测定大鼠脑脊液中主要生物标志物

2.4.1　人工脑脊液的配制　准确称取 NaCl 7.247 g，KCl 0.373 g，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.493 g，KH_2PO_4 0.174 g，$NaHCO_3$ 2.184 g，混合定容至 100 mL，即为母液（10×）。取母液 10 mL，加入葡萄糖粉 0.198 g，充分溶解，再加入 1 mol • L^{-1} $CaCl_2$ 0.2 mL（去离子水配制），去离子水定容至 100 mL，0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，置于 4 ℃冰箱备用。

2.4.2　大鼠脑脊液采集　大鼠采用腹腔注射戊巴比妥钠麻醉（给药剂量为 45 mg • kg^{-1}，给药容积为 0.15 mL/100 g），备皮，将其固定于脑立体定位仪上，保证操作台水平，两侧耳杆在同一直线，门齿杆较耳杆低 0.33 cm。维持体温 37 ℃，皮肤消毒。颈后部纵切口（1 ～ 1.5 cm），钝性分离肌肉，扩大视野。干棉球按压止血，保持术口清晰，钝性分离肌肉暴露至寰枕膜。采用一次性静脉输液针（针斜面向上）缓慢水平刺入至小脑延髓池，另端连接好 1 mL 注射器，缓慢收集脑脊液。针尖完全进入后即可直接抽取脑脊液，若未见脑脊液流出，可轻微旋转针体。

脑脊液能够抽出并且澄清、无血为采集成功。穿刺成功者，收集脑脊液后，注入等量的消毒人工脑脊液，以保持原来脑脊髓腔的压力。术毕，逐层缝合，将少许青霉素粉末洒至伤口处。术后，动物单笼饲养，每日伤口消毒两次，肌内注射 80 000 u • d^{-1} 青霉素，连续 3 d。大鼠恢复 5 ～ 7 d 后，如愈合良好并且适应环境后即可用于拆线合笼。操作示意如图 1。

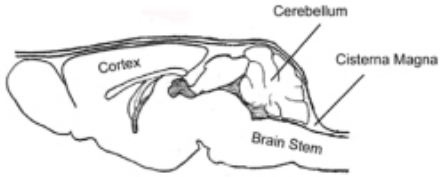


图 1　大鼠小脑延髓池

Fig 1　Cerebellomedullary cistern of rat

2.4.3　大鼠脑脊液中 Aβ42、Ach、p-tau 动态变化的测定　依试剂盒说明书进行操作，用酶标仪于相应波长下测定吸光度，计算各组大鼠脑脊液中 Aβ42、Ach、p-tau 的含量。

2.5　大鼠脑组织中 Aβ42 的测定

大鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠（剂量 45 mg • kg^{-1}）进行麻醉，随后断头剥离脑组织。依试剂盒要求处理样本，并进行显色，用酶标仪于相应波长下测定吸光度，计算各组大鼠脑组织中 Aβ42 的含量。

2.6　统计方法

应用 SPSS 21.0 For Windows 统计软件中方差分析进行数据资料处理，结果均以平均值 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。两组间比较采用独立样本 t 检验，三组及以上组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 法。P < 0.05 说明差异有统计学意义。

3　结果

3.1　黄连 - 干姜对糖尿病大鼠空腹血糖的影响

与空白组比较，模型组大鼠空腹血糖均升

高（$P < 0.01$）；与模型组比较，黄连 - 干姜组用药 60、75 d 时空腹血糖显著降低（$P < 0.05$），二甲双胍组用药 60、75 d 时空腹血糖显著降低（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。结果见图 2A。

3.2 黄连 - 干姜对糖尿病大鼠脑脊液 Aβ42、Ach、p-tau 动态变化的影响

结果发现，模型组大鼠脑脊液中 Aβ42 含量不断下降，与空白组比较，在用药 30 d 时含量显著下降（$P < 0.01$）；而黄连 - 干姜对此变化趋势具有调节作用，与模型组比较，黄连 - 干姜组大鼠在用药 30、60、75 d 脑脊液中 Aβ42 含量显著升高（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$），二甲双胍组大鼠在用药 30 d 时脑脊液 Aβ42 显著升高（$P < 0.05$），结果见图 2B。空白组和模型组大鼠脑脊液中 Ach 用药前未出现差异，与空白组比较，模型组大鼠在用药 30、60、75 d Ach 含量均较低（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）；而黄连 - 干姜对此变化趋势具有调节作用，与模型组比较，黄连 - 干姜组大鼠脑脊液中 Ach 含量在用药 30 d 时显著升高（$P < 0.01$）；二甲双胍组对脑脊液中 Ach 含量的调节作用不明显，结果见图 2C。与空白组比较，模型组大鼠脑脊液 p-tau 含量在用药 60、75 d 时显著升高（$P < 0.01$）；与模型组比较，黄连 - 干姜组和二甲双胍组在用药 30 d 后，有一定的改善作用，但差异无统计学意义（$P > 0.05$）。结果见图 2D。

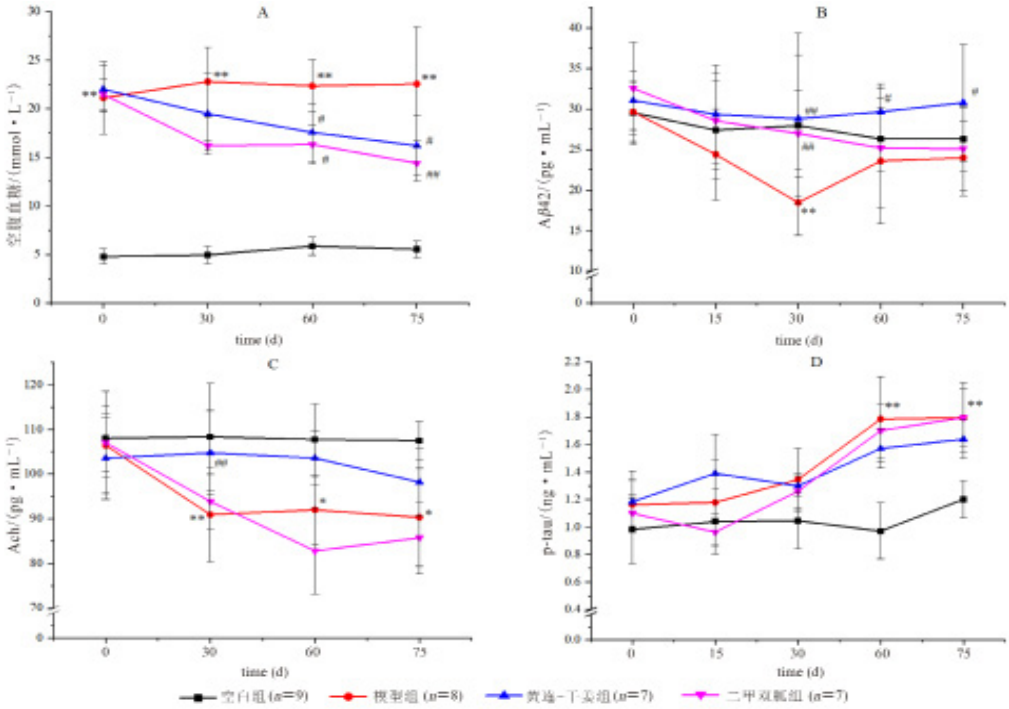


图 2 黄连 - 干姜对糖尿病大鼠空腹血糖及脑脊液 Aβ42、Ach、p-tau 的影响

Fig 2 Effect of Coptis-dried ginger on FBG，Aβ42，Ach，and p-tau in diabetic rats

注（Note）：与空白组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$（Compared with the control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；compared with the model group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$）。

3.3 黄连 - 干姜对糖尿病大鼠脑组织 Aβ42 的影响

与空白组比较，模型组大鼠造模 75 d 各脑组织中 Aβ42 含量增加（$P < 0.05$）；与模型组比较，黄连 - 干姜组脑内 Aβ42 水平显著降低（$P < 0.05$）。结果见图 3。

4 讨论

脑脊液被视为脑内传输媒体，被广泛用于临床研究，通过对脑脊液中各成分的分析，可动态观察药物对该模型的影响 [6]。采集实验动物脑脊液的方法大致分为两类：其一是侧脑室穿刺法，在动物颅骨表面钻孔插管引流脑脊液 [7]；其二是穿刺进入小脑延髓池抽取脑脊液的方法 [8]。由于大鼠的脑室及蛛网膜下腔狭小，侧脑室穿刺法在采集时所需时间过长，脑脊液标本采集困难，且穿刺过程中要穿过脑组织，故此法易造成脑组织损伤和出血，失败率非常高 [9]。据报道，体质量 300 g 的大鼠脑脊液总体积大约 580 μL，可以被抽出的脑脊液更少，故采集到足量的脑脊液用于分析是一个关键，采用静脉输液针行小脑延髓池的方法可以采集约 120 μL 用于检测。实验前期研

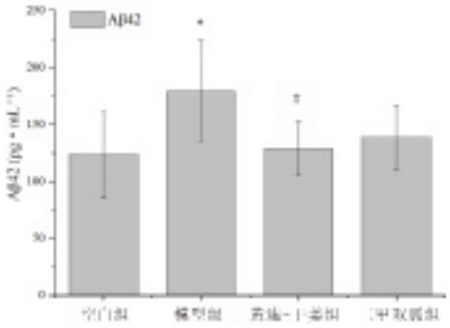


图 3　黄连 - 干姜对糖尿病大鼠脑组织 Aβ42 的影响（$n = 7$）

Fig 3　Effect of Coptis-dried ginger on brain Aβ42 in diabetic rats（$n = 7$）

注（Note）：与空白组比较，$^{*}P < 0.05$；与模型组比较，$^{\#}P < 0.05$（Compared with the control group，$^{*}P < 0.05$；compared with the model group，$^{\#}P < 0.05$）。

究比较了静脉输液针穿刺法、微量注射器穿刺法、毛细玻管穿刺法进行大鼠小脑延髓池穿刺连续采集脑脊液的效果，发现静脉输液针穿刺法具有以下优点：① 可以更精确地控制采集时脑脊液的取得量；② 因针头带针柄，在脑脊液采集过程中比较容易固定，利于采集；③ 针头较细，在刺破硬脑膜时脑脊液溢出量很少，且有利于第二次抽取；④ 可以减少残余在抽取器械内壁上脑脊液的量，避免浪费；⑤ 内径较小，便于控制抽取速度，可以将抽取速度精确地控制在 50 μL•min^{-1} 左右。本实验采用一次性静脉输液针进行小脑延髓池穿刺连续采集大鼠脑脊液，连续采集 5 次以上动物占 54.3%，连续采集 4 次以上动物占 80.0%，脑脊液采集量均在 120 μL 以上，可以保证脑脊液相关指标的动态分析。但在长期饲养中发现，此脑脊液采集方法仍存在一定的术后感染风险，受饲养环境影响而导致动物死亡，因此，在后面的研究中可以致力于非手术性采集方法的发掘。

糖尿病发病率逐年攀升，其引起的认知损害也广泛受到关注，现普遍认为其与阿尔茨海默病（AD）有密切联系，前期研究发现，糖尿病模型大鼠 90 d 内出现明显学习记忆损害 [10]，Aβ 沉积是其核心病理特征之一。Aβ 具有明显的神经毒性，可引起炎症反应、氧化应激等进一步损害突触可塑性、胆碱等神经系统功能等，脑脊液中 Aβ42 的水平，可反映构成老年斑的核心成分纤维状 Aβ 的含量，且 Aβ 沉积一般发生在 AD 早期。tau 蛋白的过度磷酸化会降低微管的稳定，使微管解聚，从而形成神经元纤维缠结 [11]。Ach 作为一种重要的神经递质，研究发现提高脑内 Ach 的含量能够修复 AD 患者损伤的胆碱能功能 [12]，组织神经元间 Ach 的代谢对提高学习、记忆关系重大 [13]。本实验自模型建立起，每隔 15 d 采集大鼠脑脊液，发现大鼠脑脊液中 Aβ42 自 15 d 开始降低，至 30 d 降到最低，与空白组相比差异具有统计学意义，而后缓慢升高。根据结果分析，在模型建立初期，血糖的剧烈升高可能引起了体内 Aβ42 的糖化现象。临床上，脑脊液中 Aβ42 的降低可能意味着脑内发生 Aβ 沉积，在实验最后对脑组织内的 Aβ42 的测定结果也证实了这一点。此外，实验发现，随着病程发展，糖尿病大鼠脑脊液中 p-tau 持续升高，与空白组相比，在给药 60、75 d 差异具有统计学意义。究其原因，可能与糖尿病引起的胰岛素抵抗现象导致的 PI3K 途径的 GSK-3 的活化相关，有待进一步考证。与空白组比较，糖尿病大鼠脑脊液中 Ach 含量呈下降趋势，经过相关性分析发现，Ach 变化与 Aβ42、p-tau 变化成负相关（$r = -0.916$），提示糖尿病大鼠脑脊液中 Ach 的变化由 Aβ42、p-tau 的变化共同决定，且由前述分析可知，模型建立 0 ～ 30 d 时，p-tau 的变化不明显，此时 Aβ42 的变化是 Ach 的变化的主要影响因素，故在药物干预时，应选择能够在早期控制血糖、纠正脑脊液中 Aβ42 降低的药物，以减少认知损害。

本实验证实了黄连 - 干姜具有较好的降低糖尿病大鼠空腹血糖的作用，接近于二甲双胍的作用，且在给药 60、75 d 时作用明显。模型组大鼠脑脊液 Aβ42 呈现先降低后缓慢升高趋势，二甲双胍组大鼠变化趋势同模型组，与模型组大鼠比较，黄连 - 干姜能够升高 30、60、75 d 脑脊液中 Aβ42 的含量；模型建立 75 d 后，黄连 - 干姜能够降低脑组织内 Aβ42 含量，黄连 - 干姜具有降低 60、75 d 脑脊液中 p-tau 蛋白的趋势，但差异无统计学意义；黄连 - 干姜能够提高给药 30、60、75 d 脑脊液中 Ach 含量。通过对黄连 - 干姜对糖尿病干预作用的初步研究，表明其可改善糖尿病大鼠空腹血糖，降低脑组织中 Aβ42 含量，提高脑脊液中 Aβ42、Ach 含量。

历代本草记载，黄连苦寒无毒，神农本草经归为上品，仅《伤寒杂病论》中含有黄连的方剂就有 14 个 [14]。小檗碱为黄连中的主要有效成分之一，研究发现，小檗碱能够通过改善脑血流量，保护神经元免受炎症，限制 tau 的高磷酸化等多种机制妨碍 AD 的发展。同时，小檗碱对糖尿病和相关疾病有效，例如动脉粥样硬化、心肌病、高血压、肝脏脂肪病、糖尿病肾病、肠道脱敏和神经病变等，表明其有预防认知障碍的间接

益处[15]。此外，有研究报道采用小檗碱联合二甲双胍进行口服给药对 db/db 小鼠糖尿病发展过程中引起的认知功能障碍有改善作用，且比单独给药二甲双胍效果更明显，其作用机制可能与抗炎、抗氧化应激以及提高兴奋性氨基酸水平等相关[16]。但前期实验发现，单用黄连可导致糖尿病动物出现摄食减少，精神状态萎靡，毛色枯槁，爪甲变白，畏寒扎堆。死亡动物脏器检查主要表现为各肠段胀气较明显，胃部胀大，肠壁变薄，腹部胀气严重，内部有食物残留，其余脏器均未发现明显病变，据此推测，糖尿病动物可能由于单用黄连导致胃肠反应而死亡。且研究发现干姜配伍黄连能够促进小檗碱等黄连中主要生物碱的吸收[17]，故本研究选择具有辛温之性的药物干姜温热补虚，同时制约黄连之苦寒，药物搭配寒热并用、升降相因、切合病机[18]。

实验发现，黄连 - 干姜可改善糖尿病大鼠空腹血糖，降低脑组织中 Aβ42 含量，提高脑脊液中 Aβ42、Ach 含量。据报道，黄连 - 干姜主要是针对糖尿病初期的阴虚热盛阶段，而根据临床糖尿病中、晚期患者以气阴两虚为主，糖尿病认知功能损害患者临床以气阴两虚夹痰证多见[19]，因此后续研究应确立糖尿病认知损害中药预防性干预的用药原则、干预最佳时间窗。另外，应进一步探究黄连 - 干姜影响糖尿病大鼠脑脊液 Aβ42、Ach、p-tau 水平的机制，为阐明药物作用机制提供基础。

参考文献

[1] Hong S，Pouya S，Suvi K，et al. IDF Diabetes Atlas：Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 [J]. Diabetes Res Clin Pract，2022，183：109119.

[2] Jan BG，Florin D. Cognitive decline and dementia in diabetes mellitus：mechanisms and clinical implications [J]. Nat Rev Endocrinol，2018，14：591-604.

[3] Kern S，Syrjanen J A，Blennow K，et al. Association of cerebrospinal fluid neurofilament light protein with risk of mild cognitive impairment among individuals without cognitive impairment [J]. JAMA Neurol，2019，76（2）：187-193.

[4] 王绍洋 . 脑脊液和血液中神经丝轻链作为神经退行性疾病生物标志物的系统评价和 Meta 分析 [D]. 青岛：青岛大学，2020.

[5] Yuki M，Masashi U，Yusuke H，et al. Evaluation of the relationship between cognitive impairment，glycometabolism，and nicotinic acetylcholine receptor deficits in a mouse model of Alzheimer’s disease [J]. Mol Imaging Biol，2019，21（3）：519-528.

[6] 章亚兵，汪宁 . 中药脑脊液药理学研究及应用进展 [J]. 安徽医药，2015，19（4）：613-616.

[7] 顾利强，章媛，徐晓珍，等 . 大鼠脑脊液多次采集改良模型的建立 [J]. 中国现代应用药学，2018，35（3）：311-313.

[8] 朱奕昕，叶冬青，李晓莉 . SD 大鼠脑脊液采集方法的改进 [J]. 中国比较医学杂志，2018，28（4）：113-115.

[9] 曹远东，章龙珍，王梅申，等 . 两种采集 SD 大鼠脑脊液方法的比较 [J]. 徐州医学院学报，2005（4）：317-319.

[10] You Z，Li XL，Xie HL，et al. Voxel-based morphology analysis of STZ-induced type 1 diabetes mellitus rats with and without cognitive impairment [J]. Neurosci Let，2018，684：210-217.

[11] 李丹，徐进，范晓飞，等 . 脑脊液 CK、Aβ42、P-tau 在阿尔茨海默病中的诊断价值 [J]. 分子诊断与治疗杂志，2021，13（3）：392-395.

[12] Stephen G. Acetylcholine neuromodulation in normal and abnormal learning and memory：vigilance control in waking，sleep，autism，amnesia and Alzheimer’s disease [J]. Front Neural Circuit，2017，11：82.

[13] Zhao L，Sun Y，Yu C，et al. Astragaloside protects rat brain from microwave-induced functional injuries via restoring acetylcholine and normalizing electroencephalogram [J]. Environ Sci Pollut Res Int，2020，27（32）：40787-40794.

[14] 徐萍，顾治平 . 黄连的药理作用研究进展 [J]. 临床医药文献电子杂志，2017，4（27）：5333-5336.

[15] Shinjyo N，Parkinson J，Bell J，et al. Berberine for prevention of dementia associated with diabetes and its comorbidities：a systematic review [J]. J Evid-Based Integr，2020，18（2）：125-151.

[16] 曹月盈，孟祥宝，孙桂波，等 . 二甲双胍联合小檗碱对 db/db 小鼠糖尿病认知功能障碍的改善作用 [J]. 中国新药杂志，2021，30（8）：690-700.

[17] 张文君，宁浩辰，周游，等 . 黄连与干姜配伍对黄连中 5 种生物碱的大鼠体内药动学影响 [J]. 中医药学报，2015，43（4）：15-19.

[18] 周莉萍，张效科，王飞 . 中药防治糖尿病认知功能障碍的实验研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（12）：227-234.

[19] 仝小林 . 黄连为主药系列经方在糖尿病辨治中的运用 [J]. 中医杂志，2013，54（3）：209-211.

（收稿日期：2021-12-05；修回日期：2022-01-05）

阿魏酸通过调节 GSK-3β 减轻阿尔茨海默样变化

许英[1, 2]，陈玲[1, 2]，张兰[1, 2]，朱斌[1, 2]，杨阳[1, 2]，王晓梅[1, 2]，洪倩[1, 2*]（1. 徐州医科大学附属淮海医院，江苏　徐州　221004；2. 中国人民解放军陆军第七十一集团军医院，江苏　徐州　221004）

摘要：目的　探讨阿魏酸的抗阿尔茨海默病（AD）的作用及潜在的作用机制。**方法**　利用人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞建立稳定表达人淀粉样前体蛋白（APP）过表达细胞模型（SH-APP 细胞），通过 MTS 和 ELISA 方法分别考察阿魏酸对 SH-APP 细胞活力及 Aβ40 含量的影响，流式细胞法和 caspase-3/7 分析验证了阿魏酸对 SH-APP 细胞的潜在抗凋亡作用，Western blot 法检测阿魏酸对 tau 蛋白过度磷酸化和 GSK-3β 相关凋亡途径的调节作用。采用 Morris 水迷宫实验观察阿魏酸对大鼠痴呆模型学习记忆功能变化的影响。**结果**　本研究建立了稳定表达人 APP 的细胞模型 SH-APP 细胞株并初步考察了阿魏酸抗 AD 的作用。0.25 ～ 10 μmol • L^{-1} 阿魏酸能显著提高 SH-APP 细胞活力并抑制 Aβ40 的分泌。同时，阿魏酸能显著降低 SH-APP 细胞中 caspase-3/7 活性，并显著降低细胞凋亡率，其相关作用机制可能是阿魏酸降低 tau 蛋白磷酸化，并通过调节 SH-APP 细胞中 GSK-3β 的表达、抑制 caspase-9 的剪切而发挥抗神经细胞凋亡的作用。Morris 水迷宫定位航行实验及空间探索实验结果显示，1.5 ～ 6 g • kg^{-1} 阿魏酸能缩短大鼠逃避潜伏期，显著增加穿台次数和在目标象限停留时间。**结论**　阿魏酸可能具有潜在的改善 AD 和 / 或神经病理学相关的神经退行性疾病症状的作用。

关键词：阿尔茨海默病；阿魏酸；淀粉样β；细胞凋亡
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0805-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.013

Ferulic acid reduces Alzheimer-like changes by modulating GSK-3β pathway

XU Ying[1, 2], CHEN Ling[1, 2], ZHANG Lan[1, 2], ZHU Bin[1, 2], YANG Yang[1, 2], WANG Xiao-mei[1, 2], HONG Qian[1, 2*] (1. *Affiliated Huaihai Hospital of Xuzhou Medical University*, *Xuzhou Jiangsu* 221004; 2. *The* 71*st Group Army Hospital of the People's Liberation Army*, *Xuzhou Jiangsu* 221004)

Abstract: Objective To explore the anti-Alzheimer's disease (AD) effect and potential mechanism of ferulic acid (FA). **Methods** Human neuroblastoma SH-SY5Y cells were used to establish a cell model stably expressing human amyloid precursor protein (APP). The effect of FA on the SH-APP cell viability and Aβ40 content was detected by MTS and ELISA. Flow cytometry and caspase-3/7 analysis were used to evaluate the anti-apoptotic effects of FA on SH-APP cells. Western blot was used to detect the regulation of FA on tau hyperphosphorylation and GSK-3β-related apoptotic pathways. The Morris Water Maze Behavior test was used to observe the effect of FA on the changes of learning and memory function in rats with dementia. **Results** We successfully established a robust cellular model that highly expressed Aβ40. The cytotoxicity and ELISA assay revealed that FA increased the cell viability and inhibited Aβ40 accumulation. At the same time, flow cytometry analysis and caspase-3/7 assay validated potential anti-apoptosis effect of FA on SH-APP cells. The underlying mechanism might involve the modulation of tau hyperphosphorylation and GSK-3β associated apoptotic pathway in SH-APP cells. In Morris Water Maze place navigation test, the escape latency of the AD model group was longer than that of the control and sham group with no significant differences between the model group and the FA group. The space exploration test showed that FA at 1.5 ～ 6 g • kg^{-1} significantly increased the number

基金项目：徐州市科技项目（No.KC19041）。
作者简介：许英，女，主管药师，主要从事临床药学工作，email：xysnoopy@sina.com　**通信作者：**洪倩，女，主治医师，硕士研究生导师，主要从事中药药理、儿科药理研究，email：hongqian177@126.com

of crossings and the staying time in the target quadrant. **Conclusion** FA may improve the symptoms of AD and/or neuropathologically related neurodegenerative diseases.

Key words: Alzheimer's disease; ferulic acid; amyloid *β*; apoptosis

阿尔茨海默病（AD）是最常见的神经退行性疾病，是老年人群中主要的痴呆症。据估计，2018 年全球有 4400 万人患有 AD。淀粉样斑块的积累和神经原纤维缠结（NFT）的形成是 AD 的两个典型病理特征。*β*- 淀粉样蛋白（A*β*）聚集在有害的寡聚体和原纤维中，包括神经元细胞死亡。已知该寡聚体会诱导氧化应激，从而触发神经炎症并加速疾病的发展。因此，抑制 A*β* 的产生，从治疗和预防的角度来看可能是具有意义的。此外，tau 过度磷酸化被认为是 tau 蛋白病的主要诱因，大量证据表明，在体外和体内多个 AD 相关位点都显示强烈的 tau 磷酸化 [1]。

阿魏酸（4- 羟基 -3- 甲氧基肉桂酸，FA）是一种酚类化合物，天然存在于植物细胞的细胞壁中，已被证明具有广泛的药理作用，如抗炎、抗糖尿病、抗肿瘤、抗衰老和神经保护。前期研究证实阿魏酸对脂多糖（LPS）刺激或 A*β*25-35 损伤的 PC12 细胞具有保护作用，表明阿魏酸具有潜在的神经保护作用 [2-4]。然而，关于阿魏酸降低 A*β* 水平作用的确切机制尚不清楚。在本研究中，课题组使用稳定转染了人类淀粉样蛋白前体蛋白（APP）的人类神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞来评估阿魏酸对 AD 的影响及相关分子机制。

1 材料

1.1 试药

阿魏酸（中国食品药品检定研究院，批号：110773-201614，通过归一化 HPLC-ELSD 检测确定纯度超过 98%）；MTS、caspase-Glo 3/7 分析检测试剂盒（Promega 公司）；Tris 缓冲液、甘氨酸、SDS 和胎牛血清（BSA）（Amresco 公司）；盐酸嘌呤霉素、DMEM 培养基（Gibco 公司）；Cleaved caspase-9、GAPDH 兔单克隆抗体、山羊抗兔 -HRP 和山羊抗小鼠 -HRP（Cell Signaling Technology 公司）；磷酸化 GSK-3*β*（Y216）兔多克隆抗体（Abcam 公司）；A*β*40 和 A*β*42 ELISA 检测试剂盒（Thermo Fisher Scientific）；A*β*42（Sigma-Aldrich）。其他化学药品均为国产分析纯。

1.2 仪器

CO_2 培养箱（ThermoForma 公司）；Quintix 224-1CN 型电子分析天平（最大载荷 220 g，分度值 0.1 mg，德国 Sartorius 公司）；Western blot 转膜仪（Bio-Rad 公司）；电泳仪（Amersham 公司）；TS-2 型脱色摇床及 TS-8 型转移脱色摇床（江苏海门市麒麟贝尔仪器制造有限公司）；Mini-spin5452 型高速离心机（德国 Eppendorf 公司）；Molecular Devices Flex Station 3 微孔板读数仪（美谷分子公司）；BC-5390CRP 型全自动细胞计数仪（迈瑞医疗国际公司）。

2 方法

2.1 细胞培养及单克隆细胞系的建立

SH-SY5Y 人类神经母细胞瘤细胞系购自中国科学院上海细胞库（No.CRL-2266），进口自 ATCC。使用 DMEM 培养基 [含 10% 胎牛血清，100 U • mL^{-1} 青霉素 / 链霉素，非必需氨基酸和丙酮酸钠（1 mmol • L^{-1}）]，于 37 ℃、5%CO_2 孵箱中培养。使用质粒载体 HBLV-H-APP-3XFLAG-ZNGREEN-PURO 或 HBLV-ZNGREEN-PURO（Hanbio）在 SH-SY5Y 细胞中构建稳定过表达人 APP 的细胞系并命名为 NC 和 SH-APP，通过在含嘌呤霉素（8 μg • mL^{-1}）的选择性培养基中维持培养。单克隆细胞系的构建按照文献所述的方法进行 [5-6]。

2.2 细胞活力测定

将细胞以每孔 1×10^4 个细胞的密度接种到 96 孔板中，并在 37 ℃、5%CO_2 的培养箱中培养 48 h。将 MTS（20 μL/ 孔）加入到每个孔中。温育 2 h 后，使用微孔板读数仪于 450 nm 处检测吸光度。

2.3 Caspase-3/7 活性测定

根据说明书的方法，使用 caspase-Glo 3/7 检测试剂盒检测 caspase-3/7 活性。具体方法为：将 NC 和 SH-APP 细胞以每孔 1×10^4 个细胞的密度接种到 96 孔板中，并用不同浓度的阿魏酸处理 48 h。48 h 后，每孔添加 100 μL 检测试剂，并在黑暗中于室温孵育 1 h 后，在微孔板上检测发光，未处理细胞的 caspase-3/7 活性定义为相对 100% caspase-3/7 活性。

2.4 A*β*40 和 A*β*42 分泌检测

使用人 A*β*40 和 A*β*42 ELISA 试剂盒检测稳定转染人 APP 细胞系中分泌的 A*β* 水平。将 NC 和 SH-APP 细胞在 6 孔板中培养过夜，并用不同浓

度的阿魏酸处理细胞 48 h。收集上清液，并向其中加入蛋白酶抑制剂。根据试剂盒说明操作，将上清液用作 ELISA 样品，每个样品一式两份进行分析。同时，保存细胞用于 Western blot 研究。

2.5　细胞凋亡检测

采用流式细胞仪测定细胞凋亡，将 NC 和 SH-APP 细胞以每孔 4×10^5 个细胞的密度接种在 6 孔板中，并用不同浓度的阿魏酸处理细胞 48 h。然后去除细胞培养基，并用 PBS 洗细胞两次，收获细胞并用含有 Annexin 和 PI 试剂的结合缓冲液在黑暗中染色 15 min，使用流式细胞仪对细胞悬浮液进行定量检测，使用 Flow Jo 软件对检测结果进行数据分析。

2.6　蛋白质印迹分析

将阿魏酸处理过的全细胞提取物在裂解缓冲液 [20 mmol • L^{-1} pH 7.4 Tris，250 mmol • L^{-1} NaCl，2 mmol • L^{-1} EDTA（pH 8.0），0.1% Triton X-100、0.01 mg • mL^{-1} 抑肽酶，0.005 mg • mL^{-1} 亮肽素，0.4 mmol • L^{-1} PMSF 和 4 mmol • L^{-1} $NaVO_4$] 中裂解。将裂解液在 12 000×g 下离心 10 min 以除去不溶物，并用 10% SDS 凝胶溶解。电泳后，将蛋白质电转至硝酸纤维素膜上，用 5% 脱脂牛奶封闭，并加入一抗（1∶1000）4 ℃孵育过夜。洗涤印迹，将其暴露于含有辣根过氧化物酶（HRP）的二抗 1 h，最后通过 ECL 化学发光法进行蛋白印迹检测，蛋白质的相对密度通过 Image J 软件进行分析。

2.7　Morris 水迷宫实验

2.7.1　动物分组　大鼠随机分为 7 组，分别为正常组，假手术组，模型组，多奈哌齐阳性药组，阿魏酸低、中、高剂量组（1.5、3、6 g • kg^{-1}）。正常组和假手术组每组 12 只，雌雄各半，其余 5 组每组 13 只。

2.7.2　Aβ 致 AD 痴呆模型的建立　大鼠适应性饲养 5 d 后，采用立体定位技术双侧海马注射 Aβ42（2 μg • μL^{-1}）5 μL 建立大鼠 AD 模型。假手术组注射等体积的 PBS，正常对照组不进行注射。造模后一周开始灌胃给药，剔除造模过程中死亡动物后，连续给药 5 周。

2.7.3　水迷宫检测　采用 Morris 水迷宫检测大鼠空间学习记忆行为。第 1、2 日为可见平台训练，第 3、4、5 日为隐藏平台训练，第 6 日为空间探索实验。可见平台训练：将插有旗子的水迷宫平台（旗子高于平台 5 cm）置于水迷宫某一象限，放入 25 ℃左右的水至没过平台 1.5 cm。每日从四个象限（4 个入水点）中将大鼠面向池壁放入水中，使其自由游泳 90 s，90 s 内大鼠找到平台并上台停留 15 s 后将其从平台上取下休息，并记录大鼠从入水开始至爬上平台所需的时间（潜伏期）。若 90 s 内动物未找到平台，则人为地将大鼠引导至平台，并停留 15 s，潜伏期记为 90 s。隐藏平台训练：将水迷宫平台上插有的旗子撤去，但平台所在的位置不变，放入 25 ℃左右的水至没过平台 1.5 cm。训练方法同可见平台训练。空间探索实验：撤除平台，任选某一象限将各组大鼠依次从该象限面向池壁放入水中，使其自由游泳 90 s，计算机监测记录大鼠在原平台所在象限停留的时间及穿越原平台所在区域的次数（行为学测试过程中应保持光线柔和、室内安静、各参照物位置不变）。

2.8　数据分析

采用 SPSS 16.0 软件对实验数据进行独立样本 t 检验，计量结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间比较，方差齐采用单因素方差分析，方差不齐则采用秩和检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义，每个实验重复 3 次或更多独立实验。

3　结果

3.1　SH-APP 稳定细胞株的构建及验证

本研究首先构建了稳定表达人 APP 的细胞株，然后通过 Western blot 法和 ELISA 法分别检测了稳定细胞株中 Aβ40 和 Aβ42 的表达情况以验证稳定细胞株是否成功构建。结果见图 1，Western blot 检测结果显示，与 NC 细胞相比，SH-APP 细胞中 Aβ 总蛋白的表达显著升高。NC 细胞和 SH-APP 细胞裂解物中 Aβ40 和 Aβ42 水平以及培养基中 Aβ42 水平均无显著差异；SH-APP 细胞培养基中的 Aβ40 水平显著增加。上述结果提示 SH-APP 稳定细胞株构建成功，后续研究中选择细胞培养基中 Aβ40 的分泌水平来进行药效的评估。

3.2　阿魏酸对 SH-APP 细胞活力及 Aβ40 水平的影响

与 NC 细胞相比，SH-APP 的细胞活力显著降低，表明 SH-APP 细胞具有潜在的神经毒性，而不同浓度的阿魏酸（0.625 ～ 10 μmol • L^{-1}）处理后可显著提高细胞活力，提高细胞存活率（见图 2A）。同时，阿魏酸（0.625 ～ 10 μmol • L^{-1}）处理 SH-APP 细胞 48 h 后能剂量依赖性地降低 Aβ40 分泌水平（见图 2B），结果表明阿魏酸在 SH-APP 细胞中具有潜在神经保护作用。

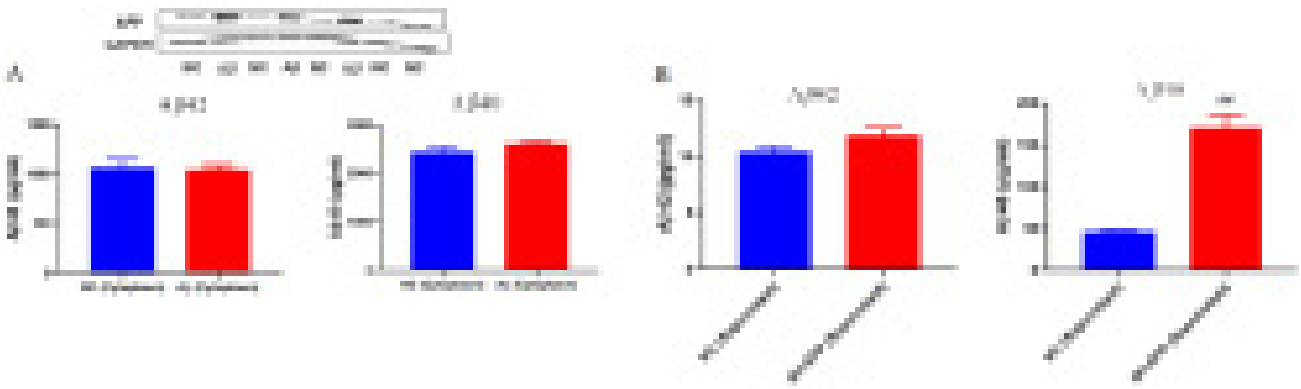


图 1 SH-APP 细胞株的构建及 Aβ 表达水平

Fig 1 Construction of SH-APP cell line and expression level of Aβ

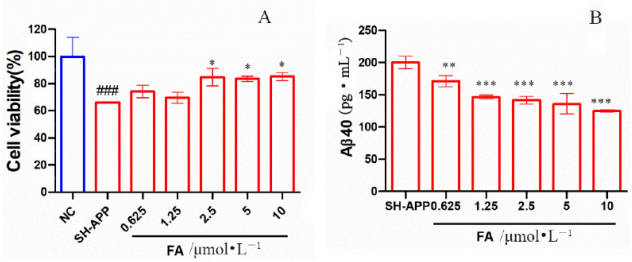


图 2 阿魏酸对 SH-APP 细胞活力（A）和淀粉样蛋白 β（Aβ）分泌的影响（B）

Fig 2 Effect of FA on SH-APP cells viability（A）and amyloid beta Aβ40 secretion（B）

注：与 NC 组比较，$^{\#\#\#}P < 0.001$；与 SH-APP 组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

Note：Compared with the NC group，$^{\#\#\#}P < 0.001$；compared with the SH-APP group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$.

3.3 阿魏酸对 SH-APP 细胞凋亡的影响

如图 3A 所示，caspase-3/7 活性检测结果显示，与 SH-APP 组相比，阿魏酸（1.25 ～ 10 μmol • L^{-1}）处理的 SH-APP 细胞中 caspase-3/7 活性明显降低。流式细胞仪检测结果显示，NC 细胞中细胞凋亡率为 3.3%，而 SH-APP 细胞中细胞凋亡率上升至 10.49%，2.5、5、10 μmol • L^{-1} 阿魏酸处理后的 SH-APP 细胞中细胞凋亡率分别降低至 4.0%、3.6% 和 3.3%，显示阿魏酸具有显著的抗凋亡作用（见图 3B），结果表明阿魏酸可能通过影响细胞凋亡发挥对 SH-APP 细胞的保护作用。

3.4 阿魏酸对 SH-APP 细胞 tau 蛋白磷酸化的影响

如图 4 所示，与 SH-APP 组细胞相比，经阿魏酸（6.25 ～ 25 μmol • L^{-1}）处理的 SH-APP 细

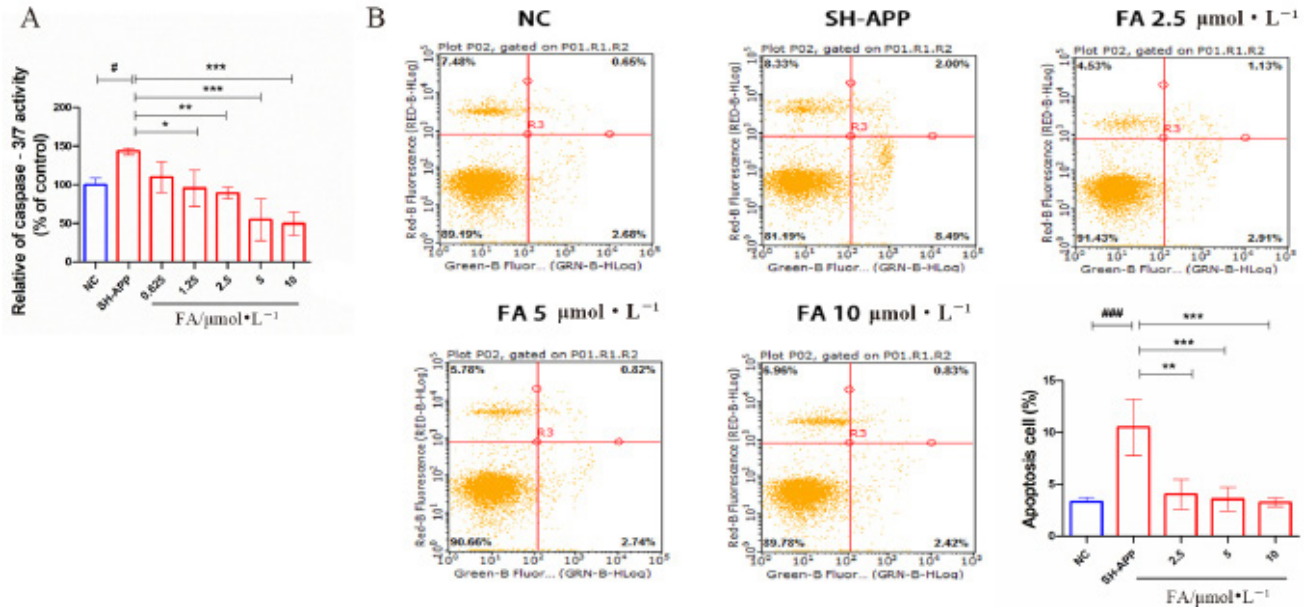


图 3 阿魏酸对 SH-APP 细胞凋亡的影响

Fig 3 Effect of FA on the apoptosis of SH-APP cells

注：与 NC 组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#\#}P < 0.001$；与 SH-APP 组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

Note：Compared with the NC group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#\#}P < 0.001$；compared with the SH-APP group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$.

胞 tau 蛋白在丝氨酸 199/202 和 396 处的磷酸化水平显著降低，表明阿魏酸抑制了 SH-APP 细胞中的 tau 蛋白磷酸化。

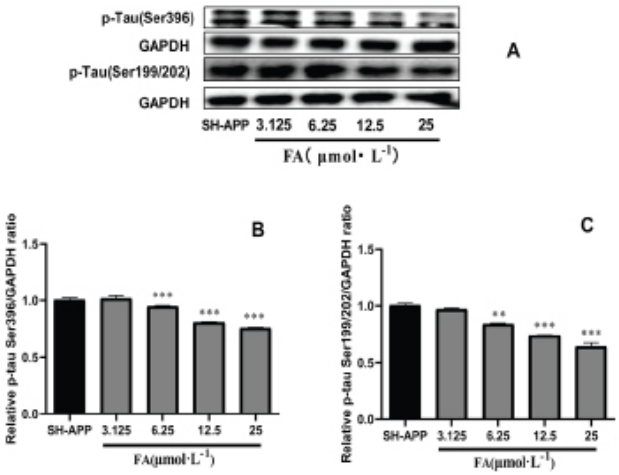


图 4　阿魏酸对 tau 蛋白磷酸化的影响

Fig 4　Effect of ferulic acid on tau hyperphosphorylation

注：与 SH-APP 组比较，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

Note：Compared with the SH-APP group，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$.

3.5　阿魏酸对 SH-APP 细胞中 GSK-3β 及 caspase-9 蛋白的影响

与 SH-APP 组细胞相比，用 25 μmol • L^{-1} 阿魏酸处理的 SH-APP 细胞的 p-GSK-3β（Y216）水平显著降低（见图 5）。此外 25 μmol • L^{-1} 阿魏酸能显著抑制 SH-APP 细胞中裂解的 caspase-9 水平。上述结果提示阿魏酸可能通过调节 GSK-3β 相关的凋亡途径发挥神经保护作用。

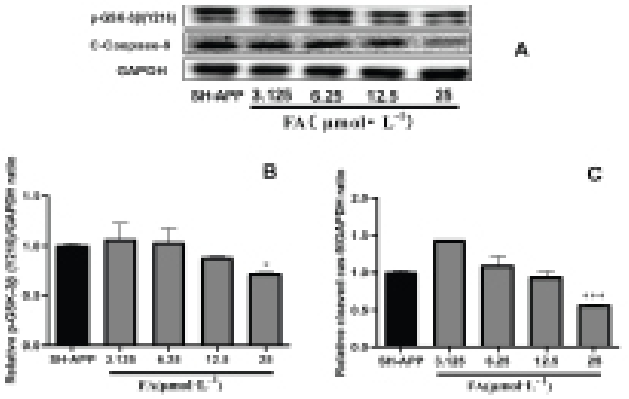


图 5　阿魏酸对 GSK-3β 和 C-caspase-9 的影响

Fig 5　Effect of ferulic acid on GSK-3β and cleaved caspase-9

注：与 SH-APP 组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$。

Note：Compared with the SH-APP group，$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$.

3.6　水迷宫实验

采用 Morris 水迷宫检测大鼠的空间学习、记忆能力，观察阿魏酸对 Aβ 模型大鼠的改善作用。如表 1 所示，与假手术组相比，模型组大鼠表现出较长的潜伏期，表明其空间学习探索能力的损伤。与模型组大鼠相比，阿魏酸低、高剂量组大鼠潜伏期有所缩短，表明大鼠的学习记忆能力得到一定改善。

撤出平台后，水迷宫实验中大鼠的行为由空间探索记忆能力决定。穿台次数是评价空间探索记忆能力的一个指标。如表 1、图 6 所示，经 5 d 的训练后，模型组大鼠在 90 s 内的穿台次数比假手术组明显减少。与模型组大鼠相比，阿魏酸各剂量组大鼠的穿台次数明显增加。此外，在空间探索阶段，模型组大鼠在目标象限停留的时间比假手术组有所缩短，阿魏酸各剂量组较模型组有较长的目标象限停留时间，表明大鼠记忆能力有所改善。

表 1　阿魏酸对大鼠 Morris 水迷宫实验的影响

Tab 1　Effect of ferulic acid on model rat in Morris Water Maze Behavior test

组别	潜伏期 /s	穿台次数	目标象限停留时间 /s
正常组	13.50±6.99	3.83±0.59	35.76±2.78
假手术组	14.61±5.42	3.75±0.59	34.48±3.34
模型组	32.33±7.64$^{\#}$	1.39±0.29$^{\#\#}$	22.89±1.85$^{\#}$
多奈哌齐组	25.11±6.57	2.77±0.36**	33.58±2.73*
阿魏酸低剂量组	23.02±6.28	3.31±0.51**	37.01±2.43**
阿魏酸中剂量组	37.06±9.02	3.77±0.89*	38.50±3.02**
阿魏酸高剂量组	26.89±8.24	4.23±0.85**	34.72±2.14*

注：与假手术组比较，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

Note：Compared with the sham group，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$；compared with the model group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$.

4　讨论

在本研究中，我们利用人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞构建了一种特征明确的稳定表达人 APP 的 SH-APP 细胞 AD 模型，并初步考察了阿魏酸对 SH-APP 细胞的影响。结果显示稳定表达 APP 的 SH-APP 细胞中 Aβ40 的水平显著升高，阿魏酸处理后减轻了 SH-APP 细胞中 Aβ40 水平。同时，阿魏酸显著升高 SH-APP 细胞的细胞活力，并抑制了细胞的凋亡。此外，阿魏酸能显著抑制 SH-APP 细胞中 tau 蛋白 Ser 199/202 和 Ser 396 位点的过度磷酸化，这对形成成对的螺旋细丝至关重要，初步的作用机制可能是阿魏酸通过调节磷酸化 GSK-3β 蛋白和抑制促凋亡蛋白如 caspase-9 的表达来发挥神经保护作用，这与前期报道的阿魏酸通过 PI3K/Akt 信号传导激活 GSK-3β 的结果一致 [3]。

β 淀粉样蛋白积聚是 AD 的主要病理标志之一，Aβ 是由 β 淀粉样蛋白 APP 通过 β 和 γ 分泌

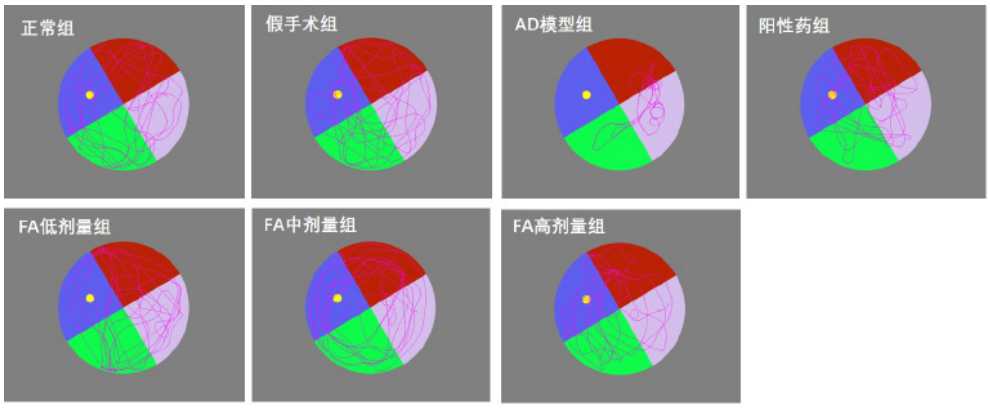


图 6 大鼠在空间探索实验中的轨迹图

Fig 6 Swimming track diagram of rats in space exploration test

酶分泌淀粉样蛋白生成途径形成的[7-9]。Aβ的积累导致神经元损伤和稳定性下降、恶化、突触抑制、氧化应激，神经元功能障碍和炎症[10-12]。FDA 于 2021 年 6 月 7 日批准 Biogen 的针对淀粉样β蛋白的单抗 aducanumab 上市，用于治疗 AD 源性轻度认知障碍及轻度 AD，这是自 2003 年以来首个批准的治疗 AD 的新药，也是首个能阻止疾病进展的药物[13]。本实验结果表明，阿魏酸在 0.625 ～ 10 μmol•L^{-1} 可以有效抑制 Aβ40 的积累。然而，阿魏酸是否直接影响 Aβ的合成尚需进一步研究。

在培养的神经元中，大量证据表明 Aβ的毒性一部分是通过对多种激酶的激活而引起 tau 磷酸化的增加来介导的，而 GSK-3β是其中关联性最强的一种激酶，被确定为 tau 发病的主要激酶[14-15]，在体外和体内多个 AD 相关位点都能增强 tau 磷酸化，过表达 GSK-3β的转基因小鼠显示出 tau 的蛋白高度磷酸化，微管破坏和神经元凋亡[16]。另外，Aβ增强了培养的神经元中 GSK-3β的活性，阻断 GSK-3β的表达或活性可抑制 Aβ诱导的 tau 磷酸化和神经元凋亡[17]。此外，GSK-3β在神经元细胞死亡，抑制抗凋亡蛋白 [例如环状 AMP 反应元件结合蛋白（CREB）] 的活性以及增强促凋亡蛋白（例如裂解的 caspase-9 和 caspase-3）中发挥重要的作用[18-19]。近期研究表明，阿魏酸能通过抑制 GSK-3β的磷酸化来保护链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠的心脏组织[19]。本研究也证实了阿魏酸能抑制 SH-APP 细胞中 GSK-3β Y216 位点的磷酸化，鉴于有证据表明磷酸化的 tau 蛋白可导致微管不稳定，轴突运输受损并最终导致神经元死亡，通常认为抑制 tau 磷酸化可能是治疗或预防 AD 的有效策略。Western blot 结果显示阿魏酸可以显著降低 SH-APP 细胞中 tau 蛋白 Ser 396 和 Ser 199/202 残基位点的磷酸化，而该残基位点是 GSK-3β的靶标，并且与 AD 脑中的 PHF 缠结有关[20-21]。因此，阿魏酸可以通过激活 GSK-3β激酶途径调节 tau 蛋白上多个 AD 相关位点的磷酸化来发挥抗 AD 的作用。

APP 和早老素基因中的一些突变与 Aβ产生的增强有关[22]，并且与细胞死亡的易感性增加有关[23]。此外，APP 也是 caspase-3 剪切的底物，几项研究表明，caspase 介导的 APP 剪切改变了其正常的蛋白水解过程，从而促进了淀粉样蛋白生成途径，提示 caspase-3 介导了 APP 毒性片段的扩大[23-25]。在本研究中，我们发现阿魏酸能抑制 SH-APP 细胞中的 caspase-3/7 活性。同时，流式细胞检测也证实了阿魏酸具有抗细胞凋亡作用。此外，阿魏酸处理能使 SH-APP 细胞中剪切的 caspase-9 的表达下调，这些结果与先前的研究一致，即阿魏酸可以降低 caspase 介导的 APP 的异常剪切，并且降低多种 AD 模型中的细胞凋亡率，从而发挥抗 AD 的作用。

Morris 水迷宫可检测啮齿类动物空间学习和空间记忆能力，是学习记忆方面最为经典的实验方法，在 AD 的研究中应用较为广泛[26]。在本次定位航行实验中，AD 模型组的逃避潜伏期均比假手术组及正常组长，而阿魏酸给药后大鼠的学习记忆能力得到提高。其次，在空间探索实验中，也得到类似结果，提示阿魏酸对 Aβ诱导的 AD 大鼠在 Morris 水迷宫中的行为学方面是有明显保护作用的。

综上所述，阿魏酸在体外建立的 APP 过表达的 AD 细胞模型中具有显著的抗 AD 作用，且能显著改善 Aβ所致 AD 模型大鼠行为学特征，可能在治疗这种复杂的神经退行性疾病中具有一定的优势，成为 AD 治疗中具有价值的候选药物。

参考文献

[1] Li C，Guo XD，Lei M，et al. Thamnolia vermicularis extract improves learning ability in APP/PS1 transgenic mice by ameliorating both Abeta and Tau pathologies [J]. Acta Pharmacol Sin，2017，38（1）：9-28.

[2] 杨长生，杨植媛，吴红彦，等 . 阿魏酸对 Aβ25-35 诱导 PC12 细胞的保护机制研究 [J]. 辽宁中医杂志，2015，42（1）：33-34，35.

[3] 苏如玉 . 阿魏酸抑制 Aβ 诱导的 PC12 细胞 tau 蛋白过度磷酸化的机制研究 [D]. 广州：广州中医药大学，2014.

[4] 黄浩，马增春，王宇光，等 . 阿魏酸对脂多糖损伤的 PC12 细胞和大鼠海马神经元细胞的保护作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志，2016，30（4）：330-337.

[5] 陶鹏飞，赵悦，宋喜君，等 . 表达 APPswe695 基因细胞系的构建及 Aβ 分泌水平的分析 [J]. 中国细胞生物学学报，2019，41：72-79.

[6] Tiwari S，Atluri VSR，Yndart AA，et al. Withaferin a suppresses beta amyloid in APP expressing cells：studies for tat and cocaine associated neurological dysfunctions [J]. Front Aging Neurosci，2018，10：291.

[7] Coronel R，Bernabeu-Zornoza A，Palmer C，et al. Role of amyloid precursor protein（APP）and its derivatives in the biology and cell fate specification of neural stem cells [J]. Mol Neurobiol，2018，55（9）：7107-7117.

[8] Guardia-Laguarta C，Pera M，Leo A. γ-secretase as a therapeutic target in alzheimers disease [J]. Curr Drug Targets，2010，11（4）：506-517.

[9] Ghosh AK，Gemma S，Tang J. β-secretase as a therapeutic target for Alzheimer’s disease [J]. Neurotherapeutics，2008，5（3）：399-408.

[10] Palop JJ，Mucke L. Amyloid-β-induced neuronal dysfunction in Alzheimer’s disease：from synapses toward neural networks [J]. Nat Neurosci，2010，13（7）：812-818.

[11] Arimon M，Takeda S，Post KL，et al. Oxidative stress and lipid peroxidation are upstream of amyloid pathology [J]. Neurobiol Dis，2015，84：109-119.

[12] Barage SH，Sonawane KD. Amyloid cascade hypothesis：pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer’s disease [J]. Neuropeptides，2015，52：1-18.

[13] FDA. FDA’s decision to approve new treatment for Alzheimer’s disease. https：//www. fda. gov/drugs/news-events-human-drugs/fdas-decision-approve-new-treatment-alzheimers-disease，2021.

[14] Hernandez F，Lucas JJ，Avila J. GSK3 and tau：two convergence points in Alzheimer’s disease [J]. J Alzheimers Dis，2013，33：S141-144.

[15] Zhang Y，Huang NQ，Yan F，et al. Diabetes mellitus and Alzheimer’s disease：GSK-3beta as a potential link [J]. Behav Brain Res，2018，339：57-65.

[16] Lucas JJ，Hernandez F，Moran MA，et al. Decreased nuclear β-catenin，tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3β conditional transgenic mice [J]. EMBO J，2001，20（1-2）：27-39.

[17] Koh SH，Noh MY，Kim SH. Amyloid-beta-induced neurotoxicity is reduced by inhibition of glycogen synthase kinase-3 [J]. Brain Res，2008，1188：254-262.

[18] Kim D，Lee J，Park S，et al. Astrocytic expressions of phosphorylated Akt，GSK3beta and CREB following an excitotoxic lesion in the mouse hippocampus [J]. Neurochem Res，2007，32（9）：1460-1468.

[19] Chowdhury S，Ghosh S，Rashid K，et al. Deciphering the role of ferulic acid against streptozotocin-induced cellular stress in the cardiac tissue of diabetic rats [J]. Food Chem Toxicol，2016，97：187-198.

[20] Bertrand J，Plouffe V，Sénéchal P，et al. The pattern of human tau phosphorylation is the result of priming and feedback events in primary hippocampal neurons [J]. Neuroscience，2010，168（2）：323-334.

[21] Reynolds CH，Betts JC，Blackstock WP，et al. Phosphorylation sites on tau identified by nanoelectrospray mass spectrometry：differences in vitro between the mitogen-activated protein kinases ERK2，c-Jun N-terminal kinase and P38，and glycogen synthase kinase-3beta [J]. J Neurochem，2000，74（4）：1587-1595.

[22] Eckert A，Schindowski K，Leutner S，et al. Alzheimer’s disease-like alterations in peripheral cells from presenilin-1 transgenic mice [J]. Neurobiol Dis，2001，8（2）：331-342.

[23] Eckert A，Steiner B，Marques C，et al. Elevated vulnerability to oxidative stress-induced cell death and activation of caspase-3 by the Swedish amyloid precursor protein mutation [J]. J Neurosci Res，2001，64（2）：183-192.

[24] Stadelmann C，Deckwerth TL，Srinivasan A，et al. Activation of caspase-3 in single neurons and autophagic granules of granulovacuolar degeneration in Alzheimer’s disease. Evidence for apoptotic cell death [J]. Am J Pathol，1999，155（5）：1459-1466.

[25] Gervais FG，Xu D，Robertson GS，et al. Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer’s amyloid-β precursor protein and amyloidogenic Aβ peptide formation [J]. Cell，1999，97（3）：395-406.

[26] Tanila H. Wading pools，fading memories-place navigation in transgenic mouse models of Alzheimer’s disease [J]. Front Aging Neurosci，2012，4：11.

（收稿日期：2021-09-06；修回日期：2021-10-28）

注射用复合辅酶渗透压摩尔浓度考察与肌肉刺激实验研究

吴森[1, 2]，吕晓君[1, 2*]，韩玮[1, 2]，王平慧[1, 2]，杨雅婷[1, 2]，周大庆[1, 2]，沈佳特[1, 2]（1. 湖北省药品监督检验研究院，武汉 430064；2. 湖北省药品质量检测与控制工程技术研究中心，武汉 430064）

摘要：目的 对不同批次的注射用复合辅酶渗透压摩尔浓度进行考察，并观察其对家兔的肌肉刺激性。**方法** 32 批注射用复合辅酶分别用 50 mL 5% 葡萄糖注射液（临床用于静脉滴注）或 1 mL、2 mL 0.9% 氯化钠注射液（临床用于肌内注射）溶解后检测渗透压摩尔浓度；4 批注射用复合辅酶分别用 1 mL、2 mL 0.9% 氯化钠注射液配制成高、低剂量溶液进行肌肉刺激实验，采用家兔同体左右侧自身对比法、股四头肌注射方式，单次给药，1 mL/ 只，于给药后 48 h 剖检观察注射局部的刺激反应并进行组织病理学检查。**结果** 注射用复合辅酶在临床静脉滴注时，渗透压与正常人体相近；肌内注射时的渗透压远大于正常人体的范围，与其对家兔产生的肌肉刺激的严重程度成正相关。不同剂量的注射用复合辅酶对家兔的肌肉刺激等级分别为无、轻度、中度、重度，其肌肉刺激性反应呈现剂量依赖性。**结论** 注射用复合辅酶对家兔有肌肉刺激性，可能与其渗透压摩尔浓度有关。

关键词：注射用复合辅酶；渗透压摩尔浓度；肌肉刺激
中图分类号：R965 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)04-0812-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.014

Osmolarity and muscle stimulation test of coenzyme complex for injection

WU Sen[1, 2], LYU Xiao-jun[1, 2*], HAN Wei[1, 2], WANG Ping-hui[1, 2], YANG Ya-ting[1, 2], ZHOU Da-qing[1, 2], SHEN Jia-te[1, 2] (1. *Hubei Institute for Drug Control*, *Wuhan* 430064; 2. *Hubei Engineering Research Center for Drug Quality Control*, *Wuhan* 430064)

Abstract: Objective To determine the osmolarity of different batches of coenzyme complex for injection, and observe its muscle stimulation in rabbits. **Methods** Thirty-two batches coenzyme complex for injection were respectively dissolved with 50 mL 5% glucose injection (intravenous drip) or 0.9% sodium chloride injection (1 mL or 2 mL, intramuscular injection). The osmolarity of coenzyme complex solution was detected. Four batches coenzyme complex for injection were prepared into a high-dose and low-dose solution with 1 mL or 2 mL 0.9% sodium chloride injection, for the muscle stimulation test. The quadriceps femurs were injected before comparing the left and right sides of the same rabbits. After the single administration (1 mL for a animal). The local stimulation reaction was observed and histopathological examination was carried out 48 hours after the administration. **Results** The osmolarity in rabbits was similar to that of normal human body when the coenzyme complex was used for intravenous drip. The osmolarity of coenzyme complex for intramuscular injection in rabbits was much higher than that in normal human body, with positive correlation between the osmolarity and the severity of muscle stimulation in rabbits. **Conclusion** The coenzyme complex for injection may stimulate the muscles in rabbits which may be related to its osmolarity.

Key words: coenzyme complex for injection; osmolarity; muscle stimulation

注射用复合辅酶能提高机体的免疫力，在临床上主要用于急、慢性肝炎，原发性血小板减少性紫癜，放化疗所引起的白细胞和血小板降低症；对冠状动脉硬化、慢性动脉炎、心肌梗死、

作者简介：吴森，女，主要从事药理毒理研究，email：81748278@qq.com *通信作者：吕晓君，女，副主任药师，主要从事药理毒理研究，email：lvxiaojunwhu@foxmail.com

肾功能不全引起的少尿、尿毒症等有一定的辅助治疗作用[1]。注射用复合辅酶是含有辅酶 A、辅酶 I、三磷酸腺苷、还原型谷胱甘肽和核苷酸等多种辅酶和生物活性物质的复合物，由新鲜食用酵母为原料提取精制所得。该品种现行质量标准为国家食品药品监管局国家药品标准 WS-XG-010-2002-2006，除了标准中规定的不溶性微粒、无菌、热原、异常毒性检查项目外，渗透压摩尔浓度和肌肉刺激性也是注射剂类药品质量控制和临床安全使用的重要指标[2-5]。在注射用复合辅酶说明书中，静脉滴注时加入 5% 葡萄糖注射液稀释溶解，肌内注射时用 1、2 mL 0.9% 氯化钠注射液溶解，因此本研究用两种溶媒配制成供试品溶液，依据《中国药典》2015 年版四部方法考察了 32 批注射用复合辅酶的渗透压摩尔浓度[6]；并参照《药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》的要求对 4 批注射用复合辅酶进行肌肉刺激研究[7]，评价其安全性，为该品种的质量控制和临床用药安全提供实验数据。

1　材料

1.1　试药与仪器

注射用复合辅酶 32 批（北京双鹭药业股份有限公司，样品序号、批号、规格见表 1）。渗透压摩尔浓度测定标准溶液（规格：100 mOsmol • kg^{-1}，批号：OSM10016K1；500 mOsmol • kg^{-1}，批号：OSM50017E1，爱尔兰 Reagecon 公司）；0.9% 氯化钠注射液（规格：100 mL/ 瓶，批号：1809230504，武汉滨湖双鹤药业有限责任公司）；5% 葡萄糖注射液（规格：100 mL/ 袋，批号：WB1704006，湖北华仁同济药业有限责任公司）；SMC-30C 型渗透压测定仪（天津天河医疗仪器有限公司）。

1.2　实验动物

日本大耳白兔，普通级，24 只，雌雄不限，体质量为 2.5 ～ 2.9 kg [生产许可证：SCXK（鄂）2016-0011，武汉市万千佳兴生物科技有限公司]。饲养于湖北省药品监督检验研究院，饲养条件：普通级环境，自由饮用净化水，光照为 12 h 明暗交替，温度为 18 ～ 26 ℃，相对湿度 40% ～ 70%。实验动物使用许可证：SYXK（鄂）2019-0009。

2　方法

2.1　渗透压摩尔浓度考察

32 批注射用复合辅酶选用 5% 葡萄糖注射液和 0.9% 氯化钠注射液两种溶媒制备供试品溶液溶解。在临床静脉滴注的体积最小为 50 mL，因此取供试品 1 支，加 50 mL 5% 葡萄糖注射液溶解，摇匀；另取供试品 2 支，每支分别用 1 mL 和 2 mL 0.9% 氯化钠注射液溶解，摇匀。将制备好的供试液依照《中国药典》2015 年版四部通则 0632 渗透压摩尔浓度测定法检测[6]，取 3 次测定结果的平均值作为测定结果。

表 1　注射用复合辅酶样品信息表

Tab 1　Sample information of coenzyme complex for injection

序号	规格	批号
1	辅酶 A200 单位，辅酶 I0.2 mg	20181203
2	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	201812062
3	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	201812032
4	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	201811092
5	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	201812140
6	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	20181214
7	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	201811042
8	辅酶 A200 单位，辅酶 I0.2 mg	20181210
9	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	201811161
10	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	20170913
11	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	201811072
12	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	201812181
13	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	201811011
14	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	201805012
15	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	201811091
16	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	201811202
17	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	20180411
18	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	201812211
19	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	201709031
20	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	201810011
21	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	201811192
22	辅酶 A200 单位，辅酶 I0.2 mg	20181018
23	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.2 mg	201811231
24	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	201812181
25	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	20180205
26	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	20181222
27	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	201811171
28	辅酶 A200 单位，辅酶 I0.2 mg	20181011
29	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	201801072
30	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	201903052
31	辅酶 A200 单位，辅酶 I0.2 mg	20190309
32	辅酶 A100 单位，辅酶 I0.1 mg	201903061

2.2　肌肉刺激实验

选取 4 批注射用复合辅酶（序号为 1、8、13、15），每批供试品分别加 0.9% 氯化钠注射液 1 mL 和 2 mL 充分混匀溶解，得供试品高剂量溶液和供试品低剂量溶液。24 只家兔随机分成 8 组，分别为 4 批供试品的高、低剂量组，每组 3 只。电推剪去两侧股四头肌给药部位的兔毛，消毒皮肤后，采用同体左右侧自身对比法，家兔左侧股

四头肌给予供试品溶液，右侧股四头肌给予 0.9% 氯化钠注射液（阴性对照）。每侧注射体积均为 1 mL，单次给药。于给药后 48 h，家兔由耳缘静脉注入空气栓塞处死，切开皮肤，钝性分离避免机械损伤肌肉，轻柔取出股四头肌，纵向切开，肉眼观察肌肉组织，记录其颜色、光泽，有无充血、水肿、变性或坏死等大体改变，并取两侧注射部位肌肉组织进行组织病理学检查。按表 2 计算相应的反应级，计算平均值，根据表 3 计算肌肉刺激性总反应级，判定刺激等级，并结合组织病理学检查的结果进行综合评价。

表 2 肌肉刺激反应分级标准

Tab 2 Classification standard for muscle stimulation responses

刺激反应	反应评分 / 分
无明显变化	0
轻度充血，范围在 0.5 cm×1.0 cm 以内	1
中度充血，范围在 0.5 cm×1.0 cm 以上	2
重度充血，伴有肌肉变性	3
出现坏死，有褐色变性	4
出现广泛性坏死	5

表 3 肌肉刺激反应平均分值和等级

Tab 3 Average score and grade of muscle stimulation response

平均分值 / 分	等级
0.0 ～ 0.4	无
0.5 ～ 1.4	轻微
1.5 ～ 2.4	轻度
2.5 ～ 3.4	中度
3.5 ～ 4.4	重度
4.5 及以上	严重

3 结果

3.1 渗透压摩尔浓度

渗透压摩尔浓度结果见表 4。注射用复合辅酶在用 50 mL 50% 葡萄糖注射液溶解时，32 批供试品溶液的渗透压摩尔浓度为 277 ～ 321 mOsmol • kg^{-1}，且不同规格的供试品无明显差异；在用 1 mL 和 2 mL 0.9% 氯化钠注射液溶解时，不同浓度的注射用复合辅酶溶液差别较大，且与剂量相关，均大于正常人体血液的渗透压摩尔浓度（285 ～ 310 mOsmol • kg^{-1}）[8]。

表 4 注射用复合辅酶渗透压摩尔浓度测定结果

Tab 4 Osmolarity of coenzyme complex solution

序号	规格（按辅酶 A 计）	渗透压摩尔浓度 /（mOsmol • kg^{-1}）		
		50 mL	1 mL	2 mL
1	200 单位	321	1689	922
2	100 单位	301	969	644
3	100 单位	299	975	603
4	100 单位	303	1027	671
5	100 单位	303	973	640
6	100 单位	305	1002	631
7	100 单位	293	1004	647
8	200 单位	313	1715	955
9	100 单位	304	1005	646
10	100 单位	299	1019	646
11	100 单位	302	1036	651
12	100 单位	314	1042	651
13	100 单位	301	965	643
14	100 单位	307	996	640
15	100 单位	302	998	649
16	100 单位	302	1063	642
17	100 单位	302	978	637
18	100 单位	295	1062	665
19	100 单位	277	1039	657
20	100 单位	311	1026	669
21	100 单位	300	974	661
22	200 单位	292	1609	959
23	100 单位	280	988	632
24	100 单位	277	1000	649
25	100 单位	311	1038	645
26	100 单位	293	935	621
27	100 单位	308	1006	649
28	200 单位	291	1617	965
29	100 单位	293	1063	674
30	100 单位	316	1061	680
31	200 单位	318	1737	1000
32	100 单位	301	980	641

3.2 肌肉刺激实验

3.2.1 肉眼观察及评分结果　家兔肌内注射给药 48 h 后，阴性对照组家兔肌肉组织未见异常（见图 1A），无肌肉刺激反应。注射用复合辅酶溶液在给药后 48 h，家兔肌肉组织出现出血、充血或坏死等不同程度的肌肉刺激反应（见图 1B ～ 1I），说明注射用复合辅酶对家兔的肌肉刺激反应程度与给药浓度有关。肌肉刺激评分结果见表 5。

3.2.2 组织病理学检查结果　家兔肌内注射给药后 48 h 肌肉组织病理学检查结果如图 2 所示。阴性对照组的给药部位肌纤维组织结构完整，无变性、坏死，未见炎细胞浸润现象（见图 2A）。注射用复合辅酶用 0.9% 氯化钠注射液配制的供试品溶液在给药后 48 h 后家兔注射部位肌肉组织出现不同程度的组织病理学改变，200 单位的供试品高剂量溶液组家兔注射部位肌肉组织出现血管扩张淤血、出血伴血栓形成、大量炎性细胞浸润、肌纤维大面积坏死（见图 2B ～ 2D），低剂量溶液组家兔注射部位肌肉组织出现不同程度的血管

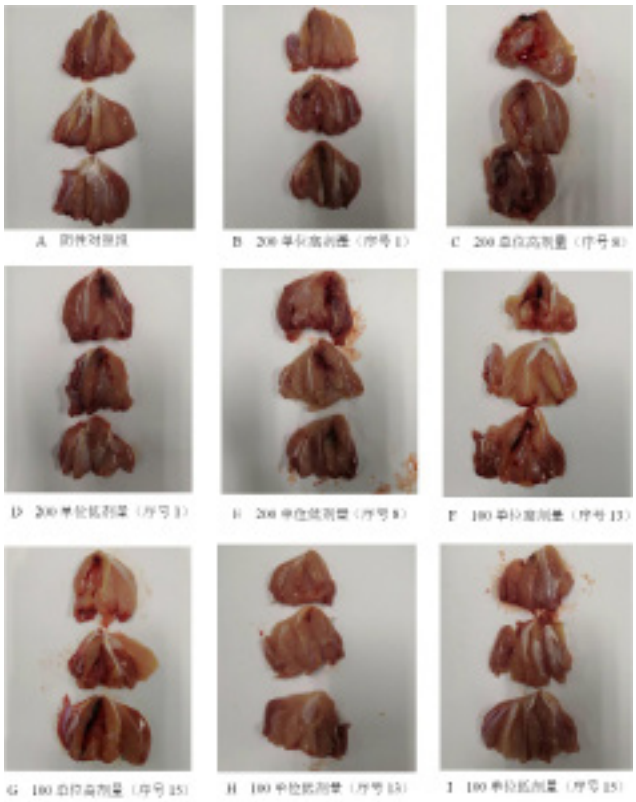


图 1　家兔给药后 48 h 肌肉刺激肉眼观察结果

Fig 1　Muscle stimulation by macroscope at 48 h after the administration in rabbits

扩张淤血、红细胞少量渗出、少量炎性细胞浸润，病变性质及程度低于高剂量组（见图 2E 及 2F）；100 单位的供试品高剂量溶液组家兔注射部位肌肉组织出现血管轻度扩张淤血、轻度至中度出血，未见变性坏死、炎性细胞浸润（见图 2G 及 2H），低剂量溶液组家兔注射部位肌肉组织未见明显异常（见图 2I 及 2J）。

4　讨论

4.1　注射用复合辅酶不同给药途径时的渗透压摩尔浓度

在溶质的扩散和通过生物膜的转运过程中，渗透压摩尔浓度起着极其重要的作用。注射剂、眼用制剂因其用药部位特殊，因此在制备中必须关注其渗透压。注射用复合辅酶在现行标准中，对渗透压摩尔浓度检查项目未进行规定和控制，可能导致该厂家生产的样品渗透压摩尔浓度过高或者过低而影响临床使用，也可能导致不同批号、不同规格的样品间渗透压摩尔浓度值存在差别。注射用复合辅酶在使用说明书上的用法有两种：加入 5% 葡萄糖注射液内稀释后静脉滴注或用 1、2 mL 0.9% 氯化钠注射液溶解后肌内注射，因此本研究考察了不同批次、两种规格的 32 批

表 5　家兔给药后 48 h 肌肉刺激反应积分和分级 (n = 3)

Tab 5　Score and grade of muscle stimulation response at 48 h after the administration in rabbits (n = 3)

序号	规格	组别	左侧（供试品）					右侧（溶媒）				
			每只家兔积分 / 分			平均分 / 分	等级	每只家兔积分 / 分			平均分 / 分	等级
1	200 单位	高剂量	2	3	3	2.67	中度	0	0	0	0	无
		低剂量	3	2	1	2.0	轻度	0	0	0	0	无
8	200 单位	高剂量	3	4	4	3.67	重度	0	0	0	0	无
		低剂量	3	3	2	2.67	中度	0	0	0	0	无
13	100 单位	高剂量	2	1	3	2.0	轻度	0	0	0	0	无
		低剂量	0	1	0	0.33	无	0	0	0	0	无
15	100 单位	高剂量	2	1	3	2.0	轻度	0	0	0	0	无
		低剂量	0	1	0	0.33	无	0	0	0	0	无

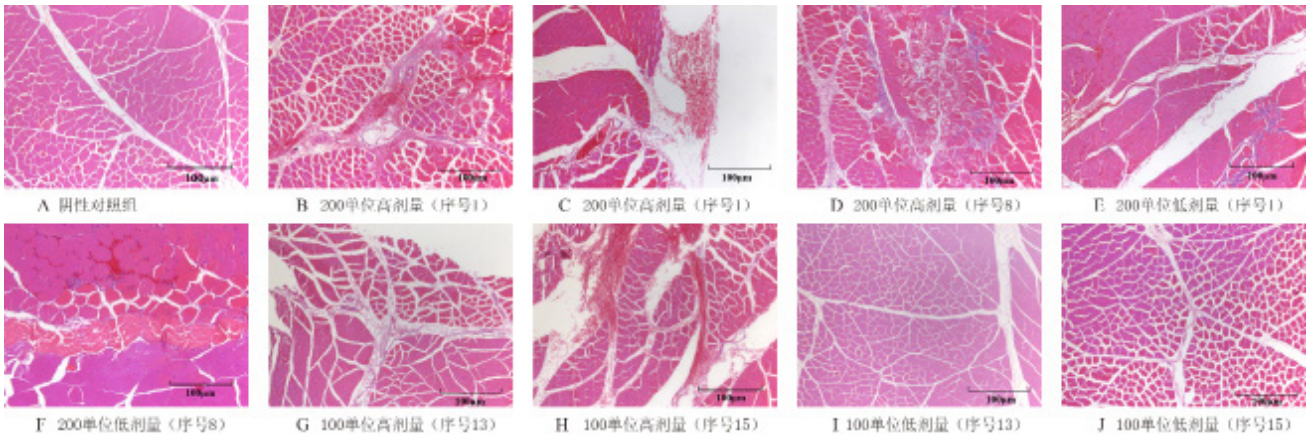


图 2　家兔给药后 48 h 肌肉组织病理图（HE 染色，×100）

Fig 2　Histopathological results of muscles at 48 h after the administration in rabbits（HE staining，×100）

样品用两种不同溶剂稀释后的渗透压摩尔浓度。

本品在静脉滴注时，采用 5% 葡萄糖注射液进行稀释。5% 葡萄糖溶液的渗透压摩尔浓度与人体血液相当，为等渗剂。注射用复合辅酶被大量等渗剂稀释，可使药物自身的渗透压摩尔浓度值大大降低，但说明书中未对稀释溶剂（5% 葡萄糖注射液）的体积进行规定或说明。溶剂的体积不同，对药物自身渗透压摩尔浓度值的降低程度不同，体积越大，对渗透压摩尔浓度值的降低程度越大，进入人体时渗透压摩尔浓度值越接近等渗值。临床使用 5% 葡萄糖注射液最大体积有 500 mL，最小体积为 50 mL，当稀释溶液体积不够大时，存在安全风险。因此 5% 葡萄糖注射液选用最小体积 50 mL 来稀释样品，结果显示，注射用复合辅酶的渗透压摩尔浓度范围为 277 ～ 321 mOsmol • kg^{-1}，接近正常人体血液的渗透压摩尔浓度值。不同批次间、不同规格间的差异较小，说明在生产过程中对该品种对静脉滴注的渗透压值控制较好。

本品在肌内注射时，结果显示渗透压摩尔浓度值范围为 603 ～ 1737 mOsmol • kg^{-1}。正常人体液（包括血浆、组织液）渗透压摩尔浓度均值为 298 mOsmol • kg^{-1}[8]，人体可承受 140 ～ 830 mOsmol • kg^{-1} 的渗透压[9]。本实验中用 1 mL 或 2 mL0.9% 氯化钠注射液进行溶解的 32 批供试品的渗透压摩尔浓度值均大于人体液的正常渗透压摩尔浓度均值，其中 5 批规格为 200 单位的供试品分别用 1 mL 或 2 mL 溶解、27 批规格为 100 单位的供试品用 1 mL 溶解时的渗透压摩尔浓度远大于正常人体可承受的渗透压摩尔浓度值上限。

4.2 注射用复合辅酶的肌肉刺激性

本实验考察了两种规格 4 批次注射用复合辅酶对家兔进行单次给药的肌肉刺激作用。结果显示注射用复合辅酶呈现剂量关系的肌肉刺激反应，200 单位规格的注射用复合辅酶用 1 mL 和 2 mL 0.9% 氯化钠注射液制备的溶液为轻度至重度的肌肉刺激性，100 单位规格的注射用复合辅酶用 1 mL 0.9% 氯化钠注射液制备的溶液为轻度肌肉刺激性。表明注射用复合辅酶的肌肉刺激性与渗透压摩尔浓度成正相关，渗透压摩尔浓度越高，对家兔的肌肉刺激性越大，在人体可承受的范围内时表现为无刺激性。

静脉注射剂进入人体血液中，其渗透压摩尔浓度值必须与人体血浆渗透压基本保持一致，过高或过低都会对人体产生不良反应，引起病理损害。大量输入低渗溶液可能导致机体血红细胞肿胀变形破裂造成溶血，大量输入高渗溶液可能会造成血管栓塞。本品在静脉注射时的渗透压摩尔浓度接近正常人体，控制较好；但在肌内注射时，用 1 mL 0.9% 氯化钠注射液溶解后的渗透压摩尔浓度值过高，可能会对局部组织细胞产生强烈的刺激作用，引起剧烈疼痛，使用时就会增大其肌肉刺激性。因此建议说明书中的用于肌内注射的样品修改为用 2 mL0.9% 氯化钠注射液溶解。

综上所述，注射用复合辅酶用于肌内注射有一定程度的肌肉刺激性，可能与其渗透压摩尔浓度有关。本次研究的结果可以为注射用复合辅酶的临床合理用药提供。

参考文献

[1] 袁忠烈 . 术中使用注射用复合辅酶的医保管理干预效果评价 [J]. 中国药业，2014，23（22）：92-94.

[2] 曹凤习，张文 . 常见静脉注射剂渗透压考察 [J]. 药物鉴定，2008，17（10）：36-37.

[3] 国家食品药品监督管理总局 . 药物研究技术指导原则 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2006：118-119.

[4] 张娟，冷佳蔚，李水仙，等 . 舒洛地特注射液非临床安全性评价 [J]. 中国药业，2021，30（6）：28-31.

[5] 黄凤娇，王平慧，吴森，等 . 注射用帕瑞西布钠特殊安全性评价 [J]. 药物评价研究，2017，40（8）：1090-1093.

[6] 中国药典 2015 年版 . 四部 [S]. 2015：78-79.

[7] 国家食品药品监督管理总局 . 药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则 [S]. 2014.

[8] 奚念朱，顾学裘 . 药剂学 [M]. 2 版 . 北京：人民卫生出版社，1994：2042-2051.

[9] 胡青，毛丹，简龙海，等 . 关于在中药注射剂质量标准中增订渗透压限度规定的几点思考 [J]. 中成药，2011，14（16）：1737-1739.

（收稿日期：2021-09-08；修回日期：2021-10-08）

基于网络药理学和体外实验探讨复方苦参注射液抗非小细胞肺癌的作用机制研究

颜渊鸳[1]，章波[2]（1. 海南省第三人民医院药剂科，海南　三亚　572000；2. 桂林医学院科学实验中心，广西　桂林　541199）

摘要：目的　基于网络药理学及体外实验探讨复方苦参注射液（CKI）抗非小细胞肺癌（NSCLC）的分子机制。**方法**　通过网络公开数据库及查阅文献，分别获得 CKI 和 NSCLC 的靶点。筛选两者共有靶点后，构建靶点蛋白互作网络，进而找到 CKI 抗 NSCLC 的关键靶点。利用 David 数据库对关键靶点进行 GO 和 KEGG 信号通路分析，通过 R 软件对结果进行可视化。通过 qPCR 技术对富集到与 NSCLC 相关的信号通路进行体外实验验证。**结果**　共收集到 CKI 相关靶点 372 个，NSCLC 相关靶点 426 个。生物信息学分析共富集到 93 个生物过程（BP）以及 30 条信号通路，其中缺氧诱导因子 1（HIF-1）信号通路、丝裂原活化蛋白激酶（AMPK）信号通路、磷脂酰肌醇 3'- 激酶（PI3K-Akt）信号通路可能与 CKI 抗 NSCLC 相关。体外实验表明，经 CKI 治疗后，*ERBB2*、*MTOR*、*IGF1R* 及 *VEGFA* 基因相对表达量显著降低。**结论**　CKI 可能通过抑制 *ERBB2*、*MTOR*、*IGF1R* 及 *VEGFA* 基因相对表达，进而调控 HIF-1、AMPK、PI3K-Akt 信号通路发挥其抗 NSCLC 的作用。

关键词：复方苦参注射液；非小细胞肺癌；网络药理学；作用机制

中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0817-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.015

Mechanism of compound Kushen injection against non-small cell lung cancer based on network pharmacology and in vitro experiment

YAN Yuan-yuan[1], ZHANG Bo[2] (1. *Department of Pharmacy, The Third People's Hospital of Hainan Province, Sanya Hainan* 572000; 2. *Scientific Research Center, Guilin Medical Institute, Guilin Guangxi* 541199)

Abstract: Objective To determine the molecular mechanism of compound Kushen injection (CKI) against non-small cell lung cancer (NSCLC) based on network pharmacology and in vitro experiments. **Methods** Through retrieving public database and literature review, the targets of CKI and NSCLC were obtained respectively. By screening the common targets of CKI and NSCLC, the target protein interaction network was constructed to find the key targets of CKI against NSCLC. David database was used to analyze gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathways for key targets. R software was used to visualize the results. Finally, qPCR was used to verify the genes enriched into NSCLC-related signaling pathways in vitro. **Results** Totally 372 CKI-related targets and 426 NSCLC-related targets were collected. Bioinformatics showed that 93 biological process (BP) and 30 signaling pathways were enriched, among which hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) signaling pathway, mitogen-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway and phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K-Akt) signaling pathway might be associated with CKI against NSCLC. In vitro experiments showed that the relative expression levels of *ERBB2*, *MTOR*, *IGF1R* and *VEGFA* genes were significantly decreased after the CKI treatment. **Conclusion** CKI may inhibit the relative expressions of *ERBB2*, *MTOR*, *IGF1R* and *VEGFA* genes to regulate HIF-1, AMPK and PI3K-Akt signaling pathway to exert its against NSCLC effect.

Key words: compound Kushen injection; non-small cell lung cancer; network pharmacology; mechanism

作者简介：颜渊鸳，女，硕士，主要从事临床药学工作，email：710023733@qq.com

肺癌在中国的发病率和病死率均较高，且是世界上病死率最高的恶性肿瘤[1]。根据不同的组织学行为和病理表现，原发性肺癌主要分为小细胞肺癌（SCLC）和非小细胞肺癌（NSCLC）[2]。其中，NSCLC 占肺癌病例的 80% ～ 85%，这是一种以基因突变的分子亚型为特征的疾病[3]。目前，含铂类药物为晚期 NSCLC 的一线药物，其作用机制为通过与 DNA 结合产生复合物，导致 DNA 断裂并出现错误编码，进而干扰 DNA 正常生理功能，发挥抗肿瘤作用[4]。然而，研究表明，多数晚期 NSCLC 患者经铂类一线化疗后效果欠佳。虽然增加剂量强度可提高疗效，但不良反应亦随之加强，不利于患者耐受[5]。除增加剂量强度外，联合用药亦可提高药物疗效。随着中医药受重视程度日益增高，越来越多的中药在癌症的治疗过程中展现出独特的疗效[6]。复方苦参注射液（CKI）具有散结止痛、凉血解毒等功效，在临床中可用于 NSCLC 的辅助治疗[7-8]。然而，其抗 NSCLC 的作用机制尚不明确。网络药理学在探索中药药理机制方面拥有巨大优势，其可借助公共数据库[9]和文献，获得药物成分和特定疾病的靶点信息，进而预测药物防治疾病的有效成分、药效靶点。此外，借助生物信息学分析可进一步挖掘其及可能参与调控的细胞信号转导通路等[10]。

本文拟通过网络药理学的方法探索 CKI 抗 NSCLC 的分子机制，并通过实时荧光定量 PCR（qPCR）实验对关键基因进行验证，以期为 CKI 在临床合理应用提供科学有效的依据。

1 材料与方法

1.1 CKI 有效成分收集

查阅文献发现，Ma 等[11]使用 LC-MS/MS 对 CKI 进行分析，共鉴定出 21 个有效成分。经 Pubchem 数据库中搜索后，共导出 16 个有效成分（见表 1）可用于后续网络药理学分析的有效成分三维结构数据。

1.2 CKI 有效成分靶点预测

将上述 16 个有效成分的三维结构均保存为 mol2 格式，并上传至 Pharm Mapper 数据库[12-14]（http：//www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/）。基于反向药效团匹配法，选择药物的药效团模型，设置最终产生 300 个蛋白构象，得到与 CKI 中 16 个有效成分相关的靶点名称、基因名称、Uniprot ID 等结果。合并 16 个有效成分相关的靶点，导入 UniProt 数据库（https：//www. uniprot. org/），选择物种为“Homo sapiens”，剔除重复、非人源与不规范的靶点，最终得到与 CKI 有效成分相关的蛋白靶点。

表 1 CKI 有效成分信息

Tab 1 Information of active ingredients in CKI

PubChem CID	中文名	英文名
15385684	9α- 羟基苦参碱	9α-hydroxymatrine
621307	穿叶赝靛碱	baptifoline
5271984	异苦参碱	isomatrine
115269	槐果碱	sophocarpine
12442899	槐醇碱	sophoranol
165549	槐定碱	sophoridine
442827	三叶豆紫檀苷	trifolirhizin
87752	lamprolobine	lamprolobine
9576780	大泽明素	macrozamin
91466	苦参碱	matrine
670971	甲基金雀花碱	*N*-methylcytisine
24864132	氧化苦参碱	oxymatrine
24721085	氧化槐果碱	oxysophocarpine
6710641	番石榴酸	piscidic acid
71773433	氧化槐定碱	oxysophoridine
132555388	9α- 羟基槐果碱	9α-hydroxysophocarpine

1.3 收集 NSCLC 相关靶点

分别在 Drug Bank（https：//www. drugbank. ca/）、CTD（http：//ctd. mdibl. org/）、Gene Cards（https：//www. genecards. org/）、OMIM（https：//omim.org/）数据库检索 NSCLC 相关靶点。为了减少假阳性结果，CTD 数据库中 NSCLC 相关靶点选取基因总数的 1% 作为后续研究靶点，Gene Cards 数据库中 NSCLC 相关靶点仅选取评分大于 20 的基因作为后续研究靶点，Drug Bank 数据库和 OMIM 数据库收集全部靶点。合并 4 个数据库的靶点即为 NSCLC 相关靶点。

1.4 蛋白 - 蛋白互作网络（PPI）构建

将 CKI 有效成分相关靶点与 NSCLC 相关靶点取交集，得到 CKI 抗 NSCLC 潜在作用靶点。再将潜在作用靶点导入 STRING（http：//string-db. org/）数据库，物种限定为人类，获得潜在作用靶点蛋白互作关系文件。提取上述文件中 node1、node2 和 Combined score 信息导入 Cytoscape 3.8.2 软件进行可视化分析，运用软件中 Network Analyzer 功能计算蛋白互作网络的拓扑参数。根据拓扑参数中的度值（degree）来筛选核心蛋白，即任意蛋白度值大于所有蛋白度值中位数，则认为该蛋白为 CKI 抗 NSCLC 潜在作用靶点中的关键靶点。

1.5 关键靶点生物信息学分析

将筛选出的关键靶点的蛋白名均转换为 Gene Symbol，并以该格式导入 David 6.8 数据库（https：//

david. ncifcrf. gov/），进行 GO 分析及 KEGG 通路分析。下载 David 数据库分析结果，数据经整理后使用 R 语言中 ggplot2 包进行可视化。

1.6　A549 细胞体外实验验证

1.6.1　材料　A549 细胞株（中国科学院上海细胞库）。CKI（山西振动制药股份有限公司，批号：20210106）；RPMI 1640 培养基、胎牛血清（美国 Gibco 公司）；CCK-8 试剂盒（美国 MedChemExpress 公司）；TRIzol 试剂（美国 Ambion 公司）；qPCR 试剂盒（日本 TaKaRa 公司）；PCR 引物 [生工生物工程（上海）股份有限公司]。TECAN SPARK 酶标仪、QuantStudio 5 实时荧光定量 PCR 仪（美国 Thermo 公司）；Galaxy 170 S 培养箱（英国 New Brunswick 公司）。

1.6.2　细胞分组及给药　A549 细胞在 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度下，培养于 RPMI 1640 培养液中（含 10% 胎牛血清、100 U • mL^{-1} 青霉素及 0.1 mg • mL^{-1} 链霉素）。实验共分为 3 组，正常对照组（A549 细胞，不加药物干预），CKI 低剂量组（培养基中 CKI 含量为 40 μL • mL^{-1}），CKI 高剂量组（培养基中 CKI 含量为 80 μL • mL^{-1}）。

1.6.3　细胞活性实验　采用 CCK-8 试剂盒检测细胞活性。取 1×10^4 个 • mL^{-1} 的细胞悬液 100 μL 接种于 96 孔培养板中，培养 24 h，待细胞贴壁后，按照“1.6.2”项下分组对细胞进行药物处理，每组 6 个复孔。药物处理 24 h，每孔加入 10 μL CCK-8 试剂，于 37 ℃、5%CO_2 饱和湿度下孵育 1 h，用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度值，并计算细胞存活率（%）。

1.6.4　qPCR 检测参与调控相关信号通路基因的 mRNA 相对表达　A549 细胞经 CKI 干预 24 h 后，弃去培养基，PBS 清洗细胞 5 次，TRIzol 试剂提取各组细胞总 RNA，于 260 nm 处测量其吸光度值，测定总 RNA 浓度。利用随机六聚体引物和 SuperScript Ⅲ逆转录酶试剂盒获得互补 DNA（cDNA）。逆转录后采用 20 μL 体系进行 qPCR 检测 mRNA 相对表达量，结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析。引物序列见表 2。

表 2　引物序列

Tab 2　Primer sequences

基因名	正向引物（5’-3’）	反向引物（5’-3’）
ERBB2	TTGAGTCCATGCCCAATCCC	CCTCTGCTGTCACCTCTTGG
MTOR	CGATGGCCAGGGATCTCTTC	GGTCTGTGTGACTTCAGCGA
CCND1	AGCTGTGCATCTACACCGAC	GAAATCGTGCGGGGTCATTG
IGF1R	GCCGATGTGTGAGAAGACCA	ACGTGCTTGGGCACATTTTC
VEGFA	CTTGCCTTGCTGCTCTACCT	GCAGTAGCTGCGCTGATAGA
FN1	AGCCTGGGAGCTCTATTCCA	CTTGGTCGTACACCCAGCTT
β-actin	CCGCGAGAAGATGACCCAGA	GATAGCACAGCCTGGATAGCA

1.7　统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件，计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析，行方差齐性检验。若方差齐，则组间两两比较应用 LSD 法；方差不齐则应用秩和检验。$P < 0.05$ 表示组间差异有统计学意义。

2　结果

2.1　CKI 和 NSCLC 靶点分析

将 CKI 的 16 个有效成分上传至 Pharm Mapper 数据库后，剔除非人源靶点后，共收集到 372 个 CKI 靶点，NSCLC 靶点 426 个。将 CKI 和 NSCLC 靶点进行对比分析，得到 40 个 CKI 抗 NSCLC 潜在作用靶点（见图 1）。通过 STRING 数据库及 Cytoscape 软件，绘制了 40 个 CKI 抗 NSCLC 潜在作用靶点的 PPI 网络（见图 2）(其中红色代表基因在该网络度值大于各靶点度值中位数，蓝色代表小于中位数。红色靶点视为 CKI 抗 NSCLC 关键靶点）。对 PPI 网络进行拓扑分析后发现，该网络中平均聚类系数为 0.63，平均节点度为 11.48，平均最短路径为 1.37 ～ 3.42，介数中心 0.29 ～ 0.73，在关系网络中体现了较好的连通特性（见表 3）。同时，根据拓扑参数中的度值，选取大于度值中位数的靶点作为 CKI 抗 NSCLC 潜在作用的关键靶点，共 19 个（见图 2）。

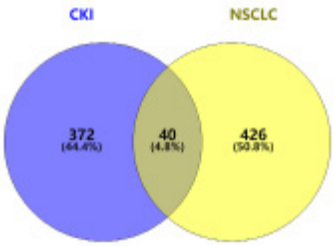


图 1　CKI 和 NSCLC 靶点韦恩图

Fig 1　Venn diagram of CKI and NSCLC targets

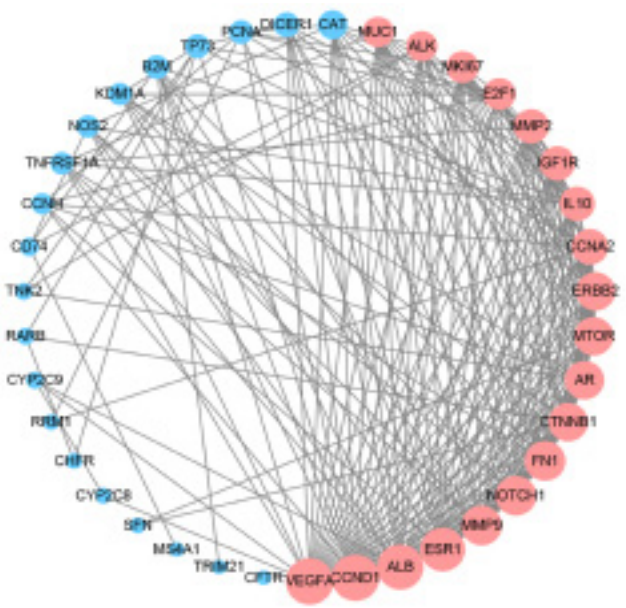


图 2 CKI 抗 NSCLC 潜在作用靶点 PPI 网络

Fig 2 PPI network of potential CKI targets against NSCLC

2.2 CKI 抗 NSCLC 关键靶点 GO 分析

将 19 个关键靶点导入 David 数据库，进行 GO 分析。结果显示，GO 分析中，19 个关键靶点参与了 93 个生物过程（BP），包括转录的正调控、基因表达的正调控、RNA 聚合酶Ⅱ启动子的转录正调控等；13 个细胞组分（CC），包括细胞核、细胞膜、核染色质等；27 个分子功能（MF），包括酶结合、蛋白激酶绑定、ATP 结合等。按照参与基因功能的基因个数，选取各基因功能前十个条目，应用 R 4.10 软件将其绘制成条图进行可视化（见图 3）。

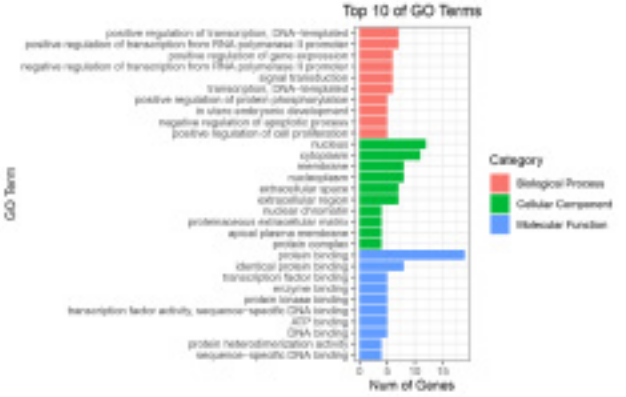


图 3 CKI 抗 NSCLC 关键靶点 GO 分析条图

Fig 3 GO analysis of key CKI targets against NSCLC

2.3 CKI 抗 NSCLC 关键靶点

将 19 个关键靶点导入 David 数据库，进行 KEGG 信号通路富集分析。结果显示，19 个关键靶点参与调控了 30 条信号通路，选取 *P* 值最小的 20 条信号通路绘制气泡图进行可视化（见图 4）。可以发现，与 NSCLC 相关的信号通路主要有缺氧诱导因子 1（HIF-1）信号通路、丝裂原活化蛋白激酶（AMPK）信号通路、磷脂酰肌醇 3'- 激酶（PI3K-Akt）信号通路。此外，KEGG 信号通路富集分析的数据显示，共 6 个基因参与调控上述 3 条与 NSCLC 相关的信号通路，分别为 *ERBB2*、*MTOR*、*CCND1*、*IGF1R*、*VEGFA*、*FN1*（见表 4）。

表 3 CKI 抗非小细胞肺癌作用靶点互作关系的拓扑学分析

Tab 3 Topological analysis of the interaction between CKI targets against NSCLC

蛋白名称	degree	平均最短路径	介数中心性	中心接近度	聚类系数
CCND1	25	1.37	0	0.73	0.55
VEGFA	25	1.40	0.12	0.717	0.53
ALB	24	1.42	0.11	0.70	0.54
ESR1	23	1.47	0.037	0.68	0.62
NOTCH1	20	1.55	0.023	0.64	0.68
MMP9	20	1.53	0.026	0.66	0.69
FN1	20	1.55	0.022	0.64	0.70
ERBB2	19	1.58	0.0088	0.63	0.77
CTNNB1	19	1.55	0.081	0.64	0.64
MTOR	19	1.58	0.032	0.63	0.73
AR	19	1.63	0.037	0.61	0.67
CCNA2	17	1.66	0.066	0.60	0.63
MMP2	16	1.74	0.0053	0.58	0.83
IGF1R	16	1.66	0.0050	0.60	0.83
IL10	16	1.71	0.013	0.58	0.72
MKI67	14	1.76	0.0063	0.57	0.80
E2F1	14	1.76	0.017	0.57	0.65
ALK	13	1.74	0.071	0.58	0.65
MUC1	13	1.82	0.0029	0.55	0.90
CAT	12	1.79	0.010	0.56	0.73
DICER1	9	1.92	0.0081	0.52	0.81
B2M	8	1.92	0.074	0.52	0.54
PCNA	8	2.11	0.010	0.48	0.61
TP73	8	2.05	0.056	0.49	0.25
TNFRSF1A	7	2.18	0.00	0.46	1.0
NOS2	7	2.05	0.018	0.49	0.67
KDM1A	7	2.05	0.0024	0.49	0.76
CCNH	6	2.16	3.56	0.46	0.93
CD74	4	2.45	0.054	0.41	0
CYP2C9	3	2.29	0.0014	0.44	0.67
TNK2	3	2.26	0.0036	0.44	0
RARB	3	2.34	0.011	0.43	0.33
RRM1	2	2.59	0	0.39	1.0
CHFR	2	2.95	0	0.34	1.0
SFN	2	2.42	0	0.41	1.0
CYP2C8	2	2.34	0	0.43	1.0
CFTR	1	2.39	0	0.42	0
TRIM21	1	2.90	0	0.35	0
MS4A1	1	3.42	0	0.29	0

2.4 CKI 对 A549 细胞活性的影响

CCK-8 实验结果显示，相比于正常对照组，经给药培养 24 h 后，CKI 低、高剂量组中 A549 细胞活性有显著下降趋势，且 A549 细胞活性下降趋势呈剂量依赖性，表明 CKI 具有抑制 A549 细胞活性的作用（见图 5）。

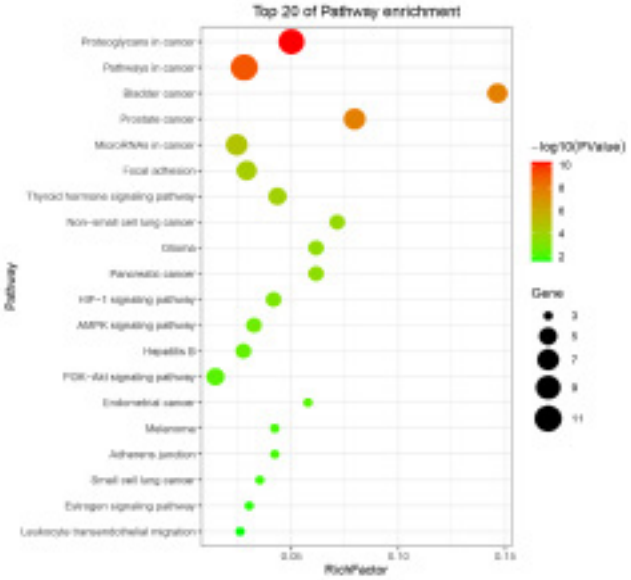


图 4　CKI 抗 NSCLC 关键靶点 KEGG 信号通路富集分析气泡图

Fig 4　Enrichment analysis of KEGG signaling pathway，a key CKI target against NSCLC

表 4　参与 CKI 抗 NSCLC 相关通路的关键基因

Tab 4　Key genes involved in related pathways CKI against NSCLC

通路名称	参与通路的关键基因
HIF-1 信号通路	*ERBB2*，*MTOR*，*IGF1R*，*VEGFA*
AMPK 信号通路	*CCND1*，*MTOR*，*IGF1R*
PI3K-Akt 信号通路	*CCND1*，*FN1*，*MTOR*，*IGF1R*，*VEGFA*

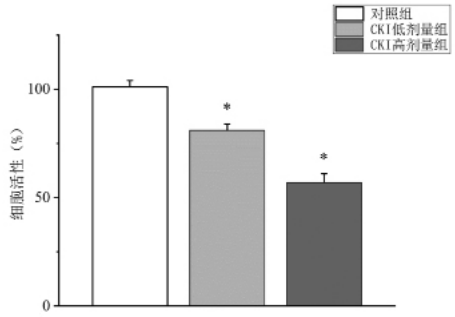


图 5　CKI 对 A549 细胞活性的影响 CCK-8 实验结果

Fig 5　Effect of CKI on A549 cell viability by CCK-8

注（Note）：与正常对照组比较，$^{*}P < 0.05$（Compared with the normal control group，$^{*}P < 0.05$）。

2.5　qPCR 检测参与调控相关信号通路基因的 mRNA 相对表达

qPCR 实验结果显示，相比于正常对照组，CKI 低剂量组及高剂量组 A549 细胞中 *ERBB2*、*MTOR*、*IGF1R*、*VEGFA* mRNA 相对表达量显著降低，CCND1、FN1 mRNA 相对表达量差异无统计学意义（见图 6），表明 CKI 可能是通过抑制 *ERBB2*、*MTOR*、*IGF1R* 及 *VEGFA* 基因的表达调控 HIF-1、AMPK 及 PI3K-Akt 信号通路，进而发挥其抑制 A549 细胞活性的作用。

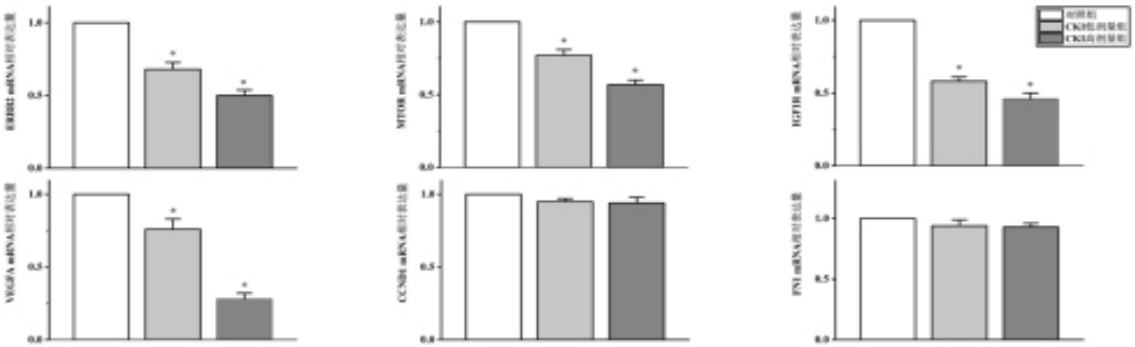


图 6　信号通路相关关键基因 qPCR 实验结果

Fig 6　qPCR of key genes related to signaling pathways

注（Note）：与正常对照组比较，$^{*}P < 0.05$（Compured with the normal control group，$^{*}P < 0.05$）。

3　讨论

本研究通过文献及数据库挖掘共找到 19 个 CKI 抗 NSCLC 的关键靶点，在对其进行 GO 分析后发现，靶点主要涉及到转录的正调控、基因表达的正调控、RNA 聚合酶Ⅱ启动子的转录正调控等生物学过程。同时，KEGG 富集分析发现，CKI 可能通过调控 HIF-1 信号通路、AMPK 信号通路及 PI3K-Akt 信号通路等发挥抗 NSCLC 作用。此外，通过 CCK-8 细胞活性实验证明 CKI 具有抑制 NSCLC 的作用。进一步的 qPCR 实验验证表明，CKI 调控上述 3 条信号通路可能与抑制 *ERBB2*、*MTOR*、*IGF1R* 及 *VEGFA* 基因的表达有关。

缺氧是包括 NSCLC 在内的实体肿瘤的一个特征，与肿瘤的恶性程度直接相关 [15]。在缺氧肿瘤微环境中，缺氧诱导因子（HIF）被激活，激活的 HIF 诱导与血管生成、代谢调节、细胞凋亡和肿瘤生存相关的多个基因的表达 [16]。HIF 在血管形成和肿瘤血供恢复中的重要作用使肿瘤难以治疗，导致对放疗、化疗和免疫治疗产生抗药性 [17]。据报道，缺氧诱导因子 -1α 的上调与 NSCLC 的肿瘤坏死和患者总生存期相关 [18]。因

此，抑制 HIF-1 信号通路可能有助于 NSCLC 的治疗。自噬是一种进化上保守的分解代谢机制，是真核细胞通过膜转运途径循环或降解内部成分的一种机制，可以通过消除细胞异常增殖以维持体内稳态，有望成为治疗癌症的靶点 [19]。研究表明，AMPK 信号通路及 PI3K-Akt 信号通路均与细胞自噬的发生密切相关，抑制该通路的异常表达有助于癌症的治疗 [20-21]。本研究中，通过网络药理学发现 CKI 抗 NSCLC 的作用机制可能与 NSCLC 细胞中 HIF-1 信号通路、AMPK 信号通路及 PI3K-Akt 信号通路的异常表达有关。进一步通过 qPCR 实验验证发现，CKI 可有效抑制与上述通路相关的 CKI 抗 NSCLC 靶点（*ERBB2*、*MTOR*、*IGF1R*、*VEGFA*）mRNA 的表达。

综上所述，本研究通过网络药理学技术分析了 CKI 抗 NSCLC 的分子机制并对信号通路关键基因靶点进行 qPCR 实验验证，进一步为 CKI 的临床应用提供了科学依据。然而，本研究并未对发现的 HIF-1 信号通路、AMPK 信号通路及 PI3K-Akt 信号通路进行进一步的实验验证，使得本研究结论具有一定局限性。因此，CKI 如何调控上述 3 条信号通路的实验验证或将成为后续研究重点。

参考文献

[1] Bray F，Ferlay J，Soerjomataram I，et al. Global cancer statistics 2018：GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA-Cancer J Clin，2018，68（6）：394-424.

[2] Osmani L，Askin F，Gabrielson E，et al. Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma（NSCLC）：moving from targeted therapy to immunotherapy [J]. Semin Cancer Biol，2018，52（Pt 1）：103-109.

[3] Rusch VW，Chansky K，Kindler HL，et al. The IASLC Mesothelioma Staging Project：proposals for the m descriptors and for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming（eighth）edition of the TNM classification for mesothelioma [J]. J Thoroc Oncol，2016，11（12）：2112-2119.

[4] 杨健，陈世唏，徐卫东 . 培美曲塞联合铂类一线药物治疗晚期非鳞型非小细胞癌的疗效观察 [J]. 实用临床医药杂志，2018，22（1）：65-67.

[5] 高萌，呼群 . 白蛋白紫杉醇联合铂类方案治疗一线治疗失败的晚期肺鳞癌的回顾性研究 [J]. 中华生物医学工程杂志，2019（6）：768-769.

[6] 单思，严小军，刘红宁 . 中医药治疗恶性肿瘤的研究进展 [J]. 中华中医药杂志，2018，33（10）：4539-4541.

[7] Yu ZY，Peng RY，Han M，et al. Adjunctive effect of compound Kushen Injection to chemotherapy for non-small cell lung cancer：an evidence map and overview of systematic reviews [J]. J Ethnopharmacol，2021，281：114538.

[8] 蓝秀，林伟龙，陈文宇，等 . 复方苦参注射液联合化疗治疗非小细胞肺癌骨转移疼痛的疗效 [J]. 中华中医药学刊，2019，37（9）：2286-2289.

[9] Li S，Zhang B. Traditional Chinese medicine network pharmacology：theory，methodology and application [J]. J Chin Nat Med，2013，11（2）：110-120.

[10] 章波，麦琬婷，黄秋洁，等 . 秋水仙碱治疗肝纤维化的网络药理学研究 [J]. 广西医科大学学报，2020，37（3）：372-379.

[11] Ma Y，Gao HM，Liu J，et al. Identification and determination of the chemical constituents in a herbal preparation，compound kushen injection，by HPLC and LC-DAD-MS/MS [J]. J Liq Chromatogr Relat Technol，2014，37（2）：1-9.

[12] Liu X，Ouyang S，Yu B，et al. PharmMapper server：a web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach [J]. Nucleic Acids Res，2010，38：W609-614.

[13] Wang X，Pan C，Gong J，et al. Enhancing the enrichment of pharmacophore-based target prediction for the polypharmacological profiles of drugs [J]. J Chem Inf Model，2016，56（6）：1175-1183.

[14] Wang X，Shen Y，Wang S，et al. PharmMapper 2017 update：a web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database [J]. Nucleic Acids Res，2017，45（W1）：W356-w360.

[15] Muz B，de la Puente P，Azab F，et al. The role of hypoxia in cancer progression，angiogenesis，metastasis，and resistance to therapy [J]. Hypoxia（Auckl），2015，3：83-92.

[16] Majmundar AJ，Wong WJ，Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress [J]. Mol Cell，2010，40（2）：294-309.

[17] Cha JE，Bae WY，Choi JS，et al. Angiogenic activities are increased via upregulation of HIF-1α expression in gefitinib-resistant non-small cell lung carcinoma cells [J]. Oncol lett，2021，22（3）：671.

[18] Kim SJ，Rabbani ZN，Dewhirst MW，et al. Expression of HIF-1alpha，CA IX，VEGF，and MMP-9 in surgically resected non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer，2005，49（3）：325-335.

[19] 顾超，王恺纯，徐勤芬，等 . 山柰酚调控 PI3K/Akt/mTOR 通路诱导人结直肠癌 RKO 细胞自噬 [J]. 中南药学，2020，18（10）：1668-1673.

[20] 吴俏兰，宋婷，陈泽涛，等 . 基于 p53/AMPK 信号通路研究益气扶正解毒方对 A549 细胞自噬水平和生长的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（22）：65-75.

[21] 孟东雪，郭玉荣，罗斌军，等 . 扶正抑瘤汤通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制非小细胞肺癌增殖、凋亡及自噬 [J]. 中国癌症防治杂志，2021，13（2）：177-182.

（收稿日期：2021-09-15；修回日期：2021-10-19）

基于 LC-MS 法分析宁夏贺兰山野生酸枣不同部位化学成分

梁雨璐[1, 3]，李忆红[1, 3]，雷艳[1, 3]，刘传鑫[1, 2, 3*]，黄建梅[1, 3*]（1. 北京中医药大学中药学院，北京　102488；2. 河南科技大学临床医学院，河南科技大学第一附属医院内分泌代谢中心，河南省遗传罕见病医学重点实验室，国家代谢性疾病临床医学研究中心洛阳分中心，河南　洛阳　471003；3. 北京中医药大学中药学院 中药品质评价北京市重点实验室，北京　102488）

摘要：目的　基于高分辨色谱与质谱联用分析平台，对贺兰山野生酸枣不同部位的化学成分进行定性分析，促进野生酸枣资源的开发和利用。**方法**　以 50% 甲醇对酸枣的果仁、叶片、果肉进行提取，色谱分析使用 Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱，流动相为 0.1% 甲酸水（A）-0.1% 甲酸乙腈（B）。采用 UPLC-Q-TOF/MS^E 和 UHPLC-Q-Exactive/MS 技术对酸枣各部位中的化合物进行鉴定。数据采集分别采用 MassLynx 和 Xcalibur 工作站对一级碎片进行分析，并结合 UNIFI 软件及文献信息对二级碎片进行鉴定。**结果**　鉴定出贺兰山野生酸枣中共有 62 种化合物，其中黄酮类化合物 20 种，生物碱类化合物 8 种，萜类化合物 12 种，脂肪酸类化合物 8 种，核苷类化合物 5 种，氨基酸类化合物 5 种，有机酸类化合物 3 种，甾体类化合物 1 种。**结论**　黄酮类及萜类化合物主要分布在果仁和叶片中，生物碱类和脂肪酸类化合物在果仁、叶片、果肉位分布较均匀，通过探究野生酸枣不同部位的成分差异，为贺兰山野生酸枣资源的开发利用提供一定的理论基础。

关键词：野生酸枣；不同部位；UPLC-Q-TOF/MS^E；UHPLC-Q-Exactive/MS；定性鉴别；资源开发
中图分类号：R927.2　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0823-10
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.016

Chemical constituents from different parts of wild sour jujube at Helan Mountains in Ningxia based on LC-MS

LIANG Yu-lu[1, 3], LI Yi-hong[1, 3], LEI Yan[1, 3], LIU Chuan-xin[1, 2, 3*], HUANG Jian-mei[1, 3*] (1. *School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488; 2. *Department of Metabolism and Endocrinology*, *Endocrine and Metabolic Disease Center*, *The First Affiliated Hospital*, *and College of Clinical Medicine of Henan University of Science and Technology*, *Key Laboratory of Rare Hereditary Diseases of Henan*, *National Clinical Research Center for Metabolic Diseases in Luoyang*, *Luoyang Henan* 471003; 3. *Beijing Key Laboratory of Quality Assessment of Traditional Chinese Medicine*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488)

Abstract: Objective To qualitatively analyze chemical constituents from different parts of wild sour jujube in Helan Mountains by high-performance liquid chromatographic tandem mass spectrometry and to promote the development and utilization of wild sour jujube resources. **Methods** The kernels, leaves and sarcocarp of wild sour jujube were extracted with 50% methanol, and the separation was performed on Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} column. The mobile phase was 0.1% formic acid (A)-0.1% formic acid acetonitrile (B) for the gradient elution. UPLC-Q-TOF/MS^E and UHPLC-Q-Exactive/MS techniques were used to identify the compounds in each part of the wild sour jujube. Data acquisition was performed with MassLynx and Xcalibur work stations for analysis of primary fragments. UNIFI software and literature information were used to identify the secondary fragments. **Results** Totally 62 compounds were identified, including 20 flavonoids, 8 alkaloids, 12 terpenoids, 8 fatty acids, 5 nucleosides, 5 amino acids, 3 organic acids and 1 steroidal compound. **Conclusion**

作者简介：梁雨璐，女，在读硕士研究生，主要从事抗焦虑及毒性中药研究，email：20200935100@bucm.edu.cn　*通信作者：刘传鑫，男，博士，讲师，主要从事分析毒理学与临床分子诊断学研究，email：15222003775@163.com；黄建梅，女，教授，博士研究生导师，主要从事中药有效成分及体内过程分析，email：huangjm@bucm.edu.cn

Flavonoids and terpenoids are mainly distributed in the kernels and leaves, while alkaloids and fatty acids are more evenly distributed in the kernels, leaves and sarcocarp. By exploring the differences in the compositions from different parts of wild sour jujube, we provide theoretical basis for the development and utilization of wild sour jujube resources in Helan Mountains.

Key words: wild sour jujube; different part; UPLC-Q-TOF/MS^E; UHPLC-Q-Exactive/MS; qualitative identification; resource development

酸枣仁（Ziziphi Spinosae Semen）为鼠李科植物酸枣 [*Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa*（Bunge）Hu ex H.F. Chou] 的干燥成熟种子，主产于河北、陕西、山西、辽宁、河南等省，具有养心补肝，宁心安神，敛汗，生津的功效，主要用于虚烦不眠，惊悸多梦，体虚多汗，津伤口渴等证 [1]。酸枣仁的主要成分为萜类、黄酮类、脂肪酸、挥发油、生物碱、多糖以及一系列吲哚衍生物等 [2]，其中皂苷类、黄酮类成分具有镇静安眠的作用。另外酸枣仁还具有抗惊厥、抗抑郁、抗焦虑、改善心血管系统疾病、抗氧化、抗炎、增强记忆等药理作用 [3]。

酸枣仁的药理作用与其成分息息相关，近年来利用 LC-MS 技术对酸枣仁的成分分析研究较多，而酸枣除药用部位果仁以外，其他部位成分的研究鲜有报道。酸枣的其他部位同样具有药用价值，酸枣叶能改善睡眠 [4]，具有保肝 [5]、抗氧化、抑菌 [6] 等作用；酸枣果肉也被证明具有镇静催眠 [7]、抗氧化 [8] 等作用。因此，充分了解酸枣叶及果肉的化学成分可以促进其有效利用。

为了更加简便、快速地分析鉴定中药复杂体系中的化学成分，本研究采用了 UPLC-Q-TOF/MS^E 和 UHPLC-Q-Exactive/MS 技术，对宁夏回族自治区石嘴山市北武当贺兰山脚下野生酸枣的不同部位中化学成分进行定性分析，从而了解酸枣不同部位的成分差异，为酸枣叶、果肉功效的深入研究以及野生酸枣的开发利用奠定了理论基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

ACQUITY 超高效液相色谱系统串联 SYNAPT G2-Si 质谱仪（美国 Waters 公司，离子源为电喷雾离子源 ESI，配有 MassLynx V4.1 工作站），超高效液相色谱与质谱联用仪（Thermo Scientific Q Exactive LC-MS）[美国 Thermo Fisher 公司，离子源为电喷雾离子源（ESI），配有 Xcalibur 3.0 工作站]，电子天平 ME104E/02（瑞士 Mettler Toledo 公司），KQ-100DB 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司），UNIFI 1.8（美国 Waters 公司），高速台式冷冻离心机（上海安亭科学仪器厂），MILLI-Q Advantage A10 超纯水系统（美国 Millipore 公司）。

1.2 材料

乙腈、甲酸 [质谱级，赛默飞世尔科技（美国）有限公司]。水为质谱级超纯水。甲醇（分析纯，天津市致远化学试剂有限公司）。酸枣药材采于宁夏回族自治区石嘴山市北武当贺兰山脚下，经北京中医药大学杨瑶珺教授鉴定为鼠李科植物酸枣 [*Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa*（Bunge）Hu ex H.F. Chou] 的干燥成熟果实及枝叶。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

洗净的酸枣果实、叶片于 105 ℃烘干 24 h，取叶片、果肉及果仁粉碎后过 4 号筛得到粉末，称取酸枣叶、果仁、果肉粉末各 0.2 g 放入 50 mL 具塞锥形瓶中，加入 20 mL50% 甲醇，30 ℃超声 1.5 h，滤过，收集滤液，12 000 r • min^{-1} 高速离心 10 min，取上清液即得。

2.2 色谱条件

采用 UPLC-Q-TOF/MS^E 和 UHPLC-Q-Exactive/MS 技术对酸枣各部位中的化合物进行分析。

色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）；柱温为 35 ℃，体积流量为 0.3 mL • min^{-1}；进样量为 5 μL；流动相为 0.1% 甲酸水溶液（A）和 0.1% 甲酸乙腈（B），梯度洗脱（0 ～ 8 min，2% ～ 9%B；8 ～ 18 min，9% ～ 32%B；18 ～ 20 min，32% ～ 89%B；20 ～ 35 min，89% ～ 98%B；35 ～ 37 min，98% ～ 2%B，37 ～ 40 min；2%B）。

2.3 质谱条件

① 采用 SYNAPT G2-Si 质谱仪，离子源为 ESI，在正离子模式下进行质谱检测分析。辅助喷雾电离与脱溶剂气体使用的是高纯 N_2，N_2 温度为 120 ℃；干燥气流速为 10 mL • min^{-1}；雾化气气压为 310 kPa；脱溶剂 N_2 流速为 900 L • h^{-1}；锥

孔反吹氮气为 50 L·h^{-1}；毛细管电离电压和锥孔电压分别为 500 V、40 V；高能通道碰撞能量为 40 ～ 65 eV；四极杆质量扫描范围：*m/z* 50 ～ 1500 Da，扫描时间 0.2 s，进行质谱检测分析[9]。

② 采用 Q Exactive 质谱仪，ESI 在负离子模式下进行分析，扫描范围设定为 *m/z* 100 ～ 1500 Da。具体的质谱条件参数：毛细管电压 3200 V；毛细管温度为 350 ℃，离子源温度为 350 ℃；采用高纯 N_2 作为鞘气和辅助气，鞘气流速为 35 L·h^{-1}，辅助气流速为 15 L·h^{-1}；采用 Thermo Xcalibur 3.0 工作站处理数据[10]。

2.4　数据分析

利用中国知网（CNKI），SciFinder，PubMed 上已有文献与中药系统药理学数据库与分析平台（TCMSP）检索酸枣的化学成分，将检索得到的化学成分进行整合、去除重复项后通过 PubChem，ChemSpider 等平台或数据库下载各化合物的 mol 格式的文件，建立酸枣各部分的化学成分信息数据库。

基于 MassLynx V4.1 工作站和以中药数据库为基础的 UNIFI 1.8 软件对正离子模式数据进行采集与分析，将酸枣化合物信息条目导入库中，设定高能通道阈值为 25.0，低能通道阈值为 200.0，选择运行碎片分析功能，选取的相关加和离子为 H^+，Na^+，K^+，NH_4^+，输入 lockmass 值（556.2766）校正质量数，设定误差 Error 的绝对值不超过 1.5×10^{-5}。同时也基于文献和人类代谢组数据库（Human Metabolome Database，HMDB，www.hmdb.ca），收集相关化合物的二级碎片和保留时间进行比对，保留时间接近并且误差 Error 的绝对值不超过 1×10^{-5} 鉴定为同一化合物。

采用 Xcalibur 3.0 工作站将 Thermo 仪器产生的“.raw”格式的负离子模式数据打开，查询相关文献收集化合物的二级碎片和保留时间，保留时间接近并且误差 Error 的绝对值不超过 5×10^{-6} 鉴定为同一化合物。

2.5　化学成分的鉴定

野生酸枣仁、叶、果肉样品溶液按“2.2”和“2.3”项下的色谱及质谱条件进行分析，得到其在正、负离子模式下的 BPI 图（见图 1）。结合 UNIFI 数据库匹配和已有文献报道以及 HMDB 数据库比对，确定化合物的分子式及裂解规律，鉴定出黄酮类化合物 20 种，生物碱类化合物 8 种，萜类化合物 12 种，脂肪酸类化合物 8 种，核苷类化合物 5 种，氨基酸类化合物 5 种，有机酸类化合物 3 种，甾体类化合物 1 种，总计 62 种化合物，鉴定结果见表 1[11-27]。其中，酸枣仁鉴定出 42 种化合物，酸枣叶鉴定出 41 种化合物，酸枣果肉鉴定出 28 种化合物。

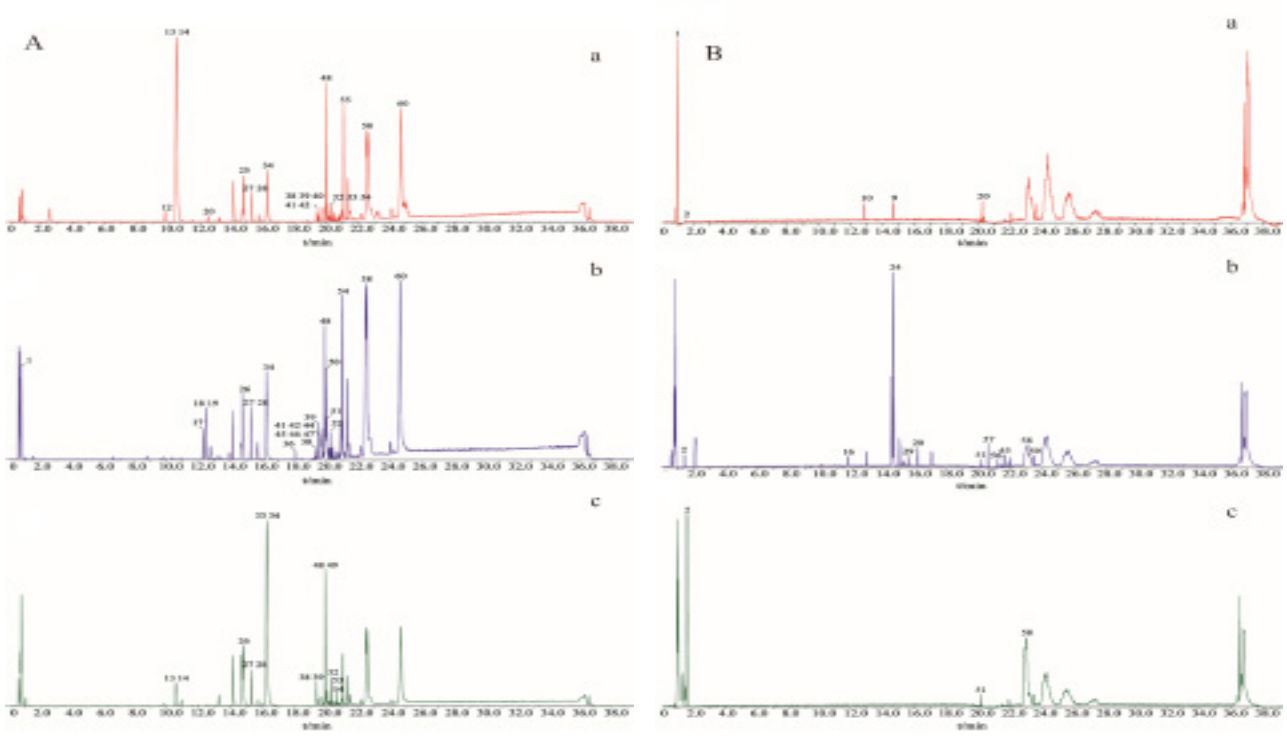


图 1　野生酸枣仁（a）、叶（b）、果肉（c）在正离子模式（A）和负离子模式（B）下的基峰离子流图

Fig 1　Base peak ion in the positive ion mode（A）and the negative mode（B）in the kernel（a），leaf（b）and sarcocarp（c）of wild sour jujube

表 1 UPLC-Q-TOF/MS^E 和 UHPLC-Q-Exactive/MS 法鉴定野生酸枣不同部位的化学成分

Tab 1 Compounds from different parts of wild sour jujube by UPLC-Q-TOF/MS^E and UHPLC-Q-Exactive/MS

No.	t_R/min	加和离子	分子式	理论值 *m/z*	实测值 *m/z*	误差/$\times10^{-6}$	来源	碎裂离子	化学成分	化合物类型
1	0.80	$[M-H]^-$	$C_{16}H_{19}NO_8$	352.1037	352.1036	0.34	仁	188.0709，146.0601	*N*-glc-indoleaceticacid [11, 16]	生物碱类
		$[M+H]^+$		354.1189	354.1164	7.06	叶	254.0333，188.0238，174.0465，146.0288，128.0543		
2	1.48	$[M-H]^-$	$C_6H_8O_7$	191.0197	191.0189	4.27	仁	111.0075，87.0074，85.0281	柠檬酸（citric acid）[12]	有机酸
							叶	111.0074，87.0073，85.0281		
							肉	111.0097，87.0102，85.0309		
3	2.76	$[M-H]^-$	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	282.0843	282.0843	0.04	叶	150.0411，133.0145	鸟嘌呤核苷（guanosine hydrate）[12]	核苷
4	2.81	$[M-H]^-$	$C_{10}H_{12}N_5O_6P$	328.0452	328.0451	0.44	肉	191.9455，134.0461，61.9870	环磷酸腺苷（cyclic adenosine monophosphate）[12]	核苷
5	2.89	$[M-H]^-$	$C_{10}H_{12}N_5O_7P$	344.0401	344.0399	0.52	肉	66.03316	环单磷酸鸟苷（cyclic guanosinc monophosphate）[12]	核苷
6	3.38	$[M-H]^-$	$C_{11}H_{19}N_5O_2$	252.1466	252.1463	0.94	仁	210.12416，208.10846，113.07095	cycol（arginine proline）[12]	氨基酸
7	3.68	$[M-H]^-$	$C_9H_{11}NO_2$	164.0717	164.0708	4.95	仁	147.04416，72.00777	苯丙氨酸（phenylalanine）[12]	氨基酸
8	4.87	$[M-H]^-$	$C_{16}H_{19}NO_9$	368.0987	368.0984	0.61	仁	144.04442	3*R*（*S*）-*N*-glc-3-hydroxy-indoleacetc acid [11]	有机酸
9	5.87	$[M-H]^-$	$C_{14}H_{18}O_9$	329.0878	329.0877	0.29	仁	167.03397，152.01051	pseudolaroside B [16]	萜类
							叶	167.03403，152.01033		
							肉	167.03404，152.01059		
10	6.93	$[M+H]^+$	$C_{23}H_{29}NO_8$	448.1971	448.1947	5.36	仁	269.1346，237.0904，219.5598，175.0732，137.0601	6-葡萄糖-乌药碱（6-glc-coclaurine）[16]	生物碱类
							肉	286.8565，237.0904，209.0981，175.0790		
11	7.16	$[M-H]^-$	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	203.0826	203.0817	4.14	仁	156.99820，142.06502，116.04925	色氨酸（typtophan）[12]	氨基酸
							叶	157.05566，142.06506，116.04924		
12	9.86	$[M+H]^+$	$C_{17}H_{19}NO_3$	286.1443	286.1471	9.79	仁	237.1644，209.1044，175.0847，107.0457	乌药碱（coclaurine）[a]	生物碱类
							叶	269.0630，237.1240，209.0350，175.1078		
							肉	237.0501，175.1078，143.0529，107.0547		
13	10.53	M^+	$C_{20}H_{24}NO_4^+$	342.1705	342.1753	14.04	仁	297.1133，282.0925，265.0892，237.0971，222.0703，219.0814，207.0829，191.0831，179.0874，165.0712	异喹啉类酸李碱（zizyphusine）[16]	生物碱类
							叶	297.0681，265.4376，237.0568		
							肉	282.0852，265.0892，237.0904，222.0703		
14	10.56	$[M-H]^-$	$C_{15}H_{14}O_6$	289.0717	289.0716	0.25	仁	221.0821，203.0709，187.0394，109.0283，97.0282	儿茶素/表儿茶素（catechine/epicatechin）[12]	黄酮类
							叶	221.0813，203.0705，187.0392，109.0281，97.0281		
							肉	221.08112		
15	11.54	M^+	$C_{19}H_{24}NO_3^+$	314.1756	314.1774	5.73	仁	269.0273，237.0904，209.0918，189.0728，178.0781，175.0732，165.0712，151.0567，137.0755	木兰箭毒碱/莲心季铵碱（magnocurarine/lotusine）[16]	生物碱类
							肉	237.0770，178.1306，165.0768，151.0246，107.0547		
16	11.79	$[M-H]^-$	$C_9H_{12}N_{26}$	483.1665	483.1649	3.25	叶	174.95561，86.95338	uridine monophosphate [12]	核苷
17	12.30	$[M+H]^+$	$C_{15}H_{10}O_7$	303.0505	303.0497	2.64	叶	153.0211	槲皮素（quercetin）[a]	黄酮类
18	12.48	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{20}O_{12}$	465.1033	465.1076	9.25	叶	324.0268，303.0511，274.0517，247.0632，153.0205	罗布麻甲素（isoquercitrin）[a]	黄酮类
19	12.48	$[M+H]^+$	$C_{27}H_{30}O_{16}$	611.1612	611.1576	5.89	叶	331.1029，324.0268，303.0511，247.0632，153.0205	芦丁（rutin）[a]	黄酮类
20	12.54	$[M+H]^+$	$C_{28}H_{32}O_{15}$	609.1819	609.1841	3.61	仁	447.0494，429.3217，411.0050，381.0122，351.0997，327.0907，297.0756	斯皮诺素（spinosin）[11, 17]	黄酮类
	16.25	$[M-H]^-$		607.1668	607.1665	0.57	叶	487.84293，445.07715		

续表 1

No.	t_R/min	加和离子	分子式	理论值 *m/z*	实测值 *m/z*	误差/$\times10^{-6}$	来源	碎裂离子	化学成分	化合物类型
21	12.70	$[M-H]^-$	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.1511	593.1511	0.12	仁	503.1178，473.1089，412.8452，383.0764，353.0670，325.0711，297.0767	维采宁Ⅱ（vicenin Ⅱ）[12，16，20]	黄酮类
	13.41	$[M+H]^+$		595.1663	595.1612	8.57	叶	541.1288，337.1307，325.0175，307.0451，295.1000		
22	14.18	$[M-H]^-$	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.1511	593.1512	0.10	仁	413.0891，353.067，335.0553，311.0555，293.0455，89.0230，59.0125	异牡荆素 -2"-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷（isovitexin-2"-*O*-*β*-*D*-glucopyranoside）[12，20]	黄酮类
23	14.34	$[M+H]^+$	$C_{38}H_{40}O_{18}$	785.2293	785.2328	4.46	仁	351.0921，327.0902，297.0806，177.0574，145.0313	6'''- 阿魏酰斯皮诺素（6'''-feruloylspinosin）[a]	黄酮类
24	14.42	$[M-H]^-$	$C_{32}H_{38}O_{19}$	725.1934	725.1936	0.20	仁 叶	725.18982，284.03247，227.03452 284.0325，227.03470	山茶苷 B（camelliaside B）[29]	黄酮类
25	14.78	$[M-H]^-$	$C_{21}H_{20}O_{10}$	431.0983	431.0983	0.16	仁 肉	341.06705，311.05615 311.16824	异牡荆素（isovitexin）[11，17]	黄酮类
26	14.70	$[M+K]^+$	$C_{14}H_{19}NO_5$	320.0900	320.0936	11.25	仁 叶 肉	176.0655 176.0636 176.0632，175.0571，165.0697，163.0566	Boc-*D*-Tyr-OH [a]	氨基酸
27	15.30	$[M+K]^+$	$C_{29}H_{50}O$	453.3499	453.3482	3.75	仁 叶 肉	227.1795 227.1797 227.1798	植物固醇（phytosterol）[a]	甾体
28	15.33	$[M+NH_4]^+$	$C_{12}H_{24}O_2$	218.2120	218.2099	9.63	仁 叶 肉	201.0525，139.004，153.0323，115.1007，113.1094 201.0525，165.020，139.0864，115.1007，113.1094 201.0525，155.086，153.0431，129.0591，113.1141	月桂酸（lauric acid）[b]	脂肪酸
29	15.63	$[M-H]^-$	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.1511	593.1508	0.63	叶	284.03238，256.03619	山柰酚 -3- 芸香糖苷（kaempferol-3-rutinoside）[20]	黄酮类
30	15.66	$[M-H]^-$	$C_{35}H_{36}O_{17}$	727.1879	727.1882	0.44	仁	607.1683，427.1037，325.0752，307.0613，292.0373，281.0453	6'''-*p*-hydroxylbenzoylspinosin [17，27]	黄酮类
31	15.78	$[M-H]^-$	$C_{37}H_{38}O_{18}$	769.1985	769.1987	0.33	仁	593.1499，413.0879，311.0563，293.0456	nervilifordin J [27]	黄酮类
32	16.12	$[M-H]^-$	$C_{39}H_{42}O_{19}$	813.2247	813.2251	0.43	仁	427.1032，307.0604，292.0378，265.0716	6'''- 芥子酰斯皮诺素（6'''-sinapoylspinosin）[20，27]	黄酮类
33	16.27	$[M+H]^+$	$C_{18}H_{13}NO_3$	292.0974	292.1004	10.27	肉	246.0545，248.0715，262.087，277.0745，278.0821	观音莲明碱（lysicamine）[a]	生物碱类
34	16.27	$[M+Na]^+$	$C_{18}H_{19}NO_4$	336.1212	336.1215	0.89	仁 叶 肉	176.0633，177.0632 165.0709，176.0644，177.0615 163.0558，175.0569，177.061，179.0754，280.0911	*N*- 反式 - 阿魏酰酪胺（*N*-trans-feruloyltyramine）[a]	生物碱类
35	16.34	$[M-H]^-$	$C_{37}H_{38}O_{17}$	753.2036	753.2035	0.10	仁	607.1718，427.1038，307.0608，292.0379，265.0720，205.0500	6'''- 对香豆酰斯皮诺素（6'''-p-coumaroylspinosin）[17，27]	黄酮类
36	18.11	$[M+H]^+$	$C_{53}H_{88}O_{23}$	1093.5795	1093.5793	0.18	叶	751.4608，733.4750，473.3633，455.3582	3，20，23，30-tetrahydroxy-dammar-3-glc- [rha]- arabinopyranoside[16]	萜类
37	18.75	$[M+H]^+$	$C_{36}H_{49}N_5O_5$	632.3812	632.3841	4.59	仁	148.1136	安木非宾碱 D（amphibine D）[a]	生物碱类
38	19.39	$[M+NH_4]^+$	$C_{14}H_{28}O_2$	246.2433	246.2452	7.72	仁 叶 肉	229.1124，145.0650，131.1156，117.0620，102.8376 229.2049，145.1018，131.0856，117.0715，103.6627 229.1388，145.2649，117.0904	肉豆蔻酸（tetradecanoic acid）[b]	脂肪酸

续表 1

No.	t_R/min	加和离子	分子式	理论值 *m/z*	实测值 *m/z*	误差/$\times10^{-6}$	来源	碎裂离子	化学成分	化合物类型
39	19.40	$[M+Na]^+$	$C_{22}H_{22}O_{10}$	469.1111	469.1082	6.18	仁	429.2674，327.1065，411.1201，393.1742，297.1584	当药黄素（swertisin）[16]	黄酮类
							叶	429.1136，327.0907，411.3680，393.1136，351.0506，297.0079		
							肉	327.146，411.1555，393.0703，351.0260，297.1208		
40	19.41	$[M+NH_4]^+$	$C_{58}H_{94}O_{26}$	1224.6377	1224.6335	3.43	仁	1057.2031，749.9297，733.5105，455.3582，437.3096	酸枣仁皂苷 A（jujuboside A）[a]	萜类
41	19.60	$[M+H]^+$	$C_{52}H_{84}O_{21}$	1045.5583	1045.5531	4.98	仁	881.9821，601.2367，587.1685，455.3582，437.3552，369.1588	酸枣仁皂苷 B（jujuboside B）[a，16]	萜类
							叶	949.5305		
42	19.61	$[M+H]^+$	$C_{30}H_{46}O_3$	455.3525	455.3582	12.53	仁	455.3489，203.1937，177.1705	桦木酮酸（betulonic acid）[b]	黄酮类
							叶	455.3582，203.1875，177.1879		
43	19.64	$[M-H]^-$	$C_7H_6O_4$	153.0193	153.0186	4.46	肉	124.01571，95.04896，81.03287	原儿茶酸（protocatechuic acid）[12]	有机酸
44	19.71	$[M+H]^+$	$C_{49}H_{78}O_{17}$	939.5317	939.536	4.58	叶	437.3469，455.3571，791.4582	jujubasaponins Ⅱ [a]	萜类
45	19.73	$[M+H]^+$	$C_{30}H_{48}O_4$	473.3631	473.3633	0.42	叶	437.3469，455.3571	麦珠子酸（alphitolic acid）[a，13，16]	萜类
	21.69	$[M-H]^-$		471.3479	471.3477	0.43	肉	453.16196，355.0166		
46	19.78	$[M+H]^+$	$C_{47}H_{76}O_{17}$	913.5161	913.5179	1.97	叶	455.3565，513.3628，791.4560	大枣皂苷 Ⅰ（zizyphus saponin Ⅰ）[a]	萜类
47	19.82	$[M+H]^+$	$C_{30}H_{48}O_3$	457.3682	457.3726	9.63	叶	441.3369，427.2437，339.2904，205.1212，175.1483	熊果酸（ursolic acid）[b]	萜类
48	19.94	$[M+NH_4]^+$	$C_{16}H_{32}O_2$	274.2746	274.2726	7.30	仁	197.1287，183.1412，169.1059，153.1241，141.0757	棕榈酸（palmitic acid）[b]	脂肪酸
							叶	197.1471，183.1235，169.1059，153.0971，141.0808		
							肉	197.1226，183.1235，153.0701，141.086，111.2276		
49	19.94	$[M+NH_4]^+$	$C_{18}H_{30}O_2$	296.2590	296.2560	10.14	肉	231.1588，217.0249，205.1275，191.1616，189.1689	亚麻酸（linolenic acid）[b]	脂肪酸
50	20.01	$[M+H]^+$	$C_{51}H_{80}O_{18}$	981.5423	981.5447	2.45	叶	369.283，437.3463，733.4553，737.431，755.4416	大枣苷（ziziphin）[a]	萜类
51	20.14	$[M-H]^-$	$C_9H_{18}N_{25}$	475.2104	475.2105	0.24	叶	96.95921	谷氨酸二肽（glutamic acid dipeptide）[12]	氨基酸
							肉	96.95874，56.84827		
52	20.31	$[M+NH_4]^+$	$C_{18}H_{36}O_2$	302.3059	302.3054	1.66	仁	237.2988，223.2038，209.1234，197.2820，181.1321	硬脂酸（stearic acid）[b]	脂肪酸
							叶	237.2450，223.1190，209.1549，197.1348，183.1117		
							肉	237.1307，223.1385，181.1028，169.1003，141.0808		
53	20.63	$[M+NH_4]^+$	$C_{20}H_{40}O_2$	330.3372	330.3359	3.94	仁	253.2337，183.0822，181.1439，155.0751，153.0971	花生酸（arachidic acid）[b]	脂肪酸
							叶	253.1920，183.1235，181.1557，155.0805，153.0755		
							肉	253.1643，183.1649，181.3908，153.0917		
54	20.87	$[M+NH_4]^+$	$C_{22}H_{44}O_2$	358.3685	358.3681	1.12	仁	281.1182，267.2044，239.1788，225.1713，155.0697	山嵛酸（behenic acid）[b]	脂肪酸
							叶	281.1914，267.1616，239.1451，225.1320，155.0914		
							肉	281.1108，267.1402，239.1721，225.1385，155.0697		

续表 1

No.	t_R/min	加和离子	分子式	理论值 *m/z*	实测值 *m/z*	误差/$\times10^{-6}$	来源	碎裂离子	化学成分	化合物类型
55	20.99	$[M+H]^+$	$C_{18}H_{32}O_2$	281.2481	281.2499	6.41	仁	303.1942，281.1474，123.9479	亚油酸（linoleic acid）[b]	脂肪酸
56	21.05	$[M-H]^-$	$C_{30}H_{46}O_6$	501.3221	501.3222	0.15	叶	439.32352	24-hydroxyceanothic acid [16]	萜类
57	20.83	$[M-H]^-$	$C_{15}H_{10}O_5$	269.0455	269.0454	0.29	仁	225.18500	芹菜素（apigenin）[11]	黄酮类
							叶	241.96483，225.18622		
							肉	241.04990，225.05511		
58	22.54	$[M+H]^+$	$C_{30}H_{48}O_3$	457.3682	457.3633	10.72	仁	355.2675，283.2669，217.115，163.1139，135.1401	桦木酸（betulinic acid）[a, b, 13, 29]	萜类
							叶	85.0302，135.1191，147.1192，159.1189，187.1505		
	23.02	$[M-H]^-$		455.3530	455.3527	0.77	肉	455.35349		
59	23.69	$[M-H]^-$	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	266.0894	266.0903	3.21	叶	61.987	腺苷（adenosine）[12]	核苷
60	24.67	$[M+NH_4]^+$	$C_{30}H_{46}O_5$	504.3689	504.3729	7.94	仁	457.3073，451.3519，311.2900，249.1653，181.1028	美洲茶酸（ceanothic acid）[b, 11, 13, 16]	萜类
	21.27	$[M-H]^-$		485.3272	485.3270	0.51	叶	485.32739，455.31766，439.32095，423.32773		
							肉	485.32715，439.32159，423.32727		
61	27.74	$[M+NH_4]^+$	$C_{36}H_{38}O_{18}$	776.2402	776.2404	0.26	仁	207.0350，281.054，355.0743	6'''-vanilloylspinosin）[a]	黄酮类
							叶	207.0356，281.054		
62	34.68	$[M+NH_4]^+$	$C_{41}H_{46}O_{23}$	924.2774	924.2767	0.76	仁	281.054，355.0758	isovitexin-2''-[*O*-4''''-（*O*-glc）-6-vanilloyl]glucopyranoside [a]	黄酮类

注（Note）：[a] 通过 MassLynx V4.1 工作站和 UNIFI 1.8 软件匹配得到（obtained by MassLynx V4.1 workstation and UNIFI 1.8 software）；[b] 采用 HMDB 数据库进行鉴别（identified by Human metabolome database）。

2.6　化学成分质谱裂解途径分析

从黄酮类、生物碱类、萜类化合物中各选取了一种代表性化合物，对其进行了裂解规律分析。

化合物 **12**：正离子检测模式下，t_R 为 9.86 min，准分子离子峰 $[M+H]^+$ 的 *m/z* 为 286.1471，推测其分子式为 $C_{17}H_{19}NO_3$。在二级质谱图中，果仁获得 MS/MS 碎片的 *m/z* 分别为 237.1644，209.1044，175.0847，107.0457；叶片获得 MS/MS 碎片的 *m/z* 分别为 269.0630，237.1240，209.0350，175.1078；果肉获得 MS/MS 碎片的 *m/z* 分别为 237.0501，175.1078，143.0529，107.0547。推测化合物 **12** 的二级质谱图中 $[M+H]^+$ 失去 1 分子 NH_3 形成 *m/z* 269 的 $[M+H-NH_3]^+$ 碎片离子，$[M+H-NH_3]^+$ 失去 1 分子 CH_3OH 形成 *m/z* 237 的 $[M+H-NH_3-CH_3OH]^+$ 碎片离子，$[M+H-NH_3-CH_3OH]^+$ 失去 1 分子 CO 形成 *m/z* 209 的 $[M+H-NH_3-CH_3OH-CO]^+$ 碎片离子；$[M+H]^+$ 失去 1 分子 C_6H_9NO 形成 *m/z* 175 的 $[M+H-C_6H_9NO]^+$ 碎片离子，$[M+H-C_6H_9NO]^+$ 失去 1 分子 CH_3OH 形成 *m/z* 143 的 $[M+H-C_6H_9NO-CH_3OH]^+$ 碎片离子；$[M+H]^+$ 失去 1 分子 $C_{10}H_{13}NO_2$ 形成 *m/z* 107 的 $[M+H-C_{10}H_{13}NO_2]^+$ 碎片离子 [14-15]。通过对其裂解过程的分析，初步鉴定化合物为生物碱类成分乌药碱，广泛分布于酸枣的仁、叶、果肉中，具体裂解规律见图 2A。

化合物 **20**：正离子检测模式下，t_R 为 12.54 min，准分子离子峰 $[M+H]^+$ 的 *m/z* 为 609.1841，负离子检测模式下，准分子离子峰 $[M+H]^-$ 的 *m/z* 为 607.16650，推测其分子式为 $C_{28}H_{32}O_{15}$。在二级质谱图中，获得 MS/MS 碎片，其 *m/z* 分别为 447.0494，429.3217，411.0050，381.0122，351.0997，327.0907，323.0921，308.0710，297.0756，267.0688。推测化合物 **20** 的二级质谱图中 $[M+H]^+$ 失去 1 分子葡萄糖（162 Da）形成 *m/z* 447 的 $[M+H-Glc]^+$ 碎片离子，$[M+H-Glc]^+$ 失去 1 分子 $C_4H_8O_4$ 形成 *m/z* 327 的 $[M+H-Glc-C_4H_8O_4]^+$ 碎片离子，并在此处产生基峰 [16]；$[M+H-Glc]^+$ 失去 1 分子 H_2O 形成 *m/z* 429 的 $[M+H-Glc-H_2O]^+$ 碎片离子，$[M+H-Glc-H_2O]^+$ 再失去 1 分子 H_2O 形成 *m/z* 411 的 $[M+H-Glc-2H_2O]^+$ 碎片离子，$[M+H-Glc-H_2O]^+$ 失去 1 分子 CH_4O_2 形成 *m/z* 381 的 $[M+H-Glc-H_2O-CH_4O_2]^+$ 碎片离子，$[M+H-Glc-H_2O]^+$ 失去 1 分子 $C_2H_6O_3$ 形成 *m/z* 351 的 $[M+H-Glc-H_2O-C_2H_6O_3]^+$ 碎片离子，$[M+H-Glc-H_2O]^+$ 失去 1 分子 $C_5H_8O_4$ 形成 *m/z* 297 的碎片离子 [17]，通过对其裂解过程的分析，初步鉴定

化合物为黄酮类成分斯皮诺素，主要分布在酸枣的果仁和叶片中，具体裂解规律见图 2B。

化合物 **40**：正离子检测模式下，t_R 为 19.41 min，准分子离子峰 $[M + H]^+$ 的 *m/z* 为 1207.6130，$[M + NH_4]^+$ 的 *m/z* 为 1224.6335，负离子检测模式下，准分子离子峰 $[M + H]^-$ 的 *m/z* 为 1205.5941，推测其分子式为 $C_{58}H_{94}O_{26}$。在二级质谱图中，获得 MS/MS 碎片，其 *m/z* 分别为 1057.2031，749.9297，733.5105，455.3582，437.3096。推测化合物 **40** 的二级质谱图中，离子断裂途径开始于 1 分子 H_2O（18 Da）的中性损失，产生一个不稳定的中间体，其中 C20 和 C22 之间产生双键，C16-C17 单键和 C23-O（C16）单键断裂，不稳定的中间体通过 RDA 裂解立即转化为 *m/z* 1189 的离子 $[M + H-H_2O]^+$[18]，$[M + H-H_2O]^+$ 失去 1 分子 Xyl 形成 *m/z* 1057 的 $[M + H-Xyl]^+$ 碎片离子，$[M + H-Xyl]^+$ 失去 1 分子 Glc 后再失去 1 分子 Glc 或 Rha 形成 *m/z* 733 的 $[M + H-Xyl-2Glc]^+$ 和 *m/z* 749 的 $[M + H-Xyl-Glc-Rha]^+$ 碎片离子，之后失去所有的糖得到 17-Ebelin lactone，形成 *m/z* 455 的碎片离子峰 $[M + H-C_{28}H_{47}O_{23}]^+$，并在 *m/z* 437（$C_{30}H_{45}O_2$）处产生一系列的优势产物离子[16]。通过对其裂解过程的分析，初步鉴定化合物为皂苷类成分酸枣仁皂苷 A，主要分布在酸枣仁中，具体裂解规律见图 2C。

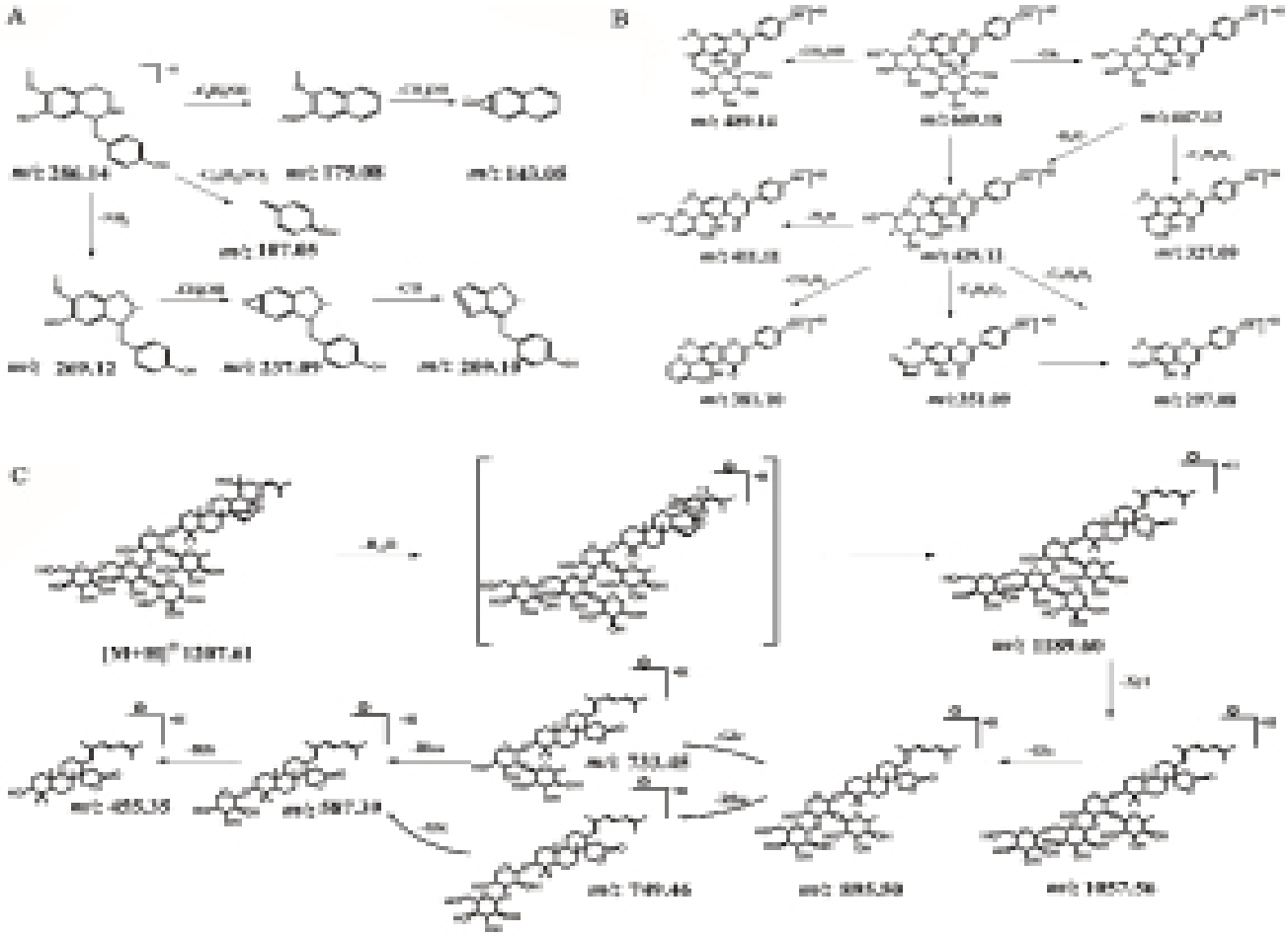


图 2 乌药碱（A）、斯皮诺素（B）和酸枣仁皂苷 A（C）的推测裂解途径

Fig 2 Possible fragmentation pathways for coclaurine（A），spinosin（B）and jujuboside A（C）

3 讨论

3.1 不同部位化学成分差异

黄酮类化合物及萜类化合物主要分布在酸枣的果仁和叶片中，果仁中鉴定出 15 种黄酮类化合物，5 种萜类化合物；叶片中鉴定出 11 种黄酮类化合物，11 种萜类化合物。果肉中鉴定出 3 种黄酮类化合物，4 种萜类化合物，这两类成分在果肉中含量较少、离子强度较低。研究表明，酸枣抗氧化活性成分主要为黄酮类及萜类化合物，总还原能力酸枣叶＞酸枣仁＞酸枣果肉[19]，与本研究中这两类成分种类分布的趋势相符。

黄酮类及萜类化合物也是酸枣主要的镇静安眠成分[20]，果仁中黄酮类化合物种类丰富，萜类化合物的种类比叶片少，然而 6'''- 对香豆酰斯皮

诺素[21]、6'''-阿魏酰斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A[22]等具有镇静安眠作用的药效成分主要分布在果仁中，其他药效成分斯皮诺素[22]、当药黄素[23]、酸枣仁皂苷 B、山茶苷 B 和白桦脂酸[24]主要分布在果仁和叶片中，当药黄素和白桦脂酸分布于三个部位中。酸枣叶片中的黄酮类及萜类成分种类多，这表明酸枣叶也具有很好的镇静安眠作用，与已有的报道相符[25]，具有很大的开发潜力。酸枣果肉中这两类成分种类较少，镇静安眠作用可能比较弱，后续需进行相关药理实验研究证明酸枣不同部位镇静催眠作用的强弱。

生物碱类和脂肪酸类成分在酸枣三个部位分布较均匀，酸枣中的生物碱具有抗惊厥[26]、催眠[27]的作用；果仁中的亚油酸及果肉中的亚麻酸属于不饱和脂肪酸，具有镇静催眠作用[28]。

3.2　野生酸枣资源综合开发与利用

酸枣仁是治疗失眠的各种中药制剂中最常用的组分[29]，酸枣不仅应用于医疗，也应用于食品保健，人们对酸枣的需求量日益增大，近年来各地酸枣仁的价格持续高涨，出现了供不应求的现象。宁夏石嘴山市北武当贺兰山脚下拥有丰富的酸枣资源，但综合开发利用的深度不够。本研究发现，酸枣除果仁部位以外，叶片及果肉也富含黄酮和萜类等活性成分。酸枣叶已被用于开发功能性饮料、食品添加剂、牲畜饲料等产品[30]，但其尚未得到广泛而充分的利用。此外，酸枣叶还可用于提取黄酮和萜类成分，相比于果实的获取受季节限制，叶片无论采摘、贮存和运输都具有较大优势。果肉中活性成分较少，适合开发为果脯类零食，不仅口感更佳，而且具有一定安神的作用，适合常年失眠多梦的患者使用，具有较大的市场需求。

开发贺兰山野生酸枣具有很高的商业价值，但是过度采摘容易造成资源匮乏，破坏野生酸枣种质资源。因此应该在保护野生种质资源的基础上，合理地开发和利用贺兰山野生酸枣资源，实现可持续发展，这不仅可以满足市场的需求，提高酸枣的遗传多样性，还可以为选育抗逆性优良的酸枣新品种提供宝贵的基础材料，也为当地实现产业升级、中草药资源开发和经济转型提供新的思路。

3.3　不足和局限性

本研究也存在一定局限性，首先，由 UPLC-Q-TOF/MS^E 和 UHPLC-Q-Exactive/MS 鉴定到的化合物无对照品进行比对，可能存在一定的假阳性情况；其次，研究采用的酸枣数据库都是已知成分，野生酸枣中存在的未知成分尚无法鉴定；再次，本研究仅使用 50% 甲醇部位进行成分提取研究，提取工艺有待优化；最后，本研究每个部位仅有 1 个样品，且质谱本身具有灵敏度的局限性，本方法鉴定得到的化合物并不代表酸枣中的全部成分，后续应增加样品数量及实验批次。由于色谱峰数量多而复杂，在离子流图中有一些响应较好的峰尚未定性，因此溶剂、色谱、质谱条件还有待优化，化学成分需要进一步研究。

4　结论

综上分析，本研究采用了 UPLC-Q-TOF/MS^E 和 UHPLC-Q-Exactive/MS 技术，对宁夏回族自治区石嘴山市北武当贺兰山脚下野生酸枣的不同部位（果仁、叶片、果肉）中化学成分进行定性分析；同时初步探索了贺兰山野生酸枣的种属分布，表明其作为药用酸枣的可行性，有利于在一定程度上缓解酸枣资源供不应求的现状，也为贺兰山野生酸枣资源的综合开发和利用提供依据。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020.

[2] He SR，Zhao CB，Zhang JX，et al. Botanical and traditional uses and phytochemical，pharmacological，pharmacokinetic，and toxicological characteristics of *Ziziphi Spinosae Semen*：a review [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2020，2020（9）：1-21.

[3] 韩鹏，李冀，胡晓阳，等 . 酸枣仁的化学成分、药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中医药学报，2021，49（2）：110-114.

[4] 庄福金，许雪平，于丹，等 . 崂山酸枣芽茶改善小鼠睡眠作用的研究 [J]. 食品安全质量检测学报，2017，8（10）：4051-4056.

[5] Bai L，Cui X，Cheng N，et al. Hepatoprotective standardized EtOH-water extract of the leaves of Ziziphus jujuba. [J]. Food Function，2017，8（2）：816-822.

[6] Silvia D，Martino F，Arpan D，et al. Antioxidant and antibiofilm activities of secondary metabolites from Ziziphus jujuba leaves used for infusion preparation [J]. Food Chem，2017，230：24-29.

[7] 张蕾，何晓曦，徐淑萍，等 . 酸枣果肉的镇静催眠作用 [J]. 中药材，2011，34（8）：1263-1266.

[8] 张璐 . 酸枣果肉多糖的提取优化及抗氧化活性研究 [J]. 中国酿造，2015，34（8）：92-96.

[9] 雷艳，刘传鑫，李尹，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS^E 的玉泉丸化学成分表征 [J]. 中药材，2020，43（7）：1639-1646.

[10] 高旭华，冯欣，毕玥琳，等 . 基于 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 的新癀片化学成分分析 [J]. 中南药学，2021，19（9）：1792-1799.

[11] Li M，Zhang FX，Wei ZC，et al. Systematically characterization of in vivo substances of *Ziziphi Spinosae* Semen in rats by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry analysis-ScienceDirect [J]. J Pharm Biomed Anal，2020，193：113756.

[12] Wang D，Li Q，Liu R，et al. Quality control of Semen Ziziphi Spinosae standard decoction based on determination of multi-components using TOF-MS/MS and UPLC-PDA technology [J]. J Pharm Anal，2019，9（6）：406-413.

[13] Shang J，Chen XL，Li L，et al. Identification of the absorptive constituents and their metabolites in vivo of *Ziziphi Spinosae* Semen by UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS [J]. Biomed Chromatogr，2020，34（12）：e4965.

[14] Dai X，Hu R，Sun C，et al. Comprehensive separation and analysis of alkaloids from *Stephania yunnanensis* by counter-current chromatography coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis [J]. J Chromatogr A，2012，1226：18-23.

[15] Schmidt J，Boettcher C，Kuhnt C，et al. Poppy alkaloid profiling by electrospray tandem mass spectrometry and electrospray FT-ICR mass spectrometry after [ring-$^{13}C_6$]-tyramine feeding [J]. Phytochemistry，2007，68（2）：189-202.

[16] Zhang FX，Li M，Qiao LR，et al. Rapid characterization of *Ziziphi Spinosae* Semen by UPLC/Qtof MS with novel informatics platform and its application in evaluation of two seeds from Ziziphus species [J]. J Pharm Biomed Anal，2016，122：59-80.

[17] Niu CY，Wu CS，Sheng YX，et al. Identification and characterization of flavonoids from semen zizyphi spinosae by high-performance liquid chromatography/linear ion trap FTICR hybrid mass spectrometry [J]. J Asian Nat Prod Res，2010，12（4）：300-312.

[18] Ma JJ，Kang LP，Zhou WB，et al. Identification and characterization of saponins in extract of *Ziziphi spinosae* Semen（ZSS）by ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry（UPLC-ESI-QTOF-MSE）[J]. J Med Plant Res，2011，5（26）：6152-6159.

[19] 王相，杨梦婷，高乐，等 . 酸枣不同部位提取物指标成分测定及体外抗氧化活性研究 [J]. 现代中医药，2020，40（4）：13-19.

[20] 王卫记，罗建光，孔令义 . HPLC-ESI-MS^n 分析酸枣仁有效部位的化学成分 [J]. 中国中药杂志，2009，34（21）：2768-2773.

[21] Li Y，Zhou A，Cui X，et al. 6'-*p*-coumaroylspinosin protects PC12 neuronal cells from acrylamide-induced oxidative stress and apoptosis [J]. J Food Biochem，2020，44（9）：e13321.

[22] Du C，Yan Y，Shen C，et al. Comparative pharmacokinetics of six major compounds in normal and insomnia rats after oral administration of *Ziziphi Spinosae* Semen aqueous extract [J]. J Pharm Anal，2020，10（4）：385-395.

[23] Yan Y，Li Q，Du CH，et al. Investigation of the potentially effective components of *Semen Ziziphi* Spinosae based on "in vitro to in vivo" translation approach [J]. Yao Xue Xue Bao，2017，52（2）：283-290.

[24] Liu X，Zhu X，Zhu H，et al. Simultaneous quantification of six bioactive components in decoction of *Ziziphi spinosae* Semen using ultrahigh performance liquid chromatography coupled with triple-quadrupole mass spectrometry [J]. J Anal Methods Chem，2018，2018：1-6.

[25] 赵新华，伊丽楠 . 酸枣叶提取物对中枢神经系统作用的实验研究 [J]. 时珍国医国药，2009，20（2）：463-464.

[26] 赵连红，乔卫，许岚 . 酸枣仁中生物碱抗惊厥作用的实验研究 [J]. 天津药学，2007，19（1）：4-5.

[27] 孙燕 . 酸枣仁生物碱和皂苷部位配伍指纹图谱及解郁安神作用机制的研究 [D]. 天津：天津医科大学，2014.

[28] 赵启铎 . 酸枣仁油中不饱和脂肪酸的药理实验研究 [J]. 天津中医药，2005，22（4）：331-333.

[29] 李强，杜晨晖，张敏，等 . 血清化学与网络药理学关联研究酸枣仁的体内效应成分 [J]. 中草药，2017，48（10）：1936-1943.

[30] 闫艳，付彩，杜晨晖 . 酸枣叶的营养成分、保健功能及产品开发研究进展 [J]. 食品工业科技，2018，39（20）：330-336，342.

（收稿日期：2021-09-07；修回日期：2021-10-18）

基于 UHPLC-Q-Exactive/MS 及多元统计分析识别栀子果实不同部位差异化学成分

李忆红[1, 3]，梁雨璐[1, 3]，张洁[1, 3]，解嘉琪[1, 3]，刘传鑫[1, 2, 3*]，黄建梅[1, 3*]（1. 北京中医药大学 中药学院，北京　102488；2. 河南科技大学临床医学院，河南科技大学第一附属医院内分泌代谢中心 内分泌代谢科，河南省遗传罕见病医学重点实验室，国家代谢性疾病临床医学研究中心洛阳分中心，河南　洛阳　471003；3. 北京中医药大学 中药品质评价北京市重点实验室，北京　102488）

摘要：目的　采用超高效液相色谱 - 四极杆 - 静电场轨道阱高分辨质谱技术（UHPLC-Q-Exactive/MS），建立栀子果皮、果仁中化学成分的快速识别方法，鉴别其特征性差异化合物。**方法**　选择电喷雾离子源，负离子模式下采集数据，通过保留时间、二级碎片及文献参考等进行分析，获得栀子果实不同部位的特征性差异成分。**结果**　筛选鉴定出栀子果实皮、果仁中具有统计学差异的化合物 22 种，其中环烯醚萜类化合物 9 种，有机酸类 6 种，西红花苷类 3 种，黄酮类 2 种，单萜苷类 2 种。**结论**　通过液质及多元统计分析识别的具有统计学差异的化合物中，鸡矢藤次苷甲酯、京尼平龙胆二糖苷、栀子苷、Jasminodiol、西红花苷Ⅰ在栀子果仁中的相对含量更高，该结果为栀子不同部位入药物质基础的研究提供了一定的参考。

关键词：栀子果皮；栀子果仁；UHPLC-Q-Exactive/MS；多元统计分析；差异化合物
中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0833-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.017

Identification of chemical components in different parts of Gardeniae fructus based on UHPLC-Q-Exactive/MS and multivariate statistical analysis

LI Yi-hong[1, 3], LIANG Yu-lu[1, 3], ZHANG Jie[1, 3], XIE Jia-qi[1, 3], LIU Chuan-xin[1, 2, 3*], HUANG Jian-mei[1, 3*]
(1. *School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488; 2. *Department of Metabolism and Endocrinology*, *Endocrine and Metabolic Disease Center*, *The First Affiliated Hospital*, *College of Clinical Medicine of Henan University of Science and Technology*, *Key Laboratory of Rare Hereditary Diseases of Henan*, *National Clinical Research Center for Metabolic Diseases in Luoyang*, *Luoyang Henan* 471003; 3. *Beijing Key Laboratory of Quality Assessment of Traditional Chinese Medicine*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488)

Abstract: Objective To establish an UHPLC-Q-Exactive/MS method to rapidly identify and analyze chemical constituents from different parts of the pericarp and seeds of Gardeniae fructus. **Methods** Electron spray ionization (ESI) source was adopted with negative ion modes. Compounds with statistical differences in the pericarp and seeds of Gardeniae fructus were analyzed from the retention time, second-level fragments and related literatures. **Results** Totally 22 compounds with statistical differences were identified in the pericarp and seeds of Gardeniae fructus, including 9 iridoids, 6 organic acids, 3 crocins, 2 flavonoids, and 2 monoterpenoids. **Conclusion** Among the compounds identified by UHPLC-MS, the content of scandoside methyl ester, genipin 1-gentiobioside, geniposide, jasminodiol, and crocin Ⅰ in the seeds of Gardeniae fructus is relatively higher, which can provide some reference for the study of different parts of Gardeniae fructus.

Key words: pericarp of Gardeniae fructus; seed of Gardeniae fructus; UHPLC-Q-Exactive/MS; multivariate statistical analysis; compound with statistical difference

作者简介：李忆红，女，在读硕士研究生，主要从事抗焦虑中药研究，email：liyihong98@126.com　*通信作者：刘传鑫，男，讲师，主管药师，主要从事分析毒理学与临床分子诊断学研究，email：15222003775@163.com；黄建梅，女，教授，博士研究生导师，主要从事中药有效成分及体内过程分析，email：huangjm@bucm.edu.cn

栀子为茜草科植物栀子（*Gardenia jasminoides* Ellis）的干燥成熟果实，其味苦，性寒，归心、肺、三焦经；具有泻火除烦，清热利湿，凉血解毒的功效[1]。在我国栀子主产区有江西、浙江、福建、湖南等地[2]，应用广泛，属于原卫生部颁布的第一批药食同源的中药材。栀子作为传统的大宗药材，具有广泛的药理活性，如保肝利胆、抗炎镇痛、抗肿瘤、抗抑郁、降血糖、神经保护等，另外还有改善血液循环、抗血栓、防治脑出血等保护心血管系统的药理活性[3-12]。

生栀子苦寒，炮制可降低栀子的寒性，《中国药典》[1]中有生栀子、炒栀子（清炒至黄褐色）、焦栀子（清炒至焦褐色或焦黑色）3 种，是对全果进行炮制，另外在《上海炮制规范》《湖南炮制规范》的记载中，炮制栀子无去壳、带壳的说法，但根据东汉至明清典籍记载，栀子果实的皮仁分用较为常见，目前部分地区中医用药仍沿用古时用法，如清《本草备要》记载“内热用仁，表热用皮”；《本草纲目》记载，栀子用以“治上焦、中焦连壳用，下焦去壳”[13-14]；根据记载，樟帮法[15]炮制栀子是去皮留仁，建昌帮法[16]炮制栀子是以皮、仁分用。栀子果皮、果仁易分离，其皮、仁分用可能是临床使用中两者表现出了药效差异，而这种差异可能来源于栀子果皮、果仁的物质基础的不同。

有研究表明栀子苷、西红花苷Ⅰ、西红花苷Ⅱ在栀子仁中含量比栀子皮中含量高[17]，去乙酰车叶草酸甲酯、京尼平龙胆二糖苷、栀子苷等化合物的含量分布存在差异[18-20]。虽已有文献报道关于栀子果皮、果仁成分差异研究，但选用的指标成分较少，也缺乏系统性。基于此，本试验利用 UHPLC-Q-Exactive/MS 技术对栀子果实不同部位的化学成分进行系统性的快速识别，并结合正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）判别模式对栀子果实不同部位特征性差异化合物进行筛选识别，为栀子果皮、果仁药效差异提供理论依据，也为栀子皮、仁的快速鉴定与临床合理应用提供了基础。

1 仪器与材料

超高效液相色谱与质谱联用仪（Thermo Scientific Q Exactive LC-MS，美国 Thermo Fisher 公司）；ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）（美国 Waters 公司）；JA2003B 电子天平（上海越平科学仪器有限公司）；KQ-300DB 数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；SHZ-D（Ⅲ）循环水式多用真空泵（河南省予华仪器有限公司）；TGL-16aR 高速冷冻离心机（上海安亭科学仪器厂）；MX-S 涡旋混匀仪（北京博雅创新科技发展有限公司）。

质谱级乙腈、乙酸［赛默飞世尔科技（中国）有限公司］；屈臣氏蒸馏水（广州屈臣氏食品饮料有限公司）；栀子药材采摘于福建，经北京中医药大学杨瑶珺教授鉴定为茜草科植物栀子（*Gardenia jasminoides* Ellis）的干燥成熟果实。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

取 20 颗栀子干燥果实（福建同一批次），分离栀子果皮、果仁，分别粉碎，取各粉末（过一号筛）约 0.5 g，精确称定，置于 50 mL 离心管中，精密加入 25 mL 去离子水，40 ℃超声提取 1.5 h（300 W，40 kHz），减压抽滤，将续滤液以 9820 g 离心 10 min，取 400 μL 上清液，即得。

2.2 色谱条件

采用 ACQUITY UPLC BEH C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）色谱柱；以 0.2% 乙酸水（A）-乙腈（B）作为流动相，线性洗脱梯度（0 ～ 1 min，10%B；1 ～ 4 min，10% ～ 15%B；4 ～ 18 min，15% ～ 30%B；18 ～ 24 min，30% ～ 50%B；24～28 min，50%～100%B；28～31 min，100%B；31 ～ 32 min，100% ～ 10%B；32 ～ 35 min，10%B）；柱温为 30 ℃；流速为 0.3 mL·min^{-1}；进样量为 2 μL。

2.3 质谱条件

采用电喷雾离子源（ESI），在负离子模式下（ESI^-）对栀子果实不同部位的样品进行分析，扫描范围设定为 *m/z* 100 ～ 1500 Da。具体的质谱条件参数：毛细管电压 3200 V；毛细管温度为 350 ℃，离子源温度为 350 ℃；采用高纯 N_2 作为鞘气和辅助气，鞘气流速为 35 L·h^{-1}，辅助气流速为 15 L·h^{-1}；采用 Thermo Xcalibur 3.0 工作站处理数据。

2.4 数据转换与分析

将 Thermo 仪器产生的“.raw”格式的数据，通过 Abf（Analysis Base File）Converter、MSFileReader 软件转换成“.abf”格式的数据，然后利用 MSDIAL 4.48 软件进行参数设置（误差范围、保留时间范围、加合物类型等），进行峰提取、对齐操作，然后将归一化之后的数据集导出，利用软件 SIMCA 14.1 进行多元统计分析、主成分分析（PCA）和 OPLS-DA。再利用 IBM SPSS Statistics 20.0 软件对栀子果皮、果仁两组间的数据进行正态性检验（Kolmogorov-Smirnov）和基于均值的方差齐性检验（$\alpha = 0.05$），然后根据正态性检验和方差齐

性检验的结果进行独立样本 t 检验（正态检验 $P > 0.05$）或独立样本 Mann-Whitney U 检验（正态检验 $P < 0.05$），筛选出差异具有统计学意义的化合物。

3　结果

3.1　UHPLC-Q-Exactive/MS 分析

取栀子样品，按“2.2”和“2.3”项下液质条件进行数据采集与分析，栀子不同部位样品在负离子模式下的基峰离子流色谱图（BPI）如图 1 所示。

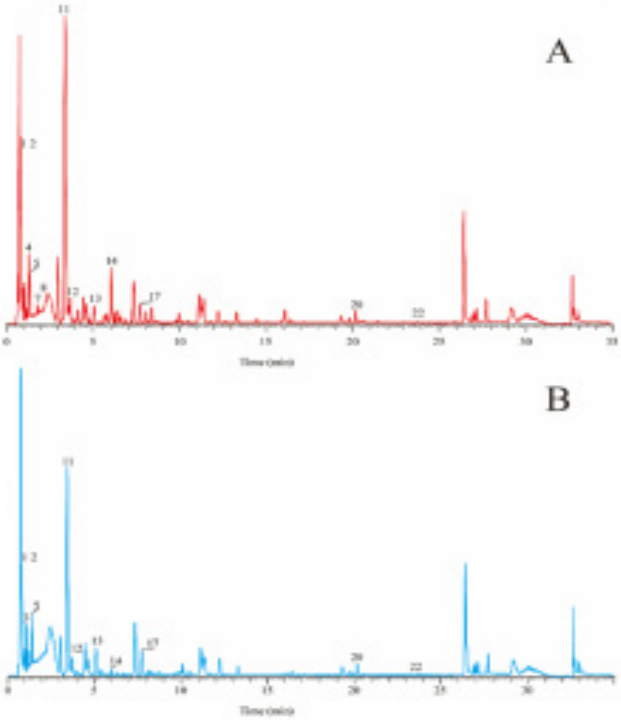


图 1　ESI⁻模式下栀子果皮（A）、果仁（B）的基峰色谱图

Fig 1　Base peak ion current of pericarp（A）and seeds（B）of Gardeniae fructus in negative ion mode

3.2　多元统计分析

采集福建同一批次的 20 颗栀子果皮、果仁的样本信息，采用多元统计分析寻找差异成分。通过 PCA 剔除异常值后，利用 OPLS-DA 筛选栀子果皮、果仁组间贡献率高的变量。如图 2 中 A1、B1 所示，在 PCA 模型中可以观察到一个异常值（P-13、R-9）。在剔除异常值的基础上，建立了 OPLS-DA 模型。R^2（cum）和 Q^2（cum）分别表示模型的真实性和预测能力。当 R^2 和 Q^2 都小于 1，且两个参数接近 1 时，所建立的模型是稳定合理的。在剔除异常值之后图 2 中 A2、B2 及表 1 统计分析的参数可以看出，本试验建立的 OPLS-DA 模型 R^2 和 Q^2 值都小于 1，保证了分析结果的准确性，具体 ESI⁻模式下交叉比较的多元统计分析模型相关参数见表 1。为了进一步验证所建模型的稳定性，采用置换试验对所建模型进行验证。假设检验在 $n = 200$ 时进行，结果如图 2C 所示。R^2 和 Q^2 的左点均小于最右点，Q^2 截距为 − 0.469。该模型具有较好的可预测性，且无过拟合现象。

表 1　栀子果皮、果仁比较的多元统计分析模型相关参数 (ESI⁻)

Tab 1　Parameters of multivariate analysis model of pericarp and seeds of Gardeniae fructus (ESI⁻)

种类	参数	P *vs* R
PCA	R^2X	0.523
	Q^2	0.372
OPLS-DA	R^2X	0.628
	R^2Y	0.986
	Q^2	0.965
Permutations	R^2	（0.0，0.357）
	Q^2	（0.0，− 0.469）
	Hypothesis	200

3.3　栀子果皮、果仁差异化合物的识别

将采集到的两组原始数据导入 SIMCA 14.1 进行 OPLS-DA 分析，结果两组数据出现明显差异。如图 2 中 B2 所示，栀子果实果皮、果仁样品显著分成两群，结果提示栀子果实不同部位中含有的化学成分存在显著差异。

通过保留时间、质谱裂解规律、文献信息共鉴定了 22 个差异具有统计学意义的化合物[21-25，27-34，42]，如表 2 所示，化合物 **1** ～ **7**、**11**、**12**、**14** ～ **19**、**21**、**22** 等 17 种化合物在栀子果皮中的含量更高；而化合物 **8**[鸡矢藤次苷甲酯（scandoside methyl ester）]、**9**[栀子苷（geniposide）]、**10**[京尼平龙胆二糖苷（genipin 1-gentiobioside）]、**13**（Jasminodiol）、**20**[顺 / 反西红花苷 Ⅰ（trans-crocin Ⅰ/cis-crocin Ⅰ）] 在栀子果仁中的含量更高。

4　讨论

4.1　化学成分质谱裂解分析

4.1.1　环烯醚萜类化合物质谱解析　栀子中含有多种环烯醚萜类成分，这些成分在 ESI⁻模式下，一般检测到脱氢准分子离子峰 $[M-H]^-$，当流动相中含有酸时，环烯醚萜苷还会生成 $[M + HCOO]^-$[35-37]，如化合物 **1** 山栀苷的一级质谱图中可见 *m/z* 437.13 $[M + HCOO]^-$，化合物 **3** 栀子新苷可见 *m/z* 419.10 $[M + HCOO]^-$，化合物 **8** 鸡矢藤次苷甲酯可见 *m/z* 449.08 $[M + HCOO]^-$。

在串联质谱（MS/MS）中，化合物 **1** 山栀苷以 *m/z* 391.12458 $[M-H]^-$ 作为准分子离子峰，对其进行 MS^2 分析，碎片离子 *m/z* 229.07、211.06 是由准分子离子 *m/z* 391.12 $[M-H]^-$ 依次脱去一分子葡萄糖残基和脱去一分子 H_2O 形成，从而推断出其裂

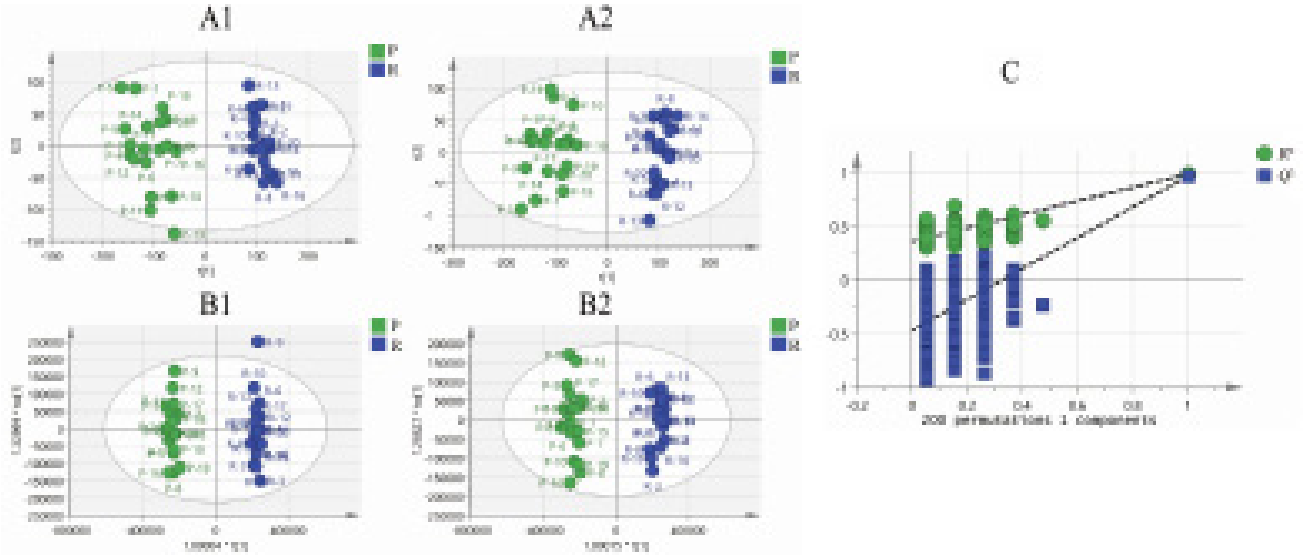


图 2 多元统计分析结果

Fig 2 Results of multivariate statistical analysis

注：A1. 未剔除异常值（P-13）PCA 散点图，A2. 剔除异常值后的 PCA 散点图；B1. 未剔除异常值（R-9）的 OPLS-DA 散点图，B2. 剔除异常值后的 OPLS-DA 散点图；C. ESI⁻模式下的交叉验证（假设检验数 $n = 200$）；P. 栀子果皮样品，R. 栀子果仁样品。

Note：A1. PCA scatter plots without eliminating outliers（P-13）；A2. PCA scatter plot after eliminating outliers；B1. OPLS-DA scatter plot without removing outliers（R-9），B2. OPLS-DA scatter plot after removing outliers；C. Cross-validation in ESI-mode（Number of hypothesis tests $n = 200$）；P and R. represent the samples of pericarp and seeds of Gardeniae fructus respectively.

解途径[28, 38]，如图 3A 所示。化合物 **4** 去乙酰车叶草苷酸主要脱去 H_2O、CO_2、葡萄糖残基或葡萄糖。碎片离子 *m/z* 345.12、209.04 是由准分子离子 *m/z* 389 $[M-H]^-$分别脱去一分子 CO_2 和葡萄糖残基形成；碎片离子 *m/z* 209.04 失去一分子 CO_2，形成碎片离子 *m/z* 165.05；碎片离子 *m/z* 165.05、147.04 也有可能由其前体离子（*m/z* 183.07、165.05）失去一分子 H_2O 形成，由此推测出化合物 **4** 去乙酰车叶草苷酸可能的裂解途径[22]如图 3B 所示。化合物 **9** 栀子苷准分子离子 *m/z* 387.16 $[M-H]^-$，二级扫描中负离子模式可见失去葡萄糖残基的碎片 *m/z* 225.08，说明环烯醚萜类化合物的裂解方式是以糖苷键断裂为主，丢失一分子葡萄糖基和 H_2O，苷元再次通过逆狄尔斯 - 阿德尔反应（RDA）方式裂解，生成碎片离子 *m/z* 123.04，符合栀子苷的裂解规律[30, 40]，如图 3C 所示。

4.1.2 单萜苷类化合物质谱解析 化合物 **12** jasminoside B、化合物 **13** jasminodiol 是栀子单萜苷类成分，化合物 **12** Jasminoside B 的碎片离子 *m/z* 183.10、301.27，是由准分子离子 *m/z* 345.15 $[M-H]^-$分别脱去一分子葡萄糖残基和 CO_2 形成；化合物 **13** Jasminodiol 的准分子离子 *m/z* 183.10 $[M-H]^-$ 脱去一分子 CO_2 产生碎片 *m/z* 139.11 $[M-H-CO_2]^-$。化合物 **12** 的碎片离子 *m/z* 183.10 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$进一步产生碎片离子 *m/z* 165.09 $[M-H-C_6H_{10}O_5-H_2O]^-$、121.10 $[M-H-C_6H_{10}O_5-H_2O-CO_2]^-$[27]，裂解途径如图 4 所示。

4.1.3 二萜类化合物质谱解析 栀子中二萜类化合物主要为色素类成分，其中包括西红花苷（藏红花素）及其衍生物，查阅文献可以发现藏红花素类成分有很明显的裂解特征，主要是糖苷键的断裂及脱去 CO_2 分子[21, 30, 41]，化合物 **20** 西红花苷Ⅰ分子离子峰 *m/z* 975.37 $[M-H]^-$首先脱去两端糖残基得到碎片离子 *m/z* 651.26 $[M-gen-H]^-$、327.16 $[M-2gen-H]^-$，碎片离子进一步脱去 CO_2 分别产生碎片离子 *m/z* 283.17 $[M-2gen-CO_2-H]^-$、239.18 $[M-2gen-2CO_2-H]^-$，化合物 **21** 的一级质谱的分子离子峰 *m/z* 813.32 $[M-H]^-$与化合物 **20** 正好相差一个葡萄糖残基的相对分子质量（162 Da），推测其为 trans-crocin Ⅱ/cis-crocin Ⅱ，即西红花苷Ⅱ；化合物 **22** 的分子离子峰 *m/z* 651.27 $[M-H]^-$与化合物 **20** 西红花苷Ⅰ相差一个龙胆二糖残基的相对分子质量（324 Da），推测其为 trans-crocin Ⅲ/cis-crocin Ⅲ，即西红花苷Ⅲ。化合物 **20** 的裂解途径如图 5 所示。

4.1.4 有机酸类 绿原酸易先脱去咖啡酰残基，产生碎片离子 *m/z* 191.06$[M-caffeoyl-H]^-$及咖啡酸特征离子 *m/z* 179.03 $[M-quinate-H]^-$，然后脱去一分子 H_2O 产生 *m/z* 173.04 $[M-caffeoyl-H_2O-H]^-$，同时咖啡酰基碎片 *m/z* 179.03 脱去一

表 2　栀子果实不同部位差异化合物的鉴定结果

Tab 2　Identification of compounds with statistical difference in different parts of Gardeniae fructus

峰号	t_R/min	差异化合物	分子式	实测值 *m/z*	理论值 *m/z*	误差/$\times10^{-6}$	碎片	变化趋势（P *vs* R）	变化倍数	参考文献
1	1.00	山栀苷[a]（shanzhiside）	$C_{16}H_{24}O_{11}$	391.1242	391.1245	0.87	391.12，437.13，373.11，229.07，211.06，193.03	↑***	3.12	[23]
2	1.03	京尼平苷酸[a]（geniposidic acid）	$C_{16}H_{22}O_{10}$	373.1143	373.1140	0.80	373.11，312.11	↑***	2.53	[23]
3	1.16	栀子新苷[a]（gardoside）	$C_{16}H_{22}O_{10}$	373.1143	373.1140	0.97	373.11，419.10，356.02，266.10，227.06	↑*	1.42	[23]
4	1.21	去乙酰车叶草苷酸[a]（deacetylasperulosidic acid）	$C_{16}H_{22}O_{11}$	389.1089	389.1089	0.13	389.11，345.12，209.04，183.07，165.05，147.04	↑***	2.92	[23]
5	1.32	新绿原酸[a]（5-*O*-caffeoylquinic acid）	$C_{16}H_{18}O_9$	353.0879	353.0878	0.31	353.09，191.06，179.03，173.04，135.04	↑***	18.49	[23]
6	1.33	异羟栀子苷[a]（gardenoside）	$C_{17}H_{24}O_{11}$	403.1242	403.1245	0.84	449.13，402.91，241.07，223.06，193.05	↑***	2.68	[23，25]
7	1.93	绿原酸[a]（3-*O*-caffeoylquinic acid）	$C_{16}H_{18}O_9$	353.0880	353.0878	0.57	191.06，179.03，173.04，135.04	↑***	14.21	[23]
8	2.03	鸡矢藤次苷甲酯[a]（scandoside methyl ester）	$C_{17}H_{24}O_{11}$	403.1240	403.1245	1.32	449.08，403.12，402.92，241.07，139.04	↓***	0.53	[23]
9	3.35	栀子苷[a]（geniposide）	$C_{17}H_{24}O_{10}$	387.1293	387.1296	0.96	225.08，207.07，193.05，123.04	↓*	0.79	[22-24]
10	3.35	京尼平龙胆二糖苷[a]（genipin 1-gentiobioside）	$C_{23}H_{34}O_{15}$	549.1812	549.1824	2.22	595.19，549.18，225.08	↓**	0.79	[23]
11	3.53	京尼平[a]（genipin）	$C_{11}H_{14}O_5$	225.0761	225.0768	3.33	207.07，147.04，123.04，101.02	↑***	5.37	[27]
12	3.67	jasminoside B[a]	$C_{16}H_{26}O_8$	345.1553	345.1554	0.38	345.15，301.27，165.09，121.10，301.27	↑***	1.63	[27-28]
13	5.19	jasminodiola	$C_{10}H_{16}O_3$	183.1013	183.1026	7.04	183.10，139.11，111.08	↓*	0.88	[27-28]
14	6.07	芦丁[a]（rutin）	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.1464	609.1461	0.51	609.15，343.05，301.03，271.02	↑***	179.47	[29]
15	6.49	异绿原酸 B[a]（3，4-di-*O*-caffeoylquinic acid）	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515.1156	515.1195	7.50	353.09，179.03，335.08，191.06，173.04，135.04	↑***	5.90	[23，34，42]
16	6.53	金丝桃苷/异槲皮苷[a]（hyperoside/isoquercitrin）	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.0887	463.0882	1.25	463.09，301.04，271.02，255.03	↑***	126.43	[29-33]
17	7.67	异绿原酸 A[a]（3，5-di-*O*-caffeoylquinic acid）	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515.1192	515.1195	0.58	191.06，179.03，135.04，173.04，353.09	↑***	4.66	[34，42]
18	8.95	异绿原酸 C[a]（4，5-di-*O*-caffeoylquinic acid）	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515.1181	515.1195	2.72	191.06，179.03，135.04，173.04，353.09	↑***	5.90	[34，42]
19	9.14	隐绿原酸[a]（4-*O*-caffeoylquinic acid）	$C_{16}H_{18}O_9$	353.0878	353.0878	0.14	173.04，179.03，135.04，191.06	↑***	6.16	[23，34]
20	20.16	顺/反西红花苷Ⅰ[a]（trans-crocin Ⅰ/cis-crocin Ⅰ）	$C_{44}H_{64}O_{24}$	975.3696	975.3714	1.89	651.26，327.16，283.17，239.18	↓***	0.78	[21，27]
21	21.47	顺/反西红花苷Ⅱ[b]（trans-crocin Ⅱ/cis-crocin Ⅱ）	$C_{38}H_{54}O_{19}$	813.3187	813.3186	0.17	651.27，327.16，283.17，239.18，185.13	↑***	3.93	[21，27]
22	23.52	顺/反西红花苷Ⅲ[b]（trans-crocin Ⅲ/cis-crocin Ⅲ）	$C_{32}H_{44}O_{14}$	651.2658	651.2658	0.03	327.16，283.17，239.18	↑***	2.12	[21，27]

注：a. 独立样本 *t* 检验；b. 独立样本 Mann-Whitney U 检验；$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$。

Note：a.independent sample *t* test; b.independent sample Mann-Whitney U test；$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$.

分子 CO_2 得到 *m/z* 135.04 $[caffeoyl\text{-}H\text{-}CO_2]^-$ 碎片离子。化合物 **5**、**7**、**19** 的保留时间分别为 1.32、1.93、9.14 min，准分子离子峰均为 *m/z* 353.09 $[M\text{-}H]^-$，三者的质谱碎片离子数据相同（*m/z* 191.06、179.03、173.04、135.04），说明这 3 个化合物互为同分异构体，同分异构体化合物无法通过质谱分辨，只能结合文献数据、保留时间和离子丰度差异区分，根据文献报道新绿原酸裂解碎片强度：*m/z* 191 ＞ 179 ＞ 135；绿原酸裂解碎片强度：*m/z* 191 最强，*m/z* 179 和 *m/z* 135 强度

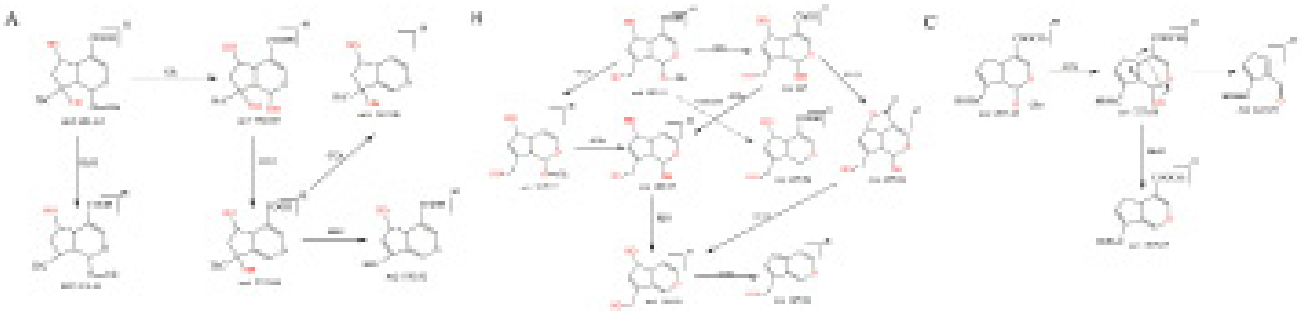


图 3 环烯醚萜类化合物的质谱裂解途径

Fig 3 Mass spectra and possible fragment pathways of iridoids

A. 山栀苷（shanzhiside）；B. 去乙酰车叶草苷酸（deacetylasperulosidic acid）；C. 栀子苷（geniposide）

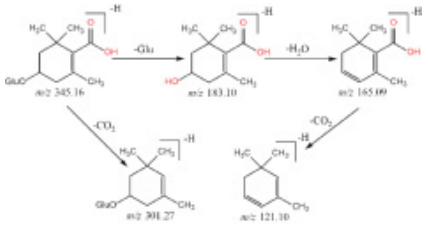


图 4 单萜苷类化合物 jasminoside B 的质谱裂解途径

Fig 4 Mass spectra and possible fragment pathways of monoterpenoids jasminoside B

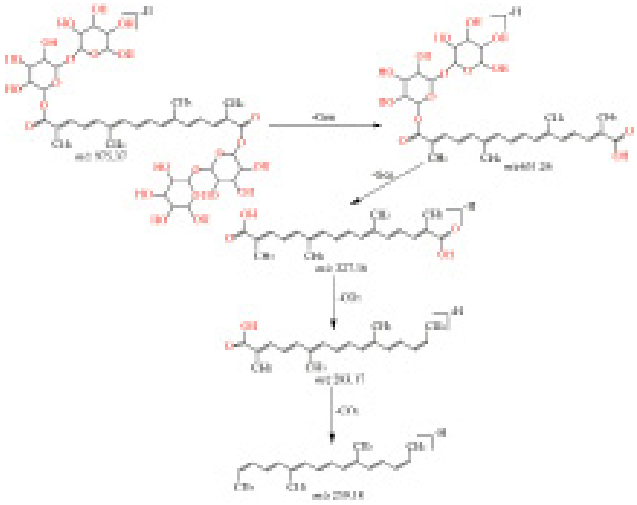


图 5 二萜类化合物西红花苷 I 的质谱裂解途径

Fig 5 Mass spectra and possible fragment pathways of crocin Ⅰ

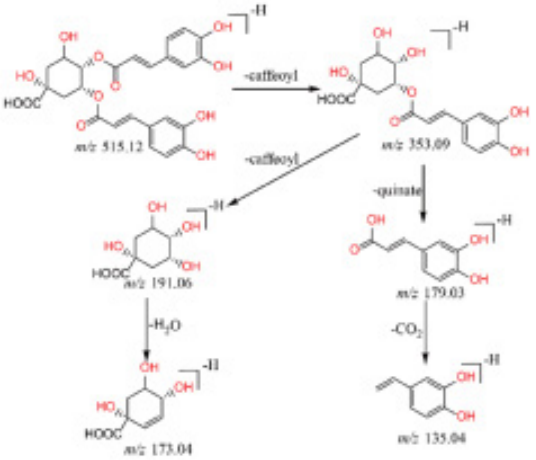


图 6 有机酸类化合物异绿原酸 C 的质谱裂解途径

Fig 6 Mass spectra and possible fragment pathways of organic acids 4，5-di-*O*-caffeoylquinic acid

相当，较弱；隐绿原酸裂解碎片强度：*m/z* 179 ＞ 191 ＞ 135[41-45]。化合物 **7** 的碎片离子 *m/z* 191.06 响应最强，*m/z* 179.03、135.04 强度较弱，与文献报道的绿原酸裂解规律相符，推测化合物 **5** 为新绿原酸（5-*O*-caffeoylquinic acid），化合物 **7** 为绿原酸（3-*O*-caffeoylquinic acid），化合物 **19** 为隐绿原酸（4-*O*-caffeoylquinic acid）。异绿原酸 A、B、C 的结构比绿原酸多一分子的咖啡酰基，具有相似的结构碎片。在负离子模式下检测到化合物 **15**、**17**、**18** 准分子离子峰均为 *m/z* 515.12 $[M-H]^-$，二级质谱均有脱去一分子咖啡酰残基的碎片离子 *m/z* 353.09 $[M\text{-caffeoyl-H}]^-$，通过查阅保留时间及对比文献，推测化合物 **15** 为异绿原酸 B（3，4-di-*O*-caffeoylquinic acid），化合物 **17** 为异绿原酸 A（3，5-di-*O*-caffeoylquinic acid），化合物 **18** 为异绿原酸 C（4，5-di-*O*-caffeoylquinic acid），化合物 **18** 异绿原酸 C 的裂解途径如图 6 所示。

4.2 提取溶剂的选择

在预试验中，分别以 70% 甲醇、水两种体系作为提取溶剂，按照“2.2”和“2.3”项下液质条件进行考察，结果表明栀子果皮、果仁的醇提物、水提取色谱图大体相同，其中醇提物的质谱响应稍强，考虑到栀子入药的使用方法及绿色环保的角度，故选择水作为提取溶剂。

4.3 栀子不同部位差异化合物的临床意义

本研究在 ESI^- 模式下筛选鉴定了 22 个差异成分，其中鸡矢藤次苷甲酯、京尼平龙胆二糖苷、栀子苷、jasminodiol、西红花苷 I 在栀子果仁中的含量更高。研究表明栀子苷、西红花苷都具有抗炎、保肝利胆等作用，并且对神经系统和心脑血管疾病也有治疗作用[3-4, 46]，鉴于本试验发现

栀子苷及西红花苷Ⅰ在栀子果皮、果仁中分布存在显著差异，果仁中栀子苷及西红花苷Ⅰ分别是果皮中的 1.27、1.28 倍，可以认为栀子果仁在栀子苷和西红花苷Ⅰ方面的药效比栀子果皮的效果更好；绿原酸及其异构体是一类具有抗氧化、抗菌、降血脂、降血压、降血糖、抗抑郁和焦虑等多方面药理作用的天然化合物 [47]，虽然栀子质控的药效成分栀子苷在果仁中分布高于果皮，但绿原酸、异绿原酸及其异构体在栀子果皮中分布远高于果仁，也可以认为在有机酸类化合物药效方面栀子果皮比果仁效果更好，说明栀子果皮、果仁分用有一定的科学依据。

4.4 局限与不足

本试验在识别鉴定化合物过程中，缺少对照品进行对比，只能通过质谱二级碎片、保留时间、离子丰度及文献信息作为参考，推测化合物的归属，可能存在一定的假阳性结果；同时，在对比栀子果皮、果仁成分差异时，只得出西红花苷Ⅰ在栀子果仁中的相对含量更高，而西红花苷Ⅱ在栀子果皮中的相对含量更高，与文献研究结果不完全一致 [17]，未使用不同产地不同批次的栀子药材，试验条件有待进一步优化；其次，本研究鉴定栀子所含有的 22 种化学成分都是文献中报道的已知化合物，仍存在部分离子峰没有确定归属，可通过分离纯化等手段对含量较低的成分进行富集，鉴别出更多差异化合物；在选择离子模式时，预试验图谱显示负离子模式信号强度更高，选择栀子文献中常用的负离子模式，结果可能具有片面性。

5 小结

本研究应用 UHPLC-Q-Exactive/MS 技术对栀子果皮、果仁不同部位中化合物进行分析与鉴定，共鉴定出 22 种差异具有统计学意义的化合物，其中鸡矢藤次苷甲酯、京尼平龙胆二糖苷、栀子苷、jasminodiol、西红花苷Ⅰ 5 种成分在栀子果仁中的相对含量更高，山栀苷、京尼平苷酸、栀子新苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯、异羟栀子苷、京尼平、jasminoside B、芦丁、金丝桃苷 / 异槲皮苷、西红花苷Ⅰ、绿原酸、异绿原酸及其异构体等 17 种成分在栀子果皮中的相对含量更高。该方法的建立为中药不同部位入药的的物质基础的研究提供了一定的参考，也为栀子果皮、果仁分用的科学性及临床应用的合理性提供一定的研究基础。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：259.

[2] 潘媛，李隆云，王钰，等 . 我国主要栀子栽培资源分布与综合利用调查 [J]. 天然产物研究与开发，2019，31（10）：1823-1830.

[3] 卜妍红，陆婷，吴虹，等 . 栀子化学成分及药理作用研究进展 [J]. 安徽中医药大学学报，2020，39（6）：89-93.

[4] 史永平，孔浩天，李昊楠，等 . 栀子的化学成分、药理作用研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中草药，2019，50（2）：281-289.

[5] 王亭 . 中药栀子有效成分及药理作用的研究进展 [J]. 中国药师，2015，18（10）：1782-1784.

[6] Chen P，Chen Y，Wang ，et al. Comparative evaluation of hepatoprotective activities of geniposide，crocins and crocetin by CCl_4-induced liver injury in mice [J]. Biomol Ther，2016，24（2）：156-162.

[7] Ko H，Kim JM，Kim SJ，et al. Induction of apoptosis by genipin inhibits cell proliferation in AGS human gastric cancer cells via Egr1/p21 signaling pathway [J]. Bioorg Med Chem Lett，2015，25（19）：4191-4196.

[8] Ren L，Tao WW，Zhang HL，et al. Two standardized fractions of *Gardenia jasminoides* Ellis with rapid antidepressant effects are differentially associated with BDNF up-regulation in the hippocampus [J]. J Ethnopharmacol，2016，187：66-73.

[9] 王立，潘海鸥，钱海峰，等 . 栀子中京尼平苷及藏红花素的神经保护作用研究进展 [J]. 中草药，2017，48（12）：2564-2571.

[10] Cheng F，Ma C，Sun L，et al. Synergistic neuroprotective effects of Geniposide and ursodeoxycholic acid in hypoxia-reoxygenation injury in SH-SY5Y cells [J]. Exp Ther Med，2018，15（1）：320-326.

[11] Nasirzadeh M，Rasmi Y，Rahbarghazi R，et al. Crocetin promotes angiogenesis in human endothelial cells through PI3K-Akt-Enos signaling pathway [J]. Excli J，2019，18：936-949.

[12] Higashino S，Sasaki Y，Giddings JC，et al. Crocetin，a carotenoid from *Gardenia jasminoides* Ellis，protects against hypertension and cerebral thrombogenesis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats [J]. Phytother Res，2014，28（9）：1315-1319.

[13] 庞素银 . 浅谈古今及不同地域中药炮制的差异和对药效的影响 [J]. 中医文献杂志，2020，38（3）：30-34.

[14] 赵梦亭，朱如意，应佳亮，等 . 栀子炮制历史沿革、临床应用及质量评价研究进展 [J]. 中华中医药杂志，2021，36（4）：2229-2237.

[15] 龚千锋 . 樟树中药炮制全书 [M]. 南昌：江西科学技术出版社，1990.

[16] 彭红，付建武，黄丽芸 . 建昌帮法焦栀子炮制工艺研究 [J]. 中华中医药学刊，2010，28（5）：940-941.

[17] 刘怡，陈磊，张留记 . 不同产地栀子皮和栀子仁中有效成分的含量比较 [J]. 中药新药与临床药理，2012，23（1）：81-83.

[18] 邵坚，罗光明，朱继孝，等 . 栀子炮制前后 7 种成分的比较研究 [J]. 中草药，2015，46（11）：1629-1633.

[19] 梁献葵，王艳慧，雷敬卫，等 . 栀子皮、仁、须中 3 个成分含量测定及指纹图谱 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（4）：193-200.

[20] 蔡仲希，傅祥平，龚千锋 . 栀子皮、栀子仁、全栀子中挥发油成分的比较研究 [J]. 江西中医学院学报，2013，25（4）：56-58.
[21] 高凤阳 . 基于液质联用技术的清开灵注射液中栀子和金银花色素成分的研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2012.
[22] 姚蓝 . 基于栀子炒炭存性的物质基础内涵研究 [D]. 北京：中国中医科学院，2014.
[23] Han Y，Wen J，Zhou TT，et al. Chemical fingerprinting of *Gardenia jasminoides* Ellis by HPLC-DAD-ESI-MS combined with chemometrics methods [J]. Food Chem，2015，188：648-657.
[24] Zhu HY，Bi KS，Han F，et al. Identification of the absorbed components and metabolites of Zhi-Zi-Da-Huang decoction in rat plasma by ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry [J]. J Pharmaceut Biomed，2015，111：277-287.
[25] 杨阳，孙连娜，陈万生 . 栀子中 geniposide 与 gardenoside 中文译名的商榷 [J]. 医药导报，2008，27（3）：367-368.
[26] 何理想，王允吉，张倩倩，等 . UPLC Q-Exactive Orbitrap MS 分析栀子水提液中的化学成分 [J]. 广州化工，2020，48（5）：94-97.
[27] Wang L，Liu S，Zhang X，et al. A strategy for identification and structural characterization of compounds from Gardenia jasminoides by integrating macroporous resin column chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with ion-mobility spectrometry [J]. J Chromatogr A，2016，1452：47-57.
[28] 王晓燕，张丽，王添琦，等 . 栀子化学成分的 UHPLC-Q-TOFMS 分析 [J]. 中药材，2013，36（3）：407-410.
[29] 张忠立，左月明，杨雅琴，等 . 栀子中的黄酮类化学成分研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19（4）：79-81.
[30] 雷磊，王玉，霍志鹏，等 .LCMS-IT-TOF 分析栀子炒焦前后化学成分的变化 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（17）：88-97.
[31] 彭开锋 . 栀子化学成分及生物活性研究 [D]. 沈阳：沈阳药科大学，2012.
[32] 田丰，陈婷，王晔尘，等 .HPLC-ESI-TOF-MS 法快速分离与鉴别益母草药材中的多种化学成分 [J]. 上海中医药大学学报，2014，28（4）：86-89.
[33] Chen QC，Zhang WY，Youn U，et al. Iridoid glycosides from Gardeniae Fructus for treatment of ankle sprain [J]. Phytochemistry，2009，70（6）：779-784.
[34] He WH，Liu XA，Xu HG，et al. On-line HPLC-ABTS screening and HPLC-DAD-MS/MS identification of free radical scavengers in Gardenia（*Gardenia jasminoides* Ellis）fruit extracts [J]. Food Chem，2010，123（2）：521-528.
[35] 李存满，骆亚薇，田宝勇 . 环烯醚萜类化合物的质谱裂解规律研究进展 [J]. 河北师范大学学报（自然科学版），2015，39（6）：522-526.
[36] Ling Y，Liu K，Zhang Q，et al. High performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization and quadrupole time-of-flight-mass spectrometry as a powerful analytical strategy for systematic analysis and improved characterization of the major bioactive constituents from Radix Dipsaci [J]. J Pharm Biomed Anal，2014，98：120-129.
[37] Li CM，Zhang XL，Xue XY，et al. Structural characterization of iridoid glucosides by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom，2008，22（12）：1941-1954.
[38] 严欢，左月明，袁恩，等 . 基于 UHPLC-Q-TOF-MS 技术分析栀子花的化学成分 [J]. 中药材，2018，41（6）：1359-1364.
[39] 赵祥升，杨美华，吴海峰，等 . 巴戟天中环烯醚萜苷和蒽醌在电喷雾离子源负离子模式下的质谱裂解行为 [J]. 质谱学报，2018，39（3）：342-350.
[40] 卢建秋，孙明谦，张宏桂 . 栀子苷和梓醇的电喷雾质谱裂解机制研究 [J]. 中草药，2008，39（7）：1011-1014.
[41] 李玲云，王云，刘梦娇，等 . 栀子金花丸化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 快速鉴定与分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（14）：1-11.
[42] Clifford MN，Knight S，Kuhnert N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS^n [J]. J Agric Food Chem，2005，53（10）：3821-3832.
[43] 胡静，杨媛媛，任慧，等 . 光叶丁公藤中化学成分的 UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS 鉴定 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（18）：124-132.
[44] 严颖，赵慧，邹立思，等 . 杜仲化学成分的 LC-Triple TOF MS/MS 分析 [J]. 质谱学报，2017，38（1）：146-156.
[45] 张阿琴，李迩娜，张仓，等 . LC-MS 分析消癌平注射液中有机酸类成分 [J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18（4）：88-90.
[46] 韩宇，谢国勇，李冉，等 . 西红花苷药理活性的研究进展 [J]. 现代药物与临床，2017，32（9）：1806-1814.
[47] 那袭雪，张文涛，谈远锋，等 . 绿原酸及其异构体药理作用及不良反应研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报，2018，20（3）：140-144.

（收稿日期：2021-09-07；修回日期：2021-11-08）

小儿柴胡退热栓的解热作用研究

王莉博[1]，刘泽干[2, 3]，雷攀[2]，黄小凤[1]，王淑惠[1]，杜士明[2, 3*]（1. 湖北医药学院药学院，湖北　十堰　442000；2. 湖北医药学院附属太和医院，湖北　十堰　442000；3. 武当特色中药研究湖北省重点实验室，湖北医药学院，湖北　十堰　442000）

摘要：目的　评价小儿柴胡退热栓的解热作用，并初步探讨其解热机制。**方法**　将新西兰家兔 25 只随机分为空白组、模型组、试药组（小儿柴胡退热栓）和阳性对照组（柴胡注射液组、小儿布洛芬栓组），通过建立家兔发热模型，观测各组家兔行为学和肛温变化，ELISA 检测血浆中白细胞介素 1β（IL-1β）、白细胞介素 6（IL-6）、肿瘤坏死因子 α（TNF-α）水平和下丘脑中环磷酸腺苷（cAMP）、精氨加压素（AVP）和前列腺素 E_2（PGE_2）水平。**结果**　与模型组相比，小儿柴胡退热栓在给药后 1 ～ 2.5 h 内可显著降低发热家兔肛温至正常水平（$P < 0.01$）；同时小儿柴胡退热栓能显著下调发热家兔血浆中 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平（$P < 0.05$）；并可显著下调发热家兔下丘脑中 cAMP（$P < 0.05$）、PGE_2（$P < 0.01$）水平，上调 AVP 水平（$P < 0.01$）。**结论**　小儿柴胡退热栓可显著降低发热家兔体温，其机制可能与调节发热家兔血浆中 IL-1β、IL-6、TNF-α 含量及下丘脑中 cAMP、PGE_2、AVP 含量密切相关。

关键词：小儿柴胡退热栓；内毒素；解热；炎症因子
中图分类号：R285.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0841-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.018

Antipyretic effect of Xiaoer Chaihu Tuire suppository

WANG Li-bo[1], LIU Ze-gan[2, 3], LEI Pan[2], HUANG Xiao-feng[1], WANG Shu-hui[1], DU Shi-ming[2, 3*] (1. *School of Pharmacy*, *Hubei University of Medicine*, *Shiyan Hubei* 442000; 2. *Taihe Hospital*, *Hubei University of Medicine*, *Shiyan Hubei* 442000; 3. *Key Laboratory of Wudang Local Chinese Medicine Research*, *Hubei University of Medicine*, *Shiyan Hubei* 442000)

Abstract: Objective To evaluate the antipyretic effect of Xiaoer Chaihu Tuire suppository, and determine the mechanism. **Methods** Totally 25 New Zealand rabbits were randomly divided into a blank groups, a model group, a drug group (Xiaoer Chaihu Tuire suppository), and two positive control groups (Chaihu injection group and paediatric ibuprofen suppositories group). The endotoxin-reduced rabbit fever model was used, and the changes of behaviors and rectal temperature in every group were observed. The levels of IL-1β, IL-6, and TNF-α in the plasma and cAMP, AVP, and PGE_2 in the hypothalamus were measured by ELISA. **Results** During 1 ～ 2.5 hours after the administration, Xiaoer Chaihu Tuire suppository significantly reduced the rectal temperature as compared with the model group ($P < 0.01$). Xiaoer Chaihu Tuire suppository significantly reduced the level of IL-1β, IL-6, and TNF-α in the plasma ($P < 0.05$), reduced the level of cAMP ($P < 0.05$) and PGE_2 ($P < 0.01$), and raised the level of AVP ($P < 0.01$) in the hypothalamus. **Conclusion** Xiaoer Chaihu Tuire suppository have antipyretic effect on rabbits with fever, whose mechanism is closely related to the regulation of the levels of IL-1β, IL-6, and TNF-α in the plasma and cAMP, PGE_2, and AVP in the hypothalamus.

Key words: Xiaoer Chaihu Tuire suppository; endotoxin; antipyretic; inflammatory factor

基金项目：十堰市科技指导项目（No.16Y21）；武当特色中药研究湖北省重点实验室（湖北医药学院）开放课题（No.WDCM2019015）；湖北医药学院科技创新项目（No.YC2021034）。
作者简介：王莉博，女，硕士研究生，主要从事制剂开发与研究，email：a13523852978@163.com　*通信作者：杜士明，男，教授，主要从事制剂开发与研究，email：dushiming@taihehospital.com

机体发热主要是由于外源性致热原进入机体，刺激巨噬细胞等产生致热性细胞因子，并可直接或间接作用于脑组织中前列腺素受体（EP_3），引起发热介质释放[1-3]，体温定调点上移，体温升高。目前临床常用非甾体抗炎药，其大剂量使用会引起心血管系统、肝脏、中枢神经系统损害等不良反应[4]。中药治疗外感发热以解表症为主，外感风热宜用辛凉解表药，如柴胡、薄荷等；外感风寒宜用辛温解表药，如防风、麻黄等[5]。亦有文献报道中药的解热作用机制与降低血清中白细胞介素 1β（IL-1β）、白细胞介素 6（IL-6）、肿瘤坏死因子α（TNF-α）水平和下丘脑中环磷酸腺苷（cAMP）、精氨加压素（AVP）和前列腺素 E2（PGE_2）等含量有关[6-7]。因此中药治疗发热症状具有广阔前景。

柴胡注射液诞生于 20 世纪 40 年代，其主要有效成分为柴胡挥发油，临床解热效果显著，受辅料、工艺等条件限制，其不良事件频发[8]，2018 年国家药品监督管理局发布《关于修订柴胡注射液说明书的公告》禁止其在儿童中使用。为满足临床需求，课题组前期采用水蒸气蒸馏法精馏得柴胡挥发油，通过包合挥发油后熔融法制备小儿柴胡退热栓，并自拟小儿柴胡退热栓的质量标准和质量控制方法，目前正在申请《一种柴胡栓剂的制备方法》专利（专利号：201510375864.6）。为进一步明确小儿柴胡退热栓的有效性，本实验通过家兔耳缘静脉注射内毒素建立发热模型，观测家兔行为学及肛温变化，测定各组家兔血浆中炎症因子和下丘脑中枢介质的水平变化，评价小儿柴胡退热栓的解热作用并初步探讨其解热机制，为小儿柴胡退热栓的后期研究及应用奠定基础。

1 材料

1.1 实验动物

新西兰家兔 40 只，体质量 1.5 ～ 2.0 kg，2 月龄，雌雄各半，雌兔无孕（湖北医药学院动物实验中心，动物合格证号：No.4200090 0000938，No.42000900000946）。

1.2 试药

小儿柴胡退热栓（自制，生药含量：1.20 g/粒，批号：20200805）；空白栓（自制，批号：20200805）；柴胡注射液（信合制药有限公司，生药含量：2 mL/ 支，1 mL 相当于原生药材 1 g，批号：1708101）；小儿布洛芬栓（西南药业有限股份公司，主药含量：50 mg/ 粒，批号：20200604）；内毒素（湛江安度斯有限公司，批号：20070903）；兔 TNF-α、IL-1β、IL-6 ELISA 试剂盒（武汉华美生物工程有限公司）；兔 cAMP、AVP、PGE_2 ELISA 试剂盒（上海将来实业股份有限公司）；PBS 缓冲液（美国 Gibco 公司，批号：8120329）。

1.3 仪器

全波长多功能酶标仪（美国 Thermo 公司，SB-079）；超速控温离心机（德国 Eppendorf 公司，H1750R）；－ 80 ℃低温冰箱（青岛海尔有限股份公司，DE-251262）；－ 20 ℃低温冰箱（青岛海尔有限股份公司，DW-861626）；电热恒温箱（上海嘉鹏科技有限公司，DPH350）；纯水仪（英国 ELGA 公司，PURELAB）；电子天平（美国 Bio-Radg 公司，MS205DU）；兽用电子体温计（领航畜牧工厂）。

2 方法

2.1 小儿柴胡退热栓的制备[9]

取柴胡饮片至 10 倍量的 10% 氯化钠溶液中室温浸泡 8 h，采用水蒸气蒸馏法提取柴胡挥发油 2 h，收集初馏液，重蒸馏得柴胡挥发油精馏液。柴胡挥发油精馏液中加入β- 环糊精，于 50 ℃恒温水浴磁力搅拌包合 2 h，室温冷却后，2 ～ 8 ℃下静置 12 h，抽滤干燥得柴胡挥发油包合物。取半饱和脂肪酸甘油酯至烧杯中，于 50 ℃水浴中搅拌至熔融，加入制得的柴胡挥发油包合物，搅拌均匀，保持流体状，注入栓模中，室温放置 30 min，取栓，即得小儿柴胡退热栓。

2.2 动物适应性操作

家兔适应饲养 3 d，选择体温 38.5 ～ 39.5 ℃，且体温波动（△ T）＜ 0.2 ℃的家兔入组，连续测量 3 次，取其平均值作为基础肛温。实验环境：室温（25±2）℃，相对湿度 55% ～ 70%，食用标准的家兔颗粒饲料，自由饮水。

2.3 动物造模、分组及给药

入组的家兔 25 只，随机分为 5 组，除空白组外，其余各组家兔分别于耳缘静脉注射内毒素，1.5 h 内诱导肛温△ T ＞ 0.7 ℃为造模成功。造模成功后，各组家兔分别给予不同药物进行干预。家兔分组及给药剂量见表 1。

表 1 家兔分组及给药剂量

Tab 1 Grouping of rabbits and dosing

分组	内毒素剂量 /（10 EU・mL^{-1}）	药物剂量	给药方式
空白组	－	－	－
模型组	1.5 mL・kg^{-1}	空白栓	直肠给药
小儿柴胡退热栓组	1.5 mL・kg^{-1}	0.8 g・kg^{-1}	直肠给药
柴胡注射液组	1.5 mL・kg^{-1}	0.6 mL・kg^{-1}	耳缘静脉注射
小儿布洛芬栓组	1.5 mL・kg^{-1}	25 mg・kg^{-1}	直肠给药

2.4 观测家兔行为学及肛温变化

观察各组家兔造模前后及给药前后精神活动状态、呼吸频率等变化，记录各组家兔行为学表征变化；并采用电子肛温计分别于造模前、造模

后 1.5 h 及给药后 0.5、1、1.5、2.5、3.5、4.5 h 测量各组家兔肛温变化。

2.5　标本采集

除空白组外，各组家兔分别在造模前、造模后 1.5 h、给药后 1.5 h 各采血 2 mL，置于含 EDTA 的 EP 管中，放置室温，以 5000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液，置－20 ℃保存，备用。

各组家兔（末次）测量肛温后，处死，取下丘脑于冻存管中，并迅速冻存于液氮罐中，于－80 ℃条件下保存，备用。

2.6　检测血浆中炎症因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 含量

按试剂盒方法操作，于酶标仪 450 nm 波长处测定 *OD* 值，以对照品浓度为横坐标，*OD* 值为纵坐标绘制标准曲线，计算血浆中 IL-1β、IL-6、TNF-α 含量。

2.7　检测下丘脑中发热介质 cAMP、AVP、PGE_2 含量

按试剂盒方法操作，于酶标仪 450 nm 波长处测定 *OD* 值，以对照品浓度为横坐标，*OD* 值为纵坐标绘制标准曲线，计算下丘脑中 cAMP、AVP、PGE_2 含量。

2.8　统计学方法

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，以 GraphPad Prism 8.0 版软件进行分析，以单因素方差分析（One-Way ANOVA，LSD）进行多组间和组内差异的比较，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　小儿柴胡退热栓对家兔行为学表征和肛温变化影响

观察各组家兔行为学表征发现，与空白组相比，其余各组注入内毒素 1 h 后家兔出现耸毛、兔体触之发烫、畏冷缩团、呼吸加快等变化，且个别家兔出现喘促、鼻煽、躁动、纳差等行为表现；小儿柴胡退热栓组及阳性对照组（柴胡注射液组和小儿布洛芬栓组）给予药物干预 1 h 后家兔逐渐恢复正常活动。

与空白组相比，各给药组家兔给予内毒素 1.5 h 后肛温显著升高，说明造模成功；与模型组相比，各给药组在给药后 1 ～ 2.5 h 家兔肛温显著降低并至正常水平（见图 1）。

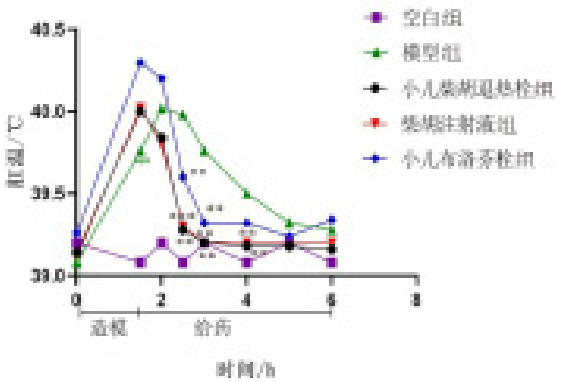


图 1　小儿柴胡退热栓对发热家兔肛温变化影响（$n = 5$）

Fig 1　Effect of Xiaoer Chaihu Tuire suppository on anal temperature in febrile rabbits（$n = 5$）

注：与空白组相比，$^{###}P < 0.001$；与模型组相比，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

Note：*vs* the blank group，$^{###}P < 0.001$；*vs* the model group，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$.

3.2　小儿柴胡退热栓对发热家兔血浆中 IL-1β、IL-6、TNF-α 含量变化的影响

与造模前相比，各组家兔造模后 1.5 h IL-1β、IL-6、TNF-α 含量显著升高；与造模后 1.5 h 相比，各给药组给予药物干预 1.5 h 后 IL-1β、IL-6、TNF-α 含量显著降低（见图 2）。

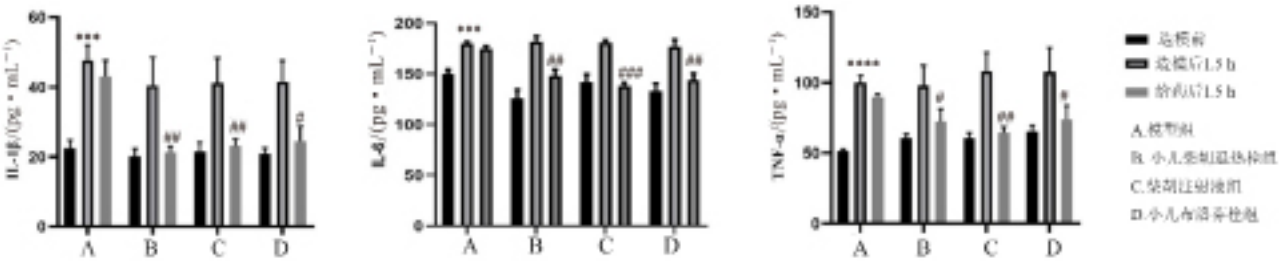


图 2　小儿柴胡退热栓对发热家兔血浆中 IL-1β、IL-6、TNF-α 含量变化影响（$n = 5$）

Fig 2　Effect of Xiaoer Chaihu Tuire suppository on the serum levels of IL-1β，IL-6，and TNF-α in fever rabbits（$n = 5$）

注：与造模前相比，$^{***}P < 0.001$，$^{****}P < 0.0001$；与造模后 1.5 h 相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$。

Note：*vs* before the modeling，$^{***}P < 0.001$，$^{****}P < 0.0001$；*vs* 1.5 h after the modeling，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$.

3.3　小儿柴胡退热栓对发热家兔下丘脑中 cAMP、AVP、PGE_2 含量变化的影响

与空白组相比，模型组家兔造模后 1.5 h 后 cAMP、PGE_2 含量显著升高，AVP 含量显著降低；与模型组相比，各给药组给予药物干预 1.5 h 后 cAMP、PGE_2 含量显著降低，AVP 含量显著升高，见图 3。

4　讨论

本课题组前期以柴胡注射液的制备工艺为基础，对挥发油进行包合后制备小儿柴胡退热栓，为进一步明确小儿柴胡退热栓解热效果，实验设计

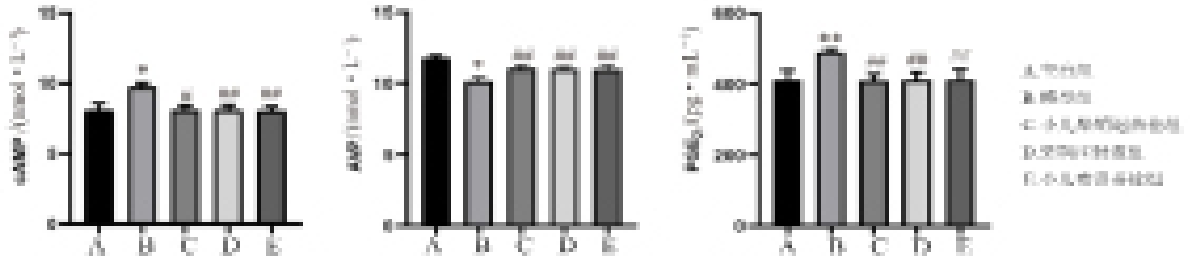


图 3 小儿柴胡退热栓对发热家兔下丘脑中 cAMP、AVP、PGE_2 含量变化影响（$n = 5$）

Fig 3 Effect of Xiaoer Chaihu Tuire suppository on the hypothalamus levels of cAMP，AVP，and PGE_2 in fever rabbits（$n = 5$）

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

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

中以小儿布洛芬栓和柴胡注射液两种药物作为阳性对照。实验选择在造模后给予药物，目的是评价小儿柴胡退热栓对发热家兔体温变化的影响。因动物个体差异性，本实验准备 40 只新西兰家兔，筛选出基础体温合格及造模成功的 25 只家兔用于实验。依据 2020 年版《中国药典》一部规定[10]，柴胡用量为 3 ～ 10 g，根据质量与体表面积转换因子折算[11]，家兔的用药剂量最大应为 0.54 g • kg^{-1}。

通过预实验发现小儿柴胡退热栓剂量为 0.54 g • kg^{-1} 时解热效果并不显著，分析可能有以下原因[12]：

① 同一种中药，不同剂量发挥不同作用，小剂量的柴胡（1 ～ 2 g）适于升阳举气；中剂量的柴胡（6 ～ 12 g）主要用于疏肝解郁；大剂量的柴胡（15 ～ 30 g）主要用于和解少阳，适合于往来寒热者。② 药典规定的剂量只能作为临床参考标准，中药剂型也对剂量有影响。因此拟订小儿柴胡退热栓的剂量为 0.80 g • kg^{-1}，结果表明小儿柴胡退热栓可显著降低发热家兔体温。后续实验将会对小儿柴胡退热栓的家兔体内代谢学和毒性实验进一步研究。

内毒素为外源性致热源，属于中医温病“外感发热”范畴，其大量进入血液后会促进巨噬细胞等分泌 TNF-α、IL-1β、IL-6 等致热因子，可直接或间接刺激环氧合酶（COX2）的合成，使下丘脑释放的发热介质 cAMP、PGE_2 增加，AVP 释放减少，从而产生热源反应[13-14]。有研究通过家兔耳缘静脉注射内毒素建立发热模型，明确穿心莲软胶囊解热作用，结果显示穿心莲软胶囊对发热家兔有明显的解热作用，其机制可能是穿心莲软胶囊可显著降低发热家兔脑脊液及下丘脑组织中 cAMP 含量[15]；亦有研究发现赤雹果总有机酸对内毒素致热大鼠降温作用的机制可能与下调发热大鼠血清中 TNF-α、PGE_2、IL-1β 及脑脊液中 PGE_2 的水平有关[16]。本研究结果显示，与模型组相比，小儿柴胡退热栓组血浆中 TNF-α、IL-1β、IL-6 和下丘脑中 cAMP、PGE_2 等含量均降低，AVP 含量升高，说明小儿柴胡退热栓的解热作用机制可能与下调 TNF-α、IL-1β、IL-6、cAMP、PGE_2，上调 AVP 含量水平有关。但目前有关柴胡挥发油解热作用与何种通路相关，尚未见文献报道，本实验可为后续柴胡挥发油分子水平机制研究及小儿柴胡退热栓的临床应用提供理论依据。

参考文献

[1] Takahashi F，Endo K，Matsui R，et al. Activates macrophages via Toll-like receptors [J]. Biosci Biotechnol Biochem，2021，85（3）：656-665.

[2] Luheshi GN. Cytokines and fever. Mechanisms and sites of action [J]. Ann N Y Acad Sci，1998，856：83-89.

[3] Li D，Yang F，Huang J，et al. Study on the antipyretic，analgesic effects of qingkailing freeze-dried powder for injection and its antipyretic mechanism [J]. Zhong Yao Cai，2005，28（9）：796-799.

[4] 续艳姣 . 非甾体类抗炎药的不良反应表现及预防措施的探讨分析 [J]. 世界最新医学信息文摘，2017，17（49）：106-111.

[5] 朱文琳，王建超，银艳桃，等 . 中医药治疗发热用药规律 [J]. 河南中医，2020，40（9）：1383-1387.

[6] 吕邵娃，武印奇，李英鹏，等 . 白虎汤不同相态对发热模型家兔血清中 TNF-α、IL-1β 及 IL-6 水平的影响 [J]. 国际药学研究杂志，2020，47（10）：870-875.

[7] 党珏，袁岸，罗林，等 . 连翘提取物和连翘挥发油对酵母致热大鼠的解热机制研究 [J]. 天然产物研究与开发，2017，29（9）：1542-1545.

[8] 刘旭，刘振华，仲华，等 . 柴胡注射液致药品不良反应 / 药品不良事件的分析及防治 [J]. 中国医院用药评价与分析，2018，18（6）：840-843.

[9] 王莉博，刘泽干，杜士明，等 . 小儿柴胡退热栓的制备及质量标准研究 [J]. 中国药业，2021，30（16）：39-43.

[10] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：293.

[11] 陈长勋 . 中药药理学 [M]. 上海：上海科学技术出版社，2006：191.

[12] 邱凤邹，张斯汉，陆燕萍 . 超药典中药处方剂量分析 [J]. 中外医疗，2010，29（23）：9-11.

[13] 李东晓，杨薇，雷玲 . 内毒素致热模型在解热中药质量的药理学评价研究 [J]. 中药药理与临床，2011，27（6）：101-103.

[14] 刘微艳，陈创，张涤，等 . 发热动物模型的研究进展 [J]. 湖南中医杂志，2017，33（8）：214-216.
[15] 徐志勇，李晓波，张红英，等 . 穿心莲软胶囊对脂多糖发热模型家兔解热作用及其机制研究 [J]. 中药新药与临床药理，2019，30（6）：692-694.
[16] 刘建东，赵春颖，佟继铭 . 赤雹果总有机酸解热作用及其机制 [J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20（6）：154-157.

（收稿日期：2021-08-19；修回日期：2021-11-10）

黄藤素的生物药剂学分类系统分类属性研究

温艳艳[1, 2]，马一丹[1, 2]，黄山[1, 2]，刘艳[1, 2]，方玲[4*]，彭灿[1, 2, 3*]（1. 安徽中医药大学药学院，合肥 230012；2. 中药复方安徽省重点实验室，合肥 230012；3. 药物制剂技术与应用安徽省重点实验室，合肥 230012；4. 安徽医科大学第一附属医院药剂科，合肥 230022）

摘要：目的　通过溶解度和渗透性研究确定黄藤素的生物药剂学分类系统（BCS）分类属性。**方法**　根据美国 FDA 2015 版工业指导原则，测定在 37 ℃，pH 1 ～ 7.5 内药物的溶解性；采用在体单向原位肠灌流模型测定黄藤素在大鼠不同肠段的渗透性；结合溶解性和渗透性结果确定黄藤素的 BCS 分类属性。**结果**　考察黄藤素在不同 pH 值介质中的溶解度发现黄藤素属于低溶解性药物，通过渗透性实验发现黄藤素在大鼠不同肠段的渗透系数 $P_{eff(rat)}$ 均小于 5.0×10^{-5} cm • s^{-1}，转换成人体吸收百分率 $F_{a(human)}$ 均小于 85%，故黄藤素属于低渗透性药物。**结论**　结合溶解度和渗透性结果，判定黄藤素属于 BCS Ⅳ 类药物。

关键词：黄藤素；生物药剂学分类系统；溶解度；渗透性
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0845-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.019

BCS classification attributes of palmatine

WEN Yan-yan[1, 2], MA Yi-dan[1, 2], HUANG Shan[1, 2], LIU Yan[1, 2], FANG Ling[4*], PENG Can[1, 2, 3*] (1. *School of Pharmacy*, *Anhui University of Traditional Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *Anhui Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula*, *Hefei* 230012; 3. *Anhui Province Key Laboratory of Pharmaceutical Technology and Application*, *Hefei* 230012; 4. *Department of Pharmacy*, *the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University*, *Hefei* 230022)

Abstract: Objective To determine the solubility and permeability of palmatine, and its the biopharmaceutical classification system (BCS) classification. **Methods** The solubility of palmatine drugs (at 37 ℃ and pH 1 ～ 7.5) was determined according to the US FDA 2015 industrial guidelines. The permeability of palmatine in different intestinal segments of rats was measured by in situ single-pass intestinal perfusion model. The BCS classification properties were determined by combining the results of solubility and permeability. **Results** The solubility of palmatine in different pH media showed that palmatine belonged to low solubility drugs. The permeability experiment showed that the permeability coefficient $P_{eff(rat)}$ in different intestinal segments was less than 5.0×10^{-5} cm • s^{-1} in rats, converting into human absorption percentage $F_{a(human)}$ was less than 85%. **Conclusion** Palmatine is BCS Ⅳ drug based on the result of its solubility and permeability.

Key words: palmatine; BCS classification; solubility; permeability

基金项目：国家科技重大专项 - 重大新药创制（No.2017ZX09101001）。
作者简介：温艳艳，女，主要从事临床药学研究，email：ahtcmwenyanyan@163.com　*通信作者：方玲，女，副主任药师，主要从事肝脏药理学、临床药学、医院药学工作，email：ayfyfl@163.com；彭灿，男，副教授，主要从事药剂学及药物分析研究，email：pengcanking@hotmail.com

黄藤素，也称巴马汀（palmatine），是一种原小檗碱异喹啉生物碱，在其 C_2、C_3、C_9 和 C_{10} 部位含有四个甲氧基的季铵盐[1-4]。黄藤素主要来源于传统中药紫苏、黄连和延胡索，是一种天然的生物碱[5-7]。黄藤素具有广泛的药理作用和生物活性，近年来，人们对黄藤素的药理作用进行了大量研究，包括神经保护、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗氧化、抗炎和血脂调节[8-11]。这些药理作用表明，黄藤素在预防和治疗某些疾病方面具有价值，如癌症、心脏肥大、骨质疏松、糖尿病和糖尿病并发症、阿尔茨海默病、特应性皮炎及骨关节炎[12-13]等。

生物药剂学分类系统（biopharmaceutics classification system，BCS）是按照药物的溶解性和肠道渗透性将药物进行分类的一个科学的框架系统[14]。根据生物药剂学把药物分为四类：BCS Ⅰ类，即高溶解性 - 高渗透性；BCS Ⅱ类，即低溶解性 - 高渗透性；BCS Ⅲ类，即高溶解性 - 低渗透性；BCS Ⅳ类，即低溶解性 - 低渗透性[15]。随着 BCS 分类系统的完善，BCS 分类系统逐步成为制药企业向监管部门申请生物等效性豁免的依据[16]。

目前市场上黄藤素相关的各种制剂均已被广泛开发，并大量应用于人们的日常生活中，但目前对黄藤素在 BCS 分类中的归属尚不明确，本文将对黄藤素的 BCS 分类属性进行研究。

1 材料

1.1 仪器

电子天平（上海浦春计量仪器有限公司），P230 Ⅱ高效液相色谱系统（UV230 Ⅱ紫外 - 可见检测器，大连依利特分析仪器有限公司），智城恒温培养振荡器（上海智城分析仪器制造有限公司），蠕动泵（上海嘉鹏，HL-2 恒流泵）。

1.2 试药

黄藤素对照品（成都普斯生物，批号：PS210402-01，纯度＞98%），黄藤素原料药（西安泽邦生物技术有限公司，批号：FHSW190619-1），三乙胺（润捷化学，批号：20141130），磷酸（阿拉丁，批号：E2009049），乙腈（北京百灵威科技有限公司，批号：L330V117），氯化钠（天津大茂化学试剂有限公司，批号：20200901），氯化镁（天津福晨化学，批号：20070115），氯化钙（批号：20180126）、葡萄糖（批号：S13J11H107301）、碳酸氢钠（批号：Z11J12Y137272）、磷酸二氢钠（批号：F27GS140266）、氯化钾（批号：Z10M12Y141330）、盐酸（批号：20180223）、醋酸钠（批号：20190312）、冰醋酸（批号：20190529）、氢氧化钠（批号：20200401）（国药集团化学试剂有限公司），磷酸二氢钾（阿拉丁，批号：L1918056），水为超纯水。

1.3 实验动物

SPF 雄性大鼠，体质量 220 g 左右 [许可证号：SCXK（皖）2017-001，安徽医科大学]。

2 方法与结果

2.1 黄藤素含量测定分析方法的建立

2.1.1 色谱条件　色谱柱：Caprisil C_{18} AQ（5 μm，250 mm×4.6 mm）；流动相：0.02 mol • L^{-1} 磷酸溶液（含 0.2% 的三乙胺）- 乙腈（65∶35）；检测波长：346 nm；流速：1.0 mL • min^{-1}；温度：36 ℃；进样量：10 μL。

2.1.2 对照品溶液的配制　精密称取黄藤素对照品 2.05 mg 加甲醇溶解并定容至 10 mL，得对照品储备液。精密量取对照品储备液 0.2 mL，加入甲醇稀释至 10 mL，过 0.22 μm 的微孔滤膜，即得。

2.1.3 供试品溶液的配制　精密称取黄藤素原料药 2.12 mg 加甲醇溶解并定容至 10 mL，从中精密量取 0.2 mL，加入甲醇稀释至 10 mL，过 0.22 μm 的微孔滤膜，即得。

2.2 方法学考察

2.2.1 线性关系考察　取适量对照品储备液，用甲醇稀释成质量浓度为 100、50、25、10、5 μg • mL^{-1} 的对照品溶液，过 0.22 μm 的微孔滤膜，进样检测，以峰面积（y）对质量浓度（x）作线性回归，得回归方程 $y = 38.45x - 46.07$，$R^2 = 0.9994$，表明黄藤素在 5 ～ 100 μg • mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好。

2.2.2 精密度　精密量取对照品储备液 0.2 mL，加入甲醇稀释至 10 mL，过 0.22 μm 的微孔滤膜，进样检测，连续进样 6 次，计算得峰面积 *RSD* 值为 0.19%，表明仪器精密度良好。

2.2.3 重复性　平行配制 6 份供试品溶液，进样检测，计算 6 份供试品溶液中黄藤素含量的 *RSD* 值为 0.27%，表明该方法重复性良好。

2.2.4 稳定性　取供试品溶液，分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样检测，计算不同时间点的峰面积 *RSD* 值为 0.62%，表明样品在 24 h 内保持稳定。

2.2.5 加样回收率　在已知含量的原料药溶液中按照 1∶0.8、1∶1.0 和 1∶1.2 的比例加入适量对照品溶液，加甲醇定容，各平行 3 份，进样检测，计算回收率。结果显示黄藤素回收率在 95% ～ 105%，*RSD* 均小于 0.71%，表明该方法回收率良好。

2.3 溶解度实验

2.3.1 溶解介质的配制　① pH 1.2 的盐酸溶液：

取 7.65 mL 盐酸加入到 1000 mL 水中，即得；② pH 4.0 的醋酸盐缓冲液：取 20.5 mL 2 mol • L^{-1} 的醋酸溶液和 1.22 g 醋酸钠加水稀释至 1000 mL，摇匀即得；③ pH 6.8 的磷酸盐缓冲液：取 250 mL 0.2 mol • L^{-1} 磷酸二氢钾溶液，加入 0.2 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液 112.0 mL，加水稀释至 1000 mL，摇匀即得；④ pH 7.4 的磷酸盐缓冲液：取 250 mL 0.2 mol•L^{-1} 磷酸二氢钾溶液，加入 0.2 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液 195.5 mL，加水稀释至 1000 mL，摇匀即得；⑤ 纯净水。

2.3.2　样品溶液配制　称取黄藤素原料药适量，于 5 mL 离心管中，分别加入 2 mL 上述溶解介质①～⑤，涡旋 30 s，混匀，每种介质设置 3 个平行组，置于 37 ℃，100 r • min^{-1} 恒温摇床，振摇 24 h 后取出，4000 r • min^{-1} 离心 25 min，取适量上清液加甲醇稀释后，即得。

2.3.3　最大溶解度的计算　对于单体化合物，美国食品药品监督管理局（FDA）2015 版工业指导原则中指出在 37 ℃，pH 1 ～ 7.5 内，单次给药最高剂量与溶解度的比值（D/S）小于 250 mL 的药物为高溶解性的药物，即 $D_0 < 1$。将“2.3.2”项下制备的样品，过 0.22 μm 的微孔滤膜，进样检测，根据测得的结果计算样品溶解浓度 C_s，取平均值，计算 D_0 值。

$$D_0 = (M_0/V_0)/C_s$$

其中 V_0 为 250 mL，C_s 为溶解度（mg•mL^{-1}），M_0 为人体单次最高给药剂量（mg）。根据上述公式计算的 D_0 值，结合《中国药典》中关于药物溶解度的规定，进行辅助证明药物的溶解性。

参考《中国药典》及药智网数据查询 [药智数据 - 医药健康产业数据服务商（yaozh.com）] 黄藤素片剂人体单次最高给药剂量为 1200 mg，代入公式计算黄藤素的溶解度 C_s 和 D_0 值（见表 1）。

表 1　黄藤素在不同 pH 值介质中的溶解度

Tab 1　Solubility of palmatine in different pH media

pH 值	C_s/（mg • mL^{-1}）	D_0 值
1.2	4.06	1.18
4	6.50	0.74
水	5.89	0.76
6.8	6.97	0.69
7.4	7.06	0.68

根据 D_0 值发现，在 pH 1.2 的介质中，黄藤素属于低溶解度药物，在 pH 4.0、6.8、7.4 和水中属于高溶解度的药物。根据《中国药典》对溶解度的定义：微溶系指溶质 1 g（mL）能在溶剂 100 ～ 1000 mL 中溶解；黄藤素溶解性属于微溶，又因其 D_0 值接近 1，故由此认为黄藤素为低溶解度的药物。

2.4　渗透性测定

本实验主要采用在体单向原位肠灌流模型测定黄藤素在大鼠不同肠段的渗透性。

2.4.1　Krebs-Ringer（K-R 试液）小肠营养液的配制　分别精密称取 NaCl 7.80 g，KCl 0.35 g，$CaCl_2$ 0.37 g，NaH_2PO_4 0.32 g，$MgCl_2$ 0.02 g，葡萄糖 1.40 g 于 500 mL 的蒸馏水中溶解完全后，精密称取 $NaHCO_3$ 1.37 g 加少量蒸馏水单独溶解后，分少量多次缓慢加入，边超声边搅拌，最后加蒸馏水定容至 1000 mL。

2.4.2　含药 K-R 液的制备　参照《中国药典》2020 年版中黄藤素片的含量及常用剂量，确定人口服常用剂量。假设按照最大剂量计算。对实验所需的大鼠进行称重，根据徐叔云教授主编的《药理实验方法学》中的等效剂量系数折算法，人的体质量按 70 kg 计算，换算成大鼠的剂量则为人体给药剂量的 0.18 倍。单向原位肠灌流实验中，常用的灌流体积为 100 mL。肠灌流液中药物的浓度＝换算的大鼠的剂量 /100 mL，以 K-R 试液作为溶剂。人体黄藤素单次剂量 400 mg，大鼠体内为 72 mg/200 g，即 360 mg • kg^{-1}。灌流液浓度为 72 μg • mL^{-1}。

2.4.3　肠灌流实验过程　SPF 雄性大鼠适应性喂养一周，禁食不禁水 18 h，按 0.8 mL/100 g 注射 20% 乌拉坦麻醉，腹部沿腹中线剪开 3 ～ 4 cm，分离实验用肠段：十二指肠、空肠、回肠和结肠，各肠段取 8 ～ 10 cm，各肠段进口端与注射泵相连，用预热至 37 ℃ 的生理盐水以 5 mL • min^{-1} 的速度对所取肠道内容物进行冲洗，冲洗干净后排空生理盐水。将注射泵流速调为 0.2 ～ 0.3 mL • min^{-1} 灌流药液，约 30 min 后药物吸收达到稳定状态。开始计时，用已知重量的小瓶在各肠段药液出口处每隔 15 min 收集一次，作为一次取样点，同时用下一个已知重量的小瓶替换，计算收集前后小瓶重量差，收集 8 次后，实验完毕。实验结束后处死大鼠并剪下被灌流的肠段，测量其长度和内径。取适量收集到的药液加入甲醇对半稀释，过 0.22 μm 的微孔滤膜，进样检测，测定不同时间点流出药液中药物含量，代入公式，计算有效渗透系数 P_{eff}、肠吸收速率常数 K_a 和肠吸收分数 F_a。

$$P_{eff} = Q_{in} \cdot \ln[C_{out(cor)}/C_{in}]/2\pi rL$$

$K_a = [1 - C_{out(cor)}/C_{in}]Q_{in}/V$

$F_a = [1 - C_{out(cor)}/C_{in}] \times 100\%$

$C_{out(cor)} = C_{out}(Q_{out}/Q_{in})$

$C_{out} = (M_{out}/D_{out})/t$

Q_{in} 是灌流液流速（$mL \cdot min^{-1}$），L 是灌流肠段长度（cm）；r 是灌流肠段半径（cm）；C_{in} 是灌流液中药物初始质量浓度（$mg \cdot L^{-1}$）；$C_{out(cor)}$ 是经重量法校正后的灌流收集液中药物质量浓度（$mg \cdot L^{-1}$）；V 是灌流肠道体积（mL）；Q_{out} 是通过灌流液密度测定的流出速度（$mL \cdot min^{-1}$）；C_{out} 是灌流收集液中药物质量浓度（$mg \cdot L^{-1}$）；M_{out} 是灌流收集液质量（g），D_{out} 是灌流收集液密度（$g \cdot mL^{-1}$），t 是取样周期（min）。

$P_{eff(rat)}$ 与 $P_{eff(human)}$ 的转化：

$P_{eff(human)} = 3.6 \times P_{eff(rat)} + 0.03 \times 10^{-4}$

$F_{a(human)} = 1 - \exp^{[-38450 \times P_{eff(rat)}]}$

2.4.4 渗透性结果 根据测得的数据代入上述公式，计算得黄藤素相关肠吸收参数见表 2。结果显示在十二指肠、回肠和结肠段吸收差异无统计学意义；与空肠段相比，吸收差异有统计学意义（$P < 0.05$），且黄藤素在十二指肠、回肠和结肠段的吸收明显大于空肠段吸收。

通常情况下认为 $P_{eff(rat)} > 5.0 \times 10^{-5} cm \cdot s^{-1}$，$P_{efff(human)} > 4.7 \times 10^{-5} cm \cdot s^{-1}$ 的药物为高渗透性药物。根据 FDA 规定，药物吸收百分率不小于 90% 的药物为高渗透性药物，根据欧盟药品审评局（EMEA）和世界卫生组织（WHO）的规定，药物吸收百分率不小于 85% 的药物为高渗透性药物。

根据表 2 结果可知黄藤素在十二指肠、空肠、回肠和结肠的 $P_{eff(rat)}$ 均小于 $5.0 \times 10^{-5} cm \cdot s^{-1}$，$P_{efff(human)}$ 均小于 $4.7 \times 10^{-5} cm \cdot s^{-1}$，根据公式换算得人体吸收百分率 $F_{a(human)}$ 均小于 85%，故可判断黄藤素属于低渗透性药物。

结合溶解度和渗透性数据，可确定黄藤素为 BCS Ⅳ类药物。

表 2 黄藤素在不同肠段的 $P_{eff(rat)}$ 值、K_a 值、$P_{eff(human)}$ 值和 $F_{a(human)}$

Tab 2 $P_{eff(rat)}$，K_a，$P_{eff(human)}$，and $F_{a(human)}$ of palmatine in different intestinal segments

肠段	$P_{eff(rat)}$/（$\times 10^{-5} cm \cdot s^{-1}$）	K_a/（$\times 10^{-4} s^{-1}$）	$P_{eff(human)}$/（$\times 10^{-5} cm \cdot s^{-1}$）	$F_{a(human)}$/%
十二指肠	2.669±0.879	1.707±0.592	1.111±0.458	63.51±14.01
空肠	1.572±0.603	0.914±0.721	0.577±0.374	45.02±13.62
回肠	3.052±0.851	1.949±0.522	1.156±0.315	68.94±8.67
结肠	3.420±0.870	2.133±0.871	1.448±0.518	67.70±9.61

3 讨论

BCS 主要应用于化学药物的分类，对于中药单一天然产物来说尚未进行明确的分类，故本研究主要针对中药天然产物黄藤素进行研究，并对其进行 BCS 分类，判断其 BCS 分类属性。

不同当局对于高溶解度高渗透性的规定如下：FDA 认为 37 ℃条件下药物单次最高剂量可溶解于 250 mL，pH 1 ～ 7.5 的介质中，且≥ 90% 的药物可以在小肠中吸收；EMEA 认为 37 ℃条件下药物单次最高剂量可溶解于 250 mL，pH 1 ～ 8 的介质中，药物在小肠中呈线性吸收或完全吸收；WHO 认为 37 ℃条件下药物单次最高剂量可溶解于 250 mL，pH 1.2 ～ 6.8 的介质中，且≥ 85% 的药物可以在小肠中吸收。因此本研究中选择 pH 1.2、4.0、6.8、7.4 和水进行溶解度考察，根据计算出的 D_0 值判断药物溶解度。根据 D_0 值计算结果发现，黄藤素在酸性条件下属于低溶解度药物，在弱碱性以及中性条件下则属于高溶解度药物，这种情况可能与药物自身结构有关，同时也表明 FDA 2015 版工业指导原则中采用 D_0 值判断药物的溶解度是有缺陷的，因此借助《中国药典》中对于溶解度的规定辅助证明药物的溶解性，结果表明黄藤素属于低溶解度的药物。

关于渗透性研究，目前主要研究方法有离体肠囊外翻模型、Caco2 细胞模型、人工渗透膜（PAMPA）模型以及在体单向原位肠灌流模型。本文主要采用在体原位肠灌流模型，相对于其他方法而言该方法相对简单，且成本低，易操作；同时在实验过程维持体内环境、神经支配、血液供应等的特点及拥有黏液层的存在、活性载体和酶的表达等优势，相对于体外法可以更好地模拟药物在体内的吸收过程 [17-18]。但该方法的主要缺点在于进行实验的动物数量较多，实验结果易受动物个体差异影响。本文通过溶解度和渗透性研究最终确定黄藤素属于低溶解度、低渗透性药物，即为 BCS Ⅳ类药物。

参考文献

[1] Pustovidko AV，Rokitskaya TI，Severina II，et al. Derivatives of the cationic plant alkaloids berberine and palmatine amplify protonophorous activity of fatty acids in model membranes and mitochondria [J]. Mitochondrion，2013，13（5）：520-525.

[2] Wang YQ，Zhang HM，Zhang GC. Studies of the interaction between palmatine hydrochloride and human serum albumin by fluorescence quenching method [J]. J Pharmaceut Biomed，2006，41（3）：1041-1046.

[3] Yang Z，Zhang Y，Chen X，et al. Total synthesis and evaluation of B-Homo palmatine and berberine derivatives as p300 histone acetyltransferase inhibitors [J]. Eur J Org Chem，2018，2018（8）：1041-1052.

[4] Chernyak BV，Antonenko YN，Galimov ER，et al. Novel mitochondria-targeted compounds composed of natural constituents：conjugates of plant alkaloids berberine and palmatine with plastoquinone [J]. Biochemistry，2012，77（9）：983-995.

[5] Kumar P，Srivastava V，Chaturvedi R，et al. Elicitor enhanced production of protoberberine alkaloids from in vitro cell suspension cultures of *Tinospora cordifolia*（Willd.）Miers ex Hook. F. & Thoms [J]. Plant Cell Tiss Org，2017，130（2）：417-426.

[6] Zhang Q，Chen C，Wang FQ，et al. Simultaneous screening and analysis of antiplatelet aggregation active alkaloids from rhizoma corydalis [J]. Pharm Biol，2016，54（12）：3113-3120.

[7] Sun M，Xu L，Peng Y，et al. Multiscale analysis of the contents of palmatine in the nature populations of phellodendron amurense in northeast China [J]. J Forestry Res，2016，27（2）：265-272.

[8] Long J，Song J，Zhong L，et al. Palmatine：a review of its pharmacology，toxicity and pharmacokinetics [J]. Biochimie，2019，162：176-184.

[9] Mai CT，Wu MM，Wang CL，et al. Palmatine attenuated dextran sulfate sodium（DSS）-induced colitis via promoting mitophagy-mediated NLRP3 inflammasome inactivation [J]. Mol Immunol，2019，105：76-85.

[10] Chaves SKM，Afzal MI，Islam MT，et al. Palmatine antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities：a pre-clinical assessment [J]. Cell Mol Biol，2020，66（4）：54-59.

[11] Tian X，Zhang Y，Li H，et al. Palmatine ameliorates high fat diet induced impaired glucose tolerance [J]. Biol Res，2020，53（1）：39.

[12] Tarabasz D，Kukula-Koch W. Palmatine：a review of pharmacological properties and pharmacokinetics [J]. Phytother Res，2020，34（1）：33-50.

[13] Liu X，Zhang Y，Wu S，et al. Palmatine induces G_2/M phase arrest and mitochondrial-associated pathway apoptosis in colon cancer cells by targeting AURKA [J]. Biochem Pharmacol，2020，175：113933.

[14] Shah VP，Amidon AG，Amidon GL，et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification：the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability [J]. AAPS J，2014，16（5）：894-898.

[15] 萧惠来 . FDA《根据 BCS 豁免速释固体口服制剂体内生物利用度和生物等效性研究的指导原则》介绍 [J]. 药物评价研究，2018，41（5）：753-760.

[16] 慈小燕，武卫党，李亚卓，等 . 不同 BCS 分类药物的肠道渗透性研究 [J]. 中国新药杂志，2018，27（1）：63-68.

[17] Annaert P，Tukker JJ，Gelder JV，et al. In vitro，ex vivo，and in situ intestinal absorption characteristics of the antiviral ester prodrug adefovir dipivoxil [J]. J Pharm Sci-US，2000，89（8）：1054-1062.

[18] Escribano E，Sala XG，Salamanca J，et al. Ingle-pass intestinal perfusion to establish the intestinal permeability of model drugs in mouse [J]. Int J Pharmaceut，2012，436（1-2）：472-477.

（收稿日期：2021-09-10；修回日期：2021-11-05）

丹皮酚醇质体凝胶的成型工艺优化及经皮渗透性研究

王睿[1]，郭东艳[1]，翟秉涛[1]，程江雪[1]，张小飞[1]，杨荣平[1, 2*]（1. 陕西中医药大学，秦药特色资源研究与开发国家重点实验室（培育）/陕西省中药基础与新药研究重点实验室，西安 712046；2. 西南大学药学院，重庆 400715）

摘要：目的 优化丹皮酚醇质体凝胶（PEG）的成型工艺并对其经皮渗透性能进行考察。**方法** 在前期研究基础上，选择卡波姆用量、甘油用量、三乙醇胺用量为影响凝胶剂的主要因素，以综合评分为响应值，Box-Behnken 法优化凝胶成型工艺；在透射电镜下观察醇质体囊泡在凝胶基质中的完整性；采用 Franz 扩散池法考察 PEG、溶液凝胶（PSG）及软膏（PO）的透皮性能；通过 HE 染色考察 PEG 的皮肤刺激性。**结果** PEG 最佳成型工艺为 1% 卡波姆，17% 甘油，0.5% 三乙醇胺；PEG 和 PO 的扩散过程符合 Higuchi 方程，两者均有缓释作用；24 h 内 PEG 的渗透量最高且显著提高了药物的经皮渗透性，透射电镜下醇质体在凝胶中保持完整，分散良好；HE 染色显示 PEG 应用于皮肤安全无刺激性。**结论** PEG 的成型工艺切实可行，能够促进药物的透皮吸收，且对皮肤安全无刺激。

关键词：丹皮酚；醇质体凝胶；工艺优化；经皮渗透；皮肤刺激性

中图分类号：R283.6 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)04-0850-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.020

Optimization of molding process and transdermal permeability of gel loaded with ethosomes containing paeonol

WANG Rui[1], Guo Dong-yan[1], ZHAI Bing-tao[1], CHENG Jiang-xue[1], ZHANG Xiao-fei[1], YANG Rong-ping[1, 2*] (1. *Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine*, *State Key Laboratory of Qin Characteristic Medicinal Resources Research and Development* (*Incubation*)/*Key Laboratory of Basic and New Drug Research of Traditional Chinese Medicine in Shaanxi Province*, *Xi'an* 712046; 2. *School of Pharmacy*, *Southwest University*, *Chongqing* 400715)

Abstract: Objective To optimize the molding process of paeonol ethosome gel (PEG) and to determine its transdermal permeation properties. **Methods** The amount of carbomer, glycerol and triethanolamine was selected as the main factors influencing the gel agent based on previous study. Box-Behnken method was used to optimize the gel molding process with the overall score as the response value. The integrity of vesicles in the gel matrix under transmission electron microscopy was observed. The transdermal properties of ethosomal gel, solution gel and ointment were determined with Franz diffusion cell method. The skin irritation of PEG was decided by HE staining. **Results** The best molding process of PEG was 1% carbomer, 17% glycerol, and 0.5% triethanolamine. The diffusion of PEG and PO was in accordance with Higuchi equation, both with slow release effect. The cumulative permeation of PEG was the highest at 24 h and greatly improved the transdermal permeability of the drug. Transmission electron microscopy showed that ethosomes remained intact and well dispersed in the gel. HE staining showed that PEG was safe for the skin. **Conclusion** The PEG molding process is practical and feasible, which promotes the transdermal absorption and smooth release of drugs, and is safe and non-irritating to the skin.

Key words: paeonol; ethosome gel; process optimization; transdermal penetration; skin irritation

基金项目：陕西中医药大学学科创新团队（No.2019-YL11）。

作者简介：王睿，女，硕士研究生，主要从事中药新制剂与体内过程研究，email：2601457549@qq.com *通信作者：杨荣平，女，博士，教授，主要从事中药新制剂、新剂型及新技术与应用研究，email：yangrp@cqacmm.com

丹皮酚（paeonol）是从毛茛科植物牡丹皮的干燥根皮和萝藦科植物徐长卿的干燥根及根茎中提取的主要有效成分，具有抗过敏、抗炎、抗肿瘤、心血管保护及神经保护作用[1]，丹皮酚对多种急慢性炎症反应都有抑制作用，对于湿疹、过敏性皮炎等皮肤炎症有一定抑制作用。目前市场上的丹皮酚外用制剂仅丹皮酚软膏一种，其主要成分为丹皮酚和丁香油，利用中药挥发油来促进丹皮酚的透皮效果，但这种促渗技术效果有限，药物经皮渗透率较低，且部分患者依从性不高，因此，对现有制剂进行技术改良，提高丹皮酚的经皮渗透能力具有重要意义。

醇质体（ethosomes）具有生物膜类囊泡结构[2]，能够包裹药物透过角质层进入皮肤及血液，达到病变部位，在结构上与脂质体相似，不同的是醇质体处方中含有相对较高浓度的乙醇，乙醇是一种促渗剂，乙醇的加入提高了传统脂质体的柔韧性，帮助药物通过角质层进入皮肤深层直至血液循环，发挥药物潜在的治疗效果。醇质体作为中间体，没有固定的剂型，存在流动性太强的问题[3-4]，因此本研究拟在前期课题组研究结果[5]的基础上，将丹皮酚醇质体混悬液（paeonol ethosomal suspensions，PES）进一步制备成凝胶剂，优化丹皮酚醇质体凝胶（paeonol ethosomal gels，PEG）的成型工艺，并对比丹皮酚溶液凝胶（paeonol solution gels，PSG）及市售丹皮酚软膏（paeonol otintmemt，PO）的经皮渗透性能，以期为丹皮酚经皮给药制剂的开发提供实验依据。

1　材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪（美国安捷伦科技公司），纳米粒径电位分析仪（ZS90，英国马尔文仪器有限公司），X1 高速冷冻离心机（美国贝克曼库尔特有限公司），HJ-3 型恒温磁力搅拌器（常州国华电器有限公司），pHS-3C 型雷磁 pH 计（上海精密科学仪器有限公司），AR1140 电子天平（梅特勒 - 托利多仪器上海有限公司），Brookfield 旋转黏度计（江苏胜祥电子科技有限公司）。

大豆卵磷脂（纯度≥ 98%，批号：J27M8R 32632）、胆固醇（纯度≥ 98%，批号：C10090003（上海麦克林生化科技有限公司）；丹皮酚原料药（纯度＞ 99%，西安德生元生物科技有限公司）；丹皮酚软膏（批号：Z34020837，合肥立方制药股份有限公司）；卡波姆 Carbomer 934（廊坊聚通化工）；超滤管（密理博中国有限公司）；甲醇（色谱级，美国飞世尔科学世界公司）；水（杭州娃哈哈集团有限公司）；其他化学试剂均为分析纯（天津市天力化学试剂有限公司）。

2　方法及结果

2.1　PES 的制备

依据课题组前期实验结果[5]得出，制备 PES 的方法为乙醇注入法，处方为 25%（*V/V*）乙醇、1.5%（*W/V*）胆固醇和 2.5%（*W/V*）卵磷脂。在此结果下，称取处方量的丹皮酚样品、胆固醇和卵磷脂，加入处方量的无水乙醇进行溶解，置于 30 ℃恒温磁力搅拌器中进行搅拌，充分溶解后缓慢注入 PBS（pH ＝ 6.8），700 r • min^{-1} 持续搅拌 1 h，细胞超声粉碎仪冰浴超声 10 min，过 0.45 μm 滤膜，得到乳白色 PES，4 ℃下保存。

2.2　PEG 及 PSG 的制备

分别取处方量的 PES 和丹皮酚溶液，称取适量卡波姆，均匀撒于混悬液和溶液液面，放置 24 h 溶胀后，加入保湿剂甘油，搅匀后，再加入三乙醇胺调节 pH 至弱酸性以接近皮肤 pH，搅拌均匀即得 PEG 和 PSG。

2.3　丹皮酚分析方法的建立

2.3.1　色谱条件　色谱柱：Thermo Scientific C_{18} 色谱柱（250 mm×4.0 mm，5 μm）；流动相：甲醇 - 水（80∶20）；流速：0.8 mL • min^{-1}；柱温：30 ℃；紫外检测波长：274 nm；进样量：10 μL。

2.3.2　专属性　按照“2.1”项下方法，分别制备 PES 及不加药物的空白醇质体混悬液，取适量丹皮酚对照品配制成 100 g • mL^{-1} 的对照品溶液，分别取 10 μL 进样测定，进行专属性考察，结果显示丹皮酚峰形良好，空白醇质体混悬液无干扰，色谱图见图 1。

2.3.3　线性关系　吸取丹皮酚对照品溶液，加入色谱甲醇逐级稀释为 10、20、40、60、80、100、120、200 μg • mL^{-1}，进样测定，以峰面积（*Y*）对质量浓度（*X*，μg • mL^{-1}）进行线性回归，得到线性方程 $Y = 33.14X + 14.87$（$r = 0.9997$），结果表明丹皮酚在 10 ～ 200 μg • mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好。

2.3.4　精密度考察　精密吸取丹皮酚对照品溶液，在“2.3.1”项色谱条件下重复进样 6 次，计算峰面积 *RSD* 为 0.41%，表明仪器精密度良好。

2.3.5　稳定性考察　取丹皮酚供试品溶液分别在 0、2、4、6、8、10 h 取样测定，记录峰面积，计算其 *RSD* 为 0.24%，表明该方法稳定性良好。

2.3.6　加样回收率考察　制备 3 组样品，每组 3

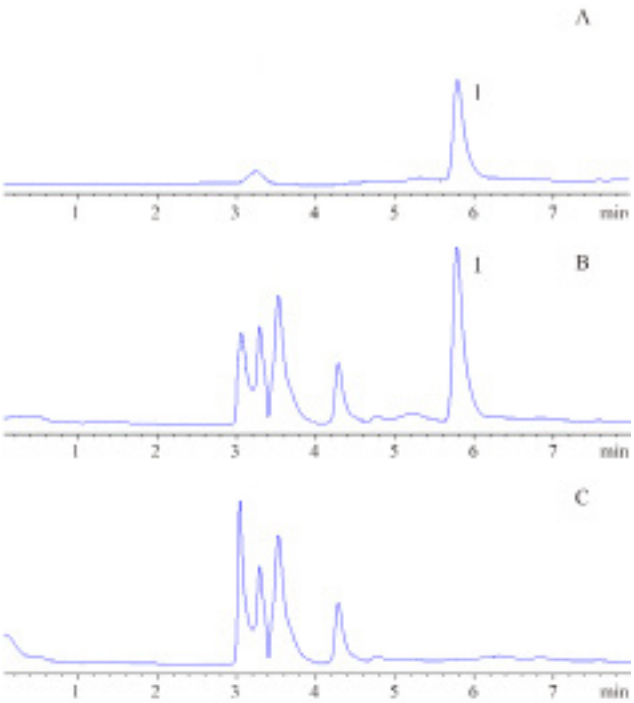


图 1 丹皮酚的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of paeonol

A. 丹皮酚对照品（paeonol control）；B. 丹皮酚醇质体（paeonol ethosomes）；C. 空白醇质体（blank ethosomes）；1. 丹皮酚（paeonol）

份，加入已知含量的 80%、100%、120% 丹皮酚对照品，制备供试品溶液，分别进样，计算得低、中、高浓度平均加样回收率分别为 97.95%、98.02%、99.07%，*RSD* 值均为 1.2%，表明该方法准确度良好。

2.4 PEG 成型工艺的优化

2.4.1 PEG 评分标准的建立 2020 年版《中国药典》四部 [6] 规定凝胶剂应均匀、细腻，在常温时保持胶状、不干涸或液化。因此以凝胶剂的外观、均匀度、黏稠度、pH、涂展性、稳定性（离心、高温、低温）为综合指标 [7-10]，考察凝胶剂的成型情况。综合评分满分为 8.0 分，评分标准如表 1 所示。

2.4.2 Box-Behnken 响应面法优化 PEG 成型工艺 采用 Box-Behnken 法，选择卡波姆用量（A）、甘油用量（B）、三乙醇胺用量（C）为影响凝胶剂的主要因素，综合评分为响应值，设计因素水平表进行实验（见表 2），利用 Design Expert 软件进行响应面分析，确定 PEG 的最佳成型工艺。实验结果见表 3。

采用 Design Expert 进行数据分析，对各因素进行回归分析后，得到二项式拟合方程

表 1 凝胶剂综合评分标准

Tab 1 Comprehensive scoring criteria for gels

评分标准	外观	均匀性	黏稠度	pH	涂展性	离心	高温	低温
优（0.8 ～ 1）	光滑亮泽	细腻均匀	适度黏稠	6.0 ～ 6.5	易于涂展	外观无变化	外观无变化	外观无变化
良（0.5 ～ 0.7）	小颗粒，光滑	较细腻	过 / 较黏稠	—	可涂展	无分层	无分层	无分层
中（0.2 ～ 0.4）	明显颗粒	较粗糙	流浸膏状	—	涂展较差	略分层	略分层	略分层
差（0 ～ 0.1）	粗糙，无光泽	粗糙	清稀状	＜ 6.0 或＞ 7.0	不易涂展	分层	分层	分层

表 2 因素水平 (%)

Tab 2 Factor and level (%)

水平	卡波姆用量（A）	保湿剂用量（B）	三乙醇胺用量（C）
－1	0.5	14	0.3
0	1	17	0.5
1	2	20	0.7

为 $Y = 7.99 - 0.225A - 0.0724B - 0.1566C - 0.0592AB - 0.2654AC + 0.025BC - 1.69A^2 - 0.7025B^2 - 0.3525C^2$（$R^2 = 0.9691$，$P < 0.001$），对二次回归进行方差分析，如表 4 所示。模型的 A、B、C、AC、A^2、B^2、C^2 均具有显著性，失拟项检验不具有显著性，说明该模型的拟合度和可信度高，可用于对凝胶成型工艺的分析和预测。

综合评分的等高线图及三维效应曲面图见图 2，可得出最大预测值，A 为 1.14，B 为 17.26，C 为 0.43，Y 为 7.95，即 PES 的成型工艺理论条件为：卡波姆用量 1.14%，保湿剂用量为 17.26%，三乙醇胺用量为 0.43%。改进最佳条件，最终确定凝胶成型工艺为 1% 卡波姆、17% 甘油、0.5% 三乙醇胺，按照此工艺平行三次实验，综合评分平均值 7.89 与理论值 7.95 较为接近，说明该回归方程与实际情况拟合较好，该工艺切实可靠。

2.5 PEG 的显微观察

取 PEG 1 g，加入纯水稀释后，取适量样品于铜网格上，用 1% 磷钨酸负染并在室温下干燥，然后在透射电镜下观察囊泡形态。结果如图 3 所示，丹皮酚醇质体囊泡呈圆形或椭圆形，大小适宜，表明醇质体在凝胶基质中结构完整、分散良好。

2.6 经皮渗透性研究

取健康大鼠，脱颈处死，剥取腹部皮肤，剃去毛发，除去脂肪、结缔组织，用生理盐水冲洗数遍；将大鼠皮肤水平放置于 Franz 扩散池 [11]，角质层面向供给池，皮下组织面向接收池。接收液为 25% 乙醇，排尽气泡，平衡 30 min，水浴

表 3　实验设计及结果

Tab 3　Experimental design and result

编号	卡波姆用量 /%	保湿剂用量 /%	三乙醇胺用量 /%	外观	均匀性	黏稠度	pH 值	涂展性	稳定性	综合得分
1	0.5	17	0.7	0	1	0.6	1	0.6	3	6.2
2	1	14	0.7	0	1	0.8	1	1	3	6.8
3	1	17	0.5	1	1	0.9	1	1	3	7.9
4	0.5	14	0.5	0	1	0	1	0.9	3	5.9
5	2	20	0.5	1	0.2	0	1	0	3	5.2
6	1	17	0.5	1	1	0.8	1	0.8	3	7.9
7	1	20	0.3	1	1	0.4	1	0.4	3	6.8
8	0.5	17	0.3	0	1	0.3	1	0.8	3	6.1
9	1	14	0.3	1	1	0.1	1	0.8	3	6.9
10	0.5	20	0.5	0	1	0	1	0.8	3	5.8
11	2	17	0.3	1	0.5	0	1	0.7	3	6.2
12	1	20	0.7	1	1	0.3	1	0.5	3	6.8
13	2	17	0.7	1	0	0	1	0.3	3	5.3
14	1	17	0.5	1	1	0.9	1	0.9	3	7.8
15	1	17	0.5	1	1	1	1	0.9	3	7.9
16	1	17	0.5	1	1	1	1	0.9	3	7.9
17	2	14	0.5	1	0	0	1	0.5	3	5.5

表 4　方差分析结果

Tab 4　Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	离差平方和	*F* 值	*P* 值
模型	14.91	9	1.66	327.79	0.0002
A	0.4050	1	0.4050	80.16	0.0001
B	0.0398	1	0.0398	7.88	0.0263
C	0.1863	1	0.1863	36.88	0.0005
AB	0.0148	1	0.0148	2.93	0.1307
AC	0.2953	1	0.2953	58.45	0.0001
BC	0.0025	1	0.0025	0.4948	0.5045
A^2	8.98	1	8.98	1777.32	＜ 0.0001
B^2	2.08	1	2.08	411.26	0.0004
C^2	0.5232	1	0.5232	103.55	＜ 0.0001
残差	0.0354	7	0.0051		
失拟项	0.0274	3	0.0091	4.56	0.0884
净误差	0.0080	4	0.0020		
总离差	14.94	16			

加热，使其保持在（37±0.5）℃，接收液用小磁粒持续磁搅拌 24 h 以确保药物均匀分散。将制剂（等量的 PSG、PEG 及 PO）涂抹在皮肤表面，并用封口膜覆盖，以避免蒸发。在 0.5、1、2、4、6、8、12 和 24 h 取出 0.5 mL 的接收液，同时补充等量的新鲜接收液。通过高效液相色谱法分析 0.5 mL 接收液中的药物含量，并根据下式计算单位面积内药物的累积渗透量（Q_n）：

$$Q_n = (VC_n + \sum_{i-1}^{n-1} V_i C_i)/S$$

C_n 为 n 小时接收池内的药物浓度，C_i 代表样品的药物浓度，S 为有效扩散面积（0.785 cm^2），

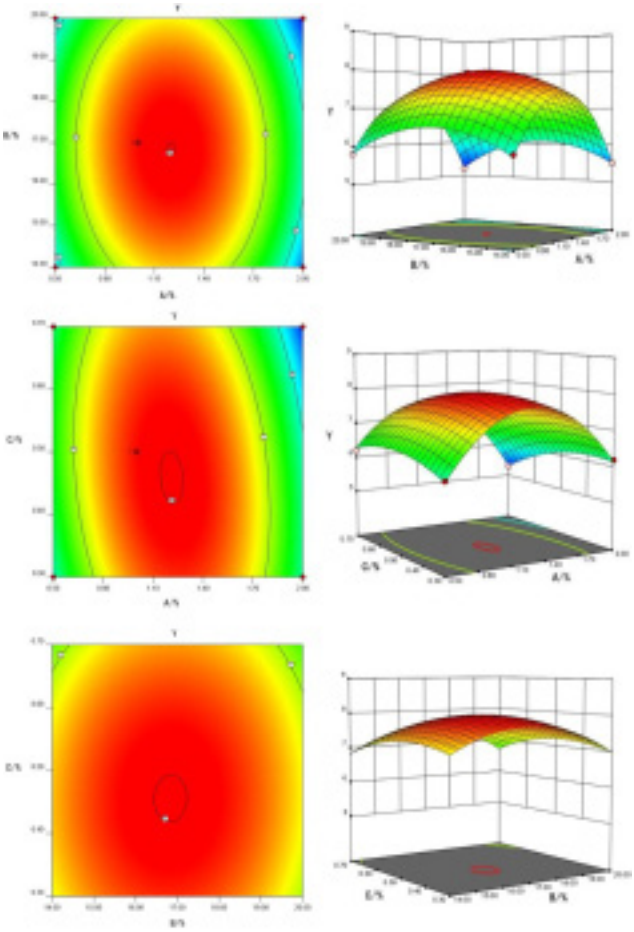


图 2　卡波姆用量（A）、保湿剂用量（B）和三乙醇胺用量（C）在综合评分上拟合方程的响应面和等高线图

Fig 2　Response surface and contour plots of the fitted equations for carbomer dosage（A），humectant dosage（B）and triethanolamine dosage（C）on the composite score

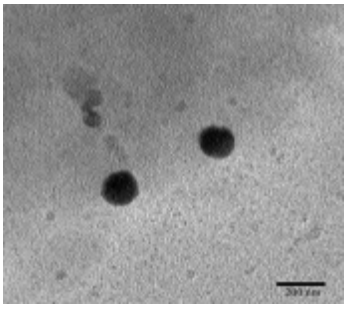


图 3　PEG 形态图

Fig 3　TEM of paeonol ethosomes

V 和 V_i 分别代表接收池体积（15 mL）和取样体积（0.5 mL）。以 Q_n 对取样时间（t）作渗透曲线，并对渗透曲线的前 12 h 进行线性回归，所得斜率即为渗透速率 J_s（$\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$）。

对各制剂的累积渗透曲线的前 12 h 进行数据拟合包括零级动力学、一级动力学、Higuchi 方程以及 Hixcon-Crowell 方程，如表 5 所示，根据 r 值可得出 PEG 和 PO 对于 Higuchi 模型拟合度最

高，说明两者的释药过程符合 Higuchi 方程，具有缓释效果。不同丹皮酚制剂的累积渗透曲线如图 4 所示，24 h 内丹皮酚的含量均在稳定增加，24 h 累积渗透量最高的是 PEG，其次是 PO，累积渗透量最低的是 PSG（见表 6）。与 PSG 组相比，PEG 和 PO 提高了药物的渗透性（$P < 0.05$）。以上结果表明醇质体能够增加皮肤对丹皮酚的吸收，原因可能是醇质体外层的脂质层能够与细胞膜融合，携带药物高度变形进入深层皮肤细胞间隙，增强其渗透能力 [12]。

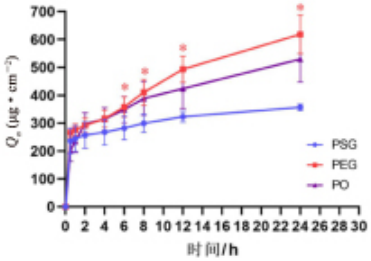


图 4 不同丹皮酚制剂 24 h 体外累积渗透曲线（$^{*}P < 0.05$，$n = 3$，$\bar{x} \pm s$）

Fig 4 24 h in vitro cumulative permeation curves of different paeonol formulations（$^{*}P < 0.05$，$n = 3$，$\bar{x} \pm s$）

表 5 体外透皮量 - 时间模型拟合方程

Tab 5 Fitting equation for the in vitro transdermal volume-time model

制剂	模型	模型拟合方程	r
PSG	零级方程	$Q = 5.1066t + 246.5275$	0.9916
	一级方程	$\ln(1 - Q) = -0.1056t - 1.0141$	0.9839
	Higuchi 方程	$Q = 0.083t^{1/2} + 0.5992$	0.9247
	Hixcon-Crowell 方程	$(1 - Q)^{1/3} = -0.0506t - 5.2891$	0.9044
PEG	零级方程	$Q = 15.6034t + 266.5793$	0.9628
	一级方程	$\ln(1 - Q) = -0.0865t - 0.4508$	0.9521
	Higuchi 方程	$Q = 0.1435t^{1/2} + 0.2997$	0.9832
	Hixcon-Crowell 方程	$(1 - Q)^{1/3} = -0.0008t - 5.6169$	0.9408
PO	零级方程	$Q = 12.8426t + 248.0443$	0.8953
	一级方程	$\ln(1 - Q) = -0.0926t - 0.5157$	0.9560
	Higuchi 方程	$Q = 0.1416t^{1/2} + 0.3108$	0.9781
	Hixcon-Crowell 方程	$(1 - Q)^{1/3} = -1064t - 5.3332$	0.8110

表 6 丹皮酚在各制剂中的渗透动力学参数

Tab 6 Osmotic kinetic parameters of paeonol in each formulation

制剂	Q-t 方程	r	Q_{24}/（μg•cm^{-2}•h^{-1}）	J_s/（μg•cm^{-2}•h^{-1}）
PSG	$Q = 5.1066t + 246.5275$	0.9916	356.8191	5.1066
PEG	$Q = 0.1435t^{1/2} + 0.2997$	0.9832	618.6944	0.1435
PO	$Q = 0.1416t^{1/2} + 0.3108$	0.9781	529.4933	0.1416

2.7 体外皮肤沉积性研究

在皮肤渗透性研究结束后取下皮肤，用滤纸轻轻擦拭皮肤表面多余的丹皮酚制剂，用甲醇和生理盐水冲洗皮肤表面并用滤纸吸干。将皮肤切成小块，加入 1 mL 甲醇，匀浆 10 min，然后超声提取 3 次，每次 15 min，以 7000 r • min^{-1} 离心 10 min，收集上清液，用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后进行 HPLC 分析，计算药物在皮肤中的沉积量。如图 5 所示，24 h 后，PEG 组的皮肤沉积量大于 PO 组皮肤沉积量，两者差异无统计学意义，而与 PSG 组相比，PEG 组与 PO 组的皮肤沉积量显著增加（$P < 0.01$），说明醇质体能够使药物缓慢渗透进入皮肤，而凝胶是充水性三维网状交联体结构，具有贮库效应，延长了药物在皮肤的滞留时间。

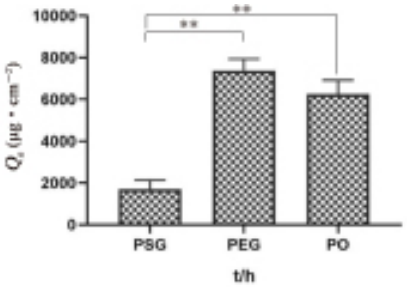


图 5 24 h 内丹皮酚制剂的大鼠皮肤滞留量（$^{**}P < 0.01$，$n = 3$，$\bar{x} \pm s$）

Fig 5 Dermal retention of paeonol preparation in rats within 24 h（$^{**}P < 0.01$，$n = 3$，$\bar{x} \pm s$）

2.8 皮肤刺激性实验

将 6 只健康 SD 大鼠随机分成 3 组，每组 2 只，剔除大鼠背部鼠毛，去毛范围为 3 cm×3 cm。给药前仔细检查大鼠剔毛区域有无破损。A 组作为对照，不做任何处理；B 组应用 PEG；C 组应用 PO。将制剂均匀涂抹于大鼠背部皮肤，用纱布覆盖，并用医用胶带固定。24 h 后将大鼠断头处死并取下处理过的皮肤，生理盐水清洗除去残留的制剂，然后将皮肤样本置于 10% 福尔马林中，组织固定。24 h 后，垂直切割成 3 ～ 4 μm 厚的切片。对石蜡组织切片进行苏木精 - 伊红染色（HE

染色）[13]。目视观察发现应用 PEG 和 PO 的大鼠皮肤无红肿现象，HE 染色结果表明 PEG 组（B）、PO 组（C）与空白组（A）无明显差异，显示 PEG 和 PO 应用于皮肤安全无刺激性（见图 6）。

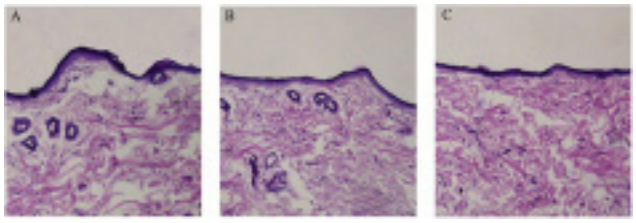


图 6　HE 染色后的皮肤（×100）

Fig 6　Skin after HE staining（×100）

3　讨论

经皮给药系统作为新型给药方式，其最大的优势在于能够有效避免口服给药存在的肝脏首过效应以及胃肠道对药物的降解的问题，在一定时间内维持恒定的血药浓度，延长了药物的作用时间，从而达到缓释效果 [13]。但经皮给药制剂起效首先要透过皮肤角质层，因此如何克服皮肤角质层障碍正是经皮给药技术的核心。当前应用较广的促渗技术有物理技术、化学技术和纳米载体，离子导入技术和微针技术促透效率有限且对皮肤会造成一定的创伤，部分患者依从性不好。化学技术主要是加入化学促渗剂，如中药挥发油、氮酮、二甲基亚砜等，其促渗效果有限，且氮酮、二甲基亚砜等化学试剂用量不当或对皮肤有一定的刺激性 [14]，纳米载体常见的有脂质体、醇质体、传递体等，其原理是类脂（磷脂、胆固醇等）自由分散于水相中时，头部亲水端插入水中，尾部疏水端伸向空气，在搅拌作用下形成的具有双分子层结构的封闭囊泡，囊泡与皮肤角质层的脂质双层融合，起到促进皮肤渗透的作用。

醇质体是一种中间体，常以混悬液的形式存在，流动性太强，容易发生药物的渗透、聚集等，不利于药物吸收。凝胶剂制备工艺简单，生物相容性好，常用于皮肤、腔道及黏膜给药，因此，将两者结合，制备成醇质体凝胶，不仅能够促进药物的透皮吸收，提高药物的生物利用度，还增加了药物的稳定性，使得药物平稳释放进入皮肤，具有一定的缓释效果 [15]。

从渗透曲线来看，给药 2 h，PEG 和 PO 的累积渗透量均大于 PSG，说明醇质体和中药挥发油提高了药物的渗透性；给药 6 h 后，PEG 的累积渗透量逐渐大于 PO，说明醇质体使得药物持续稳定渗透，而中药挥发油的促渗效果则较为有限。结合沉积结果来看，制备成凝胶剂后药物在皮肤的滞留时间延长，具有一定的缓释效果。通过透射电镜显微观察发现醇质体囊泡在凝胶中结构完整，未受到破坏。刺激性实验结果表明显示 PEG 对皮肤无刺激，说明制备的 PEG 缓慢渗透，持续稳定释放，安全可靠。

本研究为丹皮酚经皮给药新剂型的开发提供了实验依据，但对于 PEG 的药效学评价还有待于进一步研究。

参考文献

[1] 李葆林，杨梦婷，支雅婧，等 . 徐长卿化学成分和药理作用的研究进展及质量标志物（Q-Marker）预测分析 [J]. 中草药，2021，52（12）：3725-3735.

[2] 王菁华，程曼曼，施沁青，等 . 大分子药物透皮递送策略研究进展 [J]. 中南药学，2021，19（4）：671-678.

[3] 朱煜，马云淑 . 醇质体及其二次制剂在经皮给药中的应用研究进展 [J]. 西北药学杂志，2021，36（2）：324-329.

[4] 代旭栋，李云，李双双，等 . 皮肤外用脂质体的研究进展 [J]. 国际药学研究杂志，2020，47（11）：914-921.

[5] Ma H，Guo D，Fan Y，et al. Paeonol-loaded ethosomes as transdermal delivery carriers：design，preparation and evaluation [J]. Molecules，2018，23（7）：1756.

[6] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：19.

[7] 李泽福，李越，胡等慧，等 . 驻颜乳剂凝胶的质量评价及药效考察 [J]. 中国美容医学，2021，30（6）：158-163.

[8] 张昆，熊磊，程欣，等 . 苍艾油传递体凝胶的制备及其体外释药研究 [J]. 中国医院药学杂志，2021，41（14）：1385-1389.

[9] 苏婷，赵燕，毕野，等 . 乌拉草总黄酮脂质体凝胶剂的制备工艺研究 [J]. 药物评价研究，2021，44（5）：990-996.

[10] 李晓朋，尹可欢，杨斌，等 . 复方藤椒冻疮水凝胶的制备工艺及药效作用研究 [J/OL]. 中药药理与临床：1-6[2021-08-10]. https：//doi. org/10.13412/j. cnki. zyyl. 20210520.001.

[11] 陈思思，郑杭生，钱丽梅，等 . 三七总皂苷传递体凝胶剂的制备及其离体皮肤渗透性研究 [J]. 中国当代医药，2019，26（24）：7-13.

[12] 金银秀，陶雪芬，王玉新，等 . 艾拉莫德醇质体凝胶的制备及其经皮渗透特性研究 [J]. 中国药学杂志，2020，55（21）：1807-1811.

[13] 刘春梅，雷佳，周志宏，等 . 冰黄肤乐软膏体外抗炎抗菌及皮肤毒性评价研究 [J]. 中国医药科学，2021，11（7）：1-4.

[14] 王锐，张贝贝，杨婧，等 . 经皮给药系统中促渗方法的研究进展 [J]. 中华中医药杂志，2021，36（5）：2855-2858.

[15] 董玉洁，蒋沅岐，陈金鹏，等 . 中药缓控释制剂的研究进展 [J]. 中草药，2021，52（8）：2465-2472.

（收稿日期：2021-10-12；修回日期：2021-12-30）

黄芪多糖诱导细胞自噬抑制食管癌 EC109 细胞增殖的研究

常明智[1]，张思雨[2]，郝艳娇[1]，张森露[1]，张晓丽[1*]（1.河北北方学院，河北 张家口 075000；2.新乡医学院三全学院，河南 新乡 453003）

摘要：目的 研究黄芪多糖（APS）对食管癌 EC109 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭能力的影响及其与细胞自噬的关系。**方法** 体外培养 EC109 细胞，实验分为以下几组：浓度为 0（对照组）、1.0、1.5、2.0 mg • mL^{-1} 的黄芪多糖组，5 μmol • L^{-1} PIK-Ⅲ（自噬抑制剂）组，2.0 mg•mL^{-1} 黄芪多糖联合 5 μmol•L^{-1} PIK-Ⅲ组。采用 MTT 法检测各组 EC109 细胞的增殖活性；吖啶橙染色实验和流式细胞术检测黄芪多糖组细胞的凋亡；扫描电镜观察黄芪多糖组 EC109 细胞表面结构的变化；Transwell 细胞迁移、侵袭实验分别检测黄芪多糖组 EC109 细胞的迁移和侵袭能力；激光共聚焦显微镜检测黄芪多糖组 LC3 的荧光表达强度；Western blot 检测黄芪多糖组自噬相关蛋白 Beclin1、P62 和 LC3B 的表达水平。**结果** 与对照组相比，随着黄芪多糖浓度的升高，EC109 细胞增殖抑制率及凋亡率显著增加；细胞表面结构破坏程度增加；细胞迁移和侵袭能力受到显著抑制；LC3 荧光表达强度增强（$P < 0.01$）；P62 蛋白表达水平显著降低（$P < 0.01$），Beclin1 和 LC3B 表达水平显著增高（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。**结论** 黄芪多糖可浓度依赖性地抑制 EC109 细胞的增殖、迁移和侵袭，并促进 EC109 细胞的凋亡，其机制可能与黄芪多糖诱导 EC109 细胞自噬有关。

关键词：黄芪多糖；食管癌 EC109 细胞；增殖；凋亡；自噬
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)04-0856-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.021

Astragalus polysaccharide inhibits the proliferation of esophageal cancer EC109 cells by inducing cell autophagy

CHANG Ming-zhi[1], ZHANG Si-yu[2], HAO Yan-jiao[1], ZHANG Sen-lu[1], ZHANG Xiao-li[1*] (1. *Hebei North University*, *Zhangjiakou Hebei* 075000; 2. *Sanquan College of Xinxiang Medical University*, *Xinxiang Henan* 453003)

Abstract: Objective To determine the effect of astragalus polysaccharide (APS) on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of esophageal cancer EC109 cells and its relationship with cell autophagy. **Methods** EC109 cells were cultured in vitro and divided into 4 APS groups at the concentrations of 0 (the control group), 1.0, 1.5 and 2.0 mg • mL^{-1}, a 5 μmol • L^{-1} PIK-Ⅲ (autophagy inhibitor) group and a 2.0 mg • mL^{-1} APS combined with 5 μmol • L^{-1} PIK-Ⅲ group. The proliferation of EC109 cells was determined by MTT assay. The degree of apoptosis of EC109 cells of the APS groups was determined by acridine orange staining assay and flow cytometry. Scanning electron microscope was used to observe the changes in the surface structure of EC109 cells of the APS groups. Transwell cell migration and invasion assay were used to detect the migration and invasion of EC109 cells in the APS groups, respectively. The fluorescence expression intensity of LC3 in the APS groups was detected by confocal laser microscopy. Western blot was used to detect the expression levels of the autophagy-related proteins Beclin1, P62 and LC3B in the APS groups. **Results** Compared with the control group, the proliferation inhibition rates and apoptosis

基金项目：河北北方学院自然科学研究计划项目（No. YB2018008）。
作者简介：常明智，男，硕士，主要从事中药抗肿瘤基础研究，email：changmz0321@163.com *通信作者：张晓丽，女，教授，硕士研究生导师，主要从事中药抗肿瘤基础研究，email：smkxyjzx0810@163.com

rates of EC109 cells significantly increased with APS concentrations; the destruction of cell surface structure was increased; the migration and invasion were significantly inhibited ($P < 0.01$); and LC3 fluorescence expression intensity was enhanced ($P < 0.01$). The expression of P62 protein was significantly reduced ($P < 0.01$), while the expression of Beclin1 and LC3B were increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** APS can inhibit the proliferation, migration and invasion of EC109 cells in a concentration-dependent manner and promote the apoptosis of EC109 cells, whose mechanism may be related to APS-induced autophagy in the EC109 cells.

Key words: astragalus polysaccharide; esophageal cancer EC109 cell; proliferation; apoptosis; autophagy

食管癌是常见的消化道肿瘤，国际癌症研究机构统计的“2018 年全球癌症发病率和病死率”数据显示，在全球恶性肿瘤中食管癌的发病率和病死率分别位居第七位和第六位[1-2]。临床治疗食管癌主要以局部放疗和全身化疗为主，但由于食管癌早期症状隐匿，患者就诊时多已发展至中晚期，导致疗效欠佳且毒副作用明显，严重影响患者预后。因此寻找疗效明显、副作用小的抗食管癌药物成了亟需解决的问题之一。黄芪是我国传统的补气中药之一，含有多种化学成分，具有增强免疫力、抗肿瘤、抗衰老等作用。黄芪多糖是黄芪的主要有效成分之一，相关研究证实了黄芪多糖对多种肿瘤细胞都有抑制作用[3-4]。

自噬是在自噬相关基因的调控下溶酶体自我降解代谢的过程，是包括肿瘤发生、发展、细胞死亡和存活在内的各种生理病理过程中的一个关键机制[5-6]。自噬被证明与凋亡有复杂的关系，特别是在肿瘤细胞系中。正常情况下，自噬在细胞生长，发育和稳态中发挥重要作用，是一种依赖溶酶体对异常的细胞器和蛋白质等物质进行降解的过程，然而，当自噬持续发生时，会引起细胞非程序性死亡从而抑制细胞的增殖[7]。自噬在抗肿瘤作用机制中具有重要意义，但是黄芪多糖抗食管癌的作用机制是否与影响细胞自噬水平有关仍待探索。

本课题组拟通过体外培养食管癌 EC109 细胞，探讨黄芪多糖能否通过调控食管癌 EC109 细胞自噬水平进而影响 EC109 细胞的生物学行为。

1 材料

1.1 细胞

食管癌 EC109 细胞系（中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库）。

1.2 试药

注射用黄芪多糖（批号：210202，天津赛诺制药有限公司，每瓶含黄芪多糖 250 mg）。噻唑蓝（MTT）试剂盒和 BCA 蛋白定量试剂盒（北京索莱宝有限公司）；DMEM 高糖培养基（美国 CORNING 公司）；胎牛血清（美国 Gegrogen 公司）；胰蛋白酶（南京凯基生物科技有限公司）；微管相关蛋白 1 轻链 3（LC3B 抗体）和人死骨片 1（P62 抗体）(美国 CST 公司）；自噬效应蛋白 Beclin1（Abcam 公司）；自噬抑制剂 PIK-Ⅲ（Selleck 公司）。

1.3 仪器

S-3400N 扫描电镜和冷冻干燥机（日本日立公司）；流式细胞仪（美国 BD 公司）；二氧化碳恒温孵化器（美国热电公司）；电泳仪（北京六一仪器厂）；超灵敏多功能成像仪 600（美国 GE 公司）。

2 方法

2.1 细胞培养

复苏后的 EC109 细胞用 DMEM 高糖培养基（含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U • mL^{-1}、链霉素 100 μg • mL^{-1}）培养，置于 37 ℃、5%CO_2 恒温培养箱中，培养液每 24 h 更换一次，待细胞融合至 80% 以上后传代，继续在培养箱中培养。

2.2 黄芪多糖对 EC109 细胞增殖活性的影响

将处于对数生长期的 EC109 细胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化后制成细胞悬液，以每孔 4×10^3 个细胞接种于 96 孔板，置于恒温培养箱中培养。24 h 后弃掉原培养液，加药，设对照组（0 mg • mL^{-1}）、黄芪多糖药物组（0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg • mL^{-1}），每组设立 6 个复孔，边缘孔内各加入 100 μL PBS，继续于培养箱中培养。24 h 后每孔加入 20 μL MTT（质量浓度为 5 mg • mL^{-1}），继续培养 4 h 后，弃去培养液，每孔加入 100 μL 的二甲基亚砜（DMSO），避光摇床轻微振荡 10 min，使用酶联免疫检测仪检测波长 490 nm 处的各孔的细胞光密度值（*OD* 值），并

对各组的 *OD* 值进行比较，计算其抑制率：细胞抑制率（%）＝（1 － $OD_{实验组}/OD_{对照组}$）×100%，筛选出低、中、高 3 个质量浓度（1.0、1.5、2.0 mg • mL^{-1}）的黄芪多糖进行后续实验。

2.3 黄芪多糖抑制 EC109 细胞增殖与细胞自噬的关系

按照“2.2”项下结果，将细胞分为对照组、高浓度黄芪多糖组（2.0 mg • mL^{-1}）、高浓度黄芪多糖（2.0 mg • mL^{-1}）联合 5 μmol • L^{-1} PIK-Ⅲ（自噬抑制剂）组、自噬抑制剂组。其他步骤同“2.2”项下。

2.4 吖啶橙染色实验观察黄芪多糖对 EC109 细胞凋亡的影响

取对数生长期的 EC109 细胞，制成细胞悬液，以每孔 2×10^5 个细胞接种于铺好爬片的 24 孔板中，于 5%CO_2、37 ℃培养箱中培养，待其贴壁后，吸弃培养基，PBS 洗 2 遍，每次 5 min，分别用不同浓度的黄芪多糖进行处理，继续于培养箱中继续培养 24 h，吸弃培养基，PBS 洗 2 遍，晾干，95% 乙醇溶液固定 5 min，滴加 0.01%（1 μg • mL^{-1}）吖啶橙染液染色 5 min，于培养箱中培养 20 min，小心取出爬片，PBS 冲洗 2 遍，滴加防淬灭封片液，激光共聚焦显微镜下观察。

2.5 流式细胞术检测黄芪多糖对 EC109 细胞凋亡的影响

消化、离心并收集处于对数生长期的 EC109 细胞接种于 6 孔板，计数并调整细胞密度为 4×10^5 个 • mL^{-1}，24 h 后弃培养液，加药，设置对照组，低、中、高浓度（1.0、1.5、2.0 mg•mL^{-1}）黄芪多糖组，继续培养 24 h 后弃培养液，PBS 洗涤 2 次，无 EDTA 胰酶消化后离心，收集细胞，加入 500 μL 1×Binding Buffer 制备成细胞悬液，再加入 5 μL PI 和 5 μL Annexin V-FITC 后避光孵育 15 min，冰上放置，于 1 h 内上机检测，FACS Diva 4.1 软件对结果进行分析。

2.6 黄芪多糖对 EC109 细胞表面结构的影响

准备无菌圆形小盖玻片，于 37 ℃、5%CO_2 恒温培养箱中取出细胞，制成 4×10^4 个 • mL^{-1} 的 EC109 细胞悬液，24 孔板细胞爬片，于细胞培养箱中培养 24 h 后取出，用 PBS 缓冲液清洗 3 次（贴孔壁缓慢加入，避免细胞被冲掉），使用 2.5% 戊二醛固定样本，于 4 ℃冰箱放置 4 ～ 6 h，PBS 洗 3 次（每次 5 min），乙醇（30%、50%、70%、75%、80%、85%、95%、100%）梯度脱水（每次 5 min），叔丁醇置换 2 次（每次 10 min），第二次叔丁醇不吸出，放入冷冻干燥仪中过夜，次日用离子溅射仪喷镀，扫描电子显微镜观察细胞表面结构。

2.7 黄芪多糖对 EC109 细胞垂直迁移的影响

将处在对数生长期时的 EC109 细胞饥饿处理 12 h，24 孔板内加入 500 μL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基，将 Transwell 小室放入加了培养基的孔里，然后将上述饥饿处理过的 EC109 细胞用 0.25% 的胰蛋白酶进行消化，离心，PBS 重悬细胞，每组细胞数为 4.0×10^4 个 • mL^{-1}，调整黄芪多糖的浓度为 1.0、1.5、2.0 mg • mL^{-1}，用其再次将细胞重悬，24 孔板每孔加 200 μL 的 EC109 细胞悬液，置于培养箱中培养 24 h，取出 24 孔板，使用移液枪吸出小室中的废液，擦去小室壁上未迁移的细胞，风干，用 4% 多聚甲醛固定 15 ～ 20 min，取出小室，再次风干，结晶紫染色 15 ～ 20 min，PBS 清洗 3 次，倒置显微镜下观察，拍照留存。

2.8 黄芪多糖对 EC109 细胞侵袭能力的影响

将 － 20 ℃ Matrigel 胶（基质胶）于 4 ℃ 解冻过夜，次日，用无血清的 DMEM 培养基稀释 Matrigel 胶（基质胶∶无血清 DMEM 培养基＝1∶4），取出 4 个 Transwell 小室，每个小室内均匀加入 60 μL 已稀释的 Matrigel 胶，置于培养箱中 4 h 至 Matrigel 胶凝固，其他步骤同“2.7”项下。

2.9 黄芪多糖对 LC3 的荧光表达强度的影响

将食管癌 EC109 细胞按照对照组，低、中、高浓度黄芪多糖药物组分别接种到共聚焦小皿中孵育 24 h，加药处理，药物作用 24 h 后用 PBS 缓冲液冲洗细胞 2 次，每次 5 min，然后用 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min，再用适量 0.1% Triton X-100 孵育 10 min，1% BSA 封闭 30 min，最后在含有一抗 LC3（1∶200）中 4 ℃孵育过夜。孵育完成后用 PBS 缓冲液洗涤 3 次，每次 5 min，室温避光孵育对应二抗 1 h（1∶200），用 PBS 洗涤 3 次，每次 5 min，DAPI 室温避光染色 5 min，PBS 洗涤 3 次，每次 5 min，双蒸水洗涤 1 次，滴加防淬灭封片剂进行避光封片，激光共聚焦显微镜下进行成像观察。

2.10 黄芪多糖对自噬相关蛋白 Beclin1、P62 和 LC3B 表达水平的影响

不同浓度黄芪多糖处理 EC109 细胞 24 h 后，收集各组细胞，按照 100 μL RIPA（细胞裂解液）∶1 μL PMSF（蛋白酶抑制剂）∶2 μL NAF（磷酸酶抑制剂）比例提取细胞全蛋白，BCA 蛋白定量试剂盒对蛋白浓度进行定量，制备分离胶和浓缩胶（LC3B 抗体用 15% 分离胶和浓缩胶，其余

抗体用 10% 分离胶和浓缩胶），煮蛋白 10 min，加样，电泳（电压 90 V，电流 300 mA，30 min 后电压转 120 V，电流不变，1 h），转膜（电压 100 V，电流恒流 250 mA，1 h），转膜结束后，室温下用 5% 的脱脂牛奶（脱脂奶粉：1×TBST ＝ 1：20）封闭 PVDF 膜 1 h，一抗（Beclin1、LC3B、P62）用 5% 的脱脂牛奶稀释（根据抗体说明书）后孵育，4 ℃过夜；复温后回收一抗，用 1×TBST 洗膜 3 次，每次 10 min，二抗室温下孵育 2 h，再用 1× TBST 洗膜 3 次，每次 10 min，显色液显色，Amersham Imager 600 显影，使用 Image J 软件分析灰度值。

2.11　统计学处理

实验结果采用 SPSS 22.0 进行数据分析，计量资料以（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间数据比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA），组间数据两两比较采用 t 检验，使用 GraphPad Prism 软件进行绘图，$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　黄芪多糖抑制 EC109 细胞增殖

MTT 结果显示，随着黄芪多糖浓度升高，其对 EC109 细胞的抑制率也越来越高，表明黄芪多糖可以以剂量依赖性方式抑制 EC109 细胞增殖。与对照组比较，差异均具有统计学意义（$P < 0.01$）。筛选出抑制率分别为 28%、45%、56% 的低、中、高 3 个质量浓度（1.0、1.5、2.0 mg • mL^{-1}）的黄芪多糖进行后续实验（见表 1）。

表 1　黄芪多糖对 EC109 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of APS on the proliferation of EC109 cells ($\bar{x}\pm s$)

黄芪多糖药物浓度 /（mg • mL^{-1}）	*OD* 值	抑制率 /%
0	0.947±0.02	0
0.5	0.742±0.03**	21
1.0	0.676±0.01**	28
1.5	0.514±0.02**	45
2.0	0.411±0.03**	56
2.5	0.332±0.04**	64
3.0	0.253±0.02**	73

注（Note）：与对照组（0 mg • mL^{-1}）相比，$^{**}P < 0.01$（Compared with the control group，$^{**}P < 0.01$）。

3.2　黄芪多糖可能通过诱导细胞自噬抑制 EC109 细胞增殖

MTT 结果显示，与对照组相比，高浓度黄芪多糖组、高浓度黄芪多糖联合自噬抑制剂组、自噬抑制剂组的细胞抑制率逐渐降低（$P < 0.01$），表明黄芪多糖可能通过诱导细胞自噬进而抑制 EC109 细胞增殖（见表 2）。

3.3　黄芪多糖促进 EC109 细胞凋亡

表 2　黄芪多糖、自噬抑制剂对 EC109 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effect of APS and autophagy inhibitor on the proliferation of EC109 cells ($\bar{x}\pm s$)

组别	*OD* 值	抑制率 /%
对照组	0.771±0.02	0
高浓度黄芪多糖组	0.377±0.02**	51
高浓度黄芪多糖＋自噬抑制剂组	0.433±0.01**	44
自噬抑制剂组	0.584±0.03**	24

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

吖啶橙染色实验结果显示，对照组活细胞核内多呈弥散均匀荧光，随着用药浓度的增加，细胞核内浓染致密的颗粒块状荧光逐渐增多，表明黄芪多糖可以促进 EC109 细胞凋亡产生程序性的核固缩现象（见图 1）。

流式细胞术结果显示，以凋亡早期（Q4）和晚期凋亡（Q2）之和为总的凋亡细胞数，其细胞凋亡率随着用药浓度的增加呈现递增趋势，对照组，低、中、高浓度黄芪多糖组的细胞凋亡率分别为：（11.8±0.44）%、（15.9±0.37）%、（28.3±0.41）%、（41.0±0.48）%（见图 2）。

3.4　黄芪多糖破坏 EC109 细胞表面结构

对照组的 EC109 细胞可以观察到细胞呈三维立体椭圆形结构，细胞整体形态丰满，表面可见丰富的微绒毛和伪足，且伪足与其他细胞表面的伪足相互连接（见图 3A）；低浓度黄芪多糖组可见细胞的整体形态变化与对照组相比不太明显，但细胞表面的微绒毛和伪足相对减少且形态上变得更加短小（见图 3B）；中浓度黄芪多糖组观察到细胞整体形态呈不规则型改变，细胞膜发生轻微的皱缩，细胞表面微绒毛和伪足进一步减少（见图 3C）；高浓度黄芪多糖组可见细胞膜皱缩明显，细胞表面观察不到明显的微绒毛和伪足的存在（见图 3D）。可见，随着黄芪多糖浓度的增加，食管癌 EC109 细胞表面结构的破坏愈发严重，表明黄芪多糖可能通过破坏 EC109 细胞的表面结构影响细胞的生长进而抑制其增殖。

3.5　黄芪多糖抑制 EC109 细胞迁移能力

Transwell 实验结果显示，黄芪多糖能显著抑制 EC109 细胞的迁移能力（见图 4）。随着黄芪多糖浓度的增加，EC109 细胞穿膜数逐渐减少，对照组，低、中、高浓度黄芪多糖组迁移细胞数依次是（152±4）、（98±6）、（84±2）、（20±5）。与对照组相比，差异均具有统计学意义（$P < 0.01$）。

3.6　黄芪多糖抑制 EC109 细胞侵袭能力

Transwell 实验结果显示，黄芪多糖能显著抑

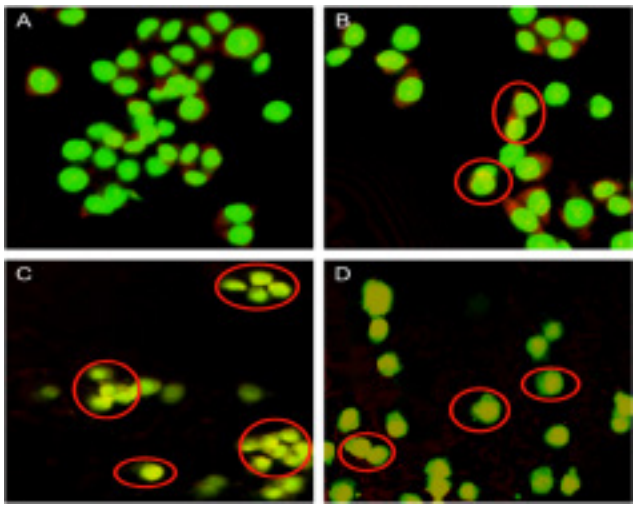


图 1 吖啶橙染色实验检测黄芪多糖组细胞的凋亡程度

Fig 1 Degree of apoptosis of EC109 cells determined by acridine orange staining assay in the APS groups

A. 对照组（control group）；B. 低浓度黄芪多糖组（low-concentration astragalus polysaccharide group）；C. 中浓度黄芪多糖组（medium-concentration astragalus polysaccharide group）；D. 高浓度黄芪多糖组（high-concentration astragalus polysaccharide group）

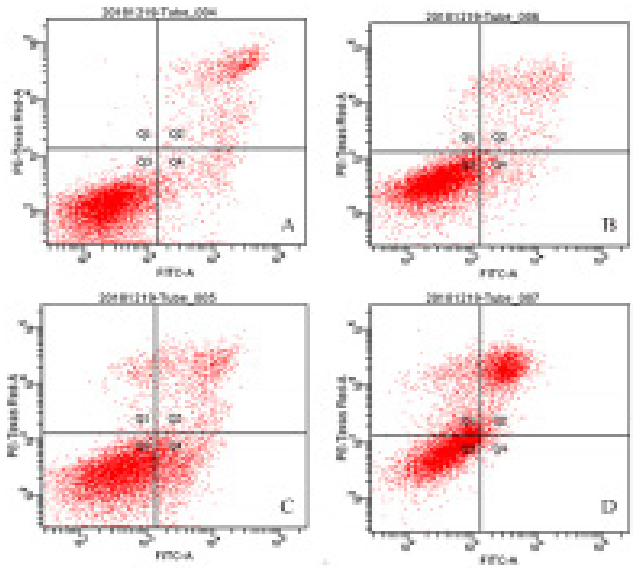


图 2 流式细胞术检测黄芪多糖组细胞的凋亡程度

Fig 2 Degree of apoptosis of EC109 cells determined by flow cytometry in the APS groups

A. 对照组（control group）；B. 低浓度黄芪多糖组（low-concentration astragalus polysaccharide group）；C. 中浓度黄芪多糖组（medium-concentration astragalus polysaccharide group）；D. 高浓度黄芪多糖组（high-concentration astragalus polysaccharide group）

制 EC109 细胞的侵袭能力（见图 5）。随着黄芪多糖浓度的递增，EC109 细胞穿胶数逐渐减少。对照组，低、中、高浓度黄芪多糖组侵袭细胞数依次是（109±3）、（68±5）、（53±4）、（17±6）。与对照组相比，差异均具有统计学意义（$P < 0.01$）。

3.7 黄芪多糖诱导 LC3 荧光表达强度增强

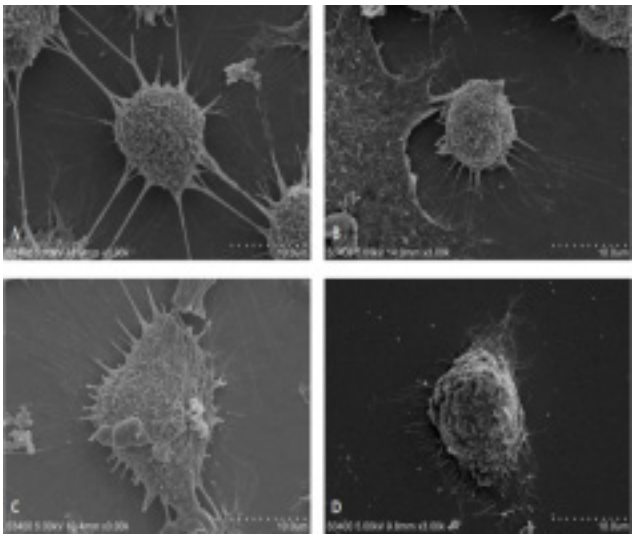


图 3 黄芪多糖对 EC109 细胞表面结构的影响（×3000）

Fig 3 Effect of APS on the surface structure of EC109 cells（×3000）

A. 对照组（control group）；B. 低浓度黄芪多糖组（low-concentration astragalus polysaccharide group）；C. 中浓度黄芪多糖组（medium-concentration astragalus polysaccharide group）；D. 高浓度黄芪多糖组（high-concentration astragalus polysaccharide group）

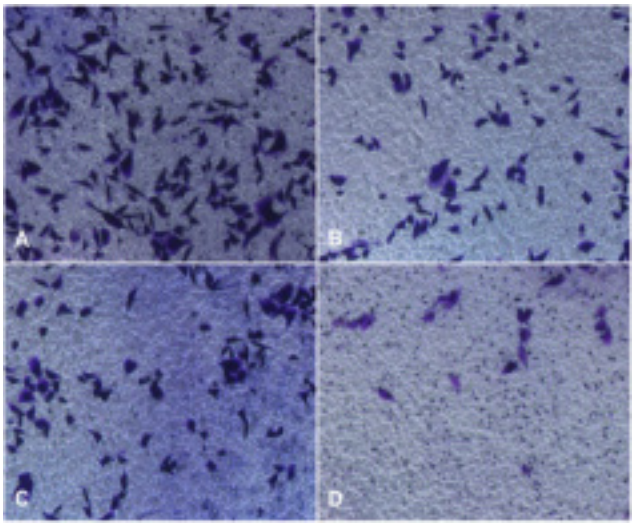


图 4 黄芪多糖对 EC109 细胞的迁移能力的影响

Fig 4 Effect of APS on the migration capacity of EC109 cells

A. 对照组（control group）；B. 低浓度黄芪多糖组（low-concentration astragalus polysaccharide group）；C. 中浓度黄芪多糖组（medium-concentration astragalus polysaccharide group）；D. 高浓度黄芪多糖组（high-concentration astragalus polysaccharide group）

如图 6 所示，对照组细胞 LC3 荧光强度较弱，各给药组细胞 LC3 荧光染色强度较对照组升高。表明黄芪多糖可能通过诱导 LC3 蛋白的表达增强进而诱导细胞自噬水平增高。对照组，低、中、高浓度黄芪多糖组 LC3 的相对荧光强度表达依次为（0.05±0.01）、（0.11±0.02）、（0.24±0.04）、（0.52±0.02）。与对照组相比，差异均具有统计学意义（$P < 0.01$）。

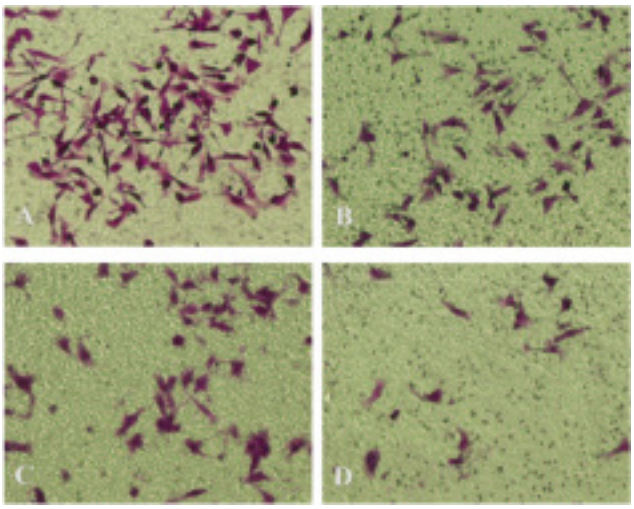


图 5　黄芪多糖对 EC109 细胞的侵袭能力的影响

Fig 5　Effect of APS on the invasion capacity of EC109 cells

A. 对照组（control group）；B. 低浓度黄芪多糖组（low-concentration astragalus polysaccharide group）；C. 中浓度黄芪多糖组（medium-concentration astragalus polysaccharide group）；D. 高浓度黄芪多糖组（high-concentration astragalus polysaccharide group）

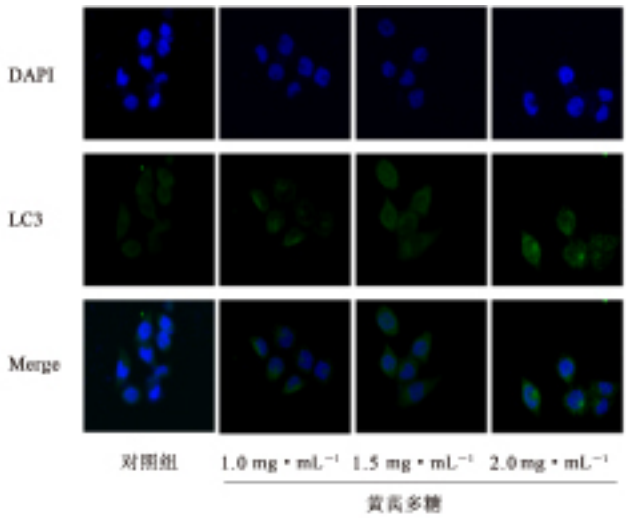


图 6　黄芪多糖诱导 LC3 荧光表达强度增强

Fig 6　APS induced an enhanced fluorescence expression intensity of LC3

3.8　黄芪多糖诱导 EC109 细胞发生自噬

Western blot 结果显示，与对照组相比，各给药组 P62 蛋白表达逐渐下调（$P < 0.01$），Beclin1、LC3B 蛋白表达逐渐上调（$P < 0.05$，$P < 0.01$），表明黄芪多糖可以诱导 EC109 细胞发生自噬（见图 7）。

4　讨论

食管癌是消化系统肿瘤中侵袭性极强的恶性肿瘤之一，食管癌细胞的快速增殖以及其极强的侵袭能力是导致患者病死率高的重要原因 [8]。临床放化疗治疗食管癌的毒副作用较强，患者的生存质量较差，因此研究药效温和，副作用少且可

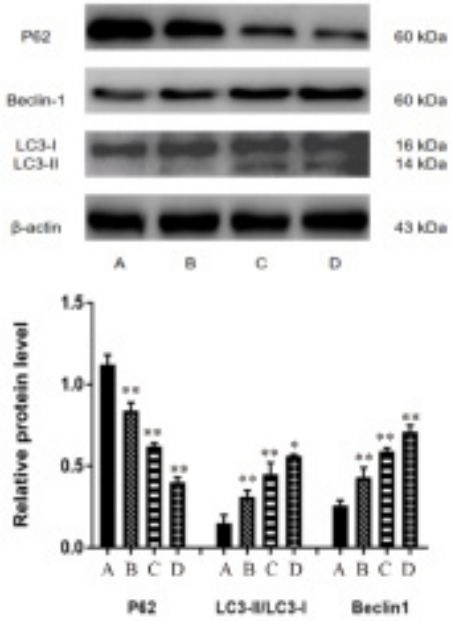


图 7　黄芪多糖对 EC109 细胞自噬相关蛋白的影响

Fig 7　Effect of APS on autophagy-related proteins in EC109 cells

A. 对照组（control group）；B. 低浓度药物组（low-concentration drug group）；C. 中浓度药物组（medium-concentration drug group）；D 高浓度药物组（high-concentration drug group）

注（Note）：与对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$（Compared with the control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）。

抑制其细胞增殖及侵袭能力的药物具有一定的意义。传统中药因靶点多、毒性低、疗效佳，已成为抗肿瘤药物研究领域的热点话题。作为黄芪最主要的有效成分之一，黄芪多糖药效温和，毒副作用较小，且已被证实在诸多肿瘤治疗中有效，并与细胞自噬关系密切 [9-11]。本课题组研究发现，随着黄芪多糖浓度的升高，食管癌 EC109 细胞增殖率远低于对照组。通过扫描电镜观察其表面结构的变化，发现细胞表面微绒毛和伪足均少于对照组，且细胞膜也发生了皱缩。经吖啶橙染色实验发现，黄芪多糖可以使食管癌 EC109 细胞发生明显的核固缩现象，流式细胞术结果证明了黄芪多糖可诱导 EC109 细胞凋亡。LC3 荧光强度表达以及免疫蛋白印迹实验验证了黄芪多糖可诱导食管癌 EC109 细胞自噬水平增强。这表示黄芪多糖对于食管癌的治疗具有一定的临床应用价值。

细胞自噬调控作为一种有效的肿瘤治疗干预策略越来越受到医药工作者的关注。自噬相关蛋白 LC3、Beclin1 和 P62 是自噬体形成必不可少的分子，在自噬体形成的不同阶段均有 LC3、Beclin1 和 P62 的参与，是检测自噬水平的三种标记蛋白。LC3 分为 LC3A、LC3B 和 LC3C 三种亚型，其中 LC3B 亚型与自噬关系最为密切 [12]，

LC3 参与自噬体形成到成熟的各个阶段，当自噬发生时，LC3-Ⅰ被活化，结合磷脂酰乙醇胺转变为 LC3-Ⅱ，促进自噬体形成及成熟[13]，LC3-Ⅱ的变化水平与自噬程度成正相关，故自噬水平的高低可以通过 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ的比值大小进行判断[14]。Beclin1 作为参与自噬体形成的一个必需分子，通过对自噬的调节，在肿瘤的发生发展中起着重要作用[15]，在自噬过程中 Beclin1 的表达水平往往会升高。而在自噬过程中，P62 蛋白会在细胞质中不断地被降解，如果自噬被抑制，P62 蛋白将会在细胞质中不断地积累，因此 P62 也可作为反映自噬水平的一种标记蛋白[16]。有研究证实在诸多癌症中检测到 P62 的异常积聚[17-19]，提示 P62 的积聚与肿瘤的进展有关，自噬通过限制 P62 的积聚而抑制肿瘤的发生[20]。本研究证实黄芪多糖可以通过上调自噬相关蛋白 LC3、Beclin1，同时下调 P62 蛋白的表达诱导细胞自噬水平增高，表明黄芪多糖对食管癌细胞的影响机制与其诱导发生细胞自噬有关。

综上所述，黄芪多糖作为一种具有抗肿瘤作用的中药，在抑制食管癌 EC109 细胞增殖、迁移和侵袭，促进凋亡方面具有重要意义，其发挥抗肿瘤作用的机制与诱导细胞自噬水平增强有关。生物体内自噬与病理生理的关系复杂，本课题仅论证了黄芪多糖可以通过调控其自噬相关蛋白诱导食管癌 EC109 细胞自噬水平增强，但其具体机制仍待进一步探索。

参考文献

[1] Feng RM，Zong YN，Cao SM，et al. Current cancer situation in China：good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics [J]. Cancer Commun（Lond），2019，39（1）：22.

[2] Bray F，Ferlay J，Soerjomataram I，et al. Global cancer statistics 2018：GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin，2018，68（6）：394-424.

[3] Song J，Chen YM，He DH，et al. Astragalus polysaccharide promotes adriamycin-induced apoptosis in gastric cancer cells [J]. Cancer Manag Res，2020，12：2405-2414.

[4] Yang S，Sun SQ，Xu WQ，et al. Astragalus polysaccharide inhibits breast cancer cell migration and invasion by regulating epithelialmesenchymal transition via the Wnt/βcatenin signaling pathway [J]. Mol Med Rep，2020，21（4）：1819-1832.

[5] Levine B，Kroemer G. Biological functions of autophagy genes：a disease perspective [J]. Cell，2019，176（1-2）：11-42.

[6] Wen X，Klionsky DJ. An overview of macroautophagy in yeast [J]. J Mol Biol，2016，428（9 Pt A）：1681-1699.

[7] Guan H，Piao H，Qian ZQ，et al. 2，5-Hexanedione induces autophagic death of VSC4.1 cells via a PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. Mol Biosyst，2017，13（10）：1993-2005.

[8] Kawasaki M，Ikeda Y，Ikeda E，et al. Oral infectious bacteria in dental plaque and saliva as risk factors in patients with esophageal cancer [J]. Cancer，2021，127（4）：512-519.

[9] 翟秋丽，胡向丹，肖静，等 . 黄芪多糖可能通过调控细胞自噬提高宫颈癌 HeLa 细胞对顺铂的敏感性 [J]. 中国中药杂志，2018，43（4）：805-812.

[10] Zhou Y，Hong T，Tong L，et al. Astragalus polysaccharide combined with 10-hydroxycamptothecin inhibits metastasis in non-small cell lung carcinoma cell lines via the MAP4K3/mTOR signaling pathway [J]. Int J Mol Med，2018，42（6）：3093-3104.

[11] Tan YY，Yin L，Sun ZF，et al. Astragalus polysaccharide exerts anti-Parkinson via activating the PI3K/AKT/mTOR pathway to increase cellular autophagy level in vitro [J]. Int J Biol Macromol，2020，153：349-356.

[12] Larose TL，Guida F，Fanidi A，et al. Circulating cotinine concentrations and lung cancer risk in the lung cancer cohort consortium（LC3）[J]. Int J Epidemiol，2018，47（6）：1760-1771.

[13] Dikic I，Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy [J]. Nat Rev Mol Cell Biol，2018，19（6）：349-364.

[14] Aparicio IM，Munoz PM，Salido GM，et al. The autophagy-related protein LC3 is processed in stallion spermatozoa during short-and long-term storage and the related stressful conditions [J]. Animal，2016，10（7）：1182-1191.

[15] Jin SK，White E. Role of autophagy in cancer：management of metabolic stress [J]. Autophagy，2007，3（1）：28-31.

[16] Li XH，He SK，Ma BY. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer [J]. Mol Cancer，2020，19（1）：12.

[17] Saito T，Ichimura Y，Taguchi K，et al. P62/SQSTM1 promotes malignancy of HCV-positive hepatocellular carcinoma through Nrf2-dependent metabolic reprogramming [J]. Nat Commun，2016，7：12030.

[18] Umemura A，He F，Taniguchi K，et al. P62，upregulated during preneoplasia，induces hepatocellular carcinogenesis by maintaining survival of stressed HCC-initiating cells [J]. Cancer Cell，2016，29（6）：935-948.

[19] Li SS，Xu LZ，Zhou W，et al. P62/SQSTM1 interacts with vimentin to enhance breast cancer metastasis [J]. Carcinogenesis，2017，38（11）：1092-1103.

[20] Huang JF，Duran A，Reina-Campos M，et al. Adipocyte p62/SQSTM1 suppresses tumorigenesis through opposite regulations of metabolism in adipose tissue and tumor [J]. Cancer Cell，2018，33（4）：770-784.

（收稿日期：2022-01-09；修回日期：2022-02-10）

综述

克服顺铂耐药性的新型 Pt（Ⅳ）前药研究进展

孙蒙琪，陈西敬*，赵娣*（中国药科大学基础医学与临床药学学院，南京　210009）

摘要：顺铂在各种恶性肿瘤的治疗中发挥着关键作用，但其使用常因耐药受到限制。Pt（Ⅳ）前药是将活性或非活性配体与 Pt（Ⅱ）化合物通过化学键合而成，其在一定程度上表现出更佳的药效、更低的毒性、较低的耐药性以及更好的代谢稳定性，是一类有望规避顺铂耐药性的新型铂类抗肿瘤药物。本文围绕靶向细胞凋亡逃逸、DNA 损伤修复以及提高 Pt（Ⅳ）前药的脂溶性和靶向性等方面，对目前研究中出现的能够克服顺铂耐药的新型 Pt（Ⅳ）前药进行了分析探讨，以期能为克服顺铂耐药的 Pt（Ⅳ）前药开发提供借鉴。

关键词：顺铂；多药耐药；Pt（Ⅳ）前药；逆转耐药
中图分类号：R914.2　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0863-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.022

Research progress in new Pt (Ⅳ) prodrugs to overcome cisplatin resistance

SUN Meng-qi, CHEN Xi-jing*, ZHAO Di* (*School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 210009)

Abstract: Cisplatin plays a key role in the treatment of various malignant tumors, but its use is usually limited due to drug resistance. Pt (Ⅳ) prodrugs are formed by the chemical bonding of active or inactive ligands with Pt (Ⅱ) compounds. To a certain extent, they show better efficacy, lower toxicity, lower drug resistance and better metabolic stability. They are a new type of platinum anticancer drugs expected to reduce drug resistance of cisplatin. This paper focused on targeting apoptosis escape, DNA damage repair, and improving fat solubility and targeting of Pt (Ⅳ) prodrugs, and summarized Pt (Ⅳ) prodrugs that can overcome cisplatin resistance to provide reference for the development of Pt (Ⅳ) prodrugs.

Key words: cisplatin; multidrug resistance; Pt (Ⅳ) prodrug; reversal of drug resistance

自 1965 年铂电极被发现能够抑制细菌生长以来[1]，铂类药物得到了极大的发展。1978 年，顺铂问世[2]。在之后的几十年中，顺铂、卡铂、奥沙利铂等经典 Pt（Ⅱ）药物广泛应用于国内外的临床一线，超过 50% 的实体瘤都采用了铂类药物治疗方案[3-4]。目前普遍认为顺铂通过主动转运 [铜离子转运体 1（copper transporter 1，CTR1）] 和被动扩散两种方式进入细胞，在进入细胞后顺铂被水解活化，活化后的顺铂会与 DNA 的 N7 处鸟嘌呤结合，使得 DNA 不能进行正常的复制和转录，进而引起细胞凋亡，从而达到治疗的目的[5]。

尽管铂类药物在肿瘤治疗中有着重要的地位，但是其严重的毒副作用和不可避免的耐药性限制了其临床进一步应用。目前研究表明，Pt（Ⅱ）化合物可引起包括耳毒性、肾毒性、神经毒性和血液毒性等在内的毒副作用[6-9]，患者往往因为毒性明显而不得不中断治疗。除了毒副作用，耐药性（先天性耐药和获得性耐药）也是不可忽视的问题之一。基于此，研究人员期望通过开发新型铂类药物来克服耐药问题，因而 Pt（Ⅳ）前药得到了广泛的关注。Pt（Ⅳ）前药是在 Pt（Ⅱ）化合物的基础上，在轴向位置添加功能或非功能配体，形成与 Pt（Ⅱ）化合物不同的

作者简介：孙蒙琪，女，硕士研究生，主要从事药物代谢动力学研究，email：15553872660@163.com　*通信作者：陈西敬，男，教授，博士研究生导师，主要从事药物代谢动力学研究，email：83271286@163.com；赵娣，女，副教授，硕士研究生导师，主要从事药物代谢动力学研究，email：zh_d99@cpu.edu.cn

低自旋八面体结构，使其在体内不易发生取代反应，进而减少了 Pt（Ⅱ）化合物在到达靶 DNA 之前与生物分子过早反应而失效问题的发生，并且在一定程度上降低了毒副作用[10-11]。通常认为，Pt（Ⅳ）前药的中心铂原子处于相对惰性的四价氧化态，前药在细胞中被还原物质激活而释放出轴向配体，同时生成对应的有活性的 Pt（Ⅱ）化合物而发挥药效。这些细胞内的还原物质主要包括抗坏血酸、半胱氨酸、谷胱甘肽（glutathione，GSH）和其他大分子[12-13]。Pt（Ⅳ）前药的两个配体可以对化合物的理化性质进行一定的调整，包括亲脂性、氧化还原电位和靶向性等，以期能够增强药物的活性并且克服顺铂耐药性[14]。尽管对 Pt（Ⅳ）前药的设计研发日益增加，但是目前仍未有 Pt（Ⅳ）前药获批上市。因此，本文概括了顺铂耐药发生的机制以及目前设计合成的能够克服顺铂耐药的新型 Pt（Ⅳ）前药，以期为后续 Pt（Ⅳ）前药的设计开发提供借鉴。

1 顺铂耐药机制研究现状

近年来，顺铂在肿瘤中的耐药机制得到了广泛的研究。顺铂耐药的产生通常涉及到达靶 DNA 前的药物转运和代谢过程、DNA 损伤修复过程以及基因组表观遗传发生变化等[15-17]（见图 1）。CTR1 在细胞摄取顺铂的过程中发挥着重要的作用，而其下调与铂类药物耐药性的产生密切相关[18-19]。顺铂被细胞摄取后，并不意味着其可以顺利与 DNA 结合而发挥药效，肿瘤细胞内高表达的亲核物质（如 GSH、金属硫蛋白）会与顺铂结合而使其失活，随后顺铂与 GSH 的结合物由多药耐药相关蛋白 2（multidrug resistance-associated protein 2，MRP2）转运排出细胞[20]。而一些未结合的顺铂则可能由铜转运 P 型 ATP 酶（ATP7A 和 ATP7B）转运排出细胞，ATP7A 和 ATP7B 的过表达也成为细胞对顺铂耐药的诱因之一[21]。也有研究表明铜离子转运蛋白 2（copper transporter 2，CTR2）和有机阳离子转运体 2（organic cation transporter 2，OCT2）与经顺铂治疗后的癌症患者的疗效和预后有关[22-23]，但是其参与细胞产生顺铂耐药的机制仍有待探索，有研究发现在肺癌中 OCT6 下调与顺铂耐药直接相关[24]。不仅仅是转运和代谢的改变会导致顺铂的药效降低。在癌症中，DNA 损伤修复反应引起的耐药问题也不容忽视。顺铂诱导产生的 DNA 损伤主要通过核苷酸切除修复（nucleotide excision repair）、同源重组修复（homologous recombination）和碱基切除修复（base-excision repair）等途径修复，主要涉及但不限于核苷酸切除修复交叉互补组 1/2（excision repair cross complementing group 1/2，ERCC1/2）、同源重组修复蛋白 RAD51 和 X 射线修复交叉互补基因 1（X-ray repair cross complementing 1，XRCC1）等，这些蛋白在大多数顺铂耐药细胞中都出现表达上调的现象[25-27]。

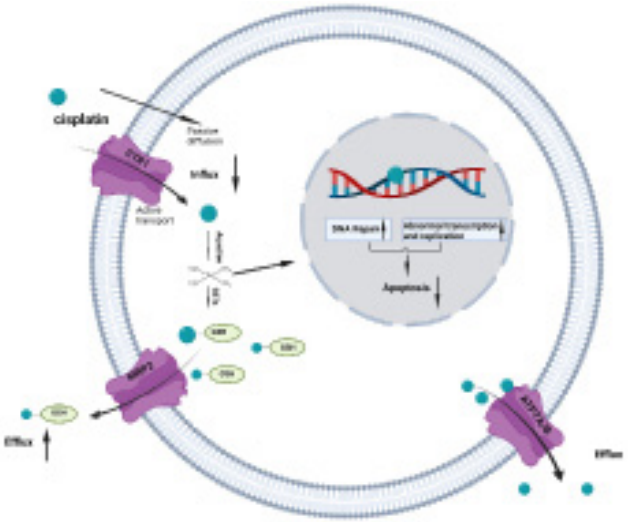


图 1 肿瘤细胞中顺铂出现耐药的常见原因

Fig 1 Causes of cisplatin resistance in tumor cells

在大多数情况下，耐药机制不止一种，近年来对表观遗传学和肿瘤微环境的研究也为化疗耐药的产生做出了一些新的解释[28]。表观遗传学研究发现，RNA 选择性剪接[29]、RNA 和 DNA 高甲基化[30-31]以及凋亡相关蛋白（如 BIRC3）的表观遗传学修饰[32]均与顺铂耐药的发生有着密切的关系。而对肿瘤微环境变化的研究也从另一方面对顺铂耐药做出了解释。肿瘤微环境中包括除了肿瘤细胞以外的间充质细胞、免疫细胞及其相关成分等[33]。研究人员发现，间充质细胞表型的变化[34-35]、CD8 ＋ T 细胞活性的降低[36]以及 CD44、CD117 和 β- 整合素等分子[37]都与顺铂耐药具有一定的相关性。目前研究人员还在对因表观遗传学和肿瘤微环境的变化而使细胞产生顺铂耐药的原因进行更深入的研究，这些研究为寻找更有效的逆转顺铂耐药的策略提供了更多的方向。

2 克服顺铂耐药的 Pt（Ⅳ）前药研究现状

2.1 靶向细胞凋亡及 DNA 损伤修复

2.1.1 细胞凋亡逃逸 p53 在调控细胞凋亡以及维持基因组稳定等方面发挥着重要作用，其突变与肿瘤的发生密切相关[38]。在设计能够逆转顺铂耐药的 Pt（Ⅳ）前药时，这个靶点也被研究人员考虑在内。在顺铂耐药的人卵巢癌细胞 A2780 中，Xie 等[39]自主合成的 Pt（Ⅳ）前药 DAP（化

合物 **1**，见图 2）[40]不仅可以延长 p53 半衰期，还可以阻止其由活性状态转化为非活性结合状态，从而在体外达到良好的抗肿瘤效果。查尔酮与顺铂结合形成的查尔铂（化合物 **2**，见图 2）可以激活 *p53* 基因，在 A549 及顺铂耐药细胞株中均发挥了良好的药效，但是进一步的研究结果显示查尔铂在 *p53* 缺失的细胞中并不能提高铂类与 DNA 的结合率[41]，因而查尔铂具体的药理作用机制仍旧需要进行进一步的探究。以上的研究结果表明以 p53 为靶点进行 Pt（Ⅳ）前药开发具有可能性，但需要进一步在体内进行药理药效探究。除了 p53 以外，caspase 3 以及 bcl-2/bax 在细胞凋亡中也发挥着重要的作用。研究人员将阿司匹林与顺铂结合而形成的 Pt（Ⅳ）前药（化合物 **3**，见图 2）在体外可以抑制抗凋亡基因 *bcl-2* 的表达，而促进促凋亡基因 *bax* 的表达，进而诱导生成更多的 caspase3 以达到更佳的抗肿瘤效果，但其体内药效还未被验证[42]。

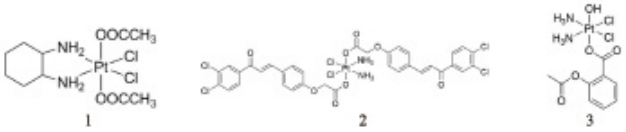


图 2　促进细胞凋亡的 Pt（Ⅳ）前药

Fig 2　Pt（Ⅳ）prodrugs that increase cell apoptosis

2.1.2　DNA 损伤修复　DNA 损伤修复反应包括核苷酸切除修复、同源重组修复和碱基切除修复等。修复过程涉及多种分子，如共济失调毛细血管扩张突变基因（ataxia telangiectasia-mutated gene，ATM）、XRCC1、检查点激酶 1（checkpoint kinase 1，CHK1）、乳腺癌 1 号基因（breast cancer 1，BRCA1）、酪蛋白激酶 2（caseinkinase 2，CK2）、ERCC1 和 RAD51 蛋白等[43-44]，在维持基因组完整性和调节抗肿瘤药物的药效方面具有重要意义。如抑制核苷酸切除修复过程是克服顺铂耐药的策略之一。NERi-Pt（Ⅳ）前药（化合物 **7**，见图 3）是在顺铂的轴向位置键合了一种核苷酸切除修复抑制剂（NERi），该前药在进入细胞后会释放出顺铂和 NERi，NERi 的存在使得顺铂可以与更多的鸟苷酸有效结合，从而发挥更佳的药效。该化合物对顺铂耐药的 A549 细胞的毒性相较于顺铂提高了约 88 倍，且与顺铂存在较低的交叉耐药。除此之外，NERi-Pt（Ⅳ）前药的耐药因子仅为 1.1，表明 NERi-Pt（Ⅳ）前药几乎不产生耐药性[45]。同源重组修复在 DNA 损伤修复反应中也发挥了重要的作用。郭子建课题组设计合成了同时靶向同源修复相关基因 *RAD51* 和 *BRCA1* 及细胞凋亡基因 *MCL1* 的 Pt（Ⅳ）前药（化合物 **8** 和 **9**，见图 3），两 Pt（Ⅳ）前药对顺铂耐药的卵巢癌和非小细胞肺癌具有良好的治疗效果，体内荷瘤鼠肿瘤抑制实验结果显示肿瘤的体积减少了 80% 以上，不仅如此，两 Pt（Ⅳ）前药还表现出更低的毒性[46]。苟少华课题组将生物素与 Pt（Ⅱ）化合物相连进而形成多功能 Pt（Ⅳ）前药（化合物 **4**，见图 3），该化合物有效抑制了同源重组修复基因 *RAD51* 和非同源末端连接基因 *Ku70* 的表达，对顺铂耐药细胞表现出良好的细胞毒性作用。同时，该化合物利用生物素可以被恶性肿瘤表面的生物素特异性亲和蛋白结合并摄取的特性，使其更多地靶向肿瘤细胞，这在一定程度上降低了铂类化合物的全身毒性[47]。除此之外，碱基切除修复通路 JWA-XRCC1 也被当作靶点来设计合成逆转顺铂耐药的 Pt（Ⅳ）前药（化合物 **5** 和 **6**，见图 3），其对 A2780 顺铂耐药细胞的毒性相较于顺铂提高了 10 倍左右。DNA 损伤修复能力评价的实验结果表明，与顺铂相比，使用该 Pt（Ⅳ）前药的细胞 DNA 修复能力明显降低。体内肿瘤抑制实验的抑瘤率也达到 60%[48]，展现出较好的体内药效。虽然 DNA 损伤修复的途径很多，但是市面上针对该途径的抗肿瘤药物较少，将参与 DNA 损伤修复相关基因或蛋白为靶点进行 Pt（Ⅳ）前药的设计开发是一种很有希望克服顺铂耐药的策略。

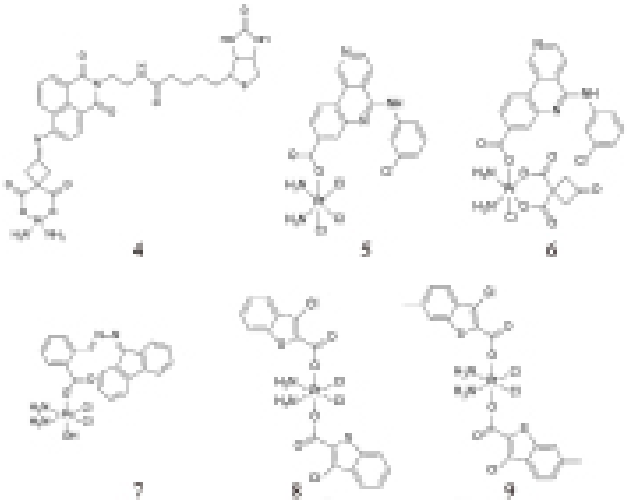


图 3　抑制 DNA 损伤修复的 Pt（Ⅳ）前药

Fig 3　Pt（Ⅳ）prodrugs inhibited DNA damage repair

2.2　靶向组蛋白去乙酰化酶

组蛋白去乙酰化酶（histone deacelytase，HDAC）对基因的表达调控发挥了重要作用，其通过催化组蛋白尾部赖氨酸残基去乙酰化而抑制转录的进行[49]，有研究表明 HDAC 的表达增加会诱导顺铂耐药的产生[50]。目前顺铂与 HDAC 抑制剂的联合治疗已经展现出逆转顺铂耐药的效

果[51]。基于此，开发含 HDAC 抑制剂的单靶向或多靶向作用的 Pt（Ⅳ）前药也成为研发的热点，这些 Pt（Ⅳ）前药（化合物 **10** ～ **14**，见图 4）在不同的细胞系中均展现出远优于顺铂的细胞毒性，尤其在耐药细胞系中表现出良好的细胞杀伤作用。除此之外，在进行 HDAC 活性、细胞凋亡、DNA 损伤情况等实验探究时，含 HDAC 抑制的 Pt（Ⅳ）前药也表现出较好的效果。这可能是由于 HDAC 抑制剂可以使更多的核 DNA 与铂类药物作用，从而提高铂类药物的疗效[52-54]。但是对于含 HDAC 抑制剂的 Pt（Ⅳ）前药的开发也需要进行综合评估，它们在体内是否同样能够拥有令人满意的药效以及其药效是否会优于联合用药的效果需要进一步探究。

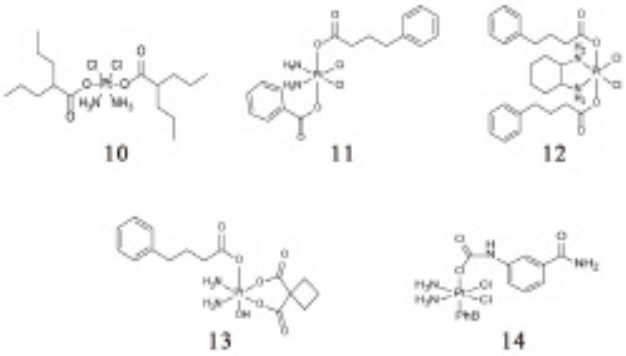


图 4 靶向 HDAC 的 Pt（Ⅳ）前药

Fig 4 Pt（Ⅳ）prodrugs targeting HDAC

2.3 靶向顺铂代谢

顺铂进入细胞后，会与 GSH 结合失去药效，继而被转运体转出细胞[55]。谷胱甘肽 -*S*- 转移酶（glutathione *S*-transferase，GSTs）是 GSH 合成过程中的关键酶，其高表达已被证明与顺铂耐药的产生相关[56]。抑制 GSTs 的活性可以减少 GSH 合成，进而减少铂类的代谢失活。GSTs 抑制剂与顺铂结合形成的 Pt（Ⅳ）前药（化合物 **15**，见图 5）可以在细胞内稳定释放 GSTs 抑制剂，从而减少细胞内 GSH 的含量，其体外疗效远优于顺铂，IC_{50} 值仅为 0.45 μmol • L^{-1}（顺铂为 7.65 μmol • L^{-1}）。同时，实验结果显示该 Pt（Ⅳ）前药还可以阻止肿瘤细胞的迁移和侵袭[57]。这表明，在肿瘤产生了顺铂耐药的情况下减少 GSH 对顺铂的解毒作用有望提高药物治疗指数，但其体内效果需要进一步验证。

2.4 改变 Pt（Ⅳ）前药的摄取过程

顺铂在肿瘤细胞中的积累减少是导致患者产生顺铂耐药的关键原因之一。由于顺铂脂溶性较差，因而 CTR1 对顺铂的转运在细胞对顺铂的摄取过程中有着重要的贡献。但在耐药细胞中，

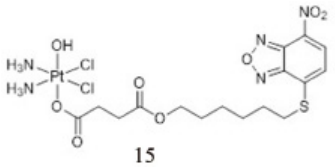


图 5 靶向 GSTs 的 Pt（Ⅳ）前药

Fig 5 Pt（Ⅳ）prodrugs targeting GSTs

CTR1 表达水平明显降低，耐药细胞中顺铂的摄取总量显著降低，进而使顺铂无法发挥药效[13]。基于此，提高 Pt（Ⅳ）前药的脂溶性可以增加耐药细胞对其摄取量，有希望克服顺铂耐药。以辛酸酯为轴向配体的双辛酸 Pt（Ⅳ）前药（化合物 **16**，见图 6）就在一定程度上增加了化合物的脂溶性，化合物 **16** 在顺铂敏感和耐药的卵巢癌细胞中的 IC_{50} 仅为顺铂的 6% 和 3%，在体外展示了良好的肿瘤细胞杀伤效果。在转运方式的探究中，与正常细胞相比，在 CTR1 表达沉默的卵巢癌细胞中，顺铂的摄取减少了 30%，而化合物 **16** 的摄取没有显著差异，这表明化合物 **16** 的摄取不依赖于 CTR1 而可能更多地依赖于其脂溶性的提高，摄取的增加提高了化合物 **16** 的药效[58]。除此之外，含有苯基侧链的 Pt（Ⅳ）前药（化合物 **17**）也展现出良好的治疗效果，其具有较高的亲脂性和相对较低的还原性，在体外展现出很好的抗肿瘤作用。在结肠癌模型小鼠中，化合物 **17** 以灌胃的方式给药后可以显著减小肿瘤体积，疗效甚至优于先前已经进入临床试验的赛特铂。这可能是由于该化合物在灌胃给药后结肠药物浓度更高而使细胞摄取更多。这也提示研究人员含有苯基侧链的 Pt（Ⅳ）前体药物有望被开发为用于治疗结直肠癌的口服 Pt（Ⅳ）前体药物[59]。上述结果可以看出，烷基链或苯基侧链的引入能够增加化合物的脂溶性并改变 Pt（Ⅳ）前药的细胞摄取方式，这种改变提高了铂类药物的细胞摄取，但是需要综合评估这种没有选择性的细胞摄取增加是否会对其他正常细胞产生较大毒性的问题。

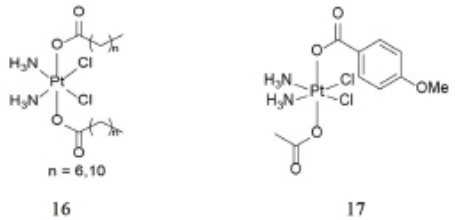


图 6 提高脂溶性的 Pt（Ⅳ）前药

Fig 6 Pt（Ⅳ）prodrugs improved fat solubility

2.5 提高 Pt（Ⅳ）前药的靶向性

肿瘤细胞与正常细胞的代谢方式不同，其细胞膜表面蛋白的表达也有所不同。因此除了增加

脂溶性，增加膜蛋白（如葡萄糖转运蛋白、谷氨酰胺转运蛋白等）靶向基团也是一种设计方向。根据“瓦伯格效应”，研究人员将六碳糖、五碳糖或糖类似物与顺铂或奥沙利铂连接形成新的 Pt（Ⅳ）前药（化合物 **18**、**19**、**20**，见图 7），这些 Pt（Ⅳ）前药可以被葡萄糖转运体转运，在体外虽表现出较好的效果，但是体内药效不尽如人意 [60-62]。同样，利用“第二瓦伯格效应”将谷氨酰胺及其类似物与顺铂连接形成 Pt（Ⅳ）前药，谷氨酰胺为配体的 Pt（Ⅳ）前药（化合物 **21**，见图 7）虽然在转运过程中表现出靶向性，但是其药效没有明显的提高。而谷氨酰胺类似物为配体的 Pt（Ⅳ）前药（化合物 **22**，见图 7）表现出较好的药效，但是其药效的发挥更多是依赖于化合物脂溶性的提高而非靶向转运 [63]。因此，虽然设计开发靶向细胞膜蛋白转运的 Pt（Ⅳ）前药是一种合理的设想，但是目前的实验结果并不能达到令人满意的效果。究竟是设计方向本身的问题还是未寻找到更佳的配体仍需要进一步探究。

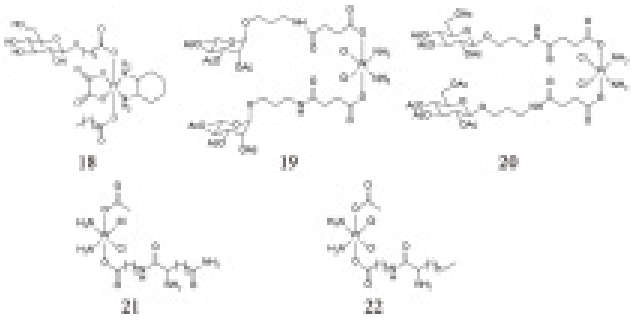


图 7　靶向葡萄糖糖转运体的 Pt（Ⅳ）前药（**18**、**19**、**20**）及靶向谷氨酰胺受体的 Pt（Ⅳ）前药（**21**、**22**）

Fig 7　Pt（Ⅳ）prodrugs targeting glucose transporters（**18**，**19**，and **20**）and Pt（Ⅳ）prodrugs targeting glutamine receptors（**21** and **22**）

人血清白蛋白（human serum albumin，HSA）是循环系统中最丰富的蛋白质之一，在多种内、外源性物质的运输、分布和代谢中发挥关键作用 [64]。研究人员也对能够与 HSA 结合的 Pt（Ⅳ）前药的开发进行了尝试。在体内，Pt（Ⅳ）前药与 HSA 结合，结合物可以延长 Pt（Ⅳ）前药在体内的循环时间，同时利用肿瘤细胞营养需求增加而胞吞率提高和肿瘤的高通透性和滞留效应（enhanced permeability and retention effect，EPR），可使到达肿瘤细胞的 Pt（Ⅳ）前药总量增加而提高药效 [65]。十六烷基链是可以与 HSA 有效结合的基团，将十六烷基链与顺铂化学键合后形成的 Pt（Ⅳ）前药（化合物 **23**，见图 8）在顺铂耐药卵巢癌细胞中的细胞毒性增加了 60 倍左右并诱导产生了更多的细胞凋亡。与此同时，研究人员通过计算机分子对接和体外亲和力实验对该 Pt（Ⅳ）前药与 HSA 的结合能力进行了验证，结果显示该 Pt（Ⅳ）前药可以与 HSA 紧密结合。而后续的体外透析实验结果显示 90% 的 Pt（Ⅳ）前药可以从其与 HSA 的结合物中释放。但是该 Pt（Ⅳ）前药的体内药效仍需要进一步探究 [66]。

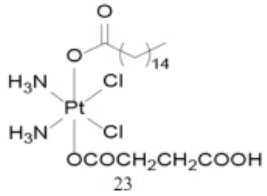


图 8　与 HAS 结合的 Pt（Ⅳ）前药

Fig 8　Pt（Ⅳ）prodrug combined with HSA

除了合成新的 Pt（Ⅳ）前药，不同制剂也是改变铂类药物转运方式的策略之一。纳米制剂通常是研究人员的首选，它通过胞吞的方式进入细胞，在顺铂耐药的细胞中不受 CTR1 下调的影响。同时配合 EPR 效应，能够使得纳米颗粒包裹的 Pt（Ⅳ）前药有效地运送到肿瘤细胞中，从而提高药物的疗效并克服耐药性。已经有不少纳米载体 -Pt（Ⅳ）前药在体外表现出良好的效果，其作用靶点也是多种多样的 [67-68]。具有光激活特性的携带 Pt（Ⅳ）前药的 HSA 纳米载体系统对 A2780 敏感株和耐药株的凋亡诱导能力也均有所增强。但是该研究还未进行体内疗效的验证 [69]。除此之外，研究人员也尝试利用纳米制剂的方式减少细胞内 GSH 的含量来避免铂类的代谢性失活。二硫酰胺中二硫键可以结合 GSH，利用这种原理设计的纳米颗粒可以诱导顺铂耐药的卵巢癌细胞出现明显凋亡。体内药效结果显示该纳米颗粒能有效抑制顺铂耐药异种移植瘤的生长，抑瘤率可达到 83.32%[70]。

3　结语

虽然顺铂在临床上已经使用了 40 多年，但其非靶向性和获得性 / 固有耐药严重限制了临床应用。耐药产生的原因是多方面的，除了细胞转运和代谢导致的顺铂药效降低，表观遗传学和肿瘤微环境的变化也是肿瘤对顺铂产生耐药的原因。Pt（Ⅳ）前药通过一系列配体修饰来改变药物转运、增加药物的肿瘤细胞靶向性、改变药物代谢途径或与其他耐药靶点基团发生作用，从而发挥药效，克服顺铂耐药（见表 1）。除此之外，纳米系统的应用也为逆转顺铂耐药的 Pt（Ⅳ）前药的开发提供了更多的可能。从目前的研究情况来看，以抑制 DNA 损伤修复反应为初衷设计合成的 Pt（Ⅳ）前药展现出了良好的效果。而以改变药物转运或增加药物的靶向性为目的合成的 Pt（Ⅳ）前药虽然数量较多，但大都没有展现出预期的药效。在其他类型的化合物研发中，以表观遗传学

和肿瘤微环境中的相关分子为靶点设计开发更有效的抗肿瘤药物已经受到越来越多的重视，而这样设计开发的 Pt（Ⅳ）前药还相对较少。随着对肿瘤细胞产生顺铂耐药原因的深入研究，以表观遗传学和肿瘤微环境中的相关分子为靶点设计开发能够逆转顺铂耐药的 Pt（Ⅳ）前药也应该受到更多的关注。除此之外，虽然目前已有许多的 Pt（Ⅳ）前药被合成出来，但是对他们的研究大部分只停留在体外水平，缺少后续的体内药效和安全性评价。

本文基于顺铂耐药的不同分子机制，从多种途径提供了克服顺铂耐药 Pt（Ⅳ）前药的设计策略，以期能够为未来逆转耐药 Pt（Ⅳ）前药的设计和开发提供一定的借鉴。

表 1 不同种类逆转顺铂耐药的 Pt (Ⅳ) 前药

Tab 1 Different Pt (Ⅳ) prodrugs reversing cisplatin resistance

设计思路	化合物	体外 / 体内药效
增加细胞凋亡的 Pt（Ⅳ）前药 [40-42]	**1**、**2**、**3**	(**1**) IC_{50} = (0.19±0.038) μmol • L^{-1} (A2780CP/Cl-16，24 h)；(**2**) IC_{50} = (1.6±0.5) μmol • L^{-1} (A549/DDP，72 h)；(**3**) IC_{50} = (4.2±0.6) μmol • L^{-1} (HeLa，24 h)
靶向 HDAC[52-54]	**10**、**11**、**12**、**13**、**14**	(**10**) IC_{50} = (0.3±0.1) μmol • L^{-1} (A2780/DDP，24 h)；(**11**) IC_{50} = (3.1±1.4) μmol • L^{-1} (A2780/DDP，24 h)；(**12**) IC_{50} = (1.54±0.27) μmol • L^{-1} (A2780/DDP，72 h)；(**13**) IC_{50} = (13.5±3.9) μmol • L^{-1} (LoVo，72 h)；(**14**) IC_{50} = (4.8±1.28) μmol • L^{-1} (A2780/DDP，72 h)
抑制 DNA 损伤修复 [45-48]	**4**、**5**、**6**、**7**、**8**、**9**	(**4**) IC_{50} = (15.1±0.89) μmol • L^{-1} (A2780/DDP，48 h)；IC_{50} = (11.6±0.71) μmol • L^{-1} (A549/DDP，48 h)；(**5**) IC_{50} = (2.92±0.07) μmol • L^{-1} (A2780/DDP，72 h)；ID8 荷瘤鼠肿瘤抑制率约 66%；(**6**) IC_{50} = (8.48±0.15) μmol • L^{-1} (A2780/DDP，72 h)；ID8 荷瘤鼠肿瘤抑制率约 40%；(**7**) IC_{50} = (0.3±0.02) μmol • L^{-1} (A2780/DDP，72 h)；IC_{50} = (0.29±0.02) μmol • L^{-1} (A549/DDP，72 h)；(**8**) IC_{50} = (0.4±0.1) μmol • L^{-1} (A2780/DDP，72 h)；IC_{50} = (1.4±0.4) μmol • L^{-1} (A549/DDP，72 h)；A549 荷瘤鼠肿瘤体积减少 80%；(**9**) IC_{50} = (0.7±0.2) μmol • L^{-1} (A2780/DDP，72 h)；IC_{50} = (0.8±0.1) μmol • L^{-1} (A549/DDP，72 h)；A549 荷瘤鼠肿瘤体积减少 93%
靶向 GSTs[57]	**15**	IC_{50} = (0.45±0.02) μmol • L^{-1} (U2OS，72 h)
改变脂溶性 [58-59]	**16**、**17**	(**16**) IC_{50} = 0.01 μmol • L^{-1} (n = 6；A2780/DDP，24 h)；IC_{50} = 0.013 μmol • L^{-1} (n = 10；A2780/DDP，24 h)；(**17**) IC_{50} = (19.09±5.62) μmol • L^{-1} (A2780/DDP，72 h)；结肠癌荷瘤鼠的平均肿瘤直径明显减小
靶向膜转运蛋白 [60-63]	**18**、**19**、**20**、**21**、**22**	(**18**) IC_{50} = (1.10±1.69) μmol • L^{-1} (A549/DDP)；(**19**) IC_{50} = (6.18±1.70) μmol • L^{-1} (Hela，48 h)；(**20**) IC_{50} = (10.32±1.34) μmol•L^{-1} (Hela，48 h)；(**21**) IC_{50} = (100.2±8.8) μmol • L^{-1} (A549，72 h，培养基中添加 0.5 mmol • L^{-1} 谷氨酰胺)；(**22**) IC_{50} = (14.3±2.3) μmol • L^{-1} (A549，72 h，培养基中添加 0.5 mmol • L^{-1} 谷氨酰胺)
与 HSA 结合的 Pt（Ⅳ）前药 [66]	**23**	IC_{50} = (0.10±0.02) μmol • L^{-1} (A2780CP70，72 h)

参考文献

[1] Rosenberg B，Camp LV，Krigas TS. Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode [J]. Nature，1965，205：698-699.

[2] Ghosh S. Cisplatin：the first metal based anticancer drug [J]. Bioorg Chem，2019，88：102925.

[3] Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy [J]. Nat Rev Cancer，2007，7（8）：573-584.

[4] Chen SH，Chang JY. New insights into mechanisms of cisplatin resistance：from tumor cell to microenvironment [J]. Int J Mol Sci，2019，20（17）：4136.

[5] Galluzzi L，Senovilla L，Vitale I，et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance[J]. Oncogene，2012，31（15）：1869-1883.

[6] Rybak LP，Mukherjea D，Ramkumar V. Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention [J]. Semin Hear，2019，40（2）：197-204.

[7] Volarevic V，Djokovic B，Jankovic MG，et al. Molecular mechanisms of cisplatin-induced nephrotoxicity：a balance on the knife edge between renoprotection and tumor toxicity [J]. J Biom Sci，2019，26（1）：25.

[8] Park SB，Lin CS，Krishnan AV，et al. Oxaliplatin-induced neurotoxicity：changes in axonal excitability precede development of neuropathy [J]. Brain，2009，132（Pt 10）：2712-2723.

[9] Hu L，Lv QL，Guo Y，et al. Genetic variation of CYP3A5 influences paclitaxel/carboplatin-induced toxicity in Chinese epithelial ovarian cancer patients [J]. J Clin Pharmacol，2016，56（3）：349-354.

[10] Bruijnincx PC，Sadler PJ. New trends for metal complexes with anticancer activity [J]. Curr Opin Chem Biol，2008，12（2）：197-206.

[11] Zxa C，Zw B，Zda C，et al. Recent advances in the synthesis，stability，and activation of platinum（Ⅳ）anticancer prodrugs [J]. Coordin Chem Rev，2021，442：213991.

[12] Wexselblatt E，Gibson D. What do we know about the reduction of Pt（Ⅳ）pro-drugs? [J]. J Inorg Biochem，2012，117（none）：220-229.

[13] Ravera M，Gabano E，McGlinchey MJ，et al. Pt（Ⅳ）antitumor prodrugs：dogmas，paradigms，and realities [J]. Dalton Trans，2022，51（6）：2121-2134
[14] Gibson D. Platinum（Ⅳ）anticancer agents：are we en route to the holy grail or to a dead end? [J]. J Inorg Biochem，2021，217：111353.
[15] Tchounwou PB，Dasari S，Noubissi FK，et al. Advances in our understanding of the molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer therapy [J]. J Exp Pharmacol，2021，2021（13）：303-328.
[16] Mezencev R，Matyunina LV，Wagner GT，et al. Acquired resistance of pancreatic cancer cells to cisplatin is multifactorial with cell context-dependent involvement of resistance genes [J]. Cancer Gene Ther，2016，23（12）：446-453.
[17] Lv P，Man S，Xie L，et al. Pathogenesis and therapeutic strategy in platinum resistance lung cancer [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer，2021，1876（1）：188577.
[18] Li T，Peng J，Zeng F，et al. Association between polymorphisms in CTR1，CTR2，ATP7A，and ATP7B and platinum resistance in epithelial ovarian cancer [J]. Int J Clin Pharmacol Ther，2017，55（10）：774-780.
[19] Makovec T. Cisplatin and beyond：molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy [J]. Radiol Oncol，2019，53（2）：148-158.
[20] Chen Y，Zhou H，Yang S，et al. Increased ABCC2 expression predicts cisplatin resistance in non-small cell lung cancer [J]. Cell Biochem Funct，2021，39（2）：277-286.
[21] Ferreira JA，Peixoto A，Neves M，et al. Mechanisms of cisplatin resistance and targeting of cancer stem cells：adding glycosylation to the equation [J]. Drug Resist Updat，2016，24：34-54.
[22] Lee YY，Choi CH，Do IG，et al. Prognostic value of the copper transporters，CTR1 and CTR2，in patients with ovarian carcinoma receiving platinum-based chemotherapy [J]. Gynecol Oncol，2011，122（2）：361-365.
[23] Naka A，Takeda R，Shintani M，et al. Organic cation transporter 2 for predicting cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy response in gastric cancer [J]. Am J Cancer Res，2015，5（7）：2285-2293.
[24] Oguri T，Kunii E，Fukuda S，et al. Organic cation transporter 6 directly confers resistance to anticancer platinum drugs [J]. Biomedical Reports，2016，5（5）：639-643.
[25] Selvakumaran M，Pisarcik DA，Bao R，et al. Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair pathway in ovarian cancer cell lines [J]. Cancer Res，2003，63（6）：1311-1316.
[26] Rocha CRR，Silva MM，Quinet A，et al. DNA repair pathways and cisplatin resistance：an intimate relationship [J]. Clinics（Sao Paulo），2018，73（suppl 1）：e478s.
[27] Duan M，Ulibarri J，Liu KJ，et al. Role of nucleotide excision repair in cisplatin resistance [J]. Int J Mol Sci，2020，21（23）：9248.
[28] Shen DW，Pouliot LM，Hall MD，et al. Cisplatin resistance：a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes [J]. Pharmacol Rev，2012，64（3）：706-721.
[29] Wang Y，Bernhardy AJ，Cruz C，et al. The BRCA1-Delta11q alternative splice isoform bypasses germline mutations and promotes therapeutic resistance to PARP inhibition and cisplatin [J]. Cancer Res，2016，76（9）：2778-2790.
[30] Zhou S，Bai ZL，Xia D，et al. FTO regulates the chemo - radiotherapy resistance of cervical squamous cell carcinoma（CSCC）by targeting β-catenin through mRNA demethylation [J]. Mol Carcinogen，2018，57（5）：590-597.
[31] Chan DW，Lam WY，Chen F，et al. Genome-wide DNA methylome analysis identifies methylation signatures associated with survival and drug resistance of ovarian cancers [J]. Clin Epigenetics，2021，13（1）：142.
[32] Hu X，Meng Y，Xu L，et al. Cul4 E3 ubiquitin ligase regulates ovarian cancer drug resistance by targeting the anti-apoptotic protein BIRC3 [J]. Cell Death Dis，2019，10（2）：104.
[33] Erin N，Grahovac J，Brozovic A，et al. Tumor microenvironment and epithelial mesenchymal transition as targets to overcome tumor multidrug resistance [J]. Drug Resistance Updates，2020，53（588-602）：100715.
[34] Skolekova S，Matuskova M，Bohac M，et al. Cisplatin-induced mesenchymal stromal cells-mediated mechanism contributing to decreased antitumor effect in breast cancer cells [J]. Cell Commun Signal，2016，14（1）：1.
[35] Ashrafizadeh M，Zarrabi A，Hushmandi K，et al. Association of the epithelial-mesenchymal transition（EMT）with cisplatin resistance [J]. Int J Mol Sci，2020，21（11）：4002.
[36] Chang CL，Hsu YT，Wu CC，et al. Dose-dense chemotherapy improves mechanisms of antitumor immune response [J]. Cancer Res，2013，73（1）：119-127.
[37] Khan MA，Vikramdeo KS，Sudan SK，et al. Platinum-resistant ovarian cancer：from drug resistance mechanisms to liquid biopsy-based biomarkers for disease management [J]. Semin Cancer Biol，2021，77：99-109.
[38] Sabapathy K，Lane DP. Understanding p53 functions through p53 antibodies [J]. J Mol Cell Biol，2019，11（4）：317-329.
[39] Xie X，He G，Siddik ZH. Functional activation of mutant p53 by platinum analogues in cisplatin-resistant cells is dependent on phosphorylation [J]. Mol Cancer Res，2017，15（3）：328-339.
[40] Khokhar AR，Al-Baker S，Siddik ZH. Synthesis and antitumor activity of 1，2-diaminocyclohexane platinum（Ⅳ）complexes [J]. J Inorg Biochem，1994，54（1）：39-47.
[41] Ma L，Ma R，Wang Y，et al. Chalcoplatin，a dual-targeting and p53 activator-containing anticancer platinum（Ⅳ）prodrug with unique mode of action [J]. Chem Commun（Camb），2015，51（29）：6301-6304.
[42] Cheng Q，Shi H，Wang H，et al. Asplatin enhances drug efficacy by altering the cellular response [J]. Metallomics，2016，8（7）：672-678.
[43] Li X，Liu Y，Tian H. Current developments in Pt（Ⅳ）prodrugs conjugated with bioactive ligands [J]. Bioinorg Chem Appl，2018，2018：8276139.

[44] Zhao W，Steinfeld JB，Liang F，et al. BRCA1-BARD1 promotes RAD51-mediated homologous DNA pairing [J]. Nature，2017，550（7676）：360-365.

[45] Wang Z，Xu Z，Zhu G. A platinum（Ⅳ）anticancer prodrug targeting nucleotide excision repair to overcome cisplatin resistance [J]. Angew Chem Int Ed Engl，2016，55（50）：15564-15568.

[46] Zhang SR，Zhong XM，Yuan H，et al. Interfering in apoptosis and DNA repair of cancer cells to conquer cisplatin resistance by platinum（Ⅳ）prodrugs [J]. Chem Sci，2020，11（15）：3829-3835.

[47] Wang X，Wang YJ，Gou SH，et al. A trifunctional Pt（Ⅱ）complex alleviates the NHEJ/HR-related DSBs repairs to evade cisplatin-resistance in NSCLC [J]. Bioorg Chem，2020，104：104210.

[48] Chen FH，Pei SN，Wang X，et al. Emerging JWA-targeted Pt（Ⅳ）prodrugs conjugated with CX-4945 to overcome chemo-immune-resistance [J]. Biochem Biophys Res Commun，2020，521（3）：753-761.

[49] Berdasco M，Esteller M. Clinical epigenetics：seizing opportunities for translation [J]. Nat Rev Genet，2019，20（2）：109-127.

[50] Wang L，Liu X，Ren Y，et al. Cisplatin-enriching cancer stem cells confer multidrug resistance in non-small cell lung cancer via enhancing TRIB1/HDAC activity [J]. Cell Death Dis，2017，8（4）：e2746.

[51] Jin KL，Park JY，Noh EJ，et al. The effect of combined treatment with cisplatin and histone deacetylase inhibitors on HeLa cells [J]. J Gynecol Oncol，2010，21（4）：262-268.

[52] Almotairy ARZ，Montagner D，Morrison L，et al. Pt（Ⅳ）pro-drugs with an axial HDAC inhibitor demonstrate multimodal mechanisms involving DNA damage and apoptosis independent of cisplatin resistance in A2780/A2780cis cells [J]. J Inorg Biochem，2020，210：111125.

[53] Petruzzella E，Sirota R，Solazzo I，et al. Triple action Pt（Ⅳ）derivatives of cisplatin：a new class of potent anticancer agents that overcome resistance [J]. Chem Sci，2018，9（10）：4299-4307.

[54] Babu T，Sarkar A，Karmakar S，et al. Multiaction Pt（Ⅳ）carbamate complexes can codeliver Pt（Ⅱ）drugs and amine containing bioactive molecules [J]. Inorg Chem，2020，59（7）：5182-5193.

[55] Cadoni E，Valletta E，Caddeo G，et al. Competitive reactions among glutathione，cisplatin and copper-phenanthroline complexes [J]. J Inorg Biochem，2017，173：126-133.

[56] Han T，Zhu X，Wang J，et al. Establishment and characterization of a cisplatin-resistant human osteosarcoma cell line [J]. Oncol Rep，2014，32（3）：1133-1139

[57] Chen H，Chen F，Wang X，et al. Multifunctional Pt（Ⅳ）complexes containing a glutathione *S*-transferase inhibitor lead to enhancing anticancer activity and preventing metastasis of osteosarcoma cells [J]. Metallomics，2019，11（2）：317-326.

[58] Ratzon E，Najajreh Y，Salem R，et al. Platinum（Ⅳ）-fatty acid conjugates overcome inherently and acquired cisplatin resistant cancer cell lines：an in-vitro study [J]. BMC Cancer，2016，16：140.

[59] Yap SQ，Chin CF，Thng AHH，et al. Finely tuned asymmetric platinum（Ⅳ）anticancer complexes：structure-activity relationship and application as orally available prodrugs [J]. Chem Med Chem，2017，12（4）：300-311

[60] Wang QP，Huang Z，Ma J，et al. Design，synthesis and biological evaluation of a novel series of glycosylated platinum（Ⅳ）complexes as antitumor agents [J]. Dalton Trans，2016，45（25）：10366-10374.

[61] Wang H，Yang X，Zhao C，et al. Glucose-conjugated platinum（Ⅳ）complexes as tumor-targeting agents：design，synthesis and biological evaluation [J]. Bioorg Med Chem，2019，27（8）：1639-1645.

[62] Ma J，Wang Q，Yang X，et al. Glycosylated platinum（Ⅳ）prodrugs demonstrated significant therapeutic efficacy in cancer cells and minimized side-effects [J]. Dalton Trans，2016，45（29）：11830-11838.

[63] Ravera M，Gabano E，Tinello S，et al. May glutamine addiction drive the delivery of antitumor cisplatin-based Pt（Ⅳ）prodrugs? [J]. J Inorg Biochem，2016，167：27-35.

[64] Camargo CR，Caruso ÍP，Gutierrez SJC，et al. Spectral and computational features of the binding between riparins and human serum albumin [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc，2018，190：81-88.

[65] Garmann D，Warnecke A，Kalayda GV，et al. Cellular accumulation and cytotoxicity of macromolecular platinum complexes in cisplatin-resistant tumor cells [J]. J Control Release，2008，131（2）：100-106.

[66] Zheng YR，Suntharalingam K，Johnstone TC，et al. Pt（Ⅳ）prodrugs designed to bind non-covalently to human serum albumin for drug delivery [J]. J Am Chem Soc，2014，136（24）：8790-8798.

[67] Min Y，Mao CQ，Chen S，et al. Combating the drug resistance of cisplatin using a platinum prodrug based delivery system [J]. Angew Chem Int Ed Engl，2012，51（27）：6742-6747.

[68] Zhang W，Shen J，Su H，et al. Co-delivery of cisplatin prodrug and chlorin e6 by mesoporous silica nanoparticles for chemo-photodynamic combination therapy to combat drug resistance [J]. Acs Appl Mater Interfaces，2016，8（21）：13332-13340.

[69] Li X，Mu J，Liu F，et al. Human transport protein carrier for controlled photoactivation of antitumor prodrug and real-time intracellular tumor imaging [J]. Bioconjugate Chem，2015，26（5）：955-961.

[70] Ling X，Chen X，Riddell IA，et al. Glutathione-scavenging poly（disulfide amide）nanoparticles for the effective delivery of pt（Ⅳ）prodrugs and reversal of cisplatin resistance [J]. Nano Lett，2018，18（7）：4618-4625.

（收稿日期：2021-12-31；修回日期：2022-02-19）

酵母微胶囊包埋新技术及药效评价的研究进展

贾丽娟[1]，戴智强[1]，高青青[1]，刘玉璇[1*]，商学良[2]，国大亮[1*]（1. 天津中医药大学，天津　301617；2. 华北理工大学，河北　唐山　063210）

摘要：微囊化是一种固定化技术，通过提供一个物理屏障克服外界环境对包封分子的影响，从而提高包合物的稳定性。利用酵母细胞作为包埋壁材是靠其自身的吸附性能来完成，无需引入其他化学试剂，具有安全、无毒的优点，且获得的微胶囊产品大小均一，生物相容性好，易生物降解。酵母微胶囊法作为微胶囊技术的一种新型制备方法，具有安全有效、易于获取的优点，故酵母包封技术越来越受到人们的青睐。当前，酵母微胶囊技术应用领域十分广泛，本文主要从酵母微胶囊技术包埋的不同囊芯以及药效评价方面进行综述，以期为微胶囊技术的进一步发展提供参考。

关键词：微胶囊技术；酵母；芯材；包埋技术；药效评价

中图分类号：R94　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0871-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.023

Research progress of embedding technology，therapeutic efficacy in yeast microencapsulation

JIA Li-juan[1], DAI Zhi-qiang[1], GAO Qing-qing[1], LIU Yu-xuan[1*], SHANG Xue-liang[2], GUO Da-liang[1*]
(1. *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617; 2. *North China University of Science and Technology*, *Tangshan Hebei* 063210)

Abstract: As a pharmaceutical method, microencapsulation promotes the stability of the inclusion compound by providing a physical barrier to overcome the influence of the external environment on the encapsulated molecules. Yeast is a commonly used food-grade industrial microorganism. The use of yeast cells as the embedding wall material is accomplished by its own adsorption performance without introducing other chemical reagents. It is safe and non-toxic. The obtained microcapsule products have uniform size, good biocompatibility, and easy biodegradation. As a new preparation method of microencapsulation, yeast microencapsulation is safe, effective and easy to obtain, for which reason it is more and more favored. Currently, yeast microcapsule technology is widely used. This article mainly reviewed the different capsule cores embedded in yeast microcapsule technology and evaluated the drug efficacy to provide a scientific basis for the further development of microcapsulation.

Key words: microcapsulation; yeast; core material; embedding technology; drug efficacy evaluation

20 世纪 30 年代，美国一家渔业公司首次制备出鱼肝油明胶微胶囊，从此微胶囊技术正式进入大众的视野。微胶囊作为一种微型容器，可用来包封固体、液体和气体。微胶囊包埋是建立芯材和壁材间功能性障碍的过程，以避免化学和物理反应，并保持芯材的生物活性和理化性质[1]。历经几十年的发展变化，微胶囊技术已日趋成熟，并已广泛应用在食品、医药、化工、农业等多个领域。当前，制备微胶囊的方法有很多，文章重点对微胶囊的新型制备方法——酵母微胶囊法进行综述，以期为微胶囊技术的后续发展提供参考。

曾经对比多种微生物（如霉菌、原生虫、酵母菌）作为壁材的包埋效果，结果发现采用酵母微胶囊包埋效果最理想[2]。对于所有的包封体系，

作者简介：贾丽娟，女，硕士研究生，主要从事中药药剂研究，email：15350736379@163.com　*通信作者：国大亮，男，主要从事中药制剂研究，email：silenthawk@126.com；刘玉璇，男，教授，主要从事中药制剂研究，email：lsrlyx2008@126.com

包封分子与基质之间的相互作用对其稳定性和生物利用度都有着重要的影响。而经酵母包埋后的活性物质稳定性、生物利用度、溶解性和缓释性均有所提高[3]。酵母是最常用的食品级工业微生物之一。酵母细胞以分散的单细胞状态存在，其完整的细胞壁和细胞膜结构具有一定的强度和通透性，从而使酵母细胞具有很好的吸附性能，可作为一种新型的微胶囊壁材。酵母细胞有一层磷脂膜，因此它可以充当脂质体，既可以封装疏水化合物，也可以封装亲水化合物[4]。研究表明香料、精油、农药、脂溶性维生素和生物活性物质等成分在加工或储存过程中容易因氧化而失去作用[5-6]，采用酵母包封法可有效克服不同种类生物活性化合物的氧化问题。

1 酵母微胶囊包埋新技术

1.1 酵母微胶囊包埋油脂

微胶囊包埋技术有利于控制精油的挥发性，可以改善油脂的水溶性、化学稳定性和释放特性，并保持其生物活性。微胶囊化的植物油和精油更利于加工和储藏，可以延长富含油脂产品的货架期[7]。细胞壁作为细胞的保护屏障，可以降低对药物的敏感性，细胞壁的主要成分和与细胞壁有关的酶可作为精油活性成分的重要作用位点[8]。目前，研究者主要利用酵母微胶囊技术包埋油脂类化合物，包埋后的油脂从液态转化为粉末状，挥发性降低，生物稳定性提高。

马齿苋籽油是 ω-3 脂肪酸的潜在营养来源，易氧化。Kavosi 等[9]采用酵母微胶囊包埋技术解决此类问题，把马齿苋籽油作为囊芯，将其包裹在包覆羧甲基纤维素（CMC）的酿酒酵母细胞中，研究贮藏 30 d 后的氧化稳定性。结果表明制备酵母微胶囊可增加马齿苋籽油的稳定性。鱼油富含多种不饱和脂肪酸，有很好的营养价值，但易氧化，且有强烈刺激性气味，限制了其应用。Adrian 等[10]研究酵母微胶囊包埋鱼油技术，对酵母细胞预处理的各种方法（自溶预处理、化学促进自溶、酶促细胞壁消化）进行评价，从温度、搅拌速度和乳化剂添加量三个方面对酵母细胞中鱼油的微胶囊化进行研究和优化，并验证其稳定性。实验表明包封后的鱼油稳定性明显提高，不良气味被有效掩盖。Karaman 等[11]应用酵母细胞对没食子酸进行包封，并研究质壁分离处理和溶剂类型的包埋介质对包封性能、生物活性性质、形态 - 构象特征和在模拟胃和肠介质中的释放行为的影响。结果表明，包封介质的溶剂类型对包封率和生物活性参数有显著影响，质壁分离处理的酵母细胞微胶囊可为食品和制药工业提供控制释放特性。Karaman 等[12]利用酵母细胞抑制了黑孜然籽油中百里香醌的降解。薄荷精油作为从薄荷中提取出来的物质，具有很好的抗菌、抗氧化性能。调查发现，薄荷精油对一些农作物害虫具有良好的防治效果，基于此，Kavetsou 等[13]将薄荷精油包封在酵母细胞载体中，制备出一种绿色、环保的杀虫农药。

除了上述提到的几种油脂外，近几年来，中国酵母微胶囊技术也用于包埋其他油脂，部分研究如表 1 所示。

表 1 酵母微胶囊包埋的油脂

Tab 1 Yeast microencapsulated oils

文献	芯材	包埋率 /%
王娣等 2013[14]	百里香精油	86.71
刘立志等 2015[15]	石榴籽油	53.35
刘鑫等 2017[2]	花椒精油	68.71
荆佳伊等 2017[16]	野木瓜籽油	39.56
杨军君 2018[17]	红瓜子油	41.42
崔凤烨 2020[18]	蕲艾挥发油	85.71

1.2 酵母微胶囊包埋黄酮

槲皮素是从芦丁中提取出的一种多羟基黄酮类化合物，具有抗氧化及清除自由基的作用，还具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤、降糖及免疫调节等作用[19]。但疏水性、在生理介质中不稳定、胃肠吸收不佳等使其功效受限[20]。近年来，有学者使用酵母微胶囊技术对槲皮素进行包埋，以期改善槲皮素的稳定性。Pham-Hoang 等[21]研究酵母细胞壁包埋槲皮素，在 4 个月贮藏期内的分子稳定性，并利用紫外 - 可见分光光谱法和时间相关单光子计数技术评价槲皮素与酵母胶囊之间的相互作用，证实了酵母包埋的优点。黄秋葵是一种富含黄酮类化合物的植物，苏平等[22]采用酵母微胶囊技术包封黄秋葵黄酮，并对振荡时间、温度和芯壁比三个因素进行优化，优化后的包埋率为 64.2%，抗氧化效果为黄秋葵花黄酮微胶囊＞BHT ＞纯化后的黄酮，且黄酮微胶囊表现出很好的缓释效应。

1.3 酵母微胶囊包埋多糖

多糖又称为多聚糖，是由 10 个以上的单糖通过不同类型糖苷键聚合而成的生物大分子，广泛存在于动植物和微生物中[23]。已有研究表明植物多糖具有多种生物活性，如抗氧化、抗炎、免疫调节、抗肿瘤、降血糖、保肝、降血脂和调节

肠道菌群[24-31]等，且无毒副作用，逐渐成为食品科学、天然药物、生物化学与生命科学研究的热点。但多糖易吸湿、对酸碱、金属离子不稳定，将多糖微囊化是对现有问题的一种潜在解决方法。洪自兵等[32]利用酵母微胶囊技术包埋决明子多糖，有效延长了其药效，未被包埋的决明子多糖和包埋后的决明子多糖酵母均可以抑制 $HepG_2$ 细胞的生长，但后者比前者抑制效果更好。

1.4 酵母微胶囊包埋生物碱

小檗碱，又名黄连素，是从传统中药黄连中提取出的一种季铵型异喹啉生物碱[33]。研究表明，小檗碱具有良好的抗肿瘤、降血脂、治疗糖尿病、抗动脉粥样硬化、抗脑缺血、神经保护、抗炎、抗凋亡等作用[34-38]。然而小檗碱的水溶性差，对环境条件敏感，使其在许多行业中无法应用。Salari 等[39]以冻干的质壁分离和非质壁分离的酵母细胞作为载体对小檗碱进行包埋，通过差示扫描量热法（DSC）、傅里叶变换红外光谱（FT-IR）和荧光显微镜对微胶囊进行表征，对小檗碱微胶囊进行研究。结果表明，酵母微胶囊装载有高达（40.2±0.2）% 的小檗碱且小檗碱主要通过与酵母细胞膜和细胞壁的疏水相互作用定位于细胞内。

1.5 酵母微胶囊包埋维生素

维生素 D_3 是一种用于佝偻病、骨软化症与骨质疏松症等代谢性骨疾病治疗的重要药物，然而，维生素 D_3 化学性质极不稳定，水溶性差，且易受环境因素影响。Dadkhodazade 等[40]利用酵母细胞壁包封维生素 D_3，模拟在胃肠道中的释放研究，结果表明，载维生素 D_3 微囊在胃中表现出持续和缓慢的释放，并且能克服胃酸介质的影响，提高了维生素 D_3 的稳定性。因此这种酵母微囊包封技术有望产生一种新型包封维生素的载体。

1.6 酵母微胶囊包埋多酚

酚类化合物因其对人类健康的有益影响而受到关注。白藜芦醇作为纯天然多酚类化合物，以顺式和反式两种异构体的形式存在。Shi 等[41]首次成功地将白藜芦醇包埋在酵母细胞壁中，并比较了非包封白藜芦醇和包封后白藜芦醇对 DPPH 自由基的清除能力。结果证明酵母包封的白藜芦醇具有良好的稳定性，DPPH 自由基清除能力增强。殷佳雅等[42]研究酵母微囊化技术包埋茶多酚，以避免外界环境影响使茶多酚结构改变或活性消失。姜黄素作为一种酸性多酚类物质，其水溶性差，对加工和储存条件要求严格，易降解，药物利用率低。Medeiros 等[43]利用酵母包埋技术缓解姜黄素的降解，提高其稳定性，结果显示经酵母包埋后的姜黄素其光化学稳定性提高了 5.7 倍。

2 酵母微胶囊技术的药效评价研究

2.1 降血糖

1 型糖尿病是一种与碳水化合物代谢受损相关的代谢紊乱，可导致慢性高血糖，该疾病的特征是 β 细胞进行性自身免疫破坏，导致胰岛素不足或胰岛素分泌缺陷。胰岛素皮下注射用于糖尿病的日常治疗。但是由于胰岛素给药带来的不便，很难满足患者的依从性。为了克服这个困难，可优先选择口服胰岛素输送系统。然而，口服胰岛素必须克服某些生理障碍[44]。侵入性和强化方法促使人们需要一种相容的胰岛素给药途径[45]。酿酒酵母的微胶囊可以通过静电力介导的自发沉积结合不同的带电纳米粒子[46]，长期服用酵母微胶囊在治疗慢性疾病方面显示出良好的安全性[47]。Sabu 等[48]首次提出了一种利酵母微胶囊包埋胰岛素抑制糖尿病的生物激励方法。利用胰岛素和酵母微胶囊之间的静电相互作用促使酵母微胶囊包埋胰岛素的形成，并在荧光成像下证实了这一点。在酵母微胶囊包埋胰岛素的表面装载海藻酸钠涂层可以保护酵母微胶囊免受恶劣的胃肠道环境影响，防止胰岛素降解。药理学实验发现，糖尿病大鼠口服海藻酸钠包覆的酵母微胶囊包埋胰岛素后血糖明显降低。

2.2 治疗心血管疾病

心血管疾病的发生和动脉硬化紧密相关。近年来，基于纳米粒子的靶向策略被认为是治疗动脉粥样硬化（AS）的新途径。

Zhang 等[49]研发了一种用于靶向治疗心血管疾病的方法，该方法由酵母衍生微胶囊（YC）介导，利用静电驱动自发沉积的方式使不同带电纳米颗粒成功负载到 YC 中。口服给药后，包埋纳米颗粒的酵母胶囊（YDMC）可以优先到达关节炎和肿瘤的病变部位，并显著降低斑块面积，增强 AS 斑块的稳定性。最重要的是，实验发现 YC 介导的纳米疗法比未包装的纳米药物更有效，对毒性测定的结果显示包装后的纳米药物在长期口服后表现出良好的安全性，因此该方法或可用于 AS 和其他血管疾病的靶向治疗。单核细胞趋化蛋白 -1（MCP-1）在 AS 中扮演着关键的角色，是 AS 发生早期的重要因素。Yin 等[50]利用上述 YC 介导的仿生方法成功将一种 MCP-1 的特异性合成抑制剂靶向输送到 AS 斑块内部，结果显示这种抑制剂的作用明显增强，有效减少了单核细

胞在 AS 斑块中的聚集。

2.3 治疗炎症相关疾病

胃肠道存在许多生物屏障，即使是当前最先进的纳米粒子靶向传递系统口服给药后也面临来自胃肠道障碍的挑战。Zhou 等[51]尝试将含有消炎药吲哚美辛或抗肿瘤药物紫杉醇的纳米粒负载到酵母胶囊中，口服后经过一系列的体内运输过程，包埋在酵母胶囊中的纳米粒最终被传递到小鼠或大鼠炎症或肿瘤的远程病变部位。结果显示，在该急性炎症模型中，酵母胶囊介导的纳米探针的靶向效率甚至比静脉注射相同剂量的纳米探针的靶向效率还要高。口服经酵母胶囊介导的吲哚美辛或紫杉醇纳米疗法在炎症和肿瘤动物模型中与单独纳米治疗相比，作用显著增强。Plavcová 等[52]利用酵母细胞包封姜黄素研究其在体外的抗炎作用，发现克服姜黄素生物利用度低、提高靶向传递主要是酵母细胞中纯化的葡聚糖颗粒发挥作用。

2.4 抗肿瘤

口服是最常见和最有效的给药方式，具有较高的安全性、方便性和用药依从性。目前，口服抗肿瘤药物在治疗癌症方面越来越受欢迎。但一些治疗癌症的口服药物存在亲水性低、对上皮细胞渗透性差、毒副作用大等问题。卡巴他赛是一种新型半合成紫杉醇，具有很强的抗肿瘤活性，与其他紫杉醇类似，卡巴他赛的口服给药仍然受到限制，Ren 等[53]将载药聚合物 - 脂质杂化纳米粒子（NPs）负载到多孔空心酵母细胞壁微颗粒（YPs）中，制备了一种载药纳米微载体，用于巨噬细胞靶向口服卡巴他赛；在模拟胃肠道环境中，NPs 负载 YPs 的体外释药速度较 NPs 慢，药物稳定性较高；体内药动学研究中，卡巴他赛溶液的口服利用度提高了 5 倍。顺铂是当前联合化疗中最常用的药物之一，Zhou 等[54]将制备好的顺铂衍生的前体纳米粒子（PreCDDP）封装到酵母胶囊中得到可以口服给药的 PreCDDP/YC，并从其理化性质、体外药物释放、体外抗肿瘤活性、口服靶向性、体内药动学和体内药效等方面对酵母胶囊仿生给药系统进行考察，结果 PreCDDP/YC 在细胞内释放后仍具有抗肿瘤活性，口服载于酵母胶囊中的 PreCDDP 比口服或静脉注射游离的顺铂具有更好的安全性和更高的生物利用度。上述研究表明载药纳米微载体技术是增加小分子药物口服吸收的一种可能途径。

2.5 潜在的骨组织再生能力

已有研究表明，生物医学材料聚磷酸钙掺锶后能够显著增强成骨细胞的增殖和分化。Huang 等[55]利用酵母细胞对某些金属离子的吸附作用，成功将锶离子富集到多孔聚磷酸钙酵母微胶囊中，保证了微囊中微量元素的持续缓慢释放。与人骨髓基质细胞共培养的结果显示，酵母调控法制备的锶掺杂多孔聚磷酸钙微胶囊对碱性磷酸酶和Ⅰ型胶原基因的表达均有推动作用，证实了对成骨细胞的促进作用。其效果明显优于纯聚磷酸钙和沉淀的锶掺杂聚磷酸钙。这也表明酵母微囊技术可以通过掺杂微量元素控制其在聚磷酸钙中的渗入，进一步为骨组织工程开发新型生物材料。

目前的研究大多利用酵母微囊化口服给药，但也可用于全身给药、局部或吸入性黏膜给药[56]。

3 结语

鉴于微胶囊化技术带来的实用价值及其在众多领域中的应用前景，目前对酵母微胶囊研究越来越多。酵母细胞是一种绿色、天然、营养丰富、价格低廉、可大规模培养、安全系数高的可食用微载体。与传统的微胶囊制备方法相比，以酵母细胞为囊壁材料制备微胶囊具有以下优势：微胶囊产品大小均一、无毒、生物相容性好、易生物降解，制备过程中，不需要或很少引入其他化学试剂，较少溶剂残留或脱除的问题，非常适合药物和食品添加剂的包覆。我国研究人员对酵母微胶囊技术的研究虽然起步较晚，但已取得了较大的进步，在医药、食品领域进行了一定的实际应用和深入的研究，不过与国外相比还存在较大差距，特别是对成囊机制的分析，新技术、新设备的开发，药物控释、缓释及靶向释放等方面的研究还很不足。相信不久的将来，随着医药技术的不断进步，我国在酵母微胶囊的基础研究与应用研究一定会取得突破。

参考文献

[1] 殷欣，程昊，梁丽 . 油脂的微胶囊包埋 [J]. 科学观察，2021（6）：85-87.

[2] 刘鑫，陈虹宇，李增威，等 . 响应面法优化花椒精油酵母微胶囊制备工艺 [J]. 中国调味品，2017，42（6）：61-66，76.

[3] Salari R，Rajabi O，Khashyarmanesh Z，et al. Characterization of encapsulated berberine in yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Iran J Pharm，2015，14（4）：1247-1256.

[4] Paramera EI，Konteles SJ，Karathanos VT. Microencapsulation of curcumin in cells of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Food Chem，2011，125（3）：892-902.

[5] Jean V，Stephen Y，Nitin N. Bioactive delivery vehicles：US，20180296490-A1 [P]. 2018-10-18.
[6] Kavetsou E，Koitsoukos S，Daferera D，et al. Encapsulation of *Mentha pulegium* essential oil in yeast cell microcarriers：an approach to environmentally friendly pesticides [J]. J Agric Food Chem，2019，67（17）：4746-4753.
[7] 刘星，丁琨，李冠文，等 . 连翘叶精油微胶囊制备工艺优化及其对油脂抗氧化的影响 [J]. 保鲜与加工，2020，20（6）：76-83.
[8] 贾会玲，韩双双，黄晓德，等 . 植物精油对植物病原菌的抑菌活性研究进展 [J]. 中国野生植物资源，2018，37（6）：47-52.
[9] Kavosi M，Mohammadi A，Shojaee-aliabadi S，et al. Characterization and oxidative stability of purslane seed oil microencapsuiated in yeast cells biocapsules [J]. J Sci Food Agric，2017，98（7）：2490-2497.
[10] Adrian C，Piotr K，Wojciech B，et al. Improvement of oxidative stability of menhaden fish oil by microencapsulation within biocapsules formed of yeast cells [J]. J Food Eng，2015，167：2-11.
[11] Karaman K. Fabrication of gallic acid loaded yeast（Saccharomyces cerevisiae）microcapsules：effect of plasmolysis treatment and solvent type on bioactivity and release kinetics [J]. LWT，2021，148（1）：111640.
[12] Karaman K. Characterization of Saccharomyces cerevisiae based microcarriers for encapsulation of black cumin seed oil：stability of thymoquinone and bioactive properties [J]. Food Chem，2020，313（C），126129.
[13] Kavetsou E，Koutsoukos S，Daferera D，et al. Encapsulation of *Mentha pulegium* essential oil in yeast cell microcarriers：an approach to environmentally friendly pesticides [J]. J Agric Food Chem，2019，67（17）：4746-4753.
[14] 王娣，许晖，汪张贵，等 . 百里香精油的微胶囊制备及其缓释性能 [J]. 食品科学，2013，34（6）：60-63.
[15] 刘立志，郭婵娟，范智义，等 . 石榴籽油的微胶囊化研究 [J]. 中国粮油学报，2015，30（2）：43-49.
[16] 荆佳伊，张惟广 . 响应曲面法优化酵母微胶囊化野木瓜籽油工艺研究 [J]. 食品与发酵科技，2017，53（5）：30-35.
[17] 杨军君，陈光斌，陈振林，等 . 利用酵母细胞对红瓜子油进行微胶囊化的研究 [J]. 粮食与油脂，2018，31（10）：17-20.
[18] 崔凤烨，钱晓明，王立晶，等 . 蕲艾挥发油微胶囊的制备和应用 [J]. 上海纺织科技，2020，48（8）：60-64.
[19] Marisa G，Rizzello C，Montani MSG，et al. Quercetin induces apoptosis and autophagy in primary effusion lymphoma cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR and STAT3 signaling pathways [J]. J Nutr Biochem，2017，41：124-136.
[20] Carla C，Octavio D，Ramon P，et al. Cross-linked chitosan/liposome hybrid system for the intestinal delivery of quercetin [J]. J Colloid Interface Sci，2016，461：69-78.
[21] Pham-Hoang BN，Winckler P，Waché Y. Fluorescence lifetime and UV-Vis spectroscopy to evaluate the interactions between quercetin and its yeast microcapsule [J]. Biotechnol J，2018，13（1）：201700389.
[22] 苏平，宋思圆，吴秋敏，等 . 黄秋葵花黄酮的酵母微胶囊制备及其对油脂的抗氧化能力 [J]. 中国食品学报，2016，16（4）：153-158.
[23] 聂少平，唐炜，殷军艺，等 . 食源性多糖结构和生理功能研究概述 [J]. 中国食品学报，2018，18（12）：1-12.
[24] Wang JQ，Hu SZ，Nie SP，et al. Reviews on mechanisms of invitro antioxidant activity of polysaccharides [J]. Oxid Med Cell Longev，2016，2016（2016）：13.
[25] Hou CY，Chen LL，Yang LZ，et al. An insight into anti-inflammatory effects of natural polysaccharides [J]. Int J Biol Macromol，2020，153（153）：248-255.
[26] Ramberg JE，Nelson ED，Sinnott RA. Immunomodulatorydietary polysaccharides：a systematic review of the literature [J]. Nutrition Journal，2010，9（1）：54.
[27] Chakraborty I，Sen IK，Mondal S，et al. Bioactive polysaccharides from natural sources：a review on the antitumor and immunomodulating activities [J]. Biocatal Agric Biotechnol，2019，22（22）：101425.
[28] Shanchen，Khan BM，Cheong KL，et al. Pumpkin polysaccharides：purification，characterization and hypoglycemic potential [J]. Int J Biol Macromol，2019，139（2）：842-849.
[29] 邓青芳，周欣，陈华国 . 多糖抗肝损伤作用及其机制研究进展 [J]. 中国中药杂志，2016，41（16）：2958-2967.
[30] 杨夏，冯颖淑，童珊珊，等 . 降血脂多糖活性机制及构效关系研究进展 [J]. 中国中药杂志，2018，43（20）：4011-4018.
[31] Tang C，Ding R，Sun J，et al. The impacts of natural polysaccharides on intestinal microbiota and immune responses-a review [J]. Biotechnol Adv，2019，10（5）：2290-2312.
[32] 洪自兵，孙洁琼，刘梅，等 . 决明子多糖酵母微囊制备条件优化及对 HepG2 细胞抑制作用研究 [J]. 乐山师范学院学报，2017，32（8）：15-19，37.
[33] Wang K，Feng X，Chai L，et al. The metabolism of berberineand its contribution to the pharmacological effects. [J]. Drug Metab Rev，2017，49（2）：139-157.
[34] Imenshahidi M，Hosseinzadeh H. Berberine and barberry（Ber-beris vulgaris）：a clinical review [J]. Phytother Res，2019，33（3）：504-523.
[35] Luo R，Liao Z，Song Y，et al. Berberine ameliorates oxidativestress-induced apoptosis by modulating ER stress and autoph-agy in human nucleus pulposus cells [J]. Life Sci，2019，228（228）：85-97.
[36] Cui HX，Hu YN，Li JW，et al. Preparation and evaluation ofantidiabetic agents of berberine organic acid salts for enhancingthe bioavailability [J]. Molecules，2018，24（1）：103.
[37] Wang Y，Zhang S. Berberine suppresses growth and me-

tastasisof endometrial cancer cells via miR-101/COX-2[J]. Biomed Pharmacother，2018，103（6）：1287-1293.

[38] Lu J，Yi Y，Pan R，et al. Berberine protects HK-2 cells from hypoxia/reoxygenation induced apoptosis via inhibiting SPHK1 expression [J]. J Nat Med，2018，72（2）：390-398.

[39] Salari R，Bazzaz BSF，Rajabi O，et al. New aspects of Saccharomyces cerevisiae as a novel carrier for berberine [J]. DARU J Pharm Sci，2013，21（1），73.

[40] Dadkhodazade E，Mohammadi A，Shojaee-aliabadi S，et al. Yeast cell microcapsules as a novel carrier for cholecalciferol encapsulation：development，characterization and release properties [J]. Food Bio，2018，13（4）：404-411.

[41] Shi GR，Rao LQ，Yu HZ，et al. Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell [J]. Int J Pharm，2008，349（1/2）：83-93.

[42] 殷佳雅，冯瑛，杨晓萍 . 酵母微胶囊包埋茶多酚工艺研究 [J]. 食品工业，2017，38（11）：117-121.

[43] Medeiros F，Dupont S，Beney L，et al. Efficient stabilisation of curcumin microencapsulated into yeast cells via osmoporation [J]. Applied Micr Bio，2019，103（23-24）：9659-9672.

[44] Wong CY，Martinez J，Dass CR. Oral delivery of insulin for treatment of diabetes：status quo，challenges and opportunities [J]. J Pharm Pharmacol，2016，68（9）：1093-1108.

[45] Owens DR，Zinman B，Bolli G. Alternative routes of insulin delivery [J]. Diabet Med，2010，20（11）：886-898.

[46] Zhou X，Zhang X，Han S，et al. Yeast microcapsule-mediated targeted delivery of diverse nanoparticles for imaging and therapy via the oral route [J]. Nano Lett，2017，17（2）：1056.

[47] Zhang X，Xu X，Cheri Y，et al. Bioinspired yeast microcapsules loaded with self-assembled na-notherapies for targeted treatment of cardiovascular disease [J]. Mater Today，2017，20（6）：301-313.

[48] Sabu C，Raghav D，Jijitha US，et al. Bioinspired oral insulin delivery system using yeast microcapsules [J]. Materials Sci Engineering C，2019，103：109753.

[49] Zhang XJ，Xu XQ，Chen YD，et al. Bioinspired yeast microcapsules loaded with self-assembled nanotherapies for targeted treatment of cardiovascular disease [J]. Mater Today，2017，20（6）：301-313.

[50] Yin LQ，Peng CP，Tang Y，et al. A biomimetic orally targeted delivery of bindarit for immunotherapy of atherosclerosis [J]. Biomater Sci，2020，8（13）：3640-3648.

[51] Zhou X，Zhang XJ，Han SL，et al. Yeast microcapsule-mediated targeted delivery of diverse nanoparticles for lmaging and therapy via the oral route [J]. Mol Pharmaceut，2017，17（2）：1056.

[52] Plavcová Z，Šalamúnová P，Saloň I，et al. Curcumin encapsulation in yeast glucan particles promotes its anti-inflammatory potential in vitro [J]. Int J Pharm，2019，568（C）：118532.

[53] Ren TY，Gou JX，Sun WX，et al. Entrapping of nanoparticles in yeast cell wall microparticles for macrophage-targeted oral delivery of cabazitaxel [J]. Molecular Pharm，2018，15（7）：2870-2882.

[54] Zhou X，Ling KJ，Liu MY，et al. Targeted delivery of cisplatin-derived nanoprecursors via a biomimetic yeast microcapsule for tumor therapy by the oral route [J]. Theranostics，2019，22（9）：6568-6586.

[55] Huang MJ，Li TJ，Pan T，et al. Controlling the strontium-doping in calcium phosphate microcapsules through yeast-regulated biomimetic mineralization [J]. Regen Biomater，2016，3（5）：269-276.

[56] Ostroff GR，Soto E. Yeast cell wall particles for receptor-targeted nanoparticle delivery：US，US20120070376 A1 [P]. 2012.

（收稿日期：2021-10-18；修回日期：2021-12-15）

药用植物中萜类化合物改善胆汁淤积性肝损伤的作用及机制研究进展

袁若兰，张议文，沈佳妍，王丹，陈倩，王涛，刘梦扬*（天津中医药大学中医药研究院，天津　300190）

摘要：胆汁淤积是由于多种因素导致胆汁生成、分泌异常或胆管梗阻引起胆汁流动障碍的一种病理状态。在胆汁淤积状态下，大量毒性胆汁酸潴留在肝细胞内，如果治疗不及时则会损伤肝脏和胆管细胞，甚至发展为肝纤维化、肝硬化，最终导致肝功能衰竭。研究发现，萜类化合物具有抗炎、抗氧化、抗纤维化等多种药理活性，能够有效缓解多种因素导致的胆汁淤积性肝损伤，有望成为治疗胆汁淤积性肝病的新型药物。本文阐述了近年来药用植物中萜类化合物对胆汁淤积性肝损伤的治疗作用及相关机制，为萜类化合物治疗胆汁淤积性肝病的临床应用和新药研发提供参考。

关键词：胆汁淤积；萜类化合物；肝损伤；作用机制；药用植物

中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0877-11

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.024

Research progress in the effect and mechanism of medicinal plants derived terpenoids on cholestatic liver injury

YUAN Ruo-lan, ZHANG Yi-wen, SHEN Jia-yan, WANG Dan, CHEN Qian, WANG Tao, LIU Meng-yang* (*Institute of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 300190)

Abstract: Cholestasis is a pathological condition in which the bile production/secretion is reduced or the bile duct is obstructed, caused by many factors. In tcholestasis, a large amount of toxic bile acids is retained in the liver cells. If not treated promptly, it may damage the hepatocytes and bile duct cells, or even develop into fibrosis and cirrhosis, which may ultimately lead to liver failure. Studies have found that terpenoids possess various anti-inflammatory, anti-oxidation, and anti-fibrosis activities, and can effectively alleviate cholestatic liver damage caused by various factors. Therefore, these compounds are expected new drugs for cholestatic liver disease. This paper reviewed research progress in the therapeutic effect and related mechanism of medicinal plants derived terpenoids for cholestatic liver injury to provide reference for the clinical application and new drug development of terpenoids for cholestatic liver disease.

Key words: cholestasis; terpenoid; liver injury; mechanism; medicinal plants

胆汁淤积（cholestasis）是指肝内外各种原因引起胆汁生成、分泌和排泄障碍，导致胆汁不能正常流入十二指肠而逆流回血液循环的一种病理状态。常见病因有遗传性疾病、药物性肝损伤、病毒性或酒精性肝炎、胆管缺失综合征、原发性胆汁性肝硬化（PBC）、原发性硬化性胆管炎（PSC）、胆管系统损伤、肿瘤等[1]。临床表现主要为黄疸、皮肤瘙痒、尿色加深、疲劳乏力等，并伴有血清碱性磷酸酶（ALP）、γ- 谷氨酰转移酶（γ-GT）、总胆红素（TBIL）和总胆汁酸（TBA）水平的异常升高。如果不及时治疗，胆汁会淤积在细胞内，损伤肝脏和机体。持续性胆汁淤积可能会发展成肝纤维化、肝硬化，最终导致肝功能衰竭[2]。

生理条件下，肝内胆固醇转化生成初级胆汁

作者简介：袁若兰，女，硕士研究生，主要从事中药脂质代谢调控研究，email：1157815374@qq.com　*通信作者：刘梦扬，男，副研究员，博士研究生导师，主要从事中药脂质代谢调控研究，email：liumengyang0212@tjutcm.edu.cn

酸后，随胆汁流入肠道被肠道菌群代谢为次级胆汁酸，95% 以上的胆汁酸被肠道重吸收后通过门静脉重回肝脏，剩下的 5% 随粪便排出体外，这一代谢过程称为胆汁酸的肠肝循环 [3]。当药物、病毒、遗传性疾病、机械性损伤等多种因素刺激肝脏时，胆汁酸肠肝循环中断，胆汁流动受阻，大量毒性胆汁成分（主要为疏水性胆汁酸等）潴留肝内，形成胆汁淤积。胆汁淤积发生后，损伤的肝细胞内 ALP、谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）、γ-GT、TBIL 等大量外泄，炎性细胞浸润增加，胆管上皮细胞大量增殖、管壁变厚，肝脏细胞和胆管上皮细胞的基本结构破坏、功能受损，引发肝脏大面积坏死 [4-5]。

1 胆汁淤积性肝损伤的病理机制及治疗药物

1.1 胆汁淤积性肝损伤的病理机制

目前研究认为，胆汁淤积性肝损伤的发生主要与胆汁酸稳态失衡、炎症反应、氧化应激三个方面密切相关。首先，胆汁酸根据分子内基团的不同性质一般分为亲水性和疏水性两种，亲水性胆汁酸有熊去氧胆酸（UDCA）、牛磺熊去氧胆酸（TUDCA）等，疏水性胆汁酸包括胆酸（CA）、石胆酸（LCA）、鹅脱氧胆酸（CDCA）、脱氧胆酸（DCA）和甘氨鹅脱氧胆酸（GCDCA）等 [6]。肝脏胆汁酸合成和转运的整个过程由胆汁酸合成酶胆固醇 7α 羟化酶（CYP7A1）、胆固醇 8β 羟化酶（CYP8B1）、胆固醇 7β 羟化酶（CYP7B1）、胆固醇 27α 羟化酶（CYP27A1），肝脏基底外侧转运体钠离子 - 牛磺胆酸共转运多肽（NTCP）、有机阴离子转运多肽（OATPs）、有机溶质转运体 -α（OST-α）、有机溶质转运体 -β（OST-β）、多药耐药相关蛋白 3（MRP3）、多药耐药相关蛋白 4（MRP4）、胆管膜转运体胆汁酸盐输出泵（BSEP）、多药耐药相关蛋白 2（MRP2）等综合调控。正常情况下，机体内各类胆汁酸含量相对稳定，但多种因素诱导引发肝脏胆汁酸代谢失衡时，会造成肝脏内淤积大量疏水性胆汁酸 CA、DCA、LCA 等，损伤肝脏和胆管细胞，导致肝脏和胆管内胆汁酸合成、转运蛋白表达异常，正常代谢受阻，胆汁酸稳态失衡，进而加重胆汁淤积肝损伤 [7]。

胆汁淤积时，源于肠道的革兰氏阴性菌释放的磷脂多糖（LPS）刺激肝脏细胞、胆管细胞等释放白介素 6（IL-6）、白介素 8（IL-8）、单核细胞趋化蛋白 1（MCP-1）等细胞因子。此外，LPS 能够结合到 LPS 结合蛋白（LBP）上，与分化抗原簇 14（CD14）和髓样分化蛋白 2（MD2）形成复合物，再与肝细胞膜上的 Toll 样受体 4（TLR4）结合，进一步激活核转录因子 κB（NF-κB）、c-Jun 氨基末端激酶（JNK）等炎症通路，促进肝脏炎性损伤 [6]。此外，胆汁淤积状态下疏水性胆汁酸在肝内大量累积，也能直接激活炎症信号通路及多种促炎介质，损伤肝脏细胞。DCA 和 CDCA 可以通过激活表皮生长因子受体（EGFR）增加小鼠肝脏内早期生长反应因子（Egr-1）的表达，进一步上调细胞间黏附分子 -1（ICAM-1）和巨噬细胞炎症蛋白 2（MIP-2）、肿瘤坏死因子 α（TNF-α）、白介素 10（IL-10）、白介素 1β（IL-1β）的表达，并加速中性粒细胞等免疫细胞的激活与聚集，加重肝脏病理性炎症损伤 [4，8-9]。

正常情况下，机体内活性氧（ROS）的生成和清除处于动态平衡。当机体处于病理状态时，ROS 生成过多导致体内氧化和抗氧化作用失衡，最终引起氧化应激。胆汁淤积时肝脏内累积大量疏水性胆汁酸，导致肝脏线粒体功能障碍，产生大量 ROS。同时显著抑制超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）、谷胱甘肽过氧化物（GSH-Px）等抗氧化酶的活性，过量的 ROS 会破坏肝细胞的基本结构和功能，进一步加重肝脏氧化损伤 [6，9-10]。

1.2 胆汁淤积性肝病的治疗药物

目前，西医临床上用于治疗胆汁淤积的药物主要有 UDCA、奥贝胆酸（OCA）、贝特类（非诺贝特、苯扎贝特等）。UDCA 属于亲水性胆汁酸，是国际批准用于治疗胆汁淤积的唯一的一线药物，但对 40% 左右的 PBC 患者不应答或应答较差。OCA 是 CDCA 的衍生物，能激活胆汁酸受体 FXR，改善应答不佳的 PBC 症状，但使用时常伴有瘙痒等多种不良反应。贝特类药物属于过氧化物酶体增殖物激活受体（PPARs）激动剂，能有效改善 PBC 患者生化指标和远期预后，但存在肾毒性、肝毒性等风险 [11]。近年来，中医药治疗胆汁淤积性肝病成效显著。多数保肝利胆的中药里都含有非常丰富的萜类化合物，且生物活性强、毒性低。因此，萜类化合物在治疗胆汁淤积性肝病方面有很大的潜力和研发前景。

萜类化合物是指由 1 个或 1 个以上异戊二烯单位（C_5 单位）为基本骨架构成的化合物，按照其分子中的异戊二烯单位的多少可以分为单萜、倍半萜、二萜、三萜等。萜类化合物广泛存在于唇形科、伞形科、樟科、五加科、桔梗科等植物中。萜类化合物能通过抗炎、抗氧化、抗凋亡和调节胆汁酸代谢等多种途径改善胆汁淤积性肝损伤。本文对近年来天然萜类化合物治疗胆汁淤积性肝损伤的研究进展进行综述，以期为基于萜类化合物治疗胆汁淤积性

肝病相关药物的研发和临床应用提供参考。

2　单萜

2.1　环烯醚萜类

2.1.1　胡黄连苷Ⅱ　胡黄连苷Ⅱ是从玄参科植物胡黄连中提取的环烯醚萜类化合物，具有抗炎、抗氧化、抗凋亡等多种药理作用，在胆汁淤积、肝脏损伤、器质性缺血再灌注损伤等疾病的防治中有很好的效果[12]。Li 等[13-14]采用 *α*- 萘异硫氰酸酯（ANIT）构建体内胆汁淤积模型，并给予小鼠胡黄连苷Ⅱ进行治疗，结果 ANIT 小鼠血清中 TBIL、TBA、AST、ALT、*γ*-GT 异常升高，小鼠肝脏出现局部坏死、炎性因子浸润等组织学明显改变；胡黄连苷Ⅱ治疗组能显著抑制 ANIT 引起的血清生化指标的异常升高，改善肝脏组织学损伤，且呈剂量依赖性；进一步研究发现，胡黄连苷Ⅱ通过诱导法尼醇 X 受体（FXR）激活，从而抑制胆汁酸合成酶 CYP7A1、CYP8B1 的表达，上调胆汁酸转运体 BSEP、NTCP 和胆汁酸代谢酶尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1A1（UGT1A1）、胆盐硫酸基转移酶 2A1（SULT2A1）的表达水平，进而调节胆汁酸稳态；机制为胡黄连苷Ⅱ通过抑制 ERK1/2-LKB1-AMPK 磷酸化，调节 FXR 及其他胆汁酸代谢相关基因，减轻胆汁淤积性肝损伤。Piao 等[12]研究表明，胡黄连苷Ⅱ还能通过影响 FXR 和 JAK-STAT3 信号通路，降低机体氧化应激、炎症和细胞凋亡水平，缓解肝损伤。

2.1.2　龙胆苦苷　龙胆苦苷属于环烯醚萜类化合物，广泛存在于龙胆、秦艽等龙胆属植物中，有清热利湿、保肝利胆等功效[15]。研究发现，龙胆苦苷对肝胆系统保护作用显著。在胆管结扎（BDL）诱导的大鼠胆汁淤积模型中，龙胆苦苷通过激活雄甾烷受体（CAR）进一步调控膜转运蛋白 MRP3、MRP4 的表达，保护肝脏功能[16]。高宇[17]的实验显示，川西獐芽菜及其主要成分龙胆苦苷能够通过上调肝细胞毛细胆管膜面的胆汁酸转运蛋白 BSEP、MRP2，增加肝内胆汁酸和毒素外排，减缓胆汁淤积，进而保护肝脏。Tang 等[18]发现，龙胆苦苷能通过调控 *CYP7A1*、*CYP27A1*、*MRP3*、顶端钠依赖性胆盐转运体（*ASBT*）等基因的表达水平，缓解 ANIT 导致的小鼠胆汁酸代谢失调。同样，Han 等[19]通过蛋白质组学和代谢组学分析 ANIT 大鼠的血清、肝脏等样本发现，龙胆苦苷治疗能抑制大鼠胆汁酸代谢物的异常升高，恢复大鼠肝脏内抗氧化及胆汁酸转运相关蛋白的表达、减少疏水性胆汁酸的累积，缓解胆汁淤积性肝损伤。因此，龙胆苦苷的保肝作用可能与其通过 FXR 调控胆汁酸合成、转运相关基因有关。

2.1.3　獐芽菜苷　獐芽菜苷是环烯醚萜类化合物，广泛存在于獐芽菜、秦艽等药用植物中。研究发现，獐芽菜苷具有抗炎杀菌、保护肝脏等多种药理活性，在胆汁淤积、肝炎等一系列肝胆疾病中疗效显著[20-22]。Yang 等[20]研究发现，獐芽菜苷能显著抑制模型组小鼠血清中 ALT、AST、TBA、TBIL 的异常升高，降低肝内 *β*- 鼠胆酸（*β*-MCA）、CA 等胆汁酸的含量，并调节 *MRP2*、*OST-β*、*NTCP*、有机阴离子转运多肽 1A1（*OATP1A1*）等胆汁酸转运相关基因，恢复被破坏的胆汁酸稳态。此外，獐芽菜苷还显著下调了肝脏促炎因子 TNF-*α*、IL-6、小鼠角化细胞衍生因子（mKC）、MIP-2 和 ICAM-1 的表达。因此，獐芽菜苷能够通过调控胆汁酸循环、抑制炎症反应，缓解 ANIT 诱导的小鼠胆汁淤积性肝损伤。

2.1.4　獐芽菜苦苷　獐芽菜苦苷大多存在于獐芽菜、青叶胆等龙胆科植物中，是环氧环烯醚萜苷类化合物。据报道，獐芽菜苦苷能通过抗炎、抗氧化、调节脂质代谢等药理活性防治肝炎、脂肪肝等一系列肝脏疾病[23]。此外，獐芽菜苦苷对胆汁淤积也有良好的保护作用。Feng 等[24]发现，给予大鼠獐芽菜苦苷后，血清中结合型胆汁酸 TCA 和 TDCA 含量升高、游离型胆汁酸 *α*-MCA 含量减少，肝损伤指标 ALP 显著下调。肝脏中与胆汁酸代谢相关的基因 *CYP8B1*、多药耐药基因 1（*MDR1*）、*MRP3*、尿苷二磷酸 - 葡萄糖醛酸转移酶 2B（*UGT2B*）和谷胱甘肽 *S* 转移酶 A1（*GSTA1*）等的表达水平明显升高。因此，獐芽菜苦苷能够通过调控胆汁酸合成、外排等相关基因，增加疏水性胆汁酸的水溶性，促进共轭胆汁酸的清除，降低细胞毒性，进而缓解胆汁淤积。

2.1.5　京尼平苷和京尼平　京尼平苷是从栀子、牛膝等植物中提取的一种环烯醚萜类化合物，生物活性广泛，常被用于治疗胆汁淤积等多种肝胆疾病。京尼平苷是大黄 - 栀子联合用药或者茵栀黄注射液的主要成分，能显著缓解胆汁淤积，保护肝脏[25-26]。Wang 等[27]的研究显示，京尼平苷在调控胆汁酸代谢相关基因，抑制胆汁酸合成和摄取的同时增加外排，使肝内累积的毒性胆汁酸明显减少，进而缓解 ANIT 诱导的大鼠胆汁淤积。此外，Tan 等[28]发现，京尼平苷显著抑制了 ANIT 小鼠血清生化指标的异常升高，并调节胆汁酸代谢相关基因 *OATP1*、*OATP2*、*NTCP* 等的表达水平，减轻了炎症和肝脏的病理损伤，抗炎机制可能是通过抑制 STAT3 和 NF-*κ*B 信号通路

实现的。京尼平是京尼平苷经肠道细菌源酶*β-D*-糖苷酶水解后的苷元，研究表明，京尼平对胆汁淤积的保护作用也同样显著，其作用机制主要是通过上调肝脏 MRP2 的表达实现的[29-30]。

2.1.6 京尼平苷酸 京尼平苷酸是一种环烯醚萜葡萄糖苷化合物，主要存在于茜草科植物中。京尼平苷酸对胆汁淤积性肝损伤也具有良好的保护作用。研究显示，京尼平苷酸能剂量依赖性地缓解急性肝内胆汁淤积，其机制可能是激活 FXR 及其靶基因 *MRP2*、*BSEP* 的表达，增加肝脏胆汁酸流出量，减轻肝脏毒性[31]。陈浩等[32]研究也表明，京尼平苷酸能通过激活 SIRT1-FXR 信号通路，调控胆汁酸代谢基因，恢复完整的胆汁酸肝肠循环。此外，京尼平苷酸还能激活小分子异源二聚体伴侣受体 SHP，SHP 通过竞争性结合肝同源受体 LRH1 的位点，进而下调胆汁酸合成限速酶 CYP7A1 的表达，抑制胆汁酸的过度合成，发挥抗胆汁淤积作用[33]。

2.1.7 梓醇 梓醇是从玄参科植物地黄根部提取的一种环烯醚萜类化合物，是地黄的主要活性成分之一。梓醇具有抗炎、抗氧化、抗细胞凋亡等多种药理活性，在 CCL4、BDL 等诱导的肝纤维化动物模型中显示出肝脏保护作用[34-35]。Gao 等[34]研究发现，梓醇能有效抑制 BDL 小鼠血清肝损伤相关指标的异常升高，并降低 TNF-*α*、IL-1*β*、IL-6 等炎症因子的表达水平，改善肝细胞损伤和炎性细胞浸润；此外，梓醇治疗组小鼠肝细胞线粒体 ATP 含量和膜电位显著升高，线粒体损伤得以缓解。研究发现，给予梓醇后小鼠体内 ROS 生成和丙二醛（MDA）表达明显减少、谷光甘肽（GSH）含量升高，Bcl-2 相关 X 蛋白（BAX）、细胞色素 C 和半胱氨酸蛋白酶 3（caspase 3）表达水平显著下调，抗凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤 -2（Bcl-2）表达水平显著上调[34]。因此，梓醇能够通过恢复线粒体膜电位、抑制氧化应激和炎症反应相关的细胞凋亡来改善 BDL 诱导的胆汁淤积性肝损伤。

2.2 双环单萜类——芍药苷

芍药苷是赤芍、白芍等药用植物中的一类单萜类化合物，在非酒精性肝病、缺血再灌注性肝损伤等多种肝脏疾病中有广泛的药理功效[36]。报道发现，芍药苷预处理能增加 ANIT 诱导的胆汁淤积小鼠体内白蛋白含量，保护肝脏。此外，芍药苷治疗组小鼠血清肝损伤指标表达水平降低，肝组织中炎性因子 TNF-*α*、IL-1*β*、IL-18 及炎症小体通路相关蛋白核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白（NLRP3）、凋亡相关斑点样蛋白（ASC）和半胱氨酸蛋白酶 1（caspase 1）表达下调，肝脏病理学损伤得到明显改善。进一步研究发现，芍药苷能够通过诱导 SIRT1-FXR 表达调控胆汁酸代谢，并抑制 NF-*κ*B/NLRP3 炎症通路造成的炎症损伤，从而缓解胆汁淤积[37]。此外，芍药苷也能通过减少肝脏 NF-*κ*B、IL-1*β* 的表达，抑制肝脏胆汁酸转运体 NTCP、BSEP 以及 MRP2 的异常表达，减轻 ANIT 诱导的大鼠胆汁淤积性肝损伤[38]。另一项体内实验发现，芍药苷还能恢复大鼠胆汁流量，并抑制体内 NO 和 MDA 生成、增加 GSH 含量。进一步研究发现，芍药苷是通过抑制 NADPH 氧化酶 -4（NOX4）活性，减轻肝脏氧化应激，从而减轻肝脏损伤[37，39]。Chen 等[40]的实验表明，芍药苷还能通过调控 PI3K/Akt 依赖途径激活核因子 E2- 相关因子 2（Nrf2）表达，促进 GSH 合成，改善胆汁淤积。综上所述，芍药苷可以通过抗炎、抗氧化、调控胆汁酸代谢等多途径改善胆汁淤积性肝损伤。

3 倍半萜——青蒿素及其衍生物

青蒿素是从蒿属药用植物黄花蒿中提取分离的一种倍半萜内酯类化合物，具有多种药理活性，因优异的抗疟特性备受关注[41]。青蒿素及其衍生物可通过抗炎、抗氧化途径治疗多种肝脏疾病[42]。青蒿素对胆汁淤积性肝损伤具有明显的保护作用。Alkhedaide 等[43]研究发现，青蒿素处理后小鼠血清 AST、ALP、TBIL 等的表达水平明显低于石胆酸（LCA）诱导的模型组小鼠，肝脏病理损伤程度明显减轻：一方面，青蒿素能够增加抗氧化物质 GSH 的表达，减轻肝脏氧化应激；另一方面，青蒿素能显著激活 FXR 和 CAR，上调 MRP4、OATP2、OATP4 等胆汁酸转运体的表达。恢复胆汁酸代谢，减轻肝毒性。因此，青蒿素可通过抗氧化应激和调控胆汁酸稳态，缓解 LCA 诱导的小鼠胆汁淤积性肝损伤。

4 二萜

4.1 二萜醌类——丹参酮ⅡA

丹参酮ⅡA 是从唇形科植物丹参根部提取的二萜醌类成分，有抗炎、抗纤维化等多种药理活性。近年来，丹参酮ⅡA 在药物性肝损伤、胆汁淤积性肝损伤等一系列肝脏疾病中防治效果显著[44-45]。研究表明，丹参酮ⅡA 能显著降低小鼠血清肝损伤相关指标的水平，通过激活孕烷 X 受体（PXR）进而调控 LCA 代谢相关酶细胞色素 P450 3A11（CYP3A11）、细胞色素 P450 3A13（CYP3A13）和 MDR1 的表达水平，剂量依赖性地缓解胆汁淤积性肝损伤[46]。Yang 等[45]研究发现，利福平会抑制胆汁酸转运体 NTCP 的正常表

达，造成胆汁淤积性肝损伤。利福平处理的同时给予丹参酮ⅡA 治疗，NTCP 水平显著增加，胆汁酸转运增强，肝损伤减轻。此外，丹参酮ⅡA 还能通过减少氧化应激、抑制 JNK 活化，在体外抑制甘氨鹅去氧胆酸（GCDC）引起的大鼠原代肝细胞凋亡[44]。另有研究证实，丹参酮ⅡA 还可通过激活 HOTAIR-Nrf2-MRP2/4 信号通路，增加 MRP2 和 MRP4 的表达，进而保护肝脏[47]。

4.2　双环二萜类——穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯

穿心莲内酯是中药穿心莲的主要活性成分，是一类典型的二环双萜类内酯，对多种胆汁淤积模型有明显的保护作用。穿心莲内酯预处理能剂量依赖性地抑制 ANIT 小鼠体内 NF-κB/COX-2 信号通路激活，减轻炎症反应。此外，穿心莲内酯还能通过上调肝脏中沉默信息调控因子 1（SIRT1）和 Nrf2 的表达，调控下游靶点，改善氧化应激[48]。Wang 等[49]研究发现，穿心莲内酯能显著降低 ANIT 诱导的小鼠血清肝损伤指标和炎性因子的水平，减少肝脏环氧合酶 -2（COX-2）和 NF-κB 的表达，上调肝脏 SOD、GSH 和 GSH-Px 的同时减少 MDA 的积累，通过抗炎和抗氧化缓解小鼠胆汁淤积性肝损伤。此外，ANIT 大鼠经穿心莲内酯治疗后，纤维化相关 α- 平滑肌肌动蛋白（α-SMA）阳性细胞和门静脉区增殖细胞核抗原（PCNA）阳性细胞数量显著减少。大鼠肝内胆汁酸合成限速酶 CYP7A1、基底外侧外排转运蛋白 ATP 结合盒转运蛋白 C3（ABCC3）和 ATP 结合盒转运蛋白 C4（ABCC4）表达水平下调，而 PXR 和细胞色素 P450 3A2（CYP3A2）的表达增加，胆汁酸代谢和毒性胆汁成分清除能力增强[50]。此外，薛莲芳等[51]用苯甲酸雌二醇诱导孕鼠发生妊娠期肝内胆汁淤积（ICP），给予穿心莲内酯治疗后，孕鼠胆汁酸代谢和肝功能损伤得到显著改善，子代生存率明显提升。

脱水穿心莲内酯是穿心莲的另一种二萜内酯类成分，对 BDL 引起的胆汁淤积也具有保护作用。Weng 等[52]给 BDL 小鼠回盲肠部位静脉注射脱水穿心莲内酯，模拟胆道梗阻引起的更严重的胆汁淤积性肝损伤，结果显示，脱水穿心莲内酯能限制 LPS 和 TLR4 结合并进一步抑制 NF-κB 信号通路的调控作用，降低模型组小鼠肝脏炎性因子表达水平，减少胆管增生及胆道坏死，显著缓解胆汁淤积性肝损伤。另有研究发现，在 BDL 小鼠和人肝星状细胞（LX-2）中，脱水穿心莲内酯也能通过抑制肝星状细胞（HSC）激活并阻断转化生长因子 -β（TGF-β）促纤维化通路，减少 BDL 诱导的胆汁淤积性肝纤维化的形成[53]。

5　三萜

5.1　四环三萜类

5.1.1　黄芪甲苷　黄芪甲苷属于三萜类皂苷，有抗病毒、抗炎、抗氧化等多种药理作用，是传统中药黄芪的主要活性成分。研究表明，黄芪汤对胆汁淤积性肝病有良好的治疗效果，而其中主要组分黄芪甲苷也具有一定的抗胆汁淤积作用[54]。在 BDL 大鼠胆汁淤积性肝纤维化模型中，给予黄芪甲苷治疗能够明显抑制胆管细胞的异常增殖、胶原过度沉积和羟脯氨酸（Hyp）含量的异常升高，并显著减少造血干细胞的活化，进而减轻肝脏纤维化程度。作用机制为黄芪甲苷通过增强 Smad7 表达抑制 TGF-β 信号通路的激活，显著下调 α-SMA、TGF-β_1 和 MCP-1 的表达水平，抑制成纤维细胞的激活和募集。进一步的机制研究证实，黄芪甲苷能阻断 Notch 信号通路，抑制肝脏祖细胞（HPC）向胆道上皮细胞的异常分化，从而有效降低胆道肝纤维化[55]。另有报道称，黄芪甲苷Ⅳ和阿魏酸联合使用，可通过抑制 TGF-β 信号通路，激活 Nrf2 途径协同诱导 LX-2 失活，进而显著降低胆管结扎性肝纤维化[56]。

5.1.2　人参皂苷　人参皂苷是一类广泛存在于人参属药材中的四环三萜类皂苷，有抗炎、抗纤维化等多种药理作用，在 CCl_4、LPS 等引起的多种体外肝细胞或者动物肝脏损伤模型中都具有显著的肝保护作用[57-58]。研究表明，给予 ANIT 大鼠人参皂苷 Rg_1 治疗后，血清中胆汁淤积和肝损伤标志物的异常升高被抑制，炎性因子的表达水平降低，肝组织病理损伤显著减轻。此外，人参皂苷 Rg_1 还可以恢复 ANIT 大鼠肝脏代谢酶细胞色素 P450 3A4（CYP3A4）、细胞色素 P450 2B10（CYP2B10）等的表达水平，调控胆汁酸代谢。进一步研究发现，人参皂苷 Rg_1 通过激活 FXR 增加其下游靶基因 *BSEP*、*MRP2* 和 *NTCP* 的表达，改善胆汁分泌，缓解胆汁淤积性肝损伤[59]。在 BDL 诱导的小鼠肝纤维化模型中，人参皂苷 Rg_1 治疗可显著降低核内 NF-κB 蛋白水平，减弱其对可溶性血管细胞黏附分子 -1（*VCAM-1*）的基因表达启动活性，缓解机体炎性损伤，从而减轻胆汁淤积性肝纤维化[57]。Xu 等[60]给予大鼠 17- 乙炔雌二醇诱导肝内胆汁淤积，结果显示，人参皂苷治疗能显著抑制模型组大鼠肝脏炎性因子的表达、增加抗氧化酶 SOD 的活性，减轻肝脏炎症反应和氧化应激损伤，缓解肝内胆汁淤积。此外，人参皂苷还能调控促凋亡分子 Bax 和抗凋亡分子 BCL-2 的表达平衡，抑制胆汁淤积性肝缺血再灌注损伤引起的细胞凋亡，进而保护肝脏[61]。

5.2 五环三萜类

5.2.1 桔梗皂苷 D 桔梗皂苷 D 是从桔梗科药用植物桔梗中提取分离的一种五环三萜皂苷类化合物，具有保肝、抗炎等多种药理活性。研究表明，桔梗皂苷 D 能剂量依赖性地降低血清 ALT、AST、TBIL 水平，降低脂质过氧化和氧化应激指标硫代巴比妥酸活性物质（TBARS）、NO 的表达水平，抑制胆汁淤积引起的抗氧化酶 GSH、SOD 的耗竭，机制为抑制 NF-κB 激活下调一氧化氮合成酶（iNOS）表达，降低肝脏 NO 水平。因此，桔梗皂苷 D 通过降低氧化应激，改善肝细胞凋亡和组织纤维化，从而减轻胆汁淤积性肝损伤 [62]。

5.2.2 甘草酸和甘草次酸 甘草酸是中药甘草的主要有效成分，属于五环三萜类化合物，具有多种生物活性。沈淑娇等 [63] 发现，甘草水煎液能通过增加胆汁酸代谢和转运酶 CYP3A11、UGT1A1 等的表达，降低胆汁淤积小鼠的肝内胆汁酸负荷，减轻肝内胆汁淤积。甘草次酸由甘草酸经肠道菌群代谢产生，也是甘草的主要活性成分之一。在 ANIT 诱导的胆汁淤积性肝损伤模型中，甘草酸和甘草次酸预处理可逆转多种共轭胆汁酸水平的异常改变，胆汁酸转运和代谢蛋白 CYP7A1、微粒体三酰甘油转移蛋白（MTTP）、乙酰辅酶 A 乙酰转移酶 2（ACAT2）等的异常表达，恢复胆汁酸循环，减轻肝损伤 [64]。此外，甘草酸和甘草次酸还能降低 ANIT 大鼠血清胆汁淤积相关指标的水平。通过检测酮洛酚葡萄糖醛酸结合物（KPI）的累积排泄发现，甘草酸和甘草次酸能增加胆汁流量，缓解胆管阻塞引起的肝脏损伤 [65]。另有研究表明，甘草次酸（β 型）能通过诱导 SIRT1 激活 FXR 及其下游基因 *SHP*、*BSEP* 的表达，上调 Nrf2 及其介导的 MRP2、MRP3 和 MRP4 水平，改善肝细胞内胆酸稳态失衡，减轻 ANIT 诱导的大鼠胆汁淤积性肝损伤 [66]。Gumpricht 等 [67] 用 GCDC 诱导离体肝细胞凋亡模型，同时给予甘草酸和甘草次酸（β 型）处理。结果发现，两者均能抑制 ROS 生成，减少线粒体膜通透性转变（MPT）和抑制细胞色素 C 的释放。而甘草次酸（β 型）能显著抑制半胱氨酸蛋白酶 10（caspase 10）、caspase 3、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶（PARP）和 JNK 等几种促凋亡信号的激活，减轻细胞凋亡和坏死。另有研究表明，甘草酸能调节胆汁的代谢和排泄、抑制炎症，有效缓解 ANIT 诱导的急性胆管消失综合征（AVBDS）的初期损伤 [68]。此外，甘草酸还能通过 PXR 上调 CYP3A 的表达、激活 SHP，并竞争性抑制 CYP7A1 的转录，进而调控胆汁酸的生物合成和代谢，有效抑制 LCA 导致的肝损伤 [69]。Zheng 等 [70] 研究发现，甘草酸衍生物 TY501 能激活 FXR，并上调其介导的 BSEP、MRP2 和 NTCP 的表达，在体内或体外模型中缓解 LCA 引起的胆汁淤积性肝损伤。

5.2.3 雷公藤红素 雷公藤红素是从传统中药雷公藤根皮提取分离的一种五环三萜类化合物，具有广泛的生物活性，在多种胆汁淤积性肝损伤模型中均显示出保护作用。研究表明，雷公藤红素能抑制血清生化指标的异常变化，并通过降低基质金属蛋白酶 MMP-2 和 MMP-9 的表达减轻肝脏毒性、恢复胆汁酸的正常流动，进而改善大鼠妊娠期肝内胆汁淤积 [71]。另一项实验也显示，雷公藤红素能降低 ANIT 小鼠血清肝损伤指标的水平，并抑制炎性因子的异常升高，恢复胆汁酸合成和转运相关基因的表达，减轻肝脏炎性细胞浸润和坏死，从而缓解胆汁淤积性肝损伤；此外，雷公藤红素还能下调肝损伤和炎症相关指标的表达，同时调控肝脏胆汁酸代谢相关基因 *CYP7A1*、*NTCP*、*MRP4* 等的水平，来治疗硫代乙酰胺（TAA）引起的小鼠胆汁淤积性肝损伤；机制研究表明，雷公藤红素可能是通过激活 SIRT1-FXR 通路，调节 SIRT1 下游靶基因 *FXR*、*NF-κB*、*P53* 的表达水平，发挥肝保护作用。相同的调控机制在 DCA 诱导的小鼠原代肝细胞胆汁淤积模型中也得到了证实 [72]。

5.2.4 齐墩果酸 齐墩果酸是广泛存在于青叶胆、女贞子、獐芽菜等植物中的一种五环三萜类化合物，具有抗炎、抗氧化等多种药理作用。齐墩果酸在石胆酸、乙醇等诱导的多种体内体外肝损伤模型中均有良好的肝保护作用 [73-74]。研究表明，低剂量齐墩果酸治疗可提高小鼠存活率，降低血清肝损伤指标和肝脏 TBA 含量，减轻肝坏死；机制研究表明，齐墩果酸可能是通过激活 Nrf2，进而上调 MRP2、MRP3 和 MRP4 的表达，从而缓解 LCA 诱导的小鼠胆汁淤积性肝损伤 [73]。除此之外，齐墩果酸还能通过拮抗 FXR 来减轻 BDL 小鼠的梗阻性胆汁淤积 [75]。Chai 等 [76] 研究发现，口服齐墩果酸可显著增加胆汁酸合成酶和肝脏代谢酶的表达，上调肝小管膜膜外排转运蛋白和基底外侧膜转运蛋白的水平，缓解 BDL 大鼠的炎症和胆汁淤积肝损伤。同样的，在 ANIT 诱导的肝内胆汁淤积模型中，齐墩果酸能通过激活 FXR 和 Nrf2 调控外排转运体的表达，发挥肝脏保护作用 [77]。然而，有研究显示，高剂量齐墩果酸反而会加重胆汁淤积，损伤肝脏 [73]。因此，未来齐墩果酸的应用需要注意使用剂量，避免其潜在毒性。

5.2.5 泽泻醇 B23- 乙酸乙酯（AB23A） AB23A

是从传统中药泽泻中提取分离出来的一种五环三萜类化合物，在药物开发中具有广阔前景。研究表明，在 ANIT 诱导的胆汁淤积性肝损伤模型中，AB23A 能剂量依赖性地降低胆汁酸合成酶 CYP7A1 和 CYP8B1、肝脏摄取转运蛋白 NTCP 的水平，上调外排转运蛋白 BSEP、MRP2 和 MDR2 的表达，减轻肝脏内胆汁酸的过度积累；此外，AB23A 还能上调 *SULT2A1*、胆汁酸辅酶 A 连接酶（*BAL*）、胆酸辅酶 A（*BAAT*）的基因表达，增加胆汁酸代谢；进一步探究发现，AB23A 的肝脏保护作用主要与 FXR 受体的激活有关 [78]。Meng 等 [79] 研究证实，AB23A 通过激活 FXR 上调叉头框蛋白 M1B（FOXM1B）、细胞周期蛋白 D1（Cyclin D1）和细胞周期蛋白 B1（Cyclin B1）的表达水平，调控胆汁酸代谢相关基因，从而促进肝细胞增殖、减轻肝脏毒性。此外，AB23A 还能诱导 STAT3 磷酸化，促进 STAT3 靶基因 *Bcl-xl* 和细胞信号转导抑制因子 3（*SOCS3*）的表达，进而抑制肝细胞凋亡。

6　总结与展望

胆汁淤积可以发生在胆汁酸代谢过程中的任何环节，发病机制复杂，影响因素多样。随着胆汁淤积的加重，多种毒性胆汁成分尤其是疏水性胆汁酸在细胞内过度堆积，损伤肝脏和胆管。如果不及时治疗，胆汁淤积会发展为肝纤维化、肝硬化，甚至导致肝功能衰竭。目前，临床上用于治疗胆汁淤积的药物主要有 UDCA、OCA、非诺贝特、*S*- 腺苷蛋氨酸等。这些药物大多疗效欠佳，且存在应答不良、肝移植生存率降低、瘙痒等多种不良反应。因此，寻找和开发治疗胆汁淤积的新药非常有必要。近年来，药用植物中的萜类化合物因在各种肝脏疾病中显示出突出的保护作用而备受关注，也为胆汁淤积相关治疗药物的研发提供了有效潜在的前体药物。胡黄连苷、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷、京尼平苷酸、青蒿素、丹参酮ⅡA 等主要通过调节胆汁酸代谢相关基因，恢复胆汁酸稳态，减轻肝损伤；獐芽菜苷、雷公藤红素、齐墩果酸、梓醇等则主要够通过抑制炎症相关通路激活和炎性因子释放，缓解胆汁淤积；而穿心莲内酯、桔梗皂苷 D、黄芪甲苷等则具有抗炎、抗氧化、调控胆汁酸代谢等多方面、多靶点作用，从而减轻胆汁淤积性肝损伤。目前，萜类化合物改善胆汁淤积肝损伤的具体机制还有待深入的探究。此外，为避免部分萜类化合物的潜在不良反应，保证治疗效果的同时也需要在给药剂量上进一步调整和明确。但鉴于此类化合物有良好的抗胆汁淤积活性，对近年来天然萜类化合物改善胆汁淤积性肝损伤的基础研究进行总结和梳理仍具有重要意义。因此，本文就药用植物中萜类成分（化学结构式见图 1）对胆汁淤积性肝损伤的改善作用及相关机制进行归纳（见表 1），综述目前防治胆汁淤积性肝损伤药物的研究进展，显示了天然萜类化合物在胆汁淤积性肝病治疗中的广泛应用前景，为其进一步临床应用和新药研发提供参考。

表 1　药用植物中萜类化合物对胆汁淤积性肝损伤的作用机制及靶点

Tab 1　Mechanism and targets of medicinal plants derived terpenoids for cholestatic liver injury

种类	名称	分子式	药理活性	分子靶点及通路	参考文献
单萜	胡黄连苷Ⅱ	$C_{23}H_{28}O_{13}$	调节胆汁酸合成、转运、代谢等，抗氧化，抗炎，抗凋亡	ERK1/2-LKB1-AMPK，JAK-STAT3，FXR，CYP7A1，CYP8B1，BSEP，NTCP，UGT1A1，SULT2A1	[12-14]
	龙胆苦苷	$C_{16}H_{20}O_9$	调节胆汁酸合成、转运	CAR，FXR，MRP2，MRP3，MRP4，BSEP，MDR1，CYP7A1，CYP8B1，CYP27A1，OST-β，ASBT，STAT3，NQO1	[16-19]
	獐芽菜苷	$C_{16}H_{22}O_9$	调控胆汁酸转运，抗炎	MRP2，OST-β，MDR1，NTCP，OATP1A1，OATP1B2，TNF-α，IL-6，mKC，MIP-2，ICAM-1	[20]
	獐芽菜苦苷	$C_{16}H_{22}O_{10}$	调节胆汁酸代谢	CYP8B1，MDR1，MRP3，MRP4，CYP3A，UGT2B，SULT2A1，GSTA1	[24]
	京尼平苷	$C_{17}H_{24}O_{10}$	调节胆汁酸合成、转运，抗炎	STAT3，NF-κB，CYP7A1，CYP8B1，NTCP，CYP27A1，OATP1，OATP2	[28]
	京尼平	$C_{11}H_{14}O_5$	调控胆汁酸合成和分泌	MRP2	[29-30]
	京尼平苷酸	$C_{16}H_{22}O_{10}$	调节胆汁酸合成、外排	SIRT1，FXR，SHP，LRH1，CYP7A1，MRP2，BSEP	[31-33]
	梓醇	$C_{22}H_{26}O_{12}$	抗炎，抗凋亡，抗氧化应激，恢复线粒体膜电位	TNF-α，IL-1β，IL-6，BAX，cleaved caspase3，Bcl-2，Cytochrome C	[34]
	芍药苷	$C_{23}H_{28}O_{11}$	抗氧化，抗炎，调节胆汁酸转运	PI3K/Akt，Nrf2，SIRT1，FXR，NOX4，NLRP3，ASC，caspase-1，NF-κB，TNF-α，IL-1β，IL-18，NTCP，BSEP，MRP2	[37-40]
倍半萜	青蒿素	$C_{15}H_{22}O_5$	调节胆汁酸转运、代谢，抗氧化	FXR，CAR，MRP2，MRP4，OATP2，OATP4，SULT2A1	[43]

续表 1

种类	名称	分子式	药理活性	分子靶点及通路	参考文献
二萜	丹参酮ⅡA	$C_{19}H_{18}O_3$	调节胆汁酸转运、代谢，抗氧化，抗凋亡	HOTAIR，Nrf2，PXR，MRP2，MRP4，MDR1，CYP3A11，CYP3A13，NTCP，JNK	[44-47]
	穿心莲内酯	$C_{20}H_{30}O_5$	抗炎，抗氧化，抗纤维化，调节胆汁酸合成、转运	NF-κB，COX-2，SIRT1，Nrf2，PXR，IL-6，TNF-α，α-SMA，CYP7A1，ABCC3，ABCC4，CYP3A2	[48-51]
	脱水穿心莲内酯	$C_{20}H_{28}O_4$	抗纤维化，抗炎	TLR4，TGF-β，NF-κB，IL-6，TNF-α	[52-53]
三萜	黄芪甲苷	$C_{28}H_{32}O_{17}$	抗纤维化，抗炎	Notch，Nrf2，TGF-β，Smad7，α-SMA，MCP-1	[55-56]
	人参皂苷	$C_{30}H_{52}O_2$	抗炎，抗氧化，抗凋亡，调节胆汁酸代谢	FXR，NF-κB，TNF-α，IFN-γ，IL-1β，IL-6，VCAM-1，BAX，Bcl-2，UGT1A1，SULT2A1，BSEP，MRP2，NTCP，CYP3A4，CYP2B10	[58-61]
	桔梗皂苷 D	$C_{57}H_{92}O_{28}$	抗氧化	NF-κB，iNOS	[62]
	甘草酸	$C_{42}H_{62}O_{16}$	调节胆汁酸代谢	PXR，FXR，SHP，CYP3A，CYP3A11，UGT1A1，BSEP，MTTP，CYP7A1，NPC111，ACAT2，Cytochrome C，MRP2，NTCP	[65，67-70]
	甘草次酸	$C_{30}H_{46}O_4$	调节胆汁酸代谢，抗凋亡	SIRT1，FXR，Nrf2，SHP，BSEP，MRP2，MRP3，MRP4，CYP7A1，MTTP，ACAT2，JNK，caspase-3，caspase-10，PARP，Cytochrome C	[64，66-67]
	雷公藤红素	$C_{29}H_{38}O_4$	调节胆汁酸合成、转运，抗炎	SIRT1，FXR，NF-κB，P53，MMP-2，MMP-9，CYP7A1，NTCP，OATP4，CYP8B1，MRP4，BSEP，MRP2，IL-6，TNF-α	[71-72]
	齐墩果酸	$C_{30}H_{48}O_3$	调节胆汁酸转运	FXR，Nrf2，MRP2，MRP3，MRP4，BSEP	[73，75-77]
	泽泻醇 B23- 乙酸乙酯	$C_{32}H_{50}O_5$	调节胆汁酸代谢，抗凋亡	FXR，STAT3，FOXM1B，Cyclin D1，Cyclin B1，SOCS3，Bcl-xl，BAAT，SULT2A1，BAL，CYP8B1，NTCP，BSEP，MRP2，MRD2，CYP7A1	[78-79]

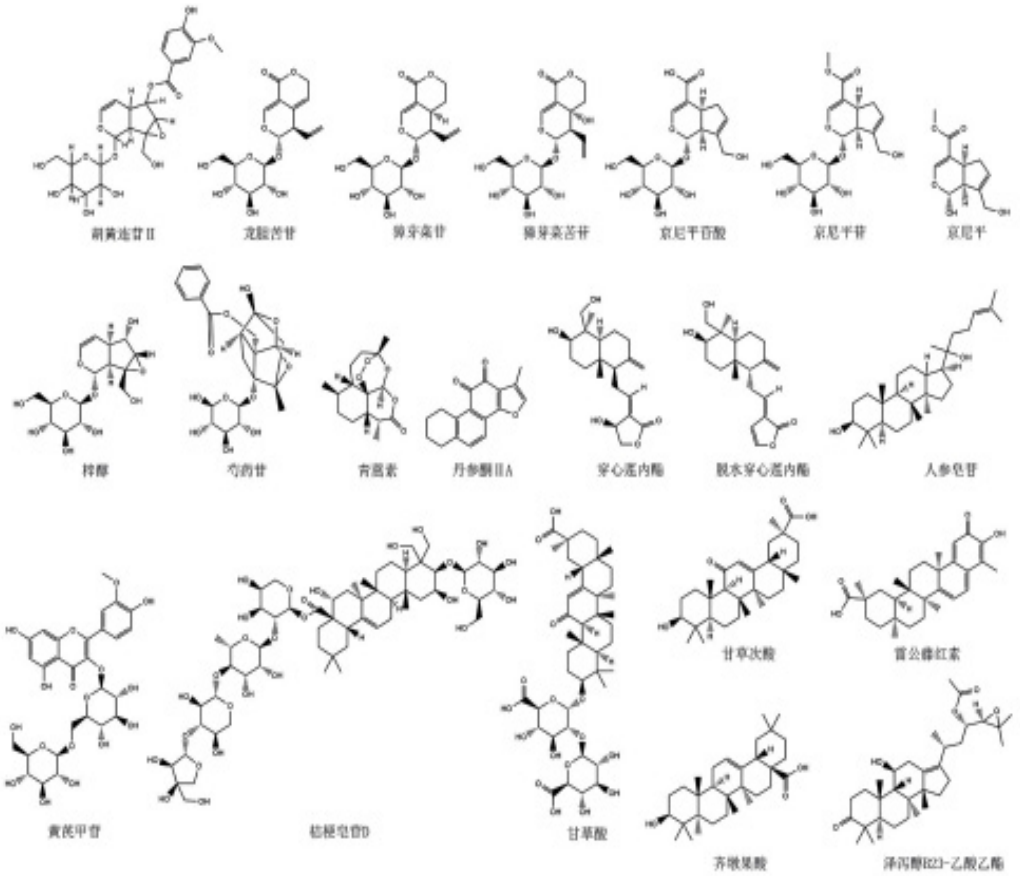


图 1 萜类化合物化学结构式

Fig 1 Chemical structural formula of terpenoids

参考文献

[1] 陈东风，孙文静 . 从发病机制谈肝内胆汁淤积的诊治 [J]. 临床肝胆病杂志，2015，31（10）：1559-1562.

[2] 方丹，黎培员 . 胆汁淤积的治疗 [J]. 内科急危重症杂志，2020，26（1）：22-24.

[3] Chiang JYL，Ferrell JM. Bile acid metabolism in liver pathobiology [J]. Gene Expr，2018，18（2）：71-87.

[4] Wei S，Ma X，Zhao Y. Mechanism of hydrophobic bile acid-induced hepatocyte injury and drug discovery [J]. Front Pharmacol，2020（11）：1-11.

[5] 杨丽，曹燕，杨长青 . 胆汁淤积的发生机制及相关疾病 [J]. 内科理论与实践，2014，9（5）：308-312.

[6] 王锋，李克 . 疏水性胆汁酸诱导肝细胞损伤机制研究进展 [J]. 医学研究生学报，2012，25（8）：882-885.

[7] Li J，Dawson PA. Animal models to study bile acid metabolism [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis，2019，1865（5）：895-911.

[8] Li M，Cai S，Boyer JL. Mechanisms of bile acid mediated inflammation in the liver [J]. Mol Aspects Med，2017，56（8）：45-53.

[9] Zhang Y，Lu Y，Ji H，et al. Anti-inflammatory，anti-oxidative stress and novel therapeutic targets for cholestatic liver injury [J]. Biosci Trends，2019，13（1）：23-31.

[10] 王贵阳，李可为 . 氧化应激在胆汁淤积性肝损伤中的作用及抗氧化治疗研究进展 [J]. 中国现代普通外科进展，2014，17（1）：38-41.

[11] 王璐，韩英 . 原发性胆汁性胆管炎的诊治现状与挑战 [J]. 临床肝胆病杂志，2021，37（10）：2257-2261.

[12] Piao X，Sui X，Liu B，et al. PicrosideⅡ improves severe acute pancreatitis-induced hepatocellular injury in rats by affecting JAK2/STAT3 phosphorylation signaling [J]. Biomed Res Int，2021，2021：1-12.

[13] Li T，Xu L，Zheng R，et al. PicrosideⅡ protects against cholestatic liver injury possibly through activation of farnesoid X receptor [J]. Phytomedicine，2020，68：1-8.

[14] Li T，Zheng R，Xu L，et al. Picroside Ⅱ alleviates liver injury induced by alpha-naphthylisothiocyanate through AMPK-FXR pathway [J]. Toxicol Appl Pharmacol，2020，408：1-34.

[15] 赵永焕，朱桂华，赵海英，等 . 龙胆草有效成分提取方法的研究 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报，1997（3）：84-85.

[16] 封欣婵 . 龙胆苦苷对肝细胞表面膜转运蛋白 MRP3、MRP4 的表达影响 [D]. 重庆：第三军医大学，2014.

[17] 高宇 . 川西獐牙菜及龙胆苦苷对胆汁淤积大鼠肝脏 MRP2、BSEP 表达的影响 [D]. 重庆：第三军医大学，2014.

[18] Tang X，Yang Q，Yang F，et al. Target profiling analyses of bile acids in the evaluation of hepatoprotective effect of gentiopicroside on ANIT-induced cholestatic liver injury in mice [J]. J Ethnopharmacol，2016，194：63-71.

[19] Han H，Xu L，Xiong K，et al. Exploration of hepatoprotective effect of gentiopicroside on alpha-naphthylisothiocyanate-induced cholestatic liver injury in rats by comprehensive proteomic and metabolomic signatures [J]. Cell Physiol Biochem，2018，49（4）：1304-1319.

[20] Yang QL，Yang F，Gong JT，et al. Sweroside ameliorates alpha-naphthylisothiocyanate-induced cholestatic liver injury in mice by regulating bile acids and suppressing pro-inflammatory responses [J]. Acta Pharmacol Sin，2016，37（9）：1218-1228.

[21] Sun H，Li L，Zhang A，et al. Protective effects of sweroside on human MG-63 cells and rat osteoblasts [J]. Fitoterapia，2013，84：174-179.

[22] Yang Q，Shu F，Gong J，et al. Sweroside ameliorates NAFLD in high-fat diet induced obese mice through the regulation of lipid metabolism and inflammatory response [J]. Int J Mol Sci，2020，255：1-10.

[23] Yang Y，Li J，Wei C，et al. Amelioration of nonalcoholic fatty liver disease by swertiamarin in fructose-fed mice [J]. Phytomedicine，2019，59：1-12.

[24] Feng X，Du X，Chen S，et al. Swertianlarin，isolated from Swertia mussotii Franch，increases detoxification enzymes and efflux transporters expression in rats [J]. Int J Clin Exp Patho，2015，8（1）：184-195.

[25] Dong L，Fan Y，Yu Q，et al. Synergistic effects of rhubarb-gardenia herb pair in cholestatic rats at pharmacodynamic and pharmacokinetic levels [J]. J Ethnopharmacol，2015，175：67-74.

[26] 谭桢，刘爱明，罗敏，等 . 茵栀黄注射液抗胆汁淤积药效成分的筛选及其作用机制研究 [J]. 中国中药杂志，2016，41（6）：1113-1118.

[27] Wang L，Wu G，Wu F，et al. Geniposide attenuates ANIT-induced cholestasis through regulation of transporters and enzymes involved in bile acids homeostasis in rats [J]. J Ethnopharmacol，2017，196：178-185.

[28] Tan Z，Liu A，Luo M，et al. Geniposide inhibits alpha-naphthylisothiocyanate-induced intrahepatic cholestasis：the downregulation of STAT3 and NFκB signaling plays an important role [J]. Am J Chinese Med，2016，44（4）：721-736.

[29] Fan X，Lin L，Cui B，et al. Therapeutic potential of genipin in various acute liver injury，fulminant hepatitis，NAFLD and other non-cancer liver diseases：more friend than foe [J]. Pharmacol Res，2020，159：1-9.

[30] Shoda J，Miura T，Utsunomiya H，et al. Genipin enhances Mrp2（Abcc2）-mediated bile formation and organic anion transport in rat liver [J]. Hepatology，2004，39（1）：167-178.

[31] Chen H，Huang X，Min J，et al. Geniposidic acid protected against ANIT-induced hepatotoxity and acute intrahepatic cholestasis，due to FXR-mediated regulation of BSEP and MRP2 [J]. J Ethnopharmacol，2016，179：197-207.

[32] 陈浩，李甲，胡蕾，等 . 基于 Sirt1-FXR 通路探究京尼平苷酸对胆汁淤积大鼠胆汁酸肝肠循环的影响 [J]. 中国

中药杂志，2019，44（4）：787-795.
[33] 陈浩，高璇，赵威，等 . 栀子酸调节胆汁淤积大鼠 SHP-LRH-1 信号通路的实验研究 [J]. 中南大学学报（医学版），2019，44（6）：605-613.
[34] Gao X，Xu J，Liu H. Protective effects of catalpol on mitochondria of hepatocytes in cholestatic liver injury [J]. Mol Med Rep，2020，22（3）：2424-2432.
[35] Liu Z，Zhu P，Zhang L，et al. Autophagy inhibition attenuates the induction of anti-inflammatory effect of catalpol in liver fibrosis [J]. Biomed Pharmacother，2018，103：1262-1271.
[36] 张晔 . 芍药苷对各类型肝损伤保护作用的实验研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志，2019，28（6）：681-684.
[37] Chen L，Wei S，Liu H，et al. Paeoniflorin protects against ANIT-induced cholestatic liver injury in rats via the activation of SIRT1-FXR signaling pathway [J]. Evid-Based Compl Alt，2021，2021：1-12.
[38] Zhao Y，He X，Ma X，et al. Paeoniflorin ameliorates cholestasis via regulating hepatic transporters and suppressing inflammation in ANIT-fed rats [J]. Biomed Pharmacother，2017，89：61-68.
[39] 罗琳，吴锋，窦志华，等 . 芍药苷对胆汁淤积肝损伤保护作用机制研究 [J]. 南通大学学报（医学版），2011，31（6）：450-452.
[40] Chen Z，Ma X，Zhu Y，et al. Paeoniflorin ameliorates ANIT-induced cholestasis by activating Nrf2 through an PI3K/Akt-dependent pathway in rats [J]. Phytother Res，2015，29（11）：1768-1775.
[41] Ma N，Zhang Z，Liao F，et al. The birth of artemisinin [J]. Phytother Res，2020，216：1-4.
[42] Xiong Y，Huang J. Anti-malarial drug：the emerging role of artemisinin and its derivatives in liver disease treatment [J]. Chin Med，2021，16（1）：80.
[43] Alkhedaide AQ，Ismail TA，Alotaibi SH，et al. Preventive effect of artemisinin extract against cholestasis induced via lithocholic acid exposure [J]. Bioscience Rep，2018，38（6）：1-12.
[44] Park E，Zhao Y，Kim Y，et al. PF2401-SF，standardized fraction of Salvia miltiorrhiza and its constituents，tanshinone Ⅰ，tanshinone ⅡA，and cryptotanshinone，protect primary cultured rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis by inhibiting JNK phosphorylation [J]. Food Chem Toxicol，2007，45（10）：1891-1898.
[45] Yang Y，Liu L，Xu M，et al. Tanshinone a may alleviate rifampin-induced cholestasis by regulating the expression and function of NTCP [J]. Hum Exp Toxicol，2021，40（6）：1003-1011.
[46] Zhang X，Ma Z，Liang Q，et al. Tanshinone ⅡA exerts protective effects in a LCA-induced cholestatic liver model associated with participation of pregnane X receptor [J]. J Ethnopharmacol，2015，164：357-367.
[47] Zhang X，Wang T，Yang Y，et al. Tanshinone ⅡA attenuates acetaminophen-induced hepatotoxicity through HOTAIR-Nrf2-MRP2/4 signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother，2020，130：1-13.
[48] 王雷 . 穿心莲内酯对 ANIT 诱导的大鼠肝损伤的保护作用及其机制研究 [D]. 大连：大连医科大学，2016.
[49] Wang L，Cao F，Zhu L，et al. Andrographolide impairs alpha-naphthylisothiocyanate-induced cholestatic liver injury in vivo [J]. J Nat Med-Tokyo，2019，73（2）：388-396.
[50] Khamphaya T，Chansela P，Piyachaturawat P，et al. Effects of andrographolide on intrahepatic cholestasis induced by alpha-naphthylisothiocyanate in rats [J]. Eur J Pharmacol，2016，789：254-264.
[51] 薛莲芳，刘慧，丘穗珊，等 . 穿心莲用于妊娠胆汁淤积症的作用机制 [J]. 暨南大学学报（自然科学与医学版），2021，42（3）：284-292.
[52] Weng Z，Chi Y，Xie J，et al. Anti-Inflammatory activity of dehydroandrographolide by TLR4/NF-κB signaling pathway inhibition in bile Duct-Ligated mice [J]. Cell Physiol Biochem，2018，49（3）：1124-1137.
[53] 谢婧 . 脱水穿心莲内酯对小鼠胆管结扎诱导的肝纤维化的抑制作用及机制探讨 [D]. 锦州：锦州医科大学，2019.
[54] Zou J，Li W，Wang G，et al. Hepatoprotective effects of Huangqi decoction（Astragali Radix and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma）on cholestatic liver injury in mice：involvement of alleviating intestinal microbiota dysbiosis [J]. J Ethnopharmacol，2021，267：1-34.
[55] Mu YP，Zhang X，Li XW，et al. Astragaloside prevents BDL-induced liver fibrosis through inhibition of notch signaling activation [J]. J Ethnopharmacol，2015，169：200-209.
[56] Zhao X，Zhang J，Liang Y，et al. AstragalosideⅣsynergizes with ferulic acid to alleviate hepatic fibrosis in bile duct-ligated cirrhotic rats [J]. Digest Dis Sci，2020，65（10）：2925-2936.
[57] 罗飘，楚世峰，彭也，等 . 人参皂苷 Rg_1 调节 NF-κB/VCAM-1 减轻胆汁淤积性肝纤维化 [J]. 药学学报，2019，54（2）：321-328.
[58] Huynh DTN，Baek N，Sim S，et al. Minor ginsenoside rg2 and rh1 attenuates LPS-Induced acute liver and kidney damages via downregulating activation of TLR4-STAT1 and inflammatory cytokine production in macrophages [J]. Int J Mol Sci，2020，21（18）：6656.
[59] Xiao Q，Zhang S，Ren H，et al. Ginsenoside Rg_1 alleviates ANIT-induced intrahepatic cholestasis in rats via activating farnesoid X receptor and regulating transporters and metabolic enzymes [J]. Chem-Biol Interact，2020，324：1-9.
[60] Xu Y，Yu Z，Zhang C，et al. Protective effects of ginsenosides on 17α-ethynyelstradiol-induced intrahepatic cholestasis via anti-oxidative and anti-inflammatory mechanisms in rats [J]. Am J Chinese Med，2017，45（8）：1613-1629.
[61] Fu YQ，Hua C，Zhou J，et al. Protective effects of ginseng total saponins against hepatic ischemia/reperfusion

injury in experimental obstructive jaundice rats [J]. Pharm Biol，2013，51（12）：1545-1551.

[62] Kim T，Lee H，Song I，et al. Platycodin D attenuates bile duct ligation-induced hepatic injury and fibrosis in mice [J]. Food Chem Toxicol，2013，51：364-369.

[63] 沈淑娇，张志荣，张林林，等 . 甘草水煎液对 α- 萘异硫氰酸酯诱导的肝内胆汁淤积性损伤的防治及其机理研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2016，21（12）：1321-1327.

[64] Wang H，Fang Z，Meng R，et al. Glycyrrhizin and glycyrrhetinic acid inhibits alpha-naphthyl isothiocyanate-induced liver injury and bile acid cycle disruption [J]. Toxicology，2017，386：133-142.

[65] 赵营，张玉林，徐林刚，等 . 甘草酸、甘草次酸及苦参碱等对实验性胆汁淤积大鼠作用的比较 [J]. 中国药科大学学报，2007，38（3）：256-260.

[66] Wu SY，Cui SC，Wang L，et al. 18Beta-glycyrrhetinic acid protects against alpha-naphthylisothiocyanate-induced cholestasis through activation of the Sirt1/FXR signaling pathway [J]. Acta Pharmacol Sin，2018，39（12）：1865-1873.

[67] Gumpricht E，Dahl R，Devereaux MW，et al. Licorice compounds glycyrrhizin and 18β-glycyrrhetinic acid are potent modulators of bile acid-induced cytotoxicity in rat hepatocytes [J]. J Biol Chem，2005，280（11）：10556-10563.

[68] Zhao Y，Zhai D，Chen X，et al. Protective effect of glycyrrhizin and matrine on acute vanishing bile duct syndrome induced by alpha-naphthylisothiocyanate in rats [J]. Hepatol Res，2007，37（2）：143-151.

[69] Wang Y，Zhou J，Ma Z，et al. Pregnane X receptor mediated-transcription regulation of CYP3A by glycyrrhizin：a possible mechanism for its hepatoprotective property against lithocholic acid-induced injury [J]. Chem-Biol Interact，2012，200（1）：11-20.

[70] Zheng X，Zhu S，Zhou Z，et al. Glycyrrhetic acid derivative TY501 protects against lithocholic acid-induced cholestasis [J]. Drug Res（Stuttg），2018，68（7）：370-377.

[71] Guo J，Wang Y，Wang N，et al. Celastrol attenuates intrahepatic cholestasis of pregnancy by inhibiting matrix metalloproteinases-2 and 9 [J]. Ann Hepatol，2019，18（1）：40-47.

[72] Zhao Q，Liu F，Cheng Y，et al. Celastrol protects from cholestatic liver injury through modulation of SIRT1-FXR signaling [J]. Mol Cell Proteomics，2019，18（3）：520-533.

[73] Chen P，Zeng H，Wang Y，et al. Low dose of oleanolic acid protects against lithocholic acid-induced cholestasis in mice：potential involvement of nuclear factor-E2-related factor 2-mediated upregulation of multidrug resistance-associated proteins [J]. Drug Metab Dispos，2014，42（5）：844-852.

[74] Liu J，Wang X，Liu R，et al. Oleanolic acid co-administration alleviates ethanol-induced hepatic injury via Nrf-2 and ethanol-metabolizing modulating in rats [J]. Chem Biol Interact，2014，221：88-98.

[75] Chen P，Li J，Fan X，et al. Oleanolic acid attenuates obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice，possibly via activation of NRF2-MRPs and FXR antagonism [J]. Eur J Pharmacol，2015，765：131-139.

[76] 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.

[77] 宗思豆 . 齐墩果酸通过调节胆汁酸转运体和代谢酶改善 ANIT 诱导的肝内胆汁淤积 [D]. 南昌：南昌大学，2019.

[78] Meng Q，Chen X，Wang C，et al. Protective effects of alisol B 23-acetate from edible botanical Rhizoma alismatis against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice [J]. Food Funct，2015，6（4）：1241-1250.

[79] Meng Q，Chen X，Wang C，et al. Alisol B 23-acetate protects against ANIT-induced hepatotoxity and cholestasis，due to FXR-mediated regulation of transporters and enzymes involved in bile acid homeostasis [J]. Toxicol Appl Pharm，2015，283（3）：178-186.

（收稿日期：2021-11-29；修回日期：2021-12-25）

胃癌干细胞作为胃癌治疗靶点的研究进展

李扬波，董卫国*（武汉大学人民医院消化内科，武汉 430060）

摘要：胃癌是世界范围内最常见的肿瘤之一，研究胃癌的发病及进展机制对治疗胃癌十分重要。越来越多的证据表明胃癌的侵袭、转移和化疗耐药与胃癌干细胞有着密切的联系，同时伴随干细胞相关信号通路的异常，并且胃癌干细胞周围的肿瘤间质细胞参与维持了胃癌干细胞的干性特征，这可能为以根除胃癌干细胞为目标的治疗方案提供了新思路。本文总结了目前对胃癌干细胞的认识及研究现状，概述了以胃癌干细胞作为靶点治疗胃癌的研究进展。

关键词：胃癌干细胞；胃癌；肿瘤间质；靶向治疗
中图分类号：R735.2，R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)04-0888-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.025

Research progress in gastric cancer stem cells as therapeutic targets of gastric cancer

LI Yang-bo, DONG Wei-guo* (*Department of Gastroenterology*, *People's Hospital of Wuhan University*, *Wuhan* 430060)

Abstract: Gastric cancer is still one of the most common malignant neoplasms in worldwide, so it is of great significance to clarify the mechanism of gastric cancer oncogenesis. It has been proven that the invasion, metastasis and chemoresistance of gastric cancer are closely related to gastric cancer stem cells, with the dysregulation of relevant signal pathways during the tumor formation. The stromal cells surrounding gastric cancer stem cells help maintain the stemness of gastric cancer stem cells, from which new therapeutic strategies may be developed to eradicate gastric cancer stem cells. This article summarized the current understanding and research status of gastric cancer stem cells, and rerviewed the research progress in gastric cancer stem cells as targets in the treatment of gastric cancer.

Key words: gastric cancer stem cell; gastric cancer; tumor stroma; target therapy

胃癌（gastric cancer，GC）是最常见的胃肠道恶性肿瘤之一，2020 年全球因胃癌死亡的人数超过 76.9 万人[1]。目前，胃癌的主要治疗手段是放化疗、手术以及综合治疗，然而目前仅有 30% 左右的患者可以获得长期生存，总体病死率依然很高[2]。胃癌干细胞（gastric cancer stem cell，GCSC）可以通过多种机制诱导胃癌细胞的侵袭转移和对化疗的耐药，而现有的肿瘤治疗手段难以有效杀伤 GCSC，因此 GCSC 是影响胃癌患者生存和预后的最主要原因之一，成为肿瘤治疗领域的研究热点[3]。本文概述了 GCSC 在胃癌发生发展过程中的作用并且总结了近年来针对 GCSC 靶向治疗的研究进展，以期为临床精准化治疗胃癌提供有效参考。

1 GCSC

无限的增殖潜能、自我更新和对凋亡的抵抗是肿瘤干细胞（cancer stem cell，CSC）反映出的细胞干性[4]。自从人类第一次在体外分离出 CSC 后，CSC 几乎在所有的实体肿瘤中都有发现，包括 GCSC[5]。目前 GCSC 的起源尚无定论，部分科学家认为 GCSC 来源于胃腺正常干细胞恶性转化或者发生致癌突变，激活祖细胞，成为肿瘤的起始细胞，并促进肿瘤的侵袭、转移和异质性[6]。另一部分科学家则认为 GCSC 来源于骨髓源性细胞，累积的遗传变异足以引起细胞增殖与突变，促使局部或骨髓来源的成人干细胞

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 81870392）。
作者简介：李扬波，男，在读硕士研究生，主要从事消化系统肿瘤研究，email：liyangbo@whu.edu.cn *通信作者：董卫国，男，教授，博士研究生导师，主要从事消化系统肿瘤研究，email：dongweiguo@whu.edu.cn

与分化的细胞融合产生 GCSC[7]。此外，与维持干细胞特性密切相关的上皮间质转化（epithelial-mesenchymal transition，EMT）是 GCSC 形成的重要环节。EMT 有助于肿瘤细胞的侵袭和转移，导致其产生具有干性和迁移表型的特殊类型细胞，即 GCSC[8]。幽门螺杆菌是胃癌的主要致病因素之一，已有研究证明，幽门螺杆菌感染可促进 EMT 及 GCSC 的产生，该过程与胃黏膜癌前病变的进展密不可分 [9]。

目前，在胃癌中鉴定 GCSC 的方法主要有表面标记物检测、成球生长实验和侧群细胞检测。识别 GCSC 的最佳方法是使用流式细胞术检测 CD44、CD90、CD133 和乙醛脱氢酶 1（acetaldehyde dehydrogenase 1，ALDH1）等表面标记物，为了更方便地在临床通过血液标本识别 GCSC，可以使用微流控平台对循环肿瘤细胞和 GCSC 进行分离，并评估肿瘤的进展 [10]。

2 GCSC 与肿瘤间质细胞

GCSC 周围的免疫微环境称为“生态位”，“生态位”包括各种间质细胞，如成纤维细胞、血管内皮细胞、周细胞、骨髓源性细胞以及脂肪细胞等 [11]。肿瘤间质细胞可以通过各种相互作用以及细胞融合与肿瘤细胞形成细胞团来支持 GCSC 的生存，对肿瘤间质细胞的了解有助于认识其作用于 GCSC 的具体机制 [12]。

2.1 肿瘤相关巨噬细胞

已有研究表明，肿瘤周围浸润的巨噬细胞影响着肿瘤的进展和预后，这些巨噬细胞被称为肿瘤相关巨噬细胞（tumor-associated macrophages，TAM），TAM 在多种肿瘤中可促进肿瘤的生长、细胞外渗和抗肿瘤免疫 [13]。目前认为 TAM 与 GCSC 之间的相互作用是通过血管内皮生长因子、γ- 干扰素和表皮生长因子等细胞因子的表达介导 [14]。一项研究发现乳脂球表皮生长因子是一种影响细胞吞噬、血管生成和免疫耐受的生长因子，经 TAM 大量表达后，可促进 GCSC 的致瘤性和耐药性 [15]。而 GCSC 通过分泌趋化因子，招募 TAM 并传递促进肿瘤增殖的信号，进一步增强胃癌的发生发展 [16]。TAM 还可与 GCSC 的标记物相互作用，CD44 通过诱导 TAM 抑制 miR-328 进一步上调 CD44 的表达，从而促进肿瘤细胞适应高氧化应激状态 [17]。TAM 的一个重要特点是，可在不同条件下分化为 M1 型和 M2 型，而 M2 型细胞可以促进程序性死亡配体 1（programmed cell death 1 ligand 1，PD-L1）的表达，促进 T 淋巴细胞的凋亡，从而抑制细胞毒性 T 淋巴细胞的抗肿瘤作用 [18]。

2.2 肿瘤相关成纤维细胞

肿瘤相关成纤维细胞（cancer-associated fibroblasts，CAF）在维持 TAM 特性中起到了重要作用。CAF 通过细胞之间的相互作用，分泌趋化因子募集单核细胞，并诱导单核细胞呈现 M2 型来维持 TAM 特性 [19-20]。因此，CAF 可以通过募集的 TAM 来增强 GCSC 的干性及标记物的表达，促进胃癌的发生发展。另有研究发现转化生长因子 β（transforming growth factor-β，TGF-β）可以显著增强 CAF 对 GCSC 的促进作用，诱导胃癌的侵袭和转移，提示 CAF 通过 TGF-β 信号通路直接增强 GCSC 的干性 [21]。此外，CAF 通过分泌胞外体来增强 GCSC 的化疗耐药性，该过程作用机制可能与增强 Wnt 信号通路有关 [22]。综上，CAF 通过多种途径增强了 GCSC 的干性特征，导致了胃癌进一步恶化，同时靶向抑制 TAM 和 CAF 可能是更好的治疗方案。

3 GCSC 与靶向治疗

GCSC 对传统化疗和放疗均呈抵抗状态，传统的化疗药物难以清除 GCSC，化疗后残留的癌细胞团中仍有 GCSC 富集，导致了晚期胃癌患者的预后不良 [23]。因此针对 GCSC 的靶向治疗越来越受到关注。

3.1 针对 GCSC 表面标记物的靶向治疗

CD44 是 GCSC 最常见的标记物并且在 GCSC 高表达，可以作为 GCSC 免疫治疗的有效靶点 [24]。近年来评估了多种针对 CD44 或 CD44v 亚型的单克隆抗体，如 RG7356 和比伐珠单抗，作为单一疗法具有较好的抗肿瘤效果 [25]。CD44v 的高表达与胃癌的治疗及预后相关，其中 CD44v6 可促进肿瘤增殖与耐药性，是胃癌重要的预后指标 [26]。此外，在一项动物实验中抗 CD44v6 的单克隆抗体偶联纳米药物 GNS-PEG-CD44v6 可明显抑制实验动物体内的肿瘤增殖，并显著延长生存期 [27]。作为另一种 GCSC 高表达的标记物，CD133 成为了胃癌的靶向治疗研究热点，目前已经开发了数种针对 CD133 的药物。如将细胞因子诱导的杀伤细胞与抗 CD133 特异性抗体结合形成效应细胞群，用于靶向治疗 CD133 高表达的 GCSC[28]。一项 Ⅰ 期临床试验研究了靶向 CD133 的嵌合抗原受体修饰 T 细胞（chimeric antigen receptor-modified T-cell directed CD133，CART-133）对消化系统恶性肿瘤的作用，结果显

示接受 CART-133 治疗的患者胃癌中的 CD133 阳性细胞完全清除[29]。GCSC 中标记物常以共表达的形式存在，因此有学者研发了一种抗 CD44 与抗 CD133 偶联的纳米药物 CD44/CD133-ATRA-PLPN 被研发用于靶向 CD44＋/CD133＋的 GCSC，药效明显高于其他的单靶向药物[30]。基于针对 CD44 和 CD133 的研究，GCSC 的其他标记物也有望成为治疗靶点。GCSC 表面的 CD47 分子会抑制巨噬细胞的吞噬作用，一项临床研究显示，抗 CD47 抗体可恢复巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用，提示 CD47 也是治疗 GCSC 的有效靶点[31]。

3.2 针对 GCSC 相关信号通路的靶向治疗

除 GCSC 标记物外，Hippo、Hedgehog 和 Wnt/*β*-catenin 等信号通路通过维持 GCSC 的干性特征，参与了胃癌的发生发展。目前科研人员正在开发靶向 GCSC 信号通路的药物，通过抑制异常信号通路的活性，增强 GCSC 的化疗敏感性，以期改善临床治疗效果。

Hippo 信号通路是通过抑制细胞生长调节细胞数量和组织大小的关键信号通路，在多种癌症中均检测到了 Hippo 信号通路的转导异常[32]。Hippo 通路的异常导致下游分子 Yes 相关蛋白 1（yes-associated protein 1，YAP1）的激活，使胃癌细胞具有 GCSC 特性[33]。目前有研究证实以 Hippo 信号通路为靶点，利用 YAP1 蛋白抑制剂维替泊芬靶向 YAP1 的转录活性可以抑制 GCSC 的致瘤性，从而抑制胃癌细胞的生长[34]。

Hedgehog 信号通路在胚胎的发育和成体组织的维持中起着重要作用，胃组织的稳态失调与胃癌的发生和 Hedgehog 蛋白异常表达有关[35]。研究发现，Hedgehog 信号通路抑制剂阿帕替尼干预阻断 Hedgehog 通路后，GCSC 自我更新的能力降低，对化疗药物更加敏感[36]。

Wnt/*β*-catenin 信号通路通过调节细胞周期、凋亡、血管生成以及肿瘤免疫微环境等参与了胃癌的发生[37]。此外，Wnt 通路在癌变过程中增强了 GCSC 的干性和增殖，促进了 EMT 的形成[38]。目前，已有针对 *β*-catenin 依赖的 Wnt 信号级联和抗 Wnt 抗体的小分子药物开展临床前试验。抗菌药物沙利霉素是一种基于对 Wnt/*β*-catenin 信号转导的抑制剂，能高效抑制 GCSC[39]。有研究显示，沙利霉素处理胃癌细胞后，ALDH1＋细胞数量显著减少，并且 GCSC 的耐药性明显降低[40]。

3.3 针对 GCSC 相关间质细胞的靶向治疗

GCSC 所处的免疫微环境中，间质细胞对肿瘤细胞的干性具有重要影响，因此，针对 GCSC 相关间质细胞的靶向治疗也是一种具有潜力的策略。以 TAM 为靶点的治疗手段主要是减少 TAM 数量和抑制 M2 型的极化。唑来膦酸是一种双膦酸盐，可诱导巨噬细胞 M2 型向 M1 型极化，即减少 TAM 的数量。唑来膦酸已被用于治疗多发性骨髓瘤和骨转移瘤，在一项针对晚期前列腺癌患者的实验中，唑来膦酸联合化疗组患者的中位总生存期明显延长[41]。集落刺激因子 1（colony stimulating factor 1，CSF-1）促进单核巨噬细胞的生长分化，CSF-1 受体激酶抑制剂如 PLX3397 和 BLZ945 可抑制 M2 型的极化，其中 PLX3397 的Ⅰ/Ⅱ期临床研究结果显示，24 例腱鞘巨细胞瘤患者中有 12 例患者得到部分缓解[42]。此外，STAT3 在 GCSC 中高表达，促进了 TAM 向 M2 型的极化，STAT3 抑制剂 CA-LCL-*α*CD163 经 CD163 抗体修饰后可逆转这种过程，抑制 TAM 特性从而发挥抗肿瘤作用[43]。

以 CAF 为靶点的治疗策略主要是降低、消除 CAF 活性或者逆转为静息态成纤维细胞。白细胞介素 -6（interleukin-6，IL-6）主要参与 CAF 的活化过程，美国食品药品管理局已批准 IL-6 单抗（司妥昔单抗）和 IL-6 受体单抗（托珠单抗）用于治疗骨髓增生性肿瘤，其中司妥昔单抗联合激素治疗多发性骨髓瘤的Ⅰ/Ⅱ期临床研究结果显示，客观缓解率高达 90.9%[44]。伊马替尼临床上常用于治疗恶性胃肠道间质肿瘤，研究发现，伊马替尼通过阻断血小板衍生生长因子受体信号通路降低了 CAF 中细胞因子表达量，从而抑制肿瘤新生血管生成[45]。另一项针对 CAF 的动物实验证明，同时靶向 PD-L1 和 TGF-*β* 的双效蛋白 M7824 可通过抑制 CAF 活性发挥抗肿瘤作用，目前Ⅰ期临床研究正在进行中[46]。

3.4 其他靶向治疗

端粒缩短会引起细胞凋亡，然而肿瘤细胞可通过激活端粒酶实现增殖，因此 GCSC 无限增殖、自我更新的潜在原因可能是端粒酶活性的增加[47-48]。端锚聚合酶被认为是有助于维持端粒长度的端粒特异性结合蛋白之一，体外实验利用端锚聚合酶抑制剂能够降低端粒酶活性、缩短端粒长度，因此，抑制干细胞端锚聚合酶以及端粒酶活性可以获得良好的抑癌效果[49]。

4 总结与展望

在外科治疗的基础上，常规化疗以及分子靶

向治疗对延长晚期胃癌患者的生存起到了关键作用，目前大多数针对胃癌的药物因为耐药而不能很好地清除肿瘤细胞，导致患者预后不良，急需寻找新的靶向药物。大量的证据表明 GCSC 往往对常规化疗有耐药性，与癌症的转移和复发密切相关，另外免疫微环境中的肿瘤间质细胞在维持 GCSC 特性方面发挥着重要作用。因此笔者认为，GCSC 及其“生态位”可能是针对 GCSC 特性治疗胃癌、延长患者术后生存期的潜在治疗靶点。通过进一步的研究识别胃癌免疫微环境中独特的因子及其信号通路的相互作用，探索 GCSC 的特定表面标记物，可能会产生新的个性化、精准化治疗手段来丰富现有的治疗策略，以提高胃癌患者的总体治疗效果。

参考文献

[1] Sung H，Ferlay J，Siegel RL，et al. Global cancer statistics 2020：GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin，2021，71（3）：209-249.

[2] Ganesh K，Massague J. Targeting metastatic cancer [J]. Nat Med，2021，27（1）：34-44.

[3] 杨婷，冉宇靓 . 靶向肿瘤干细胞治疗肿瘤 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，2021，28（7）：651-658.

[4] Peixoto J，Lima J. Metabolic traits of cancer stem cells [J]. Dis Model Mech，2018，11（8）：dmm033464.

[5] Xiao S，Zhou L. Gastric stem cells：physiological and pathological perspectives [J]. Front Cell Dev Biol，2020，8：571536.

[6] Lopez de Andres J，Grinan-Lison C，Jimenez G，et al. Cancer stem cell secretome in the tumor microenvironment：a key point for an effective personalized cancer treatment [J]. J Hematol Oncol，2020，13（1）：136.

[7] Yong X，Tang B，Xiao YF，et al. Helicobacter pylori upregulates Nanog and Oct4 via Wnt/beta-catenin signaling pathway to promote cancer stem cell-like properties in human gastric cancer [J]. Cancer Lett，2016，374（2）：292-303.

[8] 陈彦臻，刘沈林，邹玺 . 胃癌干细胞与上皮间质转化研究进展 [J]. 中华肿瘤防治杂志，2018，25（10）：750-754.

[9] 李年双，谢川，吕农华 . 上皮 - 间充质转化和肿瘤干细胞在幽门螺杆菌致病中的作用机制 [J]. 中华消化杂志，2019，39（4）：280-282.

[10] Li MM，Yuan J，Guan XY，et al. Molecular subclassification of gastrointestinal cancers based on cancer stem cell traits [J]. Exp Hematol Oncol，2021，10（1）：53.

[11] Cheng HS，Lee JXT，Wahli W，et al. Exploiting vulnerabilities of cancer by targeting nuclear receptors of stromal cells in tumor microenvironment [J]. Mol Cancer，2019，18（1）：51.

[12] Oshimori N，Guo Y，Taniguchi S. An emerging role for cellular crosstalk in the cancer stem cell niche [J]. J Pathol，2021，254（4）：384-394.

[13] DeNardo DG，Ruffell B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy [J]. Nat Rev Immunol，2019，19（6）：369-382.

[14] Allavena P，Digifico E，Belgiovine C. Macrophages and cancer stem cells：a malevolent alliance [J]. Mol Med，2021，27（1）：121.

[15] Jinushi M，Chiba S，Yoshiyama H，et al. Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anticancer drug responses of cancer stem/initiating cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2011，108（30）：12425-12430.

[16] Sainz B，Carron E，Vallespinos M，et al. Cancer stem cells and macrophages：implications in tumor biology and therapeutic strategies [J]. Mediators Inflamm，2016，2016：9012369.

[17] Ishimoto T，Sugihara H，Watanabe M，et al. Macrophage-derived reactive oxygen species suppress miR-328 targeting CD44 in cancer cells and promote redox adaptation [J]. Carcinogenesis，2014，35（5）：1003-1011.

[18] Wang J，Li D，Cang H，et al. Crosstalk between cancer and immune cells：role of tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment [J]. Cancer Med，2019，8（10）：4709-4721.

[19] Gunaydin G. CAFs interacting with TAMs in tumor microenvironment to enhance tumorigenesis and immune evasion [J]. Front Oncol，2021，11：668349.

[20] Li X，Bu W，Meng L，et al. CXCL12/CXCR4 pathway orchestrates CSC-like properties by CAF recruited tumor associated macrophage in OSCC [J]. Exp Cell Res，2019，378（2）：131-138.

[21] Ishimoto T，Miyake K，Nandi T，et al. Activation of transforming growth factor beta 1 signaling in gastric cancer-associated fibroblasts increases their motility，via expression of rhomboid 5 homolog 2，and ability to induce invasiveness of gastric cancer cells [J]. Gastroenterology，2017，153（1）：191-204 e116.

[22] 王向阳，黄开禹，杜天明，等 . 肿瘤相关性成纤维细胞分泌胞外体增强胃癌干细胞化疗耐药 [J]. 中华实验外科杂志，2020，37（3）：434-436.

[23] Zhang ZZ，Yu WX，Zheng M，et al. PIN1 inhibition sensitizes chemotherapy in gastric cancer cells by targeting stem cell-like traits and multiple biomarkers [J]. Mol Cancer Ther，2020，19（3）：906-919.

[24] Chen C，Zhao S，Karnad A，et al. The biology and role of CD44 in cancer progression：therapeutic implications [J]. J Hematol Oncol，2018，11（1）：64.

[25] Diebolder P，Mpoy C，Scott J，et al. Preclinical evaluation of an engineered single-chain fragment variable-fragment crystallizable targeting human CD44 [J]. J Nucl Med，2021，62（1）：137-143.

[26] Xu H，Niu M，Yuan X，et al. CD44 as a tumor biomarker and therapeutic target [J]. Exp Hematol Oncol，2020，9（1）：36.
[27] Duan H，Liu Y，Gao Z，et al. Recent advances in drug delivery systems for targeting cancer stem cells [J]. Acta Pharm Sin B，2021，11（1）：55-70.
[28] Huang J，Li C，Wang Y，et al. Cytokine-induced killer（CIK）cells bound with anti-CD3/anti-CD133 bispecific antibodies target CD133（high）cancer stem cells in vitro and in vivo [J]. Clin Immunol，2013，149（1）：156-168.
[29] Wang Y，Chen M，Wu Z，et al. CD133-directed CAR T cells for advanced metastasis malignancies：a phase Ⅰ trial [J]. Oncoimmunology，2018，7（7）：e1440169.
[30] Salapa J，Bushman A，Lowe K，et al. Nano drug delivery systems in upper gastrointestinal cancer therapy [J]. Nano Converg，2020，7（1）：38.
[31] Liu L，Zhang L，Yang L，et al. Anti-CD47 Antibody as a targeted therapeutic agent for human lung cancer and cancer stem cells [J]. Front Immunol，2017，8：404.
[32] Kulkarni A，Chang MT，Vissers JHA，et al. The Hippo pathway as a driver of select human cancers [J]. Trends Cancer，2020，6（9）：781-796.
[33] Giraud J，Molina-Castro S，Seeneevassen L，et al. Verteporfin targeting YAP1/TAZ-TEAD transcriptional activity inhibits the tumorigenic properties of gastric cancer stem cells [J]. Int J Cancer，2020，146（8）：2255-2267.
[34] Xiong J，Wang S，Chen T，et al. Verteporfin blocks Clusterin which is required for survival of gastric cancer stem cell by modulating HSP90 function [J]. Int J Biol Sci，2019，15（2）：312-324.
[35] Cherepanov SA，Grinenko NF，Antonova OM，et al. Relationship between Hedgehog signaling pathway and drug resistance of poorly differentiated gliomas [J]. Bull Exp Biol Med，2018，164（3）：356-361.
[36] Cao W，Li Y，Sun H，et al. Apatinib suppresses gastric cancer stem cells properties by inhibiting the sonic hedgehog pathway [J]. Front Cell Dev Biol，2021，9：679806.
[37] Chi HC，Tsai CY，Wang CS，et al. DOCK6 promotes chemo-and radioresistance of gastric cancer by modulating WNT/beta-catenin signaling and cancer stem cell traits [J]. Oncogene，2020，39（37）：5933-5949.
[38] Li G，Su Q，Liu H，et al. Frizzled7 promotes epithelial-to-mesenchymal transition and stemness via activating canonical wnt/beta-catenin pathway in gastric cancer [J]. Int J Biol Sci，2018，14（3）：280-293.
[39] Li L，Cui D，Ye L，et al. Codelivery of salinomycin and docetaxel using poly（*D*，*L*-lactic-co-glycolic acid）-poly（ethylene glycol）nanoparticles to target both gastric cancer cells and cancer stem cells [J]. Anticancer Drugs，2017，28（9）：989-1001.
[40] Mao J，Fan S，Ma W，et al. Roles of Wnt/beta-catenin signaling in the gastric cancer stem cells proliferation and salinomycin treatment [J]. Cell Death Dis，2014，5（1）：e1039.
[41] Cassetta L，Pollard JW. Targeting macrophages：therapeutic approaches in cancer [J]. Nat Rev Drug Discov，2018，17（12）：887-904.
[42] Salmaninejad A，Valilou SF，Soltani A，et al. Tumor-associated macrophages：role in cancer development and therapeutic implications [J]. Cell Oncol（Dordr），2019，42（5）：591-608.
[43] Andersen MN，Etzerodt A，Graversen JH，et al. STAT3 inhibition specifically in human monocytes and macrophages by CD163-targeted corosolic acid-containing liposomes [J]. Cancer Immunol Immunother，2019，68（3）：489-502.
[44] Hassan R，Sharon E，Thomas A，et al. Phase 1 study of the antimesothelin immunotoxin SS1P in combination with pemetrexed and cisplatin for front-line therapy of pleural mesothelioma and correlation of tumor response with serum mesothelin，megakaryocyte potentiating factor，and cancer antigen 125 [J]. Cancer，2014，120（21）：3311-3319.
[45] De Palma M，Biziato D，Petrova TV. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis [J]. Nat Rev Cancer，2017，17（8）：457-474.
[46] Lan Y，Zhang D，Xu C，et al. Enhanced preclinical antitumor activity of M7824，a bifunctional fusion protein simultaneously targeting PD-L1 and TGF-beta [J]. Sci Transl Med，2018，10（424）：eaan5488.
[47] Dillard P，Koksal H，Maggadottir SM，et al. Targeting telomerase with an HLA class Ⅱ-restricted TCR for cancer immunotherapy [J]. Mol Ther，2021，29（3）：1199-1213.
[48] 程靖，周小杰. 小檗碱抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. 中南药学，2021，19（5）：921-925.
[49] Zamudio-Martinez E，Herrera-Campos AB，Munoz A，et al. Tankyrases as modulators of pro-tumoral functions：molecular insights and therapeutic opportunities [J]. J Exp Clin Cancer Res，2021，40（1）：144.

（收稿日期：2021-11-11；修回日期：2021-12-05）

药物分析与检验

液相色谱 - 质谱法分析磷酸芦可替尼中强制降解后的产物

刘发贵[1]，孙丽霞[1]，李敏[1]，刘思光[1]，李铁健[1]，张贵民[2*]（1. 山东新时代药业有限公司，山东　临沂 273400；2. 鲁南制药集团股份有限公司，山东　临沂　276002）

摘要：目的　采用液相色谱 - 质谱法（LC-MS）联用对磷酸芦可替尼强制降解后的产物进行色谱分离，并对其结构进行鉴定。**方法**　对各降解杂质进行分离的液相色谱法以 YMC Triart C_{18}（4.6 mm×150 mm，3 μm）为色谱柱；以甲醇和水为流动相，梯度洗脱；检测波长 230 nm。同时采用 LC-MS 法，运用 UPLC 串联 6540B Q-TOF 仪器对主要的降解产物进行初步定性研究。**结果**　对磷酸芦可替尼各降解产物进行了有效分离，并初步鉴定出 11 个主要降解产物的结构。**结论**　本法可用于磷酸芦可替尼有关物质的检测，为其药品质量的控制提供了参考。

关键词：液相色谱 - 质谱法；磷酸芦可替尼；有关物质；降解产物
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0893-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.026

Identification of forced degradation compounds in ruxolitinib phosphate by liquid chromatography-mass spectrometry

LIU Fa-gui[1], SUN Li-xia[1], LI Min[1], LIU Si-guang[1], LI Tie-jian[1], ZHANG Gui-min[1, 2*] (1. *Shandong New Times Pharmaceutical Co. Ltd.*, *Linyi Shandong* 273400; 2. *Lunan Pharmaceutical Group Co. Ltd.*, *Linyi Shandong* 276002）

Abstract: Objective To separate and identify the forced degradation products of ruxolitnib phosphate by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). **Methods** The separation was performed on a YMC Triart C_{18} column (4.6 mm×150 mm, 3 μm) by gradient elution with methanol water buffer. The UV detection wavelength was 230 nm. The main degradation products were qualitatively studied by UPLC in series with 6540b Q-TOF. **Results** The degradation products of ruxolitnib phosphate were effectively separated and 11 degradation products were preliminarily identified. **Conclusion** The method can be used for the determination of related substances in ruxolitnib phosphate, which can provide basis for the drugs quality control.

Key words: LC-MS; ruxolitinib phosphate; related substance; degradation product

骨髓纤维化实质上是一种骨髓增殖性肿瘤[1]。磷酸芦可替尼作为一种 JAK 抑制剂[2-3]，具有潜在的抗肿瘤和免疫调节活性，用于治疗中间或高危骨髓纤维化，包括原发性骨髓纤维化，真性红细胞增多症后骨髓纤维化和原发性血小板增多症后骨髓纤维化的治疗[4-5]。磷酸芦可替尼作为首个骨髓纤维化治疗药物（结构见图 1），也是目前唯一批准针对其发病机制的靶向药物[6-7]。

本文主要采用高效液相色谱法（HPLC）和液相色谱 - 质谱联用技术（LC-MS）研究磷酸芦可替尼的强制降解产物，了解其稳定性及降解途径[8-10]，为药品的质量控制提供依据。

1　材料

1.1　仪器

安捷伦 UPLC 串联 6540B Q-TOF 色谱 - 液质联用仪（安捷伦）；高效液相色谱仪 Thermo

作者简介：刘发贵，男，硕士，主要从事药品质量检验研究，email：fagui168@163.com　*通信作者：张贵民，男，研究员，主要从事药物合成与新药开发，email：lunanzhangguimin@163.com

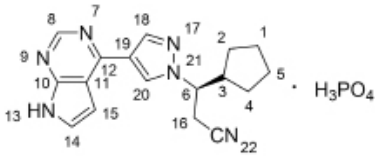


图 1 磷酸芦可替尼化学结构图

Fig 1 Chemical structure of ruxolitinib phosphate

Ultimate 3000，配 DAD 检测器（Thermo）；高效液相色谱仪 Waters ALLIANCE e2695，配 PDA 检测器（Waters）；电子分析天平（XSR105U/A、XPR10）、pH 计（S210）（Mettler Toledo）。

1.2 试药

乙酸铵（Merck，LC-MS 专用，50 g，批号：A1468804117）；氢氧化钠（批号：2009172）、盐酸（批号：2103151）、30% 过氧化氢（批号：190826）（西陇科学，分析级）；乙腈（Merck，色谱级，批号：I1102930036）；磷酸芦可替尼（佰麦生物，纯度：99.9%，批号：BM20210111）。

2 方法

2.1 液相色谱条件

色谱柱：YMC Triart C_{18}（4.6 mm×150 mm，3 μm）；以水为流动相 A，甲醇为流动相 B；梯度洗脱（0 ～ 5 min，45%B；5 ～ 20 min，45% ～ 70%B；20 ～ 25 min，70% ～ 75%B；25 ～ 26 min，75% ～ 45%B；26 ～ 35 min，45%B）；柱温 40 ℃；流速 1.0 mL • min^{-1}；检测波长 230 nm，同时开启 3D 数据采集（190 ～ 400 nm）；进样量 20 μL。

2.2 色谱 - 质谱条件[11]

色谱柱：YMC Triart C_{18}（2.1 mm×150 mm，1.9 μm）；以 10 mmol • L^{-1} 乙酸铵水溶液为流动相 A，乙腈为流动相 B；梯度洗脱（0 ～ 2 min，20%B；2 ～ 14.5 min，20% ～ 60%B；14.5 ～ 14.6 min，60% ～ 20%B；14.6 ～ 20 min，20%B）；柱温 40 ℃；流速 0.3 mL • min^{-1}；检测波长 230 nm；进样量 10 μL。

电喷雾解吸电离源 DESI，正离子检测模式；离子源雾化温度 300 ℃；毛细管电压 400 V；锥孔电压 45 V；裂解电压 60 V（Fragmentor）；干燥气流量 8 L•min^{-1}；MS 扫描范围 50 ～ 1600 *m/z*。

2.3 溶液配制

2.3.1 供试品溶液（未破坏溶液） 取本品约 2 mg，精密称定，置 10 mL 量瓶中，加乙腈 - 水（20∶80）（以下简称溶剂）溶解，并稀释至刻度，摇匀，即得供试品溶液（质量浓度为 0.2 mg • mL^{-1}）。

2.3.2 强制降解试验 取本品约 2 mg，精密称定，置 10 mL 量瓶中，高温破坏 24 h（105 ℃条件下固体直接暴露）；取供试品溶液直接暴露于 4500 lx 强度光照 10 d；氧化破坏（1 mL 溶剂溶解后，加 10% 双氧水 1 mL，80 ℃水浴）2 h；酸破坏（1 mL 溶剂溶解后，加 2 mol•L^{-1} 盐酸溶液 1 mL，80 ℃水浴）2 h；碱破坏（1 mL 溶剂溶解后，加 1 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液 1 mL，80 ℃水浴）5 min。取上述各破坏样品，加溶剂稀释至刻度（酸碱破坏需中和至中性），摇匀，滤过，取续滤液，作为各条件下的强制降解溶液。同时做各条件下的空白试验。

3 结果

3.1 强制降解结果

经过液质联用的分析，初步鉴定出 11 个降解杂质，分别命名为杂质 A ～ K，各破坏条件下降解杂质及磷酸芦可替尼含量见表 1 及图 2。

表 1 磷酸芦可替尼强制降解试验结果 (%)

Tab 1 Ruxolitinib phosphate forced degradation test (%)

名称	未破坏	高温固体破坏	液体光照破坏	氧化破坏	酸破坏	碱破坏
杂质 A	—	—	—	—	0.202	4.155
杂质 B	—	0.027	—	—	0.040	0.034
杂质 C	—	—	—	—	—	0.135
杂质 D	—	—	0.145	—	—	—
杂质 E	—	—	—	0.494	—	—
杂质 F	—	—	—	0.370	—	—
杂质 G	—	—	—	0.283	—	—
杂质 H	—	—	—	0.736	—	—
杂质 I	—	—	0.314	1.349	—	—
杂质 J	—	—	—	0.328	—	—
杂质 K	—	—	—	0.475	—	—
物料守恒	\	98.47	98.70	95.45	103.2	104.7
芦可替尼 [a]	99.857	99.906	99.207	95.700	99.731	95.282

注（Note）：[a]. 以芦可替尼形式存在（calculated by ruxolitinib）；“—”表示在该破坏条件下未生成杂质（“—” means no impurities are generated under the destructive conditions）。

3.2 磷酸芦可替尼及降解产物母离子与特征离子

通过 ESI^+-MS 对上述破坏溶液进行测定，得到磷酸芦可替尼降解杂质一级质谱图的 $[M + H]^+$ 及主要特征离子，各降解杂质可能的降解途径及结构推理简要如下。

3.2.1 杂质 A、杂质 B 和杂质 C

① 对于杂质 A、杂质 B：ESI^+-MS 测得的杂质 A 的一级质谱图中 *m/z* 325 为 $[M + H]^+$ 峰，相对分子质量为 324，比芦可替尼多一个水分子。最有可能是 -CN 官能团被氧化，成为酰胺键。ESI^+-MS 测得的杂质 B 的一级质谱图中 *m/z* 326 为 $[M + H]^+$ 峰，表明其相对分子质量为 325，比芦可替尼多 19，即 -CN 被氧化成 -COOH。最有可能是在杂质 A 的基础上，$-NH_2$ 被 -OH 取代（见图 3）。

② 对于杂质 C：ESI^+-MS 测得的杂质 A 的

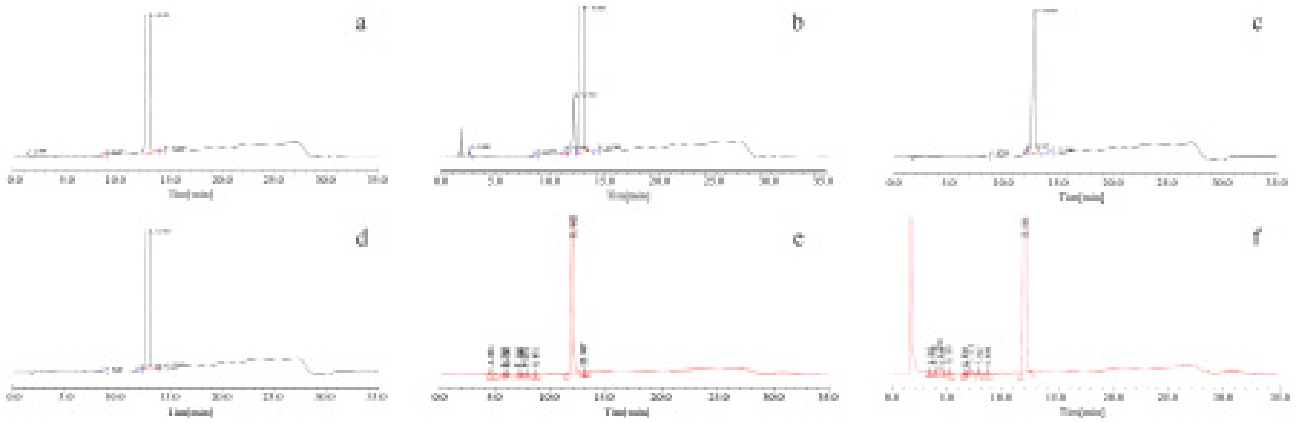


图 2　强制降解性试验 HPLC 色谱图

Fig 2　HPLC chromatogram of the forced degradation

a. 供试品（sample untreated）；b. 碱破坏（destruction with base）；c. 酸破坏（destruction with acid）；d. 高温固体破坏（heat destruction）；e. 液体光照破坏（light destruction）；f. 氧化破坏（oxidative destruction）

一级质谱图中 *m/z* 186 为 $[M+H]^+$峰，相对分子质量为 185，正好是杂质 C 的一个单元。从芦可替尼中掉下的另一个五元环单位，紫外响应弱，本法无法有效检出（见图 3）。

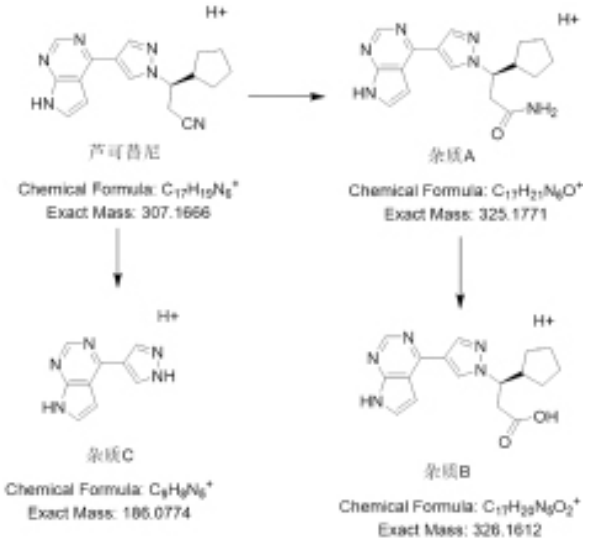


图 3　磷酸芦可替尼降解产生杂质 A、B 和 C 的可能途径

Fig 3　Possible degradation pathways for impurity A，B and C from ruxolitinib phosphate degradation

3.2.2　杂质 D、杂质 E 和杂质 F

① 对于杂质 D：ESI^+-MS 测得的杂质 D 的一级质谱图中 *m/z* 311 为 $[M+H]^+$峰，相对分子质量为 310，比芦可替尼多 4。最有可能是结构中含 1 个氮的五元环发生光自由基反应，从而开环，分别生成 $-NH_2$ 和 -CHO，推测出杂质 D 的结构（见图 4）。

② 对于杂质 E 和杂质 F：ESI^+-MS 测得的杂质 E 的一级质谱图中 *m/z* 323 为 $[M+H]^+$峰，相对分子质量为 322，比芦可替尼多 16。可能是芦可替尼 C_{14} 位和 C_{15} 位形成环氧环，推测出杂质 E。ESI^+-MS 测得的杂质 F 的一级质谱图中 *m/z* 341 为 $[M+H]^+$峰，相对分子质量为 340，比杂质 E 多 18。即比杂质 E 的环氧环发生了开环，生成 2 个 -OH，推测出杂质 F 的结构（见图 4）。

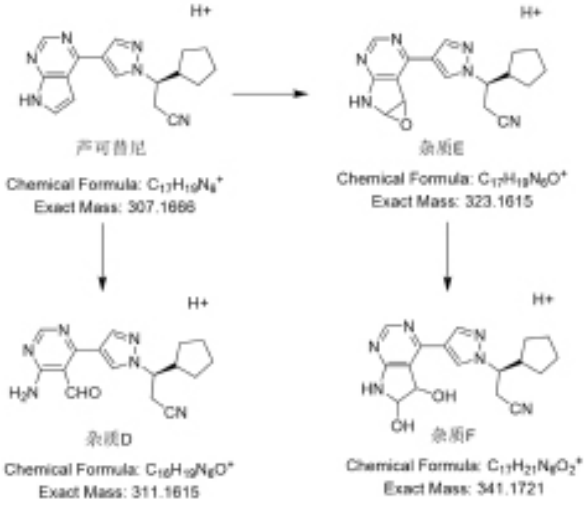


图 4　磷酸芦可替尼降解产生杂质 D、E 和 F 的可能途径

Fig 4　Possible degradation pathway for impurity D，E and F from ruxolitinib phosphate

3.2.3　杂质 G、杂质 H 和杂质 I

① 对于杂质 G：ESI^+-MS 测得的杂质 G 的一级质谱图中 *m/z* 305 为 $[M+H]^+$峰，表明其相对分子质量为 304，比芦可替尼少 2。即最有可能是手性碳原子上形成双键，即 6 号位和 3 号位形成双键。推测出杂质 G 的结构（见图 5）。

② 对于杂质 H 和杂质 I：ESI^+-MS 测得杂质 H 的一级质谱图中 *m/z* 373 为 $[M+H]^+$峰，相对分子质量为 372，比杂质 A 多 48，可能是 7、9、17 号位等 3 个位置的氮形成了氮氧键，推测出杂质 H 的结构。同理分析，ESI^+-MS 测得杂质 I 的一级质谱图中 *m/z* 357 为 $[M+H]^+$峰，相对分子质量为 356，比杂质 A 多 32。可能 9 号和 17 号位

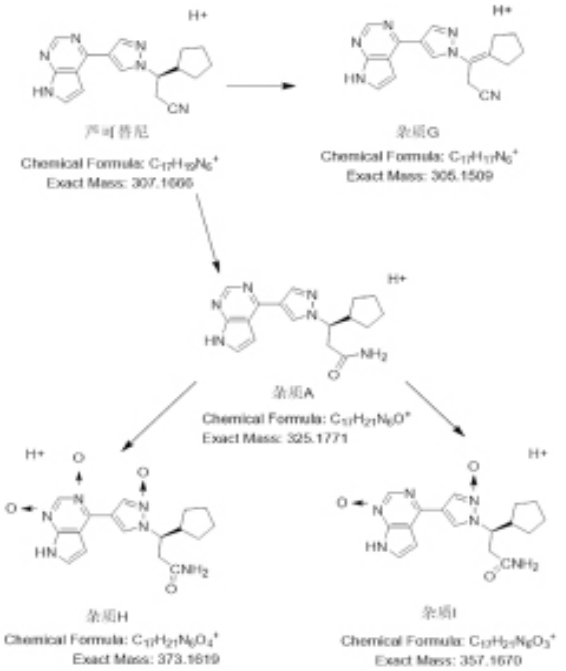


图 5 磷酸芦可替尼降解产生杂质 G、H 和 I 的可能途径

Fig 5 Possible degradation pathways for impurity G，H and I from ruxolitinib phosphate

置氮形成氮氧键，但具体位置，目前的研究无法准确判定，需要进一步试验进行确认。

3.2.4 杂质 J 和杂质 K ESI$^+$-MS 测得的一级质谱图中 *m/z* 323 均为 [M + H]$^+$峰，相对分子质量均为 322，比杂质 A 少 2，可能是手性碳原子位置脱去 2 个氢形成双键，即 3 号和 6 号位置间，6 号和 16 号位置间，具体两者如何区分，目前研究无法确认，有待进一步试验确认，本文将 3 号和 6 号位置间形成双键的化合物命名为杂质 K，另一结构命名为杂质 J（见图 6）。

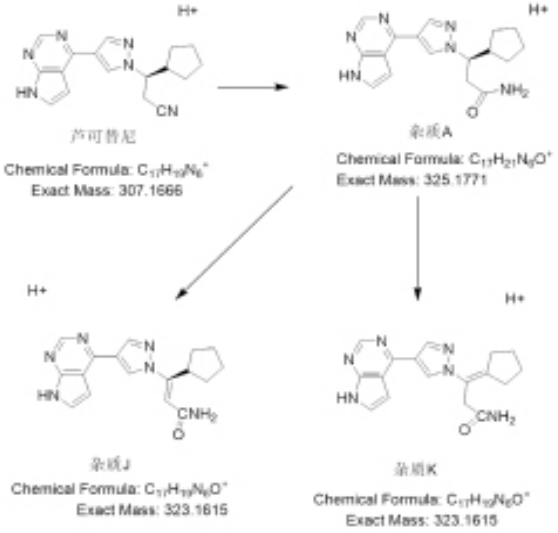


图 6 磷酸芦可替尼降解产生杂质 J 和 K 的可能途径

Fig 6 Possible degradation pathways for impurity J and K from ruxolitinib phosphate

综上将磷酸芦可替尼可能的降解途径归纳见图 7。

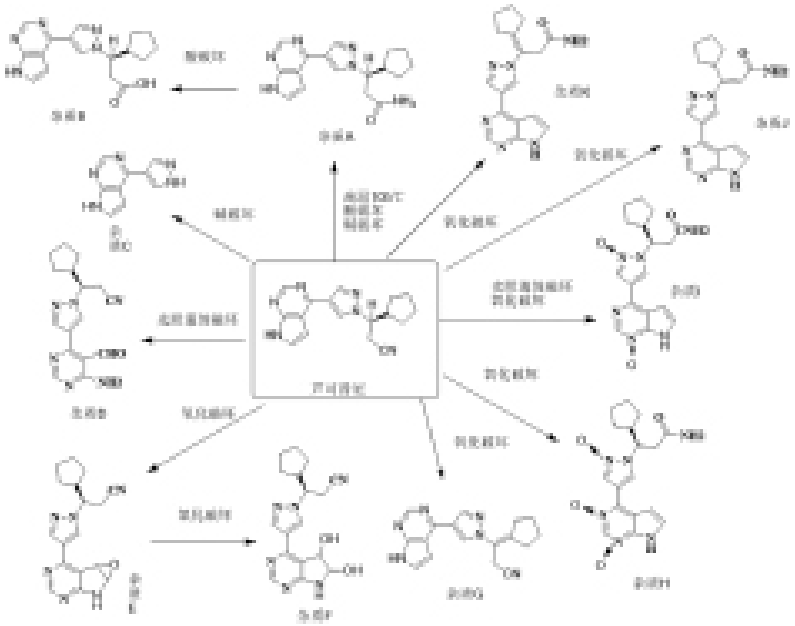


图 7 磷酸芦可替尼可能的降解途径

Fig 7 Possible degradation pathways of ruxolitinib phosphate

4 结论

磷酸芦可替尼在高温和光照条件下，较为稳定，但是在酸和碱条件下易降解，氧化条件下极易降解。经过初步鉴定共得到 11 个降解杂质（见表 2 及图 8），其结构还存在不确定性，本文提到的结构仅供参考[12-13]。杂质 H 和杂质 I 均为氮氧化合物，由于结构中存在较多氮原子，在无对照品的基础上，很难确定其准确的氮氧键的位置，本文列出的结构为

表 2　磷酸芦可替尼及其主要降解产物的质谱特征

Tab 2　Mass spectrometry characteristics of ruxolitinib phosphate and its major degradation compounds

编号	母离子 *m/z*	t_R/min	推测的离子式	实测精确质量	质量误差	不饱和度
杂质 A	325	12.107（0.94）	$C_{17}H_{21}N_6O^+$	325.1774	-9.2257×10^{-7}	11
杂质 B	326	8.733（0.68）	$C_{17}H_{20}N_5O_2^+$	326.1614	-9.1979×10^{-7}	11
杂质 C	186	2.680（0.21）	$C_9H_8N_5^+$	186.0777	-1.0748×10^{-6}	9
杂质 D	311	8.651（0.72）	$C_{16}H_{19}N_6O^+$	311.1620	0	11
杂质 E	323	7.927（0.66）	$C_{17}H_{19}N_6O^+$	323.1618	-6.1888×10^{-7}	12
杂质 F	341	3.838（0.32）	$C_{17}H_{21}N_6O_2^+$	341.1720	-1.7586×10^{-6}	11
杂质 G	305	8.650（0.72）	$C_{17}H_{17}N_6^+$	305.1511	-1.3108×10^{-6}	13
杂质 H	373	7.111（0.59）	$C_{17}H_{21}N_6O_4^+$	373.1620	-1.0719×10^{-6}	11
杂质 I	357	4.314（0.36）	$C_{17}H_{21}N_6O_3^+$	357.1676	2.7998×10^{-7}	11
杂质 J	323	4.621（0.38）	$C_{17}H_{19}N_6O^+$	323.1623	9.2833×10^{-7}	12
杂质 K	323	5.183（0.43）	$C_{17}H_{19}N_6O^+$	323.1616	-1.2378×10^{-6}	12
磷酸芦可替尼	307	12.011（1.00）	$C_{17}H_{19}N_6^+$	307.1667	-1.3022×10^{-6}	12

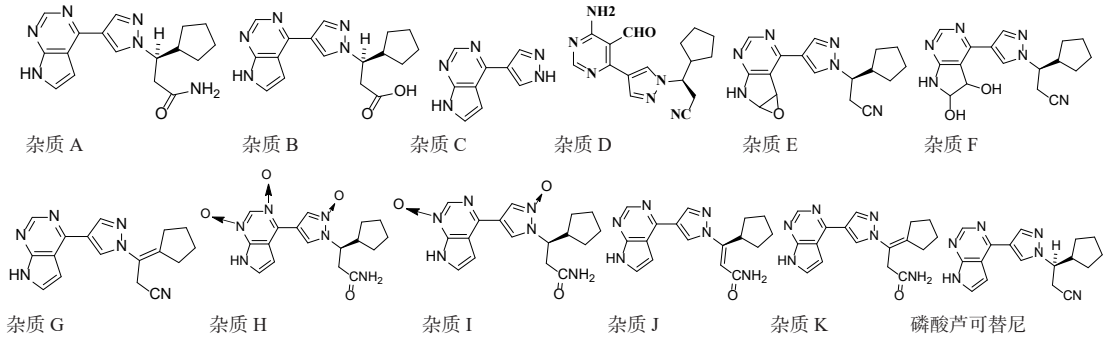


图 8　磷酸芦可替尼及其主要降解产物的推测结构

Fig 8　Proposed chemical structures of ruxolitinib phosphate and its major degradation compounds

理论上最大可能性的结构。同时杂质 J 和杂质 K 为同分异构体结构，性质类似，目前的研究无法判定其在本法中的出峰顺序，有待进一步试验证明。

综上所述，本文检测方法简便，能够有效分离各降解杂质，为磷酸芦可替尼的质量控制提供参考，同时对其降解杂质的研究，也可为其存储及质量研究提供参考依据。

参考文献

[1] 诺华骨髓纤维化治疗新药捷恪卫（磷酸芦可替尼）正式上市 [J]. 临床合理用药杂志，2017，10（26）：12.

[2] 于嘉 . Ruxolitinib phosphate [J]. 中国药物化学杂志，2012，22（2）：175-176.

[3] Shi JG，Chen X，Emm T，et al. The effect of CYP3A4 inhibition or induction on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of orally administered ruxolitinib（INCB018424 phosphate）in healthy volunteers [J]. J Clin Pharmacol，2013，52（6）：809-818.

[4] 吕娟丽，刘洋，沈丹，等 . Ruxolitinib 磷酸盐用于治疗骨髓纤维化 [J]. 中国临床药理学杂志，2012，28（11）：866-868.

[5] 杨爱莹，刘晋琴，蔡亚楠，等 . JAK1 抑制剂 SHR0302 和芦可替尼对骨髓增殖性肿瘤 SET2 细胞系和原代细胞增殖抑制和抗炎作用机制的研究 [J]. 中华血液学杂志，2019，40（12）：1003-1007.

[6] Takata F，Dohgu S，Sakaguchi S，et al. Oncostatin-m-reactive pericytes aggravate blood-brain barrier dysfunction by activating JAK/ STAT3 signaling in vitro [J]. Neuroence，2019，422：12-20.

[7] Sweet KL，Hazlehurst LA，Sahakian E，et al. A phase I clinical trial of ruxolitinib incombination with nilotinib in chronic myeloid leukemia patients with molecular evidence of disease [J]. Leuk Res，2018，74：89-96.

[8] 王丽，申兰慧，沈于兰 . LC-MS/MS 法分析萘普生钠中强制破坏后的降解产物 [J]. 药物分析杂志，2017，37（9）：1701-1709.

[9] 马晓宁，梁晟，将涛，等 . 酒石酸唑吡坦片中杂质的色谱 - 质谱结构鉴定 [J]. 药物分析杂志，2017，37（6）：1087-1096.

[10] Rakibe U，Tiwari R，Mahajan A，Rane V，et al. LC and LC-MS/MS studies for the identification and characterization of degradation products of acebutolol [J]. J Pharm Anal，2018，8（6）：357-365.

[11] 沈红梅，秦明明 . HPLC 法测定原料药磷酸芦可替尼的含量和有关物质 [J]. 广州化工，2021，49（2）：66-67，114.

[12] Zhou N，Li T，Ai L，et al. Identification of forced degradation products of iacosamide by LC-QQLIT-MS and LC-IT/TOF-MS [J]. Acta Chromatographica，2019，31（1）：12-18.

[13] 陈爱萍，束盼 . LC-MS/MS 法分析注射用头孢哌酮钠他唑巴坦钠中未知降解杂质的结构 [J]. 海峡药学，2016，28（9）：51-55.

（收稿日期：2021-09-08；修回日期：2021-10-09）

基于指纹图谱和多指标成分含量测定的枳壳与枳实药材质量差异性研究

童培珍，李国卫*，何嘉莹，邱韵静，王利伟，徐敏，何广铭（广东一方制药有限公司 广东省中药配方颗粒企业重点实验室，广东 佛山 528244）

摘要：目的 建立测定枳壳与枳实中多指标成分含量及超高效液相色谱（UPLC）指纹图谱的方法，为枳壳与枳实的质量评价提供依据。**方法** 采用 Agilent SB C_{18}（100 mm×2.1 mm，1.8 μm）色谱柱，以乙腈 -0.05% 磷酸为流动相，梯度洗脱，流速 0.4 mL • min^{-1}，柱温 30 ℃，检测波长 320 nm，对 18 批枳壳、10 批枳实的特征图谱及多个指标成分的含量进行测定，并运用相关软件进行分析。**结果** 枳壳及枳实 UPLC 特征图谱中确定 18 个共有峰，聚类分析和主成分分析可将 28 个样品按枳壳与枳实聚为两类；同时对已归属的 8 个特征峰进行含量测定。**结论** 本研究建立的方法简便、快捷、可靠，可为枳壳及枳实的质量评价提供参考。

关键词：枳壳；枳实；聚类分析；主成分分析；偏最小二乘回归分析；多指标含量测定
中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)04-0898-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.027

Quality difference in *Aurantii Fructus* and *Aurantii Fructus Immatutus* based on fingerprint analysis and multi-index content determination

TONG Pei-zhen, LI Guo-wei*, HE Jia-ying, QIU Yun-jing, WANG Li-wei, XU Min, HE Guang-ming (*Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Guangdong Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granule, Foshan Guangdong* 528244)

Abstract: Objective To determine multi-index content and chromatogram for *Aurantii Fructus* and *Aurantii Fructus Immatutus* by UPLC and to provide reference for their quality control. **Methods** Agilent SB C_{18} column (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) was used. The mobile phase consisted of acetonitrile-0.05% phosphoric acid as the mobile phase with gradient elution at the flow rate of 0.4 mL • min^{-1}. The column temperature was 30 ℃ and the detection wavelength was 320 nm. Totally 18 batches of *Aurantii Fructus* and 10 batches of *Aurantii Fructus Immatutus* were determined and analyzed with related softwares. **Results** Eighteen common peaks were identified in the UPLC spectra of *Aurantii Fructus* and *Aurantii Fructus Immatutus*. Cluster analysis and principal component analysis clustered 28 samples into 2 groups according to *Aurantii Fructus* and *Aurantii Fructus Immatutus*. At the same time, the content of 8 characteristic peaks was determined. **Conclusion** The method is simple, rapid and reliable, providing reference for the quality evaluation of *Aurantii Fructus* and *Aurantii Fructus Immatutus*.

Key words: *Aurantii Fructus*; *Aurantii Fructus Immatutus*; cluster analysis; principal component analysis; partial least square method-discriminant analysis; multi-index content determination

枳壳为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实，7 月果皮尚绿时采收，具有理气宽中，行滞消胀之功效，临床常用于胸胁气滞、胀满疼痛、食积不化、痰饮内停、脏器下垂[1]；枳实为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种或甜橙 *Citrus sinensis*

基金项目：佛山市核心技术攻关项目（No.1920001000387）；佛山科大专项（No.FSUST19-SRI10）。
作者简介：童培珍，女，主要从事中药配方颗粒质量控制及标准研究，email：229456594@qq.com *通信作者：李国卫，男，硕士，主要从事中药质量评价研究，email：452048107@qq.com

Osbeck 的干燥幼果，5 ～ 6 月收集自落的果实，具有破气消积、化痰散痞的作用，临床常用于积滞内停、痞满胀痛、泻痢后重、大便不通、痰滞气阻、胸痹、结胸、脏器下垂[1]。《本草纲目》曰："枳实、枳壳，气味功用俱同，上世亦无分别，魏晋以来，始分实、壳之用。洁古张氏，东垣李氏，又分治高治下之说。大抵其功皆能利气，气下则痰喘止，气行则痞胀消，气通则痛刺止，气利则后重除。故以枳壳利胸膈，枳实则利肠胃，然张仲景治胸痹痞满，以枳实为要药，诸方治下血诸痢，大肠秘塞，里急后重，又以枳壳为通用，则枳实不独治下，而枳壳不独治高也[2]。"枳实苦重性寒，善于破气消积，枳壳味苦酸性微寒，善于理气宽中，两者性能各有侧重，不可代用。研究表明，枳壳与枳实中含量较高的为黄酮类成分和香豆素类成分，具有调节胃肠道、抗癌等多种生物活性[3-7]。目前已有文献报道不同物候期枳实、枳壳黄酮类和生物碱类成分变化，或是对枳壳与枳实黄酮类成分进行单一定性定量研究，无法系统地评价枳壳与枳实的差异[8-14]。枳壳和枳实来源几乎相同，化学成分也相似，通过外观颜色和果实大小只能进行主观评价，可能会对其鉴别造成误差，难以保证临床药效。现有文献报道枳实及枳壳的含量或指纹图谱多采用高效液相色谱法进行测定，耗时长。本研究采用 UPLC 法建立枳实与枳壳的指纹图谱，利用主成分分析及偏最小二乘法 - 判别分析寻找枳实及枳壳的主要差异成分；对上述差异性成分进行定量分析，大大缩短了检测时间，为枳壳和枳实的整体质量评价提供依据。

1　材料

1.1　仪器

Waters Acquity UPLC H-Class 型超高效液相色谱仪（四元泵，PDA 检测器）；Mettler-Toledo ME204E 型万分之一电子分析天平、Mettler-Toledo XP26 型百万分之一电子分析天平（瑞士梅特勒公司）；HWS28 型恒温水浴锅（上海一恒科技有限公司）；Milli-Q Direct 超纯水系统（默克股份有限公司）。

1.2　试药

柚皮苷（批号：110722-201714，含量：93.4%）、橙皮苷（批号：110721-201818，含量：96.20%）、新橙皮苷（批号：111857-201804，含量：99.4%）（对照品，中国食品药品检定研究院）；芸香柚皮苷（批号：wkq19041908，含量：98.0%）、水合橙皮内酯（批号：wkq20031904，含量：98.0%）、川陈皮素（批号：wkq20031701，含量：98.0%）、橘红素（批号：wkq16011401，含量：98.6%）（对照品，四川维克奇生物科技有限公司）；马尔敏（批号：CFS201901，含量：98.0%，Chem Face 生物有限公司）。乙腈（默克股份有限公司），磷酸（天津市科密欧化学试剂有限公司），甲醇（西陇科学股份有限公司），水为自制超纯水。

枳壳与枳实经广东一方制药有限公司质量中心鉴定：枳壳为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实（编号：ZQ1-ZQ18）；枳实为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥幼果（编号：ZS1-ZS10），样品详细信息见表 1。

表 1　样品信息表

Tab 1　Information source of sample

编号	品种	产地	采集日期	经度 / 度	纬度 / 度	部位
ZQ1	枳壳	江西省吉安市	2017-07	115.47	27.71	干燥未成熟果实
ZQ2	枳壳	江西省吉安市	2017-07	115.39	27.74	干燥未成熟果实
ZQ3	枳壳	江西省吉安市	2017-07	115.42	27.91	干燥未成熟果实
ZQ4	枳壳	江西省吉安市	2017-07	115.43	27.88	干燥未成熟果实
ZQ5	枳壳	江西省吉安市	2017-07	115.41	27.85	干燥未成熟果实
ZQ6	枳壳	湖南省益阳市	2017-07	112.35	28.79	干燥未成熟果实
ZQ7	枳壳	湖南省益阳市	2017-07	112.59	29.06	干燥未成熟果实
ZQ8	枳壳	江西省九江市	2017-07	116.34	29.58	干燥未成熟果实
ZQ9	枳壳	江西省九江市	2017-07	116.33	29.62	干燥未成熟果实
ZQ10	枳壳	江西省宜春市	2017-07	115.42	28.00	干燥未成熟果实
ZQ11	枳壳	江西省宜春市	2017-07	115.31	27.92	干燥未成熟果实
ZQ12	枳壳	江西省宜春市	2017-07	115.32	28.11	干燥未成熟果实
ZQ13	枳壳	江西省宜春市	2017-07	115.44	28.10	干燥未成熟果实
ZQ14	枳壳	江西省宜春市	2017-07	115.42	28.00	干燥未成熟果实
ZQ15	枳壳	江西省宜春市	2017-07	115.44	28.10	干燥未成熟果实
ZQ16	枳壳	江西省宜春市	2017-07	115.42	28.00	干燥未成熟果实
ZQ17	枳壳	江西省宜春市	2017-07	115.44	28.10	干燥未成熟果实
ZQ18	枳壳	江西省宜春市	2017-07	115.42	28.00	干燥未成熟果实
ZS1	枳实	江西省吉安市	2018-05	115.43	27.93	干燥幼果
ZS2	枳实	江西省宜春市	2018-05	114.51	28.46	干燥幼果
ZS3	枳实	江西省吉安市	2018-05	115.43	27.91	干燥幼果
ZS4	枳实	江西省吉安市	2018-05	115.40	27.94	干燥幼果
ZS5	枳实	湖南省益阳市	2018-06	112.31	28.73	干燥幼果
ZS6	枳实	湖南省益阳市	2018-06	112.36	28.85	干燥幼果
ZS7	枳实	江西省九江市	2018-05	115.12	29.30	干燥幼果
ZS8	枳实	江西省九江市	2018-05	115.12	29.31	干燥幼果
ZS9	枳实	湖南省益阳市	2018-06	112.34	28.82	干燥幼果
ZS10	枳实	湖南省益阳市	2018-06	112.37	28.80	干燥幼果

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱为 Agilent SB C_{18}（100 mm×2.1 mm，1.8

μm）；以乙腈为流动相A，0.05%磷酸水为流动相B，梯度洗脱（0～7 min，15%→25%A；7～8 min，25%→40%A；8～10 min，40%→45%A；10～13 min，45%→60%A；13～15 min，60%→15%A）；流速为0.4 mL·min^{-1}；柱温为30 ℃；检测波长为320 nm；进样量为2 μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、马尔敏、川陈皮素、橘红素对照品适量，加甲醇制成含芸香柚皮苷336.6 μg·mL^{-1}、柚皮苷257.4 μg·mL^{-1}、橙皮苷221.6 μg·mL^{-1}、新橙皮苷105.7 μg·mL^{-1}、水合橙皮内酯69.1 μg·mL^{-1}、马尔敏225.3 μg·mL^{-1}、川陈皮素219.7 μg·mL^{-1}、橘红素256.4 μg·mL^{-1}的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取枳壳和枳实粉末（过三号筛）约0.2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇50 mL，称定重量，加热回流提取1.5 h，放冷，称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，精密量取续滤液10 mL，置25 mL量瓶中，加甲醇定容，摇匀，即得。

2.4 指纹图谱研究

2.4.1 精密度试验 取枳壳样品（ZQ17）粉末约0.2 g，精密称定，制备供试品溶液，连续进样6次，以新橙皮苷为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积，结果显示18个共有峰相对保留时间*RSD*在0.010%～0.040%，相对峰面积*RSD*在0.040%～0.89%，均小于2.0%，表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取枳壳样品（ZQ18）粉末约0.2 g，精密称定，制备供试品溶液，分别在0、2、4、6、8、12 h进样测定，以新橙皮苷为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积，结果显示18个共有峰相对保留时间*RSD*在0.040%～0.15%，相对峰面积*RSD*在0.120%～0.63%，均小于2.0%，表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.4.3 重复性试验 取枳壳样品（ZQ17）粉末约0.2 g，平行6份，精密称定，制备供试品溶液，进样测定，以新橙皮苷为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积，结果显示18个共有峰相对保留时间相对保留时间*RSD*在0.020%～0.040%，相对峰面积*RSD*在0.34%～2.2%，均小于3.0%，表明该方法重复性良好。

2.5 指纹图谱测定结果与分析

2.5.1 枳壳与枳实共有峰的确定 取18批枳壳样品和10批枳实样品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，结果得到18个共有峰，通过对照品指认了8个峰，分别为芸香柚皮苷（峰1）、柚皮苷（峰2）、橙皮苷（峰4）、新橙皮苷（峰5）、水合橙皮内酯（峰7）、马尔敏（峰13）、川陈皮素（峰15）、橘红素（峰18）。其中新橙皮苷分离度好，保留时间适中，峰形稳定，设为参照峰（S）。见图1～3。

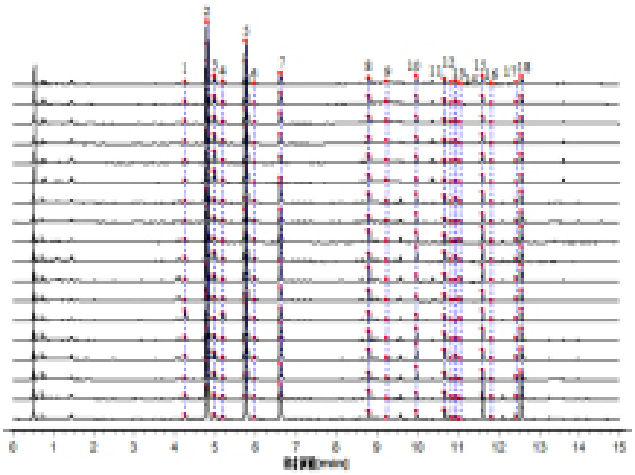


图1 18批枳壳指纹图谱叠加图

Fig 1 Fingerprint and chromatogram of 18 batches of *Aurantii Fructus*

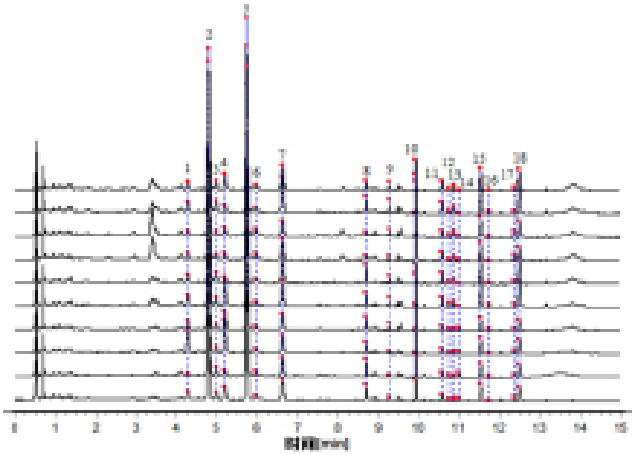


图2 10批枳实指纹图谱叠加图

Fig 2 Fingerprint and chromatogram of 10 batches of *Aurantii Fructus Immatutus*

2.5.2 相似度评价 分别将18批枳壳和10批枳实指纹图谱导入“中药指纹图谱相似度评价系统（2012.0版本）”，生成枳壳和枳实对照指纹图谱。结果显示，18批枳壳与枳壳对照指纹图谱的相似度在0.943～0.998；10批枳实与枳实对照指纹图谱相似度在0.965～0.998。相似度均

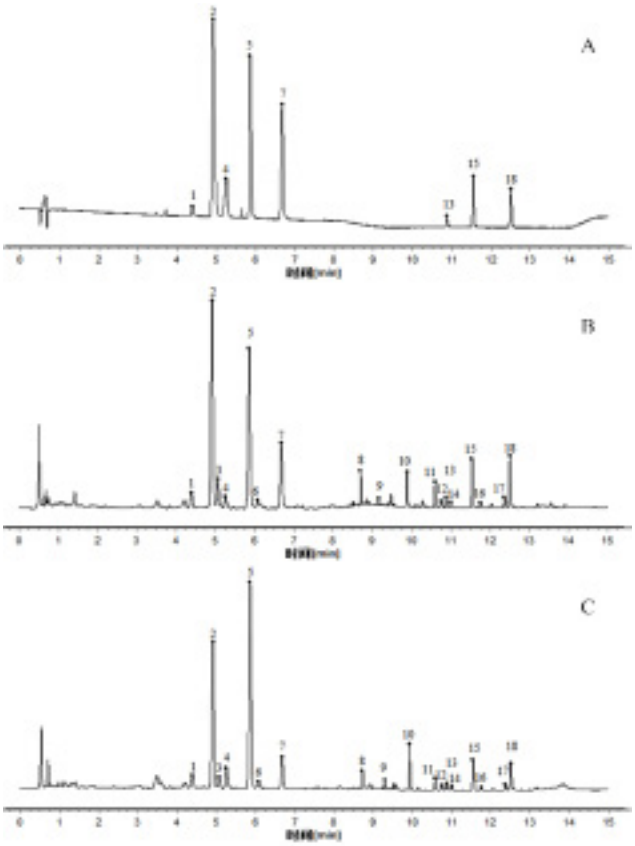


图 3　对照品、供试品 UPLC 色谱图

Fig 3　UPLC of reference substance and sample

A. 混合对照品（mixed reference）；B. 枳壳对照指纹图谱（contrast fingerprints of *Aurantii Fructus*）；C. 枳实对照指纹图谱（contrast fingerprints of *Aurantii Fructus Immatutus*）；1. 芸香柚皮苷（narirutin）；2. 柚皮苷（naringin）；4. 橙皮苷（hesperidin）；5. 新橙皮苷（neohesperidin）；7. 水合橙皮内酯（meranzin hydrate）；13. 马尔敏（marmin）；15. 川陈皮素（nobiletun）；18. 橘红素（tangeretin）

大于 0.940，说明不同批次同种药材质量大体一致。18 批枳壳与枳实对照指纹图谱的相似度在 0.843 ～ 0.989；10 批枳实与枳壳对照指纹图谱相似度在 0.845 ～ 0.996，相似度均大于 0.84，说明同一基原不同采收期的两种药材相似度较高，仅通过相似度评价难以区分（见表 2）。

2.5.3　聚类分析　将枳壳与枳实色谱峰峰面积导入 SPSS 20.0 软件进行聚类分析，采用组间联接法，选用欧氏距离进行聚类分析，结果见图 4。由聚类分析结果可知，枳壳与枳实明显地分成两大类，一类为枳壳样品（Ⅰ），另一类为枳实样品（Ⅱ），说明枳壳和枳实样品间存在一定的差异。

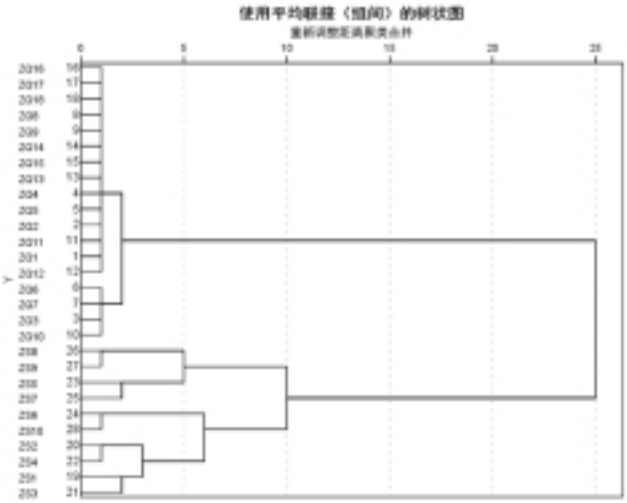


图 4　枳壳与枳实样品聚类分析结果

Fig 4　Clusster analysis of *Aurantii Fructus and Aurantii Fructus Immatutus*

表 2　相似度评价结果

Tab 2　Similarity evaluation

编号	与枳壳相似度	与枳实相似度	编号	与枳壳相似度	与枳实相似度	编号	与枳实相似度	与枳壳相似度
ZQ1	0.943	0.843	ZQ11	0.997	0.937	ZS1	0.998	0.965
ZQ2	0.974	0.884	ZQ12	0.992	0.967	ZS2	0.992	0.913
ZQ3	0.998	0.946	ZQ13	0.980	0.971	ZS3	0.978	0.921
ZQ4	0.978	0.885	ZQ14	0.989	0.948	ZS4	0.989	0.898
ZQ5	0.997	0.934	ZQ15	0.995	0.949	ZS5	0.996	0.935
ZQ6	0.954	0.933	ZQ16	0.991	0.941	ZS6	0.967	0.996
ZQ7	0.975	0.989	ZQ17	0.993	0.948	ZS7	0.996	0.934
ZQ8	0.990	0.972	ZQ18	0.994	0.947	ZS8	0.965	0.845
ZQ9	0.993	0.964	/	/	/	ZS9	0.986	0.987
ZQ10	0.990	0.926	/	/	/	ZS10	0.982	0.987

2.5.4　主成分分析　将枳壳与枳实的共有峰峰面积导入 SIMCA 14.1 软件进行主成分分析。结果前三个主成分的累积贡献率为 73.1%，说明前三个主成分基本能反映枳壳与枳实样品的主要特征（见图 5）。以前三个主成分建立坐标系，构建枳壳与枳实的主成分分析得分图（见图 6）。由得分图可知，枳壳与枳实聚为两类。结合聚类分析和主成分分析结果，表明枳壳与枳实的化学成分含量存在明显差异。

2.5.5　偏最小二乘法 - 判别分析（PLS-DA）　为

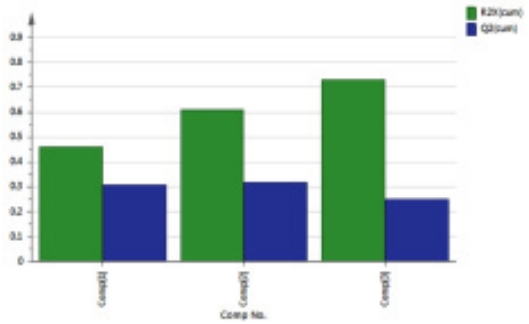


图 5 主成分方差贡献率

Fig 5 Variance contribution rate of principal components

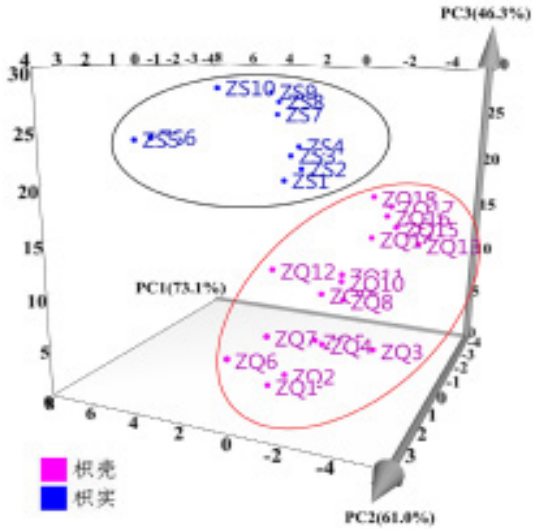


图 6 主成分分析得分图

Fig 6 Principal components scores

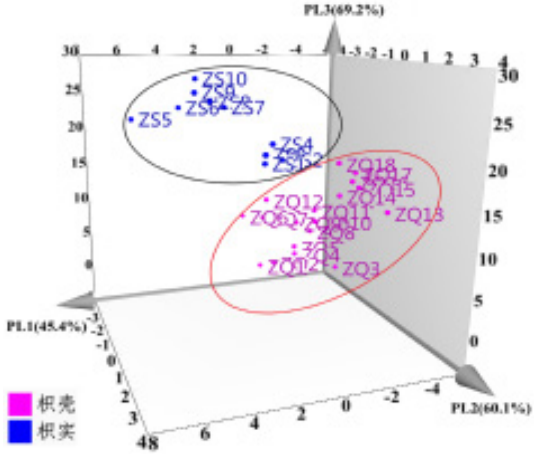


图 7 PLS-DA 得分图

Fig 7 PLS-DA scores

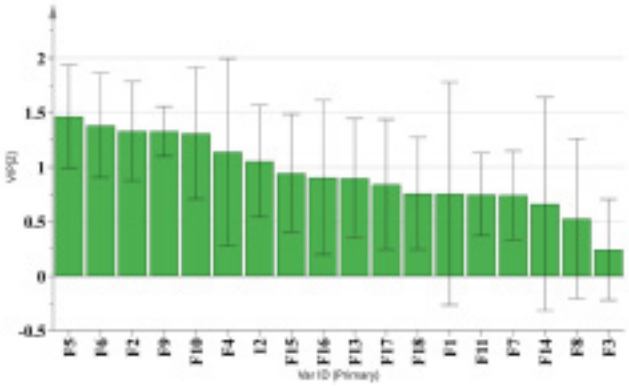


图 8 枳壳与枳实差异标志物的 VIP 图

Fig 8 VIP value of *Aurantii Fructus and Aurantii Fructus Immatutus*

了进一步比较枳壳与枳实化学成分的差异和寻找两者之间的差异性化合物，笔者进行了 PLS-DA 建模分析。PLS-DA 模型中，R^2_Y 为 0.923，Q^2_Y 为 0.871，均大于 0.5，说明建立的模型稳定可靠。由 PLS-DA 得分图可知（见图 7），枳壳与枳实明显分为两类，与聚类分析和主成分分析结果一致。通过变量重要性投影值（VIP）筛选出两者间化学成分差异的主要标志性成分（见图 8）。以 VIP 值大于 1 作为标准筛选，贡献由大到小的 7 个变量依次为：峰 5、峰 6、峰 2、峰 9、峰 10、峰 4、峰 12。通过对照品指认出 3 个成分，分别为峰 5 新橙皮苷、峰 2 柚皮苷，峰 4 橙皮苷，其中峰 5 新橙皮苷的 VIP 值最大，是枳壳与枳实差异最大的峰。

2.6 含量测定

由指纹图谱测定结果可知，枳壳与枳实化学成分类似，但存在含量间的差异。故采用 UPLC 法对枳壳和枳实的 4 个黄酮类成分（芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷）和 4 个香豆素类成分（水合橙皮内酯、马尔敏、川陈皮素、橘红素）进行含量测定。

2.6.1 精密度考察 取“2.2”项下混合对照品，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，结果芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、马尔敏、川陈皮素、橘红素 8 个成分峰面积 *RSD* 分别为 0.52%、0.83%、1.0%、1.3%、1.1%、1.2%、1.6%、1.0%，表明仪器精密度良好。

2.6.2 稳定性考察 取枳壳样品（ZQ17）粉末约 0.2 g，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样测定，计算芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、马尔敏、川陈皮素、橘红素 8 个成分峰面积 *RSD* 分别为 1.6%、1.6%、1.4%、1.3%、1.6%、1.6%、1.1%、1.7%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.6.3 线性关系考察 精密移取“2.2”项下对照品溶液，加甲醇稀释成 6 个不同质量浓度的对照品溶液，以峰面积为纵坐标，质量浓度为横坐标，绘制标准曲线，结果见表 3。

表 3　回归方程及线性范围

Tab 3　Regression equation and linearity

成分	回归方程	r	线性范围 /μg
芸香柚皮苷	$y = 1.390\times10^3x - 1.803\times10^3$	1.000	0.671 ～ 335.633
柚皮苷	$y = 1.538\times10^3x - 1.184\times10^3$	1.000	0.515 ～ 257.410
橙皮苷	$y = 1.707\times10^3x - 1.622\times10^3$	1.000	0.443 ～ 221.607
新橙皮苷	$y = 1.714\times10^3x + 363.6$	1.000	0.212 ～ 105.762
水合橙皮内酯	$y = 1.467\times10^4x - 4.624\times10^3$	1.000	0.138 ～ 69.188
马尔敏	$y = 5.349\times10^3x + 141.5$	1.000	0.045 ～ 225.302
川陈皮素	$y = 1.555\times10^4x - 1.597\times10^4$	1.000	0.439 ～ 219.716
橘红素	$y = 2.121\times10^4x - 2.460\times10^4$	1.000	0.513 ～ 256.438

2.6.4　重复性试验　取枳壳样品（ZQ17）粉末约 0.2 g，平行 6 份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，计算芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、马尔敏、川陈皮素、橘红素 8 个成分含量 *RSD* 分别为 1.6%、0.82%、0.66%、1.1%、1.3%、1.6%、1.1%、1.7%，表明该方法重复性良好。

2.6.5　加样回收试验　取已知含量的枳壳样品（ZQ17）粉末约0.1 g，精密称定，平行6份，1∶1 加入对照品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，计算各成分的加样回收率。结果 8 种成分的平均回收率在 96.14% ～ 104.88%，*RSD* 在 0.91% ～ 4.2%。

2.6.6　样品测定结果　精密吸取 18 批枳壳和 10 批枳实供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，结果见表 4。除川陈皮素外，枳实整体含量高于枳壳，尤其是柚皮苷和新橙皮苷含量远高于枳壳含量，说明柚皮苷和新橙皮苷为枳壳与枳实的差异性化合物，与 PLS-DA 分析结果一致。

表 4　含量测定结果 (mg・g^{-1})

Tab 4　Content determination (mg・g^{-1})

批号	芸香柚皮苷	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷	水合橙皮内酯	马尔敏	川陈皮素	橘红素
ZQ1	5.611	67.128	4.066	54.345	3.053	0.842	1.736	1.545
ZQ2	5.086	55.007	2.863	35.323	2.798	0.293	1.733	1.560
ZQ3	3.921	40.656	2.690	25.308	1.630	0.247	1.304	1.327
ZQ4	4.062	49.874	2.972	40.833	2.301	0.690	1.421	1.325
ZQ5	4.715	53.469	3.054	39.677	2.113	0.247	1.771	1.515
ZQ6	6.936	44.139	2.468	23.697	2.884	0.436	2.368	1.934
ZQ7	7.515	50.217	2.464	26.076	1.983	0.338	2.124	1.920
ZQ8	4.677	62.903	2.817	39.457	2.070	0.461	1.299	1.158
ZQ9	5.322	67.112	2.758	38.886	2.276	0.372	1.536	1.330
ZQ10	16.109	32.214	7.840	27.795	1.721	0.112	1.403	1.361
ZQ11	3.405	45.650	3.717	47.418	1.873	0.364	1.311	1.269
ZQ12	3.973	60.650	3.281	52.510	2.528	0.211	1.811	1.597
ZQ13	4.846	53.511	3.649	42.136	0.749	0.349	1.170	1.097
ZQ14	4.707	54.550	3.270	35.558	0.982	0.489	1.495	1.157
ZQ15	4.793	52.397	3.279	33.146	1.241	0.548	1.211	1.160
ZQ16	5.110	70.349	3.085	41.396	1.427	0.481	1.155	1.075
ZQ17	4.776	68.358	2.897	42.213	1.440	0.456	1.204	1.094
ZQ18	5.550	69.675	4.190	42.543	1.499	0.621	1.305	1.155
ZS1	10.373	86.001	13.435	93.129	2.269	0.457	1.068	1.338
ZS2	3.214	85.781	6.829	129.622	2.119	0.244	1.016	1.309
ZS3	30.341	79.275	31.168	99.170	2.030	0.543	1.051	1.378
ZS4	11.555	77.499	17.411	125.514	1.871	0.381	0.980	1.211
ZS5	12.467	108.355	26.994	143.349	2.728	1.008	1.364	1.890
ZS6	10.457	131.574	5.599	94.138	3.131	0.953	1.318	1.854
ZS7	6.708	116.664	6.564	149.538	2.310	0.719	1.109	1.325
ZS8	5.425	87.739	8.720	188.421	1.848	1.049	1.166	1.404
ZS9	12.363	165.131	7.861	143.476	3.902	1.316	1.471	2.127
ZS10	9.619	132.602	14.794	106.299	2.765	0.929	1.200	1.631

2.6.7 结果分析 以上述 8 个含量测定指标为检验变量，枳壳与枳实作为分组变量，采用 SPSS 20.0 软件进行独立样本检验分析，由表 5 可知，芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、水合橙皮内酯、马尔敏、川陈皮素含量在枳壳与枳实中差异具有统计学意义（$P < 0.05$）；橘红素含量无显著性差异（$P < 0.05$）。综上，说明除橘红素外，枳壳与枳实其余 7 个指标成分含量变化明显。

表 5 独立样本检验分析表

Tab 5 Independent sample analysis

成分	检验方式	*P* 值
芸香柚皮苷	Mann-Whitney U 检验	0.005
柚皮苷	Mann-Whitney U 检验	＜ 0.001
橙皮苷	Mann-Whitney U 检验	＜ 0.001
新橙皮苷	Mann-Whitney U 检验	＜ 0.001
水合橙皮内酯	方差方程的 Levene 检验	0.033
马尔敏	Mann-Whitney U 检验	0.001
川陈皮素	Mann-Whitney U 检验	0.003
橘红素	Mann-Whitney U 检验	0.098

3 讨论

本试验在流动相、检测波长、柱温、流速等色谱条件优化基础上，采用 UPLC 法对 18 批枳壳药材和 10 批枳实药材进行研究，建立了指纹图谱，标定了 18 个共有峰，通过对照品指认出 8 个色谱峰。相似度分析结果表明，枳壳药材与枳实药材样品相似度均大于 0.90，枳壳药材与枳实药材指纹图谱共有峰一致，表明两者所含化学成分基本一致，但两者共有峰峰面积相差较大，表明枳壳药材与枳实药材某些化学成分含量差异较大。为寻找枳壳药材与枳实药材差异性化合物，采用了聚类分析、主成分分析及 PLS-DA 分析等方法进行分析，均能对枳壳与枳实进行识别与聚类，并确认了新橙皮苷、柚皮苷和橙皮苷等 7 个成分是枳壳与枳实质量差异的主要物质。

本研究在指纹图谱基础上，对枳壳药材和枳实药材中 8 个指标性成分进行含量测定，除川陈皮素外，枳实整体含量高于枳壳，尤其是柚皮苷和新橙皮苷含量远高于枳壳药材，与文献[8，14-15]报道一致。黄酮类成分随着果实成熟而呈下降趋势，这与其在植物体内的代谢转化过程相关，多种因素对不同生长发育阶段物质成分的积累具有一定影响。现代药理研究表明，黄酮类化合物如橙皮苷、新橙皮苷、柚皮苷可促进胃肠动力，有明显的促进胃排空、胃肠蠕动作用，这与枳实行气力量较大，多用于破积导滞，通利大便，而枳壳作用较缓，长于理气宽胸，消胀除痞的作用相一致，两者功效性能不一，临床应用也有所侧重。本试验通过建立指纹图谱和多指标成分含量测定的方法，可较好地反映枳壳与枳实指纹图谱的差异，也可为枳壳与枳实药材的鉴别和质量评价提供依据。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：257-258.

[2] 南京中医药大学编著 . 中药大辞典 [M]. 上海：上海科学技术出版社，2006.

[3] 王刚，张静泽，陈虹，等 . 中药枳壳提取物对大鼠不同肠段平滑肌运动功能的影响 [J]. 武警后勤学院学报（医学版），2013，22（8）：679-682.

[4] 谢冬萍，李伟，瞿颂义，等 . 枳实对大鼠结肠肌条运动的影响 [J]. 山东医科大学学报，2001，39（5）：437-438.

[5] 邓可众，杨堃，邓敏芝，等 . HPLC 法同时分析酸橙果实类药材中黄酮和香豆素类成分 [J]. 中药材，2016，39（3）：575-578.

[6] 张霄潇，李正勇，马玉玲，等 . 中药枳实的研究进展 [J]. 中国中药杂志，2015，40（2）：185-190.

[7] 胡源祥，陈海芳，宋玉鹏，等 . 枳实及其主要活性成分促进脾虚模型大鼠胃肠运动的机制研究 [J]. 中国药房，2017，28（13）：1747-1750.

[8] 田芳，何小芳，谭梓君，等 . 枳壳 HPLC 特征图谱及 6 个黄酮苷类成分含量测定 [J]. 药物分析杂志，2020，40（6）：1090-1096.

[9] 陈欢，高萌，罗小泉，等 . 不同产地枳壳药材中 12 种有效成分的主成分分析和判别分析 [J]. 中草药，2019，50（14）：3433-3437.

[10] 高喜梅，池玉梅，张雯，等 . 指纹图谱结合一测多评法评价酸橙枳实质量的研究 [J]. 中草药，2020，51（9）：2548-2556.

[11] 陈建维，刘圆，刘晟楠，等 . 一测多评法测定枳实中 4 种黄酮类成分 [J]. 中草药，2015，46（9）：1374-1377.

[12] 郭元满，刘爱华，张妮瑜，等 . 不同产地枳壳药材柠檬苦素、诺米林含量测定及聚类分析 [J]. 中南药学，2018，16（1）：104-106.

[13] 贾富霞，王秀娟，罗容 . 酸橙枳实 HPLC 指纹图谱方法研究及 6 种黄酮类药效组分的含量测定 [J]. 中华中医药学刊，2016，34（12）：2917-2920.

[14] 朱露，雷鹏，黄琪，等 . 反相高效液相色谱法测定枳实中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的含量 [J]. 中南药学，2013，11（12）：934-937.

[15] 李正红，陈海芳，骆利平，等 . 江枳壳不同采收期活性成分 HPLC 含量测定 [J]. 中药材，2013，36（1）：28-31.

[16] 邓可众，陈虹，熊艺，等 . 不同产地及不同采收期江枳实的 UPLC 指纹图谱研究 [J]. 中药材，2017，40（9）：2051-2054.

（收稿日期：2021-01-06；修回日期：2021-11-10）

醋酸钠林格注射液与包材中抗氧剂的相容性研究

邹宇，刘杨，刘亚威，张迪，孙苓苓*（辽宁省检验检测认证中心，辽宁省药品检验检测院，沈阳　110036）

摘要：目的　建立醋酸钠林格注射液与包材中抗氧剂的高效液相色谱测定方法。**方法**　采用 TechMate C_{18}-STII（250 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱，以水 - 四氢呋喃 - 乙腈（1∶3∶6）为流动相，流速为 1.5 mL • min^{-1}，波长为 280 nm，进样量为 20 μL，对包材和注射液进行提取、迁移试验。**结果**　抗氧剂 1010、抗氧剂 330、抗氧剂 1076、抗氧剂 168 分别在 0.4596 ～ 459.6 μg • mL^{-1}、0.4594 ～ 459.4 μg • mL^{-1}、1.173 ～ 469.2 μg • mL^{-1}、1.152 ～ 461.0 μg • mL^{-1} 内与峰面积呈良好的线性关系（$r \geqslant 0.9999$）；4 种抗氧剂的平均回收率在 86.4% ～ 107.5%；检测限分别为 0.011、0.011、0.023、0.046 μg • mL^{-1}，均低于对应的分析评价阈值；提取、迁移试验结果均符合要求。**结论**　本方法简便快速、准确灵敏，适用于醋酸钠林格注射液包材相容性抗氧剂研究，同时为其安全性提供数据参考。

关键词：醋酸钠林格注射液；相容性；抗氧剂；提取试验；迁移试验
中图分类号：R917，R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0905-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.028

Compatibility of sodium acetate ringer injection with antioxidants in the packing materials

ZOU Yu, LIU Yang, LIU Ya-wei, ZHANG Di, SUN Ling-ling* (*Liaoning Inspection*, *Examination and Certification Center*, *Liaoning Institute for Drug Control*, *Shengyang* 110036)

Abstract: Objective　To develop an HPLC method to determine the content of antioxidant in sodium acetate ringer injection and packing materials. **Methods**　TechMate C_{18}-STII (250 mm×4.6 mm, 5 μm) chromatographic column was used with water-tetrahydrofuran-acetonitrile (1∶3∶6) as the mobile phase at 1.5 mL • min^{-1}. The wavelength was 280 nm and the injection volume was 20 μL. The extraction and migration tests of packaging materials and injection were carried out. **Results**　Antioxidant 1010, 330, 1076 and 168 showed good linearity at 0.4596 － 459.6 μg • mL^{-1}, 0.4594 － 459.4 μg • mL^{-1}, 1.173 － 469.2 μg • mL^{-1}, and 1.152 － 461.0 μg • mL^{-1} respectively ($r \geqslant 0.9999$). The average recovery of the 4 antioxidants was at 86.4% － 107.5%. The limit of detection was 0.011, 0.011, 0.023, and 0.046 μg • mL^{-1}, respectively, all of which was lower than the corresponding analytical evaluation threshold. The test results of extraction and migration all met the requirements. **Conclusion**　The method is simple, rapid, accurate and sensitive, which is suitable for the determination of antioxidants in sodium acetate ringer injection with packing materials and provides data reference for its safety.

Key words: sodium acetate ringer injection; compatibility; antioxidant; extraction test; migration test

醋酸钠林格注射液是一种新型的电解质平衡液，组成接近细胞外液生理比例，其含有的醋酸钠盐代谢速率快，可迅速改善微循环，纠正酸中毒[1-2]。临床上广泛用于围术期液体治疗，在安全性、有效性方面优势明显[3-5]。醋酸钠林格注射液为五层共挤输液用袋包装，直接接触药品的包材有五层共挤输液用袋、聚丙烯接口、聚丙烯组合盖，均为塑料制品。塑料药包材在生产过程中会加入抗

基金项目：辽宁省自然基金资助计划（No. 2019-MS-185）。
作者简介：邹宇，女，副主任药师，主要从事化学药品质量标准研究，email：zoe0921cn@163.com　*__通信作者：__孙苓苓，女，主任药师，主要从事药物分析及药品标准研究，email：sunll@vip.163.com

氧剂来抑制或延缓老化降解，注射液在生产、流通、储存及使用过程中长时间与药包材接触，抗氧剂可能溶出、迁移至药液中，影响药物的理化性质和药理作用，甚至对人体具有一定的毒性[6-8]。2012 年 9 月，我国药审中心发布了《化学药品注射剂与塑料包装材料相容性研究技术指导原则（试行）》[9]，指出包装系统应与药品具有良好的相容性，即不能引入可引发安全性风险的浸出物，或引入浸出物的水平应符合安全性要求。欧洲药典中对各种塑料材料中添加剂的添加量进行了限定，并给出了检验方法[10]。有文献对不同塑料材料中的抗氧剂含量、不同注射液包材相容性进行了研究[11-20]，但未见醋酸钠林格注射液包材相容性的相关报道。

醋酸钠林格注射液的药包材中使用了抗氧剂 1010、抗氧剂 330、抗氧剂 1076、抗氧剂 168，本研究参考欧洲药典方法[10]和相关文献[11-20]，建立了 4 种抗氧剂的测定方法，并对包材和注射液进行提取、迁移试验，现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪（美国 Waters 公司），Tomy SX-700 型高压灭菌锅（日本 Tomy 公司），BUCHI 旋转蒸发仪（瑞士 BUCHI 公司），TechMate C_{18}-STII 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm，北京泰克美公司），Cleanert S C_{18}-SPE 固相萃取柱（600 mg/6 mL，天津 Agela 公司）。

1.2 试药

抗氧剂 1010[四（3，5-二叔丁基-4-羟基）苯丙酸季戊四醇酯，批号：195014-201601，纯度：98.2%]、抗氧剂 330 [2，2'，2"，6，6'，6"-己烷-叔丁基-4，4'，4"-（2，4，6-三甲基-1，3，5-苯基）三亚甲基]三苯酚，批号：195007-201601，纯度：99.6%]、抗氧剂 1076[*β*-（3，5-二叔丁基-4-羟基苯基）丙酸十八碳醇酯，批号：195009-201601，纯度：99.5%]（中国食品药品检定研究院）；抗氧剂 168[三（2，4-二叔丁基）亚磷酸苯酯，批号：172881，纯度：98.5%，LGC]；四氢呋喃、甲醇（色谱纯，Fisher）；乙腈（色谱纯，Tedia）；二氯甲烷和甲苯（分析纯，国药集团）。

醋酸钠林格注射液（规格：500 mL，批号：B19041901，B19041902，B19041903，A 公司），五层共挤输液用袋（批号：2001680853，2001680898，2001680930，B 公司），聚丙烯接口（批号：1809151）、聚丙烯组合盖（批号：1811012）（C 公司）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 TechMate C_{18}-STII（250 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱，流动相为水-四氢呋喃-乙腈（1∶3∶6），流速为 1.5 mL·min^{-1}，检测波长为 280 nm，柱温为 40 ℃，进样量为 20 μL。

2.2 对照品溶液的制备

称取抗氧剂 1010、抗氧剂 330、抗氧剂 168、抗氧剂 1076 对照品适量，加入少量二氯甲烷溶解，以二氯甲烷-甲醇（3∶7）稀释至含抗氧剂 1010、抗氧剂 330、抗氧剂 168、抗氧剂 1076 各约 0.24 mg·mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 包材提取试验供试品溶液的制备 取包材样品约 2.0 g，精密称量，置于烧瓶中，加入甲苯 80 mL，持续搅拌，加热回流 1.5 h，冷却至 60 ℃，在搅拌下加入甲醇 120 mL，烧结玻璃过滤器滤过。用甲苯-甲醇（4∶6）混合液 25 mL 清洗烧瓶和滤渣，将清洗液与滤液合并，并用相同的混合溶剂稀释至 250 mL。取 50 mL 在 45 ℃真空蒸干，残渣用二氯甲烷-甲醇（3∶7）溶解残留物并定容至 5 mL，0.45 μm 有机膜过滤，即为包材提取试验供试品溶液。同法制备空白溶液。

2.3.2 相容性提取试验供试品溶液的制备 模拟并适当加强灭菌工艺条件，考察目标物的浸出情况。取五层共挤输液用袋，剪切成 0.5 cm×2 cm 条状，按表面积 6 cm^2·mL^{-1} 比例加入醋酸钠林格注射液 100 mL；分别取聚丙烯接口、组合盖，剪成小块，按 0.2 g·mL^{-1} 比例加入醋酸钠林格注射液 100 mL，置高压蒸汽灭菌器中，121 ℃浸提 1 h，取出放冷至室温，作为提取试验供试品溶液。固相萃取柱使用前分别用 3 mL 甲醇和 3 mL 水依次活化。量取提取试验供试品溶液 100 mL，以约 1.5 mL·min^{-1} 的流速通过固相萃取柱，用 6 mL 水淋洗，再分别用 5 mL 甲醇、3 mL 二氯甲烷依次洗脱，收集洗脱液，用甲醇稀释至 10 mL，0.45 μm 有机膜过滤后进样测定。同法配制空白溶液。

2.3.3 相容性迁移试验供试品溶液的制备 固相萃取柱使用前分别用 3 mL 甲醇和 3 mL 水依次活化。量取醋酸钠林格注射液 100 mL，以约 1.5 mL·min^{-1} 的流速通过固相萃取柱，用 6 mL 水淋洗，再分别用 5 mL 甲醇、3 mL 二氯甲烷依次洗脱，收集洗脱液，用甲醇稀释至 10 mL，0.45 μm 有机膜过滤后进样测定。同法配制空白溶液。

2.4　测定方法

将对照品溶液、供试品溶液与空白溶液分别注入高效液相色谱仪，采用外标法定量。要求抗氧剂对应峰之间的分离度均不小于 2.0，空白溶液在抗氧剂的出峰位置不得有干扰。

2.5　方法学考察

2.5.1　专属性试验　取制备好的抗氧剂对照品溶液、空白溶液、供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进行测定，抗氧剂 1010 的保留时间为 5.3 min；抗氧剂 330 的保留时间为 6.5 min；抗氧剂 1076 的保留时间为 11.2 min；抗氧剂 168 的保留时间为 12.8 min，各峰分离良好，醋酸钠林格注射液及空白溶液无干扰，典型色谱图见图 1。

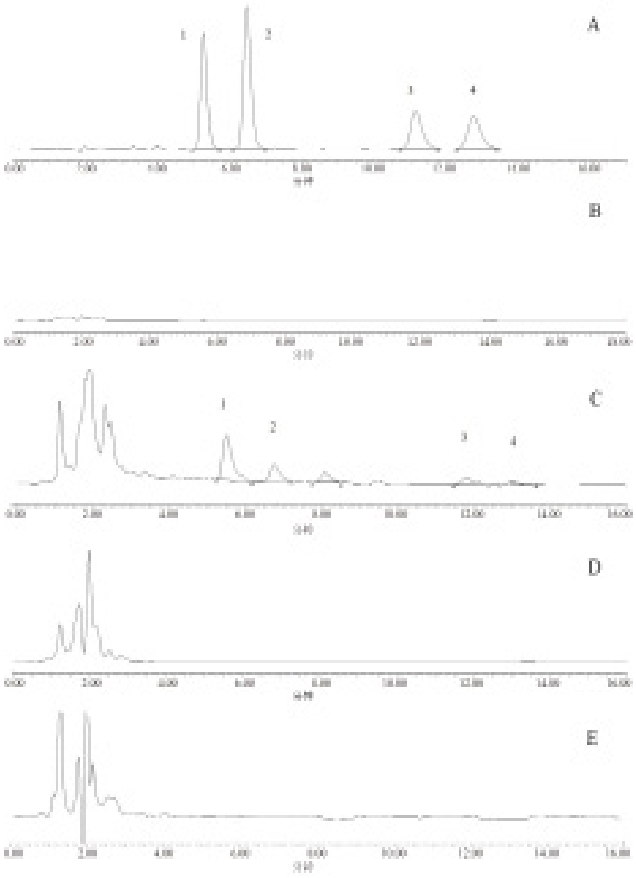


图 1　典型 HPLC 色谱图

Fig 1　Typical HPLC chromatogram

A. 对照品溶液（reference substance solution）；B. 空白溶液（blank solution）；C. 包材提取试验供品试溶液（test solution of packing materials extraction test）；D. 相容性提取试验供试品溶液（test solution of extraction test）；E. 相容性迁移试验供试品溶液（test solution of migration test）

1. 抗氧剂 1010（antioxidant 1010）；2. 抗氧剂 330（antioxidant 330）；3. 抗氧剂 1076（antioxidant 1076）；4. 抗氧剂 168（antioxidant 168）

2.5.2　线性关系考察　以二氯甲烷 - 甲醇（3∶7）溶液稀释抗氧剂对照品，制得含抗氧剂 1010 质量浓度为 0.4596、1.149、2.298、4.596、22.98、45.96、229.8、459.6 μg • mL^{-1}，含抗氧剂 330 质量浓度为 0.4594、1.148、2.297、4.594、22.97、45.94、229.7、459.4 μg • mL^{-1}，含抗氧剂 1076 质量浓度为 1.173、2.346、4.692、23.46、46.92、234.6、469.2 μg • mL^{-1}，含抗氧剂 168 质量浓度为 1.152、2.305、4.610、23.05、46.10、230.5、461.0 μg • mL^{-1} 的系列混合对照品溶液，依法测定，以质量浓度为横坐标，响应值为纵坐标，进行线性回归，结果见表 1，表明 4 种抗氧剂在各自质量浓度范围内与峰面积线性关系良好。

表 1　线性关系结果

Tab 1　Linearity

化合物	回归方程	线性范围 /（μg • mL^{-1}）	r
抗氧剂 1010	$Y = 4349.7X + 1415.3$	0.4596 ～ 459.6	1.000
抗氧剂 330	$Y = 6191X + 1860.4$	0.4594 ～ 459.4	1.000
抗氧剂 1076	$Y = 2527.9X - 2613.5$	1.173 ～ 469.2	1.000
抗氧剂 168	$Y = 2462.6X - 6222.2$	1.152 ～ 461.0	0.9999

2.5.3　精密度试验　取质量浓度均为 0.24 μg • mL^{-1} 的 4 种抗氧剂混合对照品溶液，连续进样 6 次，以峰面积计算 *RSD* 值，结果抗氧剂 1100、抗氧剂 330、抗氧剂 1076、抗氧剂 168 的峰面积 *RSD* 分别为 0.32%、0.16%、0.21%、0.25%，表明仪器精密度良好。

2.5.4　包材提取试验回收率　取五层共挤输液用袋，聚丙烯接口、组合盖，剪成小块混合，精密称定（约 2.0 g），按“2.3.1”项下方法制备回收率本底供试品溶液；同法加入低、中、高浓度的抗氧剂对照溶液，制备回收率加标供试品溶液，进样测定，计算回收率，结果见表 2，表明包材提取试验准确度良好。

2.5.5　相容性提取试验和迁移试验回收率　固相萃取柱使用前分别用 3 mL 甲醇和 3 mL 水依次活化。分别取 24 μg • mL^{-1}、46 μg • mL^{-1}、240 μg • mL^{-1} 的低、中、高质量浓度对照溶液 1 mL，加入醋酸钠林格注射液至 100 mL，混匀。溶液以约 1.5 mL • min^{-1} 的流速通过固相萃取柱，用 6 mL 水淋洗，分别用 5 mL 甲醇、3 mL 二氯甲烷依次洗脱，收集洗脱液，用甲醇稀释至 10 mL，0.45 μm 有机膜过滤后进样测定，结果见表 2，表明提取迁移试验准确度良好。

2.5.6　检测限和定量限　取抗氧剂对照品溶液用二氯甲烷 - 甲醇（3∶7）逐步稀释测定，以各抗氧剂峰信噪比 *S/N* 为 3 的质量浓度作为检测限，以 *S/N* 为 10 的质量浓度作为定量限，结果见表 3。

表 2 回收试验考察结果

Tab 2 Recovery

化合物		包材提取试验		相容性提取迁移试验	
		平均回收率 /%	*RSD*/%	平均回收率 /%	*RSD*/%
抗氧剂 1010	低	91.9	1.5	95.7	0.50
	中	104.5	1.4	96.2	1.1
	高	103.9	1.7	99.6	0.20
抗氧剂 330	低	105.8	2.4	94.2	0.40
	中	107.5	0.10	96.7	1.3
	高	104.8	0.30	96.8	0.10
抗氧剂 1076	低	98.5	1.7	100.6	3.2
	中	104.4	0.70	96.1	1.4
	高	104.4	0.90	96.1	2.3
抗氧剂 168	低	98.2	1.2	94.0	6.1
	中	86.4	2.0	90.2	1.3
	高	97.2	0.90	88.1	2.8

2.5.7 稳定性试验 将混合对照品溶液分别于 0、16、24、48、96 h 进样测定，结果抗氧剂 1100、抗氧剂 330、抗氧剂 1076、抗氧剂 168 的峰面积 *RSD* 值分别为 1.4%、1.4%、1.1%、0.90%，表明抗氧剂对照品在二氯甲烷 - 甲醇（3∶7）溶剂中稳定性良好。

表 3 抗氧剂的检测限与定量限

Tab 3 LOD and LOQ of different antioxidants

化合物	检测限		定量限	
	包材提取试验 /（μg • g^{-1}）	提取迁移试验 /（μg • mL^{-1}）	包材提取试验 /（μg • g^{-1}）	提取迁移试验 /（μg•mL^{-1}）
抗氧剂 1010	1.44	0.011	2.87	0.023
抗氧剂 330	1.44	0.011	2.87	0.023
抗氧剂 1076	2.93	0.023	5.86	0.047
抗氧剂 168	5.76	0.046	14.4	0.115

2.6 样品测定

2.6.1 包材提取试验测定结果 取包材样品，照“2.3.1”项下方法进行制备，按外标法计算五层共挤输液用袋、聚丙烯接口、聚丙烯组合盖中各抗氧剂的含量，结果见表 4。

表 4 包材中抗氧剂含量 (%)

Tab 4 Content of antioxidants in packaging materials (%)

包材	样品批号	抗氧剂 1010 含量	抗氧剂 330 含量	抗氧剂 1076 含量	抗氧剂 168 含量	抗氧剂总量
五层共挤输液袋	2001680898	0.0091	0.0024	0.0026	0.000 89	0.015
	2001680930	0.012	0.0027	0.0022	0.000 89	0.018
	2001680853	0.0090	0.0024	0.0033	0.0012	0.016
聚丙烯接口	1809151	0.027	0.0022	0.013	0.012	0.054
聚丙烯组合盖	1811012	0.023	0.0019	0.028	0.0046	0.058

2.6.2 相容性提取试验测定结果 取醋酸钠林格注射液及包材样品，按“2.3.2”项下方法进行制备，按外标法计算抗氧剂在提取液中的浸出量，提取液中的抗氧剂含量均低于检测限。

2.6.3 相容性迁移试验测定结果 取醋酸钠林格注射液 3 批样品，照“2.3.3”项下方法进行制备，按外标法计算抗氧剂在注射液中的迁移量，注射液中的抗氧剂含量均低于检测限。

3 讨论

3.1 溶剂的选择

欧洲药典方法中使用四氢呋喃 - 乙腈（1∶1）作为溶剂 [10]。笔者在试验中发现，抗氧剂 168 在使用该溶剂配制对照品溶液时不稳定，连续进样 6 次，峰面积呈连续下降趋势，1.5 h 峰面积下降了 22%。经过条件优化，最终选择二氯甲烷 - 甲醇（3∶7）溶液作为溶剂，4 种抗氧剂峰形良好，溶液稳定性良好，96 h 内峰面积没有明显变化。

3.2 固相萃取小柱的选择

抗氧剂在注射液中的迁移量很小，且不溶于水，本试验采用 Cleanert S C_{18} 固相萃取柱进行富集。该固相萃取柱为高纯球型硅胶基质的反相 C_{18} 萃取柱，既通过强疏水作用保留非极性化合物，又避免了普通 C_{18} 对碱性与极性物质的过度吸附，更适合用于萃取低浓度分析物。

3.3 分析评价阈值（AET）与方法检测限比较

根据《化学药品注射剂与塑料包装材料相容性研究技术指导原则（试行）》[9] 要求，分析测试方法应满足待测物 AET 的测定要求，选择可达到其能灵敏检出的分析方法。AET 计算方法为各抗氧剂最大日暴露量（PDE）与最大剂量的比值，醋酸钠林格注射液的最大日剂量为 1000 mL，即 AET ＝ PDE/1000。由文献 [21] 可知，PDE 值有两种计算方法，可采用口服途径 PDE 数据的 10% 计算注射途径的 PDE 值，则抗氧剂 1010、抗氧剂 330、抗氧剂 1076、抗氧剂 168 的 PDE 值分别为 15、5、0.5、5 mg • d^{-1}，其对应的 AET 值分别为 15、5、0.5、5 μg • mL^{-1}；也可按动物 NOEL 数据计算注射途径的 PDE 值，抗氧剂 1010、抗氧剂 330、抗氧剂 1076、抗氧剂 168 的 PDE 值分别为 10、200、0.3、2.5 mg • d^{-1}，则其对应的 AET

值分别为 10、200、0.3、2.5 μg • mL^{-1}。本方法抗氧剂 1010、抗氧剂 330、抗氧剂 1076、抗氧剂 168 的提取迁移试验检测限分别为 0.011、0.011、0.023、0.046 μg • mL^{-1}，远低于两种方法对应的 AET 值，灵敏度高，方法可行。

3.4 安全性评估

五层共挤输液袋、聚丙烯接口及聚丙烯组合盖中的抗氧剂单个含量和总含量均小于 0.3%，符合欧洲药典 [10] 和《化学药品注射剂与塑料包装材料相容性研究技术指导原则（试行）》[9] 规定的单个抗氧剂含量不得过 0.3%，总量不得过 0.3% 的限度要求。五层共挤输液袋、聚丙烯接口及聚丙烯组合盖在醋酸钠林格注射液高压 121 ℃浸提 1 h 的提取试验及迁移试验中检出量均低于检测限，试验结果可为其安全性提供数据参考。

参考文献

[1] Tsukano K，Kato S，Sarashina S，et al. Effect of acetate ringer’s solution with or without 5% dextrose administered intravenously to diarrheic calves [J]. J Vet Med Sci，2017，79（4）：795-800.

[2] 刘艳秋，任益民，曾丽，等 . 醋酸钠林格液和乳酸钠林格液对血乳酸、血糖及电解质的影响 [J]. 贵阳医学院学报，2016，41（2）：222-224.

[3] 王昆鹏，白宇，白涛，等 . 醋酸钠林格液用于围术期容量治疗的随机对照临床研究 [J]. 沈阳药科大学学报，2011，28（6）：474-476.

[4] 邓小彦，冼丽娜，林志星，等 . 醋酸钠林格液对脓毒症休克患者乳酸清除率和组织灌注及电解质水平的影响 [J]. 中国医药，2020，15（9）：1464-1468.

[5] 陈如，屈双权 . 醋酸钠林格注射液应用于小儿骨科手术补液对血糖及乳酸的影响 [J]. 儿科药学杂志，2019，25（5）：8-10.

[6] 霍秀敏，马玉楠，蒋煜 . 药品与包装容器系统相容性研究探讨 [J]. 中国新药杂志，2012，22（19）：2226-2229.

[7] 李樾，孙会敏，张烜 . 塑料输液包装材料与容器中抗氧剂含量测定方法的建立及其在注射液中的迁移研究 [J]. 中国药学杂志，2016，51（19）：1699-1705.

[8] 蔡心怡，王悦雯，冯靖，等 . 药品包装材料用塑料粒料中 8 个常用抗氧剂的含量测定 [J]. 药物分析杂志，2020，40（3）：523-528.

[9] 国家食品药品监督管理局 . 化学药品注射剂与塑料包装材料相容性研究技术指导原则（试行）[S]. 2012-09-07.

[10] EP. 欧洲药典 [S]. 第 10.0 版，2019：431-434.

[11] 王小艳，张涛，李鹏 . HPLC 法测定中药袋中 4 种抗氧剂的含量及其迁移 [J]. 中国合理用药探索，2021，18（4）：97-101.

[12] 于秋玲，李根容，龙梅，等 . 高效液相色谱法测定输液袋中 12 种抗氧剂的迁移量 [J]. 分析试验室，2021，40（9）：1075-1079.

[13] 徐燕慧 . HPLC 测定三层共挤输液用袋中四种抗氧剂的含量 [J]. 海峡药学，2020，32（11）：81-84.

[14] 王丽，赵锐，田恩圣，等 . 35 批次头孢类抗生素注射用粉针丁基胶塞中游离硫及常见抗氧剂的迁移研究 [J]. 药物分析杂志，2020，40（11）：2033-2041.

[15] 朱碧君，李婷婷，孙会敏，等 . HPLC 法同时测定药用卤化丁基胶塞中 5 种抗氧剂和游离硫的含量 [J]. 中国药房，2018，29（18）：2475-2479.

[16] 饶艳春，左军凤，熊马建，等 . 胶塞中抗氧剂测定及其在药品中的迁移研究 [J]. 中国药物评价，2020，37（5）：380-383.

[17] 孟玉芳 . 国产非 PVC 五层共挤输液用膜生产输液的可行性研究 [J]. 中国现代应用药学，2016，33（4）：455-460.

[18] 黄萍，刘兴兰 . SPE-HPLC 法测定三层共挤输液袋中抗氧剂在氧氟沙星氯化钠注射液中的迁移量 [J]. 中国药师，2016，19（12）：2267-2269.

[19] 熊微，丁冠军，汪秋兰，等 . 更昔洛韦氯化钠注射液与聚丙烯输液瓶的相容性评价 [J]. 中国现代应用药学，2018，35（8）：1166-1172.

[20] 张旭，傅萍，谢华，等 . HPLC 法同时测定药用卤化丁基胶塞中 17 种抗氧剂向注射用伏立康唑中的迁移 [J]. 药物分析杂志，2020，40（8）：1481-1489.

[21] 蒋煜，马玉楠，霍秀敏，等 .《化学药品注射剂与塑料包装材料相容性研究技术指导原则》解读——提取迁移试验方法设计 [J]. 中国新药杂志，2014，23（15）：1738-1742.

（收稿日期：2021-12-31；修回日期：2022-03-15）

山豆根药材 UPLC-UV 指纹图谱及 3 种成分含量测定研究

南俊伶[1]，王超众[1]，闫广利[1*]，吴芳芳[2]，宋志军[2]，王硕[2]，周小雷[2]，缪剑华[2]，王喜军[1, 2*]（1. 黑龙江中医药大学，国家中医药管理局中医方证代谢组学研究中心，教育部经典名方有效性评价及产业化开发工程研究中心，哈尔滨 150040；2. 广西壮族自治区药用植物园，西南濒危药材资源开发国家工程实验室，南宁 530023）

摘要：目的 建立山豆根药材 UPLC-UV 指纹图谱和同时测定其中三叶豆紫檀苷、高丽槐素、山豆根素含量的方法。**方法** 采用 Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm），以乙腈 -0.1% 磷酸水溶液为流动相，梯度洗脱，检测波长为 203 nm，流速为 0.3 mL • min^{-1}，柱温为 25 ℃，进样量为 1 μL，建立山豆根药材 UPLC-UV 指纹图谱分析方法及同时测定三叶豆紫檀苷、高丽槐素、山豆根素含量的方法，测定 16 批山豆根药材的指纹图谱及 3 种成分的含量。**结果** 指纹图谱及含量测定方法学验证均良好，16 批山豆根药材 UPLC 指纹图谱的相似度在 0.926 ～ 0.989，确定 10 个共有峰，三叶豆紫檀苷含量为 0.056% ～ 0.226%，高丽槐素含量为 0.04% ～ 0.151%，山豆根素含量为 0.163% ～ 0.585%。**结论** 本研究为山豆根整体质量评价提供了新的方法，可用于山豆根药材质量控制。

关键词：山豆根；指纹图谱；含量测定；三叶豆紫檀苷；高丽槐素；山豆根素
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)04-0910-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.029

UPLC-UV fingerprint of Sophora Tonkinensis and content determination of three components

NAN Jun-ling[1], WANG Chao-zhong[1], YAN Guang-li[1*], WU Fang-fang[2], SONG Zhi-jun[2], WANG Shuo[2], ZHOU Xiao-lei[2], MIU Jian-hua[2], WANG Xi-jun[1, 2*] (1. *Heilongjiang University of Chinese Medicine*, *National Chinmedomics Research Center*, *Engineering Research Center of Efficacy Evaluation and Industrial Development of TCM Classic Formulae of the Ministry of Education*, *Harbin* 150040; 2. *Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants*, *National Engineering Laboratory for the Development of Southwestern Endangered Medicinal Materials*, *Nanning* 530023)

Abstract: Objective To establish the UPLC-UV fingerprint of Sophora Tonkinensis and simultaneously determine the content of trifolirhizin, sophoranone, and maackiain. **Methods** Waters Acquity UPLC HSS T3 column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) was used with the mobile phase consisting of acetonitrile-0.1% phosphoric acid at a flow rate of 0.3 mL • min^{-1} for gradient elution. The column temperature was 25 ℃ . The detection wavelength was 203 nm, and the injection volume was 1 μL. The fingerprints of 16 batches of Sophora Tonkinensis and the content of trifolirhizin, sophoranone and maackiain were determined. **Results** The fingerprints and content determination methods were well verified. The similarity of UPLC fingerprints of the 16 batches of Sophora Tonkinensis was between 0.926 and 0.989, and 10 common peaks were calibrated. The content of trifolirhizin, maackiain, and sophoranone was 0.056% ～ 0.226%, 0.04% ～ 0.151%, and 0.163% ～ 0.585%. **Conclusion** This study provides a new method for the overall quality evaluation of Sophora Tonkinensis, which can be used for the quality control of Sophora Tonkinensis.

Key words: Sophora Tonkinensis; fingerprint; content determination; trifolirhizin; sophoranone; maackiain

基金项目：广西创新驱动发展专项（桂科 AA18242040）。
作者简介：南俊伶，女，硕士研究生，主要从事中药药效物质基础及新药开发研究，email：1065913709@qq.com *通信作者：闫广利，男，硕士研究生导师，主要从事中药药效物质基础及新药开发研究，email：gancaosuan@163.com；王喜军，男，博士研究生导师，主要从事中药血清药物化学及中医方证代谢组学研究，email：xijunw@sina.com

山豆根为豆科植物越南槐 *Sophora tonkinensis* Gagnep. 的干燥根和根茎，又名广豆根，主要分布于广西、贵州等地[1]，具有清热解毒、消肿利咽的功效[2]。现代药理学研究表明，山豆根具有抗肿瘤[3]、抗病毒[4]、镇痛、抗炎[5]、抗肝损伤[6]、抗氧化[7]以及增强免疫[8]等药理作用。山豆根中主要含有生物碱类、黄酮类、三萜类成分[9],《中国药典》规定山豆根中含苦参碱和氧化苦参碱的总量不得少于 0.70%[2]，除药典规定外，也有研究对山豆根中的金雀花碱、槐果碱、槐醇、芒柄花素、越南槐醇以及高丽槐素等成分的含量进行检测[10-12]，然而仍没有对山豆根各类成分进行整体分析的质量控制方法。本课题利用超高效液相色谱 - 紫外光谱法对山豆根药材进行指纹图谱分析，并同时测定三叶豆紫檀苷、高丽槐素、山豆根素等 3 个非生物碱活性成分的含量，为山豆根药材的整体质量控制提供有效方法。

1　材料

超高效液相色谱仪（ACQUITY UPLC，美国 Waters 公司）；光电二极管阵列检测器（ACQUITY PDA，美国 Waters 公司）；电子分析天平（AE-240，瑞士梅特勒公司）；数控超声波清洗器（KQ-300DA 型，中国昆山市超声仪器有限公司）；国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 年版。

乙腈（色谱纯，美国 Fisher 公司）；磷酸（色谱纯，中国科密欧化学试剂公司公司）；甲醇（分析纯，天津市富宇精细化工有限公司）；水为超纯水。

高丽槐素（批号：RFS-M03002005008）、氧化苦参碱（批号：Y-013-181216）、三叶豆紫檀苷（批号：RFS-S06111812027）(对照品，纯度均＞ 98%，成都瑞芬思生物科技有限公司）；山豆根素对照品（批号：21S059-A2，纯度＞ 95.8%，上海甄准生物科技有限公司）。16 批山豆根药材产地如表 1 所示，经鉴定为豆科植物越南槐 *Sophora tonkinensis* Gagnep. 的干燥根和根茎。

表 1　山豆根药材产地

Tab 1　Origin of 15 batches of Sophora Tonkinensis

编号	产地	编号	产地
S1	广西	S9	广西
S2	广西	S10	广西
S3	广西	S11	广西
S4	广西	S12	广东
S5	广西	S13	贵州
S6	广西	S14	贵州
S7	广西	S15	贵州
S8	广东	S16	广西

2　指纹图谱分析方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱：Waters Acquity UPLC HSS T3 柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）；流动相：乙腈为流动相 A，0.1% 磷酸溶液为流动相 B，梯度洗脱程序如表 2；检测波长 203 nm；流速 0.3 mL • min^{-1}；柱温 25 ℃，进样量 1 μL。

表 2　梯度洗脱程序

Tab 2　Elution gradient

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0 ～ 3	1 → 15	99 → 85
3 ～ 8	15 → 40	85 → 60
8 ～ 9	40 → 45	60 → 55
9 ～ 14	45 → 100	55 → 0
14 ～ 16	100	0

2.2　溶液的制备

2.2.1　对照品溶液的制备　分别取三叶豆紫檀苷、高丽槐素、山豆根素、氧化苦参碱的对照品适量，精密称定，配制成质量浓度分别为 0.9810、0.9810、0.9580、0.9820 mg • mL^{-1} 的对照品溶液，摇匀，即得。

2.2.2　供试品溶液的制备　取山豆根药材细粉约 0.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 80% 乙醇 50 mL，称定重量，超声处理 30 min，再称定重量，用 80% 乙醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.3　方法学考察

2.3.1　精密度试验　取山豆根药材细粉 0.5 g，精密称定，制备供试品溶液，连续进样 6 针，采集色谱图。以 7 号峰高丽槐素为参照峰，计算 10 个色谱峰的相对峰面积 *RSD* 在 0.720% ～ 3.4%，相对保留时间 *RSD* 在 0.010% ～ 0.11%，表明仪器的精密度较好。

2.3.2　稳定性试验　取山豆根药材细粉，制备供试品溶液，分别于制备后 0、2、4、6、8、12、18、24 h 注入液相色谱仪进行分析，以 7 号峰高丽槐素为参照峰，计算 10 个色谱峰的相对峰面积 *RSD* 为 0.80% ～ 4.2%，相对保留时间 *RSD* 为 0.010% ～ 0.42%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.3　重复性试验　取同一批山豆根药材细粉，称取 0.5 g，精密称定，共 6 份，平行制备供试品溶液，进样测定。以 7 号峰高丽槐素为参照峰，计算 10 个色谱峰的相对峰面积 *RSD* 为 0.89% ～ 4.0%，相对保留时间 *RSD* 为 0.010% ～ 0.19%。表明供试品溶液制备方法的重复性较好。

2.4 山豆根指纹图谱的建立

2.4.1 指纹图谱采集与相似度评价 取 16 批山豆根药材样品，按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按照“2.1”项下条件建立指纹图谱并进行比较，共确定 10 个共有峰。山豆根指纹图谱中峰 7 被鉴定为高丽槐素，是山豆根的主要活性成分，在该指纹图谱中峰面积适中，峰位居中，分离度良好，保留时间和峰面积稳定，因此选择峰 7 作为参照峰。对 10 个共有峰进行统一积分后，将所得图谱以 cdf 格式导入国家药典委员会研制的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”软件进行处理，生成对照指纹图谱。运用多点校正方法对 16 批样品的共有峰进行匹配，得到指纹图谱的叠加图，计算 16 批山豆根的指纹图谱与对照指纹图谱的相似性，结果见图 1 和表 3。各批次相似度结果在 0.926 ～ 0.989，表明以该指纹图谱能够有效表征山豆根药材的整体化学特征，暂定样品指纹图谱与对照指纹图谱比较，相似度不小于 0.9，用于山豆根药材的整体质量控制。

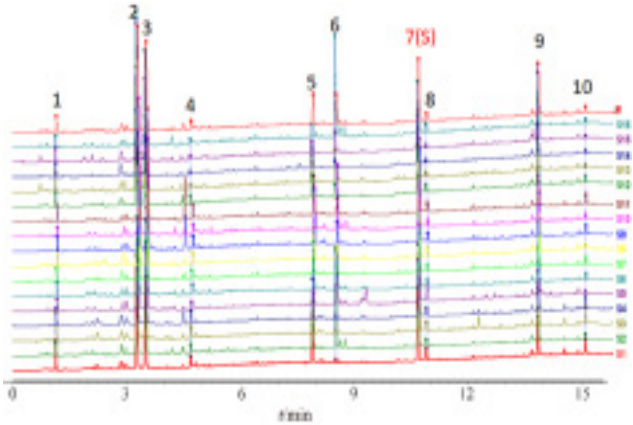


图 1 16 批山豆根药材的 UPLC 指纹图谱和对照指纹图谱（R）

Fig 1 UPLC fingerprint and control fingerprint（R）of 16 batches of Sophora Tonkinensis

表 3 16 批山豆根药材 UPLC 指纹图谱相似度评价结果

Tab 3 UPLC fingerprint similarity evaluation of 16 batches of Sophora Tonkinensis

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.964	S9	0.943
S2	0.940	S10	0.962
S3	0.963	S11	0.954
S4	0.969	S12	0.971
S5	0.965	S13	0.987
S6	0.983	S14	0.980
S7	0.989	S15	0.955
S8	0.981	S16	0.926

2.4.2 共有峰相对保留时间和相对峰面积 计算 16 批山豆根指纹图谱中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 值。结果共有峰的相对保留时间的 *RSD* 值在 0.01% ～ 1.4%，相对峰面积的 *RSD* 值较大，说明各批次间成分含量存在较大差异。

2.4.3 指纹图谱共有峰指认 取氧化苦参碱、三叶豆紫檀苷、山豆根素、高丽槐素对照品溶液以及山豆根药材供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样分析，采集色谱图如图 2 所示。通过比较保留时间和紫外光谱图，鉴定峰 2 为氧化苦参碱，峰 5 为三叶豆紫檀苷，峰 7 为高丽槐素，峰 9 为山豆根素。

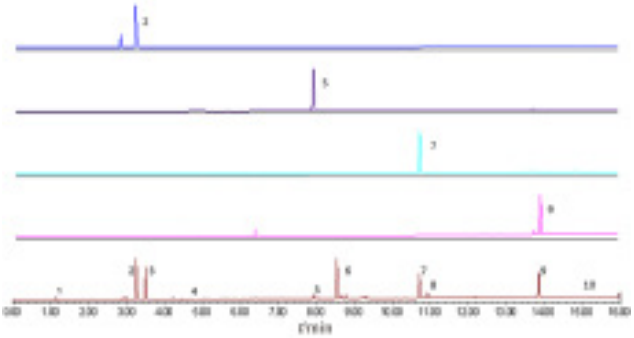


图 2 山豆根 UPLC-UV 指纹图谱

Fig 2 UPLC-UV characteristic spectrum of Sophora Tonkinensis

2. 氧化苦参碱（oxymatrine）；5. 三叶豆紫檀苷（trifolirhizin）；7. 高丽槐素（maackiain）；9. 山豆根素（sophoranone）

3 含量测定分析方法与结果

3.1 对照品溶液的制备

分别取三叶豆紫檀苷、高丽槐素、山豆根素对照品适量，精密称定，配制成三叶豆紫檀苷、高丽槐素、山豆根素的质量浓度分别为 9.810、14.71、47.90 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液，摇匀，备用。

3.2 方法学考察

3.2.1 系统适用性考察 取对照品溶液及供试品溶液进样检测，记录色谱图（见图 3）。各化合物峰均能达到良好的分离，分离度均＞ 1.5，理论塔板数均不低于 100 000。

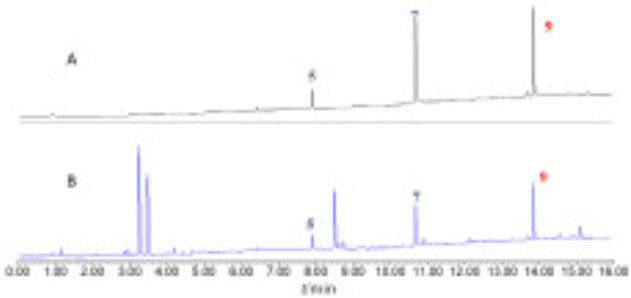


图 3 山豆根 UPLC-UV 色谱图

Fig 3 UPLC-UV chromatogram of Sophora Tonkinensis

A. 混合对照品溶液（mixed reference solution）；B. 供试品溶液（test solution）；5. 三叶豆紫檀苷（trifolirhizin）；7. 高丽槐素（maackiain）；9. 山豆根素（sophoranone）

3.2.2 线性关系考察　取对照品储备液适量，配制成含三叶豆紫檀苷 49.05 μg • mL^{-1}、高丽槐素 73.57 μg • mL^{-1}、山豆根素 239.5 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液，用甲醇稀释，得到系列浓度的混合对照品溶液，按“2.1”项下条件测定色谱图，记录峰面积。以质量浓度为横坐标（x），峰面积为纵坐标（y）进行线性回归分析，得回归方程、相关系数及线性范围，见表 4。

表 4　线性关系考察结果

Tab 4　Linear relationship

化合物	回归方程	R^2	线性范围 /（μg • mL^{-1}）
三叶豆紫檀苷	$y = 1580x + 441.7$	0.9999	0.9800 ～ 49.05
高丽槐素	$y = 4192x + 1068$	0.9999	1.470 ～ 73.57
山豆根素	$y = 1066x + 5770$	0.9999	4.790 ～ 239.5

3.2.3 精密度试验　取“3.1”项下对照品溶液，连续进样 6 次，计算三叶豆紫檀苷、高丽槐素、山豆根素峰面积的 *RSD* 值分别为 0.84%、0.52%、0.39%，表明仪器精密度良好。

3.2.4 重复性试验　取同一批山豆根药材样品，称取 0.5 g，精密称定，共 6 份，按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液，进样测定。随行测定对照品溶液计算含量，测得三叶豆紫檀苷、高丽槐素、山豆根素含量的 *RSD* 值分别为 2.5%、1.4%、1.9%，表明该方法重复性良好。

3.2.5 稳定性试验　取同一批供试品溶液，分别于制备后 0、2、4、6、8、12、18、24 h 进样测定，计算三叶豆紫檀苷、高丽槐素、山豆根素峰面积的 *RSD* 值分别为 4.1%、1.5%、1.3%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

3.2.6 加样回收试验　称取山豆根样品共 6 份，每份约 0.25 g，精密称定，分别按已知成分含量的 100% 加入三叶豆紫檀苷、高丽槐素、山豆根素的对照品，按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液，进样测定，计算三叶豆紫檀苷、高丽槐素、山豆根素的平均回收率分别为 95.31%、96.14%、98.94%，*RSD* 值分别为 4.4%、1.4%、1.8%，表明该方法准确度良好。

3.3 山豆根药材含量测定

取 16 批山豆根药材样品，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，计算各成分含量，结果见表 5。

表 5　16 批山豆根药材的含量 (%)

Tab 5　Content of 16 batches of Sophora Tonkinensis (%)

批号	三叶豆紫檀苷	高丽槐素 /	山豆根素
S1	0.194	0.151	0.197
S2	0.107	0.088	0.163
S3	0.140	0.128	0.186
S4	0.174	0.104	0.194
S5	0.049	0.112	0.585
S6	0.162	0.078	0.172
S7	0.135	0.081	0.219
S8	0.134	0.078	0.259
S9	0.226	0.134	0.211
S10	0.180	0.058	0.192
S11	0.164	0.106	0.287
S12	0.101	0.077	0.301
S13	0.118	0.099	0.355
S14	0.101	0.040	0.167
S15	0.056	0.060	0.353
S16	0.059	0.083	0.328

4 讨论

4.1 提取条件的优化

本研究在供试品溶液的制备方面提取溶剂考察了水、甲醇（25%、50%、80%、100%）以及乙醇（25%、50%、80%、100%），提取方式考察了超声提取（30、60、90 min），回流提取（30、60、90 min）。研究发现利用加热回流方法提取山豆根药材时，峰 6 随着加热时间延长，其峰面积逐渐减小，而峰 5 随着加热时间延长，峰面积逐渐增加，两者总峰面积基本不变，表明峰 6 加热提取过程不稳定，因此，为真实表征山豆根药材化学成分，采用超声提取的方法。比较发现，使用 80% 乙醇超声提取 30 min 能够获得更全面的色谱峰和更高的峰强度，因此，选择 80% 乙醇超声提取 30 min。

4.2 色谱条件的优化

采用 PDA 检测器在 200 ～ 400 nm 波长内进行扫描，提取不同波长下的色谱图，发现在 203 nm 波长下色谱峰较多，峰强度均匀适中，且待测物均具有最大吸收。对色谱柱 Acquity UPLC BEH C_{18} 柱和 Waters Acquity UPLC HSS T3 柱，流动相甲醇 - 水、乙腈 - 水、乙腈 - 磷酸水（0.05%、0.1%、0.2%），柱温 23、25、27 ℃，流速 0.24、0.3、0.36 mL • min^{-1} 进行考察，最终选择本文的色谱条件。

4.3 用于山豆根药材整体质量控制的分析

山豆根含有生物碱、黄酮、三萜、有机酸等多种活性次生代谢产物，然而目前《中国药典》仅对其所含有的苦参碱和氧化苦参碱进行控制，存在专属性差和药效关联性差的不足。苦参碱和氧化苦参碱具有抗炎镇痛 [13]、抑菌 [14]、抗肿瘤 [15-16] 等广泛的药理作用，因此传统认为苦参碱和氧化苦参碱为山豆根的主要有效成分，并规定

其在山豆根中含量总和不低于 0.70%。近年来，山豆根非生物碱类成分受到关注，研究发现山豆根氯仿部位具有显著的抗鼻咽癌作用，成分分析表明该部位主要含有三叶豆紫檀苷、高丽槐素、染料木素等非生物碱类成分[17]。因此，有必要对山豆根生物碱、黄酮等成分进行全面分析，建立整体化学成分表征方法，有效控制山豆根药材质量。本研究利用超高效液相色谱法，通过优化提取方法和色谱条件，建立了涵盖氧化苦参碱、高丽槐素、三叶豆紫檀苷、山豆根素等 10 个共有成分峰的指纹图谱测定方法，测定了来自广西、广东、贵州三大产地的 16 批山豆根药材，表明各产地山豆根相似度较高，有效表征了山豆根药材的整体物质基础，可以整体化学组成上控制山豆根药材的质量。

《中国药典》规定了山豆根药材中苦参碱和氧化苦参碱的含量，为进一步控制黄酮类成分的含量，本研究在指纹图谱测定基础上，选择含量较高的高丽槐素、三叶豆紫檀苷、山豆根素作为质控成分建立含量测定方法。苏雯清等[18]研究发现高丽槐素可显著抑制鼻咽癌细胞 CNE-1 的增殖、克隆与迁移，并且可促进细胞凋亡。Zhang 等[19]研究发现三叶豆紫檀苷可以通过抑制 m-TOR/PI3K/AKT 信号通路，诱导胃癌细胞自噬和线粒体介导的凋亡。Kajimoto 等[20]发现山豆根素可以诱导人白血病 U937 细胞凋亡。高丽槐素、三叶豆紫檀苷、山豆根素都有明确的抗肿瘤活性，可能是山豆根抗肿瘤作用的主要有效成分。因此，本研究同时测定指纹图谱和高丽槐素、三叶豆紫檀苷、山豆根素的含量，与《中国药典》含量测定项相结合，为山豆根药材的整体质量提供了有效的评价方法。黄乐等[11]对 7 个产地的山豆根成分含量进行测定，发现高丽槐素含量在 0.05% ～ 0.11%，何常明等[21]对 17 个批次的山豆根中的黄酮类成分进行含量测定，发现三叶豆紫檀苷的含量在 0.05% ～ 0.20%，含量波动范围与本研究结果基本一致，本研究首次测定了山豆根药材中山豆根素的含量，以往文献未见报道。16 批山豆根中 3 种成分的含量有较大差异，可能与不同产地以及采收日期等因素有关。

本试验利用 UPLC-UV 法建立了山豆根药材的指纹图谱，并测定了高丽槐素、山豆根素以及三叶豆紫檀苷的含量，为山豆根整体质量评价提供了新方法，为山豆根的质量控制提供了参考。

参考文献

[1] 邹俐，赵焕君，李娜，等 . 山豆根的本草考证及毒性分析 [J]. 现代中医药，2021，41（5）：19-23.

[2] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：28-29.

[3] 彭百承，黄健，李萍，等 . 山豆根颗粒及其饮片抗肿瘤作用及其机制 [J]. 中国试验方剂学杂志，2014，20（23）：190-193.

[4] Pan QM，Li YH，Hua J，et al. Antiviral matrine type alkaloids from the rhizomes of Sophora tonkinensis [J]. J Nat Prod，2015，78（7）：1683-1688.

[5] 航艾，孙杰，盛云华，等 . 基于药代动力学的山豆根抗炎作用机制研究 [J]. 中国药理学通报，2020，36（5）：645-649.

[6] Cai LL，Zou SS，Liang DP，et al. Structural characterization，antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from Sophorae tonkinensis Radix [J]. Carbohydr Polym，2018，184：354-365.

[7] 许海棠，卢建芳，赵彦芝，等 . 山豆根提取物抗氧化和抑菌活性的研究 [J]. 食品工业科技，2015，36（14）：111-114.

[8] 周明眉，杨红舟，赵爱华，等 . 山豆根非生物碱部分对小鼠免疫功能的影响 [J]. 时珍国医国药，2011，22（12）：2954-2955.

[9] 何晓艳，周应军，田洪 . 山豆根化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中南药学，2011，9（7）：525-528.

[10] 韩馥蔓，王莉鑫，陈影，等 . HPLC 同时测定山豆根中 7 种生物碱及 3 种黄酮的含量 [J]. 中国中药杂志，2016，41（24）：4628-4634.

[11] 黄乐，姚彩云，梁莹，等 . 一测多评法测定山豆根中 3 个非生物碱成分含量 [J]. 中国现代中药，2020，22（12）：2015-2020.

[12] 何超然，李哲，李任，等 . HPLC 法同时测定山豆根中 4 种生物碱及其含量 [J]. 中国药物应用与监测，2018，84（2）：77-81.

[13] 钱利武，戴五好，周国勤，等 . 苦参及山豆根主要生物碱镇痛抗炎作用研究 [J]. 中成药，2012，34（8）：1593-1596.

[14] 孙磊，郭江玉，闫彦，等 . 苦参化学成分及其生物碱抑菌活性研究 [J]. 辽宁中医药大学学报，2017，19（11）：49-53.

[15] 戴美琴，蔡茁，陈娜娜，等 . 苦参碱通过调控 β-catenin 信号通路抑制肝癌细胞干性 [J]. 南方医科大学学报，2019，39（10）：1239-1245.

[16] 王亚萍，陈锴，刘晓斌，等 . 氧化苦参碱联合维生素 C 抑制人胃癌 SGC-7901 细胞增殖 [J]. 细胞与分子免疫学杂志，2016，32（6）：805-807.

[17] Wang S，Song ZJ，Gong XM，et al. Chloroform extract from *Sophora Tonkinensis Gagnep*. inhibit proliferation，migration，invasion and promote apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells by silencing the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol，2021，271：113879.

[18] 苏雯清，杨晓男，何文栋，等.高丽槐素对鼻咽癌CNE1细胞增殖、迁移、凋亡的影响及机制[J].广西医科大学学报，2021，38（2）：258-264.
[19] Zhang K，Liu W，Qu Z，et al. In vitro and in vivo human gastric cancer inhibition by Trifolirhizin is facilitated via autophagy，mitochondrial mediated programmed cell death，G_2/M phase cell cycle arrest and inhibition of m-TOR/PI3K/AKT signalling pathway [J]. J Buon，2019，24（3）：1100-1105.
[20] Kajimoto S，Takanashi N，Kajimoto T，et al.Sophoranone，extracted from a traditional Chinese medicine Shan Dou Gen，induces apoptosis in human leukemia U937 cells via formation of reactive oxygen species and opening of mitochondrial permeability transition pores [J]. Int J Cancer，2002，99（6）：879-890.
[21] He CM，Cheng ZH，Chen DF. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids in Sophora tonkinensis by LC/MS and HPLC [J]. Chin J Nat Med，2013，11（6）：690-698.

（收稿日期：2021-12-13；修回日期：2022-02-18）

UPLC-PDA 测定胆木中异长春花苷内酰胺含量

侯倩煜[1]，李飞宇[1]，陈燕艳[1]，杨美华[2]，赵祥升[1*]（1. 中国医学科学院药用植物研究所海南分所，海南省南药资源保护与开发重点实验室，海口　570311；2. 中国医学科学院&北京协和医学院药用植物研究所，北京　100193）

摘要：目的　建立超高效液相色谱法测定胆木不同部位（根、枝、皮、叶）中异长春花苷内酰胺含量。**方法**　样品采用 75% 甲醇超声提取；选用 Waters BEH C_{18} 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）；流动相为乙腈（A）- 纯水（B），梯度洗脱；流速 0.4 mL • min^{-1}；柱温 40 ℃；进样量 3 μL；检测波长 227 nm。**结果**　异长春花苷内酰胺在 0.11 ～ 85.60 μg • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好（R^2 = 0.9991），平均加样回收率为 99.77%，*RSD* 为 0.13%。异长春花苷内酰胺在根中含量最高（11.42 ～ 13.38 mg • g^{-1}），其次为叶（2.03 ～ 5.00 mg • g^{-1}），在枝中含量相对较低（1.57 ～ 3.79 mg • g^{-1}）。**结论**　该方法快捷、灵敏、准确、可靠，可用于胆木中异长春花苷内酰胺含量的测定，为胆木的质量控制提供参考。

关键词：胆木；异长春花苷内酰胺；超高效液相色谱；含量测定
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0915-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.030

Content determination of isovincoside lactone in *Nauclea officinalis* Pierrc ex Pitard by UPLC-PDA

HOU Qian-yu[1], LI Fei-yu[1], CHEN Yan-yan[1], YANG Mei-hua[2], ZHAO Xiang-sheng[1*] (1. *Hainan Branch Institute of Medicinal Plant Development*, *Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College*, *Hainan Key Laboratory of Resources Conservation and Development of Southern Medicine*, *Haikou* 570311; 2. *Institute of Medicinal Plant Development*, *Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College*, *Beijing* 100193)

Abstract: Objective To determine the content of isovincoside lactone in the root, branch, bark and leaf of *Nauclea officinalis* Pierrc ex Pitard by UPLC-PDA. **Methods** The samples were extracted by ultrasound with 75% methanol. The analysis was performed on a Waters BEH C_{18} chromatographic column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) with gradient elution of acetonitrile-water at the flow rate of 0.4 mL • min^{-1}. The column temperature was 40 ℃ , the injection volume was 3 μL, and the detection wavelength was 227 nm. **Results** There was a good linear relationship between the peak areas and

基金项目：中国医学科学院医学与健康科技创新工程（No.2017-I2M-1-013；No. 2021-I2M-1-032）。
作者简介：侯倩煜，女，主要从事中药质量分析方面的研究，email：2397565293@qq.com　*通信作者：赵祥升，男，博士，副研究员，硕士研究生导师，主要从事中药质量分析和安全性评价方面的研究，email：xiangsheng437@163.com

the concentration of isovincoside lactone at 0.11 ～ 85.60 μg • mL $^{-1}$ (R^2 = 0.9991). The average recovery was 99.77% with the *RSD* of 0.13%. The content of isovincoside lactone in the root was the highest (11.42 ～ 13.38 mg • g $^{-1}$), followed by that of the leaf (2.03 ～ 5.00 mg • g $^{-1}$), and the branch (1.57 ～ 3.79 mg • g $^{-1}$) was the lowest. **Conclusion** This method is rapid, sensitive, accurate and reliable, and can be used to determine the content of isovinoside lactone in *Nauclea officinalis* Pierrc ex Pitard, and provide a reference for its quality control.

Key words: *Nauclea officinalis* Pierrc ex Pitard; isovincoside lactone; UPLC; content determination

胆木为茜草科乌檀属乔木乌檀（*Nauclea officinalis* Pierrc ex Pitard）的干燥茎、枝、树皮和根，又称乌檀、药乌檀、黄羊木、熊胆树、山熊胆等，是一味常用的黎药，收载于《黎族医药》[1-2]。胆木生于高山近顶或半山腰荫蔽潮湿地带的杂木林中，分布狭窄且种群数量少，为中海拔森林中少见的乔木树种，主要分布于广东、广西和海南等地，为我国重点保护的珍稀野生植物物种，也是海南省珍贵的南药树种[3-4]。胆木味苦、性寒，全株可入药，具有消炎杀菌、清热解毒、消肿止痛之功效，我国南方民间常用于治疗感冒发热、肺炎、肠炎、胆囊炎、痢疾、湿疹、皮疹、泌尿系统感染、脓疡等病症，外用于痈疖脓肿[2-3]。国内临床目前有胆木注射液、胆木浸膏糖浆和胆木浸膏胶囊等中药制剂，主要用于急性扁桃腺炎、急性咽喉炎、急性结膜炎及上呼吸道感染等，疗效良好[4]。

胆木中主要有效成分为吲哚类生物碱，其主要为异长春花苷内酰胺。异长春花苷内酰胺（isovincoside lactone，又名 strictosamide）具有抗肿瘤、杀疟原虫等活性，是胆木中药制剂中的主要有效成分，含量较高，是评价胆木注射液、胆木浸膏糖浆和胆木浸膏胶囊质量的指标成分[5-7]。目前，文献多采用高效液相色谱法测定胆木中药制剂中异长春花苷内酰胺含量，但对胆木生药中该成分的含量测定相对较少，且文献中报道主要用药部位为茎、枝[8]，根、皮和叶的研究较少。为充分利用胆木资源，需探索胆木其他部位异长春花苷内酰胺含量，挖掘胆木新的药用部位。本文采用超高效液相色谱法（UPLC）对胆木的根、枝、皮、叶中异长春花苷内酰胺含量进行测定，并比较各部位含量高低，探讨采集地区、部位、月份、树龄对胆木中异长春花苷内酰胺含量的影响，以期为胆木药材的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Waters H-class 型超高效液相色谱仪（美国 Waters 公司，带 PDA 检测器）；XS105DU 型十万分之一电子天平、LE203E 型千分之一电子天平（上海托利多有限公司）；KQ-500DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；GL-21B 型低温高速离心机（上海安亭科学仪器厂）；BJ-800A 型多功能粉碎机（上海拜杰实业有限公司）；Mili-Q 型纯水仪（美国 Millipore 公司）。

1.2 试药

胆木采自海南省五指山、琼中等地，经中国医学科学院药用植物研究所海南分所南药研究中心鉴定为茜草科乌檀属乔木乌檀 *Nauclea officinalis* Pierrc ex Pitard 的枝、树皮、根和叶。异长春花苷内酰胺对照品（中国食品药品检定研究院，纯度＞98%，批号：111778-202003）。色谱纯的甲醇、乙腈、甲酸、乙酸（Fisher 公司）。

2 方法与结果

2.1 对照品储备液的制备

精密称取异长春花苷内酰胺对照品适量，置于 5.0 mL 的棕色量瓶中，75% 甲醇溶解并定容至刻度，配成质量浓度为 1070 μg • mL $^{-1}$ 的对照品储备液，4 ℃保存，备用。不同质量浓度的对照品溶液由储备液稀释得到。

2.2 供试品溶液的制备

称取胆木药材粉末（过二号筛）0.10 g，加入 75% 甲醇 40 mL，称重，超声提取 45 min（功率 500 W，频率 40 kHz），冷却至室温，用 75% 甲醇补足减失的重量，离心 10 min（3000 r • min $^{-1}$），取上清液，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得供试品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱：Waters BEH C_{18}（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）；流动相：乙腈（A）- 纯水（B），梯度洗脱（0 ～ 7 min，20% ～ 40%A）；流速为 0.4 mL • min $^{-1}$；柱温为 40 ℃；进样量为 3 μL；检测波长为 227 nm。在该条件下，对照品及胆木样品的色谱图见图 1。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系、检测限与定量限　异长春花苷内酰胺对照品储备液用 75% 甲醇稀释为不同质量浓度的对照品溶液，0.22 μm 微孔滤膜过滤，按

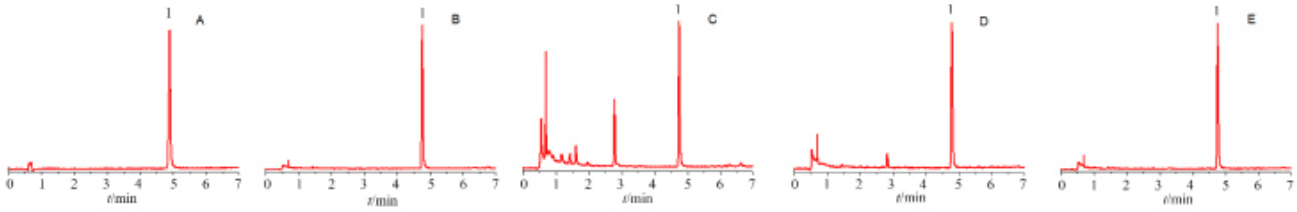


图 1　对照品（A）和胆木根（B）、叶（C）、枝（D）、皮（E）样品的 UPLC 色谱图

Fig 1　UPLC chromatogram of the reference substance（A）and root（B），leaf（C），branch（D）and bark（E）of *Nauclea officinalis* Pierrc ex Pitard

1. 异长春花苷内酰胺（isovincoside lactone）

“2.3”项下色谱条件测定，记录峰面积。以进样质量浓度（X，μg • mL^{-1}）为横坐标，峰面积（Y）为纵坐标进行线性回归，得标准曲线 $Y = 5.298\times10^4X + 3.947\times10^4$（$R^2 = 0.9991$），线性范围为 0.11 ～ 85.60 μg • mL^{-1}。取异长春花苷内酰胺对照品储备液，用 75% 甲醇逐级稀释，测定异长春花苷内酰胺检测限（$S/N = 3$）和定量限（$S/N = 10$）分别为 53.5 ng • mL^{-1} 和 107.0 ng • mL^{-1}。

2.4.2　精密度、稳定性、重复性　取异长春花苷内酰胺质量浓度为 5.35 μg • mL^{-1} 的对照品溶液，连续进样 6 次，计算得异长春花苷内酰胺色谱峰峰面积的 *RSD* 为 0.98%，表明仪器精密度良好。取同一批胆木（S13）粉末 6 份，按“2.2”项下方法制备供试品溶液并进样测定，记录峰面积。计算得异长春花苷内酰胺的平均含量为 3.132 mg • g^{-1}，*RSD* 为 1.2%，表明该方法重复性良好。取同一供试品溶液，分别于 0、2、4、8、12、18、24 h 进样测定，计算异长春花苷内酰胺色谱峰峰面积的 *RSD* 为 0.32%，表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.4.3　加样回收试验　称取 6 份已知含量的同一批胆木样品（S13）粉末 0.05 g，精密加入适当浓度的对照品溶液（相当于供试药材原有含量质量分数的 100%）。按照“2.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，计算加样回收率，结果异长春花苷内酰胺的平均加样回收率（$n = 6$）为 99.77%，*RSD* 为 0.13%，表明方法准确可靠。

2.5　样品含量测定

分别取不同编号的胆木药材粉末，依据“2.2”项下方法制备供试品溶液，注入 UPLC 进行测定，结果见表 1。胆木不同部位的异长春花苷内酰胺含量存在差异，根中含量最高（11.42 ～ 13.38 mg • g^{-1}），其次为叶（2.03 ～ 5.00 mg • g^{-1}），枝中（1.57 ～ 3.79 mg • g^{-1}）含量相对较低。该结果在文献报道的胆木异长春花苷内酰胺含量范围内（1.68 ～ 19.77 mg • g^{-1}）[8-10]。

此外，不同地区和不同树龄胆木的枝中异长春花苷内酰胺含量存在差异，海南琼中胆木枝中异长春花苷内酰胺含量大于海南五指山（S6 ～ S9），5 年生的胆木枝中异长春花苷内酰胺含量大于 3 年、7 年和 12 年生胆木枝（S8 ～ S12）。采集时间对胆木根和枝样品中的异长春花苷内酰胺含量也存在影响，在 5 月份采集的胆木根和枝中异长春花苷内酰胺含量大于 1、3 月份（S13 ～ S18）。由此猜测胆木中异长春花苷内酰胺含量会随地区、植株年龄、采集月份不同等因素发生波动。

表 1　胆木样品中异长春花苷内酰胺的含量

Tab 1　Content of isovincoside lactone in *Nauclea officinalis* Pierrc ex Pitard

编号	采集地区	树龄 / 年	部位	采集月份	含量 /mg • g^{-1}
S1	海南琼中	3	叶	5 月	5.00
S2	海南琼中	10	叶	5 月	4.27
S3	海南琼中	14	叶	5 月	4.23
S4	海南琼中	6	叶	1 月	2.03
S5	海南琼中	15	叶	1 月	2.98
S6	海南五指山	5	枝	5 月	2.87
S7	海南五指山	3	枝	5 月	1.87
S8	海南琼中	3	枝	5 月	3.12
S9	海南琼中	5	枝	5 月	3.79
S10	海南琼中	7	枝	5 月	1.59
S11	海南琼中	7	枝	5 月	2.17
S12	海南琼中	12	枝	5 月	1.57
S13	海南琼中	7	枝	1 月	3.13
S14	海南琼中	7	枝	3 月	3.40
S15	海南琼中	7	枝	5 月	3.72
S16	海南琼中	7	根	1 月	11.42
S17	海南琼中	7	根	3 月	12.89
S18	海南琼中	7	根	5 月	13.38
S19	海南琼中	7	皮	1 月	6.73

3　讨论

试验考察了不同流动相（乙腈 - 水、乙腈 - 甲酸水溶液、乙腈 - 乙酸水溶液）、流速（0.2、0.3、0.4、0.5 mL • min^{-1}）和柱温（30、40、50、60 ℃）等对目标峰分离度的影响。结果表明，乙腈 - 水为流动相时分离效果好、保留时间短且基线稳定。流速为 0.4 mL • min^{-1} 可缩短

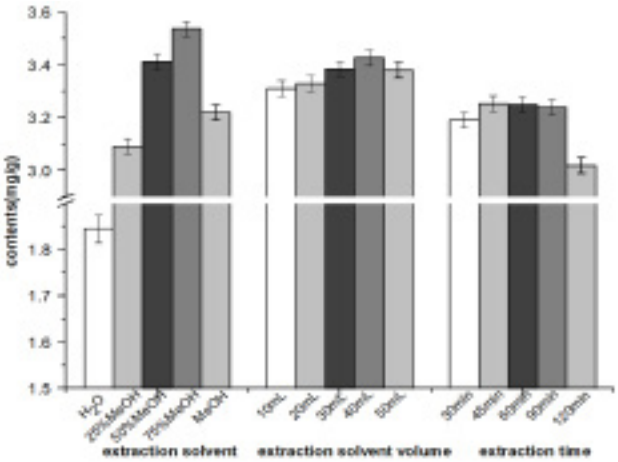


图 2 提取溶剂、溶剂体积和提取时间对异长春苷内酰胺提取率的影响

Fig 2 Effect of extraction solvent，volume of solvent and extraction time on extraction efficiency of isovincoside lactone in the *Nauclea officinalis* Pierrc ex Pitard.

样品运行时间且柱压适中。温度波动对异长春花苷内酰胺的色谱峰峰面积无较大影响（*RSD* = 0.62%），本方法优选 40 ℃柱温，分离度和保留时间都较好。UPLC 分析结果表明，异长春花苷内酰胺能在 227 nm 下得到较好吸收，因此，选择 227 nm 作为检测波长，表观峰度高、峰形较好且基线稳定。

考察了超声提取和回流提取对提取异长春花苷内酰胺含量的影响。结果显示两种方法差异不大，但超声提取简便、快速、适合批量提取。试验中优化了影响目标物超声提取率的因素：提取溶剂（纯水、25% 甲醇、50% 甲醇、75% 甲醇、甲醇），料液比（1∶10、1∶20、1∶30、1∶40、1∶50）和超声时间（30、45、60、90、120 min）等，结果见图 2。由图可知，用 40 mL 75% 甲醇超声提取 45 min 时，异长春花苷内酰胺的提取效果最好。

由于胆木原材料逐渐匮乏，为了更加合理地利用资源，实现可持续发展，需探索胆木各部位的药用价值。异长春花苷内酰胺是胆木中药制剂中主要有效成分，研究结果发现胆木根、茎、皮、叶中皆含有异长春花苷内酰胺，且含量较大，其中胆木根中异长春花苷内酰胺含量较高，但采集树根对胆木树的伤害较大，故不建议根入药，现阶段运用最多的为胆木枝，胆木叶的运用较少。胆木叶中异长春花苷内酰胺含量高于胆木茎，且胆木叶的采收产量较多、对胆木树伤害较小。根据文献报道，胆木叶醇提物（20 g • kg^{-1}）与由胆木茎皮提取的胆木浸膏片（800 mg • kg^{-1}）具有相同的抗炎镇痛作用，胆木叶提取物有抗氧化活性且对耐甲氧西林葡萄球菌具有很好的抑菌效果 [11-13]，但胆木叶的毒理学还有待研究。

综上，本研究建立了 UPLC 测定胆木中异长春花苷内酰胺含量的方法，该方法准确度高，选择性好，具有较好的重复性和精密度，适用于胆木中异长春花苷内酰胺含量定量分析，可为相关检测工作提供参考。

参考文献

[1] 宣伟东，陈海生，袁志仙，等 . 中药胆木的化学成分 [J]. 中国天然药物，2005，3（3）：181-183.

[2] 李湘怡，周明艳，谢振蕊，等 . 胆木浸膏糖浆质量标准研究 [J]. 海南医学院学报，2021，27（9）：651-655，660.

[3] 王和飞，梁柳，刘进平 . 爱多收和赤霉素对胆木种子萌发的影响 [J]. 中国农学通报，2011，27（6）：12-16.

[4] 陶佳颐，戴胜军，刘军锋，等 . 胆木化学成分的研究 [J]. 中草药，2007，38（8）：1155-1156.

[5] 丁琳，吴德康，蒋俊毅 . HPLC 法测定胆木注射液中异长春花苷内酰胺的含量 [J]. 中医药学刊，2006，24（9）：1753-1754.

[6] 刘欢，于鑫淼，王月，等 . 胆木浸膏糖浆的 HPLC 指纹图谱研究和 9 种成分的含量测定 [J]. 中国药房，2019，30（14）：1940-1945.

[7] 黄有兴，刘春 . HPLC 法测定胆木浸膏胶囊中异长春花苷内酰胺的含量 [J]. 中国热带医学，2008，8（12）：2245-2246.

[8] 杨卫丽，刘明生，毛彩霓，等 . 胆木的生药学研究 [J]. 中药材，2008，31（9）：1324-1325.

[9] 张志远，林秋梅，赖潜，等 . 海南黎药胆木引种栽培技术研究 [J]. 山西中医学院学报，2010，11（5）：69-71.

[10] 陈家全，徐光富，王慧，等 . UPLC 法同时测定胆木中 6 种成分的含量 [J]. 中国药科大学学报，2014，45（4）：434-437.

[11] 唐菲，王豪，骆辉，等 . 胆木叶的抗炎镇痛作用研究 [J]. 中国医药导刊，2009，11（7）：1191-1192.

[12] 张伟敏，肖健雄，符致坚，等 . 胆木叶提取物的抗氧化活性研究 [J]. 林产化学与工业，2009，29（4）：82-86.

[13] 苏奎，龚敏，周静，等 . 胆木叶抗 MRS 活性研究 [J]. 安徽农业科学，2009，37（25）：12014-12016.

（收稿日期：2021-09-02；修回日期：2021-10-11）

化妆品中 10 种 α- 羟基酸的高效液相色谱检测及质谱确证

郑梅，贾昌平*（苏州市药品检验检测研究中心，江苏　苏州　215104）

摘要：目的　建立同时测定化妆品中 10 种 α- 羟基酸（葡糖醛酸、酒石酸、羟基乙酸、苹果酸、乳酸、柠檬酸、2- 羟基丁酸、扁桃酸、二苯乙醇酸、羟基辛酸）含量的高效液相色谱方法及液相色谱 - 串联质谱确证方法。**方法**　色谱柱为 SHISEIDO CAPCELL PAK C_{18} AQ（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相为甲醇 -0.1 mol • L^{-1} 的磷酸氢二铵溶液，梯度洗脱，外标法定量；对疑似阳性样品，进一步采用液相色谱 - 串联质谱法进行确证，离子源为电喷雾离子源（ESI），在负离子扫描方式下，以一级和二级全扫描模式进行检测。**结果**　10 种 α- 羟基酸在各自浓度范围内与峰面积线性关系良好，相关系数均大于 0.9995，检测限为 4 ～ 329 μg • g^{-1}，平均回收率在 94.2% ～ 111.9%，*RSD* 在 0.30% ～ 4.8%。采用该法对 30 批化妆品样品进行检验，其中 1 批检出羟基乙酸，2 批检出乳酸，含量在 0.4% ～ 1.3%。**结论**　本法简便、快速、准确，适用于化妆品中 10 种 α- 羟基酸测定。

关键词：α- 羟基酸；化妆品；高效液相色谱法；液相色谱 - 串联质谱法
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0919-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.031

Determination and verification of 10 α-hydroxy acids in cosmetics by high performance liquid chromatography and mass spectrometry

ZHENG Mei, JIA Chang-ping* (*Suzhou Institute for Drug Control*, *Suzhou Jiangsu* 215104)

Abstract: Objective To simultaneously determine 10 α-hydroxy acids (glucuronic acid, tartaric acid, glycolic acid, malic acid, lactic acid, citric acid, 2-hydroxybutyric acid, mandelic acid, benzilic acid and hydroxycaprylic acid) in cosmetics by high performance liquid chromatography and mass spectrometry. **Methods** A SHISEIDO CAPCELL PAK C_{18} AQ chromatographic column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with gradient elution of methanol-0.1 mol • L^{-1} diammonium hydrogen phosphate solution as the mobile phases. Quantification analysis was performed by the external standard method. Suspected positive samples were further confirmed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Electrospray ion source was detected in negative ion modes with full scan MS and full scan MS^2 mode. **Results** Good linearity was achieved for all the 10 α-hydroxy acids, and the correlation coefficients were all greater than 0.9995. The limits of detection were 4 ～ 329 μg • g^{-1}. The average recoveries were within 94.2% ～ 111.9%, with *RSD* of 0.30% ～ 4.8%. Totally 30 batches of cosmetics were detected, among which glycolic acid was detected in 1 batch, and lactic acid was detected in 2 batches, with the content at 0.4% ～ 1.3%. **Conclusion** This method is simple, rapid and accurate for the simultaneous determination of 10 α-hydroxy acids.

Key words: α-hydroxy acid; cosmetics; high performance liquid chromatography; liquid chromatography-tandem mass spectrometry

抗皱、延缓皮肤衰老是大多数亚洲女性一直关注的美容问题之一。α- 羟基酸，又称果酸，作为一种能促进皮肤再生的皮肤调理剂广泛用于护肤类化妆品中[1-3]。α- 羟基酸是在羧基（-COOH）面第一个（α）碳原子位置上有一个羟基（-OH）的有机酸[4]。近年来 α- 羟基酸换肤已成为一种美容护肤

作者简介：郑梅，女，药师，主要从事化妆品质量研究，email：jiangsuzhengmei@163.com　*通信作者：贾昌平，男，副主任药师，主要从事化妆品质量研究，email：jiakane@126.com

的新趋势，但诱发的皮肤过敏问题也屡见不鲜[5]。美国 FDA 在 2006 年发表了一份关于 α- 羟基酸的研究报告显示，长期使用 α- 羟基酸可能会减弱皮肤对紫外线的抵抗力，使皮肤老化，加速细胞的破坏或死亡，导致皮肤发红、起泡及灼伤，可能给皮肤造成永久性的伤害，其长期的安全性无法得到保障[6-7]。因此须严格控制 α- 羟基酸的含量。

我国 2015 年版《化妆品安全技术规范》规定化妆品配方中 α- 羟基酸总量不得大于 6%，但只检测了酒石酸、羟基乙酸、苹果酸、乳酸和柠檬酸 5 种成分[8]。2019 年国家药品监督管理局发布的第 12 号通告中提供了 10 种 α- 羟基酸的液相检测方法，但实际应用中发现，部分样品在待测物出峰位置存在杂质干扰，这对检测方法的专属性提出了更高的要求。目前，关于化妆品中 α- 羟基酸的检测方法主要有高效液相色谱法、高效液相色谱 - 串联质谱法、气相色谱法、离子色谱法等[9-12]，但仅检测了酒石酸、羟基乙酸、苹果酸、乳酸和柠檬酸，远不能满足对化妆品中实际使用的多种 α- 羟基酸检测的需要。考虑到化妆品基质种类较多，成分复杂，本文采用高效液相色谱法同时测定化妆品中 10 种 α- 羟基酸的含量，并对阳性样品进行液相色谱 - 串联质谱法确证，避免假阳性结果的产生，以期为化妆品中 10 种 α- 羟基酸的质量监管提供技术参考。

1 材料

1.1 试药

葡糖醛酸（批号：0610-RA-0001，纯度：99.2%，CATO）；酒石酸（批号：10113600，纯度：99.5%，CHEM SERVICE INC）；羟基乙酸（批号：11296KMV，纯度：99%，Sigma-aldrich）；苹果酸（批号：F20110509，纯度：99%，国药）；乳酸（批号：ZZS-20-107-A5，纯度：92.1%，ZZ-standard）；柠檬酸（批号：CFAD310543-1605，纯度：99.5%，CATO）；2- 羟基丁酸（批号：ZZS-20-146-A1，纯度：96%，ZZstandard）；扁桃酸（批号：3047-023A2，纯度：99.9%，TLC）；二苯乙醇酸（批号：Y0000432，纯度：99.0%，EDQM）；羟基辛酸（批号：1-GRR-28-1，纯度：96%，TRC）。样品共 30 批（水剂类、膏霜类、乳液类各 10 批），均来源于苏州市市场监督管理局抽查送样。甲醇为色谱纯，水为超纯水，其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；Agilent 6538 高效液相质谱仪（美国 Agilent 公司）；KQ-300DA 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液　分别精密称取葡糖醛酸、酒石酸、羟基乙酸、苹果酸、乳酸、柠檬酸、2- 羟基丁酸、扁桃酸、二苯乙醇酸、羟基辛酸对照品适量，置于同一 50 mL 的量瓶中，用水溶解并稀释成质量浓度分别为 4.0、2.0、4.0、4.0、5.0、4.0、5.0、0.1、0.1、4.0 mg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液　称取样品约 1 g（精确到 0.0001 g）置于 10 mL 具塞比色管中，置于 90 ℃水浴中 30 min 以去除挥发性有机溶剂，加水至 10 mL，涡旋混合 30 s，60 ℃超声提取 30 min，取适量样品在 10 000 r • min^{-1} 下高速离心 15 min，上清液用 0.45 μm 滤膜过滤，作为供试品溶液[8]。

2.1.3 阴性样品溶液　取空白膏霜剂作为阴性样品基质，按“2.1.2”项下方法制备阴性样品溶液，即得。

2.2 色谱与质谱条件

2.2.1 高效液相色谱条件　色谱柱：SHISEIDO CAPCELL PAK C_{18} AQ（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 A 为 0.1 mol • L^{-1} 的磷酸氢二铵溶液（磷酸调 pH 2.45），流动相 B 为甲醇；柱温 30 ℃；检测波长 214 nm；进样量 5 μL；梯度洗脱程序见表 1。

表 1　梯度洗脱程序

Tab 1　Gradient elution program

时间 /min	流速 /（mL • min^{-1}）	流动相 A/%	流动相 B/%
0	0.7	100	0
7	0.7	100	0
7.1	1.0	100	0
14	1.0	50	50
14.1	1.0	35	65
23	1.0	35	65
23.1	0.7	100	0
28	0.7	100	0

2.2.2 高效液相色谱 - 串联质谱确证条件　色谱柱：CORTECS UPLC T_3（2.1 mm×100 mm，1.6 μm）；流动相以 0.1% 甲酸水溶液为流动相 A，乙腈（0.1% 甲酸）溶液为流动相 B，梯度洗脱（0～5 min，100%A；5 ～ 8 min，100%→ 5%A；8 ～ 9 min，5%A；9 ～ 9.1 min，5%→ 100%A；9.1 ～ 10 min，100%A）；柱温 30 ℃；流速 0.3 mL • min^{-1}；进样量 5 μL。电离方式：电喷雾离子源（ESI）；扫描方式：负离子检测；检测方式：一、二级全扫描；毛细管电压：3.0 kV；脱溶剂温度：350 ℃；脱溶剂气流速：600 L • h^{-1}。10 种 α- 羟基酸的质谱参数见表 2，二级质谱图见图 1。

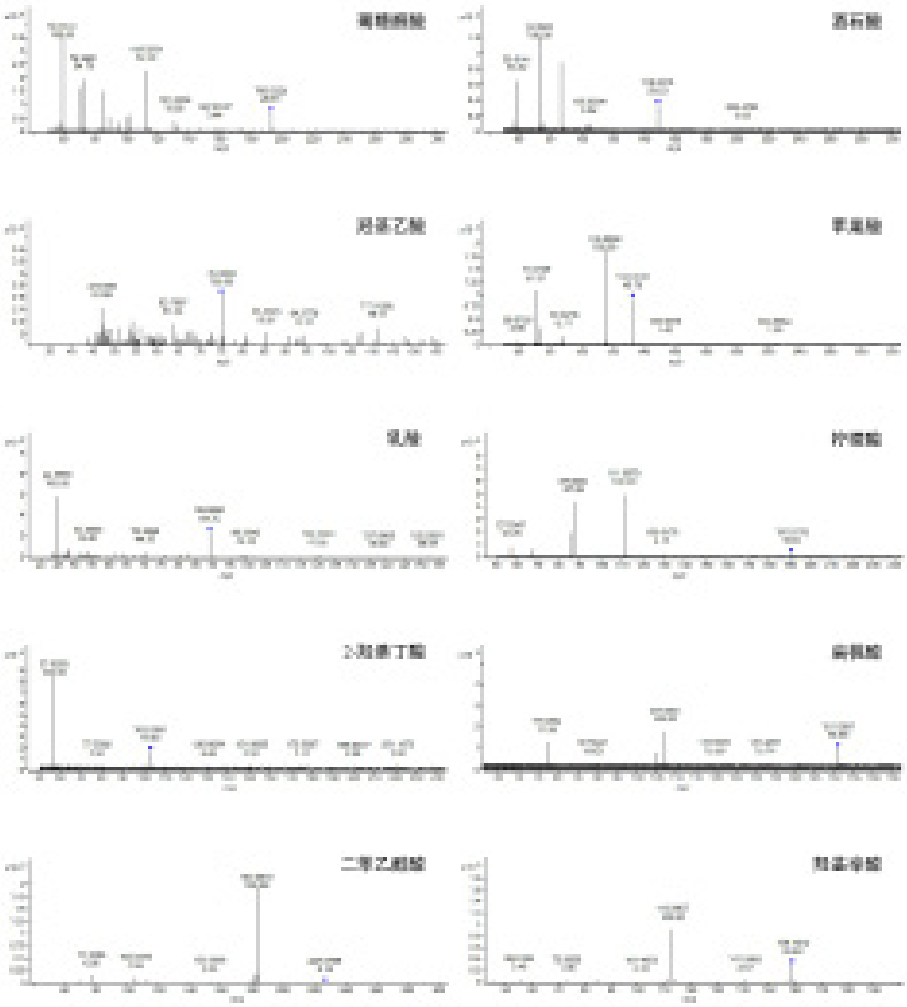


图 1　10 种 α- 羟基酸的二级质谱图

Fig 1　MS^2 spectrum of 10 α-hydroxy acids

表 2　10 种 α- 羟基酸的质谱分析参数

Tab 2　MS/MS parameters for the detection of 10 α-hydroxy acids

成分	保留时间 / min	母离子 / (*m/z*)	子离子 / (*m/z*)	碰撞能量 /eV
葡糖醛酸	0.914	193.0328	113.02，59.01	10
酒石酸	1.013	149.0076	72.99	15
羟基乙酸	0.988	75.0088	47.02，63.77	20
苹果酸	1.207	133.0142	115.00，71.01	10
乳酸	1.440	89.0244	45.00，53.89	20
柠檬酸	1.886	191.0197	111.01，87.01	15
2- 羟基丁酸	2.637	103.0395	57.04，77.51	15
扁桃酸	7.167	151.0401	107.05，77.04	15
二苯乙醇酸	8.134	227.0714	183.08	10
羟基辛酸	7.982	159.1027	113.10	15

2.3　*方法学考察*

2.3.1　专属性试验　分别取混合对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液及空白溶剂（水），按“2.2.1”项下方法进样 5 μL，结果见图 2。空白溶剂和阴性样品溶液不干扰待测物的测定，各峰保留时间适中，分离度良好。

2.3.2　线性关系考察　分别精密吸取“2.1.1”项下混合对照品溶液 0.25、0.5、1、2、5、10 mL 于 20 mL 量瓶中，加水溶解，稀释至刻度，摇匀，得到系列对照品溶液，分别按“2.2.1”项下方法分别测定，记录色谱图。以质量浓度为横坐标（*X*），峰面积为纵坐标（*Y*），绘制标准曲线，结果见表 3。

2.3.3　定量限与检测限　取“2.1.1”项下混合对照品溶液，用水逐级稀释，按“2.2.1”项下方法测定，以信噪比（*S/N*）为 3 和 10 分别计算仪器的检测限（LOD）和定量限（LOQ），结果见表 3。

2.3.4　精密度试验　取“2.1.1”项下混合对照品溶液，按“2.2.1”项下方法重复进样 6 次，结果 10 种 α- 羟基酸峰面积的 *RSD* 在 0.25% ～ 2.3%，表明仪器精密度良好。

2.3.5　加样回收试验　以空白水剂、膏霜剂、乳剂作为基质考察本方法的回收率。精密称取空白基质 1 g 于 10 mL 具塞比色管中，分别加入 0.5、2.0、5.0 mL 混合对照品溶液，作为低、中、高浓

表 3 线性关系、检测限和定量限

Tab 3 Linearity，limit of detection and limit of quantization

成分	回归方程	线性范围 /（μg·mL^{-1}）	r	LOD /（μg·g^{-1}）	LOQ /（μg·g^{-1}）
葡糖醛酸	$Y = 204.7X + 1.321\times10^4$	99.22 ～ 3968.79	0.9995	91	329
酒石酸	$Y = 697.4X - 3.627\times10^3$	50.06 ～ 2002.29	0.9996	50	184
羟基乙酸	$Y = 214.0X - 5.242\times10^3$	99.06 ～ 3962.57	0.9996	150	450
苹果酸	$Y = 266.9X - 4.492\times10^3$	99.21 ～ 3968.42	0.9996	155	450
乳酸	$Y = 146.7X - 4.278\times10^3$	115.32 ～ 4612.83	0.9995	255	603
柠檬酸	$Y = 311.9X - 4.252\times10^3$	99.83 ～ 3993.33	0.9996	178	527
2-羟基丁酸	$Y = 204.2X - 1.129\times10^3$	120.11 ～ 4804.42	0.9995	133	380
扁桃酸	$Y = 1.024\times10^4X - 1.130\times10^4$	2.50 ～ 100.10	0.9996	4	10
二苯乙醇酸	$Y = 1.791\times10^4X - 1.112\times10^4$	2.46 ～ 98.51	0.9996	4	10
羟基辛酸	$Y = 159.4X + 6.806\times10^3$	96.19 ～ 3847.58	0.9995	329	610

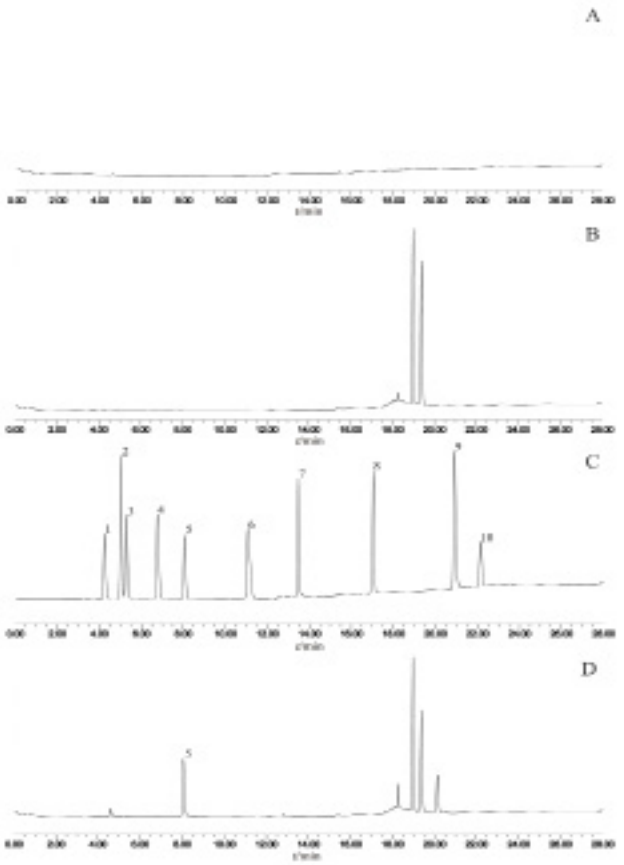


图 2 空白溶剂（A）、阴性样品溶液（B）、对照品溶液（C）及供试品溶液（D）典型色谱图

Fig 2 Chromatogram of blank solution（A），negative sample solution（B），reference solution（C）and sample solution（D）

1. 葡糖醛酸（glucuronic acid）；2. 酒石酸（tartaric acid）；3. 羟基乙酸（glycolic acid）；4. 苹果酸（malic acid）；5. 乳酸（lactic acid）；6. 柠檬酸（citric acid）；7. 2-羟基丁酸（2-hydroxybutyric acid）；8. 扁桃酸（mandelic acid）；9. 二苯乙醇酸（benzilic acid）；10. 羟基辛酸（hydroxycaprylic acid）

度的加标溶液，按“2.1.2”项下方法制备，每个浓度平行配制 3 份，进样测定，计算平均加样回收率。结果葡糖醛酸、酒石酸、羟基乙酸、苹果酸、乳酸、柠檬酸、2-羟基丁酸、扁桃酸、二苯乙醇酸、羟基辛酸的加样回收率分别在 98.3% ～ 106.5%（*RSD* 在 0.40% ～ 4.4%）、100.2% ～ 108.5%（*RSD* 在 0.40% ～ 2.2%）、99.6% ～ 108.9%（*RSD* 在 0.30% ～ 2.4%）、99.4% ～ 104.6%（*RSD* 在 0.30% ～ 3.1%）、102.7% ～ 109.6%（*RSD* 在 0.60% ～ 3.0%）、94.7% ～ 105.6%（*RSD* 在 1.0% ～ 4.1%）、101.0% ～ 105.3%（*RSD* 在 0.60% ～ 4.1%）、94.2% ～ 111.9%（*RSD* 在 0.60% ～ 4.8%）、97.5% ～ 106.5%（*RSD* 在 0.80% ～ 3.8%）、96.1% ～ 105.6%（*RSD* 在 1.1% ～ 4.7%）。

2.3.6 重复性试验 取某批号阳性样品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液 6 份，按“2.2.1”项下条件测定，结果样品中乳酸平均含量为 0.4%，*RSD* 为 1.4%，表明该方法重复性良好。

2.3.7 稳定性试验 取“2.1.1”项下混合对照品溶液，于室温下放置 0、1、2、4、8、12、24 h 后进样分析，结果葡糖醛酸、酒石酸、羟基乙酸、苹果酸、乳酸、柠檬酸、2-羟基丁酸、扁桃酸、二苯乙醇酸、羟基辛酸峰面积的 *RSD* 分别为 0.33%、0.25%、2.6%、0.32%、0.47%、0.42%、0.91%、0.65%、1.8%、1.6%，可满足分析测试要求。

2.3.8 样品测定 采用本文建立的方法对 30 批化妆品进行检测。经高效液相色谱法初筛，3 批样品中疑似含有 *α*-羟基酸，需进行液质确证。当样品的提取离子流图中出现与标准品溶液保留时间一致的色谱峰，且色谱峰的一级、二级质谱的特征离子（*m/z*）信息均一致时，则可判定样品中检出相应的 *α*-羟基酸化合物。结果显示 1 份样品检出羟基乙酸，含量为 0.6%；2 份样品检出乳酸，含量分别为 0.4%、1.3%；其余样品未检出 *α*-羟基酸。阳性样品液质确证谱图见图 3 和图 4。

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

本试验检测的 10 种化合物极性均较大，需要选择耐水相色谱柱。本研究考察了 Agilent ZORBAX SB-AQ C_{18}（4.6 mm×250 mm，5 μm）、

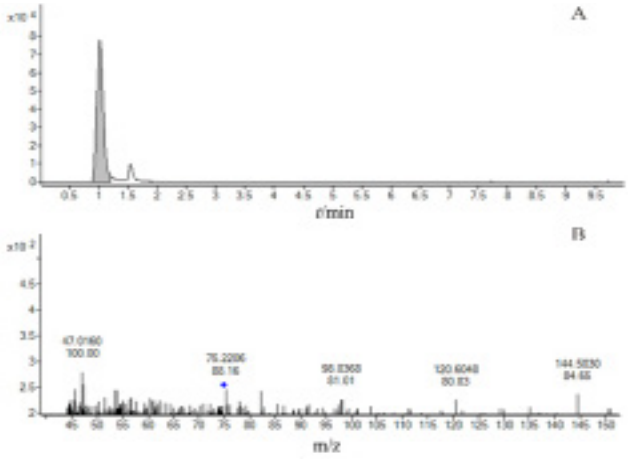


图 3　阳性样品中羟基乙酸的提取离子流图（A）和二级质谱图（B）

Fig 3　Extracted ion chromatogram（A）and MS^2 spectrum（B）of glycolic acid in the positive samples

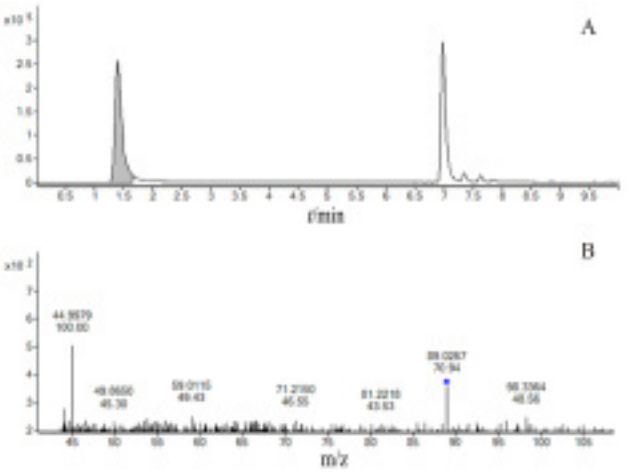


图 4　阳性样品中乳酸的提取离子流图（A）和二级质谱图（B）

Fig 4　Extracted ion chromatogram（A）and MS^2 spectrum（B）of lactic acid in the positive samples

Waters Atlantics T_3（4.6 mm×250 mm，5 μm）、SHISEIDO CAPCELL PAK C_{18} AQ（4.6 mm×250 mm，5 μm）三种品牌的色谱柱，以目标化合物分离度和峰形为选择依据，结果显示，当使用 Agilent ZORBAX SB-AQ C_{18} 柱时，苹果酸、乳酸和柠檬酸稍有拖尾；当使用 Waters Atlantics T_3 柱时，10 种化合物的响应均偏低；而当使用 SHISEIDO CAPCELL PAK C_{18} AQ 柱时，各化合物分离效果较好，峰形对称，出峰时间适中。SHISEIDO CAPCELL PAK C_{18} AQ 柱填料为新型聚合物包被的硅胶，在 100% 的水系流动相中具有良好稳定性，能有效分离高极性化合物，因此是最适用的色谱柱。

3.2　流动相 pH 的选择

参考文献[6，10]，考察磷酸氢二铵溶液不同 pH 值（2.3、2.45、3.0）对目标化合物色谱行为的影响。结果显示，当 pH 值为 3.0 时，酒石酸与羟基乙酸不能完全分离，色谱峰有重叠现象；当 pH 值为 2.3 时，二苯乙醇酸和羟基辛酸色谱峰前延，峰形较差；而 pH 值为 2.45 时，各成分色谱峰的分离度良好，均能达到基线分离。

3.3　提取方法的选择

以 10 种 α- 羟基酸峰面积大小为考察依据，考察了不同提取时间（15、30、45 min）、超声温度（室温、40 ℃、60 ℃、80 ℃）、溶剂用量（10、20、25 mL）对提取效率的影响，结果表明不同溶剂用量对检测结果无明显影响，从操作简便性和成本考虑，最终选择 10 mL 为溶剂用量。当提取时间 30 min、超声温度 60 ℃时，10 种 α- 羟基酸峰面积达到最大值，因此选择 30 min 为最佳提取时间、60 ℃为最佳超声温度。

3.4　小结

本研究建立了化妆品中 10 种 α- 羟基酸的高效液相色谱检测及液相色谱 - 串联质谱确证方法，该方法快速、简便、准确度高、专属性强，可为化妆品中 α- 羟基酸类化合物的测定提供参考，对严格规范我国化妆品市场具有重要意义。

参考文献

[1] 梁嘉琪 . α- 羟基酸在化妆品中的应用专利技术综述 [J]. 山东化工，2020，49（14）：70-71，76.

[2] 裘炳毅，高志红 . α- 羟基酸及其在护肤品中的应用 [J]. 日用化学工业，1995（4）：29-35.

[3] 杨艳伟，刘思然，罗嵩，等 . 化妆品中限用物质使用情况调查 [J]. 中国卫生检验杂志，2013，23（5）：1298-1299.

[4] 魏娇，程培华，蒋增琼，等 . 果酸在皮肤美容中的临床应用现状及进展 [J]. 中国美容医学，2017，26（9）：125-128.

[5] 朱会卷，刘思然，杨艳伟，等 . 化妆品和消毒剂中 α- 羟基酸的检测方法比较 [J]. 环境与健康杂志，2014，31（3）：267-268.

[6] 李杨杰，吴震，肖树雄，等 . 高效液相色谱法同时测定化妆品中的 10 种 α- 羟基酸 [J]. 中国卫生检验杂志，2017，27（19）：2757-2760.

[7] 杨艳伟，朱英，董兵 . 化妆品中 α- 羟基酸的使用情况分析 [J]. 中国卫生检验杂志，2008，18（1）：133-134.

[8] 国家食品药品监督管理总局 . 化妆品安全技术规范（2015 版）[S]. 北京：中国标准出版社，2015.

[9] 陈海滨，李玲玲，王红梅 . HPLC-MS/MS 法测定化妆品中 α- 羟基酸的含量 [J]. 药物分析杂志，2017，37（11）：2057-2061.

[10] 孙文闪，田富饶，王旭强，等 . 高效液相色谱法测定化妆品中 5 种 α- 羟基酸 [J]. 香料香精化妆品，2012（5）：25-28.

[11] 张泓，王斌，周世伟 . 气相色谱法测定化妆品中的 α- 羟基酸 [J]. 上海预防医学杂志，2002，14（6）：261-262.

[12] 钟志雄，杜达安，梁旭霞 . 离子色谱法测定化妆品中的 α- 羟基酸 [J]. 中国卫生检验杂志，2001，11（1）：21-26.

（收稿日期：2021-09-08；修回日期：2021-10-09）

焦点评论

降脂药理学有什么新进展？整合基础研究和临床研究以改善患者治疗结果

Peter E. Penson[1, 2, 3] (1.*School of Pharmacy and Biomolecular Sciences*, *Liverpool John Moores University*, *Liverpool UK*; 2. *Liverpool Centre for Cardiovascular Science*, *Liverpool UK*; 3. *Institute of Ageing and Chronic Disease*, *University of Liverpool*, *Liverpool UK*)

中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)04-0924-02
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.032

自 20 世纪 90 年代以来，使用他汀类药物（以下简称他汀）一直是降脂治疗的主要方法。大量大规模随机对照试验表明，使用他汀疗法一年后，低密度脂蛋白（LDL）每年降低约 1 mmol • L^{-1}，主要心血管事件的风险降低约 25%[1]。

最近降脂领域的讨论集中在新的降脂药上，尤其是 pro-protein convertase subtilisin/kexin type 9（PCSK9）抑制剂，其降低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）水平显著优于他汀疗法。PCSK9 是肝脏 LDL 受体的重要调节剂。当 PCSK9 被单克隆抗体（MoAbs）(alirocumab 和 evolocumab）灭活或被小干扰 RNA（inclisiran）抑制时，LDL 受体会上调，从而使 LDL 更有效地从循环中清除，降低由 LDL 引起的动脉粥样硬化的发展程度。大规模临床试验证明了 PCSK9 MoAb 抑制剂对主要心血管事件的疗效。有研究表明，evolocumab 在白种人和亚洲人中具有相似的药动学和药效学作用，表明该药物在广泛的人群类型中有用[2]。但是，新药的高成本和他汀疗法的长期临床试验证据意味着他汀在很多年内将继续成为绝大多数患者的首选药物。

他汀虽然是一种在世界各地广泛使用且已在专业医学工具箱中使用 30 多年的药物，但还有很多作用可以发现。与以往一样，药理学引领发现的道路，这使我们能够改善对患者的治疗。多年来，对于药物如何起效及剂量 - 反应关系的理解都是基于 S 函数曲线（刻画在对数表上）得来。在临床前试验中，对一种药物的生物反应，可以在模型系统的一系列浓度范围内（通常以分钟或几小时计算）表征出来。有些临床试验可能需要数年时间才能获得有意义的临床结果，而根据小剂量研究和药代动力学模型选择的药物一般为一剂或两剂，在临床试验中选择错误剂量可能造成巨大损失，剂量太低，治疗药物可能会失去效力；剂量太高，药物的效益可能会被毒性所抵消。

西澳大利亚大学的 Simon Dimmitt 及其同事将药理学原理应用于临床数据，并认为目前他汀的剂量过高，讨论了 ED_{50}（半数有效量，指能引起 50% 最大反应强度 E_{max} 的药量）在剂量范围内的相关性。他们指出，在心脏病学中，药物的给药剂量通常是其 ED_{50} 的数倍；如氢氯噻嗪以其 ED_{50} 的 2.5 倍进行定量，其他药物的剂量类似：氨氯地平 5 倍、美托洛尔 3.3 倍、非诺贝特 1.8 倍和氯吡格雷 2.5 倍。第一代他汀 使用类似的剂量，如辛伐他汀 0.3 ～ 5.3 倍和普伐他汀 0.25 ～ 2 倍。这与较新的他汀（阿托伐他汀和瑞舒伐他汀）形成了鲜明的对比，这两种药物的推荐剂量都比其降低 LDL-C 的 ED_{50} 大 40 倍[3]。有研究者指出，将剂量提高到 ED_{50} 以上会产生不良反应，且不会增加治疗效益。他汀类药物相关不良反应的严重程度可能被夸大了，由于“Drucebo”（药物安慰剂）效应，其他药物广为人知的不良反应也被归因于他汀类药物治疗，即使没有因果关系[4]。他汀类药物的长期依从性较差，且不依从性与较差的临床结果有关[1, 3-4]。Awad 等[5]认为可向在使用更好的他汀类药物治疗但出现肌肉症状的人推荐较低剂量的阿托伐他汀和瑞舒伐他汀，然而，这种方法的合理性暂时没有得到高质量随机对照证据的支持。一项随机对照试验的荟萃分析表明，阿托伐他汀和瑞舒伐他汀隔日给药对降低 LDL-C 效果与每日给药一样。国际血脂专家组（ILEP）

是一个由医师和科学家组成的协作小组，已就他汀类药物不耐受的管理提出了建议，包括将他汀类药物的剂量降低到患者可以耐受的水平[6]。

无不良反应且可耐受的他汀类药物剂量在患者间的差异可以反映药物代谢的个体间差异。利物浦大学的 Turner 及 Pirmohamed 课题组调查了 571 名非 ST 段抬高型急性冠脉综合征的患者血浆中阿托伐他汀及其代谢产物浓度的影响因素。除了确认现有的已知因素外，还确定了吸烟（这会减少阿托伐他汀的羟基化并增加其内酯化）、合用质子泵抑制和袢利尿剂都与阿托伐他汀浓度增加有关。虽然这种影响很小并且可能取决于 CYP2C19 表型，但它们可能在一些服用高剂量他汀的患者中引起毒性[7]，研究结果还强调了将药物遗传学检测作为个体化精准医疗的一个重要方面。

肿瘤 - 心脏病学的研究越来越重要，因为近年来癌症存活率的急剧上升提出了一个问题，即如何管理以前接受或正在接受恶性肿瘤治疗的个体的心血管风险，包括观察药物相互作用。奥希替尼是一种表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂，用于治疗非小细胞肺癌。基于其已知的作用机制，已经提出了与辛伐他汀（通过 CYP3A）和瑞舒伐他汀（通过乳腺癌抗性蛋白底物）的理论相互作用。一项 Ⅰ 期临床研究显示未发现临床相关的药物相互作用，表明与奥希替尼同时使用辛伐他汀（或其他 CYP3A 底物）或瑞舒伐他汀可能是安全的[8]。有研究发现，他汀的使用可能与癌症的更好结果有关，观察性研究的荟萃分析表明，诊断后使用他汀类药物与全因死亡率 HR（95%*CI*）0.74（0.63 ～ 0.8）成负相关。这些发现将刺激随机对照试验（以确定是否存在因果关系）和实验药理学（以研究任何潜在机制）的开展[9]。

长期以来，固有认知觉得：LDL-C 水平越低越好，且降脂治疗引起的心血管疾病风险降低幅度随着治疗时间的延长而增加[10]。但是，与许多卫生保健预防性干预措施一样，人们最关注的是如何将临床试验和流行病学研究的结果转化为指南，仿佛我们是在治疗整个人群，而不是个别患者。重要的是，即使对于高质量数据结果，也不应做过分的外推和解读。对于维持正常生理功能可能有一个必须的 LDL-C 的最低基线值，即便药物使用的最高剂量下也是如此，虽然药品及说明书中未提及此点限制。

该篇评论的目的是希望帮助我们能够更以“病人为中心”，考虑降脂药的使用问题，这样我们才有信心说：“LDL-C 越低越好，对于每个人。”

ORCID：Peter E. Penso https：//orcid.org/0000-0001-6763-1489

文献综述

[1] Collins R，Reith C，Emberson J，et al. Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy [J]. The Lancet，2016，388（10059）：2532-2561.

[2] Wang C，Zheng Q，Zhang M，et al. Lack of ethnic differences in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of evolocumab between Caucasian and Asian populations [J]. Br J Clin Pharmacol，2019，85（1）：114-125.

[3] Dimmitt SB，Stampfer HG，Warren JB. The pharmacodynamic and clinical trial evidence for statin dose [J]. Br J Clin Pharmacol，2018，84（6）：1128-1135.

[4] Penson PE，Mancini GBJ，Toth PP，et al. Introducing the ‘Drucebo’effect in statin therapy：a systematic review of studies comparing reported rates of statin-associated muscle symptoms，under blinded and open-label conditions [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle，2018，9（6）：1023-1033.

[5] Awad K，Mikhailidis DP，Toth PP，et al. Efficacy and safety of alternate-day versus daily dosing of statins：a systematic review and metaanalysis [J]. Cardiovasc Drugs Ther，2017，31（4）：419-431.

[6] Penson P，Toth P，Mikhailidis D，et al. Step by step diagnosis and management of statin intolerance：position paper from an international lipid expert panel [J]. Eur Heart J，2019，40（Supplement_1）.

[7] Turner RM，Fontana V，FitzGerald R，et al. Investigating the clinical factors and comedications associated with circulating levels of atorvastatin and its major metabolites in secondary prevention [J]. Br J Clin Pharmacol，2020，86（1）：62-74.

[8] Harvey RD，Aransay NR，Isambert N，et al. Effect of multiple-dose osimertinib on the pharmacokinetics of simvastatin and rosuvastatin [J]. Br J Clin Pharmacol，2018，84（12）：2877-2888.

[9] Li X，Zhou J. Impact of postdiagnostic statin use on ovarian cancer mortality：a systematic review and meta-analysis of observational studies [J]. Br J Clin Pharmacol，2018，84（6）：1109-1120.

[10] Ference BA，Ginsberg HN，Graham I，et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic，epidemiologic，and clinical studies. A consensus statement from the European atherosclerosis society consensus panel [J]. Eur Heart J，2017，38（32）：2459-2472.

（收稿日期：2022-02-05；修回日期：2022-03-01）

医院药学

铬用于 2 型糖尿病辅助治疗的有效性和安全性评价

孙洁雨[1]，王彪[1]，徐敏[2]，吴亚丽[2]，倪明明[3]（1. 南京医科大学第一附属医院，南京 210029；2. 银川市第一人民医院，银川 750001；3. 南京医科大学附属儿童医院，南京 210008）

摘要：目的 系统评价铬用于 2 型糖尿病辅助治疗的有效性和安全性。**方法** 计算机检索 Pubmed、The Cochrane Library、EMbase 以及中国期刊全文数据库，收集在标准降糖治疗基础上添加铬治疗 2 型糖尿病的随机对照试验，同时辅以手工检索，检索时限均从各数据库建库至 2020 年 12 月 31 日。评价纳入研究的质量，并对结果进行 meta 分析。**结果** 共纳入 23 项试验，合计患者 1098 例。试验组患者的胰岛素抵抗指数 [SMD ＝－ 1.32，95%*CI*（－ 2.56，－ 0.09），*P* ＝ 0.04]、空腹血糖 [SMD ＝－ 1.93，95%*CI*（－ 2.69，－ 1.17），*P* ＜ 0.000 01]、空腹血胰岛素 [SMD ＝－ 0.83，95%*CI*（－ 1.53，－ 0.14），*P* ＝ 0.02]、糖化血红蛋白 [SMD ＝－ 0.71，95%*CI*（－ 1.27，－ 0.15），*P* ＝ 0.01]、总胆固醇 [SMD ＝－ 0.66，95%*CI*（－ 1.31，－ 0.01），*P* ＝ 0.05] 和三酰甘油 [SMD ＝－ 1.80，95%*CI*（－ 2.50，－ 1.11），*P* ＜ 0.000 01] 水平均显著低于对照组患者，铬对 2 型糖尿病患者血糖和血脂的改善效果明显。与对照组比较，试验组患者在体质量指数 [SMD ＝－ 0.59，95%*CI*（－ 1.23，0.06），*P* ＝ 0.08]、收缩压 [SMD ＝－ 0.23，95%*CI*（－ 1.02，0.57），*P* ＝ 0.58]、舒张压 [SMD ＝－ 0.34，95%*CI*（－ 1.00，0.33），*P* ＝ 0.32] 以及不良反应事件发生数量 [RR ＝ 0.95，95%*CI*（0.77，1.17），*P* ＝ 0.61] 方面，差异均无统计学意义。**结论** 铬添加在 2 型糖尿病患者的治疗中，可以显著改善患者胰岛素抵抗、血糖和血脂情况，并且不良反应的发生没有显著增加。

关键词：铬；2 型糖尿病；血糖；血脂；胰岛素抵抗
中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)04-0926-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.033

Systematic review of the efficacy and safety of chromium for adjuvant treatment in type 2 diabetes mellitus

SUN Jie-yu[1], WANG Biao[1], XU Min[2], WU Ya-li[2], NI Ming-ming[3] (1. *The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University*, *Nanjing* 210029; 2. *The First People's Hospital of Yinchuan*, *Yinchuan* 750001; 3. *Children's Hospital of Nanjing Medical University*, *Nanjing* 210008)

Abstract: Objective To systematically evaluate the efficacy and safety of chromium for adjuvant treatment in type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods** Pubmed, the Cochrane Library, EMbase and CJFD database were retrieved, and randomized controlled trials (RCT) on chromium used in the adjuvant treatment in T2DM on the basis of standard anti-glycemic therapy were collected. The retrieval time was from the establishment of the databases to December 31st, 2020. Quality evaluation and meta-analysis of included literatures were conducted. **Results** Totally 23 RCTs were included, involving 1098 patients. The insulin resistance index in the test group (chromium supplementation) [SMD ＝ － 1.32, 95% *CI* (－ 2.56, － 0.09), *P* ＝ 0.04], the fasting blood glucose [SMD ＝ － 1.93, 95% *CI* (－ 2.69, － 1.17), *P* ＜ 0.000 01], the fasting blood insulin [SMD ＝ － 0.83, 95% *CI* (－ 1.53, － 0.14),

基金项目：南京医科大学科技发展基金面上项目（No. 2017NJMU059）。
作者简介：孙洁雨，女，硕士，主要从事循证药学研究，email：cpu_sunjy@163.com *__通信作者：__倪明明，男，硕士，主管药师，主要从事药物不良反应研究，email：nimingming.cool@163.com

$P = 0.02$], the glycosylated hemoglobin [SMD = − 0.71, 95% *CI* (− 1.27, − 0.15), $P = 0.01$], total cholesterol [SMD = − 0.66, 95% *CI* (− 1.31, − 0.01), $P = 0.05$], and triglycerides [SMD = − 1.80, 95% *CI* (− 2.50, − 1.11), $P < 0.000\ 01$] all lower than those of the control group, revealing obvious effect of chromium on improving blood glucose and blood lipid in T2DM patients. The body mass index [SMD = − 0.59, 95% *CI* (− 1.23, 0.06), $P = 0.08$], the systolic blood pressure [SMD = − 0.23, 95% *CI* (− 1.02, 0.57), $P = 0.58$], diastolic blood pressure [SMD = − 0.34, 95%*CI* (− 1.00, 0.33), $P = 0.32$] and adverse events number [RR = 0.95, 95%*CI* (0.77, 1.17), $P = 0.61$] of the test group had no significant difference as compared with those of the control group. **Conclusion** Chromium supplementation for patients with T2DM significantly improves insulin resistance, blood glucose and blood lipids, without obvious increase of adverse reactions.

Key words: chromium; type 2 diabetes mellitus; blood glucose; blood lipid; insulin resistance

2 型糖尿病（type 2 diabetes mellitus，T2DM）仍然是全球公共卫生关注的焦点问题，近年来在中低收入国家发病率急剧攀升。研究表明，中国已有近 10% 成年的 T2DM 患者，造成了沉重的经济和社会负担 [1]。T2DM 是胰腺胰岛素分泌缺陷或抵抗而致血糖升高的代谢性疾病，而健康的生活方式和降糖药物对于预防或延缓 T2DM 并发症的进展至关重要。近几十年来，膳食微量营养素或天然补充剂干预逐渐被用于改善 T2DM 患者的血糖水平和控制其他心血管疾病的危险因素 [2]。铬是一种必需的微量元素，被认为是葡萄糖代谢和脂质平衡所必需的，有研究表明，严重的铬缺乏可导致可逆性胰岛素抵抗和糖尿病 [3]。目前铬补充剂常见的有含铬酵母、烟酸铬、吡啶甲酸铬等。在临床实践中，一系列试验评估了铬在预防和治疗胰岛素抵抗及相关心血管疾病方面的益处 [4-5]，然而，铬对 T2DM 患者心血管危险因素的确切影响尚有争议 [6-7]，其在 T2DM 临床治疗中的作用尚未明确。因此本文对随机对照试验（RCT）进行了系统回顾和 meta 分析，以评估多种临床生物标记物对铬治疗 T2DM 的反应。

1　方法

1.1　文献检索

通过 PubMed、The Cochrane Library、EMbase 以及中国期刊全文数据库进行系统的文献检索，检索从各数据库建库起至 2020 年 12 月 31 日已经发表的关于糖尿病使用铬治疗的临床试验研究。使用的组合主题词和关键词如下：（chromium OR Cr）AND（diabetes mellitus OR diabetes OR type 2 Diabetes OR type 2 diabetes mellitus OR noninsulin-dependent diabetics OR NIDDM），铬，糖尿病，T2DM，非胰岛素依赖型糖尿病。

1.2　纳入排除标准

纳入符合以下标准的 RCT：研究对象是诊断为 T2DM 的患者 [空腹血糖（FBG）> 7.0 mmol • L^{-1}，糖化血红蛋白（HbAlc）≥ 7%]；干预措施是铬补充剂，试验组患者在标准降糖治疗的基础上添加铬补充剂至少 1 个月，对照组在同样的降糖治疗基础上添加等量安慰剂；结局指标包含 FBG、空腹血胰岛素（FBI）、HbAlc、稳态模型 - 胰岛素抵抗指数（HOMA-IR）、稳态模型 -β 细胞功能指数（HOMA-β）、体质量指数（BMI）、总胆固醇（TC）、三酰甘油（TG）、高密度脂蛋白（HDL）、低密度脂蛋白（LDL）、收缩压（SBP）、舒张压（DBP）和不良反应事件发生数量。排除以下类型的文献：综述类、回顾性分析、研究对象不符、干预措施不符、无对照组、自身前后对照以及重复发表的文献。

1.3　数据提取和质量评估

从单个研究中提取和归纳研究数据，同时将纳入的研究按照 Cochrane 系统评价员手册 5.1.0 偏倚风险工具进行质量评价，内容包括随机序列的产生、分配隐藏、实施者和参与者双盲、结局评价中的盲法、数据的完整性、选择性报道结局和其他偏倚来源等。针对每篇纳入的研究，对上述 7 项做出“高风险”“低风险”“未知风险”的判断。

1.4　统计分析

采用 Rev Man 5.3 统计软件进行数据分析。对于二分类变量，采用相对危险度（RR）为效应分析统计量，对于连续性变量，采用标准化均数差（SMD）进行统计分析，区间估计采用 95% 置信区间（*CI*），用 I^2 评估异质性大小，当异质性 χ^2 检验结果为 $I^2 < 50\%$ 时，采用固定效应模型分析，反之则采用随机效应模型。

2　结果

2.1　文献检索结果

共检索出 940 篇相关文献，通过阅读文题和摘要，排除综述、临床前研究，剩余 56 篇文献进一步阅读，排除分组干预条件不符 15 篇、自身前

后对照 5 篇、研究对象不符 4 篇、结局指标不符 5 篇、非 RCT 5 篇、文献数据重复 3 篇，最终纳入 19 篇（共 23 项 RCT），合计 1098 例患者，其中包括试验组 647 例，对照组 451 例。纳入的 23 项 RCT 均对两组患者的年龄、性别等基线数据进行了统计学处理，差异均无统计学意义（$P > 0.05$）。

2.2 纳入研究基本信息

纳入 19 篇英文文献，涉及的 23 项 RCT 的基本特征见表 1。

表 1 纳入研究的基本特征

Tab 1 Basic characteristics of included studies

第一作者	发表年份	例数		干预措施		持续时间	结局指标
		试验组	对照组	试验组	对照组		
Yanni[8]	2016	15	15	含铬酵母（99 μg・d^{-1}）	等量安慰剂	12 周	abdefghijkl
Guimaraes[9]	2013	13	13	烟酸铬（50 μg・d^{-1}）	等量安慰剂	90 d	bcdefghij
Guimaraes[9]	2013	16	13	烟酸铬（200 μg・d^{-1}）	等量安慰剂	90 d	bcdefghij
Sharma[10]	2011	20	20	含铬酵母（42 μg・d^{-1}）	等量安慰剂	3 个月	adfghijkl
Albarracin[11]	2007	226	122	吡啶酸铬（600 μg・d^{-1}）＋生物素（2 mg・d^{-1}）	等量安慰剂	90 d	defghijklm
Geohas[12]	2007	20	16	吡啶酸铬（600 μg・d^{-1}）＋生物素（2 mg・d^{-1}）	等量安慰剂	30 d	deghij
Racek[13]	2005	19	17	含铬酵母（400 μg・d^{-1}）	等量安慰剂	12 周	adefghijm
Król[14]	2011	20	20	含铬酵母（500 μg・d^{-1}）	等量安慰剂	2 个月	abcdefghijm
Esther[15]	1980	12	12	含铬酵母（10.8 μg・d^{-1}）	等量安慰剂	8 周	gh
Kleefstra[16]	2006	14	17	吡啶甲酸铬（500 μg・d^{-1}）	等量安慰剂	6 个月	afghijkl
Kleefstra[16]	2006	15	17	吡啶甲酸铬（1000 μg・d^{-1}）	等量安慰剂	6 个月	afghijkl
Gunton[17]	2005	20	20	吡啶甲酸铬（800 μg・d^{-1}）	等量安慰剂	3 个月	abdegh
Martin[18]	2006	14	11	吡啶甲酸铬（1000 μg・d^{-1}）	等量安慰剂	6 个月	df
Dee[19]	2006	30	30	吡啶甲酸铬（400 μg・d^{-1}）	等量安慰剂	16 周	bdefm
Sushil[20]	2012	25	25	吡啶甲酸铬（400 μg・d^{-1}）	等量安慰剂	3 个月	defm
Sushil[20]	2012	24	25	己二酸半胱氨酸铬 CDNC（400 μg・d^{-1}）	等量安慰剂	3 个月	defm
Paiva[21]	2015	39	32	吡啶甲酸铬（600 μg・d^{-1}）	等量安慰剂	4 个月	dfghij
Gregory[22]	2006	20	16	吡啶酸铬（600 μg・d^{-1}）＋生物素（2 mg・d^{-1}）	等量安慰剂	30 d	deghij
Fatemeh[23]	2019	23	23	吡啶甲酸铬（500 μg・d^{-1}）	等量安慰剂	4 个月	abdefghijkl
Aria[24]	2020	22	19	吡啶甲酸铬（400 μg・d^{-1}）	等量安慰剂	8 周	bdeghij
Lai[25]	2008	10	10	铬酵母（1000 μg・d^{-1}）	等量安慰剂	6 个月	adf
Saiyed[26]	2016	12	13	吡啶甲酸铬（400 μg・d^{-1}）	等量安慰剂	3 个月	bde
Saiyed[26]	2016	18	13	己二酸半胱氨酸铬 CDNC（400 μg・d^{-1}）	等量安慰剂	3 个月	bde

注（Note）：a. 体质量指数（body mass index）；b. 稳态模型 - 胰岛素抵抗指数（homeostasis model assessment-insulin resistance）；c. 稳态模型 -β 细胞功能指数（homeostasis model assessment-β）；d. 空腹血糖（fasting blood glucose）；e. 空腹血胰岛素（fasting blood insulin）；f. 糖化血红蛋白（haemoglobin A1c）；g. 总胆固醇（total cholesterol）；h. 三酰甘油（triglyceride）；i. 高密度脂蛋白（high-density lipoprotein）；j. 低密度脂蛋白（low-density lipoprotein）；k. 收缩压（systolic blood pressure）；l. 舒张压（diastolic blood pressure）；m. 不良反应发生次数（number of adverse reactions）。

2.3 方法学质量评价

纳入的 23 项研究中有 16 项描述了具体的随机方法[8，10-12，14，16-18，20-22，24，26]；有 5 项研究未使用分配隐藏[10-11，15，21，23]；有 6 项研究未对实施者和参与者使用双盲[10-11，15，21-23]，有 2 项研究数据不完整[13，15]。23 项 RCT 偏倚风险较低，方法学质量评价结果见图 1。漏斗图的对称性表明纳入的研究基本不存在发表偏倚，见图 2。

图 1 偏倚风险比例

Fig 1 Ratio of bias risk

2.4 Meta 分析结果

2.4.1 血糖改善情况

① FBG：有 20 项研究报道了糖尿病患者治疗后的 FBG[8-14，17-26]，共纳入了 1079 例 T2MD 患者，其中试验组 606 例，安慰剂对照组 473 例，各研究间存在异质性（$P < 0.000\,01$，$I^2 = 96\%$），采用随机效应模型进行分析，结果见图 3。Meta 分析显示，糖尿病患者在降糖治疗后，试验组患者 FBG 水平显著低于对照组患者 [SMD ＝－ 1.93，95%CI（－ 2.69，－ 1.17），$P < 0.000\,01$]。在铬添加剂种

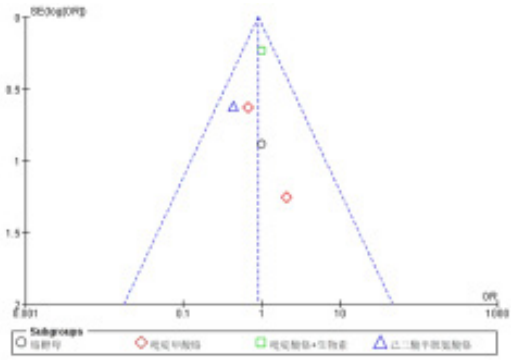


图 2　纳入研究的偏倚漏斗图

Fig 2　Funnel plots of bias risk

类的亚组分析中，使用烟酸铬的试验组与对照组 FBG 水平无显著差异 [SMD ＝－ 0.52，95%*CI*（－ 2.28，1.25），*P* ＝ 0.57]，其余种类的铬添加剂铬酵母、吡啶甲酸铬、吡啶酸铬与生物素结合物、己二酸半胱氨酸铬使用后 FBG 水平均显著低于对照组。

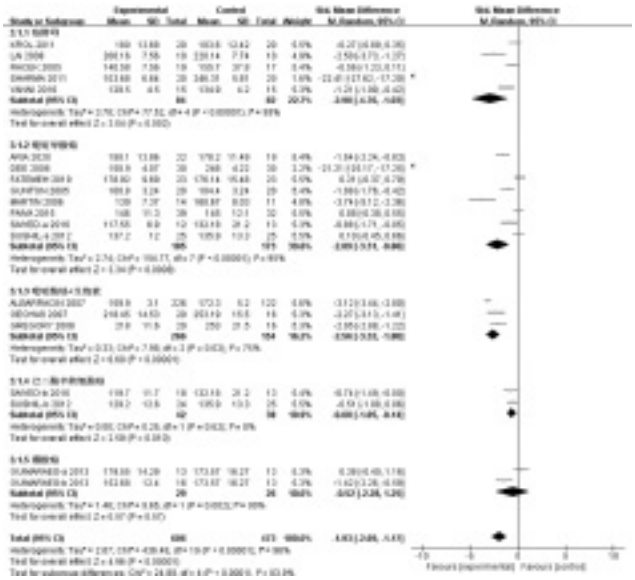


图 3　两组患者治疗后空腹血糖的 meta 分析森林图

Fig 3　Forest plot of meta-analysis of the fasting blood glucose in the two groups after the treatment

② FBI：有 16 项研究报道了糖尿病患者治疗后的 FBI[8-9，11-14，17，19-20，22-24，26]，共纳入了 923 例 T2MD 患者，其中试验组 523 例，安慰剂对照组 400 例，各研究间存在异质性（*P* ＜ 0.000 01，I^2 ＝ 95%），采用随机效应模型进行分析，结果见图 4。Meta 分析显示，患者在降糖治疗后，试验组患者 FBI 水平显著低于对照组患者 [SMD ＝－ 0.83，95%*CI*（－ 1.53，－ 0.14），*P* ＝ 0.02]。在铬添加剂种类的亚组分析中，铬剂为铬酵母、吡啶甲酸铬、吡啶酸铬与生物素结合物的试验组 FBI 水平与对照组无显著差异（*P* ＝ 0.11、*P* ＝ 0.06、*P* ＝ 0.09），而铬添加剂为烟酸铬、己二酸半胱氨酸铬的试验组 FBI 水平均显著低于对照组。

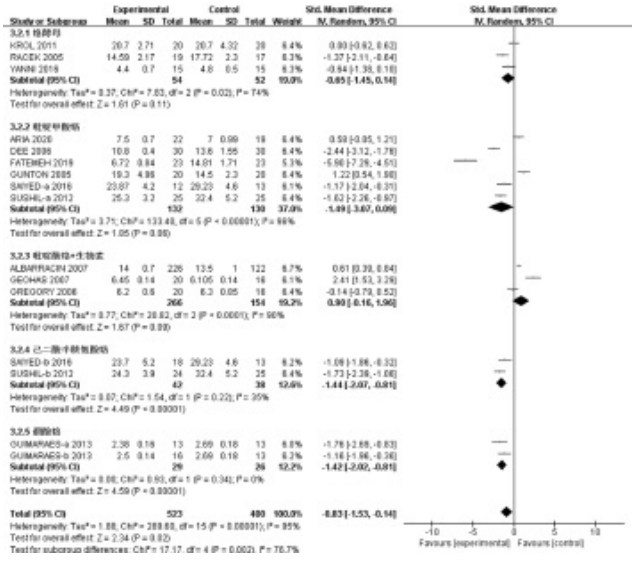


图 4　两组患者治疗后空腹血胰岛素的 meta 分析森林图

Fig 4　Forest plot of meta-analysis of the FBI in the two groups after the treatment

③ HbA1c：有 16 项研究报道了患者治疗后的 HbA1c 水平 [8-11，13-14，16，18，19-21，23，25]，共纳入了 933 例 T2DM 患者，其中试验组 523 例，安慰剂对照组 410 例，各研究间存在异质性（*P* ＜ 0.000 01，I^2 ＝ 93%），采用随机效应模型进行分析，结果见图 5。Meta 分析显示，糖尿病患者在降糖治疗后，试验组患者 HbA1c 水平显著低于对照组患者 [SMD ＝ －0.71，95%*CI*（－ 1.27，－ 0.15），*P* ＝ 0.01]。但在铬添加剂种类的亚组分析中，只有己二酸半胱氨酸铬试验亚组的 HbA1c 显著低于对照组（*P* ＜ 0.05）。

2.4.2　胰岛素耐受性

① HOMA-IR：有 10 项研究报道了患者治疗后的 HOMA-IR[8-9，14，17，19，23-24，26]，共纳入了 368 例 T2DM 患者，其中试验组 189 例，安慰剂对照组 179 例，各研究间有异质性（*P* ＜ 0.000 01，I^2 ＝ 96%），采用随机效应模型进行分析，结果见图 6。Meta 分析表明，糖尿病患者在降糖治疗后，试验组患者 HOMA-IR 水平显著低于对照组患者 [SMD ＝－ 1.32，95%*CI*（－ 2.56，－ 0.09），*P* ＝ 0.04]。在铬添加剂种类的亚组分析中，使用铬酵母的试验组与对照组 HOMA-IR 无显著差异 [SMD ＝ 0.90，95%*CI*（－ 1.83，3.64），*P* ＝ 0.52]，其余种类的铬添加剂吡啶甲酸铬、烟酸铬、己二酸半胱氨酸铬使用后试验组 HOMA-IR 均显著低于对照组。

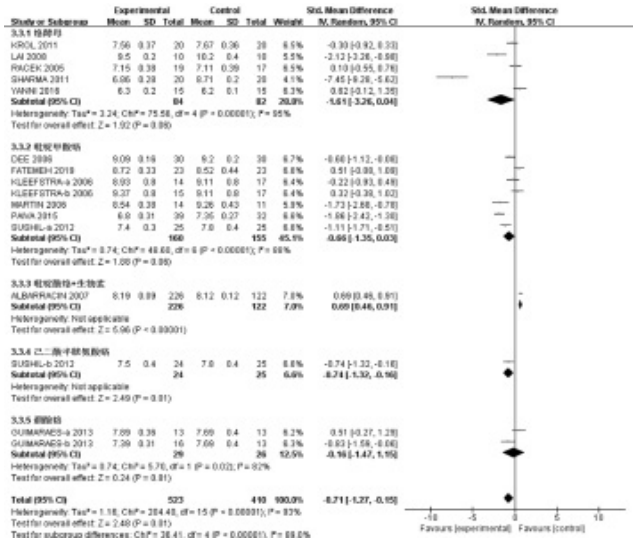


图 5 两组患者治疗后 HbA1c 的 meta 分析森林图

Fig 5 Forest plot of meta-analysis of the HbA1c in the two groups after the treatment

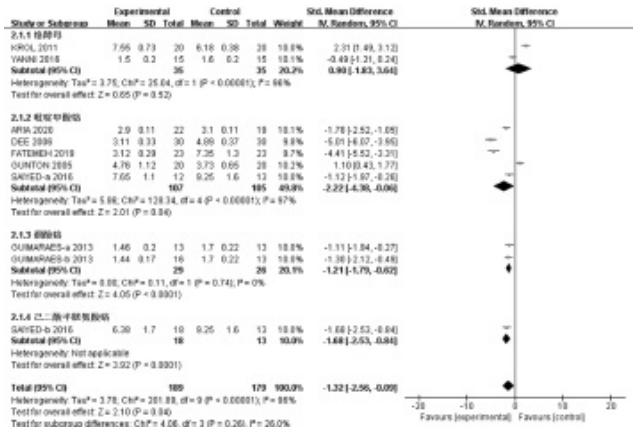


图 6 两组患者治疗后 HOMA-IR 的 meta 分析森林图

Fig 6 Forest plot of meta-analysis of the HOMA-IR in the two groups after the treatment

② HOMA-β：有 3 项研究报道了糖尿病患者治疗后的 HOMA-β[9，14]，共纳入了 95 例 T2DM 患者，其中试验组 49 例，安慰剂对照组 46 例，各研究间存在异质性（$P < 0.000\,01$，$I^2 = 91\%$），采用随机效应模型进行分析，结果见图 7。Meta 分析显示，患者使用铬剂和不使用铬剂的 HOMA-β 无显著差异 [SMD ＝－ 0.80，95%CI（－ 2.29，0.70），$P = 0.30$]。

③ BMI：有 9 项研究报道了糖尿病患者治疗后 BMI 的改善情况 [8，10，13-14，16-17，23，25]，共纳入了 315 例 T2DM 患者，其中试验组 156 例，安慰剂对照组 159 例，各研究间有异质性（$P < 0.000\,01$，$I^2 = 86\%$），采用随机效应模型进行分析，结果见图 8。Meta 分析显示，患者使用铬剂和不使用铬剂 BMI 水平无显著差异 [SMD ＝－ 0.59，

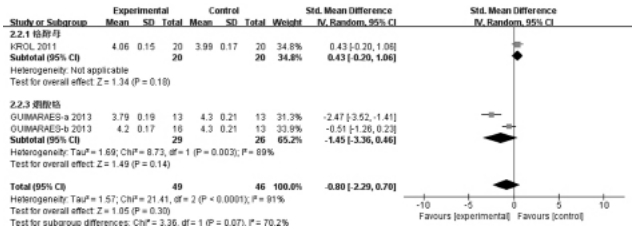


图 7 两组患者治疗后 HOMA-β 的 meta 分析森林图

Fig 7 Forest plot of meta-analysis of the HOMA-β in the two groups after the treatment

95%CI（－ 1.23，0.06），$P = 0.08$]。但是在铬添加剂为铬酵母的亚组，使用铬剂治疗后的患者 BMI 明显低于对照组患者 [SMD ＝－ 0.96，95%CI（－ 1.64，－ 0.29），$P = 0.005$]。

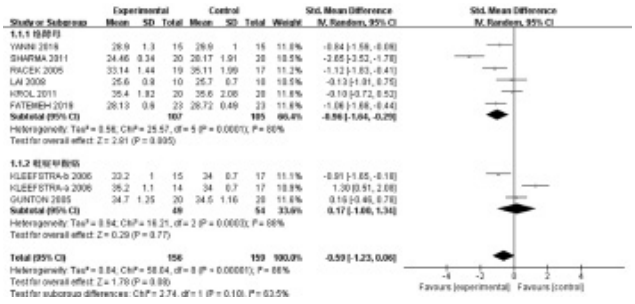


图 8 两组患者治疗后 BMI 的 meta 分析森林图

Fig 8 Forest plot of meta-analysis of the BMI in the two groups after the treatment

2.4.3 血脂

① TC：有 16 项研究报道了糖尿病患者治疗后的 TC[8-17，21-24]，共纳入了 906 例 T2DM 患者，其中试验组 514 例，安慰剂对照组 392 例，各研究间存在异质性（$P < 0.000\,01$，$I^2 = 94\%$），采用随机效应模型进行分析，见图 9。Meta 分析显示，糖尿病患者在降糖治疗后，试验组患者 TC 水平显著低于对照组患者 [SMD ＝－ 0.66，95%CI（－ 1.31，－ 0.01），$P = 0.05$]。在铬添加剂种类的亚组分析中，铬添加剂为吡啶甲酸铬、吡啶酸铬和生物素结合物的试验组患者 TC 水平均显著低于对照组。

② TG：有 14 项研究报道了糖尿病患者治疗后的 TG 水平 [8，10-17，21-24]，共纳入了 851 例 T2DM 患者，其中添加铬剂治疗的试验组 485 例，安慰剂对照组 366 例，各研究间存在异质性（$P < 0.000\,01$，$I^2 = 93\%$），采用随机效应模型进行分析，结果见图 10。Meta 分析显示，糖尿病患者在降糖治疗后，试验组患者 TG 水平显著低于对照组患者 [SMD ＝－ 1.80，95%CI（－ 2.50，－ 1.11），$P < 0.000\,01$]。在铬添加剂种类的亚组分析中，铬添加剂为吡啶甲酸铬、吡啶酸

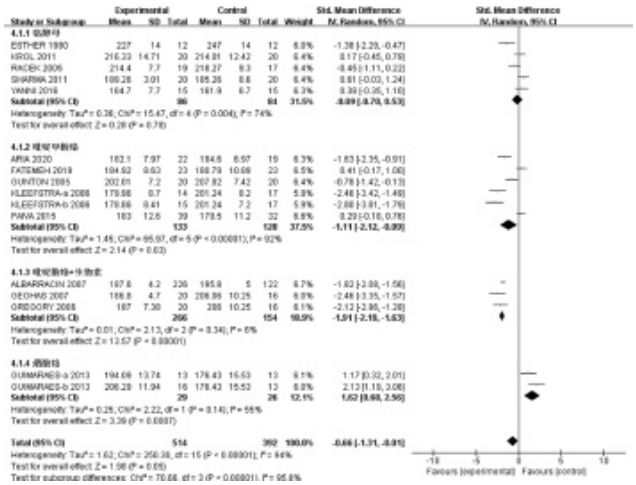


图 9　两组患者治疗后 TC 的 meta 分析森林图

Fig 9　Forest plot of meta-analysis of the TC in the two groups after the treatment

铬和生物素结合物的试验组患者 TG 水平均显著低于对照组。

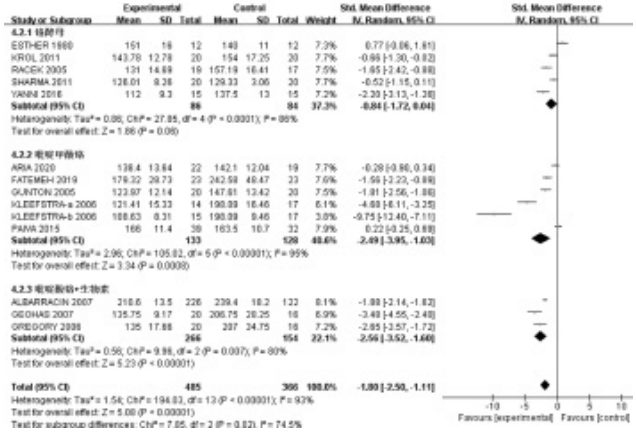


图 10　两组患者治疗后甘油三酯的 meta 分析森林图

Fig 10　Forest plot of meta-analysis of the TG in the two groups after the treatment

③ HDL：有 14 项研究报道了糖尿病患者治疗后的 HDL 水平 [8-14，16，21-24]，共纳入了 842 例 T2DM 患者，其中试验组 482 例，安慰剂对照组 360 例，各研究间存在异质性（$P < 0.000\ 01$，$I^2 = 96\%$），故选用随机效应模型进行分析，见图 11。Meta 分析结果显示，糖尿病患者在降糖治疗后，添加铬剂的试验组患者 HDL 水平与对照组患者 [SMD ＝ 0.79，95%*CI*（－ 0.01，1.59），$P = 0.05$] 无显著差异。

④ LDL：有 13 项研究报道了糖尿病患者治疗后的 LDL 水平 [9-14，16，21-24]，共纳入了 812 例 T2DM 患者，其中添加铬剂治疗的试验组 467 例，安慰剂对照组 345 例，各研究间存在异质性（$P < 0.000\ 01$，$I^2 = 97\%$），采用随机效应模型

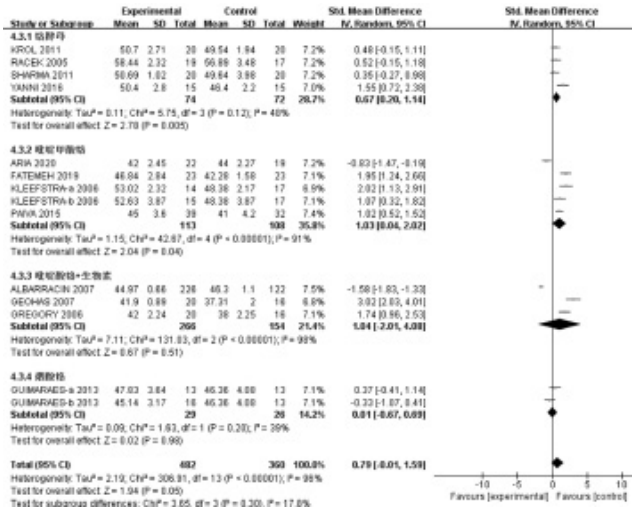


图 11　两组患者治疗后 HDL 的 meta 分析森林图

Fig 11　Forest plot of meta-analysis of the HDL in the two groups after the treatment

进行分析，见图 12。Meta 分析显示，糖尿病患者在降糖治疗后，添加铬剂的试验组患者 LDL 水平与对照组患者 [SMD ＝－ 0.97，95%*CI*（－ 2.07，0.13），$P = 0.08$] 无显著差异。

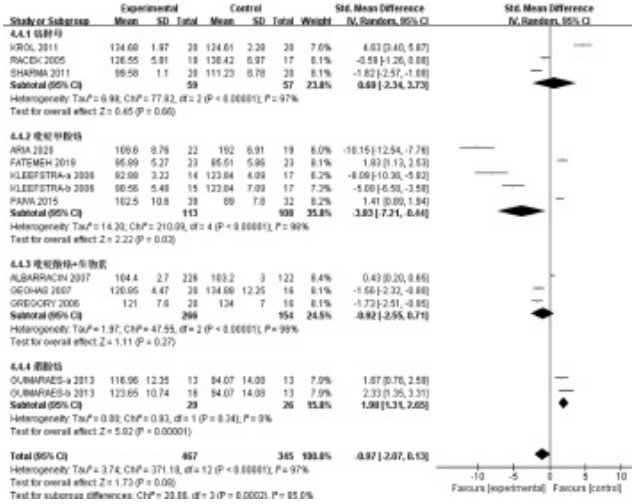


图 12　两组患者治疗后 LDL 的 meta 分析森林图

Fig 12　Forest plot of meta-analysis of the LDL in the two groups after the treatment

2.4.4　血压

① SBP：有 6 项研究报道了糖尿病患者治疗后的 SBP[8，10，11，16，23]，共纳入了 527 例 T2DM 患者，其中试验组 313 例，安慰剂对照组 214 例，各研究间存在异质性（$P < 0.000\ 01$，$I^2 = 91\%$），采用随机效应模型进行分析，结果见图 13。Meta 分析显示，糖尿病患者在降糖治疗后，试验组患者 SBP 与对照组患者无显著差异 [SMD ＝－ 0.23，95%*CI*（－ 1.02，0.57），$P = 0.58$]。

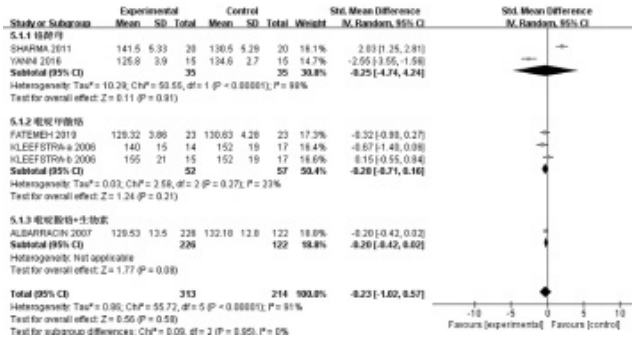


图 13 两组患者治疗后收缩压的 meta 分析森林图

Fig 13 Forest plot of meta-analysis of the SBP in the two groups after the treatment

② DBP：有 6 项研究报道了糖尿病患者治疗后的 DBP[8，10-11，16，23]，共纳入了 527 例 T2DM 患者，其中试验组 313 例，安慰剂对照组 214 例，各研究间存在异质性（$P < 0.000\,01$，$I^2 = 88\%$），采用随机效应模型进行分析，结果见图 14。Meta 分析显示，糖尿病患者在降糖治疗后，试验组患者 DBP 与对照组患者无显著差异 [SMD = −0.34，95%*CI*（−1.00，0.33），$P = 0.32$]。

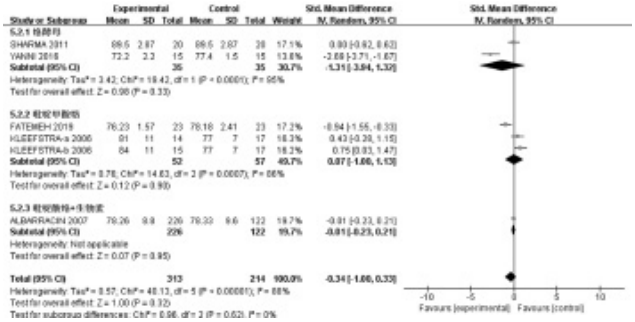


图 14 两组患者治疗后舒张压的 meta 分析森林图

Fig 14 Forest plot of meta-analysis of the DBP in the two groups after the treatment

2.4.5 不良反应发生情况 有 6 项研究报道了糖尿病患者治疗后的不良反应发生情况[11，13-14，19，20]，主要包括胃肠胀气、消化不良、便秘、食欲减退、口干、皮疹、神经系统反应、骨骼肌肉疼痛和泌尿系统反应等。共纳入了 583 例 T2DM 患者，其中试验组 344 例，安慰剂对照组 239 例，各研究间存在异质性（$P = 0.80$，$I^2 = 0\%$），采用固定效应模型进行分析，结果见图 15。Meta 分析结果显示，糖尿病患者在降糖治疗后，试验组患者不良反应事件的发生件数与对照组患者无显著差异 [RR = 0.95，95%*CI*（0.77，1.17），$P = 0.61$]。

3 讨论

研究发现糖尿病患者的空腹血清铬显著低于健康人，说明糖尿病患者可能缺铬[27]。三价铬是

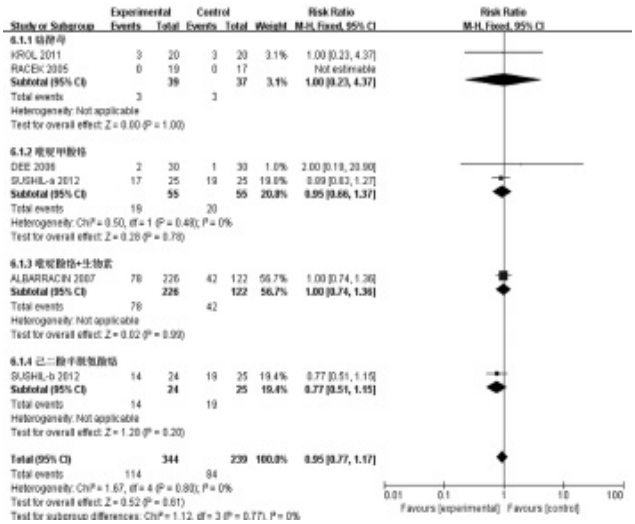


图 15 两组患者治疗后不良反应的 meta 分析森林图

Fig 15 Forest plot of meta-analysis of the adverse events in the two groups after the treatment

一种具有生物活性的铬调素复合物，其通过改善细胞对胰岛素的敏感性，作为在胰岛素抵抗的情况下诱导糖耐量的辅助疗法上市，然而补充铬是否会影响内源性胰岛素的分泌或影响胰岛素信号变化，目前尚不清楚[28]。有研究表明，三价铬与一种被称为铬调蛋白的铬聚合物形成寡肽，并结合胰岛素受体参与胰岛素信号转导，从而发挥降糖作用[29-31]。一般来说，很难直观简单地比较单个不同的铬补充剂临床试验研究的结果。由于铬水平极低，很难对生物组织和体液中的铬状态进行可靠的评估，而且不同的研究使用了不同剂量和类型的铬补充剂，很难界定铬对 T2DM 的确切影响。

本研究对 23 项 RCT 进行了系统评价，结果显示试验组患者相比对照组患者在胰岛素抵抗、血糖和血脂等方面均有显著改善，具体来说补充铬的患者在 HOMA-IR、FBG、FBI、HbAlc、TC 和 TG 水平等指标上均有显著改善，而补充铬对 T2DM 患者的体质量指数、血压和不良反应的发生均无显著影响。从亚组分析结果来看，铬酵母的添加可以显著改善 T2DM 患者的体质量指数，而吡啶甲酸铬是对胰岛素抵抗、血糖和血脂改善均有显著影响的单一铬剂类型，可能是由于吡啶甲酸铬吸收率较高，远高于普通铬剂的吸收率[32]，因此从亚组分析看，吡啶甲酸铬对各指标的影响效果显著。对于相同类型的铬制剂，当铬的剂量为 1000 μg • d^{-1}，使用时间为 6 个月时，试验组空腹血糖的降低效果最为显著[18，25]。此外，有 3 项 RCT 的试验组是采用了吡啶甲酸铬联合生物素，从 meta 分析的结果来看，该试验

亚组的空腹血糖水平也显著低于对照组，与总体研究结果一致，并未造成研究结果的偏倚。所有RCT中的患者均未出现低血糖反应，各试验组空腹血糖值均大于72 mg·dL^{-1}，也未有患者在试验中出现低血糖反应的报道。

本文纳入的23项RCT中有12项为随机、多中心、双盲试验，纳入的研究整体偏倚风险低。研究系统评价了T2DM患者添加使用铬剂的疗效和安全性，为胰岛素非依赖型糖尿病的治疗提供了思路和依据。但本次系统评价存在一些局限性：① 在疗效的指标分析上，各研究间的同质性较差，可能影响结果的准确性；② 关于安全性评价纳入的研究数量较少，还需要更多RCT研究数据进一步验证，同时现有的研究只报道了不良反应事件发生数量，对于不良反应发生的严重程度、种类等并没有更细化的报道，因此后期可以及时跟进，细化安全性分析。

参考文献

[1] 世界卫生组织发布《全球糖尿病报告》[J]. 中国卫生政策研究，2016，9（4）：61.

[2] Vincent JB. Effects of chromium supplementation on body composition，human and animal health，and insulin and glucose metabolism [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care，2019，22（6）：483-489.

[3] Eva H，Akter QS，Alam MK. Relationship between glycemic status and serum chromium level with type 2 diabetes mellitus [J]. Mymensingh Med J，2020，29（1）：183-186.

[4] Paiva AN，Lima JG，Medeiros AC，et al. Beneficial effects of oral chromium picolinate supplementation on glycemic control in patients with type 2 diabetes：a randomized clinical study [J]. J Trace Elem Med Biol，2015，32（5）：66-72.

[5] Ali A，Ma Y，Reynolds J，et al. Chromium picolinate for the prevention of type 2 diabetes [J]. Treat Strategies Diabetes，2011，3（1）：34-40.

[6] Costello RB，Dwyer JT，Bailey RL. Chromium supplements for glycemic control in type 2 diabetes：limited evidence of effectiveness [J]. Nutr Rev，2016，74（7）：455-468.

[7] Landman GW，Bilo HJ，Houweling ST，et al. Chromium does not belong in the diabetes treatment arsenal：current evidence and future perspectives [J]. World J Diabetes，2014，5（2）：160-164.

[8] Yanni AE，Stamataki NS，Konstantopoulos P，et al. Controlling type-2 diabetes by inclusion of Cr-enriched yeast bread in the daily dietary pattern：a randomized clinical trial [J]. Eur J Nutr，2018，57（1）：259-267.

[9] Guimarães MM，Martins S，Silva MS. Chromium nicotinate has no effect on insulin sensitivity，glycemic control，and lipid profile in subjects with type 2 diabetes [J]. J Am Coll Nutr，2013，32（4）：243-250.

[10] Sharma S，Agrawal RP，Choudhary M，et al. Beneficial effect of chromium supplementation on glucose，HbA1C and lipid variables in individuals with newly onset type-2 diabetes [J]. J Trace Elem Med Biol，2011，25（3）：149-153.

[11] Albarracin CA，Fuqua BC，Evans JL，et al. Chromium picolinate and biotin combination improves glucose metabolism in treated，uncontrolled overweight to obese Patients with type 2 diabetes [J]. Diabetes Metab Res Rev，2008，24（1）：41-51.

[12] Geohas J，Daly A，Juturu V，et al. Chromium Picolinate and biotin combination reduces atherogenic index of Plasma in Patients with type 2 diabetes mellitus：a placebo-controlled，double-blinded，randomized clinical trial [J]. Am J Med Sci，2007，333（3）：145-153.

[13] Racek J，Trefil L，Rajdl D，et al. Influence of chromium-enriched yeast on blood glucose and insulin variables，blood lipids，and markers of oxidative stress in subjects with type 2 diabetes mellitus [J]. Biol Trace Elem Res，2006，109（3）：215-230.

[14] Król E，Krejpcio Z，Byks H，et al. Effects of chromium brewer’s yeast supplementation on body mass，blood carbohydrates，and lipids and minerals in type 2 diabetic patients [J]. Biol Trace Elem Res，2011，143（2）：726-737.

[15] Offenbacher EG，Pi-Sunyer FX. Beneficial effect of chromium-rich yeast on glucose tolerance and blood lipids in elderly subjects [J]. Diabetes，1980，29（11）：919-925.

[16] Kleefstra N，Houweling ST，Jansman FG，et al. Chromium treatment has no effect in patients with poorly controlled，insulin-treated type 2 diabetes in an obese Western population：a randomized，double-blind，placebo-controlled trial [J]. Diabetes Care，2006，29（3）：521-525.

[17] Gunton JE，Cheung NW，Hitchman R，et al. Chromium supplementation does not improve glucose tolerance，insulin sensitivity，or lipid profile：a randomized，placebo-controlled，double-blind trial of supplementation in subjects with impaired glucose tolerance [J]. Diabetes Care，2005，28（3）：712-713.

[18] Martin J，Wang ZQ，Zhang XH，et al. Chromium picolinate supplementation attenuates body weight gain and increases insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes [J]. Diabetes Care，2006，29（8）：1826-1832.

[19] Pei D，Hsieh CH，Hung YJ，et al. The influence of chromium chloride-containing milk to glycemic control of patients with type 2 diabetes mellitus：a randomized，double-blind，placebo-controlled trial [J]. Metabolism，2006，55（7）：923-927.

[20] Jain SK，Kahlon G，Morehead L，et al. Effect of chromium dinicocysteinate supplementation on circulating levels of insulin，TNF-α，oxidative stress，and insulin resistance in type 2 diabetic subjects：randomized，double-blind，Placebo-controlled study [J]. Mol Nutr Food Res，2012，56（8）：1333-1341.

[21] Paiva AN，Lima JG，Medeiros AC，et al. Beneficial effects of oral chromium picolinate supplementation on glyce-

mic control in patients with type 2 diabetes：a randomized clinical study [J]. J Trace Elem Med Biol，2015，32（5）：66-72.

[22] Singer GM，Geohas J. The effect of chromium picolinate and biotin supplementation on glycemic control in poorly controlled patients with type 2 diabetes mellitus：a placebo-controlled，double-blinded，randomized trial [J]. Diabetes Technol Ther，2006，8（6）：636-643.

[23] Imanparast F，Javaheri J，Kamankesh F，et al. The effects of chromium and vitamin D_3 co-supplementation on insulin resistance and tumor necrosis factor-alpha in type 2 diabetes：a randomized placebo-controlled trial [J]. Appl physiol Nutr Metab，2020，45（5）：471-477.

[24] Talab AT，Abdollahzad H，Nachvak SM，et al. Effects of chromium picolinate supplementation on cardiometabolic biomarkers in patients with type 2 diabetes mellitus：a randomized clinical trial [J]. Clin Nutr Res，2020，9（2）：97-106.

[25] Lai MH. Antioxidant effects and insulin resistance improvement of chromium combined with vitamin C and supplementation for type 2 diabetes mellitus [J]. J Clin Biochem Nutr，2008，43（3）：191-198.

[26] Saiyed ZM，Lugo JP. Impact of chromium dinicocysteinate supplementation on inflammation，oxidative stress，and insulin resistance in type 2 diabetic subjects：an exploratory analysis of a randomized，double-blind，placebo-controlled study [J]. Food Nutr Res，2016，60（1）：31762.

[27] 程南征，胡晓林，姜桂荣 . 糖尿病病人和健康人的血铬、尿铬含量 [J]. 营养学报，1987（3）：265-269.

[28] Racek J，Sindberg CD，Moesgaard S，et al. Effect of chromium-enriched yeast on fasting plasma glucose，glycated haemoglobin and serum lipid levels in patients with type 2 diabetes mellitus treated with insulin [J]. Biol Trace Elem Res，2013，155（1）：1-4.

[29] Vincent JB. Mechanisms of chromium action：low-molecular-weight chromium-binding substance [J]. J Am Coll Nutr，1999，18（1）：6-12.

[30] Vincent JB. Recent advances in nutritional biochemistry of trivalent Chromium [J]. Proc Nutr Soc，2004，63（1）：41-47.

[31] Vincent JB. Elucidating a biological role for chromium at a molecular level [J]. Accounts Chem Res，2000，33（7）：503-510.

[32] 唐海燕，肖清贵，徐红彬，等 . 有机铬营养生物学研究进展 [J]. 食品工业科技，2014，35（12）：378-383.

（收稿日期：2021-08-10；修回日期：2021-11-03）

老年共病多重用药抗胆碱能负担与营养不良发生的影响因素分析

徐梦琪，秦侃（安徽医科大学第三附属医院，合肥 230061）

摘要：目的 分析老年共病多重用药患者营养状况与抗胆碱能负担间的关系及发生营养不良的相关影响因素，促进临床规范使用易增加抗胆碱能负担的药物并关注此类患者营养状况。**方法** 分析 2021 年 1 月—2021 年 4 月 89 例在某三甲医院住院的 70 岁及以上年龄的患者的临床资料，采用 NRS-2002 和 MNA-SF 量表评估患者营养状况，用 ACB 量表量化老年患者的抗胆碱能负担，通过多元 Logistic 回归分析该类患者使用抗胆碱能药物与营养状况的关系。**结果** 89 例老年共病多重用药患者中，61 例有营养风险（68.5%）；发生营养不良者 14 例，发生率为 15.7%；有营养不良风险者 64 例（占 71.9%）；无营养不良者 11 例（占 12.4%）。多因素 Logistic 回归分析发现入院 ACB 评分（OR = 1.790，95%CI 1.038 ～ 3.087）、入院体质量（OR = 0.904，95%CI 0.845 ～ 0.966）均为老年共病多重用药患者有营养不良风险的独立危险因素（P < 0.05）。**结论** 老年共病多重用药患者的抗胆碱能负担可能是其发生营养不良的促进因素，临床营养药师应考虑医嘱中药物对营养状况的影响，帮助临床选择更合适的药物，进行有效的干预防止营养不良风险患者转为营养不良，减少营养不良的发生率。

关键词：老年共病多重用药；营养风险；抗胆碱能负担

中图分类号：R969.3，R95 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)04-0934-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.034

基金项目：2021 年安徽省医疗卫生重点专科建设项目（皖卫函 [2021]273 号）。

作者简介：徐梦琪，女，硕士研究生，主要从事临床药学工作，email：mengqi19_xu@163.com *__通信作者：__秦侃，男，硕士研究生导师，主要从事临床药学工作，email：qinkan99@163.com

Anticholinergic burden in the elderly with comorbidity and multiple medication and influencing factors for malnutrition

XU Meng-qi, QIN Kan (*The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University*, *Hefei* 230061)

Abstract: Objective To analyze the relationship between nutritional status and anticholinergic burden of the elderly with comorbidity and multiple medication and related factors for malnutrition, and promote rational use of drugs and reduce the anticholinergic burden. **Methods** Clinical data of 89 patients aged 70 or above who were hospitalized in a tier-three comprehensive hospital from January 2021 to April 2021 were analyzed. The nutritional status of the patients was assessed by MNA-SF and NRS-2002 scale, the anticholinergic load of the patients was quantified by ACB scale, and the risk factors of malnutrition were analyzed by multiple Logistic regression analysis. **Results** Among the 89 patients with comorbidity and multiple medication, 61 (68.5%) showed nutritional risk; 14 (15.7%) had malnutrition; 64 (71.9%) had risk of malnutrition and 11 (12.4%) had good nutrition. Multivariate Logistic regression showed that ACB scores at admission (OR = 1.790, 95%CI 1.038 − 3.087) and weight at admission (OR = 0.904, 95%CI 0.845 − 0.966) were independent risk factors for malnutrition (P < 0.05). **Conclusion** Anticholinergic burden of the elderly with comorbidity and multiple medication increases the occurrence of malnutrition. Clinical dietitian and pharmacists should consider the influence of drugs on the nutritional status in medical advice and reduce the incidence of malnutrition.

Key words: elderly with comorbidity and multiple medication; nutritional risk; anticholinergic load

2021 年 60 岁及以上人口的比重较 2020 年上升了 5.44%[1]。营养不良在各个年龄段都会存在，但在老年群体中更易发生，随着年龄的增长，人体器官功能衰退，老年患者的营养问题越来越突出。营养不良通常与不良的结局相关，如住院时间延长、死亡率增加[2]，以及虚弱和功能状态较差等[3]。造成老年患者营养不良状况的因素较为复杂，包括年龄、饮食、疾病及药物等，需格外重视。

在临床中，老年人常服用抗胆碱能药物，用于治疗过敏、哮喘、抑郁症、高血压、帕金森病等[4]。根据其治疗效果，这些药物可分为两大类：一类是具有抗胆碱能活性并用于治疗的药物，如抗帕金森药物、抗痉挛药及抗毒蕈碱药物等；一类是具有抗胆碱能活性但不作为其主要治疗目的的药物，如抗组胺药、抗精神病药和抗抑郁药等。抗胆碱能药物毒性常为多种药物的累积效应，而非单一药物过量[5]。在医疗过程中人们常会忽视这类药物的累积抗胆碱能活性，且国内很少有研究评估临床环境中药物使用与营养状况的关系，忽略了药物对营养状况的影响。本文旨在研究老年共病多重用药患者使用抗胆碱能药物产生的抗胆碱能负担与其营养状况的关系。

1　资料与方法

1.1　一般资料

选取 2021 年 1 月—2021 年 4 月在某三甲医院住院的 70 岁及以上的患者，入院诊断主要为高血压、肺炎、脑梗死、糖尿病、冠心病，患有三种及以上疾病的患者约占 84%。纳入研究的患者共 89 例，年龄 70 ～ 89 岁，平均年龄（79.92±0.62）岁，其中男性 54 人，女性 35 人，入院前约 84.3% 的患者用药≥ 3 种，入院后所有患者用药均≥ 3 种。纳入标准：① 年龄≥ 70 岁且< 90 岁；② 患者神志清楚、无交流障碍、能回答问题；③ 住院时间≥ 7 d；④ 临床资料全且愿意参与本研究。

1.2　评估方法

抗胆碱能认知负担（anticholinergic cognitive burden）量表是最常用的基于专家的抗胆碱能不良预后量表[6]。营养风险筛查表（NRS-2002）是建立在 128 项随机对照临床研究基础上的营养风险筛查工具，用于判断本次住院是否存在营养风险，从而影响疾病转归；微型营养评定表（MNA-SF）是一种用于老年患者营养评定的工具，它能

够通过营养不良的生化标志物的变化，在营养问题出现之前进行诊断，具有较好的灵敏性，两种量表均被欧洲肠外肠内营养学会和中华医学会肠外肠内营养学分会推荐使用[7]。

采用 NRS-2002 及 MNA-SF 评估患者营养状况，问卷调查由同一人完成，NRS-2002 ≥ 3 分，判定为有营养风险；MNA-SF 评定表满分为 14 分，12 ～ 14 分为营养正常，8 ～ 11 分为有营养不良风险，0 ～ 7 分则为营养不良。对符合标准的患者进行抗胆碱能药物评估，并采用 ACB 分数量化患者的抗胆碱能负担。

1.3 观察指标

收集患者的临床资料，主要包括年龄、性别、入院体质量、出院体质量、入院体质量指数（BMI）、出院 BMI、白蛋白（ALB）、总胆固醇、胱抑素 C、入院共病数量、入院药物种类、出院药物种类、住院时间等。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计学软件进行数据分析，*K-S* 检验计量资料是否正态，计量资料用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。计数资料比较采用卡方检验，入院前和入院后的 ACB 评分用 McNemar 检验进行比较，采用多因素 Logistic 回归分析筛选独立危险因素，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 老年共病多重用药患者营养不良的发生情况

89 例患者中有营养风险者 61 人，约占 68.5%。营养不良者 14 人，发生率 15.7%；有营养不良风险者 64 人，营养正常者 11 人。

老年共病多重用药患者抗胆碱能负担情况 ACB 评分增加患者有 39 人，ACB 评分未增加患者有 50 人，抗胆碱能负担增加患者占 43.8%。ACB 等级为 1 的药物具有抗胆碱能活性，但临床影响尚不明确，ACB 等级为 2 或 3 的药物已产生明确的临床抗胆碱能作用。ACB 等级越高，临床相关的抗胆碱能作用越强，见表 1。结果显示抗胆碱能负担增加的老年患者出院 BMI、总胆固醇低于抗胆碱能负担未增加的患者，而其年龄、体质量变化、入院药物种类、出院药物种类、入院前 ACB 评分、入院后 ACB 评分、入院共病数量、出院 NRS 评分、住院时长均高于抗胆碱能负担未增加的患者，见表 2。

2.2 老年共病多重用药患者出院营养状况的多因素分析

表 1 抗胆碱能药物分级

Tab 1 Classification of anticholinergic drugs

ACB 等级	抗胆碱能药物
1	美托洛尔；硝苯地平；卡托普利；茶碱；可待因；秋水仙碱；华法林；地西泮；地高辛；芬太尼；呋塞米；茶碱；氯雷他定
2	卡马西平；奥卡西平；哌替啶；环苯扎林；金刚烷胺
3	阿米替林；扑尔敏；氯丙嗪；氯氮平；苯海拉明；奥氮平；帕罗西汀；异丙嗪；苯海索

表 2 不同组别的实验室和临床因素分析

Tab 2 Laboratory and clinical factors in different groups

因素		ACB 评分增加	ACB 评分未增加	*P*
年龄 / 岁		81.85±5.85	78.70±5.06	0.009
性别	男	22	32	0.305
	女	17	18	
入院体质量 /kg		59.89±1.86	59.94±1.24	0.941
出院体质量 /kg		59.30±1.88	59.82±1.25	0.797
体质量变化 /kg		1.5	0	0.002
入院 BMI/（kg・m^{-2}）		21.24±0.43	22.50±0.30	0.082
出院 BMI/（kg・m^{-2}）		20.96±0.41	22.46±0.31	0.043
入院药物种类		11.79±4.44	8.20±3.61	＜ 0.001
出院药物种类		4.97±1.74	3.62±1.69	＜ 0.001
住院时长		14.10±5.72	11.54±5.81	0.008
入院前 ACB 评分		0.92±0.98	0.20±0.40	＜ 0.001
入院后 ACB 评分		3.00±1.76	0.52±0.51	＜ 0.001
入院 NRS 评分		3.18±1.00	2.88±0.98	0.136
出院 NRS 评分		3.77±1.53	3.02±1.20	0.018
ALB		34.95±0.60	35.58±0.72	0.469
总胆固醇 /（mmol・L^{-1}）		3.68±0.14	4.10±0.14	0.031
胱抑素 C /（mg・L^{-1}）		1.45±0.06	1.31±0.07	0.004
入院共病数量		6.23±0.42	4.46±0.29	0.002

以老年共病多重用药患者出院 NRS 评分为因变量（赋值 NRS ≥ 3 ＝ 1，NRS ＜ 3 ＝ 0），以入院后 ACB 评分、ALB、入院体质量、入院共病数量为自变量进行多元 Logistic 回归分析，结果显示入院后 ACB 评分、入院体质量是独立危险因素，结果见表 3。

2.3 住院时 ACB 评分的变化

入院前约 59.6% 的患者抗胆碱能评分为 0，但入院后这一比例降低至 21.3%，与此同时，ACB 评分为 1 分、2 分及 ≥ 3 分的患者比例由 23.6%、14.6%、2.2% 增加至 31.5%、29.2%、18%（见图 1）。

3 讨论

3.1 营养状况分析

本研究发现，通过 NRS-2002 评分，入院时约 68.5% 的患者有营养风险，而出院时 73.0% 的患者有营养风险，可以看出随着老年共病多重用药患者

表 3　老年患者出院营养状况的多因素分析

Tab 3　Multivariate analysis of nutritional status in elderly patients at discharge

变量	回归系数	标准误	*P* 值	*OR* 值	95%*CI*
入院后 ACB 评分	0.582	0.278	0.036	1.790	1.038 ～ 3.087
ALB	－ 0.055	0.059	0.358	0.947	0.843 ～ 1.064
入院体质量	－ 0.101	0.034	0.003	0.904	0.845 ～ 0.966
入院共病数量	0.162	0.130	0.211	1.176	0.912 ～ 1.517
常量	13.968	5.623	0.013	－	－

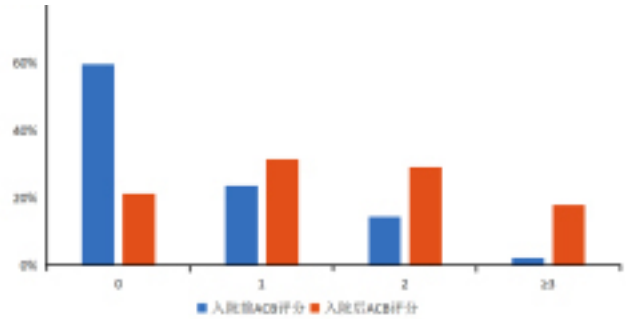


图 1　入院前和入院后的 ACB 评分比较

Fig 1　ACB score before and after the admission

的抗胆碱能负担增加，有营养风险的患者数量也有所增加。营养风险表明患者的营养状况对临床结局的不利影响较大，但并不能表明患者营养不良情况，因此又进行了 MNA-SF 评估。结果显示已有营养不良患者占 15.7%，而营养不良风险患者高达 71.9%。一项对 12 个国家老年人的回顾性汇总分析报告称，营养不良的总流行率约为 23%，康复机构营养不良发生率最高（50.5%），其次是医院（38.7%）、养老院（13.8%）和社区（5.8%）[8]。国内研究也表示，老年住院患者普遍存在营养不良风险，尤其是蛋白质能量营养不良 [9]。营养不良的原因十分复杂，与器官功能性疾病、老年退行性生理改变、环境因素、不良饮食习惯等都密切相关 [10]。本研究中营养不良发生率相比之前的报告较低，可能是因为没有纳入意识不清的重症患者，且市区人民生活水平较高，物资丰富，因此本研究中营养不良的总体比例略低于其他研究，但潜在的营养不良发生率依然较高。

3.2　抗胆碱能药物使用状况

本研究结果显示住院时 78.7% 的老年患者至少使用了 1 种抗胆碱能药物，近 50% 的患者使用联合处方抗胆碱能药物，营养不良患者的抗胆碱能负担明显高于非营养不良者。由于大部分老年人同时合并多种疾病以及使用多种药物，同时衰老伴随着肝和肾药物代谢能力的下降，血脑屏障通透性增加以及中枢胆碱能活性降低，老年人更容易受到抗胆碱能相关作用的影响。抗胆碱能药物的非预期抗胆碱能效应会导致许多不良反应，包括跌倒、认知功能障碍、住院时间延长以及各种原因引起的痴呆和死亡的风险增加等。Fox 等 [11] 报道抗胆碱能药物的使用与更大的认知能力下降风险相关，还与两年更高的病死率相关。此外还有分析表明，抗胆碱能药物的使用与糖代谢降低和脑萎缩增加有关 [12]。认知功能障碍等疾病很可能与营养不良相关 [13]，抗胆碱能药物可能因此影响到老年患者的营养状况。

在抗胆碱能药物的使用方面，90% 患者使用了 ACB 分级为 1 的抗胆碱能药物，如茶碱、呋塞米、异山梨醇、美托洛尔等，使用确定性的抗胆碱能药物为奥氮平、氯丙嗪、帕罗西汀。奥氮平、帕罗西汀等药物作用于中枢神经系统，这类药物不仅能通过诱导镇静和嗜睡降低意识水平，还能减少唾液分泌量，导致口腔干燥。虽然绝大部分患者使用单个药物的抗胆碱能效应低，但这些药物的累积负荷已被证明会增加严重不良事件的风险，如精神错乱、口干、眼干和便秘等 [14]。先前的研究表明，≥ 65 岁的患者经常使用多种药物，年龄相关的药代动力学变化的风险最大，其抗胆碱能药物不良反应的风险也会随之增加 [15]。

本研究最重要的发现是营养状况与 ACB 的评分密切相关，ACB 评分增加的患者中，37.5% 存在营养不良，50% 有营养不良风险，这表明抗胆碱能负担增加的老年住院患者更可能会发生营养不良，且抗胆碱能负担增加的患者住院时间明显长于未增加组。据报道，服用抗胆碱能药物的老年人与不服用抗胆碱能药物的个体相比，外周不良反应风险增加 [16]，如氯丙嗪等强抗胆碱能药物可导致锥体外系反应、张口和闭口困难以及舌侧运动受限等不良反应。有研究报道了羟基嗪的强抗胆碱能作用会减少唾液分泌，损害食物团形成，并引起味觉障碍，这表明该类药物对营养状况具有较强作用 [17]。抗胆碱能负担增加的老年患者住院时间相对更长，用药种类更多，加重了患者的身体及心理负荷，焦虑情绪会破坏体内平衡，也会影响患者的食欲 [18]。此外抗胆碱能负担增加组的体质量降低较明显，这表明了患者的摄入量与需求的不平衡，这些都可能增加营养不良的风险。

入院后使用的药物种类也与老年共病多重用药患者出院时的营养状况相关。随着老年人口的增加，老年人多重用药现象加剧，由于药物的相互作用及对摄入量的影响等均容易导致营养不良进展 [19]。

有效的营养筛查方法能较好地预测临床结局，了解老年共病多重用药患者的营养状况有助于减少营养不良的发生，提高他们的生活质量。

因此在老年人入院就进行营养状况评估是十分必要的，这可以为临床医师开具处方提供参考，在使用抗胆碱能药物时更加谨慎。

4 结语

本研究存在几个局限：首先，无法确定 ACB 评分和营养状况之间的因果关系；其次，本研究中没有考虑每种药物的剂量；再次，除了 ACB 显示的药物外，其他的抗胆碱能药物并未包含，未来可以参考一下 Rudolph 等[20]开发的根据抗胆碱能效力区分的抗胆碱能药物清单；最后，本研究存在样本量较少，研究时间较短等问题，还需进一步验证。

目前研究表明老年共病多重用药抗胆碱能负担与 NRS-2002 评分相关，通过本研究可能有助于改善这类患者的营养状况。未来的研究可以调查通过减少或停止使用抗胆碱能药物，改善老年共病多重用药患者的营养状况。

参考文献

[1] 国家统计局 . 第七次全国人口普查公报（第五号）[DB]. 第七次全国人口普查公报（第五号），2021.

[2] Leiva BE，Badia TM，Virgili CN，et al. Hospital malnutrition screening at admission：malnutrition increases mortality and length of stay [J]. Nutr Hosp，2017，34（4）：907-913.

[3] Griffin A，O’Neill A，O’Connor M，et al. The prevalence of malnutrition and impact on patient outcomes among older adults presenting at an Irishem ergency department：a secondary analysis of the OPTI-MEND trial [J]. BMC Geriatr，2020，20（1）：455.

[4] Vangala VR，Tueth MJ. Chronic anticholinergic toxicity. Identification and management in older patients [J]. Geriatrics，2003，58（7）：36-37.

[5] Mate KE，Kerr KP，Pond D，et al. Impact of multiple low-level anticholinrgic medications on anticholinergic load of community-dwelling elderly with and without dementia [J]. Drugs Aging，2015，32（2）：159-167.

[6] Salahudeen MS，Duffull SB，Nishtala PS. Anticholinergic burden quantified by anticholinergic risk scales and adverse outcomes in older people：a systematic review [J]. BMC Geriatr，2015，15（31）：1-14.

[7] 中华医学会肠外肠内营养学分会老年营养支持学组 . 中国老年患者肠外肠内营养应用指南（2020）[J]. 中华老年医学杂志，2020，39（2）：119-132.

[8] Kaiser MJ，Bauer JM，Cederholm T，et al. Frequency of malnutrition in older adults：a multinational perspective using the mini nutritional assessment [J]. J Am Geriatr Soc，2010，58（9）：1734-1738.

[9] 吴晓娜，黄承钰，邓波 . 应用微型营养评价精法评价老年住院病人的营养状况 [J]. 肠外与肠内营养，2015，22（6）：359-361.

[10] Willis H. Causes，assessment and treatment of malnutrition in older people [J]. Nurs Older People，2017，29（2）：20-25.

[11] Fox C，Richardson K，Maidment ID，et al. Anticholinergic medication use and cognitive impairment in the older population：the medical research council cognitive function and ageing study [J]. J Am Geriatr Soc，2011，59（8）：1477-1483.

[12] Risacher SL，McDonald BC，Tallman EF，et al. Association between anticholinergic medication use and cognition，brain metabolism and brain atrophy in cognitively normal older adults [J]. JAMA Neurol，2016，73（6）：721-732.

[13] Guérin O，Andrieu S，Schneider SM，et al. Different modes of weight loss in Alzheimer’disease：a prospective study of 395 patients [J]. Am J Clin Nutr，2005，82（2）：435-441.

[14] Natalin R，Lorenzetti F，Dambros M. Management of OAB in those over age 65[J]. Curr Urol Rep，2013，14（5）：379-385.

[15] Durán CE，Azermai M，Vander SRH. Systematic review of anticholinergic risk scales in older adults [J]. Eur J Clin Pharmacol，2013，69（7）：1485-1496.

[16] Rudolph JL，Salow MJ，Angelini MC，et al. The anticholinergic risk scale and anticholinergic adverse effects in older persons [J]. Arch Intern Med，2008，168（5）：508-513.

[17] Kose E，Hirai T，Seki T，et al. Role of potentially inappropriate medication use in rehabilitation outcomes for geriatric patients after strokes [J]. Geriatr Gerontol Int，2018，18（2）：321-328.

[18] Lambrinakou S，Katsa ME，Zyga S，et al. Correlations between nutrition habits，anxiety and metabolic parameters in greek healthy adults [J]. Adv Exp Med Biol，2017，987：23-34.

[19] Pourhassan M，Böttger S，Janssen G，et al. The association of inflammation with food intake in older hospitalized patients [J]. J Nutr Health Aging，2018，22：589-593.

[20] Rudolph JL，Salow MJ，Angelini MC，et al. The anticholinergic risk scale and anticholinergic adverse effects in older persons [J]. Arch Intern Med，2008，168（5）：508-513.

（收稿日期：2021-09-06；修回日期：2021-11-08）

处方前置审核在辅助药临床合理运用中的作用

申青，韩勇，周逸梦，何元媛，王尧，李洪林，边原（四川省医学科学院·四川省人民医院药学部/电子科技大学附属医院个体化药物治疗四川省重点实验室，成都　610072）

摘要：目的　探讨处方前置审核系统协同审方药师在规范辅助用药中的作用，为促进该类药物临床合理应用提供参考。**方法**　回顾性分析 2019 年 12 月至 2020 年 11 月，经系统与药师前置审核且含有此类辅助药的某院门急诊处方，比较审核过程中处方合理率的变化。**结果**　随着处方前置审核的推进，与审核首月比较，审核末月的门急诊辅助药处方不合理率由 8.67% 下降至 1.69%，有效干预率为 91.39%。**结论**　该院门急诊辅助药处方经前置审核系统与药师实时审核后，患者用药风险降低，临床用药合理性提高。

关键词：处方前置审核；辅助药；药师干预；合理用药
中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0939-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.035

Pre-prescription review system in the clinicial rational use of adjuvant drugs

SHEN Qing, HAN Yong, ZHOU Yi-meng, HE Yuan-yuan, WANG Yao, LI Hong-lin, BIAN Yuan (*Department of Pharmacy*, *Sichuan Academy of Medical Sciences*・*Sichuan Provincial People's Hospital/Key Laboratory of Individualized Drug Therapy of Sichuan Province*, *School of Medicine*, *University of Electronic Science and Technology of China*, *Chengdu* 610072)

Abstract: Objective To determine the effect of pre-prescription review system combined with pharmacist auditors on standardizing the application of adjuvant drugs, and to provide reference for rational drug use in clinic. **Methods** Retrospective analysis was conducted on prescriptions of the outpatient and emergency department in a hospital which contained adjuvant drugs and had been pre-reviewed by system and pharmacists from December 2019 to November 2020. The prescription qualification rate was compared in the prescription review. **Results** With the application of prescription auditing, the unreasonable prescription rate of adjuvant drugs decreased from 8.67% to 1.69%, and the effective intervention rate was 91.39%. **Conclusion** After the intervention by review system and pharmacists in time, the risk of unreasonable drug utilization is reduced.

Key words: pre-prescription review system; adjuvant drug; pharmacist intervention; rational drug use

在当今的医疗环境下，优化用药的同时减少非必要医疗开销是药物管理的关键[1]，而我国辅助药的普遍性过度使用问题[2]，已成为医疗机构及药事管理部门监管的重点，探索其用药合理性评价方法及规范化使用策略是药学技术人员的重要任务。根据国家重点监控合理用药相关政策[3]，医疗机构超常规辅助用药使用情况宜进行重点考察跟踪。

合理用药工具与前置审核系统的整合在规范信息化处方医嘱开具、规避用药错误方面具有正向作用[4]，但未见其用于辅助药专项审核的报道。本研究中，审方药师参考国家重点监控合理用药目录中该院配备品种及门急诊辅助药具体使用情况，结合信息化辅助审核系统，针对需要监控的药物，在其自定义模块设置实时监测内容，直达侧重点，全面审查相关药品的使用规范性、

基金项目：临床研究及转化基金项目（No.2018LY09）
作者简介：申青，女，硕士，主管药师，主要从事医院药学和处方审核工作，email：shering1017@163.com　*通信作者：边原，男，副主任药师，硕士研究生导师，主要从事临床药学研究，email：85778860@qq.com

合法性及适宜性。并依据相关要求，对该医疗机构使用的辅助药的用药合理性展开追踪并予以实时干预，完善审核系统信息规则库，对出现问题类型进行回顾性分析，初步观察监控效果，以优化医师开方行为，提升药师干预技能及药事服务能力，促进该院辅助药的临床合理运用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

回顾性抽取某院门急诊 2019 年 12 月至 2020 年 11 月包含辅助药并经系统及药师二重前置审核的所有处方进行查看并分析。

1.2 信息技术基础

审核辅助工具为药师前置审方干预系统 PASS pharmReview（美康医药软件公司，版本号 V1.2）。该系统与医师工作站 HIS（东软医疗信息管理系统 V2）对接，用药信息于处方打印前传输至审核系统中。

1.3 干预依据

相关法律法规 [5]、药品说明书、国家处方集、专家共识、临床诊疗指南、文献资料等均作为辅助用药审核参考依据，主要考察用药合法性、规范性以及适宜性。审核项目包括诊断用药相符性、重复给药、给药方式、用量疗程、溶媒配伍、禁忌证、特殊人群用药等。

1.4 审核方式

设立独立岗位进行前置审方。为考察既定药物的使用情况，避免漏审假阴性处方，药师将需要监控的药品手动添加到特殊关注行列，无论系统预判结果如何，每一张含有辅助用药的处方均可到达药师处进行实时在线审核，药师可结合系统提示及警示级别进行干预，选择通过、双签通过、不通过按键，分别执行通过合理处方、医师添加通过理由、强制提请医师修改操作，审核流程见图 1。之后药师做好干预记录，查漏补缺，医师可在系统预判不合理提示及药师操作后进行处方修改。在干预的每一环节，药师均可与医师在线交流及传输资料。干预时间设定为≤ 60 s。

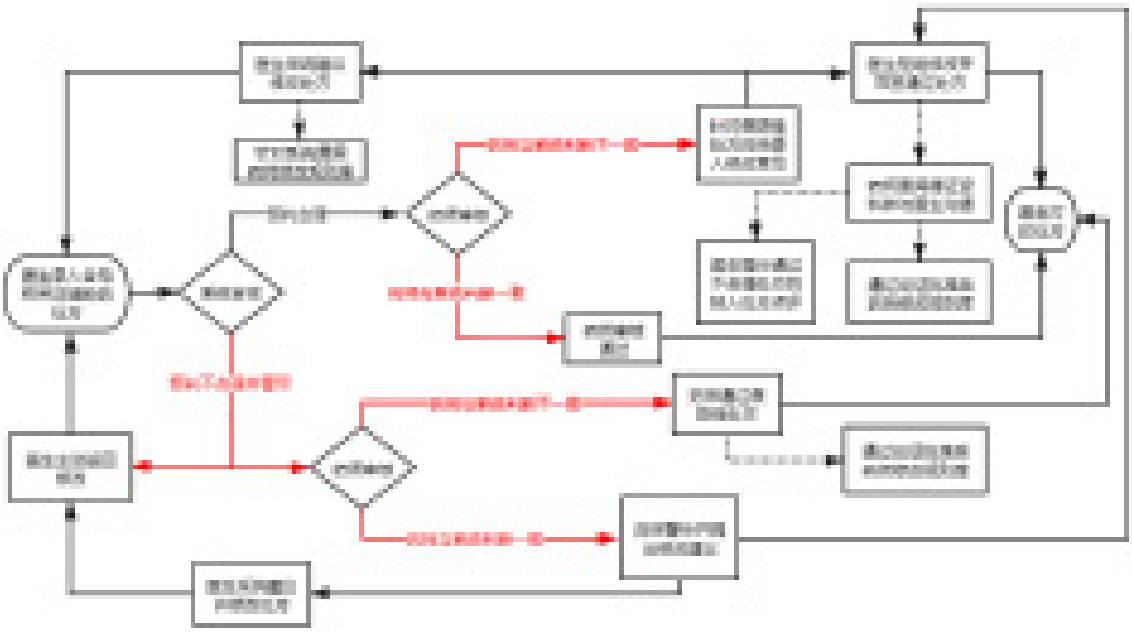


图 1 门急诊辅助药处方前置审核流程

Fig 1 Procedure of pre-prescription review of adjuvant drugs in the outpatient and emergency departments

1.5 完善系统审核规则

源于商业或自主设计的处方前置审核软件均可通过系统知识库中的药品规则与即时处方进行比对实现智能化判断 [6]。完善与更新系统规则有助于构建适合医疗机构个性化的审核方法，降低假阳性与假阴性率 [7]。药师可透过与临床的互动及反馈，搜集相关意见及建议，做好干预小结，促进规则完善。在该项研究中，由于将相关辅助用药设置了重点关注，无论系统是否自动通过，医师处方协同系统判定结果均可传输至药师处进行人工审核，因此，在审核过程中，药学人员可根据系统与人工审核结果的比对，查漏补缺，实现规则库的维护，在系统层面上规避“漏审”与“错审”。

1.6 分析方法

记录并分析审核中拦截的辅助药不合理处方。计算每月处方不合理率（%）＝系统及人工拦截的辅助药不合理处方数 / 当月辅助药处方总数 ×100%，在审核过程中，比较首末月辅助药临床使用改善效果，计算各辅助用药处方合格率及有效干预率（%）＝干预后医师修改辅助药处方数 / 审核干预辅助药处方总数 ×100%。

2　结果

2.1　辅助用药干预基本情况

在 12 个月中，人机结合审核辅助药物处方 18 757 份，合理率为 95.17%。在前置审核过程中，系统审核后医师主动返回修改处方比例为 24.50%，药师进行人工审核后医师修改处方比例为 66.89%，有效干预率高达 91.39%。采用系统＋药师对门急诊辅助药处方进行双重审核后，处方不合理率由首个干预月（2019 年 12 月）的 8.67% 下降至干预末月（2020 年 11 月）的 1.69%，下降幅度较显著，见图 2。

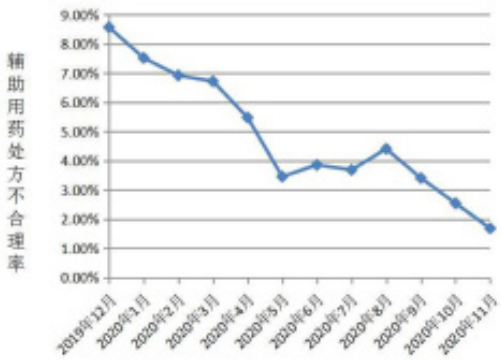


图 2　前置审核中门急诊辅助用药各月处方不合理率变化

Fig 2　Percentage change of pre-audit irrational adjuvant drug prescriptions in the department of outpatient and emergency per month

2.2　辅助用药合理率分析

辅助用药前置审核中，各类药物被干预的主要原因为适应证不适宜，体现为临床诊断与用药不相符，使用指征不明确。丹参川芎嗪注射液存在主要问题为重复用药，体现为功能相似的中成药注射液联用。前列地尔注射液主要问题为遴选药物不适宜，体现为未考虑患者已有疾病，触犯禁忌证用药。其余问题包括用法用量不适宜，体现为注射液浓度及给药方式与剂量不合理等。各辅助药处方合理率及存在问题见表 1，典型前置审核干预实例见表 2。

表 1　各辅助药处方合理率及存在问题类型

Tab 1　Rational rate of adjuvant drugs and main problems

品种	处方合理率 /%	被干预主要问题	被干预次要问题
奥拉西坦胶囊	95.98	适应证不适宜（85.71%）	重复用药（7.69%）
奥拉西坦注射液	99.26	适应证不适宜（60.00%）	重复用药（23.33%）
前列地尔注射液	91.55	遴选药物不适宜（45.83%）	适应证不适宜（33.33%）
丹参川芎嗪注射液	95.80	重复用药（64.29%）	用法用量不适宜（14.29%）
依达拉奉注射液	97.10	适应证不适宜（61.29%）	重复用药（35.48%）
注射用长春西汀	90.20	适应证不适宜（80.00%）	用法用量不适宜（16.67%）
注射用鼠神经生长因子	96.43	适应证不适宜（96.00%）	用法用量不适宜（4.00%）
注射用胸腺五肽	99.66	适应证不适宜（45.45%）	用法用量（18.18%）
转化糖电解质注射液	99.27	适应证不适宜（87.72%）	遴选药物不适宜（8.77%）

表 2　门急诊辅助用药处方前置审核干预实例

Tab 2　Examples of pre-intervened adjuvant drug prescriptions in the outpatient and emergency departments

药物	临床诊断	干预原因	医师处置
奥拉西坦胶囊	焦虑症	诊断与用药不符	提请药师审核后，医师增加血管性痴呆的诊断
	阿尔茨海默病	每次用量超常用量；本品胶囊剂型规格为 400 mg，医师开具 1.2 g po tid；超过推荐用量：800 mg，2 ～ 3 次 • d^{-1}	系统审核提示后，医师返回修改单次用量
奥拉西坦注射液	脑血管意外伴意识障碍	给药方式不适宜；医师开具该药用法为静脉注射，说明书未推荐此种给药方式	系统审核提示后，医师返回修改给药方式为静脉滴注
	尿毒症、脑卒中伴认知障碍	禁忌证用药；本品禁用于重度肾功能损害患者	提请药师审核后，医师更改药物为胞磷胆碱钠片
前列地尔注射液	结缔组织病	诊断与用药不符	提请药师审核后，医师增加系统硬化症，雷诺现象诊断
	急性下肢动脉栓塞	用法用量不适宜；本品规格为 10 μg，医师开具 20 μg ivgtt bid；超过推荐用量：5 ～ 10 μg qd	系统审核提示后，医师返回修改用量为 10 μg qd ivgtt

续表 2

药物	临床诊断	干预原因	医师处置
丹参川芎嗪注射液	冠心病	重复用药；医师同时开具丹参川芎嗪注射液、丹红注射液，此类药物均为治疗血栓性疾病的药物，主药均为丹参成分，处方中仅推荐使用 1 种	提请药师审核后，医师删除丹红注射液
	腔隙性脑梗死	用法用量不适宜；医师开具 20 mL qd ivgtt，超过推荐量：成人每次 5 ～ 10 mL	提请药师审核后，医师修改用量为 10 mL qd ivgtt
依达拉奉注射液	颅内多发缺血灶	超疗程用药；医师开具 30 mg ivgtt bid，共 40 支；超过脑梗缺血用药疗程：14 d 内	提交药师审核后，医师修改药物总量为 14 d 用药
	急性脑梗死	配伍禁忌；医师开具 30 mg ivgtt bid，溶媒为 5% 葡萄糖注射液 100 mL；不推荐该药与 5% 葡萄糖注射液在大输液中配伍，可使依达拉奉浓度降低	系统审核提示后，医师返回修改溶媒为 0.9% 氯化钠注射液
注射用长春西汀	眩晕	诊断与用药不符	提请药师审核后，医师增加脑出血诊断
注射用鼠神经生长因子	青光眼	诊断与用药不符	提请药师审核后，医师增加脑神经萎缩诊断
注射用胸腺五肽	慢性乙型肝炎	给药方式不适宜；医师开具 1 mg ivgtt qd。推荐为肌内或皮下注射给药：1 mg/ 次，1 ～ 2 次 • d^{-1}	系统审核提示后，医师返回修改为肌内注射
	肺部恶性肿瘤	重复用药；医师同时开具注射用胸腺五肽与注射用胸腺法新；两者功能相似，均有提高免疫应答作用	提请药师审核后，医师删除注射用胸腺法新
转化糖电解质注射液	高尿酸血症、纳差	禁忌证用药；本品禁用于遗传性果糖不耐受、高尿酸血症或痛风患者	系统审核提示后，医师返回删除该药物
	电解质紊乱	给药方式不适宜；医师开具 500 mL，肌内注射，st。本品用于静脉滴注，250 ～ 1000 mL/ 次	系统审核提示后，医师返回修改为静脉滴注

2.3 系统规则维护与更进

药师在审核过程中发现的部分假阳性处方提示问题及系统漏洞，可通过启用规则的自主维护功能完善。在说明书范围内或经 FDA 获批的用药规则，经讨论后可由处方审核小组修改。例如，前列地尔注射液被批准用于勃起功能障碍的辅助治疗；依达拉奉注射液被批准用于肌萎缩侧索硬化辅助治疗且疗程可达 28 d。在规则库中可将前列地尔注射液与勃起功能障碍匹配，后者亦然。注射用长春西汀，用于糖尿病患者，系统提示："本品含山梨醇，会引起血糖不稳，使用时注意监测血糖水平"。系统误将注射用长春西汀粉针剂与长春西汀注射液辅料成分混淆，此种提示可由审方药师进行规则修订。对于超说明书药物使用，需上报并经医院药事管理与药物治疗学委员会通过后方能修改。基于医药互动沟通与循证结果查询的动态循环，药师积极更新规则，完善信息化处方前置审核系统知识库。

3 讨论

辅助用药的界定与定义尚未明确。笔者认为，这类药物于医疗机构中使用，应当有助于患者疾病及功能紊乱的防治 [8]，预防或缓解相关主药的毒副作用或通过影响主药代谢途径、作用机制，提高其生物利用度以增强功效，在肿瘤放化疗、保肝降酶、活血通络、滋养神经、免疫调节、术后修复等方面有协同治疗作用。在处方前置审核中，判断辅助药的应用是否合理应基于"安全、有效、经济、适当"的原则 [9]。

3.1 辅助药审核切入点分析

辅助药审核可从以下几方面思考：（1）药物使用有无相应适应证。例如诊断为视物模糊，医师开具注射用鼠神经生长因子，被判断为诊断与用药不相符，经审核后，医师将诊断修改为左侧外展神经损伤，符合该药物对应适应证范围。（2）是否存在超说明书使用情况。例如奥拉西坦用于一氧化碳中毒。说明书未记载，但依据指南及随机对照试验结果 [10-11]，奥拉西坦为拟胆碱能促智药，对恢复神经细胞功能有积极作用，可用于一氧化碳中毒急性期辅助治疗。（3）给药方式是否适宜。例如医师开处方时误将静脉滴注录入为静脉注射；一些药物特殊用法需注意，前列地尔注射液用于Ⅲ、Ⅳ期慢性动脉闭塞症，可由输液泵进行动脉滴注。（4）频次剂量是否合理。例如在处方录入时，奥拉西坦注射液用量"4 g qd"误录为"4 g tid"；极少数医师以加大用药量或频次的方式，满足慢性病患者"少就医，多开药"的要求，此举风险大且不合规，属于硬性拦截范围。（5）是否超疗程用药。例如奥拉西坦注射液疗程

不应超过 3 周；依达拉奉注射液对于不同适应证疗程也不同，用于改善脑梗死后遗神经症状使用不宜超过 14 d；注射用胸腺五肽连续使用不宜超过 30 d。（6）有无用药禁忌。例如具有免疫双向调节功能的药物不宜用于需要免疫抑制治疗的人群，包括器官移植初期的患者。（7）特殊人群用药限制。例如具有活血化瘀功效，用于闭塞血管疾病的辅助药不宜用于妊娠期妇女及有极大出血倾向的患者；儿童用药需综合考虑循证的安全性及有效性。（8）溶媒适当与否。例如依达拉奉注射液，为维持稳态血药浓度及脑脊液中有效药物浓度，需在较短时间内（30 min）滴注完毕，因此溶媒量需控制。前列地尔注射液的配伍溶媒量不宜过多，以免脂微球结构遭到破坏，影响其分布到受损血管部位的靶向特性。（9）液体药物浓度适宜与否。例如丹参川芎嗪注射液配伍浓度不应高于 4%；奥拉西坦注射液宜溶于不低于 100 mL 的溶媒中。（10）是否重复用药。需注意两种或多种所含成分相似或为同一种物质的药品联用，特别是含君药成分相同的中成药注射剂联用。（11）联用药物是否有不良相互作用；例如前列地尔注射液与抗凝药或血小板聚集抑制药合用，可增加患者的出血倾向；依达拉奉注射液与具有肾毒性抗菌药物如一代头孢合用，导致肾毒性增加。（12）同一静脉通道内能否混合滴注。例如依达拉奉注射液不宜与高能量输液、氨基酸溶液同一通道输注。中成药注射液由于成分辅料较为复杂，不宜与其他药物在同一通道混合输注 [12]。

3.2　处方前置审核对某院辅助用药的规范作用

前置审核、临床决策支持系统用于抗菌药物、急诊儿科等临床领域，可减少处方医嘱不合理率，是规范医师开嘱行为的有效方式 [13-14]。国内医疗机构可通过行政手段与技术手段相结合，例如削减辅助药采购量合并处方医嘱前置审核、处方点评及辅助用药培训等措施来遏制该类药物的不合理应用，笔者通过 12 个月的处方前置审核持续考察，门急诊辅助药物处方不合理率下降幅度为 80.51%[15]。随着信息化审核模式的推进及规则漏洞动态修补，系统假阳性问题有所改善，辅助药处方质量得到提升。从本研究结果看，被干预处方中的 24.50% 由系统提示后医师主动返回修改。该类问题主要涉及电子化医嘱系统（CPOE）相关性错误，有研究表明这类差错发生率为 6.1% ～ 77.7%[16]，包括用法用量录入差错、剂量单位选择差错、品规选择差错、溶媒体积选择差错、患者信息抓取不全导致的药物使用禁忌等。这些问题一旦被系统警示，医师会立即意识到此类客观差错而选择第一时间更正用药信息。该研究中，系统提示后医师选择提交药师审核的处方比例为 75.5%，医师采纳药师审核建议后的处方修改率为 66.89%，其中大多为提示“诊断与用药不符”者，提交人工审核后，医师可就患者个体化用药问题与药师线上交流。医师双签通过，拒绝修改的处方，部分是有相应指南或专家共识推荐的非说明书记载用药，例如鼠神经生长因子用于婴幼儿脑损伤的神经修复，属Ⅱ类推荐，可通过加强与临床沟通，了解医师诉求并更新系统规则后改善，同时药师也应与时俱进，研读专科指南；部分是临床经验性用药，已形成固有习惯的不合理用药情况的纠正，往往不能立竿见影，需要加大审核力度并循序渐进地改善，例如脑部外科手术滥用依达拉奉；部分是由于患者检验指标缺失而被拦截者，药师未知则难免过度干预及错误干预，例如前列地尔禁用于严重心功能不全患者，系统对于分级指标、射血分数的描述缺失，会影响审核药师对禁忌情况的判断，此类问题的解决需医疗机构信息部门协助，并督促门诊病历逐步完善，该类问题是审核中的难点亦是系统功能改进的重点，此外，审方药师需要提升自身专业知识水准、循证工具应用能力及综合审核技术，以契合临床需求。

3.3　信息化辅助用药前置审核中的不足与思考

3.3.1　假阳性、假阴性问题干扰审核　该类情况的产生与系统对问题处方识别的灵敏度与准确度相关。警报阈值低则系统灵敏度高，假阳性问题增多；规则库完善度高，系统准确度则高，假阴性问题减少。有研究表明，医师对于系统警报建议的接受与否是一个复杂的利益权衡过程，灵敏度高而警示级别低的提示，譬如药物相互作用类常被医师视为证据级别不足继而进行综合思考，若患者治疗方案利大于弊，医师则会忽略警报，产生假阳性 [17]。因此，在警报阈值的设定中，应根据医疗机构具体用药情况、医师开方习惯及审核条目设置不同的警示级别。用药剂量、给药方式、液体浓度、配伍禁忌等电子医嘱系统录入相关性错误警报阈值可适度调低，而容易产生假阳性问题的临床诊断、药物相互作用等可将警报阈值略微调高。系统预警后人工“二重审核”是解决假阳性提示的有效途径 [18]。假阴性漏洞越多，则患者药物使用安全隐患越大。可通过设置重点关注药品，报警与否都反馈至人工处

进行前置审核，结合系统建议综合判断，适用于处方量不大的辅助用药审核；也可在前置审核及回顾性处方点评当中找问题，不断更进系统规则，运用质量控制工具，定期开展 PDCA 循环，逐步完善系统用药知识库。

3.3.2 患者及处方信息采集不全 门急诊患者检验指标、历史用药、生理病理基本参数等信息若不能在处方前置审核时被药师全面参考，则会影响人工判断，产生“误审漏审”“警报疲劳”；处方规范性问题无法全面识别，例如医师签章留样、门急诊及儿科处方颜色，则对处方合法性的审核造成影响。加强审核软件的信息链接及细节识别功能，与生化指标、基本参数等数据库接壤且强化信息安全，保障患者隐私是解决该问题的有效途径。审核药师也可就患者未知的关键指标与处方医师进行在线沟通交流。

3.3.3 辅助药使用时效性问题易被忽略 部分药物使用时效需纳入考虑，例如神经营养修复类药物需要强调受损早期的作用，需在 3 ～ 6 h 保护窗内使用，以防不可逆神经病变。转化糖电解质等静脉途径补液类药物，若患者术后 12 ～ 24 h 恢复进食，则无需长时间使用。针对此类药物，审方药师需加强医护沟通并做好临床用药宣传指导工作。

总而言之，采用处方前置审核系统与人工判断相结合的干预方式，在促进门急诊辅助药合理规范使用当中发挥了积极作用，部分规避了因处方错误带给患者的用药风险。在今后辅助药审核的探索当中，药师应合理运用审核系统，而不依赖智能工具[19]，强化自身专业技能，加强监测力度，围绕“该不该用”“该怎么用”“该用多久”的问题，并结合药物自身特点及相关政策法规，制订统一审核标准，保证辅助药的审核更加高效、精准地开展。

参考文献

[1] Splawski J，Minger H. Value of the pharmacist in the medication reconciliation process [J]. PT，2016，41（3）：176-178.

[2] 韩爽，钟敏涛，李锦，等 . 我国辅助用药应用现状及管理对策初探 [J]. 中国药学杂志，2016，51（8）：678-682.

[3] 国家卫生健康委员会医政医管局 . 关于印发第一批国家重点监控合理用药药品目录（化药及生物制品）的通知 [EB/OL].（2019-06-11）[2019-07-01]. http：//www. nhc. gov. cn/yzygj/s7659/201907/d356ce8a4ba1461ca66c544724dffc5e.shtm.

[4] 谢珊珊，刘松，万瑾瑾，等 . 药师借助合理用药软件开展门急诊处方前置审核的实践及效果 [J]. 中国药房，2021，32（7）：876-880.

[5] 国家卫生健康委员会 . 关于印发《医疗机构处方审核规范》的通知 [EB/OL].（2018-07-10）[2019-11-30]. http：//www. nhc. gov. cn/yzygj/s7659/201807/de5c7c9116b547af819f825b5374117. shtm.

[6] 林文强，林琦，张金，等 . 医院自主的门诊处方审核干预系统的建立 [J]. 中国医院药学杂志，2016，36（11）：943-946.

[7] 廖丽娜，李鑫，黄菲，等 . 处方前置审核系统在保障患者用药安全中的作用 [J]. 中国医院管理，2018，38（10）：23-25.

[8] 钟敏涛，韩爽，张璐，等 . 基于德尔菲法专家调研的我国医疗机构辅助用药研究 [J]. 中国医院药学杂志，2016，36（19）：1621-1624.

[9] 孙道开 . 医院辅助治疗用药的管理模式探讨 [J]. 医药导报，2014，33（1）：128-129.

[10] 沙月红，胡书群，燕宪亮，等 . 奥拉西坦联合地塞米松对急性重度一氧化碳中毒患者的疗效观察 [J]. 中国中西医结合急救杂志，2017，24（4）：405-408.

[11] 才立云，王克宇，郭佳 . 奥拉西坦联合胞磷胆碱治疗急性一氧化碳中毒患者的临床研究 [J]. 中国临床药理学杂志，2020，36（10）：1224-1227.

[12] 徐媛，徐蔚蔚，李扬 . 辅助用药临床应用情况分析 [J]. 中国医院药学杂志，2017，37（1）：73-75.

[13] Holstiege J，Mathes T，Pieper D. Effects of computer-aided clinical decision support systems in improving antibiotic prescribing by primary care providers：a systematic review [J]. J Am Med Inform Assoc，2015，22（1）：236-242.

[14] Sethuraman U，Kannikeswaran N，Murray KP，et al. Prescription errors before and after introduction of electronic medication alert system in a pediatric emergency department [J]. Acad Emerg Med，2015，22（6）：714-719.

[15] 唐哲，西娜 . 某院辅助用药合理管控的探索与实践 [J]. 中国药房，2016，27（31）：4395-4399.

[16] Korb-Savoldelli V，Boussadi A，Durieux P，et al. Prevalence of computerized physician order entry systems-related medication prescription errors：a systematic review [J]. Int J Med Inform，2018，111（3）：112-122.

[17] Horsky J，Aarts J，Verheul L，et al. Clinical reasoning in the context of active decision support during medication prescribing [J]. Int J Med Inform，2017，97（1）：1-11.

[18] 楼江，王刚，李晴宇，等 . 系统审核与人工审核相结合的处方前置审核模式对临床合理用药的影响 [J]. 医药导报，2020，39（9）：1199-1202.

[19] 武明芬，史卫忠，赵志刚 . 国内处方前置审核系统的比较 [J]. 中南药学，2019，17（9）：1547-1552.

（收稿日期：2021-09-09；修回日期：2021-10-06）

受试者用药依从性影响因素及药学干预效果分析

钟绍金[1, 2]，陈晓亮[1]，邱英麒[1]，王思琴[1]，李馥伶[1]（1. 中南大学湘雅医学院附属海口医院药学部，海口 570208；2. 上海市第六人民医院——海口市骨科与糖尿病医院药学部，海口　570000）

摘要：目的　探讨受试者用药依从性影响因素及药学干预效果分析。**方法**　选取 2016 年 7 月至 2019 年 12 月在本院参与临床试验并成功入组的受试者 104 例，作为观察组，再从未进行药学干预的受试者中随机抽取 80 例，作为对照组。收集所有病例的性别、年龄、体质量指数、所在区域、文化程度、伴随疾病、用药方式、受试者类型及用药方案复杂程度等基本信息。通过单因素分析受试者依从性的影响因素，并通过 Logistic 回归筛选出关键影响因素。综合受试者依从性、不良事件发生情况和受试者对药学服务的满意度评估药学干预效果。**结果**　单因素分析结果显示，年龄、所在区域、文化程度、用药方式、受试者类型、用药方案复杂程度、药学干预及发生不良事件均对受试者用药依从性具有显著影响（$P < 0.05$）。Logistic 回归分析可知，年龄（$OR = 4.442$，95%CI 1.172 ～ 16.831）、文化程度（$OR = 3.749$，95%CI 1.127 ～ 12.470）、受试者类型（$OR = 3.894$，95%CI 1.155 ～ 13.124）、用药方案复杂程度（$OR = 4.206$，95%CI 1.117 ～ 15.842）及药学干预（$OR = 4.756$，95%CI 1.838 ～ 12.304）是影响受试者用药依从性的独立危险因素。观察组依从性好的受试者比例较对照组高（82.69% *vs* 66.25%，$P = 0.01$），其受试者满意度也较对照组明显提升（99.04% *vs* 77.50%，$P < 0.001$），而其不良事件发生率显著低于对照组（30.77% *vs* 47.50%，$P = 0.02$）。**结论**　高龄、文化水平偏低、门诊患者、用药方案复杂及药学干预均是影响受试者用药依从性的关键因素；药学干预模式可提升受试者用药依从性及满意度，减少其不良事件发生，值得在临床研究中推广应用。

关键词：临床研究；用药依从性；影响因素；药学干预

中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0945-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.036

用药依从性问题一直是医疗领域的重点话题，从多个方面影响患者预后及生命安全[1]。药物临床试验是系列试验的统称，旨在考察药物治疗效果及安全性[2]，而临床试验本身源于临床，大多以患者为研究对象，且其药物疗效及安全性多不确定，受试者的用药依从性问题亟待解决[3]。药师是经过系统药学知识学习并具备药学专业知识的技术人员，多项研究证明，药师的参与可显著改善患者用药依从性，提升患者治疗效果并减少用药安全性问题[4-5]。尽管药师在药物临床研究的药物管理、GCP 培训、方案设计等多方面作用已得到证明，但鲜见其改善受试者用药依从性的相关报道[6]。故本研究以本院药物临床试验项目中的受试者为研究对象，初步分析影响其用药依从性的因素，并探讨药学干预后的药物管理新型模式对临床试验的影响。

1　对象与方法

1.1　研究对象

选取 2016 年 7 月至 2019 年 12 月参与本院临床试验并成功入组的受试者 104 例，作为观察组，包括男性受试者 65 例和女性受试者 39 例，年龄 25 ～ 72 周岁；再从 2016 年 6 月前（未进行药学干预）的受试者中选取 80 例，作为对照组，包括男性受试者 49 例和女性受试者 31 例，年龄 24 ～ 70 周岁。入选标准：① 受试者资料完整；② 符合相应研究方案要求，签署知情同意书并成功入组。排除标准：① 符合项目排除标准相关要求；② 缺失随访记录。

1.2　方法

1.2.1　数据收集　包括所有入选受试者的性别、年龄、体质量指数（BMI）、所在区域（城市 / 农村）、文化程度、伴随疾病、用药方式（无创 / 有创）、受试者类型（门诊 / 住院）等基本信息。

1.2.2　用药方案复杂程度评估　参考 Johnson 等[7]制订的药物方案复杂性指数（MRCI）条目设定用药方案评估标准，符合以下一项则认为用

基金项目：海南省卫生健康行业科研项目（No.20A200147）。

作者简介：钟绍金，男，硕士，副主任中药师，主要从事药物临床研究，email：439238735@qq.com

药方案复杂：① 注射给药或需借助辅助装置给药；② 用药种类超过 2 种；③ 用药频率每日超过 2 次；④ 用药操作复杂，如需要多次培训才能掌握，或需要他人帮助或返院才能完成用药等。

1.2.3 药学干预方法 观察组从药物管理、领药和发药、用药过程及用药后依从性评估，全程都有临床药师参与其中，当出现用药依从性问题时，详细记录其问题情况及原因，评估是否有必要再次启动针对性干预程序；而对照组未设专人管理药物，药师仅以发药为主，全程无具体干预措施，详见表 1。

表 1 两组病例干预措施

组别	药物管理	领药凭证	发药	用药过程	用药访视
观察组	专职药师管理；提前解读研究方案，启动会时对研究人员进行用药培训；跟申办方沟通，药物标签醒目，早晚用药分不同颜色	药师根据药品说明书，制订详细的领药凭证，内容包括用药方法、注意事项、访视日程等	药师送药给受试者或管理住院患者的研究护士；根据方案及领药凭证，当面培训每一例受试者或家属，请其当面复述用药方法并签字确认	确保每个受试者发放用药日记卡和温馨提示卡，嘱其按要求用药；增加电话访视，密切掌握其用药情况	每次访视时详细清点剩余试验用药品，发现漏服、错服、丢失、未按规定带回剩余药物及其包装、超窗访视等问题，及时干预后再发药
对照组	无专人管理，无具体干预措施	普通处方	简单的用药交代	遵照研究方案，药师无干预措施	简单清点后发药，无详细记录，药师不进行干预

1.2.4 用药依从性评估[8] 参照 Morisky 用药依从性评价量表 8 条目（MMAS-8）进行改进，以适用于受试者用药依从性评估，包括：① 自愿并按方案要求的剂量和疗程用药；② 用法用量适宜；③ 无漏服、错服、丢失等情况；④ 按要求访视并带回剩余试验用药等，见表 2。

评价方法：首先，根据受试者的回答及实际药物统计情况进行计分，所有条目答案均设计为是（0 分）、否（1 分），根据评分总和评价受试者用药依从性，分值越高，评分低于 6 分判定为依从性差，评分≥ 6 分则判定为为依从性好。

表 2 改进版 MMAS-8

序号	条目内容	评分	
		是	否
1	您遵守现在的治疗方案有困难吗？	0	1
2	您记住所有试验药物的用法用量有困难吗？	0	1
3	距上次访视期间，您是否忘记过服用药物？	0	1
4	距上次访视期间，您是否因其他原因漏服药物？	0	1
5	感觉病情加重时，您是否在未告知研究者的情况下自行停用或减少服药？	0	1
6	距上次访视期间，您是否丢失过药物？	0	1
7	本次随访，您是否忘记带回剩余试验药物？	0	1
8	感觉病情得到控制时，您是否会自行停止服药？	0	1

1.2.5 发生不良事件情况 按照对应临床研究方案记录不良事件发生情况，并计算不良事件发生率（发生不良事件例数 / 总病例数 ×100%）。

1.2.6 受试者满意度评估[9] 受试者最后一次访视结束后，采用本院自制调查表进行满意度评价，内容涵盖领药流程、持续时间、指导用药及服务态度等多个方面，共计 20 题，每题均以 0 ～ 5 分计分，总分 100 分，评分越高代表受试者越满意。分为 3 个级别：非常满意（≥ 80 分）、满意（≥ 60 分且＜ 80 分）及不满意（＜ 60 分），受试者满意度为 60 分及以上所占比例。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 25.0 软件进行分析，计量资料以（均数 ± 标准差）方式表示，采用 t 检验进行组间对比；计数资料以 n（%）表示，经卡方（χ^2）检验分析；以 Logistic 回归筛选影响受试者用药依从性关键影响因素。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组受试者基本情况

两组受试者性别、年龄、BMI 值、所在区域、文化程度、伴随疾病及受试者类型等基本参数差异均无统计学意义（$P > 0.05$），结果见表 3。

2.2 用药依从性情况单因素比较

将所有受试者按照依从性情况分为依从性好

表 3　两组受试者基本情况

因素	观察组（104 例）	对照组（80 例）	t/χ^2	P
性别（男 / 女）	65/39	49/31	0.030	0.862
年龄 / 岁	56.32±12.34	54.68±11.66	0.915	0.361
BMI/（kg・m^{-2}）	23.21±2.05	22.81±1.82	1.377	0.170
所在区域 /[n（%）]			1.120	0.290
城市	69（66.35）	47（58.75）		
农村	35（33.65）	33（41.25）		
文化程度 /[n（%）]			0.172	0.678
高中及以上	54（51.92）	44（55.00）		
初中及以下	50（48.08）	36（45.00）		
伴随疾病 /[n（%）]			0.118	0.731
有	27（25.96）	19（23.75）		
无	77（74.04）	61（76.25）		
受试者类型 /[n（%）]			0.061	0.806
门诊患者	50（48.08）	37（46.25）		
住院患者	54（51.92）	43（53.75）		
依从性情况 /[n（%）]			6.617	0.010
好	86（82.69）	53（66.25）		
差	18（17.31）	27（33.75）		

和依从性差两类，并通过单因素分析进行比较。结果发现年龄、所在区域、文化程度、用药方式、受试者类型、用药方案复杂程度、药学干预及发生不良事件均对受试者用药依从性具有显著影响（$P < 0.05$）。结果见表 4。

2.3　Logistic 回归分析

以受试者用药情况（依从性好＝1，依从性差＝0）为因变量进行 Logistic 回归分析，自变量为上述分析中具有明显差异的变量，其赋值见表 5。结果年龄、文化程度、受试者类型、用药方案复杂及药学干预是影响受试者用药依从性的独立危险因素（见表 6）。

2.4　药学干预效果比较

观察组的依从性好受试者比例较对照组高（82.69% *vs* 66.25%，$P = 0.01$），其受试者满意度也较对照组明显提升（99.04% *vs* 77.50%，$P < 0.001$），而其不良事件发生率显著低于对照组（30.77% *vs* 47.50%，$P = 0.02$）。

3　讨论

调查称，受试者依从性降低 20% 可能导致样本量增加超过 50%，极大地增加申办方的经济成本，因此，作为受试者依从性的关键部分，用药依从性研究具有重要意义[6，10-11]。受试者用药依从性的影响因素涉及多个层面[12]，本研究发现，年龄、所在区域、文化程度等多项因素均会影响受试者用药依从性。年龄较高者往往并发疾病较多，用药相对复杂，容易忘记用药；长期居住农

表 4　用药依从性情况单因素比较

因素	依从性好（139 例）	依从性差（45 例）	χ^2	P
性别 /[n（%）]			2.118	0.146
男	82（58.99）	32（71.11）		
女	57（41.01）	13（28.89）		
年龄 /[n（%）]			7.080	0.008
≥ 60 岁	52（37.41）	27（60.00）		
＜ 60 岁	87（62.59）	18（40.00）		
所在区域 /[n（%）]			6.857	0.009
城市	95（68.35）	21（46.67）		
农村	44（31.65）	24（53.33）		
文化程度 /[n（%）]			5.736	0.017
高中及以上	81（58.27）	17（37.78）		
初中及以下	58（41.73）	28（62.22）		
伴随疾病 /[n（%）]			0.480	0.488
有	33（23.74）	13（28.89）		
无	106（76.26）	32（71.11）		
用药方式 /[n（%）]			17.232	＜ 0.001
无创	124（89.21）	28（62.22）		
有创	15（10.79）	17（37.78）		
受试者类型 /[n（%）]			19.103	＜ 0.001
门诊患者	53（38.13）	34（75.56）		
住院患者	86（61.87）	11（24.44）		
用药方案复杂 /[n（%）]			13.157	＜ 0.001
是	47（33.81）	29（64.44）		
否	92（66.19）	16（35.56）		
药学干预 /[n（%）]			6.617	0.010
是	86（61.87）	18（40.00）		
否	53（38.13）	27（60.00）		
发生不良事件 /[n（%）]			7.750	0.005
发生	45（32.37）	25（55.56）		
未发生	94（67.63）	20（44.44）		

表 5　变量赋值

变量	赋值
年龄	＜ 60 岁＝1，≥ 60 岁＝0
所在区域	城市＝1，农村＝0
文化程度	高中及以上＝1，初中及以下＝0
用药方式	无创＝1，有创＝0
受试者类型	住院患者＝1，门诊患者＝0
用药方案复杂	否＝1，是＝0
药学干预	是＝1，否＝0
发生不良事件	未发生＝1，发生＝0

表 6　多元 Logistic 回归分析

变量	β	$S.E.$	$Wald\chi^2$	P	OR	95%CI
年龄	1.49	0.68	4.813	0.028	4.442	（1.172，16.831）
文化程度	1.32	0.61	4.645	0.031	3.749	（1.127，12.470）
受试者类型	1.36	0.62	4.809	0.028	3.894	（1.155，13.124）
用药方案复杂	1.44	0.68	4.508	0.034	4.206	（1.117，15.842）
药学干预	1.56	0.48	10.339	0.001	4.756	（1.838，12.304）

村者，信息相对滞后，对临床研究了解较少，加上地域限制，更会影响其依从性；文化水平低则易影响受试者对临床研究的认识和认可度；而用药方便是影响药品使用的关键因素，无创的口服用药服用方便，较注射用药等有创方式更易接受，但多种口服药同时使用也难免会影响其依从性；住院受试者多在医务人员管控下用药，依从性相对较高；研究过程中如经常出现不良事件，受试者从思想和身体都会产生抗拒，其依从性自然大打折扣[13]。另外，Logistic 回归分析可知，年龄超过 60 岁、初中及以下文化水平、门诊患者及用药方案复杂程度是影响受试者用药依从性的独立危险因素，提示临床研究时应综合考虑。

近年来，国家越来越重视临床研究，势必对其药物管理提出更高要求[14]。本研究将合理用药及药学服务理念融入试验药物管理，以发挥药师的专业优势，也是药师转型的重要途径[15]。结果显示，药学干预已成为本院临床研究中受试者用药依从性的关键影响因素。尽管部分工作与临床研究中临床监察员（CRC）工作重合，但其更多关注的是记录完整性，且多为非药学专业出身，对复杂用药掌握不够熟练，难以达到预想的效果。故在此基础上增加药学干预十分必要。另外，尽管不良事件难以避免，但必要的干预措施仍可减少其发生[16]。实施以来，受试者用药依从性和满意度明显提升，而不良事件发生率显著下降，提示其应用效果明显，获得了受试者的广泛认可。专业药师参与并进行充分的用药培训及宣教，能够消除受试者顾虑，每次回访时清点，发现问题后再次干预，其依从性问题明显减少；更加配合并遵从研究方案用药，不良事件自然减少；最后，药师送药可避免受试者来回奔波，当面的沟通可加深受试者印象，辅以用药温馨提示及电话跟踪随访，可明显提升其满意度。

综上，除高龄、初中及以下文化水平、门诊患者、用药方案复杂程度外，药学干预亦是影响受试者用药依从性的独立危险因素，可明显提升受试者用药依从性及满意度，减少不良事件的发生，值得临床研究中推广应用。但是，本研究样本量相对较小，未能深入考虑到政府政策及其他因素的影响，存在一定的不足，有待后续更多专业、更大样本的研究予以确证。

参考文献

[1] Anderson LJ，Nuckols TK，Coles C，et al. A systematic overview of systematic reviews evaluating medication adherence interventions [J]. Am J Health Syst Pharm，2020，77（2）：138-147.

[2] 徐永素，苏薇，曾尤超，等 . 药物临床试验中受试者服药依从性影响因素调查及护理对策 [J]. 实用临床护理学电子杂志，2018，33（3）：29-30.

[3] Pál C，Skolnick P. The Secrets of a successful clinical trial：compliance，compliance，and compliance [J]. Mol Interv，2011，11（2）：107-110.

[4] 黄敏芳，唐亚芳，张巧真，等 . 临床药师干预对反复发作的失眠症患者用药依从性和治疗效果的影响 [J]. 中国医刊，2019，54（6）：667-670.

[5] 钱华，朱雅芳，王佳良，等 . 新型药学服务模式对患者用药安全及依从性的干预效果 [J]. 中华全科医学，2019，17（7）：1218-1221.

[6] Brown JN，Britnell SR，Stivers AP，et al. Medication safety in clinical trials：Role of the pharmacist in optimizing practice，collaboration，and education to reduce errors [J]. Yale J Biol Med，2017，90（1）：125-133.

[7] George J，Phun YT，Bailey MJ，et al. Development and validation of the medication regimen complexity index [J]. Ann Pharmacother，2004，38（9）：1369-1376.

[8] 俞吉，冉烁，徐玲 . Morisky 用药依从性量表 8 条目在老年慢性病患者用药评价中的应用 [J]. 临床药物治疗杂志，2020，18（11）：68-71.

[9] 应兵红，郑宇龙，刘琼 . 舒适理论对门诊患者药学服务满意度的影响 [J]. 基层医学论坛，2020，24（25）：3674-3675.

[10] 李亚刚，韩铭，姚铭 . 浅谈开展药物临床试验的意义 [J]. 中国厂矿医学，2009，22（2）：204-205.

[11] Nakata C，Izberk-Bilgin E，Sharp L，et al. Chronic illness medication compliance：a liminal and contextual consumer journey [J]. J Acad Mark Sci，2018，47（2）：192-215.

[12] 周文菁，娄小焕，魏涵，等 . 药物临床试验受试者依从性的影响因素评估和对策研究 [J]. 药物流行病学杂志，2020，29（5）：347-351.

[13] 李立红，汪华蓉，文素琪，等 . 药物临床试验中影响受试者依从性的因素及对策 [J]. 天津药学，2015，27（1）：30-31.

[14] 韩珊颖，钟绍金，邱英麒 . GCP 药房试验药品管理模式介绍 [J]. 药学服务与研究，2018，18（3）：225-228.

[15] 王世英 . 药师药学服务对药物安全性及患者满意度的影响 [J]. 临床合理用药杂志，2019，12（12）：172-173.

[16] 杨凤，黄哲，衡建福，等 . 某肿瘤医院药物临床试验中 611 例次严重不良事件报告分析 [J]. 中南药学，2021，185（6）：1254-1258.

（收稿日期：2021-09-05；修回日期：2021-11-05）

药品不良反应

755 例质子泵抑制剂致新的和严重的药品不良反应报告分析

周秀丽[1]，刘宝生[2*]，宫凯凯[3]，纪强[1]（1. 阳光融和医院药学部，山东　潍坊　261000；2. 潍坊市中医院临床药学科，山东　潍坊　261000；3. 滨州医学院附属医院肿瘤研究实验室，山东　滨州　256603）

摘要：目的　了解山东省质子泵抑制剂致新的和严重的药品不良反应（ADR）的发生情况及特点，为临床安全合理用药提供参考。**方法**　对山东省 ADR 监测中心 2018 年 1 月—2020 年 9 月收集到的质子泵抑制剂致 ADR 的病例报告进行回顾性分析。**结果**　共收集到 3925 例质子泵抑制剂致 ADR 病例报告，新的和严重的 ADR 共 755 例（19.24%），包括严重的 ADR 359 例（9.15%），新的一般的 ADR 396 例（10.09%）。男性（50.06%）与女性（49.67%）发生率基本接近，65 岁以上老年人（40.77%）为高发人群；消化系统疾病（58.01%）为主要原患疾病，用药原因主要为胃炎（22.65%）；引发 ADR 数量最多的药物为奥美拉唑（47.15%），其次为泮托拉唑（31.52%）；发生 ADR 的主要途径是静脉给药（73.38%），ADR 多发生于用药后 25 min 内，主要累及全身损害、皮肤及其附件损害、胃肠损害，若用药疗程 7 d 以上发生肝胆、血液系统损害等罕见 ADR 的数量较多，同时也应警惕循环系统、呼吸系统损害等新的 ADR 的发生。**结论**　临床应掌握质子泵抑制剂 ADR 发生特点，加强用药监护，减少 ADR 对患者造成的损害，保障临床用药安全。

关键词：质子泵抑制剂；新的和严重的药品不良反应；合理用药
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0949-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.037

755 new and serious adverse drug reaction reports of proton pump inhibitors

ZHOU Xiu-li[1], LIU Bao-sheng[2*], GONG Kai-kai[3], JI Qiang[1] (1. *Department of Pharmacy*, *Sunshine Union Hospital*, *Weifang Shandong* 261000; 2. *Department of Clinical Pharmacy*, *Weifang Hospital of Traditional Chinese Medicine*, *Weifang Shandong* 261000; 3. *Cancer Research Institute*, *Binzhou Medical University Hospital*, *Binzhou Shandong* 256603)

Abstract: Objective To investigate the occurrence and characteristics of new and serious adverse drug reaction (ADR) reports of proton pump inhibitors (PPI) in Shandong province, and provide reference for the safety of drug use. **Methods** The case reports of PPI induced ADRs collected in Shandong ADR Monitoring Center from January 2018 to September 2020 were retrospectively analyzed. **Results** Totally 3925 PPI induced ADR were reported: 755 (19.24%) were new and severe ADR, including 359 (9.15%) severe ADR and 396 (10.09%) new general ADRs. The incidence in male (50.06%) and female (49.67%) was almost the same, and the over 65 year olds (40.77%) had the highest incidence. Digestive system diseases (58.01%) were the main primary disease, and the main reason for drug use was gastritis (22.65%). Omeprazole (47.15%) caused the most ADR, followed by pantoprazole (31.52%). Intravenous administration (73.38%) was the main way to develop ADR, and ADRs mostly occurred within 25 min after the administration. ADR mainly involved systemic damage, skin and accessory damage and gastrointestinal damage. There were many rare ADR in the

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81903537）；潍坊高新区科技惠民计划项目（No. 2021KJHM75）。
作者简介：周秀丽，女，硕士，主管药师，主要从事临床药学工作，email：xiulizhou1990@163.com　*通信作者：刘宝生，男，主管药师，硕士，主要从事药事管理与临床药学，email：1057080284@163.com

liver, gallbladder and blood when the treatment course lasted more than 7 days. Attention should be paid to the occurrence of new ADR such as in the circulatory system. **Conclusion** The occurrence characteristics and medication monitoring of PPI induced ADR should be strengthened in clinic to reduce the damage caused by ADR to patients and ensure the safety of clinical medications.

Key words: proton pump inhibitor; new and serious adverse drug reaction; rational use

质子泵抑制剂（PPIs）具有强大而持久的抑酸作用，广泛用于治疗急、慢性消化系统相关性疾病，例如胃食管反流病（GERD）、卓 - 艾综合征、消化性溃疡、上消化道出血及相关疾病、根除幽门螺杆菌（*Helicobacter pylori*，*H.pylori*）感染以及预防和治疗应激性胃黏膜病变等[1-2]，这类药物主要包括奥美拉唑、兰索拉唑、泮托拉唑、雷贝拉唑、艾司奥美拉唑以及艾普拉唑等。随着该类药物的普遍应用，逐渐显现出超适应证、超剂量、超疗程用药以及药物联合使用不当等不合理用药现象，这可能会增加患者用药的风险以及经济负担[3-4]。为了解山东省 PPIs 致 ADR 发生的情况及特点，笔者对 2018 年 1 月—2020 年 9 月山东省 ADR 监测中心收集到的 PPIs 致新的 / 严重的 ADR 病例报告进行统计和分析，为进一步促进临床安全合理使用 PPIs 提供参考。

1 资料与方法

1.1 资料来源

2018 年 1 月—2020 年 9 月山东省医疗机构、药品生产企业、经营企业、个人向山东省 ADR 监测中心自愿上报，经评估认定有效的所有 PPIs 致 ADR 病例报告，并根据《药品不良反应报告和监测管理办法》[5] 筛选出符合标准要求的新的和严重的 ADR 病例报告。

1.2 统计方法

对新的和严重的 ADR 报告进行信息提取，包括患者的性别、年龄、原患疾病、有无既往史或家族 ADR 史、ADR 的发生对原患疾病的影响及 ADR 转归情况、药品种类、给药途径、用法用量、用药原因、ADR 发生时间分布、ADR 累及的系统 / 器官及临床表现等，采用 Excel 电子表格和手工检索对数据进行回顾性分析与描述。

2 结果

2.1 ADR 基本情况

PPIs 致 ADR 共计 3925 例，其中新的和严重的 ADR 755 例（19.24%），包括严重的 288 例（7.34%），新的严重的 71 例（1.81%）以及新的一般的 396 例（10.09%）。在 755 例新的和严重的 ADR 报告中，关联性评价为可能的 362 例（47.95%），为很可能的 365 例（48.34%），为肯定的 28 例（3.71%）。上报单位中医疗机构上报 745 例（98.68%），生产企业上报 8 例（1.06%），经营企业上报 2 例（0.265%）。

2.2 患者性别、年龄基本情况

在 755 例新的和严重的 ADR 报告中，男性 378 例（50.06%），女性 375 例（49.67%），不详 2 例，男女比例为 1∶1.01。≥ 65 岁的患者 ADR 发生例次最多，其次为 45 ～ 64 岁，见表 1。

表 1 发生 ADR 患者的年龄分布

Tab 1 Age distribution of patients in ADR cases

年龄 / 岁	严重的 / 例	新的严重的 / 例	新的一般 / 例	*n*（%）
1 ～ 4	2	—	—	2（0.27%）
5 ～ 14	3	3	—	6（0.8%）
15 ～ 44	54	10	74	138（18.32%）
45 ～ 64	123	28	149	300（39.84%）
≥ 65	105	29	173	307（40.77%）
合计	287	70	396	753（100%）

2.3 患者原患疾病、既往 ADR 史、家族 ADR 史

在 755 例新的和严重的 ADR 报告中，原患疾病以消化系统疾病为主，共 438 例（58.01%）；其次为心脑血管系统，共 127 例（16.82%），见表 2。既往出现过 ADR 史患者有 31 例（4.11%），其中 14 例患者为药物过敏史，包括奥美拉唑 2 例，卡马西平 1 例、磺胺类 2 例、利伐沙班 1 例、热毒宁 1 例、丹参注射液 1 例、左氧氟沙星 1 例、头孢类 1 例、青霉素 3 例以及具体药物不详 1 例，其余 17 例未记录具体 ADR 原因；无既往 ADR 史患者 511 例（67.68%），既往 ADR 史记录不详的患者 201 例（26.62%），未记录既往 ADR 史患者 12 例（1.59%）。无家族 ADR 史患者 478 例（63.32%），家族 ADR 史记录为不详患者 263 例（34.83%），家族 ADR 史未记录患者 14 例（1.85%）。

2.4 ADR 对原患疾病的影响及 ADR 转归情况分析

在 755 例新的和严重的 ADR 报告中，ADR 的发生对原患疾病病程影响不明显的 698 例（92.45%），致使患者病程延长的 50 例（6.62%），导致患者病情加重的 7 例（0.93%）。所有患者经过停药或救治处理后，痊愈 368 例（48.74%），

表 2　患者原患疾病分布

Tab 2　Distribution of primary diseases

原患疾病	总例数	占比 /%
消化系统	438	58.01
心脑血管系统	127	16.82
肿瘤	84	11.13
呼吸系统	71	9.40
骨骼运动系统	44	5.83
泌尿生殖系统	27	3.58
内分泌系统	22	2.91
风湿免疫系统	7	0.93
其他	45	5.96

注（Note）：其中 96 例有 2 种以上原患疾病（96 cases of them had more than 2 primary diseases）。

病情好转 373 例（49.40%），病情未好转 4 例（0.53%），转归不详 10 例（1.32%）。

2.5　可疑药品的品种及给药途径

ADR 涉及的可疑药品主要包括 6 种 PPIs，剂型为注射剂型和口服剂型。其中奥美拉唑引起的新的和严重的 ADR 数量最多（47.15%），其次为泮托拉唑（31.52%）。静脉给药是引发 ADR 的主要给药途径，静脉滴注共 554 例（73.38%），其次为口服给药 123 例（16.29%），见表 3。

表 3　ADR 涉及的药品品种及给药途径

Tab 3　Drug types and administration routes involved in ADRs

药名	总数 / 例	占比 /%	给药途径	数量 / 例
奥美拉唑	356	47.15	口服	70
			鼻饲	1
			静脉滴注	284
			静脉注射	1
泮托拉唑	238	31.52	口服	13
			静脉滴注	225
兰索拉唑	81	10.74	口服	9
			静脉滴注	72
雷贝拉唑	46	6.09	口服	27
			鼻饲	1
			静脉滴注	18
艾司奥美拉唑	33	4.37	口服	4
			静脉滴注	27
			泵内注射	2
艾普拉唑	1	0.13	静脉滴注	1

2.6　质子泵抑制剂用药原因

在 755 例 ADR 报告中，用药原因排名前五的有胃炎（包括急、慢性胃炎）、胃酸分泌过多、保护胃黏膜、预防应激性溃疡以及消化性溃疡，此外，其他用药原因的占比（14.05%）也较大，见表 4。

2.7　质子泵抑制剂的用量分布

在 PPIs 用量分布中，奥美拉唑、泮托拉唑以及艾司奥美拉唑用量为 40 mg qd 所致的 ADR 数量最多，分别为 198 例、120 例及 14 例。兰索拉唑所致 ADR 数量最多的用量为 30 mg qd，共涉及 48 例。雷贝拉唑致 ADR 数量最多的为 20 mg qd，共涉及 27 例，见表 5。

表 4　质子泵抑制剂用药原因

Tab 4　Reasons for medication of proton pump inhibitors

用药原因	严重的 / 例	新的严重的 / 例	新的一般的 / 例	总计 / 例	占比 /%
胃炎	64	18	89	171	22.65
胃酸分泌过多	44	12	97	153	20.26
保护胃黏膜	40	14	79	133	17.62
预防应激性溃疡	35	9	22	66	8.75
消化性溃疡	28	6	30	64	8.48
消化道出血	9	4	7	20	2.65
胃食管反流	9	1	7	17	2.25
急性胃肠炎	9	0	4	13	1.72
抗幽门螺杆菌	2	0	2	4	0.53
急性胰腺炎	2	0	0	2	0.26
急性胆囊炎	1	0	1	2	0.26
急性肠炎	1	1	0	2	0.26
NSAIDs 相关性溃疡	0	0	2	2	0.26
其他	44	6	56	106	14.05
合计	288	71	396	755	100

2.8　ADR 发生时间

从发生时间来看（除去未记录的），主要集中在 10 ～ 25 min 内，其次是 2 ～ 5 d，最短发生于 0 ～ 5 min，最长可在用药 7 d 后发生，见表 6。

2.9　ADR 累及的系统 / 器官及临床表现

在 755 例 ADR 报告中发现 PPIs 导致的 ADR 可同时累及多个系统 / 器官，其临床表现共涉及 1357 例次，主要累及全身系统损害，表现为寒战、多汗、发热、过敏性休克等；其次累及皮肤及其附件损害，表现为瘙痒、皮疹、皮肤潮红等，见表 7。

3　讨论

3.1　基本情况分析

在 755 份新的和严重的 ADR 报告中，部分 ADR 会导致患者病程延长或病情加重，对于基础疾病较多的老年患者或病情较重的患者来说，可能会增加用药风险。既往有 ADR 史的患者发生严重的 ADR 的风险较高，临床对患者既往 ADR 史和家族 ADR 史知晓率不高。针对以上问题，临床药师建议在患者用药前应详细询问患者 ADR 史，同时用药过程中应加强观察与监测，及时与患者沟通用药反应，避免发生严重的 ADR。总体来看，各年龄段均有新的和严重的 ADR 的发生，且无性别差异，65 岁以上老年人发生最多，老年人 PPIs 药动学与青年人相似，一般无需调整剂

表 5 质子泵抑制剂用量

Tab 5 Usage for proton pump inhibitors

药名	PPI 用量分布		
	严重的 ADR	新的严重的 ADR	新的一般的 ADR
奥美拉唑	10 mg qd（1）、10 mg bid（2）、20 mg qd（8）、20 mg bid（14）、40 mg qd（70）、40 mg bid（15）、40 mg tid（2）、60 mg qd（6）、60 mg bid（3）、60 mg tid（1）、80 mg qd（9）	20 mg qd（2）、20 mg bid（2）、40 mg qd（24）、40 mg bid（2）、40 mg tid（1）、60 mg qd（1）、80 mg qd（2）	10 mg qd（2）、20 mg qd（13）、20 mg bid（31）、40 mg qd（104）、40 mg bid（18）、60 mg qd（6）、60 mg bid（5）、80 mg qd（12）
泮托拉唑	10 mg qd（1）、20 mg qd（1）、20 mg bid（1）、24 mg qd（1）、40 mg qd（49）、40 mg bid（8）、42.3 mg qd（2）、60 mg qd（8）、60 mg bid（1）、80 mg qd（16）、80 mg bid（3）、120 mg qd（1）	40 mg qd（13）、40 mg bid（4）、60 mg qd（2）、60 mg bid（1）、80 mg qd（5）	30 mg qd（1）、40 mg qd（58）、40 mg bid（17）、40 mg tid（1）、42.3 mg qd（3）、42.3 mg bid（2）、60 mg qd（12）、60 mg bid（1）、80 mg qd（24）、80 mg bid（1）、84.6 mg qd（1）
兰索拉唑	15 mg qd（1）、30 mg qd（14）、30 mg bid（17）、60 mg qd（1）	30 mg qd（5）、30 mg bid（1）	20 mg bid（1）、30 mg qd（29）、30 mg bid（12）
雷贝拉唑	10 mg qd（3）、20 mg qd（10）、20 mg bid（5）、20 mg tid（2）	20 mg qd（2）	10 mg qd（7）、10 mg bid（2）、20 mg qd（15）
艾司奥美拉唑	20 mg qd（4）、20 mg bid（2）、40 mg qd（5）、40 mg bid（1）	20 mg qd（2）、40 mg qd（1）、40 mg qid（1）	20 mg bid（2）、40 mg qd（8）、40 mg bid（6）、40 mg tid（1）
艾普拉唑	—	—	10 mg qd（1）

表 6 ADR 发生时间与例次

Tab 6 Onset times and numbers of ADRs

发生时间	严重的 / 例	新的严重的 / 例	新的一般的 / 例	*n*（%）
0 ～ 5 min	7	4	6	17（2.25%）
5 ～ 10 min	32	6	27	65（8.61%）
10 ～ 15 min	34	12	61	107（14.17%）
15 ～ 25 min	48	14	68	130（17.22%）
25 ～ 35 min	25	5	33	63（8.34%）
35 ～ 60 min	8	4	12	24（3.18%）
1 ～ 2 h	9	0	11	20（2.65%）
2 ～ 12 h	15	1	10	26（3.44%）
1 ～ 2 d	17	4	34	55（7.28%）
2 ～ 5 d	46	8	52	106（14.04%）
5 ～ 7 d	14	6	14	34（4.50%）
7 d 以上	18	2	16	36（7.91%）
未记录	15	5	52	72（9.54%）

量[6-7]，但老年人生理机能逐渐出现下降且多合并其他基础疾病，较青年人易发生 ADR[8-9]，故对于老年患者应严格掌握适应证，从低剂量开始，考虑短疗程用药。此外，笔者发现有 8 例儿童患者发生严重的 ADR，值得注意的是该类药物暂未在中国获批儿童适应证，因此临床药师建议原则上儿童不使用此类药物，如需使用应向医疗机构备案超说明书用药，并在患者知情同意下使用。

3.2 ADR 与用药原因的分析

该类药物应用涉及多种疾病，以消化系统疾病为主，如急、慢性胃炎，消化性溃疡，出血等，但急、慢性胃炎并非药品说明书中明确适应证，提示超说明书用药的现象比较普遍，但对于由黏膜糜烂或酸相关症状的慢性胃炎患者，可酌情选用 PPIs[10-11]，由于报告描述有限，无法进一步判断应用是否合理。其次为心脑血管系统，如脑梗死、脑出血、高血压、冠心病等，这类疾病用药目的多为预防，指南提出当患者存在某些危险因素时或者出现化疗后上消化道等不适症状时可预防应用[2，11]，这进一步增加了该类药物超说明书用药的数量。另外，不同 PPIs 用于治疗各种酸相关性胃肠道疾病的适应证有所差异，相较其他 5 种 PPIs，奥美拉唑注射剂适应证说明书规定最广，因此应用数量最多，可能为其发生 ADR 数量最多的主要原因。笔者还发现实际用药中存在泮托拉唑、雷贝拉唑、兰索拉唑注射剂型用于预防应激性溃疡的现象，这已超出说明书适应证范围并可能增加 ADR 发生率。以上提示实际用药中存在一定盲目扩大适应证的情况，因此，临床药师建议应根据疾病的治疗目标、药物的效应及患者的意愿，选择适宜的药物，避免盲目扩大适应证，以减少 ADR 的发生。

3.3 ADR 与用法用量分析

雷贝拉唑注射剂型相较于口服剂型其适应证仅限于上消化道出血，应用范围相对较小，因此口服给药导致新的和严重的 ADR 例数多。其他类 PPIs 的两种剂型均存在 2 ～ 3 种相同适应证，对于住院患者使用静脉给药的人数较多。该类药物发生 ADR 频率较高的用量均为常规给药剂量[1-2]，这与常规用量患者基数较大有一定关系。有文献提出若患者存在难治性 GERD、非静脉曲

表 7　ADR 累及的系统 / 器官情况

Tab 7　Involved organs and systems of ADRs

累及系统 / 器官	临床表现 / 例次	例次	构成比 /%
全身系统	寒战（95）、发热（54）、多汗（30）、过敏性休克（20）、全身无力（20）、肌肉关节痛（17）、高热（16）、畏寒（14）、局部颤抖（11）、震颤（9）、全身颤抖（5）、抽搐（5）、麻木（3）、喉头水肿（3）、冷汗（2）、四肢强直（2）、局部僵硬（2）、身体不适（2）、下肢水肿（1）、下肢痉挛（2）、胸痛（1）、晕厥（1）	315	22.91
皮肤及其附件	瘙痒（105）、皮疹（87）、皮肤潮红（36）、过敏反应（16）、面色改变（12）、斑丘疹（9）、面部肿胀（9）、荨麻疹（8）、紫绀（8）、局部皮肤红肿（5）、皮肤发热（3）、静脉炎（3）、苍白（2）、嘴唇变色（2）、唇肿胀（1）、丘疹（1）	307	22.33
呼吸系统	胸闷（140）、呼吸困难（36）、憋气（41）、呼吸急促（9）、喘息（5）、气短（5）、咳嗽（5）、干咳（2）、咽喉异物感（3）、哮喘发作（1）、咽喉不适（1）、胸痛（1）	249	18.11
胃肠系统	恶心（61）、呕吐（27）、腹痛（21）、腹泻（13）、口干（13）、腹胀（12）、烧心（8）、上腹不适（8）、呃逆（6）、反酸（4）、便秘（3）、口苦（2）、打嗝（2）、嗳气（2）、口腔异味（1）、食欲不振（1）、舌痛（1）、口渴（1）	186	13.53
神经系统	头痛（34）、局部麻木（27）、烦躁（15）、头晕（20）、失眠（9）、意识模糊（6）、眩晕（4）、嗜睡（4）、舌麻木（3）、头胀（3）、味觉障碍（2）、抑郁（1）、昏迷（1）、言语不清（1）、坐立不安（1）、头部不适（1）	132	9.60
循环系统	心慌（71）、心悸（29）、血压降低（8）、心跳加剧（4）、血压升高（4）、窦性心动过速（3）、心窦性心动过缓（2）、心区不适（2）、房颤（1）	124	9.02
肝胆系统	肝功能异常（17）、转氨酶升高（10）	27	1.96
眼部系统	视物模糊（10）、视力下降（2）、干眼症（1）、眼痛（1）、飞蚊症（1）、眼睑水肿（1）	16	1.16
血液系统	白细胞减少症（6）、血红蛋白下降（1）、中性粒细胞减少（2）、骨髓抑制（1）、血小板减少（1）	11	0.80
其他	痛风（3）、锂浓度升高（1）、电解质异常（1）、声音嘶哑（1）、肾功能损害（1）、肌酐升高（1）	8	0.58

张性上消化道出血等较严重病情时，往往需加大剂量或增加给药频率[12-13]，这势必会增加 ADR 发生的风险。笔者发现超出常规剂量时发生 ADR 的例数也相对较多（237 例，占比 31.39%），因此，临床药师建议对于轻、中度疾病的患者，首选口服给药，在治疗卓 - 艾综合征等须增加给药剂量或频率的情况时，应增加对患者的用药监护，及时评估治疗效果，一旦达到治疗目标应及时改口服或逐渐停药，以避免严重 ADR 的发生。

3.4　ADR 发生时间分析

该类药物新的和严重的 ADR 主要为速发型 ADR，而用药 2 ～ 5 d 后，发生 ADR 的例次相对也较高，一方面可能是该类药物用药疗程大多在这个时间范围内；另一方面也可能在多次给药后体内药物浓度逐渐趋于稳定，当再次给药时更易诱发 ADR 的发生。因此建议临床医疗工作者持续密切观察用药反应，一旦发现严重 ADR，立即停药并采用积极措施救治患者。

3.5　ADR 的临床表现分析

PPIs 具有基本相同的作用机制，故发生 ADR 所累及的系统 / 器官基本相似[14]，全身系统损害中过敏性休克最快发生于用药 2 min 后，最晚发生于用药 4 h 后，但主要集中在用药后 30 min 内，主要涉及奥美拉唑、泮托拉唑以及雷贝拉唑，注射剂较口服剂发生迅速，因此在给药后 30 min 内应严密监测患者的用药反应，一旦发生过敏性休克，应及时停药并给予抢救。值得注意的是，奥美拉唑、泮托拉唑、雷贝拉唑以及兰索拉唑均可引起罕见的血液系统损害，且大多发生在用药后的 4 ～ 14 d，主要表现为白细胞、中性粒细胞、血小板以及血红蛋白减少，除有 1 例患者导致病情延长未好转外，其他 8 例经停药和对症治疗后均好转。对于该类药物引起白细胞以及粒细胞减少的机制目前暂无确切研究，有人认为是免疫抑制机制或者骨髓抑制机制，或者两者混合机制[15]。对于血小板减少，有研究认为 PPIs 与血小板表面糖蛋白 GPⅡb/Ⅲa、GPⅠb/Ⅸ 特异性表位结合，引起机体免疫反应，直接或间接破坏血小板、使血小板生成减少，但当药物清除后，血小板可逐渐恢复正常[16-17]。另有研究提出，由于 PPIs 抑制胃酸分泌，胃内 pH 升高，长期服用后可导致铁吸收减少，从而诱发血红蛋白合成降低[18]。近年来有关 PPIs 致肝胆损害的报道逐渐增多[19-21]，本研究中 PPIs 导致肝胆损害的有 27 例，最短的在用药 2 d 后发生，最长的在用药 29 d 后发生，有研究认为可能是由于 PPIs 经过 P450 酶代谢，与 P450 酶的基因多态性相关或可能与特异性反应相关[22]，但雷贝拉唑、泮托拉唑的代谢并不完全依赖于 P450 酶，因此可能存在其他机制，也可能与患者的特异质有关[23]。PPIs 致肝损害以肝细胞损伤型为主，其恢复时间相对较短，且一般预后良好[24]。笔者还发现部分 PPIs 还可引起患者痛风，主要为艾司奥美拉唑（2 例）和泮托拉唑（2 例）用药后 6 ～ 9 d 引起，有研究指出 PPIs 可能对肾小管 H^+/

K^+-ATP 酶产生抑制作用，致机体肾小管酸碱平衡紊乱和 / 或尿酸代谢障碍，进而导致痛风复发或加重，但具体机制仍待研究[25-26]。血液系统损害、肝胆系统损害以及痛风均为相对罕见的不良反应，虽发生率低，但严重程度较高，临床应重视，在用药过程中进行监测。

此外，笔者通过查阅药物说明书发现不良反应项下对循环系统以及呼吸系统相关 ADR 的临床表现缺少相关描述，这类不良反应通常伴发于其他不良反应的过程中，往往不易引起临床重视，因此实际应用中应加强对该类 ADR 的分辨，以便及时采取应对措施。

综上所述，临床在应用 PPIs 时存在一定超适应证、超用法用量等现象，建议临床应严格把握适应证，按照药品说明书和指南规范用药，同时对儿童患者应谨慎用药，若必须使用应做好超说明书用药备案和相关知情同意；对老年患者用药应遵循低剂量、短疗程原则，必要时加强用药监护。该类药物致血液系统损害、肝胆系统损害以及痛风等相对罕见的严重 ADR 数量较多，循环系统损害和呼吸系统损害等新的 ADR 也时有发生，因此临床药师应加强用药监护，增强与临床医师的沟通与交流，同时呼吁各生产厂家及时补充说明书中 ADR 内容，保障患者安全用药。

参考文献

[1] 中国药学会医院药学专业委员会，中华医学会临床药学分会 . 质子泵抑制剂优化应用专家共识 [J]. 中国医院药学杂志，2020，40（21）：2195-2213.

[2] 国家卫生健康委办公厅，质子泵抑制剂临床应用指导原 则（2020 年 版）[S/OL].（2020-12-03）[2021-06-20]. http：//www. nhc. gov. cn/yzygj/s7659/202012/9aac2b-191c844082aac2df73b820948f. shtml.

[3] 尹钢，张石革 . 2010-2013 年全国医院系统质子泵抑制剂应用趋势及相关问题分析 [J]. 中国医院用药评价与分析，2016，16（6）：817-820.

[4] 王佳，李丹滢，葛卫红 . 注射用质子泵抑制剂预防应激性溃疡的应用现状与挑战 [J]. 药学与临床研究，2020，28（6）：451-458.

[5] 卫生部 . 药品不良反应报告和监测管理办法 [S/OL].（2011-05-04）[2020-09-20]. http：//www. gov. cn/gongbao/con-tent/2011/content_2004739. html.

[6] Yeomans N，Lanas A，Labenz J，et al. Efficacy of esomeprazole（20 mg once daily）for reducing the risk of gastroduodenal ulcers associated with continuous use of low-dose aspirin [J]. Am Gastroenterol，2008，103（10）：2465-2473.

[7] Tanner W. Effectiveness and safety of proton pump inhibitors in infantile gastroesophageal reflux disease [J]. Ann Pharmacother，2010，44（3）：572-576.

[8] 卫晓晓，高科江，吴萍，等 . 473 例新的和严重的药品不良反应分析 [J]. 中国药师，2019，22（2）：298-301.

[9] 刘宝生，周秀丽，宫凯凯 . 山东省 8 566 例新的药品不良反应报告分析 [J]. 中国药房，2021，32（4）：475-479.

[10] 中华医学会消化病学分会 . 中国慢性胃炎共识意见 [J]. 胃肠病学，2017，22（11）：670-687.

[11] 柏愚，李延青，任旭，等 . 应激性溃疡防治专家建议 [J]. 中华医学杂志，2018，98（42）：3392-3395.

[12] Fock KM，Talle Y，Goh KL，et al. Asia-Pacific consensus on the management of gastro-oesophageal reflux disease：an update focusing on refractory reflux disease and Barrett’s oesophagus [J]. Gut，2016，65（9）：1102-1415.

[13] Sung JJ，Chiu PW，Chan FK，et al. Asia-Pacific working group consensus on non-variceal upper gastrointestinal bleeding：an update 2018 [J]. Gut，2018，67（10）：1757-1768.

[14] Krisztina H，Müllner K，Herszényi L，et al. Update on the pharmacogenomics of proton pump inhibitors [J]. Pharmacogenomics，2011，12（6）：873-888.

[15] 毛娇娇，潘杰 . 质子泵抑制剂致血液系统不良反应的特点及机制分析 [J]. 中国药物警戒，2019，16（2）：119-122.

[16] 杨九一，顾健 . 药源性血小板减少症机制研究进展 [J]. 中国医院药学杂志，2013，33（22）：1874-1877.

[17] George JN，Aster RH. Drug-induced thrombocytopenia：Pathogenes evaluation，and management [R]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program，2009：153-158.

[18] Sarzynski E，Puttarajappa C，Xie Y，et al. Association between proton pump inhibitor use and anemia：a retrospective cohort study [J]. Dig Dis Sci，2011，56（8）：2349-2353.

[19] 卢荣枝，黎颖然 . 注射用奥美拉唑例致肝损害 1 例 [J]. 中国药物警戒，2010，7（5）：312.

[20] 薛晓拉，田泾 . 质子泵抑制剂疑致肝损害 1 例 [J]. 药学实践杂志，2017，35（5）：479-480.

[21] 薛晓拉，夏玉朝，王延涛，等 . 质子泵抑制剂致肝损害 3 例并文献复习 [J]. 安徽医药，2018，22（12）：2468-2470.

[22] Gomez MR，Otero MA，Fobelo MJ，et al. Acute hepatitis related to omeprazole [J]. Am J Gastroenterol，l999，94（4）：1119-1120.

[23] Wael EM，Mark D. Omeprazole-induced hepatitis [J]. Pediatric Emergency Care，2005，21（8）：529-530.

[24] Aslan M，CelikY，Karadas S，et al. Liver hepatotoxicity associated with pantopr-azole：a rare case report [J]. Wien Klin Wochenschr，2014，126（11-12）：390-392.

[25] 王淑玲，姜葵，陈鑫，等 . 质子泵抑制剂诱发痛风性关节炎急性发作病例回顾并可能机制分析 [J]. 世界华人消化杂志，2017，25（9）：852-856.

[26] 袁钢 . 质子泵抑制剂对痛风疾病活动性的影响 [D]. 遵义：遵义医学院，2013.

（收稿日期：2021-08-09；修回日期：2021-09-25）

司库奇尤单抗不良反应文献分析

冀召帅，毛乾泰，艾超*（清华大学附属北京清华长庚医院/清华大学临床医学院药学部，北京　102218）

摘要：目的　分析司库奇尤单抗药品不良反应（ADR）的发生情况及相关因素，为临床安全用药提供参考。**方法**　检索 CNKI、万方、维普中文数据库以及 PubMed、Embase、Medline 外文数据库收载的司库奇尤单抗致 ADR 的个案报道，进行分析统计。**结果**　收集到司库奇尤单抗致 ADR 的案例报道 22 篇，共 25 例个案，以女性（16 例，64.0%）为主；原患疾病以中 / 重度斑块性银屑病占比较高（15 例，60.0%），其次为强直性脊柱炎 6 例、银屑病关节炎 2 例、外周型脊柱关节炎 1 例和滑膜炎 - 痤疮 - 脓疱病 - 骨肥厚 - 骨髓炎综合征 1 例；ADR 表现以皮肤和软组织症状（13 例，52.0%）和消化系统症状（8 例，32.0%）为主，其他系统症状相对较少（4 例，16.0%），均为新发不良反应；经停药和 / 或对症处理后，17 例（68.0%）好转，4 例（16.0%）治愈、4 例（16.0%）效果不明显。ADR 关联性评价结果中肯定 4 例、很可能 20 例、可能 1 例。**结论**　临床使用司库奇尤单抗时，应密切监护其发生在皮肤和软组织、消化系统的不良反应，并做好及时停药和对症治疗的准备。

关键词：司库奇尤单抗；不良反应；文献分析
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0955-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.038

Literature analysis of adverse drug reactions induced by secukinumab

JI Zhao-shuai, MAO Qian-tai, AI Chao* (*Department of Pharmacy*, *Beijing Tsinghua Changgung Hospital*, *School of Clinical Medicine*, *Tsinghua University*, *Beijing* 102218)

Abstract: Objective To analyze the occurrence and related factors of adverse drug reactions (ADR) induced by secukinumab, and to provide references for clinical safe medication. **Methods** The case reports of ADRs induced by secukinumab in CNKI, Wanfang, VIP Chinese, PubMed, Embase, and Medline were retrieved and analyzed. **Results** Totally 22 papers of ADRs induced by secukinumab, involving 25 patients, 16 of whom were females (64.0%). The primary disease was moderate/severe plaque psoriasis (15 cases, 60.0%), followed by ankylosiag spondylitis (6 cases), psoriatic arthritis (2 cases), peripheral spinal arthritis (1 case) and SAPHO syndrome (1 case). The main manifestations of ADRs included skin and soft tissue symptoms (13 cases, 52.0%) and digestive system disorders (8 cases, 32.0%). Other systemic symptoms were relatively few (4 cases, 16.0%), all of which were new ADRs. After drug withdrawal and/or symptomatic treatment, 17 cases (68.0%) improved, 4 cases (16.0%) cured, and the other 4 cases (16.0%) had no obvious effect. There were 4 positive cases, 20 probable cases and 1 possible case in the ADR correlation evaluation. **Conclusion** In clinical use, the adverse reactions in the skin, soft tissue and digestive system should be closely monitored, and timely withdrawal and symptomatic treatment are necessary.

Key words: secukinumab; adverse drug reaction; literature analysis

司库奇尤单抗是一种人类免疫球蛋白 G1（IgG1）单克隆单体，通过选择性与细胞因子 IL-17 结合，抑制该因子与其受体结合。目前在国外被广泛应用于中重度银屑病、活动性强直性

基金项目：北京清华长庚医院研究基金（No.12017C1001）。
作者简介：冀召帅，男，硕士，主管药师，主要从事医院药房管理、药物治疗学研究，email：jizhaoshuai@btch.edu.cn　*通信作者：艾超，男，硕士，副主任药师，主要从事医院药事管理、精准化药学、智能药房建设工作，email：aichao@btch.edu.cn

脊柱炎、活动性银屑病关节炎、中轴型脊柱关节炎等的治疗，2019 年在我国上市，被国家药品监督管理局批准用于治疗符合系统治疗或光疗指征的中度至重度斑块状银屑病的成年患者。根据说明书记录，其常见的不良反应（ADR）为上呼吸道感染（如鼻咽炎、鼻窦炎、扁桃体炎等）、口腔疱疹、口腔假丝酵母菌病、足癣、中性粒细胞减少症、结膜炎、腹泻、荨麻疹等。为进一步了解司库奇尤单抗导致 ADR 的临床特点，本文对国内外公开发表的司库奇尤致 ADR 的个案进行收集并分析其临床规律和特点，以期为其在临床使用的安全性提供参考。

1 资料和方法

1.1 资料来源

在 PubMed、Embase 及 Medline 数据库中以题目、主题、摘要中含有“secukinumab”“induced”“related”“after”“adverse reaction”及“case”等进行检索；通过 CNKI、万方以及维普等中文数据库中以题目、主题、摘要中含有“司库奇尤单抗”“致”“相关”“不良反应”“案例”等进行检索。收集司库奇尤单抗致 ADR 的相关个案报道。检索时间为建库以来至 2021 年 8 月。剔除综述性文献、病例记载不完整的文献，纳入公开发表的文献记载相关信息完整的个案报道，筛选出司库奇尤单抗导致 ADR 病例报道 22 篇 [1-22]，共计 25 例病例。

1.2 研究方法

详细阅读纳入文献，提取患者的性别、年龄、原患疾病、既往史、用法用量、ADR、发生时间、处置、转归等有效信息，采用 WHO-UMC 药物不良反应因果关系关联性评价标准对 25 例 ADR 进行关联性判断 [23-24]，为避免主观性差异带来的影响，关联性由 2 名药师分别进行评价，针对不一致的结果统一讨论后确定。本研究的所有数据及分析过程通过 Excel 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 患者基本情况

共纳入 25 例个案报道，其中男性 9 例（36.0%），女性 16 例（64.0%），年龄在 18 ～ 70 岁，平均年龄（43.32±13.30）岁，30 ～ 60 岁的患者 18 例（72.0%），占比最高。

2.2 原患疾病分布

25 例患者中，中 / 重度斑块性银屑病有 15 例（60.0%），强直性脊柱炎 6 例、银屑病关节炎 2 例、外周脊柱关节炎 1 例和滑膜炎 - 痤疮 - 脓疱病 - 骨肥厚 - 骨髓炎（SAPHO）综合征 1 例。

2.3 用药剂量、疗程

经统计，15 例中 / 重度斑块性银屑病患者用药方案：初始剂量 300 mg，1 次 / 周，连续 5 周；维持剂量 300 mg，每 4 周 1 次。2 例银屑病关节炎患者用药方案：1 例常规剂量 150 mg，每月 1 次；另 1 例首月剂量为 150 mg，因治疗效果不显著，第 2 个月开始后续增加剂量至 300 mg/月。6 例强直性脊柱炎患者用药方案：初始剂量 150 mg，每周 1 次，连续 5 周后调整为 150 mg，每月 1 次。1 例外周型脊柱关节炎患者用药方案：150 mg，具体用法不详，为超说明书用药。1 例 SAPHO 综合征患者用药方案：初始剂量 300 mg，每周 1 次，连续 5 周；维持剂量 300 mg，每 4 周 1 次，为超说明书用药。

2.4 ADR 情况

25 例 ADR 累及系统主要以皮肤和软组织为主（13 例，占总例数 52.0%），其次为消化系统 8 例（32.0%），神经系统 2 例、生殖系统 3 例、循环系统 1 例。ADR 发生后，采用停药 ± 对症处理的 16 例（64.0%）、减量＋对症处理的 1 例（4.0%）、未停药仅对症处理的 8 例（32.0%），具体情况见表 1。

2.5 关联性评价

采用 WHO-UMC 标准对 25 例 ADR 进行关联性评价，结果发现“很可能”20 例（80.0%），“肯定”4 例（16.0%），“可能”1 例（4.0%）。

3 讨论

3.1 原患疾病与超说明书用药

25 例患者中，中 / 重度斑块性银屑病、强直性脊柱炎、银屑病关节炎患者的司库奇尤单抗的用法用量均符合说明书的推荐用法。2 例超说明书用药患者中，第 1 例患者诊断为外周型脊柱关节炎，表现为腹泻、结膜炎和右膝和左踝关节炎，既往接受过非甾体抗炎药、皮质类固醇、柳氮磺胺吡啶和甲氨蝶呤治疗，症状控制不佳，更换为英夫利昔单抗（5 mg • kg^{-1}），疗效显著，5 年后因英夫利昔单抗引起的不良反应（腿和脚红斑丘疹）以及停药后的病情复发，更换为司库奇尤单抗（150 mg，用法不详）；另外 1 例患者诊断为 SAPHO 综合征，既往接受拉唑吡林、甲氨蝶呤和英夫利昔单抗等药物治疗，骨关节症状控制不佳，后开始使用司库奇尤单抗（采用斑块性银屑病治疗方案）。目前司库奇尤单抗在外周型脊柱关节炎和 SAPHO 的适应证尚未在国内外批准，但均表

表 1　25 例患者发生 ADR 情况汇总

Tab 1　ADRs in 25 patients

编号	原患疾病	临床表现	出现时间 / 月	累及系统	处置	转归	关联性评价
1[22]	重度斑块性银屑病	面部和右肘的皮肤损伤，关节痛，腹部痉挛，疲劳	2	皮肤和软组织	停药，对症治疗	好转	很可能
2[11]	脓疱性银屑病	躯干和四肢荨麻疹	0.5	皮肤和软组织	停药，对症治疗	治愈	肯定
3[19]	银屑病关节炎	上下肢水肿、前臂和双手水肿，无法握拳	22	皮肤和软组织	停药	好转	很可能
4[8]	银屑病	睑缘炎、唇炎、鼻皮炎	6	皮肤和软组织	停药	治愈	很可能
5[1]	银屑病、银屑病关节炎	颈部、背部、肩膀褐色丘疹	0.5	皮肤和软组织	对症治疗	不明显	很可能
6[15]	银屑病、银屑病关节炎	肘窝瘙痒性皮疹	3	皮肤和软组织	对症治疗	不明显	很可能
7[13]	外周型脊柱关节炎	腿和脚上出现疼痛的红斑丘疹、溃疡	2	皮肤和软组织	停药，对症治疗	好转	很可能
8[20]	银屑病	下肢皮肤紫癜	17	皮肤和软组织	停药，对症治疗	好转	很可能
9[2]	慢性斑块性银屑病	皮肤扁平苔藓	6	皮肤和软组织	对症治疗	不明显	很可能
10[17]	斑块性银屑病	双手掌和双脚脓疱	16	皮肤和软组织	停药，对症治疗	好转	很可能
11[17]	重度银屑病关节炎	双手掌和双脚脓疱	3.5	皮肤和软组织	停药，对症治疗	好转	很可能
12[4]	银屑病	腹部和腿紫色斑丘疹	5	皮肤和软组织	停药，对症治疗	好转	很可能
13[3]	重度斑块性银屑病	口腔溃疡、疼痛，舌头两侧和背面黏膜变色	8	消化系统	对症治疗	不明显	很可能
14[6]	银屑病	发热、发冷、腹泻	1.5	消化系统	停药	好转	很可能
15[12]	SAPHO 综合征	软腭疼痛的疱疹样溃疡，舌苔变白	1.25	消化系统	剂量减半，对症治疗	好转	肯定
16[12]	斑块性银屑病	嘴唇肿胀，疱疹样溃疡，舌上白色沉积物	1	消化系统	停药	治愈	很可能
17[7]	银屑病	中重度结肠炎	0.25	消化系统	停药，对症治疗	好转	很可能
18[5]	强直性脊柱炎	口腔溃疡	4	消化系统	对症治疗	好转	肯定
19[9]	强直性脊柱炎	口腔溃疡、生殖器溃疡	1	消化系统、生殖系统	停药，对症治疗	好转	很可能
20[9]	强直性脊柱炎	口腔溃疡、生殖器溃疡	0.75	消化系统、生殖系统	停药，对症治疗	好转	很可能
21[10]	强直性脊柱炎	角膜晶体沉积物	6	神经系统	对症治疗	好转	很可能
22[18]	强直性脊柱炎	右眼剧烈疼痛、发红	2	神经系统	对症治疗	好转	可能
23[14]	重度斑块性银屑病	勃起功能障碍	2	生殖系统	停药	治愈	肯定
24[16]	强直性脊柱炎	双手手指的颜色（苍白、发绀和红斑）	3	循环系统	对症治疗	好转	很可能
25[21]	脓疱型银屑病	湿疹样皮炎	0.75	皮肤和软组织	停药，对症治疗	好转	很可能

现出了较好的临床获益，如 van Mens 等[25] 的一项纳入 20 例外周型脊柱关节炎患者接受 12 周司库奇尤单抗的研究结果表明，试验中无严重不良事件或严重治疗相关不良事件，13 例患者达到 20% 缓解 [其中 8 例达到 50% 缓解，5 例达到 70% 缓解]，所有临床疾病活动度均得到快速、显著改善；Wendling 等[26] 针对早期治疗无反应的 3 例 SAPHO 综合征患者接受司库奇尤单抗 6 个疗程的靶向治疗分析的结果显示，1 例改善，1 例缓解。但鉴于目前司库奇尤单抗在 SAPHO 和外周型脊柱关节炎的安全性和有效性数据相对不足，建议临床患者使用时应做好充分的获益和风险评估。

3.2　ADR 临床表现、处置与转归

3.2.1　ADR 类型及发生率　基于司库奇尤单抗用于治疗斑块性银屑病的四项随机、双盲、安慰剂对照的Ⅲ期研究（ERASURE[27]、FIXTURE[27]、FEATURE[28]、JUNCTURE[29]）的安全性数据显示，其常见的 ADR 包括感鼻咽炎（11% ～ 12%）、腹泻（3% ～ 4%）、上呼吸道感染（3%）、高胆固醇血症（≥ 2%）、头痛（≥ 2%）、恶心（≥ 2%）、皮肤黏膜假丝酵母菌感染（1%）、鼻炎（1%）、咽炎（1%）、荨麻疹（≤ 1%）、炎症性肠病（≤ 1%）、口腔单纯疱疹感染（≤ 1%）；少见的 ADR 包括腹痛、尿路感染、超敏反应、葡萄球菌感染、结膜炎、脓疱、足癣、中性粒细胞减少、口腔假丝酵母菌感染、外耳炎等。

本文共纳入 25 例司库奇尤单抗致 ADR 个案报告，其中以发生在皮肤和软组织的 ADR 为主、其次为消化系统。可以看出，本文中各系统 ADR 的发生情况与临床试验[27-29] 差异较大，可能的原因为：① 临床试验最常见的 ADR 为上呼吸道感染（如鼻咽炎、鼻炎），大多数为轻度或中度，通常不需要停药，患者可耐受或对症治疗好转，本文纳入的 ADR 个案报道通常为严重级别较高、重视程度较高、需要停药或更换治疗方案的病例；② 受目前已公开报道的个案数量的影响，本文纳入

的 ADR 发生情况的占比与真实世界研究有差异。

3.2.2 ADR 与性别及年龄的关系 从银屑病及银屑病关节炎、强直性脊柱炎等流行病学数据来看，男性银屑病患病率为 0.1% ～ 0.29%，女性为 0.07% ～ 0.21%[30]；发生强直性脊柱炎患者男女比例约 2∶1[31]，而本文 25 例发生 ADR 的患者女性有 16 例（64.0%），这可能提示司库奇尤单抗在应用时，女性较男性患者更易发生 ADR，临床上应重视。

3.2.3 皮肤和软组织 ADR 司库奇尤单抗导致皮肤系统的 ADR 最多，共 13 例（52.0%）。发病时间在 0.5 ～ 22 个月，中位时间为 4.25 个月，发病时间≥ 2 个月有 10 例（占皮肤系统 ADR 总例数 76.92%），ADR 出现中位给药次数 6 次，中位累积给药剂量 1800 mg。13 例患者发生 ADR 后采用停药 ± 局部激素治疗的 10 例，治疗后达到治愈效果的 2 例，好转的 8 例；未停药仅激素局部治疗的 3 例，治疗效果均不明显。这表明司库奇尤单抗致皮肤系统的 ADR 经停药及对症处理后基本可以治愈或好转，不停药仅采取对症治疗对皮肤系统的 ADR 效果不大。

从 ADR 分布来看，司库奇尤单抗导致的皮肤软组织的 ADR 多发生在银屑病患者当中；从原患疾病的分布来看，银屑病 / 银屑病关节炎原患病与用药后皮肤和软组织的 ADR 可能存在正相关。研究表明，司库奇尤单抗导致皮肤和软组织的 ADR 尚未证实，其导致的皮肤黏膜假丝酵母菌感染可能与 IL-17 通路在机体抗真菌感染中的重要作用有关 [32]；司库奇尤单抗导致炎症可能与其选择性地与细胞因子 IL-17 结合，导致 IL-17 上游炎性细胞因子的产生增加，或者含有细胞因子 IL-12 和 TNF 的辅助 T 细胞 1（Th1）通路上调，导致基质金属蛋白酶（MMP）的激活，从而导致皮肤炎症反应、组织破坏等有关 [15，17]。

3.2.4 消化系统不良反应 本文收集的司库奇尤单抗导致的消化系统 ADR 有 8 例，其中有 2 例患者同时伴有生殖系统的 ADR[9]，表现为生殖器溃疡。发生时间在用药后 0.25 ～ 8 个月，中位时间为 1.12 个月，发病时间≤ 2 个月的有 6 例；中位给药次数 5 次，中位累积给药剂量 1275 mg。8 例患者发生 ADR 后停药 ± 对症治疗 5 例，治愈 1 例，好转 4 例;减量（剂量减半）＋对症治疗 1 例，好转；未停药仅对症治疗 2 例，1 例好转，1 例不明显。表明停药或减量＋对症治疗后，司库奇尤单抗致消化系统的 ADR 均可以得到治愈或好转；而仅对症治疗对消化系统 ADR 的改善也有一定的作用。

目前司库奇尤单抗导致口腔溃疡的作用机制尚不清楚，可能与皮肤黏膜假丝酵母菌病的发生有关 [33]。

3.2.5 其他系统 ADR 除皮肤和消化系统 ADR 外，本文还发现 4 例其他系统的 ADR，其中神经系统（眼部）2 例，1 例患者表现为角膜结晶物沉积 [10]，1 例表现为眼睛剧烈疼痛发红 [18]，经过临床诊断为葡萄膜炎，2 例患者经眼科医师对症治疗后均好转；生殖系统 1 例，表现为勃起功能障碍 [14]，停药后 ADR 消失；循环系统 1 例，表现为手指颜色变化（雷诺现象）[16]，使用低剂量阿司匹林和钙通道阻滞剂对症治疗后好转。以上 4 例均为司库奇尤单抗说明书中未曾记载的 ADR，为新发 ADR，临床中在使用司库奇尤单抗时应重视。

3.3 关联性评价

采用 WHO-UMC 标准对 25 例 ADR 进行关联性评价，结果发现“很可能”20 例，“肯定”4 例，“可能”1 例。其中 1 例“可能”的患者使用司库奇尤单抗 2 个月后出现右眼剧烈疼痛、发红，怀疑为葡萄膜炎，但该症状的出现不能排除是强直性脊柱炎导致的，所以评价为“可能”。而 4 例“肯定”患者在使用司库奇尤单抗的疗程中均出现再次或多次使用该药后相关 ADR 重新出现或加重的情况，且未有其他干扰因素，因此本文给出的评价为“肯定”。其他 20 例关联性评价为“很可能”，但需要指出的是因部分文献中给出的信息有限，本文研究者在作出判断时可能会与该个案实际关联存在差异。

3.4 合并症与合并用药

25 例个案中存在合并症的患者 12 例，合并症分布相对分散，主要有高血压、高脂血症、糖尿病、甲状腺功能减退（存在 2 例以上报道）等。但从个案分析来看，本文发现 1 例既往结肠炎的患者，在使用司库奇尤单抗 1.5 个月后出现克罗恩结肠炎 [6]；1 例既往生殖器溃疡患者使用司库奇尤单抗 1 个月后出现生殖器溃疡症状。12 例个案中记录合并用药的患者 6 例，合并用药主要为慢性病长期治疗用药，如美托洛尔、氢氯噻嗪、缬沙坦、二甲双胍、普伐他汀等药物，从目前的数据来看，合并用药与司库奇尤单抗不存在相互作用的影响。

4 结论

综上所述，根据司库奇尤单抗 ADR 的发生

规律及特点，临床应用时应重点监护其发生在皮肤和软组织系统及消化系统的 ADR，一旦出现应及时停药并加强对症处理。此外，该药也有导致角膜结晶沉积、葡萄膜炎、勃起功能障碍、雷诺现象等新发 ADR，临床上应予以关注和鉴别。

参考文献

[1] Bonomo L，Ghoneim S，Levitt J. A case of granuloma annulare associated with secukinumab use [J]. Case Rep Dermatol Med，2017，2017：5918708.

[2] Doolan BHA，Christie M. Cutaneous lichen planus induced by secukinumab [J]. Clin Exp Dermatol，2017，9（1）：437.

[3] Capusan TM，Herrero-Moyano M，Martínez-Mera CR，et al. Oral lichenoid reaction in a psoriatic patient treated with secukinumab：a drug-related rather than a class-related adverse event? [J]. JAAD Case Rep，2018，4（6）：521-523.

[4] Clark ML，Tobin CA，Sutton A，et al. Granuloma annulare in the setting of secukinumab [J]. Case Rep Dermatol Med，2018，2018：5175319.

[5] Grimaux X，Leducq S，Goupille P，et al. Aphthous mouth ulcers as an initial manifestation of sécukinumab-induced inflammatory bowel disease [J]. Ann Dermatol Venereol，2018，145（11）：676-682.

[6] Paul KH，Bing AZ. Secukinumab-induced unmasking of crohn colitis：a case report：1509 [J]. Am J Gastroenterol，2018，113（Supplement）：S866-S867.

[7] Wang J，Bhatia A，Krugliak CN，et al. Rapid onset of inflammatory bowel disease after receiving secukinumab infusion [J]. ACG Case Rep J，2018，5：e56.

[8] Burlando M，Cozzani E，Russo R，et al. Atopic-like dermatitis after secukinumab injection：a case report [J]. Dermatol Ther，2019，32（1）：e12751.

[9] Dincses EYB，Esatoglu SN. Secukinumab induced Behet's syndrome：a report of two cases [J]. Oxf Med Case Reports，2019，2019（5）：239-241.

[10] Power B，Pilson Q，Fulcher T. Secukinumab-associated crystalline corneal deposition [J]. Cornea，2019，38（2）：249-251.

[11] Bekkali N，Simon C，Binois R，et al. Severe urticaria with recurrence complicated by angioedema under secukinumab：a case report [J]. Therapie，2020，75（5）：509-511.

[12] Benzaquen M，Yawalkar N，Feldmeyer L，et al. Herpetiform aphthous ulcerations induced by secukinumab：report of 2 cases [J]. JAAD Case Rep，2020，6（10）：1107-1109.

[13] da Silva CDC，Barreto SM. Cutaneous vasculitis during secukinumab treatment [J]. Eur J Case Rep Intern Med，2020，7（10）：001815.

[14] Dastoli S，Iannone LF，Bennardo L，et al. A rare case of drug-induced erectile dysfunction with secukinumab solved after switch to ixekizumab in a psoriatic patient：a case report [J]. Curr Drug Saf，2020，15（1）：69-72.

[15] Fox JD，Aramin H，Ghiam N，et al. Secukinumab-associated localized granuloma annulare（SAGA）：a case report and review of the literature [J]. Dermatol Online J，2020，26（8）：13030.

[16] Kobak S. Secukinumab-induced Raynaud's phenomenon：First report in the literature [J]. Ther Adv Drug Saf，2020，11：1-4.

[17] Mössner R，Pinter A. Paradoxical palmoplantar pustulosis induced by secukinumab and brodalumab：a report of three cases [J]. Eur J Dermatol，2020，30（2）：177-178.

[18] Oprea D，Jimbu D，Ionescu E，et al. Uveitis-possible adverse reaction to secukinumab in a patient with rehabilitation treatment for ankylosing spondylitis（case report）[J]. Balneo Res J，2020，11（4）：561-565.

[19] Elias N，Sami N，Shulman K，et al. Secukinumab-induced scleroderma：A case report [J]. Rheumatology（Oxford），2021，60（3）：e99-e100.

[20] Perkovic D，Simac P，Katic J. IgA vasculitis during secukinumab therapy [J]. Clin Rheumatol，2021，40（5）：2071-2073.

[21] 于晓虹，李天博，韩世新，等. 司库奇尤单抗治疗脓疱型银屑病继发湿疹样皮炎一例 [J]. 中华皮肤科杂志，2021，54：E056-E056.

[22] Kaler J，Kaeley GS. Secukinumab-Induced lupus erythematosus：A case report and literature review [J]. J Clin Rheumatol，2021，27（8S）：561-565.

[23] Tantikul C，Dhana N，Jongjarearnprasert K，et al. The Utility of the World Health Organization-The Uppsala Monitoring Centre（WHO-UMC）System for the Assessment of Adverse Drug Reactions in Hospitalized Children [J]. Asian Pac J Allergy Immunol，2008，26（2-3）：77-82.

[24] Organization WH. The Use of the WHO-UMC System for Standardised Case Causality Assessment[EB/OL].（2018-12-26）. https：//www.who.int/medicines/areas/quality_safety/safety_efficacy/WHOcausality_assessment.pdf?ua = 1.

[25] van Mens L，van de Sande M，Menegatti S，et al. Brief report：interleukin-17 blockade with secukinumab in peripheral spondyloarthritis impacts synovial immunopathology without compromising systemic immune responses [J]. Arthritis Rheumatol，2018，70（12）：1994-2002.

[26] Wendling D，Aubin F，Verhoeven F，et al. IL-23/Th17 targeted therapies in SAPHO syndrome. A case series [J]. Joint Bone Spine，2017，84（6）：733-735.

[27] Langley RG，Elewski BE，Lebwohl M，et al. Secukinumab in plaque psoriasis-results of two phase 3 trials [J]. N Engl J Med，2014，371（4）：326-338.

[28] Blauvelt A，Prinz JC，Gottlieb AB，et al. Secukinumab administration by pre-filled syringe：efficacy，safety and usability results from a randomized controlled trial in pso-

riasis（FEATURE）[J]. Br J Dermatol，2015，172（2）：484-493.
[29] Paul C，Lacour JP，Tedremets L，et al. Efficacy，safety and usability of secukinumab administration by autoinjector/pen in psoriasis：a randomized，controlled trial（JUNCTURE）[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol，2015，29（6）：1082-1090.
[30] 黄丹，陈崑 . 银屑病相关流行病学调查进展 [J]. 诊断学理论与实践，2021，20（1）：48-52.
[31] 杜琳，高延征 . 强直性脊柱炎诊断及治疗新进展 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志，2019，33（7）：629-631.
[32] Lian C，Rongfen C，Smriti S，et al. Efficacy and safety of biologics targeting IL-17 and IL-23 in the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis：a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Int Immunopharmacol，2018，62：46-58.
[33] Puel A，Cypowyj S，Bustamante J，et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity [J]. Science，2011，332（6025）：65-68.

（收稿日期：2021-09-09；修回日期：2021-11-25）

硝苯地平致内镜下结肠息肉术后多发出血 3 例

黄春华[1，2]，张巍巍[2*]，赵新闻[3]（1. 潍坊医学院，山东 潍坊 261000；2. 中山大学孙逸仙纪念医院呼吸与危重症医学科，山东 青岛 266000；3. 青岛大学附属青岛市市立医院西院心内科，山东 青岛 266000）

关键词：硝苯地平；结肠息肉；内镜黏膜下切除术；迟发性出血
中图分类号：R969.3 **文献标识码：**B **文章编号：**1672-2981(2022)04-0960-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.039

结肠息肉是消化科的常见疾病，一般采用内镜下黏膜切除治疗[1]。息肉术后存在迟发性出血风险，其危险因素包括患者自身因素、息肉相关因素、外界因素等；与手术者的技术水平也有一定关系，手术时间超过 75 min 以及术中出现显著的出血则会增加术后迟发性出血发生率；极少数病例术后出血是因为服用了硝苯地平。本文总结了 3 例结肠多发息肉内镜下切除术后迟发出血的病例特点，并对其发生迟发性出血的可能机制进行分析。

1 病例简介

患者 1，女，66 岁，2020 年 9 月因“发现结肠息肉 6 个月”就诊于青岛大学附属青岛市市立医院。既往高血压病史 10 余年，规律服用硝苯地平缓释片（青岛黄海制药）20 mg qd，血压波动在 110 ～ 140/60 ～ 85 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa）。入院时查体无阳性体征。血常规、肝肾功能、凝血功能、肿瘤标志物无异常。术前 6 h 常规服用硝苯地平缓释片。结肠镜检查见升结肠、横结肠两个无蒂息肉，大小分别为 0.4 cm×0.3 cm、0.6 cm×0.7 cm，行内镜下息肉活检钳摘除术，术中少量渗血，并予凝血酶 5000 iu 喷洒止血，创面予 4 枚钛夹缝合，无活动性出血。术后病理：管状腺瘤。术后嘱患者卧床休息，予禁食、止血、补液及降压治疗，血压维持在 120 ～ 140/75 ～ 85 mmHg。术后第 4 日，患者出现鲜红色血便 1 次，约 150 mL。急查凝血功能：凝血酶原时间（PT）12.60 s，活化部分凝血活酶时间（APTT）30.40 s，凝血酶时间（TT）15.80 s，凝血功能未见异常。急诊结肠镜示升结肠、横结肠息肉切除创面钛夹固定，创面均有弥漫的活动性出血（见图 1A）。再次给予 2 枚钛夹缝合，术后嘱患者禁食 1 d，降压药由硝苯地平缓释片更换为缬沙坦胶囊（诺华制药）80 mg qd，血压控制良好，未再便血。术后 1 个月门诊随访，患者未再便血。

患者 2，女，62 岁，2020 年 12 月因“腹部不适 1 周”就诊于青岛大学附属青岛市市立医院。既往高血压病史 20 余年，规律服用硝苯地平缓释片（青岛黄海制药）20 mg qd，血压维持在 120 ～ 150/70 ～ 85 mmHg。入院时查体无阳性体征。血常规、肝肾功能、凝血功能、肿瘤标志物无异常。术前 6 h 常规服用硝苯地平缓释片。结肠镜检查示升结肠、结肠肝曲分别有 0.6

作者简介：黄春华，男，硕士，主要从事急诊医学工作，email：15622154452@163.com *通信作者：张巍巍，女，博士，副主任医师，主要从事消化内镜工作，email：zhangwwapple@163.com

cm×0.8 cm、0.6 cm×0.5 cm无蒂息肉，行息肉黏膜切除术。术中创面少量渗血，未见裸露血管，予凝血酶 5000 iu喷洒止血，钛夹缝合。术后病理：管状腺瘤。术后患者卧床休息，予禁食、补液、营养支持及降压治疗，血压维持在 120 ～ 140/70 ～ 80 mmHg。术后第 3 日，排暗红色血便，量约 30 mL，术后第 4 日排血便，量约 120 mL。急查凝血功能：PT 13.80 s，APTT 27.10 s，TT 18.80 s，凝血功能未见异常。急诊结肠镜检查示升结肠息肉创面钛夹并覆黑色血痂，结肠肝曲息肉术后溃疡处有血凝块附着，残基一端见红色血栓头（见图 1B），予黏膜下注射 1∶10 000 肾上腺素盐水、热活检钳电凝，钛夹缝合术。术后停用硝苯地平缓释片，给予缬沙坦胶囊（诺华制药）80 mg qd，降压效果良好，禁食、止血、补液等对症治疗后，好转出院。术后 1 个月电话随访，患者未再便血。

患者 3，男，50 岁，2021 年 1 月因“腹痛、腹胀半月”就诊于青岛大学附属青岛市市立医院。发现高血压病 1 年，规律服用硝苯地平控释片（德国拜尔）30 mg qd，平素血压维持在 120 ～ 140/60 ～ 80 mmHg。入院查体上腹部轻压痛，血常规、肝肾功能、凝血功能、肿瘤标志物无异常。术前 6 h 常规服用硝苯地平控释片降压。结肠镜检查示直肠及乙状结肠分别见大小约 1.2 cm×1.2 cm亚蒂息肉、1.2 cm×1.3 cm亚蒂息肉，行息肉黏膜切除术，术中创面少量渗血，无裸露血管，予钛夹夹闭创面，术后病理：管状腺瘤。术后患者卧床休息，予禁食、补液、营养支持及降压治疗，血压波动在 120 ～ 130/60 ～ 70 mmHg。术后第 5 日出现便血，急查凝血功能：PT 14.10 s，APTT 33.20 s，TT 19.00 s，凝血功能未见异常。急诊结肠镜示乙状结肠及直肠息肉创面多点、弥漫性渗血，血痂附着（见图 1C），分别喷洒止血药物凝血酶 5000 iu止血，钛夹缝合，无活动性出血后退镜。患者停用硝苯地平控释片，给予缬沙坦胶囊 80 mg qd控制血压，未再便血，3 d 后患者病情平稳，准予出院。术后 1 个月门诊随访，患者未再便血。

图 1　3 例结肠息肉患者术后出血急诊电子结肠镜检查

2　讨论

消化道出血是内镜下结肠息肉切除后的常见并发症，研究显示出血危险因素包括年龄、性别、抗凝药与抗血小板药服用史及息肉数目、大小、形态、位置、病理类型等 [2-3]。本文报道的 3 例内镜下结肠黏膜切除术后多发出血病例，手术者均具有 10 年以上内镜下治疗经验，且息肉切除操作顺利，息肉小于 1.5 cm、非宽基底、无恶性肿瘤倾向、术后创面整齐且无血管裸露，患者均否认抗凝、抗血小板及非甾体抗炎药（NSAIDs）等药物服用史，否认出血性疾病及家族史。有高血压病史多年，规律服用硝苯地平，血压控制平稳，迟发性出血后行急诊内镜检查发现此 3 例患者均有多处息肉术后，创面多点、弥漫性出血，非单一部位出血，临床推测硝苯地平导致内镜下结肠黏膜切除术后创面多发出血可能。此 3 例患者非手术期长期使用硝苯地平缓释片血压控制理想，无出血不良反应出现，手术后迟发性出血，考虑为药品的不良事件。分析原因如下：① 硝苯地平用药与内镜下结肠息肉术后多发出血有合理的时间关系；② 杨敬泽等 [4] 报道的个案与本文 3 例个案相似，硝苯地平药理作用之一是可以舒张血管平滑肌致血管扩张，但此类不良事件未在硝苯地平药物说明书中提及，故结肠息肉术后多发出血是否符合硝苯地平不良反应类型的情况尚不明确；③ 为预防再次出血，均让患者第二次结肠镜术后停用可疑药物硝苯地平，更换不同类型的降压药，患者未再便血；④ 3 位患者住院期间未服用其他特殊药物，无其他特殊治疗，此事件无法用合并用药的作用、患者病情的进展、其他治疗的影响来合理解释。

硝苯地平是钙通道阻滞剂，广泛用于心绞痛、高血压病的治疗，其常见不良反应有面部潮红、窦性心动过速、踝部水肿、头痛等。国产硝苯地平缓释剂为亲水凝胶型骨架型缓释剂，硝苯地平控释片为双层渗透泵型控释剂，相比普通剂

型的硝苯地平片，缓释及控释药物制剂具有肠道刺激轻、疗效长、更安全等特点[5-6]。Kuipers 等[7]发现使用钙通道阻滞剂与消化道出血的风险增加有关，Jalil 等[8]根据美国社区病例对照研究发现，钙通道阻滞剂是下消化道出血的重要危险因素。钙通道阻滞剂可抑制血小板活化因子与胞质钙离子反应，刺激内源性血小板聚集抑制剂（一氧化氮）的合成。此外，钙通道阻滞剂还能抑制血小板的功能，其作用机制可能为：① 抑制纤维蛋白原和血小板表面特异性受体结合；② 抑制血小板磷酸二酯酶活性，使环磷酸腺苷等含量增加，抑制血小板的形态改变、聚集及释放；③ 促进血管内皮合成前列腺素 I_2 和一氧化氮，并抑制血浆血栓素 B_2 合成。血管扩张、血小板聚集被抑制和血小板功能下降均会增加出血的风险。徐向艳等[9]报道过 1 例患者因心绞痛长期服用硝苯地平出现急性胃黏膜病变，最终出现上消化道出血。杨敬泽等[4]报道了 1 例硝苯地平控制血压的同时诱发内镜黏膜下剥离术后出血。本案例内镜下结肠息肉术后多发出血一方面主要考虑硝苯地平可舒张血管平滑肌致血管扩张以及抑制血小板聚集和释放，不仅增加出血风险，而且在发生出血时也会抑制血管的收缩，不利于创面止血[10]；另一方面，高血压患者的血管壁较脆，长期高血压导致动脉硬化，血液流变率不稳定[11]。此外，高血压病患者动脉血管长期处于紧张收缩状态，血管壁增厚，管径增加，血管弹性差，息肉切除后断端血管收缩不全，高压血流穿透受损血管易发生出血。

He 等[12]荟萃分析表明钙通道阻滞剂的使用与消化道出血风险之间存在边缘性关联，但这一关联的临床意义尚不十分明确。硝苯地平致内镜下结肠息肉术后多发出血，由于文献报道数量有限，发生的规律性还需要更多资料的支持。Veeravich 等[13]通过 meta 分析综合了 12 篇文献共 14 313 例患者证实高血压能增加息肉切除术后出血的风险。高血压病是结肠镜息肉摘除术后迟发性出血的高危因素，术前应积极控制血压，有助于降低术后迟发性出血风险[14]。因此，加强对高血压患者内镜治疗围术期的管理尤为重要，围术期将硝苯地平替换为有同样降压效果的血管紧张素转化酶抑制剂（ACEI）/ 血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂（ARB）类药物也许是一个可行的方案。本文列举的临床病例较少，有一定的局限性，是否需要术前更换硝苯地平药物、更换为何种降压药物，仍需大量样本进一步研究。

参考文献

[1] Elliott TR，Tsiamoulos ZP，Thomas-Gibson S，et al. Factors associated with delayed bleeding after resection of large nonpedunculated colorectal polyps [J]. Endoscopy，2018，50（8）：790-799.

[2] 程芃，柏愚，方军，等 . 内镜下结直肠息肉切除术后迟发性出血的危险因素分析 [J]. 中华消化内镜杂志，2018，35（5）：332-335.

[3] Zhang ZH，Jiang QF，Ma JF. Analysis of risk factors for delayed bleeding after endoscopic colorectal polypectomy [J]. Int J Dig Dis，2018，38（2）：130-134.

[4] 杨敬泽，寇冠军，李延青 . 硝苯地平诱发内镜黏膜下剥离术后出血一例 [J]. 中华消化内镜杂志，2020，37（2）：137-138.

[5] 孙雨菁，李琰华，李俊伟 . 抗高血压药物不同缓控释剂型在鼻饲中的应用 [J]. 中华全科医学，2021，19（1）：108-112.

[6] 张珍 . 控释及缓释药物制剂的临床应用及研究 [J]. 中国实用医药，2014，9（26）：188-188.

[7] Kuipers EJ，Hill C. Risk factors for upper gastrointestinal bleeding in patients using low-dose acetylsalicylic acid：a systematic literature analysis [J]. Gastroenterology，2011，140（5）：174.

[8] Jalil AA，Gorski R，Jalil SA，et al. Factors associated with diverticular bleeding and re-bleeding：a United States hospital study [J]. North Clin Istanb，2018，6（3）：248-253.

[9] 徐向艳，彭洁敏 . 硝苯地平诱发上消化道出血 1 例 [J]. 中华临床医药杂志，2003，4（3）：19-19.

[10] Kaplan RC，Heckber SR. Use of calcium channel blockers and risk of hospitalized gastrointestinal tract bleeding [J]. Arch Int Med，2000，160（12）；1849-1855.

[11] Catanescu I，Long G，Bove P，et al. Rupture of abdominal aortic aneurysm in patients with and without antecedent endovascular repair [J]. Ann Vasc Surg，2017，39：99-104.

[12] He Y，Chan EW，Leung WK，et al. Systematic review with meta-analysis：the association between the use of calcium channel blockers and gastrointestinal bleeding [J]. Aliment Pharmacol Ther，2015，41（12）：1246-1255.

[13] Veeravich J，Narut P，Buravej A，et al. Risk factors for delayed colonic post-polypectomy bleeding：a systematic review and meta-analysis [J]. Int J Colorectal Dis，2017（5）：1126-1131.

[14] 顾建华，刘芳，周静，等 . 结肠镜下息肉摘除术后迟发性出血危险因素分析 [J]. 结直肠肛门外科，2017，23（1）：60-63.

（收稿日期：2022-01-05；修回日期：2022-02-20）

鱼精蛋白致过敏性休克 1 例

刘欣，胡益杏，鲁虹*（长沙市中心医院药学部，长沙　410004）

关键词：鱼精蛋白；肝素；药物不良反应；过敏性休克
中图分类号：R699.2；R587.2　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2022)04-0963-02
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.04.040

1　临床资料

患者，男，55 岁，2021 年 7 月 29 日入院。患者肾功能异常 4 年余，维持性血透 3 年余，此次因内瘘无震颤入院，考虑人工动静脉内瘘失功能。根据检查结果及体征，考虑诊断：1. 肾病综合征；2. 人工动静脉内瘘失功能等。

8 月 2 日，该患者拟行动静脉内瘘切除重造术，术中无特殊不适。8 月 5 日，患者右上肢轻微肿胀，伤口无血液渗出，震颤明显。8 月 8 日，右上肢轻微肿胀未见好转，完善彩超提示右颈内静脉下段血栓形成，引起右上肢血液回流障碍。同时患者原左颈内静脉长期导管位于右头臂静脉，导管尖端进入右锁骨下静脉，致静脉管腔狭窄，介入无法复位。患者既往有“高血压病”病史，血压最高 180/100 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa）左右，8 月 9 日测得血压 140/98 mmHg。患者术前检查未见明显手术禁忌，能够耐受手术。8 月 10 日 13：00 － 17：20 行右上肢静脉造影＋右头臂静脉球囊扩张术＋左锁骨下静脉透析导管更换术，术中予以肝素钠 12 500 U，并于闭塞处予以尿激酶共 30 万 U 溶栓治疗，术后 17：30 给予 50 mg 鱼精蛋白中和肝素。手术顺利，术中术后患者无特殊不适。后发现患者行左颈内静脉长期导管更换术后伤口渗血明显，考虑与应用肝素导致凝血功能障碍有关，18：50 再次静脉注射鱼精蛋白 50 mg 后出血停止，缝合皮肤切口未见出血，19：00 患者出现胸闷，出汗，血压下降至 75/54 mmHg，立即静脉推注 50% 葡萄糖注射液 40 mL，静脉滴注 5% 葡萄糖注射液 500 mL，吸氧，症状无明显好转，予心电监护，0.9% 氯化钠注射 100 mL ＋多巴胺 200 mg 静脉滴注升压，急抽血查血常规，交叉合血，患者血压回升至 95/60 mmHg，胸闷症状好转。21：20 患者返回病房后立即予以心电监护，示血压 84/44 mmHg，立即予以 0.9% 氯化钠注射 100 mL ＋多巴胺 200 mg 静脉滴注，后血压回升至 152/73 mmHg。

2　讨论

2.1　关联性评价

患者术中使用肝素钠，术后给予鱼精蛋白，术中术后无特殊不适，后发现伤口渗血明显，注射鱼精蛋白中和肝素后出血停止，患者出现过敏性休克。从不良反应发生时间和两种药物出现过敏性休克的发生率综合比较，鱼精蛋白所致的可能性较大。理由如下：

① 术中使用肝素的时间为 13：30，鱼精蛋白第一次使用时间是术后 17：30，第二次使用时间是 18：50，患者出现不良反应症状时间是 19：00，鱼精蛋白过敏反应通常在用药后即可发生或 5 ～ 15 min 内出现 [1]，而肝素导致的血压下降等严重过敏反应多在用药后立即发生 [2]。② 患者在本院规律进行血液透析治疗，常规使用低分子肝素，两年来未发生任何不适。目前关于肝素和低分子肝素交叉过敏的研究较少，但有研究指出，迟发性过敏反应在肝素及低分子肝素皮下使用时有高度的交叉反应，即使低分子肝素不耐受肝素也可以耐受 [3]。患者发生过敏性休克后，继续规律使用低分子肝素进行血液透析未发生不适，且国内关于肝素致过敏反应的报道较少 [2，4]，而鱼精蛋白的不良反应发生率为 2.7% ～ 5.8%[5]，鱼精蛋白所致过敏性休克是已知的药品不良反应，主要表现为低血压 [6]，本例患者血压明显下降，予以对症处理后患者症状明显好转，后未再出现类似反应，因此鱼精蛋白导致过敏性休克可能性较大，根据国家药品不良反应因果关系评价，本例关联性评价为“可能”。

2.2　鱼精蛋白不良反应的临床特点

鱼精蛋白是肝素唯一的拮抗剂，对肝素术后抗凝作用的逆转发挥着不可替代的作用。在鱼精蛋白的不良反应中，中度、重度反应的死亡率可达 20%，严重毒性反应死亡率升高至 70%[5]。目前通常对鱼精蛋白引起的不良反应分型可按

作者简介：刘欣，女，硕士，药师，主要从事静脉用药调配中心审方工作，email：lx_stone@163.com　*__通信作者：__鲁虹，女，硕士，副主任药师，主要从事治疗药物监测和药品不良反应评价，email：1430368@qq.com

Charles 的总结分为三型[7]：

Ⅰ型为快速给药型低血压，是最常见的类型，其表现为一过性血压下降，肺动脉压力升高不明显；根据患者自身情况，血压下降可自行逆转或通过补液来治疗；发生机制可能与鱼精蛋白通过直接抑制心肌导致心肌收缩力减弱，直接作用于毛细血管床导致有效循环血量减少、激活一氧化氮合酶舒张体循环血管有关[8]。Ⅱ型为过敏反应型，临床表现为皮肤、黏膜、内脏水肿，外周血管阻力下降，支气管痉挛，出现皮肤潮红、荨麻疹等；根据国家药品不良反应对过敏性休克的判断标准：血压下降为必需指标，再伴有呼吸系统、心血管系统、神经系统表现的 1 ～ 2 个指标即可[9]。患者血压下降至 75/54 mmHg，同时出现胸闷、出汗等症状，符合过敏性休克的判定标准。过敏性休克又可分为三种[7]：真过敏反应、速发型类过敏反应和迟发型类过敏反应。真过敏反应是由抗体介导的，即Ⅰ型变态反应，有文献分析，鱼精蛋白初次进入机体刺激特异性 B 细胞产生 IgE 抗体[10]。此类抗体与肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面的受体相结合，使机体致敏。鱼精蛋白再次进入机体，与致敏的肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面的抗体结合，使细胞释放出组胺等生物活性物质，引起过敏反应。两种类过敏反应不由抗体介导，而是通过补体激活，有文献指出，鱼精蛋白可直接激活补体产生过敏毒素 C5a 和 C3a，发生与过敏反应症状相似的类过敏反应[3]。Ⅲ型为严重肺血管收缩型，表现为肺动脉压力急剧升高，伴随右心室扩张、左心室充盈压降低，全身性低血压[11]。这类型不良反应在低剂量注射鱼精蛋白后可立即发生，好发于肺循环障碍患者中，发生机制可能与病变的肺血管内皮对前列腺素 I_2 的合成能力减弱，无法抵抗血浆血栓素 A_2 导致肺血管收缩有关[12]。

2.3 鱼精蛋白不良反应的防治

按说明书要求，鱼精蛋白的用量根据最后一次的肝素用量，1 mg 可中和 100 U 肝素，10 min 内用量不得超过 50 mg，如临床需要，可重复给药[13]，2 h 内用量不宜超过 100 mg。有研究指出鱼精蛋白引起严重低血压和过敏反应可能与给药速度和给药途径有关[14]。可采取以下措施预防鱼精蛋白的不良反应：血容量偏低的患者，宜纠正血容量后再使用鱼精蛋白；控制给药速度、采用微量泵法给药，可经主动脉根部给药[12]，避免快速大量注射，鱼精蛋白注射过快易引起严重低血压；用药前详细询问药物过敏史及鱼虾过敏史，对有风险因素的患者进行获益评估；尽可能使用同一厂家同一批号的鱼精蛋白。鱼精蛋白的不良反应发生迅速，在使用过程中必须加强用药监测，密切监测血压、心肌收缩力及心率、气道压力等变化，若患者平均动脉压下降幅度超过 10 mmHg，同时伴有心肌收缩乏力、心率改变明显、气道压力升高等症状[11，15]，应考虑为鱼精蛋白的不良反应，立即停止注射。若发生快速给药型低血压或过敏反应，及时给予多巴胺维持血压，纠正血容量，必要时给予糖皮质激素和抗组胺药物；若发生严重肺血管收缩反应，应慎重补充血容量[13]，先予以多巴胺或肾上腺素，再给予糖皮质激素强心抗过敏，必要时给予扩张肺血管药物如硝酸甘油等[16]。

参考文献

[1] 李柏均，董珍艳 . 血液透析后鱼精蛋白中和肝素致过敏反应 3 例 [J]. 临床合理用药杂志，2011，4（6）：85.

[2] 黄年旭，李园，余雄杰，等 . 肝素过敏患者替代抗凝治疗用药分析与监测 [J]. 中国处方药，2020，18（4）：52-54.

[3] Grassegger A，Fritsch P，Reider N. Delayed-type hypersensitivity and cross-reactivity to heparins and danaparoid：a prospective study [J]. Dermatol Surg，2001，27（1）：47-52.

[4] 黄玲娟 . 肝素封管液致输液港植入患者过敏性休克 1 例 [J]. 中国药师，2015，18（11）：1953-1954.

[5] 谢安，魏蔚 . 鱼精蛋白的应用现状及存在的问题 [J]. 中国胸心血管外科临床杂志，2016，23（1）：78-82.

[6] 詹海燕，杨健 . 某院 2015—2017 年 382 例硫酸鱼精蛋白注射液用药及其药品不良反应分析 [J]. 中国药物警戒，2018，15（1）：41-44.

[7] Horrow JC. Protamine：a review of its toxicity [J]. Anesth Analg，1985，64（3）：348-361.

[8] 丘劲华，程丛林，张蓓蕾，等 . 二尖瓣置换术中鱼精蛋白过敏反应死亡 1 例 [J]. 法医学杂志，2021，37（3）：434-436.

[9] 钟露苗，张贵赋，陈希，等 . 药械安全监测与评价概要 [M]. 长沙：湖南科学技术出版社，2020，51.

[10] 范燕，王丹，王春婷 . 鱼精蛋白注射液致毒性反应机制分析与措施 [J]. 中国药物警戒，2021，18（12）：1159-1161.

[11] 韩忠，王健 . 鱼精蛋白不良反应及抢救体会 [J]. 现代医学，2009，37（1）：54-55.

[12] 黄洪，叶宁 . 心内直视手术后鱼精蛋白不良反应与不同给药途径的观察 [J]. 广西医学，2008，30（4）：524-526.

[13] 江腊梅，赵燕 . 47 例鱼精蛋白致严重低血压不良反应分析 [J]. 中国药物警戒，2011，8（8）：501-504.

[14] 邱立成，王奇，石海燕，等 . 鱼精蛋白毒性反应的防治 [J]. 武警医学，2006，17（7）：535-538.

[15] 梁艳冰，马中富，许元文，等 . 血液透析患者使用鱼精蛋白致过敏性休克 13 例 [J]. 新医学，2003，34（6）：376-377.

[16] 王晓伟，梁永年，陈宇，等 . 心脏手术中鱼精蛋白重度不良反应致严重循环抑制的临床对策 [J]. 中国体外循环杂志，2009，7（3）：169-171.

（收稿日期：2021-12-30；修回日期：2022-03-04）

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
郭建军　湖南恒兴医药科技有限公司总经理

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。

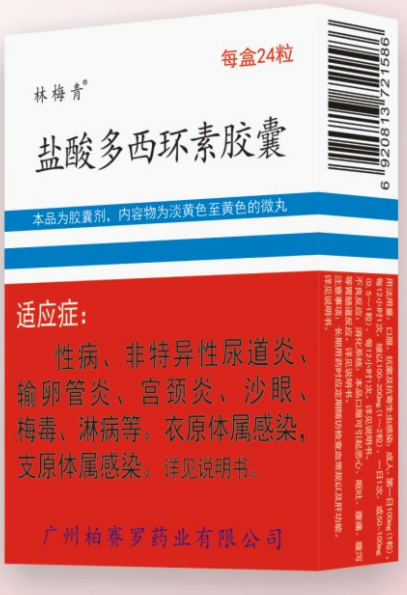
克拉霉素缓释胶囊

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：25.00元/册