◆ 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5月 第20卷 第5期
Volume 20 Number 5 May 2022

CENTRAL SOUTH PHARMACY

◆ 槲皮素通过抑制TGF-β/TAK1/JNK和TGF-β/Smad2信号通路发挥抗肝纤维化的作用
◆ 重楼皂苷H诱导耐替莫唑胺胶质瘤SHG44R细胞凋亡和焦亡的作用研究
◆ 矮地茶对刀豆蛋白A致大鼠免疫性肝损伤的保护作用及机制探讨
◆ 心肌缺血再灌注损伤及其潜在治疗靶点LCN2的研究进展

ISSN 1672-2981
9 771672 298224 05>

5
2022

中南药学 第二十卷 第五期 第965~1216页 二〇二二年五月

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 5 期（总第 196 期）　2022 年 5 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

E-mail：znyxzz2003@vip.163.com

广告经营许可证：4300004000764

中国标准连续出版物号

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

2022 年版权归《中南药学》编辑部所有

目　次

研究论文

（965）槲皮素通过抑制 TGF-β/TAK1/JNK 和 TGF-β/Smad2 信号通路发挥抗肝纤维化的作用 …… 王绍展，王媛媛，顾妍秋，等

（973）重楼皂苷 H 诱导耐替莫唑胺胶质瘤 SHG44R 细胞凋亡和焦亡的作用研究 …… 孙光强，薛玉叶，陆云阳，等

（979）矮地茶对刀豆蛋白 A 致大鼠免疫性肝损伤的保护作用及机制探讨 …… 韩冰，程栋梁，林世源，等

（985）基于高效液相色谱指纹图谱的天麻饮片 - 标准汤剂 - 配方颗粒对比研究 …… 王辙远，张璠璠，王隆隆，等

（992）菟丝子不同炮制品指纹图谱及多指标成分定量研究 …… 李国卫，孙冬梅，胡绮萍，等

（999）布地奈德直肠用脂质体温敏凝胶制备工艺的研究 …… 杨东亮，马瑞丽，赵宇郁，等

（1005）响应面法结合熵权法优选麦门冬汤颗粒的干法制粒工艺 …… 莫秋怡，施文婷，徐东婷，等

（1010）苍耳子治疗变应性鼻炎的网络药理学分析及作用机制研究 …… 李丹，章秀梅，宣自华，等

（1017）miR-145 通过靶向 ABCE1 发挥抗乳腺癌作用 …… 陈双华，李荣，周玉生

（1023）黄精对原发性痛经大鼠药效作用初步研究 …… 聊晓玉，方静，方媛，等

（1028）人参皂苷 Rg_1 对顺铂损伤大鼠卵巢颗粒细胞的保护作用及其分子机制 …… 颜倩，石丹宁，杨佳迪，等

（1034）毛白杨雌、雄花蕾总黄酮含量及抗氧化活性的比较 …… 李卓俊，吴翠，徐博，等

（1039）基于网络药理学的山豆根保肝作用药效物质筛选及实验验证 …… 秦妍，包永睿，王帅，等

（1044）华中五味子藤茎中苯丙素类化学成分研究 …… 杨洁，孙琛，郭东艳，等

（1048）G 试验和 GM 试验联合无菌体液真菌培养检测对侵袭性念珠菌病的诊断效果评估 …… 杨玉琪，雷玲玲，周磊，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
王朝辉　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
睢大筵　肇丽梅　翟　青　黎　敏
颜　苗　潘卫三　魏高文

（1052）喀什小檗提取物对动脉粥样硬化大鼠血脂及炎症相关指标的影响
……艾丽非热·阿布都外力，阿迪力·阿不都热合曼，伊木然江·苏布哈提，等
（1057）齐墩果酸线粒体靶向脂质体的制备及抗胰腺癌研究
…… 谭晓柯，武香香，曾华辉，等
（1063）基于网络药理学探讨四臣止咳颗粒治疗慢性支气管炎急性发作的作用机制 …… 崔爽，张明倩，梁五林，等
（1072）基于 P 物质和 P- 糖蛋白探讨黄芪多糖温敏凝胶改善小鼠放射性皮炎的机制 …… 张国荣，张建萍，马小花，等
（1077）毛菊苣子 - 毛菊苣根配伍的体外抗肝纤维化作用研究
…… 阿达来提·木合塔尔，臧薇，李茜，等
（1083）重组黧豆蛋白酶的制备及其活性研究
…… 王真，吴方晖，阴忆烽，等
（1089）氮、磷对根瘤菌液处理下甘草根瘤生长及固氮活力的影响
…… 耿业业，王桂荣，张远帆，等

综述

（1095）心肌缺血再灌注损伤及其潜在治疗靶点 LCN2 的研究进展
…… 朱香梅，石雨荷，李晴，等
（1102）天然小分子化合物抗鼻咽癌活性及机制的研究进展
…… 蒲缓缓，屈赵，林金榕，等
（1113）慢性阻塞性肺疾病患者使用吸入剂用药依从性的研究进展
…… 刘冀衡，谢倩，黄丽，等
（1117）降低万古霉素肾毒性的药物及作用机制研究进展
…… 潘坤明，蒋啸天，徐辰祺，等
（1123）基于尿酸转运蛋白的中药治疗高尿酸血症的研究进展
…… 张凤阳，邢志华，申光焕，等
（1129）峻下逐水药与肠道菌群相互作用的研究进展
…… 秦贝贝，贾泽菲，王佳莉，等
（1136）乌司他丁在缺血再灌注损伤中的研究进展
…… 赵书馨，张雄，苏晨林，等

中药资源的开发与利用

（1142）经典名方中旋覆花的本草考证… 蔡梦如，王开心，尹东阁，等

药物分析与检验

（1148）基于多波长高效液相色谱指纹图谱和多成分定量分析的益肝明目口服液质量标准研究 …… 谢百波，里艳茹，寻园，等
（1153）3 种半夏饮片的微生物污染状况考察
…… 朱文娟，黎丽敏，李锦妹，等

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。

（1158）高效液相色谱法测定延龄草中 4 种甾体皂苷的油水分配系数及平衡溶解度 …… 左月明，陈林林，张忠立

（1162）离子色谱法测定盐酸二甲双胍药物中二甲胺的含量 …… 储韫婧，邵方娴，陈民辉，等

（1167）一测多评法同时测定不同产地佛手中 6 种化学成分的含量 …… 曹士政，赵登高，马燕燕，等

（1172）UPLC-MS/MS 法测定利奈唑胺中的一种基因毒性杂质 …… 李倚天，梅芊，刘英

医院药学

（1176）化疗相关恶心呕吐危险因素的性别差异 …… 孙博，刘勋，王会品，等

（1183）基于文献计量学和可视化技术分析恩格列净在心血管疾病方面的研究现状及发展趋势 …… 赵福坤，唐飞，罗敏，等

（1188）26 例抗菌药物联合根治性手术治疗坏死性外耳道炎分析 …… 王维娜，郭恒，邸宣，等

（1192）基于 CiteSpace 对红景天研究进展的可视化分析 …… 刘成娟，黄盛洁，杜瑞姣，等

（1198）经肺泡灌洗并局部灌注抗菌药物治疗支气管扩张合并肺部感染的文献分析 …… 段曼，孙志猛，汪亚，等

临床药师在临床

（1205）临床药师对肾移植患者实施药物治疗管理的示例 …… 谢静，苏妍，吴琼诗

（1209）1 例剖宫产术后重度疼痛患者的药学监护 …… 赵路，雷伟，苗杨，等

药品不良事件信号监测专题

（1212）基于美国 FAERS 数据库的利那洛肽不良事件信号挖掘与分析 …… 王浩，阳丽，刘小英，等

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*252*zh*P*25.0*44*2022-5

本期责任编辑：彭金飞，陆窈窈，邬志娟，李科

英文编辑：周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 20, Number 5 May 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

(965) Effect of quercetin on liver fibrosis by inhibiting TGF-β/TAK1/JNK and TGF-β/Smad2 signaling pathways …… *WANG Shao-zhan, WANG Yuan-yuan, GU Yan-qiu, et al*

(973) Effect of paris saponins H on inducing the apoptosis and pyroptosis of temozolomide-resistant glioma SHG44R cells …… *SUN Guang-qiang, XUE Yu-ye, LU Yun-yang, et al*

(979) Protective effect of Ardisiae japonicae herba on concanavalin A-induced immunological liver injury in rats and related mechanism …… *HAN Bing, CHENG Dong-liang, LIN Shi-yuan, et al*

(985) Gastrodia pieces，standard decoction，and formula granules based on HPLC fingerprints …… *WANG Zhe-yuan, ZHANG Fan-fan, WANG Long-long, et al*

(992) Fingerprints and quantitative analysis of *Cuscuta australis* R. Br. processed products …… *LI Guo-wei, SUN Dong-mei, HU Qi-ping, et al*

(999) Preparation of budesonide liposome temperature sensitive gel for rectal use …… *YANG Dong-liang, MA Rui-li, ZHAO Yu-yu, et al*

(1005) Optimization of dry granulation technology of Maimendongtang granules by response surface methodology combined with entropy weight method …… *MO Qiu-yi, SHI Wen-ting, XU Dong-ting, et al*

(1010) Network pharmacology and mechanism of Xanthii Fructus for allergic rhinitis …… *LI Dan, ZHANG Xiu-mei, XUAN Zi-hua, et al*

(1017) miR-145 exerts anti-breast cancer effects by targeting ABCE1 …… *CHEN Shuang-hua, LI Rong, ZHOU Yu-sheng*

(1023) Pharmacodynamic effect of Polygonatum on rat with primary dysmenorrhea …… *LIAO Xiao-yu, FANG Jing, FANG Yuan, et al*

(1028) Protective effect and molecular mechanism of ginsenoside Rg_1 on the senescence of rat ovarian granulosa cells induced by cisplatin …… *YAN Qian, SHI Dan-ning, YANG Jia-di, et al*

(1034) Total flavonoid content and antioxidant activity of female and male flower buds of *Populus tomentosa* …… *LI Zhuo-jun, WU Cui, XU Bo, et al*

(1039) Screening and validation of hepatoprotective substances of Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma based on network pharmacology …… *QIN Yan, BAO Yong-rui, WANG Shuai, 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.

(1045) Phenylpropanoids from the stems of *Schisandra sphenanthera*
…… *YANG Jie, SUN Chen, GUO Dong-yan, et al*

(1048) Evaluation of G test and GM test combined with sterile humoral fungal culture in the diagnosis of invasive candidiasis
…… *YANG Yu-qi, LEI Ling-ling, ZHOU Lei, et al*

(1053) Effect of *Berberis Kaschgarica* Rapr. extract on serum lipids and inflammation-related factors in atherosclerosis rats
… *Ailifeire Abuduwaili, Adili Abudureheman, Yimuranjiang Subuhati, et al*

(1057) Preparation of oleanolic acid mitochodrial targeting liposome and its anti-pancreatic cancer effect
…… *TAN Xiao-ke, WU Xiang-xiang, ZENG Hua-hui, et al*

(1064) Mechanism of action of Sichen Zhike granules for acute attack of chronic bronchitis based on network pharmacology
……*CUI Shuang, ZHANG Ming-qian, LIANG Wu-lin, et al*

(1072) Thermosensitive gel of Astragalus polysaccharide improves radioactive dermatitis in mice by regulating substance P and P-glycoprotein
…… *ZHANG Guo-rong, ZHANG Jian-ping, MA Xiao-hua, et al*

(1077) Anti-liver fibrosis activity in vitro of *Cichorium glandulosum* seed and root compatibility …… *Adalaiti Muhetaer, ZANG Wei, LI Qian, et al*

(1083) Preparation and activity of recombinant mucunain
…… *WANG Zhen, WU Fang-hui, YIN Yi-feng, et al*

(1089) Effects of N and P on root nodules growth and nitrogen fixation of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. treated with Rhizobium solution
…… *GENG Ye-ye, WANG Gui-rong, ZHANG Yuan-fan, et al*

(1095) Research progress in myocardial ischemia reperfusion injury and its potential therapeutic target LCN2
…… *ZHU Xiang-mei, SHI Yu-he, LI Qing, et al*

(1102) Advance in anticancer activity and mechanism of natural small molecule compounds for nasopharyngeal carcinoma
…… *PU Huan-huan, QU Zhao, LIN Jin-rong, et al*

(1113) Advances in medication compliance of inhalers in patients with chronic obstructive pulmonary disease
…… *LIU Ji-heng, XIE Qian, HUANG Li, et al*

(1117) Research progress in drugs reducing vancomycin nephrotoxicity and related mechanism ……*PAN Kun-ming, JIANG Xiao-tian, XU Chen-qi, et al*

(1123) Research progress in traditional Chinese medicine treatment based on uric acid transporter for hyperuricemia
…… *ZHANG Feng-yang, XING Zhi-hua, SHEN Guang-huan, et al*

(1129) Research progress in the interaction between drastic purgatives and intestinal microflora ……*QIN Bei-bei, JIA Ze-fei, WANG Jia-li, et al*

(1136) Progress in the role of ulinastatin in ischemia-reperfusion injury
…… *ZHAO Shu-xin, ZHANG Xiong, SU Chen-lin, et al*

(1142) Textual research on the materia medica of Inula in the prescriptions
…… *CAI Meng-ru, WANG Kai-xin, YIN Dong-ge, et al*

(1148) Quality standard of Yigan Mingmu oral liquid by multi-wavelength HPLC fingerprint and multi-component quantitative analysis
…… *XIE Bai-bo, LI Yan-ru, XUN Yuan, et al*

(1153) Microbial contamination of 3 kinds of Pinelliae rhizome
…… *ZHU Wen-juan, LI Li-min, LI Jin-mei, et al*

(1158) Determination of equilibrium solubility and apparent oil-water partition coefficient of 4 steroidal saponins in *Trillium tschonoskii* by HPLC
…… *ZUO Yue-ming, CHEN Lin-lin, ZHANG Zhong-li*

(1162) Determination of dimethylamine in metformin hydrochloride by ion chromatography
…… *CHU Yun-jing, SHAO Fang-xian, CHEN Min-hui, et al*

(1167) Simultaneous determination of 6 chemical components in *Citrus medica* from different areas by quantitative analysis of multi-components with single marker method
…… *CAO Shi-zheng, ZHAO Deng-gao, MA Yan-yan, et al*

(1172) Determination of genotoxic impurity in linezolid by UPLC-MS/MS
…… *LI Yi-tian, MEI Qian, LIU Ying*

(1176) Gender difference in risk factors for chemotherapy-related nausea and vomiting …… *SUN Bo, LIU Xun, WANG Hui-pin, et al*

(1183) Current status and research progress in empagliflozin for cardiovascular diseases based on bibliometrics and visualization technology
…… *ZHAO Fu-kun, TANG Fei, LUO Min, et al*

(1188) Antibiotics combined with radical operation for necrotizing external otitis: a report of 26 cases …… *WANG Wei-na, GUO Heng, DI Xuan, et al*

(1192) Visual analysis of research progress in *Rhodiola* based on CiteSpace
…… *LIU Cheng-juan, HUANG Sheng-jie, DU Rui-jiao, et al*

(1198) Literature analysis of local application of antibiotics through the bronchoalveolar lavage for bronchiectasis with lung infection
…… *DUAN Man, SUN Zhi-meng, WANG Ya, et al*

(1205) Medication therapy management services for a renal transplant recipient
…… *XIE Jing, SU Yan, WU Qiong-shi*

(1212) Datamining of adverse event signals of linaclotide based on FAERS database …… *WANG Hao, YANG Li, LIU Xiao-ying, et al*

研究论文

槲皮素通过抑制 TGF-β/TAK1/JNK 和 TGF-β/Smad2 信号通路发挥抗肝纤维化的作用

王绍展，王媛媛，顾妍秋，陈春，李胜男，王蓉*，原永芳（上海交通大学医学院附属第九人民医院药剂科，上海　201999）

摘要：目的　探讨槲皮素抗肝纤维化的潜在作用机制。**方法**　通过腹腔注射 10 mg • kg^{-1} 二甲基亚硝胺构建大鼠肝纤维化模型，于造模第 3 周开始灌胃槲皮素（12.5、25、50 mg • kg^{-1}）治疗，造模第 4 周末处死；对肝组织进行 HE 和胶原染色，检测羟脯氨酸含量；检测肝功能指标和肝纤维化指标的变化；实时定量 PCR 检测肝星状细胞活化相关因子的表达水平；免疫组织化学法测定肝组织中 TGF-β/TAK1/JNK 和 TGF-β/Smad2 信号途径相关蛋白表达水平的变化。采用 MTT 法和 Western blot 法检测槲皮素对大鼠肝星状细胞系 HSC-T6 的增殖的影响以及对 TGF-β1 诱导的 TAK1、JNK、Smad2 蛋白磷酸化的抑制作用。**结果**　与模型组相比，槲皮素 25 和 50 mg • kg^{-1} 组大鼠肝纤维化程度明显降低；槲皮素（20 和 40 μmol • L^{-1}）能显著抑制 HSC-T6 细胞的增殖，并能有效地降低 TGF-β/TAK1/JNK 和 TGF-β/Smad2 信号途径相关蛋白磷酸化程度。**结论**　槲皮素可通过调节 TGF-β/TAK1/JNK 和 TGF-β/Smad2 信号通路影响肝星状细胞活化以发挥抗肝纤维化作用。

关键词：肝纤维化；槲皮素；肝星状细胞；TGF-β/TAK1/JNK 信号通路；TGF-β/Smad2 信号通路
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)05-0965-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.001

Effect of quercetin on liver fibrosis by inhibiting TGF-β/TAK1/JNK and TGF-β/Smad2 signaling pathways

WANG Shao-zhan, WANG Yuan-yuan, GU Yan-qiu, CHEN Chun, LI Sheng-nan, WANG Rong*, YUAN Yong-fang (*Department of Pharmacy, Shanghai 9th People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai* 201999)

Abstract: Objective　To determine the potential mechanism of quercetin on liver fibrosis. **Methods** The SD rat model of liver fibrosis was established by intraperitoneal injection of 10 mg • kg^{-1} dimethylnitrosamine. Quercetin (12.5, 25, and 50 mg • kg^{-1}) was intragastrically used at the third week for 2 weeks. The mRNA levels of the liver were detected by real-time PCR, and the protein expression of TGF-β/TAK1/JNK and TGF-β/Smad2 signaling pathways were determined by immunohistochemistry. The proliferation activity of HSC-T6 cells, the mRNA levels and protein expressing about fibrosis-indexs in HSC-T6 cells were determined by MTT, real-time PCR and Western blot, respectively. **Results**　The quercetin groups (25 and 50 mg • kg^{-1}) effectively attenuated the progress of liver fibrosis in the rats. Quercetin (20 and 40 μmol • L^{-1}) significantly inhibited the activation of HSC-T6 cells, and decreased the phosphorylation of TGF-β/TAK1/JNK and TGF-β/Smad2 signaling pathways. **Conclusion**　Quercetin has significant effect on liver fibrosis, whose mechanism may relate to inhibition of the activation of hepatic stellate cells by regulating TGF-β/TAK1/JNK and TGF-β/Smad2 signaling pathways.

Key words: liver fibrosis; quercetin; hepatic stellate cell; TGF-β/TAK1/JNK signaling pathway; TGF-β/Smad2 signaling pathway

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81703779，No.81803815）。

作者简介：王绍展，男，药师，主要从事中药抗肝纤维化分子机制研究，email：wsz_2001@126.com　*通信作者：王蓉，女，副主任药师，主要从事中药抗肝纤维化分子机制研究，email：wangrong198521@126.com

肝纤维化是各种慢性刺激或病因所致肝组织中细胞外基质（ECM）的过度增生和沉积，是一种可逆性的肝损伤修复反应，继续发展可导致肝硬化甚至肝癌。大量研究表明，肝星状细胞的活化是肝纤维化发生的中心环节[1-2]，在促纤维化因子作用下，激活的肝星状细胞急剧增殖并分泌大量 ECM，胶原纤维的合成和分解失衡，导致肝组织 ECM 过度沉积。目前尚无美国食品药品监督管理局（FDA）批准的特效的抗肝纤维化的化学或生物药物进入临床应用。槲皮素是一种黄酮类化合物（结构式见图 1），广泛存在于蔬菜、水果、茶等植物的花、叶、果实中，具有抗氧化、抗炎、免疫调节、抑制新生血管生成等作用[3]。研究证实槲皮素对多种实验性肝纤维化模型具有很好的保护作用[4-7]，对其抗肝纤维化作用机制 NF-κB/IκBα、Wnt 等信号传导通路方面进行了有益的探讨[4-8]，但仍然不够全面。研究发现 TGF-β 介导的 TGF-β/Smad 通路和非 Smad 依赖通路（如 TGF-β/TAK1/JNK 信号传导通路）在肝星状细胞的活化、增殖以及胶原合成的过程中发挥了非常重要的调控作用[9-12]。为探讨槲皮素抗纤维化的作用机制与 TGF-β/TAK1/JNK 和 TGF-β/Smad2 信号通路之间的关联，本研究构建了二甲基亚硝胺（DMN）诱导大鼠肝纤维化模型和 TGF-β 诱导 HSC-T6 细胞活化模型，从体内和体外两个方面，着重考察槲皮素对 TGF-β/TAK1/JNK 和 TGF-β/Smad2 信号通路的影响。

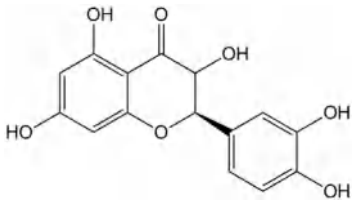


图 1 槲皮素的结构式

Fig 1 Chemical structure of quercetin

1 材料

槲皮素（CAS：117-39-5，上海诗丹德生物技术有限公司，纯度≥ 98%），DMN（Sigma），TAK1、Phospho-TAK1、JNK、Phospho-SAPK/JNK（美国 Cell signaling Technology），Smad2、Phospho-Smad2 单克隆抗体、α- 平滑肌肌动蛋白（α-SMA）（美国 Santa Cruz Biotechnology），转化生长因子 β1（TGF-β1）（美国 R&D Systems），免疫组化试剂盒（武汉博士德生物工程有限公司），大鼠肝功能检测试剂盒（南京建成生物工程研究所），血清肝纤维化指标检测试剂盒（郑州安图生物工程股份有限公司）。引物序列由上海生工工程技术服务有限公司合成；其他主要试剂均购自碧云天生物技术公司。

全自动生化分析仪（美国 Beckman LX-2）；Nanodrop 2000 分光光度计（Thermo Fisher Scientific）；LightCycler 480 仪器（Hoffman-La Roche）；奥德赛红外探测及图像成像分析系统（LI-COR Biotechnology，Nebraska）。

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只 [6 周龄，180 ～ 220 g，上海西普尔 - 必凯实验动物有限公司，许可证号：SCXK（沪）2013-0016]，饲养条件为标准动物实验室：温度 25 ℃，湿度（55±10）%，12 h/12 h 明暗循环，给予标准的食物和水。

2 方法

2.1 大鼠分组及给药

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只适应性饲养 2 周后，将大鼠随机分为正常组，DMN 模型组，槲皮素 12.5 mg • kg^{-1} 组、25 mg • kg^{-1} 组 和 50 mg • kg^{-1} 组，每组 8 只。除正常组腹腔注射相同剂量生理盐水外，其余大鼠均腹腔注射 1% DMN（10 mg • kg^{-1}），每周 3 次（每周前 3 日每日一次，连续注射 3 次，后 4 日不给予注射），共 4 周[13]。造模第 3 周开始灌胃给予槲皮素治疗，每日一次，治疗 2 周。在第 4 周结束时，再次称量大鼠体质量（空腹），并用 5% 水合氯醛麻醉，然后，从腹主动脉快速获取新鲜血液样本，3000 r•min^{-1}、4 ℃离心 10 min，－ 80 ℃下储存。所有肝脏样本获取后迅速称重，部分用 4% 多聚甲醛固定，进行组织病理学和免疫组化检测。剩余的肝脏样本液氮速冻后，在－ 80 ℃下冷冻保存。

2.2 肝功能、肝纤维化指标检测

采用全自动生化分析仪测定丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）、总胆红素（TBIL）。采用肝纤维化系列检测试剂盒测定透明质酸（HA）、血清Ⅲ型前胶原氨基末端前肽（PⅢNP）、Ⅳ型胶原（Ⅳ-C）和层粘连蛋白（LN）的水平。采用羟脯氨酸检测试剂盒检测肝组织中羟脯氨酸的含量。

2.3 肝脏组织病理学观察和免疫组化检测

将 4% 多聚甲醛固定 24 h 的肝组织标本，经脱水，石蜡包埋后，制成 5 μm 厚的切片，再经脱蜡冲洗，用苏木精伊红（HE）染色、天狼星红（Sirius）和 Masson 三色染色方法进行切片染色，光学显微镜下观察肝脏病理情况和胶原沉积的变化，并用 Image pro-Plus 6.0 软件计算肝组织中的胶原形成面积（胶原形成面积＝阳性染色面积 / 总面积 ×100%）。用抗 α-SMA、p-TAK1、p-JNK、Smad2 的抗体进行免

疫组化染色，黄色或棕褐色染色显示阳性信号，根据阳性染色的程度和位置进行评估[14]。

2.4　肝组织 mRNA 定量 PCR 检测

按 QIAGEN 总 RNA 提取试剂盒说明书，称取约 30 mg 肝组织，用 TRIzol 试剂均质离心提取 mRNA，Nanodrop 2000 分光光度计测定浓度。按照 TaKaRa 逆转录及 PCR 试剂盒说明书，在 LightCycler 480 仪器上进行逆转录合成 cDNA 并扩增。以 β-actin 为内参，用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式对目的基因进行定量分析。引物序列及扩增产物长度如表 1 所示。

表 1　mRNA 扩增的基因引物序列

Tab 1　Geneprimer sequences for mRNA amplification

基因名称	上游引物序列	下游引物序列	扩增产物长度 /bp
α-SMA	ACCATCGGGAATGAACGCTT	TTGCGTTCTGGAGGAGCAAT	263
Collagen Ⅰ	CTGACTGGAAGAGCGGAGAG	GAGTGGGGAACACACAGGTC	111
Collagen Ⅲ	TGGAGGTGAAAAGTCTGGCG	TCTCTGCAATTCCGAGCAGG	168
TIMP-1	ACGCTAGAGCAGATACCACG	CCAGGTCCGAGTTGCAGAAA	141
MMP-1	AACAGCAGAAGATTTCCCTGG	TTCGGAGGCTAAATCTGCGT	110
E-cadherin	CCTCTACAAGCAGGGCTTTG	CCGAAAAGACTGGAAAGCAG	150
Snail	GAGGACAGTGGCAAAAGCTC	TCGGATGTGCATCTTCAGAG	139
β-actin	TGTTGCCCTAGACTTCGAGCA	GGACCCAGGAAGGAAGGCT	153

2.5　MTT 法检测槲皮素对 HSC-T6 细胞增殖的影响

对数生长期 HSC-T6 细胞消化离心后，用 10% 血清的 DMEM 培养基调成 5×10^4 个 • mL^{-1} 的混悬液接种于 96 孔板中，每孔 100 μL，使细胞数为 5000 个 / 孔，将细胞分为正常组、槲皮素 6 个质量浓度梯度（2.5、5、10、20、40、80 μmol • L^{-1}），每组 3 个复孔，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱培养 24 h。待细胞贴壁后，正常对照组加 100 μL 培养基，其余各组加相应的药物 100 μL，继续培养 24 h 后，每孔加入 10 μL MTT 溶液（5 mg • mL^{-1}），4 h 后弃去上清液，加入 150 μL DMSO，振荡 10 min，用酶标仪在 490 nm 处测各孔吸光度值（*OD*），将正常对照组的细胞活性设为 100%，计算槲皮素各浓度处理组细胞活性，细胞活性（%）=（实验组平均 *OD* 值 / 对照组平均 *OD* 值）×100%。

2.6　定量 PCR 检测 HSC-T6 细胞活化相关基因转录情况

对数生长期 HSC-T6 细胞消化离心后，用无血清的 DMEM 培养基调成 5×10^4 个 • mL^{-1} 混悬液，接种于 6 孔板中，每孔 2 mL，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱培养过夜；将细胞分为正常组、TGF-β1（2 ng • mL^{-1}）组、TGF-β1 ＋槲皮素（10、20、40 μmol • L^{-1}）处理组；在 TGF-β1 和槲皮素共同处理 24 h 后，提取总 RNA，按照 TaKaRa 逆转录及 PCR 试剂盒说明书，在 LightCycler 480 仪器上进行逆转录合成 cDNA 并扩增。以 β-actin 为内参，用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式对目的基因（α-SMA、Collagen Ⅰ、MMP-I、TIMP-1）进行定量分析。

2.7　Western blot 法检测 HSC-T6 蛋白表达

取对数生长期 HSC-T6 细胞，按“2.6”项下方法处理并分组。槲皮素预处理 24 h 后，加入 TGF-β1 刺激 30 min；提取总蛋白，BCA 试剂盒测定蛋白浓度，加入 5 × 上样缓冲液，沸水浴变性 15 min，取 30 μg 蛋白上样，待 SDS-PAGE 电泳分离后，转移至 PVDF 膜，用 5% BSA 溶液 4 ℃ 封闭 3 h，加入一抗（1∶1000），4 ℃ 过夜；TBST 洗涤 3 次，5 min/ 次，加入二抗（驴抗鼠 Alexa Fluor 546 IgG 或驴抗兔 Alexa Fluor 488 IgG），室温孵育 2 h。采用奥德赛红外探测及图像成像分析系统进行检测，以 GAPDH 为内参，计算目的条带的灰度值[15]。

2.8　统计分析

使用 SPSS 21.0 对数据进行分析，数据以平均值 ± 标准差（SD）表示，统计分析方法采用单因素方差分析，$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　槲皮素对 DMN 诱导的大鼠肝脏总体形态及肝质量的影响

DMN 造模期间大鼠体质量增长情况如图 2A 所示，与正常组相比，DMN 模型组大鼠体质量增长显著下降（$P < 0.05$），而槲皮素各给药组的体质量增长情况好于 DMN 模型组，尤其是 25 和 50 mg • kg^{-1} 治疗组（$P < 0.05$）。造模结束时各组大鼠体质量如图 2B 所示，DMN 模型组大鼠体质量显著低于正常组（$P < 0.05$）；而同模型组相比，槲皮素 25 和 50 mg • kg^{-1} 治疗组能剂量依赖性地提高大鼠体质量（$P < 0.05$）。

图 2B 显示，DMN 模型组大鼠的肝质量同正

常组相比亦显著下降（$P < 0.05$），而槲皮素 25 和 50 mg • kg^{-1} 治疗组大鼠的肝质量显著高于模型组（$P < 0.05$），其中槲皮素 50 mg • kg^{-1} 组的治疗效果最优（$P < 0.05$）。

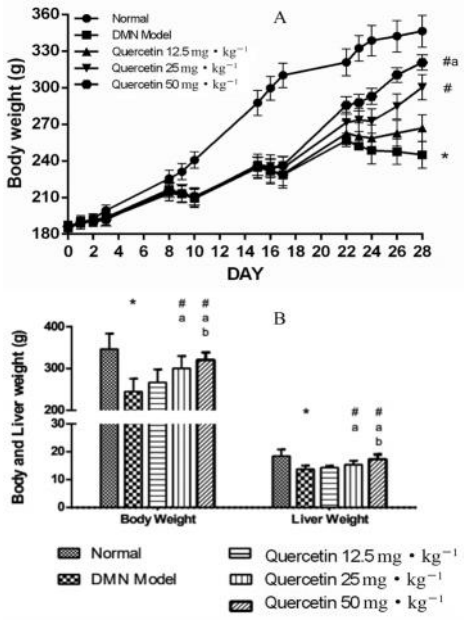


图 2　大鼠体质量和肝质量

Fig 2　Body mass and liver mass

A. 造模 4 周期间（4 weeks of DMN modeling）；B. 造模结束后（at the end of modeling）

注：与正常组相比，$^{*}P < 0.05$；与模型组相比，$^{\#}P < 0.05$；与槲皮素 12.5 mg • kg^{-1} 组相比，$^{a}P < 0.05$；与槲皮素 25 mg • kg^{-1} 组相比，$^{b}P < 0.05$。

Note：Compared with the normal group，$^{*}P < 0.05$；compared with the model group，$^{\#}P < 0.05$；compared with the quercetin 12.5 mg • kg^{-1} group，$^{a}P < 0.05$；compared with the quercetin 25 mg • kg^{-1} group，$^{b}P < 0.05$.

3.2　肝功能及血清肝纤维化的影响

槲皮素对肝功能指标 TBIL、ALT 和 AST 的影响如图 3A 所示。与正常组相比，DMN 模型组的 ALT、AST 和 TBIL 水平显著升高（$P < 0.05$）。与模型组相比，槲皮素组 TBIL、AST 和 ALT 的水平显著降低（$P < 0.05$），且呈剂量依赖性，说明槲皮素能显著改善 DMN 诱导的大鼠肝功能。

血清肝纤维化指标 HA、PⅢNP、Ⅳ-C 和 LN 的水平如图 3B 所示。DMN 模型组这四项指标明显高于正常组（$P < 0.05$），说明 DMN 造模后，肝组织中胶原合成增加，发生了显著的肝损伤和肝纤维化。而槲皮素各给药组与模型组比较，四项指标含量均下降（$P < 0.05$），50 mg • kg^{-1} 下调效果最显著（$P < 0.05$），25 mg • kg^{-1} 的治疗效果也优于 12.5 mg • kg^{-1}（$P < 0.05$）。

上述结果表明，槲皮素可有效减轻 DMN 诱导的大鼠肝损伤和肝纤维化，在 12.5 ～ 50 mg • kg^{-1} 给药剂量内，随着给药剂量增加，治疗效果逐步提升。

3.3　槲皮素对 DMN 诱导的大鼠肝脏组织病理学变化的影响

采用 HE 染色观察肝组织病理变化，采用 Sirius 和 Masson 染色观察胶原沉积的情况，结果如图 4A 所示。从图中可见，正常组肝组织中，肝细胞围绕中央静脉呈放射状整齐排列，肝小叶结构完整，没有变性或坏死的肝细胞以及其他病理特征。DMN 模型组肝细胞周围紊乱，胶原明显沉积，形成宽窄不一的纤维间隔，包绕、分割肝小叶，小叶结构紊乱，汇管区扩大，小叶内出现坏死，出现大量炎性细胞浸润。槲皮素各给药组能不同程度地改善肝组织损伤，减少胶原生成，降低肝小叶被破坏的程度，尤其在 50 mg•kg^{-1} 组，肝脏病变和炎性细胞浸润明显减少。

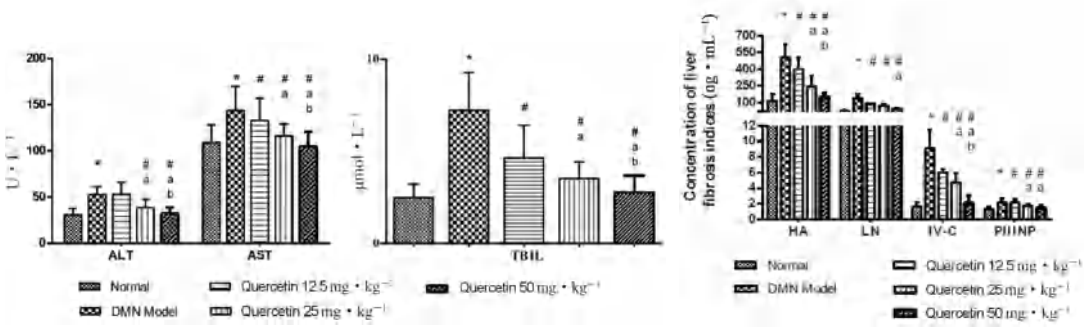
如图 4B 所示，与正常组相比，DMN 模型组胶原面积急剧扩大，羟脯氨酸含量显著升高（$P < 0.05$），槲皮素 25 和 50 mg • kg^{-1} 治疗 2 周后，能显著抑制胶原的生成，降低羟脯氨酸的含量，且 50 mg • kg^{-1} 的槲皮素治疗效果优于 25 mg • kg^{-1}（$P < 0.05$）。

3.4　槲皮素对纤维化肝组织中纤维化相关基因转录水平的影响

采用 Real-time PCR 检测肝组织中星状细胞活化相关基因（*α-SMA*、*E-cadherin*、*Snail*），胶原合成相关基因（*Collagen* Ⅰ 和 *Collagen* Ⅲ），以及胶原降解相关基因（*TIMP-1* 和 *MMP-1*）的 mRNA 水平，结果如图 5 所示。与正常组相比，DMN 模型组大鼠肝组织中 *α-SMA*、*Snail*、*Collagen* Ⅰ、*Collagen* Ⅲ 和 *TIMP-1* 的 mRNA 水平显著升高（$P < 0.05$），而 *MMP-1* 和 *E-cadherin* 的 mRNA 水平显著下调（$P < 0.05$）；与 DMN 模型组相比，槲皮素给药组能显著上调 *MMP-1* 和 *E-cadherin* 的 mRNA 水平，并显著抑制 *α-SMA*、*Snail*、*Collagen* Ⅰ、*Collagen* Ⅲ 和 *TIMP*-1 的 mRNA 水平，且效果呈剂量依赖性，50 mg • kg^{-1} 效果最显著（$P < 0.05$）。

3.5　槲皮素对纤维化肝组织中 α-SMA、p-TAK1、p-JNK、Smad2 蛋白表达的影响

免疫组织化学检测结果如图 6 所示。与正常组相比，DMN 模型组大鼠肝组织中 α-SMA、p-TAK1、p-JNK、Smad2 蛋白表达水平明显升高；槲皮素各给药组肝组织中这些蛋白表达显著降



A　　B

图 3　槲皮素对大鼠肝功能（A）及血清肝纤维化（B）的影响

Fig 3　Effect of quercetin on the liver function（A）and serum hepatic fibrosis（B）in rats

注：与正常组相比，$^{*}P < 0.05$；与模型组相比，$^{\#}P < 0.05$；与槲皮素 12.5 mg • kg^{-1} 组相比，$^{a}P < 0.05$；与槲皮素 25 mg • kg^{-1} 组相比，$^{b}P < 0.05$。

Note：Compared with the normal group，$^{*}P < 0.05$；compared with the model group，$^{\#}P < 0.05$；compared with the quercetin 12.5 mg • kg^{-1} group，$^{a}P < 0.05$；compared with the quercetin 25 mg • kg^{-1} group，$^{b}P < 0.05$.

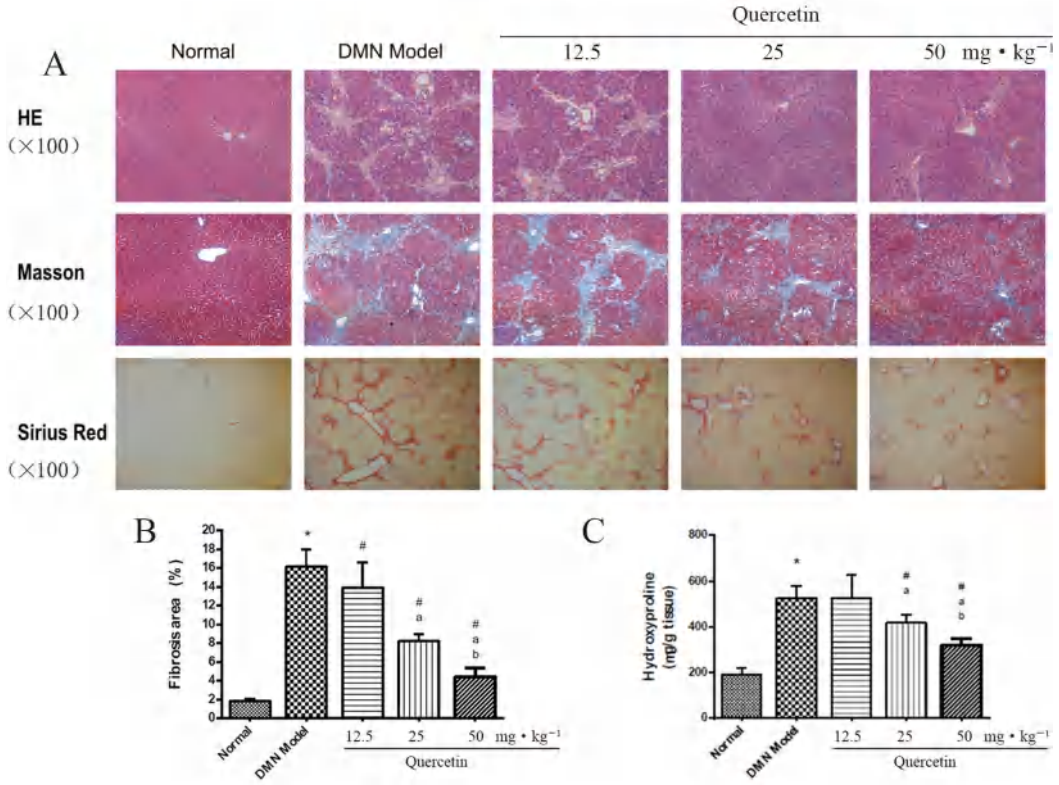


图 4　槲皮素对 DMN 诱导大鼠肝组织的病理学变化及胶原合成的影响

Fig 4　Effect of quercetin on the pathological changes and collagen synthesis of liver tissues in rats induced by DMN

注：与正常组相比，$^{*}P < 0.05$；与模型组相比，$^{\#}P < 0.05$；与槲皮素 12.5 mg • kg^{-1} 组相比，$^{a}P < 0.05$；与槲皮素 25 mg • kg^{-1} 组相比，$^{b}P < 0.05$。

Note：Compared with the normal group，$^{*}P < 0.05$；compared with the model group，$^{\#}P < 0.05$；compared with the quercetin 12.5 mg • kg^{-1} group，$^{a}P < 0.05$；compared with the quercetin 25 mg • kg^{-1} group，$^{b}P < 0.05$.

低，并且槲皮素 25 和 50 mg•kg^{-1} 组降低较明显。

3.6　*槲皮素对肝星状细胞 HSC-T6 增殖活性的影响*

通过 MTT 法检测槲皮素对 HSC-T6 细胞增殖活性的影响，结果如图 7 所示。低于 10 μmol • L^{-1} 的槲皮素处理 24 h，对 HSC-T6 细胞的增殖基本没有影响；当槲皮素浓度升至 20 μmol • L^{-1} 时，显示出一定的抑制作用，细胞活性为 84.07%（$P < 0.05$）；随着浓度继续上升，槲皮素对 HSC-T6 细胞的增殖抑制作用越来越强，当浓度达到 80 μmol•L^{-1} 时，细胞活性为 70.5%（$P < 0.01$）。

3.7　*槲皮素对 TGF-β1 刺激下 HSC-T6 细胞肝纤维化相关基因转录水平的影响*

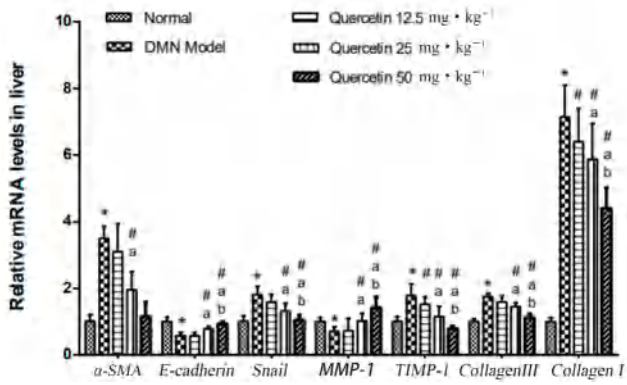


图 5 槲皮素抑制 DMN 诱导大鼠肝组织的纤维化相关基因转录

Fig 5 Quercetin inhibits the transcription of fibrosis related genes in rat liver induced by DMN

注：与正常组相比，$^{*}P < 0.05$；与模型组相比，$^{\#}P < 0.05$；与槲皮素 12.5 mg • kg^{-1} 组相比，$^{a}P < 0.05$；与槲皮素 25 mg • kg^{-1} 组相比，$^{b}P < 0.05$。

Note：Compared with the normal group，$^{*}P < 0.05$；compared with the model group，$^{\#}P < 0.05$；compared with the quercetin 12.5 mg • kg^{-1} group，$^{a}P < 0.05$；compared with the quercetin 25 mg • kg^{-1} group，$^{b}P < 0.05$.

通过 Real-time PCR 评估槲皮素对 HSC 活化标志物 *α-SMA* 基因，胶原合成与降解相关基因（*Collagen* Ⅰ、*MMP-1*、*TIMP-1*）的转录水平的影响，如图 8 所示。与正常组比较，TGF-*β*1（2 ng•mL^{-1}）刺激 24 h，除 *MMP-1* 降低外，*α-SMA*、*Collagen* Ⅰ、*TIMP-1* 的 mRNA 水平均显著升高（$P < 0.05$）；与 TGF-*β*1 刺激组相比，槲皮素（10 ～ 40 μmol • L^{-1}）处理 24 h，能剂量依赖性地抑制这些基因的转录变化（$P < 0.05$）。

3.8 槲皮素对 TGF-*β*/TAK1/JNK 和 TGF-*β*/Smad2 信号传导通路相关蛋白表达水平的影响

采用 Western blot 法检测 TGF-*β*/TAK1/JNK 和 TGF-*β*/Smad2 信号传导通路相关蛋白在 HSC-T6 细胞中的变化情况，结果如图 9 所示。与正常组相比，TGF-*β*1（2 ng • mL^{-1}）刺激 30 min，能显著地升高 p-TAK1、p-JNK 和 p-Smad2 水平（$P < 0.05$）；槲皮素（20、40 μmol • L^{-1}）预处理 24 h 能剂量依赖性地下调 p-TAK1、p-JNK 和 p-Smad2 水平（$P < 0.05$）。

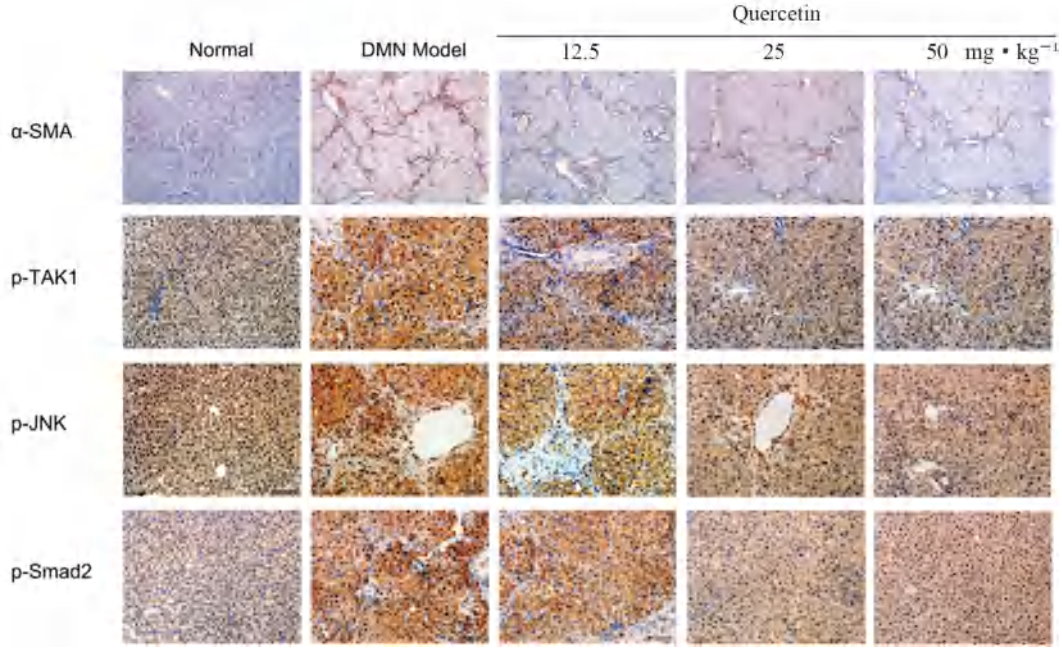


图 6 槲皮素对 DMN 诱导的纤维化肝组织表达纤维化相关蛋白的调控作用

Fig 6 Effect of quercetin on the expression of fibrosis related proteins in DMN induced fibrotic liver tissues

4 讨论

肝纤维化是各种慢性肝损伤因素诱发的肝组织损伤修复反应，是各种慢性肝病向肝硬化进展的共同病理过程，由于肝纤维化具有可逆性特点，因此防治肝纤维化对于防治肝硬化具有重要的临床意义[16]。

DMN 诱导的大鼠肝纤维化模型，是常用的实验性肝纤维化动物模型[13，15]。本研究中发现槲皮素治疗 2 周，能剂量依赖性地下调 DMN 诱导肝纤维化大鼠血清 ALT、AST 和 TBIL 水平，改善大鼠肝功能；同时有效抑制血清肝纤维化指标上升，降低肝组织中羟脯氨酸的含量；对肝组织切片进行 HE、Sirius 和 Masson 染色，结果同样表明槲皮素可以有效抑制胶原生成，保护肝小叶的正常结构。这些结果说明槲皮素能有效缓解 DMN 诱导的大鼠肝损伤，降低胶原的沉积，阻遏肝纤维化的进程。

肝星状细胞的活化并大量合成胶原蛋白是肝

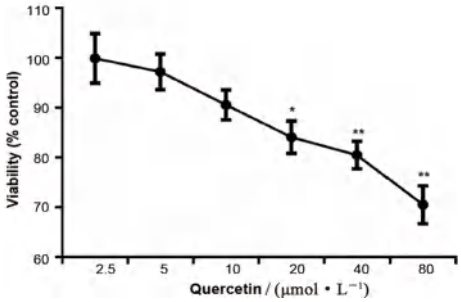


图 7　槲皮素对 HSC-T6 细胞增殖活性的抑制作用

Fig 7　Inhibitory effect of quercetin on the proliferation of HSC-T6 cells

注：与正常组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

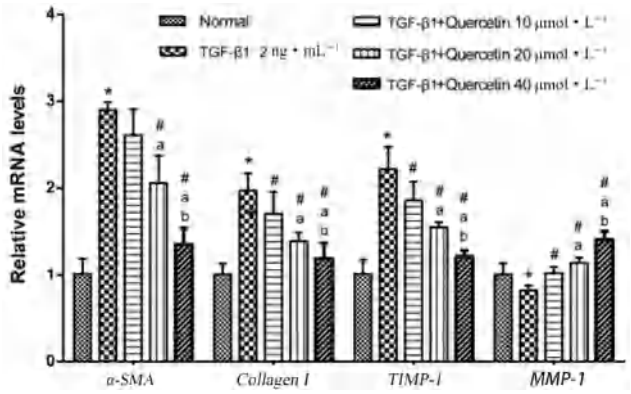


图 8　槲皮素对 HSC-T6 细胞肝纤维化相关基因 mRNA 水平的影响

Fig 8　Effect of quercetin on the mRNA levels of fibrosis-related factors in HSC-T6 cells

注：与正常组比较，$^{*}P < 0.05$；与 TGF-β1 组比较，$^{\#}P < 0.05$；与槲皮素 10 μmol • L^{-1} 组比较，$^{a}P < 0.05$；与槲皮素 20 μmol • L^{-1} 组比较，$^{b}P < 0.05$.

Note：Compared with the normal group，$^{*}P < 0.05$；compared with the TGF-β1 group，$^{\#}P < 0.05$；compared with the quercetin 10 μmol • L^{-1} group，$^{a}P < 0.05$；compared with the quercetin 20 μmol • L^{-1} group，$^{b}P < 0.05$.

纤维化发生发展的中心环节[17]。活化的星状细胞其特征性表现为：高表达 *α-SMA*、*Snail* 和 *TIMP-1*[18-20]，低表达 *E-cadherin* 和 *MMP-1*[21-22]，并且大量合成Ⅰ、Ⅲ型胶原等[23]。本研究结果发现，槲皮素能剂量依赖性地下调肝星状细胞中 *α-SMA*、*Snail*、*TIMP-1* 以及 *Collagen* Ⅰ、*Collagen* Ⅲ的 mRNA 水平，同时上调 *E-cadherin* 和 *MMP-1* 的 mRNA 水平。这表明槲皮素能有效抑制肝星状细胞的活化及合成胶原蛋白。

肝星状细胞的活化机制与 TGF-β 介导的信号通路密切相关[24]。TGF-β 首先在细胞表面与 TGF-β Ⅱ型受体（TβRⅡ）结合后，募集并激活 TGF-β Ⅰ型受体（TβRⅠ）；活化的 TβRⅠ进而招募并磷酸化激活受体 Smad2 和 Smad3；然后激活的 p-Smad2/3 与胞浆中的共同通路型 Smad4

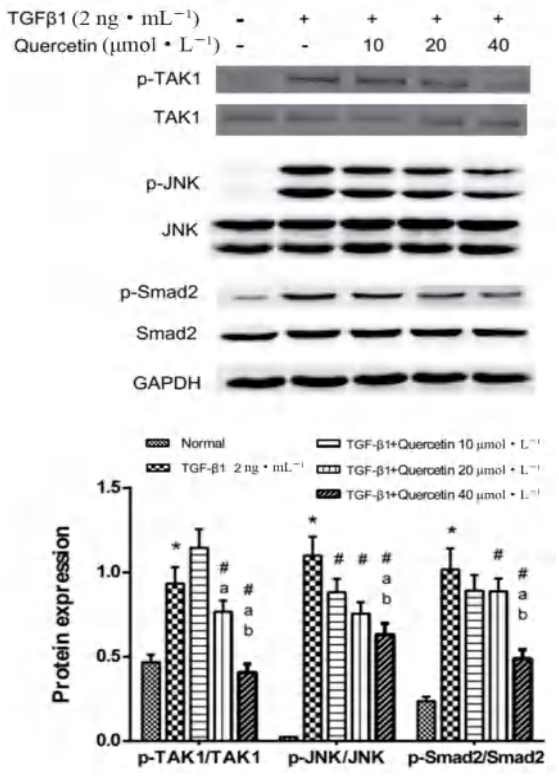


图 9　槲皮素对 HSC-T6 细胞 TGF-β/TAK1/JNK 和 TGF-β/Smad2 信号通路的调控作用

Fig 9　Regulation of quercetin on TGF-β/TAK1/JNK and TGF-β/Smad2 signal pathways in HSC-T6 cells

注：与正常组相比，$^{*}P < 0.05$；与 TGF-β1 组相比，$^{\#}P < 0.05$；与槲皮素 10 μmol • L^{-1} 组相比，$^{a}P < 0.05$；与槲皮素 20 μmol • L^{-1} 组比较，$^{b}P < 0.05$.

Note：Compared with the normal group，$^{*}P < 0.05$；compared with the TGF-β1 group，$^{\#}P < 0.05$；compared with the quercetin 10 μmol • L^{-1} group，$^{a}P < 0.05$；compared with the quercetin 20 μmol • L^{-1} group，$^{b}P < 0.05$.

形成异源复合体，转入胞核，调控肝星状细胞活化相关靶基因的转录，此为典型的 TGF-β 信号通路[25-26]。同样活化的 TβRⅠ也可以激活非 Smad 依赖的 TAK1/JNK 信号传导通路。TAK1 属于 MAPKKK 家族成员，活化后可以通过激活 MAPKK4/7 而磷酸化 JNK（p-JNK）[27]；JNK 是 MAPK 家族的成员，活化的 JNK（p-JNK）进一步激活其底物（包括 c-Jun、ATF2、Elk1、p53、NFAT4 等），从而调控肝星状细胞的活化和增殖，参与肝纤维化形成[28]。本研究发现槲皮素能显著下调 DMN 诱导肝纤维化模型大鼠肝组织中 p-TAK1、p-JNK 以及 Smad2 的水平；能剂量依赖性地下调 p-TAK1、p-JNK 和 p-Smad2 水平。这些结果充分说明，槲皮素能通过抑制 TGF-β/Smad 和 TGF-β/TAK1/JNK 信号通路活化，从而抑制星状细胞活化。

综上，本研究证实槲皮素具有显著的抗 DMN 诱导大鼠肝纤维化作用，通过抑制 TGF-β/Smad 和 TGF-β/TAK1/JNK 信号通路的激活与传导，来抑制肝星状细胞的活化和增殖，最终逆转肝纤维化进程。

参考文献

[1] Yin C，Evason KJ，Asahina K，et al. Hepatic stellate cells in liver development，regeneration，and cancer [J]. J Clin Invest，2013，123（5）：1902-1910.

[2] Puche JE，Saiman Y，Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis [J]. Compr Physiol，2013，3（4）：1473-1492.

[3] Yao LH，Jiang YM，Shi J，et al. Flavonoids in food and their health benefits [J]. Plant Foods Hum Nutr，2004，59（3）：113-122.

[4] Wang R，Zhang H，Wang Y，et al. Inhibitory effects of quercetin on the progression of liver fibrosis through the regulation of NF-κB/IκBα，p38 MAPK，and Bcl-2/Bax signaling [J]. Int Immunopharmacol，2017，47：126-133.

[5] 陈文龙，戴富臻，邵正勇，等 . 槲皮素对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化抑制作用和肝保护作用 [J]. 中国免疫学杂志，2021，37（1）：46-50.

[6] 闫宏宇，白庆云，盛雨辰，等 . 槲皮素对 ANIT 致小鼠胆汁淤积的保肝作用 [A]//2016 年第六届全国药物毒理学年会论文集 [C]. 2016：385-386.

[7] 徐标，韩春荣，何生松 . 槲皮素抗小鼠日本血吸虫肝纤维化的实验研究 [J]. 中国人兽共患病学报，2006，22（5）：423-427.

[8] Kawada N，Seki S，Inoue M. Effect of antioxidants，resveratrol，quercetin，and *N*-acetylcysteine，on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells [J]. Hepatology，1998，27（5）：1265-1274.

[9] Miyazawa K，Hara T. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signaling [J]. Genes Cells，2002，7（12）：1191-1204.

[10] SchnabI B，Bradh am CA，BennetI BL，et al. TAKI/JNK and p38 have opposite effects on rat hepatic stellate cells [J]. Hepatology，2001，34（5）：953-963.

[11] Tsukada S，Westwick JK，Ikejima K，et al. SMAD and p38 MAPK signaling pathways independently regulate alphal（I）collagen gene expression in unstimulated and transforming growth factor-beta-stimulated hepatic stellate cells [J]. J BioI Chem，2005，280（11）：10055-10064.

[12] Fabre T，Kared H，Friedman SL，et al. IL-17A enhances the expression of profibrotic genes through upregulation of the TGF-β receptor on hepatic stellate cells in a JNK-dependent manner [J]. J Immunol，2014，193（8）：3925-3933.

[13] Lee MF，Liu ML，Cheng AC，et al. Pterostilbene inhibits dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats [J]. Food Chem，2013，138（2-3）：802-807.

[14] Wang Y，Wang R，Wang Y，et al. Ginkgo bilobaextract mitigates liver fibrosis and apoptosis by regulating p38 MAPK，NF-κB/IκBα，and Bcl-2/Bax signaling [J]. Drug Des Devel Ther，2015，9：6303-6317.

[15] Li J，Li X，Xu W，et al. Antifibrotic effects of luteolin on hepatic stellate cells and liver fibrosis by targeting AKT/mTOR/p70S6K and TGFβ/Smad signalling pathways [J]. Liver Int，2015，35（4）：1222-1233.

[16] Pinzani M，Rombouts K. Liver fibrosis：from the bench to clinical targets [J]. Dig Liver Dis，2004，36（4）：231-242.

[17] Yin C，Evason KJ，Asahina K，et al. Hepatic stellate cells in liver development，regeneration，and cancer [J]. J Clin Invest，2013，123（5）：1902-1910.

[18] Puche JE，Saiman Y，Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis [J]. Compr Physiol，2013，3（4）：1473-1492.

[19] Peinado H，Olmeda D，Cano A. Snail，Zeb and bHLH factors in tumour progression：an alliance against the epithelial phenotype? [J]. Nat Rev Cancer，2007，7（6）：415-428.

[20] Fowell AJ，Collins JE，Duncombe DR，et al. Silencing tissue inhibitors of metalloproteinases（TIMPs）with short interfering RNA reveals a role for TIMP-1 in hepatic stellate cell proliferation [J]. Biochem Biophys Res Commun，2011，407（2）：277-282.

[21] Lim YS，Lee HC，Lee HS. Switch of cadherin expression from E-to N-type during the activation of rat hepatic stellate cells [J]. Histochem Cell Biol，2007，127（2）：149-160.

[22] Cao Q，Mak KM，Lieber CS. Leptin represses matrix metalloproteinase-1 gene expression in LX2 human hepatic stellate cells [J]. J Hepatol，2007，46（1）：124-133.

[23] 彭汝琴，王绍展，王媛媛，等 . 丹参素通过 MEK/ERK 信号通路抑制肝纤维化 [J]. 中南药学，2017，15（5）：580-586.

[24] Dewidar B，Meyer C，Dooley S，et al. TGF-β in hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis-updated 2019 [J]. Cells，2019，8（11）：1419.

[25] Mao Y，Zhang S，Yu F，et al. Ghrelin attenuates liver fibrosis through regulation of TGF-β1 expression and autophagy [J]. Int J Mol Sci，2015，16（9）：21911-21930.

[26] Jee MH，Hong KY，Park JH，et al. New mechanism of hepatic fibrogenesis：hepatitis C virus infection induces transforming growth factor β1 production through glucose-regulated protein 94 [J]. J Virol，2015，90（6）：3044-3055.

[27] Widmann C，Gibson S，Jarpe MB，et al. Mitogen-activated protein kinase：conservation of a three-kinase module from yeast to human [J]. Physiol Rev，1999，79（1）：143-180.

[28] Schnabl B，Bradham CA，Bennett BL，et al. TAK1/JNK and p38 have opposite effects on rat hepatic stellate cells [J]. Hepatology，2001，34（5）：953-963.

（收稿日期：2021-10-10；修回日期：2021-12-10）

重楼皂苷 H 诱导耐替莫唑胺胶质瘤 SHG44R 细胞凋亡和焦亡的作用研究

孙光强[1]，薛玉叶[2]，陆云阳[3]，杜洋[3]，王媛媛[1]，方菲[4]，纪玉强[4]，程光[5]，汤海峰[1, 3*]，邱鹏程[3*]
（1. 陕西中医药大学药学院，陕西　咸阳　712046；2. 空军特色医学中心药剂科，北京　100142；3. 空军军医大学药学系中药与天然药物学教研室，西安　710032；4. 西安市第一医院中心实验室，西安　710002；5. 空军军医大学西京医院神经外科，西安　710032）

摘要：目的　研究重楼皂苷 H 诱导耐替莫唑胺胶质瘤 SHG44R 细胞程序性死亡的途径和初步分子机制。**方法**　CCK-8 法检测给药后细胞活力影响，透射电子显微镜（TEM）检测给药后细胞形态及细胞器变化，流式细胞术检测给药后细胞凋亡率，Western blot 法检测凋亡和焦亡的相关蛋白表达，RT-qPCR 检测焦亡相关 mRNA 表达水平。**结果**　CCK-8 法检测结果表明重楼皂苷 H 呈时间剂量依赖性地抑制 SHG44R 增殖；TEM 观察到给药后细胞膜破裂、胞质出现囊泡，提示具有细胞凋亡和焦亡的表征；流式细胞术检测结果表明重楼皂苷 H 剂量依赖性地介导细胞凋亡；Western blot 法检测结果表明 Bax、Cleaved-caspase-3、Cleaved-caspase-1、Cleaved-*N*-terminal-GSDMD、IL-1β、IL-18 和 NLRP3 蛋白上调，Bcl-2 蛋白下调；RT-qPCR 结果表明，与正常组相比，给药后 caspase-1、caspase-11、GSDMD、IL-1β、IL-18 和 NLRP3 的 mRNA 表达水平显著上升。**结论**　重楼皂苷 H 诱导耐替莫唑胺胶质瘤 SHG44R 细胞凋亡与焦亡。

关键词：胶质瘤；重楼皂苷 H；凋亡；焦亡；替莫唑胺；耐药
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)05-0973-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.002

Effect of paris saponins H on inducing the apoptosis and pyroptosis of temozolomide-resistant glioma SHG44R cells

SUN Guang-qiang[1], XUE Yu-ye[2], LU Yun-yang[3], DU Yang[3], WANG Yuan-yuan[1], FANG Fei[4], JI Yu-qiang[4], CHENG Guang[5], TANG Hai-feng[1, 3*], QIU Peng-cheng[3*] (1. *School of Pharmacy*, *Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046; 2. *Department of Pharmacy*, *Air Force Medical Center*, *the Peple's Liberation Army*, *Beijing* 100142; 3. *Section of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine*, *Department of Pharmacy*, *Air Force Military Medical University*, *Xi'an* 710032; 4. *Central Laboratory*, *Xi'an No.*1 *Hospital*, *Xi'an* 710002; 5. *Department of Neurosurgery*, *Xijing Institute of Clinical Neuroscience*, *Air Force Medical University*, *Xi'an* 710032)

Abstract: Objective　To determine the programmed death pathway and molecular mechanism of paris saponins H (PSH) on the induction of apoptosis and pyroptosis of temozolomide-resistant glioma SHG44R cells. **Methods**　CCK-8 method was used to detect the effect of PSH on the cell viability of SHG44R cells; transmission electron microscopy (TEM) was used to detect the changes of cell morphology and organelles; flow cytometry was used to detect the rate of apoptosis; Western blot was used to detect the apoptosis and pyroptosis-related proteins; RT-qPCR was used to detect the expression of pyroptosis-related mRNA. **Results**　CCK-8 method showed that PSH inhibited the proliferation of

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 81973192，No. 81903862）；陕西省重点研发计划（No. 2020SF-311，No. 2021SF-388，No. 2021ZDLSF04-07）。
作者简介：孙光强，男，硕士研究生，主要从事中药活性成分抗肿瘤分子机制研究，email：1206734136@qq.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；邱鹏程，男，博士，实验师，主要从事中药和天然产物抗肿瘤药理研究，email：qpc023@126.com

SHG44R cells in a time and does-dependent manner. TEM showed that the cell membrane was ruptured and vesicles appeared in the cytoplasm in PSH-treated cells, suggesting the signs of apoptosis and pyrolysis. The flow cytometry showed that PSH mediated the apoptosis in a does-dependent manner. Western blot showed that Bax, Cleaved-caspase-3, Cleaved-caspase-1, Cleaved-*N*-GSDMD, IL-1*β*, IL-18 and NLRP3 proteins were up-regulated, and Bcl-2 protein was down-regulated. RT-qPCR showed that the mRNA expression levels of caspase-1, caspase-11, GSDMD, IL-1*β*, IL-18, and NLRP3 increased significantly in the PSH-treated cells as compared with those of the control group. **Conclusion** PSH may induce the apoptosis and pyroptosis of temozolomide-resistant glioma SHG44R cells.

Key words: glioma; paris saponin H; apoptosis; pyroptosis; temozolomide; drug resistance

胶质瘤是中枢性恶性肿瘤的一种，目前临床上主要采用手术联合放化疗治疗，但患者对其一线化疗药物替莫唑胺的耐药问题不容忽视[1]。同时，胶质瘤具有四高一低的发病特点，即高发病率、高复发率、高死亡率、高致残率和低治愈率[2]。因此，寻找一种新型的胶质瘤的化疗药物具有十分重要的意义。

细胞焦亡（pyroptosis）是一种细胞炎性程序性死亡方式，主要通过炎症小体介导包含 caspase-1 在内的多种 caspase 蛋白的激活，造成包括 GSDMD 在内的多种 Gasdermin 家族成员发生剪切和多聚化，造成细胞穿孔，进而引起细胞死亡[3-4]。相比于凋亡（apoptosis），焦亡发生更快，并伴随着大量促炎症因子的释放[5]。大量的证据表明细胞焦亡能够影响肿瘤的发展，可作为潜在的肿瘤治疗策略，为患者开发基于焦亡的新药提供思路[6]。

重楼皂苷 H（结构式见图 1，paris saponin H，PSH）属于偏诺皂苷元型甾体皂苷，在百合科重楼属多种植物中大量存在，本课题组先后从川产南重楼和陕产具柄重楼、狭叶重楼、云南重楼中分离鉴定了该化合物。据报道，PSH 具有抗肿瘤、抗炎、抗凝等作用[7-8]。课题组前期研究发现 PSH 通过 A1 和 A3 腺苷受体途径，抑制胶质瘤 U251 细胞增殖[9]，但其对耐替莫唑胺胶质瘤的作用机制研究尚无报道，尤其未见其诱导细胞焦亡的报道。故本研究基于细胞凋亡和焦亡对 PSH 抗耐药胶质瘤机制进行初步探讨。

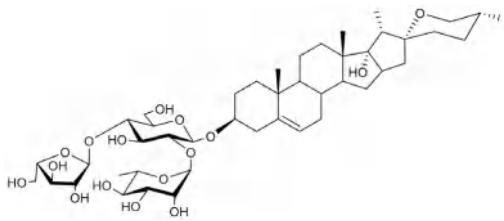


图 1 重楼皂苷 H 的化学结构式

Fig 1 Chemical structure of paris saponin H

1 材料

1.1 细胞来源

耐替莫唑胺胶质瘤 SHG44R 细胞株由本课题组前期研究建立成功[10]。

1.2 仪器

超净工作台（Thermo Fisher），CO_2 恒温培养箱（ESCO 公司），倒置显微镜（Olympus），血球计数板（上海市求精生化试剂仪器有限公司），Multiskan FC 酶标仪（赛默飞公司），流式细胞仪（BD FACSCalibur），透射电子显微镜（JEOL，JEM-1400），电泳系统（Bio-Rad），凝胶成像系统（Bio-Rad），荧光定量 PCR 仪（BIONEER，Exicycler 96），紫外分光光度计（Thermo，NANO 2000），真空干燥箱（SYSBERY 公司），微量移液器（BIOHIT 公司，Proline），超纯水系统（Heal 公司，NW10LVF），超速冷冻离心机（湖南湘仪公司）。

1.3 试药

重楼皂苷 H（宝鸡翊瑞生物科技有限公司，纯度：99.45%，批号：JOT-11279），CCK-8 试剂盒（Elabscience，批号：E-CK-A362），Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒（BD，批号：556547），DMEM 培养基（Gibco，批号：11965092），胎牛血清（Biological Industries，批号：04-121-1A），胰蛋白酶（Solarbio，批号：T1300），青链霉素混合液（Solarbio，批号：P1400），Cleaved-caspase-1 抗体（Cell Signaling Technology，批号：4199T）、*N*-GSDMD 抗体（abcam，批号：ab215203）、Cleaved-caspase-3 抗体（批号：19677-1-AP）、Bax 抗体（批号：50599-2-AP）、Bcl-2 抗体（批号：12789-1-AP）、IL-1*β* 抗体（批号：16806-1-AP）、IL-18 抗体（批号：10663-1-AP）、NLRP3 抗体（批号：19771-1-AP）、*β*-actin 抗体（批号：20536-1-AP）（Proteintech），TRIpure（BioTeke，批号：RP1001），BeyoRT

II M-MLV 反转录酶（碧云天，批号：D7160L），RNase inhibitor（BioTeke，批号：RP5602），2×Taq PCR MasterMix（Solarbio，批号：PC1150），SYBR Green（Solarbio，批号：SY1020），其他试剂均为国产分析纯，引物由金斯瑞生物科技有限公司合成。

2 方法

2.1 细胞培养

将 SHG44R 细胞培养于含 10% 胎牛血清，1% 青链霉素混合液的 DMEM 高糖培养基中，置于 37 ℃、5%CO_2 细胞培养箱中培养，取对数生长期且状态良好的细胞用于后续实验。

2.2 CCK-8 法检测细胞活力

取对数生长期的 SHG44R 细胞接种于 96 孔板中。待细胞贴壁后，加入不同浓度用 DMSO 配制的 PSH，培养不同时间后，弃上清液，每孔加入 10 μL CCK-8 溶液，孵育 2 h，用酶标仪在 450 nm 波长下测量各孔的吸光度（*OD*）值，计算细胞存活率。

2.3 透射电子显微镜观察细胞形态变化

取对数生长期的 SHG44R 细胞，PBS 洗涤，加入 6 μg·mL^{-1} 的 PSH，培养 24 h 后收集细胞，用 2% 戊二醛溶液固定 2 h，随后 PBS 洗涤 2 次，每次 10 min。然后在 1% 四氧化锇溶液中固定 2 h。用乙醇梯度脱水后，将细胞包埋在环氧树脂中并切成 50 ～ 60 nm 的切片。切片用醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色。透射电子显微镜分析切割样品。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

取对数生长期的 SHG44R 细胞，接种于 6 孔板中，待细胞完全贴壁后，加入不同质量浓度的 PSH（6、12 μg·mL^{-1}）处理 24 h。收集细胞，按照 Annexin V-FITC/PI 双染色细胞凋亡检测试剂盒进行细胞凋亡双染色，流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.5 Western blot 法检测凋亡相关蛋白表达

将细胞消化后接种于 6 孔板中，待细胞贴壁后，加入不同质量浓度的 PSH（6、12 μg·mL^{-1}）处理细胞 24 h。收集细胞制备蛋白样品，10% 聚丙烯胺 -SDS 凝胶电泳后转至 PVDF 膜上，5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h，加入一抗 4 ℃孵育过夜，PBST 洗 3 次，加入二抗室温孵育 1 h，PBST 洗 3 次。加入 ECL 化学发光液后放入全自动化学发光图像分析系统中曝光。

2.6 RT-qPCR 检测焦亡相关 mRNA 表达

取对数生长期的 SHG44R 细胞，接种于 6 孔板中，待细胞完全贴壁后，加入 3 μg·mL^{-1} 的 PSH 处理 24 h。收集细胞，加入 Trizol 试剂提取总 RNA。反转录制备 cDNA，除去培养基，PBS 洗 1 次，除去 PBS，每组加入 1 mL Trizol 后放置于冰面，轻摇使 Trizol 试剂充分接触 5 min。RT-qPCR 检测 PSH 给药组（3 μg·mL^{-1}）与对照组 SHG44R 细胞 caspase-1、caspase-11、GSDMD、IL-1β、IL-18、NLRP3 的 mRNA 的表达，采用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法计算 mRNA 相对表达量。

caspase-1：Forward，ATTACAGACAAGGGTGCT；Reverse，CTTTCGGAATAACGGAGT；

caspase-11：Forward，GCACAATGGGCTCTATCT；Reverse，CAGTCGTTCTATGGTGGG；

GSDMD：Forward，GGTTAGGAAGCCCTCAAGC；Reverse，CATGGCATCGTAGAAGTGG；

IL-1β：Forward，TATTACAGTGGCAATGAGG；Reverse，ATGAAGGGAAAGAAGGTG；

IL-18：Forward，ATAGCCAGCCTAGAGGTA；Reverse，ATCAGGAGGATTCATTTC；

NLRP3：Forward，CCCCGTGAGTCCCATTA；Reverse，GACGCCCAGTCCAACAT；

β-actin：Forward，GGCACCCAGCACAATGAA；Reverse，TAGAAGCATTTGCGGTGG。

2.7 统计分析

所有统计分析均采用 Graphpad prism 8 软件完成，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间差异通过单因素方差分析检验（One-way ANOVA），$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 PSH 对耐替莫唑胺胶质瘤 SHG44R 细胞活力的影响

采用 CCK-8 法检测不同剂量 PSH 处理 24、48、72 h 对细胞存活率的影响，结果表明 PSH 抑制 SHG44R 细胞增殖具有时间和剂量依赖性。PSH 在 24 h 对 SHG44R 的 IC_{50} = 6.986 μg·mL^{-1}，见图 2。

3.2 PSH 对耐替莫唑胺胶质瘤 SHG44R 细胞形态学影响

如图 3 所示，与正常组相比，PSH 组出现核染色质固缩、核膜皱褶，细胞器集中，出现凋亡小体，表明 PSH 可诱导细胞凋亡。此外，细胞内容物渗漏，细胞膜有轻微损伤，提示 PSH 可能诱导耐替莫唑胺胶质瘤细胞焦亡。

3.3 PSH 诱导耐替莫唑胺胶质瘤 SHG44R 细胞凋亡

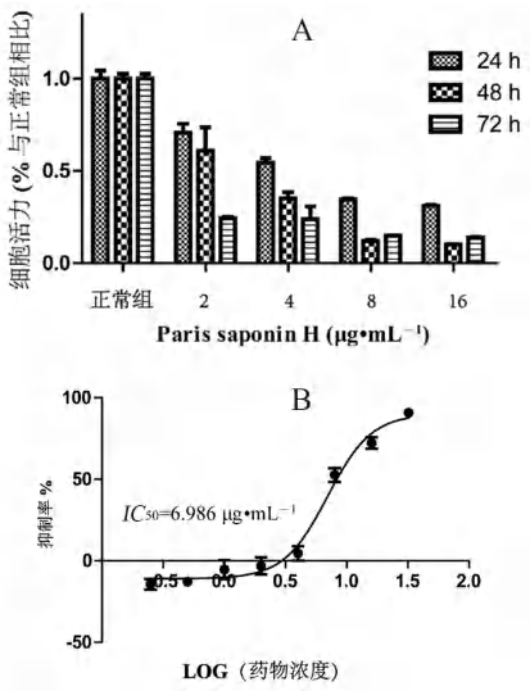


图 2 PSH 对 SHG44R 细胞活力的影响

Fig 2 Effect of PSH on the cell viability of SHG44R cells

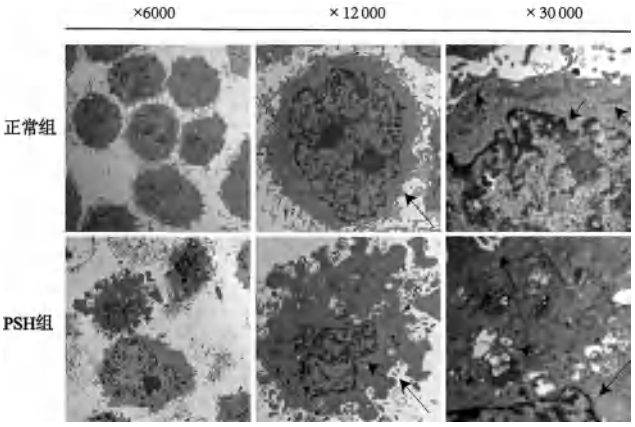


图 3 PSH 对 SHG44R 细胞形态学影响

Fig 3 Effect of PSH on the cell morphology of SHG44R cells

为了进一步证实 PSH 介导耐替莫唑胺胶质瘤 SHG44R 细胞凋亡，采用流式细胞术检测给予 PSH 后细胞凋亡率的变化。结果表明 PSH 呈剂量依赖性地诱导细胞凋亡（见图 4）。

3.4 PSH 对耐替莫唑胺胶质瘤 SHG44R 细胞凋亡的蛋白的影响

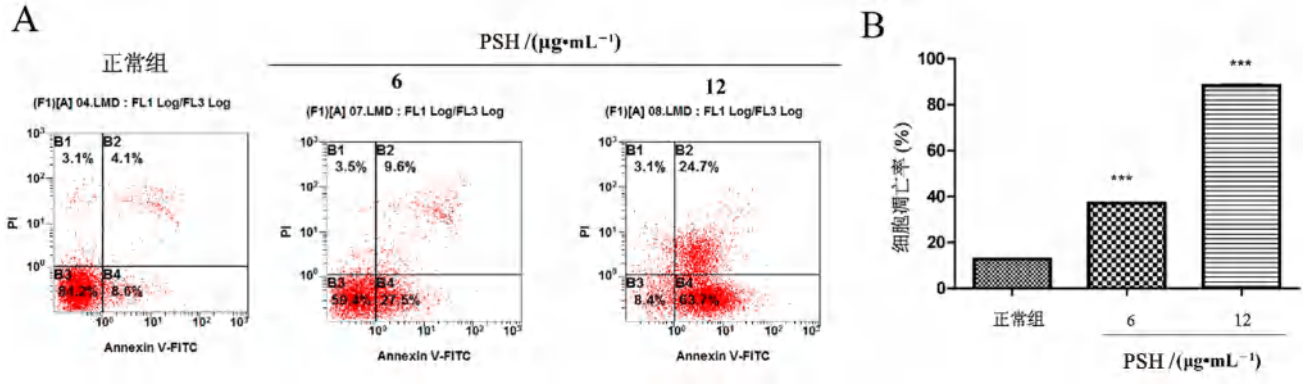


图 4 PSH 对 SHG44R 细胞凋亡的影响（$n = 3$）

Fig 4 Effect of PSH on the cell apoptosis of SHG44R cells（$n = 3$）

注：与正常组相比，$^{***}P < 0.001$。

Note：Compared with the normal group，$^{***}P < 0.001$.

采用 Western blot 法检测不同剂量 PSH 处理后细胞凋亡相关蛋白的表达。结果表明，给予 PSH 可使 Bax、Cleaved-caspase-3 蛋白上调，Bcl-2 蛋白下调（见图 5）。

3.5 PSH 诱导耐替莫唑胺胶质瘤 SHG44R 细胞焦亡

如图 6 所示，与正常组相比，PSH 组 caspase-1、caspase-11、GSDMD、IL-1β、IL-18 和 NLRP3 的 mRNA 表达量显著增加。进一步采用 Western blot 法检测不同剂量 PSH 处理后细胞焦亡相关蛋白的表达。结果表明，给予 PSH 使 Cleaved-caspase-1、Cleaved-*N*-terminal-GSDMD、

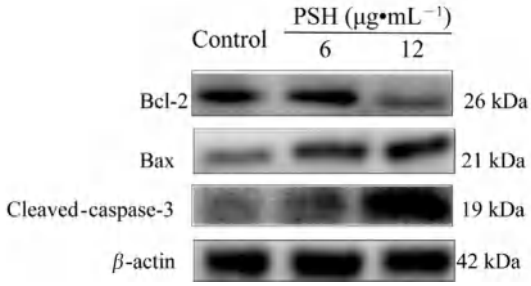


图 5 PSH 对 SHG44R 细胞凋亡关键蛋白的影响

Fig 5 Effect of PSH on the key proteins of cell apoptosis in SHG44R cells

IL-1β、IL-18、NLRP3 蛋白上调（见图 7）。蛋白表达和基因水平结果一致，说明 PSH 可诱导耐替莫唑胺胶质瘤 SHG44R 细胞焦亡。

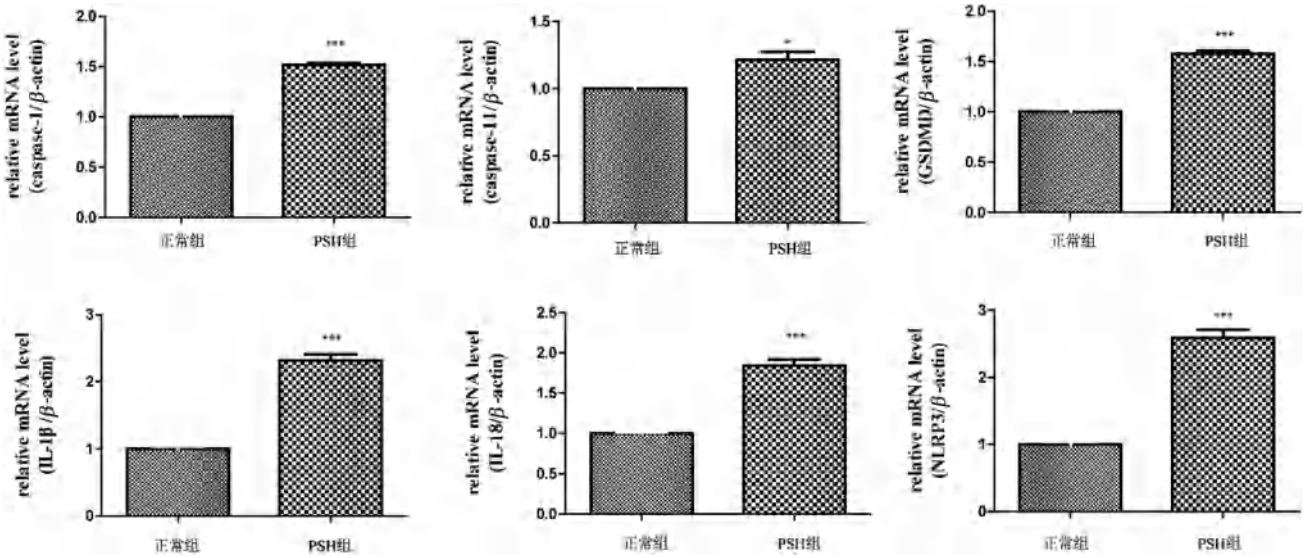


图 6　PSH 对 SHG44R 细胞焦亡 GSDMD 通路相关 mRNA 表达的影响（$n = 3$）

Fig 6　Effect of PSH on the expression of mRNA related to the GSDMD pathway of pyroptosis of SHG44R cells（$n = 3$）

注：与正常组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$。

Note：Compared with the normal group，$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$.

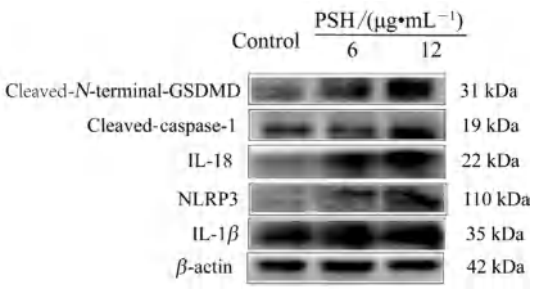


图 7　PSH 对 SHG44R 细胞焦亡 GSDMD 通路相关蛋白的影响

Fig 7　Effect of PSH on GSDMD pathway pyroptosis-related proteins in SHG44R cells

4　讨论

耐药是胶质瘤临床治疗面临的重要问题。天然产物是抗肿瘤先导化合物的重要来源[11]，从中药中寻找具有抗耐药胶质瘤作用的活性成分具有重要意义。既往研究已报道重楼皂苷抗肿瘤的多种作用机制，主要包括抑制增殖、凋亡、影响迁移与侵袭、阻滞细胞周期、联合一线化疗药物辅助治疗、逆转肿瘤耐药、氧化应激、改变肿瘤细胞膜通透性、抑制胞内药物外流，抑制血管增生、诱导自噬等[7-8，12]。但关于重楼皂苷对细胞焦亡等新型细胞死亡方式的影响的报道较少。本研究结果显示，PSH 可抑制耐替莫唑胺胶质瘤 SHG44R 细胞增殖，诱导 SHG44R 细胞凋亡和焦亡。

细胞凋亡是一种程序性细胞死亡，是多数重楼皂苷引起肿瘤细胞死亡的常见机制[13-14]。其中内源性通路是由促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白调节，如 Bcl-2 蛋白家族蛋白[15-16]，当 Bax/Bcl-2 比值发生变化，线粒体通透性增加，线粒体破裂，促凋亡蛋白细胞色素 C 将从线粒体释放到细胞质，激活下游 caspase 家族[17-18]。caspase-8 和 caspase-9 作为 caspase 的启动子，最终激活下游凋亡执行蛋白 caspase-3，通过裂解细胞底物诱导细胞凋亡。本研究结果显示，与正常组相比，重楼皂苷 H 可显著上调 SHG44R 细胞中凋亡相关蛋白 Cleaved-caspase-3、Bax 表达水平，显著降低 Bcl-2 蛋白表达水平，表明重楼皂苷 H 可诱导 SHG44R 细胞凋亡。

细胞焦亡在体外抑制肿瘤细胞增殖和体内肿瘤生长中起着关键作用[19]。与其他细胞死亡方式相比，具有独特的形态和机制[20-21]。Gasdermin 家族蛋白是细胞焦亡的关键效应分子，其诱导细胞焦亡的机制比较明确，同时也是其经典途径[22]。一方面，在外界的刺激下，细胞内的模式识别受体（NLR）作为感受器，识别信号，通过接头蛋白 ASC 与 Pro-caspase-1 结合，形成多蛋白复合物，激活 caspase-1，活化的 caspase-1 一方面切割 GSDMD，形成含有 GSDM-NT 活性域的肽段，诱导细胞膜穿孔，细胞破裂，释放内容物，引起炎症反应；另一方面，活化的 caspase-1 对 IL-1β 和 IL-18 前体进行切割，形成有活性的 IL-1β 和 IL-18，并释放到胞外，募集炎症细胞聚集，扩大炎症反应其是由炎性小体组装介导的，伴随着 GSDMD 裂解及 IL-1β 和 IL-18 的释放[23]。本研究结果显示，与正常组相比，PSH 可显著上调 SHG44R 细胞中 caspase-1、caspase-11、GSDMD、IL-1β、IL-

18、NLRP3 的 mRNA 表达水平，同时上调 Cleaved-caspase-1、Cleaved-*N*-terminal-GSDMD、IL-1β、IL-18 和 NLRP3，表明重楼皂苷 H 可诱导耐替莫唑胺胶质瘤 SHG44R 细胞焦亡。

综上所述，PSH 能够抑制耐替莫唑胺胶质瘤 SHG44R 细胞增殖，诱导其细胞凋亡与焦亡。

参考文献

[1] Bocangel DB，Finkelstein S，Schold SC，et al. Multifaceted resistance of gliomas to temozolomide [J]. Clin Cancer Res，2002，8（8）：2725-2734.

[2] Dolecek TA，Propp JM，Stroup NE，et al. CBTRUS statistical report：primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005—2009 [J]. Neuro Oncol，2012，14（Suppl 5）：v1-49.

[3] Shi JJ，Gao WQ，Shao F，et al. Pyroptosis：gasdermin-mediated programmed necrotic cell death [J]. Trends Biochem Sci，2017，42（4）：245-254.

[4] Cookson BT，Brennan MA，Pro-inflammatory programmed cell death [J]. Trends Microbiol，2001，9（3）：113-114.

[5] Tsuchiya K，Switching from apoptosis to pyroptosis：gasderminelicited inflammation and antitumor immunity [J]. Int J Mol Sci，2021，22（1）：426.

[6] Hou JW，Hsu JM，Hung MC，Molecular mechanisms and functions of pyroptosis in inflammation and antitumor immunity [J]. Mol Cell，2021，81（22）：4579-4590.

[7] Ji Y. A monograph of Paris（melanthiaceae）. Chapter 4. Economic importance [M]. Beijing：Science Press，2021.

[8] Zhou N，Xu LF，Park SM，et al. Genetic diversity，chemical components and property of biomass *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. Front Bioeng Biotech，2021，9：713860.

[9] Bi LL，Liu Y，Yang Q，et al. Paris saponin H inhibits the proliferation of glioma cells through the A1 and A3 adenosine receptor-mediated pathway [J]. Int J Mol Med，2021，47（4）：30.

[10] Xue YY，Lu YY，Sun GQ，et al. CN-3 increases TMZ sensitivity and induces ROS-dependent apoptosis and autophagy in TMZ-resistance glioblastoma [J]. J Biochem Mol Toxic，2022，36（3）：e22973.

[11] Wang Y，Zhong J，Bai JJ，et al. The application of natural products in cancer therapy by targeting apoptosis pathways [J]. Curr Drug Metab，2018，19（9）：739-749.

[12] Xu XH，Li T，Fong CM，et al. Saponins from Chinese medicines as anticancer agents [J]. Molecules，2016，21（10）：1326.

[13] D'Arcy M，Cell death：a review of the major forms of apoptosis，necrosis and autophagy [J]. Cell Biol Int，2019，43（6）：582-592.

[14] Fuchs H，Bachran D，Panjideh H，et al. Saponins as tool for improved targeted tumor therapies [J]. Curr Drug Targets，2009，10（2）：140-151.

[15] Birkinshaw RW，Czabotar PE. The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation [J]. Semin Cell Dev Biol，2017，72：152-162.

[16] Edlich F. BCL-2 proteins and apoptosis：recent insights and unknowns [J]. Biochem Biophys Res Commun，2018，500（1）：26-34.

[17] Pfeffer CM，Singh ATK. Apoptosis：a target for anticancer therapy [J]. Int J Mol Sci，2018，19（2）：448.

[18] Kiraz Y，Adan A，Kartal YM，et al. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis [J]. Tumour Biol，2016，37（7）：8471-8486.

[19] Yu JH，Li S，Qi J，et al. Cleavage of GSDME by caspase-3 determines lobaplatin-induced pyroptosis in colon cancer cells [J]. Cell Death Dis，2019，10（3）：193.

[20] Shi J，Zhao Y，Wang K，et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death [J]. Nature，2015，526（7575）：660-665.

[21] Chen X，He WT，Hu LC，et al. Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis [J]. Cell Res，2016，26（9）：1007-1020.

[22] Fischer FA，Chen KW，Bezbradica JS，et al. Posttranslational and therapeutic control of gasdermin-mediated pyroptosis and inflammation [J]. Front Immunol，2021，12：661162.

[23] Yu P，Zhang X，Liu N，et al. Pyroptosis：mechanisms and diseases [J]. Signal Transduct Tar，2021，6（4）：21.

（收稿日期：2022-01-04；修回日期：2022-03-15）

矮地茶对刀豆蛋白 A 致大鼠免疫性肝损伤的保护作用及机制探讨

韩冰[1]，程栋梁[1]，林世源[1]，陈卉[1]，张玮[1]，奉建芳[2]，吴卫[1*]（1. 桂林医学院药学院，广西　桂林　541199；2. 广西中医药大学药学院，南宁　530200）

摘要：目的　研究矮地茶对刀豆球蛋白 A（Con-A）诱导的急性免疫性肝损伤大鼠的保护作用及机制。**方法**　将大鼠随机分为空白组、模型组及矮地茶低、中、高（10、20、40 mg • kg^{-1}）剂量组，各组均通过灌胃给药；后尾静脉注射 Con-A（20 mg • kg^{-1}）建立肝损伤模型，测定肝脏指数，脾脏指数，血清 ALT、AST、ALP 水平及肝组织 MDA、SOD、GSH-Px、CD4$^+$、CD8$^+$水平，HE 染色观察组织病理变化。**结果**　与空白组相比，模型组 ALT、AST、ALP、MDA 水平普遍升高，SOD、GSH-Px 水平显著降低；与模型组相比，矮地茶低、中剂量组肝脏指数、脾脏指数，AST、ALT、ALP、MDA 水平及 CD4$^+$、CD8$^+$细胞数量均降低，SOD、GSH-Px 升高。**结论**　矮地茶对 Con-A 引起的大鼠免疫性肝损伤有一定保护作用，其机制可能与调节免疫平衡、炎症、氧化应激反应有关。

关键词：矮地茶；刀豆蛋白 A；免疫性肝损伤；作用机制
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)05-0979-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.003

Protective effect of Ardisiae japonicae herba on concanavalin A-induced immunological liver injury in rats and related mechanism

HAN Bing[1], CHENG Dong-liang[1], LIN Shi-yuan[1], CHEN Hui[1], ZHANG Wei[1], FENG Jian-fang[2], WU Wei[1*] (1. *School of Pharmacy*, *Guilin Medical University*, *Guilin*　*Guangxi*　541199; 2. *School of Pharmacy*, *Guangxi University of Chinese Medicine*, *Nanning*　530200)

Abstract: Objective　To determine the protective effect of Ardisiae japonicae herba on acute immunological liver injury induced by concanavalin A (Con-A) in rats and mechanism. **Methods**　SD rats were randomly divided into a blank group, a model group, and Ardisiae japonicae herba low, middle and high dose groups (10, 20, and 40 mg • kg^{-1}). Intragastric administration was used in each group. The rat model of immunological liver injury was established by tail vein injection of Con-A (20 mg • kg^{-1}). The liver-spleen coefficient, serum ALT, AST and liver tissue MDA, SOD, and GSH-Px were measured. The pathological features of hepatic tissue were observed by HE staining. The CD4$^+$ and CD8$^+$ positive cells in the lymphocytes were detected by ELISA. **Results**　Compared with the blank group, the level of ALT, AST, ALP and MDA in the model group generally increased, while the level of SOD and GSH-Px in the liver tissues were decreased obviously. Compared with the model group, the liver-spleen coefficient, AST, ALT, ALP and MDA levels of rats in the low and middle dose groups of Ardisiae japonicae herba were decreased, the levels of SOD and GSH-Px in the liver tissues were increased, and the number of CD4$^+$ and CD8$^+$ cells in liver tissue was decreased. **Conclusion**　Ardisiae japonicae herba has a protective effect on Con-A-induced immunological liver injury in rats, whose mechanism may be related to immunity balance regulation, inflammation and oxidative stress.
Key words: Ardisiae japonicae herba; concanavalin A; immunological liver injury; action mechanism

基金项目：国家自然科学基金委员会地区科学基金项目（No.81760704）；广西自然科学基金面上项目（No.2018GXNSFAA281332）。
作者简介：韩冰，女，在读硕士研究生，主要从事药物研发与转化方面的研究，email：2485827897@qq.com　*通信作者：吴卫，男，博士，教授，主要从事药物研发与转化方面的研究，email：wuwei_2007@126.com

据世界卫生组织统计，全球肝脏疾病已达到13亿，影响人类健康发展并构成全球主要的公共卫生问题之一[1]。病毒性肝炎、自身免疫性肝病、药物性肝损伤以及遗传性肝脏疾病是导致急性肝衰竭及死亡的主要病因。肝脏炎症和肝损伤是免疫细胞和细胞趋化、生长、凋亡因子相互作用的结果，在肝脏疾病的发展过程中起重要作用[2]。由于肝组织血供丰富、流速慢，免疫细胞易停留、作用于肝脏，释放促炎细胞因子及活性氧簇等分子，这些细胞因子和免疫应答之间的相互作用决定了肝脏病理的发展[3-4]，如不加以干预治疗，会逐渐演变成肝癌，导致死亡。目前肝脏疾病治疗方式以对症治疗为主，肝移植逐渐在临床上应用，但肝源稀少、治疗费用高、技术设备要求高等限制了其应用[5-6]，目前尚无特效治疗药物及手段。

矮地茶为紫金牛科植物紫金牛[*Ardisia japonica*（Thunb）Blume]的干燥全株，又名平地木、不出林等，广泛分布于长江流域以南各地[7]。《中国药典》2015年版一部记载矮地茶具有化痰止咳、清利湿热、活血化瘀的功效，用于新久咳嗽、湿热黄疸、经闭瘀阻、跌打损伤、风湿痹痛。矮地茶主要含有皂苷类、香豆素类、苯醌类和黄酮类等成分，具有止咳平喘、保肝抗炎、抗病毒、抗肿瘤等药理活性[8-12]。《本草纲目》记载其有治疗肝炎、急性肾炎、膀胱炎等功效。在广西、湖南等地区，民间常用矮地茶来治疗慢性肝炎，取得了良好的治疗效果。但其抗炎保肝作用机制及其药效物质基础尚不明确。

外界异物（病毒、药物、酒精、化学品）进入体内，引发机体自身免疫应答机制，分化大量炎症细胞，浸润肝脏组织是导致肝损伤的主要原因。刀豆球蛋白A（Con-A）诱导的肝损伤与病毒性肝炎、自身性免疫性肝病和肝衰竭病理生理过程中的肝脏免疫反应极其相似，造模方法已成熟且应用较为广泛[13]。本文以Con-A诱导的急性肝损伤SD大鼠为病理模型，探究中药矮地茶对肝损伤的保护作用及机制，为矮地茶进一步开发及应用提供资料。

1 材料

1.1 动物

SPF级雄性SD大鼠78只，4～5周龄，体质量190～230 g[湖南斯莱克景达实验动物有限公司，许可证号SCXK（湘）2019-0004]，饲养环境室温（23±2）℃，湿度50%～60%。所有大鼠均自由进食饮水，适应性饲养一周。实验用所有动物均经桂林医学院实验动物伦理委员会审查批准（批准号：GLMC201703029）。

1.2 试药

矮地茶经桂林医学院吴卫教授鉴定为紫金牛科植物紫金牛的干燥全株；Con-A试剂盒（批号：SLBT3093，美国Sigma公司）；血清丙氨酸转氨酶（ALT）试剂盒（批号：20201015）、天冬氨酸转氨酶（AST）试剂盒（批号：20201015）、碱性磷酸酶（ALP）试剂盒（批号：20201015）、丙二醛（MDA）试剂盒（批号：20200724）、超氧化物歧化酶（SOD）试剂盒（批号：20200723）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）试剂盒（批号：20200723）、$CD4^+$试剂盒（批号：E-EL-R2459c）、$CD8^+$试剂盒（批号：E-EL-R0219c）（南京建成生物工程研究所）。

1.3 仪器

KD-TS3A全自动封闭式组织脱水机、KD-BMⅡ生物组织冷冻包埋机KD-BL冷冻台（浙江科迪仪器设备有限公司）；生物组织摊片烤片机（湖北伯纳医疗科技有限公司）；BX-51正置荧光显微镜（日本Olympus公司）；iMark酶标仪（美国Bio-Rad公司）；RE52CS-1旋转蒸发仪（上海爱朗仪器有限公司）；LC-10N-50A冷冻干燥机（上海力辰邦西仪器科技有限公司）；GL-88B涡旋混合器（其林贝尔仪器制造有限公司）；ES-A电子天平（天津德安特有限公司）；UV-1800 PC紫外分光光度计（上海美普达仪器有限公司）。

2 方法

2.1 干膏制备

将中药矮地茶全草研磨成粗粉，干燥通风保存。精密称定干燥矮地茶粗粉400 g 4份，置于2000 mL圆底烧瓶内，做好标记。分别分批加入10倍量体积的60%、70%、80%、90%乙醇，加热回流提取两次，首次2.5 h，末次1.5 h。各提取液分别减压浓缩，回收乙醇，冷冻干燥得矮地茶60%、70%、80%、90%乙醇提取物干膏40.08 g、40.26 g、39.86 g、40.38 g。每克干膏相当于生药量9.98 g、9.94 g、10.03 g、9.91 g。阴凉干燥处保存，待后续实验使用（给药浓度均以浸膏重量计）。

2.2 造模及给药

2.2.1 矮地茶不同溶剂提取物的药效学考察 将36只SD大鼠随机分为6组，空白组、模型组及矮地茶干预组（60%、70%、80%、90%乙醇提取物），每组6只。空白组和模型组灌服等体积生理盐水，矮地茶干预组分别灌服60%、70%、

80%、90% 乙醇提取物干膏（20 mg • kg^{-1}），1 次 • d^{-1}，连续给药 7 d；末次给药 2 h 后，除空白组外，各组大鼠均一次性尾静脉注射剂量为 20 mg • kg^{-1} 的 Con-A 进行造模。造模结束后的各组大鼠，均禁食不禁水 12 h，称定大鼠体质量后取样。

2.2.2　矮地茶不同给药剂量的药效学考察　在确定矮地茶提取溶剂（80% 乙醇）的基础上，进行给药剂量的考察。将 30 只 SD 大鼠随机分为 5 组，空白组、模型组及矮地茶低、中、高剂量组（10、20、30 mg • kg^{-1} 3 种给药剂量），每组 6 只。空白组和模型组灌服等体积生理盐水，矮地茶干预组分别灌服对应剂量矮地茶，1 次 • d^{-1}，连续给药 7 d；末次给药 2 h 后，除空白组外，各组大鼠均一次性尾静脉注射 20 mg • kg^{-1} Con-A 造模。造模结束的各组大鼠，均禁食不禁水 12 h，称定大鼠体质量后，异氟烷麻醉，开始取样。

2.3　血清 ALT、AST、ALP 水平的测定

造模 12 h 后，将各组 SD 大鼠用异氟烷麻醉，酒精消毒，腹主动脉取血，使用肝素抗凝，3500 r • min^{-1} 离心 10 min 后取上清液，－ 20 ℃冰箱保存待用。于一周内按试剂盒操作检测血清 ALT、AST、ALP 水平。

2.4　肝脏指数、脾脏指数的测定

造模 12 h 后，将各组大鼠用异氟烷麻醉，酒精消毒，腹主动脉取血后，取肝脏、脾脏称定质量，颈椎脱臼处死大鼠，计算肝脏指数、脾脏指数 [肝脏或脾脏质量 / 体质量 ×100%]。

2.5　肝脏组织中 MDA、SOD、HYP、GSH-Px 水平的测定

剪取肝右小叶同一部位组织，于冰浴中用生理盐水制成 10% 肝组织匀浆并离心，取上清液，置－ 20 ℃冰箱保存待用。于一周内按试剂盒操作检测 MDA、SOD、GSH-Px 水平。

2.6　HE 染色观察肝脏组织病理

取肝左叶同一部位组织，修剪为 1 cm^3 大小组织块，中性甲醛固定，脱水、包埋、常规制备切片，HE 染色，光镜下观察病理切片并拍照。

2.7　ELISA 检测淋巴细胞中的 CD4$^+$、CD8$^+$

剪取肝右小叶同一部位组织，于冰浴中用生理盐水制成 10% 肝组织匀浆并离心，取上清液，置于－ 20 ℃冰箱保存待用。根据试剂盒操作要求稀释成相应浓度肝组织匀浆进行 CD4$^+$、CD8$^+$ 阳性细胞数量的测定。

2.8　统计学分析

应用 GraphPad Prism 8 软件进行分析，血清与肝脏组织检测指标以（$\bar{x}\pm s$）表示，符合正态分布且方差齐性资料采用独立样本 t 检验；以 $P \leqslant 0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　矮地茶不同溶剂提取物的药效学考察

3.1.1　不同溶剂提取物对肝损伤大鼠肝脾指数的影响　模型组较空白组肝脏、脾脏指数均显著升高（$P < 0.01$，$P < 0.001$）；与模型组相比，60%、90% 乙醇提取物肝脏指数均无明显差异。70%、80% 乙醇组肝脏指数显著降低（$P < 0.05$）。矮地茶各个浓度乙醇提物组脾脏指数较模型组均无明显差异（见表 1）。

表 1　矮地茶不同溶剂提取物对大鼠肝脏、脾脏指数的影响

Tab 1　Effect of different extraction of Ardisiae japonicae herba on liver and spleen index in rats

组别	肝脏指数	脾脏指数
空白组	3.390±0.208	0.235±0.045
模型组	4.257±0.291***	0.469±0.096**
60% 醇提取物组	4.095±0.144	0.581±0.169
70% 醇提取物组	3.836±0.227$^{\#}$	0.499±0.082
80% 醇提取物组	4.074±0.216$^{\#}$	0.392±0.082
90% 醇提取物组	4.309±0.126	0.439±0.074

注（Note）：与空白组相比，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$；与模型组相比，$^{\#}P < 0.05$（Compared with the blank group，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$；compared with the model group，$^{\#}P < 0.05$）。

3.1.2　不同溶剂提取物对肝损伤大鼠血清 AST、ALT 的影响　与空白组相比，模型组大鼠血清 AST、ALT 水平显著升高（$P < 0.0001$）；与模型组相比，矮地茶 70%、90% 乙醇提取物对 AST、ALT 水平无降低作用；60% 乙醇提取物物能够显著降低 AST 水平但对 ALT 水平无影响；80% 乙醇提取物组 AST、ALT 水平均显著降低（$P < 0.01$，$P < 0.001$），见图 1。

3.1.3　不同溶剂提取物对肝损伤大鼠肝组织病理变化的影响　HE 染色结果显示，模型组肝细胞索断裂且排列混乱，细胞肿胀，细胞膜边缘模糊，有炎性细胞浸润。80% 乙醇提取物组肝索排列较模型组整齐，且细胞无明显肿胀（见图 2）。

3.2　矮地茶 80% 乙醇提取物不同给药剂量的药效学考察

3.2.1　不同给药剂量对肝损伤大鼠肝脾指数的影响　与空白组相比，模型组肝脏、脾脏指数显著增大（$P < 0.001$）。与模型组相比，矮地茶低、中剂量组能降低大鼠肝脏指数（$P < 0.05$），高剂量组肝脏指数虽有降低但差异无统计学意义。矮

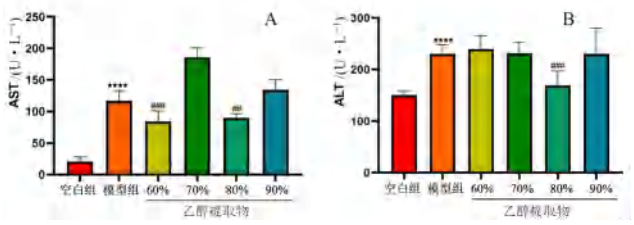


图 1　矮地茶不同溶剂提取物对大鼠血清 AST、ALT 的影响

Fig 1　Effect of different extraction of Ardisiae japonicae herba on the serum AST and ALT in rats

注（Note）：与空白组相比，$^{****}P < 0.0001$；与模型组相比，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$（Compared with the blank goup，$^{****}P < 0.0001$；compared with the model group，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$）。

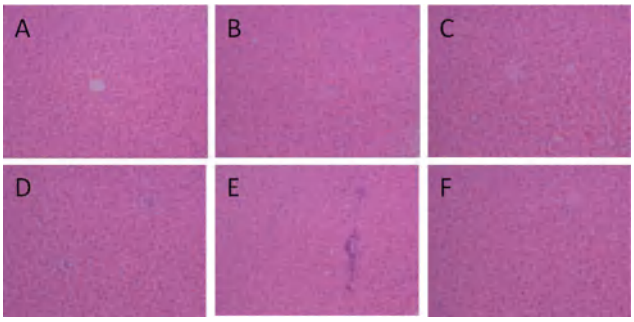


图 2　矮地茶不同溶剂提取物对大鼠肝组织病理变化的影响

Fig 2　Effect of different extraction of Ardisiae japonicae herba on hepatic tissue pathological features in rats

A. 空白组（blank group）；B. 模型组（model group）；C. 60% 乙醇提取物组（60% ethnoal extract group）；D. 70% 乙醇提取物组（70% ethnoal extract group）；E. 80% 乙醇提取物组（80% ethanol extract group）；F. 90% 乙醇提取物组（90% ethanol extract group）

地茶低、中、高剂量组脾脏指数与模型组相比均无显著差异（见表 2）。

表 2　不同给药剂量对大鼠肝脾指数的影响

Tab 2　Effect of different doses on liver and spleen index in rats

组别	肝脏指数	脾脏指数
空白组	3.752±0.260	0.266±0.047
模型组	4.469±0.372***	0.474±0.038***
矮地茶低剂量组	4.306±0.233$^{\#}$	0.460±0.089
矮地茶中剂量组	4.296±0.222$^{\#}$	0.457±0.084
矮地茶高剂量组	4.290±0.435	0.445±0.046

注（Note）：与空白组相比，$^{***}P < 0.001$；与模型组相比，$^{\#}P < 0.05$（Compared with the blank group，$^{***}P < 0.001$；compared with the model group，$^{\#}P < 0.05$）。

3.2.2　不同给药剂量对肝损伤大鼠血清 AST、ALT、ALP 的影响　如图 3 所示，与空白组相比，模型组血清 AST、ALT、ALP 活性显著升高（$P < 0.001$）；与模型组相比，矮地茶低、中、高剂量组均能降低 AST、ALT 活性（$P < 0.05$，$P < 0.01$，$P < 0.001$）；矮地茶低、中剂量组均能降低 ALP 活性（$P < 0.01$）。

3.2.3　不同给药剂量对肝损伤大鼠 MDA、SOD、GSH-Px 的影响　如图 4 所示，与空白组相比，模型组肝组织 GSH-Px、SOD 水平显著降低（$P < 0.001$），MDA 水平显著升高（$P < 0.0001$）；与模型组相比，矮地茶低、中剂量组均能显著降低 MDA 水平（$P < 0.05$），高剂量组无改善；矮地茶低、中、高剂量组能显著升高 SOD（$P < 0.001$）及 GSH-Px 活力水平（$P < 0.01$，$P < 0.001$），中剂量组最为明显。

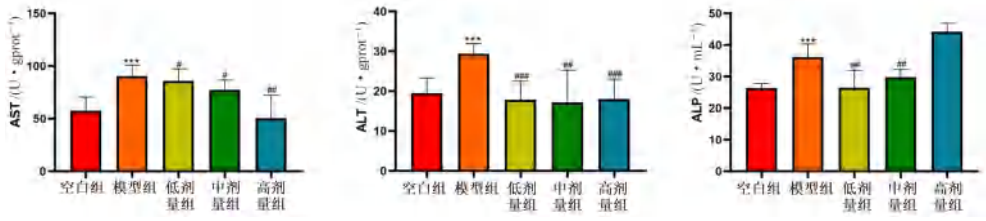


图 3　矮地茶不同给药剂量对大鼠血清 AST、ALT、ALP 的影响

Fig 3　Effect of different doses of Ardisiae japonicae herba on the serum AST，ALT and ALP in rats

注（Note）：与空白组相比，$^{***}P < 0.001$；与模型组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$（Compared with the blank goup，$^{***}P < 0.001$；compared with the model group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$）。

3.2.4　不同给药剂量对肝损伤大鼠肝组织 $CD4^+$、$CD8^+$数量的影响　如图 5 所示，与空白组相比，模型组 T 淋巴细胞 $CD4^+$、$CD8^+$细胞数量均显著上升（$P < 0.05$，$P < 0.001$）。与模型组相比，矮地茶各干预组 $CD4^+$、$CD8^+$细胞数量显著降低（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。

3.2.5　不同给药剂量对肝损伤大鼠肝组织病理变化的影响　如图 6 所示，模型组肝索排列紊乱，有肝索断裂迹象。细胞膜边缘模糊，且细胞肿胀明显，伴有大量炎性浸润。矮地茶各干预组肝索排列较为整齐，炎性浸润肉眼可见有所减轻，中剂量组的保护作用较其他组显著。

4　讨论

中药矮地茶为南方地区民间草药，常用于治疗肝炎，但缺乏相应的理论研究。本文通过 Con-A 诱导免疫性肝损伤大鼠动物模型，探讨矮地茶抗炎保肝的药效及作用机制，为民间用药的

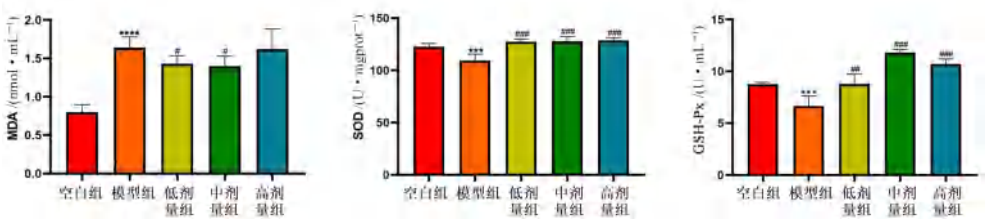


图 4　矮地茶不同给药剂量对 MDA、SOD、GSH-Px 的影响

Fig 4　Effect of different doses of Ardisiae japonicae herba on MDA, SOD and GSH-Px

注（Note）：与空白组相比，$^{****}P < 0.0001$，$^{***}P < 0.001$；与模型组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$（Compared with the blank goup，$^{****}P < 0.0001$，$^{***}P < 0.001$；compared with the model group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$）。

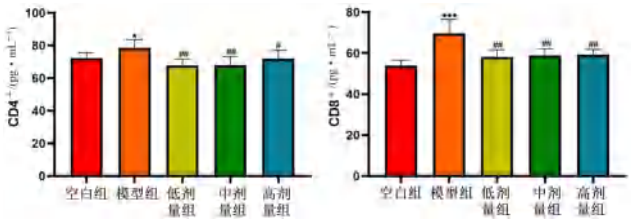


图 5　矮地茶不同给药剂量对 $CD4^+$、$CD8^+$的影响

Fig 5　Effect of different doses of Ardisiae japonicae herba on $CD4^+$ and $CD8^+$

注（Note）：与空白组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$；与模型组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$（Compared with the blank goup，$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$；compared with the model group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$）。

合理性提供理论依据。

本文主要以血清 AST、ALT、ALP 水平和 HE 病理切片以及肝组织 MDA、SOD、GSH-Px、T 淋巴细胞亚群指标来初步探究矮地茶抗 Con-A 诱导肝损伤药效及保护作用机制。血清 AST、ALT、ALP 可以反映肝细胞受损程度以及线粒体损伤的情况[14]，AST 与 ALT 存在于肝细胞质与线粒体，并作用于肝脏，当肝细胞受损，这两种酶便释放到血液中。本研究发现，矮地茶降低血清中 AST、ALT、ALP 水平效果明显，证明对 Con-A 诱导的肝损伤有一定的保护作用。

图 6　矮地茶不同给药剂量对大鼠肝组织病理变化的影响

Fig 6　Effect of different doses of Ardisiae japonicae herba on hepatic tissue pathological features in rats

A. 空白组（blank group）；B. 模型组（model group）；C. 低剂量组（low dose group）；D. 中剂量组（middle dose group）；E. 高剂量组（high dose group）

此前，已有研究证明肝损伤过程中氧化应激指标异常，MDA 为机体脂质过氧化物的最终产物，可严重破坏细胞膜结构，间接反映肝细胞损伤程度。SOD 是源于机体的活性物质，能消除机体在新陈代谢过程中产生的具有氧化性质的一类物质即活性氧（ROS），降低由 ROS 引起的机体过氧化产生的肝损伤[15]。本研究发现大鼠经 Con-A 诱导建模后，模型组肝组织中 MDA 水平显著升高，SOD 活力水平显著降低，提示 Con-A 可能诱导肝组织细胞一系列氧化应激反应，抑制 SOD 的活力，从而降低机体清除 ROS 的能力，加重肝细胞损伤。GSH 是细胞抗氧化主要成分，在肝脏内合成最多，GSH-Px 酶以 GSH 为底物，限制脂质过氧化，从而预防细胞膜受损，减少机体氧化反应产生的自由基对 DNA 的损害，从而对肝脏起到保护作用。结果表明，Con-A 诱导 SD 大鼠造模后，GSH-Px 活力显著降低，矮地茶干预后，能够有效降低 MDA 水平，升高 SOD 活力水平，上调 GSH-Px 活力水平，推测矮地茶可能通过调控氧化应激反应来应对 Con-A 诱导的肝损伤作用。

研究表明，Con-A 诱导肝损伤动物模型主要是通过活化 T 淋巴细胞致免疫性肝损伤，Con-A 刺激 T 淋巴细胞，激活肝脏组织免疫反应，$CD4^+$、$CD8^+$两种 T 淋巴细胞集聚肝门区，释放炎症因子攻击肝组织，致使肝细胞坏死、凋亡，肝组织受损[3, 13]。$CD4^+$为辅助 T 细胞（Th 细胞）的总称，Th 细胞受刺激后会分化成 Th0、Th1、Th2 等，这些被活化得的淋巴细胞会分泌 IL-6、IL-10、TNF-α、IFN-γ 等炎症因子，炎症因子浸润

肝细胞导致损伤产生。本研究发现 $CD4^+$、$CD8^+$ 两种 T 淋巴细胞在模型组较空白组表达显著升高，矮地茶干预组能够降低 $CD4^+$、$CD8^+$ T 淋巴细胞表达，抑制 T 淋巴细胞分化，调节 T 淋巴细胞亚群，改善免疫功能紊乱，降低炎症因子对于肝脏组织的浸润，起到保护肝脏组织的作用。

综上，矮地茶 80% 乙醇提取物中 20 mg • kg^{-1} 剂量组在降低 AST、ALT、ALP、MDA、$CD4^+$、$CD8^+$水平，在升高 GSH-Px、SOD 水平最为显著。本文通过 Con-A 诱导免疫性肝损伤大鼠动物模型，探讨矮地茶抗炎保肝的药效及作用机制，为民间用药的合理性提供理论依据。

参考文献

[1] Megahed FAK，Zhou X，Sun P. The interactions between HBV and the innate immunity of hepatocytes [J]. Viruses，2020，12（3）：285.

[2] Suresh D，Srinivas AN，Kumar DP. Etiology of hepatocellular carcinoma：special focus on fatty liver disease [J]. Front Oncol，2020，10：601-710.

[3] 王翔鹏，武璐璐，李丽丽，等 . 枫杨醇提物对刀豆蛋白 A 诱导的免疫性肝损伤的保护作用 [J]. 西安交通大学学报（医学版），2020，41（1）：157-160.

[4] Khan HA，Ahmad MZ，Khan JA，et al. Crosstalk of liver immune cells and cell death mechanisms in different murine models of liver injury and its clinical relevance [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int，2017，16（3）：245-256.

[5] 宋佳伟，邢蓉 . 异甘草酸镁的药理与临床 [J]. 中国新药与临床杂志，2012，31（10）：578-582.

[6] 毛海鹰，滕华安，廖礼艳，等 . 异甘草酸镁治疗重型肝炎肝衰竭疗效的 Meta 分析 [J]. 中国肝脏病杂志（电子版），2017，9（1）：15-19.

[7] 刘雅思，张薇，张尚坤，等 . 广东紫金牛科野生植物资源调查与应用研究 [J]. 中药材，2018，41（9）：2062-2066.

[8] Xiang S，Chen K，Xu L，et al. Bergenin exerts hepatoprotective effects by inhibiting the release of inflammatory factors，apoptosis and autophagy via the PPAR-γ pathway [J]. Drug Des Devel Ther，2020，14：129-143.

[9] Mejía EGD，Ramírez-Mares MV. Ardisia：Health-promoting properties and toxicity of phytochemicals and extracts [J]. Toxicol Mech Methods，2011，21（9）：667-674.

[10] Kobayashi H，Mejía ED. The genus Ardisia：a novel source of health-promoting compounds and phytopharmaceuticals [J]. J Ethnopharmacol，2005，96（3）：347-354.

[11] 刘伟林，杨东爱，余胜民，等 . 矮地茶药理作用研究 [J]. 时珍国医国药，2009，20（12）：3002-3003.

[12] 刘相文，侯林，张晓平，等 . 中药矮地茶不同洗脱部位抗病毒活性研究 [J]. 天然产物研究与开发，2017，29（1）：106-109.

[13] 高钰迪，田原，张向颖，等 . 异甘草酸镁对刀豆蛋白 A 诱导的急性肝衰竭小鼠模型的影响 [J]. 临床肝胆病杂志，2020，36（7）：1571-1576.

[14] 徐博，沈楠，安英，等 . 汉防己多糖对急性酒精性肝损伤小鼠氧化应激及肝细胞凋亡的影响 [J]. 中国药房，2017，28（7）：885-888.

[15] 王雪，司丽君，刘燕，等 . 天山堇菜总黄酮抗炎和免疫调节作用研究 [J]. 中药药理与临床，2021，37（2）：49-54.

（收稿日期：2021-10-02；修回日期：2021-11-30）

基于高效液相色谱指纹图谱的天麻饮片 - 标准汤剂 - 配方颗粒对比研究

王辙远[1]，张璠璠[1]，王隆隆[1]，杨忠杰[1]，陈恒文[2]，于晓涛[1]，王瑞[1*]（1. 漯河市中心医院，河南　漯河 462300；2. 中国中医科学院广安门医院，北京　100000）

摘要：目的　研究天麻饮片、标准汤剂及配方颗粒化学成分种类和量的相关性，为天麻配方颗粒的临床应用和研究提供参考。**方法**　建立高效液相色谱指纹图谱，从化学成分种类、相似度、共有峰峰面积、指标性成分含量 4 个方面对天麻饮片（12 批）、标准汤剂、配方颗粒（A ～ D 厂，各 3 批）进行对比研究。**结果**　饮片、标准汤剂、配方颗粒的共有峰数目分别为 13 个、12 个、12 个，与饮片（0.935）相比，标准汤剂（0.972）的相似度较高，配方颗粒（A 厂 0.879，B 厂 0.866，C 厂 0.854，D 厂 0.863）相似度稍低。以 12 批饮片共有峰总峰面积的均值为基准 1，天麻饮片、标准汤剂及配方颗粒的相对值为饮片（1.00）、标准汤剂（0.91）、配方颗粒（A 厂 0.62，B 厂 0.47，C 厂 0.52，D 厂 0.65）。测定了天麻素、对羟基苯甲醇、巴利森苷 A、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 E 共 6 种指标成分的含量，发现与饮片相比，标准汤剂、配方颗粒中各成分含量均有不同程度降低，成分相对值顺序为天麻素＞巴利森苷 C ＞对羟基苯甲醇＞巴利森苷 E ＞巴利森苷 B ＞巴利森苷 A。**结论**　天麻饮片、标准汤剂及配方颗粒的化学成分种类和数目基本一致，但含量存在差异，其中配方颗粒中指标成分的含量差异较明显，说明应建立全面的质量控制体系、调整临床使用当量，以促进天麻配方颗粒的临床合理应用。

关键词：天麻；标准汤剂；配方颗粒；饮片；指纹图谱；相似度
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)05-0985-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.004

Gastrodia pieces，standard decoction，and formula granules based on HPLC fingerprints

WANG Zhe-yuan[1], ZHANG Fan-fan[1], WANG Long-long[1], YANG Zhong-jie[1], CHEN Heng-wen[2], YU Xiao-tao[1], WANG Rui[1*] (1. *Central Hospital of Luohe*, *Luohe Henan* 462300; 2. *Guang'anmen Hospital*, *China Academy of Chinese Medical Sciences*, *Beijing* 100000)

Abstract: Objective　To determine the correlation between the types and numbers of chemical components of gastrodia pieces, standard decoction and formula granules, and to provide references for the clinical application and research of gastrodia formula granules. **Methods**　High performance liquid chromatography was used to establish a fingerprint spectrum, to campare gastrodia pieces (12 batches), standard decoctions, and formula granules (factory A － D, 3 batches from each factory) from types of components, similarity, area of common peaks and index components. **Results**　The number of common peaks were 13 in gastrodia pieces, 12 in standard decoction and 12 in formula granules. Compared with the similarity of gastrodia pieces (0.935), that of the standard decoction (0.972) was a bit higher, while those of the formula granules (factory A: 0.879, factory B: 0.866, factory C: 0.854, factory D: 0.863) were lower. Based on the average value of the total peak area of 12 batches of gastrodia pieces (1), the relative values of the gastrodia pieces, standard decoction and formula granules were 1.00 for the

基金项目：国家自然科学基金项目（No.82074396）；河南省工程研究中心（No. 豫发改高技〔2019〕569 号）；漯河市工程技术研究中心（No. 漯科 [2018]88 号）；漯河市创新型科技团队（No. 漯科 [2018]88 号）。
作者简介：王辙远，男，主管中药师，主要从事医院制剂研发与质量标准控制研究，email：wangzheyuan1122@163.com　***通信作者：**王瑞，男，主任药师，主要从事医院药学管理工作与中药制剂开发，email：wangrui56116@163.com

gastrodia pieces, 0.91 for the standard decoction, and for the formula granules (factory A: 0.62, factory B: 0.47, factory C: 0.52, factory D: 0.65). The content of 6 index components (gastrodin, *p*-hydroxybenzyl alcohol, parishin A, parishin B, parishin C, and parishin E) were determined. Compared with the gastrodia pieces, the content of each component in the formula granules and the standard decoction was reduced to different degrees. The relative value of the 6 components followed the order of gastrodin ＞ parishin C ＞ *p*-hydroxybenzyl alcohol ＞ parishin E ＞ parishin B ＞ parishin A. **Conclusion** The types and numbers of chemical components of gastrodia pieces, standard decoction and formula granules are basically the same, but with difference in the content. The content of index components in the formula granules is significantly different, indicating that a comprehensive quality control system is needed and clinical dose should be adjusted.

Key words: gastrodia; standard decoction; formula granule; pieces; fingerprint; similarity

天麻为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎，具有息风止痉、平抑肝阳、祛风通络的功效[1]。天麻最早记载于《神农本草经》，历代本草学都把天麻列为“上品”，素有“补益上药，天麻第一”的美誉[2]。研究表明天麻化学成分复杂，主要为天麻素、天麻苷元及其他的酚类、有机酸类、甾醇糖类和氨基酸，对循环、神经、骨骼、消化、内分泌、泌尿系统等病症均有潜在的治疗作用[3-5]。

标准汤剂（standard decoction，SD）是指以中医理论为指导、临床应用为基础，参考现代提取方法，标准化工艺制备而成的单味饮片水煎剂[6]。标准汤剂是中药研发质量控制及提升的重要举措[7]。中药配方颗粒（Chinese medicine formula granules，CFG）是指运用现代技术以单味中药为基础进行提取、浓缩、制粒、分装等工艺制成的一种粉末或颗粒状制剂[8-9]。中药配方颗粒保留了传统中药复方临证加减的特点，又具有免煎煮、易携带等优势，促进了中药剂型创新的进程，由于缺少科学统一的质量控制标准，导致中药配方颗粒质量良莠不齐[10]。

目前，关于天麻的研究较多，但多集中在单独药材、化学成分或配方颗粒等的研究，没有以天麻饮片（gastrodia pieces，GP）、标准汤剂、配方颗粒三者为基础进行的 HPLC 指纹图谱相关性和差异性的研究[11-13]。

本研究采用 HPLC 法建立天麻饮片、标准汤剂及配方颗粒的指纹图谱，同时测定多指标成分含量，比较三者间化学成分种类和量的差异，揭示三者间联系，为天麻配方颗粒的临床应用和研究提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；YRE-2000B 型旋转蒸发仪（河南省予华仪器有限公司）；SB25-12D 超声波清洗机（宁波新芝生物科技有限公司）；FW-80 型微型高速万能试样粉碎机（天津市工兴电器厂）；AUW-120D 型十万分之一电子天平（日本 SHIMADZU 公司）；Milli-Q 超纯水机（美国 Millipore 公司）；5810R 高速离心机（美国 Eppendorf 公司）。

1.2 样品

12 批天麻饮片均购买于漯河市 4 家医院及 2 家药店，经河南中医药大学苗明三教授鉴定均为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎。12 批天麻配方颗粒购买于漯河市 4 家医院和郑州市 2 家医院，详情见表 1。

表 1 天麻饮片与配方颗粒信息

Tab 1 Gastrodia pieces and formula granule information

天麻饮片	产地	批号	配方颗粒	厂家	浓缩比	批号
GP1	云南	200508	A1	A	1.0∶6.0	20031110
GP2	云南	2007015	A2			20101016
GP3	云南	20180401	A3			21061613
GP4	云南	180501	B1	B	1.0∶6.0	20041102
GP5	云南	191101	B2			20092701
GP6	云南	200201	B3			21032201
GP7	云南	200401	C1	C	1.0∶6.0	19112071
GP8	云南	2011013	C2			20051004
GP9	云南	2011015	C3			21010551
GP10	云南	201201	D1	D	1.0∶6.0	2009001W
GP11	云南	2101097	D2			2101001W
GP12	云南	210601	D3			2105002W

1.3 试药

天麻素（批号：DST190922-062，纯度：99.58%）、对羟基苯甲醇（批号：DSTDD012301，

纯度：99.99%）、巴利森苷 A（批号：DSTDB-010201，纯度：98.39%）、巴利森苷 B（批号：DSTDB006401，纯度：98.87%）、巴利森苷 C（批号：DSTDB006501，纯度：99.9%）、巴利森苷 E（批号：DSTDB006601，纯度：98.67%）（对照品，成都德思特生物科技有限公司）；乙腈、甲醇（色谱纯，美国 Fisher 公司），磷酸（色谱纯，天津科密欧化学试剂有限公司）；水为饮用水或超纯水。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

采用 Agilent 1260 高效液相色谱仪，色谱柱为 Agilent SB-C_{18}（4.6 mm×250 mm，5 μm），以 0.1% 磷酸水溶液（A）- 乙腈（B）为流动相进行梯度洗脱（0 ～ 10 min，5%B；10 ～ 25 min，5% ～ 40%B；25 ～ 30 min，40%B；30 ～ 31 min，40% ～ 5%B；31 ～ 36 min，5%B）；进样量 10 μL；流速 1 mL • min^{-1}，柱温 30 ℃，检测波长 220 nm[11-12]。

2.2　溶液的配制

2.2.1　对照品溶液　取天麻素、对羟基苯甲醇、巴利森苷 A、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 E 对照品适量，加甲醇分别制成质量浓度为 1.96、2.01、2.18、3.11、2.88、1.99 mg • mL^{-1} 的储备液；精密量取上述各储备液适量，混匀，制得含天麻素、对羟基苯甲醇、巴利森苷 A、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 E 分别为 490.39、138.06、122.94、120.56、110.71、154.79 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.2.2　供试品溶液　参考《中国药典》2020 年版一部方法，取 12 批天麻饮片各 10 g，加 100 mL 50% 甲醇，超声 30 min，补足称重，静置，取上清液，过 0.22 μm 微孔滤膜，得 12 批天麻饮片供试品（GP1 ～ GP12）[1]。

取 12 批天麻饮片各 20 g，置于 250 mL 圆底烧瓶中，加水 180 mL，充分浸润 30 min，加热回流 30 min，趁热过滤，收集滤液，药渣加水 140 mL，回流 20 min，趁热过滤；滤液合并，降压浓缩至 200 mL，静置，取上清液，过 0.22 μm 微孔滤膜，得 12 批天麻标准汤剂供试品（SD1 ～ SD12）[11]。

取相当于 10 g 天麻饮片的配方颗粒样品，加热水（80 ℃）100 mL，使完全溶解，静置，取上清液，过 0.22 μm 微孔滤膜，得 12 批配方颗粒供试品（A 厂：CFG1 ～ CFG3、B 厂：CFG4 ～ CFG6、C 厂：CFG7 ～ CFG9、D 厂：CFG10 ～ CFG12）[14-15]。

2.3　方法学验证

2.3.1　线性关系考察　精密取“2.2.1”项下混合对照品溶液，用甲醇稀释成系列混合对照品溶液，进样分析。以质量浓度为横坐标（*X*），峰面积为纵坐标（*Y*），得线性回归方程、线性范围及相关系数，结果见表 2。

表 2　各化学成分的回归方程、相关系数和线性范围

Tab 2　Regression equation，correlation coefficient and linearity

化合物	线性方程	相关系数	线性范围 /（μg • mL^{-1}）
天麻素	$Y = 6.397\times10^4X + 8.583\times10^4$	0.9998	70.056 ～ 490.389
对羟基苯甲醇	$Y = 9.289\times10^4X - 6.521\times10^4$	0.9999	19.722 ～ 138.056
巴利森苷 E	$Y = 7.001\times10^4X + 2.677\times10^4$	0.9999	17.563 ～ 122.938
巴利森苷 B	$Y = 1.546\times10^4X + 2.174\times10^4$	0.9997	17.222 ～ 120.555
巴利森苷 C	$Y = 1.629\times10^4X + 4.213\times10^4$	0.9999	15.816 ～ 110.710
巴利森苷 A	$Y = 2.285\times10^4X - 1.562\times10^4$	0.9999	22.113 ～ 154.791

2.3.2　精密度试验　取 GP1 供试品溶液，连续进样 6 次，以巴利森苷 E 为参照峰，计算得各主要共有特征峰相对保留时间的 *RSD* 均≤ 1.0%，相对峰面积 *RSD* 均≤ 1.6%，表明仪器精密度良好。

2.3.3　重复性试验　取 GP1 样品，平行制备 6 份供试品溶液，进样测定，以巴利森苷 E 为参照峰，计算得各主要共有特征峰相对保留时间的 *RSD* 均≤ 0.9%，相对峰面积 *RSD* 均≤ 1.2%，表明方法重复性良好。

2.3.4　稳定性试验　取 GP1 供试品溶液，分别在 0、3、9、24、48 h 测定，以巴利森苷 E 为参照峰，计算得各主要共有特征峰相对保留时间的 *RSD* 均≤ 1.0%，相对峰面积的 *RSD* 均≤ 1.2%，表明供试品在 48 h 内稳定。

2.3.5　加样回收试验　取已知含量的 GP1 样品 9 份，精密加入各成分质量分数的 50%、100%、150% 的混合对照品溶液，混匀，制备供试品溶液，进样分析。结果 6 种成分平均回收率均在 98.08% ～ 102.0%，*RSD* 均小于 2.0%，表明方法准确度良好。

2.4 指纹图谱研究

取“2.2.2”项下饮片、标准汤剂及配方颗粒供试品各 12 批，进样分析，记录色谱图，建立天麻饮片、标准汤剂及配方颗粒的指纹图谱。结果饮片供试品相似度均超过了 0.963，共标定 13 个共有峰；标准汤剂供试品相似度均大于 0.978，共标定 12 个共有峰，其中相对于饮片样品缺少了峰 2；配方颗粒供试品相似度均大于 0.899，共标定 12 个共有峰，其中相对于饮片样品，缺少了峰 2、峰 8，增加了峰 14（见图 1）。

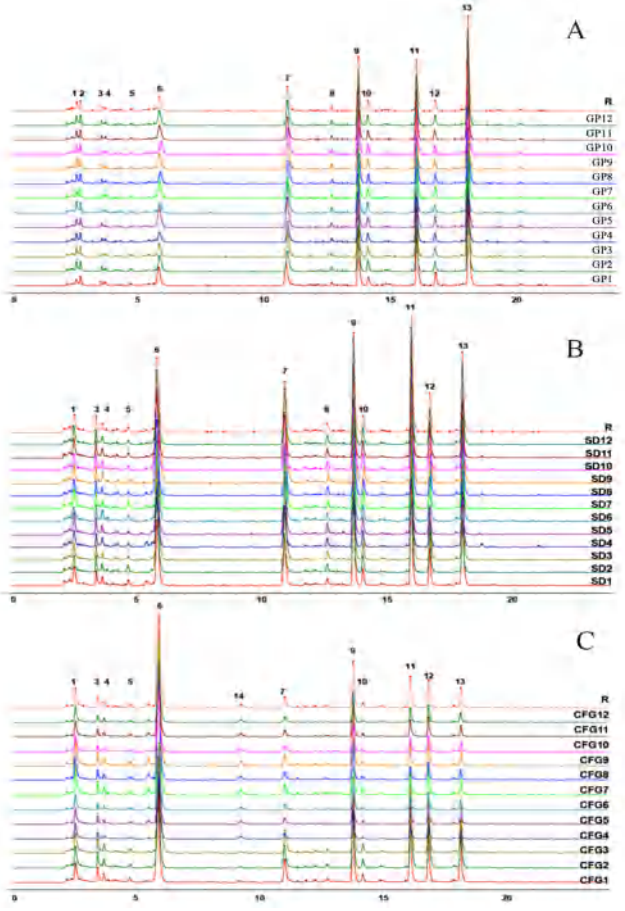


图 1 天麻指纹图谱结果

Fig 1 Fingerprint of gastrodia

A. 天麻饮片（gastrodia pieces）；B. 标准汤剂（standard decoction）；C. 配方颗粒（formulated granules）

2.5 化学成分指认

取混合对照品溶液、供试品（GP1）适量，进样分析，记录色谱图。根据化学对照品色谱、供试品溶液色谱比较，共指认 6 个色谱峰，分别为峰 6（天麻素）、峰 7（对羟基苯甲醇）、峰 9（巴利森苷 E）、峰 11（巴利森苷 B）、峰 12（巴利森苷 C）、峰 13（巴利森苷 A），见图 2。

2.6 样品含量测定

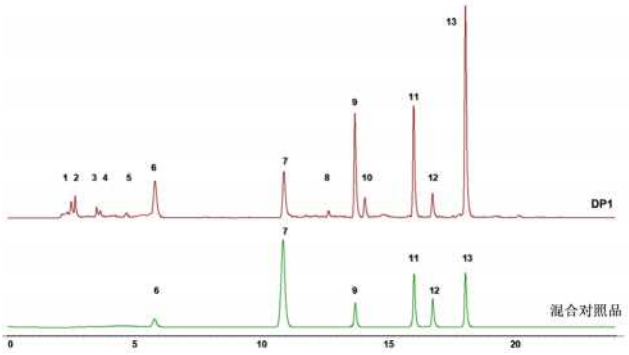


图 2 化学成分指认图

Fig 2 Chemical composition identification

6. 天麻素（gastrodin）；7. 对羟基苯甲醇（*P*-hydroxybenzyl alcohol）；9. 巴利森苷 E（parishin E）；11. 巴利森苷 B（parishin B）；12. 巴利森苷 C（parishin C）；13. 巴利森苷 A（parishin A）

按“2.1”项下色谱条件，同时测定天麻饮片、标准汤剂、配方颗粒供试品中天麻素、对羟基苯甲醇、巴利森苷 E、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 A 的含量。以 12 批 GP 样品中各成分质量分数均值为基准 1，计算天麻饮片、标准汤剂、配方颗粒中各成分质量分数的相对值，见表 3。

2.7 指纹图谱的比较

2.7.1 化学成分种类和数目比较 通过指纹图谱比较，天麻饮片、标准汤剂、配方颗粒的共有峰稍有差异，但基本保持稳定，这可能与提取过程中化学成分间的络合、氧化、分解、成盐等反应有关[15]。

2.7.2 指纹图谱相关性比较 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”对天麻饮片、标准汤剂及配方颗粒色谱图分析。以 S1 为参照图谱（采用中位数法、时间宽度为 0.2 min），进行多点校正和峰匹配，评价样品相似度。结果与饮片（0.935）相比，标准汤剂（0.972）的相似度较高，配方颗粒（A 厂：0.879、B 厂：0.866、C 厂：0.854、D 厂：0.863）相似度稍低。说明与配方颗粒相比，标准汤剂更具有优势；配方颗粒中各厂家存在较小差异，这可能与各厂家的制备工艺有关[16]，提示了统一制备工艺、加强质量管理的重要性。

2.7.3 共有峰总峰面积比较 以天麻饮片、标准汤剂及配方颗粒共有的特征峰（11 个，峰 1，峰 3 ～峰 7，峰 9 ～峰 13）为研究对象，计算天麻饮片、标准汤剂及配方颗粒共有峰总峰面积的均值。以 12 批饮片共有峰总峰面积的均值为基准 1，计算标准汤剂及配方颗粒的相对值[6]。结果天麻饮片、标准汤剂及配方颗粒共有峰总峰面积的相

表 3　天麻样品中各成分质量分数相对值结果

Tab 3　Relative value of the mass of each component in the gastrodia sample

样品		天麻素	对羟基苯甲醇	巴利森苷 E	巴利森苷 B	巴利森苷 C	巴利森苷 A
GP	DP1	1.077	0.948	1.007	1.167	1.347	1.134
	DP2	1.004	0.797	0.839	0.912	1.034	1.006
	DP3	0.892	0.970	1.108	0.946	0.872	1.101
	DP4	1.077	0.849	0.909	0.898	0.905	1.000
	DP5	0.962	1.250	0.981	1.169	1.092	1.085
	DP6	0.981	1.215	1.159	0.947	0.843	0.645
	DP7	1.021	0.918	0.900	1.014	1.162	1.046
	DP8	0.813	0.887	1.014	0.927	0.895	1.049
	DP9	1.032	1.184	1.068	1.047	0.962	0.894
	DP10	1.064	1.073	1.044	0.997	0.960	0.960
	DP11	1.049	0.912	0.963	0.982	0.935	1.063
	DP12	1.028	0.998	1.010	0.994	0.994	1.017
SD	SD1	1.060	0.817	0.938	0.968	0.851	0.544
	SD2	1.053	0.683	0.923	1.013	0.937	0.664
	SD3	1.069	1.044	0.829	1.183	0.898	0.657
	SD4	1.090	0.716	0.790	1.099	0.839	0.677
	SD5	1.093	1.035	0.895	0.979	0.932	0.689
	SD6	1.035	0.923	0.876	1.206	1.111	0.698
	SD7	1.021	0.738	0.789	0.987	0.886	0.605
	SD8	1.058	0.886	0.814	1.148	0.877	0.616
	SD9	1.171	0.972	0.883	1.093	0.870	0.638
	SD10	1.108	0.948	0.887	1.129	0.960	0.699
	SD11	1.098	0.799	0.768	1.035	0.802	0.674
	SD12	1.076	0.981	0.896	1.070	0.805	0.697
CFG-A	CFG1	1.016	0.551	0.489	0.463	1.101	0.245
	CFG2	1.026	0.544	0.489	0.464	0.900	0.246
	CFG3	1.012	0.553	0.490	0.464	0.936	0.244
CFG-B	CFG4	0.786	0.530	0.447	0.402	0.686	0.110
	CFG5	0.770	0.544	0.355	0.390	0.490	0.113
	CFG6	0.806	0.467	0.373	0.397	0.627	0.107
CFG-C	CFG7	0.821	0.516	0.422	0.547	0.732	0.149
	CFG8	0.824	0.358	0.415	0.445	0.811	0.142
	CFG9	0.818	0.461	0.417	0.403	0.838	0.154
CFG-D	CFG10	0.954	0.621	0.561	0.451	0.925	0.300
	CFG11	0.946	0.640	0.610	0.451	0.897	0.328
	CFG12	0.970	0.587	0.622	0.417	0.992	0.306

对值为饮片（1.00）、标准汤剂（0.91）、配方颗粒（A 厂：0.62、B 厂：0.47、C 厂：0.52、D 厂：0.65）。

2.7.4　已知化学成分含量比较　由表 3 可知，以 12 批饮片中各成分质量分数的均值为基准 1，计算天麻饮片、标准汤剂及配方颗粒的相对值，结果与饮片相比标准汤剂中各成分质量分数相对值除巴利森苷 A（0.654）有所降低外，其余 5 种成分基本保持一致；配方颗粒中各成分质量分数相对值均有不同程度的降低，其中天麻素降低不明显（0.896），巴利森苷 A 降低最为突出（0.204），6 种成分相对值顺序为天麻素＞巴利森苷 C ＞对羟基苯甲醇＞巴利森苷 E ＞巴利森苷 B ＞巴利森苷 A。采用 GraphPad Prism8.0.2（263）软件将表 3 数据生成含量测定结果热图，颜色越深表明相对值越大；反之颜色越浅相对值越小（见图 3）。

2.7.5　天麻样品聚类分析　将天麻饮片、标准汤剂及配方颗粒供试品共有特征峰（11 个）峰面积数据及 6 种指标成分含量测定的数据进行 z-score 标准化处理后，采用 SPSS 20.0 软件分别对样品进行聚类分析。结果共有峰峰面积及指标成分含量测定的聚类结果一致，即在欧氏平方距离为 10 时，可将样品分为两类，其中 CFG1 ～ CFG12 聚合为一类，其余样品为一类。采用 SIMCA 14.1 软件对样品聚类分析和 OPLS-DA 分析，以特征值＞ 1 为提取标准，共有峰峰面积数据组共得到 4 个成分，累积方差贡献率 94.6%，指标成分含量数据组共得到 3 个成分，累积方差贡献率 93.2%，均能概括色谱图绝大部分信息。结果，PCA 和 OPLS-DA 均将样品分为两类，CFG1 ～ CFG12 聚合为一类，其余样品为一类，与聚类分析结果一致，见图 4。

根据上述结果，可知以饮片为基准，标准汤剂相比配方颗粒的优势明显；不同厂家的天麻配方颗粒间质量基本保持稳定 [16]，这可能与配方颗粒的制备工艺等差异有关，提示了统一配方颗粒制备工艺的重要性和建立配方颗粒全面质量控制体系迫切性 [6]。

3　讨论

3.1　色谱条件的选择

本试验考察了不同色谱柱（Phenomenex、Agilengt、YMC），不同流动相 [（乙腈 -（0.1% 磷酸 - 水）、乙腈 -（0.05% 磷酸 - 水），不同流速（1、0.8 mL・min^{-1}）]，不同柱温（30、35 ℃），不同检测波长（220、270 nm）等对色谱图的影响，最终确定本研究的色谱方法。

3.2　指纹图谱比较的分析

本研究采用指纹图谱法比较了天麻饮片、标准汤剂及配方颗粒间的差异，发现三者相似度均大于 0.854，说明虽然受制备工艺差异影响，但是生药来源是基本相同的，所以相似度较高 [6，17]。共有峰数由饮片的 13 个，标准汤剂的 12 个到配方颗粒的 12 个，说明三者在化学成分种类上基本一致，通过共有峰总峰面积的比较，发现与饮

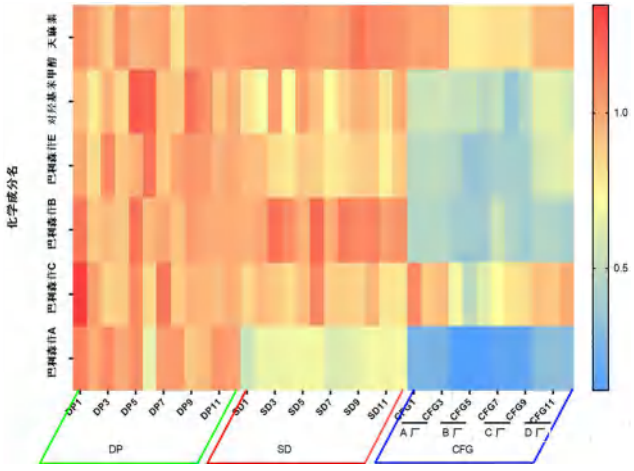


图 3 天麻样品含量测定相对值结果热图

Fig 3 Heat map of relative value of content in gastrodia sample

片相比标准汤剂及配方颗粒均有不同程度的降低，天麻饮片、标准汤剂及配方颗粒的相对值为饮片（1.00）、标准汤剂（0.91）、配方颗粒（A厂：0.62、B厂：0.47、C厂：0.52、D厂：0.65），说明标准汤剂与饮片相比基本保持一致，而配方颗粒中各成分的含量相对于饮片均有不同程度降低，提示了配方颗粒标示量与实际量存在误差，在临床应用中应进行修正。

3.3 指标成分选定及比较分析

天麻中化学成分复杂，以往天麻仅用天麻素与对羟基苯甲醇为评价指标，不能全面评价天麻的产品质量，本文增加了巴利森苷 A、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 E 4 个成分，以上均

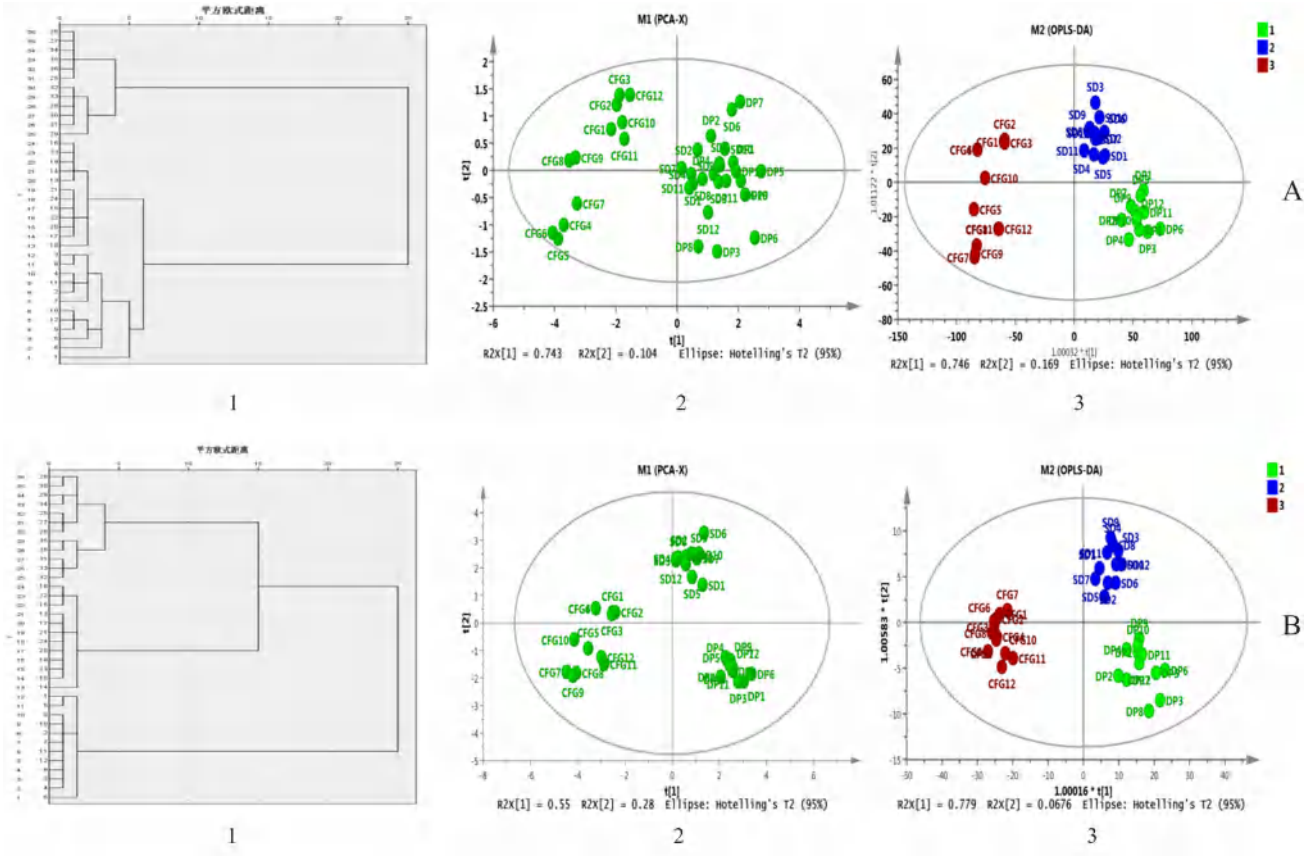


图 4 天麻样品聚类分析结果

Fig 4 Cluster analysis of common peak area of gastrodia

A. 共有峰峰面积分析结果（result of common peak areas）；B. 指标成分含量测定分析结果（result of content determination of index components）；1. 聚类分析图（cluster analysis）；2. 主成分分析图（principal component analysis）；3. OPLS-DA 得分图（OPLS-DA score）

是天麻重要的活性成分，具有抗惊厥、镇痛、镇静、祛风通络等多种药理作用[2-4, 18-19]，故本文选择上述 6 种成分为指标成分研究天麻饮片、标准汤剂及配方颗粒的相关性和差异。

本研究通过对比天麻饮片、标准汤剂及配方颗粒中 6 种成分的含量测定结果，发现与饮片相比标准汤剂中各成分质量分数除巴利森苷 A 降低外，其余 5 种成分基本保持一致；配方颗粒中各成分质量分数均有不同程度的降低，其中天麻素降低不明显，巴利森苷 A 降低最为突出。说明与饮片及标准汤剂相比配方颗粒中各化学成分含量有不同程度的降低，提示配方颗粒建立全面质量控制标准的重要性。

3.4 小结

综上分析，天麻饮片、标准汤剂及配方颗粒化学成分种类基本保持一致，但各成分质量分数存在一定差异，其中配方颗粒中含量降低较为突出，反映了配方颗粒应加强质量控制、调整临床使用当量，以促进天麻配方颗粒的临床合理应用。本研究采用指纹图谱和化学模式识别方法，从定性和定量两个方面，对比天麻饮片、标准汤剂及配方颗粒的相关性与差异，课题组今后将从临床疗效和谱效关系继续深入研究，以期为天麻的临床应用提供参考。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：59-60.

[2] 魏富芹，黄蓉，何海艳，等 . 天麻的药理作用及应用研究进展 [J]. 中国民族民间医药，2021，30（11）：72-76.

[3] 张志龙，郜玉钢，臧埔，等 . 天麻素、对羟基苯甲醇对中枢神经系统作用机制研究进展 [J]. 中国中药杂志，2020，45（2）：312-320.

[4] 柳威，邓林华，祁东利，等 . 天麻及其有效成分的药理作用概述 [J/OL]. 中药药理与临床，2021，37（4）：240-244，12.

[5] 谢笑天，李海燕，王强，等 . 天麻化学成分研究概况 [J]. 云南师范大学学报（自然科学版），2004，24（3）：22-25.

[6] 许鑫，姜慧洁，汪佳楠，等 . 基于传统煎煮标准汤剂的桂枝配方颗粒制备及质量标准研究 [J]. 中国药学杂志，2020，55（13）：1103-1110.

[7] 陈士林，代云桃 . 标准汤剂——提升中药配方颗粒质量的重要桥梁 [N]. 中国医药报，2021-03-09（3）.

[8] 朱峰，吴潍 . 中药配方颗粒存在的问题与应对策略 [J]. 中医药管理杂志，2020，28（9）：92-94.

[9] 刘安 . 中药饮片标准汤剂制备与质量标准研究方法概述 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（7）：1.

[10] 徐玉玲，雷燕莉，曾立，等 . 中药配方颗粒品种统一标准的有关问题探讨 [J]. 中草药，2020，51（20）：5389-5394.

[11] 杜俊潮，浦香兰，范恺磊，等 . 基于 UPLC 指纹图谱及一测多评法的天麻标准汤剂质量评价研究 [J]. 中国中药杂志，2020，45（20）：4909-4917.

[12] 毕荣璐，赵峰宁，郭文，等 . 天麻 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 广西中医药大学学报，2017，20（2）：53-57.

[13] 邹琼 . ^{60}Co-γ 射线辐射灭菌对天麻药材指纹图谱及有效成分的影响 [J]. 中国药师，2021，24（3）：488-492，498.

[14] 刁飞燕，李俊婕，李启艳，等 . 不同产地天麻药材的指纹图谱建立及分析 [J]. 中国药师，2020，23（10）：1920-1925.

[15] 刘瑞新，施钧瀚，张璐，等 . 基于 HPLC，PCA 与相似度评价的芍药甘草汤传统汤剂与配方颗粒汤剂的差异规律分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20（24）：1-5.

[16] 邓李红，张志鹏，田清清，等 . 吴茱萸和制吴茱萸的饮片、水煎液、配方颗粒 UPLC 特征图谱研究 [J]. 中国药房，2020，31（14）：1739-1745.

[17] 黄杨敏，沈治平，朱阿金，等 . 罗布麻叶配方颗粒与传统汤剂 HPLC 指纹图谱的相关性 [J]. 生物加工过程，2021，19（3）：314-320.

[18] Li Y，Liu XQ，Liu SS，et al. Transformation mechanisms of chemical ingredients in steaming process of Gastrodia elata Blume [J]. Molecules，2019，24（17）：1-14.

[19] 张琦，王兆丰，王秋颖 . 天麻中巴利森苷类化合物的研究概述 [J]. 中国现代中药，2020，22（1）：148-153.

（收稿日期：2021-10-14；修回日期：2021-11-19）

菟丝子不同炮制品指纹图谱及多指标成分定量研究

李国卫，孙冬梅*，胡绮萍，索彩仙，何嘉莹，童培珍，陈向东，曹斯琼（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 建立菟丝子指纹图谱及多指标含量测定方法探究菟丝子炮制后的变化。**方法** 以 Agilent SB 柱（100 mm×2.1 mm，1.8 μm）为色谱柱，乙腈（A）-0.1% 磷酸（B）为流动相，流速为 0.3 mL·min^{-1}，柱温为 40 ℃，检测波长为 360 nm。采用相似度评价结合主成分分析、正交偏最小二乘法 - 判别分析等模式探讨影响菟丝子炮制前后指纹图谱中总体化学成分的变化。**结果** 菟丝子生品和炮制品指纹图谱具有一定的差异，菟丝子标定了 10 个共有峰，炒菟丝子和盐菟丝子标定了 12 个共有峰，其中峰 11、峰 12 为炒菟丝子和盐菟丝子炮制后产生的新成分，分别为新绿原酸、隐绿原酸。指认了 8 个色谱峰并对其进行定量分析，结果显示，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷和槲皮素含量在炮制后发生了变化。**结论** 该方法可控制菟丝子炮制品的质量。

关键词：菟丝子；炮制品；指纹图谱；正交偏最小二乘法 - 判别分析；定量分析
中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)05-0992-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.005

Fingerprints and quantitative analysis of *Cuscuta australis* R. Br. processed products

LI Guo-wei, SUN Dong-mei*, HU Qi-ping, SUO Cai-xian, HE Jia-ying, TONG Pei-zhen, CHEN Xiang-dong, CAO Si-qiong (*Guangdong Efong Pharmaceutical Co., Ltd., Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granule, Foshan Guangdong* 528244)

Abstract: Objective To determine the change of *Cuscuta australis* R. Br. before and after being processing by fingerprint and multi-index determination method. **Methods** The column was Agilent SB (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) and acetonitrile-0.1% phosphoric acid was used as the mobile phase with gradient elution. The flow rate was 0.3 mL·min^{-1}. The column temperature was 40 ℃. The detection wavelength was 360 nm. Similarity evaluation, principal component analysis and orthogonal partial least squares-discriminant analysis were conducted to explore the changes in total chemical ingredients of *Cuscuta australis* R. Br. before and after the processing. **Results** There were some differences in the fingerprints of *Cuscuta australis* R. Br. and its processed products. Totally 10 common peaks were marked in *Cuscuta australis* R. Br., while 12 common peaks were marked in fried-processed *Cuscuta australis* R. Br. and salt-processed *Cuscuta australis* R. Br.. Peak 11 and 12 (neochlorogenic acid and cryptochlorogenic acid) were the new components generated after the processing. Totally 8 peaks were identified and measured. Analysis of variance displayed the changes of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, hyperoside and quercetin after the processing. **Conclusion** This method can control the quality of processed *Cuscuta australis* R. Br..
Key words: *Cuscuta australis* R. Br.; processed product; fingerprint; orthogonal partial least squares-discriminant analysis; quantitative analysis

基金项目：广东省省级科技计划项目（No.2018B030323004）。
作者简介：李国卫，男，硕士，副主任中药师，主要从事中药配方颗粒质量控制及标准研究，email：452048107@qq.com *通信作者：孙冬梅，女，博士研究生导师，教授，主要从事中药配方颗粒质量控制及标准研究，email：452048107@qq.com

菟丝子为旋花科植物南方菟丝子 *Cuscuta australis* R.Br. 或菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam. 的干燥成熟种子[1]，其性味甘、温，归肝、肾、脾经，为常用补益中药。文献研究表明，菟丝子含有金丝桃苷、槲皮素、异槲皮苷等黄酮类化学成分，具有改善心肌缺血、调节机体免疫等多种功效[2-5]。传统中医认为菟丝子生品可养肝明目，多用于目暗不明；菟丝子经盐制后可以引药入肾，能增强补肾固涩作用，常用于阳痿、遗精、胎动不安等。

菟丝子临床使用的饮片有菟丝子、盐菟丝子、炒菟丝子，其中菟丝子、盐菟丝子为 2020 年版《中国药典》收载品种，炒菟丝子为地方习用炮制品。现菟丝子的文献研究大部分集中在药材的化学成分和质量控制、真伪鉴别等方面[6-9]，缺乏对生品及炮制品的系统研究。本研究以菟丝子生品和盐菟丝子、炒菟丝子两种炮制品进行比较研究，通过 36 批样品建立了菟丝子药材的超高效液相色谱（UPLC）特征图谱，结合相似度、主成分分析（PCA）和正交偏最小二乘法 - 判别分析（OPLS-DA）探讨影响菟丝子药材和炮制品的差异成分，同时建立了菟丝子药材中 8 个指标性成分的含量测定方法，以期控制菟丝子及其炮制品的质量。

1 仪器与材料

Waters H-Class 超高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；Agilent SB 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.8 μm）；XP-26 型百万分之一天平、ME204E 型万分之一天平（瑞士 Mettler 公司）；KQ-500DE 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；甲醇、乙腈为色谱纯（Merk）；水为纯化水；其余试剂为分析纯。

绿原酸（批号：110753-202018，含量：96.10%）、金丝桃苷（批号：111521-201809，含量：94.90%）、异槲皮苷（批号：111809-201403，含量：92.90%）、槲皮素（批号：100081-201509，含量：96.80%）（对照品，中国食品药品检定研究院）；紫云英苷（批号：wkq17032404）、异绿原酸 A（批号：wkq20020403）、新绿原酸（批号：wkq18030107）（对照品，含量均为 98%，四川省维克奇生物科技有限公司）；隐绿原酸对照品（批号：DSTDY003501，含量：98%，成都德斯特生物技术有限公司）。所用药材经广东一方制药有限公司魏梅主任中药师鉴定为旋花科植物南方菟丝子 *Cuscuta australis* R.Br. 的干燥成熟种子，见表 1。

表 1 药材信息来源

Tab 1 Source of samples

菟丝子	炒菟丝子	盐菟丝子	样品来源
T1	CT1	YT1	甘肃酒泉市玉门市
T2	CT2	YT2	甘肃酒泉市玉门市
T3	CT3	YT3	内蒙古巴彦淖尔市
T4	CT4	YT4	内蒙古巴彦淖尔市
T5	CT5	YT5	内蒙古巴彦淖尔市
T6	CT6	YT6	甘肃省酒泉市
T7	CT7	YT7	黑龙江省黑河市
T8	CT8	YT8	黑龙江省黑河市
T9	CT9	YT9	内蒙古赤峰市
T10	CT10	YT10	内蒙古赤峰市
T11	CT11	YT11	内蒙古赤峰市
T12	CT12	YT12	广州清平中药材市场

2 方法与结果

2.1 样品炮制

2.1.1 炒菟丝子 《山东省中药饮片炮制规范》2012 年版[10]：“取净菟丝子置热锅内，文火炒至微黄，有香气逸出时，取出，放凉”。

2.1.2 盐菟丝子 《中国药典》2020 年版[1]：“取净菟丝子，照盐炙法（加盐水拌匀，闷透，置炒制容器内，文火加热，炒至微鼓起，取出，放凉）。”

2.2 色谱条件

以 Agilent SB 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.8 μm）为色谱柱；以乙腈（A）-0.1% 磷酸溶液（B）为流动相，梯度洗脱（0 ～ 9 min，7% → 11%A；9 ～ 15 min，11% → 14%A；15 ～ 20 min，14%A；20 ～ 25 min，14% → 25%A；25 ～ 30 min，25% → 27%A；30 ～ 35 min，27% → 93%A）；流速为 0.3 mL • min^{-1}；柱温为 40 ℃；检测波长为 360 nm。

2.3 混合对照品溶液制备

取新绿原酸、金丝桃苷、绿原酸、异槲皮苷、隐绿原酸、异绿原酸 A、紫云英苷和槲皮素对照品适量，精密称定，加甲醇制成质量浓度分别为 161.112、604.668、200.753、62.798、130.6536、210.834、60.449、100.128 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液制备

取样品粉末（过四号筛）约 0.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，加 70% 甲醇 50 mL，加热回流 30 min，放冷，补重，摇匀，过滤，即得。

2.5 指纹图谱的建立及分析

2.5.1 精密度试验 取同一供试品溶液，连续进样 6 次，以金丝桃苷为参照峰，计算各特征峰相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 均＜ 2.0%，表

明仪器精密度良好。

2.5.2　稳定性试验　取同一供试品溶液，分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样测定，以金丝桃苷为参照峰，计算各特征峰相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 均＜ 2.0%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.5.3　重复性试验　取样品粉末约 0.5 g，平行 6 份，按“2.4”项下方法制备供试品溶液，进样测定，以金丝桃苷为参照峰，计算各特征峰相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 均＜ 2.0%，表明该方法重复性良好。

2.5.4　指纹图谱的生成　取 36 批样品，按“2.4”项下方法制备供试品溶液，进样测定，分别记录 UPLC 特征图谱。采用指纹图谱相似度软件进行结果分析，菟丝子共确定 10 个共有峰（见图 1），炒菟丝子和盐菟丝子共确定 12 个共有峰（见图 2 ～ 3），其中峰 11、峰 12 为炮制后产生。5 号峰（金丝桃苷）分离度好，峰形对称，2020 年版《中国药典》规定其为评价菟丝子质量的指标性成分，故以 5 号峰（金丝桃苷）为参照峰（即为 S 峰）。

2.5.5　色谱峰指认　通过各对照品保留时间和紫外吸收光谱对共有峰的化学成分进行归属，指认了其中 8 个特征峰，分别为峰 2 绿原酸（最大吸收波长 325 nm），峰 5（S）金丝桃苷（最大吸收波长 254 nm），峰 6 异槲皮苷（最大吸收波长 255 nm），峰 7 紫云英苷（最大吸收波长 264 nm），峰 8 异绿原酸 A（最大吸收波长 327 nm），峰 10 槲皮素（最大吸收波长 254 nm），峰 11 新绿原酸（最大吸收波长 325 nm），峰 12 隐绿原酸（最大吸收波长 323 nm）。结果见图 4。

2.5.6　相似度评价　采用指纹图谱相似度软件对 36 批样品进行相似度评价，结果见表 2。说明同一工艺的样品之间相似度较高，炮制工艺较为稳定。

2.6　多元统计分析

为研究菟丝子炮制前后指纹图谱中总体化学成分的变化，统计 36 批样本中 12 个色谱峰的峰面积，并将其除以每个样品的称样量，以消除称样量差异造成的影响 [11]。

2.6.1　PCA　将 36 批样品的色谱峰峰面积数据导入 SIMCA 14.1 软件进行分析。提取到两个主成分，累积贡献率达到 70.50%，见表 3。提取前两个主成分做得分图，见图 5。36 批样品得到了较好的划分，第一类（T1 ～ T12）为菟丝子，主要分布在第一、四象限，第二类（CT1 ～ CT12）为炒菟丝子，主要集中在第二、三象限，第三类

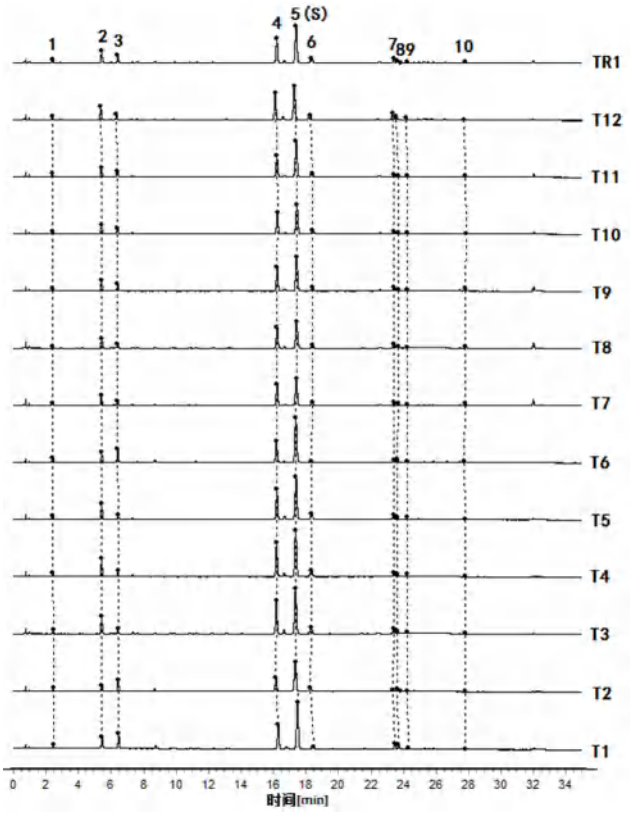


图 1　12 批菟丝子 UPLC 指纹图谱共有峰

Fig 1　Common peaks in the UPLC fingerprints of 12 batches of *Cuscuta australis* R.Br.

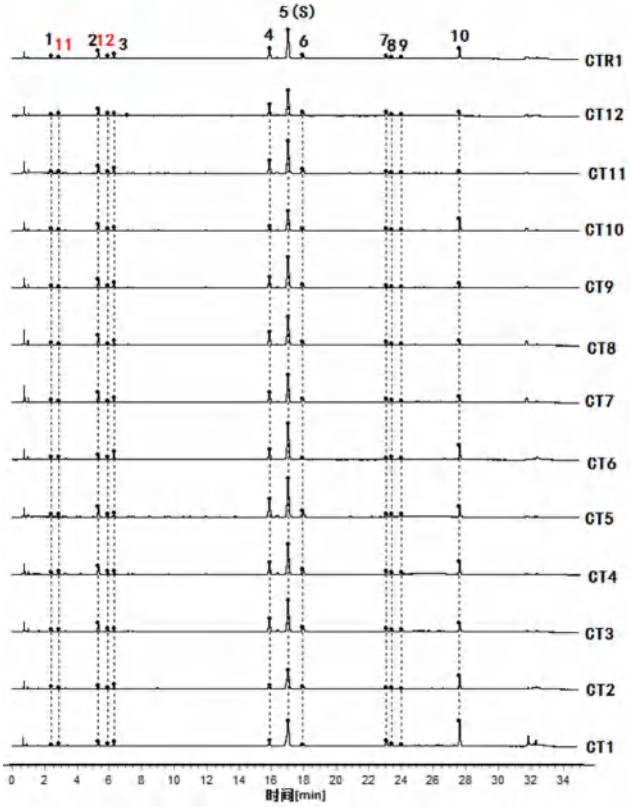


图 2　12 批炒菟丝子 UPLC 指纹图谱共有峰

Fig 2　Common peaks in the UPLC fingerprints of 12 batches of fried-processed *Cuscuta australis* R.Br.

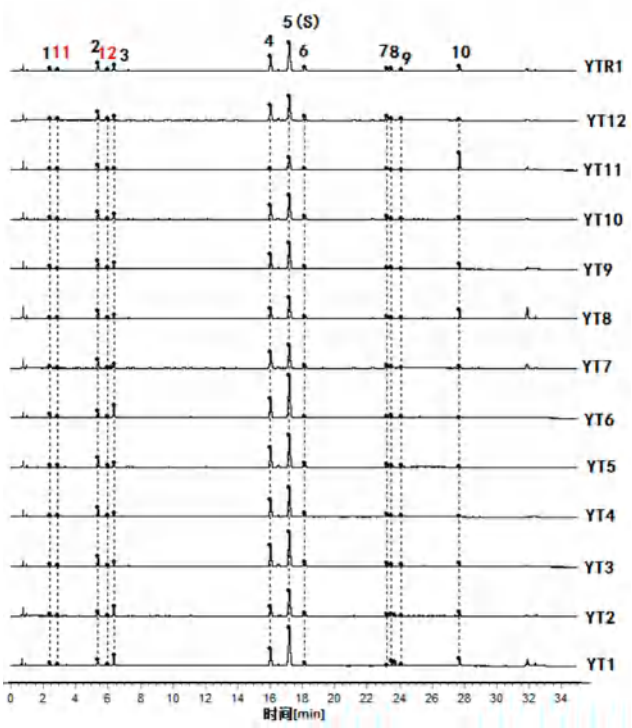


图 3　12 批盐菟丝子 UPLC 指纹图谱共有峰

Fig 3　Common peaks in UPLC fingerprint of 12 batches of salt-processed *Cuscuta australis* R.Br.

表 2　36 批样品相似度评价结果

Tab 2　Similarity evaluation of 36 batches of samples

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
T1	1.0000	CT1	1.0000	YT1	1.0000
T2	0.9940	CT2	0.9870	YT2	0.9940
T3	0.9800	CT3	0.9320	YT3	0.9770
T4	0.9820	CT4	0.9550	YT4	0.9770
T5	0.9830	CT5	0.9180	YT5	0.9740
T6	0.9980	CT6	0.9630	YT6	0.9940
T7	0.9790	CT7	0.9120	YT7	0.9630
T8	0.9800	CT8	0.9000	YT8	0.9750
T9	0.9890	CT9	0.9030	YT9	0.9870
T10	0.9860	CT10	0.9850	YT10	0.9810
T11	0.9950	CT11	0.8850	YT11	0.8120
T12	0.9750	CT12	0.8890	YT12	0.9660

（YT1 ～ YT12）为盐菟丝子，在第一、二、三象限中均有分布，其中 YT6 散落在第四象限。PCA 结果表明菟丝子生品与炮制品能较好区分，但两种炮制品分布较为集中，为更好地考察化学计量学方法能否将菟丝子及两种炮制品完全区分，进一步采用 OPLS-DA 法对样品进行分析。

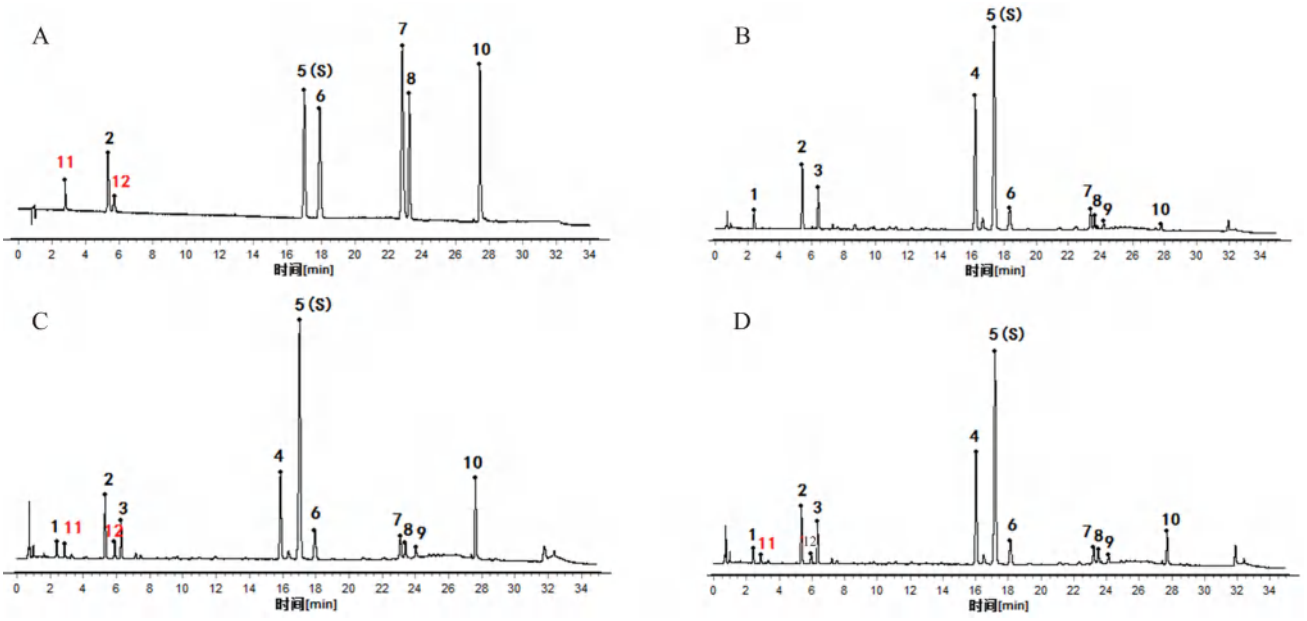


图 4　菟丝子及其炮制品 UPLC 色谱图

Fig 4　UPLC chromatograms of *Cuscuta australis* R.Br. and its processed product

A. 混合对照品溶液（mixed reference solution）；B. 菟丝子供试品溶液（test solution of *Cuscuta australis* R.Br.）；C. 炒菟丝子供试品溶液（test solution of fried-processed *Cuscuta australis* R.Br.）；D. 盐菟丝子供试品溶液（test solution of salt-processed *Cuscuta australis* R.Br.）；峰 2. 绿原酸（chlorogenic acid）；峰 5（S）. 金丝桃苷（hyperoside）；峰 6. 异槲皮苷（isoquercitrin）；峰 7. 紫云英苷（astragalin）；峰 8. 异绿原酸 A（isochlorogenic acid a）；峰 10. 槲皮素（quercetin）；峰 11. 新绿原酸（neochlorogenic acid）；峰 12. 隐绿原酸（cryptochlorogenic acid）

2.6.2　OPLS-DA　将 36 批样品数据导入 SIMCA-P 14.0 软件进行分析，建立 3 组 OPLS-DA 模型，见图 6。结果显示，菟丝子与炒菟丝子、菟丝子与盐菟丝子、炒菟丝子与盐菟丝子的 R^2X 分别为：0.970、0.912、0.964，R^2Y 分别为：0.924、0.938、0.842，说明建立的 3 组模型能有效解释 3 种菟丝子之间的差异；Q^2 分别为 0.569、0.890、0.522，说明模型具有一定的预测能力。通过提取 OPLS-

表 3　特征根、各主成分的贡献率

Tab 3　Contribution rates of characteristic roots and principal components

主成分	累积贡献率 /%	特征值
1	46.80	5.61
2	70.50	2.85

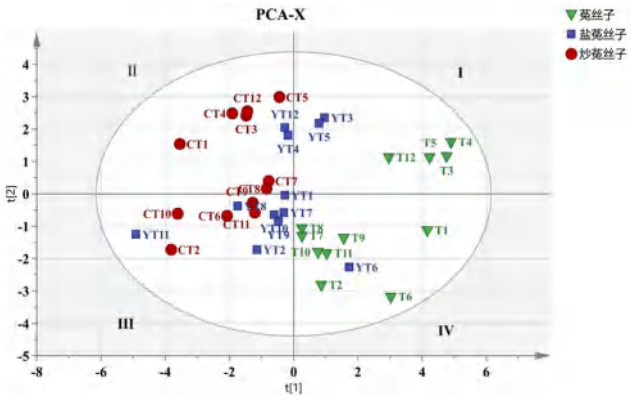


图 5　主成分得分分布图

Fig 5　Principal component score distribution

DA 模型中 12 个变量的 VIP 值图（见图 7），对 12 个色谱峰峰面积 VIP 值大小进行排列，结果显示 F12、F11、F1、F4 的 VIP 值均大于 1，其中 F12 为隐绿原酸，F11 为新绿原酸，F1 和 F4 为未知成分，有待进一步指认。上述结果说明以上 4 种化学成分对莵丝子生品与炮制品分类具有显著的影响，是区分生品与炮制品质量差异的主要标志物。

2.7　多指标含量测定

文献研究发现，莵丝子主要药效成分除常见的黄酮类化合物外，还有酚酸类等化合物 [12-13]，具有多种功效，如保肝、抗衰老、抗氧化、免疫调节等作用 [14]，在进行指纹图谱研究的同时，选择黄酮类成分中的金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素，以及具备抗炎作用的酚酸类物质绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸和异绿原酸 A 作为莵丝子的质量控制指标，为莵丝子药材和不同炮制品的质量评价提供参考。

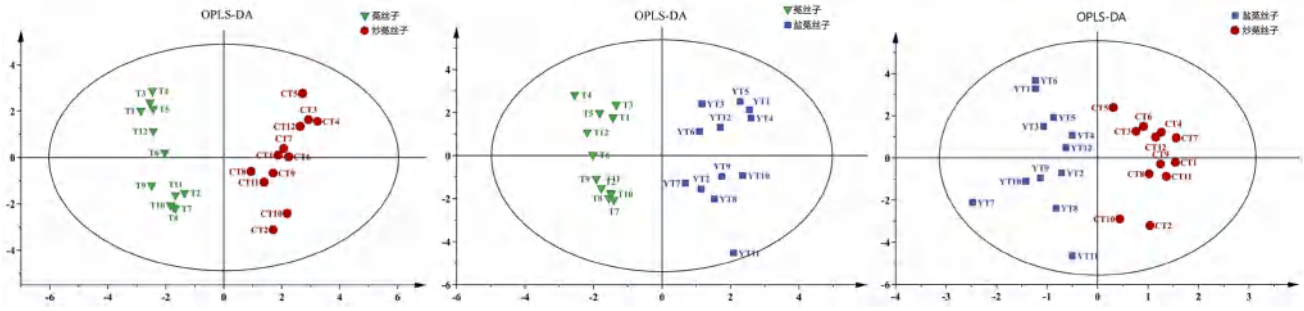


图 6　OPLS-DA 得分图

Fig 6　Chart of OPLS-DA score

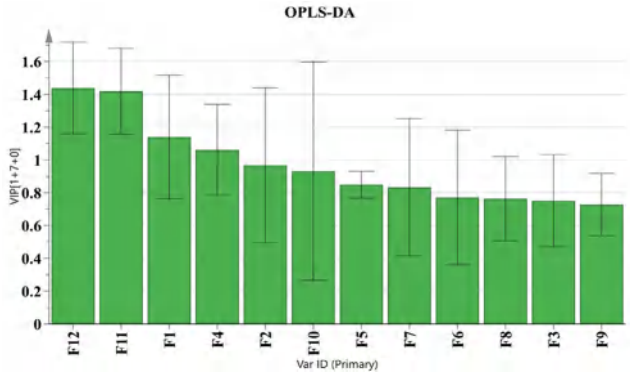


图 7　12 个化学成分的 VIP 值

Fig 7　VIP values of 12 chemical components

2.7.1　系统适用性考察　取“2.3”项下混合对照品溶液，按“2.2”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果新绿原酸、异槲皮苷、绿原酸、紫云英苷、隐绿原酸、金丝桃苷、异绿原酸 A 和槲皮素与相邻色谱峰的分离度均大于 1.5，拖尾因子在 1.00 ～ 1.05。

2.7.2　线性关系考察　取“2.3”项下混合对照品溶液，加甲醇稀释制得 6 个不同质量浓度的对照品溶液，以峰面积为纵坐标（*Y*），质量浓度（μg • mL^{-1}）为横坐标（*X*）进行线性回归，结果各个对照品的线性关系良好，见表 4。

2.7.3　精密度试验　取“2.3”项下混合对照品溶液，连续进样 6 次，8 个成分的峰面积 *RSD* 分别为 1.1%、0.98%、0.81%、1.1%、1.2%、1.2%、0.87%、1.1%（n = 6），表明方法精密度良好。

2.7.4　稳定性试验　取同一供试品溶液，分别在室温下放置 0、2、4、6、8、12 h 进样测定，记录峰面积。8 个成分的峰面积 *RSD* 分别为 1.0%、1.1%、0.78%、0.98%、1.3%、1.2%、1.3%、1.8%（n = 6），表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.7.5　重复性试验　取样品约 0.5 g，平行 6 份，按“2.4”项下方法制备成供试品溶液，进样测定，记录峰面积，按外标法计算含量。结果 8 个成分的含量 *RSD* 分别为 0.87%、0.98%、1.0%、1.3%、1.4%、1.0%、1.9%、1.2%（n = 6），表明方法重

表 4　回归方程及线性范围

Tab 4　Regression equation and linearity

化合物	回归方程	R^2	范围 /（μg・mL^{-1}）
新绿原酸	$y = 1.887\times10^3x - 2.371\times10^3$	0.9998	2.6852 ～ 61.1120
绿原酸	$y = 1.907\times10^3x + 7.917\times10^2$	0.9993	10.0376 ～ 200.7529
隐绿原酸	$y = 1.815\times10^3x - 2.213\times10^3$	0.9997	2.1776 ～ 130.6536
金丝桃苷	$y = 7.652\times10^3x - 1.729\times10^4$	0.9999	20.4889 ～ 614.6673
异槲皮苷	$y = 7.468\times10^3x - 1.782\times10^3$	0.9999	2.0149 ～ 60.4487
紫云英苷	$y = 6.725\times10^3x - 1.611\times10^3$	0.9999	2.0933 ～ 62.7984
异绿原酸 A	$y = 3.378\times10^3x - 7.221\times10^3$	0.9996	1.0542 ～ 210.8340
槲皮素	$y = 1.141\times10^4x - 9.646\times10^3$	0.9990	0.2003 ～ 100.1283

复性良好。

2.7.6　加样回收率考察　精密称取已知含量的炒菟丝子（CT10）0.25 g，平行 6 份，加入与样品中含量等量的对照品，按“2.4”项下方法制备供试品溶液，进样测定，计算加样回收率。新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、异绿原酸 A、槲皮素平均加样回收率分别为 95.52%、94.11%、97.24%、93.41%、93.90%、93.88%、93.92%、96.56%，*RSD* 分别为 1.5%、0.94%、1.2%、0.47%、2.3%、2.8%、1.3%、1.7%，符合方法学要求。

2.7.7　含量测定结果　精密称取 36 批样品，按“2.4”项下方法制备成供试品溶液，进样测定，结果见表 5。菟丝子生品及两种炮制品的 8 个成分含量存在差异，*RSD* 值在 24.9% ～ 92.6%。

2.7.8　方差分析　以上述 8 个含量测定指标为检验变量，菟丝子、炒菟丝子和盐菟丝子作为分组变量，通过 Shapiro-Wilk 检验法对 36 批药材样品的 8 个成分数据进行正态分布验证，结果显示金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷和异绿原酸 A 的 sig. 值小于 0.05，不服从正态分布，故采用非参数检验法（秩和检验）进行分析。对菟丝子生品和两种炮制品的 8 个指标进行两两比较（Kruskal-Wallis 法）。新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸和槲皮素在菟丝子和炒菟丝子以及菟丝子和盐菟丝子间均有显著差异（$P < 0.05$），而在炒菟丝子和盐菟丝子间则无显著差异；金丝桃苷在菟丝子和炒菟丝子间具有显著差异（$P < 0.05$）。上述结果说明菟丝子生品和炮制品含量存在一定差异。

3　分析与讨论

3.1　指纹图谱及多元统计结果分析

菟丝子经加热炮制后特征峰 F11、F12、F1 和 F4 产生了变化，其中，F11 和 F12 为菟丝子炮制后产生的特有峰，经指认分别为新绿原酸和隐绿原酸，可作为区分菟丝子生品和炮制品的特

表 5　含量测定结果 (mg・g^{-1})

Tab 5　Content determination (mg・g^{-1})

编号	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	金丝桃苷	异槲皮苷	紫云英苷	异绿原酸 A	槲皮素
T1	/	2.73	/	4.416	0.444	0.324	1.312	0.140
T2	/	1.371	/	2.751	0.142	0.448	0.904	0.119
T3	/	4.139	/	4.171	0.367	0.666	1.034	0.119
T4	/	4.191	/	4.398	0.338	0.692	1.042	0.151
T5	/	3.773	/	4.032	0.382	0.658	1.020	0.166
T6	/	2.275	/	4.243	0.169	0.198	1.167	0.155
T7	/	2.244	/	2.574	0.277	0.335	0.590	0.263
T8	/	2.183	/	2.552	0.306	0.328	0.566	0.247
T9	/	2.436	/	3.332	0.272	0.402	0.672	0.371
T10	/	2.227	/	2.811	0.231	0.348	0.613	0.141
T11	/	2.142	/	3.514	0.177	0.434	0.646	0.196
T12	/	3.02	/	3.153	0.501	0.525	0.968	0.118
CT1	0.990	1.089	1.294	2.727	0.388	0.237	0.755	2.111
CT2	0.609	0.724	0.716	1.999	0.100	0.282	0.556	1.139
CT3	1.016	1.920	1.398	2.843	0.290	0.484	0.837	0.826
CT4	1.061	1.913	1.468	2.756	0.279	0.484	0.837	1.067
CT5	1.089	2.337	1.505	3.402	0.284	0.568	0.916	0.883
CT6	0.895	1.127	1.236	3.392	0.172	0.196	0.936	1.258
CT7	0.559	2.202	0.851	2.459	0.295	0.341	1.048	0.491
CT8	0.551	2.274	0.733	2.589	0.310	0.350	0.699	0.463
CT9	0.648	1.916	0.923	2.677	0.222	0.334	0.692	0.395
CT10	0.611	1.305	0.882	1.784	0.172	0.249	0.554	0.980
CT11	0.629	1.663	0.842	2.876	0.186	0.375	0.607	0.264
CT12	0.884	1.611	1.238	2.241	0.393	0.413	0.837	0.318
YT1	0.975	1.503	1.378	4.265	0.420	0.308	1.137	0.731
YT2	0.505	0.980	0.726	2.814	0.176	0.395	0.745	0.532
YT3	0.731	2.602	1.080	3.492	0.251	0.571	0.885	0.390
YT4	0.851	2.356	1.228	3.038	0.241	0.505	0.790	0.184
YT5	0.820	2.623	1.193	3.368	0.262	0.563	0.893	0.202
YT6	0.543	1.834	0.787	4.369	0.130	0.210	1.148	0.162
YT7	0.313	2.313	0.494	2.517	0.258	0.332	0.661	0.309
YT8	0.453	1.992	0.679	2.276	0.254	0.311	0.610	0.855
YT9	0.521	2.232	0.704	2.943	0.194	0.359	0.669	0.508
YT10	0.479	2.049	0.805	2.603	0.260	0.337	0.633	0.241
YT11	0.623	1.142	0.888	1.509	0.105	0.224	0.379	1.643
YT12	0.739	2.095	1.092	2.610	0.414	0.451	0.743	0.183
RSD/%	30.4	37.0	28.7	24.9	36.9	33.7	26.3	92.6

征成分，而炒菟丝子与盐菟丝子的指纹图谱则无明显差异，表明菟丝子生品与炮制品存在一定差异，建立的方法可对其进行区分。

3.2 多指标含量结果分析

新绿原酸和隐绿原酸为炒菟丝子和盐菟丝子的特征峰，绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷和异绿原酸 A 在三者中的含量大小排序为：菟丝子＞盐菟丝子＞炒菟丝子，而槲皮素则在炒菟丝子中占比最高，其次为盐菟丝子、菟丝子。文献研究表明，绿原酸在加热情况下，容易生成新绿原酸和隐绿原酸 [15]，这可能是导致炒菟丝子和盐菟丝子中绿原酸含量降低的主要原因。加热炮制亦对金丝桃苷含量有显著影响，炮制温度和时间是关键因素 [16]。菟丝子经炒黄、盐炙后槲皮素增加，可能是由于以槲皮素为苷元的黄酮苷类受热易分解生成槲皮素所致 [17]。定量分析结果显示，菟丝子生品与炮制品在化学成分的含量上存在较大的差异，这与肖岚等 [18] 的研究结果一致。

3.3 炮制品间差异分析

在含量测定的 8 个成分中，两种炮制品间的新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷以及异绿原酸 A 含量数据差异较小，而槲皮素含量则相差一半。盐菟丝子炮制方法比炒菟丝子多了盐水闷润这个环节，炮制受热温度会存在一定差异，猜测这是导致两者间槲皮素含量存在差异的主要原因。本研究结果表明炒菟丝子与盐菟丝子在槲皮素成分上存在较大差异。

本研究从定性和定量两个方面对菟丝子、炒菟丝子和盐菟丝子进行了质量评价，通过多元统计分析手段研究菟丝子炮制前后指纹图谱中特征成分的变化，明确区分炮制前后的特征峰，并测定了 8 个主要药效成分的含量，为优选菟丝子炮制工艺提供参考。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：322.
[2] 丁安伟 . 中药炮制学 [M]. 北京：高等教育出版社，2007：264.
[3] 刘利萍，刘建，陈海丰 . 中药菟丝子的研究进展 [J]. 中药材，2001，24（11）：839-843.
[4] 郭澄，王雅君 . 张剑萍 . 菟丝子的化学成分和药理活性研究 [J]. 时珍国医国药，2005，16（10）：1035-1036.
[5] 肖岗，杨梓懿，石继连 . HPLC 法同时测定菟丝子不同炮制品中 5 种主要活性成分含量 [J]. 湖南中医药大学学报，2012，32（7）：50-53.
[6] 田春雨，薄海新 . 不同产地菟丝子抗衰老作用的比较 [J]. 辽宁中医药大学学报，2009，11（4）：206-207.
[7] 肖岚，刘塔斯，杨梓懿，等 . 菟丝子及炮制品高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 时珍国医国药，2014，25（8）：1858-1860.
[8] 马鸿雁，刘小彬，李楠，等 . 附子粗多糖提取工艺的优化 [J]. 时珍国医国药，2005，16（1）：22-23.
[9] 徐丽媛，吕永磊，王丹，等 . 南方菟丝子不同炮制品多糖含量的比较研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18（7）：119-122.
[10] 山东省食品药品监督管理局 . 山东省中药饮片炮制规范 [S]. 济南：山东科学技术出版社，2012：595-598.
[11] 王宇卿，庄果，张须学，等 . 多元统计分析比较宛艾及 31 个产地艾叶 HPLC 指纹图谱 [J]. 中成药，2018，40（3）：653-658.
[12] 叶敏，阎玉凝，乔梁，等 . 中药菟丝子化学成分研究 [J]. 中国中药杂志，2002，27（2）：115-117.
[13] 叶苹 . 大菟丝子与菟丝子化学成分的比较研究 [J]. 中成药，1992，14（3）：36-37.
[14] 郭澄，王雅君，张剑萍 . 菟丝子的化学成分和药理活性研究 [J]. 时珍国医国药，2005，16（10）：1035-1036.
[15] 朱鹏，苗潇磊，陈勇 . 绿原酸、隐绿原酸和新绿原酸在中性和碱性 pH 条件下的降解动力学 [J]. 药学学报，2016，51（1）：122-126.
[16] 李坤，王明芳，薛非非，等 . 荷叶炒炭过程中金丝桃苷、异槲皮苷与槲皮素含量变化规律研究 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2016，18（1）：112-117.
[17] 杨青月，张学兰，李慧芬，等 . 菟丝子不同炮制品中 3 种黄酮类成分比较 [J]. 中成药，2011，33（11）：1945-1948.
[18] 肖岚，刘塔斯，杨梓懿，等 . 近菟丝子及炮制品高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 时珍国医国药，2014，25（8）：1858-1860.

（收稿日期：2021-09-22；修回日期：2021-12-20）

布地奈德直肠用脂质体温敏凝胶制备工艺的研究

杨东亮[1, 2]，马瑞丽[3]，赵宇郁[2]，滕亮[1]，马桂芝[2*]，高晓黎[2]（1. 新疆医科大学第一附属医院药学部，乌鲁木齐 830054；2. 新疆医科大学药学院，乌鲁木齐 830011；3. 庆阳市中医医院药剂科，甘肃 庆阳 745099）

摘要：目的 优化布地奈德（Bud）脂质体温敏凝胶的制备工艺。**方法** 采用逆向蒸发法制备 Bud 脂质体，以包封率、载药量和粒径为评价指标，通过单因素和星点设计 - 响应面法筛选及优化工艺，继以 Bud 脂质体为中间体，采用单因素和正交试验优化温敏凝胶制备工艺。**结果** Bud 脂质体的最佳制备工艺为膜材比 9∶1、脂药比 4.5∶1、$V_{有机}/V_{水相}$ 4.0∶1、乳化时间 12 min、孵育温度 50 ℃、分散时间 15 s。Bud 脂质体温敏凝胶的制备工艺为 P407 用量 20%、P188 用量 4%、HPMC 用量 0.4%、胶凝温度 33 ℃。**结论** 制备的 Bud 脂质体温敏凝胶工艺稳定，成形性良好。

关键词：布地奈德；脂质体；温敏凝胶；星点设计 - 响应面法；正交试验设计
中图分类号：R94　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)05-999-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.006

Preparation of budesonide liposome temperature sensitive gel for rectal use

YANG Dong-liang[1, 2], MA Rui-li[3], ZHAO Yu-yu[2], TENG Liang[1], MA Gui-zhi[2*], GAO Xiao-li[2] (1. *Department of Pharmacy*, *the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830054; 2. *College of Pharmacy*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830011; 3. *Department of Pharmacy*, *Qingyang Hospital of Traditional Chinese Medicine*, *Qingyang Gansu* 745099)

Abstract: Objective To optimize the preparation of budesonide (Bud) liposome temperature sensitive gel. **Methods** Bud liposomes were prepared by reverse evaporation method. With entrapment efficiency, drug loading and particle size as the evaluation indexes, prescription were selected and process optimized by single factor test and central composite design-response surface methodology. Bud liposomes were used as intermediates, single factor and orthogonal experiments were used to optimize the preparation of temperature sensitive gel. **Results** The optimum preparation of bud liposomes was as follows: the membrane material ratio was 9∶1, the lipid drug ratio was 4.5∶1, the $V_{organic}/V_{aqueous}$ was 4.0∶1, the emulsification time was 12 min, the incubation temperature was 50 ℃, and the dispersion time was 15 s. The preparation technology of Bud liposome temperature sensitive gel included P407 dosage 20%, P188 dosage 4%, HPMC dosage 0.4%, and gelatinization temperature 33 ℃. **Conclusion** The Bud liposome temperature sensitive gel is stable with good mold ability.

Key words: budesonide; liposome; temperature sensitive gel; central composite design-response surface methodology; orthogonal experiment

溃疡性结肠炎（UC）是结直肠的一种慢性免疫介导的炎症性疾病[1]，病因尚不明确，且暂无法治愈，如果不及时治疗，可导致黏膜损伤及结直肠癌等致命并发症[2]。在全球范围内，UC 的发病率呈上升趋势[3]，近二十余年来，我国 UC 的就诊人数快速增长[4]。UC 一般均以连续性分布的方式，从直肠向近端结肠扩展，在中国病变的主要部位为直肠、直 - 乙状结肠、左侧结肠。

基金项目：吴阶平医学基金会临床科研专项资助基金（No.320.6750.2020-04-33）；新疆维吾尔自治区药学会科研基金项目（No. YXH202102）。

作者简介：杨东亮，男，博士，主管药师，主要从事临床药学与药物制剂的研究，email：yanglove6543@126.com　*通信作者：马桂芝，女，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事药品质量控制与药物新剂型研究，email：maguizhi000@126.com

糖皮质激素是活动期 UC 诱导缓解治疗的重要药物，临床常口服或静脉给予糖皮质激素，但全身用药易出现药物不良反应并存在诸多限制，且局部药物浓度低[5]。布地奈德（budesonide，Bud）是第二代皮质类固醇类激素，具有局部抗炎作用强，全身不良反应少的优点，可有效缓解轻中度 UC 患者的症状[6]。

目前，临床常使用吸入用 Bud 混悬剂灌肠[7]，但混悬剂几乎没有生物黏附性，在肠道保留时间短，且几乎不溶于水、局部吸收差，影响疗效。故本研究利用脂质体的特性增加药物溶解度、提高黏膜滞留性能、升高靶部位浓度、减少药物入血[8]；同时，利用温敏凝胶常温下为液态、体温下为凝胶的特点，促进药物的均匀分布、提高局部黏附性能，以对抗肠道的自蠕动[9-10]。本研究将 Bud 制备成脂质体后再进一步制成脂质体温敏凝胶，使其兼顾脂质体和温敏凝胶的优势：给药前为液体状态，到达给药部位后均匀分布，后迅速相变为凝胶黏附于肠黏膜，进一步通过脂质体实现靶向作用，提高疗效，降低不良反应。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20AD 高效液相色谱仪（日本岛津公司）；New Classic MS 分析天平（梅特勒 - 托利多公司，d ＝ 0.01 mg）；KQ5200DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；Zetasizer Nano ZS 纳米激光粒径测定仪（英国马尔文仪器有限公司）；PS-1000 磁力搅拌器（东京理化器械株式会社）；3-18KS 台式高速冷冻离心机（SIGMA 公司）；VCX500 超声波细胞破碎仪（Sonics & Materials Inc）；TP-6 智能透皮试验仪（天津市鑫洲科技有限公司）；PHSJ-3F 雷磁 pH 计（上海仪电科学仪器有限公司）；NDJ-5S 数字式黏度计（上海菁海仪器有限公司）；Milli-Q 艾柯超纯水仪（美国密理博公司）。

1.2 试药

Bud 对照品（上海源叶生物科技有限公司，批号：Y13J7C9082，纯度≥ 98%）；Bud 原料药（山东泰华生物科技有限公司，批号：20190906，纯度≥ 99%）；大豆磷脂（批号：SYSO-200401）、胆固醇（批号：B80859）（上海艾伟拓医药科技有限公司）；泊洛沙姆 407、泊洛沙姆 188（北京索莱宝科技有限公司）；羟丙基甲基纤维素（上海麦克林生化科技有限公司）；醋酸纤维素膜（孔径：0.45 μm，尺寸：50 mm）（上海市新亚净化器件厂）；甲醇为色谱纯，水为超纯水，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 Bud 的含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent SB-C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm），以甲醇 - 水（72∶28）为流动相等度洗脱，检测波长 260 nm，进样量 10 μL，流速 1 mL • min^{-1}，柱温 25 ℃。

2.1.2 溶液的配制 取 Bud 对照品适量，精密称定，置 25 mL 量瓶中，加甲醇超声溶解并定容，即得质量浓度为 196.4 μg•mL^{-1} 的对照品储备液。精密移取对照品储备液适量，用甲醇依次稀释为 0.38、0.77、1.53、3.07、6.14、12.28、24.55、49.1、98.2 μg • mL^{-1} 的系列对照品溶液。

分别取 Bud 对照品溶液、Bud 脂质体、Bud 脂质体温敏凝胶 1.0 mL，甲醇定容，超声，以 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得供试品溶液。

制备不含 Bud 的空白脂质体、空白脂质体温敏凝胶，各取 1.0 mL，甲醇定容，超声，以 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得阴性样品溶液。

2.1.3 专属性考察 取 Bud 对照品、供试品及阴性样品溶液各 10 μL，进样分析，记录色谱图，结果见图 1，基质对 Bud 测定无干扰[11]。

2.1.4 线性关系考察 测定系列对照品溶液，以峰面积（*Y*）对 Bud 质量浓度（*X*）进行线性回归，得回归方程 $Y = 1.59\times10^{4}X + 1.993\times10^{3}$（$r$ ＝ 0.9999）。结果表明，Bud 在 0.38 ～ 98.2 μg • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好。

2.1.5 方法学考察 取供试品溶液连续测定 6 次，测得精密度 *RSD* 为 0.30%。于常温下供试品分别放置 0、2、4、6、8、10、12 h，测得稳定性 *RSD* 为 1.1%。平行制备 6 份供试品溶液，测得重复性 *RSD* 为 1.7%。精密量取已知浓度样品 9 份，加低、中、高浓度对照品溶液，测得平均加样回收率在 98.7% ～ 100.2%，*RSD* 均＜ 2.0%。

2.2 Bud 脂质体的制备

2.2.1 制备工艺优选指标 以包封率、载药量和粒径作为考察指标，综合分析。结合层次分析法确定的权重系数，得到综合评分 *Y* ＝包封率 / 包封率最大值 ×0.7306 ＋载药量 / 载药量最大值 ×0.1884 ＋粒径最小值 / 粒径 ×0.0810[11]。

2.2.2 Bud 脂质体的制备工艺 根据 Bud 性质，采用逆向蒸发法制备 Bud 脂质体。精密称取 Bud 原料药、胆固醇和大豆磷脂适量于 250 mL 圆底烧瓶中，加入 20 mL 氯仿超声使其溶解，再按有机

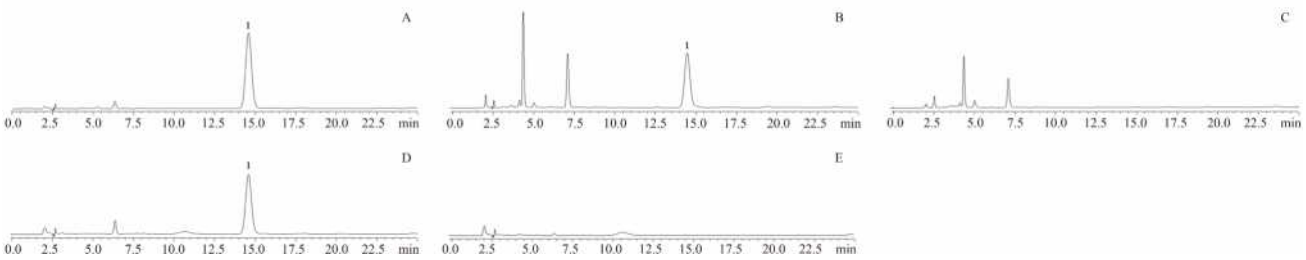


图 1　Bud 脂质体及 Bud 脂质体温敏凝胶的 HPLC 图

Fig 1　HPLC chromatogram of Bud liposomes and Bud liposome temperature sensitive gel

A. Bud 对照品（Bud reference）；B. Bud 脂质体（Bud liposomes）；C. 空白脂质体（negative liposomes）；D. Bud 脂质体温敏凝胶（Bud liposome temperature sensitive gel）；E. 空白脂质体温敏凝胶（negative liposome temperature sensitive gel）；1. Bud

相与水相的体积比加入超纯水，水浴超声 10 min 形成稳定的 *W/O* 型乳液，40 ℃下减压蒸发除去有机溶剂，加入超纯水，继续旋转蒸发，于冰浴条件下超声，即得 Bud 脂质体，于 3 ～ 5 ℃保存 [12]。

2.2.3　Bud 脂质体制备工艺单因素的考察　测定各脂质体包封率、载药量和粒径，以综合评分 *Y* 为指标，按 “2.2.2” 项下方法考察膜材比（3∶1、6∶1、9∶1、12∶1 和 15∶1）、脂药比（2∶1、6∶1、10∶1、14∶1 和 18∶1）、有机相与水相比例（$V_{有机}/V_{水相}$ 为 2∶1、3∶1、4∶1、5∶1 和 6∶1）、乳化时间（6、8、10、12 和 14 min）、孵育温度（20、30、40、50 和 60 ℃）、分散时间（10、15、20、25 和 30 s）等因素对 Bud 脂质体综合指标的影响。结果，在膜材比为 9∶1、脂药比为 6∶1、$V_{有机}/V_{水相}$ 为 4∶1、乳化时间 12 min、孵育温度 50 ℃、分散时间 15 s 时，所制脂质体包封率较高。

2.2.4　星点设计 - 效应面法优化制备工艺　在单因素试验的基础上，选取脂药比和 $V_{有机}/V_{水相}$ 两个对指标影响较大的因素，设计二因素三水平的星点设计 - 效应面法优化 Bud 脂质体制备工艺。因素水平见表 1，以综合评分 *Y* 为考察指标，按照星点设计 - 响应面法设计进行试验见表 2、图 2，方差分析结果见表 3。

表 1　星点设计 - 效应面法的因素水平表

Tab 1　Factor and level of central composite design-response surface method

因素	水平				
	− 1.414	− 1	0	1	1.414
脂药比	0.34∶1	2∶1	6∶1	10∶1	11.66∶1
$V_{有机}/V_{水相}$	2.6∶1	3∶1	4∶1	5∶1	5.4∶1

采用 Design-Expert 10.0.7 软件对表 2 数据进行拟合，得到综合评分 *Y* 的回归方程为 $Y = 0.8897 - 0.0854A + 0.0527B - 5.9275AB - 0.0874A^2 - 0.0902B^2$，模型 $P < 0.01$，与数据的拟合度好，误差低，可用于进一步分析与检测。

表 2　星点设计 - 效应面法的结果

Tab 2　Central composite design-response surface method

编号	脂药比	$V_{有机}/V_{水相}$	包封率 /%	载药量 /%	粒径 /nm	综合评分
1	10∶1	5∶1	66.50	4.56	201.1	0.69
2	6∶1	4∶1	85.41	8.71	154.3	0.94
3	2∶1	5∶1	75.00	9.68	201.6	0.84
4	6∶1	4∶1	78.45	7.71	168.1	0.85
5	0.34∶1	4∶1	72.85	12.45	268.8	0.85
6	6∶1	4∶1	84.52	7.90	188.1	0.90
7	2∶1	3∶1	66.86	6.68	200.3	0.73
8	11.66∶1	4∶1	55.10	2.72	212.5	0.57
9	6∶1	4∶1	78.45	7.81	144.7	0.87
10	6∶1	5.4∶1	74.94	4.75	167.2	0.78
11	6∶1	4∶1	81.32	8.70	182.9	0.89
12	6∶1	2.6∶1	58.41	3.87	162.0	0.63
13	10∶1	3∶1	56.66	2.47	139.1	0.60

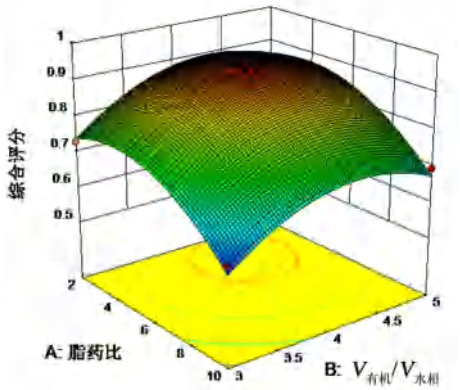


图 2　Bud 脂质体制备工艺优化的效应面图

Fig 2　Response surface for optimization of preparation process of budesonide liposomes

通过 Design-Expert 10.0.7 软件对优选的制备工艺条件进行预测，$A = 4.5∶1$，$B = 4.0∶1$，*Y* 的预测值为 0.92。应用 Design-Expert 10.0.7 软件对优选的制备工艺条件进行预测，$A = 4.5∶1$，$B = 4.0∶1$，*Y* 的预测值为 0.92。结合实际操作条件，初步确定优选工艺参数为：脂药比 4.5∶1，$V_{有机}/V_{水相} = 4.0∶1$，按照优选参数，采用逆向

表 3 方差分析

Tab 3 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值
Model	0.177 753	5	0.035 551	39.057	0.0001
A	0.058 401	1	0.058 401	64.160	0.0001
B	0.022 185	1	0.022 185	24.373	0.0017
AB	0.000 141	1	0.000 141	0.154	0.7061
A^2	0.053 135	1	0.053 135	58.375	0.0001
B^2	0.056 540	1	0.056 540	62.116	0.0001
残差	0.006 372	7	0.000 910		
失拟项	0.002 383	3	0.000 794	0.797	0.5564
纯误差	0.003 988	4	0.000 997		
总差	0.184 125	12			

蒸发法制备 3 批 Bud 脂质体。结果表明，3 批样本的包封率为（82.15±0.34）%、载药量为（12.71±0.34）%、粒径为（273.8±3.4）nm、*Y* 为（0.95±0.01），说明工艺稳定可行，重现性好。

2.3 Bud 脂质体温敏凝胶的制备

采用冷溶法制备 Bud 脂质体温敏凝胶。精密称取泊洛沙姆 407（P407）、泊洛沙姆 188（P188）和羟丙基甲基纤维素（HPMC）适量，在磁力搅拌下缓慢加入到一定量的脂质体中，搅拌均匀后，于 4 ℃下静置溶胀 24 h，即得。

2.4 Bud 脂质体温敏凝胶工艺优选指标

2.4.1 胶凝温度 采用试管倒置法 [13] 测定胶凝温度。试管中加 2 mL 凝胶溶液，插入温度计，置恒温水浴锅中，从 25 ℃开始缓慢升温，每隔 0.2 ℃将试管倾斜 180° 以观察溶液的流动情况。溶液不流动时的最低温度即为胶凝温度，重复 3 次取平均值。

2.4.2 累积释放度的测定 采用 Franz 扩散池对药物的累积释放度进行测定 [14]。供给池和接收池间以半透膜隔离。向接收池中加入恒温至 37.5 ℃的磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.4）释放介质，将 Franz 扩散池置于 37.5 ℃恒温水浴磁力搅拌器中。取 Bud 脂质体温敏凝胶 1.0 mL，加入到供给池中，放置 10 min，待凝胶胶凝后开始搅拌。分别于 0.5、1、2、4、6、8、10、12 h 各取样 0.4 mL，同时补充恒温介质 0.4 mL。按“2.1.1”项下方法测定 Bud 含量。

2.4.3 评价指标——综合评分法 以胶凝温度（Y_1）和累积释放度（Y_2）的综合评分（*Y*）为评价指标 [15]，其中：

Y_1 ＝胶凝温度 /32 ℃，$Y_{1\,评分}$ 实行分段评分，即：当 $Y_1 \geqslant 1$ 时，$Y_{1\,评分} = 1/Y_1 \times 80$；当 $Y_1 < 1$ 时，$Y_{1\,评分} = Y_1 \times 80$；

$Y_2 = |Q_{2h} - 20\%| + |Q_{6h} - 50\%| + |Q_{12h} - 80\%|$，$Y_{2\,评分} = Y_{2min}/Y_2 \times 20$；

$Y = Y_{1\,评分} + Y_{2\,评分}$。*Y* 值越大指标越好。其中，$Q_{2h}$、$Q_{6h}$、$Q_{8h}$ 分别为 2 h、6 h、8 h 后的累积释放度；Y_{2min} 为 Y_2 最小值。

2.5 单因素对处方用量的考察

2.5.1 P407 用量的考察 固定处方中其他用量，分别加入 14%、16%、18%、20%、22%、24% 的 P407 制备 Bud 脂质体温敏凝胶，测定胶凝温度分别为 38.8、36.2、33.5、31.0、30.0、29.0 ℃。表明随着 P407 用量的增加，胶凝温度逐渐降低，当 P407 的用量小于 16% 时，温敏凝胶在 37 ℃仍未发生胶凝。

2.5.2 P188 用量的考察 固定处方中其他用量，分别加入 1%、2%、3%、4%、5%、6% 的 P188 制备 Bud 脂质体温敏凝胶，测定胶凝温度分别为 28.9、30.8、33.5、35.5、37.2、39.0 ℃。表明随着 P188 用量的增加，胶凝温度逐渐增大，当 P188 的用量大于 5% 时，温敏凝胶在 37.5 ℃仍未发生胶凝。

2.5.3 HPMC 用量的考察 固定处方中其他用量，分别加入 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1% 的 HPMC 制备 Bud 脂质体温敏凝胶，测定胶凝温度分别为 34.3、34.0、33.8、33.6、33.5 ℃。表明随着 HPMC 用量的增加，胶凝温度逐渐减小，但减小的趋势不显著。

2.6 正交试验优选温敏凝胶的处方组成

根据单因素试验，确定各因素的水平，以“2.4.3”项下 *Y* 为综合评价指标，进行 $L_{16}(4^5)$ 正交试验，因素水平见表 4，正交试验结果见表 5，方差分析见表 6。

表 4 正交试验设计的因素水平 (%)

Tab 4 Factor and level of orthogonal test (%)

因素	水平			
	1	2	3	4
P407（A）	16	18	20	22
P188（B）	2	3	4	5
HPMC（C）	0.4	0.6	0.8	1

由表 5 及表 6 中可知，处方中各因素对 Bud 脂质体温敏凝胶质量的影响程度依次为 AB ＞ A ＞ C ＞ B，优选水平组合为 $A_3B_3C_1$，即优选处方为 P407 用量 20%、P188 用量 4%、HPMC 用量 0.4%。

2.7 最佳工艺的验证

表 5　正交试验设计与结果

Tab 5　Orthogonal test

No.	A	B	AB	C	D（空白）	$Y_{1\,评分}$	$Y_{2\,评分}$	Y
1	1	1	1	1	1	74.85	8.47	83.32
2	1	2	2	2	2	69.19	13.02	82.21
3	1	3	3	3	3	65.64	16.43	82.07
4	1	4	4	4	4	62.59	20.00	82.59
5	2	1	2	3	4	78.75	5.21	83.96
6	2	2	1	4	3	74.42	6.92	81.34
7	2	3	4	1	2	70.52	12.16	82.68
8	2	4	3	2	1	67.19	5.22	72.41
9	3	1	3	4	2	74.75	6.40	81.15
10	3	2	4	3	1	80.00	6.03	86.03
11	3	3	1	2	4	75.29	10.49	85.79
12	3	4	2	1	3	71.11	19.57	90.69
13	4	1	4	2	3	70.25	4.85	75.10
14	4	2	3	1	4	74.50	4.97	79.47
15	4	3	2	4	1	80.00	4.32	84.32
16	4	4	1	3	2	75.29	5.10	80.40
K_1	82.547	80.882	82.713	84.040	81.520			
K_2	80.097	82.263	85.295	78.877	81.610			
K_3	85.915	83.715	78.775	83.115	82.300			
K_4	79.822	81.523	81.600	82.350	82.953			
R	6.093	2.833	6.520	5.163	1.433			

表 6　方差分析

Tab 6　Variance analysis

来源	自由度	离均差平方和	均方	F	P
A	3	95.806	31.935	17.831	＜ 0.05
B	3	17.801	5.933	3.313	＞ 0.05
AB	3	87.555	29.185	16.295	＜ 0.05
C	3	60.963	20.321	11.346	＜ 0.05
误差	3	5.373	1.791		

按优化的最佳工艺条件平行制备 3 批样品，平均胶凝温度为（33.1±0.1）℃；平均体外累积释放度 Q_{2h}（13.6±0.2）%、Q_{6h}（41.6±0.4）%、Q_{12h}（72.6±1.1）%；平均综合评分（90.12±0.43）；分别用超纯水将 3 批样本稀释 10 倍，置于 NDJ-5S 数字式粘度计样品池中，通过 Zetasizer Nano ZS 纳米激光粒径测定仪对其粒径和 Zeta 电位进行测定，每个样平行测 3 次。分别用超纯水将 3 批样本稀释 10 倍，置于 NDJ-5S 数字式粘度计样品池中，通过 Zetasizer Nano ZS 纳米激光粒径测定仪对其粒径和 Zeta 电位进行测定，每个样平行测 3 次。平均粒径为（285.2±6.7）nm，平均 Zeta 电位为－（45.8±5.3）mV，分布见图 3。制备的脂质体的平均粒经和平均 Zeta 电位分别为（273.8±3.4）nm 和－（31.9±2.16）mV，可知制成脂质体温敏凝胶后粒径和 Zeta 电位绝对值有增大的趋势，但影响不明显。经验证该 Bud 脂质体温敏凝胶在体温条件下能迅速胶凝，且累积释药性能良好。

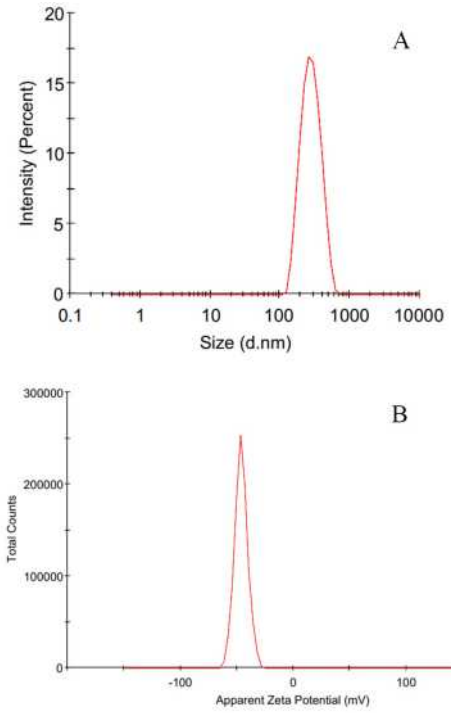


图 3　Bud 脂质体温敏凝胶的粒径（A）和 Zeta 电位分布（B）

Fig 3　Particle size（A）and Zeta potential distribution（B）of Bud liposome temperature sensitive gel

2.8　稳定性初步考察

按最佳处方工艺制备 Bud 脂质体温敏凝胶，置密闭西林瓶中，于 4 ℃冰箱避光保存，分别于第 0、15、30、45、60 日取样，观察外观性状，测定胶凝温度及药物含量。结果表明在考察的时间范围内，Bud 脂质体温敏凝胶外观、胶凝温度、含量、粒径和 Zeta 电位无明显变化，可满足后续药效学和药动学的研究要求。

3　讨论

Bud 为亲脂性药物，几乎不溶于水，难以有效分散于水溶性凝胶中，故将其包裹于脂质体，以有效分散于温敏凝胶中，从而发挥缓释、局部靶向作用[16]。Bud 脂质体温敏凝胶，在常温下为自由流动的液体，在灌肠后可快速均匀分布于降结肠、乙状结肠、直肠，后在体温调节下迅速胶凝，黏度升高以对抗肠道自蠕动。另外，脂质体还可提高局部黏膜的滞留量，减少全身作用[8]。包封率、载药量、粒径、分散指数、电位等均为评价脂质体制备工艺的指标，一方面指标过多容易导致试验难度增加；另一方面，预试验中各考察因素对分散指数和电位并无显著影响，故选择包封率、载药量和粒径为指

标，采用加权后综合评分进行全面评价，不仅能全面反映各检测指标对脂质体的重要程度，也能直观反映整体制备工艺[11]。

胶凝温度是温敏凝胶的一个重要指标，温敏凝胶灌肠后，若在病灶部位短时间内不能相变，会因肠道自蠕动作用而漏出，且凝胶所载药物会发生突释，降低制剂的缓释作用，因此选择胶凝温度在 30 ～ 34 ℃为宜[16]。为保证该直肠给药系统在室温下为液态，便于给药和分布，进入直肠后迅速的胶凝，本研究以 32 ℃为胶凝温度的参考温度[17]。然而，制剂质量的好坏不只取决于胶凝温度，还与合适温度下药物能否充分释放有关。故本研究在单因素筛选出各基质的合理范围后，继以胶凝温度和累积释放度的综合评分为指标，使优选出的 Bud 脂质体温敏凝胶在生理温度下迅速胶凝，发挥良好的释药作用。

在筛选处方时，P407 的质量分数影响最为显著，这与 P407 在处方中的作用与贡献是一致的。泊洛沙姆分子是排列整齐的 Z 字形结构。当温度升高时，Z 字形结构可能转变为缠绕紧密的折叠结构，而且缠绕越来越紧密，形成更黏稠的凝胶[18]。P407 是由聚氧乙烯（PEO）、聚氧丙烯（PPO）组成的 PEO-PPO-PEO 非离子型三嵌段共聚物，其中 PEO 与 PPO 的质量比为 7∶3。加入 P188 后，相对增加了 PEO 的比例而降低了 PPO 的比例，升高了体系的胶凝温度。但 P188 的用量过大时，本身已胶束化的 P188 分子亦可参与凝胶构成，又导致体系胶凝温度降低。因此要调节 P407 的胶凝温度需选择 P188 合适的用量[19]。本研究还发现 P407 与 P188 存在较为显著的交互作用，其对指标的影响甚至大于 P407 与 P188 各自的影响。

虽然本研究对该直肠定向给药制剂进行了初步研究，但对于其生物有效性、安全性尚待进一步研究，以期为 UC 患者提供可靠的药物制剂。

参考文献

[1] 孟利珠，卢诗旭 . 同伴支持自我管理教育对溃疡性结肠炎患者认知水平及健康行为的影响 [J]. 中国医药导报，2021，18（13）：168-171.

[2] 万健，吴开春 . 溃疡性结肠炎癌变的危险因素和监测 [J]. 中华消化杂志，2018，38（12）：865-867.

[3] Du L，Ha C. Epidemiology and pathogenesis of ulcerative colitis [J]. Gastroenterol Clin North Am，2020，49（4）：643-654.

[4] 梁笑楠，尹凤荣，张晓岚 . 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见（2018 年，北京）溃疡性结肠炎部分解读 [J]. 临床荟萃，2018，33（11）：987-990.

[5] Gionchetti P，Rizzello F，Annese V，et al. Use of corticosteroids and immunosuppressive drugs in inflammatory bowel disease：clinical practice guidelines of the Italian Group for the Study of Inflammatory Bowel Disease [J]. Dig Liver Dis，2017，49（6）：604-617.

[6] Makoto N，Fumihito H，Kiyonori K，et al. Middle-term prognosis in patients with ulcerative colitis who achieved clinical and endoscopic remission by budesonide rectal foam [J]. PLoS One，2019，14（8）：e0220413.

[7] 林志金，弭希峰，洪顺忠 . 布地奈德联合云南白药保留灌肠治疗溃疡性结肠炎疗效观察 [J]. 临床合理用药杂志，2017，10（25）：67-69.

[8] 沈婷，陈林，谢兴亮，等 . 布地奈德直肠原位温敏凝胶的处方设计与优化 [J]. 中国药科大学学报，2018，49（6）：689-694.

[9] 陈林 . 布地奈德直肠原位温敏凝胶的制备及评价 [D]. 成都：成都医学院，2020.

[10] 唐随意，杨晶，符旭东 . 布地奈德灌肠用温敏性凝胶的体外释放度及局部滞留性评价 [J]. 中国医院药学杂志，2019，39（13）：1332-1336.

[11] 马瑞丽，杨东亮，赵宇郁，等 . 布地奈德脂质体制备工艺优选及质量评价 [J]. 中南药学，2021，19（4）：593-598.

[12] 吕凤娇，赖燕霞，张远航，等 . 逆相蒸发法制备黄芩苷脂质体工艺的研究 [J]. 中国药学杂志，2019，54（3）：219-225.

[13] 陈函，廉婷，杜远东，等 . 鼻用葛根素脂质体温敏凝胶剂的制备与质量评价 [J]. 化工科技，2020，28（5）：41-46.

[14] 江敏，邓小丽，傅彦妍，等 . 松果菊苷脂质体温敏凝胶的制备及体外释放度的考察 [J]. 时珍国医国药，2019，30（5）：1132-1135.

[15] 刘巍，刘文，宋信莉，等 . 灯盏花素胃黏附片的制备及质量评价 [J]. 中国药房，2020，31（14）：1690-1694.

[16] 曹佳薇，倪坚军，姚君，等 . 利福平脂质体温敏型原位凝胶的制备及其体外释药特征研究 [J]. 中国现代应用药学，2016，33（2）：183-187.

[17] 殷雅卓，陈林，谢兴亮，等 . 美沙拉嗪直肠原位温敏凝胶的制备及体外评价 [J]. 中国新药杂志，2019，28（12）：1484-1489.

[18] Cholapranee A，Hazlewood GS，Kaplan GG，et al. Systematic review with meta-analysis：comparative efficacy of biologics for induction and maintenance of mucosal healing in Crohn’s disease and ulcerative colitis controlled trials [J]. Aliment Pharmacol Ther，2017，45（10）：1291-1302.

[19] Mosli MH，Al-Harbi O，Feagan BG，et al. A saudi gastroenterology association position statement on the use of tumor necrosis factor-alfa antagonists for the treatment of inflammatory bowel disease [J]. Saudi J Gastroenterol，2015，21（4）：185-197.

（收稿日期：2021-10-23；修回日期：2021-12-15）

响应面法结合熵权法优选麦门冬汤颗粒的干法制粒工艺

莫秋怡，施文婷，徐东婷，严玉晶，崔婷，孙冬梅，梁志毅*（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　优选麦门冬汤颗粒的干法制粒工艺。**方法**　以颗粒的一次成型率、吸湿率、溶化率和脆碎度为质量指标，通过熵权法确定各质量指标的权重系数，并计算综合评分。先用单因素试验筛选出最佳辅料种类及配比，再用 Box-Behnken 试验对干法制粒的压轮压力、送料频率和压轮频率进行优化，并对优选的工艺参数进行验证。**结果**　优选的最佳辅料及配比为浸膏粉∶乳糖＝1∶1，最佳干法制粒参数为压轮压力 15.6 MPa，送料频率 20 r • min $^{-1}$，压轮频率 3 r • min $^{-1}$。验证试验的综合评分分别为 0.931、0.906、0.912，*RSD* 为 1.4%。**结论**　优选的麦门冬汤颗粒干法制粒工艺稳定可行，颗粒质量属性较好，可为麦门冬汤颗粒的工业化生产提供参考。

关键词：麦门冬汤颗粒；响应面法；干法制粒；熵权法；辅料
中图分类号：R283　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)05-1005-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.007

Optimization of dry granulation technology of Maimendongtang granules by response surface methodology combined with entropy weight method

MO Qiu-yi, SHI Wen-ting, XU Dong-ting, YAN Yu-jing, CUI Ting, SUN Dong-mei, LIANG Zhi-yi* (*Guangdong Efong Pharmaceutical Co., Ltd*, *Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granules in Guangdong*, *Foshan Guangdong* 528244)

Abstract: Objective　To optimize the dry granulation of Maimendongtang granules. **Methods**　The particle forming rate, moisture absorption rate, dissolubility and particle friability were used as indexes, the weight coefficient of each quality indicator was determined by entropy weight method, and the comprehensive score was calculated. The single factor experiment was used to screen the best type and proportion of excipient, and then Box-Behnken text was used to optimize the rolling pressure, feeding speed, and rolling speed of the dry granulation. Validation test was also performed. **Results**　The optimal excipient ratio was extract powder ∶ lactose ＝ 1∶1, and the optimal dry granulation parameters were rolling pressure of 15.62 MPa, feeding speed of 20 r • min $^{-1}$, and rolling speed of 3 r • min $^{-1}$. The comprehensive scores of the verification test were 0.931, 0.906, and 0.912, and the *RSD* was 1.4%. **Conclusion**　The optimal dry granulation process of Maimendongtang granules is stable and feasible, and the granules have good quality attributes, which can provide a reference for the industrial production of Maimendongtang granules.

Key words: Maimendongtang granules; response surface methodology; dry granulation; entropy weight method; excipient

麦门冬汤属国家中医药管理局 2018 年 4 月 13 日发布的《古代经典名方目录（第一批）》，始载于汉代“医圣”张仲景所著《金匮要略 • 卷上 • 肺痿肺痈咳嗽上气病脉证治第七》[1]。该方由麦冬、半夏、人参、甘草、粳米、大枣组成，具有滋养肺胃、降逆下气的功效，原治虚热肺痿，后世亦用于肺阴不足或胃阴不足证[2]。现代药理临床应用研究表明，麦门冬汤具有治疗慢性萎缩性

基金项目：广东省省级科技计划项目（No. 2018B030323004）；佛山市核心技术攻关项目（No. 1920001000378）。
作者简介：莫秋怡，女，主要从事中药制剂工艺与质量控制研究，email：954634853@qq.com　*通信作者：梁志毅，男，副主任中药师，主要从事中药制剂工艺与质量控制研究，email：liangzy112@163.com

胃炎、抗呼吸道炎症及镇咳、干预肺纤维化、抗肿瘤及免疫增强等作用，临床多用于治疗慢性胃炎、硅沉着病、肺纤维化、肺癌、多病因咳嗽等[3]。

目前，关于麦门冬汤的研究多集中在药理作用、临床应用等方面[3-7]，尚未见麦门冬汤相关制剂研究的报道，面对古今制剂方式的更迭以及现代市场应用的需求，对麦门冬汤颗粒的成型工艺进行研究具有重要意义。中药制粒技术主要有湿法制粒、干法制粒、流化喷雾制粒等，湿法制粒历史悠久，至今仍被广泛应用；干法制粒则是近年才出现的新型制粒技术，相比于湿法制粒节省了软材，简化了干燥过程，具有效率高、制粒过程不受热、成品不易吸潮、质量稳定，颗粒崩解性与溶出性好、含药量高等特点[8-9]，特别适合以中药浸膏粉直接制粒。麦门冬汤处方中麦冬和大枣含有大量糖苷类物质，在制粒过程中易黏机，颗粒一次成型率较低，且易产生花颗粒，造成资源浪费。辅料是影响颗粒剂质量的重要因素，辅料的种类选择及配比直接影响颗粒剂的成型难易、溶出速度等。因此，本研究先通过单因素试验对辅料种类及配比进行筛选，再通过 Box-Behnken 试验对麦门冬汤颗粒的干法制粒工艺参数进行优化，根据熵权法确定各指标权重，并进行综合评分，优选出干法制粒的最佳工艺参数，为麦门冬汤颗粒的产业化生产提供数据支持。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LGS20 型干法制粒机（南京迦南科技有限公司），TDL-4000C 低速壹式大容量离心机（上海安亭科学仪器厂），ME204E 型万分之一天平（瑞士 METTLER TOLEDO 公司），DHG-9146A 型电热恒温鼓风干燥箱（上海精宏试验设备有限公司），CS-2A ＋型脆碎度测定仪（天津市精拓仪器有限公司），JJ200B 型电子天平（常熟市双杰测试仪器厂），CR 不锈钢标准筛（上海宜昌仪器纱筛厂）。

1.2 试药

麦芽糊精（批号：2019110751，吉林中粮生化能源销售有限公司），糊精（批号：190114C，曲阜市天利药用辅料有限公司），乳糖（批号：20200112，珠海安宝健药业有限公司），可溶性淀粉（批号：210108，安徽山河药用辅料股份有限公司），麦门冬汤浸膏粉（广东一方制药有限公司制备，纯浸膏粉每克相当于生药 1.92 ～ 2.08 g）。

2 方法与结果

2.1 麦门冬汤颗粒的制备

将麦门冬汤浸膏粉与一定比例的辅料混合均匀，调节压轮压力、压轮频率和送料频率后，将混匀的物料置于干法制粒机中压成片状物，再破碎成颗粒，整粒即得[10]。

2.2 评价指标测定方法

2.2.1 一次成型率[11] 将颗粒依次通过一号筛和五号筛，称定能通过一号筛但不能通过五号筛的颗粒的质量，计算一次成型率。一次成型率（%）＝通过一号筛但不通过五号筛的颗粒质量 / 送料质量 ×100%。

2.2.2 吸湿率[12] 参照药物引湿性试验指导原则（2020 年版《中国药典》四部通则 9103）测定。

2.2.3 溶化率[13] 取颗粒约 0.5 g，精密称定，置 20 mL 离心管中，精密加入 10 mL 沸水，振荡搅拌 3 min 后，4000 r • min $^{-1}$ 离心 10 min，弃去上清液，加入适量水将残渣溶解并转移至蒸发皿中，水浴蒸干，于 105 ℃烘箱内干燥 3 h，置干燥器中冷却 30 min，迅速称定质量，计算溶化率。溶化率（%）＝（总颗粒质量－残渣质量）/ 总颗粒质量 ×100%。

2.2.4 脆碎度[10] 取适量颗粒依次通过二号筛和四号筛，取能通过二号筛但不能通过四号筛的颗粒适量，称定质量（m_1），置于脆碎度测定仪中，设定转速为 35 r • min $^{-1}$，转动 4 min，取出，过四号筛，精密称定未过四号筛的颗粒质量（m_2），计算脆碎度。脆碎度（%）＝（$m_1 - m_2$）/ m_1×100%。

2.3 权重系数的考察[14]

熵权法是根据指标的变异程度来确定客观权重，若某个指标的信息熵越小，表明该指标值变异程度越大，能提供的有效信息就越多，其权重也就相应变大，反之则变小。

① 数据标准化：针对定量指标数据，考虑到数量级不同，对指标进行无量纲化处理。本研究采用 Hassan 法[15]分别对各指标进行数学转换求“归一值”，计算公式如下：

对于取值越大越好的指标：$Y_{ij} = (x_{ij} - min\{x_{ij}\}) / (max\{x_{ij}\} - min\{x_{ij}\})$

对于取值越小越好的指标：$Y_{ij} = (max\{x_{ij}\} - x_{ij}) / (max\{x_{ij}\} - min\{x_{ij}\})$

② 对标准化数据进行归一化：即计算第 j 项指标下第 i 项评价项目指标值所占的比重（f_{ij}）。

$$f_{ij} = Y_{ij} / \sum_{i=1}^{n} Y_{ij}$$

③ 计算各指标的信息熵：根据信息论中信息

熵的定义，信息熵 E_j 公式如下：

$$E_j = -\ln(1/m)\sum_{i=1}^{n} f_{ij}\ln f_{ij}$$

当 $f_{ij}=0$，考虑到 $\ln f_{ij}$ 无意义，因此，对 f_{ij} 的计算进行修正，将其定义为 $\lim_{f_{ij}\to 0}$

$$f_{ij}\ln f_{ij}=0$$

④ 计算各指标的熵权系数：根据 E_j 的计算公式计算出各个指标的 E_j 为 E_1，E_2，……，E_m。通过 E_j 计算各指标的权重。

$$W_j=(1-E_j)/(m-\sum_{j=1}^{m}E_j),\ j=1,2,\cdots,m$$

2.4　辅料种类的筛选

本试验将对麦芽糊精、乳糖、糊精、可溶性淀粉进行考察，按浸膏粉和辅料为 3∶1、2∶1、1∶1 的配比设置了 12 组试验，固定干法制粒参数（压轮压力 12 MPa，送料频率 16 r·min^{-1}，压轮频率 3 r·min^{-1}），经制粒后整粒成型，分别测定各组试验的一次成型率、吸湿率、溶化率和脆碎度。由熵权法计算得到一次成型率、吸湿率、溶化率和脆碎度的权重分别是 0.35、0.24、0.26 和 0.15，按综合评分＝一次成型率 ×0.35 ＋吸湿率 ×0.24 ＋溶化率 ×0.26 ＋脆碎度 ×0.15，计算各组试验的综合评分。结果见表 1，由表 1 可知，当浸膏粉和乳糖的配比为 1∶1 时，综合评分最高，故确定最优辅料及加入比例为浸膏粉∶乳糖＝ 1∶1。

表 1　辅料种类及用量考察结果

Tab 1　Type and dosage of excipient

序号	物料 /g					颗粒评价指标 /%				综合评分
	浸膏粉	麦芽糊精	乳糖	糊精	可溶性淀粉	一次成型率	吸湿率	溶化率	脆碎度	
1	675	225	/	/	/	36.12	22.01	96.73	8.45	0.474
2	600	300	/	/	/	30.86	20.94	97.45	7.24	0.414
3	450	450	/	/	/	29.52	19.05	97.83	5.30	0.468
4	675	/	225	/	/	38.64	18.78	96.87	4.60	0.672
5	600	/	300	/	/	36.20	16.84	96.92	4.76	0.676
6	450	/	450	/	/	34.30	13.19	97.69	6.27	0.730
7	675	/	/	225	/	32.33	19.45	82.81	9.53	0.358
8	600	/	/	300	/	46.04	17.87	78.74	13.12	0.622
9	450	/	/	450	/	33.38	15.34	69.62	16.69	0.319
10	675	/	/	/	225	45.61	18.93	80.45	7.97	0.657
11	600	/	/	/	300	34.64	17.88	74.32	9.01	0.400
12	450	/	/	/	450	36.92	14.81	63.83	7.29	0.486

2.5　Box-Behnken 设计 - 响应面法设计试验

2.5.1　试验设计及结果　本试验选择影响干法制粒的主要工艺参数压轮压力、送料频率、压轮频率[16]，为影响因素，以一次成型率、吸湿率、溶化率、脆碎度的综合评分作为响应值进行 Box-Behnken 试验设计。由熵权法计算得到一次成型率、吸湿率、溶化率和脆碎度的权重分别是 0.38、0.13、0.24 和 0.25，按综合评分＝一次成型率 ×0.38 ＋吸湿率 ×0.13 ＋溶化率 ×0.24 ＋脆碎度 ×0.25，计算各组试验的综合评分，试验设计及结果见表 2、3。

表 2　Box-Behnken 试验设计因素水平

Tab 2　Factor and level of Box-Behnken test design

水平	A. 压轮压力 /MPa	B. 送料频率 /（r·min^{-1}）	C. 压轮频率 /（r·min^{-1}）
－1	8	20	3.0
0	12	30	4.0
1	16	40	5.0

表 3　Box-Behnken 试验设计及结果

Tab 3　Box-Behnken test design and results

No.	A	B	C	一次成型率 /%	吸湿率 /%	溶化率 /%	脆碎度 /%	综合评分
1	12	30	4	32.92	12.50	97.48	6.30	0.517
2	8	30	3	30.92	12.50	96.76	7.72	0.220
3	8	30	5	30.40	12.31	97.09	7.26	0.294
4	16	40	4	30.61	12.30	95.91	5.91	0.321
5	16	30	3	33.50	12.27	97.25	5.69	0.631
6	12	30	4	33.36	12.21	96.80	6.10	0.565
7	16	30	5	30.78	12.49	96.43	7.42	0.213
8	8	20	4	35.68	12.68	96.54	7.97	0.431
9	8	40	4	30.10	11.94	96.80	7.50	0.311
10	12	40	5	31.61	11.86	96.98	6.75	0.497
11	12	20	5	34.52	11.94	97.19	4.90	0.822
12	12	30	4	32.90	11.80	96.81	6.50	0.591
13	12	40	3	30.30	12.40	97.23	6.90	0.311
14	12	30	4	29.41	12.23	97.17	5.10	0.435
15	12	30	4	32.95	11.77	96.96	6.90	0.582
16	16	20	4	35.30	11.66	97.16	6.25	0.818
17	12	20	3	35.65	11.55	96.29	5.90	0.817

2.5.2　模型拟合与方差分析　利用 Design Expert 8.0.6 软件对试验数据进行二次多元回归拟合，得到综合评分对编码自变量的二次多元回归方程 $Y=0.54+0.09A-0.18B-0.019C-0.096AB-0.12AC+0.046BC-0.17A^2+0.1B^2-0.028C^2$，方差分析结果见表 4。

由表 4 可知，模型 $P=0.0061<0.01$，表明该方程模型显著性高，拟合度良好；失拟项 $P=0.1343>0.05$，表明失拟项不显著，未知因素对试验结果干扰小；决定系数 $R^2=0.9108$，进一步表明模型的拟合度和可信度良好；精密度＝10.153 ＞ 4，说明此模型的精密度较好，因此可

表 4 拟合回归方程的方差分析结果

Tab 4 Analysis of variance results of the fitted regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	*F*	*P*
模型	0.600	9	0.066	7.94	0.0061
A	0.066	1	0.066	7.89	0.0262
B	0.260	1	0.260	31.31	0.0008
C	0.003	1	0.003	0.35	0.5729
AB	0.036	1	0.036	4.25	0.0783
AC	0.061	1	0.061	7.23	0.0311
BC	0.008	1	0.008	0.98	0.3555
A^2	0.120	1	0.120	14.54	0.0066
B^2	0.044	1	0.044	5.26	0.0555
C^2	0.003	1	0.003	0.41	0.5430
残差	0.059	7	0.008		
失拟项	0.042	3	0.014	3.29	0.1343
纯误差	0.017	4	0.004		
总离差	0.660	16			
决定系数	0.9108				
校正决定系数	0.7961				
精密度	10.153				

用此模型对麦门冬汤干法制粒工艺进行分析和预测。由 *F* 值可知，各因素对综合评分影响大小顺序为：送料频率＞压轮压力＞压轮频率，*A*、*B* 对综合评分影响显著；交互项中，仅 *AC* 交互作用影响显著；二次项中，仅 A^2 影响显著；说明各因素与综合评分之间并非简单的线性关系。

2.5.3 响应面各因素交互作用分析 通过 Design-Expert 8.0.6 软件处理，得到两因素间的交互作用响应面分析图，如图 1 ～ 3。

图 1 响应曲面较平滑，说明 AB 之间交互作用影响不显著；当送料频率不变时，综合评分随压轮压力的增大表现为先上升后下降；当压轮压力不变时，综合评分随送料频率的增大表现为先下降后上升。

图 2 的响应曲面较陡峭，等高线呈椭圆形，说明 AC 之间交互作用影响显著；当压轮频率较小时，综合评分随压轮压力的增大而增加；当压轮频率达到一定值后，综合评分随压轮压力的增

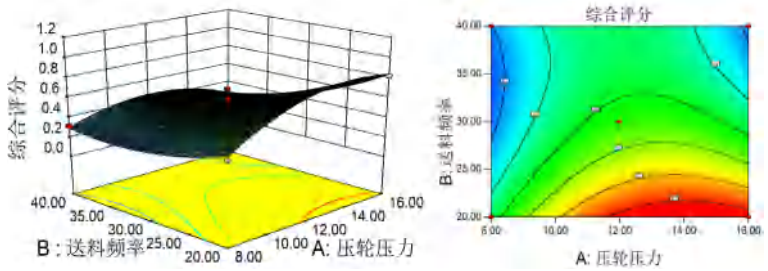


图 1 压轮压力与送料频率对综合评分的响应面及等高线图

Fig 1 Response surface and contour map of rolling pressure and feeding speed to the comprehensive score

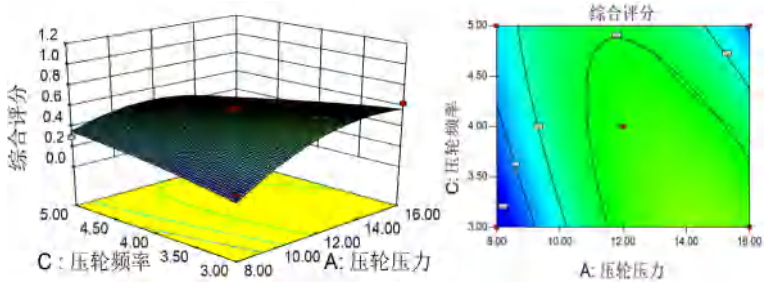


图 2 压轮压力与压轮频率对综合评分的响应面及等高线图

Fig 2 Response surface and contour map of rolling pressure and rolling speed to the comprehensive score

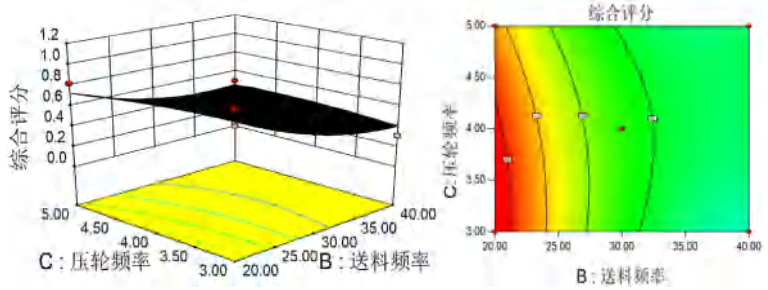


图 3 送料频率与压轮频率对综合评分的响应面及等高线图

Fig 3 Response surface and contour map of feeding speed and rolling speed to the comprehensive score

加表现为先上升后下降；当压轮压力较小时，综合评分随压轮频率的增大而增加；当压轮压力达到一定值后，综合评分随压轮频率的增大而减小。

图 3 的响应曲面较平缓，说明 BC 之间交互作用影响不显著。当压轮频率不变时，综合评分随送料频率的增大表现为先下降后趋于平缓；当送料频率不变时，随压轮频率的增大，综合评分变化不明显。

2.6 验证试验

利用 Design Expert 8.0.6 软件，由回归模型进行预测分析，综合评分最大预测值为 0.997，最优工艺条件为压轮压力 15.6 MPa，送料频率 20 $r \cdot min^{-1}$，压轮频率 3 $r \cdot min^{-1}$。在此条件下，进行 3 组验证试验，见表 5。3 组验证试验综合评分均值为 0.916，*RSD* 为 1.4%，与预测值的偏差为 8.1%，说明建立的模型预测性良好，优化的工艺稳定可行。

表 5 验证试验结果

Tab 5 Verification test

试验号	一次成型率 /%	吸湿率 /%	溶化率 /%	脆碎度 /%	综合评分
1	36.79	11.61	97.98	5.60	0.931
2	35.94	11.59	97.48	5.01	0.906
3	36.65	11.65	97.89	5.40	0.912
RSD/%	1.3	0.16	0.26	2.4	1.4

3 讨论

中药制剂常用的辅料有麦芽糊精、可溶性淀粉等[17]，本试验通过单因素试验筛选出最佳辅料配比为浸膏粉∶乳糖＝ 1∶1，乳糖具有良好的流动性、溶化性、成型性和较弱的吸湿性，使用乳糖作为辅料可以提高颗粒的成型率、溶出率和降低颗粒的吸湿性，保证临床疗效。

本研究采用 Box-Behnken 试验优选麦门冬汤颗粒的干法制粒工艺[18-19]，结果表明，建立的二次多元回归方程的拟合度和可信度良好，通过回归方程进行预测，得到最优工艺条件为压轮压力 15.6 MPa，送料频率 20 $r \cdot min^{-1}$，压轮频率 3 $r \cdot min^{-1}$。同时，采用熵权法计算各指标的权重可以使评分结果更科学、合理、接近实际情况，避免了主观因素对试验结果造成误差。

本研究制得的麦门冬汤颗粒外观性状均匀，流动性、溶化性较好，吸湿性较低，改善了浸膏粉的流动性、飞散性、吸湿性以及直接应用的局限性，并通过验证试验确定响应面法优选的干法制粒工艺稳定可行，可为麦门冬汤颗粒的工业化生产提供参考。

参考文献

[1] 国家中医药管理局 . 关于发布《古代经典名方目录（第一批）》的通知 [EB/OL].（2018-04-13/2018-06-10）http：//kjs.satcm. gov. cn/zhengce wenjian/2018-04-16/7107. html.

[2] 李飞 . 方剂学（下册）[M]. 北京：人民卫生出版社，2002：1534-1541.

[3] 张保国，刘庆芳 . 经方麦门冬汤现代研究与临床运用 [J]. 中成药，2011，33（4）：671-674.

[4] 李宁，宋建平，王振亮 . 麦门冬汤最新药理研究与临床应用进展 [J]. 中医研究，2013，26（8）：74-76.

[5] 张勇，周勇锋，罗璐 . 麦门冬汤联合左金丸治疗食管癌术后反流性食管炎的临床观察 [J]. 世界中西医结合杂志，2020，15（6）：1096-1099，1103.

[6] 沙艳萍 . 半夏厚朴汤合麦门冬汤治疗慢性咳嗽的效果探析 [J]. 当代医药论丛，2020，18（12）：186-187.

[7] 杨晓慧，臧海洋，顾小侠 . 麦门冬汤合泽漆汤联合化疗治疗晚期肺癌疗效观察 [J]. 山西中医，2020，36（5）：8-10.

[8] 把挹，徐玲玲，年华 . 中药颗粒剂制粒技术综述 [J]. 中国药师，2010，13（5）：733-736.

[9] 吴司琪，伍振峰，岳鹏飞，等 . 中药制粒工艺及其设备的研究概况 [J]. 中国医药工业杂志，2016，47（3）：341-346.

[10] 范凌云，余琰，高建德，等 . Box-Behnken 设计 - 效应面法优选蒲黄干法制粒工艺 [J]. 中国中医药信息杂志，2018，25（1）：84-88.

[11] 杜中梅 . 响应曲面法优化板蓝根颗粒干法制粒工艺 [J]. 中国当代医药，2017，24（24）：82-84.

[12] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：485-486.

[13] 杨辛欣，王楚盈，杨波，等 . 含难溶性黏液质类成分的车前子配方颗粒制备工艺研究 [J]. 时珍国医国药，2017，28（3）：623-626.

[14] 王光函，姜鸿，刘晶，等 . 基于多指标综合评分法优选化胃舒颗粒挥发油包合工艺 [J]. 中草药，2020，51（6）：1537-1541.

[15] 吴伟，崔光华，陆彬 . 试验设计中多指标的优化：星点设计和总评 “归一值” 的应用 [J]. 中国药学杂志，2000，35（8）：26-29.

[16] 曹韩韩，杜若飞，冯怡，等 . 干法制粒技术在中药研究中的应用进展 [J]. 中草药，2013，44（19）：2772-2776.

[17] 杨净尧，邱智东，王畅，等 . 响应曲面法优选柴桂解郁颗粒的成型工艺 [J]. 医药导报，2020，39（2）：216-220.

[18] 方艳，田静，罗颂，等 . 响应面法优化防风中升麻素和亥茅酚苷的提取工艺 [J]. 中医药导报，2019，25（16）：66-69.

[19] 葛少波，施务务，周静，等 . Box-Behnken 设计 - 响应面法优选小儿爽肤洗液的提取工艺 [J]. 中医药导报，2020，26（9）：49-53，58.

（收稿日期：2021-10-09；修回日期：2021-11-10）

苍耳子治疗变应性鼻炎的网络药理学分析及作用机制研究

李丹[1]，章秀梅[1]，宣自华[1]，刘丛彬[1]，俞年军[1, 2, 3]，谢冬梅[1, 2, 3*]（1.安徽中医药大学，合肥 230012；2.安徽省中医药科学院 中药资源保护与开发研究所，合肥 230012；3.中药研究与开发安徽省重点实验室，合肥 230012）

摘要：目的 通过网络药理学分析苍耳子治疗变应性鼻炎（AR）的机制，并通过动物学实验进行药效部位筛选及治疗活性研究。**方法** ① 应用 Cytoscape 软件，通过 TCMSP、GeneCards、Uniprot 数据库构建“活性成分 - 靶点 - 疾病”网络；通过 STRING 数据库构建蛋白互作网络，推测核心靶点；使用 Metascape 数据库对靶点进行 GO、KEGG 富集分析。② 建立大鼠 AR 模型，以血清中的免疫球蛋白 E（IgE）、白介素 -4（IL-4）和干扰素（IFN-γ）的含量为评价指标，比较苍耳子不同提取物治疗大鼠 AR 的效果；采用 Western blot 法检测各组大鼠鼻黏膜组织中的 PI3K 和 P-AKT 蛋白表达。**结果** ① 本研究纳入活性成分 19 个，预测靶点 217 个，疾病靶点 2803 个，PPI 筛选核心靶点 108 个；GO 生物功能分析发现：存在神经元迁移、积极调控细胞迁移、对受伤的反应、对脂多糖的反应等生物过程，膜筏、膜面、细胞外基质等细胞组成，蛋白酶活性、细胞因子受体结合、蛋白质结构域特异性结合等分子功能；KEGG 信号通路分析发现，乙型肝炎、PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、T 细胞受体信号通路、Th17 细胞分化、细胞周期等通路参与调控。② 动物大鼠实验表明苍耳子总水提物及正丁醇部位可改善鼻黏膜病理变化，降低 AR 大鼠血清 IgE 和 IL-4 水平（$P < 0.01$），升高 IFN-γ 水平（$P < 0.01$）；AR 模型大鼠鼻黏膜组织中 PI3K 和 P-AKT 蛋白表达增加。给予药物治疗干预后，各给药组 PI3K、P-AKT 蛋白表达下调且苍耳子正丁醇组作用最为显著。**结论** 通过网络药理学和动物实验发现苍耳子可能通过调控 PI3K/AKT 通路发挥其治疗作用，为更深入研究苍耳子治疗 AR 提供了依据。

关键词：苍耳子；变应性鼻炎；网络药理学；活性部位；PI3K/AKT 通路
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)05-1010-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.008

Network pharmacology and mechanism of Xanthii Fructus for allergic rhinitis

LI Dan[1], ZHANG Xiu-mei[1], XUAN Zi-hua[1], LIU Cong-bin[1], YU Nian-jun[1, 2, 3], XIE Dong-mei[1, 2, 3*] (1. *Anhui University of Chinese Medicine, Hefei* 230012; 2. *Institute of Traditional Chinese Medicine Resources Protection and Development, Hefei* 230012; 3. *Anhui Key Laboratory of Research & Development of Chinese Medicine, Hefei* 230012)

Abstract: Objective To determine the mechanism of Xanthii Fructus for allergic rhinitis (AR) by network pharmacology, and verify it with animal experiments. **Methods** ① Cytoscape software was used to construct an active component-target-disease network through TCMSP, GeneCards and Uniprot databases. The protein interaction network was established with the STRING database, and the core targets were speculated. GO and KEGG enrichment analysis was performed on the targets with Metascape database. ② Rats were intraperitoneal injected with ovalbumin and aluminum hydroxide suspension, and local nasal stimulation of aluminum hydroxide drops was used to establish AR model to determine the anti-inflammatory activity of Xanthii Fructus. The contents of immunoglobulin E (IgE), interleukin-4 (IL-4) and interferon (IFN-γ) in the serum of the rats were used as the evaluation indexes.

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81503190）；安徽中医药大学 2021 年度校级探索性科研项目（No.2021hxts22）。
作者简介：李丹，女，硕士研究生，主要从事中药质量控制与评价研究，email：1062247461@qq.com *通信作者：谢冬梅，女，副教授，主要从事中药资源开发与利用及中药质量控制与评价研究，email：xiedongmei@126.com

PI3K and P-AKT protein expressions in the nasal mucosa of rats in each group were detected by Western blot. **Results** ① This study included 19 active ingredients, 217 predicted targets, 2803 disease targets, and 108 PPI screening core targets. GO biological function analysis found: t biological processes such as neuronal migration, active regulation of cell migration, response to injury and response to lipopolysaccharide; cell components such as membrane raft, membrane surface, extracellular matrix and other; molecular functions such as protease activity, cytokine receptor binding, protein domain specific binding and other. KEGG signaling pathway analysis showed that hepatitis B, PI3K-Akt signaling pathway, MAPK signaling pathway, T cell receptor signaling pathway, Th17 cell differentiation, cell cycle and other pathways were involved in the regulation. ② Rat experiments showed that the total water extract of Xanthii Fructus and *n*-butanol fractions improved the pathological changes in the nasal mucosa, reduced the levels of serum IgE and IL-4 in AR rats ($P < 0.01$), and increased the level of IFN-γ ($P < 0.01$); The expression of PI3K and P-AKT proteins increased in the nasal mucosa of AR model rats. After the drug intervention, the expressions of PI3K and P-AKT proteins in each administration group were down-regulated, and the protein expression in the Xanthii Fructus *n*-butanol group was most significantly down-regulated. **Conclusion** Xanthii Fructus plays an important therapeutic role by regulating the PI3K/AKT pathway, which provides a basis for further research on the treatment of AR with Xanthii Fructus.

Key words: Xanthii Fructus; allergic rhinitis; network pharmacology; active site; PI3K/AKT pathway

变应性鼻炎（allergic rhinitis，AR）又称过敏性鼻炎，是特异性个体的鼻黏膜受到过敏原的刺激后，IgE 的介导功能被激活而引起的鼻腔慢性炎症性疾病。西医临床常用包括抗组胺药物、糖皮质激素、口服抗白三烯类等药物进行治疗，但是不同患者之间可能存在疗效差异，且对持续性 AR 需维持治疗 [1]，因此寻找疗效显著的中药显得尤为重要。

苍耳子（Xanthii Fructus）为菊科植物苍耳（*Xanthium sibiricum* Patr.）的干燥成熟带总苞的果实，具有散风寒、通鼻窍、祛风湿的功效 [2]，为历代医家常用的鼻科要药。现代研究表明，苍耳子含有挥发油类、甾醇类、倍半萜内酯类、水溶性苷类、酚酸及其衍生物、黄酮类、蒽醌类等化合物 [3-6]，其抗炎作用已得到相关学者的认可 [7]。但是对苍耳子发挥抗炎活性的机制仍不清晰，因此本研究通过网络药理学对苍耳子治疗 AR 的主要化学成分、作用靶点及信号通路进行了预测分析；同时，通过动物实验对预测得到的通路上的关键靶点进行检测，探究苍耳子治疗 AR 的活性成分及其作用机制。

1　资料与方法

1.1　网络药理学

1.1.1　数据库靶点筛选　查阅文献，并搜索中药系统药理学分析平台数据库（TCMSP，https：//tcmspw. com/index. php），整理数据库中苍耳子的全部成分。对搜索得到的化学成分保存后导入 SwissADME 数据库中，进行预测分析确定出其作用靶点；按照 Uniprot 编号，在 Uniprot 数据库中查找对应的 gene offical sympol 格式，将其作为靶点基因保存。

1.1.2　成分 - 炎症疾病的交集靶点分析　以“rhinitis”为关键词，在 DisGeNET 相关的数据库中进行搜索，确定出可能的靶点，接着基于中位数筛选“Relevance score”值，在此基础上进行搜索得到满足相关要求的靶点信息。合并处理提取的信息，删除其中重复项后，将对应的靶点导入 Venn 工具中进行绘图处理，从而确定出相关的交集靶点。

1.1.3　靶点的 GO 及 KEGG 通路富集分析　核心靶点确定后导入 Metascape 数据库中，设定物种为“人类”，开展 GO 生物功能富集处理，从而确定出生物过程（biological process，BP）、细胞组成（cell composition，CC）、分子功能（molecular function，MF）富集分析；KEGG 通路在富集研究时选择同样的数据库，将以上确定出的结果导入 Cytoscape 3.5.1 中进行相关性分析，从而得到成分 - 靶点 - 通路网络图。

1.2　动物实验

1.2.1　仪器与试药　SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒（ASPEN 公司）；RIPA 总蛋白裂解液、BCA 蛋白质浓度测定试剂盒（ASPEN 公司）；ECL 化学发光检测试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司）；GAPDH 抗体（ab37168）（Abcam 公司）；PI3K 抗体（CST 4249）；Akt 抗体（CST 9272）；P-Akt 抗体（CST 4060）；IL-4 ELISA 检测试剂盒（批

号：05/2021）、IFN-γ ELISA 检测试剂盒（批号：05/2021）、IgE ELISA 检测试剂盒（批号：05/2021）（上海将来实业股份有限公司）。

1.2.2 动物 SPF 级健康 SD 大鼠 60 只，雌雄各半，体质量 200 ～ 250 g [济南朋悦实验动物繁育有限公司，许可证号：SCXK（鲁）20190003]。

1.2.3 药物的制备 苍耳子药材购于安徽省亳州药材市场，经安徽中医药大学谢冬梅副教授鉴定为菊科植物苍耳（*Xanthium sibiricum* Patr.）成熟带总苞的果实。取苍耳子药材 500 g，自然干燥后粉碎，参考文献中的煎煮法进行提取，获得苍耳子石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水提取部位 [8]。

1.2.4 AR 模型大鼠的复制 参照课题组前期的造模方法 [9] 制备 AR 大鼠模型。基础致敏阶段：以 150 mg 鸡卵清蛋白（ovalbumin，OVA）作为抗原，15 g 氢氧化铝粉末作为佐剂，两者共同混悬于 50 mL 生理盐水中，作为致敏剂。采用腹腔注射的方法，每只大鼠注射致敏剂 1 mL，隔日 1 次，共进行 7 次基础致敏，用时 14 d，正常组大鼠腹腔注射等容积的生理盐水。局部刺激阶段：第 15 ～ 21 日采用滴鼻法，以 2% OVA 生理盐水溶液滴入大鼠两侧鼻孔，每侧 50 μL，每日 1 次，正常组大鼠以等容积的生理盐水进行滴鼻。造模成功后，需要以 2%OVA 生理盐水溶液隔日滴鼻维持对鼻部的刺激以及过敏性症状直到实验结束。

1.2.5 实验分组与给药 将造模成功的大鼠重新随机分成模型组、氯雷他定组、石油醚组、乙酸乙酯组、正丁醇组和总水提物组。各给药组大鼠通过灌胃分别给予相应的药物，每日 1 次，共给药 14 次。氯雷他定给药剂量为 2 mg • kg $^{-1}$；石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位受试物以及总水提物的给药剂量为 5 g（生药）• kg $^{-1}$，各组大鼠的给药体系均为 1 mL/100 g。模型组和正常组大鼠灌胃给予等容积的生理盐水。

1.2.6 鼻黏膜组织病理观察 末次给药 1 h 后，用 10% 水合氯醛麻醉，腹主动脉取血后剥除上颌骨部的皮肤，取出整个鼻甲后放入 4% 甲醛固定，制作病理切片，在光学显微镜下观察、拍照、分析。

1.2.7 指标检测 末次给药 1 h 后，用 10% 水合氯醛麻醉，腹主动脉取血 5 ～ 10 mL，在离心管中静置 2 h 后，3000 r • min $^{-1}$ 离心 10 min，收集血清，于 − 20 ℃冰箱中储存备用。检测前取出，室温下放置 1 h 后按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作，分别对大鼠血清中 IgE、IL-4 和 IFN-γ 的含量进行检测。

1.2.8 Western blot 实验 取大鼠鼻腔黏膜组织，采用液氮研磨法，以 1 ∶ 10 比例（0.1 g 组织∶ 1 mL 裂解液）进行研磨，12 000 r • min $^{-1}$ 离心 10 min，取上清液，用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。制备样品，采用 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒制备 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶，上样，电泳，PVDF 转膜，5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后加一抗，其中内参 1 ∶ 5000，其他抗体 1 ∶ 1000，过夜，TBST 冲洗 3 次，加入二抗 1 ∶ 5000，TBST 冲洗 3 次，ECL 发光液显影。

1.3 统计分析方法

在研究过程中基于 SPSS 25.0 软件进行统计分析，同时利用 GraphPad Prism6.0 软件工具进行绘图，连续变量用均数 ± 标准差表示。组间结果差异进行单因素方差分析，计数数据通过百分比描述，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学分析

2.1.1 成分库的构建与筛选 搜索苍耳子化学成分，共得到 138 种化学成分，去掉无对应靶点的成分，共得到了 23 个潜在有效成分，其中羧基苍术苷、洋蓟素（1，3- 二咖啡酰奎宁酸）、*N*- 反式 - 阿魏酰酪胺、噻嗪二酮在 Uniprot 数据库中无对应靶点信息，故苍耳子最终得到 19 个潜在有效成分，具体信息见表 1。

2.1.2 化合物靶点的筛选 将搜集到的化学成分导入 SwissADME 数据库（http：//www.swissadme.ch），对搜集到的苍耳子活性成分进行筛选，将筛选得到的化学结构式导入 SwissTargetPrediction（www.sib.swiss）数据库，预测其作用靶点；按照 Uniprot 编号，在 Uniprot 数据库中查找对应的 gene offical sympol 格式，将其作为靶点基因保存。将筛选的各活性成分化合物的靶点与疾病靶点进行对照，得到各个活性成分的潜在抗炎靶点基因，综合后获得 217 个苍耳子潜在抗炎靶点基因。

2.1.3 成分 - 疾病的交集靶点分析 以“rhinitis”为关键词，在 GeneCards 数据库中查询到有关疾病候选靶点 10 275 个，通过“Relevance score”取中位数（$n \geqslant 12.43$），筛选得到 2803 个相关疾病靶点。药物与疾病的交集靶点共 108 个，提示这些靶点可能是苍耳子抗鼻炎作用的潜在靶点。

2.1.4 成分 - 疾病靶点的 GO 生物功能及 KEGG 信号通路富集分析 将得到的 108 个核心靶点导入 Metascape 数据库，物种选择为“人类”，共确定 1859 个 GO 条目（$P < 0.01$），其中 BP 有 1632 个条目，主要涉及白细胞迁移（leukocyte migration）、积极调控细胞迁移（positive regulation of cell migration）、对受伤的反应（response to wounding）、细胞对激素刺激的反应（cellular response to

表 1　苍耳子潜在有效成分

Tab 1　Potential active components inXanthii Fructus

序号	化学名	相对分子质量
1	松脂酚（pinoresinol）	358.40
2	苍耳明（xanthumin）	306.40
3	4- 羟基 -3- 甲氧基肉桂醛（4-hydroxy-3-methoxy-cinnamaldehyde）	178.18
4	对羟基苯甲酸（*p*-hydroxybenzoic acid）	138.12
5	穿心莲黄酮（andrographin）	328.30
6	芹菜素（apigenin）	270.24
7	咖啡酸（caffeic acid）	180.16
8	肉桂酸（cinnamic acid）	148.16
9	过氧麦角甾醇（ergosterol peroxide）	444.60
10	阿魏酸（ferulic acid）	194.18
11	刺芒柄花素（formononetin）	268.26
12	富马酸单乙酯（ethyl fumarate）	144.12
13	间苯三酚（phloroglucinol）	126.11
14	槲皮素（quercetin）	302.23
15	丁二酸（succinic acid）	118.09
16	香草酸（vanillic acid）	168.15
17	香兰素（vanillin）	152.15
18	（1*R*- 顺式）-5- 甲基 -*α*- 亚甲基 -4-（3- 氧代丁基）-3- 环庚烯 -1- 乙酸 [（1*R*-cis）-5-methyl-alpha-methylene-4-（3-oxobutyl）-3-cycloheptene-1-acetic acid]	250.33
19	绿原酸（chlorogenic acid）	354.31

hormone stimulus）；CC 有 99 个条目，主要涉及膜筏（membrane raft）、膜微结构域（membrane microdomain）、膜区域（membrane region）、溶酶体（lysosome）等；MF 有 128 个条目，主要涉及蛋白激酶活性（protein kinase activity）、磷酸转移酶活性（phosphotransferase activity）、生长因子结合（growth factor binding）、受体配体活动（receptor ligand activity）。每项取 *P* 值前 10 位条目，见图 1。

将比对得到的 108 个核心靶点导入 Metascape 数据库，限定物种为“人类”，对其进行 KEGG 信号通路功能富集分析，共确定 292 个条目（$P < 0.01$），根据－ log10（*P*）值的大小取前 20 位 KEGG 信号通路，见图 2。主要涉及癌症通路、乙型肝炎、MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、T 细胞受体信号通路等。以上通路表明，苍耳子活性成分与抗炎作用密切相关，详见表 2。

2.1.5　成分 - 靶点 - 通路的网络构建　上述的 20 条通路，包含 108 个靶点，涉及 19 个成分，将其导入 Cytoscape 3.5.1 软件，构建“成分 - 靶点 - 通路”的网络关系图。红色圆形为中药苍耳子，紫色正方形为苍耳子的主要活性成分，黄色菱形为关键靶点，绿色六边形为关键通路，图形面积大小和颜色深浅与 Degree 值成正比，如图 3 所示。根据 Degree 值，排名前 5 位的靶点为 CASP3、TP53、TNF、MYC、PIK3CG。以上信息提示这些靶点可能是苍耳子发挥抗炎作用的重要靶点。

2.2　*动物实验验证*

2.2.1　鼻黏膜组织病理变化　各组大鼠鼻黏膜组织经 HE 染色后在光学显微镜下观察，结果正常组大鼠鼻黏膜上皮组织结构完整，血管正常，组

表 2　成分 - 疾病靶点的 KEGG 信号通路 (前 20 条)

Tab 2　KEGG signaling pathways of component-disease targets (top 20 items)

通路	富集倍数	*P* 值	基因数
hsa05200：Pathways in cancer（癌症通路）	37.3563	4.4023×10^{-38}	39
hsa04151：PI3K-Akt signaling pathway（PI3K-Akt 信号通路）	28.8162	1.5270×10^{-29}	29
hsa01522：Endocrine resistance（内分泌抵抗）	23.2189	6.0413×10^{-24}	17
hsa01521：EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance（EGFR 酪氨酸激酶抑制剂抵抗）	22.8749	1.3337×10^{-23}	16
hsa05215：Prostate cancer（前列腺癌）	22.7385	1.8259×10^{-23}	17
hsa05205：Proteoglycans in cancer（蛋白多糖与癌症）	21.3506	4.4607×10^{-22}	20
hsa05167：kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection（卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染）	20.8302	1.4784×10^{-21}	19
hsa05161：Hepatitis B（乙型肝炎）	18.5012	3.1537×10^{-19}	17
hsa04510：Focal adhesion（黏着斑）	18.4967	3.1865×10^{-19}	18
hsa04014：Ras signaling pathway（Ras 信号通路）	18.4299	3.7164×10^{-19}	19
hsa04015：Rap1 signaling pathway（Rap1 信号通路）	18.0365	9.1948×10^{-19}	18
hsa04917：Prolactin signaling pathway（催乳激素信号通路）	17.6853	2.0641×10^{-18}	13
hsa05163：Human cytomegalovirus infection（人类巨细胞病毒感染）	17.6361	2.3114×10^{-18}	18
hsa04380：Osteoclast differentiation（破骨细胞分化）	17.1252	7.5121×10^{-18}	15
hsa04010：MAPK signaling pathway（MAPK 信号通路）	16.7084	1.9573×10^{-17}	19
hsa05162：Measles（麻疹）	16.2741	5.3195×10^{-17}	15
hsa05166：Human T-cell leukemia virus 1 infection（人类 T 细胞白血病病毒 1 感染）	16.0425	9.0678×10^{-17}	18
hsa04625：c-type lectin receptor signaling pathway（c 型凝集素受体信号通路）	15.5736	2.6692×10^{-16}	13
hsa04933：AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications（AGE-RAGE 信号通路在糖尿病并发症中的作用）	15.5736	2.6692×10^{-16}	13
hsa05212：Pancreatic cancer（胰腺癌）	15.4162	3.8352×10^{-16}	12

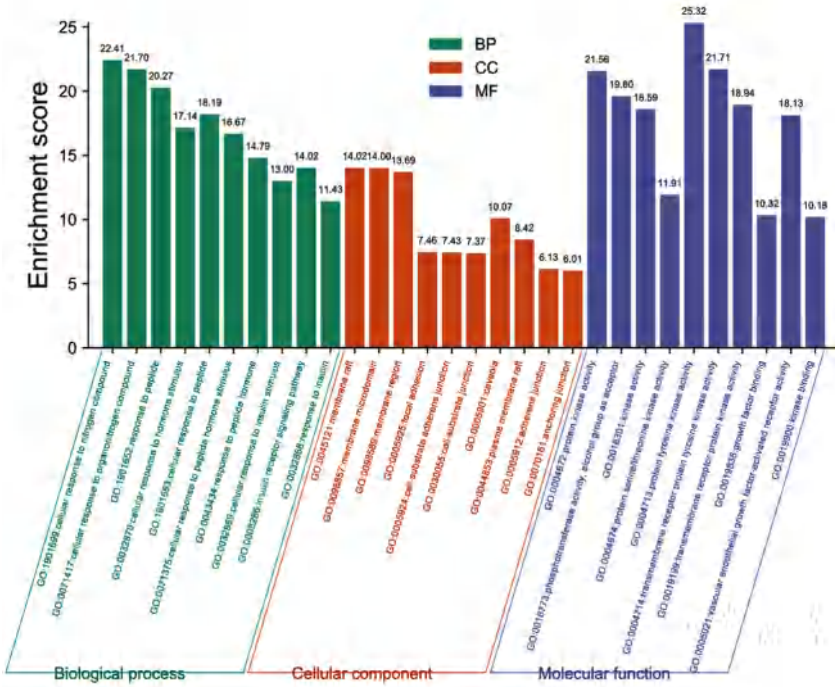


图 1 成分 - 疾病靶点的 GO 生物功能富集分析

Fig 1 GO biological enrichment analysis of component-disease targets

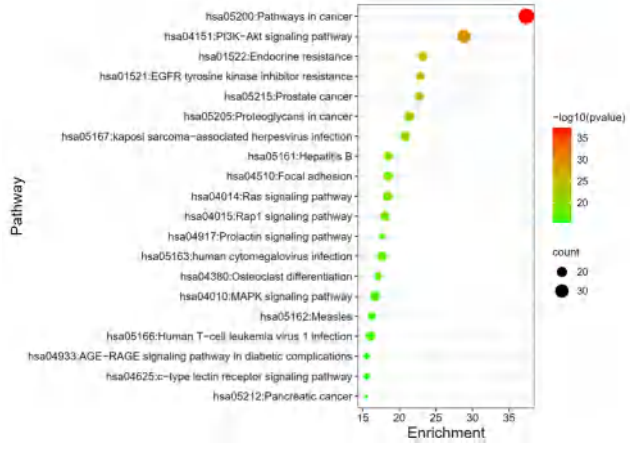


图 2 KEGG 富集分析气泡图

Fig 2 Bubble diagram of KEGG enrichment analysis

织未发生水肿，无浸润的嗜酸性粒细胞（见图 4A）；模型组大鼠鼻黏膜上皮组织发生脱落，血管扩张充血，组织出现水肿，可见大量的嗜酸性粒细胞浸润（见图 4B）；氯雷他定组及总水提液组大鼠鼻黏膜上皮组织基本完整，未见明显扩张的小血管，有少量浸润的嗜酸性粒细胞（见图 4C 及 4D）；石油醚组大鼠鼻黏膜上皮组织脱落不明显，小血管充血扩张，伴有大量嗜酸性粒细胞浸润（见图 4E）；乙酸乙酯组大鼠鼻黏膜上皮组织脱落，血管扩张，组织水肿，可见大量浸润的嗜酸性粒细胞（见图 4F）；正丁醇部位组大鼠鼻黏膜上皮组织结构较为完整，血管无明显扩张的现象，有嗜酸性粒细胞浸润（见图 4G）。

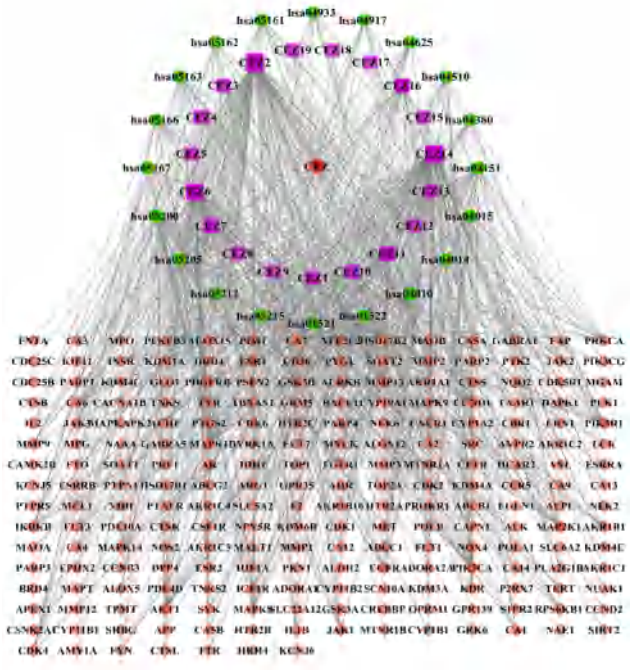


图 3 成分 - 靶点 - 通路网络图

Fig 3 Component-target-pathway network diagram

2.2.2 对大鼠血清中 IgE、IL-4 及 IFN-γ 水平的影响

各组大鼠血清中 IgE、IL-4 及 IFN-γ 水平见表 3。模型组大鼠血清中 IgE 和 IL-4 水平均明显高于正常组，IFN-γ 水平明显低于正常组。与模型组相比，氯雷他定组、正丁醇组和总水提液组大鼠血清中 IgE 水平均明显低于模型组；石油醚组和乙酸乙酯组无显著性差异；各给药组大鼠血清 IL-4 水平较模型组

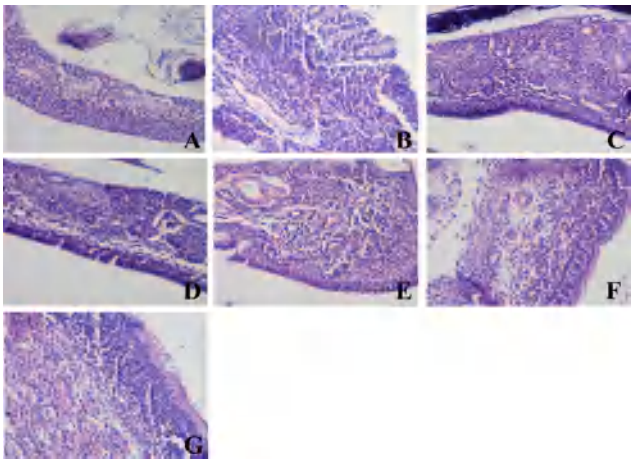


图 4　各组大鼠鼻黏膜组织形态学变化比较（HE 染色，×200）

Fig 4　Morphological changes in the nasal mucosa of the rats in each group（HE staining，×200）

A. 正常组（normal group）；B. 模型组（model group）；C. 氯雷他定组（loratadine group）；D. 总水提液组（total water extract group）；E. 石油醚部位组（petroleum ether fraction group）；F. 乙酸乙酯部位组（acetic acid ethyl ester fraction group）；G. 正丁醇部位组（*n*-butanol fraction group）

含量均显著降低，IFN-γ 水平明显升高。

2.2.3　鼻黏膜组织 PI3K、P-AKT、AKT 蛋白表达水平　与正常组相比，模型组 PI3K 表达明显增加；与模型组相比，石油醚组，乙酸乙酯组与总水提液组 PI3K 表达无显著性差异；正丁醇组 PI3K 表达显著降低。与正常组相比，模型组 P-AKT 表达显著增加；与模型组相比，石油醚组、总水提液组和正丁醇组 P-AKT 蛋白表达明显降低，乙酸乙酯组 P-AKT 蛋白表达无显著性差异；与正丁醇组相比，总水提液组和氯雷他定组 P-AKT 蛋白表达无显著性差异，石油醚组和乙酸乙酯组 P-AKT 蛋白表达显著性增加。各组大鼠 AKT 总蛋白表达无明显差异。实验结果见图 5。

表 3　各组大鼠血清中 IL-4、IFN-γ 及 IgE 的水平（n = 8）

Tab 3　Level of IL-4，IFN-γ and IgE in the rat serum in each group（n = 8）

组别	IgE/（μg•mL^{-1}）	IL-4/（pg•mL^{-1}）	IFN-γ/（pg • mL^{-1}）
正常组	4.84±0.39	29.66±1.06	446.20±1.24
模型组	7.17±0.52$^{\#\#}$	32.57±1.10$^{\#\#}$	426.24±2.93$^{\#\#}$
氯雷他定组	4.51±0.06**	28.20±1.29*	440.51±1.52**
石油醚组	6.23±0.54	29.08±2.85*	431.79±1.32**
乙酸乙酯组	5.99±1.06	28.57±1.36**	433.20±1.31**
正丁醇组	5.08±1.17**	28.97±2.49*	442.57±1.94**
总水提液组	4.77±0.98**	28.20±1.81**	445.01±1.80**

注：与正常组相比，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

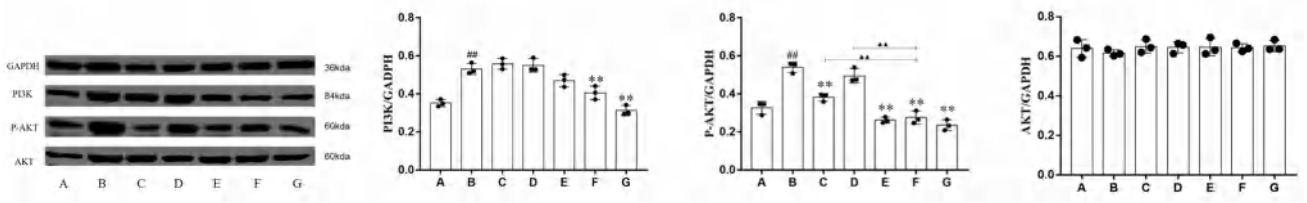


图 5　各组大鼠鼻黏膜组织 PI3K、P-AKT、AKT 蛋白相对表达量

Fig 5　Relative expression levels of PI3K，P-Akt and AKT in the nasal mucosal of the rats in teach group

注（Note）：与正常组相比，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与正丁醇组相比，$^{\blacktriangle\blacktriangle}P < 0.01$（Compared with the normal group，$^{\#\#}P < 0.01$；compared with the model group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；compared with the *n*-butanol site group，$^{\blacktriangle\blacktriangle}P < 0.01$）。

A. 正常组（normal group）；B. 模型组（model group）；C. 石油醚组（petroleum ether fraction group）；D. 乙酸乙酯组（acetic acid ethyl ester fraction group）；E. 总水提液组（total water extract group）；F. 正丁醇组（*n*-butanol fraction group）；G. 氯雷他定组（loratadine group）

3　讨论与结论

AR 作为一种常见的免疫异常类疾病，全球患有 AR 者已超过 5 亿，目前已成为主要的呼吸道慢性炎性疾病，给患者的生活质量和社会经济带来了负面影响[10]。中医认为 AR 属于“鼻鼽”的范畴，认为正气不足、外邪侵袭是导致鼻鼽发生的主要原因[11]。机体免疫系统具有免疫监视、防御、调控机体的作用，这与“中医正气”抵御外邪入侵、驱邪外出、修复调节能力及维持脏腑经络的功能相似。因而治疗 AR 需“扶正祛邪”，增强机体免疫调节能力。苍耳子作为一味传统中药材，已在临床上使用上千年，常被广泛用作发散风寒药，其最主要功效为“通鼻窍”作用，被称为“鼻科要药”。苍耳子临床常用于治疗鼻塞流涕、鼻鼽、鼻渊等病症，具有很好的疗效，但是对其药效作用机制仍需要不断研究。

苍耳子临床使用多为水煎煮法，本研究旨在研究苍耳子水提取部位中的有效成分对 AR 的影响。苍耳子经过水煎煮法后依次使用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇依次萃取，咖啡酸、肉桂酸、阿魏酸、香草酸、绿原酸和丁二酸等水溶性成分，可出现在各个萃取部位中[8]。本研究通过网络药理学得到 PIK3CA、AKT1、MAPK1 等 108 个苍耳子核心治疗 AR 的靶点，GO 分析结果主要涉及

磷酸转移酶活性、信号转导、细胞增殖等。KEGG 分析结果得到 292 条通路，主要有涉及癌症通路、PI3K-Akt 信号通路、乙型肝炎、MAPK 信号通路、T 细胞受体信号通路等。其中 PI3K-Akt 信号通路是细胞内重要的信号转导通路之一，广泛存在于细胞中，调控细胞增殖、凋亡及分化等功能。有研究表明 PI3K-Akt 信号通路参与了炎性痛的形成与发展，在炎症部位损失组织及脊髓小胶质细胞中高表达，阻断或抑制 PI3K/Akt/NF-κB 信号通路可缓解和减轻炎性痛的发生发展 [12]。

本研究通过给予大鼠苍耳子不同提取部位，探究其作用机制，对网络药理学结果进行验证。AR 发病机制非常复杂，随着研究的不断深入，发现 Th1/Th2 平衡与 AR 的发病过程有着密切的联系，IL-4 和 IFN-γ 等 Th 细胞因子参与了 AR 的发病过程，并且对 AR 的发生发展具有重要的影响。IL-4 和 IFN-γ 间存在着拮抗关系，能够互相调节，Th1 细胞释放的 IFN-γ 可以抑制 Th2 的活化，进而抑制 IgE 的产生。当 γ- 干扰素的释放量缺少时，Th2 细胞因子功能亢进，分泌的 IL-4 增多，诱导 B 淋巴细胞释放 IgE，导致 AR 发生 [13]。通过观察鼻黏膜病理学变化可以科学地反映 AR 的变化情况，并且可以直接根据 AR 大鼠鼻黏膜组织病理变化及血清中 IL-4、IFN-γ 及 IgE 浓度判断造模是否成功。本研究综合分析各种检测指标的结果，苍耳子水提液经萃取得到的正丁醇部位可以减轻 AR 大鼠打喷嚏、流鼻涕等过敏性症状，改善鼻黏膜组织形态学的变化，降低血清中 IL-4 和 IgE 的水平，升高 IFN-γ 的水平，可能是苍耳子发挥治疗 AR 的作用的活性部位。KEGG 结果表明 PI3K/AKT 通路为苍耳子治疗 AR 的关键通路。袁家胜 [14] 研究发现通过敲除小鼠的 *CCR3* 基因可以降低 PI3K/AKT 信号通路的激活水平，缓解小鼠 AR 症状。Chen 等 [15] 发现屋尘螨（HDM）提取物刺激的鼻上皮细胞（NEC）和体外刺激得到的 AR 模型小鼠鼻黏膜组织中均发现 PI3K/AKT 通路表达被激活。PI3K/AKT 通路和中性粒细胞关系密切，其下游因子对中性粒细胞的趋化和存活有重要影响。PI3K/AKT 通路可以通过活化 HIF-1α，来调节巨噬细胞和树突状细胞的活性；调节中性粒细胞的功能；调节 T 细胞的发育、分化和功能。本实验结果表明，AR 模型大鼠鼻黏膜组织中 PI3K 和 P-AKT 蛋白表达增加，AKT 总蛋白含量无明显变化。给予药物治疗干预后，各给药组 PI3K、P-AKT 蛋白表达下调且正丁醇组的蛋白表达量下调最为显著。由此推断，苍耳子正丁醇部位可抑制 PI3K 蛋白表达，而使得 AKT 蛋白磷酸化被抑制，减轻鼻部炎性症状。

综上，本研究通过网络药理学预测了治疗 AR 的靶点与通路，通过鼻黏膜组织 HE 染色，血清炎症因子 IL-4、IFN-γ 及 IgE 及鼻黏膜组织中 PI3K、AKT、P-AKT 蛋白的检测来验证网络药理学预测结果，初步揭示了苍耳子正丁醇部位治疗 AR 的作用机制，为后期继续探索其治疗 AR 机制提供理论依据。

参考文献

[1] 顾瑜蓉，李华斌 . 变应性鼻炎的发病机制与精准治疗 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志，2019，25（6）：578-584.

[2] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：169.

[3] 庄延双，胡静，蔡皓，等 . 苍耳子化学成分及药理作用研究进展 [J]. 南京中医药大学学报，2017，33（4）：428-432.

[4] Qin L，Han T，Li H，et al. A new thiazinedione from *Xanthium strumarium* L. [J]. Fitoterapia，2006，77（3）：245-246.

[5] Jiang H，Yang L，Liu C，et al. Four new glycosides from the fruit of *Xanthium sibiricum* Patr. [J]. Molecules，2013，18（10）：12464-12473.

[6] 姜海，张妍妍，张颖，等 . 苍耳子化学成分研究 [J]. 中医药信息，2016，33（3）：8-10.

[7] Huang MH，Wang BS，Huang G，et al. Antioxidant，antinociceptive，and anti-inflammatory activities of Xanthii Fructus extract [J]. Ethnopharmacol，2011，135（2）：545-552.

[8] 韩婷 . 苍耳子的生物活性成分及品质评价 [D]. 上海：第二军医大学，2006.

[9] 孙小草 . 中药苍耳子治疗变应性鼻炎的药效学评价 [D]. 合肥：安徽中医药大学，2020.

[10] 李华斌 . 变应性鼻炎的发病机制及诊治进展 [J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志，2014，49（4）：374-352.

[11] 刘蓬，熊大经 . 中医耳鼻咽喉科学 [M]. 北京：中国中医药出版社，2019.

[12] 蒋晶晶，姚鹏，田悦，等 . PI3K/AKT 信号传导通路在 Neuregulin1 加剧大鼠疼痛中的作用 [J]. 热带医学杂志，2016，16（5）：593-596.

[13] 单采霞，杜军，高丽 . Th 细胞因子在变应性鼻炎中的研究进展 [J]. 黑龙江中医药，2018，47（1）：97-99.

[14] 袁家胜 . 下调 CCR3 基因调控 PI3K/AKT 信号通路对变应性鼻炎小鼠的作用研究 [D]. 南昌：南昌大学，2021.

[15] Chen X，Li YY，Zhou H. et al. House dust mite extract induces growth factor expression in nasal mucosa by activating the PI3K/Akt/HIF-1α pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun，2016，469（4）：1055-1061.

（收稿日期：2021-12-08；修回日期：2022-03-29）

miR-145 通过靶向 ABCE1 发挥抗乳腺癌作用

陈双华[1, 2]，李荣[1, 3]，周玉生[1, 4*]（1. 南华大学药物药理研究所，湖南　衡阳　421001；2. 湖南中医药高等专科学校，湖南　株洲　412000；3. 南华大学附属第二医院，湖南　衡阳　421001；4. 南华大学附属南华医院，湖南　衡阳　421001）

摘要：目的　探讨 miR-145 靶向调节 ABCE1 的分子机制及其在抗乳腺癌细胞增殖中的作用。**方法**　利用生物信息学方法筛选出靶向调节 ABCE1 的 miR-145，取乳腺癌组织和癌旁组织检测 ABCE1 和 miR-145 的表达水平。通过在乳腺癌细胞 MCF-7 中转染 miR-145 mimic 和 inhibitor，分析 miR-145 对 ABCE1 的蛋白表达及细胞凋亡的影响。采用荧光素酶报告基因实验验证 miR-145 对 ABCE1 mRNA 的靶向调节作用。**结果**　在乳腺癌组织中 ABCE1 蛋白的表达明显高于癌旁组织，同时 miR-145 在癌组织中的含量显著降低。在 MCF-7 细胞中转染 miR-145 mimic 后能抑制 ABCE1 的表达，同时促进细胞凋亡。此外，在 293T 细胞中共转染 miR-145 mimic 和 psiCHECK-ABCE1-3'UTR 后，发现荧光素酶活性受到明显抑制。**结论**　miR-145 可通过靶向沉默 ABCE1 mRNA 来抑制乳腺癌细胞增殖，提示 miR-145 对 ABCE1 的调控可作为治疗乳腺癌的途径之一。

关键词：miR-145；ABCE1；乳腺癌；乳腺癌细胞
中图分类号：R737.9　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)05-1017-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.009

miR-145 exerts anti-breast cancer effects by targeting ABCE1

CHEN Shuang-hua[1, 2], LI Rong[1, 3], ZHOU Yu-sheng[1, 4*] (1. *Institute of Pharmacology*, *University of South China*, *Hengyang Hunan* 421001; 2. *Hunan College of Traditional Chinese Medicine*, *Zhuzhou Hunan* 412000; 3. *The Second Affiliated Hospital*, *University of South China*, *Hengyang Hunan* 421001; 4. *Affiliated Nanhua Hospital*, *University of South China*, *Hengyang Hunan* 421001)

Abstract: Objective　To determine the molecular mechanism of miR-145 targeting and regulating ABCE1 and its role in the anti-proliferation of breast cancer cells. **Methods**　Bioinformatics methods were used to screen out miR-145 that targeted and regulated ABCE1. Breast cancer tissues and adjacent tissues were taken to detect the expression levels of ABCE1 and miR-145. By transfecting miR-145 mimic and inhibitor into breast cancer cell MCF-7, the effect of miR-145 on ABCE1 protein expression and cell apoptosis was analyzed. The luciferase reporter gene experiment was used to verify the targeted regulation of miR-145 on ABCE1 mRNA. **Results**　The expression of ABCE1 protein in the breast cancer tissues was significantly higher than that in the adjacent tissues, and the content of miR-145 in the cancer tissues was reduced. Transfection of miR-145 mimic in MCF-7 cells inhibited the expression of ABCE1 and promoted the cell apoptosis. In addition, after co-transfection of miR-145 mimic and psiCHECK-ABCE1-3'UTR in 293T cells, luciferase activity was significantly inhibited. **Conclusion**　MiR-145 can inhibit the proliferation of breast cancer cells by targeting ABCE1 mRNA silence, suggesting that the regulation of ABCE1 by miR-145 can be used as a treatment for breast cancer.

Key words: miR-145; ABCE1; breast cancer; breast cancer cell

基金项目：湖南省卫生健康委员会重点指导项目（No.20201914）。

作者简介：陈双华，女，在职硕士研究生，主要从事药学教学与科研，email：26992235@qq.com　*通信作者：周玉生，男，教授，主要从事中药药理学、药学教学与科研，email：yszhou08@126.com

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一，病死率居女性肿瘤首位[1]。随着诊疗手段的不断发展，乳腺癌患者的病死率逐渐下降，但即便是在疾病早期进行治疗，也只能短时间内控制疾病的发展，大多数患者仍会复发、转移、恶化。因此，深入了解乳腺癌的发病机制和乳腺癌细胞的分子生物学特点，寻找乳腺癌新的治疗靶点，对乳腺癌的防治是非常必要的[2]。

ABCE1 属 ATP 结合盒转运子基因亚家族成员之一，其编码的 ABCE1 蛋白是一种核糖核酸酶 L（ribonuclease L，RNase L）抑制因子[3]。RNase L 属于 2-5 腺苷酸（2'-5'oligoadenylate，2-5A）系统，作用于水解磷酸二酯键，水解单链 RNA 分子[4]。以往研究表明 RNase L 主要与干扰素抗病毒作用有关，近期研究表明此酶有诱导细胞死亡的功能[5-6]。越来越多的研究发现，RNase 不仅具有消化酶的功能，而且还可作为一种有选择性的细胞毒素，具有抗病毒和抗肿瘤等特殊的生物学功能[7]。研究发现，ABCE1 能特异性抑制 2-5A/RNase L 信号通路，又名 RNase L 抑制因子，从而增强肿瘤细胞蛋白质合成及细胞增殖，促进肿瘤的进展[3]。Huang 等[2]研究发现，在人小细胞肺癌细胞中转染 *ABCE1* 基因的 siRNA 后能限制肿瘤细胞的增殖、侵袭与迁移，并促使其凋亡。使用 ABCE1 特异性 shRNA 的慢病毒载体感染人肺腺癌细胞后，细胞生长受到显著的抑制，凋亡率增加[8]，上述研究均提示 *ABCE1* 基因与恶性肿瘤有着较为密切的关系。

微小 RNA（micro RNA，miRNA）是真核细胞中一类参与基因转录后调控的非编码小分子 RNA，是一类近年来新发现的非编码小 RNA 分子，通常成熟 miRNA 通过与 mRNA 完全或不完全配对，降解靶 mRNA 或阻遏其转录后翻译[9]。研究表明，超过 50% 的 miRNA 基因定位于与肿瘤相关的基因组区域或其脆性位点，认为 miRNA 在肿瘤的发生机制中扮演着重要作用。多种 miRNA 在乳腺癌中低表达并可作为肿瘤抑制基因，如 *miR-34*、*miR-125*、*miR-200*、*miR-205*、*miR-328*、*miR-30*、*miR-213* 和 *miR-203* 等[10-12]。Cosentino 等[12]首次对乳腺癌疾病患者的癌组织 miRNA 表达谱进行了系统性分析，发现这些 miRNA 表达异常可能诱发乳腺癌，并在肿瘤的分类及预后评估方面起着重要的作用，如 *miR-213* 及 *miR-203* 与乳腺癌的发展相关联。随着越来越多 miRNA 与乳腺癌相关研究成果的积累，现在更多的关注于 miRNA 的靶向调控作为乳腺癌治疗的一个新手段。因此本课题研究 *ABCE1* 在乳腺癌发生发展中的作用，并寻找调控其基因表达的 miRNA，探讨干预 *ABCE1* 基因表达对乳腺癌肿瘤细胞的影响及作用机制。

1 材料

1.1 细胞与试药

乳腺癌细胞株（MCF-7，中南大学湘雅药学院馈赠，来源于中国科学院上海细胞库）。*β*-actin 抗体（sc-47778）、GAPDH 抗体（sc-47724）、tubulin 抗体（sc-23950）（美国 santa cruz 公司）；山羊抗兔 IgG（ZB-2301）、兔抗山羊 IgG（ZF-0314）和 DAB 试剂盒（ZLI-9017）（北京中杉金桥生物技术有限公司）；RNA 提取试剂盒、cDNA 反转录试剂盒、RIPA 裂解液（CW2333）和 SDS-PAGE 制胶试剂盒（CW0022）（康为世纪）；蛋白 marker（26616）（Thermo scientific）；clone1 试剂盒（CL001）（湖南莱拓福生物科技有限公司）。miR-145 mimic 和 miR-145 inhibitor 由吉玛基因（中国）合成；本实验中所用到的引物均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

1.2 仪器

生物倒置显微镜（日本 Nikon 公司），高速冷冻离心机（德国 Eppendorf 公司），酶标仪（美国 BioTek 公司），凝胶成像分析系统（美国 Alpha Innotech 公司），Q-PCR 仪（美国 Bio Rad 公司）。

2 方法

2.1 细胞培养和组织样本来源

MCF-7 细胞培养于含体积分数为 10% 胎牛血清、100 U·mL^{-1} 青霉素和 100 U·mL^{-1} 链霉素的 DMEM 高糖培养基中，培养环境为 37 ℃、5%CO_2 条件。

本研究中所用到的组织样本来自南华大学附属第一医院妇产科，选择 2015 年 1 月至 2017 年 3 月收住院行手术治疗的乳腺癌患者 10 例，术前均无放疗、化疗及其他治疗史，患者中位年龄 52 岁（31 ～ 69 岁），均经病理检查确诊。所有患者均为中国汉族人，无亲缘关系，并签署知情同意书，收集上述患者术后乳腺病变组织和癌旁组织，－ 86 ℃保存。本研究已获得本院伦理委员会的批准同意。纳入标准：① 乳腺癌患者经病理诊断确诊；② 认知功能正常；③ 知情同意本研究。排除标准：① 有乳腺整形病史患者；② 认知功能障碍患者；③ 伴有严重心肝肾功能不全患者；④ 伴有急性传染病患者。

2.2 Western blot 实验

提取乳腺癌组织和癌旁组织蛋白：将组织称重，分别取约 100 mg 组织于研磨器内，加入 500 μL 细胞裂解液 RIPA 研磨。

提取乳腺癌细胞蛋白：将乳腺癌细胞 MCF-7 分为 3 组，分别是对照组（转染 miR-NC，序列为 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'）、miR-145 高表达组（转染 miR-145 mimic，序列为 5'-GUCCAGUUUUCCCAGGAAUCCCU-3'）和 miR-145 抑制组（转染 miR-145 inhibitor，序列为 5'-AGGGAUUCCUGGGAAAACUGGAC-3'）。用预冷的 PBS 清洗细胞 3 次，小心倾去 PBS，并加入 RIPA 裂解液于冰上孵育 30 min。使用 RIPA 裂解液分别提取组织和细胞中的总蛋白后，采用 BAD 试剂盒测定提取液中蛋白浓度，上样蛋白量为 70 μg，蛋白样本与上样缓冲液以 1∶4 体积混合均匀，置于 100 ℃水中煮 10 min，使蛋白充分变性。待蛋白样本混合物自然冷却后加至凝胶加样孔内，电泳直至溴酚兰到达凝胶底部。

利用转膜装置用湿转法将凝胶上的蛋白质转移到 PVDF 上，转膜后用丽春红溶液染膜 4 ～ 8 min，再用去离子水漂洗脱色，观察 PVDF 膜上有无蛋白条带出现，以明确转膜效果。将已完成转膜的 PVDF 膜浸泡于 1% 脱脂奶粉中室温封闭 1 h。然后用 TBST 漂洗 PVDF 膜 3 次，每次 5 min，用相应一抗于 37 ℃孵育 1 h，然后将 PVDF 膜用 TBST 漂洗 3 次，每次 5 min，加入辣根过氧化酶标记的 IgG 二抗，于 37 ℃孵育 45 ～ 60 min，TBST 洗膜 3 次，每次 5 min，然后取出 PVDF 膜，沥干残余液体，置于凝胶成像分析系统观察照相并进行灰度扫描。用 β-actin 作标准，来表示目的蛋白的相对含量。

2.3　总 RNA 提取与荧光定量 PCR

采用 Trizol 分别提取乳腺组织总 RNA 提取和 MCF-7 细胞总 RNA 提取，核酸蛋白分析仪测量样本的 A_{260} 和 A_{280} 值。按逆转录试剂盒说明合成 cDNA，置于－ 20 ℃保存备用。采用 10 μL 反应体系进行目的基因表达分析，实验条件为：50 ℃ 2 min；95 ℃ 5 min；95 ℃ 30 s；60 ℃ 30 s，40 个循环；Melt Curve 55 ～ 95 ℃。实验结果由荧光定量 PCR 分析软件自动进行统计和计算。实验中使用引物如下：*ABCE1* 上游引物：5'-GCCCAGTTATGGCAGACAAG-3'，下游引物：5'-GTGACAACTCCATAGGCGCT-3'；β-actin 上游引物：5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3'，下游引物：5'-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3'。根据 miRNA-145 成熟体序列 5'-GUCCAGUUUUCCCAGGAAUCCCU-3' 设计如下引物用于检测细胞内 miRNA-145 的表达水平：上游引物：5'-ACACTCCAGCTGGGGTCCAGTTTTCCCAGGA-3'；下游引物：5'-CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAGGGATTC-3'。以 U6 作为 miR-145 检测的参照 miRNA，U6 上游引物：5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'，下游引物：5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

2.4　MTT 实验

将乳腺癌细胞 MCF-7 分为 3 组，即对照组（转染 miR-NC）、miR-145 高表达组（转染 miR-145 mimic）和 miR-145 抑制组（转染 miR-145 inhibitor）。收集各组 MCF-7 细胞，用完全培养基调整细胞悬液浓度为 5×10^4 个 • mL^{-1}，在 96 孔板中每孔加入 100 μL 细胞悬液，每个样本设 6 个复孔，边缘孔用无菌 PBS 充填，细胞培养 24 h 后，每孔加入 20 μL MTT 工作液（5 mg • mL^{-1}），培养 3 ～ 4 h 后，弃去培养液，每孔加入 150 μL DMSO，继续孵育 15 min 后，酶标仪检测 490 nm 处各孔的吸光度值（*OD*）。细胞存活率＝（实验组 *OD* －空白组 *OD*）/（对照组 *OD* －空白组 *OD*）×100%。

2.5　psiCHECK-ABCE1-3'UTR 载体构建与鉴定

根据 clone1 试剂盒设计 ABCE1 mRNA 3'-UTR 插入片段引物，序列如下：上游引物：5'-ATTCTAGGCGATCGCTCGAGTAGACTGACTCTGAGAATAT-3'（Xhol）；下游引物：5'-TTATTGCGGCCAGCGGCCGCAGCCATTATTTGCATATTAA-3'（Notl）。从 MCF-7 细胞中提取总 mRNA，利用上述引物进行 PCR 扩增出 ABCE1 从终止密码子到 3500 位的 UTR 序列及两侧 Xhol 和 Notl 的酶切序列区。利用 clone1 试剂盒将 psiCHECK 质粒与 PCR 产物进行连接，培养感受态细胞，提取菌液，纯化质粒，－ 80 ℃保存备用。

2.6　miRNA 生物信息学分析

通过 Target Scans 靶基因预测软件对 miR-145 的潜在靶基因进行预测，为了降低假阳性，选择至少 6 种 miRNA 靶标预测工具预测的交集。利用在线软件 RNAhybrid 预测 miR-145 与 ABCE1 mRNA 靶序列的结合自由能。通过 TAM 数据库查询 miR-145 与疾病的相关性。

2.7　荧光素酶报告基因实验

采用重组质粒 psiCHECK-ABCE1-3'UTR 转染 HEK293T 细胞，转染前 24 h 在 500 μL 完全培养基重接种 1×10^5 个 MCF-7 细胞，待细胞融合度达 80% 时进行转染。转染步骤分别取 1 μg psiCHECK-

ABCE1-3'UTR 质粒和 psiCHECK 空质粒用 50 μL 无血清培养基稀释。取 2 μL 脂质体 lipofectamne2000 用 50 μL 无血清培养基稀释，轻轻混匀，室温下静置 5 min。将含有质粒的培养基和含有脂质体的培养基混合在一起，室温下静置 20 min。将上述混合物按 100 μL/ 孔分别加到 24 孔培养板中，轻轻混匀。将 24 孔培养板在 CO_2 培养箱中孵育 24 h，转染 24 h 后收集细胞采用荧光素酶报告基因检测试剂盒检测荧光素酶活性。

2.8 统计学方法

所有数据采用 SPSS 16.0 软件进行分析，*t* 检验用于两个样本间的比较，方差分析用于多个样本均数差别的显著性检验。$P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 乳腺癌组织中 ABCE1 蛋白及 mRNA 的表达

为了确定 ABCE1 与乳腺癌的相关性，我们检测乳腺癌组织和癌旁组织中 ABCE1 蛋白及 mRNA 的表达情况。结果显示，10 例乳腺癌组织样本中 ABCE1 蛋白含量明显高于其癌旁组织（$P < 0.05$），但 mRNA 的表达水平在乳腺癌组织和癌旁组织间并无明显差异（见图 1，2）。

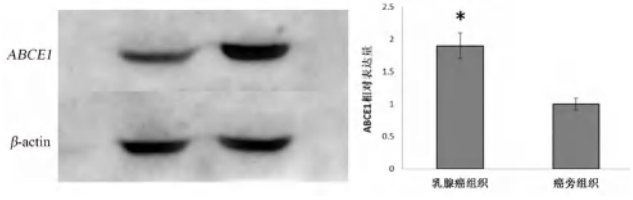


图 1 乳腺癌组织和癌旁组织中 ABCE1 蛋白的表达情况

Fig 1 Expression of ABCE1 protein in the breast cancer and adjacent tissues

注：与癌旁组织比较，$^*P < 0.05$。

Note：Compared with the adjacent tissues，$^*P < 0.05$.

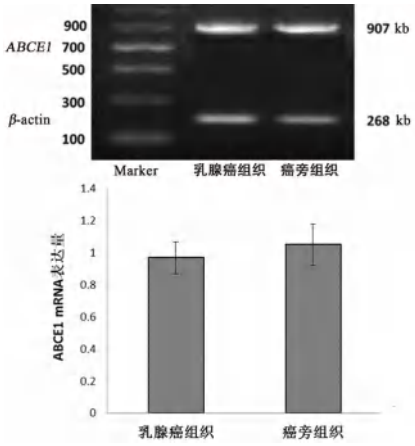


图 2 乳腺癌组织和癌旁组织中 ABCE1 mRNA 的表达情况

Fig 2 Expression of ABCE1 mRNA in the breast cancer and adjacent tissues

3.2 生物信息学分析 miR-145 对 ABCE1 mRNA 的靶向作用

乳腺癌组织中 ABCE1 蛋白含量明显增加，但其 mRNA 水平并未明显改变，提示在乳腺癌组织中可能存在对 ABCE1 的转录后调节机制。笔者将 ABCE1 mRNA 序列输入 miR Base、miR anda、TargetScan 和 PicTar 等 miRNA 靶标预测网站，以预测靶向调节 ABCE1 的 miRNA，得到 miR-135、miR-29、miR-145 等多个目标 miRNA。同样，检索疾病数据库发现乳腺癌组织中 miR-145 表达是明显降低的，并且 TAM 疾病数据库也显示 miR-145 与乳腺肿瘤和细胞增殖能力密切相关（见图 3）。进一步分析 miR-145 对 ABCE1 mRNA 的 3'-UTR 序列能较好吻合，且两者结合自由能较低，提示具有较高亲和力（见图 4）。因此，上述相关查询结果提示 miR-145 对 ABCE1 的调控机制可能参与乳腺癌发生发展。

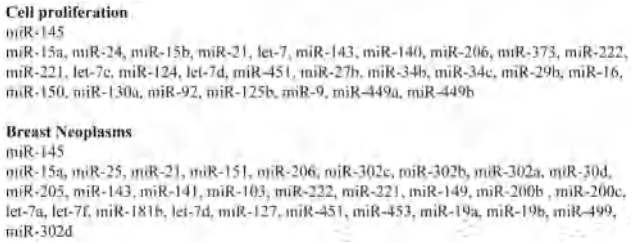


图 3 TAM 数据库显示 miR-145 与乳腺肿瘤和细胞增殖具有明确的相关性

Fig 3 TAM database shows that miR-145 is clearly associated with breast tumors and cell proliferation

注：来源：http：//www.cuilab.cn/tam。

Note：Source：http：//www.cuilab.com cn/tam.

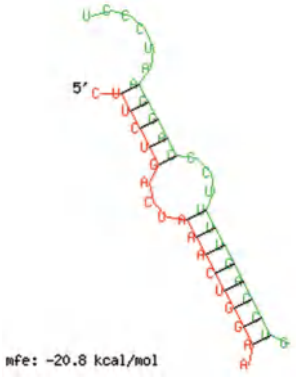


图 4 ABCE1 mRNA 与 miR-145 结合的自由能

Fig 4 Free energy of ABCE1 mRNA binding with miR-145

3.3 miR-145 与 ABCE1 的结合能力

为了验证 *ABCE1* 基因的 3'UTR 是否是 miR-145 的靶序列，我们将 *ABCE1* 基因的 3'UTR 片段克隆到荧光素酶报告基因载体 psiCHECK 中，构建 miR-reporter 载体 psiCHECK-ABCE1-3'UTR，将

荧光素酶报告载体 psiCHECK-ABCE1-3'UTR 分别和 miR-145 mimic（miR-145 高表达组）、miR-NC（对照组）共转染 HEK 293T 细胞，48 h 后检测荧光素酶活性。结果表明，共转染 miR-145 mimic 和 psiCHECK-ABCE1-3'UTR 后，荧光素酶活性受到明显抑制（见图 5）。说明 *ABCE1* 是 miR-145 的靶基因。

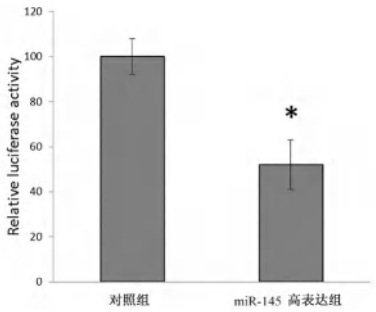


图 5　荧光素酶报告基因实验检测 miR-145 与 ABCE1 的结合能力

Fig 5　Binding ability of miR-145 with ABCE1 by luciferase reporter gene assay

注：与对照组比较，$^{*}P < 0.05$。

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

3.4　miR-145 对 ABCE1 的调节在乳腺癌细胞凋亡中的作用

为明确 miR-145 对 ABCE1 的靶向调节作用对乳腺癌细胞凋亡的影响，我们检测了乳腺癌组织和癌旁组织中的 miR-145 的表达情况。结果显示，乳腺癌组织中 miR-145 表达水平显著降低（见图 6）。然后，在乳腺癌细胞 MCF-7 中通过外源转染 miR-145 mimic 和 miR-145 inhibitor 分别上调或下调细胞内 miR-145 水平。结果表明，与 miR-145 抑制组相比，miR-145 高表达组能够显著抑制 ABCE1 蛋白表达（见图 7）。此外，MTT 实验结果表明转染 miR-145 的 MCF-7 细胞存活率显著低于 miR-145 抑制组细胞（见图 8）。

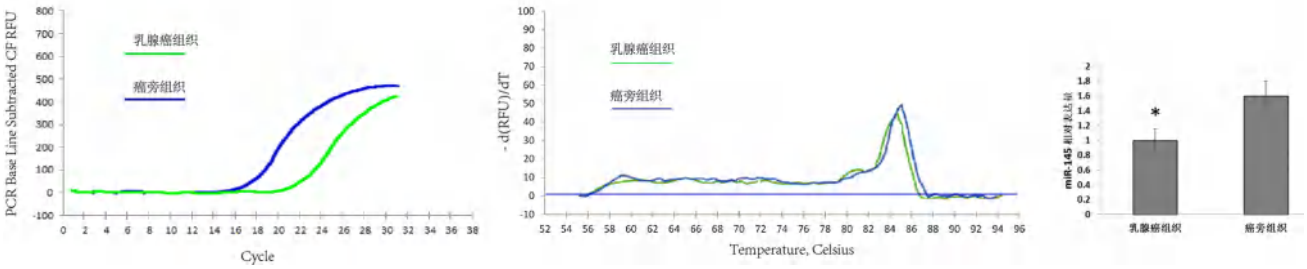


图 6　乳腺癌组织与癌旁组织中 miR-145 的表达差异

Fig 6　Expression differences of miR-145 in the breast cancer tissues and adjacent tissues

注：与癌旁组织比较，$^{*}P < 0.05$。

Note：Compared with the adjacent tissues，$^{*}P < 0.05$.

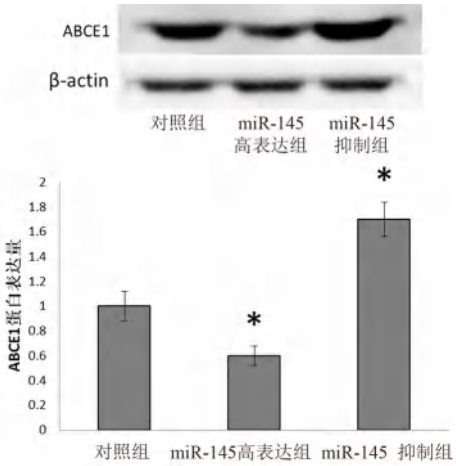


图 7　miR-145 对乳腺癌细胞 MCF-7 中 ABCE1 蛋白表达的影响（$n = 3$）

Fig 7　Effect of miR-145 on the expression of ABCE1 in MCF-7 cells（$n = 3$）

注：与对照组比较，$^{*}P < 0.05$。

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

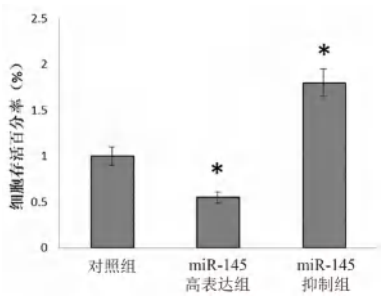


图 8　miR-145 对 MCF-7 细胞增殖能力的影响（$n = 3$）

Fig 8　Effect of miR-145 on the proliferation of MCF-7 cells（$n = 3$）

注：与对照组比较，$^{*}P < 0.05$。

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

4　讨论

临床上乳腺癌的治疗主要通过手术、放化疗等[13]，但不可避免地给患者带来了极大伤害，且后续治疗对身心均有不利影响，因此深入研究乳腺癌的发病机制，从中寻找可供应用的治疗靶点将有益于临床治疗。

肿瘤细胞的代谢过程如转录、翻译都异常亢进，RNase L 能通过切割 RNA 抑制肿瘤细胞的转

录，被认为是肿瘤治疗的重要分子靶点。*ABCE1* 在多种肿瘤组织中高表达，是肿瘤发生的关键基因，其编码的 ABCE1 蛋白是一种 RNase L 抑制因子，通过抑制 RNase L 发挥促肿瘤细胞增殖的作用。本研究发现，乳腺癌组织中 ABCE1 蛋白含量明显高于癌旁组织，提示其与乳腺癌的发生密切相关。然而，ABCE1 mRNA 的表达水平在两组间并无明显差异，说明在乳腺癌组织中存在着对 ABCE1 的转录后调节机制。我们通过多种 miRNA 靶标预测软件发现 ABCE1 的 3'-UTR 含有多个 miR-145 互补的序列，提示 miRNA-145 与 ABCE1 之间可能存在调控关系。应用 miRNA 靶标预测显示 miR-145 与 ABCE1 mRNA 的 3'-UTR 序列能较好吻合，提示 miR-145 与 ABCE1 mRNA 的结合特异性较高。采用 RNAhybrid 和 PicTar 在线网站发现 miR-145 与 ABCE1 mRNA 结合自由能较低，提示两者具有较高的亲和力。这些均说明 miR-145 对 ABCE1 靶向抑制是一种普遍存在的生理性调节。我们通过在乳腺癌细胞 MCF-7 中外源转染 miR-145 mimic 和 miR-145 inhibitor 分别上调或下调细胞内 miR-145 水平，证实了 miR-145 mimic 能抑制 MCF-7 细胞中 ABCE1 的表达，同时促进细胞凋亡。此外，荧光素酶报告基因实验也显示 miR-145 与 ABCE1 mRNA 具有结合能力，这些结果进一步证实 miR-145 对 ABCE1 蛋白表达存在靶向调节作用。

综上所述，本研究筛选出乳腺癌组织内能够有效靶向 ABCE1 mRNA 的 miR-145。通过外源性增加 miR-145 能够抑制 ABCE1 的表达，进而取消 ABCE1 对 2-5A/RNase L 信号的阻滞，有利于 RNase L 促进乳腺癌细胞的凋亡。因此，miR-145 及其调节的 *ABCE1* 基因可能作为新的突破口，为乳腺癌的诊治提供新的作用靶点。

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] Huang B，Zhou H，Lang X，et al. siRNAinduced ABCE1 silencing inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells [J]. Mol Med Rep，2014，10（4）：1685-1690.

[3] Barkha R，Praveen M，Sarah J，et al. ABCE1 regulates RNase L-induced autophagy during viral infections [J]. Viruses，2021，13（2）：315.

[4] Burke JM，Moon SL，Matheny T，et al. RNase L reprograms translation by widespread mRNA turnover escaped by antiviral mRNAs [J]. Mol Cell，2019，75（6）：1203-1217. e5.

[5] Manivannan P，Reddy V，Mukherjee S，et al. RNase L induces expression of a novel serine/threonine protein kinase，DRAK1，to promote apoptosis [J]. Int J Mol Sci，2019，20（14）：3535.

[6] Xiang Y，Wang Z，Murakami J，et al. Effects of RNase L mutations associated with prostate cancer on apoptosis induced by 2’，5’-oligoadenylates [J]. Cancer Res，2003，63（20）：6795-801.

[7] Le Roy F，Silhol M，Salehzada T，et al. Regulation of mitochondrial mRNA stability by RNase L is translation-dependent and controls IFNalpha-induced apoptosis [J]. Cell Death Differ，2007，14（8）：1406-1413.

[8] Huang B，Gao Y，Tian D，et al. A small interfering ABCE1-targeting RNA inhibits the proliferation and invasiveness of small cell lung cancer [J]. Int J Mol Med，2010，25（5）：687-693.

[9] Krasniqi E，Sacconi A，Marinelli D，et al. MicroRNA-based signatures impacting clinical course and biology of ovarian cancer：a miRNOmics study [J]. Biomark Res，2021，9（1）：57.

[10] Williams MM，Christenson JL，O’Neill KI，et al. MicroRNA-200c restoration reveals a cytokine profile to enhance M1 macrophage polarization in breast cancer [J]. NPJ Breast Cancer，2021，7（1）：64.

[11] Ding Y，Wu W，Ma Z，et al. Potential value of MicroRNA-21 as a biomarker for predicting the prognosis of patients with breast cancer：a protocol for meta-analysis and bioinformatics analysis [J]. Medicine（Baltimore），2021，100（22）：e25964.

[12] Cosentino G，Plantamura I，Cataldo A，et al. MicroRNA and oxidative stress interplay in the context of breast cancer pathogenesis [J]. Int J Mol Sci，2019，20（20）：5143.

[13] 仲崇柏 . 早期乳腺癌保乳手术与改良根治术联合心理干预的临床疗效 [J]. 心理月刊，2021，16（15）：98-99，117.

（收稿日期：2021-08-17；修回日期：2022-02-23）

黄精对原发性痛经大鼠药效作用初步研究

聊晓玉[1, 2, 3]，方静[1, 2, 3]，方媛[1, 2, 3]，桂文琪[1, 2, 3]，孙纪[1, 2, 3]，韩燕全[4, 5]，韩岚[1, 2, 3*]，吴存林[6]，龙子江[7]，孙松[8*]（1. 安徽中医药大学药学院，合肥　230000；2. 中药复方安徽省重点实验室，合肥　230000；3. 安徽道地中药材品质提升协同创新中心，合肥　230000；4. 安徽中医药大学第一附属医院，合肥　230012；5. 国家中医药管理局中药制剂三级实验室，合肥　230093；6. 合肥仟金草生物科技有限公司，合肥　230093；7. 安徽仟金草黄精规划院，合肥　230093；8. 合肥远志医药科技开发有限公司，合肥　230093）

摘要：目的　建立原发性痛经大鼠模型，初步研究黄精对原发性痛经大鼠的药效作用。**方法**　采用大鼠雌激素与缩宫素联合法建立原发性痛经大鼠模型。通过观察大鼠的扭体反应，判断原发性痛经大鼠模型是否建立成功；ELISA 法检测大鼠血清中 6-keto-$PGF_1\alpha$ 和 β-EP 的含量以及子宫组织中 $PGF_2\alpha$ 和 PGE_2 的含量；离体组织器官恒温灌流系统测定子宫肌张力。**结果**　与正常组相比，模型组大鼠扭体潜伏时间缩短，扭体次数明显增加，表明原发性痛经大鼠模型建立成功。与模型组相比，各治疗组大鼠血清中 6-keto-$PGF_1\alpha$、β-EP 的含量显著提升，大鼠子宫组织中 $PGF_2\alpha$ 的含量明显降低，PGE_2 的含量显著提升，子宫肌张力明显下降。HE 染色结果表明，治疗组大鼠子宫上皮细胞空泡病变基本消失，充血现象明显改善。**结论**　黄精对原发性痛经大鼠具有良好的治疗效果，其可能与大鼠体内 PGE_2、$PGF_2\alpha$ 等因子有关。

关键词：黄精；原发性痛经；药效学
中图分类号：R284　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)05-1023-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.010

Pharmacodynamic effect of Polygonatum on rat with primary dysmenorrhea

LIAO Xiao-yu[1, 2, 3], FANG Jing[1, 2, 3], FANG Yuan[1, 2, 3], GUI Wen-qi[1, 2, 3], SUN Ji[1, 2, 3], HAN Yan-quan[4, 5], HAN Lan[1, 2, 3*], WU Cun-lin[6], LONG Zi-jiang[7], SUN Song[8*] (1. *School of Pharmacy*, *Anhui University of Traditional Chinese Medicine*, *Hefei* 230000; 2. *Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Compound Prescriptions in Anhui*, *Hefei* 230000; 3. *Collaborative Innovation Center for Anhui Genuine Traditional Chinese Medicine Quality Improvement*, *Hefei* 230000; 4. *The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 5. *Level Three Laboratory of Traditional Chinese Medicine Preparation*, *State Administration of Traditional Chinese Medicine*, *Hefei* 230093; 6. *Hefei Qianjincao Biotechnology Co.*, *Ltd.*, *Hefei* 230093; 7. *Anhui Qianjincao Polygonatum Planning Institute*, *Hefei* 230093; 8. *Hefei Yuanzhi Pharmaceutical Technology Development Co.*, *Ltd.*, *Hefei* 230093)

Abstract: Objective　To determine the pharmacodynamic effect of Polygonatum on primary dysmenorrhea in rat models. **Methods**　Estrogen and oxytocin were combined to establish primary dysmenorrhea model in rats. By observing the writhing response of rats, we decided whether the model of primary dysmenorrhea was established. ELISA was used to detect the serum concentration of 6-keto-$PGF_1\alpha$ and β-EP, and that in the uterine tissue $PGF_2\alpha$ and PGE_2. The tension of uterine muscle was measured by constant temperature perfusion system. **Results**　Compared with the normal group, the writhing latency of the rats in the model group was shortened, and the number of writhings were significantly increased, indicating successful establishment of rat model of primary dysmenorrhea. Compared with the model group, in the treatment group 6-keto-$PGF_1\alpha$ and β-EP in

基金项目：国家自然科学基金面上项目（No.8207142977）。
作者简介：聊晓玉，女，硕士，主要从事中药药理研究，email：2284783924@qq.com　*通信作者：韩岚，女，博士，教授，主要从事中药药理研究，email：hanlan56@ahtcm.edu.cn；孙松，男，主要从事药物新剂型和质量研究，email：747547311@qq.com

the serum were significantly increased, the $PGF_2\alpha$ content in the rat uterus decreased, while the PGE_2 content was increased, and the uterine muscle tension was decreased. HE staining showed that the vacuolation of uterine epithelial cells in the treatment group basically disappeared, and the congestion was significantly improved. **Conclusion** Polygonatum has a good therapeutic effect on rats with primary dysmenorrhea, which may be related to factors such as PGE_2 and $PGF_2\alpha$ in rats.

Key words: Polygonatum; primary dysmenorrhea; pharmacodynamics

痛经发生在月经前后期或月经期间，痛经发生时小腹有疼痛、坠胀感，同时还伴有腰酸或其他疼痛。在临床上，主要将痛经分为两种，一种是原发性痛经，另外一种是继发性痛经，在这两者中原发性痛经占 90% 以上。对广大女性朋友来说，痛经不仅仅伤害了她们的身心健康，还给她们的工作及学习带来了严重的困扰，因而预防和治疗原发性痛经已经成为医学界迫切需要解决的问题。大多数研究者认为原发性痛经的产生与前列腺素 E_2（PGE_2）、前列腺素 $F_2\alpha$（$PGF_2\alpha$）、β- 内啡肽（β-EP）、6- 酮 - 前列腺素 $F_1\alpha$（6-keto-$PGF_1\alpha$）及其他因素有关 [1-7]。$PGF_2\alpha$ 含量升高可引起子宫平滑肌过强收缩，血管痉挛，造成子宫缺血、乏氧而出现痛经；PGE_2 则能抑制子宫平滑肌的自发活动，降低 $PGF_2\alpha/PGE_2$ 比值可在一定程度上缓解疼痛。β-EP 水平降低可使子宫功能失常，成为疼痛的原因之一。前列腺环素（PGI2）有扩张血管和抑制血小板聚集的作用，而 6-keto-$PGF_1\alpha$ 作为 PGI2 的代谢产物，性质稳定，可以反映 PGI2 的含量。因此，本文选择上述代表性生化指标、组织病理指标以及子宫肌张力对黄精药效学进行初步评价。

黄精是我国常用传统中药之一，用药历史悠久，同时也是一种药食同源的中药材。具有补肝益肾、延年益寿等功效，被尊崇为养生之圣药。黄精的记载始于梁朝陶弘景《名医别录》，并列于草部的首位。研究表明其具有抗炎 [8-10]、镇痛 [11]、抗肿瘤 [12-13]、调节血糖血脂 [14-19] 和抗衰老 [20] 等药理作用。《本经逢原》：“黄精，宽中益气，使五藏调和，肌肉充盛，骨髓强坚，皆是补阴之功。”一种具有益肾调经功能的组合物及其应用的专利表明，该组合物可以用于治疗因肾气虚弱、血亏血滞导致的卵巢功能早衰、月经不调以及原发性痛经，其中黄精的补气养阴、健脾润肺益肾作用起到了很大的作用 [21-25]。

基于黄精的“补阴之功”，从原发性痛经的发病机制出发，为了能更好的挖掘黄精的药用范围，本文通过建立原发性痛经大鼠模型，初步探究黄精对原发性痛经的治疗作用。

1 材料

1.1 试药

黄精（采自安徽省池州市青阳县酉华镇，经安徽中医药大学药学院俞年军教授鉴定为百合科黄精属植物多花黄精 *Polygonatum cyrtonema* Hua. 的干燥根茎）；戊酸雌二醇片（拜耳医药保健有限公司广州分公司，批号：492A）；缩宫素注射液（宁波第二激素厂，批号：201212）；妇科千金片（株洲千金药业股份有限公司，批号：20191011）；乐氏液（上海源叶生物科技有限公司，批号：R20265）；大鼠 $PGF_2\alpha$ 酶联免疫试剂盒（批号：JL13273）、大鼠 PGE_2 酶联免疫试剂盒（批号：JL12636）、大鼠 6-keto-$PGF_1\alpha$ 酶联免疫试剂盒（批号：JL11068）、大鼠 β-EP 酶联免疫试剂盒（批号：JL20852）（上海江莱实业股份有限公司）。

1.2 实验动物

健康 SD 大鼠，雌性，体质量（220±20）g，购于安徽医科大学动物实验中心 [许可证号 SCXK（皖）2017-001；本实验使用所有动物均通过安徽中医药大学动物伦理委员会批准，动物伦理编号：AHUCM-rats-2021024]。将购买的大鼠在实验室动物房适应性饲养一周。饲养期间，正常喂饲料、喂水，房间温度为 25 ℃，房间湿度为 60% ～ 65%。

1.3 仪器

恒温平滑肌实验系统（成都泰盟软件有限公司，HW200S）；BL-420N 信号采集与分析系统、FT-102 生物张力传感器（成都泰盟软件有限公司）；离心机（德国 Eppendorf 公司，Centrifuge5417R）；多功能酶标仪（美国 MD 公司）；微量移液器（德国 Eppendorf）；艾科浦超纯水系统（中国重庆颐洋企业发展有限公司，AD3L）；电子天平（上海菁海仪器有限公司，FA2004N）；BHWY-100BC 恒温振荡培养箱（常州杰博森仪器有限公司）。

2 方法与结果

2.1 黄精水提液的制备

根据《中国药典》（2020 年版）黄精临床指导用药用量 9 ～ 15 g[26]，参考陈奇主编的《中药药理研究方法学》，查表可得人和大鼠间体表面积的折算系数为 6.3[27]。按临床指导每年平均用药量 9 g、12 g、15 g 换算成大鼠的用药量，即大鼠用药低、中、高剂量分别为 0.945、1.26、1.575 g•kg^{-1}。取适量黄精，加入 10 倍总生药量的水，加热提取两次，每次 2 h，合并浓缩水提物至 0.945、1.26、1.575 g • kg^{-1}，灭菌备用。

2.2 模型复制

实验采用雌激素与缩宫素联合使用的方法制备大鼠原发性痛经模型，除了正常组以外，其余各组的每只大鼠均每日 1 次灌胃给予戊酸雌二醇片，使各组大鼠子宫处于共情期，提高大鼠子宫的敏感程度。给药周期为 10 d，其中第 1 日和第 10 日每只大鼠给药 0.2 mg，第 2 日至第 9 日每只大鼠给药 0.1 mg，末次给药 1 h 后，各组大鼠腹腔注射缩宫素 2 U/ 只[21]，观察 30 min 内大鼠的疼痛反应。将扭体反应作为子宫强烈收缩即痛经的指标，同时扭体反应也可以直观地反映原发性痛经模型建立成功。

2.3 分组与给药

采用体质量随机区组的方法将大鼠分为正常组，阳性对照组（妇科千金片），模型组，黄精水提物低、中、高剂量组，每组 10 只。从给予戊酸雌二醇片第 5 日开始，按照各组给药剂量灌胃给药，其中阳性对照组给药剂量为 0.08 g • kg^{-1}，黄精水提物低、中、高剂量组分别给予 0.945、1.26、1.575 g • kg^{-1} 黄精水提物，正常组和模型组均灌胃给予等量大豆油，连续 7 d。

2.4 行为学测试

扭体表现为大鼠腹部向内凹陷、躯干和后肢伸展、臀部和一侧的肢体内旋[21-23]，有时还有抱头舔腹的行为。最后一次灌胃给予戊酸雌二醇片 1 h 后，观察注射完缩宫素后 10 ～ 30 min 内大鼠的扭体反应情况，记录扭体潜伏时间和扭体次数。结果与正常组相比，模型组大鼠扭体潜伏时间显著缩短（$P < 0.05$），扭体次数显著增加（$P < 0.05$）。与模型组相比，黄精低、高剂量组及阳性对照组均可延长扭体潜伏时间，降低扭体次数（$P < 0.05$）（见图 1）。

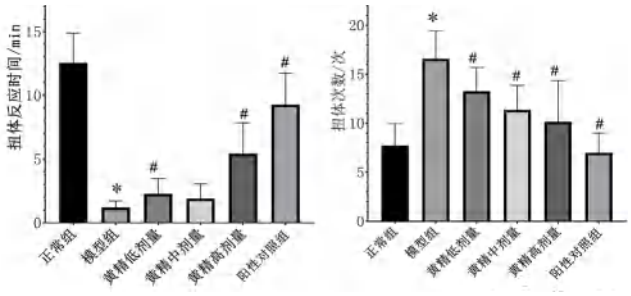


图 1　黄精对原发性痛经大鼠扭体反应的影响

Fig 1　Effect of Polygonatum on writhing responses in rats with primary dysmenorrhe

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

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

2.5 大鼠血清中 6-keto-PGF$_1\alpha$ 和 β-EP 含量以及大鼠子宫组织中 PGF$_2\alpha$ 和 PGE$_2$ 含量的测定

末次给药后，对各组大鼠进行腹腔注射 2% 戊巴比妥钠（2 mL • kg^{-1}）麻醉，将大鼠仰卧置于解剖台上，进行腹主动脉取血，全血室温静置 10 ～ 20 min 至血液凝固后离心，3000 r • min^{-1} 离心 15 min 后留取血清。严格按照 ELISA 试剂盒说明书，测定大鼠血清中 6-keto-PGF$_1\alpha$ 和 β-EP 的含量。

取大鼠子宫组织，按 1∶9 比例加入磷酸盐缓冲液（PBS），匀浆后离心，取上清液，严格按照 ELISA 试剂盒说明书，测定大鼠子宫组织中 PGF$_2\alpha$ 和 PGE$_2$ 的含量。

与正常组相比，模型组大鼠血清中 6-keto-PGF$_1\alpha$ 和 β-EP 水平均显著降低（$P < 0.05$）。与模型组相比，黄精高剂量组、中剂量组、低剂量组均可显著提升大鼠血清中 6-keto-PGF$_1\alpha$ 和 β-EP 的含量（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。结果见图 2A、2B。

与正常组相比，模型组大鼠子宫组织中 PGF$_2\alpha$ 水平显著升高（$P < 0.05$），PGE$_2$ 含量显著降低（$P < 0.05$）。与模型组相比，黄精中剂量组可降低大鼠子宫组织中 PGF$_2\alpha$ 的含量，提升 PGE$_2$ 的含量（$P < 0.001$），从而使 PGF$_2\alpha$/PGE$_2$ 的比值降低，缓解痛经。结果见图 2C、2D。

2.6 组织病理学检测

分离子宫组织，浸泡于 4% 多聚甲醛缓冲液中，固定。石蜡包埋后，进行常规的 HE 染色，观察子宫病理变化情况。

由图 3 可见，正常组大鼠子宫组织形态正常，组织平滑形态清晰，而模型组大鼠子宫组织内膜变薄，上皮细胞空泡样变，子宫肌层有充血现象。阳性对照组大鼠子宫内膜细胞少量空泡样病变。黄精高剂量组大鼠子宫上皮细胞空泡病变基本消失，充血现象明显改善。黄精中剂量组大鼠子宫内膜相对平整，空泡样病变基本消失。黄精低剂量组大鼠子宫上皮细胞空泡变化有所改善。

2.7 缩宫素致大鼠离体子宫平滑肌收缩程度的测定

将大鼠麻醉后解剖，完全暴露子宫，快速剪

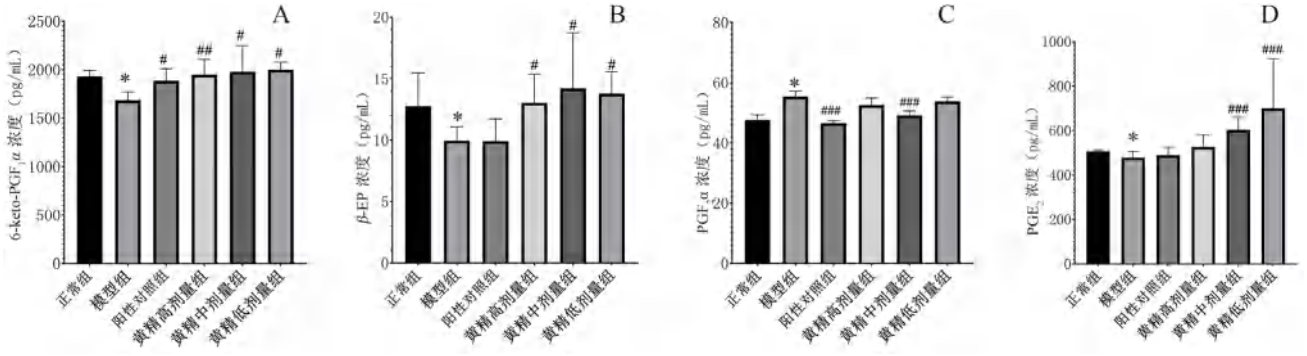


图 2　黄精对原发性痛经大鼠生化指标的影响

Fig 2　Effect of Polygonatum on biochemical indexes in rats with primary dysmenorrhea

注：与正常组相比，$^{*}P < 0.05$；与模型组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$。

Note：Compared with the normal group，$^{*}P < 0.05$；compared with the model group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$.

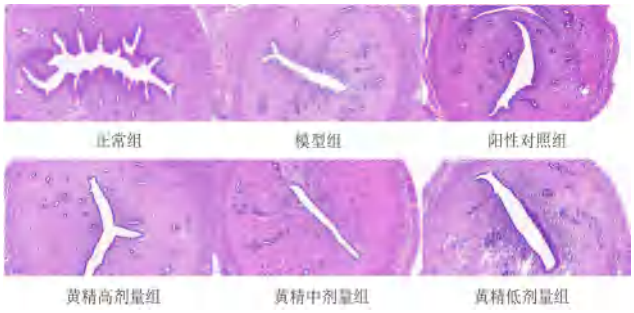


图 3　黄精对原发性痛经大鼠子宫组织病理变化的影响（HE，×200）

Fig 3　Effect of Polygonatum on histopathological changes of uterus of rats with primary dysmenorrhea（HE，×200）

取一侧子宫，立即放置在盛有乐氏液的玻璃平皿中充分清洗干净，仔细清除子宫上残留的结缔组织和脂肪，用乐氏液冲洗子宫，将子宫内容物充分洗净，在整个过程中注意不要过分拉伸子宫。然后剪取中间段子宫平滑肌约 2 cm，注意必须现取现用，避免时间过长子宫平滑肌失去活性。平滑肌两端分别系上缝合线，将 HW200S 恒温平滑肌实验系统的温度调整至 37 ℃，管内加入足量乐氏液，将系上缝合线的子宫平滑肌置于该系统内，使阴道端固定于小钩上并固定在管内，另一端连接在张力传感器上。实验过程中持续向乐氏液内通入氧气，速度为每 1 ～ 2 s 一个气泡，使子宫平滑肌正常自主收缩。通过 BL-420N 信号采集与分析系统记录大鼠离体子宫平滑肌的收缩曲线，先稳定半小时至子宫收缩稳定后，先记录一段子宫正常收缩曲线 6 min，然后向管内加入缩宫素 50 μL，记录曲线 1 min，随后依次向管中加入各种药液，分别记录曲线 6 min。最后对曲线进行分析，得出张力值和频率，并计算活动度（活动度＝平均张力值 × 频率）。

与模型组大鼠相比，黄精组与阳性对照组的子宫组织张力，收缩频率及活动度均有明显变化；黄精高剂量组和阳性对照组大鼠的子宫组织平滑肌平均张力具有统计学差异（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。黄精高剂量组、黄精中剂量组和阳性对照组大鼠的子宫组织收缩频率均有统计学差异（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。黄精中、高剂量组和阳性对照组大鼠的子宫组织平滑肌活动度也具有统计学差异（$P < 0.05$，$P < 0.01$，$P < 0.001$）。其中黄精高剂量组较黄精组其他两组效果较优。结果见表 1。

表 1　黄精对缩宫素致大鼠离体子宫平滑肌收缩的影响 ($n = 6$，$\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of Polygonatum on oxytocin induced contraction of isolated rat uterine smooth muscles ($n = 6$，$\bar{x}\pm s$)

组别	终浓度 /（mg·g^{-1}）	平均张力值 /g	频率 /（次·min^{-1}）	活动度
模型组	—	7.37±0.47	34.40±3.82	254.33±39.55
黄精低剂量组	0.21	7.22±0.55	31.70±4.40	230.82±50.50
黄精中剂量组	0.42	6.77±0.65	28.20±2.47*	189.75±11.22**
黄精高剂量组	0.84	6.30±0.74*	25.00±2.10**	158.41±29.25**
阳性对照组	0.08	5.85±0.70**	19.10±2.39**	112.27±22.08***

注：与模型组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

Note：Compared with the model group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$.

2.8　统计学处理

实验所有检查结果经 SPSS 25.0 软件进行数据统计分析，多组间比较用单因素方差分析，组间两两比较用 LSD 分析，方差不齐时用 Dunnett’s 方法分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3　讨论

痛经是妇科临床的常见病，症状严重的患者甚至会昏厥，给广大女性带来诸多困扰。研究原发性痛经，需要选择合适的动物模型，目前公认的关于原发性痛经动物模型是用雌激素与缩宫素联合使用建立[14]。因此，本研究采取这种方法复制原发性痛经动物模型，研究黄精对原发性痛经的药效作用。

原发性痛经发病机制复杂，然而大多数研究者认为原发性痛经的产生与前列腺素、缩宫素、前列环素及其他一些因素有关。其中 PGE_2 和 $PGF_2\alpha$ 发挥主要作用。研究表明痛经患者的子宫内膜和经血中 $PGF_2\alpha$ 浓度会远远高于正常女性，痛经越严重，患者体内的 $PGF_2\alpha/PGE_2$ 的比值越高 [2]。本实验结果表明，黄精能够降低原发性痛经大鼠子宫组织中 $PGF_2\alpha$ 的含量，提升 PGE_2 的含量，降低 $PGF_2\alpha/PGE_2$ 的比值，抑制子宫收缩。

研究发现，当子宫中 β- 内啡肽含量上升时，其内源性镇痛作用会使子宫疼痛减轻，子宫慢慢恢复正常，而当子宫中 β- 内啡肽含量过低时，会导致子宫收缩异常，进而导致痛经的产生 [24]。除此之外，PGI2 含量降低则会造成子宫收缩异常、肌张力增高、收缩频率增加，从而导致子宫血流量降低，子宫缺血，痉挛等从而引发痛经。6-keto-$PGF_1\alpha$ 是 PGI2 的代谢产物，其性质稳定，所以可以测量其代谢产物 6-keto-$PGF_1\alpha$ 的含量，以此间接反应 PGI2 的水平 [7]。实验结果显示，黄精可显著提升大鼠血清中 β-EP 和 6-keto-$PGF_1\alpha$ 的含量。

以上实验结果提示，痛经大鼠子宫过度收缩，造成子宫组织损伤，导致炎症反应的发生。黄精组大鼠子宫内壁空泡变化有所改善、充血现象明显改善、子宫内膜相对光滑平整。同时，黄精组能显著降低痛经大鼠子宫收缩频率和收缩张力，达到缓解痛经的效果。

综上，本实验首次在黄精原有的药理作用上，以黄精的抗炎、镇痛、补阴益肾作用为基础，进而探究黄精对原发性痛经大鼠模型的药效作用。本研究结果提示黄精可能对原发性痛经具有药效作用，为黄精的临床应用提供了实验依据。

参考文献

[1] 杨继红，陈英，胡佳贞 . 中学女生外周血前列腺素与原发性痛经的关系 [J]. 中国公共卫生，2011，27（8）：1042-1043.

[2] 方玲，朱新冰，范同梅 . 缩宫素与原发性痛经的相关性研究进展 [J]. 天津中医药，2011，28（5）：435-437.

[3] 蒲宝婵，姜国云，方玲 . 原发性痛经疼痛因子及其关联性研究 [J]. 中华中医药学刊，2014，32（6）：1368-1370.

[4] 潘野清，张健安 . 原发性痛经的发病机制及治疗进展 [J]. 安徽预防医学杂志，2017，23（2）：113-115.

[5] 王艳英 . 原发性痛经发病机制及治疗的研究进展 [J]. 中华中医药杂志，2015，30（7）：2447-2449.

[6] 马青，师伟，刘少玲，等 . 温经化瘀止痛法对寒凝血瘀证原发性痛经大鼠血清 E_2、P、PGE_2、$PGF_2\alpha$、TXB_2 及 6-Keto-$PGF_1\alpha$ 的影响 [J]. 中华中医药学刊，2017，35（5）：1281-1284.

[7] 丁爱娟 . 血竭含药血清对子宫内膜异位症在位内膜间质细胞凋亡和分泌 6-keto-$PGF_1\alpha$、TXB_2 的影响 [D]. 扬州：扬州大学，2009.

[8] 陈婷婷 . 黄精多糖对糖尿病大鼠心肌炎症的影响 [D]. 锦州：锦州医科大学，2016.

[9] 郑春艳，汪好芬，张庭廷 . 黄精多糖的抑菌和抗炎作用研究 [J]. 安徽师范大学学报（自然科学版），2010，33（3）：272-275.

[10] 王巧莲 . 黄精根茎化学成分及其抗炎活性研究 [D]. 北京：北京化工大学，2016.

[11] 张永芳 . 中药黄精对小鼠镇静镇痛作用及耐力的观察 [J]. 兽医科技，2017，24（6）：324-327

[12] Zhou WZ，Hong J，Zhu J，et al. Effects of Polygonatum sibiricum polysaccharides（PSP）on human esophageal squamous cell carcinoma（ESCC）via NF-κB signaling pathway [J]. Int J Polym Sci，2019，82（8）：1-9.

[13] Ma YL，Zhang YS，Zhang F，et al. Methyl protodioscin from olygonatum sibiricum inhibits cervical cancer through cell cycle arrest and apoptosis induction [J]. Food Chem Toxicol，2019，132：10655.

[14] 柳兆龙，刘攀，倪子婷，等 . 基于数据挖掘探索邵正斌治疗冠心病合并 2 型糖尿 PCI 术后用药规律 [J]. 海南医学院学报，2020，26（6）：424-429.

[15] 刘万富，谢兰兰，熊冉，等 . 中药及复方对糖尿病肠道微生物的影响 [J]. 中国微生态学杂志，2019，31（12）：1470-1474.

[16] 王宏伟，冷锦红 . 一贯煎加减辨证治疗糖尿病周围神经病变 [J]. 现代中西医结合杂志，2019，28（18）：2025-2028，2033.

[17] 何卫波，曾梅艳，宋厚盼，等 . 黄精治疗糖尿病的分子机制 [J]. 中医学报，2019，34（10）：2186-2193.

[18] 陶爱恩，赵飞亚，王莹，等 . 黄精属植物抗糖尿病本草学、物质基础及其作用机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（15）：15-24.

[19] 齐聪聪，黄晓芹 . 黄精对造血系统药理作用的研究进展 [J]. 中国民族民间医药，2015，24（24）：21-23.

[20] 褚福龙，宋永佳，刁立超，等 . 黄精 - 大枣药对协同抗氧化及提高免疫活性的对比研究 [J]. 中成药，2014，36（3）：614-616.

[21] 杨海燕，王健，李振国，等 . 艾附暖宫软胶囊对大鼠实验性痛经模型的作用 [J]. 中成药，2019，41（1）：208-210.

[22] 嵇波，张露芬，朱江，等 . 痛经模型建立和评价方法的思考 [J]. 中国药理学通报，2008，24（6）：711-714.

[23] 吴珊，汪蒙蒙，彭代银，等 . 桃红四物对寒凝血瘀痛经大鼠的治疗作用及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（14）：111-116.

[24] 李继俊 . 妇产科领域中的 β- 内啡肽 [J]. 实用妇科与产科杂志，1990，6（3）：155-156.

[25] 阳吉长 . 一种具有益肾调经功能的组合物及应用 [P]. 湖南省：CN112773865A，2021-05-11.

[26] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：319-320.

[27] 陈奇主编 . 中药药理研究方法学 [M]. 北京：人民卫生出版社，1993：33-34.

（收稿日期：2022-01-20；修回日期：2022-03-05）

人参皂苷 Rg_1 对顺铂损伤大鼠卵巢颗粒细胞的保护作用及其分子机制

颜倩，石丹宁，杨佳迪，何悦双，赵丕文*（北京中医药大学 生命科学学院，北京 102488）

摘要：目的 探究人参皂苷 Rg_1 对顺铂损伤大鼠卵巢颗粒细胞的保护作用及分子机制。**方法** 选取 22 ～ 24 d SD 的大鼠提取卵巢颗粒细胞进行原代培养，应用顺铂诱导建立卵巢早衰模型。设置正常组，模型组，人参皂苷 Rg_1 低浓度组、中浓度组、高浓度组和雌二醇（E2）组。HE 染色及免疫细胞化学法进行颗粒细胞鉴定；CCK8 法检测人参皂苷 Rg_1 作用 24 h、48 h 对顺铂损伤颗粒细胞的保护作用；Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡；Western blot 法检测 FSHR、PI3K、*p*-AKT、AKT、Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达。**结果** 细胞形态观察和胞质 FSHR 表达检测结果均表明所提取细胞为卵巢颗粒细胞；顺铂处理 12 h 后，颗粒细胞增殖率呈剂量依赖性下降，而给予人参皂苷 Rg_1 后，细胞增殖率下降被显著抑制，且呈剂量和时间依赖性；与模型组比较，人参皂苷 Rg_1 和 E2 处理后卵巢颗粒细胞中 FSHR、PI3K、*p*-AKT/AKT 及 Bcl-2/Bax 蛋白表达水平显著上升，而 PI3K 抑制剂干预后，Bcl-2 蛋白表达显著下降。**结论** 人参皂苷 Rg_1 对顺铂损伤的卵巢颗粒细胞具有保护作用，该保护作用可能通过激活 FSHR/PI3K/AKT 通路，抑制卵巢颗粒细胞凋亡实现。

关键词：人参皂苷 Rg_1；卵巢早衰；细胞凋亡；FSHR/ PI3K/AKT；卵巢颗粒细胞
中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)05-1028-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.011

Protective effect and molecular mechanism of ginsenoside Rg_1 on the senescence of rat ovarian granulosa cells induced by cisplatin

YAN Qian, SHI Dan-ning, YANG Jia-di, HE Yue-shuang, ZHAO Pi-wen* (*School of Life Sciences*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488)

Abstract: Objective To determine the effect and molecular mechanism of ginsenoside Rg_1 on the senescence of rat ovarian granulosa cells induced by cisplatin. **Methods** Firstly, primary granulosa cells extracted from 22 － 24 d SD rats were cultured. Premature ovarian failure (POF) cell model induced by cisplatin was applied for the following experiments. Granulosa cells were divided into a normal group, a model group, ginsenoside Rg_1 low, medium, high concentration groups, and an estradiol (E2) group. The primary granulosa cells were identified by HE staining and immunocytochemistry. CCK8 assay was used to detect the protective effect of ginsenoside Rg_1 on the granulosa cells injured by cisplatin at 24 h and 48 h. The cell apoptosis was detected by Hoechst 33258 staining. The protein expression of FSHR, PI3K, *p*-AKT, AKT, Bcl-2 and Bax were examined by Western blot. **Results** The expression of FSHR in the cytoplasm and cell morphology indicated that the extracted cells were granulosa cells. The proliferation rate of granulosa cells decreased in a dose-dependent manner after 12 h of cisplatin treatment, while the decrease in proliferation rate of granulosa cells was inhibited in a dose and time-dependent manner after ginsenoside Rg_1 treatment. Compared with the model group, the protein expression of FSHR, PI3K, *p*-AKT/AKT and Bcl-2/Bax in the ovarian granulosa cells increased significantly after ginsenoside Rg_1 and E2 treatment, while the protein expression of Bcl-2 decreased significantly after PI3K inhibitor intervention. **Conclusion** Ginsenoside Rg_1 can protect cisplatin-injured

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 81673764）。
作者简介：颜倩，女，硕士研究生，主要从事常用妇科中药的药理机制研究，email：1840888186@qq.com *通信作者：赵丕文，女，教授，博士研究生导师，主要从事常用妇科中药的药理机制研究，email：pwzhao@263.net

granulosa cells by activating FSHR/PI3K/AKT pathway and inhibiting the apoptosis of granulosa cells.
Key words: ginsenoside Rg_1; premature ovarian failure; cell apoptosis; FSHR/PI3K/AKT; ovarian granulosa cell

近年来，由于环境污染及生活、工作压力的日益增加，卵巢早衰（premature ovarian failure，POF）及其导致的生殖功能障碍发生率明显上升，引起了大家的普遍关注[1]。POF 是指在女性 40 岁以前出现卵巢功能衰退的现象，其发病率约 1%[2]。临床特征表现为闭经，伴随高促卵泡激素（FSH）和低雌激素水平[3]等。

目前 POF 的发病机制尚不完全明确。临床上，对 POF 患者常采取的治疗方法是雌激素替代疗法[4]，虽然可明显缓解症状，但由于激素治疗所带来的致癌等不良反应及高复发率等问题，使患者对激素治疗的依从性普遍较低，在临床应用中受到一定限制。因此，寻找具有疗效确凿且不良反应小的抗 POF 药物并揭示其分子机制具有重要的理论和临床意义。有研究者发现，人参主要活性成分人参皂苷 Rg_1 能明显改善 POF 的症状和体征[5]，但其发挥作用的分子机制尚待阐明。近年来研究发现 FSH 受体（FSHR）可介导激活细胞内多条信号通路，如 PI3K/AKT 通路，影响生殖细胞的生长发育[6]。PI3K/AKT 通路与 POF 发病机制关系密切，通过激活该通路，可显著抑制细胞的增殖与凋亡[7]。此外，本课题组前期研究中已利用顺铂体外诱导卵巢颗粒细胞损伤，成功建立了 POF 模型[8]。因此，本研究利用该模型深入探讨人参皂苷 Rg_1 对 FSHR/PI3K/AKT 通路的调控作用，揭示人参皂苷 Rg_1 对卵巢颗粒细胞保护作用的可能分子机制，为人参皂苷 Rg_1 应用于 POF 临床治疗提供新的理论依据。

1 材料

1.1 动物

健康雌性 SD 大鼠 16 只，22 ～ 24 d，体质量为（55±2）g（北京华阜康生物科技股份有限公司），饲养在温度为（25±3）℃，湿度 50% ～ 60%，光照 12 h，实验前适应性喂养 7 d。动物使用许可证：SYXK [京] 2020-0033。

1.2 试药

人参皂苷 Rg_1（源叶生物，批号：RSZD-121106，纯度≥ 98%），β- 雌二醇（E2，批号：100182-201906，纯度：96.3%，中国食品药品检定研究院），顺铂（源叶生物，批号：B24462）。Dulbecco’s Modification of Eagle’s Medium/Ham’s F-12 50/50 Mix（DMEM/F12）（Cellgro 公司，货号：10-092-CVR），HE 染色试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司），BCA 蛋白定量试剂盒、Hoechst33258 试剂盒（北京索莱宝公司），抗体 FSHR、PI3K、*p*-AKT、AKT、Bcl-2、Bax、β-actin、Coralite594-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody（美国 Proteintech），LY294002（Abcam，美国 ab146593）。

2 方法

2.1 体外原代卵巢颗粒细胞的提取与培养

SD 大鼠适应性喂养结束后，每只注射孕马血清促性腺激素（PMSG）50 IU，48 h 后，无菌环境下提取双侧卵巢颗粒细胞进行培养。操作步骤如下：① 取 SD 雌鼠，经颈椎脱臼处死，于 75% 乙醇中消毒 3 min；② 将 SD 雌鼠放入消毒托盘中取出双侧卵巢，并加入适量预冷 PBS；③ 将卵巢表面的脂肪，包膜等处理干净后，放入预冷 PBS 的消毒托盘中清洗；④ 将卵巢移入无血清培养基中，并用 1 mL 一次性注射器刺破卵巢边缘的卵泡，使卵巢颗粒细胞充分释放；⑤ 处理完毕后，将含有卵巢颗粒细胞的无血清培养基移入 EP 管，离心（半径 8 cm，1000 r • min $^{-1}$）10 min；⑥ 弃上清液，加入适量的 PBS 冲散细胞，1000 r • min $^{-1}$ 离心 5 min；⑦ 再次弃上清液，加入一定量的含 10% 胎牛血清 DMEM/F12 培养基，并吹打均匀；⑧ 调整细胞悬液浓度，以 1×10^5 个 / 孔接种于 96 孔板，于 37 ℃、5% CO_2 培养基中培养，3 d 后换一次培养基。观察细胞贴壁情况，待细胞生长至 75% ～ 80% 时用于后续实验。

2.2 卵巢颗粒细胞鉴定

2.2.1 HE 染色　将颗粒细胞接种于含爬片的 24 孔板，培养基体积为 1 mL/ 孔，细胞数量 1×10^6 个 / 孔，按照 HE 染色试剂盒说明书进行操作，具体步骤如下：① 移除旧培养基，PBS 洗涤 3 次，每次 5 min；② 在 37 ℃下，用 4% 多聚甲醛先固定 20 min，然后 PBS 洗涤 3 次，每次 5 min；③ 苏木素染色 2 min，自来水冲洗 2 min；④ 盐酸乙醇分色 2 s，快速取出并用自来水小心冲洗 3 min；⑤ 醇溶性伊红染色 2 min，自来水冲洗；⑥ 无水乙醇脱水，并用二甲苯透明化处理。封片后镜下观察细胞形态并拍照。

2.2.2 免疫细胞化学法　以 1×10^6 个 / 孔的密度将颗粒细胞接种于含爬片的 24 孔板中，使用免

疫细胞化学法测定 FSHR 表达量。具体操作如下：① 弃培养基后用 PBS 洗涤 3 次，每次 2 min；② 先用 4% 多聚甲醛于 37 ℃下固定 15 min，接着 PBS 洗涤 3 次，每次 3 min；③ 每孔加 0.5 mL5% BSA 室温封闭 1 h 后弃掉；④ 每孔加 0.5 mL FSHR 一抗（1∶250），4 ℃过夜，次日 PBS 洗涤 3 次，每次 10 min；⑤ 每孔加 0.5 mL 相对应的羊抗兔二抗（1∶200），室温条件下，避光孵育 1 h，PBS 洗涤 3 次，每次 10 min；⑥ 将含 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂滴加于载玻片上，盖上爬片，于荧光显微镜下观察并拍照。

2.3 CCK8 法

2.3.1 实验分组 不同质量浓度人参皂苷 Rg_1（0 ～ 400 ng • mL^{-1}）处理颗粒细胞 24 h，用于研究人参皂苷 Rg_1 对颗粒细胞的毒副作用，并根据结果选择人参皂苷 Rg_1 低、中、高浓度。不同质量浓度顺铂（0 ～ 80 μg • mL^{-1}）处理颗粒细胞 12 h，用于建立 POF 模型，并选出最佳造模浓度。然后，将细胞分为正常组、模型组、人参皂苷 Rg_1 低（顺铂＋低浓度人参皂苷 Rg_1）、中（顺铂＋中浓度人参皂苷 Rg_1）、高浓度组（顺铂＋高浓度人参皂苷 Rg_1）和 E2 组（顺铂＋β- 雌二醇），并分别培养 24、48 h，用于研究人参皂苷 Rg_1 对顺铂作用下颗粒细胞的影响，并根据实验结果选择最佳人参皂苷 Rg_1 的浓度。

2.3.2 细胞活力检测 以 1×10^5 个 / 孔将颗粒细胞接种于 96 孔板，每组 5 个复孔，药物处理结束后，将含 10% CCK8 无血清 DMEM/F12 培养基加入每个孔中，100 μL/ 孔，并在 37 ℃下继续培养 2.5 h，于 450 nm 处检测吸光值。

2.4 Hoechst 33258 染色

按“2.3.1”项下方法进行细胞的分组与给药，用 4% 多聚甲醛固定后加入 Hoechst 33258 染色液反应 5 min。其他操作同“2.2.2”项下⑤⑥的步骤。

2.5 Western blot

使用预冷 PBS 清洗细胞后，用含 1% PMSF 和 1% 磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解细胞，提取总蛋白。离心后吸取上清液，进行 BCA 蛋白定量。用 12% SDS-PAGE 分离蛋白，将蛋白转移到 PVDF 膜（100 V 75 min）。然后，室温下封闭 1.5 h，再将膜与一抗：FSHR 抗体（1∶1000）、PI3K 抗体（1∶1000）、Akt 抗体（1∶1000）、*p*-AKT 抗体（1∶1000）、Bax 抗体（1∶1000）、Bcl-2 抗体（1∶1000）和 β-actin 抗体（1∶5000）在 4 ℃孵育过夜。用 PBST 洗涤 3 次，每次 10 min 后，加入对应的二抗（1∶10 000）室温孵育 1 h。再用 PBST 洗涤 3 次，每次 10 min，用 BCL 发光底物后使用凝胶成像仪显影，通过 Image J 软件统计条带灰度值。

2.6 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件对数据进行统计学分析，实验结果以均值 ± 标准差表示，组间差异用单因素方差分析检验，两两比较采用独立样本 *t* 检验，以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 卵巢颗粒细胞的鉴定

HE 染色结果显示，细胞贴壁生长，体积较大，呈多角梭形，细胞核位于细胞中央，为深蓝色，呈卵圆形或者不规则形；胞质为淡红色，染色均匀，边缘清晰（见图 1）。免疫细胞化学法结果显示，卵巢颗粒细胞的特异性标志物 FSHR 在胞质中大量表达，呈红色，在核呈深蓝色，结果表明分离到的细胞是卵巢颗粒细胞（见图 2）。

3.2 人参皂苷 Rg_1 对卵巢颗粒细胞增殖的影响

应用 0、12.5、25、50、100、200、300、400 ng • mL^{-1} 的人参皂苷 Rg_1 作用于颗粒细胞后，细胞存活率分别为 100%、100.94%、100.03%、101.28%、99.86%、100.02%、100.74%、101.78%，表明在此质量浓度范围内，人参皂苷 Rg_1 并未对颗粒细胞产生毒性作用（见图 3A）。人参皂苷 Rg_1 在 100、200、300 ng • mL^{-1} 时，细胞的存活率较为稳定。所以本实验选取 100、200、300 ng • mL^{-1} 分别作为人参皂苷 Rg_1 低、中、高浓度进行后续实验。

3.3 顺铂诱导的 POF 模型建立

如图 3B 所示，与正常组相比，顺铂作用于颗粒细胞 12 h 后，细胞的存活率随着顺铂质量浓度的增加而下降。基于顺铂处理卵巢颗粒细胞的半数抑制浓度（IC_{50}），选取 40 μg • mL^{-1} 顺铂处理细胞 12 h 作为后续 POF 模型建立的条件。

3.4 人参皂苷 Rg_1 对卵巢颗粒细胞的保护作用

如图 3C 所示，40 μg•mL^{-1} 顺铂处理 12 h 后，再使用低浓度、中浓度和高浓度人参皂苷 Rg_1 处理后，其存活率随着人参皂苷 Rg_1 质量浓度的增加显著提高，且高质量浓度对细胞的保护作用最为明显。以上结果表明，人参皂苷 Rg_1 可保护顺铂诱导的细胞损伤，在高质量浓度时作用效果最佳。因此，选取高质量浓度人参皂苷 Rg_1 用于完成后续分子机制的研究。

3.5 人参皂苷 Rg_1 对卵巢颗粒细胞凋亡的影响

与正常组相比，模型组胞核呈亮蓝色荧光，并出现固缩与破碎现象；与模型组相比，高质量浓度人参皂苷 Rg_1 组和 E2 组胞核荧光强度降低，且核固缩与破碎现象显著减少（见图 4）。

3.6 Western blot 检测细胞内相关蛋白的变化

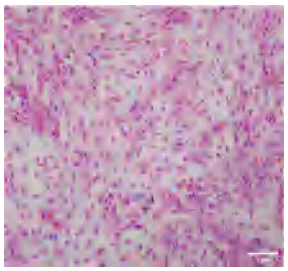


图 1　卵巢颗粒细胞形态（HE 染色，×200）

Fig 1　Morphological of ovarian granulosa cells（HE staining，×200）

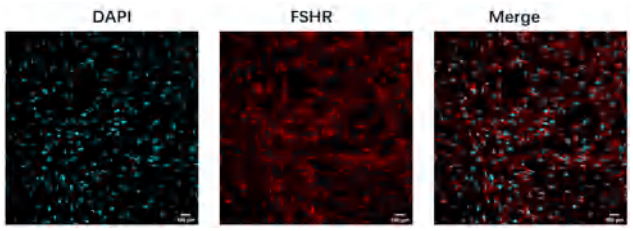


图 2　免疫荧光检测卵巢颗粒细胞 FSHR 的表达（免疫荧光染色，×200）

Fig 2　Expression of FSHR in ovarian granulosa cells detected by immunofluorescence（immunofluorescence staining，×200）

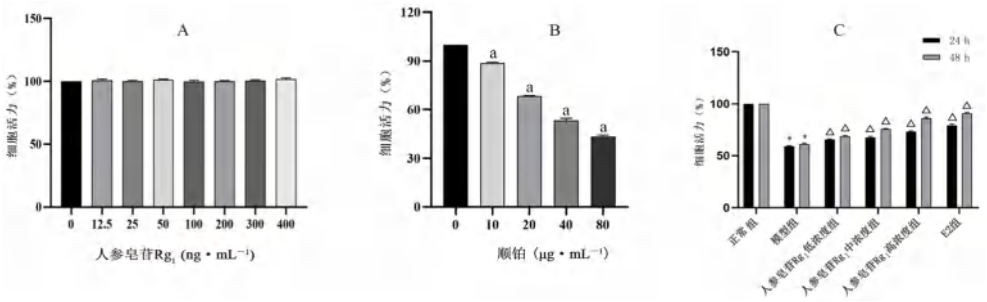


图 3　人参皂苷 Rg_1 对颗粒细胞增殖的影响

Fig 3　Effect of ginsenoside Rg_1 on granulosa cell proliferation

A. 人参皂苷 Rg_1 对颗粒细胞的毒性作用（toxicity of ginsenosid Rg_1 to granulosa cells）；B. 顺铂对颗粒细胞的抑制作用（inhibition of cisplatin on granulosa cells）；C. 人参皂苷 Rg_1 对卵巢颗粒细胞的保护作用（protective effect of ginsenosid Rg_1 on ovarian granulosa cells）

注：与顺铂 0 μg • mL^{-1} 组比较，$^{a}P < 0.05$；与正常组比较，$^{*}P < 0.05$；与模型组比较，$^{\triangle}P < 0.05$。

Note：Compared with the 0 μg • mL^{-1} cisplatin group，$^{a}P < 0.05$；compared with the normal group，$^{*}P < 0.05$；compared with the model group，$^{\triangle}P < 0.05$.

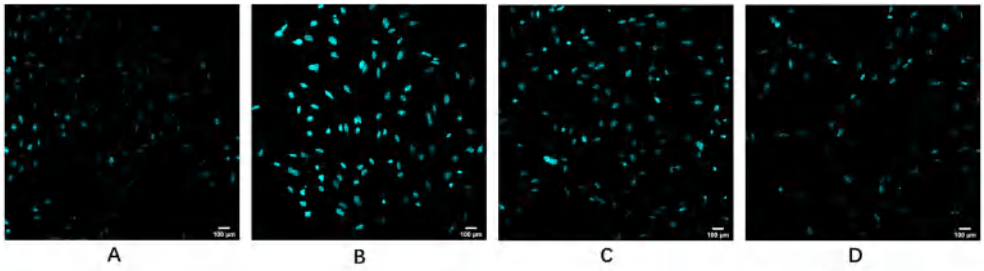


图 4　人参皂苷 Rg_1 对顺铂损伤的颗粒细胞凋亡的影响（Hoechst 33258 染色，×200）

Fig 4　Effect of ginsenosid Rg_1 on the apoptosis of cisplatin-injured granulosa cells（Hoechst 33258 staining，×200）

A. 正常组（normal group）；B. 模型组（model group）；C. 人参皂苷 Rg_1 高浓度组（high concentration ginsenosid Rg_1 group）；D. E2 组（E2 group）

与正常组相比，模型组中 FSHR、PI3K、*p*-AKT/AKT 和 Bcl-2 蛋白表达均显著减少，Bax 蛋白表达均增加；与模型组相比，人参皂苷 Rg_1 高浓度组和 E2 组中 FSHR、PI3K、*p*-AKT/AKT 和 Bcl-2 蛋白表达水平均表达增加，Bax 的表达减少（见图 5 及图 6）；与人参皂苷 Rg_1 高浓度组和 E2 组相比，人参皂苷 Rg_1 高浓度＋抑制剂组和 E2 ＋抑制剂组中 Bcl-2 蛋白表达均明显减少（见图 7）。

4　讨论

POF 是一种由遗传和免疫等原因引起的发生于 40 岁以下女性的内分泌紊乱性疾病 [9]，伴有多组织、器官功能障碍，如心血管、骨骼系统相关疾病的发生，甚至促使患者提前衰老，影响其寿命 [10-11]。临床上激素替代疗法虽能明显改善患者的症状与体征，但也增加了子宫内膜癌、乳腺癌和静脉栓塞性疾病等发生的风险 [12]。近年来，研究发现，人参皂苷 Rg_1 可显著提高卵巢组织的抗衰老能力和 POF 小鼠的生育能力 [13-14]。课题组前期研究也发现，通过激活 PI3K/AKT 通路与抑制颗粒细胞凋亡可改善 POF，保护卵巢功能 [8，15]。因此，本研究从体外提取原代卵巢颗粒细胞，探讨人参皂苷 Rg_1 是否通过调控 FSHR/PI3K/AKT 途径发挥抗 POF 作用。

顺铂是临床一线常用化疗药物，其对肿瘤细胞具有明确的杀伤作用，但其对正常组织细胞的结构和功能也有损伤，研究表明，顺铂可导致 POF [16]。另外，在顺铂诱导的 POF 大鼠模型中，血清 FSH 显著升高，且其卵巢组织衰退性改

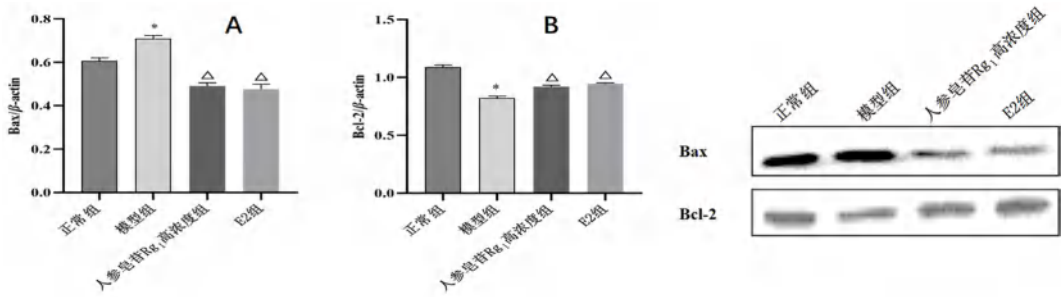


图 5 人参皂苷 Rg_1 对顺铂损伤的颗粒细胞中 Bax 和 Bcl-2 表达的影响

Fig 5 Effect of ginsenosid Rg_1 on Bax and Bcl-2 expression in cisplatin-injured granulosa cells

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

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

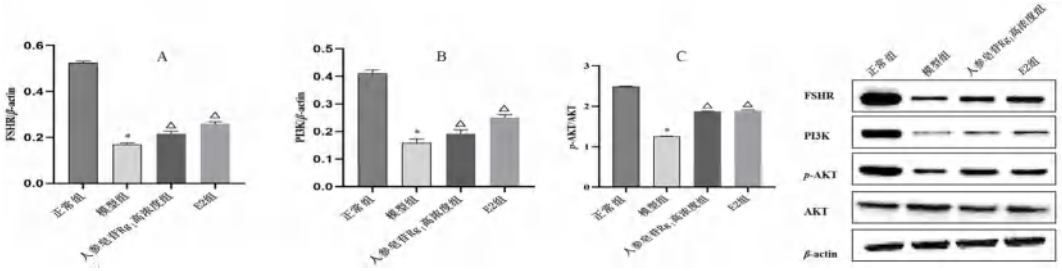


图 6 人参皂苷 Rg_1 对顺铂损伤的颗粒细胞内 FSHR/PI3K/AKT 信号通路关键蛋白表达的影响

Fig 6 Effect of ginsenosid Rg_1 on the expression of key proteins in FSHR/PI3K/AKT signaling pathway in cisplatin-injured granulosa cells

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

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

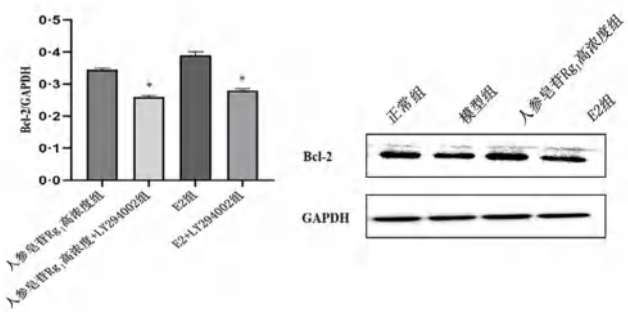


图 7 PI3K 抑制剂对顺铂损伤的颗粒细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响

Fig 7 Effect of PI3K inhibitor on the expression of Bcl-2 protein in cisplatin-injur granulosa cells

注：与不加抑制剂组比较，$^{*}P < 0.05$。

Note：Compared with the without inhibitor group，$^{*}P < 0.05$.

变与化疗药应用于人体导致的 POF 病变过程很相似 [17]。因此，本实验利用顺铂诱导卵巢颗粒细胞损伤来建立 POF 模型。

FSH 是哺乳动物生殖与发育的重要激素，可促进卵泡的发育、卵母细胞的成熟和性类固醇激素的合成 [18]。POF 患者检查结果主要显示为血清 FSH 值增高和卵泡发育不成熟，其原因可能是卵巢组织上 FSH 受体（FSHR）的功能减弱或受损，导致对 FSH 刺激不敏感，从而抑制卵泡的发育 [19]。本研究结果显示，人参皂苷 Rg_1 可显著增强细胞中 FSHR 表达，即人参皂苷 Rg_1 可通过上调 FSHR 的表达，促进对卵巢颗粒细胞的增殖生长。

FSH 与靶细胞表面 FSHR 结合后，可激活 PI3K/AKT 信号通路 [20]，促进生殖系统的发育与成熟。在 *D*-半乳糖诱导的 POF 模型中，姜黄素可通过激活 PI3K/AKT 信号通路，有效抑制颗粒细胞凋亡和卵巢损伤 [21]。在环磷酰胺和白消安诱导的小鼠 POF 模型中，胚胎干细胞来源细胞外小囊泡可以通过激活 PI3K/AKT 通路，明显提高血清性激素水平，增加卵泡数量和减少凋亡细胞数量 [22]。Wang 等 [23] 研究表明，针刺百会、关元和太冲等可通过上调 PI3K/AKT 通路关键蛋白的表达，抑制颗粒细胞凋亡和改善卵泡的发育，从而减轻环磷酰胺诱导的 POF。本研究结果显示，人参皂苷 Rg_1 可明显提高 PI3K 和 *p*-AKT 的蛋白表达，提示人参皂苷 Rg_1 可通过上调 FSHR 蛋白的表达，激活下游 PI3K/AKT 途径中关键蛋白的表达。

PI3K/AKT 通路不但是影响 POF 的重要途径，还是影响细胞凋亡的重要途径。在卵巢颗粒细胞凋亡过程中，Bcl-2 和 Bax 两种调控因子通过形成同 / 异源二聚体的形式发挥重要作用。Bcl-2 和 Bax 两者互为拮抗作用，当 Bax 蛋白水平表达上调时，Bax 可与 Bax 结合形成同源二聚体，促进颗粒细胞的凋亡。反之当 Bcl-2 水平上调时，Bcl-2 可与 Bax 形成异源二聚体，抑制颗粒细胞凋亡 [24-25]。本研究结果显示，人参皂苷 Rg_1 可显著增强 Bcl-2 蛋白表达并降低 Bax 表达，而加入

PI3K 抑制剂后，Bcl-2 蛋白表达显著降低，即人参皂苷 Rg_1 可通过激活 FSHR/PI3K/AKT 途径，抑制颗粒细胞凋亡，保护卵巢的功能。

综上所述，人参皂苷 Rg_1 可能通过激活 FSHR/PI3K/AKT 信号通路，抑制顺铂损伤的颗粒细胞凋亡，从而保护卵巢颗粒细胞免受损伤。该实验结果或为深入了解中药人参的药理作用机制和 Rg_1 的进一步研究提供参考。

参考文献

[1] Wesevich V，Kellen AN，Pal L. Recent advances in understanding primary ovarian insufficiency [J]. F1000Res，2020，9：1101.

[2] Choe SA，Sung J. Trends of premature and early menopause：a comparative study of the US National Health and Nutrition Examination Survey and the Korea National Health and Nutrition Examination Survey [J]. J Korean Med Sci，2020，35（14）：e97.

[3] Demayo S，Giannone L，Monastero A，et al. Reality of premature ovarian failure in Argentina [J]. Rev Assoc Med Bras，2019，65（3）：419-423.

[4] Vujović S，Ivovic M，Tančić-Gajić M，et al. Endometrium receptivity in premature ovarian insufficiency-how to improve fertility rate and predict diseases? [J]. Gynecol Endocrinol，2018，34（12）：1011-1015.

[5] Liu XH，Cai SZ，Zhou Y，et al. Ginsenoside Rg_1 attenuates premature ovarian failure of D-gal induced POF mice through downregulating p16INK4a and upregulating SIRT1 expression [J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets，2021，doi：10.2174/1871523020666210830164152.

[6] Banerjee AA，Joseph S，Mahale SD. From cell surface to signalling and back：the life of the mammalian FSH receptor [J]. FEBS J，2021，288（8）：2673-2696.

[7] 姜凤丽，王晓滨，宗婧，等 . PI3K-Akt/mTOR 信号通路对卵巢早衰相关性研究进展 [J]. 黑龙江科学，2019，10（2）：50-51.

[8] 赵笛，赵丕文，武虹波，等 . 二仙汤对顺铂所致大鼠卵巢早衰模型中卵巢颗粒细胞增殖及周期的影响 [J]. 环球中医药，2017，10（2）：131-136.

[9] Lim YM，Jeong K，Lee SR，et al. Association between premature ovarian insufficiency，early menopause，socioeconomic status in a nationally representative sample from Korea [J]. Maturitas，2019，121：22-27.

[10] Schipper I，Louwers YV. Premature and early menopause in relation to cardiovascular disease [J]. Semin Reprod Med，2020，38（4）：270-276.

[11] Tsiligiannis S，Panay N，Stevenson JC. Premature ovarian insufficiency and long-term health consequences [J]. Curr Vasc Pharmacol，2019，17（6）：604-609.

[12] Patel H，Arruarana V，Yao L，et al. Effects of hormones and hormone therapy on breast tissue in transgender patients：a concise review [J]. Endocrine，2020，8（1）：6-15.

[13] He L，Wang X，Cheng D，et al. Ginsenoside Rg_1 improves pathological damages by activating the p21-p53-STK pathway in ovary and BaxBcl-2 in the uterus in premature ovarian insufficiency mouse models [J]. Mol Med Rep，2021，23（1）：37.

[14] He L，Ling L，Wei T，et al. Ginsenoside Rg_1 improves fertility and reduces ovarian pathological damages in premature ovarian failure model of mice [J]. Exp Biol Med（Maywood），2017，242（7）：683-691.

[15] 杨蕾，王继峰，牛建昭，等 . 二仙汤含药血清对顺铂干预的大鼠卵巢颗粒细胞凋亡调控蛋白 bcl-2、bax 表达的影响 [J]. 世界中医药，2017，12（4）：865-869.

[16] 丁艳，张静，陶然，等 . 顺铂治疗导致卵巢早衰的研究进展 [J]. 基础医学与临床，2018，38（6）：845-848.

[17] 梁丹，曹保利，李继坤，等 . 顺铂诱导大鼠卵巢早衰的实验研究 [J]. 现代中西医结合杂志，2012，21（26）：2873-2875.

[18] Juárez-Rendón KJ，García-Ortiz JE. Evaluation of four genes associated with primary ovarian insufficiency in a cohort of Mexican women [J]. J Assist Reprod Genet，2018，35（8）：1483-1488.

[19] Zhuandi G，Tuanjie C，Luju L，et al. FSH receptor binding inhibitor restrains follicular development and possibly attenuates carcinogenesis of ovarian cancer through down-regulating expression levels of FSHR and ERβ in normal ovarian tissues [J]. Gene，2018，668：174-181.

[20] Zhang H，Qin F，Liu A，et al. Kuntai capsule attenuates premature ovarian failure through the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. J Ethnopharmacol，2019，239：111885.

[21] Yan Z，Dai Y，Fu H，et al. Curcumin exerts a protective effect against premature ovarian failure in mice [J]. J Mol Endocrinol，2018，60（3）：261-271.

[22] Liu M，Qiu Y，Xue Z，et al. Small extracellular vesicles derived from embryonic stem cells restore ovarian function of premature ovarian failure through PI3K/AKT signaling pathway [J]. Stem Cell Res Ther，2020，11（1）：3.

[23] Wang S，Lin S，Zhu M，et al. Acupuncture reduces apoptosis of granulosa cells in rats with premature ovarian failure via restoring the PI3k/Akt signaling pathway [J]. Int J Mol Sci，2019，20（24）：6311.

[24] Vartak SV，Iyer D，Santhoshkumar TR，et al. Novel Bcl-2 inhibitor，Disarib induces apoptosis by disruption of Bcl-2-BAK interaction [J]. Biochem Pharmacol，2017，131：16-28.

[25] Rahmani M，Nkwocha J，Hawkins E，et al. Cotargeting Bcl-2 and PI3K induces Bax-dependent mitochondrial apoptosis in AML cells [J]. Cancer Res，2018，78：3075-3086.

（收稿日期：2022-01-03；修回日期：2022-02-19）

毛白杨雌、雄花蕾总黄酮含量及抗氧化活性的比较

李卓俊，吴翠，徐博，宋平平，刘震营，巢志茂*（中国中医科学院中药研究所，北京 100700）

摘要：目的 比较毛白杨雌、雄花蕾总黄酮含量及体外抗氧化活性。**方法** 采集毛白杨雌株和雄株的花蕾作为样品。以儿茶素为对照，采用亚硝酸钠 - 硝酸铝显色法测定总黄酮含量。以 Trolox 为阳性对照，采用 DPPH 和 ABTS 自由基清除法测定体外抗氧化活性。采用 *t* 检验对雌雄花蕾之间的差异进行比较。**结果** 收集毛白杨雌株和雄株的花蕾各 11 株。雌、雄花蕾组总黄酮平均含量分别为 25.60 mg • g^{-1} 和 30.39 mg • g^{-1}，DPPH 法的雌、雄花蕾组的平均 TEAC 值分别为 19.99 mmol • L^{-1} 和 23.91 mmol • L^{-1}，ABTS 法的雌、雄花蕾组的平均 TEAC 值分别为 19.97 mmol • L^{-1} 和 23.44 mmol • L^{-1}，差异均具有统计学意义（$P < 0.05$）。**结论** 毛白杨雄花蕾的总黄酮含量显著高于雌花蕾，雌、雄花蕾均具有良好的抗氧化活性，且以雄花蕾的活性显著。

关键词：毛白杨；雌雄异株植物；总黄酮；含量测定；抗氧化
中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)05-01034-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.012

Total flavonoid content and antioxidant activity of female and male flower buds of *Populus tomentosa*

LI Zhuo-jun, WU Cui, XU Bo, SONG Ping-ping, LIU Zhen-ying, CHAO Zhi-mao* (*Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing* 100700)

Abstract: Objective To compare the total flavonoid content and in vitro antioxidant activity between female and male flower buds of *Populus tomentosa* Carrière. **Methods** The flower buds of female and male *Populus tomentosa* were collected as samples. Catechin was used as the control, and the content of total flavonoid was determined by the aluminum nitrate colorimetric method. Trolox was used as the positive control, and DPPH and ABTS free radical scavenging methods were used to evaluate the antioxidant activities in vitro. The content and antioxidant activities were compared between the female and male flower buds by Student's *t* test. **Results** Eleven female flower buds and eleven male flower buds of *Populus tomentosa* were collected. The average content of total flavonoid in the female and male groups was 25.60 mg • g^{-1} and 30.39 mg • g^{-1}, respectively. The average TEAC values of the DPPH method in the female and male groups were 19.99 mmol • L^{-1} and 23.91 mmol • L^{-1}. The average TEAC values of ABTS method in the female and male groups were 19.97 mmol • L^{-1} and 23.44 mmol • L^{-1}, respectively. The difference were significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The content of total flavonoid in male were buds of *Populus tomentosa* is higher than that in female flower buds. Both have antioxidant activity, and the activity of the male flower buds is more obvious than that of the female flower buds.

Key words: *Populus tomentosa*; dioecious plant; total flavonoid; content determination; antioxidation

毛白杨（*Populus tomentosa* Carrière）为杨柳科杨属落叶大乔木，在华北地区有大量的种植，属于常见的造林绿化树种，其叶、树皮和雄花序均可作为中药使用。1977 年版《中国药典》中记载毛白杨干燥雄花序是中药杨树花的植物来源，具有化湿止痢的功效，用于治疗细菌性痢疾和急性肠炎[1]。在《中药大辞典》中记载，毛白杨树皮具有清热利湿的功效，主要用于治疗赤白痢疾、日

基金项目：国家现代农业产业技术体系资助项目（No.CARS-21）；中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目（No.CI2021A04512）。
作者简介：李卓俊，女，硕士研究生，主要从事中药材贮藏与包装研究，email：18811385399@163.com *通信作者：巢志茂，男，研究员，主要从事中药材贮藏与包装研究，email：chaozhimao@163.com

久不止、淋浊白带、急性肝炎、支气管炎、肺炎、蛔虫、习惯性便秘等[2]。临床上使用毛白杨花、叶和树皮用于治疗急性菌痢、骨肉瘤、外伤感染[3-4]。杨树花目前还用作兽药，用于治疗牛羊猪等的痢疾、腹泻等疾病，并在山东等地有食用的历史[5-7]。毛白杨的化学成分主要有黄酮类、甾醇类、有机酸类、酚及其苷类[8-10]，具有抗炎镇痛、抗腹泻、抑菌、抗氧化等药理活性[11-13]。

雌雄异株植物是指在具有单性花的种子植物中，雌花和雄花长在不同的植株中[14]。对于雌雄异株植物性别之间存在的理化性质和药效活性的差异的研究，早期仅见极少的报道[15]。有研究通过高效液相色谱指纹图谱方法结合多元统计分析方法对毛白杨的树皮进行雌雄的比较发现，雌株中 micranthoside 的含量高于雄株，而 siebolside B、樱花苷、异樱花苷、isograndidentatin A 的含量低于雄株[16]。有研究通过顶空进样固相微萃取气质联用法对毛白杨花蕾的挥发性成分进行比较发现，雌株中 2- 环己烯 -1- 酮、苯甲酸苄酯和苯甲酸甲酯的含量高于雄株，而苯甲酸乙酯的含量低于雄株[17]。通过磁共振技术结合多元统计分析对毛白杨雌雄花蕾进行化学成分研究发现，雌雄花蕾间主要差异成分有胡萝卜苷、*β*- 谷甾醇、熊果酸和白桦脂酮酸，均为雄株中的含量高于雌株[18]。尽管存在一些成分含量高低不等的现象，但对于雌雄异株植物毛白杨的花蕾尚未见总黄酮含量及抗氧化活性差异的研究报道。

本文收集了成年毛白杨雌株和雄株的花蕾，通过亚硝酸钠 - 硝酸铝显色法测定了总黄酮的含量，通过 DPPH 和 ABTS 自由基清除法评价了体外抗氧化活性，并进行了雌雄组之间的比较，为毛白杨的开发利用了提供科学依据。

1 材料

1.1 试药

于 2020 年 2 月 23 日至 28 日在北京市东城区东直门北大街、通教寺、民安小区、安定门东大街、青龙胡同和朝阳区黄金苑等地点（东经 116°22'53" ～ 116°26'57"， 北 纬 39°52'36" ～ 39°57'17"）采集了成年毛白杨的花蕾，阴干。性别是通过该植株之后形成的花序和果实确认。雌株花蕾标记为 F1 ～ F11，雄株花蕾标记为 M1 ～ M11。经中国中医科学院中药研究所巢志茂研究员鉴定为杨柳科植物毛白杨的干燥花蕾，样品贮藏于中国中医科学院中药研究所。

亚硝酸钠、氢氧化钠（分析纯，北京化工厂），硝酸铝 [分析纯，福晨（天津）化学试剂有限公司]，儿茶素对照品（批号：154-23-4，纯度：98%，成都埃法生物科技有限公司），6- 羟基 -2，5，7，8- 四甲基色烷 -2- 羧酸 [Trolox，货号：238813，Sigma-Aldrich（上海）贸易有限公司，纯度≥ 97%]，2，2- 联苯基 -1- 苦基肼基（DPPH，批号：D1915107，上海阿拉丁生化科技股份有限公司，纯度≥ 97%），2，2'- 联氮双（3- 乙基苯并噻唑啉 -6- 磺酸）二铵盐 [ABTS，货号：A1888，纯度≥ 98%，Sigma-Aldrich（上海）贸易有限公司]；无水乙醇（分析纯，天津市鼎盛鑫化工有限公司），甲醇（分析纯，天津市富宇精细化工有限公司），纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司）。

1.2 仪器

TU-1810 紫外可见分光光度计（北京普析通用仪器有限责任公司）；Ohaus CP224C 型电子天平 [精度：0.1 mg，奥豪斯（上海）仪器有限公司]；ME155DU 型电子天平 [精度：0.01 mg，梅特勒 - 托利多仪器（上海）有限公司]；DFT-50A 型手提式高速粉碎机（温岭市林大机械有限公司）；DFD-700 型双列四孔电热恒温水浴锅（天津泰斯特仪器有限公司）。

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液的制备 将样品粉碎，过 40 目筛。精密称取 2.0 g 粉末，置于 50 mL 具塞锥形瓶中，精密加入 70% 甲醇 25 mL，称定质量后，水浴锅上加热回流 30 min，放置室温后，再次称定质量，用 70% 甲醇补足减失的质量，摇匀，过滤，取续滤液即得。

2.1.2 显色溶液的制备 精密称取亚硝酸钠 5.0 g，加水溶解并定容至 100 mL 量瓶中，摇匀即得 5%$NaNO_2$ 溶液。精密称取硝酸铝 10.0 g，加水溶解并定容至 100 mL 量瓶中，摇匀即得 10% $Al(NO_3)_3$ 溶液。精密称取氢氧化钠 4.0 g，加水溶解并定容至 100 mL 量瓶中，摇匀即得 1 mol • L^{-1} NaOH 溶液。精密称取 DPPH 7.00 mg，加甲醇溶解并定容至 100 mL 棕色量瓶中，摇匀即得 0.07 mg • mL^{-1} DPPH 溶液。精密称取 ABTS 0.10 g，加水溶解并定容至 25 mL 棕色量瓶中，摇匀即得 7 mmol • L^{-1} ABTS 溶液。精密称取过硫酸钾 0.19 g，加水溶解并定容至 5 mL 棕色量瓶中，摇匀即得 140 mmol • L^{-1} $K_2S_2O_8$ 溶液。

2.2 总黄酮的含量测定

参考相关文献[19-20]并对测定方法进行优化。

2.2.1 标准曲线的制备 精密称取儿茶素 10.80

mg，加水溶解并定容至 100 mL 量瓶中，摇匀，即得 0.11 mg • mL^{-1} 儿茶素对照品溶液。精密吸取 0.11 mg • mL^{-1} 儿茶素对照品溶液 1.4、1.6、2.0、3.0、4.0、5.0 mL，置于 25 mL 量瓶中，加入 6 mL 水，摇匀，加入 5%$NaNO_2$ 1 mL，摇匀，静置 6 min，加入 10%$Al(NO_3)_3$ 1 mL，摇匀，静置 6 min，加入 1 mol • L^{-1} NaOH 溶液 10 mL，加水至刻度线，摇匀，放置 10 min 后测定，以 70% 甲醇为空白，在 510 nm 的波长处测定吸光度，以儿茶素对照品溶液质量浓度（mg • mL^{-1}）为横坐标，以吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。

2.2.2　供试品溶液的测定　精密吸取毛白杨雌、雄花蕾的供试品溶液 20 μL，按“2.2.1”项下方法测定吸光度。根据标准曲线计算毛白杨雌、雄花蕾中总黄酮的含量。

2.3　DPPH 自由基清除能力测定

参考相关文献[21-22]并对测定方法进行优化。

2.3.1　标准曲线的制备　精密称取 Trolox 对照品 10.14 mg，加甲醇溶解并定容至 50 mL 棕色量瓶中，摇匀，即得 0.20 mg • mL^{-1} Trolox 对照品溶液。精密吸取 Trolox 对照品溶液 20、40、60、80、100、120 μL，置于 5 mL 棕色量瓶中，加入 0.07 mg • mL^{-1} DPPH 溶液 2 mL，摇匀，加甲醇至刻度线，摇匀，避光静置 30 min，在 517 nm 波长下测定吸光度为 A_0，计算 DPPH 自由基清除率，以 Trolox 对照品溶液的浓度（μmol • L^{-1}）为横坐标，清除率为纵坐标，绘制标准曲线。

DPPH 清除率（%）$=[1-(A_1-A_0)/A_2]\times 100\%$

式中：A_1 为 70% 甲醇空白组的吸光度；A_2 为 DPPH 溶液对照组的吸光度。

2.3.2　供试品溶液的测定　将“2.1.1”项下供试品溶液稀释 10 倍，精密吸取 20 μL，按“2.3.1”项下方法测定吸光度 A_0，平行测定 3 次，取平均值，计算 DPPH 自由基清除率。根据标准曲线结合稀释程度计算 TEAC 值。TEAC 值是指在对 DPPH 自由基相同的清除率情况下，样品所对应的 Trolox 浓度。

2.4　ABTS 自由基清除能力测定

参考相关文献[23-24]并对测定方法进行优化。精密吸取 140 mmol • L^{-1} $K_2S_2O_8$ 溶液 176 μL 置于具塞锥形瓶中，加入 7 mmol • L^{-1} ABTS 溶液 10 mL，摇匀，室温且黑暗条件下反应 16 h，即得 ABTS 储备液。使用前量取一定量的 ABTS 储备液，加无水乙醇稀释，在 734 nm 波长下测定吸光度，直至稀释后的吸光度为（0.70±0.02），即得 ABTS 工作液。

2.4.1　标准曲线的制备　分别精密称取 Trolox 对照品 0.24、1.02、1.50、2.14、2.60、3.16 mg 置于 5 mL 棕色量瓶中，加无水乙醇溶解并定容，摇匀，即得 0.048、0.204、0.300、0.428、0.520、0.632 mg • mL^{-1} Trolox 对照品溶液。精密吸取各质量浓度的 Trolox 对照品溶液 20 μL，置于 5 mL 棕色量瓶中，加入 ABTS 工作液 3 mL，摇匀，避光反应 4 min，在 734 nm 的波长下测定吸光度为 A_a，计算 ABTS 自由基清除率，以 Trolox 对照品溶液的浓度（mmol • L^{-1}）为横坐标，清除率为纵坐标，绘制标准曲线。

ABTS 清除率（%）$=[1-(A_b-A_a)/A_c]\times 100\%$

式中：A_b 为 70% 甲醇空白组的吸光度；A_c 为 ABTS 工作液对照组的吸光度。

2.4.2　供试品溶液的测定　将“2.1.1”项下供试品溶液稀释 10 倍，精密吸取 20 μL，按“2.4.1”项下方法测定吸光度 A_a，平行测定 3 次，取平均值，计算 ABTS 自由基清除率。根据标准曲线结合稀释程度计算 TEAC 值。TEAC 值是指在对 ABTS 自由基相同的清除率情况下，样品所对应的 Trolox 浓度。

3　结果

3.1　总黄酮含量测定结果

按“2.2.1”项下方法绘制标准曲线，得到线性回归方程为 $Y=31.50X-0.01$（$r^2=0.9995$），线性范围为 0.0069 ～ 0.0259 mg • mL^{-1}。按“2.2.2”项下方法对 22 个毛白杨花蕾样品进行总黄酮含量的测定，结果见表 1。

表 1　毛白杨花蕾的总黄酮含量的测定结果（$n=3$）

Tab 1　Total flavonoid content of flower buds of *Populus tomentosa* ($n=3$)

编号	总黄酮质量分数 /（mg • g^{-1}）	编号	总黄酮质量分数 /（mg • g^{-1}）
F1	25.95±0.00	M1	31.99±0.00
F2	25.70±0.00	M2	30.81±0.00
F3	26.07±0.00	M3	29.82±0.00
F4	25.24±0.01	M4	32.55±0.01
F5	24.17±0.00	M5	30.86±0.01
F6	25.06±0.00	M6	36.25±0.00
F7	24.30±0.01	M7	31.69±0.00
F8	27.56±0.01	M8	25.54±0.01
F9	25.75±0.01	M9	26.60±0.01
F10	25.75±0.01	M10	30.10±0.00
F11	26.00±0.00	M11	28.08±0.01

3.2　DPPH 自由基清除法

按“2.3.1”项下方法绘制标准曲线，得到线性回归方程为 $Y = 1.187\times10^4X + 2.53$（$r^2 = 0.9990$），线性范围为 0.0081 ～ 0.0049 mg•mL^{-1}。按“2.3.2”项下方法对 22 个毛白杨花蕾样品的 DPPH 自由基清除能力进行测定，其 TEAC 值结果见表 2。

3.3　ABTS 自由基清除法

按“2.4.1”项下方法绘制标准曲线，得到线性回归方程为 $Y = 105.25X + 1.22$（$r^2 = 0.9998$），线性范围为 0.0480 ～ 0.6320 mg•mL^{-1}。按“2.4.2”项下方法对 22 个毛白杨花蕾样品的 ABTS 自由基清除能力进行测定，TEAC 值结果见表 2。

表 2　毛白杨花蕾的体外抗氧化活性 ($n = 3$)

Tab 2　In vitro antioxidant activity of flower buds of *Populus tomentosa* ($n = 3$)

编号	DPPH 法（TEAC 值）/（mmol • L^{-1}）	ABTS 法（TEAC 值）/（mmol • L^{-1}）
F1	15.62±1.65	19.35±0.23
F2	16.20±1.04	19.51±0.26
F3	16.35±1.17	19.08±0.41
F4	19.90±1.74	20.24±0.38
F5	15.62±0.58	20.21±0.44
F6	21.91±1.04	20.37±0.48
F7	21.25±1.20	19.92±0.47
F8	24.22±1.43	21.61±0.38
F9	22.76±0.87	19.11±0.23
F10	23.14±0.94	20.35±0.36
F11	22.91±1.54	19.86±0.44
M1	28.81±1.41	26.34±0.33
M2	20.33±1.43	24.01±0.18
M3	20.13±1.81	23.75±0.09
M4	21.94±1.51	22.91±0.32
M5	22.49±1.20	23.90±0.21
M6	29.03±0.61	25.59±0.28
M7	25.60±0.89	24.24±0.29
M8	24.74±0.99	20.90±0.38
M9	21.35±0.83	21.52±0.38
M10	24.42±1.12	22.09±0.43
M11	24.19±1.03	22.56±0.41

3.4　总黄酮含量的统计学分析

运用 IBM SPSS Statistics 25 对毛白杨花蕾的总黄酮含量进行统计学分析，结果呈明显的正态分布（$P > 0.05$）；对其进行独立样本 t 检验，结果显示雌雄花蕾之间的总黄酮含量差异具有统计学意义（$P < 0.05$）。其中雌花蕾的总黄酮含量为 24.30 ～ 27.56 mg • g^{-1}，雄花蕾的总黄酮含量为 25.54 ～ 32.55 mg • g^{-1}。雌雄花蕾之间的结果比较显示，雄花蕾中的总黄酮含量高于雌花蕾，说明毛白杨的总黄酮含量与性别有关。

3.5　体外抗氧化活性的统计学分析

运用 IBM SPSS Statistics 25 分别对毛白杨雌雄花蕾的 TEAC 值（DPPH 法和 ABTS 法）进行统计学分析，结果认为均呈明显的正态分布（$P > 0.05$）；对 DPPH 法和 ABTS 法各自的 TEAC 值分别进行独立样本 t 检验，结果显示这两种方法的 TEAC 值在雌雄花蕾之间差异均具有统计学意义（$P < 0.05$）。其中 DPPH 法毛白杨雌、雄花蕾的 TEAC 值分别为 15.62 ～ 24.22 mmol • L^{-1} 和 20.13 ～ 29.03 mmol • L^{-1}；ABTS 法毛白杨雌、雄花蕾的 TEAC 值分别为 19.08 ～ 21.61 mmol • L^{-1} 和 20.90 ～ 26.34 mmol • L^{-1}。雌雄差异之间的结果比较显示，雄花蕾的 TEAC 值（DPPH 法和 ABTS 法）均大于雌花蕾。TEAC 值越大，对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除能力越强，抗氧化能力越强，即雄花蕾的抗氧化活性高于雌花蕾。

3.6　毛白杨花蕾总黄酮含量与其抗氧化活性的相关性分析

运用 IBM SPSS Statistics 25 软件，将 22 个毛白杨花蕾的总黄酮含量与其对应的 DPPH 法和 ABTS 法所测定的 TEAC 值分别进行相关性分析，结果见表 3。两种活性方法测定的 TEAC 值均与总黄酮含量成正相关，说明毛白杨花蕾的抗氧化活性与其总黄酮含量成正相关。

表 3　毛白杨花蕾总黄酮含量与其抗氧化活性的相关性

Tab 3　Correlation between total flavonoid content and antioxidant activity of flower buds of *Populus tomentosa*

项目	总黄酮含量	DPPH 法（TEAC 值）	ABTS 法（TEAC 值）
总黄酮含量	1		
DPPH 法（TEAC 值）	0.605**	1	
ABTS 法（TEAC 值）	0.896**	0.665**	1

注（Note）：$^{**}P < 0.01$，相关性显著（$^{**}P < 0.01$，significant correlation）。

4　讨论

本研究通过亚硝酸钠 - 硝酸铝显色法测定了毛白杨雌雄花蕾的总黄酮含量，结果显示雌花蕾的总黄酮平均含量为 25.60 mg • g^{-1}，雄花蕾的为 30.39 mg • g^{-1}，两者差异有统计学意义，雄花蕾的黄酮含量高于雌花蕾。黄酮类成分多具有抗氧化、抗菌、抗炎等活性[25]，这可能是选择雄花序入药的理由之一。此外，通过 DPPH 和

ABTS 自由基清除法评价和比较毛白杨雌雄花蕾的体外抗氧化活性，认为雌雄花蕾均具有一定的抗氧化活性，雌花蕾的平均 TEAC 值（DPPH 法和 ABTS 法）分别为 19.99 mmol • L^{-1} 和 19.97 mmol • L^{-1}，雄花蕾的平均 TEAC 值（DPPH 法和 ABTS 法）分别为 23.91 mmol • L^{-1} 和 23.44 mmol • L^{-1}，雌雄花蕾的比较差异均具有统计学意义，雄花蕾两种方法的 TEAC 值均高于雌花蕾，表明雄花蕾的抗氧化活性高于雌花蕾。两种方法测得的毛白杨花蕾的体外抗氧化活性均与其总黄酮含量成正相关，表明黄酮类成分可能是杨树花的重要有效成分。

与毛白杨一样来源于雌雄异株植物的中药还有杜仲、天花粉、桑叶等，毛白杨的花蕾入药是有明确的性别限制，但是，其他品种在实际的中医临床应用中并未进行性别的区别和限制。毛白杨花蕾的抗氧化活性与雌雄有关，其他品种的中药是否也存在性别间活性大小的差异，临床上是否需要进行性别的区分，本研究的结果给出了一个新的启发。雌雄异株植物在外观性状上是存在一定差异的，开展化学成分含量、药效活性以及临床效果的差异的研究，不仅将揭示雌雄异株植物的性别本质，还将有可能在提高中医药的临床疗效提供新的思考角度。

参考文献

[1] 中国药典 1977 年版 . 一部 [S]. 1977：287.

[2] 南京中医药大学 . 中药大辞典（上册）[M]. 2 版 . 上海：上海科学技术出版社，2006：607.

[3] 杨秀珍 . “杨树花”治疗急性菌痢 78 例报告 [J]. 内蒙古中医药，1988，7（2）：10.

[4] 智良，王文定，智忠 . 毛白杨树叶治疗骨与软组织损伤感染 [J]. 现代中西医结合杂志，1998，7（10）：1645-1646.

[5] 马景梅 . 杨树花治疗羔羊痢疾的诊疗效果 [J]. 今日畜牧兽医，2014，30（11）：58.

[6] 宋维彪，郭俊梅 . 自制止痢三联液治疗犊牛腹泻 936 例 [J]. 当代畜牧，2016，34（35）：77.

[7] 郑秋明 . 仔猪腹泻的防治体会 [J]. 浙江畜牧兽医，2020，45（6）：39.

[8] 刘海萍，巢志茂，吴晓毅，等 . 毛白杨化学成分研究 [J]. 中国中药杂志，2012，37（10）：1422-1425.

[9] 侯勇，张广杰，崔慧敏，等 . 毛白杨雄花序的化学成分研究 [J]. 国际药学研究杂志，2017，44（12）：1131-1136.

[10] Xu L，Liu H，Ma Y，et al. Isomeric phenolic glycosides from *Populus tomentosa* [J]. Rec Nat Prod，2018，13（2）：97-103.

[11] Xu Q，Shen Z，Wang Y，et al. Anti-diarrhoeal and anti-microbial activity of *Flos populi*（male inflorescence of *Populus tomentosa* Carrière）aqueous extracts [J]. J Ethnopharmacol，2013，148（2）：640-646.

[12] Xu Q，Wang Y，Guo S，et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of *Flos populi* [J]. J Ethnopharmacol，2014，152（3）：540-545.

[13] Ni H，Muhammad I，Li J，et al. In vitro and in vivo antioxidant activities of the flavonoid-rich extract from *Flos populus* [J]. Pak J Pharm Sci，2019，32（6）：2553-2560.

[14] 翟飞飞，孙振元 . 木本植物雌雄株生物学差异研究进展 [J]. 林业科学，2015，51（10）：110-116.

[15] 刘海萍，巢志茂，谭志高，等 . 雌雄异株药用植物的物质基础分析及其研究技术 [J]. 中国中医药信息杂志，2012，19（4）：104-107.

[16] Wu C，Xu B，Li Z，et al. Gender discrimination of *Populus tomentosa* barks by HPLC fingerprint combined with multivariate statistics [J]. Plant Direct，2021，5（3）：e00311.

[17] Xu L，Liu H，Ma Y，et al. Comparative study of volatile components from male and female flower buds of *Populus*×*tomentosa* by HS-SPME-GC-MS [J]. Nat Prod Res，2019，33（14）：2105-2108.

[18] Xu B，Wu C，Li Z，et al. ^{1}H NMR combined with multivariate statistics for discrimination of female and male flower buds of *Populus tomentosa* [J]. Molecules，2021，26（21）：6458.

[19] Dewanto V，Wu X，Adom KK，et al. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity [J]. J Agric Food Chem，2002，50（10）：3010-3014.

[20] 彭亮，胡本祥，张琳，等 . 太白米总黄酮超声提取工艺优化及其抗氧化活性研究 [J]. 中南药学，2018，16（12）：1693-1697.

[21] 邹晓红，曹骋，曾元儿，等 . 不同产地砂仁总酚测定及抗氧化活性比较 [J]. 中国现代中药，2018，20（7）：811-815.

[22] 阮凯华，唐志书，刘红波，等 . 不同产地酸枣果肉的品质评价研究 [J]. 中南药学，2021，19（5）：896-901.

[23] 周福佳，李恩超，陈伟，等 . 金丝梅石油醚超声提取物 GC-MS 分析及其体外抗氧化作用 [J]. 中国现代应用药学，2020，37（1）：30-34.

[24] Yagi S，Drouart N，Bourgaud F，et al. Antioxidant and antiglycation properties of *Hydnora johannis* roots [J]. S Afr J Bot，2013，84：124-127.

[25] Wang TY，Li Q，Bi KS. Bioactive flavonoids in medicinal plants：structure，activity and biological fate [J]. Asian J Pharm Sci，2018，13（1）：12-23.

（收稿日期：2022-02-23；修回日期：2022-03-16）

基于网络药理学的山豆根保肝作用药效物质筛选及实验验证

秦妍[1]，包永睿[1, 2]，王帅[1, 2]，李天娇[1, 2]，张秀君[3]，孟宪生[1, 2*]（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. 丹东药业集团有限公司，辽宁　丹东　118303）

摘要：目的　采用网络药理学方法探讨山豆根治疗肝病的药效物质，并进行初步验证。**方法**　检索中药系统药理学数据库以及 TCMSP 分析平台，筛选山豆根中的化学成分。通过 GeneCards、OMIM、PharmGkb 以及 DrugBank 数据库获取肝病相关疾病靶点，运用 Cytoscape 3.8.2 软件进行网络构建；并基于微流控芯片及酶联免疫吸附法对预测的药效成分展开验证。**结果**　山豆根与肝病的靶点取交集后共获得 170 个共同靶点，其中槲皮素富集的靶点最多。验证结果显示，槲皮素、山柰酚、异鼠李素对 L-02 肝损伤模型、HSC-T6、HepG-2 细胞的侵袭作用明显，可使 TNF-α 和 IL-6 分泌显著降低（$P < 0.05$）。**结论**　基于网络药理学方法实现山豆根药效物质的筛选及预测，为山豆根治疗肝病的科学解释提供实验数据。

关键词：山豆根；信号通路；网络药理学；保肝；酶联免疫吸附法

中图分类号：R285.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)05-1039-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.013

Screening and validation of hepatoprotective substances of Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma based on network pharmacology

QIN Yan[1], BAO Yong-rui[1, 2], WANG Shuai[1, 2], LI Tian-jiao[1, 2], ZHANG Xiu-jun[3], MENG Xian-sheng[1, 2*] (1. *College of Traditional Chinese Medicine*, *Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, *Dalian Liaoning* 116600; 2. *Liaoning Innovation Technology Center for Multidimensional Analysis of Traditional Chinese Medicine*, *Liaoning Research Engineering Laboratory of Modern Traditional Chinese Medicine*, *Dalian Liaoning* 116600; 3. *Dandong Pharmaceutical Group Co.*, *Ltd*, *Dandong Liaoning* 118303)

Abstract: Objective　To determine the pharmacodynamic substances of Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma for liver diseases based on network pharmacology, and to verify by experiments preliminarily. **Methods**　The pharmacological database of traditional Chinese medicine system and TCMSP platform were retrieved to screen the chemical components in Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma. The targets of liver diseases were obtained through GeneCards, OMIM, PharmGkb and DrugBank databases, and the network was constructed by Cytoscape 3.8.2 software. The predicted pharmacodynamic components were verified by microfluidic chip and enzyme linked immunosorbent assay. **Results**　Totally 170 common targets were obtained after the intersection of Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma and liver disease, of which quercetin enriched the most targets. Quercetin, kaempferol and isorhamnetin had obvious invasion on L-02 liver injury model, HSC-T6 and HepG-2 cells. TNF-α and IL-6 secretion were decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion**　Based on the network pharmacology, pharmacodynamic substances of Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma are screened and predicted to provide experimental data for the scientific interpretation of

基金项目：民族创新联合基金项目（No. 2020-MZLH-35）。

作者简介：秦妍，女，在读硕士研究生，主要从事药物分析研究，email：1840956602@qq.com　*通信作者：孟宪生，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药药效物质组学及作用机制整合研究，email：mxsvvv@126.com

mountain bean root in the treatment of liver disease.

Key words: Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma; signal path; network pharmacology; liver protection; enzyme linked immunosorbent assay

肝病一直以来都是全球面临的公共问题和社会问题，包括脂肪性肝病、药物性肝病、自身免疫性肝病、病毒性肝炎、肝硬化、肝癌等[1]。目前，世界卫生组织统计数据表明[2]，全球约有 2.4 亿慢性乙肝病毒携带者和 1.5 亿慢性丙肝病毒感染者。其中，慢性乙型肝炎患者中有 10% ～ 20% 进展为肝硬化；2020 年，全球肝癌发病人数高达 90.5677 万人，因肝癌死亡人数为 83.0180 万人。肝病发病原因众多，氧化应激毒性、胆汁酸异常代谢、噬肝性病毒、miRNA 调控可能是造成肝脏疾病主要危险因素[3]。除此之外，酒精、肥胖、遗传因素、饮食状况等也与肝病的发生发展有关。目前，临床上治疗肝病的抗病毒药物层出不穷，其机制主要为抑制病毒的复制。但对于肝硬化、原发性肝癌患者，更多的治疗手段也难以控制疾病的进程，因此迫切需要寻找毒副作用低、安全有效的治疗药物。

山豆根为豆科植物越南槐 *Sophora tonkinensis* Gagnep. 的干燥根和根茎，始载于《开宝本草》，《植物名实图考》中记载，山豆根解毒功热甚效，与临床消热解毒的效用一致[4]。山豆根具有多种不同生物活性成分，包括生物碱类、黄酮类、多糖类、酶、核苷酸和微生物等。山豆根具有广泛的药理作用，如抗肿瘤、保肝、抗病毒、抗氧化、免疫调节、抗炎、改善心血管系统等[5-9]。体内外试验研究表明，山豆根及其主要活性成分在治疗肝癌、抑制新生血管生成、保护肝损伤方面发挥着重要作用。本实验采用微流控芯片技术始终保持给药持续性，更加接近人体真实环境。静态培养易出现药物蓄积等情况，而微流控芯片采用低剪切力灌注不会因药物蓄积而影响药物释放，因而也避免了因侵袭作用结果不准确的问题。酶联免疫吸附法将抗原抗体亲和反应的高度特异性与酶催化反应的放大作用相结合，在本实验中通过颜色反应来进行定量分析，操作简单方便、灵敏度高、检测结果相对可靠。

本实验室前期研究发现，从山豆根中提取的山豆根生物碱能不同程度地减少肝组织中 VEGF、PI3K mRNA 的表达，增加 PTEN mRNA 的表达，其作用机制与环磷酰胺相似[10]。然而由于山豆根活性成分的多样和结构复杂，难以获得山豆根保肝作用的药效物质基础。因此本研究首先通过中药网络药理学，预测山豆根抗肝炎、肝硬化、肝癌的潜在药效物质。进一步采用微流控芯片技术进行验证，以期为山豆根保肝作用的相关靶点及机制阐述提供理论依据。

1 材料

1.1 试药

槲皮素（批号：100081-201509，中国食品药品检定研究院）；山柰酚（批号：JOT-10193）、异鼠李素（批号：JOT-10450）（成都普菲德生物技术有限公司）；脂多糖（批号：HY-D1056，Sigma 公司）。0.1% 结晶紫染色液（北京索莱宝科技有限公司）；冰醋酸（批号：20181123，分析纯，天津科密欧有限公司）；Corning Matrigel 基质胶（批号：6235004，美国 Gibco 有限公司）；胎牛血清（批号：S0901A，美仑生物技术有限公司）；肿瘤坏死因子（TNF-α）酶联免疫吸附测定 ELISA 试剂盒（批号：KE00068，Proteintech 公司）；白介素 -6（IL-6）酶联免疫吸附测定 ELISA 试剂盒（批号：E-EL-R0015c，武汉伊莱瑞特生物科技有限公司）。

1.2 细胞株

人正常肝细胞（L-02）、小鼠肝星形细胞（HSC-T6）、人肝癌细胞（HepG-2）[赛百慷（上海）生物技术股份有限公司]。

1.3 仪器

SUNRISE 酶标仪（瑞士 TECAN 公司）；NIKON ECLIPSE TI 荧光倒置显微镜（日本 Nikon 公司）；JKG-2A 型光刻机（上海学泽光学机械有限公司）；HPDC32G2 型等离子清洗机（美国 Harrick Plasma 公司）；KW-4A 型匀胶机（昆山力电精密机械有限公司）；LSP04-1A 精密注射泵（保定兰格公司）。

2 方法

2.1 药理学研究

2.1.1 山豆根有效化学成分与靶点的收集 在 TCMSP（http：//tcmspw.com/tcmsp.php）数据库中检索山豆根的有效化学成分及成分对应的靶点，筛选条件为口服利用度（oral bioavailabil-

ity，OB）≥ 30%，药物相似性（drug likeness，DL）≥ 0.18，根据筛选所得的山豆根活性成分获取所对应的靶标，利用 UniProt（https：//www.uniprot.org）数据库，限定物种为“Homo sapiens”，收集山豆根活性成分对应靶点的基因名。

2.1.2　疾病靶点的收集　利用 GeneCards（https：//www.genecards.org）数据库（相关性评分≥ 1.0）、DrugBank（https：//www.drugbank.com）数据库、TTD（http：//db.idrblab.net/ttd）数据库、OMIM（https：//omim.org）数据库、PharmGkb（https：//www.pharmgkb.org）数据库，以“cirrhosis”“chronic hepatitis”“liver cancer”作为检索词分别检索。合并去除重复基因后，收集相关的靶点。

2.1.3　山豆根“化学成分 - 靶点”网络的构建　将山豆根化学成分与靶点信息导入 Cytoscape 3.8.2 软件中，利用 R 语言获取山豆根和肝病的共同靶点，同时构建“山豆根 - 成分 - 靶点”网络。

2.2　*实验验证*

2.2.1　基于细胞侵袭特征的微流控芯片构建　采用 CorelDraw X7 矢量制图软件进行芯片设计，结合高分辨率打印机以胶印的方式输出至透明菲林片上制成掩膜。

2.2.2　脂多糖诱导 L-02 细胞损伤模型的制备　将细胞随机分为 0（空白对照组）、5、10、15、20、25 mg·L^{-1} 的脂多糖组，每孔 5 个复孔。待细胞基本完全贴壁后，加入不同质量浓度的脂多糖，于培养箱中培养 3、6、9、12、24、48 h，用 CCK-8 法检测各组细胞的存活情况，确定肝损伤模型。

2.2.3　体外侵袭药效学评价　根据实验设计，将基质胶与无血清的 DMEM 混匀后缓慢注入芯片上层通道内，待基质胶固化后将脂多糖处理的 L-02 肝损伤模型[11]、HSC-T6、HepG-2 分别接种于上层通道内，并在芯片下层通入含有 2%FBS 的 DMEM 培养液，待细胞稳定生长后，借助蠕动注射泵以 0.1 μL·min^{-1} 的速度对上层通道通入含药培养液，以 1 μL·h^{-1} 的速度对下层通入含有 10%FBS 的细胞培养液。

给药干预 24 h 后，分离两层通道层，取出微孔滤膜放置 12 孔板中，使用 0.1% 的结晶紫染色液对微孔滤膜进行浸泡染色 15 min；使用生理盐水洗掉多余染料后，置于培养箱内烘干；烘干后在各个孔内加入 1.5 mL 33% 的醋酸，置于摇床上进行脱色处理，10 min 后收集洗脱液，借助酶标仪在 570 nm 下读取 *OD* 值，以空白组的 *OD* 值为参照，计算相对侵袭率。相对侵袭率（%）=（$OD_{给药}/OD_{空白}$）×100%。

2.2.4　ELISA 法检测上清中 TNF-*α* 及 IL-6 水平　将处于对数生长期的 L-02、HSC-T6、HepG-2 细胞，以 5×10^5 个 / 孔接种于 6 孔板中，置于 37 ℃、5%CO_2 细胞培养箱中培养，待细胞生长至 70% ～ 80% 时，加入终浓度为 0、150、200、250 μmol·L^{-1} 的槲皮素、山柰酚、异鼠李素培养 24 h 后，收集各组细胞培养上清，严格按照试剂盒说明书操作，检测 TNF-*α* 和 IL-6 水平。

2.2.5　统计学处理　采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析，所有数据以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用单因素方差分析，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　*山豆根药理学研究结果*

3.1.1　山豆根活性成分收集结果　共得到山豆根的活性成分 21 个。去除无靶点的成分共得到山豆根活性成分 10 个，主要包括黄酮类化合物（如槲皮素、山柰酚）、生物碱类（如槐果碱、槐醇）、异黄酮类（如芒柄花素），以及酮类（如异鼠李素）。这些主要的活性有效成分均有不同程度的抗炎、抗肿瘤作用。

3.1.2　肝病潜在靶点的收集　GeneCard 数据库中检索到与肝炎、肝硬化、肝肿瘤关联基因 12 450 个，DrugBank 数据库中检索到 105 个，TTD 数据库中检索到 130 个，OMIM 数据库中检索到 167 个关联基因以及 PharmGkb 数据库中检索到 320 个相关基因，删除共有的基因，共得到 12 648 个疾病关联基因。

3.1.3　山豆根 - 活性成分网络构建　将收集的 174 个山豆根潜在靶点与肝癌的 12 646 个潜在靶点相匹配，得到山豆根和肝病的共同靶点（170 个），将山豆根药材与其所含有效活性成分及靶点相互对应，并运用 Cytoscape 3.8.2 软件构建相互关系，见图 1，其中槲皮素富集的靶点最多。

3.2　*细胞侵袭实验验证*

3.2.1　构建细胞侵袭特征的微流控芯片　本实验所用芯片设计为四层，呈现中心对称结构，设计图及实物图见图 2。该芯片从下至上依次是玻璃基底层、流体通道层 B、三层微孔滤膜层以及流体通道层 A，三层微孔滤膜结构单元通过静电吸附作用键合在一起，PDMS 层通过热键合处理，实现可逆封接，以便后续去除固定，并且每层都有独立的药液入口及废液口。

3.2.2　脂多糖处理的 L-02 肝损伤模型的建立　由

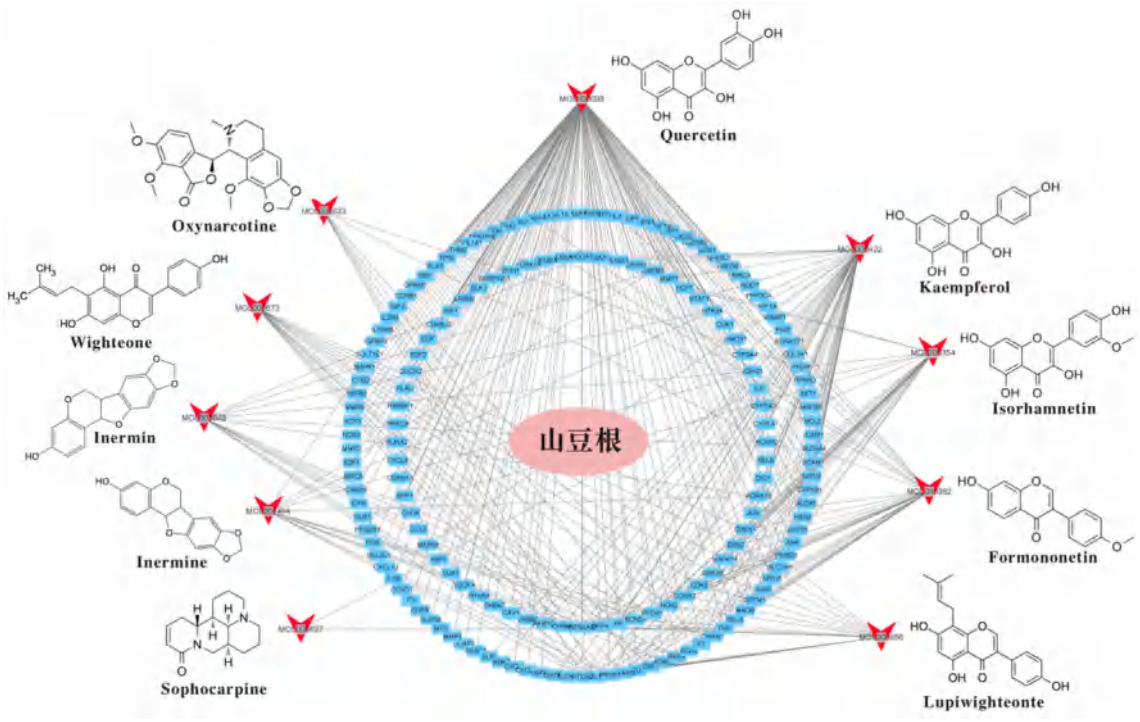


图 1 山豆根 - 活性成分网络构建

Fig 1 Network construction of active components in Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma

注（Note）：蓝色节点代表靶点，红色节点代表有靶点的活性成分（The blue node represents the target，and the red node represents the active component with the target）。

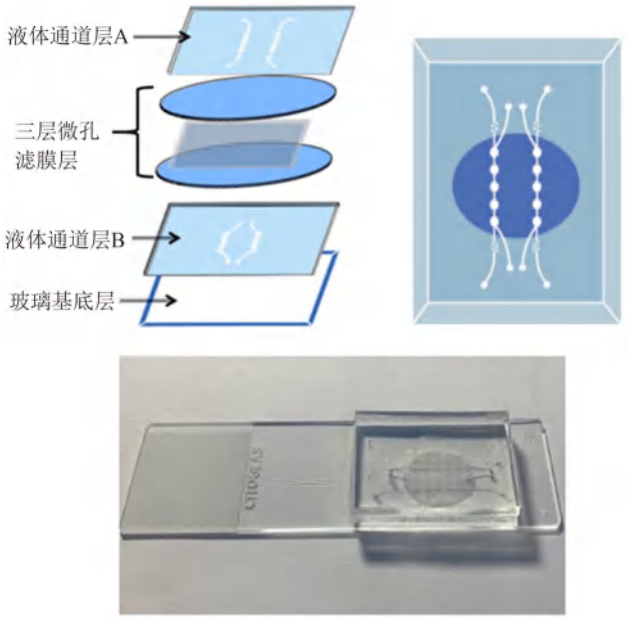


图 2 细胞侵袭特征微流控芯片设计图及实物图

Fig 2 Design drawing and physical drawing of microfluidic chip with cell invasion characteristics

图 3 可知，脂多糖对肝细胞活力的影响具有剂量依赖性；脂多糖作用 24 h，其存活率接近线性变化；但时间超过 24 h，各组细胞增殖活力均下降。15、20、25 mg • L^{-1} 脂多糖作用 12、24、48 h 条件下，除 15 mg • mL^{-1} 作用 12 h 细胞存活率降低不明显，各组均可明显降低肝细胞活力。质量浓度为 20 mg • L^{-1}，作用 24 h 时，其存活率为 50.66%，从存活曲线来看，选择接近线性变化的中间剂量 20 mg • L^{-1} 脂多糖，作用 24 h 作为致肝损伤造模剂量[12]。

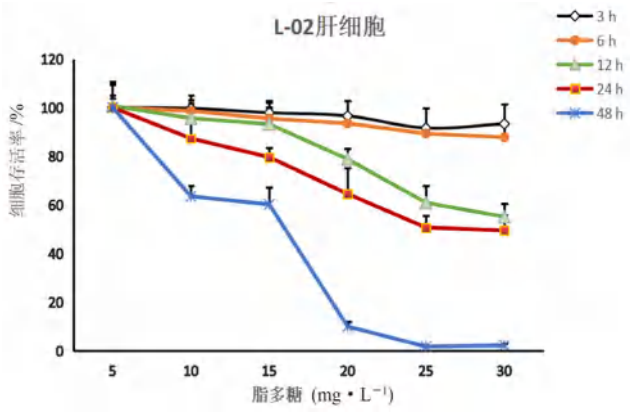


图 3 不同质量浓度脂多糖对各组肝细胞存活率的影响

Fig 3 Effect of different concentrations of lipopolysaccharide on the survival rate of hepatocytes in each group

3.2.3 细胞侵袭实验结果 不同质量浓度药效单体干预下的细胞侵袭活性结果见图 4。与空白对照组相比，3 种药效单体均能显著抑制细胞侵袭，呈剂量依赖性，特别是槲皮素（6 μg • mL^{-1}）和异鼠李素（6 μg • mL^{-1}）抑制 HepG-2 细胞侵袭作

用明显。

3.2.4 ELISA 实验结果　与空白对照组比较，细胞培养上清中 TNF-α 和 IL-6 水平有所降低，中、高浓度组最为明显，仅有槲皮素中浓度组对 HSC-T6 的 IL-6 的影响无统计学意义，另外槲皮素、山柰酚、异鼠李素（200、250 μmol·L^{-1}）组细胞培养上清中 TNF-α 和 IL-6 水平明显降低（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$），见表 1。

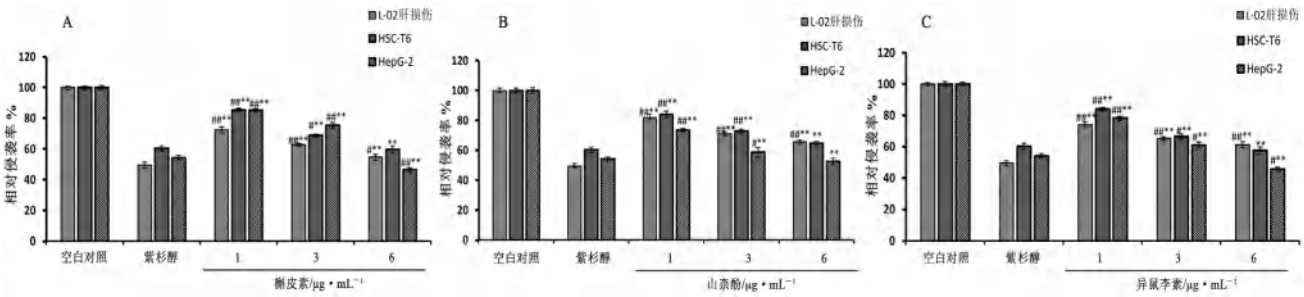


图 4　槲皮素（A）、山柰酚（B）、异鼠李素（C）对 L-02 肝损伤模型及 HSC-T6、HepG-2 细胞的相对侵袭率

Fig 4　Relative invasion rate of quercetin（A），kaempferol（B）and isorhamnetin（C）on L-02 liver injury model，HSC-T6 and HepG-2 cells

注：与空白对照组比较，$^{**}P < 0.01$；与阳性药比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note：Compared with the blank control group，$^{**}P < 0.01$；compared with the positive drug，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$.

表 1　L-02 肝损伤模型及 HSC-T6、HepG-2 细胞 ELISA 实验结果

Tab 1　ELISA of L-02 liver injury model，HSC-T6 and HepG-2 cell invasion

组别	剂量 /（μmol·L^{-1}）	L-02 肝损伤模型		HSC-T6		HepG-2	
		IL-6/（pg·mL^{-1}）	TNF-α/（pg·mL^{-1}）	IL-6/（pg·mL^{-1}）	TNF-α/（pg·mL^{-1}）	IL-6/（pg·mL^{-1}）	TNF-α/（pg·mL^{-1}）
空白对照组	0	271.66±8.84	156.33±8.27	261.25±6.34	176.60±6.33	284.02±6.92	185.78±7.17
槲皮素组	150	241.68±8.30*	129.87±4.79*	253.15±6.49	156.56±5.78*	255.87±5.67*	177.16±7.06
	200	211.67±6.52**	105.44±7.85**	245.07±9.82	124.17±5.10**	226.17±4.50**	158.56±6.19*
	250	195.64±5.80**	89.02±7.34**	236.08±5.89*	105.54±6.80**	205.26±5.68**	136.93±3.31**
山柰酚组	150	257.45±6.15	134.70±4.61*	256.78±7.87	167.56±6.39	238.35±7.32**	176.42±4.96
	200	223.32±3.60**	116.33±4.77**	239.13±5.99*	152.99±3.10**	209.82±4.94**	134.62±3.86**
	250	197.70±5.73**	106.21±6.84**	210.71±4.74**	143.99±4.26**	192.88±6.42**	123.87±4.11**
异鼠李素组	150	220.88±9.29**	140.96±3.72	219.33±3.96**	140.50±5.60**	273.95±4.00	141.51±7.90**
	200	198.16±8.53**	124.60±4.06**	192.41±3.64**	116.14±4.87**	256.88±5.65*	124.69±11.73**
	250	164.5±11.01**	110.23±7.51**	181.11±6.48**	96.56±6.04**	229.09±9.03**	102.26±8.50**

注（Note）：与空白对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$（Compared with the blank control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）。

4　讨论

肝脏疾病的治疗与预防一直以来都是公共卫生领域的热点问题，肝脏不仅参与代谢、消化，在维持机体平衡方面也具有至关重要的作用。“慢性肝炎 - 肝硬化 - 肝癌” 是公认的肝脏疾病三部曲，抑制疾病的发展进程将可能避免肝癌的发生。

本研究利用 “有效成分 - 靶点” 网络分析了山豆根药效物质，进一步明确化学成分与靶点之间的相互作用关系。其中，药理网络中排名前三位的化学成分依次为槲皮素、山柰酚、异鼠李素，均为黄酮类。槲皮素具有抗氧化、抗炎、免疫调节、抗细胞凋亡等多种药理作用 [13]。Lu 等 [14] 研究显示，槲皮素可通过调控 PI3K/Akt 信号通路，下调 MMP-2 和 MMP-9D 的表达，进而抑制重组质粒转染组 HC-CLM3 细胞的迁移和侵袭。Liu 等 [15] 研究发现槲皮素可显著降低血清转氨酶和总胆汁酸水平，减少促炎因子及 IL-6 的释放，通过降低氧化应激、减轻炎症，发挥对肝脏潜在的保护作用。山柰酚是多种植物性食品中一类主要膳食黄酮，日常食用富含山柰酚的食物能够降低肝癌、动脉粥样硬化的发病风险，通过抑制细胞凋亡、下调上皮 - 间质相关信号，调节 PI3K-PKB 信号通路而发挥作用 [16]。异鼠李素可以显著阻止四氯化碳（CCl_4）或胆管结扎诱导的肝纤维化，降低磷酸化 Smad 蛋白（Smad3）、减少细胞外基质（ECM）的形成及自噬、抑制转化生长因子 -β1（TGF-β1）和 p38 丝裂原活化蛋白激酶（p38MAPK）信号通路的传导，从而预防肝纤维化 [17]。

综上所述，本研究通过网络药理学揭示了山豆根的药效物质，其可通过调节多个靶点共同作用实现保肝护肝作用。结合微流控芯片技术及体

外 ELISA 实验，验证了网络药理学的预测结果，对于下一步分子机制研究具有重要的意义。

参考文献

[1] 余文豪，刘汶 . 药物性肝病研究进展 [J]. 中国中西医结合消化杂志，2020，28（5）：398-402.

[2] Ferlay J，Ervik M，Lam F，et al. Global Cancer Observatory：Cancer Today [EB/OL]. Lyon，France：International Agency for Research on Cancer. https：//gco. iarc. fr/today.（2020-12-01）[2021-09-12].

[3] 白庆云，陶思敏，田锦鸿，等 . 黄芩对肝病的防治作用及机制研究进展 [J]. 中国中药杂志，2020，45（12）：2808-2816.

[4] 清 • 吴其浚 . 植物名实图考 [M]. 北京：商务印书馆，1957：492-493.

[5] 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]. 中国实验方剂学杂志，2014，20（23）：190-193.

[6] 周明眉，范自全，赵爱华，等 . 山豆根非生物碱部位对免疫性肝损伤模型小鼠的影响 [J]. 时珍国医国药，2011，22（11）：2709-2710.

[7] 钟正贤，张颖，卢文杰，等 . 多叶越南槐和山豆根的药理作用比较 [J]. 云南中医中药杂志，2012，33（1）：58-60.

[8] 杜士明，周本宏，杨光义 . 山豆根水提物抗炎作用研究 [J]. 中国药房，2008，19（18）：1371-1372.

[9] 张明发，沈雅琴 . 氧化苦参碱抗心律失常作用及其机制的研究进展 [J]. 药物评价研究，2021，44（4）：900-908.

[10] 曹洛云，李天娇，孟宪生，等 . 山豆根生物碱对 DEN 诱发肝癌大鼠的作用及机制研究 [J]. 中国现代应用药学，2018，35（3）：370-374.

[11] 宋云飞 . 异丙酚抑制内质网应激减轻脂多糖诱导人肝细胞损伤的机制研究 [J]. 安徽医药，2021，25（3）：451-455.

[12] 陈云华 . 不同来源甘草的化学成分及其相关药效的研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2008.

[13] 姚建武 . 槲皮素影响肝肿瘤细胞 HepG2 代谢组的研究 [D]. 武汉：中国科学院研究生院（武汉物理与数学研究所），2012.

[14] Lu J，Wang Z，Li S，et al. Quercetin inhibits the migration and invasion of HCCLM3 cells by suppressing the expression of p-Akt1，matrix metalloproteinase（MMP）MMP-2，and MMP-9 [J]. Med Sci Monit，2018，24：2583-2589.

[15] Liu S，Tian L，Chai G，et al. Targeting heme oxygenase-1 by quercetin ameliorates alcohol-induced acute liver injury via inhibiting NLRP3 inflammasome activation [J]. Food Funct，2018，9（8）：4184-4193.

[16] 童方念，罗超，罗丹，等 . 山柰酚对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 西安交通大学学报（医学版），2014，35（6）：816-819.

[17] Hoang MH，Jia YY，Lee JH，et al. Kaempferol reduces hepatic triglyceride accumulation by inhibiting Akt [J]. J Food Biochem，2019，43（11）：e13034.

（收稿日期：2021-10-06；修回日期：2021-12-08）

华中五味子藤茎中苯丙素类化学成分研究

杨洁[1]，孙琛[1]，郭东艳[1]，刘银环[2*]（1. 陕西中医药大学药学院，陕西省中药基础与新药研究重点实验室，陕西 咸阳 712046；2. 咸阳市中心医院药剂科，陕西 咸阳 712000）

摘要：目的 研究华中五味子藤茎中的苯丙素类化学成分。**方法** 采用硅胶柱色谱，葡聚糖凝胶 LH-20 柱色谱以及半制备高效液相色谱等方法分离化学成分，MS 和 NMR 等数据鉴定化合物的结构。**结果** 从五味子藤茎中共分离鉴定了 9 个化合物，分别为肉桂酸（**1**），3，4，5-三甲氧基肉桂酸（**2**），erythro-7-methoxyguaiacylglycerol（**3**），3-（4-hydroxy-3-methoxy-phenyl）propan-1，2-diol（**4**），3- 羟基 -1-（3- 甲氧基 -4- 羟基 - 苯基）- 丙基 -1- 酮（**5**），对羟基苯丙醇（**6**），3- 甲氧基 -4- 羟基苯丙醇（**7**），1-（3-methoxy-4-hydroxy-phenyl）-propan-1，2-diol（**8**），C-veratroylglycol（**9**）。**结论** 化合物 **1** ～ **6** 为首次从该植物中分离鉴定。

关键词： 华中五味子；化学成分；苯丙素类化合物；肉桂酸

中图分类号： R284.1 **文献标识码：** A **文章编号：** 1672-2981(2022)05-1044-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.014

基金项目： 陕西省教育厅科学研究计划项目（No.17JK0205）；陕西省中医药管理局中医药科研课题（No.ZCMS008）.

作者简介： 杨洁，女，实验师，主要从事中药药效物质及制剂研究，email：275097575 @qq.com * **通信作者：** 刘银环，女，硕士，主管药师，主要从事药事管理研究，email：1224659725@qq.com

Phenylpropanoids from the stems of *Schisandra sphenanthera*

YANG Jie[1], SUN Chen[1], GUO Dong-yan[1], LIU Yin-huan[2*] (1. *School of Pharmacy*, *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Shaanxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Foundation and New Drug Research*, *Xianyang Shaanxi* 712046; 2. *Department of Pharmacy*, *Xianyang Central Hospital*, *Xianyang Shaanxi* 712000)

Abstract: Objective To determine the phenylpropanoids in the stems of *Schisandra sphenanthera*. **Methods** The chemical constituents were studied by chromatography on silica gel, Sephadex LH-20 and semi-preparative HPLC. The structures were elucidated on the basis of spectroscopic methods, including MS and NMR spectral techniques. **Results** Nine phenylpropanoids were obtained from the stems of *Schisandra sphenanthera* and identified as cinnamic acid (**1**), 3, 4, 5-trimethoxy-cinnammic acid (**2**), erythro-7-methoxyguaiacylglycerol (**3**), 3- (4-hydroxy-3-methoxy-phenyl) propan-1, 2-diol (**4**), *β*-hydroxypropiovanillone (**5**), *p*-hydroxyl-benzyl-propanol (**6**), 3-hydroxy-1-(4-hydroxy-phenyl) propan-1-one (**7**), 1- (3-methoxy-4-hydroxy-phenyl)-propan-1, 2-diol (**8**) and C-veratroylglycol (**9**). **Conclusion** Compounds **1** － **6** have been isolated from this plant for the first time.

Key words: *Schisandra sphenanthera*; chemical constituent; phenylpropanoid; cinnammic acid

华中五味子（*Schisandra sphenanthera*）为五味子科（Schisandraceae）五味子属（*Schisandra*）多年生落叶木质藤本[1]，又称“南五味子”。文献报道其主要化学成分为苯丙素、三萜和黄酮等[2-4]，具有保肝、抗炎和抗肿瘤等多种药理作用[5-7]。目前关于华中五味子的化学成分研究多集中于果实和根皮，而关于其藤茎的化学成分研究鲜有报道[3-5]，为进一步明确华中五味子藤茎的化学成分，本文对其 80% 乙醇提取物进行了系统分离纯化，从中共鉴定了 9 个简单的苯丙素类化合物（结构见图 1），分别为肉桂酸（**1**），3，4，5- 三甲氧基肉桂酸（**2**），erythro-7-methoxyguaiacylglycerol（**3**），3-（4-hydroxy-3-methoxy-phenyl）propan-1，2-diol（**4**），3- 羟基 -1-（3- 甲氧基 -4- 羟基 - 苯基）- 丙基 -1- 酮（**5**），对羟基苯丙醇（**6**），3- 甲氧基 -4- 羟基苯丙醇（**7**），1-（3-methoxy-4-hydroxy-phenyl）-propan-1，2-diol（**8**），C-veratroylglycol（**9**），其中，化合物 **1** ～ **6** 为首次从该植物中分离鉴定。

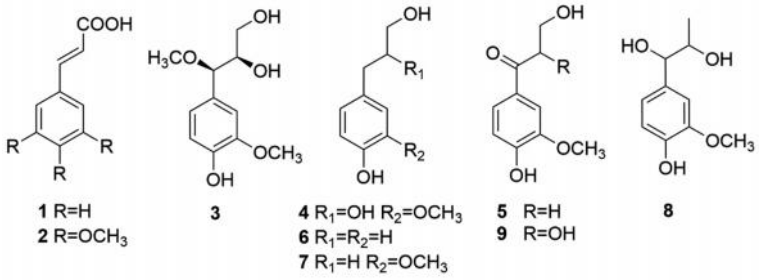


图 1　化合物 **1** ～ **9** 的化学结构图

Fig 1　Chemical structures of compounds **1** ～ **9**

1　材料

Bruker-AVANCE400 型核磁共振仪（布鲁克公司，400 MHz）；HH-4 型数显恒温水浴锅（江苏省金坛市环宇科学仪器厂）；BT125D 型赛多利斯电子分析天平（上海皖衡电子仪器有限公司，精密度 0.01 mg）；Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶（Pharmacia 公司）；GF_{254} 薄层色谱硅胶、柱色谱用硅胶（青岛海洋化工厂）；色谱甲醇和色谱乙腈（科密欧化学试剂有限公司）；甲醇、二氯甲烷、石油醚、乙酸乙酯等均为分析纯（天津市天力化学试剂有限公司），水为实验室自制超纯水。

华中五味子的藤茎于 2019 年 8 月购于陕西省眉县天源中草药开发有限公司，经陕西中医药大学药学院杨洁实验师鉴定为五味子科 Schisandraceae 五味子属 *Schisandra* 华中五味子 *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils 的藤茎，标本（No. SS2019-2）保存于陕西中医药大学药学院中药标本馆。

2 提取分离

称取干燥的华中五味子藤茎 8.6 kg，粉碎后经 80% 的乙醇回流提取 3 次，每次 2 h。减压回收乙醇至浸膏，分散于水中，分别用石油醚和乙酸乙酯萃取 3 次，得石油醚部位 103.4 g，乙酸乙酯部位 269.1 g。取乙酸乙酯部位 260 g，经硅胶柱色谱，以二氯甲烷 - 甲醇 100∶0、80∶1、60∶1、40∶1、20∶1、10∶1、5∶1、3∶1 和 1∶1 梯度洗脱，TLC 检测，合并相同流分，得到组分 F1 ～ F10。F3（14.2 g）经葡聚糖凝胶柱色谱，二氯甲烷∶甲醇＝ 1∶1 洗脱，得到化合物 **1**（30.4 mg）。F4（10.3 g）经葡聚糖凝胶柱色谱，二氯甲烷∶甲醇＝ 1∶1 洗脱，TLC 检测，合并相同流分，得到 F4-1 ～ F4-4；F4-2 经葡聚糖凝胶柱色谱，二氯甲烷∶甲醇＝ 1∶1 洗脱，得到化合物 **2**（8.0 mg）；F4-3（0.6 g）经半制备 HPLC，乙腈∶水＝ 38∶62 洗脱，流速 2 mL • min^{-1}，得到化合物 **6**（12.6 mg，t_R ＝ 22.2 min）和化合物 **7**（17.1 mg，t_R ＝ 25.7 min）。F5（22.5 g）经硅胶柱色谱，以二氯甲烷 - 甲醇 100∶0 ～ 5∶1 梯度洗脱，TLC 检测，合并相同流分，得到 F5-1 ～ F5-8；F5-2（0.9 g）经半制备液相色谱，乙腈∶水＝ 30∶70 洗脱，流速 2 mL • min^{-1}，得到化合物 **4**（12.4 mg，t_R ＝ 28.5 min）和化合物 **5**（8.3 mg，t_R ＝ 19.9 min）；F5-3（0.4 g）经半制备液相色谱，甲醇∶水＝ 35∶65 洗脱，流速 1.5 mL • min^{-1} 得到化合物 **8**（16.9 mg，t_R ＝ 30.5 min）；F5-5（0.8 g）经半制备液相色谱，乙腈∶水＝ 25∶75 洗脱，流速 2 mL • min^{-1}，得到化合物 **3**（6.9 mg，t_R ＝ 41.1 min）和化合物 **9**（13.7 mg，t_R ＝ 30.7 min）。

3 结构鉴定

化合物 **1**：白色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z* 149 $[M + H]^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ_H：7.61 ～ 7.34（5H，overlap，H-Ar），6.48（1H，d，J ＝ 15.9 Hz，H-α），7.67（1H，d，J ＝ 15.9 Hz，H-β）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ_C：170.4（-COOH），146.1（C-1），129.0（C-2，C-6），129.8（C-3，C-5），135.8（C-4），119.5（C-α），131.1（C-β）。化合物 **1** 鉴定为肉桂酸 [8]。

化合物 **2**：白色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z* 237 $[M - H]^-$。^{1}H-NMR（CD_3OD，400 MHz）δ_H：6.90（2H，s，H-2，6），7.58（1H，d，J ＝ 15.8 Hz，H-7），6.37（1H，d，J ＝ 15.8 Hz，H-8），3.87（6H，s，3，5-OCH_3），3.78（3H，s，4-OCH_3）；^{13}C-NMR（CD_3OD，100 MHz）δ_C：126.4（C-1），107.0（C-2，6），149.8（C-3，5），140.1（C-4），147.2（C-7），115.7（C-8），169.9（C-9），52.1（3，5-OCH_3），57.1（4-OCH_3）。化合物 **2** 鉴定为 3，4，5- 三甲氧基肉桂酸 [9]。

化合物 **3**：白色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z* 229 $[M + H]^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ_H：6.80（1H，d，J ＝ 7.9 Hz，H-2），6.74（1H，dd，J ＝ 7.9，1.8 Hz，H-5），6.90（1H，d，J ＝ 1.8 Hz，H-6），4.07（1H，d，J ＝ 6.7 Hz，H-7），3.65（1H，dd，J ＝ 6.7，3.8 Hz，H-8），3.40（1H，dd，J ＝ 11.3，3.8 Hz，H-9a），3.32（1H，m，H-9b），3.86（3H，s，3-OCH_3），3.20（3H，s，7-OCH_3）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：131.4（C-1），111.7（C-2），149.0（C-3），147.4（C-4），116.1（C-5），121.5（C-6），77.0（C-7），85.5（C-8），63.8（C-9），56.7（3-OCH_3），56.2（7-OCH_3）。化合物 **3** 鉴定为 erythro-7-methoxyguaiacylglycerol[10]。

化合物 **4**：白色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z* 199 $[M + H]^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：6.80（1H，d，J ＝ 1.8 Hz，H-2），6.71（1H，d，J ＝ 8.0 Hz，H-5），6.64（1H，dd，J ＝ 8.0，1.8 Hz，H-6），2.72（1H，dd，J ＝ 13.8，5.8 Hz，H-7a），2.56（1H，dd，J ＝ 13.8，7.4 Hz，H-7b），3.75（1H，m，H-8），3.47（1H，dd，J ＝ 11.1，4.5 Hz，H-9a），3.42（1H，dd，J ＝ 11.1，6.3 Hz，H-9b），3.82（3H，s，3-OCH_3）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：131.2（C-1），114.0（C-2），148.7（C-3），146.2（C-4），116.0（C-5），122.6（C-6），40.4（C-7），74.6（C-8），66.4（C-9），56.2（3-OCH_3）。化合物 **4** 鉴定为 3-（4-hydroxy-3-methoxy-phenyl）propan-1，2-diol[11]。

化合物 **5**：白色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z* 195 $[M - H]^-$。^{1}H-NMR（DMSO-d_6，400 MHz）δ_H：3.80（1H，t，J ＝ 6.2 Hz，H-2a），3.04（1H，t，J ＝ 6.2 Hz，H-2b），3.72（2H，t，J ＝ 6.2 Hz，H-3），7.43（1H，d，J ＝ 1.8 Hz，H-2'），6.85（1H，d，J ＝ 8.0 Hz，H-5'），7.50（1H，dd，J ＝ 8.0，1.8 Hz，H-6'），3.81（3H，s，OCH_3）；^{13}C-NMR（DMSO-d_6，100 MHz）δ_C：197.2（C-1），40.8（C-2），57.1（C-3），128.8（C-1'），110.9（C-2'），147.4（C-3'），151.4（C-4'），114.8（C-5'），123.0（C-6'），55.5（3'-OCH_3）。化合物 **5** 为 3- 羟基 -1-（3- 甲氧基 -4- 羟基 - 苯基）- 丙基 -1- 酮 [12]。

化合物 **6**：白色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z* 151 $[M-H]^-$。^{1}H-NMR（DMSO-d_6，400 MHz）δ_H：6.93（2H，d，J = 8.2 Hz，H-2，6），6.63（2H，d，J = 8.2 Hz，H-3，5），2.46（2H，t，J = 6.5 Hz，H-7），1.64（2H，m，H-8），3.38（2H，t，J = 6.5 Hz，H-9）；^{13}C-NMR（DMSO-d_6，100 MHz）δ_C：132.1（C-1），129.0（C-2，6），115.1（C-3，5），155.1（C-4），30.7（C-7），34.6（C-8），60.0（C-9）。化合物 **6** 为对羟基苯丙醇[13]。

化合物 **7**：白色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z* 183 $[M+H]^+$。^{1}H-NMR（DMSO-d_6，400 MHz）δ_H：6.73（1H，d，J = 1.9 Hz，H-2），6.66（1H，d，J = 7.8 Hz，H-5），6.58（1H，dd，J = 7.8，1.9 Hz，H-6），2.51（2H，t，J = 7.1 Hz，H-7），1.66（2H，m，H-8），3.40（2H，t，J = 6.6 Hz，H-9），3.75（3H，s，3-OCH_3）；^{13}C-NMR（DMSO-d_6，100 MHz）δ_C：133.0（C-1），112.5（C-2），147.4（C-3），144.4（C-4），115.3（C-5），120.3（C-6），31.3（C-7），34.7（C-8），60.2（C-9），55.5（3-OCH_3）。化合物 **7** 为 3- 甲氧基 -4- 羟基苯丙醇[14]。

化合物 **8**：白色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z* 199 $[M+H]^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：4.22（1H，d，J = 7.1 Hz，H-1），3.80（1H，m，H-2），0.94（3H，d，J = 6.4 Hz，H-3），6.73 ～ 6.76（2H，overlap，H-2'，H-6'），6.93（1H，d，J = 1.8 Hz，H-5'），3.82（3H，s，3'-OCH_3）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：72.9（C-1），80.2（C-2），19.2（C-3），134.7（C-1'），111.5（C-2'），148.8（C-3'），147.1（C-4'），115.6（C-5'），121.1（C-6'），56.3（3'-OCH_3）。化合物 **8** 鉴定为 1-（3-methoxy-4-hydroxy-phenyl）-propan-1，2-diol[15]。

化合物 **9**：白色粉末（甲醇），ESI-MS *m/z* 213 $[M+H]^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：5.10（1H，dd，J = 5.4，3.6 Hz，H-2），3.74（1H，dd，J = 11.7，5.4 Hz，H-3a），3.86（1H，d，J = 3.6 Hz，H-3b），7.55（1H，d，J = 1.7 Hz，H-2'），6.87（1H，d，J = 8.1 Hz，H-5'），7.57（1H，dd，J = 8.1，1.7 Hz，H-6'），3.90（3H，s，3'-OCH_3）；^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：199.4（C-1），75.4（C-2），66.1（C-3），128.0（C-1'），112.3（C-2'），149.1（C-3'），153.7（C-4'），115.7（C-5'），125.0（C-6'），56.4（3'-OCH_3）。化合物 **9** 鉴定为 C-veratroylglycol[16]。

4 讨论

本试验从华中五味子的藤茎中共分离鉴定了 9 个简单的苯丙素类化合物，其中，化合物 **1** ～ **6** 为首次从该植物中分离鉴定。目前关于华中五味子藤茎的化学成分和药理活性研究较少，仅有零散的文献报道，本研究进一步丰富了华中五味子藤茎的化学成分，为其药理活性研究的开展提供了物质基础。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：255.

[2] 刘海涛，李兴博，张进，等 . 华中五味子果实石油醚部位化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志，2012，37（11）：1597-1601.

[3] 黄泽豪，秦路平 . 华中五味子藤茎的化学成分研究 [J]. 中草药，2016，47（19）：3374-3378.

[4] 蒋艳，李芸芳，刘亚丽，等 . 华中五味子藤茎化学成分研究 [J]. 中成药，2013，35（11）：2438-2442.

[5] 石新卫，路强强，李晓君，等 . 华中五味子藤茎化学成分及其抗氧化活性 [J]. 西北林学院学报，2020，35（5）：207-212.

[6] 季嘉诚，邱峰，雷新响 . 华中五味子中一个新的糖苷类化合物及活性研究 [J]. 天然产物研究与开发，2020，32（1）：70-74.

[7] Fan SC，Liu CH，Jiang YM，et al. Lignans from *Schisandra sphenanthera* protect against lithocholic acid-induced cholestasis by pregnane X receptor activation in mice [J]. J Ethnopharmacol，2019，245：112103.

[8] 马学敏，王力生，郭亚健，等 . 活血益气汤中 1 个新的异黄酮类化合物 [J]. 中国中药杂志，2005，30（15）：1159-1162.

[9] 李萍，闫明，李平亚 . 远志化学成分的分离与鉴定 [J]. 中国药物化学杂志，2005，15（1）：42-45，5.

[10] 张婷婷，吴佳妮，安妮，等 . 海南核果木中苯丙素类化学成分的分离与鉴定 [J]. 中国药物化学杂志，2015，25（5）：393-396.

[11] Ouyang MA，Chen PQ，Wang SB. Water-soluble phenylpropanoid constituents from aerial roots of *Ficus microcarpa* [J]. Nat Prod Res，2007，21（9）：769-774.

[12] 段营辉，戴毅，高昊，等 . 草珊瑚的化学成分研究 [J]. 中草药，2010，41（1）：29-32.

[13] 张树军，时志春，王丹，等 . 紫丁香树叶化学成分研究 [J]. 中草药，2018，49（16）：3747-3757.

[14] 董伟，周堃，王月德，等 . 傣药竹叶兰中 1 个新苯丙素及其抗烟草花叶病毒活性 [J]. 中草药，2015，46（20）：2996-2998.

[15] Ma JP，Jin XL，Yang L，et al. Diarylheptanoids from the rhizomes of *Zingiber officinale* [J]. Phytochemistry，2004，65（8）：1137-1143.

[16] 李启照 . 女贞树皮的化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发，2014，26（4）：521-525.

（收稿日期：2021-10-09；修回日期：2021-11-28）

G 试验和 GM 试验联合无菌体液真菌培养检测对侵袭性念珠菌病的诊断效果评估

杨玉琪[1]，雷玲玲[2]，周磊[1]，周柯[1]，刘昊[1]，郑恬[1]，孔美娟[1]，刘家云[1*]（1. 空军军医大学第一附属医院检验科，西安 710032；2. 延安大学医学院，陕西 延安 716000）

摘要：目的 评估血清 1，3-*β*-*D*- 葡聚糖试验（G 试验）和半乳甘露聚糖试验（GM 试验）对侵袭性念珠菌病（IC）的临床诊断效能。**方法** 对本院 2019 年 1 月—2020 年 12 月期间临床怀疑为 IC 且无粒细胞缺乏患者的 G 试验、GM 试验和无菌体液培养结果进行相关回顾性分析。以无菌体液培养真菌阳性作为 IC 确诊标准，将收集的病例分为 IC 组（49 例）和非 IC 组（152 例），分析评价 G 试验和 GM 试验对 IC 诊断的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值、符合率、诊断效能。**结果** IC 组和非 IC 组 G 试验的检测结果差异具有统计学意义（$P < 0.001$），两组 GM 试验血清学指数差异无统计学意义（$P = 0.744$）。G 试验和 GM 试验对 IC 诊断的灵敏度、特异度、阴性预测值、阳性预测值、符合率、最高诊断效能分别为 79.26%、91.45%、93.29%、73.47%、88.38%、0.825 和 8.69%、94.08%、77.29%、30.77%、74.24%、0.559。G 试验和 GM 试验联合检测可以提高临床对 IC 的诊断效率，G 试验和 GM 试验结果同为阴性时可拟排除 IC。**结论** G 试验和 GM 试验联合检测可以提高诊断 IC 的灵敏度和特异度，是无菌体液侵袭性真菌感染早期实验室诊断的重要检测指标，可以提高对无菌体液侵袭性念珠菌感染的早期预警；同时，两者同为阴性时对排除 IC 具有明确的指导意义。综合分析 G 试验和 GM 试验检测结果，可以为 IC 的早期诊断、早期治疗提供有效的实验室支持。

关键词：侵袭性念珠菌病；G 试验；GM 试验；灵敏度；特异度；诊断效能
中图分类号：R51 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)05-1048-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.015

Evaluation of G test and GM test combined with sterile humoral fungal culture in the diagnosis of invasive candidiasis

YANG Yu-qi[1], LEI Ling-ling[2], ZHOU Lei[1], ZHOU Ke[1], LIU Hao[1], ZHENG Tian[1], KONG Mei-juan[1], LIU Jia-yun[1*] (1. *Department of Clinical Laboratory*, *The First Affiliated Hospital of Air Force Medical University*, *Xi'an* 710032; 2. *Medical College of Yan'an University*, *Yan'an Shaanxi* 716000)

Abstract: Objective To evaluate the clinical diagnostic efficacy of serum 1, 3-*β*-*D*-glucan test (G test) and galactomannan test (GM test) in the diagnosis of invasive candidiasis (IC). **Methods** A retrospective analysis was performed on the results of G test, GM test and sterile humoral fungal culture for patients whose were suspected of IC but without agranulocytosis from January 2019 to December 2020 in our hospital. Positive sterile body fluid culture fungal was used as diagnostic index to confirm IC. All patients were divided into an IC group ($n = 49$) and a non-IC group ($n = 152$). The sensitivity, specificity, positive prediction value, negative prediction value, coincidence rate and diagnostic efficacy of G test and GM test were analyzed. **Results** There was a significant difference of G test between the IC group and the non-IC group ($P < 0.001$). There was no statistical difference of GM test between the IC group and the non-IC group ($P = 0.744$). The sensitivity, specificity, negative prediction value, positive prediction value, coincidence rate and the highest diagnostic

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81972026）；空军军医大学第一附属医院助推计划项目（No.XJZT19ML08）。
作者简介：杨玉琪，女，硕士，主管技师，主要从事临床院内感染相关研究，email：379118695@qq.com *通信作者：刘家云，男，教授，硕士研究生导师，主要从事临床感染性疾病相关研究，email：jiayun@fmmu.edu.cn

efficacy in the IC diagnosis were 79.26%, 91.45%, 93.29%, 73.47%, 88.38%, and 0.825 for the G test. While 8.69%, 94.08%, 77.29%, 30.77%, 74.24%, and 0.559 for the GM test respectively. The combined detection of G test and GM test improved the diagnostic efficacy for IC, and the negative results in both G test and GM test excluded IC. **Conclusion** The combined use of G test and GM test can improve the sensitivity and specificity in the diagnosis of IC. It is an important detection index for the early laboratory diagnosis of IC by sterile body fluids, and also improves the early warning IC by sterile body fluids. Meanwhile, negative results in both G test and GM test excluded IC. Comprehensive analysis of G test and GM test results provides laboratory support for the early diagnosis and treatment of IC effectively.

Key words: invasive candidiasis; G test; GM test; sensitivity; specificity; diagnostic efficacy

侵袭性真菌病（invasive fungal disease，IFD）是指真菌侵入人体，在组织、器官或血液中生长、繁殖，并导致炎症反应及组织损伤的感染性疾病[1]。其中，侵袭性念珠菌病（invasive candidiasis，IC）的病原菌是以念珠菌为主的酵母样真菌，可以占到所有 IFD 的 70% ～ 90%。近年来，随着医疗技术的快速发展、器官移植的增多和抗菌药物的应用等，IC 的发病率逐渐上升[2]。IC 因其临床表现不特异而诊断困难，且治疗周期长，会导致病情凶险、死亡率高，从而对患者的生命和财产安全构成很大的威胁，因此早期诊断 IC 对临床早期干预治疗具有重大意义[3]。

近几年，以 1，3-*β*-*D*- 葡聚糖（G 试验）和半乳甘露聚糖抗原（GM 试验）检测为主的血清学检测方法，因其具有非侵袭性、快速且阳性率高等特点，已被广泛应用于 IC 感染的早期诊断[4-6]。前期调查研究显示，G 试验和 GM 试验对 IC 诊断的灵敏度和特异度各家报道差异较大[7-10]，分析发现其可能与各研究者所选择的研究对象数量、诊断 IC 的诊断方式和判断标准不同有关。G 试验和 GM 试验诊断 IC 相关研究的重点和难点在于 IC 确诊标准的选择和确定，为进一步探讨 G 试验和 GM 试验在 IC 早期诊断中的临床价值，本研究对本院 2019 年 1 月—2020 年 12 月期间临床怀疑为 IC 且无粒细胞缺乏的患者的 G 试验、GM 试验和无菌体液真菌培养结果进行回顾性相关分析。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集本院 2019 年 1 月—2020 年 12 月期间临床怀疑为 IC 且无粒细胞缺乏，同时送检 G 试验、GM 试验和无菌体液真菌培养的患者共计 201 例。病例分别来自烧伤科、移植中心、血液科、麻醉监护室、心血管外科、心血管内科、神经内科、神经外科、肝胆外科、泌尿外科、呼吸内科、骨科、老年病科等。根据中国侵袭性真菌感染工作组 2017 年“血液病 / 恶性肿瘤患者侵袭性真菌病的诊断标准与治疗原则（第六次修订版）”确诊 IFD 的诊断标准，本研究根据无菌体液（包括血液、脑脊液及 24 h 内的引流液）是否培养出酵母菌，并经临床确诊后分为：① 无菌体液真菌培养结果阳性，临床确诊为侵袭性真菌感染的 49 例（IC 组），年龄在 22 ～ 87 岁，平均年龄为（52.4±15.3）岁，男性 32 例，女性 17 例；② 无菌体液真菌培养结果阴性，临床确诊为非侵袭性真菌感染的 152 例（非 IC 组），年龄在 1 ～ 96 岁，平均年龄为（50.8±19.0）岁，男性 104 例，女性 48 例。

1.2 仪器与试药

1.2.1 仪器 微生物快速动态检测系统（IGL-800，北京金山川），全自动细菌培养系统（BACTEC FX，美国 BD），全自动微生物鉴定及药敏分析系统（VITEK 2 Compact）、全自动快速微生物质谱检测系统（VITEK MS）（法国梅里埃），恒温恒湿箱（HWS-80B，天津泰斯特），Tol 智能恒温仪（D-91052，德国 Erlangen），低温高速离心机（Micro 21R）、酶标仪（Multiskan FC）（美国 Thermo）。

1.2.2 试药 GKT 动态真菌检测试剂盒和质控品（北京金山川，JBGSS8F205Q），GM 检测试剂盒（美国 Bio-Rad，F92430），酵母菌鉴定卡（法国梅里埃，21343），血平板和沙保弱平板（郑州安图生物）。

1.3 方法

G 试验：严格按照仪器和试剂盒说明书进行标准操作，结果参考试剂盒说明书，G ≤ 60 pg • mL^{-1} 为阴性，G ＞ 60 pg • mL^{-1} 为阳性。GM 试验：严格按照试剂盒说明书进行标准操作，

最后测定每个反应孔的 *OD* 值，通过换算，将待测样本的 *OD* 值转化为血清指数 I（待测样本的血清指数＝待测样本 *OD* 值 / 标准对照血清 *OD* 值），结果参考试剂盒说明书，血清指数 I ≤ 0.5 为阴性，血清指数 I ＞ 0.5 为阳性。真菌培养及鉴定：无菌体液真菌培养及真菌病原学鉴定按《全国临床检验操作规程》（第四版）进行，报警阳性后，转种于血平板、沙保弱平板，采用 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统、全自动快速微生物质谱检测分析系统（MS）对真菌菌种进行鉴定。

1.4　统计学分析

应用统计学软件 SPSS 23.0 进行数据处理及分析，以无菌体液真菌培养阳性为金标准，分析 G 试验、GM 试验以及二者联合检测诊断 IC 的灵敏度、特异度、阳性预测值及阴性预测值、符合率等指标。数据经检验，计量资料是非正态分布，因此以 M（P_{25}，P_{75}）对其进行描述；计数资料“例数（百分比）”以“*n*（%）”的形式进行统计学描述。两组间分类资料率的比较使用 χ^2 检验，以 $P < 0.05$ 表明其差异有统计学意义。同时绘制 ROC 曲线，对诊断效能进行分析。

2　结果

2.1　无菌体液标本来源

201 例可疑 IC 且无粒细胞缺乏患者，其无菌体液培养标本主要来源于血液、脑脊液，以及无菌穿刺抽取的胸腹水、腹透液等无菌体液标本，具体见表 1。

表 1　无菌体液标本来源 (*n*)

Tab 1　Source of sterile body fluid samples (*n*)

组别	血液	脑脊液	胸水	腹水	腹透液	骨髓	关节液	心包液
IC 组	32	4	4	3	5	0	1	0
非 IC 组	81	10	18	10	23	5	3	2

2.2　菌株分布及报警时间

49 例无菌体液真菌培养阳性的 IC 确诊病例，经鉴定菌株分布为：白色念珠菌 17 株（34.69%），近平滑念珠菌 14 株（28.57%），热带念珠菌 8 株（16.33%），光滑念珠菌 6 株（12.24%），新型隐球菌 3 株（6.12%），解脂假丝酵母菌 1 株（2.04%）。其中，阳性报警时间最短为 13 小时 5 分钟，最长为 5 天 16 小时，平均阳性报警时间为 1 天 23 小时 24 分钟。

2.3　G 试验和 GM 试验检测值水平

IC 组和非 IC 组的 G 试验和 GM 试验其检测值水平及 *P* 值，见表 2。

2.4　G 试验和 GM 试验诊断 IC 的临床效能

表 2　IC 组和非 IC 组 G 试验和 GM 试验检测值

Tab 2　Detection value of G test and GM test in the IC group and the non-IC group

组别	G 试验结果 /（pg • mL^{-1}）	GM 试验结果（血清指数）
IC 组	189.45（119.30，264.60）	0.23（0.17，0.36）
非 IC 组	7.00（5.00，9.00）	0.21（0.15，0.31）
P 值	＜ 0.001	0.744

注（Note）：依据指南规定，隐球菌和接合菌感染，其 G 试验阴性，故 G 试验结果为排除 3 株隐球菌后计算所得（according to the guideline，the G test of cryptococcus and conjugated bacteria infection was negative，so the G test was calculated after excluded 3 strains of cryptococcus）。

以 G 试验和 GM 试验检测结果大于阳性判断值为 IC 实验室指标，以无菌体液培养真菌阳性结果为 IC 确诊指标，计算 G 试验、GM 试验以及联合检测诊断 IC 的灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值等指标，见表 3。

表 3　G 试验、GM 试验诊断 IC 的性能指数 (%)

Tab 3　Performance index of G test and GM test for IC (%)

方法	灵敏度	特异度	阴性预测值	阳性预测值	符合率
GM 试验	8.69	94.08	77.29	30.77	74.24
G 试验	79.26	91.45	93.29	73.47	88.38
G ＋ GM 联合	4.35	98.03	77.20	40.00	76.26
G/GM 联合	82.61	87.50	94.32	66.67	86.36

注（Note）：G ＋ GM 联合：G 试验和 GM 试验均为阳性；G/GM 联合：G 试验和 GM 试验中任何一项试验为阳性（G ＋ GM combination：both G test and GM test were positive；G / GM combination：any one of G test and GM test was positive）。

2.5　分析不同浓度水平的 G 试验和 GM 试验对 IC 诊断效能

将 49 例 IC 患者和 152 例非 IC 患者作为分组，绘制 ROC 曲线并计算曲线下面积，见图 1。其中，G 试验检测质量浓度在 10.18 pg • mL^{-1} 时，灵敏度为 87.0%，特异度为 85.5%，诊断最高效能为 *AUC* ＝ 0.825（95% 的置信区间 72.9% ～ 92%）；GM 试验血清指数为 0.185 时，灵敏度为 73.9%，特异度为 40.1%，诊断最高效能为 *AUC* ＝ 0.559（95% 的置信区间 46.2% ～ 65.6%）；G/GM 联合检测，诊断最高效能为 *AUC* ＝ 0.826（95% 的置信区间：73.8% ～ 91.5%）。

3　讨论

根据中国侵袭性真菌感染工作组 2017 年“血液病 / 恶性肿瘤患者侵袭性真菌病的诊断标准与治疗原则（第六次修订版）”的标准，直接针吸或者活检取材的深部无菌部位标本，通过组织病理学或者细胞病理学检查是确诊 IFD 的金标准，但

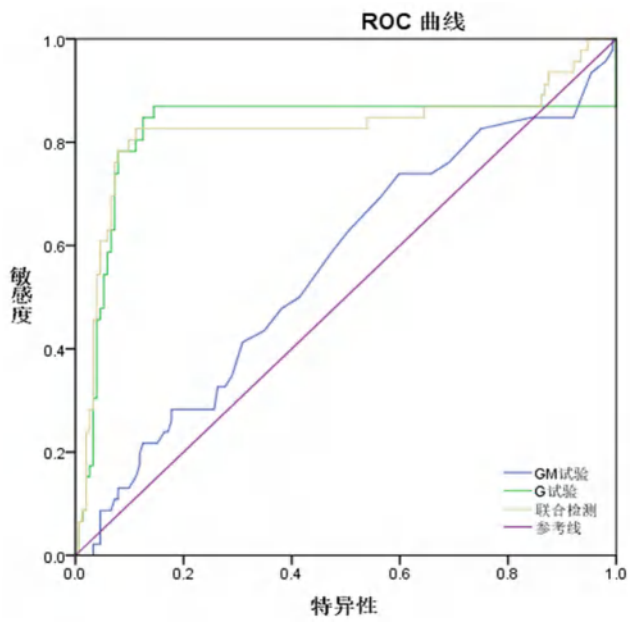


图 1　G 试验和 GM 试验诊断 IC 的 ROC 曲线

Fig 1　ROC curve of G test and GM test for IC

是因其具有创伤性、耗时长，且其检出阳性率跟取材相关，易导致漏诊，因此对于诊断 IFD 具有一定的局限性。而以无菌体液真菌培养阳性作为 IFD 诊断的金标准，可以降低临床诊断的不确定性所造成的偏差，提高其客观性和准确性。本研究的阳性无菌体液标本，菌株分离结果最终均以念珠菌为主，故本文主要探讨 G 试验和 GM 试验对 IC 早期诊断的效果和临床应用价值。

表 2 结果显示，IC 组和非 IC 组 G 试验的检测结果差异具有统计学意义（$P < 0.001$）；而两组 GM 试验血清指数差异无统计学意义（$P = 0.744$）。提示 G 试验的检测结果可以为 IC 的早期诊断提供重要的参考，而 GM 试验在两组间的差异无统计学意义，这与之前报道存在差异 [11-12]。究其原因，1，3-*β-D* 葡聚糖是除隐球菌和接合菌外所有真菌（包括念珠菌属、曲霉、镰孢菌属、酵母菌、毛孢子菌属、支顶孢属等）细胞壁的特有成分，而半乳甘露聚糖（GM）是曲霉菌特有的细胞壁多糖，本研究确诊的 49 例 IC 无菌体液培养真菌阳性菌株均为念珠菌属，对于念珠菌感染的患者，G 试验可呈阳性，而 GM 试验为阴性，这可能是造成 IC 组和非 IC 组 GM 试验检测结果无统计学差异的原因。表 3 结果显示，G 试验诊断 IC 的特异度，不及 GM 试验高；而 G 试验诊断 IC 的灵敏度明显高于 GM 试验；G ＋ GM 联合（两项试验均为阳性）特异度可以提高至 98.03%，其均高于 G 试验或 GM 试验单独检测的特异度；而两个试验进行 G/GM 联合（两项试验中任何一项试验为阳性）灵敏度可以提高至 82.61%，其也均高于 G 试验或 GM 试验单独检测的灵敏度。可以看出，G 试验和 GM 试验联合检测可以提高对 IC 的诊断效率，G 试验和 GM 试验结果同为阴性时可拟排除 IC。且合理设置 G 试验和 GM 试验的临床诊断界值可以提高诊断效能，G/GM 联合检测可以提高对 IC 诊断的最高诊断效能，值得注意的是 GM 试验单独用于无菌体液感染 IC 的诊断其诊断效能较低。

G 试验和 GM 试验具有检测速度快，操作简单，检测范围宽，连续定量检测可以为 IFD 的治疗效果提供参考依据。文献报道，G 试验因受各种医疗操作（包括血透、输注免疫球蛋白、凝血因子等）、使用药物（包括抗肿瘤药物、磺胺类药物等）、食用蘑菇类食物、细菌感染的白血病等各种因素的影响造成试验结果出现假阳性 [13-14]，而影响其出现假阴性的因素较少。GM 试验相对于 G 试验，其影响因素较少，特异度可以达到 85% 以上 [15]。本研究选用无菌体液真菌培养结果作为 IFD 诊断的金标准，虽减少了因临床诊断 IFD 导致的不确定性，但也导致针对检测侵袭性曲霉菌的 GM 试验，其在 IC 组和非 IC 组差异无统计学意义，同时导致 GM 试验的灵敏度较低，这是本研究不够全面的地方。

通过本研究综合分析，以无菌体液真菌培养结果作为 IC 诊断的金标准，G 试验和 GM 试验其特异度均在 90% 以上，G 试验的阴性预测值也达到 90% 以上，两者联合检测可以提高 IC 的诊断价值，是无菌体液侵袭性真菌感染早期实验室诊断的重要检测指标；同时，两者同为阴性时对排除 IC 具有明确的指导意义。合理检测 G 试验和 GM 试验，综合分析两者的检测结果，可以为 IC 的早期诊断、早期治疗提供有效的实验室支持。

参考文献

[1] 血液病 / 恶性肿瘤患者侵袭性真菌病的诊断标准与治疗原则（第六次修订版）[J]. 中华内科杂志，2020，59（10）：754-763.

[2] 郭景景，李钦峰，史芳宇，等 .（1，3）-*β-D*- 葡聚糖、半乳甘露聚糖联合降钙素原检测对侵袭性真菌感染的诊断价值 [J]. 国际免疫学杂志，2020，43（1）：31-36.

[3] 钱柯羽，吕全省，戴丽君，等 . G 及 GM 试验在急性白血病合并侵袭性真菌病中的诊断价值 [J]. 中国实验血液学杂志，2019，27（5）：1678-1681.

[4] 郑罡，余进，李若瑜，等 .（1，3）-*β-D*- 葡聚糖检测和半乳甘露聚糖抗原检测在侵袭性真菌病诊断中的价值探讨 [J]. 中国真菌学杂志，2012，7（3）：132-135.

[5] Kedzierska A，Kochan P，Pietrzyk A，et al. Current sta-

tus of fungal cell wall components in the immunodiagnostics of invasive fungal infections in humans：galactomannan，mannan and（1-3）-β-D-glucan antigens [J]. Eur J Clin Microbiol，2007，26（11）：755-766.
[6] 冯潜，李颖，顾兵，等 .（1-3）-β-D 葡聚糖联合半乳甘露聚糖抗原检测在侵袭性真菌感染中的应用价值 [J]. 国际检验医学杂志，2016，37（1）：71-73.
[7] 黄琳，戴玮，张传明，等 . 1-3-β-D 葡聚糖和半乳甘露聚糖检测与血培养真菌结果的相关性分析 [J]. 国际检验医学杂志，2019，40（9）：1077-1080.
[8] 张宇，吴斌，陈会欣，等 . 葡聚糖与半乳甘露聚糖抗原联合检测对临床侵袭性真菌病的诊断价值 [J]. 临床输血与检验，2019，21（3）：285-289.
[9] 吕晓东，周玲，宋永平，等 . 恶性血液病患者侵袭性念珠菌病中 1，3-β-D 葡聚糖、甘露聚糖及其抗体联合检测的临床价值 [J]. 郑州大学学报（医学版），2018，53（1）：84-88.
[10] 余鹏，魏欣 . 1，3-β-D- 葡聚糖试验、半乳甘露聚糖试验及痰培养诊断肺曲霉菌感染比较 [J]. 实用临床医药杂志，2020，24（14）：53-55.
[11] 孙婷婷，王艺 . 1，3-β-D 葡聚糖和半乳甘露聚糖检测对 ICU 患者侵袭性真菌感染的诊断价值 [J]. 国际检验医学杂志，2017，38（11）：1468-1470.
[12] 韩卓婷，黄妹，林小菊，等 . 1，3-β-D 葡聚糖检测与半乳甘露聚糖抗原检测试验诊断侵袭性真菌感染的临床价值分析 [J]. 黑龙江医学，2021，45（19）：2102-2103.
[13] 申旺，杨文丽，张鑫，等 . 念珠菌血症的临床特征及其与（1，3）-β-D 葡聚糖的关系 [J]. 中国感染与化疗杂志，2019，19（1）：42-47.
[14] 吴真，徐晓刚 . 深部真菌病的实验诊断进展 [J]. 中国感染与化疗杂志，2014，14（1）：82-85.
[15] Mennink-Kersten MA，Donnelly JP，Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis [J]. Lancet Infect Dis，2004，4（6）：349-357.

（收稿日期：2022-01-05；修回日期：2022-02-20）

喀什小檗提取物对动脉粥样硬化大鼠血脂及炎症相关指标的影响

艾丽非热·阿布都外力，阿迪力·阿不都热合曼，伊木然江·苏布哈提，阿布来提·阿布力孜，周文婷，艾尼瓦尔·吾买尔*（新疆医科大学药学院，乌鲁木齐 830011）

摘要：目的 研究喀什小檗干燥果实提取物对动脉粥样硬化大鼠血脂指标及炎症相关因子水平的影响。**方法** 将 60 只雄性 SD 大鼠随机分为两组，分别为空白对照组（$n=10$）和模型组（$n=60$），空白对照组大鼠给予普通饲料，模型组大鼠给予高脂乳剂（10 mL·kg^{-1}）及维生素 D_3（70 U·kg^{-1}）腹腔注射，建立动脉粥样硬化模型。8 周后将模型组 50 只大鼠随机分为 5 组，每组 10 只，即模型对照组、辛伐他汀阳性对照组 [5 mg/（kg·d）]、喀什小檗提取物低剂量组 [60 mg/（kg·d）]、喀什小檗提取物中剂量组 [120 mg/（kg·d）] 及喀什小檗提取物高剂量组 [240 mg/（kg·d）]，各组大鼠连续灌胃给药 6 周后，大鼠腹主动脉取血，检测血清中血脂指标及炎症因子的水平。**结果** 与模型对照组相比，辛伐他汀组及喀什小檗提取物高剂量组大鼠血清中 TC、TG、LDL-C、IL-1β、IL-6 及 TNF-α 含量降低，HDL-C 和 IL-10 含量升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）；喀什小檗提取物中剂量组大鼠血清中 TC、TG、LDL-C、IL-1β、IL-6 及 TNF-α 含量降低，HDL-C 含量升高，喀什小檗提取物低剂量组大鼠血清中 TC、TG 及 IL-1β 含量降低，HDL-C 含量升高，差异有统计学意义（$P<0.05$），喀什小檗提取物低剂量组大鼠血清中 LDL-C、IL-6 及 TNF-α 含量降低，喀什小檗提取物低、中剂量组大鼠血清中 IL-10 含量升高，差异无统计学意义（$P>0.05$）。**结论** 喀什小檗果实提取物可通过调节动脉粥样硬化大鼠血脂及炎症因子的水平，显著预防与改善动脉粥样硬化。

关键词：喀什小檗；动脉粥样硬化；血脂；炎症因子
中图分类号：R285.5 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)05-1052-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.016

基金项目：新疆维吾尔自治区自然科学青年基金（No.2017D01C237）；国家自然科学基金（No.81560586）；《XJDX1713 自治区重点实验室建设经费项目》。

作者简介：艾丽非热·阿布都外力，女，硕士，主要从事心血管药理研究，email：1041728285@qq.com *通信作者：艾尼瓦尔·吾买尔，男，教授，博士研究生导师，主要从事心血管药理学方面的研究，email：anwar.umar@126.com

Effect of *Berberis Kaschgarica* Rapr. extract on serum lipids and inflammation-related factors in atherosclerosis rats

Ailifeire Abuduwaili, Adili Abudureheman, Yimuranjiang Subuhati, Abulaiti Abulizi, ZHOU Wenting, Ainiwaer Wumaier* (*Department of Pharmacology*, *College of Pharmacy*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830011)

Abstract: Objective To determine the effect of dry fruit extract of *Berberis kaschgarica* Rapr. (BKR) on the serum lipids and the level of inflammation-related factors in atherosclerosis rats. **Methods** Sixty male Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into 2 groups: a normal control group (n = 10) and a model group (n = 60). Rats in the normal control group were given normal diet while rats in the model group were given high-fat emulsion (10 mL • kg^{-1}) with vitamin D_3 (70 U • kg^{-1}) injections (intraperitoneal) to establish atherosclerosis model. After 8 weeks, the 50 rats in the model group were randomly divided into 5 groups with 10 rats in each group: a model control group, a simvastatin positive control group [5 mg/(kg • d)], a BKR low-dose group [60 mg/(kg • d)], a BKR medium-dose group [120 mg/(kg • d)], and a BKR high-dose group [240 mg/(kg • d)]. The rats in each group were continuously treated with intra-gastric administration for 6 weeks. After blood was drawn from the abdominal aorta of the rats, the levels of serum lipids and inflammation factors in the serum were detected. **Results** Compared with the model control group, the serum level of TC, TG, LDL-C, IL-1β, IL-6, and TNF-α in the simvastatin group and the BKR high-dose group were decreased, while the levels of serum HDL-C and IL-10 were increased, with significant differernce (P < 0.05). The levels of serum TC, TG, LDL-C, IL-1β, IL-6, and TNF-α in the BKR middle-dose group rats were decreased, while the level of HDL-C was increased. The serum TC, TG, and IL-1β levels in the BKR low-dose group were decreased, while the HDL-C level increased, with significant differernce (P < 0.05). In the BKR low-dose group, the LDL-C, IL-6, and TNF-α levels were decreased while the IL-10 level increased. In the BKR low- and medium- dose groups, the difference was not significant (P > 0.05). **Conclusion** *Berberis kaschgarica* Rapr. extract can significantly prevent and improve atherosclerosis by regulating the level of serum lipids and inflammation factors in rats with atherosclerosis.

Key words: *Berberis kaschgarica* Rapr.; atherosclerosis; blood lipid; inflammatory factor

动脉粥样硬化（atherosclerosis，AS）是一种常见的慢性心血管系统性疾病，其主要的发病特点是以动脉内膜中脂质的堆积和炎症的发生、内皮细胞的损伤、血管平滑肌细胞的迁移和增殖，进而形成泡沫样细胞、脂质和纤维斑块，最终引起血管狭窄和血栓形成。随着人们生活条件的改善和饮食习惯的改变，AS 已成为最常见的致死因素之一，因此近几年来人们一直致力于其发病机制及治疗措施的研究 [1-2]。

小檗属于小檗科植物，世界上约有 500 种类型，在中国约有 200 种，主要分布于西部和西南地区。而新疆小檗的种类主要分为喀什小檗、黑果小檗以及红叶小檗等 [3]。喀什小檗 *Berberis kaschgarica* Rapr. 隶属小檗科小檗属，在新疆喀什地区野生生长，偶有栽培，其果实可入药和食用，具有活血、化瘀、利胆、防治高血压以及抗炎等作用 [4]。本研究探讨喀什小檗果实水提物对 AS 大鼠血脂代谢及炎症细胞因子水平的影响，为其进一步机制研究提供实验研究基础。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠，体质量约 200 g，由新疆医科大学实验动物中心提供 [生产许可证号：SCXK（新）20200004]。给予普通饲料适应性饲养 7 d，相对湿度（50±10）%，温度（20±2）℃，实验进行前大鼠禁食 12 h，不禁水。

1.2 试药

喀什小檗干燥果实，采自于新疆喀什，经新

疆医科大学药学院天然药物化学与生药学教研室帕丽达·阿布力孜教授鉴定为小檗科小檗属喀什小檗 *Berberis kaschgarica* Rapr. 的果实；高脂乳剂（配方：猪油、胆固醇、丙基硫氧嘧啶、吐温 -80、胆酸钠、丙二醇及蒸馏水）；辛伐他汀片剂（批号：M018303，杭州默沙东制药有限公司）；维生素 D_3 注射液（批号：180905，上海通用药业股份有限公司）；总胆固醇（TC）、三酰甘油（TG）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）试剂盒（批号分别为：TJYTVSP186、5P9WGDW747、P3X2EB42XH、N16J14RAIK，武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司）；白介素（IL）1β、IL-6、肿瘤坏死因子（TNF-α）、IL-10 ELISA 试剂盒（批号分别为：VEUV2IXI4Y、JAKSHFQB9X、WIUSK3NVUV、ERSH5RSLJC，武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司）。

1.3　仪器

Multiskan Go 型酶标仪（美国 Termo Fisher 公司），XPN-100 型低温超速离心机（德国 Eppendorf 公司），AE-31 显微镜（MOTIC 公司）。

2　方法

2.1　AS 模型的建立

将雄性 SD 大鼠随机分为两组，分别为空白对照组（n = 10）与模型组（n = 60），均自由饮水。模型组大鼠灌胃高脂乳剂（10 mL·kg^{-1}），腹腔注射维生素 D_3（70 U·kg^{-1}），每日 1 次，连续 3 d，正常对照组大鼠给予普通饲料，造模周期为 8 周。第 9 周，模型组组挑选 1 只大鼠，腹腔注射 3% 的戊巴比妥钠对其进行麻醉，对大鼠主动脉组织进行病理形态学观察，AS 模型的建立以血管内形成明显的斑块为准。

2.2　分组与给药

AS 模型建立成功后，开始给各组大鼠灌胃给药。将模型组 50 只大鼠随机分为 5 组，每组 10 只，即模型对照组、辛伐他汀阳性对照组 [5 mg/（kg·d）]、喀什小檗提取物低剂量组 [60 mg/（kg·d）]、喀什小檗提取物中剂量组 [120 mg/（kg·d）] 和喀什小檗提取物高剂量组 [240 mg/（kg·d）]。10 只健康小鼠作为正常对照组。给正常对照组和模型对照组大鼠灌胃等体积生理盐水，每日 1 次，连续给药 6 周，记录各组大鼠体质量变化。

2.3　标本采集与处理

各组大鼠禁食 12 h，对其进行麻醉后处死（3% 戊巴比妥钠），主动脉采血，4000 r·min^{-1} 离心 15 min，收集血清，并进行检测。分离主动脉组织，将组织在 4% 多聚甲醛中固定 24 h，脱水、包埋并制成切片，随后进行苏木红 - 伊红（HE）染色实验。

2.4　检测大鼠血脂水平

使用酶标仪检测各组大鼠血清中 TC、TG、LDL-C 及 HDL-C 的水平，严格按照试剂盒说明书进行操作。

2.5　血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 和 IL-10 水平检测

使用酶标仪在 450 nm 波长处检测血清中 IL-1β、IL-6、TNF-α 和 IL-10 等炎性因子的含量并记录数据，实验操作严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行。

2.6　统计学处理

实验数据采用统计学软件（SPSS 26.0 版）进行单因素方差分析处理，统计数据的表达用均值 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$），以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　大鼠胸主动脉组织病理变化

正常对照组大鼠主动脉组织形态结构清晰并完整，无脂质堆积和斑块，中膜区域可发现很典型的梭形排列的平滑肌细胞，外膜为疏散的结缔组织结构；模型对照组大鼠的主动脉组织中内膜的增厚极为严重，可见结构不完整的内皮细胞脱落，中膜可见炎症细胞的浸润，泡沫细胞和单核细胞聚集，并伴有斑块形成；与模型对照组相比，辛伐他汀组和喀什小檗水提物低、中、高剂量组大鼠主动脉组织的内膜增厚程度较轻，内皮细胞结构相对完整并清晰，中膜内炎症细胞和泡沫样细胞浸润较少见，见图 1。

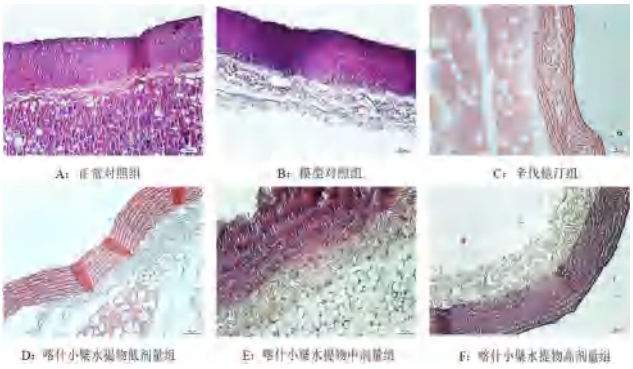


图 1　各组大鼠胸主动脉组织病理图（HE，×200）

Fig 1　Histopathological characteristics of thoracic aorta among the rats（HE，×200）

3.2　各组大鼠血脂水平的比较

与正常对照组相比，模型对照组大鼠血清中 TC、TG 和 LDL-C 的含量升高，HDL-C 的含量降低（P < 0.01）；与模型对照组相比，辛伐他

汀组、喀什小檗水提物中、高剂量组大鼠血清中 TC、TG 和 LDL-C 的含量降低，HDL-C 的含量升高（$P < 0.01$）；喀什小檗水提物低剂量组大鼠血清中 TC 和 TG 的含量降低，HDL-C 的含量升高（$P < 0.05$，$P < 0.01$），LDL-C 的含量降低，但差异无统计学意义（$P > 0.05$），见表 1。

表 1　各组大鼠血清血脂水平比较 ($n = 10$)

Tab 1　Serum lipid levels among the rats ($n = 10$)

组别	TC/（mmol・L^{-1}）	TG/（mmol・L^{-1}）	LDL-C/（mmol・L^{-1}）	HDL-C/（mmol・L^{-1}）	动脉硬化指数（AI）
正常对照组	1.79±0.37	1.17±0.29	0.91±0.27	2.36±0.51	0.18±0.25
模型对照组	4.92±1.23$^{\#\#}$	1.94±0.12$^{\#\#}$	2.79±1.21$^{\#\#}$	1.49±0.19$^{\#\#}$	2.58±1.02$^{\#\#}$
辛伐他汀组	2.53±1.14**	0.55±0.23**	0.82±0.03**	2.27±0.55**	0.35±0.84**
喀什小檗水提物低剂量组	3.82±0.42*	1.28±0.31**	2.22±0.49	2.09±0.44*	0.83±0.41**
喀什小檗水提物中剂量组	3.00±0.53**	0.89±0.17**	1.22±0.22**	2.27±2.21**	0.41±0.12**
喀什小檗水提物高剂量组	2.54±0.36**	0.71±0.15**	1.20±0.18**	2.19±0.16**	0.21±0.10**

注：与正常对照组相比，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

3.3　各组大鼠血清 IL-1β、IL-6、TNF-α 和 IL-10 水平变化

与正常对照组相比，模型对照组大鼠血清中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的含量升高，IL-10 的含量降低（$P < 0.01$）；与模型对照组相比较，辛伐他汀组、喀什小檗水提物中、高剂量组大鼠血清中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的含量降低，IL-10 的含量升高（$P < 0.05$，$P < 0.01$），喀什小檗水提物低剂量组血清中 IL-1β 的含量降低（$P < 0.01$），喀什小檗水提物低剂量组大鼠血清中 IL-6 和 TNF-α 的含量降低，喀什小檗水提物低、中剂量组大鼠血清中 IL-10 的含量升高，但差异无统计学意义（$P > 0.05$），见表 2。

表 2　各组大鼠血清 IL-1β、IL-6、IL-10 和 TNF-α 水平比较 ($n = 10$)

Tab 2　Serum levels of IL-1β，IL-6，IL-10 and TNF-α among the rats ($n = 10$)

组别	IL-1β/（pg・mL^{-1}）	IL-6/（pg・mL^{-1}）	IL-10/（pg・mL^{-1}）	TNF-α/（pg・mL^{-1}）
正常对照组	50.54±10.70	24.83±4.81	666.20±89.60	58.83±21.55
模型对照组	211.10±13.16$^{\#\#}$	70.26±13.68$^{\#\#}$	371.05±55.46$^{\#\#}$	166.82±20.90$^{\#\#}$
辛伐他汀组	96.81±22.51**	41.09±8.54**	536.36±74.53**	92.94±17.42**
喀什小檗水提物低剂量组	173.40±30.03**	67.93±8.85	353.35±57.68	146.93±18.61
喀什小檗水提物中剂量组	176.25±18.71**	53.39±8.61*	362.15±37.81	139.18±17.70*
喀什小檗水提物高剂量组	142.24±19.09**	49.15±7.93*	457.61±129.60*	111.32±13.26**

注：与正常对照组相比，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

4　讨论

AS 最主要的特点是血脂代谢紊乱并发炎症[5-6]。大多数研究表明[7]，脂代谢紊乱与 AS 的形成有密切的关系，高脂血症是 AS 产生的重要因素，可引起内皮血管炎症，进而促进沉积在血管内膜的 LDL-C 氧化修饰成 ox-LDL，形成泡沫样细胞，促进血管壁脂质的堆积以及斑块和血栓的形成[8]。本研究采用高脂饮食诱导 AS 大鼠模型，结果表明，喀什小檗果实水提物可降低血清中 TC、TG 及 LDL-C 水平，升高 HDL-C 水平，有效改善血脂的紊乱。

炎症在 AS 发生发展过程中起着必不可少的作用，炎症相关细胞因子在 AS 发生早期导致内皮功能的损伤，接着促进斑块的形成[9]。从国内外众多动物和临床试验中可以发现，促炎细胞因子的水平增高可诱导 AS 的发生，这会导致抗炎细胞因子水平的降低[10-11]。IL-1β 是一种典型的促炎细胞因子，也是众多细胞因子的中枢，它不仅促进巨噬细胞从 M2 向 M1 极化[12]，还可以刺激细胞间黏附分子的释放，从而促进白细胞迁移[13]。IL-1β 除了自身的促炎能力以外，还可以促进平滑肌细胞分泌 IL-6，进一步加快炎症反应的发生[14]。在炎症和损伤发生的早期阶段，IL-6 表达量体现了炎症程度的水平，它由巨噬细胞和 T 淋巴细胞释放[15]。AS 斑块不稳定的主要原因可能是跟 TNF-α 和基质金属蛋白酶（MMPs）水平的增高，进而促进斑块中 IL-6 的高表达有关[16]。TNF-α 也是一种炎性细胞因子，可以促进

炎症的发生与发展，它可能由 AS 斑块中的平滑肌细胞、内皮细胞及巨噬细胞分泌。有研究发现，在晚期 AS 和急性中风的患者体内的循环 TNF-α 水平高表达，敲除 TNF-α 基因的小鼠中斑块的面积会减少[17-18]。IL-10 由调节性 T 细胞分泌产生，AS 发生的过程中促炎性细胞因子和趋化因子会导致内皮细胞损伤，而 IL-10 会抑制它们的过高表达，从而促进 LDL 被巨噬细胞吞噬，并抑制其释放 MMPs，进一步促进 M2 型转变过程[19-21]。

综上所述，本研究结果表明，喀什小檗果实水提物具有调节血脂代谢、降低炎症因子的表达及抑制血管斑块形成等作用，可有效预防和抑制 AS 的形成。目前，喀什小檗对 AS 的治疗作用仍处于初步的探索阶段，其作用机制尚需更多的实验来验证。

参考文献

[1] 赵战芝，姜志胜 . 我国动脉粥样硬化基础研究几个热点领域的新进展 [J]. 中国动脉硬化杂志，2019，27（8）：645-654.

[2] 牟寻寻 . 动脉粥样硬化的发病机制及治疗的综述 [J]. 健康大视野，2019（3）：253.

[3] 买尔旦·玉苏甫，周文婷，阿地力江·萨吾提，等 . 喀什小檗果实水提物对大鼠离体胸主动脉环的舒张作用 [J]. 中成药，2019，41（2）：448-450.

[4] 热米莱·塔衣尔，买尔旦·玉苏甫，徐勤伟，等 . 喀什小檗叶不同萃取部位舒张血管活性的筛选 [J]. 中成药，2021，43（3）：612-616.

[5] Libby Peter，Ridker Paul M，Hansson Göran K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis [J]. Nature，2011，473（7347）：317-325.

[6] Fredman G，Spite M. Recent advances in the role of immunity in atherosclerosis [J]. Circ Res，2013，113（12）：e111-114.

[7] Hu Y，Sun B，Liu K，et al. Icariin attenuates high-cholesterol diet induced atherosclerosis in rats by inhibition of inflammatory response and p38 MAPK signaling pathway [J]. Inflammation，2016，39（1）：228-236.

[8] 艾诗媛，张英姜 . 黄素灌胃对动脉粥样硬化大鼠血管内皮损伤的逆转作用及其机制 [J]. 山东医药，2018，58（40）：24-28.

[9] Tousoulis D，Oikonomou E，Economou E，et al. Inflammatory cytokines in atherosclerosis：current therapeutic approaches [J]. Eur Heart J，2016，37（22）：1723-1732.

[10] Ghanim H，Green K，Abuayshen S，et al. Ezetimibe and simvastatin combination inhibits and reverses the pro-inflammatory and pro-atherogenic effects of cream in obese patients [J]. Atherosclerosis，2017，263：278-286.

[11] Vila-Caballer M，González-Granado J，Zorita V，et al. Disruption of the CCL1-CCR8 axis inhibits vascular Treg recruitment and function and promotes atherosclerosis in mice [J]. J Mol Cell Cardiol，2019，132：154-163.

[12] Chan Y，Ramji D. A perspective on targeting inflammation and cytokine actions in atherosclerosis [J]. Future Med Chem，2020，12（7）：613-626.

[13] Eun S，Ko Y，Park S，et al. IL-1β enhances vascular smooth muscle cell proliferation and migration via P2Y2 receptor-mediated RAGE expression and HMGB1 release [J]. Vasc Pharmacol，2015，72：108-117.

[14] Libby P. Interleukin-1Beta as a target for atherosclerosis therapy：biological basis of CANTOS and beyond [J]. J Am Coll Cardiol，2017，70（18）：2278-2289.

[15] 李志明，王铭洁 . 细胞因子在动脉粥样硬化发病中的作用机制及相关治疗举措研究现状 [J]. 生理学报，2021，73（3）：501-508.

[16] Sancho JJA，Villarino MR，Espí GA，et al. SAT0234 study of the role of IL-6 in the development of atherosclerosis in patients with systemic sclerosis [J]. Ann Rheum Dis，2016，75（Suppl 2）：753.2-753.

[17] Zhang Y，Yang X，Bian F，et al. TNF-α promotes early atherosclerosis by increasing transcytosis of LDL across endothelial cells：crosstalk between NF-κB and PPAR-γ [J]. J Mol Cell Cardiol，2014，72：85-94.

[18] Olson N，Callas P，Hanley A，et al. Circulating levels of TNF-α are associated with impaired glucose tolerance，increased insulin resistance，and ethnicity：the insulin resistance atherosclerosis study [J]. J Clin Endocrinol Metab，2012，97（3）：1032-1040.

[19] Han X，Boisvert W. Interleukin-10 protects against atherosclerosis by modulating multiple atherogenic macrophage function [J]. Thromb Haemostasis，2015，113（3）：505-512.

[20] Li X，Fang P，Sun Y，et al. Anti-inflammatory cytokines IL-35 and IL-10 block atherogenic lysophosphatidylcholine-induced，mitochondrial ROS-mediated innate immune activation，but spare innate immune memory signature in endothelial cells [J]. Redox Biol，2020，28：101373.

[21] Lucero D，Islam P，Freeman L，et al. Interleukin 10 promotes macrophage uptake of HDL and LDL by stimulating fluid-phase endocytosis [J]. BBA-mol Cell Biol L，2020，1865（2）：158537.

（收稿日期：2022-01-10；修回日期：2022-02-20）

齐墩果酸线粒体靶向脂质体的制备及抗胰腺癌研究

谭晓柯[1]，武香香[2]，曾华辉[2]，朱鑫[1*]（1. 河南中医药大学药学院，郑州　450046；2. 河南中医药大学中医药科学院，郑州　450046）

摘要：目的　制备齐墩果酸（OA）线粒体靶向脂质体（α-TOS-TPP-OA），以实现药物的靶向性并提高其抗胰腺癌的活性。**方法**　通过两步反应，合成三苯基膦（TPP）修饰的生育酚琥珀酸酯（α-TOS）得到线粒体靶向载体（α-TOS-TPP）；采用过膜挤压法制备α-TOS-TPP-OA，并通过超滤法分离α-TOS-TPP-OA和游离药物，测得其包封率和载药量；通过动态光散射、透射电子显微镜对α-TOS-TPP-OA的粒径大小、表面电荷、形态进行表征，并通过线粒体共定位考察其线粒体靶向性；通过MTT法和流式细胞仪考察OA、α-TOS-TPP、α-TOS-TPP ＋ OA和α-TOS-TPP-OA对胰腺癌细胞（Bxpc-3）增殖的抑制和诱导凋亡的作用。**结果**　制备的α-TOS-TPP-OA平均粒径为（137.01±0.82）nm，PDI为（0.23±0.01），表面电荷为＋（43.09±1.22）mV；α-TOS-TPP的包封率和载药量分别为（76.21±7.74）%和（39.06±5.51）%，OA的包封率和载药量分别为（70.96±9.13）%和（3.90±0.75）%；能较好地定位于线粒体；α-TOS-TPP-OA组与其他组相比抗胰腺癌的效果有明显增强。**结论**　α-TOS-TPP-OA具有良好的稳定性和线粒体靶向性，能增强OA的抗胰腺癌活性。

关键词：三苯基膦；胰腺癌；齐墩果酸；脂质体；线粒体靶向
中图分类号：R943　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)05-1057-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.017

Preparation of oleanolic acid mitochodrial targeting liposome and its anti-pancreatic cancer effect

TAN Xiao-ke[1], WU Xiang-xiang[2], ZENG Hua-hui[2], ZHU Xin[1*] (1. *School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine*, *Zhengzhou* 450046; 2. *Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou* 450046)

Abstract: Objective　To prepare oleanolic acid (OA) mitochondria-targeted liposomes (α-TOS-TPP-OA) for drug targeting and improve anti-pancreatic cancer activity. **Methods**　A mitochondrial targeting carrier (α-TOS-TPP) was synthesized from tocopherol succinate (α-TOS) modified by triphenylphosphine (TPP) by two-step reaction. The α-TOS-TPP-OA was prepared by extrusion through the membrane. Free drugs and α-TOS-TPP-OA were separated by ultrafiltration, and the entrapment efficiency and drug loading were measured. The particle size, surface charge and morphology of α-TOS-TPP-OA were characterized by dynamic light scattering and transmission electron microscope. The targeting property of α-TOS-TPP-OA was determined by co-localization of mitochondria. The effects of OA, α-TOS-TPP, α-TOS-TPP ＋ OA and α-TOS-TPP-OA on the proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells (BxPC-3) were investigated by MTT and flow cytometry. **Results**　The average particle size, PDI and surface charge of α-TOS-TPP-OA were (137.01±0.82) nm, (0.23±0.01) and ＋ (43.09±1.22) mV, respectively. The entrapment efficiency and drug loading of α-TOS-TPP were (76.21±7.74)% and (39.06±5.51)%, while the entrapment efficiency and drug loading of OA were (70.96±9.13)% and (3.90±0.75)%. The anti-pancreatic cancer effect of α-TOS-TPP-OA group was much stronger than that of other groups. **Conclusion**

基金项目：国家自然科学基金项目（No.U1604185，No.21601053）；河南省优秀青年基金项目（No.212300410057）；河南省科技攻关项目（No.202102310515）；河南省科技创新人才工程项目（No.20HASTIT050）；河南省教育厅重点科研项目（No.20B350003）。
作者简介：谭晓柯，男，在读硕士研究生，主要从事药物剂型研究，email：3154468622@qq.com　*通信作者：朱鑫，女，教授，硕士研究生导师，主要从事药物化学研究，email：13603869261@139.com

α-TOS-TPP-OA has good stability and mitochondrial targeting, which can enhance the anti-pancreatic cancer activity of OA.

Key words: triphenylphosphine; pancreatic cancer; oleanolic acid; liposome; mitochondrial targeting

胰腺癌（pancreatic cancer，PC）是一种难治性恶性肿瘤[1]，预后非常差，通常在确诊后，只有24%的人存活1年，9%的人存活5年[2]。预后不良的主要原因是缺乏早期症状、肿瘤进展迅速以及局部/转移性疾病的有效药物疗效有限[3]。

齐墩果酸（oleanolic acid，OA）是一种五环三萜类天然产物，广泛存在于多种中药材中，如三七、怀牛膝、甘草、石斛夹竹桃和女贞等[4]。研究发现，OA具有多种有益的药理学活性，比如抗氧化作用、抗炎作用、降糖作用、抗病毒作用、肝功能保护作用、胃黏膜保护作用、抗微生物作用、抗肿瘤作用等[5]。虽然OA具有一定的抗肿瘤活性，能够抑制多种肿瘤细胞的增殖[6]，但该药物的水溶性较差，在水中的溶解度仅为1 μg·mL^{-1}，肠黏膜透过性较差且具有较大的首过效应，致使其生物利用度低且个体间差异较大，这些性质限制了其临床应用与开发[7]。目前，OA在市场上销售的药物制剂只有片剂和胶囊剂，国内外有关学者进行了OA新剂型的研究，大多数新型制剂制备工艺较复杂，载药量低，对设备要求较高，而且存在靶向性较低的问题，使药物疗效不佳以及易产生不良反应[8]。因此，我们需要开发基于脂质体的靶向性制剂来提高OA的治疗效果，并减少毒副作用。

α-生育酚琥珀酸酯（*α*-TOS）是维生素E最主要的成分*α*-生育酚（*α*-TOH）的一种酯化衍生物。维生素E在储存和应用过程中易被氧化，因而常将其酯化衍生物作为商业的供应形式，*α*-TOS即是其中的一种[9]。近年来研究发现，*α*-TOS除作为维生素E的供应前体外，还具有广泛的抗肿瘤活性，可通过多种机制发挥抗肿瘤作用，如诱导细胞凋亡、抑制NF-*κ*B功能、抑制血管生成等。此外，*α*-TOS能选择性杀死肿瘤细胞而对正常组织无不良反应[10]。三苯基磷基团（TPP）中含有3个苯基，使得整个分子具有很强的脂溶性，同时TPP中磷原子上的正电荷可以离域到3个苯环上，在更大空间分散正电荷，降低扩散渗透膜时的自由能，促使TPP穿越磷脂膜。正常细胞的线粒体膜电位为－（130～150）mV，远高于内质网、核糖体等细胞器的膜电位，因此亲脂性阳离子可以很容易地通过脂质双分子层的疏水屏障并在线粒体中积聚。此外，肿瘤细胞较正常细胞具有更高的线粒体膜电位（大约为200 mV），可将抗肿瘤药物优先靶向肿瘤细胞的线粒体，诱导肿瘤细胞凋亡[11]。因此，通过亲脂性阳离子对抗肿瘤药物进行修饰，可以实现将药物递送至线粒体的目的。

因此，本研究通过TPP修饰*α*-TOS构成具有线粒体靶向能力的三苯基磷基生育酚琥珀酸酯（*α*-TOS-TPP）偶联物作为线粒体靶向载体，以期通过静电作用使药物更容易富集于肿瘤细胞线粒体。此外脂质体表面修饰聚乙二醇（PEG）可使脂质体清除速率减慢，延长其在血液中的循环时间，提高OA的生物利用度，进而提高其抗肿瘤活性。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260高效液相色谱仪（美国Agilent公司）；手动挤压器（型号：HE8433 Genizer公司）；粒径分析仪（型号：250144，Brookhaven Instruments）；高倍显微镜（型号：TS100，Nikon）；万分之一电子天平（型号：AL204，梅特勒-托利多仪器上海有限公司）；透射电子显微镜[型号：JEM-1230（HC）]；UV-2201紫外分光光度计（日本岛津公司）；全波长酶标仪（Multiskan GO）；激光共聚焦显微镜（德国，ZEISS）；流式细胞仪（美国贝克曼）。

1.2 试药

α-TOS（阿拉丁，批号：T109349，纯度＞98%）；6-溴正己醇（阿拉丁，批号：B138834，纯度＞97%）；三苯基膦（阿拉丁，批号：T104475，纯度＞99.0%）；大豆卵磷脂（阿拉丁，批号：B1504087，纯度＞98%）；胆固醇（北京百灵威科技有限公司，批号：LK40Q28，纯度：95%）；PEG（SIGMA，批号：BCBQ6878V）；二甲基亚砜（Solarbio，批号：710N032，细胞培养级）；香豆素6（阿拉丁，批号：12009083，纯度＞98.0%）；Mito-Tracker Red（Beyotime，批号：062320210302）；DAPI溶液（Solarbio，批号：20190923）；Annexin V-FITC/PI apoptosis kid凋亡试剂盒（联科生物，批号：A11015）；其他试剂均为分析纯。

1.3 细胞

胰腺癌BxPC-3细胞（武汉普诺赛生命科技

有限公司）。

2　方法与结果

2.1　α-TOS-TPP 的合成

将 α-TOS（5.0000 g，9.4201 mmol）、6- 溴正己醇（1938.3 μL，14.1302 mmol）、二环己基碳二亚胺（2.3307 g，11.3041 mmol）、4- 二甲基吡啶（0.0575 g，0.4710 mmol）分别用适量二氯甲烷溶解后，在冰浴条件下，将其混合，搅拌 10 min 后转至室温，再搅拌 12 h 后加入 6- 溴正己醇（646.1 μL，4.7101 mmol），继续搅拌 12 h [12]。通过柱层析分离收集，初始展开剂为石油醚 - 乙酸乙酯（24∶1），之后适当改变比例增大极性，收集的预测产物在真空管干燥箱 60 ℃下减压干燥 5 h，得到无色或浅黄色油状物化合物 A，收率为 64.56%。经核磁验证，如图 1 所示。

取化合物 A（3.0769 mmol，2.1349 g）、三苯基膦（6.1538 mmol，1.6141 g）、无水 K_2CO_3（0.3000 g）在适量乙腈中混合，90 ℃ 回流 30 h[12]。过滤除去 K_2CO_3 后，浓缩滤液，加入石油醚超声，过滤除去滤液，不溶物经柱层析，初始展开剂为乙酸乙酯 - 甲醇（20∶1），之后适当改变比例增大极性，收集的预测产物在真空管干燥箱 60 ℃ 下减压干燥 5 h，得到无色或浅黄色油状物化合物 B，收率为 46%，纯度为 98.53%。经核磁验证，如图 2 所示。

通过 ^{1}H-NMR 对化合物 A 和 B 进行了表征。在化合物 A 的 ^{1}H-NMR 谱中，在 δ = 4.11 ～ 4.14（2H）和 3.37 ～ 3.41（2H）处出现的三重峰，在 δ = 1.84 ～ 1.91（2H），1.78 ～ 1.86（2H），1.74 ～ 1.81（2H），1.64 ～ 1.71（2H）处出现的多重峰证实了 6- 溴正己醇通过酯键与 α-TOS 连接。δ = 2.92 ～ 2.95（2H）、2.75 ～ 2.80（2H）、2.58 ～ 2.64（2H）处存在三重峰和代表单线态峰，δ = 2.09（3H）、2.02（3H）、1.98（3H）证实了 α-TOS 部分的存在，如图 1。在化合物 B 的 ^{1}H-NMR 谱中，δ = 7.6 ～ 7.9（15H）证实了苯基的存在，剩余特征质子峰与化合物 A 位置相同，如图 2。经验证化合物 B 为 α-TOS-TPP。

2.2　α-TOS-TPP-OA 的制备

精密称取 5.0 mg 卵磷脂，10.0 mg α-TOS-TPP，1.0 mg OA，1.0 mg 胆固醇，PEG 1.0 mg（1∶2∶0.2∶0.2∶0.2）分别溶于 2.0 mL 的二氯甲烷中，混合上述溶液，20 r • min^{-1}、40 ℃下旋转蒸发除去二氯甲烷，40 ℃真空干燥 2 h 以彻底除去有机溶剂，加入去离子无菌水 2.0 mL，60 ℃下磁力搅拌水化 2 h，250 W 水浴超声 5 min，在 60 ℃下依次挤压通过 200 nm、100 nm 聚碳酸酯膜，即得 α-TOS-TPP-OA，在 4 ℃下储存备用 [13]。

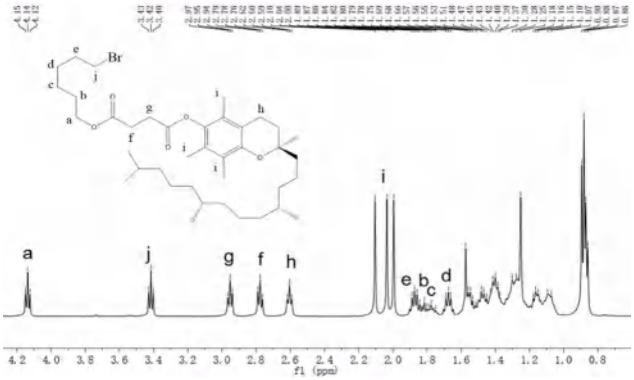


图 1　化合物 A 的氢核磁谱图

Fig 1　^{1}H-NMR spectrum of compound A

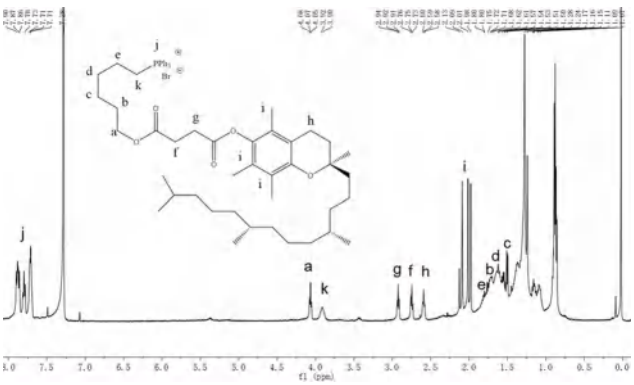


图 2　化合物 α-TOS-TPP 的氢核磁谱图

Fig 2　^{1}H-NMR spectrum of compound α-TOS-TPP

2.3　形态、粒径和电位

在室温下采用粒径分析仪对制备的脂质体的粒径与多分散系数（PDI）进行表征，结果平均粒径为（137.0±0.82）nm，PDI 为（0.23±0.01），PDI 的值较大，可能是因为挤压膜时聚碳酸酯膜的孔径大小不一所造成的，如图 3A 所示。使用 α-TOS 制备的 α-TOS-OA，测得其 Zeta 电位为 −（31.9±0.97）mV，将 α-TOS 换成 α-TOS-TPP 后制备的 α-TOS-TPP-OA 的 Zeta 电位为 +（43.09±1.22）mV，Zeta 电位由负电荷转变为正电荷，见图 3B，说明 TPP 可分散在脂质体表面，使其具有线粒体靶向的能力，与预期一致。采用高倍透射电子显微镜观察 α-TOS-TPP-OA 的形貌，形态见图 3C ～ 3E。由电镜照片可以观察到，脂质体单分散，呈球形，粒度较均一，其结果与粒径仪所测到的脂质体粒径相吻合。

2.4　包封率和载药量的测定

2.4.1　α-TOS-TPP 标准曲线的建立　配制质量浓度为 10、30、50、80、120 和 150 μg • mL^{-1} 的溶液，通过紫外可见光分光光度计在 λ = 287 nm 检测溶液的吸光度。以吸光度（y）对质量浓度（x）进行线性拟合，得到回归方程 y =

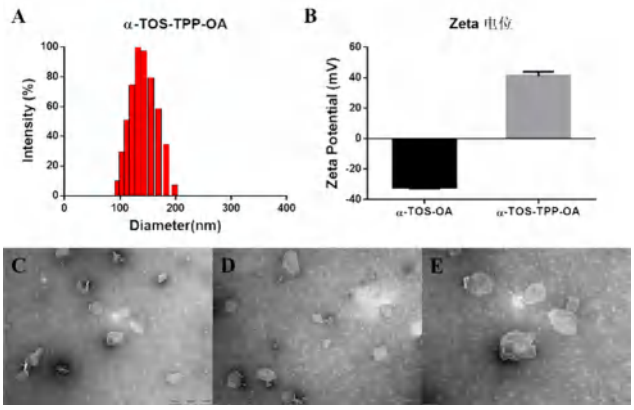


图 3 α-TOS-TPP-OA 的粒径分布（A）、Zeta 电位及透射电子显微镜图（C ～ E）

Fig 3 Particle size distribution (A), Zeta potential (B), and transmission electrons (C ～ E) of α-TOS-TPP-OA microscope picture

$10.082x + 0.1995$，$R^2 = 0.997$，表明 α-TOS-TPP 在 10 ～ 150 μg • mL^{-1} 内与吸光度线性关系良好。

2.4.2 OA 标准曲线的建立 采用高效液相色谱法（HPLC）测定 OA 的含量。采用 ZORBAX SB-C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相：甲醇 -1% 醋酸水（90∶10，*V/V*）；柱温：25 ℃；流速：1.0 mL • min^{-1}；波长：220 nm；进样量：20 μL。配制质量浓度为 10、50、80、100、150、200 和 300 μg • mL^{-1} 的 OA 溶液，进样测定，以峰面积（y）对质量浓度（x）进行线性拟合，得回归方程 $y = 5495.8x - 34.366$，$R^2 = 0.9991$，表明 OA 在 10 ～ 300 μg • mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好。

取 1.0 mL α-TOS-TPP-OA 溶液置于超滤离心管内（截留相对分子质量为 30 000），以 4000 r • min^{-1} 离心 30 min，分离溶液中游离的 OA 及 α-TOS-TPP，截留在离心管内的为 α-TOS-TPP-OA，离心管内加入 5 倍体积的甲醇破坏脂质体结构，促使 OA 和 α-TOS-TPP 从胶束中释放出来，采用 HPLC 测定脂质体中包封的 OA 质量，离心管外为游离的 OA，采用同样的方法可测定游离的 OA 的质量。α-TOS-TPP 的含量则通过紫外可见光分光光度计在 $\lambda = 287$ nm 检测；用以下公式计算包封率和载药量：

包封率＝脂质体内包封的药物质量 /（脂质体内包封的药物质量＋未包封的游离药物质量）×100%

载药量＝包封于脂质体内的药物质量 /（载体的质量＋脂质体包封的药物总质量）×100%

经计算得到 α-TOS-TPP 的包封率和载药量分别为（76.21±7.74）% 和（39.06±5.51）%，OA 的包封率和载药量分别为（70.96±9.13）% 和（3.90±0.75）%。

2.5 脂质体的稳定性

将 α-TOS-TPP-OA 分别在 4 ℃纯水中和 37 ℃的 PBS 环境中分别存放 7 d 和 3 d，模仿存储环境和体内环境，检测其粒径及 PDI 变化。如图 4 所示，在 4 ℃的纯水下储存 7 d 后粒径从（137.0±0.82）nm 变为（131.1±0.80）nm，PDI 从（0.227±0.005）变为（0.248±0.009）。在 37 ℃的 PBS 储存 3 d 后，粒径增加到（176.7±3.9）nm，PDI 则变为（0.257±0.013）。由此表明，该脂质体在 4 ℃的纯水中有良好的储存稳定性，且在 37 ℃的 PBS 中也有较好的稳定性（见图 4）。

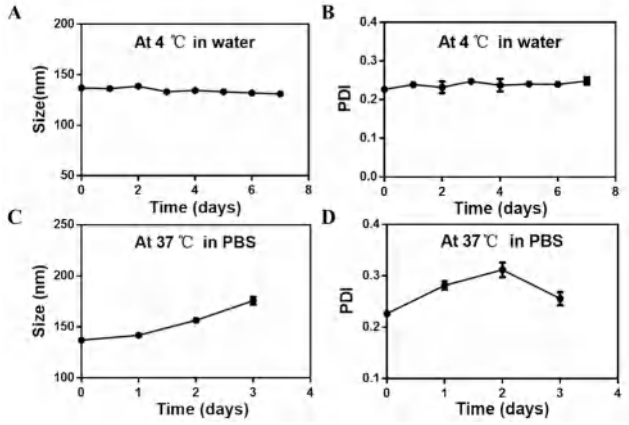


图 4 α-TOS-TPP-OA 的稳定性

Fig 4 Stability of α-TOS-TPP-OA

2.6 线粒体靶向

由于 OA 自身不发荧光，因此采用脂溶性的带绿色荧光的香豆素 6 作为替代 OA 的模型药物，按“2.1”“2.2”项下方法制备含有香豆素 6（C6）的脂质体。将 BxPC-3 细胞以 1×10^4 个的密度接种于 24 孔培养板内，用血清培养基培养 24 h，将质量浓度为 100 ng • mL^{-1} 的载 C6（显绿色荧光）的 α-TOS-C6 和载 C6 的 α-TOS-TPP-C6 加入其中，再与细胞共同孵育 1、3 h 后，用 37 ℃的 PBS 洗涤。用 100 nmol • L^{-1} 的 Mitotracker Red 染线粒体（红色荧光）20 min，10 μg • mL^{-1} 的 DAPI 溶液染细胞核（蓝色荧光）5 min，然后在激光共聚焦显微镜下观察 C6 在细胞内的分布情况。

结果如图 5 所示，孵育 1、3 h 后，含有 C6 的脂质体进入肿瘤细胞，且随着孵育时间的延长，绿色荧光逐渐增强，表明随着孵育时间的延长，肿瘤细胞对脂质体的摄取增加。带有绿色荧光的脂质体与呈红色荧光的线粒体重合，会呈现为黄色。随着孵育时间的增加黄色逐渐变深，说明脂质体逐步聚集在线粒体周围。脂质体与线粒体的共定位通过皮尔逊系数（PCC）来体现，通过 Image J 分析的到共定位散点图及 PCC。通过共定位散点图表明，随着孵育时间的增加，α-TOS-TPP-C6 的红色荧光和绿色荧光共定位关

系明显好于α-TOS-C6。PCC结果如图6显示，α-TOS-TPP-C6的PCC明显高于α-TOS-C6，且存在显著性差异。由此可知，TPP阳离子能促进脂质体聚集在肿瘤细胞的线粒体部位。

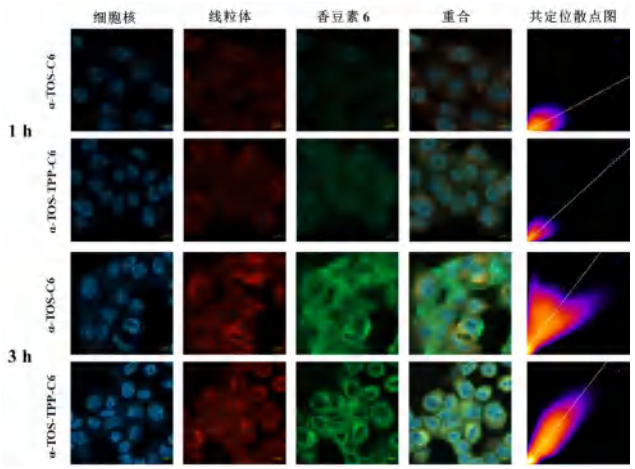


图5　α-TOS-C6和α-TOS-TPP-C6孵育1、3 h后激光共聚焦显微镜图片及共定位散点图

Fig 5　Confocal laser confocal microscopy images and colocalization scatter plots of α-TOS-C6 and α-TOS-TPP-C6 after incubation for 1 and 3 h

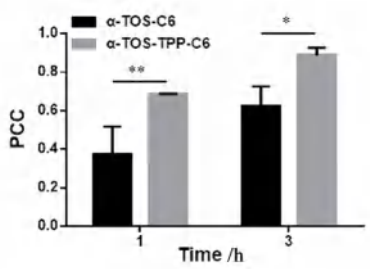


图6　α-TOS-C6和α-TOS-TPP-C6孵育1、3 h后的PCC值（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig 6　PCC of α-TOS-C6 and α-TOS-TPP-C6 after 1 and 3 h incubation（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

注：与同等条件下α-TOS-C6的比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

Note：Comparison with α-TOS-C6 under the same conditions，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$.

2.7　细胞存活率的测定

将胰腺癌细胞株BxPC-3复苏传代，在37 ℃、5%CO_2培养箱中培养24 h，然后分为OA组、α-TOS-TPP组、α-TOS-TPP＋OA组和α-TOS-TPP-OA组，给予对应药物处理，由于不同给药组在相同浓度时的抑制率相差较大，在计算IC_{50}时容易造成误差，故给药浓度有所不同。其中α-TOS-TPP＋OA游离药物组和α-TOS-TPP-OA组的给药浓度为1、2、5、10、15、20、25、30 μmol•L^{-1}（以OA浓度为准），OA组、α-TOS组和α-TOS-TPP组给药浓度为15、20、25、30、35、40、45、50 μmol•L^{-1}，每个浓度设6个复孔，加药后孵育48 h后，取出96孔板，避光条件下加入MTT溶液20 μL，继续培养4 h后取出，加入150 μL二甲基亚砜，轻微振荡10 min，在490 nm波长下检测下吸光度，计算IC_{50}。

结果如表1所示，通过TPP对α-TOS的修饰，α-TOS-TPP对BxPC-3的抑制作用较α-TOS明显增加。α-TOS-TPP＋OA给药组合对BxPC-3的抑制作用高于α-TOS-TPP和OA单独给药。而α-TOS-TPP-OA对BxPC-3的毒性高于α-TOS-TPP＋OA的给药组合，其IC_{50}明显低于其他给药组。

表1　OA、α-TOS-TPP、α-TOS-TPP＋OA游离药物和α-TOS-TPP-OA在48 h的IC_{50}

Tab 1　IC_{50} of OA，α-TOS-TPP，α-TOS-TPP＋OA free drugs and α-TOS-TPP-OA at 48 h

药物种类	IC_{50}/（μmol•L^{-1}）
OA	57.04±1.41
α-TOS	53.41±4.09
α-TOS-TPP	27.51±1.08
α-TOS-TPP＋OA	16.84±2.42
α-TOS-TPP-OA	8.65±5.73

2.8　流式细胞仪检测细胞凋亡

为检测α-TOS-TPP-OA诱导BxPC-3细胞凋亡的作用，将BxPC-3细胞以2×10^6个每孔加入6孔板中，孵育过夜贴壁。孔内分别加入相应IC_{50}的α-TOS-TPP-OA，其中OA、α-TOS、α-TOS-TPP和α-TOS-TPP＋OA的加入量与α-TOS-TPP-OA中相应含量相等。孵育24 h后，分别收集孔中的细胞，PBS洗涤两次后，加入5 μL Annexin V-FITC和10 μL PI标记。通过流式细胞仪分析凋亡情况。如图7所示，α-TOS-TPP-OA处理的细胞处于早期和晚期凋亡阶段的分别占45.34%和37.55%，而α-TOS-TPP＋OA分别诱导46.74%和5.73%的细胞进入早期和晚期凋亡阶段。从流式细胞仪分析可以看出，α-TOS-TPP-OA比α-TOS-TPP＋OA能诱导更多的BxPC-3细胞凋亡，可能是因为靶向作用让更多的药物进入线粒体所致。

3　讨论

OA具有潜在的抗肿瘤活性，可诱导许多肿瘤细胞系凋亡，但OA的低水溶性和低渗透性限制了其使用[14]。因此，有必要选择合适的纳米给药系统来增加OA的溶解度，减少口服首过效应，提高生物利用度。近年来，为了克服低溶解度药物的缺点，目前已有脂质体[15]、纳米脂质体[16]、纳米混悬剂[17]、口服微乳[18]、固体分散体[19]等剂型的报道，但存在长期稳定性差、载药量小、靶向性多、仅依靠通透性保留（EPR）效应的被动靶向等不足。

α-TOS能与线粒体电子传递链复合物Ⅱ结合，通过线粒体外膜通透性诱导不同类型肿瘤细

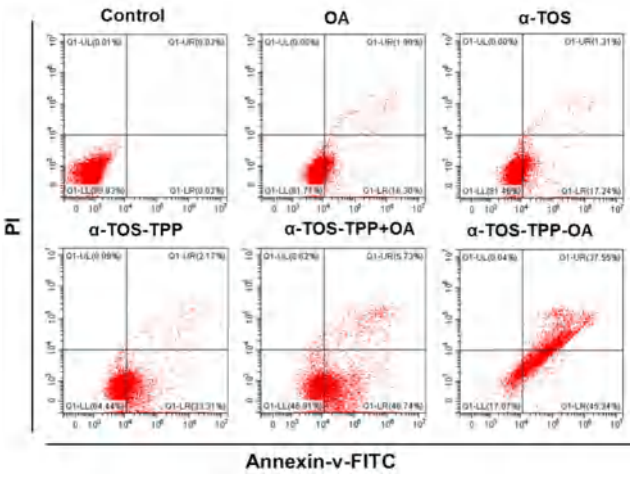


图 7 流式细胞仪分析 OA、α-TOS、α-TOS-TPP、α-TOS-TPP ＋ OA 和 α-TOS-TPP-OA 诱导 BxPC-3 细胞凋亡的作用

Fig 7 Apoptosis of BxPC-3 cells induced by OA, α-TOS, α-TOS-TPP, α-TOS-TPP ＋ OA and α-TOS-TPP-OA by flow cytometry

胞凋亡，从而损伤线粒体[20]。Mallick 等[13]证明了 α-TOS- 化疗药物偶联脂质体可以同时靶向肿瘤细胞中的线粒体和细胞核。本研究通过酯化反应将 6- 溴正己醇连接到 α-TOS 上，该反应生成化合物 A，进一步引入线粒体靶向 TPP 基团，得到 α-TOS-TPP。α-TOS-TPP 具有一定的亲脂性，更容易透过细胞膜，而且肿瘤细胞中的线粒体具有更高的膜电位，使得 α-TOS-TPP 这种离域型亲脂阳离子（DLC）更容易选择性富集肿瘤细胞线粒体，因此使其一定程度上具有了线粒体靶向的能力[21]。

以 α-TOS-TPP 作为线粒体靶向载体，制备了具有线粒体靶向性的 OA 脂质体，并且使用 PEG 对脂质体进行表面包覆，以避开单核吞噬系统，以确保长时间的血液循环。粒径的大小是通过独特的渗漏血管系统成功积聚到肿瘤组织中的重要决定因素之一，经证实，粒径为 20 ～ 300 nm 的胶束的血液循环时间和肿瘤聚集量随其直径的增大而增加，最佳粒径范围为 100 ～ 160 nm[22]。该脂质体的粒径为（137.0±0.8）nm，可通过增强 EPR 效应和减少网状内皮系统（RES）的清除提高抗肿瘤效果和降低毒性[23]。此外，α-TOS-TPP-OA 的表面电荷为＋（43.09±1.22）mV，说明 TPP 覆盖在脂质体的表面，使得该脂质体表面带有正电荷，这可以使该脂质体通过胞吞进入细胞内后依靠静电效应向线粒体聚集，通过线粒体靶向性考察，证实了这一点。通过 MTT 实验和流式细胞仪分析发现，α-TOS-TPP-OA 对 BxPC-3 细胞的抑制作用明显增强，这可能与 α-TOS-TPP-OA 增加了药物在线粒体的聚集有关。

综上所述，本研究通过 TPP 对 α-TOS 的修饰，合成了一种具有线粒体靶向性的载体，制备了搭载 OA 的脂质体，并初步评价了其体外抗胰腺癌作用，为 OA 治疗胰腺癌提供了一种新的思路，但后续还需要更深入地开展细胞水平研究及动物体内实验对本结论进一步验证。

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] Siegel RL，Miller KD，Fuchs HE，et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin，2021，71（1）：7-33.

[3] Schizas D，Charalampakis N，Kole C，et al. Immunotherapy for pancreatic cancer：a 2020 update [J]. Cancer Treat Rev，2020，86：102016.

[4] Luo Y，Liu Z，Zhang X，et al. Effect of a controlled-release drug delivery system made of oleanolic acid formulated into multivesicular liposomes on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo [J]. Int J Nanomedicine，2016，11：3111-3129.

[5] 李美睢，卢婷，赵建云，等 . 齐墩果酸和熊果酸的测定方法与药理作用研究进展 [J]. 青海草业，2020，29（4）：58-63.

[6] 毛午佳，周立，雷发啟，等 . 齐墩果酸结构修饰及抗肿瘤活性的探究 [J]. 中华肿瘤防治杂志，2018，25（S1）：4-5.

[7] Greatrex BW，Daines AM，Hook S，et al. Synthesis，formulation，and adjuvanticity of monodesmosidic saponins with olenanolic acid，hederagenin and gypsogenin aglycones，and some c-28 ester derivatives [J]. Chem Open，2015，4（6）：740-755.

[8] Nelson AT，Camelio AM，Claussen KR，et al. Synthesis of oxygenated oleanolic and ursolic acid derivatives with anti-inflammatory properties [J]. Bioorg Med Chem Lett，2015，25（19）：4342-4346.

[9] 陈丹，张小里，李冰麟，等 . 正己烷 / 丙酮混合溶剂中非均相催化合成 α- 生育酚琥珀酸酯 [J]. 化工进展，2019，38（9）：4095-4101.

[10] 郑益萍，鲁春青，纪宏宇，等 . α- 生育酚琥珀酸酯抗肿瘤新剂型研究进展 [J]. 中国药师，2018，21（7）：1275-1277.

[11] 杨丹琦，王艳宏，李洪晶，等 . 基于亲脂性阳离子、线粒体靶向信号肽和己糖激酶修饰的线粒体靶向抗肿瘤制剂的研究进展 [J]. 中国药房，2019，30（2）：272-276.

[12] Mallick A，More P，Syed MM，et al. Nanoparticle-mediated mitochondrial damage induces apoptosis in cancer [J]. ACS Appl Mater Interfaces，2016，8（21）：13218-13231.

[13] Mallick A，More P，Ghosh S，et al. Dual drug conjugated nanoparticle for simultaneous targeting of mitochondria and nucleus in cancer cells [J]. ACS Appl Mater Interfaces，2015，7（14）：7584-7598.

[14] Wu H，Zhong Q，Zhong R，et al. Preparation and antitumor evaluation of self-assembling oleanolic acid-loaded Pluronic P105/d-α-tocopheryl polyethylene glycol succinate mixed micelles for non-small-cell lung cancer treatment [J].

Int J Nanomedicine，2016，11：6337-6352.
[15] 周惠恩，王婴，王岩，等 . 齐墩果酸长循环脂质体大鼠体内药动学及组织分布研究 [J]. 中药新药与临床药理，2017，28（4）：489-493.
[16] 刘双 . 齐墩果酸分离与纳米粒制备及对 CCl_4 肝损伤小鼠防护作用 [D]. 哈尔滨：哈尔滨工业大学，2020.
[17] 程佳慧，刘喜纲，常金花，等 . 不同稳定剂种类对齐墩果酸纳米混悬剂溶出度的影响 [J]. 中国医院药学杂志，2020，40（22）：2327-2331.
[18] Yang R，Huang X，Dou J，et al. Self-microemulsifying drug delivery system for improved oral bioavailability of oleanolic acid：design and evaluation [J]. Int J Nanomedicine，2013，8：2917-2926.
[19] 武倩，常金花，薛禾菲，等 . 复合载体齐墩果酸固体分散体的制备及评价 [J]. 中国医院药学杂志，2020，40（4）：385-390.
[20] Sánchez-Rodríguez C，Palao-Suay R，Rodrigáñez L，et al. α-tocopheryl succinate-based polymeric nanoparticles for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma [J]. Biomolecules，2018，8（3）：97.
[21] 叶琳 . 基于三苯基膦线粒体靶向载 7- 羟基香豆素纳米粒的制备及其抗肿瘤活性研究 [D]. 咸宁：湖北科技学院，2021.
[22] Wang J，Mao W，Lock LL，et al. The role of micelle size in tumor accumulation，penetration，and treatment [J]. ACS Nano，2015，9（7）：7195-7206.
[23] Luan X，Yuan H，Song Y，et al. Reappraisal of anticancer nanomedicine design criteria in three types of preclinical cancer models for better clinical translation [J]. Biomaterials，2021，275：120910.

（收稿日期：2021-09-22；修回日期：2021-12-18）

基于网络药理学探讨四臣止咳颗粒治疗慢性支气管炎急性发作的作用机制

崔爽，张明倩，梁五林，郭凡帆，欧文静，伍永鸿，贾占红，葛东宇，董瑞娟*，张硕峰*（北京中医药大学中药学院，北京 102488）

摘要：目的 基于网络药理学和分子对接技术探讨四臣止咳颗粒治疗慢性支气管炎（CB）急性发作的作用机制，并对其进行实验验证。**方法** 通过 TCMSP、TCMID 数据库等筛选四臣止咳颗粒的潜在化学成分，采用 SwissTargetPrediction 数据库预测活性成分的潜在靶点；在 OMIM、GeneCards 数据库中检索 CB 急性发作的相关靶点，对四臣止咳颗粒与 CB 急性发作的靶点进行 PPI 网络构建，交互处理得到四臣止咳颗粒治疗 CB 急性发作的关键靶点，进行 GO 和 KEGG 分析；利用分子对接技术对成分与关键靶点蛋白进行分子对接，通过多次气道内雾化给药的方式建立脂多糖（LPS）致大鼠 CB 急性发作模型加以验证。**结果** 获得四臣止咳颗粒靶点 823 个，CB 急性发作潜在靶点 744 个，共同靶点 180 个，关键靶点包括 STAT3、AKT1、NFκB1 等 25 个，涉及 toll 样受体信号通路、NF-κB 信号通路等。分子对接结果显示，STAT3、AKT1、MAPK1、NFκB1 等可能为四臣止咳颗粒治疗 CB 急性发作的关键靶点。体内实验验证结果表明，四臣止咳颗粒可明显减轻大鼠肺组织病理程度，肺泡结构紊乱明显好转，炎症明显减轻，WAm/Pbm、WAi/Pbm、WAt/Pbm 显著降低（$P < 0.01$），肺泡灌洗液（BALF）中促炎因子 IL-6 和 TNF-α 含量显著降低（$P < 0.01$），肺组织 NF-κB p-p65 蛋白表达均降低。**结论** 四臣止咳颗粒可能通过下调炎症信号通路 NF-κB 的激活，减轻炎性细胞浸润和气道重塑程度，调节炎症反应进程，从而起到抗 CB 急性发作的作用，可为深入四臣止咳颗粒治疗 CB 急性发作分子机制提供理论依据。

关键词：四臣止咳颗粒；慢性支气管炎急性发作；网络药理学；分子对接；作用机制
中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)05-1063-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.018

基金项目：西藏自治区科技计划项目（No. XZ201801-GA-16）。
作者简介：崔爽，女，硕士研究生，主要从事中药防治呼吸系统相关疾病研究，email：1306167309@qq.com *通信作者：张硕峰，男，博士研究生导师，教授，主要从事中药治疗临床常见病的药效评价及机制分析，email：shuofengzhang@sina.com；董瑞娟，女，硕士，中级实验师，主要从事中药的药理、毒理以及呼吸系统等相关疾病研究，email：drjdongruijuan@126.com

Mechanism of action of Sichen Zhike granules for acute attack of chronic bronchitis based on network pharmacology

CUI Shuang, ZHANG Ming-qian, LIANG Wu-lin, GUO Fan-fan, OU Wen-jing, WU Yong-hong, JIA Zhan-hong, GE Dong-yu, DONG Rui-juan*, ZHANG Shuo-feng* (*School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488)

Abstract: Objective To determine the molecular mechanism of herbal couple Sichen Zhike (SCZK) granules against acute attack of chronic bronchitis (CB) based on network pharmacology and molecular docking, and verify the results with experiment. **Methods** Potential chemical components of SCZK granules were obtained by TCMSP and TCMID. The targets of the active components were predicted by SwissTargetPrediction. The targets related to CB acute attack were obtained by OMIM and GeneCards databases. The PPI network was constructed with SCZK granules and CB acute attack targets. The key targets of SCZK granules for acute attack of CB were obtained by interactive processing, and then GO and KEGG analyses were conducted. Moreover, the molecular docking technique was applied to validate the compound-target association. Finally, Lipopolysaccharide-induced acute attack of CB in rats established by intranasal aerosol administration was used to validate the results. **Results** Totally 823 targets of SCZK granules and 744 potential targets of acute attack of CB, 180 common targets, and 25 key targets including STAT3, AKT1 and NFκB1 were obtained. Toll-like receptor signaling pathway and NF-κB signaling pathway were involved. The molecular docking showed that STAT3, AKT1, MAPK1 and NFκB1 might be the key targets of SCZK granules for acute attack of CB. In vivo experimental verification showed that SCZK granules markedly reduced the histopathological damage of the lung, the alveolar structure disorder was improved significantly, inflammation reduced, and WAm/Pbm, WAi/Pbm, and WAt/Pbm were decreased significantly ($P < 0.01$). The content of IL-6 and TNF-α in BALF was decreased significantly ($P < 0.01$). The expression of NF-κB p-p65 protein in the lung tissue was decreased. **Conclusion** SCZK granules many attenuate LPS-induced acute attack of CB responses in multiple airway aerosol administration of rats by downregulating the NF-κB signaling pathway, which can provide theoretical basis for further research and treatment.

Key words: Sichen Zhike granule; acute attack of chronic bronchitis; network pharmacology; molecular docking; mechanism of action

慢性支气管炎（chronic bronchitis，CB）主要特征为气道高反应性及变异性炎症，该病病程长，因受寒、致敏原刺激等易诱发急性发作[1]。其急性发作期发病较快，会出现痰量增加的表现，容易阻塞气道致使感染迁延难愈，一旦发作会导致机体并发呼吸衰竭、心力衰竭、窒息等症，甚至可引起重症肺炎、呼吸衰竭等严重并发症[2]。四臣止咳颗粒由甘草、岩白菜、螃蟹甲、猪毛蒿 4 味药材组成[3]，源于藏医经典古方。据《新编藏药配方》记载其具有“清热养肺、止咳、退烧、滋补元气的功效，用于感冒发热、止咳、气管炎、消肿等”[4]。藏医临床上以传统汤剂使用多年，证明其具有显著的清热解毒、止咳平喘、润喉祛痰作用，对于多种类型的肺部和支气管相关疾病具有显著的治疗作用。

本研究拟通过网络药理学预测四臣止咳颗粒治疗 CB 急性发作的作用靶点或通路，并对其进行体外实验验证，为四臣止咳颗粒在 CB 急性发作疾病中的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 网络药理学预测四臣止咳颗粒抗 CB 急性发作的共同靶点及通路

1.1.1 化学成分收集与活性成分筛选 通过 TCMSP（https：//tcmspw.com/）和 TCMID（http：//119.3.41.228：8000/tcmid/）数据库以及相关文献和书籍获得四臣止咳颗粒的化学成分，筛选出潜在活性成分，通过 PubChem（https：//pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）获得化学成分的 Canonical SMILES，

通过 admetSAR 数据库（http：//lmmd.ecust.edu.cn/admetsar2/）按照口服生物利用度、胃肠吸收和类药性的筛选规则进行筛选，以 OB 和 IA 为＋，类药性符合 Lipinski 提出的类药分子筛选五规则的化合物作为候选活性成分。

1.1.2　四臣止咳颗粒作用靶点收集和疾病相关靶点搜集　通过 SwissTargetPrediction（http：//www.swisstargetprediction.ch/）和 TCMSP 数据库查找四臣止咳颗粒活性成分对应的潜在靶点。在 Genecards（https：//www.genecards.org/）和 OMIM 数据库（http：//www.omim.org/）中以“acute attack of chronic bronchitis”为关键词进行检索，去重后，使用 UniProt（https：//www.uniprot.org/）数据库进行标准化处理。

1.1.3　“中药 - 活性成分 - 疾病靶点”网络构建及可视化分析　将活性成分靶点与疾病靶点进行 Venny 分析（https：//bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/）得到交集作用靶点，利用 Cytoscape 3.7.1 软件构建“四臣止咳颗粒 - 活性成分 - 疾病靶点”网络图。

1.1.4　构建 PPI 网络图及筛选核心靶点　利用 STRING 平台（https：//string-db.org/）构建蛋白 - 蛋白相互作用（PPI）网络图，使用 Cytoscape 3.7.1 软件进行可视化分析，选取同时满足大于平均度值和平均介数的节点作为核心靶点并绘制 PPI 网络图。

1.1.5　GO 生物信息学分析和 KEGG 信号通路富集分析　利用 DAVID 6.8（https：//david.ncifcrf.gov/home.jsp）数据库对潜在靶点进行 GO 富集分析，选取前 20 个通过 SangerBox（http：//sangerbox.com/Tool/）进行可视化处理（$P < 0.05$）。以“$P < 0.01$”及“FDR ＜ 0.01”为筛选条件，对潜在靶点进行 KEGG 通路富集分析，保留与 CB 急性发作相关的通路并进行可视化，通过 Cytoscape 3.7.1 软件构建四臣止咳颗粒“中药 - 成分 - 靶点 - 通路”网络图。

1.1.6　分子对接　选取 PPI 网络中度值较高的前 8 个靶点并反向寻找四臣止咳颗粒各单药中的潜在活性成分，利用 PyRx 中的 AutoDock Vina 算法进行分子对接。

1.2　实验验证

1.2.1　实验动物　SPF 级 SD 大鼠 60 只，体质量 200 ～ 220 g，雌雄各半，购于斯贝福（北京）生物技术有限公司，许可证号为 SCXK（京）2019-0010。

1.2.2　试药　四臣止咳颗粒（北京中医药大学中药制药系倪健教授提供，批号：2101003）；复方甘草口服溶液（批号：2005801，青岛黄海制药有限责任公司）；脂多糖（LPS，批号：L2630，Sigma 公司）；NF-κB p-p65 抗体（批号：ab194726，abcam 公司）；小鼠 SAP 试剂盒（SAP-9102，北京中杉金桥生物技术有限公司）；二抗山羊抗兔免疫荧光试剂盒（ab150077，abcam 公司）；荧光封片剂（含 DAPI）（批号：ZLI-9557，北京中杉金桥生物技术有限公司）；白介素 6（IL-6）检测试剂盒（批号：SEA079Ra）、肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）检测试剂盒（批号：SEA133Ra）（武汉云克隆科技股份有限公司）；白介素 8（IL-8）检测试剂盒（批号：MM-0175R1，江苏科特生物科技有限公司）。

1.2.3　仪器　Buxco RC 肺功能仪检测系统（美国 Buxco 公司）；小动物喉镜（型号：HY-SHJ01）、微量液体气管内雾化器（型号：HY-LWH01）、大小鼠操作平台（型号：HY-SC01）（北京元森凯德生物技术有限公司）；小动物吸入式麻醉机（型号：ZS-M，北京众实迪创科技发展有限责任公司）；生物显微镜 [型号：LH-M100CB-1，尼康仪器（上海）有限公司]；激光共聚焦显微镜 [型号：TCS-SP8，徕卡显微系统（上海）有限公司]。

1.2.4　实验方法　将大鼠适应性饲养 5 d 后，随机分为 6 组，每组 10 只，分别为对照组，模型组，复方甘草组，四臣止咳颗粒 1.8、3.6、7.2 g 生药 • kg^{-1} 组。除对照组外各组在异氟烷麻醉状态下进行 LPS 雾化吸入，对照组雾化给药同体积生理盐水。待大鼠进入深度麻醉后，将大鼠置于大小鼠操作平台，将小动物喉镜插入至舌根部，挑起会厌软骨显露声门，将微量液体气管内雾化器通过口腔沿声门插入气管，迅速按压液体推送把手喷入 1 mg • mL^{-1} 的 LPS 溶液，第 6、13、20 日雾化给药 25 μL，第 23、27 日雾化给药 50 μL，进行 CB 急性发作的模型制备。四臣止咳颗粒各剂量组于第 7 ～ 12 日、14 ～ 19 日、21 ～ 22 日、24 ～ 26 日、28 ～ 29 日分别灌胃给予相应药物，1 次 • d^{-1}。对照组、模型组给予等量饮用水（10 mL • kg^{-1}）。复方甘草组大鼠灌胃给予复方甘草口服液 3 mL • kg^{-1}。实验于第 30 日采集标本。

1.2.5　支气管病理学观察及气道重塑指标的检测　处死大鼠，打开胸腔暴露心脏，分离右肺取下叶置于 4% 福尔马林固定，常规脱水包埋，切片后进行 HE 染色，置于 200 倍镜观察大鼠肺组织病理损伤情况。每张切片选取 5 个完整的支气管横断面，结果采用 Image5 软件测量基底膜周径（Pbm）、平滑肌面积（WAm）、气道内壁面积（WAi）、支气管总管壁面积（WAt），为消除管径大小、气道状态和切片方向等造成的误差，采用 Pbm 将上述测量值标准化，以平滑肌厚度（WAm/Pbm）、气道内壁内壁厚度（Wai/Pbm）、总管壁厚度（WAt/Pbm）衡量气道重塑程度。

1.2.6　ELISA 法检测各组大鼠 BALF 中促炎因

子 IL-6、IL-8、TNF-α 水平　分别采用 2 mL、2 mL、1 mL PBS 缓冲液灌洗大鼠左肺，回收率＞90%，回收后的 BALF 置于 4 ℃、3000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液按照 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-6、IL-8、TNF-α 的含量。

1.2.7　免疫荧光法检测肺组织 NF-κB p-p65 表达　将切片进行脱蜡、抗原修复后进行山羊血清封闭，一抗（1∶50）4 ℃孵育过夜，羊抗兔二抗（1∶200）室温避光孵育 1 h，DAPI 封片。置于 400 倍镜激光共聚焦显微镜下进行观察，每张切片选取 5 个视野，图片采用 Image5 对 NF-κB p-p65 蛋白表达进行半定量分析。

1.2.8　统计学分析　采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析，计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，所有数据均进行正态检验，数据满足方差齐时采用单因素方差分析，组间比较采用 LSD 检验；数据呈非正态或方差不齐时采用非参数检验或 Welch 检验，P ＜ 0.05 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　四臣止咳颗粒化学成分筛选

通过 TCMSP、TCMID 在线数据库平台检索以及文献分析，共收集到四臣止咳颗粒化学成分 141 个，获得作用靶点 823 个。

2.2　CB 急性发作的疾病靶点筛选

在 GeneCards 数据库获得 CB 急性发作靶点 710 个（Relevance score ＞ 10），在 OMIM 数据库获得靶点 53 个，去除重复靶点 19 个，最终获得靶点 744 个。

2.3　交集靶点筛选与“中药 - 活性成分 - 药物靶点”网络图

通过在线韦恩图两者取交集，获得四臣止咳颗粒与 CB 急性发作共同靶点 180 个，利用 Cytoscape 3.7.1 网络可视化软件构建“中药 - 活性成分 - 药物靶点”网络图（见图 1）。

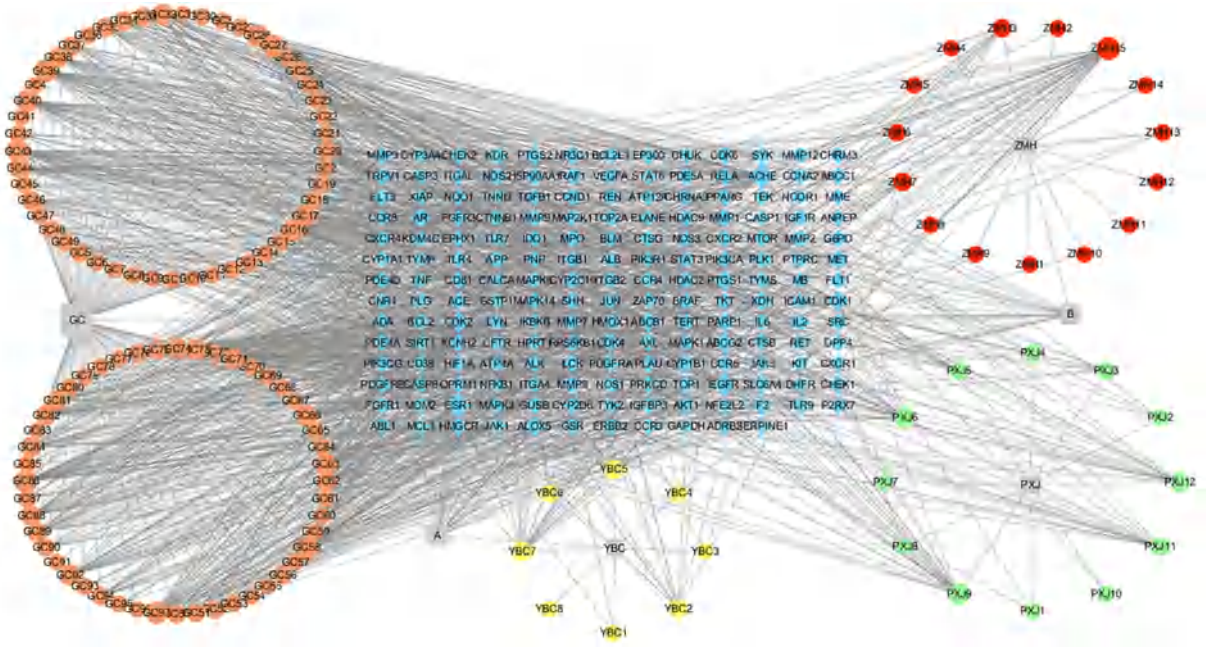


图 1　四臣止咳颗粒“中药 - 活性成分 - 药物靶点”网络图

Fig 1　Network diagram of “TCM-active component-drug target” of Sichen Zhike granules

2.4　PPI 网络构建及核心靶点的筛选

将交集靶点导入 STRING 数据库进行 PPI 分析（见图 2），平均 Degree 为 11.181、平均 Betweenness 为 0.021，其关键靶点包括 STAT3、PIK-3CA、PIK3R1、SRC、AKT1、MAPK1、MAPK3、NFκB1 等 25 个，可能是四臣止咳颗粒治疗 CB 急性发作的关键靶点。

2.5　GO 生物信息学和 KEGG 信号通路富集分析

共获得 GO 条目 729 个（P ＜ 0.05），其中生物过程（BP）541 条，细胞组成（CC）73 条，分子功能（MF）115 条，分别选取 P 值排名前 20 位使用 SangerBox 在线作图平台绘制成高级气泡图（见图 3）。

KEGG 通路富集分析共筛选出与 CB 急性发作相关通路 19 条（见图 4），涉及 NF-κB 信号通路、toll 样受体信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、HIF-1 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、T 细胞受体信号通路等。

将中药、活性成分和交集靶点以及筛选后的 19 条通路导入 Cytoscape 3.7.1 软件绘制“中药 -

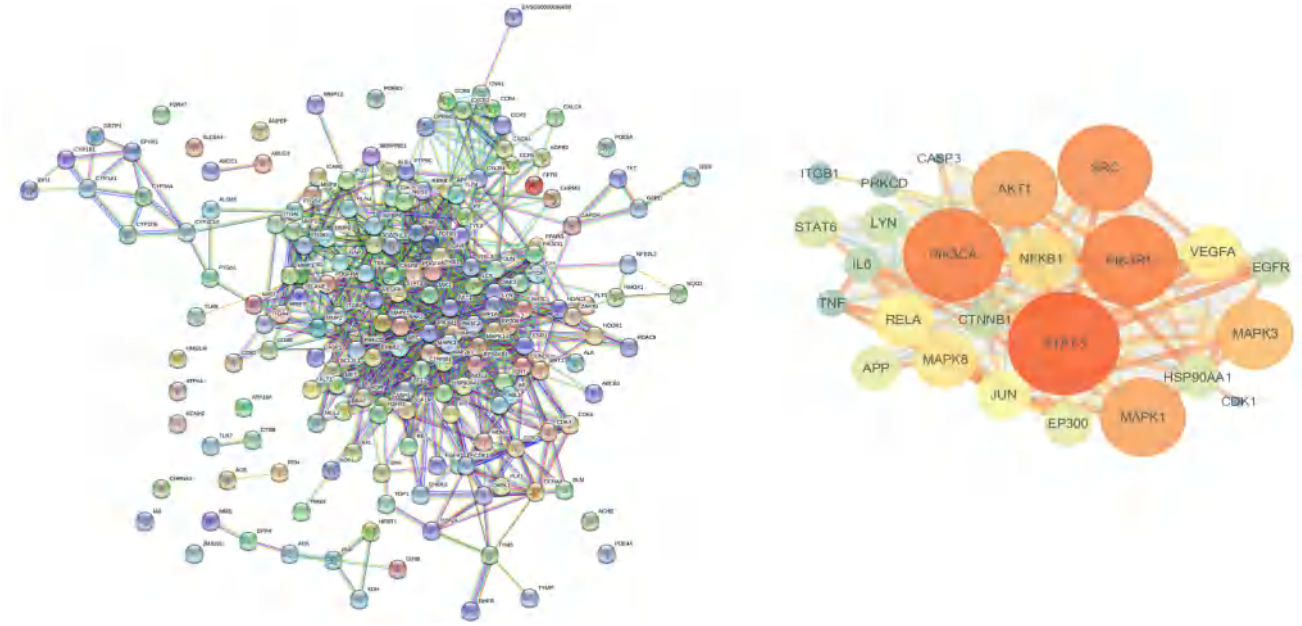


图 2　靶点相互作用网络图

Fig 2　Network diagram of target interaction

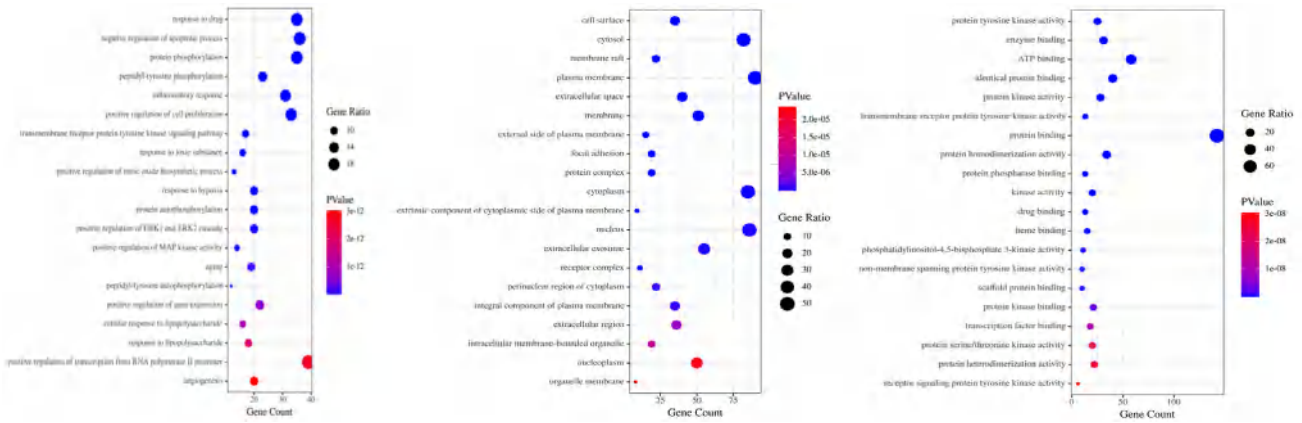


图 3　四臣止咳颗粒治疗 CB 急性发作交集基因 GO 功能富集结果

Fig 3　GO enrichment of the intersection genes of acute attack of CB treated by Sichen Zhike granules

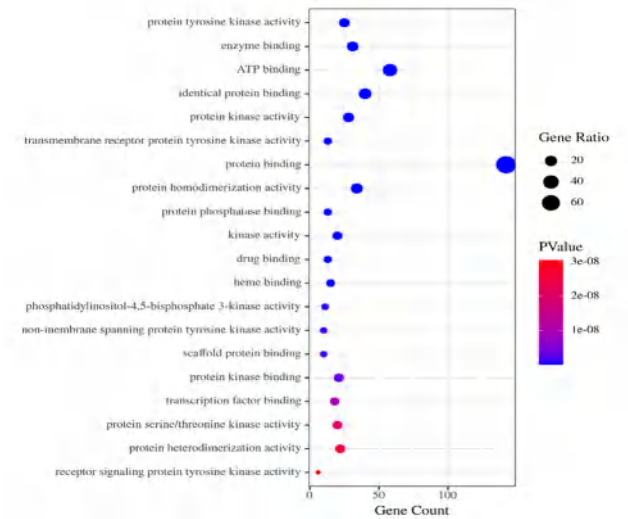


图 4　四臣止咳颗粒治疗 CB 急性发作交集基因 KEGG 功能富集结果

Fig 4　KEGG enrichment of the intersection genes of acute attack of CB treated by Sichen Zhike granules

成分 - 靶点 - 通路”网络图（见图 5）。网络图中包含 337 个节点，1923 条边线。

2.6　分子对接结果

各靶点与其潜在活性成分的结合能绝大部分小于－ 5 kcal • mol^{-1}，表明活性成分与有效靶点具有较好的结合活性（见图 6）。

2.7　四臣止咳颗粒对 LPS 致 CB 急性发作大鼠肺组织病理学变化

对照组大鼠支气管黏膜上皮基本完整，肺泡呈空泡状，薄壁结构，未见炎性细胞浸润。模型组大鼠肺实质破坏，支气管黏膜上皮出现部分脱落坏死，肺泡壁毛细血管扩张，充血淤血，肺泡间隔断裂，相邻肺泡融合成较大囊腔，并且气管壁增厚，气道管腔明显变窄，可见炎性细胞广泛浸润。四臣止咳颗粒 1.8、3.6、7.2 g • kg^{-1} 组大鼠病理结构改

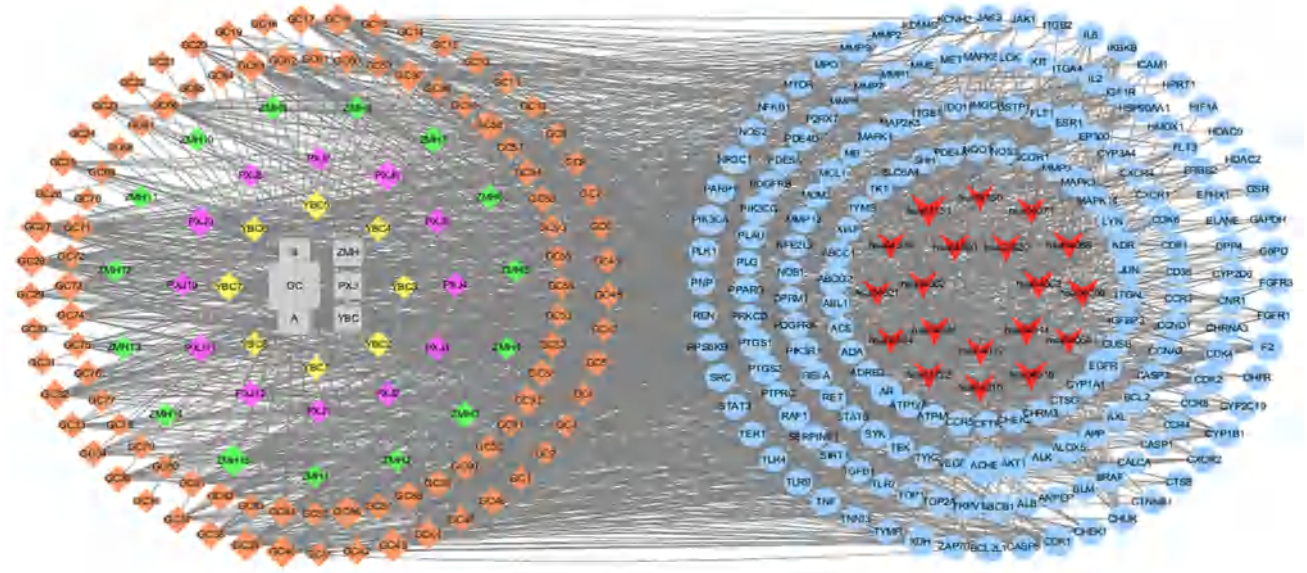


图 5 中药 - 成分 - 靶点 - 通路网络图

Fig 5 Network diagram of TCM-component-target-pathway

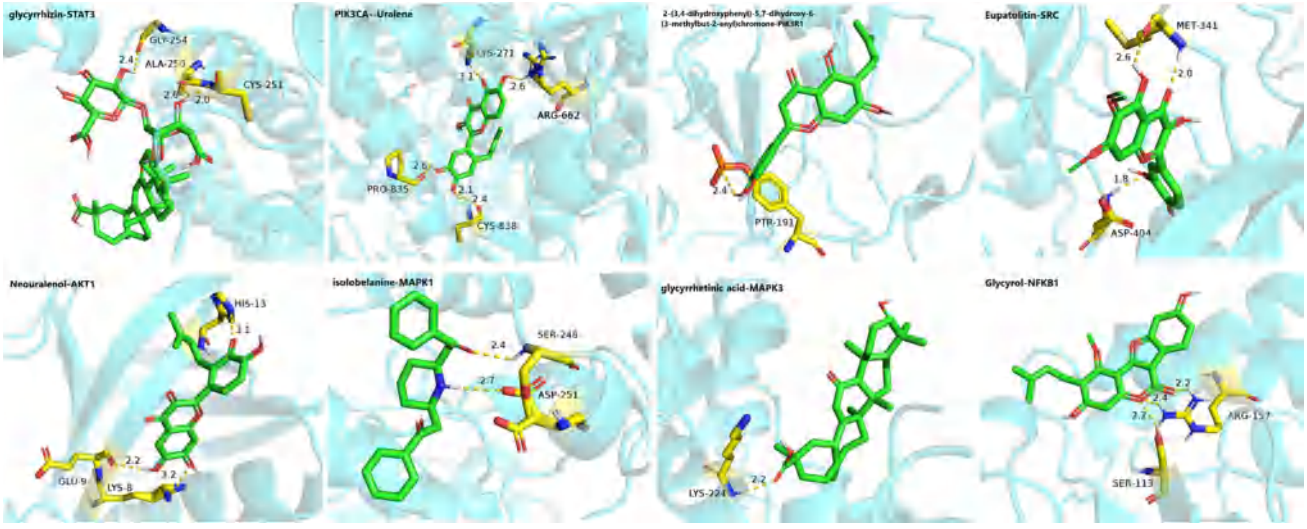


图 6 化学成分与靶点的分子对接模式图

Fig 6 Molecular docking pattern of chemical compositions and targets

变明显减轻，支气管上皮细胞偶见脱落坏死，肺泡结构紊乱明显好转，炎症明显减轻（见图 7）。

图 7 四臣止咳颗粒对 LPS 致 CB 急性发作大鼠肺组织病理学的影响（HE，×200）

Fig 7 Effect of Sichen Zhike granules on the lung histopathology of LPS-induced CB acute attack in rats（HE，×200）

A. 对照组（control group）；B. 模型组（model group）；C. 复方甘草组（compound glycyrrhiza group）；D ～ F. 分别为四臣止咳颗粒 1.8、3.6、7.2 g • kg^{-1} 组（Sichen Zhike granules 1.8，3.6，7.2 g • kg^{-1} groups）

2.7 四臣止咳颗粒对 LPS 致 CB 急性发作大鼠气道重塑指标的影响

与对照组相比，模型组大鼠平滑肌厚度（WAm/Pbm）、气道内壁厚度（WAi/Pbm）、气道总管壁厚度（WAt/Pbm）明显增加（$P < 0.01$），与模型组相比，四臣止咳颗粒 1.8、3.6 g • kg^{-1} 组大鼠 WAi/Pbm、WAt/Pbm 显著降低（$P < 0.01$），四臣止咳颗粒 7.2 g • kg^{-1} 组大鼠 WAm/Pbm、WAi/Pbm、WAt/Pbm 显著降低（$P < 0.01$）（见表 1）。

表 1　四臣止咳颗粒对 LPS 致 CB 急性发作大鼠气道重塑指标的影响（n = 10，μm^2 · μm^{-1}）

Tab 1　Effects of Sichen Zhike granules on airway remodeling indexes in LPS-induced CB acute attack rats (n = 10，μm^2 · μm^{-1})

组别	WAm/Pbm	WAi/Pbm	WAt/Pbm
对照组	6.67±0.81	30.43±3.46	37.09±3.61
模型组	20.37±4.41**	47.08±4.39**	67.45±7.20**
复方甘草组	10.36±1.51$^{\#\#}$	27.50±3.60$^{\#\#}$	37.86±3.83$^{\#\#}$
四臣止咳颗粒 1.8 g · kg^{-1} 组	14.58±2.70	30.53±3.42$^{\#\#}$	45.11±5.00$^{\#\#}$
四臣止咳颗粒 3.6 g · kg^{-1} 组	11.60±2.21	27.89±4.57$^{\#\#}$	39.49±4.30$^{\#\#}$
四臣止咳颗粒 7.2 g · kg^{-1} 组	9.84±1.38$^{\#\#}$	23.79±2.90$^{\#\#}$	33.63±3.61$^{\#\#}$

注：与对照组比较，$^{**}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P < 0.01$。

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

2.8　四臣止咳颗粒对 LPS 致 CB 急性发作大鼠 BALF 中促炎因子 IL-6、IL-8、TNF-α 水平的影响

与对照组相比，模型组大鼠 BALF 中促炎因子 IL-6、IL-8 和 TNF-α 含量显著升高（$P < 0.01$）；与模型组相比，四臣止咳颗粒 1.8、3.6、7.2 g · kg^{-1} 组大鼠 BALF 中促炎因子 IL-6、IL-8 和 TNF-α 含量显著降低（$P < 0.01$）（见表 2）。

表 2　四臣止咳颗粒对 LPS 致 CB 急性发作大鼠 BALF 中 IL-6、IL-8、TNF-α 水平的影响（n = 10，pg · mL^{-1}）

Tab 2　Effects of Sichen Zhike granules on IL-6，IL-8 and TNF-α levels in BALF of LPS-induced CB acute attack rats (n = 10，pg · mL^{-1})

组别	IL-6	IL-8	TNF-α
对照组	7.60±3.89	44.35±21.76	20.78±5.17
模型组	28.86±7.80**	261.62±55.50**	30.78±2.60**
复方甘草组	11.28±4.14$^{\#\#}$	47.24±19.65$^{\#\#}$	19.59±3.46$^{\#\#}$
四臣止咳颗粒 1.8 g · kg^{-1} 组	10.36±4.83$^{\#\#}$	124.16±29.90$^{\#\#}$	21.58±3.44$^{\#\#}$
四臣止咳颗粒 3.6 g · kg^{-1} 组	8.12±2.65$^{\#\#}$	98.16±36.13$^{\#\#}$	21.45±3.39$^{\#\#}$
四臣止咳颗粒 7.2 g · kg^{-1} 组	10.78±3.90$^{\#\#}$	100.81±31.79$^{\#\#}$	21.34±4.70$^{\#\#}$

注：与对照组比较，$^{**}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P < 0.01$。

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

2.9　四臣止咳颗粒对 LPS 致 CB 急性发作大鼠肺组织 NF-κB p-p65 免疫荧光表达的影响

与对照组相比，模型组大鼠肺组织 NF-κB p-p65 蛋白表达显著升高（$P < 0.01$）；与模型组相比，四臣止咳颗粒各剂量组大鼠肺组织 NF-κB p-p65 蛋白表达显著降低（$P < 0.01$）（见图 8 及表 3）。

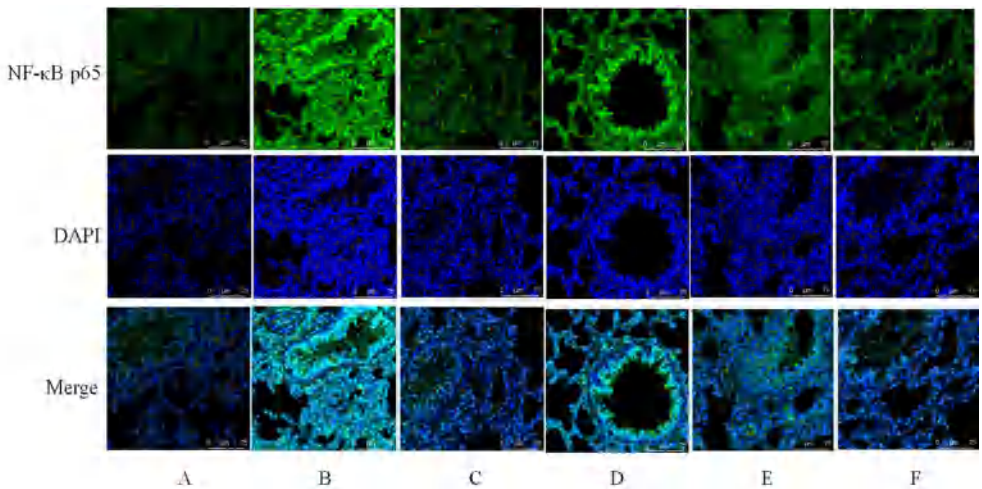


图 8　四臣止咳颗粒对 LPS 致 CB 急性发作大鼠肺组织 NF-κB p-p65 免疫荧光表达（IF，×400）

Fig 8　Immunofluorescence expression of NF-κB p-p65 in the lung tissues of LPS-induced acute attack of CB in rats by Sichen Zhike granules（IF，×400）

A. 对照组（control group）；B. 模型组（model group）；C. 复方甘草组（compound glycyrrhiza group）；D ～ F. 分别为四臣止咳颗粒 1.8、3.6、7.2 g · kg^{-1} 组（Sichen Zhike granules 1.8，3.6，7.2 g · kg^{-1} groups）

3　讨论

CB 是指气管、支气管黏膜与周围组织发生的慢性非特异性炎性疾病，病因机制较为复杂，其急性发作期会出现咳嗽、喘息及咳痰加重等一系列症状，同时呼吸系统黏膜存在广泛性的水肿和充血现象，容易阻塞气道致感染加重，致使机

表 3 四臣止咳颗粒对 LPS 致 CB 急性发作大鼠肺组织 NF-κB p-p65 蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$）（$n=10$）

Tab 3 Effect of Sichen Zhike granules on NF-κB p-p65 protein expression in lung tissues of LPS-induced CB acute attack rats ($\bar{x}\pm s$) ($n=10$)

组别	NF-κB p-p65
对照组	23.v75±6.07
模型组	79.84±13.10**
复方甘草组	34.55±9.29$^{\#\#}$
四臣止咳颗粒 1.8 g·kg^{-1} 组	46.71±11.88$^{\#\#}$
四臣止咳颗粒 3.6 g·kg^{-1} 组	34.32±9.34$^{\#\#}$
四臣止咳颗粒 7.2 g·kg^{-1} 组	35.73±9.42$^{\#\#}$

注：与对照组比较，$^{**}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P<0.01$。

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

体出现严重损伤，甚至出现持续性哮喘、呼吸衰竭等症，对机体生命安全产生严重威胁。CB 急性发作涉及多种蛋白、基因、致病因素等，因此研究药物治疗 CB 急性发作的潜在机制和作用靶点具有重要意义。

藏药四臣止咳颗粒中 4 味药材的有效成分对于多种类型的肺部和支气管相关疾病具有显著的治疗作用，如甘草及其多种单体成分均具有抗炎、抗菌[5]、抗氧化[6]、抗纤维化[7]、抗肿瘤[8]及调节免疫等作用，还可能通过抑制 NF-κB 向核内转移，减少炎症介质的转录和合成，拮抗大鼠哮喘时的氧化应激，从而发挥抗哮喘作用[9-10]；岩白菜中的主要有效成分岩白菜素具有抗炎镇痛[11]、止咳平喘[12]、抗肿瘤[13]、抗氧化[14]等作用，是治疗咳嗽咳血、肺气肿、慢性阻塞性肺疾病（COPD）、支气管哮喘、CB 等呼吸系统疾病的特效药物，其另一主要成分熊果苷同样具有治疗相关呼吸系统疾病的药理作用[15-16]；藏药螃蟹甲主要含有黄酮类、环烯醚萜苷类、苯乙醇苷类、挥发油类等化合物，其水提物、乙酸乙酯部位和正丁醇部位具有良好的抗炎镇痛活性[17-18]，其中镇咳、祛痰作用以正丁醇部位最为明显，平喘作用以乙酸乙酯部位为佳[19]；猪毛蒿常用于清热解毒，消肿，其有效成分绿原酸具有广泛的抗菌[20]、抗炎[21]、抗氧化[22-23]、抗肿瘤等药理作用，可用于治疗上呼吸道感染，消炎解热等。

本研究共筛选出的共同靶点的通路富集分析显示主要与 NF-κB 信号通路、toll 样受体信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、PI3K-Akt 信号通路、B 细胞受体信号通路等相关，PPI 网络分析结果发现 STAT3、PIK3CA、PIK3R1、SRC、AKT1、MAPK1、MAPK3 和 NF-κB1 排名靠前。其中，STAT3 作为重要的转录因子，参与调节肺部炎症，其活性依赖于巨噬细胞、中性粒细胞和细胞因子 IL-6 等的存在[24]，同时 IL-6 可通过促进 STAT3 蛋白磷酸化进而激活 NF-κB 通路，提高免疫反应[25]；SRC 蛋白不仅能够调控细胞的增殖、发育、分化等，其产物还能在多种肿瘤细胞中高度活化和过量表达，同时由肿瘤细胞分离出来的 *c-src* 基因具有较强的转化细胞的能力[26-27]；AKT1 作为 PI3K 下游的关键蛋白，可通过激活 PI3K 募集活化 AKT1 以促进内皮细胞活化和细胞增殖，促进上皮细胞间质转化，增加 COPD 的炎症损伤，该通路的下调会使 NF-κB 抑制蛋白 IKBα 表达下调并促进 NF-κB 磷酸化，引起 IL-6、TNF-α 等多种炎症因子的释放[28-29]；丝裂原活化蛋白激酶 1（MAPK1）、丝裂原活化蛋白激酶 3（MAPK3）在炎症细胞的增殖、分化和产生过程中主要通过外界刺激使其磷酸化而激活，促进 T 细胞的增殖能力和分泌水平，致巨噬细胞以及单核细胞等出现大量的聚集和激活，出现组织炎症的恶化[30]；NF-κB1 由经典通路激活，细胞外信号传入胞内可激活下游 IKK 激酶，诱导 IκB 泛素化、磷酸化或降解，使 NFκB 解离入核，促使炎性细胞因子转录与表达，诱发炎症反应[31]，以上靶点可能作为关键靶点发挥抗 CB 急性发作的作用。

LPS 是一种非常有效的刺激性物质，当吸入 LPS 时，LPS 能够刺激活化巨噬细胞并诱导机体释放大量的炎症因子，TLR4 在接受到促炎因子刺激后与相应配体作用，即完成跨膜信号转导，通过依赖于 MYD88 的 NF-κB 经典信号通路调控炎症基因的转录翻译和表达，产生和释放 IL-6、IL-8、TNF-α 等细胞因子及基质金属蛋白酶等多种蛋白酶[31-32]。其产生的炎性物质不仅可以直接损伤细胞、破坏细胞外基质，还可作为内源性配体与中性粒细胞、NK 细胞等表面的相应受体结合诱导生成一氧化氮（NO）、前列腺素（PG）等介质，介导炎症反应。同时，IL-6、IL-8、TNF-α 等细胞因子可刺激 NF-κB 活化，活化后的 NF-κB 又可进一步刺激、合成并释放大量炎症介质，募集炎症细胞，形成一个正反馈循环，最终炎症反应级联放大并持续存在。实验结果显示，经过四臣止咳颗粒治疗的大鼠病理结构改变明显减轻，支气管上皮细胞偶见脱落坏死，肺泡结构紊乱明显好转，炎症明显减轻，WAm/Pbm、WAi/Pbm、WAt/Pbm 显著降低，BALF 中促炎因子 IL-6 和 TNF-α 含量显著降低，肺组织 NF-κB p-p65 蛋白表达均降低，初步推测其可能通过下调炎症信号通路 NF-κB 的激活，减轻炎性细胞浸润和气道重塑程度，调节炎症反应进程，从而起到抗 CB 急性发作的作用。

本研究基于网络药理学方法和分子对接技术，阐明了四臣止咳颗粒通过多成分、多靶点、多通路发挥作用，并采用四臣止咳颗粒对多次气道内雾化给药建立 LPS 致大鼠 CB 急性发作进行实验验证，进一步证实四臣止咳颗粒对 CB 急性发作具有保护作用，为后续四臣止咳颗粒对提取中药有效成分治疗 CB 急性发作提供了理论支持。

参考文献

[1] Yaniv D，So Jennifer Y，Victor K. Chronic bronchitis：where are we now [J]. Chronic Obstr Pulm Dis，2019，6（2）：178-192.

[2] 田伟，张淑香，江柏华 . 清肺止咳灵糖浆对慢性支气管炎急性发作期止咳祛痰平喘作用的实验研究 [J]. 上海中医药杂志，2015，49（6）：81-84.

[3] 王聚乐，周惠英，顿珠，等 . 藏药四臣止咳颗粒剂的药效学研究 [J]. 中华中医药杂志，2007，22（12）：895-898.

[4] 钟绍金，王光发，廖正根，等 . 四臣止咳颗粒提取工艺的优选 [J]. 江西中医药，2011，42（3）：60-62.

[5] Chakotiya AS，Tanwar A，Srivastava P，et al. Effect of aquo-alchoholic extract of glycyrrhiza glabra against pseudomonas aeruginosa in mice lung infection model [J]. Biomed，2017，90：171-178.

[6] 武晓英，刘地，李娜，等 . 甘草多糖对小鼠肺组织炎症及氧化损伤的修复机制 [J]. 甘肃农业大学学报，2020，55（5）：8-14，30.

[7] 耿艳艳，于冰，周植星，等 . 甘草次酸衍生物 TY501 抗肺纤维化作用及机制研究 [J]. 中国药理学通报，2015，31（2）：210-215.

[8] Xiang SJ，Chen HJ，Luo XJ，et al. Isoliquiritigenin suppresses human melanoma growth by targeting miR-301b/LRIG1 signaling [J]. J Exp Clin Canc Res：CR，2018，37（1）：184.

[9] Changda L，David W，Paula B，et al. The flavonoid 7，4’-dihydroxyflavone Inhibits MUC5AC gene expression，production，and secretion via regulation of NF-κB，STAT6，and HDAC2 [J]. Phytother Res：PTR，2015，29（6）：925-32.

[10] 陈伟，马磊，杨立山 . 甘草次酸对哮喘大鼠的抗氧化应激作用及 NF-κB 信号通路的调控 [J]. 郑州大学学报（医学版），2016，51（6）：762-765.

[11] De Oliveira CM，Nonato FR，de Lima，et al. Antinociceptive properties of bergenin [J]. J Nat Prod，2011，74（10）：2062-2068.

[12] 吕修梅，王军宪 . 岩白菜属植物的研究进展 [J]. 中药材，2003，26（1）：58-60.

[13] Sumino M，Sekine T，Ruangrungsi N，et al. Ardisiphenols and other antioxidant principles from the fruits of ardisia colorata [J]. Chem Pharm Bull，2002，50（11）：1484-1487.

[14] Sadat A，Uddin G，Alam M，et al. Structure activity relationship of bergenin，p-hydroxybenzoyl bergenin，11-*O*-galloylbergenin as potent antioxidant and urease inhibitor isolated from bergenia ligulata [J]. Natural Product Research，2015，29（24）：2291-2294.

[15] Lee Hyo-Jong，Kim Kyu-Won. Anti-inflammatory effects of arbutin in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells [J]. Inflamm Res，2012，61（8）：817-825.

[16] 王亚芳，周宇辉，张建军 . 熊果苷镇咳、祛痰及平喘的药效学研究 [J]. 中草药，2003，34（8）：70-72.

[17] 赵斌 . 螃蟹甲化学成分及质量控制研究 [D]. 成都：成都中医药大学，2008.

[18] 张超，李茂星，尚小飞，等 . 藏药螃蟹甲的镇痛抗炎作用 [J]. 华西药学杂志，2011，26（2）：135-137.

[19] 刘敬，赵斌，王琼 . 藏药螃蟹甲镇咳祛痰平喘有效部位研究 [J]. 中医药导报，2011，17（2）：66-68.

[20] Deniz B，Zulfiye G，Julie Meade A，et al. Pharmacologic overview of chlorogenic acid and its metabolites in chronic pain and inflammation [J]. Curr neuropharmacol，2020，18（3）：216-228.

[21] Liang NJ，Kitts David D. Chlorogenic acid（CGA）isomers alleviate interleukin 8（IL-8）production in Caco-2 cells by decreasing phosphorylation of p38 and Increasing cell integrity [J]. Int J Mol Sci，2018，19（12）：3873.

[22] Yang L，Wei J，Sheng F，et al. Attenuation of palmitic acid–induced lipotoxicity by chlorogenic acid through activation of SIRT1 in hepatocytes [J]. Mol Nutr Food Res，2019，63（14）：1801432.

[23] 王庆华，杜婷婷，张智慧，等 . 绿原酸的药理作用及机制研究进展 [J]. 药学学报，2020，55（10）：2273-2280.

[24] 侯嘉杰，孙倍成 . STAT3：慢性炎症介导肿瘤发生和进展的关键节点 [J]. 生物化学与生物物理进展，2014，41（1）：69-78.

[25] 鲁进，尹伶，黄汉平 . IL-6/STAT3 通路在肺结核患者巨噬细胞免疫中的作用机制 [J]. 实用医学杂志，2021，37（3）：319-323.

[26] Balzer EM，Whipple RA，Thompson K，et al. c-Src differentially regulates the functions of microtentacles and invadopodia [J]. Oncogene，2010，29（48）：6402-6408.

[27] 张妍 . c-Src 通过激活 ACSS2 促进肿瘤细胞的增殖 [D]. 厦门：厦门大学，2019.

[28] 吴中华，闫玲玲，杨爱东，等 . 鱼腥草素钠对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠肺组织 PI3K、AKT1 及 mTOR mRNA 表达的影响 [J]. 中国实验动物学报，2018，26（1）：8-12.

[29] Hemavathy H，Ibrahim J，Areeful HM，et al. Anti-inflammatory effects of hypophyllanthin and niranthin through downregulation of NF-κB/MAPKs/PI3K-Akt signaling pathways [J]. Inflammation，2018，41（3）：984-995.

[30] 牛啸博 . MAPK 途径在脂多糖对骨肉瘤细胞增殖过程中的作用机制研究 [D]. 武汉：武汉大学，2017.

[31] 石勤业，郭剑，徐建红 . 核转录因子 κB 及其抑制因子研究 [J]. 医学信息，2020，33（22）：45-47，54.

[32] 贾国泉，沈桂权，张权，等 . Toll 受体介导的 MyD88/TRAF6/NF-κB 研究 [J]. 新发传染病电子杂志，2017，2（2）：104-107，111.

（收稿日期：2021-09-26；修回日期：2021-12-15）

基于 P 物质和 P- 糖蛋白探讨黄芪多糖温敏凝胶改善小鼠放射性皮炎的机制

张国荣，张建萍，马小花，周燕，武新安*（兰州大学第一医院药剂科，兰州 730000）

摘要：目的 基于 P 物质（SP）和 P- 糖蛋白（P-gp）探讨黄芪多糖（APS）温敏凝胶对小鼠放射性皮炎的作用及其机制。**方法** 小鼠随机分为正常对照组、模型组、APS 温敏凝胶组和空白温敏凝胶对照组，通过 10 Gy X 线连续照射 5 d 制备放射性皮炎小鼠模型；采用 RT-PCR 考察 APS 温敏凝胶对 SP mRNA 和炎性因子 mRNA 的影响，采用 Western blot 法测定皮肤 P-gp 的表达；采用 HE 染色、甲苯胺蓝染色和 CD31 免疫荧光染色评价 APS 温敏凝胶对小鼠放射性皮炎病理学的影响。**结果** 与模型组比较，0 ～ 5 d 时 APS 温敏凝胶组 SP mRNA 升高，10 d 和 15 d 时 APS 温敏凝胶 SP、IL-6、IL-10 和 IL-12 mRNA 均显著降低，P-gp 的表达升高。**结论** APS 温敏凝胶可增加 SP 和 P-gp 的表达，降低炎症因子的表达，有效缓解小鼠放射性皮炎。

关键词：黄芪多糖；温敏凝胶；P 物质；P- 糖蛋白；放射性皮炎
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)05-1072-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.019

Thermosensitive gel of Astragalus polysaccharide improves radioactive dermatitis in mice by regulating substance P and P-glycoprotein

ZHANG Guo-rong, ZHANG Jian-ping, MA Xiao-hua, ZHOU Yan, WU Xin-an* (*Department of Pharmacy, The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou* 730000)

Abstract: Objective To determine the effect and mechanism of thermosensitive gel of Astragalus polysaccharides (APS) on radioactive dermatitis in mice based on substance P (SP) and P-glycoprotein (P-gp). **Methods** The mice were randomly divided into a normal control group, a model group, an APS thermosensitive gel group and a blank thermosensitive gel group. The mice model of radioactive dermatitis was established by 10 Gy X-ray irradiation for 5 days. RT-PCR was used to determine the mRNA expression of SP and inflammatory factors. P-gp expression was evaluated by Western blot. HE staining, toluidine blue staining and CD31 immunofluorescence staining were used to evaluate the effect of APS thermosensitive gel on the pathology of radioactive dermatitis in mice. **Results** Compared with the normal control group, SP mRNA of the APS thermosensitive gel group was increased on 0 ～ 5 d, and mRNA of inflammatory factors decreased on 10 d and 15 d, and the expression of P-gp increased. **Conclusion** APS thermosensitive gel can increase the expression of SP and P-gp, decrease the expression of inflammatory factors, and effectively alleviate radioactive dermatitis in mice.

Key words: Astragalus polysaccharide; thermosensitive gel; substance P; P-glycoprotein; radioactive dermatitis

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalusmembranaceus*（Fisch.）Bge. var. *mongholicus*（Bge.）Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalusmembranaceus*（Fisch.）Bge. 的干燥根，具有补气升阳、固表止汗、敛疮生肌等功效 [1]。黄芪多糖（Astragalus polysaccharides，APS）是黄芪中含量最多的一类物质，是由葡萄

基金项目：甘肃省中医药管理局项目（No.GZK-2019-44）；甘肃省科技厅项目（No.21JR1RA068）。
作者简介：张国荣，男，副主任药师，主要从事中药新制剂与剂型研究，email：523625044@qq.com *通信作者：武新安，男，教授，主要从事基于转运体的药物新型制剂与药理学研究，email：xinanwu6511@163.com

糖、果糖、木糖、核糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖和鼠李糖组成的酸性多糖[2-3]。现代药理学研究发现 APS 具有抗感染、抗氧化、抗自由基和免疫调节等药理作用，临床广泛应用于皮肤创伤、疱疹病毒感染、疮疡、过敏性皮肤病和烫伤等[4-6]。

放疗是利用放射线治疗肿瘤的一种局部方法，是目前治疗恶性肿瘤的重要手段之一，约 70% 肿瘤患者需要接受放疗。然而，95% 的放疗患者在放疗后均会出现不同形式的放射性皮炎[7]，部分患者甚至因出现 3 级和 4 级放射性皮炎，而不得不进行伤口处理，甚至中断放疗。因此，缓解或减慢放射性皮炎进展对于确保放疗顺利进行具有重要的意义。研究表明放射性皮炎与 DNA 破坏，氧化应激和免疫破坏等有关[7-8]。P 物质（substance P，SP）是参与皮肤局部免疫炎症反应和促进创面修复的重要介质。P- 糖蛋白（P-glycoprotein，P-gp）是分布于细胞膜上的外排转运体，可促进毒性物质的排出。免疫组化研究显示 P-gp 在表皮、表皮角质形成细胞或真皮成纤维细胞中的表达较弱，而在人皮肤汗管、血管、神经鞘和肌肉中有明显表达，其可将表皮细胞吸收的毒性物质及代谢废物及时分泌到血流和汗管中，促进皮肤微环境的改善[9]。为此，本研究基于 SP 和 P-gp 探讨 APS 温敏凝胶对小鼠放射性皮炎的作用及其机制。

1 材料

1.1 仪器

Western blot 电泳仪（DYCZ-24DN）、湿转仪（DYCZ-40D）和水平脱色摇床（WD-9405B）（北京六一仪器厂）；Unique 型直线加速器（美国 VARIAN 医疗设备有限公司）；罗氏实时荧光定量 PCR 仪（480/480 Ⅱ）（瑞士罗氏公司）；GBS 光学显微镜（德国 GBS 公司）。

1.2 试药

APS（西安明泽生物科技有限公司，纯度＞ 90%，批号：89250-26-0）；泊洛沙姆 407（德国巴斯夫公司，批号：GNC08825B）；泊洛沙姆 188（德国巴斯夫公司，批号：GNC33221B）；SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒和组织裂解液（碧云天生物科技研究所）；RNA 提取试剂盒和甲苯胺蓝染液（北京索莱宝科技有限公司）；苏木素染液和伊红染液（博士德生物）；ECL 发光液（北京天能公司）；CD31（武汉塞维尔生物科技有限公司）；P-gp 抗体（Abcam 有限公司）；双染检测试剂（抗小鼠 IgG/AP ＋抗兔 IgG/HRP）（北京中杉金桥生物技术有限公司）；去离子水（自制）。

1.3 动物

健康 SPF 级昆明种小鼠，雄性，体质量 18 ～ 22 g，动物许可证书号：SCXK（甘）2019-0723，由兰州大学实验动物中心提供。所有实验均按照动物保护法进行，并经兰州大学第一医院伦理委员会批准。

2 方法

2.1 APS 温敏凝胶的制备

将处方量的 APS、1，2- 丙二醇和 0.02% 苯扎溴铵先溶于适量纯化水中，搅拌加入泊洛沙姆 407 和泊洛沙姆 188，4 ℃放置 24 h 至泊洛沙姆完全溶解，最后加水至全量，搅拌混匀，即得。胶凝温度为（32.3±0.2）℃，pH 值为 7.03。

2.2 小鼠放射性皮炎模型的制备[10-11]

小鼠随机分为正常对照组、模型组、APS 温敏凝胶组和空白温敏凝胶组，每组 10 只，除正常对照组，其他组小鼠腹部以 8% Na_2S 溶液去毛，将同组 10 只小鼠固定于鼠板上，进行 10 Gy X 线的照射，每日照射 1 次，连续照射 5 d（如图 1 所示）。每次照射后，在腹部涂抹 APS 温敏凝胶或空白温敏凝胶，每日涂抹 2 次，涂抹 15 d。

2.3 RT-PCR 法测定皮肤中 SP 和炎症因子的 mRNA

根据 RNA 提取试剂盒说明书提取皮肤组织中的总 RNA，经总 RNA 浓度测定、反转录、PCR 反应和 PCR 产物定量分析，考察 APS 对皮肤中 SP 和炎症因子白介素（IL）-6、IL-10、IL-12 mRNA 的影响。SP 和各炎症因子引物序列见表 1[12]。

表 1 引物序列

Tab 1 Primer paris for RT-PCR

名称	正向引物	反向引物
SP	5'-TGGACATGGCCAGATCTCTCACAA-3'	5'-GCATCGCGCTTCTTTCATAAGCCA-3'
IL-6	5'-TGGCTAAGGACCAAGACCATCCAA-3'	5'-AACGCACTAGGTTTGCCGAGTAGA-3'
IL-10	5'-CCCTTTGCTATGGTGTCCTTTC-3'	5'-ATCTCCCTGGTTTCTCTTCCC-3'
IL-12	5'-CTCAGGATGGAAGAGTCC-3'	5'-CAAGTGGAATGCTAGAATATC-3'

2.4 Western blot 法测定皮肤中 P-gp 的表达

称取皮肤组织 0.04 g，加组织裂解液提取蛋白。然后采用 BCA 蛋白定量检测法测定并计算蛋白浓度。再采用聚丙烯酰胺凝胶电泳，依次经

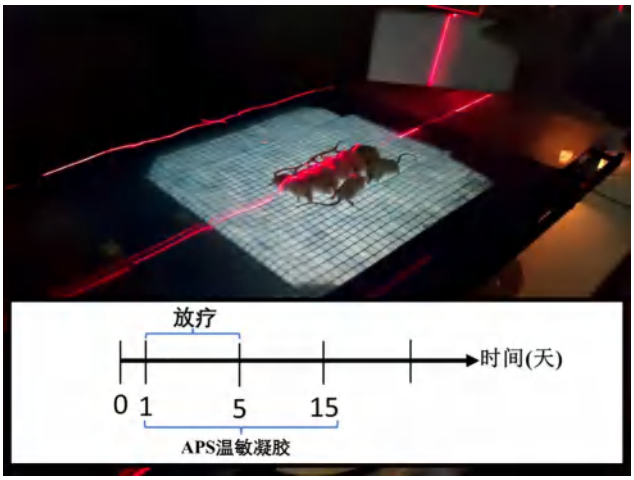


图 1 小鼠放射性皮炎模型的制备

Fig 1 Preparation of radioactive dermatitis model in mice

制胶、上样与电泳、转膜、封闭、抗体孵育和 ECL 发光液显影成像，最后用 Image J 软件对成像结果进行灰度值统计及分析。

2.5 组织形态学检查

将皮肤组织置于 10% 甲醛溶液中固化 48 h，常规制备石蜡组织切片，经苏木精 - 伊红染色及甲苯胺蓝染色，于光学显微镜下观察皮肤组织病理学形态。

2.6 CD31免疫荧光染色 [13]

组织切片常规梯度脱蜡后，用抗原修复缓冲液进行抗原修复、洗涤（5 min×3 次）、封闭液封闭 30 min、4 ℃孵育一抗过夜、洗涤（5 min×3 次）、孵育二抗 50 min、洗涤（5 min×3 次）、加 DAPI 染液避光 - 室温孵育 10 min、洗涤（5 min×3 次）、抗荧光淬灭封片剂封片，最后于荧光显微镜下观察并采集图像。

2.7 数据处理

数据结果以平均值 ± 标准差表示，采用 IBM SPSS21 统计软件进行数据分析，通过单因素方差进行统计学分析，$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。采用 Graphpad Prism 软件绘图。

3 结果

3.1 APS 温敏凝胶对放射性皮炎小鼠创面的影响

模型组照射 5 d 时，小鼠皮肤开始发红伴轻度水肿，有少量分泌物渗出，红肿部位向外蔓延趋势；恢复 5 d 后红肿减轻，无明显分泌物渗出；恢复 10 d 后无明显红肿，皮毛恢复生长。与模型比较，APS 温敏凝胶组照射 5 d 时，皮肤红肿及分泌物渗出情况较轻，小鼠抓挠次数较少；恢复 5 d 后可见明显结痂；恢复 10 d 后无明显红肿，皮毛恢复生长较好（见图 2）。空白温敏凝胶组对小鼠创面无明显影响。

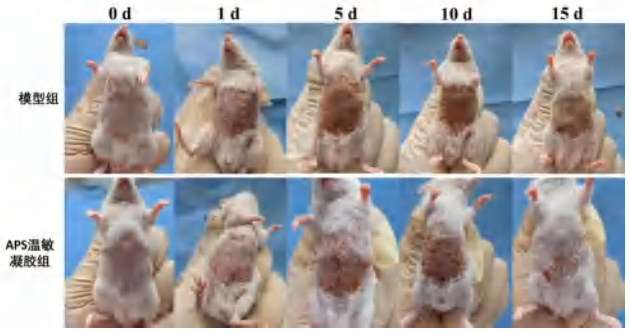


图 2 APS 温敏凝胶对放射性皮炎小鼠创面情况的考察

Fig 2 Effect of APS thermosensitive gel on the wound of radioactive dermatitis

3.2 APS 温敏凝胶对放射性皮炎 SP 和炎症因子的影响

0 ～ 5 d 时，模型组和 APS 温敏凝胶组的 SP、IL-6、IL-10 和 IL-12 mRNA 随照射时间延长而逐渐升高，且 APS 温敏凝胶组的 SP 高于模型组；10 d 和 15 d 时 APS 温敏凝胶组的 SP、IL-6、IL-10 和 IL-12 mRNA 较模型组均显著降低，见图 3。

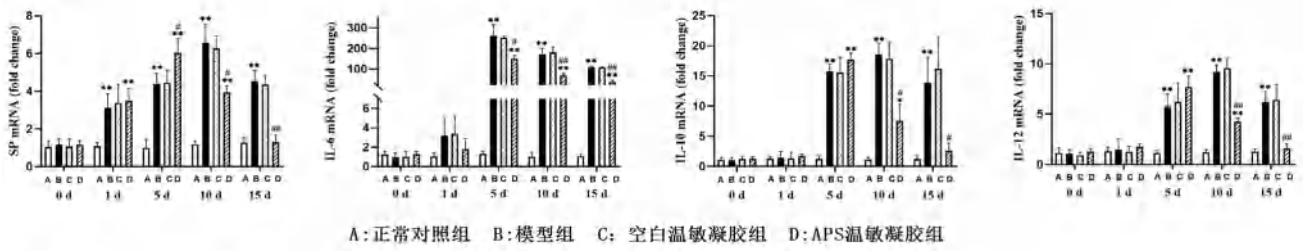


图 3 ASP 温敏凝胶对放射性皮炎 SP 和炎症因子的影响

Fig 3 Effect of APS thermosensitive gel on SP and inflammatory factors of radioactive dermatitis

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

3.3 APS 温敏凝胶对放射性皮炎 P-gp 的影响

如图 4a 所示，放疗后皮肤组织中 P-gp 的表达显著降低，即使放疗结束 10 d 后，皮肤组织中的 P-gp 仍显著低于正常对照组。在放疗的同时给予 APS 温敏凝胶，可显著增加皮肤组织中的 P-gp 表达，且放疗后第 5 d 的表达量仍显著高于正常对照组，直到放疗结束 10 d 后，P-gp 较正常对照组差异无统计学意义。

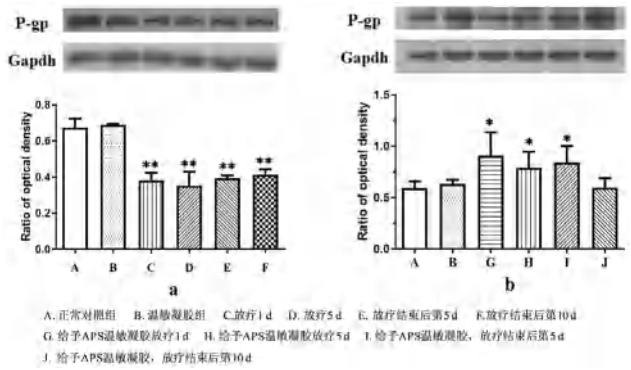


图 4　放疗（a）及放疗的同时给予 APS 温敏凝胶（b）对皮肤组织中 P-gp 表达的影响

Fig 4　Effect of radiotherapy（a）and combination with APS thermosensitive gel（b）on P-gp in the skin tissue

注（Note）：与正常对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$（Compared with the normal control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）。

3.4　APS 温敏凝胶对放射性皮炎病理学改变的影响

HE 染色显示正常对照组及空白温敏凝胶组表皮轻度角化，真皮浅层可见少量淋巴细胞、中性粒细胞、肥大细胞浸润，毛囊汗腺未见明显异常。模型组 15 d 时可见表皮过度角化伴角化不全，真皮充血水肿，真皮浅层皮肤附属器周围有较多淋巴细胞、中性粒细胞、肥大细胞浸润。APS 温敏凝胶组给药 15 d 时表皮轻度角化，真皮轻度水肿，真皮浅层皮肤附属器周围有少量淋巴细胞、中性粒细胞、肥大细胞浸润。甲苯胺蓝染色显示正常对照组及空白温敏凝胶组真皮浅层有少量肥大细胞，模型组 15 d 时可见真皮浅层有大量肥大细胞，APS 温敏凝胶组 15 d 时真皮浅层有少量肥大细胞，较模型组明显减少，见图 5。

3.5　APS 温敏凝胶对放射性皮炎微血管的影响

与正常对照组、模型组和空白温敏凝胶组相比较，APS 温敏凝胶组的血管损伤最小，见图 6。

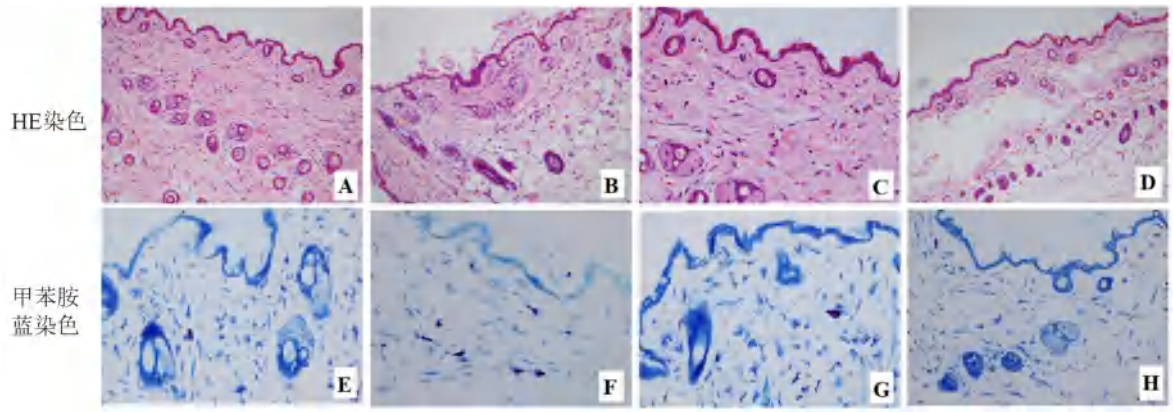


图 5　APS 温敏凝胶对放射性皮炎病理学改变的影响

Fig 5　Effect of APS thermosensitive gel on the pathological changes in radioactive dermatitis

A ～ D. 正常对照组、模型组、空白温敏凝胶组和 APS 温敏凝胶组给药 15 d 后皮肤组织切片 HE 染色（×200）[HE staining of skin tissue slice of the normal control group，the model group，the blank thermosensitive gel and APS thermosensitive gel 15 d after the adminstration（×200）]；E ～ H. 正常对照组、模型组、空白温敏凝胶组和 APS 温敏凝胶组给药 15 d 后皮肤组织切片甲苯胺蓝染色（×400）[Toluidine blue staining of skin tissue slice of the normal control group，the model group，the blank thermosensitive gel and APS thermosensitive gel 15 d（×400）]。

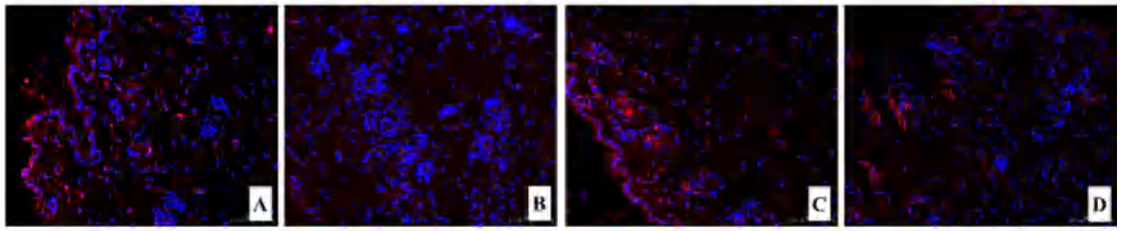


图 6　免疫荧光染色检测 APS 温敏凝胶对放射性皮炎微血管的影响（×15）

Fig 6　Effect of APS thermosensitive gel on the microvascular of radioactive dermatitis detected by immunological fluorescence assay（×15）

A. 正常对照组（normal control group）；B. 模型组（model group）；C. 空白温敏凝胶组（blank thermosensitive gel group）；D. APS 温敏凝胶组（APS thermosensitive gel group）

注（Note）：蓝色荧光表示细胞核着色，红色荧光表示血管内皮细胞 CD31 着色（The blue fluorescence indicated cell nucleus，while the red fluorescence indicated CD31 of vascular endothelial cells）。

4　讨论

放射治疗中高能 X 线产生大量的自由基，并导致 DNA 双链断裂，其不仅抑制了皮肤基底角质形成细胞的增殖和分化，而且还可引起炎性反应，引发放射性皮炎[14]。SP 是一种高活性神经肽类物质，合成于背根神经节的小型神经元胞体中，再

由轴浆运输至外周神经末梢，储存于皮肤感觉神经末梢的大囊泡中。当神经末梢受到刺激时，囊泡中 SP 释放，并与其受体结合后，在皮肤免疫炎症和创伤修复中扮演重要角色。Kim 等 [15] 研究发现慢性皮肤损伤如糖尿病大鼠皮肤溃疡因无充足的血供，使营养物质和生长因子很难达到损伤部位，导致伤口难以愈合，SP 偶联自组装肽水凝胶可动员具有修复作用的内源性间充质干细胞归巢，促进糖尿病大鼠皮肤的伤口愈合。有学者报道生物活性 SP 和转化生长因子装载的壳聚糖微粒复合水凝胶可显著增加放射性皮炎的再生修复 [16]。

本研究发现，0 ～ 5 d 时小鼠皮肤组织中 SP、IL-6、IL-10 和 IL-12 mRNA 逐渐升高，且 APS 温敏凝胶组的 SP 高于模型组，提示 APS 在炎症早期一定程度可增加 SP 表达以促进皮肤局部免疫炎性因子参与的修复反应。15 d 时模型组肥大细胞数目显著增加、病理损伤以及血管丢失最严重，15 d 时 APS 温敏凝胶组 SP 及炎症因子 mRNA 显著降低，且可有效缓解肥大细胞数目的增加、改善病理学损伤和血管丢失。这些结果与文献报道一致，SP 可增加肥大细胞蓄积 [17]，高浓度 SP 可诱导肥大细胞脱颗粒 [18]，肥大细胞脱颗粒和组胺释放的免疫反应进一步加重了急性放射性皮炎 [19]。与野生型小鼠相比较，敲除外排性转运体 P-gp 和乳腺癌耐药蛋白的小鼠皮炎及抓挠行为更严重，代谢组学分析显示皮肤代谢物组胺、尿酸盐和 5-羟色胺在皮肤中的浓度较高 [20]，提示这两种转运体可能与皮肤炎症介质有关，二者具有保护作用。本研究也发现模型组 P-gp 的表达显著降低，APS 温敏凝胶在一定时间内可增加 P-gp 的表达。

综上所述，APS 温敏凝胶可增加 SP 和 P-gp 的表达，降低炎症因子的表达，有效缓解小鼠放射性皮炎，提示 APS 具有一定的皮肤保护作用。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：315-316.

[2] Xu XY，Rui SZ，Chen C，et al. Protective effects of astragalus polysaccharide nanoparticles on septic cardiac dysfunction through inhibition of TLR4/NF-kappaB signaling pathway [J]. Int J Biol Macromol，2020，53：977-985.

[3] 曹宇欣，李科，秦雪梅，等 . 基于糖特征图谱及免疫细胞活性研究的不同产地黄芪的质量评价 [J]. 药学学报，2019，54（7）：1277-1287.

[4] 肖卫棉，周杰，廖志忠 . 黄芪祛疣汤对尖锐湿疣患者外周血 Treg/Th17 细胞免疫的影响 [J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志，2019，18（3）：219-222.

[5] 姑丽斯坦·阿不都热西提，阿斯亚·麦麦吐逊，阿依姆妮萨·阿卜杜热合曼 . 黄芪注射液对糖尿病下肢皮肤溃疡患者血清炎症指标及氧化应激指标的影 [J]. 现代中西医结合杂志，2020，29（30）：95-98.

[6] 李莉 . 黄芪多糖对深Ⅱ度烧伤大鼠免疫功能及创面巨噬细胞炎症蛋白 -2 和单核细胞趋化蛋白 -1 表达的影响 [J]. 中国临床药理学杂志，2020，36（9）：1110-1113.

[7] Singh M，Alavi A，Wong R，et al. Radiodermatitis：a review of our current understanding [J]. Am J Clin Dermatol，2016，17（3）：277-292.

[8] Dar TB，Henson RM，Shiao SL. Targeting innate immunity to enhance the efficacy of radiation therapy [J]. Front Immunol，2018，9：3077.

[9] Skazik C，Wenzel J，Marquardt Y，et al. P-glycoprotein（ABCB1）expression in human skin is mainly restricted to dermal components [J]. Exp Dermatol，2011，20（5）：450-452.

[10] Fallah M，Shen Y，Brodén J，et al. Plasminogen activation is required for the development of radiation-induced dermatitis [J]. Cell Death Dis，2018，9（11）：1051.

[11] Ning SC，Budas GR，Churchill Eric N，et al. Mitigation of radiation-induced dermatitis by activation of aldehyde dehydrogenase 2 using topical alda-1 in mice [J]. Radiat Res，2012，178（1）：69-74.

[12] Leal EC，Carvalho E，Tellechea A，et al. Substance P promotes wound healing in diabetes by modulating inflammation and macrophage phenotype [J]. Am J Pathol，2015，185（6）：1638-1648.

[13] 魏萌萌 . 有机阴离子转运体（Oats）和糜酶 /Ang II 在阿德福韦所致慢性肾损伤和甲氨蝶呤所致急性肾损伤中的作用 [D]. 兰州：兰州大学，2020.

[14] 欧丹，王孝深，胡超苏 . 放射性皮炎预防与治疗研究进展 [J]. 中华放射肿瘤学杂志，2019，28（2）：151-154.

[15] Kim JE，Lee JH，Kim SH，et al. Skin regeneration with self-assembled peptide hydrogels conjugated with substance P in a diabetic rat model [J]. Tissue Eng Part A，2018，24（1-2）：21-33.

[16] Park SJ，Cho W，Kim MS，et al. Substance-P and transforming growth factor-beta in chitosan microparticle-pluronic hydrogel accelerates regenerative wound repair of skin injury by local ionizing radiation [J]. J Tissue Eng Regen Med，2018，12（4）：890-896.

[17] Zhan MM，Zheng WJ，Jiang QJ，et al. Upregulated expression of substance P（SP）and NK1R in eczema and SP-induced mast cell accumulation [J]. Cell Biol Toxicol，2017，33（4）：389-405.

[18] Levick SP，Brower GL and Janicki JS. Substance P-mediated cardiac mast cell activation：an in vitro study [J]. Neuropeptides，2019，74：52-59.

[19] Muller K，Meineke V. Radiation-induced mast cell mediators differentially modulate chemokine release from dermal fibroblasts [J]. J Dermatol Sci，2011，61（3）：199-205.

[20] Hashimoto N，Nakamichi N，Nanmo H，et al. Metabolome analysis reveals dermal histamine accumulation in murine dermatitis provoked by genetic deletion of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein [J]. Pharm Res，2019，36（1）：158.

（收稿日期：2021-12-26；修回日期：2022-01-28）

毛菊苣子 - 毛菊苣根配伍的体外抗肝纤维化作用研究

阿达来提·木合塔尔[1]，臧薇[2]，李茜[1]，赵耀[1]，王杨静楠[1]，杨建华[3*]，胡君萍[1*]（1. 新疆医科大学药学院，乌鲁木齐　830017；2. 河北廊坊市药品检验所，河北　廊坊　065000；3. 新疆医科大学第一附属医院，乌鲁木齐　830054）

摘要：目的　研究毛菊苣子 - 毛菊苣根配伍前后对 PDGF-BB 诱导的大鼠肝星状细胞 HSC-T6 体外抗肝纤维化活性及其作用机制。**方法**　采用 PDGF-BB 诱导 HSC-T6 细胞，分别给予毛菊苣种子和根以及两者配伍的（1∶1、1∶2、2∶1）的水煎液。检测细胞增殖、细胞凋亡和肝纤维化相关指标，检测 ERK/Ras 信号通路中相关蛋白的表达。**结果**　与模型组相比，各组均能显著抑制 HSC-T6 细胞的增殖，促进细胞凋亡，降低肝纤维化指标的表达（$P < 0.05$），其中 S1R2 组的抑制率和凋亡率最高；各给药组的 Ras、ERK1、ERK2、C-fos、JNK 表达量均有所下降（$P < 0.05$）。**结论**　毛菊苣子 - 毛菊苣根 1∶2 配伍后的体外抗肝纤维化作用强于毛菊苣子或根，其抗肝纤维化作用机制可能是通过影响 ERK/Ras 信号通路。

关键词：毛菊苣；抗肝纤维化；药材配伍
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)05-1077-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.020

Anti-liver fibrosis activity in vitro of *Cichorium glandulosum* seed and root compatibility

Adalaiti Muhetaer[1], ZANG Wei[2], LI Qian[1], ZHAO Yao[1], WANG Yang-jing-nan[1], YANG Jian-hua[3*], HU Jun-ping[1*] (1. *College of Pharmacy*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi*　830017; 2. *Hebei Langfang Institute for Drug Control*, *Langfang*　*Hebei*　065000; 3. *The First Affiliated Hospital*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi*　830054)

Abstract: Objective　To determine the anti-liver fibrosis effect of chicory seed root compatibility on the hepatic stellate cells HSC-T6 induced by PDGF-BB in vitro and related mechanism. **Methods**　HSC-T6 cells were induced by PDGF-BB, and chicory seeds, roots, and compatibity at 3 proportions (1∶1, 1∶2, and 2∶1) were given respectively. The related for cell proliferation, apoptosis and liver fibrosis were detected, and the expression of related proteins in ERK/Ras signal pathway was detected. **Results**　Compared with the model group, the drug groups significantly inhibited the proliferation of HSC-T6 cells, promoted the apoptosis and reduced the expression of liver fibrosis indexes ($P < 0.05$), among which the inhibition rate and the apoptosis rate of the S1R2 group were the highest. The expressions of RAS, ERK1, ERK2, C-fos and JNK with 5 seed-root compatibilities of the *Cichorium glandulosum* treatment group were decreased ($P < 0.05$). **Conclusion**　Compatibility of chicory seed-root at 1∶2 shows stronger anti-liver fibrosis effect in vitro than that of other ratios, whose actions may be via influencing the Ras/ERK signal transduction pathway.

Key words: *Cichorium glandulosum*; anti-liver fibrosis; compatibility of medicinal material

《中国药典》2020 年版收载的菊苣是指菊科菊苣属植物菊苣（*Cichorium intybus*）或者毛菊苣（*Cichorium glandulosum*）的干燥地上部分或根，具有清肝利胆、健胃消食、利尿消肿作用[1]。毛菊

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 81860745）；新疆天然药物活性成分与释药技术重点实验室（No. XJDX1713）。
作者简介：阿达来提·木合塔尔，女，硕士研究生，主要从事新疆特色药用资源的开发与利用研究，email：a13139657230@163.com
[*]**通信作者：**杨建华，男，博士，主任药师，主要从事新疆特色药用资源的开发与利用研究，email：609571241@qq.com；胡君萍，女，博士，教授，主要从事中药民族药开发利用研究，email：hjp-yft@163.com

苣广泛分布于中国新疆，在新疆地区其根、种子、全草都可入药[2]。毛菊苣根具有保肝、降血糖和降血脂等作用，毛菊苣种子主治湿热性疾病，如肝脏阻塞、湿热性肾炎、小便不利和全身性水肿等，其黄酮类成分还具有保肝、抗氧化和抗菌作用[3]。毛菊苣根和种子在许多成方制剂中也有应用，其用药配伍也有独特之处，如毛菊苣子 - 根在护肝布祖热方、炎消迪娜尔方、复方木尼孜其方中的比例分别为 2∶1、1∶2 和 1∶1，这种同一植物不同药用部位以不同比例配伍使用在维吾方剂中较为常见[4]。研究显示，毛菊苣子 - 毛菊苣根配伍后的保肝护肝作用优于单一药材，不同配伍比例的肝保护作用亦不同[5-7]；课题组进一步研究发现，毛菊苣根和种子中所含化学成分及微量元素存在较大差异[8-9]，但两者配伍组方治疗肝病的规律和机制尚不明确。因此本文探讨了毛菊苣子 - 毛菊苣根配伍前后体外抗肝纤维化活性及其机制，以期为揭示毛菊苣在护肝方剂中配伍规律提供数据。

1 材料

1.1 药材

毛菊苣种子（批号：20171201）、毛菊苣根（批号：20170704）（新疆和田县中医院）由新疆医科大学药学院胡君萍教授鉴定为毛菊苣 *Cichorium glandulosum* 的干燥种子和根。

1.2 细胞

大鼠肝星状细胞（HSC-T6 细胞）（新疆医科大学第一附属医院临床研究院惠赠）。

1.3 试药

1640 培养基（批号：0013819）、胎牛血清（批号：1922693）、0.25% 胰酶 -EDTA 消化液（批号：0052419）（BI 公司）；磷酸缓冲盐溶液（PBS，北京全式金生物技术有限公司，批号：N50807）；双抗（青霉素 - 链霉素）（北京全式金生物技术有限公司，批号：N20401）；CCK-8 试剂盒（北京博奥森生物技术有限公司，批号：AI08014117）；碘化丙啶 / 核糖核酸酶染色溶液（批号：9183478）、FITC 偶联 Annexin-V 凋亡检测试剂盒（批号：9154818）（比欧联科供应链管理有限公司）；PDGF-BB（PeproTech，批号：101704）；大鼠透明质酸检测试剂盒（批号：05/2019）、大鼠Ⅳ型胶原检测试剂盒、大鼠层粘连蛋白检测试剂盒（上海酶联）；大鼠Ⅲ型前胶原检测试剂盒（上海将来实业股份有限公司）；RIPA 细胞裂解液、BCA 蛋白测定试剂盒、蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒（北京索莱宝科技有限公司）；甘氨酸（批号：56-40-6）、SDS（批号：151-21-3）、Tris（批号：77-86-1）、琼脂糖（批号：1183GR500）（德国 Biofroxx 公司）；脱脂奶粉（美国 BD 公司，批号：N/A）；一抗稀释液（Biosharp 生物科技有限公司，批号：210217）；溴化乙锭（批号：D0129）、焦炭酸二乙酯（批号：D1135）、Loading buffer（批号：D0214）、DNA marker DL2000（批号：D0237）（碧云天生物技术研究所）；荧光定量试剂盒 [TB Green RT-PCR Kit Ⅱ宝生物工程（大连）有限公司]；辣根过氧化酶标记二抗、JNK（美国 CST 公司）；彩色蛋白预染 marker（10 ～ 180 kDa）（赛默飞世尔科技有限公司）；PVDF 膜（美国 Milipore 公司）；ECL 试剂盒（Biosharp 生物科技有限公司）；DAB 显色试剂盒、通用 SP 试剂盒、柠檬酸盐、PBS 缓冲盐、中性树胶（北京中杉金桥生物技术有限公司）。

1.4 仪器

DMI6000B 型倒置显微镜（德国 Leica 公司）；Galaxy-170R 型 CO_2 培养箱（英国 New Brunswick 公司）；KS18 型超净工作台、MuLtiskan-G0 型全波长酶标仪（美国 Thermo 公司）；KG-SX-500 型高压蒸汽灭菌锅（日本 TOMY 公司）；EPICS-XL/XL-MCL 流式细胞仪（美国 Beckmann 公司）；MuLtiskan 全波长酶标仪（美国 Thermo Fisher 公司）；化学发光成像系统（美国 ProteinSimple 公司）；Mini-PROTEAN Tetra Cell 系统（美国 Bio-Rad 公司）；BCD-238WF 型超低温冰箱（中国海尔集团）。

2 方法

2.1 样品制备

取毛菊苣种子（S 组）、根（R 组）以及两者配伍 1∶1（S1R1 组）、1∶2（S1R2 组）和 2∶1（S2R1 组）药材分别以 10 倍量蒸馏水煎煮 2 次，每次 1.5 h，合并煎煮液，减压浓缩，得到干燥浸膏，具体信息见表 1。将浸膏研磨成细粉，分别称取 0.25 g，用 3 mL 的 1640 完全培养基溶解，再用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌，使其成为终浓度为 83 mg • mL $^{-1}$ 的样品母液，置于 － 4 ℃冰箱保存备用。

表 1 毛菊苣样品分组

Tab 1 Samples of *Cichorium glandulosum* at different compatibilities seed and root

组别	种子 - 根配比	质量 /g		浸膏质量 /g	浸膏得率 /%
		种子	根		
S 组	1∶0	30	0	5.65	18.8
R 组	0∶1	0	30	3.81	12.7
S1R1 组	1∶1	15	15	5.49	18.3
S1R2 组	1∶2	10	20	4.74	15.8
S2R1 组	2∶1	20	10	4.88	16.2

2.2 细胞培养及体外肝纤维化细胞模型的建立

将 HSC-T6 细胞用 1640 完全培养基（含 10% 胎牛血清、1% 双抗）于 37 ℃、5%CO_2、饱和湿度的培养箱内培养。取对数生长期的 HSC-T6 细胞，以 5×10^4 个 • mL^{-1} 接种于 96 孔板内，待细胞 24 h 贴壁后，吸弃上清液，设空白组（完全培养基），对照组（含细胞以及 1640 完全培养基），不同浓度 PDGF-BB 干预组（将 PDGF-BB 用 1640 完全培养基进行溶解使其终质量浓度为 5、25、125、250 ng • mL^{-1}），每孔加入 100 μL 的 PDGF-BB。每组设 3 个复孔。置于 37 ℃、5%CO_2 饱和湿度的培养箱内培养 24 h 和 48 h 后，吸弃旧的培养基，加入新鲜的 1640 完全培养基，每孔加入 10 μL 的 CCK-8 试剂，放回培养箱避光孵育 1 h 后，在酶标仪于 450 nm 下测定各孔 *OD* 值，取其平均值计算细胞存活率。细胞存活率（%）＝[（$OD_{给药组}$－$OD_{空白组}$）/（$OD_{对照组}$－$OD_{空白组}$）]×100%。

2.3 不同配比药材对 HSC-T6 细胞增殖的影响

取对数生长期的 HSC-T6 细胞，以 5×10^4 个 • mL^{-1} 接种于 96 孔板内，设空白组（1640 完全培养基）、对照组（不加任何药物的 HSC-T6 细胞组）、模型组（含 25 ng • mL^{-1} 的 PDGF-BB 培养液）、不同比例药材水提液组（含 25 ng • mL^{-1} 的 PDGF-BB 培养液和不同配比药材），每组设 3 个复孔，置于 37 ℃、体积分数 5%CO_2 饱和湿度的培养箱内培养 48 h，每孔加入 10 μL 的 CCK-8 试剂，放回培养箱避光孵育 1 h 后，在全波长酶标仪上于 450 nm 波长处测定每孔 *OD* 值，计算细胞的生长抑制率。抑制率（%）＝[（$OD_{对照组}$－$OD_{加药组}$）/（$OD_{对照组}$－$OD_{空白组}$）]×100%。

2.4 不同配比药材对 HSC-T6 细胞肝纤维化的影响

取对数生长期的 HSC-T6 细胞以 5×10^4 个 • mL^{-1} 的密度接种于 96 孔培养板内，设空白组（1640 完全培养基）、对照组（不加任何药物的 HSC-T6 细胞组）、模型组（含 25 ng • mL^{-1} 的 PDGF-BB 培养液）、不同比例药材水提液组（含 25 ng • mL^{-1} 的 PDGF-BB 培养液和不同配比药材），每组设 3 个复孔，放入 5%CO_2 培养箱内培养 48 h 后，取出 96 孔板，吸出上清液，用试剂盒测定细胞上清液中透明质酸（HA）、层粘连蛋白（LN）、Ⅲ型前胶原（PCⅢ）、Ⅳ型胶原（Ⅳ-C）等肝纤维化指标。

2.5 不同配比药材对 HSC-T6 细胞凋亡的影响

将对数生长期的 HSC-T6 细胞，调整浓度为 5×10^5 个 • mL^{-1}，接种于 6 孔板内，待细胞贴壁后，吸弃上清液，实验组分别加入含 25 ng • mL^{-1} 的 PDGF-BB 的不同配伍比例药材培养液 2 mL，对照组加入不含药物的完全培养液 2 mL，放入培养箱内培养 48 h 后，收集细胞，实验组细胞加入 100 μL Binding Buffer 和 FITC 标记的 Annexin-V 和 PI 各 5 μL，室温避光反应 5 min 后加入 400 μL Binding Buffer，滤膜过滤，上流式细胞仪检测。

2.6 不同配比药材对 HSC-T6 细胞相关蛋白表达的影响

采用 Western blot 法检测各组细胞上清液中 Ras、ERK1、ERK2、C-fos、JNK 蛋白的表达。将细胞蛋白裂解后，BCA 法进行蛋白定量。待测样品蛋白上样总量为 30 μg，上样体积控制在 4 ～ 8 μL，预染蛋白 marker 的上样量为 2 μL，用于分辨蛋白分子量条带。样品经过 SDS-PAGE 垂直电泳后进行 PVDF 膜凝胶转移，转膜成功后浸入 5% 脱脂奶粉的封闭液中 60 min，1×TBST 清洗 3 次，每次 5 min，加入一抗孵育过夜。次日用 1×TBST 清洗 3 次，每次 15 min，加入辣根酶标记二抗（1∶2000 稀释），室温孵育 60 min。二抗孵育结束后，放入化学发光凝胶成像系统中曝光，使用 Image J 软件对扫描后的图像进行分析，通过对目标条带积分来计算积分下面积，并与内参 *β*-actin 进行比较，结果以相对表达值表示。

2.7 统计学方法

采用 SPSS21.0 统计软件进行数据分析，计量资料以均数 ± 标准差表示，先经方差齐性检验，若方差齐再进行单因素方差分析，$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 模型建立的浓度和时间筛选

PDGF-BB 对 HSC-T6 细胞干预之后，采用 CCK-8 法分别于 24 h 和 48 h 检测细胞增殖情况。结果显示，加入 PDGF-BB 24 h 后，各组细胞存活率随着 PDGF-BB 浓度增加而增加；干预 48 h 后，各组细胞虽然呈现增殖，但增殖率较低，且无剂量依赖性。故选择体外 PDGF-BB 诱导 HSC-T6 细胞肝纤维化模型建立的剂量和时间分别为 25 ng • mL^{-1} 和 24 h。结果见图 1。

3.2 不同配比药材对 HSC-T6 细胞增殖的影响

由图 2 可知，与模型组相比，给予不同配比药物水提液干预对细胞增殖均有不同程度的抑制作用（$P < 0.01$），R 组的抑制率高于 S 组（$P < 0.01$），说明毛菊苣根对 HSC-T6 细胞增殖

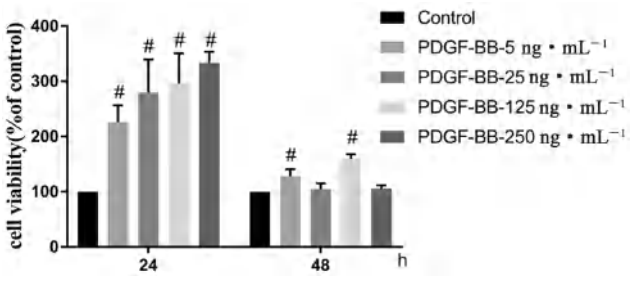


图 1　不同造模浓度和时间下 HSC-T6 的细胞存活率（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig 1　Survival rate of HSC-T6 cells induced by different PDGF-BB concentrations and time（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

注：与对照组比较，$^{\#}P<0.01$。

Note：Compared with the control group，$^{\#}P<0.01$.

的抑制活性强于种子。与 S 组相比，S1R1 组、S1R2 组、S2R1 组的抑制率也较高（$P<0.01$），说明配伍后药物的细胞增殖抑制作用强于单味药种子。与 R 组相比，S1R2 组和 S2R1 组对细胞增殖抑制率较高（$P<0.01$）。

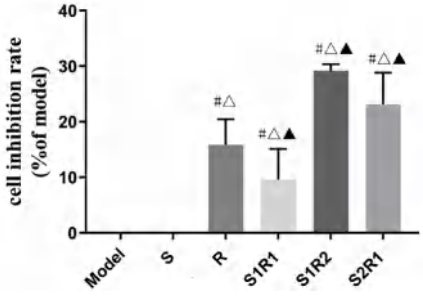


图 2　不同配伍比例药材对 HSC-T6 细胞增殖的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig 2　Effect of different compatibility drug ratios on the proliferation of HSC-T6 cells（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

注：与模型组比较，$^{\#}P<0.01$；与 S 组比较，$^{\triangle}P<0.01$；与 R 组相比，$^{\blacktriangle}P<0.01$。

Note：Compared with the model group，$^{\#}P<0.01$；compared with the S group，$^{\triangle}P<0.01$；compared with the R group，$^{\blacktriangle}P<0.01$.

3.3　不同配比药材对 HSC-T6 细胞肝纤维化指标的影响

与对照组比较，模型组细胞上清液中透明质酸（HA）、层粘连蛋白（LN）、Ⅲ型前胶原（PCⅢ）、Ⅳ型胶原（Ⅳ-C）等肝纤维化指标均显著增高（$P<0.01$）。与模型组相比，各给药组肝纤维化指标均有显著性降低（$P<0.01$），其中，S1R2 组和 S2R1 组降幅更大，说明毛菊苣种子、根以及两者配伍后均具有体外抗肝纤维化作用，且配伍后作用更强。结果见图 3。

3.4　不同配比药材对 HSC-T6 细胞凋亡的影响

与对照组相比，模型组给予 PDGF-BB 干预后，其凋亡率降低（$P<0.01$）。与模型组相比，给予不同配伍比例药材水提液后，其凋亡率均有所增加，其中，S1R2 组的凋亡率最高 [（46.8±0.15）%]，其次为 S2R1 组，S 组的凋亡率最低 [（14.8±0.35）%]。结果图 4。

3.5　不同配比药材对 Ras、ERK1、ERK2、C-fos、JNK 蛋白表达的影响

与对照组相比，模型组 Ras、ERK1、ERK2、C-fos、JNK 的表达较强（$P<0.05$）。与模型组相比，各给药组 Ras、ERK1、ERK2、C-fos、JNK 表达均有所下降（$P<0.05$）；其中，S1R2 组和 S2R1 组下降更明显；R 组比 S 组下调蛋白表达更为明显，说明毛菊苣种子抑制蛋白表达的能力弱于毛菊苣根。结果见图 5。

4　讨论

HSCs 是位于肝间质的肝特异性细胞，也是肝纤维化的主要细胞类型 [10]。各种病因（如酒精性脂肪肝、非酒精性脂肪肝、病毒性肝炎等）导

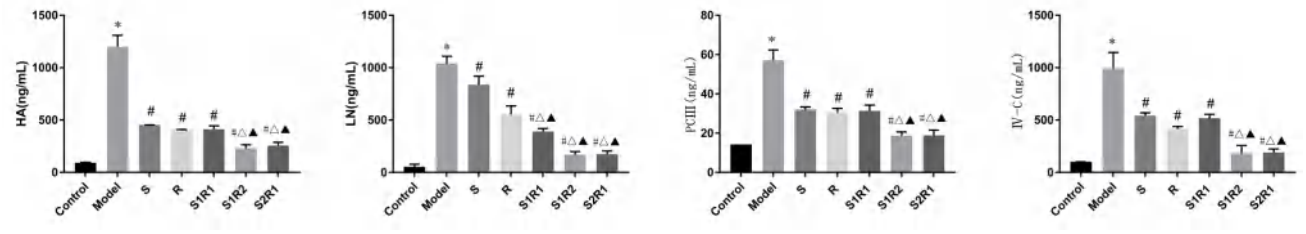


图 3　不同配伍比例药材对 HSC-T6 细胞肝纤维化指标的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig 3　Effect of different compatibility drug ratios on the liver fibrosis indexes for HSC-T6 cells（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

注：与对照组比较，$^{*}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#}P<0.01$；与 S 组比较，$^{\triangle}P<0.01$；与 R 组相比，$^{\blacktriangle}P<0.01$。

Note：Compared with the control group，$^{*}P<0.01$；compared with the model group，$^{\#}P<0.01$；compared with the S group，$^{\triangle}P<0.01$；compared with the R group，$^{\blacktriangle}P<0.01$.

致肝脏发生损伤时，静息态的 HSC 活化并转分化为促进瘢痕形成的肌成纤维细胞，并分泌细胞外基质（extracellular matrix，ECM）促进损伤修复，但过度的 ECM 累积会导致肝脏纤维化 [11]。血小板衍生生长因子（platelet derived growth factor，PDGF）是一种促进 HSC 活化的较强的有丝分裂因子，A 链和 B 链组成 PDGF 的 3 种形式，即 PDGF-AA、PDGF-BB 和 PDGF-AB。有

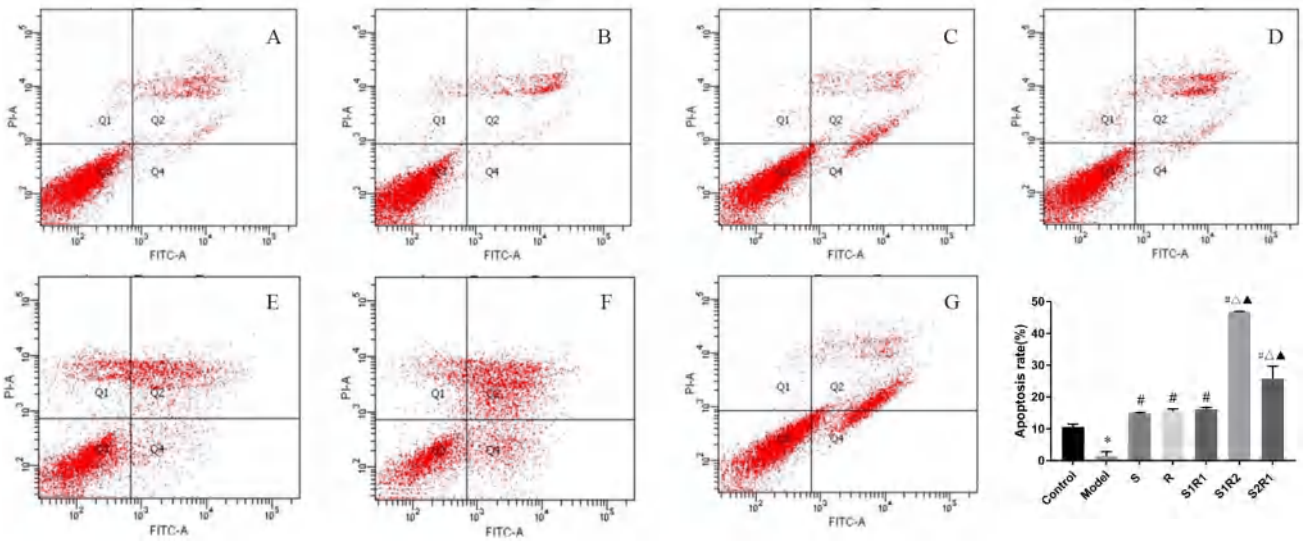


图 4　不同配伍比例药材对 HSC-T6 细胞增殖凋亡的影响

Fig 4　Apoptosis Effect of different compatibility drug ratios on the proliferation and apoptosis of HSC-T6 cells

A. 对照组（control group）；B. 模型组（model group）；C. S 组（S group）；D. R 组（R group）；E. S1R1 组（S1R1 group）；F. S1R2 组（S1R2 group）；G. S2R1 组（S2R1 group）

注：与对照组比较，$^{*}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\#}P < 0.01$；与 S 组比较，$^{\triangle}P < 0.01$；与 R 组相比，$^{\blacktriangle}P < 0.01$。

Note：Compared with the control group，$^{*}P < 0.01$；compared with the model group，$^{\#}P < 0.01$；compared with the S group，$^{\triangle}P < 0.01$；compared with the R group，$^{\blacktriangle}P < 0.01$.

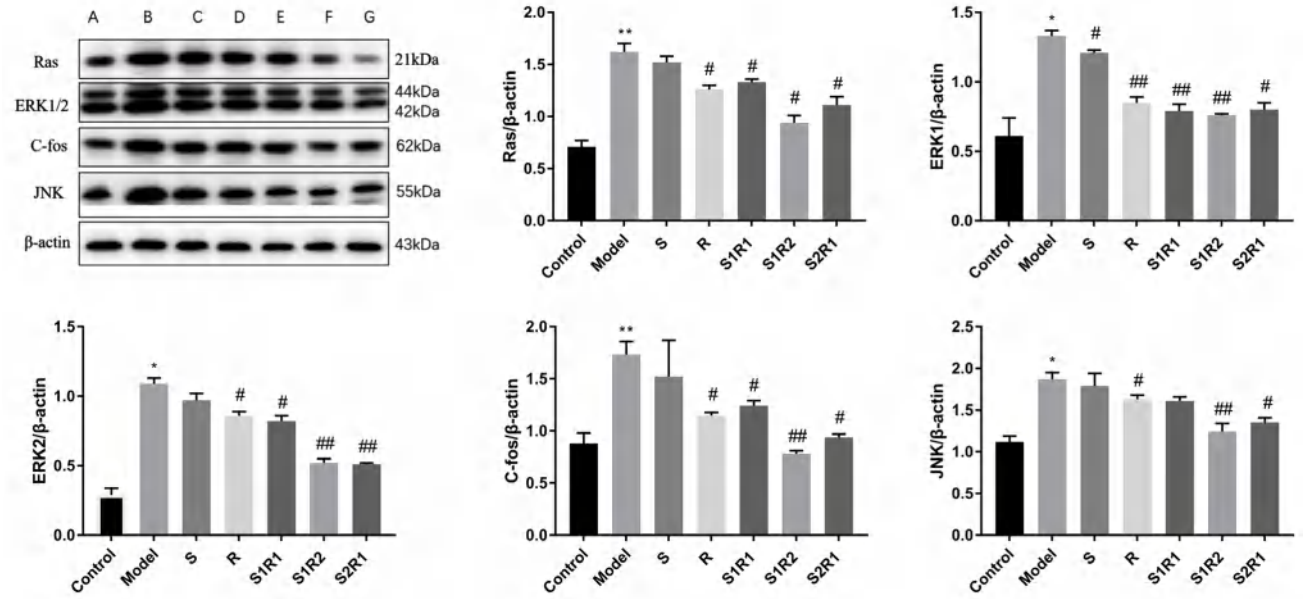


图 5　不同配伍比例药材水提液对 ERK/Ras 信号通路中关键蛋白表达量的影响

Fig 5　Effect of different compatibility of drug water extract on the protein expression in the ERK/Ras signaling pathway of HSC-T6 cells

A. 对照组（control group）；B. 模型组（model group）；C. S 组（S group）；D. R 组（R group）；E. S1R1 组（S1R1 group）；F. S1R2 组（S1R2 group）；G. S2R1 组（S2R1 group）

注：与对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

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

研究表明，PDGF-BB 是最强的刺激 HSC 活化增殖的因子 [12]。故本实验中采用 PDGF-BB 诱导大鼠 HSC-T6 细胞活化增殖建立体外肝纤维化模型。

ECM 主要由 HSC 活化产生，该活化过程以及肝纤维化的形成由多种细胞信号转导通路参与形成 [13]。PDGF-BB 在肝纤维化过程中刺激 Ras/Raf-1/MEK/ERK 级联反应。在 MAPK 信号转导途径中，ERK 通路是较为经典的一条，该途径对细胞形态、迁移、代谢、增殖、分化和存活具有重要的调控作用，ERK1/2 可以通过磷酸化被一

系列细胞生长因子激活[14-15]。激活的激酶有助于调节 HSC 的增殖和 ECM 的产生。此外，在静止的或激活的 HSC 中抑制 JNK 活性可以阻止 HSC 激活。故本研究采用免疫印迹法检测不同配伍比例毛菊苣子 - 毛菊苣根对 PDGF-BB 诱导增殖的 HSC-T6 细胞 ERK/Ras 通路中 Ras、ERK1/2、C-fos、JNK 相关蛋白的表达情况，结果显示毛菊苣子 - 毛菊苣根在配伍前后抗肝纤维化作用机制与下调 Ras、ERK1/2、C-fos、JNK 相关蛋白的表达和抑制 MAPK 激活有关，并且配伍后对蛋白表达的影响也更为显著。

在中医药领域，经过长期的临床实践和循证医学研究，已逐步建立起以辨证论治为特征的抗肝纤维化治疗方案，并产生了许多抗肝纤维化中成药和经验方，如扶正化瘀片（胶囊）、复方鳖甲软肝片、安络化纤丸、养血柔肝丸（汤）等[16]。在一些新疆地产民族药方中，主药均包含不同比例的毛菊苣子和毛菊苣根，但其功效不尽相同，如护肝布祖热颗粒和炎消迪娜尔糖浆临床用于治疗肝病，而复方木尼孜其颗粒则用于调节体液及气质[4]。毛菊苣子和根不同配伍比例与临床适应证是否存在相关性值得关注。本研究结合肝纤维化四项指标和细胞增殖、凋亡实验结果综合分析发现，毛菊苣子 - 毛菊苣根以 1∶2 和 2∶1 配伍后的抗肝纤维化活性强于单味药材，推测配伍后药材中的化学成分发生了变化，故其配伍的化学机制值得进一步研究。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：323.

[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会 . 中华本草 . 分卷 [M]. 上海：上海科学技术出版社，2005：326-328.

[3] 祖越，李国栋，张程亮，等 . 维药毛菊苣活性成分及其药理作用研究进展 [J]. 中药药理与临床，2021，37（5）：229-234.

[4] 中华人民共和国卫生部药典委员会 . 中华人民共和国卫生部药品质量标准（分册）[M]. 乌鲁木齐：新疆科技卫生出版社，1999.

[5] 杨飞，罗玉琴，薛桂蓬，等 . 维药毛菊苣根 - 种子不同比例配伍的 90% 乙醇提取物对小鼠急性肝损伤的保护作用及其机制 [J]. 中国医院药学杂志，2015，35（15）：1352-1356.

[6] 哈木拉提·哈斯木，徐磊，帕依曼·亥米提，等 . 毛菊苣根 - 种子不同配伍的乙醇提取物对小鼠肝损伤的保护作用 [J]. 西北药学杂志，2015，30（6）：705-709.

[7] 臧薇，王杨静楠，李茜，等 . 毛菊苣子 - 毛菊苣根不同配伍比例的抗肝癌活性研究 [J]. 西北药学杂志，2020，35（3）：372-377.

[8] 杨建华，骆旭东，臧薇，等 . 基于灰色关联分析法评价毛菊苣药材的质量 [J]. 新疆医科大学学报，2020，43（2）：219-224，228.

[9] 骆旭东，杨建华，张海波，等 . HPLC 法同时测定毛菊苣根和种子中 7 种化学成分的含量 [J]. 西北药学杂志，2019，34（3）：289-294.

[10] Higashi T，Friedman SL，Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis [J]. Adv Drug Delive Rev，2017，121：27-42.

[11] 姜娜，平键，徐列明 . 肝星状细胞的活化机制—探寻肝纤维化新的诊断指标和治疗靶点 [J]. 临床肝胆病杂志，2019，35（3）：640-643.

[12] Zhou JY，Deng YQ，Yan LL，et al. Serum platelet-derived growth factor BB levels：a potential biomarker for the assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B [J]. Int J Infect Dis，2016，49（C）：94-99.

[13] Koo BH，Won MH，Kim YM，et al. p32-dependent p38 MAPK activation by arginase Ⅱ downregulation contributes to endothelial nitric oxide synthase activation in HUVECs [J]. Cells，2020，9（2）：392.

[14] Foglia B，Cannito S，Bocca C. ERK pathway in activated，myofibroblast-like，hepatic stellate cells：a critical signaling crossroad sustaining liver fibrosis [J]. Int J Mol Sci，2019，20（11）：2700-2722.

[15] Eblen ST. Extracellular-regulated kinases：signaling from Ras to ERK substrates to control biological outcomes [J]. Adv Cancer Res，2018，138：99-142.

[16] 傅柳，尚广彬，陈中，等 . 中药逆转肝纤维化进程的研究概况 [J]. 时珍国医国药，2021，32（4）：944-948.

（收稿日期：2022-01-08；修回日期：2022-03-04）

重组黧豆蛋白酶的制备及其活性研究

王真，吴方晖，阴忆烽，张毅，刘艳丽*，宋云扬*（国民核生化灾害防护国家重点实验室，北京 102205）

摘要：目的 通过基因克隆表达和纯化，获得高纯度的重组黧豆蛋白酶（mucunain，93 ～ 309，M），并对其生物活性进行研究，为非组胺依赖性痒觉信号通路研究提供模型物质。**方法** 将全基因合成的编码 mucunain 活性域（93 ～ 309）的基因片段克隆至 pET-28a（＋）-Sumo 载体中，转入大肠埃希菌 Rosetta（DE3）中进行表达。融合蛋白 His6-Sumo-M 用 SUMO 蛋白酶酶切后使用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化，经透析复性得到重组黧豆蛋白酶。分别采用 15% SDS-PAGE 和 Edman 降解法对重组黧豆蛋白酶的分子量和 *N*- 端氨基酸序列进行鉴定。使用 FLIPR 检测技术分析重组黧豆蛋白酶的生物活性。**结果** 获得了纯度≥ 90% 的重组黧豆蛋白酶，产量达到 50 mg • L^{-1}；FLIPR 检测结果显示，相比于对照组，重组黧豆蛋白酶作用于 Hela 细胞后可以引发明显持续的钙流变化，而半胱氨酸蛋白酶抑制剂 E-64 可以抑制胞质 Ca^{2+} 的变化。**结论** 通过基因克隆表达技术可以得到具有生物活性的重组黧豆蛋白酶。

关键词：黧豆蛋白酶（93 ～ 309）；瘙痒；重组表达；活性分析
中图分类号：TS201.2；TS210.9 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)05-1083-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.021

Preparation and activity of recombinant mucunain

WANG Zhen, WU Fang-hui, YIN Yi-feng, ZHANG Yi, LIU Yan-li*, SONG Yun-yang* (*State Key Laboratory of NBC Protection for Civilians*, *Beijing* 102205)

Abstract: Objective To obtain bioactive recombinant mucunain (93 ～ 309, M) in large amounts via gene cloning, expression, purification and activity evaluation, and to provide a model substance for the research of histamine-independent itch signaling pathway. **Methods** The synthetic gene encoding the active domain (93 ～ 309) of mucunain predicted was cloned into pET-28a (＋)-Sumo and transformed into competent *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3) for expression. After being digested with SUMO protease, the recombinant mucunain was obtained, which suffered purification by Ni-NTA affinity chromatography column and renaturation by dialysis. Subsequently, the molecular weight and the *N*-terminal amino acid sequence of recombinant mucunain were identified respectively by 15% SDS-PAGE and Edman degradation. Furthermore, the bioactivity of recombinant mucunain was assessed by FLIPR detection technology. **Results** Mucunain with purity ≥ 90% was obtained and the yield reached 50 mg • L^{-1}. The recombinant mucunain obviously induced continuous changes in cytosolic Ca^{2+} were Hela cells, whereas the changes of cytosolic Ca^{2+} was inhibited by the cysteine protease inhibitor E-64. **Conclusion** Recombinant mucunain with bioactivity is obtained by gene cloning.

Key words: mucunain (93 ～ 309); itch; recombinant expression; activity

瘙痒是一种可以引起抓挠反应的主观感觉，大多数的皮肤病以及系统性疾病都伴有瘙痒症状，长期的慢性瘙痒严重影响人们的生活质量。目前，由于瘙痒的发生发展机制尚不完全清楚，也因此缺乏较为有效完善的治疗方法。随着组胺依赖性和非组胺依赖性痒觉信号通路的发现，表明多种信号通路参与了痒觉信号的传导[1]。常见的瘙痒介质有生物胺类、神经肽类、类花生酸类、蛋白

作者简介：王真，女，在读硕士研究生，主要从事分子药理学方面的研究，email：15737189881@163.com *通信作者：宋云扬，男，研究员，硕士研究生导师，主要从事分子药理学方面的研究，email：syyfeng@126.com；刘艳丽，女，副研究员，硕士研究生导师，主要从事分子药理学方面的研究，email：liuh306@hotmail.com

酶类及细胞因子类等多种，我们研究的黧豆蛋白酶属于蛋白酶类致痒介质，它是通过非组胺依赖性的痒觉信号通路传导瘙痒的。

黧豆（Cowhage）是豆科黧豆属植物，多生在热带、亚热带地区，黧豆豆荚毛刺可以导致瘙痒。黧豆毛刺在刺入灵长类或啮齿类动物皮肤不久后可以产生持续几分钟的痒感[2]。早期的生化研究表明，黧豆毛刺中含有一种可以引发瘙痒的蛋白酶，称之为 mucunain[3]。研究人员发现，mucunain 是通过一群对辣椒素敏感的传入神经纤维引发瘙痒的，它可以激活所有的机械热敏感的 C 纤维，这与介导组胺诱发瘙痒的机械刺激不敏感的 C 纤维不同，mucunain 诱导的瘙痒不能被抗组胺药所阻断[4-5]。Reddy 等[6]从黧豆豆荚毛刺中分离出天然黧豆蛋白酶并进行了重组表达，鉴定了 mucunain 是一种半胱氨酸蛋白酶，并发现 mucunain 是蛋白酶激活受体 2 和 4（proteinase activated receptor 2/4，PAR2/4）的配体，而且对 PAR4 的活性大于对 PAR2 的活性。在之后的研究中，人们发现与组胺引发的瘙痒相比，mucunain 诱导的瘙痒感觉更为强烈，其瘙痒反应与慢性瘙痒更为类似，因此，mucunain 致痒可作为研究特应性皮炎（atopic dermatitis，AD）等慢性瘙痒疾病的理想模型[7]。

在止痒药物研究方面，抗组胺药物并不能有效解决临床瘙痒问题，而 mucunain 作为一种非组胺机制的致痒物，常作为与组胺进行瘙痒方面比较性研究的典型致痒剂。到目前为止，仅有一篇文献报道了 mucunain 的重组表达[6]。鉴于从黧豆毛刺中大量获取 mucunain 比较困难，本研究主要开展黧豆蛋白酶的基因克隆表达与纯化，采用 FLIPR 检测技术对重组黧豆蛋白酶的生物活性进行研究，以期可以高效地获得大量黧豆蛋白酶，为相关止痒剂的研究提供模型物质。

1　材料

1.1　试药

pET-28a（＋）-Sumo 载体（美国 Novagen 公司）；DH5*α* 感受态细胞、Rosetta（DE3）感受态细胞（北京天根生化科技有限公司）。

DNA 连接酶，限制性内切酶 *Xho* Ⅰ，限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ，1 kb DNA Ladder，Prestained protein MW marker 26616（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；卡那抗菌药物（美国 Amersco 公司）；E-64（德国 Sigma 公司）；Ni-NTA 亲和层析柱（美国 Cytiva 公司）。

1.2　仪器

MillQ-10A 超纯水净化系统（美国 Millipore 公司）；CO_2 培养箱（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；离心机（德国 Sigma 公司，德国 Eppendorf 公司）；FLIPR Penta 高通量实时荧光检测分析系统（德国 Molecular Devices 公司）。

2　方法

2.1　黧豆蛋白酶的重组构建

黧豆蛋白酶全长基因（NCBI：ACB87490.1）编码整个前体蛋白（前体肽和成熟肽），可分为 I29 抑制肽、C1 半胱氨酸蛋白肽和颗粒蛋白 3 个部分（见图 1）[8]。

图 1　黧豆蛋白酶的组成

Fig 1　Composition of mucunain

根据结构活性预测结果，推测其活性区域位于氨基酸序列的 93 ～ 309 位，对其进行大肠埃希菌密码子优化，全基因合成获得质粒 M-pUC57（南京金斯瑞生物科技有限公司合成）。将 M-pUC57 用限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切后，与用同样酶酶切后的线性化表达载体 pET-28a（＋）-Sumo 在 T4 DNA 连接酶作用下于 25 ℃连接 2 h，载体构建如图 2 所示。采用 $CaCl_2$ 法进行转化，将 *Escherichia coli* DH5*α*（DE3）感受态细胞置于冰上孵育 30 min，细胞在 42 ℃水浴 90 s，冰上孵育 2 ～ 3 min。加入 900 μL 2×YT 培养基于 37 ℃振荡培养箱中孵育 40 ～ 50 min，最后涂布在含有 50 μg • mL^{-1} 卡那抗菌药物的 2×YT 琼脂平板上，在 37 ℃孵育 16 h 后，挑取单菌落进行质粒提取，并通过限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ、*Xho* Ⅰ进行双酶切鉴定和 DNA 测序鉴定。

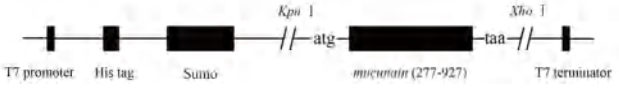


图 2　M-pET-28a（＋）-Sumo 表达质粒的构建

Fig 2　Construction of M-pET-28a（＋）-Sumo expression plasmid

2.2　黧豆蛋白酶的表达

将重组质粒 M-pET-28a（＋）-Sumo 转入大肠埃希菌 Rosetta（DE3）菌株中进行诱导表达。挑取单个菌落，在含卡那抗菌药物（50 μg • mL^{-1}）的 10 mL 2×YT 培养基中于 37 ℃、220 r • min^{-1} 条件下培养 12 ～ 16 h。以 1∶100 的比例接种于新鲜培养基中，37 ℃、220 r • min^{-1} 条件下培养至 OD_{600} 达到 0.6 ～ 0.8，用 0.05 mmol • L^{-1} 异丙基 -*β*-*D*-1- 硫代半乳糖苷（IPTG）在 18 ℃诱导

48 h。4 ℃、4500 r • min^{-1} 离心 15 min，收集细胞，将其重悬于 100 mL 冰冷的裂解缓冲液（20 mmol • L^{-1} PBS，pH 7.4）中，采用低温超高压细胞破碎仪进行裂解。将裂解液进行 SDS-PAGE 电泳，对其进行表达形式分析。

2.3 黧豆蛋白酶的纯化

在室温下，将包涵体用洗涤液（2 mol • L^{-1} 尿素、20 mmol • L^{-1} Tris、5 mmol • L^{-1} 咪唑和 500 mmol • L^{-1} 氯化钠）洗涤两次，9000 r • min^{-1} 离心 10 min，之后溶解在增溶缓冲液（pH 7.4，8 mol • L^{-1} 尿素、280 mmol • L^{-1} *β*-巯基乙醇、20 mmol • L^{-1} Tris、5 mmol • L^{-1} 咪唑和 500 mmol • L^{-1} 氯化钠）中室温放置 1 h，10 000 r • min^{-1} 离心 15 min，回收溶解有目的蛋白 His6-Sumo-M 的上清液。将融合蛋白 His6-Sumo-M 进行纯化和重折叠复性。融合蛋白用超滤管浓缩后用 SUMO 蛋白酶酶切，SUMO 蛋白酶与 His6-Sumo-M 以 100∶1 的比例加入到 Sumo Protease Buffer（50 mmol • L^{-1} Tris-HCl，1 mmol • L^{-1} DTT，pH 8.0）中 4 ℃过夜。然后采用镍柱亲和层析法（Ni-NTA 亲和层析柱）进行纯化得到变性蛋白。将纯化的蛋白进行透析重折叠恢复其活性。重折叠过程分以下三步进行，第一步透析是用由 1.5 mol • L^{-1} 尿素、50 mmol • L^{-1} 咪唑、300 mmol • L^{-1} 氯化钠、200 mmol • L^{-1} 蔗糖、1 mmol • L^{-1} 还原型谷胱甘肽（GSH）、0.2 mmol • L^{-1} 氧化型谷胱甘肽（GSSG）和 0.1% Triton X-100 组成的溶液（pH 7.4）进行的；使用由 0.5 mol • L^{-1} 尿素、25 mmol • L^{-1} 咪唑、300 mmol • L^{-1} 氯化钠、200 mmol • L^{-1} 蔗糖、1 mmol•L^{-1} 谷胱甘肽、0.2 mmol•L^{-1} GSSG 和 0.1% Triton X-100 组成的溶液（pH 7.4）进行第二步透析；用 100 mmol • L^{-1} Tris、2 mmol • L^{-1} 咪唑、300 mmol • L^{-1} 氯化钠和 200 mmol • L^{-1} 蔗糖组成的溶液（pH 7.4）进行最后一步透析。所有透析步骤均使用搅拌器在 4 ℃冰箱内搅拌 6 h，最后用 0.45 μm 滤膜过滤除去沉淀物[9]。将蛋白溶液进行超滤浓缩，冷冻干燥，－ 20 ℃保存。

2.4 黧豆蛋白酶的分子量鉴定

经过蛋白表达纯化以及复性得到了重组蛋白，采用 15% SDS-PAGE 确定其分子量大小是否与预期一致，并采用 Edman 降解法对表达的重组黧豆蛋白酶进行 *N*-端氨基酸序列分析，将重组蛋白溶解于 500 μL 含蛋白酶抑制剂的 8 mol • L^{-1} 尿素溶液中，用胰蛋白酶按酶∶底物＝1∶50 的比例对蛋白进行酶切。将酶切后的多肽溶于溶剂 A（0.1% 甲酸水），10 000 g 离心 5 min。取上清液采用 Q Exactive 型液质联用质谱仪检测，以含 0.1% 甲酸的水（溶剂 A）和含 0.1% 甲酸的乙腈（溶剂 B）为流动相，梯度洗脱（0 ～ 8 min，6% ～ 10%B；8 ～ 60 min，10% ～ 30%B；60 ～ 79 min，30% ～ 42%B；79 ～ 80 min，42% ～ 95%B；80 ～ 85 min，95%B；85 ～ 86 min，95% ～ 6%B；86 ～ 90 min，6%B），流速为 0.6 L • min^{-1}，总采集时间为 90 min。喷雾电压为 2.1 kV，毛细管温度为 320 ℃；碰撞能量为 27 eV，采集一级质量范围为 300 ～ 1400 *m/z*，二级扫描范围为 200 ～ 2000 *m/z*。使用 MaxQuant 对液质联用质谱仪（LC/MS）原始数据进行处理。

2.5 黧豆蛋白酶生物活性分析

采用 FLIPR 检测 Hela 细胞中胞质 Ca^{2+} 的变化，分析重组黧豆蛋白酶的生物活性。使用 RPMI-1640 完全培养基，以（1 ～ 2）×10^5 个 • mL^{-1} 的密度将 Hela 细胞接种于 96 孔板内。培养 24 h 后，弃去培养基，每孔加入 80 μL Hank’s 缓冲液配制的 calcium 6 染料（10× calcium 6 染料用含 20 mmol • L^{-1} HEPES 的 Hank’s 缓冲液以 1∶10 稀释，pH 7.4），37 ℃避光孵育。2 h 后，分别加入 20 μL 重组黧豆蛋白酶（10 μmol•L^{-1}）及重组黧豆蛋白酶（10 μmol•L^{-1}）与 E-64（20 μmol • L^{-1}，半胱氨酸蛋白酶抑制剂）的混合物至孔中。采用 FLIPR 检测胞质 Ca^{2+} 的变化，应用 Max Pro 软件对数据进行分析和可视化。所有实验均重复进行三次，采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件对数据进行统计分析。

3 结果

3.1 黧豆蛋白酶的重组构建与表达

将 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切后的 pET-28a（＋）-Sumo 载体和胶回收纯化的黧豆蛋白酶基因片段连接，转化 *Escherichia coli* DH5*α* 感受态细胞，提取质粒，经 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切后鉴定得到约 650 bp 大小的特异条带（见图 3）。DNA 测序结果表明，与优化后的核苷酸序列一致。

实验采用了多种感受态细胞、不同的温度、不同的时间以及不同的 IPTG 浓度进行诱导条件优化，发现重组黧豆蛋白酶都能进行表达，但始终以包涵体的形式存在（结果未列出）。采用 Rosetta（DE3）感受态细胞，在 18 ℃时用 0.05 mmol • L^{-1} IPTG 诱导 48 h，用 20 mmol • L^{-1} PBS 裂解细菌后蛋白获得量最高，并确定其为最终的表达和裂解条件，结果如图 4 所示。

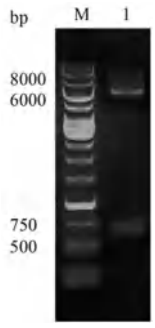


图 3 重组质粒 M-pET-28a（＋）-Sumo 的酶切鉴定

Fig 3 Identify of recombinant plasmid M-pET-28a（＋）-Sumo digested by restriction enzyme

注：泳道 1. 重组质粒 M-pET-28a（＋）-Sumo 经 *Kpn* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切；M.1 kb DNA ladder。

Note：Lane 1. recombinant plasmid M-pET-28a（＋）-Sumo digested with *Kpn* Ⅰ and *Xho* Ⅰ；M.1 kb DNA ladder.

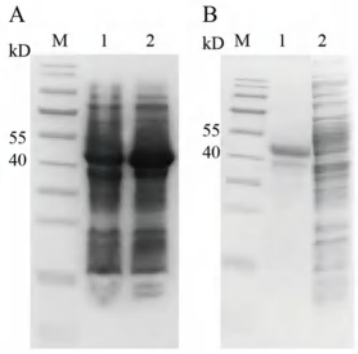


图 4 重组黧豆蛋白酶的表达

Fig 4 Recombinant mucunain expressed in *Escherichia coli* strain Rosetta（DE3）

注：A. 泳道 1 和泳道 2 是融合蛋白 His6-Sumo-M 诱导前后的全细胞裂解液；B. 泳道 1 和泳道 2 分别为沉淀和上清液中表达的融合蛋白 His6-Sumo-M；M. Prestained protein MW marker 26 616。

Note：A. Lane 1 and 2 were the whole cell lysate of fusion protein His6-Sumo-M before/after the induction；B. Lane 1 and 2 were the fusion protein His6-Sumo-M in the precipitation and supernatant, respectively；M. Prestained protein MW marker 26 616.

3.2 黧豆蛋白酶的纯化与鉴定

黧豆蛋白酶纯化时同样进行了条件优化，发现先将包涵体洗涤后溶解，再进行酶切、纯化和重折叠复性，这样得到的重组黧豆蛋白酶收率较大。酶切以及重折叠复性时都应保证溶液中各成分浓度条件合适，避免沉淀的生成，最终影响复性及产率。将包涵体进行溶解、酶切、纯化和重折叠复性后得到重组黧豆蛋白酶，经超滤除盐和浓缩以及冻干后，得到的重组黧豆蛋白酶纯度≥ 90%，产量达到 50 mg • L^{-1}。

纯化复性后的重组黧豆蛋白酶进行 SDS-PAGE 电泳，结果如图 5 所示。重组黧豆蛋白酶用 LC/MS 进行鉴定，检测到 18 条肽段，蛋白序列覆盖率为 68.2%（见图 6，表 1）。

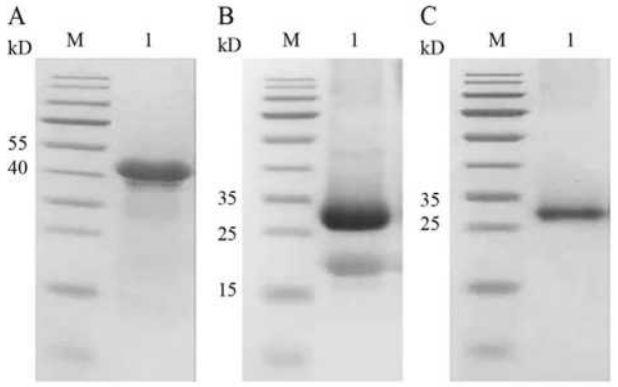


图 5 重组黧豆蛋白酶的纯化结果鉴定

Fig 5 15% SDS-PAGE analysis of recombinant mucunain purified by Ni-NTA

注：A. 泳道 1，包涵体 His6-Sumo-M 溶解变性结果；B. 泳道 1，SUMO 蛋白酶对包涵体 His6-Sumo-M 酶切；C. 泳道 1，重组黧豆蛋白酶纯化结果；M.Prestained protein MW marker 26 616。

Note：A. Lane 1，denaturation of inclusion body His6-Sumo-M dissolved in 8 mol • L^{-1} urea；B. Lane 1，the inclusion body His6-Sumo-M digested with SUMO protease；C. Lane 1，purification of recombinant mucunain；M. Prestained protein MW marker 26 616.

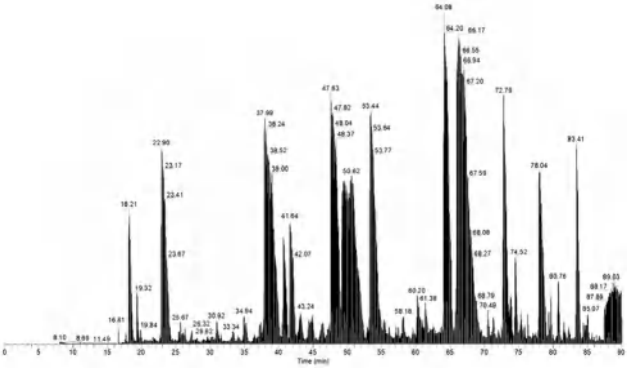


图 6 重组黧豆蛋白酶经胰蛋白酶酶解的肽段质谱 TIC 图

Fig 6 Total ion chromatogram of recombinant mucunain obtained by trypsin

3.3 重组黧豆蛋白酶生物活性研究

将得到的重组黧豆蛋白酶刺激内源性表达 PAR2 和 PAR4 受体的 Hela 细胞（见图 7），采用 FLIPR 进行了胞质钙流变化的测定，钙流变化如图 8 所示，发现重组黧豆蛋白酶可以引起胞内 Ca^{2+} 浓度升高，持续时间约 20 ～ 30 min，而加入重组黧豆蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶抑制剂 E-64 后的混合物后胞质 Ca^{2+} 无明显的变化，即 E-64 可以抑制重组黧豆蛋白酶引起胞内 Ca^{2+} 浓度的变化，这表明获得的重组黧豆蛋白酶具有生物活性。

4 讨论

Mucunain 是黧豆豆荚毛刺中引起强烈瘙痒的主要成分，是研究慢性瘙痒性疾病的理想模型。大多数文献报道中使用的黧豆蛋白酶是从黧豆毛

表 1　重组黧豆蛋白酶的 MaxQuant 搜库肽段鉴定结果

Tab 1　Peptides identification of recombinant mucunain in MaxQuant library

Sequence of recombinant mucunain	Sequence of mucunain（NCBI：ACB87490.1）	Mass	Score	Matching score/%
NESAVLPVK（11 ～ 19）	NESAVLPVK（101 ～ 109）	955.53385	207.68	100
NESAVLPVKDQGNCGSCWAFSTIGAVEGINK（11 ～ 41）	NESAVLPVKDQGNCGSCWAFSTIGAVEGINK（101 ～ 131）	3307.5602	161.46	100
DQGNCGSCWAFSTIGAVEGINK（20 ～ 41）	DQGNCGSCWAFSTIGAVEGINK（110 ～ 131）	2370.0369	302.15	100
AVDGTCDQYR（94 ～ 103）	AVDGTCDQYR（183 ～ 193）	1183.4928	202.28	100
AVDGTCDQYRK（94 ～ 104）	AVDGTCDQYRK（183 ～ 194）	1311.5877	204.36	100
NAKVVTIDSYEDVPANDELALK（105 ～ 126）	NAKVVTIDSYEDVPANDELALK（195 ～ 216）	2403.2169	235.26	100
NAKVVTIDSYEDVPANDELALKK（105 ～ 127）	NAKVVTIDSYEDVPANDELALKK（195 ～ 217）	2531.3119	144.5	100
VVTIDSYEDVPANDELALK（108 ～ 26）	VVTIDSYEDVPANDELALK（198 ～ 216）	2090.0419	245.03	100
VVTIDSYEDVPANDELALKK（108 ～ 127）	VVTIDSYEDVPANDELALKK（198 ～ 217）	2218.1369	271.56	100
KAVANQPVSVAIEGGGR（127 ～ 143）	KAVANQPVSVAIEGGGR（217 ～ 233）	1651.9006	212.17	100
AVANQPVSVAIEGGGR（128 ～ 143）	AVANQPVSVAIEGGGR（218 ～ 233）	1523.8056	203.51	100
EFQLYVSGVFTGR（144 ～ 156）	EFQLYVSGVFTGR（234 ～ 246）	1501.7565	220.1	100
CGTALDHGVVAVGYGSVK（157 ～ 174）	CGTALDHGVVAVGYGSVK（247 ～ 264）	1788.8829	347.73	100
CGTALDHGVVAVGYGSVKGHDYWIVR（157 ～ 182）	CGTALDHGVVAVGYGSVKGHDYWIVR（247 ～ 272）	2815.3864	282.86	100
GHDYWIVR（175 ～ 182）	GHDYWIVR（265 ～ 272）	1044.5141	265.73	100
NSWGASWGEEGYVR（183 ～ 196）	NSWGASWGEEGYVR（273 ～ 286）	1596.6957	234.3	100
NSWGASWGEEGYVRLER（183 ～ 199）	NSWGASWGEEGYVRLER（273 ～ 289）	1994.9235	161.14	100
CGIAIEPSYPIK（209 ～ 220）	CGIAIEPSYPIK（299 ～ 310）	1346.6904	103.7	100

注（Note）：根据肽序列从 *N*- 末端到 *C*- 末端的位置对肽序列进行排序。评分值表示二阶碎裂谱和二阶离子匹配，分数值越高，表明二阶谱匹配效果越好（Sequencing of peptide was sorted by the position of peptides from *N*-terminal to *C*-terminal. The score value indicated second-order fragmentation spectrum and second-order ion matching. The higher the score, the better the matching of second-order spectrum）。

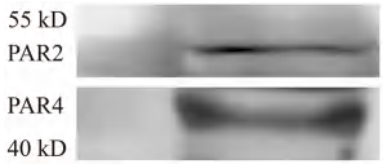


图 7　Hela 细胞中 PAR2 和 PAR4 受体表达情况

Fig 7　Expression of PAR2 and PAR4 receptor in Hela cells

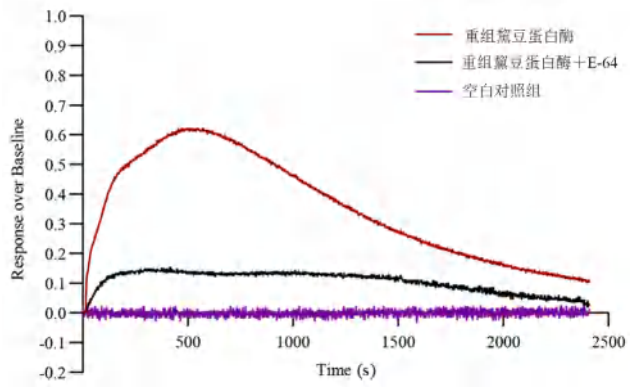


图 8　Hela 细胞中 Ca^{2+} 浓度变化曲线

Fig 8　Changes of Ca^{2+} concentration in Hela cells

刺中提取后直接使用的，其活性效应评价也均是通过有活性或灭活的毛刺或者制作成嵌刺板形式将天然黧豆蛋白酶作用于人体或动物体皮肤。到目前为止，仅有一篇文章报道 mucunain 的重组表达[6]。考虑到从黧豆豆荚毛刺中分离提取大量天然 mucunain 比较困难，本研究将 *mucunain* 基因片段克隆到 pET-28a（＋）-Sumo 载体上，其上带有 -Sumo 和 -His6 标签，以期得到可溶性表达的目的蛋白，同时便于后续进行蛋白纯化。在重组黧豆蛋白酶表达的过程中，我们采用了不同的诱导时间和温度、不同浓度的 IPTG 以及多种大肠埃希菌表达菌株进行诱导表达，发现融合蛋白始终以包涵体的形式呈现。我们对包涵体的纯化和复性条件也进行了适当调整，包括蛋白的溶解、酶切、纯化以及重折叠的条件和顺序等，最终得到了重组黧豆蛋白酶，产量达到 50 $mg•L^{-1}$。

文献表明，mucunain 激活 PAR2 和 PAR4 受体，不是通过受体配体占位，而是切割 PAR2 和 PAR4 受体使其产生一个新的栓系配体后，与细胞外受体外环 -2 相互作用启动自身，活化的 PAR2 和 PAR4 受体激活 PLC，PLC 继续激活 TRPV1 和 TRPA1 通道引起 Ca^{2+} 内流。为了研究重组黧豆蛋白酶是否具有生物活性，本研究采用内源性表达 PAR2 和 PAR4 受体的 Hela 细胞，使用 FLIPR 检测 Hela 细胞胞质 Ca^{2+} 浓度变化。FLIPR 检测结果表明，重组黧豆蛋白酶可以引起胞质 Ca^{2+} 持续变化 20 ～ 30 min，而 E-64 可以抑制重组黧豆蛋白酶引起的 Hela 细胞胞质中

Ca^{2+}的变化，表明重组黧豆蛋白酶具有显著的生物活性。这与 Reddy 等[6]的研究结果并不完全一致，他们的结果显示在分别外源性表达 PAR2 和 PAR4 受体的 Hela 细胞中，胞质 Ca^{2+}浓度的变化持续 20 ～ 100 s。而在本研究中使用的是内源性共表达 PAR2 和 PAR4 受体的 Hela 细胞，这可能是重组黧豆蛋白酶引发了持续的 Ca^{2+}变化的原因，也可能是多种信号通路对 Ca^{2+}释放的协同作用。PAR2 受体下游的 PLC 激活后，不仅可以激活 TRPV1 和 TRPA1 诱导细胞外 Ca^{2+}的内流[10]，而且可以将二磷酸磷脂酰肌醇（PIP2）水解成三磷酸肌醇（IP3），IP3 能和内质网上的 IP3R 结合刺激内质网内 Ca^{2+}释放进入胞质中。在 RIN-5F 细胞，饱和浓度的 IP3 对胞质中高浓度的 Ca^{2+}抑制具有低灵敏度，呈现一个宽峰，称为高原型钙依赖曲线[11]。Pierre 等[12]的研究显示，PbTx-1 诱导的钙流是多相的和持续的，钙流的变化可以持续 25 min，PbTx-1 诱导的 Ca^{2+}的增加可能与偏倚通路和经典的 PAR2 途径有关。目前已经有研究证实了激活后的 PAR 受体的脱敏、内化和再敏化的机制[13]。在大鼠成纤维细胞中，PAR4 受体可以促进持续的信号转导反应，而且在过表达时不会出现激动剂促进的磷酸化，活化的 PAR4 受体也表现出缓慢的内化速率[14]。这说明重组黧豆蛋白酶激活的 PAR2 和 PAR4 受体的内化过程较慢也可能是导致 Hela 细胞胞质 Ca^{2+}浓度持续变化的原因。另外在本研究中，经重组表达获得的蛋白为黧豆蛋白酶的活性部分——C1A 半胱氨酸蛋白酶，而 Reddy 等[6]获得的是 C1A 半胱氨酸蛋白酶和颗粒蛋白酶部分，这也可能与重组黧豆蛋白酶引起的 Ca^{2+}变化不一致有关。

5 结论

根据文献对 mucunain 的全长序列进行分析，发现其活性片段为中间 C1A 半胱氨酸蛋白酶部分。因此，我们对活性片段进行设计合成、高效表达及活性验证，获得了具有生物活性的重组黧豆蛋白酶，为非组胺依赖性痒觉信号通路研究提供模型物质。

参考文献

[1] Misery L，Brenaut E，Le Garrec R，et al. Neuropathic pruritus [J]. Nat Rev Neurol，2014，10（7）：408-416.

[2] Graham DT，Goodell H，Wolff HG. Neural mechanisms involved in itch，“itchy skin”，and tickle sensations [J]. J Clin Invest，1951，30（1）：37-49.

[3] Shelley WB，Arthur RP. Studies on cowhage（Mucuna pruriens）and its pruritogenic proteinase，mucunain [J]. Ama Arch Derm，1955，72（5）：399-406.

[4] Johanek LM，Meyer RA，Hartke T，et al. Psychophysical and physiological evidence for parallel afferent pathways mediating the sensation of itch [J]. J Neurosci，2007，27（28）：7490-7497.

[5] Namer B，Carr R，Johanek LM，et al. Separate peripheral pathways for pruritus in man [J]. J Neurosci，2008，100（4）：2062-2069.

[6] Reddy VB，Iuga AO，Shimada SG，et al. Cowhage-evoked itch is mediated by a novel cysteine protease：a ligand of protease-activated receptors [J]. J Neurosic，2008，28（17）：4331-4335.

[7] Papoiu AD，Tey HL，Coghill RC，et al. Cowhage-induced itch as an experimental model for pruritus. a comparative study with histamine-induced itch [J]. PLoS One，2011，6（3）：e17786.

[8] Singh SK，Dhawan SS. Analyzing trichomes and spatio-temporal expression of a cysteine protease gene mucunain in *Mucuna pruriens* L.（DC）[J]. Protoplasma，2018，255（2）：575-584.

[9] Choi JW，Eom HJ，Kim HY. Non-structural protein 1 from Japanese encephalitis virus expressed in *Escherichia coli* retains its molecular weight and immunogenicity [J]. Protein Expr Purif，2020，169：105548.

[10] Davidson S，Giesler GJ. The multiple pathways for itch and their interactions with pain [J]. Trends Neurosci，2010，33（12）：550-558.

[11] Hagar RE，Burgstahler AD，Nathanson MH，et al. Type III InsP3 receptor channel stays open in the presence of increased calcium [J]. Nature，1998，396（6706）：81-84.

[12] Pierre O，Fouchard M，Buscaglia P，et al. Calcium increase and substance P release induced by the neurotoxin brevetoxin-1 in sensory neurons：involvement of PAR2 activation through both cathepsin S and canonical signaling [J]. Cells，2020，9（12）：2704.

[13] Chandrabalan A，Ramachandran R. Molecular mechanisms regulating Proteinase-activated receptors（PARs）[J]. The FEBS J，2021，288（8）：2697-2726.

[14] Soh UJ，Dores MR，Chen B，et al. Signal transduction by protease-activated receptors [J]. Br J Pharmacol，2010，160（2）：191-203.

（收稿日期：2022-02-24；修回日期：2022-04-06）

氮、磷对根瘤菌液处理下甘草根瘤生长及固氮活力的影响

耿业业，王桂荣，张远帆，白钰，陈莹，朱成豪，吴繁琦，侯俊玲*，孙志蓉*（北京中医药大学中药学院，北京　102488）

摘要：目的　探究不同水平的氮素和磷素对根瘤菌液处理下甘草根瘤生长及固氮活力的影响。**方法**　设置甘草播种盆栽试验，对盆栽土壤施加根瘤菌液，播种浸泡根瘤菌液的甘草种子，采用不同水平的氮素和磷素处理，调查取样，测定甘草生长指标、成分含量及根瘤固氮活力。**结果**　随着氮素和磷素水平的增加，甘草根部及根瘤的生长指标呈先升后降的趋势，其中 N2 和 P2 处理的甘草根长、根粗、根鲜重最大，单株结瘤数最多，分别为对照组的 5.35 倍和 2.14 倍；N1 和 P1 处理的根瘤单重最高，分别为对照组的 4.49 倍和 5.43 倍。根瘤豆血红蛋白含量随着氮素水平的增加呈先升后降的趋势，以 N2 处理的含量最高，为对照组的 1.96 倍；随着磷素水平的增加根瘤豆血红蛋白的含量呈下降趋势。甘草酸和甘草苷含量随着氮素水平的增加先升高后下降，其中 N2 处理的含量最高；随着磷素水平的增加甘草酸和甘草苷含量呈上升趋势。**结论**　在施加根瘤菌液的条件下，适量的氮素、磷素可以促进甘草生物量和活性成分积累，促进甘草结瘤，提高根瘤的固氮活力。

关键词：甘草；氮素；磷素；根瘤；固氮活力；根瘤菌

中图分类号：R28　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)05-1089-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.022

Effects of N and P on root nodules growth and nitrogen fixation of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. treated with Rhizobium solution

GENG Ye-ye, WANG Gui-rong, ZHANG Yuan-fan, BAI Yu, CHEN Ying, ZHU Cheng-hao, WU Fan-qi, HOU Jun-ling*, SUN Zhi-rong* (*School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 102488)

Abstract: Objective　To determine the effect of N and P levels on the growth of root nodules and nitrogen fixation of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. treated with Rhizobium solution. **Methods**　A pot experiment of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. sowing was set up, Rhizobium solution was added to the pot soil. *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. seeds soaked in Rhizobium solution was sowed after they were treated with different levels of N and P. The growth index, content of active components of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. and nitrogen fixation index of root nodules were determined. **Results**　With the increase of N and P concentration, the growth indexes of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. roots and nodules first increased and then decreased. *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. treated with N2 and P2 showed longer, thicker and heavier roots, and more nodules, which was 5.35 times and 2.14 times of the control group. The nodule unit weight after N1 and P1 treatment was the highest, which was 4.49 times and 5.43 times of the control group, respectively. The hemoglobin content of nodule beans first increased and then decreased with the increase of N level. The hemoglobin content was 1.96 times of the control group after N2 treatment, but decreased with the increase of P level. The content of glycyrrhizic acid and liquirtin first increased and then decreased with the increase of N level, the content after N2 treatment being the highest. The content of glycyrrhizic acid and liquirtin increased with the P level. **Conclusion**　When Rhizobium solution is used, an appropriate amount of N and P

基金项目：国家现代农业产业技术体系资助项目（No. CARS-21）。

作者简介：耿业业，女，在读硕士研究生，主要从事中药资源的开发和利用研究，email：28338887624@qq.com　*通信作者：侯俊玲，女，教授，主要从事中药资源的开发和利用研究，email：mshjl@126.com；孙志蓉，女，博士，教授，主要从事中药资源质量与调控研究，email：zrs67@126.com

helps promote the accumulation of biomass and active components in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., promote the nodulation of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., and improve the nitrogen fixation of root nodules.

Key words: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. ; nitrogen; phosphorus; root nodule; nitrogen fixation activity; Rhizobium

甘草（*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.）是豆科多年生草本植物，以根与根茎入药，具有补脾益气，清热解毒，祛痰止咳，缓急止痛，调和诸药之功效，有“十方九草”“国老”的美誉[1]，在医药、食品、化工等领域应用广泛，市场需求量大。目前野生甘草资源逐渐减少，人工栽培甘草成为解决供需矛盾的有效途径。野生甘草具有根瘤固氮特性[2]，是甘草植株氮营养的重要来源之一，但人工栽培甘草的水肥措施会减少甘草根部结瘤量[3]，质量不及野生甘草[4]。豆科植物氮素来源有土壤供氮、肥料供氮和根瘤固氮三种。根瘤固氮在花生、大豆等豆科经济作物的生长中发挥着重要作用，郑永美等[5]研究表明，花生的根瘤固氮占总氮量的 40% 以上，最高可达 50%。人工甘草栽培过程中接种根瘤菌剂，能提高 10% ～ 30% 的产量[6]。根瘤菌剂施入土壤后，土壤中营养元素的形态和含量会对豆科植物结瘤固氮的效果产生影响[7]，其中氮素和磷素对结瘤影响较大。已有的根瘤固氮研究多集中在大豆、花生、紫花苜蓿等豆科经济作物[8-9]。目前甘草根瘤固氮方面根瘤菌分离鉴定、遗传多样性分析及系统进化分析的研究较多[10]，氮素、磷素对甘草结瘤以及固氮活力的影响还不清楚。本文以盆栽甘草为研究对象，考察不同浓度的氮素和磷素对施加根瘤菌剂的甘草结瘤量及根瘤固氮活力的影响，探讨营养元素对甘草根瘤固氮作用的影响，为甘草栽培措施选定提供参考。

1 材料

1.1 试药

甘草种子由中国中药有限公司提供，经北京中医药大学中药学院孙志蓉教授鉴定为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的种子。根瘤菌购自中国普通微生物菌种保藏管理中心，为天山中间根瘤菌（*Mesorhizobium tianshanense.*），菌株编号“1.2546”。酵母粉（Solarbio）、琼脂粉（北京奥博星生物技术有限责任公司）；甘露醇（Beijing Lablead Biotech Co.，Ltd）；硫酸铵（福晨化学试剂有限公司）；磷酸二氢钾（天津市兴复科技发展有限公司）；pH 6.8 磷酸缓冲液（国家化学试剂质检中心）；牛血红蛋白（上海源叶生物科技有限公司）；甘草酸（批号：P24J10F91300）、甘草苷（批号：Z10J8X39611）对照品（上海源叶生物科技有限公司，均供含量测定用）；乙腈和磷酸（Fisher chemical 美国，均为色谱纯）；乙醇（北京化工厂，分析纯）；用水为娃哈哈纯净水。

1.2 仪器

SQP 型电子分析天平（赛多利斯科学仪器有限公司）；立式压力蒸汽灭菌器（上海博迅实业有限公司医疗设备厂）；超净工作台（上海力辰邦西仪器科技有限公司）；HZQ-QX 全温振荡器；BY-R20 医用离心机（北京白洋医疗器械有限公司）；UV-2800 型紫外可见分光光度计（舜宇恒平）；SP-742D 型高速粉碎机（广州市兆利电器实业有限公司）；YCD-EL 260 电热鼓风干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司）；KQ-500DE 型数控超声清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；岛津 LSM 780 型高效液相色谱仪。

2 方法

2.1 根瘤菌液培养

2.1.1 根瘤菌活化 将配制的 YMA 固体培养基[11]放入灭菌锅内灭菌，在超净工作台中趁热分装，每皿 25 mL，置于室温凝固，然后均匀涂布菌液，于常温培养箱内活化。

2.1.2 根瘤菌扩繁 将配好的 YMA 液体培养基倒入锥形瓶中，每瓶 200 mL，放入灭菌锅内灭菌，移至超净工作台中放至室温。将活化后的根瘤菌接至液体培养基中，在 25 ℃、170 $r \cdot min^{-1}$ 摇床培养，当 620 nm 下检测吸光度达 0.6 时即得到根瘤菌液。

2.2 材料培养

采用圆形塑料盆（33 cm×22 cm×31 cm），每盆装混匀的河沙 15 kg。课题组前期在探索根瘤固氮对甘草根部氮营养吸收的影响时，每盆施加了 1.5 g 硫酸铵，结果表明此用量下甘草根瘤固氮占比高于土壤供氮占比，肥料供氮最低，说明在此用量下甘草可以正常结瘤固氮，据此设置低、

中、高三个水平探索不同氮素水平对甘草根瘤生长及固氮活力的影响，1.5 g 硫酸铵换算得 0.32 g N，以 0.32 g 为 N2 水平，其 0.5 倍量为 N1 水平，1.5 倍量为 N3 水平；磷素用量参考金燕清[12]的“3414”试验，促进一年生甘草生物量和甘草酸、甘草苷含量积累的磷（P_2O_5）用量为 9 g·m^{-2}、18 g·m^{-2}，花盆中装填基质表层直径测量为 28 cm，根据圆形面积公式计算表面积，得到对应每盆施加 P_2O_5 量为 0.54 g、1.08 g，以 0.54 g 为 P1 水平，1.08 g 为 P3 水平，P2 水平为 P1 和 P3 水平的均值。另设不加氮素及磷素的对照组（即 0 水平组），不同水平氮素和磷素每盆施肥量见表 1。在播种前，每盆施入对应量的硫酸铵和磷酸二氢钾，每盆再施入根瘤菌液 90 mL，甘草种子处理后在根瘤菌液中浸泡 30 min，于 2021 年 4 月 25 日播种，各重复 3 次。当幼苗长至 5 ～ 6 片真叶时间苗，每盆留苗 10 株，于甘草出苗后每隔两周浇灌 1000 mL Hogland 营养液（氮素处理去除氮，磷素处理去除磷），常规管理。

表 1　氮素和磷素的水平

Tab 1　N and P level

元素水平	N	P_2O_5
0	（N0）0	（P0）0
1	（N1）0.16 g	（P1）0.54 g
2	（N2）0.32 g	（P2）0.81 g
3	（N3）0.48 g	（P3）1.08 g

2.3　生长指标测定

于 9 月 25 日取样，将根部冲净，用滤纸吸干水分，测定根长、芦头下 1 cm 粗度、根鲜重，结瘤数、根瘤鲜重，平行 6 次。

2.4　豆血红蛋白含量测定

精密称取 120.0 mg 牛血红蛋白，用去离子水溶解并移至 10 mL 量瓶定容至刻度，配制成质量浓度为 12.0 mg·mL^{-1} 的标准蛋白溶液。按照表 2 添加试剂，混合反应后，在 540 nm 波长下测定吸光值，建立标准曲线。

取 0.2 g 的新鲜根瘤，用去离子水洗净，滤纸吸干后，加入 5 mL pH 6.8 的磷酸缓冲液，在 4 ℃的条件下研磨成匀浆，置于冷冻离心机中 4 ℃、3000 r·min^{-1} 离心 15 min，吸取上清液，4 ℃、10 000 r·min^{-1} 离心 20 min，吸取上清液，紫外分光光度计下于 540 nm 处测定吸光度，以 pH 6.8 的磷酸缓冲液作为空白对照，平行测定 3 次。

2.5　甘草酸和甘草苷含量测定

2.5.1　甘草供试品溶液的制备　取甘草样品粉末（干燥，粉碎过 40 目筛）约 0.1 g，精密称定，置于 50 mL 量瓶中，加入 10 mL 70% 乙醇，称重，密塞，100 Hz，40 ℃超声提取 30 min，冷却至室温，用 70% 乙醇补足损失重量，摇匀，过滤，取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜备用，即为供试品溶液。

表 2　牛血红蛋白标准曲线制作方法

Tab 2　Method for making standard curve of bovine hemoglobin

序号	12.0 mg·mL^{-1} 标准蛋白溶液 /μL	水 /μL	0.1 mol·L^{-1} pH 6.8 磷酸缓冲液 /mL
0	0	300	2
1	20	280	2
2	40	260	2
3	80	220	2
4	120	180	2
5	160	140	2
6	200	100	2
7	250	50	2
8	300	0	2

2.5.2　对照品溶液的制备　精密称取 1.94 mg 甘草酸、2.85 mg 甘草苷置于 10 mL 量瓶中，用 70% 乙醇溶解并定容至刻度，摇匀，即得甘草酸质量浓度为 0.194 mg·mL^{-1}，甘草苷质量浓度为 0.285 mg·mL^{-1} 的对照品储备液，各取 2 mL 于 10 mL 量瓶中，用 70% 乙醇溶解并定容至刻度，摇匀，得到混合对照品溶液。

2.5.3　测定条件　参照文献[13]的方法，以 Diamonsil-C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）为色谱柱，乙腈 - 磷酸水为流动相，流速 0.6 mL·min^{-1}，柱温 30 ℃，按表 3 中的洗脱程序进行梯度洗脱，进样量为 10 μL，于 237 nm 下检测。

表 3　流动相梯度条件

Tab 3　Gradient elution

时间 /min	乙腈 /%	0.05% 磷酸水 /%
0 ～ 8	20	80
8 ～ 30	20 → 38	80 → 62
30 ～ 42	38 → 50	62 → 50
42 ～ 45	50 → 95	50 → 5
45 ～ 50	95 → 20	5 → 80
50 ～ 60	20	80

2.6　数据统计与分析

采用 Excel 2019 软件进行数据处理，SPSS 25.0 软件进行统计分析。用 S-N-K 法进行差异显著性分析。

3　结果与分析

3.1　氮素和磷素对甘草根系生长的影响

不同水平氮素、磷素处理下甘草的根长、根粗、根鲜重（不含根瘤，下同）测定结果见图 1。随着氮、

磷水平的增加，甘草各指标呈先升后降的趋势，处理组根鲜重显著高于对照组，各水平中以 N2、P2 处理各指标最高。N2 根长 34 cm、根粗 8.06 mm、根鲜重 4.13 g，分别为对照组的 1.25 倍、2.01 倍和 4.73 倍；P2 根长 33.6 cm、根粗 7.24 mm、根鲜重 4.11 g，分别为对照组的 1.17 倍、1.85 倍和 4.07 倍。

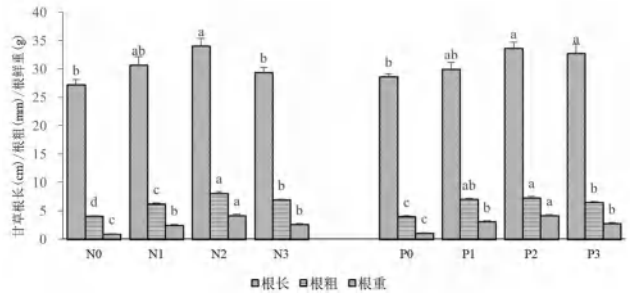


图 1　氮、磷对甘草根系生长指标的影响

Fig 1　Effect of N and P on roots growth indexes of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.

注：相同元素不同水平处理间不同小写字母表示差异有统计学意义（$P < 0.05$）。

Note：Lowercase letters for different levels of the same element indicate significant differences（$P < 0.05$）.

3.2　氮素和磷素对甘草结瘤量的影响

不同水平氮素、磷素处理下甘草的根瘤单重测定结果见图 2。随着氮素、磷素水平的增加，根瘤单重呈先升后降的趋势，氮素各水平中以 N1 处理组最高，根瘤单重 0.05 g，为对照组的 4.49 倍，N2、N3 处理组高于对照组，但 N3 与对照组的差异无统计学意义；磷素各水平（P1、P2、P3）均显著高于对照组，其中 P1 处理最高，根瘤单重 0.04 g，为对照的 5.43 倍。

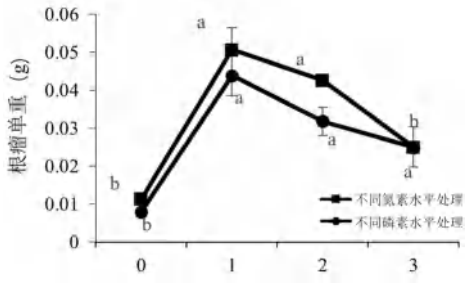


图 2　氮磷对甘草根瘤单重的影响

Fig 2　Effect of N and P on the weight of single nodule of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.

注：相同元素不同水平处理间不同小写字母表示差异有统计学意义（$P < 0.05$）。

Note：Lowercase letters for different levels of the same element indicate significant differences（$P < 0.05$）.

不同水平氮素、磷素处理下甘草的单株结瘤数量测定结果见图 3。随着氮素、磷素水平的增加，单株结瘤数呈先升后降趋势，氮素各水平中以 N2 处理最高，单株结瘤 18 个，为对照组的 5.35 倍，N1、N3 处理与对照组的差异无统计学意义；磷素各水平中以 P2 处理最高，单株结瘤 9 个，为对照组的 2.14 倍，P1、P3 处理与对照组的差异无统计学意义。

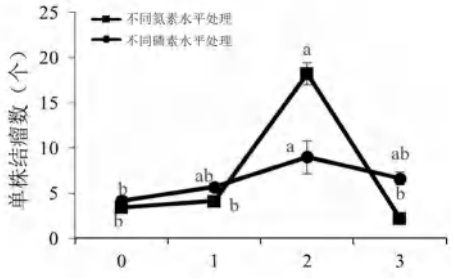


图 3　氮磷对甘草单株结瘤数的影响

Fig 3　Effect of N and P on the number of nodulations of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. per plant

注：相同元素不同水平处理间不同小写字母表示差异有统计学意义（$P < 0.05$）。

Note：Lowercase letters for different levels of the same element indicate significant differences（$P < 0.05$）.

3.3　氮素和磷素对甘草根瘤豆血红蛋白含量的影响

按“2.4”项下方法，以标准溶液中的牛血红蛋白质量（mg）为横坐标，以 540 nm 下吸光度值为纵坐标绘制标准曲线，得线性回归方程：$Y = 0.1459X - 0.0097$（$R^2 = 0.9994$），牛血红蛋白在 0 ～ 3.6 mg 内与吸光度线性关系良好。

将不同氮素、磷素用量下测定的甘草根瘤的豆血红蛋白吸光度带入回归方程，得到对应的豆血红蛋白含量，结果见图 4。随着氮素水平的升高，根瘤中豆血红蛋白含量呈先升后降趋势，N2 处理组最高，豆血红蛋白含量 18.84 mg·g^{-1}，为对照组的 1.96 倍，N2、N3 处理与对照组差异无统计学意义；随磷肥水平的增加，根瘤中豆血红蛋白含量呈下降趋势，P2、P3 处理显著低于对照组。

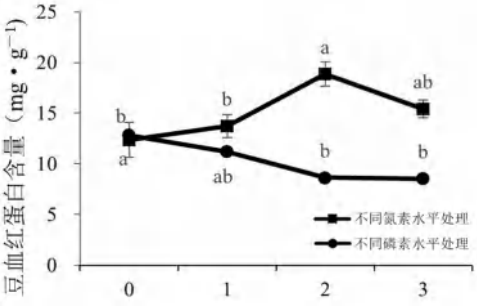


图 4　氮磷对甘草根瘤豆血红蛋白含量的影响

Fig 4　Effect of N and P on hemoglobin content of nodules of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.

注：相同元素不同水平处理间不同小写字母表示差异有统计学意义（$P < 0.05$）。

Note：Lowercase letters for different levels of the same element indicate significant differences（$P < 0.05$）.

3.4　氮素和磷素对甘草酸和甘草苷含量的影响

取“2.5.2”项下混合对照品溶液，稀释成系列浓度，以峰面积为纵坐标（Y），以各对照品中甘草酸、甘草苷含量为横坐标（X）绘制标准曲线，得到线性回归方程：甘草酸：$Y = 9.542\times10^{6}X + 1.422\times10^{4}$（$R^2 = 1.000$），线性范围：0.001 94 ～ 0.031 04 mg • mL^{-1}，甘草苷：$Y = 3.199\times10^{7}X - 3.511\times10^{3}$（$R^2 = 1.000$），线性范围：0.002 85 ～ 0.0456 mg • mL^{-1}。

不同水平氮素、磷素处理下甘草的甘草酸、甘草苷测定结果见图 5。随着氮素浓度的升高，甘草酸、甘草苷含量呈先升后降趋势，N1、N2、N3 均显著高于对照组，其中 N2 处理组最高，甘草酸含量为 2.99 mg • g^{-1}，甘草苷含量为 1.27 mg • g^{-1}，分别为对照组的 7.77 倍、5.62 倍；随着磷素浓度的升高，甘草酸、甘草苷含量呈上升趋势，P1、P2、P3 均显著高于对照组，其中 P3 处理最高，但与 P2 处理相比差异无统计学意义，甘草酸含量为 2.19 mg • g^{-1}，甘草苷含量为 0.90 mg • g^{-1}，分别为对照组的 2.24 倍、2.64 倍。

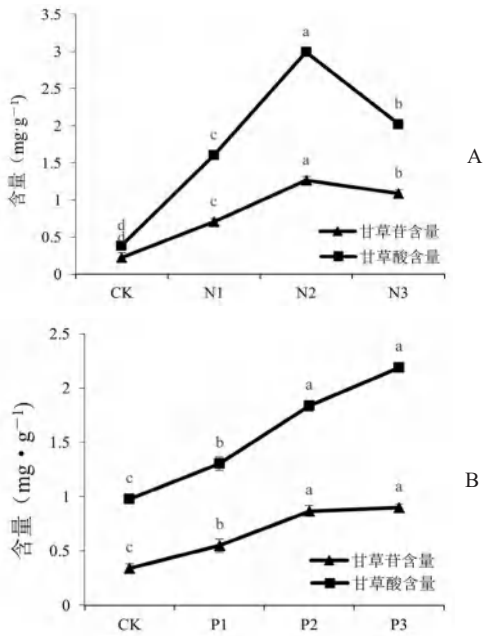


图 5　氮素（A）及磷素（B）对甘草中甘草酸、甘草苷含量的影响

Fig 5　Effect of N（A）and P（B）on the content of glycyrrhizic acid and liquiritin in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.

注：相同元素不同水平处理间不同小写字母表示差异有统计学意义（$P < 0.05$）。

Note：Lowercase letters for different levels of the same element indicate significant differences（$P < 0.05$）.

4　讨论与结论

根瘤固氮为豆科植物提供生长所需氮素，豆科植物为根瘤菌提供碳源，两者互利共生。1947 年 Virtanen 证明了含有豆血红蛋白的根瘤具有固氮能力 [14]，近年来有研究 [15-16] 以乙炔还原法测定根瘤固氮酶活性，然后测定该根瘤中豆血红蛋白含量，研究结果表明不同植物和不同部位个体瘤中，瘤体的固氮酶活性与豆血红蛋白含量均成正相关。研究表明外源因素处理通过改变根瘤中豆血红蛋白含量来改变固氮酶活性 [17-18]，因此本文以根瘤中豆血红蛋白含量评价根瘤固氮活力，豆血红蛋白含量越高，结瘤数目越多，说明根瘤固氮能力越强。

在不外施根瘤菌剂的条件下，随着氮素浓度的增加，大豆、花生的生物量、结瘤量和固氮活性呈先上升后下降的单峰变化趋势 [19-21]，在伴施根瘤菌剂的基础上，紫花苜蓿的生物量、结瘤数量和根瘤重随氮肥施用量的增加先上升后下降 [22]，说明外源施加根瘤菌不会改变氮素浓度对豆科植物的生长和结瘤趋势，但根瘤菌对氮素、磷素敏感，高浓度的氮素、磷素会抑制结瘤 [23]，所以在外源施加根瘤菌液，增强植株固氮能力的同时，选择适合根瘤菌存活及侵染的氮素、磷素浓度至关重要。本文在施加根瘤菌液的基础上，施用不同水平的氮素、磷素，发现在施加根瘤菌剂的基础上，施用氮素、磷素能够促进甘草根部生物量积累，提高根部结瘤数量，增加根瘤单重，以 N2、P2 处理组最好，说明适量氮素、磷素会为甘草植株生长提供养分，促进甘草生长，进而为根瘤提供养分，促进结瘤。豆血红蛋白中血红素的部分由根瘤菌合成，而球蛋白的部分则是由寄主（豆科植物）所合成 [24]，在本试验条件下，豆血红蛋白含量随氮素施用水平的增加先升后降，与甘草生物量和根瘤数目的变化趋势一致；随磷素施用水平的增加而下降，可能与磷素降低植株根部全铁含量有关 [25]。随氮素、磷素水平的增加，甘草酸、甘草苷含量呈上升趋势，说明在试验条件下的氮素、磷素浓度不会抑制甘草酸、甘草苷的积累。基于本研究结果，可以为后续研究甘草施加根瘤菌剂与肥料提供参考，优选施肥用量，既能节省成本，又能提高甘草固氮能力，促进甘草生长和活性成分积累。

综上所述，在试验条件下，甘草生物量、根瘤单重和结瘤数目随氮素、磷素施用水平的增加先上升后下降，豆血红蛋白含量、甘草酸和甘草苷含量随氮素施用水平的增加先上升后下降，随磷素施用水平的增加豆血红蛋白含量呈下降的趋势，甘草酸和甘草苷含量呈上升的趋势。在施加

根瘤菌剂基础上，每 15 kg 河沙施 0.32 g N、0.81 g P_2O_5 有利于甘草生物量和活性成分甘草酸、甘草苷的积累，促进结瘤，可为后续研究外源营养对甘草根瘤固氮的影响提供参考。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：88.

[2] 饶小莉，张敏，沈德龙，等 . 内蒙古乌拉尔甘草根瘤菌的遗传多样性分析 [J]. 微生物学杂志，2008，28（5）：21-24.

[3] 孙志蓉，王文全，翟明普 . 甘草播种苗结瘤特性的研究 [J]. 中药材，2006，2（3）：103-105.

[4] 郭争争 . 基于 SSH 研究野生与栽培甘草药用成分含量差异形成的基因机制 [D]. 北京：北京中医药大学，2015.

[5] 郑永美，杜连涛，王春晓，等 . 不同花生品种根瘤固氮特点及其与产量的关系 [J]. 应用生态学报，2019，30（3）：961-968.

[6] 内蒙古自治区科学技术开发中心 . 生物固氮技术在药用植物甘草种植中的应用 [J]. 中国科技成果，2004（10）：63.

[7] 陈利云，张海林，周志宇 . 生物与非生物因素对共生固氮的影响 [J]. 草业科学，2010，27（6）：64-70.

[8] 李晓林，曹一平 . 菌根和非菌根三叶草根际土壤磷钾养分变化 [J]. 土壤通报，1992，23（4）：180-182.

[9] 姚玉波 . 大豆根瘤固氮特性与影响因素的研究 [D]. 哈尔滨：东北农业大学，2012.

[10] 杨雪颖，张执欣，杨亚珍，等 . 甘草根瘤菌的 16S rDNA 全序列测定及系统进化分析 [J]. 西北植物学报，2006，26（4）：707-711.

[11] 李萍，杨会青，李泰仑，等 . 费氏中华根瘤菌培养基的选择及优化 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报，2007，19（6）：71-74.

[12] 金燕清 . 氮磷钾配施对甘草产量和质量的影响 [D]. 北京：北京中医药大学，2016.

[13] 周香珍，王文全 . 甘草质量差异研究概况 [J]. 中国中药杂志，2011，36（10）：1394-1396.

[14] Virtanen AI，Jorma J. On the relation between nitrogen fixation and leghemoglobin content of leguminous root nodules. Ⅱ [J]. Acta Chemica Scandinavica，1947，1（1）：90-111.

[15] 杨淑全 . 三年生红豆草和苜蓿根瘤固氮酶活性与豆血红蛋白含量的比较 [J]. 中国草业科学，1987，4（2）：35-37.

[16] 王慧英，黄维南 . 毛萼田菁茎瘤豆血红蛋白含量与固氮活性的关系 [J]. 亚热带植物通讯，1994，23（2）：26-29.

[17] 左元梅，刘永秀，张福锁 . 与玉米混作改善花生铁营养对其根瘤形态结构及豆血红蛋白含量的影响 [J]. 植物生理与分子生物学学报，2003，29（1）：33-38.

[18] 李慧，丁伟，姜俊凤，等 . 咪唑乙烟酸抑制大豆根瘤固氮酶活性的机理研究 [J]. 中国农业科学，2013，46（19）：4173-4178.

[19] 夏玄 . 氮素营养对大豆结瘤固氮及相关调控物质影响的研究 [D]. 哈尔滨：东北农业大学，2018.

[20] 王树起，韩晓增，乔云发，等 . 施氮对大豆根瘤生长和结瘤固氮的影响 [J]. 华北农学报，2009，24（2）：176-179.

[21] 左元梅，刘永秀，张福锁 . NO^{3-} 态氮对花生结瘤与固氮作用的影响 [J]. 生态学报，2003，23（4）：758-764.

[22] 马霞，王丽丽，李卫军，等 . 不同施氮水平下接种根瘤菌对苜蓿固氮效能及种子生产的影响 [J]. 草业学报，2013，22（1）：95-102.

[23] 邸伟 . 大豆根瘤固氮酶活性与固氮量的研究 [D]. 哈尔滨：东北农业大学，2010.

[24] Nadler KD，Avissar YJ. Heme synthesis in soybean root nodules：I. on the role of bacteroid δ-aminolevulinic acid synthase and δ-aminolevulinic acid dehydrogenase in the synthesis of the heme of leghemoglobin [J]. Plant Physiology，1977，60（3）：433-436.

[25] 李志伟，刘建玲，廖文华，等 . 过量供磷对花生生长和吸收铁的影响 [J]. 华北农学报，2013，28（2）：197-201.

（收稿日期：2022-01-24；修回日期：2022-03-14）

综述

心肌缺血再灌注损伤及其潜在治疗靶点 LCN2 的研究进展

朱香梅[1, 2]，石雨荷[1, 2]，李晴[1, 2]，朱珏[1, 2]，刘湘丹[1, 2, 3]，王智[1, 2, 3]，童巧珍[1, 2, 3*]（1.湖南中医药大学药学院，长沙　410208；2. 湘产大宗道地药材种质资源及规范化种植重点研究室，长沙　410208；3. 湖南省普通高等学校中药现代化研究重点实验室，长沙　410208）

摘要：心肌缺血再灌注损伤（MIRI）是缺血性心脏病患者术后预后不良的关键，同时也是世界范围内严重的健康问题。该病的发生涉及自噬、坏死、凋亡、焦亡和铁死亡等多种细胞死亡方式。脂质运载蛋白 -2（LCN2）通过与细菌铁载体结合发挥作用，调节趋化因子及其受体的表达和凋亡来影响再灌注移植物中的粒细胞浸润。大量文献研究发现 LCN2 可能是心肌梗死、肝损伤、癌症等疾病的生物标志物，因此，LCN2 可作为 MIRI 的潜在治疗靶点。本文对 MIRI 发生的机制及相关信号通路进行归纳，并对其潜在靶点 LCN2 的结构、受体、表达等研究进行总结，为探索 MIRI 相关治疗靶点及方法提供新的思路。

关键词：心肌缺血再灌注损伤；脂质运载蛋白 -2；心肌梗死；治疗靶点；肝损伤标志物；抗癌靶点

中图分类号：R54，R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)05-1095-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.023

Research progress in myocardial ischemia reperfusion injury and its potential therapeutic target LCN2

ZHU Xiang-mei[1, 2], SHI Yu-he[1, 2], LI Qing[1, 2], ZHU Jue[1, 2], LIU Xiang-dan[1, 2, 3], WANG Zhi[1, 2, 3], TONG Qiao-zhen[1, 2, 3*] (1. *College of Pharmacy*, *Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha* 410208; 2. *Key Laboratory of Germplasm Resources and Standardized Planting of Bulk Authentic Medicinal Materials in Hunan*, *Changsha* 410208; 3. *Key Laboratory of Modern Research of Traditional Chinese Medicine*, *Universities and Colleges of Hunan Province*, *Changsha* 410208)

Abstract: Myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) is not only the key reason for poor prognosis of patients with cardiovascular disease, but also a serious health problem globally. At present, the occurrence of MIRI involves autophagy, necrosis, apoptosis, pyrosis and iron death. Lipocalin-2 (LCN2), through binding with bacterial iron carriers, regulates the expression of chemokines and their receptors and the rate of apoptosis to affect granulocyte infiltration in reperfusion grafts. Many studies have found that LCN2 may be a biomarker for acute myocardial infarction, liver injury, cancer and other diseases. Therefore, LCN2 is a potential therapeutic target of MIRI. This paper summarized the mechanism and related signal pathways of MIRI, and research on the structure, receptor and expression of LCN2 to provide new ideas for exploring MIRI related therapeutic targets and methods.

Key words: myocardial ischemia-reperfusion injury; lipocalin-2; acute myocardial infarction; therapeutic target; marker for liver injury; anti-cancer target

基金项目：国家现代农业产业技术体系项目（No.CARS-21）；湖南省自然科学基金项目（No.2020JJ4466）；湖南省中医药管理局重点项目（No.202016）；湖南省卫健委重点课题（No.202113051021）；湖南中医药大学“东健”研究生创新项目课题（No.2020DJ05）；2020 年湖南省研究生教育创新课题（No.CX20200761）。

作者简介：朱香梅，女，硕士研究生，主要从事中药资源质量评价与开发利用研究，email：2785384490@qq.com　*通信作者：童巧珍，女，教授，博士研究生导师，主要从事中药资源质量评价与开发利用研究，email：qztong88@126.com

冠心病（coronary heart disease，CHD），又称为缺血性心脏病，是最常见的心血管疾病，由于心肌供血中断而导致冠状动脉阻塞的一种心肌病变[1]。目前，在我国心血管病中心发布的《国家心血管病报告 2018》中，心血管疾病（cardiovascular disease，CVD）患病人数已接近 3 亿，同时死亡率高居首位，远超肿瘤及其他疾病[2]。冠心病最直接的后果是急性心肌梗死（acute myocardial infarction，AMI），对于减少心肌梗死面积最有效的治疗是及时进行再灌注。临床上常采用再灌注治疗来改善梗死区的血液循环，但往往会导致心肌缺血再灌注损伤（myocardial ischemia-reperfusion injury，MIRI）[3]。MIRI 与多种病理生理特征有关，包括钙超载、氧自由基生成、内皮功能障碍、免疫反应、线粒体功能障碍、心肌细胞凋亡和自噬以及血小板聚集[4]。通过对基因表达综合数据库的分析，研究者发现脂质运载蛋白 -2（lipocalin-2，LCN2）是 MIRI 的潜在治疗靶点[5]。LCN2 也称为嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白（NGAL）或 24p3，是一种 25 kDa 的分泌蛋白，它可以被许多细胞分泌，如巨噬细胞、内皮细胞、上皮细胞、心肌细胞、肝细胞和脂肪细胞[6]。LCN2 可调节缺血再灌注的心脏功能，作为显性心脏病的诊断和预后标志物[7]，并且 LCN2 在其他疾病中的作用也十分广泛。本文综述了近几年 MIRI 的发生机制、相关通路及其潜在治疗靶点 LCN2 相关的研究进展。

1 MIRI 发生机制

当器官的血液供应中断（缺血）然后重新建立（再灌注）时，就会发生缺血再灌注损伤，导致线粒体中活性氧（reactiveoxygen species，ROS）的“爆发”。MIRI 是引发心肌细胞坏死和凋亡的一种病理过程，尤其是当冠状动脉灌注恢复时。血流的重建通过 ROS 的积累、细胞离子稳态的干扰和细胞死亡的炎症反应触发缺血组织的进一步损伤，而 ROS 能够刺激组织炎症并诱导 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3（NLRP3）炎症体激活，从而引发无菌性炎症疾病[8]。心肌缺血再灌注时，氧化能力极强的氧自由基通过攻击膜成分中的不饱和脂肪酸，生成脂质过氧化物，引起细胞膜功能单位结构和功能的障碍[9]。有研究发现在心肌缺血后，心肌组织中便能观察到少量氧自由基的产生，而再灌注后数秒钟至一分钟后以后氧自由基快速增长到 35%[10]。此外，心肌缺血时心肌膜结构损伤，Na^+/Ca^{2+} 离子通道异常，细胞外钙离子呈浓度梯度进入细胞内，引起心肌钙超载，并且在心肌再灌注时加重，钙超载引发线粒体膜通透性转换孔（mito-chondria permeability transition pore，mPTP）开放、线粒体膜电位异常、促凋亡因子释放等，最终导致心肌细胞死亡[11]。黄艳平等[12]研究发现内吗啡肽 -1（EM-1）可能通过抑制 mPTP 的开放，保持线粒体结构和功能的完整性，减少线粒体中细胞色素 C（Cyt-C）的释放，下调相关凋亡蛋白 caspase-3 的表达，减少心肌细胞凋亡，发挥心肌保护作用。MIRI 的发生一般由炎性反应、氧化应激、线粒体功能障碍、细胞内钙超载等多种因素导致。由于 MIRI 的发生较复杂，还需要对其病理机制进一步深入研究。

2 MIRI 的相关信号通路

2.1 促损伤作用相关的信号通路

核因子 κB（nuclear factor kappa B，NF-κB）是一种能调节基因表达的核转录因子，在包括缺血性病理学在内的许多疾病中的细胞凋亡和炎症信号传导非常重要。不活跃的 NF-κB 位于细胞质中，当 NF-κB 被激活时，IκB-α 被 IκB 激酶（IKKβ）磷酸化，然后降解，导致 NF-κB 亚基从细胞质转移到细胞核。早期研究证明 NF-κB 通路在 MIRI 中是诱导心肌细胞氧化应激启动和炎症反应发生的一个重要途径，而槲皮素、赤芍总苷、绞股蓝皂苷、红景天苷和三七皂苷 R_1 可以通过抑制 NF-κB 信号通路保护缺血心肌[13]。Kim 等[14]研究发现三白草酮通过丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinases，MAPK）和 Jun 激酶（c-Jun *N*-terminal kinase，JNK）信号通路的磷酸化从而保护局部 MIRI。缺血再灌注过程中，先天免疫的激活是急性炎症反应的重要组成部分。Toll 样受体（Toll-like receptors，TLRs）是种系编码的跨膜蛋白，来源于 Toll 基因家族，在检测许多微生物模式和激活先天免疫系统中起着至关重要的作用。TLRs 家族成员主要有 13 个（TLR1 ～ 13），它们在心脏细胞中都会表达，其中 TLR4 在心肌细胞中表达最高[15]。缺血再灌注损伤时的炎症反应与 TLRs 密切相关，TLR4 缺陷小鼠心肌缺血再灌注时，炎症和组织损伤也明显减轻，并且吴茱萸次碱可通过抑制 TLR4/NF-κB 信号通路保护缺血心肌[16]。此外，Wnt 信号在心脏中是静止的，但受到损伤后会被激活，而在 MIRI 过程中，激活 Rho/Rho 激酶信号通路调节细胞凋亡途径可促进心肌进一步损伤[11, 17]，目前这条通路在 MIRI 的机制研究中报道较少。

2.2 保护作用相关信号通路

磷脂酰肌醇三激酶（phosphatidylinositide 3-kinases，PI3K）通过影响下游丝氨酸/苏氨酸激酶（PKB 或称为 Akt）、雷帕霉素靶蛋白（mTOR）、糖原合成酶 3β（GSK3β）等蛋白通路，抑制心肌细胞凋亡，减轻氧化应激造成的细胞损伤，同时有效减少了心肌中的炎症反应，最终在 MIRI 过程对心肌起到保护作用。Liao 等 [18] 研究发现胰岛素样生长因子 -1（IGF-1）可通过抑制心肌细胞凋亡来保护缺血再灌注损伤的心脏，且 IGF-1 的抗凋亡作用是通过激活 PI3K/Akt 通路介导的。GSK3β 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶，抑制其磷酸化可激活核因子 E2 相关因子 2（Nrf-2）相关通路，发挥氧化应激作用，进而改善 MIRI[19]。Sulaiman 等 [20] 发现对氧磷酶 2（PON2）可通过激活 PI3K/Akt/GSK-3β 通路，减少心肌细胞线粒体功能障碍和氧化应激，保护心肌免受急性缺血再灌注损伤。内皮细胞虽然对缺血不太敏感，但与心肌细胞相比，它们对心脏缺血再灌注非常敏感，缺血再灌注通过破坏内皮屏障功能增加内皮通透性，进而加剧缺血再灌注后心肌的炎症。Kong 等 [21] 研究结果表明热休克蛋白 A12B（HSPA12B）过度表达可通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号来改善内皮完整性减轻急性 MIRI，而靶向 HSPA12B 表达可能是治疗 MIRI 的另一种治疗方法。

3 LCN2 的概述

3.1 LCN2 的结构

LCN2 是由 198 个氨基酸残基组成的分泌型糖蛋白，LCN2 老鼠同系物用 Lcn2 或 Ngal 表示 [22]。与大多数其他蛋白质家族不同，lipocalin 成员是根据其氨基酸序列的相似性来鉴定的，共享更少的序列同一性。LCN2 作为脂质运载蛋白，主要功能是运输亲脂性小分子，与脂质运载蛋白家族成员共享一个二级和三级结构特征——脂质运载蛋白折叠，这是它们作为各种配体的转运或载体蛋白的基本功能 [23]。与 lipocalin 家族的其他成员一样，LCN2 具有 3D 桶状结构，它的结合位点具有极性，并且它的宽度足以与某些蛋白质结合 [24]。LCN2 的极性结合位点结合的是硫酸盐离子或不定共纯化脂肪酸 [25]。Coles 等 [26] 通过核磁共振阐明了人类 LCN2 的三维结构，结果显示 LCN2 包含 1 个氮端 3_{10} 螺旋，然后是 8 个反平行的 β 链，1 个 α 螺旋和 1 个碳端 β 链，β 链形成 1 个桶状结构，其壁由 2 个 β 片组成，第一个由 β2 ～ β4 链组成，第二个由 β6 ～ β8 链组成，另外还观察到 3 个 β 凸起，其中 1 个在第 1β 链和 2 个在第 6β 链。正是这种空腔和结构的多样性导致了 LCN2 各种不同的结合模式，每种模式都能够适应不同大小、形状和化学特性的配体。

3.2 LCN2 的受体

LCN2 蛋白属于 lipocalin 蛋白家族的一员，被归类为转运蛋白，其结构和功能均具有多样性 [27]。LCN2 受体有 3 种：黑素皮质素受体 4（MC4R）、LCN2R、脂蛋白受体相关蛋白 2（LRP2）。MC4R 主要在下丘脑室旁核中表达，在能量平衡中起着核心作用。LCN2R 是一种内吞受体，进入细胞参与铁稳态的控制，LRP2 是一种多配体内吞受体，在多种细胞中表达，已有研究证实了 LCN2R 在内髓集合管（IMCD）细胞中的顶端表达 [28]，LCN2 与 LRP2 之间的相关性具有最高的预测置信度，早期研究认为 LRP2 可能作为 LCN2 的细胞受体，协助其细胞摄取 [29]。LRP2 在许多类固醇反应组织中表达，如男性和女性生殖器官；在非哺乳脊椎动物中，LRP2 在其生长和发育过程中起着重要作用 [30]。Plieschnig 等 [31] 研究发现 LCN2-LRP2 复合物对人类先天免疫反应的结构有较大影响。此外，成骨细胞衍生的 LCN2 还可以穿过血脑屏障，与下丘脑室旁核和腹内侧神经元中的 MC4R 结合，并激活 MC4R 依赖的厌食（食欲抑制）途径，表明 LCN2 是一种具有代谢调节作用的骨源性激素，以 MC4R 依赖的方式抑制食欲 [32]。

4 LCN2 的表达

LCN2 具有多种作用，包括铁转运、趋化作用和抑菌作用。LCN2 作为一种生长因子，可以促进细胞分化和增殖 [33]。有研究发现糖皮质激素暴露显著增加绝经前女性皮下和网膜脂肪组织中 *Lcn2* 基因的表达，但绝经后女性中 *Lcn2* 基因的表达没有增加 [34]。另外，脂多糖（LPS）、IL-6、IL-17、IFN-γ 等促炎细胞因子可诱导 LCN2 的表达，表明 LCN2 在促炎反应中起重要作用 [35]。LCN2 在包括血浆、血清、尿液和心包液在内的样品中以多种变体形式存在。LCN2 可以以 130 kDa LCN2- 基质金属蛋白酶 9（matrix metalloproteinase 9，MMP9）复合物的形式存在，或者以 25 kDa 单体或 56 kDa 同型二聚体存在于健康个体中 [36]，临床研究表明，LCN2 表达增加与异位疾病（心血管疾病、肠道炎症、神经炎症）以及其他代谢疾病（2 型糖尿病和肥胖）密切相

关[37]。因此，LCN2 被认为是许多病理状况的可靠生物标志物。

4.1 心脏组织

心脏是一个新陈代谢高度活跃的器官，其铁平衡尤为重要。越来越多的证据表明，LCN2 是一种促炎症因子，与肥胖相关的心血管并发症紧密相连，被认为是急性心力衰竭患者心肾综合征早期检测的生物标志物[38]，可通过升高细胞内铁水平诱导心肌细胞凋亡，介导对心脏功能的有害影响[39]。LCN2 水平升高与心肌肥厚密切相关，体外研究证明了 LCN2 在心肌细胞肥大和心肌细胞增殖减少的源头中发挥直接作用[40]。Xiong 等[41]研究发现 LCN2 是 miR-138 的直接靶点，miR-138 过度表达通过下调 LCN2 的表达抑制缺氧诱导的心肌细胞凋亡。LCN2 在缺血再灌注后心脏病变的发展过程也占有重要地位。在心脏移植后的缺血再灌注小鼠模型中，使用抗 LCN2 抗体可减少巨噬细胞和中性粒细胞向缺血区的浸润，抑制巨噬细胞的 M1 极化，从而减轻 MIRI[42]。Yang 等[7]研究结果表明抑制 LCN2 表达可改善缺血再灌注小鼠离体心脏的功能，与线粒体功能恢复和磷脂重塑有关。另外，LCN2 可通过与含铁细菌铁载体结合，从而限制细菌生长，在细菌感染的先天免疫反应中发挥关键作用[43]。铁参与调节各种细胞机制，包括氧化应激、线粒体功能障碍、内质网应激和自噬，所有这些都可能在受到干扰时导致心脏功能障碍，而 LCN2 与铁超载及缺铁性心肌病的关系还在研究中[44]。临床研究证实了心肌梗死患者血浆中的 LCN2 水平较正常人明显升高，且敏感性强，推测其可与心肌酶谱 CK-MB、肌钙蛋白 I（cTnI）一起作为心肌梗死早期预测和诊断的指标[45]。

4.2 肝脏组织

肝脏是脂肪和碳水化合物代谢的重要器官，肝脏的功能损害直接影响整个生物体。Xu 等[46]研究发现肝细胞是导致细菌感染或肝部分切除术（PHx）后血清 LCN2 蛋白水平升高的主要细胞类型。LCN2 过表达可阻止新生脂肪生成、脂质过氧化和细胞凋亡，从而预防脂肪性肝炎，而促炎性 TNF-α、IL6 和抵抗素治疗可上调 HepG2 细胞中的 LCN2，因此，LCN2 被认为是肝脏对炎症的保护成分[47]。LCN2 是肝脏脂质稳态的关键调节剂，通过调节脂滴包被蛋白 5（PLIN5）的表达来控制细胞内脂滴的形成，用于治疗与脂肪堆积和脂肪变性相关的肝病[48]。此外，Alwahsh 等[49]的研究证实了果糖饮食上调肝脏 LCN2 的表达，这与氧化应激和线粒体功能障碍指标的增加有关，LCN2 可能参与肝脏保护。在多种肝发病机制模型中 LCN2 表达水平有明显变化，如急 / 慢性肝损伤、非酒精性脂肪性肝病、急 / 慢性肝衰竭等病中 LCN2 表达水平升高[50]，因此，LCN2 是一种值得信赖的肝损伤生物标志物。

4.3 其他

LCN2 开始在胚胎阶段表达，在肾脏、肺、骨骼、大脑等器官组织中被激活。Karoui 等[51]研究发现白蛋白通过钙依赖性内质网应激激活导致 LCN2 过度表达，进而触发肾小管细胞凋亡和肾损害。LCN2 在脂多糖诱导的急性肺损伤中具有诊断作用，小鼠肺和血液中 LCN2 的表达均显著上调[52]。Costa 等[53]研究发现骨骼中的 LCN2 过度表达通过调节关键分泌因子和细胞因子的表达来改变骨髓微环境，从而调节造血干细胞生态位行为，同时增强幼鼠的造血干细胞定位和老年小鼠的红细胞产生。当然，LCN2 的不平衡表达也与一些器官组织中肿瘤的形成和发展有关。有研究报道 LCN2 的表达与子宫内膜癌侵袭性肿瘤特征、远处转移扩散和生存率降低有关[54]，临床研究表明，MMP-9/LCN2 复合物水平的升高与胃癌患者生存率的降低相关[55]。Villodre 等[56]首次证明了 LCN2 在乳腺癌患者中的表达水平显著升高，并且 LCN2 促进了乳腺癌异种移植小鼠模型中的肿瘤生长、皮肤浸润和转移。LCN2 在多种癌症中过度表达，通过促进肿瘤细胞生存、生长和转移加快肿瘤的发展，提示 LCN2 可作为肿瘤化疗敏感性的潜在靶点。

5 LCN2 与 MIRI 相关信号通路的研究

随着 MIRI 在分子生物学领域研究的不断深入，越来越多的细胞信号转导通路被证实在 MIRI 过程中通过影响各种损伤机制发挥着关键的调控作用，而 LCN2 是许多疾病相关信号通路的介质。Huang 等[57]研究发现维生素 D 促进 LCN2 启动子甲基化以抑制 LCN2 蛋白表达，减少 LCN2- 核糖体蛋白 S3（RPS3）结合、RPS3-NF-κB 结合，从而增加了肿瘤对顺铂的化疗敏感性。Song 等[58]发现了 LCN2 在心功能不全发展中的新机制，LCN2 通过释放危险相关分子模式（DAMP）高迁移率族蛋白 B1（HMGB1）和随后的 TLR4 依赖性信号，诱导 NLRP3 炎症体激活，而 NLRP3 炎症小体激活会影响糖尿病和心血管疾病。此外，有研究表明 LCN2 可以通过 PI3K/

AKT/MTOR 信号通路抑制炎症，揭示了 LCN2 在肝脏保护中的作用机制、通过激活 ERK/GSK3β/β-连环蛋白信号通路促进卵巢癌细胞增殖和迁移[59-60]。LCN2 是 Wnt/β-catenin 信号转导的下游靶点，可能作为一种适应性措施被激活，以应对高渗压引起的应激[28]。LCN2/JAK2-STAT3 通路参与了脊髓损伤后神经毒性小胶质细胞和星形胶质细胞的激活，已被证实是一种有希望的治疗策略[61]。目前，LCN2 在 MIRI 促进损伤、产生保护作用信号通路的研究较少，尤其是 LCN2 如何调控各信号通路影响 MIRI 的进展尚不清楚，需要进一步的实验证明。

6 结论及展望

MIRI 的损伤机制主要包括氧化应激、钙超载、炎症反应、线粒体代谢障碍、血管内皮功能障碍和细胞自噬。不同细胞信号通路通过调控不同的 MIRI 机制产生不同的作用，促损伤效应 NF-κB、TLRs、Wnt 信号通路病理生理机制是氧化应激和细胞凋亡、炎症反应、细胞坏死和细胞凋亡、钙超载、细胞纤维化和炎症反应。PI3K 的下游 Akt、mTOR、GSK-3β 等蛋白通路病理生理机制主要是氧化应激、炎症反应和钙超载。有研究证明 LCN2 敲除小鼠在心肌梗死后心脏纤维化和炎症减轻，心脏功能良好[62]。MIRI 病理机制研究的不断完善，有助于挖掘更多与其相关的潜在治疗靶点，为缺血性心脏病相关疾病或其并发症的治疗提供参考。

LCN2 作为心脏缺血再灌注损伤期间炎症的潜在调节因子，在多种组织中表达上调，如心脏、肝脏、多种黏膜组织、肺和上皮组织，在这些组织中，LCN2 表现为急性期蛋白。在首次将 LCN2 作为保证免疫平衡的重要因素后，LCN2 的功能进一步扩展到许多生物过程，包括炎症、中毒、免疫防御、癌症等。在心肌缺血再灌注的早期阶段，对心肌细胞自噬的减弱增加了对应激诱导的细胞死亡的敏感性，而缺乏 LCN2 却能够在缺血后引发更高的自噬反应，并免受细胞死亡和心脏功能障碍的影响。LCN2 是否可以作为心脏相关疾病生物标志物或者作为一个可靠的治疗靶点，还需要大量研究进一步证明。

参考文献

[1] 夏夏，夏中元 . 稳定缺氧诱导因子 -1α 表达对 1 型糖尿病心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞线粒体自噬的影响 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志，2020，34（10）：978-981.

[2] 胡盛寿，高润霖，刘力生，等 .《中国心血管病报告 2018》概要 [J]. 中国循环杂志，2019，34（3）：209-220.

[3] 童英，段小花，杨丽萍，等 . 线粒体功能障碍在心肌缺血再灌注损伤发病中的作用及靶向治疗研究进展 [J]. 山东医药，2020，60（21）：103-107.

[4] Mokhtari-Zaer A，Marefati N，Atkin SL，et al. The protective role of curcumin in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. J Cell Physiol，2018，4（1）：214-222.

[5] Jiang T，Liu Y，Chen B，et al. Identification of potential molecular mechanisms and small molecule drugs in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Braz J Med Biol Res，2020，53（9）：1-9.

[6] Chella KK，Sabir S，Shum M，et al. Sex-specific metabolic functions of adipose Lipocalin-2[J]. Mol Metab，2019，30（1）：30-47.

[7] Yang B，Fan P，Xu A，et al. Improved functional recovery to I/R injury in hearts from lipocalin-2 deficiency mice：restoration of mitochondrial function and phospholipids remodeling [J]. Am J Translational Res，2012，4（1）：60-71.

[8] Minutoli L，Puzzolo D，Rinaldi M，et al. ROS-mediated NLRP3 inflammasome activation in brain，heart，kidney，and testis ischemia/reperfusion injury [J]. Oxid Med Cell Longev，2016，21（8）：26-30.

[9] Cadenas S. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection [J]. Free Radic Biol Med，2018，117：76-89.

[10] Kevin LG，Camara AKS，Riess ML. Ischemic preconditioning alters real-time measure of O_2 radicals in intact hearts with ischemia and reperfusion [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol，2003，53（2）：H566-H574

[11] 夏君彦，李冬 . 心肌缺血再灌注损伤的研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2019，17（21）：3329-3334.

[12] 黄艳平，杨天华，金植炎，等 . 线粒体通透性转换孔在内吗啡肽 -1 后处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用 [J]. 南方医科大学学报，2018，38（5）：547-553.

[13] 刘丹，张永慧，金良友，等 . 抑制 NF-κB 信号通路保护缺血 / 再灌注损伤心肌的研究进展 [J]. 科技视界，2017，7（5）：31-34

[14] Kim SJ，Jeong CW，Bae HB，et al. Protective effect of sauchinone against regional myocardial ischemia/reperfusion injury：inhibition of p38 MAPK and JNK death signaling pathways [J]. J Korean Med Sci，2012，27（5）：572-575.

[15] Frantz S，Ertl G，Bauersachs J. Mechanisms of disease：Toll-like receptors in cardiovascular disease [J]. Nat Clin Pract Card Med，2007，4（8）：444-454.

[16] 杨晶，张晓坚，胡长平 . 吴茱萸次碱通过抑制 TLR4/NF-κB 信号通路保护大鼠心肌缺血 / 再灌注损伤 [J]. 中国药理学通报，2017，33（12）：1707-1712.

[17] 吴珍妮 . Rho/Rho 激酶信号通路对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响及欣怡胶囊对其的保护作用 [D]. 合肥：安徽

中医药大学，2016.
[18] Liao Y，Li H，Pi Y，et al. Cardioprotective effect of IGF-1 against myocardial ischemia/reperfusion injury through activation of PI3K/Akt pathway in rats in vivo [J]. J Int Med Res，2019，47（8）：3886-3897.
[19] 刘晓瑜，顾民华，徐煜凌，等 . 定心方Ⅰ号方通过调控 GSK3β/Nrf2/HO-1 通路防治大鼠心肌缺血再灌注损伤的机制研究 [J]. 中药新药与临床药理，2020，31（11）：1265-1270.
[20] Sulaiman D，Li J，Devarajan A，et al. Paraoxonase 2 protects against acute myocardial ischemia-reperfusion injury by modulating mitochondrial function and oxidative stress via the PI3K/Akt/GSK-3β RISK pathway [J]. J Mol Cell Cardiol，2019，12（9）：154-164.
[21] Kong Q，Dai L，Wang Y，et al. HSPA12B attenuated acute myocardial ischemia/reperfusion injury via maintaining endothelial integrity in a PI3K/Akt/mTOR-dependent mechanism [J]. Sci Rep，2016，20（6）：1-11.
[22] Abella V，Scotece M，Conde J，et al. The potential of lipocalin-2/NGAL as biomarker for inflammatory and metabolic diseases [J]. Biomarkers，2015，20（8）：565-571.
[23] Chakraborty S，Kaur S，Guha S，et al. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin（NGAL）in inflammation and cancer [J]. BBA-Rev Cancer，2012，1826（1）：129-169.
[24] Goetz DH，Borregaard N，Bluhm ME，et al. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition [J]. Mol Cell，2002，10（5）：1033-1043.
[25] Goetz DH，Willie ST，Armen RS，et al. Ligand preference inferred from the structure of neutrophil gelatinase associated lipocalin [J]. Biochemistry，2000，39（8）：1935 - 1941.
[26] Coles M，Diercks T，Muehlenweg B，et al. The solution structure and dynamics of human neutrophil gelatinase-associated lipocalin [J]. J Mol Biol，1999，289（1）：139-157.
[27] Ganfornina MD，Gabriel G，Michael B，et al. A phylogenetic analysis of the lipocalin protein family [J]. Mol Biol Evol，2000，17（1）：114-126.
[28] Betten R，Scharner B，Probst S，et al. Tonicity inversely modulates lipocalin-2（LCN2/24p3/NGAL）receptor（SLC22A17）and LCN2 expression via Wnt/β-catenin signaling in renal inner medullary collecting duct cells：implications for cell fate and bacterial infection [J]. Cell Commun Signal，2018，16（1）：1-18.
[29] Ghosh M，Sodhi SS，Kim JH，et al. An integrated in silico approach for the structural and functional exploration of lipocalin 2 and its functional insights with metalloproteinase 9 and lipoprotein receptor-related protein 2 [J]. Appl Biochem Biotechnol，2015，176（3）：712-719.
[30] Zheng G，Bachinsky DR，Stamenkovic I，et al. Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family，gp330 and LRP/alpha 2MR，and the receptor-associated protein（RAP）[J]. J Histochem Cytochem，1994，42（4）：531-542.
[31] Plieschnig JA，Gensberger ET，Bajari TM，et al. Renal LRP2 expression in man and chicken is estrogen-responsive [J]. Gene，2012，15，508（1）：49-59.
[32] Mosialou I，Shikhel S，Liu JM，et al. MC4R-dependent suppression of appetite by bone-derived lipocalin 2 [J]. Nature，2017，543（7645）：385-390.
[33] Buonafine M，Martinez-Martinez E，Jaisser F. More than a simple biomarker：the role of NGAL in cardiovascular and renal diseases [J]. Clin Sci，2018，132（9）：909-923.
[34] Kamble PG，Pereira MJ，Sidibeh CO，et al. Lipocalin 2 produces insulin resistance and can be upregulated by glucocorticoids in human adipose tissue [J]. Mol Cell Endocrinol，2016，4（16）：124-132.
[35] Shen H，Wang Z，Huang A，et al. Lipocalin 2 Is a regulator during macrophage polarization induced by soluble worm antigens [J]. Front Cell Infect Microbiol，2021，11：71-78.
[36] Wheeler DS，Devarajan P，Ma Q，et al. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin（NGAL）as a marker of acute kidney injury in critically ill children with septic shock [J]. Crit Care Med，2008，36（4）：1297-1303.
[37] Mondal A，Bose D，Saha P，et al. Lipocalin 2 induces neuroinflammation and blood-brain barrier dysfunction through liver-brain axis in murine model of nonalcoholic steatohepatitis [J]. J Neuroinflammation，2020，17（1）：201-216.
[38] Wang Y. Small lipid-binding proteins in regulating endothelial and vascular functions：focusing on adipocyte fatty acid binding protein and lipocalin-2 [J]. British J Pharmacol，2012，165（3）：603-621.
[39] Xu G，Ahn J，Chang S，et al. Lipocalin-2 induces cardiomyocyte apoptosis by increasing intracellular iron accumulation [J]. J Biol Chem，2012，287（7）：4808-4817.
[40] Marques FZ，Prestes PR，Byars SG，et al. Experimental and human evidence for lipocalin-2（neutrophil gelatinase-associated lipocalin [NGAL]）in the development of cardiac hypertrophy and heart failure [J]. J Am Heart Assoc，2017，6（6）：1-15.
[41] Xiong H，Luo T，He W，et al. Up-regulation of miR-138 inhibits hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis via down-regulating lipocalin-2 expression [J]. Exp Biol Med（Maywood），2016，241（1）：25-30.
[42] Cheng L，Xing H，Mao X，et al. Lipocalin-2 promotes M1 macrophages polarization in a mouse cardiac ischemia-reperfusion injury model [J]. Scand J Immunol，2015，81（1）：31-38.
[43] Yang J，Goetz D，Li JY，et al. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin [J]. Mol Cell，2002，10（5）：1045-1056.
[44] Chan YK，Sung HK，Sweeney G. Iron metabolism and

regulation by neutrophil gelatinase-associated lipocalin in cardiomyopathy [J]. Clin Sci（Lond），2015，129（10）：851-862.

[45] Bolignano D，Coppolino G，Lacquaniti A，et al. From kidney to cardiovascular diseases：NGAL as a biomarker beyond the confines of nephrology [J]. Eur J Clin Invest，2010，40（3）：273-276.

[46] Xu MJ，Feng D，Wu H，et al. Liver is the major source of elevated serum lipocalin-2 levels after bacterial infection or partial hepatectomy：a critical role for IL-6/STAT3 [J]. Hepatology，2015，61（2）：692-702.

[47] Krizanac M，Massanchez PB，Weiskirchen R，et al. A scoping review on lipocalin-2 and its role in non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma [J]. Int J Mol Sci，2021，22（6）：2865-2869.

[48] Asimakopoulou A，Borkham KE，Henning M，et al. Lipocalin-2（LCN2）regulates PLIN5 expression and intracellular lipid droplet formation in the liver [J]. Biochim Biophys Acta，2014，1842（10）：1513-1524.

[49] Alwahsh SM，Xu M，Seyhan HA，et al. Diet high in fructose leads to an overexpression of lipocalin-2 in rat fatty liver [J]. World J Gastroenterol，2014，20（7）：1807-1821.

[50] Asimakopoulou A，Weiskirchen S，Weiskirchen R. Lipocalin 2（LCN2）expression in hepatic malfunction and therapy [J]. Front Physiol，2016，27（7）：1-18.

[51] Karoui K，Viau A，Dellis O，et al. Endoplasmic reticulum stress drives proteinuria-induced kidney lesions via Lipocalin 2 [J]. Nat Commun，2016，7：103-110.

[52] Zeng G，Jia CW，Liu J，et al. Lipocalin-2 test in distinguishing acute lung injury cases from septic mice without acute lung injury [J]. Chin Med Sci J，2014，29（2）：65-77.

[53] Costa D，Principi E，Lazzarini E，et al. LCN2 overexpression in bone enhances the hematopoietic compartment via modulation of the bone marrow microenvironment [J]. J Cell Physiol，2017，232（11）：3077-3087.

[54] Mannelqvist M，Stefansson IM，Wik E，et al. Lipocalin 2 expression is associated with aggressive features of endometrial cancer [J]. BMC Cancer，2012，12（1）：169-176.

[55] Kubben F，Sier C，Hawinkels L，et al. Clinical evidence for a protective role of lipocalin-2 against MMP-9 autodegradation and the impact for gastric cancer [J]. Eur J Cancer，2007，43（12）：1869-1876.

[56] Villodre ES，Hu X，Larson R，et al. Lipocalin 2 promotes inflammatory breast cancer tumorigenesis and skin invasion [J]. Mol Oncol，2021，15（10）：2752-2765.

[57] Huang Z，Zhang Y，Li H，et al. Vitamin D promotes the cisplatin sensitivity of oral squamous cell carcinoma by inhibiting LCN2-modulated NF-*κ*B pathway activation through RPS3[J]. Cell Death Dis，2019，10（12）：936-946.

[58] Song E，Jahng JW，Chong LP，et al. Lipocalin-2 induces NLRP3 inflammasome activation via HMGB1 induced TLR4 signaling in heart tissue of mice under pressure overload challenge [J]. Am J Transl Res，2017，9（6）：2723-2735.

[59] Hu Y，Chen F，Huang C，et al. LCN2 suppressed inflammation through PI3K/AKT/MTOR signaling pathway [J]. J Hepatol，2016，64（2）：S530-536.

[60] Hao P，Li H，Wu A，et al. Lipocalin 2 promotes cell proliferation and migration in ovarian cancer through activation of the ERK/GSK3*β*/*β*-catenin signaling pathway [J]. Life Sci，2020，24：1-21.

[61] Wang X，Li X，Zuo X，et al. Photobiomodulation inhibits the activation of neurotoxic microglia and astrocytes by inhibiting Lcn2/JAK2-STAT3 crosstalk after spinal cord injury in male rats [J]. J Neuroinflammation，2021，18（1）：256-276.

[62] Bauersachs J，Fraccarollo D. Mineralocorticoid receptor-dependent adverse remodeling after myocardial infarction mediated by uNGALant activation of NF-*κ*B [J]. Hypertension，2017，70（1）：1080-1082.

（收稿日期：2021-10-22；修回日期：2022-01-28）

天然小分子化合物抗鼻咽癌活性及机制的研究进展

蒲缓缓[1]，屈赵[2]，林金榕[1]，陈四保[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. 三峡大学，湖北 宜昌 443002）

摘要：鼻咽癌是一种常见的头颈部恶性肿瘤，由于其位置隐蔽，易转移，单纯放疗和化疗的临床疗效并不令人满意。天然产物是药物的丰富来源，从天然化合物中发现抗鼻咽癌药物受到了广泛关注。本文综述了近十年来天然抗鼻咽癌化合物的发现、作用机制及其与化疗药物联用的研究进展，以期为抗鼻咽癌药物的研发提供更多信息。研究发现，许多天然萜类、黄酮类、多酚类、酚酸类化合物、醌类、生物碱等对鼻咽癌具有潜在的体内外活性。部分天然产物与化疗药物联用对鼻咽癌有协同作用，可以提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性，进而提高化疗药物的治疗效果，并在一定程度上有助于克服耐药性。因此，天然产物在鼻咽癌治疗中的应用值得进一步研究。

关键词：天然化合物；鼻咽癌；作用机制；耐药性；萜类化合物

中图分类号：R284.1，R979.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)05-1102-11

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.024

Advance in anticancer activity and mechanism of natural small molecule compounds for nasopharyngeal carcinoma

PU Huan-huan[1], QU Zhao[2], LIN Jin-rong[1], CHEN Si-bao[1*] (1. *Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing* 100193; 2.*Three Gorges University of China, Yichang Hubei* 443002)

Abstract: Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a common head and neck malignant tumor. Due to its hidden location and easy metastasis, the clinical efficacy of radiotherapy and chemotherapy alone is not satisfactory. Natural products are rich sources of drugs. The discovery of anti-NPC drugs from natural small molecule compounds has attracted much attention. To provide more information for the research and development of anti-NPC drugs, we reviewed and summarized the progress in the discovery of natural anti-NPC compounds, their mechanism of action, and their combination with other chemotherapy drugs in recent 10 years. Many natural terpenoids, flavonoids, polyphenols, phenolic acids compounds, quinones, and alkaloids have showed potential activities on NPC in vitro or in vivo. Meanwhile, some natural products in combination with other chemotherapy drugs showed synergistic effects on NPC. They improved the sensitivity of tumor cells to chemotherapy drugs, hence improving the therapeutic effect of chemotherapy, and overcoming drug resistance to some extent. So, natural products are worthy of further study and application in NPC treatment.

Key words: natural compound; nasopharyngeal carcinoma; mechanism; drug resistance; terpenoid

鼻咽癌（nasopharyngeal carcinoma，NPC）是一种特殊的头颈部恶性肿瘤，发生于鼻咽顶部及双侧咽隐窝。流行病学研究表明，NPC 在我国的发病率居世界之首[1]。由于其发生部位隐蔽，早期症状不典型，且绝大多数鼻咽癌属于未分化鳞状细胞癌，容易发生转移，因此 70% 的患者确诊时已属于临床中晚期[2]。近年来，包括免疫治疗、基因治疗、单克隆抗体治疗在内的生物治疗

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 81872769）。

作者简介：蒲缓缓，女，硕士研究生，主要从事药理学研究，email：puhuanhuan2019@163.com *通信作者：陈四保，男，研究员，主要从事天然药物化学研究，email：sbchen@implad.ac.cn

成为抗肿瘤研究的热点，但目前未得到广泛的应用[3]。放疗是目前治疗癌症最常用的方法。在放疗的基础上加以铂类药物化疗是晚期鼻咽癌治疗的标准方法，这些患者的 5 年生存率可达 90% 以上[4]。目前化疗的方法主要有同步化疗、诱导化疗和辅助化疗，然而化疗药物易出现耐药性和不良反应等问题。如何减少化疗药物的耐药性并降低不良反应是鼻咽癌治疗的关键，因此寻找高效低毒的化合物尤为重要。

从 1930 年到 2014 年，被批准的小分子抗癌药物中约有 60% 是天然产物或其衍生物[5]。天然产物的化学结构丰富，不仅可以与化疗药物联用降低肿瘤细胞对化疗药物的耐药性，还可以单独用于某些体质较差且不能耐受大剂量抗癌药物的晚期癌症患者。因此天然产物在新型抗癌药物的开发中发挥着越来越重要的作用。本文对近十年治疗鼻咽癌的天然化合物的化学结构、抗癌活性、抗癌机制和耐药性进行综述，为发现治疗鼻咽癌的先导化合物提供了新的视角和可能性，也为天然化合物抗鼻咽癌的机制研究提供了思路。

1　抗鼻咽癌的天然化合物

在过去的十年里，发现了许多抗鼻咽癌的天然产物，主要分为萜类、黄酮类、多酚类、酚酸类、醌类、生物碱类和其他类化合物。

1.1　萜类化合物

近年来发现的具有抗鼻咽癌活性的天然萜类化合物有倍半萜类，如莪术醇（curcumol，**1**）、单端孢菌素（trichothecin，**2**）、neoalbaconol（**3**）、山金车内酯 D（arnicolide D，**4**），化合物见表 1 和图 1。

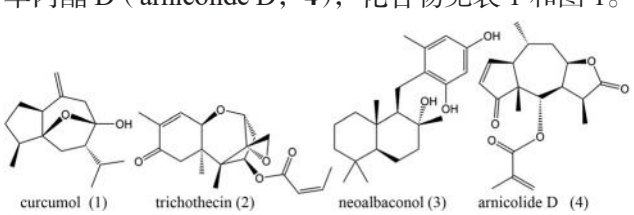


图 1　抑制鼻咽癌的倍半萜类化合物的结构

Fig 1　Structure of sesquiterpenoids for nasopharyngeal carcinoma

莪术醇是从中草药莪术 Curcumae Rhizoma 中分离而来的倍半萜醇类化合物，对多种实体瘤如肺癌、乳腺癌和胃癌等均具有抗癌作用，其潜在的作用机制主要与 NF-κB、MAPK 和 PI3K/AKT 信号通路有关[6]。研究表明莪术醇可显著抑制 CNE2 细胞的增殖并诱导其凋亡，这可能与其下调 NF-κB 蛋白水平[7]和抑制 IGF-1R/PI3K/AKT 信号通路[8]有关。莪术醇通过降低细胞周期蛋白 Cyclin 和细胞周期蛋白依赖性激酶 CDK 的表达诱导细胞周期停滞在 G_0/G_1 期[8]。多功能蛋白核仁素（nucleolin，NCL）在鼻咽癌细胞中显著上调，进一步研究表明，通过敲除 NCL 可以显著逆转莪术醇对 CNE2 细胞生长的抑制作用，因此 NCL 可能是莪术醇治疗鼻咽癌的靶标[9]。

单端孢菌素是从草本植物美登木 *Maytenus hookeri* Loes. 的内生真菌中分离出来的倍半萜类次级真菌代谢产物[10]。单端孢菌素能显著抑制鼻咽癌细胞（HK1 和 C666-1 细胞）生长并上调脱氢酶 / 还原酶家族成员 2（DHRS2）的 mRNA 和蛋白水平，且敲除 DHRS2 可逆转单端孢菌素的抗增殖作用[11]。体内研究发现，在 HK1-CON 细胞和 HK1-DHRS2 细胞构建的肿瘤异种移植模型中，相对于接种 HK1 细胞的裸鼠，接种过表达 DHRS2 的 HK1 细胞的裸鼠肿瘤大小和肿瘤质量均显著减少且体质量没有明显变化[11]。因此单端孢菌素可通过靶向 DHRS2 抗鼻咽癌。

Neoalbaconol 是一种从地花菌 *Albatrellus confluens*（Alb. & Schw. : Fr.）Kotl. & Pouz. 中分离的倍半萜类化合物，有抑制 C666-1 和 HK1 细胞增殖的作用，通过靶向 PDK1 抑制其下游的 PI3K/AKT/HK2 信号通路从而发挥抗鼻咽癌的作用[12]。在 C666-1 细胞构建的肿瘤异种移植模型中，用 100 mg • kg^{-1} 的 neoalbaconol 处理的裸鼠肿瘤体积明显较小，且未显示出明显的毒性，通过免疫组化染色发现肿瘤中 p-mTOR、p-AKT 和 HK2 表达均下调。体内数据与体外数据一致表明 neoalbaconol 通过抑制 AKT 信号通路抑制肿瘤生长[12]。

山金车内酯 D 是从鹅不食草 *Centipeda minima*（L.）A. Br. et Aschers. 中分离得到的倍半萜内酯，对 CNE2 细胞有显著的抑制作用[13]。山金车内酯 D 可诱导细胞周期停滞在 G_2/M 期并诱导其凋亡，可能与其对 PI3K/AKT/mTOR 信号传导途径和 STAT3 信号通路的抑制以及线粒体凋亡途径的激活有关[13]。

二萜类化合物有疏展香茶菜宁 E（effusanin E，**5**）、冬凌草素（lasiodin，**6**）和 11α- 羟基 -15- 氧 -16- 烯 - 对映贝壳杉烷 -19 酸（5F）（**7**）。化合物见表 1 和图 2。

疏展香茶菜宁 E 和冬凌草素是从溪黄草 *Isodon serra*（Maxim.）Hara 中提取的二萜类化合物，均能激活 CNE1 和 CNE2 细胞中的 Caspase 凋亡信号通路[14-15]。在 CNE2 细胞构建的肿瘤异种移植模型中，与对照组相比疏展香茶菜宁 E [10.0 mg/（kg • d）和 30.0 mg/（kg • d）] 可显著抑制肿瘤体积和质量，且无明显毒性，此外疏展

表 1 治疗鼻咽癌的天然萜类化合物

Tab 1 Natural terpenoids for nasopharyngeal carcinoma

化合物	名称	来源	细胞	IC_{50}/（μmol•L^{-1}）	作用机制	文献
1	莪术醇（curcumol）	Rhizoma Curcumae	CNE2	—	NF-κB ↓，IGF-1R/PI3K/Akt/GSK-3β ↓，NCL*，Cyclin ↓，CDK ↓，P21 ↑，P27 ↑	[7-9]
2	单端孢菌素（trichothecin）	*Maytenus hookeri* Loes.	C666-1 HK1	—	DHRS2 ↑	[11]
3	neoalbaconol	*Albatrellus confluens*（Alb. & Schw. : Fr.）Kotl. & Pouz.	C666-1 HK1	10 18	PDK1*，PI3K/AKT/HK2 ↓	[12]
4	山金车内酯 D（arnicolide D）	*Centipeda minima*（L.）A. Br. et Aschers.	CNE2	4.26	PI3K/AKT/mTOR ↓，STAT3 ↓，Cyclin D3 ↓，CDC2 ↓，cleaved PARP ↑，cleaved Caspase-9 ↑，Bax ↑	[13]
5	疏展香茶菜宁 E（effusanin E）	*Rabdosia serra*（Maxim.）Hara	CNE1 CNE2	—	NF-κB ↓，COX-2 ↓	[14]
6	冬凌草素（lasiodin）	*Rabdosia serra*（Maxim.）Hara	CNE1 CNE2	＜12.5 ＜12.5	Apaf-1/Caspase*，AKT/MAPK*，COX-2/NF-κB *	[15]
7	5F	*Pteris semipinnata*L. Sp.	CNE-2Z	—	NF-κB ↓，Bax/Bcl-2 ↑	[16]
8	葫芦素 E（cucurbitacin E）	*Cucumis melo* Linn.	HONE1	＜2.5	GADD45γ ↑，Cyclin B1 ↓，CDC2 ↓	[17]
9	人参皂苷 Rg_3（ginsenoside Rg_3）	*Panax ginseng* C. A. Meyer	HNE1 CNE2	—	MMP-2 ↓，MMP-9 ↓，EMT ↓	[19]
10	Pinicolol B	*Antrodia cinnamomea*	TW02 TW04	63.3 115.0	—	[20]

注（Note）：↑表示上调；↓表示下调；* 表示有影响（↑. upregulate；↓. downregulate；*. impact）。

图 2 抑制鼻咽癌的二萜类化合物的结构

Fig 2 Structure of diterpenoids for nasopharyngeal carcinoma

香茶菜宁 E 处理的肿瘤中 COX-2 和 NF-κB p50 蛋白的表达均下降[14]。冬凌草素通过调节 Apaf-1/Caspase、AKT/MAPK 和 COX-2/NF-κB 信号通路抑制人鼻咽癌细胞的增殖[15]。

化合物 **7** 是从半边旗 *Pteris semipinnata* L. 中分离得到的一种二萜类化合物，可通过诱导细胞周期停滞在 G_2/M 期、激活线粒体介导的凋亡途径和抑制 NF-κB 信号通路来抑制 CNE-2Z 细胞增殖[16]。

综上，目前发现的二萜类化合物均可通过抑制 NF-κB 和 COX-2 信号通路治疗鼻咽癌，这两条通路可能是该类化合物抗鼻咽癌的作用通路。

抗鼻咽癌的三萜类化合物有葫芦素 E（cucurbitacin E，**8**）、人参皂苷 Rg_3（ginsenoside Rg_3，**9**）和 pinicolol B（**10**）。化合物见表 1 和图 3。

葫芦素 E 是一种从甜瓜 *Cucumis melo* Linn. 中提取的天然四环三萜类化合物，具有抗鼻咽癌的作用。用浓度为 0.62525 μmol • L^{-1} 的葫芦

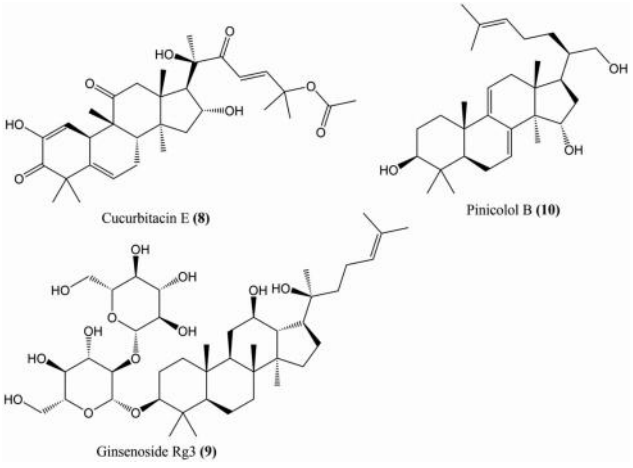


图 3 抑制鼻咽癌的三萜类化合物的结构

Fig 3 Structure of triterpenoids for nasopharyngeal carcinoma

素 E 处理 HONE1 细胞时，并没有发生明显的坏死、凋亡或 Caspase-3 的激活，但其 24 h 的 IC_{50} 值小于 2.5 μmol • L^{-1}[17]。此外，葫芦素 E 通过下调 *CDC2* 基因和细胞周期蛋白 B1 的表达，上调 *GADD45γ* 基因的表达，在鼻咽癌细胞系中诱导 GADD45γ/CDC2 复合物的形成和 G_2/M 细胞周期停滞而发挥有效的抗鼻咽癌作用[17]。

人参皂苷 Rg_3 是从人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 中提取的四环三萜皂苷，是广谱抗肿瘤化合物，其机制主要包括诱导细胞凋亡、抑制细胞增殖、转移和血管生成以及增强免疫[18]。用

不同质量浓度的人参皂苷 Rg_3（25、50 和 100 μg • mL^{-1}）处理 HNE1 和 CNE2 细胞 24 h 发现 MMP-2、MMP-9 和 EMT 的表达降低，因此人参皂苷 Rg_3 通过调节 MMP-2、MMP-9、EMT 的表达来抑制鼻咽癌细胞的迁移和侵袭[19]。

Pinicolol B 是从中国台湾特有的樟芝 *Antrodia cinnamomea* 中提取的四环三萜类化合物，可诱导鼻咽癌细胞的凋亡和坏死，对 TW02 和 TW04 细胞有微弱的抑制作用，IC_{50} 值分别约为 63.3 μmol • L^{-1} 和 115.0 μmol • L^{-1}[20]。

1.2　黄酮类化合物

近年来发现的具有抗鼻咽癌活性的黄酮类化合物有柳穿鱼黄素（pectolinarigenin，**11**）、黄芩苷水合物（baicalin hydrate，**12**）、伽升沃（cbarcinone C，**13**）、槲皮素（quercetin，**14**）、异甘草素（isoliquiritigenin，**15**）和高良姜素（galangin，**16**）。化合物见图 4 及表 2。

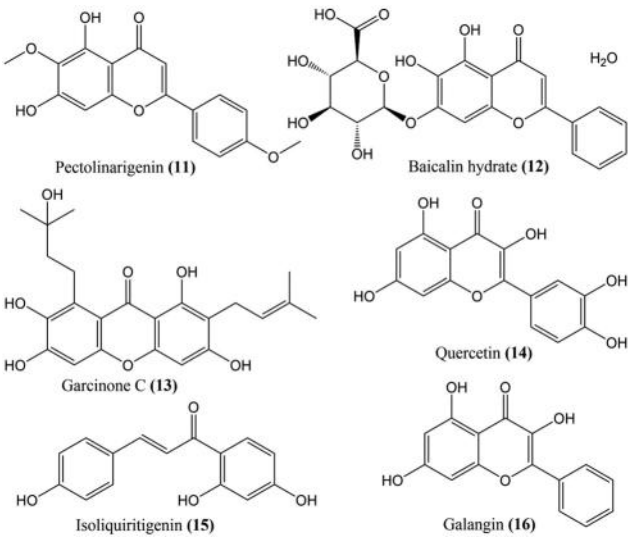


图 4　抑制鼻咽癌的黄酮类化合物的结构

Fig 4　Structure of flavonoids for nasopharyngeal carcinoma

表 2　抗鼻咽癌的黄酮类化合物

Tab 2　Flavonoids for nasopharyngeal carcinoma

化合物	名称	来源	细胞 [对应 IC_{50}/（μmol • L^{-1}）]	作用机制	文献
11	柳穿鱼黄素（pectolinarigenin）	*Eupatorium odoratum* Linn.	C666-1（＜ 512 μg • mL^{-1}）	Caspase-3 ↑，ROS ↑，Bcl-XL/S ↓	[21]
12	黄芩苷水合物（baicalin hydrate）	*Scutellaria baicalensis* Georgi	CNE1，HNE3，5-8F，6-10B，C666-1，HK1（45.93，23.17，32.89，34.03，19.38，31.22）	p53*	[22]
13	伽升沃 C（garcinone C）	*Garcinia oblongifolia* Champ. ex Benth.	CNE1，CNE2，HK1，HONE1（10.68，13.24，9.71，8.99）	ATR/STAT3/4EBP1*，Cyclin B1 ↓，Cyclin D1 ↓，Cyclin E2 ↓，CDC2 ↓，CDK7 ↓，STAT3 ↓，4E-BP1 ↑	[23]
14	槲皮素（quercetin）	Sesquiterpenes isolated from different plants	NPC-039（＜ 10 mg • mL^{-1}）	EGF ↓，NF-κB ↓	[25]
15	异甘草素（isoliquiritigenin）	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	C666-1，CNE2（－）	miR-32/LATS2/Wnt*，Bax ↑，Caspase-3 ↑，Caspase-9 ↑，Bcl-2 ↓，MMP-2 ↓，MMP-9 ↓	[26]
16	高良姜素（galangin）	*Alpinia galanga*（Linn.）Willd.	NPC-TW039，NPC-TW076（60，60）	P53*，PI3K-AKT*	[27]

注（Note）：↑表示上调；↓表示下调；* 表示有影响（↑. upregulate；↓. downregulate；*. impact）。

柳穿鱼黄素是从药用植物飞机草 *Eupatorium odoratum* L. 中提取的黄酮类化合物。体外研究发现柳穿鱼黄素可以通过线粒体相关的凋亡途径和活性氧（ROS）诱导的凋亡途径诱导 C666-1 细胞凋亡，通过 Transwell 实验和伤口愈合实验发现其能抑制 C666-1 细胞的迁移[21]。在 C666-1 细胞构建的肿瘤异种移植模型中，柳穿鱼黄素（20.0、40.0 和 80.0 mg • kg^{-1}）可显著抑制肿瘤生长且对心肝肾等器官无明显毒性，此外在肿瘤组织中 Bax 和 Cleaved-caspase-3 表达上调而 Bcl-XL/S 表达下调[21]。

黄芩苷水合物是从黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 中提取具有抗鼻咽癌活性的类黄酮，对 CNE1、HNE3、5-8F、6-10B、C666-1 和 HK1 细胞具有明显的抑制作用[22]。在 C666-1 和 HK1 细胞中，黄芩苷水合物通过影响 Cyclin 蛋白水平诱导细胞周期停滞在 G_2/M 期并以 p53 依赖的方式诱导细胞早期凋亡[22]。体内研究发现在由 C666-1 细胞构建的肿瘤异种移植模型中，每隔两日腹腔注射 10 mg • kg^{-1} 黄芩苷水合物的裸鼠其肿瘤质量显著降低且体质量没有显著变化，表明黄芩苷水合物具有显著的抗鼻咽癌活性[22]。值得注意的是，黄芩苷水合物虽然提高了 Suv39H1 和 SON 的水平，通过激活 m6ARNA 甲基化促进了

Suv39H1 的剪接，但没有改变 Suv39H1 DNA 的甲基化 [22]。

伽升沃 C 是从岭南山竹子 *Garcinia oblongifolia* Champ. ex Benth. 中提取的天然黄酮类化合物，可显著抑制 CNE1、CNE2、HK1 和 HONE1 细胞的活力和集落形成能力 [23]。此外，伽升沃 C 能够通过激活 ATR 下调 Cyclin 和 CDK7 诱导鼻咽癌细胞 S 期停滞，大剂量的伽升沃 C 还可诱导鼻咽癌细胞坏死 [23]。

槲皮素是具有广谱抗肿瘤活性的黄酮醇类化合物，大量存在于蔬菜、水果和饮料中，比如羽衣甘蓝、洋葱、浆果、苹果、红葡萄、西蓝花、樱桃、茶和红酒等。槲皮素的抗肿瘤作用主要与诱导肿瘤细胞凋亡和选择性地抑制血管生成因子 VEGF 表达及活性有关 [24]。比如槲皮素可通过调节 PI3K/AKT/mTOR 和 STAT3 信号通路诱导肿瘤细胞凋亡和自噬。在 NPC-039 细胞中，用 10 mg • mL $^{-1}$ 的槲皮素处理 24 h 后细胞活力降低至 36%[25]。槲皮素还可通过抑制 NF-κB 的磷酸化从而抑制鼻咽癌细胞的增殖和血管生成 [25]。

异甘草素可通过下调 MMP-2 和 MMP-9 的表达来抑制鼻咽癌细胞的迁移和侵袭 [26]。在由 CNE2 细胞构建的肿瘤异种移植模型中，每日灌胃 12.5、25、50 mg • kg $^{-1}$ 的异甘草素的裸鼠其肿瘤体积显著降低且体质量没有明显变化。异甘草素可抑制体内肿瘤细胞增殖、诱导凋亡并降低 β-catenin 和 LATS2 蛋白的表达，并通过调节 miR-32/LATS2/Wnt 抑制鼻咽癌细胞增殖和诱导其凋亡 [26]。

高良姜素是从姜科植物红豆蔻 *Alpinia galanga*（L.）Willd. 根中提取的黄酮类化合物，对 NPC-TW039 和 NPC-TW076 细胞有轻度的抑制作用，其作用机制与抑制 PI3K/AKT 通路、诱导 p53 依赖的 S 期停滞和凋亡、抑制 PARP 有关 [27]。

1.3　多酚类化合物

多酚类化合物的共同特点是具有良好的抗氧化活性，能够清除游离自由基，对一些肿瘤细胞具有增殖抑制作用。抗鼻咽癌的多酚类化合物有奇果菌素（grifolin，**17**）、姜黄素（curcumin，**18**）和白藜芦醇（resveratrol，**19**）。化合物见图 5 及表 3。

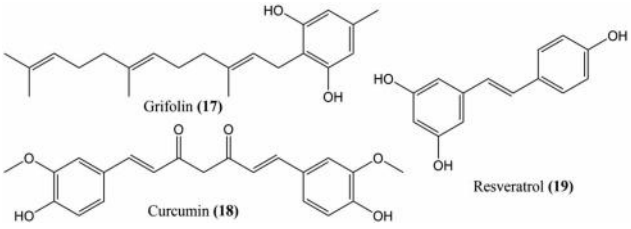


图 5　抑制鼻咽癌的多酚类化合物的结构

Fig 5　Structure of polyphenols for nasopharyngeal carcinoma

表 3　治疗鼻咽癌的多酚类化合物

Tab 3　Polyphenols for nasopharyngeal carcinoma

化合物	名称	来源	细胞 [对应 IC_{50}/（μmol • L $^{-1}$）]	作用机制	文献
17	奇果菌素（grifolin）	*Albatrellus confluens* 和 *Boletus pseudocalopus*	CNE1，C666-1（－）	DNMT1 *	[28]
18	姜黄素（curcumin）	*Curcuma longa* Linn.	TW076（＜ 10）	ROS ↑，Caspase-3 ↑	[30]
19	白藜芦醇（resveratrol）	多种植物	C666-1，TW076，CG-1，TW04（－）	AMPK ↑，p70S6K ↓，s6 ↓，Bcl-2 ↓，Bax ↑	[31-32]

注（Note）：↑表示上调；↓表示下调；* 表示有影响（↑. upregulate；↓. downregulate；*. impact）。

奇果菌素是从蕈 *Albatrellus confluens* 和假美柄牛肝菌 *Boletus pseudocalopus* 中提取的天然法尼基酚类化合物，可以通过靶向 DNA 甲基转移酶 1（DNMT1）阻碍肿瘤细胞代谢重编程，因此在高 CpG 岛甲基化表型（CpG island methylator phenotype，CIMP）的鼻咽癌中，奇果菌素有希望作为抗鼻咽癌的先导化合物 [28]。

姜黄素是一种从植物姜黄 *Curcuma longa* Linn 中分离出来的黄色多酚，对乳腺癌、肺癌和头颈部鳞状细胞癌等均有显著的抗癌作用，抗癌机制主要是通过抑制多种细胞信号通路诱导癌细胞凋亡并抑制其增殖和侵袭 [29]。研究表明姜黄素可抑制人鼻咽癌细胞生长，用 10 μmol • L $^{-1}$ 姜黄素处理 NPC-TW076 细胞 48 h 后，存活率下降 50% 以上。姜黄素通过线粒体凋亡途径诱导细胞凋亡和细胞周期停滞在 G_2/M 期并通过上调鼻咽癌细胞中 miR-7 的活性来使 Skp2 失活，从而发挥抗鼻咽癌作用 [30]。

白藜芦醇是一种从红葡萄中提取的天然多酚类化合物，可抑制鼻咽癌细胞增殖并诱导其凋亡 [31]。在鼻咽癌细胞中，白藜芦醇可破坏线粒体膜电位，从而引起线粒体中细胞色素 C 的释放、FasL 和 Bax 的表达上调以及 GRP78 和 Bcl-2 的表达下调 [32]，这可能与其激活 AMPK 的活性并阻断 p70S6K 和 s6 的活性有关 [31]。

1.4　酚酸类化合物

抗鼻咽癌的酚酸化合物有藤黄酸（gambogic acid，**20**）和没食子酸（gallic acid，**21**）。化合物见图 6 及表 4。

藤黄酸是藤黄 *Garcinia hanburyi* Hook. f. 的主要活性成分，有显著的抗 CNE1 和 CNE2 细胞增

表 4　抗鼻咽癌的酚酸类化合物

Tab 4　Phenolic acids for nasopharyngeal carcinoma

化合物	名称	来源	细胞 [对应 IC_{50}/（μmol • L^{-1}）]	作用机制	文献
20	藤黄酸（gambogic acid）	*Garcinia hanburyi* Hook. f.	CNE1，CNE2（1.2，1.1）	Caspase-3 ↑，Bax ↑，Bcl-2 ↓，CyclinB1/p-CDC2 ↓	[33]
21	没食子酸（gallic acid）	多种植物	NPC-BM1（－）	MMP-1 ↓	[34]

注（Note）：↑表示上调；↓表示下调（↑. upregulate；↓. downregulate）。

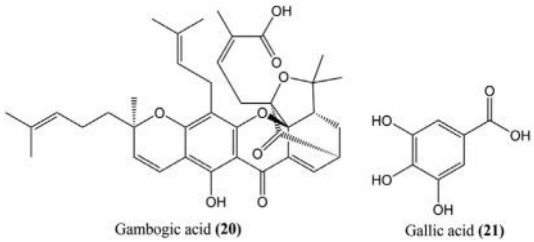


图 6　抑制鼻咽癌的天然酚酸类化合物的结构

Fig 6　Structure of natural phenolic acids for nasopharyngeal carcinoma

殖的作用[33]。藤黄酸诱导细胞凋亡与在缺氧条件下 Caspasase-3 和 Bax/Bcl-2 的表达相关，此外还诱导细胞周期停滞在 G_2/M 期[33]。没食子酸抑制人鼻咽癌细胞中基质侵袭和 AP-1/ETS-1 介导的 MMP-1 转录，可用于开发抗鼻咽癌转移的新化疗药物[34]。

1.5　醌类化合物

大多数醌类药物具有酚类羟基或羟基，这可能是其具有抗肿瘤作用的原因。抗鼻咽癌的醌类化合物有紫草素（shikonin，**22**），大黄素（emodin，**23**）和大黄素甲醚（physcion，**24**）。化合物见图 7 及表 5。

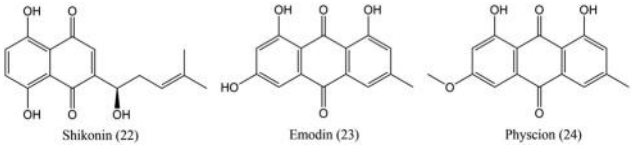


图 7　抑制鼻咽癌的醌类化合物的结构

Fig 7　Structure of quinones for nasopharyngeal carcinoma

表 5　治疗鼻咽癌的醌类化合物

Tab 5　Quinones for nasopharyngeal carcinoma

化合物	名称	来源	细胞 [对应 IC_{50}/（μmol • L^{-1}）]	作用机制	文献
22	紫草素（shikonin）	*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.	CNE-2Z（＜ 12.8）	ROS ↑，RIP1 ↑，RIP3 ↑	[35]
23	大黄素（emodin）	*Rheum officinale* Baill.	CNE-2Z，NP69-SV40T（＜ 50）	氯通道 ↑	[36]
24	大黄素甲醚（physcion）	*Rheum officinale* Baill.	CNE2（＜ 20）	ROS ↑，Sp1 ↓，miR-27a ↓	[37]

注（Note）：↑表示上调；↓表示下调（↑. upregulate；↓. downregulate）。

紫草素是一种从紫草 *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. 中提取的醌类化合物，在体内外均对 CNE-2Z 细胞有良好的抑制作用[35]。紫草素可通过激活 ROS 并上调 RIP1 和 RIP3 的表达导致 CNE-2Z 细胞坏死[35]。

大黄素和大黄素甲醚是在中药大黄 *Rheum officinale* Baill. 中发现的活性蒽醌类化合物，可分别诱导 CNE-2Z 细胞周期停滞在 S 期和 G_1 期[36-37]。大黄素通过靶向氯通道来抑制鼻咽癌细胞生长，因此氯通道应可作为鼻咽癌治疗的新靶点[36]。每日腹腔注射 10 mg • kg^{-1} 的大黄素甲醚可显著减少肿瘤体积且对体质量无明显影响，此外通过增加 Cleaved-caspase-3 和 LC3B-Ⅱ的表达诱导体内肿瘤细胞凋亡和自噬。大黄素甲醚对肿瘤生长的抑制作用与组织中 Sp1 和 miR-27a 表达的降低相关，可通过 ROS/miR-27a/ZBTB10 信号靶向 Sp1 从而诱导人鼻咽癌细胞的凋亡和自噬[37]。

1.6　生物碱化合物

抗鼻咽癌的生物碱有小檗碱（berberine，**25**），3，3'-二吲哚甲烷（3，3'-diindolylmethane，**26**）和（vetypyrroloids A，**27**）。化合物见图 8 及表 6。

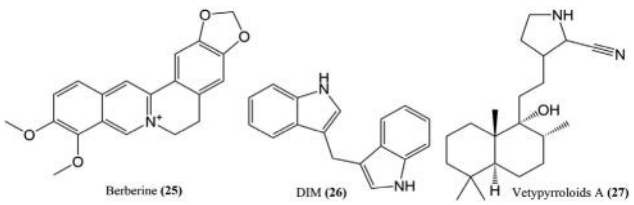


图 8　抑制鼻咽癌的天然醌类化合物的结构

Fig 8　Structure of natural alkaloids for nasopharyngeal carcinoma

小檗碱是一种异喹啉生物碱，存在于许多药用植物的根、根茎和茎皮中，比如黄连 *Coptis chinensis* Franch.。小檗碱是一种广谱的抗癌化合物，主要通过诱导细胞周期停滞和增加凋亡因子的表达来抑制肿瘤细胞生长[38-39]。小檗碱可通过诱导 STAT3 活化抑制肿瘤相关成纤维细胞从而对鼻咽癌细胞增殖有一定的抑制作用[39]。将 C666-1 细胞皮下注射至裸鼠腋下，对照组在约 14 d 出现较大肿瘤，而腹腔注射 5 mg • kg^{-1} 和 10 mg • kg^{-1} 的小檗碱分别在 30 d 和 45 d 均未出

现可测量的肿瘤，表明小檗碱能有效地抑制体内肿瘤的形成[39]。

3，3'-二吲哚甲烷在十字花科植物中含量丰富，如西蓝花和甘蓝，能抑制 5-8F 和 CNE2 细胞在肿瘤异种移植模型动物中的生长。体外研究发现 3，3'-二吲哚甲烷显著抑制 5-8F 和 CNE2 细胞的活力 60%[40-41]；其还可以同时调节与鼻咽癌相关的几种信号通路，如 PI3K/AKT、MAPK 和 NF-κB 信号通路，从而有效地诱导鼻咽癌细胞凋亡并诱导细胞周期停滞在 G_2/M 期，在鼻咽癌的发生和发展中具有预防和治疗作用[42]。

Vetypyrroloids A（**27**）是一种从植物蔓荆 *Vitex trifolia* Linn. 分离出的新型二萜类生物碱，含有氰基部分和吡咯环[42]。Vetypyrroloids A 对 CNE1 细胞有显著的抑制作用，IC_{50} 值为 8.7 μmol • L^{-1}，但作用机制目前尚不清楚[42]。

表 6　抗鼻咽癌的生物碱

Tab 6　Alkaloids for nasopharyngeal carcinoma

化合物	名称	来源	细胞细胞 [对应 IC_{50}/（μmol • L^{-1}）]	作用机制	文献
25	小檗碱（berberine）	*Coptis chinensis* Franch.	HONE1（100），HK1（400），C666-1 STAT3 ↓（400），NP460（400）		[39]
26	3，3'-二吲哚甲烷（DIM）	*Brassicaceae*	5-8F（＜ 75），CNE2（＜ 75）	PI3K/AKT*，MAPK*，NF-κB*	[42]
27	vetypyrroloids A	*Vitex trifolia* Linn.	CNE1（8.7）	—	[42]

注（Note）：↑表示上调；↓表示下调；* 表示有影响（↑. upregulate；↓. downregulate；*. impact）。

1.7　其他类化合物

其他抗鼻咽癌的化合物还有三白脂素（manassantin B，**28**）、雷公藤甲素（triptolide，**29**）、化合物 **30**、（cherimolacyclopeptide E，**31**）、化合物 **32** 和化合物 **33**（见图 9 及表 7）。

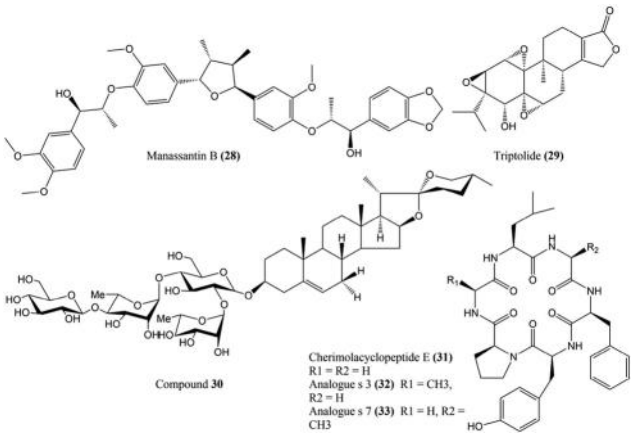


图 9　抑制鼻咽癌的其他化合物的结构

Fig 9　Structure of other compounds for nasopharyngeal carcinoma

三白脂素是从三白草 *Saururus chinensis*（Lour.）Baill. 的根中提取的[43]，对 Akata-BX1 细胞有较强的抑制作用。三白脂素可通过抑制 AP-1 信号转导来抑制 EB 病毒早期基因 *BZLF1* 的表达，从而抑制 EBV 裂解复制；此外 mTORC2 是三白脂素抗 EBV 感染的靶标[1]。

雷公藤甲素是从雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 中提取的环氧二萜内酯，对 C666-1、HONE1/Akata、HK1/Akata、CNE1/Akata 和 CNE1 细胞等多种肿瘤细胞有显著的抑制作用。体内研究发现，每日腹腔注射 0.4 mg • kg^{-1} 雷公藤甲素对 HONE1/Akata 细胞构建的肿瘤异种移植模型有显著的治疗作用，且 Cleaved-caspase-3 蛋白表达增加，但 EBNA1 蛋白表达降低。雷公藤甲素可诱导细胞周期停滞在 S 期，通过线粒体凋亡途径诱导 EBV 核抗原 1（EBNA1）降解并促进鼻咽癌细胞凋亡[44]。

化合物 **30** 是从滇重楼 *Paris polyphylla* var. *Yunnanensi* 中提取的甾体皂苷，其对 CNE 细胞的抑制作用比顺铂强，其 IC_{50} 值为 1.50 μmol • L^{-1}，作用机制与诱导凋亡和细胞周期停滞在 G_1/S 期有关[45]。

Cherimolacyclopeptide E（**31**）是一种从毛叶番荔枝 *Annona cherimola* Mill. 中获得的环六肽，对 KB 细胞具有显著的细胞毒性，IC_{50} 值为 0.017 μmol • L^{-1}[46]。将其 2 位甘氨酸和 6 位甘氨酸用 Ala 取代得到衍生物 **32** 和 **33**，对 KB 细胞表现出显著的细胞毒性，IC_{50} 值分别为 6.3 μmol • L^{-1} 和 7.8 μmol•L^{-1}[47]，但是作用机制目前尚未明确。

2　用于鼻咽癌联合化疗的天然化合物

常见治疗鼻咽癌的化疗药物是顺铂、卡铂、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、紫杉醇、蒽环类药物、博来霉素、表柔比星和西妥昔单抗等。几十年来顺铂与 5-氟尿嘧啶联用一直是鼻咽癌的一线治疗方案，其应答率为 40% ～ 65%，但单纯化疗容易产生耐药性，晚期鼻咽癌治疗的主要障碍之一是耐药性的发展[48]。

研究表明，化疗药物与天然产物联用比单独使用具有毒性低、疗效高或逆转多药耐药性等优点。比如槲皮素和顺铂联合使用比单独使用时疗效好，可协同抑制鼻咽癌细胞的增殖[49]，且槲皮素可降低顺铂诱导的猪肾细胞 LLC-PK1 的肾毒性[50]。

天然化合物影响化疗药物对鼻咽癌的耐药

表 7　其他抗鼻咽癌的化合物

Tab 7　Other compounds for nasopharyngeal carcinoma

化合物	名称	来源	细胞细胞 [对应 IC_{50}/（μmol • L^{-1}）]	作用机制	文献
28	三白脂素（manassantin B）	*Saururus chinensis*（Lour.）Baill.	Akata-BX1（12.96）	BZLF1 ↓	[1]
29	雷公藤甲素（triptolide）	*Tripterygium wilfordii* Hook. f.	C666-1（0.055 43），HONE1/Akata（0.076 56），HK1/Akata（0.001 12），CNE1/Akata（0.011 04），CNE1（0.010 66）	EBNA1 ↓，Cleaved-caspase-3 ↑	[44]
30	—	*Paris polyphylla* var. *yunnanensi*	CNE（1.50）	诱导 G_1/S 期细胞阻滞和凋亡	[45]
31	cherimolacyclopeptide E	*Annona cherimola* Mill.	KB [0.017（天然），＞ 10（合成）]	—	[46]
32	—	*Annona cherimola* Mill.	KB（6.3）	—	[47]
33	—	*Annona cherimola* Mill.	KB（7.8）	—	[47]

注（Note）：↑表示上调；↓表示下调（↑. upregulate；↓. downregulate）。

性主要涉及 EBV 感染、癌症干细胞（cancer stem cells，CSCs）形成、miRNA、DNA 修复、EMT 和凋亡等 [51]。本文将从诱导癌细胞凋亡、清除癌症干细胞、靶向 EBV 和靶向 miRNA 四个方面讨论天然化合物如何减少鼻咽癌对化疗药物的耐药性。

2.1　诱导癌细胞凋亡

在耐药的鼻咽癌细胞中，高水平的 Survival 和抑凋亡相关蛋白能够抑制细胞凋亡从而降低化疗药物的疗效。然而，一些天然化合物，如 5F、槲皮素、积雪草酸（asiatic acid，**34**）、雷公藤红素（celastrol，**35**）和虫草素（cordycepin，**36**）（见图 10）可通过诱导细鼻咽癌胞凋亡从而减少化疗药物的耐药性。

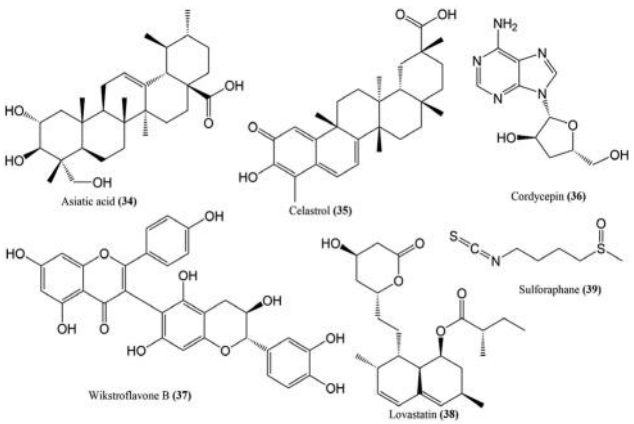


图 10　抑制化疗药物耐药性的天然化合物的结构

Fig 10　Structure of natural small compounds to reduce cancer resistance

顺铂可通过增加 ROS 的产生来增加细胞毒性从而发挥抗癌活性 [52]。有趣的是 5F 与顺铂联合使用可减少 ROS 产生却通过协同增加 Caspase-3 的活性诱导鼻咽癌细胞凋亡从而提高顺铂的抗癌作用 [16]。同时积雪草酸、雷公藤红素和虫草素均可通过增加 p38 和 ERK 蛋白的磷酸化来诱导对顺铂耐药的人鼻咽癌细胞凋亡 [53-54]。小檗碱与人参皂苷 Rg_3 联合使用可以通过靶向 MAPK/ERK 信号通路来促进凋亡相关蛋白 Bax 的表达，并抑制凋亡抑制蛋白 Survivin 和 Bcl-2 的表达，从而协同抑制 CNE2 细胞增殖并诱导其凋亡 [55]。

Wikstroflavone B（**37**）是从了哥王 *Wikstroemia indica*（Linn.）C. A. Mey. 中分离的双黄酮类化合物。Wikstroflavone B 和姜黄素通过阻断 FAK/STAT3 信号通路抑制 Survivin 表达并促进 p53，MMP-2 和 MMP-9 表达从而协同诱导 NPC 细胞凋亡并抑制转移 [56]。与单独使用相比，CNE1 细胞经 10 μmol • L^{-1} 的姜黄素和 40 μmol • L^{-1} 的 wikstroflavone B 处理后，可显著抑制细胞伤口间隙闭合并减少侵袭细胞的数量 [56]。而且姜黄素在联合方案中可增强放化疗的疗效 [57]。

2.2　清除肿瘤干细胞

癌症干细胞是指负责维持肿瘤发生的肿瘤细胞亚群，具有自我更新、高致瘤性、侵袭性和对传统化疗和放疗的耐药性等特点 [58]。肿瘤干细胞的存在是多发性恶性肿瘤进展、复发和转移的罪魁祸首，想要治愈肿瘤，首先要解决肿瘤干细胞问题。

洛伐他汀（lovastatin，**38**）在临床上广泛用于治疗高胆固醇血症，最新研究发现其可通过抑制 5-8F 和 6-10B 的鼻咽癌干细胞增殖和自我更新从而诱导其凋亡和细胞周期停滞在 G_2/M 期 [59]。此外，洛伐他汀还可以增强鼻咽癌干细胞对化学疗法和光动力疗法的敏感性 [59]。莱菔硫烷（sulforaphane，**39**）可通过 DNMT1/Wnt 抑制因子 1（WIF1）轴抑制鼻咽癌细胞生长，此外通过抑制肿瘤干细胞而增强顺铂的抗肿瘤作用 [60]。洛伐他汀和莱菔硫烷都可通过抑制鼻咽癌干细胞来增强化疗药物的敏感性（见图 10），这证明消除肿瘤干细胞可以减少化疗药物的耐药性。

2.3　靶向 EBV

EBV 病毒与 NPC 的发生发展密切相关 [61]。越来越多的证据表明 EBV 蛋白和 EBV miRNAs 参

与了鼻咽癌化疗的耐药性。

三白脂素[1]和虫草素[62]可以抑制 EBV 早期基因 *BZLF1* 的表达。虫草素和阿霉素通过激活 PKC-p38 MAPK 信号通路诱导 C/EBP*β* 蛋白磷酸化从而激活裂解性 EBV 感染发挥抗鼻咽癌作用[62]。EBNA1 是唯一一个在所有 EBV 阳性细胞中均表达的病毒蛋白，在 EBV 基因组的维持、复制和转录中发挥了重要作用，可作为潜在的研究靶点。敲除 EBNA1 可抑制 EBV DNA 的载量从而使鼻咽癌细胞对顺铂和 5- 氟尿嘧啶敏感，初步提示 EBNA1 在鼻咽癌化疗的耐药中发挥潜在作用[63]。VK-2019 是目前最先进的直接针对 EBNA1 的化合物[61]。雷公藤甲素的抗鼻咽癌作用与靶向 EBNA1 有关[44]。然而，针对 EBNA1 的研究仍处于早期阶段。

在 NPC 中，EBV 编码了超 44 种病毒的 miRNA。miR-BARTs 是 EBV 编码的 miRNA，占 NPC 细胞中 miRNA 的三分之一，能促进 NPC 的发展[64]。越来越多的证据表明，miR-BARTs 通过参与 EMT 和抗凋亡等信号通路促进鼻咽癌化疗耐药的发生[65]。

2.4 靶向 miRNA

最近的研究表明，miRNA 不仅在维持细胞功能方面起着重要作用，还与肿瘤的发生和耐药性的产生有关，miRNA 既可以作为肿瘤诊断和预后的生物标志物，又可以作为治疗靶点[66]。天然化合物可以通过调节 miRNA 的表达发挥抗肿瘤作用[60-61]。例如，由于 miR-21 在细胞中的异位表达，槐果碱（sophocarpine）处理头颈部鳞状细胞癌的细胞后导致磷酸化的 PTEN 和 p38 蛋白表达增加并逆转 EMT[67]。

研究发现 miRNA 在鼻咽癌中的作用涉及到多个信号通路，比如 NF-*κ*B 信号通路[68]、PI3K/AKT 信号通路[69]、PTEN/AKT 信号通路[70]和 Wnt/*β*-catenin 信号通路[71]。目前靶向 miRNA 的天然化合物的研究较少，因此具有广泛研究前景。

3 小结

综上，目前关于天然化合物抗鼻咽癌的研究越来越多，但大多数都停留在活性的研究层面上，机制研究不够深入，主要围绕 PI3K/AKT/mTOR 和 NF-*κ*B 信号通路展开。其中天然化合物通过靶向 EBV 和靶向 miRNA 抗鼻咽癌的研究较少，但具有广泛的研究前景，进一步探讨其作用机制对天然化合物抗鼻咽癌的研究具有重要意义。此外治疗晚期鼻咽癌的主要障碍是耐药性的发展，因此降低耐药性仍是今后研究的重点。

参考文献

[1] Wang Q，Zhu N，Hu J，et al. The mTOR inhibitor manassantin B reveals a crucial role of mTORC2 signaling in Epstein-Barr virus reactivation [J]. J Biol Chem，2020，295（21）：7431-7441.

[2] Lai SZ，Li WF，Chen L，et al. How does intensity-modulated radiotherapy versus conventional two-dimensional radiotherapy influence the treatment results in nasopharyngeal carcinoma patients? [J].Int J Radiat Oncol Biol Phys，2011，80（3）：661-668.

[3] Fletcher A，Choudhury A，Alam N. Metastatic bladder cancer：a review of current management [J]. ISRN Urol，2011，2011：545241.

[4] Perri F，Scarpati GDV，Buonerba C，et al. Combined chemo-radiotherapy in locally advanced nasopharyngeal carcinomas [J]. World J Clin Oncol，2013，4（2）：47-51.

[5] Agarwal G，Carcache PJB，Addo EM，et al. Current status and contemporary approaches to the discovery of antitumor agents from higher plants [J]. Biotechnol Adv，2020，38：107337.

[6] Cai F，Chen M，Zha D，et al. Curcumol potentiates celecoxib-induced growth inhibition and apoptosis in human non-small cell lung cancer [J]. Oncotarget，2017，8（70）：115526-115545.

[7] Wang J，Chen X，Zeng J. Effect of curcumol on proliferation and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2 [J]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi，2011，27（7）：790-792.

[8] Li X，Liu H，Wang J，et al. Curcumol induces cell cycle arrest and apoptosis by inhibiting IGF-1R/PI3K/Akt signaling pathway in human nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells [J]. Phytother Res，2018，32（11）：2214-2225.

[9] Wang J，Wu J，Li X，et al. Identification and validation nucleolin as a target of curcumol in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. J Proteomics，2018，182：1-11.

[10] Rocha O，Ansari K，Doohan FM. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells：a review [J]. Food Addit Contam，2005，22（4）：369-378.

[11] Luo X，Li N，Zhao X，et al. DHRS2 mediates cell growth inhibition induced by Trichothecin in nasopharyngeal carcinoma [J]. J Exp Clin Cancer Res，2019，38（1）：300.

[12] Deng Q，Yu X，Xiao L，et al. Neoalbaconol induces energy depletion and multiple cell death in cancer cells by targeting PDK1-PI3-K/Akt signaling pathway [J]. Cell Death Dis，2013，4（9）：e804.

[13] Liu R，Dow Chan B，Mok KW，et al. Arnicolide D，from the herb Centipeda minima，is a therapeutic candidate against nasopharyngeal carcinoma [J]. Molecules，2019，24（10）：1908

[14] Zhuang M，Zhao M，Qiu H，et al. Effusanin E suppresses nasopharyngeal carcinoma cell growth by inhibiting NF-*κ*B and COX-2 signaling [J]. PLoS One，2014，9（10）：e109951.

[15] Lin L，Deng W，Tian Y，et al. Lasiodin inhibits proliferation of human nasopharyngeal carcinoma cells by simultaneous modulation of the Apaf-1/caspase，AKT/MAPK and COX-

2/NF-κB signaling pathways [J]. PLoS One，2014，9（5）：e97799.

[16] Wu K，Liu Y，Lv Y，et al. Ent-11α-hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic-acid induces apoptosis and cell cycle arrest in CNE-2Z nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Oncol Rep，2013，29（6）：2101-2108.

[17] Hung CM，Chang CC，Lin CW，et al. GADD45γ induces G_2/M arrest in human pharynx and nasopharyngeal carcinoma cells by cucurbitacin E [J]. Sci Rep，2014，4：6454.

[18] Sun M，Ye Y，Xiao L，et al. Anticancer effects of ginsenoside Rg_3（review）[J]. Int J Mol Med，2017，39（3）：507-518.

[19] Wang D，Wu C，Liu D，et al. Ginsenoside Rg_3 inhibits migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells and suppresses epithelial mesenchymal transition [J]. Biomed Res Int，2019，2019：8407683.

[20] Wu TR，Huang TT，Martel J，et al. Pinicolol B from Antrodia cinnamomea induces apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells [J]. J Ethnopharmacol，2017，201：117-122.

[21] Wang C，Cheng Y，Liu H，et al. Pectolinarigenin suppresses the tumor growth in nasopharyngeal carcinoma [J]. Cell Physiol Biochem，2016，39（5）：1795-1803.

[22] Lai W，Jia J，Yan B，et al. Baicalin hydrate inhibits cancer progression in nasopharyngeal carcinoma by affecting genome instability and splicing [J]. Oncotarget，2018，9（1）：901-914.

[23] Xia Y，Liu X，Zou C，et al. Garcinone C exerts antitumor activity by modulating the expression of ATR/Stat3/4E-BP1 in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Oncol Rep，2018，39（3）：1485-1493.

[24] Granato M，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.

[25] Huang DY，Dai ZR，Li WM，et al. Inhibition of EGF expression and NF-κB activity by treatment with quercetin leads to suppression of angiogenesis in nasopharyngeal carcinoma [J]. Saudi J Biol Sci，2018，25（4）：826-831.

[26] Wang TT，Chen ZZ，Xie P，et al. Isoliquiritigenin suppresses the proliferation and induced apoptosis via miR-32/LATS2/Wnt in nasopharyngeal carcinoma [J]. Eur J Pharmacol，2019，856：172352.

[27] Lee CC，Lin ML，Meng M，et al. Galangin induces p53-independent S-phase arrest and apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma cells through inhibiting PI3K-AKT signaling pathway [J]. Anticancer Res，2018，38（3）：1377-1389.

[28] Luo X，Hong L，Cheng C，et al. DNMT1 mediates metabolic reprogramming induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and reversed by grifolin in nasopharyngeal carcinoma [J]. Cell Death Dis，2018，9（6）：619.

[29] Anand P，Sundaram C，Jhurani S，et al. Curcumin and cancer：an "old-age" disease with an "age-old" solution [J]. Cancer Lett，2008，267（1）：133-164.

[30] Kuo CL，Wu SY，Ip SW，et al. Apoptotic death in curcumin-treated NPC-TW 076 human nasopharyngeal carcinoma cells is mediated through the ROS，mitochondrial depolarization and caspase-3-dependent signaling responses [J].Int J Oncol，2011，39（2）：319-328.

[31] Cai Y，Zhao L，Qin Y，et al. Resveratrol inhibits proliferation and induces apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cell line C666-1 through AMPK activation [J]. Pharmazie，2015，70（6）：399-403.

[32] Huang TT，Lin HC，Chen CC，et al. Resveratrol induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells via activation of multiple apoptotic pathways [J]. J Cell Physiol，2011，226（3）：720-728.

[33] Yang M，Yang Y，Cui H，et al. The natural compound gambogic acid radiosensitizes nasopharyngeal carcinoma cells under hypoxic conditions [J]. Tumori，2016，102（2）：135-143.

[34] Pang JS，Yen JH，Wu HT，et al. Gallic acid inhibited matrix invasion and AP-1/ETS-1-Mediated MMP-1 transcription in human nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Int J Mol Sci，2017，18（7）：1354.

[35] Zhang Z，Zhang Z，Li Q，et al. Shikonin induces necroptosis by reactive oxygen species activation in nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2Z [J]. J Bioenerg Biomembr，2017，49（3）：265-272.

[36] Ma L，Yang Y，Yin Z，et al. Emodin suppresses the nasopharyngeal carcinoma cells by targeting the chloride channels [J]. Biomed Pharmacother，2017，90：615-625.

[37] Pang MJ，Yang Z，Zhang XL，et al. Physcion，a naturally occurring anthraquinone derivative，induces apoptosis and autophagy in human nasopharyngeal carcinoma [J]. Acta Pharmacol Sin，2016，37（12）：1623-1640.

[38] Lin CC，Yang JS，Chen JT，et al. Berberine induces apoptosis in human HSC-3 oral cancer cells via simultaneous activation of the death receptor-mediated and mitochondrial pathway [J]. Anticancer Res，2007，27（5A）：3371-3378.

[39] Tsang CM，Cheung YC，Lui VW，et al. Berberine suppresses tumorigenicity and growth of nasopharyngeal carcinoma cells by inhibiting STAT3 activation induced by tumor associated fibroblasts [J]. BMC Cancer，2013，13：619.

[40] Chen C，Chen SM，Xu B，et al. In vivo and in vitro study on the role of 3，3'-diindolylmethane in treatment and prevention of nasopharyngeal carcinoma [J]. Carcinogenesis，2013，34（8）：1815-1821.

[41] Li F，Chen C，Chen SM，et al. ERK signaling mediates long-term low concentration 3，3'-diindolylmethane inhibited nasopharyngeal carcinoma growth and metastasis：an in vitro and in vivo study [J]. Oncol Rep，2016，35（2）：955-961.

[42] Luo P，Xia W，Morris-Natschke SL，et al. Vitepyrroloids A-D，2-cyanopyrrole-containing labdane diterpenoid alkaloids from the leaves of Vitex trifolia [J]. J Nat Prod，2017，80（5）：1679-1683.

[43] Cui H，Xu B，Wu T，et al. Potential antiviral lignans from the roots of Saururus chinensis with activity against Epstein-Barr virus lytic replication [J]. J Nat Prod，2014，77（1）：100-110.

[44] Zhou H，Liu Y，Wang C，et al. Triptolide inhibits Ep-

stein-Barr nuclear antigen 1 expression by increasing sensitivity of mitochondria apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells [J]. J Exp Clin Cancer Res，2018，37（1）：192.

[45] Wu X，Wang L，Wang H，et al. Steroidal saponins from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. Phytochemistry，2012，81：133-143.

[46] Wélé A，Ndoye I，Zhang Y，et al. Glaucacyclopeptide A from the seeds of *Annona glauca* [J]. Phytochemistry，2005，66（10）：1154-1157.

[47] Shaheen F，Rizvi TS，Musharraf SG，et al. Solid-phase total synthesis of cherimolacyclopeptide E and discovery of more potent analogues by alanine screening [J]. J Nat Prod，2012，75（11）：1882-1887.

[48] Perri F，Scarpati GDV，Caponigro F，et al. Management of recurrent nasopharyngeal carcinoma：current perspectives [J]. Onco Targets Ther，2019，12：1583-1591.

[49] Daker M，Ahmad M，Khoo AS. Quercetin-induced inhibition and synergistic activity with cisplatin-a chemotherapeutic strategy for nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Cancer Cell Int，2012，12（1）：34.

[50] Kuhlmann MK，Horsch E，Burkhardt G，et al. Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by the bioflavonoid quercetin [J]. Arch Toxicol，1998，72（8）：536-540.

[51] Guan S，Wei J，Huang L，et al. Chemotherapy and chemo-resistance in nasopharyngeal carcinoma [J]. Eur J Med Chem，2020，207：112758.

[52] Cruz-Bermúdez A，Laza-Briviesca R，Vicente-Blanco RJ，et al. Cisplatin resistance involves a metabolic reprogramming through ROS and PGC-1α in NSCLC which can be overcome by OXPHOS inhibition [J]. Free Radic Biol Med，2019，135：167-181.

[53] Hsieh MJ，Wang CW，Lin JT，et al. Celastrol，a plant-derived triterpene，induces cisplatin-resistance nasopharyngeal carcinoma cancer cell apoptosis though ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathway [J]. Phytomedicine，2019，58：152805.

[54] Liu YT，Chuang YC，Lo YS，et al. Asiatic acid，extracted from *Centella asiatica* and induces apoptosis pathway through the phosphorylation p38 mitogen-activated protein kinase in cisplatin-resistant nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Biomolecules，2020，10（2）：184.

[55] Zhou F，Hu J，Dai N，et al. Berberine and ginsenoside Rg3 act synergistically via the MAPK/ERK pathway in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. J Funct Foods，2020，66：103802.

[56] Shao M，Lou D，Yang J，et al. Curcumin and wikstroflavone B，a new biflavonoid isolated from Wikstroemia indica，synergistically suppress the proliferation and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells via blocking FAK/STAT3 signaling pathway [J]. Phytomedicine，2020，79：153341.

[57] Momtazi-Borojeni AA，Ghasemi F，Hesari A，et al. Anti-cancer and radio-sensitizing effects of curcumin in nasopharyngeal carcinoma [J]. Curr Pharm Des，2018，24（19）：2121-2128.

[58] Lun SW，Cheung ST，Lo KW. Cancer stem-like cells in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma [J]. Chin J Cancer，2014，33（11）：529-538.

[59] Peng Y，He G，Tang D，et al. Lovastatin inhibits cancer stem cells and sensitizes to chemo-and photodynamic therapy in nasopharyngeal carcinoma [J]. J Cancer，2017，8（9）：1655-1664.

[60] Chen L，Chan LS，Lung HL，et al. Crucifera sulforaphane（SFN）inhibits the growth of nasopharyngeal carcinoma through DNA methyltransferase 1（DNMT1）/Wnt inhibitory factor 1（WIF1）axis [J]. Phytomedicine，2019，63：153058.

[61] Messick TE，Smith GR，Soldan SS，et al. Structure-based design of small-molecule inhibitors of EBNA1 DNA binding blocks Epstein-Barr virus latent infection and tumor growth [J]. Sci Transl Med，2019，11（482）：eaau5612.

[62] Du Y，Yu J，Du L，et al. Cordycepin enhances Epstein-Barr virus lytic infection and Epstein-Barr virus-positive tumor treatment efficacy by doxorubicin [J]. Cancer Lett，2016，376（2）：240-248.

[63] Yuen KS，Wang ZM，Wong NM，et al. Suppression of Epstein-Barr virus DNA load in latently infected nasopharyngeal carcinoma cells by CRISPR/Cas9 [J]. Virus Res，2018，244：296-303.

[64] Raab-Traub N. Nasopharyngeal carcinoma：an evolving role for the epstein-barr virus [J]. Curr Top Microbiol Immunol，2015，390（Pt 1）：339-363.

[65] Liu Y，Jiang Q，Liu X，et al. Cinobufotalin powerfully reversed EBV-miR-BART22-induced cisplatin resistance via stimulating MAP2K4 to antagonize non-muscle myosin heavy chain IIA/glycogen synthase 3β/β-catenin signaling pathway [J]. EBioMedicine，2019，48：386-404.

[66] Hau PM，Lung HL，Wu M，et al. Targeting epstein-barr virus in nasopharyngeal carcinoma [J]. Front Oncol，2020，10：600.

[67] Liu W，Zhang B，Chen G，et al. Targeting miR-21 with sophocarpine inhibits tumor progression and reverses epithelial-mesenchymal transition in head and neck cancer [J]. Mol Ther，2017，25（9）：2129-2139.

[68] Zheng Z，Qu JQ，Yi HM，et al. MiR-125b regulates proliferation and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma by targeting A20/NF-κB signaling pathway [J]. Cell Death Dis，2017，8（6）：e2855.

[69] Yang Y，Li Q，Guo L. MicroRNA122 acts as tumor suppressor by targeting TRIM29 and blocking the activity of PI3K/AKT signaling in nasopharyngeal carcinoma in vitro [J]. Mol Med Rep，17（6）：8244-8252.

[70] Liu Y，Zhao R，Wang H，et al. MiR-141 is involved in BRD7-mediated cell proliferation and tumor formation through suppression of the PTEN/AKT pathway in nasopharyngeal carcinoma [J]. Cell Death Dis，2016，7（3）：e2156.

[71] Shi B，Wang Y，Yin F，et al. MALAT1/miR-124/Capn4 axis regulates proliferation，invasion and EMT in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Cancer Biol Ther，2017，18（10）：792-800.

（收稿日期：2021-09-29；修回日期：2021-11-30）

慢性阻塞性肺疾病患者使用吸入剂用药依从性的研究进展

刘冀衡[1]，谢倩[2]，黄丽[3]，阎昱升[1]，吴璐[1]，汤渝玲[1]，刘晓慧[1*]（1. 长沙市第一医院，长沙　410005；2. 怀化市中医院，湖南　怀化　418099；3. 株洲市中心医院，湖南　株洲　412007）

摘要：随着人口老龄化的进程，慢性阻塞性肺疾病（简称慢阻肺）的发病率逐年增加。慢阻肺稳定期药物治疗旨在预防与控制症状，减少急性加重的程度与频率，提高运动耐力与生活质量。世界卫生组织将吸入治疗推荐为慢阻肺的首选疗法，使用吸入剂的依从性又决定了慢阻肺稳定期的控制情况。本文就慢阻肺患者使用吸入剂的现状、影响因素及干预措施等进行综述。

关键词：慢性阻塞性肺疾病；吸入剂；用药依从性

中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)05-1113-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.025

Advances in medication compliance of inhalers in patients with chronic obstructive pulmonary disease

LIU Ji-heng[1], XIE Qian[2], HUANG Li[3], YAN Yu-sheng[1], WU Lu[1], TANG Yu-ling[1], LIU Xiao-hui[1*]

(1. *First Hospital of Changsha*, *Changsha* 410005; 2. *Huaihua Hospital of Traditional Chinese Medicine*, *Huaihua Hunan* 418099; 3. *Zhuzhou Central Hospital*, *Zhuzhou Hunan* 412007)

Abstract: With the aging of the population, the incidence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is increasing year by year. Drug treatment in the stable stage of COPD is to prevent and control symptoms, reduce the degree and frequency of acute exacerbation, and improve exercise endurance and quality of life. The World Health Organization recommends inhalation as the first choice for COPD, and the compliance of inhalers determines the control of COPD in the stable period. This paper reviewed the current situation, influencing factors and interventions of inhalants in patients with COPD.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease; inhalers; medication compliance

随着人口老龄化的进程，慢性阻塞性肺疾病（简称慢阻肺）的发病率逐年增加。预测到2030年，慢阻肺将成为全球第三大死因[1]。2017年流行病学调查结果显示，我国慢阻肺患者数接近1亿[2]。2013年我国慢阻肺总死亡人数约为91万，单病种排名第三位，并且慢阻肺所致死亡占我国全部死因的11%；我国慢阻肺总死亡人数占全球慢阻肺死亡总人数的31.1%[3]。慢阻肺患者每年发生0.5～3.5次的急性加重，慢阻肺急性加重是其死亡的重要因素[4]。慢阻肺稳定期药物治疗旨在预防与控制症状，减少急性加重的程度与频率，提高运动耐力与生活质量。与传统的口服和静脉给药等方式相比，吸入用药由于直接作用于肺部，起效迅速、疗效佳、安全性好，具有全身用药不可替代的临床地位[5]。慢性阻塞性肺疾病全球倡议（Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease，GOLD）和我国指南均推荐吸入疗法作为慢阻肺稳定期患者的一线基础治疗方法[1，6]。吸入用药虽然有明确的优势，由于装置复杂、患者的接受程度不一，目前慢阻肺患者使用吸入剂的用药依从性并不佳。本文就慢阻肺患者吸入制剂用药依从性现状、影响因素及干预方法进行综述，旨在为今后临床提高慢阻肺患者吸入制剂疗效提供依据。

1　慢阻肺患者吸入制剂用药依从性评估方法及现状

1.1　用药依从性概念

依从性是指患者的行为与医嘱的一致性，它反映了患者和医疗工作者之间的关系[7]。依从性主要表现在两个方面，分别为对医疗干预措施的依从和行为方式改变的依从。

基金项目：湖南省卫生健康委科研计划课题项目（No.20200216）。

作者简介：刘冀衡，男，硕士，副主任医师，主要从事乳腺癌、消化道肿瘤和肺癌等实体肿瘤的化疗和综合治疗，email：634471196@qq.com　*通信作者：刘晓慧，女，硕士，主任药师，主要从事抗感染药物、呼吸系统药物合理使用，email：glycerinum@163.com

1.2 用药依从性评估方法

目前患者依从性评估方法分为主观和客观监测评估方法，客观监测评估方法如测量药物及其代谢物的浓度，推算服用药物量，或利用药物治疗监测系统等；主观监测评估方法如直接观察药物治疗效果，自我报告法等[7-8]。依从性评价指标接近 100% 表示患者依从性良好，小于 80% 则表示依从性不佳。国内外针对慢阻肺吸入剂研究主观评估法包括 Morisky 依从性量表、TAI 依从性量表，客观评价指标包括计算服用药物量、使用用药监测器等[9-15]。

1.2.1 监测药物浓度 Feinstein[9] 提出通过测定药物及尿液中代谢物的浓度，借以评估患者的用药依从性。但是浓度测定方法通常分析步骤复杂，费用高昂，结果易受饮食因素影响，同时部分药物及其代谢物不易批量监测，其次患者非检测日的用药无法很好地监测，因此该方法在实际应用中较为局限，不能准确地反映所有患者的依从性[10]。

1.2.2 计算药物用量 依从性的公式为：实际服药量 / 医嘱服药量，通过比较患者服用药物量与医师处方的日用量及用药周期来计算依从性，如计算患者一段时间内一瓶吸入剂的剩余量。这种方法可以定量评估依从性，较为客观准确，但是要求完整保存医疗档案或服药记录。此外，由于中间环节难以控制，因此，本法最好实行单盲法，避免患者通过其他方法自行处理药品从而过高估计依从性[11]。

1.2.3 药物治疗监测系统 是指应用现代技术，在药瓶上安装微电子系统，通过记录患者打开瓶盖取药时间和取药频率来监测患者的依从性。Andrejak 等[12] 用电子监测系统比较了高血压患者每日一次服用群多普利和每日两次服用卡托普利时漏服药发生情况、降压效果、安全性以综合评价依从性高低。这种方法简单有效，曾被认为是依从性评估的金标准，但存在费用较高、不便于携带、不适合大样本监测的缺点，单盲可以提高此法的测量准确性。

1.2.4 评价治疗效果 该方法是根据是否达到治疗目标来评估依从性，治疗后达不到目标即提示依从性不好。此方法更适合单独用药方案的患者，且这个评估方法受到个体差异及主观因素影响，药品不良反应等其他原因可能会导致病情没有改善甚至恶化，所以不能提供客观准确的信息[13]。

1.2.5 自我报告法 自我报告法的模式有问卷调查、电话随访、访谈等，较为简单易行，能快速评估患者的依从性，并且比较容易找出患者依从性差的原因，从而及时制订相应的干预方法，使用最为广泛，但是可能因为患者的回忆偏差、主观因素（如逃避心理等）高估患者的依从性，因此沟通技巧极为重要。临床常用评价依从性量表多参考 Morisky[14-15] 的问卷，即包括 4 个问题：① 您是否有忘记服药的经历；② 您是否有时不注意服药；③ 当您自觉症状改善时，是否曾停药；④ 当您自觉症状恶化时，是否曾停药。当答案全为肯定时，依从性不好，否则为依从性好。

1.3 用药依从性现状

尽管吸入剂对慢阻肺患者的稳定期治疗至关重要，但临床研究表明患者的依从性普遍较差。国外研究中患者完全依从率只有 33.6%[16]，国内研究表明，哮喘或慢阻肺患者吸入剂使用依从率为 19.83%[17]，院外依从率为 45.57%[18]。王玉等[19] 调查发现 30 例使用吸入剂的慢阻肺患者中，依从性好的患者占 63.9%。林小玉等[20] 调查 60 例使用吸入剂的患者发现 70% 的患者使用干粉吸入剂依从性差。李材忠[18] 对 790 例使用吸入剂治疗的患者进行分析，发现 45.57% 的患者依从性较差。

2 慢阻肺患者吸入剂用药依从性的影响因素

2.1 疾病因素

病程是影响慢阻肺患者治疗依从性的危险因素。国内研究表明，随着病程延长，慢阻肺患者对于使用吸入剂改善病情的预期逐渐降低，不断失去耐心和信心，致使患者停药或不按医嘱剂量、时间用药，依从性不佳[19，21]。一项来自越南的调查结果显示，吸入剂使用不当和依从性差与慢阻肺患者呼吸困难评分高、住院时间较长和过去 12 个月内急性加重次数多有关[22]。

2.2 患者因素

研究表明，慢阻肺患者使用吸入剂受到个体因素影响，如年龄，受教育程度，经济状况，心理因素，对疾病缺乏认识，与医务人员缺乏信任、沟通，吸入技术掌握情况等[11]。一方面，慢阻肺患者多为老年男性，由于频繁住院存在经济负担，理解力和记忆力较差，主观认为吸入剂无效或因价格昂贵而拒绝使用吸入剂，或者自行减少用药次数来节省药费等；另一方面，吸入剂使用时可能存在上药操作错误、吸入前未吐气吸力不够导致药粉易沉积于咽喉部、吸入速度过快以及吸入药物后未屏气等问题[17，19]。一项针对哮喘和慢阻肺患者吸入技术错误的临床荟萃分析显示，50% 以上的患者在操作过程中至少存在一项错误，且慢阻肺患者出现错误的频次高于哮喘患者[23]。吸入技术错误不仅会影响药物疗效，而且会导致并发症的发生，增加患者计划外医疗活动（如口服激素、使用抗菌药物）和医疗费用[24]。GOLD2020 指出吸入装置使用技术需要定期评估[1]。

2.3 药物因素

慢阻肺患者使用吸入剂的依从性亦受到复杂的药物因素影响，如药物与装置、治疗方案复杂程度、不良反应、可及性等[25]。① 药物的药理作用各不相同，在慢阻肺治疗中的应用也有区别，GOLD 指南指出慢阻肺稳定期患者使用吸入用糖皮质激素时，需综合考虑患者的急性加重发作次数、血嗜酸粒细胞计数水平、是否合并哮喘、分枝杆菌感染等因素，如不加考虑，患者出现了不良反应没有及时处理或更换药物，都可能影响患者用药依从性[1]。②《稳定期慢性气道疾病吸入装置规范应用中国专家共识》指出，干粉吸入剂的药物输出率与吸气的流速有关，因此，对于吸气流速不足的患者使用干粉剂时疗效会受限，从而影响吸入的依从性[26]。有研究表明使用准纳器的患者依从性高于使用都保吸入装置者，考虑可能与装置操作的难易程度相关[27]。③ 使用两个以上的吸入剂与单一吸入剂相比，治疗中断发生率更高，患者依从性更差[28]。

3 提升慢阻肺患者用药依从性的相关研究

医务人员在吸入治疗过程中应起主导作用，包括指导吸入装置的选择、吸入技术的培训和随访评估以及吸入装置的转换等环节。

3.1 疾病及用药宣教

医务人员应该加强对慢阻肺患者及其家属的宣教，使患者对慢阻肺病情有基本的了解，认识到长期规律使用吸入剂的必要性及重要性，同时应对患者进行用药指导。研究结果表明，健康教育讲座对患者的依从性有显著影响，有利于患者认识到慢阻肺稳定期的用药控制对疾病症状缓解和预防急性发作的重要作用，从而提高患者的用药依从性[27]。另外，仅在住院期间的宣教作用有限，出院后长期随访的院外用药教育更有利于患者进一步掌握吸入制剂使用方法，提高用药依从性[29]，如定期电话随访等。

3.2 指导吸入装置的选择

GOLD 指南指出，对于不同类型、不同严重程度的慢阻肺患者推荐使用不同的吸入剂治疗，这对于慢阻肺患者使用吸入剂的疗效至关重要。《稳定期慢性气道疾病吸入装置规范应用中国专家共识》亦指出：吸入剂选择应个体化，需要综合考虑患者的健康状况、使用装置的能力、最大吸气流速、手口协调操作能力、可及性、价格等各方面因素。医务人员在指导吸入剂选择时，首先需告知患者认识疾病，了解不同吸入剂的作用；其次应结合患者使用装置的能力、吸气流速和手口协调操作能力选择适宜的吸入剂：如患者吸气流速足够，手口协调好时不同吸入剂均可选用，如手口协调不佳时，可选用干粉吸入剂、软雾吸入剂，此时压力定量气雾剂需连接储雾罐使用；如患者吸气流速不足，手口协调好时可选用压力定量气雾剂、软雾吸入剂，手口协调能力不佳时仍可使用软雾吸入剂，或选择雾化或压力定量气雾剂连接储雾罐使用；最后应指导患者精确吸入药物，防止药物量过多或使用不足带来的负面影响[26]。

3.3 提供用药教育方式

国外研究发现，通过进行认知功能评估，选择合适的吸入剂以及制订教育计划，可以帮助慢阻肺患者掌握有效的吸入技能，提升治疗依从性[30-31]。可以通过口头宣教、操作示范、健康教育视频、信息回授法等指导方法提高患者的依从性。

3.3.1 口头宣教 以口头语言告知患者吸入剂的用法，如结合吸入剂说明书进行讲解，这种方法灵活简便，随时随地都可运用，但是比较抽象，患者可能难以理解而无法正确掌握用法。

3.3.2 操作示范 由医务人员现场向患者简单地讲授吸入剂的操作理论与技术规范，然后进行操作示范，利用演示方法把吸入剂用法的步骤、注意事项等呈现给患者，患者反复模仿练习，直至完全掌握吸入剂的用法。医务人员在现场做指导，可随时纠正患者吸入操作中的错误表现，如果仅通过一两次的教学，患者可能无法形成深刻的印象，且出院后无法获得医务人员的操作指导，患者可能会忘记吸入操作中的一些细节从而影响吸入剂疗效或者发生不良反应[27]。

3.3.3 健康教育视频 预先录制规范操作的吸入剂用药视频，对患者进行教学，这种方法能充分调动老年患者视、听、感官功能，画面感与动态感强，易于在老年患者头脑中留下深刻、鲜明的记忆痕迹，患者下载资料后可反复回放揣摩、模拟演练、对照修正，解决老年患者技能学习实践能力退化、遗忘度高的问题[32]。

3.3.4 信息回授法 信息回授法是指通过让被教育对象对医务工作者教育信息加以知识复述与行为回示，以评估其知识技能掌握程度，并将其作为进一步教育方案的制订和实施依据，是被美国国家质量论坛认可的 34 种安全有效的教育方式之一[33]。这种方法医务人员可依据评估结果，针对患者模糊、错误、偏差的部分反复进行循环式指导示范，帮助老年患者在专业人员指导下不断修正吸入剂使用错误，掌握吸入技巧。

3.4 用药依从性监测

定期对患者吸入剂的使用情况进行检查，评估其用药依从性，对依从性差的患者及时找出其原因并实施干预。近年来，国内外研究致力于研究改进

的用药教育模式，利用互联网 APP 小程序、用药监测器等物联网技术实时监测，以评估患者使用吸入剂的依从性[30-31, 34-40]。罗艳等[34]对 60 例轻、中度哮喘患者分组，观察组采用都保训练哨联合健康跟踪干预，对照组采用常规方法，比较两组患者夜间症状控制情况、最大呼气流量、哮喘控制测试（ACT）评分、哮喘依从性量表（MARS-A）评分等来评估疗效、依从性，各指标观察组均优于对照组，两者的差异有统计学意义。徐钦涛[35]通过对 98 例患者分组，干预组实施药学监护，分析用药依从性，结果表明干预组患者基础知识、正确用药、生活方式、运动锻炼方面的认知程度高于对照组，圣乔治呼吸问卷（SGRQ）评分显著低于对照组，但两组肺功能差异无统计学意义。

4 小结

综上所述，在慢阻肺稳定期管理中，提升慢阻肺患者使用吸入剂的依从性迫在眉睫。患者依从性受到包括患者本人、疾病、家庭、医务人员等多方面因素的影响，各项研究表明慢阻肺患者用药依从性普遍较低，这需要从患者、患者家属、医务人员及社会等方面制订干预措施，以便更好地提高患者的依从性和生活质量。医务人员需要制订切实可行的用药教育计划，加强健康宣教，开展依从性监测与随访，从而帮助慢阻肺患者提升吸入剂治疗效果，降低慢阻肺急性加重发作，使慢阻肺患者获益。

参考文献

[1] Global initiative for chronic obstructive lung disease. Global strategy for the diagnosis，management，and prevention of chronic obstructive pulmonary disease（2021 REPORT）[EB/OL]. [2021-01-20]. https：//goldcopd. org/goldreports/.

[2] Chan KY，Li X，Chen W，et al. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease（COPD）in China in 1990 and 2010 [J]. J Glob Health，2017，7（2）：020704.

[3] Yin P，Wang H，Vos T，et al. A subnational analysis of mortality and prevalence of COPD in China from 1990 to 2013：findings from the global burden of disease study 2013 [J]. Chest，2016，150（6）：1269-1280.

[4] Lin J，Wan W，Chen P，el a1. Prevalence and risk factors of asthma in mainland China：the CARE study [J]. Resp Med，2018，137（4）：48-54.

[5] Newman SP. Inhaler treatment options in COPD [J]. Eur Resp Rev，2005，14（96）：102-108.

[6] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组，中国医师协会呼吸医师分会慢性阻塞性肺疾病工作委员会 . 慢性阻塞性肺疾病诊治指南（2021 年修订版）[J]. 中华结核和呼吸杂志，2021，44（3）：170-205.

[7] Erwin H，Bragg-Gresham JL，Rayner HC，et al. Haemodialysis prescription，adherence and nutritional indicators in five European countries：results from the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study（DOPPS）[J]. Nephrol Dial Transplant，2004（1）：100-107.

[8] Geest SD，Vanhaecke J. Methodological issues in transplant compliance research [J]. Transplant Proc，1999，31（4A）：81S-83S.

[9] Feinstein AR. On white-coat effects and the electronic monitoring of compliance [J]. Arch Intern Med，1990，150（7）：1377-1378.

[10] 沈爱宗，陈飞虎，陈礼明 . 患者治疗依从性的研究进展 [J]. 医药导报，2005，24（8）：58-60.

[11] 马莉莉，管晓东 . 依从性评价方法研究综述 [J]. 中国药事，2016，30（4）：389-390.

[12] Andrejak M，Genes N，Vaur L，et al. Electronic pillboxes in the evaluation of antihypertensive treatment compliance：comparison of once daily versus twice daily regimen [J]. Am J Hypertens，2000，13（2）：184-190.

[13] Vermeire E，Hearnshaw H，Van Royen P，et al. Patient adherence to treatment：three decades of research. A comprehensive review [J]. J Clin Pharm Ther，2001，26（5）：331-342.

[14] Morisky DE，Green LW，Levine DM. Concurrent and predictive validity of a self-reported measure of medication adherence [J]. Medical Care，1986，24（1）：67-74.

[15] 费力娟，吴淑芬，戈丹艳 . 护理质量敏感指标对提高 COPD 患者正确使用吸入剂的影响 [J]. 实用临床护理学电子杂志，2020，5（19）：31.

[16] Humenberger M，Horner A，Labek A，et al. Adherence to inhaled therapy and its impact on chronic obstructive pulmonary disease（COPD）[J]. BMC Pul Med，2018，18（1）：163.

[17] 张素平，黄巧妹，廖洪娟，等 . 哮喘 / 慢性阻塞性肺疾病患者吸入剂用药依从性调查 [J]. 中国医院药学杂志，2018，38（7）：777-780.

[18] 李材忠 . 慢性阻塞性肺疾病稳定期患者院外使用吸入制剂的依从性分析 [J]. 临床肺科杂志，2018，23（8）：1455-1459.

[19] 王玉，苏丹，林莹 . 慢性阻塞性肺疾病患者使用吸入制剂的依从性分析与评价 [J]. 中国医院用药评价与分析，2020，20（1）：114-117.

[20] 林小玉，陈群 . COPD 患者使用干粉吸入剂依从性影响因素及护理对策 [J]. 齐齐哈尔医学院学报，2015，36（3）：449-450.

[21] 林佳媛，何乐，徐斌，等 . 慢性阻塞性肺疾病患者吸入制剂依从性调查 [J]. 临床肺科杂志，2017，22（4）：658-661.

[22] Ngo C，Phan D，Vu G，et al. Inhaler technique and adherence to inhaled medications among patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease in Vietnam [J]. Int J Environ Res Public Health，2019，16（2）：185.

[23] Chrystyn H，Job V，Sharma R，et al. Device errors in asthma and COPD：systematic literature review and meta-analysis [J]. Npj Prim Care Resp M，2017，27（1）：22.

[24] Lewis A，Torvinen S，Dekhuijzen PN，et al. The economic burden of asthma and chronic obstructive pulmonary disease and the impact of poor inhalation technique with commonly prescribed dry powder inhalers in three European countries [J]. BMC Health Serv Res，2016，16：251.

[25] Mika J，Backer V，Hedegaard M，et al. Adherence to inhaled therapies，health outcomes and costs in patients with asthma

and COPD [J]. Resp Med，2013，107（10）：1481-1490.
[26] 中国医学装备协会呼吸病学专委会吸入治疗与呼吸康复学组 . 稳定期慢性气道疾病吸入装置规范应用中国专家共识 [J]. 中华结核和呼吸杂志，2019，42（4）：241-253.
[27] 姚莉，李茜，范芳芳，等 . 慢性气道疾病患者使用干粉吸入制剂依从性的 Logistic 回归分析 [J]. 中国医院药学杂志，2018，38（4）：399-402.
[28] Yu AP，Guérin A，Ponce de Leon D，et al. Therapy persistence and adherence in patients with chronic obstructive pulmonary disease：multiple versus single long-acting maintenance inhalers [J]. J Med Econ，2011，14：486-496.
[29] 马庆阳，周捷 . 临床药师在吸入制剂用药教育实践的体会 [J]. 医学信息，2014，27（9）：8.
[30] Takaku Y，Kurashima K，Ohta C，et al. How many instructions are required to correct inhalation errors in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease? [J]. Resp Med，2017，123（2）：110-115.
[31] Turan O，Turan PA，Mirici A. Parameters affecting inhalation therapy adherence in elderly patients with chronic obstructive lung disease and asthma [J]. Geriatr Gerontol Int，2017，17（6）：999-1005.
[32] 李艺晨，刘雪玉，黄媛媛 . 微视频对慢阻肺患者使用吸入剂掌握的应用研究 [J]. 实用临床护理学电子杂志，2020，5（7）：69.
[33] Hyde YM，Kautz DD. Enhancing health promotion during rehabilitation through information-giving，partnership-building，and teach-back [J]. Rehabil Nurs，2014，39（4）：178-182.
[34] 罗艳，李赵兰，王婷婷 . 都保训练哨联合跟踪健康干预在哮喘患者使用都保吸入剂后的临床效果观察 [J]. 重庆医学，2017，46（33）：4639-4640.
[35] 徐钦涛 . 药学监护对慢性阻塞性肺疾病患者用药依从性和认知程度及预后的影响 [J]. 临床合理用药杂志，2016，9（5C）：28-29.
[36] 陆卫芬，陈文宇，方志仙，等 . 呼吸慢病管理平台在改善稳定期 COPD 患者吸入剂使用效率中的应用研究 [J]. 中国现代医生，2019，57（28）：80-83.
[37] 潘兴，王黎青，王慧铃 . 患者教育对慢性阻塞性肺疾病患者干粉吸入剂使用正确率及依从性的影响 [J]. 临床肺科杂志，2019，24（11）：1952-1956.
[38] 张宁，李祥美，李慧，等 . 可视化教育与管理对 COPD 患者使用干粉吸入剂效果的影响 [J]. 齐鲁护理杂志，2019，25（15）：78-80.
[39] 张楠，张娜，闫阔，等 . 医联体药师团队协作建立慢性气道疾病患者长期用药安全评估管理模式的实践 [J]. 中国药房，2018，29（11）：1453-1457.
[40] 李爱菊 . 微信随访对支气管哮喘患者治疗依从性的影响 [J]. 当代护士（专科版），2019，26（10）：35-37.

（收稿日期：2021-11-18；修回日期：2021-12-02）

降低万古霉素肾毒性的药物及作用机制研究进展

潘坤明[1]，蒋啸天[2]，徐辰祺[2]，许青[1]，李晓宇[1]，丁小强[2*]，吕迁洲[1*]（1. 复旦大学附属中山医院药剂科，上海　200032；2. 复旦大学附属中山医院肾内科，上海　200032）

摘要：万古霉素是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的首选药，但万古霉素导致肾毒性（VIN）限制了其临床应用。目前依然缺乏可应用于临床的 VIN 保护剂。抗氧化剂及减少万古霉素肾脏聚集的药物可能具有降低 VIN 的作用。本综述对 VIN 发生机制、降低 VIN 的可能机制及潜在药物等最新研究进行总结归纳，为促进 VIN 保护剂的研发和临床应用提供参考。

关键词：万古霉素；肾毒性；保护剂；氧化应激；肾脏转运蛋白
中图分类号：R978.1，R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)05-1117-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.026

Research progress in drugs reducing vancomycin nephrotoxicity and related mechanism

PAN Kun-ming[1], JIANG Xiao-tian[2], XU Chen-qi[2], XU Qing[1], LI Xiao-yu[1], DING Xiao-qiang[2*], LYU Qian-zhou[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *Zhongshan Hospital*, *Fudan University*, *Shanghai* 200032; 2. *Department of Nephrology*, *Zhongshan Hospital*, *Fudan University*, *Shanghai* 200032)

基金项目：复旦大学附属中山医院科研项目（No.2018ZSQN30）；2021 中国药学会医院药学专业委员会医院药学科研专项青年基金（No. CPA-Z05-ZC-2021-002）。

作者简介：潘坤明，男，硕士，主管药师，主要从事药物肾损伤方面的研究，email：panxso@163.com　*通信作者：丁小强，男，教授，主要从事急性肾损伤研究，email：ding.xiaoqiang@zs-hospital.sh.cn；吕迁洲，男，教授，主要从事医院药学研究，email：lv.qianzhou@zs-hospital.sh.cn

Abstract: Vancomycin is the first choice for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. However, vancomycin induced nephrotoxicity (VIN) limits its clinical application. There is still a lack of VIN protective drugs in clinical practice. Agents inhibiting oxidative stress and/or reducing renal accumulation of vancomycin may be protective. This review summarized the latest research in the mechanism of VIN, possible mechanism of drug reducing VIN, and potential protective drugs to promote the development and clinical application of drugs against VIN.

Key words: vancomycin; nephrotoxicity; protective agent; oxidative stress; renal transporter

万古霉素为三环糖肽类抗生素，于 1958 年获批，对多种革兰氏阳性菌有活性，是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（methicillin-resistant staphylococcus aureus，MRSA）感染的首选药[1]。但万古霉素导致的肾毒性（vancomycin induced nephrotoxicity，VIN）限制了其临床应用[2]。我国医疗机构中万古霉素使用比例占万古霉素、利奈唑胺和替拉考宁总数的 31.4% ～ 94.4%[3]。2021 年一项中国人群全国多中心药物导致急性肾损伤（acute kidney injury，AKI）横断面调查显示：单个药物排序中，万古霉素是我国第二大致肾损伤药物[4]。

目前降低 VIN 的措施主要为加强抗菌药物管理和开展治疗药物浓度监测，依然缺乏可应用于临床的 VIN 保护剂[5]。了解降低 VIN 的药物及其作用机制，对 VIN 的防治具有重要意义。VIN 确切机制尚不明确，大多数研究认为与氧化应激介导的肾小管损伤以及万古霉素在肾脏聚集有关[5-6]。因此，抗氧化剂及减少万古霉素肾脏聚集的药物可能具有降低 VIN 的作用。笔者对近年来降低 VIN 的药物及其作用机制研究进展进行综述，以期为促进 VIN 保护药的研发和临床应用提供参考。

1 VIN 的定义

大多数研究将 VIN 定义为在没有其他原因可解释的情况下，血清肌酐（serum creatinine，Scr）浓度增加≥ 0.5 mg • dL^{-1}，或连续每日测得的 Scr 较基线增加 50%，或连续两日肌酐清除率较基线下降 50%[7]。2004 年急性透析质量方案开发协作组制定了 AKI 的诊断与分类系统，即 RIFLE 标准（风险 Risk、损伤 Injury、衰竭 Failure、丧失 Loss 和终末期肾脏病 End-Stage Renal Disease）[8]。2007 年急性肾损伤工作组（acute kidney injury network，AKIN）对 RIFLE 标准稍作修改，形成了 AKIN 标准[9]。2012 年改善全球肾脏病预后组织对 AKI 定义进行了统一规范，将 RIFLE/AKIN 标准定义为 AKI 诊断的正式标准，而此前关于 AKI 的定义至少有 35 种[10]。据此，目前建议对 VIN 采用敏感性更高的定义，即在无其他原因可解释的情况下，连续使用万古霉素数日后 Scr 在 48 h 内升高≥ 0.3 mg • dL^{-1}[11]。

2 VIN 的发生机制

VIN 早期主要是由于万古霉素制剂工艺不佳，杂质含量较高（纯度只有 70% 左右）导致的[5]。通过不断地改进纯化工艺，目前制剂中万古霉素 B（活性部分）的含量达到 90% ～ 95%，肾毒性显著降低[1]。我国人群 VIN 横断面调查显示其发生率在 14.3% ～ 16.2%[12-13]。多种因素会影响 VIN 的发生，在合并风险因素时，VIN 发生率高达 43%。发生率差异大可能的原因是不同研究采用的 VIN 定义、研究人群的疾病严重程度以及研究人群的合并风险因素存在差异等[5，14-15]。VIN 可能是多种因素导致的。根据患者肾脏活检病理报告显示，VIN 主要为急性肾小管坏死（acute tubular necrosis，ATN），罕见急性间质性肾炎（acute interstitial nephritis，AIN）[16-19]。万古霉素导致 ATN 是剂量依赖性的，可能与万古霉素诱导的肾小管上皮细胞氧化应激损伤[20]、细胞自噬[21]和阻塞性管型形成[22]等机制有关[23]。万古霉素导致的 AIN 可能是细胞介导的超敏反应[17]。肾活检病理表现为肾间质水肿，嗜酸性粒细胞、肥大细胞、浆细胞、淋巴细胞和巨噬细胞浸润[19，23]。

3 降低 VIN 的药物及其机制研究

目前对于降低 VIN 药物的探索主要在临床前研究阶段，包括抑制万古霉素介导的氧化应激、细胞自噬；减少万古霉素肾脏聚集、促进万古霉素肾脏排泄；抑制肾脏血管收缩等多种机制[21，23-26]。目前对于 VIN 的临床研究以回顾性研究为主，研究药物均为抗氧化剂。根据文献检索，已发表的随机对照试验（RCT）仅一项[27]。

3.1 临床前研究中药物降低 VIN 及其作用机制

3.1.1 VIN 动物及细胞模型　体内实验大多采用大鼠构建 VIN 模型。万古霉素剂量大多采用 200 mg/（kg • d）q 12h 或 400 mg/（kg • d）qd；给药方式以腹腔注射为主；一般连续给药 7 d。给药结束后收集大鼠血液、尿液、肾组织等样本检测肾功能指标变化情况，并取大鼠肾组织病理切片观

察肾脏损伤情况。肾毒性的指标一般为 Scr、血尿素氮（blood urea nitrogen，BUN），以及肾脏病例切片中细胞的损伤情况等。体外实验大多采用人肾小管上皮细胞构建 VIN 模型，给予万古霉素 4 mmol • L^{-1} 处理细胞 24 h，观察肾损伤指标变化情况及细胞损伤情况。

3.1.2 抑制万古霉素诱导的氧化应激损伤通路 Nishino 等[20]研究表明氧化应激损伤是 VIN 的基础发生机制，而其合成的具有抗氧化作用的六亚甲基二胺偶联超氧化物歧化酶（AH-SOD）能够通过抑制氧化应激降低 VIN[24]。随后，大量研究表明抗氧化剂能够通过抑制氧化应激而发挥 VIN 保护作用，这些抗氧化剂包括 *α*- 硫辛酸、银杏叶提取物、褪黑素、氨力农[28]、厄多司坦[29]、促红细胞生成素[30]、2，3- 二羟基苯甲酸[31]、咖啡酸苯乙酯、维生素 C[32-33]、维生素 E[34]、*N*- 乙酰半胱氨酸[35]、1，5- 异喹啉二醇（ISO）[一种 ADP 核糖聚合酶（PARP）抑制剂][36]、姜黄素[37-38]、百里醌[39]、阿托伐他汀[40]、碧萝芷、螺旋藻[41]、羰基氰化物 -4-（三氟甲氧基）苯腙 [FCCP，一种线粒体解偶联剂] 和 [2-（2，2，6，6- 四甲基哌啶 -1- 氧基 -4- 基氨基）-2- 氧乙基] 三苯基氯化鏻（MitoTEMPO，一种线粒体靶向抗氧化剂）[34]、富含 DHA 的磷脂酰胆碱（DHA-PC）[42]、芦丁[43-44]、水飞蓟素[45-46]、姜油酮[47]、绿原酸[48]、柚皮素[49]、五酯胶囊[50]等。Ocak 等[35]比较了咖啡酸苯乙酯、维生素 C、维生素 E 和 *N*- 乙酰半胱氨酸对 VIN 的保护作用，结果显示维生素 E（脂溶性维生素）降低 VIN 的效果最好，其次是维生素 C、*N*- 乙酰半胱氨酸和咖啡酸苯乙酯。维生素 E 的抗氧化优势在另一项研究中也得到了验证[34]。Dalaklioglu 等[36]进一步发现，万古霉素通过诱导氧化应激及随后的 DNA 链断裂，激活 PARP 通路导致细胞凋亡，而 ISO 通过抑制 PARP 通路发挥 VIN 保护作用。Sakamoto 等[34]发现线粒体膜心磷脂过氧化介导了万古霉素诱导的细胞内活性氧产生和近端肾小管上皮细胞凋亡的启动。而 FCCP、维生素 E、MitoTEMPO 能够通过去除线粒体活性氧，发挥 VIN 保护作用。Shi 等[42]研究显示 DHA-PC 不仅抑制氧化应激，还通过上调 Bcl-2 以及下调胱天蛋白酶（caspase）-9、caspase-3、细胞色素 C、p38 和 JNK 灭活丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）通路抑制细胞凋亡，发挥 VIN 保护作用。Qu 等[43-44]研究发现芦丁可通过抑制万古霉素诱导的氧化应激、线粒体功能障碍、炎症细胞浸润和细胞凋亡来改善 VIN。水飞蓟素[45-46]、柚皮素[49]也可通过减少细胞凋亡和氧化应激发挥 VIN 保护作用。Qu 等[48]发现绿原酸通过减轻万古霉素诱导的氧化应激和亚硝化应激；抑制万古霉素诱导的核因子 -*κ*B（NF-*κ*B）、诱导型一氧化氮合酶（iNOS）、下游促炎介质肿瘤坏死因子（TNF）-*α* 和白介素（IL）1*β* 及 IL-6 的表达，抑制炎症反应；抑制万古霉素诱导的细胞凋亡发挥 VIN 保护作用。

3.1.3 抑制细胞自噬通路 自噬是一种溶酶体降解途径，可分解细胞质组分进行清除和再利用。然而，肾细胞自噬调控异常可导致多种肾脏疾病[51]。Xu 等[21]首次发现自噬在 VIN 中的作用：万古霉素通过抑制细胞外信号调节激酶（ERK）1/2 和激活哺乳动物类雷帕霉素靶蛋白信号（mTOR）通路来诱导自噬。此外，自噬相关蛋白 7 抗体通过激活蛋白激酶 C（PKC）-*δ* 诱导细胞凋亡。氯喹能够通过抑制自噬，显著改善肾小管细胞凋亡而发挥 VIN 保护作用[21]。自噬抑制可作为治疗 VIN 的新靶点。Bayomy 等[41]也发现螺旋藻和碧萝芷不仅可以减少肾脏氧化应激，抑制细胞凋亡，还可以通过上调自噬标志蛋白（LC3/B）的表达抑制细胞自噬，从而发挥 VIN 的保护作用。

3.1.4 作用于肾脏转运蛋白通路促进万古霉素肾脏排泄 VIN 与万古霉素在肾小管的聚集有关[7]。研究发现磷霉素[52-54]、氟氧头孢钠[55]、亚胺培南西司他丁[53-54]、西司他丁[25，56]等可以通过降低万古霉素在肾组织中的浓度降低 VIN。西司他丁是一种脱氢二肽酶 -1（DHP-1）抑制剂，在临床上与亚胺培南组成复方制剂，以防止亚胺培南被 DHP-1 水解，延长抗菌作用；并作用于肾近端小管刷状缘膜以防止亚胺培南的蓄积和毒性[56]。Humanes 等[56]发现西司他丁可能部分通过减少万古霉素在肾小管上皮细胞中的积累以减少细胞凋亡和线粒体损伤，发挥 VIN 保护作用。Im 等[25]进一步研究发现西司他丁的肾脏保护作用与 P- 糖蛋白（P-gp）有关。西司他丁可能通过上调 P-gp 蛋白表达和减弱万古霉素对 P-gp 蛋白表达的抑制作用，降低肾近端小管细胞中的药物浓度，从而抑制万古霉素诱导的氧化应激和细胞凋亡以发挥 VIN 保护作用。

3.1.5 抑制氧化应激及促进肾脏排泄双重机制 Wen 等[57]的研究显示 JBP485（Cyclo-trans-4-Lhydroxyprolyl-L-serine，一种抗肝炎二肽）能够通过抑制氧化应激，降低细胞凋亡发挥 VIN 保护作用；并进一步探索其对肾脏转运蛋白的影响，结果显示 VIN 的机制可能部分与抑制肾脏有机阴离子转运蛋白 1（OAT1）、有机阴离子转运蛋白 3（OAT3）、有机阳离子转运蛋白 2（OCT2）、多药

耐药相关蛋白 2（MRP2）和 P-gp 蛋白的表达有关，而 JBP485 可通过上调这些转运蛋白的表达来加速肾脏内源性毒素（例如硫酸吲哚酚）的排泄降低 VIN。Kandemi 等[58]研究显示姜酮可以通过抑制万古霉素诱导的肾脏氧化应激、炎症和细胞凋亡，发挥 VIN 保护作用；此外，该课题组还探索了姜酮对肾水通道蛋白（aquaporin，AQP）的影响，发现姜酮可抑制万古霉素诱导的 AQP1 降低，减少肾小管缺血，发挥 VIN 保护作用。丹参酮ⅡA 是唇形科植物丹参的脂溶性主要有效成分之一，具有抗氧化、抗炎、改善微循环等作用，陈晓宇等[59]进一步发现丹参酮可以通过降低万古霉素肾组织浓度和血清浓度降低 VIN。

3.1.6 舒张肾血管，改善肾脏血供 Bayram 等[26]发现右美托咪定可抑制万古霉素诱导的内皮素 1 水平升高和一氧化氮水平降低，抑制肾血管收缩，降低 VIN，发挥肾脏保护作用。但需注意右美托咪定可能导致低血压及后续的低灌注风险。

3.2 临床研究中降低 VIN 的药物

Badri 等[27]开展了一项 RCT 探索 *N*- 乙酰半胱氨酸对 VIN 的降低作用，研究共纳入 179 例患者，其中 84 例患者接受 *N*- 乙酰半胱氨酸（600 mg/ 次 q12h）联合万古霉素治疗。结果显示，相比于单用万古霉素组，联用 *N*- 乙酰半胱氨组患者 Scr 和 BUN 水平更低，VIN 发生率更低（12.63% *vs*. 4.76%，*RR* ＝ 0.377，*P* ＝ 0.066）。该研究提示 *N*- 乙酰半胱氨酸具有降低 VIN 的潜力。

多项回顾性对照研究显示维生素 C[60-61]、还原性谷胱甘肽[62]、褪黑素[63]等抗氧化剂有助于降低 VIN。Saagar 等[61]的研究显示，与万古霉素单用相比，联用维生素 C（500 mg/ 次 bid）的患者发生 AKI 的比例较低（29.2% *vs* 21.7%，*P* ＝ 0.248）。控制协变量的多因素 logistic 回归分析显示，维生素 C 与 VIN 发生率降低显著相关（*OR* ＝ 0.377，*P* ＝ 0.029）。何娟等[60]的研究显示，相比于单用万古霉素，联用大剂量静脉维生素 C [50 ～ 200 mg/（kg • d）] 的重症患者，其肾功能指标（Scr、BUN）显著改善。李娟等[62]研究了还原型谷胱甘肽对重症患者 VIN 的降低作用，结果显示万古霉素联用还原性谷胱甘肽后，Scr 值明显改善（102.0 μmol • L^{-1} *vs* 81.0 μmol • L^{-1}，*P* ＜ 0.05）。Hong 等[63]研究褪黑素对 VIN 的作用，结果显示与万古霉素单用相比，联用褪黑素患者 AKI 发生率显著降低（16.3% *vs* 7.9%，*P* ＝ 0.043）；多因素 logistic 回归分析显示联用褪黑素有助于 VIN 发生率降低。

4 结语

目前降低 VIN 的药物及其作用机制以临床前研究为主，临床研究缺乏且以回顾性分析为主。氧化应激可能是 VIN 发生机制的基础，因此，大量研究聚焦于抗氧化剂对 VIN 的保护作用及机制，目前 30 多种抗氧化剂显示有降低 VIN 的作用。体内外实验揭示抗氧化剂可能通过抑制万古霉素诱导的肾小管上皮细胞氧化应激损伤、线粒体功能障碍、炎症反应、自噬、细胞凋亡等通路，从而降低 VIN。此外，VIN 与万古霉素在肾脏聚集有关。以西司他丁为代表，药物作用于肾脏转运蛋白，通过增加万古霉素肾脏排泄，降低肾小管上皮细胞药物浓度发挥 VIN 保护作用。然而，目前缺乏临床研究证据的支持，仅一项 RCT 研究显示 *N*- 乙酰半胱氨酸具有降低 VIN 的潜力。

期待更多的随机、多中心临床试验来验证这些抗氧化剂对 VIN 的作用，包括如 *α*- 硫辛酸、银杏叶提取物、褪黑素、厄多司坦、促红细胞生成素、维生素 C、维生素 E、*N*- 乙酰半胱氨酸、阿托伐他汀、芦丁、水飞蓟素、五酯胶囊等；此外，作用于 P-gp 的西司他丁在多项研究中证实有降低 VIN 的作用，具有较大的应用潜力。

参考文献

[1] 万古霉素临床应用中国专家共识（2011 版）[J]. 中国新药与临床杂志，2011，30（8）：561-573.

[2] He N，Su S，Ye Z，et al. Evidence-based Guideline for Therapeutic Drug Monitoring of Vancomycin：2020 Update by the Division of Therapeutic Drug Monitoring，Chinese Pharmacological Society. [J]. Clin Infect Dis，2020，71（Supplement_4）：S363-S371.

[3] 周颖，刘晓，马凌云，等 . 万古霉素的临床应用及急性肾损伤监测现状分析 [J]. 中国临床药理学杂志，2019，35（12）：1298-1302.

[4] Liu C，Yan S，Wang Y，et al. Drug-induced hospital-acquired acute kidney injury in China：a multicenter cross-sectional survey [J]. Kidney Dis，2021，7（2）：143-155.

[5] Filippone EJ，Kraft WK，Farber JL. The nephrotoxicity of vancomycin [J]. Clin Pharmacol Ther，2017，102（3）：459-469.

[6] 潘坤明，陈灿，陈璋璋，等 . 万古霉素相关急性肾损伤的文献计量学分析 [J]. 中南药学，2019，17（12）：2195-2199.

[7] Rybak M，Lomaestro B，Rotschafer JC，et al. Therapeutic monitoring of vancomycin in adult patients：a consensus review of the American Society of Health-System Pharmacists，the Infectious Diseases Society of America，and the Society of Infectious Diseases Pharmacists [J]. Am J Health Syst Pharm，2009，66（1）：82-98.

[8] Bellomo R，Ronco C，Kellum JA，et al. Acute Dialysis Quality Initiative workgroup. Acute renal failure-defini-

tion，outcome measures，animal models，fluid therapy and information technology needs：the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative（ADQI）Group [J]. Crit Care，2004，8（4）：R204-R212.

[9] Mehta RL，Kellum JA，Shah SV，et al. Acute Kidney Injury Network：report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury [J]. Crit Care，2007，11（2）：R31.

[10] Garabed E，Norbert L，Kai-uwe E，et al. Kidney Disease：Improving Global Outcomes（KDIGO）Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical practice guideline for acute kidney injury [J]. Kidney Int，2012，2（Suppl 1）：1-138.

[11] Rybak MJ，Le J，Lodise TP，et al. Therapeutic monitoring of vancomycin for serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections：a revised consensus guideline and review by the American Society of Health-System Pharmacists，the Infectious Diseases Society of America，the Pediatric Infectious Diseases Society，and the Society of Infectious Diseases Pharmacists [J]. Am J Health Syst Pharm，2020，77（11）：835-864.

[12] Pan K，Ma L，Xiang Q，et al. Vancomycin-associated acute kidney injury：a cross-sectional study from a single center in China [J]. PLoS One，2017，12（4）：e0175688.

[13] Pan KM，Chen C，Cheng ZZ，et al. Vancomycin associated acute kidney injury：a longitudinal study in China [J]. Front Pharmacol，2021，12：632107

[14] 潘坤明，马凌云，周颖，等 . 万古霉素相关急性肾损伤危险因素研究进展 [J]. 药物不良反应杂志，2017，19（6）：443-447.

[15] Pan KM，Wu Y，Chen C，et al. Vancomycin-induced acute kidney injury in elderly Chinese patients：a single-centre cross-sectional study [J]. Br J Clin Pharmacol，2018，84（8）：1706-1718.

[16] Alkhinaizi AM，Hinedi K. Vancomycin-induced acute tubular necrosis [J]. Saudi Med J，2014，35（9）：1140-1142.

[17] Bergman MM，Glew RH，Ebert TH. Acute interstitial nephritis associated with vancomycin therapy [J]. Arch Intern Med，1988，148（10）：2139-2140.

[18] Wu CY，Wang JS，Chiou YH，et al. Biopsy proven acute tubular necrosis associated with vancomycin in a child：case report and literature review [J]. Ren Fail，2007，29（8）：1059-1061.

[19] Htike NL，Santoro J，Gilbert B，et al. Biopsy-proven vancomycin-associated interstitial nephritis and acute tubular necrosis [J]. Clin Exp Nephrol，2012，16（2）：320-324.

[20] Nishino Y，Takemura S，Miinamiyama Y，et al. Inhibition of vancomycin-induced nephrotoxicity by targeting superoxide dismutase to renal proximal tubule cells in the rat [J]. Redox Rep，2002，7（5）：317-319.

[21] Xu X，Pan J，Li H，et al. Atg7 mediates renal tubular cell apoptosis in vancomycin nephrotoxicity through activation of PKC-δ [J]. FASEB J，2019，33（3）：4513-4524.

[22] Stokes MB. Vancomycin in the kidney-a novel cast nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol，2017，28（6）：1669-1670.

[23] Pais GM，Liu J，Zepcan S，et al. Vancomycin-induced kidney injury：animal models of toxicodynamics，mechanisms of injury，human translation，and potential strategies for prevention [J]. Pharmacotherapy，2020，40（5）：438-454.

[24] Nishino Y，Takemura S，Minamiyama Y，et al. Targeting superoxide dismutase to renal proximal tubule cells attenuates vancomycin-induced nephrotoxicity in rats [J]. Free Radic Res，2003，37（4）：373-379.

[25] Im DS，Shin HJ，Yang KJ，et al. Cilastatin attenuates vancomycin-induced nephrotoxicity via P-glycoprotein [J]. Toxicol Lett，2017，277：9-17.

[26] Bayram A，Erkan GN，Talih G，et al. The alpha-2 receptor agonist dexmedetomidine attenuates vancomycin-induced acute kidney injury [J]. Bratisl Lek Listy，2019，120（6）：429-433.

[27] Badri S，Soltani R，Sayadi M，et al. Effect of *N*-acetylcysteine against vancomycin-induced nephrotoxicity：a randomized controlled clinical trial [J]. Arch Iran Med，2020，23（6）：397-402.

[28] Celik I，Cihangiroglu M，Ilhan N，et al. Protective effects of different antioxidants and amrinone on vancomycin-induced nephrotoxicity [J]. Basic Clin Pharmacol，2005，97（5）：325-332.

[29] Oktem F，Arslan MK，Ozguner F，et al. In vivo evidences suggesting the role of oxidative stress in pathogenesis of vancomycin-induced nephrotoxicity：protection by erdosteine [J]. Toxicology，2005，215（3）：227-233.

[30] Cetin H，Olgar S，Oktem F，et al. Novel evidence suggesting an anti-oxidant property for erythropoietin on vancomycin-induced nephrotoxicity in a rat model [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol，2007，34（11）：1181-1185.

[31] Naghibi B，Ghafghazi T，Hajhashemi V，et al. The effect of 2，3-dihydroxybenzoic acid and tempol in prevention of vancomycin-induced nephrotoxicity in rats [J]. Toxicology 2007，232（3）：192-199.

[32] Xu W，Mao Z，Zhao B，et al. Vitamin C attenuates vancomycin induced nephrotoxicity through the reduction of oxidative stress and inflammation in HK-2 cells [J]. Ann Palliat Med，2021，10（2）：1748-1754.

[33] Takigawa M，Yatsu T，Takino Y，et al. High-Dose vitamin c preadministration reduces vancomycin-associated nephrotoxicity in mice [J]. J Nutr Sci Vitaminol（Tokyo），2019，65（5）：399-404.

[34] Sakamoto Y，Yano T，Hanada Y，et al. Vancomycin induces reactive oxygen species-dependent apoptosis via mitochondrial cardiolipin peroxidation in renal tubular epithelial cells [J]. Eur J Pharmacol，2017，800：48-56.

[35] Ocak S，Gorur S，Hakverdi S，et al. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester，vitamin C，vitamin E and N-acetylcysteine on vancomycin-induced nephrotoxicity in rats [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol，2007，100（5）：

328-333.
[36] Dalaklioglu S，Tekcan M，Gungor NE，et al. Role of the poly（ADP-ribose）polymerase activity in vancomycin-induced renal injury [J]. Toxicol Lett，2010，192（2）：91-96.
[37] Ahmida MH. Protective role of curcumin in nephrotoxic oxidative damage induced by vancomycin in rats [J]. Exp Toxicol Pathol，2012，64（3）：149-153.
[38] 罗洁，徐芬，丁岚 . 姜黄素和万古霉素对大鼠肾小管上皮细胞乳酸脱氢酶释放百分率及丙二醛的影响 [J]. 实验与检验医学，2020，38（1）：71-73.
[39] Basarslan F，Yilmaz N，Ated S，et al. Protective effects of thymoquinone on vancomycin-induced nephrotoxicity in rats [J]. Hum Exp Toxicol，2012，31（7）：726-733.
[40] Panonnummal A，Varkey J，Dinoop DR. Are statins nephroprotective?：a dose dependent study in albino rats [J]. J Pharm Pharm Sci，2 013，5（3）：182-190.
[41] Bayomy NA，Adbelaziz EZ，Said MA，et al. Effect of pycnogenol and spirulina on vancomycin-induced renal cortical oxidative stress，apoptosis，and autophagy in adult male albino rat [J]. Can J Physiol Pharmacol，2016，94（8）：838-848.
[42] Shi H，Zou J，Zhang T，et al. Protective effects of DHA-PC against vancomycin-induced nephrotoxicity through the inhibition of oxidative stress and apoptosis in BALB/c mice [J]. J Agric Food Chem，2018，66（2）：475-484.
[43] Qu S，Dai C，Guo H，et al. Rutin attenuates vancomycin-induced renal tubular cell apoptosis via suppression of apoptosis，mitochondrial dysfunction，and oxidative stress [J]. Phytother Res，2019，33（8）：2056-2063.
[44] Qu S，Dai C，Lang F，et al. Rutin attenuates vancomycin-induced nephrotoxicity by ameliorating oxidative stress，apoptosis，and inflammation in rats [J]. Antimicrob Agents Chemother，2019，63（1）：e01545-18.
[45] Guzel S，Sahinogullari ZU，Canacankatan N，et al. Potential renoprotective effects of silymarin against vancomycin-induced nephrotoxicity in rats [J]. Drug Chem Toxicol，2020，43（6）：630-636.
[46] Malkani N，Naeem A，Iiaz F，et al. Silybum marianum（milk thistle）improves vancomycin induced nephrotoxicity by downregulating apoptosis [J]. Mol Biol Rep，2020，47（7）：5451-5459.
[47] Kucukler S，Darendelioglu E，Caglayan C，et al. Zingerone attenuates vancomycin-induced hepatotoxicity in rats through regulation of oxidative stress，inflammation and apoptosis [J]. Life Sci，2020，259：118382.
[48] Qu S，Dai C，Hao Z，et al. Chlorogenic acid prevents vancomycin-induced nephrotoxicity without compromising vancomycin antibacterial properties [J]. Phytother Res，2020，34（12）：3189-3199.
[49] Uckun Z，Guzel S，Canacankatan N，et al. Potential protective effects of naringenin against vancomycin-induced nephrotoxicity via reduction on apoptotic and oxidative stress markers in rats [J]. Drug Chem Toxicol，2020，43（1）：104-111.
[50] 张忠银，王欣怡 . 五酯胶囊对万古霉素所致肾损伤大鼠的影响及其机制研究 [J]. 中国药师，2017，20（11）：1954-1957.
[51] Tang C，Livingston MJ，Liu Z，et al. Autophagy in kidney homeostasis and disease [J]. Nat Rev Nephrol，2020，16（9）：489-508.
[52] Marre R，Schulz E，Hedtke D，et al. Influence of fosfomycin and tobramycin on vancomycin-induced nephrotoxicity [J]. Infection，1985，13（4）：190-192.
[53] Nakamura T，Hashimoto Y，Kokuryo T，et al. Effects of fosfomycin and imipenem/cilastatin on nephrotoxicity and renal excretion of vancomycin in rats [J]. Pharm Res，1998，15（5）：734-738.
[54] Nakamura T，Kokuryo T，Hashimoto Y，et al. Effects of fosfomycin and imipenem-cilastatin on the nephrotoxicity of vancomycin and cisplatin in rats [J]. J Pharm Pharmacol，1999，51（2）：227-232.
[55] Toyoguvhi T，Nakagawa Y. Nephrotoxicity and drug interaction of vancomycin [J]. Folia Pharmacologica Japonica，1996，107（5）：225-235.
[56] Humanes B，Jado JC，Camano S，et al. Protective effects of cilastatin against vancomycin-induced nephrotoxicity [J]. Biomed Res Int，2015，2015：1-12.
[57] Wen S，Wang C，Huo X，et al. JBP485 attenuates vancomycin-induced nephrotoxicity by regulating the expressions of organic anion transporter（Oat）1，Oat3，organic cation transporter 2（Oct2），multidrug resistance-associated protein 2（Mrp2）and P-glycoprotein（P-gp）in rats [J]. Toxicol Lett，2018，295：195-204.
[58] Kandemir FM，Yildirim S，Kucukler S，et al. Therapeutic efficacy of zingerone against vancomycin-induced oxidative stress，inflammation，apoptosis and aquaporin 1 permeability in rat kidney [J]. Biomed Pharmacother，2018，105：981-991.
[59] 陈晓宇，席加喜，张华君 . 丹参酮Ⅱ-A 对万古霉素损伤大鼠肾功能及血、肾组织万古霉素浓度的影响研究 [J]. 内科，2018，13（3）：277-279，301.
[60] 何娟，毛恩强，徐文筠，等 . 大剂量维生素 C 可显著降低重症患者万古霉素的肾毒性 [J]. 中华危重病急救医学，2020，32（4）：468-472.
[61] Akundi S，Lee YR，Perry GK，et al. Nephrotoxicity in recipients of vancomycin vs. vancomycin with vitamin C [J]. International Journal of Medicine and Pharmacy，2015，3（2）：1-15.
[62] 李娟，何娟，毛恩强，等 . 还原型谷胱甘肽对重症患者使用万古霉素致药物性肾损伤的保护作用 [J]. 中华危重病急救医学，2020，32（7）：819-823.
[63] Hong TS，Briscese K，Yuan M，et al. Renoprotective effects of melatonin against vancomycin-related acute kidney injury in hospitalized patients：a retrospective cohort study [J]. Antimicrob Agents Chemother，2021，65（9）：e0046221.

（收稿日期：2021-09-20；修回日期：2021-10-28）

基于尿酸转运蛋白的中药治疗高尿酸血症的研究进展

张凤阳[1, 2]，邢志华[1, 2*]，申光焕[1, 2]，高原[1, 2]，韩维娜[3]，程美池[1, 2]，徐志远[1, 2]（1. 哈尔滨商业大学药学院，哈尔滨　150076；2. 黑龙江省预防与治疗老年病药物研究重点实验室，哈尔滨　150076；3. 哈尔滨医科大学药学院，哈尔滨　150081）

摘要：近年来，高尿酸血症及其引发的痛风引起了医药学界的高度重视。随着对高尿酸血症发病机制研究的不断深入，发现了一系列在体内尿酸转运中发挥重要作用的尿酸转运蛋白，这些蛋白按照功能分为尿酸分泌蛋白、尿酸重吸收蛋白和其他如骨架蛋白等，以尿酸转运蛋白为分子靶点开发具有作用机制明确的中药具有重要意义。因此，本文围绕尿酸转运蛋白，对中药治疗高尿酸血症及其机制的研究进展进行综述，为中药降尿酸研究提供参考。

关键词：中药；高尿酸血症；尿酸排泄；尿酸转运蛋白

中图分类号：R282.71　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)05-1123-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.027

Research progress in traditional Chinese medicine treatment based on uric acid transporter for hyperuricemia

ZHANG Feng-yang[1, 2], XING Zhi-hua[1, 2*], SHEN Guang-huan[1, 2], GAO Yuan[1, 2], HAN Wei-na[3], CHENG Mei-chi[1, 2], XU Zhi-yuan[1, 2] (1. *School of Pharmacy*, *Harbin University of Commerce*, *Harbin* 150076; 2. *Key Laboratory for Drug Research on Prevention and Treatment of Geriatric Diseases of Heilongjiang*, *Harbin* 150076; 3. *School of Pharmacy*, *Harbin Medical University*, *Harbin* 150081)

Abstract: In recent years, hyperuricemia and the gout caused by it has attracted much attention. With the research on the pathogenesis of hyperuricemia, many uric acid transporter proteins have been discovered that play an important role in uric acid transportation in vivo. These proteins can be divided into reabsorption proteins, excretion proteins and skeletal proteins. It is important to develop traditional Chinese medicine (TCM) with clear mechanism of action using uric acid transporter as the molecular targets. Revolving around uric acid transporter, this paper reviewed the research progress in TCM treatment of hyperuricemia and its mechanism, and provides reference for reduction of uric acid by TCM.

Key words: traditional Chinese medicine; hyperuricemia; uric acid excretion; uric acid transporter

近年来，随着国民饮食结构的改变，我国高尿酸血症（hyperuricemia，HUA）发病率逐年攀升。研究表明，约 90% 原发性 HUA 跟尿酸排泄障碍有关，因此促进尿酸排泄是预防和治疗 HUA 的关键。尿酸的排泄过程包括滤过 - 重吸收 - 分泌 - 重吸收四个步骤，除滤过外其余步骤均需要尿酸转运蛋白的参与，尿酸转运蛋白在尿酸排泄过程中发挥着重要作用[1-2]。在临床中，中药用于降尿酸具有疗效明确和毒副作用低的优点，随着研究深入，其降尿酸机制也受到广泛关注。本文围绕相关尿酸转运蛋白，在分子水平上，对中药通过促进尿酸排泄治疗 HUA 的作用机制及其研究进展加以综述。

1　尿酸转运蛋白

肾小管对尿酸的排泄依托于离子通道，这一过程又依靠尿酸转运蛋白完成。尿酸转运蛋

基金项目：黑龙江省自然科学基金面上项目（No.H2016001）；黑龙江省留学回国人员择优资助项目（No.18930101）；黑龙江省博士后科研启动基金（No.LBH-Q15111）；哈尔滨商业大学研究生科研创新项目（No.YJSCX2020-684HSD）。

作者简介：张凤阳，男，硕士研究生，主要从事天然药物结构修饰与抗痛风药物研究，email：407971160@qq.com　*通信作者：邢志华，女，教授，主要从事天然药物结构修饰与抗痛风药物研究，email：xzhh1224@163.com

白分为重吸收蛋白和分泌蛋白，重吸收蛋白主要包括葡萄糖转运蛋白 9（glucose transporter 9，GLUT9）、尿酸阴离子转运体 1（urate anion transporter 1，URAT1）和有机阴离子转运体家族（organic anion transporters，OATs）中的 OAT4；分泌蛋白主要包括有机阴离子转运体 OATs 家族中的 OAT3 与 OAT1，三磷酸腺苷结合转运蛋白 G2（ATP-binding cassette superfamily G member 2，ABCG2）以及多药耐药蛋白 4（multidrug resistance protein 4，MRP4）。除这两类以外还有其他蛋白参与尿酸排泄过程，如支架蛋白 PDZK1（PDZ domain-containing 1，PDZK1）等。

1.1 尿酸重吸收蛋白

URAT1 是在人肾脏发现的尿酸重吸收蛋白 [3]，由 *SLC22A12* 基因编码，定位于肾脏近端小管细胞的顶端（刷状缘）膜，通过介导管腔内的尿酸与近曲小管上皮细胞内无机阴离子（如 Cl^-）和有机阴离子（如乳酸盐）的交换，从而将尿酸从管腔内进行重吸收，临床上用于促进尿酸排泄的药物如丙磺舒等即通过与 URAT1 结合从而促进尿酸排泄，而当 *URAT1* 基因缺失或发生突变，会出现肾功能障碍和尿酸排泄异常，证实 URAT1 是参与尿酸排泄的重要靶点 [4]。GLUT9 是一类应用于高尿酸血症的治疗靶点，参与肾脏近端小管尿酸盐重吸收的葡萄糖转运蛋白，属于 SLC2A9 家族，由细胞膜胞质面的氨基末端、羧基末端和 12 个跨膜螺旋环组成，主要分布于近端小管的上皮细胞基底外侧膜和顶端，由于氨基末端存在差异性导致有两种不同的异构体（GLUT9S 和 GLUT9L）[5-6]。有机阴离子转运体 4（OAT4）是已发现的 OATs 中为数不多的介导尿酸重吸收的蛋白，由 *SLC22A11* 基因编码，位于肾小管上皮细胞的顶端，有助于有机阴离子（如尿酸）从尿液中重吸收返回近端肾小管细胞，发挥尿酸重吸收作用 [7]。

1.2 尿酸分泌蛋白

尿酸分泌蛋白如有机阴离子转运体 OATs 家族中的 OAT1 与 OAT3，两者在肾脏中都是以 α-酮戊二酸盐作为交换底物（如尿酸）。OAT1 由 *SLC22A6* 基因编码，大多数表达于肾脏近端小管的基底膜面上；OAT3 由 *SLC22A8* 基因编码，主要在肾脏近端小管以及远端小管表达，约为 OAT1 表达的 3 倍 [8-9]。HUA 发生时，OAT1 与 OAT3 的表达均有所下降 [10]。另一种尿酸分泌蛋白 ABCG2 也与 HUA 和痛风的发生相关，属于 ABC 转运家族，表达于肾脏近曲小管上皮细胞顶端膜上 [11]，研究发现 ABCG2 功能缺失会导致肾功能异常的慢性肾病患者出现 HUA，证实其是痛风或 HUA 发病的一个重要机制 [12]。MRP4 是多药耐药蛋白家族一员，由 *ABCC4* 基因编码，在体内分布广泛，在转运过程中消耗三磷酸腺苷（ATP），这一特性类似于 ABCG2，当 *MRP4* 基因突变时可导致 HUA 的发生，证实这一靶点与体内尿酸水平息息相关 [13-14]。

1.3 其他参与尿酸排泄的蛋白

PDZK1 属于 PDZ 蛋白家族，作为多种转运蛋白和调控蛋白的支架蛋白，是一种特殊的辅助蛋白，在人体内表达广泛，通过与其他尿酸转运蛋白相结合从而参与人体内尿酸转运，间接影响了 HUA 的发病过程 [15-16]。

2 中药有效成分对尿酸转运蛋白的调控

2.1 黄酮类

甘草素通过抑制尿酸转运体 OAT4 和 URAT1 对尿酸的重吸收，从而促进尿酸排泄 [17]。史坤等 [18] 发现葛根素有抑制尿酸生成和促进尿酸排泄的双重作用，可促进 HK-2 细胞内 *ABCG2* 基因和蛋白表达，从而影响体内尿酸排泄水平 [19]。一项在人肾小管上皮细胞中对尿酸吸收的考察实验显示，玉米须总黄酮能够抑制 HK-2 细胞对尿酸的吸收，上调 *ABCG2*、*OAT1*、*OAT3* 的 mRNA 表达，下调 *URAT1* 和 *PDZK1* 的 mRNA 表达，有效降低体内尿酸 [20]。在动物实验中，桑黄素通过下调 URAT1 和 GLUT9 的表达和上调 OAT1 的表达影响小鼠尿酸排泄水平 [21]。芹菜素能够通过下调 URAT1 和 GLUT9 的表达促进尿酸排泄，同时具有改善肾纤维化的保护作用 [22]。白杨素可有效降低尿酸水平，包括上调 OAT1 和 ABCG2，下调 GLUT9 和 URAT1 的表达促进尿酸排泄，同时可影响黄嘌呤氧化酶（XOD）活性抑制体内尿酸产生 [23]。

2.2 皂苷类

卢芳等 [24] 发现穿山龙总皂苷可以促进尿酸排泄，其机制可能为上调尿酸转运体 OAT1 的表达，另一项实验也证实了穿山龙总皂苷可通过回调 ABCG2 蛋白的表达促进尿酸排泄 [25]。实验发现七叶莲总皂苷通过抑制 URAT1 表达起到促尿酸排泄作用，并且其降尿酸作用呈现一定的剂量依赖性 [26]。薯蓣皂苷通过抑制 GLUT9 和 URAT1，上调 OAT1 和 OAT3 的表达水平，达到增加尿酸排泄的效果 [27]。葎蘞总皂苷可以通过

抑制肾脏尿酸转运蛋白 URAT1 的表达减少尿酸重吸收，进而促进尿酸排泄[28]，其降低尿酸水平与剂量成正比，尿液检测发现给予萆薢总皂苷后，大鼠尿液中尿酸及尿酸排泄量、尿酸排泄分数等都有所提高[29-31]。康乐等[32]发现牛膝茎叶总皂苷有促进尿酸排泄的作用，其可能的机制为上调尿酸转运蛋白 OAT1 的表达并下调 URAT1 和 GLUT9 的表达。

2.3 多糖类

中药茯苓中的茯苓多糖能够上调 OAT1、下调 URAT1 的表达从而增加尿酸排泄，同时还具有一定的肾脏保护作用[33]。枸杞多糖有抑制尿酸产生和促进尿酸排泄的双重作用，其促进尿酸排泄的机制为上调 OAT1、OAT3 以及下调 GLUT9 的表达[34]。浒苔是一种石莼属海洋绿藻，浒苔多糖是其主要活性成分，有研究表明浒苔多糖可影响尿酸转运蛋白 ABCG2、OAT1 和 URAT1 的表达起到降尿酸效果[35]。

2.4 其他

水蛭素通过下调尿酸转运蛋白 GLUT9 而有效降低血清尿酸水平，并且对肾脏有一定保护作用[36]，体内及体外实验也证明其可以促进尿酸排泄，这一作用是通过上调尿酸转运蛋白 OAT1，下调 URAT1 和 GLUT9 的表达实现的[37-38]。栀子苷既能抑制尿酸的过度生成，又可以通过上调 *OAT1*、下调 *URAT1* 和 *GLUT9* 的 mRNA 及蛋白表达提升体内尿酸排泄量[39-40]。白藜芦醇是一种多酚类化合物，来源广泛，被证实具有调控尿酸转运蛋白表达的效果，可下调 GLUT9 进而促进尿酸排泄[41-42]。中药菊苣中的活性成分菊苣酸能通过抑制 GLTU9 的表达促进尿酸排泄[43]（见表 1）。

表 1 中药有效成分对尿酸转运蛋白的调控

Tab 1 Regulation of uric acid transporters by active components of traditional Chinese medicine

中药	有效成分	干预靶点
甘草	甘草素	OAT4；URAT1[17]
葛根	葛根素	ABCG2[18-19]
玉米须	玉米须总黄酮	ABCG2；OAT1；OAT3；URAT1；PDZK1；GLUT9[20]
黄木	桑黄素	URAT1；GLUT9；OAT1[21]
芹菜籽	芹菜素	URAT1；GLUT9[22]
木蝴蝶	白杨素	OAT1；ABCG2；URAT1；GLUT9[23]
穿山龙	穿山龙总皂苷	OAT1；ABCG2[24-25]
七叶莲	七叶莲总皂苷	URAT1[26]
薯蓣	薯蓣皂苷	GLUT9；URAT1；OAT1；OAT3[27]
萆薢	萆薢总皂苷	URAT1[28-31]
牛膝茎叶	牛膝茎叶总皂苷	OAT1；URAT1；GLUT9[32]
茯苓	茯苓多糖	OAT1；URAT1[33]
枸杞	枸杞多糖	OAT1；OAT3；GLUT9[34]
浒苔	浒苔多糖	ABCG2；OAT1；URAT1[35]
金边蚂蟥	水蛭素	OAT1；URAT1；GLUT9[36-38]
栀子	栀子苷	OAT1；URAT1；GLUT9[39-40]
葡萄	白藜芦醇	GLUT9[41-42]
菊苣	菊苣酸	GLUT9[43]

3 中药对尿酸转运蛋白的调控

3.1 中药醇提物

虎杖醇提液对高尿酸血症小鼠有促进尿酸排泄的作用[44]，其通过调控 GLUT9、URAT1 和 OAT1 蛋白及其 mRNA 的表达，从而增加机体尿酸的排泄[45]。曾金祥等[46]发现车前草醇提物可通过下调肾脏 *URAT1* 的 mRNA 表达促进高尿酸血症小鼠的尿酸排泄。近来有研究提出秦皮醇提物可以降低血尿酸水平，其机制可能与下调尿酸转运蛋白 URAT1 和 GLUT9 表达相关[47]。杜仲醇提物可以上调肾脏有机阴离子转运蛋白 OAT1 和 OAT3 的表达，同时下调 URAT1 和 GLUT9 的表达，起到促进尿酸排泄的作用[48]。闫曼等[49]对高尿酸血症模型大鼠灌胃益母草醇提物并检测血清尿酸和肌酐，尿液尿酸以及肾脏中相关尿酸转运蛋白，结果表明，血清尿酸和肌酐降低，尿液尿酸水平升高，其促尿酸排泄的机制之一为下调 *URAT1* 和 *GLUT9* 的 mRNA 表达。刘非等[50]对鼠麴草的降尿酸活性进行研究，发现其具有促进尿酸排泄、抑制尿酸生成以及保护肾脏的多重药理作用，其具体干预靶点有待进一步研究。美花石斛是常用的药用石斛之一，经动物实验证实其有促进尿酸排泄的作用，机制为上调 OAT1 表达，下调 URAT1 和 GLUT9 表达[51]。铁皮石斛叶提取物有降低尿酸的功效，包括影响 XOD 活性抑制尿酸产生，此外可通过上调 ABCG2 及下调 URAT1 和 GLUT9 的表达促进尿酸排泄[52]。

3.2 中药水提物

菊苣水提物通过下调 GLUT9、上调 OAT1 和 OAT3 蛋白表达，从而增加肾脏尿酸排泄[53]，还可以上调 ABCG2 表达[54]。孙红等[55]研究表明，土茯苓可抑制蛋白 URAT1 的 mRNA 表达，达到促进尿酸排泄的作用，丁瑞等[56]同样证实土茯苓促进尿酸排泄机制之一为下调肾脏 *URAT1* 及 *GLUT9* 的 mRNA 表达。猫须草水提物可以通过上调 OAT1 以及下调 URAT1 的表达起到促进尿酸排泄的作用[57]。茯苓提取物被证实具有降尿

酸和保护肾脏的作用，其机制可能是上调肾脏内 ABCG2 的表达[58]。动物实验证实叶下珠提取物通过下调 URAT1 蛋白的表达有效促进小鼠尿酸排泄[59]。此外有学者研究益智仁水提液和醇提液合并的提取物，发现其可通过下调高尿酸血症大鼠肾脏中 URAT1 和上调 OAT1 蛋白水平进而促进尿酸排泄[60]（见表 2）。

表 2 中药提取物对尿酸转运蛋白的调控

Tab 2 Regulation of uric acid transporters by extract of traditional Chinese medicine

中药	提取物	干预靶点
虎杖	醇提物	GLUT9；URAT1；OAT1[44-45]
车前草	醇提物	URAT1[46]
秦皮	醇提物	URAT1；GLUT9[47]
杜仲	醇提物	OAT1；OAT3；URAT1；GLUT9[48]
益母草	醇提物	URAT1；GLUT9[49]
鼠麴草	醇提物	—[50]
美花石斛	醇提物	GLUT9；URAT1；OAT1[51]
铁皮石斛叶	醇提物	ABCG2；URAT1；GLUT9[52]
菊苣	水提物	GLUT9；OAT1；OAT3；ABCG2[53-54]
土茯苓	水提物	URAT1；GLUT9[55-56]
猫须草	水提物	URAT1；OAT1[57]
茯苓	水提物	ABCG2[58]
叶下珠	水提物	URAT1[59]
益智仁	醇提物和水提物	URAT1；OAT1[60]

4 展望

HUA 是痛风最重要的生化基础，也是诱发痛风最危险的因素，而且与肾脏疾病、高血压、高血脂症及糖尿病等多种疾病有关，已成为严重威胁人类健康的代谢性疾病。近年来，基于其发病机制的深入研究逐渐揭示了参与尿酸重吸收与排泄作用的相关转运蛋白，并明确其结构与功能。同时，将其作为药物的干预靶点促进尿酸排泄治疗 HUA 也取得了一定进展，近年来干预尿酸排泄的蛋白研究主要围绕 URAT1、GLUT9 和 OAT1 等，见图 1。

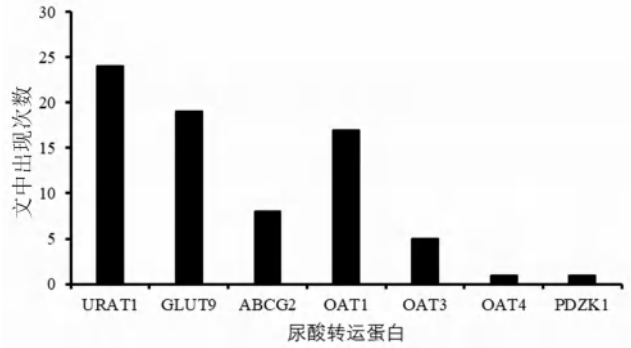


图 1 尿酸转运蛋白在文中出现次数

Fig 1 Number of times of uric acid transporters in the text

中药在促进尿酸排泄的基础上拥有良好的安全性，不仅为防治 HUA 及痛风提供了多方面、多角度的治疗方案，同时发现了一些新的降尿酸作用靶点，如菊苣提取物及大黄中的有效成分大黄酸可以有效促进尿酸自肠道排出，对于肾功能不全的患者治疗有重要的意义。但中药防治 HUA 及痛风也存有不足之处，当下中药用于临床治疗 HUA 主要还是通过方剂形式，由于中药机制及其作用靶点复杂，多种单味药组合后的具体有效成分和 / 或作用机制也有待明确，攻克单味中药及方剂的具体机制仍是当前中药迈向国际化的重点。随着尿酸转运蛋白的深入研究，将分子生物学、基因技术等现代医学手段结合传统中医药理论，相信可以进一步揭示中药防治 HUA 的机制，为治疗 HUA 及痛风药物的研发提供新思路。

参考文献

[1] 孙泽锐，王宣军，盛军 . 高尿酸血症研究进展 [J]. 云南民族大学学报（自然科学版），2021，30（2）：135-142，156.

[2] 周启蒙，赵晓悦，梁宇，等 . 治疗高尿酸血症相关药物研究新进展 [J]. 中国新药杂志，2021，30（10）：929-936.

[3] Enomoto A，Kimura H，Chairoungdua A，et al. Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels [J]. Nature，2002，417（6887）：447-452.

[4] Li Z，Ding H，Chen C，et al. Novel URAT1 mutations caused acute renal failure after exercise in two Chinese families with renal hypouricemia [J]. Gene，2013，512（1）：97-101.

[5] 刘代焱，姚昕韬，倪银星，等 . 葡萄糖转运子 9 与尿酸代谢间关系的研究进展 [J]. 中华内分泌代谢杂志，2012，28（1）：81-84.

[6] Fadieieva A，Prystupa L，Pogorelova O，et al. Role of SLC2A9 and ABCG2 gene polymorphisms in origin of hyperuricemia and gout [J]. Georgian Med News，2016，（252）：79-83.

[7] Flynn TJ，Phipps-Green A，Hollis-Moffatt JE，et al. Association analysis of the SLC22A11（organic anion transporter 4）and SLC22A12（urate transporter1）urate transporter locus with gout in New Zealand casecontrol sample sets reveals multiple ancestral-specific effects [J]. Arthritis Res Ther，2013，15（6）：R220.

[8] Vallon V，Eraly SA，Rao SR，et al. A role for the organic anion transporter OAT3 in renal creatinine secretion in mice [J]. Am J Physiol Renal Physiol，2012，302（10）：F1293-1299.

[9] Burckhardt G，Burckhardt BC. In vitro and in vivo evidence of the importance of organic anion transporters

（OATs）in drug therapy [J]. Handb Exp Pharmacol，2011，(201)：29-104.
[10] Liu N，Wang L，Yang T，et al. EGF receptor inhibition alleviates hyperuricemic nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol，2015，26 (11)：2716-2729.
[11] Kimiyoshi I，Hirotaka M，Tappei T，et al. Decreased extra-renal urate excretion is a common cause of hyperuricemia [J]. Nat Commun，2012，3 (1)：1811-1821.
[12] Eckenstaler R，Benndorf RA. The role of ABCG2 in the pathogenesis of primary hyperuricemia and gout——an update [J]. Int J Mol Sci，2021，22 (13)：6678.
[13] Dong Z，Zhou JR，Jiang S，et al. Effects of multiple genetic loci on the pathogenesis from serum urate to gout [J]. Sci Rep，2017，7：43614-43624.
[14] 吴新荣，臧路平，刘志刚 . 抗高尿酸血症药物作用靶点研究进展 [J]. 中国药理学通报，2010，26（11）：1414-1417.
[15] Vadakedath S，Kandi V. Probable potential role of urate transporter genes in the development of metabolic disorders [J]. Cureus，2018，10 (3)：1-20.
[16] Nakayama A，Matsuo H，Takada T，et al. ABCG2 is a high-capacity urate transporter and its genetic impairment increases serum uric acid levels in humans [J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids，2011，30 (12)：1091-1097.
[17] 王泽，慈小燕，崔涛，等 . 不同药性成分对 OAT4、URAT1 抑制作用及对急性高尿酸血症小鼠血尿酸水平的影响 [J]. 中草药，2019，50 (5)：1157-1163.
[18] 史珅，张荣涛，尚小玉，等 . 葛根提取物对高尿酸血症大鼠血尿酸的影响 [J]. 食品科技，2014，39（2）：216-220.
[19] 张洪长，张莹，律广富，等 . 葛根素对人肾近曲小管上皮细胞 ABCG2 表达影响 [J]. 上海中医药杂志，2016，50 (3)：74-77.
[20] 迟迅，叶鸿博，马超，等 . 玉米须黄酮类成分对 HK-2 细胞尿酸吸收及相关基因表达的影响 [J]. 中药药理与临床，2020，36 (5)：95-100.
[21] Wang CP，Wang X，Zhang X，et al. Morin improves urate excretion and kidney function through regulation of renal organic ion transporters in hyperuricemic mice [J]. J Pharm Pharm Sci，2010，13 (3)：411-427.
[22] Li YM，Zhao Z，Luo J，et al. Apigenin ameliorates hyperuricemic nephropathy by inhibiting URAT1 and GLUT9 and relieving renal fibrosis via the Wnt/β-catenin pathway [J]. Phytomedicine，2021，87：153585.
[23] Chang YH，Chiang YF，Chen HY，et al. Anti-inflammatory and anti-hyperuricemic effects of chrysin on a high fructose corn syrup-induced hyperuricemia rat model via the amelioration of urate transporters and inhibition of NLRP3 inflammasome signaling pathway [J]. Antioxidants（Basel），2021，10 (4)：564.
[24] 卢芳，周琦，张颖，等 . 基于痛风性关节炎 ABCG2 尿酸转运靶点的穿山龙调控机制研究 [J]. 中华中医药学刊，2016，34 (5)：1057-1061.
[25] 周琦，张翀，于栋华，等 . 穿山龙总皂苷对高尿酸血症的降尿酸及细胞抗炎作用研究 [J]. 中华中医药杂志，2013，28 (5)：1444-1448.
[26] 朱玲玲，陈宝军 . 七叶莲总皂苷体内外降尿酸作用及对高尿酸血症小鼠尿酸转运蛋白的影响 [J]. 新中医，2018，50 (5)：41-44.
[27] Zhu LR，Dong YF，Na S，et al. Saponins extracted from dioscorea collettii rhizomes regulate the expression of urate transporters in chronic hyperuricemia rats [J]. Biomed Pharmacother，2017，93：88-94.
[28] 陈光亮，朱立然，那莎，等 . 萆薢总皂苷对大鼠慢性高尿酸血症和肾小管尿酸转运体 1 表达的影响 [J]. 中国中药杂志，2013，38 (14)：2348-2353.
[29] Su JX，Wei YH，Liu ML，et al. Anti-hyperuricemic and nephroprotective effects of rhizoma dioscoreae septemlobae extracts and its main component dioscin via regulation of mOAT1，mURAT1 and mOCT2 in hypertensive mice [J]. Arch Pharm Res，2014，37 (10)：1336-1344.
[30] Zhou Q，Yu DH，Zhang C，et al. Total saponins from discorea nipponica ameliorate urate excretionin hyperuricemic mice [J]. Planta Med，2014，80 (15)：1259-1268.
[31] 陈光亮，武松，那莎，等 . 萆薢总皂苷对慢性高尿酸血症大鼠尿酸排泄指标的影响 [J]. 中国中西医结合杂志，2014，34 (1)：75-80.
[32] 康乐，苗艳艳，苗明三，等 . 基于调控尿酸转运蛋白的牛膝茎叶总皂苷治疗高尿酸血症肾病大鼠机制研究 [J]. 中华中医药杂志，2020，35 (5)：2305-2310.
[33] 邓耒娇，闫洁熙，王沛，等 . 茯苓多糖对高尿酸血症大鼠肾小管转运体 rURAT1、rOAT1 和 rOCT2 表达的影响 [J]. 西部中医药，2019，32 (6)：10-14.
[34] Yu X，Zhang L，Zhang P，et al. Lycium barbarum polysaccharides protect mice from hyperuricaemia through promoting kidney excretion of uric acid and inhibiting liver xanthine oxidase [J]. Pharm Biol，2020，58（1）：944-949.
[35] Li X，Gao X，Zhang H，et al. The anti-hyperuricemic effects of green alga enteromorpha prolifera polysaccharide via regulation of the uric acid transporters in vivo [J]. Food Chem Toxicol，2021，158：112630.
[36] 刘喜华，赵应学，周元明，等 . 水蛭素抗痛风作用及其机制研究 [J]. 中草药，2018，49 (6)：1365-1370.
[37] 吴林秀，梁红，赵应学，等 . 水蛭素对高尿酸血症大鼠尿酸盐转运体 OAT1、URAT1、GLUT9 表达的影响 [J]. 中草药，2020，51 (22)：5776-5780.
[38] 赵应学，黄思诗，梁红，等 . 水蛭素对大鼠 NRK-52E 细胞尿酸盐转运体表达的影响 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2021，23 (6)：1972-1977.
[39] 胡庆华，朱继孝，李宁，等 . 栀子苷对氧嗪酸钾盐致小鼠高尿酸血症的作用及其机制研究 [J]. 中南药学，2013，11 (10)：721-725.
[40] 孟兆青，唐朝辉，闫云霞，等 . 栀子苷降尿酸作用研究 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2014，16（7）：1565-1568.

[41] Zhang X，Nie Q，Zhang Z，et al. Resveratrol affects the expression of uric acid transporter by improving inflammation [J]. Mol Med Rep，2021，24（2）：564.
[42] Li L，Li Y，Luo J，et al. Resveratrol，a novel inhibitor of GLUT9，ameliorates liver and kidney injuries in a *D*-galactose-induced ageing mouse model via the regulation of uric acid metabolism [J]. Food Funct，2021，12（18）：8274-8287.
[43] 邹丽娜，王雨，姜卓希，等 . 基于肾脏尿酸转运的中药降尿酸活性成分筛选及评价——以菊苣酸为例 [J]. 世界中医药，2021，16（1）：28-34.
[44] 闫云霞，杨中林，萧伟，等 . 虎杖降尿酸作用初步研究 [J]. 亚太传统医药，2015，11（8）：7-9.
[45] 叶茂高 . 虎杖对高尿酸血症大鼠肾小管尿酸转运蛋白表达的影响 [J]. 浙江中医杂志，2019，54（12）：917-919.
[46] 曾金祥，毕莹，魏娟，等 . 车前草提取物降低急性高尿酸血症小鼠血尿酸水平及机理研究 [J]. 时珍国医国药，2013，24（9）：2064-2066.
[47] Zhou YL，Zhang XG，Li C，et al. Research on the pharmacodynamics and mechanism of Fraxini Cortex on hyperuricemia based on the regulation of URAT1 and GLUT9 [J]. Biomed Pharmacother，2018，106：434-442.
[48] Fang C，Chen LY，He MZ，et al. Molecular mechanistic insight into the anti-hyperuricemic effect of Eucommia ulmoides in mice and rats [J]. Pharm Biol，2019，57（1）：112-119.
[49] 闫曼，安雅婷，李舰，等 . 益母草提取物对大鼠高尿酸血症的调控作用 [J]. 中国中药杂志，2014，39（24）：4856-4859.
[50] 刘非，林珊，吴春珍，等 . 鼠麴草降尿酸活性研究 [J]. 沈阳药科大学学报，2020，37（1）：12-20.
[51] Zhang KH，Wang MQ，Wei LL，et al. Investigation of the effects and mechanisms of Dendrobium loddigesii rolfe extract on the treatment of gout [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2020，2020：4367347.
[52] Wang YZ，Zhou C，Zhu LJ，et al. Effects of macroporous resin extract of dendrobium officinale leaves in rats with hyperuricemia induced by fructose and potassium oxonate [J]. Comb Chem High Throughput Screen，2021，doi：10.2174/1386207324666210528114345. Online ahead of print.
[53] 王雨，林志健，聂安政，等 . 菊苣提取物对高尿酸血症大鼠肾脏果糖转运体 9 表达的影响 [J]. 中国中药杂志，2017，42（5）：958-963.
[54] Wang Y，Lin ZJ，Zhang B，et al. Cichorium intybus L. promotes intestinal uric acid excretion by modulating ABCG2 in experimental hyperuricemia [J]. Nutr Metab（Lond），2017，14（1）：38-49.
[55] 孙红，王少明，庄捷，等 . 土茯苓等中药抑制 URAT1 表达及降尿酸作用筛选研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2012，17（4）：403-407.
[56] 丁瑞，洪权，耿晓东，等 . 土茯苓治疗小鼠高尿酸血症的机制研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志，2019，20（2）：97-100.
[57] 符静泉，郭为，韦曼莉，等 . 猫须草水提物对痛风性肾病大鼠肾脏 URAT1、OAT1 及病理的影响 [J]. 中成药，2021，43（3）：877-882.
[58] Liang D，Yong T，Diao X，et al. Hypouricaemic and nephroprotective effects of *Poria cocos* in hyperuricemic mice by up-regulating ATP-binding cassette super-family G member 2 [J]. Pharm Biol，2021，59（1）：275-286.
[59] 李浩，余佳，杨常波，等 . 叶下珠提取物对高尿酸血症小鼠模型尿酸水平的影响 [J]. 海南医学院学报，2020，26（18）：1389-1394.
[60] Lee YS，Sung YY，Yuk HJ，et al. Anti-hyperuricemic effect of Alpinia oxyphylla seedextract by enhancing uric acid excretion in the kidney [J]. Phytomedicine，2019，62：152975.

（收稿日期：2022-01-11；修回日期：2022-02-21）

峻下逐水药与肠道菌群相互作用的研究进展

秦贝贝，贾泽菲，王佳莉，马琳，胡静*（天津中医药大学，天津　301617）

摘要：近年来，峻下逐水药由于其重要的临床药用价值和较大的开发前景，引起人们的广泛关注。虽然其化学成分、药效、毒性作用的相关研究较多，但揭示其与肠道菌群相关性的研究相对较少。本文结合近年文献从毒性、炮制减毒、药效、配伍禁忌等方面对峻下逐水药与肠道菌群相互作用的研究进行归纳总结，旨在为该类药物的临床安全合理使用和开展多方向研究提供思路。

关键词：峻下逐水；肠道菌群；甘遂；京大戟；千金子

中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)05-1129-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.028

Research progress in the interaction between drastic purgatives and intestinal microflora

QIN Bei-bei, JIA Ze-fei, WANG Jia-li, MA Lin, HU Jing* (*Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617)

Abstract: In recent years, drastic purgatives have attracted much attention due to their important medicinal value and development prospects. Although there are many studies on their chemical compositions, efficacy and toxicity, few focus on their correlation with intestinal microflora. This paper summarized related literatures in recent years, and interactions between drastic purgatives and intestinal microflora from toxicity, processing, efficacy, and incompatibility, to provide ideas for the rational use of drastic purgatives and multi-directional research.

Key words: drastic purgative; intestinal microflora; Kansui Radix; Euphorbiae Pekinensis Radix; Euphorbiae Semen

肠道微生物是一个庞大而复杂的微生态系统，包含数量众多、种类丰富的肠道菌群，它们主要由细菌组成，其中专性厌氧菌占 70% ～ 90%。人类肠道中已经发现超过 50 个细菌门，大多属于拟杆菌门 *Bacteroidetes*、厚壁菌门 *Firmicutes* 和放线菌门 *Actinobacteria*。肠道菌群与宿主之间是互利共生的关系，正常情况下，机体与肠道菌群之间是处于动态平衡的，这种平衡对宿主的健康、消化吸收、代谢及免疫功能都起着至关重要的作用。当环境、毒素、药物等因素破坏了肠道微生态结构，会造成肠道菌群失调，进而影响人体健康。研究表明，肠道菌群与肿瘤、代谢及免疫性疾病等都有密切关系 [1-2]。

近年来，肠道菌群在中药药效和毒性方面的作用逐渐受到重视 [3-4]。肠道菌群位于胃肠，中医认为胃肠是六腑通降的枢纽，腑以通为用，胃肠以降为顺，胃肠通降则脏安，胃肠不通则脏病，因此，“通降法” 是脏腑疾病的重要治则。研究表明，泻下药由于具有泻下通便、荡涤肠胃的作用，能够通过调节肠蠕动，促进消化等功能，调理肠道微生态平衡 [5-6]。峻下逐水药泻下作用猛烈，归脾、胃、大肠经，苦能泄降，有毒而力强，善通利二便、排除肠胃积滞而泻水逐饮，并能攻毒、消肿、散结，用以治疗邪在肠胃，实热内结，大便不通或寒积、水结、停痰留饮等 [7-8]。峻下逐水药药用历史悠久，具有重要的临床药用价值和较大的开发前景，虽然对其化学成分、药效、毒性作用的相关研究较多，但揭示其与肠道菌群相关

基金项目：国家自然科学基金面上项目（No.81873083）。

作者简介：秦贝贝，女，硕士研究生，主要从事中药品质评价研究，email：319006239@qq.com　*通信作者：胡静，女，副教授，主要从事中药材加工及中药品质评价研究，email：hjtju@163.com

性的研究相对较少[9-13]。本文结合近年文献从毒性、炮制减毒、药效、配伍禁忌等方面对峻下逐水药与肠道菌群相互作用的研究进行归纳总结，旨在为该类药物临床安全合理使用和开展多方向研究提供思路。

1 肠道菌群与峻下逐水药毒性的相关性

1.1 与甘遂毒性的相关性

甘遂始载于《神农本草经》，为大戟科植物甘遂 *Euphorbia kansui* 的干燥块根，其性寒、味苦，具有泻水逐饮、消肿散结的功效，临床常用于治疗水肿、腹水、哮喘等。《本草纲目》将甘遂归入毒草类，其对胃肠道黏膜有刺激作用，能引起炎症、充血、腹泻、腹痛等。药理研究显示，甘遂能引起肝肾组织病理损伤和生化指标的改变[14]。Jiang 等[15]研究表明甘遂的毒性与大鼠肠道微生物 Alpha 多样化的升高有关。在门水平上，甘遂组大鼠粪便以 *Firmicutes* 和 *Bacteroidetes* 为优势菌群，两者的相对丰度分别为 56.37% 和 38.88%。进一步研究发现，甘遂给药后大鼠粪便乳酸菌属 *Lactobacillus* 相对丰度降低，蓝藻属 *Blautia* 相对丰度增加，且两者均为属水平上的高表达菌。此外，甘遂组瘤胃球菌 *Ruminococcus* 和异普雷沃菌 *Alloprevotella* 的相对丰度也降低。*Lactobacillus* 可通过产生乳酸、过氧化氢、细菌素等抗菌物质保护肠道、抑制病原菌、增强肠屏障功能[16]。*Blautia* 是肠道产酸菌，能将气体转化成乙酸，临床研究显示肠易激综合征患者体内的 *Blautia* 水平明显升高[17]。因此，甘遂可影响肠道菌群多样性，使益生菌的水平降低，有害菌的水平升高。

肠道微生物代谢产物是通过微生物 - 微生物和宿主 - 微生物的相互作用产生的，它们不仅是维持机体免疫稳态所必需的，而且影响宿主对许多免疫介导疾病的敏感性，是潜在的重要生理调节剂[18]。作为结肠细菌发酵的主要底物，复合碳水化合物的主要代谢终产物是短链脂肪酸（short-chain fatty acids，SCFAs）。研究显示甘遂给药后，大鼠粪便中乙酸、丙酸、丁酸等 SCFAs 的含量均显著降低[19]。SCFAs 不仅是肠道微生物本身的重要能量来源，也是肠道上皮细胞的重要能量来源，具有多种机体调节功能[20-21]。此外，甘遂给药后肝脏合成胆汁酸的能力下降，胆道发生部分阻塞，排泌的胆汁酸也相应减少[22]。

Tang 等[23]研究发现甘遂除了引起大鼠肠道菌群失调，还使大鼠尿液中牛磺酸、马尿酸、氧化三甲胺（trimethylamine *N*-oxide，TMAO）的含量显著升高。三甲胺（trimethylamine，TMA）是由肠道微生物从营养物质中合成而来，通过肝脏宿主酶进一步转化为 TMAO。肠道微生物介导的磷脂酰胆碱、胆碱或左肉碱代谢最终均会产生 TMAO。TMAO 水平的升高与慢性肾病、糖尿病、心血管疾病等密切相关，常被认为是肾功能损伤和心血管疾病的重要生物标志物[24-25]。马尿酸是尿液中常见的代谢物，其浓度和肠道微生物结构组成相关，被认为是有毒溶剂环境暴露的常用指标[26]。微生物代谢产物分析表明，氨基酸代谢是依赖于肠道微生物群功能代谢中最大的一类[20]。甘遂给药后能引起机体氨基酸代谢、三羧酸循环紊乱，使大鼠肾脏中异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸等支链氨基酸，苯丙氨酸等芳香族氨基酸，以及丙氨酸、赖氨酸的含量显著增加[27]。

1.2 与京大戟毒性的相关性

京大戟始载于《神农本草经》，为大戟科植物大戟 *Euphorbia pekinensis* Rupr. 的干燥根，其性寒、味苦，具有泻水逐饮、消肿散结的功效，临床用于治疗水肿、腹水、痰饮积聚、咳喘、二便不利等。京大戟有毒，使用不当可引起肝脏和肠道毒性等[28-29]。

二萜类是京大戟的主要化学成分，可引起严重的肠道毒性，小鼠肠黏膜损伤和肠黏膜屏障功能减弱[30]。研究发现，京大戟二萜给药后，小鼠肠道微生物多样性发生显著变化，其中 *Bacteroidetes*、*Firmicutes*、*Actinobacteria*、*Patescibacteria* 为优势菌群，且 *Bacteroidetes*、*Actinobacteria* 的相对丰度均显著降低。此外，京大戟二萜组小鼠粪便中乙酸、丙酸、丁酸等 SCFAs 的含量和结肠紧密连接蛋白的表达显著降低，白介素 -1β（IL-1β）、白介素 -6（IL-6）、肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）等炎症因子及内毒素血清磷酸脂多糖（LPS）水平显著升高。在肠道菌群与代谢物相关性分析中鉴定了京大戟二萜致结肠损伤的 9 种关键细菌，其中 *Barnesiella*、*Candidatus Arthromitus*、*Alistipes*、*Enterorhabdus*、*Muribaculaceae*、*Alloprevotella* 对结肠起保护作用，它们与炎症因子成负相关，与紧密连接蛋白和 SCFAs 成正相关，且相对丰度均显著降低；而 *Bilophila*、*Mucispirillum*、*Ruminiclostridium* 相对丰度均显著增加。此外，京大戟二萜引起的肠道微生物群紊乱还会进一步加重肠黏膜损伤[31]。京大戟肾毒性生物标志物主要包括次黄嘌呤、溶血磷脂酰胆碱、烟酰胺、苯丙氨酸、*N*，*N*- 二甲基甘氨酸、C_{16}- 二氢鞘氨醇以及 C_{18}- 植鞘糖苷[32]；肝毒性生物

标志物主要包括磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、脂肪酸、神经酰胺[33]，有关这些内源性毒性代谢物与肠道菌的相关性还需进一步研究。

1.3 与千金子毒性的相关性

千金子为大戟科植物续随子 *Euphorbia lathyris* L. 的干燥成熟种子，性温、味辛，具有泻下逐水、破血消癥的功效，为利水要药，临床用于二便不通、水肿、痰饮、积滞胀满、血瘀经闭、顽癣等。千金子有毒，使用不当可引起胃痛、腹泻等肠道系统和头痛、头晕、烦躁等神经系统毒性[34]。

研究表明，千金子造成肠道损伤的特征性差异菌属主要包括梭形杆菌属 *Lysinibacillus*、嗜胆菌属 *Bilophila* 等[35]。千金子可使肠黏膜损伤，肠屏障功能标志物血清二胺氧化酶（diamine oxidase，DAO）、LPS 水平明显升高，使益生菌 *Lactobacillus*、*Bifidobacterium* 等水平显著降低[36-37]。*Lactobacillus*、*Bifidobacterium* 在肠黏膜表面发挥抗炎作用，益生菌水平的增加可消除病原体，减少肠黏膜炎症，改变肠道菌群的组成[38]。*Lysinibacillus*、*Bilophila* 与氨基酸代谢、糖类分解[39]有关，可使结肠炎发病率增加[40]。因此，千金子的毒性作用表现为其通过影响肠道菌群多样性，改变正常肠道菌群的结构，使益生菌 *Lactobacillus*、*Bifidobacterium* 水平降低，致病菌 *Lysinibacillus*、*Bilophila* 水平升高，进而造成肠黏膜损伤、肠屏障功能减弱。

1.4 与芫花毒性的相关性

芫花为瑞香科植物芫花 *Daphne genkwa* Sieb. Et Zucc. 的干燥花蕾，性辛、温，味苦，有毒，具有泻水逐饮的功效，临床用于水肿胀满、胸腹积水、二便不利等。药理研究表明，芫花可对大鼠造成明显的肝脏和肠道损伤，使血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶、胆酸、鼠胆酸、熊去氧胆酸水平均显著升高[41-42]，改变肠顶端结构域、微绒毛和肠顶端连接发育所需基因的表达模式[43]。芫花平是芫花中的主要活性成分，同时也是毒性成分。研究表明，芫花平引起的肠道和肝脏毒性可造成肠道菌群紊乱和体内氨基酸代谢、脂类代谢、碳水化合物代谢的异常，同时使大鼠尿液中的 14 种内源性生物标志物也发生了显著变化[44]。其中，苯乙酰甘氨酸是苯丙氨酸在肠道菌群作用下的代谢产物，3- 甲基二氧吲哚是色氨酸代谢产物 3- 甲基吲哚在结肠细菌作用下产生的体内氧化产物。马尿酸是苯甲酸和甘氨酸在肠道内由微生物代谢合成，其变化反映了肠道微生物的代谢能力和组成，具有重要的毒理学意义[45]。芫花平给药后，大鼠尿液中苯乙酰甘氨酸水平的降低和马尿酸、3- 甲基二氧吲哚水平的升高均与芫花平造成的肠道微生物群紊乱有关，这说明肠道菌群在芫花平对宿主的内源性代谢中也发挥了重要作用。

峻下逐水类中药甘遂、京大戟、千金子等多有毒、作用猛烈，使用不当容易引起中毒。以上研究表明，这类药物的刺激性和毒性能够造成肠道菌群紊乱，影响肠道微生物多样性，引起肠道菌群失衡，特征性差异菌属 *Lactobacillus*、*bifidobacterium*、*Barnesiella*、*Candidatus_Arthromitus*、*Alistipes*、*Enterorhabdus*、*Muribaculaceae*、*Alloprevotella* 等益生菌比例的降低及 *Blautia*、*Lysinibacillus*、*Bilophila*、*Mucispirillum*、*Ruminiclostridium* 等条件致病菌比例的增加等。肠道菌群的结构稳态是机体代谢功能稳态的基础，肠道菌群结构失调、微生态紊乱会诱发机体产生各种疾病。因此，峻下逐水药能够影响肠道菌群多样化，改变其结构数量，进而造成肠黏膜损伤、肠道屏障功能减弱、肝肾组织损伤等。此外，峻下逐水药使 SCFAs 等代谢产物也发生了改变。代谢物是肠道微生物（有益的、致病的）与宿主之间相互作用的主要驱动力，发挥着各种调节机体的功能。微生物代谢物既可以被宿主直接感知，也可以通过肠道转运被肠外细胞和组织感知，从而触发宿主的生理和病理变化[2]。甘遂、京大戟等引起了肠道微生物代谢物 SCFAs 的改变、宿主氨基酸代谢紊乱以及 TMAO、马尿酸、3- 甲基二氧吲哚等内源性代谢产物含量升高等，这些代谢物的异常变化会进一步影响宿主与微生物之间的平衡关系，改变机体生理功能，从而产生毒性作用。

2 肠道菌群与峻下逐水药炮制减毒的相关性

峻下逐水药作用猛烈、有毒，易伤正气，使用时应注意中病即止、不宜久服，确保用药安全。传统中医药理论认为，炮制能降低该类药物的毒烈之性，缓和其刺激性和峻下作用。临床上，甘遂、京大戟、芫花需醋炙，千金子、巴豆需制霜后使用。

毒性研究表明，醋炙后的甘遂给药组小鼠的肠组织病理学、炎性损伤及黏膜渗透性等损伤指标均明显减轻[46-47]。与生品相比，醋炙甘遂给药组肠道微生物 Alpha 多样化降低，潜在致病菌 *Blautia* 比例明显降低，益生菌 *Lactobacillus* 比例明显升高。醋甘遂大鼠粪便中乙酸、丙酸盐、丁酸盐、戊酸盐等 SCFAs 水平也明显升高[15，48-49]，SCFAs 能够通过降低趋化因子的产生或支持分子表达等降低肠道

炎症。同时，醋甘遂给药组大鼠肝肾组织损伤较生品明显减轻，代谢产物马尿酸、TMAO、甜菜碱、氨基酸、赖氨酸、尸胺、牛磺酸、谷氨酰胺、肌酸、肌酐等的变化幅度也比生品缓和[50]。此外，千金子制霜后对大鼠中 *Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、大肠埃希菌、肠球菌等肠道菌群的作用减弱，引起的肠道菌群紊乱程度较生品降低，与千金子制霜后较生品泻下作用缓和一致[37]。

以上说明，甘遂、千金子经过炮制后缓和了生品对肠道微生物多样化的影响，使益生菌 *Lactobacillus*、*Bifidobacterium* 水平升高，潜在致病菌 *Blautia* 水平降低。同时，炮制缓解了生品对肠道微生物代谢物 SCFAs、内源性代谢产物 TMAO、马尿酸以及机体氨基酸代谢，蛋白质合成、糖酵解、三羧酸循环等的影响。甘遂、千金子炮制前后对肠道菌群结构、组成及代谢物影响的差异与传统炮制理论认为甘遂醋炙、千金子制霜能够缓解生品对机体的刺激性和毒性作用一致。目前，巴豆、芫花等炮制前后对肠道菌群及代谢产物影响差异的相关文献还很少，尚需进一步探索。

3 肠道菌群与峻下逐水药药效作用的相关性

甘遂、京大戟、芫花等对治疗重症胰腺炎、肝硬化、乳腺癌、肝癌、肠梗阻等重症恶性疾病有显著疗效[11, 13]。肠道菌群与便秘、腹泻、肠易激综合征、肿瘤等多种疾病密切相关，被认为是治疗肝癌、结肠癌、直肠癌等的潜在作用靶点。

3.1 与泻水逐饮作用的相关性

甘遂被历代医家称为“泄水圣药”，是治疗水肿、腹水的良药。研究发现，醋甘遂能够明显改善癌性腹水（malignant ascites，MA）大鼠的腹水病理状态，促进排尿、排泄、水通道蛋白及其 mRNA 的表达，抑制腹水生成，促进腹水排泄，且甘遂醋炙后发生腹泻、胃肠道损伤等不良反应的程度也明显降低。醋甘遂给药后，MA 大鼠的肠道损伤明显减轻，肠道菌群多样性和结构也趋于正常，益生菌 *Lactobacillus* 等比例明显增加，潜在病原菌 *Blautia*、*Anaeroplasm*、*Lachnospiraceae* 等比例明显降低。同时，*Lactobacillus* 的干预能增强醋甘遂的逐水作用和对肠道菌群的影响[51]。此外，醋甘遂的泻水逐饮作用还与苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸生物合成，苯丙氨酸代谢、色氨酸代谢、精氨酸代谢、甘油磷脂代谢等代谢通路相关。醋甘遂通过这些代谢通路和内源性代谢产物纠正 MA 大鼠的肠道菌群紊乱和肠上皮细胞的通透性，增强肠道防御的能力，维持肠道细胞结构和功能的完整性等。内源性代谢产物与肠道菌群相关性的研究表明，*Lachnospiraceae* 与 γ- 亚油酸、9- 羟基十八碳二烯酸、4- 氧 - 视黄酸、磷脂酰乙醇胺水平成负相关；*Alistipes* 与苯丙酮酸水平成负相关；*Ruminiclostridium* 9 与 γ- 亚油酸、4- 氧 - 视黄酸、磷脂酰乙醇胺水平成负相关；*Ruminiclostridium* 与 4- 氧 - 视黄醇、磷脂酰乙醇胺水平成负相关[52]。

巨大戟烷型和假白榄烷型二萜是甘遂的主要有效成分，醋甘遂二萜可增加 MA 大鼠的尿量、排便量，降低 Na^+、K^+、Cl^- 的水平，从而显著减少腹水形成。甘遂二萜减轻肠黏膜损伤作用的关键肠道菌群为 *Prevotellaceae* 和 *Bacteroidetes*[53]。肠道菌群 Beta 多样性研究表明，二萜类成分通过增加有益菌 *Lactobacillus* 相对丰度，降低有害菌 *Lachnospiraceae* 和 *Anaeroplasma* 相对丰度，调节腹水大鼠肠道菌，发挥泻水逐饮作用[53]。甘遂大戟萜酯 C（kansuiphorin C，KPC），甘逐萜酯 A（kansuinin A，KA）是甘遂中含量较高的二萜类成分，可使 *Lactobacillus* 相对丰度增加，幽门螺杆菌 *Helicobacter* 相对丰度降低，并通过调节碳水化合物和氨基酸代谢等改善大鼠的腹水症状。当剂量为 10 $mg \cdot kg^{-1}$ 时，KPC 对 MA 大鼠腹水的抑制效果明显优于 KA，且对肝、胃、肠的损伤更小。KPC 对 Helicobacter 水平降低的效果是 KA 的 3.5 倍，说明其对肠道菌群的调节作用更强。在体内微生物作用下，KPC、KA 通过氧化、水解、脱水和甲基化转化成小极性代谢物，其中 KPC 在体内的转化率更高[54-55]。

3.2 抑菌作用

研究表明，商陆皂苷对产气荚膜梭菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、普通变形杆菌、铜绿假单胞菌等均有明显的抑制作用[56-57]。巴豆果壳和种子提取物均具有一定的抑菌活性[58]。此外，芫花对大肠埃希菌抑杀作用较强，而肛管性疾病的感染以大肠埃希菌为主，提示了其对大肠埃希菌的抑制和杀灭作用是治疗肛管性疾病（如痔瘘）的作用机制之一[59-60]。

由此可见，峻下逐水药不仅对生理性肠道菌群有影响，对病理性肠道菌群也有调节作用。当肠道菌群失调时，体内的微生态平衡被打破、机体免疫功能下降，正常菌的定植力下降，致病菌大量繁殖，导致“邪气”入侵和疾病发生。峻下逐水药能够直接作用于病理性肠道菌群，调节其多样性，使益生菌的比例增加、致病菌的比例降低，从而纠正紊乱的肠道菌群。峻下逐水药对机体正常菌群“扶正”和对致病菌“祛邪”的过程，体现

了中医“扶正祛邪”“整体观”的理论基础[61]。此外，峻下逐水药还能调节宿主的代谢功能和内源性代谢产物的水平，改善机体生物学功能，从而达到治疗疾病的目的。

4 肠道菌群与峻下逐水药配伍禁忌的相关性

我国历代医者在不断研究和长期临床实践的基础上，总结出了以“十八反”为代表的中药配伍禁忌理论，药物配伍禁忌的实质是药物与机体的相互作用。

研究表明甘遂、甘草合用可造成肠道菌群失调，使条件致病菌 *Mycoplasma*、*Desulfovibrio*、*Enterorhabdus* 的水平显著增加、*Prevotellaceae* 的水平显著降低，肠道菌群之间的相关性分析发现 *Desulfovibrio*、*Mycoplasma*、*Enterorhabdus* 主要与 *Prevotellaceae* 竞争。甘遂、甘草合用还引起了肠道菌群宏基因组的变化，且该变化与 *Mycoplasma* 密切相关[62]。芫花、甘草合用可引起明显的肝肾损伤和生殖毒性，造成苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成及酪氨酸代谢、甘油磷脂代谢中断。其中，甘油磷脂代谢途径与肝损伤有关，苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸生物合成和酪氨酸代谢途径与肾损伤有关[63]。芫花、甘草合用导致 *Desulfovibrio* 水平显著增加，结肠硫化氢（H_2S）代谢紊乱，并影响了肠道微生物宏基因组的 1172 个基因。巴豆霜、甘草合用不仅削弱了巴豆霜的快速利尿作用，还使小鼠小肠组织的损伤加重，同时肠道菌群结构和数量均发生显著变化，有害菌属 *Streptococcus*、*Rikenellaceaeukn*、*Desulfovibrio*、*Streptococcaceaeukn* 水平显著升高，且差异肠道菌属的种类与给药剂量相关[64]。以上研究证实，甘遂、芫花、巴豆霜与甘草合用均会造成 *Desulfovibrio* 水平显著升高，*Desulfovibrio* 参与 H_2S 生成，可引起肠道菌群失调，造成机体氨基酸、胆固醇代谢功能紊乱和代谢产物 H_2S 的异常变化[65]。

京大戟、甘草合用不仅抵消了甘草增加 *Lactobacillus* 比例的作用，而且使 *Akkermansia* 和 *Butyricimonas* 的比例显著降低，链球菌 *Streptococcus* 和 *Prevotellaceae* 的比例显著升高。此外，京大戟、甘草合用还能使大鼠粪便中丁酸等 SCFAs 的含量显著减少，且甘草所占比例越大，SCFAs 含量下降越明显[66]。千金子、甘草合用导致肠道菌群宏基因组结构发生异常变化，其中 98% 显著调节的基因功能是两药合用后产生的。特征性差异菌属分析表明，千金子、甘草合用使 *Enterococcus*、*S24_7_ukn*、*Candidatus arthromitus* 等 7 个肠道菌属的种类和含量发生了显著变化。其中，*Enterococcus* 为肠道致病菌，*S24_7_ukn*、*Candidatus Arthromitus* 与内毒素合成及肠道免疫相关，这些菌属含量的增加会导致肠道内毒素增加、肠黏膜损伤、肠道免疫功能被破坏。此外，两药合用后芳香氨基酸代谢、黏液降解功能紊乱，入血 LPS、DAO 水平显著升高，肠源尿毒素硫酸吲哚、硫酸等毒性物质的含量显著增加，进一步加剧了肠道损伤[35]。

由此可见，甘草与甘遂、京大戟、芫花、巴豆霜配伍不仅影响了肠道微生物多样性，使益生菌 *Lactobacillus* 等减少，致病菌 *Enterococcus*、*S24_7_ukn*、*Candidatus Arthromitus*、*Desulfovibrio*、*Streptococcus*，*Rikenellaceaeukn*、*Desulfovibrio*、*Streptococcaceaeukn* 等增加，而且还改变了肠道微生物宏基因组。相反配伍的增毒作用还会引起氨基酸、胆固醇、H_2S 等代谢功能紊乱，菌群代谢产物 SCFAs 含量降低和内源毒性代谢产物含量增加等，而这些代谢的失衡与结肠炎症、肿瘤等多种疾病都密切相关。

5 展望

综上，肠道菌群在峻下逐水药的毒性、药效、炮制和配伍中均发挥着重要的作用。峻下逐水药对正常肠道菌群平衡的影响和对病理性肠道菌群紊乱的纠正体现了其对肿瘤等恶性疾病以毒攻毒、扶正祛邪的治疗作用。峻下逐水药与肠道菌群的相互作用（见图 1）体现在两方面：一方面，峻下逐水药能够通过调节肠道微生物多样性，肠道有益菌 / 条件致病菌的比例和细菌代谢产物等产生毒性或药效作用；另一方面，肠道微生态环境的改变会影响宿主相关代谢功能的稳态和代谢产物的水平，也能发挥药物本身及药物配伍之后的毒效作用。峻下逐水药 - 肠道菌群 - 特征差异菌属 - 细菌代谢产物 - 机体代谢为中药及其配伍作用的研究提供了新模式，其中特征性差异菌属、代谢产物的鉴别及其相关性的揭示是研究的关键。目前，峻下逐水药与肠道菌群相互作用的研究仍处于积累阶段，肠道微生物既可以作为调节靶点，也可以作为中药与机体相互作用的媒介，其结构平衡和代谢功能同时受到药物和肠道微生态的影响。中药 - 肠道菌群 - 代谢产物之间的相互作用为中药毒效、炮制和配伍机制的研究开辟了新思路。此外，剂量大小是有毒中药对机体产生疗效还是毒性的关键，不同剂量的峻下逐水药与肠道菌群关系的研究对于其临床药效的发挥及不良反应的降低也具有重要意义。

图 1 峻下逐水药与肠道菌群的相互作用

Fig 1 Interactions between drastic purgatives and intestinal microflora

参考文献

[1] Ulluwishewa D，Anderson RC，McNabb WC，et al. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components [J]. J Nutr，2011，141（5）：769-776.

[2] McCarville JL，Chen GY，Cuevas VD，et al. Microbiota metabolites in health and disease [J]. Annu Rev Immunol，2020，38（1）：147-170.

[3] 李寒冰，吴宿慧，张颜语，等 . 中药与肠道菌相互作用研究进展 [J]. 中成药，2016，38（1）：147-151.

[4] Yue S，Wang W，Yu J，et al. Gut microbiota modulation with traditional Chinese medicine：a system biology-driven approach [J]. Pharmacol Res，2019，148：104453.

[5] 张宇航，徐佳元，曹丹，等 . 肠道微生物菌群对大黄蒽醌类化合物代谢研究进展 [J]. 中华中医药学刊，2021，39（10）：203-211.

[6] 吴云，陈瑞，田维毅 . 苦寒中药对肠道菌群结构影响的研究进展 [J]. 中国微生态学杂志，2015，27（2）：235-239.

[7] 董必成，张广，卢愿，等 . 基于肠道菌群探讨“腑以通为用”的新内涵 [J]. 时珍国医国药，2021，32（3）：683-685.

[8] 叶玲，柯敏辉 . 论下法在肛肠科的临床应用 [J]. 中国现代药物应用，2008，2（16）：101-102.

[9] Lou JW，Cao LL，Zhang Q，et al. The toxicity and efficacy evaluation of different fractions of Kansui fry-baked with vinegar on Walker-256 tumor-bearing malignant ascites effusion rats and normal rats [J]. J Ethnopharmacol，2018，219：257-268.

[10] Shen J，Kai J，Tang Y，et al. The chemical and biological properties of *Euphorbia kansui* [J]. Am J Chin Med，2016，44（2）：253-273.

[11] 申博蔚 . 京大戟中单体月腺大戟素 A 对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖和凋亡的影响 [D]. 沈阳：辽宁中医药大学，2021.

[12] 陈飞燕，陶伟伟，陈扣玉，等 . 京大戟中二萜类化合物 pekinenal 对肝癌细胞增殖、周期和凋亡的影响 [J]. 中国药理学通报，2016，32（4）：519-524.

[13] 刘玉梅，任慧婧 . 有毒中药甘遂治疗重症恶性疾病的现状与展望 [J]. 铜仁学院学报，2013，15（4）：132-135.

[14] 赵雪艳，蔡霞，胡正海 . 甘遂生物学、化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药，2014，45（20）：3029-3033.

[15] Jiang D，Kang A，Yao W，et al. *Euphorbia kansui* fry-baked with vinegar modulates gut microbiota and reduces intestinal toxicity in rats [J]. J Ethnopharmacol，2018，226：26-35.

[16] Verdenelli MC，Coman MM，Cecchini C，et al. Evaluation of antipathogenic activity and adherence properties of human *Lactobacillus* strains for vaginal formulations [J]. J Appl Microbiol，2014，116（5）：1297-1307.

[17] Ford AC，Quigley EM，Lacy BE，et al. Efficacy of prebiotics，probiotics，and synbiotics in irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation：systematic review and meta-analysis [J]. Am J Gastroenterol，2014，109（10）：1546-1562.

[18] Sridharan GV，Choi K，Klemashevich C，et al. Prediction and quantification of bioactive microbiota metabolites in the mouse gut [J]. Nat Commun，2014，5（1）：5492.

[19] Jiang D，Guo S，Kang A，et al. Comparison of the short-chain fatty acids in normal rat faeces after the treatment of *Euphorbia kansui*，a traditional Chinese medicine for edoema [J]. Pharm Biol，2020，58（1）：367-373.

[20] Rooks MG，Garrett WS. Gut microbiota，metabolites and host immunity [J]. Nat Rev Immunol，2016，16（6）：341-352.

[21] Tan J，McKenzie C，Potamitis M，et al. The role of short-chain fatty acids in health and disease [J]. Adv Immunol，2014，121：91-119.

[22] 唐冰雯 . 基于 NMR 的代谢组学对甘遂毒性机制的研究 [D]. 广州：广东药学院，2012.

[23] Tang B，Ding J，Wu F，et al. ^{1}H NMR-based metabonomics study of the urinary biochemical changes in Kansui treated rat [J]. J Ethnopharmacol，2012，141（1）：134-142.

[24] Tang WH，Wang Z，Kennedy DJ，et al. Gut microbiota-dependent trimethylamine *N*-oxide（TMAO）pathway

contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease [J]. Circ Res，2015，116（3）：448-455.

[25] Tong Y，Marion T，Schett G，et al. Microbiota and metabolites in rheumatic diseases [J]. Autoimmun Rev，2020，19（8）：102530.

[26] Morgan MS. The biological exposure indices：a key component in protecting workers from toxic chemicals [J]. Environ Health Perspect，1997，105（Suppl 1）：105-115.

[27] 杨永霞，唐冰雯，丁佳佳，等 . 甘遂毒性的血浆代谢组学研究 [J]. 第三军医大学学报，2014，36（1）：38-41.

[28] 曹雨诞，陈海鹰，张丽，等 . 醋制降低京大戟细胞毒性部位对小鼠肝脏氧化损伤机制研究 [J]. 中国药理学通报，2014，30（2）：295-296.

[29] 王奎龙，郁红礼，吴皓，等 . 京大戟毒性部位及其醋制前后成分变化研究 [J]. 中国中药杂志，2015，40（23）：4603-4608.

[30] Yao F，Jiang D，Cheng F，et al. Diterpene pekinenal from Euphorbia Pekinensis Radix induced IEC-6 cells apoptosis mediated by mitochondria and death receptors [J]. Toxicol In Vitro，2019，57：1-8.

[31] Wang K，Xu X，Maimaiti A，et al. Gut microbiota disorder caused by diterpenoids extracted from *Euphorbia pekinensis* aggravates intestinal mucosal damage [J]. Pharmacol Res Perspect，2021，9（5）：1-13.

[32] Liu Z，Zeng Y，Hou P. Metabolomic evaluation of *Euphorbia pekinensis* induced nephrotoxicity in rats [J]. Pharm Biol，2018，56（1）：145-153.

[33] Shi J，Zhou J，Ma H，et al. An in vitro metabolomics approach to identify hepatotoxicity biomarkers in human L02 liver cells treated with pekinenal，a natural compound [J]. Anal Bioanal Chem，2016，408（5）：1413-1424.

[34] Zhu A，Zhang T，Wang Q. The phytochemistry，pharmacokinetics，pharmacology and toxicity of *Euphorbia Semen* [J]. J Ethnopharmacol，2018，227：41-55.

[35] 陶伟伟，于金高，陈艳琰，等 . 基于千金子与甘草对肠道菌群 / 屏障系统的影响探讨其配伍禁忌机制 [J]. 中国中药杂志，2018，43（2）：369-376.

[36] 张瑜，王英姿，李凤英，等 . 千金子制霜前后提取物对 4 类肠道菌影响的体外研究 [J]. 中国微生态学杂志，2017，29（10）：1117-1121.

[37] 孙振阳，王英姿，聂瑞杰，等 . 千金子制霜前后提取物对大鼠肠道菌群的影响 [J]. 中草药，2017，48（21）：4493-4496.

[38] O’Mahony L，McCarthy J，Kelly P，et al. *Lactobacillus* and *bifidobacterium* in irritable bowel syndrome：symptom responses and relationship to cytokine profiles [J]. Gastroenterology，2005，128（3）：541-551.

[39] Gómez-Garzón C，Hernández-Santana A，Dussán J. Comparative genomics reveals *Lysinibacillus sphaericus* group comprises a novel species [J]. BMC Genomics，2016，17（1）：709.

[40] Devkota S，Wang Y，Musch MW，et al. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in Il10$^{-/-}$ mice [J]. Nature，2012，487（7405）：104-108.

[41] Chen Y，Guo J，Qian Y，et al. Toxicity of daphnane-type diterpenoids from Genkwa Flos and their pharmacokinetic profile in rat [J]. Phytomedicine，2013，21（1）：82-89.

[42] Qiao Y，Zhao Y，Wu Q，et al. Full toxicity assessment of Genkwa Flos and the underlying mechanism in nematode Caenorhabditis elegans [J]. PLoS One，2014，9（3）：e91825.

[43] Geng L，Ma C，Zhang L，et al. Metabonomic study of Genkwa Flos-induced hepatotoxicity and effect of herb-processing procedure on toxicity [J]. Phytother Res，2013，27（4）：521-529.

[44] Chen Y，Duan J，Guo J，et al. Yuanhuapine-induced intestinal and hepatotoxicity were correlated with disturbance of amino acids，lipids，carbohydrate metabolism and gut microflora function：a rat urine metabonomic study [J]. J Chromatogr B，2016，1026：183-192.

[45] Williams RE，Eyton-Jones HW，Farnworth MJ，et al. Effect of intestinal microflora on the urinary metabolic profile of rats：a ^{1}H-nuclear magnetic resonance spectroscopy study [J]. Xenobiotica，2002，32（9）：783-794.

[46] 王文晓，高兰，张丽，等 . 醋炙减弱甘遂醋酸乙酯部位对小鼠胃肠黏膜通透性影响的研究 [J]. 中草药，2014，45（22）：3289-3294.

[47] 高兰，颜晓静，李征军，等 . 醋炙降低甘遂对小鼠胃肠道氧化损伤作用机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19（10）：257-260.

[48] 唐冰雯，丁佳佳，杨永霞，等 . 基于 NMR 的代谢组学对醋制甘遂减毒作用的研究 [J]. 中药药理与临床，2013，29（4）：98-103.

[49] 杨永霞，丁佳佳，唐冰雯，等 . 醋制甘遂减毒的血浆代谢组学研究 [J]. 第二军医大学学报，2013，34（10）：1097-1103.

[50] 丁佳佳 . 基于 NMR 代谢组学的醋制甘遂减毒作用研究 [D]. 广州：广东药学院，2012.

[51] Guo S，Jiang D，Zhang Q，et al. Diverse role of gut microbiota on reduction of ascites and intestinal injury in malignant ascites effusion rats treated with *Euphorbia kansui* stir-fried with vinegar [J]. J Ethnopharmacol，2021，267：113489.

[52] 周世康，姜东京，张毅，等 . 醋甘遂对 Walker-256 腹水模型大鼠的粪便代谢组学研究 [J]. 中国中药杂志，2021，47（6）：1558-1566.

[53] 张毅，姜东京，周世康，等 . 醋甘遂成分群 B、C 对 Walker-256 癌性腹水模型大鼠肠道菌群多样性的影响 [J]. 中国中药杂志，2022，47（5）：1253-1261.

[54] Zhang Y，Lou J，Zhang Q，et al. Determination of kansuiphorin C and kansuinin A in rat feces using UFLC-MS/MS and its application in the comparative excretion study on normal and malignant ascites rats [J]. J Pharm Biomed Anal，2019，170：254-263.

[55] Zhang Y，Lou J，Kang A，et al. Kansuiphorin C and Kansuinin A ameliorate malignant ascites by modulating gut microbiota and related metabolic functions [J]. J Ethnopharmacol，2020，249：112423.
[56] 赵国栋，王立宽，段静，等 . 商陆不同极性、根和茎提取物的抑菌性能分析 [J]. 基因组学与应用生物学，2010，29（4）：717-720.
[57] 朱晓松，贾林，王蜜蜜，等 . 商陆提取物抑菌活性评价研究 [J]. 中国现代中药，2010，12（12）：33-35.
[58] 胡林峰，韩会娟，朱红霞，等 . 巴豆提取物抑菌活性初步研究 [J]. 湖南农业科学，2011（7）：78-79，84.
[59] 朱红霞，胡林峰，郑海瑛，等 . 芫花乙醇提取物抑菌活性初步研究 [J]. 广东农业科学，2011，38（6）：84-85.
[60] 陈建 . 芫花根水煎剂对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑杀作用的研究 [D]. 南京：南京中医药大学，2016.
[61] 林海，杨婷，张雨曦，等 . 肠道微生物组、免疫组等共生微生态系统与中医药干预肿瘤进展 [J]. 中药药理与临床，2021，37（4）：228-234.
[62] Yu J，Guo J，Tao W，et al. Gancao-Gansui combination impacts gut microbiota diversity and related metabolic functions [J]. J Ethnopharmacol，2018，214：71-82.
[63] Chen Y，Tang Y，Shang E，et al. Incompatibility assessment of Genkwa Flos and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma with biochemical，histopathological and metabonomic approach [J]. J Ethnopharmacol，2019，229：222-232.
[64] 李瑶，郭盛，陶伟伟，等 . 基于利尿作用及肠道菌群结构的巴豆霜与甘草配伍禁忌机制研究 [J]. 中国中药杂志，2019，44（3）：518-525.
[65] Yu J，Liu Y，Guo J，et al. Health risk of Licorice-Yuanhua combination through induction of colonic H_2S metabolism [J]. J Ethnopharmacol，2019，236：136-146.
[66] Liu S，Qiao S，Wang S，et al. Intestinal bacteria are involved in Radix Glycyrrhizae and Radix Euphorbiae Pekinensis incompatibility [J]. J Ethnopharmacol，2021，273：113839.

（收稿日期：2022-01-10；修回日期：2022-03-16）

乌司他丁在缺血再灌注损伤中的研究进展

赵书馨，张雄，苏晨林，李霁，于锋*（中国药科大学基础医学与临床药学学院，南京 211198）

摘要：缺血再灌注损伤是一种严重的病理事件，是组织缺血所引起的，当血流恢复时，组织损伤加剧甚至发生不可逆损伤的现象。乌司他丁作为一种丝氨酸蛋白酶抑制剂，其可能通过抗炎、抗氧化、抗缺血损伤、抗细胞凋亡、调节血脂等作用对缺血再灌注损伤起到潜在的治疗作用，逐渐成为研究热点。研究表明，乌司他丁对肺、肝、肾、心肌、大脑等器官的缺血再灌注损伤具有保护作用。本文旨在综述乌司他丁对多种器官缺血再灌注损伤的研究进展，为今后的研究提供启示。

关键词：乌司他丁；缺血再灌注损伤；炎症；氧化应激；凋亡
中图分类号：R654，R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)05-1136-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.029

Progress in the role of ulinastatin in ischemia-reperfusion injury

ZHAO Shu-xin, ZHANG Xiong, SU Chen-lin, LI Ji, YU Feng* (*School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 211198)

Abstract: As a serious pathological event, ischemia-reperfusion injury occurs because of tissue ischemia, and when blood flow is restored, tissue damage worsens or irreversible damage occurs. As a serine protease inhibitor, ulinastatin plays a potential therapeutic role against inflammation, oxidation, ischemic injury, and apoptosis, and regulates the lipid, and thus becoming a hot research topic. Various studies have shown that ulinastatin can protect against ischemia-reperfusion injury in the lung, liver, kidney, myocardium, brain and other organs. This paper reviewed the research progress in the role of ulinastatin in ischemia-reperfusion injury in various organs and to provide insight for future studies.

Key words: ulinastatin; ischemia-reperfusion injury; inflammation; oxidative stress; apoptosis

作者简介：赵书馨，女，硕士，主要从事药理学研究，email：zsx19950606@163.com *通信作者：于锋，男，教授，主要从事药理学和临床药学研究，email：yufeng305cpu@163.com

组织短暂缺血，恢复血液灌注后，组织损伤不仅没有得到有效的缓解甚至进一步加重的现象，称为缺血再灌注损伤[1]。缺血再灌注损伤几乎发生在每个器官中，自从 1960 年心肌缺血再灌注损伤的定义被提及之后，陆续发现了在脑、肾、肺、肠道等器官中的缺血再灌注损伤[2]。缺血再灌注损伤涉及局部和全身作用的病理生理机制，主要是通过两个阶段发展：在局部缺血期间，主要发生的是缺氧损伤，能量的消耗，由于能量缺乏直接或间接地导致细胞内某些状态的改变，例如细胞离子稳态紊乱、水解酶激活和细胞膜通透性增加等。随后在再灌注过程中，主要发生炎症因子的释放和细胞凋亡等生理反应[3]。近年来研究发现，缺血再灌注损伤涉及多种生物学过程，主要由自由基产生的增加，细胞内钙离子（Ca^{2+}）超载和炎症因子的过度激活等原因造成[4]。

丝氨酸蛋白酶抑制剂是蛋白酶家族的重要成员，主要参与蛋白的合成和降解过程，并且参与炎症和肿瘤的抑制等。抑肽酶、rhKD/APP、乌司他丁等丝氨酸蛋白酶抑制剂具有保护器官缺血再灌注损伤的能力[5]。尤其是近几年对于乌司他丁在缺血再灌注损伤中的研究更为深入，已证实其在心脏、肾脏和肺等器官的缺血再灌注损伤中具有良好的保护作用。器官的缺血再灌注损伤有望成为乌司他丁新的临床适应证。

乌司他丁由 143 个氨基酸残基组成，相对分子量约为 67 000，其序列包括两个 Kunitz 型结构域，在血浆中主要以中间 α- 抑制剂和前 α- 抑制剂两种前体形式存在[6]。中间 α- 抑制剂和前 α- 抑制剂的主要合成部位是肝脏，在肾脏、胰腺、肠和胃中虽然也会产生，但浓度要低得多[7]。乌司他丁作为广谱蛋白水解酶，可在体内外抑制多种丝氨酸蛋白酶[8]。临床治疗方面，乌司他丁已被广泛用于治疗急性胰腺炎、败血性休克、器官衰竭等疾病。乌司他丁通过抑制炎症反应、抗氧化应激、抗凋亡、调节酶活性、抗血液凝固等来预防和治疗疾病[9]。本文针对乌司他丁通过不同的信号通路缓解不同器官的缺血再灌注进行系统性的汇总分析，以期望为临床用药提供参考。

1 乌司他丁与缺血再灌注损伤

1.1 乌司他丁与肺缺血再灌注损伤

肺移植等手术和术后环境中常常伴随着肺缺血再灌注损伤的发生，急性肺损伤、肺部切除和创伤性休克也可以诱发肺缺血再灌注损伤形成[10]。肺缺血再灌注损伤的主要原因之一是氧自由基过剩，而其根本原因是氧化和抗氧化系统的不平衡致使大量活性氧和脂质过氧化物产生的增加。实验研究表明，与肺缺血再灌注损伤模型组相比，乌司他丁（1.2×10^4 U·kg^{-1}）能够通过调节丙二醛（MDA）的表达来缓解氧化损伤，进而对肺组织起到保护作用[11]。此外，乌司他丁（1×10^4 U·kg^{-1}）能显著降低肿瘤坏死因子 -α（TNF-α），白介素 -6（IL-6）的表达[12]，表明其通过抑制炎症因子的释放，保护肺组织免受缺血再灌注的损伤。另有研究表明，乌司他丁（1×10^4 U·kg^{-1}）能通过抑制 p38 丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）缓解肺缺血再灌注损伤，使肺血气屏障的通透性降低，肺部组织形态和显微结构明显好转，相应的肺部检测指标也得到了改善[13]。用于肺移植的肺保存液中的成分被认为是在缺血期间使肺损伤最小化的关键，合理保存肺器官从而降低肺组织缺血再灌注损伤的发展也是近几年来探索的热点[14]。研究表明，往保存液中的添加乌司他丁能够缓解肺缺血再灌注损伤的发生，实验对兔子进行原位肺缺血再灌注损伤的造模处理，使用乌司他丁处理的保存液中用于肺保护，肺部组织的髓过氧化物酶（MPO）、MDA 水平明显降低，且实验兔血清中 TNF-α 水平降低，炎症因子的释放和中性粒细胞的迁移得到了有效的抑制[15]。以上研究表明，乌司他丁在肺缺血再灌注损伤中能够通过降低氧化损伤，抑制炎症反应发挥保护作用。

1.2 乌司他丁与肝脏缺血再灌注损伤

造成肝脏缺血再灌注损伤的原因有很多，如钙稳态失衡，产生过量的活性氧（ROS）和线粒体功能出现障碍等[16]。乌司他丁对于肝脏缺血再灌注损伤的保护目前已有较多的研究。有研究发现，在乳酸林格保存液中补充乌司他丁（1×10^3 U·mL^{-1}）可有效降低肝酶释放，其机制是通过增加抗凋亡基因 B 淋巴细胞瘤 -2 基因（*Bcl-2*），降低促凋亡基因半胱氨酸蛋白酶 -3（Caspase-3）和 BAX（Bcl-2 assaciated X protein）的表达来发挥保护作用，乌司他丁可使肝脏免受肝脏缺血再灌注损伤的影响，且呈现剂量依赖性，并能显著延长肝移植中肝供体的存活时间[17]。自噬的发生通常是由于蛋白质和细胞器的过度降解继而引发细胞死亡[18]。与常见的缺血再灌注损伤保护机制不同，乌司他丁通过激活张氏肝细胞的自噬功能，进而起到保护作用。实验通过对张氏肝细胞进行缺氧复氧处理，发现乌司他丁在体外以剂量依赖形式抑制缺氧复氧损伤，同时抑制细胞凋亡和诱导自噬，上调丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶（ULK1）、自噬蛋白 1 和微管相关蛋白 1 轻链 3（LC - 3）的表达；然而，一旦自噬被抑制，缺氧复氧损伤将会加重。表明乌司他丁诱导的缺氧复氧损

伤细胞自噬是保护性代偿反应[19]。

乌司他丁除单独用于肝脏缺血再灌注损伤治疗，也常与其他药物联用来治疗该疾病，有研究表明乌司他丁联合粉防己碱、维拉帕米等药物可以对肝脏缺血再灌注损伤起到较好的保护作用，且联合用药的作用效果较单用更好[20-21]。以上研究说明，乌司他丁单独及联合用药具有治疗肝脏缺血再灌注损伤的作用。

1.3 乌司他丁与脑缺血再灌注损伤

大脑是最容易缺氧的器官，脑组织的缺血再灌注会加剧神经细胞坏死和脑组织水肿。细胞内 Ca^{2+} 超载、自由基产生、兴奋性氨基酸毒性和炎症反应与脑缺血再灌注损伤密切相关，以上因素都可能引发细胞凋亡和坏死，进而导致疾病的发生[22]。Toll 样受体 4（TLR4）介导的核因子 -κB（NF-κB）参与触发中枢神经系统疾病的炎症反应[23]。乌司他丁（3×10^3 U/100 g）治疗后脑水肿和梗死体积显著减少，并抑制 TLR4 和 NF-κB 的表达，说明乌司他丁可以通过抑制 TLR4/NF-κB 信号通路来发挥稳定有效的神经保护作用[24]。此外，乌司他丁（3×10^5 U·kg^{-1}）可以重新激活 Nrf2/ 血红素加氧酶 1（HO-1）的表达；从分子途径可发现，Nrf2 抑制剂的治疗可阻断乌司他丁对氧化应激、细胞凋亡和炎症的抑制作用，更加深入地论证了乌司他丁对于氧化应激的治疗作用；另外，高表达的 ROS、MDA 也被显著抑制[25]。然而，乌司他丁对缺血再灌注损伤的改善并不能归因于单一的分子途径，其还可以通过抑制凋亡相关信号通路的表达，进而缓解缺血再灌注损伤诱导的细胞凋亡。实验研究表明，对沙鼠进行缺血诱导后，乌司他丁的治疗能抑制海马神经元细胞的凋亡，从而改善缺血诱导的短期记忆障碍[26]。另外，乌司他丁还可以下调脑组织 c-Jun 氨基末端激酶（JNK）的表达，抑制细胞凋亡，这与抑制 JNK 的传导路径有关[27]。

基质金属蛋白酶 -9（MMP-9）作为 MMPs 的主要成员之一，其过表达可诱导血脑屏障被破坏，进而导致脑缺血恶化。脑缺血再灌注损伤会激活 MMPs 水平，特别表现为 MMP-9 水平升高[28]。研究发现乌司他丁（3×10^3 U/100 g）可以显著地逆转缺血再灌注损伤诱导的 MMP-9 的过度表达，减轻紧密连接蛋白 -1 和 occludin 的降解，表明乌司他丁可促进缺血性脑组织中血脑屏障完整性的恢复[29]。研究发现，脑缺血再灌注模型组大鼠通过伊文思蓝（EB）染色呈现明显可见的蓝色，再灌注 6 h 可发现 EB 含量显著升高，并且在 24 h 达到峰值；给予乌司他丁后脑组织中 EB 染色面积明显减小，说明乌司他丁显著降低了大鼠脑缺血再灌注损伤中血脑屏障的通透性[30]。综上，乌司他丁可以通过抑制细胞凋亡、降低炎症反应、减轻氧化应激以及改善血脑屏障的通透性来发挥脑缺血再灌注损伤的保护作用。

1.4 乌司他丁与心肌缺血再灌注损伤

心肌缺血再灌注损伤是由再灌注治疗导致的急性心肌梗死。与其他类型的缺血再灌注损伤类似，氧自由基的损伤、炎症因子的活化释放及细胞凋亡损伤等机制皆会导致心肌缺血再灌注损伤的发生[31]。研究表明，ERK 信号传导途径在心肌缺血再灌注引起的损伤中表现出保护性作用，其主要机制包括激活抗凋亡信号传导途径和抑制促凋亡信号传导途径。乌司他丁（2.5×10^3 U·kg^{-1}）通过降低炎症因子的表达，激活 p-ERK 的表达并抑制心肌细胞凋亡，从而有效地缓解心肌缺血再灌注损伤[32]。同为 MAPK 家族的 p38/JNK，在乌司他丁治疗心肌缺血再灌注损伤中也起着重要的作用。乌司他丁（1×10^4 U·kg^{-1}）可通过下调 p38 和 JNK 导致凋亡细胞数量减少，进而提高 Bcl-2 水平，并且使 Bax 和 caspase-3 水平下降[33]。因此，上述途径的下调可能有助于抑制心肌缺血再灌注损伤中细胞的凋亡。另有实验结果证明乌司他丁改善了区域缺血再灌注损伤后的心功能和降低梗死面积大小可能是通过抑制 MPO 活性和降低 TNF-α 的表达有关[34]。自噬在心肌缺血再灌注损伤中也较为重要。乌司他丁的预处理可以使小鼠心肌梗死面积减少，LC3-Ⅱ蛋白表达降低，此外，乌司他丁（1×10^4 U·kg^{-1}）上调了 p-Akt、p-mTOR 和 p-P70S6K 蛋白表达。进一步研究发现，与模型组相比，在乌司他丁治疗前 30 min 使用 mTOR 抑制剂雷帕霉素处理细胞，可使细胞活力增加，乳酸脱氢酶表达降低[35]。由此可以发现乌司他丁通过 mTOR 激活调节自噬，对心肌缺血再灌注损伤发挥保护作用。

1.5 乌司他丁与肾脏缺血再灌注损伤

肾脏缺血再灌注损伤通常会引起急性肾损伤、肾衰竭等多种肾脏相关疾病，因此治疗肾脏缺血再灌注损伤是减少肾脏疾病的重要举措。在肾脏缺血再灌注损伤期间，乌司他丁可以显著降低尿素氮和肌酐水平，且 TNF-α、IL-6 mRNA 表达降低等[36]。细胞黏附分子的活化，可以通过激活多种信号传导途径来启动加剧细胞炎症的发生[37]。研究发现，缺血再灌注损伤大鼠基础肾脏功能损伤指标皆有所上升，且对体内细胞间黏附分子 -1（ICAM-1）表达的检测能够发现，随着对大鼠再灌注时间的延长，

ICAM-1 表达也逐渐增加。证明了 ICAM-1 在肾缺血再灌注损伤中至关重要，乌司他丁（1.25×10^4 U·kg^{-1}）可显著抑制缺血再灌注损伤后各个阶段 ICAM-1 表达的升高，对肾缺血再灌注损伤有一定程度的保护作用[38-39]。实验监测造模组和给药组大鼠体内 ATP，细胞内 pH（pHi）和细胞内钠（Nai）的动态变化，发现造模组的 pHi 值呈现出严重的酸中毒，给予乌司他丁（5×10^4 U·kg^{-1}）后能较快地恢复 ATP 的供应，且 Nai 的恢复比对照组更早[40]。另外，观察肾小管超微结构发现，乌司他丁给药后能显著减轻线粒体膜和嵴的肿胀程度，且跨细胞钠梯度得以恢复[41]，表明乌司他丁可能在缺血期间保护线粒体构象，并促进再灌注后离子泵的功能恢复。研究通过对缺血再灌注期间肾皮质和髓质组织氧分压的测定来验证乌司他丁是否对肾脏缺血再灌注有保护作用，结果表明与对照组相比，乌司他丁低剂量组和高剂量组的值完全恢复到缺血前的值，且各组之间的心肺参数没有差异[42]。说明乌司他丁改善了再灌注后的肾脏氧合而没有改变心肺参数，从而起到对肾脏的保护作用。因此，乌司他丁能够对肾脏缺血再灌注损伤起到保护作用，但其确切机制还需要进一步的论证。

2　总结与展望

缺血再灌注损伤作为严重的生理疾病，其发病机制较为复杂。乌司他丁能够通过多种调控途径治疗器官的缺血再灌注损伤，总结如表 1 所示。

表 1　乌司他丁治疗器官缺血再灌注损伤的剂量及调控机制汇总

Tab 1　Dose and regulation mechanism of ulinastatin for organ ischemia-reperfusion injury

器官	治疗剂量	治疗机制	参考文献
肺	1.2×10^4 U·kg^{-1}	降低 MDA、MPO 的表达水平，缓解氧化损伤	[11，15]
	1×10^4 U·kg^{-1}	降低 TNF-α、IL-6 的表达，抑制炎症因子的释放	[12，15]
	1×10^4 U·kg^{-1}	抑制 p38MAPK，减低肺血气屏障的通透性	[13]
肝脏	1×10^3 U·mL^{-1}	通过增加 Bcl-2 的表达，降低 Caspase-3 和 BAX 的表达，减少细胞的凋亡	[17]
	1×10^3 U·mL^{-1}	上调 ULK1、Beclin-1 和 LC-3 的表达，诱导自噬发生，保护性代偿反应	[19]
脑	3×10^3 U/100 g	抑制 TLR4 和 NF-κB 的表达，降低炎症反应	[23-24]
	3×10^5 U·kg^{-1}	激活 Nrf2/ HO-1 的表达，抑制氧化应激	[25]
		下调脑组织 JNK 的表达，抑制细胞凋亡	[27]
	3×10^3 U/100 g	降低 MMP-9 的过度表达，减轻 ZO-1 和 occludin 的降解	[29]
心肌	2.5×10^3 U·kg^{-1}	激活 P-ERK 的表达并抑制心肌细胞凋亡	[32]
	1×10^4 U·kg^{-1}	下调 p38 和 JNK，凋亡细胞数量减少	[33]
	1×10^4 U·kg^{-1}	上调了 p-Akt、p-mTOR 和 p-P70S6K 蛋白表达，调节自噬	[35]
肾脏		TNF-α、IL-6 mRNA 表达降低，Bcl-2 蛋白表达增加	[36]
	1.25×10^4 U·kg^{-1}	抑制 ICAM-1 表达的升高	[39]
	5×10^4 U·kg^{-1}	促进离子泵功能的恢复	[40]

根据目前的研究可知，TNF-α 和 IL-6 等促炎细胞因子水平升高导致缺血再灌注损伤的产生，MAPK 和 NF-κB 等分子信号通路介导了缺血再灌注损伤过程中的炎症和氧化应激，细胞的凋亡和自噬的发生在缺血再灌注损伤中亦较为常见。乌司他丁通过降低 TNF-α、IL-6、IL-1β 等细胞因子而抑制炎症反应。在减轻炎症的信号通路机制方面，乌司他丁通过抑制 TLR4、NF-κB、HMGB1 等分子通路发挥保护作用。另外，乌司他丁通过上调 Bcl-2、下调 caspase 和 Bax 抑制缺血再灌注损伤后的细胞凋亡，下调 p38 和 JNK 信号通路的表达发挥保护作用。本文系统性地汇总了乌司他丁对于缺血再灌注损伤的不同保护机制，如抑制炎症反应，降低氧化应激，抑制细胞的凋亡等。每一种作用机制都可以通过多个信号通路来介导，形成一个巨大的药理学机制网络。在基础实验研究中，我们发现不同剂量下乌司他丁对器官缺血再灌注损伤的作用机制不同，这对临床中不同器官的损伤治疗提供了剂量的参考，用药时应酌情考虑剂量因素的影响。另外，研究也多涉及乌司他丁的联合用药对于缺血再灌注损伤的治疗，这为缺血再灌注损伤提供了新的治疗思路。尽管目前乌司他丁对器官缺血再灌注损伤的研究已经有了一定的进展，但仍存在一些问题需进一步的思考和解决。从目前的研究资料来看，乌司他丁对于肾、肺等器官的研究尚不深入，相关机制研究较少。而且，目前大部分研究仍处于动物实验阶段，临床研究较为缺乏。另外，已有研究表明丝氨酸蛋白酶抑制剂可以通过抑制中性粒细胞释放出来的丝氨酸蛋白酶来降低炎症反应，而乌司他丁作为丝氨酸蛋白酶抑制剂，通过维持酶的平衡来缓解缺血再灌注损伤的报道较为缺乏，这也为以后乌司他丁更为深入的研究提供了思路和方向。因此，乌司他丁对缺血再灌注损伤的治疗保护的机制研究还有很长的路要走，需要更多科学严谨的实验来进一步探索和证明。然而，不可否认的是，

乌司他丁是一种非常有前景的药物，有望在器官缺血再灌注损伤的临床治疗方面发挥重大作用。

参考文献

[1] Zang X，Zhou J，Zhang X，et al. Ischemia reperfusion injury：opportunities for nanoparticles [J]. ACS Biomater Sci Eng，2020，6（12）：6528-6539.

[2] de Groot H，Rauen U. Ischemia-reperfusion injury：processes in pathogenetic networks：a review [J]. Transplant Proc，2007，39（2）：481-484.

[3] Jia J，Zang E，Lv L，et al. Flavonoids in myocardial ischemia-reperfusion injury：therapeutic effects and mechanisms [J]. Chin Herb Med，2021，13（1）：49-63.

[4] Huang R，Zhang C，Wang X，et al. PPARγ in ischemia-reperfusion injury：over-view of the biology and therapy [J]. Front Pharmacol，2021，12：600618.

[5] 谢礼波，卢一平 . 蛋白酶抑制剂防治器官缺血再灌注损伤研究进展 [J]. 中华移植杂志（电子版），2012，6（1）：43-47.

[6] Sjöberg EM，Fries E. Biosynthesis of bikunin（urinary trypsin inhibitor）in rat hepatocytes [J]. Arch Biochem Biophys，1992，295（1）：217-222.

[7] Pugia MJ，Lott JA. Pathophysiology and diagnostic value of urinary trypsin inhibitors [J]. Clin Chem Lab Med，2005，43（1）：1-16.

[8] Li S，Yang W，Zhou L，et al. Vascular permeability and hemodynamic effects of ulinastatin on organs affected by shock during early burn injury [J]. Am J Emerg Med，2019，37（2）：249-253.

[9] Sarjana S Atal，Shubham Atal. Ulinastatin——a newer potential therapeutic option for multiple organ dysfunction syndrome [J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol，2016，27（2）：91-99.

[10] de Perrot M，Liu M，Waddell TK，et al. Ischemia-reperfusion-induced lung injury [J]. Am J Respir Crit Care Med，2003，167（4）：490-511.

[11] 陈新忠，孙宗全，杜心灵，等 . 乌司他丁在肺缺血再灌注损伤中的保护作用 [J]. 临床心血管病杂志，2004，20（11）：682-684.

[12] Xu L，Ren B，Li M，et al. Ulinastatin suppresses systemic inflammatory response following lung ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Transplant Proc，2008，40（5）：1310-1311.

[13] 王甜甜，林飞，潘灵辉，等 . 乌司他丁调控 P38MAPK 信号通路降低大鼠肺缺血再灌注损伤血气屏障通透性的作用及机制研究 [J]. 广西医科大学学报，2019，36（3）：14-18.

[14] Gao W，Jing T，Liu YH，et al. Endothelial progenitor cells attenuate the lung ischemia/reperfusion injury following lung transplantation via the endothelial nitric oxide synthase pathway [J]. J Thorac Cardiovasc Surg，2019，157（2）：803-814.

[15] Ming XU，Wen XH，Chen SP，et al. Addition of ulinastatin to preservation solution promotes protection against ischemia-reperfusion injury in rabbit lung [J]. Chin Med J，2011，124（14）：2179-2183.

[16] Abu-Amara M，Yang SY，Tapuria N，et al. Liver ischemia/reperfusion injury：processes in inflammatory networks-a review [J]. Liver Transpl，2010，16（9）：1016-1032.

[17] Guan L，Liu H，Fu P，et al. The protective effects of trypsin inhibitor on hepatic ischemia-reperfusion injury and liver graft survival [J]. Oxid Med Cell Longev，2016，2016：1-9.

[18] Zhang T，Guo J，Gu J，et al. Protective role of mtor in liver ischemia/reperfusion injury：involvement of inflammation and autophagy [J]. Oxid Med Cell Longev，2019，2019（11）：1-17.

[19] Zhao Y，Cai H，Zhou P，et al. Protective effect of ulinastatin on hepatic ischemia reperfusion injury through autophagy activation in Chang liver cells [J]. J Cell Biochem，2019，120（9）：14960-14970.

[20] 高飞，赵浩亮 . 乌司他丁联合维拉帕米对大鼠肝缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国药物与临床，2010，10（5）：530-531.

[21] 钟毓杰，刘忠民，黄勇平，等 . 乌司他丁联合粉防己碱预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究 [J]. 肝胆胰外科杂志，2017，29（2）：134-137，144.

[22] 李亮，陈立峰 . 中药对脑缺血再灌注损伤保护作用的研究进展 [J]. 中南药学，2012，10（6）：459-462.

[23] Guan F，Zhou X，Li P，et al. MG53 attenuates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and neuroinflammation via inhibiting TLR4/NF-κB pathway in vitro and in vivo [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry，2019，95：109684.

[24] Li X，Su L，Zhang X，et al. Ulinastatin downregulates TLR4 and NF-κB expression and protects mouse brains against ischemia/reperfusion injury [J]. Neurol Res，2017，39（4）：367-373.

[25] Cui L，Cao W，Xia Y，et al. Ulinastatin alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by activating the Nrf-2/HO-1 signaling pathway [J]. Ann Transl Med，2020，8（18）：1136-1136.

[26] Cho YS，Shin MS，Ko IG，et al. Ulinastatin inhibits cerebral ischemia-induced apoptosis in the hippocampus of gerbils [J]. Mol Med Rep，2015，12（2）：1796-1802.

[27] 刘庆杰，白宏英 . 乌司他丁对脑缺血再灌注大鼠脑组织 JNK 及细胞凋亡的影响 [J]. 中国实用神经疾病杂志，2017，20（17）：4-6.

[28] Alam M，Mohammad A，Rahman S，et al. Hyperthermia up-regulates matrix metalloproteinases and accelerates basement membrane degradation in experimental stroke [J]. Neurosci Lett，2011，495（2）：135-139.

[29] Li XF，Zhang XJ，Zhang C，et al. Ulinastatin protects brain against cerebral ischemia/reperfusion injury through inhibiting MMP-9 and alleviating loss of ZO-1 and occludin

proteins in mice [J]. Exp Neurol，2018，302：68-74.
[30] Liu M，Shen J，Zou F，et al. Effect of ulinastatin on the permeability of the blood-brain barrier on rats with global cerebral ischemia/reperfusion injury as assessed by MRI [J]. Biomed Pharmacother，2017，85：412-417.
[31] Gunata M，Parlakpinar H. A review of myocardial ischaemia/reperfusion injury：pathophysiology，experimental models，biomarkers，genetics and pharmacological treatment [J]. Cell Biochem Funct，2021，39（2）：190-217.
[32] Che H. Effect of ulinastatin on myocardial ischemia reperfusion injury through ERK signaling pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci，2019，23（10）：4458-4464.
[33] Yang Z，Lv YJ，Gu JB，et al. Effect of ulinastatin on myocardial ischemia-reperfusion injury through JNK and P38 MAPK signaling pathways [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci，2019，23（19）：8658-8664.
[34] Shin IW，Jang IS，Lee SM，et al. Myocardial protective effect by ulinastatin via an anti-inflammatory response after regional ischemia/reperfusion injury in an in vivo rat heart model [J]. Korean J Anesthesiol，2011，61（6）：499-505.
[35] Xiao J，Zhu X，Ji G，et al. Ulinastatin protects cardiomyocytes against ischemia-reperfusion injury by regulating autophagy through mTOR activation [J]. Mol Med Rep，2014，10（4）：1949-1953.
[36] Chen CC，Liu ZM，Wang HH，et al. Effects of ulinastatin on renal ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Acta Pharmacol Sin，2004，25（10）：1334.
[37] Hashmp SF，Sattar MZA，Rathore HA，et al. A critical review on pharmacological significance of hydrogen sulfide（H_2S）on NF-κB concentration and ICAM-1 expression in renal ischemia reperfusion injury [J]. Acta Pol Pharm，2017，74（3）：747-752.
[38] Li M，Luo Z，Chen X，et al. Use of contrast-enhanced ultrasound to monitor rabbit renal ischemia-reperfusion injury and correlations between time-intensity curve parameters and renal ICAM-1 expression [J]. Clin Hemorheol Microcirc，2015，59（2）：123-131.
[39] 季健，马超龙，况应敏，等 . 乌司他丁对缺血 - 再灌注大鼠肾脏 ICAM-1 表达的影响 [J]. 昆明医学院学报，2008，29（5）：68-71.
[40] Taie S，Yokono S，Ueki M，et al. Effects of ulinastatin（urinary trypsin inhibitor）on ATP，intracellular pH，and intracellular sodium transients during ischemia and reperfusion in the rat kidney in vivo [J]. J Anesth，2001，15（1）：33-38.
[41] 陈聪聪，周燕，柳子明，等 . 乌司他丁对肾缺血再灌注大鼠肾组织超微结构的影响 [J]. 中华外科杂志，2004，42（14）：877-880.
[42] Taie S，Ueki M，Chujo K，et al. Urinary trypsin inhibitor ameliorates renal tissue oxygenation after ischemic reperfusion in rats [J]. J Anesth，2008，22（2）：149-154.

（收稿日期：2021-09-29；修回日期：2021-11-02）

《中南药学》杂志基金项目论文征稿启事

为促进《中南药学》杂志学术质量提升，本刊诚征各级基金项目论文，实行快速发表通道，并提高基金项目论文奖励：

1. 对基金项目核心研究论文开辟“快速通道”，以最快的速度发表（4 ～ 5 个月见刊）。

2. 对重点基金项目论文（作者须提供项目合同书扫描件）实行奖励，奖励人为基金项目主持人（第一作者或通讯作者）：

① 国家级基金项目核心研究论文每篇奖励 1000 ～ 2000 元。

② 省部级基金项目核心研究论文每篇奖励 500 ～ 800 元。

3. 投稿要求和注意事项

① 投稿请直接登陆官网（http：//znyx.cbpt.cnki.net）首页，点击“作者投稿系统”栏，按要求填写有关内容和项目后直接进行投稿，注明“基金论文投稿”。

② 论文写作参考本刊投稿须知，项目要齐全，包括中英文标题，中英文作者及作者单位（包括邮编、所在地、单位名称、科室名称），中英文摘要及关键词，正文，图表（图表标题中英文对照）；稿件所附图片一律要求使用原始清晰图片（像素不能低于 200）。

③ 来稿请在署名下标明：基金项目（项目来源及编号）；作者简介（包括姓名、性别、学位、技术职称、是否研究生导师、主要研究方向和 email）。

④ 来稿须附单位推荐证明（明确注明“同意推荐、内容真实、无一稿两投、不涉及保密及署名争议问题”）和基金项目合同书扫描件。

中药资源的开发与利用

经典名方中旋覆花的本草考证

蔡梦如，王开心，尹东阁，姚宇，胡雪凌，胡盼祥，朱荣玥，杨玉畅，尹兴斌，曲昌海，董晓旭*，倪健*（北京中医药大学 中药学院，北京 102488）

摘要：中药的本草考证在经典名方的开发中发挥着重要作用。查阅文献发现，现代对旋覆花的研究多集中在化学成分及药理作用等方面，对其名称、基原、产地变迁、采收加工、炮制、药用部位及功效的本草考证仍缺乏报道。经查阅历代本草、医籍、方书，古今所用旋覆花均为菊科植物旋覆花 *Inula japonica* Thunb. 的干燥头状花序。在历代本草中旋覆花分布广泛，在明代明确道地产区为河南及湖南，近代在广西、广东等地也有出产。现代资源调查结果发现，旋覆花生于海拔 150 ～ 2400 m 的山坡路旁、湿润草地、河岸和田埂上。旋覆花极少以生品入药，多花开后晒干或采用其炮制品入药。根据考证结果，建议旋覆花选取菊科植物旋覆花 *Inula japonica* Thunb. 为基原，以其干燥头状花序入药，未注明特殊要求均可参考《中国药典》处理。

关键词：经典名方；旋覆花；本草考证
中图分类号：R281.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)05-1142-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.030

Textual research on the materia medica of Inula in the prescriptions

CAI Meng-ru, WANG Kai-xin, YIN Dong-ge, YAO Yu, HU Xue-ling, HU Pan-xiang, ZHU Rong-yue, YANG Yu-chang, YIN Xing-bin, QU Chang-hai, DONG Xiao-xu*, NI Jian* (*School of Chinese Material Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488)

Abstract: The textual research of Chinese herbal medicines plays an important role in the development of classic prescriptions. Modern research on Inula mostly focuses on the chemical components and pharmacological effects. Reports on the herbal textual research of its name, origin, change in producing areas, harvesting, processing, medicinal parts and efficacy are lacking. In ancient materia medica, medical books, and prescription books, the Inula used in ancient and modern times was all dried capitula of *Inula japonica* Thunb. Inula has been widely distributed in ancient Chinese herbal medicines. In the Ming Dynasty, its best producing areas were Henan and Hunan, but it is also produced in Guangxi, Guangdong and other places in modern times. Modern resource surveys show that the Inula grows on hillside, roadsides, moist grasslands, river banks and ridges at an altitude of 150 ～ 2400 m. Inula's dried flowers and its processed products are always used as medicine rather than its raw products. According to the textual research results, the origin of *Inula japonica* Thunb is recommended to be selected, and its dried capitula is chosen as medicine. If there is no special requirement, please refer to Pharmacopoeia of the People's Republic of China for treatment.

Key words: Chinese classical prescription; Inula; textual research on materia medica

基金项目：中央高校基本科研业务费专项资金资助（No. 2020-JYB-ZDGG-046）。
作者简介：蔡梦如，女，在读博士研究生，主要从事中药新剂型与新技术的研究工作，email：cmrtcm@163.com *通信作者：董晓旭，男，博士，主要从事中药新剂型与新技术的研究工作，email：dxiaoxv@163.com；倪健，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药新剂型与新技术的研究工作，email：njtcm@263.net

旋覆花又称“金沸草”“金钱花”“六月菊”，具有降气化痰、降逆止呕等功效，用于治疗寒痰咳喘，胃气上逆所致的嗳气、呕吐等。《中国药典》规定旋覆花为菊科植物旋覆花 *Inula japonica* Thunb. 或欧亚旋覆花 *Inula britannica* L. 的干燥头状花序[1]。

虽然 2018 年国家中医药管理局同国家药品监督管理局制定并公布的《古代经典名方目录（第一批）》[2] 中包含旋覆花的经典名方仅有 1 首（源自张仲景《伤寒杂病论》的“旋覆代赭汤”），但 2020 年 9 月 28 日国家药品监督管理局发布《中药注册分类及申报资料要求》[3] 的通告（2020 年第 68 号）规定 3.2 类“其他来源于古代经典名方的中药复方制剂”，不难看出未来含有旋覆花的经典名方数量可能会有所增加。

近代以来，关于旋覆花的本草考证鲜有报道，而经典名方应用的关键在于本草考证。因此，本研究对旋覆花不同历史时期的名称、基原、产地、采收加工、炮制、药用部位及功效进行本草考证，以期为经典名方的开发利用提供依据。

1 名称

旋覆花在历代本草中均有记载，始载于《神农本草经》[4]，列为下品：“旋覆花，味咸，温。主治结气，胁下满，惊悸，除水，去五脏间寒热，补中下气。…一名金沸草，一名盛椹。”此后，历代本草多沿用此名，医籍初见于《伤寒杂病论》[5]。在《神农本草经》[4]、《名医别录》[6]、《本草经集注》[7]、《新修本草》[8]、《证类本草》[9]、《本草纲目》[10] 等均有记载，至今《中国药典》[1] 仍将旋覆花定为正名。

旋覆花别名众多，大多根据其生长时节及形态等进行命名。明朝李时珍[10] 称其为盗庚，对盗庚的理解为：“盖庚者，金也，谓其夏开黄花、盗窃金气也”；《神农本草经》[4] 中称为“盛椹”；《名医别录》[6] 中记载为“戴椹”；在《本草图经》[11] 中根据其花色金黄，花朵圆而覆下，中央呈筒状，形如铜钱，因而得名“金钱花”；在《小儿卫生总微论方》[12] 中也被称为“野油花”，《本草纲目》[10] 中有“滴滴金”“夏菊”的记载；《群芳谱》[13] 中有“艾菊”“迭罗黄”的记载；在《岭南采药录》[14] 中将旋覆花又称为“满天星”。由于旋覆花分布较广，各地方对旋覆花的别名也各有差异，例如在《南京民间药草》[15] 中以“黄熟花”命名，《贵州民间方药集》[16] 中有“水葵花”“金盏花”的记载，《河北药材》[17] 所描述的“小黄花”即旋覆花，《山东中药》[18] 将旋覆花称为“猫耳朵花”“驴耳朵花”，而在《上海常用中草药》[19] 中又被称为“金沸花”“伏花”“全福花”。

此外，旋覆花亦花亦药，因其金花俏丽的色彩以及较长的花期常被用作观赏植物，可以进行大面积绿化，也可以种植于庭院、公园等处进行装饰栽培，不仅增添景色之美，还可醒神消倦。

2 基原考证

旋覆花始载于《神农本草经》[4]，尽管书中对旋覆花的形态等并未进行具体的描述，但其所载之功效与《中国药典》[1] 记载旋覆花具有降气、消痰、行水、止呕的作用基本一致。

魏晋南北朝时期，陶弘景在《本草经集注》[7] 中最早提及旋覆花的性状：“似菊花而大”。此时对旋覆花的大小和形状只进行了简单抽象的描述，即形似菊花但又大于菊花，这也是旋覆花在众多的别名中习惯以菊命名的原因之一。但此时对旋覆花的性状细节还未做详细的记载与描述，后续本草著作均沿用这种描述，并对其性状进行了更为具体形象的描绘。

唐朝苏敬所著的《新修本草》[8] 载：“一名金沸草，一名盛椹，一名戴椹，……，似菊花而大。又别有旋覆根，乃出河南来，北国亦有，形似穹窮，唯合旋覆膏用之，余无所入也，非此旋覆华根也”，基本沿用了《本草经集注》[7] 中的描述，此时，又对旋覆花的根进行了适当的描述，“形似穹窮”，即其根与川穹外形很像。此外，《千金翼方》[20] 云：“一名戴椹，一名金沸草，一名盛椹。生平泽川谷，五月采花，日干，二十日成”。可见在唐朝及以前对于旋覆花的记录比较统一，大多沿用陶弘景的记载，未出现争议，但此时对旋覆花形态基原的描述较少，且相对简单。有关描述旋覆花的诗句有代罗隐的《金钱花》：“占得佳名绕树芳，依依相伴向秋光”，记载了金钱花的名称，形态及香气。唐代皮日休《金钱花》诗云：“阴阳为炭地为炉，铸出金钱不用模”也提到了金钱花的颜色及形态，即色呈金黄，花形似钱。

到宋朝时期，苏颂等所著《本草图经》[11] 记载旋覆花：“大似红蓝而无刺，长一、二尺以来，叶如柳，茎细。六月开花如菊花，小铜钱大，深黄色；上党田野人呼为金钱花”（见图 1）。至此，本草著作中对旋覆花的形态特征进行了详尽的描述。从古籍中可以看出，旋覆花喜湿润环境，似红蓝但没有刺，长一到两尺，叶如柳，茎细，花如菊花，深黄色，形如铜钱一般大小，这与《中国药典》[1]2020 年版一部中“舌状花 1 列，黄色，

长约 1 cm，多卷曲；管状花多数，棕黄色，长约 5 mm”的描述较为相似。宋代《证类本草》[9]有云：“叶似水苏，花黄如菊”，说明旋覆花的叶子如水苏一样呈现披针形或者是条形，开黄花，形如菊花。《绍兴本草》[21]中亦载有旋覆花图，见图 1。《本草衍义》[22]中详细记载了该花的形态，即：“旋復花，叶如大菊，又如艾蒿。八、九月有花，大如梧桐子，花淡黄绿，繁茂，圆而覆下”，与历代本草描述一致，旋覆花的叶与大菊、艾蒿较为相似；八、九月开淡黄绿色花，大小与梧桐子相近，花朵呈圆形向下翻转，这也是旋覆花名字的由来。宋代诗人方一夔的《秋花十咏•其三•旋覆花》中载：“一串金铺簇碧丛，野田高低状童童。凭君洗我读书眼，收入公门药笼中”，描述了旋覆花的外观性状和生长环境，即黄色，簇生，生长于湿润的水泽田间，药用。

明朝李时珍所著的《本草纲目》除引载上述本草外，尚载有旋覆花图（见图 1）。《本草品汇精要》[23]记载：“类野菊花”，用野菊花来描述旋覆花的形态。清朝时期吴其濬所著《植物名实图考》[24]记载：“旋覆似菊…未秋有黄花”；旋覆花初秋开黄花，形如菊花；亦载有旋覆花图（见图 1）。《本草述钩元》[25]载：“二月生苗。长一二尺。茎柔细。似红兰而无刺。叶如大菊及水苏蒿艾辈。六月开金黄色花。亦如菊。香亦胜菊。”旋覆花一二尺长，其茎细长而柔软，与红兰的茎形态较为相似，但是没有刺。旋覆花的叶大小与菊花、水苏、艾叶等相近。花期六月，为金黄色的花，花与菊花也很相似，但其香味较之更甚。清朝时期赵瑾叔的《本草诗》云：“旋覆花开洵足珍，别名金沸草称神。蕊繁最喜生家圃，根细空教产水滨”，介绍了旋覆花的别名金沸草，其花蕊繁多，根较细，更喜生长于水边等湿润的环境。

历代本草旋覆花图片及现代旋覆花如图 1 所示，可以发现，除《绍兴本草》外，自魏晋以来历代本草对旋覆花的描述及附图，与现代《药用植物学》[26]对旋覆花的描述基本相符：“多年生草本，高 30 ～ 70 cm，被伏长毛。叶互生，狭椭圆形，无叶柄。头状花序直径 2.5 ～ 4 cm，排成疏散的伞房状；舌状花一轮，黄色，顶端有 3 小齿；盘花管状”，说明古今所用旋覆花均为菊科植物旋覆花 *Inula japonica* Thub. 的干燥头状花序。

3　产地考证

东汉时期，《神农本草经》[4]记载“生川谷”，并没有具体指出旋覆花在东汉时期的区域产地，只提到了其大多生于河谷地带。

图 1　历代文献所附旋覆花图

Fig 1　Inula in the documents of various dynasties

a.《图经本草》（Tujing Materia Medica）；b.《绍兴本草》（Shaoxing Materia Medica）；c.《本草品汇精要》（The Essentials of Materia Medica）；d.《本草纲目》（Compendium of Materia Medica）；e.《植物名实图考》（A Study on the Names of Plants）；f. 菊科植物旋覆花（*Inula japonica* Thub.）；g. 欧亚旋覆花（*Inula britannica* L.）

魏晋南北朝时期，陶弘景所著《名医别录》[6]中记载：“生平泽川谷”，“平泽”为当今山西西南部。《本草经集注》[7]曰：“出近道下湿地，似菊花而大”。据其描述旋覆花多生长于湿润草地、河岸或田埂上，说明其生长环境对水分的要求较高，且该植物为头状花序，黄色，形态方面与菊花非常相似，这两点与现代对旋覆花的描述基本相同。

唐代时期，《新修本草》[8]载：“出近道下湿地，似菊花而大”；《千金翼方》[20]云：“生平泽川谷”。该时期有关记载旋覆花的产地与《本草经集注》基本一致，证明旋覆花喜湿，生长在河边、川谷等阴凉湿润的地方。

宋代时期，《证类本草》[9]记载：“叶似水苏，花黄如菊。今所在皆有”，说明旋覆花产地分布广泛。《图经本草》[27]记载：“生平泽川谷，今所在有之。二月以后生苗，多近水旁。今近都人家园圃所莳金钱花，花、叶并如上说，极易繁盛，恐即经旋覆也”。此时对旋覆花的描述与《本草经集注》也基本一致，旋覆花各地皆有，产地记载未有变化。

明代时期，《御制本草品汇精要》[28]记载：“道地：随州、河南”，即现在的湖北和河南一带。《本草纲目》[10]记载：“田野塍堑皆生，逐节延蔓”，表明旋覆花生长在田野塍堑等地，即阴凉湿润之地。可见自明代以后，旋覆花的道地产

区已基本明确，即在今湖北、河南一带。

从产地考证来看，宋代以前旋覆花在中原各处均有分布，但主要分布于湿地河谷等地，明代开始基本确定了旋覆花的道地产区在河南、湖南及湖北等地，近代研究发现其在广西、广东皆有出产。现代研究表明旋覆花产于全国大部分地区，以东北、华北、华东、华中及广西等地为多（见表 1）。从历代本草著作来看，自魏晋以来药用旋覆花产地与现代旋覆花产地无显著区别。

表 1　旋覆花历代产地变迁信息

Tab 1　Information on the change of the producing areas of Inula in various dynasties

朝代	出处	本草记载	产地
东汉	《神农本草经》	生川谷	生于河谷地带
魏晋南北朝	《名医别录》	生平泽川谷	山西西南部
	《本草经集注》	出近道下湿地	生长于湿润草地、河岸或田埂上
宋代	《证类本草》	今所在皆有	分布广泛
	《图经本草》	生平泽川谷，今所在有之。二月以后生苗，多近水旁	各地皆有
明代	《御制本草品汇精要》	道地：随州、河南	分布于湖北、河南一带
	《本草纲目》	田野塍堑皆生，逐节延蔓	生长于湿润草地、河岸或田埂上
近现代	《药物出产辨》	产广西贺县、钟山、八步，广东下四府，惠州、阳江等均有出	产地分布极为广泛，由北部地区至今广西等南部地区均有所分布

4　采收加工炮制考证

古时关于旋覆花的采收有较多的论述，陶弘景《本草经集注》[7] 载：“五月采花，日干，二十日成”，认为农历 5 月花开采收晒干以用。苏颂所著《图经本草》[27] 中记载：“七月、八月采花，曝干，二十日成”，认为应在农历 7 ～ 8 月采收，在太阳下晒干，20 d 曝干而成。以后诸本草均沿用了此说法。唐慎微所著《证类本草》[9]：“六月至九月采花”，认为 6 ～ 9 月皆可采花。北宋寇宗奭所撰《本草衍义》[22] 中记载：“八、九月有花，大如梧桐子，花淡黄绿，繁茂，圆而覆下”。明代李时珍于《本草纲目》[10] 中提出：“至秋开花”，故应在秋前采花入药。清代杨时泰所著《本草述钩元》[24] 中记载：“二月生苗。六月开金黄色花”，现代《中华本草》[29] 记载：“7 ～ 10 月分批采收花序，晒干。夏、秋采摘即将开放的花序，晒干”。从上述本草考证中可看出，古人多认为旋覆花农历二月后种子萌发而生芽，开花时间为农历六月后，采花时间为六至九月花开均可，即夏、秋二季，其中八、九月份旋覆花盛放之时，与现代旋覆花采收花期基本一致。

自陶弘景提出“晒干”以来，历代本草多沿用此说法，至魏晋南北朝时期，雷敩所在《雷公炮炙论》[30] 中记载：“凡采得后，去裹花蕊壳皮并蒂子，取花蕊，蒸，从巳至午，晒干用”，具体为：将采得的旋覆花去掉花萼、花托等，取花蕊，净制后，从早晨到中午蒸制 4 h 左右，后晒干以备用，该书首次提出了旋覆花蒸制后晒干的炮制方法。东汉张仲景所著《伤寒论》[5] 中对旋覆花并无特殊炮制要求，可以认为仅使用晒干的旋覆花。宋代《圣济总录》[31] 记载旋覆花的炮制方式为“净择去茎叶微炒”，首次提出了“炒制”的炮制方法，旋覆花应该净制取出茎叶取花微炒而成；《太平惠民和剂局方》[32] 云：“凡使，须蒸过入药用”，与《雷公炮炙论》中炮制方法类似，即旋覆花应蒸制后入药用；《证类本草》[9] 有云：“洗尘令净，捣末”，旋覆花应净制后捣末入药；明代《入门》[33] 亦用“蒸制”的方法来炮制旋覆花：“去梗叶蒸熟晒干，入煎药，用绢滤过”，文中也明确了入煎药时需要用丝质绢布过滤后再使用；《通玄》[34] 中记载到：“去皮及蒂，洗净微焙”。清代《本草害利》总结旋覆花的炮制方式为“蒸晒干用”[35]，延续了《雷公炮炙论》中的描述，先蒸后晒干，其目的为方便旋覆花的贮存。《四要》记载“蒸用，煎剂绢包”[36]，旋覆花应包煎入药。从上述本草考证中可以看出，古人极少使用鲜品旋覆花，多采用“晒干”的方式对旋覆花进行炮制，一方面可以便于贮存，另一方面可能与增强旋覆花“降气，消痰，行水，止呕”的功效有关。旋覆花历代采收加工炮制信息见表 2。

现代旋覆花炮制多采用晒干和蜜炙的方式，在《中国药典》[1]、《中药大辞典》[37]、《上海市中药饮片炮制规范》[38] 及《四川中药志》[39] 中均有旋覆花蜜炙品的记载。即取炼蜜，加适量开水稀释，淋入净旋覆花内拌匀，稍闷，置炒制容器内，用文火加热，炒至不黏手时，取出晾凉。蜜制后苦辛，降逆止呕作用弱于生品，其性偏润，作用偏重于肺，长于润肺止咳，降气平喘，多用于咳嗽痰喘而兼呕恶者。

表 2 旋覆花历代采收加工炮制信息

Tab 2 Information about the harvesting and processing of Inula in various dynasties

朝代	出处	采收加工、炮制
南北朝	《本草经集注》	五月采花，日干，二十日成
梁代	《雷公炮炙论》	凡采得后，去裹花蕊壳皮并蒂子，取花蕊，蒸，从巳至午，晒干用
宋	《图经本草》	七月、八月采花，曝干，二十日成
	《证类本草》	六月至九月采花。
	《圣济总录》	净择去茎叶微炒
	《太平惠民和剂局方》	凡使，须蒸过入药用
	《证类本草》	洗尘令净，捣末
明代	《入门》	去梗叶蒸熟晒干，入煎药，用绢滤过
	《药品化义》	去蒂，焙
	《通玄》	去皮及蒂，洗净微焙
清	《本草害利》	蒸晒干用
	《四要》	蒸用，煎剂绢包

5 药用部位考证

历代本草文献记载旋覆花的药用部位多为其干燥头状花序，如魏晋南北朝时期《本草经集注》[7]中记载“五月采花，日干，二十日成”。唐朝时期的《新修本草》[8]记载“五月采花，日干，二十日成”。《千金翼方》[20]中记载“生平泽川谷，五月采花，日干，二十日成”。宋朝时期《本草图经》[11]记载“七月、八月采花，暴干，二十日成”。《中国药典》中菊科植物旋覆花 *Inula japonica* Thunb. 干燥地上部分为金沸草，而干燥头状花序为旋覆花。

根据以上本草记载可知，旋覆花药用部位记载首见于南北朝《本草经集注》，所用为其干燥头状花序，此后历代记载均为干燥头状花序入药，这与现行《中国药典》所载旋覆花的药用部位一致。

6 功效考证

《神农本草经》[4]首次记载了旋覆花的功效主治：“主结气胁下满惊悸，除水，去五脏间寒热，补中下气”。旋覆花主治邪气聚积造成的胁下胀满，惊恐心悸，消除水湿，祛除五脏间的寒热邪气，补益内脏，使气下行。《名医别录》[6]中有云“消胸上痰结，唾如胶漆，心胁痰水，膀胱留饮，风气，湿痹，皮间死肉，目中眵喊，利大肠，通血脉，益色泽”。旋覆花治胸中痰结，胁下胀满，咳喘，呃逆，唾如胶漆，心下痞鞕，噫气不除，大腹水肿，清热，利尿。唐代甄权所著的《药性论》[40]中写道“主肋胁气，下寒热、水肿，主治膀胱宿水，去逐大腹，开胃，止呕逆不下食”。总结旋覆花的功效即主治痰结气结，可下气行水。清代张璐在《本经逢原》[41]中载“旋覆花升而能降，肺与大肠药也。其功在于开结下气，行水消痰，治惊悸，祛痞坚，除寒热，散风湿，开胃气，止呕逆，除噫气，故肺中伏饮寒嗽宜之”。旋覆花入肺经、大肠经，开结下气，利水，除痰饮，主治惊悸，祛除五脏寒热，降逆止呕，肺中寒痰咳嗽尤其适用。从历代著作来看，旋覆花具“降气，消痰，行水，止呕”的功效[1, 42]。从旋覆花的功效来看其作用趋势是向下的，故有“诸花皆升，旋覆花独降”的说法。但旋覆花质轻而上扬，其降气、止呕等功效的实现依赖于炮制加工，故所谓“生升熟降”。

7 结语

综上所述，旋覆花既可以作为观赏性植物，又可以药用，且历代旋覆花基原主流清晰，即为旋覆花 *Inula japonica* Thunb. 的干燥头状花序。历代记载旋覆花的产地也较为广泛，在全国大部分地区都有分布，其主要分布于湿地、河谷等较为湿润的环境，其道地产区主要在河南、湖南及湖北等地，在广西、广东亦有出产。历代本草记载旋覆花均在夏秋花开后采收，与《中国药典》规定的旋覆花采收期接近。历代古籍记载大多采用晒干对旋覆花进行炮制，极少使用生品入药，因其质轻而上扬，应用“生升熟降”之理对旋覆花炮制后能使其功效向内向下，增强其“降气，消痰，行水，止呕”功效。对旋覆花的药用部位进行考证，《中国药典》中以旋覆花 *Inula japonica* Thunb. 的干燥地上部分入药为金沸草，以旋覆花 *Inula japonica* Thunb. 的干燥头状花序入药为旋覆花，古籍中大多以干燥头状花序入药，故应以干燥头状花序为药用部位。参考经典名方旋覆代赭汤出处《伤寒论》，此方功效主要依赖于旋覆花“降气，消痰，行水，止呕”的功效，进一步确定经典名方中旋覆花入药部位为干燥头状花序方中对旋覆花并无特殊炮制要求，故采收加工及炮制方式可依照《中国药典》。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：339.

[2] 国家中医药管理局 . 国家中医药管理局关于发布《古代经典名方目录（第一批）》的通知 [EB/OL]. http：//kjs. satcm. gov. cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107. html [2018-04-13].

[3] 国家药品监督管理局 . 国家药监局关于发布《中药注册分类及申报资料要求》的通告（2020 年第 68 号）[EB/OL]. http：//www. nmpa. gov. cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20200928164311143. html [2020-09-27].

[4] 吴普，孙星衍，石学文 . 神农本草经 [M]. 第 3 卷 . 沈阳：辽宁科学技术出版社，1997：38.

[5] 李孝波 . 桂林古本伤寒杂病论 [M]. 太原：山西科学技术

出版社 . 2018：159.
[6] 陶弘景，尚志钧 . 名医别录 [M]. 第 3 卷 . 北京：人民卫生出版社，1986：219.
[7] 陶弘景，尚志钧，尚元胜 . 本草经集注 [M]. 第 5 卷 . 北京：人民卫生出版社，1994：333.
[8] 苏敬，尚志钧 . 新修本草 [M]. 第 10 卷 . 合肥：安徽科学技术出版社，1981：246.
[9] 唐慎微，尚志钧 . 证类本草重修政和经史证类备急本草 [M]. 第 10 卷 . 北京：华夏出版社，1993：289.
[10] 李时珍 . 本草纲目校点本（第二册）[M]. 第 15 卷 . 北京：人民卫生出版社，1977：961.
[11] 苏颂，尚志钧 . 本草图经 [M]. 第 8 卷 . 合肥：安徽科学技术出版社，1994：254.
[12] 小儿卫生总微论方 [M]. 第 2 卷 . 2 版 . 上海：上海卫生出版社，1958：16.
[13] 王象晋，伊钦恒 . 群芳谱诠释 [M]. 第 10 卷 . 北京：中国农业出版社，1985：290.
[14] 萧步丹 . 岭南采药录 [M]. 广州：广东科技出版社，2009：174.
[15] 周太炎，丁志遵 . 南京民间药草 [M]. 北京：科学出版社，1956：122.
[16] 杨济秋，杨济中 . 贵州民间方药集 [M]. 第 3 卷 . 3 版 . 贵阳：贵州人民出版社，1978：363.
[17] 河北省商业厅医药局 . 河北药材 [M]. 石家庄：河北人民出版社，1959：253.
[18] 山东卫生干部进修学院 . 山东中药 [M]. 济南：山东人民出版社，1959：213.
[19] 上海常用中草药编写组 . 上海常用中草药 [M]. 上海：上海市出版革命组，1970：288.
[20] 孙思邈 . 千金翼方 [M]. 第 3 卷 . 上海：第二军医大学出版社，2008：56.
[21]（南宋）王继先，尚志钧 . 绍兴本草所有注 [M]. 第 7 卷 . 北京：中医古籍出版社，2007：178.
[22] 寇宗奭，颜正华 . 本草衍义 [M]. 第 11 卷 . 北京：人民卫生出版社，1990：69.
[23] 刘文泰 . 本草品汇精要 [M]. 第 13 卷 . 北京：人民卫生出版社，1982：56.
[24] 清吴其浚著 . 植物名实图考 [M]. 第 11 卷 . 北京：商务印书馆，1957：283.
[25] 杨时泰 . 本草述钩元 37 卷 [M]. 第 9 卷 . 北京：科技卫生出版社，1958：220.
[26] 艾铁民 . 药用植物学 [M]. 北京：北京大学医学出版社，2004：336.
[27] 苏颂，胡乃长，王致谱 . 图经本草辑复本 [M]. 第 8 卷 . 福州：福建科学技术出版社，1988：234.
[28] 刘文泰，陈仁寿，杭爱武 . 御制本草品汇精要 [M]. 第 13 卷 . 上海：上海科学技术出版社，2005：449.
[29] 国家中药学管理局《中华本草》编委会 . 中华本草 [M]. 上海：上海科学技术出版社，1998：1954.
[30] 雷敦，顿宝生，王盛民 . 雷公炮炙论通解 [M]. 西安：三秦出版社，2001：261.
[31] 赵佶敕 . 圣济总录 [M]. 北京：人民卫生出版社，1962：1180.
[32] 陈承，彭建中，魏富有 . 太平惠民和剂局方 [M]. 第 10 卷 . 沈阳：辽宁科学技术出版社，1997：123.
[33] 李挺 . 医学入门 [M]. 第 2 卷 . 南昌：江西科学技术出版社，1988：343.
[34] 李中梓，付先军等 . 本草通玄 [M]. 北京：中国中医药出版社，2015：29.
[35] 凌奂 . 本草害利 [M]. 北京：中医古籍出版社，1982：125.
[36] 雷大震，江诚，程曦 . 医家四要 [M]. 第 4 卷 . 太原：山西科学技术出版社，2012：179.
[37] 卫生报馆编辑部编 . 中药大辞典 [M]. 上海：上海交通大学出版社，2018：2216.
[38] 上海市药品监督管理局编 . 上海市中药饮片炮制规范 [M]. 2018 年版 . 上海：上海科学技术出版社，2019：421.
[39] 本书协作编写组编 . 四川中药志 [M]. 第 2 卷 . 四川人民出版社，1980：203.
[40] 甄权 . 药性论 [M]. 第 2 卷 . 安徽：皖南医学院科研科，1983：32.
[41] 张璐，赵小青，裴晓峰 . 本经逢原 [M]. 第 2 卷 . 北京：中国中医药出版社，1996：75.
[42] 金锐，王宇光 . 基于“汤液经法图”的新型冠状病毒肺炎临床各期中药治疗复方的配伍原理及加减原则研究 [J]. 中南药学，2020，18（3）：340-344.

（收稿日期：2021-09-08；修回日期：2021-11-10）

药物分析与检验

基于多波长高效液相色谱指纹图谱和多成分定量分析的益肝明目口服液质量标准研究

谢百波[1, 2, 3]，里艳茹[1]，寻园[1]，臧新钰[1]，李映[1]，苏加乐[2, 3]，程林友[2, 3]，周骅[1, 2, 3*]（1. 北京慧宝源生物技术股份有限公司，北京 102206；2. 广西慧宝源医药科技有限公司，广西 钦州 535008；3. 抗肿瘤药物国家地方联合工程研究中心，广西 钦州 535008）

摘要：目的 建立益肝明目口服液的高效液相色谱（HPLC）指纹图谱，并对其中 6 种成分（芍药苷、绿原酸、木犀草苷、阿魏酸、川陈皮素和橙皮苷）进行定量分析。**方法** 采用色谱柱 Inertsil ODS-SP（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相为乙腈 -0.05% 磷酸水溶液梯度洗脱，体积流量 0.8 mL·min^{-1}，检测波长 190 ～ 600 nm，柱温 35 ℃。建立 12 批益肝明目口服液的 HPLC 指纹图谱，并进行相似度评价；在不同检测波长（230、284、325、348 nm）下，对 6 个指标成分进行含量测定。**结果** 通过与对照品的保留时间和紫外光谱图对比，指认其中 6 个成分（芍药苷、绿原酸、木犀草苷、阿魏酸、川陈皮素、橙皮苷），并对其进行了定量分析。结果显示 12 批样品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度在 0.916 ～ 0.999。6 个成分的含量分别为 909.91 ～ 1249.15、38.71 ～ 62.76、13.17 ～ 29.45、27.01 ～ 49.60、2.19 ～ 7.52、264.97 ～ 496.05 μg·mL^{-1}。**结论** 建立的多波长 HPLC 指纹图谱及定量分析方法稳定性、重复性好，操作简单，可以为完善益肝明目口服液的质量标准提供参考。

关键词：益肝明目口服液；多波长高效液相色谱指纹图谱；多成分定量分析；质量标准
中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)05-1148-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.031

Quality standard of Yigan Mingmu oral liquid by multi-wavelength HPLC fingerprint and multi-component quantitative analysis

XIE Bai-bo[1, 2, 3], LI Yan-ru[1], XUN Yuan[1], ZANG Xin-yu[1], LI Ying[1], SU Jia-le[2, 3], CHENG Lin-you[2, 3], ZHOU Hua[1, 2, 3*] (1. *Beijing Hebabiz Biotechnology Co. Ltd, Beijing* 102206; 2. *Guangxi Hebabiz Pharmaceutical Co. Ltd., Qinzhou Guangxi* 535008; 3. *National and Regional Joint Engineering Center for Anticancer Drug Development, Qinzhou Guangxi* 535008)

Abstract: Objective To establish multi-wavelength HPLC fingerprints and simultaneously determine the content of 6 components (paeoniflorin, chlorogenic acid, luteoloside, ferulic acid, nobiletin, and hesperidin) in Yigan Mingmu oral liquid. **Methods** The chromatographic column (Inertsil ODS-SP, 4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was acetonitrile-0.05% phosphoric acid aqueous solution with gradient elution, the volume flow was 0.8 mL·min^{-1}, the detection wavelength was 190 ～ 600 nm, and the column temperature was 35 ℃. The fingerprint chromatogram of 12 batches of Yigan Mingmu oral liquid was established. The content of 6 components was determined at 230, 284, 325, and 348 nm. **Results** The similarity of 12 batches of samples and the reference fingerprints ranged from 0.916 to 0.999. Six characteristic peaks were

基金项目：广西千亿元产业产学研用合作项目 [桂工信投资（2013）158 号]。
作者简介：谢百波，男，副研究员，主要从事中药天然药物药效物质基础、质量控制及新药开发，email：baiboxie@163.com
*通信作者：周骅，男，研究员，主要从事中药新药研发和产业化研究，email：drjge@163.com

identified as paeoniflorin, chlorogenic acid, luteoloside, ferulic acid, nobiletin, and hesperidin, whose content was at 909.91 ～ 1249.15, 38.71 ～ 62.76, 13.17 ～ 29.45, 27.01 ～ 49.60, 2.19 ～ 7.52, and 264.97 ～ 496.05 μg • mL^{-1}, respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate and reliable, with good reproducibility, which can be used to improve the quality standard of Yigan Mingmu oral liquid.

Key words: Yigan Mingmu oral liquid; multi-wavelength HPLC-fingerprint; multi-component quantitative analysis; quality standard

中药口服液是目前广受欢迎的中成药剂型，其药效的发挥是多成分共同作用的结果，药效成分的含量和比例对疗效有重要影响。因此，在评价其质量时，需采用能更全面反映其内在品质的方法，比如指纹图谱[1-7]，结合多指标成分的含量测定[8-10]。益肝明目口服液是在古方“固根汤”[11]的基础上加味所得，主要由玉竹、当归、白芍、熟地和麦冬等 12 味中药组成，具有补益肝肾的作用，适用于肝肾不足症见腰膝酸软、头晕目糊、记忆力减退、体倦乏力等[12]。研究表明，益肝明目口服液对异烟肼联合利福平诱导的大鼠药物性肝损伤[13]和大鼠急性酒精性肝损伤[14]均有较好的保护作用。益肝明目口服液现有标准的含量测定项仅对芍药苷的含量进行了相应规定，只能反映药品中药材白芍的情况，比较片面[15]。为了更加全面地评价该药品的质量，完善其质量标准，本研究建立了该产品的多波长 HPLC 指纹图谱，并对其中 6 个成分（芍药苷、绿原酸、木犀草苷、阿魏酸、川陈皮素、橙皮苷）进行含量测定，现报道如下。

1　仪器与试药

高效液相色谱仪（包含 Labsolution 工作站，SIL-20A 自动进样器，SPD-M20A 二极管阵列检测器，日本岛津公司，型号：20A）；MS105DU 电子天平（Mettler Toledo）；KQ-500DE 超声波清洗仪（昆山市超声仪器有限公司）。

益肝明目口服液（广西慧宝源医药科技有限公司）；乙腈（Honeywell，HPLC 级）；甲醇、磷酸、正丁醇（北京化工厂，分析级）。阿魏酸（批号：12112204）、绿原酸（批号：13031401）、木犀草苷（批号：13060908）、川陈皮素（批号：13122311）、橙皮苷（批号：14010315）和芍药苷（批号：13113009）（对照品，成都曼思特生物科技有限公司，质量分数均大于 98%）。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

采用 Inertsil ODS-SP 色谱柱（250 mm×46 mm，5 μm），流动相为乙腈（A）-0.05% 磷酸水溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 25 min，5% ～ 15%A；25 ～ 35 min，15% ～ 20%A；35 ～ 55 min，20% ～ 30%A；55 ～ 70 min，30% ～ 70%A；70 ～ 90 min，70% ～ 100%A）；体积流量 0.8 mL • min^{-1}，检测波长 190 ～ 600 nm，柱温 35 ℃，进样量 10 μL。

2.2　供试品溶液制备

精密量取益肝明目口服液 1 mL，置 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，称定重量，超声处理 10 min（功率 100 W，频率 40 kHz，温度 20 ℃），静置至室温后，称定重量，甲醇补足损失的重量，即得供试品溶液（在制备后 24 h 内检测）。

2.3　对照品溶液制备

取阿魏酸、绿原酸、川陈皮素、橙皮苷、芍药苷、木犀草苷对照品各适量，分别置 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，即得阿魏酸 415 μg • mL^{-1}、绿原酸 222 μg • mL^{-1}、川陈皮素 192 μg • mL^{-1}、橙皮苷 966 μg • mL^{-1}、芍药苷 494 μg•mL^{-1} 和木犀草苷 19.0 μg•mL^{-1} 的对照品溶液。

2.4　指纹图谱方法学考察

2.4.1　精密度试验　取批号为 130829 的益肝明目口服液，按照“2.2”项下方法制备供试品溶液，连续进样 6 次，使用中药指纹图谱相似度评价系统（2012）计算相似度，相似度 *RSD* 为 0.64%，说明方法精密度良好。

2.4.2　重复性试验　取批号为 130829 的益肝明目口服液，按照“2.2”项下方法制备供试品溶液，平行操作 6 份，进样测定，计算相似度 *RSD* 为 0.17%，说明方法重现性良好。

2.4.3　稳定性试验　取批号为 130829 的益肝明目口服液，按照“2.2”项下方法制备供试品溶液，分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，计算相似度 *RSD* 为 0.08%，说明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.5　指纹图谱建立及共有峰的指认

分别取 12 批益肝明目口服液，按照“2.2”项下方法制备供试品溶液，分别进样测定，将 12 批样品的图谱以 AIA 格式依次导入中药指纹图谱相似度评价系统（2012）进行分析，采用中位数法对相关参数进行自动匹配，标定出共有峰，根据色谱峰共有模式生成对照指纹图谱 R，并生成 12 批益肝明目口服液的指纹图谱，见图 1。通过谱图对比，选择特征明显的色谱峰进行标定，在 230、284、325、348 nm 波长下分别标定了 22、20、31、32 个共有峰（见图 1）。

2.6 相似度分析

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》（2012 版）分析软件，以 130102 批样品的 HPLC 图谱为对照，进行整体相似度评价。结果显示，4 个波长下 12 批益肝明目口服液相似度均大于 0.91，表明样品批间差异较小，质量稳定，结果见表 1。

表 1 12 批益肝明目口服指纹图谱相似度评价结果

Tab 1 Similarity of 12 batches of Yigan Mingmu oral liquid

批号	不同波长下的相似度			
	230 nm	284 nm	325 nm	348 nm
130104	0.941	0.991	0.989	0.988
130106	0.988	0.991	0.995	0.996
130414	0.916	0.981	0.972	0.952
130417	0.970	0.966	0.991	0.970
130418	0.996	0.992	0.989	0.993
130420	0.995	0.986	0.997	0.990
130421	0.995	0.997	0.996	0.997
130505	0.999	0.992	0.996	0.993
130506	0.998	0.983	0.996	0.998
130507	0.999	0.975	0.989	0.992
130829	0.991	0.973	0.987	0.979
130922	0.990	0.977	0.987	0.976

2.7 聚类分析

以 12 批益肝明目口服液在 4 个波长下共有峰的相对峰面积为原始数据，应用 SPSS 22.0 软件，采用组间平均数联结法进行聚类分析。结果显示，12 批益肝明目口服液可聚为一大类。

2.8 含量测定方法学考察

2.8.1 专属性试验 精密吸取混合对照品、供试品、阴性样品（甲醇）溶液各 10 μL，按照“2.1”项下色谱条件进样分析，结果见图 2。样品在与对照品阿魏酸、绿原酸、川陈皮素、橙皮苷、芍药苷和木犀草苷相应的位置上，均有相同保留时间的色谱峰，而阴性样品（空白溶剂）无对应色谱峰（图谱未再给出），说明该色谱条件不干扰测定。

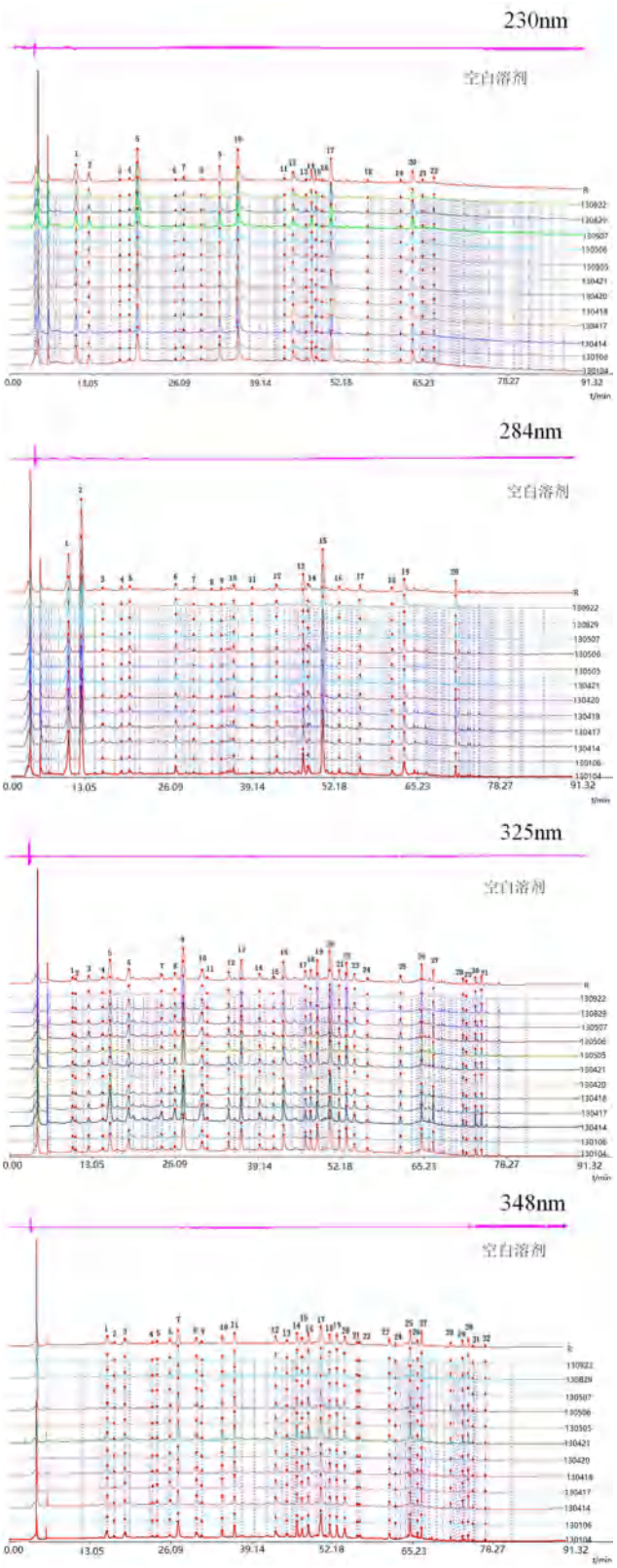


图 1 12 批益肝明目口服液在不同波长下的指纹图谱

Fig 1 Fingerprint of 12 batches of Yigan Mingmu oral liquid at different wavelength

R. 对照指纹图谱（reference fingerprint）；10. 芍药苷（paeoniflorin）；15. 橙皮苷（hesperidin）；9. 绿原酸（chlorogenic acid）；16. 阿魏酸（ferulic acid）；30. 川陈皮素（nobiletin）；14. 木犀草苷（luteoloside）

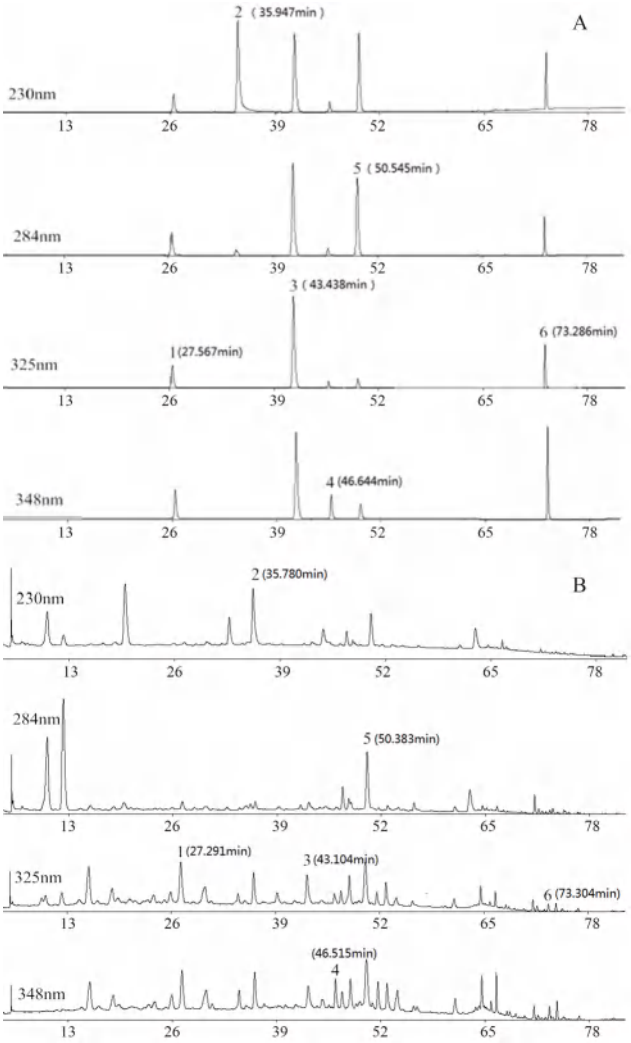


图 2　对照品（A）和供试品（B）HPLC 图谱

Fig 2　HPLC chromatogram of blank solvent，mixed reference（A）and samples（B）

1. 绿原酸（chlorogenic acid）；2. 芍药苷（paeoniflorin）；3. 阿魏酸（ferulic acid）；4. 木犀草苷（luteoloside）；5. 橙皮苷（hesperidin）；6. 川陈皮素（nobiletin）

2.8.2　线性关系考察　根据样品中不同成分的含量，将对照品分别稀释成适宜的浓度，并配制系列标准曲线工作液，滤过，分别进样 10 μL，以质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，建立标准曲线，进行线性回归，结果见表 2。

表 2　6 种指标成分的线性关系考察结果

Tab 2　Linearity and ranges of 6 chemical markers

成分	回归方程	相关系数	线性范围 /（μg・mL^{-1}）
阿魏酸	$Y=6.99\times10^{5}X-2.02\times10^{4}$	1.000	1.66 ～ 8.30
绿原酸	$Y=1.23\times10^{6}X-1.50\times10^{6}$	1.000	2.22 ～ 11.10
川陈皮素	$Y=1.10\times10^{6}X-1.57\times10^{4}$	1.000	0.192 ～ 0.960
木犀草苷	$Y=6.34\times10^{5}X-3.19\times10^{4}$	1.000	0.76 ～ 3.80
橙皮苷	$Y=4.51\times10^{5}X-1.47\times10^{6}$	1.000	19.32 ～ 173.88
芍药苷	$Y=2.78\times10^{5}X-1.79\times10^{6}$	0.9996	49.4 ～ 247.0

2.8.3　精密度试验　取混合对照品溶液连续进样 6 次，测定其峰面积，结果阿魏酸、绿原酸、川陈皮素、木犀草苷、橙皮苷、芍药苷的 *RSD* 分别为 1.1%、0.72%、0.30%、1.0%、0.84%、1.5%，表明仪器精密度良好。

2.8.4　重复性试验　取批号为 130420 的益肝明目口服液，按照“2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液，进样测定，结果阿魏酸、绿原酸、川陈皮素、木犀草苷、橙皮苷、芍药苷的 *RSD* 分别为 1.7%、2.9%、1.5%、1.0%、2.8%、1.7%，表明方法重现性良好。

2.8.5　稳定性试验　取批号为 130420 的益肝明目口服液，按照“2.2”项下方法制备供试品溶液，分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，结果阿魏酸、绿原酸、川陈皮素、木犀草苷、橙皮苷、芍药苷的 *RSD* 分别为 0.46%、2.4%、1.9%、1.2%、0.7%、1.8%，表明样品在 24 h 内稳定。

2.8.6　回收试验　取已知含量的 130420 批次的益肝明目口服液，按照“2.2”项下方法制备供试品溶液，加入与样品含量约 1∶1 的对照品溶液，平行操作 6 份，进样测定，计算回收率。结果阿魏酸、川陈皮素、绿原酸、木犀草苷、橙皮苷、芍药苷的平均回收率分别为 99.26%、102.95%、102.68%、101.66%、101.75%、97.03%，*RSD* 分别为 2.4%、2.7%、2.0%、2.1%、0.31%、0.41%，表明方法准确度良好。

2.9　含量测定结果

取 12 批益肝明目口服液，按照“2.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，结果见表 3。

表 3　12 批样品中 6 个成分的含量测定结果（$n=3$，μg・mL^{-1}）

Tab 3　Contents of 6 markers in 12 batches of samples（$n=3$，μg・mL^{-1}）

批号	阿魏酸	川陈皮素	绿原酸	木犀草苷	橙皮苷	芍药苷
130104	34.00	3.92	55.12	29.45	496.05	1249.15
130106	27.01	2.19	38.71	13.17	264.97	909.91
130414	38.37	6.87	52.03	19.33	300.06	1257.33
130417	43.23	7.52	56.96	20.43	304.76	1124.90
130418	49.60	4.50	54.84	18.90	457.57	1200.36
130420	34.34	3.05	42.48	14.55	306.34	1031.98
130421	46.82	5.77	62.76	24.17	469.27	1042.73
130505	35.75	4.60	53.94	19.47	410.34	943.27
130506	31.01	4.15	51.83	17.98	367.71	916.40
130507	31.33	4.56	52.87	19.02	379.76	940.47
130829	43.10	3.74	46.81	15.96	449.57	941.45
130922	36.05	4.14	52.05	19.14	253.46	977.51

3 讨论

本研究比较了水饱和正丁醇萃取法和甲醇提取法制备供试品溶液。经比较发现，水饱和正丁醇萃取法中芍药苷的含量高于甲醇提取法，而其他 5 种成分的含量均低于甲醇提取法，故选择甲醇超声处理供试品溶液。考察了甲醇 - 水、乙腈 - 水、乙腈 -0.05% 醋酸水溶液、乙腈 -0.05% 磷酸水溶液和乙腈 -0.05% 甲酸水溶液 5 种流动相系统，综合考虑峰形、分离度、出峰数等因素选择乙腈 -0.05% 磷酸水溶液作为流动相。

本研究通过二极管阵列检测器（DAD）在 190 ～ 600 nm 波长下对样品进行全波长扫描，并对各波长下的色谱行为进行分析。结果发现绿原酸、阿魏酸和川陈皮素在 4 个波长（230、284、325、348 nm）处均有较强吸收峰，结合供试品图谱出峰情况，从谱图信息最大化考虑选择 325 nm 作为这 3 个成分含量测定的共同检测波长；芍药苷在 230 nm 处、橙皮苷在 284 nm 处、木犀草苷在 348 nm 处有较强吸收峰，在其他波长下吸收峰较弱，阿魏酸在 4 个波长下都有紫外吸收，在 325 nm 和 348 nm 波长下吸光度较强，在 230 和 348 nm 波长下吸收峰面积较弱，因此选择不同波长作为相应成分含量测定的检测波长。

益肝明目口服液组方包括 12 味药材，成分复杂，采用单一波长检测会出现色谱峰组成单一，特征峰信息的丢失或残缺，且难以涵盖全方所有药味。本试验采用了 230、284、325、348 nm 为检测波长，建立了多波长指纹图谱和多成分含量测定方法，使各个色谱峰得到较好的分离，特征峰明显且峰形较好，尽可能多地获取色谱峰组成信息以更好地了解益肝明目口服液的化学组成。同时，方法学考察结果表明，本研究建立的指纹图谱和含量测定方法，重复性好，方法可靠，可以为完善该药品质量标准提供依据。

对于建立复杂中成药样品的 HPLC 指纹图谱，可采取多种策略，如多波长融合指纹图谱、不同极性部位的指纹图谱等 [16-18]。在条件允许的情况下，将 HPLC-MS^n 研究和活性测定结合起来，对复杂中成药的质量控制更有意义 [19-20]。希望将来能更加深入地研究益肝明目口服液的谱效关系，进一步完善该产品的质量标准。

参考文献

[1] 任晓蕾，霍金海，张树明，等 . 川菊止痛胶囊高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中南药学，2019，17（8）：1233-1236.

[2] 郭庆，许东亚，程世云 . 肺宁颗粒高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中南药学，2019，17（10）：1695-1698.

[3] 苏瑞，唐志书，刘峰，等 . 脑心通胶囊 HPLC-DAD 指纹图谱研究 [J]. 中南药学，2019，17（1）：1-4.

[4] 郑艳春，李云霞，李春花 . 颈复康片高效液相色谱指纹图谱的研究 [J]. 中南药学，2019，17（6）：811-814.

[5] 于颖超，倪健，高利利，等 . 芪箭颗粒的高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中南药学，2020，18（2）：231-234.

[6] 刘东方，赵丽娜，李银峰，等 . 中药指纹图谱技术的研究进展及应用 [J]. 中草药，2016，47（22）：4085-4094.

[7] 邹纯才，鄢海燕 . 我国中药色谱指纹图谱相似度评价方法 30 年（1988—2017 年）研究进展与展望 [J]. 中国中药杂志，2018，43（10）：1969-1977.

[8] 李丹丹，裴文菡，郭泰麟，等 . 不同道地来源大黄药材的多指标成分测定，指纹图谱研究及一致性评价 [J]. 中南药学，2020，18（4）：123-129.

[9] 张羽，李云霞，郑艳春，等 . 高效液相色谱法同时测定黄芪精颗粒中 3 种黄酮类成分及其指纹图谱研究 [J]. 中南药学，2019，17（4）：87-92.

[10] 杨忠杰，王博，王隆隆，等 . 基于高效液相色谱指纹图谱及化学模式识别的疮疡生肌散质量控制研究 [J]. 中南药学，2020，18（7）：1168-1172.

[11] 清 • 陈士铎 . 辨证录 [M]. 北京：中国中医药出版社，2007：102.

[12] 国家药品监督管理局标准（试行）[S]. WS-5054（B-0054）-2014Z.

[13] Chen YX，Mo QG，Xie BB，et al. Hepatoprotective Activity of Yigan Mingmu Oral Liquid against Isoniazid/Rifampicin-induced Liver Injuries in Rats [J]. Chinese Med，2018，9（12）：165-178.

[14] Mo QG，Zhou G，Xie BB，et al. Evaluation of the hepatoprotective effect of Yigan Mingmu oral liquid against acute alcohol-induced liver injury in rats [J]. BMC Complement Med Ther，2020，20（1）：32-41.

[15] 周志敏 . HPLC 测定益肝明目口服液芍药苷的含量 [J]. 临床合理用药杂志，2009，2（17）：86-87.

[16] 任培培，孙国祥，孙丽娜 . 附子理中丸多波长融合 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志，2009，29（3）：411-415.

[17] 王艳慧，周琳琳，雷敬卫，等 . 香砂养胃丸（浓缩丸）不同极性部位 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志，2017，37（11）：1937-1948.

[18] 蔡跃辉，叶财发，曾棋平，等 . 复方首乌藤合剂中多糖的高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中南药学，2020，18（3）：493-496.

[19] 李慧，包永睿，王帅，等 . 基于灰色关联分析的茜草醇提物抗氧化，抗肝癌谱效关系研究 [J]. 中南药学，2019，17（6）：815-819.

[20] 张序晴，彭兰，李赛，等 . 附子 - 甘草对离体蛙心的影响及其指纹图谱研究 [J]. 中南药学，2019，17（2）：42-47.

（收稿日期：2021-09-26；修回日期：2021-12-25）

3 种半夏饮片的微生物污染状况考察

朱文娟[1]，黎丽敏[2]，李锦妹[1]，陈文静[1]（1. 惠州市食品药品检验所，广东　惠州　516003；2. 嘉应学院医学院，广东　梅州　514031）

摘要：目的　建立 3 种半夏饮片的微生物限度检查法，通过对 32 批半夏的微生物限度检查，分析其微生物污染现状，为 3 种半夏饮片微生物的限度检查和限值的制订提供参考。**方法**　参考《中国药典》2020 年版 1108 中药饮片微生物限度检查法，测定 3 种半夏饮片中的需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数、耐热菌总数、耐胆盐革兰氏阴性菌数，对大肠埃希菌、沙门菌进行检查，并采用全自动细菌鉴定实验系统对平板中分离得到的菌株进行鉴定。**结果**　法半夏、姜半夏和清半夏中的需氧菌总数和霉菌酵母菌总数值均介于 10 ～ 10^5 cfu • g^{-1}；耐热菌检出率为 46.9%，未检出大肠埃希菌及沙门菌，但其他污染菌有成团泛菌属、非脱羧勒克氏菌、肺炎克雷伯菌肺炎、赫氏埃希菌和阴沟肠杆菌等 5 类。**结论**　由于特殊的炮制工艺，半夏饮片的需氧菌总数较低，但部分样品霉菌和酵母菌总数较高，从安全性角度，建议对通过煎煮、冲泡服用的半夏应控制耐热菌并制订相关微生物限度标准。

关键词：半夏饮片；微生物限度检查；中药饮片标准；菌株鉴定；方法适用性；耐热菌
中图分类号：R286　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)05-1153-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.032

Microbial contamination of 3 kinds of Pinelliae rhizome

ZHU Wen-juan[1], LI Li-min[2], LI Jin-mei[1], CHEN Wen-jing[1] (1. *Huizhou Institute for Food and Drug Control*, *Huizhou*　*Guangdong*　516003; 2. *Medical College of Jiaying University*, *Meizhou Guangdong*　514031)

Abstract: Objective　To determine the microbial contamination of Chinese herbal pieces by the microbial limit test for 32 batches of Pinelliae rhizome, and to provide a reference for the microbial limit standard. **Methods**　According to the general rules of "1108 Chinese medicine decoction pieces" in Chinese Pharmacopoeia (2020 Edition), the herbal pieces were analyzed of the total number of aerobic bacteria, yeasts, heat-resistant bacteria, bile-tolerant gram-negative bacteria, *Escherichia coli*, and *Salmonella*. The bacterial strains were identified by the automatic bacteria identification test system. **Results**　The total aerobic bacteria and total number of molds and ranged 10 ～ 10^5 cfu • g^{-1} in Pinelliae rhizoma praeparatum,Pinelliane rhizoma praeparatum cum zingibera et alumine, Pinelliae rhizoma praeparatum, and Pinelliae rhizoma praeparatum cum alumine. The detection rate of heat-resistant bacteria was 46.9%, while *Escherichia coli* and *Salmonella* were not detected. Other contaminated bacteria including *Pantoea*, *Leclercia adecarboxylata*, *Klebsiella pneumoniae, Escherichia hermannii* and *Enterobacter cloacei* were detected. **Conclusion**　Due to the special processing technology, the total number of aerobic bacteria is lower in Pinelliae rhizome pieces, but the total number of molds and yeasts was higher in some samples. For safety concern, the heat-resistant bacteria should be controlled and relevant limit standards should be established for Pinelliae rhizome pieces.

Key words: Pinellia rhizome piece; microbial limit test; Chinese herbal piece standard; strain identification; method applicability; heat-resistant bacteria

作者简介：朱文娟，女，主管药师，主要从事食品药品化妆品微生物检测及相关研究，email：157620896@qq.com

半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata*（Thunb.）Breit. 的干燥块茎，有降逆止呕、镇咳祛痰、抗溃疡、抗血栓、抗肿瘤、抗氧化、抗癫痫、助眠和糖皮质激素样等作用[1-4]。在抗击新型冠状病毒肺炎（COVID-19）时，中药汤剂发挥着重要的作用，其中清肺排毒汤因其良好的治疗作用备受推崇，而半夏为其组方药之一[5]。半夏为临床常用的中药，但生品有毒，故不作内服。通过炮制降低半夏毒性、增强其药效，有利于临床应用和储存。常见的半夏炮制品有法半夏、姜半夏和清半夏，均收载于《中国药典》2020 年版一部中药饮片部分。饮片的炮制方法为煎煮、浸泡、晾干等。法半夏炮制过程中需加入甘草和生石灰，姜半夏需加入白矾和生姜，清半夏需加入白矾[6]。半夏和甘草没有明显的抑菌性[7]；生姜对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均有抑制作用，对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌有强烈的抑制作用[8]；白矾对白假丝酵母菌、大肠埃希菌和枯草杆菌有明显的抑制作用[9]。3 种半夏在炮制过程中使用不同的辅料，推测其抑菌性可能会有不同，因而其微生物限度方法适用性实验有差异。

2020 年版《中国药典》仅对中药提取物、直接口服及泡服饮片进行了微生物限度规定，提出了耐热菌总数的概念和检测方法，但没有对其限值进行统一规定，其他类型的中药饮片也没有微生物限度控制的规定，且缺乏针对不同品种饮片的微生物限度检查法。中药来源主要分为植物、动物和矿物三大类，大多数中药饮片炮制过程简单，经过净选、洗润、干燥等过程，所携带的微生物有所降低，但仍有不同程度的附着和残留，若存放不当，在适宜的温度和湿度下，微生物很容易生长繁殖[10]。在污染严重的情况下，其附带的有害微生物、代谢毒素等，即使经过生产加工仍无法去除，进入终产品后将或多或少给患者带来风险[11]。

近年来，中药饮片的微生物污染情况受到越来越多的关注，张平等[10]对 50 种中药煎煮类饮片微生物污染情况进行了初步探索，范一灵等[12]也对上海地区 10 种中药饮片微生物情况进行研究，结果发现需氧菌总数（TAMC）最高值可达 $10^7 \sim 10^8$ cfu·g^{-1}，霉菌和酵母菌总数（TYMC）最高值可达 $10^5 \sim 10^7$ cfu·g^{-1}，耐热菌检出率高达 50%，60 种需煎煮类中药饮片，炮制方法为煮制类、炒制类和蒸制类的只占 22%，切制、净制、敲制等占 78%。切制、净制、敲制等炮制方式并不能降低中药饮片中的微生物数量，反而可能因为加工过程受到微生物的二次污染，因此，目前国内研究大多聚焦在此类中药饮片。而蒸、煮、炒制类的中药饮片微生物限度检查法和污染情况研究较少，本文选择半夏的 3 种不同炮制品，炮制方式为加辅料煮制，同时建立 3 种半夏的微生物限度检查法并对购自全国 11 家企业 32 批半夏饮片进行微生物污染调查，数据更有代表性和可比性，在初步探明半夏饮片的微生物危害因子的基础上，为中药饮片微生物污染风险评估、蒸煮类炮制方式的中药饮片微生物限度标准的制订和完善提供数据支持。

1 仪器与材料

1.1 仪器

BS-1600Ⅱ级生物安全柜（苏州安泰），BSP-400 生化培养箱（上海博讯），BMJ-400C 霉菌培养箱（上海博讯），VITEK 2 Compact 30 全自动微生物鉴定系统（法国生物梅里埃），Stemi 508 显微镜（德国蔡司）。

1.2 中药饮片

法半夏 13 批、姜半夏 12 批、清半夏 7 批购自 11 家企业，均由笔者按《中国药典》2020 年版各药材项下相关要求进行鉴定。

1.3 培养基

胰酪大豆胨肉汤培养基（TSB）、麦康凯液体培养基（MCB）（批号分别为 1080935、K1459Y，广东环凯生物科技有限公司）；胰酪大豆胨琼脂培养基（TSA）、沙氏葡萄糖琼脂培养基（SDA）、麦康凯琼脂培养基（MCA）、紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基、木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基（XLD）（批号分别为 20011411、19121261、2004282、18062761、190627，北京陆桥技术股份有限公司）；肠道菌增菌液体培养基（EEB）、RV 沙门菌增菌液体培养基（批号分别为 20201128、20210108，北京奥博星生物技术有限公司），培养基适用性检查均符合要求[13]。

1.4 试剂

VITEK 2 革兰氏阴性鉴定卡、革兰氏阳性鉴定卡、芽孢杆菌鉴定卡（批号分别为 2411302103、2421137403、2391523503，生物梅里埃美国股份有限公司）。

1.5 菌种

枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）[CMCC（B）63501]、金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）[CMCC（B）26003]、铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）[CMCC（B）10104]、白假丝酵母菌（*Candida albicans*）[CMCC（B）

98001]、黑曲霉（*Aspergillus niger*）[CMCC（F）98003]，定量菌株（100 ～ 1000 cfu/100 μL）；乙型副伤寒沙门菌（*Salmonella paratyphi*）[CMCC（B）50094]、大肠埃希菌（*Escherichia coli*）[CMCC（B）44102]，定量菌株（10 ～ 100 cfu/100 μL）；所有菌种均购于杭州微球科技有限公司，经菌种确认验收合格。

2　方法

按 2020 年版《中国药典》四部中药饮片微生物限度检查项下的相关要求，先进行方法适用性实验，以符合要求的稀释级供试液作为最低稀释级的供试液进行供试品检查。耐热菌及控制菌检查中划线分离到的菌株用 VITEK 2 进行鉴定。

2.1　菌液制备

取复溶溶液 1.1 mL，加入菌种冻干西林瓶中，充分混匀，即得方法适用性实验所需浓度的菌液。

2.2　供试液制备

取 25 g 样品，加入 225 mL TSB 中，振荡 15 min，取其 1∶10 的清液为供试液。

2.3　方法适用性实验

法半夏：选取亳州市中药饮片厂（批号：200701）、北京仟草中药饮片有限公司（批号：D200601001）、北京本草方源药业集团有限公司（批号：20200521）各 1 批样品。

姜半夏：选取亳州市中药饮片厂（批号：200202）、北京仟草中药饮片有限公司（批号：D191116001）、北京本草方源药业集团有限公司（批号：20200701）各 1 批样品。

清半夏：北京仟草中药饮片有限公司（批号：D200103001）、北京本草方源药业集团有限公司（批号：20200127）、郑州瑞龙制药股份有限公司（批号：18020401）各 1 批样品。

中药饮片中微生物数量相对较高 [12]，为避免影响微生物回收结果，先对上述样品各称取 25 g 后，进行 115 ℃、20 min 灭菌，再进行方法适用性实验。

2.4　微生物的计数

取供试液及 2 个连续 10 倍稀释级，分别于 TSA 和 SDA 中培养，TSA 置 32.5 ℃下培养 5 d，SDA 置 22.5 ℃下培养 7 d，分别计数平皿需氧菌落数。

取供试液 10 mL 经沸水浴 30 min 处理后迅速冷却，后续实验步骤和培养条件同 TAMC 计数实验，测定耐热菌总数。将耐热菌进一步分离纯化，采用 VITEK 2 进行菌株鉴定。

2.5　控制菌的检查

2.5.1　耐胆盐革兰氏阴性菌　取供试液，于 25 ℃下预培养 2 h，取相当于 0.1、0.01、0.001 g 样品的供试品溶液加入至 10 mL EEB 中，按药典要求进行实验和培养，并查表得出定量结果 [13]。

2.5.2　大肠埃希菌　取供试液 10 mL，加至 100 mL TSB 中，混匀，按药典要求进行实验和培养 [13]，若 MCA 平板上有菌落生长，挑取单菌落接种至 TSA 平板，32.5 ℃下培养 24 h 后，采用 VITEK 2 进行菌株鉴定。

2.5.3　沙门菌　取 10 g 供试品，加入 100 mL TSB 中，混匀，按药典要求进行实验和培养 [13]，若 XLD 平板上有菌落生长，挑取单菌落接种至 TSA 平板，32.5 ℃下培养 24 h 后，采用 VITEK 2 进行菌株鉴定。

3　结果

3.1　微生物限度检查法的建立

采用常规平皿法，在供试液浓度为 1∶10 时，3 种饮片的各菌回收比值均为 0.5 ～ 2.0，结果见表 1；控制菌检查中，均能检出实验菌。3 种半夏均无抑菌性，可用常规法进行检验。

3.2　微生物限度检查结果

3.2.1　需氧菌、霉菌和酵母菌、耐热菌数测定　32 批样品的需氧菌、霉菌和酵母菌计数结果介于 10 ～ 10^5 cfu • g^{-1}，其中需氧菌、霉菌和酵母菌的主要分布：法半夏在 10^2 ～ 10^4 cfu • g^{-1} 和 10 ～ 10^2 cfu • g^{-1}，姜半夏和清半夏在 10^3 ～ 10^4 cfu • g^{-1} 和 10^2 ～ 10^4 cfu • g^{-1}，结果见图 1 和图 2。

32 批半夏中，共有 15 批检出耐热菌，计数结果在 10 ～ 550 cfu • g^{-1}，检出率为 46.9%。耐热菌鉴定结果主要为芽孢杆菌属，有地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、坚固芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌；检出 2 批少动鞘氨醇单胞菌。结果表明，半夏经过 30 min 煎煮，大部分条件致病菌可得到有效控制，但仍有不少芽孢杆菌能存活下来。

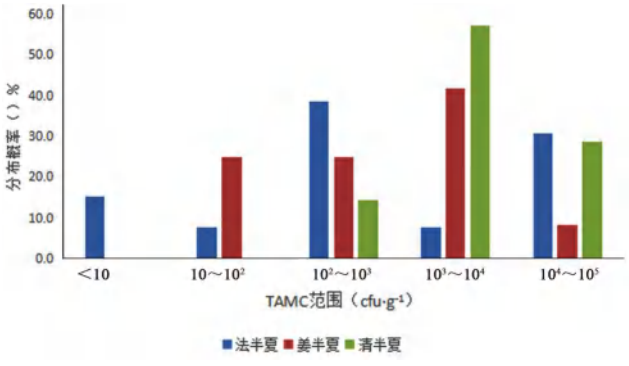


图 1　TAMC 分布图

Fig 1　TAMC results

表 1 半夏炮制饮片微生物限度方法适用性实验结果

Tab 1 Applicability test for microbial limit test of Pinelliae rhizome

样品	批号	回收比值			TSA 琼脂平板上回收比值		SDA 琼脂平板上回收比值	
		金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	枯草芽孢杆菌	白假丝酵母菌	黑曲霉	白假丝酵母菌	黑曲霉
法半夏	200701	1.12	0.94	0.71	1.24	1.21	1.17	1.11
	D200601001	1.10	1.05	0.80	1.22	1.07	1.09	1.01
	20200521	0.85	1.08	0.78	1.01	1.00	1.03	0.83
姜半夏	200202	1.18	1.14	0.99	0.83	0.93	0.98	1.09
	D191116001	1.31	1.11	0.99	0.87	1.03	1.48	0.84
	20200701	1.08	1.15	1.10	0.83	1.11	1.18	0.92
清半夏	D200103001	1.16	1.22	1.08	1.00	1.23	1.22	0.99
	20200127	1.22	0.94	1.03	0.76	1.20	1.34	1.24
	18020401	1.29	1.08	1.02	0.66	1.05	1.11	0.98

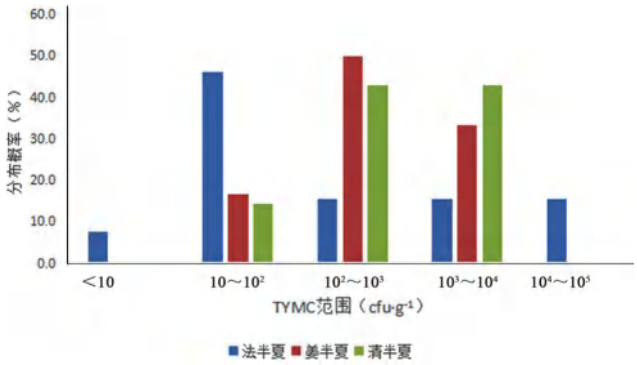


图 2 TYMC 分布图

Fig 2 TYMC results

3.2.2 控制菌检查 3 批耐胆盐革兰氏阴性菌定量实验呈阳性，污染范围均在 10 ～ 10^2 cfu • g^{-1}，3 种半夏各占 1 批。结果表明，3 种半夏的耐胆盐革兰氏阴性菌负载水平较低。32 批半夏饮片均未检出大肠埃希菌和沙门菌，但有 13 批在控制菌检查中发现可疑菌落，主要为以下 5 类菌：成团泛菌属、非脱羧勒克氏菌、肺炎克雷伯菌、赫氏埃希菌和阴沟肠杆菌，分别占 30.7%、23.1%、15.4%、15.4%、15.4%。

4 讨论

传统的标准冻干菌株在复苏、传代和稀释中步骤烦琐、操作耗时。工作菌液需稀释多个数量级，才能达到实验的要求，不仅对实验者的稀释操作要求较高，对每次传代培养的菌液浓度也有严格要求；而实际操作中，工作菌液的浓度常因传代菌株的活性、接种量、培养时间和保存温度及时间而产生较大的差异，实验者往往会因为培养后菌液组的数量达不到药典要求而不得不重复方法适用性实验，费时费力。《中国药典》2020 年版四部 9203 药品微生物实验室质量管理指导原则里指出，可使用与标准菌株所有相关特性等效的商业派生菌株作为工作菌株 [13]。本法适用性实验中，使用的是商品化定量菌株，只需将定量菌株按操作要求进行复溶即可，且菌量稳定。定量菌株的使用，既缩短了菌液的培养和配制稀释的时间，又保证了菌活性和浓度，省时省力，值得推广。

3 种半夏在炮制过程中，使用不同的辅料进行煎煮、浸泡、洗净及晾干。虽然部分辅料（如姜、明矾等）存在一定的抑菌性，但经过炮制后，浓度被稀释，抑菌效力减弱，故 3 种半夏在微生物限度的方法适用性的结果均无抑菌性，可采用常规平皿法进行微生物限度检查。也正因为 3 种半夏炮制过程中使用到含抑菌性的辅料，且在炮制煎煮过程中灭活部分的微生物，半夏饮片相较于仅进行简单晾晒切割的中药饮片，如通草 [14]、红花 [15]，鱼腥草 [16] 等，本底污染微生物的负载量要少 2 ～ 3 个对数级别。半夏饮片的控制菌污染主要为成团泛菌属、非脱羧勒克氏菌、肺炎克雷伯菌肺炎、赫氏埃希菌和阴沟肠杆菌，虽然不是 2020 年版《中国药典》要求的控制菌，但均为条件致病菌，在检查中应关注。

半夏的耐热菌污染主要来自于两大类，一类是耐热的革兰氏阳性芽孢杆菌，另一类是革兰氏阴性条件致病菌。芽孢杆菌属主要源于土壤，枯草芽孢杆菌虽为常见的环境菌，但仍会导致部分人群感染 [17]；此次在耐热菌检测中检出少动鞘氨醇单胞菌，该菌为革兰氏阴性杆菌，是院内感染的致病菌之一 [18]。半夏常以煎煮后的汤剂形式服用，近几年流行养生茶直接泡服，参照 2020 年版《中国药典》，按直接口服及泡服饮片要求，本次实验霉菌和酵母菌总数中，有 7 批次不符合要求；且从 15 批半夏中检出耐热菌，为了保障群众的用药安全，应对半夏的上述两项微生物指标进行限值规定。

在方法学适用性实验中，对样品先进行 115 ℃、20 min 灭菌处理以减少本底菌数量过大

的干扰，摸索出合适的限度方法后，再对未灭菌的样品进行污染性探究实验。在 TAMC、TYMC 中，相邻 10 倍稀释级别的菌落数均呈现 10 倍数值左右的比例，再次表明样品不具有抑菌性。若样品相邻稀释级别的菌落数倍数差异不成比例时，应考虑样品的抑菌因子被灭菌处理所破坏，应调整样品前处理的灭菌温度和时间，重新进行实验，减少对抑菌因子的破坏。

本次实验未检出大肠埃希菌和沙门菌，但并不代表此类致病菌不存在于半夏样品中。本次实验样本数量偏少，接下来将进一步扩大样本数量，寻找各地有代表性的样品，同时开展更多炮制后可降低微生物数量的中药饮片的微生物限度方法建立和污染调查，为药典制订该类中药饮片的微生物限值提供数据支持。

2020 年版《中国药典》新增了中药材饮片的微生物限度检查方法，目前仅对中药提取物、直接口服及泡服饮片的微生物限度标准提出要求。而欧洲药典 7.0 版（EP7.0）、日本药典 16 版（JP16）和美国药典 36 版（USP36）早已明确需煎煮类的中药材饮片的微生物限度标准，包括 TAMC、TYMC 以及控制菌 [19-21]。范一灵等 [12] 的研究表示，炮制过程不涉及热加工和涉及热加工的中药饮片的需氧菌和耐热菌计数有显著性差异，热加工处理的中药饮片，需氧菌和耐热菌计数比不涉及热加工的低。张平等 [10] 分析 50 种药材饮片，非热加工方式切制净制饮片的微生物负载最高，热加工方式的煮制、炒制、蒸制饮片次之，热加工与非热加工的炮制方式对需氧菌、霉菌和酵母菌有明显差异（$P < 0.05$），对耐热菌无显著差异（$P > 0.05$）。

笔者认为，应根据中药材饮片的炮制方式和服用方式，将中药饮片进行分类，炮制方式分为炮制或预处理后不能降低微生物数量、炮制后可降低微生物数量、直接干燥或打粉三类，服用方式分为不需煎煮和需煎煮两类，根据不同的炮制方式和服用方式的相互组合，增加 TAMC、TYMC、耐热菌的限值指标。控制中药材饮片的微生物指标，降低药材本身的各类污染菌，可以在一定程度上延长饮片的保存期限，保证药材的质量和药效。此外，中药材饮片的微生物数量得到一定的控制后，也可降低下游中成药制剂的微生物负载量，减少因原材料中药材带来的微生物污染，在一定程度上减轻制药企业的产品过程控制和终端灭菌的压力。

参考文献

[1] 张则甫 . 半夏泻心汤加味治疗慢性胃炎合并溃疡性结肠炎 50 例 [J]. 浙江中医杂志，2020，55（12）：904.

[2] 绽永华，王学红，王芳 . 半夏泻心汤加减对非酒精性脂肪肝的临床疗效及对胰岛素抵抗的调节效果观察 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（3）：117-122.

[3] 毛梦迪，尚立芝，许二平 . 半夏厚朴汤治疗抑郁症研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（23）：37-43.

[4] 张科卫，吴皓，沈绣红 . 半夏中总游离有机酸的作用研究 [J]. 南京中医药大学学报（自然科学版），2001，17（3）：159-161.

[5] 余绍福，肖敏，向春红，等 . 清肺排毒汤治疗 COVID-19 的理论分析与临床研究进展 [J]. 湖南中医杂志，2020，36（10）：184-187.

[6] 中国药典 2020. 年版一部 [S]. 2020.

[7] 张文燕，曹晓云 . 半夏糖浆 / 半夏止咳糖浆抑菌效力测定及分析 [J]. 中国药品标准，2020，21（3）：213-217.

[8] 邓开野，周海钰，邢盼盼 . 生姜的抗菌及抗氧化作用的研究进展 [J]. 中国调味品，2012，37（2）：28-31.

[9] 冯宝玲，梁丽贞，任晓瑜，等 . 白矾抗真菌和抗细菌的实验研究及其临床意义 [J]. 广东医药学院学报，1992，（2）：8-10.

[10] 张平，石春红，胡亚英，等 . 50 种中药煎煮类饮片微生物检查方法研究及污染情况分析 [J]. 中国药业，2021，30（3）：40-44.

[11] 乐巍，丁安伟，邱蓉丽 . 中药材微生物侵染途径及控制方法研究概况 [J]. 江苏中医药，2010，42（2）：80-81.

[12] 范一灵，李琼琼，房蕊，等 . 上海地区 10 种中药饮片微生物污染情况研究 [J]. 中草药，2015，46（13）：1908-1913.

[13] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020.

[14] 甘永琦，王涛，苏顶，等 . 通草饮片的微生物污染状况考察 [J]. 华西药学杂志，2018，33（1）：52-56.

[15] 刘鹏，战宏利，杨美琴，等 . 红花的微生物污染状况分析 [J]. 药物分析杂志，2015，35（7）：1257-1262.

[16] 林铁豪，张帆，曾璞 . 中药饮片鱼腥草中微生物污染情况研究 [J]. 广东化工，2018，45（8）：86-87.

[17] 蓝晓红，周永刚 . 临床药师在创伤术后枯草芽孢杆菌感染中的药学监护 [J]. 抗感染药学，2013，10（1）：68.

[18] 王焕，袁晶晶，屈健，等 . 少动鞘氨醇单胞菌临床易感因素分析及药物治疗策略 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2019，24（8）：944-947.

[19] European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia [Z]. 7.0 edition. Strasbourg：European Directorate for Quality Medicines，2010.

[20] Pharmaceuticals and Medical Devices Agency of Japan. The Japanese Pharmacopoeia [Z]. 16th edition. Tokyo：the Ministry of Health，Labor and Welfare，2011.

[21] The United States Pharmacopoeia Convention. The United States Pharmacopia & The National Formulary [Z]. USP 36-NF31. Rockville：the United States Pharmacopeia Convention，2012.

（收稿日期：2021-09-10；修回日期：2021-10-14）

高效液相色谱法测定延龄草中 4 种甾体皂苷的油水分配系数及平衡溶解度

左月明，陈林林，张忠立*（江西中医药大学，南昌 330004）

摘要：目的 测定延龄草中 4 种甾体皂苷单体在不同溶剂和不同 pH 缓冲液中的平衡溶解度及其在正辛醇 - 水 / 缓冲液中的油水分配系数。**方法** 采用摇瓶法结合高效液相色谱法，以偏诺皂苷元 -3-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷（简称 Y1T）、偏诺皂苷元 -3-*O*-*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基（1→2）-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷（简称 Y2T）、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（简称 Y3T）、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→4）-[*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基（1→2）]-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷（简称 Y4T）的含量为指标，考察延龄草中 4 种甾体皂苷的平衡溶解度及油水分配系数。**结果** 在 25 ℃下，Y1T、Y2T、Y3T、Y4T 在 pH 2.0 ～ 7.8 的缓冲液中平衡溶解度为 21.667 ～ 46.869 mg • L^{-1}、18.780 ～ 54.054 mg • L^{-1}、17.811 ～ 71.355 mg • L^{-1}、26.027 ～ 63.034 mg • L^{-1}，油水分配系数为 0.161 ～ 0.194、0.855 ～ 1.345、0.536 ～ 0.884、0.294 ～ 0.581。**结论** 本文建立的方法简单可行，延龄草中 4 种甾体皂苷均属于低溶解度、高透过性的药物，水溶性较差，脂溶性较好，且 pH 能影响平衡溶解度和油水分配系数。

关键词：延龄草；甾体皂苷；平衡溶解度；油水分配系数

中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)05-1158-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.033

Determination of equilibrium solubility and apparent oil-water partition coefficient of 4 steroidal saponins in *Trillium tschonoskii* by HPLC

ZUO Yue-ming, CHEN Lin-lin, ZHANG Zhong-li* (*Jiangxi University of Chinese Medicine*, *Nanchang* 330004)

Abstract: Objective To determine the equilibrium solubility in different solvents and pH buffers, and the oil-water partition coefficients of 4 steroidal saponins with *n*-octanol-water/buffer in *Trillium tschonoskii*. **Methods** Shaking flask method combined with HPLC was used to determine the equilibrium solubility and the oil-water partition coefficient of 4 steroidal saponins with pennogenin-3-*O*-*β*-*D*-glucopyranoside (Y1T), pennogenin-3-*O*-*α*-*L*-rhamnopyranosyl (1→2)-*β*-*D*-glucopyranoside (Y2T), pennogenin-3-*O*-*α*-*L*-rhamnopyranosyl- (1 → 4)-[*α*-*L*-rhamnopyranosyl- (1 → 2)] -*β*-*D*-glucopyranoside (Y3T) and pennogenin-3-*O*-*α*-*L*-rhamnopyranosyl (1 → 4)-*α*-*L*-rhamnopyranosyl (1 → 4)-[*α*-*L*-rhamnopyranosyl- (1 → 2)] -*β*-*D*-glucopyranoside (Y4T). **Results** At 25 ℃, the equilibrium solubility of Y1T, Y2T, Y3T, and Y4T in the buffer with pH 2.0 — 7.8 was at 21.667 — 46.869 mg • L^{-1}, 18.780 — 54.054 mg • L^{-1}, 17.811 — 71.355 mg • L^{-1}, and 26.027 — 63.034 mg • L^{-1}; the of oil-water partition coefficient was at 0.161 — 0.194, 0.855 — 1.345, 0.536 — 0.884, and 0.294 — 0.581. **Conclusion** The method is simple and feasible. The 4 steroidal saponins in *Trillium tschonoskii* have low-solubility, high-permeability, poor water solubility and good fat solubility. pH can affect the balance of solubility and oil-water partition coefficient.

Key words: *Trillium tschonoskii*; steroidal saponin; equilibrium solubility; oil-water partition coefficient

基金项目：江西省自然科学基金重点项目资助（No.20212ACB206008）；国家自然科学基金项目资助（No.81760696）。

作者简介：左月明，女，博士，教授，主要从事天然药物的药效物质基础与分子机制研究，email：zuo_yueming@163.com

*通信作者：张忠立，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事天然药物的药效物质基础研究工作，email：zzl51518@163.com

延龄草为百合科植物延龄草（*Trillium tschonoskii* Maxim.）的根及根茎，俗称“地珠”，味甘、性平，有小毒，具有镇静止痛、活血止血之功效，主治头晕目眩、跌打损伤、神经衰弱、脑震荡后遗症等疾病，是恩施土家族著名的民间药[1]。延龄草的主要活性成分为甾体皂苷，以 4 种甾体皂苷偏诺皂苷元 -3-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷（简称 Y1T）、偏诺皂苷元 -3-*O*-*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基（1→2）-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷（简称 Y2T）、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（简称 Y3T）、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→4）-[*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基（1→2）]-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷（简称 Y4T）为主。现代药理研究表明，甾体皂苷类成分具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎及防治心脑血管疾病等作用[2-4]。笔者前期研究发现，延龄草中 4 种甾体皂苷对心脑血管缺血性疾病具有较强的生物活性，说明此类皂苷具有成药性的可能。由于这 4 种甾体皂苷的平衡溶解度和油水分配系数未见相关报道，本文对 4 种甾体皂苷在不同溶剂中的平衡溶解度以及在不同 pH 缓冲液中的油水分配系数进行测定，旨在预测其体内吸收状况，为后续制剂及新药研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Waters2695 高效液相色谱仪（美国沃特世公司）；HY-5A 振荡器（上海力辰邦西科技有限公司）；CP225D 十万分之一分析天平（北京赛多利斯仪器系统有限公司）；KQ-700DE 超声清洗机（昆山超声仪器有限公司）；NP-30S 涡旋混合器（常州恩培仪器制造有限公司）；TGL-16C 离心机（天津广丰科技有限公司）；CT-6023 pH 计（杭州艾普仪器制造有限公司）。

1.2 试药

Y1T、Y2T、Y3T、Y4T 对照品（实验室自制，纯度均大于 98.0%）。乙腈、甲醇（色谱纯，德国默克公司）；磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、氢氧化钠、正辛醇、甲醇、磷酸（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

2.1.1 不同 pH 的缓冲液 按 2020 年版《中国药典》四部通则 8004 项下方法[5]，配制不同 pH 值的磷酸盐缓冲液，使各缓冲液 pH 值分别为 2.0、3.0、5.0、6.0、7.0、7.8。用 pH 计检测各缓冲液的 pH 值，并进行校正。

2.1.2 正辛醇水饱和溶液的制备 吸取正辛醇溶液适量，分别与同体积水混合置于 500 mL 带塞的锥形瓶中，室温下于恒温振荡器上振荡 24 h，离心，分取上层和下层，即得水饱和正辛醇、正辛醇饱和水溶液，备用[6]。

2.1.3 对照品溶液的制备 精密称取 5.00 mg Y1T、Y2T、Y3T、Y4T 对照品，分别置于 5 mL 量瓶中，加甲醇超声溶解 5 min，定容，摇匀，即得质量浓度均为 1.00 mg • mL^{-1} 的 Y1T、Y2T、Y3T、Y4T 对照品溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱：Waters Symmetry C_{18} 柱（4.6 mm×150 mm，5 μm）；流动相：乙腈 - 水（45∶55）；流速：1.0 mL • min^{-1}；检测波长：203 nm；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。在上述色谱条件下，延龄草 4 种甾体皂苷 Y1T、Y2T、Y3T、Y4T 的保留时间分别为 11.94、6.58、5.39、4.96 min，结果见图 1。

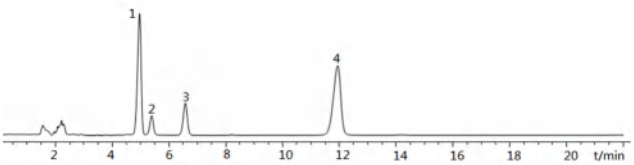


图 1 4 种甾体皂苷对照品的色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of 4 steroidal saponins reference substance

1.Y4T；2.Y3T；3.Y2T；4.Y1T

2.3 4 种甾体皂苷含量测定的方法学考察

2.3.1 标准曲线的绘制 精密量取“2.1.3”项下各对照品溶液适量，稀释得最终质量浓度分别为 0.025、0.050、0.100、0.200、0.400、0.600、0.800、1.000 mg • mL^{-1} 的 Y1T、Y2T、Y3T、Y4T 系列标准溶液。经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后，分别进样测定，记录峰面积。以药物质量浓度（*X*，mg • mL^{-1}）为横坐标，峰面积值（*Y*）为纵坐标，进行线性回归分析，得回归方程，结果见表 1，Y1T、Y2T、Y3T、Y4T 在质量浓度 0.025 ～ 1.000 mg • mL^{-1} 内与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.2 精密度试验 取 Y1T、Y2T、Y3T、Y4T 对照品溶液，连续测定 6 次，结果 4 种甾体皂苷 *RSD* 值分别为 0.32%、0.44%、1.1%、1.7%，表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 取 pH 值 7.8 缓冲液（为 4 种物质的最大溶解度）的 Y1T、Y2T、Y3T、Y4T 水饱和正辛醇溶液 6 份，进样测定其峰面积，计

表 1　4 种甾体皂苷的标准方程及线性范围 (n = 8)

Tab 1　Standard equation and linearity of 4 steroidal saponins (n = 8)

化合物	线性方程	R^2	线性范围 /（mg • mL^{-1}）
Y1T	$Y = 4.61\times10^6X - 2.94\times10^4$	0.9991	0.025 ～ 1.000
Y2T	$Y = 4.00\times10^6X - 7.75\times10^4$	0.9996	0.025 ～ 1.000
Y3T	$Y = 3.27\times10^6X + 1.02\times10^4$	0.9997	0.025 ～ 1.000
Y4T	$Y = 2.84\times10^6X - 1.91\times10^4$	0.9996	0.025 ～ 1.000

算 *RSD* 值分别为 3.0%、0.39%、1.5%、1.4%，表明该方法重复性良好。

2.3.4　稳定性试验　取 Y1T、Y2T、Y3T、Y4T 对照品溶液，于室温下放置 0、2、4、8、16、24 h，进样测定其峰面积，根据其质量浓度计算出 *RSD* 值分别为 2.3%、2.2%、2.3%、2.0%，表明 4 种对照品溶液于室温下放置 24 h 稳定。

2.4　4 种甾体皂苷平衡溶解度的测定

2.4.1　在不同介质中的平衡溶解度　分别取过量的 Y1T、Y2T、Y3T、Y4T，置 2 mL 具塞离心管中，分别加入 1 mL 水、甲醇、乙醇、正丁醇、正辛醇超声溶解 10 min，使成饱和溶液后，置于 25 ℃恒温振荡器中，200 r • min^{-1} 振荡 8 h，离心（12 000 r • min^{-1}，10 min），各吸取上清饱和液，经适当稀释后，过 0.45 μm 的微孔滤膜，进样测定，记录峰面积，结果见表 2。

表 2　Y1T、Y2T、Y3T、Y4T 在不同介质中的平衡溶解度 (n = 3)

Tab 2　Equilibrium solubility of Y1T，Y2T，Y3T，and Y4T in different solvents (n = 3)

溶剂	平衡溶解度 /（mg • mL^{-1}）			
	Y1T	Y2T	Y3T	Y4T
水	0.054	0.058	0.222	0.182
甲醇	9.175	92.949	26.592	11.768
乙醇	3.692	53.034	28.739	46.481
正丁醇	1.652	22.477	9.535	7.277
正辛醇	0.750	6.566	3.114	1.327

2.4.2　在不同 pH 溶液中的平衡溶解度　分别取过量的 Y1T、Y2T、Y3T、Y4T，置 5 mL 具塞离心管中，分别加入 3 mL 不同 pH 值 2.0、3.0、5.0、6.0、7.0、7.8 的磷酸盐缓冲液，超声溶解 10 min，使成饱和溶液后，置于 25 ℃下恒温振荡器中，200 r•min^{-1} 振荡 8 h，离心（12 000 r•min^{-1}，10 min），分别吸取上清饱和液，经旋转蒸发器适当浓缩后，过 0.45 μm 微孔滤膜，进样测定，记录峰面积，结果见图 2。

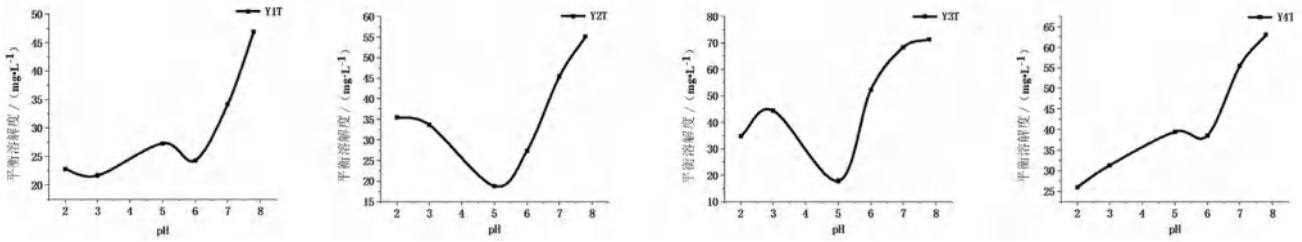


图 2　4 种甾体皂苷在不同 pH 缓冲液中的平衡溶解度（n = 3）

Fig 2　Equilibrium solubility of 4 steroidal saponins in different pH buffers（n = 3）

2.5　油水分配系数的测定

分别取质量浓度为 0.5 mg • mL^{-1} 的 Y1T、Y2T、Y3T、Y4T 水饱和正辛醇溶液 1 mL，分别加入 pH 值为 2.0、3.0、5.0、6.0、7.0、7.8 的磷酸盐缓冲液 1 mL，置于 2 mL 具塞离心管中，涡旋混匀 30 min，置于 25 ℃下恒温振荡器中，100 r • min^{-1} 振荡 12 h，静置后，3500 r • min^{-1} 离心 10 min，小心吸取上层油相，过 0.45 μm 的微孔滤膜，精密吸取续滤液 10 μL，进样测定，记录峰面积，按标准曲线分别计算其浓度，并按下式计算表观油水分配系数 $P = (CV - C_wV_w) / C_wV_w$，式中 P 为皂苷的表观油水分配系数，C 为正辛醇中皂苷的初始浓度，V 为水饱和正辛醇的体积（即 1 mL），C_w 为分配平衡时皂苷在水相中测得的浓度，V_w 为水相的体积（即 1 mL）。按照公式计算不同 pH 磷酸盐缓冲溶液中表观正辛醇缓冲溶液分配系数，结果见表 3。

表 3　4 种甾体皂苷在不同 pH 缓冲溶液中的油水分配系数 (n = 3)

Tab 3　Oil-water partition coefficients of 4 steroidal saponins in different pH buffers (n = 3)

甾体皂苷	参数	不同 pH 下油水分配系数					
		2.0	3.0	5.0	6.0	7.0	7.8
Y1T	P	1.535	1.563	1.473	1.45	1.465	1.463
	log$P$	0.186	0.194	0.168	0.161	0.166	0.165
Y2T	P	7.163	22.133	9.433	10.913	7.318	8.587
	log$P$	0.855	1.345	0.975	1.038	0.864	0.934
Y3T	P	3.877	7.658	6.752	3.439	6.689	4.698
	log$P$	0.589	0.884	0.829	0.536	0.825	0.672
Y4T	P	3.813	3.699	3.304	2.812	2.319	1.966
	log$P$	0.581	0.568	0.519	0.449	0.365	0.294

3　讨论

3.1　测定介质的选择

目前关于延龄草中 4 种甾体皂苷平衡溶解度

测定的相关报道较少，本文结合以往的研究经验选择 4 种甾体皂苷在 5 种常用溶剂介质水、甲醇、乙醇、正丁醇、正辛醇和不同 pH 溶液的平衡溶解度进行测定，并对其在不同 pH 溶液中的油水分配系数进行测定，使研究更加系统和全面，可为延龄草中 4 种甾体皂苷在药物制剂方面的研究提供更多参考依据。

3.2 pH 对 4 种甾体皂苷平衡溶解度的测定结果分析

药物溶解是药物在体内吸收的前提，故水溶性是药物吸收的先决条件 [7]。若溶解速度大于吸收速度，吸收过程与剂型关系较小；反之，溶解则会成为药物吸收的限速因素 [8-9]。本研究结果显示：在 pH 在 2.0 ～ 7.8 时，4 种甾体皂苷的平衡溶解度总体呈现上升趋势；当 pH 为 7.8 时 4 种甾体皂苷的平衡溶解度达到最大值分别为 46.869、54.054、71.355、63.034 $mg•L^{-1}$；而当 pH 在 5 ～ 6 时，4 种甾体皂苷的平衡溶解度出现较低值。结果说明 4 种甾体皂苷水溶性均较差，其中 Y3T 和 Y4T 的水溶性略大于 Y1T 和 Y2T，后续的剂型设计中可考虑加入辅料改善其水溶性，增加溶出度，进而提高其生物利用度。

3.3 pH 对 4 种甾体皂苷油水分配系数的测定结果分析

药物的油水分配系数用于预测膜的通透性，包括胃肠道吸收、穿过血脑屏障的情况以及与药动学性质的关系，是药物成药性的考察指标之一 [10]。由于胃肠道不同位置的 pH 不同，如胃 1.0 ～ 3.0，十二指肠 4.0 ～ 6.0，空肠 6.0 ～ 7.0，回肠 7.0，结肠 7.8 ～ 8.0[11]，因此选择 pH 2.0 ～ 7.8 的缓冲液作为溶剂。若药物的 log*P* 值在－ 1 ～ 2 内，则该药物脂溶性和水溶性适中，具有较好生物膜渗透性，一般认为在胃肠道有较好吸收的药物 log*P* ＞ 1[12]。本研究测定了 4 种甾体皂苷的油水分配系数，结果显示 4 种甾体皂苷在水饱和正辛醇 - 不同 pH 磷酸盐缓冲溶液体系中的 log*P* 具有一定的规律：Y1T 在 pH 2.0 ～ 7.8 内的 log*P* 值基本趋势保持不变，这说明 Y1T 的 log*P* 值对 pH 值依赖性不强；Y2T 在 pH 3 和 6 的缓冲溶液中 log*P* 值为 1.345、1.038，说明 Y2T 在胃肠道中有较好的吸收，亲脂性较好，适合口服给药；Y3T 在 pH 3 的缓冲溶液中 log*P* 值达到最大（为 0.884），说明 Y3T 脂溶性较 Y2T 弱；Y4T 在 pH 2.0 ～ 7.8 内 log*P* 值随着 pH 的升高而减小，说明随着 pH 的升高其脂溶性减弱，亲水性增强，口服吸收利用度下降。

3.4 展望

综上所述，根据本试验对延龄草 4 种甾体皂苷的平衡溶解度和油水分配系数的测定结果可知，机体对延龄草 4 种甾体皂苷的吸收性较好，按照生物药剂学分类系统分类可知，4 种甾体皂苷均属于低溶解度、高透过性的药物。所以，研制 4 种甾体皂苷口服制剂的关键在于增加药物在体内的溶出度，进而有利于提高其生物利用度，为 4 种甾体皂苷的成药性以及后续剂型研究奠定基础。

参考文献

[1] 中国科学院武汉植物所 . 湖北植物志（第四册）[M]. 武汉：湖北科技出版社，2003：453.

[2] 喻玲玲，邹坤 . 延龄草属植物的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中成药，2008，30（9）：1350-1354.

[3] Ur Rahman S，Ismail M，Khurram M，et al. Bioactive steroids and saponins of the genus *Trillium* [J]. Molecules，2017，22（12）：2156.

[4] 左月明，刘电航，张忠立，等 . 延龄草根及根茎的化学成分研究（Ⅳ）[J]. 中药材，2016，39（4）：770-774.

[5] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：424-425.

[6] 王林娜 . 重楼皂苷Ⅱ体外抗肺癌活性、分子机制及其制剂处方前研究 [D]. 武汉：湖北中医药大学，2019.

[7] 徐春蕾，薛平，吴玉兰，等 . 三白草酮及衍生物的溶解性和保肝活性研究 [J]. 中成药，2014，36（5）：960-964.

[8] 焦莹，李慧贤，葛欣怡，等 . 穿山龙薯蓣皂苷平衡溶解度及表观油水分配系数的测定 [J]. 中南药学，2017，15（9）：1245-1248.

[9] 房启龙，刘宏尉，刘江云，等 . 败酱皂苷 H_1 平衡溶解度和表观油水分配系数的测定 [J]. 中国药房，2016，27（3）：364-366.

[10] 熊耀坤，梁爽，杜焰，等 . HPLC 法测定洋川芎内酯Ⅰ的平衡溶解度和表观油水分配系数 [J]. 药物分析杂志，2012，32（9）：1644-1647.

[11] 饶小勇，尹姗，张国松，等 . HPLC 测定白头翁皂苷 D 的油水分配系数及平衡溶解度 [J]. 中国中药杂志，2014，39（9）：1593-1596.

[12] 金诚，陈丽英，吴飞，等 . HPLC 法测定胡黄连苷Ⅰ的表观油水分配系数和平衡溶解度 [J]. 药物分析杂志，2019，39（4）：744-748.

（收稿日期：2022-01-23；修回日期：2022-03-09）

离子色谱法测定盐酸二甲双胍药物中二甲胺的含量

储韫婧[1]，邵方娴[2]，陈民辉[2*]，冯芳[1]（1. 中国药科大学药物分析教研室，南京 211198；2. 江苏省食品药品监督检验研究院，南京 210019）

摘要：目的 建立离子色谱法测定盐酸二甲双胍药物中二甲胺的含量。**方法** 采用阳离子交换柱 Dionex IonPac CS12A（4 mm×250 mm），以甲磺酸溶液为淋洗液进行梯度洗脱，流速 1.0 mL·min^{-1}，柱温 30 ℃，进样体积 25 μL，采用抑制型电导器检测。**结果** 原料、胶囊及片剂中的二甲胺在 0.050 ～ 50 μg·mL^{-1} 与峰面积线性关系良好（r = 1.000），定量限和检测限分别为 6 ng·mL^{-1} 和 2 ng·mL^{-1}。缓释片中的二甲胺在 0.025 ～ 5.0 μg·mL^{-1} 与峰面积线性关系良好（r = 0.9990），定量限和检测限分别为 6 ng·mL^{-1} 和 3 ng·mL^{-1}。原料及制剂中二甲胺的回收率在 92.5% ～ 103.5%，*RSD* < 4.0%。**结论** 该方法操作简便，准确可靠，可用于盐酸二甲双胍药物中二甲胺含量的检测。

关键词：离子色谱法；抑制电导；盐酸二甲双胍；二甲胺

中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)05-1162-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.034

Determination of dimethylamine in metformin hydrochloride by ion chromatography

CHU Yun-jing[1], SHAO Fang-xian[2], CHEN Min-hui[2*], FENG Fang[1] (1. *Department of Pharmaceutical Analysis*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 211198; 2. *Jiangsu Institute for Food and Drug Control*, *Nanjing* 210019)

Abstract: Objective To determine the dimethylamine (DMA) in metformin hydrochloride by ion chromatography method. **Methods** The determination was conducted on a Dionex IonPac CS12A (4 mm×250 mm) column and a protective column [Dionex IonPac CG12A (4 mm×50 mm)] with methanesulfonic acid solution as the eluent. The flow rate was 1.0 mL·min^{-1}. The column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 25 μL. **Results** In non-sustained released dosage forms, the method showed good linearity at 0.050 ～ 50 μg·mL^{-1} (r = 1.000) for DMA, the limit of quantification and detection were 6 ng·mL^{-1} and 2 ng·mL^{-1}, respectively. In sustained released dosage forms, the method showed good linearity at 0.025 ～ 5.0 μg·mL^{-1} (r = 0.9990) for DMA, the limit of quantification and detection were 6 ng·mL^{-1} and 3 ng·mL^{-1}, respectively. The recoveries of raw materials and its preparations ranged from 92.5% to 103.5% with the *RSD* less than 4.0%. **Conclusion** The method is simple, accurate and reliable for the determination of DMA in metformin hydrochloride and its preparations.

Key words: ion chromatography method; inhibitory conductance; metformin hydrochloride; dimethylamine

盐酸二甲双胍是治疗二型糖尿病的首选药[1]，能有效降低患者血糖，改善胰岛素抵抗，并对糖尿病并发症糖尿病视网膜病变有效[2-3]，对糖尿病相关的肾脏并发症也有改善作用[4-5]。盐酸二甲双胍由盐酸二甲胺和双氰胺通过加热缩合反应合成[6]，二甲胺具有毒性，对皮肤及眼睛有刺激损伤作用[6]，易与亚硝酸盐生成基因毒性杂质 *N*- 亚硝基二甲胺（*N*-nitroso dimethylamine，

作者简介：储韫婧，女，在读硕士研究生，主要从事化学药品质量检验研究，email：2530828322@qq.com *通信作者：陈民辉，男，主任药师，主要从事化学药品质量研究，email：chinminki@189.cn

NDMA）[7]。控制盐酸二甲双胍药物中二甲胺的含量，有利于降低患者的用药风险。目前国内外药典均有盐酸二甲双胍及其制剂的收载，其中美国药典 43 版 [8]、日本药局方 18 版 [9] 和《中国药典》2020 年版 [10] 均未对二甲胺杂质进行限度控制，仅欧洲药典 10.1 版 [11] 和英国药典 2021 版 [12] 中收载了盐酸二甲双胍中二甲胺（杂质 F）的检测方法及限度，限度均规定为 0.05%。二甲胺没有紫外吸收，且极性强 [13]，在反相色谱柱上没有保留，采用柱前衍生化使二甲胺形成具有紫外吸收的衍生化产物，同时改善二甲胺在反相色谱柱上的色谱行为，从而满足高效液相色谱法 [6, 14] 的检测要求。欧洲药典和英国药典以 2，4- 二硝基氟苯为柱前衍生化试剂，采用高效液相色谱法对二甲胺进行测定。柱前衍生化法前处理过程复杂，衍生化试剂具有毒性。气相色谱检测法 [15] 和气相质谱联用法 [16] 可以实现二甲胺的直接检测，但药物中二甲胺常以盐酸二甲胺形式存在，样品制备时需要使用强碱性溶液将盐酸二甲胺转化成二甲胺 [7]，操作烦琐且易损伤色谱柱，定量限只能达到微克级别 [7, 17]。液相质谱联用法 [17] 适用于二甲胺的检测，操作简便，灵敏度高，但需要使用特殊的 HILIC 亲水色谱柱以改善二甲胺的保留行为，过低质量数的分子离子峰易受干扰。近年来，离子色谱也广泛应用于二级胺和三级胺的检测 [18]，离子色谱法 [19-21] 测定药物中二甲胺，不需要进行衍生化，且灵敏度高，但离子色谱法用于盐酸二甲双胍片剂及缓释制剂中盐酸二甲胺检测尚未见报道。本研究旨在建立一种简便、准确且灵敏度高的分析方法用于检测盐酸二甲双胍及其制剂中盐酸二甲胺的含量。

1 仪器与试药

1.1 仪器

ICS-6000 离子色谱仪（配有 CDRS-600 4 mm 阳离子抑制器、ICS-6000 DC-6 电导检测器、ST16R 型冷冻离心机，美国赛默飞世尔公司）；XA205 型号电子天平（梅特勒·托利多公司）；Mili-Q 纯水仪（美国 Millipore 公司）；IKA MS3 digital 涡旋振荡器（德国 IKA 公司）、CPX8800H-C 型超声波清洗器（必能信超声有限公司）。

1.2 试药

盐酸二甲胺对照品（批号：183726M-YX-01，纯度：100%，STD）；乙腈（色谱纯，美国 Honeywell 公司）；超纯水（电阻率为 18.2 MΩ，美国 Millipore 公司）；钾元素标准溶液（GSB1304-1733-2004，1000 μg·mL^{-1}）、钠元素标准溶液（GSB1304-1738-2004，1000 μg·mL^{-1}）、钙元素标准溶液（GSB1304-1720-2004，1000 μg•mL^{-1}），（国家有色金属及电子材料分析测试中心）；氯化铵（批号 20190516，国药集团化学试剂有限公司）；盐酸二甲双胍原料药、胶囊、盐酸二甲双胍片与缓释片均为市售样品。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取盐酸二甲胺对照品 90.4 mg（约相当于二甲胺 50 mg）置 20 mL 量瓶中，用 10% 乙腈溶液溶解并稀释至刻度，即得对照品储备液。精密移取对照品储备液适量，用 10% 乙腈溶液稀释成含二甲胺 5 μg·mL^{-1} 的原料、胶囊及片剂的对照品溶液；用 50% 乙腈溶液稀释成含二甲胺 2.5 μg·mL^{-1} 的缓释片对照品溶液。

2.1.2 系统适用性溶液 分别以 10% 乙腈溶液和 50% 乙腈溶液作为溶剂，配制含 K^+、Na^+、Ca^{2+}、DMA、NH_4^+ 各 1 μg·mL^{-1} 的混合溶液。

2.1.3 原料、胶囊及片剂系列标准曲线溶液 精密移取对照品储备液适量，用 10% 乙腈溶液稀释成含二甲胺分别为 0.050、0.10、1.0、5.0、10 和 50 μg·mL^{-1} 的原料、胶囊及片剂的系列标准曲线溶液。

2.1.4 缓释片系列标准曲线溶液 精密移取对照品储备液适量，用 50% 乙腈溶液稀释成含二甲胺分别为 0.025、0.050、0.50、1.0、2.5 和 5.0 μg·mL^{-1} 的缓释片的系列标准曲线溶液。

2.1.5 原料及胶囊供试品溶液 取原料药或胶囊内容物适量（约相当于盐酸二甲双胍 200 mg），精密称定，置 15 mL 离心管中，加入 1.0% 乙腈溶液 2 mL，超声 10 min，涡旋 1 min，10 000 r·min^{-1} 离心 5 min，精密量取上清液 1 mL 置 10 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，混匀，作为盐酸二甲双胍原料和胶囊的供试品溶液。

2.1.6 片剂供试品溶液 取本品粉末适量（约相当于盐酸二甲双胍 200 mg），精密称定，置 15 mL 离心管中，加入 10% 乙腈溶液 2 mL，超声 20 min，涡旋 10 min，10 000 r·min^{-1} 离心 8 min，精密量取上清液 1 mL 置 10 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，混匀，滤过，取续滤液作为盐酸二甲双胍片的供试品溶液。

2.1.7 缓释片供试品溶液 取本品粉末适量（约相当于盐酸二甲双胍 200 mg），精密称定，置 50 mL 离心管中，加入 5.0% 乙腈溶液 20 mL，涡旋

30 min，10 000 r • min^{-1} 离心 8 min，精密量取上清液 5 mL 置 10 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，混匀，滤过，取续滤液作为盐酸二甲双胍缓释片的供试品溶液。

2.2　色谱条件及系统适用性

采用阳离子交换柱 Dionex IonPac CG12A（4 mm×50 mm）为保护柱、Dionex IonPac CS12A（4 mm×250 mm）为分析柱，甲磺酸溶液为淋洗液，梯度洗脱：0 ～ 10 min（10 mmol • L^{-1}），10 ～ 11 min（10 → 30 mmol • L^{-1}），11 ～ 28 min（30 mmol • L^{-1}），28 ～ 29 min（30 → 10 mmol • L^{-1}），29 ～ 35 min（10 mmol•L^{-1}），流速 1.0 mL•min^{-1}，柱温 30 ℃，抑制电导检测，抑制电流 88 mA，检测器温度 35 ℃，抑制器温度 20 ℃，进样体积 25 μL。理论塔板数按二甲胺峰计大于 5000，各峰之间的分离度均大于 1.5（见图 1）。出峰顺序为 Na^+ → NH_4^+ →二甲胺→ K^+ → Ca^{2+}。

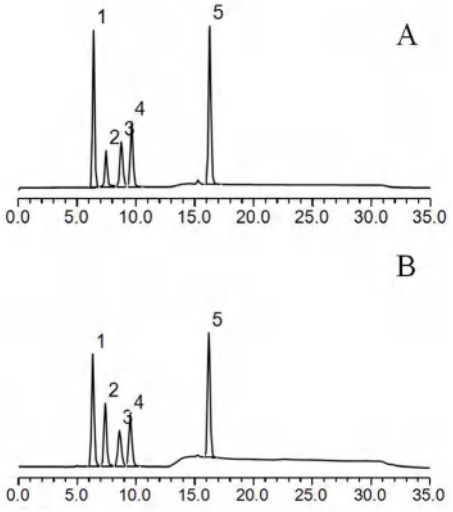


图 1　二甲胺测定的系统适用性色谱图

Fig 1　System suitability for the determination of DMA

A. 10% 乙腈溶液作溶剂（solution with 10% acetonitrile as solvent）；B. 50% 乙腈溶液作溶剂（solution with 50% acetonitrile as solvent）1. Na^+；2. NH_4^+；3. 二甲胺（dimethylamine）；4. K^+；5. Ca^{2+}

2.3　专属性

将空白溶液、对照品溶液及不同剂型的供试品溶液注入色谱仪，记录色谱图（见图 2）。二甲胺峰与相邻色谱峰分离度较好，分离度均大于 1.5，且空白不干扰 DMA 检测，方法专属性良好。

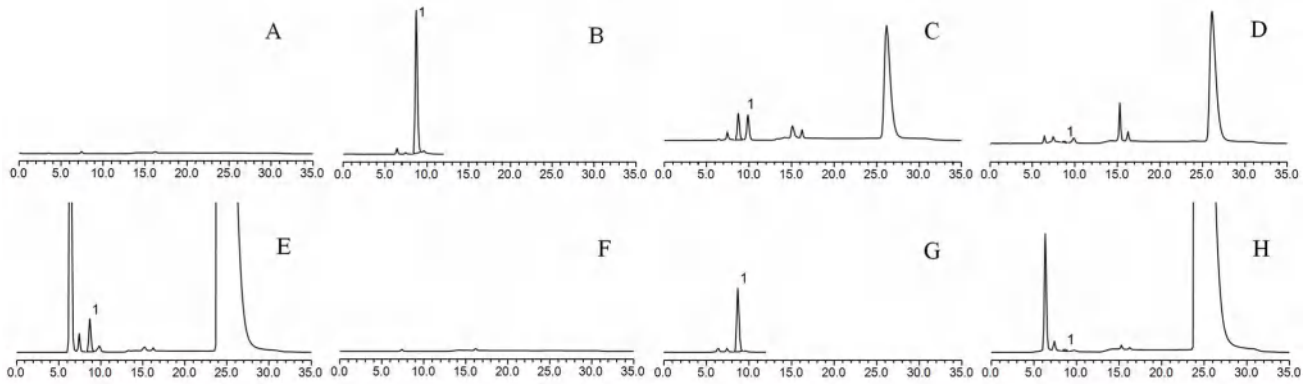


图 2　二甲胺测定的专属性色谱图

Fig 2　Specificity for the determination of DMA

A. 空白溶液（10% 乙腈溶液）（blank solution of 10% acetonitrile）；B. 原料、胶囊及片剂的对照品溶液（reference solution of API，capsule and tablet）；C. 原料药供试品溶液（sample solution of API）；D. 胶囊供试品溶液（sample solution of capsule）；E. 片剂供试品溶液（sample solution of tablet）；F. 空白溶液（50% 乙腈溶液）（blank solution of 50% acetonitrile）；G. 缓释片对照品溶液（reference solution of sustained released tablet）；H. 缓释片供试品溶液（sample solution of sustained released tablet）；1. 二甲胺（dimethylamine）

2.4　检测限、定量限和线性关系

分别取原料、胶囊及片剂的系列标准曲线溶液和缓释片的系列标准溶液，照“2.2”项下色谱条件进样分析，记录色谱图，以峰面积（Y）对质量浓度（X）进行回归，绘制标准曲线。将原料、胶囊及片剂的系列标准曲线溶液和缓释片的系列标准溶液分别逐级稀释，以信噪比为 3（S/N = 3）和信噪比为 10（S/N = 10）计算二甲胺的检测限（LOD）和定量限（LOQ）。结果见表 1。

表 1　二甲胺定量限、检测限和线性范围

Tab 1　LOD，LOQ and linearity of DMA

剂型	回归方程	r	线性范围 /（μg • mL^{-1}）	LOD/（ng • mL^{-1}）	LOQ/（ng • mL^{-1}）
原料、片剂和胶囊	$Y = 0.1236X - 4.286\times10^{-3}$	1.000	0.050 ～ 50	2	6
缓释片	$Y = 0.1191X - 9.375\times10^{-4}$	0.9990	0.025 ～ 5.0	3	6

2.5　进样精密度试验

分别取原料、胶囊及片剂的对照品溶液和缓释片的对照品溶液，照“2.2”项下色谱条件注入离子色谱仪并记录色谱图，连续进样 6 次，峰面积的 *RSD* 分别为 0.20% 和 0.20%，表明该方法的进样精密度良好。

2.6　重复性试验

制备原料药、胶囊、片剂及缓释片供试品溶液，平行配制 6 份，按标准曲线法计算二甲胺的含量和 *RSD* 值。原料药、胶囊及缓释片中二甲胺的含量均低于 0.01%，*RSD* 均小于 4.0%。片剂中的二甲胺含量小于 0.04%，*RSD* 小于 2.0%，表明该方法重复性良好。

2.7　回收试验

向不同剂型的供试品中分别加入 50、100 和 150 μg 的二甲胺溶液，制备供试品溶液，得到不同剂型低、中和高浓度的加标样品，每个浓度平行配制 3 份，进样分析，计算回收率，结果表明该方法的准确度良好（见表 2）。

表 2　盐酸二甲双胍原料药及制剂中二甲胺的回收率 (n = 3)

Tab 2　Recovery of dimethylamine in metformin hydrochloride and its preparations (n = 3)

剂型	厂家	本底 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均回收率 /%	*RSD*/%
原料	甲	7.846	51.07	59.56	101.26	102.7	0.60
		7.846	102.1	113.6	103.58		
		7.846	153.2	166.3	103.40		
	乙	2.020	51.07	52.45	98.75	100.0	0.40
		2.020	102.1	104.9	100.76		
		2.020	153.2	155.8	100.38		
胶囊	丙	1.114	51.07	49.93	95.59	98.6	3.7
		1.114	102.1	103.2	99.96		
		1.114	153.2	154.9	100.38		
片剂	丁	23.66	51.07	76.25	102.98	99.4	0.40
		23.66	102.1	125.1	99.35		
		23.66	153.2	170.7	95.98		
	戊	65.56	51.07	115.4	97.59	95.6	2.4
		65.56	102.1	161.7	94.16		
		65.56	153.2	211.1	95.00		
缓释片	己	3.405	50.40	50.06	92.57	94.9	1.2
		3.405	100.8	99.74	95.57		
		3.405	151.2	149.4	96.56		

2.8　稳定性试验

取各供试品溶液和对照品溶液，分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 测定。结果各供试品溶液和对照品溶液二甲胺的峰面积 *RSD* 均小于 2.0%，说明溶液稳定性良好。

2.9　样品测定结果

对 6 批原料药、3 批胶囊、9 批片剂及 3 批缓释片进行加速试验考察，结果原料药、胶囊、片剂及缓释片中二甲胺的含量均不超过 0.05%。其中原料药及胶囊中二甲胺的含量不超过 0.002%，片剂中二甲胺的含量在 0.006% ～ 0.045%，缓释片中二甲胺的含量在 0.002% ～ 0.005%。加速 6 个月内，原料和各剂型中二甲胺含量增加均不超过 0.01%。

3　讨论

3.1　样品处理方法的优化

杨芹等 [20] 将盐酸二甲双胍用水稀释后直接进样测定，二甲胺能够有效提取，但盐酸二甲双胍在水中易溶，样品中高浓度的盐酸二甲双胍会降低柱效。同时盐酸二甲双胍缓释片在水中发生溶胀，难以获得澄清的供试品溶液。文献报道的盐酸二甲胺的定量限为 0.0328 μg • mL^{-1}，为进一步提高检测灵敏度，考虑使用一种溶剂降低供试品溶液中的盐酸二甲双胍含量，而不影响二甲胺的提取 [20]。盐酸二甲双胍在乙腈中几乎不溶或不溶，而盐酸二甲胺在乙腈中略溶，能满足试验要求，因此考虑用含少量水的乙腈溶液作提取溶剂。比较了不同含水量的乙腈溶液，结果表明 1% 乙腈溶液作为原料及胶囊的提取溶剂，10% 乙腈溶液作为片剂的提取溶剂，5% 乙腈溶液作为缓释片的提取溶剂，能完全提取样品中的盐酸二甲胺。但盐酸二甲胺在乙腈中的稳定性差，室温下 1.5 h 内稳定，试验发现增加溶剂中的含水量能够提高盐酸二甲胺的稳定性，盐酸二甲胺在 50% 乙腈溶液和 10% 乙腈溶液中室温放置，24 h 内稳定。考虑实际试验中操作的便利，将样品用提取溶剂处理后再用水稀释，增加供试品的稳定性。

3.2　色谱条件的优化

Dionex IonPac CS12A 是高容量阳离子交换色谱柱，该色谱柱的离子交换基团除了羧基还添加了膦酸基，增加了离子的选择性 [22]，适用于快速分离一价和二价阳离子以及铵，并且对 0 ～ 100% 乙腈水溶液作溶剂的样品耐受，能够满足本试验的要求。为了达到最优的分离条件，用含二甲胺及环境中易存在的阳离子 K^+、Na^+、Ca^{2+}、NH_4^+ 的混合溶液，考察不同的淋洗液浓度（10、15、20 mmol • L^{-1}）、流速（0.8、1、1.2 mL • min^{-1}）及柱温（25、30、35 ℃）条件下二甲胺与相邻离子的分离情况，结果表明在各淋洗液浓度、流速和柱温条件下二甲胺与相邻离子 NH_4^+

和 K^+分离度均能满足要求（分离度大于 1.5）。选择最优条件，淋洗液浓度为 10 mmol • L^{-1}，流速为 1 mL • min^{-1}，柱温为 30 ℃。

3.3 盐酸二甲胺限度的制订

加速试验研究过程中同时考察了各样品中 NDMA 的检出情况，结果发现二甲胺在加速试验 6 个月内随时间的延长而含量升高，但均不超过 0.05%，除了缓释片中的 NDMA 随二甲胺的增大而增大，其他样品中均未检出 NDMA，表明二甲胺并不是 NDMA 产生的单一影响因素，建议参考欧洲药典 10.1 版中盐酸二甲胺的限度规定，将盐酸二甲双胍中盐酸二甲胺的限度拟订为 0.05%。

4 结论

本文建立了检测盐酸二甲双胍原料药及其制剂中二甲胺含量的方法，并进行了考察，结果表明该方法操作简便，灵敏度高，可以准确检测盐酸二甲双胍原料药及其制剂中二甲胺的含量，可用于盐酸二甲双胍原料药及其制剂的质量控制。

参考文献

[1] Inzucchi S，Bergenstal R，Buse J，et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes：A Patient-Centered Approach：Position Statement of the American Diabetes Association（ADA）and the European Association for the Study of Diabetes（EASD）[J]. Diabetes Care，2012，35（6）：1364-1379.

[2] 刘会华，陈敏，杨瑾 . 二甲双胍治疗早期糖尿病性视网膜病变临床研究 [J]. 中国药业，2021，30（13）：93-95.

[3] 韩秀丹，朱凌燕，徐积兄 . 二甲双胍对糖尿病视网膜病变的作用及机制 [J]. 国际内分泌代谢杂志，2019，39（1）：53-56.

[4] Corremans R，Vervaet BA，D’Haese PC，et al. Metformin：a candidate drug for renal diseases [J]. Int J Mol Sci，2019，20（1）：42.

[5] Amador-Licona N，Guízar-Mendoza J，Vargas E，et al. The short-term effect of a switch from glibenclamide to metformin on blood pressure and microalbuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. Arch Med Res，2000，31（6）：571-575.

[6] 甘加明，李永平，黄诺哲，等 . 盐酸二甲双胍肠溶胶囊中二甲胺残留量的测定 [J]. 中国药物评价，2020，37（1）：31-35.

[7] Hu J，Christison T，Rohrer J. Determination of dimethylamine and nitrite in pharmaceuticals by ion chromatography to assess the likelihood of nitrosamine formation [J]. Heliyon，2021，7（2）：e06179.

[8] The United States Pharmacopoeial. Convention US. Pharmacopoeia National Formulary USP43-38 [S]. US Pharmacopoeia Convention，2021：2821-2823.

[9] 日本薬局方委員会 . 第十八改正日本薬局方 [S]. 厚生労働省，2021：1717.

[10] 中国药典 2020 年版 . 二部 [S]. 2020：1035.

[11] Council of Europe. European Pharmacopoeia 10.1 [S]. Strasbourg：European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care Council of Europe，2020：4448-44450.

[12] British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia 2021 [S]. British Pharmacopoeia Commission，2020：247-249.

[13] Han LF，Hou DS，Ma CY，et al. Simultaneous determination of eight short-chain aliphatic amines in drug substances by HPLC with diode array detection after derivatization with halonitrobenzenes [J]. J Sep Sci，2017，40（15）：3074-3085.

[14] 张一平，张倩，王一然，等 . 柱前衍生化反相高效液相色谱法测定盐酸二甲双胍缓释片中二甲胺含量 [J]. 中国药业，2020，29（21）：44-48.

[15] 郭芳芳，高宏，张书玉 . 顶空气相色谱法测定水中的二甲胺 [J]. 化工管理，2017（17）：141.

[16] 石梦琦，李翠梅，朱君妍，等 . 衍生化 - 气相色谱 - 质谱法测定饮用水中的二甲胺 [J]. 环境污染与防治，2021，43（4）：432-435.

[17] Michal D，Jakub J. HILIC-MS determination of dimethylamine in the active pharmaceutical ingredients and in the dosage forms of metformin [J]. J Pharmaceut Biomed，2020，191（5）：113573.

[18] Michalski R，Pecyna-Utylska P，Kernert J. Determination of ammonium and biogenic amines by ion chromatography. a review [J]. J Chromatogr A，2021，1651：462319.

[19] 马平平，周君安，孙琳 . 离子色谱法测定富马酸贝达喹啉中二甲胺的含量 [J]. 山东化工，2020，49（8）：128，131.

[20] 杨芹，朱凤姝，邵长冰，等 . 离子色谱 - 直接电导法在盐酸二甲双胍药物中二甲胺残留检测中的应用 [J]. 化工设计通讯，2020，46（6）：161-162.

[21] 方琳美，胡咪，陈爱连，等 . 离子色谱法测定盐酸阿比朵尔中残留的二甲胺含量 [J]. 药物分析杂志，2016，36（10）：1852-1856.

[22] 宋月，杨丽君，徐峰 . 离子色谱法测定血液透析水中的钠、钾、镁和钙离子 [J]. 中国卫生检验杂志，2013，23（6）：1397.

（收稿日期：2021-08-05；修回日期：2021-10-06）

一测多评法同时测定不同产地佛手中 6 种化学成分的含量

曹士政，赵登高，马燕燕，张焜*（五邑大学，广东　江门　529020）

摘要：目的　建立测定佛手中 6 种化学成分含量的一测多评法，并验证其可行性和适用性。**方法**　采用超高效液相色谱法，以 5，7-二甲氧基香豆素为内标，计算 6，7-二甲氧基香豆素、橙皮苷、香叶木苷、水合氧化前胡素和佛手柑内酯的相对校正因子及含量。通过一测多评法和外标法对 15 批佛手中 6 种化学成分的含量进行比较，以检验一测多评法的适用性、准确性和可重复性。结合中药指纹图谱系统数据和聚类分析数据，就不同产地佛手间的差异性进行分析。**结果**　一测多评法与外标法所测得的结果差异无统计学意义，指纹图谱和聚类分析数据表明分类情况与药材的产地分布情况基本一致。**结论**　该方法准确可靠，可用于佛手的质量控制。

关键词：一测多评法；佛手；超高效液相色谱；指纹图谱；聚类分析
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)05-1167-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.035

Simultaneous determination of 6 chemical components in *Citrus medica* from different areas by quantitative analysis of multi-components with single marker method

CAO Shi-zheng, ZHAO Deng-gao, MA Yan-yan, ZHANG Kun* (*Wuyi University*, *Jiangmen Guangdong* 529020)

Abstract: Objective　To establish a quantitative analysis of multi-components with single marker (QAMS) method for 6 components in *Citrus medica* and verify its feasibility and applicability. **Methods**　5, 7-dimethoxycoumarin was used as the internal standard, the relative correction factors and contents of 6, 7-dimethoxycoumarin, hesperidin, diosmin, oxypeucedanin hydrate and bergapten were calculated by ultra-high performance liquid chromatography. The content of 6 chemical components in 15 batches of *Citrus medica* was compared by QAMS method and external standard method. We combined traditional Chinese medicine fingerprint system data and cluster analysis data, and analyzed the differences in *Citrus medica* from different areas. **Results**　There was no significant difference between the results measured by QAMS method and external standard method. The fingerprint and cluster analysis data showed that the classification was consistent with the origin distribution of medicinal materials. **Conclusion**　The method is accurate and reliable, which can be used for the quality control of *Citrus medica*.

Key words: quantitative analysis multi-components by single-marker method; *Citrus medica*; ultra-performance liquid chromatography; fingerprint; cluster analysis

佛手（*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle）为芸香科香橼属植物佛手的果实，具有疏肝理气、和胃止痛、燥湿化痰的功效，可用于肝胃气滞、胸胁胀痛、胃脘痞满、食少呕吐、咳嗽痰多等症状[1]。佛手在中国长江以南多地有栽种，主要分为川佛手、广佛手和金佛手，其质量存在差异。《中国药典》2020 年版采用单一的橙皮苷作为佛手的质量评价指标，难以对佛手的整体质量进行全面控制与准确评价。研究表明，除橙皮苷外，可增加 6，7-二甲氧基香豆素、香叶木苷、5，

基金项目：国家自然科学基金项目（No.22077020）；江门市创新团队项目（No.2018630100180019806）。
作者简介：曹士政，男，硕士研究生，主要从事天然产物药物分析，email：913403301@qq.com　*通信作者：张焜，男，教授，博士生研究生导师，主要从事药食同源资源开发及利用，email：kzhang@gdut.edu.cn

7-二甲氧基香豆素、佛手柑内酯和水合氧化前胡素等 5 个成分作为佛手的质量评价指标[2-4]。

一测多评（QAMS）法通过建立各个组分与内参物之间的相对校正因子，可实现多组分的一测多评[5]。QAMS 法不仅可以同时检测多指标成分，还能降低实验成本和检测周期[6]。目前佛手中化学成分的含量测定大多采用外标法[7-11]，实验操作过程烦琐，所需对照品价格昂贵。因此，本研究基于超高效液相色谱（UPLC）技术，建立了 QAMS 法，测定佛手中 5，7-二甲氧基香豆素、6，7-二甲氧基香豆素、橙皮苷、香叶木苷、水合氧化前胡素和佛手柑内酯的含量，为提升佛手的质量控制标准提供理论依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

ACQUITY UPLC H-Class 超高效液相系统（美国 Waters 公司），KQ-500VDB 型超声波清洗器（昆明市超声仪器有限公司），SQP 电子天平（赛多利斯公司）。

1.2 试药

佛手药材于 2021 年购入，共 15 批，由五邑大学生物科技与大健康学院马燕燕教授鉴定为芸香科植物佛手（*Citrus medica* L.var.*sarcodactylis* Swingle）的干燥果实，详细信息见表 1；6，7-二甲氧基香豆素（批号：PS020517）、橙皮苷（批号：PS011588）、香叶木苷（批号：PS020083）、水合氧化前胡素（批号：PS001249）、5，7-二甲氧基香豆素（批号：PS021023）、佛手柑内酯（批号：PS002115）（对照品，纯度≥ 98%，成都普思生物科技有限公司）；甲醇（色谱级，默克），乙腈（色谱级，赛默飞世尔），水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Thermo Fisher Scientific HypersII GOLD-C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.9 μm），流速 0.4 mL·min^{-1}，进样量 2 μL，柱温 40 ℃，检测波长为 330 nm，流动相：乙腈溶液（A）-0.1% 甲酸水溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 2 min，10%A；2 ～ 12 min，10% ～ 15%A；12 ～ 17 min，15%A；17 ～ 17.5 min，15% ～ 17.2%A；17.5 ～ 33 min，17.2% ～ 25%A；33 ～ 53 min，25% ～ 75%A；53 ～ 54 min，75% ～ 95%A；54 ～ 58 min，95%A；58 ～ 59 min，95% ～ 10%A，59 ～ 62 min，10%A）。混合对照品与待测样品的色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

取对照品 6，7-二甲氧基香豆素 1.01 mg，橙皮苷 1.06 mg，香叶木苷 1.04 mg，水合氧化前胡素 1.03 mg，5，7-二甲氧基香豆素 1.09 mg，佛手柑内酯 1.03 mg，分别用甲醇均配成 1 mg·mL^{-1} 的对照品溶液。吸取各对照品溶液适量用甲醇稀释，制成 100、50、20、10、5、2、1、0.5、0.2、0.1、0.05、0.02、0.01 μg·mL^{-1} 梯度浓度的系列线性溶液，4 ℃冷藏静置备用。

表 1 样品信息

Tab 1 Source information of the samples

No.	产地	购买时间	No.	产地	购买时间
S1	浙江金华	2021-10	S9	浙江金华	2021-11
S2	四川安岳	2021-10	S10	云南楚雄	2021-11
S3	广东潮汕	2021-10	S11	广东肇庆	2021-11
S4	云南金边	2021-10	S12	广东揭阳	2021-11
S5	广西玉林	2021-11	S13	广东肇庆	2021-11
S6	广西贵港	2021-11	S14	广东肇庆	2021-11
S7	广西桂林	2021-11	S15	重庆江津	2021-11
S8	四川乐山	2021-11			

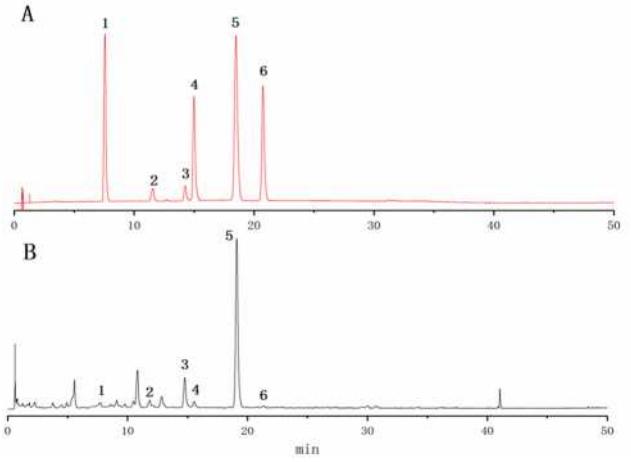


图 1 混合对照品（A）及待测样品（B）色谱图

Fig 1 Chromatogram of mixed reference substance（A）and sample（B）

1. 6，7-二甲氧基香豆素（6，7-dimethoxycoumarin）；2. 橙皮苷（hesperidin）；3. 香叶木苷（diosmin）；4. 水合氧化前胡素（oxypeucedanin hydrate）；5. 5，7-二甲氧基香豆素（5，7-dimethoxycoumarin）；6. 佛手柑内酯（bergapten）

2.3 供试品溶液制备

在 25 mL 量瓶中加入佛手果粉末 2 g，加入 25 mL 甲醇后 35 ℃超声（功率 500 W，频率 45 kHz）45 min，冷却后定容。

2.4 方法学验证

2.4.1 线性关系考察 将“2.2”项下制备的对照品梯度系列线性溶液，按照“2.1”项下色谱条件依次进样，以质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制各对照品的回归方程，信噪比 *S/N* = 10 时求定量限，信噪比 *S/N* = 3 时求检测限，结果表明，各化合物在相应质量浓度范围内与峰面积线性关系良好，结果见表 2。

表 2　佛手中 6 种成分线性方程、线性范围、检测限和定量限

Tab 2　Linear equation，linearity，detection limit and quantification limit of 6 components in *Citrus medica*

成分	回归方程	线性范围 /（μg・mL^{-1}）	R^2	检测限 /（μg・mL^{-1}）	定量限 /（μg・mL^{-1}）
6，7-二甲氧基香豆素	$Y=1.585\times10^4X+0.474\times10^3$	0.05 ～ 100	0.9999	0.025	0.05
橙皮苷	$Y=9.011\times10^3X+1.546\times10^3$	0.10 ～ 100	0.9999	0.050	0.10
香叶木苷	$Y=8.339\times10^3X+0.276\times10^3$	0.10 ～ 100	0.9999	0.050	0.10
水合氧化前胡素	$Y=1.211\times10^4X+0.918\times10^3$	0.05 ～ 100	0.9999	0.025	0.05
5，7-二甲氧基香豆素	$Y=2.312\times10^4X+1.640\times10^3$	0.05 ～ 100	0.9999	0.025	0.05
佛手柑内酯	$Y=1.569\times10^4X-0.590\times10^3$	0.05 ～ 100	0.9999	0.025	0.05

2.4.2　精密度试验　精密吸取混合对照品溶液 2 μL，连续测定 6 次，计算得各样品的日间和日内峰面积 *RSD* 均小于 2%，表明仪器精密度良好。

2.4.3　稳定性试验　精密吸取“2.3”项下供试品溶液，分别在 0、4、8、12、16、24、48 h 进样测定。6，7-二甲氧基香豆素、橙皮苷、香叶木苷、水合氧化前胡素、5，7-二甲氧基香豆素、佛手柑内酯峰面积的 *RSD* 分别为 0.69%、0.70%、1.9%、0.62%、0.40%、1.0%，表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.4.4　重复性试验　按照“2.3”项下方法制备佛手供试品溶液 6 份，进样测定，结果 6，7-二甲氧基香豆素、橙皮苷、香叶木苷、水合氧化前胡素、5，7-二甲氧基香豆素、佛手柑内酯峰面积的 *RSD* 分别为 2.0%、2.7%、2.3%、2.9%、1.3%、2.7%，表明样品重复性良好。

2.4.5　加样回收试验　称量佛手样品 6 份，加入含量相同的对照品溶液，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，求得 6，7-二甲氧基香豆素、橙皮苷、香叶木苷、水合氧化前胡素、5，7-二甲氧基香豆素、佛手柑内酯的平均加样回收率（$n=6$）分别为 104.22%、105.36%、100.58%、102.18%、114.85%、100.06%，*RSD* 分别为 2.2%、2.1%、2.6%、2.2%、2.7%、0.38%，表明该方法回收率良好。

2.5　相对校正因子 $f_{s/i}$ 的建立

本试验采用多点矫正法。根据 $f_{s/i}=f_s/f_i=A_s\times C_i/(A_i\times C_s)$ 计算 QAMS 的 $f_{s/i}$，式中 $f_{s/i}$ 为内标物对待测组分 *i* 的校正因子，A_s 为内标物峰面积，C_s 为内标物浓度，A_i 为待测组分 *i* 峰面积，C_i 为待测组分 *i* 浓度。以 5，7-二甲氧基香豆素为内参物，根据公式分别计算 6，7-二甲氧基香豆素、橙皮苷、香叶木苷、水合氧化前胡素、佛手柑内酯的 $f_{s/i}$。

2.6　$f_{s/i}$ 耐用性评价

2.6.1　不同高效液相色谱仪和色谱柱对 $f_{s/i}$ 的影响

分别考察了 Waters ACQUITY UPLC H-Class、Aglient 1290 UPLC 两种高效液相色谱仪和 Thermo Fisher Scientific HypersII GOLD-C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.9 μm）、Shim pack GLSS C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.9 μm）、Supelco Titan C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.9 μm）三种色谱柱对 $f_{s/i}$ 的影响，结果显示 6，7-二甲氧基香豆素、橙皮苷、香叶木苷、水合氧化前胡素、佛手柑内酯在不同高效液相色谱仪和不同色谱柱上的 $f_{s/i}$ 的 *RSD* 分别为 1.0%、2.5%、2.8%、2.6%、1.4%，均小于 3%，单因素 ANOVA 检验显示差异无统计学意义，说明不同高效液相色谱仪和不同色谱柱对各成分的 $f_{s/i}$ 无明显影响。

2.6.2　不同进样体积对 $f_{s/i}$ 的影响　分别精密吸取不同体积（0.6、1、1.3、1.6、2 μL）的混合对照品溶液，依次注入高效液相色谱仪中进行检测，记录色谱峰峰面积，考察不同进样体积对 $f_{s/i}$ 的影响，结果表明，进样体积的改变对佛手各成分 $f_{s/i}$ 无明显影响，6，7-二甲氧基香豆素、橙皮苷、香叶木苷、水合氧化前胡素、5，7-二甲氧基香豆素、佛手柑内酯 $f_{s/i}$ 的 *RSD* 依次为 1.2%、1.4%、1.4%、2.0%、0.94%，均小于 2.5%，单因素 ANOVA 检验显示差异无统计学意义，说明不同进样体积对各成分的 $f_{s/i}$ 无明显影响。

2.6.3　不同色谱柱柱温对 $f_{s/i}$ 的影响　采用 Waters ACQUITY UPLC H-Class，Thermo Fisher Scientific HypersII GOLD-C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.9 μm），分别使用不同柱温（25、30、35、40、45 ℃）对混合对照品溶液进行检测，结果表明，柱温的改变对佛手 6，7-二甲氧基香豆素、橙皮苷、香叶木苷、水合氧化前胡素、5，7-二甲氧基香豆素、佛手柑内酯 $f_{s/i}$ 无明显影响，各成分 $f_{s/i}$ 的 *RSD* 依次为 1.5%、1.7%、2.4%、1.5%、1.0%，均小于 2.5%，单因素 ANOVA 检验显示差异无统计学意义，说明不同色谱柱柱温对各成分的 $f_{s/i}$ 无明显影响。

2.6.4　不同流速对 $f_{s/i}$ 的影响　分别使用不同流速（0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL・min^{-1}）对混合对照品溶液进行检测，记录色谱峰峰面积，考察不同流速对 $f_{s/i}$ 的影响。结果表明，流速的改变对佛手各个成分 $f_{s/i}$ 无明显影响，6，7-二甲氧基香豆素、橙皮苷、香叶木苷、水合氧化前胡素、5，7-二甲氧基香豆素、佛手柑内酯 $f_{s/i}$ 的 *RSD* 依次为 1.8%、2.2%、1.0%、1.9%、1.9%，均小于 2.5%，

单因素 ANOVA 检验显示差异无统计学意义，说明不同流速对各成分的 $f_{s/i}$ 无明显影响。

2.6.5 不同检测波长对 $f_{s/i}$ 的影响 分别使用不同波长（328、329、330、331、332 nm）对混合对照品溶液进行检测，记录色谱峰峰面积，考察不同检测波长对 $f_{s/i}$ 的影响。结果表明，检测波长的改变对佛手各个成分 $f_{s/i}$ 无明显影响，6，7-二甲氧基香豆素、橙皮苷、香叶木苷、水合氧化前胡素、5，7-二甲氧基香豆素、佛手柑内酯 $f_{s/i}$ 的 *RSD* 依次为 2.8%、1.7%、2.7%、2.6%、2.7%，均小于 3%，单因素 ANOVA 检验显示差异无统计学意义，说明不同检测波长对各成分的 $f_{s/i}$ 无明显影响。

2.6.6 不同操作人员对 $f_{s/i}$ 的影响 不同操作人员按照“2.2”项下方法制备对照品，在“2.1”项色谱条件下，分别对混合对照品溶液进行检测，记录色谱峰峰面积，考察不同操作人员对 $f_{s/i}$ 的影响。结果表明，操作人员的改变对佛手各个成分 $f_{s/i}$ 无明显影响，6，7-二甲氧基香豆素、橙皮苷、香叶木苷、水合氧化前胡素、5，7-二甲氧基香豆素、佛手柑内酯 $f_{s/i}$ 的 *RSD* 依次为 2.2%、1.1%、2.6%、0.85%、1.9%，均小于 3%，单因素 ANOVA 检验显示差异无统计学意义，说明不同操作人员对各成分的 $f_{s/i}$ 无明显影响。

2.7 待测成分的色谱峰定位

通过计算在不同色谱仪和不同色谱柱中，佛手各组分的色谱峰与 5，7-二甲氧基香豆素色谱峰的相对保留时间（$t_{s/i}$），对各待测组分进行定位，结果不同仪器与色谱柱测得的 $t_{s/i}$ 的 *RSD* 均小于 2.5%，表明可以以 $t_{s/i}$ 对佛手中各组分的色谱峰进行定位。

2.8 QAMS 与外标法测定结果的比较

取 15 批佛手药材粉末制成样品溶液，精密吸取 2 μL 注入液相色谱仪进行测定。分别采用 QAMS 法和外标法计算 15 批佛手中 6，7-二甲氧基香豆素、橙皮苷、香叶木苷、水合氧化前胡素、5，7-二甲氧基香豆素、佛手柑内酯的含量，每批 3 份，结果见表 3。将 QAMS 法与外标法测得的各组分含量进行比较，发现两种方法测得的 6 种组分含量基本一致，*RSD* 均小于 3%。单因素 ANOVA 检验分析结果表明，QAMS 法与外标法所得结果差异无统计学意义，说明该 QAMS 法可以替代外标法用于佛手药材的含量测定。

表 3 QAMS 法与外标法测得 15 批佛手中 6 种成分的含量 ($mg \cdot g^{-1}$，$n = 3$)

Tab 3 Contents of 6 components in 15 batches of *Citrus medica* measured by QAMS method and ESM ($mg \cdot g^{-1}$，$n = 3$)

样品	5，7-二甲氧基香豆素	6，7-二甲氧基香豆素			橙皮苷			香叶木苷			水合氧化前胡素			佛手柑内酯		
		ESM	QAMS	*RSD*/%	ESM	QAMS	*RSD*/%	ESM	QAMS	*RSD*/%	ESM	QAMS	*RSD*/%	ESM	QAMS	*RSD*/%
S1	5.89	0.19	0.20	2.10	2.48	2.48	0.14	3.12	3.11	0.17	0.24	0.24	0.79	0.05	0.05	2.41
S2	3.74	0.11	0.12	2.55	1.07	1.10	2.36	2.55	2.50	1.42	0.18	0.19	1.03	0.05	0.05	3.01
S3	4.71	0.07	0.07	1.37	1.92	1.91	0.19	2.30	2.30	0.07	0.23	0.24	2.28	0.01	0.01	1.17
S4	3.03	0.18	0.18	2.01	2.99	3.06	1.77	2.79	2.74	1.45	0.19	0.20	1.56	0.04	0.05	2.34
S5	3.21	0.09	0.10	2.84	3.70	3.79	1.72	1.66	1.62	1.40	0.17	0.18	1.43	0.04	0.04	2.22
S6	3.25	0.35	0.36	1.40	3.39	3.40	0.28	2.37	2.37	0.10	0.27	0.28	1.39	0.02	0.02	2.09
S7	3.76	0.11	0.11	2.85	0.48	0.48	0.24	1.38	1.38	0.18	0.15	0.15	1.86	0.03	0.03	2.54
S8	2.88	1.09	1.11	1.00	2.43	2.45	0.53	1.58	1.57	0.24	0.52	0.52	0.11	0.14	0.14	2.43
S9	4.77	0.24	0.25	1.80	2.07	2.13	1.96	2.40	2.35	1.39	0.57	0.59	2.27	0.17	0.17	2.01
S10	3.17	0.05	0.05	1.63	2.72	2.71	0.29	2.47	2.46	0.22	0.06	0.06	2.51	0.03	0.03	1.87
S11	6.11	0.27	0.28	1.75	2.33	2.39	1.93	3.33	3.27	1.40	0.29	0.30	1.06	0.16	0.16	1.67
S12	5.77	0.18	0.19	2.05	3.65	3.74	1.78	2.77	2.72	1.39	0.51	0.52	1.03	0.08	0.08	1.56
S13	5.49	0.12	0.13	2.44	1.91	1.97	2.01	1.77	1.73	1.35	0.24	0.24	1.04	0.05	0.05	2.70
S14	5.16	0.43	0.44	1.51	3.37	3.45	1.79	2.08	2.04	1.37	0.77	0.79	1.84	0.33	0.34	2.64
S15	3.80	0.04	0.04	1.76	2.50	2.57	1.86	1.48	1.45	1.37	1.53	1.54	0.26	0.06	0.06	2.23

2.9 指纹图谱建立及相似度评价

为了解这 15 批来源不同的佛手药材的差异，本研究进行了指纹图谱的考察。将 15 批佛手药材按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进行测定，将 15 批样品指纹图谱的 CDF 数据文件导入中药指纹图谱相似度评价系统（2004 版），进行相似度计算，设置样品 S12 图谱为参照图谱，根据中药色谱指纹图谱相似度评价系统的操作规范 2004A，采用中位数法产生对照指纹图谱，时间窗宽度为 0.1，由 19 个峰校正，自动匹配，生成对照指纹图谱（见图 2），其相似度结果见表 4。15 批佛手的相似度均大于 0.94，这表明不同产地的佛手药材具有较高的一致性。四川安岳与广西桂林的相似度较差，可能与药材的质量有关。

2.10 聚类分析

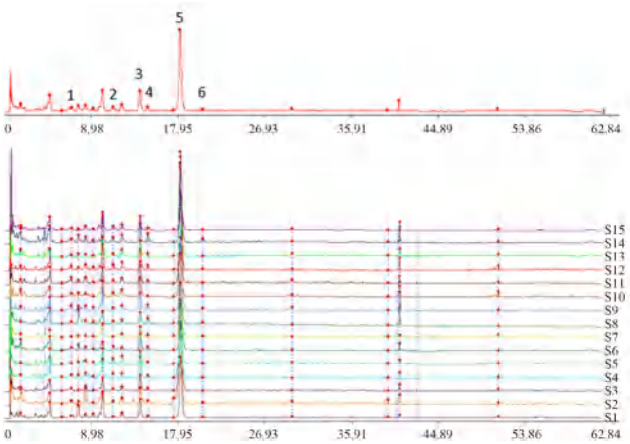


图 2　15 批佛手的 UPLC 指纹图谱

Fig 2　UPLC fingerprints of 15 batches of *Citrus medica*

1. 6，7-二甲氧基香豆素（6，7-dimethoxycoumarin）；2. 橙皮苷（hesperidin）；3. 香叶木苷（diosmin）；4. 水合氧化前胡素（oxypeucedanin hydrate）；5. 5，7-二甲氧基香豆素（5，7-dimethoxycoumarin）；6. 佛手柑内酯（bergapten）

表 4　不同产地佛手的相似度

Tab 4　Similarity of *Citrus medica* from different regious

No.	相似度	No.	相似度
S1	0.981	S9	0.983
S2	0.940	S10	0.997
S3	0.989	S11	0.984
S4	0.998	S12	0.989
S5	0.997	S13	0.997
S6	0.993	S14	0.983
S7	0.947	S15	0.996
S8	0.994		

以不同产地佛手样品的 19 个峰含量为变量，采用 SPSS 22.0 统计软件对 15 批佛手药材进行聚类分析，结果见图 3。采用组间联接的聚类方法，选取欧式距离平方和作为样本测度。当欧式距离平方和为 15 时，佛手药材可以分为 3 类，Ⅰ类为 S1，S11，S12，S14，S3，S9，S13；Ⅱ 类为 S2，S7；Ⅲ类为 S4，S10，S6，S5，S8，S15。上述结果与相似度评价一致，相同产地不同批次样品间差异较小，浙江金华与广东的佛手比较相似，四川、云南、广西、重庆的佛手比较相似。推测影响分类的结果可能与药材产地的纬度、气候及土壤等有一定联系。

3　讨论

与 HPLC 法相比，UPLC 法具有灵敏度高、线性范围宽、分析时间短等优点，本试验的线性范围达到了 0.05 ～ 100 μg·mL^{-1}，定量限和检测限分别达到了 0.05 和 0.025 μg·mL^{-1}，表明本方法具有较高的灵敏度和较宽的线性范围。本试验对样品进行了 190 ～ 400 nm 全波长扫描，比较各波长下色谱图，各成分在 330 nm 处均有较大吸收。因此本试验选用 330 nm 为检测波长。

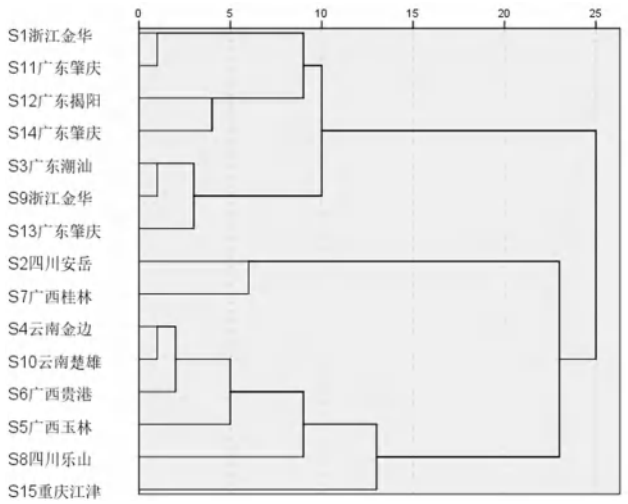


图 3　15 批佛手指纹图谱聚类分析

Fig 3　Cluster analysis of fingerprints of 15 batches of *Citrus medica*

钟艳梅等[4]研究显示，香豆素类成分的含量差异是区分佛手药材的关键指标。佛手中的香豆素类成分具有多种生物活性，水合氧化前胡素具有抗炎、抗肿瘤等活性、6，7-二甲氧基香豆素具有止喘及降血压作用[12]，佛手柑内酯具有催眠抗肿瘤等活性[14]。因此，本试验在橙皮苷的基础上，增加水合氧化前胡素等香豆素类化合物作为指标，建立更全面、快速、高效的多组分含量测定方法。

佛手在我国南方多地均有栽培，根据产地的不同，佛手可分为川佛手、广佛手、金佛手。本研究聚类分析表明，东南地区的广东佛手和浙江佛手聚为一类，西南地区的四川、云南和广西佛手聚为一类。说明不同地域的佛手虽有差异，但亦有相同之处。

综上所述，本试验采用 UPLC 技术建立了以 5，7-二甲氧基香豆素为内参物的 QAMS 法，用于测定佛手中 5，7-二甲氧基香豆素、6，7-二甲氧基香豆素、橙皮苷、香叶木苷、水合氧化前胡素和佛手柑内酯等 6 种化学成分的含量，该方法操作简便，精密度高，稳定性、重复性好，为全面评价不同产地佛手的质量提供了参考根据。

参考文献

[1] 《中国药典》2020 年版 . 一部 [S]. 2020：185-186.

[2] 李克杰，罗碧，杨全 . HPLC 法测定不同存储年限广佛手药材中主要活性成分的含量及指纹图谱研究 [J]. 时珍国医国药，2020，31（2）：426-428.

[3] 郑振兴，胡瀚文，曾利 . 基于 HPLC 指纹图谱结合化学计量学评价不同产地佛手药材质量 [J]. 中国实验方剂学志，2021，27（21）：174-180.

[4] 钟艳梅，田庆龙，肖海文 . 不同产地佛手药材的化学成分比较研究 [J]. 中南药学，2014，12（1）：63-66.

[5] 王智民，高慧敏，付雪涛，等 . “一测多评” 法中药质量

评价模式方法学研究 [J]. 中国中药杂志，2006，23（1）：1925-1928.
[6] 杨洋，黄良永，朱美玲 . 一测多评法在中国药典 2015 年版中的应用 [J]. 中南药学，2017，15（12）：1738-1741.
[7] 孙全，徐冲，刘霞 . HPLC 同时测定川佛手中的橙皮苷与 5，7- 二甲氧基香豆素 [J]. 华西药学杂志，2017，32（6）：646-648.
[8] 刘盼，雷素娟，何兵 . 合江佛手两种香豆素含量测定及指纹图谱研究 [J]. 食品研究与开发，2019，40（3）：184-189.
[9] 崔广林，李隆云，谭均 . 不同产地川佛手中 8 种化学成分的分析与评价 [J]. 天然产物研究与开发，2019，31（2）：250-260，324.
[10] 魏莹，陈珍，杨兰 . HPLC 法同时测定不同产地佛手中 5 个成分的含量 [J]. 药物分析杂志，2017，37（12）：2180-2184.
[11] 魏莹，肖莉，杨兰 . 不同产地佛手的香叶木苷及橙皮苷含量同时测定法 [J]. 安徽医药，2021，25（1）：32-34.
[12] 王梦月，贾敏如，马逾英 . 白芷中四种线型呋喃香豆素类成分药理作用研究 [J]. 天然产物研究与开发，2010，22（3）：485-489.
[13] 周蕙祯，罗伟，陈爽 . 瑞香狼毒花中香豆素成分及生物活性研究 [J]. 中草药，2021，52（4）：943-950.
[14] 谢术欢，冯玛莉 . 佛手柑内酯药理作用研究进展 [J/OL]. 海南医学院学报，2022，15（12）：1-6.

（收稿日期：2021-12-25；修回日期：2022-02-17）

UPLC-MS/MS 法测定利奈唑胺中的一种基因毒性杂质

李倚天，梅芊，刘英（河南省食品药品检验所，郑州 450018）

摘要：目的 采用 UPLC-MS/MS 法快速测定利奈唑胺中基因毒性杂质 *S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐的含量。**方法** 使用 ACE EXCEL C_{18}-AR（2.1 mm×100 mm，5 μm）色谱柱，以 0.2% 甲酸水溶液 - 乙腈（70∶30）为流动相，流速为 0.3 mL·min^{-1}，正离子（ESI^+）模式下单离子检测扫描模式（SIM）方式检测。**结果** *S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐在 3.013 ～ 30.125 ng·mL^{-1} 与峰面积线性关系良好（r = 0.9997），9 批次样品均未检出 *S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐。**结论** 该方法简便快捷，准确可靠，适合利奈唑胺中 *S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐的快速检测，可为研究其他药物中此类杂质的检测提供参考。

关键词：UPLC-MS/MS；遗传毒性杂质；利奈唑胺；*S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐
中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)05-1172-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.036

Determination of genotoxic impurity in linezolid by UPLC-MS/MS

LI Yi-tian, MEI Qian, LIU Ying (*Henan Provincial Institute of Food and Drug Control*, *Zhengzhou* 450018)

Abstract: Objective To determine *S*-1-amino-3-chloro-2-propanol hydrochloride in linezolide by UPLC-MS/MS. **Methods** The analytes were separated on an ACE EXCEL C_{18}-AR (2.1 mm×100 mm, 5 μm) column with 0.2% formic acid-acetonitrile (70∶30) as the mobile phase. The flow rate was 0.3 mL·min^{-1}. The target compound was analyzed by the positive ion single ion monitoring (SIM) mode. **Results** The linearity of hydrazine was 3.013 － 30.125 ng·mL^{-1} (r = 0.9997). No *S*-1-amino-3-chloro-2-propanol hydrochloride was detected in the samples. **Conclusion** This method is simple, accurate and reliable, which is suitable for the rapid detection of *S*-1-amino-3-chloro-2-propanol hydrochloride in linezolide, which provides a reference for determining *S*-1-amino-3-chloro-2-propanol hydrochloride impurities in other drugs.

Key words: UPLC-MS/MS; genotoxic impurity; linezolide; *S*-1-amino-3-chloro-2-propanol hydrochloride

作者简介：李倚天，女，主管药师，主要从事抗菌药物质量分析与控制，email：yitian1117@126.com

基因毒性杂质是指能引起 DNA 突变、染色体断裂或者 DNA 重组的物质，可导致肿瘤的发生 [1-2]。基因毒性杂质主要来源于原料合成过程中的起始物料、中间体、试剂及反应副产物，也可在药物贮存中降解产生 [3]。近年来，随着各国基因毒性杂质法规的逐步健全和监管要求的日益提高，基因毒性杂质的研究已成为药物质量研究与控制的热点与难点。

利奈唑胺是第一个由人工合成并应用于临床的新型噁唑烷酮类抗菌药，2000 年在美国获批上市，2007 年进入中国市场 [4]。自 2000 年美国 FDA 批准该药物上市以来，利奈唑胺被广泛用于治疗革兰氏阳性球菌引起的感染，包括由耐甲氧西林金黄色葡萄球菌引起的疑似或确诊院内获得性肺炎、社区获得性肺炎、复杂性皮肤或皮肤软组织感染以及耐万古霉素肠球菌感染等 [5]。其合成以（*S*）-*N*-[2-（乙酰氧基 -3- 氯丙基）] 乙酰胺（ACPA）为起始物料，过程中用到了 *S*- 环氧氯丙烷（ECH）和 *S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐（结构见图 1）[6]。依照欧盟基因毒性杂质指导原则及相关文献，这三者的结构式中均含有基因毒性警示结构 [7]，其中 ECH 与 ACPA 根据文献报道已采用 GC-MS 法进行测定和控制，而 *S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐暂无方法对其进行控制，因此需要建立合适的方法对其进行测定。考虑到利奈唑胺治疗期为 1 ～ 12 个月，根据人用药品注册技术要求国际协调会（International Conference on Harmonization，ICH）M7 指南规定，关于遗传毒性杂质基于毒性学关注阈值（threshold of toxicological concern，TTC）的治疗期为 1 ～ 12 个月的药品的可接受摄入量为每日 60 μg[8]，*S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐的限度为 15 μg • g^{-1}，限度较低，对测定方法的专属性及灵敏度要求较高，采用常规的液相色谱紫外检测器检测难以实现，因此有必要建立一种准确及灵敏度高的分析方法对其进行控制。液相色谱 - 质谱联用技术具有灵敏度高、分析速度快、结果准确等特点，能够满足痕量基因毒性杂质的检测要求 [9-10]。本文建立了液相色谱 - 四极杆 - 离子肼高分辨质谱法分析利奈唑胺中 *S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐的含量，为其质量控制提供参考。

1　材料

1.1　仪器

赛默飞 Q Exactive Plus 超高效液相色谱 - 四极杆 / 静电场轨道阱高分辨质谱联用仪（美国赛默飞世尔科技公司），XPE205 电子天平 [梅特勒 - 托利多仪器（上海）有限公司]。

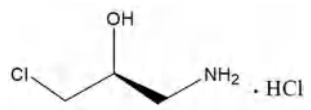


图 1　*S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐化学结构

Fig 1　Chemical structure of *S*-1-amino-3-chloro-2-propanol hydrochloride

1.2　试药

甲醇、乙腈为色谱纯（MERCK 公司），甲酸（Sigma-Aldrich，批号：SHBL0331），水为 MillQ 去离子水。*S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐（上海阿拉丁生化科技股份有限公司，纯度：98.0%，批号：F2002149）；利奈唑胺原料（批号：27150501、27150601、27150602、27150603，浙江新塞科药业有限公司；批号：4039190801、4039190802、4039190803、4039191001，河南华润双鹤药业股份有限公司）。

2　方法与结果

2.1　测定条件

色谱条件：采用 ACE EXCEL C_{18}-AR（2.1 mm×100 mm，5 μm）色谱柱，流动相为 0.2% 甲酸水溶液 - 乙腈（70∶30），流速 0.3 mL • min^{-1}，柱温 30 ℃，进样量 1 μL，0 ～ 5.0 min 进质谱检测。

质谱条件：采用电喷雾离子源（ESI 源），正离子模式检测，喷雾电压 3.5 kV，离子传输管温度 350 ℃，辅助气温度 350 ℃，辅助气流量 10 mL • min^{-1}，鞘气流量 40 mL • min^{-1}，碰撞能量（NCE）50 eV，扫描范围为 *m/z* 50 ～ 235，扫描方式为 SIM 扫描母离子，目标离子精确质量数：110.036 41，质谱图见图 2。

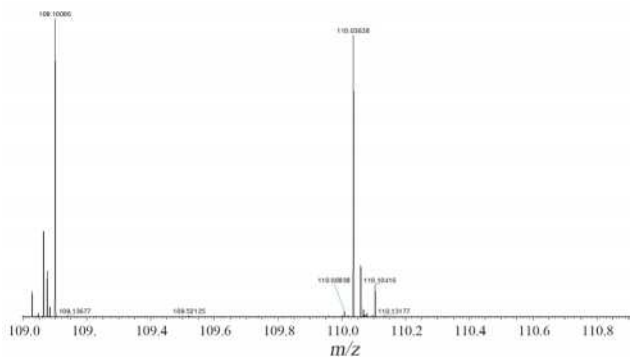


图 2　*S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇质谱图

Fig 2　Mass spectrogram of *S*-1-amino-3-chloro-2-propanol

2.2　溶液的制备

2.2.1　供试品溶液　精密称取利奈唑胺原料 50 mg，置 50 mL 量瓶中，用水溶解并稀释至刻度，滤过，取续滤液进样。

2.2.2　对照品溶液储备液　精密称取 *S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐对照品约 15 mg，置 100 mL 量瓶中，用水溶解并稀释至刻度，精密量取 1 mL 置 200 mL 量瓶中，用水稀释制成每 1 mL 中约含 0.75 μg 对照品的溶液。

2.3　专属性

按照“2.1”项下条件进样，空白溶剂不干扰 *S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐的测定，方法的专属性较好，色谱图见图 3。

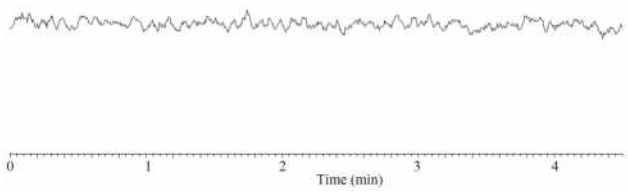


图 3　空白溶剂质谱图

Fig 3　Ion chromatograms of the blank solution

2.4　线性关系、检测限与定量限

精密量取“2.2.2”项下对照品溶液储备液适量，用水分别稀释制成 3、12、15、18、22、30 ng • mL^{-1} 的 *S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐对照品溶液，进样测定，记录色谱图。以质量浓度（*X*，ng • mL）为横坐标，峰面积（*Y*）为纵坐标进行线性回归，得线性方程：$Y = 1.601\times10^{5}X + 1.634\times10^{5}$（$r = 0.9997$）。

S-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐在 3.013 ～ 30.125 ng • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好。将对照品溶液逐级稀释，在信噪比（*S/N*）约为 10.0 时测得定量限为 7.53×10^{-5} ng，在 *S/N* 约为 3.0 时测得检测限为 7.53×10^{-6} ng。

2.5　进样精密度与重复性试验

取“2.4”项下 15 ng • mL^{-1} 的对照品溶液连续进样 6 次，测得 *S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐峰面积的 *RSD* 为 0.50%（$n = 6$），表明仪器精密度良好。

精密称取利奈唑胺原料（批号：27150501）约 50 mg 共 6 份，分别按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，按”2.1”项下条件进行测定，记录色谱图。结果样品中均未检出 *S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐，表明方法重复性良好。

2.6　加样回收试验

分别精密称定已知含量（*S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐未检出）的利奈唑胺原料（批号：27150501）9 份，再分别精密称取 *S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐对照品适量，用供试品溶液溶解，分别制成低、中、高浓度（80%、100%、120% 水平）的溶液分别进样（各 3 份），并作 *S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐随行标准曲线，按“2.1”项下条件进行测定，计算回收率，结果 *S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐的低、中、高浓度的平均回收率分别为 95.8%、94.1%、95.8%，*RSD* 分别为 1.8%、1.0%、1.5%。

2.7　稳定性试验

取利奈唑胺原料（批号：27150501）约 50 mg 置 50 mL 量瓶中，用“2.4”项下 15 ng • mL^{-1} 的对照品溶液稀释至刻度，于 0、1、2、4、6、8 h 进样测定并记录色谱图，以 *S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐峰面积为指标考察溶液稳定性。结果原料及制剂加标供试品溶液中 *S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐峰面积的 *RSD* 分别为 1.9%，表明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

2.8　样品测定

按“2.2”项下方法制备对照品溶液及供试品溶液，照“2.1”项下色谱条件进样测定，并作随行标准曲线，采用回归方程计算其含量，结果 8 批次原料均未检出 *S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐杂质（见图 4）。

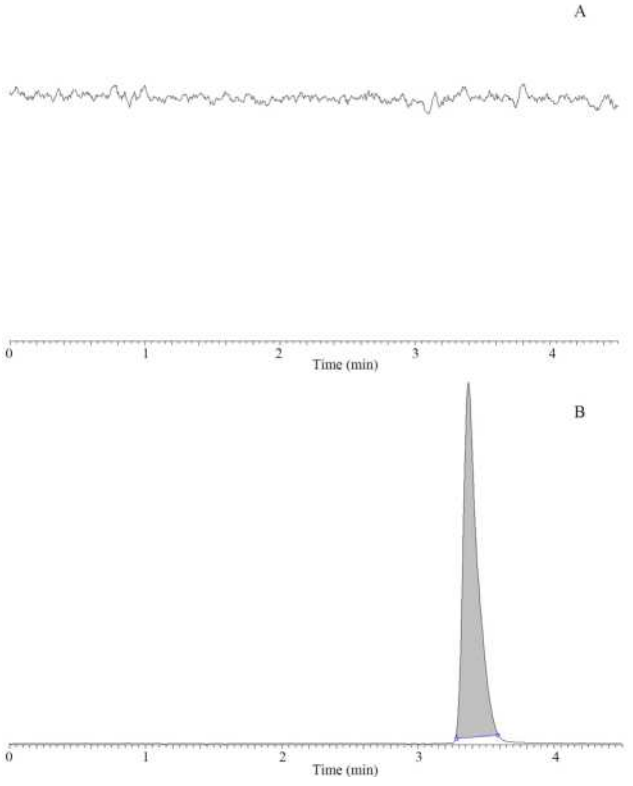


图 4　*S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐离子色谱图

Fig 4　Ion chromatogram of *S*-1-amino-3-chloro-2-propanol hydrochloride

A. 利奈唑胺原料（linezolide）；B. 对照品溶液（reference substance）

3　讨论

3.1　流动相的选择

笔者曾用乙腈作为流动相，峰的响应较甲醇作为流动相时更高，分析原因为乙腈的离子化效果更好，样品更容易离子化。进一步比较了不同浓度如 0.1%、0.15%、0.2%、0.25% 甲酸水溶液作为流动相的峰响应情况，结果甲酸浓度越低，*S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐峰响应越大，基线噪音越小，但综合考虑保留时间的影响，选择 0.2% 甲酸水溶液为流动相。

3.2　流动相比例的确定

分别比较了 0.2% 甲酸水溶液与乙腈在不同色谱条件下 *S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐峰与利奈唑胺峰的出峰情况，两者比例越接近（50∶50），*S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐峰与利奈唑胺峰保留时间越近，考虑到利奈唑胺浓度过大，进入质谱检测器后过载，有可能造成检测器污染，因此，将比例设定 0.2% 甲酸水溶液 - 乙腈（70∶30），*S*-1- 氨基 -3- 氯 -2- 丙醇盐酸盐峰杂质峰保留时间约为 3.4 min，而主成分利奈唑胺峰约为 9 min，质谱采集时间设定为 0 ～ 5 min，利奈唑胺经液相洗脱后直接从废液管排出，以避免污染质谱。

3.3　检测模式的选择

比较了 3 种不同检测模式，即全扫描模式（Fullscan）、单离子检测扫描（SIM）以及多反应监测扫描（MRM）模式，其中 MRM 模式基线噪音最小，干扰最少，SIM 的检测限及定量限最低，最终从检测能力方面考虑采用 SIM 作为本次检测方法的扫描模式。

参考文献

[1] 王东升，牟吉，王斌梁，等 . 利奈唑胺与替考拉宁序贯治疗革兰阳性球菌重症肺炎疗效分析 [J]. 中华医院感染学杂志，2015，25（5）：1050-1052.

[2] 刘萍 . 噁唑烷酮类抗菌素 Linezolid [J]. 国外医药合成药生化药制剂分册，2001，22（1）：52-57.

[3] Bouder F. Regulating impurities in pharmaceutical products：a tolerability of risk approcah [J]. Expert Rev Clin Pharmacol，2008，1（2）：241.

[4] Committee for Medicinal Products for Human Use. Guidelines on the limits of genotoxic impurities [S]. London：European Medicines Agency Evaluation of Medicines for Human Use，2006.

[5] 阮晓玲，郑项元，徐洁，等 . 药物中基因毒性杂质分析方法的研究进展 [J]. 中国药科大学学报，2016，47（3）：267.

[6] 腾汉兵，黄进 . *L*- 高丝氨酸内酯盐酸盐的氨基保护 [J]. 武汉大学学报（理学版），2010，56（1）：11-14.

[7] 徐建妙，徐永鑫，郑裕国，等 . 柱前手性衍生化 -RP-HPLC 法拆分 *D*，*L*- 草铵膦 [J]. 农药，2013，52（3）：195-197.

[8] 李桂杰，赵静国，张飞，等 . 新型抗菌药利奈唑胺合成的研究 [J]. 化学与生物工程，2013，30（1）：57-59.

[9] 马磊，马玉楠，陈震，等 . 遗传毒性杂质的警示结构 [J]. 中国新药杂志，2014，23（18）：2106-2111.

[10] 王萍，徐彩虹，陈仙，等 . 原料药中基因毒性杂质控制的研究进展 [J]. 中国现代应用药学，2015，32（1）：119-126.

（收稿日期：2021-03-16；修回日期：2022-03-30）

医院药学

化疗相关恶心呕吐危险因素的性别差异

孙博[1]，刘勋[2]，王会品[1]，李淑芳[1]，张二锋[1]，马换青[1]，潘丽丽[1]，刘丹娜[1*]（1. 郑州市第三人民医院药学部，郑州 450099；2. 郑州市第二人民医院药学部，郑州 450006）

摘要：目的 探索不同性别患者化疗相关恶心呕吐（CINV）危险因素的差异，为临床用药提供参考。**方法** 采用回顾性病例对照研究，以某院 871 例化疗患者为对象，其中男性 448 例，女性 423 例，分别统计人口学数据，病史资料，检查情况，治疗信息等资料共 32 项。以 CINV 为终点，采用单因素分析、向后似然比逐步回归法进行变量筛选。将筛选后的变量纳入多因素 Logistic 回归。使用多层感知神经网络预测各危险因素的重要性。**结果** 结果显示男性独有的独立危险因素 3 项，分别为体表面积、阿片类止痛药应用、首次化疗；女性独有的独立危险因素 1 项，为化疗前紧张焦虑情绪；男女共有的独立危险因素 6 项，分别为胃肠道疾病史、手术史、电解质紊乱、化疗前 24 h 恶心呕吐、化疗呕吐史，化疗方案致吐风险等级。男性患者的独立危险因素中，化疗前 24 h 恶心呕吐（100.0%），体表面积（96.5%），化疗方案致吐风险等级（96.3%）的相对重要性较高。女性患者的独立危险因素中，化疗方案致吐风险等级（100.0%），化疗前 24 h 恶心呕吐（78.3%），紧张焦虑情绪（58.8%）的相对重要性较高。**结论** CINV 的发生与多种因素相关，不同性别的患者，CINV 的危险因素有所不同，各危险因素的重要性亦有不同。体表面积更大、使用阿片类药物、首次化疗的男性更容易发生 CINV；存在紧张焦虑情绪的女性更容易发生 CINV。医师在化疗前应充分考虑患者的性别差异，有针对性地对 CINV 进行预防。

关键词：化疗相关恶心呕吐；危险因素；性别差异
中图分类号：R453 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)05-1176-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.037

Gender difference in risk factors for chemotherapy-related nausea and vomiting

SUN Bo[1], LIU Xun[2], WANG Hui-pin[1], LI Shu-fang[1], ZHANG Er-feng[1], MA Huan-qing[1], PAN Li-li[1], LIU Dan-na[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *The Third People's Hospital of Zhengzhou*, *Zhengzhou* 450099; 2. *Department of Pharmacy*, *Zhengzhou Second Hospital*, *Zhengzhou* 450006)

Abstract: Objective To determine the difference in the risk factors for chemotherapy-related nausea and vomiting (CINV) in patients of different genders, and to provide references for clinical safe medication use. **Methods** A retrospective case-control study was conducted involving 871 chemotherapy patients in a hospital (448 males and 423 females). The demographic data, medical history, examination results, treatment information and other data were recorded with 32 items in total. With CINV as the endpoint, single-factor analysis, and backward likelihood ratio stepwise regression were used to screen the variables. The selected variables were incorporated into the multivariate Logistic regression. The regression model was constructed, and the multi-layer perceptual neural network was used to predict the importance of each risk factor. **Results** Three independent risk factors unique to males, included the body surface area, use of opioid analgesics, and first chemotherapy. The only independent risk factor unique to women was anxiety before the chemotherapy. Six independent risk factors for both men and women included the history of gastrointestinal diseases, history of surgery, electrolyte disorder, nausea

基金项目：河南省医学科技攻关项目（No. LHGJ20200721）。
作者简介：孙博，男，硕士，主管药师，主要从事临床药学研究，email：sss679031@163.com *通信作者：刘丹娜，女，副主任药师，主要从事临床药学相关研究，email：13938475217@163.com

and vomiting 24 h before the chemotherapy, history of vomiting during the chemotherapy, and the risk level of vomiting caused by chemotherapy. Among the independent risk factors for male patients, nausea and vomiting 24 h before chemotherapy (100.0%), body surface area (96.5%), risk level of chemotherapy-induced vomiting were relatively important (96.3%). Among the independent risk factors for female patients, chemotherapy regimen-induced nemesis (100.0%), nausea and vomiting (78.3%) 24 h before chemotherapy, and anxiety (58.8%) were relatively important. **Conclusion** The occurrence of CINV involves many factors. Patients of different genders have different risk factors for CINV, and the importance of each risk factor also vary. Men with larger body surface areas, opioids, and first chemotherapy are more likely to develop CINV; women with anxiety and tension are more likely to develop CINV. Gender differences should be taken into consideration before the chemotherapy.

Key words: chemotherapy-related nausea and vomiting; risk factor; gender difference

化疗所致恶心呕吐（CINV）是化疗时一种令人畏惧的伴随症状，是化疗常见的不良反应之一，CINV 的发生会严重影响化疗患者的依从性[1]，因此预防 CINV 对于化疗患者具有重要意义。探究 CINV 发生的危险因素，可使医师对发生 CINV 的高危患者采用更有针对性的治疗，最大限度地减少 CINV 的影响。多项研究表明，相对于男性，女性患者更易发生 CINV[2-4]，2019 版 CSCO 指南也将女性作为 CINV 发生的危险因素[5]。目前对于 CINV 危险因素的性别间的差异尚无相关研究，本研究尝试探索不同性别患者 CINV 危险因素的差异，为临床用药提供参考。

1　材料与方法

1.1　研究对象

采用回顾性研究，抽取某院 2016—2020 年化疗患者 871 例。纳入标准：① 诊断为肿瘤并接受全身化疗的患者；② 以帕洛诺司琼（0.25 mg iv）联合地塞米松（10 mg po）对 CINV 进行预防的患者。排除标准：① 病历资料不完整者；② 1 个月内接受过放射性治疗或手术的患者；③ 预防性应用其他止吐药品的患者。

1.2　分组情况

以 CINV 为终点根据是否发生 CINV 进行分组，以未发生 CINV 为对照组。病例组与对照组未进行匹配，全部纳入分析。根据 CSCO 指南，未发生 CINV 的标准为：化疗开始至化疗结束后 72 h 未发生呕吐，也不需要解救治疗，无恶心或伴轻度恶心[5]。

1.3　资料统计

分别统计人口学资料，病史资料，化疗前检查情况，化疗情况等 32 项资料，包括年龄、性别、体质量、体表面积、KPS 评分、营养情况、精神状况、过敏史、胃肠道疾病史等。

1.4　性别对 CINV 的影响

通过单因素 Logistic 回归，初步探讨性别对 CINV 的影响。采用多因素 Logistic 回归，对最终筛选出的危险因素进行矫正，以验证性别对 CINV 的影响。

1.5　变量筛选及多因素 Logistic 回归模型的建立

各变量进行共线性检验。男、女两组分别对各因素进行单因素 Logistic 回归，单因素回归结果以 $P < 0.2$ 为界限。将 $P < 0.2$ 的因素纳入似然比法向后逐步回归，逐步回归进入阈值设定为 0.05，去除阈值设定为 0.1。将逐步回归筛选出的因素纳入多因素 Logistic 回归，构建回归模型。

1.6　变量预处理及样本量估计

对变量根据数据特征进行分类处理，对肿瘤类型中数量＜ 2% 的进行合并或去除。Logistic 回归模型通常要求阳性样本数量是模型所纳入变量数量的 15 倍以上，本次研究变量经过筛选，最终仅少量变量纳入模型，故样本量可以满足研究需要。

1.7　独立危险因素重要性

将多因素 Logistic 回归得出的独立危险因素纳入多层感知神经网络，对各危险因素的重要性进行预测。

1.8　软件处理

使用 Excel 2019 进行数据统计，计数资料以 n（%）表示，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 SPSS 25.0 进行 Logistic 回归分析和神经网络预测，$P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　纳入病例基本资料

本次研究共纳入 871 例，其中男性 448 例，女性 423 例。单因素回归结果显示，性别对 CINV 有影响，女性更易发生 CINV（52.01% *vs* 36.38%，$OR = 1.89$，$P < 0.001$）。基本资料详见表 1。

2.2　变量筛选结果

体质量 $VIF = 8.9$ 和体表面积 $VIF = 10.67$ 存在严重共线性，化疗药物剂量是根据体表面积计

表 1 基本资料

Tab 1 Basic information

影响因素		男（n = 448）		女（n = 423）	
		无 CINV	发生 CINV	无 CINV	发生 CINV
年龄 / 岁		63.03±10.33	62.11±10.23	59.25±12.58	56.45±11.93
体质量 /kg		65.56±10.41	66.66±11.04	59.03±9.89	58.27±10.64
体表面积 /m^2		1.74±0.14	1.77±0.16	1.57±0.14	1.57±0.13
KPS 评分 / 分	≥ 80*	245（85.96%）	138（84.66%）	177（87.19%）	187（85.00%）
	＜ 80	40（14.04%）	25（15.34%）	26（12.81%）	33（15.00%）
营养情况	一般*	272（95.44%）	146（89.57%）	194（95.57%）	193（87.73%）
	差	13（4.56%）	17（10.43%）	9（4.43%）	27（12.27%）
精神状况	一般*	235（82.46%）	133（81.6%）	186（91.63%）	191（86.82%）
	差	50（17.54%）	30（18.4%）	17（8.37%）	29（13.18%）
过敏史	无*	254（89.12%）	144（88.34%）	161（79.31%）	187（85.00%）
	有	31（10.88%）	19（11.66%）	42（20.69%）	33（15.00%）
胃肠道疾病史	无*	227（79.65%）	91（55.83%）	165（81.28%）	140（63.64%）
	有	58（20.35%）	72（44.17%）	38（18.72%）	80（36.36%）
高血压史	无*	211（74.04%）	106（65.03%）	142（69.95%）	151（68.64%）
	有	74（25.96%）	57（34.97%）	61（30.05%）	69（31.36%）
高血脂史	无*	242（84.91%）	125（76.69%）	165（81.28%）	186（84.55%）
	有	43（15.09%）	38（23.31%）	38（18.72%）	34（15.45%）
糖尿病史	无*	245（85.96%）	137（84.05%）	186（91.63%）	189（85.91%）
	有	40（14.04%）	26（15.95%）	17（8.37%）	31（14.09%）
手术史	无*	176（61.75%）	81（49.69%）	92（45.32%）	84（38.18%）
	有	109（38.25%）	82（50.31%）	111（54.68%）	136（61.82%）
中枢系统病变史	无*	245（85.96%）	137（84.05%）	168（82.76%）	181（82.27%）
	有	40（14.04%）	26（15.95%）	35（17.24%）	39（17.73%）
饮酒史	无*	191（67.02%）	109（66.87%）	203（100%）	219（99.55%）
	有	94（32.98%）	54（33.13%）	0（0%）	1（0.45%）
晕动症史	无*	285（100%）	163（100%）	203（100%）	220（100%）
	有	0（0%）	0（0%）	0（0%）	0（0%）
焦虑症史	无*	281（98.6%）	161（98.77%）	203（100%）	216（98.18%）
	有	4（1.40%）	2（1.23%）	0（0%）	4（1.82%）
肿瘤类型	肺癌*	160（56.14%）	68（41.72%）	79（38.92%）	59（26.82%）
	肝癌	22（7.72%）	18（11.04%）	6（2.96%）	4（1.82%）
	黑色素瘤	9（3.16%）	13（7.98%）	17（8.37%）	35（15.91%）
	结直肠癌	12（4.21%）	12（7.36%）	11（5.42%）	12（5.45%）
	其他	52（18.25%）	18（11.04%）	58（28.57%）	79（35.91%）
	乳腺癌	0（0%）	0（0%）	24（11.82%）	21（9.55%）
	胃食管癌	30（10.53%）	34（20.86%）	8（3.94%）	10（4.55%）
确诊时间	＜ 1 年*	134（47.02%）	93（57.06%）	77（37.93%）	76（34.55%）
	≥ 1 年	151（52.98%）	70（42.94%）	126（62.07%）	144（65.45%）
转移情况	无*	169（59.30%）	101（61.96%）	107（52.71%）	114（51.82%）
	转移	116（40.70%）	62（38.04%）	96（47.29%）	106（48.18%）
肝功能	正常*	237（83.16%）	142（87.12%）	171（84.24%）	188（85.45%）
	异常	48（16.84%）	21（12.88%）	32（15.76%）	32（14.55%）
电解质	正常*	201（70.53%）	83（50.92%）	162（79.80%）	124（56.36%）
	异常	84（29.47%）	80（49.08%）	41（20.20%）	96（43.64%）
肌酐清除率 /（$mL \cdot min^{-1}$）		105.82±36.25	109.85±39.18	102.34±34.02	106.28±37.36
血浆白蛋白 /（$g \cdot L^{-1}$）		36.36±5.13	35.79±5.07	38.19±5.03	36.98±5.19

续表 1

影响因素		男（n = 448）		女（n = 423）	
		无 CINV	发生 CINV	无 CINV	发生 CINV
紧张焦虑情绪	无*	273（95.79%）	143（87.73%）	196（96.55%）	198（90.00%）
	有	12（4.21%）	20（12.27%）	7（3.45%）	22（10.00%）
化疗前 24 h 恶心呕吐	无*	284（99.65%）	142（87.12%）	198（97.54%）	175（79.55%）
	有	1（0.35%）	21（12.88%）	5（2.46%）	45（20.45%）
单次化疗时间	单日*	123（43.16%）	56（34.36%）	100（49.26%）	93（42.27%）
	多日	162（56.84%）	107（65.64%）	103（50.74%）	127（57.73%）
首次化疗	否*	234（82.11%）	116（71.17%）	168（82.76%）	179（81.36%）
	是	51（17.89%）	47（28.83%）	35（17.24%）	41（18.64%）
化疗呕吐史	无*	215（75.44%）	88（53.99%）	104（51.23%）	76（34.55%）
	有	70（24.56%）	75（46.01%）	99（48.77%）	144（65.45%）
化疗方案致吐风险等级	低*	76（26.67%）	24（14.72%）	58（28.57%）	29（13.18%）
	中	170（59.65%）	87（53.37%）	104（51.23%）	81（36.82%）
	高	39（13.68%）	52（31.90%）	41（20.20%）	110（50.00%）
化疗药数量	单药*	70（24.56%）	37（22.70%）	68（33.50%）	59（26.82%）
	多药联合	215（75.44%）	126（77.30%）	135（66.50%）	161（73.18%）
单次化疗时间	单日*	123（43.16%）	56（34.36%）	100（49.26%）	93（42.27%）
	多日	162（56.84%）	107（65.64%）	103（50.74%）	127（57.73%）
止痛药应用	未用*	189（66.32%）	73（44.79%）	144（70.94%）	127（57.73%）
	阿片	96（33.68%）	90（55.21%）	59（29.06%）	93（42.27%）
总数		285（63.62%）	163（36.38%）	203（47.99%）	220（52.01%）

注（Note）：* 表示在 Logistic 回归分析中作为对照组（* means that it is used as the control group in Logistic regressiun analysis）。

算所得，因此保留体表面积，将体质量排除。根据单因素分析结果，男性组将体表面积、营养情况、胃肠道疾病史、高血压史、高血脂史、手术史、肿瘤类型、确诊时间、紧张焦虑情绪、电解质、化疗前 24 h 恶心呕吐、首次化疗、化疗呕吐史、化疗方案致吐风险等级、单次化疗时间、止痛药应用共 16 项纳入逐步回归。女性组将年龄、营养情况、精神状况、过敏史、胃肠道疾病史、糖尿病史、手术史、肿瘤类型、白蛋白水平、紧张焦虑情绪、电解质、化疗前 24 h 恶心呕吐、化疗呕吐史、化疗方案致吐风险等级、化疗药数量、单次化疗时间、止痛药应用共 17 项纳入逐步回归。结果见表 2。

2.3 *多因素 Logistic 回归结果*

逐步回归筛选后，男性组将体表面积、胃肠道疾病史、高血压史等 11 项影响因素纳入多因素 Logistic 回归。结果显示男性患者中，在矫正了其他因素后，体表面积越大、存在胃肠道疾病史、存在手术史、电解质紊乱、化疗前 24 h 出现过恶心呕吐、首次化疗、存在化疗呕吐史的患者发生 CINV 的概率更高；且患者使用的化疗方案致吐风险等级越高，CINV 发生的概率越大；同时应用阿片类止痛药物的患者发生 CINV 的概率更高。详见表 3。

逐步回归筛选后，女性组将营养情况、胃肠道疾病史、手术史等 8 项影响因素纳入多因素 Logistic 回归。结果显示女性患者中，在矫正了其他因素后，存在胃肠道疾病史、存在手术史、电解质紊乱、在紧张焦虑情绪、化疗前 24 h 出现恶心呕吐、存在化疗呕吐史的患者发生 CINV 的概率更高；且患者使用的化疗方案致吐风险等级越高，CINV 发生的概率越大。详见表 4。

根据 Logistic 回归结果，男、女均有的独立危险因素 6 项，为胃肠道疾病史、手术史、电解质紊乱、化疗前 24 h 恶心呕吐、化疗呕吐史、化疗方案致吐风险等级。男性特有的独立危险因素 3 项，为体表面积、首次化疗、阿片类止痛药应用。女性特有的独立危险因素 1 项，为化疗前紧张焦虑情绪。详见图 1。

2.4 *性别对于 CINV 的影响*

在矫正了体表面积、胃肠道疾病史、手术史、电解质、紧张焦虑情绪、化疗前 24 h 恶心呕吐、首次化疗、化疗呕吐史、化疗方案致吐风险等级、止痛药应用等 10 项危险因素后，性别可影响 CINV 的发生，女性患者相对于男性（男性作为对照组）更易发生 CINV（OR = 1.68，95%CI：1.13 ～ 2.48，P = 0.010）。详见表 5。

2.5 *危险因素的重要性*

男性患者的独立危险因素中，化疗前 24 h 恶

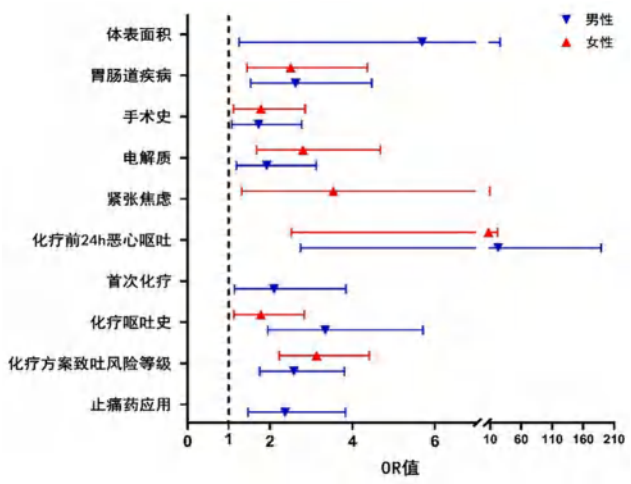


图 1 不同性别独立危险因素对比图

Fig 1 Independent risk factors for different genders

表 2 单因素分析及共线性检验

Tab 2 Single factor analysis and collinearity test

变量	男		女		共线性检验	
	P	*OR*	*P*	*OR*	容差	*VIF*
年龄	0.362	0.99	0.020	0.98	0.52	1.91
体质量	0.295	1.01	0.448	0.99	0.11	8.90
体表面积	0.114	2.80	0.957	0.96	0.09	10.67
KPS 评分	0.707	1.11	0.516	1.20	0.68	1.47
营养情况	0.020	2.44	0.006	3.02	0.69	1.45
精神状况	0.819	1.06	0.115	1.66	0.75	1.33
过敏史	0.801	1.08	0.127	0.68	0.90	1.11
胃肠道疾病史	＜ 0.001	3.10	＜ 0.001	2.48	0.69	1.45
高血压史	0.044	1.53	0.770	1.06	0.78	1.28
高血脂史	0.031	1.71	0.373	0.79	0.68	1.47
糖尿病史	0.582	1.16	0.067	1.79	0.89	1.12
手术史	0.013	1.63	0.137	1.34	0.88	1.14
中枢系统病变史	0.582	1.16	0.895	1.03	0.74	1.35
饮酒史	0.975	1.01	1.000	＞ 100	0.76	1.31
焦虑症史	0.876	0.87	0.999	＞ 100	0.88	1.13
肿瘤类型	＜ 0.001		0.055		0.72	1.38
确诊时间	0.041	0.67	0.469	1.16	0.74	1.36
转移情况	0.579	0.89	0.855	1.04	0.76	1.32
肝功能	0.265	0.73	0.727	0.91	0.95	1.06
肌酐清除率	0.272	1.00	0.259	1.00	0.50	1.99
白蛋白水平	0.253	0.98	0.016	0.95	0.71	1.40
紧张焦虑情绪	0.002	3.18	0.011	3.11	0.94	1.07
电解质	＜ 0.001	2.31	＜ 0.001	3.06	0.81	1.24
化疗前 24 h 恶心呕吐	＜ 0.001	42.00	＜ 0.001	10.18	0.79	1.27
首次化疗	0.008	1.86	0.709	1.10	0.69	1.45
化疗呕吐史	＜ 0.001	2.62	0.001	1.99	0.67	1.49
化疗方案致吐风险等级	＜ 0.001	2.09	＜ 0.001	2.43	0.70	1.44
化疗药数量	0.657	1.11	0.135	1.37	0.55	1.83
单次化疗时间	0.068	1.45	0.150	1.33	0.60	1.67
止痛药应用	＜ 0.001	2.43	0.005	1.79	0.79	1.26

心呕吐（100.0%），体表面积（96.5%），化疗方案致吐风险等级（96.3%）重要性较高。女性患者的独立危险因素中，化疗方案致吐风险等级（100.0%），化疗前 24 h 恶心呕吐（78.3%），紧张焦虑情绪（58.8%）重要性较高。详见表 6。

3 讨论

3.1 研究设计

本文研究 CINV 危险因素的性别差异，采用回顾性病例对照研究，收集某院近 5 年化疗患者的病历资料，将所有可能与 CINV 相关的资料进行统计汇总，以 CINV 的发生与否为终点，分为男性组和女性组，采用多因素 Logistic 回归来控制混杂因素的影响，将不同性别的危险因素进行对比分析，使用神经网络预测各危险因素的重要性。结果表明不同性别患者 CINV 的危险因素有所差异，胃肠道疾病史、手术史、电解质紊乱、化疗前 24 h 恶心呕吐、化疗呕吐史、化疗方案致吐风险等级对于男女均为独立危险因素，这与多个研究的结果一致 [6-7]。某些因素只对特定性别有所影响，如体表面积大小、使用阿片类药物、是否首次化疗对男性 CINV 的发生有影响，化疗前的紧张焦虑情绪对女性 CINV 的发生有影响。

本次研究采用多种方法控制偏倚，通过排除不完整病历来排除因残缺项而导致的数据偏倚。依据 CSCO 指南选择帕洛诺司琼联合地塞米松作为预防止吐方案，以排除因药物不同而造成的偏倚。Logistic 回归模型对于样本量有一定的要求，通常要求阳性样本量为纳入因素的 15 ～ 20 倍，为了优化模型，采用单因素分析、逐步回归的方法对所统计的变量进行筛选。将单因素分析的 *P* 值阈值设定为 0.2，以防止误删某些可能的影响因素。筛选后两组分别纳入 8 项、11 项因素，样本量可以满足要求。

神经网络是一种新的预测结果的方法，在预测性能上与 Logistic 回归相似 [8]，神经网络预测能以影响因素的重要性和标准化重要性（影响因素重要性指标值除以该因素最大值）来评价影响因素的贡献度大小 [9-10]。

3.2 结果分析

化疗剂量通常根据患者的体表面积计算所得 [11]，化疗剂量与临床疗效和毒性之间存在关联，但目前对于体表面积较大者是否应调整剂量尚有争议。Schwartz 等 [12] 研究认为，使用紫杉醇治疗妇科肿瘤体表面积＞ 2 m^2 时无须减量，接受全剂量不会出现过度的毒性。Lyman 等 [13]研究认为体表面积较大的患者接受全剂量化疗不会承受更大的毒性，接受低剂量化疗会导致复发率和相关死亡率的增加。但 Furlanetto 等 [14] 研究认为体表面积＞ 2 m^2 时根据实际体表面积接受足量化疗的患者发生严重毒性反应的风险较高。本研究结果显示，男性患者的体表面积是 CINV 的独立危险因素，体表面积越大发生 CINV 概率越高。本次入

表 3　男性多因素 Logistic 回归结果

Tab 3　Multivariate Logistic regression results for men

影响因素	*B*	标准误差	*Wald*	*P*	*OR*	95%*CI*	
						下限	上限
体表面积	1.74	0.77	5.05	0.025	5.69	1.25	25.92
胃肠道疾病史	0.96	0.27	12.42	＜ 0.001	2.62	1.53	4.47
高血压史	0.42	0.25	2.73	0.098	1.52	0.93	2.49
手术史	0.54	0.24	5.02	0.025	1.72	1.07	2.77
确诊时间	－ 0.44	0.25	3.11	0.078	0.64	0.40	1.05
电解质	0.65	0.25	7.06	0.008	1.92	1.19	3.12
化疗前 24 h 恶心呕吐	3.13	1.08	8.38	0.004	22.78	2.74	189.12
首次化疗	0.74	0.31	5.72	0.017	2.10	1.14	3.84
化疗呕吐史	1.21	0.27	19.41	＜ 0.001	3.34	1.95	5.71
化疗方案致吐风险等级	0.95	0.20	22.87	＜ 0.001	2.58	1.75	3.81
止痛药应用	0.86	0.24	12.41	＜ 0.001	2.37	1.47	3.83
常量	－ 7.35	1.54	22.83	＜ 0.001	0.01		

表 4　女性多因素 Logistic 回归结果

Tab 4　Multivariate Logistic regression results for women

影响因素	*B*	标准误差	*Wald*	*P*	*OR*	95%*CI*	
						下限	上限
营养情况	0.87	0.48	3.31	0.069	2.40	0.93	6.14
胃肠道疾病史	0.92	0.28	10.53	0.001	2.50	1.44	4.36
手术史	0.57	0.24	5.64	0.018	1.78	1.11	2.85
电解质	1.03	0.26	15.60	＜ 0.001	2.80	1.68	4.68
紧张焦虑情绪	1.27	0.51	6.18	0.013	3.54	1.31	9.61
化疗前 24 h 恶心呕吐	2.00	0.55	13.20	＜ 0.001	7.42	2.52	21.85
化疗呕吐史	0.58	0.24	6.02	0.014	1.78	1.12	2.83
化疗方案致吐风险等级	1.14	0.17	42.67	＜ 0.001	3.13	2.22	4.41
常量	－ 3.91	0.49	63.29	＜ 0.001	0.02		

表 5　性别对 CINV 的影响

Tab 5　Effect of gender on CINV

因素	*B*	标准误差	*Wald*	*P*	*OR*	95%*CI*	
						下限	上限
单因素	0.64	0.14	21.37	＜ 0.001	1.89	1.45	2.48
多因素	0.52	0.20	6.67	0.010	1.68	1.13	2.48

表 6　不同性别危险因素重要性

Tab 6　Importance of risk factors for different genders

危险因素	男		女	
	重要性	标准化重要性	重要性	标准化重要性
体表面积	0.176	96.5%	—	—
胃肠道疾病史	0.104	56.9%	0.074	29.5%
手术史	0.038	21.0%	0.042	16.5%
电解质	0.047	26.0%	0.084	33.1%
紧张焦虑情绪	—	—	0.149	58.8%
化疗前 24 h 恶心呕吐	0.182	100.0%	0.198	78.3%
首次化疗	0.091	49.8%	—	—
化疗呕吐史	0.084	46.0%	0.070	27.9%
化疗方案致吐风险等级	0.175	96.3%	0.253	100.0%
止痛药应用	0.063	34.4%	—	—

选患者的化疗剂量是根据体表面积计算所得，而在男性患者中体表面积＞ 2 m^2 的较女性更多，男性 CINV 与体表面积相关性更强可能与此有关。

阿片类药物的效果存在性别差异，对于女性具有更强的镇痛作用 [15]，相对于男性较小的剂量即可达到镇痛效果。目前已证实阿片类药物是引起术后恶心呕吐的主要原因 [16]，多项研究表明，帕洛诺司琼用于预防术后恶心呕吐时，高剂量效果优于低剂量 [16-18]，帕洛诺司琼的血药浓度越大，对于阿片类药物引起的恶心呕吐的效果越好。而对于 CINV 的预防均采用静脉滴注 0.25 mg 帕洛诺司琼，男性较女性体质量大，因此在使用相同剂量的帕洛诺司琼时体内药物浓度低于女性，同时男性使用阿片类药物的剂量大于女性，这可能是男性 CINV 的发生与阿片类药物相关性更强的原因。

化疗前紧张焦虑情绪是一种心理因素，即对化疗有一种畏惧心理，甚至想放弃治疗。Di 等 [19] 研究发现妇科肿瘤中 CINV 的发生与焦虑水平关系密切，焦虑状态会增加 CINV 的风险。Yap 等 [20] 研究显示医师可用焦虑程度作为 CINV 的预测指标。肿瘤的确诊会对患者的心理造成冲击，男性患者高发肺癌和胃癌，确诊时多见于中晚期，而女性多见于妇科肿瘤，确诊时中晚期较少，有研究显示，女性患者肿瘤的宣布确诊与 CINV 发作之间没有关系 [21]。因此肿瘤确诊可能对男性造成的心理压力更大。这可能导致男性首次化疗时更为焦虑紧张，从而使男性首次化疗的 CINV 较高，矫正了首次化疗的因素后，紧张焦虑对于 CINV

的影响无统计学意义。对于女性患者，化疗前紧张焦虑情绪是 CINV 发生的独立危险因素。

3.3 不足与改进

本次研究存在一定的不足。在研究中，无法做到将所有与 CINV 可能相关的因素全部纳入分析，例如本次研究未统计女性患者孕吐史，原因是病历中未记载。因未发现阳性样本，晕动症史也未纳入分析。本次研究的变量以二分类为主，在资料统计归类时，可能会出现因分组不够细致而导致的信息缺失，这可能导致某些影响因素被忽视。紧张焦虑方面的数据源于病历中医师对于有焦虑倾向的患者进行的量表评分记录，并非所有患者都进行了量表评分，这可能导致一定的偏倚。本次研究为回顾性病例对照研究，仅可说明影响因素与结果存在相关性，并不能证明其存在因果关系，仍需前瞻性试验对结果进行验证。

4 结论

性别对于 CINV 的发生有一定的影响，不同性别患者的危险因素有所不同。体表面积更大、使用阿片类药物、首次化疗的男性更容易发生 CINV；存在紧张焦虑情绪的女性更容易发生 CINV。

参考文献

[1] 上海市抗癌协会癌症康复与姑息专业委员会 . 化疗所致恶心呕吐全程管理上海专家共识（2018 年版）[J]. 中国癌症杂志，2018，28（12）：946-960.

[2] Tsuji D，Suzuki K，Kawasaki Y，et al. Risk factors associated with chemotherapy-induced nausea and vomiting in the triplet antiemetic regimen including palonosetron or granisetron for cisplatin-based chemotherapy：analysis of a randomized，double-blind controlled trial [J]. Support Care Cancer，2019，27（3）：1139-1147.

[3] Sekine I，Segawa Y，Kubota K，et al. Risk factors of chemotherapy-induced nausea and vomiting：index for personalized antiemetic prophylaxis [J]. Cancer Sci，2013，104（6）：711-717.

[4] Mosa ASM，Hossain AM，Lavoie BJ，et al. Patient-related risk factors for chemotherapy-induced nausea and vomiting：a systematic review [J]. Front Pharmacol，2020，11：329.

[5] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会，中国临床肿瘤学会（CSCO）. 抗肿瘤治疗相关恶心呕吐预防和治疗指南 [M]. 北京：人民卫生出版社，2019：11，81.

[6] Rittmeister H，Oskay-Özcelik G，Richter R，et al. Development of a questionnaire for monitoring risk factors for chemotherapy-induced nausea and vomiting-a NOGGO pilot study [J]. Anticancer Res，2018，38（8）：4859-4864.

[7] Pirri C，Katris P，Trotter J，et al. Risk factors at pretreatment predicting treatment-induced nausea and vomiting in Australian cancer patients：a prospective，longitudinal，observational study [J]. Support Care Cancer，2011，19（10）：1549-1563.

[8] Rezaeian A，Rezaeian M，Khatami SF，et al. Prediction of mortality of premature neonates using neural network and logistic regression [J]. J Ambient Intell Humaniz Comput，2021，13（3）：3.

[9] 郭正军，娄丽娟，王玉杰，等 . 基于 BP 神经网络模型的河南省严重精神障碍患者服药依从性影响因素分析 [J]. 郑州大学学报（医学版），2020，55（5）：689-693.

[10] Sutradhar R，Barbera L. Comparing an artificial neural network to Logistic regression for predicting ED visit risk among patients with cancer：a population-based cohort study [J]. J Pain Symptom Manage，2020，60（1）：1-9.

[11] Kaestner SA，Sewell GJ. Chemotherapy dosing part I：scientific basis for current practice and use of body surface area [J]. Clin Oncol（R Coll Radiol），2007，19（1）：23-37.

[12] Schwartz J，Toste B，Dizon DS. Chemotherapy toxicity in gynecologic cancer patients with a body surface area（BSA）＞ 2 m^2 [J]. Gynecol Oncol，2009，114（1）：53-56.

[13] Lyman GH，Sparreboom A. Chemotherapy dosing in overweight and obese patients with cancer [J]. Nat Rev Clin Oncol，2013，10（8）：451-459.

[14] Furlanetto J，Eiermann W，Marmé F，et al. Higher rate of severe toxicities in obese patients receiving dose-dense（dd）chemotherapy according to unadjusted body surface area：results of the prospectively randomized GAIN study [J]. Ann Oncol，2016，27（11）：2053-2059.

[15] Fillingim RB，Gear RW. Sex differences in opioid analgesia：clinical and experimental findings [J]. Eur J Pain，2004，8（5）：413-425.

[16] 王鹏，易红，李雪，等 . 帕洛诺司琼预防术后恶心呕吐的有效性与安全性的系统评价 [J]. 中国医院用药评价与分析，2020，20（11）：1365-1369，1373.

[17] Jain D，Jain K，Bala I，et al. Evaluation of weight-adjusted doses of palonosetron for prevention of postoperative nausea and vomiting in day care laparoscopic gynaecological surgery：a dose ranging，randomised controlled trial [J]. Eur J Anaesthesiol，2016，33（2）：104-109.

[18] Kovac AL，Eberhart L，Kotarski J，et al. A randomized，double-blind study to evaluate the efficacy and safety of three different doses of palonosetron versus placebo in preventing postoperative nausea and vomiting over a 72-hour period [J]. Anesth Analg，2008，107（2）：439-444.

[19] Di Mattei VE，Carnelli L，Carrara L，et al. Chemotherapy-induced nausea and vomiting in women with gynecological cancer：a preliminary single-center study investigating medical and psychosocial risk factors [J]. Cancer Nurs，2016，39（6）：E52-E59.

[20] Yap KY，Low XH，Chui WK，et al. Onco-Informatics Group. Computational prediction of state anxiety in Asian patients with cancer susceptible to chemotherapy-induced nausea and vomiting [J]. J Clin Psychopharmacol，2012，32（2）：207-217.

[21] Vanbockstael J，Coquan E，Gouerant S，et al. How to improve the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting? the French NAVI study [J]. Support Care Cancer，2016，24（3）：1131-1138.

（收稿日期：2021-09-05；修回日期：2021-11-06）

基于文献计量学和可视化技术分析恩格列净在心血管疾病方面的研究现状及发展趋势

赵福坤[1]，唐飞[2]，罗敏[1]，王远敏[1]，李美燕[1]，苏穆[1]，陈欢[1*]（1. 遵义市第一人民医院（遵义医科大学第三附属医院）临床药学部，贵州 遵义 563000；2. 绥阳县中医医院疼痛科，贵州 遵义 563304）

摘要：目的 探讨恩格列净在心血管疾病方面的研究现状及发展趋势。**方法** 检索 2010 年 1 月 1 日至 2021 年 7 月 1 日 Web of Science 数据库关于恩格列净在心血管疾病方面研究的英文文献，用计量学方法对文献进行可视化分析。**结果** 共纳入 1616 篇文献，全球关于恩格列净在心血管疾病方面的研究呈逐年增长趋势，2016 年开始迅速增长。美国发文量、被引频次及总联系强度均明显高于其他国家。相关研究热词主要是 heart failure、cardiovascular disease、blood pressure、cardiovascular outcomes、chronic kidney disease and diabetic kidney diseases 等。**结论** 根据目前趋势，关于恩格列净在心血管疾病方面研究的发表量将会增加，美国是该领域最大的贡献者，“heart failure”为目前恩格列净在心血管疾病方面的主要研究热点，未来的研究热点可能主要集中在该药对动脉粥样硬化、心肌梗死、心房颤动等疾病的获益情况及作用机制上。

关键词：恩格列净；2 型糖尿病；SGLT2i；心血管保护；心力衰竭
中图分类号：R289.5 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)05-1183-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.038

Current status and research progress in empagliflozin for cardiovascular diseases based on bibliometrics and visualization technology

ZHAO Fu-kun[1], TANG Fei[2], LUO Min[1], WANG Yuan-min[1], LI Mei-yan[1], SU Mu[1], CHEN Huan[1*] (1. *Department of Clinical Pharmacy*, *Zunyi First People's Hospital*, *The Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University*, *Zunyi Guizhou* 563000; 2. *Department of Pain*, *Suiyang County Hospital of Traditional Chinese Medicine*, *Zunyi Guizhou* 563304)

Abstract: Objective To determine status and research progress in empagliflozin for cardiovascular diseases. **Methods** English literatures on empagliflozin for cardiovascular diseases in the Web of Science database from January 1st, 2010 to July 1st, 2021 were retrieved and visually analyzed with metrological methods. **Results** Totally 1616 articles were included. The global publication on empagliflozin for cardiovascular diseases increased year by year, with a rapid increase since 2016. The number of publications, citation frequency and total association of the United States were obviously higher than those of other countries. The hot words mainly included heart failure, cardiovascular disease, blood pressure, cardiovascular outcomes, chronic kidney disease and diabetic kidney diseases, etc. **Conclusion** There will be an increase in the publication of empagliflozin for cardiovascular diseases, with the United States being the largest contributor. “Heart failure” is the research hotspot of empagliflozin for cardiovascular diseases currently, and the future research hotspot may focus on its benefits and mechanism for atherosclerosis, myocardial infarction and atrial fibrillation.

Key words: empagliflozin; type 2 diabetes; SGLT2i; cardiovascular protection; heart failure

作者简介：赵福坤，女，硕士，主要从事心血管方面的工作，email：871484776@qq.com *通信作者：陈欢，女，硕士，主要从事抗感染方面的工作，email：812526064@qq.com

心血管疾病（CVD）严重威胁人类健康，大量研究表明，糖尿病是 CVD 的独立危险因素，而 CVD 是 2 型糖尿病（T2DM）患者发病和死亡的主要原因。传统降糖药物如双胍类、磺脲类、格列奈类、噻唑烷二酮类在单独或联合治疗中都能有效降低血糖水平，但其并不能减少不良心血管事件 [1]，甚至可能增加发生 CVD 的风险 [2]。因此，2008 年开始美国食品药品监督管理局规定对所有新型降糖药，均需评估其心血管安全性 [3]。在评估最新一类糖尿病药物钠 - 葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂（SGLT-2i）心血管安全性的研究中发现，该类药物在降低血糖水平的同时兼具良好的心血管保护作用，可以减少主要不良心血管事件 [4-5]。目前在中国上市的 SGLT2i 有恩格列净、达格列净和卡格列净。研究显示，在伴有动脉粥样硬化性 CVD 的 T2DM 患者中，恩格列净和卡格列净可降低动脉粥样硬化性 CVD 并发症发生率和死亡率 [4-5]，但初步分析显示达格列净可能不会减少动脉粥样硬化性 CVD 并发症发生率和死亡率 [6]。且卡格列净治疗的患者中，下肢截肢和骨折的风险增加 [7-10]，而在恩格列净的试验中没有观察到这些风险 [11-12]。

文献计量学是对文献的计量学特点进行量化，展示某一领域的发展现状，对比不同国家、机构、期刊、学者间的学术贡献 [13]，进而展示全球的研究现状和预测未来的发展趋势 [14]。可视化技术能直观展示研究领域某些具体信息。基于此，笔者采用文献计量学和可视化技术分析恩格列净自上市后在心血管保护作用方面的研究现状及趋势，为临床合理用药选择及今后研究方向提供参考。

1 材料与方法

1.1 数据来源

本研究采用 Web of Science（WOS）核心合集数据库 [12]，收集关于恩格列净在 CVD 方面的文献，时间范围为 2010 年 1 月 1 日—2021 年 7 月 1 日，语言不限。检索式为：输入“empagliflozin”及其自由词，检索结果保存为“#1”，输入“cardiovascular disease”及其自由词，检索结果保存为“#2”，用“or”链接自由词，用“AND”连接“#1”和“#2”，纳入文献类型为“ARTICLE 和 REVIEW”，得出最终的检索结果。由两名作者独立整理提取数据，若存在分歧由第三名作者加入讨论达成共识。

1.2 文献计量学分析

导出检索文献的全记录及参考文献，导出格式为 Excel 和纯文本，采用 Co-Occurrence 9.9（COOC9.9）对作者关键词进行同义词合并，并进行频次统计，使用文献计量工具 Bibexcel 提取题录字段信息，包括年代及发文量、国家、期刊等，并记录其发文量及被引总频次。

1.3 可视化分析

将同义词合并后的纯文本导入 VOS viewer（1.6.16）软件（https：//www.vosviewer.com/download.）进行文献耦合及关键词共现分析 [15]。

2 结果

2.1 文献检索结果

最终获得相关文献 1616 篇，涉及 81 个国家 / 地区，446 份期刊，3061 个机构，8807 位作者。

2.2 关于恩格列净在 CVD 方面的研究现状

2013 年开始恩格列净在 CVD 方面的年发文量呈逐年上升态势，2016 年开始增长迅速（见图 1）。国家以美国发文量及被引频次最多，机构以多伦多大学发文量及被引频次最多，期刊 *Diabetes Obesity & Metabolism* 发文量最多，作者以 Zinman Bernard 发文量（55 篇）最多，而 Broedl Uli C 相关文献的被引频次（9809 次）最高；中国总发文量（151 篇）排第 7 位，被引总频次（11 408 次）排第 9 位，其中北京大学在该领域的研究较多，发文量为 19 篇，排第 42 位，被引频次（2006 次）排第 29 位。相关文献发表量及被引频次排名前 5 的国家 / 地区、机构、期刊、作者见表 1。

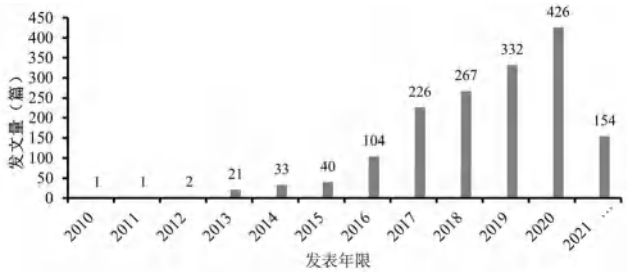


图 1 恩格列净在 CVD 方面的发文量（2010 年 1 月—2021 年 7 月）

Fig 1 Number publications of empagliflozin in CVD disease（January 2010—July 2021）

2.3 文献耦合分析

2.3.1 国家 / 地区的文献耦合分析 纳入标准：① 国家 / 地区最少出版相关文献 5 篇，出版相关文献被引用至少 50 次；② 排除标准：文献中共同作者超过 25 位 [16]。81 个国家 / 地区中，最终纳入 47 个国家 / 地区，其中总联系强度排前 5 位的国家分别是美国（3 027 742）、德国（1 439 519）、英国（1 109 144）、加拿大（1 043 144）及日本

表 1　相关文献发表量及被引频次排名前 5 的国家 / 地区、机构、期刊和作者

Tab 1　Top 5 countries/regions，institutions，journals and authors in terms of published and cited literatures

排名	国家 / 地区		机构		期刊		作者	
	发表量	被引频次	发表量	被引频次	发表量	被引频次	发表量	被引频次
1	美国	美国	多伦多大学	多伦多大学	*Diabetes Obesity & Metabolism*	*New England Journal Of Medicine*	Zinman Bernard	Broedl Uli C.
2	德国	英国	勃林格殷格翰制药两合公司	勃林格殷格翰制药两合公司	*Cardiovascular Diabetology*	*Diabetes Obesity & Metabolism*	Wanner Christoph	Woerle Hans J.
3	英国	加拿大	哈佛大学医学院	耶鲁大学	*Diabetes Therapy*	*Circulation*	Inzucchi Silvio E.	Zinman Bernard
4	加拿大	德国	格罗宁根大学	勃林格殷格翰制药公司	*Diabetes Care*	*Diabetes Care*	Broedl Uli C.	Inzucchi Silvio E.
5	日本	荷兰	哈佛大学医学院附属布列根和妇女医院	格罗宁根大学	*Circulation*	*Lancet Diabetes & Endocrinology*	Woerle Hans J.	Zinman B.

（983 094），中国排第 7 位（658 073）。相互间联系强度最大的是美国和德国（332 980），其次是美国和英国（261 866）、美国与加拿大（246 499）、美国与日本（233 656）等，美国与中国的总联系强度排第 6 位（155 047）（见图 2）。

2.3.2　机构的文献耦合分析　纳入标准：① 纳入机构至少发表 10 篇相关文献，文献至少被引用了 50 次；② 排除标准：文献中的共同作者超过 25 位[16]。3061 个机构中，共纳入了 89 个机构，其中总联系强度排前 5 位的机构分别是：Univ of Toronto（516 583）、Harvard Medical School（300 717）、Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. Kg（289 074）、University of Groningen（272 128）、Brigham & Womens Hospital（232 834）。相互之间联系强度排前 5 位的机构分别是：Univ of Toronto 和 Harvard Medical School（21 612）、Univ of Toronto 和 University of Groningen（19 076）、Univ of Toronto 和 Boehringer Ingelheim Pharma Gmbh & Co. Kg（19 073）、Univ of Toronto 和 Brigham & Womens Hospital（16 554）、Univ of Toronto 和 Univ of Texas South Western Med Ctr，Dallas（15 827）（见图 3）。

2.4　共现分析

2.4.1　研究现状　从 1815 个关键词中提取出现频次在 10 次以上的关键词 75 个进行共现分析，其球体越大表明出现频次越高，出现频次排前 5 位的关键词是 type 2 diabetes（539 次）、empagliflozin（357 次）、heart failure（240 次）、dapagiflozin（150 次）、cardiovascular disease（138 次）。图 4A 中，不同的颜色展示不同的研究方向：红色主要展示 2 型糖尿病治疗药物的相关研究，其中出现频次较多的关键词是 type 2 diabetes（437 次）、metformin（48 次）、GLP-1 receptor agonists（42 次）、antidiabetic drug（37 次）、DPP-4 inhibitors（34 次）；绿色主要展示 2 型糖尿病并发症的相关研究，其中关键词出现频次较多的是 heart failure（240 次）、cardiovascular disease（138 次）、chronic kidney disease（83 次）、diabetic kidney disease（78 次）、blood pressure（47 次）；蓝色主要展示 SGLT2i 一类药物的相关研究，其中关键词出现频次较多的是 empagliflozin（357 次）、dapagiflozin（150 次）、canagliflozin（141 次）、cardiovascular outcomes（79 次）、ertugliflozin（23 次）。

2.4.2　研究热点的演变　文章整理了 2010 年 1 月至 2021 年 7 月的研究热点，见图 4B，图中右下角有一颜色从深紫到浅黄排列的刻度线，圆圈的颜色越深说明关键词越出现在研究早期，越浅则说明越接近当前的研究热点。从图中可以看出恩格列净在血糖控制及安全性的相关研究主要出现在早期，在 2 型糖尿病方面的相关研究大多出现在中期，而在 CVD 及肾病方面的相关研究为当下的研究热点，其研究热词主要包含了 heart failure、cardiovascular disease、cardiovascular outcomes、chronic kidney disease、diabetic kidney disease、atherosclerosis、albuminuria、inflammation、oxidative stress、myocardial infarction、atrial fibrillation 等。

3　讨论

3.1　恩格列净在 CVD 方面研究的全球发展情况

恩格列净在 CVD 方面的研究从 2013 年开始全球的年发文量呈逐年上升态势，2016 年较 2015 年增长了 55 篇，增长率达 112.2%，2017 年较 2016 年增长了 122 篇，增长率高达 117.3%。整体分析，2016—2020 年的增长速度明显高于 2010—2015 年，这表明自 2015 年 EMPA-REGOUTCOME 试验[5] 发现恩格列净可降低心血管不良事件、改善心血管预后、降低全因死亡后，该药的心血管

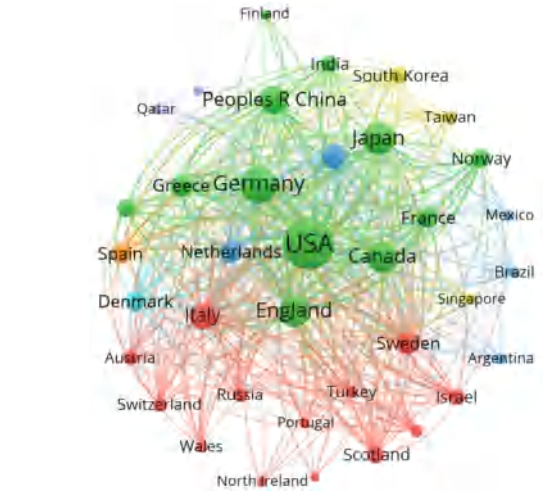


图 2 恩格列净在 CVD 方面的国家 / 地区的文献耦合分析

Fig 2 Coupling analysis of publications on empagliflozin for cardiovascular diseases by country/regional

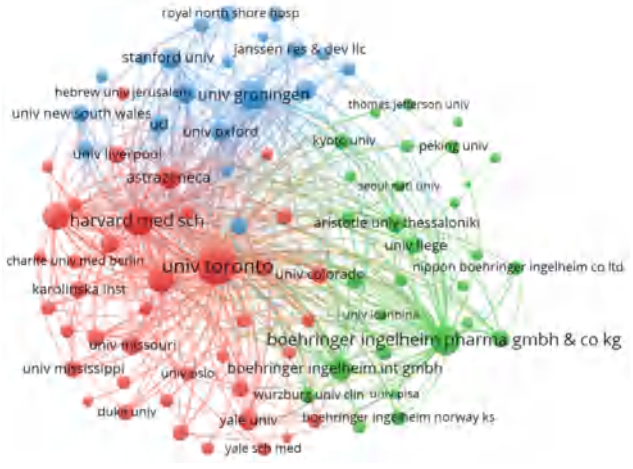


图 3 恩格列净在 CVD 方面的机构的文献耦合分析

Fig 3 Coupling analysis of the organizations of empagliflozin in cardiovascular disease

保护作用开始受到关注，这也是该领域的发文量于 2016 年开始迅速增长的主要原因。

美国发文量及被引频次明显领先其他国家 / 地区，表明其在该领域处于核心地位；中国在该领域的发文量及被引频次均处于前 10 位，这表明相关研究在中国也得到一定的重视和关注。从发文期刊来看，*Diabetes Obesity & Metabolism* 可能是该领域的热门期刊。发文量排名前 5 位的作者 Zinman Bernard、Wanner Christoph、Inzucchi Silvio E、Broedl Uli C、Woerle Hans J，其被引频次也靠前，推测以上作者可能是该领域的权威专家。文献耦和分析发现，德国、英国、加拿大、荷兰以及中国与美国之间的合作较紧密，而多伦多大学在恩格列净对 CVD 方面的研究居首要地位，其与哈佛大学、格罗宁根大学、勃林格殷格翰制药两合公司之间的合作密切。

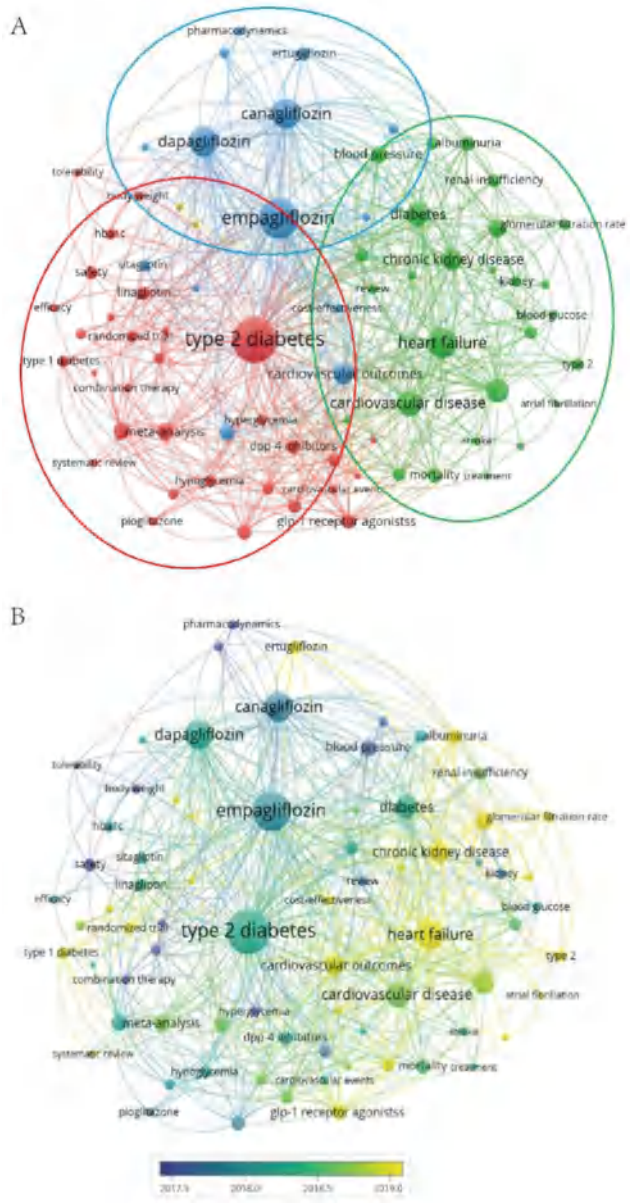


图 4 恩格列净在 CVD 方面研究的研究现状（A）和研究热点（B）（2010 年 1 月—2021 年 7 月）

Fig 4 Status（A）and hotspot（B）of research on empagliflozin for cardiovascular diseases（January 2010—July 2021）

3.2 恩格列净在 CVD 方面的研究热点

关键词出现频次最多的是“type 2 diabetes”，其次是“empagliflozin”，这可能与该药的适应证有关。而 CVD 中出现频次最多的是“heart failure”，其次是 cardiovascular outcomes、atherosclerosis、myocardial infarction、atrial fibrillation、inflammation、oxidative stress 等，且以上关键词的球体为黄色，是该领域近两年的研究热点。EMPEROR-Reduced 研究表明，对于射血分数降低的慢性心力衰竭患者，无论有无糖尿病，恩格列净均可显著降低心血管死亡与因心力衰竭住院复合终点事件风险 25%[17]；EMPEROR-Preserved 研究亦表明恩格列净可使射血分

数保留的心力衰竭患者心血管死亡或因心力衰竭住院的复合风险显著降低[18]，但具体数据目前还未公布。以上 2 项研究证实了恩格列净在各种类型心力衰竭患者中的疗效。EMPA-REGOUTCOME 研究还表明在伴显性 CVD 的 2 型糖尿病患者中，恩格列净可降低动脉粥样硬化性心血管并发症发生率和病死率[5]；动物实验显示，恩格列净可以通过影响动脉粥样硬化危险因素除血糖外的其他危险因素（如血压、体质量、脂质代谢紊乱）来改善小鼠的动脉粥样硬化[19-21]。此外，Oshima 等[22]的研究探索了恩格列净对心肌梗死后糖尿病大鼠病死率的影响，在心肌梗死面积相当的前提下，恩格列净可使糖尿病大鼠的生存率由原来的 40% 提升至 70%。因此，恩格列净可明显改善 2 型糖尿病患者的 CVD 预后，对于 2 型糖尿病合并心力衰竭的患者，尤其是射血分数下降的患者，恩格列净是不错的选择，对于伴动脉粥样硬化性 CVD 的 2 型糖尿病患者也可选择恩格列净作降糖治疗。然而，对于恩格列净在心肌梗死和心房颤动的获益上目前还主要停留在小型的临床试验和动物实验上，希望今后有更多的大型临床试验能证实该药在心肌梗死及心房颤动上的获益情况，以期为临床提供用药依据。此外，目前对于恩格列净在 CVD 获益方面的机制研究较少，相关学者今后可多关注该药在 CVD 获益方面的作用机制，为临床合理用药提供更多的理论依据。

3.3 不足及展望

本研究对比了不同国家、机构、作者及期刊的出版情况，研究相关文献随时间的发表情况，运用可视化技术对收集的文献进行耦合分析和共现分析，较直观科学地呈现了相关研究热点。然而，缺乏对比不同基金的出版情况及国家 / 地区的 H 指数来评估各国发表该领域文章的学术影响力情况。预测未来恩格列净在 CVD 方面的研究会继续增加，相关研究可能会集中在恩格列净对心肾获益的作用机制及临床研究上。

参考文献

[1] Zhu JH，Yu XX，Zheng YY，et al. Association of glucose-lowering medications with cardiovascular outcomes：an umbrella review and evidence map [J]. Lancet Diabetes Endocrinol，2020，8（3）：192-205.

[2] Douros A，Dell’Aniello S，Yu OHY，et al. Sulfonylureas as second line drugs in type 2 diabetes and the risk of cardiovascular and hypoglycaemic events：population based cohort study [J]. BMJ，2018，362：k2693.

[3] Schnell O，Standl E，Catrinoiu D，et al. Report from the 1st cardiovascular outcome trial（CVOT）summit of the diabetes & cardiovascular disease（D&CVD）EASD study group [J]. Cardiovasc Diabetol，2016，15：33.

[4] Wiviott SD，Raz I，Bonaca MP，et al. Dapagliflozin and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes [J]. N Engl J Med，2019，380：347.

[5] Zinman B，Wanner C，Lachin JM，et al. Empagliflozin，cardiovascular outcomes，and mortality in type 2 diabetes [J]. N Engl J Med，2015，373：2117.

[6] Neal B，Perkovic V，Mahaffey KW，et al. Canagliflozin and cardiovascular and renal events in type 2 diabetes [J]. N Engl J Med，2017，377：644.

[7] IMS Health：Total Patient Tracker（TPT）. July 2014 through June 2015. Extracted August 2015. File：DATA 2015-Canagliflozin DSC. http：//www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm461449.htm（Accessed on September 14，2015）.

[8] Watts NB，Bilezikian JP，Usiskin K，et al. Effects of canagliflozin on fracture risk in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. J Clin Endocrinol Metab，2016，101（1）：157-166.

[9] Tang HL，Li DD，Zhang JJ，et al. Lack of evidence for a harmful effect of sodium-glucose co-transporter 2（SGLT2）inhibitors on fracture risk among type 2 diabetes patients：a network and cumulative meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Diabetes Obes Metab，2016，18（12）：1199-1206.

[10] Ueda P，Svanström H，Melbye M，et al. Sodium glucose cotransporter 2 inhibitors and risk of serious adverse events：nationwide register based cohort study [J]. BMJ 2018，363：k4365.

[11] Chang HY，Singh S，Mansour O，et al. Association between sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors and lower extremity amputation among patients with type 2 diabetes [J]. JAMA Intern Med，2018，178（9）：1190-1198.

[12] Inzucchi SE，Iliev H，Pfarr E，et al. Empagliflozin and assessment of lower-limb amputations in the EMPA-REGOUTCOME trial [J]. Diabetes Care，2018，41（1）：e4-e5.

[13] Pu QH，Lyu QJ，Su HY. Bibliometric analysis of scientific publications in transplantation journals from Mainland China，Japan，South Korea and Taiwan between 2006 and 2015 [J]. BMJ Open，2016，6（8）：e11623.

[14] Xing D，Zhao Y，Dong S，et al. Global research trends in stem cells for osteoarthritis：a bibliometric and visualized study [J]. Int J Rheum Dis，2018，21（7）：1372-1384.

[15] Catal B，Akman YE，Sukur E，et al. Worldwide arthroplasty research productivity and contribution of Turkey [J]. Acta Orthop Traumatol Turc，2018，52（5）：376，381.

[16] 陈立新，何晓铭，龚水帝，等 . 基于文献计量学和可视化技术分析髋关节置换术治疗股骨颈骨折的全球研究现状及趋势 [J]. 中国老年学志，2019，39（11）：2673-2677.

[17] Packer M，Anker SD，Butler J，et al. Cardiovascular and renal outcomes with empagliflozin in heart failure [J]. N Engl J Med，2020，383（5）：1413-1424.

[18] Ingelheim B. Empagliflozin outcome trial in patients with chronic heart failure with preserved ejection fraction（emperor-preserved）[EB/OL].（2017-02-20）[2018-12-21]. https：//clinicaltrials. Gov/ct2/show/NCT03057951.
[19] Dimitriadis GK，Nasiri-Ansari N，Agrogiannis G，et al. Empagliflozin improves primary haemodynamic parameters and attenuates the development of atherosclerosis in high fat diet fed APOE knockout mice [J]. Mol Cell Endocrinol，2019，494：110487.
[20] Ganbaatar B，Fukuda D，Shinohara M，et al. Empagliflozin ameliorates endothelial dysfunction and suppresses atherogenesis in diabetic apolipoprotein E-defcient mice [J]. Eur J Pharmacol，2020，875：173040.
[21] Han JH，Oh TJ，Lee G，et al. The benefcial effects of empagliflozin，an SGLT2 inhibitor，on atherosclerosis in ApoE$^{-/-}$ mice fed a western diet [J]. Diabetologia，2017，60（2）：364-376.
[22] Oshima H，Miki T，Kuno A，et al. Empagliflozin，an SGLT2 inhibitor，reduced the mortality rate after acute myocardial infarction with modification of cardiac metabolomes and antioxidants in diabetic rats [J]. J Pharmacol Exp Ther，2019，368（3）：524-534.

（收稿日期：2021-09-15；修回日期：2021-12-05）

26 例抗菌药物联合根治性手术治疗坏死性外耳道炎分析

王维娜，郭恒，邸宣，李哲，沈素*（首都医科大学附属北京友谊医院药学部，北京 100050）

摘要：目的 探讨抗菌药物联合根治性手术治疗坏死性外耳道炎的疗效和预后。**方法** 收集 2016—2020 年某院抗菌药物联合根治性手术治疗坏死性外耳道炎的病例，对治疗过程和复发影响因素进行分析。**结果** 共纳入 26 例患者，耳分泌物病原菌培养阳性率为 65.38%，主要为铜绿假单胞菌和葡萄球菌。经抗菌药物联合根治性手术治疗后，病情均有所缓解，9 例于术后 1 ～ 5 个月复发。**结论** 根治性手术对于保守治疗不佳的坏死性外耳道炎患者具有重要作用。药敏试验阳性率低，临床医师应结合患者临床症状、体征和检查结果等制订抗菌药物治疗方案。术后复发率高，其影响因素有待进一步研究。

关键词：坏死性外耳道炎；抗菌药物；根治性手术；复发；影响因素
中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)05-1188-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.039

Antibiotics combined with radical operation for necrotizing external otitis: a report of 26 cases

WANG Wei-na, GUO Heng, DI Xuan, LI Zhe, SHEN Su* (*Department of Pharmacy*, *Beijing Friendship Hospital*, *Capital Medical University*, *Beijing* 100050)

Abstract: Objective To determine the curative effect and prognosis of antibiotics combined with radical operation for necrotizing external otitis (NEO). **Methods** The data of necrotizing external otitis cases from 2016 to 2020 were collected, and the course of treatment and factors of recurrence were analyzed. **Results** Totally 26 patients were included in the study, 21 with diabetes mellitus. The positive rate of pathogenic bacteria culture in the ear secretions reached 65.38%, mainly *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. All patients were treated with antimicrobial agents, and otitis relieved. The NEO relapsed in 9 patients 1 — 5 months after the radical operation. **Conclusion** Radical operation plays an important role in the treatment of NEO. Due to low positive rate of drug sensitivity test, clinicians should make antibiotic treatment plan based on clinical signs and examination results. Since the

基金项目：北京市医院管理局消化内科学科协同发展中心重点项目（No. XXZ06）。
作者简介：王维娜，女，主管药师，主要从事临床药学研究，email：wweina@126.com *通信作者：沈素，女，主任药师，主要从事医院药学研究，email：shensu11022000@163.com

postoperative recurrence rate is high, the influence factors need to be verified.

Key words: necrotizing external otitis; antibiotics; radical operation; recurrence; influence factor

坏死性外耳道炎（necrotizing external otitis，NEO），是一种少见且可能危及生命的侵袭性感染性疾病，通常始发于外耳道软组织，可广泛侵及周围组织而导致患者颅底蜂窝织炎、骨髓炎、血栓性静脉炎及脑神经病变，甚至死亡[1]。NEO早期没有明显的临床症状，较难与普通外耳道炎区别，易发生误诊而延迟有效治疗，进而引起严重后果。目前关于NEO的治疗尚无指南推荐，普遍认为抗菌药物是治疗NEO的主要方法，当药物治疗无效、有死骨或脓肿形成时，可考虑手术治疗[2]。近年来，国外对NEO的研究逐渐增多，国内却少见相关报道。本研究对某院26例抗菌药物联合根治性手术治疗NEO的病例进行回顾性分析，为临床治疗NEO提供参考。

1　资料与方法

利用电子病历系统，调阅某院2016—2020年诊断为NEO，且行根治性手术治疗的患者资料。总结分析患者的基本情况、合并症、临床症状和体征、手术情况、病原菌培养和药敏结果、药物治疗、疗效和随访结果等，并探讨NEO复发的影响因素。采用SPSS 25.0软件对计量学数据进行χ^2检验。

2　结果

2.1　一般情况

共纳入26例患者，男性21例，女性5例；平均年龄（70.50±18.43）岁，最小32岁，最大93岁；合并慢性病数量≤3种的18例，＞3例的8例，构成比较高的3种合并症分别是糖尿病、高血压和冠心病，具体合并症见表1。18例患者行乳突根治术，8例行颞骨次全切除术，平均住院时间（22.35±12.40）d。根据临床分期标准[3]，Ⅰ期18例，Ⅱ～Ⅲ期8例。

表1　26例NEO患者合并症分布

Tab 1　Complications of necrotizing external otitis in 26 patients

合并症	n（%）	合并症	n（%）
糖尿病	21（80.77）	肝囊肿	4（14.29）
高血压	18（69.23）	高脂血症	3（10.71）
冠心病PCI术后	10（35.71）	低蛋白血症	3（10.71）
贫血	8（28.57）	高尿酸血症	2（7.14）
脑梗死	8（28.57）	极重度混合型聋	2（7.14）
慢性肾功能不全	6（23.08）	慢性胃炎	2（7.14）
神经性耳聋	5（17.86）	肾移植状态	1（3.57）

2.2　临床表现及检查结果

入院时临床表现为耳痛的26例，耳道流脓20例（伴流水6例，伴流血1例），听力下降18例，耳鸣和面瘫各7例，头痛6例，面部疼痛4例，走路不稳2例，发热和吞咽困难各1例。C反应蛋白（CRP）为（31.35±28.60）ng·mL^{-1}，其中表现为升高的21例。6例血沉（ESR）升高，平均值为（85.50±23.47）mm·h^{-1}。

2.3　细菌学检查结果

26例患者均送检耳道分泌物，病原菌培养阳性17例（65.38%），共培养出21株病原菌，其中铜绿假单胞菌10例，金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌各3例，利泽柠檬酸杆菌、近平滑假丝酵母菌、纹带棒状杆菌、粪肠球菌和肺炎克雷伯菌各1例。检出2种病原菌有4例，分别是金黄色葡萄球菌和肺炎克雷伯菌混合感染，近平滑假丝酵母菌和表皮葡萄球菌混合感染，金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌混合感染，以及纹带棒状杆菌和铜绿假单胞菌混合感染，其他13例均仅检出1种病原菌。

2.4　治疗情况分析

26例患者行根治性手术后，初始治疗方案为三、四代头孢9例，碳青霉烯类7例，碳青霉烯联合万古霉素6例，哌拉西林他唑巴坦3例，三代头孢联合万古霉素1例。之后根据患者病情变化、病原菌培养和药敏结果调整用药。18例患者出院后口服序贯治疗方案：二代头孢6例，左氧氟沙星4例，米诺环素3例，利奈唑胺2例，头孢地尼联合利奈唑胺2例，左氧氟沙星联合利奈唑胺1例。所有患者术后均局部使用氧氟沙星滴耳剂治疗。静脉用药疗程（17.92±11.03）d，口服用药疗程（7.65±5.52）d，总疗程（25.58±13.46）d。

2.5　疗效和安全性分析

26例患者经手术和抗菌药物治疗后，病情均有所缓解。治疗期间未出现药物不良反应。随访时间至术后1年，9例（34.62%）患者于术后1～5个月复发NEO，其中1例诊断为右外耳道鳞状细胞癌。

2.6　NEO患者术后复发影响因素分析

对复发组和未复发组患者的性别、年龄、临床分期、合并症、空腹血糖、手术类型、住院时间、经验用药、用药疗程等进行比较，差异无统计学意义，具体见表2。

表 2 26 例 NEO 患者术后复发的影响因素分析

Tab 2 Influence factors of postoperative recurrence in 26 patients

项目		复发组（n = 9）	未复发组（n = 17）	项目		复发组（n = 9）	未复发组（n = 17）
性别	男	9	12	住院时间 / 周	≤ 4	7	9
	女	0	5		＞ 4	2	8
年龄 / 岁	≤ 75	6	11	经验用药	三、四代头孢单用或联合万古霉素	4	5
	＞ 75	3	6		哌拉西林他唑巴坦或碳青霉烯单用或联合万古霉素	5	12
临床分期	1	8	10	用药疗程 / 周	≤ 4	7	8
	≥ 2	1	7		＞ 4	2	9
合并慢病数目	≤ 3	5	13	空腹血糖 /（mmol • L^{-1}）	≤ 6.1	4	5
	＞ 3	4	4		＞ 6.1	5	12
手术类型	颞骨切除	2	5	高血压		7	11
	乳突根治	7	12	贫血		2	6
糖尿病		7	14	慢性肾功能不全		1	5

3 讨论

NEO 是外耳道、颞骨和颅底的一种侵袭性感染性疾病。未确诊或部分治疗的 NEO 可能引起侧窦或颈内静脉血栓形成、脑膜炎、颞骨骨膜下脓肿和脑神经麻痹等并发症，影响患者预后 [4]。本研究中 80.77% 为糖尿病患者，外耳道血液微循环功能受损、白细胞对致病菌的免疫应答降低是导致糖尿病患者 NEO 的主要因素 [5-6]。本研究中 28.57% 的患者合并贫血，23.08% 合并慢性肾功能不全（1 例为肾移植患者）。此外，69.23% 的患者合并高血压，与其他报道相似 [7]。

本研究中患者主要临床表现为剧烈耳痛、耳漏、听力下降、头痛和面部疼痛等，与既往报道一致 [8]。颅神经麻痹是 NEO 的重要并发症，以面瘫最多见，可使病死率增加 50%[9]，本研究中 30.77% 的患者出现周围性面瘫，其炎症指标如 ESR、白细胞（WBC）和 CRP 有可能升高 [10]。ESR 和 CRP 水平与疾病转归密切相关，有助于监测抗菌药物疗效，应在治疗期间和复诊时定期监测 [11]。本研究中仅 6 例患者入院时检查了 1 ～ 2 次 ESR，均显示升高，检测率和监测频率有待提高；80.7% 的患者入院时 CRP 升高。

NEO 最常见的病原体是铜绿假单胞菌，占 50% ～ 90%，其他致病菌如奇异变形杆菌、烟曲霉、变形杆菌、克雷伯菌、葡萄球菌等也有报道 [12]，对于非糖尿病的 NEO 患者也应高度怀疑耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）等病原菌 [13]。本研究中患者耳道分泌物病原菌培养阳性率为 65.38%，检出病原体包括铜绿假单胞菌、葡萄球菌、假丝酵母菌、棒状杆菌、柠檬酸杆菌、粪肠球菌和肺炎克雷伯菌等，检出率低可能与前期局部使用抗菌药物有关。

目前对于 NEO 的治疗尚无统一指南，主要以抗菌药物治疗为主，对于进展性或严重的病例、面神经麻痹、深层组织感染或难治性 NEO（常规治疗 6 周后无临床改善），必须考虑手术治疗 [14]。手术可减少局部感染负荷，移除坏死组织，促进新组织形成，增加局部血管，使全身抗菌药物到达所需的区域 [15]。NEO 抗菌药物治疗的最佳疗程尚未可知，通常持续 4 ～ 6 周 [16]，但对于复发感染风险高的患者可能是不够的，比如那些因 MRSA 和终末期肾病而感染的患者 [17]，建议治疗超过 6 周。NEO 一般在治疗结束一年内复发，因此应在治疗后至少随访一年 [18]。本研究中患者均因前期抗菌药物治疗无法有效缓解临床症状，因此进行了根治性手术。手术切口包括Ⅲ、Ⅳ类切口，术后有感染金黄色葡萄球菌和凝固酶阴性葡萄球菌的风险。本研究中患者多为老年人、多伴糖尿病、免疫力低下，且考虑到氟喹诺酮耐药菌的增加，术后经验性用药主要为碳青霉烯类，三、四代头孢和哌拉西林他唑巴坦单药或联合万古霉素治疗，之后均根据患者病情变化、病原菌培养和药敏结果调整用药。所有患者治疗后，病情均缓解，提示根治性手术对于保守治疗效果不佳的患者具有重要作用。

本研究中高达 34.62% 的患者于术后 1 ～ 5 个月复发 NEO。文献报道的 NEO 复发率为 9% ～ 27%，低于本院复发率，可能是因为文献报道的是手术和非手术治疗患者的总体复发率。提示 NEO 手术治疗患者复发率可能更高，这可能与手术患者病情更重有关。文献报道的 NEO 复发通常与治疗疗程不足有关，还可能与合并糖尿病、颅神

经受累、CT 或 MRI 成像确定的疾病程度有关[5]。本研究中患者用药疗程超过 4 周的仅占 42.31%，疗程普遍不足，颅神经受累患者占近 33.3%。本研究对 NEO 患者术后复发的影响因素进行了初步探讨。结果显示 NEO 患者术后复发与患者的性别、年龄、临床分期、合并症、空腹血糖、手术类型、住院时间、经验用药和用药疗程无显著相关性。这可能与本研究纳入病例数较少有关。因此，NEO 复发影响因素有待进行大样本多中心的研究。

4 结论

本研究对 26 例抗菌药物联合手术治疗 NEO 的病例进行回顾性分析，结果显示根治性手术对于保守治疗效果不佳的患者具有重要作用，但复发率较高，可能与患者用药疗程不足有关，但还有待进行大规模多中心研究以进一步探讨。

参考文献

[1] Hasibi M，Ashtiani MK，Motassadi ZM，et al. A treatment protocol for management of bacterial and fungal necrotizing external otitis：a large cohort in Tehran，Iran [J]. Ann Otol Rhinol Laryngol，2017，126（7）：561-567.

[2] 李琦，莫婷婷，彭宏，等 . 颞骨骨髓炎 5 例报告 [J]. 中华耳科学杂志，2016，14（5）：660-664.

[3] Corey JP，Levandowski RA，Panwalker AP. Prognostic im-plications of therapy for necrotizing external otitis [J]. Am J Otol，1985，6（4）：353-358.

[4] Marina S，Goutham MK，Rajeshwary A，et al. A retrospective review of 14 cases of malignant otitis externa [J]. J Otol，2019，14（2）：63-66.

[5] Long DA，Koyfman A，Long B. An emergency medicine focused review of malignant otitis externa [J]. Am J Emerg Med，2020，38（2020）：1671-1678.

[6] 申卫东，刘军，候昭晖，等 . 左耳根治术后剧烈耳痛、头痛 20 余天 [J]. 中华耳科学杂志，2017，15（5）：602-609.

[7] Adegbiji WA，Aremu SK，Nwawolo CC，et al. Malignant otitis externa in developing country [J]. Clin Otorhinolaryngol，2017，1（2017）：1003.

[8] Singh J，Bhardwaj B. The role of surgical debridement in cases of refractory malignant otitis externa [J]. Indian J Otolaryngol Head Neck Surg，2018，70（4）：549-554.

[9] Stern SS，Soudry E，Hamzany Y，et al. Malignant external otitis：factors predicting patient outcomes [J]. Am J Otolaryngol，2016，37（5）：425-430.

[10] Honnurappa V，Ramdass S，Mahajan N，et al. Effective inexpensive management of necrotizing otitis externa is possible in resource-poor settings [J]. Ann Otol Rhinol Laryngo，2019，128（9）：848-854.

[11] Lee SK，Lee SA，Seon SW，et al. Analysis of prognostic factors in necrotizing external otitis [J]. Clin Exp Otorhinolaryngol，2017，10（3）：228-235.

[12] Yang TH，Xirasagar S，Cheng YF，et al. Malignant otitis externa is associated with diabetes：a population-based case-control study [J]. Ann Otol Rhinol Laryngol，2020，129（6）：585-590.

[13] Hobson CE，Moy JD，Byers KE，et al. Malignant otitis externa：evolving pathogens and implications for diagnosis and treatment [J]. Otolaryngol Head Neck Surg，2014，151（1）：112-116.

[14] Singh J，Bhardwaj B. The role of surgical debridement in cases of refractory malignant otitis externa [J]. Indian J Otolaryngol Head Neck Surg，2018，70（4）：549-554.

[15] Peled C，El-Seid S，Bahat-Dinur A，et al. Necrotizing otitis externa-analysis of 83 cases：clinical findings and course of disease [J]. Otol Neurotol，2019，40（1）：56-62.

[16] Conterno LO，da Silva Filho CR. Antibiotics for treating chronic osteomyelitis in adults [J]. Cochrane Database Syst Rev，2009，3：CD004439.

[17] Arsovic N，Radivojevic N，Jesic S，et al. Malignant otitis externa：causes for various treatment responses [J]. J Int Adv Otol，2020，16（1）：98-103.

[18] Peled C，Parra A，El-Saied S，et al. Surgery for necrotizing otitis externa-indications and surgical findings [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol，2020，277（5）：1327-1334.

（收稿日期：2021-09-16；修回日期：2021-12-05）

基于 CiteSpace 对红景天研究进展的可视化分析

刘成娟，黄盛洁，杜瑞姣，李彤，姜苗苗*（天津中医药大学组分中药国家重点实验室，天津 301617）

摘要：目的 分析红景天的研究现状及发展趋势，为进一步开展相关研究提供参考。**方法** 运用 CiteSpace 5.6.R5 软件分析 2000 年 1 月—2021 年 7 月 CNKI 和 Web of Science 核心合集数据库检索平台收录的红景天相关文献。**结果** 本研究最终纳入中文文献 3877 篇，英文文献 957 篇。作者分析结果显示，崔建华和 Skopinska-rosewska EWA 分别是中、英文红景天研究发文量最多的作者；发文机构分析结果显示，延边大学和中国科学院分别是中、英文红景天研究发文量最多的机构；中、英文关键词分析结果显示，红景天的研究内容主要涉及红景天化学成分、药理作用、临床制剂及应用等。**结论** 大株红景天注射液的临床应用和红景天的抗炎作用及其对炎症信号转导通路的调控是研究热点，也是未来的研究趋势。

关键词：红景天；CiteSpace；可视化分析；研究进展；研究热点
中图分类号：R259 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)05-1192-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.040

Visual analysis of research progress in *Rhodiola* based on CiteSpace

LIU Cheng-juan, HUANG Sheng-jie, DU Rui-jiao, LI Tong, JIANG Miao-miao* (*State Key Laboratory of Component-Based Chinese Medicine*, *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617)

Abstract: Objective To analyze the current status and development of *Rhodiola*, and provide reference for further research. **Methods** CiteSpace 5.6.R5 software was used to analyze the literatures of *Rhodiola* collected by CNKI database and the core database of Web of Science from January 2000 to July 2021. **Results** Totally 3877 Chinese literatures and 957 English literatures were included in this study. Author analysis showed that CUI Jian-hua and Skopinska-rosewska EWA published more papers on *Rhodiola* in Chinese and English respectively than others. Institutions analysis showed that Yanbian University and Chinese Academy of Sciences were the insitutions with most published literatures on *Rhodiola* in Chinese and English. Keywords analysis showed that the research of *Rhodiola* mainly focused on chemical components, pharmacological effect, clinical preparations and application. **Conclusion** Clinical application of Sofren injection and anti-inflammatory activity and regulation on inflammatory signal transduction pathways of *Rhodiola* are hotspots and future trend.
Key words: *Rhodiola*; CiteSpace; visual analysis; research progress; research hotspot

中药红景天为蔷薇目（Rosales）景天科（Crassulaceae）红景天属（*Rhodiola* L.）多年生开花植物，素有“西藏人参”和“东方神草”之称，长期以来，在亚洲和欧洲被用作草药和膳食补充剂。红景天的首次出现可以追溯到公元前，我国古代第一部药学专著《神农本草经》将红景天列为药中上品，服用红景天有理气养血、益气轻身、活血止血的功效，之后藏药著作《四部医典》《晶珠本草》都再次肯定了红景天的诸多功效。红景天于 1977 年首次被列入《中国药典》，现代研究发现，红景天具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗疲劳、免疫调节、抗糖尿病等药理作用[1-6]。目前红景天研究的中、英文文献数量巨多，但相关文献计量学统计尚未见报道。

基金项目：天津市自然科学基金重点项目（No.18JCZDJC97700）；天津市科技计划项目（No.20ZYJDJC00120）；国家自然科学基金面上项目（No.81573547）。
作者简介：刘成娟，女，硕士研究生，主要从事药物化学研究，email：liuchengjuan1217@163.com *通信作者：姜苗苗，女，研究员，博士，主要从事中药药效物质基础及质量控制研究，email：miaomiaojiang@126.com

CiteSpace 是美国德雷塞尔大学陈超美教授开发的一款用于分析文献的信息可视化软件，可以用来了解某一学科领域的研究热点与前沿[7-8]。本研究采用 CiteSpace 对 CNKI 和 Web of Science（WOS）核心合集数据库中 21 世纪以来红景天的相关文献进行分析，从宏观上展现红景天研究热点及动态前沿，为红景天后续研究方向提供可能的参考依据，以期促进红景天的深入研究，更好地服务于临床。

1　资料与方法

1.1　数据来源

中文文献来源于 CNKI 数据库，检索词选定“红景天”，检索时间为 2000 年 1 月 1 日—2021 年 7 月 31 日，共检索出 3890 篇中文文献，去除与主题无关的和重复发表的文献后，最终纳入有效文献 3877 篇。

英文文献来源于 WOS 核心合集数据库，按主题词“*Rhodiola*” or “Hong Jing Tian” 进行检索，检索时间为 2000 年 1 月 1 日—2021 年 7 月 31 日，共检索出英文文献 1163 篇，选择文献类型 article 和 review，除重后最终纳入有效文献 957 篇。

1.2　研究方法

将纳入的中、英文文献题录分别以“Refworks”和“纯文本”格式导出，并通过 CiteSpace 5.6.R5 进行转化、分析。时间跨度（time slicing）：均为 2000—2021 年；时间切片（years per slice）：1 年；主题词来源（term source）：默认全选；节点类型中作者、机构、关键词：阈值（top N per slice）= 50，并对关键词采用“pathfinder”图谱修剪算法进行修剪使图谱更加清晰，根据各节点参数设置生成相应的可视化知识图谱。

2　结果

2.1　红景天研究发文趋势

年度发文量是衡量相关研究领域的研究热度、受关注程度和发展趋势的重要指标[9-10]，以年份为横坐标，发文量为纵坐标，对中、英文文献进行分析，见图 1。结果显示，红景天中文文献的发文大致可以分为两个阶段：第一阶段为 2000—2017 年，年发文量呈波动性逐年快速递增，且在 2017 年达到峰值 284 篇，提示在 2017 年左右国内对红景天的研究出现高峰；第二阶段为 2017—2021 年，年发文量呈下降趋势。红景天英文文献的发文也可以分为两个阶段：第一阶段为 2000—2009 年，2001 年首次出现英文文献，之后年发文量呈波动性逐年缓慢递增；第二阶段为 2009—2021 年，为稳定期，年发文量基本维持在 50 篇左右。对比中、英文文献发文情况可以看出，中文文献的年度发文量远高于英文文献，由于 2021 年文献只收录到 7 月份，总体来说，在 2017 年后中文文献发文量出现下滑，但英文文献发文量仍然保持稳定，说明国内外对于红景天的研究仍处于发展中阶段且已受到国外研究者持续的关注。

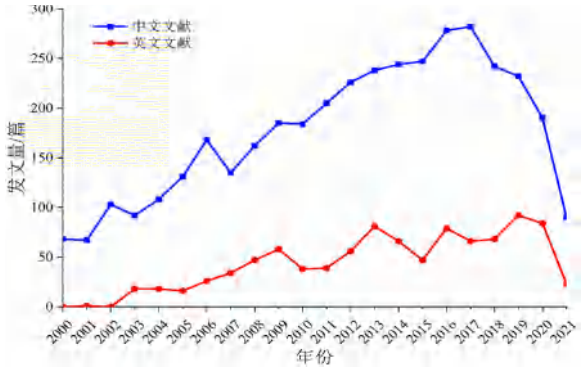


图 1　2000—2021 年中药红景天的发文量

Fig 1　Literatures of Chinese medicine *Rhodiola* from 2000—2021

2.2　作者合作网络分析

研究作者合作共现图谱，可以反映作者在该研究领域做出的贡献以及合作关系。使用 CiteSpace 5.6.R5，以“Author”为网络节点，分别对研究纳入的相关文献进行分析，获得红景天研究作者合作图谱见图 2。

中文文献作者合作分析显示，共有 1072 位作者进行过红景天相关领域研究，发文量排名前十的作者见表 1。作者之间存在合作关系，并形成了稳定的合作团队，其中以崔建华、张西洲、哈振德等为核心的团队是红景天中文文献研究最多的团队，团队成员合作密切，发文量较多，研究内容涉及高原脱适应[11]、高原人体运动[12]、急性高原病[13]、血液流变学[14]等，其主要研究方向是红景天属植物及其制剂防治高原病的作用与机制。英文文献作者合作分析显示，共有 612 位作者进行过红景天相关领域研究，发文量排名前十的作者见表 1。高产作者之间形成了以 Skopinska-rosewska EWA 为核心的研究团队，其发文量较多，文章质量较高，提示国外已经形成了有影响力的红景天研究团队。该团队的研究主要涉及淋巴细胞[15]、免疫系统[16]等，其主要研究方向是红景天的有效成分增加淋巴细胞的转化率和吞噬细胞能力，从而增强免疫力的功能。

2.3　机构合作网络分析

研究机构合作网络图谱可以反映在该研究领域内机构的发文量、合作关系、科研实力以及做出的贡献。将节点类型设置为“Institute”，使用 CiteSpace 5.6.R5 对研究纳入的相关文献进行分

表 1 中药红景天研究高产作者信息

Tab 1 Productive author information of Chinese and English literatures on Chinese medicine *Rhodiola* research

序号	中文作者（发文量）	英文作者（发文量）
1	崔建华（33）	Skopinska-rosewska EWA（25）
2	张西洲（28）	Zdanowski R（14）
3	哈振德（27）	Lewicki S（11）
4	王伟（22）	Panossian A（10）
5	曾维政（22）	Siwicki AK（10）
6	李涛（18）	Zhang JIAN-QIANG（9）
7	蒋明德（18）	Wasiutynski A（9）
8	马勇（18）	Tolonen A（8）
9	阎秀峰（18）	Sommer EWA（7）
10	吴晓玲（17）	Han FEI（7）

析，获得了红景天研究机构合作图谱，见图 3。

本研究的中文文献共有 757 个机构参与红景天相关领域的研究，发文量排名前十的机构见表 2。其中发文量最多的是延边大学，发文量 72 篇，远超过排名第二的沈阳药科大学。本研究的英文文献包含 436 个机构，发文量排名前十的机构见表 2。其中发文量最多的机构是中国科学院，发文量 44 篇，其次是华沙医科大学，发文量 34 篇。由中、英文文献机构合作图谱可知，研究机构间有合作，但合作较少，与不同团队研究侧重及研究方向不同有关，提示国内外研究机构应重视科研合作与交流。

表 2 中药红景天研究高产机构信息

Tab 2 Productive institution information of Chinese and English literatures on Chinese medicine *Rhodiola* research

序号	中文文献发文机构（发文量）	英文文献发文机构（发文量）
1	延边大学（72）	中国科学院（44）
2	沈阳药科大学（29）	Medical University of Warsaw（34）
3	兰州军区兰州总医院（27）	吉林大学（24）
4	东北林业大学（25）	Military Institute of Hygiene and Epidemiology（21）
5	福建中医药大学（25）	第四军医大学（16）
6	北京中医药大学（24）	复旦大学（16）
7	解放军第十八医院（21）	南通大学（15）
8	中国药科大学（21）	中国医学科学院（14）
9	上海美优制药有限公司（19）	Russian Academy of Sciences（14）
10	长春中医药大学（18）	Defence Institute of Physiology and Allied Sciences（11）

2.4 关键词分析

2.4.1 关键词共现分析 关键词是对论文主题的高度概括和凝练 [17]，对于深入了解与分析这一领域的研究具有十分重要的意义。出现频次和中心性是衡量关键词重要性的两个重要指标 [18]，出现频次和中心性值越大，该关键词被关注的程度越高，中心性超过 0.1 则被认为有较高的影响力。以 “Keyword” 为网络节点，使用 CiteSpace 5.6.R5 对研究纳入的相关文献进行分析，获得的关键词共现图谱见图 4。

中文文献关键词共现分析得到 960 个节点，关键词节点越大，说明对应的关键词出现频次越多，共现频次排名前十的见表 3。结合图谱和关键词对节点背后信息进一步分析，红景天研究涉及内容较全面，包括红景天属植物、化学成分、药理作用、临床制剂及应用等方面（关键词：研究进展）。红景天属植物种类繁多（关键词：红景天、高山红景天、大株红景天），分布广，化学成分复杂，主要采用高效液相色谱法对其进行化学成分分析及含量测定，红景天苷和酪醇是其代表性化合物（关键词：红景天苷、酪醇、高效液相色谱法）。红景天具有多种药理作用，为促进其合理利用，需运用现代科学技术手段和方法来分析研究红景天的化学成分、药理作用和机制，进一步研制、开发以及推广符合国际标准的红景天制剂（关键词：大株红景天注射液、大鼠、凋亡）。分析高中心性、高频关键词可知，红景天属植物的有效成分及其含量测定为红景天研究的重要内容。

英文文献关键词共现分析得到 621 个关键词，其中共现频次排名前十的见表 3，主要研究内容为红景天有效成分的提取及其抗氧化应激作用。其中红景天提取物相关研究同样也是中文文献研究的主要内容（关键词：salidroside、*Rhodiola*、extract）；不同于中文文献，英文文献侧重对红景天苷抑制凋亡细胞相关蛋白表达、抗氧化应激等作用机制的研究（关键词：oxidative stress、apoptosis、cell、expression、mice、activation），并使用双盲法对红景天制剂展开临床试验（关键词：double blind）。

表 3 中药红景天研究中高频关键词信息

Tab 3 Information of high frequency keywords in Chinese and English literatures on Chinese medicine *Rhodiola* research

序号	中文文献			英文文献		
	文章数	中心性	关键词	文章数	中心性	关键词
1	1249	0.52	红景天苷	323	0.09	salidroside
2	1018	0.54	红景天	305	0.09	*Rhodiola*
3	206	0.09	大株红景天注射液	190	0.11	oxidative stress
4	201	0.19	大鼠	127	0.09	extract
5	198	0.06	高效液相色谱法	116	0.07	apoptosis
6	178	0.13	高山红景天	84	0.09	cell
7	123	0.08	凋亡	78	0.06	expression
8	115	0.04	大株红景天	72	0.06	double blind
9	103	0.03	研究进展	68	0.08	mice
10	101	0.05	酪醇	67	0.05	activation

2.4.2 关键词聚类分析 在共现图谱的基础上，采用对数似然比对文献中关系紧密的关键词进行聚类分析，得到关键词聚类图，见图 5。中、英

图 2　中药红景天研究中文（左）和英文（右）文献作者合作图谱

Fig 2　Collaboration of authors in Chinese（left）and English（right）literatures on Chinese medicine *Rhodiola*

图 3　中药红景天研究中文（左）和英文（右）文献机构合作图谱

Fig 3　Collaboration of institution atlas in Chinese（left）and English（right）literatures on Chinese medicine *Rhodiola*

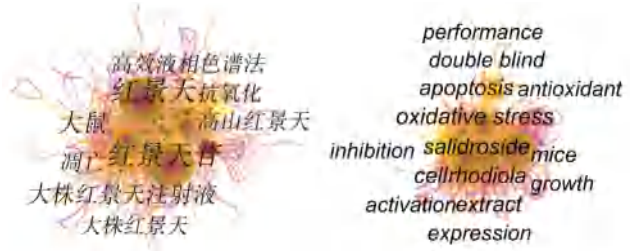


图 4　中药红景天研究中文（左）和英文（右）文献关键词共现关系

Fig 4　Co-occurrence relationship of keywords in Chinese（left）and English（right）literatures on Chinese medicine *Rhodiola* research

文文献关键词均形成了 8 个聚类，聚类模块值分别为 0.5292 和 0.4736，提示聚类的结构显著，是合理的。导出聚类明细表，提取关键词并对其进行归纳，结果见表 4 及表 5。对比中、英文关键词聚类结果发现，中文文献更倾向于红景天有效成分的提取、含量测定及其制剂的研究，而英文则集中研究红景天的药理作用及其机制，重点有所不同。

2.4.3　关键词时间线图分析　在聚类图谱的基础上，对关键词进行时间线视图可视化，以年份为横坐标，聚类编号及名称为纵坐标，对中、英文文献关键词进行分析，得到时间线图。

由图 6 可见，中文文献聚类中，凋亡（#0）、红景天苷（#1）、含量测定（#2）的研究较多，每个聚类的研究皆从 2000 年延续至今，提示中药红景天有效成分的含量测定、药理作用及其机制的研究在红景天领域占有重要地位，并形成稳定的研究方向。英文文献聚类中，apoptosis（#0）、rosavin（#1）、salidroside（#2）的研究较多，并持续至今，研究分布较为集中，提示红景天中有效成分的药理作用及机制同样是英文文献的重要研究内容。

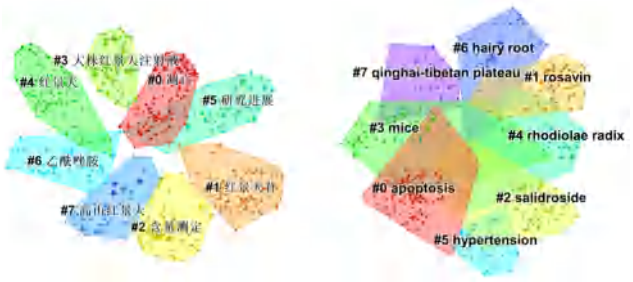


图 5　中药红景天研究中文（左）和英文（右）文献关键词聚类图

Fig 5　Clustering map of keywords of Chinese（left）and English（right）literatures on Chinese medicine *Rhodiola* research

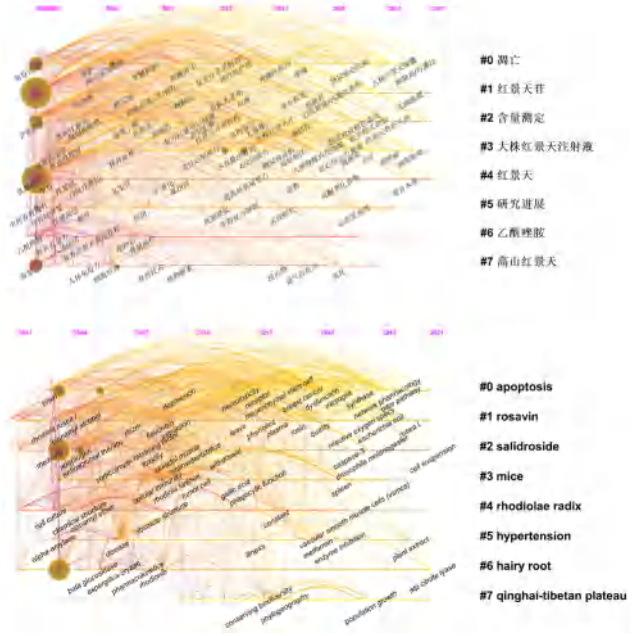


图 6　中药红景天研究中、英文文献关键词时间线视图

Fig 6　Timeline view of keywords of Chinese and English literatures on Chinese medicine *Rhodiola* research

2.4.4　关键词突现分析　关键词突现是指关键词在较短时间内出现频率骤增[19]，对其分析可以明确某一时间段内的研究热点，判断潜在的发展趋势。“begin”和“end”分别表示突变的开始和结束时间，“strength”表示关键词的突变强度，强度越高表示影响力越大[20]。

由图 7 可见，在红景天文献关键词分析中得到 14 个突现词，中、英文文献均以 2014 年为界，中文文献 2014 年之前红景天研究的前沿主要集中在红景天属植物及其制剂用于预防和治疗高原反应的药理作用；2014—2021 年的研究热点主要集中于大株红景天及其制剂临床用于治疗冠心病，心力衰竭等。而英文文献 2015 年之前的研

表 4 中药红景天研究中文文献关键词聚类信息

Tab 4 Clustering information of keywords in Chinese literatures on Chinese medicine *Rhodiola* research

聚类 ID	节点数	轮廓值	聚类标签	标签词	主要内容
0	131	0.781	凋亡	凋亡；大鼠；阿尔茨海默病；炎症	红景天改善大鼠阿尔茨海默病的药理作用及机制
1	120	0.747	红景天苷	红景天苷；动脉粥样硬化；镇静；斑块稳定性	红景天苷改善动脉粥样硬化的药理作用
2	118	0.86	含量测定	含量测定；HPLC；指纹图谱；主成分分析	HPLC 用于红景天有效成分的含量测定和质量控制
3	115	0.841	大株红景天注射液	大株红景天注射液；冠心病；心绞痛；心力衰竭	大株红景天注射液治疗冠心病、心绞痛等的临床应用
4	111	0.648	红景天	红景天；乳腺癌；肾损伤；宫颈癌	红景天改善乳腺癌、肾损伤等的药理作用
5	58	0.772	研究进展	研究进展；综述；药理作用；活性	红景天中活性成分的药理作用研究进展
6	56	0.886	乙酰唑胺	乙酰唑胺；高原；红景天复方；力竭运动	红景天及其复方能够有效预防和缓解高原反应
7	54	0.847	高山红景天	高山红景天；愈伤组织；氮源；诱导率	氮源对高山红景天种子萌发和愈伤组织生长的影响

表 5 中药红景天研究英文文献关键词聚类信息

Tab 5 Clustering information of keywords in English literatures on Chinese medicine *Rhodiola* research

聚类 ID	节点数	轮廓值	聚类标签	标签词	主要内容
0	117	0.639	apoptosis	apoptosis；mice；inflammation；*Rhodiola*；oxidative stress	红景天抗炎抗氧化的药理作用
1	106	0.669	rosavin	rosavin；rosin；HPLC；antioxidant capacity	采用 HPLC 对红景天中苯丙素类化合物进行含量测定及抗氧化能力评价
2	83	0.741	salidroside	salidroside；adaptogen；dietary supplements；nerve regeneration	红景天具有提高适应原能力、神经保护作用等而被作为膳食补充剂广泛应用
3	72	0.78	mice	mice；bacterial infection；immune response；spleen	红景天具有健脾益气、增强机体免疫力、抗菌等药理作用
4	59	0.867	*Rhodiola*	*Rhodiola*；alpha-glucosidase；sachaloside；rosiridoside	红景天中活性化合物在糖代谢方面的生理功能
5	51	0.72	hypertension	hypertension；angiotensin converting enzyme；enzyme inhibitors；type 2 diabetes	红景天在治疗高血压和糖尿病方面的临床应用
6	45	0.777	hairy root	hairy root；quality evaluation；characterization；secondary metabolism	对红景天根部次级代谢产物的化学成分表征以进行质量评价
7	29	0.937	Qinghai-tibetan plateau	Qinghai-tibetan plateau；phylogeography；molecular phylogenetics；species distribution models	综合气候，快速辐射等对青藏高原地区红景天的物种分布及生态适宜性分析

究前沿主要集中在红景天属植物有效部位及其抗疲劳和细胞凋亡的药理作用；2015—2021 年的研究热点主要集中于红景天的抗炎作用及其对炎症信号转导通路的调控。

3 讨论与展望

本研究利用软件 CiteSpace 5.6.R5，从发文量、作者、机构和关键词分析，研究总结了国内外中药红景天领域研究的论文发表情况、作者机构合作情况、研究路径演进与重点研究方向。

对本文纳入的 2000 年 1 月—2021 年 7 月发表的红景天相关文献整理分析发现，近年来红景天领域的研究和发展相对平稳，研究主要集中在红景天化学成分、药理作用、临床制剂及应用等方面。作者和机构合作图谱显示，研究团队和机构应加强合作，共同推动红景天药材的研究与应用。通过 CiteSpace 软件对红景天相关文献关键词进行可视化分析发现，红景天的有效成分研究仍然以苯乙醇类化合物红景天苷和酪醇为主，建议可以加强对红景天中其他有效成分的探索，例如苯丙素类化合物络赛维、酚酸类化合物原花青素等 [21-22]。从中文文献来看，大株红景天注射液治疗冠心病、心力衰竭等多种心血管疾病是当前的研究热点。心血管疾病是人类健康的第一杀手 [23]，而红景天在治疗心血管疾病方面作用突出，因此，红景天治疗心血管疾病的药理作用及机制仍然会是未来的研究热点之一。从英文文献来看，红景天的抗炎作用及其对炎症信号转导通路的调控是研究热点，炎症是一种多因素的、极复杂的病理过程，任何能够引起组织损伤的因素均可导致炎症的发生，红景天的抗炎作用机制虽取得了一定的进展，但仍处于起步阶段，因此，还有待进一步从分子水平上揭示。

本研究采用 CiteSpace 软件对红景天相关文献进行可视化分析，与传统的综述相比，基于 CiteSpace 的分析可以更方便、快捷、直观地展现某一领域内的研究内容和研究热点，并且数据分析结果可预测未来的研究趋势，进而聚焦并引领将来的研究。总之，进一步促进各国家、机构间的资源共享与交流合作，培养相关人才，深入开展对大株红景天注射液治疗心血管疾病、红景天

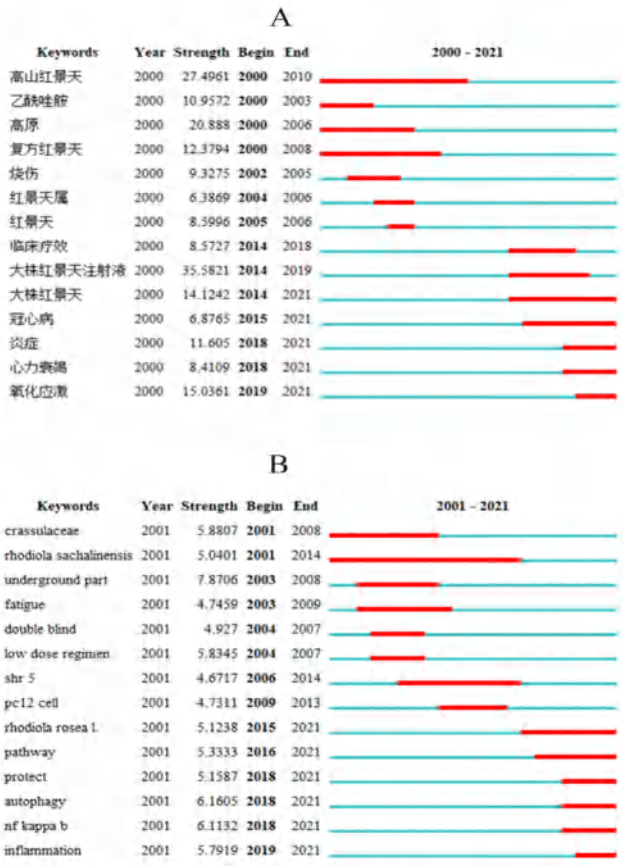


图 7　中药红景天研究中文文献（A）及英文文献（B）关键词突现图谱

Fig 7　Dash forward show map of keywords with shrongest citation bursts in Chinese（A）and English literatures（B）on Chinese medicine *Rhodiola* research

的抗炎作用及机制的研究可能是未来红景天领域的主要发展方向。

参考文献

[1] Li Y，Pham V，Bui M，et al. *Rhodiola* rosea L.：an herb with anti-stress，anti-aging，and immunostimulating properties for cancer chemoprevention [J]. Curr Pharmacol Rep，2017，3（6）：384-395.

[2] 蒲位凌，李文华，白茹玉，等 . 红景天及其抗炎和抗肿瘤活性成分药理作用研究进展 [J]. 天津中医药，2017，34（12）：856-859.

[3] Kang D，Hong H，Kim K，et al. Anti-fatigue effects of fermented *Rhodiola* rosea extract in mice [J]. Prev Nutr Food Sci，2015，20（1）：38-42.

[4] 侯红平，张广平，高云航，等 . 红景天苷对慢性阻塞性肺疾病体外细胞模型的保护作用及抗氧化应激机制 [J]. 中药新药与临床药理，2020，31（12）：1389-1393.

[5] Zheng T，Bian F，Chen L，et al. Beneficial effects of *Rhodiola* and salidroside in diabetes：potential role of AMP-activated protein kinase [J]. Mol Diagn Ther，2019，23（4）：489-498.

[6] 姚敏娜，高凯，马侗，等 . 酪萨维片质量标准及药效学研究 [J]. 中南药学，2019，17（1）：42-47.

[7] 王洁婷，俞紫涵，陈健敏，等 . 基于 CiteSpace 的药学教育教学的研究热点与趋势分析 [J]. 基础医学教育，2018，20（11）：1026-1029.

[8] 陈悦，陈超美，刘则渊，等 . CiteSpace 知识图谱的方法论功能 [J]. 科学学研究，2015，33（2）：242-253.

[9] 王贵海，朱学芳 . 我国替代计量学研究：现状、演进、热点与趋势 [J]. 图书馆论坛，2020，40（8）：43-53.

[10] 胡金萍，林丽君 . 国内残疾人研究的热点主题和前沿演进——基于 CSSCI 期刊的可视化分析 [J]. 山东社会科学，2019（11）：118-125.

[11] 崔建华，张西洲，李彬，等 . 高原脱适应的药物防治措施 [J]. 高原医学杂志，2009，19（S1）：9-13.

[12] 崔建华，张西洲，王引虎，等 . 银杏叶片对高原人体运动血乳酸及血氨的影响 [J]. 高原医学杂志，2005，15（3）：10-12.

[13] 崔建华，张扬，李强，等 . 溶栓胶囊防治急性高原病的效果观察 [J]. 西南国防医药，2015，25（6）：662-665.

[14] 崔建华，崔宇，吴佩峰，等 . 溶栓胶囊和红景天对缺氧脱习服大鼠血流动力学的影响 [J]. 西北国防医学杂志，2016，37（3）：172-175.

[15] Siwicki AK，Skopinska-Rozewska E，Wasiutynski A，et al. The effect of *Rhodiola kirilowii* extracts on pigs' blood leukocytes metabolic（RBA）and proliferative（LPS）activity，and on the bacterial infection and blood leukocytes number in mice [J]. Cent Eur J Immunol，2012，37（2）：145-150.

[16] Lewicki S，Balan BJ，Skopinska-Rozewska E，et al. Modulatory effects of feeding pregnant and lactating mice *Rhodiola kirilowii* extracts on the immune system of offspring [J]. Exp Ther Med，2016，12（5）：3450-3458.

[17] 郭姗姗，李草，刘腾，等 . 基于 CiteSpace 的国内外依达拉奉研究文献计量学分析 [J]. 中南药学，2020，18（10）：1743-1749.

[18] 蒋鑫，洪明 . 国际教育大数据研究的热点、前沿和趋势——基于 WOS 数据库的量化分析 [J]. 中国远程教育，2019（2）：26-38.

[19] 朱素梅，覃仕娜，覃淼，等 . 基于 CiteSpace 的 2016—2021 年国内外中药质量标志物研究文献的计量学分析 [J]. 中草药，2021，52（9）：2575-2588.

[20] 陈定芳，吴月峰，李海英，等 . 基于 CiteSpace 文献计量法的中西医治疗痉挛型脑瘫文献可视化图谱分析 [J]. 中草药，2021，52（14）：4318-4326.

[21] Li D，Park S，Lee K，et al. 5-HT1A receptors mediate the analgesic effect of rosavin in a mouse model of oxaliplatin-induced peripheral neuropathic pain [J]. Korean J Physiol Pha，2021，25（5）：489-494.

[22] Zhou Q，Han X，Li R，et al. Anti-atherosclerosis of oligomeric proanthocyanidins from *Rhodiola* rosea on rat model via hypolipemic，antioxidant，anti-inflammatory activities together with regulation of endothelial function [J]. Phytomedicine，2018，51：171-180.

[23] 张艺丹，刘思敏 . 心血管代谢疾病诊断、治疗、防控一体化的必要性 [J]. 岭南心血管病杂志，2019，25（2）：238-240.

（收稿日期：2021-09-12；修回日期：2021-11-09）

经肺泡灌洗并局部灌注抗菌药物治疗支气管扩张合并肺部感染的文献分析

段曼，孙志猛，汪亚，朱雯雯，陈大奎，唐晓霞*（武汉科技大学附属孝感医院药学部，湖北 孝感 432000）

摘要：目的 对经肺泡灌洗并局部灌注抗菌药物治疗支气管扩张合并肺部感染的文献进行调查分析。**方法** 通过检索国内外文献，对经肺泡灌洗并局部灌注抗菌药物治疗支气管扩张合并肺部感染的临床研究的有效性、肺泡灌洗技术参数、局部灌注抗菌药物技术参数进行分析。**结果** 目前国内该项技术在肺泡灌洗液的选择、灌洗液总量上差异大；局部灌注抗菌药物的药品类型、用药剂量、用药浓度、使用疗程不明确。国外未见指南推荐及临床试验报道。**结论** 肺泡灌洗并局部灌注抗菌药物的有效性、安全性评价仍不充分，多项技术参数不清晰，临床应慎重考虑该项技术目前的循证医学证据。

关键词：肺泡灌洗并局部灌注抗菌药物；支气管扩张合并肺部感染；有效性；安全性；文献调查分析

中图分类号：R563 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)05-1198-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.041

Literature analysis of local application of antibiotics through the bronchoalveolar lavage for bronchiectasis with lung infection

DUAN Man, SUN Zhi-meng, WANG Ya, ZHU Wen-wen, CHEN Da-kui, TANG Xiao-xia*
(*Department of Pharmacy, Xiaogan Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Xiaogan Hubei* 432000)

Abstract: Objective To review the local application of antibiotics through the bronchoalveolar lavage for bronchiectasis with lung infection. **Methods** Through searching domestic and foreign literatures, the effectiveness, technical parameters of bronchoalveolar lavage and local application of antibiotics in clinical research were analyzed. **Results** Differences existed in the selection of bronchoalveolar lavage fluid in China. The type, dose, concentration, and course of local antibacterial drugs were not clear. No guidelines or recommendations and clinical trial reports were found in foreign countries. **Conclusion** The effectiveness and safety of bronchoalveolar lavage and local application of antibiotics are insufficient, and many technical parameters are not clear. This technology should be cautiously used in clinical practice due to the lack of evidence.

Key words: local application with antibiotics through bronchoalveolar lavage; bronchiectasis with lung infection; efficacy; safety; literature review

支气管扩张合并肺部感染由于扩张的支气管病理性不可逆扩张，清除分泌物的功能丧失，容易同一肺段反复发生感染迁延不愈，临床常规抗感染疗效差。多篇报道提示，支气管扩张合并肺部感染患者经支气管镜肺泡灌洗机械排痰，再联合灌洗区域局部灌注抗菌药物，可达到更好的临床治疗效果，在临床应用广泛[1-3]。本文结合目前国内经外肺泡灌洗并局部灌注抗菌药物治疗支气管扩张合并肺部感染的临床相关文献研究，对其现状进行总结分析。

基金项目：孝感市自然科学基金项目（No. XGKJ2019010004）。

作者简介：段曼，女，硕士，主管药师，主要从事医院药学临床药学方面的研究，email：demyman@126.com *通信作者：唐晓霞，女，主任药师，主要从事医院药学临床药学方面的研究，email：amyhty@163.com

1　资料与方法

1.1　资料来源

检索数据库：中国知网、维普、万方、PubMed、Web of Science 和 MEDLINE 数据库；检索词：中文以“肺泡灌洗”“局部灌注”“局部灌注抗菌药物”“支气管扩张合并肺部感染”“疗效观察”或“临床分析”；英文以“broncho-alveolar lavage”“topical application”“bronchiectasis with infection”“effect observation”或“clinical analysis”等；检索时间：建库起截至 2020 年 12 月。共检索到相关文献 150 篇，逐篇查阅文章题目及摘要，排除综述、指南、共识、meta 分析等文献，剔除局部灌注药物但不含有抗菌药物的临床研究、剔除局部灌注含有抗菌药物但以评价其他灌注药物效果为核心（如化痰效果）的临床研究，得到符合条件的临床研究文献 52 篇 [1-52]。具体文献筛查流程见图 1。

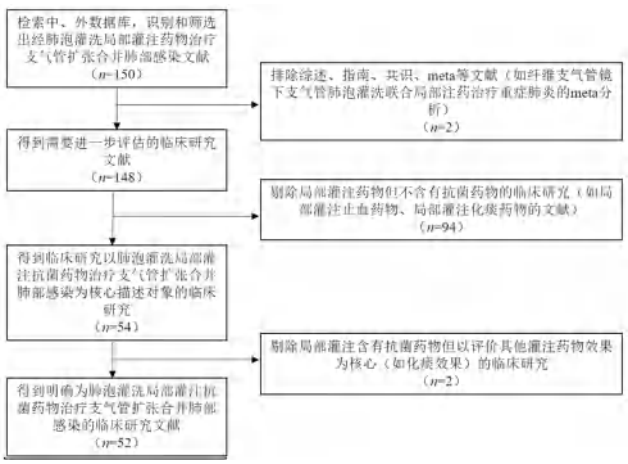


图 1　临床研究文献筛查流程图

Fig 1　Flow chart of literature screening

1.2　方法

采用回顾性研究方法，由两名中级职称以上的临床药师独立进行资料提取，详细阅读临床研究病例，记录第一作者姓名、发表期刊、复合影响因子、是否核心期刊、发表年限、纳入对照组和观察组病例数量、对照组和观察组治疗方案、每次灌洗总量、肺泡灌洗液的选择、单次灌洗量、灌洗频率、局部灌注抗菌药物的名称、用药剂量、用药浓度、使用疗程、疗效评价等信息。最终由两人讨论达成共识后形成正式的临床研究信息提取表，并采用 SPSS 20.0 版统计软件，对收集到的数据进行统计分析。

2　结果

2.1　纳入文献描述及质量评价

共收集到符合条件的文献 52 篇。总病例数为 4336 例，其中观察组病例共计 2180 例。纳入的文献包括前瞻性研究 49 项（前瞻性研究中随机对照研究 43 项，非随机对照研究 6 项），回顾性研究 3 项。

2004 年国内发表首篇肺泡灌洗并局部灌注抗菌药物治疗支气管扩张合并肺部感染的随机对照试验文献 [1]，未见国外文献报道。相关研究在 2014 年（10 篇）、2018 年（10 篇）最多，从 2019 年开始明显下降。具体发表时间及对应的复合影响因子见图 2。

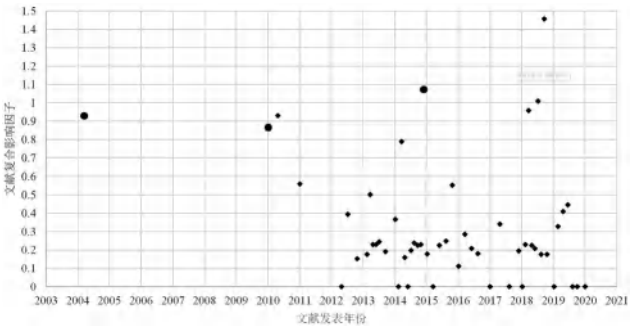


图 2　中文文献发表时间及对应的复合影响因子

Fig 2　Time and corresponding composite factors of Chinese literature

注：复合影响因子以中国知网 2020 年为标准；●该文献发表在中文核心期刊；◆该文献发表在中文非核心期刊。

Note：For composite factors please refer to CNKI 2020；● Papers is published in a Chinese core journal；◆ Papers published in a Chinese non-core journal.

2.2　研究的有效性、不良反应及对照组/观察组设定现状

52 篇文献均从总体有效率、和/或临床症状缓解有效率、和/或血气指标、和/或超敏 C 反应蛋白指标的好转率肯定了肺泡灌洗并局部灌注抗菌药物治疗支气管扩张合并肺部感染的有效性，总有效率 95.32%。共有 14 篇文献 [1, 3, 5, 9, 13, 17, 21, 23, 38-39, 42, 44, 51-52] 对不良反应的发生进行了报道，主要表现为心率失常、一过性血氧饱和度下降和气道刺激，具体见表 1。

共有 43 篇研究 [2-16, 18-25, 27-33, 35-37, 39-41, 45-51] 的对照组为常规内科治疗，观察组为常规内科治疗联合肺泡灌洗并局部灌注抗菌药物；7 篇研究 [17, 26, 34, 42-44, 52] 的对照组为常规内科治疗联合肺泡灌洗，观察组为常规内科治疗联合肺泡灌洗并局部灌注抗菌药物；1 篇研究 [1] 对照组为常规内科治疗联合肺泡灌洗并局部用水剂型抗菌药物（采用 0.9% 氯化钠稀释的抗菌药物），观察组为常规内科治疗联合肺泡灌洗并局部用凝胶型抗菌药物（采用羧甲基纤维素钠和 0.9% 氯化钠混合稀释的抗菌药物）；1 篇研究 [38] 对照组为常规内科治疗联合肺泡

灌洗并局部灌注氨溴索，观察组为常规内科治疗联合肺泡灌洗并局部灌注氨溴索＋依替米星。

2.3 *实施肺泡灌洗局部灌注抗菌药物的技术现状*

52 篇研究中，经细菌学培养选择局部灌注的抗菌药物品种的研究 33 篇，未行细菌学培养经验性选择抗菌药物品种的研究 18 篇，1 篇研究未提及选择局部灌注抗菌药物品种的依据，具体见表 1。

17 篇[8，14，17，21，23，29，36，38，40，42-45，48，50-52]使用氨基糖苷类抗菌药物局部灌注肺部感染病灶，其中经细菌学培养选择氨基糖苷类的研究 6 篇[14，17，29，40，42，45]，余 11 篇未行细菌学培养直接选择氨基糖苷类抗菌药物。10 篇[8，17，23，29，36，43，45，48，50，52]使用阿米卡星局部灌注，阿米卡星单次用量有 0.2 g[17，23，29，50，52]、0.4 g[8，43，48]、0.8 g[36]，1 篇文献[43]用药剂量不详。阿米卡星单次灌洗浓度和溶媒选择上仅 6 篇研究有明确描述，阿米卡星单次灌洗质量浓度有 20 mg·mL^{-1}[8，48，50，52]、80 mg·mL^{-1}[36]，均采用 0.9% 氯化钠注射液作为溶媒，有 1 篇文献[17] 0.2 g 阿米卡星采用 5 ～ 10 mL 0.9% 氯化钠注射液作为溶媒，其余研究中阿米卡星溶媒选择及浓度均不详。5 篇文献[14，21，40，44，51]使用依替米星局部灌注，单次用量为 0.2 g[44，51]、0.3 g[14]、0.2 ～ 0.3 g[40]，1 篇文献[21]用药剂量不详。依替米星溶媒选择及浓度均不详；1 篇文献[38]使用奈替米星局部灌注单次用量为 0.2 g，溶媒选择及浓度均不详。1 篇文献[42]使用异帕米星局部灌注单次用量为 0.4 g，采用 10 mL 0.9% 氯化钠注射液作为溶媒，质量浓度为 40 mg·mL^{-1}。

2 篇文献单独使用头孢哌酮舒巴坦局部灌注肺部感染病灶[15，39]，经细菌学培养选药[39]和未行细菌学培养直接选药[15]各 1 篇。药物剂量、溶媒选择及浓度均不详。1 篇研究使用头孢哌酮舒巴坦 0.5 g 联合左氧氟沙星 0.2 g，采用羧甲基纤维素钠 0.5 g、0.9% 氯化钠注射液 10 mL 混合自制凝胶剂型局部灌注肺部感染病灶[1]。24 篇文献[2，4-6，9-12，16，19-20，24，26-28，30-35，41，46-47]根据药敏结果使用敏感抗菌药物局部灌注肺部感染病灶，具体药物不详；余 8 篇[3，7，13，18，22，25，37，49]局部灌注抗菌药物品种、剂量、浓度、溶媒均不详。

2.4 *肺泡灌洗技术的应用调查*

肺泡灌洗技术中灌洗液的选择不统一，35 篇研究[1-6，8-9，11-12，14-17，21，24，26，28，31，33-37，39-42，44-47，49-50，52]单独使用 0.9% 氯化钠注射液灌洗，2 篇研究[43，51]使用氨溴索的 0.9% 氯化钠注射液配制液灌洗，1 篇研究[22]使用甲硝唑的 0.9% 氯化钠注射液配制液灌洗，1 篇研究[18]使用 5% 碳酸氢钠注射液灌洗，其余 13 篇研究灌洗液不详。灌洗液的总量差异大，仅 13 篇研究[1，4，17，23，29，38，40，42-44，50-52]灌洗总量明确，总量在 50 ～ 300 mL，余不详。单次灌洗液的液体量差异较小，38 篇研究[2，4-6，9，13-17，19-24，27-30，32-34，36-38，40-47，49-52]单次灌洗液在 20 ～ 30 mL，余 14 篇研究单次灌洗液液体体量不详。肺泡灌洗的治疗频次和疗程差异大，普遍为每周 2 次，疗程 1 ～ 4 周，且存在灌洗液的温度控制参数未描述的情况。

3 讨论

支气管扩张这类结构性肺病是支气管树的病理性、永久性扩张，因清除分泌物的功能丧失，其病原菌往往难以清除，多数患者常常需要反复住院进行抗感染治疗，细菌耐药多见。导致支扩并感染治疗难度增加的具体原因有：① 由于肺实变区域灌注不足，对于耐药菌感染尚敏感、但肺组织穿透性均较差的多黏菌素、阿米卡星及妥布霉素等药物，全身抗感染治疗时肺部常难以获得有效浓度，加大剂量时毒性及不良反应则较多；② 由于病原微生物的生物膜形成，导致最小抑菌浓度（*MIC*）增加 10 ～ 25 倍[53]，亦降低了全身应用抗菌药物的疗效；③ 在泛耐药或多重耐药鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌和耐碳青霉烯的肠杆菌等 *MIC* 升高的革兰氏阴性菌感染的情况下，即便使用最高剂量及优化给药方案，仍有相当部分的患者肺部浓度不足。

虽然《抗菌药物临床应用指导原则（2015 年版）》指出[54]治疗全身感染或脏器感染时宜尽量避免局部应用抗菌药物，但是，人们对支气管扩张合并肺部感染局部灌注抗菌药物应用的态度发生了转变。继 2004 年国内首篇肺泡灌洗并局部灌注抗菌药物治疗支气管扩张合并肺部感染的随机对照试验发表之后，该研究在全国陆续开展和应用。值得注意的是，根据目前统计的 52 篇研究，仅 7 篇研究合理证实了增加局部灌注抗菌药物这一技术对支气管扩张合并肺部感染治疗有效，余 45 篇研究仅能提示肺泡灌洗并局部灌注抗菌药物较常规内科治疗有效。肺泡灌洗其技术核心为排痰，机械清除气管致病菌[55]已大大降低肺部带菌量，局部灌注抗菌药物的必要性还有待进一步论证。2021 年《成人抗感染药物下呼吸道局部应用专家共识》（以下简称“共识”）指出，目前尚缺乏较高质量的临床研究证据支持经支气管镜注入药物局部治疗的有效性[56]，不推荐常规应用，未见该研究的荟萃分析，亦未见多中心、双盲、随机、平行对照试验对该技术的研究。而且，目前局部灌注抗菌药物仅在肺曲霉菌感染治疗上有指南的

表 1　经肺泡灌洗并局部灌注抗菌药物治疗支气管扩张合并肺部感染总体有效率和不良反应具体表现类型

Tab 1　Overall effective rate of local application of antibiotics through bronchoalveolar lavage for bronchiectasis with lung infection and types of adverse reactions

治疗方案		病例数（观察组 / 对照组）	药物品种	是否经细菌学培养	疗效（观察组 / 对照组）					不良反应（观察组 / 对照组）		文献
观察组	对照组				总体有效率 /%	临床症状	血气指标	细菌清除率	hs-CRP	发生例数	具体表现及例数	
CMT ＋ BAL ＋ LAA（凝胶型）	CMT ＋ BAL ＋ LAA（水剂型）	30/30	左氧氟沙星＋头胞哌酮钠舒巴坦纳	是	93.3%/83.3%	NR	NR	NR	NR	0/5	气道刺激反应（0/5）	[1]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	36/36	敏感抗菌药物	是	100.0%/88.9%	是	是	NR	NR	NR	NR	[2]
CMT ＋ BAL	CMT	52/52	敏感抗菌药物	是	82.7%/55.8%	NR	是	NR	NR	3/10	肺内出血（0/1）；气胸（1/5）；心率失常（2/4）	[3]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	60/60	敏感抗菌药物	是	93.3%/75.0%	NR	NR	NR	NR	NR	NR	[4]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	61/61	敏感抗菌药物	是	96.7%/78.7%	是	是	NR	NR	5/17	NR	[5]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	47/47	抗菌药物	NR	91.5%/76.6%	NR	NR	NR	NR	NR	NR	[6]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	43/43	抗菌药物	是	93.0%/76.8%	是	是	NR	NR	NR	NR	[7]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	55/55	阿米卡星＋氨溴索	否	NR	NR	是	NR	是	NR	NR	[8]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	25/25	敏感抗菌药物	是	96.0%/88.0%	是	NR	NR	NR	0/2	NR	[9]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	22/22	敏感抗菌药物	是	100.0%/81.8%	是	NR	NR	NR	NR	NR	[10]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	26/26	敏感抗菌药物	是	96.2%/80.8%	NR	是	NR	NR	NR	NR	[11]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	22/22	敏感抗菌药物	是	100.0%/81.8%	是	NR	NR	NR	NR	NR	[12]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	23/23	抗菌药物	否	95.7%/60.9%	NR	NR	NR	NR	1/8	皮疹（1/3）；短暂低热（0/5）	[13]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	40/40	依替米星	是	92.5%/70.0%	是	NR	NR	NR	NR	NR	[14]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	60/60	头孢哌酮钠舒巴坦钠	否	90.0%/70.0%	NR	是	NR	是	NR	NR	[15]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	62/62	敏感抗菌药物	是	100.0%/85.5%	是	是	NR	NR	NR	NR	[16]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT ＋ BAL	22/20	阿米卡星或敏感抗菌药物	是	100%/100%	NR	NR	NR	否	0/1	短暂低热（0/1）	[17]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	33/33	抗菌药物	否	93.9%/69.7%	NR	NR	NR	NR	NR	NR	[18]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	46/41	敏感抗菌药物	是	95.7%/78.1%	NR	NR	NR	NR	NR	NR	[19]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	46/41	敏感抗菌药物	是	95.7%/78.1%	NR	NR	NR	NR	NR	NR	[20]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	41/41	依替米星	否	100.0%/87.8%	NR	是	NR	NR	1/0	一过性血氧饱和度下降（1/0）	[21]
CMT ＋ BAL	CMT	33/33	抗菌药物	否	97.0%/81.8%	NR	NR	NR	NR	NR	NR	[22]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	41/40	阿米卡星	否	95.1%/77.5%	是	是	NR	NR	14/0	气道刺激反应（5/0）；心率失常（6/0）；一过性血氧饱和度下降（3/0）	[23]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	40/45	敏感抗菌药物	是	100.0%/80.0%	NR	是	95.0%/75.6%	NR	NR	NR	[24]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	45/45	抗菌药物	否	90.3%/81.3%	NR	NR	NR	NR	NR	NR	[25]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT ＋ BAL	44/44	敏感抗菌药物	是	90.9%/72.7%	NR	是	NR	NR	NR	NR	[26]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	34/34	敏感抗菌药物	是	97.1%/73.5%	NR	NR	NR	NR	NR	NR	[27]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	45/45	敏感抗菌药物	是	93.3%/75.6%	NR	是	NR	NR	NR	NR	[28]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	24/24	阿米卡星或敏感抗菌药物	是	95.8%/66.7%	NR	NR	NR	NR	NR	NR	[29]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	50/50	敏感抗菌药物	是	96.0%/78.0%	NR	NR	NR	NR	NR	NR	[30]

续表 1

治疗方案		病例数（观察组 / 对照组）	药物品种	是否经细菌学培养	疗效（观察组 / 对照组）					不良反应（观察组 / 对照组）		文献
观察组	对照组				总体有效率 /%	临床症状	血气指标	细菌清除率	hs-CRP	发生例数	具体表现及例数	
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	24/24	敏感抗菌药物	是	91.7%/75.0%	NR	是	NR	NR	NR	NR	[31]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	60/50	敏感抗菌药物	是	100.0%/84.0%	NR	是	NR	NR	NR	NR	[32]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	52/52	敏感抗菌药物	是	NR	NR	是	NR	NR	NR	NR	[33]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT ＋ BAL	15/15	敏感抗菌药物	是	100.0%/60.0%	是	NR	NR	NR	NR	NR	[34]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	43/43	敏感抗菌药物	是	100.0%/90.7%	NR	是	NR	NR	NR	NR	[35]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	41/40	阿米卡星	否	100.0%/75.0%	NR	是	NR	NR	NR	NR	[36]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	51/51	抗菌药物	否	98.0%/88.2%	是	是	NR	NR	NR	NR	[37]
CMT ＋ BAL ＋局部灌注氨溴索＋ LAA	CMT ＋ BAL ＋局部灌注氨溴索	50/50	奈替米星	否	96.0%/82.0%	是	是	NR	是	4/5	呕吐 / 焦虑 / 头痛（1 /2/1；2 /1/2）	[38]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	40/40	头胞哌酮钠舒巴坦纳	是	100.0%/92.5%	是	是	NR	是	9/0	气道刺激反应（4/0）；心率失常（5/0）	[39]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	39/39	依替米星	是	97.4%/82.1%	是	NR	NR	NR	NR	NR	[40]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	48/48	敏感抗菌药物	是	87.5%/70.8%	NR	NR	NR	是	NR	NR	[41]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT ＋ BAL	42/42	异帕米星	是	NR	是	是	NR	是	5/4	肺内出血（2/1）；心率失常（2/1）；短暂低热（1/2）	[42]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT ＋ BAL	68/68	阿米卡星	否	98.5%/82.4%	是	是	NR	NR	NR	NR	[43]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT ＋ BAL	85/75	依替米星	否	95.3%/84.0%	是	是	NR	NR	7/6	心率失常（1/1）；一过性血氧饱和度下降（2/1）；恶心（4/4）	[44]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	32/30	庆大霉素或阿米卡星	是	96.9%/76.7%	NR	是	NR	NR	NR	NR	[45]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	24/28	敏感抗菌药物	是	100.0%/64.3%	NR	NR	NR	NR	NR	NR	[46]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	32/32	敏感抗菌药物	是	96.9%/84.4%	是	是	NR	NR	NR	NR	[47]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	24/24	阿米卡星	否	NR	NR	是	NR	是	NR	NR	[48]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	57/57	抗菌药物	否	100.0%/89.5%	是	是	NR	NR	NR	NR	[49]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	63/63	阿米卡星	否	76.2%/47.6%	是	是	NR	是	NR	NR	[50]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT	60/60	依替米星	否	98.3%/80.0%	是	是	NR	NR	2/12	肺内出血（0/1）；气胸（1/6）；心率失常（1/5）	[51]
CMT ＋ BAL ＋ LAA	CMT ＋ BAL	24/23	阿米卡星	否	95.8%/69.6%	NR	NR	NR	是	12/12	心率失常（5/4）；一过性血氧饱和度下降（7/8）	[52]

注：CMT. 常规内科治疗（conventional medical treatment）；BAL. 肺泡灌洗（bronchoalveolar lavage）；LAA. 局部灌注抗菌药物（local application with antibiotics）；NR. 未报道（not report）。

循证支持[57]，在支气管扩张合并肺部感染治疗上暂无高级别循证推荐。局部灌注抗菌药物在不同病原菌感染治疗的有效性仍需探索和验证。

临床在进行肺泡灌洗并局部灌注抗菌药物这项操作时还存在多项技术参数不明确的现象。例如灌洗液的选择较为随机，大部分研究选择 0.9% 氯化钠注射液灌洗，小部分研究或使用氨溴索、甲硝唑、5% 碳酸氢钠注射液的 0.9% 氯化钠注射液配制液灌洗；灌洗液的总量差异大，在 50 ～ 300 mL；灌洗的疗程差异大，在 1 ～ 4 周；局部灌注抗菌药物的品种虽多集中在氨基糖苷类、敏感抗菌药物，但大多存在单次局部灌注抗菌药物剂量随机、浓度随机的现象。不仅如此，抗菌药物与中药注射液、祛痰药及支气管舒张剂等药物联合进行局部灌注使用的不规范情况时有报道，值得警惕。

临床在行肺泡灌洗并局部灌注抗菌药物存在诱导细菌耐药的风险。目前，“共识”中经气道局部雾化的抗感染药物剂型、给药剂量和频次基本符合抗菌药物 PK/PD 特征，如妥布霉素吸入溶

液[56]（不含防腐剂，且 pH 值调为 6.0，对气道的刺激较注射液小）雾化吸入 300 mg bid，而该研究气管镜下灌注给药，每周 2 次的治疗频率难以使药物达到持续稳定的治疗浓度，可能存在耐药风险。Regan 等[58]指出吸入抗菌药物治疗支气管扩张患者产生耐药风险增加，相较与经气道 / 口腔雾化给药，肺部局部灌注抗菌药物诱导细菌耐药风险更甚，可能影响患者的远期预后。

临床在行肺泡灌洗并局部灌注抗菌药物存在超给药途径用药的医疗机构管理风险和用药安全风险。除硫酸妥布霉素注射液说明书中列有雾化吸入给药途径，目前国内无其他经气道局部应用剂型的抗感染药物上市，肺泡灌洗并局部灌注抗菌药物属于超给药途径用药，增加了医疗机构管理用药的难度。52 篇研究中的局部灌注抗菌药物为静脉注射用剂型，含有依地酸二钠和 / 或亚硫酸钠等防腐剂、稳定剂，静脉注射用剂型的辅料使患者气道痉挛、心率失常、一过性血氧饱度下降、过敏性肺炎的风险增加，存在安全隐患。且局部用抗菌药物的配制浓度高，还可能直接对肺上皮细胞产生毒性。动物实验结果显示局部灌注抗菌药物对气管黏膜和肺组织可造成一过性急性损伤[59]，不推荐常规使用。

综上，目前肺泡灌洗并局部灌注抗菌药物的有效性、安全性评价暂不充分，多项技术参数不清晰，临床应慎重考虑该项技术目前的循证医学证据。同时，对于支气管扩张合并难治、严重的肺部感染，期待国内在抗菌药物雾化剂型、局部灌注剂型上有所突破。

参考文献

[1] 柳仓生，张军，张捷，等 . 支气管肺泡灌洗介入抗生素凝胶治疗支气管扩张合并感染观察 [J]. 中国内镜杂志，2004，10（2）：22-24.

[2] 李晓辕，谭恩丽，彭丽萍 . 支气管肺泡灌洗联合局部注药治疗老年支气管扩张合并感染的疗效 [J]. 中国老年学杂志，2010，30（6）：741-743.

[3] 马建永，李明晖，张春意 . 支气管肺泡灌洗治疗肺脓肿和支气管扩张合并感染的临床研究 [J]. 中华医院感染学杂志，2014，24（4）：895-897.

[4] 刘晓俊 . 探讨经纤维支气管镜支气管肺泡灌洗并局部注药治疗支气管扩张合并感染的疗效 [J]. 医药前沿，2012，34（29）：206-207.

[5] 沙丹 . 老年支气管扩张合并感染行支气管肺泡灌洗联合局部注药治疗的疗效观察 [J]. 中外健康文摘，2014，11（26）：209-210.

[6] 吴春艳 . 支气管肺泡灌洗并局部注药治疗支气管扩张疗效分析 [J]. 医药前沿，2014，36（34）：218-219.

[7] 马丽娜 • 艾山拜，于世寰 . 支气管肺泡灌洗联合注药治疗支气管扩张合并感染的疗效观察 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志，2015，3（3）：21-22.

[8] 张荣昶，何金星 . 经纤支镜肺泡灌洗联合局部使用阿米卡星、氨溴索治疗对支气管扩张急性加重期的疗效影响 [J]. 大家健康，2017，11（11）：78-79.

[9] 谌洪勋，杨昭军，刘建伟 . 支气管肺泡灌洗联合局部注药治疗老年支气管扩张合并感染的疗效分析 [J]. 特别健康，2017，13（19）：82.

[10] 徐文斌 . 观察支气管肺泡灌洗联合局部注药治疗支气管扩张合并感染的临床效果 [J]. 养生保健指南，2018，17（30）：40.

[11] 吴倩佳 . 支气管肺泡灌洗联合局部注药治疗支气管扩张合并感染的临床观察 [J]. 健康必读，2018，26（14）：46-47.

[12] 贾国柱 . 观察支气管肺泡灌洗联合局部注药治疗支气管扩张合并感染的临床效果 [J]. 保健文汇，2019，20（7）：15-16.

[13] 孙俣，刘薇，李明，等 . 支气管肺泡灌洗联合局部抗生素治疗支气管扩张并发感染的效果分析 [J]. 中国保健营养，2019，29（34）：294-295.

[14] 张宇辉 . 支气管肺泡灌洗联合局部注药治疗支气管扩张合并感染的临床效果观察 [J]. 全科口腔医学电子杂志，2019，6（23）：188-189.

[15] 邓淑娇，雍文穆 . 纤维支气管镜支气管肺泡灌洗联合局部加注抗生素治疗老年重症支气管扩张合并感染患者的临床效果 [J]. 临床医学研究与实践，2020，5（1）：67-68.

[16] 郭华，张容，谢明金 . 支气管肺泡灌洗加局部抗生素治疗支气管扩张伴感染的疗效 [J]. 西南国防医药，2012，22（7）：729-731.

[17] 林南生 . 支气管镜肺泡灌洗加局部应用抗生素治疗支气管扩张症疗效观察 [J]. 中国社区医师（医学专业），2012，14（12）：107-108.

[18] 楚俊利，赵志伟 . 经纤维支气管镜支气管肺泡灌洗联合局部注药治疗支气管扩张合并感染的疗效观察 [J]. 中国民康医学，2013，25（22）：33-34.

[19] 刘长志 . 支气管肺泡灌洗联合局部抗生素治疗支气管扩张并发感染的疗效探究 [J]. 中国实用医药，2013，8（27）：173-174.

[20] 肖庆 . 支气管肺泡灌洗联合局部抗生素治疗支气管扩张并发感染的效果观察 [J]. 中国实用医药，2013，8（21）：73-74.

[21] 周鹏飞 . 支气管肺泡灌洗联合依替米星局部给药治疗老年支气管扩张合并感染 [J]. 长治医学院学报，2013，27（5）：350-352.

[22] 谢飞，何凤仙 . 支气管肺泡灌洗治疗支气管扩张合并感染临床分析 [J]. 当代医学，2013，19（5）：97-98.

[23] 武玉荣，李国吾 . 经纤维支气管镜肺泡灌洗联合局部给药治疗支气管扩张并感染的疗效分析 [J]. 中国现代医药杂志，2014，16（9）：44-46.

[24] 庞进学 . 支气管肺泡灌洗治疗支气管扩张并感染 40 例疗效分析 [J]. 湖北科技学院学报（医学版），2014，28（6）：488-490.

[25] 赵军 . 支气管肺泡灌洗加局部应用抗生素治疗支气管扩张合并感染疗效分析 [J]. 北方药学，2014，11（1）：136.

[26] 彭瑞芳 . 支气管肺泡灌洗联合局部抗生素治疗支气管扩张并发感染的临床观察 [J]. 临床合理用药杂志，2014，7

(16)：102-103.
[27] 杨茜 . 支气管肺泡灌洗联合局部抗生素治疗支气管扩张并发感染的效果观察 [J]. 中国现代药物应用，2014，8(6)：129-130.
[28] 亢国良 . 支气管肺泡灌洗联合局部抗生素治疗支气管扩张并发感染临床分析 [J]. 中国实用医药，2014，9(18)：112-113.
[29] 吴琳玲 . 肺泡灌洗术联合局部抗生素治疗支气管扩张并发感染 24 例临床观察 [J]. 中国民族民间医药，2015，24(7)：95-97.
[30] 胡艳东 . 支气管肺泡灌洗联合局部抗生素治疗支气管扩张并发感染的有效性探究 [J]. 中国现代药物应用，2015，9(24)：188-189.
[31] 张福红 . 支气管肺泡灌洗联合局部抗生素治疗支气管扩张并发感染的有效性探讨 [J]. 临床医学，2015，35(10)：47-48.
[32] 贺素锦 . 支气管肺泡灌洗联合局部抗生素治疗支气管扩张并发感染的有效性探究 [J]. 基层医学论坛，2016，20(15)：2035-2036.
[33] 杨朝阳 . 支气管肺泡灌洗联合局部抗生素治疗支气管扩张并发感染的效果 [J]. 中国实用医刊，2016，45(2)：128-128.
[34] 陈花，唐荣昌，刘杰，等 . 支气管肺泡灌洗联合局部抗生素治疗支气管扩张并发感染治疗效果分析 [J]. 吉林医学，2016，37(10)：2474-2475.
[35] 刘新华 . 支气管肺泡灌洗与局部注药在支气管扩张合并感染患者治疗中的应用 [J]. 中外医疗，2016，35(14)：163-165.
[36] 彭瑞芳 . 支气管肺泡灌洗联合局部抗生素治疗支气管扩张并发感染的效果分析 [J]. 河南医学研究，2017，26(13)：2434-2435.
[37] 方勇 . 支气管肺泡灌洗与局部注药用于治疗支气管扩张合并感染患者临床观察 [J]. 中国处方药，2017，15(8)：108-109.
[38] 熊志刚，孔妹边，梁永强，等 . 经纤维支气管镜奈替米星局部用药联合肺泡灌洗治疗老年支气管扩张并感染的临床研究 [J]. 中国实用医药，2018，13(19)：3-6.
[39] 郑勋伯 . 纤维支气管镜支气管肺泡灌洗联合局部注药治疗老年重症支气管扩张合并感染的效果 [J]. 慢性病学杂志，2018，19(11)：1596-1598，1601.
[40] 赖盈盈 . 观察支气管肺泡灌洗联合局部注药治疗支气管扩张合并感染的临床效果 [J]. 吉林医学，2018，39(1)：37-39.
[41] 景森 . 支气管肺泡灌洗联合局部灌注射抗生素治疗支气管扩张伴感染患者的疗效观察 [J]. 中国民康医学，2018，30(16)：16-17.
[42] 奚峰，杨华，袁亚平，等 . 经支气管肺泡灌洗联合异帕米星局部用药治疗老年支气管扩张感染的临床研究 [J]. 老年医学与保健，2019，25(3)：339-342.
[43] 费宗宝 . 局部注药联合支气管肺泡灌洗治疗耐药菌感染的支气管扩张症的临床效果 [J]. 中国当代医药，2019，26(9)：73-75.
[44] 廖振辉，谭经福，陈勇，等 . 纤支镜下肺泡灌洗联合依替米星局部给药治疗支气管扩张并感染患者疗效观察 [J]. 内科，2019，14(3)：297-299，336.
[45] 张伟强 . BAL 并局部注入抗生素治疗支气管扩张合并感染的疗效观察 [J]. 中国热带医学，2010，10(10)：1246-1248.
[46] 李霞 . 支气管肺泡灌洗并局部注药治疗支气管扩张合并感染 52 例疗效分析 [J]. 中国美容医学，2011，20(4)：424.
[47] 林卫涵 . 纤维支气管镜支气管肺泡灌洗并局部注药治疗支气管扩张合并感染的疗效观察 [J]. 实用心脑肺血管病杂志，2013，21(6)：85-86.
[48] 蔡志芳，王雪峰，姚汉玲，等 . 纤支镜肺泡灌洗并局部用药对支气管扩张急性加重期的疗效影响 [J]. 临床肺科杂志，2014，19(5)：925-926.
[49] 杨晓娟，曹官铭，闫霞，等 . 支气管肺泡灌洗联合局部注药治疗支气管扩张合并感染的临床观察 [J]. 现代生物医学进展，2015，15(13)：2515-2517，2600.
[50] 李加雄，邱雪梅，唐淑妮，等 . 经支气管镜灌洗治疗支气管扩张合并感染的疗效 [J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版)，2018，12(2)：134-139.
[51] 陈勇，谭经福，廖振辉，等 . 纤维支气管镜肺泡灌洗联合依替米星局部给药治疗支气管扩张并感染的临床疗效 [J]. 疑难病杂志，2018，17(2)：133-136.
[52] 王小江，李承红 . 支气管肺泡灌洗并局部使用阿米卡星治疗支气管扩张合并慢性阻塞性肺疾病的临床观察 [J]. 中国感染控制杂志，2018，17(5)：395-399.
[53] 瞿介明，刘崇，张静 . 下呼吸道抗菌药物局部用药的现状及进展 [J]. 中华结核和呼吸杂志，2017，40(8)：564-568.
[54]《抗菌药物临床应用指导原则》修订工作组 .《抗菌药物临床应用指导原则(2015 年版)》[M]. 北京：人民卫生出版社，2015：4.
[55] Du Rand IA，Blaikley J，Booton R，et al. Summary of the British Thoracic Society guideline for diagnostic flexible bronchoscopy in adults [J]. Thorax，2013，68(8)：786-787.
[56] 成人抗感染药物下呼吸道局部应用专家共识 [J]. 中华结核和呼吸杂志，2021，44(4)：322-339.
[57] Garcia-Vidal C，Alastruey-Izquierdo A，Aguilar-Guisado M，et al. Executive summary of clinical practice guideline for the management of invasive diseases caused by Aspergillus：2018 Update by the GEMICOMED-SEIMC/REIPI [J]. Enferm Infecc Microbiol Clin，2019，37(8)：535-541.
[58] Regan KH，Hill AT. Risk of development of resistance in patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis treated with inhaled antibiotics [J]. Curr Pulmonol Rep，2018，7(3)：63-71.
[59] 赖国祥，柳德灵，姚丽青，等 . 气管内药物注射治疗安全性的实验研究 [J]. 中华结核和呼吸杂志，2011，34(4)：282-287.

(收稿日期：2022-01-05；修回日期：2022-04-02)

临床药师在临床

临床药师对肾移植患者实施药物治疗管理的示例

谢静[1]，苏妍[2]，吴琼诗[1]（海南省人民医院，海南医学院附属海南医院，1. 药学部；2. 肾内科，海口　570311）

摘要：以 1 例肾移植患者的药物治疗管理（MTM）实践为例，介绍了 MTM 的规范化流程。通过药物治疗回顾、干预 / 转诊、制订用药清单和药物相关治疗计划、记录与随访，临床药师解决了药物治疗过程中的潜在药物相互作用，改善了患者的血压控制，并协助医师将他克莫司血药浓度调整至适宜范围。临床药师实施 MTM 服务对肾移植患者的慢病管理起到了积极有益的作用，可为药学工作者开展 MTM 服务提供参考。

关键词：药物治疗管理；临床药师；肾移植患者
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)05-1205-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.042

Medication therapy management services for a renal transplant recipient

XIE Jing[1], SU Yan[2], WU Qiong-shi[1] (1. *Department of Pharmacy*; 2. *Department of Nephrology*, *Hainan General Hospital*, *Hainan Affiliated Hospital of Hainan Medical University*, *Haikou* 570311)

Abstract: The standard process of medication therapy management (MTM) was introduced in a renal transplant patient. Through medication therapy review, intervention and/or referral, personal medication list and medication action plan, documentation and follow-up, clinical pharmacists addressed potential drug-drug interactions, improved blood pressure control, and assisted the physician to adjust tacrolimus concentration to appropriate range. Clinical pharmacists helped manage renal transplant patients with chronic disease by offering MTM service.

Key words: medication therapy management; clinical pharmacist; renal transplant patient

肾移植患者通常需要服用多种药物，涉及的用药问题复杂，存在较大的相互作用风险；而常用免疫抑制药物中的钙调磷酸酶抑制剂还有治疗窗窄、可与多种药物 / 食物发生相互作用的特点；因此有必要对肾移植患者进行有效、规范的药物监护[1]。近年来，药物治疗管理（medication therapy management，MTM）的药学监护实践模式开始崭露头角，其在慢病管理的临床疗效及经济人文方面均取得了良好的成果[2-4]。在肾移植患者的慢病管理方面，也有报道显示药师可通过 MTM 服务有效降低治疗费用，显著改善肾移植患者血压控制率和他克莫司血药浓度达标率[5]。MTM 实质上是“以药师为主导，病人为中心”的标准化服务，通过提供用药教育、咨询指导等专业服务，协助患者提高用药依从性、预防用药错误并最终实现自我管理[6-7]。本文以 1 例肾移植患者 MTM 实践为例，介绍了 MTM 的规范化流程，为药学工作者提供参考。

1　病例简介

患者，男，46 岁。身高 173 cm，体质量 64 kg，BMI 21.38 kg • m^{-2}。因“慢性肾脏病 5 期（CKD5 期）慢性肾小球肾炎”于 2015 年 7 月行同种异体肾移植术，术后以激素联合他克莫司、吗替麦考酚酯的三联方案免疫抑制治疗；2017 年诊断“移植后糖尿病”，规律服用二甲双胍片降糖治疗，未规律监测血糖。有高血压病史 10 余年，收缩压（SBP）最高达 160 mmHg（1 mmHg ＝ 133.2 Pa），目前规律服用氨氯地平片控制血压，自诉近期血压控制不佳；近 2 个月有反酸、嗳气等症状，当地医院就诊后间断服用奥美拉唑镁肠溶片。患者于 2021 年 3

基金项目：海南省卫生计生行业科研项目（No.19A200027）。
作者简介：谢静，女，临床药师，副主任药师，主要从事临床药学工作，email：10860228@qq.com

月 8 日复诊，监测他克莫司血药浓度偏高，达 10.8 ng·mL^{-1}，血尿酸（SUA）升高至 442 μmol·L^{-1}，且近期血压控制不佳，于 3 月 10 日临床药师咨询门诊进行用药咨询。患者具体的疾病及用药资料详见图 1。

个人信息	姓名　谢 **　性别　男　年龄　46 岁　婚姻状态　已婚　身高　173 cm　体质量　64 kg　BMI　21.38 kg·m^{-2}　主诊医师　**
病史	•肾移植术后 肾移植状态：患者因“CKD5 期 慢性肾小球肾炎”于 2015 年 7 月行同种异体肾移植术，术后以激素联合他克莫司、吗替麦考酚酯的三联方案免疫抑制治疗；2017 年诊断“移植后糖尿病”，规律服用二甲双胍降糖治疗，未规律监测血糖 •高血压：高血压病史 10 余年，SBP 最高达 160 mmHg，目前规律服用氨氯地平控制血压，自诉近期血压控制不佳，波动在 135 ～ 155/80 ～ 95 mmHg •消化道症状：近 2 月有反酸、嗳气等症状，当地医院就诊后间断服用奥美拉唑镁肠溶片
用药情况	甲泼尼龙片 10 mg po qd；吗替麦考酚酯分散片 0.25 g po q12h；他克莫司胶囊 1.5 mg po q12h；五酯胶囊 11.25mg po q12h；苯磺酸氨氯地平片 5 mg po qd；二甲双胍片 0.5 mg po bid（早，晚）；碳酸钙 D_3 咀嚼片 1.25 g po qd；奥美拉唑肠溶片 20mg po prn
家族史	父亲患高血压 30 余年（具体情况不详）
生活方式	偶尔饮酒，约一周 2 ～ 3 杯白酒，饮酒约 5 ～ 6 年，10 年前已戒酒
食物 / 药物过敏史	无
查体与检查	查体：T 36.5 ℃，P 75 次·min^{-1}，R 20 次·min^{-1}，BP 144/82 mmHg。神志清，精神可，心肺听诊无异常，腹平软，无压痛及反跳痛，肾区叩击痛（－），双下肢无明显水肿。辅助检查：2021/3/8：糖化血红蛋白（HbA1c）7.2%，随机血糖 6.7 mmol·L^{-1}；尿常规：尿蛋白（－），尿潜血（－）；肌酐（SCr）76 μmol·L^{-1}，估算肾小球滤过率（eGFR）104 mL/（min^{1}·1.73m^{2}），SUA 442 μmol·L^{-1}；谷丙转氨酶（AST）31 U·L^{-1}，谷草转氨酶（ALT）28 U·L^{-1}，白蛋白（ALB）37.6 g·L^{-1}；他克莫司血药浓度 10.8 ng·mL^{-1}。2020/12/14：随机血糖 7.2 mmol·L^{-1}；尿常规：尿蛋白（－），尿潜血（－）；SCr 67 μmol·L^{-1}，eGFR 110 mL/（min^{1}·1.73m^{2}），SUA 322 μmol·L^{-1}；AST 29 U·L^{-1}，ALT 26 U·L^{-1}，ALB 35.3 g·L^{-1}；他克莫司血药浓度 7.2 ng·mL^{-1}
MTM 实施目标	此次监测他克莫司血药浓度偏高，血尿酸高，且近期血压控制不佳；患者想了解是否有未关注的用药注意事项和相互作用，治疗方案是否可以优化

图 1　患者资料

Fig 1　Patient’s information review

2　MTM 实施流程

2.1　药物治疗评估（medication therapy review，MTR）

2.1.1　收集患者资料　收集个人信息、疾病、用药和生活方式的资料，明确患者关于治疗药物、疾病状况的问题和实施 MTM 的目标。疾病资料包括病史、查体及检查指标等；用药资料包括处方药、非处方药、草药及膳食补充剂的用药清单及用药史。该患者资料见图 1。

2.1.2　评估药物治疗相关问题（medication related problems，MRPs）　在 MRPs 的分类上，参照适应性、有效性、安全性、依从性 4 个维度及其涵盖的 7 类问题：药物治疗不足、药物治疗过度、无效药物、剂量不足、药物不良反应、剂量过高、用药依从性差[8]。该患者药物治疗中涉及的 MRPs 见图 2。

序号	MRP				干预计划	优先级
	具体问题	维度	分类	确定 / 可能		
1	近期他克莫司血药浓度升高至 10.8 ng·mL^{-1}，超出了适宜浓度范围（5 ～ 10 ng·mL^{-1}）[9]；他克莫司血药浓度升高可能导致严重不良反应，影响患者移植肾的功能	安全性	剂量过高	确定	评估是否需要暂时调整他克莫司剂量	高
2	他克莫司血药浓度升高，可能与近期奥美拉唑的使用相关	安全性	剂量过高	可能	评估是否需要停用奥美拉唑或转换为其他质子泵抑制剂	高
3	患者血尿酸升高至 442 μmol·L^{-1}，需要积极控制尿酸水平（控制目标 SUA ＜ 360 μmol·L^{-1}）[10]	适应性	药物治疗不足	确定	予以生活饮食指导，提供宣教资料，后续再行评估是否需要额外药物治疗	中
4	近期血压高于血压控制目标（120 ～ 140/70 ～ 90 mmHg）	适应性	药物治疗不足	确定	评估是否需要调整降压药物	中
5	血糖监测依从性不佳。患者复测 HbA1c 7.2%、随机血糖 6.7 mmol·L^{-1}，血糖控制可，但未规律监测血糖	依从性	用药依从性差	确定	加强患者教育，可转介至糖尿病健康教育门诊或内分泌临床药师咨询门诊	低

图 2　患者 MRPs 评估表单

Fig 2　MRPs evaluation form for patient’s

2.2.1　干预 / 转诊　针对患者的病情和 MRPs，药师可实施的干预包括直接干预、合作干预和转诊。直接干预内容涵盖用药教育、疾病管理教育、生活方式与饮食指导等内容。而合作干预则是与医师或其他医务人员合作解决 MRPs；当存在药物治疗方案调整、其他疾病评估等问题时，药师应及时与医师沟通并给出干预建议。如患者存在需进一步诊断及评估、紧急疑难病症、限于专业无法解决的 MRPs 等情况时，应尽快转诊给医师或其他医疗团队。

本例患者涉及药物治疗方案调整，因此药师根据其 MRPs 制订了医师沟通表单，见图 3；并对该患者进行了用药教育、疾病管理教育和生活饮食指导，干预记录见图 4。

2.2.2　制作患者个人用药记录（personal medication record，PMR）　PMR 需包括患者使用的所有处方药、非处方药、草药及膳食补充剂的详细信息，如名称、剂量规格、用药目的、具体用法用量等。药师在患者面诊后应审查 PMR，确保其正确性和完整性，并提供给患者一份记录，以便于患者后续的就诊或转诊。该患者就诊后，药师收集其用药信息和 MTR，制作了 PMR，见图 5。

2.2.3　制订药物治疗行动计划（medication-related action plan，MAP）　MAP 旨在帮助患者改善生活方式和提高用药管理能力，是药师在 MTR 后根据 MRPs 制订的，能由患者独立完成的行动建议。MAP 主要服务于患者，应采用通俗易懂的语言，针对患者现阶段最需解决的问题制订行动计划；在

医师沟通表单

患者姓名：谢**　　门诊号/住院号：*　　日期：2021/3/10

*医师：

您好！

您的患者 谢** 至临床药师咨询门诊就诊，根据患者的病情及用药情况，我们有以下几个用药建议想与您商讨。

药物相关问题及建议：

1. 患者他克莫司血药浓度（2021/3/8）达10.8 ng·mL^{-1}，可能与近期奥美拉唑肠溶片的使用相关（2020/12/14 患者监测他克莫司血药浓度为7.2 ng·mL^{-1}，近2月患者因“反酸、嗳气”于当地医院就诊后间断服用奥美拉唑镁肠溶片，既往有报道指出奥美拉唑可能引起他克莫司血药浓度升高[11-12]）。建议进一步评估是否需要暂时调整他克莫司胶囊的剂量，同时评估是否需要停用奥美拉唑肠溶片或转换为其他质子泵抑制剂（如对他克莫司的血药浓度影响较小的雷贝拉唑、泮托拉唑[13-14]）。

2. 患者近期血压控制不佳，波动在135~155/80~95 mmHg，可能与近期他克莫司血药浓度升高相关，建议进一步评估是否需要调整降压药物（如增加苯磺酸氨氯地平片剂量至10 mg po qd）。

医师意见回执：

□ 采纳

□ 不采纳，您的意见 _____

□ 部分采纳，具体采纳部分 _____

医师签名：*

药师签名：*

联系电话：*

电子邮箱：*

感谢 * 医师的支持，恳请您回复您的意见。

药师将告知、随访患者，并向您汇报患者后续的药物治疗情况。

图 3　医师沟通表单

Fig 3　Communication form for doctors

姓名：谢**　　性别：男　　年龄：46岁　　日期：2021/3/10

门诊号/住院号：*　　联系电话：*

干预内容：

1. 用药教育：对患者所用药物进行详细的用药教育，特别交待他克莫司、吗替麦考酚酯、甲泼尼龙的用药注意事项（服药方法、不良反应、相互作用等）以及他克莫司的血药浓度监测，并提供相关教育资料。强调他克莫司可与多种药物及食物发生相互作用，影响其血药浓度，在加用或停用其他药物前需咨询医师/药师。

2. 疾病管理教育：在调整生活方式与饮食的前提下，加强移植肾肾功能监测要点的宣教。此外，对血压、血糖、尿酸的控制进行相关宣教（疾病影响因素，监测指标及控制目标等）。

3. 生活方式与饮食指导：建议低盐、低糖、低嘌呤饮食；限制酒精及高果糖饮食，鼓励新鲜蔬果的摄入；适量饮水（结合患者肾功能及血压情况，每日饮水量可保证每日尿量在1500 mL以上）；规律运动，可进行一周3次的30 min以上中等强度运动。提供饮食建议及食物嘌呤含量表。

图 4　药师干预记录

Fig 4　Record of pharmacist’s intervention

个人用药记录

序号	药物 名称	药物 剂量	用药目的	用药时间	开始服用时间	停药时间	处方医师	备注
1	甲泼尼龙片	5 mg/片	免疫抑制	早7-8点服2片	2015年7月		*	开始使用后逐渐减量至目前剂量
2	吗替麦考酚酯分散片	0.25 g/片	免疫抑制	早9点、晚9点，各服1片	2015年7月		*	同上
3	他克莫司胶囊	0.5 mg/粒	免疫抑制	早9点、晚9点，各服3粒（必须空腹服用）	2015年7月		*	同上；必须空腹服用
4	五酚胶囊	11.25 mg/粒	他克莫司增效剂	早9点、晚9点，各服1粒	2015年7月		*	
5	苯磺酸氨氯地平片	5 mg/片	控制血压	早7点服1片	2013年2月		*	
6	二甲双胍片	0.5 mg/片	控制血糖	早、晚餐时各服1片	2017年3月		*	注意随餐服用
7	碳酸钙D$_3$咀嚼片	1.25 g/片	预防激素诱导的骨质疏松	晚上睡前服1片	2015年7月		*	
8	奥美拉唑肠溶片	20 mg/片	改善胃肠道症状	必要时服1片	2021年1月		*	

图 5　个人用药记录

Fig 5　Personal medication record

设定过程中，鼓励患者成为积极的 MTM 合作者，促进 MAP 的顺利实施。该患者的 MAP 见图 6。

药物治疗行动计划

患者姓名：谢**　　门诊号/住院号：*　　年龄：46岁　　联系电话：*

药师姓名：*　　药师联系电话：*　　日期：2021/3/10

该表格列出了帮助您改善药物治疗的重要行动步骤，可帮助您和医师、药师更好的管理您的用药，请填写相应栏目。

	药师建议的行动步骤	行动时间、具体行动内容（患者填写）
1	门诊就诊，请肾内科医师评估是否调整他克莫司剂量；评估是否调整高血压用药。	
2	门诊就诊，请消化内科医师或肾内科医师评估是否停用奥美拉唑或更换药为其他药物。	
3	出现以下方案调整时，可能需要在调整后进行他克莫司血药浓度监测，请致电药师，明确是否需要监测以及何时监测： 1.调整了他克莫司剂量 2.停用了奥美拉唑 3.更换了改善消化道症状的药物	
4	调整饮食和生活方式，将有利于降低尿酸水平和控制血压、血糖。饮食建议可参照药师提供的资料。 3个月后复查，如血尿酸≥420 μmol·L^{-1}，需门诊就诊评估是否开始药物治疗。	

下次药学门诊预约时间：*

图 6　药物治疗行动计划

Fig 6　Medication-related action plan

3　文档记录与随访

3.1　文档记录

在完成 MRP 的评估和干预后，药师应完善相关 MTM 的文档记录，包括依照医疗专业格式记录的 SOAP 药历[8]、PMR、MAP 及医师沟通表单等。规范的文档记录，可提升 MTM 服务质量，保证患者配合的积极性，加强与医务合作者的沟通，并有利于评估干预效果、监测与随访。该患者的 SOAP 药历见图 7。

3.2　随访

随访是评估 MTM 服务的干预效果的重要步骤，在完成 MTM 服务后，药师应与患者商议下次面诊或电话随访时间，根据发现的 MRPs 进行目标性的再评估，以明确干预目标是否达到、是否出现新的 MRPs。

患者门诊就诊后，电话与临床药师联系，告知医师已采纳“医师沟通表单”里提及的药物相关问题建议，对药物治疗方案进行如下调整：① 将奥美拉唑肠溶片更换为雷贝拉唑肠溶片（20 mg po prn）；② 减少他克莫司剂量至他克莫司胶囊 1.5 mg 早上服用，1.0 mg 晚上服用；③ 苯磺酸氨氯地平片增加剂量至 10 mg po qd。临床药师通过电话联系该医师，确认其已采纳全部建议，并核对了药物治疗方案的调整情况；建议患者调整药物治疗方案 5 ～ 7 d 后复测他克莫司血药浓度，最佳抽血时间为他克莫司服用前半个小时至计划服药时。临床药师 1 周后随访该患者，患者复测他克莫司血药浓度为 6.7 ng·mL^{-1}，已回落至适宜范围[9]；高血压控制有所改善，波动在 125 ～ 145/75 ～ 90 mmHg，暂维持目前降压方案，后续视血压情况调整；已依照药师指导调整

SOAP 药历

患者姓名：谢 **　性别：男　年龄：46 岁　门诊号 / 住院号：*　医保：省医保　MTM 日期：2021/3/10

S（主观信息）：患者因“慢性肾脏病 5 期 慢性肾小球肾炎”于 2015 年 7 月行同种异体肾移植术，术后以激素联合他克莫司、吗替麦考酚酯的三联方案免疫抑制治疗（就诊时方案为：甲泼尼龙片 10 mg po qd，吗替麦考酚酯分散片 0.25 g po q12h，他克莫司胶囊 1.5 mg po q12h）；2017 年诊断“移植后糖尿病”，规律服用二甲双胍片 0.5 mg po bid（早，晚）降糖治疗，未规律监测血糖。有高血压病史 10 余年，SBP 最高达 160 mmHg，目前规律服用氨氯地平片 5 mg po qd 控制血压，自诉近期血压控制不佳，波动在 135 ～ 155/80 ～ 95 mmHg。近 2 月有反酸、嗳气等症状，当地医院就诊后间断服用奥美拉唑镁肠溶片。患者近期复诊，监测的他克莫司血药浓度偏高，达 10.8 ng • mL $^{-1}$，血尿酸升高至 442 μmol • L $^{-1}$，且近期血压控制不佳。患者父亲有高血压 30 余年（具体情况不详），无食物、药物过敏史。

O（客观信息）：

生命体征：T 36.5 ℃，P 75 次 • min $^{-1}$，R 20 次 • min $^{-1}$，BP 144/82 mmHg。

辅助检查：2021/3/10：HbA1c 7.2%，随机血糖 6.7 mmol•L $^{-1}$；尿常规：尿蛋白（-），尿潜血（-）；SCr 76 μmol•L $^{-1}$ [eGFR 104 mL/（min^{1}•1.73m^{2}）]，SUA 442 μmol•L $^{-1}$；AST 31 U•L $^{-1}$，ALT 28 U • L $^{-1}$，ALB 37.6 g • L $^{-1}$；他克莫司血药浓度：10.8 ng • mL $^{-1}$。2020/12/14：随机血糖 7.2 mmol • L $^{-1}$；尿常规：尿蛋白（-），尿潜血（-）；SCr 67 μmol • L $^{-1}$ [eGFR 110 mL/（min^{1} • 1.73m^{2}）]，SUA 322 μmol • L $^{-1}$；AST 29 U • L $^{-1}$，ALT 26 U • L $^{-1}$，ALB 35.3 g • L $^{-1}$；他克莫司血药浓度 7.2 ng • mL $^{-1}$。

A（评估情况）：1. 近期他克莫司血药浓度升高至 10.8 ng•mL $^{-1}$，可能与近期奥美拉唑的使用相关。2. 患者血尿酸升高至 442 μmol•L $^{-1}$，不排除有他克莫司浓度升高导致血尿酸升高的影响，需要积极控制尿酸水平（控制目标 SUA ＜ 360 μmol • L $^{-1}$）。3. 近期血压控制不佳，波动在 135 ～ 155/80 ～ 95 mmHg，不排除有他克莫司浓度升高导致血压升高的影响。4. 血糖监测依从性不佳。患者降糖药物服用方式正确，规律用药，复测 HbA1c 7.2%、随机血糖 6.7 mmol • L $^{-1}$，血糖控制可，但未规律监测血糖。

P（干预计划）：1. 建议患者门诊就诊，由专科医师评估是否需要暂时减少他克莫司剂量（他克莫司血药浓度偏高可通过减少他克莫司胶囊或五酯胶囊的剂量进行调整，从经济性上可优先考虑选取他克莫司减量的方式）。2. 建议患者门诊就诊，由专科医师评估是否需要停用奥美拉唑或转换为其他质子泵抑制剂（奥美拉唑为 CYP 3A4 底物，可能影响他克莫司的代谢，据文献调研，他克莫司与奥美拉唑的相互作用尚不明确，但有相关报道指出奥美 拉唑可能引起他克莫司血药浓度升高）。3. 建议患者门诊就诊，由专科医师评估是否需要调整降压药物。4. 嘱咐患者在调整了他克莫司剂量或停用了奥美拉唑 / 更换了改善消化道症状的药物后，联系药师指导他克莫司血药浓度监测（一般方案调整后建议 5 ～ 7 d 后复测）。5. 予以生活饮食指导，提供宣教资料。6. 加强患者教育，建议患者加强血糖自我监测，可至糖尿病健康教育门诊或内分泌临床药师咨询门诊咨询糖尿病管理与血糖自我监测。7. 提供患者 PMR 和 MAP。

药师签名：*

图 7　SOAP 药历

Fig 7　SOAP notes form

了生活方式与饮食。在自我血糖监测方面，患者于该周内监测了两次空腹血糖，波动在 5.5 ～ 7.5 mmol • L $^{-1}$，基本达标 [15]。考虑到他克莫司有升高血糖的作用，近期他克莫司的血药浓度回落可能影响血糖水平，临床药师建议加强血糖监测，每周监测 2 ～ 4 次空腹或餐后血糖 [16]，注意预防低血糖反应。此外，临床药师再次进行用药教育和疾病管理教育，并预约 1 个月后随访。

4　总结

本文通过 1 例肾移植患者的 MTM 实践，详细介绍了药师的 MTM 服务流程。临床药师全面收集患者信息，进而评估 MRPs，实施干预，制订 PML 和 MAP，进行文档记录与随访，解决了潜在的药物相互作用，使他克莫司的血药浓度调整至适宜范围，并改善了疾病控制，在肾移植患者的慢病管理中起到了积极有益的作用。目前我国的药学服务正在向“以病人为中心”的药学监护转型，MTM 即是转型过程中具有重要意义的新兴实践模式 [6，17]。通过借鉴国外成功的 MTM 服务经验，逐步建立适应我国的规范化 MTM 服务，将有助于体现药师的专业价值，促进药学事业健康发展，有利于合理用药及慢病管理。

参考文献

[1] 庞晶瑶，刘丽宏，张小东，等 . 临床药师对肾移植受者的医嘱审核及用药建议的分析 [J]. 中国临床药理学杂志，2019，35（23）：3109-3111.

[2] Detoni KB，Oliveira IV，Nascimento MM，et al. Impact of a medication therapy management service on the clinical status of patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Int J Clin Pharm，2017，39（1）：95-103.

[3] Bell SP，Schnipper JL，Goggins K，et al. Effect of pharmacist counseling intervention on health care utilization following hospital discharge：a randomized control trial [J]. J Gen Intern Med，2016，31（5）：470-477.

[4] Murphy-Menezes M. Role of the pharmacist in medication therapy management services in patients with osteoporosis [J]. Clin Ther，2015，37（7）：1573-1586.

[5] Yang H，Li LL，Hu XP，et al. Impact of pharmacist-led post-transplant medication management for kidney transplant recipients：a retrospective pre-and post-intervention study [J]. J Clin Pharm Ther，2019，44（4）：603-610.

[6] 王可，侯凯旋，闫素英 . 国内外药物治疗管理开展现状 [J]. 中国药房，2018，29（5）：580-586.

[7] Pellegrino AN，Martin MT，Tilton JJ，et al. Medication therapy management services：definitions and outcomes [J]. Drugs，2009，69（4）：393-406.

[8] 曾英彤，伍俊妍，郑志华 . 美国药师协会药物治疗管理服务 [M]. 北京：中国医药科技出版社，2018：70-71，129-132.

[9] 中华医学会器官移植学分会，中国医师协会器官移植医师分会 . 中国肾移植受者免疫抑制治疗指南（2016 版）[J]. 器官移植，2016，7（5）：1-5.

[10] 中华医学会器官移植学分会 . 中国肾移植术后高尿酸血症诊疗技术规范（2019 版）[J]. 器官移植，2019，10（1）：10-15.

[11] Peloso LJ，Faria PN，Bossolan MV，et al. The serum con-centration of tacrolimus after ingesting omeprazole：a pilot study [J]. Transplantation，2014，98（6）：63-64.

[12] Zhao W，Fakhoury M，Maisin A，et al. Pharmacogenetic determinant of the drug interaction between tacrolimus and omeprazole [J]. Ther Drug Monit，2012，34（6）：739-741.

[13] 李红莲，张峻，李骞，等 . 质子泵抑制剂对器官移植患者他克莫司血药浓度的影响 [J]. 国际药学研究杂志，2019，46（12）：912-917.

[14] Homma M，Itagaki F，Yuzawa K，et al. Effects of lansoprazole and rabeprazole on tacrolimus blood concentration：case of a renal transplant recipient with CYP2C19 gene mu-

tation [J]. Transplantation，2002，73（2）：303-304.
[15] 中华医学会器官移植学分会，中国医师协会器官移植医师分会 . 中国器官移植术后糖尿病诊疗指南（2016 版）[J]. 器官移植，2016，7（6）：407-416.
[16] 中华医学会糖尿病学分会 . 中国血糖监测临床应用指南（2015 年版）[J]. 中华糖尿病杂志，2015，7（10）：603-613.
[17] 李远，吴秋惠，陈燕华，等 . 创新药学服务模式探究——门诊药物治疗管理实践 [J]. 中南药学，2020，18（1）：163-166.

（收稿日期：2021-10-14；修回日期：2021-11-23）

1 例剖宫产术后重度疼痛患者的药学监护

赵路[1]，雷伟[1]，苗杨[2]，王玉霞[3]，马新秀[1]，姚尧[1*]（郑州市妇幼保健院，1. 药学部；2. 麻醉科；3. 产科，郑州 450003）

摘要：临床药师参与 1 例剖宫产术后重度疼痛患者的镇痛治疗，根据患者的疼痛评分和用药方案，查阅相关文献资料，结合自身药学专业知识，协助医师为该患者制订了以非甾体抗炎药为基础的镇痛方案，并进行全程药学监护，取得了良好的镇痛效果，保障患者镇痛治疗安全有效，为临床药师参与剖宫产术后疼痛患者管理的工作模式提供了参考。

关键词：临床药师；剖宫产；术后疼痛；非甾体抗炎药；药学监护
中图分类号：R730.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)05-1209-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.043

有调查研究显示，92.39% 的二胎剖宫产产妇急需术后疼痛控制相关知识 [1]，剖宫产术后镇痛已成为医患关注的焦点。剖宫产术后镇痛不足严重影响产妇恢复和母乳喂养，甚至增加产后抑郁发生的风险 [2]。前期有临床药师参与关节外科患者疼痛管理工作，取得了一定的成效 [3]。本文结合妇幼专科特色，通过临床药师参与 1 例剖宫产术后重度疼痛患者的镇痛治疗，协助医师优化剖宫产术后镇痛方案，进行药学监护，取得了令医患满意的效果。

1　病例摘要

樊某某，女，41 岁，身高 170 cm，孕前体质量 63 kg，现体质量 78 kg，以“孕 36 周 2 d，下腹坠胀 4 d”为主诉入院。既往体健，无高血压病、肾病、糖尿病史；对青霉素过敏；否认肝炎、结核等传染病史；2008 年因异位妊娠于外院行左侧输卵管开窗取胚术。2018 年因脊髓性颈椎病于当地医院行手术治疗，自诉术后疼痛明显，难以忍受。无其他手术及外伤史；孕 7 产 0。曾孕早期行人工流产 5 次。因“卵巢功能减退”行体外受精 - 胚胎移植术。孕 2^{+}月在外院诊断为“易栓症”，给予依诺肝素钠注射液 4000 IU ih qd 治疗 1 个月，后复查治疗效果欠佳，联合阿司匹林肠溶片 100 mg po qd 治疗至今。孕晚期无头晕、眼花等不适。入院查体：体温（T）36.5 ℃，脉搏（P）93 次 • min^{-1}，呼吸（R）22 次 • min^{-1}，血　压（BP）127/84 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa）。专科查体：腹围 105 cm，宫高 33 cm，胎方位左枕前（LOA），胎心 142 次 • min^{-1}，胎先露头，宫颈拒查，胎膜未破，偶有宫缩。Bishop 评分法未查。入院诊断：① 先兆早产；② 易栓症；③ 胚胎移植术后；④ 不良孕产个人史；⑤ 高龄初产；⑥ 孕 36 周 2 d；⑦ 孕 7 产 0；⑧ LOA。

2　主要治疗经过

入院后完善相关检查，于 2021 年 4 月 9 日 10：20 ～ 10：50 在联合麻醉下行新式剖宫产术，术中以 LOA 位娩出一活婴，手术顺利，术中出血 200 mL。手术结束，在彩色多普勒超声引导下给予 0.25% 罗哌卡因 20 mL 于双侧腹横肌平面神经阻滞（TAP），联合患者自控静脉镇痛（PCIA）治疗，术后镇痛药物应用见表 1。

术后对患者进行疼痛评估 [4]，并监测药物不良反应，疼痛评估结果见表 2。术后 10 h（4 月 9 日 20：20）患者诉疼痛难忍，临床医师给予布洛芬缓释胶囊 0.3 g po qd 对症治疗，此时镇痛泵使用情况：总用药量共 26 mL，有效按压次数 4 次；

基金项目：河南省医学科技攻关计划项目（No.LHGJ20200741）。
作者简介：赵路，女，主管药师，主要从事临床药学工作，email：zhaolu1202@163.com　*通信作者：姚尧，女，副主任药师，主要从事医院药学及药事管理工作，email：yaoy567@163.com

表 1 剖宫产术后镇痛药物组成

术后镇痛模式	药物组成				
TAP 药物方案	0.25% 罗哌卡因 20 mL 于双侧腹横肌平面神经阻滞				
PCIA 药物方案	酒石酸布托啡诺注射液 12 mg ＋地佐辛注射液 20 mg ＋盐酸右美托咪定注射液 150 μg ＋盐酸托烷司琼注射液 5 mg，用 0.9% 氯化钠注射液稀释至 100 mL				
PCIA 工作模式	负荷量 2 mL	持续输注量 2 mL・h^{-1}	冲击量 2 mL	锁定时间 15 min	给药总量 100 mL

静息状态疼痛评分：NRS 6 分；功能活动 FAS 及 NRS 评分：床上翻身Ⅲ级 7 分，按压子宫Ⅲ级 7 分。术后 22 h（4 月 10 日 8：30）患者再次诉疼痛难忍，此时镇痛泵使用情况：总用药量 58 mL，有效按压次数较前增加 3 次，共按压 7 次；静息状态疼痛评分：NRS 6 分；功能活动 FAS 及 NRS 评分：床上翻身Ⅲ级 8 分，坐起Ⅳ级 8 分。临床药师探寻患者疼痛为子宫收缩痛，建议停用布洛芬缓释胶囊，改用氟比洛芬酯注射液 50 mg iv q8h。医师接受建议，用药 30 min 后再次进行疼痛评估，静息状态下疼痛评分 NRS 4 分，功能活动评分Ⅱ级 6 分，患者疼痛明显缓解。术后第 1 日，患者下床活动前按压镇痛泵 1 次，术后 42 h 镇痛泵药物用完后给予停用，仅静脉注射氟比洛芬酯。术后第 2 日，患者诉未排气，查体腹胀明显，给予四磨汤口服液对症治疗。术后第 3 日，患者诉已排气，便秘严重，查体未见异常，给予乳果糖口服液治疗，疼痛评分评估为静息状态 NRS 2 分，功能活动 FAS 及 NRS 评分：坐起Ⅱ级 2 分，下床活动Ⅱ级 2 分。术后第 5 日，患者一般情况好，无不适，给予出院。

表 2 患者住院期间静息状态 NRS 评分、功能活动 FAS 及 NRS 评分

评估时间	静息状态 NRS 评分	床上翻身	按压子宫	坐起	下床活动
术后 6 h	5 分	Ⅱ级 6 分	Ⅲ级 6 分		
术后 8 h	4 分	Ⅱ级 6 分	Ⅲ级 6 分		
术后 10 h	6 分	Ⅲ级 7 分	Ⅲ级 7 分		
术后 18 h	6 分	Ⅲ级 7 分	Ⅲ级 7 分		
术后 22 h	6 分	Ⅲ级 8 分		Ⅳ级 8 分	
术后 24 h	5 分	Ⅱ级 5 分		Ⅱ级 5 分	
术后 30 h	5 分	Ⅱ级 4 分		Ⅱ级 4 分	Ⅱ级 5 分
术后 36 h	4 分	Ⅱ级 4 分		Ⅱ级 4 分	Ⅱ级 5 分
术后 42 h	3 分	Ⅱ级 4 分		Ⅱ级 3 分	Ⅱ级 4 分
术后 48 h	2 分	Ⅱ级 3 分		Ⅱ级 3 分	Ⅱ级 3 分
术后 60 h	2 分	Ⅱ级 2 分		Ⅱ级 3 分	Ⅱ级 3 分
术后 72 h	2 分	Ⅱ级 2 分		Ⅱ级 2 分	Ⅱ级 2 分

注：FAS 评分具体分级为Ⅰ级疼痛，完全没有限制功能活动，患者能够如常完成某项功能活动；Ⅱ级疼痛，轻度限制功能活动，患者采用非药物措施（如按压伤口、使用腹带）后能如常开展功能活动；Ⅲ级疼痛，中度限制功能活动，患者采用非药物措施（如按压伤口、使用腹带）后能尝试开展功能活动，但因疼痛无法完成；Ⅳ级疼痛，严重限制功能活动，患者即使采用非药物措施（如按压伤口、使用腹带）仍无法尝试开展功能活动。

3 分析和讨论

普通外科术后疼痛由多种因素引起，包括机械损伤、炎症、缺血或其他刺激等。剖宫产术后人群有其自身的特殊性，就疼痛类型而言，除了外科手术带来的腹壁切口痛和炎症反应导致的炎性痛外，还有剖宫产特有的子宫阵发性收缩产生的宫缩痛，产后胀乳疼痛等，剖宫产术后急性疼痛 12 h 达到峰值，持续将近 24 h[5]；就该患者而言，有多次手术史，疼痛阈值较低，是术后疼痛管理重点关注的对象，且产妇处于哺乳期，镇痛药物既要兼顾母体自身的有效性又要考虑哺乳的安全性。

3.1 患者镇痛方案的分析

该产妇 PCIA 的药物组分中的地佐辛和布托啡诺均属于阿片型的受体激动类的拮抗药物，是术后镇痛药物常用的药物[6]。然而以非甾体抗炎药（NSAIDs）为基础，借鉴阿片类药物的多模式镇痛方案已成为加速康复外科疼痛管理中的主流趋势，研究表明，NSAIDs 与阿片类药物的联用可减少大手术后 50% ～ 70% 吗啡用量，从而有效降低阿片类药物相关的恶心、呕吐、抑制胃肠蠕动及便秘、新生儿中枢抑制等不良反应的发生率[7-8]。2016 年美国疼痛协会指出：排除禁忌证，所有儿童和成人患者的术后疼痛管理，都应给予 NASIDs 作为多模式镇痛的一部分。该患者的术后镇痛方案未覆盖 NSAIDs，因此在产妇镇痛效果不佳时，药师建议医师考虑联合应用 NSAIDs 类药物。

3.2 NSAIDs 的应用

NSAIDs 可有效预防手术治疗后炎症相关痛敏反应，可使外周与中枢敏化得到有效抑制，将术后慢性疼痛减轻，提升患者舒适度，发挥超前镇痛作用，且不良反应少[9]。与阿片类药物按需给药的原则不同，NSAIDs 类药物是按时给药。

NSAIDs 根据药物作用靶点不同，可以分为酮咯酸氨丁三醇、氟比洛芬酯等非选择性 NSAIDs，塞来昔布、帕瑞昔布等高选择性 NSAIDs 和其他 NSAIDs。氟比洛芬酯是以脂微球为载体，具有靶向作用，进入体内可靶向分布至创伤部位后，从脂微球中释放，在羧基酯酶作用下迅速水解生成氟比洛芬，经氟比洛芬抑制前

列腺素的合成而发挥镇痛作用。有报道术前、术中、术后持续输注氟比洛芬酯可发挥抑制中枢敏化作用，其他非选择性 NSAIDs 术前用药的作用尚未确定。布洛芬效果不佳的情况下，建议医师换用氟比洛芬酯。既往研究显示，氟比洛芬酯与布托啡诺联合应用可降低布托啡诺的不良反应发生率，并增加镇痛效果，且氟比洛芬酯并没有呼吸抑制和中枢性镇痛的效果，可以安全地用于剖宫产术前、术中以及术后[10]。因此临床药师建议将氟比洛芬酯作为镇痛泵的组成成分之一，以达到多模式镇痛的效果，已反馈给麻醉科，相关工作正在有序开展。

3.3 NSAIDs 哺乳期的安全性

剖宫产术后镇痛与其他种类手术术后镇痛另外的不同之处是选择的药物以及给药方式均要对母乳影响最小。药物的脂溶性和蛋白结合率会影响乳汁中的药物浓度，大部分的 NSAIDs 都具有低脂溶性和高蛋白结合率的特点，不宜通过血乳屏障。研究发现，剖宫产术后镇痛泵中加入氟比洛芬酯，用药 24 h 后乳汁中未检测到氟比洛芬[11]，可作为哺乳期 NSAIDs 的选择之一[12]。

3.4 镇痛方案的药学监护

NSAIDs 的主要不良反应包括胃肠道、心血管、血小板计数异常等，临床药师制订了详细的药学监护计划，关注患者胃肠道不适症状，及时采取相应措施，并告知患者和家属可能发生的胃肠道不适的原因，减轻其恐慌和焦虑，该患者镇痛泵中托烷司琼对预防恶心呕吐也有一定的作用。术后该患者出现腹胀和便秘，不伴有恶心呕吐，可能与使用阿片类药物或托烷司琼有关，也可能与患者因疼痛术后活动受限有关，对症治疗后，症状缓解。

临床药师在药学查房时，了解到该患者因为疼痛难忍，要求联合应用布洛芬和氟比洛芬酯，或者增加氟比洛芬酯的剂量。NSAIDs 具有“天花板”镇痛效应，达到最大效果后，增加剂量镇痛疗效并不增加，且血浆蛋白结合率高，会导致用药风险急剧上升[13]。因此一定要避免超说明书剂量使用；同类药物勿联合使用；采用最低有效剂量且不宜长时间使用。经过药师详细讲解药学知识后，患者最终选择遵医嘱用药，避免了潜在的用药风险。

4 小结

本文通过临床药师参与剖宫产术后重度疼痛患者的镇痛治疗，从临床药学的角度，合理使用 NSAIDs，服务于临床，并进行全程药学监护，取得了令医患满意的效果；同时通过参与临床，发挥自身的药学知识优势，提升临床药师在医疗团队中的地位，打开了临床医师对 NSAIDs 在剖宫产术后疼痛治疗中的新思路，并以此本院也将逐渐形成临床药师参与剖宫产术后疼痛管理的工作模式，提升临床药师在医疗团队中的地位，提高医院的整体医疗水平，使患者得到更专业的医疗服务。

参考文献

[1] 吴波，常隽，刘静，等 . 二胎剖宫产待产妇服务需求现状及其影响因素 [J]. 医学与社会，2020，33（11）：57-61.

[2] 于瀛，马腾彪，戚思华 . 剖宫产术后镇痛方式的研究进展 [J]. 医学综述，2021，27（1）：126-130.

[3] 张晅，陈春玲 . 临床药师参与关节外科患者疼痛管理的工作模式构建及药学监护实践 [J]. 中南药学，2021，19（1）：133-136.

[4] 成燕，童莺歌，刘敏君，等 . 手术后患者活动性疼痛的护理评估现状 [J]. 中国实用护理杂志，2015，31（7）：481-485.

[5] Cao XQ，Zhang XW. Comparison of different sufentanil-tramadol combinations for pain relief within the first 24 hours after cesarean section：a retrospective study [J]. J Pain Res，2018，(11)：2445-2451.

[6] 王朝辉，毛毛，张盼盼，等 . 持续背景输注不同剂量酒石酸布托啡诺对疤痕子宫产妇再次剖宫产术后疼痛的效果 [J]. 临床麻醉学杂志，2020，36（7）：656-659.

[7] 国家卫生健康委员会医管中心加速康复外科专家委员会，浙江省医师协会临床药师专业委员会，浙江省药学会医院药学专业委员会 . 中国加速康复外科围手术期非甾体抗炎药临床应用专家共识 [J]. 中华普通外科杂志，2019，34（3）；283-288.

[8] 阮剑辉，甘国胜，宋晓阳 . 多模式镇痛药物和技术在快速康复外科临床应用进展 [J]. 广东医学，2020，41（23）：2402-2406.

[9] 牛富国，刘雪红，侯增光，等 . 帕瑞昔布钠超前镇痛对剖宫产术产妇炎性因子及应激的影响 [J]. 海南医学院学报，2016，22（19）：2322-2324，2328.

[10] 温剑华，李建平，蔡青，等 . 剖宫产术后应用布托啡诺复合氟比洛芬酯的镇痛效果观察 [J]. 临床合理用药杂志，2018，11（1）：65-66.

[11] 王晓燕，郑海燕 . 氟比洛芬酯复合舒芬太尼用于剖宫产手术后静脉镇痛对新生儿哺乳安全性研究 [J]. 浙江创伤外科，2016，21（2）：392.

[12] Amundsen S，Nordeng H，Nezvalová-Henriksen K，et al. Pharmacological treatment of migraine during pregnancy and breastfeeding [J]. Nat Rev Neurol，2015，11（4）：209-219.

[13] 王融溶，饶跃峰，俞振伟，等 . 围手术期非甾体抗炎药合理使用情况的多中心回顾性研究 [J]. 中国药学杂志，2019，54（13）：1104-1108.

（收稿日期：2021-07-10；修回日期：2021-10-08）

药品不良事件信号监测专题

基于美国 FAERS 数据库的利那洛肽不良事件信号挖掘与分析

王浩[1]，阳丽[1]，刘小英[1]，陈力[2, 3, 4*]（1. 成都市新都区人民医院药剂科，成都 610500；2. 四川大学华西第二医院药学部，成都 610041；3. 四川大学华西第二医院循证药学中心，成都 610041；4. 出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室，成都 610041）

摘要：目的 采用美国 FDA 不良事件报告系统挖掘利那洛肽的不良事件信号，为其安全风险控制和临床合理用药提供参考。**方法** 采用报告比值比法和综合标准法对美国 FAERS 数据库中 2016 年第一季度至 2021 年第二季度共 22 个季度的利那洛肽相关不良事件报告进行数据挖掘。**结果** 获得利那洛肽报告数 1088 个，不良事件信号 75 个，涉及 11 个系统器官，主要集中在胃肠系统疾病及全身性疾病及给药部位各种反应；发现了如便秘、大便不规律、胃肠动力障碍、粪便变色、硬便、便血、胃肠鸣音异常、直肠出血、肠梗阻、尿潴留、憩室炎、嗳气、胃扩张、尿排出量降低、肾疼痛、皮肤气味异常等多个新的药物不良事件。**结论** 基于 FAERS 数据库对利那洛肽上市后的不良事件进行全面的挖掘分析，可对临床安全及合理用药提供参考。

关键词：利那洛肽；不良事件；数据挖掘
中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)05-1212-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.05.044

Datamining of adverse event signals of linaclotide based on FAERS database

WANG Hao[1], YANG Li[1], LIU Xiao-ying[1], CHEN Li[2, 3, 4*] (1. *People's Hospital of Xindu District*, *Chengdu* 610500; 2. *Department of Pharmacy*, *West China Second University Hospital*, *Sichuan University*, *Chengdu* 610041; 3. *Evidence-Based Pharmacy Center*, *West China Second University Hospital*, *Sichuan University*, *Chengdu* 610041; 4. *Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children* (*Sichuan University*), *Ministry of Education*, *Chengdu* 610041)

Abstract: Objective To analyze the adverse event signals of linaclotide with the data from US FDA Adverse Event Reporting System (FAERS) to provide guidance for the safe and rational use of linaclotide. **Methods** Reporting odds ratio and comprehensive Healthcare Products Regulatory method were used to analyze the data in FAERS database from the first quarter of 2016 to the second quarter of 2021. **Results** Totally 1088 linaclotide related reports were collected, with 75 adverse event signals, involving 11 system sorgans, mainly occurring in the gastrointestinal system, systemic diseases and various reactions at the administration sites. Multiple new adverse drug events were also discovered, including iconstipation, irregular stool, gastrointestinal motility obstacles, discoloration of stool, hard stool, bloody stool, abnormal gastrointestinal sounds, rectal bleeding, intestinal obstruction, urinary retention, diverticulitis, belching, stomach distension, decreased urine output, renal pain, and abnormal skin odor. **Conclusion** Based on the FAERS database, the adverse events of linalool peptide after marketing are comprehensively analyzed, which provides reference for clinical safety and rational use of linaclotide.

Key words: linaclotide; adverse event; data mining

基金项目：成都市医学科研课题（No.2020114）；成都某区心血管疾病患者用药依从性风险 KAP 调查研究（No.CMEI2021KPYJ00104）。
作者简介：王浩，男，主要从事医院药学与药事管理研究，email：1273784755@qq.com *通信作者：陈力，男，副主任药师，主要从事临床药学与医院合理用药研究，email：13674852qq.com

肠易激综合征（IBS）是一种全球范围内常见的、以腹痛 / 腹胀或腹部不适为主要症状的功能性肠病，排便后症状多有改善，常伴有排便习惯（频率和 / 或性状）的改变 [1]。若腹部症状＋便秘反复不断，则很有可能是 IBS 的一种主要亚型便秘型肠易激综合征（IBS-C）[2]。我国 IBS 患病率为 6.5%[1]，其中 IBS-C 占比达 15.1%[3]。利那洛肽是一种鸟苷酸环化酶 C 受体（GC-C）激动剂，它与肠道 GC-C 结合后，一方面使细胞内和细胞外环磷酸鸟苷（cGMP）浓度升高，可刺激肠液分泌，加快胃肠道蠕动，从而增加排便频率；另一方面细胞外 cGMP 浓度升高可降低痛觉神经信号传导，缓解腹痛症状 [4-5]。2013 年 2 月，利那洛肽在美国获批准上市，用于 IBS-C 和慢性特发性便秘患者的治疗。作为全球首个获批用于便秘治疗的鸟苷酸环化酶 C 激动剂，它的上市填补了 IBS-C 患者仅能选择症状改善类药物而无针对性治疗药物的空白。2019 年 1 月 15 日国家药品监督管理局（NMPA）批准该药正式在中国上市。作为我国专门治疗成人 IBS-C 的处方药物，将填补我国成人 IBS-C 治疗的空白，为广大国内患者带来福音。随着利那洛肽的广泛使用，真实世界的药物不良事件（ADE）报告也逐渐增多。本文通过对美国 FDA ADE 报告系统（FAERS）收集到的数据进行挖掘和筛选，分析利那洛肽可疑的 ADE 信号，以期为国内临床安全合理用药提供参考。

1　资料与方法

1.1　数据来源

选取 FAERS 数据库中 2016 年第一季度至 2021 年第二季度共 22 个季度的数据，用 MySQL 进行分析，去重处理后得到首要怀疑药物为利那洛肽的 ADE 报告。

1.2　数据筛选

以利那洛肽的通用名“Linaclotide”和商品名“LINZESS”为关键检索词在数据库中进行检索，得到包括人员信息、药物信息、ADE 和原发疾病等数据资料，删除重复和存疑数据，形成研究 ADE 的原始数据。

1.3　数据处理

采用《国际医学用语词典》MedDRA 23.0 更新版（MedDRA）中药物不良反应（ADR）术语集的首选系统器官分类（SOC）和首选术语（PT）对 ADE 进行分类和表达，并完成相应的中英文映射。

1.4　数据分析

选用在 ADE 监测中广泛应用的比值失衡测量法中的报告比值比法（ROR）[6] 和综合标准法（MHRA）[7] 分别计算 ROR 值和比例报告比值（PRR），筛选潜在信号（见表 1、2）。目标药物相关风险信号的检测阈值设定为 ROR 中 95% 的可信区间（95% *CI*）下限大于 1 且报告数不少于 3 例，以及 MHRA 中 PRR ≥ 2、$\chi^2 \geq 4$ 且报告数不少于 3 例 [8]。

1.5　严重 ADE

严重 ADE 系指使用药物引起下列情况之一：导致死亡；危及生命；致畸、致癌、致缺陷；导致显著或永久的人体伤残或器官功能损伤；导致住院或住院时间延长；导致其他重要医学事件，如不进展治疗可能出现上述情况（如成瘾性）。

2　结果

2.1　ADE 报告的基本情况

2016 年第一季度至 2021 年第二季度的 ADE 背景信号共 22 137 402 个，其中经删除重复数据后得到首要怀疑药物为利那洛肽的 ADE 报告共 16 730 份，报告数 1088 个。在 6560 例患者的报告中，可发现女性占大多数（61.20%），患者主要为 18 岁及以上人群（34.59%），而美国是报告数最多的国家（94.38%），2016 至 2020 年每年报告数差距不大，具体报告基本信息见表 1。

表 1　利那洛肽相关 ADE 报告基本信息

Tab 1　Basic information of linaclotide ADE reports

信息	分类	报告例数	构成比 /%
性别	男性	1956	29.82
	女性	4015	61.20
	不清楚	589	8.98
年龄段	＜ 18 岁	143	2.18
	18 ～ 64 岁	1152	17.56
	≥ 65 岁	1117	17.03
	不清楚	4148	63.23
报告国家（前三）	美国	6191	94.38
	日本	193	2.94
	加拿大	8	0.12
年份（2016—2021）	2016	1169	17.82
	2017	1377	20.99
	2018	1610	24.54
	2019	1263	19.25
	2021	58	0.88

2.2　不良反应信号分析结果

对利那洛肽为首要怀疑药品的 ADE 信号进行筛选，经 ROR 法和 MHRA 法筛选后最终获得的利那洛肽 ADE 信号数为 102 个，报告总计数为

11 623 份，经删除存疑信号后，得到 ADE 相关信号 75 个，报告总计数为 7577 份。在有信号的 PT 中，以报告数排序的前 50 位如表 2 所示。其中，较为常见的未在说明书中提及的 ADE 为腹泻（1943 例）、腹胀（434 例）、腹痛等（318 例）等。

表 2 利那洛肽报告数排名前 50 位的 ADE 信号

Tab 2 Top 50 ADE signals of linaclotide in descending order of reports

序号	首选术语	例数	95%*CI* 下限（ROR）	PRR χ^2	序号	首选术语	例数	95%*CI* 下限（ROR）	PRR χ^2
1	腹泻 *	1943	12.19	14 831.96	26	胃肠痛 *	19	3.51	69.72
2	便秘	524	7.83	3201.34	27	憩室炎	19	1.31	10.29
3	腹胀 *	434	13.69	5269.20	28	嗳气	18	2.47	38.98
4	腹痛 *	318	4.35	928.37	29	里急后重 *	15	29.47	681.31
5	上腹痛 *	304	4.50	937.33	30	肛门直肠不适	14	8.49	171.87
6	肠胃气胀 *	298	16.80	4746.32	31	粪便松软	13	3.24	48.64
7	腹部不适	139	2.11	121.27	32	功能性胃肠紊乱	12	5.23	87.33
8	大便不规律	96	32.54	3473.10	33	粪瘤	12	4.13	64.51
9	脱水 *	85	1.83	59.48	34	肛部痛	11	3.55	50.07
10	肛门失禁 *	72	14.76	1171.04	35	失禁 *	11	1.98	20.32
11	排便频率增加	69	6.87	462.88	36	肠易激综合症	11	1.18	6.59
12	粪便异常	68	21.37	1660.67	37	胃扩张	10	9.44	154.39
13	胃肠动力障碍	63	27.55	2027.01	38	肠梗阻（机能性）	8	1.18	6.28
14	粪便变色	62	7.50	471.99	39	尿排出量降低	7	1.36	8.40
15	硬便	57	37.61	2553.89	40	肾疼痛	7	1.01	4.17
16	紧急排便感 *	41	16.62	827.53	41	电解质失衡 *	7	1.00	4.04
17	大便次数少	37	37.14	1750.44	42	皮肤气味异常	6	2.34	20.41
18	便血	36	1.53	21.38	43	痔疮出血	6	1.47	9.44
19	胃肠鸣音异常	31	17.21	683.39	44	胃排空障碍	6	1.16	5.77
20	直肠出血	31	1.55	20.46	45	肠扭转	5	2.72	23.43
21	排便困难	28	16.60	606.37	46	缺血性结肠炎	5	1.13	5.38
22	痔疮	27	3.19	76.79	47	胃肠运动过强	4	12.82	126.94
23	肠梗阻	27	1.59	20.20	48	胃肠道动力不足	4	4.04	35.34
24	尿潴留	22	1.44	14.04	49	血电解质降低 *	4	3.51	29.79
25	下腹痛 *	20	1.73	20.98	50	消瘦	4	3.32	27.75

注：“*”表示在利那洛肽说明书中出现的 PT。

Note：“*” represents PT which appear in the instruction of linaclotide.

2.3 SOC 分类 ADE 报告及信号分类

根据 MedDRA 对有信号的 PT 进行 SOC 分类排序，可发现有信号的 SOC 11 个，具体见图 1。其中，胃肠系统疾病（64.99%）、全身性疾病及给药部位各种反应（32.04%）的报告例数相对较多。

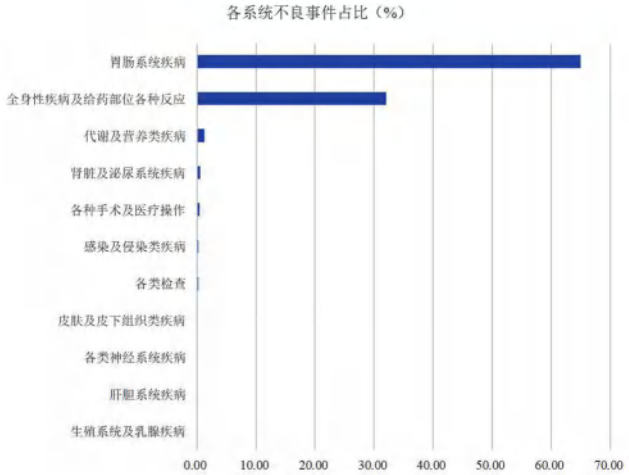


图 1 各 SOC 项下不良事件信号的报告例数占比

Fig 1 Percentage of ADE signal detection of each SOC

2.4 严重的 ADE

严重的 ADE 主要体现在胃肠系统和肾脏及泌尿系统两大类。其中在胃肠系统主要表现为肛门失禁、便血、直肠出血、肠梗阻等，而在肾脏及泌尿系统疾病主要表现为尿潴留、失禁等（见表 3）。

3 讨论

通过 ROR 法和 MHRA 法挖掘到的 ADE 信号与利那洛肽说明书记录及用药警示信息基本一致，主要表现为胃肠系统疾病、全身性疾病及给药部位各种反应。

表 3　严重的 ADE 信号

Tab 3　Severe ADE signal

分类	SOC	PT	95%*CI*（ROR）下限
肛门失禁	胃肠系统疾病	72	14.76
便血	胃肠系统疾病	36	1.53
直肠出血	胃肠系统疾病	31	1.55
肠梗阻	胃肠系统疾病	27	1.59
肠梗阻（机能性）	胃肠系统疾病	8	1.18
肠扭转	胃肠系统疾病	5	2.72
缺血性结肠炎	胃肠系统疾病	5	1.13
胃肠穿孔	胃肠系统疾病	4	1.16
尿潴留	肾脏及泌尿系统疾病	22	1.44
失禁	肾脏及泌尿系统疾病	11	1.98
肾疼痛	肾脏及泌尿系统疾病	7	1.01
间质性膀胱炎	肾脏及泌尿系统疾病	4	3.14
非心源性胸痛	全身性疾病及给药部位各种反应	3	1.12
憩室炎	感染及侵染类疾病	19	1.31
胆绞痛	肝胆系统疾病	3	1.18
脱水	代谢及营养类疾病	85	1.83

3.1　常见的 ADE 信号

一项关于利那洛肽治疗 IBS-C 的 meta 分析发现利那洛肽的主要不良反应为胃肠道反应，以腹痛、腹泻较为常见[9]。结合表 2 和图 1 可发现，胃肠系统疾病这一 SOC 的 ADE 报告数占比最高，主要信号包括腹泻、腹胀、腹痛等。在慢性便秘患者的两项大型Ⅲ期试验中，最常见和剂量相关的 ADE 是腹泻，导致两个利那洛肽治疗组中 4% 的患者停止治疗[10]。一项利那洛肽在对合并便秘的 IBS 患者的Ⅱ b 期研究中发现有至少 3% 的利那洛肽使用者发生了腹泻，且腹泻发生率跟剂量成正相关，大多数为轻度或中度，也有部分患者出现较为严重的腹泻，从第一次服用研究药物到首次出现腹泻的中位天数为 4 d[11]，可能与利那洛肽主要作用于胃肠道有关，提示临床使用过程中如果发生持续（如超过 1 周）或重度腹泻，应考虑暂停利那洛肽直至腹泻缓解，同时因持续性或严重腹泻可能导致水、电解质紊乱，对有水、电解质紊乱倾向及耐受性差的患者（如老年人、心血管疾病患者、糖尿病和高血压）应谨慎使用。一项为期 12 周的临床随机对照试验发现，有 7 例接受利那洛肽的患者在治疗结束时血清碳酸氢盐水平低于正常下限，但这些患者均未报告腹泻为或其他被认为与低碳酸氢盐水平有关的不良反应[12]，提示利那洛肽使用者虽未出现腹泻但依然有酸碱失衡的风险。对于上述情况，应考虑检查电解质及酸碱平衡。除说明书记载的常见胃肠道不良反应，此次研究还检测到粪便变色、胃肠鸣音异常、肠梗阻、便血、肠扭转、胃肠穿孔等少见的胃肠道 ADE 信号，提示在治疗过程中发生此类疾病需考虑是否具有相关性，在存在高危因素尤其有肠梗阻的患者应避免使用。而仅次于胃肠系统疾病的全身性疾病及给药部位反应，主要信号包括药物无效、对非适应证用药无效、治疗反应减弱，提示临床在使用过程中注意观察药品效应，出现上述情况应考虑重新调整用药方案。

3.2　其他少见的 ADE 信号

虽然在安全性上，利那洛肽几乎不进入血液循环，与其他药物基本无相互作用[13]，但在本次研究中发现尚有少量非胃肠系统的新的 ADE 信号的报告，主要包括尿排出量降低、肾疼痛、皮肤气味异常等，具体原理和机制尚不明确。说明书中病毒性胃肠炎、头晕、头痛是常见的 ADE，但在本次研究前 50 位中却未被发现，此处与说明书提示存在差异，临床需注意。

3.3　严重的 ADE 信号

通过表 3 可以发现利那洛肽严重 ADE 信号中肛门失禁、脱水较其他严重 ADE 信号计数多，可能是因腹泻是利那洛肽常见的 ADE，严重腹泻及腹泻持续时间较长时容易导致患者肛门失禁、脱水，且肛门失禁信号强度较大，提示于药物使用的相关性较强。此外，其他严重 ADE 虽然发生较少但可能会导致患者住院或危及生命，提示在使用过程中应密切监测，出现以上严重 ADE 时应立即停药，并做相应处理。

3.4　小结

即使有如此大样本的数据，本研究仍存在一定的局限性。首先，由于 FAERS 是自发呈报系统，存在漏报、错报等情况；其次，尽管 ROR 法和 MHRA 法两种方法同时使用，但仍不能完全排除假阳性信号的出现；另外，在使用 MedDRA 术语集时，使用比 PT 更高级别的术语可能出现统计上不同的结果[14]；最后，定量信号检测方法产生的 ADE 信号是基于报告的数量关联而非生物学关联[15]。综上，本研究无法精确定义利那洛肽的 ADE 真实发生率，最终结果仍需进一步的研究证实。

4　结论

基于美国 FAERS 数据库，利用 ROR 法和 MHRA 法对利那洛肽上市后的 ADE 进行分析，

挖掘出更加真实完整的药品安全信息，发现了如便秘、大便不规律、胃肠动力障碍、粪便变色、硬便、便血、胃肠鸣音异常、直肠出血、肠梗阻、尿潴留、憩室炎、嗳气、胃扩张、尿排出量降低、肾疼痛、皮肤气味异常等新的 ADE，同时还观察到利那洛肽在胃肠系统、全身性疾病及给药部位各种反应方面的 ADE 相对较多，这在一定程度上弥补了药品上市前临床试验的不足，可为临床合理用药提供参考。当然，利那洛肽的 ADE 还需在真实世界中不断地被探索和研究，以更好地为患者的生命健康保驾护航。

参考文献

[1] 中华医学会消化病学分会胃肠功能性疾病协作组，中华医学会消化病学分会胃肠动力学组 . 中国肠易激综合征专家共识意见（2015 年，上海）[J]. 中华消化杂志，2016，36（5）：299-312.

[2] Lacy BE，Mearin F，Chang L，et al. Bowel disorders [J]. Gastroenterology，2016，150（6）：1393-1407.

[3] 熊理守，陈曼湖，陈惠新，等 . 广东省社区人群肠易激综合征的流行病学研究 [J]. 中华医学杂志，2004，84（4）：278-281.

[4] Thomas RH，Luthin DR. Current and emerging treatments for irritable bowel syndrome with constipation and chronic idiopathic constipation：focus on prosecretory agents [J]. Pharmacotherapy，2015，35（6）：613-630.

[5] Ford AC，Moayyedi P，Lacy BE，et al. American college of gastroenterology monograph on the management of irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation [J]. Am J Gastroenterol，2014，109（8）：2-26.

[6] Sakadeda T，Tamon A，Kadoyama K，et al. Data mining of the public version of the FDA adverse event reporting system [J]. Int J Med Sci，2013，10（7）：796-803.

[7] Ye X，Fu Z，Wang H，et al. A computerized system for signal detection in spontaneous reporting system of Shanghai China [J]. Pharmacoepidemiol Drug Saf，2009，18（2）：154-158.

[8] 张婧媛，白羽霞，韩晟，等 . 数据挖掘方法检测药品不良反应信号的应用研究 [J]. 药物不良反应杂志，2016，18（6）：412-416.

[9] 刘雪莲，杨见权，潘昭杰 . 利那洛肽治疗便秘型肠易激综合征的分析 [J]. 中国新药与临床杂志，2013，32（8）：650-655

[10] Lembo AJ，Schneier HA，Shiff SJ，et al. Two randomized trials of linaclotide for chronic constipation [J]. N Engl J Med，2011，365（6）：527-536.

[11] Johnston JM，Kurtz CB，Macdougall JE，et al. Linaclotide improves abdominal pain and bowel habits in a phase iib study of patients with irritable bowel syndrome with constipation [J]. Gastroenterology，2010，139（6）：1877-1886.

[12] Rao S，Lembo AJ，Shiff SJ，et al. A 12-week，randomized，controlled trial with a 4-week randomized withdrawal period to evaluate the effi cacy and safety of linaclotide in irritable bowel syndrome with constipation [J]. Am J Gastroenterol，2012，107（11）：1714-1724.

[13] Thomas RH，Luthin DR. Current and emerging treatments for irritable bowel syndrome with constipation and chronic idiopathic constipation：focus on prosecretory agents [J]. Pharmacotherapy，2015，35（6）：613-630.

[14] Pearson RK，Hauben M，Goldsmith DI，et al. Influence of the MedDRA hierarchy on pharmacovigilance data mining results [J]. Int J Med Inform，2009，78（12）：97-103.

[15] 张晓兰，夏佳 . 浅谈药物警戒中的安全信号与信号管理 [J]. 药物流行病学杂志，2012，21（2）：90-94.

（收稿日期：2021-10-08；修回日期：2021-11-30）

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

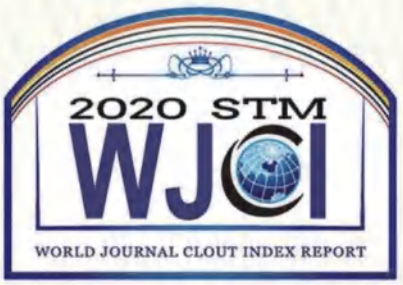
曾春辉　湖南天士力民生药业有限公司总经理
黎鸠鸠　湖南一格制药有限公司总经理

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



世界期刊影响力指数（WJCI）报告（2020科技版）

收录证书

This is certificate for

中南药学

（ISSNS：1672-2981）

to be indexed in

World Journal Clout Index Report(2020 STM)

项目联合研发单位 Project research units：

中国科学技术信息研究所 Institute of Scientific and Technical Information of China

《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司 Chinese Academic Journal(CD Edition) Electronic Publishing House Co.ltd

清华大学图书馆 Library of Tsinghua University

万方数据有限公司 Wanfang Data Co.Ltd

中国高校科技期刊研究会 Society of China University Journals

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