◆ 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6月 第20卷 第6期
Volume 20 Number 6 June 2022

CENTRAL SOUTH PHARMACY

◆ SiO_2/PDMS复合膜的制备及其蒸汽渗透分离石菖蒲油水混合液的性能研究
◆ 香烟烟雾颗粒通过MAPK和NF-κB信号通路上调内皮素受体诱导大鼠肠系膜动脉平滑肌收缩
◆ 鸦胆子转录组测序及基因功能注释
◆ 药物递释系统用于肝纤维化的开发与思考

ISSN 1672-2981
9 771672 298224 06>

6
2022

中南药学 第二十卷 第六期 第1217～1466页 二〇二二年六月

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 6 期（总第 197 期）　2022 年 6 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

（1217）基于生物信息学和实验探究艾灸对肺纤维化的作用及其机制 …… 董怀洋，叶雨萌，李包娟，等

（1226）狼毒大戟的化学成分及细胞毒活性研究 …… 葛继芸，周艳卿，邱彦，等

（1232）SiO_2/PDMS 复合膜的制备及其蒸汽渗透分离石菖蒲油水混合液的性能研究 …… 姬莎莎，刘红波，唐志书，等

（1238）香烟烟雾颗粒通过 MAPK 和 NF-κB 信号通路上调内皮素受体诱导大鼠肠系膜动脉平滑肌收缩 …… 张盼，王钰莹，王婷，等

（1245）非水溶媒水合氯醛灌肠剂的制备及体外释放研究 …… 周春慧，王增明，韩晓璐，等

（1251）氟康唑片在中国健康受试者的生物等效性研究 …… 张丽英，郭彩会，宋浩静，等

（1255）基于 LTB4/BLTR 通路探讨黄芩苷 - 栀子苷配伍对局灶性脑缺血大鼠再灌注损伤的影响 …… 周爽，李慧敏，张行行，等

（1262）多花黄精须根营养成分及抗氧化活性研究 …… 高海燕，余欢迎，金传山，等

（1267）鸦胆子转录组测序及基因功能注释 …… 石好宇，王慧芸，赵艺，等

（1274）冻干口崩片的质量评价研究 …… 李思潼，薛婉莹，李红鑫，等

（1280）联合质谱法与光谱法探讨辐照前后医用胶原蛋白海绵的三螺旋结构及变化 …… 程红，田锐

（1287）五味子总木脂素的富集及微乳制备研究 …… 许煜晨，丁文文，赛那，等

（1294）基于网络药理学的复方杜仲健骨颗粒作用机制解析研究 …… 舒展，任越，陈紫军，等

（1301）超高效液相色谱 - 飞行时间质谱法鉴定蛇胆汁特征成分及其应用研究 …… 黄博，黄清泉，白桂昌，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
睢大筠　肇丽梅　翟　青　黎　敏
颜　苗　潘卫三　魏高文

（1309）栀子花舒心胶囊、酸橙花舒畅胶囊和酸橙栀子双花抗脑衰胶囊对大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤的保护作用
…… 张忠立，李淑琪，左月明

（1316）基于 PERK-ATF4-CHOP 通路探讨马里苷对高糖高脂诱导胰岛 β 细胞损伤的影响
…… 克迪热亚·卡地尔，祖力皮亚·阿布拉，马红梅，等

（1322）注射用红花黄色素抗心肌缺血和抗凝量效关系研究
…… 梁五林，蔡梦如，崔爽，等

（1328）微透析技术研究盐酸曲马多在小鼠额叶皮层细胞外液药动学的性别差异 …… 朱岳，黄东梅

（1333）CRITIC-AHP 法结合 Box-Behnken 响应面法优选三金排石合剂提取工艺 …… 石金敏，周灿，余绪明，等

（1338）肾复舒颗粒通过调节炎症和纤维化延缓糖尿病肾病的发展
…… 杨永玉，姜思怡，葛星成，等

综述

（1344）药物递释系统用于肝纤维化的开发与思考
…… 许青，刘莉莎，杨磊，等

（1354）软胶囊崩解迟缓问题及评测方法的研究进展
…… 张强，张纯刚，程岚，等

（1359）雄黄的形态砷与价态砷在体内的转化和蓄积
…… 陈杨，王楚茵，姚妮，等

（1366）药源性低纤维蛋白原血症危险因素和可能机制的研究进展
…… 郑昕昕，王静，朱怀军，等

（1373）能量代谢与氧化应激在肿瘤中的作用及其相互关系
…… 阎鑫宇，张绍林，陈海燕，等

（1379）白杨素生物利用度的影响因素及提高办法研究进展
…… 石志群，田贻婷，张朋朋，等

（1385）脑转移瘤的药物治疗选择…… 叶莉，钟晓辉

（1391）NLRP3 炎症小体在心血管疾病中的研究进展
…… 刘铂，王瑞莹，周嘉惠，等

药物分析与检验

（1397）不同产地延龄草根茎药材 HPLC 指纹图谱和 3 种甾体皂苷成分的含量测定及多元统计分析 …… 左月明，陈林林，张忠立

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。

（1404）阿卡波糖口服固体制剂含量测定方法的优化 …… 石笑弋，易必新，李昌亮，等

（1407）HPLC-MS 法检测盐酸美金刚片中 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸的含量 …… 黄引，蔡国伟，钟莹，等

（1412）三方益子膏的质量标准研究…… 陈海燕，随家宁，黄婉清，等

（1417）加校正因子的替代对照品法测定注射用头孢硫脒聚合物 …… 黄财顺，贺凡珍，王乾蕾

（1422）反相高效液相色谱法同时测定清泻丸中 8 种成分的含量 …… 蒋范任，王玮，肖正贤，等

（1426）超高效液相色谱 - 四极杆线性离子阱串联质谱法法测定他达拉非原料药中潜在基因毒性杂质的含量 …… 刘家兴，李丽美，杨庆云，等

（1430）基于染色法和 HPLC 法测定龙葵不同部位中多酚含量 …… 孟莹，王晓红，刘晓利，等

医院药学

（1436）吸入性糖皮质激素治疗儿童哮喘安全性的网状 meta 分析 …… 申丽红，胡利华，尉耘翠，等

（1443）时间序列模型在门诊患者抗菌药物使用率预测中的应用 …… 王娜，闵芳芳

（1448）黄芩苷领域的文献计量研究及其可视化分析 …… 惠玉玉，王敏，田文丽，等

（1454）Ⅳ型心肾综合征患者 IL-35 血浓度及药学意义的探讨 …… 白运焕，陈葶，王涛，等

（1457）利用医院卫生技术评估对 2018—2020 年南京地区 67 家医院保肝药物使用现状及趋势进行分析 …… 彭苗苗，刘慧

（1463）肺癌患者使用阿美替尼后出现横纹肌溶解症的用药分析 …… 欧阳丽辉，何鸽飞，黄娟娟，等

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*250*zh*P*25.0*42*2022-6

本期责任编辑：陆窈窈，彭金飞，邬志娟，李科

英文编辑：周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 20, Number 6 June 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

(1217) Effect of moxibustion on pulmonary fibrosis based on bioinformatics and experiments and the mechanism …… *DONG Huai-yang, YE Yu-meng, LI Bao-juan, et al*

(1226) Chemical constituents and cytotoxic activity of *Euphorbia fischeriana* Steud. …… *GE Ji-yun, ZHOU Yan-qing, QIU Yan, et al*

(1232) Preparation of SiO_2/PDMS composite membrane and its performance in vapor permeation separation of *Acorus calamus* oil-water mixture …… *JI Sha-sha, LIU Hong-bo, TANG Zhi-shu, et al*

(1238) Endothelin receptor-mediated vaso contraction via activation of MAPK/NF-κB pathways in the mesenteric artery of rats by cigarette smoking particle …… *ZHANG Pan, WANG Yu-ying, WANG Ting, et al*

(1245) Preparation and in vitro release of non-aqueous solvents chloral hydrate enema …… *ZHOU Chun-hui, WANG Zeng-ming, HAN Xiao-lu, et al*

(1251) Bioequivalence of fluconazole tablets in healthy Chinese volunteers …… *ZHANG Li-ying, GUO Cai-hui, SONG Hao-jing, et al*

(1256) Effect of baicalin-geniposide compatibility on the brain tissue injury in rats with focal cerebral ischemia-reperfusion via LTB4/BLTR pathway …… *ZHOU Shuang, LI Hui-min, ZHANG Hang-hang, et al*

(1262) Nutrient compositions and antioxidant activity of fibrous root of *Polygonatum cyrtonema* Hua …… *GAO Hai-yan, YU Huan-ying, JIN Chuan-shan, et al*

(1267) Transcriptome analysis and gene function annotation of *Brucea javanica* (L.) Merr. …… *SHI Hao-yu, WANG Hui-yun, ZHAO Yi, et al*

(1274) Quality evaluation of lyophilised orally disintegrating tablets …… *LI Si-tong, XUE Wan-ying, LI Hong-xin, et al*

(1280) Triple-helix structure and changes of medical collagen sponge before and after the irradiation by mass spectrometry and spectroscopy …… *CHENG Hong, TIAN Rui*

(1288) Enrichment of total lignans of Schisandrae Chinensis Fructus and preparation of microemulsion …… *XU Yu-chen, DING Wen-wen, SAI Na, et al*

(1294) Mechanism of compound Duzhong Jiangu granules based on network pharmacology …… *SHU Zhan, REN Yue, CHEN Zi-jun, 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.

(1301) Identification of snake bile characteristic components by ultra-high performance liquid chromatography-time of flight mass spectrometry ····· *HUANG Bo, HUANG Qing-quan, BAI Gui-chang, et al*

(1309) Gardenia flower Shuxin capsules, Lime flower Shuchang capsules and Gardenia lime flower Kangnaoshuai capsules on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats ····· *ZHANG Zhong-li, LI Shu-qi, ZUO Yue-ming*

(1316) Effects of marein on pancreatic β cell injury induced by high glucose and high lipids based on PERK-ATF4-CHOP pathway ····· *Kedireya • Kadier, Zulipiya • Abula, MA Hong-mei, et al*

(1322) Dose-effect relationship between anti-myocardial ischemia and anticoagulation of safflower yellow injection ····· *LIANG Wu-lin, CAI Meng-ru, CUI Shuang, et al*

(1328) Gender difference in pharmacokinetics of tramadol hydrochloride in the extracellular fluid of the frontal cortex by microdialysis in mice ····· *ZHU Yue, HUANG Dong-mei*

(1333) Optimization of extraction process of Sanjin Paishi mixture by Box-Behnken response surface methodology and CRITIC-AHP ····· *SHI Jin-min, ZHOU Can, YU Xu-ming, et al*

(1338) Shenfushu granules attenuate the development of diabetic nephropathy by regulating inflammation and fibrosis ····· *YANG Yong-yu, JIANG Si-yi, GE Xing-cheng, et al*

(1344) Drug delivery systems for liver fibrosis and prospect ····· *XU Qing, LIU Li-sha, YANG Lei, et al*

(1354) Research progress in the slow disintegration of soft capsules and evaluation methods ····· *ZHANG Qiang, ZHANG Chun-gang, CHENG Lan, et al*

(1359) In vivo transformation and accumulation of speciation arsenic and valence arsenic in realgar ····· *CHEN Yang, WANG Chu-yin, YAO Ni, et al*

(1366) Research progress in risk factors and mechanism of drug-induced hypofibrinogenemia ····· *ZHENG Xin-xin, WANG Jing, ZHU Huai-jun, et al*

(1373) Role and relationship between energy metabolism and oxidative stress in tumor ····· *YAN Xin-yu, ZHANG Shao-lin, CHEN Hai-yan, et al*

(1379) Research progress on influencing factors and improving methods of chrysin bioavailability ····· *SHI Zhi-qun, TIAN Yi-ting, ZHANG Peng-peng, et al*

(1385) Drug treatment options for brain metastaseis ····· *YE Li, ZHONG Xiao-hui*

(1392) A review of NLRP3 inflammasome in cardiovascular diseases ····· *LIU Bo, WANG Rui-ying, ZHOU Jia-hui, et al*

(1397) Multivariate analysis of HPLC fingerprints and content determination of 3 steroidal saponins in *Trillium kamtschaticum* rhizomes of different origins ····· *ZUO Yue-ming, CHEN Lin-lin, ZHANG Zhong-li*

(1404) Optimization of content determination of acarbose oral solid preparation ····· *SHI Xiao-yi, YI Bi-xin, LI Chang-liang, et al*

(1407) Content determination of *N*-(dimethyl-monosane) glycine in memantine hydrochloride tablets by HPLC-MS ····· *HUANG Yin, CAI Guo-wei, ZHONG Ying, et al*

(1412) Quality standard of Sanfang Yizi ointment ····· *CHEN Hai-yan, SUI Jia-ning, HUANG Wan-qing, et al*

(1418) Determination of polymers in cefathiamidine by substitution of reference substance method with correction factors ····· *HUANG Cai-shun, HE Fan-zhen, WANG Qian-lei*

(1422) Simultaneous determination of 8 components in Qingxie pills by RP-HPLC ····· *JIANG Fan-ren, WANG Wei, XIAO Zheng-xian, et al*

(1426) Determination of genotoxic impurity in tadalafil raw materials by UPLC-q/LIT-MS ····· *LIU Jia-xing, LI Li-mei, YANG Qing-yun, et al*

(1430) Determination of polyphenols in different parts of *Solanum nigrum* L. by staining and HPLC method ····· *MENG Ying, WANG Xiao-hong, LIU Xiao-li, et al*

(1448) Bibliometrics and visualization of baicalin related studies ····· *HUI Yu-yu, WANG Min, TIAN Wen-li, et al*

(1454) Serum level of indoxyl sulfate and its pharmacological significance in patients with type Ⅳ cardiorenal syndrome ····· *BAI Yun-huan, CHEN Ting, WANG Tao, et al*

(1458) Status quo and trend of the use of hepatoprotective drugs in 67 hospitals in Nanjing areas from 2018 to 2020 by hospital health technology assessment ····· *PENG Miao-miao, LIU Hui*

研究论文

基于生物信息学和实验探究艾灸对肺纤维化的作用及其机制

董怀洋，叶雨萌，李包娟，张奘之*（新疆医科大学药学院，乌鲁木齐　830011）

摘要：目的　基于现代生物信息技术，预测艾灸干预肺纤维化的作用靶点和通路，并通过动物实验验证作用效果及其机制。**方法**　通过生物信息预测得到艾灸干预肺纤维化的作用靶点，蛋白互作获得作用的关键靶点，GO 和 KEGG 将通路可视化，采用 AutoDock4.2.6 对接软件进行验证。博来霉素 4 U·kg^{-1} 构建肺纤维化模型，连续给药干预 28 d。每日观察小鼠外观，测量小鼠饮食、体质量，计算肺指数，HE 和 Masson 染色观察肺组织病变及纤维化程度，ELISA 测定相关因子，蛋白免疫印迹法检测相关蛋白表达，荧光定量法测定 mRNA 水平。**结果**　得到关键靶点 8 个，关键通路为 EGFR/JAK/STAT1，分子对接显示 4 种核心成分有极好的对接活性。动物实验结果表明艾灸可改善小鼠体质量，提高存活率，HE 和 Masson 染色结果显示艾灸后炎症细胞和胶原细胞减少。艾灸组小鼠的肺系数、肺组织 Hyp 和血清 IL-6、CCL2 炎症因子水平显著降低，肺组织 EGFR、JAK、STAT1、p-STAT1 蛋白表达显著降低，相关 mRNA 水平显著降低。**结论**　艾灸可通过抑制 EGFR/JAK/STAT1 通路延缓肺纤维化进程。

关键词：肺纤维化模型；艾灸；生物信息分析；动物实验验证；EGFR/JAK/STAT1 通路

中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)06-1217-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.001

Effect of moxibustion on pulmonary fibrosis based on bioinformatics and experiments and the mechanism

DONG Huai-yang, YE Yu-meng, LI Bao-juan, ZHANG Yan-zhi* (*Department of Pharmacology*, *School of Pharmacy*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830011)

Abstract: Objective　To predict the targets and pathways of moxibustion for pulmonary fibrosis based on modern bioinformatics, and to clarify the effect and mechanism by animal experiments. **Methods**　The targets of moxibustion for pulmonary fibrosis were predicted by bioinformatics. The pathways were visualized by GO and KEGG and validated by molecular docking with AutoDock4.2.6. The pulmonary fibrosis model was established with 4 U·kg^{-1} bleomycin and administered continuously for 28 days. The mice were observed every day, and their diet and body weight were measured. HE and Masson staining were used to observe the degree of lung tissue lesions and fibrosis. ELISA was used to detect related inflammatory factors. Western blot was used to detect the expression of related proteins, and fluorescence quantitative detection for mRNA levels. **Results**　Eight key targets were identified, and the key pathways was EGFR/JAK/STAT1. Molecular docking showed the 4 key components had excellent docking activity. Animal experiments showed that moxibustion improved the body weight and survival rate of mice. HE and Masson staining showed that the inflammatory

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81760767）；新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目（No.2017D01C204）；新疆医科大学博士启动基金（No.2019-017）；新疆自治区重点实验室经费（No.XJDX1713）。

作者简介：董怀洋，男，硕士研究生，主要从事天然产物与呼吸系统疾病研究，email：1962077346@qq.com　*通信作者：张奘之，女，博士，教授，硕士研究生导师，主要从事天然产物与代谢及呼吸系统疾病研究，email：1533465971@qq.com

cells and collagen cells in the moxibustion group were reduced. The lung coefficient, Hyp in the lung tissue, and serum IL-6 and CCL2 inflammatory factor levels in the moxibustion group were significantly reduced. Western blot showed down-regulation of the protein expressions of EGFR, JAK, STAT1, and p-STAT1. The related mRNA levels were significantly decreased. **Conclusion** Moxibustion can delay the process of pulmonary fibrosis by inhibiting EGFR/JAK/STAT1 pathways.
Key words: pulmonary fibrosis; moxibustion; bioinformatic analysis; animal experiment verification; EGFR/JAK/STAT1 pathways

肺纤维化是多种原因导致的，以长期慢性炎症浸润，成纤维细胞增殖、大量细胞外基质沉积及肺组织结构破坏为特征的间质性肺疾病的终末期肺脏改变[1]。目前针对肺纤维化的药物只能延缓而不能逆转纤维化进程，同时存在不良反应大、价格昂贵等问题[2]。肺移植手术是目前有效的治疗手段，但其存活率低，费用高、器官供体少[3]。

中医药具有悠久的历史，研究发现中药复方及单体有效成分可通过抑制上皮细胞 - 间充质转化、抑制内质网应激、介导细胞自噬、调节免疫平衡等对肺纤维化发挥治疗作用，辅助治疗还可降低不良反应，提高机体免疫力[4-5]。肺纤维化属于“肺痹”“肺痿”等病范畴，早期以肺痹为主，晚期发展为肺痿[6]。艾灸“温则消而去之”，能温补肺气，疏通肺络，峻补其本，疏其壅滞，则肺虚自实，痰瘀自除，故可用于治疗肺气亏虚、痰瘀阻肺的肺纤维化。现代药理学研究发现，艾灸有较好的抗炎和抗氧化作用[7]。本文通过整合生物信息学和网络药理学信息，分子对接和动物模型实验验证，系统地探究艾灸治疗肺纤维化的药理作用机制，为艾灸的进一步应用提供理论依据。

1 生物信息分析预测

1.1 肺纤维化的微阵列数据集获取

通过基因表达综合 GEO 数据库（https：//www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/）得到肺纤维化的基因表达数据集。搜索术语包含“肺纤维化”“肺组织”“mRNA 表达”和“智人”。筛选标准：至少包含 12 个样本；至少 6 个健康样本和 6 个肺纤维化样本；GEO 提供原始数据。

1.2 差异基因分析

使用 R 语言（x64 4.0.3）软件包 GEOquery、BiocManger 获取数据集，并对基因芯片原始数据的探针进行注释和过滤，校正背景，对样本进行归一化处理[8]。Limma 程序包分析差异表达的基因（DEG），$|\log_2 FC| \geq 2$，$P < 0.05$ 作为筛选差异基因的标准[9]。

1.3 药物有效成分及靶点筛选

从 TCMSP 数据库获取艾蒿成分，以艾叶燃烧、艾烟成分为关键词检索文献中已报道的定量化学成分，根据生物利用度（OB）≥ 30%，化合物类药性（DL）≥ 0.18，脂水分配系数（Alog*P*）≤ 5[10-11]，筛选候选药效成分的作用靶点。

1.4 药物 - 疾病靶点互作网络构建及可视化

将筛选得到的艾灸作用靶点与肺纤维化差异基因交集，并绘制 Venn 图。交集靶点通过蛋白相互作用（PPI）分析获取作用的关键靶点。

1.5 生物信息学分析注释

运用 R 语言插件 ggplot2、pathview 和 clusterProfiler 数据包对基因进行编码以及 GO 富集分析和 KEGG 富集分析。

1.6 分子对接

获取主要活性成分的 mol2 文件格式，从 PDB 数据（https：//www.rcsb.org/）下载度值最大的关键靶点的 3D 结构（*PDB 格式），采用 AutoDock4.2.6 对核心化合物配体进行对接。

2 动物实验验证

2.1 材料

2.1.1 动物 健康 SPF 级 KM 小鼠 60 只，雄性，8 周龄，体质量 20 ～ 22 g [新疆医科大学动物中心，生产许可证号：SCXK（新）2018-0002]。饲养于新疆医科大学动物中心，湿度 50% ～ 70%。实验通过实验中心伦理委员会伦理审核（No. IACUC-20210331-05）。

2.1.2 试药 注射用盐酸博莱霉素（BLM，瀚晖海正公司）；醋酸泼尼松（仙琚制药公司）；艾绒（百草堂药店）；Masson 染色套装、苏木素伊红（HE）（索莱宝公司）；ELISA 试剂盒（上海江莱公司）；HRP 标记的山羊抗兔抗体，GAPDH、STAT1、EGFR 兔抗小鼠抗体（沈阳万类公司）；RNA 提取试剂盒（美国 Omega 公司）。

2.1.3 仪器 SA-YLS-8B 医用超声雾化器（江苏赛昂斯公司）；Eclipse Ni-U 生物显微镜（尼康生物公司）；Power Pac 电泳转膜仪（美国 Bio-Rad 公司）；QuantStudio6 Flex 实时荧光定量 PCR 仪

（赛默飞公司）；Azure 600 多功能分子成像系统（美国 Azure Biosystems 公司）。

2.2　*方法*

2.2.1　动物分组及给药　小鼠适应性饲养 3 d 后随机分为对照组（C）、模型组（IPF）、艾灸上午组（MA）、艾灸下午组（MP）、阳性药组（PA）。其中，对照组 8 只，其余每组 12 只。

2.2.2　造模及给药　小鼠用 3% 戊巴比妥钠（0.15 mL/10 g）腹腔注射麻醉，对照组留置针气管滴入 40 μL 生理盐水，其余组按照 4 U·kg^{-1} 的剂量给予约 40 μL BLM（2 U·mL^{-1}）。给药第一周内小鼠体质量急剧下降，一周后呼吸伴有轻微湿啰音，呼吸急促则代表造模成功。

造模成功后第 2 日起对照组和模型组每日灌胃 0.3 mL 生理盐水，艾灸组小鼠背部剃毛暴露穴位，5 mg 左右麦粒灸直接灸，大椎穴每日艾灸一次，肺腧和膏肓左右穴位每日各一侧轮流艾灸，每次每穴三壮，上午组在 9 ～ 11 点艾灸，下午组在 19 ～ 21 点艾灸。阳性药组给予醋酸泼尼松 5 mg·kg^{-1}（生理盐水配制）灌胃给药。连续干预 28 d。

每日称量小鼠体质量，记录饮食饮水量，观察小鼠行为活动、精神状态、毛发情况、口鼻及呼吸情况等。

2.2.3　样本采集　干预 28 d 后，小鼠眼球取血，分离上层血清。剥离肺外表面的气管及脂肪等杂质，称全肺湿质量，计算肺系数。左肺固定于 4% 多聚甲醛溶液中，右肺冻存于－ 80 ℃，备用。肺系数＝肺湿质量（g）/ 体质量（kg）。

2.2.4　血清及肺匀浆指标测定　取部分肺组织按照 1∶9 的质量比加入磷酸盐缓冲液（PBS），匀浆机将肺组织匀浆，按照试剂盒要求分别测定肺组织中羟脯氨酸（Hyp）及血清中白介素 6（IL-6）、趋化因子 2（CCL2）的含量。

2.2.5　肺组织形态学观察　取小鼠肺脏，肉眼观察小鼠肺脏外观及形态，采用常规脱水，石蜡包埋、切片制片、HE 和 Masson 染色，封片后晾干，显微镜下观察肺组织病理形态变化。参照 Szapiel 等 [12] 的方法对肺泡炎及纤维化程度进行评分。

2.2.6　肺脏组织相关指标 mRNA 相对表达量检测　按照试剂盒说明提取肺组织总 RNA，定量后反转录成 cDNA，加入相应引物和荧光染色液后进行荧光定量 PCR（RT-qPCR）测定，使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法，将 PCR 反应结果标准化。基因引物均由上海生工生物合成（见表 1）。

表 1　引物序列

Tab 1　Primer sequences

基因名称	上游引物序列	下游引物序列
GAPDH	CCAATGTCCGTCGTGGATC	GTGCAGACATGAAGTCAA
EGFR	TTCTTGCAGCGATACAGCTC	TTGGGAACGGACTGGTTTAT
JAK	ACATTCTTACCAAAGTGCGTTC	GCTGAATGAATCTGCGAAATCT
STAT1	GATCCGTCAGCAGCTTAAAAAG	CTGACAACACCTGCTTGTTTTT

2.2.7　肺脏组织相关蛋白表达量检测　取各组小鼠肺脏组织，组织匀浆后提取总蛋白。定量后经 10% 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h，TBST 洗膜后加入一抗 4 ℃孵育过夜。二抗室温孵育 50 min，ECL 超敏化学发光试剂显色，凝胶成像分析系统曝光条带，使用 Image J 软件对条带进行定量分析。

2.3　*数据分析*

所有数据用 SPSS 22.0 软件统计分析和 GraphPad Prism 7 绘图，本次实验采集数据为计量资料，以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）描述，若方差齐，则组间差异用单因素 ANOVA 进行分析；若方差不齐，则用非参数秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　*生物信息分析结果*

3.1.1　肺纤维化微阵列数据集及差异基因分析结果　筛选来自 GPL1708、GPL6480、GPL6244 平台的 GSE185492、GSE110147、GSE109882 数据集，并进行 ID 转换，去除重复项，共得到 28 807 个基因，“Limma” 程序包以 $|\log_2 FC| \geq 2$ 为标准筛选得到差异基因 1581 个，其中上调基因 502 个，下调基因 229 个（见图 1）。

3.1.2　药物活性成分及靶点筛选　通过 TCMSP 数据库和已报道的文献中找出艾灸艾烟成分 235 个 [13]，筛选后共得到艾烟活性成分 11 个，主要包含槲皮素、谷甾醇、儿茶酚等（见表 2），获得潜在靶点 1249 个。

3.1.3　药物 - 疾病靶点互作网络构建及可视化　获取的药物靶点与肺纤维化差异基因交集得到 33 个共同靶点。将交集基因导入 STRING 数据库构建 PPI 网络，导入 Cytoscape 软件对 PPI 网络进行可视化，通过 Cytoscape hubba 插件提取核心作用靶点网络（见图 2），得到核心作用靶点 8

表 2 筛选后活性化合物

Tab 2 Active compounds after screening

编号	艾烟成分
AY-1	guaiacol
AY-2	beta-thujone
AY-3	eucalyptol
AY-4	thujone
AY-5	borneol
AY-6	2-methylnaphthalene
AY-7	camphor
AY-8	catechol
AY-9	beta-caryophyllene oxide
AY-10	hydroquinone
AY-11	dammaradienyl acetate

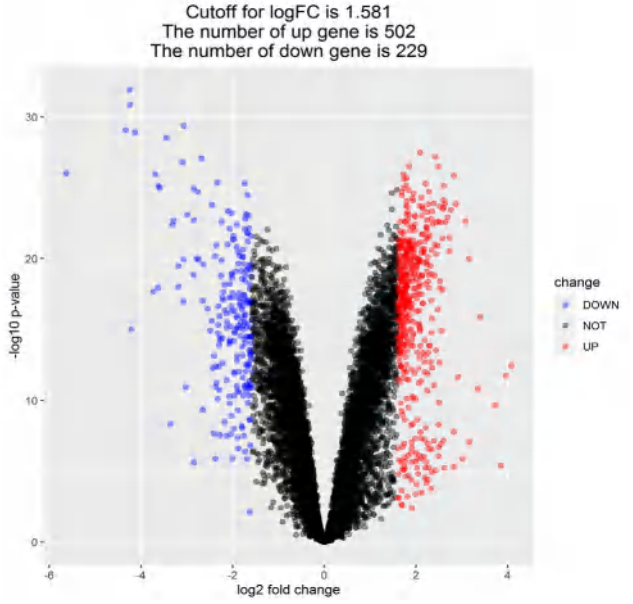


图 1 差异基因火山图

Fig 1 Volcano map of differential gene

个，包括 IL-6、AKT1、STAT1、EGFR、CASP3、CCL2、HIF1A、IL1B。

3.1.4 生物信息学注释结果 通过 GO 富集分析，以校正（$P \leqslant 0.01$）为标准，确定了 171 个 GO 条目，其中涉及生物过程（biological process）的有 103 个，包含炎症反应、细胞凋亡等；细胞组分（cellular component）条目有 13 个，包括线粒体、溶酶体及轴突神经传导等；分子功能（molecular function）涉及 RNA 聚合酶、受体结合等 25 个条目。筛选前 10 个进行可视化分析，结果见图 3。

得到 KEGG 富集通路 41 条（$P \leqslant 0.01$），涉及主要通路为 EGFR 信号通路、PI3K/AKT 信号通路、趋化因子信号通路和 HIF-1 信号通路等（见图 4）。发挥上下游调控作用的主要为 EGFR/JAK/STAT1 通路（见图 5）。最后通过 Cytoscape 3.6.1 软件，构建出治疗肺纤维化的“成分 - 靶点 - 通路”网络图（见图 6）。

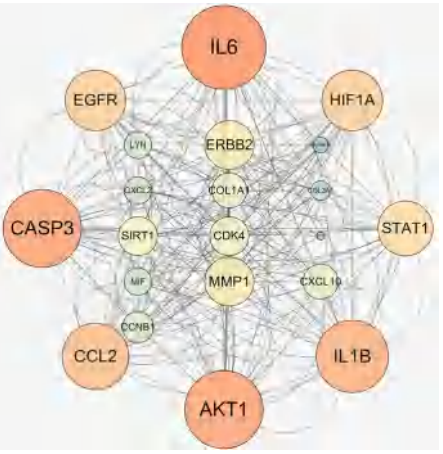


图 2 蛋白互作 PPI

Fig 2 PPI of protein interaction

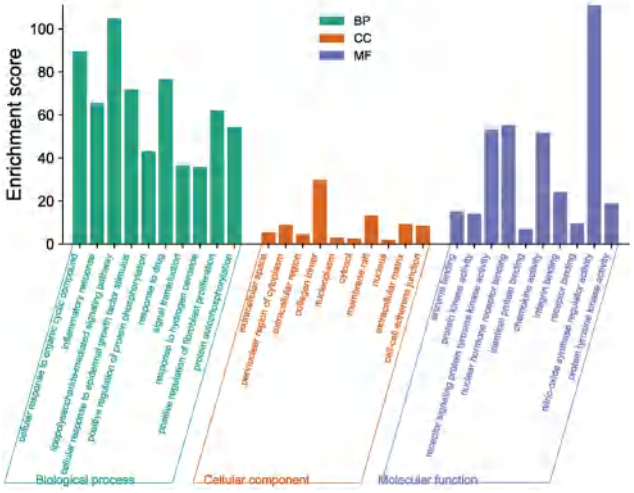


图 3 GO 富集分析结果

Fig 3 GO enrichment analysis

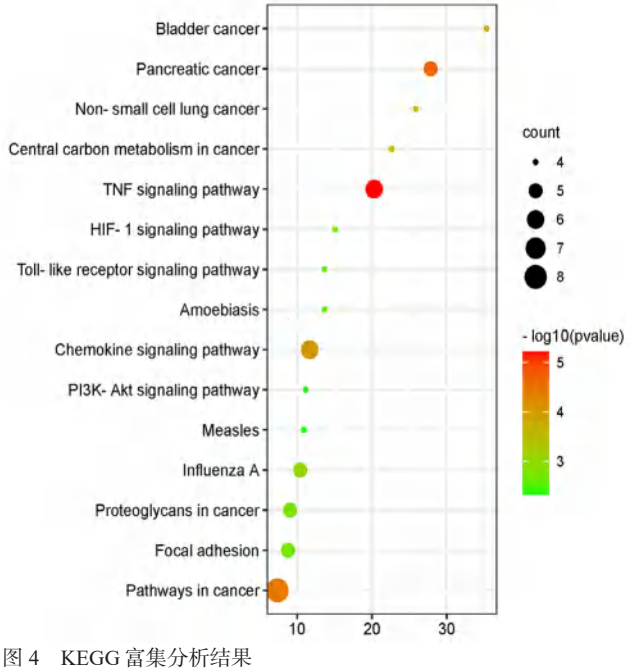


图 4 KEGG 富集分析结果

Fig 4 KEGG enrichment analysis

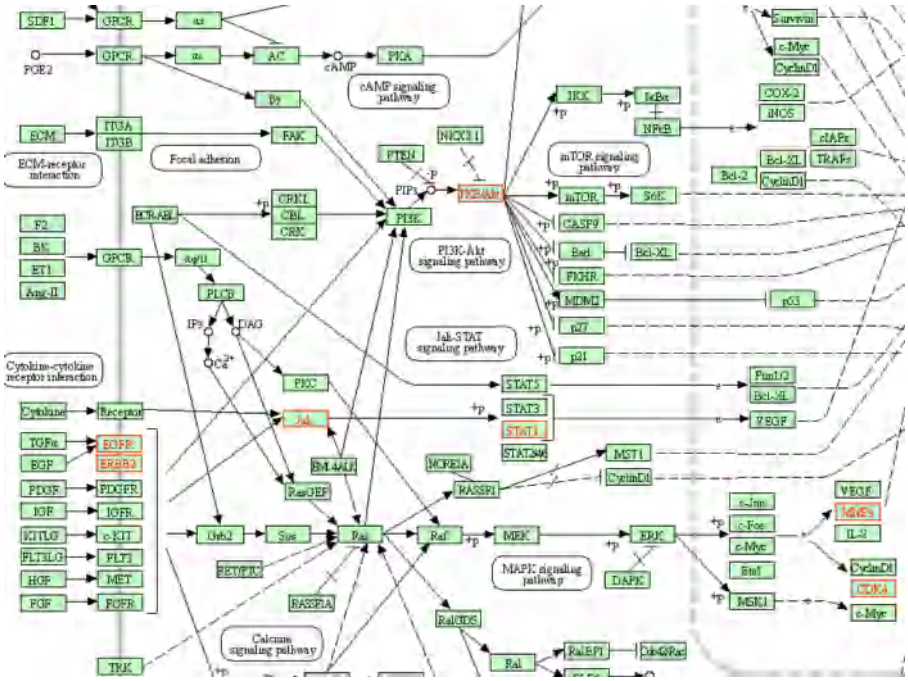


图 5　KEGG 富集分析通路图

Fig 5　KEGG enrichment analysis pathway diagram

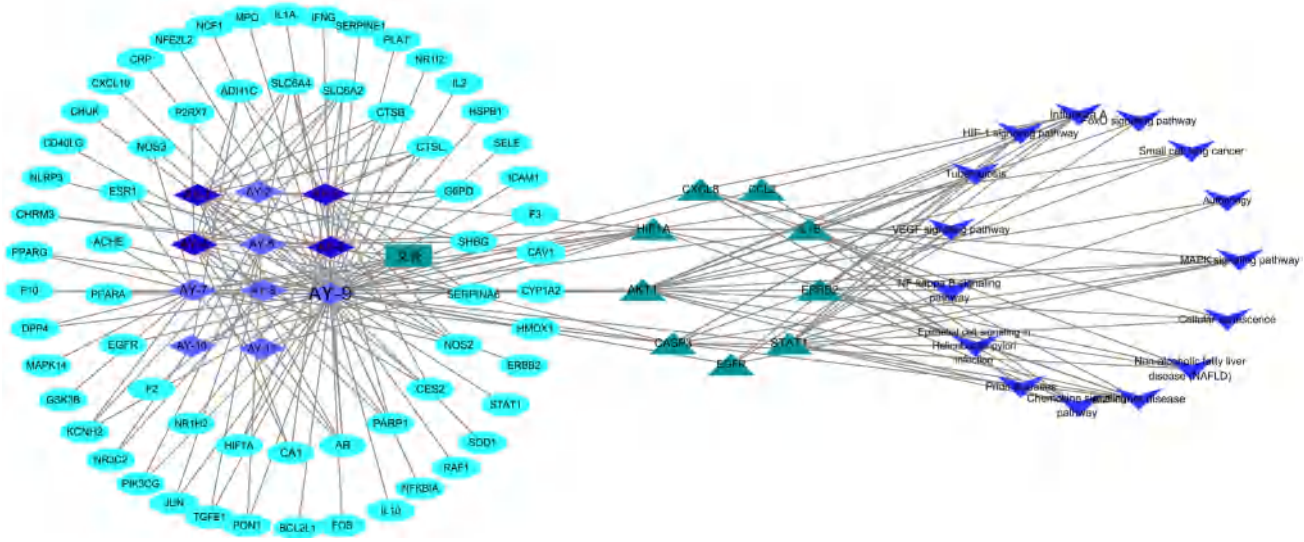


图 6　“成分 - 靶点 - 通路”网络图

Fig 6　“Component-target-pathway” network diagram

3.1.5　分子对接结果　通过拓扑学参数、度值筛选获得活性最显著的 4 种核心成分（槲皮素、异泽兰黄素、龙脑、*β*-谷甾醇），分别与 IL-6、AKT1、EGFR、JAK、STAT1、CCL2 等蛋白进行分子对接。取结合能绝对值为分子对接得分（见图 7），结果显示具有较强的结合活性，表明这些可能为治疗肺纤维化的关键成分和靶点。

3.2　*动物实验结果*

3.2.1　小鼠一般状况与存活率　对照组小鼠毛发光亮，活跃度高，模型组小鼠毛发枯槁、静卧无力，消瘦、弓背、口鼻发黑伴有轻微湿啰音；体质量较对照组显著降低，且随时间无恢复（$P < 0.01$）；艾灸下午组小鼠 28 d 内体质量较模型组均有明显恢复（$P < 0.01$），体质量改善在造模后第一周优于阳性药组（$P < 0.01$）；艾灸上午组小鼠前三周体质量较模型组有明显改善（$P < 0.01$，$P < 0.05$），第一周体质量改善优于阳性药组（$P < 0.01$）（见表 3）。对照组 28 d 内无死亡；艾灸下午组 28 d 内小鼠存活率稳定，第二周开始存活率高于模型组，艾灸上午组第一周死亡率较高，第二周开始存活率较稳定，第四周存活率高于模型组。阳性药组存活率四周内持续降低，第四周低于艾灸组，艾灸下午组存活率优于上午组（见图 8）。

表 3 各组小鼠体质量变化 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Changes in body mass of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	体质量 /g			
	7 d	14 d	21 d	28 d
对照组	28.19±1.09	31.86±1.53	33.95±2.95	37.15±2.17
模型组	21.28±2.39	20.46±4.12**	19.41±5.64**	20.34±4.93**
艾灸上午组	25.77±2.38$^{\#\#\&\&}$	26.27±5.17$^{\#}$	26.33±7.18$^{\#}$	25.96±7.09
艾灸下午组	26.18±3.75$^{\#\#\&\&}$	26.77±6.73$^{\#\#}$	29.34±9.68$^{\#\#}$	33.31±10.30$^{\#\#}$
阳性药组	22.60±3.05	23.78±5.50	24.79±8.85	29.06±8.28$^{\#}$

注：与对照组比较，$^{**}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与阳性药组比较，$^{\&\&}P<0.01$.

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

3.2.2 小鼠肺系数和纤维化指标结果 与模型组比较，艾灸下午组和阳性药组肺系数、Hyp、CCL2、IL-6 显著降低（$P<0.05$，$P<0.01$），艾灸上午组肺系数、CCL2、IL-6 均显著降低（$P<0.05$，$P<0.01$）；与阳性药组比较，除艾炙上午组肺系数外，其余艾灸组各指标均无明显差异（见表 4）。

表 4 各组指标检测结果 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Indicators of each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	肺系数 /（g·kg^{-1}）	Hyp/（μg·mL^{-1}）	CCL2/（pg·mL^{-1}）	IL-6/（pg·mL^{-1}）
对照组	6.10±0.23	1.78±0.24	3.62±0.56	55.58±17.53
模型组	21.60±4.15**	3.55±1.24**	10.13±2.03**	95.27±24.66**
艾灸上午组	14.45±2.15$^{\#\#}$	2.73±0.43	6.59±1.25$^{\#\#}$	72.39±16.10$^{\#}$
艾灸下午组	11.20±3.91$^{\#\#}$	2.53±0.44$^{\#}$	6.32±1.54$^{\#\#}$	68.46±11.57$^{\#\#}$
阳性药组	10.71±2.00$^{\#\#}$	2.21±0.25$^{\#\#}$	5.52±0.98$^{\#\#}$	62.75±8.40$^{\#\#}$

注：与对照组比较，$^{**}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$.

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

3.2.3 肺脏组织形态变化 对照组小鼠肺组织质软、红润，表面光滑；模型组小鼠肺组织肥大无弹性，肺表面存在大量颗粒结节和水肿区域，呈糜烂状；艾灸上午组肺组织发白和肿大区域减少，部分组织红润有弹性；艾灸下午组和阳性药组肺组织水肿区域减少，大部分区域红润有光泽（见图 9）。

3.2.4 肺组织病理形态 HE 染色结果，对照组小鼠肺组织结构清晰，肺泡完整排列有序，肺泡壁薄，间质无明显炎症细胞浸润；模型组小鼠肺组织实变，肺泡结构破坏严重，未见完整肺泡结构，炎症细胞浸润明显；艾灸组均有效抑制肺泡壁增厚，部分肺泡完整，炎症浸润减少，与阳性药组效果接近；阳性药组肺泡结构较为完整，炎症浸润较少（见图 10）。

Masson 染色结果，对照组小鼠肺组织支气管及肺泡壁仅有极少的胶原纤维存在，模型组可见明显的蓝色胶原纤维沉积，整个肺组织被密集的胶原纤维充满。艾灸组和阳性药组纤维化程度减轻，纤维丝减少，纤维团较模型组稀疏，艾灸下午组效果最好，纤维丝和纤维团最少（见图 11）。

3.2.5 肺组织 *EGFR*、*STAT1*、*JAK* mRNA 表达水平 与模型组比较，艾灸上午组、艾灸下午组、阳性药组 *EGFR*、*STAT1*、*JAK* mRNA 表达均显著降低（$P<0.01$）；与阳性药组比较，艾灸组 *EGFR*、*STAT1* mRNA 高表达（$P<0.05$，$P<0.01$）（见图 12）。

3.2.6 小鼠肺组织 JAK、STAT1、p-STAT1/STAT1、EGFR 蛋白表达水平 与模型组比较，艾灸上午组、艾灸下午组和阳性药组 JAK、STAT1、p-STAT1/STAT1 和 EGFR 蛋白表达均显著降低（$P<0.01$）；与阳性药组比较，艾灸上午组和艾灸下午组 p-STAT1/STAT1 蛋白表达有显著差异（$P<0.05$，$P<0.01$）（见图 13）。

4 讨论

研究表明，艾灸可降低肺泡炎程度，延缓肺纤维化进程[14-16]，但作用的主要通路还不明确。现代药理研究发现艾蒿水提物具有较好的抗炎、抗氧化、抑制肿瘤细胞增殖的药理作用[17-19]，可显著抑制 α-SMA 和脂质过氧化达到抑制肝纤维化的作用[20]。文章通过生物信息分析预测得到艾灸作用的主要通路为 EGFR/JAK/STAT1。IL-6 作为一种促炎细胞因子，是判断肺部炎症的关键细胞因子，可通过驱动慢性炎症促进纤维化，在纤维化肺中高表达[21]。IL-6 与 sIL-6R 结合，激活膜结合糖蛋白，这个过程同时也激活了 EGFR 和 Janus 激酶（JAK）/STAT 信号通路[22]，它们与多种炎症过程有关[23-24]。JAK 分布于增生的肺泡上皮Ⅱ型细胞（AT Ⅱ）、成纤维细胞[25]，可被 IL-6 和 EGFR 分别激活[26]介导纤维化作用，JAK 活化后进一步激活 STAT[27]。EGFR 是酪氨酸激酶家族的成员，存在气道、肺泡上皮和成纤维细胞中，被炎症直接或间接激活，激活后调节多种与纤维化有关的细胞功能，同时 EGFR 还是激活 JAK 的重要纤维化生长因子，抑制 EGFR 可有效降低胶原蛋白沉积和 Hyp 积累[28]。

通过气管滴注博来霉素构建肺纤维化动物模型，博来霉素给药后小鼠伴有轻微腹泻和眼部红肿等明显炎症反应，促炎因子 IL-6 过量产生。实验发现伴随 IL-6 等炎症因子的产生，EGFR 被激活，进一步激活 JAK/STAT1 通路，加速了纤维化

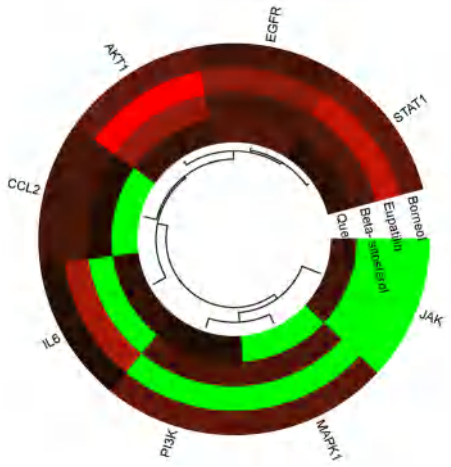


图 7　对接结果热图

Fig 7　Heat map of docking results

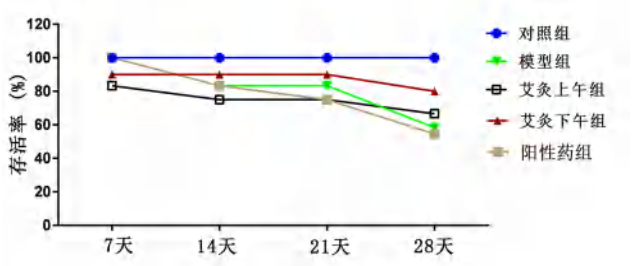


图 8　存活率变化

Fig 8　Changes in survival rate

的进程。艾灸组干预治疗后 EGFR 的过表达被抑制，纤维化进程减缓，通过蛋白表达测定和基因表达测定，JAK/STAT 信号通路蛋白及 mRNA 表达被抑制，艾灸可负性调节博来霉素对 JAK 和磷

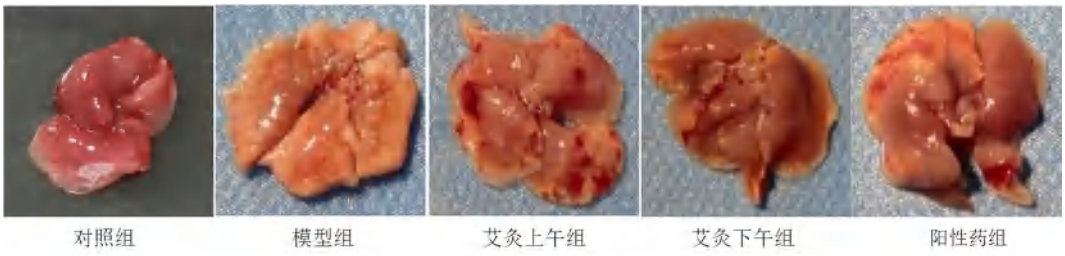


图 9　肺组织形态

Fig 9　Morphology of lung tissue

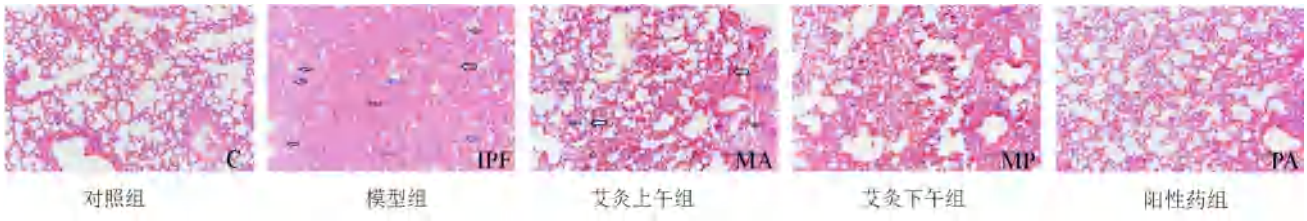


图 10　肺组织病理染色结果（×100）

Fig 10　Pathological staining results of lung tissue（×100）

注（Note）：黑色箭头指示炎症；蓝色箭头指示增生（Black arrows indicate inflammation；blue arrows indicate hyperplasia）。

图 11　肺组织 Masson 染色结果（×200）

Fig 11　Pathological Masson of lung tissue（×200）

注（Note）：绿色箭头指示胶原纤维（Green arrows indicate collagen fibers）。

酸化 STAT1 的激活作用，降低炎症对纤维化进程的催化刺激，抑制纤维化进程。肺腧、膏肓是足太阳膀胱经上的一个常用腧穴，常用于治疗咳嗽、气喘、胸满，相对于西药治疗，穴位艾灸能更快地改善病情。中医认为肺腧、膏肓可滋补肺气，研究发现艾灸大椎穴可有效改善肺部炎症 [29]。实验采用麦粒灸对小鼠穴位进行艾灸，在《扁鹊心书》中便有对麦粒灸的叙述，现代临床研究发现通过麦粒灸可更精确刺激相关穴位发挥作用 [30]。根据子午流注时间规律 [31]，肺俞穴在凌晨 3 ～ 5 点运行，但考虑到人体睡眠原因，选择在肺经的同名经循行时间也就是在上午 9 ～ 11 点足太阴脾经运行的时候来对肺经进行敲打，同时因小鼠昼伏夜出的作息规律，经脉运行也存在与人体相反

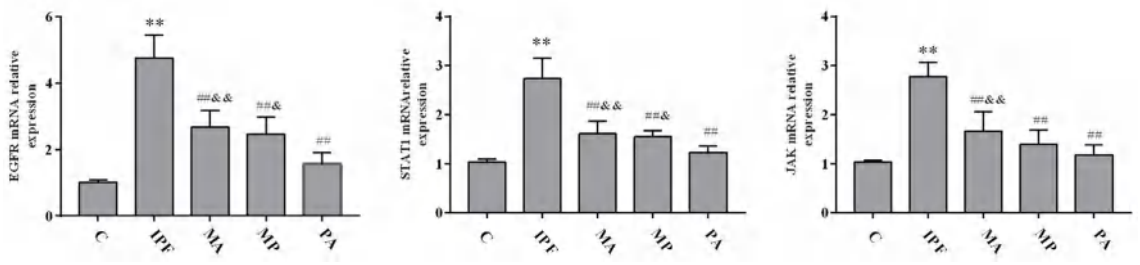


图 12 *EGFR*、*STAT1* 及 *JAK* mRNA 表达水平

Fig 12 *EGFR*，*STAT1*，and *JAK* mRNA expression levels

注：与对照组比较，$^{**}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与阳性药组比较，$^{\&}P < 0.05$，$^{\&\&}P < 0.01$.

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

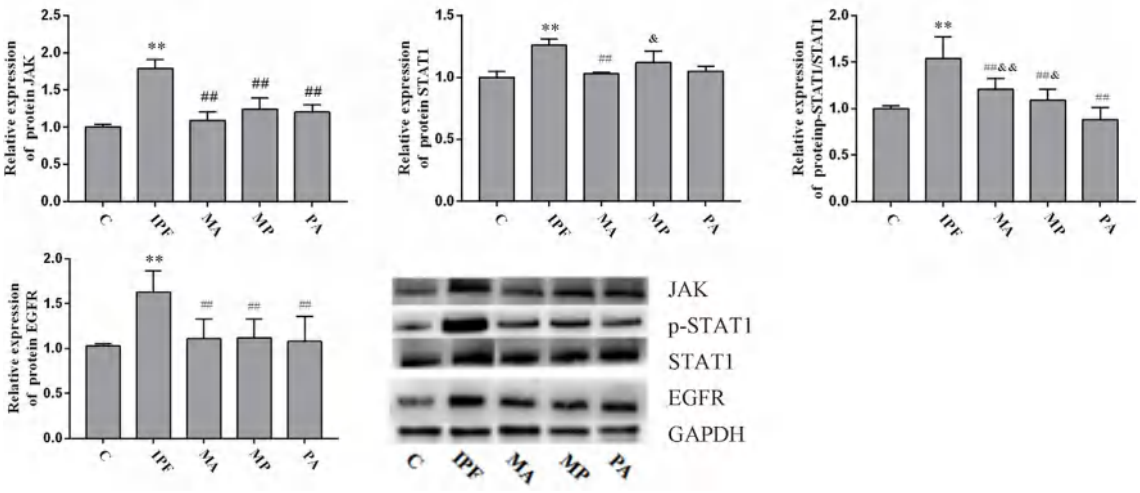


图 13 肺组织蛋白表达结果

Fig 13 Protein expression in lung tissue

注：与对照组比较，$^{**}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与阳性药组比较，$^{\&}P < 0.05$，$^{\&\&}P < 0.01$。

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

的可能，因此将艾灸组分为艾灸上午组（9 ～ 11 时）及艾灸下午组（19 ～ 21 时），艾灸下午组类似于人类肺经的同名经运行时间干预。

实验中艾灸下午组小鼠的存活率远高于上午组，其他检测指标艾炙下午组较上午组有轻微的改善效果，但改善不明显。艾灸下午组与阳性药组相比各项指标均无显著差异，说明艾灸下午组效果与阳性药组相近，同时存活率更优于阳性药组。基于以上结果分析，艾灸下午组小鼠的改善效果最优。艾灸主要通过艾绒燃烧刺激相应穴位发挥治疗作用，作为一种外用治疗手段，不仅降低了药物体内的直接损伤，还可有效提高小鼠抵抗力，改善机体免疫系统。经脉运行有特定的时间段，实验发现在经脉运行时进行穴位艾灸干预治疗效果最佳。艾灸作为一种简单有效的治疗手段，其操作简单，经济易得，对于长期治疗的慢性疾病，辅助艾灸干预不仅可有效改善治疗效果，还可进一步改善机体免疫活力，提高患者生存体质。

综上所述，艾灸可有效改善肺纤维化机体的免疫调节能力，提高机体活力和抵抗力，降低体内炎症水平，缓解炎症对机体的损伤，并进一步通过调节 EGFR/JAK/STAT1 信号通路抑制成纤维细胞增殖，延缓肺纤维化进程。但本研究未通过实验验证明确作用的主要成分，尚需进一步探究验证，为进一步应用奠定基础。

参考文献

[1] Sharif R. Overview of idiopathic pulmonary fibrosis（IPF）and evidence-based guidelines [J]. Am J Manag Care，2017，23（11）：S176-182.

[2] Saito S，Alkhatib A，Kolls JK，et al. Pharmacotherapy and adjunctive treatment for idiopathic pulmonary fibrosis（IPF）[J]. J Thorac Dis，2019，11（14）：S1740.

[3] Richeldi L，Collard HR，Jones MG. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Lancet，2017，389（10082）：1941-1952.

[4] Zhang Y，Lu P，Qin H，et al. Traditional Chinese medicine combined with pulmonary drug delivery system and

idiopathic pulmonary fibrosis：rationale and therapeutic potential [J]. Biomed Pharmacother，2021，13（1）：111072.
[5] 高风丽，孙丽丽，李竹英 . 中药对肺纤维化相关机制调控的研究进展 [J]. 上海中医药杂志，2021，55（9）：91-95.
[6] Zhang Y，Lu P，Qin H，et al. Traditional Chinese medicine combined with pulmonary drug delivery system and idiopathic pulmonary fibrosis：rationale and therapeutic potential [J]. Biomed Pharmacother，2021，133（1）：111072.
[7] Cheng L，Li R，Zhou M，et al. Moxibustion has a positive effect on pulmonary fibrosis：an alternative approach [J]. Afr J Tradit Complement Altern Med，2017，14（2）：125-129.
[8] Toro-Domínguez D，Martorell-Marugán J，López-Domínguez R，et al. ImaGEO：integrative gene expression meta-analysis from GEO database [J]. Bioinformatics，2019，35（5）：880-882.
[9] Clough E，Barrett T. The gene expression omnibus database [J]. Methods Mol Biol，2016，1418：93-110.
[10] Russell OP，Richard HG. Predicting skin permeability [J]. Pharm Res，1992，9（5）：663-669.
[11] Pecoraro B，Tutone M，Hoffman E，et al. Predicting skin permeability by means of computational approaches：reliability and caveats in pharmaceutical studies [J]. J Chem Inf Model，2019，59（5）：1759-1771.
[12] Szapiel SV，Elson NA，Fulmer JD，et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude，athymic mouse [J]. Am Rev Respir Dis，1979，120（4）：893-899.
[13] Deng H，Shen X. The mechanism of moxibustion：ancient theory and modern research [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2013，20（13）：379291.
[14] 李戎，周蜜娟，李翠霞，等 . 艾灸“肺俞”“膏肓”对博莱霉素 A5 诱导肺纤维化大鼠Ⅰ/Ⅱ型细胞因子平衡调节的影响 [J]. 针刺研究，2005，30（3）：164-166.
[15] 周蜜娟 . 艾灸合刺血对肺纤维化大鼠肺组织 TGF-β 的影响研究 [D]. 成都：成都中医药大学，2006.
[16] 李梅 . 艾灸“肺俞”“膏肓俞”对肺纤维化大鼠肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）的影响 [D]. 成都：成都中医药大学，2008.
[17] Park EJ，Nan JX，Kim JY，et al. The ethanol-soluble part of a hot-water extract from Artemisia iwayomogi inhibits liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats [J]. J Pharm Pharmacol，2000，52（7）：875-881.
[18] Batiha GES，Olatunde A，El-Mleeh A，et al. Bioactive compounds pharmacological actions and pharmacokinetics of wormwood（Artemisia absinthium）[J]. Antibiotics（Basel），2020，9（6）：353.
[19] Liu Y，He Y，Wang F，et al. From longevity grass to contemporary soft gold：Explore the chemical constituents，pharmacology，and toxicology of Artemisia argyi H. Lév. & vaniot essential oil [J]. J Ethnopharmacol，2021，279（6）：114404-114404.
[20] Chen LL，Zhang HJ，Chao J，et al. Essential oil of Artemisia argyi suppresses inflammatory responses by inhibiting JAK/STATs activation [J]. J Ethnopharmacol，2017，204（5）：107-117.
[21] Shochet GE，Brook E，Bardenstein-Wald B，et al. TGF-β pathway activation by idiopathic pulmonary fibrosis（IPF）fibroblast derived soluble factors is mediated by IL-6 trans-signaling [J]. Respir Res，2020，21（1）：1-10.
[22] Robinson MB，Deshpande DA，Chou J，et al. IL-6 trans-signaling increases expression of airways disease genes in airway smooth muscle [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol，2015，309（2）：L129-L138.
[23] O’Donoghue RJJ，Knight DA，Richards CD，et al. Genetic partitioning of interleukin-6 signalling in mice dissociates Stat3 from Smad3-mediated lung fibrosis [J]. EMBO Mol Med，2012，4（9）：939-951.
[24] Le TTT，Karmouty-Quintana H，Melicoff E，et al. Blockade of IL-6 Trans signaling attenuates pulmonary fibrosis [J]. J Immunol，2014，193（7）：3755-3768.
[25] Milara J，Hernandez G，Ballester B，et al. The JAK2 pathway is activated in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Respir Res，2018，19（1）：24.
[26] Prêle CM，Yao E，O’Donoghue RJJ，et al. STAT3：a central mediator of pulmonary fibrosis? [J]. Proc Am Thorac Soc，2012，9（3）：177-182.
[27] Shi K，Jiang J，Ma T，et al. Dexamethasone attenuates bleomycin-induced lung fibrosis in mice through TGF-β，Smad3 and JAK-STAT pathway [J]. Int J Clin Exp Med，2014，7（9）：2645-2650.
[28] Tzouvelekis A，Ntolios P，Karameris A，et al. Increased expression of epidermal growth factor receptor（EGF-R）in patients with different forms of lung fibrosis [J]. Biomed Res Int，2013，2013：654354.
[29] 滕金艳，周仲瑜，姚敏，等 . 艾灸在肺系疾病中的应用与研究进展 [J]. 针灸临床杂志，2021，37（10）：88-92.
[30] 金钟熙 . 张学丽导师麦粒灸临床经验总结 [D]. 北京：北京中医药大学，2019.
[31] 郑君，张昆 . 古时间针法的中医理论机制探析 [A]// 山东针灸学会第七届学术年会论文集 [C]. 日照，2015.

（收稿日期：2022-02-20；修回日期：2022-05-11）

狼毒大戟的化学成分及细胞毒活性研究

葛继芸[1]，周艳卿[2]，邱彦[3]，王建[3]，周瑾[2]，李盛建[2]，赵亮[2]，曹青青[3*]（1. 上海东方肝胆外科医院药材科，上海 200438；2. 上海市宝山区罗店医院药剂科，上海 201908；3. 上海市浦东新区人民医院药剂科，上海 201200）

摘要：目的 研究大戟科植物狼毒大戟的化学成分及其细胞毒活性。**方法** 采用硅胶柱色谱等术分离纯化狼毒大戟中的化学成分，根据化合物的理化性质和波谱数据分析鉴定化合物的结构。采用噻唑蓝比色法探究 9 个化合物对肝癌细胞株和乳腺癌细胞株的细胞毒活性。**结果** 共从狼毒大戟饮片中分离得到 9 个化合物，分别鉴定为岩大戟内酯 B（**1**）、ebracteolatain A（**2**）、3，3'- 二乙酰基 -2，4'- 二甲氧基 -2'，4，6，6'- 四羟基 - 二苯基甲烷（**3**）、*β*- 香树脂醇乙酸酯（**4**）、狼毒乙素（**5**）、*β*- 谷甾醇（**6**）、euphebracteolatain A（**7**）、fischeria A（**8**）、岩大戟内酯 A（**9**）。细胞毒活性研究发现，化合物 **1** ～ **9** 对肝癌细胞株 HepG2 无显著活性；化合物 **2** 对乳腺癌细胞株 MCF-7、MDA-MB-231、Sum149、ZR-75-1、SKBr3、BT474 的 IC_{50} 分别为（5.73±0.74）、（5.41±0.26）、（5.47±0.17）、（3.49±0.54）、（10.10±1.66）、（2.63±0.59）μmol·L^{-1}。化合物 **3** 对乳腺癌细胞株 Sum149、ZR-75-1 细胞毒活性明显，其 IC_{50} 分别为（5.23±0.44）、（10.13±1.80）μmol·L^{-1}。**结论** 化合物 **3** 是新化合物，化合物 **7** 为首次从狼毒大戟中分离得到；化合物 **2** 和化合物 **3** 对乳腺癌细胞有显著细胞毒活性。

关键词：狼毒大戟；化学成分；结构鉴别；细胞毒活性

中图分类号：R283，R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1226-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.002

Chemical constituents and cytotoxic activity of *Euphorbia fischeriana* Steud.

GE Ji-yun[1], ZHOU Yan-qing[2], QIU Yan[3], WANG Jian[3], ZHOU Jin[2], LI Sheng-jian[2], ZHAO Liang[2], CAO Qing-qing[3*] (1. *Department of Pharmacy*, *Shanghai Fongfang Hepatobiliary Surgery Hospital*, *Shanghai* 200438; 2. *Department of Pharmacy*, *Luodian Hospital of Baoshan District*, *Shanghai* 201908; 3. *Department of Pharmacy*, *People's Hospital of Shanghai Pudong New District*, *Shanghai* 201200)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents of *Euphorbia fischeriana* Steud. and its cytotoxic activity. **Methods** The chemical constituents were isolated and purified by silica column chromatography, and identified by nuclear magnetic resonance spectrum analysis based on their physical characteristics. MTT was performed to determine the cycotoxic activities of these compounds on hepatoma carcinoma cells and breast cancer cells in vitro. **Results** Nine compounds were isolated and identified from *Euphorbia fischeriana* Steud., including jolkinolide B (**1**), ebracteolatain A (**2**), 3, 3'-diacetyl-2, 4'-dimethoxy-2', 4, 6, 6'-tetrahydroxy-diphenyl (**3**), *β*-amyrin acetate (**4**), 2, 4-dihydroxy-6-methoxy-3-methyl-1-acetophenone (**5**), *β*-sitosterol (**6**), euphebracteolatain A (**7**), fischeria A (**8**), and jolkinolide A (**9**). Theses compounds had no significant cytotoxic activity on hepatocellular carcinoma cell line HepG2. The IC_{50} values of compound **2** for the breast cancer cell lines MCF-7, MDA-MB-231, Sum149, ZR-75-1, SKBr3 and BT474 were (5.73±0.74), (5.41±0.26), (5.47±0.17), (3.49±0.54), (10.10±1.66) and (2.63±0.59) μmol·L^{-1}, respectively. The IC_{50} values of compound **3** for the breast cancer cell lines Sum149, and ZR-75-1 were (5.23±0.44), and (10.13±1.80) μmol·L^{-1}, respectively. **Conclusion** Compound **3** is a new compound, and compound **7** has been

基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（No.81303300）；宝山区科技创新基金项目（No.19-E-2）。

作者简介：葛继芸，女，药师，主要从事医院药学工作，email：1083552322@qq.com *__通信作者__：曹青青，女，主管药师，主要从事活性成分研究，email：amy5629@163.com

isolated from *Euphorbia fischeriana* Steud. for the first time. Compound **2** and Compound **3** show cytotoxic activity on breast cancer cells.

Key words: *Euphorbia fischeriana* Steud.; chemical comstituent; structure identification; cytotoxic activity

狼毒大戟又名猫眼睛，为大戟科大戟属植物狼毒大戟（*Euphorbia fischeriana* Steud.）的干燥块根，为多年生草本植物，主要生长于丘陵坡地以及林缘地带[1]。在我国主要分布于内蒙古、东北及河北等地区，药源充足，资源丰富。《神农本草经》中记载狼毒有泄水逐饮，破积杀虫的功效，主治水肿腹胀，痰食虫积，心腹疼痛，结核，疥癣等，但其味苦、辛，性平，有大毒[2]，现代药理学研究表明狼毒大戟具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗结核、免疫调节等作用，但由于大毒制约了其临床应用和新药开发。

近年来，国内外诸多学者对狼毒大戟做了大量研究，狼毒大戟的临床应用也逐渐被人们重视。狼毒大戟主要以根入药，故诸多研究主要基于狼毒大戟总提取物或提取部位探索活性，对于具体活性成分尚不明确[3]。狼毒大戟的化学成分主要有二萜类、倍半萜类、苯乙酮类及黄酮类等[4]，而对于单体化合物的活性成分研究报道不够深入。为了扩大与利用狼毒大戟的临床应用与新药开发，其单体化合物的研究显得尤为重要。因此，本文采用色谱分离制备技术，对狼毒大戟的化学成分进行提取、分离、鉴别，同时采用MTT 法研究其单体化合物对肝癌细胞与乳腺癌细胞的毒性作用，旨在进一步探索狼毒大戟单体化合物的药理作用，为临床安全有效的应用和药材的进一步开发提供实验数据。

1　材料

1.1　仪器

Agilent1260 高效液相色谱仪、Agilent 6220 飞行时间质谱仪（美国安捷伦科技有限公司）；Bruker AVANCE Ⅲ 600 高分辨核磁共振波谱仪（德国布鲁克科技有限公司）；SMART-N 超纯水机（香港力康生物医疗科技控股有限公司）；RE-52 型旋转蒸发仪（上海申生科技有限公司）；CO_2 培养箱（美国 Thermo）；TS-100 摇床（海门其林贝尔）；Multiskan MK3 酶标仪（美国 Thermo）；XDS-200 倒置显微镜（上海蔡康光学）；全自动手持式细胞计数器 Scepter 2.0（美国 Millipore）；18 XW-80A 型旋涡混合器（海门其林贝尔）；SB3200-T 超声发生器（上海科导，50 kHz，120 W）；AE240 型十万分之一电子天平（瑞士梅特勒）。

1.2　试药

所用试剂均为分析纯（江苏强盛功能化学股份有限公司），水为自制超纯水。玻璃色谱柱（江苏南通三晶玻璃仪器有限公司）；反相 C_{18} 硅胶（日本大曹株式会社）；柱色谱用硅胶、硅胶 GF254 薄层板（山东烟台江友化工有限公司）。

乳腺癌细胞株 MDA-MB-231、Sum149、MCF-7、ZR-75-1、SKBr3、BT474、肝癌细胞株 HepG2（南京科佰生物科技有限公司）；紫杉醇（北京谱析，纯度：98%）；澳洲胎牛血清、DMEM 培养基、PBS 溶液、0.5% 胰蛋白酶（美国 Gibco 公司）。

中药狼毒大戟饮片购自安徽（产地西藏）；经海军军医大学药学院生药教研室的韩婷副教授鉴定为大戟科大戟属植物狼毒大戟 *Euphorbia fischeriana* Steud. 的干燥根。标本存放于上海诗丹德生物技术公司留样库。

2　方法与结果

2.1　提取和分离

取狼毒大戟药材 30 kg 粉碎后，用 80% 的乙醇于 65 ℃下回流提取两次，合并两次提取液减压回收至无乙醇残留，得粗提液 16 L。取粗提液 2 L，加水使其混悬，依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇各萃取 3 次，每次加入萃取溶剂 2 L。合并各萃取层溶液，减压回收溶剂，得石油醚浸膏 80 g，乙酸乙酯浸膏 90 g，正丁醇浸膏 300 g。

取乙酸乙酯浸膏采用正相硅胶柱色谱分离，采用石油醚 - 乙酸乙酯系统从 50∶1 逐渐过渡到 1∶1 梯度洗脱，收集其中薄层点相似的流分，得到流分 Fr1 ～ Fr6；从 Fr2 通过反相 C_{18} 硅胶柱（丙酮∶乙酸乙酯∶甲醇梯度洗脱）分离得到化合物 **3**（20 mg），**7**（33 mg），**8**（78 mg）；采用反相 C_{18} 硅胶柱从 Fr3（氯仿 - 甲醇梯度洗脱）分离得到化合物 **1**（21 mg），**2**（30 mg），**4**（38 mg）；从 Fr4 应用反相 C_{18} 硅胶柱（氯仿 - 甲醇梯度洗脱）分离得到化合物 **6**（34 mg）；从 Fr5 应用反相 C_{18} 硅胶柱（氯仿 - 甲醇梯度洗脱）分离得到化合物 **5**（28 mg）；从 Fr6 也通过反相 C_{18} 硅胶柱（氯仿 - 甲醇

梯度洗脱）分离得到化合物 **9**（26 mg）。

2.2 结构鉴定

对狼毒大戟中分离得到的 9 个化合物进行 MS、^{1}H-NMR 谱与 ^{13}C-NMR 谱的波谱数据采集，解析波谱数据并与参考文献对比，推测化合物的结构，结构见图 1。

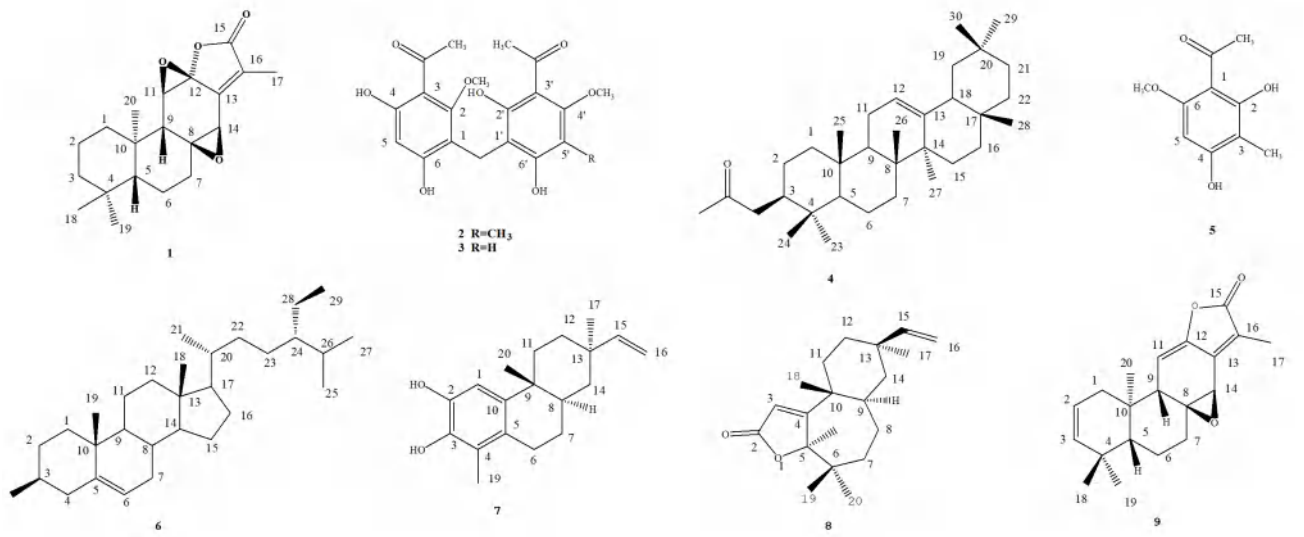


图 1 9 个单体化合物的结构式

Fig 1 Structures of 9 compounds

化合物 **1**：白色针晶，$C_{20}H_{26}O_4$，ESI-MS 的质核比（*m/z*）为 331.19 $[M+H]^+$。^{1}H-NMR（600 MHz，$CDCl_3$）δ：4.03（1H，s，11-H），3.67（1H，s，14-H），2.28（1H，s，9-H），2.08（3H，s，17-CH_3），0.93（3H，s，20-CH_3），0.85（3H，s，19-CH_3），0.82（3H，s，18-CH_3）；^{13}C-NMR（150 MHz，$CDCl_3$）δ：169.6（C-16），148.6（C-13），130.3（C-15），85.2（C-12），66.1（C-8），60.9（C-11），55.4（C-14），53.5（C-5），48.0（C-9），41.3（C-1），39.2（C-10），39.2（C-3），35.6（C-7），33.5（C-4），33.5（C-18），21.9（C-19），20.8（C-6），18.4（C-2），15.4（C-20），8.7（C-17）。以上数据与文献[5]报道基本一致，推测化合物为岩大戟内酯 B。

化合物 **2**：黄色针晶，$C_{20}H_{22}O_8$，ESI-MS 的质核比（*m/z*）为 391.10 $[M+H]^+$。^{1}H-NMR（600 MHz，$CDCl_3$）δ：13.19（1H，s，4-OH），9.15（1H，s，6-OH），8.82（1H，s，6'-OH），6.02（1H，s，5-H），3.95（3H，s，2-OCH_3），3.84（3H，s，4'-OCH_3），3.74（2H，s，CH_2），2.66（3H，s，3'-$COCH_3$），2.63（3H，s，3-$COCH_3$），2.06（3H，s，5'-CH3）；^{13}C-NMR（150 MHz，$CDCl_3$）δ：203.8，32.5（3-$COCH_3$），202.3，30.5（3'-$COCH_3$），163.0（C-6），162.7（C-4'），162.6（C-4），162.5（C-2'），160.6（C-6'），155.8（C-2），110.8（C-1'），110.7（C-5'），107.6（C-3'），105.2（C-1），105.2（C-3），92.4（C-5），64.7（4'-OCH_3），55.7（2-OCH_3），16.2（CH_2），8.7（5-CH_3）。以上数据与文献[6]报道基本一致，推测化合物为 ebracteolatain A。

化合物 **3**：浅黄色针晶，$C_{19}H_{20}O_8$，ESI-MS 的质核比（*m/z*）为 377.08 $[M+H]^+$。^{1}H-NMR（600 MHz，$CDCl_3$）δ：12.81（1H，s，4-OH），9.11（1H，s，6-OH），8.67（1H，s，6'-OH），6.32（1H，s，5'-OH），6.02（1H，s，5-OH），3.97（3H，s，2-OCH_3），3.84（3H，s，4'-OCH_3），3.71（2H，s，CH_2），2.61（3H，s，3-OCH_3），2.67（3H，s，3'-OCH_3）；^{13}C-NMR（150 MHz，$CDCl_3$）δ：205.3，33.9（3-$COCH_3$），203.5，31.8（3'-$COCH_3$），166.1（C-2'），164.6（C-6），164.3（C-4），164.1（C-6'），163.9（C-4'），159.7（C-2），109.8（C-1'），106.6（C-3），104.0（C-1），104.0（C-3'），93.8（C-5'），93.8（C-5），66.1（2-$COCH_3$），57.1（4'-$COCH_3$），17.4（CH_2），该化合物 5 号位上无甲基取代，其他位置的化学位移与 ebracteolatain A 基本一致[6]。HMBC 谱图显示，H-2 OCH_3（δ_H3.91）与 C-2（δ_C159.7）相关，H-4'（δ_H3.84）与 C-4（δ_C163.9）相关，H-5（δ_H 6.02）与 C-6（δ_C164.6）相关，H-5'（δ_H 6.32）与 C-6'（δ_C164.1）相关，H-6' OH（δ_H 8.67）与 C-5'（δ_C 95.8）相关，进一步确认该化合物与 ebracteolatain A 结构相似。推测该化合物为 3，3'- 二乙酰基 -2，

4'-二甲氧基-2'，4，6，6'-四羟基-二苯基甲烷。通过 SciFinder 检索未发现与该化合物结构一致的文献报道，故确认该化合物为新发现的化合物，且在狼毒大戟中首次报道。

化合物 **4**：无色细针晶，$C_{32}H_{52}O_2$，ESI-MS 的质核比（*m/z*）为 409.38 $[M-COOCH_3]^+$。^{1}H-NMR（600 MHz，$CDCl_3$）δ：5.18（1H，t，J = 3.6 Hz，H-12），4.45（1H，dd，J = 7.8 Hz，H-3），2.03（3H，s，CH_3CO），1.13（3H，s，CH_3-27），0.97（6H，s，CH_3-25，26），0.96（6H，s，CH_3-29，30），0.87（6H，s，CH_3-23，24），0.81（3H，s，CH_3-28）；^{13}C-NMR（150 MHz，$CDCl_3$）δ：171.2（C-32），145.5（C-13），121.9（C-12），81.2（C-3），55.5（C-5），47.8（C-9），47.5（C-18），47.0（C-19），41.9（C-14），40.1（C-8），38.5（C-21），37.9（C-1），37.4（C-4），37.1（C-22），34.9（C-10），33.6（C-21），32.8（C-7），32.7（C-17），31.3（C-20），28.6（C-23），28.3（C-15），27.2（C-28），26.4（C-16），26.2（C-27），23.9（C-30），23.8（C-2），23.8（C-11），21.5（C-31），18.5（C-6），17.0（C-26），16.9（C-24），15.8（C-25）。以上数据与文献 [7] 报道基本一致，推测化合物为 β-香树酯醇乙酸酯。

化合物 **5**：无色针晶，$C_{10}H_{12}O_4$，ESI-MS 的质核比（*m/z*）为 197.07 $[M+H]^+$。^{1}H-NMR（600 MHz，DMSO）δ：14.22（1H，s，2-OH），10.53（1H，s，4-OH），6.07（1H，s，H-5），3.78（3H，s，6-OCH_3），2.53（3H，s，1-$COCH_3$），1.88（3H，s，3-CH_3）；^{13}C-NMR（150 MHz，DMSO）δ：204.1，34.6（1-$COCH_3$），165.9（C-4），164.6（C-6），162.7（C-2），106.1（C-3），104.5（C-1），92.3（C-5），57.4（6-OCH_3），9.2（3-CH_3）。以上数据与文献 [8] 报道基本一致，推测化合物为狼毒乙素。

化合物 **6**：无色针晶，^{1}H-NMR（600 MHz，$CDCl_3$）δ：5.35（1H，dd，J = 3.0，2.4 Hz，H-5），3.52（1H，tt，J = 10.8，4.2 Hz，H-3），1.00（3H，s，H-19），0.92（3H，d，J = 6.6 Hz，H-21），0.84（3H，t，J = 7.8 Hz，H-29），0.83（3H，d，J = 6.0 Hz，H-26），0.81（3H，d，J = 6.6 Hz，H-27），0.68（3H，s，H-18）；^{13}C-NMR（150 MHz，$CDCl_3$）δ：140.8（C-5），121.7（C-6），71.8（C-3），56.8（C-14），56.1（C-17），45.9（C-24），42.3（C-4，13），39.8（C-12），37.3（C-1），36.5（C-10），36.2（C-20），33.7（C-22），31.9（C-7，8），31.7（C-2），29.2（C-25），28.3（C-23），26.1（C-16），24.3（C-15），23.1（C-28），21.1（C-11），19.8（C-26），19.4（C-19），19.1（C-27），18.8（C-21），12.0（C-29），11.9（C-18）。以上数据与文献 [9] 报道基本一致，推测化合物为 β-谷甾醇。

化合物 **7**：黄色油状，$C_{19}H_{26}O_2$，ESI-MS 的质核比（*m/z*）为 285.20 $[M-H]^-$。^{1}H-NMR（600 MHz）δ：6.71（1H，s，H-1），5.87（dd，J = 10.8，17.4 Hz，H-15），4.89（1H，dd，J = 1.2，10.8 Hz，H_a-16），4.98（1H，dd，J = 1.2，17.4 Hz，H_b-16），2.69 ～ 2.59（2H，m，H-6），2.11（3H，s，H-19），1.98 ～ 1.95（2H，m，H-11），1.77 ～ 1.72（1H，s，H-8），1.67 ～ 1.54（2H，s，H-7），1.46 ～ 1.42（1H，m，H_a-14），1.21 ～ 1.18（1H，m，H_b-14），1.02（3H，s，H-17），1.00（3H，s，H-20）；^{13}C-NMR（150 MHZ，$CDCl_3$）δ：151.3（C-15），140.9（C-2），140.6（C-10），140.0（C-3），127.3（C-5），122.7（C-4），109.0（C-16），109.0（C-1），39.8（C-14），36.6（C-9），36.5（C-8），36.5（C-13），34.3（C-11），33.1（C-12），27.0（C-6），25.8（C-7），22.9（C-17），21.5（C-20），11.5（C-19）。以上数据与文献 [10] 报道基本一致，推测化合物为 euphebracteolatins A。化合物 euphebracteolatins A 主要存在于月腺大戟中，首次在狼毒大戟中发现。

化合物 **8**：无色针晶，$C_{19}H_{28}O_2$，ESI-MS 的质核比（*m/z*）为 289.21 $[M-H]^-$。^{1}H-NMR（600 MHz，$CDCl_3$）δ：5.89（1H，d，J = 1.2 Hz，H-3），5.80（1H，dd，J = 5.4，10.8 Hz，H-15），4.95（1H，d，J = 1.2 Hz，H-5），4.92（1H，dd，J = 1.2，3.6 Hz，H_a-16），4.90（1H，dd，J = 0.6，10.8 Hz，H_b-16），1.21（3H，s，H-18），1.20（3H，s，H-20），1.02（3H，s，H-17），0.69（3H，s，H-19）；^{13}C-NMR（150 MHz，$CDCl_3$）δ：183.9（C-2），173.3（C-4），150.0（C-15），117.3（C-3），109.5（C-16），89.9（C-5），43.3（C-7），41.0（C-14），39.6（C-10），39.4（C-8），39.4（C-9），39.1（C-6），36.0（C-13），31.7（C-12），30.0（C-20），28.5（C-11），22.6（C-17），18.9（C-19），18.8（C-18）。以上数据与文献 [11] 报道基本一致，推测化合物为 fischeria A。

化合物 **9**：白色针晶，$C_{20}H_{26}O_4$，ESI-MS 的质核比（*m/z*）为 315.19 $[M-H]^-$。^{1}HNMR（600 MHz，$CDCl_3$）δ：5.47（1H，d，J = 5.4 Hz，

H-11），3.71（1H，s，H-14），2.64（1H，d，J = 5.4 Hz，H-9），2.06（3H，s，H-17），0.95（3H，s，H-18），0.86（3H，s，H-19），0.73（3H，s，H-20）；^{13}CNMR（150 MHz，$CDCl_3$）δ：170.6（C-16），147.5（C-12），145.1（C-13），125.2（C-15），104.1（C-11），61.2（C-8），54.5（C-14），53.6（C-5），51.9（C-9），41.6（C-1），41.5（C-10），39.2（C-3），34.2（C-7），33.6（C-4），33.5（C-18），21.9（C-19），20.9（C-6），18.5（C-2），15.0（C-20），8.7（C-17）。以上数据与文献[12]报道基本一致，推测化合物为岩大戟内酯 A。

2.3 细胞毒活性实验

采用 MTT 法对狼毒大戟中提取得到的 9 个单体化合物进行细胞毒活性评价，选取 6 种类型乳腺癌细胞株（Her 2 阳性型 SKBr 3 及 BT 474、LuminalA 型 MCF-7、LuminalB 型 ZR-75-1、三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 及 Sum149）及 1 种肝癌细胞株 HepG2。以紫杉醇为阳性对照药。将上述 7 种肿瘤细胞密度调整为 5×10^4 个 • mL^{-1}，接种到 96 孔培养板中，每孔接种 100 μL 细胞悬液，置于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养过夜，观察细胞贴壁且生长良好后，设置阳性对照组，空白对照组和各个不同浓度药物的实验组。配制 **1** ～ **9** 化合物的母液浓度为 5 mmol • L^{-1}，紫杉醇母液浓度为 3.5 mmol • L^{-1}，将各化合物和紫杉醇母液稀释得到 8 个梯度浓度的样品溶液（20、15、12.5、10、7.5、5、2、1 mol • L^{-1}），分别作用于 7 种肿瘤细胞，空白对照组中加等量培养基，每个剂量样本设置 6 个平行孔。分别置于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养 72 h，之后每孔加入 MTT 液（5 g•L^{-1}）20 μL。继续培养 4 h，吸弃上清液，每孔加入 100 μL DMSO，避光，低速震荡 15 min，使结晶充分溶解。用酶标仪（波长 492 nm）测定吸光度（*OD*）值，计算不同浓度的化合物对乳腺癌细胞的抑制率。细胞抑制率（%）＝[1 －（加药组 *OD* 值 － 调零孔 *OD* 值）/（对照组 *OD* 值 － 调零孔 *OD* 值）]×100%。由此计算阳性药紫杉醇及化合物 **1** ～ **9** 对不同肿瘤细胞的抑制率，并确定 72 h 半数抑制浓度，结果如表 1、2，图 2 所示。

3 讨论

为了进一步探索狼毒大戟的化学成分和药理活性，本研究以中药材狼毒大戟饮片作为研究对象，应用多种色谱技术，从其乙醇总提物的乙酸乙酯萃取部位分离得到 9 个单体化合物。通过化合物的理化性质、质谱及核磁数据，结合文献报道，分析鉴定了各单体化合物的化学结构。单体化合物涉及的结构类型有二萜类、三萜类、苯乙酮类、甾醇类，本研究已在 SciFinder 中检索，确认化合物 **3** 是新发现的化合物，化合物 **7** 为首次从狼毒大戟中分离得到。

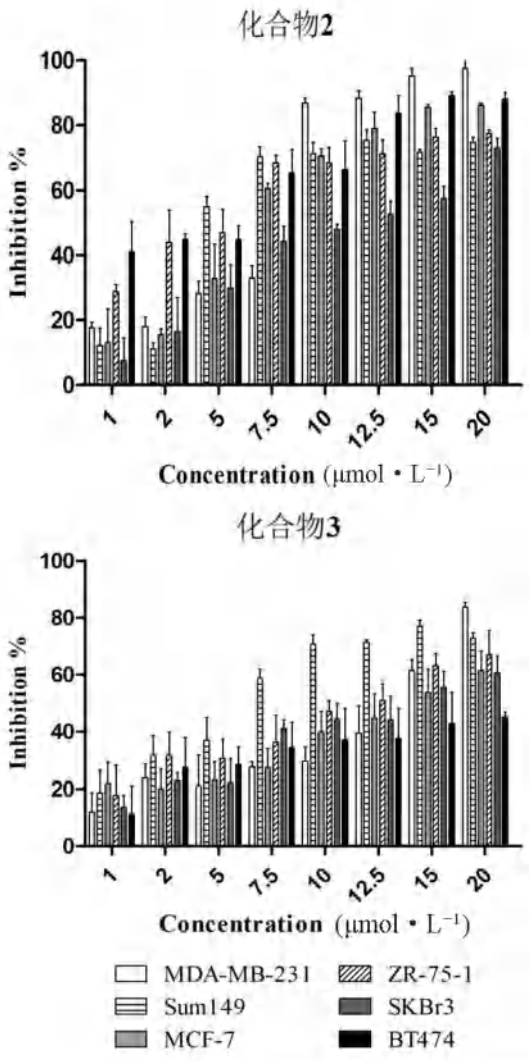


图 2 不同浓度的化合物 **2** 和化合物 **3** 对乳腺癌细胞株的抑制率

Fig 2 Inhibition rate of compound **2** and compound **3** with different concentrations on the breast cancer cells

诸多学者对狼毒大戟的抗肿瘤活性进行了研究，结果表明其提取物及单体化合物对肝癌细胞、乳腺癌细胞、肺癌细胞、胃癌细胞、结肠癌细胞等具有显著的抑制作用[13]。本研究主要探索其狼毒大戟单体化合物对肝癌细胞和乳腺癌细胞的细胞毒活性。结果表明 9 个单体化合物对肝癌细胞株 HepG2 均无显著细胞毒活性。化合物 **2** 对乳腺癌细胞株的细胞毒活性作用均显著，对乳腺癌细胞株 BT474 的细胞毒活性效果最强，且其抑制效果呈浓度依赖性。化合物 **3** 对乳腺癌细胞株

表 1　9 个化合物对 HepG2 和 MCF-7 细胞生长的影响

Tab 1　Effect of 9 compounds on the growth of HepG2 and MCF-7 cells

化合物	IC_{50}/（μmol・L^{-1}）	
	HepG2	MCF-7
1	—	—
2	61.83±0.116	5.73±0.74
3	54.55±0.076	16.71±0.121
4	—	—
5	—	—
6	—	—
7	25.55±0.029	19.62±0.117
8	—	—
9	—	—
紫杉醇	＜1	＜1

注：“—”表示给药浓度＞ 100 μmol・L^{-1}。

Note：“—” indicates that the administration concentration is more than 100 μmol・L^{-1}.

Sum149、ZR-75-1 细胞毒活性明显，对乳腺癌细胞株 Sum149 的细胞毒活性较乳腺癌细胞株 ZR-75-1 强。化合物 **7** 对乳腺癌 MCF-7 细胞有一定抑制作用。其他化合物对乳腺癌细胞株未表现出显著抑制活性。

化合物 **3** 的抗乳腺癌细胞毒活性与化合物 **2** 相比发生明显变化，其对乳腺癌细胞株 ZR-75-1 细胞毒活性较化合物 **2** 弱，而对 Sum149 细胞的细胞毒活性较化合物 **2** 强，且对其他乳腺癌细胞株均无明显的细胞毒活性。化合物 **3** 结构较化合物 **2** 在 5' 位上少了一个甲基，从化合物构效关系上来看，化合物 **2** 结构中 5' 位上甲基对化合物的活性具有显著影响。明确化合物的构效关系有利于进一步探索化合物对肿瘤细胞毒性的作用机制。

综上，尽管相关学者对狼毒大戟进行了大量研究，但针对其化学成分及活性的研究仍然是目前开发应用的热点。本研究进一步分析狼毒大戟的化学成分，筛选其单体化合物对肝癌细胞和乳腺癌细胞株的细胞毒活性，并初步探讨其活性化合物的构效关系，为深入开发狼毒大戟的中药资源和临床应用提供参考。

表 2　3 个化合物对乳腺癌细胞生长的影响

Tab 2　Effect of 3 compounds on the growth of the breast cancer cells

化合物	IC_{50}/（μmol・L^{-1}）					
	MDA-MB-231	Sum149	MCF-7	ZR-75-1	SKBr3	BT474
2	5.41±0.26	5.47±0.17	5.73±0.74	3.49±0.54	10.10±1.66	2.63±0.59
3	12.55±0.39	5.23±0.44	16.71±0.12	10.13±1.80	13.69±2.67	＞20（40%）
5	＞20（30%）	＞20（30%）	＞20（30%）	＞20（30%）	＞20（30%）	＞20（30%）
紫杉醇	1.72±0.092	＜1	＜1	1.89±0.110	＜1	＜1

注：“20（30%）”表示给药浓度 20 μmol・L^{-1} 时抑制率为 30%。

Note：“20（30%）” indicates that the inhibition rate is 30% when the administration concentration is 20 μmol・L^{-1}.

参考文献

[1] 谢文仙 . 狼毒大戟三萜的提取纯化、鉴定与抑瘤抑菌等作用研究 [D]. 广州：广东工业大学，2015.

[2] 南京中医药大学 . 中药大辞典 . 下册 [M]. 上海：上海科学技术出版社，2006.

[3] 邱韵萦 . 大戟科大戟属有毒中药药理研究进展 [J]. 现代诊断与治疗，2014，25（22）：5107-5108.

[4] 林世翼，贾景明，王安华 . 狼毒二萜类化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中草药，2020，51（1）：256-264.

[5] 曹青青，李盛建，李云青，等 . 月腺大戟的化学成分及其乳腺癌细胞毒活性研究 [J]. 药学践杂志，2019，37（4）：309-313.

[6] Wang XY，Liu LP，Kang TG，et al. Chemical constituents of *Euphorbia fischeriana* [J]. Chin J Nat Med，2012，10（4）：299-302.

[7] 庞丽纹，丁立军，简丽，等 . 狼毒大戟乙酸乙酯超声提取物中萜类化合物的分离与鉴定 [J]. 内蒙古农业大学学报（自然科学版），2012，33（1）：236-239.

[8] Deng B，MU SZ，Hao XJ. Chemical constituents from *Euphorbia ebracteolata* [J]. Chin J Nat Med，2010，8（3）：183-185.

[9] 马良，王欢，王金兰，等 . 狼毒大戟地上部分化学成分研究 [J]. 齐齐哈尔大学学报（自然科学版），2012（6）：30-32.

[10] Mu SZ，Jiang CR，Huang T，et al. Two new rosane-type diterpenoids from *Euphorbia ebracteolata* Hayata [J]. Cheminform，2013，96（12）：2299-2303.

[11] Pei Y，Koike K，Han B，et al. Fischeria A，a novel norditerpene lactone from *Euphorbia fischeriana* [J]. Tetrahedron Lett，1999，40（5）：951-952.

[12] 马玉坤，白丽明，郭丽娜，等 . 狼毒大戟中二萜成分的研究 [J]. 化工时刊，2017，31（1）：12-14.

[13] 马玉坤，马天成，孙宇，等 . 狼毒大戟抗肿瘤活性成分 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（7）：156-164.

（收稿日期：2021-10-25；修回日期：2021-12-05）

SiO_2/PDMS 复合膜的制备及其蒸汽渗透分离石菖蒲油水混合液的性能研究

姬莎莎[1, 2]，刘红波[1, 2]，唐志书[3*]，朱华旭[4*]，宋忠兴[1, 2]（1. 陕西中医药大学/陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心，陕西 咸阳 712083；2. 秦药特色资源研究与开发国家重点实验室（培育）/陕西省创新药物研究中心，陕西 咸阳 712083；3. 中国中医科学院，北京 100700；4. 南京中医药大学/江苏省植物药深加工工程研究中心/江苏省中药资源产业化过程协同创新中心，南京 210023）

摘要：目的 以截留分子量 50 kDa 的聚偏氟乙烯（PVDF）超滤膜为基底膜，制备 SiO_2 填充改性的聚二甲基硅氧烷（PDMS）复合膜（简称 SiO_2/PDMS），优化制备工艺，并考察其蒸汽渗透分离石菖蒲油水混合液的性能。**方法** 采用涂布法制备 SiO_2/PDMS 复合膜，考察 SiO_2 填充比例、交联温度及交联时间等因素对 SiO_2/PDMS 复合膜性能的影响，采用 SEM/EDS、FTIR、接触角等对复合膜材料进行表征，并且通过对石菖蒲油水混合液的蒸汽渗透过膜实验来对复合膜制备过程的影响因素进行优化，评价复合膜的渗透汽化性能。**结果** SiO_2 填充剂可降低 PDMS 膜的疏水性，提高膜渗透通量及分离因子。SiO_2 填充比例、交联温度及交联时间等因素对 SiO_2/PDMS 复合膜蒸汽渗透分离石菖蒲油水混合液的性能均有不同程度影响。优化的制备工艺为 SiO_2 填充量 4%，交联温度 50 ℃，交联时间 12 h。**结论** SiO_2/PDMS 复合膜可提高膜的分离性能，在中药挥发油分离富集方面具有一定的应用前景。

关键词：聚偏氟乙烯；聚二甲基硅氧烷；亲水性纳米 SiO_2；蒸汽渗透；石菖蒲油水混合液
中图分类号：R284，TS255.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1232-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.003

Preparation of SiO_2/PDMS composite membrane and its performance in vapor permeation separation of *Acorus calamus* oil-water mixture

JI Sha-sha[1, 2], LIU Hong-bo[1, 2], TANG Zhi-shu[3*], ZHU Hua-xu[4*], SONG Zhong-xing[1, 2] (1. *Shaanxi University of Chinese Medicine/Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine Resources Industrialization by Shaanxi & Education Ministry*, *Xianyang Shannxi* 712083; 2. *State Key Laboratory of Research & Development of Characteristic Qin Medicine Resources* (*Cultivation*)/*Shaanxi Innovative Drug Research Center, Xianyang Shannxi* 712083; 3. *China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing* 100700; 4. *Nanjing University of Chinese Medicine/Jiangsu Engineering Research Center for Deep Processing of Plant Medicine/Jiangsu Collaborative Innovation Center for the Industrialization of Traditional Chinese Medicine Resources, Nanjing* 210023)

Abstract: Objective To prepare a SiO_2 filled modified polydimethylsiloxane (PDMS) composite membrane (referred to as SiO_2/PDMS) with a polyvinylidene fluoride (PVDF) ultrafiltration membrane with a molecular weight cut-off of 50 kDa as the base membrane, to optimize the preparation technology, and to dertermine the performance of its steam permeation separation of *Acorus calamus* oil-water mixture. **Methods** SiO_2/PDMS composite film was prepared by coating method, and the effect of SiO_2 filling ratio, crosslinking temperature and crosslinking time on the

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81773919，No.81873015）；中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目”（No.2060302）。

作者简介：姬莎莎，女，硕士研究生，主要从事中药制剂研究，email：1115499365@qq.com *通信作者：唐志书，男，教授，主要从事中药制剂研究，email：tzs6565@163.com；朱华旭，女，研究员，主要从事基于化学结构的中药制药分离过程研究，email：Huaxu72@126.com

properties of SiO_2/PDMS composite film was investigated. The factors influencing the preparation of the composite membrane were optimized by vapor permeation experiment of the oil-water mixture of *Acorus calamus*. The pervaporation performance of the composite membrane was evaluated. **Results** SiO_2 filler reduced the hydrophobicity of PDMS membrane and improved the membrane permeation flux and separation factors. Factors such as SiO_2 filling ratio, cross-linking temperature and cross-linking time had different effects on the performance of SiO_2/PDMS composite membrane in vapor permeation separation of *Acorus calamus* oil-water mixture. The optimized preparation process included 4% SiO_2 filling, 50 ℃ crosslinking temperature and 12 h crosslinking time. **Conclusion** SiO_2/PDMS composite membrane can improve the separation of the membrane, and has a certain application prospect in the separation and enrichment of volatile oil in traditional Chinese medicine.

Key words: polyvinylidene fluoride; polydimethylsiloxane; hydrophilic nano-SiO_2; vapor permeation; *Acorus calamus* oil-water mixture

膜分离技术作为一种新型且高效的分离技术，具有广阔的发展前景[1]。膜分离技术是指借助外界能量或化学位差的推动，通过特定膜的渗透作用，实现对两组分或多组分混合液体或气体进行分离、分级、提纯以及浓缩富集的技术，具有过程简单、无二次污染、分离系数大、无相变、高效、节能等优点[2]。蒸汽渗透（vapor permeation，VP）作为一项新型膜分离技术以其流程简单、选择性好、无相变能耗、无污染、易放大的优点，在高浓度有机溶剂脱水和低浓度有机溶剂提纯等领域，获得了广泛关注[3-4]。蒸汽渗透技术是用于液（气）体混合物分离的一种技术，是混合物在各组分蒸气分压差的推动下，利用各组分通过致密膜溶解和扩散速度的不同实现分离[5]。其具有分离效率高，环境污染小，运行能耗低，不受气液平衡条件限制等优点[6]，可以用于分离传统方法难以分离的混合物，如近沸点混合物、恒沸物体系、各种同分异构体混合物、有机溶剂脱水以及水溶液中脱除微量有机溶剂等[7-9]。

目前，中药挥发油普遍采用水蒸气蒸馏法进行提取，蒸馏后所得馏出物多以油水混合物形式（俗称“芳香水液”）存在，需要经过有机溶剂萃取、加盐冷藏、重蒸馏等技术实施油 / 水分离，而再处理后挥发油的收率普遍偏低、所得挥发油中药效成分含量不稳定；若采用超临界萃取、微波提取等替代技术获取挥发油，因提取原理的差异，所得中药挥发油的组成和药效往往与水蒸气蒸馏法具有较大差异[10-11]。因此，将蒸汽渗透技术用于中药油水混合液的分离中，可以避免在共沸精馏等手段中引入的“第三组分”，防止产物被污染[12]。现有的膜材料存在机械性能差、热稳定性差以及油水分离效率低等缺点，因此需要对膜材料进行改性，以提高膜通量及分离效率，改善其机械性能。

本研究采用亲水性纳米 SiO_2 对聚二甲基硅氧烷（PDMS）进行填充改性，对石菖蒲油水混合液进行分离研究，并且探究了填充量、交联温度以及交联时间对复合膜渗透汽化性能的影响。

1 材料

1.1 仪器

AT-TB-2101AB 型涂布机（山东安尼麦特仪器有限公司），CPA225D 型分析天平（十万分之一，德国赛多利斯科学仪器有限公司），AREX-6 型磁力搅拌器（意大利 VELP 公司），TESCAN MIRA4 型扫描电子显微镜 [泰斯肯贸易（上海）有限公司]，X- 射线能量色散谱仪（瑞塞奇精密仪器有限公司），670 型傅里叶变换红外光谱仪（美国尼高力公司），DSA100S 型接触角测量仪（德国 KRUSS 公司），KS-300VDE/3 型超声波清洗器（昆山洁力美超声仪器有限公司），101 型电热鼓风干燥箱、MH-3000 型调温型电热套（北京科伟永兴仪器有限公司），蒸汽渗透过膜装置（南京工业大学实验室加工生产），JC-201T 型 COD 浊度测定仪、JC-101B 型 COD 快速消解器（青岛聚创环保集团有限公司）。

1.2 试药

聚偏氟乙烯 [PVDF，超滤孔径 50 K，中科瑞阳膜技术（北京）有限公司]，PDMS（运动黏度为 18 000 ～ 22 000 cSt，化学纯）、正硅酸乙酯（TEOS，分析纯）、二月桂酸二丁基锡（DBTDL，分析纯）（西格玛奥德里奇贸易有限公司），正己烷（分析纯，天津市科密欧化学试剂有限公司），

亲水性纳米 SiO_2（上海麦克林生化科技有限公司），石菖蒲（陕西兴盛德药业有限责任公司，经陕西中医药大学刘世军教授鉴定为天南星科植物石菖蒲 *Acorus tatarinowii* Schott 的干燥根茎）。

2 方法与结果

2.1 SiO_2-PDMS/PVDF 复合膜的制备

采用亲水性纳米 SiO_2 粒子进行膜改性，称取一定量的 PDMS 溶于正己烷中，常温下磁力搅拌 1 h 使溶液混合均匀，加入不同比例亲水性纳米 SiO_2 粒子，继续搅拌 1 h，超声 30 min 后，再次搅拌 2 h，使纳米 SiO_2 粒子均匀地分散在 PDMS 溶液中；按比例配制 TEOS、DBTDL 溶液，搅拌 2 h 后将其加入 PDMS 溶液中搅拌使该溶液混合均匀，超声 10 min，然后将溶液涂布在 PVDF 基底膜上，室温下挥干溶剂，后将复合膜置于 60 ℃的烘箱中一定时间，备用。将交联温度设为 60 ℃，交联时间为 18 h，按照前面所述方法分别制备填充比例为 0%、2%、4%、6%、8%、10% 的 SiO_2/PDMS 复合膜；在 SiO_2 填充量为 4%，交联时间为 18 h 时，分别制备 50、60、70、80、90 ℃等不同交联温度的 SiO_2/PDMS 复合膜；选择 4%SiO_2 填充量，交联温度为 50 ℃时，分别制备 6、12、18、24、30 h 等不同交联时间的 SiO_2/PDMS 复合膜。

2.2 石菖蒲油水混合液的制备

称取 1 kg 的石菖蒲药材，加入 8 倍量水，采用水蒸气蒸馏法进行提取，收集油水混合液 1 L，备用。

2.3 复合膜材料的表征

2.3.1 扫描电镜（SEM）和 X 射线能谱分析（EDS） ① 准备膜样品：将制好的膜裁成比较小的薄片；② 样品固定：在载物台上，对制好的膜片进行位置的固定，所用的固定物为导电胶；③ 真空喷金：将处理好的膜样品放于 SEM 的空腔中，轻轻关闭舱门，抽完真空后依次选择适宜的放大倍数以及合适的膜位置拍摄各个膜样品照片，观察膜材料的表面形貌，并使用能量色散 EDS 结合 SEM 对膜表面的元素及其含量进行分析。

复合膜的表面形貌见图 1，A 膜为未填充 SiO_2 的 PDMS 膜，其表面致密平滑，均一平整，无膜空隙或缺陷，B ～ F 分别为填充了不同质量 SiO_2 的复合膜，可以看出 SiO_2 在 PDMS 膜表面分散均匀，并且随着填充量的增加，复合膜表面的 SiO_2 分布越来越稠密。通过能谱图可以得出，PDMS 膜以及复合膜的表面均含有 C、N、O、F、Si 5 种元素，并且随着 SiO_2 添加量的增加，复合膜表面的 Si 含量占比逐渐增大。

2.3.2 傅里叶变换红外光谱分析（FTIR） 采用傅里叶变换红外光谱仪测试得到的 SiO_2/PDMS 复合膜的红外光谱图，扫描范围为 400 ～ 4000 cm^{-1}。红外光谱主要用来测定有机物分子中不同的化学键和官能团的吸收峰值，确定它们的存在和运动情况。

如图 2 所示，图 2A 为未填充 SiO_2 的 PDMS/PVDF 膜，图 2B 为填充量分别为 2%、4%、6%、8%、10% 的复合膜，其中 2900 cm^{-1} 和 2905 cm^{-1} 分别是 -CH_3 中 C-H 键的不对称伸缩振动峰和对称伸缩振动峰，1258 cm^{-1} 处是连接在 Si 上的两个 -CH_3 的对称变形峰，1078 cm^{-1} 处是 Si-OH 的伸缩振动峰，865 cm^{-1} 处是 Si-OH 的弯曲振动峰，778 cm^{-1} 处是 -CH_3 的平面外弯曲振动峰。对比图 2A 和 2B，发现改性膜在 1258 cm^{-1} 处的吸收峰强度变弱，而且在 1078 cm^{-1} 处峰强度明显减弱，说明复合膜表面发生了明显的交联反应。图 2C 与 2D 分别为不同交联温度与交联时间下的谱图，说明在 5 种交联温度与交联时间下都发生了交联反应。

2.3.3 接触角的测定 将复合膜裁剪成 3 cm×3 cm 的样品条。测量步骤如下：将注射器内装满蒸馏水且保证没有气泡存在，将裁剪好的样品平整铺展在样品台上，调整载物台与注射器针头之间的距离及相对位置，选择需要测定的点同时确保针尖不与样品接触。滴一滴蒸馏水落到膜上，液滴直径为 3 ～ 4 μm，拍摄液体与膜接触瞬间的照片；最后，软件测量接触角大小。每个复合膜选取 5 个点进行测量，取平均值，即可测得复合膜的接触角。结果如图 3 所示。

由图 3A 得知，未填充 SiO_2 的膜接触角为 120° 左右，随着 SiO_2 填充量的增加，接触角逐渐减小，说明复合膜表面的疏水性逐渐减小。图 3B 为不同交联温度下的复合膜接触角的变化情况，随着交联温度的升高，复合膜的接触角呈微弱增大趋势，在 90 ℃时下降，可能原因是交联温度过高使膜表面发生了破坏。图 3C 为不同交联时间的复合膜接触角变化情况，随着交联时间的增加，接触角先减小后逐渐增大，且在 12 h 最小。

2.4 复合膜的渗透汽化性能研究

采用复合膜对“2.2”项下石菖蒲油水混合液进行过膜实验，取 1 L 石菖蒲油水混合液，采用蒸汽渗透膜装置进行实验，待渗透液体积为 0.7 L

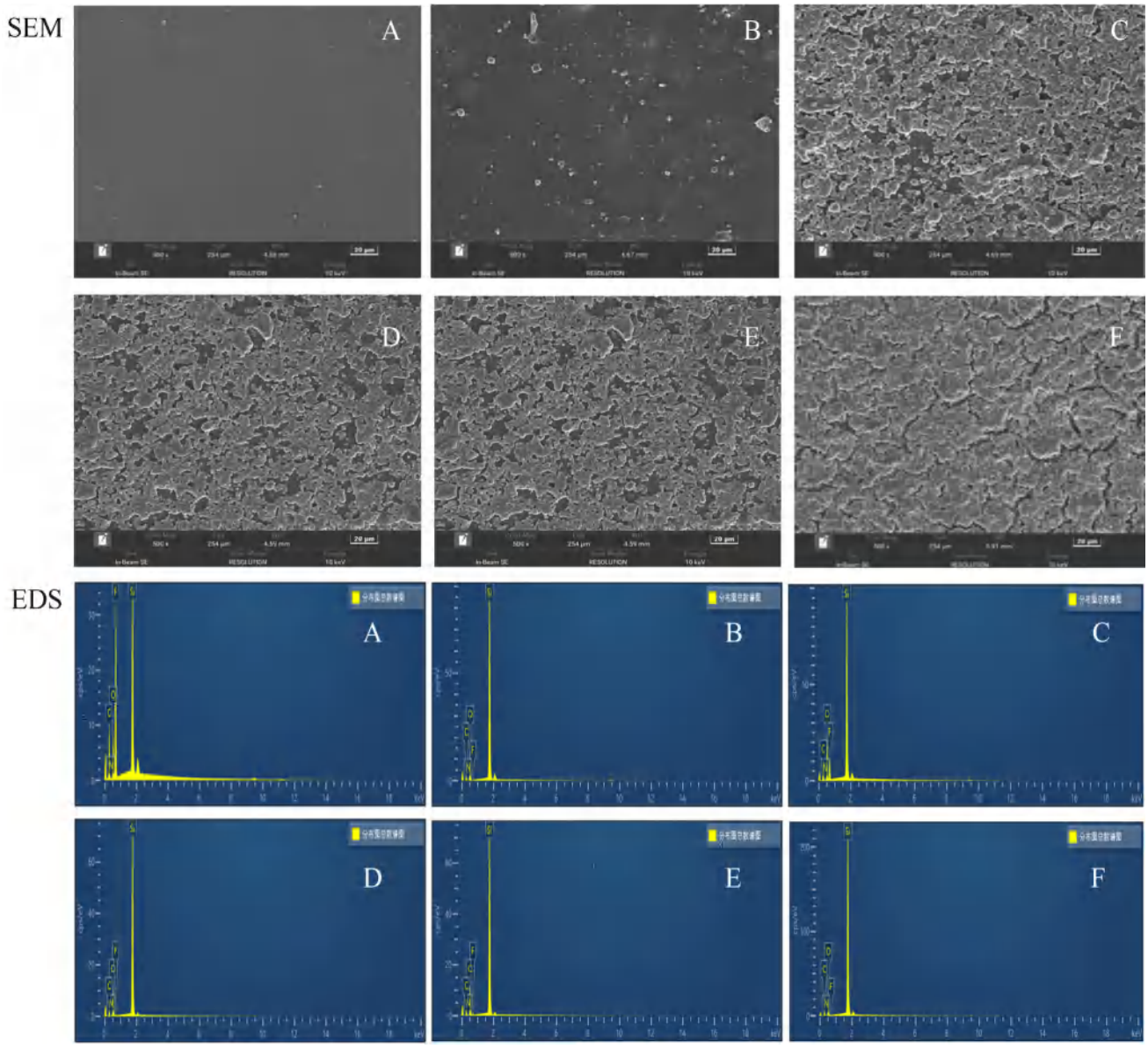
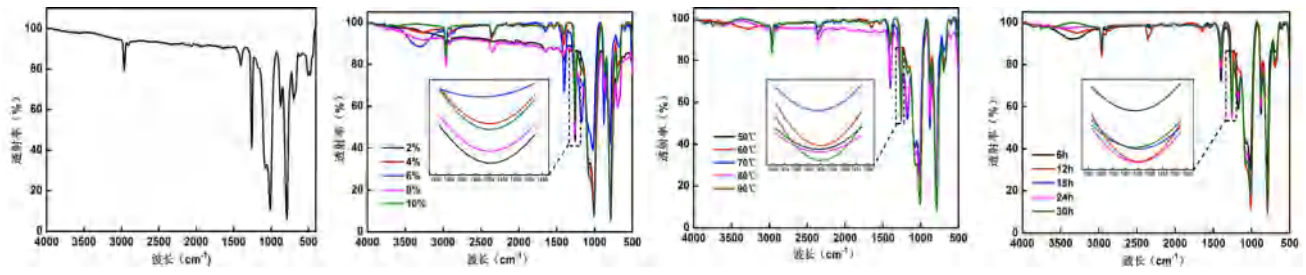


图 1　膜的扫描电镜和能谱图

Fig 1　SEM and EDS image of membrane

注（Note）：A ～ F. SiO_2 填充比例分别为 0%、2%、4%、6%、8%、10%（SiO_2 filling ratio is 0%，2%，4%，6%，8%，and 10%，respectively）。

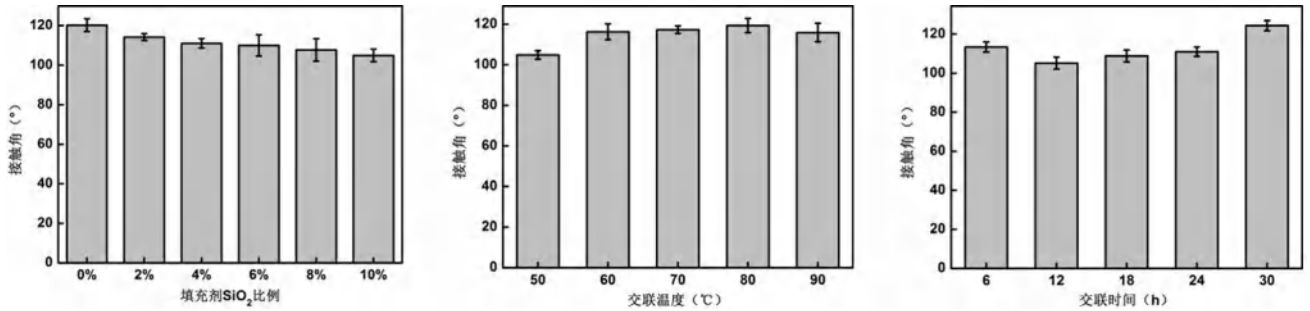


A　　B　　C　　D

图 2　膜的红外光谱图

Fig 2　FTIR spectra of membrane

A. PDMS/PVDF 膜（PDMS/PVDF membrane）；B. 不同 SiO_2 填充量的 SiO_2/PDMS 膜（SiO_2/PDMS membranes with different SiO_2 fillings）；C. 不同交联温度的 SiO_2/PDMS 膜（SiO_2/PDMS membranes with different crosslinking temperatures）；D. 不同交联时间的 SiO_2/PDMS 膜（SiO_2/PDMS membranes with different crosslinking time）



A B C

图 3 膜接触角的测定

Fig 3 Determination of membrane contact angle export settings

A. 不同 SiO_2 填充量的 SiO_2/PDMS 膜（SiO_2/PDMS membranes with different SiO_2 fillings）；B. 不同交联温度的 SiO_2/PDMS 膜（SiO_2/PDMS membranes with different crosslinking temperatures）；C. 不同交联时间的 SiO_2/PDMS 膜（SiO_2/PDMS membranes with different crosslinking time）

时，记录时间，后续进行渗透通量 J 的计算。通过测定石菖蒲油水混合液中原液与截留液的化学需氧量（COD 值）来进行分离因子 α 的计算。其中渗透通量 J 与分离因子 α 的计算公式如下所示：

$$J = W/At \quad (1)$$

$$\alpha = y(1-y)/x(1-x) \quad (2)$$

其中 J 为渗透通量，单位为 L/（m^2 • h）；W 为渗透液体积，单位为 L；A 为膜面积，单位 m^2；t 为时间，单位为 h；α 为分离因子，y 为分离产物中的油水混合液 COD 值，单位为 g • g^{-1}，x 为原液中的 COD 值，单位为 g • g^{-1}。

2.4.1 SiO_2 填充量对复合膜渗透汽化性能的影响 在交联温度为 60 ℃，交联时间为 18 h 时不同 SiO_2 填充量的复合膜的渗透汽化性能变化情况见图 4，可知膜渗透通量与油水分离因子呈现出明显的“trade-off”现象，即膜渗透通量与油水分离因子两者的变化趋势是相反的，渗透通量增大意味着分离因子的降低，反之亦然。与未填充 SiO_2 时比较，膜的渗透通量增加，当填充量为 4% 时，膜的渗透通量最小而分离因子最大，此时复合膜的渗透通量为 6.33 L/（m^2 • h），分离因子为 7.31，后面随着填充量的增加，膜的渗透通量逐渐上升而分离因子逐渐下降，综合以上因素选择 SiO_2 填充量为 4% 作为制膜最佳填充量。

2.4.2 交联温度对复合膜渗透汽化性能的影响 在 4%SiO_2 填充量及交联时间为 18 h 时，不同交联温度的复合膜的渗透汽化性能变化情况见图 5，可知膜渗透通量与油水分离因子亦呈现出明显的“trade-off”现象。随着交联温度的升高，复合膜的渗透通量先上升后下降再上升，并且在 90 ℃时达到最大。而分离因子随着交联温度的升高而下降，当温度为 50 ℃时膜的分离因子最高，此时复合膜的渗透通量为 6.18 L/（m^2 • h），分离因子为

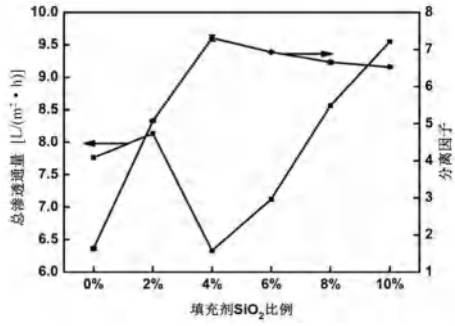


图 4 SiO_2 填充量对渗透汽化性能的影响

Fig 4 Effect of SiO_2 loading on the pervaporation performance

7.57，因此选择 50 ℃为最佳交联温度进行后续复合膜的制备。

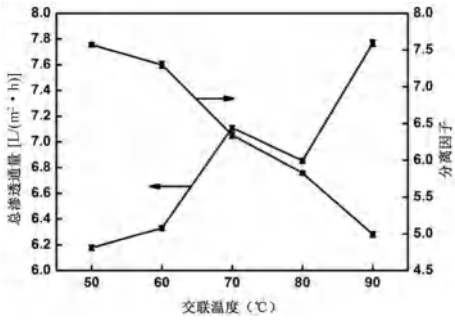


图 5 交联温度对渗透汽化性能的影响

Fig 5 Effect of crosslinking temperature on the pervaporation performance

2.4.3 交联时间对复合膜渗透汽化性能的影响 在 4%SiO_2 填充量且交联温度为 50 ℃时，不同交联时间对复合膜渗透性能的影响情况见图 6，可知随着交联时间的增加，复合膜的渗透通量先减小后逐步增加，而分离因子则相反，符合“trade-off”现象。当交联时间为 12 h 的时候，分离因子达到最大而渗透通量最小，此时的复合膜渗透通量为 5.94 L/（m^2 • h），分离因子为 7.67；当交联时间大于 12 h 时，分离因子随交联时间增大而显著降低。因此，复合膜制备的最佳交联时间选择 12 h。

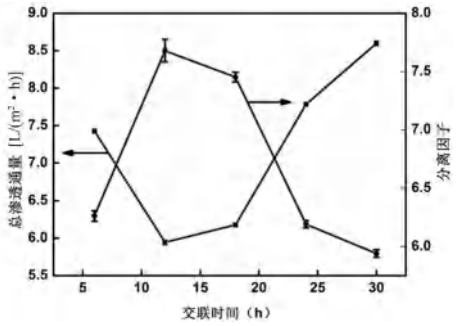


图 6　交联时间对渗透汽化性能的影响

Fig 6　Effect of crosslinking time on the pervaporation performance

2.4.4　最佳制膜工艺下复合膜分离石菖蒲油水混合液的性能研究　通过上面复合膜制备影响因素的考察，得出了 SiO_2/PDMS 复合膜的最佳制备条件为 4%SiO_2 填充量，交联温度为 50 ℃，交联时间为 12 h。选择最佳制膜条件下的复合膜对石菖蒲油水混合液进行过膜实验，得到复合膜的渗透通量为 5.92 L/（m^2 • h），分离因子为 7.61，说明该复合膜对石菖蒲油水混合液有着较好的分离效果。

3　结论

本研究以亲水性 SiO_2 为填充剂，采用涂布法制备了不同的复合膜材料，并且对这些复合膜材料进行了表征，采用 SEM/EDS、FTIR、接触角的测定等对膜材料进行了研究，结果表明制备的膜表面 SiO_2 分布均匀，且随着填充量的增大膜表面 SiO_2 分布更加密集；能谱扫描出膜表面主要含有 C、N、O、F、Si 等 5 种元素，并且随着填充量的增大，Si 占比也逐步增加；红外光谱图结果表明在经过填充 SiO_2 后的复合膜在 1078 cm^{-1} 处吸收减弱；接触角结果表明填充了 SiO_2 的复合膜接触角逐渐减小，但变化趋势不大，交联温度与交联时间对接触角影响不是很大；通过对石菖蒲油水混合液的蒸汽渗透过膜实验，测定了各复合膜的渗透汽化性能，确定了复合膜最佳制备工艺为 SiO_2 填充量为 4%，交联温度为 50 ℃，交联时间为 12 h。

膜技术是一种新型的分离技术，与传统的水蒸气蒸馏法相比，具有分离效率高、无相变、节能、无二次污染等优点，适合现代工业对低能高效、节能减排的需要，符合中药制药工业绿色发展的要求，是推动我国中药制药产业转型升级的重要分离技术。本研究将蒸汽渗透技术用于石菖蒲油水混合液的分离中，通过对 PDMS/PVDF 膜的填充改性，提高了复合膜的分离效率，为蒸汽渗透技术在中药油水混合液的分离研究中提供依据。本研究制备的 SiO_2/PDMS 复合膜，从调控 PDMS/PVDF 复合膜表面亲疏水性角度出发，对 PDMS/PVDF 复合膜表面进行亲水化改性，以增大水分子的透过性，从而增加挥发油类成分的截留性，实现了有机物与水的分离，为采用蒸汽渗透膜技术分离富集中药挥发油提供一种新的分离模式。

参考文献

[1] 刘金瑞，林晓雪，张妍，等 . 膜分离技术的研究进展 [J]. 广州化工，2021，49（13）：27-29，71.

[2] 王华，刘艳飞，彭东明，等 . 膜分离技术的研究进展及应用展望 [J]. 应用化工，2013，42（3）：532-534.

[3] Vane LM. Review：membrane materials for the removal of water from industrial solvents by pervaporation and vapor permeation [J]. J Chem Technol Biot，2019，94（2）：343-365.

[4] 陈镇，秦培勇，陈翠仙 . 渗透汽化和蒸汽渗透技术的研究、应用现状及发展 [J]. 膜科学与技术，2003，23（4）：103-109.

[5] 张浅，朱华旭，唐志书，等 . 蒸汽渗透技术用于细辛挥发油含油水体分离的可行性研究 [J]. 中草药，2019，50（8）：1795-1803.

[6] Schissel P，Orth RA. Separation of ethanol—water mixtures by pervaporation through thin，composite membranes [J]. J Membrane Sci，1984，17（1）：109-120.

[7] 刘铁勇 . 渗透汽化法水中脱醇及传质过程的研究 [D]. 北京：北京化工大学，2007.

[8] 陆连玉 . 用于酯化反应——渗透蒸发耦合过程的高性能脱水膜的研究 [D]. 天津：天津大学，2008.

[9] Naik PV，Kerkhofs S，Martens JA，et al. PDMS mixed matrix membranes containing hollow silicalite sphere for ethanol/water separation by pervaporation [J]. J Membrane Sci，2016，502：48-56.

[10] 伍振峰，王赛男，杨明，等 . 中药挥发油提取工艺与装备现状及问题分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20（14）：224-228.

[11] 严红梅，贾晓斌，张振海，等 . 氧化石墨烯固化挥发油的 [J]. 药学学报，2015，50（2）：222-226.

[12] Jiang LY，Wang Y，Chung TS，et a1. Polyimides membranes for pervaporation and biofuels separation [J]. Prog Polym Sci，2009，34（11）：1135-1160.

（收稿日期：2022-02-03；修回日期：2022-05-05）

香烟烟雾颗粒通过 MAPK 和 NF-κB 信号通路上调内皮素受体诱导大鼠肠系膜动脉平滑肌收缩

张盼[1]，王钰莹[1]，王婷[1]，史永恒[1, 2]，刘继平[1, 2]，徐仓宝[3]，胡锐[1, 2*]，王川[1, 2*]（1. 陕西中医药大学药学院，陕西 咸阳 712046；2. 陕西省中医药管理局中药药效机制与物质基础重点研究室，陕西 咸阳 712046；3. 西安医学院基础与转化医学研究所/陕西省缺血性心血管疾病重点实验室，西安 710021）

摘要：目的 研究香烟烟雾颗粒（DSP）对大鼠肠系膜动脉平滑肌内皮素受体的影响及作用机制。**方法** 采用离体血管环技术观察 DSP 对内皮素受体介导的肠系膜动脉平滑肌收缩功能的影响，Western blot 法检测内皮素受体以及 MAPK 和 NF-κB 信号通路相关蛋白的表达。**结果** DSP 可以增强内皮素受体激动剂引起的血管收缩并使内皮素受体蛋白表达增加，ERK1/2 和 P38 通路抑制剂可以抑制 DSP 诱导的血管收缩和降低内皮素受体的表达。**结论** DSP 通过 MAPK 和 NF-κB 信号通路上调内皮素受体诱导大鼠肠系膜动脉平滑肌收缩。

关键词：香烟烟雾颗粒；大鼠肠系膜动脉；内皮素受体；MAPK 信号通路；NF-κB 信号通路
中图分类号：R965.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1238-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.004

Endothelin receptor-mediated vaso contraction via activation of MAPK/NF-κB pathways in the mesenteric artery of rats by cigarette smoking particle

ZHANG Pan[1], WANG Yu-ying[1], WANG Ting[1], SHI Yong-heng[1, 2], LIU Ji-ping[1, 2], XU Cang-bao[3], HU Rui[1, 2*], WANG Chuan[1, 2*] (1. *College of Pharmacy*, *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046; 2. *Key Laboratory of Pharmacodynamics and Material Basis of Chinese Medicine*, *Shaanxi Bureau of Traditional Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046; 3. *Shaanxi Key Laboratory of Ischemic Cardiovascular Disease*, *Institute of Basic and Translational Medicine of Xi'an Medical University*, *Xi'an* 710021)

Abstract: Objective To determine the effect of cigarette smoking particles on the vasoconstrictions induced by endothelin receptors in the mesenteric artery of rats. **Methods** In vitro aorta ring culture was used to observe how cigarette smoking particles affected vasoconstrictions induced by endothelin receptors and MAPK/NF-κB pathway related proteins expression by Western blot. **Results** Cigarette smoking particles enhanced mesenteric artery constriction induced by endothelin receptor agonists and increased the expression of endothelin receptors, while the inhibitors of ERK1/2 and P38 signaling pathway inhibited the vasoconstriction responses and decreased the protein expression of endothelin receptors. **Conclusion** Cigarette smoking particles can up-regulate endothelin receptor-mediated vaso contraction by activating MAPK and NF-κB signaling pathways in the mesenteric artery of rats.

Key words: cigarette smoking particle; rat mesenteric artery; endothelin receptor; MAPK signaling pathways; NF-κB signaling pathways

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81800401）；大学生创新创业训练计划项目（No.S202010716021；No.S202010716024）；陕西中医药大学学科创新团队（No.2019-YL13）。

作者简介：张盼，女，在读硕士研究生，主要从事心血管疾病的发病及防治研究，email：980383890@qq.com *通信作者：王川，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事心血管疾病的发病及防治研究，email：wangchuan@sntcm.edu.cn；胡锐，女，教授，硕士研究生导师，主要从事心血管疾病的发病及防治研究，email：463219785@qq.com

吸烟是危害人类健康的主要因素之一。吸烟不仅对人类呼吸系统产生严重的损害，导致哮喘、慢性阻塞性肺病、肺癌等多种肺部疾病，而且也是冠心病、高血压、中风等多种疾病的危险因子[1-2]。烟草烟雾中有 4000 多种化学物质，其中尼古丁、一氧化碳、多环芳香烃和氧自由基等与心血管的损害直接相关[3]。大量的临床研究和动物实验均证实，吸烟可以显著增加心血管系统疾病的患病风险[4-6]。据《中国心血管健康与疾病报告》报道，全球每年约 190 万人因烟草使用或二手烟暴露引发的冠心病而失去生命，约占全球因冠心病死亡的 20%[7]。内皮素（endothelin，ET）是一种强烈且持久收缩血管的多肽，主要由血管中的内皮细胞合成及分泌。内皮素受体（endothelin receptor）有两种亚型，分别为 A 亚型（ETA）和 B 亚型（ETB），在生理条件下，ETA 受体主要存在于血管平滑肌细胞中，介导血管收缩，而 ETB 受体主要在血管内皮细胞上表达，促进一氧化氮和前列环素的产生，诱导血管舒张；然而，在病理条件下，ETB 受体在平滑肌细胞中大量表达，并且介导血管收缩[8-10]。内皮素及其受体与多种心血管疾病的发病相关，在高血压和冠心病患者中，血管平滑肌上 ETA 和 ETB 受体上调[11]。越来越多的证据表明，吸烟和血管痉挛可能与血管平滑肌细胞中内皮素受体的上调有关[12-14]。丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）信号通路主要包括胞外信号调节激酶 1 和 2（extracellular signal-regulated protein kinase 1 and 2，ERK1/2）、c-Jun N 端激酶（c-Jun N-terminal kinase，JNK）和 P38 蛋白激酶通路，调控细胞内的信号转导，在心血管疾病中具有重要的作用[15]。核因子 κB（nuclear factor-kappa B，NF-κB） 是 MAPK 下游的重要转录因子之一，调控基因的表达[16]。MAPK/NF-κB 信号通路的激活与动脉血管收缩密切相关，大量的研究表明，低密度脂蛋白、细颗粒物 $PM_{2.5}$ 和香烟烟雾颗粒（DSP）等均可以损伤动脉血管，激活 MAPK/NF-κB 信号转导通路介导的转录和翻译，合成新的收缩性受体（如血栓素受体、肾上腺素受体和内皮素受体等），导致血管平滑肌收缩，甚至引起血管痉挛[17-20]。本课题组前期的研究也表明，DSP 通过 ERK1/2 信号通路上调肾上腺素 α_1 受体诱导血管平滑肌收缩[20]。内皮素受体在血管收缩中起重要作用，但 DSP 对 ETA 和 ETB 受体的作用机制还不十分清楚。为了进一步研究其作用机制，本实验采用 SD 大鼠离体肠系膜动脉培养模型，将分离的大鼠肠系膜动脉，制成血管环进行器官培养，将特异性的细胞内信号通路抑制剂加到培养基中，以检验不同信号通路的参与情况；并通过肌张力描记技术记录血管环的张力变化，依次在血管环浴槽中加入选择性受体激动剂，观察内皮素受体介导的血管收缩；Western blot 法检测相关蛋白的表达，通过研究 DSP 调节 ETA 和 ETB 受体的作用及机制，为预防和治疗与吸烟有关的心血管疾病提供新的思路。

1 材料

1.1 动物

雄性 SD 大鼠，SPF 级，6 ～ 8 周龄，体质量 200 ～ 250 g [成都达硕实验动物有限公司，实验动物许可证号：SCXK（川）2020-030]，动物饲养于陕西中医药大学中药药理实验室，饲养期间动物自由饮水进食。动物实验经陕西中医药大学伦理委员会批准。

1.2 试药

角蝰毒素 6C（S6C，ETB 受体激动剂，Sigma-Aldrich，批号：097M4843V）、ET-1（Sigma-Aldrich，批号：088M4849V）、U0126（ERK1/2 通路抑制剂，批号：19826）、SP600125（JNK 通路抑制剂，批号：13775）、SB203580（P38 通路抑制剂，批号：10206）和 Bay-117082（NF-κB 通路抑制剂，批号：17893）（MedChemExpress 公司）；ETA 受体抗体（Abcam，批号：ab117521），ETB 受体抗体（GeneTex，批号：39603），p-ERK1/2（批号：4370S）、ERK1/2（批号：4695S）、p-P38（批号：4511S）、P38（批号：8690S）、p-NF-κB P65（批号：3039S）和 NF-κB P65（批号：8242S）抗体（CST 公司）；β-actin 抗体（武汉博士德，批号：17353873）；青霉素 / 链霉素溶液 - 双抗（HyClone 公司，批号：J190033）。

1.3 仪器

DMT 630M 离体微血管张力测定系统（丹麦 DMT 公司）；CO_2 培养箱（美国 Thermo Scientific 公司）；Powerlab 生物信号采集处理系统（澳大利亚 ADI 公司）；电泳仪、转膜仪及化学发光系统（美国 Bio-rad 公司）。

2 方法

2.1 DSP 的制备

将点燃的 3 支万宝路香烟通过负压经过脱脂棉球，将脱脂棉球浸入 1 mL DMSO 中使其附着物充分溶解，过滤除菌即得 DSP[20]。

2.2 肠系膜动脉环培养及分组、给药

SD 大鼠断颈处死，体视显微镜下分离出肠系膜动脉，使用 Triton X-100 去除内皮，肠系膜动脉剪成约 2 mm 的血管环，每段血管环加入 DMEM 高糖培养基 1 mL，按不同实验设计进行分组与给药：在培养基中加入 DSP 或溶剂对照（DMSO）或 MAPK 信号通路抑制剂（U0126、SP600125、SB203580）或 NF-κB 通路抑制剂（Bay-117082），培养板置于 CO_2 培养箱中培养 24 h[20]。

2.3 离体肌张力描记

将培养的动脉环穿入两根直径为 40 μm 的金属丝，一根金属丝与可调节预张力的张力微调装置相连，另一根连接张力换能器。恒温离体浴槽内加入 5 mL Na^+-PSS 溶液（Na^+-PSS 液组成为 NaCl 119 mmol • L^{-1}，$NaHCO_3$ 15 mmol • L^{-1}，KCl 4.6 mmol • L^{-1}，$MgCl_2$ 1.2 mmol • L^{-1}，NaH_2PO_4 1.2 mmol • L^{-1}，$CaCl_2$ 1.5 mmol • L^{-1} 和葡萄糖 5.5 mmol • L^{-1}）。固定好的动脉环平衡 40 min 后，施加 2 mN 的预张力，加入 5 mL 60 mmol • L^{-1} K^+-PSS 液（K^+-PSS 液组成为 NaCl 63.6 mmol • L^{-1}，$NaHCO_3$ 15 mmol • L^{-1}，KCl 60 mmol • L^{-1}，$MgCl_2$ 1.2 mmol • L^{-1}，NaH_2PO_4 1.2 mmol • L^{-1}，$CaCl_2$ 1.5 mmol • L^{-1} 和葡萄糖 5.5 mmol • L^{-1}）检验动脉环收缩活性，使用乙酰胆碱检测内皮功能，若乙酰胆碱引起的舒张率＜ 10%，认为内皮已被去除[20]。采用梯度累加法加入特异性 ETB 受体激动剂 S6C 和 ETA 受体激动剂 ET-1，观察浓度 - 收缩曲线。

2.4 Western blot 检测相关蛋白的表达

培养的大鼠肠系膜动脉使用 RIPA 裂解液提取总蛋白，采用 BCA 法检测蛋白含量，蛋白样品经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后转印至 PVDF 膜，5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h，一抗 4 ℃孵育过夜，二抗室温孵育 1 h，ECL 发光试剂显影，使用化学发光成像系统进行拍照，检测目标条带的光密度值，分析相关蛋白表达[20]。

2.5 统计学分析

所有数据用均数 ± 标准差表示。激动剂在血管环上引起的收缩用 K^+-PSS 溶液引起的收缩的百分数表示，E_{max} 是激动剂产生的最大收缩。使用 SPSS 25.0 软件采用单因素方差分析（ANOVA）进行多组数据间的比较，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 DSP 对 ETA 和 ETB 受体介导的收缩反应的影响

离体动脉血管在含 DSP（0.1、0.2 和 0.4 μL • mL^{-1}）的培养液中培养 24 h，梯度累加法加入 S6C（1×10^{-10} ～ 1×10^{-7} mol • L^{-1}），图 1B 结果显示，与 DMSO 对照组相比，DSP 0.2 μL • mL^{-1} 对 S6C 引起的收缩增强，量效曲线显著左移（$P < 0.01$）。ETB 受体激动剂 S6C 加入浴槽 60 min 后，收缩曲线回到基线，使 ETB 受体脱敏，再按梯度累加法加入 ET-1（1×10^{-10} ～ $1\times10^{-6.5}$ mol • L^{-1}），激动 ETA 受体，结果表明，DSP 0.2 μL • mL^{-1} 和 DSP 0.4 μL • mL^{-1} 可以明显地增强 ET-1 的收缩作用，浓度 - 收缩曲线明显左移（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$），因此 DSP 的使用浓度选择为 DSP 0.2 μL • mL^{-1}。

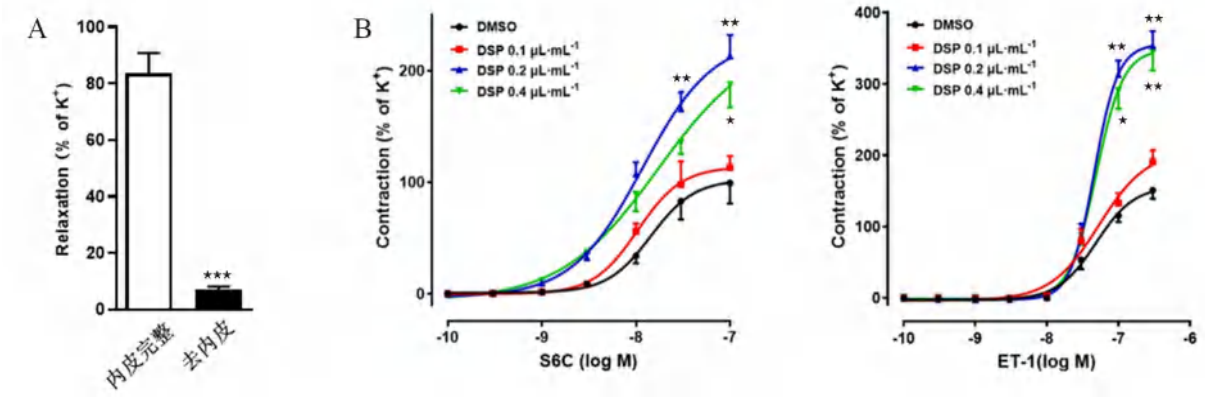


图 1 DSP 对 S6C 和 ET-1 诱导的浓度 - 收缩曲线的影响

Fig 1 Effect of DSP on concentration-contractile curves induced by S6C and ET-1 in a concentration-dependent manner

注（Note）：与 DMSO 对照组相比，$^*P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$（*vs* the DMSO group，$^*P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）。

3.2　MAPK 通路抑制剂对 DSP 诱导 ETA 和 ETB 受体介导的收缩反应的影响

为了考察 MAPK 通路是否参与了内皮素受体介导的动脉收缩，采用 0.2 μL·mL^{-1} 的 DSP 与 U0126、SP600125 或 SB203580（浓度均为 10 μmol·L^{-1}）共同培养 24 h。结果如图 2 所示，与 DSP 组相比，U0126 可以抑制 ETB 受体激动剂 S6C 和 ETA 受体激动剂 ET-1 诱导的收缩反应，S6C 诱导收缩的 E_{max} 从（204.3±29.5）% 降低为（2.56±1.17）%（$P<0.01$），ET-1 诱导收缩的 E_{max} 从（372.5±60.3）% 降低为（123.1±26.7）%（$P<0.01$）；SP600125 对 S6C 和 ET-1 诱导的收缩反应没有显著影响；SB203580 可以显著抑制 ETB 受体激动剂 S6C 和 ETA 受体激动剂 ET-1 诱导的收缩反应，S6C 诱导收缩的 E_{max} 从（200.6±26.9）% 降低为（38.9±9.8）%（$P<0.01$），ET-1 诱导收缩的 E_{max} 从（343.8±33.2）% 降低为（239.3±42.4）%（$P<0.05$）。

Western blot 检测结果表明，DSP 组 ETB 和 ETA 受体蛋白表达升高，DSP ＋ U0126 组 ETB 和 ETA 受体蛋白表达降低，DSP 组 p-ERK1/2 蛋白的表达升高，DSP ＋ U0126 组 p-ERK1/2 蛋白的表达降低；DSP ＋ SB203580 组 ETB、ETA 受体蛋白和 p-P38 蛋白的表达均降低（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）。以上结果表明 ERK1/2 和 P38 可能参与了 DSP 上调 ETA 和 ETB 受体引起的血管收缩（见图 3）。

3.3　NF-κB 通路抑制剂对 DSP 诱导 ETA 和 ETB 受体介导的收缩反应的影响

为了研究 NF-κB 信号通路是否参与了 DSP 诱导的收缩，采用 NF-κB 通路抑制剂 Bay-117082（10 μmol·L^{-1}）与 0.2 μL·mL^{-1} DSP 共培养 24 h。图 4A 结果显示，与 DSP 组相比，Bay-117082 可以显著抑制 S6C 诱导的收缩反应，DSP 组的 E_{max} 为（214.6±56.2）%，DSP ＋ Bay-117082 组的 E_{max} 为（165.9±30.2）%（$P<0.05$）；与 DSP 组相比，Bay-117082 对 ET-1 诱导的收缩反应没有明显影响。Western blot 结果表明，Bay-117082 可以显著抑制 ETB 受体的表达，而对 ETA 受体的表达没有明显影响。与 DMSO 组相比，DSP 显著增加了 p-P65 蛋白表达；与 DSP 组相比，DSP ＋ Bay-117082 组 p-P65 蛋白表达降低。以上结果表明 NF-κB 信号通路可能参与了 DSP 上调 ETB 受体介导的血管收缩（见图 5）。

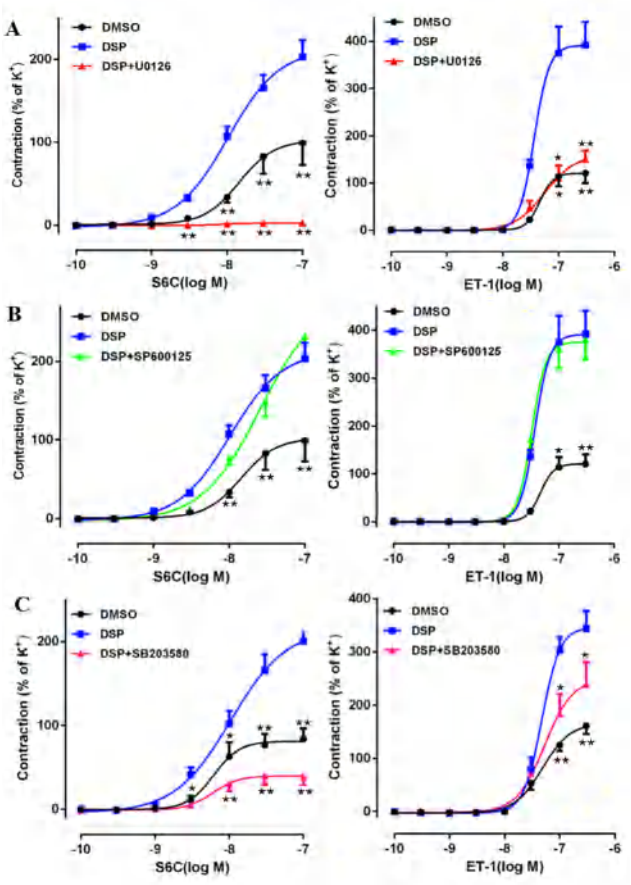


图 2　MAPK 抑制剂对 S6C 和 ET-1 介导收缩的影响

Fig 2　Effect of MAPK inhibitors on S6C and ET-1 induced contraction

注（Note）：与 DSP 组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$（*vs* the DSP group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$）。

4　讨论

吸烟与心血管疾病的发病密切相关，然而，吸烟导致血管痉挛的分子机制尚不清楚。内皮素与多种心血管疾病的发病机制有关[21-22]，ET-1 是目前作用最强的内源性血管收缩剂，引起血管强烈且持久的收缩，ET-1 通过与血管平滑肌表面特异性内皮素受体（ETA 和 ETB）结合，产生收缩血管的作用，刺激血管平滑肌细胞增殖、迁移，引起动脉血管重塑以及细胞外基质合成等多种生物学效应，使动脉血管的血管壁增厚和顺应性降低，导致血管阻力增加[23-24]。内皮素还参与了原发性高血压、动脉粥样硬化、冠心病、充血性心力衰竭、肺动脉高压、脑血管疾病急性肾衰竭、多囊肾病和慢性肾脏疾病[25]。大量的实验证明，在高血压患者的动脉、心肌梗死患者缺血区的动脉和自发性高血压大鼠动脉等中内皮素受体的表达上调，内皮素受体介导的动脉收缩参与了心血管疾病的发生与发展[26-28]。

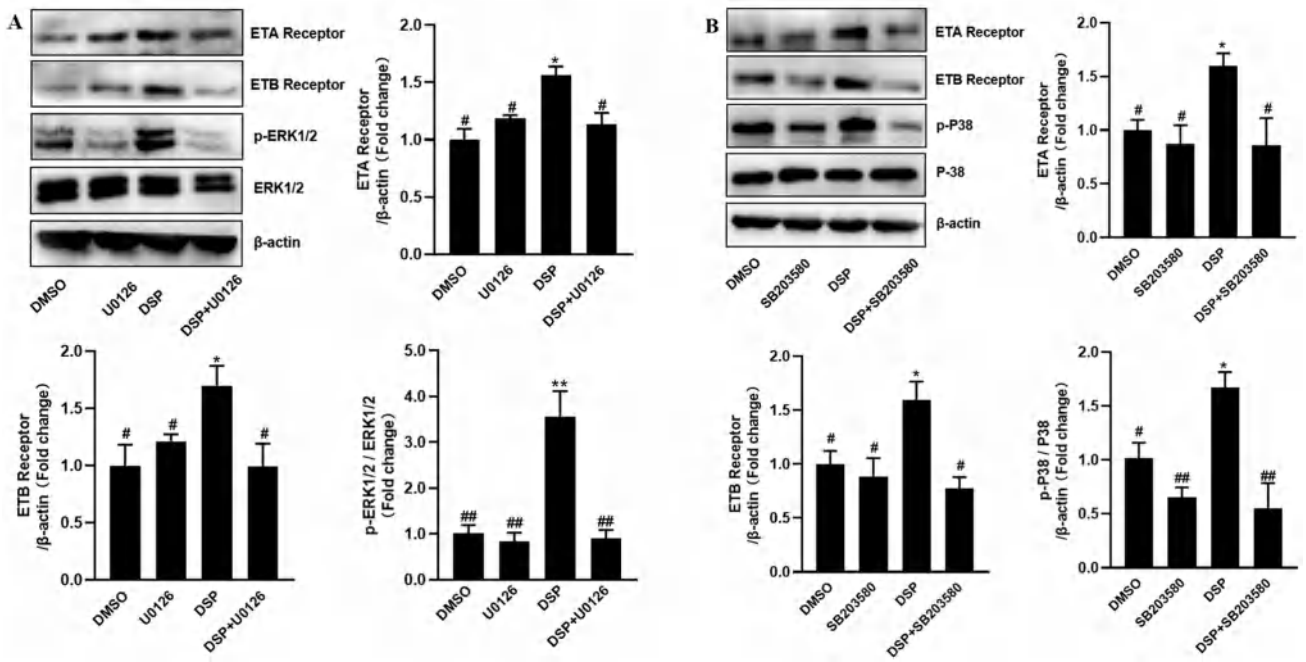


图 3 肠系膜动脉 ETA、ETB 受体和 MAPK 通路蛋白的表达

Fig 3 Protein expression of ETA, ETB receptor and MAPK pathways in mesenteric arteries

注（Note）：与 DMSO 对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与 DSP 组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$（*vs* the DMSO group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；*vs* the DSP group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$）。

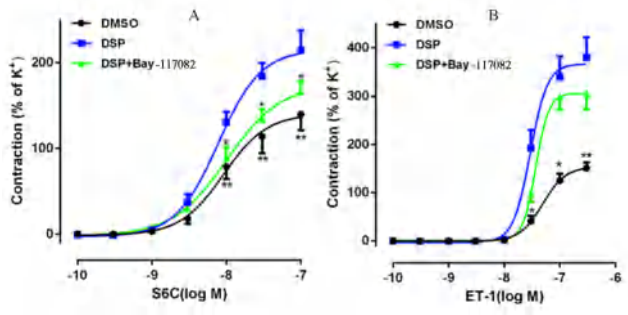


图 4 NF-κB 抑制剂 Bay-117082 对 S6C（A）和 ET-1（B）介导收缩的影响

Fig 4 Effect of NF-κB pathway inhibitor Bay-117082 on S6C（A）and ET-1（B）induced contraction

注（Note）：与 DSP 组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$（*vs* the DSP group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）。

本研究通过离体血管培养技术，从大鼠肠系膜动脉平滑肌收缩功能和相关蛋白表达方面研究了 DSP 对内皮素受体作用及其相关信号通路。研究结果表明，DSP 可以使肠系膜动脉环对 S6C（ETB 受体激动剂）的收缩作用呈浓度依赖性，收缩量效曲线左移，与 DMSO 相比，0.2 μL • mL^{-1} DSP 使血管的收缩反应明显增强。在 ETB 受体脱敏后按累加浓度法加入 ET-1，激动 ETA 受体，DSP 对 ETA 受体介导的收缩反应也明显增强。MAPK 信号通路在血管痉挛和动脉高

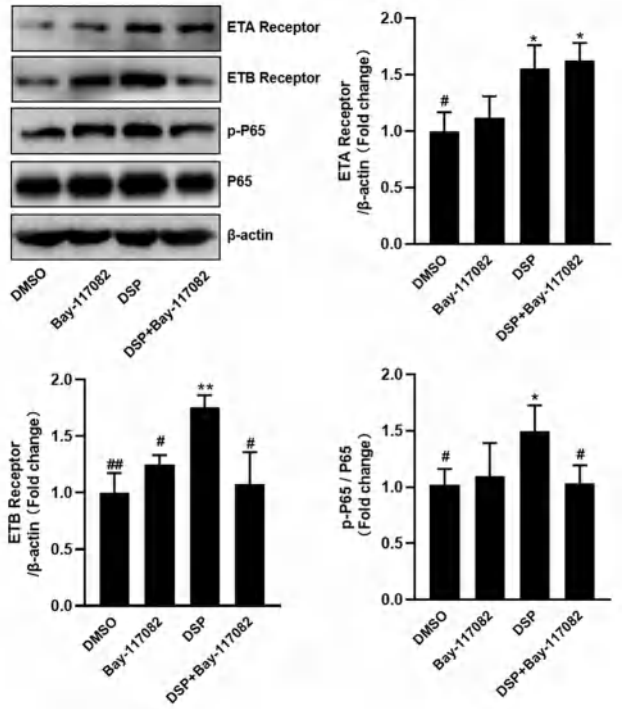


图 5 肠系膜动脉 ETA、ETB 受体和 p-P65 蛋白的表达

Fig 5 Protein expression of ETA, ETB receptor and p-P65 in mesenteric arteries

注（Note）：与 DMSO 对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与 DSP 组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$（*vs* the DMSO group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；*vs* the DSP group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$）。

反应性中发挥着重要的作用，部分心血管危险因

子刺激动脉平滑肌细胞上的 G 蛋白偶联受体而激活 MAPK 信号转导通路参与平滑肌收缩反应，如 5- 羟色胺、血管紧张素Ⅱ、血栓素、肾上腺素 α1 和内皮素等 G 蛋白偶联受体引发的收缩机制中均有 MAPK 通路参与 [24，29-30]。本课题组前期的研究也表明，DSP 激活 ERK1/2-MAPK 信号通路，上调肾上腺素 α_1 受体的表达，使血管收缩作用增强 [20]。本研究使用 MAPK 信号通路抑制剂与 DSP 共培养研究 MAPK 通路对 DSP 刺激引起的 ETA 和 ETB 受体上调的影响，发现 U0126（ERK1/2 通路抑制剂）和 SB203580（P38 通路抑制剂）可以显著抑制 S6C 和 ET-1 诱导的收缩反应；DSP 上调 ETA 和 ETB 受体的表达，活化 ERK1/2 和 P38 通路，而 U0126 和 SB203580 抑制了 ETA 和 ETB 受体的表达，降低了 p-EKR1/2 或 p-P38 的蛋白表达，表明 ERK1/2 和 P38 通路可能参与了 DSP 上调 ETA 和 ETB 受体介导的血管收缩，而 JNK 抑制剂 SP600125 对 S6C 和 ET-1 诱导的收缩反应没有显著影响，提示 DSP 诱导内皮素受体的上调可能与 JNK 信号通路无关。DSP 激活 MAPK 信号通路中的 ERK1/2 和 P38 通路，而不激活 JNK 通路，介导动脉平滑肌 ETA 和 ETB 受体上调，导致血管平滑肌呈高反应性，增强血管收缩，甚至引起血管痉挛。

NF-κB 是 MAPK 下游的重要转录因子之一 [31-32]，Bay-117082（NF-κB 抑制剂）可以显著的抑制 S6C 诱导的收缩反应，而对 ET-1 诱导的收缩反应没有明显的影响。Western blot 结果也表明，Bay-117082 可以抑制 ETB 受体的表达，而对 ETA 受体没有明显的影响。P-65 蛋白是 NF-κB 家族中的代表蛋白，DSP 激活使 p-P65 蛋白的表达增加，而 Bay-117082 可以降低 p-P65 蛋白的表达，表明 NF-κB 可能参与了 DSP 上调 ETB 受体介导的血管收缩，而 ETA 受体上调可能与 NF-κB 信号通路无关，提示 ETA 受体的上调可能与转录后机制有关，后续将进一步深入研究。

本研究也存在一定局限性，香烟烟雾中有 4000 多种成分，我们无法得知香烟中的哪些成分刺激血管平滑肌导致内皮素受体上调；其次，血管内皮被去除，主要目的在于排除内皮功能的影响，针对性地研究 DSP 引起平滑肌内皮素受体介导的收缩反应，但内皮细胞与平滑肌细胞的相互作用无法体现。

综上所述，DSP 通过激活 MAPK/NF-κB 通路，激活转录及翻译，合成新的内皮素受体，使血管平滑肌内皮素受体表达上调，从而增强血管收缩。因此，阻断 MAPK 和 NF-κB 信号转导通路，抑制内皮素受体上调，改善血管平滑肌高反应性，有望成为治疗血管痉挛等心血管疾病的新思路和药物开发的新靶点。

参考文献

[1] Rigotti NA，Kruse GR，Livingstone-Banks J，et al. Treatment of tobacco smoking：a review [J]. JAMA，2022，327（6）：566-577.

[2] Baker TB，McCarthy DE. Smoking treatment：a report card on progress and challenges [J]. Annu Rev Clin Psychol，2021，17：1-30.

[3] 李奕霖，倪师军，郭亚杰，等 . 香烟燃烧过程有害元素气固分配比实验研究 [J]. 地球与环境，2009，37（1）：91-95.

[4] Skipina TM，Soliman EZ，Upadhya B. Association between secondhand smoke exposure and hypertension：nearly as large as smoking [J]. J Hypertens，2020，38（10）：1899-1908.

[5] Munzel T，Hahad O，Kuntic M，et al. Effects of tobacco cigarettes，e-cigarettes，and waterpipe smoking on endothelial function and clinical outcomes [J]. Eur Heart J，2020，41（41）：4057-4070.

[6] Messner B，Bernhard D. Smoking and cardiovascular disease：mechanisms of endothelial dysfunction and early atherogenesis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol，2014，34（3）：509-515.

[7] 《中国心血管健康与疾病报告 2020》概述 [J]. 中国心血管病研究，2021，19（7）：582-590.

[8] Barton M，Yanagisawa M. Endothelin：30 years from discovery to therapy [J]. Hypertension，2019，74（6）：1232-1265.

[9] Xu CB，Sun Y，Edvinsson L. Cardiovascular risk factors regulate the expression of vascular endothelin receptors [J]. Pharmacol Ther，2010，127（2）：148-155.

[10] 徐仓宝，张亚萍 . 内皮素受体表达上调在冠状动脉痉挛中的作用机制 [J]. 中国动脉硬化杂志，2015，23（1）：1-4.

[11] Nilsson D，Wackenfors A，Gustafsson L，et al. Increased ET（A）and ET（B）receptor contraction in the left internal mammary artery from patients with hypertension [J]. J Hum Hypertens，2008，22（3）：226-229.

[12] Xu CB，Zheng JP，Zhang W，et al. Low density lipoprotein induces upregulation of vasoconstrictive endothelin type B receptor expression [J]. Vascul Pharmacol，2014，60（1）：42-48.

[13] Chen Y，Su X，Qin Q，et al. Metformin inhibited homocysteine-induced upregulation of endothelin receptors

through the Sirt1/NF-kappaB signaling pathway in vascular smooth [J]. Vascul Pharmacol，2020，124：106613.

[14] Cao L，Zhang Y，Cao YX，et al. Secondhand smoke exposure causes bronchial hyperreactivity via transcriptionally upregulated endothelin and 5-hydroxytryptamine 2A receptors [J]. PLoS One，2012，7（8）：e44170.

[15] Johnson GL，Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK，JNK，and p38 protein kinases [J]. Science，2002，298（5600）：1911-1912.

[16] Kim JH，Na HK，Pak YK，et al. Roles of ERK and p38 mitogen-activated protein kinases in phorbol ester-induced NF-kappaB activation and COX-2 expression in human breast epithelial cells [J]. Chem Biol Interact，2008，171（2）：133-141.

[17] Zhang Y，Edvinsson L，Xu CB. Up-regulation of endothelin receptors induced by cigarette smoke--involvement of MAPK in vascular and airway hyper-reactivity [J]. Sci World J，2010，10：2157-2166.

[18] 江高峰，郭立军，秦旭平，等 . ERK1/2 通路参与弱氧化型低密度脂蛋白上调小鼠肠系膜动脉 α1 受体的研究 [J]. 中华生物医学工程杂志，2018，24（1）：1-6.

[19] Cao L，Lindstedt I，Edvinsson ML，et al. Secondhand cigarette smoke induces increased expression of contractile endothelin receptors in rat coronary arteries via a MEK1/2 sensitive mechanism [J]. Scand Cardiovasc J，2021，55（1）：50-55.

[20] 许梦荣，王川，路鹏鹏，等 . 香烟烟雾颗粒通过 ERK1/2 信号通路上调肾上腺素 α_1 受体诱导血管平滑肌收缩 [J]. 中南药学，2021，19（5）：831-835.

[21] Jankowich M，Choudhary G. Endothelin-1 levels and cardiovascular events [J]. Trends Cardiovasc Med，2020，30（1）：1-8.

[22] 赵金龙，周志旭，吴成军，等 . 治疗心血管系统疾病的内皮素抑制剂研究进展 [J]. 中南药学，2014，12（1）：37-43.

[23] 张亚萍，徐仓宝 . 内皮素 1 及其受体在肺动脉高压发病机制中作用的研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志，2019，27（11）：1009-1012.

[24] Xie YH，Wang SW，Zhang Y，et al. Up-regulation of G-protein-coupled receptors for endothelin and thromboxane by lipid-soluble smoke particles in renal artery of rat [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol，2010，107（4）：803-812.

[25] Eroglu E，Kocyigit I，Lindholm B. The endothelin system as target for therapeutic interventions in cardiovascular and renal disease [J]. Clin Chim Acta，2020，506：92-106.

[26] Southwood M，MacKenzie Ross RV，Kuc RE，et al. Endothelin ETA receptors predominate in chronic thromboembolic pulmonary hypertension [J]. Life Sci，2016，159：104-110.

[27] Cao L，Cao YX，Xu CB，et al. Altered endothelin receptor expression and affinity in spontaneously hypertensive rat cerebral and coronary arteries [J]. PLoS One，2013，8（9）：e73761.

[28] Rubin LJ，Badesch DB，Barst RJ，et al. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension [J]. Engl J Med，2002，346（12）：896-903.

[29] Zheng JP，Cheng Z，Jiang J，et al. Cyclosporin A upregulates ETB receptor in vascular smooth muscle via activation of mitogen-activating protein kinases and NF-kappaB pathways [J]. Toxicol Lett，2015，235（1）：1-7.

[30] Tang HX，Lin J，Xu CB，et al. Minimally modified low-density lipoprotein upregulates mouse mesenteric arterial 5-HT1B receptor in vivo via activation of the JAK2/STAT3 pathway [J]. Microvasc Res，2022，139：104260.

[31] Xie YH，Wang SW，Zhang Y，et al. Nuclear factor-kappaB-mediated endothelin receptor up-regulation increases renal artery contractility in rats [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol，2013，113（6）：401-410.

[32] Zhang Y，Cardell LO，Edvinsson L，et al. MAPK/NF-kappaB-dependent upregulation of kinin receptors mediates airway hyperreactivity：a new perspective for the treatment [J]. Pharmacol Res，2013，71：9-18.

（收稿日期：2022-02-23；修回日期：2022-04-13）

非水溶媒水合氯醛灌肠剂的制备及体外释放研究

周春慧[1, 2]，王增明[2]，韩晓璐[2]，李蒙[2]，张慧[2]，李春梅[1*]，王向涛[1*]，郑爱萍[2*]（1. 哈尔滨商业大学药学院，哈尔滨　150076；2. 军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所，北京　100850）

摘要：目的　采用非水溶媒制备一种高稳定性的水合氯醛灌肠剂，以解决水合氯醛在水溶液中不稳定的问题。**方法**　以日本市售水合氯醛灌肠剂为参比制剂，考察以非水溶媒甘油和 PEG 400 作为辅料制备的水合氯醛灌肠剂在不同 pH 调节剂中的稳定性，筛选出适宜的 pH 调节剂；同时考察制剂在不同 pH 中的稳定性以确定制剂的 pH，得到最佳处方，并与水合氯醛水溶液的稳定性进行比较；采用透析袋进行体外释放研究评估其释放能力，并拟合释放模型。**结果**　最优处方为使用盐酸调节水合氯醛灌肠剂的 pH 为 2.5。采用非水溶媒制备的水合氯醛灌肠剂与水合氯醛水溶液相比稳定性更好。自研制剂与日本市售水合氯醛灌肠剂体外释放相似，药物释放均服从 Ritger peppas 方程。**结论**　本研究制备的非水溶媒水合氯醛灌肠剂工艺简单可靠，处方重现性好，稳定性佳，具有良好的应用前景。

关键词：水合氯醛灌肠剂；非水溶媒；稳定性；体外释放

中图分类号：TQ461　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)06-1245-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.005

Preparation and in vitro release of non-aqueous solvents chloral hydrate enema

ZHOU Chun-hui[1, 2], WANG Zeng-ming[2], HAN Xiao-lu[2], LI Meng[2], ZHANG Hui[2], LI Chun-mei[1*], WANG Xiang-tao[1*], ZHENG Ai-ping[2*] (1. *School of Pharmacy*, *Harbin University of Commerce*, *Harbin* 150076; 2. *China Institute of Pharmacology and Toxicology*, *Academy of Military Medical Sciences*, *Beijing* 100850)

Abstract: Objective　To prepare a highly stable chloral hydrate enema with non-aqueous solvents to solve the problem of chloral hydrate enema being unstable in water. **Methods**　Commercially available chloral hydrate enema from Japan was used as a reference formulation. The stability of chloral hydrate enema prepared with non-aqueous solvents glycerol and PEG 400 as excipients was determined in different pH adjusters. Suitable pH adjusters were screened; the stability of the formulation in different pH values was also investigated to determine the pH of the formulation and to obtain the optimal prescription. The stability of the formulation was compared with that of aqueous solution; in vitro release studies were conducted with dialysis bags to assess the release capacity and a release model was fitted. **Results**　The optimal prescription included the chloral hydrate enema was set at pH 2.5 (adjusted with hydrochloric acid). The chloral hydrate enema prepared with a non-aqueous solvent was more stable than that of aqueous chloral hydrate solution. The in vitro release of the self-developed agent was similar to that of the commercially available chloral hydrate enema in Japan, with drug release obeying the Ritger peppas equation. **Conclusion**　The non-aqueous solvents chloral hydrate enema prepared in this study is simple, reliable, reproducible, and stable, and has good application prospects.

Key words: chloral hydrate enema; non-aqueous solvent; stability; in vitro release

基金项目：国家科技重大专项（No.2018ZX09721003-007）；黑龙江省博士后资助项目（No.LBH-Z16094）；哈尔滨商业大学博士科研启动项目资助（No.2019DS114）。

作者简介：周春慧，女，硕士研究生，主要从事新药研究与开发，email：18800423043@163.com　*通信作者：李春梅，女，博士，讲师，主要从事天然产物及其制剂研究开发，email：lichunmei81@163.com；王向涛，男，研究员，博士研究生导师，主要从事药物新剂型研究，email：xtaowang@163.com；郑爱萍，女，研究员，博士研究生导师，主要从事纳米技术药物、仿生智能递药系统和 3D 打印技术药物，email：apzheng@163.com

水合氯醛是较老的镇静和催眠药物，化学名为 2，2，2- 三氯 -1，1- 乙二醇，于 1832 年由 Liebig[1-2] 首次合成，其催眠作用最早于 1869 年由 Liebreich 发现 [3]。水合氯醛易合成，用于催眠时吸收和作用迅速，几乎无新生期，治疗剂量对呼吸和血压无影响，并且其催眠效果与自然睡眠几乎相同，在临床被广泛使用，可经口服和直肠充分吸收 [4]。水合氯醛具有价格低廉、使用方便、无痛苦、无毒副作用、患儿易接受等优点，长期作为儿童催眠剂用于神经影像学检查、超声心动图检查、听觉脑干反应测试等 [5-6]，是医院儿科检查、治疗使用的最成熟的镇静剂之一 [7-8]。

水合氯醛在高温、光照、氧化等条件下易降解，性质不稳定，特别是在水溶液中稳定性很差，会缓慢分解，加热、氧化和光照时分解加快，生成三氯甲烷、三氯乙酸、二氯乙醛、盐酸等降解物 [9-14]。各种降解物会影响产品安全性，对患者造成危害 [15]。医院自制的水合氯醛口服水溶液稳定性较差，5% 浓度的产品冷藏有效期仅 30 d，10% 浓度的产品室温（25 ℃）下有效期为 35 d。有研究在水合氯醛口服溶液中加入 β- 环糊精制备包合物，以提高稳定性，但产品有效期仅提高至 46.63 d，未有实质性改善 [16]。而由于其不稳定，故仅有医院内制剂临时调剂，现用现配，难以推广使用 [17]。水合氯醛作为儿科常用的镇静剂，目前市场的规格和剂型尚无法满足巨大的市场需求，仍需既便于向个体给药又能保持水合氯醛长时间稳定的制剂 [16]。

鉴于水合氯醛在水溶液不稳定且有刺激气味，口服适应性差，故本研究以日本市售水合氯醛灌肠剂为参考开发自研水合氯醛灌肠剂。日本市售水合氯醛灌肠剂（商品名 ESCRE RECTAL KIT）由日本久光制药公司于 2006 年 8 月 1 日上市，有效期 2 年，成功延长了水合氯醛制剂的保质期，其研发采用的辅料为非水溶媒甘油和聚乙二醇（PEG）400，且加入 pH 调节剂提高稳定性，因处方未显示加入何种 pH 调节剂，故本课题组筛选加入制剂的 pH 调节剂和确定制剂 pH 范围，采用非水溶媒甘油和 PEG 400 为辅料并调节制剂 pH 制备成水合氯醛灌肠剂。

1 材料

1.1 仪器

XS105 型十万分之一电子分析天平、Seven Compact 型 pH 计（梅特勒 - 托利多仪器有限公司）；Brookfield DV next 锥板黏度计（美国 BROOKFIELD 公司）；CAPCELL PAK ADME HR（S-5）(4.6 mm×250 mm）液相色谱柱（日本资生堂科技有限公司）；1260 型高效液相色谱仪、7820A 型气相色谱仪、DB-624（30 m×0.25 mm，1.40 μm）气相色谱柱（美国安捷伦科技有限公司）；TP-6 智能透皮试验仪（天津市鑫洲科技有限公司）。

1.2 试药

水合氯醛（纯度≥ 99.0%，青岛宇龙海藻有限公司，批号：20200614）；水合氯醛对照品（纯度：99.90%，美国 SINCO 公司，批号：20-11-2201）；三氯甲烷对照品（纯度：99.7%，美国 SIGMA-ALDRICH 公司）；甘油（浙江遂昌惠康药业有限公司，批号：20201039）；聚乙二醇 400（湖南新绿方药业有限公司，批号：20071201）；水合氯醛灌肠剂（商品名 ESCRE RECTAL KIT）（日本久光制药公司，批号：00106、00109、00110、00112，规格：含主药水合氯醛 500 mg）；盐酸、磷酸（国药集团化学试剂有限公司，批号：20201211、20200106）；枸橼酸（成都华邑药用辅料制造有限责任公司，批号：20210101）；磷酸二氢钾（批号：10017618）、氢氧化钠（批号：10019718）(国药集团化学试剂有限公司）；截留分子量 7000 透析袋 MD34（北京索莱宝科技有限公司，批号：1123C0216）。

2 方法

2.1 反向工程

取 4 批日本市售水合氯醛灌肠剂，进行 pH 和黏度测定，制剂的黏度在 610 ～ 660 mPa • s，pH 在 2.0 ～ 2.5，并进行甘油和 PEG 400 含量的处方剖析，结果见表 1。而按表 1 拆方处方量制备的不加酸非水溶媒制剂（批号：20210609）pH 为 4.5 ～ 4.7，与日本市售水合氯醛灌肠剂（pH 2.0 ～ 2.5）差异较大。且从表 3 影响因素（高温、光照、高湿 30 d）的实验结果可知，不加酸非水溶媒制剂（批号：20210609）的 pH 和黏度均不稳定，有关物质三氯甲烷也超过限度（> 0.045%），制剂稳定性差；而日本市售水合氯醛灌肠剂（批号：00110）影响因素研究中，pH 和黏度均稳定，有关物质三氯甲烷未超限，制剂稳定性良好。提示本研究需筛选 pH 调节剂，以提高制剂稳定性。

表 1 日本上市水合氯醛灌肠剂拆方结果

Tab 1 Dismantling of chloral hydrate enema marketed in Japan

原辅料名称	比例 /%	用途分析
水合氯醛	37.31	主药
甘油	0.6 ～ 1.0	稳定剂
PEG 400	55.36 ～ 62.09	溶剂、保湿剂

2.2 灌肠剂的制备

称取甘油和 PEG 400 混合搅匀，然后加入酸稀释液（取适量 PEG 400，加入 pH 调节剂，搅拌均匀，即得）并搅匀，得到基质溶液。搅拌并缓慢向基质溶液中加入水合氯醛（80 目），继续搅拌直至水合氯醛完全溶解，静置至无气泡，即得。

2.3 处方筛选

2.3.1 pH 调节剂筛选 本研究分别采用盐酸、磷酸、无水枸橼酸制备 pH 2.5 的水合氯醛灌肠剂（批号分别为 210526-1、210526-2、210526-3），处方组成见表 2，置于高温（60±2）℃、光照（4500±500）lx、高湿（92.5±5）%RH 30 d 条件下考察 pH、黏度、含量 [15]、有关三氯甲烷含量，筛选最佳的 pH 调节剂。

表 2 3 批灌肠剂的处方组成及用量 (%)

Tab 2 Prescription composition and dosage of 3 batches of chlorol hydrate enema (%)

批号	水合氯醛	甘油	PEG 400	盐酸＋PEG 400	磷酸＋PEG 400	枸橼酸＋PEG400
210526-1	37.3	0.73	50	0.40 ＋ 11.57	—	—
210526-2	37.3	0.73	50	—	1.09 ＋ 10.88	—
210526-3	37.3	0.73	50	—	—	5.44 ＋ 6.53

2.3.2 有关物质三氯甲烷的测定 有关物质三氯甲烷的含量测定参照残留溶剂测定法（《中国药典》2020 年版通则 0861 第二法）。色谱条件：以氰丙基苯基 - 二甲基聚硅氧烷（6∶94）为固定液的毛细管柱为色谱柱；起始温度为 40 ℃，维持 5 min，以 15 ℃ • min^{-1} 的速率升温至 150 ℃，维持 2 min；进样口温度为 150 ℃；氢火焰离子化检测器（FID），检测器温度为 200 ℃。顶空瓶平衡温度为 50 ℃，平衡时间为 30 min。测定时取三氯甲烷对照品溶液与供试品溶液分别进样，记录色谱图。限度按外标法以峰面积计算，三氯甲烷应不得过 0.045%。

2.3.3 制剂 pH 的筛选 药物在制剂 pH 条件下应保持较好的稳定性，本实验以盐酸作为 pH 调节剂，加入处方量的甘油和 PEG 400 分别制备了 pH 为 2.0、2.5、3.0、3.5 的水合氯醛灌肠剂（批号分别为 210811-1、210811-2、210811-3、210811-4），实测 pH 值分别为 1.98、2.53、3.11、3.44。分别取足量不同 pH 的制剂于西林瓶轧盖密封后置于 60 ℃高温环境，分别于 0、5、10 和 30 d 取样检测水合氯醛的含量，检测 30 d 内的有关物质三氯甲烷的含量，考察水合氯醛在不同 pH 制剂中的稳定性。

2.4 体外释放

使用体外透皮实验仪及 Franz 扩散池，采用材质为再生纤维素膜的透析袋进行自研水合氯醛灌肠剂和日本市售水合氯醛灌肠剂体外释放实验。将处理后的透析袋 MD34（截留分子量 7000）置于 Franz 扩散池（有效扩散面积为 1.76 cm^2）的上室（供给池）和下室（接受池）之间，分别采用 210 mg 的涂药剂量考察，以 15 mL 释放介质为接受液，将扩散池置于（37±0.5）℃的恒温水浴中，开动电磁搅拌，转速为 100 r•min^{-1}。分别于 0.5、1、1.5、2、2.5、3 h 取接受液 0.2 mL，并立即补充等量等温度的接受液。样品溶液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后进样测定 [15]。将释放曲线拟合到不同的动力学模型中，包括零级、一级、Higuchi 和 Ritger peppas 扩散模型。相关系数（r）用作拟合优度的度量，以确定释放动力学的最佳模型 [18]。

$$Q_n = \frac{VC_n + \sum_{i=1}^{n=1} V_i C_i}{A} \quad \text{公式 1}$$

式中 Q_n 为第 n 次取样时的累计渗透量，V 为接受池的体积，V_i 为第 i 次取样的体积，C_i 为第 i 次取样测得的接受液中药物浓度，C_n 为第 n 次取样点浓度（mg • mL^{-1}）；A 为扩散渗透面积（cm^2）。

$$f_2 = 50 \log \left[\frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^{n} (R_t - T_t)^2}{n}}} \right] \quad \text{公式 2}$$

式中 f_2 为相似因子，R_t 与 T_t 分别代表参比和受试制剂第 t 时间点的平均累积释放度，n 为测试点数。

3 结果

3.1 pH 调节剂筛选

添加不同酸（盐酸、磷酸、枸橼酸）调节制剂 pH 值为 2.5，将制剂置于高温、强光照、高湿条件下考察稳定性，结果如表 3 所示。放置 30 d 后，加盐酸、磷酸、枸橼酸制剂溶液仍为无色澄明略微黏稠液体，加盐酸、磷酸制剂水合氯醛的含量与 0 d 无明显变化，加枸橼酸制剂高湿 30 d 和不加酸制剂光照 30 d 的药物含量明显下降，且加枸橼酸制剂黏度在 1164 mPa • s，灌肠液的黏度太大不便于给药，同时也不利于药物在直肠内的铺展。加盐酸制剂 30 d 时的三氯甲烷含量相对

加磷酸制剂较小且未超过限度（＜ 0.045%），与参比制剂（批号：00110）相比，两者稳定性相当。综合考虑确定 pH 调节剂为盐酸。

表 3 添加不同酸及不加酸制剂、日本上市水合氯醛灌肠剂的稳定性结果汇总

Tab 3 Stability of chloral hydrate enema with or without adding different acid formulation（marketed in Japan）

制剂批号	放置条件	pH			黏度 /（mPa・s）			含量 /%			三氯甲烷 /%
		0 d	10 d	30 d	0 d	10 d	30 d	0 d	10 d	30 d	30 d
210526-1	高温	2.55	2.46	2.54	626.4	595.9	606.7	100.32	100.91	100.43	0.014
（盐酸）	光照	2.55	2.41	2.48	626.4	590.9	612.0	100.32	100.91	99.72	0.005
	高湿	2.55	2.43	2.54	626.4	431.6	303.0	100.32	100.55	98.37	0.019
210526-2	高温	2.51	2.41	2.46	645.2	652.1	644.5	99.80	100.27	98.13	0.033
（磷酸）	光照	2.51	2.41	2.47	645.2	650.2	639.6	99.80	101.11	99.32	0.005
	高湿	2.51	2.43	2.49	645.2	450.0	341.9	99.80	100.08	98.91	0.007
210526-3	高温	2.56	2.53	2.65	1124.7	1168	1147	99.50	101.94	98.36	0.021
（枸橼酸）	光照	2.56	2.49	2.57	1124.7	1159	1164	99.50	100.61	98.01	0.007
	高湿	2.56	2.50	2.59	1124.7	758.4	520.4	99.50	101.10	95.19	0.005
20210609	高温	4.76	3.42	3.26	593.0	504.6	506.3	98.21	97.53	96.95	1.878
（不加酸）	光照	4.76	3.52	3.34	593.0	561.3	584.4	98.21	99.68	95.79	0.114
	高湿	4.76	4.64	4.27	593.0	423.6	321.2	98.21	100.08	99.97	0.303
00110	高温	2.27	2.16	2.15	641.2	611.8	596.6	99.70	97.51	98.23	0.026
（参比制剂）	光照	2.27	2.13	2.10	641.2	623.7	624.9	99.70	97.40	97.23	0.019
	高湿	2.27	2.15	2.11	641.2	423.6	301.6	99.70	97.93	97.86	0.008

3.2 制剂 pH 筛选结果

在 pH 为 2.0 ～ 3.5 时，制剂中有关物质三氯甲烷生成量随 pH 值升高而缓慢增多，说明水合氯醛的稳定性随 pH 值升高呈缓慢下降趋势（见图 1）。其中 pH 3.5 的制剂在高温 90 d 时 pH 下降为 3.08，结果见表 4，可能是降解物三氯乙酸增多导致酸性变强，制剂较不稳定，而没有加盐酸控制 pH 的制剂（pH 4.7）高温 30 d 时三氯甲烷的量剧增，已超 0.045% 的限度。由此可知，较低的 pH 值有利于提高水合氯醛的稳定性，但一味地降低水合氯醛制剂的 pH 值并不能更好地降低三氯甲烷的生成量，且过低的 pH 值也不利于水合氯醛制剂的商业化生产、保存以及使用 [19-20]，综合考虑水合氯醛短期使用不会对直肠黏膜产生严重的刺激性，因此确定制剂的 pH 值为 2.5。

从表 4 结果可知，pH 2.5 的非水溶媒制备的水合氯醛灌肠剂在高温 90 d 时与 0 d 相比，制剂性状仍为无色澄明略微黏稠液体，pH 和含量未出现明显下降，而 pH 2.5 的水合氯醛水溶液（批号：210811-5）的性状由无色澄明溶液变为淡黄色溶液（见图 2），pH 由 2.5 变为 3.62，含量下降了 5.88%。同 pH 下的水合氯醛水溶液不稳定，而采用非水溶媒制备的水合氯醛灌肠剂稳定性得到显著提高。

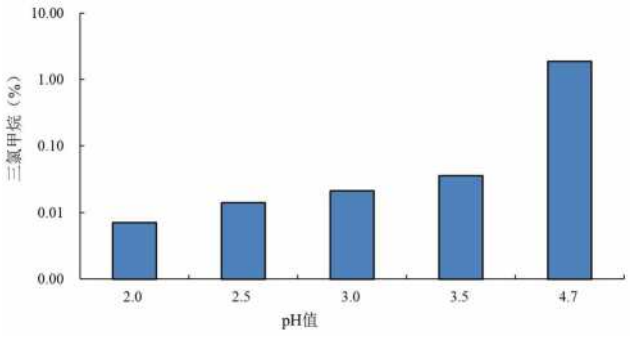


图 1 不同 pH 值的水合氯醛灌肠剂高温 30 d 三氯甲烷的生成量

Fig 1 Amount of trichloromethane produced by chloral hydrate enema at different pH levels at high temperature for 30 days

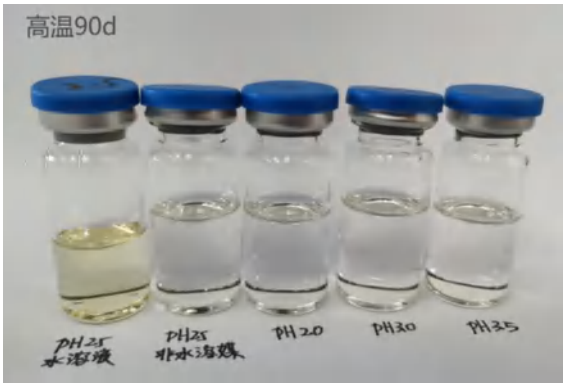


图 2 水合氯醛水溶液和不同 pH 值水合氯醛灌肠剂高温 90 d 的样品图

Fig 2 Aqueous chloral hydrate and chloral hydrate enema at different pH levels at high temperature for 90 days

表 4　不同 pH 值的水合氯醛灌肠剂高温条件下的稳定性考察结果

Tab 4　Stability of chloral hydrate enema with different pH values under high temperature conditions

批号	考察时间 /d	性状	pH	水合氯醛含量 /%
210811-1	0 d	无色澄明略微黏稠液体	1.98	100.31
（pH 2.0）	5 d	无色澄明略微黏稠液体	1.91	102.13
	10 d	无色澄明略微黏稠液体	1.92	101.78
	30 d	无色澄明略微黏稠液体	2.04	102.67
	90 d	无色澄明略微黏稠液体	2.10	103.29
210811-2	0 d	无色澄明略微黏稠液体	2.53	101.88
（pH 2.5）	5 d	无色澄明略微黏稠液体	2.45	101.75
	10 d	无色澄明略微黏稠液体	2.45	101.72
	30 d	无色澄明略微黏稠液体	2.57	102.76
	90 d	无色澄明略微黏稠液体	2.57	103.13
210811-3	0 d	无色澄明略微黏稠液体	3.11	101.57
（pH 3.0）	5 d	无色澄明略微黏稠液体	2.99	102.73
	10 d	无色澄明略微黏稠液体	3.13	101.80
	30 d	无色澄明略微黏稠液体	3.02	102.83
	90 d	无色澄明略微黏稠液体	2.97	103.21
210811-4	0 d	无色澄明略微黏稠液体	3.44	101.21
（pH 3.5）	5 d	无色澄明略微黏稠液体	3.20	101.32
	10 d	无色澄明略微黏稠液体	3.23	102.01
	30 d	无色澄明略微黏稠液体	3.13	100.90
	90 d	无色澄明略微黏稠液体	3.08	102.20
210811-5	0 d	无色澄明溶液	2.53	101.33
	5 d	无色澄明溶液	2.34	101.62
	10 d	无色澄明溶液	1.98	101.37
	30 d	无色澄明溶液	1.78	102.50
	90 d	淡黄色溶液	3.62	95.45

3.3　确定的处方组成（200 支）

综上，确定水合氯醛灌肠剂的处方组成为：水合氯醛 100 g，甘油 2 g，PEG 400 165 g，盐酸 1 g。

3.4　制备工艺

① 称取 31 g PEG 400，向其中缓慢加入盐酸 1 g，搅拌均匀，得到盐酸稀释液；② 称取 2 g 甘油和 134 g PEG 400 混合搅匀，加入盐酸稀释液并搅匀，得到基质溶液；③ 搅拌、缓慢地向基质溶液中加入 100 g 水合氯醛（80 目），继续搅拌直至水合氯醛完全溶解，静置直至无气泡，即得 268 g 的水合氯醛灌肠剂（批号：20210909），药液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，装入一次性预灌封注射器（1.34 g/ 支）。按最优工艺制备了 3 批样品，加速试验 3 个月后，样品稳定性较好。

3.5　体外释放

以人工膜评价药物的释放性可克服生物膜的个体间差异，具有重现性好，操作简便的优点，故体外释放实验采用材质为再生纤维素膜的透析袋，以 Franz 扩散池来比较 3 批市售日本水合氯醛灌肠剂和自研的释放差异，并通过零级、一级、Higuchi 和 Ritger peppas 扩散模型对获得的释放数据进行动力学分析。

本研究以累积释放百分率为指标，三批市售日本水合氯醛灌肠剂（批号分别为 00106、00109、00112）释放批间差异性小，且自研水合氯醛灌肠剂（批号：20210909）与其释放相似（见图 3，f_2 ＝ 66），制剂均在 3 h 达到 65% 以上的释放率。根据释放度测定的结果，对其进行释药模型拟合，结果见表 5。由拟合结果可看出两者以 Ritger peppas 方程拟合的相关系数最大。故水合氯醛释放服从 Ritger peppas 方程（$\ln Q = b + \ln t$），且制剂释放参数 k 均满足 $0.45 < n < 0.89$，为扩散和溶蚀的协同作用，表明药物以扩散和溶蚀相结合的方式从透析袋释放。

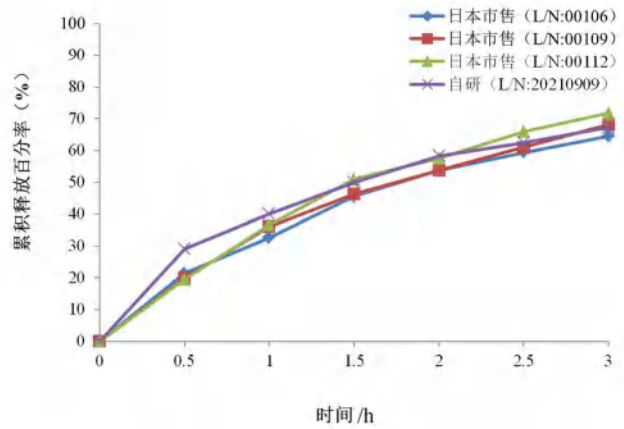


图 3　3 批日本市售水合氯醛制剂和自研制剂的体外释放曲线

Fig 3　In vitro release profiles of 3 batches of commercially available Japanese chloral hydrate formulations and self-developed agent

4　讨论

水合氯醛是一种镇静催眠药，具有吸收和作用迅速、不良反应少的特点。彭巧玉等 [21] 探究了不同年龄儿童镇静剂的临床使用情况，发现水合氯醛对婴幼儿和学龄前儿童中的镇静持续时间和效果显著优于苯巴比妥和地西泮（$P < 0.01$）。水合氯醛灌肠对不同年龄的儿童有确切可靠的镇静作用，操作简便，是临床上比较理想的镇静剂。以水合氯醛为主要原料制成的剂型有口服溶液、糖浆、灌肠剂、栓剂等，目前仅口服溶液被广泛使用。水合氯醛在水溶液中极不稳定，仅有医院内制剂现用现配，难以推广使用。为克服水合氯醛水溶液不稳定差的缺点，本研究采用非水溶媒制备高稳定性的水合氯醛灌肠剂，减少了有害物质的产生，保证用药安全，在临床上具有重要意义。

表 5 自研制剂和三批市售日本水合氯醛灌肠剂体外释药模型的拟合方程及相关系数

Tab 5 Fitting equation and correlation coefficients for the in vitro release of self-developed agent and 3 batches of commercially available Japanese chloral hydrate enema

模型	方程	相关系数（r）			
		自研制剂	00106	00109	00112
零级模型	$Q = kt + b$	0.9441	0.9715	0.9754	0.9751
一级模型	$\log(Q_\infty - Q) = \frac{-k_{r1}t}{2.303} + \log M$	0.9948	0.9889	0.9919	0.9856
Higuchi	$Q = a + bt^{1/2}$	0.9987	0.9945	0.9937	0.9901
Ritger peppas	$\ln Q = b + \ln t$	0.9982	0.9963	0.9941	0.9908

本实验考察了加入不同 pH 调节剂的制剂，比较其稳定性，以 pH、水合氯醛含量、黏度、有关物质三氯甲烷含量为评价指标，确定了 pH 调节剂为盐酸。通过改变加入盐酸用量制备不同 pH 的制剂，最终确定制剂 pH 为 2.5，其稳定性与日本市售水合氯醛灌肠剂相当。与 pH 为 2.5 的水合氯醛水溶液稳定性进行比较，结果显示水合氯醛水溶液高温 90 d 时含量出现显著下降，而采用甘油和 PEG 400 为辅料的非水溶媒制备的水合氯醛灌肠剂含量未出现下降，稳定性更高，体现了采用非水溶媒制备的水合氯醛制剂的优势，克服了水合氯醛在水溶液中不稳定的缺点。通过体外释放，比较自研制剂与日本市售水合氯醛灌肠剂的释放曲线（3 h 释放度大于 50%），两者释放相似且拟合后释放行为符合 Ritger peppas 方程，表明药物以扩散和溶蚀相结合方式从透析袋释放。

本研究采用非水溶媒作为辅料成功获得了室温下长期放置稳定的水合氯醛灌肠剂，在水不稳定性药物水合氯醛的临床应用及产业化方面具有积极意义。

参考文献

[1] Liebig J. Ueber die Zersetzung des Alkohols durch Chlor [J]. Annalen der Pharmacie，1832，1（1）：31-32.

[2] Liebig J. Ueber die Verbindungen，welche durch die Einwirkung des Chlors auf Alkohol，Aether，ölbildendes Gas und Essiggeist entstehen [J]. Annalen der Pharmacie，1832，1（2）：182-230.

[3] Liebreich O. Das Chloralhydrat：ein neues Hypnoticum und Anaestheticum und dessen Anwendung in der Medecin [M]. GFO Mueller，1871.

[4] Kiametis AS，Stock L，Cirqueira L，et al. Atomistic model for simulations of the sedative hypnotic drug 2，2，2-trichloroethanol [J]. Acs Omega，2018，3（11）：15916-15923.

[5] Roach CL，Husain N，Zabinsky J，et al. Moderate sedation for echocardiography of preschoolers [J]. Pediatr Cardiol，2010，31（4）：469-473.

[6] Hare M. Question 1 chloral hydrate or midazolam：which is better for sedating children for painless diagnostic imaging? [J]. Arch Dis Child，2012，97（8）：750-752.

[7] 吴颖，王旭梅 . 水合氯醛用于婴幼儿镇静的研究进展 [J]. 实用临床护理学电子杂志，2018，3（25）：128-129.

[8] Necula V，Stamate MC，Blebea C，et al. Safety and effectiveness of chloral hydrate in outpatient paediatric sedation for objective hearing tests [J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol，2019，126（C）：109605.

[9] Song S，Han M，Kim J. Safety of chloral hydrate sedation in dental practice for children：an overview [J]. JDAPM，2020，20（3）：107.

[10] 南京市卫生局，医院制剂规范 [M]. 南京：南京大学出版社，1989：146.

[11] 陈新谦，金有豫，汤光 . 新编药物学 [M]. 15 版 . 北京：人民卫生出版社，2004：226.

[12] 冯家星，李惠民，邢丽娜，等 . 水合氯醛溶液稳定性的影响因素及有效期预测 [J]. 化工科技，2020，28（1）：37-40.

[13] 刘佳，姜清华，杨跃辉 . 水合氯醛溶液稳定性考察 [J]. 实用药物与临床，2013，16（8）：720-721.

[14] 张华，石磊 . 水合氯醛溶液中主成分稳定性考察 [J]. 中国药师，2014，17（1）：168-169.

[15] 唐城，马小华，陶亮，等 . 高效液相色谱法测定水合氯醛口服溶液含量 [J]. 中国药品标准，2021，22（2）：182-186.

[16] 陶亮，云琦，孙媛媛 . 含有水合氯醛的药盒及其用途：CN112009875A [P]. 2020-12-01.

[17] 刘忠雁，刘梅 . 水合氯醛在婴幼儿镇静给药方法中的应用 [J]. 临床合理用药杂志，2015，8（29）：84-85.

[18] Moawad FA，Ali AA，Salem HF. Nanotransfersomes-loaded thermosensitive in situ gel as a rectal delivery system of tizanidine HCl：preparation，in vitro and in vivo performance [J]. Drug Deliv，2017，24（1）：252-260.

[19] 云琦，陶亮，张蓉，等 . 一种稳定的水合氯醛溶液及其制备方法和用途 . CN110151687A [P]. 2019-08-23.

[20] Jannin V，Lemagnen G，Gueroult P，et al. Rectal route in the 21st century to treat children [J]. Adv Drug Deliv Rev，2014，73：34-49.

[21] 彭巧玉，左静. 不同年龄阶段儿童镇静剂使用的临床研究 [J]. 继续医学教育，2016，30（3）：136-138.

（收稿日期：2022-02-02；修回日期：2022-04-08）

氟康唑片在中国健康受试者的生物等效性研究

张丽英[1]，郭彩会[1]，宋浩静[1]，刘亚丽[2]（1. 河北省人民医院药学部，石家庄　050051；2. 石家庄四药有限公司，石家庄　050011）

摘要：目的　评价健康受试者空腹和餐后条件下单剂量服用氟康唑片的生物等效性。**方法**　采用单中心、单剂量、随机、开放、两周期、自身交叉对照试验设计，液相色谱串联质谱法测定健康受试者空腹或餐后给药后血浆中氟康唑的药物浓度，使用 WinNonlin 7.0 软件计算药动学参数，使用 SAS 9.4 软件进行生物等效性评价。**结果**　空腹生物等效性试验：24 例健康受试者分别单次空腹服用氟康唑受试制剂和参比制剂 150 mg 后，C_{max}、$AUC_{0\sim t}$及 $AUC_{0\sim\infty}$的几何均值的比值分别为 104.64%、98.01% 和 97.64%，90%*CI* 分别为 97.04% ～ 112.85%、96.57% ～ 99.48% 和 96.18% ～ 99.12%，均落在等效区间 80.00% ～ 125.00%；餐后生物等效性试验：21 例健康受试者高脂餐后服用受试制剂和参比制剂 150 mg 后，C_{max}、$AUC_{0\sim t}$及 $AUC_{0\sim\infty}$的几何均值的比值分别为 97.42%、98.65% 和 98.88%，90%*CI* 分别为 94.28% ～ 100.67%、95.90% ～ 101.48% 和 95.69% ～ 102.17%，均落在等效区间 80.00% ～ 125.00%。**结论**　在空腹和餐后条件下，两制剂均具有生物等效性。

关键词：氟康唑；生物等效性研究；药动学；健康受试者
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)06-1251-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.006

Bioequivalence of fluconazole tablets in healthy Chinese volunteers

ZHANG Li-ying[1], GUO Cai-hui[1], SONG Hao-jing[1], LIU Ya-li[2] (1. *Department of Pharmacy*, *Hebei General Hospital*, *Shijiazhuang* 050051; 2. *Shijiazhuang Siyao Co.*, *Ltd.*, *Shijiazhuang* 050011)

Abstract: Objective To evaluate the bioequivalent of single dose fluconazole tablets test formulation and reference formulation in fasting and postprandial conditions in healthy Chinese subjects. **Methods** A single center, single dose, randomized, open label, two cycle, self crossover controlled trial design was used to determine the concentrations of fluconazole in the plasma after fasting or postprandial administration in healthy subjects by liquid chromatography tandem mass spectrometry. The pharmacokinetic parameters were calculated with WinNonlin 7.0 software, and the bioequivalence was evaluated with SAS 9.4 software. **Results** Fasting bioequivalent test: after the administration of a single, fasting dose of fluconazole test formulation and reference formulation 150 mg in 24 healthy subjects, the odds ratios for the geometric means of C_{max}, $AUC_{0\sim t}$, and $AUC_{0\sim\infty}$ were 104.64%, 98.01%, and 97.64%, respectively; the 90%*CI* was 97.04% － 112.85%, 96.57% － 99.48%, and 96.18% － 99.12%, respectively, which fell within the equivalence interval of 80.00% － 125.00%. bioequivalent test after meal: the ratios of the geometric means of C_{max}, $AUC_{0\sim t}$, and $AUC_{0\sim\infty}$ after a high-fat meal were 97.42%, 98.65%, and 98.88%, respectively, with 90%*CI* of 94.28% － 100.67%, 95.90% － 101.48%, and 95.69% － 102.17% in 21 healthy subjects, which fell within the equivalence interval of 80.00% － 125.00%. **Conclusion** Both formulations are bioequivalent in healthy Chinese subjects under fasting and postprandial conditions.

Key words: fluconazole; bioequivalence study; pharmacokinetics; healthy volunteer

氟康唑作为氟代三唑类抗真菌药物，主要是　通过抑制真菌细胞膜合成受阻，进而影响真菌细

作者简介：张丽英，女，主管护师，主要从事临床药理研究，email：zlyzsm123456@ 163.com

胞的生长繁殖。因氟康唑具有抗真菌谱广，抗菌活性强，口服吸收良好，在体内分布广，毒性低等特点，在临床上得到广泛应用[1]。本试验参考《以药动学参数为终点评价指标的化学药物仿制药人体生物等效性研究技术指导原则》[2]，研究氟康唑片的人体生物等效性[3]。

1 材料与研究对象

1.1 试药和仪器

氟康唑片受试制剂（T）（规格：150 mg / 片，石家庄四药有限公司，批号：FZ16120901）；氟康唑片参比制剂（R）（规格：150 mg / 片，Pharmaceuticals LLC，批号：H79933）。氟康唑片化学对照品（纯度：99.7%，批号：100314-201605，中国食品药品检定研究院）；氟康唑片 -d4（内标）（纯度：98.7%，批号：1132-051A1，加拿大 TLC Pharmaceutical Standards 公司）。空白基质（人血浆和人全血，肝素钠抗凝）均来自中国健康志愿者，由河北省人民医院Ⅰ期临床研究室提供。甲醇（HPLC 级）、乙腈（HPLC 级）、甲酸（LC/MS 级）（赛默飞世尔科技有限公司），甲酸（色谱级，Aladdin）。

1.2 受试者选择与入组完成情况

本试验方案经河北省人民医院伦理委员会批准 [（2017）药伦审第（02）号]。所有受试者均在充分了解本试验的目的、方法及风险后，自愿签署知情同意书，年龄要求 18 ～ 45 岁，单一性别受试者人数不少于总人数的 1/3，体质量指数在 19.0 ～ 26.0 kg • m^{-2}；无滥用药物史、药物依赖史；近 3 个月内未参加过其他临床试验且未献血；近 2 周内未服用任何药物；统一进行查体和实验室检查，经筛选合格并随机纳入空腹试验的受试者 24 例，餐后试验的受试者因筛选困难，合格 21 例，虽未满足方案，但病例数符合相关法规要求。45 例受试者均按要求完成试验，空腹组与餐后组健康受试者的一般资料见表 1。

表 1 空腹组与高脂餐后组健康受试者的一般资料

Tab 1 General information of healthy subjects in the fasting group and the postprandial group

一般资料	空腹组（n = 24）	餐后组（n = 21）
性别 [n（%）]		
男	15（62.5）	12（57.1）
女	9（37.5）	9（42.9）
年龄 / 岁	30.2±6.09	29.0±7.76
身高 /cm	168.50±9.103	166.48±6.783
体质量 /kg	64.29±8.523	62.33±8.558
BMI/（kg • m^{-2}）	22.59±1.853	22.42±1.956

2 方法

2.1 给药方案与血样采集

本研究采用单中心、单剂量、随机、开放、两周期、自身交叉对照试验设计，评价氟康唑片在空腹及高脂餐后两种状态下的生物等效性研究。空腹组 24 例，高脂餐组 21 例，分别将空腹组和高脂餐组的健康受试者随机分为两组，交叉给药，每周期给药一次，洗脱期为 14 d。空腹组受试者空腹过夜 10 h 以上，服用相应受试制剂或参比制剂 150 mg，用 240 mL 水送服，于给药前 1 h 内（0 h）和给药后 0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3、6、12、24、36、48、72、96、120 h 采集静脉血，每次取血约 4 mL 至 EDTA-K_2 抗凝真空采血管中。高脂餐组受试者空腹过夜 10 h 以上，于第 2 日早上在服药前 30 min 开始高脂（提供食物中约 50% 的热量）高热量餐（约 800 ～ 1000 kcal）[4]（高脂餐成分见表 2，30 min 内结束进餐），在进餐后 30 min 时开始服用相应受试制剂或参比制剂，用水 240 mL 送服，于高脂餐后服药前（0 h）和给药 后 0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3、6、12、24、36、48、72、96、120 h 采集静脉血，每次取血约 4 mL 至 EDTA-K_2 抗凝的真空采血管中。空腹组和高脂餐组所采集的血样在 1 h 内 4 ℃、1700 g 离心 10 min，所有离心后血浆样品分成两份，在－ 60 ℃冰箱中保存，以供药动学分析。

表 2 高脂餐成分表

Tab 2 Ingredient list of high fat meal

种类	总量	蛋白质 /kcal	脂肪 /kcal	碳水化合物 /kcal	总热量 /kcal
伊利纯牛奶	250 mL	32	85.5	50	167.5
雨润台式烤肠	60 g	43.4	76.7	21.4	141.5
煮蛋	约 110 g	45.5	88.8	7.9	142.2
味出道牛角面包	115 g	34.0	283.6	209.8	527.4
总计		154.9	534.6	289.1	978.6

2.2 测定方法与血样处理

2.2.1 色谱条件 色谱柱：GL Sciences InertSustain C_{18}（3 μm，2.1 mm×50 mm）；柱温：40 ℃；阀 R：初始值 1；自动进样器温度：4 ℃；流动相：0.1% 甲酸水（A）-100% 乙腈（B）；梯度洗脱（0 ～ 1.3 min，15.0% → 50.0%B；1.3 ～ 1.6 min，50.0% → 95.0%B；1.6 ～ 2.5 min，95.0%B；2.5 ～ 2.6 min，95.0% → 15.0%B；2.6 ～ 3.5 min，15.0%B）；流速：0.4 mL • min^{-1}；进样体积：3.0 μL；分析时间：3.5 min。

2.2.2 质谱条件 电离化模式：ESI；接口温度：

300 ℃；DL 温度：250 ℃；雾化气流量：3.00 L·min^{-1}；加热气流量：10.00 L·min^{-1}；加热块温度：400 ℃；干燥气流量：10.00 L·min^{-1}；分析模式：正离子模式（MRM）。氟康唑的离子对：307.10/220.10，驻留时间：100.0 ms，碰撞能量（CE）：－17.0 V；内标氟康唑 -d4 的离子对：311.10/223.10，驻留时间：100.0 ms，碰撞能量（CE）：－18.0 V。

2.2.3 血浆样品处理　样品室温下融化后，涡旋混匀，吸取 30.0 μL 样品（校正标样、质控样品或测试样品）至 96 孔板中，对于双空白样品或 QC_0 样品，加入 30.0 μL 空白基质；加入 30.0 μL 内标溶液，对于双空白样品加入 30.0 μL 50% ACN 溶液；加入 180.0 μL 的 100% 乙腈，涡旋约 10 min，在约 4 ℃条件下 2600 g 离心 10 min；转移 30.0 μL 上清液至已加入 270.0 μL 30% 乙腈溶液的 96 孔板中，涡旋 5 min，待进样。

2.3 统计学处理

采用 WinNonlin 7.0 软件对氟康唑的参比制剂和受试制剂的血药浓度进行非房室模型药动学参数的估算分析，其他分析及作图采用 SAS 9.4 软件完成。采用 BES，将主要药动学参数 C_{max}、$AUC_{0\sim t}$、$AUC_{0\sim\infty}$经对数转换后，进行方差分析和90% 置信区间分析，将 t_{max} 进行配对秩和检验，评价两制剂的生物等效性。

3 结果

3.1 方法学考察

液相色谱串联质谱（LC-MS/MS）法的方法学验证由苏州国辰科技股份有限公司生物分析部完成。血浆中内源性物质不干扰氟康唑的测定。氟康唑在 10.0 ～ 5000 ng•mL^{-1} 与峰面积线性关系良好，准确度及精密度结果见表 3。血浆样品中氟康唑的提取回收率为 95.0% ～ 99.9%，内标氟康唑 -d4 的回收率为 91.7%。氟康唑在 25 000 ng·mL^{-1} 浓度范围内，稀释因子为 1∶10 时具有良好的稀释可靠性。血浆样本分别在－20 ℃和－80 ℃条件下储存 28 d、90 d 的稳定性良好，血浆样本在－60 ℃条件下经过 5 次冻融循环的稳定性良好；血浆样本在处理前室温条件下放置 25 h 以及提取后在自动进样器（温度设置：4 ℃）放置 94 h 稳定性良好；全血样本于冰浴条件下放置 2 h 内的稳定性良好；溶血基质效应、高脂基质效应、残留均不影响血浆中氟康唑的准确定量。方法学验证结果表明本方法可用于临床试验血浆样品的分析。

3.2 血药浓度 - 时间曲线及药动学参数

表 3　血浆中氟康唑的精密度和准确度

Tab 3　Precision and accuracy of fluconazole in human plasma

质量浓度 /（ng·mL^{-1}）	批内		批间	
	测定值 /（ng·mL^{-1}）	*RSD*/%	测定值 /（ng·mL^{-1}）	*RSD*/%
10.0	9.54±0.23	2.4	9.77±0.41	4.2
30.0	29.1±0.7	2.4	29.2±0.6	2.1
375	375±3	0.80	368±11	3.0
2000	2110±73	3.5	2050±76	3.7
3750	3720±35	0.90	3620±110	3.0

空腹组和餐后组受试者口服受试制剂和参比制剂后，氟康唑的平均血药浓度 - 时间曲线见图 1，药动学参数见表 4。

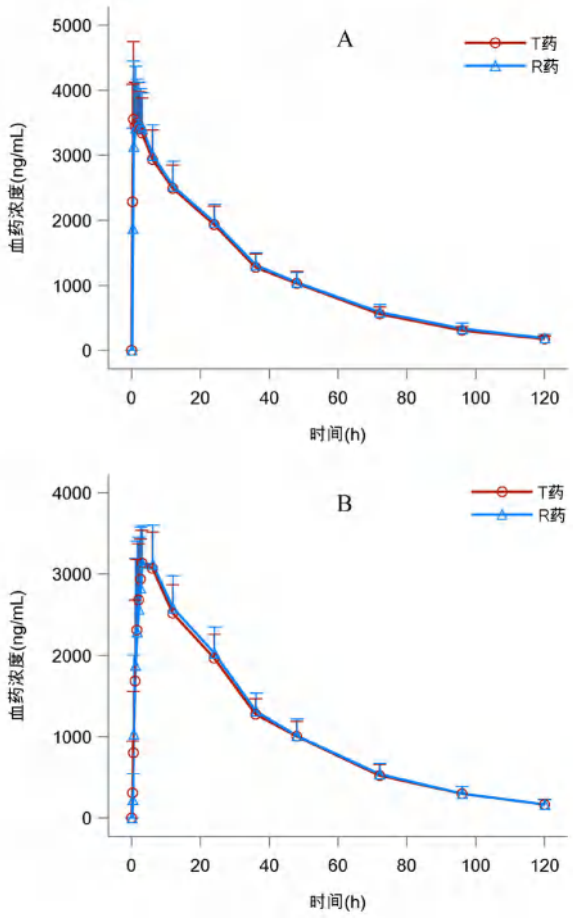


图 1　健康受试者空腹（A）和餐后（B）单次口服 150 mg 氟康唑片的平均血药浓度 - 时间图

Fig 1　Mean plasma concentration-time diagram of a single oral dose of 150 mg fluconazole tablets in healthy subjects on a fasting stomach（A）and after a meal（B）

3.3 生物等效性分析

在空腹状态下口服氟康唑受试制剂和参比制剂的 C_{max}、$AUC_{0\sim t}$ 及 $AUC_{0\sim\infty}$ 的几何均值的比值分别为 104.64%、98.01% 和 97.64%，90%*CI* 分别为 97.04% ～ 112.85%、96.57% ～ 99.48% 和 96.18% ～ 99.12%，个体内变异分别为 15.32%、3.00% 和

表 4 空腹和高脂餐受试者口服受试制剂和参比制剂后的主要药动学参数 (mean±SD)

Tab 4 Main pharmacokinetics parameters of fasting and high-fat diet subjects after the oral administration of the test and reference preparations (mean±SD)

参数	空腹组		高脂餐组	
	试验制剂（n = 24）	参比制剂（n = 24）	试验制剂（n = 21）	参比制剂（n = 21）
C_{max}/（ng • mL^{-1}）	4287.08±1016.76	4052.92±723.38	3275.71±377.08	3373.33±439.46
$AUC_{0\sim t}$/（×10^5 ng • h • mL^{-1}）	1.30±0.19	1.33±0.19	1.26±0.17	1.28±0.20
$AUC_{0\sim\infty}$/（×10^5 ng • h • mL^{-1}）	1.38±0.19	1.41±0.21	1.33±0.19	1.35±0.22
t_{max}/h	0.50（0.25，2.5）	1.00（0.25，3.00）	3.00（1.5，6.00）	3.00（1.0，6.0）
$t_{1/2}$/h	28.8±3.5	29.5±4.2	27.9±4.8	27.7±3.9

3.04%。在餐后状态下口服氟康唑受试药物和参比药物的 C_{max}、$AUC_{0\sim t}$ 及 $AUC_{0\sim\infty}$ 的几何均值的比值分别为 97.42%、98.65% 和 98.88%，90%*CI* 分别为 94.28% ～ 100.67%、95.90% ～ 101.48% 和 95.69% ～ 102.17%，个体内变异分别为 6.14%、5.30% 和 6.14%。与参比制剂比较，受试制剂 C_{max}、$AUC_{0\sim t}$ 及 $AUC_{0\sim\infty}$ 的 90% 置信区间均落在参比制剂的 80.00% ～ 125.00%，说明两种制剂具有生物等效性。

3.4 安全性评价

本试验空腹组共有 24 例受试者纳入安全性评价，服用受试制剂后，有 6 例受试者发生 7 例次不良事件，分别为丙氨酸氨基转移酶升高、心悸、恶心、上呼吸道感染、血脂升高、血小板升高、发热，其中除前 3 例不良事件研究者判断与研究药物可能无关外，其余均与研究药物肯定无关。上呼吸道感染这一不良事件严重程度为Ⅱ级，其余均为Ⅰ级。因受试者的上呼吸道感染发生在洗脱期，口服感冒清热软胶囊后缓解，经研究者分析，此药物不影响氟康唑的药动学参数，同意继续进入第二周期试验。服用参比制剂后，有 3 例受试者发生 3 例次不良事件，分别为转氨酶升高、尿上皮细胞升高、上呼吸道感染，其中转氨酶升高与研究药物可能有关，其余 2 例与研究药物肯定无关，严重程度均为Ⅰ级。

高脂餐后组共有 21 例受试者纳入安全性评价，服用受试制剂后，有 4 例受试者发生 4 例次不良事件，分别为尿潜血阳性、智齿冠周炎、针刺伤、发热，其中除尿潜血阳性与研究药物可能无关外，其余 3 例均与研究药物肯定无关。服用参比制剂后，有 2 例受试者发生 2 例次不良事件，1 例不良事件为丙氨酸氨基转移酶升高，判断与研究药物可能有关，另 1 例为尿白细胞高，与研究药物可能无关。受试制剂和参比制剂阶段所有不良事件的严重程度均为Ⅰ级。

空腹组与餐后组均未发生严重不良事件和导致退出试验的不良事件。以上表明在空腹和餐后状态下健康受试者单次口服 150 mg 氟康唑受试制剂与参比制剂在体内具有相似的安全性和耐受性。

4 讨论

氟康唑是目前临床上常用的抗真菌药，本研究得出其血浆消除半衰期为 30 h 左右，大约 120 ～ 150 h 达到稳态血药浓度，所以目前临床上每日给药一次是科学合理的，但对于肝肾功能不全的患者，药物的半衰期会明显延长，血药浓度升高，易发生蓄积中毒，建议临床上应根据患者具体情况，通过监测氟康唑的稳态血药浓度来调整用药剂量 [5]。

氟康唑不良反应主要有头痛、头晕、皮疹、腹痛、腹泻、恶心、呕吐、肝肾功能异常、血液学指标改变等 [5-6]，本研究中受试者出现的不良反应有丙氨酸氨基转移酶升高、心悸、恶心、尿潜血阳性、转氨酶升高，与说明书中基本一致。临床用药后易产生胃肠道反应和中枢系统不良反应，有时导致严重的肝损伤或血液系统疾病，故对于该药可能会出现消化道系统的不良反应的人群应餐后服用，这样可借助食物的作用避免药物对消化道的刺激，对于接受氟康唑治疗的患者建议定期检查肝功能。

本研究氟康唑片血药浓度的测定方法可靠，血浆样本中的杂质对氟康唑的测定无干扰，受试制剂和参比制剂 C_{max}、$AUC_{0\sim t}$ 及 $AUC_{0\sim\infty}$ 的几何均值的比值 90% 置信区间均落在参比制剂 80.00% ～ 125.00% 内，表明本试验两种制剂具有生物等效性 [7]。其研究结果的主要药动学参数与文献报道 [8-10] 的数据基本一致，健康受试者在试验期间发生的不良事件也基本一致，为患者安全用药提供了质量保证。

参考文献

[1] 万昆，张奕奕，周成合，等 . 抗真菌药物氟康唑研究新进展 [J]. 中国抗生素杂志，2012，37（1）：8-15.

[2] NMPA.《以药动学参数为终点评价指标的化学药物仿制药人体生物等效性研究技术指导原则》[S]. 2016.
[3] 国家食品药品监督管理总局 . 总局关于发布普通口服固体制剂参比制剂选择和确定等 3 个技术指导原则的通告（2016 年第 61 号）[EB/OL]. 2016-03-18. https：//www. nmpa. gov. cn/xxgk/ggtg /qtggtg /20160318210001725. html.
[4] FDA. Guidance for Industry：Food-effect bioavailability and fed bioequivalence studies [EB/OL].（2002-12-01）[2003-01-30]. http：//www. fda. gov/cder/guidanee/index. htm.
[5] 辉瑞（大连）制药有限公司 . 氟康唑胶囊说明书 [EB/OL].（2018-12-03）[2020-05]. https：/ /www. pfizermedicalinformation. cn /PackageInserts. aspx? product ＝ Diflucan & PageNumber ＝ 1.
[6] 杨玉仙，吴珊珊 . 1 例氟康唑和吗啡联用致吗啡中毒的病例报道及分析 [J]. 中南药学，2018，16（12）：1810-1811.
[7] U. S. Food and Drug Administration. DIFLUCAN [EB/OL].（2019-02）[2020-02]. https：//www. ac-cessdata. Fda. gov/drugsatfda_docs/label /2019/019949s065，020090s047lbl. Pdf.
[8] 杨武云，邢文荣，李珍，等 . 国产与进口氟康唑胶囊在健康人体的生物等效性研究 [J]. 药学服务与研究，2013，13（4）：288-290.
[9] 李智慧，刘静彦，邱雯，等 . 氟康唑胶囊在中国健康受试者的人体生物等效性研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2020，25（8）：910-915.
[10] 巩慧敏，冯泽岸，邵婷玑，等 . 氟康唑片在健康人体的药物动力学和生物等效性研究 [J]. 中国药师，2012，15（2）：177-179，232.

（收稿日期：2021-10-15；修回日期：2021-12-15）

基于 LTB4/BLTR 通路探讨黄芩苷 - 栀子苷配伍对局灶性脑缺血大鼠再灌注损伤的影响

周爽，李慧敏，张行行，史永恒，王川，王国全，李敏，王斌*（陕西中医药大学，陕西 咸阳 712046）

摘要：目的 基于 LTB4/BLTR 通路探讨预防及治疗脑损伤的分子机制，探究黄芩苷 - 栀子苷治疗脑缺血的抗炎作用机制。**方法** 将 SD 雄性大鼠随机分为假手术组，模型组，白三烯 B4 受体（BLTR）抑制剂组（LY255283，1 mg • kg^{-1}），黄芩苷 - 栀子苷 7∶3 配伍组低、高剂量组（BC/GP 组，45 mg • kg^{-1}、60 mg • kg^{-1}）和 BC/GP 联合抑制剂组（BC/GP45 ＋ LY255283、BC/GP60 ＋ LY255283）。线栓法构建大鼠脑中动脉阻塞模型，模拟局灶性脑缺血再灌注。缺血 2 h 后拔出线栓实现再灌注，缺血 24 h 后取材。在 2 h 和 24 h 分别进行 Zea-Longa 评分和神经缺损程度评分（mNSS）。HE 染色观察组织病理形态的变化；酶联免疫法检测脑组织中白三烯 A4 水解酶（LTA4H）和白三烯 B4（LTB4）、髓过氧化物酶（MPO）的表达，以及炎性因子 IL-1β 和促炎因子 TNF-α 的表达；qPCR 检测 BLT1、BLT2 mRNA 表达。**结果** 与假手术组相比，模型组大鼠的神经行为学评分显著增加（$P < 0.01$），脑组织中 LTA4、LTB4、MPO、BLT1、BLT2、TNF-α 和 IL-1β 的表达均显著增加。与模型组比，给予 BC/GP 后 mNSS 评分显著降低（$P < 0.01$），缺血区炎性细胞浸润及组织水肿减轻，TNF-α、IL-1β、LTB4、LTA4H、MPO、BLT1 和 BLT2 mRNA 表达显著降低（$P < 0.01$）。**结论** 黄芩苷 - 栀子苷（7∶3）配伍可以有效改善脑缺血再灌注损伤，其作用机制可能与下调 LTB4/BLTR 通路有关。

关键词：脑缺血再灌注损伤；白三烯 B4；黄芩苷；栀子苷；白三烯 B4 受体
中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1255-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.007

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81473385）；陕西省中医药优秀中青年科技骨干人才队伍建设项目（序号：2）；2020 年度陕西中医药大学创新创业项目（No.2020CX36）。
作者简介：周爽，女，硕士研究生，主要从事中药治疗脑缺血机制的研究，email：z1814304@163.com *通信作者：王斌，男，教授，主要从事抗心脑血管病的方药研究，email：wangbin812@126.com

Effect of baicalin-geniposide compatibility on the brain tissue injury in rats with focal cerebral ischemia-reperfusion via LTB4/BLTR pathway

ZHOU Shuang, LI Hui-min, ZHANG Hang-hang, SHI Yong-heng, WANG Chuan, WANG Guo-quan, LI Min, WANG Bin* (*Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046)

Abstract: Objective To determine the molecular mechanism of preventing and treating brain injury based on LTB4/BLTR pathway, and the anti-inflammation mechanism of baicalin-gardenoside for cerebral ischemia. **Methods** Male SD rats were randomly divided into a sham group, a model group, a leukotriene B4 receptor (BLTR) inhibitor group (LY255283, 1 mg • kg^{-1}), baicalin gardenoside compatibility (7∶3) low and high dose groups (BC/GP, 45 mg • kg^{-1} and 60 mg • kg^{-1}) and a BC/GP combined inhibitor group (BC/GP45 ＋ LY255283; BC/GP60 ＋ LY255283). The rat model of middle cerebral artery occlusion (MACO) was established by thread occlusion to simulate focal cerebral ischemia-reperfusion. After 2 hours of ischemia, the lead bolt was pulled out for the reperfusion, and the samples were taken after 24 hours of ischemia. Zea-longa score and nerve defect degree score (mNSS) were taken at 2 h and 24 h, respectively. The histopathological changes were observed by HE staining. The expressions of leukotriene A4 hydrolase (LTA4H), leukotriene B4 (LTB4) and myeloperoxide (MPO) in the brain tissue and the expression of inflammatory factor IL-1β and proinflammatory factor TNF-α were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The expression of BLT1 and BLT2 mRNA was detected by qPCR. **Results** Compared with the sham group, the neurobehavioral score of the model group was significantly increased ($P < 0.01$), and the expressions of LTA4, LTB4, MPO, BLT1, BLT2, TNF-α and IL-1β were significantly increased. Compared with the model group, the mNSS score was decreased significantly after BC/GP treatment ($P < 0.01$), the inflammatory cell infiltration and tissue edema in the ischemic area were alleviated. The expressions of TNF-α, IL-1β, LTB4, LTA4H, MPO, BLT1 and BLT2 mRNA were significantly inhibited ($P < 0.01$). **Conclusion** Baicalin-geniposide (7∶3) combination can effectively improve the cerebral ischemia-reperfusion injury, whose mechanism is related to the down regulaton of LTB4/BLTR pathway.

Key words: focal cerebral ischemia-reperfusion injury; leukotriene B4; baicalin; geniposide; leukotriene B4 receptor

脑缺血损伤可触发一系列的有害事件，包括谷氨酸相关的兴奋性毒性、炎症、氧化应激和细胞凋亡[1]。近年来，越来越多的研究关注炎症在脑缺血发病中的作用[2]。缺血性病变中分泌的炎症介质，包括细胞因子、前列腺素、自由基和趋化因子，可以招募其他免疫细胞，参与已经过度激活的炎症反应，导致脑细胞进一步损伤[3]。因此，调节炎症相关通路，减少炎症因子的释放，对改善脑损伤具有重要意义。白三烯 B4（leukotriene B4，LTB4）是不饱和脂肪酸通过 5- 脂氧合酶（5-lipoxygenase，5-LOX）途径中重要的下游代谢产物，与细胞膜上的白三烯受体（leukotriene B4 reportor，BLTR）结合。BLTR 即 BLT1 和 BLT2，参与并增强炎症反应[4]。越来越多的证据表明，血浆中 LTB4 水平可以作为急性脑卒中患者临床预后不良的生物标志[5-6]，但 LTB4 在脑损伤中的作用机制尚不明确。

黄芩苷（BC）、栀子苷（GP）是中药黄芩和栀子的主要活性成分。依据中医基础理论“清热解毒”的现代化研究，课题组的前期实验研究发现，BC/GP（最佳配伍比例 7∶3）联合应用可减轻脑缺血大鼠缺血区的炎性损伤和组织水肿[7-8]，可缓解脑缺血损伤后的炎症反应，并通过下调 5-LOX 起到脑保护的作用。有研究指出，抑制 5-LOX 的净效应可能掩盖了 LTB4 的作用，如影响中性粒细胞浸润和细胞因子等作用[9]。为进一步探讨 BC/GP 是否调控 LTB4 发挥抗脑缺血损伤的作用机制，本实验建立脑缺血大鼠再灌注模型，探讨 LTB4 通路在脑缺血再灌注中的作用机制，及 BC/GP 是否可以有效调控 LTB4/BLTR 通路降低脑损伤，为进一步研究缺血性脑卒中的诊断和临床治疗提供依据。

1 材料

1.1 仪器

大鼠 LTB4-ELISA 试剂盒（深圳欣博盛科技有限公司，批号 20160712）；ElX800 酶标仪（Bio-TEK 公司）；miniprotean3cell 电泳仪（Bio-R-AD 公司）；Milli-Q 纯水机（Millipore 公司）；5430R 型冷冻离心机（Eppendorf 公司）。

1.2 试药

黄芩苷、栀子苷（北京索莱宝生物公司，含量≥ 98%，批号：20201007）；白三烯 B4 受体阻断剂 LY255283（abcam，HY-15744）；BLT1 抗体（abcam，ab95492）；BLT2 抗体（abcam，ab115453）；肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）、髓过氧化物酶（MPO）、白介素 -1β（IL-1β）、白三烯 B4（LTB4）ELISA 检测试剂盒（武汉博士德）。

1.3 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 120 只，体质量 180 ～ 220 g[许可证号 SCXK（川）2020-030，成都达硕实验动物有限公司，于陕西中医药大学中药药理实验室饲养]。适应性喂养一周，自由饮食饮水。

2 方法

2.1 药品制备

根据给药剂量不同，称取一定量黄芩苷、栀子苷药物粉末，共同溶剂于适量纯净水中，超声 10 min，至 4 ℃冰箱保存，药液使用前振摇混匀。取 LY255283 粉末 10 mg 溶解于 DMSO 中，定容至 10 mL 备用。

2.2 分组及造模

将 SD 雄性大鼠随机分为 7 组，每组 15 只，分别为假手术组（sham），模型组（model），白三烯 B4 受体抑制剂组（LY255283，1 mg • kg^{-1}），黄芩苷 - 栀子苷 7∶3 配伍组低、高剂量组（BC/GP 组，45 mg • kg^{-1}、60 mg • kg^{-1}）和 BC/GP 联合抑制剂组（BC/GP45 ＋ LY255283、BC/GP60 ＋ LY255283）。适应性喂养一周后，除假手术组外，其余组采用线栓法制备大脑中动脉栓塞（MCAO）模型。大鼠经麻醉后，仰卧位固定于手术板上，颈部去毛，消毒，纵向切开颈部正中皮肤，逐层钝性分离颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉，结扎颈外动脉，在颈总动脉上距离颈内动脉交叉 5 mm 处造口，插入线栓，至有微弱阻力时停止，扎紧线栓以防止滑落，缝合伤口，缺血后 2 h 拔栓，恢复血流供应；假手术组相同处理但不进行结扎、造口和插栓操作。各组术后于（23±2）℃条件下喂养，正常饮食进水。

2.3 给药

大鼠适应性饲养一周后，按照 BC/GP 45 mg•kg^{-1} 和 60 mg•kg^{-1}（1 mL/100 g）灌胃给药，连续 7 d，每日一次。LY255283 组、BC/GP45 ＋ LY255283 组、BC/GP60 ＋ LY255283 组在手术造模前 30 min 腹腔注射 LY255283（1 mg • kg^{-1}），假手术组和模型组注射等体积的生理盐水。

2.4 神经功能评价

大鼠称重后，用 10% 水合氯醛（0.3 mg • kg^{-1}）腹腔注射麻醉，通过改良 Longa 线栓法来建立大脑中动脉局灶性梗死 MCAO 模型（右侧）[10-11]。缺血 2 h 后松开动脉夹再灌注 24 h。神经功能学评分参考 Zea-Longa 5 分制评分标准，所有大鼠均在模型成功后观察大鼠行为。评分标准为 0 分：无神经功能缺陷征；1 分：一侧前肢部分屈曲；2 分：一侧前肢完全屈曲；3 分：向偏瘫侧转圈；4 分：向偏瘫侧倾倒；5 分：不能自发行走，意识丧失。大鼠手术苏醒后，进行 Zea-Longa 评分，评分 1 ～ 4 分则纳入实验。拔出线栓，再灌注 24 h 观察并记录神经功能缺损症状，进行神经严重程度评分（mNSS）[12]。

2.5 大鼠脑组织切片 HE 染色

脑组织 4% 多聚甲醛固定脑组织，梯度浓度乙醇脱水，二甲苯脱醇；浸蜡包埋；切片，厚度 5 μm；再以二甲苯、乙醇脱蜡；苏木素浸泡 20 min，酸水分化；纯净水浸泡 20 min；0.5% 伊红染色 2 min，冲洗；梯度乙醇脱水，树脂封片。在病理显微镜下拍照。

2.6 酶联免疫法检测相关因子在脑组织含量

采用 ELISA 试剂盒检测脑梗死皮层的大鼠脑组织白三烯 A4 水解酶（LTA4H）、LTB4、MPO 和炎性因子的含量。24 h 取材，将脑组织置于液氮后，研磨后取上清液，严格按照试剂盒操作测定。

2.7 Real-time PCR 检测 BLTR 在脑组织中的含量

取匀浆管，加入 1 mL 的 RNA 提取液，置冰上预冷。取 100 mg 组织，加入到匀浆管中。匀浆仪充分研磨直至无可见组织块。样本前处理之后，12 000 r • min^{-1} 离心 10 min 取上清液。加入 250 μL 三氯甲烷，颠倒离心管 15 s，充分混匀，静置 3 min，4 ℃、12 000 r • min^{-1}，离心 10 min，将 400 μL 上清液转移到一新的离心管中。加入 0.8 倍体积的异丙醇，颠倒混匀。－ 20 ℃放置 15 min。4 ℃、12 000 r • min^{-1} 离心 10 min，管底的白色沉淀即为 RNA。溶解 RNA 将离心管置于超净台上吹 3 min，加入 15 μL 无 RNA 酶的水溶解 RNA，55 ℃ 孵育 5 min。检测 RNA 浓度。进行反转录，反应体系：5×Reaction Buffer 4 μL、dT 引物（100 μmol • L^{-1}）0.5 μL、dNTP 混合物（100 μmol • L^{-1}）0.5 μL、反转录酶 1 μL、总 RNA 10 μL、DEPC 处理水添加 20 μL。取 0.2 mL PCR 管，

配制如下反应体系：2×qPCR Mix、7.5 μL 2.5 μmol • L^{-1} 基因引物 1.5 μL、反转录产物 2.0 μL、ddH_2O 4.0 μL，每个反转录产物配制 3 管。定量 PCR 扩增反应条件：95 ℃预变性 10 min，95 ℃、15 s，60 ℃、30 s，熔解曲线 60 ～ 95 ℃，每升温 0.5 ℃采集一次荧光信号（循环 40 次）。以 GAPDH 为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1　引物序列

Tab 1　Primer sequence

基因名称	F（5'→3'）	R（5'→3'）
LTA4H	GGAGAAAGCCAGGGTTACAAAG	TGCTTTCCTGAAGTCTGCTCG
BLT1	TTTCCTACACTTTCTGGCTCGG	TTCTTGGGTGTTACTGTGCGGT
BLT2	GAGACCCTGACTGCCTTCGT	CGCCTGTAGGAGATTGACCG
GAPDH	CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT

2.8　统计分析

所有统计分析均使用 Graphpad Prism 5 软件进行。实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。同一时间点的比较采用独立样本 t 检验。多组之间比较采用单因素方差分析，两组间资料比较采用 LSD 检验。$P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　BC/GP 对脑缺血大鼠再灌注神经功能损伤的影响

如图 1 所示，与假手术组比，手术造模后大鼠神经功能损伤严重，麻醉苏醒后出现在水平地面上向轻瘫侧倾倒行为，再灌注 24 h 后向轻瘫侧转圈，提尾表现为前肢屈曲，头部在 30 s 内偏离垂直轴＞ 10° 或出现癫痫、肌阵挛、肌张力障碍等行为，平衡木测试中出现试图在平衡木上平衡但跌落（＞ 20 s）的现象。与模型组相比，LY255283 组神经功能评分无明显差异。BC/GP 组大鼠行为表现相似，各项评分较模型组差异有统计学意义（$P < 0.01$），BC/GP 联合抑制剂组的神经损伤显著降低（$P < 0.01$，$P < 0.001$）。假手术组无神经功能障碍的表现。结果表明 BC/GP 可以降低神经功能损伤。

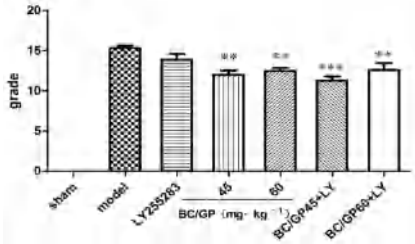


图 1　各组脑缺血再灌注大鼠神经功能评分结果（$n = 15$）

Fig 1　Neurological function score of rats with cerebral ischemia-reperfusion in each group（$n = 15$）

注（Note）：与模型组相比，$^{**}P < 0.05$，$^{***}P < 0.01$（Compared with the model group，$^{**}P < 0.05$，$^{***}P < 0.01$）

3.2　BC/GP 调控 LTB4 通路对大鼠脑组织病理形态的影响

HE 染色结果显示，与假手术组相比，脑缺血再灌注后脑组织大范围损伤，损伤处组织肿胀变大，着色明显变淡；皮层和纹状体区神经元大量坏死，神经元数量减少，多见胞核固缩或消失，可见散在的炎性细胞浸润；神经纤维结构松散，纹状体神经纤维团结构模糊等现象。部分神经元胞体和胞核肿胀，核质疏松，神经纤维水肿，结构松散，纤维团破裂，有的结构模糊不清；局部纹状体下方明显坏死，结构疏松；纹状体神经纤维团结构模糊，有的甚至液化，结构疏松。与模型组相比，LY255283 组病理形态得到改善，BC/GP 组纹状体结构松散减轻，神经坏死现象明显改善。BC/GP 联合抑制剂组的神经坏死现象也有改善。假手术组的脑组织各结构清晰，着色均匀，未见明显梗死灶。结果表明抑制 LTB4 受体的表达改善病理形态的效果并不明显，BC/GP 可以有效改善脑组织病理形态（见图 2）。

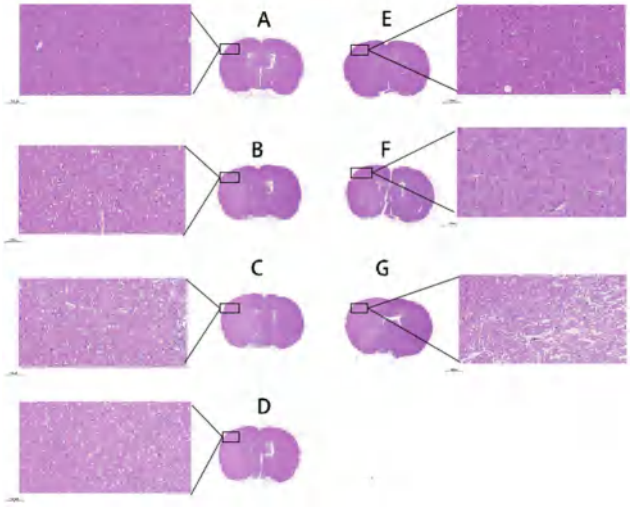


图 2　各组大鼠缺血侧脑组织皮质部分形态学观察（HE，×20）

Fig 2　Morphological of cerebral cortex on ischemic side of rats in each group（HE，×20）

A. 假手术组（sham group）；B. 模型组（model group）；C. LY255283 组（LY255283 group）；D ～ E. 黄芩苷 - 栀子苷（7∶3）配伍低、高剂量组（BC/GP 45 mg • kg^{-1}、BC/GP 60 mg • kg^{-1}）；F ～ G. 黄芩苷 - 栀子苷低、高剂量组联合 LY255283（BC/GP45 ＋ LY255283、BC/GP60 ＋ LY255283）

3.3 BC/GP 对脑缺血大鼠再灌注后脑组织中 LTA4H、LTB4 和血清中 LTB4 的影响

与假手术组相比，脑缺血再灌注后脑组织中 LTA4H、LTB4 和血清中 LTB4 的表达显著增加（$P < 0.01$）；与模型组相比，LY255283 组 LTA4H 和 LTB4 的表达显著降低（$P < 0.05$，$P < 0.01$），BC/GP 组 LTB4 和 LTA4H 的表达显著降低（$P < 0.01$）。并且 BC/GP（60 mg•kg^{-1}组）可以降低血清中 LTB4 的表达（$P < 0.05$)。结果表明，BC/GP 配伍可以显著降低 LTB4 的表达，提示 BC/GP 可能可以通过抑制 LTB4 在脑缺血后发挥作用（见图 3）。

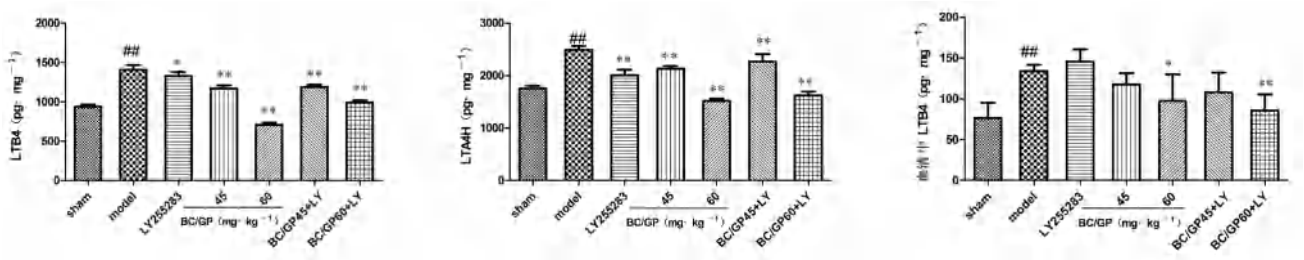


图 3　脑缺血再灌注后 LTB4 的测定结果（$n = 3$）

Fig 3　LTB4 and MPO after the cerebral ischemia-reperfusion（$n = 3$）

注（Note）：与假手术组相比，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$（Compared with the sham group，$^{\#\#}P < 0.01$；compared with the model group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）。

3.4 BC/GP 对脑缺血大鼠再灌注后脑组织中 MPO 的影响

MPO 是中性粒细胞的阳性标记物。如图 4 所示，与假手术组相比，脑缺血再灌注后脑组织中 MPO 的表达显著增加（$P < 0.01$）；与模型组相比，LY255283 组的 MPO 表达显著降低（$P < 0.01$），给予 BC/GP 显著降低 MPO 的表达（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。结果表明，BC/GP 可以降低脑损伤后 MPO 的表达和中性粒细胞浸润。

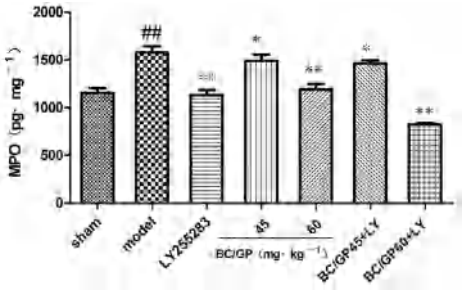


图 4　脑缺血再灌注后 MPO 的测定结果（$n = 3$）

Fig 4　Expression of MPO after the cerebral ischemia-reperfusion（$n = 3$）

注（Note）：与假手术组相比，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$（Compared with the sham group，$^{\#\#}P < 0.01$；compared with the model group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$）。

3.5 BC/GP 对脑缺血大鼠再灌注后脑组织中 BLT1 和 BLT2 mRNA 的影响

RCR 结果显示，与假手术组相比，脑缺血再灌注后 BLT1 和 BLT2 的 mRNA 显著升高（$P < 0.01$）；与模型组相比，LY255283 显著抑制 BLT1 和 BLT2 mRNA 的表达（$P < 0.01$），BC/GP 显著降低 BLT1 和 BLT2 mRNA 的表达（$P < 0.01$），BC/GP 联合 LY255283 显著抑制 BLT1 用和 BLT2 mRNA 的表达（$P < 0.01$）。结果表明 BC/GP 可以抑制 LTB4 与 BLT1 和 BLT2 受体结合而发挥作用（见图 5）。

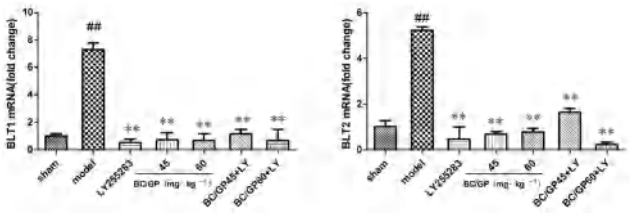


图 5　各组 BLT1 和 BLT2 mRNA 的测定结果（$n = 3$）

Fig 5　BLT1 and BLT2 mRNA in each group（$n = 3$）

注（Note）：与假手术组相比，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组相比，$^{**}P < 0.01$（Compared with the sham group，$^{\#\#}P < 0.01$；compared with the model group，$^{**}P < 0.01$）。

3.6 BC/GP 调控 LTB4 通路对脑缺血大鼠再灌注后脑组织中炎性因子的影响

如图 6 所示，与假手术组相比，脑缺血大鼠再灌注 24 h 后大鼠脑组织中促炎因子 TNF-α 和炎性因子 IL-1β 表达显著增加（$P < 0.01$）；与模型组相比，LY255283 组 TNF-α 的表达显著降低（$P < 0.01$）。给予 BC/GP 以及 BC/GP 联合 LY255283 可以显著降低 TNF-α 和 IL-1β 表达（$P < 0.01$）。结果表明，抑制 LTB4/BLTR 表达来影响炎性因子的释放，下调 LTB4 通路的表达会降低脑缺血后炎性因子的表达。BC/GP（7∶3）配伍可以降低炎性因子和改善脑损伤，其抗炎作用可能与下调 LTB4/BLTR 通路有关。

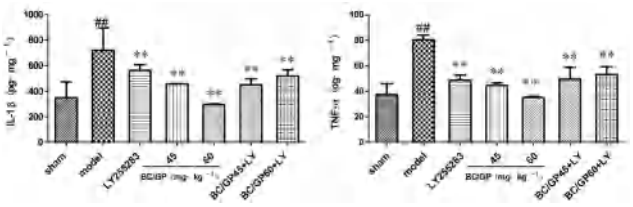


图 6 各组炎性因子 TNF-α 和 IL-1β 的测定结果（n = 3）

Fig 6 TNF-α and IL-1β inflammatory factor in each group（n = 3）

注（Note）：与假手术组相比，$^{\#\#}P$ < 0.01；与模型组相比，$^{**}P$ < 0.01（Compared with the sham group，$^{\#\#}P$ < 0.01；compared with the model group，$^{**}P$ < 0.01）。

4 讨论

脑缺血后缺血损伤区存在多种细胞因子表达、炎性细胞浸润和氧自由基反应，可加速缺血后细胞损伤 [13]。缺血再灌注损伤是缺血性脑卒中进展过程中最重要的部分，能量代谢异常，离子代谢紊乱、自由基损伤、炎症反应等都参与了缺血再灌注损伤的复杂病理机制 [14]。炎症反应在脑缺血损伤发生后被激活，导致神经细胞凋亡、死亡和组织损伤 [15]。LTB4 主要在巨噬细胞、中性粒细胞和肥大细胞中表达，与细胞表面 G 蛋白偶联受体结合 [16]，即 LTB4 的受体（BLTR），产生多种细胞内信号。LTB4 能激活粒细胞，生成超氧阴离子，对白细胞具有强效的活化作用，刺激白细胞趋化、聚集、释放氧自由基和溶酶体酶，使血管通透性增加，血管壁收缩 [17-18]，这些生理特性被认为加重了缺血引起的细胞损伤。近年来不断有研究发现，在大鼠脑缺血中心区中，神经元和小胶质细胞 BLT4 合成增加 [19-20]。在脑缺血模型前颈动脉注射 LTB4 可增加梗死组织的体积，皮瓣抑制剂 BAY-X1005 和 BLT 拮抗剂 LY255283 可减少梗死体积 [21]。上述结果证明 LTB4 在脑缺血中的产生是有害的，可使组织梗死程度恶化。本研究检测了 LTB4 在急性大鼠脑卒中模型中的水平及其机制，结果证实了在脑缺血再灌注损伤后 LTB4 表达显著增加。

目前已知 BLTR 有两种亚型，即 BLT1 和 BLT2。LTB4 通过 BLT1 引起炎症趋化因子和细胞因子的释放，BLT1 参与了许多炎症性疾病，如中性粒细胞在病变部位积聚。有报道称，BLT2 激活导致活性氧（ROS）升高，随后激活 NF-κB。LY255283 是一种非选择性拮抗剂，可同时抑制 BLT1（非竞争性）和 BLT2（竞争性）介导的 Ca^{+} 动员 [22-23]。因此，所观察到的 LY255283 的保护作用可能涉及其中一种或两种亚型。有研究表明，5-LOX 炎症途径在许多疾病中均被激活，引起炎症反应 [24]，BLT1 和 BLT2 是主要的促炎介质。5-LOX 的抑制剂也具有脑保护作用，BLT1 拮抗作用在于不干扰除 LTB4 外的脂质代谢物，相比于 5-LOX 可作为更有优势的治疗靶点 [25]，因此，抗炎和神经保护作用的净效应应该比在 5-LOX 抑制的情况下更为显著。并且与 BLTR 拮抗剂相比，5-LOX 抑制剂选择性较低，消耗多种产物，其中包括对缺血损伤有益的产物 [26]（如脂素 A4 是 5-LOX 的抗炎产物，可以抑制白三烯合成，对脑缺血具有神经保护作用 [27]），因此，BLTR 拮抗剂应该是比 5-LOX 抑制剂更好的选择。

当缺血性脑损伤发生时，激活免疫反应，进而诱发一系列级联反应如炎症反应中 TNF-α 和 IL-1β 等的表达，加剧脑损伤 [28]。中性粒细胞浸润被认为是缺血再灌注损伤主要的潜在的机制之一 [29]。MPO 是中性粒细胞的阳性标记物，本实验结果表明，在急性脑缺血脑损伤中，LTB4、MPO 和炎性因子的表达显著增加，LY255283 可降低脑损伤组织中 IL-1β 和 TNF-α 表达，表明其可阻断 LTB4 通路有效抑制炎性因子的产生，从而减轻炎性损伤。LY255283 还可降低 MPO 的表达和中性粒细胞浸润，改善脑缺血再灌注的损伤。脑损伤后 LTB4 表达显著增加，LTA4H 是合成 LTB4 的关键酶。BC/GP 可以显著抑制 LTA4H/LTB4/BLTR 的表达，减轻神经功能缺陷，降低白细胞浸润，改善脑组织的病理形态变化。BC/GP 可以减轻神经功能损伤，显著降低急性脑缺血时期的炎性因子表达，降低中性粒细胞浸润。说明 BC/GP 可以通过抑制 LTB4 通路起到脑保护的作用。此外，实验结果发现 BC/GP（7∶3）配伍联合 LY255283 对 LTB4/BLTR 通路的抑制作用显著增强，推测 BC/GP 可能通过多种途径抑制了 LTB4/BLTR 通路。

综合以上结果，BLTR 抑制剂可以起到抗炎和神经保护的作用，BC/GP 可以通过下调 LTB4/BLTR 通路在脑缺血再灌注损伤中起到脑保护作用。后续将建立体外细胞模型研究 LTB4/BLTR 在脑缺血再灌注损伤中的作用机制，并且进一步阐述黄芩苷 - 栀子苷配伍对脑缺血损伤的保护作用机制。

参考文献

[1] Marisol GR，Rojas-Mayorquín AE，Daniel OS. Nitric oxide donors as neuroprotective agents after an ischemic stroke-related inflammatory reaction [J]. Oxid Med Cell

Longev，2013，2013：297357.
[2] Shi K，Tian DC，Li ZG，et al. Global brain inflammation in stroke [J]. Lancet Neurol，2019，18（11）：1058-1066.
[3] Planas AM. Role of immune cells migrating to the ischemic brain [J]. Stroke，2018，49（9）：2261-2267.
[4] 李慧敏，向净匀，吴杰，等 . 白三烯 B4/ 白三烯 B4 受体通路在脑缺血损伤发生机制中的研究进展 [J]. 中国医药导报，2020，17（31）：50-53.
[5] 马红岗，潘琴妹，朱斐斐，等 . 白三烯 B4 与脑动脉硬化所致进展性缺血性脑卒中的相关性分析 [J]. 全科医学临床与教育，2017，15（2）：153-155.
[6] 马红岗，潘琴妹，朱斐斐，等 . 白三烯 B4、颈动脉斑块性质与进展性缺血性脑卒中相关性 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2017，22（6）：689-693.
[7] 刘寒，张欢欢，康亚国，等 . 黄芩苷、栀子苷配伍对脑缺血大鼠恢复期炎症因子的影响 [J]. 陕西中医药大学学报，2018，41（3）：75-81.
[8] 刘寒，张欢欢，康亚国，等 . 黄芩苷与栀子苷组合物对脑缺血损伤大鼠 5-LOX/CysLTs/CysLT 通路的影响 [J]. 中成药，2018，40（5）：1020-1025.
[9] Hijioka M，Anan J，Ishibashi H，et al. Inhibition of leukotriene B4 Action mitigates intracerebral hemorrhage-associated pathological events in mice [J]. Pharmacol Exp Ther，2017，360（3）：399-408.
[10] Longa EZ，Weinstein PR，Carlson S，et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke，1989，20（1）：84-91.
[11] 陈晓娟，肖宗宇，潘琪，等 . 改良线栓法大鼠脑缺血再灌注损伤模型的建立 [J]. 中国医学创新，2015，12（3）：24-27.
[12] Wang S，Jun J，Cong L，et al. Mir-328-3p，a predictor of stroke，aggravates the cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Int J Gen Med，2021，14：2367-2376.
[13] Wang Y，Fan R，Luo J，et al. An ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of rhein in patients with traumatic brain injury after administration of rhubarb decoction [J]. J Sep Sci，2015，38（7）：1100-1108.
[14] Yue H，Yaodong D，Yanchao W，et al. AMPK inhibitor BML-275 induces neuroprotection through decreasing cyt c and AIF expression after transient brain ischemia [J]. Bioorgan Med Vhem，2021，52：116522.
[15] Jayaraj RL，Azimullah S，Beiram R，et al. Neuroinflammation：friend and foe for ischemic stroke [J]. J Neuroinflamm，2019，16（1）：142.
[16] Brain SD，Williams TJ. Leukotrienes and inflammation [J]. Pharmacol Ther，1990，46（1）：57-66.
[17] Rosenblum WI. Constricting effect of leukotrienes on cerebral arterioles of mice [J]. Stroke，1985，16（2）：262-263.
[18] Woodward DF，Weichman BM，Gill CA，et al. The effect of synthetic leukotrienes on tracheal microvascular permeability [J]. Prostaglandins，1983，25（1）：131-142.
[19] Radmark OP. The molecular biology and regulation of 5-lipoxygenase [J]. Am J Respir Crit Care Med，2000，161（2 Pt 2）：S11-S15.
[20] 陈文健，李成檀，赵建波，等 . 5- 脂氧酶在全脑缺血海马 CA1 神经元损伤中的作用 [J]. 浙江大学学报（医学版），2013，42（1）：61-66.
[21] Yagami T，Yamamoto Y，Kohma H. Leukotriene receptor antagonists，LY293111 and ONO-1078，protect neurons from the sPLA2-IB-induced neuronal cell death independently of blocking their receptors [J]. Neurochem Int，2013，63（3）：163-171.
[22] Yokomizo T，Kato K，Hagiya H，et al. Hydroxyeicosanoids bind to and activate the low affinity leukotriene B4 receptor，BLT2 [J]. J Biol Chem，2001，276（15）：12454-12459.
[23] Matsunaga Y，Fukuyama S，Okuno T，et al. Leukotriene B4 receptor BLT2 negatively regulates allergic airway eosinophilia [J]. FASEB J，2013，227（8）：3306-3314.
[24] Rubin P，Mollison KW. Pharmacotherapy of diseases mediated by 5-lipoxygenase pathway eicosanoids [J]. Prostag Oth Lipid M，2007，83（3）：188-197.
[25] Hijioka M，Anan J，Ishibashi H，et al. Inhibition of leukotriene B4 action mitigates intracerebral hemorrhage-associated pathological events in mice [J]. J Pharmacol Exp Ther，2017，360（3）：399-408.
[26] Chan SJ，Ng M，Zhao H，et al. Early and sustained increases in leukotriene B4 levels are associated with poor clinical outcome in ischemic stroke patients [J]. Neurotherapeutics，2020，17（1）：282-293.
[27] Wu L，Miao S，Zou LB，et al. Lipoxin A4 inhibits 5-lipoxygenase translocation and leukotrienes biosynthesis to exert a neuroprotective effect in cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. J Mol Neurosci，2012，48（1）：185-200.
[28] 张莉，杜冠华 . 细胞因子在脑缺血损伤机制中的作用 [J]. 国外医学脑血管疾病分册，2004，12（5）：379-382.
[29] 李富强 . 脑缺血后处理对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响 [D]. 郑州：郑州大学，2012.

（收稿日期：2022-01-05；修回日期：2022-03-02）

多花黄精须根营养成分及抗氧化活性研究

高海燕[1, 2]，余欢迎[1, 2]，金传山[1, 2*]，许凤清[1, 2]，刘军玲[1, 3]，柳春风[4]，李雷[5]（1. 安徽中医药大学药学院，合肥 230012；2. 中药饮片制造新技术安徽省重点实验室，合肥 230012；3. 安徽省食品药品检验研究院，合肥 230051；4. 金寨润元生物科技有限公司，安徽 六安 237300；5. 金寨森沣农业科技开发有限公司，安徽 六安 237000）

摘要：目的 研究多花黄精须根中多糖、浸出物和氨基酸含量及体外抗氧化活性，为其资源再利用提供参考。**方法** 按照 2020 年版《中国药典》方法测定浸出物、多糖含量，使用全自动氨基酸分析仪测定氨基酸含量，以 50% 乙醇为溶剂进行提取，依次用乙酸乙酯、正丁醇进行萃取，采用 DPPH 自由基、$ABTS^+$ 自由基清除率来评价不同极性部位的抗氧化能力。**结果** 多花黄精须根的浸出物含量为 42.48% ～ 55.76%，多糖含量为 7.12% ～ 9.36%，氨基酸总量为 6.09% ～ 10.43%，不同极性部位均有较强的清除自由基能力，并且呈量效关系，其中乙酸乙酯相清除 DPPH 自由基和 $ABTS^+$ 自由基的能力最强。**结论** 多花黄精须根中多糖含量高，氨基酸种类多且含量丰富，不同极性部位均有抗氧化活性，值得进一步开发利用。

关键词： 多花黄精；须根；抗氧化；氨基酸

中图分类号： R284，R285 **文献标识码：** A **文章编号：** 1672-2981(2022)06-1262-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.008

Nutrient compositions and antioxidant activity of fibrous root of *Polygonatum cyrtonema* Hua

GAO Hai-yan[1, 2], YU Huan-ying[1, 2], JIN Chuan-shan[1, 2*], XU Feng-qing[1, 2], LIU Jun-ling[1, 3], LIU Chun-feng[4], LI Lei[5] (1. *College of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *Anhui Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces of New Manufacturing Technology*, *Hefei* 230012; 3. *Anhui Institute for Food and Drug Control*, *Hefei* 230051; 4. *Jinzhai Runyuan Biological Technology Co.*, *Ltd.*, *Lu'an Anhui* 237300; 5. *Jinzhai Senfeng Agricultural Technology Development Co.*, *Ltd.*, *Lu'an Anhui* 237000)

Abstract: Objective To determine the polysaccharide, extract, and amino acid content and in vitro antioxidant activity in the fibrous roots of *Polygonatum cyrtonema* Hua, and to provide a theoretical basis for its reuse. **Methods** The content of the extract and polysaccharides was determined according to the Chinese Pharmacopoeia 2020 edition, and the amino acid content was determined by a fully automatic amino acid analyzer. The extraction was conducted out with 50% ethanol as the solvent, and followed by ethyl acetate and *n*-butanol. The antioxidant capacity of different polar parts was evaluated by the scavenging rate of DPPH radicals and $ABTS^+$ cation radicals. **Results** The extract from the fibrous roots of *Polygonatum cyrtonema* Hua ranged from 42.48% to 55.76%, the polysaccharide contents ranged from 7.12% to 9.36%, and the total amino acids ranged from 6.09% to 10.43%. Different polar parts had strong radical scavenging ability and showed a quantity-effect relationship, ethyl acetate phase had the strongest ability to scavenge DPPH radicals and $ABTS^+$ radicals. **Conclusion** The high polysaccharide content and rich amino acid content of the fibrous roots of *Polygonatum Cyrtonema* Hua are worthy of development because of their antioxidant activity of different polar parts.

Key words: *Polygonatum cyrtonema* Hua; fibrous root; antioxidant activity; amino acid

基金项目： 国家重点研发计划资助项目（No.2018YFC1707200）；安徽省高等学校自然科学研究项目（No.KJ2020A0421）；六安市产学研合作重大专项（No. 六科 [2019]19）。

作者简介： 高海燕，女，硕士，主要从事中药炮制与中药饮片质量研究，email：1792985116@qq.com **通信作者：** 金传山，男，教授，硕士研究生导师，主要从事中药炮制与中药饮片质量研究，email：jcs4@sohu.com

《中国药典》2020 年版规定黄精为百合科黄精属黄精（*Polygonatum sibiricum*）、滇黄精（*Polygonatum kingianum*）和多花黄精（*Polygonatum cyrtonema*）的干燥根茎，味甘、性平，归脾、肺、肾经，具有补气养阴、健脾、润肺、益肾的功效，用于脾胃气虚、体倦乏力、肺虚燥咳、精血不足、须发早白等[1]。研究表明，黄精的主要化学成分为甾体皂苷类、多糖类、黄酮类、生物碱、木脂素以及多种对人体有用的氨基酸等化合物[2]，药理作用包括抗肿瘤、抗氧化、抗衰老、抗疲劳等[3]。其中氨基酸是黄精补益强壮作用和增强免疫功能的物质基础之一[4]，可作为疾病防治过程中减轻药物毒副作用的补充替代品。目前，多花黄精以根茎入药，其研究也集中于根茎的炮制加工、活性成分提取及药理药效等方面，而须根在采收产地加工过程中常作为杂质除去。据统计，多花黄精须根约占根茎总重量的 10%，有研究表明黄精须根和根茎中的成分基本相同，含多糖、氨基酸、微量元素等[5-10]，所以有望作为新资源进行开发和利用。王天梅等[11]测定多花黄精根、茎、叶、花和嫩芽 5 个部位提取液的 DPPH 自由基、羟基自由基以及亚硝酸盐的清除率，结果表明，提取物的抗氧化能力为叶＞嫩芽＞花＞根。周东月等[12]采用水提醇沉法提取黄精中的多糖类化合物，并探讨黄精多糖的抗氧化活性，结果表明，黄精多糖具有较好的还原能力以及清除 DPPH 自由基、超氧阴离子自由基、羟基自由基的能力。本实验以多花黄精须根为研究对象，测定其浸出物、多糖和氨基酸含量，且采用同一提取方式对多花黄精须根的醇溶性成分进行提取，对其不同极性部位的体外抗氧化活性进行测定分析，为合理利用须根资源提供了理论依据。

1 材料

L-8800 全自动氨基酸分析仪（日本日立公司）；FD240 电热恒温干燥箱（德国 Binder 公司）；UV-2700 紫外可见分光光度计（日本岛津公司）；Multiskan spectrum 全波长酶标仪（美国赛默飞世尔科技有限公司）；ML204 万分之一分析天平（瑞士 Mettle-Toledo 公司）；XMTE-205 数显恒温水浴锅（常州国宇仪器制造有限公司）；Simplicity-185 超纯水仪（美国默克密理博公司）。

多花黄精由安徽金寨润元生物科技有限公司提供，9 批分别采集于金寨县乡村：张冲乡（XG1）、油坊店乡（XG2）、花石乡大湾村（XG3）、花石乡花石村（XG4）、长岭乡（XG5）、槐树湾乡（XG6）、桃岭乡桃岭村（XG7）、桃岭乡牌坊村（XG8）、沙河乡（XG9），由安徽中医药大学药学院刘守金教授鉴定为百合科植物多花黄精的带须根茎，除去泥土，洗净，蒸至透心，干燥，收集黄精根茎以及须根。氨基酸混合标准溶液（日本日立公司），DPPH、ABTS 和抗坏血酸（阿拉丁试剂有限公司）；*D*- 无水葡萄糖（纯度：98%，上海源叶生物科技有限公司）；水为超纯水，其他试剂为分析纯。

2 方法

2.1 浸出物含量测定

按照 2020 年版《中国药典》中醇溶性浸出物法（通则 2201）项下的热浸法测定，重复实验 3 次，取平均值。

2.2 多糖含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 取 *D*- 无水葡萄糖对照品适量，置 100 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀，即得每 1 mL 中含无水葡萄糖 0.3316 mg 的对照品溶液。

2.2.2 标准曲线的绘制 精密量取对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL，分别置于 10 mL 具塞刻度试管中，各加水至 2.0 mL，摇匀，在冰浴中缓慢滴加 0.2% 蒽酮 - 硫酸溶液至刻度，混匀，放冷后置水浴中保温 10 min，取出，立即置冰水浴中冷却 10 min，取出，以相应试剂为空白。照紫外 - 可见分光度法（通则 0401），在 582 nm 波长处测定吸光度。以吸光度为纵坐标，质量浓度为横坐标，绘制标准曲线，$Y = 3.360X + 0.2165$，$R^2 = 0.9994$，线性范围为 0.0332 ～ 0.1990 mg • mL^{-1}。

2.3 氨基酸含量测定

2.3.1 对照品溶液的制备 分别精密移取 17 种氨基酸对照品适量，用 0.02 mol • L^{-1} 盐酸溶解至一定浓度（胱氨酸为 1.25 μmol • mL^{-1}，其他氨基酸均为 2.50 μmol • mL^{-1}）作为母液备用。取适量母液，按一定梯度比例稀释，采用自动在线衍生化方法进行衍生化检测。

2.3.2 供试品溶液的制备 取须根样品粉末 0.1 g，精密称定，置 10 mL 顶空瓶中，精密加入浓盐酸和水各 2 mL，封口，将顶空瓶放入 150 ℃恒温干燥箱中，水解 1 h，冷却，移入蒸发皿中，蒸干，残渣加 0.02 mol • L^{-1} 盐酸溶液定容至 50 mL 量瓶中，摇匀，过 0.22 μm 水相微孔滤膜，即得。

2.3.3 氨基酸自动分析仪分析条件 色谱柱：INCH 离子交换柱（4.6 mm×60 mm）；柱温 57 ℃；衍生反应器温度 135 ℃；检测波长：脯氨酸 440 nm，其他氨基酸 570 nm；进样量 20 μL；

缓冲液流速 0.400 mL·min^{-1}；缓冲液泵压 0 ～ 30 MPa；茚三酮流速 0.350 mL·min^{-1}；茚三酮泵压 0 ～ 3.5 MPa；缓冲液改变次数 6 次；分析时间 53 min，取混合氨基酸对照品溶液和样品溶液各 20 μL 注入氨基酸自动分析仪，记录各氨基酸的峰面积，按照外标法计算含量。

2.4 体外抗氧化活性

2.4.1 样品的制备 醇提物制备：参照文献[13]并稍作改动。称取须根粉末 200 g，加 10 倍量 50% 乙醇水浸泡 1 h 后，加热回流提取 3 次，每次 2 h，过滤，滤液减压浓缩至干，冷冻干燥。不同极性萃取部位的制备：取醇提物，加入 100 mL 温水溶解，依次用等体积的乙酸乙酯、正丁醇溶液分别萃取 3 次，减压回收溶剂，得到各萃取部位，称重。分别精密称取须根的乙酸乙酯萃取部位、正丁醇萃取部位、剩余水部位以及醇提物，加蒸馏水溶解，制得 1.0 mg·mL^{-1} 的样品溶液；将阳性对照品维生素 C 配制成 1.0 mg·mL^{-1} 的溶液，避光冷藏。依次将样品和维生素 C 对照品稀释成 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg·mL^{-1} 6 个质量浓度。

2.4.2 DPPH 自由基清除率测定 参照文献[14-15]的方法，并作适当改动。取不同浓度的样品溶液 1.0 mL 与 2.0 mL 0.2 mmol·L^{-1} 的 DPPH 溶液混合，充分振荡，室温暗处反应 30 min，在 517 nm 波长下测定吸光度，记为 A_1，平行重复 3 次。以蒸馏水代替样品作为空白对照（A_0），以蒸馏水代替反应液记为 A_2，以维生素 C 作为阳性对照，计算公式（1）如下：

$$清除率(\%)=[1-(A_1-A_2)/A_0]\times 100\% \quad (1)$$

2.4.3 ABTS$^+$ 自由基清除能力的测定[13] 将 7 mmol·L^{-1} ABTS 溶液与 2.45 mmol·L^{-1} 过硫酸铵混合避光氧化 12 h，用 PBS 稀释 ABTS 混合液，在 734 nm 波长下测定吸光度值为（0.80±0.02）。取不同部位的样品溶液及维生素 C 对照品 1 mL 与 2 mL ABTS 混合液混合，室温放置 6 min，在 734 nm 波长下测吸光度值，重复 3 次。按公式（1）计算清除率。

2.5 统计学处理方法

实验数据采用 GraphPad Prism 9.0 绘图和 SPSS 25.0 软件进行处理，均为 3 次重复测定结果的平均值。

3 结果与分析

3.1 多花黄精须根成分含量

多花黄精须根的浸出物、多糖含量见表 1。须根浸出物含量在 42.48% ～ 55.76%，平均值为 49.26%，约为文献[16]报道中黄精浸出物的 66.7%。黄精药用价值和营养保健主要集中在多糖含量上，而须根的多糖含量为 7.12% ～ 9.36%，与文献报道[17]的黄精多糖含量相近。

表 1 多花黄精须根含量分析结果 (%)

Tab 1 Content of fibrous root of *Polygonatum cyrtonema* Hua (%)

样品	浸出物	多糖
XG1	45.06	9.36
XG2	42.48	8.43
XG3	45.46	7.12
XG4	55.76	8.16
XG5	49.35	8.42
XG6	52.19	8.63
XG7	54.08	8.67
XG8	49.85	8.90
XG9	49.08	8.34
均值	49.26	8.45

3.2 氨基酸组成分析

从多花黄精须根中鉴定出 17 种氨基酸成分，结果见表 2。须根氨基酸总量（TAA）为 6.09% ～ 10.43%，平均值为 8.08%。其中，谷氨酸含量最高，为 1.49% ～ 2.44%，平均含量为 1.86%；其次为精氨酸、门冬氨酸，平均含量分别为 1.04%、0.80%。

相对于植物，人类和动物均需要通过食物蛋白来摄取某些氨基酸，这些人体中无法合成的氨基酸称为必需氨基酸（EAA）[18]，多花黄精须根中检测出 EAA 7 个，非必需氨基酸（NAA）10 个。须根 EAA 质量分数在 1.15% ～ 2.59%，平均值为 1.82%，其中 XG9 中 EAA 质量分数最小，XG1 质量分数最高。根据世界卫生组织 / 联合国粮农组织（WHO/FAO）颁布的理想蛋白质必需氨基酸模式谱[19]，EAA/TAA 的标准比值为 40%，须根中 EAA/TAA 的比值范围为 18.85% ～ 25.52%，与 WHO/FAO 氨基酸标准值 40% 有一定差距。

3.3 自由基清除能力

3.3.1 DPPH 自由基的清除能力 结果显示多花黄精须根各极性萃取部位能良好地清除 DPPH 自由基，且存在量效关系。须根各极性萃取相清除能力由大到小依次为乙酸乙酯相＞醇提物＞水相＞正丁醇相（见表 3 及图 1）。

3.3.2 ABTS$^+$ 自由基的清除能力 结果显示，须根各极性萃取相清除能力由大到小依次为乙酸乙酯相＞水相＞醇提物＞正丁醇相。在质量浓度为 1.0 mg·mL^{-1} 时，不同极性萃取部位中乙酸乙酯相清除能力最强，清除率达到 97.86%，其 IC_{50} 值为 0.59 mg·mL^{-1}（见表 3 及图 2）。

表 2　多花黄精须根中氨基酸组成和含量 (%)

Tab 2　Amino acid in fibrous root of *Polygonatum cyrtonema* Hua (%)

产地	种类																				
	门冬氨酸 (Asp)	苏氨酸* (Thr)	丝氨酸 (Ser)	谷氨酸 (Glu)	甘氨酸 (Gly)	丙氨酸 (Ala)	胱氨酸 (Cys)	缬氨酸* (Val)	甲硫氨酸* (Met)	异亮氨酸* (Ile)	亮氨酸* (Leu)	酪氨酸 (Tyr)	苯丙氨酸* (Phe)	赖氨酸* (Lys)	组氨酸 (His)	精氨酸 (Arg)	脯氨酸 (Pro)	TAA	EAA	NAA	EAA/TAA
XG1	0.92	0.34	0.55	2.11	0.39	0.52	1.02	0.40	0.08	0.29	0.55	0.33	0.32	0.61	0.24	1.23	0.52	10.43	2.59	7.83	24.86
XG2	1.01	0.36	0.59	2.10	0.40	0.53	0.65	0.39	0.08	0.28	0.55	0.34	0.32	0.59	0.24	1.10	0.54	10.07	2.57	7.50	25.52
XG3	0.91	0.31	0.49	1.79	0.34	0.46	0.57	0.24	0.08	0.15	0.4	0.25	0.29	0.45	0.19	1.01	0.45	8.38	1.92	6.46	22.91
XG4	0.94	0.34	0.55	2.44	0.33	0.46	0.64	0.29	0.07	0.20	0.44	0.29	0.27	0.50	0.20	1.36	0.44	9.76	2.11	7.65	21.62
XG5	0.82	0.36	0.44	1.98	0.29	0.42	0.56	0.21	0.05	0.12	0.34	0.25	0.28	0.36	0.15	1.11	0.36	8.10	1.72	6.38	21.23
XG6	0.70	0.44	0.35	1.82	0.26	0.37	0.44	0.16	0.04	0.08	0.24	0.20	0.29	0.27	0.12	0.98	0.24	7.00	1.52	5.48	21.71
XG7	0.64	0.31	0.30	1.49	0.25	0.34	0.52	0.15	0.04	0.08	0.24	0.19	0.28	0.26	0.11	0.93	0.25	6.38	1.36	5.02	21.32
XG8	0.68	0.33	0.32	1.50	0.26	0.37	0.47	0.16	0.04	0.08	0.25	0.23	0.30	0.27	0.11	0.88	0.27	6.52	1.43	5.09	21.93
XG9	0.60	0.12	0.29	1.55	0.25	0.36	0.62	0.16	0.04	0.08	0.23	0.17	0.27	0.25	0.09	0.78	0.24	6.09	1.15	4.95	18.85
均值	0.80	0.32	0.43	1.86	0.31	0.43	0.61	0.24	0.06	0.15	0.36	0.25	0.29	0.40	0.16	1.04	0.37	8.08	1.82	6.26	22.52

注：* 为必需氨基酸。

Note：* means essential amino acid.

表 3　不同极性萃取部位抗氧化活性 IC_{50}

Tab 3　Antioxidant activity IC_{50} of extracts with different polarity

部位	DPPH 自由基 / (mg • mL $^{-1}$)	ABTS $^{+}$ 自由基 / (mg•mL $^{-1}$)
乙酸乙酯相	0.78	0.59
正丁醇相	0.92	0.75
水相	0.86	0.62
醇提物	0.82	0.68

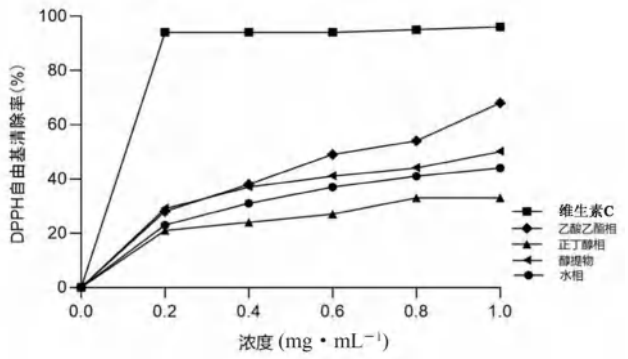


图 1　多花黄精须根不同极性部位对 DPPH 自由基清除能力

Fig 1　In vitro antioxidant activities of *Polygonatum cyrtonema* Hua' s different polar extracts evaluated by the DPPH radicals scavenging abilities

3.3.3　醇提物抗氧化活性与多糖含量的相关性　采用 SPSS 25.0 软件对醇提物中多糖含量与 DPPH 自由基清除率和 ABTS $^{+}$ 自由基清除率进行相关性分析，结果表明，多糖含量与 DPPH 自由基清除率显著相关（P = 0.005）；多糖含量与 ABTS $^{+}$ 自由基清除率显著相关（P = 0.002）。

4　讨论与结论

多花黄精须根中含有丰富的多糖、氨基酸等，其中浸出物含量为 42.48% ～ 55.76%；多糖含量为 7.12% ～ 9.36%；须根中鉴定出 17 种氨基酸，总

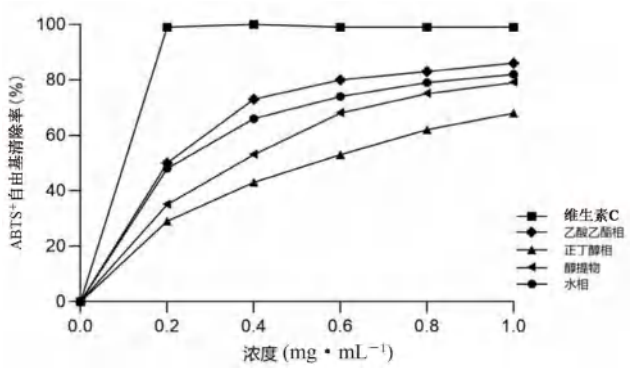


图 2　多花黄精须根不同极性部位对 ABTS 阳离子自由基清除能力

Fig 2　In vitro antioxidant activities of *Polygonatum cyrtonema* Hua' s different polar extracts evaluated by the ABTS radicals scavenging abilities

氨基酸含量为 6.09% ～ 10.43%，而谷氨酸含量最高，为 1.49% ～ 2.44%，该结果与王曙东等 [7] 研究黄精根茎及须根的氨基酸分析结果一致。虽然须根中 EAA/TAA 的比值范围为 18.85% ～ 25.52%，与 WHO/FAO 氨基酸标准值 40% 有一定差距，但是 WHO/FAO 规定的标准并非针对植物蛋白，目前研究表明完全符合此标准的植物蛋白并不多，如木芙蓉花为 22.33% ～ 37.51%[20]，蝶豆花为 34.91%[21]，重楼为 26.12% ～ 41.08%[22]。黄精多糖具有调节免疫力、抗氧化等重要功能，夏晓凯等 [23] 探讨黄精多糖的体内外抗氧化作用，发现黄精多糖的体外能抑制自发的和诱导的脂质过氧化产物的含量，王爱梅等 [24] 的研究表明黄精一方面可以抑制大脑里氧自由基的生成，另一方面可以强化大脑对氧自由基清除的力度，发挥抗氧化作用。氨基酸是黄精补益作用的物质基础，谷氨酸

作为一种功能性氨基酸，不仅参与蛋白质的合成和氧化功能，而且具有改善肠道完整性、增强肠道屏障功能和抗氧化能力[25]。缬氨酸治疗肾功能衰竭、败血症及加快外科创伤愈合[26]；亮氨酸可降低血糖，缓解肥胖、代谢综合征，调节机体免疫等[27-28]。本研究表明须根具有较强的抗氧化活性，与须根多糖含量明显相关。不同极性萃取相在抗氧化检测中均表现出不同程度的抗氧化活性，且存在一定的量效关系。乙酸乙酯相清除 DPPH 自由基能力和 $ABTS^+$ 自由基能力最强，IC_{50} 值分别为 0.78 mg • mL^{-1} 和 0.59 mg • mL^{-1}，不同极性萃取部位抗氧化能力趋势一致，但是结果差别较大，表明多花黄精须根不同极性部位的抗氧化活性存在差异，其原因可能与不同极性部位中主要活性成分的含量不同有关。

目前使用的中药材往往取自植物的某一部分，其余非药用部分常作为废料而丢弃[29]，这不仅不利于中药资源的综合利用，还造成了资源浪费和环境污染。有研究表明，药用植物的非药用部位具有与传统药用部位相同或相近的化学成分及作用，尤其是抗氧化活性[30]。本研究发现，多花黄精须根的提取物具有一定的抗氧化活性，且抗氧化能力与浓度有关，因此，后续可从优化提取活性成分的角度，将多花黄精须根作为试样，进行进一步提取工艺考察，可为多花黄精须根资源再利用提供理论依据。

参考文献

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

[2] 张娇，王元忠，杨维泽，等 . 黄精属植物化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志，2019，44（10）：1989-2008.

[3] 高嫣 . 多花黄精的活性成分及药理作用研究进展 [J]. 福建农业科技，2021，52（8）：39-44.

[4] 刘彦东，陈文生，张权，等 . 不同生长期的黄精中氨基酸含量的测定与分析 [J]. 时珍国医国药，2017，28（2）：444-447.

[5] 费建红，王曙东，李遐方 . 黄精根茎及须根中相关成分的分析 [J]. 时珍国医国药，2002，13（6）：349-350.

[6] 李遐方，费建红，王曙东 . 黄精根茎及须根中多糖含量的比较 [J]. 中成药，2002，24（5）：72-73.

[7] 王曙东，宋炳生，金亚丽，等 . 黄精根茎及须根中微量元素及氨基酸的分析 [J]. 中成药，2001，23（5）：59-60.

[8] 石牛牛，何庆玲，雷朋，等 . 长梗黄精主根与须根多糖的提取工艺研究 [J]. 资源开发与市场，2011，27（11）：963-964，971.

[9] 王曙东，吴晴斋，李汉保 . 黄精根茎、须根中营养成份的研究 [J]. 时珍国药研究，1995，6（4）：14-15.

[10] 陈怡，姚云生，陈松树，等 . 多花黄精不同龄须根药材质量研究 [J]. 山地农业生物学报，2019，38（6）：61-63，79.

[11] 王天梅，王华磊，李丹丹，等 . 多花黄精非药用部位活性成分及抗氧化性比较 [J]. 食品与机械，2022，38（1）：57-60.

[12] 周东月，关敬，付博，等 . 黄精多糖提取工艺优化及体外抗氧化研究 [J]. 安徽农业科学，2021，49（13）：180-183.

[13] 滕欢欢，王仁中，吴德玲，等 . 多花黄精炮制前后不同极性部位抗氧化与降血糖活性研究 [J]. 食品与发酵工业，2022，48（8）：70-75.

[14] 李萧娜，纪永辉，王京龙，等 . 铁十字酢浆草不同极性部位的 HPLC 指纹图谱与抗氧化活性研究 [J]. 湖北农业科学，2020，59（24）：156-163.

[15] 师聪，解春芝，张建萍，等 . 覆盆子不同极性溶剂提取物的抗氧化活性比较 [J]. 食品科技，2021，46（1）：220-224.

[16] 潘克琴，李丹丹，王华磊，等 . 九蒸九制对不同龄节多花黄精品质的影响 [J]. 特产研究，2021，43（3）：23-27.

[17] 郑晓倩，金传山，张亚中，等 . 黄精九蒸九晒炮制过程中糖类成分动态变化 [J]. 中成药，2020，42（7）：1837-1841.

[18] 张晓煜，刘静，袁海燕，等 . 不同地域环境对枸杞蛋白质和药用氨基酸含量的影响 [J]. 干旱地区农业研究，2004，22（3）：100-104.

[19] WHO/FAO. Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO ad hoc expert committee. Rome，22 March-2 April 1971 [R]. FAO Nut Met Rep，1973：52-63.

[20] 蔡露，曾心美，王希，等 . 不同品种木芙蓉花氨基酸组成分析及评价 [J]. 食品工业科技，2021，42（20）：279-285.

[21] 农彦贤，李钟婷，郝红梅，等 . 蝶豆花的氨基酸组成及营养价值 [J]. 现代食品，2021（8）：170-172.

[22] 杨勤，黄小兰，沈力，等 . 基于氨基酸成分分析不同品种重楼品质评价 [J]. 中华中医药学刊，2021，39（6）：87-92.

[23] 夏晓凯，张庭廷，陈传平 . 黄精多糖的体外抗氧化作用研究 [J]. 湖南中医杂志，2006，22（4）：90，96.

[24] 王爱梅，周建辉，欧阳静萍 . 黄精对 *D*- 半乳糖所致衰老小鼠的抗衰老作用研究 [J]. 长春中医药大学学报，2008，24（2）：137-138.

[25] 秦颖超，周加义，朱敏，等 . 谷氨酸吸收转运及对肠道发育影响的研究进展 [J]. 动物营养学报，2019，31（2）：544-552.

[26] 王均成，王可，张春宇 . *L*- 缬氨酸的应用和育种研究进展 [J]. 发酵科技通讯，2012，41（1）：30-34.

[27] Yao K，Duan Y，Li F，et al. Leucine in obesity：therapeutic prospects [J]. Trends Pharmacol Sci，2016，37（8）：714-727.

[28] Yu D，Richardson NE，Green CL，et al. The adverse metabolic effects of branched-chain amino acids are mediated by isoleucine and valine [J]. Cell Metab，2021，33（5）：905-922.

[29] 邓家刚，侯小涛 . 中药非传统药用部位的研究概况 [J]. 广西中医药大学学报，2012，15（3）：68-72.

[30] 刘红云，扶胜兰，乔新荣，等 . 猫爪草非药用部位抗氧化活性及成分研究 [J]. 安徽农学通报，2019，25（Z1）：12-14，75.

（收稿日期：2022-02-07；修回日期：2022-03-31）

鸦胆子转录组测序及基因功能注释

石好宇[1]，王慧芸[1]，赵艺[1]，朱甫臻[1]，尹艳燕[1]，缪剑华[2]，王灵芝[1*]（1. 北京中医药大学生命科学学院，北京　100029；2. 广西药用植物园，广西药用植物资源保护与遗传改良重点实验室，南宁　530023）

摘要：目的　丰富临床常用中药鸦胆子的基因资源，揭示其主要活性成分苦木素类化合物的生物合成途径。**方法**　采用高通量测序技术对鸦胆子进行转录组测序分析，构建鸦胆子转录组数据库，经 *de novo* 组装后进行生物信息学分析。**结果**　本研究共获得 85 828 条 Unigenes，平均长度为 1775 bp；有 68 806 条 Unigenes 在七大功能数据库得到注释，分别有 67 087（78.16%）、59 850（69.73%）、49 801（58.02%）、53 755（62.63%）、52 416（61.07%）、43 042（50.15%）以及 52 214（60.84%）条 Unigenes 分别注释到 NR、NT、SwissProt、KOG、KEGG、GO 和 Pfam 数据库。KEGG 分析发现 276 条萜类骨架（苦木素合成的重要前体）生物合成途径。球蛋白水解物具有显著的抗肿瘤活性，本研究共获得 56 624 个编码蛋白框（CDS）序列，其中有 10 个与球蛋白相关。共检测到 36 045 个简单重复序列（SSR），且以单核苷酸重复基序出现频率最高，其次是二核苷酸与三核苷酸重复基序。**结论**　本研究首次对鸦胆子转录组进行全面的测序分析，可进一步促进鸦胆子药用价值的开发。

关键词：鸦胆子；转录组分析；代谢通路；球蛋白；苦木素
中图分类号：S519　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)06-1267-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.009

Transcriptome analysis and gene function annotation of *Brucea javanica* (L.) Merr.

SHI Hao-yu[1], WANG Hui-yun[1], ZHAO Yi[1], ZHU Fu-zhen[1], YIN Yan-yan[1], MIAO Jian-hua[2], WANG Ling-zhi[1*] (1. *School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 100029; 2. *Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Protection and Genetic Improvement, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning* 530023)

Abstract: Objective　To further enrich the gene resource of *Brucea javanica* (L.) Merr. to deeply reveal the biosynthetic pathways of the main active ingredient, quassinoids. **Methods**　The high-throughput sequencing technology was first applied to analyze the transcriptome of *Brucea javanica* (L.) Merr., The transcriptome database was constructed by *de novo* assemble and then bioinformation analysis was conducted. **Results**　Totally 85 828 Unigenes were obtained with the average length of 1775 bp. Totally 68 806 Unigenes were annotated in 7 functional databases, which were 67 087 (78.16%), 59 850 (69.73%), 49 801 (58.02%), 53 755 (62.63%), 52 416 (61.07%), 43 042 (50.15%), and 52 214 (60.84%) Unigenes annotated to NR, NT, SwissProt, KOG, KEGG, GO and Pfam databases, respectively. Totally 276 Unigenes were annotated to terpene backbone (the key precursor of quassinoids biosynthesis) biosynthetic pathways by KEGG analysis. Totally 56 624 coding protein frame (CDS) sequences were obtained, 10 of which were associated with globulins which hydrolytes manifests antitumor activity. There were 36 045 simple repeat sequences (SSR) loci were identified with single nucleotide repeat motifs ranked first followed by dinucleotide and trinucleotide repeat motifs. **Conclusion**　It is the first comprehensive sequencing analysis of the *Brucea javanica* (L.) Merr., transcriptome in order to promote the development of the herb's medicinal value.

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81872972）。
作者简介：石好宇，男，硕士研究生，主要从事中药生物肽作用机制研究，email：20190931195@bucm.edu.cn　**通信作者：**王灵芝，女，副研究员，主要从事中药活性蛋白多肽研究，email：wanglz@bucm.edu.cn

Key words: *Brucea javanica* (L.) Merr.; transcriptome analysis; metabolic pathway; globulin; quassinoid

中药鸦胆子是苦木科植物鸦胆子[*Brucea javanica*（L.）Merr.]的干燥成熟果实，又名鸦蛋子、老鸦胆、苦榛子、苦参子，主产于我国广东、广西、云南、福建、海南和台湾等地，始记于清代《本草纲目拾遗》[1]。鸦胆子味苦、性寒，有小毒，归大肠、肝经，有清热解毒、截疟止痢等功效[2]。鸦胆子含有多种化学成分，主要包括苦木素类、类固醇、三萜类、生物碱、木质素、黄酮类、甾体类和脂肪酸等[3]。苦木素类化合物是鸦胆子主要的药理活性物质，是一类由苦楝烷型三萜降解得到的高度氧合三萜及其苷类化合物，多为四环三萜及五环三萜内酯，是鸦胆子的代表性药理活性成分，其中鸦胆子苦醇（brusatol）[4]和鸦胆丁（bruceantin）[5]是该药材中代表性抗肿瘤成分；苦木素还具有抗炎和抗医学原虫等药理活性[6]。鸦胆子油是鸦胆子中的脂肪油，抗肿瘤疗效确切且毒副作用小，被广泛应用于各种肿瘤的辅助治疗[7]。鸦胆子中蛋白质含量为 17.47%，鸦胆子多肽具有抗菌活性[8]，本课题组前期研究发现鸦胆子球蛋白酶解物具有显著的抑制肿瘤细胞增殖的活性[9-10]。

目前关于鸦胆子的研究主要集中于新化学成分的发现及作用，对于其次生代谢物合成途径的研究较少，缺乏鸦胆子基因和蛋白质序列信息，极大地限制了对鸦胆子生长发育研究以及功能分析和利用。转录组测序（RNA-seq）是利用高通量测序技术将细胞或组织中 mRNA、small RNA 或 no-codingRNA 进行测序分析的技术[11]，可用于发现新基因、提供基因表达和调控信息。该技术已广泛用于药用植物，如半夏[12]、黄芪[13]以及薏苡仁[14]等研究中。因此本文对鸦胆子进行转录组测序，并分析苦木素类化合物萜类骨架生物合成以及其衍生化修饰途径，为今后药用成分开发和药用植物的遗传改良提供理论支撑。

1 材料

1.1 药材

鸦胆子采集于广西南宁市武鸣区（108.27719°N，23.15643°E），采集不同发育时期的根、茎、叶、花序及果实等组织部位，液氮速冻后，保存于－ 80 ℃备用。

1.2 仪器与试药

Aglient RNA 6000 Nano Reagents 试剂盒、Agilent 2100 生物分析仪（美国 Aglient 公司）；BGISEQ-500 测序仪（深圳华大智造科技有限公司）；NanoDrop 超微量分光光度计（美国 Nanodrop 公司）。

2 方法

2.1 RNA 提取与转录组文库构建

利用 Aglient RNA 6000 试剂盒提取鸦胆子各组织总 RNA。采用 NanoDrop 超微量分光光度计进行样本 RNA 纯度检测，通过 Agilent 2100 生物分析仪进行样本浓度及完整性 RIN（RNA integrity number）进行检测。质检合格后，等量混合样品，用带有 Oligo（dT）的磁珠富集 mRNA，采用 fragmentation buffer 将 mRNA 片段化，随后使用随机 N6 引物进行反转录合成双链 cDNA，然后将双链 DNA 黏性末端补平、5' 端磷酸化、添加并连接测序接头，经 PCR 扩增后构建 cDNA 文库，质检合格的文库使用 BGISEQ-500 进行测序。

2.2 转录组测序分析及功能注释

测序原始序列（raw reads）使用 SOAPunke 软件进行过滤，去除接头污染、未知碱基 N 含量大于 5%、低质量的 reads（质量低于 10 的碱基占总碱基数 20% 以上），获得 clean reads。由于鸦胆子基因组测序尚未完成，缺少参考序列，因此使用 Trinity 软件对 clean reads 进行 *de novo* 组装，将组装获得的转录本去除冗余，得到非重复序列基因（Unigene）用于后续分析。使用单拷贝直系同源数据库 BUSCO（benchmarking universal single-copy orthologs）对组装的转录本进行质量评估。

组装得到转录组数据后，使用 Blast 软件将 Unigene 序列与 NR（non-redundant protein sequence database）、NT（nucleotide sequence database）、Swissprot、KEGG（kyoto encyclopedia of genes and genomes）和 KOG（clusters of orthologous groups for eukaryotic complete genomes）数据库进行比对，进行功能注释。基于 NR 注释，使用 Blast2GO 软件对 Unigene 进行 GO（gene ontology）注释，使用 Hmmscan 软件进行 Pfam 注释。

2.3 生物信息学分析

Getorf 软件检测 Unigene 的开放阅读框（ORF）后使用 Hmmsearch 将 ORF 比对到转录因子蛋白结构域（数据来源于 TF），然后根据 PlantTFDB 描述的转录因子家族特征对 Unigene 进行能力鉴定。使用 TransDecoder 软件识别 Unigene 中的候选编码区域，通过 Blast 比对 SwissProt 数据库和 Hmmscan 搜索 Pfam 蛋白同源序列，从而进行编码序列（CDS）预测。经 MISA 软件对 Unigene 进行分析后使用 Primer3 对检测到的简单重复序列（SSR）进行引物设计。

2.4　基因表达量计算

基因表达量用 FPKM（fragments per kilobase of transcript per million mapped reads）表示，即每百万 reads 中来自比对到某一基因每千碱基长度的 reads 数目。本实验使用 Bowtie2 软件将 clean reads 比对到基因序列上，然后使用 RSEM 计算各个样品的基因表达水平。计算公式如下：

FPKM ＝（cDNA fragments）/[mapped fragments（millions）/transcript length（kd）]

式中，cDNA fragments 表示比对到某一转录本上的片段数目，即双端 reads 数目；mapped fragments（Millions）表示比对到转录本上的片段总数，以 10^6 为单位；transcript length（kd）表示转录本的长度，以 10^3 个碱基为单位。

3　结果与分析

3.1　转录组测序与组装

采用 NanoDrop 超微量分光光度计和 Agilent 2100 生物分析仪对各样本 RNA 进行质量检测，结果 RIN ＞ 5.8，基线平整，表明完整性较好，样品质量合格。使用 BGISEQ-500 平台共获得鸦胆子 114.55 Mb Raw reads，过滤去除低质量、接头污染以及未知碱基 N 含量过高的 reads 后，获得 110.67 Mb（96.61%）clean reads，其中质量值大于 20（Q20）的碱基数目占总碱基数目的 98.73%，且无明显 AT 或 GC 分离现象（见图 1A），表明测序质量较高，能满足后续分析。

对 clean reads 进行组装获得转录本，使用 BUSCO 软件进行质量评估，其完全匹配的 BUSCOs 占比 98.02%，表明组装效果良好。使用 Tgicl 软件对转录本进行聚类并去除冗余得到 85 828 条 Unigenes，平均长度为 1775 bp，GC 含量为 40.07%，N50 值为 2608 bp，N70 值为 1887 bp，N90 值 1005 bp。对 Unigenes 的长度进行统计（见图 1B），其中长度≥ 3000 bp 的序列数目最多，为 14 663 条。

3.2　鸦胆子 Unigenes 的功能注释

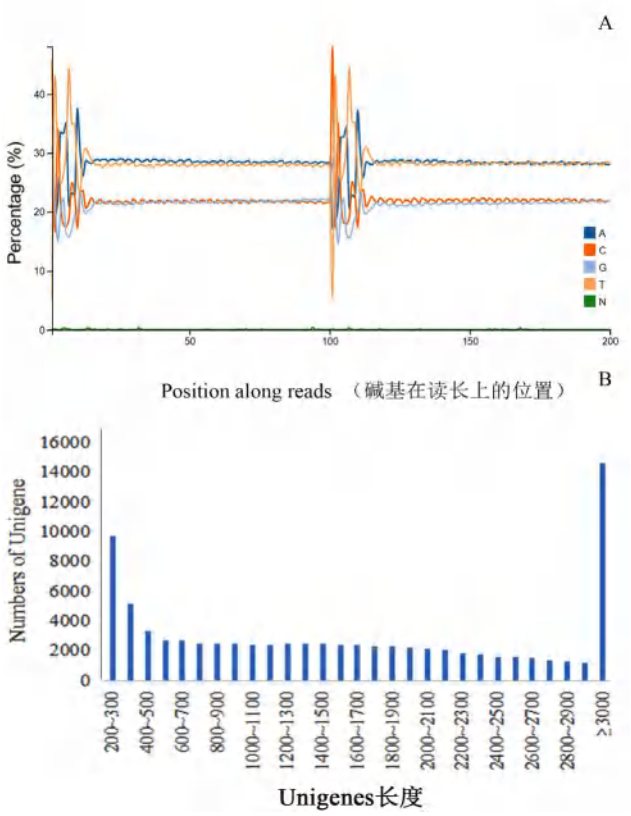


图 1　Clean reads 的碱基含量（A）与 Unigenes 长度（B）分布图

Fig 1　Distribution of clean reads base content（A）and Unigenes length（B）

为获得更全面的基因功能信息，将 Unigenes 与 NR、NT、Swissprot、KEGG、KOG、Pfam 和 GO 七大功能数据库进行比对，共有 68 806 条 Unigenes 得到注释，占总数的 80.17%。如表 1 所示，有 67 087（78.16%）条 Unigenes 在 NR 数据库匹配成功，数量最多，而在 GO 数据库中，获得注释的 Unigenes 数量最少，仅有 43 042 个，占 50.15%；有 25 734 条 Unigens 在七大功能注释库同时得到注释，占 Unigenes 总数的 29.98%。

表 1　Unigenes 功能注释表

Tab 1　Function annotation of Unigenes

数据库	数量	占比 /%
NR	67 087	78.16
NT	59 850	69.73
Swissprot	49 801	58.02
KEGG	52 416	61.07
KOG	53 755	62.63
Pfam	52 214	60.84
GO	43 042	50.15
Intersection	25 734	29.98

3.2.1　NR 数据库对比分析　将 Unigenes 与 NR 数据库进行相似序列匹配，结果如图 2A 所示，与鸦胆子 Unigenes 匹配数最多的物种是甜

橙（*Citrus sinensis*），约占 47.07%。此外，克莱门柚（*Citrus clementina*）和可可树（*Theobroma cacao*）同源性分别占 27.7% 和 2.08%。

3.2.2 GO 数据库功能分类注释 将鸦胆子 Unigenes 与 GO 数据库进行比对，共有 43 042 条 Unigenes 得到注释，获得了 99 940 条对应关系，结果如图 2B 所示，分属于生物学过程、细胞组分和分子功能三大类。在生物学过程分类中，与细胞过程（cellular process）相关的 Unigenes 为 11 377 条，所占比例最高；在细胞组分分类中，与膜部分（membrane part）相关的 Unigenes 最多，为 12 940 条；在分子功能分类中，注释上的 Unigenes 涉及抗氧化、结合、催化、分子功能调节、转运、转录调节等多方面功能活性，其中，涉及到结合（binding）功能的 Unigenes 有 21 235 条，所占比例最高；对应蛋白标签（protein tag）功能的 Unigenes 最少，为 7 条。

3.2.3 KEGG 代谢通路分析 鸦胆子 52 416 条 Unigenes 被注释到 KEGG 数据库的 134 条代谢通路中（见图 2C），其中涉及包含细胞过程（cellular processes，2282 条）、环境信息加工（environmental information processing，3191 条）、遗传信息加工（genetic information processing，10 076 条）、新陈代谢（metabolism，29 789 条）及生物体系统（organismal systems，1775 条）五大类。其中，与新陈代谢相关的 Unigenes 数量最多，占总数的 63.23%，主要参与影响氨基酸代谢、糖代谢、脂代谢等多个方面。

对鸦胆子药用活性成分合成相关信号通路进行了分析，涉及不饱和脂肪酸生物合成（Ko01040）、萜类骨架生物合成（Ko00900）、类固醇生物合成（Ko00100）相关 Unigenes 数量分别为 206、276、8 条。根据鸦胆子 KEGG 注释结果，筛选 276 条基因参与萜类骨架生物合成，其中涉及甲羟戊酸（MVA）以及非甲羟戊酸（MEP）途径的分别有 68、83 条 Unigenes（见表 2）。萜类化合物的生物合成涉及甲羟戊酸途径和脱氧木酮糖 -5- 磷酸途径两条生物合成途径，羟甲基戊二酰 CoA 还原酶（HMGR）是萜类代谢过程中的关键调控位点，有 8 条 Unigenes 调控此位点，其 FPKM 值为 85.37。1- 脱氧木糖 -5- 磷酸合酶（DXS）与 1- 脱氧木糖 -5- 磷酸还原异构酶（DXR）是 MEP 途径关键限速酶，分别有 53 和 4 条基因编码，其 FPKM 值分别为 121.74、64.03。

萜类骨架形成后需要衍生修饰，细胞色素 P450（cytochrome P450，CYP450）和糖基转移酶（UDP-glycosyltransferase，UGT）主要起氧化、置换和糖基化修饰的重要作用[15]。根据鸦胆子转录组 SwissProt 数据库注释结果，有 284 条 Unigenes 被注释为 CYP450，隶属于 20 个 CYP450 家族，其中 CYP71 家族的 Unigenes 为 71 条，占比最多，其次是 CYP82 和 CYP704，分别为 34 条和 22 条。共找到属于 18 个 UGT 亚家族的 129 个 UGTs，包括 22 个 UGT74、17 个 UGT83 等。对各个样品中基因表达量进行聚类表达分析，其中 CYP450 家族 FPKM 值较高的有 CYP82A1（FPKM ＝ 284.88）、CYP71A1（FPKM ＝ 112.44）和 CYP71A2（FPKM ＝ 105.64），UGT 家族 FPKM 值较高的有 UGT73C3（FPKM ＝ 65.93）、UGT71A15（FPKM ＝ 53.73）和 UGT71A16（FPKM ＝ 36.44）。

3.2.4 KOG 分类 利用 Blast 软件，共有 53 755 条 Unigenes 被注释到 KOG 数据库中，得到基因同源物的分类信息（见图 2D）。KOG 根据其功能可分为 25 类，其中，一般功能预测（general function prediction only）类别中 Unigenes 数量最多，占总量的 21.94%；细胞运动（cell motility）类 Unigenes 数量最少，为 1 个；未知功能（function unknown），翻译后修饰、蛋白质转换、分子伴侣（posttranslational modification，protein turnover，chaperones）、信号转导机制（signal transduction mechanisms）和转录（transcription）等类别的 Unigenes 表达丰度也相对较高，分别占总量的 9.32%、7.92%、10.78% 和 6.50%。

3.3 CDS 预测

CDS 预测可为鸦胆子基因组图谱绘制及基因功能研究提供关键依据，结果共预测得到 56 624 个 CDS 序列，总长度为 64 922 145 bp，N50 值为 1446 bp，GC 含量为 43.48%。课题组前期工作表明，鸦胆子球蛋白酶解物具有显著的体外抗肿瘤活性，通过注释，共获得 10 个与球蛋白相关的 CDS 序列，结果见表 3，可为今后高球蛋白鸦胆子药材的筛选及抗肿瘤生物肽的开发提供文本信息。

3.4 鸦胆子转录组 SSR 分析

鸦胆子转录组共鉴定出 6 种 SSR 重复类型，共检测出 36 045 个 SSR 分布于 25 747 个 Unigenes 中，单核苷酸至六核苷酸重复类型均存在，其中有 14 631 个单核苷酸，11 594 个二核苷酸，7554 个三核苷酸，649 个四核苷酸，574 个五核苷酸，1043 个六核苷酸，单核苷酸重复类型数量最多。

4 讨论

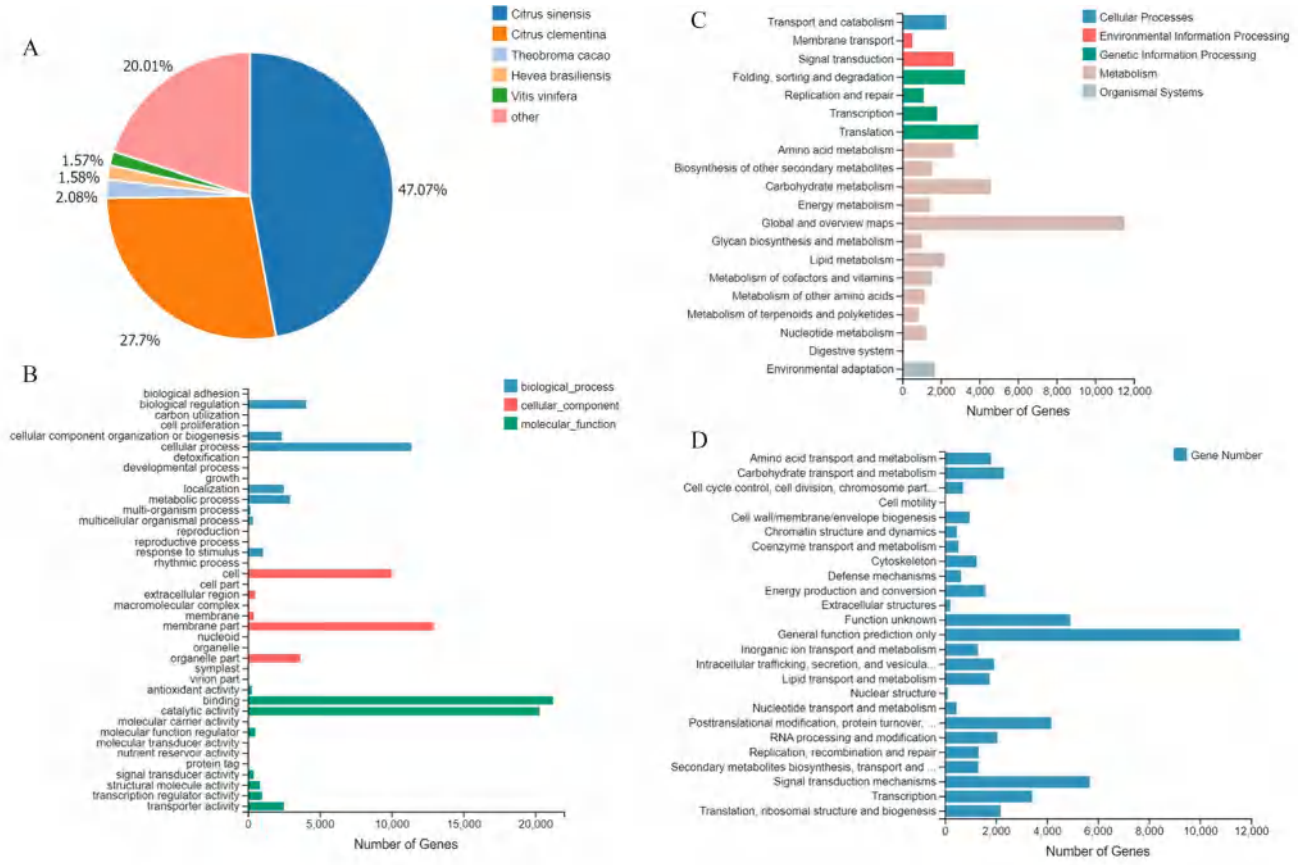


图 2　Unigene 功能注释图

Fig 2　Functional annotation of Unigenes

A. 基于 NR 注释的同源物种分布（distribution of homologous species based on NR annotation）；B. GO 功能分类统计图（GO functional classification）；C. KEGG 功能分布统计图（KEGG functional classification）；D. KOG 功能分布统计图（KOG functional classification）

表 2　鸦胆子萜类骨架生物合成中编码关键酶的 Unigenes

Tab 2　Unigenes encoding the key enzymes related with terpenoid backbone biosynthesis in *Brucea javanica* (L.) Merr.

合成途径	酶的名称	酶编号	Unigenes 数目	FPKM 值
MVA	acetyl-CoA acetyltransferase（ACAT）	2.3.1.9	6	124.71
MVA	hydroxy methylglutaryl-CoA synthase（HMGS）	2.3.3.10	5	40.20
MVA	hydroxymethylglutaryl-CoA reductase（HMGR）	1.1.1.34	8	85.37
MVA	mevalonate kinase（MVK）	2.7.1.36	2	17.02
MVA	phosphomevalonate kinase（PMK）	2.7.4.2	3	11.56
MVA	mevalonate diphosphate decarboxylase（MVD）	4.1.1.33	3	33.39
MVA	isopentenyl-diphosphate delta-isomerase（IPPs）	5.3.3.2	11	339.72
MVA	farnesyl diphosphate synthase（FDPS）	2.5.1.1	30	239.09
MEP	1-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate synthase（DXS）	2.2.1.7	53	121.74
MEP	1-deoxy-*D*-xylulose-5-phosphate reductoisomerase（DXR）	1.1.1.267	4	64.03
MEP	2-C-methyl-*D*-erythritol 4-phosphate cytidylyltransferase（ispD）	2.7.7.60	8	20.36
MEP	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-*D*-erythritol kinase（ispE）	2.7.1.148	5	48.69
MEP	2-C-methyl-*D*-erythritol 2，4-cyclodiphosphate synthase（ispF）	4.6.12	1	120.13
MEP	（*E*）-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase（ispG）	1.17.7.1	1	88.64
MEP	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate reductase（ispH）	1.17.7.4	11	203.29

RNA-seq 技术能够对真核生物复杂的转录本结构和表达水平进行分析，还可用于发现非编码 RNA 和全新的基因转录本[16]，有助于揭示生物生长发育、逆境应答机制和次生代谢产物的富集调控机制。此外，该技术还在低丰度基因检测、基因家族鉴定等方面发挥重要作用[17]。有学者利用 Illumina 高通量测序发现三江源地区灌木亚菊中与药用活性相关的基因主要富集在甾体、黄酮类、

表 3 鸦胆子球蛋白相关 CDS 序列

Tab 3 Globulin related CDS of *Brucea javanica* (L.) Merr.

编号	基因 ID	FPKM 值	功能注释	数据库来源
1	Unigene 10786	27.63	Basic 7S globulin	Swissprot
2	Unigene 12390	1.69	Basic 7S globulin	Swissprot
3	Unigene 15237	59.38	Basic 7S globulin	Swissprot
4	Unigene 15640	50.42	Basic 7S globulin	Swissprot
5	Unigene 2049	9.46	Basic 7S globulin	Swissprot
6	Unigene 27446	10.94	Basic 7S globulin 2	Swissprot
7	Unigene 7186	41.50	Basic 7S globulin	Swissprot
8	Unigene13052	20.96	*Citrus sinensis* 12S seed storage globulin 1-like	NT
9	Unigene 10829	0.63	2S globulin [*Corchorus olitorius*]	NR
10	Unigene 30886	3.03	basic 7S globulin-like [*Manihot esculenta*]	NR

苯丙素类及萜类化合物 [18]；通过与乌头转录组测序分析比较，证实铁棒锤是乌头碱生物合成途径的理想材料 [19]；梅瑜等 [20] 利用高通量测序 PacBio Sequel 平台深入了解甘葛藤转录组的整体水平，挖掘其中黄酮类生物合成相关候选基因；林江波等 [21] 利用 Illumina HiSeq 4000 高通量测序技术对铁皮石斛茎和叶进行转录组测序，并分析了植物甾醇生物合成关键酶基因的表达。

本研究首次采用 BGISEQ-500 测序平台，进行了鸦胆子转录组序列分析，共获得 85 828 条 Unigenes，数据量大且组装效果良好，填补了鸦胆子转录组信息的空白，确定了参与萜类骨架生物合成的基因，文本信息将有助于进一步研究苦木素类化合物及其衍生化在鸦胆子中生物合成的分子机制，并促进鸦胆子功能基因组学的研究。MEP 和 MVA 通路在植物萜类化合物的生物合成中发挥着重要作用 [11]。在次级代谢物的衍生化修饰过程中，需要 CYP450 和糖基转移酶的参与 [22]。Zheng 等 [23] 研究表明 CYP450 参与了真菌甲基的羟基化反应；UGT73AD1 可使羟基积雪草酸的 C-28 羧基部分糖基化 [24]。本研究发现鸦胆子转录组中有较多 CYP450、UGT 序列，推测其可能在苦木素类衍生修饰中起重要作用。

本研究共获得 56 624 个 CDS 序列，构建鸦胆子基因编码数据库，丰富了该物种蛋白质编码基因的注释，为鸦胆子及其近缘物种蛋白序列鉴定提供了更可靠的质谱数据库信息。后期可通过蛋白质组学等手段来进行数据校正，并确定新的编码基因 [25]；与蛋白质组学联用还可以有效地量化生物体中重要的蛋白质，确定基因在植物生长发育过程中的功能 [26]。鸦胆子球蛋白及其酶解物具有明确的抗肿瘤活性 [27]，在获得的 CDS 序列中有 10 个与球蛋白相关，今后可借助分子标记辅助育种技术，进行高球蛋白亲本的筛选，增强鸦胆子球蛋白抗肿瘤活性。通过植物转录组测序，还可反向预测和开发多肽类药物。Rodríguez-Decuadro 等 [28] 根据 *Peltophorum dubium* 幼苗转录组测序结果，采用同源序列搜索和半胱氨酸残基模式匹配的方法，对其中的抗菌肽进行了预测。

鸦胆子 SSR 位点重复类型以单核苷酸和双核苷酸为主，占 72.7%，与苹果 [29]、川穹 [30] 等植物研究结果一致。短重复序列的大量存在表明该物种的进化水平相对较高 [29]，表明鸦胆子处于相对较高的生物进化与分类地位，其基因组经历了较长的进化时间或具有较高的突变频率，还可为近缘物种 SSR 标记的开发及其遗传分析提供便利。

5 结论

本研究基于高通量测序平台进行了鸦胆子全长转录组分析，获得了高质量转录本，共有 68 806 条 Unigenes 注释到七大功能数据。萜类骨架是苦木素生物合成的重要前体，KEGG 分析共有 276 条 Unigenes 参与，其中涉及 MEP 和 MVA 途径的 15 种酶；还发现涉及鸦萜类骨架修饰的 CYP450 和 UGT 的 Unigenes 分别有 284 条和 129 条，为提高苦木素类化合物产量的分子生药学研究提供了重要文本信息。通过 CDS 预测共获得 10 个 CDS 序列与球蛋白相关，进一步丰富了鸦胆子球蛋白源抗肿瘤肽的数据库。本研究获得了鸦胆子转录组的数据，可为今后鸦胆子药用价值开发与利用提供理论基础。

参考文献

[1] 赵明敏 . 本草纲目拾遗 [M]. 2007：131.
[2] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：266.
[3] Chen M，Jin HZ，Zhang WD，et al. Chemical constituents of plants from the genus blumea [J]. Chem Biodivers，2010，6（6）：809-817.

[4] 卢睿瑾，杜玉梅，黄世莹，等 . 鸦胆子苦醇通过 RhoA/ROCK1 信号通路抑制人结直肠癌细胞 HCT-116 的侵袭和迁移 [J]. 中国药理学通报，2021，37（10）：1360-1365.
[5] 路莹 . 抗肿瘤药 XLII：堆心菊内酯，鸦胆子苦醇酯，鸦胆子丁及其酯类对不同 P388 淋巴白血病细胞株的抗白血病活性的比较 [J]. 国外医学药学分册，1982，（5）：308.
[6] 邬琪，孙薇，王力玄，等 . 鸦胆子中苦木素类化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中草药，2021，52（20）：6431-6441.
[7] 黄敏桃，梁梅华，温中林，等 . 鸦胆子粗油提取工艺优化研究 [J]. 广西林业科学，2020，49（2）：281-284.
[8] Sornwatana T，Roytrakul S，Wetprasit N，et al. Brucin，an antibacterial peptide derived from fruit protein of fructus bruceae，*Brucea javanica*（L.）Merr [J]. Lett Appl Microbiol，2013，57（2）：129-136.
[9] 刘露，张月圆，李开，等 . 鸦胆子球蛋白酶解物对黑色素瘤细胞毒性研究 [J]. 现代生物医学进展，2018，18（8）：1447-1452.
[10] 冀会方，刘露，李开，等 . 鸦胆子蛋白质组成分析及其酶解物细胞毒性研究 [J]. 中国中药杂志，2016，41（22）：4210-4215.
[11] 崔凯，吴伟伟，刁其玉 . 转录组测序技术的研究和应用进展 [J]. 生物技术通报，2019，35（7）：1-9.
[12] Huang X，Jing Y，Liu DJ，et al. Whole-transcriptome sequencing of pinellia ternata using the illumina platform [J]. Genet Mol Res，2016，15（2）：1676-5680.
[13] Liang JP，Li WQ，Jia XY，et al. Transcriptome sequencing and characterization of Astragalus membranaceus var. mongholicus root reveals key genes involved in flavonoids biosynthesis [J]. Genes Genomics，2020，42（8）：901-914.
[14] 欧阳雨晴，李玲玲，石好宇，等 . 薏苡转录组测序及基因功能注释 [J]. 中南药学，2021，19（7）：1286-1293.
[15] 李传旺，张贺，饶攀，等 . 植物五环三萜类化合物生物合成途径研究进展 [J]. 中草药，2021，52（11）：3436-3452.
[16] Kukurba KR，Montgomery SB. RNA sequencing and analysis [J]. Cold Spring Harb Protoc，2015，2015（11）：951-969.
[17] Wang JL，Dean DC，Hornicek FJ，et al. RNA sequencing（RNA-seq）and its application in ovarian cancer [J]. Gynecol Oncol，2019，152（1）：194-201.
[18] 徐浩，夏铭泽，张发起 . 三江源地区灌木亚菊的转录组分析 [J]. 中国野生植物资源，2021，40（10）：1-8，24.
[19] 田梅，陈灵丽，靳保龙，等 . 铁棒锤转录组分析及乌头碱生物合成相关基因的挖掘 [J]. 药学学报，2021，56（12）：3353-3361.
[20] 梅瑜，李向荣，时可，等 . 药食同源植物甘葛藤的全长转录组分析 [J]. 华北农学报，2021，36（5）：10-17.
[21] 林江波，王伟英，邹晖，等 . 基于转录组测序的铁皮石斛植物甾醇生物合成相关基因分析 [J]. 热带亚热带植物学报，2019，27（6）：693-701.
[22] Sui C，Zhang J，Wei JH，et al. Transcriptome analysis of bupleurum chinense focusing on genes involved in the biosynthesis of saikosaponins [J]. BMC Genomics，2011，12：539.
[23] Zheng XY，Li P，Lu X. Research advances in cytochrome P450-catalysed pharmaceutical terpenoid biosynthesis in plants [J]. J Exp Bot，2019，70（18）：4619-4630.
[24] Rahimi S，Kim J，Mijakovic I，et al. Triterpenoid-biosynthetic UDP-glycosyltransferases from plants [J]. Biotechnol Adv，2019，37（7）：107394.
[25] Wu HX，Jia HM，Ma XW，et al. Transcriptome and proteomic analysis of mango（*Mangifera indica* Linn）fruits [J]. J Proteomics，2014，105：19-30.
[26] Yu XL，Wang YS，Kohnen MV，et al. Large scale profiling of protein isoforms using label-free quantitative proteomics revealed the regulation of nonsense-mediated decay in moso bamboo（phyllostachys edulis）[J]. Cells，2019，8（7）：744.
[27] Zhao Y，Wang HY，Yin YY，et al. Anti-melanoma action of small molecular peptides derived from *Brucea javanica*（L.）Merr. globulin in vitro [J]. J Tradit Chin Med，2022，9（1）：7.
[28] Rodríguez-Decuadro S，Rosa GD，Radío S，et al. Antimicrobial peptides in the seedling transcriptome of the tree legume Peltophorum dubium [J]. Biochimie，2021，180：229-242.
[29] 关玲，章镇，王新卫，等 . 苹果基因组 SSR 位点分析与应用 [J]. 中国农业科学，2011，44（21）：4415-4428.
[30] 袁灿，彭芳，杨泽茂，等 . 川芎转录组 SSR 分析与 EST-SSR 标记的开发 [J]. 中国中药杂志，2017，42（17）：3332-3340.

（收稿日期：2022-03-02；修回日期：2022-05-02）

冻干口崩片的质量评价研究

李思潼[1]，薛婉莹[1]，李红鑫[1]，孙常胜[1]，吴婧楠[1]，邱旖[1]，吴雪纯[1]，蒋巧萍[1]，宇泉霖[1]，孙腾跃[2]，张欣悦[2]，张金玲[2]，蔡程科[1*]，王洪飞[2*]（1. 北京中医药大学中药学院，北京 102488；2. 北京量子高科制药科技有限公司，北京 102200）

摘要：目的 寻找评价冻干口崩片质量的方法，准确客观地评价冻干口崩片的质量。**方法** 筛选出 10 种具有代表性的冻干口崩片，通过外观、片重差异、崩解时限、水分、真密度、比表面积、孔隙率、引湿性试验等方面对其进行质量评价，使用 SPSS 20.0 对评测结果进行相关性分析。**结果** 除百荷冻干含化糖外，其余 9 种冻干口崩片各检测项目均合格；相关性分析显示，水分含量与比表面积成负相关；水分含量与引湿性成正相关；崩解时限与孔隙率成负相关；真密度与比表面积成正相关。**结论** 本研究建立了评价冻干口崩片质量的方法，方法简单可行，结果可靠，为后续冻干口崩片质量评价体系的建立奠定了基础。

关键词：口腔崩解片；冻干法；质量评价；相关性分析；加速试验
中图分类号：R944 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1274-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.010

Quality evaluation of lyophilised orally disintegrating tablets

LI Si-tong[1], XUE Wan-ying[1], LI Hong-xin[1], SUN Chang-sheng[1], WU Jing-nan[1], QIU Yi[1], WU Xue-chun[1], JIANG Qiao-ping[1], YU Quan-lin[1], SUN Teng-yue[2], ZHANG Xin-yue[2], ZHANG Jin-ling[2], CAI Cheng-ke[1*], WANG Hong-fei[2*] (1. *School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488; 2. *Beijing Quantum Hi-tech Pharmaceutical Co.*, *Ltd*, *Beijing* 102200)

Abstract: Objective To evaluate the quality of lyophilised orally disintegrating tablets, and the quality of freeze-dried orally disintegrating tablets accurately and objectively. **Methods** Ten representative lyophilised orally disintegrating tablets were screened out, and their quality was evaluated from appearance, difference in tablet weight, disintegration time limit, moisture, true density, specific surface area, porosity, and hygroscopicity test. SPSS 20.0 was used for the correlation analysis of the evaluation results. **Results** Except for the Baihe lyophilized sugar, all test items of the others 9 lyophilised orally disintegrating tablets were qualified. The correlation analysis showed that the moisture content was negatively correlated with the specific surface area. The moisture content was positively correlated with the hygroscopicity. The disintegration time is negatively correlated with the porosity. The true density was positively correlated with the specific surface area. **Conclusion** The methods to evaluate the quality of freeze-dried orally disintegrating tablets are established. The methods are simple, feasible, and reliable, which lays a foundation for establishment of the subsequent quality evaluation system for lyophilised orally disintegrating tablets.

Key words: lyophilised orally disintegrating tablet; freeze-drying; quality evaluation; correlation analysis; accelerated testing

基金项目：国家科技重大专项研发项目（No.2011ZX09201-201-15）；北京市科技计划专项研发项目（No.Z16010101390）。
作者简介：李思潼，男，硕士研究生，主要从事中药新药研发及中药新剂型与新制剂研究，email：listong00@163.com *通信作者：蔡程科，男，博士，教授，主要从事中药新剂型与新制剂研究，email：cck98@126.com；王洪飞，男，博士，主要从事药物速释制剂的研发与产业化研究，email：bjwhf@vip.sina.com

冻干口崩片（lyophilised orally disintegrating tablets）是指将特制配方溶液通过冷冻干燥技术制备得到的一种新剂型，与传统压片法制备的口崩片相比，其具有高孔隙率、崩解迅速、辅料用量少、生物利用度高的特点[1-3]。服用时仅通过唾液即可在口腔中快速崩解，无需用水送服[4-5]。其活性成分可直接通过口腔黏膜快速吸收，避免肝脏首过效应，特别适用于老人、儿童、精神类疾病以及吞咽困难的患者，可以极大地提高这些人群的服药依从性[6-9]。

冻干口崩片始载于 2015 年版《中国药典》，2020 年版《中国药典》对其要求为："除冷冻干燥法制备的口崩片外，口崩片应进行崩解时限检查（通则 0921）。采用冷冻干燥法制备的口崩片可不进行脆碎度检查"[10]。冻干口崩片在国内正处于快速发展阶段，然而对其进行质量评价的研究较少，其质量较轻，具有疏松多孔的骨架结构，现有标准及相关研究中用于经典片剂的质量评价方法并不完全适用于冻干口崩片[11-14]。

本研究选取了 10 种具有代表性的冻干口崩片（包含化药类、中药类、蛋白类等），对其进行多角度的质量评价研究，并找出合适的评价方法，为冻干口崩片及其相关剂型药物的质量表征与评价提供有效可行的新模式和新方法，也为口腔崩解片相关质量标准的制订提供参考。建立冻干口崩片的质量评价体系，可以科学、规范地评价产品的质量水平，更能在生产中准确把控产品的质量，切实引导市场选择导向，为这一新剂型的发展奠定了基础[15]。

1 材料

1.1 试药

透明质酸钠冻干泡腾片（批号：20210531，规格：15 mg）、胶原蛋白肽透明质酸钠冻干含化糖（批号：20220107，规格：50 mg）、百荷冻干含化糖（批号：20210913，规格：50 mg）、地龙蛋白含化糖（批号：20200805，规格：30 mg）、氯雷他定口崩片（批号：ZS2101002，规格：10 mg）（陕西量子高科药业有限公司）；对乙酰氨基酚口崩片（自制，批号：20210810，规格：100 mg）；霍山石斛口崩片（批号：20210428，规格：20 mg，自制）；桑葚口崩片（批号：20210823，规格：60 mg）、他达拉非口崩片（批号：20210818，规格：20 mg）、银杏叶冻干口崩片（批号：20210928，规格：40 mg）（北京量子制药科技有限公司）。

氯雷他定对照品（批号：100615-201103，纯度：99.8%，中国食品药品检定研究院）；乙腈、甲醇（色谱纯，Fisher Scientific 公司）；磷酸（分析纯，无锡市亚泰联合化工有限公司）；二乙胺（分析纯，天津市大茂化学试剂厂）；卡尔费休试剂（国家化学试剂质检中心）；无水甲醇（分析纯，天津市致远化学试剂有限公司）；纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司）。

1.2 仪器

电子天平（BT25s，北京赛多利斯仪器系统有限公司）；口崩片崩解仪（KB-1，天津市天大天发科技有限公司）；卡尔费休水分测定仪（MA-1，上海本昂科学仪器有限公司）；药品稳定性试验箱（Labone-300CGS，北京兰贝石恒温技术有限公司）；高性能全自动压汞仪 [AutoPore V9605，麦克默瑞提克（上海）仪器有限公司]；全自动真密度分析仪（Ultrapyc 5000）、全自动比表面积和孔径分析仪（Autosorb-IQ-MP）[安东帕（上海）商贸有限公司]。

2 方法与结果

2.1 冻干口崩片质量评价

2.1.1 外观评测　10 批冻干口崩片，每批随机抽取 20 片，分别置于自制外观评测装置（见图 1）的固定白色光源、纯色背景下，固定角度观察片剂。设计 5 个评价指标：颜色、形态、裂边、融化、黏片。分别要求片剂颜色均匀；呈圆形、饱满光洁；无裂片、裂边；无底融化、中心融化；没有与包材粘连残留的现象。记录每批 20 片中合格片剂的数量，合格一个记 1 分，单个评测项低于 15 分即为此项不达标，5 个评测指标中存在 2 项及以上不达标即为样品不合格。各批冻干口崩片的外观评测结果如表 1 所示。

从评测结果可得，化药类冻干口崩片多呈白色至类白色，中药类多为黄色或棕色，10 批冻干口崩片均为圆形片，片面饱满光洁，但中药类与蛋白类冻干口崩片更容易出现裂片或融化现象，顶部突起黏附顶铝的现象可通过调整灌装量解决。10 批冻干口崩片外观评测均合格。

2.1.2 片重差异　根据 2020 年版《中国药典》对于片重差异测定法的要求，对 10 批冻干口崩片每批随机抽取 20 片，精密称定总重量，求得平均片重后，再分别精密称定每片的重量，每片重量与平均片重比较，超出重量差异限度的不得多于 2 片，并不得有 1 片超出限度 1 倍。平均片重或标示片重 0.3 g 以下的重量差异限度为 ±7.5%。片重差异计算公式：

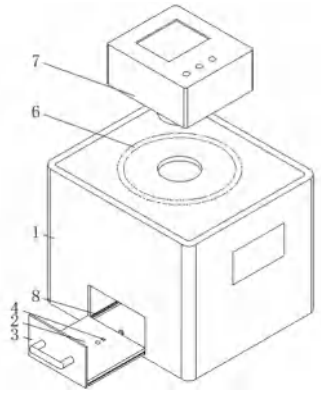


图 1 冻干口崩片外观评测装置

Fig 1 Appearance evaluation device for lyophilised orally disintegrating tablets

表 1 外观评测结果

Tab 1 Appearance evaluation

类别	样品	颜色	形态	裂片	融化	黏片
化药类	氯雷他定口崩片	20	20	20	20	20
	他达拉非口崩片	20	20	20	20	20
	对乙酰氨基酚口崩片	20	20	20	20	20
中药类	百荷冻干含化糖	9	20	16	20	20
	霍山石斛口崩片	20	20	20	20	10
	桑葚口崩片	20	20	20	20	20
	银杏叶冻干口崩片	20	20	18	19	20
蛋白类	胶原蛋白肽透明质酸钠冻干含化糖	20	20	20	3	20
	地龙蛋白含化糖	15	20	20	20	20
其他	透明质酸钠冻干泡腾片	20	20	20	20	20

图 2 氯雷他定口崩片（左）与银杏叶冻干口崩片（右）的外观

Fig 2 Appearance of loratadine orally disintegrating tablet（left）and ginkgo leaf lyophilised orally disintegrating tablet（right）

片重差异（%）=（单片重－平均片重）/ 平均片重 ×100%

各批冻干口崩片的试验结果如表 2 所示。由表 2 可以看出，10 批冻干口崩片的片重差异均合格。冻干口崩片的片重较轻，大多为 19 ～ 108 mg，通过片重与规格的比较可以发现其辅料用量很少，药物活性成分（API）占比很大，这也是冻干口崩片的优势之一。

2.1.3 崩解时限 根据 2020 年版《中国药典》口崩片崩解时限检查法的要求，使用口崩片崩解仪测定崩解时限，将崩解篮固定于支架上，浸入 1000 mL 杯中，杯内盛有温度为（37±1）℃的水

表 2 片重差异测定结果

Tab 2 Tablet weight difference

类别	样品	规格 / mg	平均片重 / mg	超限数	结果
化药类	氯雷他定口崩片	10	19.03	0	合格
	他达拉非口崩片	20	39.19	0	合格
	对乙酰氨基酚口崩片	100	108.06	0	合格
中药类	百荷冻干含化糖	50	52.07	0	合格
	霍山石斛口崩片	20	23.68	1	合格
	桑葚口崩片	60	66.76	0	合格
	银杏叶冻干口崩片	40	67.29	0	合格
蛋白类	胶原蛋白肽透明质酸钠冻干含化糖	50	76.61	1	合格
	地龙蛋白含化糖	30	57.29	0	合格
其他	透明质酸钠冻干泡腾片	15	26.84	1	合格

约 900 mL，调节水位高度使崩解篮最低位时筛网在水面下（15±1）mm，启动仪器。取本品 1 片，置崩解篮中进行检查，应在 60 s 内全部崩解并通过筛网，如有少量轻质上漂或黏附于不锈钢管内壁或筛网，但无硬心者，可作符合规定论。重复测定 6 片，均应符合规定。如有 1 片不符合规定，应另取 6 片复试，均应符合规定。各批冻干口崩片的测定结果如表 3 所示。

表 3 崩解时限测定结果 (s)

Tab 3 Disintegration time (s)

类别	样品	1	2	3	4	5	6	均值
化药类	氯雷他定口崩片	1	1	1	1	1	1	1
	他达拉非口崩片	1	1	1	1	1	1	1
	对乙酰氨基酚口崩片	97	95	107	117	105	92	102.2
中药类	百荷冻干含化糖	10	6	8	5	4	4	6.2
	霍山石斛口崩片	3	2	2	2	3	3	2.5
	桑葚口崩片	2	1	1	1	1	2	1.3
	银杏叶冻干口崩片	11	9	6	10	4	9	8.2
蛋白类	胶原蛋白肽透明质酸钠冻干含化糖	4	6	4	6	6	5	5.2
	地龙蛋白含化糖	4	6	4	4	4	5	4.5
其他	透明质酸钠冻干泡腾片	59	64	57	62	67	55	60.7

由表 3 可以得出，透明质酸钠冻干泡腾片与对乙酰氨基酚口崩片崩解时限大于 60 s，不合格，其余均在 10 s 内崩解。规格小的冻干口崩片一般情况下的崩解速度稍快于大规格冻干口崩片。

2.1.4 水分测定 参照 2020 年版《中国药典》中水测定法第一法（费休氏法）进行测定，取适量样品，放入研钵中充分研磨，精密称定重量后，快速放入卡尔费休水分测定仪中测定水分，记录测定结果，每批平行测定 3 次，结果见表 4。

由表 4 可以得出，大部分冻干口崩片的含水量在 0.5% ～ 5%，但百荷冻干含化糖含水量远高于平均水平。化药类含水量均在 2% 以下，中药类与蛋白类含水量高一些，大部分为 3% ～ 5%，中药由于其成分复杂，水分不易除去，在生产过程中更难制备。

2.1.5　引湿性试验　根据 2020 年版《中国药典》中 9103 药物引湿性试验指导原则，结合实际生产情况，设计了引湿性试验。取具塞玻璃称量瓶，于试验前一日置于药品稳定性试验箱内，设置温度为（25±1）℃，湿度为（40±2）%，精密称定称量瓶质量（m_1），每批各取 10 片样品，平铺于上述称量瓶中，精密称定质量（m_2），将称量瓶敞口，并与瓶盖同置于上述恒温恒湿条件下，分别于 1 h、2 h 取出称量瓶，盖好称量瓶盖子，精密称定质量（m_3）。增重百分率计算公式：

增重百分率（%）＝（m_3 － m_2）/（m_2 － m_1）×100%

测定结果如表 4 所示。由表 4 可以看出，冻干口崩片 1 h 与 2 h 的增重百分率相差不大，说明其吸水过程主要发生在前 1 h，在 1 ～ 2 h 期间，吸水较少。10 批冻干口崩片的 2 h 增重百分率为 0.15% ～ 8.74%，其中化药类的增重百分率很低，为 0.15% ～ 0.16%，中药类增重百分率较高，为 2.85% ～ 8.74%，蛋白类的增重百分率为 0.67% ～ 3.97%。

表 4　水分、引湿性试验测定结果

Tab 4　Moisture and hygroscopicity test

类别	样品	含水量 /%	增重百分率 /%	
			1 h	2 h
化药类	氯雷他定口崩片	1.66	0.10	0.16
	他达拉非口崩片	1.60	0.13	0.15
	对乙酰氨基酚口崩片	0.51	0.16	0.16
中药类	百荷冻干含化糖	11.04	8.24	8.74
	霍山石斛口崩片	3.07	2.85	2.85
	桑葚口崩片	4.19	3.17	3.35
	银杏叶冻干口崩片	5.17	5.92	6.86
蛋白类	胶原蛋白肽透明质酸钠冻干含化糖	5.00	0.11	0.67
	地龙蛋白含化糖	1.69	3.79	3.97
其他	透明质酸钠冻干泡腾片	3.56	6.85	6.85

2.1.6　真密度测定　试验前应将全自动真密度分析仪，以及试验材料、用具处于试验室恒温环境下放置 24 h 以上。准备开始测定样品的真密度，首先打开氦气阀，调压力为 0.13 ～ 0.14 MPa，打开仪器电源，预热 30 min，使仪器恒温，然后对仪器进行校准。校准完成后，取适量样品，精密称定，放入样品池内进行测定，依次测定 10 批样品，结果如表 5 所示。10 批冻干口崩片的真密度较为接近，在 1.473 ～ 1.862 g • cm^{-3}。

2.1.7　比表面积测定　使用氮气吸附法测定冻干口崩片的比表面积，首先开启氮气瓶的主阀，确认压力不低于 5 MPa，再将加压阀压力调至 0.08 MPa，然后开启仪器，准备做样品的前处理，取适量样品放入提前称好重量的样品管中，一起精密称定并记录，再将样品管安装在脱气站上，进行脱气处理，脱气完成后，将样品管取下精密称定，再将样品管安装在分析站上，进行测试，记录试验结果，依次测定 10 批冻干口崩片，结果如表 5 所示。

从表 5 可以看出，剔除偏离较大的数据（百荷）后，冻干口崩片的比表面积为 1.431 ～ 5.192 m^2 • g^{-1}，化药类平均比表面积高于中药类，百荷冻干含化糖比表面积较低，推测为冻干曲线不合适，在冻干过程中没有形成孔道。

2.1.8　孔隙率测定　使用压汞仪来测定冻干口崩片的孔隙率，将仪器打开后，取适量样品装入样品管中，然后将样品管密封，精密称定总重量并记录，把检测套加在样品管头上锁住，然后进行低压孔隙分析测试以及高压孔隙分析测试，依次测定 10 批样品，结果如表 5 所示，剔除偏离较大的数据（百荷冻干含化糖）后，10 批冻干口崩片的平均孔径大小为 10 254.31 ～ 29 207.12 nm，孔隙率为 76.76% ～ 86.98%。

2.1.9　加速试验　取氯雷他定口崩片 300 片放置在温度（40±1）℃，湿度（75±5）% 的恒温恒湿箱中 6 个月，分别于 0、1、2、3、6 个月取样，测定其外观、含量、有关物质、水分、崩解时限。试验结果如表 6 所示。

① 外观、水分、崩解时限测定：外观测定方法按“2.1.1”项下方法；水分测定按“2.1.4”项下方法；崩解时限测定按“2.1.3”项下方法。

② 含量测定：照高效液相色谱法（《中国药典》2020 年版四部通则 0512）测定。色谱柱用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；流动相为乙腈 - 甲醇 -0.02% 的二乙胺溶液（50∶20∶30）（用磷酸调 pH 值至 4.0±0.1）；检测波长 247 nm；进样量 20 μL；流速 1.0 mL • min^{-1}；柱温 25 ℃。

测定法：取本品 10 片（相当于氯雷他定 100 mg），置 100 mL 量瓶中，加水 5 mL，超声处理 2 min，加流动相 80 mL，再超声处理 15 min，加

表 5 物理常数测定结果

Tab 5 Physical constants

类别	样品	真密度 /（g·cm^{-3}）	比表面积 /（m^2·g^{-1}）	平均孔径 /nm	孔隙率 /%
化药类	氯雷他定口崩片	1.862	4.336	14 039.37	86.95
	他达拉非口崩片	1.661	5.192	10 254.31	80.29
	对乙酰氨基酚口崩片	1.713	2.779	29 207.12	76.76
中药类	百荷冻干含化糖	1.604	0.146	58 411.93	65.96
	霍山石斛口崩片	1.756	3.371	24 401.3	86.98
	桑葚口崩片	1.585	1.431	24 059.99	84.62
	银杏叶冻干口崩片	1.544	2.060	10 944.73	81.49
生物类	胶原蛋白肽透明质酸钠冻干含化糖	1.473	2.012	11 114.23	78.83
	地龙蛋白含化糖	1.597	3.157	17 072.65	81.75
其他	透明质酸钠冻干泡腾片	1.788	4.584	11 655.91	77.81

流动相稀释至刻度，作为储备液；精密量取储备液 10 mL，置 50 mL 量瓶中，加流动相稀释至刻度，用聚四氟乙烯滤膜滤过，取续滤液作为供试品溶液。另精密称取 105 ℃干燥至恒重的氯雷他定对照品适量，加流动相溶解并稀释成每 1 mL 中含氯雷他定 0.1 mg 的溶液，作为对照品溶液。分别吸取供试品溶液和对照品溶液各 20 μL 注入液相色谱仪，记录色谱图，按外标法以峰面积计算，即得。

③ 有关物质测定：记录色谱图至主峰保留时间的 3 倍，供试品溶液色谱图中如有杂质峰，各杂质峰面积的总和不得大于对照溶液主峰面积（1.0%），单个杂质峰的峰面积不得大于对照溶液主峰面积的 0.5 倍（0.5%）。

2.2 各评测结果相关性分析

表 6 加速试验测定结果

Tab 6 Accelerated test

检测项	外观评分	单一杂质 /%	总杂质 /%	含量 /%	水分 /%
0	100	0.10	0.30	102.80	2.40
1	100	0.06	0.20	103.40	2.20
2	98	0.06	0.20	100.40	2.40
3	99	0.06	0.20	101.30	2.40
6	98	0.07	0.30	101.70	2.50

将上述结果导入 SPSS 20.0 进行相关性分析，首先对 8 组数据的正态分布进行分析，符合正态分布的组别使用 Pearson 相关性分析，不符合正态分布的组别使用 Spearman 相关性分析，结果如表 7 所示：水分含量与比表面积成强负相关关系；水分含量与引湿性成极强正相关关系；崩解时限与孔隙率成强负相关关系；真密度与比表面积成强正相关关系。

表 7 评测结果相关性分析

Tab 7 Correlation analysis of evaluation

项目	比表面积	平均孔径	孔隙率	水分	崩解时限	片重	引湿性	真密度
比表面积	1							
平均孔径	− 0.418	1						
孔隙率	0.486	− 0.127	1					
水分	− 0.697*	0.030	− 0.188	1				
崩解时限	− 0.322	0.237	− 0.687*	0.243	1			
片重	− 0.530	0.030	− 0.321	0.164	0.535	1		
引湿性	− 0.390	0.237	− 0.512	0.796**	0.473	− 0.145	1	
真密度	0.696*	0.224	0.304	− 0.564	− 0.116	− 0.582	− 0.206	1

注（Note）：$^*P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

3 讨论

考虑到国内已上市的冻干口崩片品种较少，本研究除选取已上市产品外，其余冻干口崩片均采用与已上市药品相同的制备工艺得到。因此，可以保证其质量稳定可靠。且选取的品种类别涵盖范围较广，得到的质量评价结果具有较高的可信度与普适性。自冻干口崩片收载于 2015 年版《中国药典》以来，其质量评价的发展比较缓慢，国内研究大多为对于某一种产品的崩解时限、溶出度、含量测定等，进行质量评测，本文针对这一剂型进行系统性的质量评价研究，为其质量标准的制定提供了新方法、新思路。

冻干口崩片容易出现颜色不均匀、裂片、底部融化、中心融化、黏片等现象。冻干口崩片片

型的好坏与其冻干前溶液均匀度、处方、冻干曲线等因素有关，出现裂片现象可适当增加黏合剂进行改善，出现融化现象可适当调整冻干曲线。图 3、图 4 为冻干口崩片的三维显微结构图与切片图，可看见其疏松多孔的骨架结构，API 均匀的分布在骨架结构上，这也是其可以快速崩解的原因。

图 3　氯雷他定口崩片在 X 线三维显微镜下的结构

Fig 3　Structure of loratadine orally disintegrating tablets under X-ray three-dimensional microscope

图 4　氯雷他定口崩片在 X 线三维显微镜下的切片图

Fig 4　Sectional view of loratadine orally disintegrating tablet under X-ray three-dimensional microscope

2020 年版《中国药典》规定冷冻干燥法制备的口崩片可不进行崩解时限检查，但是在研究中发现，也存在几种冻干口崩片的崩解时限超出了药典规定的 60 s，经过多次试验，推测崩解慢与其规格较大或者原料的黏性大有关。

从相关性分析可以看出，水分含量与比表面积成负相关、与引湿性成正相关，水分含量越低的冻干片比表面积越大，引湿性越弱，因此可以通过控制冻干口崩片的水分，从而来保证其质量；崩解时限与孔隙率成负相关，孔隙率越高的冻干口崩片崩解速度越快，因此可以通过增大孔隙率的方法来加快其崩解的速度。

本研究通过对外观、片重差异、崩解时限、水分、真密度、比表面积、孔隙率、引湿性试验的评测，可以初步判断冻干口崩片的质量优劣。但是这些方法评价标准的制订还需积累更多的数据。药品审批过程中涉及到的一些方法也可用于质量评价，如口感、口味，含量均匀度，有关物质，溶出度，溶出曲线，稳定性试验等。质量评价研究可以帮助快速发现和解决在研发、生产过程中遇到的问题，从而保证产品的质量。准确客观的冻干口崩片质量评价方法，可以为其质量标准的建立提供依据，推动冻干口崩片剂型的发展，服务更多的患者，提高其用药依从性。

参考文献

[1] 王晓玲，钟武 . 新型口腔崩解用冻干片剂的研究进展 [J]. 国际药学研究杂志，2016，43（4）：632-638.

[2] 焦慧英，李艳芳，谢向阳 . 氯雷他定纳米混悬剂冻干口崩片的制备与质量评价 [J]. 中国药师，2020，23（10）：1944-1948，1966.

[3] Badgujar B，Mundada A. The technologies used for developing orally disintegrating tablets：a review [J]. Acta Pharmaceutica，2011，61（2）：117-139.

[4] 郭蕾，张俊龙，李钦青，等 . 口腔崩解片的研究进展 [J]. 中华中医药学刊，2014，32（7）：1558-1560.

[5] 李聘，檀丽萍，吴茜，等 . 冻干型口崩片的研究进展 [J]. 中国药师，2020，23（11）：2253-2257.

[6] Vanbillemont B，Everaert H，Beer TD. New advances in the characterization of lyophilised orally disintegrating tablets [J]. Int J Pharm，2020，579：119153579.

[7] 李伟伟，史建俊 . 口腔崩解片的研究进展 [J]. 唐山师范学院学报，2014，36（5）：32-34.

[8] Bryant BR，Rivera-Muniz HV，Joon PT，et al. Knowledge surrounding proper administration of antipsychotic orally disintegrating tablets [J]. Gen Hosp Psychiatry，2021，68（1）：107-108.

[9] Mohammed AR. The role of formulation excipients in the development of lyophilised fast-disintegrating tablets [J]. Eur J Pharm Biopharm，2009，72（1）：119-29.

[10] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：2.

[11] 郭婷婷 . 盐酸非索非那定和盐酸氟西汀冻干口崩片的研究 [D]. 北京：北京化工大学，2017.

[12] 王金，王静，方瑜，等 . 吲达帕胺冻干口腔崩解片的质量控制和稳定性考察 [J]. 中国医院药学杂志，2009，29（8）：676-677.

[13] 龙斯思，李龙威，罗堃，等 . 口腔崩解片的应用及研究进展 [J]. 亚太传统医药，2016，12（14）：92-95.

[14] 李红鑫，吴菲，吴婧楠，等 . 基于星点设计 - 响应面法的红景天提取物冻干口崩片制备工艺研究 [J]. 中南药学，2021，19（12）：2545-2548.

[15] 王亚森 . 建立产品质量评价体系的战略意义及可行方法 [J]. 重庆与世界（学术版），2016，33（4）：25-34.

（收稿日期：2022-01-02；修回日期：2022-03-05）

联合质谱法与光谱法探讨辐照前后医用胶原蛋白海绵的三螺旋结构及变化

程红[1]，田锐[2]（1. 华中科技大学分析测试中心，武汉 430074；2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院，武汉 430030）

摘要：目的 探讨辐照灭菌前后医用胶原蛋白海绵的三螺旋结构及变化。**方法** 使用热裂解气质联用仪（Py-GCMS）对γ-射线辐照前后的胶原蛋白海绵进行测试，通过分析裂解组分探讨其三螺旋结构及变化。使用拉曼光谱技术佐证辐照前后胶原蛋白海绵三螺旋结构的变化，进一步通过对样品的圆二色光谱数据进行计算来分析判断辐照前后三螺旋结构的完整性是否改变。**结果** 辐照后胶原蛋白海绵的局部肽链断裂导致交联度降低，但是其完整的三螺旋结构得以保持。**结论** 该工作可为胶原蛋白相关研究提供实验参考，为胶原蛋白海绵的生产企业提供技术支撑。

关键词：胶原蛋白海绵；三螺旋结构；热裂解；气相色谱；质谱；拉曼光谱；圆二色光谱
中图分类号：O657.63，O657.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1280-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.011

Triple-helix structure and changes of medical collagen sponge before and after the irradiation by mass spectrometry and spectroscopy

CHENG Hong[1], TIAN Rui[2] (1. *Analytical and Testing Center*, *Huazhong University of Science and Technology*, *Wuhan* 430074; 2. *Tongji Hospital*, *Tongji Medical College*, *Huazhong University of Science and Technology*, *Wuhan* 430030)

Abstract: Objective To determine the impact of gamma irradiation sterilization on the structural integrity of collagen sponges. **Methods** Two samples were tested by pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry, and then the triple-helix structure and its changes were discussed by analyzing the pyrolysis components. Raman spectroscopy was used to verify the changes of collagen sponge after the irradiation. The circular dichroism spectrum data of the samples were calculated to analyze and tell the integrity of the triple-helix structure after the irradiation. **Results** The self-crosslinking degree of collagen sponge was decreased after the irradiation sterilization due to local peptide chain breakage, but the integrity of triple-helix structure maintained ultimately. **Conclusion** This work provides an experimental reference for collagen related research and technical support for collagen sponge manufacturers.

Key words: collagen sponge; triple-helix structure; pyrolysis; gas chromatography; mass spectrometry; Raman spectroscopy; circular dichroism spectrum

胶原蛋白是哺乳动物体内最丰富的蛋白质，是细胞外基质中的主要结构蛋白，广泛存在于皮肤、骨骼、肌腱、韧带和其他结缔组织中[1-2]，主要用于止血海绵、软组织增强注射物、细胞产品基质以及药物输送的载体[3]。其中，胶原蛋白海绵具有吸收组织渗出物、透气性好、促进上皮细胞生长和肉芽组织生成等优良特性，可应用于止血和创面愈合[4]。手术创伤引起不同程度的出血和渗血直接影响手术的治疗效果。手术中采用物理、机械或化学的止血方法均存在一定的局限性和不良反应，而胶原蛋白类的止血敷料则是一种有益的补充，如在胆囊切除手术、T 管引流手术、阑尾切除手术、胃大部切除手术、肝叶切除手术、胰十二指肠切除术、左半或右半结肠切除

基金项目：湖北省自然科学基金项目（No.2019CFB464）；华中科技大学实验技术项目（No.013405006）。
作者简介：程红，女，硕士，高级工程师，主要从事仪器分析工作，email：chenghong@hust.edu.cn

手术（切除后端 - 端吻合）、脾脏切除等相关手术中均能获得稳定而满意的止血效果。在大多数的手术操作中，在切除的断端或出血的局部，应用 1 ～ 2 片胶原蛋白海绵短暂压迫即可达到止血的目的 [5]。

胶原蛋白和胶原蛋白海绵的共同特点是三螺旋结构 [6]：三条 α 多肽链形成超螺旋构象，出现频率最高的氨基酸序列是 -Gly-Y-Z，其中甘氨酸（Gly）代表每隔两个氨基酸就出现的重复残基，Y 和 Z 是脯氨酸（Pro）和羟脯氨酸（Pro-OH）。由三条相同大小的多肽链组成的三螺旋结构是胶原的基本结构单元，其分子量约为 285 kDa [7]。使用质谱直接测定天然胶原蛋白的分子量仍然具有挑战性 [8]，电喷雾电离质谱适合分析相对分子质量在 20 万以下的极性化合物，对于胶原蛋白来说，通常是在一定转变温度内，当三螺旋结构由三股胶原转变为单链时测定 [9]。使用热裂解气质联用仪（Py-GCMS）测试胶原蛋白可以通过裂解产物分析天然蛋白的分子结构，为分析蛋白质中的氨基酸组成提供了另一种思路。同时，新一代商用拉曼仪器促进了拉曼（Raman）光谱在生物科技和食品工业中的诸多应用 [10-11]，Raman 光谱已成为蛋白质科学的一种通用工具 [12-13]。圆二色（CD）光谱则可以分析胶原蛋白的三螺旋构象是否得以保留 [14]。

目前，胶原蛋白海绵应用最广泛的灭菌方法是 γ- 射线辐照。该方法被认为是最简单和有效的灭菌方法，不会产生有毒物质，不会破坏化学键，不会降低拉伸强度和模量，从而不会从根本上影响到被辐照的材料 [15]。但是 γ- 射线辐照对于胶原蛋白三螺旋结构的影响尚不明确。本文使用 Py-GCMS 对灭菌前后的胶原蛋白海绵的三螺旋结构进行测试，研究其辐照前后的结构变化，并使用 Raman 光谱观察辐照对胶原蛋白海绵三螺旋结构的影响，进一步通过对其 CD 光谱数据进行计算来分析判断辐照前后胶原蛋白海绵三螺旋结构的完整性是否发生改变。该工作可为胶原蛋白相关科研工作提供实验参考，并可为胶原蛋白海绵的生产企业在研究辐照灭菌的剂量和时长方面的测试提供技术支撑。

1　材料

1.1　仪器

Agilent 7890A/5975C 气相色谱质谱联用仪（美国 Agilent 公司，配有美国 CDS 公司 Pyroprobe 6150 型热裂解仪）；HR-800 型激光共焦 Raman 光谱仪（Horiba Jobin Yvon 公司）；J-810 型圆二色光谱仪（日本 Jasco 公司）。

所有试剂均为分析纯；实验用水为超纯水（电阻率为 18 MΩ • cm）。

1.2　样品

未辐照胶原蛋白海绵：由武汉某生物材料有限公司提供，经由采用酸酶联合法提取自牛跟腱的胶原蛋白原液（批号为 YF19070001）冷冻干燥得到，使用前未做任何处理。辐照后胶原蛋白海绵：由同一生物材料有限公司提供，系同批号的未辐照胶原蛋白海绵经过 γ- 射线辐照后的样品。

2　方法与结果

2.1　Py-GCMS

热裂解参数：热裂解温度 500 ℃；裂解时间 6 s；阀温 325 ℃；传输线温度 350 ℃。色谱条件：色谱柱 HP-5ms 弹性石英毛细管柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm，美国 Agilent 公司）；载气高纯氦；柱流速 1 mL • min^{-1}；采用分流进样，分流比 20∶1；进样口温度 280 ℃；柱温 40 ℃保持 1 min，6 ℃ • min^{-1} 升至 300 ℃，保持 10 min。

质谱条件：离子源 EI；离子源温度 230 ℃；四极杆温度 150 ℃；质量扫描范围 30 ～ 600 *m/z*。准确称取辐照前后的胶原蛋白海绵各 1 mg，分别填入石英管，经热裂解后进行 GC-MS 全扫描分析，得到的总离子流图见图 1。辐照前后的总离子流图使用相同的积分参数进行处理，经 NIST14 谱库检索得到谱峰对应的化合物，选取匹配度大于 60% 的产物列于表 1，采用峰面积归一化法计算面积百分比含量。表 1 中产物主要分为乙腈类、吡咯环及衍生物类、酰胺类、芳烃和烷烃几种，其中含吡咯环化合物占总裂解产物的比例分别为 28% 和 23%，较好地说明了胶原蛋白海绵的结构组成。

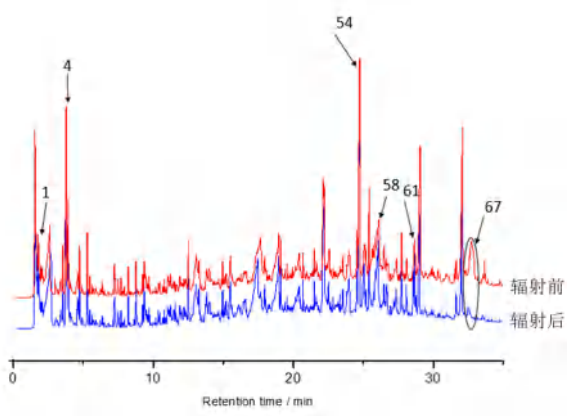


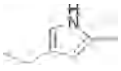
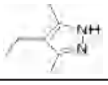
图 1　γ- 射线辐照前后胶原蛋白海绵的 Py-GCMS 总离子流图

Fig 1　Total ion chromatogram of Py-GCMS collagen sponge before and after the gamma irradiation

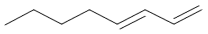
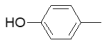
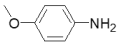
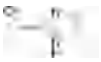
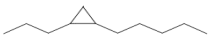
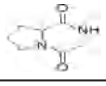
胶原蛋白三螺旋是由三条相同或不同的胶原蛋白肽相互缠绕得到特征的右手三螺旋，其中

表 1 辐照前后胶原蛋白海绵裂解产物

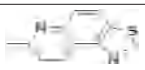
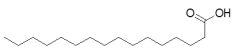
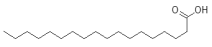
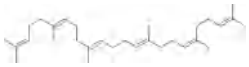
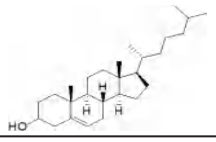
Tab 1 Collagen sponge pyrolysis products before and after the irradiation

编号	保留时间 /min	裂解产物	结构式	可能的来源	峰面积百分比 /%	
					辐照前	辐照后
1	1.763	乙腈		脯氨酸	1.38	1.21
2	2.539	乙酸		提取使用的溶剂	3.02	4.47
3	3.535	二甲基二硫		二硫键	0.55	0.51
4	3.774	吡咯		脯氨酸	3.11	3.52
5	3.910	甲苯		其他蛋白	1.20	1.29
6	4.602	乙酰胺		脯氨酸和羟脯氨酸	0.54	0.63
7	4.725	1- 乙基 -1H- 吡咯		脯氨酸和羟脯氨酸	0.46	0.48
8	4.880	2- 甲基吡啶		不明	0.14	0.12
9	5.275	3- 甲基 -1H- 吡咯		脯氨酸和羟脯氨酸	0.77	0.80
10	5.450	2- 甲基 -1H- 吡咯		脯氨酸和羟脯氨酸	0.18	0.19
11	5.605	糠醇		不明	0.07	0.09
12	5.696	间二甲苯		其他蛋白	0.07	0.07
13	5.883	4- 甲基吡啶		不明	0.06	0.09
14	6.239	丙酰胺		脯氨酸和羟脯氨酸	0.08	0.09
15	6.342	苯乙烯		其他蛋白	0.12	0.13
16	7.209	3- 乙基 -1H- 吡咯		脯氨酸和羟脯氨酸	0.36	0.51
17	7.254	2，3- 二甲基 -1H- 吡咯		脯氨酸和羟脯氨酸	0.14	/
18	7.474	2，5- 二甲基 -1H- 吡咯		脯氨酸和羟脯氨酸	0.17	0.17
19	7.675	3- 乙基 -1H- 吡咯		脯氨酸和羟脯氨酸	0.14	0.15
20	7.798	2，3- 二甲基 -1H- 吡咯		脯氨酸和羟脯氨酸	0.06	0.06
21	8.225	二甲基三硫		二硫键	0.22	0.27
22	8.328	2- 乙基 -4- 甲基 -1H- 吡咯		脯氨酸和羟脯氨酸	0.06	0.05
23	8.464	苯胺		不明	0.05	/
24	8.949	3- 乙酰基 -1- 甲基吡咯		脯氨酸和羟脯氨酸	0.05	/
25	9.137	2- 乙基 -4- 甲基 -1H- 吡咯		脯氨酸和羟脯氨酸	0.05	0.05
26	9.24	2- 乙基 -4- 甲基 -1H- 吡咯		脯氨酸和羟脯氨酸	0.18	0.25
27	9.305	乙酰胺		不明	0.05	/
28	9.363	2- 氨基吡啶		不明	0.49	0.68
29	9.590	2- 乙基 -4- 甲基 -1H- 吡咯		脯氨酸和羟脯氨酸	0.18	0.18
30	9.700	2- 乙基吡啶		不明	0.17	0.17
31	10.165	4- 乙基 -3，5- 二甲基 -1H- 吡咯		脯氨酸和羟脯氨酸	0.04	0.07

续表 1

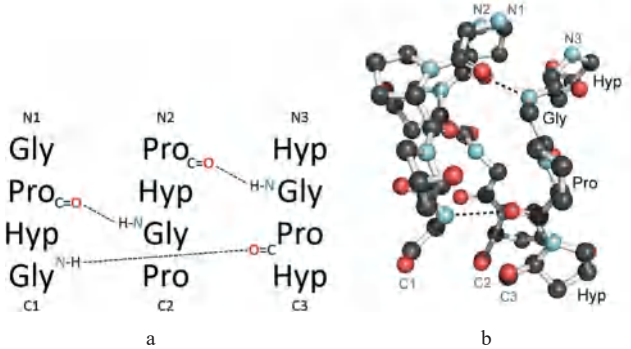
编号	保留时间 /min	裂解产物	结构式	可能的来源	峰面积百分比 /%	
					辐照前	辐照后
32	10.444	1- 戊基 -1H- 吡咯		脯氨酸和羟脯氨酸	0.07	0.11
33	10.663	2- 乙酰基吡咯		脯氨酸和羟脯氨酸	0.07	0.17
34	10.78	1，3- 辛二烯		脂肪	0.13	0.17
35	11.013	对甲酚		其他蛋白	0.17	0.40
36	11.052	间甲酚		其他蛋白	0.20	/
37	11.543	3- 乙基 -2，5- 二甲基 -1H- 吡咯		脯氨酸和羟脯氨酸	0.09	/
38	11.601	2- 氨基 -3- 甲基吡啶		不明	0.10	/
39	11.685	3- 乙基 -2，5- 二甲基 -1H- 吡咯		脯氨酸和羟脯氨酸	0.13	0.11
40	11.88	2，3- 环戊烯并吡啶		不明	0.19	0.40
41	11.944	2，3，4，5- 四氢吡啶		不明	0.12	/
42	12.242	对氨基苯甲醚		其他蛋白	0.09	/
43	12.332	吲哚		其他蛋白	0.12	/
44	12.501	苯乙腈		其他蛋白	0.65	0.78
45	13.057	3- 氰基吡咯		脯氨酸和羟脯氨酸	1.72	2.31
46	14.952	苯代丙腈		其他蛋白	0.29	0.35
47	15.502	2- 吡啶甲酰胺		不明	0.80	0.97
48	16.233	吲嗪		脯氨酸和羟脯氨酸	0.26	0.30
49	16.576	2- 哌啶基乙酸		不明	0.32	/
50	17.481	1H- 吡咯 -2- 甲酰胺		脯氨酸和羟脯氨酸	2.49	2.52
51	17.663	2- 吡咯甲酸甲酯		脯氨酸和羟脯氨酸	2.44	/
52	18.206	2- 乙酰基 -5- 甲基咪唑		脯氨酸和羟脯氨酸	0.24	0.33
53	24.552	2-isopropylidene-5，6，7，8-tetrahydro-2H-imidazo[1，2-a]pyridin-3-one		脯氨酸和羟脯氨酸	0.76	0.77
54	24.739*			两分子羟脯氨酸缩合脱去两分子水和四个氢	4.01	4.31
55	25.198	2H-naphtho[1，8-bc]thiophene，2-methyl-		不明	0.45	0.33
56	25.425	5- 苯基 -1，4- 二甲基咪唑		不明	1.11	1.78
57	25.651	cyclopropane，1-pentyl-2-propyl-		脂肪	1.23	/
58	26.136	pyrrolo[1，2-a]pyrazine-1，4-dione，hexahydro-		脯氨酸和甘氨酸缩合脱去两分子水	4.83	4.15

续表 1

编号	保留时间 /min	裂解产物	结构式	可能的来源	峰面积百分比 /%	
					辐照前	辐照后
59	26.964	thiazolo[4，5-f]quinoline，7-methyl		不明	0.17	0.30
60	27.126	exo-2-Methyl-endo-2-(acetylamino)norbornane		不明	0.17	/
61	28.692*			两分子脯氨酸缩合脱去两分子水	1.27	0.82
62	29.067	棕榈酸		脂肪	3.56	2.04
63	29.468	2H-pyrrol-2-one，1，5-dihydro-4-(1-pyrro-lidinyl)-		脯氨酸和羟脯氨酸	0.37	/
64	30.47	1H-indolizino[8，7-b]indole-1-propanol，.be-ta.-ethyl-2，3，5，6，11，11b-h exahydro-		脯氨酸和羟脯氨酸	0.22	0.11
65	31.667	油酸		脂肪	0.45	0.34
66	32.107	硬脂酸		脂肪	3.9	2.01
67	32.767*			羟脯氨酸和甘氨酸缩合脱去两分子水；羟脯氨酸和脯氨酸缩合脱去两分子水	2.91	0.42
68	37.838	正二十六烷		脂肪	0.14	0.03
69	39.054	正二十七烷		脂肪	0.16	0.04
70	40.238	正二十八烷		脂肪	0.22	0.05
71	40.626	角鲨烯		脂肪	0.16	/
72	41.377	正二十九烷		脂肪	0.25	0.06
73	43.912	胆固醇		提取物	0.21	0.27

注（Note）：*结构式为推导得到（The structural formula was derived）。

每一条多肽链各自采取左手螺旋的聚脯氨酸Ⅱ型（polyproline type Ⅱ，PPⅡ）螺旋结构[6]，见图 2，通过热裂解质谱可以观察到胶原蛋白组成中的三种氨基酸两两通过肽键缩合形成的哌嗪二酮（diketopiperazine，DKP）特征结构，在裂解产物列表中可见 5 个 DKP 结构，对应峰编号为 54、58、61、67（含两个峰），其质谱图分别见图 3，对应的产物分析见图 4。从图 4 中可以看出，两分子氨基酸之间的缩合以羧酸和氨基反应脱去两分子水为主，而当羟脯氨酸自身缩合时，由于结构中还存在羟基，脱去了四分子水和四分子氢。这些 DKP 产物印证了胶原蛋白海绵的分子结构。在总离子流图中，辐照后的样品第 67 号峰高出现明显下降，说明辐照对于胶原蛋白海绵的结构产生了一定影响，证实辐照导致了胶原蛋白三螺旋结构中局部羟脯氨酸与甘氨酸和脯氨酸的连接丢失，自身的共价交联度变低。值得注意的是，当裂解温度不变而裂解时长加长至 1 min 时或样品风干后，结果类似，即第 67 号峰出现明显下降或消失，这说明辐照、温度、失水等因素对羟脯氨酸与甘氨酸和脯氨酸的影响一致，而且羟脯氨酸与甘氨酸和脯氨酸的连接相较其他连接而言对这些因素更为敏感。



a b

图 2 胶原蛋白三螺旋结构片段的平面图（a）和球 - 棒图（b）

Fig 2 Plane graph（a）and ball-and-stick graph（b）of segments of triple-helix collagen

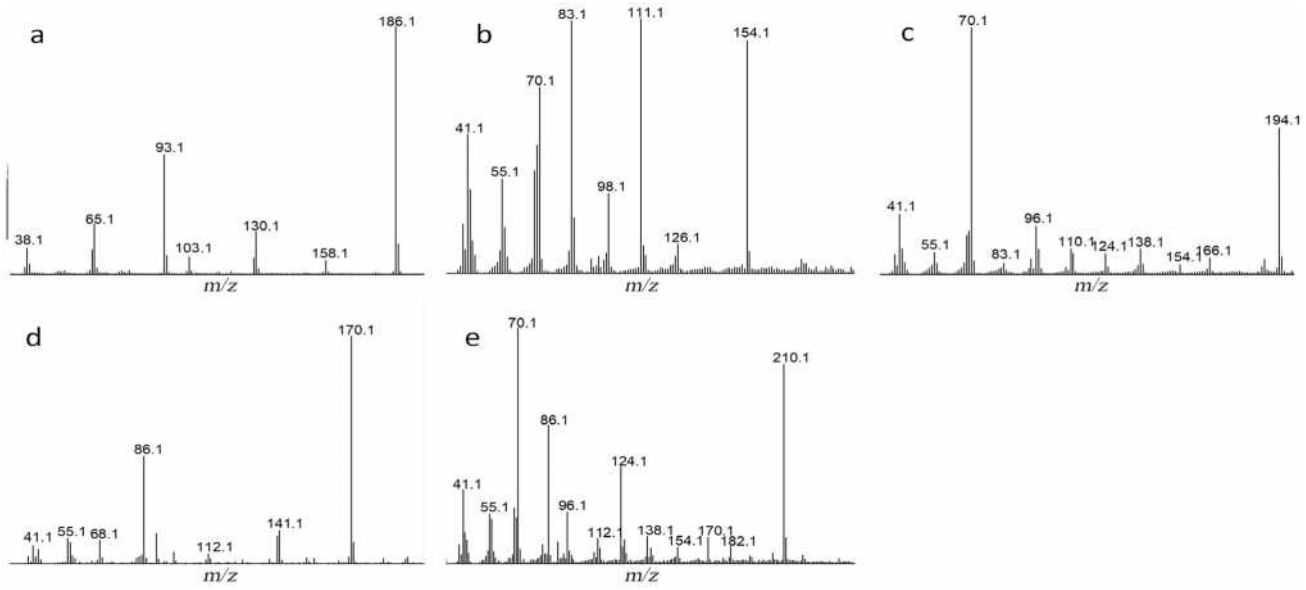


图 3　Hyp-Hyp（a），Pro-Gly（b），Pro-Pro（c），Gly-Hyp（d），Pro-Hyp（e）的 DKP 质谱图

Fig 3　DKP mass spectra of Hyp-Hyp（a），Pro-Gly（b），Pro-Pro（c），Gly-Hyp（d），and Pro-Hyp（e）

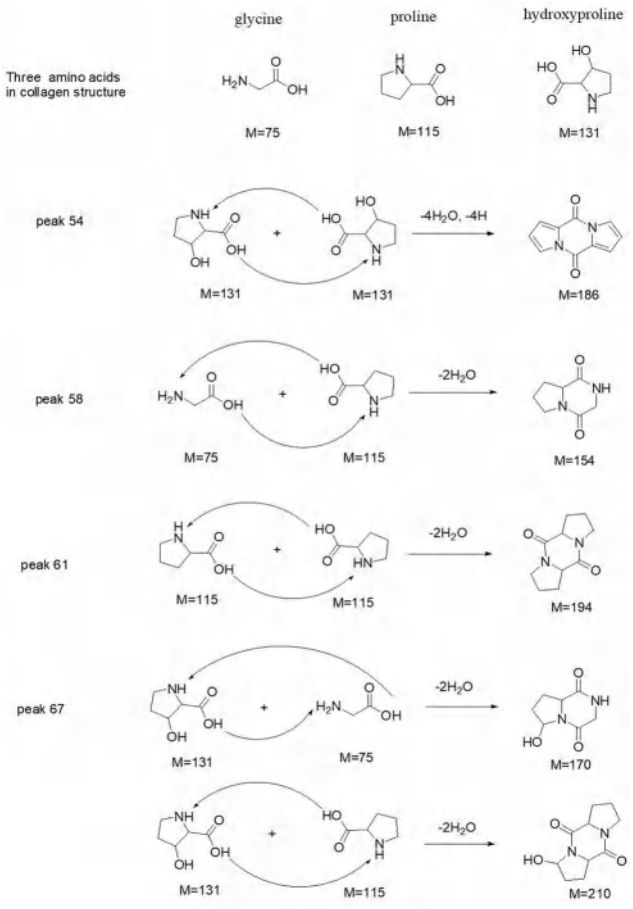


图 4　裂解产物中 DKP 的分析

Fig 4　DKP in pyrolysis products

2.2　Raman

将辐照前后的胶原蛋白海绵放在样品台上进行常温 Raman 光谱测试。激发源为 Nd-YAG：532 nm，采用 600 gr/mm 光栅，×50LWD 物镜，200 μm 针孔，60 s 曝光时间，为避免激光高温灼伤样品，在样品表面覆盖一片薄的石英片。测试前，使用单晶硅对峰位进行校准。测试得到 Raman 光谱图，见图 5。

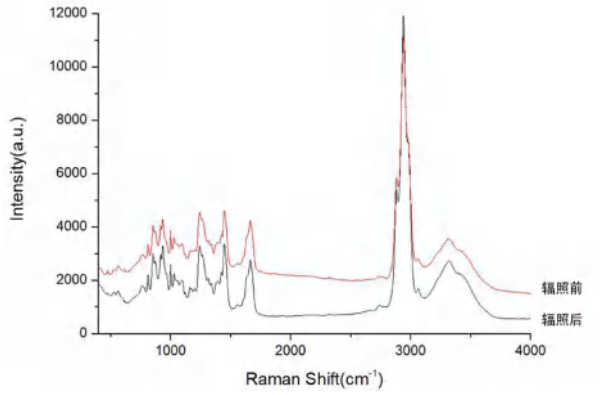


图 5　γ- 射线辐照前后胶原蛋白海绵的拉曼光谱图

Fig 5　Raman spectra of collagen sponge before and after the gamma irradiation

对 Raman 光谱图进行基线校正和归一化处理，基线校正采用 Labspec5 软件（Labspec；Horiba Jobin Yvon，Japan）。在光谱分析中没有使用去噪或平滑处理。脯氨酸和羟脯氨酸吡咯烷环上亚甲基的反对称和对称伸缩振动峰，以及酰胺 A 带、Ⅰ带和Ⅲ带是 Raman 光谱的主要组成部分。酰胺Ⅱ带在红外光谱中很强，但在 Raman 光谱中很弱。主要谱峰的归属见表 2。获得的 Raman 光谱数据在 γ- 射线辐照前后几乎相同，但当用最高峰归一化时，我们发现辐照后的谱峰强度普遍得到了增强，说明辐照对胶原的交联结构产生了一定影响。根据 Born-vonkamann 周期性条件，Raman 频率满足 $\lambda = \pi/N$，式中，π 为常数，N 是碳原子数目，由于胶原蛋白中 N 值超过 10 000，

所以少量碳原子数目变化不会影响 Raman 位移。因此，在本实验中，辐照前后样品的 Raman 频移变化不大。但强度有变化，是由于 Raman 光谱对氢键网络结构和酰胺附近的条件很敏感[16]，共价交联链局部断裂后氢键作用力减弱，使得分子键的振动加剧，从而强度得以增强。

表 2 胶原蛋白海绵拉曼光谱数据解析

Tab 2 Raman spectra data of collagen sponge

辐照前		辐照后		归属
波数 / cm^{-1}	强度 /%	波数 / cm^{-1}	强度 /%	
3321	23	3313	25	ν 对称（N-H），酰胺 A 带
2941	100	2941	100	ν 反对称（CH_2）
2883	45	2883	48	ν 对称（CH_2）
1664	23	1664	32	ν 反对称（C ＝ O），酰胺Ⅰ带
1448	28	1449	36	δ（CH_2），亚甲基的剪式振动
1265	25	1265	32	ν（C-N），δ（N-H），酰胺Ⅲ带
1243	28	1243	35	ν（C-N），δ（N-H），酰胺Ⅲ带
936	28	936	33	ν（C-C），脯氨酸和羟脯氨酸中与羰基相连的碳碳键伸缩振动
854	25	854	30	ν（C-C），脯氨酸和羟脯氨酸中的吡咯烷环骨架振动

2.3 CD 光谱

准确称取辐照前后的胶原蛋白海绵，使用 0.01 mol • L^{-1} 乙酸水溶液溶解稀释为 0.1 mg • mL^{-1} 的溶液，于 4 ℃冰箱放置过夜，测试前于室温下放置 1 h，注入 1 mm 光程的圆形比色皿中（型号：31/B/Q/1，Starna Scientific Ltd. Hainault，Essex IG6 3UT，United Kingdom）。设置带宽为 1 nm，响应时间 0.5 s，标准灵敏度，扫描范围为 190 ～ 260 nm。为了防止 CD 光谱变形，扫描速度（nm • s^{-1}）和响应时间（s）的乘积应小于半高宽的 10%（蛋白质光谱的半高宽通常约为 15 nm）[17]。本实验设置响应时间为 0.5 s，扫描速度为 100 nm • min^{-1}，再通过数据平滑处理降低噪声，得到高质量的 CD 光谱图，见图 6。

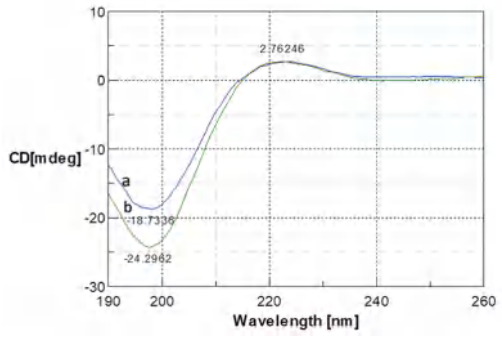


图 6 室温下 γ- 射线辐照前（a）和辐照后（b）胶原蛋白海绵溶液的 CD 光谱图

Fig 6 CD spectra of collagen solution before（a）and after（b）the gamma irradiation at room temperature

对于天然胶原蛋白，理想的 CD 光谱是出现 221 nm 处的明显正峰和 198 nm 处的负峰。在本研究中，医用胶原海绵样品的三螺旋构象由图 6 中的 CD 光谱证实。CD 光谱图中显示负峰和正峰，这表明胶原海绵在 γ- 射线辐照前后呈正常的三螺旋结构。此外，可以使用两个峰（221 nm 处的正峰，198 nm 附近的负峰）的强度比值计算的正负峰强度比（ratio of positive to negative peak intensity，Rpn）用于估计溶液中的三螺旋构象[14]。在本实验中，两个胶原海绵样品显示出良好的 Rpn，辐照前 Rpn 为 0.15，辐照后 Rpn 为 0.11，表明辐照灭菌后保留了三螺旋结构。

3 结论

对于胶原蛋白产品来说，完整的三螺旋结构是保持其稳定性、机械性能和生物活性的重要保证，对胶原蛋白三螺旋结构的理解也将有利于指导用于生物医学和纳米技术的人工胶原材料的进一步开发，因此有必要对其三螺旋结构进行分析。本文联合 Py-GCMS 质谱法和两种光谱方法（Raman 及 CD）对辐照前后胶原蛋白海绵的结构进行了讨论，详细分析了热裂解产物，并对组成胶原蛋白的 3 种氨基酸两两通过肽键缩合形成的 DKP 结构进行了推导，证实了胶原蛋白的三螺旋结构在辐照后发生了肽链的变化。Raman 光谱数据进一步佐证了这一变化，局部肽链断裂导致交联度降低。通过对 CD 光谱的计算和分析，结果表明，辐照前后医用胶原蛋白海绵的三螺旋结构得以保持。联合质谱法和光谱法对胶原蛋白进行分析，有助于更好地理解其三螺旋结构，为胶原蛋白相关科研和胶原蛋白海绵生产企业提供参考依据。

参考文献

[1] Adamiak K，Sionkowska A. Current methods of collagen cross-linking：review [J]. Int J Biol Macromol，2020，161：550-560.

[2] Bazrafshan Z，Stylios GK. Spinnability of collagen as a biomimetic material：a review [J]. Int J Biol Macromol，2019，129：693-705.

[3] ASTM F2212-19 Standard Guide for Characterization of Type I Collagen as Starting Material for Surgical Implants and Substrates for Tissue Engineered Medical Products（TEMPs）[S]. 2019.

[4] Sun LL，Li BF，Song WK，et al. Characterization of Pacific cod（Gadus macrocephalus）skin collagen and fabrication of collagen sponge as a good biocompatible biomedical material [J]. Process Biochem，2017，63：229-235.

[5] 顾其胜 . 胶原蛋白的临床应用 [J]. 中国修复重建外科杂

志，2006，20（10）：1052-1058.
[6] Shoulders MD，Raines RT. Collagen structure and stability [J]. Annu Rev Biochem，2009，78：929-958.
[7] Kim SH，Lee JH，Yun SY，et al. Reaction monitoring of succinylation of collagen with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom，2000，14（22）：2125-2128.
[8] Douglass KA，Venter AR. Protein analysis by desorption electrospray ionization mass spectrometry and related methods [J]. J Mass Spectrom，2013，48（5）：553-560.
[9] Kumar R，Sripriya R，Balaji S，et al. Physical characterization of succinylated type I collagen by Raman spectra and MALDI-TOF/MS and in vitro evaluation for biomedical applications [J]. J Mol Struc，2011，994（1-3）：117-124.
[10] Shi SC，Chang TW. FTIR and Raman study of the structural properties and tribological characteristics of collagen [J]. Opt Quant Electron，2018，50：438.
[11] 程红，王玲 . 圆二色和拉曼光谱法分析Ⅰ型胶原蛋白二级结构及热变性 [J]. 实验室研究与探索，2021，40（5）：31-35.
[12] Unal M，Jung H，Akkus O. Novel Raman spectroscopic biomarkers indicate that postyield damage denatures bone’s collagen [J]. J Bone Miner Res，2016，31（5）：1015-1025.
[13] Fields M，McMillan PF，Spencer N，et al. Structural changes in cartilage and collagen studied by high temperature Raman spectroscopy [J]. Biopolymers，2017，107（6）：e23017.
[14] Akita M，Nishikawa Y，Shigenobu Y，et al. Correlation of proline，hydroxyproline and serine content，denaturation temperature and circular dichroism analysis of type I collagen with the physiological temperature of marine teleosts [J]. Food Chem，2020，329：126775.
[15] Noah EM，Chen JS，Jiao XY，et al. Impact of sterilization on the porous design and cell behavior in collagen sponges prepared for tissue engineering [J]. Biomaterials，2002，23（14）：2855-2861.
[16] Leikin S，Parsegian VA，Yang W，et al. Raman spectral evidence for hydration forces between collagen triple helices [J]. Proc Nat Acad Sci US A，1997，94（21）：11312-11317.
[17] Pelton JT，McLean LR. Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure [J]. Anal Biochem，2000，277（215）：167-176.

（收稿日期：2021-10-25；修回日期：2021-12-20）

五味子总木脂素的富集及微乳制备研究

许煜晨[1]，丁文文[2]，赛那[3]，刘晶[1]，尹东阁[1]，刘曼婷[1]，彭胡麟玥[1]，王开心[1]，杨玉畅[1]，胡盼祥[1]，倪健[1*]，曲昌海[1*]（1. 北京中医药大学中药学院，北京 102488；2. 北京中医药大学生命科学学院，北京 102488；3. 内蒙古医科大学药学院，呼和浩特 010110）

摘要：目的 优化五味子的提取纯化工艺参数，得到较高含量的五味子总木脂素；并经制剂处方工艺优化，制备得到载药量高、稳定性良好的微乳制剂。**方法** 采用回流提取、大孔树脂柱洗脱相结合的方法，对五味子木脂素成分进行富集；建立高效液相色谱法，以五味子醇甲等 8 种成分为指标，考察五味子提取物中总木脂素的含量，明确不同环节的成分转移率；采用超声乳化法制备五味子木脂素微乳，并通过单因素考察，对制剂处方和工艺进行研究。**结果** 建立的 8 种木脂素成分同时测定的方法专属性、准确性和精密度等方法学考察均符合要求；五味子提取物总木脂素含量为 60.85%，其中五味子醇甲等 8 种木脂素成分总含量为 44.57%；以大豆油为油相，吐温 -80 为表面活性剂制备微乳，微乳的平均粒径为 248.3 nm，平均载药量为 2.44 mg•mL^{-1}，pH 值为 6.5。**结论** 建立的五味子提取物中 8 种成分同时测定方法准确可行，可用于其质量控制；提取纯化得到的总木脂素含量较高、重复性良好；制备的五味子微乳载药量较高、粒径均匀、稳定性良好，可为五味子总木脂素的进一步研究奠定基础。

关键词： 五味子；总木脂素；提取纯化；干眼症；微乳
中图分类号： R283.6 **文献标识码：** A **文章编号：** 1672-2981(2022)06-1287-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.012

基金项目： 北京市自然科学基金面上项目（No.7202123）。

作者简介： 许煜晨，女，硕士，主要从事药物制剂新技术及递药系统研究，email：790215289@qq.com *通信作者：曲昌海，男，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事药物制剂新技术及递药系统研究，email：quchanghai@bucm.edu.cn；倪健，男，博士，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，email：njtcm@263.net

Enrichment of total lignans of Schisandrae Chinensis Fructus and preparation of microemulsion

XU Yu-chen[1], DING Wen-wen[2], SAI Na[3], LIU Jing[1], YIN Dong-ge[1], LIU Man-ting[1], PENG Hu-lin-yue[1], WANG Kai-xin[1], YANG Yu-chang[1], HU Pan-xiang[1], NI Jian[1*], QU Chang-hai[1*] (1. *College of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 102488; 2. *College of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 102488; 3. *College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot* 010110)

Abstract: Objective To optimize the extraction and purification parameters of Schisandrae Chinensis Fructus to obtain a higher content of total lignans of Schisandrae Chinensis Fructus; and to prepare a microemulsion formulation with high drug loading and good stability. **Methods** The lignan components of Schisandrae Chinensis Fructus were enriched with the combination of reflux extraction and macroporous resin column elution. The content of lignan, and the transfer rate of components in different links were determined by HPLC. The microemulsion of Schisandra lignans was prepared by ultrasonic emulsification, and the formulation and the preparation process were studied with single factor investigation. **Results** The specificity, accuracy and precision of the established method for the simultaneous determination of 8 lignan components met the requirements. The total lignan content of the Schisandrae Chinensis Fructus extract prepared by the optimized extraction and purification was 60.85%. Among them, the total content of 8 lignans such as schisandrin A was 44.57%. With soybean oil as oil phase, and Tween-80 as the emulsifier surfactant, the microemulsion was prepared with an average particle size of 248.3 nm, and an average drug loading of 2.44 mg • mL^{-1}, with pH of 6.5. **Conclusion** The established method for the simultaneous determination of 8 components in Schisandrae Chinensis Fructus extract is accurate and feasible, and can be used for its quality control. The total lignan content obtained by extraction and purification is high, with good repeatability. The prepared Schisandrae Chinensis Fructus microemulsion has high drug loading and uniformed particle size and good stability, which lays the foundation for further research on total lignans of Schisandrae Chinensis Fructus.

Key words: Schisandrae Chinensis Fructus; total lignan; extraction and purification; xerophthalmia; microemulsion

五味子为木兰科植物五味子[*Schisandra chinensis*（Turcz.）Baill.]的干燥成熟果实，习称“北五味子”，临床主要用于收敛固涩、益气生津、补肾宁心，归肺、心、肾经。木脂素类成分是五味子发挥多种功效的有效成分，具有心肌再灌注损伤的保护作用[1]，可用于治疗心肌梗死[2]，可通过减少自由基的产生及抗氧化作用从而减少癫痫发作次数[3]，通过减轻脑组织神经元变性和脱失防治阿尔茨海默病[4]，通过上调 miR-101-5p 的表达来减轻肝纤维化[5]，缩短小鼠的睡眠潜伏期[6]，且具有明显的抗炎[7-10]、抗焦虑[11]作用。课题组前期研究发现，五味子醇甲等木脂素类成分对于高渗和炎症引起的角膜上皮细胞损伤具有良好的保护作用，具有成为干眼症有效治疗药物的潜力。但是，木脂素多为亲脂性成分，在水中溶解性非常低，不利于滴眼给药。而微乳作为一种新型给药系统，在口服、黏膜、透皮、注射给药及中药制剂中均有广泛应用，能有效提高脂溶性药物的溶解度和生物利用度[12]，在干眼症等眼表疾病的药物递送中也发挥着重要作用[13-17]。因此，本文拟采用回流提取 - 大孔树脂吸附工艺对五味子总木脂素进行富集，并建立测定木脂素类成分的 HPLC 方法，以 8 种成分的总含量为指标对提取纯化工艺进行优化；在此基础上进行总木脂素微乳的处方工艺研究，以期制备得到一种载药量高、粒径均匀的五味子木脂素微乳制剂。

1 仪器与试药

1.1 仪器

1200 型高效液相色谱仪（美国安捷伦公司）；DZTW 型电子调温电热套（北京中仪泓瑞科技发展有限公司）；FW-100 型高速万能粉碎机（北京科伟永兴仪器有限公司）；DHG-9023 型电热鼓风干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司）；RE-52AA 型旋转蒸发仪（北京天林恒泰科技有限公司）；FD-1A-80 ＋型冷冻干燥机（北京博医康实验仪器有限公司）；MS105DU 型万分之一天平 [METTLER TOLEDO 仪器（上海）有限公司]；VM-504 型涡旋混合器（群安实验仪器有限公司）；JY92-IIN 型超声波细胞粉碎机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；ZEN-3600 型马尔文激光粒度仪（英国马尔文公司）；TDL-40B 型低速台式大型离心机（上海安亭科学仪器厂）。

1.2　试药

五味子醇甲（批号：Y30N10H104712）、戈米辛 D（批号：M05J9S65019）、五味子醇乙（批号：P4N10F103016）、当归酰戈米辛 H（批号：P17J9F65870）、五味子酯乙（批号：P07M6S1）、五味子酚（批号：PJ0607SA13）、五味子甲素（批号：R12O8F45508）、五味子乙素（批号：Y26F11Y17148）（纯度：98%，上海源叶生物科技有限公司），乙腈、甲醇为色谱级（Fisher 公司），娃哈哈纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司），大豆油（上海源叶生物科技有限公司），吐温 -80（天津百伦斯生物技术有限公司），AB-8 大孔树脂（东鸿化工有限公司），五味子饮片（安徽桐花堂中药饮片科技有限公司），经北京中医药大学刘春生教授鉴定为木兰科植物五味子 [*Schisandra chinensis*（*Turcz.*）Baill.] 的干燥成熟果实。

2　五味子提取物中 8 种成分的测定

2.1　色谱条件

色谱柱：Agilent zorbax SB-C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：水（A）- 乙腈（C），梯度洗脱（0 ～ 17 min，50%A；17 ～ 30 min，50% → 25%A；30 ～ 40 min，25% → 40%A；40 ～ 45 min，40% → 50%A）；检测波长：254 nm；流速：1.0 mL • min^{-1}；柱温：25 ℃，进样量：10 μL。

2.2　混合对照品溶液的制备

取五味子醇甲、戈米辛 D、五味子醇乙、当归酰戈米辛 H、五味子酯乙、五味子酚、五味子甲素、五味子乙素 8 种对照品适量，精密称定，置同一量瓶中，加适量甲醇超声溶解，甲醇稀释至刻度，摇匀，得质量浓度分别约为 0.23、0.02、0.06、0.04、0.05、0.01、0.02、0.03 mg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.3　供试品溶液的制备

精密称取五味子提取物冻干粉 10 mg，置 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解并定容至刻度。吸取适量过滤，取续滤液进样测定。

2.4　方法学考察

2.4.1　专属性考察　取混合对照品溶液、供试品溶液及空白溶剂（甲醇）进样检测。色谱图见图 1，在样品及对照品出峰处溶剂无干扰，方法专属性良好。

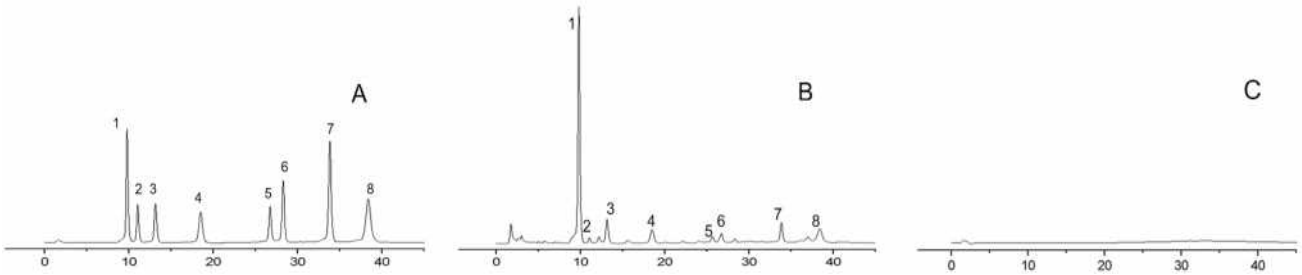


图 1　混合对照品（A）、供试品（B）和空白溶剂（C）的 HPLC 色谱图

Fig 1　HPLC chromatograms of mixed reference substance（A），test substance（B）and blank solvent（C）

1. 五味子醇甲（schisandrin A）；2. 戈米辛 D（gomisin D）；3. 五味子醇乙（schisandrin B）；4. 当归酰戈米辛 H（angeloylogomisin H）；5. 五味子酯乙（schisantherin B）；6. 五味子酚（schisanhenol）；7. 五味子甲素（deoxyschizandrin）；8. 五味子乙素（γ-schizandrin）

2.4.2　线性关系考察　精密吸取 2、2.5、3、3.5、4 mL 混合对照品溶液，置于 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，得系列浓度对照品溶液，进样测定，以对照品质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，并求得线性回归方程，结果见表 1。各成分在线性范围内与峰面积线性关系良好。

2.4.3　精密度考察　取混合对照品溶液，连续进样 6 次，结果五味子醇甲、戈米辛 D、五味子醇乙、当归酰戈米辛 H、五味子酯乙、五味子酚、五味子甲素、五味子乙素峰面积的 *RSD* 值分别为 0.21%、0.43%、0.41%、1.5%、0.16%、0.31%、

表 1　8 种木脂素成分的线性关系考察结果

Tab 1　Linearity of 8 kinds of lignans

成分	线性方程	r	线性范围 /（mg·mL^{-1}）
五味子醇甲	$y = 1849.7x + 150.54$	0.9992	0.046 ～ 0.092
戈米辛 D	$y = 951.1x + 3.2392$	0.9993	0.004 ～ 0.008
五味子醇乙	$y = 1455.8x - 10.742$	0.9991	0.012 ～ 0.024
当归酰戈米辛 H	$y = 1792.3x + 6.632$	0.9992	0.008 ～ 0.016
五味子酯乙	$y = 1113.2x + 14.605$	0.9992	0.010 ～ 0.020
五味子酚	$y = 1379.4x - 6.764$	0.9994	0.002 ～ 0.004
五味子甲素	$y = 1985.2x + 42.636$	0.9991	0.004 ～ 0.008
五味子乙素	$y = 1730.6x - 21.432$	0.9992	0.006 ～ 0.012

0.85%、1.3%，方法精密度良好。

2.4.4　稳定性考察　取同一份供试品溶液，分别在 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样测定。五味子醇甲、戈米辛 D、五味子醇乙、当归酰戈米辛 H、五味子酯乙、五味子酚、五味子甲素、五味子乙素峰面积的 *RSD* 值分别为 0.59%、0.70%、0.69%、0.54%、1.4%、2.3%、0.97%、0.71%，说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5　重复性考察　取五味子提取物冻干粉，按“2.3”项下方法制备 6 份样品溶液，进样测定。测得五味子醇甲、戈米辛 D、五味子醇乙、当归酰戈米辛 H、五味子酯乙、五味子酚、五味子甲素、五味子乙素平均含量的 *RSD* 值分别为 0.080%、0.63%、0.46%、0.20%、0.49%、1.4%、0.10%、0.37%，说明方法重复性良好。

2.4.6　加样回收率考察　精密称取五味子提取物冻干粉 10 mg，共 9 份，置 25 mL 具塞锥形瓶中，分别加入混合对照品溶液 0.8 mL、1 mL、1.2 mL，使低、中、高浓度组中对照品加入量与冻干粉末量之比在 0.8∶1、1∶1、1∶1.2 左右，进样测定，计算加样回收率，测得五味子醇甲、戈米辛 D、五味子醇乙、当归酰戈米辛 H、五味子酯乙、五味子酚、五味子甲素、五味子乙素平均回收率分别为 96.7% ～ 101.3%、97.5% ～ 100.8%、96.6% ～ 103.1%、95.7% ～ 100.1%、97.1% ～ 102.5%、98.3% ～ 100.1%、98.9% ～ 102.9%、99.4% ～ 102.0%，其 *RSD* 值分别为 2.5% ～ 2.6%、1.6% ～ 1.7%、3.6% ～ 3.9%、2.3% ～ 2.4%、2.7% ～ 2.9%、0.99% ～ 1.0%、0.010% ～ 0.020%、0.010% ～ 0.020%，方法准确性良好。

3　五味子总木脂素的富集和微乳制备研究

在前期研究的基础上，采用“95% 乙醇回流提取 - 回收乙醇并浓缩 -70% 乙醇醇沉除杂 - 回收乙醇并浓缩 - 粗提液 -AB-8 大孔树脂柱洗脱 - 回收乙醇并浓缩 - 冻干”的提取纯化工艺路线，对五味子中木脂素类成分进行富集。

3.1　五味子总木脂素的富集

3.1.1　提取和醇沉工艺　称取五味子饮片适量，60 ℃鼓风干燥 3 h 后，粉碎成粗粉，备用。称取上述五味子粗粉约 50 g，置圆底烧瓶中，加入 8 倍量 95% 乙醇，回流提取 2 次，每次 1 h；合并提取液，减压回收乙醇并浓缩至一定体积。向浓缩液中加入适量 95% 乙醇，调节醇浓度至 70%，搅拌均匀并静置 24 h 后，抽滤；上清液减压回收乙醇，并继续浓缩至一定体积得到粗提液，备用。

3.1.2　大孔树脂柱洗脱工艺　AB-8 大孔树脂适量，装柱，径高比 1∶8，对 AB-8 大孔树脂静态吸附率与静态解吸率进行考察，发现其静态吸附率为 90.34%，静态解吸率为 67.64%，可知 AB-8 大孔树脂的静态吸附率较高，解吸性能中等，可通过增加洗脱溶剂的体积来增大解吸率。过柱洗脱过程中发现，采用去离子水与低浓度乙醇梯度洗脱的方式，可有效除去提取液中极性较大的成分，而不流失有效成分。当用 100 mL 的 95% 乙醇洗脱时，有效成分基本被完全洗脱，洗脱曲线如图 2 所示。因此确定本品的洗脱工艺如下：取粗提液适量，上样，静置使吸附完全；依次用去离子水 50 mL、10% ～ 50% 乙醇各 20 mL 洗脱，洗脱液弃去；取 95% 乙醇洗脱至 100 mL，收集洗脱液，减压浓缩至无醇味后转移至西林瓶中，冷冻干燥 72 h，即得五味子总木脂素冻干粉。

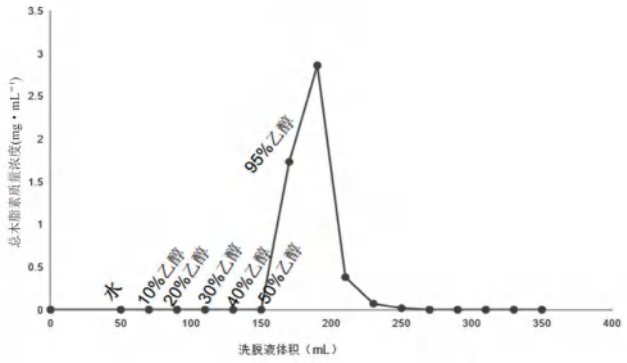


图 2　五味子总木脂素提取液洗脱曲线

Fig 2　Elution curve of total lignans of Schisandrae Chinensis Fructus

3.1.3　各环节样品及转移率的测定　按照“2.1”项下的色谱条件分别测定五味子饮片、95% 醇提液、70% 醇沉液、粗提液及冻干粉中 8 种木脂素成分含量，计算各环节样品中 8 种成分的总含量以及转移率，结果见表 2 和表 3。结果显示，每一个提取环节转移率均较高，由饮片到冻干粉总体转移率为 66.1%。

表 2　五味子总木脂素富集各环节的转移率

Tab 2　Transfer rate of total lignans of Schisandrae Chinensis Fructus in each step

提取工艺	样品量	总木脂素含量	每步转移率 /%	总体转移率 /%
饮片	49.82 g	13.54 mg·g^{-1}	82.7	—
95% 醇提液	1000 mL	0.6197 mg·mL^{-1}	91.9	91.9
70% 醇沉液	250 mL	2.2978 mg·mL^{-1}	92.7	85.2
粗提液	60 mL	9.3024 mg·mL^{-1}	97.2	82.7
冻干粉末	200 mg	445.74 mg·g^{-1}	79.9	66.1

表 3　五味子饮片及冻干粉中 8 种木脂素成分含量

Tab 3　Contents of 8 lignans in decoction pieces and freeze-dried powder of Schisandrae Chinensis Fructus

化合物	饮片 /（mg·g^{-1}）	冻干粉末 /（mg·g^{-1}）
五味子醇甲	5.55	245.20
戈米辛 D	0.37	14.16
五味子醇乙	1.59	55.93
当归酰戈米辛 H	1.02	35.25
五味子酯乙	1.26	37.98
五味子酚	0.23	5.76
五味子甲素	0.97	21.34
五味子乙素	2.55	30.12
五味子总木脂素	13.54	445.74

3.1.4　紫外分光光度法测定总木脂素含量　精密吸取配制的五味子乙素对照品 0.1、0.2、0.5、1、2 mL，分别置 20 mL 比色管中，75 ℃水浴挥去甲醇，依次加入 10% 变色酸水溶液 0.5 mL，浓硫酸 3 mL，蒸馏水 1.5 mL，摇匀，置沸水浴中加热 30 min，溶液呈紫红色，取出放置室温，摇匀，以相应试剂为空白，于 570 nm 处测定吸光度，以质量浓度为横坐标，以吸光度为纵坐标绘制标准曲线，得到回归方程为 $y = 17.96x + 0.4246$（$r = 0.9991$）。吸取样品溶液 0.5 mL，同法操作，测得吸光度值代入标准曲线计算，得到供试品质量浓度为 0.06 mg·mL^{-1}，样品总木脂素的含量为 60.85%，8 种木脂素类成分总含量为 44.57%，占总木脂素提取物的 73.25%。

3.2　五味子总木脂素微乳的制备和评价

采用富集后的五味子总木脂素冻干粉，以大豆油为油相，吐温 -80 为表面活性剂，制备五味子总木脂素微乳。对油水比、表面活性剂用量等因素进行考察，筛选出较优的微乳处方；并通过测定粒径、载药量、离心稳定性、pH 值等对所制得的微乳进行质量评价。

3.2.1　油水比考察　称取大豆油与吐温 -80 适量，置离心管中，涡旋 1 min 混匀，分别加入 0.9、1.9、2.9、3.9、4.9、5.9、6.9、7.9、8.9、9.9 g 纯化水，涡旋 1 min 混匀，得到初乳；初乳经探针超声乳化（150 W，3 min），得到终乳。观察各管的外观形态，并测定粒径，结果见表 4。当水相加入量为 5.9 g，即油水比为 1∶59 时，所得乳剂的粒径发生突变，继续增大水相比例，粒径变化不大；因此选择油水比为 1∶59，进行后续表面活性剂用量的考察。

表 4　油水相比例考察实验结果

Tab 4　Experimental results of oil-water phase ratio

序号	大豆油 /g	吐温 -80/g	水相 /g	外观形态	平均粒径 /nm
1	0.10	0.68	0.90	半固体	—
2	0.10	0.68	1.90	浅黄色液体	2203.3±83.80
3	0.10	0.68	2.90	浅黄色液体	916.6±79.50
4	0.10	0.68	3.90	白色液体	906.1±149.40
5	0.10	0.68	4.90	白色液体	752.3±8.20
6	0.10	0.68	5.90	透明液体	478.3±33.50
7	0.10	0.68	6.90	乳白色液体	437.1±9.60
8	0.10	0.68	7.90	乳白色液体	449.2±30.80
9	0.10	0.68	8.90	乳白色液体	409.4±8.70
10	0.10	0.68	9.90	乳白色液体	439.9±15.50

3.2.2　表面活性剂用量筛选　称取大豆油适量，置离心管中，分别加入 0.06、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.70、0.80、0.90、1.00、1.10 g 吐温 -80，涡旋 1 min 使混匀，向各管中分别加入纯化水 5.90 g，涡旋 1 min 混匀，得到初乳；初乳经探针超声乳化（150 W，3 min），得到终乳，结果见表 5。当吐温 -80 的用量为 0.06、0.10、0.20 g 时，微乳粒径均在 300 nm 以下；但放置过程中发现，表面活性剂含量过低会导致微乳分层，稳定性不佳。综合考虑，选择表面活性剂吐温 -80 的用量为 0.20 g。

表 5　表面活性剂用量考察实验结果

Tab 5　Experimental results of surfactant dosage investigation

序号	大豆油 /g	吐温 -80/g	水相 /g	外观形态	平均粒径 /nm
1	0.10	0.06	5.90	乳白色（轻微分层）	200.4±2.50
2	0.10	0.10	5.90	乳白色（轻微分层）	218.5±2.90
3	0.10	0.20	5.90	乳白色（不分层）	276.5±12.40
4	0.10	0.30	5.90	乳白色	610.4±107.30
5	0.10	0.40	5.90	乳白色	433.5±42.00
6	0.10	0.50	5.90	乳白色	569.8±34.60
7	0.10	0.60	5.90	乳白色	1707±130.00
8	0.10	0.70	5.90	淡黄色	588.2±29.10
9	0.10	0.80	5.90	淡黄色	501.5±28.90
10	0.10	0.90	5.90	淡黄色	406.6±21.30
11	0.10	1.00	5.90	淡黄色	298.9±27.50
12	0.10	1.10	5.90	淡黄色	130.9±40.30

3.2.3 五味子总木脂素微乳的制备 采用优选的微乳处方工艺，进行五味子总木脂素微乳的制备。处方如下：五味子总木脂素冻干粉 0.04 g、大豆油 0.1 g、吐温 -80 0.2 g、纯化水 5.9 g。按处方量称取五味子总木脂素冻干粉、大豆油和吐温 -80，超声溶解，涡旋混匀，加入处方量纯化水，涡旋 1 min 混匀，得到初乳；初乳经探针超声乳化（150 W，3 min），即得。

3.2.4 微乳的体外评价 采用纳米粒径仪测定五味子总木脂素微乳的粒径，采用透射电镜对其形态进行观察，采用离心法测定其离心稳定性。结果显示，五味子总木脂素微乳的 pH 值为 6.15；平均粒径为（248.3±9.0）nm，粒径分布图见图 3；微乳外观呈均匀的球形，形态良好，透射电镜图见图 4；经 4000 r·min^{-1} 离心 15 min，所制得的微乳不产生分层，离心稳定性良好。

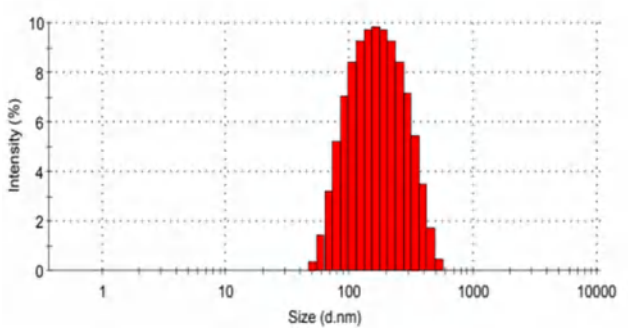


图 3 五味子总木脂素微乳粒径分布图

Fig 3 Particle size distribution of Schisandrae Chinensis Fructus total lignans microemulsion

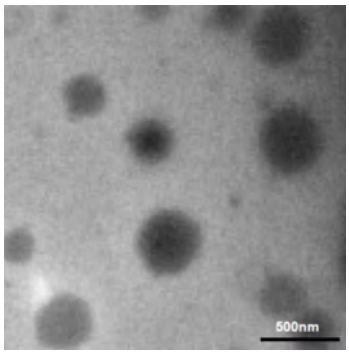


图 4 五味子总木脂素微乳透射电镜图

Fig 4 Transmission electron microscopy of Schisandrae Chinensis Fructus total lignans microemulsion

3.2.5 含量测定 取微乳 1.0 mL，置 10 mL 量瓶中，加入适量甲醇，超声 10 min 使破乳，甲醇定容至刻度。取该溶液，0.45 μm 有机滤膜过滤，进样测定，计算本品中各成分含量。平行测定 3 次，结果见表 6，微乳中 8 种木脂素成分总含量为 2.44 mg·mL^{-1}。

表 6 五味子总木脂素微乳中 8 种木脂素类成分含量测定结果 (n = 3)

Tab 6 Determination results of 8 kinds of lignans in total lignans microemulsion of Schisandrae Chinensis Fructus (n = 3)

化合物	含量平均值 /（mg·mL^{-1}）
五味子醇甲	1.35±0.005
戈米辛 D	0.07±0.005
五味子醇乙	0.31±0.008
当归酰戈米辛 H	0.19±0.005
五味子酯乙	0.20±0.005
五味子酚	0.03±0.005
五味子甲素	0.11±0.008
五味子乙素	0.18±0.008

4 讨论

4.1 提取过程

本文采用了回流提取法对五味子中的木脂素类成分进行提取。在此过程中，提取后增加 70% 乙醇醇沉操作，可有效除去提取液中五味子油等高脂溶性成分，而不影响五味子木脂素类成分的保留。

4.2 微乳油相及表面活性剂的选择

制成五味子总木脂素微乳的过程中，选用大豆油作为油相、吐温 -80 作为表面活性剂、不加助表面活性剂。五味子总木脂素在各种单纯油相中均难溶 [17]，有文献记载大豆油可用作油相。黄芬等 [18] 制备了以大豆油为油相的稳定的食品级大豆油 *W/O* 微乳。所以选择实验室较常用的大豆油作为油相，且眼用制剂的要求低于静脉注射，大豆油广泛用于静脉注射，较安全。眼用制剂一般选用无毒的非离子型表面活性剂，在亲水基为聚氧乙烯基的非离子型表面活性剂中，以聚山梨酯类溶血作用较小，聚山梨酯中吐温 -80 最安全，因此选用。已有文献记载吐温 -80 可用于眼用微乳制剂，如张晶等 [19] 选择卵磷脂∶吐温 -80（3∶10）作为混合表面活性剂，制得的环孢素 A 眼用微乳理化性质良好，符合眼用制剂要求。助表面活性剂一般为短链醇类，常见的助表面活性剂有乙醇、正丁醇、乙二醇、丙二醇、甘油等 [20]，有机溶剂大多有刺激性，因此本实验为了减小对眼部的刺激，制备的微乳不加助表面活性剂。

5 结论

本文经提取、纯化及微乳处方研究，制备得到含量约为 2.44 mg·mL^{-1} 的五味子总木脂素微乳，平均粒径约为 248.3 nm。下一步拟将之用于细胞实验，考察五味子总木脂素对于干眼症所引起的角膜上皮细胞损伤的保护作用。

参考文献

[1] Zhang W，Sun Z，Meng F. Schisandrin B ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury through attenuation of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis [J]. Inflammation，2017，40（6）：1903-1911.

[2] Shao M，Yang W，Han G. Protective effects on myocardial infarction model：delivery of schisandrin B using matrix metalloproteinase-sensitive peptide-modified PEGylated lipid nanoparticles [J]. Int J Nanomedicine，2017，12：7121-7130.

[3] 张国辉，朱建楠，林卫红，等 . 五味子木脂素的抗癫痫作用及神经保护研究 [A]// 第七届 CAAE 国际癫痫论坛论文集 [C]. 厦门：2017.

[4] 周妍妍，刘艳丽，董春雪，等 . 五味子醇甲对 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠脑组织突触素、α- 突触核蛋白表达的影响 [J]. 中国药理学通报，2013，29（8）：1076-1079.

[5] Wang CQ，Xu C，Fu XL，et al. Schisandrin B suppresses liver fibrosis in rats by targeting miR-101-5p through the TGF-β signaling pathway [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol，2020，48（1）：473-478.

[6] 石绘，万丽华，李贺，等 . 北五味子木脂素对小鼠镇静催眠作用的实验研究 [J]. 中国老年保健医学，2012，10（5）：27-28.

[7] 乔子敬，车金营，杨硕，等 . 五味子木脂素及多糖的抗炎作用 [J]. 北华大学学报（自然科学版），2018，19（6）：736-740.

[8] Tu C，Huang X，Xiao Y，et al. Schisandrin a inhibits the IL-1β-induced inflammation and cartilage degradation via suppression of MAPK and NF-κB signal pathways in rat chondrocytes [J]. Front Pharmacol，2019，1（29）：10-41.

[9] Cui L，Zhu W，Yang Z，et al. Evidence of anti-inflammatory activity of Schizandrin A in animal models of acute inflammation [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol，2020，393（11）：2221-2229.

[10] Kwon DH，Cha HJ，Choi EO，et al. Schisandrin A suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative stress in RAW 264.7 macrophages by suppressing the NF-κB，MAPKs and PI3K/Akt pathways and activating Nrf2/HO-1 signaling [J]. Int J Mol Med，2018，41（1）：264-274.

[11] Song Y，Shan B，Zeng S，et al. Raw and wine processed Schisandra chinensis attenuate anxiety like behavior via modulating gut microbiota and lipid metabolism pathway [J]. J Ethnopharmacol，2021，266：113426.

[12] 李沙沙，孙朋超，黄维维，等 . 眼部给药系统研究新进展 [J]. 中国医药工业杂志，2015，46（1）：97-102.

[13] Lidich N，Garti-Levy S，Aserin A，et al. Potentiality of microemulsion systems in treatment of ophthalmic disorders：keratoconus and dry eye syndrome-in vivo study [J]. Colloids Surf B Biointerfaces，2019，1（173）：226-232.

[14] Li Y，Huang C，Yang X，et al. Ofloxacin laden microemulsion contact lens to treat conjunctivitis [J]. J Biomater Sci Polym Ed，2020，8（12）：1566-1579.

[15] Epitropoulos AT，Therattil A，Periman LM，et al. Improving Tolerance and compliance with topical immunomodulators using micro-emulsion lipid layer artificial tears [J]. Clin Ophthalmol，2020，6（14）：1921-1929.

[16] 魏秀芳 . 黄芩苷眼用微乳制剂的制备及其性质评价 [D]. 广州：广州中医药大学，2016.

[17] 杜茂波，刘淑芝，梁丽娜，等 . 川芎眼用微乳原位凝胶与普通原位凝胶的制剂学表征及组织分布比较 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（5）：151-155.

[18] 黄芬，唐年初，郭贯新，等 . 食品级大豆油 *W/O* 微乳的制备研究 [J]. 食品工业科技，2010，31（2）：280-282，285.

[19] 张晶，刘志宏，王慧娟，等 . 环孢素 A 眼用亚微乳的制备 [J]. 中国医院药学杂志，2014，34（18）：1558-1562.

[20] 高燕，张颖，符海娟，等 . 他克莫司眼用微乳的制备及载药量测定方法 [J]. 国际药学研究杂志，2017，44（5）：453-460.

（收稿日期：2022-01-25；修回日期：2022-04-25）

基于网络药理学的复方杜仲健骨颗粒作用机制解析研究

舒展，任越，陈紫军，张燕玲*（北京中医药大学中药学院 国家中医药管理局中药信息工程重点实验室，北京 102488）

摘要：目的 基于网络药理学结合体外实验探讨复方杜仲健骨颗粒的整体作用机制。**方法** 通过 TCMSP、TCMD 数据库获得复方杜仲健骨颗粒的化学成分；基于 TCMSP 数据库收集复方杜仲健骨颗粒潜在作用靶标；将靶标导入 STRING 数据库中获得蛋白互作关系并运用 Cytoscape 的影响构建蛋白互作网络；使用 DAVID 软件进行 GO 富集分析和 KEGG 富集分析；基于 Cytoscape 软件的网络拓扑算法筛选关键作用靶标，运用 Cytoscape 软件绘制“关键靶标 - 信号通路 - 生命过程 - 药理作用”网络；体外实验检测复方杜仲健骨颗粒对产生炎症的 RAW 264.7 细胞的一氧化氮（NO）水平的影响；RT-qPCR 法测定复方杜仲健骨颗粒对 RAW 的影响 264.7 细胞中关键靶标 mRNA 表达量的影响。**结果** 检索获得复方杜仲健骨颗粒的化学成分 1522 个，潜在靶标 279 个；筛选获得复方杜仲健骨颗粒关键作用靶标 20 个、生物过程 487 条、信号通路 133 条。体外实验结果显示，复方杜仲健骨颗粒能够降低脂多糖诱导的炎症 RAW 264.7 细胞的 NO 水平（$P < 0.001$），具有抗炎作用。此外，复方杜仲健骨颗粒可抑制 *TNF*、*STAT3*、*MAPK1* mRNA 的表达（$P < 0.05$，$P < 0.01$ 或 $P < 0.001$）。**结论** 复方杜仲健骨颗粒可能通过作用于 TNF、STAT3、MAPK1 等关键靶标，调节炎症，软骨细胞增殖、分化、凋亡以及代谢等相关通路，发挥抗炎，调控细胞增殖、分化、凋亡、血管生成等药理作用，进而发挥整体疗效。

关键词：复方杜仲健骨颗粒；网络药理学；蛋白互作网络；作用机制；抗炎
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1294-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.013

Mechanism of compound Duzhong Jiangu granules based on network pharmacology

SHU Zhan, REN Yue, CHEN Zi-jun, ZHANG Yan-ling* (*State Administration of Traditional Chinese Medicine*, *Research Center of Traditional Chinese Medicine-Information Engineering*, *School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488)

Abstract: Objective To determine the potential pharmacological mechanism of compound Duzhong Jiangu granules by network pharmacology combined with cell experiment validation. **Methods** The components of compound Duzhong Jiangu granules were retrieved from TCMSP and TCMD databases, and potential targets were collected by the TCMSP database. The protein-protein interaction (PPI) network was constructed based on STRING platform and Cytoscape. DAVID database was used to perform GO enrichment analysis and KEGG enrichment analysis. The network topology algorithm based on Cytoscape was used to screen the key targets, and Cytoscape was used to create the “key targets-signaling pathways-biological processes-pharmacological action” network. In vitro experiments were performed to detect the NO level of compound Duzhong Jiangu granules on RAW 264.7 cells that caused the inflammation. RT-qPCR was used to determine the effect of compound Duzhong Jiangu granules on the mRNA expression of key targets in RAW 264.7 cells. **Results** Totally of 1522 active ingredients, 279 potential targets of compound Duzhong Jiangu granules were retrieved and screened. Totally 20 key targets, 487 biological processes and 133 signal pathways were

基金项目：复方杜仲健骨颗粒作用机制解析研究（No.2020071720411）。
作者简介：舒展，女，硕士研究生，主要从事中药信息学研究，email：sz20190935@163.com *通信作者：张燕玲，女，研究员，博士研究生导师，主要从事中药药物设计与优化、中药信息学研究，email：zhangyanling@bucm.edu.cn

obtained. The in vitro experiments results showed that compound Duzhong Jiangu granules inhibited the secretion of NO by LPS-induced RAW 264.7 cells ($P < 0.001$), indicating its anti-inflammation activity. Compound Duzhong Jiangu granules inhibited the expression of *TNF*, *STAT3*, *MAPK1* mRNA ($P < 0.05$, $P < 0.01$ or $P < 0.001$). **Conclusion** Compound Duzhong Jiangu granules may influence the inflammation, cell proliferation, differentiation, apoptosis, and angiogenesis by regulating related pathways and targets such as TNF, STAT3, MAPK1.

Key words: compound Duzhong Jiangu granule; network pharmacology; protein-protein interaction network; mechanism; anti-inflammatory

复方杜仲健骨颗粒由杜仲、白芍、续断、黄芪、枸杞子、牛膝、三七、鸡血藤、人参、当归、黄柏、威灵仙 12 味中药组成[1]。该药为红棕色的颗粒，微苦，具有滋补肝肾、养血荣筋、通络止痛的功效[2]，临床上主要用于膝关节骨性关节炎、缺血性股骨头坏死等骨关节疾病的治疗[3]。方中君药为杜仲，可补肝肾、强筋骨。黄芪、续断、白芍为臣药，具有养血荣筋、补气固表、柔肝止痛、调血脉、解痉抗炎、免疫调节的作用。人参、牛膝、当归、枸杞子、黄柏、三七、鸡血藤为佐药，具有补肝肾、益精气、坚筋骨、消肿定痛的作用。威灵仙作为佐药，发挥祛风湿、通经络、止痛的功效。现代药理学研究证实，复方杜仲健骨颗粒可以有效改善骨关节疾病，其提取液能直接作用于软骨细胞，改善新陈代谢，进而维护关节软骨的正常构造和功能，防止骨关节炎疾病的进一步发展[4]。

然而复方杜仲健骨颗粒的组成中药众多，且化学成分复杂，其发挥作用的具体机制尚不清楚。网络药理学的研究思路与中医药多成分、多靶标、系统调控的理念相一致，将其应用于中药研究能够明确药效物质和疾病的关系，揭示药物的作用机制，具有独到的优势和广阔的前景[5]。因此，本研究通过数据库收集复方杜仲健骨颗粒的化学成分及其潜在作用靶标，分析其生物功能及信号通路，以期从分子网络水平上研究复方杜仲健骨颗粒整体的作用机制，并对部分药理作用和关键靶标进行生物验证，进而评价网络药理学分析方法的合理性和准确性。

1　材料与方法

1.1　基于网络药理学的复方杜仲健骨颗粒作用机制研究

1.1.1　复方杜仲健骨颗粒中药成分及靶标筛选及收集　通过中药化学成分数据库（Traditional Chinese Medicine Database，TCMD）和中药系统药理学数据库 TCMSP（http：//www.tcmspw.com/tcmsp.php）收集复方杜仲健骨颗粒 12 味中药的化学成分，并通过 TCMSP 数据库收集相应成分的靶标。

1.1.2　靶标名称校准　采用 UniProt（https：//www.uniprot.org/）数据库中 UniProtKB 检索功能，通过输入“1.1.1”项下收集到的蛋白名称，规定物种为“human”，将获得的所有蛋白校正为 UniProt ID，从而得到复方杜仲健骨颗粒的化合物潜在作用靶标[6]。

1.1.3　蛋白 - 蛋白相互作用（PPI）网络的构建及关键靶标的获取　为明确复方杜仲健骨颗粒靶标间的相互作用，将复方杜仲健骨颗粒潜在作用靶标导入 STRING（https：//string-db.org/）平台构建蛋白相互作用网络（protein-protein interaction network，PPI），选择置信度高于 0.7 的蛋白互作信息[7]，然后将 PPI 网络模型导入 Cytoscape 3.8.2 软件，利用 cytoHubba 插件，计算互作网络中节点的度值（degree），并用度值评价节点在网络中的关键程度。

1.1.4　GO 功能富集分析与 KEGG 富集分析　通过 DAVID 数据库（https：//david.ncifcrf.gov/）对得到的化合物潜在作用靶标开展 GO 富集分析和 KEGG 富集分析[8]。以 $P < 0.05$ 作为筛选条件，获取复方杜仲健骨颗粒可能作用的 GO 富集结果及信号通路。

1.2　复方杜仲健骨颗粒部分药理作用及关键靶标的验证

1.2.1　细胞　小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7，购于上海泽叶生物科技有限公司。

1.2.2　仪器与试药　二氧化碳培养箱（美国赛默飞公司）；倒置相差显微镜（德国徕卡公司）；TDL-50B 低速台式离心机（上海安亭科学仪器厂）；KQ-500DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；冷冻干燥机（北京博医康技术有限责任公司）。复方杜仲健骨颗粒（批号：2010908，规格每袋 12 g，北京双鹤药业销售有限责任公司）；DMEM 高糖培养基（含谷氨酰胺，含丙酮酸钠，货号：06-1055-57-1ACS）、热

灭活特级胎牛血清（货号：04-121-1A，BI 公司）；青链霉素（货号：15140122，Invitrogen 公司）；MTT（货号：0793，AMRESCO 公司）；脂多糖（LPS，货号：L2880，LABLEAD 公司）；一氧化氮检测试剂盒（货号：E1030，北京普利莱基因技术有限公司）；无水乙醇（货号：SJ-C1-13-01ZY-017，天津市致远化学试剂有限公司）；氯仿（货号：112050，北京市通广精细化工公司）；异丙醇（货号：10239，美国赛默飞公司）；无 DNA 酶 /RNA 酶去离子水（货号：RT121）、6×Loading Buffer（货号：9156）、D2000 分子量标准（货号：MD114-02）、GeneGreen 核酸染料（货号：RT210）（TIANGEN 公司）；PCR 引物（上海生工公司）；PrimeScript RT reagent Kit（Perfect Real Time）（货号：RR037A）、SYBR Premix Ex Taq II（货号：RR820A）（TAKARA 公司）。

1.2.3 药物配制 称取复方杜仲健骨颗粒 10 g 加蒸馏水 50 mL，超声破碎 90 min（20 kHz），5000 r • min^{-1} 离心 15 min。离心后取上清液，利用冷冻干燥机将上清冻干后于－ 20 ℃保存，实验前用 DMEM 培养液稀释，5000 r • min^{-1} 离心 15 min，两次离心后，0.22 μm 滤膜过滤，依次稀释至质量浓度为 10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125 g • L^{-1}。

1.2.4 细胞培养及传代 RAW 264.7 细胞培养于含 10% 热灭活特级胎牛血清、1% 青链霉素的 DMEM 高糖培养基，于 37 ℃、5%CO_2 条件下培养，次日更换新鲜 DMEM 完全培养基。

1.2.5 复方杜仲健骨颗粒细胞毒性评价 RAW 264.7 细胞生长至 85% ～ 90% 时，制成密度为每孔 5×10^4 个的细胞悬液，接种于 96 孔板中培养。培养箱孵育 24 h 后弃去培养基，每孔加入 100 μL 含有不同质量浓度的药物培养基（10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125 g•L^{-1}），每组设置 4 个复孔，置 5% CO_2、37 ℃的培养箱中培养 24 h 后，每孔加入 MTT 溶液（5 mg • mL^{-1}）100 μL，培养箱内避光孵育 4 h 后弃去上清液，每孔加入 DMSO 150 μL，避光振摇 10 min，采用连续光谱扫描式酶标仪在 490 nm 波长处测量各孔的吸光度值，并计算各组细胞的存活率。

1.2.6 复方杜仲健骨颗粒对 NO 释放的影响 RAW 264.7 细胞生长至 85% ～ 90% 时进行细胞传代，制成密度为每孔 5×10^4 个的细胞悬液，接种于 96 孔板中培养。培养箱孵育 24 h 后，弃去旧的培养液，将 96 孔板培养的细胞分为空白对照组、模型组和不同剂量药物组。空白对照组加入完全培养基；模型组加入 0.2 μg • L^{-1} LPS 溶液；药物组加入 0.2 μg • L^{-1} LPS 和不同质量浓度的复方杜仲健骨颗粒（10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125 g • L^{-1}）混合液。作用 24 h 后，采用 NO 检测试剂盒测定 NO 释放量。

1.2.7 复方杜仲健骨颗粒对 *TNF*、*STAT3*、*MAPK1* mRNA 表达的影响 将处于对数期的 RAW 264.7 细胞以每孔 9×10^5 个接种于 6 孔板中，每孔 2 mL。细胞贴壁 24 h 后，设为空白对照组、模型组和药物组，空白对照组加入完全培养基；模型组加入 0.2 μg • L^{-1} LPS 溶液；药物组加入 0.2 μg • L^{-1} LPS 和最大无毒浓度的复方杜仲健骨颗粒混合液，每孔 2 mL，培养 24 h 后，提取总 RNA。使用 RNA 逆转录试剂盒进行反转录。RT-qPCR 采用 SYBR Green 法。利用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 计算目的基因表达量，试验所需引物购自生工生物工程（上海）股份有限公司。目的基因引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Tab 1 Primer sequence of PCR

靶标	正向引物	反向引物
STAT3	AATCTCAACTTCAGACCCGCCAAC	GCTCCACGATCCTCTCCTCCAG
TNF	GCGACGTGGAACTGGCAGAAG	GTGGTTTGTGAGTGTGAGGGTCTG
MAPK1	AATAAGGTGCCGTGGAACAGGTTG	AAGTCGTCCAGCTCCATGTCAAAC
GAPDH（内参）	CGTCCCGTAGACAAAATGGT	TTGATGGCAACAATCTCCAC

1.2.8 统计学方法 使用 GraphPad Prism 5 软件对数据进行处理和统计学分析，组间比较使用单因素方差分析方法（One-way ANOVA），$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基于网络药理学的复方杜仲健骨颗粒作用机制研究

2.1.1 复方杜仲健骨颗粒中药成分及靶标筛选及收集 本研究基于 TCMSP 数据库、TCMD 数据库，收集得到复方杜仲健骨颗粒化学成分及对应靶标。去重后得到杜仲相关成分 167 个，续断 57 个，黄芪 115 个，三七 191 个，黄柏 153 个，威灵仙 81 个，枸杞 102 个，人参 326 个，当归 161 个，白芍 112 个，牛膝 56 个，鸡血藤 71 个。通过 TCMSP 收集到 337 个靶标蛋白，经 UniProt 数据库对靶标名称进行校准后去重，共得到有效 UniProtID 279 个。

2.1.2 复方杜仲健骨颗粒蛋白互作网络构建与关

键靶标的筛选　将 279 个潜在靶标录入 STRING 数据库，设置 interaction score ＞ 0.7，利用 Cytoscape 3.8.2 进行可视化分析[9]，构建 PPI 网络，见图 1。对复方杜仲健骨颗粒 PPI 的关键靶标进行分析发现，可参与抗炎作用，如 TNF、IL-6 等；并可参与细胞生长、增殖和分化，如 STAT3、VEGFA 等；部分靶标对细胞信号转导具有调节作用，如 MAPK1、MAPK14、MAPK8 等。

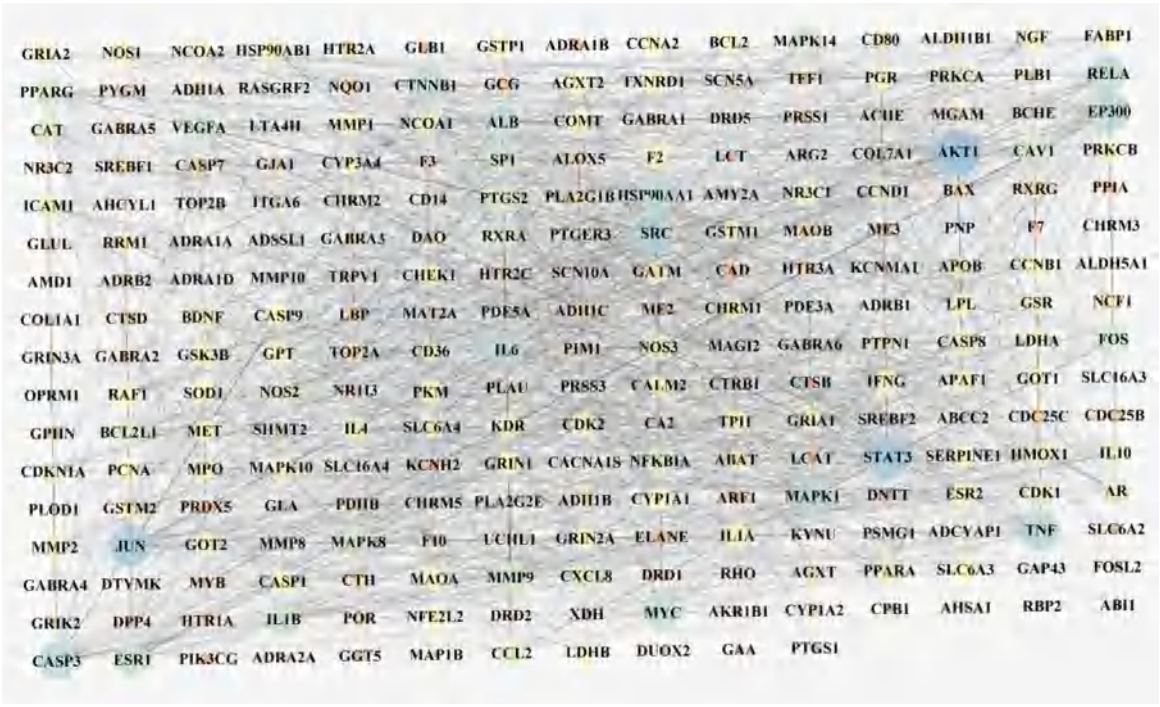


图 1　复方杜仲健骨颗粒蛋白 - 蛋白互作网络图

Fig 1　PPI network of compound Duzhong Jiangu granule

2.1.3　GO 富集分析结果　以 $P < 0.05$ 为筛选条件，获得 GO 功能富集条目 678 个，其中生物过程条目 487 条。对以上生物过程进行分析，发现复方杜仲健骨颗粒可能参与的生物学过程可以归为调节炎症反应，对细胞增殖、分化、凋亡的调控，影响血管生成等方面（见表 2）。

2.1.4　KEGG 富集分析结果　以 $P < 0.05$ 为筛选条件，对 279 个靶蛋白进行 KEGG 通路富集，共富集到 133 条信号通路。对以上信号通路进行分析、归类，发现复方杜仲健骨颗粒主要影响炎症、软骨细胞增殖、分化、凋亡以及代谢等相关通路过程发挥作用，结果见表 3。

2.2　复方杜仲健骨颗粒部分药理作用及关键靶标验证

为了进一步评价网络药理学结果的可靠性，研究对网络药理学获得的关键药理作用及靶标进行了实验验证。炎症是骨关节疾病中非常重要的致病机制，且在本研究中为关键药理作用。因此本研究选择抗炎活性进行验证。LPS 刺激诱导的 RAW 264.7 细胞炎症模型可较好地反映体内局部炎症状态，NO 水平能够反映炎症的严重程度[10]。因此研究通过检测复方杜仲健骨颗粒对 LPS 刺激诱导的 RAW 264.7 细胞炎症模型的 NO 生成抑制作用进而评价其抗炎活性。此外，基于拓扑分析发现 TNF、STAT3、MAPK1 是复方杜仲健骨颗粒的关键作用靶标。故研究利用 RT-qPCR 对其进行验证。

2.2.1　复方杜仲健骨颗粒细胞毒性研究　不同浓度的复方杜仲健骨颗粒对 RAW 264.7 细胞活性的影响结果见图 2。结果显示，0.3125 ～ 2.5 g・L^{-1} 复方杜仲健骨颗粒对细胞无毒性，表明在 2.5 g・L^{-1} 以下，复方杜仲健骨颗粒对 RAW 264.7 细胞的正常生长无影响。

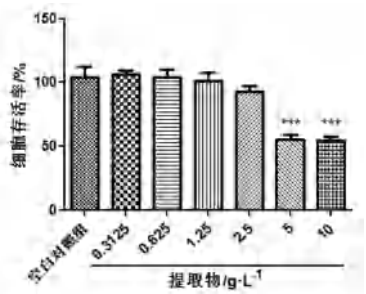


图 2　复方杜仲健骨颗粒对 RAW 264.7 细胞存活率的影响

Fig 2　Effect of compound Duzhong Jiangu granule on the survival rate of RAW 264.7 cells

注：与空白对照组比较，$^{***}P < 0.001$。

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

表 2 复方杜仲健骨颗粒作用靶标 GO 生物学过程富集

Tab 2 Biological process of GO target enrichment in compound Duzhong Jiangu granule

分类	条目名称	*P* 值
炎症反应	细胞对脂多糖的反应（cellular response to lipopolysaccharide）	4.39×10^{-12}
	脂多糖介导的信号通路（lipopolysaccharide-mediated signaling pathway）	1.55×10^{-9}
	对脂多糖的反应（response to lipopolysaccharide）	8.73×10^{-8}
	炎症反应（inflammatory response）	1.73×10^{-5}
	NF-κB 转录因子活性的正调节（positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity）	6.99×10^{-5}
	I-κB 激酶 /NF-κB 信号的正调节（positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling）	3.36×10^{-4}
	细胞因子分泌的正向调节（positive regulation of cytokine secretion）	6.88×10^{-4}
	白三烯生物合成过程（leukotriene biosynthetic process）	4.07×10^{-3}
对细胞增殖、分化、凋亡的调控	凋亡过程的负调控（negative regulation of apoptotic process）	1.01×10^{-10}
	凋亡过程的正向调控（positive regulation of apoptotic process）	2.64×10^{-8}
	无配体的外在凋亡信号通路（extrinsic apoptotic signaling pathway in absence of ligand）	6.03×10^{-8}
	神经元凋亡过程的负调控（negative regulation of neuron apoptotic process）	1.85×10^{-6}
	神经元凋亡过程的正向调节（positive regulation of neuron apoptotic process）	5.83×10^{-6}
	参与凋亡过程的半胱氨酸型内肽酶活性的激活（activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process）	8.73×10^{-6}
	凋亡过程（apoptotic process）	2.32×10^{-5}
	神经元凋亡过程（neuron apoptotic process）	1.88×10^{-4}
	内在凋亡信号通路的负调控（negative regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway）	4.14×10^{-4}
	响应 DNA 损伤的内在凋亡信号通路（intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage）	1.01×10^{-3}
	响应内质网应激的内在凋亡信号通路（intrinsic apoptotic signaling pathway in response to endoplasmic reticulum stress）	1.67×10^{-2}
	通过死亡域受体的外在凋亡信号通路（extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors）	2.43×10^{-2}
	肿瘤坏死因子产生的负调控（negative regulation of tumor necrosis factor production）	2.43×10^{-2}
血管生成	血管生成的正向调节（positive regulation of angiogenesis）	5.29×10^{-8}
	血管生成（angiogenesis）	8.50×10^{-5}
	血管内皮生长因子受体信号通路（vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway）	1.78×10^{-4}
	血管生成的调节（positive regulation of angiogenesis）	4.07×10^{-3}

表 3 复方杜仲健骨颗粒作用靶标 KEGG 通路富集

Tab 3 KEGG signal pathway information of compound Duzhong Jiangu granule

分类	信号通路名称	*P* 值
炎症相关信号通路	肿瘤坏死因子信号通路（TNF signaling pathway）	4.66×10^{-9}
	HIF-1 信号通路（HIF-1 signaling pathway）	3.25×10^{-8}
	Toll 样受体信号通路（Toll-like receptor signaling pathway）	1.48×10^{-7}
	T 细胞受体信号通路（T cell receptor signaling pathway）	4.65×10^{-5}
软骨细胞增殖、分化及凋亡相关通路	钙信号通路（calcium signaling pathway）	6.63×10^{-8}
	p53 信号通路（p53 signaling pathway）	1.98×10^{-5}
	PI3K-Akt 信号通路（PI3K-Akt signaling pathway）	3.07×10^{-5}
	FoxO 信号通路（FoxO signaling pathway）	7.24×10^{-5}
	MAPK 信号通路（MAPK signaling pathway）	2.30×10^{-4}
	NF-κB 信号通路（NF-kappa B signaling pathway）	2.30×10^{-4}
	Rap1 信号通路（Rap1 signaling pathway）	1.21×10^{-3}
	催产素信号通路（oxytocin signaling pathway）	6.84×10^{-3}
	Jak-STAT 信号通路（Jak-STAT signaling pathway）	1.37×10^{-2}
间接相关通路	HIF-1 信号通路（HIF-1 signaling pathway）	3.25×10^{-8}
	雌激素信号通路（estrogen signaling pathway）	3.12×10^{-7}
	甲状腺激素信号通路（thyroid hormone signaling pathway）	4.97×10^{-7}
	血管内皮生长因子信号通路（VEGF signaling pathway）	1.13×10^{-6}
	胰岛素抵抗信号通路（insulin resistance signaling pathway）	5.29×10^{-6}
	脂肪细胞因子信号通路（adipocytokine signaling pathway）	1.60×10^{-4}

2.2.2　复方杜仲健骨颗粒抗炎活性研究　与空白对照组相比，模型组 NO 释放量明显增加（$P < 0.001$）。结果提示 LPS 能诱导炎症的发生，成功构建了巨噬细胞炎症模型。与模型组相比，复方杜仲健骨颗粒在 0.3125 ～ 2.5 g • L^{-1} 能有效降低 NO 的释放（$P < 0.001$），见表 4。表明复方杜仲健骨颗粒可以在一定程度上恢复 RAW 264.7 的炎性损伤，进一步验证了复方杜仲健骨颗粒的抗炎作用。

表 4　复方杜仲健骨颗粒对 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞释放 NO 的抑制作用

Tab 4　Inhibitory effect of compound Duzhong Jiangu granule on NO release induced by LPS

组别	NO 释放量 /（μmol • L^{-1}）	抑制率 /%
空白对照组	1.04±0.05	—
模型组	37.74±0.72*	—
复方杜仲健骨颗粒 0.3125 g • L^{-1} 组	34.42±0.21#	9.03±0.02
复方杜仲健骨颗粒 0.625 g • L^{-1} 组	29.87±0.22#	21.43±0.02
复方杜仲健骨颗粒 1.25 g • L^{-1} 组	26.59±0.28#	30.38±0.02
复方杜仲健骨颗粒 2.5 g • L^{-1} 组	7.71±0.15#	81.83±0.01

注：与空白对照组比较，*$P < 0.001$；与模型组比较，#$P < 0.001$。

Note：Compared with the blank control group，*$P < 0.001$；compared with the model group，#$P < 0.001$.

2.2.3　复方杜仲健骨颗粒对 *TNF*、*STAT3*、*MAPK1* mRNA 表达的影响　结果显示，与空白对照组相比，模型组 *TNF*、*STAT3*、*MAPK1* 的 mRNA 表达水平上调（$P < 0.01$）；与模型组相比，2.5 g • L^{-1} 的复方杜仲健骨颗粒可使 *TNF*、*STAT3*、*MAPK1* 的 mRNA 表达水平降低（$P < 0.05$，$P < 0.01$ 或 $P < 0.001$），见图 3。

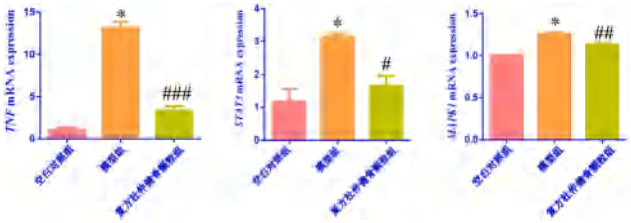


图 3　*TNF*、*AKT1* 和 *MAPK1* mRNA 表达水平

Fig 3　mRNA expression level of *TNF*，*AKT1*，and *MAPK1*

注：与空白对照组比较，*$P < 0.01$；与模型组比较，#$P < 0.05$，##$P < 0.01$，###$P < 0.001$。

Note：Compared with the blank control group，*$P < 0.01$；compared with the model group，#$P < 0.05$，##$P < 0.01$，###$P < 0.001$.

3　讨论

复方杜仲健骨颗粒在临床上应用广泛，然而其整体作用机制尚不明确。本研究利用网络药理学结合体外实验，初步探讨了复方杜仲健骨颗粒的整体作用机制。

综合拓扑参数、KEGG、GO 富集分析所得到的关键靶标、信号通路、生命过程，构建复方杜仲健骨颗粒“关键靶标 - 信号通路 - 生命过程 - 药理作用”网络，见图 4。分析网络药理学结果发现，复方杜仲健骨颗粒具有调节炎症反应、调控细胞增殖、分化及凋亡、影响血管生成等药理作用。

目前，复方杜仲健骨颗粒在临床上可用于骨关节疾病的治疗。现代医学研究发现，骨关节疾病的根本原因在于软骨等“关节保护系统”对关节保护能力的丧失[11]。研究表明，软骨细胞和关节组织的其他细胞分泌的促炎因子能够促进软骨基质的降解，进而破坏关节组织代谢平衡并导致骨关节疾病的产生[12]。此外，软骨细胞增殖、分化以及凋亡过程能够影响关节软骨的退化[13]。研究发现，在软骨病变的过程中，血管侵袭作为软骨破坏的始动环节，起到了不容忽视的作用，新生血管可进一步加重软骨结构的破坏，抑制血管侵袭可以阻止骨关节炎的进一步发展[14]。故推测复方杜仲健骨颗粒可能是通过影响骨关节处炎症、软骨细胞增殖、分化以及凋亡及调节血管生成等药理作用，进而发挥治疗骨关节疾病的作用。

为评价网络药理学方法的合理性和准确性，进一步进行了实验验证。首先针对作用突出的抗炎活性进行了体外实验验证。本研究采用 LPS 刺激巨噬细胞模拟人体在某些因素的刺激下引起的炎症反应的发生，通过不同浓度梯度的复方杜仲健骨颗粒对 LPS 诱导的 RAW 264.7 的炎性损伤进行细胞实验。结果表明复方杜仲健骨颗粒可在一定程度上减轻 RAW 264.7 的炎症反应，进一步验证了其抗炎作用。

对网络药理学筛选出的部分核心靶标进行 RT-qPCR 检测，发现复方杜仲健骨颗粒能够抑制 LPS 诱导的 RAW 264.7 炎症细胞中 *TNF*、*STAT3* 和 *MAPK1* 基因的表达，与 PPI 分析结果吻合。在骨关节炎疾病患者中，炎症相关靶标 TNF 异常高表达[15]。STAT3 是一种关键调节因子，在炎性反应中发挥着重要的作用[16]。且研究发现，STAT3 是骨关节疾病的的核心转录因子，其可通过核因子 κB（NF-κB）信号进一步导致骨关节疾病的发生[17]。MAPK1 是 MAPK 信号转导通路的重要组成部分，MAPK 信号转导通路则能够负责调节产生促炎细胞因子的过程，该过程最终可导致关节发炎和破坏[18]，由此推断复方杜仲健骨颗粒可能通过抑制 *TNF*、*STAT3* 和 *MAPK1* mRNA 表达发挥抗炎的作用。上述结果在一定程度上从药效以及靶标层面揭示了复方杜仲健骨颗粒发挥作用的分子机制，并佐证了网络药理学结果。

综上所述，本研究为复方杜仲健骨颗粒的整

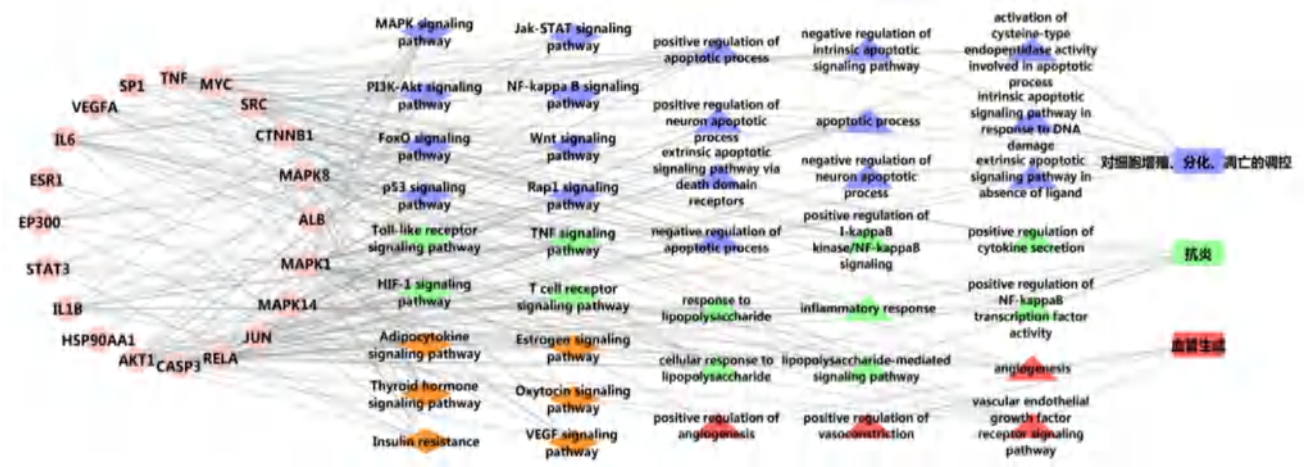


图 4 “关键靶标 - 信号通路 - 生命过程 - 药理作用”网络

Fig 4 Network of key targets-signaling pathways-biological processes-pharmacological action

注：圆形、棱形、三角形、长方形分别代表作用靶标、信号通路、生物过程、药理作用；紫色、绿色、红色、橙色分别代表对细胞增殖、凋亡的调控相关通路、抗炎相关通路、血管生成相关通路、间接相关通路。

Note：The circle，prism，triangle and rectangle respectively represent the target，signaling pathway，biological process，and pharmacological effect. Purple，green，red and orange respectively represent cell proliferation and apoptosis pathway，anti-inflammatory pathway，angiogenesis pathway，and other pathways.

体作用机制解析提供了参考，为其临床应用提供了一定基础。然而本研究仍存在一定不足，首先，本研究聚焦整体作用机制，未聚焦特定疾病，后期可针对特定疾病展开进一步研究。此外，研究仅对复方杜仲健骨颗粒抗炎活性以及部分关键靶标进行了体外验证，未对其他活性和靶标进行体外及体内验证。研究下一步将通过体外或体内实验对复方杜仲健骨颗粒的其他活性和关键靶标进行进一步验证，为其临床应用提供指导。

参考文献

[1] 刘磊，张舒，周悦悦 . 复方杜仲健骨颗粒联合硫酸氨基葡萄糖治疗膝骨关节炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床，2019，34（11）：3343-3346.

[2] 王和鸣，葛继荣，殷海波，等 . 复方杜仲健骨颗粒治疗膝关节骨性关节炎Ⅲ期临床试验总结 [J]. 中国中医骨伤科杂志，2004，12（3）：8-12.

[3] 谭乐成，柳蕾 . 舒筋松骨术治疗缺血性股骨头坏死疗效观察 [C]//2014’针药并用及穴位用药学术研讨会、山东针灸学会 2014 年学术年会论文集 . 2014：498-500.

[4] 柳晓峰，安玉芳，崔立建 . 乌头注射液对膝关节骨性关节炎模型兔体内 COMP、p53 蛋白、BMP-2 等因子的影响 [J]. 中国药房，2020，31（6）：714-718.

[5] 陶星茹，刘珂娣，赵石，等 . 基于网络药理学和分子对接探讨太白楤木皂苷治疗缺血性脑卒中的药效物质及作用机制 [J]. 中南药学，2021，19（11）：2253-2262.

[6] 韩彦琪，刘耀晨，武琦，等 . 基于网络药理学的痰热清胶囊治疗新型冠状病毒肺炎（COVID-19）机制研究 [J]. 中草药，2020，51（11）：2967-2976.

[7] 更桑，马婧，任越，等 . 基于网络药理学与分子对接探讨藏族药浴基础组方五味甘露治疗膝关节炎的作用机制 [J]. 中国中药杂志，2021，46（16）：4238-4243.

[8] 吴波，吴勤研，易剑峰，等 . 基于网络药理学的理中汤作用机制分析 [J]. 中南药学，2019，17（7）：1029-1035.

[9] 黄菊芳，蒋云霞，黎敏航，等 . 基于网络药理学的鸡血藤抗肝纤维化机制研究 [J]. 广西医学，2021，43（17）：2104-2110.

[10] Liu Q，Xiao XH，Hu LB，et al. Anhuienoside c ameliorates collagen-induced arthritis through inhibition of MAPK and NF-κB signaling pathways [J]. Front Pharmacol，2017，8：299.

[11] 胡杨 . 骨关节疾病的诊断检查 [J]. 家庭医学，2020（2）：28-29.

[12] 黄竞杰，杨俊兴，陈浩雄 . 牛膝总皂苷治疗膝骨关节炎的药理研究进展 [J]. 中药新药与临床药理，2021，32（4）：592-595.

[13] 李哲，田好超，杨锋 . 中药外治膝骨关节炎作用机制的研究进展 [J]. 中国中医急症，2019，28（11）：2061-2064.

[14] 许炜民，钱佳佳，韩龙，等 . 温经通络汤对小鼠膝骨关节炎软骨形态改变和 VEGF、MMP-13、HIF-1α 表达情况的影响 [J]. 中医药信息，2020，37（6）：6-12.

[15] Yun ML，Son E，Kim SH，et al. Anti-inflammatory and anti-osteoarthritis effect of Mollugo pentaphylla extract [J]. Pharm Biol，2019，57（1）：74-81.

[16] Hillmer EJ，Zhang H，Li HS，et al. STAT3 signaling in immunity [J]. Cytokine Growth Factor Rev，2016，31：1-15.

[17] Wang FD，Guo XY，Yuan YP. STAT3 speeds up progression of osteoarthritis through NFκB signaling pathway [J]. Exp Ther Med，2020，19（1）：722-728.

[18] Yang GL，Chang CC，Yang YW，et al. Resveratrol alleviates rheumatoid arthritis via reducing ROS and inflammation，inhibiting MAPK signaling pathways，and suppressing angiogenesis [J]. J Agric Food Chem，2018，66（49）：12953-12960.

（收稿日期：2022-01-14；修回日期：2022-03-30）

超高效液相色谱 - 飞行时间质谱法鉴定蛇胆汁特征成分及其应用研究

黄博，黄清泉，白桂昌，罗轶*，朱雪妍*（广西壮族自治区药品检验所国家药品监督管理局中药材质量监测与评价重点实验室，南宁　530021）

摘要：目的　建立以特征离子为目标的鉴别蛇胆汁的方法，并用于检查蛇胆川贝液。**方法**　采用超高效液相色谱 - 四极杆 - 飞行时间质谱（UPLC-Q-TOF-MS）测定蛇胆汁和其他动物胆汁的质谱数据，并进行主成分分析（PCA），找出蛇胆汁的特征成分。再用高效液相色谱 - 串联质谱（HPLC-MS-MS）的多反应检测（MRM）定性和验证特征成分。针对蛇胆川贝液处方中的药材，制订供试品制备方法，并将蛇胆汁的 MRM 条件应用于蛇胆川贝液的检测中。**结果**　UPLC-Q-TOF-MS 的液相方法条件为：甲醇（A）-10 mmol • L^{-1} 乙酸铵溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 5 min，30% → 50%A；5 ～ 20 min，50% → 90%A；20 ～ 25 min，90%A；25 ～ 26 min，90% → 30%A；26 ～ 30 min，30%A）；质谱条件为：电喷雾电离源（ESI^-），干燥气温度：220 ℃，干燥气流速 8 L • min^{-1}，雾化气压力 2 bar，毛细管电压 3500 V，喷嘴电压 500 V，扫描范围 50 ～ 1000，扫描频率 1 Hz。共找出两个蛇胆汁的专属性成分，分别为牛磺胆酸硫酸酯（SOTC）和牛磺去氧胆酸硫酸酯（SOTDC）。建立了 SOTC 和 SOTDC 的 HPLC-MS-MS MRM 方法，条件为：甲醇（A）-10 mmol • L^{-1} 乙酸铵溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 10 min，40% → 50%A；10 ～ 25 min，50% → 80%A；25 ～ 25.5 min，80% → 40%A；25.5 ～ 30 min，40%A），质谱条件为：电喷雾电离源（ESI^-），SOTC 的离子对为 594.2 → 514.3，594.2 → 124.0；SOTDC 为 578.2 → 498.3，578.2 → 124.0。将建立的方法应用于 41 批蛇胆川贝液制剂中，发现 40 批样品均含有蛇胆汁。**结论**　该方法可有效鉴别蛇胆汁和检查蛇胆川贝液中是否含蛇胆汁。

关键词：超高效液相色谱 - 飞行时间质谱；蛇胆汁；鉴别；主成分分析；蛇胆川贝液
中图分类号：R284　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)06-1301-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.014

Identification of snake bile characteristic components by ultra-high performance liquid chromatography-time of flight mass spectrometry

HUANG Bo, HUANG Qing-quan, BAI Gui-chang, LUO Yi*, ZHU Xue-yan* (*Guangxi Institute for Food and Drug Control*, *Key Laboratory for Quality Monitoring and Evaluation of Traditional Chinese Medicine*, *Materia Medica*, *NMPA*, *Nanning* 530021)

Abstract: Objective　To establish a method to identify snake bile with characteristic ions, and to examine Shedan Chuangbei decotion. **Methods**　Ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) was used to determine the mass spectrometry data of snake bile and other animal bile. The principal component analysis was used for detecting the characteristic components in snake bile. The conponents were established and verified by multiple reaction monitoring (MRM) of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In this paper, the preparation method was established for the medicinal materials in the prescription of Shedan Chuangbei decoction and MRM condition was applied in the detection of snake bile. **Results**

基金项目：广西重点研发计划（桂科 AB17292069）；广西自然科学基金项目（No. 2017GXNSFAA198367）。
作者简介：黄博，男，主管药师，主要从事中药质量控制及安全性研究，email：137968757@qq.com　*通信作者：罗轶，女，主任药师，主要从事中药质量评价，email：luoyi20010211@163.com；朱雪妍，女，副主任药师，主要从事中药质量评价，email：384500662@qq.com

The liquid phase conditions of UPLC-Q-TOF-MS were as follows: methanol (A)-10 mmol • L^{-1} ammonium acetate (B), gradient elution (0 － 5 min, 30% → 50%A; 5 － 20 min, 50% → 90%A; 20 － 25 min, 90%A; 25 － 26 min, 90% → 30%A; 26 － 30 min, 30%A). The conditions of MS were as follows: electrospray ionization source (ESI^-), drying temperature at 220 ℃, drying gas flow rate at 8 L • min^{-1}, atomizing gas pressure of 2 bar, capillary voltage of 3500 V, nozzle voltage of 500 V, scanning range of 50 － 1000, and scanning frequency of 1 Hz. Two characteristic components in the snake bile were found, namely sulfate of taurocholate (abbreviated as SOTC, molecular formula $C_{26}H_{45}NO_{10}S_2$) and sulfate of taurodeoxycholate (abbreviated as SOTDC, formula $C_{26}H_{45}NO_9S_2$). The MRM methods of SOTC and SOTDC were established, the liquid chromatographic conditions were as follows: methanol (A)-10 mmol • L^{-1} ammonium acetate (B), gradient elution (0 － 10 min, 40% → 50%A; 10 － 25 min, 50% → 80%A; 25 － 25.5 min, 80% → 40%A; 25.5 － 30 min, 40%A), mass spectrometry conditions were: negative mode electrospray ionization source (ESI^-), the ion pair of SOTC was 594.2 → 514.3, 594.2 → 124.0; SOTDC was 578.2 → 498.3, 578.2 → 124.0. The method was applied for 41 batches of Shedan Chuangbei decoction, and snake bile was found in 40 batches. **Conclusion** The method can effectively identify the snake bile in Shedan Chuangbei decoction.

Key words: UPLC-Q-TOF-MS; snake bile; identification; principal component analysis; Shedan Chuangbei decoction

蛇胆汁为眼镜蛇科、游蛇科或蝰科多种蛇的胆汁[1-2]，为常用中成药蛇胆川贝液、蛇连川贝散、牛黄蛇胆川贝液（胶囊、滴丸）等的主要原料。由于蛇胆汁具有独特的药用价值，加上市场需求量大，自然资源递减，价格昂贵，市场上以鸡、鸭、羊、猪、牛等动物胆汁冒充蛇胆汁和掺伪的情况时有发生，给药品的正确使用、市场监管带来了一定困难。因此，需要建立蛇胆汁专属性的鉴别方法。已有研究表明，蛇胆汁主要含有各种胆汁酸，如牛磺胆酸（TCA）、牛磺鹅去氧胆酸（TCDCA）、甘氨去氧胆酸等[3-4]，由于蛇胆汁的功效成分尚不明确，目前多以牛磺胆酸为指标对蛇胆汁进行质量控制[5-7]。但文献显示[8-9]，鸡、羊、牛等动物胆汁也含有以上胆汁酸类成分，因此，以上述成分为指标建立的分析方法无法真正区分蛇胆汁和其他动物胆汁。

超高效液相色谱 - 四极杆 - 飞行时间质谱联用技术（UPLC-Q-TOF-MS）可对成分进行结构预测分析，具有快速、高效、灵敏度高的特点[10-11]，在中药研究方面已经得到广泛应用。因此，本研究拟采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术结合主成分分析（PCA）法，从整体上对蛇胆汁和其他动物胆汁的化学成分进行分析比较，找出蛇胆汁区别于其他动物胆汁的差异性成分，并建立了基于特征离子的 HPLC-MS-MS 鉴别方法。

1 仪器与试药

戴安 Ultimate3000 液相系统（美国 Thermo 公司）；布鲁克 ImpactII Q-TOF-MS 系统（德国 Bruker 公司）；安捷伦 1290 超高效液相系统、安捷伦 6490 三重串联四极杆质谱（美国 Agilent 公司）；MILLI-PROA 纯水处理器（德国默克密理博公司）。Sartorius CP224S 万分之一电子分析天平、梅特勒 - 托利多 XS205 十万分之一电子分析天平（德国 Sartorius 公司）；KQ-600VDB 型双频数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；甲醇、乙酸铵、乙腈均为色谱纯（德国 MERCK 公司）。

原蛇胆汁（活蛇取胆，立即用 50% 乙醇 1∶1 浸泡，活蛇由广西梧州制药集团股份有限公司协助收集，经广西壮族自治区食品药品检验所主任药师谢培德鉴定）样品 15 种，生产企业投料蛇胆汁样品 26 批，其他动物胆汁收集于菜市场，见表 1 ～ 2，所有样品均经 50% 乙醇 1∶1 浸泡处理。蛇胆汁对照药材（批号：120938-200705，每瓶装 60 mg，相当于蛇胆汁 5 mg）及牛磺胆酸钠对照品（批号：110815-201510，含量 87.9%）（中国食品药品检定研究院）。41 批蛇胆川贝液样品来源于广西专项抽验。

2 超高效液相 - 四极杆 - 飞行时间质谱方法

2.1 UPLC-Q-TOF-MS 条件

表 1　蛇胆汁样品信息表

Tab 1　Information for snake bile samples

序号	品种	数量 / 条	序号	品种	数量 / 条
1	乌梢蛇	3	9	蝮蛇	3
2	王锦蛇	3	10	玉斑锦蛇	3
3	滑鼠蛇	3	11	百花锦蛇	3
4	金环蛇	3	12	三索锦蛇	3
5	银环蛇	3	13	赤练蛇	3
6	眼镜蛇	3	14	黑眉锦蛇	3
7	蕲蛇	3	15	眼镜王蛇	3
8	蝰蛇	3			

表 2　其他动物胆汁样品信息表

Tab 2　Information for bile samples from other animals

序号	品种	数量	序号	品种	数量
1	鸡	4 只	4	羊	4 只
2	鸭	5 只	5	猪	5 只
3	牛	4 头	6	狗	4 只

2.1.1　色谱条件　色谱柱：Thermo Acclaim™ RSLC 120 C_{18}（2.2 μm，2.1 mm×100 mm）；流动相：甲醇（A）-10 mmol • L^{-1} 乙酸铵溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 5 min，30% → 50%A；5 ～ 20 min，50% → 90%A；20 ～ 25 min，90%A；25 ～ 26 min，90% → 30%A；26 ～ 30 min，30%A）；柱温 35 ℃，流速 0.3 mL • min^{-1}，进样量 1 μL。

2.1.2　质谱条件　离子化模式：ESI^-；干燥气温度：220 ℃；干燥气流速：8 L • min^{-1}；雾化气压力：2 bar；毛细管电压：3500 V；喷嘴电压：500 V；校正液：甲酸钠溶液；扫描范围：50 ～ 1000，扫描频率 1 Hz。

2.2　供试品溶液的制备

精密吸取胆汁 50 μL，置 2 mL 离心管中，精密加入 50% 甲醇 950 μL，摇匀，过 0.22 μm 滤膜，即得。

2.3　蛇胆汁成分研究

采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术，对蛇胆汁的成分进行研究。对获得的数据进行处理，根据文献和获取的对照品进行定位，对色谱峰进行归属；对其他质谱响应较高的化合物，则根据分子量进行推测。在负离子模式下，蛇胆汁共检测出 38 个成分，见图 1 和表 3。

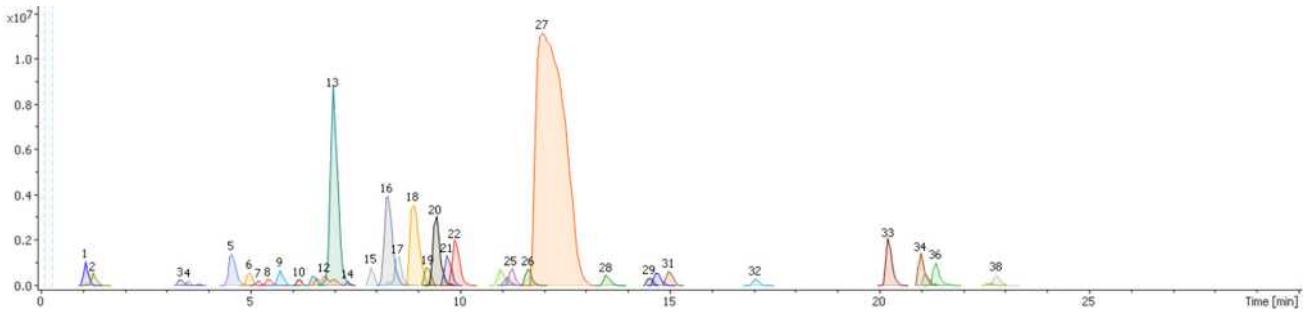


图 1　蛇胆汁组分叠加图

Fig 1　Superposed graph of snake bile components

结合文献报道，从表 3 可看出，蛇胆汁中的绝大部分成分为胆酸类成分，牛磺胆酸为蛇胆汁的主要成分，其他为在牛磺胆酸结构式的基础上加减 -H、-OH、$-SO_3H$、$-CH_3$ 等基团。

2.4　蛇胆汁特征成分的筛选

为考察蛇胆汁和其他动物胆汁之间的差异，本实验对蛇胆汁和其他动物胆汁进行 UPLC-Q-TOF-MS 分析，每种动物胆汁的基峰离子流图见图 2。以 Profileanalysis 应用软件对质谱数据进行分析。首先对每一针样品找出分子特征成分，分子特征成分检测参数为：保留时间范围 1 ～ 30 min，质谱范围为 *m/z* 50 ～ 1000，噪音阈值为 20，相关系数阈值 0.7，最小化合物长度 10 谱图，在此参数基础上每针样品均找出 200 个以上的分子特征成分，再用 PCA 法对全部数据进行分析处理，结果见图 3。

图 3A 显示，不同动物胆汁大致分别落在不同区域，蛇胆汁主要分布于评分图的左下方，与其他动物胆汁明显分离。图 3B 中每个点均代表一个分子特征成分，图中心的分子特征成分对样品的区分没有贡献，而距离中心越远的数据对样品差异贡献越大，得分和载荷图中的方向是相互关联的。从左下方的数据群里筛选出两个代表蛇胆汁专属性的特征成分，再基于化学成分的精确质量数（≤ 2 mDa）和同位素丰度（≤ 20 mSigma），推断出两个特征成分的分子式，结果见表 4。

对上述特征成分进行结构解析：蛇胆汁的主要成分为牛磺胆酸，另含有少量牛磺鹅去氧胆酸 [8]，S1 的二级碎片 498.288 为牛磺鹅去氧胆

表 3 蛇胆汁成分分析

Tab 3 Components of snake bile

No.	保留时间 /min	化学式	[M-H]⁻	误差	英文名 / 化学名
1	1.10	$C_4H_7NaO_4$	141.0169	0.3	sodium diacetate/ 双乙酸钠
2	1.29	$C_6H_{13}NO_2$	341.1090	0.2	maltose/ 亮氨酸
3	3.37	/	443.1744	/	/
4	3.55	$C_{26}H_{44}NO_{10}S_2$	296.6175（双电荷）	1.9	/
5	4.58	$C_{21}H_{34}NO_{10}S_2$	254.0729（双电荷）	0.5	/
6	5.00	$C_{26}H_{44}NO_{10}S_2$	594.2414	0.3	/
7	5.22	$C_{26}H_{45}NO_7S$	514.2843	0.2	/
8	5.46	$C_{26}H_{44}NO_{11}S_2$	304.6150（双电荷）	1.7	/
9	5.73	$C_{19}H_{32}O_8S_2$	225.0701（双电荷）	1.9	/
10	6.19	$C_{26}H_{45}NO_{10}S_2$	296.6175（双电荷）	1.9	/
11	6.53	$C_{26}H_{45}NO_{10}S_2$	594.2410	0.4	sulfate of taurocholate / 牛磺胆酸硫酸酯
12	6.79	$C_{22}H_{43}NO_{14}S$	287.6121（双电荷）	3.0	/
13	7.00	$C_{26}H_{45}NO_{10}S_2$	296.6174（双电荷）	1.6	
14	7.37	$C_{26}H_{45}NO_9S_2$	288.6196（双电荷）	0.6	/
15	7.90	$C_{26}H_{45}NO_9S_2$	288.6197（双电荷）	0.7	/
16	8.3	$C_{26}H_{45}NO_7S$	514.2837	1.3	
17	8.55	$C_{26}H_{43}NO_9S_2$	287.6119（双电荷）	0.6	/
18	8.91	$C_{26}H_{45}NO_9S_2$	288.6199（双电荷）	1.2	sulfate of taurodeoxycholate / 牛磺去氧胆酸硫酸酯
19	9.26	$C_{26}H_{43}NO_7S$	512.2679	1.7	/
20	9.45	$C_{30}H_{51}NO_{10}S_2$	323.6409（双电荷）	1.3	/
21	9.73	$C_{26}H_{45}NO_7S$	514.2837	1.4	
22	9.92	$C_{26}H_{43}NO_8S_2$	279.6147（双电荷）	1.5	/
23	11.00	$C_{26}H_{43}NO_7S$	512.2683	0.8	/
24	11.15	$C_{30}H_{50}O_{11}S_2$	324.1328（双电荷）	1.1	/
25	11.26	$C_{28}H_{48}O_{10}S_2$	303.1276（双电荷）	1.5	/
26	11.66	$C_{28}H_{46}O_8S$	541.2835	1.1	/
27	12.00	$C_{26}H_{45}NO_7S$	514.2847	0.6	taurocholic acid/ 牛磺胆酸
28	13.51	$C_{30}H_{51}NO_7S$	568.3310	0.5	/
29	14.55	$C_{26}H_{45}NO_6S$	498.2888	1.6	ethanesulfonic acid/ 牛磺鹅去氧胆酸
30	14.72	$C_{27}H_{48}O_7S$	515.3044	0.8	/
31	15.01	$C_{26}H_{44}O_9$	499.2920	1.6	/
32	17.07	$C_{29}H_{52}O_7S$	543.3354	0.7	/
33	20.25	$C_{20}H_{32}O_2$	303.2324	1.7	/
34	21.02	$C_{16}H_{32}O_2$	255.2325	1.6	/
35	21.14	$C_{17}H_{34}O_6$	333.2281	0.6	/
36	21.37	$C_{18}H_{34}O_2$	281.2280	2.1	/
37	22.63	$C_{32}H_{64}O_4$	255.2325（双电荷）	1.7	/
38	22.82	$C_{18}H_{36}O_2$	283.2636	2.2	/

注：“/”表示无法分析。

Note：“/” indicates that it cannot be analyzed.

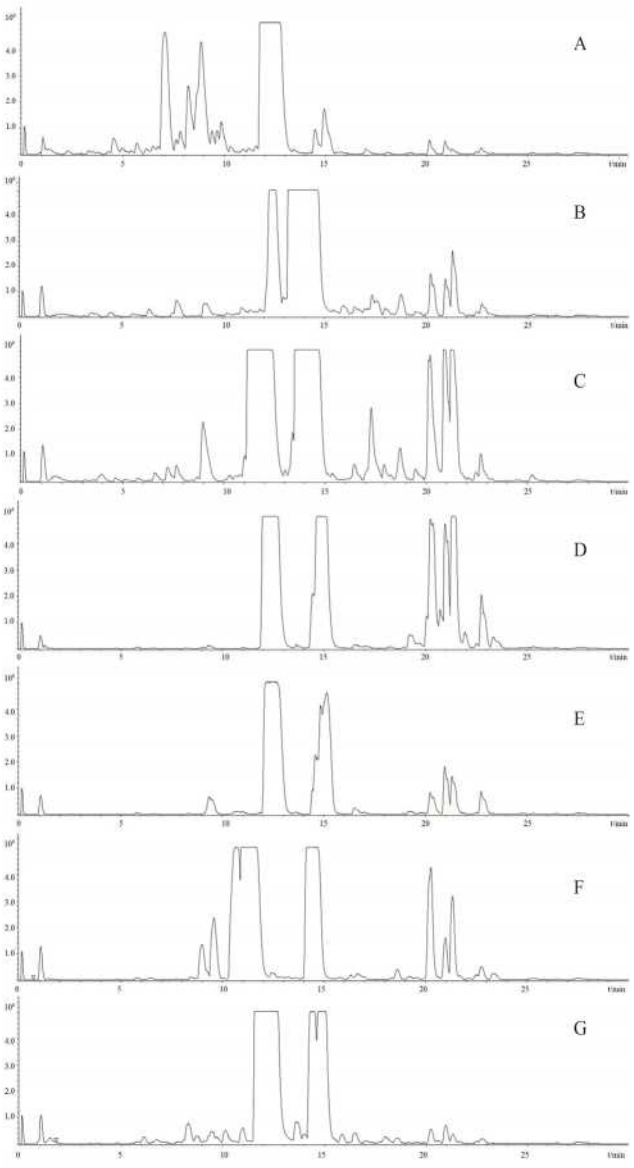


图 2 乌梢蛇胆汁（A）、鸡胆汁（B）、鸭胆汁（C）、牛胆汁（D）、羊胆汁（E）、猪胆汁（F）、狗胆汁（G）的基峰离子流图

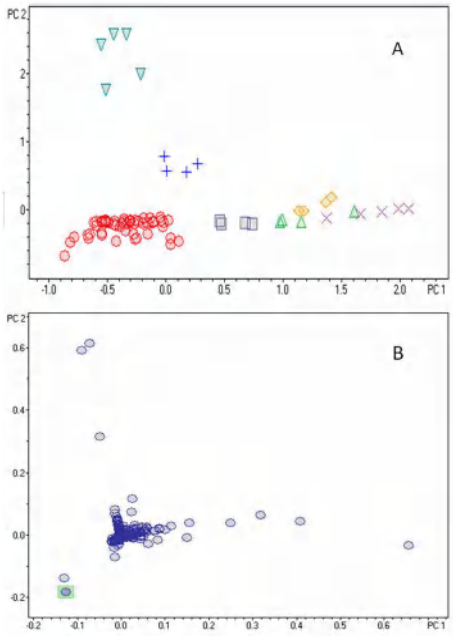
Fig 2 Basic peak chromatogram of the bile from Zaocys dhumnades（A），chicken（B），duck（C），bovine（D），sheep（E），pig（F），and dog（G）

表 4 蛇胆汁特征成分的鉴定

Tab 4 Identification of marker of snake bile

No.	保留时间 /min	实测值 [M-H]⁻	理论值 [M-H]⁻	误差	同位素丰度	分子式
S1	8.94	578.2464	578.2463	0.1	13.8	$C_{26}H_{45}NO_9S_2$
S2	6.51	594.2415	594.2412	0.3	18.3	$C_{26}H_{45}NO_{10}S_2$

酸的 [M-H]⁻峰，而 480.277 和 124.007，则是牛磺鹅去氧胆酸的碎片离子，因此该成分含有牛磺鹅去氧胆酸的母核，而 96.960 碎片离子，是 H_2SO_4 的 [M-H]⁻峰，故推断 S1 成分为牛磺鹅去氧胆酸 3 号位的羟基被硫酸酯化所生成，将其称为牛磺去氧胆酸 -3- 硫酸酯（SOTDC）[12-13]，



○蛇胆汁△鸡胆汁 × 鸭胆汁＋牛胆汁◇羊胆汁▽猪胆汁□狗胆汁

图 3　蛇胆汁和其他动物胆汁的 PCA 得分图（A）和载荷图（B）

Fig 3　PCA score（A）and loading plot（B）of the snake bile and bile from other animals

碎片解析见图 4 ～ 5。同理，S2 二级碎片包含 514.283、496.272、124.007 三个碎片离子，分别是牛磺胆酸的 $[M-H]^-$ 峰及其丰度较大的两个碎片离子，因此推测 S2 是牛磺胆酸 3 号位的羟基被硫酸酯化所生成，将其称为牛磺胆酸 -3- 硫酸酯（SOTC）[13-15]，碎片解析见图 6 ～ 7。

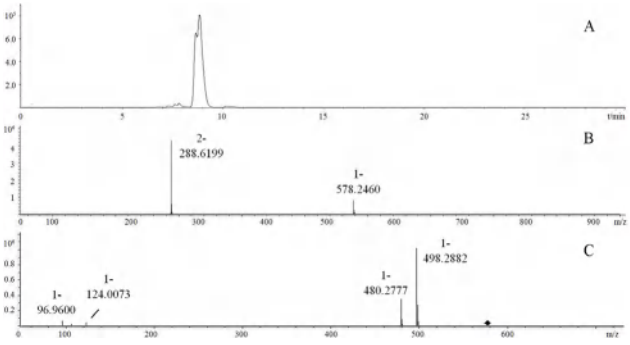


图 4　蛇胆汁特征成分（S1）选择离子流色谱图（A）及其一级（B）、二级（C）质谱图

Fig 4　Selected ion chromatogram（A）and MS^1（B）and MS^2（C）spectra of markers of the snake bile（S1）

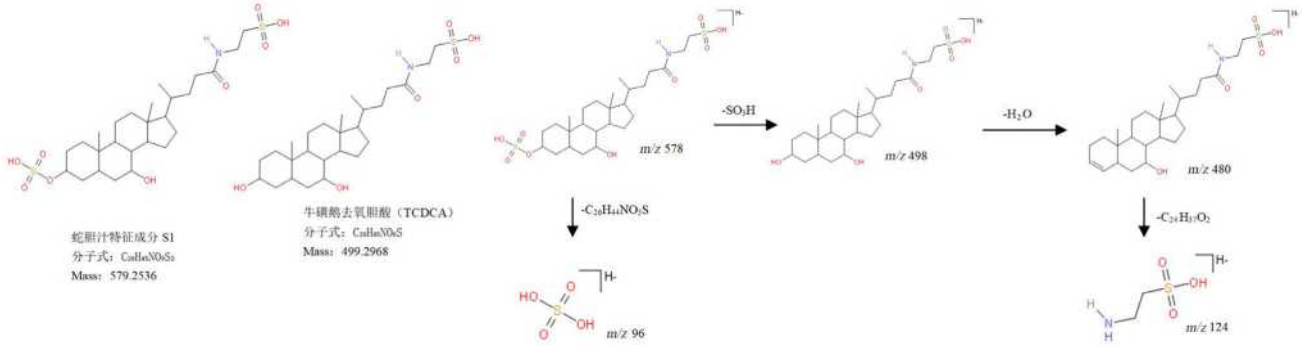


图 5　牛磺鹅去氧胆酸和蛇胆汁特征成分（S1）结构式及其可能的裂解途径

Fig 5　Structural formula of taurodeoxycholic acid and markers of snake bile（S1）and possible fragmentation pathways

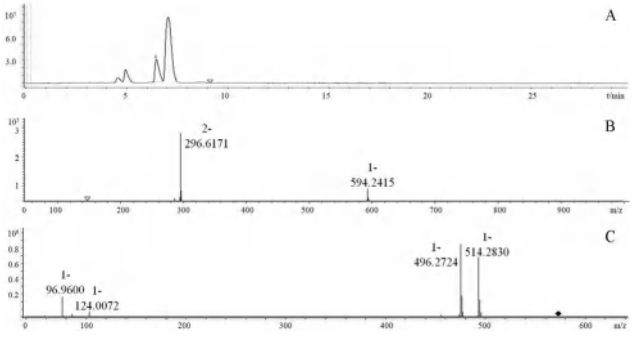


图 6　蛇胆汁特征成分（S2）选择离子流色谱图（A）及其一级（B）、二级（C）质谱图

Fig 6　Selected ion chromatogram（A）and MS^1（B）and MS^2（C）spectra of markers of the snake bile（S2）

3　基于三重串联四极杆质谱蛇胆汁特征成分检测方法的建立

3.1　HPLC-MS-MS 条件

采用三重串联四极杆质谱来建立多反应监测（MRM）的检测方法。

3.1.1　色谱条件　色谱柱：Eclipse Plus C_{18} 柱（1.8 μm，2.1 mm×100 mm）；流动相：甲醇（A）-10 mmol • L^{-1} 乙酸铵溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 10 min，40% → 50%A；10 ～ 25 min，50% → 80%A；25 ～ 25.5 min，80% → 40%A；25.5 ～ 30 min，40%A）；柱温 35 ℃，流速 0.3 mL • min^{-1}，进样量 1 μL。

3.1.2　质谱条件　离子化模式：ESI^-；干燥气温度：200 ℃；干燥气流速：12 L • min^{-1}；雾化气压力：20 psi；鞘流气温度：350 ℃；鞘流气流速：11 L • min^{-1}；离子漏斗参数：高压 150 V，低压 60 V；毛细管电压：3 kV；喷嘴电压：1000 V。

根据每个特征成分的二级碎片，均选取了两组

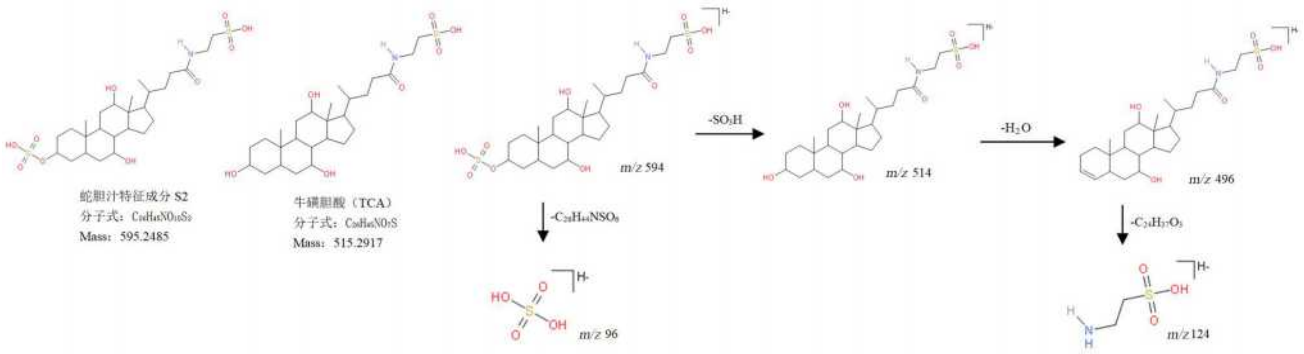


图 7 牛磺胆酸和蛇胆汁特征成分（S2）结构式及其可能的裂解途径

Fig 7 Structural formula of taurocholic acid and markers of snake bile（S2）and possible fragmentation pathway

MRM 离子对信息，并对离子对的碰撞能量进行优化，建立 HPLC-MS-MS 方法。牛磺去氧胆酸硫酸酯（SOTDC）检测离子对为 578.2 → 498.3（定量）和 578.2 → 124.0，碎裂电压均为 380 V，碰撞能量分别为 30 V、70 V；牛磺胆酸硫酸酯（SOTC）检测离子对为 594.2 → 514.3（定量）和 594.2 → 124.0，碎裂电压均为 380 V，碰撞能量分别为 30 V、70 V。

选取鸡、鸭、牛、羊、猪、狗等动物胆汁样品按“2.2”项下方法制备后进样测定，按上述蛇胆汁两个特征成分离子对进行检测。经实验结果确认，蛇胆汁样品中全部有质谱信号检出，而其他动物胆汁样品均未检出，见图 8。表明据此所建立的的液相色谱 - 串联质谱方法准确性良好，且所筛选的蛇胆汁特征成分具有特异性。

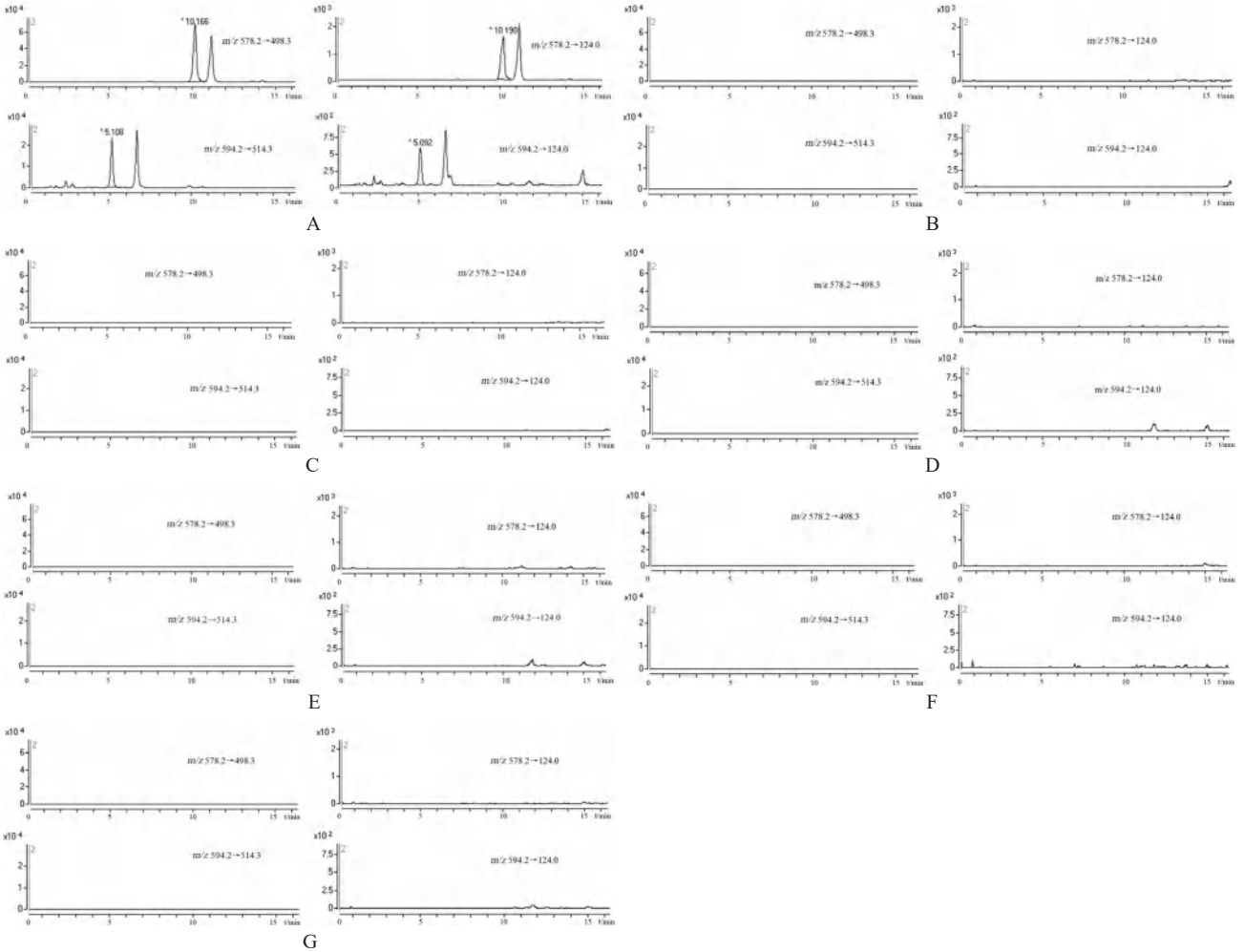


图 8 乌梢蛇胆汁（A）、鸡胆汁（B）、鸭胆汁（C）、牛胆汁（D）、羊胆汁（E）、猪胆汁（F）、狗胆汁（G）的选择离子色谱图

Fig 8 Selective ion chromatogram of the bile from Zaocys dhumnades（A），chicken（B），duck（C），bovine（D），sheep（E），pig（F），and dog（G）

3.2　蛇胆汁对照药材溶液

取蛇胆汁对照药材约 10 mg，精密称定，加 50% 甲醇 10 mL，超声处理（功率 320 W，频率 40 kHz）10 min，过 0.22 μm 滤膜，即得。

3.3　方法学验证

考察了精密度、重复性和稳定性，结果表明 SOTDC 和 SOTC 的精密度（n = 6）、重复性（n = 6）、稳定性（24 h 内，n = 6）*RSD* 均小于 3.0%，符合要求。

4　蛇胆川贝液中蛇胆汁特征成分检测方法的建立

为了将建立的蛇胆汁鉴别方法应用于处方制剂中，笔者以蛇胆川贝液为例，在上述蛇胆汁特征成分检测方法的基础上，建立了蛇胆川贝液中蛇胆汁的鉴别方法。

4.1　蛇胆汁对照药材溶液

蛇胆汁对照药材溶液的制备同“3.2”。

4.2　供试品溶液

取蛇胆川贝液供试品溶液 5 mL，加水 5 mL，加冰醋酸 0.5 mL，摇匀，以每秒 1 ～ 2 滴的速度过 HLB 小柱（200 mg，使用前先用 6 mL 甲醇，再用 6 mL 水活化），用 10 mL 水洗脱，弃去水洗液，抽干，再用 20 mL 甲醇洗脱，收集甲醇洗脱液，转移至鸡心瓶中，于 40 ℃减压蒸干或氮气吹干，加 1 mL 甲醇涡旋使溶解，过 0.22 μm 滤膜，即得。

4.3　阴性样品溶液

取缺蛇胆汁的阴性样品 5 mL，按“4.2”项下供试品溶液的制备方法操作，即得。

4.4　专属性试验

吸取蛇胆汁对照药材溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各 2 μL，分别按“3.1”项下色谱条件和质谱条件，进样分析，结果含蛇胆汁的阳性样品色谱中，在与对照药材色谱相应的保留时间位置上，呈现上述离子流色谱峰；阴性样品色谱中，在与对照药材色谱相应的保留时间位置上无相应的离子流色谱峰，各药味对测定无干扰，结果见图 9。

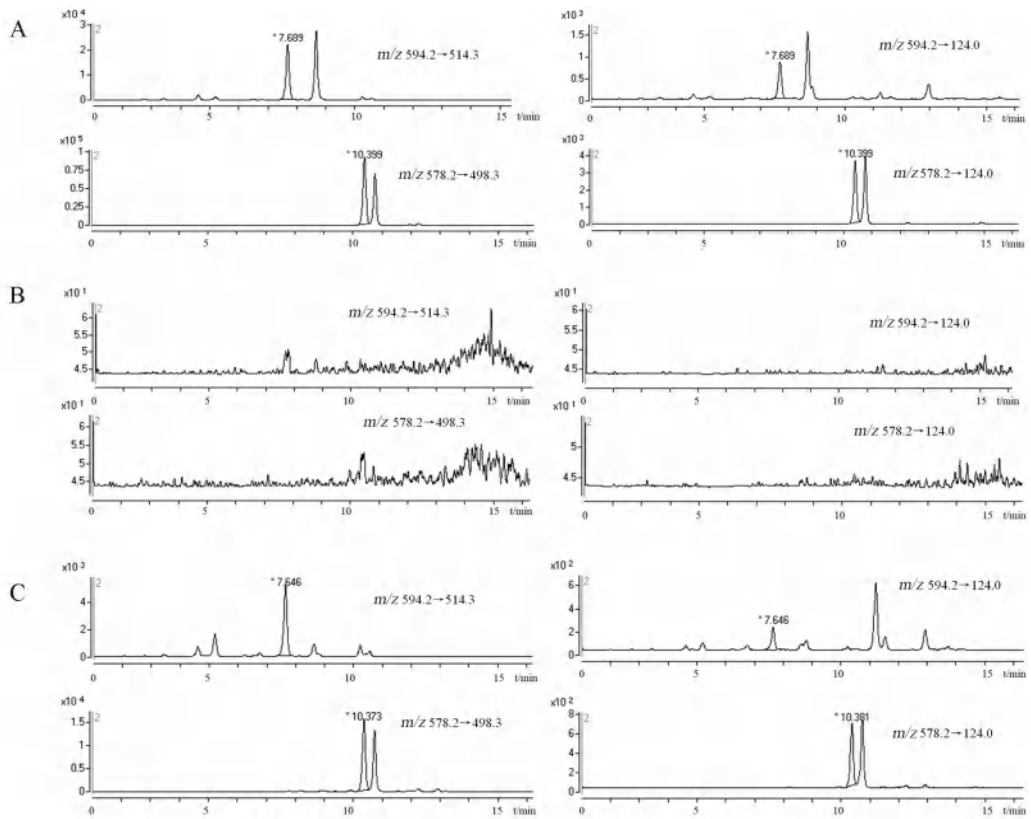


图 9　蛇胆汁对照药材（A）、蛇胆川贝液阴性样品（B）和蛇胆川贝液阳性样品（C）的选择离子色谱图

Fig 9　Selected ion chromatogram of snake bile control（A），negative sample of Shedan Chuanbei decoction（B）and positive sample of Shedan Chuanbei decoction samples（C）

4.5　方法学验证

考察了精密度、重复性和稳定性，结果表明蛇胆川贝液中 SOTDC 和 SOTC 的精密度（n = 6）、重复性（n = 6）、稳定性（24 h 内，n = 6）*RSD* 均小于 3.0%，符合方法学要求。

4.6　样品测定

以拟订的方法对监督抽样的 41 批蛇胆川贝液样品进行检验，结果有一批样品未检出蛇胆汁的两个

专属性成分，该批样品疑似未按处方以蛇胆汁投料。

5 讨论

UPLC-Q-TOF-MS 技术可以同时提供良好的分离效果，提供精确的、丰富的质谱信息，被广泛用于中药复杂成分的在线快速鉴别。本实验结合主成分分析法分析蛇胆汁和其他动物胆汁的差异。结果表明，利用该方法能区分蛇胆汁和其他动物胆汁，并找出具有鉴别意义的特征性成分，分别为牛磺去氧胆酸硫酸酯（$C_{26}H_{45}NO_9S_2$）和牛磺胆酸硫酸酯（$C_{26}H_{45}NO_{10}S_2$），再根据各自的二级碎片，建立了在质谱定性鉴别中较常用且灵敏度很高的三重串联四极杆多反应监测方法。但目前这两个成分均无法在市场上获得对照品，只能以蛇胆汁对照药材作为特征成分保留时间的参照，这种通过对照药材图谱对色谱峰定位的思路在一些难以获得对照物质的民族药或动物药上已有尝试 [14-15]。蛇胆川贝液为市面上常见的止咳药，处方中除了蛇胆汁、平贝母，还有薄荷脑、杏仁水、蜂蜜及大量蔗糖等辅料。平贝母的主要成分为生物碱类 [16]，而大量的糖浆容易损耗仪器也会增加基质效应，降低灵敏度 [17]。综合考虑，在样品前处理中，先将样品用冰醋酸酸化后，再经过耐受酸碱的 HLB 固相萃取小柱 [17] 净化，首先用水洗去糖浆以及酸化成盐的生物碱，再用甲醇将胆汁酸类成分洗脱。本文选择甲醇作为洗脱溶剂，获得了更好的浓缩效率。该方法专属性、重现性均良好，操作方便，能有效控制蛇胆汁不投料的不法行为。

参考文献

[1] 中国药典 2015 年版 . 四部 [S]. 2015：423.

[2] 广东省中药材标准 [S]. 177.

[3] 管淑玉，曾常青，刘广锋 . 中药蛇胆的鉴别及质量控制现状 [J]. 广东药学院学报，2010，26（5）：537-539.

[4] 陈晓颙，张洁，范叶琴，等 . 蛇胆药材及其成方制剂质量控制方法研究 [J]. 中国药学杂志，2019，54（17）：1380-1386.

[5] 黄玉华，丘明明 . HPLC-ELSD 法测定蛇胆川贝液中牛磺胆酸钠的含量 [J]. 中国药师，2010，13（11）：1632-1633.

[6] 符秀娟，武文，龙丽娜，等 . HPLC 法测定人工养殖蟒蛇胆汁中牛磺蟒胆酸钠的含量 [J]. 中药新药与临床药理，2011，22（2）：194-196.

[7] 马婷婷，张亚中，胡冲，等 . HPLC-CAD 法测定蛇胆汁中牛磺胆酸钠的含量 [J]. 中药分析杂志，2017，37（7）：1223-1227.

[8] 张德桐，张能荣 . 鸡胆汁与蛇胆汁组分的对比研究 [J]. 中国生化药物杂志，1994，15（1）：4-7.

[9] 简龙海，毛秀红，王柯 . 熊胆粉中 3 个新胆汁酸的结构研究与确定 [J]. 药学学报，2013，48（8）：1297-1300.

[10] 易博，张旻，胡引明，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS・MS 技术的裸花紫珠不同部位化学成分分析 [J]. 中国中药杂志，2019，44（21）：4661-4669.

[11] 罗艺，白钢，罗国安，等 . 治咳川贝枇杷滴丸 UPLC-Q-TOF-MS-E 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志，2012，32（11）：1940-1944.

[12] Zhang J，GAO F，Chen X，et al. Rapid identification of bile acids in snake bile using ultrahigh-performance liquid chromatography with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. Chromatogr B，2016，15（1036-1037）：157-169.

[13] 陈德莹，苏小玲，李君，等 . 超高效液相色谱 - 四极杆 - 飞行时间质谱对血清中结合型胆汁酸的定性分析研究，[J]. 药物分析杂志，2013，33（8）：1303-1310.

[14] 昝珂，崔淦，过立农，等 . 民族药定量对照药材研究———以藏族药小米辣为例 [J]. 中国中药杂志，2018，43（9）：1764-1768.

[15] 李广华，龙萍，程显隆，等 . 高效液相色谱 - 三重四极杆质谱法检测暖宫孕子丸中阿胶特征肽成分 [J]. 药物分析杂志，2020，40（4）：694-697.

[16] 沈莹，孙海峰 . 平贝母化学成分及药理作用研究进展 [J]. 化学工程师，2018，32（6）：62-66.

[17] 宿书芳，薛霞，刘艳明，等 . 超高效液相色谱 - 串联质谱法检测蜂蜜中的内源性酚酸和黄酮类物质 [J]. 现代食品科技，2018，34（8）：260-266.

（收稿日期：2021-10-13；修回日期：2021-11-19）

栀子花舒心胶囊、酸橙花舒畅胶囊和酸橙栀子双花抗脑衰胶囊对大鼠局灶性脑缺血 / 再灌注损伤的保护作用

张忠立，李淑琪，左月明*（江西中医药大学药学院，南昌　330004）

摘要：目的　探讨栀子花舒心胶囊、酸橙花舒畅胶囊和酸橙栀子双花抗脑衰胶囊对大鼠局灶性脑缺血 / 再灌注损伤的保护作用。**方法**　将 132 只雄性 SD 大鼠随机分为 11 组：假手术组，模型对照组，脑心通胶囊组（2.01 g • kg^{-1}），酸橙花舒畅胶囊低、中、高（0.47、0.94、1.88 g • kg^{-1}）剂量组，栀子花舒心胶囊低、中、高（0.63、1.26、2.52 g • kg^{-1}）剂量组，酸橙栀子双花抗脑衰胶囊中、高（1.45、2.90 g • kg^{-1}）剂量组。采用改良 Zea Longa 线栓法构建大鼠局灶性脑缺血 / 再灌注损伤模型，各给药组在造模手术前连续给药 8 d，造模手术后进行神经功能缺陷评分，干湿称重法检测大鼠脑指数，TTC 染色法检测大鼠脑梗死体积，试剂盒法检测大鼠血清 SOD、MDA、谷氨酸、NO、Ca^{2+}的含量，酶联免疫法检测大鼠血清中炎症介质 IL-6、IL-8、IL-1β、TNF-α 的变化，HE 染色和免疫组化观察海马皮质层区病理学改变。**结果**　与模型组比较，各给药组能明显降低脑缺血 / 再灌注大鼠翻正反射恢复时间、降低脑组织含水量、减少脑梗死体积，提高 SOD 活性，降低 MDA、谷氨酸、NO 和 Ca^{2+}含量，抑制激活小胶质细胞释放 IL-6、IL-8、IL-1β、TNF-α 炎症因子，改善病理形态学。**结论**　栀子花舒心胶囊、酸橙花舒畅胶囊和酸橙栀子双花抗脑衰胶囊对局灶性脑缺血 / 再灌注损伤具有明显保护作用，其机制可能与抗炎及抗氧化有关。

关键词：栀子花舒心胶囊；酸橙花舒畅胶囊；酸橙栀子双花抗脑衰胶囊；黄酮类；环烯醚萜类；脑缺血 / 再灌注；抗炎；抗氧化

中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)06-1309-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.015

Gardenia flower Shuxin capsules, Lime flower Shuchang capsules and Gardenia lime flower Kangnaoshuai capsules on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats

ZHANG Zhong-li, LI Shu-qi, ZUO Yue-ming* (*School of Pharmacy*, *Jiangxi University of Chinese Medicine*, *Nanchang* 330004)

Abstract: Objective　To determine the effect of Gardenia flower Shuxin capsules, Lime flower Shuchang capsules and Gardenia lime flower Kangnaoshuai capsules on the anti-focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. **Methods**　Totally 132 male SD rats were randomly divided into 11 groups: a sham operation group, a model group, a Naoxintong capsule group (2.01 g • kg^{-1}), 3 (low, medium and high-dose) Lime flower Shuchang capsule groups (0.47, 0.94, and 1.88 g • kg^{-1}), 3 (low, medium and high-dose) Gardenia flower Shuxin capsule groups (0.63, 1.26, and 2.52 g•kg^{-1}), 2 (medium and high-dose) Gardenia lime flower Kangnaoshuai capsule groups (1.45, 2.90 g • kg^{-1}). The focal cerebral ischemia/reperfusion model in rats with modified suture-occluded method of Zea Longa was established. Each group was ig administrated once daily for 8 days. The neurological function scores and brain indexes were evaluated, and the cerebral infarction area and various related enzymes (SOD, MDA, glutamate, NO, Ca^{2+}, IL-6, IL-8, IL-1β, and TNF-α) were determined. HE staining and immunohistochemistry were used to evaluate the cerebral tissue morphology. **Results**

基金项目：国家自然科学基金项目（No.82160928，No.81360632）。

作者简介：张忠立，男，副教授，主要从事天然药物的药效物质基础研究工作，email：zzl51518@163.com　*通信作者：左月明，女，教授，主要从事天然药物资源的药效物质基础与分子机制研究，email：zuo_yueming@163.com

Compared with the model group, the medication groups obviously decreased the recovery time of righting reflex in rats with cerebral ischemia/reperfusion, alleviated the pathological damage of ischemia reperfusion place, reduced the water content of the brain tissue, reduced the cerebral infarction volume, increased SOD activity and reduced the content of MDA, glutamate, NO and Ca^{2+}, and inhibited the activation of microglia releasing IL-6, IL-8, IL-1β and TNF-α inflammatory factors. The pathomorphology was significantly improved. **Conclusion** Gardenia flower Shuxin capsules, Lime flower Shuchang capsules and Gardenia lime flower Kangnaoshuai capsules have obvious protective effect on focal cerebral ischemia/reperfusion injury, whose mechanism may be related to the anti-inflammation and antioxidation functions.

Key words: Gardenia flower Shuxin capsule; Lime flower Shuchang capsule; Gardenia lime flower Kangnaoshuai capsules; flavonoid; iridoid; cerebral ischemia/reperfusion injury; anti-inflammation; antioxidation

脑缺血性疾病具有高发病率、高致残率及高病死率特点，及时恢复缺血区的血流再灌注为该类疾病的首要治疗原则。研究表明，缺血区血流的再灌注可引起脑组织损伤及相关功能障碍，即脑缺血/再灌注损伤（cerebral ischemia-reperfusion injury，CIRI）[1]，其发病机制复杂，是一个多种致病因子参与的复杂病理生理过程，而氧化应激及炎症反应在 CIRI 的发生、发展中具有重要作用 [2]。传统中药具有整体调节、多成分、多靶点，无或低毒副作用等优势，日益受到广大学者的关注。

栀子花为茜草科栀子属植物栀子（*Gardenia jasminoides* Ellis）的花或花蕾，其性寒、味甘苦，入肺、肝经，具有清肺化痰、凉血止血、润肠通便等传统功效 [3]，其富含的环烯醚萜类成分具有抗炎、抗氧化和抗阿尔茨海默病（Alzheimer's disease，AD）等药理作用，其主要成分栀子苷具有治疗脑缺血的药理作用 [4-6]。而芸香科酸橙及其变种（*Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl）的干燥花蕾，即酸橙花（又名代代花、枳壳花、枳实花），其味甘、微苦、性平，具有疏肝理气、消食和胃健脾、化痰、解郁等传统功效 [7]，其富含的黄酮类成分具有抗炎、抗氧化、保护心脑血管等药理作用 [8-9]，主要成分柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷具有抗 AD 和治疗脑缺血的药理活性 [10-12]。江西道地芳香药材栀子花和酸橙花的资源量丰富，一年原料药产值接近 10 亿元，但其综合应用开发产品较少。本课题组前期实验研究临床人正常给药剂量下栀子花配伍酸橙花不同剂量比为 1∶1、2∶1、3∶1 抗神经细胞损伤药理疗效时，栀子花配伍酸橙花剂量比为 2∶1 的疗效最优 [13]，结合提取富集工艺制备主要含总环烯醚萜类成分的栀子花 70% 乙醇洗脱部位的栀子花舒心胶囊、主要含总黄酮类成分的酸橙花 70% 乙醇洗脱部位的酸橙花舒畅胶囊、栀子花配伍酸橙花剂量比为 2∶1 的酸橙栀子双花抗脑衰胶囊（折算栀子花 70% 乙醇洗脱部位和酸橙花 70% 乙醇洗脱部位比为 1.3∶1），并采用改良 Zea Longa 线栓法建立大鼠局灶性 CIRI 模型，探讨三种胶囊抗 CIRI 的作用机制，为中药复方药味配伍及其指导临床合理用药提供依据，为江西道地药材栀子花和酸橙花的综合开发利用奠定基础。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 132 只，体质量 250 ～ 290 g [由湖南斯莱克景达实验动物有限公司，动物许可证编号为 SCXK（湘）2016-0002]。

1.2 试药

酸橙花舒畅胶囊（含酸橙花 70% 乙醇洗脱部位原料药 150.0 mg ＋ 196.5 mg 糊精 ＋ 3.5 mg 二氧化硅，简称 SC70，其总黄酮含量以芸香柚皮苷不少于 2.23%、柚皮苷不少于 4.62%、橙皮苷不少于 2.33% 和新橙皮苷不少于 10.16% 计，批号：20210608）、栀子花舒心胶囊（含栀子花 70% 乙醇洗脱部位原料药 200.0 mg ＋ 196.0 mg 糊精＋ 4.0 mg 二氧化硅，简称 ZZ70，其总环烯醚萜含量以去乙酰车叶草苷酸甲酯不少于 9.24% 和京尼平苷不少于 5.22% 计，批号：20210610）、酸橙栀子双花抗脑衰胶囊（含酸橙花 70% 乙醇洗脱部位原料药 100.0 mg ＋栀子花 70% 乙醇洗脱部位原料药 130.0 mg ＋ 166.0 mg 糊精 ＋ 4.0 mg 二氧化硅，简称 SCZZ70，批号：20210611）均由本实验室自制；脑心通胶囊（阳性药，规格：0.4 g/

粒，陕西步长制药有限公司，批号：20170320）。

氯代三苯基四氮唑（TTC，北京索莱宝科技有限公司，批号：922G037）；水合氯醛（国药集团化学试剂有限公司，批号：20141224）；超氧化物歧化酶（SOD，批号：20180920）、丙二醛（MDA，批号：20180922）、谷氨酸（批号：20180925）、一氧化氮（NO，批号：20180920）、Ca^{2+}（批号：20180922）、白介素 1β（IL-1β，批号：20180920）、IL-6（批号：20180915）、IL-8（批号：20180918）、肿瘤坏死因子α（TNF-α，批号：20180920）试剂盒（南京建成生物工程研究所）。

1.3　仪器

恒诺 2-16R 台式高速冷冻离心机（湖南恒诺仪器设备有限公司）；UV6300 紫外 - 可见分光光度计（上海美普达科技有限公司）；RM2255 切片机（德国 Leica 公司）；ST-360 酶标仪（上海科华实验有限公司）；BX43LED-FL 三目 Olympus 显微镜（杭州美敦利科技有限公司）。

2　方法

2.1　分组及给药

雄性 SD 大鼠随机分为假手术组，模型对照组，阳性对照组（脑心通胶囊 2.01 g • kg^{-1}），SC70 低、中、高剂量组（0.47、0.94、1.88 g • kg^{-1}），ZZ70 低、中、高剂量组（0.63、1.26、2.52 g•kg^{-1}）和 SCZZ70 中、高剂量组（1.45、2.90 g • kg^{-1}），每组 12 只。连续灌胃给药 8 d，于第 8 日灌胃 1 h 后，开始制备大鼠 CIRI 模型。假手术组和模型组用蒸馏水灌胃。

2.2　大脑中动脉阻塞法（middle cerebral artery occlusion，MCAO）制备局灶性 CIRI 模型

应用改良 Zea Longa 线栓法[14-15]，于末次给药 1 h 后，水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠，颈中部纵向切开皮肤 2 cm，钝性分离皮下组织与肌肉，暴露右侧颈总动脉（common carotid artery，CCA），剪开包裹 CCA 及迷走神经的鞘膜，分离右颈内动脉（internal carotid artery，ICA）及右颈外动脉（external carotid artery，ECA）。在 CCA 近心端、远心端分别穿线，近心端系紧，结扎 CCA，远心端系一松结备用。分离 ECA、ICA，并在 ECA 穿线结扎，用动脉夹夹闭 ICA。距颈总动脉分叉处约 4 mm 剪一 V 型小口，插入栓线，用备用的丝线打一正结，松开 ICA 的动脉夹，然后调整线栓角度，使线栓弧度水平向外，轻缓将线栓送入颅内至感觉到阻力，插入深度约 18 mm 左右，即完成了 CIRI 模型的制备。将部分栓线留体外，于 2 h 后轻轻向外拔出栓线 1 cm 左右至略感阻力即可进行再灌注 4 h，剪断皮肤外露的栓线。假手术组不插入线栓，其余同模型组。

2.3　指标测定

2.3.1　实验记录　实验过程中每日称重并观察动物喂养及精神状态情况。

2.3.2　神经功能评分　对大鼠神经功能进行盲评，参照 Zea Longa 5 分制评分标准（见表 1），评分在 1 ～ 3 分的，确定大鼠造模成功。

表 1　实验动物 Zea Longa 神经功能缺损评分标准

Tab 1　Animal Zea Longa neurological deficit scoring criteria

评分	动物状态
0 分	没有神经功能缺损
1 分	对侧前爪不能完全伸展，为对侧前肢内收、屈曲
2 分	行走时大鼠向对侧转圈、划圈，将大鼠置于地面时，推动患侧肩向对侧移动时，阻力明显降低
3 分	行走时大鼠身体向左侧（瘫痪侧）倾倒
4 分	意识丧失，不能自发行走
5 分	死亡

2.3.3　大鼠脑指数的测定　脑神经功能评分后，大鼠麻醉，取出全脑，生理盐水冲洗，去除嗅球、小脑及脑干，滤纸吸干水分，称重。按公式：脑指数＝脑湿重（g）/ 体质量（100 g）统计。

2.3.4　大鼠脑梗死体积的测定　将脑组织称重后立即置－ 20 ℃冰箱中快速冷冻 20 min，由前向后行冠状位切 5 片，每片厚约 2 mm，置 2% TTC 溶液中，37 ℃避光染色 30 min，15 min 后翻面。经染色假手术组脑组织呈玫瑰红色，模型组梗死灶呈苍白色，缺血明显。染色后再用 4% 多聚甲醛固定 30 min，拍照，采用 Image Pro Plus 6.0 医学图像分析系统对梗死灶体积进行分析，使用 count and measure objects 工具计算梗死区体积占整个脑体积的百分比。

2.3.5　大鼠脑组织病理形态学和血清生化指标的测定　大鼠（8 只）行心脏采血，离心后取血清，测定血清中炎症因子 IL-6、IL-8、IL-1β、TNF-α 含量，并测定生化指标 SOD、MDA、谷氨酸、NO 和 Ca^{2+}的含量；部分大鼠（4 只）取脑组织，观察脑组织皮质层病理学改变。

2.4　统计方法

实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 14.0 对数据进行统计分析。组间差异比较用单因素方差分析，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　三种胶囊对 CIRI 大鼠神经功能评分的影响

假手术组没有神经功能缺损出现；模型对照组

神经功能缺损评分接近 2.4 分；除 SC70 低、高剂量组外其余给药各组神经功能缺损评分均明显低于模型对照组（$P<0.05$，$P<0.01$）（见表 2）。

表 2 三种胶囊对 CIRI 大鼠神经功能缺损评分、脑指数及脑梗死体积的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Tab 2 Effect of 3 capsules on neurological deficit score，brain index and cerebral infarction volume in rats with brain CIRI injury（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	神经功能缺损评分 / 分	脑指数	脑梗死体积 /%
假手术组	0.00±0.00	0.4917±0.0243	0.00±0.00
模型对照组	2.38±0.74$^{\#\#}$	0.6440±0.0341$^{\#\#}$	12.15±3.46$^{\#\#}$
阳性对照组	1.13±0.83**	0.5438±0.0240**	6.77±3.43**
SC70 低剂量组	1.75±1.04	0.5371±0.0215**	7.72±3.46*
SC70 中剂量组	1.63±0.52*	0.5191±0.0311**	8.33±2.97*
SC70 高剂量组	2.00±0.76	0.5390±0.0408**	7.98±3.51*
ZZ70 低剂量组	1.50±0.93*	0.5422±0.0234**	5.19±2.07**
ZZ70 中剂量组	1.25±0.89**	0.5633±0.0361**	4.84±2.93**
ZZ70 高剂量组	1.38±0.52**	0.6003±0.0381*	4.56±1.03**
SCZZ70 中剂量组	1.00±1.00**	0.5280±0.0191**	5.81±2.65**
SCZZ70 高剂量组	0.88±0.73**	0.5443±0.0238**	4.70±1.32**

注：与假手术组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

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

3.2 三种胶囊对 CIRI 大鼠脑指数的影响

与假手术组比较，模型对照组大鼠脑指数明显升高（$P<0.01$）；与模型对照组比较，给药各组大鼠脑指数均显著降低（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）（见表 2）。

3.3 三种胶囊对 CIRI 大鼠脑梗死体积的影响

采用 TTC 染色法观察脑切片，假手术组脑组织呈玫瑰红色，没有出现梗死灶，而模型对照组脑组织呈苍白色，出现明显梗死灶。与模型对照组比较，给药各组梗死灶体积明显减小（$P<0.05$，$P<0.01$）。见表 2 和图 1。

3.4 三种胶囊对 CIRI 大鼠血清中 SOD、MDA 和谷氨酸含量的影响

与假手术组比较，模型对照组血清 SOD 活性明显降低，MDA 和谷氨酸含量明显升高（$P<0.01$）；与模型对照组比较，给药各组（除 SC70 低剂量组）能使血清中 SOD 活性升高，而使 MDA 和谷氨酸含量显著降低（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）（见表 3）。

3.5 三种胶囊对 CIRI 大鼠血清中 NO、Ca^{2+} 含量的影响

模型对照组大鼠血清中 NO 和 Ca^{2+} 含量较假手术组明显升高（$P<0.01$）；与模型对照组比较，SC70 低剂量组对血清中 NO 含量变化无明显影响，而其余给药各组均能使血清中 NO 和 Ca^{2+} 含量显著降低（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）（见表 4）。

表 3 三种胶囊对 CIRI 大鼠血清中 SOD、MDA 和谷氨酸含量的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Tab 3 Effect of 3 capsules on the contents of SOD，MDA and glutamate in serum of rats with brain CIRI injury（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	SOD/（U·mL^{-1}）	MDA/（nmol·mL^{-1}）	谷氨酸 /（μmol·L^{-1}）
假手术组	287.54±63.36	10.37±2.55	229.78±51.10
模型对照组	137.22±59.51$^{\#\#}$	22.41±3.91$^{\#\#}$	412.26±78.88$^{\#\#}$
阳性对照组	215.60±87.63*	17.26±3.08**	290.26±65.38**
SC70 低剂量组	175.24±73.05	19.10±4.21	345.35±70.54
SC70 中剂量组	207.01±74.37*	17.48±4.23*	327.22±67.02*
SC70 高剂量组	217.07±48.74**	17.14±5.13*	318.94±69.97*
ZZ70 低剂量组	210.68±48.16**	17.89±4.76*	288.20±68.63**
ZZ70 中剂量组	222.04±56.64**	15.36±3.12**	278.75±74.66**
ZZ70 高剂量组	230.60±57.90**	16.86±3.64**	301.56±76.03**
SCZZ70 中剂量组	226.26±42.47**	16.71±4.65**	271.37±67.59**
SCZZ70 高剂量组	241.84±57.42**	14.17±4.34**	260.82±76.26**

注：与假手术组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

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

表 4 三种胶囊对 CIRI 大鼠血清中 NO、Ca^{2+} 含量的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Tab 4 Effect of 3 capsules on the contents of NO and Ca^{2+} in serum of rats with brain CIRI injury（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	NO/（μmol·L^{-1}）	Ca^{2+}/（mmol·L^{-1}）
假手术组	3.74±0.37	1.57±0.34
模型对照组	6.56±0.98$^{\#\#}$	2.19±0.26$^{\#\#}$
阳性对照组	5.06±1.08**	1.80±0.30**
SC70 低剂量组	5.52±1.59	1.85±0.28*
SC70 中剂量组	5.38±1.03*	1.72±0.32**
SC70 高剂量组	5.23±1.44*	1.69±0.30**
ZZ70 低剂量组	5.00±0.93**	1.93±0.19*
ZZ70 中剂量组	4.79±1.08**	1.81±0.22**
ZZ70 高剂量组	4.83±0.98**	1.80±0.26**
SCZZ70 中剂量组	4.90±0.80**	1.79±0.34**
SCZZ70 高剂量组	4.69±0.87**	1.66±0.37**

注：与假手术组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

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

3.6 三种胶囊对 CIRI 大鼠脑组织皮质层区病理损伤的影响

HE 染色脑缺血病理学变化结果显示，模型对照组大鼠皮质层区神经细胞排列紊乱，细胞肿胀、形态不完整，出现神经元丢失、死亡，有细胞核溶解固缩、边界不清晰现象。给药各组（尤其是 ZZ70 中剂量组、SCZZ70 中剂量组、SCZZ70 高剂

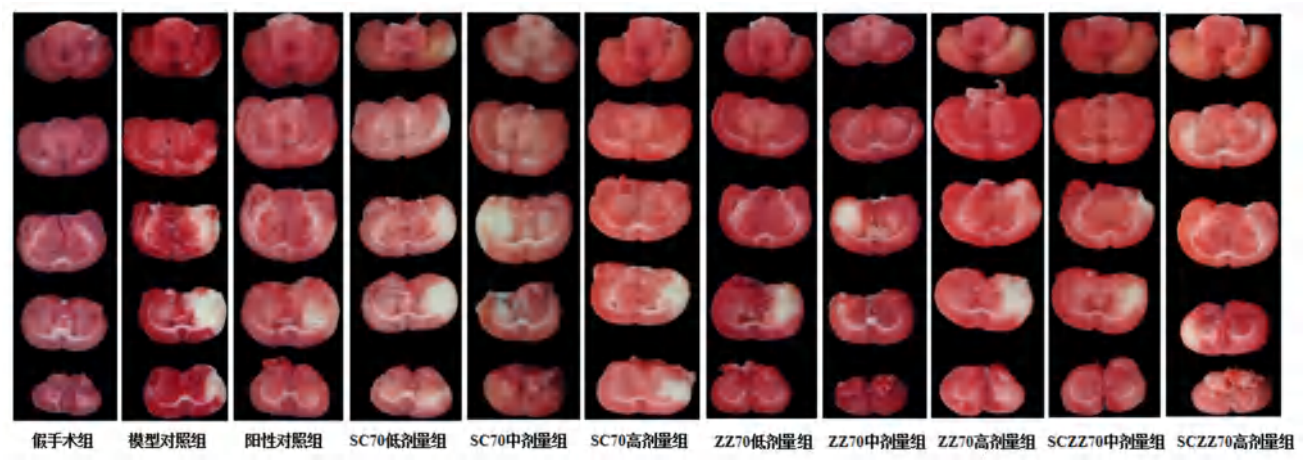


图 1　三种胶囊对 CIRI 大鼠脑梗死 TTC 染色结果

Fig 1　TTC staining of 3 capsules on cerebral infarction in rats with brain CIRI injury

量组）大鼠脑组织皮质层区神经元细胞排列较整齐，数量减少的不明显，细胞整体结构和细胞边界趋于正常，表明给药各组对 CIRI 大鼠的神经细胞损伤均有显著改善和保护作用（见图 2）。

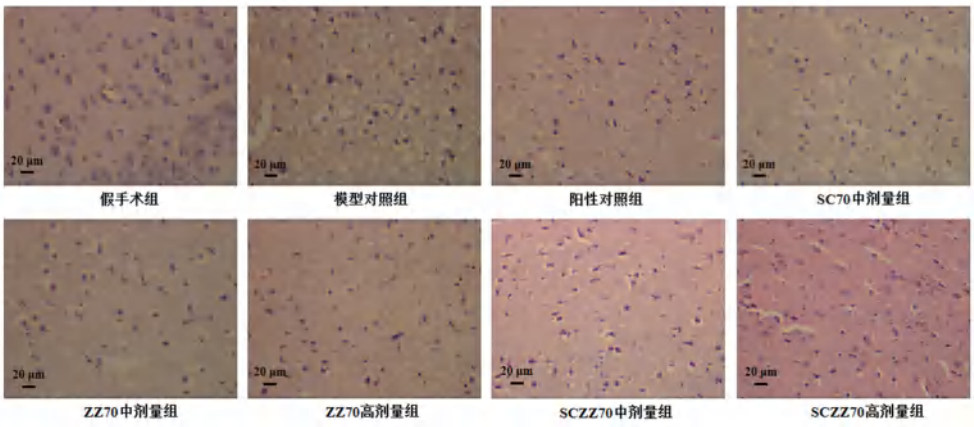


图 2　三种胶囊对 CIRI 大鼠皮质层区病理学变化（HE 染色，×400，n = 4）

Fig 2　Effect of 3 capsules on pathological changes of cortical layer in rats with brain CIRI injury（HE，×400，n = 4）

3.7　三种胶囊对 CIRI 大鼠皮层神经细胞凋亡因子 Bax、Bcl-2、Caspase-3 的影响

与假手术组比较，模型对照组大鼠大脑皮层凋亡细胞明显增加，Bax 和 Caspase-3 蛋白表达增加，Bcl-2 显著降低；给药各组能明显降低大脑皮层 Bax 和 Caspase-3 阳性细胞数，Bcl-2 显著升高，说明药物对 CIRI 大鼠的神经细胞具有抗凋亡作用（见图 3）。

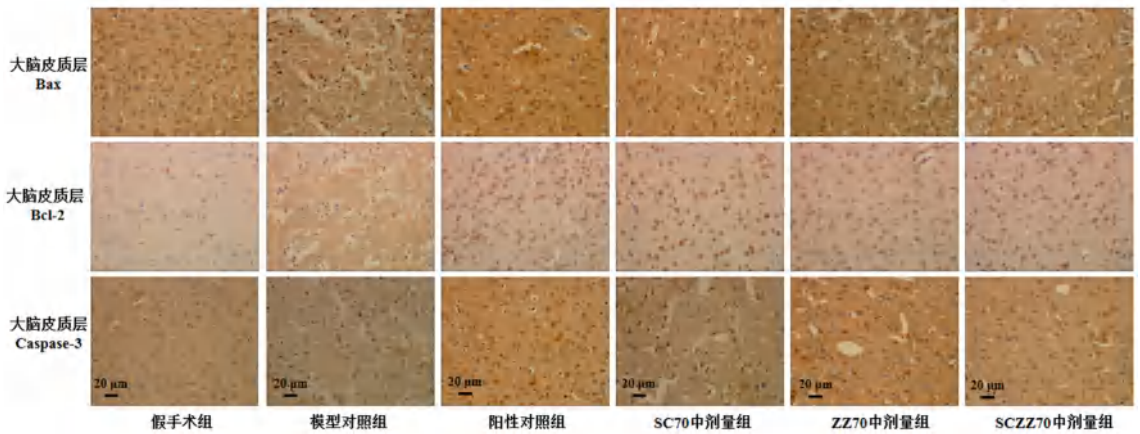


图 3　三种胶囊对 CIRI 大鼠皮层神经细胞凋亡因子 Bax、Bcl-2、Caspase-3 变化的影响（×400）

Fig 3　Effect of 3 capsules on the changes of apoptosis factors Bax，Bcl-2 and Caspase-3 in cortical neurons rats with brain CIRI injury（×400）

3.8 三种胶囊对 CIRI 大鼠血清中炎症因子 IL-6、IL-8、IL-1β、TNF-α 的影响

与假手术组比较，模型对照组大鼠血清中炎症因子 IL-6、IL-8、IL-1β 和 TNF-α 含量明显升高（$P<0.01$）；与模型对照组比较，给药各组血清中 IL-6、IL-8、IL-1β 和 TNF-α 含量均显著降低（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），提示给药各组可以减轻 CIRI 缺血区的炎症级联反应，具有抗炎作用（见表 5）。

表 5 三种胶囊对 CIRI 大鼠血清中 IL-6、IL-8、IL-1β 和 TNF-α 含量的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Tab 5 Effect of 3 capsules on the contents of IL-6，IL-8，IL-1β and TNF-α in the serum of rats with brain CIRI injury（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	IL-6/（ng·L^{-1}）	IL-8/（ng·L^{-1}）	IL-1β/（ng·L^{-1}）	TNF-α/（ng·L^{-1}）
假手术组	35.31±12.32	23.99±6.71	1.84±0.55	308.35±79.26
模型对照组	91.01±21.65$^{\#\#}$	68.67±15.30$^{\#\#}$	3.88±0.70$^{\#\#}$	842.40±200.75$^{\#\#}$
阳性对照组	57.59±18.19**	43.73±13.78**	2.56±0.60**	498.48±141.17**
SC70 低剂量组	67.68±22.01*	55.87±20.87	3.07±0.85*	635.72±110.82*
SC70 中剂量组	62.85±22.42*	48.88±17.78*	2.93±0.79*	659.67±158.63*
SC70 高剂量组	58.72±16.25**	45.11±11.98**	3.24±0.52*	689.49±192.42
ZZ70 低剂量组	53.34±16.99**	48.26±15.07**	2.91±0.62**	627.98±178.70*
ZZ70 中剂量组	56.59±19.28**	48.09±20.44*	2.81±0.75**	572.82±151.82**
ZZ70 高剂量组	57.21±13.44**	44.75±12.91**	2.62±0.87**	546.98±173.52**
SCZZ70 中剂量组	53.52±15.49**	49.62±18.70*	2.52±0.66**	509.99±127.84**
SCZZ70 高剂量组	48.58±8.44**	43.64±13.08**	2.45±0.53**	474.69±114.86**

注：与假手术组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

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

4 讨论

脑缺血再灌注损伤因其致病机制复杂，临床病症多样，治愈难度高且易复发等医学瓶颈问题，使广大学者更关注有效药物的深度开发，但单一品种的药物，作用机制和作用范围有限，导致临床疗效不佳。中医组方配伍用药可解决复杂病症的多靶点、多途径等问题，是未来抑制 CIRI 药物研究的一个发展方向。

现代研究提示，栀子花提取富集的环烯醚萜类成分具有抗炎、抗氧化、抗 AD 和治疗脑缺血等药理作用[4-6]，酸橙花提取富集的黄酮类成分具有抗炎、抗氧化、保护心脑血管等药理作用[8-11]，而将两者按治疗神经细胞保护作用最佳配伍可获得栀子花总环烯醚萜类∶酸橙花总黄酮类为 1.3∶1[13]，进一步治疗 CIRI 药效学实验研究发现两种药材富集组分的混合配伍也具有较好的疗效，提示两种药材富集组分的配伍对 CIRI 大鼠的协同保护可能属于相加作用。同时，栀子花单独用高剂量组没有中剂量组疗效好，可能是栀子花中主要成分栀子苷大剂量对肝脏产生一定不良反应导致，故本文通过配伍具有疏肝理气解郁的酸橙花来降低不良反应并提高治疗 CIRI 的整体药理疗效，结果证实酸橙花舒畅胶囊、栀子花舒心胶囊和酸橙栀子双花抗脑衰胶囊均具有抗 CIRI 的作用。

目前，线栓法制备 MCAO 动物模型技术较成熟，具有实验条件易控制、对动物身体损伤小、术后生存率高等优点，已成为经典的脑缺血模型，模拟了人类缺血性脑血管病的状态，比较符合临床。本实验成功建立了 MCAO 线栓法大鼠 CIRI 模型，模型组动物通过神经功能评分和 TTC 染色法计算脑组织的梗死体积来评价脑缺血再灌注损伤的程度[16]。实验结果显示，MCAO 线栓法造模后，大鼠的精神状态萎靡，神经功能评分、脑指数、脑梗死体积及脑病理变化均显示脑缺血造模成功。给药各组均能显著降低造模后大鼠翻正反射恢复时间，减少脑梗死体积，降低脑组织含水量，减轻脑缺血再灌注组织的损伤。

脑缺血再灌注损伤时，机体可产生大量活性氧（reactive oxygen species，ROS），这些 ROS 不能被内源性的抗氧化系统及时清除，导致 DNA 氧化，引起膜脂质过氧化反应等一系列的连锁反应[17]。SOD 是自由基清除剂，是对抗 ROS 过多产生的两种主要酶，其活力能够间接反映机体清除氧自由基的能力[18]。MDA 是脂质过氧化反应的最终产物，可以改变细胞膜的通透性和流动性。脑缺血后引起突触末梢谷氨酸释放，激活突触后膜亲离子受体，导致膜去极化，膜兴奋性增高，阳离子通道开放，Ca^{2+} 内流导致细胞内 Ca^{2+} 超载，系列酶被启动引起细胞损伤，其中活化的一氧化氮合酶可催化产生过量 NO，与超氧阴离子形成过氧亚硝酸根离子和羟基，损伤线粒体膜，致使离子平衡紊乱[19]。本研究结果显示，三种胶囊能明显升高模型大鼠血清 SOD 活性，降低 MDA 含量，抑制机体对谷氨酸的合成和分泌，减

少 NO 和 Ca^{2+}的释放，来增加机体的抗氧化应激能力，可减轻对神经元细胞的损伤。脑缺血可刺激内皮细胞和白细胞中黏附分子的表达，产生大量的促炎性细胞因子，会导致白细胞黏附以及向大脑软组织外渗[20]，是多种中枢神经系统疾病中的重要炎性介质，能加重脑组织的损伤。实验结果表明，三种胶囊能使模型大鼠抑制激活小胶质细胞释放 IL-6、IL-8、IL-1β、TNF-α等多种炎症因子，减轻炎症因子对机体的炎性损伤过程。

综上所述，酸橙花舒畅胶囊、栀子花舒心胶囊和酸橙栀子双花抗脑衰胶囊能改善脑缺血微循环障碍，增加机体的抗氧化应激能力、抗炎症级联反应和减少神经元损伤来协同发挥脑保护作用，分析两种药物的组分可能从不同环节阻碍缺血细胞的病理变化，故后续我们将继续探讨两种药物组方配伍原则和产生协同增效作用的机制，为三种胶囊剂深入开发研究提供理论依据。

参考文献

[1] Riverol M，Becker JT，López OL，et al. Relationship between systemic and cerebral vascular disease and brain structure integrity in normal elderly individuals [J]. J Alzheimer’s Dis，2015，44（1）：319-328.

[2] 张祎，陈文，孟宪丽 . 三黄泻心汤对全脑缺血再灌注大鼠氧化应激及炎性损伤的保护作用 [J]. 中药药理与临床，2014，30（4）：1-5.

[3] 中国植物志编纂委员会 . 中国植物志 [M]. 第 71 卷（第一分册）. 北京：科学出版社，2001：170.

[4] 王云，李东影，林凡凯，等 . 栀子治疗脑缺血的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（24）：226-234.

[5] Zhang XM，Liu K，Shi MY，et al. Therapeutic potential of catalpol and geniposide in Alzheimer’s and Parkinson’s diseases：a snapshot of their underlying mechanisms [J]. Brain Res Bull，2021，174：281-295.

[6] 高雅，王云，郑颖豪，等 . 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 和网络药理学方法探讨栀子治疗缺血性脑中风的潜在药效物质及作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（14）：119-128.

[7] 福建省药品监督管理局 . 福建省中药材标准 [S]. 福州：福建科技出版社，2006：171.

[8] Huang R，Zhang Y，Shen SY，et al. Antioxidant and pancreatic lipase inhibitory effects of flavonoids from different citrus peel extracts：an in vitro study [J]. Food Chem，2020，326（126785）：1-10.

[9] Ayana Y，Natsuki K，Kazuki O，et al. NEU3 inhibitory effect of naringin suppresses cancer cell growth by attenuation of EGFR signaling through GM3 ganglioside accumulation [J]. Eur J Pharmacol，2016，5（782）：21-29.

[10] Varshney V，Garabadu D. Naringin exhibits mas receptor-mediated neuroprotection against amyloid beta-induced cognitive deficits and mitochondrial toxicity in rat brain [J]. Neurotoxic Res，2021，39（4）：1023-1043.

[11] Chakraborty S，Rakshit J，Bandyopadhyay J，et al. Multi-target inhibition ability of neohesperidin dictates its neuroprotective activity：implication in Alzheimer’s disease therapeutics [J]. Int J Biol Macromol，2021，176（4）：315-324.

[12] 刘微，张洋，郭建超，等 . 柚皮苷对脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中风与神经疾病杂志，2017，34（4）：292-294.

[13] 刘倩 . 栀子花和代代花胶囊的研制及治疗睡眠障碍阿尔茨海默病药效学研究 [D]. 南昌：江西中医药大学，2021.

[14] 陈晓娟，肖宗宇，潘琪，等 . 改良线栓法大鼠脑缺血再灌注损伤模型的建立 [J]. 中国医学创新，2015，12（3）：24-27.

[15] Belayev L，Endres M，Prinz V. Focal cerebral ischemia in the mouse and rat using the intraluminal suture-filament model [J]. Neuromethods，2010，47：29-40.

[16] 程发峰，宋文婷，郭少英，等 . 三种神经功能评分在鼠类局灶性脑缺血模型评价中的比较 [J]. 中国康复医学杂志，2011，26（4）：337-341.

[17] Manzanero S，Santro T，Arumugam TV. Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke：sources and contribution to cell injury [J]. Neurochem Int，2013，62（5）：712-718.

[18] Pei HT，Cao DM，Guo ZL，et al. Bone morphogenetic protein-7 ameliorates cerebral ischemia and reperfusion injury via inhibiting oxidative stress and neuronal apoptosis [J]. Int J Mol Sci，2013，14（12）：23441-23453.

[19] Gomi S，Karp A，Greenberg JH. Regional alterations in an excitatory amino-acid transporter，blood flow，and glucose metabolism after middle cerebral artery occlusion in the rat [J]. Exp Brain Res，2000，130（4）：521-528.

[20] Cheung CY，Poon LLM，Lau AS，et al. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A（H5N1）viruses：a mechanism for the unusual severity of human disease [J]. Lancet，2002，360（9348）：1831-1837.

（收稿日期：2022-01-25；修回日期：2022-05-10）

基于 PERK-ATF4-CHOP 通路探讨马里苷对高糖高脂诱导胰岛β细胞损伤的影响

克迪热亚·卡地尔[1]，祖力皮亚·阿布拉[2]，马红梅[2]，李甜[3]，兰怡[4]，毛新民[5*]（1. 新疆医科大学药学院，乌鲁木齐 830011；2. 新疆医科大学中医学院，乌鲁木齐 830011；3. 新疆医科大学基础医学院，乌鲁木齐 830011；4. 新疆医科大学附属中医医院，乌鲁木齐 830011；5. 新疆地区高发疾病研究教育部重点实验室，乌鲁木齐 830011）

摘要：目的 探讨马里苷对高糖高脂诱导损伤胰岛β细胞的保护作用及作用机制。**方法** MIN6 细胞先用不同浓度的马里苷预处理，然后高糖高脂诱导 MIN6 细胞损伤，采用 CCK-8 法检测马里苷对 MIN6 细胞活性的影响；采用 ELISA 法检测细胞外液中胰岛素含量；采用透射电镜（TEM）观察 MIN6 细胞超微结构；采用特异性钙离子荧光探针（Fluo-4AM）检测内质网钙离子释放；采用 Western blot 法检测各组细胞激酶 R 样内质网激酶（PERK）、P-PERK、活化转录因子 4（ATF4）及 CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白（CHOP）、葡萄糖调节蛋白 78（GRP78）的表达情况。**结果** 与模型组（HGHF 组）比较，马里苷 25 ～ 100 μmol·L^{-1} 给药组细胞活力显著升高；高糖刺激胰岛素分泌量水平显著升高；内质网形态和钙离子稳态逐渐恢复正常；P-PERK（马里苷 50、100 μmol·L^{-1}），ATF4、CHOP、GRP78（马里苷 25 ～ 100 μmol·L^{-1}）蛋白表达水平显著降低。**结论** 马里苷能够改善高糖高脂诱导损伤的小鼠胰岛β细胞内质网应激、恢复胰岛素分泌量和内质网钙稳态，其机制可能与内质网应激 PERK-ATF4-CHOP 通路有关。

关键词：马里苷；胰岛β细胞；糖尿病；内质网应激；PERK-ATF4-CHOP
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1316-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.016

Effects of marein on pancreatic β cell injury induced by high glucose and high lipids based on PERK-ATF4-CHOP pathway

Kedireya·Kadier[1], Zulipiya·Abula[2], MA Hong-mei[2], LI Tian[3], LAN Yi[4], MAO Xin-min[5*] (1. *College of Pharmacy*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830011; 2. *College of Traditional Chinese Medicine*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830011; 3. *College of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi* 830011; 4. *Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi* 830011; 5. *Key Laboratory of High Incidence Diseases in Xinjiang, Ministry of Education*, *Urumqi* 830011)

Abstract: Objective To determine the protective effect and mechanism of marein on pancreatic β cell injury induced by high glucose and high lipids. **Methods** MIN6 cells were pretreated with different concentrations of marein and induced by high glucose and high lipid. CCK-8 was used to detect the effect of marein on the activity of MIN6 cells. Insulin secretion was detected by ELISA. The ultrastructure of MIN6 cells were observed by transmission electron microscopy. Endoplasmic reticulum calcium release was detected by specific calcium probe (Fluo-4AM). Western blot was used to detect the expressions of kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), P-PERK, activated transcription factor 4 (ATF4), CCAAT enhancer binding protein (CHOP), and glucose regulatory protein 78 (GRP78) in all cell groups. **Results** Compared with the midel group (HGHF), the cell viability of the marein group (25 ～ 100 mol·L^{-1}) was significantly increased. The insulin secretion

基金项目：国家自然科学基金项目（No.U1303233）。
作者简介：克迪热亚·卡地尔，女，在读硕士研究生，主要从事糖尿病药理与新药研发，email：1967046253@qq.com *通信作者：毛新民，男，博士研究生导师，教授，主要从事糖尿病药理与新药研发，email：mxm3277@139.com

(GSIS) level was significantly increased under high glucose stimulation. The protein expression of P-PERK was significantly reduced in 50 ～ 100 mol • L^{-1} marein group. The protein expression levels of ATF4, CHOP and GRP78 were significantly reduced in 25 ～ 100 mol • L^{-1} marein group. **Conclusion** Marein can inhibit endoplasmic reticulum stress of pancreatic β cells injury induced by high glucose and high lipids and restore insulin secretion and endoplasmic reticulum calcium homeostasis, which may be related to PERK-ATF4-CHOP pathway.

Key words: marein; pancreatic β cell; diabetes; endoplasmic reticulum stress; PERK-ATF4-CHOP

糖尿病（diabetes mellitus，DM）是一种由遗传和环境因素引起的慢性代谢紊乱性疾病，其主要特征为胰岛素敏感性下降、胰岛素分泌不足和生物功能障碍[1]。由于糖尿病的高患病率和病死率以及严重的并发症，糖尿病已成为全球严重的健康问题之一[2]。未能维持葡萄糖稳态导致胰岛素分泌能力下降是 1 型和 2 型糖尿病的基础。1 型糖尿病中胰岛素绝对缺乏并伴有胰岛β细胞破坏[3]；而 2 型糖尿病主要是由胰岛素分泌和胰岛素敏感性受损共同引起的糖、脂、蛋白代谢障碍，导致明显的高血糖[4]。尽管两者发病机制不同，但其特征都是进行性胰岛β细胞衰竭和质量减少。

内质网是合成、加工和储存胰岛素原的主要场所，胰岛β细胞具有复杂的内质网系统来处理胰岛素的合成和分泌[5]。因此，胰岛β细胞对内质网稳态的破坏极其敏感。近期研究显示，内质网合成的胰岛素负荷和内质网折叠能力之间的不平衡将导致内质网应激。而未折叠蛋白反应（unfolded protein response，UPR）可以感知内质网腔内未折叠 / 错误折叠蛋白质的压力，并调控内质网应激相关基因的表达使内质网恢复稳态。若 UPR 持续性发展就意味着内质网应激未得到缓解，引起内质网稳态失衡，最终将会诱导胰岛β损伤[6]。因此，调控内质网应激有可能作为改善胰岛β细胞功能的有效靶点，为 DM 的防治提供新的依据。

两色金鸡菊（*Coreopsis tinctoria* Nutt）为菊科金鸡菊属一年生草本植物。在中国生长在新疆南部海拔 3000 米以上的喀喇昆仑山和昆仑山，故又被称为“雪菊”[7]，当地居民常采集其新鲜头状花序浸泡当花茶饮用，作为降糖、调血脂的天然药材。马里苷是从两色金鸡菊头状花序中分离得到的黄酮类主要活性成分，具有降糖、降脂、抗炎、抗氧化等功效[8]。研究表明，两色金鸡菊花提取物通过抑制α- 葡萄糖苷酶活性改善高脂饮食引起的高血糖和胰岛素抵抗[9]。此外，在 STZ 诱导的大鼠糖尿病模型中，给予两色金鸡菊乙酸乙酯提取物后，模型组大鼠葡萄糖耐量和胰腺功能明显恢复[10]。因此推测两色金鸡菊黄酮类单体马里苷对高糖高脂损伤的胰岛β细胞具有保护作用。本研究通过建立胰岛β细胞高糖高脂损伤体外模型，探究马里苷对胰岛β细胞损伤的保护作用及其与内质网应激 PERK-ATF4-CHOP 通路的相关性。

1 材料

1.1 细胞

小鼠胰岛素瘤细胞（MIN6）（武汉普诺赛生命科技有限公司，货号：CL-0674），已经过 STR 技术鉴定。

1.2 试药

马里苷 [纯度≥ 99%，货号：ZES-0059S，法国中草药（Extrasynthese）公司]；葡萄糖、棕榈酸、二甲基亚砜（Sigma）；RPMI1640 培养基、胎牛血清、青霉素 - 链霉素双抗、0.25% 胰蛋白酶（Gibico）；Fluo-4 钙离子荧光探针（S1060，上海碧云天生物技术有限公司）；小鼠胰岛素（INS）酶联免疫吸附测定试剂盒（JL11459，上海江莱生物科技有限公司）；BCA 蛋白定量试剂盒（VL316399，Thermo）；ATF4 和 CHOP（货号分别为 11815、5554，CST）；山羊抗兔二抗（bs-40295G-HRP），PERK、P-PERK、GRP78、GAPDH（货号分别为 bs-2469R、bs-3330-R、bs-1219R、bs-2188R），CCK-8、PBS 缓冲液（Bioss）。

1.3 仪器

低温高速离心机（5810R，Eppendorf）；二氧化碳细胞培养箱、Multi-skan GO 酶标仪（Thermo Fisher）；蛋白电泳仪及转印仪（BIORAD）；共聚焦显微镜（Leica）；IX71-5-12F 型倒置显微镜（Roperscientific）。

2 方法

2.1 细胞培养与传代

MIN6 细胞接种于 RPMI-1640 培养液中（含 10% 胎牛血清，1% 双抗），置于 37 ℃、5%CO_2 饱和湿度的恒温培养箱中培养，待细胞生长至 80% ～ 90% 后进行传代。

2.2 CCK-8 检测细胞活力

取对数生长期的 MIN6 细胞以 5×10^3 个 / 孔接种于 96 孔细胞培养板中，分别设正常对照

组、无细胞空白组和马里苷不同浓度组（25、50、100、200、400、800 μmol•L^{-1}），每组 3 个复孔。先用 25 ～ 800 μmol • L^{-1} 马里苷干预 24 h，测定马里苷对 MIN6 细胞活力的影响。后用含 33.3 mmol • L^{-1} 葡萄糖和 250 μmol • L^{-1} 棕榈酸的高糖高脂培养基诱导损伤 48 h 后，用 PBS 清洗 1 次，向每孔中加入 100 μL 含有 CCK-8 的无血清培养基并置于培养箱中孵育 2 h，多功能酶标仪检测 490 nm 处的吸光度（*OD*），计算细胞存活率，细胞存活率（%）＝[（$OD_{给药组}$－$OD_{空白组}$）/（$OD_{正常组}$－$OD_{空白组}$）]×100%。

2.3 细胞分组及给药

将 MIN6 细胞以 2×10^5 个 / 孔接种于 6 孔板中，用含 5.5 mmol • L^{-1} 葡萄糖的正常 RPMI-1640 完全培养基培养 24 h，待细胞贴壁后分为 5 组：① 正常对照组（Control 组）；② 含 33.3 mmol • L^{-1} 葡萄糖和 250 μmol • L^{-1} 棕榈酸的高糖高脂模型组（HGHF 组）；③ 25 μmol • L^{-1} 马里苷预处理 4 h 后，再高糖高脂处理 48 h（马里苷 25 μmol • L^{-1} 组）；④ 50 μmol • L^{-1} 马里苷预处理 4 h 后，再高糖高脂处理 48 h（马里苷 50 μmol • L^{-1} 组）；⑤ 100 μmol • L^{-1} 马里苷预处理 4 h 后，再高糖高脂处理 48 h（马里苷 100 μmol • L^{-1} 组）。

2.4 ELISA 法检测细胞的胰岛素分泌水平

分组及药物干预同“2.3”项下方法。弃上清液，PBS 清洗 2 次，加入无糖的碳酸氢盐缓冲液（KRB）洗涤并预孵 30 min，弃培养液，分别加入含 2.8 mmol • L^{-1} 和 16.7 mmol • L^{-1} 葡萄糖的 KRB 缓冲液，孵育 1 h，收集细胞上清液，1000 r • min^{-1} 离心 20 min，上清液于－ 20 ℃保存。用胰岛素 ELISA 试剂盒分别测定基础胰岛素分泌量和高糖刺激胰岛素分泌量。

2.5 透射电镜（TEM）观察细胞超微结构

分组及药物干预同“2.3”项下方法。弃上清液，PBS 清洗 3 次，加入 2.5% 戊二醛固定过夜，漂洗，再用 1% 四氧化锇固定 1.5 h，将固定细胞逐级乙醇脱水，包埋切片后用透射电镜观察 MIN6 细胞超微结构。

2.6 激光共聚焦显微镜检测细胞内钙离子释放

将 MIN6 细胞以 2×10^5 个 / 皿接种于共聚焦皿中，待细胞贴壁，同“2.3”项下方法分组干预。去除培养基，PBS 轻轻润洗 3 遍，加入 5 μmol • L^{-1} 钙离子荧光探针（Fluo-4 AM）工作液，恒温避光孵育 30 min，再用 PBS 润洗 3 次，在激光共聚焦显微镜下观察各组细胞荧光强度并拍照。

2.7 Western blot 法检测各组蛋白的表达

各组处理完成后，收集细胞，PBS 洗涤 3 次，加入高效 RIPA 裂解液（含蛋白酶抑制剂），冰上裂解 1 h，离心取上清液，BCA 法测定总蛋白含量。根据蛋白浓度每孔上样 20 μg，使用 SDS-PAGE 凝胶电泳法、湿法转入 PVDF 膜，7% 脱脂奶粉封闭 2 h、TBST 洗涤、加入一抗（1∶1000），4 ℃摇床孵育过夜，次日 TBST 洗膜 5 次，每次 5 min，室温孵育二抗（1∶10 000）1 h，TBST 洗涤，ECL 法显色，用 Image J 软件分析条带灰度值，重复 3 次取平均值，以 GAPDH 作为内参，计算各目的蛋白相对表达水平。

2.8 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.0 软件对各个实验数据进行统计分析并完成作图，所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间差异比较用单因素方差分析（One-way ANOVA）和 Dunnet 多重比较 *t* 检验分析。

3 结果

3.1 马里苷对高糖高脂诱导损伤 MIN6 细胞活力的影响

不同浓度的马里苷处理 24 h 对 MIN6 细胞活力的影响见图 1A。25 ～ 800 μmol • L^{-1} 浓度的马里苷有促进细胞增殖的趋势，但差异无统计学意义。不同浓度的马里苷预处理 4 h，后用高糖高脂损伤 48 h 的结果见图 1B，与对照组比较，HGHF 组细胞存活率显著下降（$P<0.01$）。与 HGHF 组比较，25、50、100 μmol • L^{-1} 马里苷能显著提高细胞活力（$P<0.01$），而 200、400、800 μmol • L^{-1} 对模型细胞活力无明显影响。故后续实验选取 25、50、100 μmol • L^{-1} 马里苷进行预处理给药。

3.2 马里苷对高糖高脂损伤 MIN6 细胞胰岛素分泌水平的影响

在 2.8 mmol • L^{-1} 葡萄糖刺激下，与对照组比较，HGHF 组基础胰岛素分泌量减少（$P<0.05$）；与 HGHF 组比较，马里苷 25、50、100 mol • L^{-1} 干预后有升高的趋势，但差异无统计学意义。在 16.7 mmol • L^{-1} 葡萄糖刺激下，与对照组比较，HGHF 组胰岛素分泌量显著减少（$P<0.01$）；与 HGHF 组比较，马里苷 50、100 mol • L^{-1} 干预后胰岛素分泌量显著增加（$P<0.01$），见表 1。

3.3 马里苷对 MIN6 细胞超微结构的影响

透射电镜结果显示，对照组细胞结构完整，细胞器丰富；HGHF 组细胞质内有空泡，内质网产生扩张、肿胀和脱粒等现象；与 HGHF 组相比，马里苷 25、50、100 μmol • L^{-1} 干预之后，细胞内空泡明显减少，内质网形态恢复正常，见图 2。

3.4 马里苷对高糖高脂诱导 MIN6 细胞内质网 Ca^{2+} 释放的影响

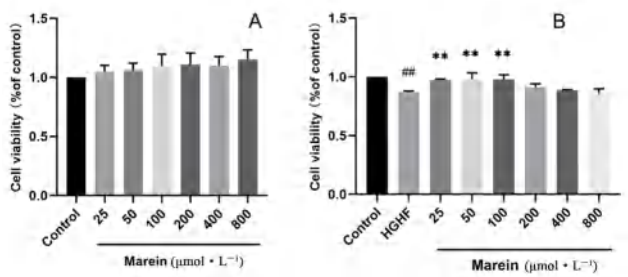


图 1　不同浓度马里苷对 MIN6（A）及高糖高脂损伤细胞（B）细胞活力的影响

Fig 1　Protective effect of marein of different concentrations on cell viability of MIN6 cells

注：与对照组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与 HGHF 组比较，$^{**}P < 0.01$。

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

Fluo4-AM 钙离子荧光探针染色结果显示，与对照组比较，HGHF 组细胞荧光强度明显增强，表明内质网 Ca^{2+} 释放增强，内质网 Ca^{2+} 稳态破坏。与 HGHF 组比较，马里苷 25、50、100 μmol・L^{-1} 干预后内质网稳态逐渐恢复，见图 3。

表 1　马里苷对高糖高脂损伤 MIN6 细胞胰岛素分泌的影响（$\bar{x}\pm s$，$n = 3$）

Tab 1　Effect of marein on insulin secretion of MIN6 cells injured by high glucose and high lipid（$\bar{x}\pm s$，$n = 3$）

组别	基础胰岛素分泌量 /（mIU・L^{-1}）	高糖刺激胰岛素分泌量 /（mIU・L^{-1}）
对照组	13.95±0.66	22.86±0.51
HGHF 组	7.61±1.51$^{\#}$	14.74±0.47$^{\#\#}$
马里苷组 25 μmol・L^{-1} 组	10.39±1.82	17.13±1.23
马里苷组 50 μmol・L^{-1} 组	10.58±1.63	19.82±0.41**
马里苷组 100 μmol・L^{-1} 组	11.26±0.63	22.57±0.90**

注：与对照组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与 HGHF 组比较，$^{**}P < 0.01$。

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

图 2　马里苷对高糖高脂诱导 MIN6 细胞超微结构的影响（×30 000）

Fig 2　Effect of marein on ultrastructure of MIN6 cells injured by high glucose and high lipid（×30 000）

A. 对照组（control group）；B. 模型组（HGHF group）；C. 马里苷 25 μmol・L^{-1} 组（marein 25 μmol・L^{-1} group）；D. 马里苷 50 μmol・L^{-1} 组（marein 50 μmol・L^{-1} group）；E. 马里苷 100 μmol・L^{-1} 组（marein 100 μmol・L^{-1} group）

注（Note）：红色箭头为细胞内质网结构（The red arrow shows the endoplasmic reticulum）。

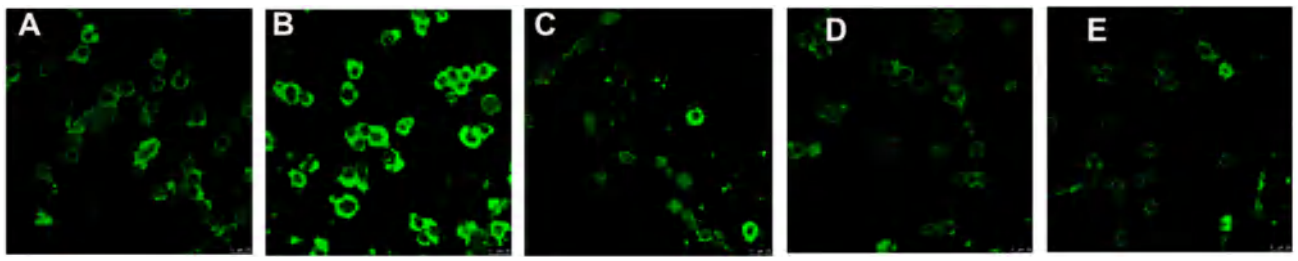


图 3　Fluo4-AM 染色观察马里苷对高糖高脂诱导 MIN6 细胞内质网 Ca^{2+} 离子释放影响（×400）

Fig 3　Effect of marein on Ca^{2+} release from endoplasmic reticulum of MIN6 cells injured by high glucose and high lipid（×400）

A. 对照组（control group）；B. 模型组（HGHF group）；C. 马里苷 25 μmol・L^{-1} 组（marein 25 μmol・L^{-1} group）；D. 马里苷 50 μmol・L^{-1} 组（marein 50 μmol・L^{-1} group）；E. 马里苷 100 μmol・L^{-1} 组（marein 100 μmol・L^{-1} group）

3.5　马里苷对高糖高脂诱导 MIN6 细胞 PERK 通路的影响

与对照组相比，HGHF 组 PERK、P-PERK 蛋白的表达有升高的趋势，但差异无统计学意义；与 HGHF 组比较，马里苷 50、100 μmol・L^{-1} 干预后 P-PERK 蛋白表达显著下调（$P < 0.05$，$P < 0.01$），PERK 蛋白表达无显著差异，见图 4。

3.6　马里苷对高糖高脂诱导 MIN6 细胞内质网应激相关蛋白的的影响

与正常组比较，HGHF 组 GRP78、ATF4、CHOP 蛋白表达均显著升高（$P < 0.05$，$P < 0.01$）；与 HGHF 组比较，马里苷 25、50、100 mol・L^{-1} 干预后 GRP78、ATF4、CHOP 蛋白表达均显著下调（$P < 0.05$，$P < 0.01$，$P < 0.001$），结果见图 5。

4　讨论

糖尿病及其并发症给全球带来了巨大的经济负担。糖尿病是一种分泌胰岛素的胰岛 β 细胞进行性衰竭或功能障碍为特征的代谢紊乱，可导致多种长期并发症和器官损伤[11]。胰岛 β 细胞是一种分泌细胞，它有一个复杂的内质网系统来处理胰岛素的

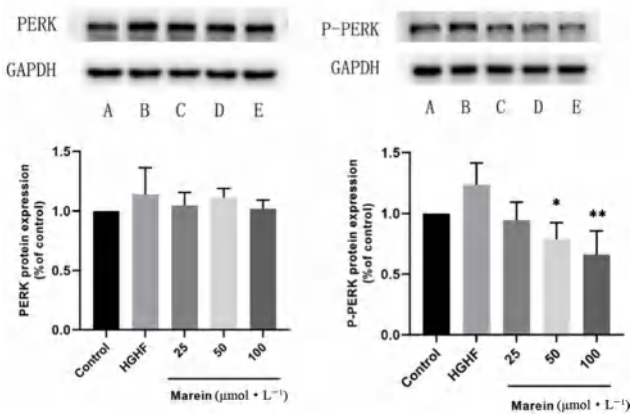


图 4 马里苷对 MIN6 细胞 PERK、P-PERK 蛋白表达的影响

Fig 4 Effect of marein on the expression of PERK and P-PERK protein in MIN6 cells

A. 对照组（control group）；B. 模型组（HGHF group）；C. 马里苷 25 μmol • L^{-1} 组（marein 25 μmol • L^{-1} group）；D. 马里苷 50 μmol • L^{-1} 组（marein 50 μmol • L^{-1} group）；E. 马里苷 100 μmol • L^{-1} 组（marein 100 μmol • L^{-1} group）

注：与 HGHF 组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

合成和分泌。糖脂毒性在胰岛 β 细胞凋亡中起重要作用，当胰岛 β 细胞长期暴露于高水平的游离脂肪酸，特别是饱和脂肪酸（如棕榈酸）时，会损害胰岛素的生成，并促进胰岛 β 细胞的凋亡 [12-13]。

马里苷是两色金鸡菊黄酮类化合物主要有效成分之一，具有抗炎、抗氧化、清除自由基等功效 [14]。研究发现马里苷和两色金鸡菊提取物对 tBPH 或细胞因子诱导损伤的 MIN6 具有保护和抑制凋亡作用 [15]。此外，马里苷通过抑制糖异生途径关键蛋白，改善高脂饮食诱导的 HepG2 细胞胰岛素抵抗 [16]。研究马里苷治疗糖尿病的机制具有很高的潜在的应用价值。本研究结果显示，经高糖高脂诱导后，MIN6 细胞活力和胰岛素分泌量明显降低，马里苷干预后能够提高 MIN6 细胞活力，并恢复胰岛素分泌量，表明马里苷对高糖高脂诱导的 MIN6 细胞有保护作用。

内质网是真核细胞内储存钙离子的重要场所之一，其在调控钙稳态方面发挥至关重要的作用。游离钙离子浓度是反映细胞损伤的重要

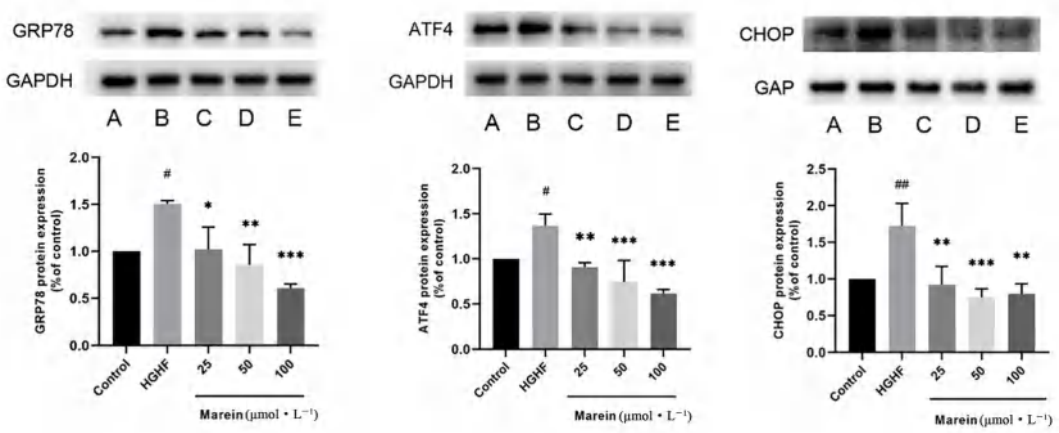


图 5 马里苷对 MIN6 细胞 GRP78、ATF4、CHOP 蛋白表达的影响

Fig 5 Effect of marein on protein expression of GRP78，ATF4 and CHOP in MIN6 cells

A. 对照组（control group）；B. 模型组（HGHF group）；C. 马里苷 25 μmol • L^{-1} 组（marein 25 μmol • L^{-1} group）；D. 马里苷 50 μmol • L^{-1} 组（marein 50 μmol • L^{-1} group）；E. 马里苷 100 μmol • L^{-1} 组（marein 100 μmol • L^{-1} group）

注：与对照组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

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

指标 [17]。本研究结果显示，高糖高脂诱导后，MIN6 细胞胞质中游离钙离子释放明显升高，马里苷预处理后，细胞质内游离钙离子明显减少，钙离子稳态逐渐恢复正常。

研究发现，与糖尿病相关的环境因素，包括病毒感染、慢性炎症和氧化应激，都可能导致错误折叠或未折叠的蛋白质在内质网管腔内积聚，从而导致内质网应激 [18]。因此，不能调节内质网应激或未折叠蛋白反应可导致胰岛 β 细胞功能障碍和死亡。GRP78 是内质网激活的特异性标志物，是未折叠蛋白反应的负调节剂 [19]。PERK 是一种内质网驻留跨膜蛋白，PERK 缺失的小鼠在出生后几周内会发生胰岛 β 细胞缺陷，表明 PERK 介导的翻译调控在保护分泌细胞免受内质网应激的过程中发挥作用 [20]。在持续的应激状态下，PERK 与 GRP78 分离，诱导自身磷酸化，激活激酶活性，从而抑制真核生物起始因子 2α（eIF-2α）介导的蛋白翻译，并使下游转录因子 ATF4 激活。激活的 ATF4 通过增加其转录来上调促凋亡转录因子 *CHOP* 的表达 [21]。*CHOP* 是一种转录因子，可诱导多种促凋亡因子的表达，导致细胞损伤甚至凋亡 [22]。此外，*CHOP* 介导的细胞凋亡参

与了β细胞的丢失，*CHOP*基因敲除可以保护胰岛β细胞免受凋亡，从而延缓糖尿病的发生[23]。ATF4上调许多参与氧化还原代谢、氨基酸稳态和细胞凋亡的基因[24]。因此PERK-ATF4-CHOP通路在胰岛β细胞内质网应激中有重要作用。本研究结果显示，与对照组比较，HGHF组细胞GRP78、ATF4、CHOP表达显著增高，内质网出现扩张、肿胀、脱粒等现象，说明经高糖高脂诱导损伤后MIN6细胞内质网应激程度显著升高。与HGHF组比较，马里苷组P-PERK、GRP78、ATF4、CHOP蛋白表达显著下调，内质网形态逐渐恢复正常，说明马里苷可抑制PERK-ATF4-CHOP信号通路，减轻MIN6细胞内质网应激。

综上所述，马里苷能够改善高糖高脂诱导损伤的MIN6细胞内质网应激，恢复MIN6细胞胰岛素分泌功能和内质网钙稳态，从而发挥保护胰岛β细胞的功能，其机制可能与内质网应激通路PERK-ATF4-CHOP相关。

参考文献

[1] GBD Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global，regional，and national incidence，prevalence，and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries，1990—2016：a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. Lancet，2017，390（10100）：1211-1259.

[2] Li Y，Teng D，Shi X，et al. Prevalence of diabetes recorded in mainland China using 2018 diagnostic criteria from the American Diabetes Association：national cross sectional study [J]. BMJ，2020，369：m997.

[3] Chillarón JJ，Flores Le-Roux JA，Benaiges D，et al. Type 1 diabetes，metabolic syndrome and cardiovascular risk [J]. Metabolism，2014，63（2）：181-187.

[4] Bonora E. Protection of pancreatic beta-cells：is it feasible? [J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis，2008，18（1）：74-83.

[5] Ghosh R，Colon-Negron K，Papa FR. Endoplasmic reticulum stress，degeneration of pancreatic islet β-cells，and therapeutic modulation of the unfolded protein response in diabetes [J]. Mol Metab，2019，27s（Suppl）：S60-S68.

[6] Yong J，Johnson JD，Arvan P，et al. Therapeutic opportunities for pancreatic β-cell ER stress in diabetes mellitus [J]. Nat Rev Endocrinol，2021，17（8）：455-467.

[7] Shen J，Hu M，Tan W，et al. Traditional uses，phytochemistry，pharmacology，and toxicology of Coreopsis tinctoria Nutt.：a review [J]. J Ethnopharmacol，2021，269：113690.

[8] Wang W，Chen W，Yang Y，et al. New phenolic compounds from Coreopsis tinctoria Nutt. and their antioxidant and angiotensin i-converting enzyme inhibitory activities [J]. J Agric Food Chem，2015，63（1）：200-207.

[9] Cai W，Yu L，Zhang Y，et al. Extracts of Coreopsis tinctoria Nutt. flower exhibit antidiabetic effects via the inhibition of α-glucosidase activity [J]. J Agric Food Chem，2016，2016：2340276.

[10] Dias T，Bronze MR，Houghton PJ，et al. The flavonoid-rich fraction of Coreopsis tinctoria promotes glucose tolerance regain through pancreatic function recovery in streptozotocin-induced glucose-intolerant rats [J]. J Ethnopharmacol，2010，132（2）：483-490.

[11] Christensen AA，Gannon M. The beta cell in type 2 diabetes [J]. Curr Diab Rep，2019，19（9）：81.

[12] El-Assaad W，Buteau J，Peyot ML，et al. Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death [J]. Endocrinology，2003，144（9）：4154-4163.

[13] Lytrivi M，Castell AL，Poitout V，et al. Recent insights into mechanisms of β-Cell lipo-and glucolipotoxicity in type 2 diabetes [J]. J Mol Biol，2020，432（5）：1514-1534.

[14] Guo Y，Ran Z，Zhang Y，et al. Marein ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting renal sodium glucose transporter 2 and activating the AMPK signaling pathway in db/db mice and high glucose-treated HK-2 cells [J]. Biomed Pharmacother，2020，131：110684.

[15] Dias T，Liu B，Jones P，et al. Cytoprotective effect of Coreopsis tinctoria extracts and flavonoids on tBHP and cytokine-induced cell injury in pancreatic MIN6 cells [J]. J Ethnopharmacol，2012，139（2）：485-492.

[16] Jiang B，Le L，Zhai W，et al. Protective effects of marein on high glucose-induced glucose metabolic disorder in HepG2 cells [J]. Phytomedicine，2016，23（9）：891-900.

[17] Zhang IX，Raghavan M，Satin LS. The endoplasmic reticulum and calcium homeostasis in pancreatic beta cells [J]. Endocrinology，2020，161（2）：692028.

[18] Schwarz DS，Blower MD. The endoplasmic reticulum：structure，function and response to cellular signaling [J]. Cell Mol Life Sci，2016，73（1）：79-94.

[19] Kamada Y，Nawata Y，Sugimoto Y. Lysozyme Mutants Accumulate in cells while associated at their *N*-terminal Alpha-domain with the endoplasmic reticulum chaperone GRP78/BiP [J]. Int J Biol Sci，2016，12（2）：184-197.

[20] Harding HP，Zeng H，Zhang Y，et al. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk-/-mice reveals a role for translational control in secretory cell survival [J]. Mol Cell，2001，7（6）：1153-1163.

[21] Zhang W，Chen L，Shen Y，et al. Rifampicin-induced injury in L02 cells is alleviated by 4-PBA via inhibition of the PERK-ATF4-CHOP pathway [J]. Toxicol In Vitro，2016，36：186-196.

[22] Huang XT，Liu W，Zhou Y，et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to NMDA-induced pancreatic β-cell dysfunction in a CHOP-dependent manner [J]. Life Sci，2019，232：116612.

[23] Oyadomari S，Koizumi A，Takeda K，et al. Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes [J]. J Clin Invest，2002，109（4）：525-532.

[24] Donnelly N，Gorman AM，Gupta S，et al. The eIF2α kinases：their structures and functions [J]. Cell Mol Life Sci，2013，70（19）：3493-511.

（收稿日期：2022-02-22；修回日期：2022-04-15）

注射用红花黄色素抗心肌缺血和抗凝量效关系研究

梁五林，蔡梦如，崔爽，张明倩，伍永鸿，欧文静，贾占红，张硕峰*（北京中医药大学中药学院，北京 102488）

摘要：目的 研究注射用红花黄色素（SYI）抗心肌缺血和抗凝量效关系。**方法** 将雄性 SD 大鼠随机分为假手术组，模型组，SYI 2.5、5、10、20、40 mg • kg^{-1} 组，结扎冠状动脉左前降支建立大鼠心肌缺血 / 再灌注损伤模型。用 2，3，5- 氯化三苯基四氮唑（TTC）染色法检测心肌梗死面积；生化法或酶联免疫吸附法检测血清肌酸激酶（CK）和肿瘤坏死因子-α（TNF-α）含量的变化。将雄性 SD 大鼠随机分为对照组，SYI 0.125、0.25、0.5、1、2 mg • L^{-1} 组，建立 Langendorff 离体心脏灌流模型，利用多导生理仪记录冠脉流量（CF）、左心室发展压（LVDP）等心功能指标。采用体外二磷酸腺苷（ADP）和花生四烯酸（AA）诱导家兔血小板聚集，观察不同质量浓度 SYI（10、20、30、40、50 mg • mL^{-1}）抗血小板聚集活性；采用活化部分凝血活酶时间（APTT）、凝血酶原时间（PT）、凝血酶时间（TT）法观察不同质量浓度 SYI（5、10、20、30、40 mg • mL^{-1}）的抗凝作用。**结果** 与模型组相比，SYI 各剂量组均可明显减少大鼠心肌梗死面积，且不同程度减少大鼠血清中 CK、TNF-α 的含量。0.125 ～ 1 mg • L^{-1} SYI 可不同程度地改善 CF、LVDP 等心功能指标，而 2 mg • L^{-1} SYI 对心功能有抑制作用。20 ～ 50 mg • mL^{-1} 的 SYI 可显著抑制 ADP 和 AA 诱导的家兔血小板聚集，具有剂量依赖性。10 ～ 40 mg • mL^{-1} 的 SYI 可显著延长家兔 APTT、TT，20 ～ 40 mg • mL^{-1} 浓度的 SYI 可显著延长家兔 PT，具有剂量依赖性。**结论** SYI 具有抗心肌缺血损伤、抗凝等心血管保护作用，且呈剂量依赖性。

关键词：注射用红花黄色素；心肌缺血；抗凝；量效关系
中图分类号：R285.5 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1322-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.017

Dose-effect relationship between anti-myocardial ischemia and anticoagulation of safflower yellow injection

LIANG Wu-lin, CAI Meng-ru, CUI Shuang, ZHANG Ming-qian, WU Yong-hong, OU Wen-jing, JIA Zhan-hong, ZHANG Shuo-feng* (*School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488)

Abstract: Objective To determine the dose-effect relationship between anti-myocardial ischemia and anticoagulation of safflower yellow injection (SYI). **Methods** Male SD rats were randomly divided into a control group, a model group, and 5 SYI groups at 2.5, 5, 10, 20, and 40 mg • kg^{-1}, ligating the left anterior descending coronary artery to establish the rat myocardial ischemia/reperfusion injury model. The myocardial infarct size was detected by TTC staining; the content and changes of the serum creatine kinase (CK) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) were detected by biochemical method or enzyme-linked immunosorbent assay. Male SD rats were randomly divided into a control group, and another 5 SYI groups at 0.125, 0.25, 0.5, 1, and 2 mg • L^{-1} to establish Langendorff isolated heart perfusion model. MP36 was used to record the cardiac function indexes like coronary flow (CF) and left ventricular development pressure (LVDP). Rabbit platelet aggregation was induced by adenosine diphosphate (ADP) and arachidonic acid (AA) in vitro to observe the anti-platelet aggregation activities of SYI (10, 20, 30, 40, and 50 mg • mL^{-1}). The anticoagulant effects of SYI

基金项目：西藏自治区重大科技专项（No.XZ201801-GA-16）。
作者简介：梁五林，男，硕士研究生，主要从事中药药理研究，email：liangwulin555@163.com *通信作者：张硕峰，男，博士，教授，主要从事中药药理研究，email：shuofengzhang@sina.com

(5, 10, 20, 30, and 40 mg • mL^{-1}) were observed by activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT) and thrombin time (TT) methods. **Results** Compared with those of the model group, each dose group of SYI significantly reduced the area of myocardial infarction in rats in a dose-dependent manner, while the content of CK and TNF-α in rat serum was reduced to various degrees. SYI (0.125 － 1 mg • L^{-1}) improved the heart function indexes such as CF and LVDP, while SYI (2 mg • L^{-1}) inhibited heart function. SYI (20 － 50 mg • mL^{-1}) greatly inhibited the platelet aggregation induced by ADP and AA in rabbits in a dose-dependent manner. SYI (10 － 40 mg•mL^{-1}) obviously prolonged the APTT and TT, and SYI (20 － 40 mg • mL^{-1}) markedly prolonged the PT in a dose-dependent manner. **Conclusion** SYI has cardiovascular protective effects against ischemic injury and anticoagulation in a dose-dependent manner.

Key words: safflower yellow injection; myocardial ischemia; anticoagulation; dose-effect relationship

目前，心血管疾病（CVDs）仍然是人类健康的主要威胁。在 CVDs 导致的死亡事件中，约有 50% 由心肌缺血引起 [1]。临床上以及时的心肌血流灌注和心功能保护为心肌缺血的主要治疗原则，但缺血心肌恢复血流再灌注之后会出现心肌损伤进一步加重的现象，被称为心肌缺血再灌注（I/R）损伤，是造成 CVDs 病死率升高的主要原因 [2]。CVDs 的另一大危险因素是血栓形成，血栓形成是冠心病的重要病变过程，血栓形成后会进一步加重组织缺血损伤，抗凝是抑制血栓形成的临床常用方法 [3]。

注射用红花黄色素（SYI）为红花的改良制剂，临床上广泛用于治疗冠心病心绞痛，疗效显著。但 SYI 改善心肌缺血损伤及抗凝作用量效关系暂不明确。因此本文旨在研究 SYI 抗心肌缺血及抗凝作用量效关系，为 SYI 的临床合理用药提供理论参考和实践指导。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠，雄性，体质量 190 ～ 210 g，由斯贝福（北京）生物技术有限公司提供，许可证编号：SCXK（京）2019-0010；普通级日本大耳白兔，体质量 2.5 ～ 3 kg，由北京金牧阳实验动物养殖有限责任公司提供，许可证号：SCXK（京）2020-0002。

1.2 试药

SYI（规格：50 mg/ 瓶，浙江永宁药业股份有限公司，批号：1810216）；乌拉坦（上海麦克林生化科技有限公司，批号：C10821102，用生理盐水配制成 25% 溶液使用）；3.8% 枸橼酸钠（北京雷根生物技术有限公司，批号：0507A21）；二磷酸腺苷（ADP，北京世帝科学仪器公司）；花生四烯酸（AA，上海吉至生化科技有限公司，批号：Z404335EA）；凝血活酶时间（APTT）、凝血酶原时间（PT）、凝血酶时间（TT）测定试剂盒（上海长岛生物技术有限公司，批号分别为 201200800、2010004501、201003201）。

1.3 仪器

BL-420I 信息化集成化信号采集与处理系统（成都泰盟科技有限公司）；离体心脏灌流装置（美国 Radnoti 公司）；Milli-Q 型超纯水系统（北京五洲东方科技发展有限公司）；MP36 型四道生理信号记录仪、SS19L 型压力换能器（美国 BIOPAC 公司）；智能恒温水油槽（苏州帕瓦西尔实验设备有限公司）；5810R 高速常温 / 冷冻离心机（德国 Eppendorf 公司）；LG-PABER-1 型血小板聚集凝血因子分析仪（北京世帝科学仪器公司）。

2 方法

2.1 K-H 液配制

以配制 1 L K-H 液为例，称取 NaCl 118 mmol，$NaHCO_3$ 24 mmol，KCl 4.7 mmol，KH_2PO_4 1.2 mmol，$MgSO_4$ 1.2 mmol，EDTA 二钠 0.5 mmol 加入到 900 mL 超纯水中，每加入一种试剂均充分摇匀溶解，再单独称取 $CaCl_2$ 2.5 mmol 加入到 100 mL 超纯水中充分溶解，分多次加入至之前所配的 900 mL 溶液中，摇匀，最后加入葡萄糖 11 mmol，混合均匀，即可得到澄清的 K-H 液 1 L。

2.2 动物模型建立及分组给药

2.2.1 大鼠在体心肌 I/R 损伤模型 将大鼠随机分为假手术组，模型组，SYI 2.5、5、10、20、40 mg • kg^{-1} 组，每组 10 ～ 11 只。给药组于冠状动脉左前降支穿线后即刻尾静脉注射相应浓度药物一次，假手术组和模型组同法给予生理盐水。大鼠称重后腹腔注射 10% 水合氯醛（3.5 mg • kg^{-1}）麻醉，仰卧位固定，气管插管，连接呼吸机进行人工辅助呼吸，并连接心电图，剪开胸部皮肤、肌肉，在第四肋间，打开胸腔，暴露心脏，用 6-0 手术线，在

主动脉圆锥与左心耳交界处下 1 mm 处（冠状动脉左前降支）穿线结扎，假手术组仅穿线不结扎。以心电图 QRS 波幅加大、ST 段抬高或降低，T 波高耸或倒置作为缺血是否成功的判断标准。结扎 45 min 后，剪开结扎线，实现再灌注，再灌注 120 min 后，采集血液及心肌组织样本进行检测。

2.2.2 Langendorff 离体大鼠心脏灌流模型 将 K-H 液倒入至 Langendorff 离体灌流装置中，打开智能恒温水油槽，使 K-H 液温度稳定在（37±0.5）℃，往 K-H 液中持续充入混合气体（95%O_2，5%CO_2），使 K-H 液呈氧饱和状态。将大鼠随机分为对照组，SYI 0.125、0.25、0.5、1、2 mg·L^{-1} 组，每组 8 ～ 10 只。大鼠称重后腹腔注射 10% 水合氯醛（3.5 mg·kg^{-1}）麻醉。打开胸腔，暴露心脏，左手拇指、食指和中指轻轻提起心脏，暴露心底血管，迅速将其剪断，取出心脏立即放入 4 ℃ K-H 液中。漂净血液，剪去肺组织、食道等多余组织，留出长度约 1 cm 左右的主动脉。将分离干净的心脏迅速转移，进行主动脉插管，连接 Langendorff 离体心脏灌流系统。在左心耳下剪一小口，将自制乳胶球囊经左心耳置入左心室内，固定球囊。球囊与压力换能器相连，可通过多道生理信号采集处理系统监视并记录左心室内压力的变化。对照组用 K-H 液平稳灌流 60 min，给药组先使用 K-H 液灌流，在灌流 30 min 后切换含 SYI 的 K-H 液灌流 30 min。

2.3 心肌梗死面积测定

再灌注结束后，取下在体心肌 I/R 模型大鼠心脏，用生理盐水清洗干净，置－ 20 ℃冰箱冷冻 10 min，将心脏左心耳以下部分均匀切成 5 片，每片厚度约为 1 mm，放入 1% TTC 溶液中，于 37 ℃下染色 30 min，正常心肌呈深红色，缺血心肌呈苍白色，再将染好的心脏薄片放入 4% 多聚甲醛中固定，24 h 后扫描拍照，使用 Image J 软件测量每片心肌面积及梗死区面积，计算心肌梗死区面积占心肌总面积的百分比。

2.4 生化指标检测

再灌注结束后，取在体心肌 I/R 模型大鼠腹主动脉血，3000 r•min^{-1} 离心 15 min，取上清液，按肌酸激酶（CK）和肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）测定试剂盒说明书进行操作，检测血清中 CK、TNF-α 的含量。

2.5 离体心脏心功能测定

所有心功能指标由 MP36 型四道生理信号记录仪测定采集，使用 AcqKnowledge 4.4 软件分析心功能指标左心室收缩压（LVSP）、左心室舒张压（LVEDP）并计算左心室发展压（LVDP）（LVDP ＝ LVSP － LVEDP）、左心室压力最大升高速率（＋ dp/dt_{max}）和左心室压力最大下降速率（－ dp/dt_{max}），同时实时记录冠脉流量（CF），在整个实验过程中以记录心脏插管灌流后第 30 min 时的稳定的数据作为最初的指标值，而后分别记录给药后固定时间点（给药 10、20、30 min）的相关指标值。计算给药后各时间点数值相对于灌流 30 min 时的数值的变化百分率。

2.6 SYI 体外抗 ADP、AA 诱导的家兔血小板聚集作用

取健康兔，禁食 12 h，按 4 mg·kg^{-1} 耳缘静脉注射 25% 乌拉坦，分离颈主动脉取血，收集于预先加入了 3.8% 枸橼酸钠抗凝剂的离心管中（抗凝剂与全血的比例为 1∶9），800 r·min^{-1} 离心 10 min，取上层液即得富血小板血浆（PRP），剩下部分以 3000 r·min^{-1} 离心 10 min 取上层液即得贫血小板血浆（PPP），PRP 呈乳白色，PPP 呈清亮透明的淡黄色。使用基于比浊法的血小板聚集仪测量血小板聚集率，整个测定控制在 4 h 内完成，且 PRP 不可低温保存和过度振荡。测定时以 300 μL PPP 调零，以 300 μL PRP 作空白对照。测试杯通道加入搅拌珠，将 50 μL 不同质量浓度 SYI（10、20、30、40、50 mg·mL^{-1}）与 300 μL PRP 在 37 ℃的测试杯内孵育 3 min，分别加入诱导剂 ADP（5 μmol·L^{-1}）、AA（5 mg·mL^{-1}）各 10 μL 诱导血小板聚集，测试并记录 10 min 内最大聚集率，计算抑制率。

血小板聚集抑制率（%）＝（对照组血小板聚集率－给药组血小板聚集率）/ 对照组血小板聚集率 ×100%。

2.7 SYI 对 APTT、TT、PT 的影响

取“2.6”项下中所得 PPP，按 APTT、TT、PT 试剂盒说明书操作，测定并记录不同质量浓度 SYI（5、10、20、30、40 mg·mL^{-1}）对 APTT、TT、PT 的作用。

2.8 统计方法

使用 SPSS 24 软件对数据进行单因素方差分析，以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义，数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。

3 结果

3.1 SYI 对心肌 I/R 大鼠心肌梗死面积的影响

与假手术组比较，模型组大鼠心肌梗死面积显著增加（$P < 0.01$）；而 SYI 各剂量组心肌梗死面积均小于模型组（$P < 0.01$），说明各给药组均能一定程度保护心脏组织。SYI 各剂量组之间

的心肌梗死面积没有显著差异，但随着给药剂量增加，心肌梗死面积呈下降趋势。结果见表 1。

表 1　SYI 对心肌 I/R 大鼠心肌梗死面积的影响

Tab 1　Effect of SYI on myocardial infarct size in myocardial I/R rats

组别	剂量 /（mg • kg^{-1}）	样本数	心肌梗死面积 /%
假手术组	—	10	0.00±0.00
模型组	—	11	25.31±7.15$^{\triangle\triangle}$
SYI 组	40	11	7.30±3.78**
	20	11	9.60±6.64**
	10	11	10.50±4.66**
	5	10	12.72±7.29**
	2.5	10	13.89±6.69**

注：与假手术组组比较，$^{\triangle\triangle}P < 0.01$；与模型组比较，$^{**}P < 0.01$。

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

3.2　SYI 对心肌 I/R 大鼠血清 CK、TNF-α 含量的影响

与假手术组比较，模型组血清 CK、TNF-α 含量明显升高（$P < 0.01$）。与模型组比较，SYI 5、10、20、40 mg • kg^{-1} 组血清中 CK、TNF-α 含量明显降低（$P < 0.05$）。SYI 各剂量组之间 CK、TNF-α 含量没有显著差异，但随着给药剂量增加，CK、TNF-α 呈下降趋势。结果见表 2。

表 2　SYI 对心肌 I/R 大鼠血清 CK、TNF-α 含量的影响

Tab 2　Effect of SYI on serum CK and TNF-α content in myocardial I/R rats

组别	剂量 /（mg • kg^{-1}）	样本数	CK/（U • mL^{-1}）	TNF-α/（ng • L^{-1}）
假手术组	—	10	0.77±0.25	103.3±35.2
模型组	—	11	1.56±0.69$^{\triangle\triangle}$	199.6±61.4$^{\triangle\triangle}$
SYI 组	40	11	1.04±0.33*	136.7±43.9*
	20	11	1.06±0.21*	151.3±24.1*
	10	11	1.09±0.60*	142.7±64.0*
	5	10	1.12±0.37*	155.7±42.6*
	2.5	10	1.20±0.48	155.1±51.1

注：与假手术组比较，$^{\triangle\triangle}P < 0.01$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$。

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

3.3　SYI 对离体大鼠心脏心功能的作用

3.3.1　SYI 对离体大鼠心脏 CF 变化率的影响　对照组大鼠心脏 CF 相对稳定，而 SYI 0.25 ～ 1 mg • L^{-1} 组在不同的时间段可增加 CF，其中 0.25 mg • L^{-1} 组效果更好，而 0.125 mg • L^{-1} 和 2 mg • L^{-1} 组 CF 增加幅度较小。结果见表 3。

3.3.2　SYI 对离体大鼠心脏 LVDP 变化率的影响　对照组离体大鼠心脏 LVDP 随灌流时间的延长缓慢下降，灌流至 60 min（SYI 灌流 30 min）时 LVDP 降低约 8.28%。SYI 0.125 mg • L^{-1} 组对离体大鼠心脏 LVDP 影响与对照组相似；而 SYI 0.25 ～ 1 mg • L^{-1} 在给药后不同时间点均可减缓离体大鼠心脏 LVDP 的减低，其中 1 mg • L^{-1} 组效果较好，可使 LVDP 增加 7.63% ～ 9.36%；SYI 2 mg • L^{-1} 组对 LVDP 有抑制作用。结果见表 4。

3.3.3　SYI 对离体大鼠心脏＋ dp/dt$_{max}$ 变化率的影响　对照组离体大鼠心脏＋ dp/dt$_{max}$ 随灌流时间的延长缓慢下降，灌流至 60 min 时（SYI 灌流 30 min）＋ dp/dt$_{max}$ 降低约 2.73%。而 SYI 0.125 ～ 1 mg • L^{-1} 组可随给药时间延长不同程度地增加离体大鼠心脏＋ dp/dt$_{max}$ 值，其中 1 mg • L^{-1} 组效果最好，可使＋ dp/dt$_{max}$ 增加 9% ～ 14.1%；SYI 2 mg • L^{-1} 组则随给药时间延长不同程度降低离体大鼠心脏＋ dp/dt$_{max}$ 值。结果见表 5。

3.3.4　SYI 对离体大鼠心脏－ dp/dt$_{max}$ 变化率的影响　对照组离体大鼠心脏－ dp/dt$_{max}$ 随灌流时间的延长缓慢下降，灌流至 60 min（SYI 灌流 30 min）时降低约 7.74%。而 SYI 0.125 ～ 1 mg • L^{-1} 组可随给药时间延长不同程度地增加离体大鼠心脏－ dp/dt$_{max}$ 值，其中 1 mg • L^{-1} 组效果最好，可使－ dp/dt$_{max}$ 增加 12.13% ～ 14.95%；而 2 mg • L^{-1} 组则随给药时间延长可不同程度地促进离体大鼠心脏－ dp/dt$_{max}$ 值的降低。结果见表 5。

表 3　SYI 对离体大鼠心脏 CF 变化率的影响

Tab 3　Effect of SYI on change rate of CF in isolated rat heart

组别	剂量 /（mg • L^{-1}）	样本数	CF 变化率 /%		
			～ 10 min	～ 20 min	～ 30 min
对照组	—	10	1.29±6.78	1.40±7.38	－0.10±6.91
SYI 组	0.125	8	2.28±6.09	4.36±4.62	8.22±4.69
	0.25	10	10.35±10.00*	12.04±8.88**	14.00±8.75**
	0.5	10	4.55±6.73	9.69±7.77*	14.07±8.03**
	1	10	6.72±8.09	9.05±10.61	10.97±15.38*
	2	10	3.02±6.14	3.36±8.42	3.71±8.69

注：与对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

3.4　SYI 体外抗 ADP、AA 诱导的家兔血小板聚集作用

与对照组比较，SYI 在 20 ～ 50 mg • mL^{-1} 范围内均可显著抑制 ADP、AA 诱导的血小板聚

表 4 SYI 对离体大鼠心脏 LVDP 变化率的影响

Tab 4 Effect of SYI on change rate of LVDP in isolated rat heart

组别	剂量 /（mg·L^{-1}）	样本数	LVDP 变化率 /%		
			10 min	20 min	30 min
对照组	—	10	− 3.64±3.11	− 6.13±3.44	− 8.28±4.66
SYI 组	0.125	8	− 5.28±4.00	− 8.18±3.39	− 8.42±5.17
	0.25	10	− 2.07±5.85	− 3.89±5.15	− 4.28±6.32
	0.5	10	− 0.06±4.44	− 1.07±6.73	− 3.27±7.20
	1	10	7.63±9.15***	8.62±8.54***	9.36±9.87***
	2	10	− 9.99±5.81*	− 11.61±7.45	− 12.76±6.72

注：与对照组比较，*P < 0.05，***P < 0.001。

Note：Compared with the control group，*P < 0.05，***P < 0.001.

表 5 SYI 对离体大鼠心脏＋ dp/dt_{max} 及− dp/dt_{max} 变化率的影响

Tab 5 Effect of SYI on change rate of ＋ dp/dt_{max} and − dp/dt_{max} in isolated rat heart

组别	剂量 /（mg·L^{-1}）	样本数	＋ dp/dt_{max} 变化率 /%			− dp/dt_{max} 变化率 /%		
			10 min	20 min	30 min	10 min	20 min	30 min
对照组	—	10	− 0.31±1.45	− 1.27±3.06	− 2.73±5.80	0.23±3.63	− 3.41±2.98	− 7.74±4.08
SYI 组	0.125	8	0.88±3.31	1.46±3.32	3.40±4.04	0.11±4.51	− 0.90±4.91	− 1.77±5.32
	0.25	10	3.64±7.75	2.94±6.25	3.51±5.58*	3.04±10.14	− 0.05±7.57	− 1.91±8.06
	0.5	10	5.04±4.99	6.54±7.33**	7.02±7.61**	6.86±8.53	6.40±11.71*	3.80±11.93**
	1	10	9.00±7.23**	12.03±7.15***	14.10±7.39***	12.13±11.43**	14.35±11.44***	14.95±13.77***
	2	10	− 5.11±5.48	− 6.51±5.43*	− 6.21±4.87	− 8.84±7.96*	− 11.19±5.96*	− 13.33±5.80

注：与对照组比较，*P < 0.05，**P < 0.01，***P < 0.001。

Note：Compared with the control group，*P < 0.05，**P < 0.01，***P < 0.001.

集（P < 0.001），且随着质量浓度的增加，SYI 对血小板聚集的抑制率也增加，呈现出量效关系。结果见表 6。

表 6 SYI 对 ADP 和 AA 诱导的血小板聚集作用

Tab 6 Effect of SYI on ADP and AA induced platelet aggregation

组别	ADP 诱导的血小板聚集		AA 诱导的血小板聚集	
	10 min 内最大聚集率 /%	抑制率 /%	10 min 内最大聚集率 /%	抑制率 /%
对照组	38.7±3.2	—	49.7±1.4	—
SYI 10 mg·mL^{-1} 组	35.9±2.7	7.1	47.6±2.4	4.1
SYI 20 mg·mL^{-1} 组	32.7±1.3***	15.5	44.6±2.7***	10.3
SYI 30 mg·mL^{-1} 组	30.1±1.5***	22.3	38.7±1.6***	22.1
SYI 40 mg·mL^{-1} 组	27.7±1.3***	28.4	33.7±1.5***	32.3
SYI 50 mg·mL^{-1} 组	24.8±2.0***	35.9	26.1±2.9***	47.5

注：与对照组相比，***P < 0.001。

Note：Compared with the control group，***P < 0.001.

3.5 SYI 对 APTT、TT、PT 的作用

与对照组比较，SYI 在 5 ～ 40 mg·mL^{-1} 的范围内均可显著延长 APTT（P < 0.001）；在 10～40 mg·mL^{-1} 范围内可显著延长 TT（P < 0.05，P < 0.001）；在 20 ～ 40 mg·mL^{-1} 范围内可显著延长 PT（P < 0.001），且随着质量浓度的增加，APTT、TT、PT 也相应增加，呈现出量效关系。结果见表 7。

表 7 SYI 对 APTT、TT、PT 的作用

Tab 7 Effect of SYI on APTT，TT，and PT

组别	APTT/s	TT/s	PT/s
对照组	33.2±0.9	15.1±0.8	15.7±0.6
SYI 5 mg·mL^{-1} 组	37.9±1.0***	16.4±1.2	15.9±0.2
SYI 10 mg·mL^{-1} 组	45.4±0.5***	18.9±1.0*	16.0±0.4
SYI 20 mg·mL^{-1} 组	67.8±2.2***	25.6±1.3***	17.6±0.3***
SYI 30 mg·mL^{-1} 组	110.4±5.6***	34.5±3.1***	19.7±0.4***
SYI 40 mg·mL^{-1} 组	231.9±8.5***	55.3±4.3***	22.5±0.5***

注：与对照组相比，*P < 0.05，***P < 0.001。

Note：Compared with the control group，*P < 0.05，***P < 0.001.

4 讨论

心肌 I/R 损伤是导致心脏手术或心肌梗死后发病率和病死率升高的主要原因。心肌 I/R 损伤涉及的病理因素包括氧化损伤、能量代谢障碍、Ca^{2+} 超载、线粒体损伤、炎症反应及细胞凋亡等[4]。寻找可以预防或改善心肌 I/R 损伤的疗法和药物对 CVDs 的临床预后具有重要意义。

目前 SYI 对心肌 I/R 损伤的作用尚不清楚。因此本研究使用大鼠体内心肌 I/R 模型来评估 SYI 的作用。CK 主要存在于心肌中，在心肌损伤早期会大量渗漏到血液中，是临床上诊断心肌梗死的主要指标，具有较高的灵敏度和特异性[5]。本次研究结果可见心肌 I/R 模型大鼠血清中 CK 明显增高，提示 I/R 对心肌细胞已造成不

可逆损伤，与心肌梗死面积的结果相吻合。SYI可剂量依赖性地减少I/R诱导的大鼠心肌梗死，显示出对I/R大鼠心肌的保护作用。在再灌注阶段，随着缺血区域血流的恢复，大量的氧自由基会对血管内皮细胞及心肌细胞造成氧化应激损伤，使TNF-α等炎症因子大量产生且释放到心肌组织中，引起炎症反应，进一步加重心肌组织损伤[6]。SYI各剂量可不同程度地减少I/R模型大鼠血清中TNF-α含量升高，提示SYI可能通过减少炎性因子水平，抑制炎症反应来减轻心肌I/R损伤。

离体心脏灌流模型可使研究者在排除神经、体液的干扰下研究心脏的收缩功能和冠状动脉特性，从而观察药物对心脏的直接作用。为进一步观察SYI对缺血状态下心脏的直接作用，本研究采用Langendorff离体心脏灌流技术，观察SYI对离体心脏心功能的作用及量效关系。LVDP和＋ dp/dt_{max}可反映心肌收缩功能，两者增加则表明心肌收缩能力增强；－ dp/dt_{max}反映心肌舒张功能，其绝对值增大表明心肌舒张功能和顺应性更好[7]。CF可用来反映血管扩张和收缩程度。研究结果表明，SYI可以改善CF、LVDP、$\pm dp/dt_{max}$等多个心功能指标，且各个指标的改善程度与其对药物的敏感性和耐受性有关，低剂量SYI对CF效果更好，而高剂量SYI对左心室收缩功能更好，并且具有剂量依赖性；但SYI为2 mg·L^{-1}时对心脏功能显示抑制作用，除CF外，各个指标均呈现出下降趋势，提升SYI改善心肌收缩的治疗窗口较窄。SYI对CF的作用提示SYI能够扩张冠状动脉从而增加心输出量，改善组织血流灌注。心肌梗死后左心室异常相关的收缩和舒张功能障碍是影响患者死亡率的决定性因素，维持左心室收缩舒张功能对给缺血心肌提供足够的血液和改善心脏损伤至关重要[8]。SYI可增加大鼠离体心脏左心室的收缩能力和CF，因此推测SYI改善在体心肌I/R损伤的作用机制除了抑制炎症反应减少细胞凋亡外，还可能与改善心脏收缩和舒张功能，扩张血管从而增加心肌供血有关，但具体的作用机制还需在体内心肌I/R模型中进行验证。

血栓形成可以造成血管闭塞、组织缺血，从而引起许多病变。大多数CVDs都与血栓形成有关，若供应心脏血流的动脉血栓形成，会导致缺血性心脏病发生[9]。血小板聚集是血栓形成的关键因素，血管受损及一些活化诱导剂（如血小板活化因子、ADP、AA等）均能引起血小板的活化从而诱导血小板聚集[10]。因此本研究采用ADP、AA体外诱导家兔血小板聚集来观察SYI是否具有抗血小板聚集作用。研究结果表明，不同质量浓度SYI可抑制ADP、AA诱导的家兔血小板聚集，表明SYI可阻断ADP和AA途径抑制血小板活化，对血栓形成具有抑制作用。预防血栓形成的另一个关键过程是抑制血液凝固[11]。血液凝固主要分为三个阶段，分别是凝血酶原激活物形成、凝血酶形成和纤维蛋白形成。其中第一阶段凝血酶原激活物形成可分为内源性和外源性两条途径。APTT和PT分别是内源凝血系统和外源凝血系统较为敏感的筛选指标[12]。本次研究发现不同质量浓度SYI可显著延长APTT和PT，表明SYI对内源性和外源性凝血系统均有抑制作用。TT为血浆凝血酶时间，主要反映纤维蛋白酶原转变为纤维蛋白的时间，纤维蛋白原含量是TT的主要影响因子[13]。SYI可显著延长TT，推测SYI可通过降低纤维蛋白原含量来起到抗凝血作用。以上研究结果提示SYI可能通过抑制血小板聚集和抗凝血抑制血栓的形成。

SYI在抗心肌缺血损伤、改善心功能和抗凝血等心血管相关作用方面表现出药理活性，量效关系好，这可为SYI临床治疗冠心病、心力衰竭、血管闭塞等CVDs提供理论依据和用药参考。但SYI抗心肌缺血损伤、抗凝血等具体的作用机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] Roth GA，Mensah GA，Johnson CO，et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors，1990－2019：update from the GBD 2019 study [J]. J Am Coll Cardiol，2020，76：2982-3021.

[2] Zhang CX，Cheng Y，Liu DZ，et al. Mitochondria-targeted cyclosporin A delivery system to treat myocardial ischemia reperfusion injury of rats [J]. J Nanobiotechnol，2019，17（1）：18.

[3] 贾君迪，李玉峰，肖珉，等 . 血栓心脉宁治疗冠心病临床疗效及安全性的Meta分析 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2021，19（5）：789-794.

[4] Tang J，Zhuang S. Histone acetylation and DNA methylation in ischemia/reperfusion injury [J]. Clin Sci（Lond），2019，133（4）：597-609.

[5] 安劲松，格日勒，闫国梁 . 血必净对急性心肌梗死患者心肌损伤标志物和梗死面积的影响 [J]. 现代中西医结合杂志，2020，29（30）：3378-3380.

[6] Lu QY，Ma JQ，Duan YY，et al. Carthamin yellow protects the heart against ischemia/reperfusion injury with reduced reactive oxygen species release and inflammatory response [J]. J Cardiovasc Pharm，2019，74（74）：

228-234.
[7] 聂培鹤，张文慧，金珠，等 . 羟基红花黄色素对离体心脏功能的影响 [J]. 上海交通大学学报（医学版），2010，30（5）：540-543.
[8] Velazquez EJ，Francis GS，Armstrong PW，et al. An international perspective on heart failure and left ventricular systolic dysfunction complicating myocardial infarction：the VALIANT registry [J]. Eur Heart J，2004，25（21）：1911-1919.
[9] 陈鹏宇，姚云峰，张莹，等 . 中药爵床抗血小板聚集的活性物质及作用机制研究 [J]. 中南药学，2021，19（3）：390-396.
[10] 王凤琴，陈岑，夏之宁，等 . 血小板在活血化瘀中药研究中的应用 [J]. 中国中药杂志，2014，39（16）：2993-3003.
[11] Xiao F，Tian X，Wang XF. Antiphospholipid syndrome causing reversible internal carotid artery thrombosis [J] Lancet，2018，391：2641.
[12] 陈晓军，韦洁，农云开，等 . 广西莪术水提取物抗血栓形成作用的实验研究 [J]. 中国中医药科技，2018，25（4）：495-497.
[13] 李小花 . 螺旋藻激酶抗凝和溶栓作用的实验研究 [D]. 南宁：广西医科大学，2009.

（收稿日期：2021-10-15；修回日期：2021-11-03）

微透析技术研究盐酸曲马多在小鼠额叶皮层细胞外液药动学的性别差异

朱岳[1]，黄东梅[2]（1. 中国科学技术大学附属第一医院离子医学中心（合肥离子医学中心），合肥 230088；2. 安徽医科大学第一附属医院，合肥 230022）

摘要：目的 研究性别差异对盐酸曲马多在小鼠脑额叶皮层细胞外液药动学的影响。**方法** 通过单次腹腔注射给予雌雄小鼠盐酸曲马多（25 mg • kg^{-1}），采用微透析技术结合高效液相色谱（HPLC）分析小鼠脑额叶皮层细胞外液的药物浓度，用 DAS 2.0 软件计算药动学参数，SPSS 25 软件进行统计学分析。**结果** 曲马多在雌鼠、雄鼠的主要药动学参数分别为达峰药浓度（C_{max}）：（870.35±181.32）、（753.24±187.95）μg • L^{-1}；消除半衰期（$t_{1/2}$）：（1.91±0.49）、（1.52±0.38）h；达峰时间（t_{max}）：（0.36±0.09）、（0.42±0.00）h；药时曲线下面积（$AUC_{0\sim\infty}$）：（1412.74±93.88）、（1075.25±100.49）μg • h • L^{-1}；药物清除率（*CLz/F*）：（17.76±1.19）、（23.43±2.27）L • h^{-1} • kg^{-1}；表观分布容积（*V/F*）：（49.07±13.23）、（51.68±16.11）L • kg^{-1}；曲马多在雌雄小鼠脑额叶皮层中 $AUC_{0\sim t}$，$AUC_{0\sim\infty}$，*CLz/F* 的差异有统计学意义（$P < 0.01$）。**结论** 曲马多在小鼠额叶皮层细胞外液的药动学存在一定性别差异。

关键词：微透析；曲马多；药动学；性别差异
中图分类号：R969 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1328-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.018

Gender difference in pharmacokinetics of tramadol hydrochloride in the extracellular fluid of the frontal cortex by microdialysis in mice

ZHU Yue[1], HUANG Dong-mei[2] (1. *Hefei Ion Medical Center, Division of Life Sciences and Medicine, The First Affiliated Hospital of USTC, University of Science and Technology of China, Hefei* 230088; 2. *The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei* 230022)

Abstract: Objective To determine the influence of gender differences in the pharmacokinetics of tramadol hydrochloride in the extracellular fluid of the frontal cortex in mice. **Methods** Female and male mice were given tramadol hydrochloride (25 mg • kg^{-1}) intraperitoneally. The concentration

作者简介：朱岳，男，硕士，主要从事定量药理学研究，email：zywnmc@163.com

of tramadol in the extracellular fluid of the frontal cortex in mice was determined by microdialysis combined with HPLC method. The main pharmacokinetic parameters of tramadol were calculated with DAS 2.0 software. The gender difference in pharmacokinetics in the mice was analyzed by SPSS 25. **Results** The main pharmacokinetic parameters of tramadol between the female and male mice were as follows: C_{max} (870.35±181.32), and (753.24±187.95) μg • L^{-1}; $t_{1/2}$ (1.91±0.49), and (1.52±0.38) h; t_{max} (0.36±0.09), and (0.42±0.00) h; $AUC_{0\sim\infty}$ (1412.74±93.88), and (1075.25±100.49)μg • h • L^{-1}; *CL*z/*F* (17.76±1.19), and (23.43±2.27) L • h^{-1} • kg^{-1}; *V*/*F* (49.07±13.23), and (51.68±16.11) L • kg^{-1}. The pharmacokinetic parameters, including $AUC_{0\sim t}$, $AUC_{0\sim\infty}$ and *CL*z/*F*, showed significant difference between the male and female mice ($P < 0.01$). **Conclusion** There is gender difference in the pharmacokinetics of tramadol in the extracellular fluid of the frontal cortex in mice.

Key words: microdialysis; tramadol; pharmacokinetics; gender difference

盐酸曲马多是一种合成的阿片类药物，具有独特的双重镇痛作用。它的镇痛作用主要是通过激活 μ-阿片受体和抑制去甲肾上腺素和 5-羟色胺的再摄取[1-3]。曲马多主要经肝药酶 CYP2D6 代谢为具有镇痛作用的 *O*-去甲基曲马多（M1），临床上主要用于治疗中重度慢性疼痛[4-5]。曲马多过量会导致恶心、呕吐、心动过速和癫痫等症状。其镇痛效果与恶心呕吐等不良反应存在较大的个体差异，这可能是由于 CYP2D6 多态性、性别或年龄等其他因素共同影响所致。目前关于 CYP2D6 多态性对其药动学影响报道较多[6-8]，但性别因素也可能造成个体差异[9]。Xia 等[10]发现曲马多清除率存在性别差异，在男性血浆中清除率高于女性。而 Ardakani 等[11-12]研究认为曲马多在人体血浆药动学过程不存在性别差异。因此曲马多药动学特征是否存在性别差异尚有争议。

盐酸曲马多作用于中枢神经系统，因此，检测曲马多在脑内（靶器官）中游离药物浓度计算所得到的药动学参数为基础制订给药方案、评估药物疗效结果更加准确、科学[13]，而目前尚无文献报道性别对盐酸曲马多在小鼠脑内的药动学影响。本研究拟通过在体微透析（microdialysis，MD）技术研究盐酸曲马多在小鼠脑额叶皮层（frontal coretex，FrCx）细胞外液的药动学性别差异，为临床用药提供参考。

1 材料

1.1 仪器

微透析采样系统，包括脑立体定位仪（深圳市瑞沃德生命科技有限公司）、微量注射泵（RS232，美国）、微量样本自动收集器（MAB85，瑞典）、微量注射器（美国）、微透析探针（CMA12，4 mm）。HPLC 系统（WATERS，美国）包括 2475 荧光检测器、FTN 样品管理器、四元溶剂管理器 QSM。高速冷冻离心机（HITACHI，日本）；颅骨钻（SAESHIN，韩国）；超纯水制备机（科尔顿有限公司）；电子天平（精度：0.0001 g，Ohaus Discovery）。

1.2 试药

盐酸曲马多注射液（批号：45170601，上海禾丰制药有限公司）；盐酸曲马多对照品（批号：171242-201206，纯度＞99%，中国食品药品检定研究院）；乌拉坦（上海化学试剂厂）；磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、高氯酸（上海阿拉丁试剂有限公司）；乙腈（EMD-Millipore 公司）；磷酸（福晨天津化学试剂有限公司），林格液（Ringer 液，中国大冢制药有限公司）。

1.3 动物

健康 ICR 小鼠，8～10 周龄，体质量（22±2）g，由南京青龙山实验动物中心提供，合格证号：SCXK（苏）2017-0001。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Ultimate XB-C_{18}（4.6 mm×150 mm，5 μm）；柱温 30 ℃；流动相：乙腈 -0.02 mol • L^{-1} 磷酸二氢钾（磷酸调 pH 2.5）＝ 22∶78（*V*/*V*）；流速 1.0 mL • min^{-1}；激发波长 275 nm，发射波长 312 nm；进样量 10 μL。

2.2 对照储备液的制备

精密称取盐酸曲马多适量，加入空白 Ringer 液溶解并稀释制得 10 μg • mL^{-1} 的对照品储备液。

2.3 微透析样本的采集

12 只 ICR 小鼠，雌雄各半，按雌、雄分为

两组，每组 6 只，实验前禁食 12 h。用 25% 乌拉坦（1.8 g • kg^{-1}，ip）麻醉后，用脑立体定位仪固定小鼠头部，将微透析探针植入大脑额叶皮层，坐标为前囟前 1.8 mm，旁开 0.8 mm，深度 2.3 mm[14]。以恒定速度 2 μL • min^{-1} 向微透析探针灌流 Ringer 液。1 h 后，腹腔注射 25 mg • kg^{-1} 盐酸曲马多，连续收集透析样本 5 h，样本收集间隔时间为 10 min，在－ 40 ℃保存备用。

2.4 微透析样品处理

取“2.3”项下透析样品 20 μL，加入 7% 高氯酸（20 μL），涡旋震荡 1 min 之后，随后在 4 ℃下 10 000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液 20 μL 进样分析。

2.5 微透析探针体内回收率测定

按“2.3”项下方法将探针植入小鼠大脑额叶皮层。以流速 2 μL • min^{-1} 灌注不同质量浓度（500、100、10 ng • mL^{-1}）的曲马多对照品溶液，稳定 1 h 后，每 10 min 采集一次样品，连续收集 5 个样品，用“2.4”项下方法处理后，在“2.1”项色谱条件下检测透析液曲马多浓度（C_{out}）和灌注液曲马多浓度（C_{in}），按如下计算公式计算体内回收率（*Rin vivo*）：*Rin vivo* ＝（1 － C_{out} / C_{in}）×100%。结果测得探针回收率为 18.81%。

2.6 方法学考察

2.6.1 方法专属性 分别取 20 μL 空白透析液、空白透析液加待测物（20 ng • mL^{-1}）和给药后 35 min 小鼠脑透析液样本，按“2.4”项下方法处理后，进样测定，分析内源性物质是否干扰检测。由结果可知，盐酸曲马多峰形良好，保留时间为 4.99 min，透析样本中无杂质与内源性物质峰干扰，方法专属性良好，相关色谱图见图 1。

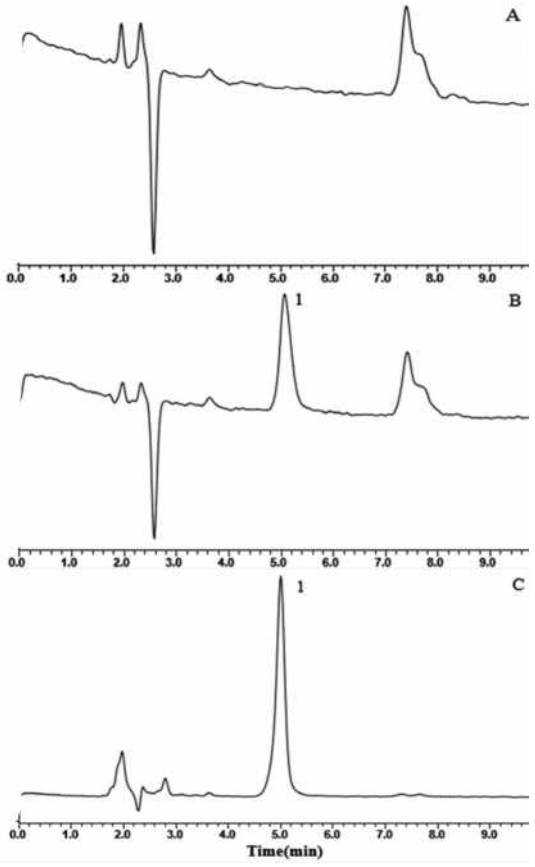


图 1 曲马多高效液相色谱图

Fig 1 Chromatograms of tramadol

A. 空白透析液（blank dialysate）；B. 空白透析液加曲马多对照品（blank dialysate spiked with tramadol）；C. 小鼠给药后 35 min 的透析液样本（dialysate sample after the tramadol administration to mice after 35 min）；1. 曲马多（tramadol）

2.6.2 线性范围的考察与检测限 取对照品储备液，加入空白透析液稀释配制成质量浓度为 1000、500、200、100、50、10 ng • mL^{-1} 的系列对照品溶液，按“2.4”项下方法处理后，进样分析。以盐酸曲马多的峰面积（*A*）与药物质量浓度（*C*）作线性回归，透析液色谱条件下线性回归方程为：$A = 5600.5C - 4739.1$（$r^2 = 0.9999$，$n = 5$），即在 10 ～ 1000 ng • mL^{-1} 内曲马多浓度与峰面积线性关系良好。检测限（*S*/*N* ＝ 3）为 5 ng • mL^{-1}。

2.6.3 精密度与回收率的考察 取“2.2”项下对照品储备液，分别配制盐酸曲马多高（500 ng•mL^{-1}）、中（100 ng•mL^{-1}）、低（10 ng•mL^{-1}）质量浓度的样品，按“2.4”项下方法处理后，进样测定，记录峰面积，计算实测浓度，实测浓度与理论浓度的比值计算方法回收率。另外，各浓度样品分别于 1 日内进样测定 5 次，考察日内精密度；连续测定 5 d，考察日间精密度。结果日内、日间精密度均小于 10%，方法回收率在 85% ～ 110%，*RSD* 在 0.97% ～ 12.1%，均符合分析要求，表明本方法精密度与准确度良好（见表 1）。

2.6.4 稳定性考察 取“2.2”项下对照品储备液，分别配制曲马多高（500 ng • mL^{-1}）、中（100 ng • mL^{-1}）、低（10 ng • mL^{-1}）质量浓度透析液样品，考察其在不同条件下的稳定性（$n = 5$）。将透析液样品存放于 4 ℃条件下 8 h、－ 40 ℃条件下 7 d，考察样品存放于 4 ℃、－ 40 ℃条件下的稳定性；样品反复冻融 3 次，考察透析液样品冻融稳定性。按“2.4”项下方法处理后，进样测定药物浓度。结果样品 4 ℃条件放置 8 h 稳定，*RSD* 分别为 7.8%、1.9%、1.0%；－ 40 ℃保存 7

表 1　曲马多测定方法的精密度和回收率 (n = 5)

Tab 1　Precision and recovery of tramadol (n = 5)

理论浓度 /（ng • mL^{-1}）	方法回收率（*RSD*）/%	日内精密度		日间精密度	
		测定浓度 /（ng • mL^{-1}）	*RSD*/%	测定浓度 /（ng • mL^{-1}）	*RSD*/%
10	107.26±13.04（12.1）	10.47±0.38	3.60	10.43±0.42	3.99
100	97.08±2.07（2.1）	97.37±1.39	1.42	97.38±3.77	3.86
500	99.59±0.98（0.97）	500.47±4.84	0.97	495.81±13.20	2.66

d 稳定，*RSD* 分别为 5.5%、2.3%、1.2%。样品冻融循环 3 次稳定，*RSD* 分别为 3.2%、4.9%、2.1%；结果表明曲马多在上述实验条件下均稳定。

2.6.5　稀释可靠性和残留效应　取“2.2”项下对照品储备液，加入空白透析液进行 10 倍和 100 倍稀释，最终得到 1000、100 ng • mL^{-1} 曲马多透析样品各 5 份，按“2.4”项下方法处理后，再按照“2.1”项下色谱条件测定药物浓度计算准确度与精密度。将标准曲线最高浓度（1000 ng • mL^{-1}）与空白透析液样品轮流进样检测，共 5 次，考察其残留。结果稀释 10 倍和 100 倍的样品精密度 *RSD* 分别为 2.3%、3.9%，准确度分别为 100.87%、109.08%，结果表明，透析液样品稀释对测定结果无影响。在进样标准曲线最高浓度样品，再进样空白样品后，出峰位置无明显干扰，表明该方法残留效应符合要求。

2.7　*数据处理*

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，DAS 2.0 软件用非房室模型计算药动学参数，用 SPSS 25 统计软件对雌雄小鼠主要药动学参数进行显著性检验。统计检验方法为独立样本 t 检验，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.8　*药动学研究*

2.8.1　平均药物浓度 - 时间曲线　透析样本按“2.4”项下方法处理后，按“2.1”项下色谱条件测定曲马多在小鼠大脑额叶皮层细胞外液中的浓度值，并经过探针回收率校正得到真实浓度值，以收集样本时间横坐标，平均质量浓度为纵坐标绘制平均药物质量浓度 - 时间曲线，由图 2 可知雌性小鼠脑额叶皮层细胞外液游离曲马多浓度略高于雄性小鼠。

2.8.2　药动学参数　小鼠给药（25 mg • kg^{-1}）后其主要药动学参数见表 2。结果显示，雌性小鼠的 $AUC_{(0\sim t)}$，$AUC_{(0\sim\infty)}$ 显著高于雄性小鼠，*CLz/F* 低于雄性小鼠，差异具有统计学意义（$P < 0.01$）。而 $t_{1/2}$、t_{max}、C_{max}、*V/F* 在性别间无统计学差异（$P > 0.05$）。该结果提示单次给予小鼠盐酸曲马多后，雌性小鼠脑额叶皮层细胞外液的药物暴露量高于雄鼠，清除率则低于雄鼠。

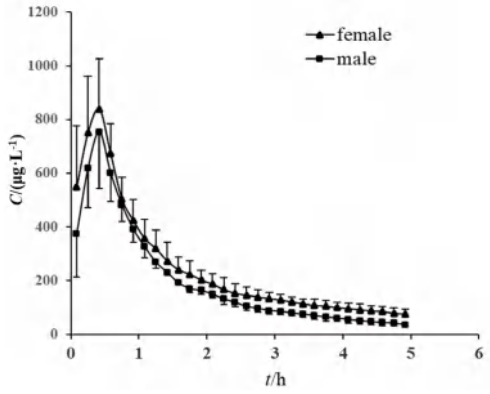


图 2　雌雄小鼠脑额叶皮层曲马多平均药物质量浓度 - 时间曲线（$\bar{x}\pm s$，n = 6）

Fig 2　Mean concentration-time profile of tramadol in the male and female in mice frontal cortex（$\bar{x}\pm s$，n = 6）

表 2　曲马多在小鼠额叶皮层药动学参数 ($\bar{x}\pm s$，n = 6)

Tab 2　Pharmacokinetics parameters of tramadol in the frontal cortex in mice ($\bar{x}\pm s$，n = 6)

参数	雄鼠	雌鼠	P
C_{max}/（μg • L^{-1}）	753.24±187.95	870.35±181.32	0.298
$t_{1/2}$/h	1.52±0.38	1.91±0.49	0.150
t_{max}/h	0.42±0.00	0.36±0.09	0.172
$AUC_{(0\sim t)}$/（μg • h • L^{-1}）	988.86±115.55	1223.89±112.15	0.005
$AUC_{(0\sim\infty)}$/（μg • h • L^{-1}）	1075.25±100.49	1412.74±93.88	< 0.001
CLz/F/[L/（h • kg）]	23.43±2.27	17.76±1.19	< 0.001
V/F/（L • kg^{-1}）	51.68±16.11	49.07±13.26	0.765

3　讨论

本文建立了在体微透析技术联合 HPLC 法测定小鼠脑额叶皮层细胞外液中游离曲马多的质量浓度的方法，该方法样品处理简便，适用于小鼠脑内药动学的研究。微透析作为一种活体取样技术，与传统的组织取样技术相比，具有连续取样、不影响体液体积、透析液样品不需要复杂的预处理、采集到的是能发挥药效的游离型药物样本等优点[15-16]。

性别差异可能会对药物在人体内的吸收、分布、代谢、排泄过程产生影响，影响作用部位（靶器官）中的药物浓度，进而可能影响药效[17-19]。本实验研究结果表明，雌、雄两组小鼠腹腔注射给予盐酸曲马多（25 mg • kg^{-1}）后，曲马多在雌雄小鼠脑额叶皮层细胞外液中药动学过程存在性别差异，雌性小鼠脑额叶皮层细胞外液中游离曲

马多暴露量比雄性小鼠高，清除率比雄性小鼠低。α1-酸性糖蛋白（α1-acid glycoprotein，AAG）是一种药物结合蛋白，能与多数药物结合，AAG与药物结合后不易通过血脑屏障，且AAG在女性体内的血浆浓度比男性低[20]，提示小鼠脑额叶皮层细胞外液中游离曲马多暴露量存在一定性别差异可能与雌鼠体内AAG含量较低有关。本研究结果提示曲马多在雌性小鼠脑额叶皮层细胞外液清除率较低，可能与其CYP2D6代谢酶活性低有关[21]，但其具体关系有待进一步研究。

在体微透析技术存在有创伤性等原因未能广泛运用于人体，未来可采用正电子发射断层成像技术（PET）等无创性分子影像技术方法[22-23]来进一步研究，两种方法相互验证，可以更好地研究性别因素对曲马多药动学的影响，这将有助于个体化治疗，提高药物的安全性和有效性。总之，根据本研究数据分析，认为性别对曲马多在小鼠脑额叶皮层细胞外液中药动学过程有一定影响。

参考文献

[1] Minami K，Ogata J，Uezono Y. What is the main mechanism of tramadol? [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol，2015，388（10）：999-1007.

[2] Bravo L，Mico JA，Berrocoso E. Discovery and development of tramadol for the treatment of pain [J]. Expert Opin Drug Discov，2017，12（12）：1281-1291.

[3] 余世荣，王林海，方宝霞，等 . 盐酸曲马多、枸橼酸芬太尼与盐酸托烷司琼在氯化钠注射液中的配伍稳定性研究 [J]. 中南药学，2015，13（7）：720-724.

[4] Lassen D，Damkier P，Brosen K. The pharmacogenetics of tramadol [J]. Clin Pharmacokinet，2015，54（8）：825-836.

[5] 王玮，田京辉，李晓曼，等 . 拉曼光谱分析盐酸曲马多的结构特征 [J]. 中南药学，2010，8（10）：736-739.

[6] Xu M，Zheng L，Zeng J，et al. Physiologically based pharmacokinetic modeling of tramadol to inform dose adjustment and drug-drug interactions according to CYP2D6 phenotypes [J]. Pharmacotherapy，2021，41（3）：277-290.

[7] Saiz-Rodríguez M，Ochoa D，Román M，et al. Involvement of CYP2D6 and CYP2B6 on tramadol pharmacokinetics [J]. Pharmacogenomics，2020，21（10）：663-675.

[8] Jeong HC，Bae SH，Bae JW，et al. Evaluation of the effect of CYP2D6 genotypes on tramadol and *O*-desmethyltramadol pharmacokinetic profiles in a korean population using physiologically-based pharmacokinetic modeling [J]. Pharmaceutics，2019，11（11）：618-633.

[9] Yoon S，Jeong S，Jung E，et al. Effect of CYP3A4 metabolism on sex differences in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of zolpidem [J]. Sci Rep，2021，11（1）：19150-19159.

[10] Xia DY，Wang YH，Guo T，et al. Pharmacokinetics of tramadol in a diverse healthy Chinese population [J]. J Clin Pharm Ther，2012，37（5）：599-603.

[11] Ardakani YH，Rouini MR. Pharmacokinetics of tramadol and its three main metabolites in healthy male and female volunteers [J]. Biopharm Drug Dispos，2007，28（9）：527-534.

[12] Ardakani YH，Lavasani H，Rouini MR. Gender dependency in streoselective pharmacokinetics of tramadol and its phase Ⅰ metabolites in relation to CYP2D6 phenotype in iranian population [J]. Iran J Pharm Res，2018，17（2）：767-782.

[13] Yamamoto Y，Danhof M，De Lange ECM. Microdialysis：the key to physiologically based model prediction of human CNS target site concentrations [J]. AAPS J，2017，19（4）：891-909.

[14] Hong ZY，Huang ZL，Qu WM，et al. Orexin A promotes histamine，but not norepinephrine or serotonin，release in frontal cortex of mice [J]. Acta Pharmacol Sin，2005，26（2）：155-159.

[15] Zhuang L，Xia H，Gu Y，et al. Theory and application of microdialysis in pharmacokinetic studies [J]. Curr Drug Metab，2015，16（10）：919-931.

[16] Hammarlund-Udenaes M. Microdialysis as an important technique in systems pharmacology-a historical and methodological review [J]. Aaps J，2017，19（5）：1294-1303.

[17] Wang ZZ，Deng SH，Lu HY，et al. Effect of venlafaxine dosage，valproic acid concentration，sex，and age on steady state dose-corrected concentrations of venlafaxine and *O*-desmethylvenlafaxine：a retrospective analysis of therapeutic drug monitoring data in a Chinese population [J]. Hum Psychopharmacol，2020，35（3）：e2733.

[18] Clayton AH，Stewart RS，Fayyad R，et al. Sex differences in clinical presentation and response in panic disorder：pooled data from sertraline treatment studies [J]. Arch Womens Ment Health，2006，9（3）：151-157.

[19] Greenblatt DJ，Von Moltke LL. Gender has a small but statistically significant effect on clearance of CYP3A substrate drugs [J]. J Clin Pharmacol，2008，48（11）：1350-1355.

[20] Bebawy M，Chetty M. Gender differences in p-glycoprotein expression and function：effects on drug disposition and outcome [J]. Curr Drug Metab，2009，10（4）：322-328.

[21] Franconi F，Brunelleschi S，Steardo L，et al. Gender differences in drug responses [J]. Pharmacol Res，2007，55（2）：81-95.

[22] Narendran R，Jedema HP，Lopresti BJ，et al. Imaging dopamine transmission in the frontal cortex：a simultaneous microdialysis and [11C] FLB 457 PET study [J]. Mol Psychiatry，2014，19（3）：302-310.

[23] Langer O，Karch R，Müller U，et al. Combined PET and microdialysis for in vivo assessment of intracellular drug pharmacokinetics in humans [J]. J Nucl Med，2005，46（11）：1835-1841.

（收稿日期：2021-10-05；修回日期：2021-11-02）

CRITIC-AHP 法结合 Box-Behnken 响应面法优选三金排石合剂提取工艺

石金敏[1, 2]，周灿[1]，余绪明[1]，钟鑫昊[3]，王佳[1]，赵利军[1*]（1. 十堰市人民医院（湖北医药学院附属人民医院）药学部，湖北　十堰　442000；2. 华中农业大学植物科学技术学院，武汉　430070；3. 湖北医药学院药学院，湖北　十堰　442000）

摘要：目的　优选三金排石合剂的提取工艺。**方法**　采用 HPLC 法测定槲皮素、山柰酚等指标，以层次分析法（AHP）联合 CRITIC 法计算权重系数，多指标综合评分结合 Box-Behnken 设计 - 响应面法考察加水量、提取时间、提取次数对三金排石合剂提取工艺的影响，优选水提取工艺。**结果**　优化得到的最佳工艺为：加水量为 10 倍量水、提取时间为 0.5 h、提取次数为 3 次。**结论**　响应面法优化的方程拟合度良好，该提取工艺科学可行，可用于三金排石合剂的制备。

关键词：CRITIC-AHP；Box-Behnken 响应面法；三金排石合剂；槲皮素；山柰酚
中图分类号：R284　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)06-1333-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.019

Optimization of extraction of Sanjin Paishi mixture by Box-Behnken response surface methodology and CRITIC-AHP

SHI Jin-min[1, 2], ZHOU Can[1], YU Xu-ming [1], ZHONG Xin-hao[3], WANG Jia[1], ZHAO Li-jun[1*] (1. *Department of Pharmacy, Renmin Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan Hubei* 442000; 2. *College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan* 430070; 3. *School of Pharmacy, Hubei University of Medicine, Shiyan Hubei* 442000)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of various components and indexes in Sanjin Paishi mixture. **Methods** Quercetin and kaempferol were determined by HPLC. The weight coefficient was calculated by analytic hierarchy process (AHP) combined with critical method (CRITIC-AHP). The effects of water addition, extraction time and extraction times on the extraction process of Sanjin Paishi mixture were determined by Box-Behnken response surface methodology, and the water extraction was optimized. **Results** The optimal process was as follows: 10 times of water volume, extraction for 0.5 h, and 3 extractions. **Conclusion** The fitting degree of the equation optimized by response surface method is good, and the extraction process is scientific, feasible, and suitable for the extraction of Sanjin Paishi mixture.

Key words: CRITIC-AHP; Box-Behnken response surface methodology; Sanjin Paishi mixture; quercetin; kaempferol

三金排石合剂由石韦、金钱草、鸡内金、瞿麦、川牛膝、乌药、白芍、通草、海金沙和甘草等十味药材配伍组成，诸药合用，共奏清热利湿、通淋排石、活血通经、祛瘀止痛之效。对于湿热下注膀胱，煎熬尿液结为砂石，导致小便不利或中断，尿血，肾结石，尿道炎等泌尿系疾病具有良好的治疗效果，疗效确切，应用广泛，但未对其制备工艺进行系统的研究，本试验

基金项目：十堰市科学技术研究与开发项目（No.16Y36）；十堰市科学技术研究与开发项目（No.16Y40）。
作者简介：石金敏，女，主管药师，主要从事制剂工艺方面的研究，email：weian510@163.com　*通信作者：赵利军，男，副主任药师，主要从事制剂工艺方面的研究，email：22915007@qq.com

以槲皮素、山柰酚和干膏得率等指标的含量进行 CRITIC-AHP 法综合评分，基于 Box-Behnken 设计 - 响应面法得到三金排石合剂的提取工艺，以期为其深入研究及开发利用提供数据支持，保证临床用药的安全有效。

1 材料

1.1 仪器

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪（日本岛津公司）；KGD-15L 超声波清洗仪（科广达超声设备有限公司）；CP214 电子分析天平（奥豪斯公司）。

1.2 试药

石韦、金钱草等药材均购自十堰市人民医院，经药学部雷龙副主任中药师鉴定均符合《中国药典》2020 年版相关规定。

对照品山柰酚（批号：110861-202013，含量 93.2%）、槲皮素（批号：100081-201610，含量 99.1%）（中国食品药品检定研究院）；甲醇、乙腈（色谱纯，天津市科密欧化学试剂有限公司）；无水乙醇、盐酸、磷酸（分析纯，武汉市中天化工有限责任公司）；水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 样品制备

精密称量三金排石合剂方中对应的中药饮片共 40.3 g，选取 1000 mL 圆底烧瓶，将药材分别加入烧瓶中，按照响应面法设计条件进行回流提取，收集每一次的提取液并浓缩至 100 mL 以下，用水定容至 100 mL 量瓶中。

2.2 色谱条件

色谱柱：WondaSiL C_{18}-WR 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇 -0.4% 磷酸水（43∶57）；流速：1.00 mL·min^{-1}；检测波长：360 nm；柱温：40 ℃；进样量：10 μL。

2.3 对照品溶液的制备

分别精密称取槲皮素、山柰酚对照品适量，加 80% 甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，配制成质量浓度分别为 7 μg·mL^{-1}、10 μg·mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

精密吸取样品 10 mL，置于 100 mL 锥形瓶中，精密加入 40 mL 甲醇和 6 mL 盐酸，称重，90 ℃水浴回流提取 1 h，迅速冷却，加 80% 甲醇溶液补足减失的重量，摇匀，过滤，即得供试品溶液 [1]。

2.5 方法学考察

2.5.1 系统适应性试验 取“2.3”项下对照品溶液，“2.4”项下供试品溶液，空白溶液（精密吸取纯净水 10 mL，同“2.4”项下方法制备），进样检测，色谱图见图 1。

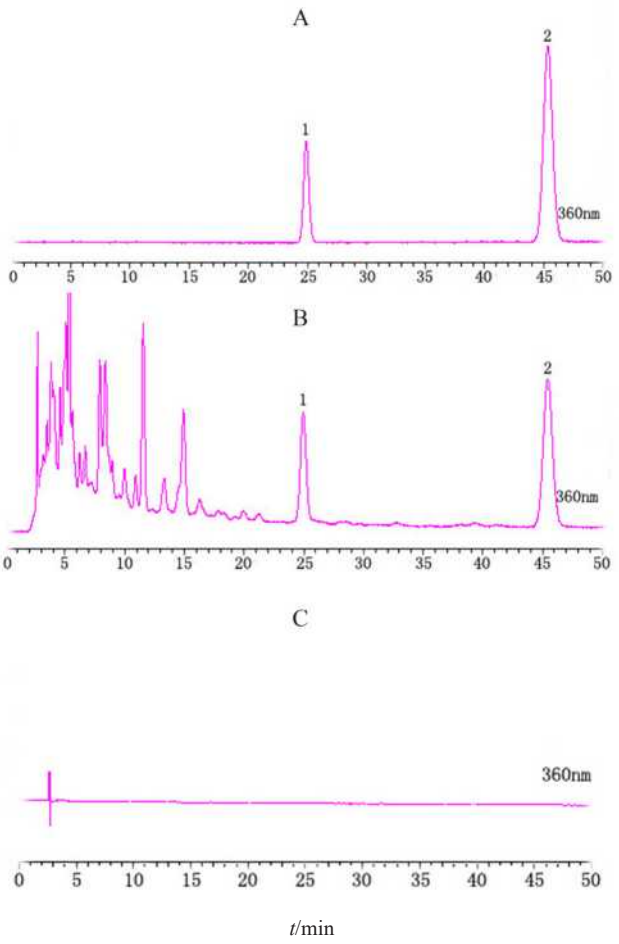


图 1 三金排石合剂 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of Sanjin Paishi mixture

A. 对照品溶液（reference solution）；B. 供试品溶液（sample solution）；C. 空白溶液（blank solution）；1. 槲皮素（quercetin）；2. 山柰酚（kaempferol）

2.5.2 线性关系考察 分别精密称取槲皮素、山柰酚对照品适量，用甲醇稀释成质量浓度槲皮素为 28、14、7、3.5、1.8、0.9 μg·mL^{-1} 和山柰酚为 42、21、11、5.5、2.8、1.4 μg·mL^{-1} 的混合对照品溶液，进样测定，以各成分的峰面积为纵坐标，质量浓度为横坐标，绘制标准曲线，槲皮素、山柰酚线性回归方程分别为 $Y_{槲皮素}=4\times10^7X-3783.5$（$r=1.0000$），$Y_{山柰酚}=4.8\times10^7X-1.41\times10^4$（$r=0.9998$），线性范围分别为 0.9 ～ 28 μg·$mL^{-1}$ 和 1.4 ～ 42 μg·mL^{-1}。

2.5.3 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液，连续进样 6 次，结果槲皮素、山柰酚峰面积的 *RSD* 值分别为 2.1%、1.3%，结果表明仪器精密度较好。

2.5.4 重复性试验 取“2.4”项下供试品溶液 6 份，进样测定，计算得槲皮素、山柰酚峰面积的 *RSD* 值

分别为 3.5%、3.5%，表明该方法的重复性较好。

2.5.5　稳定性试验　取“2.4”项下同一供试品溶液，分别在 0、2、4、6、8、12 h 进样测定，结果槲皮素、山柰酚峰面积的 *RSD* 值分别为 2.0%、1.5%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.5.6　加样回收试验　分别精密量取“2.1”项下已知含量的样品 5 mL 6 份，分别加入 0.02 mg • mL^{-1} 槲皮素对照品溶液和 0.035 mg • mL^{-1} 山柰酚对照品溶液适量，按照“2.4”项下方法制备供试品溶液，进样检测，计算槲皮素、山柰酚平均加样回收率分别为 98.6% 和 100.1%，*RSD* 依次为 2.6% 和 4.0%，结果表明该方法准确度良好。

2.6　干膏得率测定 [2]

精密量取“2.1”项下样品溶液 25 mL，置于已干燥至恒重的陶瓷蒸发皿中，水浴蒸干，再置于恒温鼓风干燥箱内 105 ℃恒温干燥 3 h，冷却至室温，迅速称定重量，计算干膏得率。

2.7　综合评分

2.7.1　CRITIC 法计算权重　将方差分析的试验数据经过线性插值处理，即 [指标成分值＝（实测值－最小值）/（最大值－最小值）]，消除单位量纲后，计算各指标对比强度（s_i）、冲突性（δ_i）、综合权重（c_i）与权重（ω_i）[3-7]，结果见表 1。由表 1 可知，槲皮素、山柰酚、干膏得率经 CRITIC 法计算得到的客观权重分别为 0.2504、0.2460、0.5036。

表 1　CRITIC 法各指标数值

Tab 1　Index values of CRITIC method

考察指标	槲皮素	山柰酚	干膏得率
s_i	23.7334	23.3623	27.8561
δ_i	0.5340	0.5330	0.9150
c_i	12.6736	12.4521	25.4883
ω_i	0.2504	0.2460	0.5036

2.7.2　AHP 法计算权重　根据方中各成分的药理作用强弱和君臣佐使配伍规律，将干膏得率和指标性成分的重要性作为权重指标予以指标量化 [8]，构建成对比较的判断优先矩阵，各指标的优先顺序：槲皮素＝山柰酚＞干膏得率，赋予各项指标的相对评分，经层次分析后的结果见表 2。

表 2　指标成对比较优先判断矩阵

Tab 2　Priority judgment matrix for paired comparison of indicators

指标成分	槲皮素	山柰酚	干膏得率
槲皮素	1	1	4
山柰酚	1	1	4
干膏得率	1/4	1/4	1

根据表 2 评分结果，计算得到槲皮素、山柰酚、干膏得率的权重系数分别为 0.4444、0.4444、0.1111。一致性比例分子（CR）＜ 0.1，即指标优先比较矩阵通过一致性检验，权重系数有效。

2.7.3　CRITIC-AHP　通过 CRITIC 法和 AHP 法分别计算得到三金排石合剂中槲皮素、山柰酚及干膏得率的相关权重，复合权重（$\omega_{复合}$）＝$\omega_{AHP}\omega_{CRITIC}/\Sigma\,\omega_{AHP}\omega_{CRITIC}$，按公式计算得槲皮素、山柰酚及干膏得率复合权重分别为 0.4023、0.3953、0.2023。

2.8　Box-behnken 响应面法优化提取工艺

2.8.1　单因素试验　参考文献 [9-11] 进行相关的预试验，根据结果选定加水量（A）、提取时间（B）、提取次数（C）等连续变量作为影响因素进行单因素试验，由单因素试验的结果设计响应面试验各因素的水平范围，因素水平见表 3。

表 3　响应面试验因素与水平

Tab 3　Factor and level of response surface methodology

因素	水平		
	－1	0	1
A 加水量 / 倍	8	10	12
B 提取时间 /h	0.5	1	1.5
C 提取次数 / 次	1	2	3

2.8.2　响应面试验设计及结果　由综合评价指标对水提取工艺的影响，结合各项指标对其进行运算，确定综合评分（Y）＝[（槲皮素含量 / 槲皮素最大含量）×0.4023 ＋（山柰酚含量 / 山柰酚最大含量）×0.3953 ＋（干膏率含量 / 干膏率最大含量）×0.2023]×100。

根据响应面的组合设计原理，采用 Design Expert 8.0.6 软件，选择 Box-Behnken 拟合模型，设置 5 个中心试验点，以 3 个指标总含量的综合评分为响应值，设计出 17 个试验点的试验方案，对加水量、提取时间、提取次数进行研究，结果见表 4。

2.8.3　试验结果分析　采用 Design Expert 8.0.6 对 17 个试验点对应的数据进行方差分析，结果见表 5，其中 P ＜ 0.05 为显著项，P ＜ 0.01 为极显著项，同时得到三因素与综合评分的三元二次方程：$Y = 82.04 + 2.26A - 4.68B + 10.40C - 1.48AB - 3.26AC - 1.88BC - 7.94A^2 + 4.58B^2 - 6.58C^2$。

该模型显著性检验 P ＝ 0.0065 ＜ 0.05，模型表现为显著，二次多项式回归模型具有显著性意义；模型的失拟项 P ＝ 0.1915 ＞ 0.05，提示模型

表 4 响应面试验设计及结果

Tab 4 Design and results of response surface methodology

试验号	A. 加水量	B. 提取时间	C. 提取次数	槲皮素 /（mg·g^{-1}）	山柰酚 /（mg·g^{-1}）	干膏得率 /%	综合评分
1	－1	0	1	0.032 33	0.056 06	23.9117	76.4847
2	1	1	0	0.031 00	0.052 48	22.3663	72.2465
3	1	－1	0	0.040 22	0.058 43	21.5266	89.9235
4	1	0	－1	0.030 16	0.050 07	15.7439	65.0890
5	－1	1	0	0.030 13	0.053 40	20.3851	70.3987
6	0	0	0	0.037 68	0.058 82	21.8382	81.0887
7	－1	0	－1	0.024 85	0.042 42	13.0769	54.3207
8	1	0	1	0.032 87	0.050 64	23.9285	74.1956
9	0	1	1	0.038 44	0.066 85	25.9682	89.1208
10	－1	－1	0	0.038 22	0.063 79	19.2824	82.1411
11	0	－1	－1	0.031 88	0.054 35	13.6288	67.1908
12	0	1	－1	0.032 31	0.050 64	15.2467	66.9264
13	0	－1	1	0.044 85	0.076 79	22.0179	96.9135
14	0	0	0	0.035 17	0.060 44	21.9385	79.7510
15	0	0	0	0.035 94	0.057 40	20.7831	77.9732
16	0	0	0	0.040 34	0.067 61	21.4134	87.6696
17	0	0	0	0.037 29	0.065 00	21.5772	83.7178

表 5 方差分析

Tab 5 Analysis of variance

来源	平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值
模型	1679.42	9	186.60	7.79	0.0065
A	40.99	1	40.99	1.71	0.2321
B	175.56	1	175.56	7.33	0.0303
C	865.02	1	865.02	36.11	0.0005
AB	8.80	1	8.80	0.37	0.5635
AC	42.62	1	42.62	1.78	0.2240
BC	14.17	1	14.17	0.59	0.4670
A^2	265.38	1	265.38	11.08	0.0126
B^2	88.18	1	88.18	3.68	0.0965
C^2	182.22	1	182.22	7.61	0.0282
残差	167.68	7	23.35		
失拟项	110.49	3	36.83	2.58	0.1915
误差	57.19	4	14.30		
总和	1847.11	16			

与实测数据拟合度好，模型值的运算可替代实际试验值对结果进行预测分析；提取工艺考察的 3 个因素通过分析相应 *P* 值可知，各因素影响大小依次为：C ＞ B ＞ A，即对三金排石合剂中所含的各项指标及综合评分影响最大的是提取次数，其次是提取时间和加水量。另外，模型的决定性系数 R^2 ＝ 0.9092，表明该模型可解释 3 个因素 90.92% 的变异性，校正决定系数 R^2_{Adj} ＝ 0.7925，说明该模型拟合程度良好，且能解释 79.25% 响应值的变化，即模型可用于对三金排石合剂的综合评分及各项指标的预测。

根据分析结果绘制响应面 3D 图，对加水量、提取时间、提取次数这三个因素每两两之间的交互作用强弱进行比较，结果见图 2。

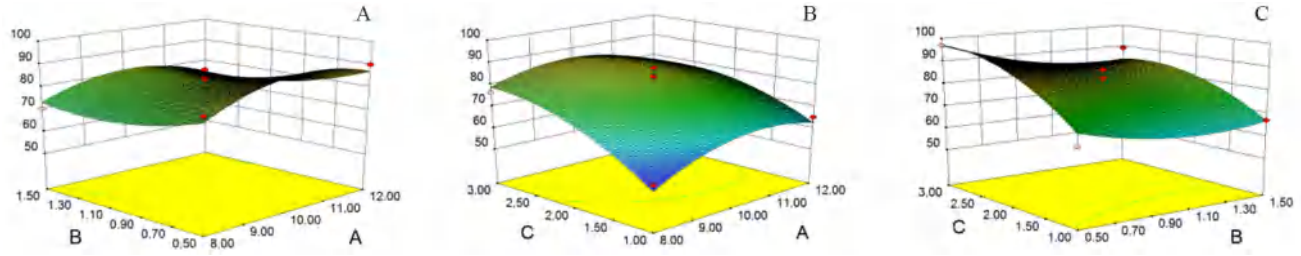


图 2 加水量（A）、提取时间（B）和提取次数（C）交互作用的三维响应面图

Fig 2 3D response surface of water adding amount（A），extraction time（B）and extraction times（C）

从三个交互因素形成的曲面陡峭程度可以看出，提取次数与加水量的交互影响最大，影响综合评分的主次顺序为提取次数＞加水量＞提取时间，以上分析与表 5 中方差分析的结果吻合。

采用 Design Expert 8.0.6 预测最佳提取工艺参数：加水量为 10.09、提取时间为 0.5 h、提取

次数为 2.92 次。综合实际操作的便利性，调整为：加水量为 10 倍量、提取时间为 0.5 h、提取次数为 3 次，在此条件下模型预测的综合评分为 97.05。

2.9　验证试验

按照优化条件进行 3 次平行试验，实际测得综合评分均值为 97.50，与预测值相比相对误差小于 5%，表明，本试验建立的回归模型适用于三金排石合剂中各种指标的综合评分的预测，与实际测定数值拟合度较好，优化得到的提取工艺参数准确可靠，结果见表 6。

表 6　验证结果

Tab 6　Verification test

编号	槲皮素 /（mg·g^{-1}）	山柰酚 /（mg·g^{-1}）	干膏得率 /%	综合评分
1	0.041 15	0.070 17	20.7722	99.3521
2	0.039 96	0.068 36	21.4501	96.6734
3	0.041 01	0.067 29	20.7543	96.4611

3　讨论

3.1　盐酸加入量对槲皮素、山柰酚含量的影响

对供试品溶液制备方法中盐酸加入量（5、6、7、8、9、10、11 mL）进行考察，结果显示，槲皮素、山柰酚的含量呈现先增加再递减的趋势，当盐酸加入量为 6 mL 时两者含量达到最大，因此，最终确定其加入量为 6 mL。

3.2　权重方法的选取

本试验采用 CRITIC-AHP 复合加权法计算权重。CRITIC 法是从实际数据出发，利用指标值所反映的客观信息确定权重的一种方法 [5]，此法容易忽视指标间的轻重关系。AHP 法是基于研究者的经验，人为确定各项指标的重要性进行比较而赋权的方法 [7]，能切合实际考虑试验中各指标的优选顺序，但主观性较强，易受影响，结果不具有普遍性。AHP-CRITIC 法复合加权法共具两种方法的优点，主客观并重，其结果具有稳定性和可靠性，且能区分数据信息。

3.3　Box-Behnken 响应面法

本研究采用 Box-Behnken 响应面法对三金排石合剂的提取工艺进行了研究，通过多元二次回归方程来拟合因素与响应值之间的函数关系，能够准确表示试验设计与优化结果，与正交试验相比准确度更高、可预测性更强 [12]。该模型预测最佳工艺为加入加水量为 10 倍量水、提取时间为 0.5 h、提取次数为 3 次。验证试验结果与预测值相比，误差小于 5%，说明利用 Box-Behnken 响应面法结合 AHP 法优化三金排石合剂的提取工艺，方法科学、合理可行、稳定可靠，为进一步开发中药治疗泌尿系结石提供参考依据。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：230.

[2] 沈晗，黄玉宇，陈汀，等 . 正交试验设计优选茵陈蒿汤水煎煮工艺 [J]. 中国药业，2020，29（11）：14-17.

[3] 欧阳丽敏，王新宏，朱思敏，等 . 基于 AHP-CRITIC 法探讨英山茅苍术最佳采收期 [J]. 中成药，2020，42（3）：708-713.

[4] 胡兆流，陈秋谷，王佛长，等 . 多指标权重分析法结合正交试验优选补脾养肾颗粒的水提工艺 [J]. 中国药房，2019，30（19）：2656-2662.

[5] 曲彤，袁培培，张琳，等 . 基于 AHP- 熵权法结合 D- 最优设计响应面法优化玄参蒸制工艺 [J]. 中草药，2019，50（10）：2325-2331.

[6] 王永祥，朱志军，李莹丽，等 . 基于多指标权重分析和均匀设计法优选人参提取工艺 [J]. 中国药师，2020，23（2）：345-348.

[7] 张琳，周欣，闫丹，等 . 基于 CRITIC-AHP 权重分析法结合 Box-Behnken 设计 - 响应面法优选陈皮饮片炮制工艺 [J]. 中草药，2018，49（16）：3829-3834.

[8] 石金敏，周灿，余绪明，等 . 基于 AHP-CRITIC 混合权重分析和正交设计法优选升麻葛根汤煎药机煎煮工艺 [J]. 中国药师，2020，23（1）：49-53.

[9] 冯小慧，秦健峰，邓家刚，等 . Box-Behnken 响应面法优化厚藤中 6 个成分的提取工艺 [J]. 中药材，2019，42（5）：1118-1121.

[10] 郭梅，木盼盼，安琪，等 . 响应面法优化超声辅助提取六神曲中总黄酮的工艺研究 [J]. 河北中医药学报，2020，35（3）：39-43.

[11] 毛艳，古丽白热木·玉素因，蔡晓翠，等 . Box-Behnken 响应面法结合层次分析法优化新疆紫草根的提取工艺 [J]. 中药材，2019，42（7）：1605-1610.

[12] 王玉，李远辉，王佳，等 . Box-Behnken 设计 - 响应面法优化乙醇提取黄芪甲苷工艺研究 [J]. 中药与临床，2016，7（4）：9-11，32.

（收稿日期：2022-03-07；修回日期：2022-05-06）

肾复舒颗粒通过调节炎症和纤维化延缓糖尿病肾病的发展

杨永玉[1, 2]，姜思怡[3]，葛星成[4]，向大雄[1, 2*]（1. 中南大学湘雅二医院药学部，长沙 410011；2. 湖南省转化医学与创新药物工程技术研究中心，长沙 410007；3. 岳阳职业技术学院药学系，湖南 岳阳 414000；4. 湖南中医药大学湘杏学院，长沙 410208）

摘要：目的 研究肾复舒颗粒对糖尿病肾病小鼠的保护作用及可能机制。**方法** C57BL/6J 雄性小鼠 40 只，随机分为正常对照组、模型组、肾复舒颗粒组和阳性药物组，每组 10 只。采用腹腔注射链脲佐菌素制备糖尿病肾病模型。药物组给予 2.08 g • kg^{-1} 的肾复舒颗粒提取物混悬液（0.5%CMC-Na），阳性药物组给予缬沙坦溶液（40 mg • kg^{-1}），其他组给予相同体积的 0.5%CMC-Na 溶液。药物干预 12 周后，收集 24 h 尿液、血液以及肾脏组织。HE、PAS 以及 Masson’s 染色评价肾脏组织病理变化，蛋白质印迹法检测 NF-κB、fibronectin、p-NF-κB（S536）、p-IKKα/β（ser176）、IKKα/β、TGF-β、p-Smad2（Ser250）和 collagen4A1 蛋白的表达。**结果** 与模型组比较，肾复舒颗粒显著降低血尿素氮、血肌酐和 24 h 尿微量白蛋白水平；降低肾小球面积、系膜基质以及胶原沉积；降低肾脏组织中 IL-6 和 TNF-α 水平及 p-NF-κB（S536）、p-IKKα/β（ser176）、p-Smad2（Ser250）、fibronetin 和 collagen4A1 蛋白的表达。**结论** 肾复舒颗粒可延缓糖尿病肾病的进展，其作用机制可能与抑制炎症和纤维化有关。

关键词：肾复舒颗粒；糖尿病肾病；炎症；纤维化
中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1338-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.020

Shenfushu granules attenuate the development of diabetic nephropathy by regulating inflammation and fibrosis

YANG Yong-yu[1, 2], JIANG Si-yi[3], GE Xing-cheng[4], XIANG Da-xiong[1, 2*] (1. *Department of Pharmacy, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha* 410011; 2. *Hunan Provincial Engineering Research Central of Translational Medical and Innovative Drug, Changsha* 410011; 3. *Department of Pharmacy, Medical College, Yueyang Vocational Technical College, Yueyang Hunan* 414000; 4. *Xiangxing College, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha* 410208)

Abstract: Objective To determine the protective effect of Shenfushu granules (SFSG) on diabetic nephropathy (DN) in mice and possible mechanism. **Methods** Forty C57BL/6J mice were randomized into four groups: a normal control group, a model group, an SFSG group, and a positive drug group (10 in each group). The DN model was established by intraperitoneal injection of streptozotocin. The SFSG group received SFSG suspendsion in 0.5% CMC-Na at 2.08 g • kg^{-1}. The positive drug group received valsartan (40 mg • kg^{-1}), and other groups were given 0.5% CMC-Na. The treatment lasted 12 weeks. The 24 h urine, blood, and kidney tissue were collected. Hematoxylin-eosin, periodic acid-Schiff, and Masson’s staining were used to evaluate the histopathological changes. The expressions of NF-κB, fibronectin, p-NF-κB (S536), p-IKKα/β (ser176), IKKα/β, TGF-β, p-Smad2 (Ser250), and collagen4A1 were detected by Western blot. **Results** Compared with the model group, SFSG

基金项目：长沙市科技局重大专项（No. kh2103006）；湖南省中医药管理局科研计划项目（No. 2021061）
作者简介：杨永玉，男，博士，主管药师，主要从事糖尿病及并发症发病机制的研究，email：yongyuyang@csu. edu. cn *通信作者：向大雄，男，教授，博士研究生导师，主要从事创新药物与新制剂、仿生纳米医药技术及靶向治疗、中药与民族药物的研究开发，email：xiangdaxiong@163. com.

significantly decreased the blood urea nitrogen, creatinine and 24-h albuminuria level, attenuated mesangial matrix and collagen deposition, and decreased the glomerular area, the levels of IL-6 and TNF-α in the kidney tissue, and the expressions of p-NF-κB (S536), p-IKKα/β (ser176), p-Smad2 (Ser250), fibronetin, and collagen4A1. **Conclusion** SFSG delays the development of DN, whose mechanism of action may be associated with inhibition of inflammation and fibrosis.

Key words: Shenfushu granule; diabetic nephropathy; inflammation; fibrosis

糖尿病肾病（diabetic nephropathy，DN）是由糖尿病引起的以尿蛋白升高、肾小球滤过率下降为特征的慢性肾脏疾病，是糖尿病最常见和最严重的微血管并发症之一，也是目前引起终末期肾病的首要原因[1]。大量证据表明炎症和纤维化参与了DN的发生、发展[2-3]。抑制肾脏炎症信号通路中重要的转录因子NF-κB（nuclear factor-kappa B）[4]以及纤维化信号通路TGF-β/Smad2/3可明显延缓DN的进展[5]。目前，对进展期的DN均无有效的药物可以逆转疾病进程，仅能延缓肾病进展。

肾复舒颗粒（Shenfushu granule，SFSG）是由中南大学湘雅二医院临床专家针对肾衰竭自主研发的医院制剂，其由大黄、丹参、甘草、土茯苓、枳壳、牡蛎六味中药材组成。SFSG主要用于各种急、慢性肾衰竭及尿毒症的治疗[6]。研究发现SFSG可降低5/6肾切除大鼠的血尿素氮、肌酐和尿蛋白水平，降低肾小球硬化和肾小管间质损伤，增加微血管密度[7]。临床研究显示SFSG能降低慢性肾衰患者血液中硫酸吲哚酚浓度[8]。此外，SFSG也用于DN患者的治疗[6]。本文研究了SFSG对DN进展的保护作用，从抗肾脏炎症以及纤维化的角度探讨可能的作用机制，为SFSG的进一步开发和临床使用提供实验支持。

1 材料

SFSG提取物（中南大学湘雅二医院药学部自制）。HE、PAS和Masson’s染色液（北京索莱宝科技有限公司）。β-actin（BM0627）、fibronectin（BA1772）、collagen4A1（BA3585）、IL-6（EK0411）和TNF-α（FEK0527）（博士德生物公司）；p-IKKα/β（ser176）抗体（Santa Cruz公司，Sc-21661）。NF-κB p65（AF-1234）、p-Smad2（Ser250）（AF2545）和TGF-β（AF0297）抗体、RIPA裂解液和BCA法蛋白定量试剂盒（碧云天生物技术公司）。p-NF-κB p65（S536）抗体（abcam公司，ab76302），IKKα/β抗体（Affinity公司，AF6014）。血糖、肌酐、尿素氮、尿微量白蛋白测定试剂盒（南京建成生物工程研究所）。链脲佐菌素（STZ，上海阿拉丁生化科技股份有限公司）。

2 方法

2.1 SFSG提取物的制备

取大黄781 g，丹参625 g，土茯苓469 g，牡蛎156 g，枳壳312 g，甘草625 g，加水浸泡8～12 h，煎煮两次，每次1.5 h，合并滤液，减压浓缩至相对密度为1.15～1.30（60 ℃）的浸膏，喷雾干燥，即得SFSG提取物。

2.2 动物分组及造模

C57BL/6J小鼠40只，体质量18～22 g[湖南斯莱克景达实验动物有限公司，动物生产及使用许可证：SCXK（湘）2019-0004]。小鼠适应性喂养1周，自由进食与饮水，饲养温度（25±2）℃，湿度40%～60%。将小鼠随机分为正常对照组和模型组。禁食过夜后，模型组小鼠连续腹腔注射STZ [60 mg·kg^{-1}，0.1 mol·L^{-1}柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，pH 4.0）配制]5 d[9-10]，正常对照组小鼠注射相同体积的0.1 mol·L^{-1}的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。48 h后测定血糖，血糖浓度≥16.7 mmol·L^{-1}认为1型糖尿病小鼠模型构建成功。一周后，将模型组建模成功小鼠分为模型对照组、SFSG组以及阳性药物组，每组10只。SFSG组小鼠灌胃给予2.08 g/（kg·d）的SFSG提取物[0.5%的羧甲基纤维素钠（0.5%CMC-Na）混悬]。小鼠给药剂量换算依据为：人用最大剂量为16 g提取物·d^{-1}，按照体表面积计算小鼠使用剂量为2.08 g/（kg·d）。阳性药物组给予缬沙坦40 mg/（kg·d），给药体积为0.20 mL。正常对照组和模型对照组给予0.2 mL0.5%CMC-Na溶液。给药12周后收集尿液，测定体质量。将动物处死，收集血样和肾脏组织，对相应指标进行检测。

2.3 血糖、血尿素氮和血肌酐的测定

采集血液样本，室温下放置30 min，自然凝固。4 ℃、3000 r·min^{-1}离心15 min，收集上清液。分别使用相应的生化试剂盒测定血清中血糖、

肌酐和血尿素氮（BUN）的含量。

2.4 尿微量白蛋白的测定

收集各组小鼠 24 h 的尿液，采用尿微量白蛋白测定试剂盒测定 24 h 尿白蛋白含量。

2.5 组织染色

肾脏组织用 4% 的多聚甲醛固定 24 h，石蜡包埋，切片后，脱蜡。分别按照 HE、PAS 或 Masson’s 染色试剂盒染色，在光镜下观察、拍照。

2.6 组织炎症因子指标检测

取肾脏组织约 100 mg，加入试剂盒中匀浆液后用匀浆机打碎。12 000 r • min $^{-1}$、4 ℃离心 15 min，取上清液。测定上清液中 IL-6 和 TNF-α 的浓度。

2.7 Western blot 分析

取适量肾组织，按照每 100 mg 组织加入 1 mL RIPA 蛋白裂解液、10 μL 丝氨酸蛋白酶及巯基蛋白酶抑制剂。在冰浴条件下充分研磨，裂解 30 min，4 ℃、12 000 r • min $^{-1}$ 离心 15 min。取上清液，BCA 法测定蛋白浓度。配制 10% 的 SDS-PAGE 胶，每个凝胶孔中加入 30 μg 的蛋白样品。电泳完成后将蛋白转印至聚偏二氟乙烯膜上。5% 脱脂奶粉室温下封闭非特异性抗原 1 h，加入一抗 [β-actin、fibronectin、collagen4A1、p-IKKα/β（ser176）、IKKα/β、NF-κB p65、TGF-β、p-Smad2（Ser250）以及 p-NF-κB p65（S536），1∶500 稀释] 抗体，4 ℃孵育过夜。用 TBS-T 洗膜 3 次，每次 5 min。然后加入辣根过氧化物酶标记的二抗（1∶5000 稀释），37 ℃孵育 1 h。TBS-T 洗膜 3 次，每次 5 min。ECL 发光液显影成像。

2.8 统计分析

采用 SPSS20.0 软件进行统计学分析，数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组数据用 t 检验分析，多组间比较用 Student-Newman-Keuls’t（SNK）分析以及 Tukey’s 检验，$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 SFSG 延缓 DN 的进展

与正常对照组相比，模型对照组小鼠血糖、血尿素氮、血肌酐、24 h 尿微量白蛋白以及尿微量白蛋白与肌酐比（ACR）升高，而体质量降低。与模型对照组相比，SFSG 对血糖和体质量没有影响；SFSG 降低 DN 小鼠血尿素氮、血肌酐、尿微量白蛋白和 ACR 水平（见图 1）。

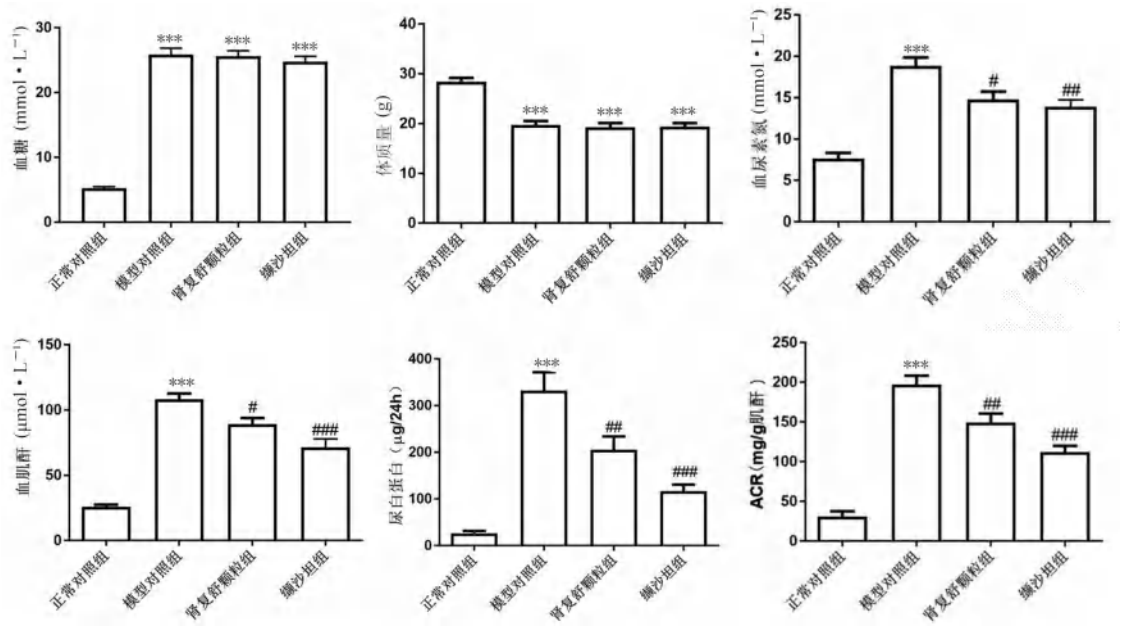


图 1 肾复舒颗粒对 DN 进展的影响

Fig 1 Effect of SFSG on the development of DN

注：与正常对照组相比，$^{***}P<0.001$；与模型对照组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$，$^{\#\#\#}P<0.001$。

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

3.2 SFSG 改善 DN 小鼠肾脏损伤

HE 染色结果表明，与正常对照组相比，模型对照组小鼠肾小球体积明显增加；相比于模型对照组，SFSG 组小鼠的肾小球面积明显降低（见图 2A 和 2B）。PAS 染色结果显示模型对照组小鼠肾小球系膜基质含量增加，SFSG 可明显降低系膜基质的含量（见图 3C 和 3D），这些结果说明 SFSG 对 DN 小鼠肾脏损伤具有保护作用。

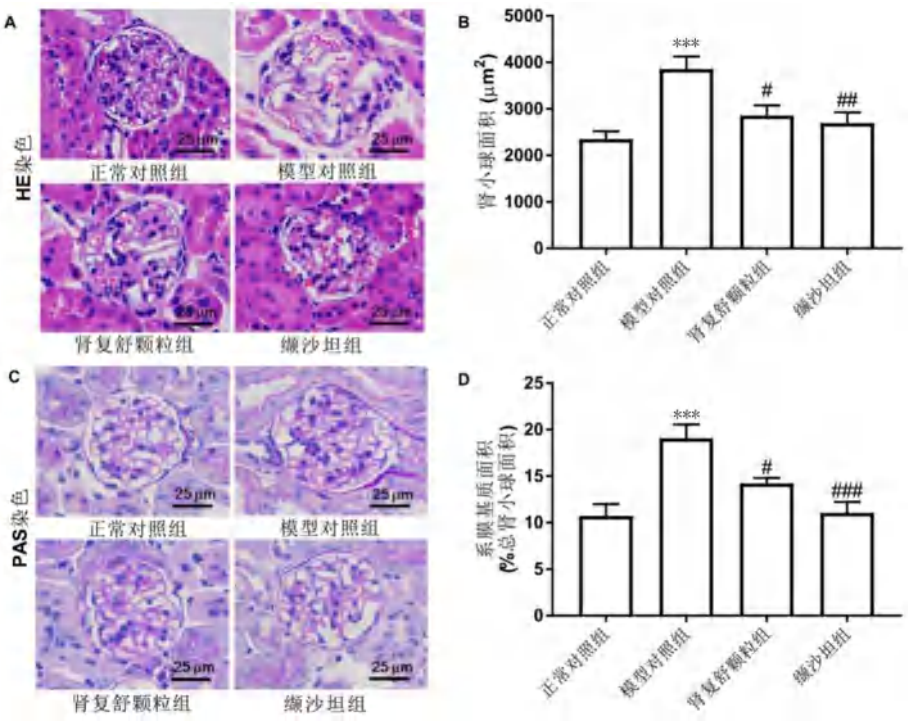


图 2　SFSG 对 DN 小鼠肾脏损伤的影响

Fig 2　Effect of SFSG on kidney tissue damage of DN mice

注：与正常对照组相比，$^{***}P < 0.001$；与模型对照组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$。

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

3.3　SFSG 改善 DN 小鼠肾组织的炎症水平

与正常对照组相比，模型对照组小鼠肾脏组织中 IL-6 和 TNF-α 的水平显著升高。与模型对照组相比，SFSG 给药组 IL-6 和 TNF-α 的水平显著降低（见图 3A 和 3B）。NF-κB 的磷酸化影响其转录活性，而 IKK 复合物是 NF-κB 信号通路的主要调节蛋白 [11]。与正常对照组相比，模型对照组小鼠肾脏组织中 p-NF-κB p65（S536）/NF-κB p65 以及 p-IKKα/β（ser176）/ IKKα/β 的水平明显增加，而 SFSG 可抑制 p-NF-κB p65（S536）/NF-κB p65 以及 p-IKKα/β（ser176）/ IKKα/β 水平的增加。这些结果表明 SFSG 改善 DN 小鼠肾组织的炎症水平。

3.4　SFSG 降低 DN 小鼠肾脏纤维化

Masson’s 染色结果显示，与正常对照组相比，模型对照组小鼠肾小球和肾小管中胶原纤维的含量显著升高；而相比于模型对照组，SFSG 可抑制肾脏组织中胶原纤维的升高（见图 4A）。TGF-β1/Smads 信号通路在肾脏纤维化发生、发展过程中发挥重要作用。相比于正常对照组，模型对照组小鼠肾脏组织中 p-smad2（ser250）、TGF-β、fibronectin 以及 collagen4A1 的表达明显升高，而 SFSG 可显著抑制这种改变（见图 4B）。

4　讨论

长期高血糖与 DN 的进展密切相关，高血糖使肾脏血流动力学和代谢途径改变，引起致肾损伤的不同信号通路的激活 [12]。通过控制患者的血糖水平，可延迟 DN 的进展。DN 的发病机制复杂，多种因素参与了其发病机制，包括晚期糖基化终产物的积聚、血流动力学变化、炎症反应、自噬、细胞死亡和表观遗传调控等 [13-14]。DN 最具特征性的病理改变是肾小球肥大、基底膜增厚、肾小球系膜和肾小管间质基质扩张 [15]。目前仍然缺乏针对 DN 的特异性治疗方法。深入研究 DN 的发病机制，开发有效的治疗药物，对 DN 的防治极为重要。临床应用证明 SFSG 是一种安全、有效的治疗慢性肾衰的药物 [16]。本研究发现 SFSG 可降低 DN 小鼠血肌酐、血尿素氮以及尿微量白蛋白的水平，说明 SFSG 可延缓 DN 的进展。

目前，大量证据表明炎症在 DN 的发病机制中起重要作用 [3]。活化的 NF-κB 经核转位后调节细胞因子的转录，产生各种趋化因子和炎症因子。在正常状态，NF-κB 与 IκB 形成复合物存在于胞质中，应激状态下，活化的 IKKα/β 使 IκB 磷酸化进而降解，激活 NF-κB[17]。本实验结果显示，

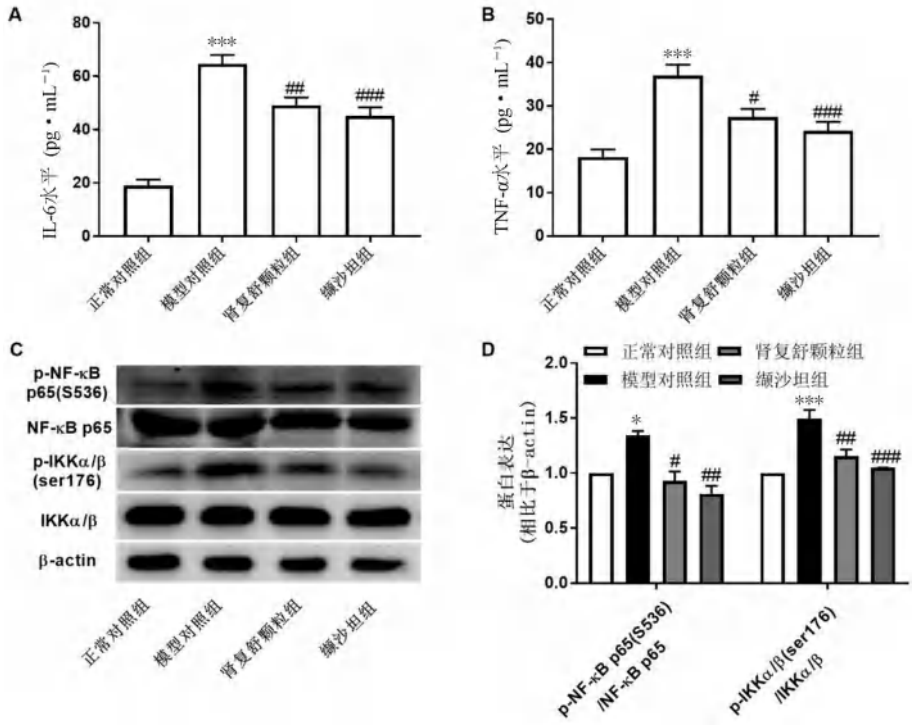


图 3 SFSG 对 DN 小鼠肾脏炎症水平的影响

Fig 3 Effect of SFSG on the inflammatory levels of kidney of DN mice

注：与正常对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{***}P < 0.001$；与模型对照组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$。

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

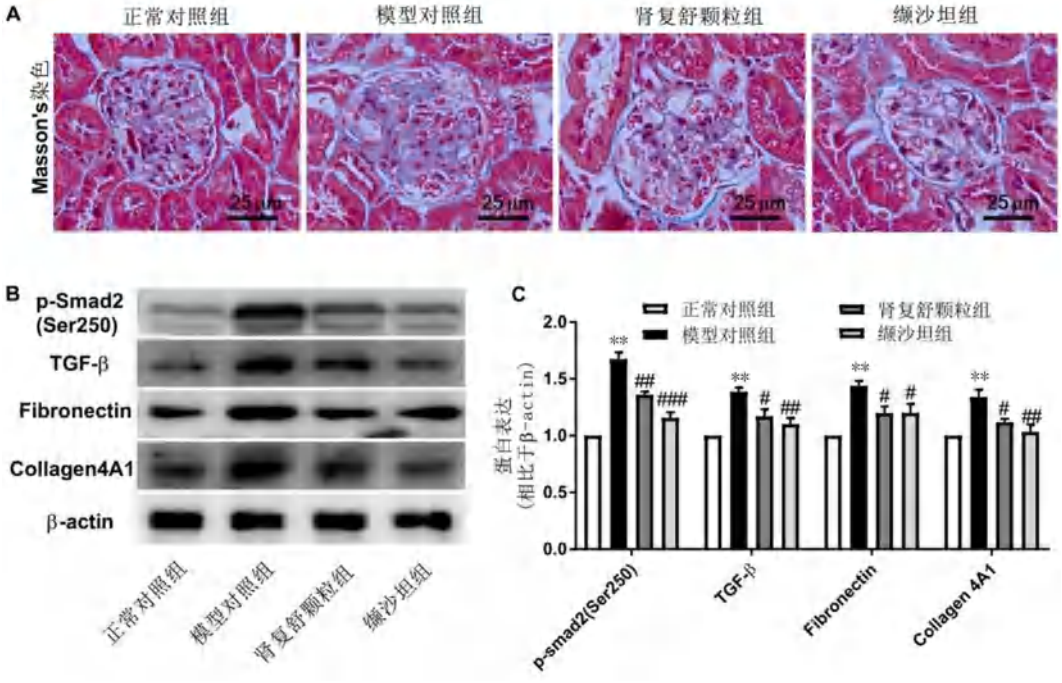


图 4 SFSG 对 DN 小鼠肾脏纤维化的影响

Fig 4 Effect of SFSG on the renal fibrosis of DN mice

注：与正常对照组相比，$^{**}P < 0.01$；与模型对照组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$。

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

SFSG 降低 DN 小鼠肾脏组织中炎症因子 IL-6 和 TNF-*α* 的水平，同时降低 NF-*κ*B 和 IKK 的磷酸化水平。这些研究表明 SFSG 可抑制 DN 小鼠肾脏的炎症水平。

在病理学上，DN患者的肾脏经历了多种变化，包括细胞外基质蛋白的沉积、肾小球基底膜增厚和肾小管萎缩，最终导致间质纤维化和肾小球硬化[15，18]。纤维化的特征是细胞外基质如fibronectin和collagen4A1的沉积增加。高糖及其代谢产物可诱导TGF-β1的表达增加。TGF-β1通过与TGF-β受体2（TGFBR2）结合后激活TGFBR1，导致Smad2/3的募集。激活的Smad2/3复合物转移到细胞核中，转录下游基因，如fibronectin[19]。阻断TGF-β/Smad信号传导可有效防止DN的进展[20-21]。本研究结果显示SFSG可降低DN小鼠肾脏组织的纤维化，以及降低TGF-β、p-Smad2（Ser250）、fibronectin和collagen4A1的表达，均说明SFSG对DN小鼠肾脏纤维化有抑制作用。

本研究发现SFSG可明显延缓DN的进展，其机制可能与抑制肾脏炎症以及纤维化有关。本研究为SFSG治疗慢性肾衰的作用提供了实验依据。

参考文献

[1] Wang H，Zhang R，Wu X，et al. The Wnt signaling pathway in diabetic nephropathy [J]. Front Cell Dev Biol，2021，9：701547.

[2] Chen J，Luo SF，Yuan X，et al. Diabetic kidney disease-predisposing proinflammatory and profibrotic genes identified by weighted gene co-expression network analysis（WGCNA）[J]. J Cell Biochem，2022，123（2）：481-492.

[3] Nicholas SB. Novel anti-inflammatory and anti-fibrotic agents for diabetic kidney disease-from bench to bedside [J]. Adv Chronic Kidney Dis，2021，28（4）：378-390.

[4] Yang C，Feng Q，Liao H，et al. Anti-diabetic nephropathy activities of polysaccharides obtained from termitornyces albuminosus via regulation of NF-κB signaling in db/db mice [J]. Int J Mol Sci，2019，20（20）：5205.

[5] Shu S，Zhang Y，Wang Q，et al. Liuwei dihuang pill attenuates diabetic nephropathy by inhibiting renal fibrosis via TGF-β/Smad2/3 pathway [J]. Comput Math Methods Med，2022，2022：5063636.

[6] 钟燕，邓小云，赵程程，等 . 2012-2016年中南大学湘雅二医院肾复舒颗粒应用分析 [J]. 中国医院用药评价与分析，2017，17（3）：300-303.

[7] Liu F，Li Y，Wang F，et al. Shenfushu granule and atropine attenuate microvasculature loss in rat models with 5/6 nephrectomy [J]. Ren Fail，2012，34（5）：600-609.

[8] 李智慧，白运焕，蒋亚芬，等 . 中药肾复舒颗粒对慢性肾衰患者血硫酸吲哚酚浓度的影响 [J]. 中南药学，2017，15（4）：537-539.

[9] Chen Y，Li X，Hua Y，et al. RIPK3-mediated necroptosis in diabetic cardiomyopathy requires CaMKII activation [J]. Oxid Med Cell Longev，2021，2021：6617816.

[10] Han X，Tao YL，Deng YP，et al. Metformin ameliorates insulitis in STZ-induced diabetic mice [J]. Peer J，2017，5：e3155.

[11] Antonia RJ，Hagan RS，Baldwin AS. Expanding the view of IKK：new substrates and new biology [J]. Trends Cell Biol，2021，31（3）：166-178.

[12] Bahreini E，Rezaei-Chianeh Y，Nabi-Afjadi M. Molecular mechanisms involved in intrarenal renin-angiotensin and alternative pathways in diabetic nephropathy-a review [J]. Rev Diabet Stud，2021，17（1）：1-10.

[13] Li X，Lu L，Hou W，et al. Epigenetics in the pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. Acta Biochim Biophys Sin（Shanghai），2022，54（2）：1-10.

[14] Zhou T，Lee A，Lo ACY，et al. Diabetic corneal neuropathy：pathogenic mechanisms and therapeutic strategies [J]. Front Pharmacol，2022，13：816062.

[15] Thomas MC. Targeting the pathobiology of diabetic kidney disease [J]. Adv Chronic Kidney Dis，2021，28（4）：282-289.

[16] 蒋云生，罗季安，湛建国，等 . 中西医结合胃肠透析与腹膜透析治疗尿毒症疗效对比 [J]. 中国中西医结合杂志，1994，（S1）：151-152.

[17] Barnabei L，Laplantine E，Mbongo W，et al. NF-κB：At the borders of autoimmunity and inflammation [J]. Front Immunol，2021，12：716469.

[18] Samsu N. Diabetic nephropathy：challenges in pathogenesis，diagnosis，and treatment [J]. Biomed Res Int，2021，2021：1497449.

[19] Hocevar BA，Brown TL，Howe PH. TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun *N*-terminal kinase-dependent，Smad4-independent pathway [J]. EMBO J，1999，18（5）：1345-1356.

[20] Wilson PG，Thompson JC，Yoder MH，et al. Prevention of renal apoB retention is protective against diabetic nephropathy：role of TGF-β inhibition [J]. J Lipid Res，2017，58（12）：2264-2274.

[21] Liu P，Wang C，Wang Y，et al. Zishen qingre tongluo formula improves renal fatty acid oxidation and alleviated fibrosis via the regulation of the TGF-β1/Smad3 signaling pathway in hyperuricemic nephrology rats [J]. Biomed Res Int，2021，2021：2793823.

（收稿日期：2022-04-11；修回日期：2022-05-23）

综述

药物递释系统用于肝纤维化的开发与思考

许青[1, 2]，刘莉莎[1, 2]，杨磊[1, 2]，尹莉芳[1, 2*]（1.中国药科大学药学院药剂系，南京 210009；2.国家药监局药物制剂及辅料研究与评价重点实验室，南京 210009）

摘要：肝纤维化是由多种致病因素导致的一种进程性慢性疾病，低渗透性的病理环境及肝内非特异性的细胞摄取使得传统药物递送系统的疗效并不显著。本文分析了肝脏中四种主要的细胞在肝纤维化疾病进程中的作用，并按细胞类型对肝纤维化的主要治疗靶点的药物递送系统进行综述。相较于传统剂型，纳米药物在提高小分子化药及大分子药物生物利用度和靶向效率优势明显，为后续新靶点和新机制的药物开发提供参考。同时，本文思考了肝纤维化治疗的局限性，从生理和病理条件进行探讨，为改善纤维化药物递送系统的开发提供新的思路。

关键词：肝纤维化；治疗靶点；药物递送系统

中图分类号：R944 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1344-10

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.021

Drug delivery systems for liver fibrosis and prospect

XU Qing[1, 2], LIU Li-sha[1, 2], YANG Lei[1, 2], YIN Li-fang[1, 2*] (1. *Department of Pharmaceutics*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 210009; 2. *NMPA Key Laboratory for Research and Evaluation of Pharmaceutical Preparations and Excipients*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 210009)

Abstract: Hepatic fibrosis (HF) is associated with multiple etiological factors, which can lead to severe liver cirrhosis and may progress into hepatocellular carcinoma. To date, there is no standard therapy for liver fibrosis, due to the poor penetration and inevitable non-specific uptake. We reviewed the role of four primary cells in HF and summarized the representative therapeutic targets. Furthermore, we focused on recent advances in emerging nanomedicine, which have advantages of improving the bioavailability and targeting efficiency. There is still a long way to go before the clinic translation of nanomedicine in HF treatment. In the end, we discussed the pathological limitations and possible synergistic strategies, which may direct the design of anti-fibrotic delivery systems in the future.

Key words: hepatic fibrosis; therapeutic target; drug delivery system

1 肝纤维化概述

肝纤维化是由多种病因学因素引起的一种进程性慢性疾病，包括酗酒、慢性病毒性肝炎、酒精性肝炎、非酒精性脂肪肝炎（NASH）、原发性胆汁性肝硬化、自身免疫性疾病与代谢疾病等[1-2]。该疾病主要以细胞外基质（ECM）过度异常的沉积为特征，是肝脏对各种病因导致的慢性损伤的一种自我修复机制，肝纤维化最终会发展为肝硬化、肝癌等晚期肝病[3-4]。截至目前，全球仍没有任何一款治疗肝纤维化的药物成功上市，因此该领域亟需新的有效的治疗药物。肝纤维化涉及多种细胞因子和肝脏细胞，肝实质细胞（HC）发生损伤和凋亡，同时免疫细胞会大量募集和浸润至损伤区域，释放多种炎性细胞因子和趋化因子，这些因子中大多对肝星状细胞（HSC）和成纤维细胞具有促炎或直接纤维化作用，共同参与疾病的形成[5-6]。各类细胞在肝纤维化进程中的作用见图 1。

基金项目：国家自然科学基金面上项目（No.81871477；No.81673377）。

作者简介：许青，女，硕士研究生，主要从事肝纤维化药物递送系统研究，email：15151862912@163.com *通信作者：尹莉芳，女，教授，博士研究生导师，主要从事缓控释制剂、口服固体制剂、纳米给药系统及产业化，email：lifangyin_@163.com

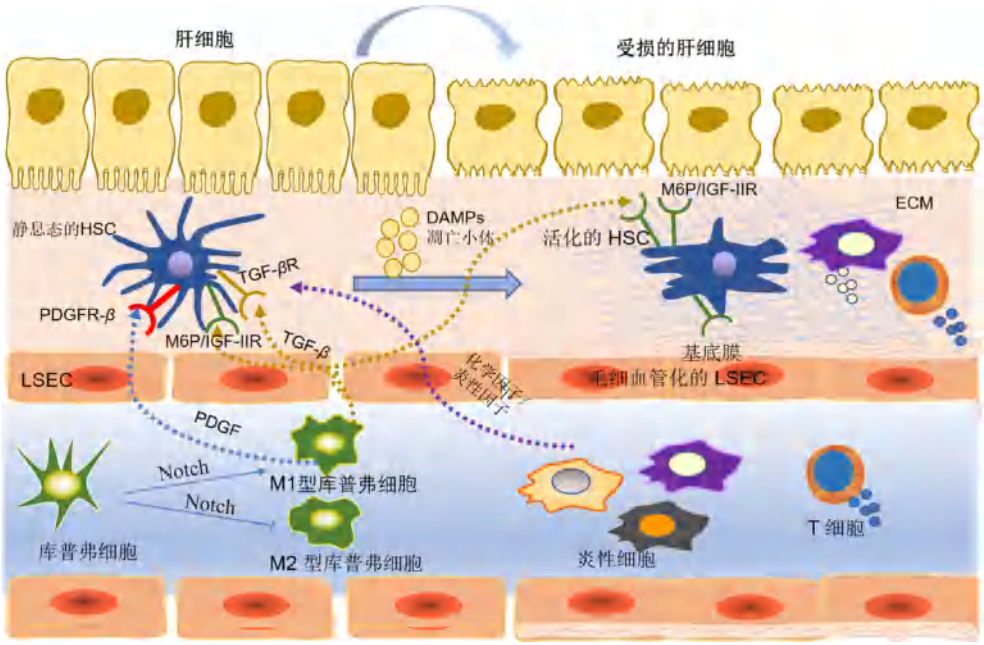


图 1　肝脏中的主要细胞类型在肝纤维化进程中的作用

Fig 1　Role of main cell types in the liver fibrosis

1.1　肝星状细胞

HSC 存在于肝血窦腔内（Disse 腔），占所有肝细胞的 5% ～ 8%[7]。HSC 在正常肝脏中处于静息态，α-平滑肌动蛋白（α-SMA）的表达极低，主要承担存储和代谢脂肪，合成和分泌胶原及糖蛋白的功能，含有大量的维生素 A 的脂滴，是体内维生素 A 的储库。HSC 是维持肝窦微环境稳态旁分泌、自分泌、近分泌和趋化因子的中心枢纽[8]。在正常生理条件下，HSC 可以分泌胶原酶和基质金属蛋白酶，降解 ECM，使 ECM 处在一个动态平衡的状态。然而在疾病状态下，HSC 的激活是一个广泛而复杂的调控过程。其受到 HC 和非实质细胞相互作用，由邻近的窦状内皮细胞（LSEC）、库普弗细胞（KC）、内皮细胞和肝细胞以及血小板和白细胞的旁分泌刺激引发，HSC 会进一步分化为成纤维细胞，快速增殖并大量形成胶原和其他 ECM，驱动纤维化过程[9-10]。这一调控过程对肝纤维化形成至关重要，影响肝脏的正常生理功能。

1.2　肝巨噬细胞

巨噬细胞在抗原的处理和传递、机体免疫应答的调节、病原体的吞噬方面发挥着重要的防御作用，是肝脏固有免疫系统的重要组成成分[11]。根据其起源可将肝脏内的巨噬细胞分为两类：一类是 KC，作为肝脏中常驻巨噬细胞，存在于肝血窦内，KC 承担吞噬病原体、内毒素、生物碎片及抗原等，保护肝脏免受感染。在肝脏发生炎症或组织损伤时，吞噬坏死的肝细胞，维持肝脏稳态[12-13]。KC 可通过 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3（NLRP3）炎性小体、转化生长因子 -β（TGF-β）和血小板衍生生长因子（PDGF）通路刺激 HSC 活化从而促进肝纤维化。此外，KC 会与肝滞留和血液循环中的其他免疫细胞比如 NK 细胞、T 细胞和单核细胞等共同参与肝纤维化的形成，当肝脏受到严重损伤时，坏死肝细胞分泌的凋亡小体刺激 KC 向 M1 型转变，产生 IL-6、TNF-α、TGF-β 和 IL-1β 等促炎因子及促纤维化因子。另一类是单核细胞衍生的巨噬细胞（MoMF），利用趋化作用从骨髓单核细胞、脾脏单核细胞和腹腔巨噬细胞浸润至损伤的肝脏组织，通过释放促炎和促纤维化的细胞因子，参与肝纤维化的发生发展[12]。其中，大部分的表型为 Ly-6C^{high} 单核巨噬细胞高度表达的趋化因子 CCR2 通过 CCR2 受体直接激活 HSC 来促进肝纤维化进展[11]。

1.3　肝实质细胞

HC 是肝脏中最丰富的细胞，占肝脏细胞总数的 60% 以上，体积占整个肝组织的 80% 以上。HC 负责体内重要的代谢、内分泌以及分泌功能。肝细胞富含粗面内质网、线粒体和高尔基体，而体内绝大多数细胞含量很少，使得肝脏合成蛋白质和脂质异常活跃，肝脏的修复能力很强。慢性肝损伤后炎症反应引发持续性的 HC 损伤，HC 发生活化、变性、侵袭并产生一系列转录因子，

产生的凋亡小体直接诱导 HSC 活化和 ECM 沉积，并伴随 TGF-β 以及炎症因子的释放 [14]。损伤相关模式分子（DAMPs）由凋亡的 HC 在细胞膜破裂后释放，间接激活静息状态下的 HSC，促进其分泌 ECM[15]。此外，HC 凋亡后留下的细胞间隙将很快被 ECM 和胶原占据，从而加速肝纤维化的发病进程。因此，改善 HC 损伤及凋亡是防治肝纤维化的有效治疗途径之一。

1.4 窦状内皮细胞

LSEC 是肝脏中主要的非实质细胞，构成肝血窦的窦壁。LSEC 缺乏隔膜和基底膜，使其成为人体内渗透性最强的内皮细胞，以便肝脏与血流进行物质交换，这一特征也与药物的肝脏高摄取及清除率相关。除了构成肝窦屏障，LSEC 也具有过滤、内吞、抗原呈递和募集炎性细胞的功能，维持肝脏的免疫稳态并调控肝损伤期间的免疫反应 [16]。正常条件下，LSEC 可保护 HSC 免受激活，甚至可以逆转激活的 HSC。当机体发生慢性肝损伤后，LSEC 发生毛细血管化，产生和释放可溶性因子，这一过程先于 HSC 和巨噬细胞活化及肝纤维化的发生 [17-18]。LESC 产生的纤连蛋白可以影响 HSC 表型，促进其活化。

2 用于肝纤维化治疗的药物递送系统

2.1 纳米药物的肝脏分布特征

针对肝纤维化的纳米药物主要以静脉注射方式给药，直接进入血液循环。30% ～ 99% 的未修饰的纳米粒在肝脏部位蓄积 [19]，有利于肝脏疾病的治疗。纳米粒本身的性质，如粒径、表面电荷、表面修饰特性均会在制剂的体内生物分布发挥极为重要的作用，影响其安全性和有效性。

人和动物的肾脏布满 10 nm 的细胞间隙，以便分子通过尿液排出，如果尺寸大于 10 nm 会引起其血液循环滞留时间延长。在肝脏中，由于正常 LSEC 孔隙为 50 ～ 200 nm，因此粒径低于 200 nm 的纳米颗粒可以穿过肝血窦，从而有可能到达肝细胞或 HSC，而更大尺寸的颗粒容易被 KC 吞噬 [20]。一般情况下，纳米粒易于在血液循环中被网状内皮系统（RES）清除，肝脏中的 KC 也属于 RES 的一部分，在纳米粒的体内消除中起着至关重要的作用，纳米粒尺寸大于 100 nm 易在肝、肺和脾等组织中蓄积，加速清除效率。聚乙二醇（PEG）修饰或其他亲水性表面的纳米颗粒可以降低其在 RES 的非特异摄取，有利于在肝脏中的累积。其次，纳米材料的表面电荷要在细胞内化能力和血清稳定性之间取得平衡，既需要具有适当的正电荷维持膜亲和力，又需要避免血液中各种蛋白的黏附，为便于纳米粒进入细胞，表面需要保持电中性。

2.2 肝纤维化药物递送系统类型

临床上从未停止对肝纤维化药物开发的步伐，然而尚无针对肝纤维化的化药制剂批准上市。Selonsertib 在Ⅲ期临床（NCT03053050、NCT03053063）未表现出纤维化明显改善，部分受试者因严重的不良反应而终止给药 [21]。Elafibranor 在治疗中重度非酒精性脂肪性肝炎（NASH）时，与安慰剂组无显著性差异（NCT02704403）[22]。中药单体如黄芩苷、水飞蓟宾、白藜芦等在体外有明显的抗纤维化活性，然而水溶性差制约了其生物利用度，体内药效不尽如人意 [23]。为了达到更高的抗肝纤维化效果和较低的毒副作用，不断发展的药物递送技术为抗肝纤维化提供了新思路。目前用于肝纤维化的新型药物递送系统包括脂质体、脂质纳米粒、胶束、无机纳米粒以及仿生载体制剂等（见表 1）。根据药物自身性质设计递送系统，改善药物的溶解性，实现药物缓释，提高生物利用度；通过改进纳米粒的处方和工艺以调整其表面性质，或修饰特定的靶向分子，实现肝脏相应靶点的精准调控与治疗。

2.3 用于不同肝脏细胞的药物递送系统

有效的药物递送需要经历受体识别，入胞及胞内释药的级联过程。除了优化纳米载体的粒径和电位等物理性质以提高药物在肝脏中的分布外，还可以将可识别肝细胞表面受体的靶向基团修饰在递送载体的表面，以提高药物的肝脏靶向能力，如维生素 A 可以通过与视黄醇蛋白结合，作用于 HSC 上的视黄醇受体，从而实现纤维化药物的 HSC 靶向递送 [36]。CD44 在活化的 HSC 中过表达，透明质酸（HA）是其特异性受体，聚乳酸（PLA）纳米粒经 HA 修饰后靶向活化的 HSC，释放活性成分姜黄素产生抗纤维化作用 [37]。通过甘露糖化修饰来靶向 KC 细胞，递送抗炎药物，也是肝纤维化治疗的一种重要策略。针对复杂的肝纤维化发病机制，需要研究者针对不同靶点进行药物筛选，实现精准的协同治疗。

2.3.1 抑制活化的肝星状细胞 肝纤维化的主要病理特征是胶原和 ECM 的过度表达，均由活化的 HSC（aHSC）产生，因此，aHSC 是肝纤维化治疗的关键靶细胞。TGF-β 由 HSC 细胞产生，是肝纤维化的关键推动者，被认为是潜在的纤维化形成细胞因子。TGF-β1 被认为是 aHSC 表达最多的一个亚型，当 TGF-β 与 TGF-βRⅡ结合时，

表 1 关于肝纤维化的药物递送系统

Tab 1 Drug delivery system of hepatic fibrosis

递送系统	药物	作用机制	设计策略	文献
脂质体	SB431542	抑制 TGF-β/Smad 通路而阻断 HSC 激活	脂质体改善脂溶性 SB431542 的包载	[24]
	Y-27632	抑制 ROCK 通路而阻断 HSC 激活	维生素 A 修饰以实现 HSC 靶向，减轻全身给药的不良反应	[25]
	维莫德吉	抑制 Hh 信号而抑制 HSC 的激活和增殖	通过 cRGDyK 环肽修饰靶向 $\alpha_v\beta_3$，实现 aHSC 的靶向递送	[26]
脂质纳米粒	siCol1a1	降低非实质细胞中 Col1a1 的表达，改善胶原沉积	C12-200 LNP 可使 siCol1a1 在血清中 24 h 内保持稳定，粒径约 80 nm，避免 RES 吞噬，肝脏蓄积强	[27]
	gp46 siRNA	沉默胶原蛋白特异性伴侣分子 gp46 表达而抑制胶原的形成	通过环肽 pPB 修饰，可实现 aHSC PDGFR-β 的靶向	[28]
	HNF4A mRNA	恢复受损肝细胞 HNF4A 水平，诱导内源性 HNF4A 表达，改善肝细胞的代谢水平	构建脂质纳米粒成功装载 mRNA，特异性递送至肝脏中的肝细胞	[29]
胶束	MDB5	抑制 Hh 信号而抑制 HSC 的激活和增殖	采用 PEG-PCC-g-DC 聚合物材料构建胶束，保证药物高载药量，延长体内的循环时间	[30]
	视黄酸和 DOX	破坏 aHSC 的高尔基体，从而下调胶原的表达	构建 CS-DOCA 两亲性材料，CS 可与 aHSC CD44 受体结合，实现 aHSC 靶向递送	[31]
	氯沙坦	抑制血管紧张素Ⅱ的表达，从而阻断其 aHSC AT1 受体活性，发挥抗纤维化和抗炎作用	构建壳聚糖 - 胆红素材料，实现 aHSC 靶向；胶束可改善氯沙坦的水溶性，提高生物利用度	[32]
无机纳米粒	丹酚酸 B	采用抗氧化剂消除 ROS，抑制 HSC 的激活	MSN 修饰罗丹明 B 使其带正电，便于药物装载，可实现药物缓释	[33]
仿生载体	miR-181-5p	下调 Stat3 和 Bcl-2 并激活 HST-T6 细胞的自噬	分离 miR181-5p-ADSC 外泌体，利用归巢效应实现 miR181-5p 的靶向性递送	[34]
	ODN	调控转录因子 RBP-J，进而影响 Notch 通路，调控巨噬细胞，发挥抗炎作用	利用外泌体递送 ODN，保证药物的稳定性，提高药物的靶向性	[35]

TGF-βRⅠ发生活化，以 Smad2/3 的磷酸化为主激活下游通路，最终促使 HSC 的活化 [38]。

目前很多研究都已发现 miR 在 HSC 活化时的表达发生显著变化，其中 miR-142-3p 被证实随疾病进展而表达水平降低 [39]，其主要机制是通过靶向 HSC 的 TGF-βRⅠ，阻断 TGF-β-Smad 通路，从而抑制 HSC 的活化。当 Broermann 等 [40] 用磷酸二酯酶 5 抑制剂处理四氯化碳（CCl_4）诱导的模型大鼠时，大鼠纤维化程度得到改善，血浆外泌体中的 miR-142-3p 表达升高，这主要是由于 miR 通常由细胞外泌体囊泡装载和传递，调节受体细胞的功能。目前，已有课题组利用胞外囊泡手段将 miR-142-3p 用于乳腺癌 [41] 和特发性肺纤维化 [42] 的研究，该指标在肝纤维化中作为疾病进展的诊断监测与治疗靶点的作用也不容小觑，但尚未开发针对肝纤维化的 miR-142-3p 药物递送系统。

此外，aHSC 的甘露糖 -6- 磷酸 / 胰岛素样生长因子受体（M6P/IGF-ⅡR）在肝纤维化发展过程中表达上调，正常肝脏中的静息态 HSC 仅表达少量的 M6P/IGF-ⅡR。相关文献显示，TGF-β结构中有 2 个糖基化位点是甘露糖 -6- 磷酸，使 TGF-β能与 M6P/IGF-ⅡR 结合 [43]，激活 HSC，从而促进纤维形成。通过合成 M6P 修饰的人血清白蛋白，细胞摄取实验证明 M6P 取代度愈高，肝脏蓄积量愈高，可实现对肝脏 HSC 的靶向。将 18β- 甘草次酸与 $M6P_{26}$-HSA 共价结合，制备纳米制剂，其在胆管结扎的纤维化大鼠模型中，迅速在肝脏蓄积，显著减轻了纤维化程度 [44-45]。18β- 甘草次酸可通过抑制游离脂肪酸诱导的脂肪毒性发挥作用，同时 TGF-β能识别 M6P/IGF-ⅡR 产生促纤维化作用，以 M6P/IGF-ⅡR 为受体的药物递送载体可以竞争性抑制 TGF-β与 M6P/IGF-ⅡR 的结合，本身也具有一定的抗纤维化作用。由于配体 M6P 带有负电荷，可能会与 KC 或 LSEC 表面的清道夫受体结合而消弱对 HSC 的靶向性，需要寻找针对 M6P/IGF-ⅡR 靶点的新思路和新策略。

PDGF 作为受体酪氨酸激酶家族的一员，是肝纤维化中参与 HSC 的活化与增殖的最关键因素之一。PDGF 家族存在四个亚型，其中二聚体 PDGF-BB 是促进 HSC 活化的最强推动剂。在 HSC 发生激活后 PDGFR-β表达显著上调，当 PDGF-BB 与 HSC 上的 PDGFR-β结合后，诱导细胞质结构域内酪氨酸残基的自磷酸化，导致受体相关蛋白的募集和激活，促使 HSC 的激活。伊马替尼作为一种强效的酪氨酸激酶抑制剂，对 PDGFR-β半数抑制浓度仅为 100 nmol • L^{-1}，El-Mezayen 等 [46] 制备了载有伊马替尼的维生素 A 修饰的脂质体，其中维生素 A 用于靶向 HSC，伊马

替尼发挥 TGF-β 和 PDGF 双重抑制作用。另一种酪氨酸激酶抑制剂——尼洛替尼，不仅对 TGF-β 及 PDGFR-β 起到双重抑制作用，还具有一定的抗炎活性，给药剂量分别为 5 mg • kg^{-1} 和 10 mg • kg^{-1}，可显著改善大鼠模型中的纤维化指标[47]。Fan 等[48]设计了一个胶原酶和视黄醇修饰的胶束系统来递送尼洛替尼，一方面降解胶原以实现药物的 ECM 穿透能力，另一方面由于视黄醇对 HSC 有着天然的靶向性，可实现药物的 HSC 靶向递送，该纳米递药系统在小鼠肝纤维化模型中展现出良好的抗纤维化活性。尽管 PDGFR-β 在 aHSC 的表达随疾病进展而逐渐上调，进展到晚期肝硬化时该受体在肾脏中会过表达，因此采用 PDGFR-β 的靶向策略需考虑肝纤维化的病程阶段，设计合适的递送系统。

PI3K/AKT/mTOR 作为 PDGFR 的一条典型的下游通路，也是肝纤维化的重要治疗靶点之一（见图 2）。PDGFR-β 将刺激信号分子转导至细胞内，激活 PI3K 信号，促使 AKT 进一步激活，抑制 TSC1/TSC2，促进 mTOR 复合物的形成[49]。其中，mTOR1 促进血管内皮生长因子（VEGF）的表达，推动 HSC 的激活[50]，mTOR2 可调控 AKT。两者在不同的生理病理条件下比例发生改变，发挥双向调控作用。Ji 等[51]设计了一种 cRGDfK 修饰的 PEG-PLGA 纳米粒共递送 Germacrone 和 miR-29b，其中 cRGDfK 靶向 HSC 表面的整合素受体 $\alpha_v\beta_3$，小分子药物和基因药物联合应用后，对 aHSC 产生显著的细胞毒性，改善了 CCl_4 诱导的小鼠肝纤维化症状。Ren 等[52]利用 HA 天然靶向 aHSC 的 CD44 受体的特性，共同递送 LY294002 和 Oridonin，经 PI3K/AKT 通路发挥抗炎和抗氧化的功效，从而改善纤维化程度。

HSC 另外一个靶点是细胞核中的过氧化物酶体增殖物激活受体（PPAR），这是执行转录控制的核激素受体，与肝纤维化有关。HSC 从静息状态转化至成纤维细胞时，PPARγ 表达降低。PPARγ 可以抑制 TGF-β1 和 PDGFRβ 诱导的 HSC 激活[53]，具有明确的抗纤维化作用。罗格列酮增加 PPARγ 表达，从而抑制 HSC 激活。在 CCl_4 刺激的大鼠慢性肝损伤模型中，基于 M6P-HSA 的罗格列酮的递送增加了药物的肝脏积聚，抑制了 HSC 的激活并减轻了纤维化[54]。替米沙坦具有 PPARγ 激动和 AT1R 阻断双重作用，将其制备成纳米乳制剂，提高了肝纤维化的治疗效果[55]。

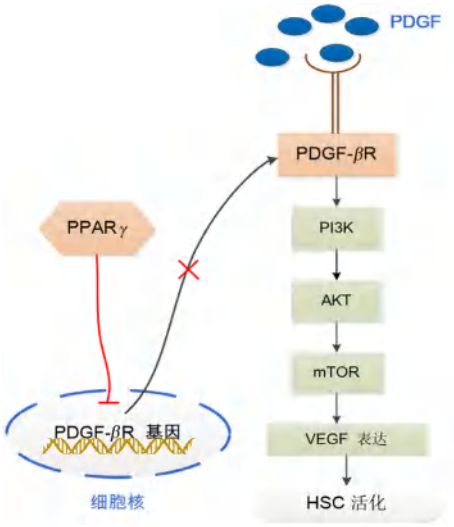


图 2 与 HSC 活化相关的 PDGF 相关通路

Fig 2 PDGF pathway related to the activation of HSC

2.3.2 调控肝巨噬细胞 在肝纤维化疾病中，驻留的 KC 在损伤因素的刺激下发生激活，促使肝脏产生局部的炎症反应，并通过招募外周的 MoMF，共同加剧了肝脏的纤维化程度。巨噬细胞为纤维化治疗的重要靶细胞，本文从抗炎、抗氧化以及细胞极化相关治疗靶点的纳米制剂对其进行阐释。

① 抗炎：肝脏受到损伤时，KC 通过损伤相关分子模式（DAMPs）和病原体相关分子模式（PAMPs）而发生激活。主要是 Toll 样受体（TLR）损伤信号[56]，产生炎症小体，分泌炎症因子和趋化因子，并进一步加剧肝损伤和纤维化程度。TLR 介导的肝脏炎症反应主要通过两条途径实施：TLR-TIRAP/MyD88-NF-κB 和 TRIF/TRAM-IRF-NF-κB（见图 3）[57-58]。Younis 等[59]研究发现牛磺酸可以通过 TLR4/NF-κB 信号转导的调节，产生抗纤维化作用。Eritoran 作为一种 TLR4 拮抗剂，当作用于纤维化小鼠时，显著下调了 MyD88 和 NF-κB p65 的表达，缓解了小鼠的肝脏炎症及纤维化程度[60]。

② 抗氧化：当肝脏受到损伤时，巨噬细胞会释放大量的活性氧（ROS），诱导 HSC 转型和 HC 凋亡，从而加速纤维化进程，因此应用抗氧化剂可以抑制肝纤维化的发展。据报道 MoMF 释放的 NOX2 所产生的 ROS 会加重肝纤维化进程。Maeda 等[61]制备了一种甘露糖修饰的多巯基化人血清白蛋白纳米制剂（SH-Man-HSA），甘露糖修饰可使其靶向巨噬细胞的相关受体，多巯基化可以产生抗氧化作用，在小鼠肝纤维化模型中，SH-Man-HSA 明显改善了小鼠的纤维化症状，降

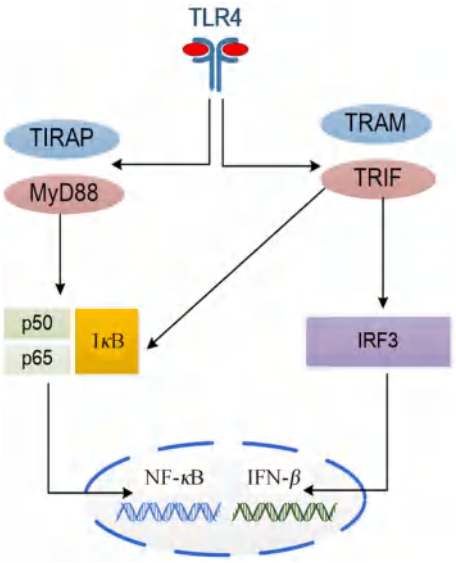


图 3　与 KC 炎症相关的 TLR4 通路

Fig 3　TLR4 pathway related to the inflammation of KC

低了氧化应激水平。Shin 等[62]采用 8- 羟基脱氧鸟苷（8-OHdG）NOX 抑制剂，显著改善了模型大鼠的肝纤维化程度，并且证明了该药物可以抑制 HSC 中 NOX1 和 NOX2 的表达。肝脏中多种细胞均表达 NOX，该抑制剂可以作用于多个细胞，抑制 ROS 的生成以治疗疾病。可以通过特定修饰，用纳米载体递送外源性的 8-OHdG，实现对巨噬细胞的精准靶向。此外，部分氧化还原型纳米粒也具有抗氧化和降低肝脏中氧化应激的作用，比如 CeO_2 纳米粒具有抗氧化和清除自由基的能力，利用其在 KC 中的蓄积效应，显著降低 NF-κB 的表达，发挥抗炎活性，改善 CCl_4 诱导的急性肝损伤程度[63]。氧化应激和炎症存在紧密联系，两者相互诱导并加重肝纤维化的恶性循环，如何发现高效抗氧化应激治疗肝纤维化的药物，需要明确相关通路的复杂联系及调节机制等。

③ 细胞极化：肝脏中未成熟的巨噬细胞可极化为 M1 型（促炎型）和 M2 型（抗炎型），其中 Notch 通路可通过促进巨噬细胞向 M1 表型和抑制其向 M2 型转化，从而促进肝纤维化[64-65]。当用 γ- 分泌酶抑制剂（GSI）抑制 γ- 分泌酶对 Notch 受体的加工，Notch1 的表达下调[66]。γ- 分泌酶是一种膜内蛋白水解酶，参与 Notch 蛋白的切割和水解，使其进入细胞内，实现信号的转导。当采用 γ- 分泌酶抑制剂后，Notch 信号被阻断，导致 TNF-α、IL-6 和 IL-10 等炎症因子表达降低，抑制巨噬细胞转型。例如，DAPT 是一种小分子 GSI 药物，当按 50 mg • kg^{-1} 的剂量连续给药 4 周后，大鼠的肝纤维化得到一定程度的缓解[67]，其机制可能是 DAPT 通过阻断 Notch 途径抑制了 aHSC，降低了 HC 的凋亡。然而，Notch 受体有四个亚型，并且在多种细胞内广泛表达，GSI 的 Notch 抑制作用范围较广，可能存在较大的毒副作用，针对特定细胞中具体亚型的 Notch 受体的靶向纳米制剂尤为重要。二苯并氮杂䓬也是一种小分子 GSI 药物，Richter 等[68]将其包裹于 PLGA 纳米粒（GSI NPs）用于缓解肥胖引起的肝纤维化，实验结果证明 GSI NPs 不仅减少了小鼠肝脏葡萄糖的合成，改善了 NASH 相关的纤维化和肝脏炎症，还显著降低了药物的胃肠道毒副作用。

2.3.3　抑制肝实质细胞凋亡　肝细胞损伤及凋亡是引发肝纤维化恶化的根本原因，将药物高效递送至肝细胞发挥保肝护肝的功效是开发肝纤维化疗法尤为重要的研究领域。脱唾液酸糖蛋白受体（ASGPR）是一种在肝细胞高度表达的受体，可以与半乳糖或 *N*- 乙酰半乳糖胺发生特异性结合。将 *N*- 乙酰半乳糖胺与寡核苷酸偶联后，可实现肝细胞靶向递送[69]。Saraswathy 等[70]开发了一种肝脏特异性诊断和治疗的探针，支链淀粉可以与 ASGPR 特异性结合，将其修饰在超顺磁性氧化铁纳米颗粒（SPION）的表面，显示出优异的磁弛豫性，在磁共振（MRI）成像中展现出高对比度。当与近红外染料 Atto-700 结合，赋予材料双重成像能力。该纳米制剂有望应用于肝纤维化的早期诊断以及后续磁热疗法，具备良好的临床应用价值。清道夫受体 B1（SR-B1）是一种高度糖基化的膜蛋白，在 HC 中表达，介导由高密度脂蛋白（HDL）和低密度脂蛋白（LDL）相关的胆固醇的细胞摄取和转运，在脂质调控方面发挥重要作用[71]。肥胖是一种脂质堆积的生理状态，脂质代谢受阻，会诱发 NASH，使肝脏发生损伤，诱发肝纤维化。Wang 等[72]研究发现在遗传性肥胖小鼠中 miR-24 过表达，抑制 SR-B1 的作用，抑制 HDL 对胆固醇的代谢和类固醇激素的合成，影响脂质代谢通路。可通过纳米药物递送至肝脏，降低 miR-24 表达，恢复脂质正常代谢途径，与抗纤维化药物共递送，发挥协同作用。目前尚无该通路的纳米药物用于肝纤维化的治疗。

2.3.4　恢复 LSEC 渗透性　引起肝纤维化的各种损伤因素首先是作用于 LSEC，导致 LSEC 表型和功能变化，ECM 大量沉积继而形成肝窦毛细血管化，一方面严重阻碍了肝脏的物质交换从而降低了药物的递送效率，另一方面释放激活 HSC 的

信号，促进纤维化的发生发展。因此，针对肝窦毛细血管化开发靶向 LSEC 纳米制剂具有广泛的应用前景。Yu 等[73]开发了一种靶向 LSEC 的辛伐他汀纳米粒，通过甘露糖修饰靶向 LSEC 的甘露糖受体，刺激 LSEC 中的 KLF2-NO 信号传导将 HSC 从活化转变为静止，缓解纤维化肝癌模型中的纤维化程度。

3 肝纤维化治疗的局限性

3.1 肝脏药物摄取低

ECM 由成纤维细胞分泌，主要由胶原蛋白和非胶原糖蛋白构成，控制细胞的表型和功能。在肝纤维化疾病中，HSC 被激活为成纤维细胞，分泌 ECM，使其过量表达，在 Disse 腔发生沉积。致密的 ECM 成为阻碍药物渗透的物理屏障，使药物无法到达响应的靶细胞而降低药效。同时，ECM 过量表达，使得肝窦血管周围基质中的非致密胶原Ⅳ被致密的胶原Ⅰ和Ⅲ替换，影响基底膜的结构。

LSEC 作为肝窦壁的组成细胞，在正常生理状态下，其带有窗孔结构，缺乏基底膜，使得肝血窦通透性高，便于进行物质交换。当肝脏发生损伤时，Disse 间隙发生纤维化，异常表达的 ECM 影响窗孔渗透性。在纤维化疾病中，VEGFR 上调导致 LSEC 发生毛细血管化、窗孔减少及组织渗透性逐渐降低，使得药物无法穿过 ECM 屏障到达 HSC 或 KC 等靶细胞，显著降低了纳米药物的递送效率。ECM 也是肿瘤细胞微环境的重要组分之一，其结构致密并具有刚性，可阻碍药物的穿透从而降低药物的有效摄取。因此，可以考虑将针对肿瘤的治疗策略应用于肝纤维化的治疗中，针对 ECM 的主要成分改善药物的渗透性。早在 2004 年，Eikenes 等[74]已将胶原酶用于骨肉瘤的研究中，通过降解 ECM，使肿瘤摄取药物增加了 2 倍。至于肝纤维化，目前已有报道利用胶原酶修饰递送载体以降解 ECM 广泛分布的胶原，使得致密的 ECM 出现孔道，便于纳米药物到达 HSC 而发挥药效。将抗纤维化药物联合赖氨酰氧化酶抑制剂、透明质酸酶、透明质酸合成酶抑制剂，均是提高药物跨越 LSEC 或 ECM 递送屏障的策略。

3.2 非特异性细胞摄取递送效率低

纳米制剂可以通过特定修饰突破细胞外基质屏障，共递送改善 LSEC 毛细血管化，提高制剂渗透性。然而，非特异性的细胞摄取也是降低纳米药物递送效率的一个重要因素。肝脏中的细胞丰富，驻留的 KC 对纳米粒产生较强的非特异性摄取，加速纳米粒的内吞和清除，使得药物到达靶细胞的药量降低，因此大部分的纳米制剂递送效率并不理想。

外泌体是一种包含核酸和蛋白的囊泡，可由多种细胞产生。在正常和疾病状态下，细胞均可分泌外泌体，外泌体携载多种 miRNA，并且随疾病进展其表达水平不同，比如前面提到的 miR-142-3p，可将高表达特定 miR 的外泌体应用于肝纤维化的新靶点或新疗法的开发。再者，外泌体可以从机体内获取，具有良好的生物相容性，不同细胞来源决定了外泌体功能的差异，比如来源于 NK 细胞的外泌体可抑制 TGF-β 诱导的 HSC 的激活，显著改善了 CCl_4 诱导的肝纤维化[75]。来源于间充质干细胞（MSC）的外泌体通过修复损伤的肝组织，表现出较好的治疗作用[76]。与传统纳米制剂相比，这一类胞外囊泡除了具备良好的生物相容性，其归巢效应可产生更高效的靶向。此外，HSC、LSEC 以及胆管细胞等非实质细胞也可分泌外泌体在细胞间传递生物信息。其中，肝细胞来源的外泌体可以促进肝脏的修复和再生[77]，对于治疗肝损伤有着重要意义。要将外泌体用于临床转化，其大规模的工业化生产还存在挑战：首先，其对体内的作用机制和功能尚未完全阐释，不同来源的外泌体差异较大；其次，外泌体的分离和纯化技术仍有待提高；最后，如何确保批次间稳定性也是值得思考的问题。

3.3 早期诊断手段缺乏

肝纤维化是由多种致病因素导致的肝脏病理损伤，若得不到及时的治疗，清除致病因素，不可避免会发展成肝硬化和肝癌，甚至危及生命。肝脏在受损初期难以诊断，只有当肝纤维化或肝硬化程度相当严重时，才可通过一些影像学手段检查得以发现。随着药物诊疗学的不断进步，肝纤维化的定量诊断目前也是肝病领域的研究热点，尤其是针对肝纤维化的早期诊断与分级对患者的治疗至关重要。其中，开发高灵敏度、无创伤及强特异性的造影剂或小分子探针仍是肝纤维化诊断领域的主流方向，比如超顺磁性氧化铁纳米作为 MRI 造影剂[62]被广泛应用于诊断领域，可以采用特异性的靶头修饰进行不同肝脏细胞的标记，并联合具有治疗作用药物的进行共递送，构建多功能的诊疗药物递送系统。再者，ECM 大量分泌的胶原也是评价肝纤维化的重要指标之一，Pomper 等[78]首次采用环状多肽 EP-3533 修

饰 Gd 纳米粒，特异性靶向Ⅰ型胶原用于多种纤维化疾病的高效成像。此外，近年来超声弹性成像的诊断效果接近病理诊断，优于血清标志物的检测，已成为目前肝纤维化诊断的常用方法之一。有学者采用 cRGD 修饰的 PLGA 包裹的全氟辛基溴（PFOB）纳米粒，通过靶向整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体可以显著区分肝纤维化区域与临近的正常肝组织[79]。然而，上述手段均存在肝毒性以及对体内其他脏器组织损害的风险，制约其转化至临床应用。

4 结论与展望

肝纤维化是一个由多种致病机制相互作用、相互促进的极其复杂的病理过程。从 LSEC 毛细血管化到 HSC 的活化，ECM 的沉积，巨噬细胞的炎症反应以及 HC 的凋亡等病理过程，环环相扣，对其中的任何一个或多个关键过程进行有效干预都将对逆转肝纤维化起着积极的作用。现有的纳米药物主要以 HSC 为靶点，通过直接或间接手段抑制 HSC 的激活通路或促进 aHSC 凋亡，从而改善肝纤维化的程度。此外，通过纳米载体递送抗氧化及抗炎药物以降低巨噬细胞产生 ROS 的水平，调控招募炎症细胞浸润以及巨噬细胞极化也是重要的治疗策略。为提高药物递送的效率和治疗效果可以从以下几个方向思考：① 优化纳米载体的理化性质以提高药物在肝脏的分布；② 筛选多靶点的药物进行共递送治疗，通过协同机制缓解肝纤维化；③ 结合新型诊断技术，深入研究不同阶段肝纤维化对药物递送的影响，从而为开发新一代的药物递送载体以增强肝纤维化治疗效果提供参考。

参考文献

[1] Bataller R，Brenner DA. Liver fibrosis [J]. J Clin Invest，2005，115（2）：209-218.

[2] Yao QY，Feng YD，Han P，et al. Hepatic microenvironment underlies fibrosis in chronic hepatitis B patients [J]. World J Gastroenterol，2020，26（27）：3917-3928.

[3] Wu YX，Cao YY，Xu KR，et al. Dynamically remodeled hepatic extracellular matrix predicts prognosis of early-stage cirrhosis [J]. Cell Death Dis，2021，12（2）：163.

[4] Kisseleva T，Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol，2021，18（3）：151-166.

[5] Koyama Y，Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis [J]. J Clin Invest，2017，127（1）：55-64.

[6] Acharya P，Chouhan K，Weiskirchen S，et al. Cellular mechanisms of liver fibrosis [J]. Front Pharmacol，2021，12：671640.

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

[8] Weiskirchen R，Tacke F. Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology [J]. Hepatobiliary Surg Nutr，2014，3（6）：344-363.

[9] 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.

[10] Tsuchida T，Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol，2017，14（7）：397-411.

[11] Wen YK，Lambrecht J，Ju C，et al. Hepatic macrophages in liver homeostasis and diseases-diversity，plasticity and therapeutic opportunities [J]. Cell Mol Immunol，2021，18（1）：45-56.

[12] Shan Z，Ju C. Hepatic macrophages in liver injury [J]. Front Immunol，2020，11：322.

[13] Dou L，Shi XM，He XS，et al. Macrophage phenotype and function in liver disorder [J]. Front Immunol，2020，10：3112.

[14] Schwabe RF，Tabas I，Pajvani UB. Mechanisms of fibrosis development in nonalcoholic steatohepatitis [J]. Gastroenterology，2020，158（7）：1913-1928.

[15] An P，Wei LL，Zhao S，et al. Hepatocyte mitochondria-derived danger signals directly activate hepatic stellate cells and drive progression of liver fibrosis [J]. Nat Commun，2020，11（1）：2362.

[16] Shetty S，Lalor PF，Adams DH. Liver sinusoidal endothelial cells-gatekeepers of hepatic immunity [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol，2018，15（9）：555-567.

[17] Xu MX，Wang XH，Zou Y，et al. Key role of liver sinusoidal endothelial cells in liver fibrosis [J]. Bio Sci Trends，2017，11（2）：163-168.

[18] Ruan B，Duan JL，Xu H，et al. Capillarized liver sinusoidal endothelial cells undergo partial endothelial-mesenchymal transition to actively deposit sinusoidal ECM in liver fibrosis [J]. Front Cell Dev Biol，2021，9：671081.

[19] Zhang YN，Poon W，Tavares AJ，et al. Nanoparticle-liver interactions：cellular uptake and hepatobiliary elimination [J]. J Control Release，2016，240：332-348.

[20] Zhang AX，Meng KY，Liu YD，et al. Absorption，distribution，metabolism，and excretion of nanocarriers in vivo and their influences [J]. Adv Colloid Interface Sci，2020，284：102261.

[21] Harrison SA，Wong VW，Okanoue T，et al. Selonsertib for patients with bridging fibrosis or compensated cirrhosis due to NASH：results from randomized phase Ⅲ STELLAR trials [J].J Hepatol，2020，73（1）：26-39.

[22] Schattenberg JM，Pares A，Kowdley KV，et al. Arandomized placebo-controlled trial of elafibranor in patients with primary biliary cholangitis and incomplete response to UDCA [J]. J Hepatol，2021，74（6）：1344-1354.

[23] Tan Z，Sun H，Xue T，et al. Liver fibrosis：therapeutic

targets and advances in drug therapy [J]. Front Cell Dev Biol，2021，9：730176.
[24] Zhang JH，Li R，Liu QH，et al. SB431542-loaded liposomes alleviate liver fibrosis by suppressing TGF-β signaling [J]. Mol Pharm，2020，17（11）：4152-4162.
[25] Li YP，Pu SY，Liu QH，et al. An integrin-based nanoparticle that targets activated hepatic stellate cells and alleviates liver fibrosis [J]. J Control Release，2019，303：77-90.
[26] Okimoto S，Kuroda S，Tashiro H，et al. Vitamin A-coupled liposomal Rho-kinase inhibitor ameliorates liver fibrosis without systemic adverse effects [J]. Hepatol Res，2019，49（6）：663-675.
[27] Calvente CJ，Sehgal A，Popov Y，et al. Specific hepatic delivery of procollagen α1（Ⅰ）small interfering RNA in lipid-like nanoparticles resolves liver fibrosis [J]. Hepatology，2015，62（4）：1285-1297.
[28] Jia ZX，Gong Y，Pi YF，et al. pPB peptide-mediated siRNA-loaded stable nucleic acid lipid nanoparticles on targeting therapy of hepatic fibrosis [J]. Mol Pharm，2018，15（1）：53-62.
[29] Yang TH，Poenisch M，Khanal R，et al. Therapeutic HNF4A mRNA attenuates liver fibrosis in a preclinical model [J]. J Hepatol，2021，75（6）：1420-1433.
[30] KumarV，Dong YX，Kumar V，et al. The use of micelles to deliver potential hedgehog pathway inhibitor for the treatment of liver fibrosis [J]. Theranostics，2019，9（25）：7537-7555.
[31] Luo JW，Zhang P，Zhao T，et al. Golgi apparatus-targeted chondroitin-modified nanomicelles suppress hepatic stellate cell activation for the management of liver fibrosis [J]. ACS Nano，2019，13（4）：3910-3923.
[32] Surendran SP，Thomas RG，Moon MJ，et al. A bilirubin-conjugated chitosan nanotheranostics system as a platform for reactive oxygen species stimuli-responsive hepatic fibrosis therapy [J]. Acta Biomater，2020，116：356-367.
[33] He QJ，Zhang JM，Chen F，et al. An anti-ROS/hepatic fibrosis drug delivery system based on salvianolic acid B loaded mesoporous silica nanoparticles [J]. Biomater，2010，31（30）：7785-7796.
[34] Qu Y，Zhang QD，Cai XB，et al. Exosomes derived from miR-181-5p-modified adipose-derived mesenchymal stem cells prevent liver fibrosis via autophagy activation [J]. J Cell Mol Med，2017，21（10）：2491-2502.
[35] He F，Li WN，Li XX，et al. Exosome-mediated delivery of RBP-J decoy oligodeoxynucleotides ameliorates hepatic fibrosis in mice [J]. Theranostics，2022，12（4）：1816-1828.
[36] Qiao JB，Fan QQ，Xing L，et al. Vitamin A-decorated control releaserated biocompatible micelles for chemogene therapy of liver fibrosis [J]. J Control Release，2018，283：113-125.
[37] Chen YN，Hsu SL，Liao MY，et al. Ameliorative effect of curcumin-encapsulated hyaluronic acid-PLA nanoparticles on thioacetamide-induced murine hepatic fibrosis [J]. Int J Environ Res Public Health，2017，14（1）：11-26.
[38] Xu F，Liu C，Zhou D，et al.TGF-β/SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis [J]. J Histochem Cytochem，2016，64（3）：157-167.
[39] Yang XX，Dan XL，Men RT，et al. MiR-142-3p blocks TGF-β-induced activation of hepatic stellate cells through targeting TGFβRI [J]. Life Sci，2017，187：22-30.
[40] Broermann A，Schmid R，Gabrielyan O，et al. Exosomal miRNAs as potential biomarkers to monitor phosphodiesterase 5 inhibitor induced anti-fibrotic effects on a treated rats [J]. Int J Mol Sci，2021，22（1）：382-403.
[41] Naseri Z，Oskuee RK，Jaafari MR，et al. Exosome-mediated delivery of functionally active miRNA-142-3p inhibitor reduces tumorigenicity of breast cancer in vitro and in vivo [J]. Int J Nanomedicine，2018，13：7727-7747.
[42] Guiot J，Cambier M，Boeckx A，et al. Macrophage-derived exosomes attenuate fibrosis in airway epithelial cells through delivery of antifibrotic miR-142-3p [J]. Thorax，2020，75（10）：870-881.
[43] Hébert E. Mannose-6-phosphate/Insulin-like growth factor Ⅱ receptor expression and tumor development [J]. Biosci Rep，2006，26（1）：7-17.
[44] Luk JM，Zhang QS，Lee NP，et al. Hepatic stellate cell-targeted delivery of M6P-HSA-glycyrrhetinic acid attenuates hepatic fibrogenesis in a bile duct ligation rat model [J]. Liver Int，2007，27（4）：548-557.
[45] Wu SY，Wang WJ，Dou JH，et al. Research progress on the protective effects of licorice-derived 18β-glycyrrhetinic acid against liver injury [J]. Acta Pharmacol Sin，2021，42（1）：18-26.
[46] El-Mezayen NS，El-Hadidy WF，El-Refaie WM，et al. Hepatic stellate cell-targeted imatinib nanomedicine versus conventional imatinib：a novel strategy with potent efficacy in experimental liver fibrosis [J]. J Control Release，2017，266：226-237.
[47] Shiha GE，Abu-Elsaad NM，Zalata KR，et al. Tracking anti-fibrotic pathways of nilotinib and imatinib in experimentally induced liver fibrosis：an insight [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol，2014，41（10）：788-797.
[48] Fan QQ，Zhang CL，Qiao JB，et al. Extracellular matrix-penetrating nanodrill micelles for liver fibrosis therapy [J]. Biomaterials，2020，230：119616.
[49] Zhao GX，Pan H，Ouyang DY，et al. The critical molecular interconnections in regulating apoptosis and autophagy [J]. Ann Med，2015，47（4）：305-315.
[50] Zhang F，Kong D，Chen L，et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-γ interrupts angiogenic signal transduction by transrepression of platelet-derived growth factor-β receptor in hepatic stellate cells [J]. J Cell Sci，2014，127（2）：305-314.
[51] Ji D，Zhao Q，Qin YW，et al. Germacrone improves liver fibrosis by regulating the PI3K/AKT/mTOR signalling pathway [J]. Cell Biol Int，2021，45（9）：1866-1875.
[52] Ren LJ，Li JJ，Liu LS，et al. Resolving hepatic fibrosis via suppressing oxidative stress and an inflammatory response using a novel hyaluronic acid modified nanocomplex [J]. Bio-

mater Sci，2021，9（24）：8259-8269.
[53] Zhao CY，Chen W，Yang L，et al. PPARγ agonists prevent TGFβ1/Smad3-signaling in human hepatic stellate cells [J]. Biochem Biophys Res Commun，2006，350（2）：385-391.
[54] Patel G，Kher G，Misra A. Preparation and evaluation of hepatic stellate cell selective，surface conjugated，peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand loaded liposomes [J]. J Drug Target，2012，20（2）：155-165.
[55] Murad H，Ahmed O，Ghabrah T，et al. Telmisartan self-nanoemulsifying drug delivery system，compared with standard telmisartan，more effectively improves hepatic fibrosis in rats [J]. Dose Response，2020，18（4）：1559325820982190.
[56] Krenkel O，Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease [J]. Nat Rev Immunol，2017，17（5）：306-321.
[57] Zhang LM，Bansal MB. Role of Kupffer cells in driving hepatic inflammation and fibrosis in HIV infection [J]. Front Immunol，2020，11：1086.
[58] Tu ZK，Bozorgzadeh A，Pierce RH，et al. TLR-dependent cross talk between human Kupffer cells and NK cells [J]. J Exp Med，2008，205（1）：233-244.
[59] Younis NS，Ghanim AMH，Elmorsy MA，et al. Taurine ameliorates thioacetamide induced liver fibrosis in rats via modulation of toll like receptor 4/nuclear factor kappa B signaling pathway [J]. Sci Rep，2021，11（1）：12296-12312.
[60] Hsieh YC，Lee KC，Wu PS，et al. Eritoran attenuates hepatic inflammation and fibrosis in mice with chronic liver injury [J]. Cells，2021，10（6）：1562-1580.
[61] Maeda H，Minayoshi Y，Ichimizu S，et al. Repeated administration of Kupffer cells-targeting nanoantioxidant ameliorates liver fibrosis in an experimental mouse model [J]. Biol Pharm Bull，2020，43（1）：93-101.
[62] Shin SK，Kim KO，Kim SH，et al. Exogenous 8-hydroxydeoxyguanosine ameliorates liver fibrosis through the inhibition of Rac1-NADPH oxidase signaling [J]. J Gastroenterol Hepatol，2020，35（6）：1078-1087.
[63] Córdoba-Jover B，Arce-Cerezo A，Ribera J，et al. Cerium oxide nanoparticles improve liver regeneration after acetaminophen-induced liver injury and partial hepatectomy in rats [J]. J Nanobiotechnol，2019，17（1）：112-123.
[64] Keewan E，Naser SA. The role of Notch signaling in macrophages during inflammation and infection：implication in rheumatoid arthritis? [J]. Cells，2020，9（1）：111-127.
[65] Wongchana W，Kongkavitoon P，Tangtanatakul P，et al. Notch signaling regulates the responses of lipopolysaccharide-stimulated macrophages in the presence of immune complexes [J]. PLoS One，2018，13（6）：e0198609.
[66] Palaga T，Buranaruk C，Rengpipat S，et al. Notch signaling is activated by TLR stimulation and regulates macrophage functions [J]. Eur J Immunol，2008，38（1）：174-183.
[67] Chen YX，Zheng SP，Qi D，et al. Inhibition of notch signaling by a γ-Secretase inhibitor attenuates hepatic fibrosis in rats [J]. PLoS One，2012，7（10）：e46512.
[68] Richter LR，Wan QF，Wen D，et al. Targeted delivery of notch inhibitor attenuates obesity-induced glucose intolerance and liver fibrosis [J]. ACS Nano，2020，14（6）：6878-6886.
[69] Cui H，Zhu XY，Li SY，et al. Liver-targeted delivery of oligonucleotides with *N*-acetylgalactosamine conjugation [J]. ACS Omega，2021，6（25）：16259-16265.
[70] Saraswathy A，Nazeer SS，Nimi N，et al. Asialoglycoprotein receptor targeted optical and magnetic resonance imaging and therapy of liver fibrosis using pullulan stabilized multi-functional iron oxide nanoprobe [J]. Sci Rep，2021，11（1）：18324.
[71] Yalaoui S，Huby T，Franetich JF，et al. Scavenger receptor BI boosts hepatocyte permissiveness to plasmodium infection [J]. Cell Host Microbe，2008，4（3）：283-292.
[72] Wang MN，Li LL，Liu R，et al. Obesity-induced overexpression of miRNA-24 regulates cholesterol uptake and lipid metabolism by targeting SR-B1 [J]. Gene，2018，668：196-203.
[73] Yu Z，Guo JF，Liu Y，et al. Nano delivery of simvastatin targets liver sinusoidal endothelial cells to remodel tumor microenvironment for hepatocellular carcinoma [J]. J Nanobiotechnology，2022，20（1）：9.
[74] Eikenes L，Bruland ØS，Brekken C，et al. Collagenase increases the transcapillary pressure gradient and improves the uptake and distribution of monoclonal antibodies in human osteosarcoma xenografts [J]. Cancer Res，2004，64（14）：4768-4773.
[75] Wang L，Wang YH，Quan J. Exosomes derived from natural killer cells inhibit hepatic stellate cell activation and liver fibrosis [J]. Hum Cell，33（3）：582-589.
[76] Lou GH，Chen Z，Zheng M，et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases [J]. Exp Mol Med，2017，49（6）：e346.
[77] Wu JY，Ji AL，Wang ZX，et al. Exosome-mimetic nanovesicles from hepatocytes promote hepatocyte proliferation in vitro and liver regeneration in vivo [J]. Sci Rep，2018，8（1）：2471-2481.
[78] Pomper MG，Lee S. Molecularly targeted MR imaging agent in liver fibrosis：high sensitivity and low gadolinium mean high translational potential [J]. Radiology，2018，287（2）：590-591.
[79] Xuan JQ，Chen YL，Zhu LL，et al. Ultrasound molecular imaging with cRGD-PLGA-PFOB nanoparticles for liver fibrosis staging in a rat model [J]. Oncotarget，2017，8（65）：108676-108691.

（收稿日期：2022-02-21；修回日期：2022-03-31）

软胶囊崩解迟缓问题及评测方法的研究进展

张强[1]，张纯刚[1*]，程岚[1]，李瑾[2]，郭勇[3]（1. 辽宁中医药大学药学院，辽宁 大连 116620；2. 陕西中医药大学药学院，西安 712046；3. 神威药业集团有限公司，石家庄 051430）

摘要：软胶囊在上架保质期内易老化导致崩解迟缓，从而影响药物在体内的吸收，目前软胶囊发生老化崩解迟缓的机制以及改善方法已成为国内外研究的热点。崩解迟缓的发生是由于软胶囊的囊壳材料明胶易因自身氧化或与醛类物质发生交联生成水不溶性薄膜，进而影响软胶囊崩解溶出。本综述对软胶囊崩解迟缓的机制、老化评测方法和影响因素等进行总结，以期为完善软胶囊的制备工艺及质量评价提供参考。

关键词：软胶囊；崩解迟缓；机制；评测方法；影响因素；溶出度

中图分类号：R944.5 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1354-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.022

Research progress in the slow disintegration of soft capsules and evaluation methods

ZHANG Qiang[1], ZHANG Chun-gang[1*], CHENG Lan[1], LI Jin[2], GUO Yong[3] (1. *College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian Liaoning* 116620; 2. *College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an* 712046; 3. *Shineway Pharmaceutical Group Co., Ltd, Shijiazhuang* 051430)

Abstract: Soft capsules are prone to aging during storage and slow disintegration, which may affect the absorption of the drug in the body. At present, the mechanism and improvement in soft capsules become a hotspot. The slow disintegration occurs because gelation, the shell material of the soft capsule is easily oxidized or cross-linking with aldehydes to form water-insoluble film, which slows down the disintegration and dissolution of soft capsules. This review summarized the mechanism, aging evaluation method and influencing factors for soft capsule disintegration to provide reference for the preparation and quality evaluation of soft capsules.

Key words: soft capsule; slow disintegration; mechanism; evaluation method; influence factor; dissolution

药物经口服后，有效成分由胃肠黏膜吸收至血液中，从而发挥治疗作用[1]。然而某些药物成分易被胃酸破坏、对胃黏膜产生刺激性或具有不良气味与口感等特点，严重影响了患者服药的有效性、安全性和依从性[2]。软胶囊因具有生物利用度高、可掩盖不良气味、防止药物与空气接触等优势[3]，常作为刺激性药物、易氧化药物、挥发性药物、疏水药物和各种保健油的有效递送系统[4]，广泛应用于医药、化妆品[5]、保健品等行业[6]。

口服药物在体内发挥疗效很大程度上取决于其在胃肠液中的溶解能力和渗透性，若溶出度是药物吸收的限速步骤，那么任何影响溶出度的因素均会对药物的生物利用度产生影响[7]。由于囊壳材料明胶的特性以及内容物的影响，软胶囊在放置一段时间后囊壳老化，崩解时限会有所延长，溶出度降低，进而影响药物在体内的吸收[8]。因此，亟需改进软胶囊的制剂工艺，提高软胶囊类制剂的有效性和安全性。为此笔者对软

基金项目：国家重点研发计划项目（No.2018YFC1706903）；国家自然科学基金项目（No.81503257）；辽宁省博士启动基金（No.201501098）；辽宁省自然科学基金指导计划项目（No.2019-ZD-0968）；中医脏象理论及应用国家教育部重点实验室一般项目（No.zyzx1809）。

作者简介：张强，男，硕士，主要从事中药新剂型、新技术及体内药物分析，email：1466951777@qq.com *通信作者：张纯刚，男，副教授，主要从事中药新剂型、新技术及体内药物分析，email：gaogaoii123@163.com

胶囊囊壳发生老化崩解迟缓问题的原因、评测方法、影响因素的研究进展予以综述，以期为完善软胶囊制备工艺及质量评价提供参考。

1　软胶囊囊壳老化崩解迟缓原因

明胶是由动物骨骼和皮肤中的胶原蛋白水解而成的一种生物聚合蛋白 [9]。良好的成膜能力以及稳定的物理性能使明胶成为软胶囊制剂的首选成膜材料 [10]。然而软胶囊经长时间储存后，易发生崩解迟缓的问题，严重阻碍了软胶囊行业的发展。

有研究表明，软胶囊发生老化崩解迟缓是由于囊壳中的明胶与醛类化合物发生交联反应所致 [11]，其交联机制可能为赖氨酸的一个自由氨基与醛基反应，生成一个亚胺基团，再经一系列的缩聚反应，最终生成交联化合物，其交联过程详见图 1[12]。该交联化合物阻挡了水分子进入，致使囊壳内壁生成一层不溶于水的薄膜，进而阻止软胶囊内容物的释放，软胶囊崩解示意图见图 2[13]。

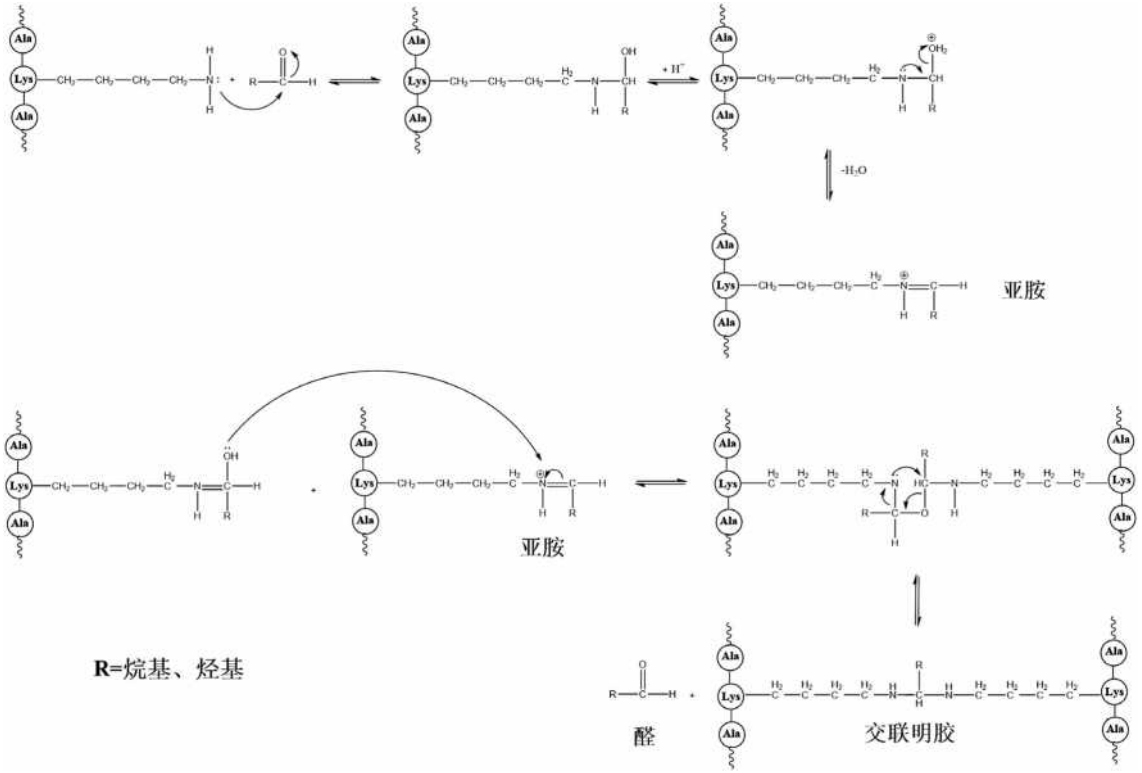


图 1　明胶交联过程

Fig 1　Process of gelatin cross-linking

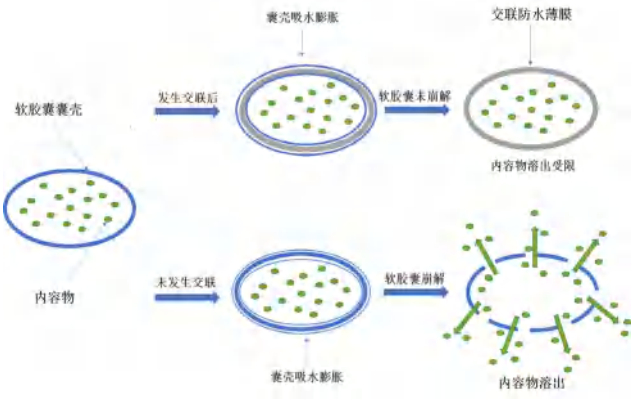


图 2　软胶囊崩解示意图

Fig 2　Schematic diagram showing of disintegration from soft capsule

明胶交联生成的防水薄膜是导致崩解迟缓的根本原因。因此，为从根本解决软胶囊囊壳发生交联问题，不含明胶的羟丙基甲基纤维素、卡拉胶、海藻酸钠等植物胶已作为明胶替代材料成为研究热点 [14]，相比于明胶，植物胶所制备的囊壳无交联反应发生，且无动物成分，可满足特殊人群的需要。然而，植物胶单独制备成胶皮无法从黏度、弹性、机械强度等物理参数上达到与明胶同等的性能 [15]，故出现了将多种胶体材料复配使用，以弥补单一材料带来的缺陷，制得性能更优的实用性囊壳 [16]。虽然植物软胶囊囊壳已取得一定的成果，但当前国内市场还未有成熟的植物胶软胶囊产品上市，这可能是因为植物胶提取生产成本高，且明胶的生产机器无法满足植物胶的生产要求。

2　软胶囊囊壳老化评测方法

目前学者常通过明胶平衡溶胀量的测定、ε-氨基酸残基含量与明胶交联度的测定、崩解时间的测定、差示扫描量热法、傅里叶变换红外光谱

法、力学性能的测定等评测方法来探究软胶囊囊壳的老化程度。

2.1 明胶平衡溶胀量的测定

明胶作为大分子胶体浸入溶剂时，并不是立即溶解，而是溶剂分子首先扩散至胶皮中，使其溶胀（即体积膨胀），当明胶溶胀达到极限时即为平衡溶胀状态[17]。但随着明胶胶皮的老化交联生成不溶于水的薄膜，使得水分进入明胶内部受到阻碍，从而使胶皮溶胀受到抑制，平衡溶胀量（S_{eq}）的值相应减小[18]。所以，通过测定 S_{eq} 值可间接用于评价明胶交联程度。

2.2 ε-氨基酸残基含量与明胶交联度的测定

明胶一般是由 α、β、γ 多肽链以三螺旋构象的形式结合而成[19]，α、β、γ 多肽链中 ε-氨基酸残基是发生交联的主要部位，交联前后的 ε-氨基酸残基经三硝基苯磺酸（TNBS）紫外分析测定可得明胶交联度[20]，其反应机制是 TNBS 与蛋白质的主要氨基在碱性条件下生成三硝基苯衍生物和亚硫酸盐离子。通过定量检测可得胶皮中 ε-氨基酸残基含量（C），计算出明胶的交联度（D）。

$$D\% = (C_{A0} - C_{At})/C_{A0} \times 100\% \quad (1)$$

C_{A0} 和 C_{At} 分别为初始时间与 t 时间明胶中 ε-氨基酸残基含量。

刘建平等[21]利用甲醛处理软胶囊囊壳，在明胶发生交联后，所测的氨基酸残基含量、S_{eq} 以及溶出百分率均成良好的线性关系，三者均可成为评价明胶交联的指标，其中通过氨基酸残基含量所得的交联度可更加清晰地表明明胶的内部交联程度。

2.3 崩解时间的测定

按照《中国药典》2020 年版四部崩解时限检查法进行测定，软胶囊崩解是指在盐酸或人工胃液条件下，于 1 h 之内，软胶囊全部崩解通过筛网，若有软胶囊未能完全崩解，则应另取 6 粒复试[22]。然而软胶囊经过长时间储存后明胶老化交联生成不溶于水的薄膜，可导致软胶囊崩解时间延长甚至未能完全崩解。崩解时间不仅可作为软胶囊的溶解性评价指标，且与囊壳老化程度成线性关系。何玉莲等[23]通过崩解时限的测定来筛选软胶囊囊壳添加醛类抑制剂后对于囊壳老化程度的改善，发现在囊壳中加入氨基酸类物质，可一定程度地改善软胶囊的崩解，证明氨基酸类抗氧化剂能吸收囊壳中的过氧化物，从而减少由过氧化物氧化明胶所引发的交联。

2.4 差示扫描量热法

差示扫描量热法是从明胶热稳定性方面探讨明胶囊壳老化机制[24]。段子卿等[25]将不同冻力的明胶制成软胶囊，在加速试验后对囊壳采用差示扫描量热法进行分析，结果明胶产生的吸热峰随着交联程度的提升而向高温区域移动。这是由于差示扫描量热图谱上的吸热峰是因明胶分子中的氢键断裂与三维螺旋结构重组产生，交联会导致明胶分子之间通过共价键形成三维的网状结构，共价键断裂吸收能量多于氢键断裂，因此交联后明胶的热稳定性更强。

2.5 傅里叶变换红外光谱法

傅里叶变换红外光谱法可以提供关于特定键的形成或丢失、结构重排和其他材料分子性质的详细信息[26]。Tengroth 等[27]研究发现经甲醛处理后的囊壳，傅里叶变化红外光谱在 1000 cm^{-1} 附近出现一个宽峰；经乙醛或丙醛硬化处理的胶囊，在 1720 cm^{-1} 处出现一个羰基特征峰。提示可使用傅里叶变换红外光谱法检测囊壳明胶的交联程度以及醛类物质从填充物到胶囊壳的迁移情况。

2.6 力学性能的测定

明胶薄膜交联后，凝胶的网格结构发生了变化，其抗拉强度与断裂伸长率也随之改变[20]。万能材料试验机或质构仪可用于胶皮的力学性能测定，研究胶皮的交联程度。高喜平等[28]通过对甲醛化的明胶 / 聚乙烯醇复合膜进行力学测定来考察甲醛交联剂对复合膜结构及性能的影响。结果显示明胶与甲醛交联程度越大，分子间的相互作用力越强，复合膜的抗拉强度越大。在其他领域力学性能测定通常与有限元分析相结合，建立受力模型，用以产品质量分析[29]，该模型目前还未用于囊壳老化领域，可成为研究软胶囊崩解迟缓的新方向。

3 影响软胶囊崩解迟缓的因素

软胶囊囊壳崩解迟缓问题是受诸多因素的影响，如图 3 所示，其中外界因素主要可分为高温、高湿、紫外照射；内部因素则主要分为接触到醛类化学物质、pH 值、物质迁移。内外因素不仅会使软胶囊发生明胶交联致使囊壳崩解迟缓，还会导致囊壳出现渗漏、粘连等稳定性问题，因而了解影响囊壳崩解迟缓的因素对改善软胶囊稳定性至关重要。

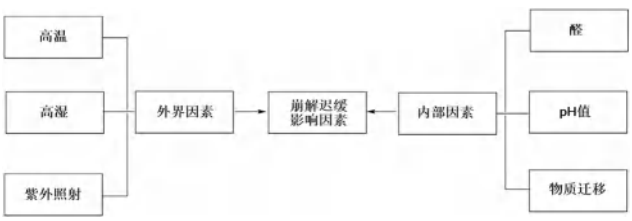


图 3 影响崩解迟缓的因素

Fig 3 Factor affecting slow disintegration

3.1 外界因素

3.1.1 高温和高湿 高温条件下，囊壳不仅易发生熔化或软化，还易致使软胶囊内的植物油酸败，生成气体及醛类物质，进而导致软胶囊渗漏和交联[30]。高湿条件下，氧气更易透过囊壳，使得明胶自氧化速度加快[31]。刘建平等[21]将银杏黄酮软胶囊在 40 ℃与 75% 高湿条件下放置 3 个月，定时取样测定软胶囊的 S_{eq} 与崩解时限，结果显示，样品放置 90 d 后，胶囊壳的 S_{eq} 为零时间的 43.19% 并且崩解时限延长，表明高温与高湿均对明胶交联有促进作用，进而导致软胶囊崩解迟缓，药物溶出度与囊壳膨胀特性降低，因此软胶囊应在低温干燥的条件下储存。

3.1.2 紫外照射 强烈的紫外线或可见光照射可使胶囊壳中的胶束发生变性聚集，交联程度加大，对软胶囊崩解造成影响，导致体外溶出速率降低[32]。通常在软胶囊囊壳里添加遮光剂二氧化钛以降低囊壳的透光率[33]。虽然明胶薄膜的透光率随着二氧化钛浓度的增加而减少，但过量的二氧化钛会影响囊壳崩解，因此在制备软胶囊时，有学者建议二氧化钛的用量为 0.2% ～ 1.2% 较为合适[34]。但二氧化钛的使用量仍取决于软胶囊的处方配比，并应尽量在避光的条件下保存软胶囊。

3.2 内部因素

3.2.1 醛 明胶中的氨基酸残基经氧化或自氧化生成的醛类物质，或外源性醛类杂质，均可诱导明胶发生交联反应，且后者对软胶囊崩解时限的影响更大[13]。因此，在软胶囊囊壳中不宜添加含醛类物质的辅料，也可通过添加抗氧化剂以阻止辅料生成醛类物质[23]。马旭等[32]在加入焦亚硫酸钠与甘氨酸等抗氧剂后，聚乙二醇 400 中的醛类物质含量减少，明胶交联趋势减缓，表明抗氧化剂能有效缓解软胶囊崩解迟缓现象。活性炭可吸附水以及挥发性化合物（例如甲醛、甲酸[35]）。Colgan 等[36]发现，在软胶囊包装内放置活性炭，可有效减弱软胶囊交联，这可能与活性炭能吸附醛类物质有关。除此之外，马国静等[37]考察了制剂处方对胶囊崩解时限的影响，研究结果表明大豆油与大豆磷脂制成的乳剂能够破坏明胶的交联结构，从而改善软胶囊的崩解时限。因此，合理的处方可有效减少软胶囊老化交联反应。

3.2.2 pH 值 pH 值对软胶囊的稳定性也有重要的影响，氨基酸残基在高 pH 环境下，以非质子化形式存在，与醛类物质可发生明胶交联反应[38]。在低 pH 条件下，氨基酸残基则以质子化形式存在，虽然不会与醛类物质发生交联，但是酸性物质易迁移到亲水性囊壳中导致明胶水解，使软胶囊发生渗漏[39]。因此，制备软胶囊时应注意控制囊壳与内容物的 pH 值以提高软胶囊的稳定性。

3.2.3 物质迁移 为使药物顺利灌装入软胶囊中，通常会加入稀释剂增加内容物的流动性。聚乙二醇 400 因对一些难溶于水的化合物有很强的增溶能力而常被用作软胶囊的稀释剂[40]。明胶为亲水性凝胶，因此亲水性稀释剂聚乙二醇 400 更易迁移至囊壳被氧化生成醛类物质，阻碍软胶囊的崩解。孙玉侠[41]的研究表明，将甘油与山梨醇混合使用可最大程度降低内容物与囊壳的相互迁移，阻挡空气对囊壳的渗透能力，延缓明胶的自氧化反应。因此需要合理优化制剂处方，根据药物性质来判断是否需要使用聚乙二醇类作为稀释剂，最大程度降低物质迁移。

4 结语

本文对软胶囊崩解迟缓问题的可能机制、软胶囊崩解的评测方法以及影响因素进行了探讨与总结，对完善软胶囊的制备以及改善软胶囊的稳定性具有一定的指导意义。尽管软胶囊有着其他剂型不可替代的优点，但稳定性问题依旧是其发展的最大制约。日后可通过有限元分析法将囊壳模型化，从囊壳的弹性模量、抗拉强度等方面进行力学分析，从而研究囊壳老化。从发展趋势上讲，非明胶替代材料的前景良好，对其研究开发将是改善软胶囊稳定性的热点。随着软胶囊生产技术以及非明胶替代材料的研究开发，工艺与辅料相辅相成，这些终将促进软胶囊的飞速发展。

参考文献

[1] 李静，张玉侠，吕迁洲，等 . 口服给药方法决策的药学基础 [J]. 上海医药，2018，39（3）：57-60，76.

[2] Arifah SN，Atho’illah MF，Lukiati B，et al. Herbal medicine from single clove garlic oil extract ameliorates hepatic steatosis and oxidative status in high fat diet mice [J]. Malays J Med Sci，2020，27（1）：46-56.

[3] Gullapalli RP，Mazzitelli CL. Gelatin and non-gelatin capsule dosage forms [J]. J Pharm Sci，2017，106（6）：1453-1465.

[4] 苏艺杰，苏斌，林福祥，等 . 欧米加 -3 酸乙酯肠溶软胶囊制备处方与工艺研究 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志，2017，5（13）：137-139.

[5] 许浩平 . 化妆品类软胶囊生产工艺简介及其工艺优化探讨 [J]. 日用化学品科学，2018，41（9）：31-34.

[6] 邵啸，艾琳，卢爽，等 . 大蒜油软胶囊的制备工艺探究 [J]. 广东蚕业，2019，53（9）：74-75.

[7] Robertis SD，Bonferoni MC，Elviri L，et al. Advances in oral controlled drug delivery：the role of drug-polymer and interpolymer non-covalent interactions [J]. Expert Opin Drug Del，2014，12（3）：441-453.
[8] 刘群，王丽英，王磊，等 . 维生素 E 软胶囊的崩解时限与破裂试验的统计分析 [J]. 药学研究，2016，35（9）：532-534.
[9] Bello AB，Kim D，Kim D，et al. Engineering and functionalization of gelatin biomaterials：from cell culture to medical applications [J]. Tissue Eng Part B-Re，2020，26（2）：164-180.
[10] Prasad VD. Formulation and modifying drug release from hard and soft gelatin capsules for oral drug delivery [J]. Int J Res Dev Pharm L Sci，2017，6（4）：2663-2677.
[11] Lu X，Shah P. Dissolution of gelatin capsules：evidence and confirmation of cross-linking [J]. Dissolut Technol，2017，24：6-21.
[12] Duconseille A，Astruc T，Quintana N，et al. Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution：a review [J]. Food hydrocolloid，2015，43：360-376.
[13] Damian F，Harati M，Schwartzenhauer J，et al. Challenges of dissolution methods development for soft gelatin capsules [J]. Pharmaceutics，2021，13（2）：1-30.
[14] 李佳，陈皓玉，张文慧，等 . 响应面法优化植物软胶囊囊皮制备工艺 [J]. 中国药学杂志，2019，54（11）：894-899.
[15] 许凤，李祥乾，李宁，等 . 可食用性植物软胶囊囊材的性质研究 [J]. 广西科学，2018，25（4）：444-448.
[16] 施鸿谋，苏一帆，范超春，等 . 响应曲面法优化植物复配胶软胶囊囊皮配方 [J]. 广州化工，2019，47（22）：67-72.
[17] 谢观凤，李培源 . 明胶的制备及其应用研究 [J]. 山东化工，2019，48（19）：76-77，81.
[18] 孙倩楠，赵娜，刘明菲，等 . 星点设计 - 效应面法优选软胶囊囊壳抗老化处方 [J]. 沈阳药科大学学报，2018，35（9）：712-718.
[19] 张丹丹，叶海，平其能，等 . 明胶的改性及其在医药领域的应用 [J]. 药学进展，2017，41（8）：600-607.
[20] Wang W，Li C，Zhang H，et al. Using liquid smoke to improve mechanical and water resistance properties of gelatin films [J]. J Food Sci，2016，81（5）：1151-1157.
[21] 刘建平，马旭，朱家壁 . 评价软胶囊中明胶交联反应的相关指标间的相关性及影响因素 [J]. 药学学报，2005，40（3）：279-284.
[22] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：129-130.
[23] 何玉莲，韦经强，黄玲，等 . 改善黑枸杞提取物软胶囊崩解时限 [J]. 食品工业，2021，42（2）：10-12.
[24] Yang B，Hou Z，Sun M，et al. Influence of surfactants on the microstructure and performance of PDMS-E grafted gelatin films [J]. Russ J Appl Chem，2018，91（2）：264-269.
[25] 段子卿，董晨东，刘建平，等 . 明胶冻力对尼莫地平软胶囊溶出稳定性的影响 [J]. 中国医药工业杂志，2011，42（6）：426-431.
[26] Sezer P，Okur I，Oztop MH，et al. Improving the physical properties of fish gelatin by high hydrostatic pressure（HHP）and ultrasonication（US）[J]. Int J Food Sci Tech，2020，55（4）：1468-1476.
[27] Tengroth C，Gasslander U，Andersson FO，et al. Cross-linking of gelatin capsules with formaldehyde and other aldehydes：an FTIR spectroscopy study [J]. Pharm Dev Tech，2005，10（3）：405-412.
[28] 高喜平，刘捷，郑学晶，等 . 甲醛交联对明胶 /PVA 膜结构及性能的影响 [J]. 功能材料，2014，45（5）：49-52.
[29] 文周，薛美贵，李伟 . 温湿度对蜂窝纸板静力学性能影响及有限元分析 [J]. 包装工程工程版，2021，41（23）：129-134.
[30] 刘志明，类彦波，孙清瑞，等 . 大豆调和油氧化酸败后的组分变化 [J]. 农产品加工，2019（6）：49-53.
[31] 刘建平，马旭，翁凌骧 . 软胶囊崩解迟缓现象机理的初步研究 [J]. 中国医药工业杂志，2005，36（2）：81-83.
[32] 马旭，刘建平，翁麟骧，等 . 软胶囊崩解迟缓现象影响因素研究 [J]. 中国药科大学学报，2003，34（5）：414-418.
[33] 曹小勇，唐建涛，侯素云，等 . 抗疲劳软胶囊制备工艺研究 [J]. 中国高新科技，2018（2）：31-33.
[34] 时军，程怡 . 辅料在软胶囊剂型中的应用 [J]. 中医药学刊，2003，21（9）：1429-1430.
[35] Likar MD，Carroll SC，Colgan ST，et al. Enhancing the dissolution stability of hard gelatin capsules using activated carbon as a packaging component [J]. J Pharm Sci，2018，107（12）：3080-3088.
[36] Colgan ST，Zelesky TC，Chen R，et al. Use of activated carbon in packaging to attenuate formaldehyde-induced and formic acid-induced degradation and reduce gelatin cross-linking in solid dosage forms [J]. J Pharm Sci，2016，105（7）：2027-2031.
[37] 马国静，白亚灵，柴振平，等 . 探讨软胶囊崩解迟缓的方法 [J]. 临床合理用药杂志，2011，4（10A）：42-50.
[38] Gullapalli RP. Soft gelatin capsules（softgels）[J]. J Pharm Sci，2010，99（10）：4107-4148.
[39] Etxabide A，Urdanpilleta M，Gómez-arriaran I，et al. Effect of pH and lactose on cross-linking extension and structure of fish gelatin films [J]. React Funct Polym，2017，117：140-146.
[40] Gullapalli RP，Mazzitelli CL. Polyethylene glycols in oral and parenteral formulations——a critical review [J]. Int J Pharm，2015，496（2）：219-239.
[41] 孙玉侠 . CCT 软胶囊制剂研发及相关质量控制 [D]. 镇江：江苏大学，2016.

（收稿日期：2021-10-29；修回日期：2021-12-09）

雄黄的形态砷与价态砷在体内的转化和蓄积

陈杨，王楚茵，姚妮，赵希彤，张谦，关君*（北京中医药大学 中药学院，北京　102488）

摘要：雄黄作为传统矿物类中药，使用历史悠久，具有燥湿祛痰、解毒、杀虫的功效。现代研究证实雄黄还能治疗多种恶性疾病，在临床应用广泛。然而，由于雄黄含有重金属元素砷，毒副作用较强，其应用安全性和科学性一直饱受争议。本文综述了近年来关于雄黄中的形态砷和价态砷的相关研究，包括雄黄中的形态砷、价态砷的种类及其毒性，形态砷在机体内的转化和蓄积，肠道菌群对雄黄代谢的作用以及雄黄的形态砷和价态砷分析的应用，以期为深入研究雄黄中的形态砷和价态砷提供参考。

关键词：雄黄；形态砷；价态砷；毒性；转化和蓄积；肠道菌群

中图分类号：R995　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)06-1359-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.023

In vivo transformation and accumulation of speciation arsenic and valence arsenic in realgar

CHEN Yang, WANG Chu-yin, YAO Ni, ZHAO Xi-tong, ZHANG Qian, GUAN Jun* (*School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488)

Abstract: Realgar, a traditional mineral medicine, has been used for a long time. Realgar can eliminate dampness and phlegm, detoxicate and kill insects. Modern studies have proved that realgar can also treat many diseases, so it is widely applied in clinical practice. However, the safety and science of its clinical application remain controversial because of its strong toxicity and side effects caused by arsenic, the main ingredient in realgar. Related studies on the speciation and valence state arsenic in realgar in recent years were reviewed. The types and toxicity of speciation arsenic and valence arsenic in realgar the transformation and accumulation of speciation arsenic and valence arsenic in vivo, the effect of gut microbiota on the metabolism of realgar, and the application of analysis of speciation arsenic and valence arsenic in realgar were discussed. These summaries are expected to provide references for further study of speciation arsenic and valence arsenic in realgar.

Key words: realgar; speciation arsenic; valence arsenic; toxicity; transformation and accumulation; gut microbiota

雄黄，又名石黄、鸡冠石等，属于传统矿物类中药，在我国古代应用广泛，具有解毒杀虫、燥湿祛痰、截疟的功效[1]。现代医学研究表明雄黄还兼具抗肿瘤的功效，可用于治疗肝癌、宫颈癌、白血病等多种恶性疾病[2-4]。但雄黄中含有重金属砷元素，长期、大量服用雄黄，会导致砷在体内蓄积中毒，造成多种组织和器官的损伤[5]。

雄黄的功效和毒性与其含有的砷元素的形态和价态密切相关[6-7]。若能基于雄黄的已有研究开发出毒性小且疗效好的形态砷，将大大促进雄黄的临床应用。然而，目前已有的形态砷和价态砷的综述多集中在水、土壤、植物等研究领域。虽然，雄黄在人体、实验动物体内的形态砷、价态砷方面的研究众多，但尚未见详实的综述总结。有鉴于此，本文综述了现有的关于形态砷和价态砷的研究，以期为雄黄药用的安全性和科学性提供理论依据。

1　雄黄的形态砷和价态砷及其毒性研究

基金项目：国家自然科学基金面上项目（No.82074001）；国家自然科学基金青年基金项目（No. 81403069）。

作者简介：陈杨，女，在读硕士研究生，主要从事中药物质基础研究，email：cybucm@163.com　*通信作者：关君，女，教授，主要从事矿物药及金属有机药物的药效物质及作用机制研究，email：timeguan@bucm.edu.cn

1.1　形态砷

1.1.1　雄黄在体外的形态砷　雄黄性温，味辛苦，有毒，入心肝二经[1]。历版《中国药典》都将雄黄记载为："硫化物类矿物雄黄族雄黄，主含二硫化二砷（As_2S_2）"[8]。但是，已有的研究结果表明，雄黄主要成分很可能为四硫化四砷（As_4S_4）[9-12]，而 As_2S_2 为其分解产物[13-16]。关于雄黄的主要成分，争议颇多。一方面，由于 X 射线衍射法难以检测到含量低于下限值的物相（每个物相具有不同的下限值），也无法检测到没有对应的标准衍射卡片（powder diffraction file，PDF 卡片）的物相；另一方面，雄黄的组成成分复杂，存在多样的同分异构体，给 X 射线衍射分析造成了很大的困难[11]。

基于量子化学计算方法，As_4S_4 有两种稳定存在的异构体（可以看作是两种不同的形态砷），见图 1[11]。As_2S_2 也有两种可能稳定存在的异构体，见图 2。

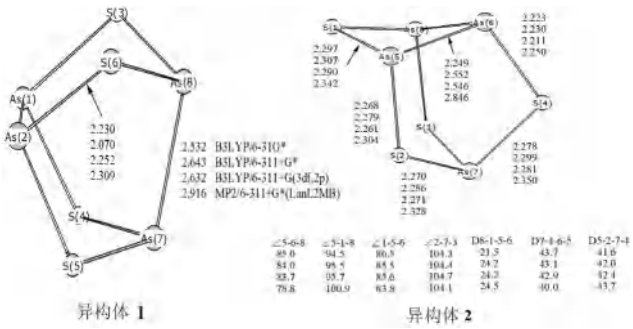


图 1　As_4S_4 的两种异构体[11]

Fig 1　Two isomers of As_4S_4[11]

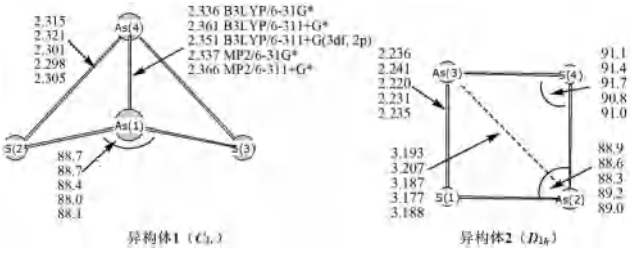


图 2　As_2S_2 的两种异构体[16]

Fig 2　Two isomers of As_2S_2[16]

1.1.2　雄黄在体内转化而成的形态砷　As_4S_4 在室温下能以固体形式存在，但难溶于水，难以吸收，在机体内的生物利用度低。因此，雄黄入药后主要起治疗作用和毒性的成分应该为其可溶性成分，即可溶性砷[14]。如无机砷中的 As（Ⅲ）、As（Ⅴ），有机砷中的一甲基砷酸（MMA）、二甲基砷酸（DMA）等。在酶催化下，砷在体内可进行氧化还原、生物甲基化、生物合成等多种过程，并产生多种形态砷，在机体内发挥主要作用。

已有多项研究证实，雄黄中的主要成分 As_4S_4 进入机体后会代谢成不同的形态砷。雄黄中的砷在生物体内的存在形式主要包括四类：无机砷，如亚砷酸盐（AsO_3^{3-}，Ⅲ）、砷酸盐（AsO_4^{3-}，Ⅴ）等；有机砷小分子，如 MMA、DMA、三甲基氧化砷（TMAO）、四甲基砷离子（$TMAs^+$）等；砷的有机化合物，如砷甜菜碱（AsB）、乳酸三甲基砷、砷胆碱（AsCh）、砷酯（AsL）、砷糖、二甲基砷氧基乙醇、二甲基砷氧基核苷、二甲基砷氧基核苷硫酸酯、*O*-磷酸酰三甲基砷乳酸等；含砷的生物大分子，如砷化物（Ⅲ或Ⅴ）与转铁蛋白或血红蛋白的结合物[17]。

1.2　价态砷

砷属于氮族元素，有四种常见的氧化值，分别为－ 3、0、＋ 3 和＋ 5[备注：在国际纯化学和应用化学联会（IUPAC）尚未推荐使用氧化值这个概念之前，人们通常用 "化合价" 或 "价态" 来表示元素原子的成键能力，且 "价态" 的说法一直沿用至今]。砷元素的四种常见氧化值可以分别表示为－Ⅲ、0、Ⅲ和Ⅴ四种价态[18]。价态砷这种说法，重点强调在不同形态砷中砷元素的氧化值，因为该氧化值与形态砷的毒性密切相关。

1.3　形态砷和价态砷的毒性研究

雄黄的主要成分 As_4S_4 经研究显示其口服吸收有限，大多随粪便排泄出体外，对机体毒性较小[19]。同时药代动力学研究表明，雄黄中的砷在人体内可利用率较低。因此，雄黄进入人体内经生物转化后，产生毒性的多为其形态砷和价态砷。雄黄的不同形态砷和价态砷之间的毒性差异较大[18]。研究表明，无机砷的毒性大于有机砷，其中，从价态的角度，无机砷（Ⅲ）的毒性又大于无机砷（Ⅴ），有机砷（Ⅲ）的毒性大于有机砷（Ⅴ）。因此，价态砷的毒性排序通常为：无机砷（Ⅲ）＞无机砷（Ⅴ）＞有机砷（Ⅲ）＞有机砷（Ⅴ）。

过往研究表明，雄黄中的形态砷和价态砷能对人体造成多种毒性[20-24]。Yi 等[21]连续给予雄黄 30 d 后观察大鼠体内的形态砷蓄积和毒性，结果显示亚砷酸盐 [iAs（Ⅲ）] 主要积累于肝脏中，而 DMA 在肝、肾都有一定蓄积，推测雄黄引起的肝肾毒性可能与 DMA 有关。Zhang 等[22-23]采用无标记定量蛋白质组学方法探讨雄黄的肾毒性机制，检测出多种可能影响细胞凋亡过程和氧化应激的蛋白发生变化，说明雄黄诱导肾毒性机制可能与

细胞凋亡和氧化应激有关。而该团队进一步通过考察雄黄诱导的急性肾损伤小鼠的血清和肾脏内源性代谢物谱，证实氨基酸代谢、脂质代谢、谷胱甘肽（GSH）代谢和嘌呤代谢途径与雄黄肾毒性呈现主要相关模式。Zhang 等[24]采用非靶向代谢组学法研究雄黄对小鼠神经系统的影响，结果显示雄黄能通过加重氧化损伤和脂质功能障碍从而引发神经毒性。

陈吴越等[25]分析了大鼠服用六神丸后肝脏组织中的四种砷形态，显示六神丸中的无机砷代谢后转变为毒性较小的 DMA，安全性提升。刘敏敏等[26]应用原子荧光光谱法（AFS）和液相色谱 - 原子荧光联用法（HPLC-AFS）测定出含雄黄制剂和标准砷溶液中砷的主要形态砷，其毒性由大到小的顺序为：亚砷酸盐、砷酸盐、MMA、DMA 和 AsB、AsCh，后两者几乎无毒。

2　雄黄的形态砷和价态砷在生物体内的转化与蓄积

在机体内，不同形态砷和不同价态砷之间能相互转化。无机砷在体内经过氧化甲基化过程（主要在肝脏中进行）和还原过程（主要在血液中进行），产生多种甲基化砷的代谢产物。因为砷甲基化化合物的急性毒性较小，与组织大分子的反应较小，而且在尿液中排泄速度比无机砷快，因此，无机砷的甲基化过程通常被认为是生物体对砷的一种解毒机制[27]。

2.1　雄黄中的形态砷和价态砷在体内的转化途径

砷在体内的经典代谢过程如图 3 所示，其中 iAs（Ⅴ）表示砷酸盐、MMA（Ⅲ）表示一甲基砷酸（Ⅲ）、MMA（Ⅴ）表示一甲基砷酸（Ⅴ）、DMA（Ⅲ）表示二甲基砷酸（Ⅲ）、DMA（Ⅴ）表示二甲基砷酸（Ⅴ）[21，28-29]。iAs（Ⅴ）通过 GSH 反应还原为 iAs（Ⅲ），iAs（Ⅲ）在砷甲基转移酶作用下，以 *S*- 腺苷甲硫氨酸（*S*-adenosylmethionine，SAM）或者甲基钴胺素（甲基维生素 B_{12}）作为甲基供体，将 iAs（Ⅲ）转化为一甲基砷和二甲基砷化合物，或者进一步生成挥发性的三甲基砷化合物 TMAs 等[30]。

同时，砷还有另外一种代谢模式学说[31]。如图 4 所示，这种学说认为 iAs（Ⅲ）通过砷甲基转移酶（Cyt19）代谢并通过砷 - 谷胱甘肽（As-GSH）复合物代谢、转化为 DMA（Ⅴ），而不是通过重复和氧化甲基化。该模式的机制如下：iAs（Ⅴ）被还原为 iAs（Ⅲ）后，iAs（Ⅲ）与 GSH 生成复合物砷 - 三谷胱甘肽（ATG），ATG 在 SAM

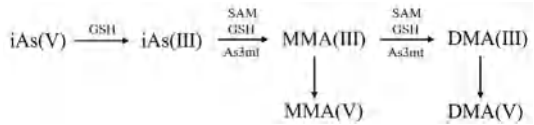


图 3　雄黄中砷在体内的简要代谢过程[21]

Fig 3　Brief metabolism process of arsenic in realgar in vivo[21]

和 Cyt19 的存在下被甲基化为单甲基胂二谷胱甘肽（MADG），MADG 可转化为 MMA（Ⅲ），再进一步氧化形成 MMA（Ⅴ）。同样的，MADG 也能被 Cyt19 进一步甲基化为二甲基胂谷胱甘肽（DMAG），DMAG 不稳定，转化为 DMA（Ⅲ）后快速转化为 DMA（Ⅴ）[32-33]。该机制中 As-GSH 复合物（ATG、MADG 和 DMAG）稳定与否取决于 GSH 的浓度。

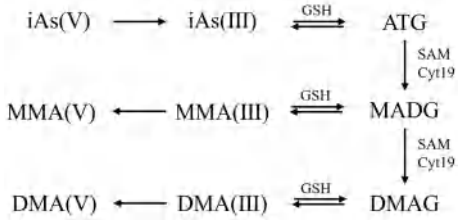


图 4　雄黄中砷在体内代谢的另一过程[31]

Fig 4　Another metabolism process of arsenic in realgar in vivo[31]

2.2　雄黄及其复方中形态砷和价态砷在机体内蓄积研究

多项研究探讨了雄黄进入机体后在机体内存在的形态砷和价态砷。张云静等[34]给大鼠灌胃雄黄和牛黄解毒片后考察大鼠血浆中砷的形态，结果显示大鼠血浆中的主要形态砷为 DMA，其他形态砷如 iAs（Ⅲ）、MMA（Ⅴ）和 iAs（Ⅴ）等，在各时间点均未检测到，表明无机砷进入体内后被迅速甲基化。Zhang 等[35]的实验显示 Beagle 犬经口服给予雄黄和牛黄解毒片后，血浆中的主要砷形态为 DMA，并有少量 iAs（Ⅴ），未测到 iAs（Ⅲ）和 MMA。强淑萍等[36]使用高效液相色谱 - 氢化物发生原子荧光光谱（HPLC-HG-AFS）联用法测定并比较灌胃给药牛黄解毒片或雄黄后 Beagle 犬血浆中的形态砷变化，结果显示 Beagle 犬血浆中主要的形态砷为 DMA，并有少量 iAs（Ⅴ）；相比雄黄组，牛黄解毒片组的血浆中 DMA 浓度较低，消除较快，说明该复方中其他味中药能减少形态砷的蓄积。Wu 等[37-38]考察了含雄黄中成药（如牛黄解毒片）中的砷在大鼠体内的药代动力学和蓄积情况，结果显示，长期用药砷在大鼠体内的消除半衰期（$t_{1/2}$）长，积累指数（AI）高，且在多个组织中蓄积，血浆中 DMA 占比最多，而牛黄解毒片组的组织损伤低于雄黄组，

且其组方中其他中药能降低大鼠体内砷的浓度，减少砷在体内的蓄积。姜新等[39]对大鼠口服雄黄与纳米雄黄后血清、肝、肾、脾中 iAs（Ⅲ）、iAs（Ⅴ）、MMA、DMA 四种砷形态进行定量分析，结果显示，在血清和肾脏中四种砷形态均被检出；在肝脏中只检测到 iAs（Ⅲ）、iAs（Ⅴ）和 DMA，脾脏中只检测到 iAs（Ⅴ）和 DMA。这些实验结果均证实了雄黄进入机体经简要代谢后，其主要成分转化为多种形态砷并在机体内各器官中蓄积。

目前，常用高效液相色谱 - 电感耦合等离子质谱（HPLC-ICP-MS）联用技术测定雄黄中多种形态砷的含量，该方法融合了几种检测方法的优点，具有高效性、高灵敏、高重现性、低检测限、宽线性范围等特点，用该法测定雄黄及含雄黄制剂中可溶性砷含量，效果良好[40-41]；王启铮等[42]用 HPLC-ICP-MS 法测定对比雄黄和六神丸中可溶性砷含量，结果显示六神丸复方可显著抑制雄黄中可溶性砷的溶出，从而降低雄黄毒性。陈绍占等[43-44]用 HPLC-ICP-MS 法分析雄黄在大鼠脏器中代谢的砷形态，表明雄黄代谢后大鼠肝脏中砷形态主要以 DMA 形式存在，还存在少量的 iAs（Ⅲ）和未知物 2；肾脏中主要存在 DMA、MMA、iAs（Ⅲ）、未知物 1、未知物 2 和未知物 3。同时，经牛黄解毒片暴露后大鼠血清中检出 AsB、DMA（Ⅴ）、未知砷化物 U1 和 U2，其中 DMA（Ⅴ）和 U1 为经牛黄解毒片暴露后主要的代谢产物，少量的 AsB 来源于饲料；砷化物 U1 可能为 DMA（Ⅲ），砷化物 U2 尚不能确定。张庆丽等[45]研究了 Beagle 犬服用不同剂量雄黄和六神丸后组织中总砷及各形态砷的分布情况，结果显示 Beagle 犬组织中总砷含量、iAs（Ⅲ）、DMA 含量呈现一定的剂量依赖性；含相同剂量雄黄的六神丸组与雄黄组相比，多数组织中总砷含量降低，所有组织中的 iAs（Ⅲ）和 DMA 浓度均降低，而肝、脾、肾中的 AsB 浓度升高，表明六神丸复方配伍后对雄黄具有一定的减毒作用。而在 Shi 等[46]的研究中，通过分析食蟹猴静脉和灌胃给药三氧化二砷后的血液，结果显示 iAs（Ⅲ）是一种有效的抗癌物，食蟹猴体内组织中含量最多的形态砷为 DMA，为最终代谢产物。

研究员们多关注雄黄在机体内各组织器官的蓄积情况，以及通过尿液代谢的情况，较少关注雄黄在动物、人类大脑的蓄积情况。2007 年，Rubio 等[47]研究了大鼠在慢性砷暴露后冻干脑切片中的砷浓度，发现砷可进入大鼠脑内，且存在体积砷浓度的饱和值。研究发现 iAs 在大脑的蓄积会损伤大鼠的周围感觉器官和中枢神经系统，破坏信息传递[48]，且有机砷化合物比无机砷化合物更容易在大脑中蓄积[49-50]。同时，Masuda 等[51]对染砷食蟹猴的中枢神经系统的实验显示，有机砷二苯基砷酸（DPAA）容易在食蟹猴大脑中蓄积，且半衰期长于大鼠。由于食蟹猴基因与人类相近，说明 DPAA 可能在人类的中枢神经系统中蓄积。多项研究[52-54]探讨了雄黄对未成年大鼠脑组织中氨基酸（如天冬氨酸、谷氨酸等）水平的影响，结果显示，雄黄在体内的代谢产物为 iAs、MMA 和 DMA，大鼠脑中砷蓄积形态以 DMA、MMA 为主，具有剂量依赖性，说明 MMA 和 DMA 可通过血脑屏障进入大脑；雄黄染毒可使大鼠脑内氨基酸水平失调，产生神经系统毒性。另有研究表明，脑组织也可能具有砷甲基化能力，无机砷在脑内可以被甲基化代谢成 MMA 和 DMA，且脑中砷蓄积形态以 DMA 为主；在脑组织中未检测到 iAs[55]。杨钊等[56]研究雄黄中砷对大鼠新事物识别能力的影响，使用氢化物发生 - 冷阱捕集 - 原子吸收光谱法（HG-CT-AAS）测定大鼠脑组织中 iAs、MMA 和 DMA 的含量。结果显示在雄黄组大鼠大脑中检测到 MMA、DMA，且呈时间 - 剂量 - 效应关系。以上研究结果均显示雄黄代谢物能通过血脑屏障进入动物脑内并蓄积，产生神经系统毒性进而损伤大脑功能，但其机制有待更深入的研究。

关于雄黄代谢产物在脑部分区中蓄积与分布规律也有研究。Huo 等[57]将大鼠暴露于雄黄 6 周，检测雄黄对大鼠的神经系统作用及海马体中砷水平，结果显示大鼠出现认知能力缺陷，且雄黄中的砷通过血脑屏障在大鼠海马体中蓄积。Sánchez-Peña 等[58]检测经 iAs（Ⅲ）暴露后小鼠不同脑区的砷种类，结果表明甲基化砷代谢物存在于所有研究的脑区（大脑皮层、海马体、丘脑等），垂体中蓄积最多。而 Shila 等[59]的研究证实经过 iAs 暴露的大鼠其大脑皮质、下丘脑、纹状体、小脑和海马区 GSH 水平及相关酶活性受砷影响降低。

3 肠道菌群对雄黄代谢的作用

雄黄以及含雄黄的复方中药多以口服给药为主，其经人体代谢后主要随粪便排泄，说明胃肠道是雄黄排泄的主要场所[60]。肠道是人口服中药后体内代谢的重要场所，肠道内含有丰富的微生物，统称为肠道菌群。肠道菌群不仅影响药物

在人体内的生物转化，同时还关联相当多的疾病[61]。人类的肠道菌群非常复杂，主要包括厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、放线菌门、梭杆菌门、疣微球菌门、蓝细菌门等 7 个门，其中厚壁菌门和拟杆菌门在肠道内最具优势[62]。目前，关于肠道菌群对雄黄的作用的研究已有一定进展，雄黄通过与肠道菌群相互作用，起到减毒增效的作用，同时对其菌群产生一定影响。

3.1 肠道菌群对雄黄的作用研究

罗世林等[63]探讨了雄黄在肠道菌群作用下的初步代谢规律，将雄黄中可溶性砷与肠道菌群共同在厌氧培养系统中进行温孵化培育，采用 HPLC-ICP-MS 法测定其形态砷。结果显示，随着时间延长，雄黄中可溶性砷中的 iAs（Ⅲ）在肠道菌群作用下呈减少趋势，而 iAs（Ⅴ）在 0 ～ 12 h 呈上升趋势，12 ～ 48 h 呈下降趋势。这可能与肠道菌群中 GSH 的浓度有关。Chi 等[64]使用肠道菌群干扰小鼠模型考察肠道菌群在砷的生物转化中的作用，结果显示砷代谢基因表达下降，其生物转化受到干扰，导致毒性加重，表明肠道菌群对雄黄中形态砷的代谢起重要作用。Xu 等[65]同样使用肠道菌群破坏小鼠模型来探究肠道菌群对雄黄中砷蓄积的影响，结果显示肠道菌群被破坏的小鼠全血中砷浓度更高，说明肠道菌群对雄黄起到一个减毒的作用。Coryell 等[66]的研究也证实了肠道菌群能防止急性砷中毒小鼠的死亡，研究选用初级砷解毒酶 As3mt 缺失小鼠并分为菌群破坏组和对照组，结果显示与正常小鼠比较，菌群破坏的正常小鼠和菌群破坏的缺酶小鼠器官中砷蓄积量大，给缺酶的菌群破坏小鼠移植人类粪便（含微生物）后，能使其免于砷中毒所引发的死亡。

3.2 雄黄对肠道菌群的作用研究

雄黄对肠道菌群也具有一定的作用。孙宇婷等[67]通过给予小鼠不同剂量的雄黄，探究了雄黄对肠道菌群的影响，结果显示各给药组小鼠肠道中乳酸菌属均减少，瘤胃球菌属、黏放线菌属增多，证明临床应用雄黄后会造成肠道菌群的紊乱，保护性菌减少，产生炎症，引发肠道不良反应。Xu 等[65]的研究中显示高剂量（750 $mg \cdot kg^{-1}$）雄黄组中，菌群破坏小鼠和对照组小鼠间砷蓄积无显著差异，说明高剂量的雄黄会破坏肠道菌群稳态。Guo 等[68]研究了砷和铁共同暴露下对肠道菌群的影响，结果显示砷和铁共同暴露能一定程度缓解两者单独使用对肠道菌群的影响，从而影响宿主代谢。

4 雄黄中形态砷和价态砷分析在中药领域中的应用

对雄黄中的形态砷和价态砷进行分析研究，一方面可以明确雄黄在机体内的代谢过程，探究其中起到治疗作用的药效成分；另一方面有助于完善雄黄及含雄黄复方中药的质量评价标准。同时，由于雄黄的临床应用广泛，分析其所含的形态砷和价态砷，能为探究雄黄配伍使用的减毒机制提供理论依据，提高雄黄在临床应用的安全性和科学性。

目前，雄黄及其复方的质量控制多以其中的总砷含量来评价，但由于雄黄在人体内主要发挥作用的是其可溶性砷部分，以总砷含量来评价雄黄的毒性并不科学，可溶性砷才是评价毒性的关键。因此雄黄的质量控制应检测其总砷和不同形态砷、价态砷的量。许珺辉等[69]使用氢化物发生 - 原子荧光光谱法（HG-AFS）测定雄黄、含雄黄中草药中的形态砷，结果显示少数雄黄样品中有 MMA，而在牛黄清心丸、安宫牛黄丸未检出 MMA 和 DMA，其含有的 iAs（Ⅲ）和 iAs（Ⅴ）也低于雄黄样品。

雄黄因其毒性以及易在人体内蓄积，临床上很少单用，而是常用一些含有雄黄的复方，如牛黄解毒片、安宫牛黄丸、牛黄清心丸等。研究表明，雄黄与其他中药配伍可以显著减少雄黄的毒性。Wu 等[37]研究了牛黄解毒片中砷在大鼠体内的积累及安全性，结果显示与单用雄黄相比，牛黄解毒片组方中其他中药能显著减轻雄黄所致的组织损伤，降低血浆中砷浓度。复方配伍能削弱雄黄对机体的毒性的机制，推测可能与雄黄中形态砷和价态砷与复方中其他中药的有效成分发生化学反应有关[70]。

5 讨论

雄黄中的形态砷和价态砷影响其疗效和毒性。本文从形态砷和价态砷的毒性研究、形态砷和价态砷在体内的转化与蓄积以及肠道菌群对雄黄生物转化的影响等方面对雄黄相关研究进行了综述。雄黄中的主要成分 As_4S_4 难溶于水，生物利用度低，并不能很好地起到治疗作用。而雄黄进入体内分解后的可溶性砷——iAs（Ⅲ）、iAs（Ⅴ）等无机砷，MMA、DMA、TMAO、AsB 等有机砷，才可能是雄黄发挥药性和毒性的来源。不同的形态砷和价态砷在体内吸收、分布、代谢、蓄积和毒性上具有较大差异。不同形态砷经过甲

基化后相互转化，最终主要以 DMA 的形态蓄积在体内，再经肠道通过粪便排泄。

目前，肠道菌群的相关研究火热，肠道菌群在人体的各种疾病以及药物代谢中发挥重要作用。研究表明，中药经口服后，其有效成分必须经过肠道菌群代谢后才能被人体吸收，从而发挥药理作用[71]。雄黄中的形态砷和价态砷经肠道菌群作用后，能有效促进其代谢，减少形态砷在人体内的蓄积，从而削弱雄黄对人体的毒性。但同时，大剂量、长期服用雄黄也会损害肠道菌群的稳态，使菌群失调，引发炎症。

近年来，雄黄因其显著的抗肿瘤作用，越来越受到医药研究者的关注。但雄黄中的砷毒性及其在人体内蓄积的问题影响着雄黄的临床应用。如何减弱雄黄的毒性，增强其疗效，更好地利用雄黄来治疗恶性疾病是研究的重点。雄黄进入机体后发挥主要作用的是可溶性砷，研究雄黄在机体内的形态砷和价态砷的代谢及蓄积能更好地实现雄黄的减毒增效，提高其临床应用水平。目前这方面的研究较少，还需研究者们进行更加深入、更加系统的研究，为提高雄黄临床用药的安全性和科学性提供依据。

参考文献

[1] 李时珍著 . 本草纲目 [M]. 北京：线装书局，2018.

[2] Song P，Chen P，Wang D，et al. Realgar transforming solution displays anticancer potential against human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by inducing ROS [J]. Int J Oncol，2017，50（2）：660-670.

[3] Wang SS，Zhang C，Li YM，et al. Anti-liver cancer effect and the mechanism of arsenic sulfide in vitro and in vivo [J]. Cancer Chemoth Pharm，2018，83（3）：519-530.

[4] Ding WC，Ji T，Xiong W，et al. Realgar，a traditional Chinese medicine，induces apoptosis of HPV16-positive cervical cells through a HPV16 E7-related pathway [J]. Drug Des Dev Ther，2018，12：3459-3469.

[5] 李玉娟，王月华，杜冠华 . 中药雄黄毒的历史认识与现代研究 [J]. 中药药理与临床，2018，34（4）：196-198.

[6] 何溶溶，吕翔，周婧，等 . 雄黄的安全性评价和配伍减毒研究 [J]. 南京中医药大学学报，2018，34（6）：645-648.

[7] 宋玲玲，韩冬月，林瑞超，等 . 矿物药雄黄的研究进展 [J]. 中国中药杂志，2019，44（3）：433-440.

[8] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：350-351.

[9] 关君，王耘，铁步荣，等 . 雄黄主要成分的考证 [J]. 北京中医药大学学报，2010，33（9）：623-627.

[10] 张志杰，周群，尉京志，等 . 我国药用雄黄的晶体结构鉴定 [J]. 光谱学与光谱分析，2011，31（2）：291-296.

[11] Song LL，Han DY，Lin RC，et al. Research progress in mineral Chinese medicine realgar [J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi，2019，44（3）：433-440.

[12] Song LL，Han DY，Yao N，et al. Investigation on structure and bonding of As_4S_4 isomers [J]. Chinese J Struc Chem，2020，39（9）：1585-1593.

[13] Brittain RD，Lau KH，Hildenbrand DL. The vaporization of realgar，As_4S_4 [J]. J Electrochem Soc，1983，130（5）：1206-1210.

[14] 梁国刚，张启伟 . 朱砂、雄黄中各成分的溶解度对其药效、毒副作用的影响 [J]. 中国中药杂志，2002，27（5）：74-75.

[15] Ito T，Morimoto N，Sadanaga R. The crystal structure of realgar [J]. Acta Crystallogr，1952，5（6）：775-782.

[16] 宋玲玲，韩冬月，姚妮，等 . 应用量子化学研究雄黄分解产物 As_2S_2 的结构与能量 [J]. 中南药学，2020，18（3）：453-457.

[17] 高双荣，梁爱华，易艳，等 . 雄黄中砷的不同形态及其毒性研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2011，17（24）：243-247.

[18] 徐智，黄可龙 . 砷的代谢及其毒性机制的相关性研究 [J]. 中国药业，2009，18（12）：19-21.

[19] 温磊，楼雅卿，江滨，等 . 四硫化四砷动物药动学研究 [J]. 中国药学杂志，2006，41（8）：619-623.

[20] Yajima I，Kumasaka MY，Iida M，et al. Arsenic-mediated hyperpigmentation in skin via NF-kappa B/endothelin-1 signaling in an originally developed hairless mouse model [J]. Arch Toxicol，2017，91（11）：3507-3516.

[21] Yi Y，Gao SR，Xia J，et al. Study of the accumulation and distribution of arsenic species and association with arsenic toxicity in rats after 30 days of oral realgar administration [J]. J Ethnopharmacol，2020，247：111576.

[22] Zhang S，Li C，Feng TT，et al. Proteomics analysis in the kidney of mice following oral feeding realgar [J]. J Ethnopharmacol，2021，275：114118.

[23] Zhang S，Li C，Feng TT，et al. A metabolic profiling study of realgar-induced acute kidney injury in mice [J]. Front Pharmacol，2021，12：706249.

[24] Zhang WW，Huo TG，Li AH，et al. Identification of neurotoxicity markers induced by realgar exposure in the mouse cerebral cortex using lipidomics [J]. J Hazard Mater，2020，389：121567.

[25] 陈吴越，崔欣语，周昊言，等 . 高效液相 - 氢化物发生 - 原子荧光光谱法分析六神丸在大鼠肝脏中代谢的砷形态 [J]. 中医药信息，2021，38（3）：26-29.

[26] 刘敏敏，司徒咏文，陈俏 . 雄黄及制剂中砷含量测定与形态分析 [J]. 药物分析杂志，2019，39（12）：2199-2205.

[27] Goering PL，Aposhian HV，Mass MJ，et al. The enigma of arsenic carcinogenesis：role of metabolism [J]. Toxicol Sci，1999，49（1）：5-14.

[28] Nemeti B，Gregus Z. Reduction of dimethylarsinic acid to the highly toxic dimethylarsinous acid by rats and rat liver

cytosol [J]. Chem Res Toxicol，2013，26（3）：432-443.
[29] Khairul I，Wang QQ，Jiang HY，et al. Metabolism，toxicity and anticancer activities of arsenic compounds [J]. Oncotarget，2017，8（14）：23905-23926.
[30] 王培培，陈松灿，朱永官，等 . 微生物砷甲基化及挥发研究进展 [J]. 农业环境科学学报，2018，37（7）：1377-1385.
[31] Hayakawa T，Kobayashi Y，Cui X，et al. A new metabolic pathway of arsenite：arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19 [J]. Arch Toxicol，2005，79（4）：183-191.
[32] Kato K，Yamanaka K，Hasegawa A，et al. Active arsenic species produced by GSH-dependent reduction of dimethylarsinic acid cause micronuclei formation in peripheral reticulocytes of mice [J]. Mutat Res-Gen Tox En，2003，539（1-2）：55-63.
[33] Yamanaka K，Mizoi M，Tachikawa M，et al. Oxidative DNA damage following exposure to dimethylarsinous iodide：the formation of cis-thymine glycol [J]. Toxicol Lett，2003，143（2）：145-153.
[34] 张云静，强淑萍，宋敏，等 . 大鼠口服雄黄和牛黄解毒片后血浆中砷形态的研究 [J]. 药学学报，2016，51（7）：1130-1135.
[35] Zhang YJ，Qiang SD，Sun J，et al. Liquid chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry determination of arsenic species in dog plasma and its application to a pharmacokinetic study after oral administration of Realgar and Niu Huang Jie Du Pian [J]. J Chromatogr B，2013，917-918：93-99.
[36] 强淑萍，张云静，孙晶，等 . 比格犬经口给予雄黄和牛黄解毒片后血浆中砷化学态的研究 [J]. 中国药科大学学报，2013，44（2）：141-146.
[37] Wu X，Guan R，Liu YX，et al. Comparative health risk assessment of realgar and NiuHuangJieDu tablets based on tissue arsenic levels after multiple oral administration to rats [J]. J Ethnopharmacol，2020，249：112370.
[38] Wu X，Wu SH，Liu YX，et al. Health risk assessment of arsenic in Realgar and NiuHuangJieDu tablets based on pharmacokinetic study [J]. J Trace Elem Med Bio，2018，48：81-86.
[39] 姜新，李少元，邓小颖，等 . 基于高效液相色谱 - 电感耦合等离子体质谱法的大鼠口服纳米雄黄后体内砷形态分析 [J]. 中草药，2018，49（22）：5328-5333.
[40] 陈秋生，程奕，孟兆芳，等 . 仿生提取 -HPLC-ICP-MS 测定含雄黄中成药中可溶性砷含量 [J]. 药物分析杂志，2010，30（10）：1829-1835.
[41] 李丽敏，夏晶，王欣美，等 . HPLC-ICP-MS 法研究 5 种含雄黄中成药的可溶性砷及其形态 [J]. 中成药，2012，34（11）：2118-2123.
[42] 王启铮，王丽敏，敬应春，等 . 雄黄和六神丸中可溶性砷的溶出度研究 [J]. 中国临床药学杂志，2015，24（1）：17-22.
[43] 陈绍占，杜振霞，刘丽萍，等 . 高效液相色谱 - 电感耦合等离子质谱法分析雄黄在大鼠脏器中代谢的砷形态 [J]. 分析化学，2014，42（3）：349-354.
[44] 陈绍占，刘丽萍，杜宏举，等 . 高效液相色谱 - 电感耦合等离子体质谱法分析经牛黄解毒片暴露后大鼠血清中砷形态 [J]. 质谱学报，2017，38（2）：177-186.
[45] 张庆丽，吴倩，谢媛媛，等 . 六神丸和雄黄中砷的组织分布研究 [J]. 药学学报，2011，46（6）：701-706.
[46] Shi QL，Ju MY，Zhu XX，et al. Pharmacokinetic properties of arsenic species after intravenous and intragastrical administration of arsenic trioxide solution in cynomolgus macaques using HPLC-ICP-MS [J]. Molecules，2019，24（2）：241-257.
[47] Rubio M，Perez RD，Perez CA，et al. Synchrotron microscopic X-ray fluorescence analysis of the effects of chronic arsenic exposure in rat brain [J]. Radiat Phys Chem，2008，77（1）：1-8.
[48] García-Chávez E，Segura B，Merchant H，et al. Functional and morphological effects of repeated sodium arsenite exposure on rat peripheral sensory nerves [J]. J Neurol Sci，2007，258（1-2）：104-110.
[49] Naranmandura H，Suzuki N，Takano J，et al. Systemic distribution and speciation of diphenylarsinic acid fed to rats [J]. Toxicol Appl Pharm，2009，237（2）：214-220.
[50] Ozone K，Ueno S，Ishizaki M，et al. Toxicity and oxidative stress induced by organic arsenical diphenylarsinic acid and inorganic arsenicals and their effects on spatial learning ability in mice [J]. J Health Sci，2010，56（5）：517-526.
[51] Masuda T，Ishii K，Seto Y，et al. Long-term accumulation of diphenylarsinic acid in the central nervous system of cynomolgus monkeys [J]. Arch Toxicol，2017，91（8）：2799-2812.
[52] 畅蓓 . 雄黄对发育中的大鼠脑组织内氨基酸类神经递质水平的影响 [D]. 沈阳：中国医科大学，2012.
[53] 张颖花，霍韬光，畅蓓，等 . 雄黄对未成年大鼠脑内谷氨酸水平的影响 [J]. 中药药理与临床，2012，28（5）：103-105.
[54] 畅蓓，霍韬光，张颖花，等 . 雄黄亚慢性染毒对未成年大鼠脑组织内 Glu 和 Gln 水平的影响 [J]. 中药材，2012，35（11）：1817-1820.
[55] Rodríguez VM，Del Razo LM，Limón-Pacheco JH，et al. Glutathione reductase inhibition and methylated arsenic distribution in Cd1 mice brain and liver [J]. Toxicol Sci，2005，84（1）：157-166.
[56] 杨钊，刘婕瑜，霍韬光，等 . 雄黄中砷对大鼠新事物识别能力的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（9）：63-69.
[57] Huo TG，Li WK，Zhang YH，et al. Excitotoxicity induced by realgar in the rat hippocampus：the involvement of learning memory injury，dysfunction of glutamate metabolism and NMDA receptors [J]. Mol Neurobiol，2015，51（3）：980-994.
[58] Sánchez-Peña LC，Petrosyan P，Morales M，et al. Arsenic species，AS3MT amount，and AS3MT gen expression

in different brain regions of mouse exposed to arsenite [J]. Environ Res，2010，110（5）：428-434.
[59] Shila S，Subathra M，Devi MA，et al. Arsenic intoxication-induced reduction of glutathione level and of the activity of related enzymes in rat brain regions：reversal by DL-alpha-lipoic acid [J]. Arch Toxicol，2005，79（3）：140-146.
[60] 汤毅珊，王宁生，宓穗卿，等 . 雄黄中的砷及其代谢物在大鼠体内的排泄动力学研究 [J]. 中药药理与临床，2009，25（3）：39-42.
[61] 林璋，祖先鹏，谢海胜，等 . 肠道菌群与人体疾病发病机制的研究进展 [J]. 药学学报，2016，51（6）：843-852.
[62] Eckburg PB，Bik EM，Bernstein CN，et al. Diversity of the human intestinal microbial flora [J]. Science，2005，308（5728）：1635-1638.
[63] 罗世林 . 雄黄在肠道菌群内的砷形态分析及砷代谢初步研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2018.
[64] Chi L，Xue JC，Tu PC，et al. Gut microbiome disruption altered the biotransformation and liver toxicity of arsenic in mice [J]. Arch Toxicol，2019，93（1）：25-35.
[65] Xu WF，Zhang SS，Jiang WQ，et al. Arsenic accumulation of realgar altered by disruption of gut microbiota in mice [J]. Evid-Based Compl Alt，2020，2020：8380473.
[66] Coryell M，McAlpine M，Pinkham NV，et al. The gut microbiome is required for full protection against acute arsenic toxicity in mouse models [J]. Nat Commun，2018，9（1）：1-9.
[67] 孙宇婷，徐焕华，聂窈，等 . 雄黄及三氧化二砷对小鼠肠道菌群的初步探究 [J]. 中国中药杂志，2020，45（1）：142-148.
[68] Guo XC，Liu S，Wang Z，et al. Metagenomic profiles and antibiotic resistance genes in gut microbiota of mice exposed to arsenic and iron [J]. Chemosphere，2014，112：1-8.
[69] 许珺辉，王洪玮，崔蓉，等 . 雄黄及含雄黄中成药中砷的形态分析 [J]. 药物分析杂志，2007，27（3）：395-399.
[70] 徐文峰，金鹏飞，徐硕，等 . 大黄中蒽醌类化合物对雄黄可溶性砷含量的影响 [J]. 中南药学，2020，18（2）：235-237.
[71] 汤齐，高霞，耿婷，等 . 肠道菌群与中药相互作用的研究进展 [J]. 中草药，2017，48（17）：3629-3635.

（收稿日期：2021-10-15；修回日期：2021-12-06）

药源性低纤维蛋白原血症危险因素和可能机制的研究进展

郑昕昕[1]，王静[1]，朱怀军[1, 2, 3]，王敏[1, 2, 3*]（1. 南京中医药大学中西医结合鼓楼临床医学院，南京 210008；2. 南京大学医学院附属鼓楼医院药学部，南京 210008；3.南京临床药学中心，南京 210008）

摘要：近年来，药源性低纤维蛋白原血症的发病率逐渐上升，引起了医疗界的关注，已有文献对该不良反应的临床表现、影响因素、可能机制及预后特点进行了初步的探讨和研究。药源性低纤维蛋白原血症的发生会导致体内凝血系统的失衡，且与患者年龄、药物使用剂量、疗程等密切相关。本文从药源性低纤维蛋白原血症危险因素和可能机制等方面进行综述，旨在为临床用药安全性和减少药物不良反应的发生提供依据。

关键词：药物；低纤维蛋白原血症；不良反应；危险因素；机制
中图分类号：R55，R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1366-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.024

Research progress in risk factors and mechanism of drug-induced hypofibrinogenemia

ZHENG Xin-xin[1], WANG Jing[1], ZHU Huai-jun[1, 2, 3], WANG Min[1, 2, 3*] (1. *Nanjing Drum Tower Hospital Clinical College of Traditional Chinese and Western Medicine*, *Nanjing University of Chinese Medicine*, *Nanjing* 210008; 2. *Department of Pharmacy*, *Drum Tower Hospital Affiliated to Medical School of Nanjing University*, *Nanjing* 210008; 3. *Nanjing Medical Center for Clinical Pharmacy*, *Nanjing* 210008)

作者简介：郑昕昕，女，硕士研究生，主要从事临床药学研究，email：1320853869@qq.com *通信作者：王敏，女，博士，主管药师，主要从事精准用药和药物毒性研究，email：wangmin19881013@126.com

Abstract: In recent years, the incidence of drug-induced hypofibrinogenemia has increased, which has attracted much attention from the medical community. Now there are many case reports and clinical studies at home and abroad. The clinical manifestations, influencing factors, mechanism and prognostic characteristics of the adverse reactions were discussed and studied. The occurrence of drug-induced hypofibrinogenemia will lead to the imbalance of blood coagulation in the body, which is closely related to patients' age, drug dosage, course of treatment and so on. This article reviewed drug-induced hypofibrinogenemia from risk factors and possible mechanism, hoping to enhance the safety of drug use and reduce the occurrence of adverse reactions.

Key words: drug; hypofibrinogenemia; adverse reaction; risk factor; mechanism

1　低纤维蛋白原血症的定义

纤维蛋白原（fibrinogen，FIB）是由肝细胞合成并分泌到血液中的一种糖蛋白类的凝血因子。作为纤维蛋白的前体，纤维蛋白原在凝血过程中起到关键性的作用，当血管壁出现损伤时，纤维蛋白原在丝氨酸蛋白酶凝血酶作用下转化为纤维蛋白，随后通过聚集和结合其他血细胞形成不溶性血凝块，起到阻塞血管的作用，防止过度出血[1-2]。

正常情况下，人血浆中纤维蛋白原水平在 2 ～ 4 g • L^{-1} 内半衰期为 3 ～ 5 d，当水平低于 2 g • L^{-1} 即可诊断为低纤维蛋白原血症（hypofibrinogenemia）。当纤维蛋白原水平降低至 1.5 g • L^{-1} 时需要输注纤维蛋白原进行治疗，当水平低于 1 g • L^{-1} 可能引起出血如消化道出血、肺部出血和脑出血等，严重者可能导致死亡。诱发低纤维蛋白原血症的因素主要包括家族遗传、肝脏疾病引起的肝功能受损、创伤后严重失血以及药物不良反应，引起低纤维蛋白原血症的药物包括替加环素、丙戊酸和蛇毒血凝酶等[3]。近年来，随着药物使用的多元化，药源性低纤维蛋白血症的研究报道逐渐增多，发病率逐年上升，不仅给患者及家属增加了额外的经济负担，也加重了患者的原发性疾病，甚至危及生命。

2　引起低纤维蛋白原血症的相关药物及危险因素

2.1　替加环素

替加环素（tigecycline）是一种广谱的甘氨酰环素类抗菌药物，对大多数革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和厌氧菌都有效，尤其对多药耐药菌如耐碳青霉烯类肠杆菌和多药耐药鲍曼不动杆菌有较强的抗菌活性[4]。替加环素于 2011 年在我国批准上市，临床上主要用于社区获得性肺炎、复杂性腹腔感染、严重的皮肤及软组织感染的治疗。常见的不良反应有胃肠道反应、肝损伤、低血糖、皮疹、凝血功能障碍和低纤维蛋白原血症等[5]。替加环素导致低纤维蛋白原血症的临床发病率在 15% ～ 60%，可能与年龄、剂量和疗程等因素有关[6]。

2.1.1　年龄　年龄是发生替加环素导致低纤维蛋白原血症的危险因素之一，替加环素在临床上多应用于危及生命的多药耐药菌的感染，这种感染多发生于高龄患者中，且大多感染较重，不良反应发生的概率较高，病死率也较高。Liu 等[6]回顾分析了 148 例患者使用替加环素与低纤维蛋白原血症的相关性，结果显示出现低纤维蛋白原血症组的年龄高于正常组（OR ＝ 8.96，95%CI [1.132 － 70.946]，P ＝ 0.038）。然而在 Zhang 等[7]的研究中，低纤维蛋白原血症的发生率与年龄无关。由此可见，年龄和替加环素所致低纤维蛋白原血症的发病率之间的关系尚不明确。

2.1.2　剂量　替加环素的推荐用药方案为负荷剂量 100 mg，维持剂量 50 mg。目前临床治疗严重感染多使用高剂量的给药方案，即负荷剂量 200 mg，维持剂量 100 mg，以提高临床治疗效果。对于严重复杂感染和多重耐药菌感染的患者，高剂量治疗方案可能比低剂量治疗方案更有效。一项临床研究回顾性分析 127 名使用替加环素的患者，发现高剂量应用替加环素是发生低纤维蛋白原血症的独立危险因素，患者接受高剂量替加环素治疗后纤维蛋白原血浆浓度明显下降，国际标准化比值（INR）显著上升，在停止治疗后逐渐恢复[8]。另一项研究也表明，替加环素给药剂量是低纤维蛋白原血症的危险因素，较低的给药剂量发生低纤维蛋白原血症的风险更低[9]。此外，还有两项临床研究[10-11]报道了高剂量治疗会导致患者纤维蛋白原水平显著降低。

2.1.3　疗程　目前替加环素推荐的常规疗程为 3 ～ 14 d，治疗时间越长，发生率越高，纤维蛋

白原降低的幅度越大。Zhang 等[7]回顾性分析引起低纤维蛋白原血症的相关因素发现，替加环素的用药疗程是危险因素之一，用药时间大于 14 d 的长疗程组不良反应的发生率高于常规疗程组，表明用药的持续时间与低纤维蛋白原血症的发生独立相关。另外一篇文献也报道了使用替加环素的患者在治疗过程发生低纤维蛋白原血症，在用药的第 7 日纤维蛋白原缓慢下降，且随着治疗时间的延长，纤维蛋白原显著降低[11]。

2.1.4 基线纤维蛋白原水平 基线纤维蛋白原与低纤维蛋白原血症相关性较大，如果患者在治疗前的基线纤维蛋白原水平比较低，则更容易发生低纤维蛋白原血症。一项研究表明，低纤维蛋白原组和正常组的基线纤维蛋白原水平分别为（3.46±1.01）g • L^{-1} 和（4.21±1.12）g • L^{-1}，治疗期间低纤维蛋白原血症组的纤维蛋白原下降 56.2%，其中 13.3% 的患者降至 1 g • L^{-1} 以下，正常组纤维蛋白原下降 33.8%[6]。

2.1.5 严重肝肾功能损伤 替加环素主要在肝脏中代谢，并将代谢产物分泌至胆汁中，其中 59% 经胆汁 / 粪便消除，中度和重度肝损伤分别使替加环素的血浆清除率降低 25% 和 55%[12]。因此，重度肝损伤的患者推荐维持剂量为 25 mg，而轻度或中度肝损伤患者在推荐中则不要求调整剂量。有报道发现两例肝功能不全的患者应用替加环素出现纤维蛋白原降低，并诱发了出血[13-14]。肾衰竭也是替加环素诱导的低纤维蛋白原血症的危险因素之一，替加环素 33% 通过肾脏排泄，多篇文献均提到肾衰竭患者使用替加环素治疗后导致纤维蛋白原显著降低，停用替加环素后，纤维蛋白原水平逐渐回升[6, 15]。原因可能是严重的肝脏和肾脏功能障碍的患者可能存在药物清除障碍，所以对于严重肝炎或肾衰竭的患者，应减少给药剂量，并密切监测凝血功能指标。然而有部分文献资料表明肝肾损伤与低纤维蛋白原血症的发生没有明确的相关性，且血液透析对替加环素的清除影响甚微[16-17]。

2.1.6 合并用药 替加环素主要在 ICU 重症患者中使用，患者大多感染严重、病情复杂，可能同时合并使用多种药物。目前，暂无证据证明替加环素与其他药物的合并使用会加重凝血障碍或降低纤维蛋白原血。Liu 等[6]回顾分析了 148 例使用替加环素的患者，根据不良反应的发生情况将其分为正常组和低纤维蛋白原血症组，分析替加环素合并使用其他药物对低纤维蛋白原血症的影响，在低纤维蛋白原血症组中，14.4% 的患者接受抗凝药物治疗，17.8% 的患者接受抗血小板药物治疗，24.4% 的患者接受头孢哌酮 / 舒巴坦治疗，结果表明低纤维蛋白原血症的发生与抗凝剂、抗血小板药物或头孢哌酮 / 舒巴坦的合并使用并不存在显著的相关性。在 Zhang 等[7]的研究中提到，患者使用替加环素同时合并使用了抗凝药物华法林和低分子肝素，或者合并使用了抗血小板药物阿司匹林和氯吡格雷，对低纤维蛋白原血症的发生均无影响。另一篇文献也表明，合并使用头孢哌酮 / 舒巴坦的患者与未合并用药的患者低纤维蛋白原血症发生率无显著差异[9]。所以现有研究表明合并用药可能并非是替加环素导致低纤维蛋白原血症的一个危险因素，需要更多的研究进行探讨。

2.2 丙戊酸

丙戊酸（valproic acid）是戊酸的衍生物，为治疗全身性强直阵挛发作和局灶性癫痫发作的一线抗癫痫药物。此外，它还可以用于平稳情绪，改善患者精神激越的症状，用于治疗与双向情感障碍有关的躁狂发作；还能保护神经，对神经外科术后、脑卒中的患者进行预防性给药，可以促进神经功能的恢复，有效控制癫痫发作[18]。丙戊酸主要由肝脏代谢，少量经过肾脏排泄，半衰期在 4 ～ 17 h，在儿童体内半衰期则较短，24 ～ 48 h 达到稳定状态。丙戊酸常见的不良反应包括恶心、腹痛、过敏、脑病、肝损伤和肾小管功能障碍等，还有一些不良反应如凝血功能异常、低纤维蛋白原血症等近来也多有提及。据文献报道，丙戊酸导致低纤维蛋白原血症的发生率在 23% ～ 57%，风险因素包括年龄、性别、给药剂量和血清浓度等[19]。

齐晓涟等[20]分析了丙戊酸引起的低纤维蛋白原血症与年龄、性别和给药剂量之间的关系，该研究纳入了 59 名因癫痫接受丙戊酸治疗的患者，年龄为 1 ～ 32 岁，丙戊酸的平均使用剂量为 18.1 mg/（kg • d），将病例根据纤维蛋白原降低的情况分为不良反应组和正常组，通过比较两组患者性别、年龄和使用剂量的差异，发现不良反应的发生与患者年龄成负相关，与使用剂量成正相关，与患者性别无关，因此该研究建议患者年龄小于 14 岁，使用丙戊酸剂量超过 13.31 mg • kg^{-1} 时，应密切监测纤维蛋白原水平。Vasudev 等[21]收集了 126 名接受丙戊酸治疗的精神病患者信息，分为不良反应组和正常组，分析

发现两组在年龄、性别和丙戊酸的血清浓度方面具有显著性差异，且女性受试者丙戊酸血清水平高于 80 μg·mL^{-1} 时，不良反应发生的风险显著增加，但在男性受试者均未发现相关性。

Kumar 等[19]综述了丙戊酸的使用与凝血功能异常的关系，患者在使用丙戊酸一段时间之后出现低纤维蛋白原血症，停用丙戊酸后纤维蛋白原水平升高，再次暴露于丙戊酸后纤维蛋白原水平降低，且丙戊酸血清浓度越高，纤维蛋白原水平下降的幅度越大。Abdallah 等[22]也综述了丙戊酸诱导凝血功能障碍发生的情况，丙戊酸的使用会导致血小板减少、Ⅶ因子水平降低和纤维蛋白原水平的下降等，其中纤维蛋白原水平与治疗时间成正相关，与丙戊酸血清水平成负相关，丙戊酸治疗超过 6 个月，血清水平超过 140 μg·mL^{-1} 时风险增加。在发生不良反应的情况下，减少药物剂量或停止用药后纤维蛋白原水平通常会升高。两篇文献均表明纤维蛋白原水平和丙戊酸的血清浓度成负相关。

然而有一项研究提出了不同的看法，认为凝血参数的降低不依赖于丙戊酸的剂量或治疗时间，Serdaroglu 等[23]回顾性分析了 29 名患者服用丙戊酸超过 6 个月的癫痫患者，观察凝血参数的变化，包括血小板计数和纤维蛋白原水平等。这些患者的使用剂量为 250 ～ 1000 mg/（kg·d），平均剂量为（639±230）mg/（kg·d），治疗时间为 6 ～ 57 个月，平均治疗时间为（21.7±13.5）个月，其中 20.7% 的患者凝血参数异常降低，与丙戊酸剂量或治疗时间无关。但这篇文献存在样本量较小的局限性，其结论仍需更多的大样本量前瞻性试验来进行验证。

2.3　蛇毒血凝酶

蛇毒血凝酶（snake venom thrombin-like enzymes）是一种止血药，止血效果显著，耐受性好，多用于术后止血以及呼吸道与消化道等出血的治疗，且血凝酶在手术切口的止血效果明显优于止血药物依他磺酸钠和维生素 K 等[24]。蛇毒血凝酶属于丝氨酸蛋白酶，类似于生理血凝酶，它可以催化纤维蛋白原生成单体纤维蛋白，随后单体纤维蛋白发生聚集，形成多聚体，并在被破坏的血管局部吸附血小板形成止血凝块，从而达到止血的效果[25]。由于蛇毒血凝酶的止血过程是通过降解纤维蛋白原发挥作用，如果长期广泛使用该药物，纤维蛋白原将被持续消耗，若消耗速度大于合成速度，血浆纤维蛋白原浓度则会降低，导致低纤维蛋白原血症的发生[26]。由于蛇毒血凝酶本身是一种止血药，但在临床应用上又有出血的可能，这一特殊性使其越来越受到重视，目前国内外文献报道临床应用蛇毒血凝酶发生低纤维蛋白原血症的概率在 0.0053% ～ 0.174%，但实际上的发生率可能远不止于此[26-27]。

低纤维蛋白原血症不良反应的发生可能与患者年龄、疗程和给药方式等因素密切相关[27]。黄茂娟等[28]收集了院内 117 例使用血凝酶患者信息，分为低纤维蛋白原组（57 例）和正常组（60 例），所有患者在应用蛇毒血凝酶治疗之前纤维蛋白原水平均正常，对比分析两组患者一般情况、用药情况以及实验室指标的变化情况。分析结果表明，患者年龄大于 60 岁更容易发生低纤维蛋白原血症（P = 0.007，OR = 11.248），应用蛇毒血凝酶的疗程过长会导致纤维蛋白原浓度显著下降而引起出血（P < 0.001，OR = 72.104），静脉给药相比于局部用药更容易发生此不良反应（P = 0.049，OR = 13.389）。Xu 等[29]报道了 11 例长期应用蛇毒血凝酶的患者，平均年龄为 31 岁（11 ～ 68 岁），监测其凝血功能的动态变化。患者在接触血凝酶超过 7 d 后，纤维蛋白原水平明显下降，停药后纤维蛋白原水平则逐渐恢复至正常。这可能是一种原发性纤维蛋白溶解的过程，所以该研究建议血液病患者必须谨慎应用蛇毒血凝酶，并且注意使用的疗程，以免出现纤维蛋白原降低导致出血的风险。

蛇毒血凝酶引起低纤维蛋白原血症可能也与基线纤维蛋白原有关。Lin 等[30]采用血栓弹性图监测 1025 名开胸手术后患者使用蛇毒血凝酶对凝血功能的影响，根据血栓弹性图检测结果将患者分为正常组和低凝血指数组，结果显示低凝血指数组的患者术前纤维蛋白原含量明显低于正常组，所以对于术前纤维蛋白原水平较低或者在正常值下限的患者，应慎用蛇毒血凝酶，在使用此类血凝酶时需监测患者的凝血功能。

2.4　其他药物

有文献报道垂体后叶素和别嘌醇也会引起低纤维蛋白原血症。垂体后叶素在临床上通常用于治疗咯血，贾玮等[31]曾报道 3 名患者使用垂体后叶素后出现低纤维蛋白原血症，随着药物剂量的减小，纤维蛋白原指标逐渐恢复到正常水平。别嘌醇是黄嘌呤氧化酶的抑制剂，临床上用于降低尿酸治疗痛风，Yin 等[32]曾报道一例 80 岁的男性患者口服别嘌醇治疗痛风，一段时间后出现低

纤维素血症，经过静脉输注纤维蛋白原和冷沉淀物的治疗后逐渐恢复，研究者认为别嘌醇可能暂时影响了肝脏的纤维素合成功能，导致纤维蛋白原生成的暂时性减少。

如表 1 所示，药源性低纤维蛋白原血症的危险因素发生大多与年龄、剂量、疗程、基线纤维蛋白原水平、肝肾功能等因素有关联，因此，建议对于年龄大于 60 岁或小于 14 岁、大剂量、长疗程、肝肾损伤以及基线纤维蛋白原水平偏低的患者应常规检测凝血指标，同时密切监测患者的出血情况，并且及时根据监测结果调整治疗方案。

表 1 药源性低纤维蛋白原血症的危险因素汇总

Tab 1 Risk factor of drug-induced hypofibrinogenemia

文献	药物	研究类型	样本数量	危险因素
Liu[6]	替加环素	回顾性研究	148 例患者	年龄、疗程、基线纤维蛋白原水平
Zhang[7]	替加环素	回顾性研究	426 例患者	疗程、肾损伤
Campany-Herrero[8]	替加环素	回顾性研究	78 例患者	剂量、疗程、基线纤维蛋白原水平
Hu[9]	替加环素	回顾性研究	128 例患者	剂量、疗程、基线纤维蛋白原水平、腹腔感染
Routsi[10]	替加环素	回顾性研究	45 例患者	剂量
Fan[11]	替加环素	病例报告	1 例患者	年龄、剂量
Cui[12]	替加环素	文献分析	17 篇文献 /184 例患者	剂量、肝肾损伤
Rossitto[13]	替加环素	病例报告	1 例患者	剂量、肝损伤
戴万程 [14]	替加环素	病例报告	1 例患者	肝损伤
Yılmaz[15]	替加环素	病例报告	1 例患者	年龄、肾损伤、肺部感染
Brandtner[16]	替加环素	实验性研究	14 例受试者	剂量
Kumar[19]	丙戊酸	综述	4 篇文献 /54 例患者	药物浓度
齐晓涟 [20]	丙戊酸	回顾性研究	59 例患者	年龄、剂量
Vasudev[21]	丙戊酸	回顾性研究	126 例患者	年龄、性别
Abdallah[22]	丙戊酸	综述	4 篇文献	药物浓度
Serdaroglu[23]	丙戊酸	回顾性研究	29 例患者	与剂量、治疗时间无关
赵珊珊 [27]	蛇毒血凝酶	文献分析	10 例不良反应报告	年龄、疗程、给药方式和基线纤维蛋白原
黄茂娟 [28]	蛇毒血凝酶	回顾性研究	117 例患者	年龄、疗程和给药途径
Xu[29]	蛇毒血凝酶	回顾性研究	11 例患者	疗程
Lin[30]	蛇毒血凝酶	回顾性研究	1025 例患者	基线纤维蛋白原水平
贾玮 [31]	垂体后叶素	病例报告	3 例患者	剂量
Yin[32]	别嘌醇	病例报告	1 例患者	疗程

3 药源性低纤维蛋白原血症的可能机制

3.1 影响维生素 K 的合成

维生素 K 是激活和合成纤维蛋白原过程中的重要因子，其合成不足会导致维生素 K 依赖性凝血功能障碍，增加了出血的风险 [33]。现有研究推测药物可能破坏肠道内菌群的生态平衡，抑制有益微生物的生长，而维生素 K 的合成依赖于肠道菌群的参与，菌群紊乱会引起机体维生素 K 缺乏，从而导致纤维蛋白原的合成减少。静脉补充维生素 K 并不能改善药物导致的低纤维蛋白原血症 [12-13]，孙露等 [34] 发现使用替加环素的同时应用维生素 K_1 注射液的患者仍可能出现纤维蛋白原的下降，这些结果都表明低纤维蛋白原血症可能并非由胃肠道菌群或维生素 K 合成的缺乏引起的。因此，还需要更多的研究来深入探讨肠道菌群与维生素 K 以及低纤维蛋白原血症之间的关系。

3.2 纤维蛋白原合成减少或消耗增多

纤维蛋白原是在肝脏中合成的一种作用于凝血过程的糖蛋白，若肝功能受损可能会引起纤维蛋白原的减少。Brandtner 等 [16] 进行了一项体外实验，在肝癌细胞分别加入不同浓度的替加环素，以测试替加环素对肝功能的抑制效果，结果显示在使用超治疗剂量的替加环素后，肝细胞线粒体活性迅速丧失。因此，影响肝功能的药物（替加环素、丙戊酸和别嘌醇等）可能通过这一途径导致纤维蛋白原合成的减少。

此外，纤维蛋白原的产生受细胞因子的调节，白介素 -6 促进纤维蛋白原的生物合成，而白介素 -1、白介素 -4、白介素 -10、白介素 -13 和肿瘤坏死因子 -α 抑制纤维蛋白原的合成。有研究者提出，替加环素和丙戊酸等药物可能通过引起某些细胞因子如白介素 -6 和肿瘤坏死因子 -α 等

水平的变化，从而干扰纤维蛋白原的产生[16，33]。

一些止血药如蛇毒血凝酶可以分解纤维蛋白原生成单体纤维蛋白，随后通过一系列聚集形成血凝块，从而达到止血的效果[35]。由于在药物发挥作用的过程中会不断地消耗纤维蛋白原，这一途径可能造成血浆纤维蛋白原浓度降低，导致低纤维蛋白原血症的发生。

3.3 免疫因素

药源性低纤维蛋白原血症发生的同时可能会出现血小板降低。与血小板减少的发生机制类似，药源性低纤维蛋白原血症可能是由于药物与一些大分子蛋白质结合形成抗原分子，刺激体内抗体的产生，这些抗体在补体作用下破坏纤维蛋白原，从而使体内纤维蛋白原减少[36]。

药物导致的低纤维蛋白原血症的发生机制尚不完全明确，目前所讨论的一些潜在机制只是研究者们提出的假说，仍需更多基础实验研究，深入探索确切的发生机制。

4 药源性低纤维蛋白原血症的治疗和预后

目前，药物导致的低纤维蛋白原血症还没有特异性的治疗方法，但可以通过停用可疑药物来改善。多项临床案例表明，患者出现低纤维蛋白原血症后，立即停用可疑药物，纤维蛋白原水平可在 3 ～ 8 d 内回升至正常水平[37-39]。若病情继续进展可补充纤维蛋白原替代物，包括新鲜冰冻血浆、冻干人纤维蛋白原和冷沉淀[40]。一般在停用药物和输注纤维蛋白原后，数天内出血情况即可得到缓解，纤维蛋白原水平也会逐渐恢复，较少出现危及生命的情况。

5 总结

药物引起的低纤维蛋白原血症一般认为是可逆的，但低纤维蛋白原血症的发生往往会增加治疗难度，延长住院时间，增加经济负担，常见引起低纤维蛋白原血症的药物有替加环素、丙戊酸、蛇毒血凝酶、垂体后叶素和别嘌醇等，且与年龄、性别、用药剂量、疗程、血药浓度、给药方式、肝肾功能和基线纤维蛋白原等因素有关，及时停药和输注纤维蛋白原治疗后，多数患者可以缓解，极少有严重出血和危及生命的情况发生。

但是目前对药源性低纤维蛋白原血症的研究还存在一定的局限性。首先，目前的研究多停留于对病例的临床症状、实验室指标变化进行描述以及回顾性的临床研究，无法确认数据的准确性且可能受到选择偏倚的影响；其次，对发生机制仅处于猜测和推论的阶段，没有明确的实验研究结果进行证实；再者，研究者们仅发现这些危险因素与药源性低纤维蛋白原血症之间存在联系，尚不明确这些因素是如何引起药源性低纤维蛋白原血症的，难以对该不良反应进行早期预测。所以期待能够开展更多前瞻性的研究以证实药源性低纤维蛋白原血症的发生机制和寻找出危险因素与该不良反应的内在联系，为进一步预防、诊断和治疗药源性低纤维蛋白原血症奠定基础。

参考文献

[1] 王蔚，周愚，童珊珊，等 . 创伤性凝血病：低纤维蛋白原血症 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志，2019，18（1）：103-107.

[2] Weisel JW，Litvinov RI. Fibrin formation，structure and properties [J]. Subcell Biochem，2017，82：405-456.

[3] Nikolaos S，Eleni P，Eleni G，et al. Hypofibrinogenemia induced by tigecycline：a potentially life-threatening coagulation disorder [J]. Infect Dis，2015，47（10）：743-746.

[4] Fritzenwanker M，Imirzalioglu C，Herold S，et al. Treatment options for carbapenem-resistant gram-negative infections [J]. Dtsch Arztebl Int，2018，115（20-21）：345-352.

[5] Leng B，Xue YC，Zhang W，et al. A Retrospective analysis of the effect of tigecycline on coagulation function [J]. Chem Pharm Bull，2019，67（3）：258-264.

[6] Liu J，Yan Y，Zhang F. Risk factors for tigecycline-associated hypofibrinogenemia [J]. Ther Clin Risk Manag，2021，17：325-332.

[7] Zhang Q，Wang J，Liu H，et al. Risk factors for tigecycline-induced hypofibrinogenaemia [J]. J Clin Pharm Ther，2020，45（6）：1434-1441.

[8] Campany-Herrero D，Larrosa-Garcia M，Lalueza-Broto P，et al. Tigecycline-associated hypofibrinogenemia in a real-world setting [J]. Int J Clin Pharm，2020，42（4）：1184-1189.

[9] Hu J，Xiao YH，Zheng Y，et al. Clinical characteristics and risk factors of tigecycline-associated hypofibrinogenaemia in critically ill patients [J]. Eur J Clin Pharmacol，2020，76（7）：913-922.

[10] Routsi C，Kokkoris S，Douka E，et al. High-dose tigecycline-associated alterations in coagulation parameters in critically ill patients with severe infections [J]. Int J Antimicrob Agents，2015，45（1）：90-93.

[11] Fan Q，Huang W，Weng Y，et al. Hypofibrinogenemia induced by high-dose tigecycline-case report and review of literature [J]. Medicine，2020，99（43）：e22638.

[12] Cui N，Cai H，Li Z，et al. Tigecycline-induced coagulopathy：a literature review [J]. Int J Clin Pharm，2019，41（6）：1408-1413.

[13] Rossitto G，Piano S，Rosi S，et al. Life-threatening coagulopathy and hypofibrinogenaemia induced by tigecycline in a patient with advanced liver cirrhosis [J]. Eur J Gastroen-

terol Hepatol，2014，26（6）：681-684.
[14] 戴万程，苏丹 . 替加环素致凝血功能异常 1 例的药学监护 [J]. 临床合理用药杂志，2018，11（1）：132-133.
[15] Yılmaz DF，Yıldırım H，Şen EM. A Lesser known side effect of tigecycline：hypofibrinogenemia [J]. Turk J Haematol，2018，35（1）：83-84.
[16] Brandtner A，Bachler M，Fries D，et al. Tigecycline interferes with fibrinogen polymerization independent of peripheral interactions with the coagulation system [J]. Antibiotics（Basel），2020，9（2）：84.
[17] Broeker A，Wicha SG，Dorn C，et al. Tigecycline in critically ill patients on continuous renal replacement therapy：a population pharmacokinetic study [J]. Crit Care，2018，22：341.
[18] 徐如祥 . 丙戊酸钠的神经保护机制及临床应用 [J]. 中华神经创伤外科电子杂志，2017，3（6）：325-329.
[19] Kumar R，Vidaurre J，Gedela S. Valproic acid-induced coagulopathy [J]. Pediatr Neurol，2019，98：25-30.
[20] 齐晓涟，杨迦雯 . 丙戊酸引起癫痫患者纤维蛋白原减少的相关因素分析 [J]. 中国药房，2018，29（11）：1550-1554.
[21] Vasudev K，Keown P，Gibb I，et al. Hematological effects of valproate in psychiatric patients：what are the risk factors? [J]. J Clin Psychopharmacol，2010，30（3）：282-285.
[22] Abdallah C. Considerations in perioperative assessment of valproic acid coagulopathy [J]. J Anaesthesiol Clin Pharmacol，2014，30（1）：7-9.
[23] Serdaroglu G，Tütüncüoglu S，Kavakli K，et al. Coagulation abnormalities and acquired von Willebrand’s disease type 1 in children receiving valproic acid [J]. J Child Neurol，2002，17（1）：41-43.
[24] Gupta G，Muthusekhar RM，Kumar SP. Efficacy of hemocoagulase as a topical hemostatic agent after dental extractions：a systematic review [J]. Cureus，2018，10（3）：e2398.
[25] Waheed H，Moin SF，Choudhary MI. Snake venom：from deadly toxins to life-saving therapeutics [J]. Curr Med Chem，2017，24（17）：1874-1891.
[26] Zhou HB. Hypofibrinogenemia caused by hemocoagulase after colon polyps excision [J]. Am J Case Rep，2017，18：291-293.
[27] 赵珊珊，李静 . 注射用蛇毒类血凝酶制剂的不良反应文献分析 [J]. 中国医院药学杂志，2015，35（24）：2227-2230.
[28] 黄茂娟，王亚萍，庄伟煌 . 蛇毒血凝酶致低纤维蛋白原血症的临床特征及危险因素分析 [J]. 中国实验血液学杂志，2020，28（2）：583-587.
[29] Xu LL，Wu JD. Prolonged hemocoagulase agkistrodon halys pallas administration induces hypofibrinogenemia in patients with hematological disorders：a clinical analysis of 11 patients [J]. Indian J Hematol Blood Transfus，2018，34（2）：322-327.
[30] Lin C，Zhang J，Yang X，et al. Use of thromboelastography to monitor effects of the hemocoagulase on the blood coagulation in patients after thoracic surgery [J]. Ann Palliat Med，2020，9（4）：2090-2095.
[31] 贾玮，张冬睿，陈丽娟，等 . 垂体后叶素致低钾血症和低纤维蛋白原血症三例报告 [J]. 天津医药，2016，44（1）：127-128.
[32] Yin Z，Xu J，Li Y，et al. Transient hypofibrinogenemia due to allopurinol [J]. Drug Des Devel Ther，2014，8：1231-1233.
[33] Araki S，Shirahata A. Vitamin K deficiency bleeding in infancy [J]. Nutrients，2020，12（3）：780.
[34] 孙露，张波，吴斌，等 . 替加环素对住院患者血浆纤维蛋白原水平的影响及相关因素分析 [J]. 药物不良反应杂志，2017，19（1）：31-36.
[35] 吴广通，张夏华，石玉岚 . 注射用白眉蛇毒血凝酶止血机制初步研究 [J]. 中国医药导报，2011，8（11）：47-49.
[36] 黄梅娟，薛加玲，于维松 . 替加环素相关凝血功能障碍文献概述 [J]. 中国药师，2017，20（11）：2046-2048，2095.
[37] Wu X，Zhao P，Dong L，et al. A case report of patient with severe acute cholangitis with tigecycline treatment causing coagulopathy and hypofibrinogenemia [J]. Medicine，2017，96（49）：e9124.
[38] Karakayalı B，Onsal Ozturk D，Yazar AS，et al. Hypofibrinogenemia and intra-articular hemorrhage due to valproic acid [J]. Pediatr Int，2016，58（12）：1358-1359.
[39] Lu S，Han M，Song Y，et al. Hemocoagulase agkistrodon can prevent bleeding and induce hypofibrinogenemia in hepatic disease cases [J]. Int J Clin Pharmacol Ther，2020，58（6）：351-353.
[40] 黄晓梅，高红瑾 . 蛇毒血凝酶致低纤维蛋白原血症浅析 [J]. 海峡药学，2016，28（6）：267-269.

（收稿日期：2021-07-08；修回日期：2021-10-09）

能量代谢与氧化应激在肿瘤中的作用及其相互关系

阎鑫宇，张绍林，陈海燕*，戴琴升*（中国药科大学，南京　210009）

摘要：肿瘤细胞的发展是一个快速增殖的过程，在此过程中需要大量的能量供应，而这些能量主要通过细胞的糖代谢来提供，少量由谷氨酰胺代谢及脂肪酸代谢补充生成。伴随着线粒体呼吸链三磷酸腺苷（ATP）的生成，肿瘤细胞会产生大量的活性氧（ROS），使其处在一个相比于正常细胞 ROS 水平更高的环境中。众所周知，过量的 ROS 会造成细胞损伤甚至死亡，然而肿瘤细胞却能够在高 ROS 的环境中继续发生发展。本文主要通过对能量代谢及氧化应激的介绍来简单阐述肿瘤细胞中能量代谢与氧化应激之间的相互作用，为后续的肿瘤研究提供理论依据。

关键词：肿瘤；能量代谢；氧化应激；活性氧

中图分类号：R730　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)06-1373-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.025

Role and relationship between energy metabolism and oxidative stress in tumor

YAN Xin-yu, ZHANG Shao-lin, CHEN Hai-yan*, DAI Qin-sheng* (*China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 210009)

Abstract: Tumor cells can rapidly proliferate. In this process, a large amount of energy is required, which is mainly provided by glucose metabolism, and a small amount is supplemented by glutamine metabolism and fatty acid metabolism. With the generation of adenosine triphosphate (ATP) from the mitochondrial respiratory chain, tumor cells will produce a lot of reactive oxygen (ROS), the exposing cell to an environment with higher ROS levels than needed by normal cells. Excessive ROS can cause cell injury or even death, but tumor cells can continue to develop in a high ROS environment. This review mainly explained energy metabolism, oxidative stress and the interactions between them to provide a theoretical basis for future research on tumor.

Key words: tumor; energy metabolism; oxidative stress; reactive oxygen

癌症是严重威胁人类生命健康的一类疾病。据统计，2019 年全球约有 2360 万癌症新发病例，约 1000 万人死于癌症 [1]。虽然自 1991 年起，美国的癌症病死率持续下降，总体约下降 32%[2]。但是，全球的形式仍然不容乐观，科学家们仍然在不断探索，希望能够通过更加深入地了解癌症以找到有效的治疗方法。在对癌症生物学的研究中，癌症代谢是研究最为深入的热门研究方向之一。早在 20 世纪 20 年代，Warburg 就观察到肿瘤细胞中的糖酵解速率会明显升高，即使在氧气充足的情况下，肿瘤细胞仍然会以糖酵解为主，这种现象被称作“有氧糖酵解”或“Warburg 效应”[3]。2011 年，能量代谢重编程被列入了肿瘤的十大特征之一 [4]。能量代谢重编程不仅为肿瘤细胞的生长和增殖提供能量和生物大分子合成所需的物质，同时还支持肿瘤细胞在应激条件下能够生存下来。近年来，越来越多的研究表明肿瘤能量代谢与氧化应激关系密切，肿瘤代谢重编程与氧化应激反应在肿瘤的发生发展中起着关键性的作用。本文旨在对肿瘤能量代谢，氧化应激以及它们之间的关系作一综述。

1　肿瘤细胞中的能量代谢

能量代谢是机体生命活动的基本特征之一，无论是在正常细胞还是肿瘤细胞中，细胞的生长

基金项目：国家自然基金青年科学基金项目（No.NSFC82001891）；杰出青年基金项目（No. BK20190028）。

作者简介：阎鑫宇，女，硕士研究生，主要从事肿瘤药理学方面的研究，email：13298686278@163.com　*通信作者：戴琴升，女，硕士研究生导师，主要从事肿瘤药理学方面的研究，email：qsheng0904@163.com；陈海燕，女，教授，博士研究生导师，主要研究肿瘤诊断及靶向治疗的新技术手段，email：chenhaiyan@cpu.edu.cn

增殖都需要能量来支持。细胞中的能量主要是由三磷酸腺苷（ATP）所提供，而细胞中大部分的ATP是通过葡萄糖分解所产生的，少量由谷氨酰胺分解以及脂肪酸代谢补充提供。

1.1 糖代谢

Warburg假说在肿瘤糖代谢的研究领域是一个里程碑式的标志。该假说认为糖酵解是肿瘤细胞的主要供能途径，即使氧气充足，肿瘤细胞依旧依赖于糖酵解供能。1分子的葡萄糖通过糖酵解途径分解成丙酮酸共涉及9～10个步骤，期间会产生2分子ATP，而通过线粒体的氧化磷酸化完全氧化则会产生32～33分子ATP。肿瘤细胞为了快速增殖需要大量的能量供应，但是它却选择了产能更低的糖酵解。Warburg认为这是由于肿瘤细胞的线粒体功能受损，使其只能依赖于糖酵解产生能量。但是，通过对肿瘤细胞线粒体的研究发现，肿瘤细胞中的线粒体保持着完整的功能，而且当靶向敲除线粒体DNA时，无论是体外还是体内的癌细胞系致瘤功能都会下降[4-5]。甚至有研究发现肿瘤细胞会积累大量的线粒体，其中具有更多受损线粒体的肿瘤细胞更趋向于维持良性状态，而积累了更多形态完整、功能正常线粒体的肿瘤细胞则更易发展为恶性[6-8]。

事实上，大多数的肿瘤细胞仍然依赖于线粒体的氧化磷酸化供能。对于肿瘤细胞而言，线粒体代谢是必不可少的。三羧酸（TCA）循环不仅可以提供氧化磷酸化所需的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NADH）和还原型黄素腺嘌呤二核苷酸（$FADH_2$），还能产生用于合成核苷酸、脂质、氨基酸等生物大分子的代谢物，当TCA循环中某些蛋白突变时会造成致癌代谢物的积累，如琥珀酸和富马酸[9]。Gentric等[10]通过代谢组学、蛋白组学以及遗传组学相结合发现高级别浆液性卵巢癌可分为高氧化磷酸化型和低氧化磷酸化型（即有氧糖酵解）。而通过正电子断层扫描（PET）成像技术也观察到小鼠的肺癌组织部位线粒体膜电位更高，即线粒体活性更强[11]；另外，在黑色素瘤、胆管癌、白血病、乳腺癌等癌症中均发现线粒体是细胞的主要能量来源，使用二甲双胍或PGC-1α等靶向氧化磷酸化的药物可以显著抑制肿瘤细胞的增殖[12-15]。这些研究均表明线粒体在肿瘤细胞中发挥着重要的作用。

既然线粒体功能如此强大，那么为什么有些肿瘤细胞仍然会选择产能更低的糖酵解途径来作为主要供能方式呢？首先，细胞质生成ATP的速度要比线粒体快100倍，即产量低但速率高，只要葡萄糖供应充足，单位时间内糖酵解产生的ATP就高于氧化磷酸化[16]；其次，糖酵解的增强会导致代谢中间物积累，它们可以通过其他反应生成肿瘤细胞增殖所需的生物大分子，如核酸、脂质、氨基酸等；最后，糖酵解中大量堆积的丙酮酸在乳酸脱氢酶A（LDHA）的作用下生成乳酸，乳酸通过单羧酸转运蛋白4（MCT4）转运到细胞外，使细胞外形成一个酸性环境，有利于肿瘤细胞的生长、侵袭和转移。而有些肿瘤细胞之所以表现出高糖酵解率，是由致癌基因的激活（如*Kras*），*c-Myc*、肿瘤抑制因子*P53*或磷酸酯酶与张力蛋白同源物（*Pten*）的丧失，PI3K-AKT-mTOR信号通路的失调所导致的[17]。

另外，研究发现肿瘤细胞会通过改变自身的代谢方式以适应不同的生存挑战，这一过程被称为代谢可塑性。在使用靶向肿瘤细胞增殖期化疗药物时，肿瘤干细胞（CSC）可以通过调节自身的代谢过程，使其处于一种能量代谢低下的“静息”状态，从而逃避化疗药物的杀伤作用。同时，CSC还会促进磷酸戊糖途径的代谢，加强自身的抗氧化能力以适应不同的肿瘤微环境（TME）[18]。Elgendy等[19]通过间歇性节食及给药也证明肿瘤细胞具有代谢可塑性，为了适应不同的生存挑战可以在糖酵解和氧化磷酸化之间进行改变。腺苷酸激活蛋白激酶（AMPK）和缺氧诱导因子（HIF）-1是氧化磷酸化和糖酵解的两种主要调控因子。当细胞处在氧化应激，葡萄糖匮乏或急需能量供应的状态时，AMPK就会被激活，通过调控多条信号通路促进脂肪酸氧化、氨基酸代谢加强回补途径从而促进细胞的氧化磷酸化，最终实现ATP相对含量的升高[20]。在缺氧情况下，大多数真核细胞会通过HIF-1诱导参与糖酵解基因的表达；而常氧状态下，肿瘤细胞依旧会通过多种机制表现出组成性HIF-1的激活，以此来抑制丙酮酸脱氢酶（PDH）的活性[21]，促进α-酮戊二酸脱氢酶（KGDH）的蛋白水解[22]，从而促进肿瘤细胞的有氧糖酵解以及谷氨酰胺代谢相关的脂质合成。Jia等[23]通过对AMPK、HIF-1和混合型数学模型的建立以及对乳腺癌患者临床样本的代谢组学和转录组学的研究验证了肿瘤细胞能够在糖酵解和氧化磷酸化之间相互转变，只有当两种途径被同时抑制时，肿瘤细胞的生长增殖才会被有效抑制。

1.2 谷氨酰胺代谢

谷氨酰胺代谢是肿瘤细胞的另一大标志[24]。正常情况下，谷氨酰胺是人体血液中含量最丰富的一种非必需氨基酸[8]，由谷氨酸和氨在谷氨酰胺合成酶（GS）的催化作用下合成。但是，在肿瘤细

胞或快速增殖的细胞中，从头合成谷氨酰胺不能满足细胞能量代谢对于谷氨酰胺的需求，故其转变为条件性必需氨基酸。谷氨酰胺通过氨基酸转运蛋白 SLC1A5 和 SLC7A5/SLC3A2 进入到细胞内，并在线粒体中经谷氨酰胺酶（GLS）的作用脱氨转化为谷氨酸，谷氨酸在谷氨酸脱氢酶（GDH）或者氨基酸转氨酶的作用下生成 *α*- 酮戊二酸（KG）回补到 TCA 循环中，通过氧化磷酸化为细胞提供能量。研究发现，相比于 TME 中的免疫细胞，肿瘤细胞会摄取更多的谷氨酰胺和更少的葡萄糖。同时，实验观察到谷氨酰胺的摄取及代谢能够明显抑制葡萄糖代谢，具体机制尚不清楚 [25]，但说明谷氨酰胺代谢对于肿瘤细胞非常重要。在肿瘤细胞中，原癌基因 *c-Myc* 能够诱导 SLC1A5 和 SLC7A5/SLC3A2 以及 GLS 的表达，从而促进谷氨酰胺代谢 [26]。而大多数肿瘤细胞中高表达的 HIF-1 会通过促进 *α*-KGDH 的泛素化和蛋白水解，使谷氨酰胺代谢产生的 KG 在异柠檬酸脱氢酶（IDH）的作用下通过消耗 NADPH 逆反应最终生成乙酰辅酶 A（CoA），用于脂质合成 [22，27]。

1.3 脂肪酸代谢

近年来，研究人员对于肿瘤细胞中的脂肪酸代谢越来越关注，因为在快速增殖的肿瘤细胞中，脂肪酸不仅是膜形成的主要成分，还是能量供应的一种来源以及信号传导的二级信使 [28]。在能量应激的状态下，线粒体中的脂肪酸会通过 *β*- 氧化产生乙酰 CoA，并伴有 NADH 和 $FADH_2$ 的生成，从而支持细胞的生物合成途径并产生 ATP。另外，磷脂肌醇 3- 激酶（PI3K）调控多条重要的信号通路：PI3K-AKT 信号通路通过激活葡萄糖转运蛋白 1（GLUT1）及己糖激酶促进葡萄糖摄取和糖酵解；PI3K-AKT 信号通路还能够通过激活谷氨酸丙酮酸转氨酶增强谷氨酰胺的回补反应以及脂质的重塑 [26]。

2 氧化应激对肿瘤细胞的影响

当细胞内的氧化还原稳态被打破时，细胞就会发生氧化应激。从理论上来说，氧化应激是指与抗氧化剂相比，细胞内的活性物质 ROS 或活性氮（RNS）相对过量。本文主要讨论 ROS 对肿瘤细胞的影响。

ROS 包括超氧阴离子（$O_2 \cdot^-$），过氧化氢（H_2O_2）和羟基自由基（OH·），它们的氧化性由强到弱依次是 OH·、$O_2 \cdot^-$、H_2O_2，但即使是它们中氧化性最弱的 H_2O_2 仍然具有很强的氧化能力。细胞内 ROS 的主要来源包括：① 线粒体呼吸链复合物Ⅰ处的反向电子泄露或复合物Ⅲ中半醌形式的辅酶 Q（CoQ）与 O_2 之间的反应生成 $O_2 \cdot^-$；② 在生长因子信号传导过程中，NADPH 氧化酶（NOXs）将 O_2 还原为 $O_2 \cdot^-$；③ 内质网中蛋白质的折叠过程产生 H_2O_2[29]。

在肿瘤细胞中 ROS 的影响根据浓度的不同而不同，过量的 ROS 对肿瘤细胞是有损伤的，严重情况会造成细胞衰老、凋亡或者铁死亡；但是，少量或者适量的 ROS 则会促进肿瘤的生长增殖，甚至是肿瘤发生发展过程中必不可少的一部分 [30]。

2.1 ROS 促进肿瘤的发生发展

适量的 ROS 可以参与细胞信号调控，促进肿瘤细胞的发生发展。较为经典的有 ROS 对生长因子信号的影响，对丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）信号通路的调控以及对血管内皮生长因子（VEGF）的作用。据报道，ROS 可以氧化表皮生长因子受体（EGFR）的 Cys-797，增加 EGFR 酪氨酸磷酸化，刺激下游的信号通路，如 Ras/MAPK 通路和 PI3K/AKT 通路，从而促进肿瘤细胞的生长 [31-32]。ROS 也可直接作用于 MAPK 相关信号通路，H_2O_2 作为乳腺癌雌激素代谢的副产物，可以直接激活 MAPK-ERK1/2 通路，从而促进肿瘤细胞生长增殖，同时有利于肿瘤的侵袭转移 [33]。而在促肿瘤转移方面，ROS 可以通过诱导细胞中 VEGF 的表达，激活基质金属蛋白酶（MMP），从而促进细胞的转移 [34]；也可以在缺氧诱导因子 -1*α*（HIF-1*α*）的作用下与 VEGF 相互作用，诱导新生血管的生成，促进肿瘤细胞的转移 [35]。

2.2 ROS 诱导肿瘤细胞死亡

ROS 对肿瘤细胞的作用是双面的，当细胞内的 ROS 水平超过阈值时就会产生细胞毒性，造成肿瘤细胞凋亡或铁死亡。Huang 等 [36] 通过对抑制素（PHB）的研究发现 PHB 会抑制胶质母细胞瘤干细胞中 ROS 的产生，造成肿瘤进展和不良预后；而一些小分子探针或纳米粒子也被设计通过光动力疗法或光热疗法刺激细胞内产生大量 ROS，从而诱导细胞凋亡 [37-38]。ROS 是细胞凋亡的有效刺激剂，在线粒体途径，死亡受体途径以及内质网（ER）应激途径中都发挥着核心作用 [39]。而每一种途径中，线粒体都是触发凋亡的核心。高浓度 ROS 会损伤线粒体膜，使线粒体内膜通透性丧失，线粒体通透性转换孔（MPTP）开放，导致线粒体膜电位被破坏，细胞色素 C 释放，从而激活 caspase-9，进一步激活 caspase-3 和 caspase-7，造成细胞凋亡 [40]。ROS 还可以与肿瘤坏死因子 -*α*（TNF-*α*）在反馈回路中相互串扰 [41]，激活死亡受体通路。另外，ROS 还会加剧蛋白的错误折叠，造成严重的内质网应激，从而激活凋亡级联反应 [39]。

近几年来铁死亡成为引起细胞死亡的又一研究热点，这是一种铁依赖性的死亡形式，有别于细胞凋亡、自噬和坏死。有研究表明，ROS可以触发铁死亡，当细胞中谷胱甘肽过氧化酶（GPX4）被抑制时，细胞内的谷胱甘肽（GSH）耗竭，导致脂质过氧化物累积，最终，在过渡金属铁的存在下磷脂过氧化物发生催化反应，引起细胞死亡[42]。Badgley等[43]的研究发现，在基因小鼠中半胱氨酸（Cys）的耗竭可以诱发铁死亡。嵌于细胞膜表面的SLC3A2和SLC7A11以二聚体形式组成了xCT，它们作用于谷氨酸和胱氨酸反向转运。其中，SLC7A11将胱氨酸运送至细胞内生成Cys，当SLC7A11的表达被抑制后，细胞内的Cys耗竭，诱发铁死亡。

3 肿瘤能量代谢与氧化应激的关系

肿瘤细胞为了应对氧化应激，将ROS的浓度维持在一个既不会伤害到细胞又能促进细胞生长增殖的合适范围内，肿瘤细胞需要改变代谢或者基因的表达增加自身的抗氧化能力，而这一过程与能量代谢有着密切的关联。

3.1 肿瘤能量代谢对ROS的影响

细胞中$O_2 \cdot^-$在超氧化物歧化酶（SOD1，SOD2和SOD3，分别定位于细胞质、线粒体基质或细胞外）的作用下生成氧化性稍差的H_2O_2，H_2O_2随后在过氧化物酶（PRXs）或者过氧化氢酶的作用下生成水，而这一过程中PRXs的活性位点Cys被氧化[44]，需要靠硫氧还蛋白（TXN）还原氧化的PRXs来完成催化[45]；当然H_2O_2还可以通过GSH氧化成氧化型谷胱甘肽（GSSG）的过程中解毒生成水[46]，最后GSSG再在谷胱甘肽还原酶（GR）的作用下还原成GSH完成催化循环[47]。人体中的抗氧化剂有很多，基本可分为水溶性和脂溶性两大类，它们协同作用，共同维持细胞的氧化还原稳态。其中，GSH体系和TXN体系是两种重要的抗氧化酶体系，而它们均由NADPH来维持，使其一直处于还原状态。所以，NADPH在细胞抗氧化方面发挥着至关重要的作用。

细胞中的NADPH主要来源于磷酸戊糖途径（PPP），还有一部分来自于由丝氨酸羟甲基转移酶2（SHMT2）和亚甲基四氢叶酸脱氢酶2（MTHFD2）调节的丝氨酸（Ser）分解代谢[48]。当细胞短时间急性暴露于ROS后，细胞会主要调整自身的代谢以应对氧化应激。大量的ROS会迅速消耗细胞中的NADPH，但由于NADPH对葡萄糖-6-磷酸脱氢酶（G6PDH）活性起到负反馈调节，所以细胞中的G6DPH被激活并通过PPP的氧化将糖酵解转化为核苷酸的合成，增加NADPH的含量[49]。同时，ROS还会通过氧化3-磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）的Cys-152和丙酮酸激酶同工酶M2（PKM2）的Cys-358[29]抑制GAPDH和PKM2的活性，从而导致糖酵解被中断，TCA循环及氧化磷酸化通量减少，ROS的产生降低，而糖酵解上游代谢中间体的大量堆积使得葡萄糖-6-磷酸从糖酵解途径中溢出，进入到PPP途径中产生大量的NADPH，维持细胞的氧化还原稳态。

PKM2是有氧糖酵解的一个标志性蛋白，同时它对细胞内的氧化还原稳态十分敏感。PKM2失活不仅会使葡萄糖代谢从糖酵解重新路由至PPP途径，造成细胞内葡萄糖-6-磷酸溢出，促进NADPH的生成，还有助于GSH的合成。研究表明，由于PKM2的失活造成的3-磷酸甘油醛的累积可以通过Ser合成途径消耗，产生的Ser可用于形成甘氨酸（Gly）和Cys，用于合成GSH[50]。不过，也有研究表明PKM2表达的升高，有利于有氧糖酵解，可以促进肿瘤细胞的生长增殖。Wang等[51]的研究证明外泌体PKM2可以中和顺铂引起的ROS，抵抗细胞凋亡，造成耐药性；Liang等[52]的研究也发现PKM2可以磷酸化Bcl2，从而稳定ROS引起的细胞凋亡。

另外，生长在低糖低氧环境中的肿瘤细胞，由于营养匮乏，细胞中ROS水平升高，氧化PPP的通量被限制，使得细胞中的NADPH水平下降无法抵抗氧化应激。在这种情况下，细胞会通过减少需要消耗高水平NADPH的合成代谢途径（如脂质合成）和刺激PPP依赖性的NADPH来激活AMPK从而提高NADPH水平[53]。

3.2 ROS造成的基因改变对肿瘤能量代谢的影响

当细胞长时间慢性暴露于ROS时，细胞会改变基因的表达，激活多种转录因子来调节细胞的氧化还原状态，如激活蛋白1（AP-1）、HIF-1α、热休克因子1（HSF1）、核因子-κB（NF-κB）、核因子红细胞2-相关因子2（NRF2）和肿瘤蛋白P53[54]。这些转录因子都与致癌作用有关。此外，转录调节蛋白BTB和CNC同系物1（BACH1）是一种拮抗NRF2的氧化应激反应的阻遏物，本身被促氧化剂抑制，也会影响癌症的进化转移[55]。这些转录因子不可能同时激活，但是它们的差异化激活程度目前尚不明确。目前存在一种假说，是氧化应激“分层反应”假说，以NRF2作为抗氧化的第一层防御，AP-1和NF-κB作为第二层防御，涉及细胞凋亡的激活作为最后一层防御[56]。研究表明，肿瘤形成早期随着细胞中ROS水平

的升高，GLUT1、己糖激酶 2（HK2）、MCT4、G6PDH 和 TP53 诱导糖酵解及凋亡调节因子（TIGAR）的表达上调，同时氧化磷酸化及琥珀酸脱氢酶被抑制，以此来减少细胞的氧化磷酸化通量，增加葡萄糖分解向 PPP 的转化，从而减少 ROS 的产生，增加抗氧化剂的生成，以此来抵抗氧化应激，维持细胞的生长增殖[57]。而其中抗氧化转录因子 HIF-1α 可能会影响 GLUT1、HK2、MCT4 的转录，NF-κB 影响 GLUT1 的表达，P53 影响 TIGAR 的转录。

4 总结

综上所述，肿瘤细胞需要大量的能量来维持其发生发展，而在氧化磷酸化（产 ATP 这一过程中）所释放的 ROS 也会随之增多，造成肿瘤细胞处在一个相比于正常细胞 ROS 水平更高的环境中。为了维持细胞的生长增殖，肿瘤细胞会通过改变自身的代谢以及基因表达来增加抗氧化能力，与此同时，代谢的转变以及一些抗氧化转录因子又会影响到细胞能量代谢的相关通路。它们之间相互影响、相互作用，共同促进了肿瘤细胞的发生发展。通过对能量代谢及氧化应激的研究，可以为抗肿瘤药物的研发及其作用机制的研究提供一些新方向；同时，通过对它们之间关系的研究，也可以为后续的肿瘤治疗以及药物联用等拓宽新思路。

参考文献

[1] Kocarnik JM，Compton K，Dean FE，et al. Cancer incidence，mortality，years of life lost，years lived with disability，and disability-adjusted life years for 29 cancer groups from 2010 to 2019：a systematic analysis for the global burden of disease study 2019 [J]. JAMA Oncol，2021，doi：10.1001/jamaoncol-2021.6987.

[2] Siegel RL，Miller KD，Fuchs HE，et al. Cancer statistics，2022 [J]. CA Cancer J Clin，2022，72（1）：7-33.

[3] Warburg O. On the origin of cancer cells [J]. Science，1956，123（3191）：309-314.

[4] Hanahan D，Weinberg RA. Hallmarks of cancer：the next generation [J]. Cell，2011，144（5）：646-674.

[5] Tan AS，Baty JW，Dong LF，et al. Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA [J]. Cell Metab，2015，21（1）：81-94.

[6] Joshi S，Tolkunov D，Aviv H，et al. The genomic landscape of renal oncocytoma identifies a metabolic barrier to tumorigenesis [J]. Cell Rep，2015，13（9）：1895-1908.

[7] Lang M，Vocke CD，Merino MJ，et al. Mitochondrial DNA mutations distinguish bilateral multifocal renal oncocytomas from familial Birt-Hogg-Dubé tumors [J]. Mod Pathol，2015，28（11）：1458-1469.

[8] Zong WX，Rabinowitz JD，White E. Mitochondria and cancer [J]. Mol Cell，2016，61（5）：667-676.

[9] Vasan K，Werner M，Chandel NS. Mitochondrial metabolism as a target for cancer therapy [J]. Cell Metab，2020，32（3）：341-352.

[10] Gentric G，Kieffer Y，Mieulet V，et al. PML-regulated mitochondrial metabolism enhances chemosensitivity in human ovarian cancers [J]. Cell Metab，2019，29（1）：156-173. e110.

[11] Momcilovic M，Jones A，Bailey ST，et al. In vivo imaging of mitochondrial membrane potential in non-small-cell lung cancer [J]. Nature，2019，575（7782）：380-384.

[12] Pollyea DA，Stevens BM，Jones CL，et al. Venetoclax with azacitidine disrupts energy metabolism and targets leukemia stem cells in patients with acute myeloid leukemia [J]. Nat Med，2018，24（12）：1859-1866.

[13] Wu Q，Ba-Alawi W，Deblois G，et al. GLUT1 inhibition blocks growth of RB1-positive triple negative breast cancer [J]. Nat Commun，2020，11（1）：4205.

[14] Raggi C，Taddei ML，Sacco E，et al. Mitochondrial oxidative metabolism contributes to a cancer stem cell phenotype in cholangiocarcinoma [J]. J Hepatol，2021，74（6）：1373-1385.

[15] Fischer GM，Jalali A，Kircher DA，et al. Molecular profiling reveals unique immune and metabolic features of melanoma brain metastases [J]. Cancer Discov，2019，9（5）：628-645.

[16] Vaupel P，Schmidberger H，Mayer A. The Warburg effect：essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression [J]. Int J Radiat Biol，2019，95（7）：912-919.

[17] DeBerardinis RJ，Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism [J]. Sci Adv，2016，2（5）：e1600200.

[18] Chen K，Zhang C，Ling S，et al. The metabolic flexibility of quiescent CSC：implications for chemotherapy resistance [J]. Cell Death Dis，2021，12（9）：835.

[19] Elgendy M，Cirò M，Hosseini A，et al. Combination of hypoglycemia and metformin impairs tumor metabolic plasticity and growth by modulating the PP2A-GSK3β-MCL-1 axis [J]. Cancer Cell，2019，35（5）：798-815. e795.

[20] Lin SC，Hardie DG. AMPK：sensing glucose as well as cellular energy status [J]. Cell Metab，2018，27（2）：299-313.

[21] Kappler M，Pabst U，Rot S，et al. Normoxic accumulation of HIF1α is associated with glutaminolysis [J]. Clin Oral Investig，2017，21（1）：211-224.

[22] Sun RC，Denko NC. Hypoxic regulation of glutamine metabolism through HIF1 and SIAH2 supports lipid synthesis that is necessary for tumor growth [J]. Cell Metab，2014，19（2）：285-292.

[23] Jia D，Lu M，Jung KH，et al. Elucidating cancer metabolic plasticity by coupling gene regulation with metabolic pathways [J]. Proc Natl Acad Sci USA，2019，116（9）：3909-3918.

[24] DeBerardinis RJ，Cheng T. Q’s next：the diverse functions

of glutamine in metabolism，cell biology and cancer [J]. Oncogene，2010，29（3）：313-324.
[25] Reinfeld BI，Madden MZ，Wolf MM，et al. Cell-programmed nutrient partitioning in the tumour microenvironment [J]. Nature，2021，593（7858）：282-288.
[26] Gao P，Tchernyshyov I，Chang TC，et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism [J]. Nature，2009，458（7239）：762-765.
[27] Altman BJ，Stine ZE，Dang CV. From Krebs to clinic：glutamine metabolism to cancer therapy [J]. Nat Rev Cancer，2016，16（10）：619-634.
[28] Koundouros N，Poulogiannis G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer [J]. Br J Cancer，2020，122（1）：4-22.
[29] Hayes JD，Dinkova-Kostova AT，Tew KD. Oxidative stress in cancer [J]. Cancer Cell，2020，38（2）：167-197.
[30] Panieri E，Santoro MM. ROS homeostasis and metabolism：a dangerous liason in cancer cells [J]. Cell Death Dis，2016，7（6）：e2253.
[31] Paulsen CE，Truong TH，Garcia FJ，et al. Peroxide-dependent sulfenylation of the EGFR catalytic site enhances kinase activity [J]. Nat Chem Biol，2012，8（1）：57-64.
[32] Moody TW，Lee L，Ramos-Alvarez I，et al. Neurotensin receptors regulate transactivation of the EGFR and HER2 in a reactive oxygen species-dependent manner [J]. Eur J Pharmacol，2019，865：172735.
[33] Moloney JN，Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer [J]. Semin Cell Dev Biol，2018，80：50-64.
[34] Vicary GW，Roman J. Targeting the mammalian target of rapamycin in lung cancer [J]. Am J Med Sci，2016，352（5）：507-516.
[35] Cheng J，Yang HL，Gu CJ，et al. Melatonin restricts the viability and angiogenesis of vascular endothelial cells by suppressing HIF-1α/ROS/VEGF [J]. Int J Mol Med，2019，43（2）：945-955.
[36] Huang H，Zhang S，Li Y，et al. Suppression of mitochondrial ROS by prohibitin drives glioblastoma progression and therapeutic resistance [J]. Nat Commun，2021，12（1）：3720.
[37] Li W，Yang J，Luo L，et al. Targeting photodynamic and photothermal therapy to the endoplasmic reticulum enhances immunogenic cancer cell death [J]. Nat Commun，2019，10（1）：1-16.
[38] Shen T，Hu X，Liu Y，et al. Specific core-satellite nanocarriers for enhanced intracellular ROS generation and synergistic photodynamic therapy [J]. ACS Appl Mater Interfaces，2020，12（5）：5403-5412.
[39] Redza-Dutordoir M，Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species [J]. Biochim Biophys Acta，2016，1863（12）：2977-2992.
[40] Abate M，Festa A，Falco M，et al. Mitochondria as playmakers of apoptosis，autophagy and senescence [J]. Semin Cell Dev Biol，2020，98：139-153.
[41] Blaser H，Dostert C，Mak TW，et al. TNF and ROS crosstalk in inflammation [J]. Trends Cell Biol，2016，26（4）：249-261.
[42] Yang WS，SriRamaratnam R，Welsch ME，et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4 [J]. Cell，2014，156（1-2）：317-331.
[43] Badgley MA，Kremer DM，Maurer HC，et al. Cysteine depletion induces pancreatic tumor ferroptosis in mice [J]. Science，2020，368（6486）：85-89.
[44] Rhee SG，Woo HA，Kil IS，et al. Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides [J]. J Biol Chem，2012，287（7）：4403-4410.
[45] Sies H，Berndt C，Jones DP. Oxidative stress [J]. Annu Rev Biochem，2017，86：715-748.
[46] Winterbourn CC. Biological production，detection，and fate of hydrogen peroxide [J]. Antioxid Redox Signal，2018，29（6）：541-551.
[47] Liu G，Liu H，Xu H，et al. Enhanced peroxidase-like activity of Fe_3O_4-sodium lignosulfonate loaded copper peroxide composites for colorimetric detection of H_2O_2 and glutathione [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc，2020，239：118544.
[48] Fan J，Ye J，Kamphorst JJ，et al. Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production [J]. Nature，2014，510（7504）：298-302.
[49] Dick TP，Ralser M. Metabolic remodeling in times of stress：who shoots faster than his shadow? [J]. Mol Cell，2015，59（4）：519-521.
[50] Pisoschi AM，Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress：a review [J]. Eur J Med Chem，2015，97：55-74.
[51] Wang D，Zhao C，Xu F，et al. Cisplatin-resistant NSCLC cells induced by hypoxia transmit resistance to sensitive cells through exosomal PKM2 [J]. Theranostics，2021，11（6）：2860-2875.
[52] Liang J，Cao R，Wang X，et al. Mitochondrial PKM2 regulates oxidative stress-induced apoptosis by stabilizing Bcl2 [J]. Cell Res，2017，27（3）：329-351.
[53] Saito Y，Chapple RH，Lin A，et al. AMPK protects leukemia-initiating cells in myeloid leukemias from metabolic stress in the bone marrow [J]. Cell Stem Cell，2015，17（5）：585-596.
[54] Yang S，Lian G. ROS and diseases：role in metabolism and energy supply [J]. Mol Cell Biochem，2020，467（1-2）：1-12.
[55] Lignitto L，LeBoeuf SE，Homer H，et al. Nrf2 activation promotes lung cancer metastasis by inhibiting the degradation of bach1 [J]. Cell，2019，178（2）：316-329. e318.
[56] Xiao GG，Wang M，Li N，et al. Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line [J]. J Biol Chem，2003，278（50）：50781-50790.
[57] Simon-Molas H，Vallvé-Martínez X，Caldera-Quevedo I，et al. TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator（TIGAR）is upregulated in lymphocytes stimulated with concanavalin A [J]. Int J Mol Sci，2021，22（14）：7436.

（收稿日期：2022-02-22；修回日期：2022-04-04）

白杨素生物利用度的影响因素及提高办法研究进展

石志群[1, 2]，田贻婷[1, 2]，张朋朋[1, 2]，张洁[1, 2]，谭宏强[1, 2]，景临林[1]，马慧萍[2*]（1.甘肃中医药大学药学院，兰州　730000；2.联勤保障部队第九四〇医院药剂科，全军高原医学重点实验室，兰州　730050）

摘要：白杨素是一种黄酮多酚类化合物，具有抗肿瘤、抗炎、降血脂、抗焦虑、抗抑郁等多种生物活性，然而其体内生物活性受到口服生物利用度等因素的制约，无法更好地发挥其疗效。本文从白杨素在体内的吸收、代谢、外排等角度出发，综述影响其口服生物利用度的因素及提高方法，明确白杨素口服生物利用度的研究方向，为白杨素新药开发奠定基础。

关键词：白杨素；生物利用度；制剂；结构修饰；研究进展

中图分类号：R945，R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)06-1379-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.026

Research progress on influencing factors and improving methods of chrysin bioavailability

SHI Zhi-qun[1, 2], TIAN Yi-ting[1, 2], ZHANG Peng-peng[1, 2], ZHANG Jie[1, 2], TAN Hong-qiang[1, 2], JING Lin-lin[1], MA Hui-ping[2*] (1. *Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou* 730000; 2. *Department of Pharmacy, The 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of the People's Liberation Army, The Lab of People's Liberation Army for High Altitude Medicine, Lanzhou* 730050)

Abstract: Chrysin is a flavonoid polyphenol compound, with various biological activities such as anti-tumor, anti-inflammatory, hypidemic, anti-anxiety, and anti-depression effect. However, it's in vivo bioactivity is influenced and limited by bioavailability, making it difficult to attain better effects. This paper reviewed factors affecting chrysin oral bioavailability and enhancement strategies by focusing on their absorption, metabolism, and elimination processes in vivo. Based on the above progress, the perspective of chrysin oral bioavailability is put forward, which can provide the basis for chrysin drug development.

Key words: chrysin; bioavailability; preparation; structural modification; research progress

白杨素（chrysin）又叫白杨黄素，化学名为5，7-二羟基黄酮，是一类具有 C_6-C_3-C_6 骨架的黄酮多酚类化合物，主要分布在紫葳科木蝴蝶的种子或茎皮、蜂蜜或蜂胶中，其在蜂蜜中的含量高达 5.3 mg • kg^{-1}，具有来源广泛、毒性低等特点[1]，有很大的经济价值和药用价值[2]。研究表明，白杨素在食品中主要作为保健品的原料，具有抗肿瘤、抗炎、抗菌、抗焦虑、抗抑郁、降血脂及神经保护等多种生物活性[3]，同时也被当作佐剂来提高其他药物疗效或减轻其他药物所引起的毒性[4]。研究发现，白杨素的绝对口服生物利用度仅为1%左右，可能是由于白杨素吸收差、广泛代谢所致[5]，因此，口服生物利用度是影响其体内发挥作用的首要因素。本文从口服生物利用度的角度出发，综述白杨素在体内的吸收、代谢、外排等过程；并对目前文献中提高白杨素生物利用度的方法进行归纳总结，以期为白杨素新药的研发提供理论基础和研究思路。

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81571847）；军队后勤科研计划（No.CWH17J010）；军队卫勤保障能力创新与生成专项（No.21WQ045）。

作者简介：石志群，男，硕士研究生，主要从事中药物质基础及其机制研究，email：zqshi1997@163.com　*通信作者：马慧萍，女，博士，硕士研究生导师，主任药师，主要从事天然药物防治高原缺氧方向研究，email：huipingmacy@163.com

1 影响白杨素生物利用度的因素

1.1 理化性质与吸收

平衡溶解度、油水分配系数（log*P*）作为药物重要的物理化学参数，是影响生物利用度的主要因素之一[6]。研究表明白杨素的 log*P* 约为 4.3，其平衡溶解度为 0.038 43 μg • mL^{-1}，表明白杨素溶解性较差，从而影响其在胃肠道内的吸收[7-8]。已知黄酮多酚类化合物在胃肠道经过多级降解和代谢，如胃肠道降解及代谢、肝脏代谢等过程。研究发现，以 20 mg • kg^{-1} 白杨素给予小鼠灌胃，测得其醛酸化和硫酸化产物的 *AUC* 分别是白杨素的 33.3 倍和 22 倍[9]，健康志愿者口服 400 mg • kg^{-1} 白杨素，检测到人体内白杨素硫酸化产物的 *AUC* 是白杨素的 24.8 倍，表明白杨素无论在动物体内还是人体内大部分都以白杨素结合产物的形式存在[10]。

1.2 代谢

体内和体外实验表明白杨素经Ⅰ相和Ⅱ相代谢（见图 1），代谢场所主要是在肝脏，少部分在胃肠道及其他器官中进行。Ⅰ相代谢，主要由细胞色素 P450 酶（CYP450）介导，生成 5，6，7- 三羟基黄酮和 5，7，4’- 三羟基黄酮；Ⅱ相代谢，主要由葡糖醛酸转移酶（UGTs）及硫酸基转移酶（SULTs）介导，生成白杨素 -7-*O*- 葡萄糖醛酸苷和白杨素 -7-*O*- 硫酸苷[11]。研究表明，当白杨素与肝脏、肠道微粒体一起孵育时，其代谢速率高于快速代谢的染料木黄酮[12]，表明白杨素代谢迅速。此外，白杨素与 Caco-2 细胞一起孵育时，检测到白杨素葡萄糖醛酸化和硫酸化等产物[13]，同时，肠道菌群也会介导黄酮类化合物的环状裂变[14]，结构中 2 位和 3 位的双键被氧化成二氢黄酮，中间环被破坏，进而发生代谢[15]。

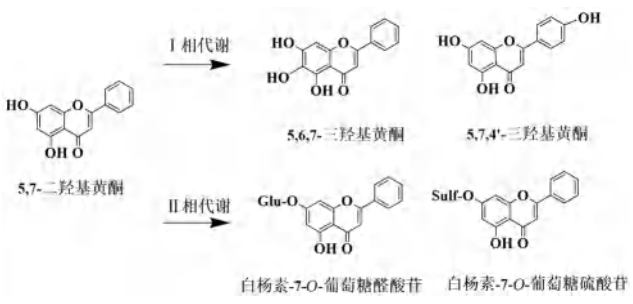


图 1 白杨素代谢途径及产物

Fig 1 Metabolic pathways and products of chrysin

1.3 外排

外排转运载体是一类十分重要的膜转运载体，目前已知有多药耐药相关蛋白（multidrug resistance-associated proteins，MRPs）、乳腺癌耐药蛋白（breast cancer resistance protein，BCRP）等转运载体参与药物转运，MRPs 参与许多类黄酮结合物的外排[16]，BCRP 主要在肠、肝以及血脑屏障中参与转运。相关学者使用药物吸收模型 Caco-2 细胞对白杨素进行转运研究，发现白杨素从基底外侧到顶端和从顶端到基底外侧的渗透率不同，多达 90% 的白杨素及其结合物分布在顶端，推测外排转运蛋白可能参与白杨素的转运[17]。通过肠道灌注实验，向大鼠肠道灌注白杨素并在灌注液中检测到大量白杨素结合物[18]，其可能在转运载体的作用下重新回到肠腔。由此推断，白杨素及其结合物的外排可能是肠道吸收差、口服生物利用度低的原因，外排干预可能是提高白杨素全身或局部生物利用度的一个方向。

总之，白杨素在进入体内后，经过肝脏和胃肠道的广泛修饰，其吸收速度与程度存在较大差异，因此，最终发挥治疗作用的成分与摄入的成分在含量上有很大差别。理化性质、吸收、代谢、外排等因素决定了白杨素的生物利用度，进而影响其生理功能。

2 提高白杨素生物利用度的方法

国内外学者一方面采用药剂学手段，制成口服生物利用度高的制剂，如固体分散体、胶束、脂质体、纳米粒、纳米乳、磷脂复合物、包含物等制剂，改善其溶出度和吸收率、增加口服生物利用度；另一方面，通过化学修饰，改变药物功能性化学结构，从根本上改善白杨素的理化性质，提高白杨素的生物利用度。

2.1 新型制剂

2.1.1 固体分散体 固体分散体（solid dispersions）是指将药物以分子、胶体无定形等状态高度分散在适宜的载体材料中形成的一种固态物质，能在很大程度上改善药物的溶出速度[19]。Lee 等[20]利用溶剂蒸发法，采用亲水性载体和 pH 调节剂来制备白杨素固体分散体，并进行体外实验研究，白杨素固体分散体溶解度较白杨素原料药提高了 13 ～ 53 倍，体外释药率提高了 5 ～ 6 倍，说明制备成白杨素固体分散体能改善白杨素的溶解度。庞榕等[21]采用溶剂挥发法，利用固体分散体技术联合磷脂复合物制备白杨素磷脂复合物固体分散体，再分别给予健康大鼠灌胃白杨素、白杨素磷脂复合物、白杨素磷脂复合物固体分散体，采用 HPLC 法测定血药浓度，并计算药动学参数。结果发现，与白杨素比较，固体

分散体 t_{max} 缩短，C_{max}、$AUC_{0\sim t}$、$AUC_{0\sim\infty}$ 升高，磷脂复合物、固体分散体的生物利用度分别增加 1.44 倍、2.16 倍。

2.1.2 胶束 胶束（micelle）是指在水中表面活性剂浓度达到一定程度时，开始大量形成稳定、粒径小、分散度高的胶体粒子，有助于提高药物的溶解度。Baidya 等 [22] 制备了白杨素叶酸共轭胶束，采用透析法研究白杨素及其胶束的体外释放量，发现胶束的体外释放量是原料药的 2.5 倍。药动学研究表明，白杨素胶束的 C_{max} 和 $AUC_{0\sim\infty}$ 分别提高 2 倍和 3 倍；人乳腺癌细胞株（MCF-7）抗肿瘤活性评价显示，混合胶束与原料药相比半抑制浓度（GI_{50}）值降低 5 倍，说明将白杨素制成混合胶束可增强白杨素的生物利用度与治疗效果。Luo 等 [23] 通过薄膜水化法制备载药白杨素（CHR）/ 二甲双胍（MET）载药胶束，当甲氧基聚乙二醇 - 聚 ε- 己内酯（MPEG-PCL）的比例为 1∶1.7 时，CHR/MET 的载药率和包封率最高，体外实验表明，CHR/MET 纳米胶束可使 T47D 人乳腺癌细胞凋亡率提高 1.14 倍，肿瘤的体积和重量分别降低 42% 和 59%，进一步说明白杨素制成胶束后显著提高了生物利用度，为治疗乳腺癌提供了新的思路。

2.1.3 脂质体 脂质体（liposomes）一般是由胆固醇和磷脂构成的一种微型囊泡，其结构与生物膜类似，具有延长药物在体内的滞留时间、增加药物靶向性等优点 [24]。国外学者采用薄膜水解和静电沉积技术，以壳聚糖 / 卵磷脂制备白杨素脂质体，并给予大鼠灌胃，结果显示，血浆中白杨素 C_{max}、AUC 均明显提高，相对生物利用度提高 5.9 倍；同时对 MCF-7 细胞系进行抗肿瘤活性评价，发现白杨素脂质体对其具有较强的抑制作用，在质量浓度为 6 mg • mL^{-1} 时，抑制作用最强 [25]。Huang 等 [26] 利用薄膜分散法制备白杨素脂质体，通过粒径、多分散指数、Zeta 电位、包封率和载药量等表征进行评价，发现灌胃给药后与原料药相比，血浆和肝组织中白杨素浓度增加 2.54 倍和 1.45 倍，提示脂质体可提高白杨素生物利用度并减轻肝缺血再灌注引起的损伤。

2.1.4 纳米粒 纳米粒（nanoparticles）是以高分子材料为载体，将难溶性药物镶嵌于其中而形成的固态胶体微粒，其粒径在 0.1 ～ 100 nm，能增加难溶性药物在水中的分散性，减少药物外排及控制药物释放等优点 [27]。Aishwarya 等 [28] 采用热均化和微乳技术制备了白杨素固体脂质纳米粒，经检测药物含量高达 73.22%，纳米粒制剂可显著提高白杨素体外释药性能。杨金枝等 [29] 采用乳化超声 - 低温固化法制备固体脂质纳米粒，以单硬脂酸甘油酯、磷脂酰胆碱溶于乙醇中作为有机相，泊洛沙姆 188 和 Tween-80 溶于蒸馏水中作为水相，将乙醇注入水相制得纳米粒，对大鼠灌胃给药。与原料药相比，纳米粒的 C_{max} 极显著提高，$t_{1/2}$ 延长至 5.57 h，相对生物利用度提高 3.36 倍，表明将白杨素包载于固体脂质材料中可显著增强白杨素在胃肠道的吸收，从而提高白杨素的生物利用度。

纳米结构脂质载体作为新一代固体脂质纳米颗粒，具有更高的载药量、稳定性和靶向性等优点 [30]。Sharma 等 [31] 采用热熔分散结合高压均质法制备白杨素纳米结构脂质载体，对健康大鼠灌胃给药，发现其较原料药生物利用度提高了 8.97 倍。刘丹花等 [32] 制备白杨素纳米结构脂质载体，并给予 SD 大鼠灌胃进行药动学研究，与原料药相比，t_{max} 显著延长至 3.39 h，C_{max} 提高 4 倍，相对生物利用度提高 3.10 倍，显著改善白杨素在体内的药动学行为。

2.1.5 纳米乳 纳米乳（nanoemulsions）是由油相、水相、表面活性剂和助表面活性剂组成的胶体微粒系统，其粒径在 10 ～ 100 nm，具有较快的吸收速率和较好的物理稳定性 [33]。Ting 等 [34] 制备白杨素纳米乳液，测得载药量为 174.21 μg • mL^{-1}，具有较高的稳定性，可在室温条件下至少存放 5 周，口服后能耐受胃肠消化，并且 Caco-2 细胞吸收显著。Dong 等 [35] 采用超声乳化法制备代谢抑制型白杨素纳米乳，灌胃给予大鼠抑制型纳米乳，结果表明，其 $AUC_{0\sim\infty}$ 和 C_{max} 较原料药分别提高 4.3 倍和 3.5 倍，抑制率为原料药的 1.42 倍，可提高药物在体内的代谢稳定性，增加口服生物利用度。

2.1.6 磷脂复合物 磷脂复合物（phytosome）是指药物与磷脂通过分子间作用力形成稳定的复合物，改变药物的存在状态，提高体内吸收，增加生物利用度 [36]。该技术制备简单，应用较广，在制剂领域应用较多。崔晓鸽等 [37] 采用溶剂挥发法制备白杨素磷脂复合物，通过正交实验筛选温度、时间、浓度、药脂比并确定最佳工艺，进行表观溶解度测定，发现在水与正辛醇中的溶解度分别提高 4.58 倍和 11.71 倍，显著改善白杨素的水溶性与脂溶性；药动学结果表明，白杨素磷脂复合物的 C_{max}、$t_{1/2}$、$AUC_{0\sim t}$、$AUC_{0\sim\infty}$ 显著提高，

相对生物利用度提高 4.22 倍，由此可见，磷脂复合物可提高其生物利用度。

2.1.7 包含物 包含物技术是指药物与客体分子通过氢键等分子间作用力，将药物嵌入包合材料中形成包合物，进而提高药物的溶解度 [38]。曾倩等 [39] 利用研磨法制备白杨素 - 羟丙基 -β- 环糊精包合物，并采用紫外分光光度法考察包合物的增溶效果，发现包合物溶解度是白杨素溶解度的 120.7 倍，溶解度得到极大改善。高凯 [40] 采用饱和水溶液法，以β- 环糊精胺类衍生物作为客体分子，对白杨素进行包合，并进行溶解度和生物活性评价，发现可显著提高白杨素的溶解度及其生物活性。Kulkarni 等 [41] 制备白杨素磺丁基醚 -β- 环糊精包合物，其表现出较高的溶解度，通过抗肿瘤活性评价，发现其活性显著。

2.2 *结构修饰*

白杨素具有广泛的生物活性，但其存在水溶性差、体内生物利用度低以及 5 位和 7 位羟基快速代谢等问题，限制其在临床上的应用 [42]。因此，国内外大量学者以白杨素母核为基础进行结构修饰，以改善白杨素的理化性质与活性，获得高效低毒的候选药物，为新药开发奠定基础。为了改善白杨素水溶性，范小飞等 [43] 利用药物拼合原理，以叠氮糖、炔丙基溴和白杨素为原料，合成 4 种糖基化三氮唑白杨素衍生物（**1**），并对衍生物进行抗缺氧活性评价，发现其能显著延长小鼠存活时间，且 **1a** ＞ **1d** ＞ **1c** ＞ **1b**。此外，本课题组将白杨素与环氧乙烷在碱性催化条件下反应得到 7- 羟乙基白杨素（**2**），通过低压低氧对损伤大鼠的保护作用研究发现，其对大鼠脑组织有保护作用并能显著减轻缺氧诱导的认知功能损伤，具有良好的药理活性 [44-46]。

Omonga 等 [47] 采用微波合成法，合成了一系列白杨素衍生物（**3**），并进行抗菌、抗肿瘤活性研究，其中 7 位上的 2，4- 二硝基苯氧基取代物（$3R_3$）在大肠埃希菌模型中生物活性增加 20 倍，并在直肠癌、乳腺癌、肝细胞模型中均具有较好地抗肿瘤效果。Zhu 等 [48] 通过烷基化、乙酰化、苯甲酰化、羧甲基化合成了一系列白杨素 5- 单取代、7- 单取代、5，7- 双取代衍生物（**4**），并进行小鼠肝癌细胞活性抑制实验，结果显示，5，7- 二乙酰衍生物（**4b**）的抗肿瘤活性最强，能显著阻滞细胞周期，使其停滞在 G_2 期。Chen 等 [49] 通过白杨素和酰氯酯化反应合成一系列化合物（**5**），其中长链衍生物，溶解性能较好且抗肝癌活性是白杨素的 5.4 倍，溶解性和生物利用度得到明显改善。彭德乾等 [50] 在白杨素骨架上引入链烷烃，通过酯化反应，合成了链烷烃类白杨素衍生物，并测定脂溶性，发现其脂溶性得到明显改善，有助于药物在体内的吸收。

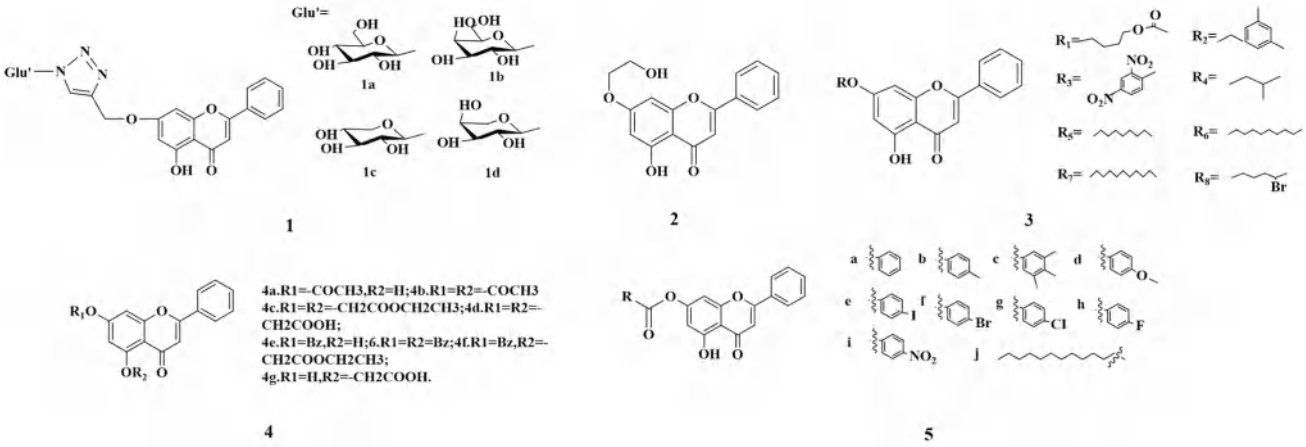


图 2 白杨素衍生物 **1** ～ **5** 的结构

Fig 2 Structure of chrysin derivatives **1** ～ **5**

3 结语

白杨素是一种具有多种生物活性的黄酮多酚类化合物，在预防癌症、糖尿病、心血管疾病等方面发挥着重要作用。然而，由于白杨素水溶性和口服吸收差等因素，限制了其应用。国内外学者运用各种手段来提高白杨素的生物利用度，将其制成新型制剂（包括固体分散体、胶束、脂质制剂、磷脂复合物、包含物、乳剂等），显著改善了白杨素的溶解度，延长其在体内的吸收与滞留时间，同时还具有靶向性，减少药物外排并控制药物释放等优点，显著提高白杨素在机体的生物利用度；通过化学手段对白杨素进行结构修饰，

从根本上改善白杨素的水溶性与脂溶性，并提高其生物活性。

尽管目前取得了一定的进展，但仍然存在许多问题和挑战：首先，白杨素的代谢机制仍需进一步明确，探明其体内转运机制，才能更好地阐述其在体内作用的过程；其次，目前研究的新型制剂，仍需进一步完善其相关机制，距离临床上市还有一定距离。值得注意的是，白杨素是一些转运蛋白、代谢酶的抑制剂或促进剂，其生物利用度的改变将会引起白杨素 - 药物相互作用，因此需要对此进行后续的研究与评价。

综上，国内外对提高白杨素口服生物利用度的方法虽多，但仍需要进一步研究与完善，提高生物可行性，不断优化制备工艺，为工业化做准备。随着科学技术的发展，相信白杨素会有良好的应用前景。

参考文献

[1] Huo JF，Zhang ML，Wang XX，et al. Chrysin induces osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells [J]. Exp Cell Res，2021，400（2）：112466.

[2] Garg A，Chaturvedi S. A comprehensive review on chrysin：emphasis on molecular targets，pharmacological actions and bio-pharmaceutical aspects [J]. Curr Drug Targets，2021，22：1-17.

[3] Saima N，Muhammad I，Abdur R，et al. Chrysin：pharmacological and therapeutic properties [J]. Life Sci，2019，235（C）：116797.

[4] Lim H，Kim KM，Jeong S，et al. Chrysin increases the therapeutic efficacy of docetaxel and mitigates docetaxel-induced edema [J]. Integra Cancer Ther，2017，16（4）：496-504.

[5] Keumhan N，Do GO，Mahesh RN，et al. Pharmacokinetic interaction of chrysin with caffeine in rats [J]. Biomol Ther，2016，24（4）：446-452.

[6] 张远冬，高健美，龚其海 . 超高效液相色谱 - 串联质谱法测定不同 pH 值溶液中三叶苷平衡溶解度和表观油水分配系数 [J]. 医药导报，2021，40（9）：1242-1246.

[7] 张慧杰，王萌，陈丽娜，等 . 12 种黄酮化合物油水分配系数的测定 [J]. 中成药，2016，38（8）：1708-1711.

[8] 穆顺达，郑国华，宋成武，等 . 白杨素平衡溶解度、油水分配系数及解离常数的测定 [J]. 药物分析杂志，2018，38（6）：997-1004.

[9] Ge S，Gao S，Yin T，et al. Determination of pharmacokinetics of chrysin and its conjugates in wild-type FVB and Bcrp1 knockout mice using a validated LC-MS/MS method [J]. J Agr Food Chem，2015，63（11）：2902-2910.

[10] Walle T，Otake Y，Brubaker J A，et al. Disposition and metabolism of the flavonoid chrysin in normal volunteers [J]. Br J Clin Pharmacol，2001，51（2）：143-146.

[11] Na Y，Runbin S，Xiaoying L，et al. UDP-glucuronosyltransferases（UGTs）and their related metabolic crosstalk with internal homeostasis：a systematic review of UGT isoforms for precision medicine [J]. Pharmacol Res，2017，121：169-183.

[12] Zeng M，Sun R，Basu S，et al. Disposition of flavonoids via recycling：direct biliary excretion of enterically or extrahepatically derived flavonoid glucuronides [J]. Mol Nutr Food Res，2016，60（5）：1006-1019.

[13] Galijatovic A，Otake Y，Walle U K，et al. Extensive metabolism of the flavonoid chrysin by human Caco-2 and Hep G2 cells [J]. Xenobiotica，1999，29（12）：1241-1256.

[14] Murota K，Nakamura Y，Uehara M. Flavonoid metabolism：the interaction of metabolites and gut microbiota [J]. Biosci Biotech Biochem，2018，82（4）：600-610.

[15] Gao S，Hu M. Bioavailability challenges associated with development of anti-cancer phenolics [J]. Mini Rev Med Chem，2010，10（6）：550-567.

[16] Li W，Sun HD，Zhang XG，et al. Efflux transport of chrysin and apigenin sulfates in HEK293 cells overexpressing SULT1A3：the role of multidrug resistance-associated protein 4（MRP4/ABCC4）[J]. Biochem Pharmacol，2015，98（1）：203-214.

[17] Walle U K，Galijatovic A，Walle T. Transport of the flavonoid chrysin and its conjugated metabolites by the human intestinal cell line Caco-2 [J]. Biochem Pharmacol，1999，58（3）：431-438.

[18] Zeng M，Sun R，Basu S，et al. Disposition of flavonoids via recycling：direct biliary excretion of enterically or extrahepatically derived flavonoid glucuronides [J]. Mol Nutr Food Res，2016，60（5）：1006-1019.

[19] 陈巧巧，董爽，王东凯 . 固体分散体技术的研究进展 [J]. 中国药剂学杂志（网络版），2019，17（4）：127-134.

[20] Lee SH，Lee Y，Song JG，et al. Improved in vivo effect of chrysin as an absorption enhancer via the preparation of ternary solid dispersion with Brij®L4 and aminoclay [J]. Curr Drug Deliv，2019，16（1）：86-92.

[21] 庞榕，李开言，王聪颖 . 白杨素磷脂复合物固体分散体的制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药，2021，43（10）：2611-2615.

[22] Baidya D，Kushwaha J，Mahadik K，et al. Chrysin-loaded folate conjugated PF127-F68 mixed micelles with enhanced oral bioavailability and anticancer activity against human breast cancer cells [J]. Drug Dev Ind Pharm，2019，45（5）：852-860.

[23] Luo D，Wang X，Zhong X，et al. MPEG-PCL nanomicelles platform for synergistic metformin and chrysin delivery to breast cancer in mice [J]. Anticancer Agents Med Chem，2021，22（2）：280-293.

[24] 章溢，崔天，李姝璇，等 . 通过增加溶解度提高 BCSⅡ类药物口服吸收：常常被忽略的药物渗透性 [J]. 药学学报，2019，54（1）：1-7.

[25] Deshmukh PK，Mutha RE，Surana SJ. Electrostatic depo-

sition assisted preparation，characterization and evaluation of chrysin liposomes for breast cancer treatment [J]. Drug Dev Ind Pharm，2021，47（5）：809-819.
[26] Huang R，Zhao Z，Jiang X，et al. Liposomal chrysin attenuates hepatic ischaemia-reperfusion injury：possible mechanism via inhibiting NLRP3 inflammasome [J]. J Pharm Pharmacol，2021，74（2）：216-226.
[27] 薛继杨 . 新型 TPGS 乳化紫杉醇 -PEG-PLGA 纳米粒的制备及其抗卵巢癌活性研究 [J]. 中南药学，2016，14（10）：1037-1040.
[28] Aishwarya V，Surekha R，Sumathi T. Preparation，characterization and in-vitro cell viabilitity assay of chrysin loaded solid lipid nanoparticles as drug delivery system [J]. Int J Pharma and Bio Sci，2015，6（1）：465-478.
[29] 杨金枝，孙文霞，王姣姣，等 . 白杨素固体脂质纳米粒的制备及其药动学行为 [J]. 中成药，2018，40（1）：76-80.
[30] Gomaa E，Fathi HA，Eissa NG，et al. Methods for preparation of nanostructured lipid carriers [J]. Methods，2021，199（41）：3-8.
[31] Sharma T，Katare OP，Jain A，et al. QbD-steered development of biotin-conjugated nanostructured lipid carriers for oral delivery of chrysin：role of surface modification for improving biopharmaceutical performance [J]. Colloids Surf B Biointerfaces，2021，197：111429.
[32] 刘丹花，马记平，张智强，等 . 白杨素纳米结构脂质载体制备及大鼠体内药动学 [J]. 医药导报，2020，39（6）：835-839.
[33] 尹孝莉，周思敏，吴方雨，等 . 新藤黄酸纳米乳的制备、表征以及体外抗肿瘤药效学的研究 [J]. 中南药学，2021，19（4）：565-572.
[34] Ting P，Srinuanchai W，Suttisansanee U，et al. Development of chrysin loaded oil-in-water nanoemulsion for improving bioaccessibility [J]. Foods，2021，10（8）：1912.
[35] Dong D，Quan E，Yuan X，et al. Sodium oleate-based nanoemulsion enhances oral absorption of chrysin through inhibition of UGT-mediated metabolism [J]. Mol Pharm，2017，14（9）：2864-2874.
[36] 王立，孙斯桐，张文君，等 . 葛根素磷脂复合物纳米粒的制备及体外评价 [J]. 中南药学，2020，18（1）：15-20.
[37] 崔晓鸽，曹伶俐，侯佳威，等 . 白杨素磷脂复合物的制备及其药动学行为 [J]. 中成药，2017，39（5）：934-939.
[38] Li J，Pan D，Yi J，et al. Protective effect of beta-cyclodextrin on stability of nisin and corresponding interactions involved [J]. Carbohydr Polym，2019，223：115115.
[39] 曾倩，纪晖，唐慧慧，等 . 白杨素 - 羟丙基 -β- 环糊精包合物的制备与表征 [J]. 药学实践杂志，2014，32（6）：456-459.
[40] 高凯 . 白杨素与环糊精衍生物的包合行为研究及手性季鏻盐催化剂的合成 [D]. 昆明：昆明理工大学，2015.
[41] Kulkarni AD，Belgamwar VS. Inclusion complex of chrysin with sulfobutyl ether-β-cyclodextrin（Captisol®）：preparation，characterization，molecular modelling and in vitro anticancer activity [J]. J Mol Struct，2017，1128：563-571.
[42] 全恩希 . 代谢抑制型白杨素纳米乳的制备及体内外评价 [D]. 广州：暨南大学，2017.
[43] 范小飞，景临林，马慧萍，等 . 糖基化三氮唑白杨素衍生物的合成与抗缺氧活性研究 [J]. 天然产物研究与开发，2015，27（3）：427-431.
[44] 马慧萍，景临林，樊鹏程，等 . 7- 羟乙基白杨素的合成方法及其在制备抗缺氧药物中的应用：CN 201410106764.9 [P]. 2015-09-23.
[45] 景临林，杨颖，邵瑾，等 . 7- 羟乙基白杨素对低压低氧致脑组织损伤的保护作用 [J]. 中国现代应用药学，2020，37（9）：1025-1029.
[46] 景临林，杨颖，邵瑾，等 . 7- 羟乙基白杨素对低压低氧大鼠认知功能的保护作用及机制研究 [J]. 中国医院药学杂志，2020，40（15）：1622-1626.
[47] Omonga N，Zia Z，Ghanbour H，et al. Facile synthesis and biological evaluation of chrysin derivatives [J]. J Chem Res，2021，45（11-12）：1083-1092.
[48] Zhu ZY，Wang WX，Wang ZQ，et al. Synthesis and antitumor activity evaluation of chrysin derivatives [J]. Eur J Med Chem，2014，75：297-300.
[49] Chen N，Wang R，Lu L，et al. Synthesis of chrysin derivatives and screening of antitumor activity [J]. J Asian Nat Prod Res，2020，22（5）：444-451.
[50] 彭德乾，白丽丽，陈训，等 . 链烷烃类白杨素衍生物的合成及其脂溶性 [J]. 化学研究与应用，2019，31（3）：507-510.

（收稿日期：2022-01-10；修回日期：2022-03-08）

脑转移瘤的药物治疗选择

叶莉[1]，钟晓辉[2*]（广汉市人民医院药剂科，四川　德阳　618300）

摘要：脑转移瘤患者的预后差，目前针对脑转移病灶的主要治疗方式仍然是手术和放疗，血脑屏障和血肿瘤屏障限制了抗肿瘤药物进入颅内发挥疗效。随着新的抗肿瘤药物的研发，其在脑转移瘤的治疗中发挥越来越重要的作用，但在临床应用中发现很多抗肿瘤药物透过血脑屏障的能力没有详细阐述，且脑转移瘤药物的选择仍值得探讨。因此，本文就传统化疗药物、靶向治疗药物及免疫治疗药物透过血脑屏障的药动学及临床研究进展进行了综述，以期为脑转移瘤的药物治疗决策和后续研究提供参考。

关键词：脑转移瘤；化疗；靶向治疗；免疫治疗；血脑屏障
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)06-1385-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.027

Drug treatment options for brain metastaseis

YE Li[1], ZHONG Xiao-hui[2*] (*Department of Pharmacy, Guanghan People's Hospital, Deyang Sichuan* 618300)

Abstract: The prognosis of patients with brain metastasis is poor. At present, the main treatments for brain metastasis are still surgery and radiotherapy. Anti-tumor drugs are blocked by the blood-brain barrier and the blood-tumor barrier, limiting their entry into the brain to function properly. With the development of new anti-tumor drugs, anti-tumor drugs will play an increasingly important role in the treatment of brain metastasis. However, in clinical practice, the permeability via the blood-brain barrier of many anti-tumor drugs is not clearly described, and the choice of drug therapy for brain metastasis remains undetermined. This article reviewed the pharmacokinetics and clinical research progress in traditional chemotherapeutics, targeted therapy drugs and immunotherapy drugs permeating the blood-brain barrier, to provide references for treatment decisions and follow-up studies of brain metastasis.

Key words: brain metastasis; chemotherapy; targeted therapy; immunotherapy; blood-brain barrier

近年来随着诊断和治疗方法的进步，恶性肿瘤患者的生存期不断延长，8% ～ 10% 的癌症患者会受到有症状脑转移的影响，是导致恶性肿瘤患者死亡的重要原因。与脑转移相关的 3 种最常见的原发性肿瘤是肺癌（占 20% ～ 56%）、乳腺癌（占 5% ～ 20%）和黑色素瘤（占 7% ～ 16%），肾细胞癌、结直肠癌发生脑转移的概率也在增加[1]。在肺癌中，肺腺癌、鳞癌和大细胞癌发生脑转移的风险分别为 11%、6% 和 12%，小细胞肺癌患者首次就诊时脑转移的发生率为 10%，诊疗过程中的发生率为 40% ～ 50%[2]。在乳腺癌脑转移的患者中约 50% 发生在人表皮生长因子受体 -2（HER2）阳性的患者中，25% ～ 46% 发生在三阴性乳腺癌中，10% ～ 15% 发生在雌激素受体（ER）阳性 HER2 阴性的患者中。与原发灶相比，乳腺癌脑转移中 *EGFR* 基因和 *HER2* 基因扩增明显增加，20% 左右的 HER2 阴性乳腺癌脑转移组织会转变为 HER2 扩增和 / 或突变，50% 的激素受体阳性乳腺癌脑转移组织会发生激素受体表达缺失[3]。目前大多数肿瘤发生脑转移后的预后仍然很差，中位生存期为 12 个月，甚至更短[4]。

外科手术切除和放射治疗是目前治疗脑转移瘤的主要手段。大多数传统化学疗法在中枢神经系统中活性有限，驱动基因突变和针对这些突变的药物的发现改变了治疗前景，一些靶向小分子酪氨酸激酶抑制剂确实能穿过血脑屏障并在中

作者简介：叶莉，女，主管药师，主要从事临床药学抗肿瘤药物方向相关工作，email：2281412116@qq.com　*通信作者：钟晓辉，男，副主任药师，主要从事药事管理工作，email：2404802797@qq.com

枢神经系统中显示出活性。在脑转移瘤药物治疗研究中的另一个重要进展是免疫治疗具有颅内活性[5]。限制药物治疗脑转移瘤疗效的主要两大因素包括脑转移灶与原发灶的驱动基因特征以及对药物的反应有不可预测的差异、血脑屏障和血肿瘤屏障对药物渗透入脑的限制[6]。随着新药的不断开发以及对血脑屏障的重新认识，药物治疗将在脑转移瘤的多学科治疗中发挥越来越重要的作用[7]，然而临床诊疗中抗肿瘤药物透过血脑屏障的能力常常不明。本文就药物透过血脑屏障的机制，用于肺癌、乳腺癌和黑色素瘤的全身治疗药物透过血脑屏障的能力以及肿瘤脑转移的药物治疗选择进行综述，以期为临床用药提供参考。

1 药物透过血脑屏障的机制

1.1 血脑屏障和血肿瘤屏障

血脑屏障通过形成内皮细胞、周细胞和星形胶质细胞等的神经血管单位来调节中枢神经系统的稳态，它们共同维持正常的脑功能。脑转移形成后，血脑屏障的完整性受到不同程度的破坏，称为血肿瘤屏障[8]。在脑转移实验模型中发现与血脑屏障相比，血肿瘤屏障对药物或造影剂的渗透性更高。超过 89% 的实验性脑转移病灶存在部分血脑屏障通透性损害，且异质性大，只有 10% 的转移灶能够使药物达到细胞毒浓度，因此，要改善患者的预后，必须要优化输送药物的策略[9-11]。

1.2 分子跨血脑屏障的转运机制

分子进出血脑屏障有 5 条主要途径[12-13]，见表 1。

表 1 分子透过血脑屏障的途径

Tab 1 Molecular pathways through the blood-brain barrier

途径	机制	分子
被动细胞旁途径[14]	该途径受到内皮细胞之间紧密连接和黏附连接的阻碍，限制了水溶性或小分子亲水溶质的通过	受限[a]
跨细胞亲脂途径	一些小的气体或亲脂性分子能够通过内皮细胞本身的被动跨细胞扩散穿过血脑屏障，分子应具有较小的相对分子量、脂溶性或电中性，并能溶于脑血管内皮细胞脂膜	O_2、CO_2、巴比妥类、乙醇、咖啡因、气态麻醉剂
转包吞途径	包含受体介导途径、吸附途径、载体介导的胞吞作用	激素、转铁蛋白、血浆蛋白、紫杉醇
转运蛋白途径	主动特异性转运机制，在血脑屏障中占主导地位，有多种转运蛋白，如葡萄糖和氨基酸之类的小亲水分子通过溶质载体（SLC）蛋白穿过血脑屏障	葡萄糖、氨基酸、左旋多巴
外排泵途径[15]	排毒的关键机制，输出蛋白 P- 糖蛋白和乳腺癌耐药蛋白是药物向大脑和软脑膜间隙运输的两个最常见障碍，许多小分子药物是血脑屏障中外排泵的底物	P- 糖蛋白：长春新碱、丝裂霉素、放线菌素；乳腺癌耐药蛋白：米托蒽醌、拓扑替康

注：a. 内皮细胞间的紧密连接严重阻碍了分子的进入，现在的一些相关研究是通过外部刺激人为诱导紧密连接开放以促进分子通过细胞旁途径进入大脑。

Note：a. The tight junctions among the endothelial cells seriously hindered the entry of molecules. Current research tries to artificially open the tight junctions by external stimuli to promote the molecular entry into the brain via paracellular pathways.

1.3 药物透过血脑屏障涉及的物理化学参数

大部分药物向中枢神经系统的转运是通过脂质膜的简单扩散及转运蛋白途径[16-18]，通常涉及以下几个物理化学参数：小分子（< 500 Da）、脂溶性、电荷与血浆蛋白的相互作用以及与外排泵和转运蛋白的相互作用[12]。分子量低、外排潜力低、可旋转键少、极性表面积小、氢键供体少和脂溶性良好的分子更易透过血脑屏障[19]。目前常见的中枢神经系统药物相对分子量一般在 300 ～ 400 Da。药物含氢键越多脂溶性越差，因此需要氢键供体少于 3 个，氢键受体少于 7 个。药物分子的柔性有利于药物入脑，多数中枢神经系统药物旋转键少于 5 个，一般少于 8 个[20]。由于脑毛细血管内皮细胞间的紧密结合而含有带负电荷的胶质，带正电荷的碱性药物或电中性的药物比带负电荷的药物易透过血脑屏障[21]。

2 药物透过血脑屏障的能力

2.1 化疗药物

中枢神经系统中药物浓度通常以脑脊液中的浓度值计，但是其不能代表脑实质和脑肿瘤中的水平。有文献报道了部分化疗药物在转移性脑肿瘤组织中的药物浓度（取自全身给药后人脑转移瘤组织或脑组织中抗肿瘤药的浓度），但这些数据的异质性较高[11，17]。报道的数据以转移性脑组织中的药物浓度与血液中药物浓度的比率展现，比率显示出广泛的范围，比率由低到高分别是依托泊苷（0.116）、替莫唑胺（0.118）、紫杉醇（0.77）、顺铂（0.78）、伊达比星（5.6）、多柔比星脂质体（8.36）、雌莫司汀（17.8）、米托蒽醌（32.02）[11，17]。由于脑组织间质液中的游离

药物检测难度大，基于脑脊液和脑间质液处于快速平衡的假设[22]，一般将药物分布到脑脊液中的浓度作为脑内游离药物的指标。如表 2 所示，在肿瘤治疗中使用较多的化疗药物（奥沙利铂、卡铂、培美曲塞、多西他赛、吉西他滨）大多在脑脊液中浓度不高，相对较高的是亚硝脲类药物、替莫唑胺、拓扑替康、白消安等。在治疗脑转移瘤时既要考虑药物透过血脑屏障的能力，还要考虑肿瘤组织对药物的敏感性，尽量选择血脑屏障通透性好的药物。对于一些血脑屏障通透性不好的药物（如甲氨蝶呤）更改给药方式也可用于部分脑转移的患者，对于某些脑转移的患者还可考虑鞘内注射药物，如甲氨蝶呤、阿糖胞苷、塞替派，其他药物如拓扑替康、依托泊苷、培美曲塞也有一些相关研究，但目前缺乏一些高级别的证据推荐，且技术要求较高限制了其广泛开展。

2.2 靶向治疗药物

目前靶向治疗已用于表皮生长因子受体（EGFR）突变和间变性淋巴瘤激酶（ALK）基因融合的非小细胞肺癌、HER2 突变阳性乳腺癌和鼠类肉瘤病毒癌基因同源物 B1（BRAF）突变黑色素瘤的脑转移瘤的治疗，显著改善了对应亚型患者的生存率[6，24]。乳腺癌患者中 10% ～ 16% 的原发肿瘤和远处转移部位之间观察到 ER、孕激素受体（PR）和 HER2 状态不一致，因此脑转移灶的病理检查是有必要的[25]。脑转移瘤中的靶向药物透过血脑屏障的能力如表 3 所示。

在非小细胞肺癌脑转移的治疗中，吉非替尼有 10 个可旋转键，且是 P- 糖蛋白的底物；厄洛替尼有 11 个可旋转键，是 P- 糖蛋白和乳腺癌抗性蛋白的底物；阿法替尼有 2 个不良的氢键供体导致渗透率低，是 P- 糖蛋白的底物[30-31]，因此这 3 个靶向 EGFR 的药物透过血脑屏障的能力有限。奥西替尼是外排转运蛋白的底物，但渗透性足以抑制外排，是目前已有的 EGFR 抑制剂中透过血脑屏障能力最好的。ALK 抑制剂中一代的克唑替尼是 P- 糖蛋白和乳腺癌耐药蛋白的底物，透过血脑屏障的能力有限；二代的阿来替尼不是 P- 糖蛋白的底物，透过血脑屏障的能力较强；三代的劳拉替尼使 P- 糖蛋白介导的药物外流最小化，以实现高中枢神经系统浓度并克服所有已知的 ALK 抗性突变，透过血脑屏障的能力较强。

在乳腺癌伴脑转移的治疗中，小分子 HER2 酪氨酸激酶抑制剂拉帕替尼、奈拉替尼、图卡替尼因其相对分子量低及具有亲脂性，能部分透过血脑屏障，其中拉帕替尼和奈拉替尼作为单药治疗疗效有限，但与卡培他滨联合后显示了更有希望的结果[1]，拉帕替尼单药治疗的中枢神经系统缓解率较低仅 6%，高于常规药物如紫杉醇或多柔比星，与卡培他滨联合治疗的中枢神经系统客观缓解率提高到 20% ～ 38%。奈拉替尼单药治疗的进行性脑转移患者的中枢神经系统客观缓解率为 8%，联合卡培他滨治疗的患者中枢神经系统缓解率为 33% ～ 49%[6]。在 HER2 阳性中枢神经系统疾病动物模型中，图卡替尼相较于拉帕替尼或奈拉替尼显示出更高的疗效[32]。抗 HER2 单克隆抗体因其相对分子量大，透过血脑屏障受限。

表 2 化疗药物透过血脑屏障的水平[12，18，23]

Tab 2 Level of chemotherapeutic drugs via the blood-brain barrier[12，18，23]

药品名称	分子量	脑脊液 / 血浆比率	数据来源
奥沙利铂	397.29	1.2%	动物实验
卡铂	371.30	2.60%	动物实验
甲氨蝶呤	454.45	0.5% ～ 2.5%；2.8%（儿童）	临床试验
培美曲塞	471.37	1% ～ 3%	临床试验
顺铂	300.60	3%	临床试验
依托泊苷	588.56	0% ～ 3%	临床试验
多柔比星	579.99	＜ 5%	动物实验
多西他赛	807.88	0% ～ 9%	临床试验
吉西他滨	299.66	6.7%	动物实验
伊立替康	623.15	9.6% ～ 16%	动物实验
阿糖胞苷	243.22	10% ～ 40%	临床试验
环磷酰胺	279.10	17%	动物实验
尼莫司汀	309.15	42%	临床试验
洛莫司汀	233.71	≥ 50%	临床试验
司莫司汀	247.72	15% ～ 30%	临床试验
福莫司汀	315.69	17% ～ 30%	临床试验
卡莫司汀	214.06	≥ 50%	临床试验
替莫唑胺	194.15	30%	临床试验
5- 氟尿嘧啶	130.08	48%（静脉推注）；11% ～ 20%（静脉滴注）	动物实验
羟基脲	76.06	33%（HIV 患者）	临床试验
博来霉素	1487.47	40%（脑生殖细胞瘤）	临床试验
拓扑替康	459.91	18% ～ 42%	临床试验
异环磷酰胺	261.09	20%	临床试验
白消安	246.29	95% ～ 99%	临床试验
塞替派	189.22	101%/95%	临床试验

注：表中数据来源于相关的文献综述或说明书，由于血肿瘤屏障的异质性，一些药物的相关研究给出的脑脊液 / 血浆比率是一个范围。

Note：Data in the table come from literature review or drug instructions. Due to the heterogeneity of the blood tumor barrier，the cerebrospinal fluid/plasma ratio given by some drug-related studies is a range.

表 3 靶向药物透过血脑屏障的水平 [7, 16, 26, 27]

Tab 3 Level of targeted drugs via blood-brain barrier[7, 16, 26, 27]

肿瘤	靶点	药物	中枢神经系统或脑脊液渗透率	外排泵底物
非小细胞肺癌	EGFR	吉非替尼	有限（1.13%）	P- 糖蛋白底物
		厄洛替尼	有限（2.8% ～ 3.3%）	P- 糖蛋白和乳腺癌耐药蛋白底物
		阿法替尼	有限（1.65%）	P- 糖蛋白底物
		奥希替尼	高（2.5% ～ 16%）	P- 糖蛋白和乳腺癌耐药蛋白底物
	ALK	克唑替尼	有限（0.26%）	P- 糖蛋白底物
		色瑞替尼	有限（15%）	P- 糖蛋白和乳腺癌耐药蛋白底物
		阿来替尼	高（63% ～ 94%）	不是 P- 糖蛋白底物
		布加替尼	不明	P- 糖蛋白和乳腺癌耐药蛋白底物
		劳拉替尼	高（31% ～ 96%）	不是 P- 糖蛋白底物
乳腺癌	HER2	拉帕替尼	非常有限（摄取小于血浆的 10%[26]）	P- 糖蛋白和乳腺癌耐药蛋白底物
		奈拉替尼	有限 [a]	不是 P- 糖蛋白底物
		图卡替尼	有限	不明
		曲妥珠单抗	不能或非常有限 [b]	不明
		曲妥珠单抗 - 美坦新	有限	不明
		帕妥珠单抗	不能或非常有限	不明
	CDK4/CDK6	阿贝西利	良好 [c]	P- 糖蛋白和乳腺癌耐药蛋白底物
		哌柏西利	有限	P- 糖蛋白和乳腺癌耐药蛋白底物
	PARP	他拉唑帕尼	非常有限	P- 糖蛋白底物
黑色素瘤	BRAF	维莫非尼	有限（0.98%）	P- 糖蛋白和乳腺癌耐药蛋白底物
		达拉非尼	有限 [d]	P- 糖蛋白和乳腺癌耐药蛋白底物
	MEK	曲美替尼	有限	P- 糖蛋白但不是乳腺癌耐药蛋白底物
		考比替尼	良好 [e]（2.7%）	P- 糖蛋白但不是乳腺癌耐药蛋白底物
		E6201	高	最小的 P- 糖蛋白和乳腺癌耐药蛋白影响

注：a. 在单个脑转移样本中发现了较低的奈拉替尼脑脊液浓度 [28]；b. 脑脊液的浓度比血清低 300 倍；c. 脑脊液中阿贝西利及其活性代谢产物的浓度与游离血浆浓度相当；d. 临床前研究表明达拉非尼比维莫非尼的大脑分布更好；e. 考比替尼比曲美替尼更能穿透脑组织，考比替尼动物研究中脑游离浓度占血浆游离浓度的 2.7%[29]。表格中“高、有限、非常有限、良好”来源于文献、原始研究以及个案报道文献的评价，部分无确切数据。表中所示药物若为外排泵的底物可增加药物从脑中泵出。

Note：a. Low cerebrospinal fluid concentration of neratinib was found in a single sample of brain metastasis [28]；b. The concentration of cerebrospinal fluid is 300 times lower than that of serum；c. The concentration of abemaciclib and its active metabolites in the cerebrospinal fluid was similar to those in the free plasma；d. Preclinical studies suggest a better brain distribution of dabrafenib than vemurafenib；e. Cobimetinib penetrates brain tissue better than dose trametinib; in animal studies，the free cobimetinib concentration in the brain was 2.7% that in the plasma[29]. High，limited，very limited and fair description in the table come from the evaluation of review，original research and case reports，and some without exact data. If the drug shown in the table is the substrate of the efflux pump，it may promote the pumping of the drug from the brain.

但由于脑转移部位的血脑屏障的破坏和脑肿瘤血管的不均匀渗漏造成部分大分子可渗透过血肿瘤屏障。研究发现 ^{89}Zr- 曲妥珠单抗可以靶向脑部，且在肿瘤中的吸收是正常脑组织的 18 倍 [33]，目前有争议的是曲妥珠单抗在脑转移中达到的浓度是否足以减缓肿瘤的生长。临床前研究表明，与同等剂量或对原发性肿瘤同样有效的曲妥珠单抗剂量相比，曲妥珠单抗 - 美坦新（T-DM1）在脑微环境中具有更好的反应 [34]。对于细胞周期依赖性激酶（CDK）4/6 抑制剂，阿贝西利应该是目前市售的 CDK4/6 抑制剂中透过血脑屏障能力最强的，脑 / 血药物浓度比阿贝西利较哌柏西利高近 10 倍，并且可能在脑中持续更长时间 [27]。

在黑色素瘤脑转移 BRAF V600E 突变患者的治疗中，维莫非尼较难透过血脑屏障，达拉非尼透过血脑屏障的能力好于维莫非尼，使用维莫非尼和达拉非尼作为单一治疗药物的反应率在 20% ～ 38%。与报道的 BRAF 抑制剂单药治疗相比，BRAF 和丝裂原活化蛋白激酶 / 细胞外信号调控激酶（MEK）抑制剂联合使用（如达拉非尼联合曲美替尼）已被证明在 BRAF 突变脑转移瘤中的颅内反应率更高（55%）[1]。

目前针对有特定基因突变的脑转移瘤的靶向治疗 [35]：对于 EGFR 突变的非小细胞肺癌脑转移患者推荐药物依次为奥西替尼、脉冲用厄洛替 尼（第 1 ～ 2 日 1200 mg， 第 3 ～ 7 日 50 mg

qw）、阿法替尼（2B 类）、吉非替尼（2B 类）。对于 ALK 重排阳性非小细胞肺癌脑转移患者，专家组更倾向于使用第二代和第三代 ALK 抑制剂如布加替尼、劳拉替尼、阿来替尼、色瑞替尼。对于 HER2 突变阳性的乳腺癌脑转移患者推荐选用 T-DM1、卡培他滨＋拉帕替尼、卡培他滨＋奈拉替尼、紫杉醇＋奈拉替尼（2B 类）、图卡替尼＋曲妥珠单抗＋卡培他滨（如果之前接受过一种或多种抗 HER2 的方案治疗）。对于黑色素瘤脑转移 BRAF V600E 突变的患者推荐选用达拉非尼 / 曲美替尼、维莫非尼 / 考比替尼（2B 类）。

2.3　免疫治疗药物

由于血脑屏障对外周免疫细胞的阻隔，同时缺乏与外周淋巴结的有效淋巴引流，一旦肿瘤细胞转移至颅内即可躲避免疫系统的监视和杀伤，所以既往一直认为大脑是一个免疫豁免的器官。近年脑膜淋巴管的发现以及血脑屏障的完整性会被脑转移灶破坏的理论得到证实，脑转移瘤的治疗也能从免疫治疗中获益 [36]。研究发现在硬脑膜窦旁有淋巴管系统，脑膜淋巴管在生理条件下会携带大量免疫细胞。淋巴系统连接循环系统和免疫系统，与血管协同工作，以交换组织内的液体、废物、碎片和免疫细胞 [37-38]。中枢神经系统内存在不同类型的抗原呈递细胞（APC），包括小胶质细胞、巨噬细胞、星形胶质细胞和经典的 APC（如树突细胞），T 细胞可以不受限制地在中枢神经系统中巡逻 [39]。

免疫检查点抑制剂（伊匹木单抗、纳武利尤单抗、帕博利珠单抗）显示出对肺癌和黑色素瘤脑转移患者有前景的初步证据见表 4。在黑色素瘤脑转移的患者中，纳武利尤单抗＋伊匹木单抗比单一的免疫检查点抑制剂（纳武利尤单抗 [客观缓解率（ORR）20%] 或帕博利珠单抗（ORR 26%）更有效，颅内反应率在 45% ～ 60%[40]，是无症状脑转移患者的一线治疗方法。在非小细胞肺癌脑转移患者中，帕博利珠单抗单药一线和一线以后治疗 PD-L1 ≥ 1% 的非小细胞肺癌脑转移患者的颅内 ORR 为 29.7%，纳武利尤单抗单药二线及二线以后治疗非小细胞肺癌脑转移患者的颅内 ORR 为 9% ～ 28.1%[2]。

表 4　脑转移瘤免疫治疗相关研究 [41-45]

Tab 4　Related studies of immunotherapy for brain metastasis[41-45]

试验	药物	阶段	肿瘤	中枢客观缓解率	中位生存期 / 月	中位无进展生存期 / 月
NCT02085070	帕博利珠单抗	Ⅱ 期	非小细胞肺癌 [42]	29.7%	7.7	未提及
			黑色素瘤 [43]	26%	17	2
	纳武利尤单抗 [44]		非小细胞肺癌	28.1%	14.8	2.8
NCT02374242	纳武利尤单抗＋伊匹木单抗	Ⅱ期	黑色素瘤	46%	未达到	13.8
	纳武利尤单抗			20%	18.5	2.6
NCT02320058	纳武利尤单抗＋伊匹木单抗	Ⅱ期	黑色素瘤	57%	未提及	未提及
NCT00623766	伊匹木单抗	Ⅱ期	黑色素瘤	未提及	7.0	1.4
					3.7	1.2
NCT01703507	放疗＋伊匹木单抗	Ⅰ 期	黑色素瘤	57.7%	8.0	2.5
					未达到	2.1
	伊匹木单抗 [45]	Ⅲ 期	黑色素瘤	未提及	11.4	未提及

3　小结和展望

大多数化疗药物在脑转移瘤中只有适度的活性，以亚硝脲类药物、替莫唑胺、拓扑替康、白消安等药物在脑中浓度较高，靶向治疗和免疫治疗正在脑转移瘤的治疗中发挥越来越重要的作用，以肺癌中的奥希替尼和阿来替尼对于颅内病灶均显示出不错的疗效，乳腺癌中的小分子靶向药物如奈拉替尼在联合卡培他滨对于颅内转移灶也显示出较好的 ORR，大分子单抗如 T-DM1 可能由于血肿瘤屏障的异质性渗漏的原因也显示出一定疗效。在免疫治疗方面，肺癌和黑色素瘤脑转移的免疫治疗研究较多，也有了一些有前景的研究结果。对于晚期肿瘤脑转移的患者可根据 NCCN 指南 [35]、CSCO 指南 [3] 和 ESMO 指南 [46] 进行一些方案选择，而一些后线治疗的脑转移患者对于药物治疗选择即可根据药物的敏感性尽量选择血脑屏障通透性好一些的药物。

针对脑转移瘤的研究从未停歇，一些具有更高分子特异性的新化合物正在开发中，包括具有更高的血脑屏障和血肿瘤屏障渗透性。增加药物跨血脑屏障的递送策略也一直在研究中，包括打开血脑屏障的紧密连接、抑制血脑屏障外排泵系统等，优化药物选择，优化药物递送，以期脑转移患者有更好的预后。

参考文献

[1] Achrol AS，Rennert RC，Anders C，et al. Brain metastasis [J]. Nat Rev Dis Primers，2019，5（1）：5.

[2] 中国医师协会肿瘤医师分会，中国医疗保健国际交流促进会肿瘤内科分会 . 肺癌脑转移中国治疗指南（2021 年版）[J]. 中华肿瘤杂志，2021，43（3）：269-281.

[3] 中国临床肿瘤学会（CSCO）. 中枢神经系统转移性肿瘤诊疗指南 [S]. 北京：人民卫生出版社，2021.

[4] Lamba N，Wen PY，Aizer AA. Epidemiology of brain metastasis and leptomeningeal disease [J]. Neuro Oncol，2021，23（9）：1447-1456.

[5] Venur VA，Karivedu V，Ahluwalia MS. Systemic therapy for brain metastasis [J]. Handb Clin Neurol，2018，149：137-153.

[6] Soffietti R，Ahluwalia M，Lin N，et al. Management of brain metastasis according to molecular subtypes [J]. Nat Rev Neurol，2020，16（10）：557-574.

[7] 杨群英 . 脑转移瘤的化疗 [J]. 广东医学，2019，40（1）：37-40.

[8] Arvanitis CD，Ferraro GB，Jain RK. The blood-brain barrier and blood-tumour barrier in brain tumours and metastases [J]. Nat Rev Cancer，2020，20（1）：26-41.

[9] Lockman PR，Mittapalli RK，Taskar KS，et al. Heterogeneous blood-tumor barrier permeability determines drug efficacy in experimental brain metastasis of breast cancer [J]. Clin Cancer Res，2010，16（23）：5664-5678.

[10] Nduom EK，Yang C，Merrill MJ，et al. Characterization of the blood-brain barrier of metastatic and primary malignant neoplasms [J]. J Neurosurg，2013，119（2）：427-433.

[11] Fortin D. The blood-brain barrier：its influence in the treatment of brain tumors metastases [J]. Curr Cancer Drug Targets，2012，12（3）：247-259.

[12] Dréan A，Goldwirt L，Verreault M，et al. Blood-brain barrier，cytotoxic chemotherapies and glioblastoma [J]. Expert Rev Neurother，2016，16（11）：1285-1300.

[13] Wong AD，Ye M，Levy AF，et al. The blood-brain barrier：an engineering perspective [J]. Front Neuroeng，2013，6：7.

[14] Fu BM. Transport across the blood-brain barrier [J]. Adv Exp Med Biol，2018，1097：235-259.

[15] 康建磊，王寅千，于书卿 . 药物透过血脑屏障的研究进展 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志，2012，39（4）：366-369.

[16] Cheng H，Perez-Soler R. Leptomeningeal metastases in non-small-cell lung cancer [J]. Lancet Oncol，2018，19（1）：e43-e55.

[17] Pitz MW，Desai A，Grossman SA，et al. Tissue concentration of systemically administered antineoplastic agents in human brain tumors [J]. J Neurooncol，2011，104（3）：629-638.

[18] 齐彩霞，安永恒 . 化疗药物透过血脑屏障的研究进展评价 [J]. 中国医院用药评价与分析，2007，7（1）：31-34.

[19] Zeng Q，Wang J，Cheng Z，et al. discovery and evaluation of clinical candidate AZD3759，a potent，oral active，central nervous system-penetrant，epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor [J]. J Med Chem，2015，58（20）：8200-8215.

[20] 王栋，徐寒梅，胡加亮 . 跨血脑屏障的药物递送策略研究进展 [J]. 药学进展，2021，45（6）：473-480.

[21] 赵志刚，龚凌志 . 血脑屏障及药物通过血脑屏障方法研究进展 [J]. 中国药学杂志，2000，35（4）：227-230.

[22] Pardridge WM. CSF，blood-brain barrier，and brain drug delivery [J]. Expert Opin Drug Deliv，2016，13（7）：963-975.

[23] Angeli E，Nguyen TT，Janin A，et al. How to make anticancer drugs cross the blood-brain barrier to treat brain metastasis [J]. Int J Mol Sci，2020，21（1）：22.

[24] Toyokawa G，Seto T，Takenoyama M，et al. Insights into brain metastasis in patients with ALK ＋ lung cancer：is the brain truly a sanctuary? [J]. Cancer Metastasis Rev，2015，34（4）：797-805.

[25] Zhang I，Zaorsky NG，Palmer JD，et al. Targeting brain metastasis in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer [J]. Lancet Oncol，2015，16（13）：e510-e521.

[26] Taskar KS，Rudraraju V，Mittapalli RK，et al. Lapatinib distribution in HER2 overexpressing experimental brain metastasis of breast cancer [J]. Pharm Res，2012，29（3）：770-781.

[27] Raub TJ，Wishart GN，Kulanthaivel P，et al. Brain exposure of two selective dual CDK4 and CDK6 inhibitors and the antitumor activity of CDK4 and CDK6 inhibition in combination with temozolomide in an intracranial glioblastoma xenograft [J]. Drug Metab Dispos，2015，43（9）：1360-1371.

[28] Freedman RA，Gelman RS，Agar NYR，et al. Pre-and postoperative neratinib for HER2-positive breast cancer brain metastasis：translational breast cancer research consortium 022 [J]. Clin Breast Cancer，2020，20（2）：145-151.

[29] Choo EF，Ly J，Chan J，et al. Role of P-glycoprotein on the brain penetration and brain pharmacodynamic activity of the MEK inhibitor cobimetinib [J]. Mol Pharm，2014，11（11）：4199-4207.

[30] Zeng Q，Wang J，Cheng Z，et al. Discovery and evaluation of clinical candidate AZD3759，a potent，oral active，central nervous system-penetrant，epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor [J]. J Med Chem，2015，58（20）：8200-8215.

[31] Togashi Y，Masago K，Masuda S，et al. Cerebrospinal fluid concentration of gefitinib and erlotinib in patients with non-small cell lung cancer [J]. Cancer Chemother Pharmacol，2012，70（3）：399-405.

[32] Duchnowska R，Loibl S，Jassem J. Tyrosine kinase inhibitors for brain metastasis in HER2-positive breast cancer [J]. Cancer Treat Rev，2018，67：71-77.

[33] Dijkers EC，Oude Munnink TH，Kosterink JG，et al. Biodistribution of 89Zr-trastuzumab and PET imaging of HER2-positive lesions in patients with metastatic breast cancer [J]. Clin Pharmacol Ther，2010，87（5）：586-592.
[34] Askoxylakis V，Ferraro GB，Kodack DP，et al. Preclinical efficacy of ado-trastuzumab emtansine in the brain microenvironment [J]. J Natl Cancer Inst，2015，108（2）：djv313.
[35] NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology：Central Nervous System Cancers（2021 Version 1）[DB/OL]. http：//www. nccn. org.
[36] 赫捷，李进 . 中国临床肿瘤学进展 [M]. 北京：人民卫生出版社，2020.
[37] Raper D，Louveau A，Kipnis J. How do meningeal lymphatic vessels drain the CNS? [J]. Trends Neurosci，2016，39（9）：581-586.
[38] Quail DF，Joyce JA. The microenvironmental landscape of brain tumors [J]. Cancer Cell，2017，31（3）：326-341.
[39] Sampson JH，Gunn MD，Fecci PE，et al. Brain immunology and immunotherapy in brain tumours [J]. Nat Rev Cancer，2020，20（1）：12-25.
[40] Suh JH，Kotecha R，Chao ST，et al. Current approaches to the management of brain metastasis [J]. Nat Rev Clin Oncol，2020，17（5）：279-299.
[41] Guan Z，Lan H，Cai X，et al. Blood-brain barrier，cell junctions，and tumor microenvironment in brain metastasis，the biological prospects and dilemma in therapies [J]. Front Cell Dev Biol，2021，9：722917.
[42] Goldberg SB，Schalper KA，Gettinger SN，et al. Pembrolizumab for management of patients with NSCLC and brain metastasis：long-term results and biomarker analysis from a non-randomised，open-label，phase 2 trial [J]. Lancet Oncol，2020，21（5）：655-663.
[43] Kluger HM，Chiang V，Mahajan A，et al. Long-term survival of patients with melanoma with active brain metastasis treated with pembrolizumab on a phase Ⅱ Trial [J]. J Clin Oncol，2019，37（1）：52-60.
[44] Zhang G，Cheng R，Wang H，et al. Comparable outcomes of nivolumab in patients with advanced NSCLC presenting with or without brain metastasis：a retrospective cohort study [J]. Cancer Immunol Immunother，2020，69（3）：399-405.
[45] Schadendorf D，Hodi FS，Robert C，et al. Pooled analysis of long-term survival data from phase ii and phase iii trials of ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma [J]. J Clin Oncol，2015，33（17）：1889-1894.
[46] Le Rhun E，Guckenberger M，Smits M，et al. EANO-ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis，treatment and follow-up of patients with brain metastasis from solid tumours [J]. Ann Oncol，2021，32（11）：1332-1347.

（收稿日期：2021-10-12；修回日期：2021-12-05）

NLRP3 炎症小体在心血管疾病中的研究进展

刘铂[1]，王瑞莹[2]，周嘉惠[2]，孙晓波[2，3，4，5，6]，孙桂波[2，3，4，5，6*]，于蕾[1*]（1. 哈尔滨商业大学药学院药物工程技术研究中心，哈尔滨 150076；2. 中国医学科学院药用植物研究所，北京 100193；3. 中国医学科学院基于经典名方的新药发现重点实验室，北京 100193；4. 教育部中药生物活性物质与资源利用重点实验室，北京 100193；5. 中药（天然产物）创新药物研发北京市重点实验室，北京 100193；6. 中草药物质基础与资源利用重点实验室，北京 100193）

摘要：炎症在心血管疾病的发生、发展中有重要作用，核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3（NLRP3）炎症小体在心血管炎症中起重要作用。NLRP3 炎症小体参与多种病理生理学过程，在动脉粥样硬化、心肌缺血再灌注损伤、压力超负荷或心肌病引起的心力衰竭等心血管疾病中发挥关键作用。目前天然药物和化学药物可通过抑制 NLRP3 的激活及表达来发挥治疗心血管疾病的作用。本文就 NLRP3 炎症体在心血管疾病发病机制和相关药物进行综述。

关键词：核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3；心血管疾病；动脉粥样硬化；充血性心力衰竭
中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1391-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.028

基金项目：广东省重点领域研发计划项目（No.2020B111111002）；中国医学科学院重点实验室课题（No.2018PT35030）。

作者简介：刘铂，男，在读硕士研究生，主要从事中药药理毒理研究，email：792388610@qq.com *通信作者：孙桂波，女，教授，博士研究生导师，主要从事中药及复方药效物质基础及分子机制研究，email：sunguibo@126.com；于蕾，女，博士，副研究员，主要从事民族药抗肿瘤研究，email：yulei912@163.com

A review of NLRP3 inflammasome in cardiovascular diseases

LIU Bo[1], WANG Rui-ying[2], ZHOU Jia-hui[2], SUN Xiao-bo[2, 3, 4, 5, 6], SUN Gui-bo[2, 3, 4, 5, 6*], YU Lei[1*] (1. *School of Pharmacy*, *Engineering Research Center for Medicine*, *Harbin University of Commerce*, *Harbin* 150076; 2. *Institute of Medicinal Plant Development*, *Chinese Academy of Medical Sciences*, *Beijing* 100193; 3. *Key Laboratory of New Drug Discovery Based on Classic Prescriptions*, *Chinese Academy of Medical Sciences*, *Beijing* 100193; 4. *Key Laboratory of Chinese Medicine Bioactive Substances and Resource Utilization*, *Ministry of Education*, *Beijing* 100193; 5. *Beijing Key Laboratory of Innovative Drug Research and Development of Traditional Chinese Medicine (Natural Products*), *Beijing* 100193; 6. *Key Laboratory of Chinese Herbal Medicine Material Basis and Resource Utilization, Beijing* 100193)

Abstract: Inflammation plays an important role in the occurrence and development of cardiovascular diseases. Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammatory bodies play an important role in cardiovascular inflammation. NLRP3 inflammasome is involved in many pathophysiological processes and plays a key role in cardiovascular diseases such as atherosclerosis, myocardial ischemia-reperfusion injury, stress overload, or heart failure due to cardiomyopathy. At present, natural drugs and chemical drugs work together for cardiovascular diseases by inhibiting the activation and expression of NLRP3. This article reviewed the pathogenesis and related drugs of NLRP3 inflammatory body for cardiovascular diseases.

Key words: nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3; cardiovascular disease; atherosclerosis;congestive heart failure

炎症在心血管疾病（cardiovascular disease，CVDS）发生发展中起着重要作用。常见的致病性、代谢性或缺血性致病因子诱发炎性细胞因子有白介素 -1（IL-1）、白介素 -6（IL-6）、白介素 -1β（IL-1β）、白介素 -18（IL-18）和肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）。临床研究表明抗炎治疗可降低心血管事件的发生率[1-2]。因此，研究心血管疾病中抗炎治疗可能是未来研究的重点。越来越多的研究表明核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3（nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3，NLRP3）炎症小体与心血管疾病的发生发展密切相关。NLRP3 通过活化天冬氨酸蛋白水解酶 -1（Caspase-1）和焦亡蛋白（GSDMD），释放大量炎症因子并且开启一种新的、可控的、有序的细胞死亡模式——细胞焦亡，加速心血管疾病的发生发展[3-4]。NLRP3 作为研究比较深入的炎症小体，参与多种心血管疾病的过程。本文就 NLRP3 参与心血管疾病的研究进展进行综述。

1 NLRP3 的介绍

1.1 NLRP3 的结构

炎症小体由模式识别受体（pattern recognition receptor，PRR）形成的多蛋白复合物，Toll 样受体、核苷酸结合寡聚化结构域样受体（nucleotide-bindingoligomerization domain-like receptor，NLR）、黑色素瘤缺乏因子 2 受体都属于模式识别受体[5]。NLR 由亮氨酸重复区域、核苷酸结合和寡聚化结构域、氨基末端热蛋白结构域 3 个结构域构成[6]。NLR 家族中的 NLRP3 最受关注。NLRP3 受体蛋白、凋亡相关斑点状蛋白（apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD，ASC）和 Caspase-1 前体蛋白（pro-Caspase-1）组成了经典的 NLRP3 炎症小体[7]。NLRP3 炎症小体可识别许多危险信号，参与多种疾病病理过程中的炎症反应。

1.2 NLRP3 的激活

NLRP3 炎症小体的激活需要启动和激活两个信号。启动：在病原体相关分子模式（PAMPs）或损伤相关分子模式（DAMPs）的刺激下，Toll 样受体激活 NF-κB 通路，增加 NLRP3、IL-1β 前体蛋白（Pro-IL-1β）的表达。激活：继续在 PAMPs、DAMPs 和其他危险信号的刺激下，NLRP3、ASC 和 pro-Caspase-1 三者进行组装，形成具有活性的 NLRP3 炎症小体，然后释放出活化

的 Caspase-1。活化的 Caspase-1 对无活性的促炎细胞因子 pro-IL-1β、IL-18 前体蛋白（pro-IL-18）进行切割加工，使其转化为成熟的促炎细胞因子 IL-1β、IL-18[8]。此外，活化的 Caspase-1 还作用于焦亡蛋白，使其产生具有打孔特性的 N 端结构域，N 端结构域与细胞磷脂双分子层结合，使细胞膜形成蜂窝状的孔洞，释放大量的促炎细胞因子 IL-1β、IL-18，从而产生炎症风暴，介导细胞焦亡[9]。

2 NLRP3 与心血管疾病

NLRP3 广泛表达于髓系细胞，如树突细胞、单核 / 巨噬细胞和中性粒细胞[10]。此外，树突细胞、单核 / 巨噬细胞和中性粒细胞及一些其他免疫细胞常常在心脏发挥作用，而巨噬细胞占免疫细胞的 70% 以上[11]。其他非免疫细胞，如内皮细胞和心脏成纤维细胞也属于心脏天然免疫的重要参与者。这些细胞和心肌细胞中的 NLRP3 炎症小体激活启动炎症反应，在动脉粥样硬化、心肌缺血再灌注损伤（MIRI）和不同病因的心力衰竭（HF）中起重要作用。

2.1 NLRP3 与动脉粥样硬化

动脉粥样硬化是 MIRI 的主要原因，是一种血管病理过程，发病机制复杂，主要由遗传、环境和全身因素共同作用。动脉粥样硬化主要特征包括内皮损伤，脂蛋白聚集，单核细胞黏附、迁移及分化为巨噬细胞和泡沫细胞，平滑肌细胞募集和增殖。诱发动脉粥样硬化的因素包括吸烟，高脂肪饮食，高血压和缺乏运动引起的超重或肥胖。诸多研究表明，NLRP3 炎症小体在动脉粥样硬化的病理过程中具有重要作用。

内皮损伤或内膜完整性丧失是动脉粥样硬化的第一步。吸烟是动脉粥样硬化的主要危险因素之一。尼古丁增加 NLRP3 和 ASC 的表达，并触发主动脉内皮细胞中的 NLRP3 炎性小体激活和内皮细胞焦亡[12]。污染是 NLRP3 炎性小体激活介导的内皮损伤的另一个重要原因[13]。丙烯醛和镉这两种常见的环境污染物同样会提高 NLRP3 炎性小体的表达，导致内皮损伤[14-15]。据报道 NLRP3 炎性小体与代谢病引起的内皮损伤有关，包括氧化低密度脂蛋白（Ox-LDL）和胆固醇等脂质的异常吸收。Ox-LDL 以剂量依赖的方式上调血管内皮细胞 NLRP3、Caspase-1 和 IL-1β 的蛋白水平，介导内皮细胞焦亡。进一步的研究表明，Ox-LDL 通过改善线粒体功能和阻断 NF-κB 通路来抑制甲基胞嘧啶双加氧酶 2（TET2）的活性，从而显著降低 Caspase-1、NLRP3 和 IL-1β 的表达[16]。总而言之，众多的研究表明在 MIRI 的发病机制中 NLRP3 炎症小体发挥着关键作用，因此 NLRP3-Caspase-1 信号通路轴的研究可作为治疗动脉粥样硬化引起 MIRI 的一个潜在的靶点。

2.2 NLRP3 与心肌缺血再灌注损伤

大多数 MIRI 病例涉及继发性阻塞性动脉粥样硬化血管疾病的血液供应减少。虽然早期再灌注可减轻心脏损伤，但晚期再灌注会激活 NLRP3 炎症小体，加重 MIRI。研究表明抑制 NLRP3 炎症小体可明显减轻心肌缺血再灌注损伤，减小心肌梗死面积。Caspase-1 抑制剂 VX-765 对大鼠急性心肌梗死有很强的保护作用，VX-765 可使大鼠心肌梗死面积缩小至（29.2±4.9）%，而未用 VX-765 的心肌梗死面积为（60.3±3.8）%。此外，VX-765 可降低血清中 IL-1 水平，保持线粒体复合体Ⅰ酶的活性，并抑制心脏乳酸脱氢酶的释放[17]。

2.2.1 心脏 NLRP3 炎症小体的初始激活位点成纤维细胞 心脏纤维化是许多心脏病理生理状况的一个共同特征，细胞焦亡和炎症是心脏成纤维化的重要过程之一。心脏成纤维细胞是 MIRI 中炎症激活的最初部位，其中 NLRP3 炎症小体的激活被认为是 MIRI 的关键[18]。在缺氧复氧刺激下心脏成纤维细胞会分泌大量 IL-1β，诱导 NLRP3 炎症小体活化，这种活化作用由心脏成纤维细胞 K^+ 外流和活性氧（ROS）生成所介导。Sandanger 等[19]研究表明，在大鼠非再灌注模型中，左心室心脏成纤维细胞中的 NLRP3、IL-1β 和 IL-18 表达升高。心脏中主要细胞群为成纤维细胞群，可参与调节心肌纤维化、修复和重构的过程[20-21]。

2.2.2 NLRP3 炎症介导的心肌缺血再灌注损伤的关键分子 TXNIP NLRP3 炎性小体介导的 MIRI 的关键分子是硫氧还蛋白（TRX）相互作用蛋白（TXNIP），在 MIRI 过程中，心肌组织中 TXNIP 水平升高；免疫沉淀实验显示 TXNIP 与 NLRP3 具有直接相互作用关系，*TXNIP* 基因敲除降低了小鼠心肌组织中 NLRP3 的表达和梗死面积[22]。研究表明，MIRI 可刺激心肌微血管内皮细胞（CMECs）的 NLRP3 炎症体激活，但对心肌细胞无明显影响；*TXNIP* 基因敲除可抑制 CMECs 的 NLRP3 炎症体激活；ROS 刺激可激活 TXNIP 介导的 NLRP3 炎症小体，而这种作用可被 ROS 清除剂 EUK134.45 抑制[23]。激活蛋白 C（APC）通过抑制凋亡[24]、调控 NLRP3 炎症[25]，对 MIRI 发挥心脏保护作用。体内研究表明 MIRI 经 APC 治疗梗死范围显著缩小，NLRP3 炎症小体的表达水平降低。心脏成纤维细

胞、心肌细胞和巨噬细胞的体外实验表明，APC 通过蛋白酶激活受体 1 和雷帕霉素复合物靶点 1 信号通路全面抑制 NLRP3 炎性小体的激活 [25]。由此可见，NLRP3 炎症小体的作用机制复杂多样，在不同细胞中有不同的机制表现。

2.3 NLRP3 与充血性心力衰竭

HF 通常指充血性心力衰竭，是许多心脏疾病的最后阶段。多种因素引起的心肌病和心肌炎是 HF 的特殊病因。NLRP3 炎症小体在 HF 的发生、发展和预后中起重要作用。一项涉及 54 名 HF 患者的临床试验报道显示，运动组与对照组相比，ASC 甲基化增加，血浆 IL-1β 和 ASC mRNA 水平降低，提示运动通过对 ASC 的表观遗传调节改善 HF[26]。此外，心脏重构和纤维化是 HF 发生的主要机制，NLRP3 炎性小体在其中同样起着至关重要的作用。

2.3.1 压力负荷引起的心力衰竭 钙 / 钙调蛋白依赖性蛋白激酶Ⅱδ（CaMK Ⅱδ）在 HF 发病机制中起重要作用 [27]。在 HF 期间，NLRP3 炎症小体激活 CaMK Ⅱδ，这种 CaMK Ⅱδ 激活主要发生在血管紧张素Ⅱ（Ang Ⅱ）输注的早期，巨噬细胞明显募集之前。*NLRP3* 基因敲除或 MCC950 介导的 NLRP3 炎症小体抑制作用可减轻心脏缺血引起的炎症，主要表现为 Ang Ⅱ输注过程中巨噬细胞聚集和纤维化减少，这与 CaMK Ⅱδ 缺失的效果相似 [28]。另一项研究发现，心肌细胞中 CaMK Ⅱδ 缺失可减轻压力负荷引起的 $CD68^+$、IL-1β 和 IL-18 等细胞因子的累积。从心肌细胞特异性 CaMK Ⅱδ 缺失和主动脉缩窄（TAC）的小鼠分离的心肌细胞显示 NLRP3 水平、Caspase-1 活性和 IL-18 活性降低，表明压力负荷时 CaMK Ⅱδ 诱导了 NLRP3 炎症小体的激活 [29]。有报道称 TET2 的突变可促进 HF，TET2 缺乏可增加 IL-1β 的表达，诱导 NLRP3 激活加速 HF，而 MCC950 治疗可显著抑制 HF 的发生 [30]。

2.3.2 心肌病和心肌炎引起的心力衰竭 心肌病和心肌炎可诱发 HF，而 NLRP3 炎症体参与其中。由于糖尿病的高发病率特点，糖尿病性心肌病的患者正在迅速增加。NLRP3 炎症体可介导果糖对大鼠心肌细胞的细胞毒作用。此外，果糖处理的 H9c2 细胞中 CD36、TLR4、TLR6、NLRP3、IL-1β、Smad 2/3 磷酸化和 Smad 4 表达增加，而 *NLRP3* 基因敲除则显著减轻果糖所致的大鼠心脏炎症和纤维化 [31]。H3 松弛素是一种活性肽，在高葡萄糖条件下能显著抑制心肌细胞中的 NLRP3 炎症激活和胶原蛋白合成。此外，ROS 的过量生产和配体门控离子通道 7 在 NLRP3 介导的高糖诱导的纤维化过程中起着至关重要的作用 [32]。利用糖尿病心肌病动物模型进行的基因敲除实验表明，非编码 RNA 如 miRNA-30d 和 lncRNA Kcnq1ot1，分别在介导 NLRP3 激活和细胞焦亡中起重要作用 [33-34]。

多种病原体，包括细菌、病毒和寄生虫会导致心脏病。柯萨奇病毒 B3（CVB3）引起的心肌炎是最常见和最重要的感染性心脏病。NLRP3 炎症小体与 CVB3 诱导的心肌炎密切相关。IL-1β、Caspase-1 和 ASC 在感染后的前 7 d 持续升高。而使用抑制剂抑制 Caspase-1 或使用中和抗体阻断 IL-1β/caspase-1 途径会降低心肌酶活性，改善心功能，提高存活率 [35]。在 HF 的发展过程中，体内的 NLRP3 炎症小体通过上调 Caspase-1、IL-1β 及 IL-18 等多种炎症因子，诱发一系列炎症反应，促使离子通道功能异常，进而诱发心律失常。提示沉默 *NLRP3* 基因，可降低 NLRP3 的表达从而达到治疗心血管疾病的目的，但还需要进一步的研究证实。

3 以 NLRP3 炎症小体为靶点治疗心血管疾病的药物

尽管有各种治疗方案可供选择，但心血管疾病仍是一个严重的健康问题。目前心血管疾病治疗的一个新方向便是 NLRP3 炎症小体。针对 NLRP3 炎症小体的心血管疾病治疗药物可分为化学药物和天然药物两类。

3.1 化学药物

别嘌呤醇是一种黄嘌呤氧化酶抑制剂，主要用于痛风治疗，它通过抑制 NLRP3 炎症小体的激活，减少心脏炎症和纤维化，从而改善果糖诱导的代谢综合征的心脏损伤 [31]。秋水仙碱通过调节 NLRP3 炎症小体，显著减轻心脏炎症，提高存活率，并防止心肌梗死发展为慢性心力衰竭 [36]。二甲双胍和恩格列净这两种抗糖尿病药物均可以抑制 NLRP3 炎症小体，减缓糖尿病心肌病的发展，但机制不同，二甲双胍促进 AMPK 磷酸化 [37]，而恩格列净抑制 sGC-cGMP-PKG 通路 [38]。吡非尼酮作为第一个用于治疗特发性肺纤维化的小分子药物，通过抑制 NLRP3 炎症小体的形成来减少心肌纤维化和心室重构 [39]。代谢调节剂他汀类药物靶向调节 OxLDL 诱导的内皮细胞 NLRP3 炎症小体激活，对心脏具有保护作用。MCC 950 是一种 NLRP3 炎症抑制剂，能特异性阻断 NLRP3 炎症小体的激活，而不影响其他炎

症小体，不仅在研究中得到了广泛的应用，而且具有潜在的临床应用价值。这些药物都能靶向作用于 NLRP3 炎症小体，通过改善新陈代谢、减轻炎症，起到保护心血管系统的作用。

3.2　天然药物

芥子酸是一种从传统中药中分离出来的化合物，在体外和体内动脉粥样硬化模型中都能减轻 NLRP3 炎症小体的激活和表达[40]。冠心宁是一种广泛用于各种心血管疾病的 B 类保护性中药复方，它可以抑制中性粒细胞在心肌中的浸润，改善心功能，降低 Caspase-1 活性和 IL-1β 的水平[41]。脑心通对 MIRI 具有相似的作用[42]。大黄素通过抑制心肌细胞松弛发挥抗炎作用，并通过 TLR4/MyD88/NF-κB/NLRP3 炎症小体途径减轻 MIRI[43]。

肉桂醛通过 CD 36 介导的 TLR 4/6-IRAK 4/1 信号通路抑制 NLRP3 炎症小体的激活，从而降低果糖对心肌的细胞毒性作用。云芝作为一种具有药用价值的食用菌，通过抑制糖尿病大鼠模型的 NLRP3 炎症小体和 TGFβ1/Smad 信号通路，显著改善心脏炎症和纤维化[44]。天然药物可通过调节 NLRP3 炎症小体抑制心血管疾病的发展。

4　结语

综上所述，心血管疾病受多种因素共同影响，且发病机制较为复杂。NLRP3 炎症小体的活化效应对心血管疾病发生、发展过程具有重要影响。抑制 NLRP3 炎症小体相关信号通路的蛋白表达，降低 Caspase-1、IL-1β 和 IL-18 等细胞因子水平，可减轻心血管疾病中的炎症，有效发挥心肌保护作用。目前，大多数治疗心血管的药物倾向于靶向干预 NLRP3 炎症小体以及下游基因的表达，但是临床研究尚少，且 NLRP3 炎症小体在心血管疾病中的作用机制尚未完全阐明。

参考文献

[1] Ridker PM，Everett BM，Thuren T，et al. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease [J]. N Engl J Med，2017，377（12）：1119-1131.

[2] Tardif JC，Kouz S，Waters DD，et al. Efficacy and safety of low-dose colchicine after myocardial infarction [J]. N Engl J Med，2019，381（26）：2497-2505.

[3] Takahashi M. Role of NLRP3 inflammasome in cardiac inflammation and remodeling after myocardial infarction [J]. Biol Pharm Bull，2019，42（4）：518-523.

[4] Xu LJ，Chen RC，Ma XY，et al. Scutellarin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by suppressing NLRP3 inflammasome activation [J]. Phytomedicine，2020，68：153169.

[5] Yu ZW，Zhang J，Li X，et al. A new research hot spot：the role of NLRP3 inflammasome activation，a key step in pyroptosis，in diabetes and diabetic complications [J]. Life Sci，2020，240：117138.

[6] Yang X，Lin G，Han Z，et al. Structural biology of NOD-like receptors [J]. Adv Exp Med Biol，2019，1172：119-141.

[7] Song H，Zhao C，Yu Z，et al. UAF1 deubiquitinase complexes facilitate NLRP3 inflammasome activation by promoting NLRP3 expression [J]. Nat Commun，2020，11（1）：6042.

[8] Shao BZ，Xu ZQ，Han BZ，et al. NLRP3 inflammasome and its inhibitors：a review [J]. Front Pharmacol，2015，6：262.

[9] Karmakar M，Minns M，Greenberg EN，et al. N-GSDMD trafficking to neutrophil organelles facilitates IL-1beta release independently of plasma membrane pores and pyroptosis [J]. Nat Commun，2020，11（1）：2212.

[10] Guarda G，Zenger M，Yazdi AS，et al. Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells [J]. J Immunol，2011，186（4）：2529-2534.

[11] Yu YR，O'Koren EG，Hotten DF，et al. A protocol for the comprehensive flow cytometric analysis of immune cells in normal and inflamed murine non-lymphoid tissues [J]. PLoS One，2016，11（3）：e150606.

[12] Wu X，Zhang H，Qi W，et al. Nicotine promotes atherosclerosis via ROS-NLRP3-mediated endothelial cell pyroptosis [J]. Cell Death Dis，2018，9（2）：171.

[13] Du X，Jiang S，Zeng X，et al. Air pollution is associated with the development of atherosclerosis via the cooperation of CD36 and NLRP3 inflammasome in ApoE（-/-）mice [J]. Toxicol Lett，2018，290：123-132.

[14] Jiang C，Jiang L，Li Q，et al. Acrolein induces NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis and suppresses migration via ROS-dependent autophagy in vascular endothelial cells [J]. Toxicology，2018，410：26-40.

[15] Chen H，Lu Y，Cao Z，et al. Cadmium induces NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis in vascular endothelial cells [J]. Toxicol Lett，2016，246：7-16.

[16] Zhaolin Z，Jiaojiao C，Peng W，et al. OxLDL induces vascular endothelial cell pyroptosis through miR-125a-5p/TET2 pathway [J]. J Cell Physiol，2019，234（5）：7475-7491.

[17] Audia JP，Yang XM，Crockett ES，et al. Caspase-1 inhibition by VX-765 administered at reperfusion in P2Y12 receptor antagonist-treated rats provides long-term reduction in myocardial infarct size and preservation of ventricular function [J]. Basic Res Cardiol，2018，113（5）：32.

[18] Takahashi M. Cell-specific roles of NLRP3 Inflammasome in myocardial infarction [J]. J Cardiovasc Pharmacol，2019，74（3）：188-193.

[19] Sandanger O，Ranheim T，Vinge LE，et al. The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and

mediates myocardial ischaemia-reperfusion injury [J]. Cardiovasc Res，2013，99（1）：164-174.
[20] Lombardi R，Chen SN，Ruggiero A，et al. Cardiac fibro-adipocyte progenitors express desmosome proteins and preferentially differentiate to adipocytes upon deletion of the desmoplakin gene [J]. Circ Res，2016，119（1）：41-54.
[21] Vasquez C，Benamer N，Morley GE. The cardiac fibroblast：functional and electrophysiological considerations in healthy and diseased hearts [J]. J Cardiovasc Pharmacol，2011，57（4）：380-388.
[22] Gao C，Wang R，Li B，et al. TXNIP/Redd1 signalling and excessive autophagy：a novel mechanism of myocardial ischaemia/reperfusion injury in mice [J]. Cardiovasc Res，2020，116（3）：645-657.
[23] Liu Y，Lian K，Zhang L，et al. TXNIP mediates NLRP3 inflammasome activation in cardiac microvascular endothelial cells as a novel mechanism in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Basic Res Cardiol，2014，109（5）：415.
[24] Loubele ST，Spek CA，Leenders P，et al. Activated protein C protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via inhibition of apoptosis and inflammation [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol，2009，29（7）：1087-1092.
[25] Nazir S，Gadi I，Al-Dabet MM，et al. Cytoprotective activated protein C averts Nlrp3 inflammasome-induced ischemia-reperfusion injury via mTORC1 inhibition [J]. Blood，2017，130（24）：2664-2677.
[26] Butts B，Butler J，Dunbar SB，et al. Effects of exercise on ASC methylation and IL-1 cytokines in heart failure [J]. Med Sci Sports Exerc，2018，50（9）：1757-1766.
[27] Sossalla S，Fluschnik N，Schotola H，et al. Inhibition of elevated Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ improves contractility in human failing myocardium [J]. Circ Res，2010，107（9）：1150-1161.
[28] Willeford A，Suetomi T，Nickle A，et al. CaMK Ⅱ delta-mediated inflammatory gene expression and inflammasome activation in cardiomyocytes initiate inflammation and induce fibrosis [J]. JCI Insight，2018，3（12）：81-87.
[29] Suetomi T，Willeford A，Brand CS，et al. Inflammation and NLRP3 inflammasome activation initiated in response to pressure overload by Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ delta signaling in cardiomyocytes are essential for adverse cardiac Remodeling [J]. Circulation，2018，138（22）：2530-2544.
[30] Sano S，Oshima K，Wang Y，et al. Tet2-mediated clonal hematopoiesis accelerates heart failure through a mechanism involving the IL-1beta/NLRP3 inflammasome [J]. J Am Coll Cardiol，2018，71（8）：875-886.
[31] Kang LL，Zhang DM，Ma CH，et al. Cinnamaldehyde and allopurinol reduce fructose-induced cardiac inflammation and fibrosis by attenuating CD36-mediated TLR4/6-IRAK4/1 signaling to suppress NLRP3 inflammasome activation [J]. Sci Rep，2016，6：27460.
[32] Zhang X，Fu Y，Li H，et al. H3 relaxin inhibits the collagen synthesis via ROS-and P2X7R-mediated NLRP3 inflammasome activation in cardiac fibroblasts under high glucose [J]. J Cell Mol Med，2018，22（3）：1816-1825.
[33] Yang F，Qin Y，Lv J，et al. Silencing long non-coding RNA Kcnq1ot1 alleviates pyroptosis and fibrosis in diabetic cardiomyopathy [J]. Cell Death Dis，2018，9（10）：1000.
[34] Li X，Du N，Zhang Q，et al. MicroRNA-30d regulates cardiomyocyte pyroptosis by directly targeting foxo3a in diabetic cardiomyopathy [J]. Cell Death Dis，2014，5：e1479.
[35] Wang Y，Gao B，Xiong S. Involvement of NLRP3 inflammasome in CVB3-induced viral myocarditis [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol，2014，307（10）：H1438-H1447.
[36] Fujisue K，Sugamura K，Kurokawa H，et al. Colchicine improves survival，left ventricular remodeling，and chronic cardiac function after acute myocardial infarction [J]. Circ J，2017，81（8）：1174-1182.
[37] Yang F，Qin Y，Wang Y，et al. Metformininhibits the NLRP3 inflammasome via AMPK/mTOR-dependent effects in diabetic cardiomyopathy [J]. Int J Biol Sci，2019，15（5）：1010-1019.
[38] Xue M，Li T，Wang Y，et al. Empagliflozin prevents cardiomyopathy via sGC-cGMP-PKG pathway in type 2 diabetes mice [J]. Clin Sci（Lond），2019，133（15）：1705-1720.
[39] Wang Y，Wu Y，Chen J，et al. Pirfenidone attenuates cardiac fibrosis in a mouse model of TAC-induced left ventricular remodeling by suppressing NLRP3 inflammasome formation [J]. Cardiology，2013，126（1）：1-11.
[40] Han Y，Qiu H，Pei X，et al. Low-dose sinapic acid abates the pyroptosis of macrophages by downregulation of lncRNA-MALAT1 in rats with diabetic atherosclerosis [J]. J Cardiovasc Pharmacol，2018，71（2）：104-112.
[41] Zhang QG，Wang SR，Chen XM，et al. Dunye guanxinning improves acute myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting neutrophil infiltration and caspase-1 activity [J]. Mediators Inflamm，2018，2018：4608017.
[42] Wang Y，Yan X，Mi S，et al. Naoxintong attenuates Ischaemia/reperfusion Injury through inhibiting NLRP3 inflammasome activation [J]. J Cell Mol Med，2017，21（1）：4-12.
[43] Ye B，Chen X，Dai S，et al. Emodin alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting gasdermin D-mediated pyroptosis in cardiomyocytes [J]. Drug Des Devel Ther，2019，13：975-990.
[44] Wang Y，Li H，Li Y，et al. Coriolus versicolor alleviates diabetic cardiomyopathy by inhibiting cardiac fibrosis and NLRP3 inflammasome activation [J]. Phytother Res，2019，33（10）：2737-2748.

（收稿日期：2021-09-17；修回日期：2021-11-29）

药物分析与检验

不同产地延龄草根茎药材 HPLC 指纹图谱和 3 种甾体皂苷成分的含量测定及多元统计分析

左月明，陈林林，张忠立*（江西中医药大学，南昌 330004）

摘要：目的 建立不同产地延龄草根茎药材的 HPLC 指纹图谱及含量测定方法，并对共有峰进行多元统计分析，确定延龄草根茎药材的最佳产地和采收期。**方法** 采用 HPLC 法，Diamonsil（2）C_{18} 型色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），以乙腈（A）-水（B）进行梯度洗脱，流速 1.0 mL·min^{-1}，柱温 30 ℃，进样量 10 μL，检测波长 203 nm。对不同产地的 21 批延龄草根茎药材进行指纹图谱相似度评价分析、主成分含量测定、聚类分析（CA）、主成分分析（PCA）、正交偏最小二乘法-判别分析（OPLS-DA），得到变量重要性投影（VIP）值＞ 1 的化合物信息。**结果** 21 批延龄草根茎药材的 HPLC 指纹图谱相似度在 0.824 ～ 0.972，其标定了 10 个共有峰，对照品指认了 3 个主要色谱峰，分别是 8 号峰重楼皂苷Ⅶ（Y4T）、9 号峰偏诺皂苷元-3-*O*-*α*-*L*-吡喃鼠李糖基-（1 → 4）-[*O*-*α*-*L*-吡喃鼠李糖基-（1 → 2）]-*O*-*β*-*D*-吡喃葡萄糖苷（Y3T）和 10 号峰重楼皂苷Ⅵ（Y2T），CA 和 PCA 分析 21 批不同产地延龄草根茎药材可大致分为四类，OPLS-DA 分析结果显示不同产地延龄草具有一定差异性，VIP 值＞ 1 的色谱峰 4、3、9、8、2 和 10 是影响延龄草药材差异的标志性成分，21 批药材含量测定结果范围：Y2T 为 10.71 ～ 27.65 mg·g^{-1}、Y3T 为 9.27 ～ 24.80 mg·g^{-1}、Y4T 为 2.84 ～ 8.95 mg·g^{-1}。确定最佳产地为吉林延龄草 4 年生或 5 年生。**结论** 所建立的延龄草根茎药材 HPLC 指纹图谱分析方法简单，重现性良好，可用于鉴别不同来源的延龄草，该含量测定方法的精密度较高、稳定性较好，可为延龄草最佳产地选择和质量评价提供依据。

关键词：延龄草；HPLC 指纹图谱；聚类分析；主成分分析；正交偏最小二乘法-判别分析；含量测定；最佳采收期

中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1397-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.029

Multivariate analysis of HPLC fingerprints and content determination of 3 steroidal saponins in *Trillium kamtschaticum* rhizomes of different origins

ZUO Yue-ming, CHEN Lin-lin, ZHANG Zhong-li* (*Jiangxi University of Chinese Medicine*, *Nanchang* 330004)

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprint and determine the content of *Trillium kamtschaticum* rhizomes of 3 origins, and to conduct multivariate analysis of the common peaks to determine the best origin and harvest period of *Trillium kamtschaticum* rhizomes. **Methods** HPLC method was used with a Diamonsil (2) C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column. Acetonitrile (A)-water (B) solution was used as mobile phase for gradient elution, the flow rate was 1.0 mL·min^{-1}, the column temperature was 30 ℃, the injection volume was 10 μL, and the detection wavelength was 203 nm. The fingerprint similarity was evaluated, content of principal components were determined,

基金项目：江西省自然科学基金重点项目（No. 20212ACB206008）；国家自然科学基金项目（No. 81760696）。

作者简介：左月明，女，教授，主要从事天然药物资源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，主要从事天然药物的药效物质基础研究，email：zzl51518@163.com

and cluster analysis, principal component analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis were performed on 21 batches of *Trillium* rhizome samples from different origins. The information of compounds with variable importance projection (VIP) value ＞ 1 was obtained. **Results** The similarity of HPLC fingerprints of 21 batches of *Trillium kamtschaticum* rhizomes was 0.824 ～ 0.972, 10 common peaks were confirmed, and the structures of 3 main chromatographic peaks were identified by the reference substance. Respectively, peak 8 was polyphyllin Ⅶ(Y4T), peak 9 was pennogenin-3-*O*-*α*-*L*-rhamnopyranosyl-(1 → 4)-[*O*-*α*-*L*-rhamnopyranosyl-(1 → 2)]-*O*-*β*-*D*-glucopyranoside (Y3T), and peak 10 was polyphyllin Ⅵ (Y2T). Cluster analysis and principal component analysis showed that the 21 batches of *Trillium kamtschaticum* rhizomes from different origins were roughly divided into 4 categories. In addition, the chromatographic peaks 4, 3, 9, 8, 2 and 10 with VIP value ＞ 1 were the landmark components for the difference in the compositions of *Trillium kamtschaticum* rhizomes. The content of 3 main chromatographic peaks ranged Y2T 10.71 ～ 27.65 mg • g^{-1}; Y3T 9.27 ～ 24.80 mg • g^{-1}; and Y4T 2.84 ～ 8.95 mg • g^{-1}. The optimal harvest period of *Trillium kamtschaticum* rhizomes was determined to be 4 or 5 years. **Conclusion** The established HPLC fingerprint analysis method for *Trillium kamtschaticum* rhizomes medicinal material is simple and reproducible, which can be used to identify *Trillium kamtschaticum* rhizomes of different origins. Providing the basis for the selection of best origin and quality evaluation.

Key words: *Trillium kamtschaticum* rhizomes; HPLC fingerprint; cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares discriminant analysis; content determination; optimal harvest period

百合科延龄草属（*Trillium* L.）植物，我国有 3 种，分别为延龄草（*Trillium tschonoskii* Maxim.）、西藏延龄草（*Trillium govanianum* wall. ex Royle）和吉林延龄草（*Trillium kamtschaticum* Pall. ex Puersh）[1]。延龄草药材又名头顶一颗珠、芋儿七和狮儿七等，药用部位为根及根茎，其味甘、性平、有小毒，有延年益寿的功效，主治头晕、跌打损伤、高血压病和脑震荡后遗症等疾病，为土家族常用药材[2-3]。目前已从延龄草属植物中分离得到 100 多个化合物，分别为甾体皂苷类、倍半萜苷类、黄酮苷类、苯丙素苷类等成分[4]。重楼皂苷Ⅵ、重楼皂苷Ⅶ等甾体皂苷成分为延龄草药材主要的药效物质，也是中药重楼的主要药效成分，具有抗炎、活血、抗心脑缺血和抗阿尔茨海默病等药理作用[5-6]。通过市场调查发现，目前国内几大药材市场流通的延龄草药材大多来自湖北、吉林、陕西等地产的延龄草和吉林延龄草，两者植物形态可明显区分，但药用部位不易辨认。目前国内文献报道大多针对延龄草的质量控制研究，而对市场上供应量最大的吉林延龄草缺少完善的质量控制标准[7-10]。因此，本文拟采用 HPLC 法建立 21 批延龄草根茎样品的指纹图谱和主成分含量测定方法，并应用多种化学计量学分析方法对不同产地延龄草根茎样品进行统计分析，为其质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Waters2695 型高效液相色谱仪（美国沃特世公司）；CP225D 十万分之一分析天平（北京赛多利斯有限公司）；KQ-700DE 超声清洗机（昆山超声仪器有限公司）；HH-6 数显恒温水浴锅（常州市凯航仪器有限公司）。

1.2 试药

偏诺皂苷元-3-*O*-*α*-*L*-吡喃鼠李糖基-（1 → 2）-*O*-*β*-*D*-吡喃葡萄糖苷，即重楼皂苷Ⅵ（简称 Y2T）；偏诺皂苷元-3-*O*-*α*-*L*-吡喃鼠李糖基-（1 → 4）-[*O*-*α*-*L*-吡喃鼠李糖基-（1 → 2）]-*O*-*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）-*O*-*α*-*L*-吡喃鼠李糖基-（1 → 4）-[*O*-*α*-*L*-吡喃鼠李糖基-（1 → 2）]-*O*-*β*-*D*-吡喃葡萄糖苷，即重楼皂苷Ⅶ（简称 Y4T），均为白色粉末（纯度均大于 98.0%，实验室自制[5, 11]）。乙腈、甲醇均为色谱纯（德国默克公司）；纯净水（杭州娃哈哈有限公司）。

延龄草根茎药材样品 S1 ～ S10 为延龄草、S11 ～ S21 为吉林延龄草，经江西中医药大学药

表 1　延龄草根茎药材样品信息

Tab 1　Information of *Trillium kamtschaticum* rhizomes sample

序号	产地	序号	产地
S1	陕西省宝鸡市眉县（栽培）	S12	吉林省白山市靖宇县（栽培）
S2	陕西省安康市旬阳县（栽培）	S13	吉林省桦甸市红石镇（栽培）
S3	陕西省安康市镇坪县（栽培）	S14	吉林省蛟河市（栽培）
S4	湖北省恩施土家族苗族自治州 1（栽培）	S15	吉林省延边朝鲜族自治州汪清县（栽培）
S5	湖北省宜昌市木鱼镇 4 年生（栽培）	S16	吉林省长白山保护区池北区 5 年生（野生）
S6	甘肃省大别山地区（野生）	S17	吉林省长白山保护区池北区 4 年生（野生）
S7	湖北省宜昌市木鱼镇 5 年生（栽培）	S18	吉林省延边朝鲜族自治州汪清县（栽培）
S8	湖北省神农架地区 5 年生（野生）	S19	吉林省延边朝鲜族自治州安图县 4 年生（栽培）
S9	湖北省神农架地区 4 年生（野生）	S20	吉林省延边朝鲜族自治州安图县 3 年生（栽培）
S10	湖北省恩施土家族苗族自治州 2（栽培）	S21	吉林省延边朝鲜族自治州安图县 5 年生（栽培）
S11	吉林省白山市江源区湾沟镇（栽培）		

学院中药鉴定教研室左月明教授鉴定为百合科延龄草属植物延龄草 *Trillium tschonoskii* Maxim. 和吉林延龄草 *Trillium kamtschaticum* Pall. ex Puersh 的干燥根茎。药材信息见表 1。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

Diamonsil（2）C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），流速 1.0 mL·min^{-1}，检测波长 203 nm；柱温 30 ℃；流动相乙腈（A）- 水（B），梯度洗脱（0 ～ 22 min，5% ～ 45%A；22 ～ 37 min，45%A；37 ～ 42 min，45% ～ 85%A；42 ～ 50 min，85%A）。

2.2　延龄草 HPLC 指纹图谱研究

2.2.1　供试品溶液的制备　称取延龄草根茎药材粉末（过 3 号筛）约 1.0 g，置于 250 mL 圆底烧瓶中，精密加入 70% 甲醇 50 mL，称重，回流提取 2 h，放冷后称重，用 70% 甲醇补足失重，过滤，蒸干，甲醇复溶，定容于 10 mL 量瓶中，超声混匀，过 0.22 μm 微孔滤膜，取续滤液，即得。

2.2.2　对照品溶液的制备　分别精密称定 Y2T、Y3T 和 Y4T 对照品 25.00 mg，置于 5 mL 量瓶中，加甲醇溶解并定容至刻度，稀释成系列浓度，即得。

2.2.3　精密度试验　称取延龄草根茎药材粉末（编号 S20）约 1.0 g，按照“2.2.1”项下方法制备成供试品溶液，连续进样 6 次。以 9 号峰 Y3T 为参照峰（该峰的相对保留时间变化稳定、分离度良好，且其为延龄草药材的特征性成分），记录各共有峰的相对保留时间与相对峰面积。结果显示，各共有峰相对保留时间 *RSD* 均小于 0.089%，相对峰面积 *RSD* 均小于 3.0%，表明仪器精密度良好。

2.2.4　稳定性试验　称取延龄草根茎药材粉末（编号 S20）约 1.0 g，按照“2.2.1”项下方法制备成供试品溶液，分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样。以 9 号峰为参照峰，记录各共有峰的相对保留时间与相对峰面积。结果显示，各共有峰相对保留时间 *RSD* 均小于 0.24%，相对峰面积 *RSD* 均小于 3.0%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.5　重复性试验　称取延龄草根茎药材粉末（编号 S20）约 1.0 g，按照“2.2.1”项下方法平行制备成 6 份供试品溶液，进样测定。以 9 号峰为参照峰，记录各共有峰的相对保留时间与相对峰面积。结果显示，各共有峰相对保留时间 *RSD* 均小于 0.15%，相对峰面积 *RSD* 均小于 3.0%，表明方法重复性良好。

2.2.6　指纹图谱的建立及相似度评价　将 21 批供试品溶液，进样测定，记录色谱图。将所得 21 批延龄草根茎药材色谱图数据依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）》软件，以样品 S20 图谱为参照指纹图谱，采用平均数法，时间窗宽度为 0.5 生成对照指纹图谱，采用多点校正后进行全谱峰自动匹配 [12]，见图 1。各共有峰相对保留时间的 *RSD* 均小于 1.0%。对 21 批延龄草根茎药材样品 HPLC 色谱图与对照指纹图谱进行相似度评价，结果表明 S1 ～ S21 号样品与对照指纹图谱的相似度介于 0.824 ～ 0.972（见表 2），除样品 S12 的相似度（0.824）和 S21 的相似度（0.890）低于 0.900 之外，其余样品化学成分组成基本相同，差异较小，且栽培品种与野生品种的相似度也达到 0.900 以上，表明本文中不同产地延龄草药材的质量较稳定，野生与栽培品种指纹图谱无明显差异。

2.2.7　指纹图谱共有峰的指认与归属　取 21 批延龄草根茎药材样品色谱图，共确定 10 个共有峰，通过保留时间和紫外图谱对照分析，指认了 3 个共

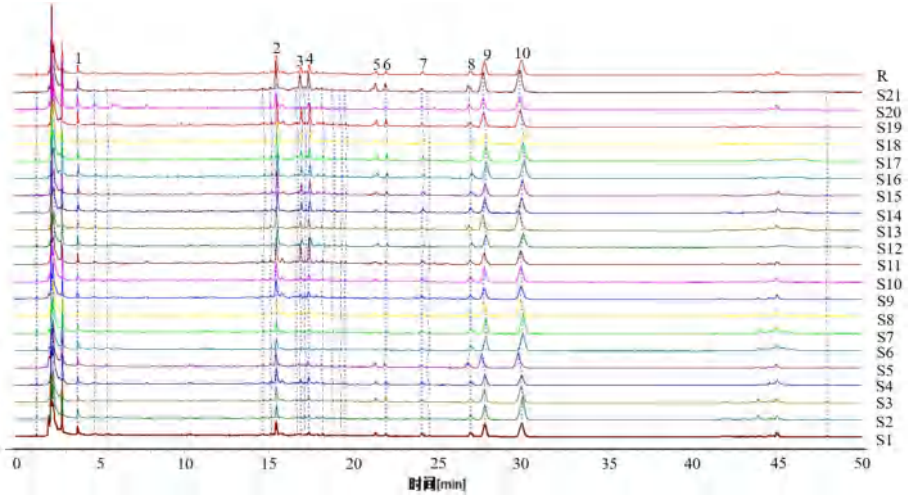


图 1 21 批延龄草根茎药材样品 HPLC 指纹图谱

Fig 1 HPLC fingerprints of 21 batches of *Trillium kamtschaticum* rhizome sample

表 2 21 批延龄草根茎药材样品 HPLC 指纹图谱相对相似度评价

Tab 2 Relative similarity evaluation of HPLC fingerprints of 21 batches of *Trillium kamtschaticum* rhizomes sample

序号	相似度	序号	相似度	序号	相似度
S1	0.950	S8	0.972	S15	0.952
S2	0.952	S9	0.953	S16	0.953
S3	0.968	S10	0.971	S17	0.951
S4	0.931	S11	0.943	S18	0.931
S5	0.932	S12	0.824	S19	0.955
S6	0.945	S13	0.924	S20	0.915
S7	0.924	S14	0.959	S21	0.890

有峰，8 号峰为重楼皂苷Ⅶ（Y4T）、9 号峰为偏诺皂苷元 -3-*O*-*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 4）-[*O*-*α*-*L*- 吡喃鼠李糖基 -（1 → 2）]-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷（Y3T）、10 号峰为重楼皂苷Ⅵ（Y2T），混合对照品和延龄草根茎药材样品的 HPLC 色谱图见图 2。

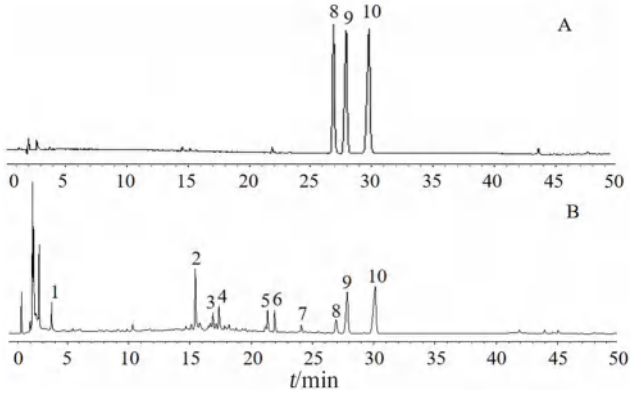


图 2 混合对照品（A）和延龄草根茎药材样品（B）的 HPLC 图

Fig 2 HPLC chromatograms of mixed reference substances（A）and *Trillium kamtschaticum* rhizomes sample（B）

8. Y4T；9. Y3T；10. Y2T

2.3 延龄草根茎药材中 3 种主要成分的含量测定 课题组前期在对延龄草根茎药材成分的研究中，发现药材中甾体皂苷 Y4T、Y3T 和 Y2T 含量较高，其中 Y3T 是延龄草中的专属性成分，且在 203 nm 处有紫外吸收，可以直接用紫外检测器进行含量测定，方法简便 [8]，并对分离得到的 3 种对照品进行结构鉴定和解析 [5, 11]，确定延龄草 HPLC 指纹图谱中 8、9、10 号色谱峰分别为 Y4T、Y3T 和 Y2T，均为含量较高的色谱峰，能较好地反映药材的质量。因此，本研究选择这 3 个指标成分进行含量测定。

2.3.1 专属性试验 从图 2 可知，延龄草样品中甾体皂苷 Y4T（8 号峰）、Y3T（9 号峰）、Y2T（10 号峰）各峰的分离度良好，其保留时间分别为 27.02、27.90 和 30.23 min。

2.3.2 线性关系考察 分别精密量取对照品溶液适量，稀释得最终质量浓度分别为 0.025、0.050、0.100、0.200、0.400、0.800、1.600、3.200、5.000 mg • mL^{-1} 的 Y2T、Y3T、Y4T 系列对照品溶液。经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后，分别精密吸取各系列对照品溶液 10 μL，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，$Y_{Y2T} = 3.675\times10^6X + 2.644\times10^4$，$r^2 = 0.9999$；$Y_{Y3T} = 3.070\times10^6X + 5.073\times10^4$，$r^2 = 0.9999$；$Y_{Y4T} = 2.564\times10^6X + 3.368\times10^4$，$r^2 = 0.9999$（$n = 9$）。结果表明 Y2T、Y3T、Y4T 均在质量浓度 0.025 ～ 5.000 mg • mL^{-1} 内的质量浓度（X）与峰面积值（Y）呈良好的线性关系。

2.3.3 精密度试验 精密称定延龄草根茎药材粉末（编号 S20）约 1.0 g，按“2.2.1”项下方法制备成供试品溶液，连续进样 6 次，记录色谱峰面积。计算 Y2T、Y3T、Y4T 峰面积的 *RSD* 分别为 1.6%、1.4%、1.7%，表明仪器精密度良好。

2.3.4　稳定性试验　精密称定延龄草根茎药材粉末（编号 S20）约 1.0 g，按“2.2.1”项下方法制备成供试品溶液，分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，记录色谱峰面积。计算 Y2T、Y3T、Y4T 各成分峰面积的 *RSD* 分别为 1.8%、1.7%、1.8%，表明 24 h 内供试品溶液的稳定性良好。

2.3.5　重复性试验　精密称定延龄草根茎药材粉末（编号 S20）约 1.0 g，按“2.2.1”项下方法制备成供试品溶液，连续进样 6 次，记录色谱峰面积，代入标准曲线进行含量计算，计算 Y2T、Y3T、Y4T 含量的 *RSD* 分别为 1.0%、1.6%、1.2%，表明该方法重复性良好。

2.3.6　加样回收试验　精密称定延龄草根茎药材粉末（编号 S20）约 1.0 g，按照对照品量 - 样品中含量约 1∶1 的比例，加入 Y2T、Y3T、Y4T 对照品，平行制备 6 份样品溶液，进样测定，记录峰面积，代入标准曲线进行含量计算，并计算回收率。结果表明 Y2T、Y3T、Y4T 的平均加样回收率分别为 103.0%、98.8%、99.2%，*RSD* 分别为 1.3%、1.1%、1.9%，表明该方法准确度良好。

2.3.7　含量测定　取 21 批延龄草根茎药材指纹图谱测定用样品溶液，进样测定，采用外标一点法计算样品中 3 个成分的含量，结果见表 3。由表 3 可知，不同产区的延龄草根茎中延龄草皂苷含量不同，Y2T 含量范围在 10.71 ～ 27.65 mg•g^{-1}，Y3T 在 9.27 ～ 24.80 mg•g^{-1}，Y4T 在 2.84 ～ 8.95 mg•g^{-1}，总皂苷含量在 23.96 ～ 61.40 mg•g^{-1}，其中 S12 号样品在 3 个指标成分含量和总皂苷含量均为最高，而 S10 号样品在 Y3T、Y4T 和总皂苷含量均为最低。从 3 个指标成分在延龄草根茎药材中的含量分布来看，21 批样品中 Y2T 含量略高于 Y3T 含量，而 Y4T 含量相对较低，且 3 个指标成分含量的相对比例存在一定的差异。所以，选择延龄草中 3 个指标成分总含量能较好地控制延龄草根茎药材的质量。

由表 3 结果还可以看出，分别从 4 个主产区湖北省宜昌市木鱼镇（S5、S7）和湖北省神农架产区（S8、S9）的延龄草、吉林省长白山保护区池北区（S16、S17）和吉林省延边朝鲜族自治州安图县（S19、S20、S21）的吉林延龄草共 9 批样品中 3 种皂苷总含量分析，5 年生药材 3 种皂苷总含量明显高于 4 年生药材，而 3 年生药材指标成分的累积量远达不到药用需求，所以综合考虑栽培成本等因素 [13] 可确定延龄草药材最佳采收年限为 4 年生或 5 年生。

表 3　3 种主要成分含量测定 (n = 3，mg•g^{-1})

Tab 3　Content determination of 3 main components (n = 3，mg•g^{-1})

序号	Y2T	Y3T	Y4T	总含量
S1	14.96	13.58	4.60	33.14
S2	26.70	15.37	5.19	47.26
S3	18.51	13.73	4.48	36.72
S4	10.71	10.70	4.15	25.56
S5	16.14	13.86	5.09	35.09
S6	21.07	16.02	6.00	43.09
S7	22.01	15.90	5.15	43.06
S8	18.73	14.62	4.72	38.07
S9	15.00	12.31	4.06	31.37
S10	11.85	9.27	2.84	23.96
S11	16.18	12.88	4.57	33.63
S12	27.65	24.80	8.95	61.40
S13	22.11	15.84	4.88	42.83
S14	17.70	16.23	5.81	39.74
S15	18.43	13.81	4.85	37.09
S16	19.74	17.54	6.18	43.46
S17	19.67	14.39	4.28	38.34
S18	19.02	15.74	4.75	39.51
S19	20.46	16.49	5.42	42.37
S20	12.10	10.27	4.54	26.91
S21	27.62	22.93	7.75	58.30

2.4　统计分析

2.4.1　聚类分析（CA）[14]　以 21 批延龄草根茎药材样品共有峰的峰面积为变量，使用 SPSS 21.0 软件进行聚类分析。利用 Z- 得分进行数据标准化处理，采用 ward 聚类方法和欧氏距离进行聚类分析，见图 3。当欧氏距离为 20 时，21 个产地聚为两类：S12、S19 和 S21 聚成一类，其他聚为一大类；当欧氏距离为 15 时，21 个产地聚为三类：S12 为一类，S19 和 S21 聚成一类，其他聚为一大类；当欧氏距离为 10 时，21 个产地聚为四类：S12 为一类，S19 和 S21 聚成一类，S4、S20、S11 和 S18 聚为一类，其他的聚为一类，说明 S12、S21 和 S19 号药材与其他组药材共有峰峰面积含量差异相对较大，其余不同产地的延龄草根茎药材样品间差异相对较小。

2.4.2　主成分分析（PCA）　PCA 是多元统计分析中使用最广泛的数据降维算法，它能够在降维模式下利用代表数据特征的不相关变量来描述样本，在无监督模式下根据数据主要成分特征进行分析 [15-16]。为更好地客观反映延龄草根茎药材之间的差异性，将 21 批延龄草根茎药材样品共有峰的峰面积结果导入 SIMCA 14.1 软件，进行 PCA。采用 UV 进行数据处理后，自动拟合 PCA 模型，得到 21 批延龄草药材的 PCA 得分图，见图 4。模

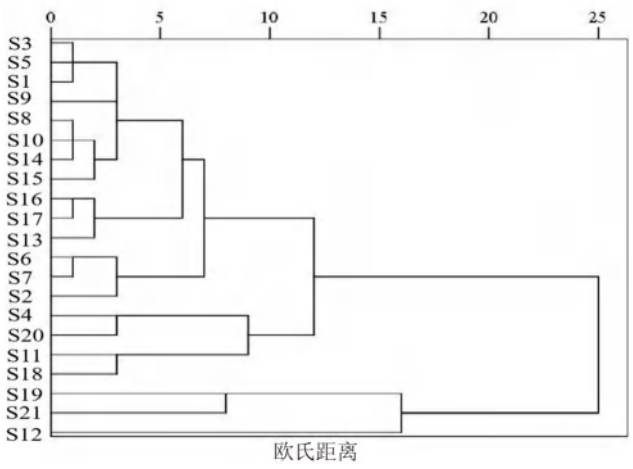


图 3 21 批延龄草根茎药材样品聚类树状图

Fig 3 Dendrogram of 21 batches of *Trillium kamtschaticum* rhizomes sample

型验证结果 R^2X（累计解释能力参数）= 0.965，Q^2（预计能力参数）= 0.635，$P < 0.05$，说明模型拟合能力较好，预测能力良好。通过 PCA 分析可知，21 批样品明显可归为四类：S12 和 S21 归为一类，S19 归为一类，S18 和 S11 归为一类，其他的归一类，由主成分分析结果可见其与聚类分析结果具有一定相似性。

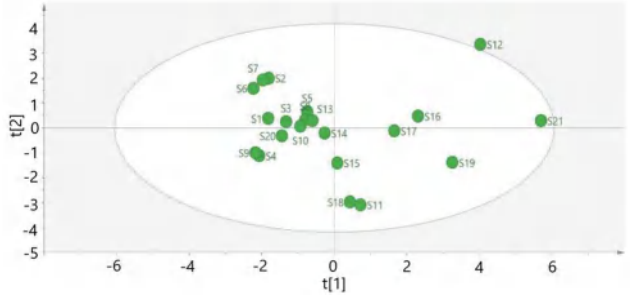


图 4 21 批延龄草根茎药材样品的 PCA 得分图

Fig 4 PCA score of 21 batches of *Trillium kamtschaticum* rhizomes sample

2.4.3 正交偏最小二乘法判别分析（OPLS-DA）[14, 17] 为了更好地筛选21批延龄草根茎样品组间差异性代表成分峰，本研究在 PCA 分析的基础上进行有监督的 OPLS-DA 分析，选择 OPLS-DA 模型分析是因其能够在 PCA 基础上增强组间分离情况，因为 OPLS-DA 模型在为样品组间的差异提供最相关变量方面具有更大的可靠性。以 21 批延龄草根茎药材指纹图谱的 10 个共有峰峰面积为变量，采用 SIMCA 14.1 软件进行 OPLS-DA 分析，结果见图 5。模型验证结果 R^2X = 0.706，R^2Y = 0.825，Q^2 = 0.722，$P < 0.05$，说明模型拟合能力较好，预测能力良好。结果显示

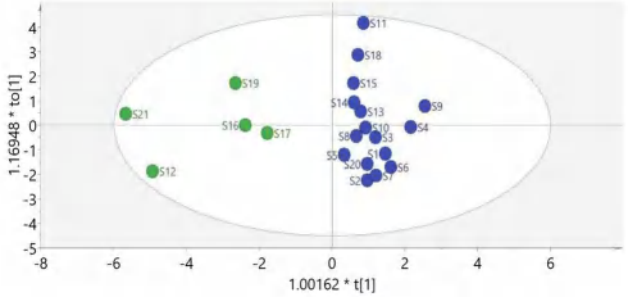


图 5 21 批延龄草根茎药材样品的 OPLS-DA 得分图

Fig 5 OPLS-DA score of 21 batches of *Trillium kamtschaticum* rhizomes sample

21 批样品主要被分为两类，S12、S16、S17、S19 和 S21 产于吉林的吉林延龄草被 t[1] 轴分为同一类，其他的被分为一类，这与 PCA 分析结果较为一致，通过 VIP 筛选出导致延龄草根茎药材样品间差异的标志性成分，结果见图 6，以 VIP > 1 为筛选标准，标记出 6 个差异较大的成分，差异大小依次为 4、3、9、8、2、10 号色谱峰。经对照品比对指认出其中的 8 号峰为 Y4T、9 号峰为 Y3T、10 号峰为 Y2T，其结果与含量测定所选用的 3 个主要指标成分互为验证，即延龄草中 3 个指标成分总含量能较好地反映延龄草根茎药材的质量。

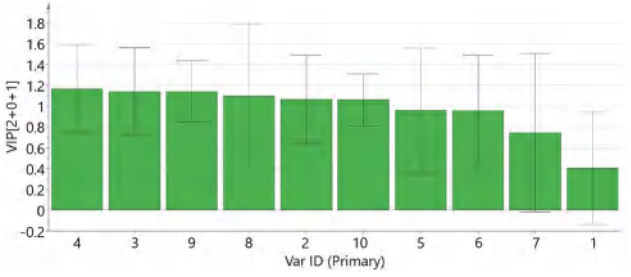


图 6 延龄草根茎药材 HPLC 指纹图谱中 10 个共有峰的 VIP 得分图

Fig 6 VIP score of 10 common peaks in HPLC fingerprint of *Trillium kamtschaticum* rhizomes sample

3 讨论

因延龄草药材须根成分含量和根茎有明显差异，有学者建议分开使用 [7]，本研究组前期研究也证实两个药用部位的质量差异性，故本文均统一选用延龄草根茎来进行分析。在样品提取过程中，试验分别比较了不同提取方法（加热回流和超声）、不同浓度提取溶剂（30% 甲醇、70% 甲醇、100% 甲醇），考察了料液比（1∶25 和 1∶50）、药材用量（1.0 g 和 2.0 g）对提取结果的影响。结果表明，选用 1.0 g 药材用量、1∶50 料液比、70% 甲醇回流提取 120 min 时，可得到指纹图谱中色谱峰最多且峰面积最大的样品信息。同时，

色谱条件的选择，分别对不同波长和流动相比例进行考察，发现延龄草皂苷类成分紫外吸收较弱，但在 203 nm 附近有明显的紫外吸收，故选用 203 nm 为检测波长。比较甲醇 - 水和乙腈 - 水系统洗脱，发现乙腈 - 水系统分离效果较好，洗脱时间为 50 min。

目前对延龄草药材的质量评价方法主要有含量测定和指纹图谱方法，而综合分析的质量控制体系还不完善，尤其对于市场供应量最大的吉林延龄草。本文建立了延龄草根茎样品的指纹图谱结合主成分含量测定方法，综合分析评价药材质量。从药材 HPLC 指纹图谱分析可知，9 号峰 Y3T 是延龄草根茎药材的主要化学成分和特征性成分，该峰相对保留时间稳定，分离度良好，因此选择 9 号峰作为参照峰。标定了 10 个共有峰，用对照品指认了其中 3 个主要色谱峰，并采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》对 21 批延龄草根茎药材的 HPLC 指纹图谱进行统计分析，相似度为 0.824 ～ 0.972。结果表明，S8 号样品与对照图谱的相似度最高，而 S12、S21 与其他样品存在一定差异。对延龄草根茎药材指纹图谱共有峰峰面积进行 CA 和 PCA 分析，除产自吉林的两批（S12、S21）延龄草根茎药材与其他产区样品略有差异外，大部分产区的延龄草根茎药材的质量较稳定。此外，OPLS-DA 分析结果显示 4、3、9、8、2 和 10 号色谱峰是影响延龄草根茎药材差异的主要标志性成分，目前本试验未获得峰 4、3、2 的化合物信息，有待进一步开展研究，因此对 8、9 和 10 号色谱峰进行含量测定。结果显示 3 种皂苷总含量最高的为 S12 号样品（吉林靖宇），S21 仅次于 S12（这也是 S12 和 S21 相似度较其他产地低的原因），含量最低的为 S10 湖北省恩施苗族自治州的药材。在对 4 个产区 9 个不同年份样品中 3 种皂苷总含量定量分析发现，皂苷含量 5 年生＞ 4 年生＞ 3 年生，所以综合考虑栽培成本等因素 [13] 可确定延龄草药材最佳采收年限为 4 年生或 5 年生。

综上，不同产区及不同采收期延龄草根茎药材中甾体皂苷的含量存在一定差异，以吉林延龄草根茎药材中 3 种皂苷总含量相对较高，也反映了市场上主流药材商品吉林延龄草的品质较好。同时本文建立的延龄草根茎药材 HPLC 指纹图谱和含量测定方法重复性好，专属性强，可用于延龄草药材及相关制剂的质量评价。

参考文献

[1] 中国植物志编辑委员会 . 中国植物志 [M]. 第 15 卷 . 北京：科学出版社，1978：97-98.

[2] 谢宗万 . 全国中草药汇编上册 [M]. 2 版 . 北京：人民卫生出版社，2000：225-226.

[3] 中国科学院武汉植物所 . 湖北植物志 [M]. 第四册 . 武汉：湖北科技出版社，2003：453.

[4] 杨杰 . 中药延龄草的活性成分研究 [D]. 广州：广东药科大学，2018.

[5] 李淑琪，胡凡，文安，等 . 延龄草甾体皂苷抗大鼠急性心肌缺血有效成分的研究 [J]. 江西中医药大学学报，2021，33（1）：89-93.

[6] 陈林林，李中炼，万登峰，等 . 延龄草甾体皂苷类成分对大鼠局灶性脑缺血 / 再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国老年学杂志，2020，40（23）：5013-5017.

[7] 杨印军，孙欣光，杨杰，等 . 延龄草与吉林延龄草根茎及须根中 3 种皂苷成分的含量测定 [J]. 中国中药杂志，2017，42（6）：1146-1151.

[8] 王彦彦，张忠立，左月明，等 . 不同产地及不同药用部位延龄草中 3 种皂苷的含量测定 [J]. 安徽农业科学，2013，41（9）：3850-3852.

[9] 涂星，斯琴，陈家艺，等 . 鄂产头顶一颗珠的 HPLC 指纹图谱及主成分分析 [J]. 中华中医药杂志，2019，34（12）：5924-5929.

[10] 陈洁，陈文茜，郭文鼎，等 . HPLC 指纹图谱结合主成分分析对不同产地头顶一颗珠质量的评价 [J]. 中国中医药信息杂志，2017，24（11）：58-62.

[11] 张忠立，左月明，熊师华，等 . 延龄草根及根茎的化学成分研究 [J]. 中草药，2011，42（9）：1689-1691.

[12] 刘玉娟，王永洁，郭子右，等 . 复方黄芪乳膏高效液相色谱指纹图谱的建立及 3 种成分的测定 [J]. 中南药学，2021，19（11）：2377-2383.

[13] 吴飞，李承阳，梁泽平，等 . 白花延龄草栽培技术 [J]. 吉林林业科技，2017，46（2）：47-48.

[14] 宋奇，王隆隆，杨忠杰，等 . 双石清热合剂指纹图研究及 5 种成分含量测定 [J]. 中南药学，2022，20（1）：154-158.

[15] 杨悦，刘颖，冯伟红，等 . 中药山楂核 HPLC 指纹图谱和 3 个主成分含量测定研究 [J/OL]. 中国中药杂志，https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20211227.202.

[16] 王素娟，贺凡珍，王乾蕾，等 . 消糖灵片的超高效液相色谱指纹图谱建立、含量测定及化学模式识别 [J]. 中南药学，2021，19（11）：2390-2396.

[17] 肖丹，范东生，刘星，等 . 不同产地铁线蕨药材指纹图谱的建立、分析及差异成分的含量测定 [J]. 中国药房，2021，32（17）：2085-2090.

（收稿日期：2022-02-05；修回日期：2022-04-06）

阿卡波糖口服固体制剂含量测定方法的优化

石笑弋[1]，易必新[1*]，李昌亮[1, 2]，李帅[1, 2]，刘雁鸣[1, 2]，兰文[1, 2]，李健和[3]（1. 湖南省药品检验检测研究院，长沙 410001；2. 国家药品监督管理局药用辅料工程技术研究重点实验室，长沙 410001；3. 中南大学湘雅二医院药学部，长沙 410011）

摘要：目的 建立一种新的高效液相色谱法测定阿卡波糖的含量。**方法** 采用 Welch Ultimate XB-SCX 色谱柱（4.6 mm×250 mm，3 μm），流动相为 0.02 mol•L^{-1}磷酸二氢钾溶液，流速 1.0 mL • min^{-1}，柱温 40 ℃，检测波长 210 nm。**结果** 阿卡波糖在 82.60 ～ 4130 μg • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好（r = 1.000），平均回收率为 99.41%，*RSD* 为 0.32%（n = 6）。**结论** 该方法准确、可靠、重复性好，可作为阿卡波糖口服固体制剂质量控制和评价的新方法。

关键词：阿卡波糖；含量测定；高效液相色谱法；SCX 色谱柱

中图分类号：R917 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1404-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.030

Optimization of content determination of acarbose oral solid preparation

SHI Xiao-yi[1], YI Bi-xin[1*], LI Chang-liang[1, 2], LI Shuai[1, 2], LIU Yan-ming[1, 2], LAN Wen[1, 2], LI Jian-he[3](1. *Hunan Institute for Drug Control and Testing, Changsha* 410001; 2.*NMPA Key Laboratory for Pharmaceutical Excipients Engineering Technology Reasearch*, *Changsha* 410001; 3. *Department of Pharmacy*, *Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha* 410011)

Abstract: Objective To establish a HPLC method to determine the content of acarbose. **Methods** The column of Welch Ultimate XB-SCX (4.6 mm×250 mm, 3 μm) was used. The mobile phase was 0.02 mol • L^{-1} potassium dihydrogen phosphate. The flow rate was 1.0 mL • min^{-1}. The column temperature was 40 ℃ . The detection wavelength was 210 nm. **Results** Acarbose showed a good linearity at 82.60 － 4130 μg • mL^{-1} (r = 1.000). The average recovery was 99.41%, and *RSD* was 0.32% (n = 6). **Conclusion** The method is accurate, reliable and repeatatble, which can be used to evaluate and control the quality of acarbose oral solid preparation.

Key words: acarbose; content determination; HPLC; SCX column

阿卡波糖是德国拜耳公司于 20 世纪 80 年代从一种游离放线菌发酵分离得到的产物，由 4 个单糖构成的寡糖[1-2]，是世界上第一个 α- 葡萄糖糖苷酶抑制剂类的口服降糖药，主要用于 2 型糖尿病的治疗[3-4]，可通过抑制淀粉酶来减少葡萄糖的吸收，更适合于降低以碳水化合物为主食的亚洲糖尿病患者的血糖[5]。阿卡波糖口服固体制剂自 1994 年在中国批准上市以来，不良反应相对较小，市场占有率较高，应用前景较广[6]。

目前，国内现有阿卡波糖及其制剂质量标准收载于《中国药典》2020 年版二部[7]，其他相关质量标准及文献中阿卡波糖含量测定的分析方法多采用 HPLC 法，检测器普遍应用紫外或示差折光检测器，亦有利用电喷雾检测器等新型检测器检测，色谱柱大多使用氨基柱，流动相均采用大量有机试剂[8-13]。现有方法大多存在受环境影响基线波动较大、灵敏度降低、柱效下降快或普及率不高等问题。因此，对阿卡波糖片及胶囊的含量测定方法进行改进十分必要。本文采用 SCX 色谱柱，优化了阿卡波糖口服固体制剂中阿卡波糖含量测定的方法，现报道如下。

1 仪器与试药

赛默飞 Dionex UltiMate 3000 高效液相色谱仪、PDA 紫外检测器；十万分之一 XP205 电子分

基金项目：2021 年国家药品抽验计划（No. 国药监药管 [2021]1 号）。

作者简介：石笑弋，女，主要从事药物分析与质量标准研究，email：40623099@qq.com *通信作者：易必新，男，副主任药师，主要从事药物分析与质量标准研究，email：48348469@qq.com

析天平（Mettler Toledo）。阿卡波糖对照品（批号：100808-201905，含量：99.4%，中国食品药品检定研究院，水分：3.45%）。阿卡波糖原料药（杭州中美华东制药有限公司，批号：1909156AK）。1 个厂家的阿卡波糖胶囊及 6 个厂家的阿卡波糖片共 165 批次样品。磷酸二氢钾、氢氧化钠、盐酸等试剂为分析纯（国药集团化学试剂有限公司）；纯水（Thermo Scientific GenPure 超纯水机制备）。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱 Welch Ultimate XB-SCX 柱（4.6 mm×250 mm，3 μm），流动相 0.02 mol • L^{-1} 磷酸二氢钾溶液，流速 1.0 mL • min^{-1}，柱温 40 ℃，检测波长 210 nm，进样量 10 μL。

2.2　溶液的配制

2.2.1　供试品溶液的配制　取本品 20 片（或 20 粒内容物），精密称定，研细，精密称取适量（约相当于阿卡波糖 50 mg），置 50 mL 量瓶中，加水适量，超声使溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液作为供试品溶液。

2.2.2　对照品溶液的配制　取阿卡波糖对照品适量，加水制成每 1 mL 中约含 1 mg 的溶液作为对照品溶液。

2.2.3　阴性样品溶液的配制　按处方比例及制备工艺，制备缺阿卡波糖的样品，按“2.2.1”项下方法制备阴性样品溶液。

2.2.4　系统适用性溶液的配制　取阿卡波糖原料药约 200 mg，置 10 mL 量瓶中，加少量水使溶解，加 0.1 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液 1 mL，混匀，室温放置 1 h，加 0.1 mol • L^{-1} 盐酸溶液 1 mL，加水稀释至刻度，摇匀，作为系统适用性溶液。

2.3　系统适用性试验

精密量取“2.2”项下阴性样品溶液、系统适用性溶液及供试品溶液各 10 μL，进样测定，结果主峰与相邻杂质峰均有效分离，以阿卡波糖色谱峰计，拖尾因子小于 1.2，理论板数大于 5000。溶剂、辅料对测定均无干扰，见图 1。

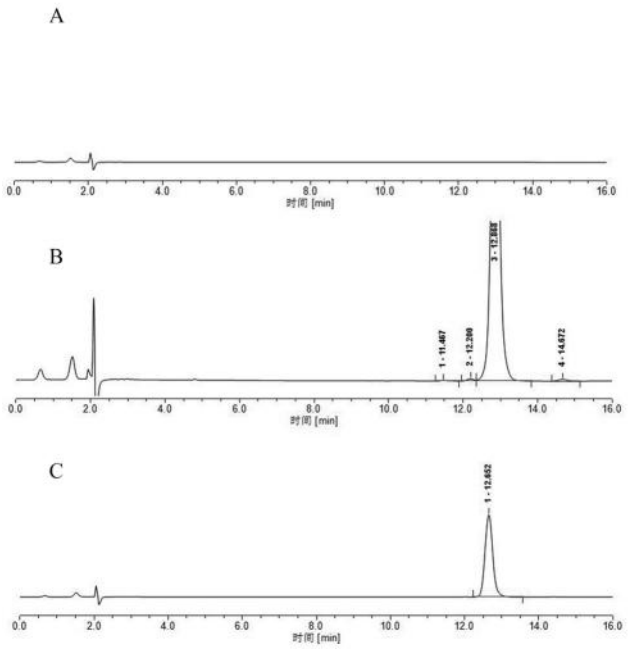


图 1　系统适用性试验 HPLC 图

Fig 1　HPLC chromatogram of system suitability test

A. 阴性样品（negative sample）；B. 系统适用性（system suitability）；C. 供试品（sample）

2.4　线性范围、检测限与定量限

精密称取阿卡波糖对照品 215.19 mg，置 50 mL 量瓶中，加水适量，超声使溶解并稀释至刻度，摇匀，作为线性溶液①，取该线性溶液 6、3、2.5、2、0.5、0.2 mL，分别置 10 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，得到质量浓度为 2.478、1.239、1.032、0.8260、0.2065、0.082 60 mg • mL^{-1} 的线性溶液②～⑦。进样测定，记录色谱图。以质量浓度（X）为横坐标和峰面积（Y）为纵坐标进行线性回归，得阿卡波糖回归方程为 $Y = 2.529\times10^{4}X - 244.2$，相关系数为 1.000，线性范围为 0.082 60 ～ 4.130 mg • mL^{-1}；并根据信噪比 $S/N \approx 3$ 确定检测限（LOD），$S/N \approx 10$ 确定定量限（LOQ），结果检测限为 6.8 μg • mL^{-1}，定量限为 22 μg • mL^{-1}。

2.5　精密度试验

取“2.4”项下质量浓度约为 1.0 mg • mL^{-1} 的对照品溶液，连续进样 6 次，记录保留时间与峰面积。结果阿卡波糖峰面积的 $RSD < 1.5\%$，保留时间的 RSD 均< 1.0%，表明仪器精密度良好。

2.6　重复性试验

取同一批样品（阿卡波糖片，批号：210301，规格：50 mg）6 份，按“2.2.1”项下方法制备并测定，结果含量平均值为 100.11%，RSD 为 0.70%，表明方法重复性良好。

2.7　溶液稳定性试验

取“2.5”项下溶液室温避光放置，分别于 0、2、4、8、12、16、20 及 24 h 进样考察，阿卡波糖的峰面积 RSD 均< 2.0%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8　回收试验

取阴性样品，精密加入阿卡波糖对照品，制成浓度相当于阿卡波糖含量 100% 水平的供试溶液共 6 份，进样分析，记录色谱图，按外标法以峰面积计算阿卡波糖的含量，结果平均回收率为 99.41%，RSD 为 0.32%（$n = 6$）。

2.9 耐用性试验

通过调节流速及柱温，考察阿卡波糖峰的变化情况。结果阿卡波糖峰的理论板数均大于5000，拖尾因子均小于 1.2，与相邻杂质峰均能有效分离。

2.10 样品测定

取 165 批次样品，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进行测定，按外标法以峰面积计算，并将含量测定结果与《中国药典》2020 年版二部收载的采用氨基柱测定的结果进行比较，采用 SPSS 统计软件对两种方法含量测定测结果进行配对样品 t 检验。结果相关系数 $r = 0.542$，$P < 0.001$，认为两配对变量有相关关系；$t = -3.263$，$d_f = 164$，双尾检验概率 $P = 0.001$，表明两种检验方法所测结果具有显著性差异，结果见表 1。

表 1 样品中阿卡波糖的含量结果 ($n = 165$)

Tab 1 Content of acarbose in the sample ($n = 165$)

测定方法	含量均值 /%	标准差 /%	含量均值的标准差 /%
药典（采用 NH_2 色谱柱）	98.81	1.1264	0.0877
本文（采用 SCX 色谱柱）	99.09	1.2160	0.0946

3 讨论

《中国药典》2020 年版二部是采用 HPLC 法测定阿卡波糖的含量。采用氨基色谱柱，以乙腈 - 磷酸盐缓冲液（75∶25）为流动相，流速 2 mL•min^{-1}，柱温 35 ℃，检测波长 210 nm。该方法存在很多缺点，严重影响了方法的重现，并造成应用困难：① 相邻降解杂质Ⅰ峰与主峰的分离效果不佳，只有系统适用性中规定杂质Ⅰ的峰高（Hp）与杂质Ⅰ和阿卡波糖两峰之间的峰谷（Hv）之比 Hp/Hv 不得低于 2.0 的要求；② 氨基柱耐用性较差，键合相容易流失，最多使用 150 次左右，柱效严重降低，色谱峰峰形变差，影响准确定量 [14]；③ 流动相中有机试剂毒性大，流速大，检测成本高。因此，有必要优化阿卡波糖含量测定的分析方法，改善方法的重现性和可应用性，提高药品质量控制水平。目前尚未见采用 SCX 色谱柱 HPLC 法测定阿卡波糖含量的报道。

3.1 流动相的选择

阿卡波糖在水中极易溶解，在乙腈中不溶。本文采用水为溶剂，0.02 mol • L^{-1} 磷酸二氢钾溶液为流动相，能解决《中国药典》2020 年版二部方法中因溶剂与流动相中有机相比例差异对灵敏度、出峰时间及峰形等的影响。

3.2 色谱条件的优化

本文以 0.02 mol • L^{-1} 磷酸二氢钾溶液为流动相，流速 1.0 mL • min^{-1}，柱温 40 ℃的色谱条件，采用 SCX 色谱柱（4.6 mm×250 mm，3 μm），系统适用性要求均能达到。SCX 色谱柱是一种典型的阳离子交换柱，以磺酸基强阳离子硅胶为键合相，用于碱性、水溶的化合物的分离。SCX 色谱柱较氨基色谱柱的固定相稳定，不易产生柱流失，在使用约 300 次后，组分仍然能保持良好的峰形，对称性好，拖尾因子小，分离度与理论板数能满足系统适用性要求。

3.3 小结

本文采用 SCX 色谱柱的 HPLC 法测得的阿卡波糖口服固体制剂含量结果准确、方法可靠，与《中国药典》2020 年版收载的方法相比，该方法毒性小、成本低、专属性强、色谱柱耐用性好，具备一定的实用性。

参考文献

[1] Balfour JA，Mctavish D. Acarbose [J]. Drugs，1993，46（6）：1025-1054.

[2] 顾觉奋，陈菁 . 阿卡波糖生物合成和发酵工艺研究进展 [J]. 国外医药抗生素分册，2006，27（3）：122-125.

[3] 阎成炟，郭崇真，张东虎，等 . 新型 α- 葡萄糖苷酶抑制剂 YG-18 在小鼠体内的降糖作用、分子对接及急性毒性研究 [J]. 中南药学，2021，19（6）：1037-1042.

[4] 刘志峰，李春梅，李敏，等 . α- 糖苷酶抑制剂阿卡波糖的临床药理作用 [J]. 中国药理学通报，2004，20（9）：965-967.

[5] Fu XY，Chen HM，Chen DQ. Effects of Acarbose on incretins in newly diagnosed type 2 diabetic patients in different carbohydrate tolerance test [J]. China Medical Abstracts（Internal Medicine），2017（1）：22.

[6] 邱虎，王群 . 采用数据挖掘技术的关联规则分析口服降糖药物的临床应用 [J]. 中南药学，2021，19（2）：323-325.

[7] 中国药典 2020 年版 . 二部 [S]. 2020：660-662.

[8] 邓晓辉 . HPLC 法测定阿卡波糖原料药的含量 [J]. 安徽医药，2005，9（7）：509.

[9] 杨蕾，郭志渊，张悦杨，等 . HPLC-ELSD/DAD 测定阿卡波糖工作参照品的含量 [J]. 华西药学杂志，2006，21（4）：392-393.

[10] 刘海燕，陈华，等 . RID-HPLC 法测定阿卡波糖原料药含量 [J]. 河北农业大学学报，2007，30（1）：97-100.

[11] 谢丽华，陈乔，李英然 . HPLC 法测定阿卡波糖的含量 [J]. 河北化工，2011，34（4）：34-36，16.

[12] 耿银银，许丽晓，等 . 亲水作用色谱法测定阿卡波糖含量 [J]. 药物分析，2017，37（5）：818-825.

[13] 赵慧 . HPLC-CAD 法测定阿卡波糖胶囊含量 [J]. 药物分析，2020，40（5）：910-915.

[14] 陈华 . Xbridge Amide 色谱柱测定果糖注射液中果糖含量 [J]. 药物生物技术，2012，19（6）：525-526.

（收稿日期：2021-10-15；修回日期：2021-12-10）

HPLC-MS 法检测盐酸美金刚片中 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸的含量

黄引[1, 2]，蔡国伟[1, 2]，钟莹[1, 2]，肖颖[1, 2]，秦飞[1, 2]，赖烨才[1, 2*]，林顺权[3]（1. 广州白云山医药集团股份有限公司白云山制药总厂，广州　510515；2. 广东省化学药原料与制剂关键技术研究企业重点实验室，广州　510515；3. 广州牌牌生物科技有限公司，广州　510530）

摘要：目的　建立测定盐酸美金刚片中 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸的高效液相色谱串联质谱（HPLC-MS）法。**方法**　采用 Phenomenex Luna C_{18}（150 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱，以 0.1% 甲酸水溶液 - 甲醇（30∶70）为流动相，等度洗脱；采用三重四极杆质谱检测器、电喷雾离子化（ESI）正离子模式、多反应监测模式进行检测，电喷雾电压为 3500 V。**结果**　*N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸在 0.0102 ～ 1.0200 μg • mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好，检测限为 3.2 pg，定量限为 14.7 pg，回收率在 92.5% ～ 105.7%。**结论**　该方法可满足盐酸美金刚片中降解杂质 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸的含量测定要求。

关键词：HPLC-MS；盐酸美金刚片；*N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸；降解杂质
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)06-1407-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.031

Content determination of *N*-(dimethyl-monosane) glycine in memantine hydrochloride tablets by HPLC-MS

HUANG Yin[1, 2], CAI Guo-wei[1, 2], ZHONG Ying[1, 2], XIAO Ying[1, 2], QIN Fei[1, 2], LAI Ye-cai[1, 2*], LIN Shun-quan[3] (1. *Guangzhou Baiyunshan Pharmaceutical Holdings Co., Ltd., Baiyunshan Pharmaceutical General Factory, Guangzhou* 510515; 2. *Key Laboratory of Key Technology Research on Chemical Raw Materials and Preparations in Guangdong, Guangzhou* 510515; 3. *Guangzhou PI & PI Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou* 510530)

Abstract: Objective　To establish an high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS) method to determine *N*- (dimethyl-monosane) glycine in memantine hydrochloride tablets. **Methods**　The separation was performed based on Phenomenex Luna C_{18} (150 mm×4.6 mm, 5 μm) column with 0.1% formic acid aqueous solution and methanol (30∶70) as the mobile phase. The mass spectrometric detections were conducted based on electrospray ionization (ESI) positive ion mode, and multi-reaction monitoring mode. The triple quadrupole mass spectrometry detector was used with electrospray voltage at 3500 V. **Results**　Among the concentration range 0.0102 － 1.0200 μg • mL^{-1}, *N*- (dimethyl-monosane) glycine showed a good linearity. The limit of detection was 3.2 pg, while the limit of quantification was 14.7 pg. The recoveries ranged from 92.5% to 105.7%. **Conclusion**　The method is suitable for the determination of *N*- (dimethyl-monosane) glycine in memantine hydrochloride tablets.

Key words: HPLC-MS; memantine hydrochloride tablet; *N*- (dimethyl-monosane) glycine; degradation impurity

基金项目：广东省粤澳科技创新联合资助项目（No.2021A0505080010）。

作者简介：黄引，女，硕士，主要从事药物分析方面的研究，email：102338@byszc.com　*通信作者：赖烨才，男，博士，主要从事药物分析方面的研究，email：102630@byszc.com

盐酸美金刚（memantine hydrochloride），化学名为 1- 氨基 -3，5- 二甲基金刚烷盐酸盐，是一类新的通过阻断 *N*- 甲基 -*D*- 天门冬氨酸（NMDA）受体作用于谷氨酸能系统从而治疗阿尔茨海默病的药物 [1-2]。盐酸美金刚可抑制兴奋性神经传递递质谷氨酸的过度释放，减轻钙离子过多所致的神经元细胞中毒、损伤和死亡，从而改善阿尔茨海默病患者的症状，具有耐受性良好、用药安全的特点 [3-4]。

随着仿制药一致性评价工作的开展，国内对药品杂质研究的重视程度越来越高，对于杂质控制与评价的先进理念、关键技术的需求也越来越大 [5-6]，药品储存过程中降解杂质会随着储存时间的延长而增加，有效控制降解杂质是亟需解决的问题。盐酸美金刚片在长期储存过程中，与辅料微晶纤维素会发生美拉德反应，产生降解杂质 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸，化学名为（3，5- 二甲基 -1- 金刚烷）氨基乙酸，分子式为 $C_{14}H_{23}NO_2$，化学结构见图 1。制剂中辅料硬脂酸镁的存在，会使 pH 升高从而促进美拉德反应，使 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸的含量增高 [7-9]。同时，在本文中影响因素试验碱性破坏条件下，*N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸含量明显增高，进一步证明碱性条件对美拉德反应有促进作用。

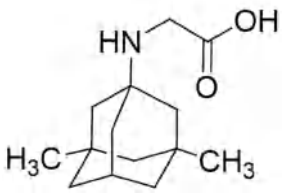


图 1 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸的化学结构式

Fig 1 Chemical formula of *N*-（dimethyl-monosane）glycine

为了更好地控制药品质量，保证用药安全，建立快速有效的检测方法对杂质 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸进行严格控制至关重要。盐酸美金刚及其相关杂质的结构式和紫外吸收全波长扫描光谱图均显示无特征吸收和末端吸收，因此无法采用紫外 - 可见光检测器对杂质进行定量；另外，TLC 法存在分离能力差、重现性差、灵敏度低等缺点 [10]，目前盐酸美金刚含量测定及杂质的定量检测多采用气相色谱（GC）法 [11-12]。前期研究发现，GC 法对于降解杂质 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸并不适用，推测此杂质在 GC 中容易发生高温降解而影响检测。进口注册标准中以 0.1% 三氟乙酸水溶液作为流动相，梯度洗脱 30 min，单离子模式（SIM）同时对美金刚乳糖加合物和 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸进行检测 [13]。因本文研究的盐酸美金刚片工艺中未涉及乳糖的使用，无需对美金刚乳糖加合物进行研究控制；同时为减少长期使用三氟乙酸对质谱仪造成的损伤，拟采用甲酸水溶液替换三氟乙酸水溶液并在质谱多反应监测模式（MRM）下等度洗脱（运行时间 10 min），对目标杂质 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸进行快速、准确的定量控制。最低本文建立了一种高效液相色谱 - 质谱联用（HPLC-MS）分析方法对盐酸美金刚片中 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸进行定量检测，并对方法进行了验证，现报道如下。

1 仪器与试药

Agilent1260-AB Sciex 4000 液相色谱 - 质谱联用仪（美国 Agilent 公司）；Sartorius CPA 225D 型分析天平（德国 Sartorius 公司）；Merck Millipore Milli-Q 实验室超纯水系统（德国 Merck Millipore 公司）。

N-（二甲基金刚烷）甘氨酸对照品（TRC，批号：6-NSR-122-1，含量：98%）；盐酸美金刚片（广州医药集团股份有限公司白云山制药总厂，批号：01171202、01171203、01171204，规格：10 mg）；甲醇、甲酸（美国 Merck 公司，色谱纯）；水为自制超纯水。

2 方法与结果

2.1 液相色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱 Phenomenex Luna C_{18}（150 mm×4.6 mm，5 μm）；以 0.1%（*V*/*V*）甲酸水溶液 - 甲醇（30∶70）为流动相，等度洗脱；流速：0.5 mL·min^{-1}；柱温：30 ℃；进样量：10 μL，运行时间：10 min。

2.1.2 质谱条件 采用三重四极杆质谱检测器，电喷雾离子源（ESI）；电喷雾电压为 3500 V；离子源温度为 500 ℃；以高纯氮气为干燥气；二级碰撞能（CE）为 2 V；正离子模式下选择质荷比为（*m*/*z*）238.1/163.3 的离子对进行定性定量检测，质谱图见图 2，裂解途径见图 3。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液 取 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸对照品适量，精密称定，用甲醇 - 水（50∶50）溶解并定量稀释制成 1 μg·mL^{-1} 的对照品储备液。精密量取对照品储备液适量，用甲醇 - 水（50∶50）分别稀释制成质量浓度为 0.01、0.03、0.10、0.20、0.30、0.50、0.70 和 1.00 μg·mL^{-1} 的标准曲线系列对照品溶液。

2.2.2 系统适用性溶液 称取适量的 *N*-（二甲基

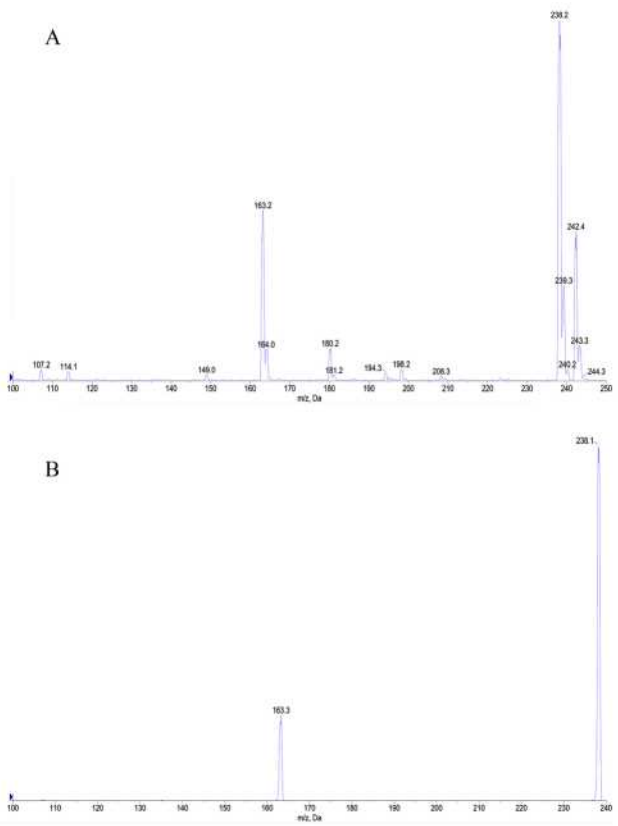
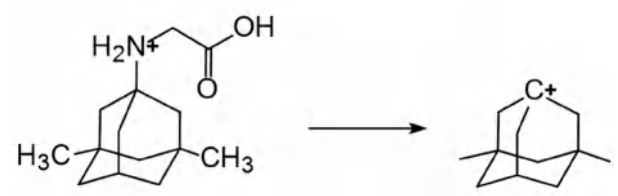


图 2　全扫描质谱图（A）和离子对提取质谱图（B）

Fig 2　Full scan mass spectrogram（A）and ion-pair extraction mass spectrogram（B）



分子式：$C_{14}H_{24}NO_2^+$　　分子式：$C_{12}H_{19}^+$

分子量：238.18　　分子量：163.15

图 3　*N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸的裂解途径

Fig 3　Fragmentation pathway of *N*-（dimethyl-monosane）glycine

金刚烷）甘氨酸对照品，用甲醇 - 水（50∶50）溶解并定量稀释成 1 μg • mL^{-1} 的溶液，作为系统适用性溶液。

2.2.3　供试品溶液　取本品 1 片，置 100 mL 量瓶中，用甲醇 - 水（50∶50）溶解并定量稀释制成 0.1 mg • mL^{-1} 的溶液，作为供试品溶液。

2.2.4　破坏试验用溶液

① 空白辅料：取空白辅料适量，精密称定，置 100 mL 量瓶中，用甲醇 - 水（50∶50）溶解并定量稀释至刻度，作为空白辅料溶液。

② 酸破坏：取本品 1 片，置 100 mL 量瓶中，用适量甲醇 - 水（50∶50）溶解，加入 0.1 mol • L^{-1} 盐酸溶液 1 mL，于 80 ℃水浴加热 2 h，用 0.1 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液中和，用甲醇 - 水（50∶50）稀释至刻度，作为酸破坏供试品溶液。

③ 碱破坏：取本品 1 片，置 100 mL 量瓶中，用适量甲醇 - 水（50∶50）溶解，加入 0.1 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液 1 mL，于 80 ℃水浴加热 2 h，用 0.1 mol • L^{-1} 盐酸溶液中和，用甲醇 - 水（50∶50）稀释至刻度，作为碱破坏供试品溶液。

④ 高温破坏：取本品 1 片，置 100 mL 量瓶中，用适量甲醇 - 水（50∶50）溶解，置 80 ℃水浴中加热 2 h 后冷却至室温，用甲醇 - 水（50∶50）稀释至刻度，作为高温破坏供试品溶液。

⑤ 氧化破坏：取本品 1 片，置 100 mL 量瓶中，用适量甲醇 - 水（50∶50）溶解，加入 30% 过氧化氢溶液 1 mL，置 80 ℃水浴中加热 2 h 后冷却至室温，用甲醇 - 水（50∶50）稀释至刻度，作为氧化破坏供试品溶液。

⑥ 光照破坏：取本品 1 片，置蒸发皿内，用适量甲醇 - 水（50∶50）溶解，于 254 nm 紫外波长下照射 2 h 后，将溶液移至 100 mL 量瓶中，用甲醇 - 水（50∶50）稀释至刻度，作为光照破坏供试品溶液。

2.3　系统适用性要求

取系统适用性溶液连续进样 6 次，*N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸峰面积的 *RSD* 不得大于 10.0%，保留时间的 *RSD* 不得大于 2.0%。

2.4　测定法

本文所有色谱图均由 Analyst 软件 1.6.3 版本采集积分产生。标准曲线由 MultiQuant 3.0.2 软件采用二次回归拟合方程 $y = ax^2 + bx + c$ 绘制，其中 y 为对照品溶液中 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸的峰面积，x 为 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸的质量浓度，相关系数 r 应不小于 0.998。在结果解析方程中，取系列对照品溶液质量浓度范围内，质量浓度与峰面积成正相关的值作为 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸的质量浓度，计算出其相对于盐酸美金刚的含量。

2.5　系统适用性

取系统适用性溶液连续进样 6 次，记录 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸的峰面积和保留时间，并计算相应 *RSD* 值，结果 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸峰面积 *RSD* 为 2.3%，保留时间 *RSD* 为 0.1%，表明系统适用性良好。

2.6　专属性试验

按照“2.1”项下色谱条件，分别测定“2.2.4”项下的酸、碱、高温、氧化及光照破坏条件下的

各供试品溶液，结果空白溶液及空白辅料对检测无干扰，*N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸峰面积在碱破坏的条件下有明显增加，在酸、高温、氧化和光照破坏条件下无明显增加，并且已破坏样品溶液经本检测方法检测均只显 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸峰，表明盐酸美金刚片经酸、碱、高温、氧化和光照破坏后，均无其他杂质干扰，方法专属性强，见图 4。

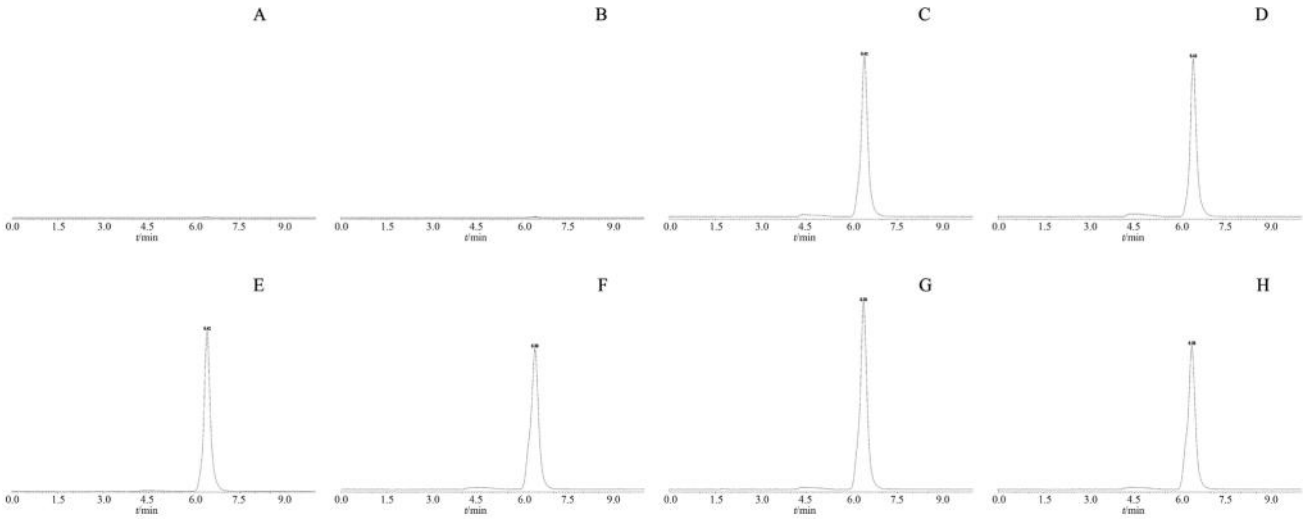


图 4 专属性试验色谱图

Fig 4 Chromatograms of specificity test

A. 空白溶剂（blank solvent）；B. 空白辅料（blank excipients）；C. 未破坏样品（undamaged sample）；D. 酸破坏（acid degradation）；E. 碱破坏（alkaline degradation）；F. 高温破坏（high temperature degradation）；G. 氧化破坏（oxidative degradation）；H. 光照破坏（illumination degradation）

2.7 线性关系考察

按照“2.2.1”项下方法配制一系列线性溶液，取各线性溶液 10 μL 进样，记录峰面积。结果显示 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸的拟合方程为 $y = -0.5200x^2 + 6993x - 2626$，$r = 0.9998$，其在 0.0102 ～ 0.102 00 μg • mL^{-1} 与峰面积呈现出良好的线性关系。

2.8 检测限与定量限

精密称取 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸对照品适量，用甲醇 - 水（50∶50）溶解并定量稀释制成一定浓度的样品溶液，按“2.1”项下条件测定。信噪比（*S*/*N*）约为 3 作为检测限，*S*/*N* 约为 10 作为定量限，结果 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸的检测限为 3.2 pg，定量限为 14.7 pg。

2.9 加样回收试验

将盐酸美金刚片剂 1 片置于 100 mL 量瓶中，用甲醇 - 水（50∶50）适量溶解，再精密加入 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸对照品溶液（102 μg • mL^{-1}）250 μL，用甲醇 - 水（50∶50）稀释至刻度，摇匀，作为 50% 限度测试溶液。同法配制 100% 和 150% 限度测试溶液。每个浓度配制 3 份，分别按“2.1”项下条件测定，计算回收率。结果显示，*N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸的加样回收率在 92.5% ～ 105.7%，*RSD* ＜ 6.5%，符合方法学要求，见表 1。

表 1 加样回收率结果

Tab 1 Recovery of standard addition

限度测试溶液	加入量 /（μg • mL^{-1}）	实测量 /（μg • mL^{-1}）	回收率 /%	平均回收率 /%	*RSD*/%
50%	0.255	0.2925	102.0	103.8	1.8
	0.255	0.3020	105.7		
	0.255	0.2971	103.8		
100%	0.510	0.5377	99.1	99.0	3.9
	0.510	0.5172	95.1		
	0.510	0.5564	102.8		
150%	0.765	0.8158	102.4	99.7	6.3
	0.765	0.8297	104.2		
	0.765	0.7403	92.5		

2.10 重复性

取同一批样品，按“2.2.3”项下方法配制 6 份供试品溶液，测定其中 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸的含量，结果 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸的含量 *RSD* 为 2.9%，保留时间 *RSD* 为 0.30%，表明方法重复性好。

2.11 耐用性

通过改变流动相流速、柱温来评估测定条件有微小变动时，对测定结果的影响，结果在各个

色谱条件参数下，测得的 6 份待测样品中 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸含量 *RSD* 均≤ 10.0%，符合要求，见表 2。

表 2　耐用性结果

Tab 2　Durability test

参数		含量 /%	*RSD*/%	系统适用性		
				峰面积 *RSD*（$n=6$）/%	保留时间 *RSD*（$n=6$）/%	标准曲线
柱温 /℃	28	0.027	8.2	2.5	0.20	$y=-0.0466x^2+6272x+4485$，$r=0.9998$
	30	0.031		2.3	0.14	$y=-0.5200x^2+6993x-2626$，$r=0.9998$
	32	0.027		1.0	0.24	$y=-0.2971x^2+6597x+2404$，$r=0.9997$
流速 /（mL•min^{-1}）	0.486	0.031	8.8	2.1	0.060	$y=-1.2271x^2+7535x-3015$，$r=0.9999$
	0.500	0.032		2.3	0.14	$y=-0.5200x^2+6993x-2626$，$r=0.9998$
	0.515	0.027		4.1	0.30	$y=0.0777x^2+5888x+3434$，$r=0.9998$

2.12　样品检测结果

取盐酸美金刚片 3 批 0 d 样品和 3 批 30 ℃长期试验样品（36 个月），按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下条件测定，结果 3 批 0 d 样品中 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸均未检出，3 批 30 ℃长期试验样品中 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸含量均为 0.2%，样品中 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸含量均符合限度要求（＜ 0.5%），结果见表 3。

表 3　*N*-(二甲基金刚烷) 甘氨酸的含量测定结果

Tab 3　Content of *N*-(dimethyl-monosane) glycine

批号	含量 /%
01171202（0 d）	0
01171203（0 d）	0
01171204（0 d）	0
01171202（30 ℃，36 个月）	0.2
01171203（30 ℃，36 个月）	0.2
01171204（30 ℃，36 个月）	0.2

3　总结

降解杂质 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸在放置过程中会随着时间的延长而增加，目前针对此杂质定量研究的文献报道较少，仅有盐酸美金刚片的进口药品注册标准对此杂质进行了定量控制。本研究采用 HPLC-MS 法对 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸进行定量检测，有效解决了因目标物紫外吸收弱而无法使用液相色谱法、因易发生高温降解而无法使用气相色谱法检测的难题。该方法可操作性强、灵敏度高、检测时间短，可应用于盐酸美金刚产品中 *N*-（二甲基金刚烷）甘氨酸杂质的检测与控制。

参考文献

[1] 张靖 . 顶空毛细管气相色谱法测定盐酸美金刚中有机溶剂的残留量 [J]. 海峡药学，2021，33（3）：82-84.

[2] 罗京京，何玲，刘国卿 . 治疗阿尔茨海默病新药盐酸美金刚 [J]. 中国新药杂志，2006，15（9）：742-744.

[3] 曾建华，徐宝杭，张嘎，等 . 盐酸美金刚有关物质的制备 [J]. 华西药学杂志，2020，35（4）：363-364.

[4] Scherm A，Homburg B，Peteri D，et al. Drugs of medicines forinfluencing the central nervous system：US 4122193A [P]. 1978-10-24.

[5] 王维剑 . 药品杂质控制与评价关键技术研究 [D]. 济南：山东大学，2016.

[6] 李娜，李玲，高松燕，等 . GC 法同时测定盐酸美金刚片中四种杂质的含量 [J]. 解放军药学学报，2014，30（3）：242-248.

[7] 付长安，郭建维，刘卅，等 . 金刚烷直接氧化制备金刚烷多元醇新工艺 [J]. 化工学报，2011，62（12）：3428-3433.

[8] 吴惠玲，王志强，韩春，等 . 影响美拉德反应的几种因素研究 [J]. 现代食品科技，2010，26（5）：440-444.

[9] 张明媛 . 三种化学药物中有关物质的分析方法研究 [D]. 上海：第二军医大学，2013.

[10] 吕凌，孔祥泰，路小东，等 . 气相色谱法测定盐酸美金刚的有关物质 [J]. 药物分析杂志，2008，28（8）：1352-1354.

[11] 姜小林，应志洪，吴宁苹 . 气相色谱内标法测定盐酸美金刚含量和有关物质 [J]. 化学工业与工程技术，2014，35（5）：75-77.

[12] 李俊，乔玉清，杨志明 . GC 法测定盐酸美金刚原料药的有关物质 [J]. 广东化工，2015，20（42）：134.

[13] 盐酸美金刚片国家食品药品监督管理局进口药品注册标准 [S]. JX20120025，2012.

（收稿日期：2021-11-15；修回日期：2021-12-15）

三方益子膏的质量标准研究

陈海燕[1]，随家宁[1]，黄婉清[1]，农丽惠[1]，冯婷[1]，李芳婵[1*]，蒋林[1, 2, 3*]（1. 广西中医药大学，南宁 530200；2. 广西壮瑶药工程技术研究中心，南宁 530200；3. 广西高校中药制剂共性技术研发重点实验室，南宁 530200）

摘要：目的 建立三方益子膏的质量标准。**方法** 采用薄层色谱法对盐益智、盐补骨脂、乌药、酒苁蓉、炙甘草进行定性鉴别；采用高效液相色谱法对三方益子膏中主要有效成分 5-羟甲基糠醛、原儿茶酸、松果菊苷、补骨脂素、异补骨脂素和甘草酸进行含量测定。**结果** 薄层色谱中，供试品色谱与对照药材或者对照品在相同位置具有相同颜色的斑点，斑点清晰，分离良好，阴性样品无干扰；含量测定中，5-羟甲基糠醛、原儿茶酸、松果菊苷、补骨脂素、异补骨脂素、甘草酸分别在 0.526 ～ 2.63 μg、0.034 ～ 0.17 μg、0.196 ～ 0.98 μg、0.076 ～ 0.38 μg、0.098 ～ 0.49 μg、0.156 ～ 0.78 μg 与峰面积线性关系良好，平均加样回收率分别为 101.75%、97.54%、101.90%、97.82%、96.56%、99.11%，*RSD* 分别为 1.2%、2.4%、1.9%、1.6%、1.0%、1.8%。**结论** 所建立的方法专属性强、准确，可用于三方益子膏的质量控制。

关键词：三方益子膏；质量控制；薄层色谱；含量测定
中图分类号：R917，R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1412-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.032

Quality standard of Sanfang Yizi ointment

CHEN Hai-yan[1], SUI Jia-ning[1], HUANG Wan-qing[1], NONG Li-hui[1], FENG Ting[1], LI Fang-chan[1*], JIANG Lin[1, 2, 3*] (1. *Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning* 530200; 2. *Guangxi Engineering Technology Research Center for Zhuang and Yao Medicine, Nanning* 530200; 3. *Guangxi Key Laboratory of Common Technology Research and Development of Chinese Medicine Preparation in Guangxi, Nanning* 530200)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Sanfang Yizi ointment. **Methods** Thin layer chromatography method was used for the qualitative identification of salt-processed alpiniae oxyphyllae, salt-processed psoraleae, lindera radix, wine-processed cistanches herba and honey grilled glycyrrhiza. The contents of 5-HMF, protocatechuic acid, echinoside, psoralen, isopsoralen and glycyrrhizic acid in the prescription were determined by HPLC. **Results** There were spots of the same color in the same position of the test material and the control. The spots were clear, well separated and negative with no interference. In the content determination, the linearity of 5-HMF, protocatechμic acid, echinoside, psoralen, isopsoralen and glycyrrhizic acid were 0.526 ～ 2.63 μg, 0.034 ～ 0.17 μg, 0.196 ～ 0.98 μg, 0.076 ～ 0.38 μg, 0.098 ～ 0.49 μg, and 0.156 ～ 0.78 μg. The average recoveries were 101.75%, 97.54%, 101.90%, 97.82%, 96.56%, and 99.11%, with *RSD*s of 1.2%, 2.4%, 1.9%, 1.6%, 1.0%, and 1.8%, respectively. **Conclusion** The method is specific and accurate, which can be used for the quality control of Sanfang Yizi ointment.

Key words: Sanfang Yizi ointment; quality control; thin layer chromatography; content determination

三方益子方由三个古代经典名方加减化裁而来，由盐益智、盐补骨脂、乌药、金樱子、酒覆盆子、酒黄精、枸杞子、桑葚、芡实、酒苁蓉和炙甘草 11 味药组成，具暖肾祛寒、温脾养肝、缩

基金项目：广西一流学科建设开放课题自然科学研究项目（No.2019XK118）；南宁市良庆区科学研究与技术开发计划项目（No.201910）。
作者简介：陈海燕，女，在读硕士研究生，主要从事中药、保健食品研究与开发研究，email：1316471462@qq.com ***通信作者：**蒋林，男，教授级高级工程师，主要从事中药、保健食品研究与开发研究，email：1009100482@qq.com；李芳婵，女，主要从事中药、保健食品研究与开发研究，email：1936490308@qq.com

尿止遗的功效。方中益智仁能温肾暖脾、固精缩尿[1-2]，补骨脂能温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻，盐炙能缓和辛窜湿燥之性，并可引药入肾[3]，增强补肾健脾之功效，两者共为君药。乌药能行气止痛、温肾散寒，能除膀胱和肾间冷气、止小便频数[4]，为臣药。肉苁蓉能补肾阳、益精血、润肠道[5-6]，为佐药。甘草益气补中、调和药性[7]，为使药。

在选择含量测定对象时，要全面且科学，按君臣佐使选择重点质量标志物[8]，文献表明，5-羟甲基糠醛是食品和药品中普遍存在的共性成分，具有保肝、改善学习记忆、保护神经系统、抗炎、抗氧化等多种功效[9]，且可促进甘草酸的代谢，加强抑制肿瘤、抗炎、降低血中胆固醇的作用[10]，本方中盐益智、黄精、枸杞子、桑葚、酒苁蓉、炙甘草均含有该成分，覆盖君臣佐使药。方中盐益智、金樱子、桑葚、枸杞子均含有原儿茶酸，该化合物可通过抗氧化应激活性发挥保肝作用[11]。单体松果菊苷为肉苁蓉中的保肝活性成分[12]，补骨脂素和异补骨脂素是补骨脂中的主要活性成分之一[13]，甘草中的甘草酸具改善肾功能的作用[14]。为提升和完善三方益子膏质量标准，确保临床用药的安全，本研究拟采用薄层色谱法对三方益子膏中盐益智、盐补骨脂、乌药、酒苁蓉、炙甘草 5 味药材进行定性鉴别，采用高效液相法测定有效成分 5-羟甲基糠醛、原儿茶酸、松果菊苷、补骨脂素、异补骨脂素和甘草酸含量，为三方益子膏的质量标准起草提供依据。

1 材料

1.1 仪器

安捷伦 1260 高效液相色谱仪（美国安捷伦科技公司）；超纯水仪一体机 Direct-Q5UV（广西南宁市博美生物科技有限公司）；KQ-500E 超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；SQP 十万分之一电子天平 [赛多利斯科学仪器（北京）有限公司]；DZF-6090 真空干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司）；HH-4 恒温水浴锅（常州国华电器有限公司）；AR204E 千分之一电子天平 [奥豪斯仪器（常州）有限公司]。

1.2 试药

甲醇（批号：2020102902）、乙醇（批号：2019121602）、乙酸乙酯（批号：2020081101）、冰醋酸（批号：2018081301）、硫酸（批号：2018082901）、正丁醇（批号：2019032201）、石油醚（批号：2020072701）（成都市科隆化学品有限公司）；36% 醋酸（上海阿拉丁生化技术有限公司）；甲酸（批号：2019040802，天津市大茂化学试剂厂）；正己烷（批号：2020080501）、环己烷（批号：2019071802）（天津市富宇精细化工有限公司）；色谱级乙腈 [赛默飞世尔科技（中国）有限公司]；分析级磷酸（批号：20190606，成都金山化学试剂有限公司）；蜂蜜（湖南药圣堂中药科技有限公司）；阿斯帕坦（南宁市越前食品添加剂有限责任公司）；对照药材益智仁（批号：121590-202003）、补骨脂（批号：121056-201605）、乌药（批号：121096-201907）、肉苁蓉（批号：121101-201603）、甘草（批号：120904-202021）；对照品原儿茶酸（批号：110809-201906）、松果菊苷（批号：110749-201919）、补骨脂素（批号：111525-201912）、异补骨脂素（批号：110736-201943）、5-羟甲基糠醛（批号：110629-201919）（含量＞ 98%，中国食品药品检定研究院）；对照品甘草酸（批号：RP190517，含量：99.34%，成都麦德生科技有限公司）；薄层样品（批号：20201001、20201002、20201003），S1 ～ S10 号样品（批号：20210301，20210302，20210303，20210304，20210305，20210306，20210307，20210308，20210309，202103010）（由广西中医药大学广西壮瑶药工程中心实验室自制，规格：180 g/ 瓶）。

2 三方益子膏的制备

按处方量称取盐益智、盐补骨脂、乌药、金樱子、酒覆盆等 11 味药材，加 14 倍量水提取 2 次，每次 2 h，滤过，浓缩至相对密度为 1.40 ～ 1.45（80 ～ 90 ℃），添加辅料蜂蜜∶阿斯帕坦（10∶0.1）适量，搅拌均匀，分装，灭菌，即得（1 g 膏滋相当于 1.842 g 生药量）。

3 薄层鉴别

3.1 益智仁的薄层鉴别

取三方益子膏 3 g（批号：20201001、20201002、20201003），加纯水 20 mL，用石油醚萃取 2 次，每次 40 mL，合并石油醚层，蒸干，残渣用 1 mL 甲醇溶解，作为供试品溶液。取益智仁对照药材 1 g 于具塞锥形瓶中，加入石油醚 30 mL，超声 30 min，滤过，滤液蒸干，残渣用 1 mL 甲醇溶解，即得对照药材溶液。按处方比例称取除益智仁外的 10 味药材，按制备工艺制备成膏滋，再同法制得缺益智仁阴性样品溶液。照薄层色谱法试验，各吸取供试品溶液和阴性样品溶液 15 μL，益智仁药材溶液 4 μL，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以环己烷 - 乙酸乙酯（3∶1）为展开剂，饱和 10 min，展开，取出，晾干，喷以 10% 硫酸乙醇溶液，在 105 ℃加热 5 min，置日光灯下检视。结果如图 1。

3.2 补骨脂的薄层鉴别

取三方益子膏3 g（批号：20201001、20201002、20201003）于具塞锥形瓶中，加乙酸乙酯20 mL，超声15 min（功率200 W，频率40 kHz），滤过，滤液蒸干，残渣加乙酸乙酯1 mL使溶解，作为供试品溶液。取补骨脂对照药材1 g于具塞锥形瓶中，加20 mL乙酸乙酯，超声15 min（功率200 W，频率40 kHz），滤过，滤液蒸干，残渣加1 mL乙酸乙酯使溶解，即得补骨脂对照药材溶液。取补骨脂素对照品、异补骨脂素对照品，加乙酸乙酯制成每1 mL各含2 mg的混合溶液。称取除补骨脂以外的10味药材，按制备工艺制备成膏滋，同法制得阴性样品溶液。照薄层色谱法试验，吸取供试品溶液、阴性样品溶液和补骨脂药材溶液2 μL，对照品溶液1 μL，分别点于同一硅胶G薄层板上，以正己烷-乙酸乙酯（4∶1）为展开剂，饱和10 min，展开，取出，晾干，喷以10%氢氧化钠乙醇溶液，吹干，置紫外光灯下（365 nm）下检视。结果如图2。

3.3 *乌药薄层鉴别*

取三方益子膏3 g（批号：20201001、20201002、20201003）于具塞锥形瓶中，加甲醇20 mL，超声30 min（功率200 W，频率40 kHz），滤过，滤液挥干，用10 mL纯水溶解，再用氯仿萃取3次，每次20 mL，合并氯仿层，蒸干，残渣加1 mL甲醇溶解，作为供试品溶液。取乌药对照药材1 g于具塞锥形瓶中，加甲醇20 mL，超声30 min（功率200 W，频率40 kHz），滤过，滤液挥干，用10 mL纯水溶解，再用氯仿萃取3次，每次20 mL，合并氯仿层，蒸干，残渣加1 mL甲醇溶解，即得乌药对照药材溶液。称取除乌药以外的10味药材，按制备工艺制备成膏滋，同法制得阴性样品溶液。照薄层色谱法试验，吸取供试品溶液和阴性样品溶液各12 μL，乌药药材溶液3 μL，分别点于同一硅胶G薄层板上，以苯-乙酸乙酯-甲酸（8∶1.5∶0.1）为展开剂，饱和10 min，展开，取出，晾干，喷以10%硫酸乙醇溶液，在105 ℃加热5 min，置紫外光灯下（365 nm）下检视。结果见图3。

3.4 *酒苁蓉薄层鉴别*

取三方益子膏3 g（批号：20201001、20201002、20201003）于具塞锥形瓶中，加25 mL甲醇，超声提取30 min（功率200 W，频率40 kHz），过滤，滤液挥干，用25 mL纯水溶解，再用水饱和正丁醇溶液萃取3次，每次25 mL，合并正丁醇层，用水洗涤2次，每次40 mL，合并正丁醇层，蒸干，残渣加2 mL甲醇溶解，作为供试品溶液。取肉苁蓉对照药材1 g于具塞锥形瓶中，加25 mL甲醇，超声提取30 min（功率200 W，频率40 kHz），过滤，滤液挥干，用25 mL纯水溶解，再用水饱和正丁醇溶液萃取3次，每次25 mL，合并正丁醇层，用水洗涤2次，每次40 mL，合并正丁醇层，蒸干，残渣加2 mL甲醇溶解，作为对照药材溶液。取毛蕊花糖苷对照品适量，加甲醇溶解并定容，制得毛蕊花糖苷质量浓度为1.045 mg·mL^{-1}的对照品溶液。称取除肉苁蓉以外的10味药材，按制备工艺制备成膏滋，同法制得阴性样品溶液。照薄层色谱法试验，吸取供试品溶液和阴性样品溶液各7 μL，肉苁蓉药材溶液2 μL，毛蕊花糖苷对照品液2 μL，分别点于同一硅胶G薄层板上，以醋酸乙酯-甲醇-9%醋酸溶液（15∶3∶2）为展开剂，饱和10 min，展开，取出，晾干，喷以5%三氯化铁乙醇溶液，吹干，置日光下检视。结果见图4。

3.5 *炙甘草薄层鉴别*

取三方益子膏3 g（批号：20201001、20201002、20201003）于具塞锥形瓶中，加甲醇30 mL，回流提取1 h，滤过，滤液蒸干，用40 mL水溶解，用正丁醇提取3次，每次20 mL，合并正丁醇层，用水洗涤2次，每次40 mL，合并正丁醇层，蒸干，残渣加5 mL甲醇溶解，作为供试品溶液。取甘草对照药材1 g于具塞锥形瓶中，加甲醇30 mL，回流提取1 h，滤过，滤液蒸干，用40 mL水溶解，用正丁醇提取3次，每次20 mL，合并正丁醇层，用水洗涤2次，每次40 mL，合并正丁醇层，蒸干，残渣加5 mL甲醇溶解，作为对照药材溶液。称取除甘草以外的10味药材，按制备工艺制备成膏滋，同法制得阴性样品溶液。照薄层色谱法试验，吸取供试品溶液和阴性样品溶液各13 μL，甘草对照药材溶液2 μL，分别点于同一硅胶G薄层板上，以三氯甲烷-甲醇-水（18∶7∶1）为展开剂，饱和10 min，展开，取出，晾干，喷以10%硫酸乙醇溶液，105 ℃加热5 min，置日光下检视。结果见图5。

4 三方益子膏中有效成分含量的测定

4.1 *色谱条件*

采用Agilent 5 TC-C_{18}（2）（4.6 mm×250 mm，5 μm）色谱柱；流动相为乙腈（B）-0.1%磷酸水溶液（A），梯度洗脱（0～5 min，5%B；5～12 min，7%B；12～26 min，15%B；26～35 min，40%B；35～45 min，50%B；45～60 min，85%B）；切换波长检测（0～15 min，260 nm；15～30 min，330 nm；30～60 min，252 nm）；柱温35 ℃；流速1.0 mL·min^{-1}；进样量10 μL。

4.2 *供试品溶液的制备*

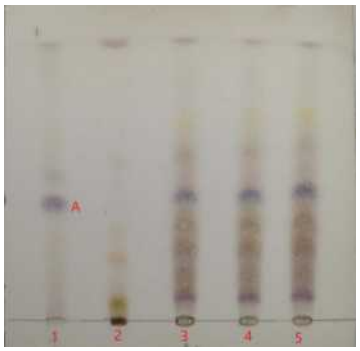


图 1　益智仁薄层色谱图

Fig 1　TLC of Alpiniae Oxyphyllae Fructus

1. 益智仁对照药材（reference herb of Alpiniae Oxyphyllae Fructus）；2. 阴性样品（negative sample）；3 ～ 5. 供试品（sample）

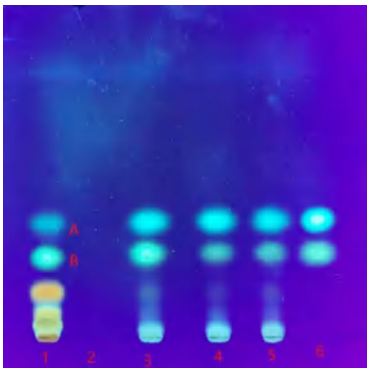


图 2　补骨脂薄层色谱图

Fig 2　TLC of Psoraleae

1. 补骨脂对照药材（reference herb of Psoraleae）；2. 阴性样品（negative sample）；3 ～ 5. 供试品（sample）；6. 对照品溶液（reference）

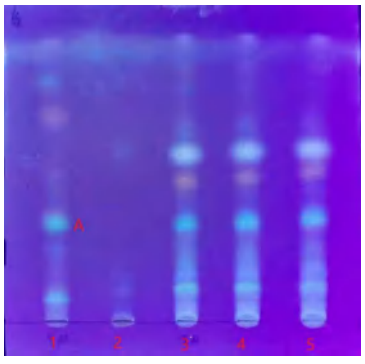


图 3　乌药薄层色谱展开图

Fig 3　TLC of Lindera Radix

1. 乌药对照药材（reference herb of Lindera Radix）；2. 阴性样品（negative sample）；3 ～ 5. 供试品（sample）

称取三方益子膏（批号：20201002）3 g，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 50 mL，称定重量，超声 30 min（功率 200 W，频率 40 kHz），放冷至室温，再次称重，用甲醇补足减失的重量，即得供试品溶液。

4.3　对照品溶液的制备

精密称取 5-羟甲基糠醛、原儿茶酸、松果菊苷、补骨脂素、异补骨脂素和甘草酸对照品各适量，加甲醇溶解，配制成质量浓度分别为 0.263、0.017、0.098、0.038、0.049、0.078 mg·mL^{-1} 的混合对照品溶液。

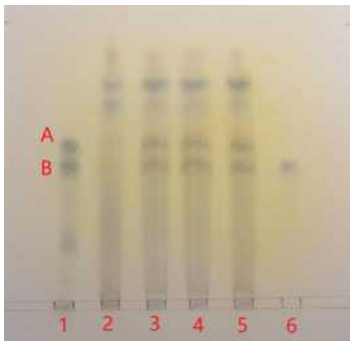


图 4　肉苁蓉薄层色谱图

Fig 4　TLC of Cistanches Herba

1. 乌药对照药材（reference herb of Cistanches Herba）；2. 阴性样品（negative sample）；3 ～ 5. 供试品（sample）；6. 毛蕊花糖苷（B）[trichosanthin（B）]

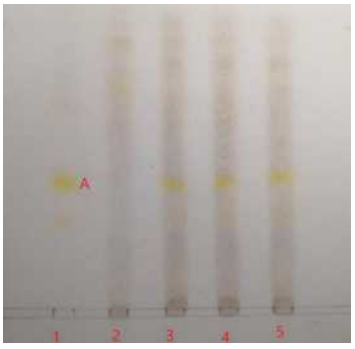


图 5　炙甘草薄层色谱图

Fig 5　TLC of Grilled Glycyrrhiza

1. 甘草对照药材（reference herb of Grilled Glycyrrhiza）；2. 阴性样品（negative sample）；3 ～ 5. 供试品（sample）

4.4　阴性样品溶液的制备

按处方比例称取相应药材，按制备工艺制成膏滋。称取各膏滋适量，按“4.2”项下方法制备阴性样品溶液 A（缺盐益智、黄精、枸杞子、桑葚、酒苁蓉、炙甘草），阴性样品溶液 B（缺盐益智、金樱子、桑葚、枸杞子），阴性样品溶液 C（缺补骨脂），阴性样品溶液 D（缺肉苁蓉）及阴性样品溶液 E（缺甘草）。

4.5　方法学考察

4.5.1　专属性考察　分别取混合对照品溶液、样品溶液、阴性样品溶液进样分析，结果样品中色谱峰保留时间与对照品相应的色谱峰保留时间一致，各峰分离度、对称性较好，各阴性样品对测定无影响，理论塔板数以原儿茶酸计不低于 10 000，色谱图见图 6。

4.5.2　线性关系考察　取“4.3”项下混合对照品溶液，稀释成系列浓度混合对照品溶液，进样测定，记录峰面积，以峰面积（Y）为纵坐标，进样

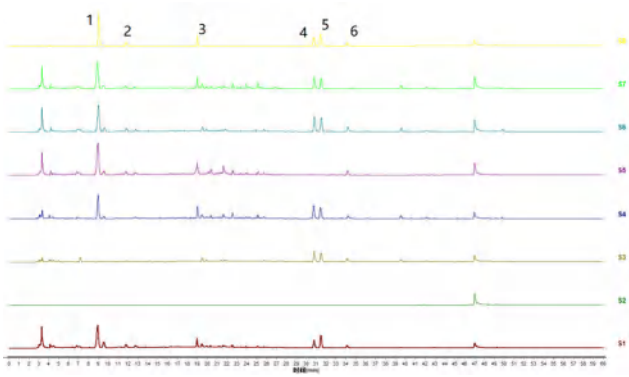


图 6 三方益子膏专属性试验 HPLC 图谱

Fig 6 HPLC chromatogram of specificity test for SanfangYizi ointment

S1. 样品（sample）；S2. 空白（blank）；S3 ～ S7. 阴性样品溶液 A ～ E（negative sample A ～ E）；S8. 混合对照品（mixed control）；1.5-羟甲基糠醛（5-hydroxymethylfurfural）；2. 原儿茶酸（protocatechuic acid）；3. 松果菊苷（pineal glucoside）；4. 补骨脂素（psoralen）；5. 异补骨脂素（iso-psoralen）；6. 甘草酸（glycyrrhetinic acid）

量（X，μg）为横坐标进行线性回归，求得各成分的回归方程，5-羟甲基糠醛：$Y = 2832.16X + 43.45$，$r = 0.9999$；原儿茶酸：$Y = 3129.93X + 3.78$，$r = 0.9999$；松果菊苷：$Y = 1196.98X + 5.68$，$r = 0.9999$；补骨脂素：$Y = 5847.81X + 11.45$，$r = 0.9999$；异补骨脂素：$Y = 5404.57X + 18.96$，$r = 0.9999$；甘草酸：$Y = 804.76X + 2.79$，$r = 0.9999$；5-羟甲基糠醛、原儿茶酸、松果菊苷、补骨脂素、异补骨脂素、甘草酸分别在 0.526 ～ 2.63 μg、0.034 ～ 0.17 μg、0.196 ～ 0.98 μg、0.076 ～ 0.38 μg、0.098 ～ 0.49 μg、0.156 ～ 0.78 μg 与峰面积线性关系良好。

4.5.3 精密度试验 取“4.3”项下混合对照品溶液连续进样 6 次，记录相应的峰面积。结果 5-羟甲基糠醛、原儿茶酸、松果菊苷、补骨脂素、异补骨脂素、甘草酸峰面积的 *RSD* 分别为 0.10%、0.13%、0.080%、0.080%、0.090%、0.060%，显示仪器精密度良好。

4.5.4 重复性试验 准确称取三方益子膏（批号：20201002）6 份，各 3 g，精密称定，按“4.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，结果 5-羟甲基糠醛、原儿茶酸、松果菊苷、补骨脂素、异补骨脂素、甘草酸的平均含量分别为 2.121、0.167、0.843、0.295、0.432、0.658 mg • g^{-1}，*RSD* 分别为 0.50%、1.1%、0.57%、0.38%、0.48%、0.37%，表明该方法的重复性良好。

4.5.5 稳定性试验 按照“4.2”项下方法制备三方益子膏（批号：20201002）供试品溶液，分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，结果 5-羟甲基糠醛、原儿茶酸、松果菊苷、补骨脂素、异补骨脂素、甘草酸含量的 *RSD* 分别为 1.0%、0.84%、1.4%、0.77%、0.76%、0.96%，表明供试品溶液 24 h 内稳定。

4.5.6 加样回收试验 称取三方益子膏（批号：20201002）1.5 g，共 6 份，分别加入适量的 5-羟甲基糠醛、原儿茶酸、松果菊苷、补骨脂素、异补骨脂素、甘草酸对照品，制备成供试品溶液进样测定，结果 5-羟甲基糠醛、原儿茶酸、松果菊苷、补骨脂素、异补骨脂素、甘草酸的平均加样回收率为 101.75%、97.54%、101.90%、97.82%、96.56%、99.11%，*RSD* 分别为 1.2%、2.4%、1.9%、1.6%、1.0%、1.8%。

4.6 样品含量测定

取 S1 ～ S10 样品各 3 g，按“4.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，结果见表 1。10 批三方益子膏中 5-羟甲基糠醛、原儿茶酸、松果菊苷、补骨脂素、异补骨脂素、甘草酸的平均含量分别为 0.863、0.187、2.323、0.145、0.185、0.631 mg • g^{-1}。按照制剂含量测定范围不得低于 80% 计算，10 批三方益子膏中 5-羟甲基糠醛、原儿茶酸、松果菊苷、补骨脂素、异补骨脂素、甘草酸的含量分别不得低于 0.690、0.149、1.858、0.116、0.147 和 0.504 mg • g^{-1}。

表 1 10 批样品的含量测定结果 (mg • g^{-1})

Tab 1 Content determination of 10 batches of samples (mg • g^{-1})

样品	5-羟甲基糠醛	原儿茶酸	松果菊苷	补骨脂素	异补骨脂素	甘草酸
S1	1.004	0.171	2.178	0.139	0.185	0.606
S2	0.802	0.171	2.215	0.137	0.180	0.544
S3	0.904	0.212	2.501	0.150	0.194	0.681
S4	0.808	0.213	2.292	0.135	0.162	0.671
S5	0.883	0.184	2.265	0.153	0.184	0.641
S6	0.791	0.204	2.557	0.154	0.182	0.675
S7	0.898	0.189	2.348	0.159	0.198	0.611
S8	0.853	0.190	2.049	0.147	0.187	0.589
S9	0.802	0.158	2.454	0.147	0.197	0.639
S10	0.889	0.176	2.374	0.134	0.180	0.653
平均值	0.863	0.187	2.323	0.145	0.185	0.631

5 讨论

本研究建立了三方益子膏的薄层鉴别方法，在盐益智、盐补骨脂、乌药、酒苁蓉、炙甘草薄层鉴别的过程中，分别考察了湿度、温度、不同展开剂以及不同薄层板对样品展开的影响，发现环己烷 - 乙酸乙酯（3∶1）、正己烷 - 乙酸乙酯（4∶1）、苯 - 乙酸乙酯 - 甲酸（8∶1.5∶0.1）、醋酸乙酯 - 甲醇 -9% 醋酸溶液（15∶3∶2）、三氯甲烷 - 甲醇 - 水（18∶7∶1）作为盐益智、盐补骨脂、乌药、酒苁蓉、炙甘草的鉴别展开剂，斑点均明亮清晰、分离效果均较好，并且无拖尾现象。在

含量测定方法中，分别考察了甲醇 -0.1% 磷酸水溶液、乙腈 -0.2% 磷酸水溶液、乙腈 -0.1% 磷酸水溶液 4 种流动相，结果在以乙腈 -0.1% 磷酸水溶液为流动相时的峰形与分离度均良好。

本研究对三方益子膏中盐益智、盐补骨脂、乌药、酒苁蓉、炙甘草 5 味药材进行薄层色谱法系统研究，覆盖处方的君臣佐使药，建立了合理、有效的三方益子膏主要成分的薄层鉴别方法；所建立的 HPLC 方法，灵敏度高，准确性好，可作为三方益子膏的定量分析方法，为三方益子膏的质量标准的建立提供依据。

参考文献

[1] 陈凯艺，董幼祺 . 董幼祺运用补肾止遗方治疗小儿遗尿经验 [J]. 中国乡村医药，2021，28（5）：28-29.

[2] 李文兵 . 基于中医“标本兼治”研究益智仁盐炙“温肾缩尿”作用机理 [D]. 成都：成都中医药大学，2013.

[3] 王增绘，付娟，武拉斌，等 . 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的补骨脂盐炙前后化学成分变化研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20（16）：51-55.

[4] 佘志华，文晓柯，吴雅莉 . 不同产地和采收时间乌药药材中有效成分的含量测定 [J]. 中南药学，2013，11（7）：541-544.

[5] 刘明川，钟少达，杨进平，等 . 肉苁蓉提取工艺优化及其神经保护作用的分析 [J]. 中南药学，2019，17（12）：2020-2026.

[6] 成喜雨，郭斌，倪文，等 . 肉苁蓉研究进展 [J]. 天然产物研究与开发，2005，17（2）：235-241，222.

[7] 张利 . 甘草的药理作用及现代研究进展 [J]. 中医临床研究，2014，6（10）：147-148.

[8] 张铁军，白钢，刘昌孝 . 中药质量标志物的概念、核心理论与研究方法 [J]. 药学学报，2019，54（2）：187-196.

[9] 王梅，王越欣，武英茹，等 . 5- 羟甲基糠醛在中药加工过程中的变化及药理作用研究概况 [J]. 药物评价研究，2020，43（11）：2319-2327.

[10] Hou YC，Ching H，Chao PD，et al. Effects of glucose，fructose and 5-hydroxymethyl-2-fμraldehyde on the presystemic metabolism and absorption of glycyrrhizin in rabbits [J]. J Pham Phamracol，2005，57（2）：247-251.

[11] 陈益耀，陈轶，何周桃，等 . 原儿茶酸、白杨素对非酒精性脂肪肝细胞模型的抗氧化作用 [J]. 中西医结合肝病杂志，2018，28（5）：294-296，322.

[12] 由淑萍，赵军，马龙，等 . 肉苁蓉苯乙醇总苷及其单体对肝星状细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 癌变·畸变·突变，2017，29（1）：13-17，22.

[13] 谭鹏，许莉，牛明，等 . 一测多评法同时测定补骨脂中 16 种化学成分的含量 [J]. 中草药，2019，50（16）：3937-3946.

[14] 于力，张蕾，郝志宏，等 . 甘草甜素对大鼠肾小球硬化早期的防护作用 [J]. 中草药，2010，41（2）：250-255.

（收稿日期：2021-10-11；修回日期：2021-11-22）

加校正因子的替代对照品法测定注射用头孢硫脒聚合物

黄财顺，贺凡珍，王乾蕾*（中山市食品药品检验所，广东　中山　528437）

摘要：目的　建立加校正因子的替代对照品法测定注射用头孢硫脒中的聚合物。**方法**　以头孢噻吩作为替代对照品，以紫外吸光系数比值法确定校正因子，以 AKTA Prime LC 高分子杂质分析仪测定聚合物含量；色谱柱：Sephadex G-10 柱（14.0 mm×400 mm）；流动相 A：pH 8.0 的 0.2 mol·L^{-1} 磷酸盐缓冲液 [0.2 mol·L^{-1} 磷酸氢二钠溶液 -0.2 mol·L^{-1} 磷酸二氢钠溶液（61∶39）]，流动相 B：超纯水；检测波长：254 nm；流速：0.9 mL·min^{-1}。**结果**　头孢噻吩对照品在 50 ～ 1000 ng·mL^{-1} 内与峰面积呈良好的线性关系（r = 0.9991），校正因子为 0.7804。**结论**　本方法能较好分离头孢硫脒与其聚合物杂质，为加校正因子的替代对照品法在抗菌药物聚合物定量中的应用做了有益探索。

关键词：聚合物；注射用头孢硫脒；头孢噻吩；校正因子；替代对照品法；紫外吸光系数

中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)06-1417-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.033

基金项目：广东省市场监督管理局科技项目（No.2021CS10）。

作者简介：黄财顺，男，硕士，主管中药师，主要从事化学药品质量控制方面的研究，email：549567264@qq.com　*通信作者：王乾蕾，男，硕士，副主任药师，主要从事食品（保健食品）、药品、化妆品的质量标准研究、非法添加化学物质、危险因子检测研究，email：274762699@qq.com

Determination of polymers in cefathiamidine by substitution of reference substance method with correction factors

HUANG Cai-shun, HE Fan-zhen, WANG Qian-lei* (*Zhongshan Institute of Food and Drug Control, Zhongshan Guangdong* 528437)

Abstract: Objective To establish the substitution of reference substance method with correction factor to determine the polymers in cefathiamidine. **Methods** Cefothiophene was used as the substitute reference substance, correction factor was calculated by ultraviolet absorption coefficient, and polymers were detected by AKTA Prime LC. Molecular exclusion chromatography was performed with Sephadex G-10 (14.0 mm×400 mm) gel column. The mobile phase A was 0.2 mol • L^{-1} phosphate buffer (pH 8.0) and the mobile phase B was water with a flow rate of 0.9 mL • min^{-1}. The detection wavelength was 254 nm. **Results** The cefothiophene was linearity at 50 － 1000 ng • mL^{-1} (r ＝ 0.9991). The correction factor was 0.7804. **Conclusion** This method can well separate cefathiamidine and its polymer impurities. It is a good exploration for the determination of polymers by substitution of reference substance method with correction factors.

Key words: polymer; cefathiamidine for injection; cefothiophene; correction factor; substitution of reference substance method; ultraviolet absorption coefficient

头孢硫脒为我国拥有自主知识产权的第一代头孢菌素，主要用于敏感菌所引起的呼吸系统、肝胆系统、五官、尿路感染和心内膜炎、败血症等[1-2]。但随着应用的增加，其不良反应发生率也逐年上升，需引起重视。抗菌药物临床应用中最常见的不良反应是过敏反应。药物分子本身只是半抗原，药物中存在的高分子聚合物才是引发β-内酰胺类抗菌药物速发型过敏反应的过敏原，严格控制高聚物的含量有着重要意义。

通常情况下，只需控制高分子聚合物的总量，无需鉴别其结构，即可降低不良反应发生率。Sephadex G-10 色谱法可调节药物分子与凝胶介质间的相互作用使高分子杂质和药物分子间的分离良好，适用于聚合物总量的控制。2020 年版《中国药典》现已收载数十种β-内酰胺类抗菌药物高分子杂质的分析方法。某些β-内酰胺类抗菌药物在特定条件下不能完全缔合，无法采用自身对照外标法定量时，可以用结构与之类似，且能够完全缔合的其他药物制备对照品进行外标法定量。如《中国药典》中阿莫西林相关制剂的聚合物分析等[3-7]。

相关研究表明，注射用头孢硫脒现行的部颁标准（方法一）及局颁标准（方法二）中，两种聚合物的测定方法，效果均不理想[8]。两种方法的区别在于方法一采用分子排阻量为 1000 ～ 10 000 的球状亲水硅胶为固定相，方法二采用分子排阻量为 5000 ～ 100 000 的球状亲水硅胶为固定相。方法二灵敏度虽高，但聚合物受分子排阻力的影响，出峰时间较长，甚至在主峰之后而不参与计算，主峰前的色谱峰也未必全是聚合物，因为一般的抗菌药物聚合物分子量为 1000 ～ 5000 Da。方法一灵敏度适中，不同分子量的聚合物被有效分离，但由于注射用头孢硫脒的聚合物总量较低，分离后的聚合物难以检测，时常出现“未检出”的结论。药品质量控制一般只需控制杂质总量，考虑头孢硫脒在水中不能完全缔合，可采用类似于阿莫西林制剂的替代对照品法。但目前确定校正因子的方法没有统一的标准，相关研究表明，用检测波长下的值比值作为校正因子，更直观，更具客观性和可比性[9]。本研究试图通过替代对照品法加校正因子建立符合药品检验要求的注射用头孢硫脒高分子聚合物测定方法。

1 仪器和试药

1.1 仪器

AKTA Prime LC 高分子杂质分析仪（美国通用电气）；岛津 UV-2450 紫外可见分光光度计、岛津 UV-2600 紫外可见分光光度计（日本岛津）；安捷伦 Cary 60 紫外可见分光光度计（美国安捷伦）；XS205DU 型电子天平（梅特勒公司，精度为十万分之一）；超声波清洗器（宁波新芝生物科技股份有限公司）；葡聚糖凝胶色谱柱 Sephadex G-10（14.0 mm×400 mm，大连依利特分析仪器有限公司）。

1.2　试药

注射用头孢硫脒（规格：1.0 g，批号分别为 3201019、3201024、3201030，广州白云山制药厂）；头孢噻吩对照品（纯度：96.1%，批号：130407-200707，中国食品药品检定研究院）；蓝色葡聚糖 2000（Cytiva，批号：10296417）；其他试剂均为色谱纯，实验用水为超纯水。

2　方法和结果

2.1　校正因子的计算

2.1.1　原理　高效液相色谱仪的紫外 / 可见检测器可看作一台紫外 / 可见分光光度计，其响应值也遵循 Lambert-Bee 定律，而峰面积是响应值对时间的积分，将以上结合校正因子公式（$f = W/A$），李聪 [10] 推导出紫外 / 可见检测器上待测物校正因子的表达式：

$$f_i = W_i/A_i = M_iF/\varepsilon_iLf \quad (1)$$

其中，W_i、A_i、M_i 和 ε_i 分别为待测物的量、峰面积、相对分子质量和摩尔吸光系数，F 为流动相流速，L 为检测器光程长度，f 为检测器输出单位。将（1）式代入替代对照品法 [11] 参照物（s）和目标物（m）的相对校正因子公式得：

$$f_{im} = f_i/f_m = W_iA_m/W_mA_i = M_i\varepsilon_m/M_m\varepsilon_i = E_m/E_i \quad (2)$$

（2）式从理论上揭示了固定条件下（波长、温度、溶剂）相对校正因子完全由两物质的特性（吸光系数）决定，为常数。因此，校正因子应以 $E_{1cm}^{1\%}$ 值比值法确定，陈颖等 [9] 验证了这一想法。

2.1.2　测定及计算方法　分别称取头孢噻吩和头孢硫脒对照品适量，配制质量浓度为 15、20、25 μg • mL^{-1} 的对照品溶液，各平行两份，分别在不同型号的紫外分光光度计下测定 254 nm 处吸光度值，每份测试样连续测定 5 次，计算紫外吸收系数 $E_{1cm}^{1\%}$，以紫外吸收系数的比值作为头孢硫脒与头孢噻吩的校正因子。结果见表 1，头孢硫脒和头孢噻吩的校正因子为 0.7804，*RSD* 符合规定。

2.1.3　校正因子的验证方法　分别称取头孢噻吩和头孢唑肟对照品适量，以上述测定方法，计算头孢噻吩与头孢唑肟的校正因子。头孢唑肟峰面积乘以校正因子后，与头孢噻吩峰面积比较，两者的偏差为 1.04%。因此，以紫外吸收系数法确定校正因子是可靠的。

表 1　校正因子的计算

Tab 1　Calculation of correction factor

仪器型号	标准物质浓度 /（μg • mL^{-1}）	校正因子	平均值	*RSD*/%
岛津 UV-2450	15	0.7946	0.7804	0.91
	20	0.7803		
	25	0.7863		
岛津 UV-2600	15	0.7744		
	20	0.7793		
	25	0.7839		
安捷伦 Cary 60	15	0.7794		
	20	0.7728		
	25	0.7730		

2.2　色谱条件

葡聚糖凝胶 G-10 色谱柱（14 mm×400 mm），以 pH 8.0 的 0.2 mol • L^{-1} 磷酸盐缓冲液 [0.2 mol • L^{-1} 磷酸氢二钠 -0.2 mol • L^{-1} 磷酸二氢钠（61∶39），调节 pH 值至 8.0] 为流动相 A，以水为流动相 B，流速 0.9 mol • L^{-1}，检测波长为 254 nm。

2.3　溶液的配制

① 对照品溶液：精密称定头孢噻吩对照品适量，用水溶解并定量稀释，制成 500.0 ng • mL^{-1} 的溶液，作为对照品溶液；② 供试品溶液：取 5 瓶注射用头孢硫脒内容物混匀，精密称取适量（约相当于头孢硫脒 600.0 mg），置 10 mL 量瓶中，加流动相 A 超声溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液为供试品溶液；③ 蓝色葡聚糖 2000 溶液：精密称定蓝色葡聚糖 2000 适量，置 10 mL 量瓶中，加水溶解并定容，制成 1.0 mg • mL^{-1} 的溶液；④ 系统适用性溶液：精密称取注射用头孢硫脒适量（约相当于头孢硫脒 600.0 mg），置 10 mL 量瓶中，用 1.0 mg • mL^{-1} 蓝色葡聚糖 2000 溶液定容至刻度，摇匀。

2.4　系统适用性试验

量取蓝色葡聚糖 2000 溶液 200 μL 注入液相色谱仪，分别用流动相 A、B 进行测定，记录色谱图。按蓝色葡聚糖 2000 峰计算，理论塔板数分别为 1752、858，拖尾因子分别为 1.0、1.4。在流动相 A 和 B 系统中，蓝色葡聚糖 2000 峰保留时间的比值为 1.00，对照品溶液主峰和供试品溶液中聚合物峰与相应色谱系统中蓝色葡聚糖 2000 峰的保留时间的比值均为 0.96，均符合药典对该类抗菌药物中高分子聚合物的测定要求。量取系统适用性溶液 200 μL 注入液相色谱仪，用流动相 A 进行测定，记录色谱图，高聚物的峰高 / 单体与高聚物之间的谷高为 2.1（应＞ 2.0），见图 1。另以 B 为流动相，精密量取对照品溶液 200 μL，连续进样 5 次，峰面积的相对标准偏差为 1.1%（应≤ 2.0%）。

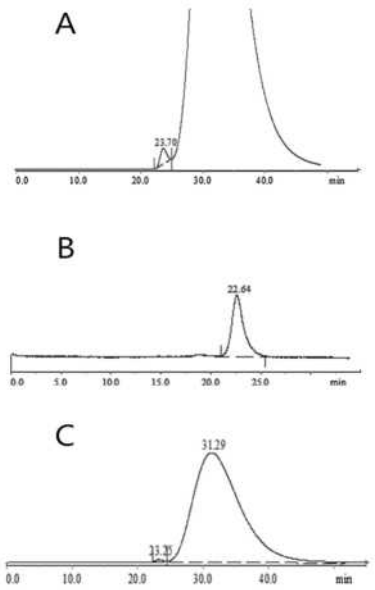


图 1　系统适用性试验

Fig 1　System suitability experiment

A. 峰高谷高比（ratio of peak and valley）；B. 流动相 B 中头孢噻吩对照品溶液色谱图（chromatogram of cefothiophene reference solution in mobile phase B）；C. 流动相 B 中头孢硫脒对照品溶液（缔合不完全）色谱图 [chromatogram of cefathiamidine reference solution（incomplete association）in mobile phase B]

2.5　标准曲线及线性范围

精密称取头孢噻吩对照品 10.0 mg，置 200 mL 量瓶中，用水溶解并稀释至刻度，摇匀。再精密量取上述溶液 10.0 mL，置 100 mL 量瓶中，用水稀释至刻度作为对照品储备溶液。取对照品储备溶液 1.0、1.0、2.0、2.5、5.0、10.0 mL 分别置 100、50、50、50、50、50 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，作为系列标准曲线工作液。取上述系列标准曲线工作液，按“2.1”项下色谱条件测定，以 B 为流动相，以质量浓度（X）为横坐标，峰面积（Y）为纵坐标，绘制标准曲线，得回归方程 $y = 0.0013x + 0.0461$（$r = 0.9991$），头孢噻吩在 50.0 ～ 1000.0 ng • mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好。

2.6　定量限和检测限

取线性最低点溶液逐级稀释，按“2.1”项下色谱条件，以 B 为流动相，确定头孢噻吩的检测限（$S/N = 3$）为 9.870 ng • mL^{-1}；定量限（$S/N = 10$）为 24.67 ng • mL^{-1}。

2.7　样品溶液稳定性

按“2.2”项下方法配制质量浓度为 60 mg • mL^{-1} 的供试品溶液，室温放置，按“2.1”项下色谱条件，以 A 为流动相，记录放置 0、1、2、3、4、20 h 后的色谱图。结果发现 2 h 内聚合物峰面积比较稳定，随后逐渐增大，并以指数形式快速增长，20 h 后增大 4 倍，头孢硫脒的稳定性较差，应溶解后立即进样。

2.8　样品中聚合物含量测定

按“2.3”项下方法配制溶液，按“2.2”项下色谱条件测定 3 批市售注射用头孢硫脒样品中聚合物含量，结果分别为 0.000 294%、0.000 297% 和 0.000 298%。

3　讨论

3.1　色谱条件的优化

传统的凝胶色谱法测定高分子杂质时，会受色谱条件影响，如流动相离子强度、pH 值、流速等，调节以上条件可以改善分离度、拖尾因子、塔板数等，使系统适应性达到要求，建立最优的测定方法 [12-14]。本研究选择水为流动相 B，因为抗菌药物在水中容易形成聚合物；对于流动相 A，作者考察了 pH 值分别为 6.5、7.0、8.0，磷酸盐浓度分别为 0.1、0.2、0.3 mol • L^{-1} 流速分别为 0.8、0.9、1.0 mL • min^{-1} 时聚合物与单体峰的分离情况。结果当 pH 值为 8.0，磷酸盐浓度为 0.2 mol • L^{-1}，流速为 0.9 mL • min^{-1} 时分离情况和峰形最好。分别考察了规格为 400 mm×10.0 mm、300 mm×10.0 mm、400 mm×14.0 mm 的葡聚糖凝胶色谱柱，结果规格为 400 mm×14.0 mm 的分离度最好。

3.2　替代对照品的选择

对照品的选择是关键环节。头孢硫脒在水中缔合不完全，峰形不好，故不能作为自身对照品。首先，筛选范围是《中国药典》2020 年版收录的 β-内酰胺类抗菌药物；其次，配制相同浓度的 9 种抗菌药物水溶液，在紫外 240 ～ 280 nm 下扫描（见图 2），从中筛选出头孢拉定、头孢唑肟和头孢噻吩三者与头孢硫脒有相似吸收，并在 254 nm 附近区域吸收值相近（见图 2）；最后，以头孢拉定、头孢唑肟和头孢噻吩对照品配制相同浓度的水溶液，观察三者在流动相 B 中的保留时间、拖尾因子、理论塔板数、峰形等色谱行为是否符合要求。结果头孢拉定塔板数偏低，头孢噻吩和头孢唑肟符合要求。其中，头孢噻吩的保留时间与头孢硫脒在流动相 A 中的比值为 0.97，头孢唑肟为 0.95，故头孢噻吩为最佳选择。

3.3　与文献结果对比

本文建立的自身对照外标法，用两种流动相测定头孢硫脒聚合物的研究暂未见报道，但相关文献的测得结果有参考价值。晏会根 [15] 以

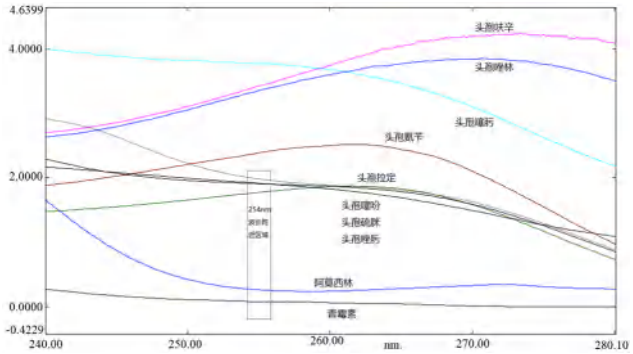


图 2　9 种抗菌药物的 240 ～ 280 nm 紫外扫描图

Fig 2　Ultraviolet scan of 9 antibiotics of 240 ～ 280 nm

高效分子排阻色谱法测得头孢硫脒聚合物含量为 0.26% ～ 0.30%，胡卫国等[16]以 2D-LC-IT-TOF /MS 联用 Cef-SEC 法测得头孢硫脒聚合物含量为 0.31% ～ 0.56%，与本文测定结果有一定差距，是由测定方法差异所导致的。以球状亲水硅胶为固定相的 TSK 法测得聚合物含量一般比《中国药典》的 G-10 色谱法高[17-18]，原因可能是对照品在水中形成的缔合物与样品中的聚合物只是结构相似，并不是真正意义上的对照品，两者的响应值有差异。但只要科学设定聚合物限值，就不会影响该方法的使用。如《中国药典》中头孢唑林钠的聚合物限值设定为 0.04%，头孢替唑钠为 0.05%，其他 β- 内酰胺类抗菌药物的限值一般在 0.1% ～ 0.5%，实际检验中经常出现 0.01% 以下的测定结果。

3.4　展望

目前，《中国药典》采用自身对照外标法测定聚合物含量，以药物自身为对照，非杂质本身。这是因为药物自身在水中形成的缔合物与样品中的聚合物有相似的色谱行为，可将缔合物视为聚合物的“对照品”。但大部分抗菌药物在水中都可以形成稳定的缔合物，不一定要用药物自身作为对照。头孢类药物分子结构相似，在水中形成的缔合物结构和响应值均有相似性，一定条件下是可以相互替代的，但要确定合适的校正因子。本文为此方面的研究提供了有益探索。

4　小结

注射用头孢硫脒中的聚合物含量较低，若不考虑质谱联用等高端却难以推广的检测手段，本研究所述加校正因子的替代对照品法是比较好的选择，适用于聚合物总量的控制，建议采用该方法对产品进行质量监管。

参考文献

[1] 彭洁，洪建文，肖慧，等 . HPLC 法测定注射用头孢硫脒有关物质 [J]. 中国抗生素杂志，2015，40（11）：831-835.

[2] 江晓玲，刘昆，邓俊丰，等 . 头孢菌素类抗菌药物中高分子杂质的研究进展 [J]. 国外医药抗生素分册，2007，28（6）：264-269.

[3] 陈宁，蔡逸筠 . 盐酸头孢吡肟中高分子聚合物含量测定方法学研究 [J]. 广东药学院学报，2011，27（6）：613-616.

[4] 刘珊，洪利娅 . 盐酸头孢唑兰高分子聚合物的测定 [J]. 中国卫生检验杂志，2014，24（3）：321-323.

[5] 臧洪梅 . 头孢羟氨苄高分子聚合物检查方法的建立与验证 [J]. 中国抗生素杂志，2010，35（6）：450-461.

[6] 牛冲，谢元超，姜俊，等 . 凝胶色谱法测定注射用硫酸头孢匹罗高分子杂质 [J]. 中国药品标准，2008，9（6）：437-439.

[7] 陈颖，廖惠惠，杨帆 . 凝胶色谱法测定注射用盐酸头孢吡肟中的高分子杂质 [J]. 广东药学院学报，2007，23（6）：663-664.

[8] 崇小萌，田冶，姚尚辰，等 . 注射用头孢硫脒聚合物检测方法比较及聚合物杂质分析 [J]. 中国新药杂志，2021，30（14）：1334-1339.

[9] 陈颖，伍善广，廖惠惠，等 . β- 内酰胺类抗菌药物高分子杂质控制研究中常见问题的探讨 [J]. 解放军药学学报，2014，30（6）：576-578.

[10] 李聪 . 紫外检测器定量校正因子的性质与实用性探讨 [J]. 色谱，1990，8（4）：254-256.

[11] 许佳，金红宇，孙磊 . 替代对照品法测定龙血竭原料中龙血素 A 和 B 的含量 [J]. 药物分析杂志，2011，31（11）：2058-2062.

[12] 高丹玲，江祥枝 . Sephadex G-10 凝胶色谱系统分析头孢西丁钠的高分子聚合物 [J]. 海峡药学，2004，16（4）：42-44.

[13] 高丹玲，林怡 . 葡聚糖凝胶柱层析法分离测定头孢尼西钠中的聚合物 [J]. 中国药事，2006，20（8）：493-495.

[14] 汪梅，朱美容，钟雅妮，等 . 注射用头孢匹胺钠中头孢匹胺聚合物的测定 [J]. 现代食品与药品杂志，2007，17（2）：46-48.

[15] 晏会根 . 高效分子排阻色谱法测定头孢硫脒聚合物含量 [J]. 海峡药学，2010，22（3）：62-64.

[16] 胡卫国，韩彬，胡利敏，等 . 2D-LC-IT-TOF /MS 联用 Cef-SEC 法鉴定注射用头孢硫脒中高分子杂质 [J]. 中国药品标准，2020，21（5）：429-434.

[17] 武少馨，张冬，李香荷，等 . 高效分子排阻色谱法测定头孢曲松钠原料药中的聚合物 [J]. 中国药房，2015，6（6）：825-827.

[18] 王成刚，周立春，王俊秋 . 高效分子排阻色谱法分析注射用头孢噻吩钠中的高分子杂质 [J]. 中国药品标准，2010，11（5）：340-342.

（收稿日期：2021-10-24；修回日期：2021-12-01）

反相高效液相色谱法同时测定清泻丸中 8 种成分的含量

蒋范任[1]，王玮[1]，肖正贤[1]，高洪琳[1]，刘小芬[2*]，蔡洪鲲[2*]（1. 益阳市食品药品检验所，湖南 益阳 413000；2. 益阳医学高等专科学校，湖南 益阳 413000）

摘要：目的 建立反相高效液相色谱法同时测定清泻丸中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量。**方法** 采用 Luna C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱，以乙腈（A）-0.1% 磷酸水溶液（B）为流动相，梯度洗脱 [0 ～ 7 min（16%A），7 ～ 8 min（16% ～ 21%A），8 ～ 27 min（21% ～ 43%A），27 ～ 28 min（43% ～ 48%A），28 ～ 45 min（48% ～ 77%A），45 ～ 46 min（77% ～ 16%A），46 ～ 60 min（16%A）]；检测波长：274 nm；流速：1.0 mL • min^{-1}。**结果** 黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量浓度分别在 4.530 ～ 226.5、0.520 ～ 26.00、0.330 ～ 16.50、0.210 ～ 10.50、0.810 ～ 40.50、0.390 ～ 19.50、1.020 ～ 51.00、0.500 ～ 25.00 μg • mL^{-1} 与峰面积呈良好的线性关系，平均回收率（n = 6）分别为 99.1%、98.7%、101.2%、99.5%、101.0%、100.9%、99.0%、101.1%，*RSD* 分别为 1.3%、1.4%、1.1%、1.8%、1.0%、1.5%、1.8%、0.90%。**结论** 该方法简便、准确、重复性好，可用于清泻丸的质量控制。

关键词：清泻丸；黄芩苷；汉黄芩苷；黄芩素；汉黄芩素；大黄酸；大黄素；大黄酚；大黄素甲醚；反相高效液相色谱法

中图分类号：R917，R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1422-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.034

Simultaneous determination of 8 components in Qingxie pills by RP-HPLC

JIANG Fan-ren[1], WANG Wei[1], XIAO Zheng-xian[1], GAO Hong-lin[1], LIU Xiao-fen[2*], CAI Hong-kun[2*] (1. *Yiyang Institute for Food and Drug Control*, *Yiyang Hunan* 413000; 2. *Yiyang Medical College*, *Yiyang Hunan* 413000)

Abstract: Objective To establish a reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method to determine baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin, rhein, emodin, chrysophanol and physcion in Qingxie pills simultaneously. **Methods** Luna C_{18} chromatographic column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used with acetonitrile (A)-0.1% phosphoric acid aqueous solution (B) as the mobile phase in gradient elution [0 － 7 min (16%A), 7 － 8 min (16% － 21%A), 8 － 27 min (21% － 43%A), 27 － 28 min (43% － 48%A), 28 － 45 min (48% － 77%A), 45 － 46 min (77% － 16%A), 46 － 60 min (16%A)]. The detective wavelength was 274 nm and the flow rate was 1.0 mL • min^{-1}. **Results** There was a good linearity between the peak area value and concentration of baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin, rhein, emodin, chrysophanol and physcion at 4.530 － 226.5, 0.520 － 26.00, 0.330 － 16.50, 0.210 － 10.50, 0.810 － 40.50, 0.390 － 19.50, 1.020 － 51.00, and 0.500 － 25.00 μg • mL^{-1}. The average recoveries (n = 6) of the 8 components were 99.1%, 98.7%, 101.2%, 99.5%, 101.0%, 100.9%, 99.0%, and 101.1%. The *RSDs* were 1.3%, 1.4%, 1.1%, 1.8%, 1.0%, 1.5%, 1.8%, and 0.90%, respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, which can be used for the quality control of Qingxie pills.

Key words: Qingxie pill; baicalin; wogonoside; baicalein; wogonin; rhein; emodin; chrysophanol; physcion; RP-HPLC

作者简介：蒋范任，男，副主任药师，主要从事药品质量分析及质量控制标准研究，email：736466980@qq.com *通信作者：刘小芬，女，副教授，主要从事药品质量分析标准研究及教学，email：13274884@qq.com；蔡洪鲲，男，副主任药师，主要从事药品质量分析标准研究，email：43014190@qq.com

清泻丸是由大黄、黄芩、枳实、甘草、朱砂粉 5 味中药组成的成方制剂，收载于《中国药典》2020 年版一部，具有清热、通便、消滞的作用，用于实热积滞所致的大便秘结[1]。随着现代分析技术的快速发展，中药质量控制方法已有长足的进步，其中化学成分的含量测定已经成为中药质量控制的重要方法，并且由单一成分逐渐发展到对多种成分的含量进行控制，通常采用高效液相色谱外标法测定各成分的含量。目前，清泻丸收载于《中国药典》2020 年版一部，药典标准中仅有朱砂粉及蒽醌类成分大黄素和大黄酚的含量测定。为进一步完善清泻丸的质量控制方法，本研究参考相关文献资料[2-15]，建立了 RP-HPLC 法同时测定清泻丸中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量，现报道如下。

1 仪器与试药

电子天平 XSE205DU（Mettler Toledo，d = 0.01 mg）；LC-20AT 高效液相色谱仪（SPD-M20A 检测器，SIL-20A 进样器，日本岛津）；KQ-300DE 中文液晶台式超声波清洗器（昆山美美超声仪器有限公司）。

对照品黄芩苷（批号：110715-202122，纯度：94.2%）、汉黄芩苷（批号：112002-201702，纯度：98.5%）、黄芩素（批号：111595-201808，纯度：97.9%）、汉黄芩素（批号：PR160215-08，纯度：100%）、大黄酸（批号：110757-201607，纯度：99.3%）、大黄素（批号：110756-201913，纯度：96.0%）、大黄酚（批号：110796-201922，纯度：99.4%）、大黄素甲醚（批号：110758-201817，纯度：99.2%）（中国食品药品检定研究院）；清泻丸（批号：A03055M、B03004M、B03014M、B03027M、B03009M、B03026M、B03023M，广州白云山中一药业有限公司，规格：5.4 g/ 袋）；乙腈（色谱纯）、甲醇（分析纯）、磷酸（分析纯）（美国 Honeywell）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Luna C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm），乙腈为流动相 A，0.1% 磷酸水溶液为流动相 B，梯度洗脱 [0 ～ 7 min（16%A），7 ～ 8 min（16% ～ 21%A），8 ～ 27 min（21% ～ 43%A），27 ～ 28 min（43% ～ 48%A），28 ～ 45 min（48% ～ 77%A），45 ～ 46 min（77% ～ 16%A），46 ～ 60 min（16%A）]；检测波长：274 nm，流速：1.0 mL·min^{-1}，柱温：35 ℃，进样量：10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取各对照品适量，加甲醇溶解并稀释成含黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚分别为 0.453、0.052、0.033、0.021、0.081、0.039、0.102、0.050 mg·mL^{-1} 的混合对照品储备液。精密吸取混合对照品储备液 0.1、0.2、0.5、1、2、3、5 mL 分别置 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，制成系列质量浓度的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取供试品（批号：A03055M），粉碎，取 0.3 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加甲醇 100 mL，密塞，称定重量，超声（功率 200 W，40 kHz）30 min，放冷，再称定重量，用甲醇溶液补足减失的重量，摇匀，滤过，即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按清泻丸制备工艺，制备不含大黄、黄芩及不含大黄和黄芩药材的阴性样品，按“2.2.3”项下方法制备阴性样品溶液。

2.3 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下系列混合对照品溶液 10 μL，进样分析，以峰面积 *Y* 为纵坐标，对照品质量浓度 *X*（μg·mL^{-1}）为横坐标绘制标准曲线，得到各对照品回归方程，结果见表 1。

表 1 各成分的线性关系考察结果

Tab 1 Linearity of each component

成分	回归方程	*r*	线性范围 /（μg·mL^{-1}）
黄芩苷	$Y = 2.08\times10^4X + 6.64\times10^2$	0.9999	4.530 ～ 226.5
汉黄芩苷	$Y = 4.56\times10^4X - 8.04\times10^2$	0.9999	0.520 ～ 26.00
黄芩素	$Y = 4.61\times10^4X - 2.70\times10^3$	1.0000	0.330 ～ 16.50
汉黄芩素	$Y = 6.15\times10^4X - 3.03\times10^3$	0.9998	0.210 ～ 10.50
大黄酸	$Y = 2.30\times10^4X - 2.39\times10^3$	1.0000	0.810 ～ 40.50
大黄素	$Y = 7.93\times10^4X - 2.67\times10^3$	0.9999	0.390 ～ 19.50
大黄酚	$Y = 4.12\times10^4X + 1.68\times10^3$	1.0000	1.020 ～ 51.00
大黄素甲醚	$Y = 3.75\times10^4X - 1.48\times10^4$	0.9999	0.500 ～ 25.00

2.4 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液，连续进样 6 次，结果黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 *RSD* 分别为 0.54%、0.63%、0.83%、0.65%、0.66%、0.53%、0.75%、0.51%，表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取供试品（批号：A03055M），按“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液，在 0、1、3、6、9、12、24、36、48 h 分别进样，结果黄芩苷、汉黄

芩苷、黄芩素、汉黄芩素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的 *RSD* 分别为 0.64%、0.51%、0.94%、0.76%、0.62%、0.58%、0.72%、0.83%，表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.6 重复性试验

取同一供试品（批号：A03055M）6 份，分别按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液，进样测定，黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的平均含量分别为 18.16、1.991、1.175、0.586、2.922、1.235、3.610、1.531 mg•g^{-1}，*RSD* 值分别为 1.5%、0.71%、1.3%、1.5%、0.90%、0.35%、0.49%、0.95%，表明方法重复性良好。

2.7 回收试验

取已知黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚含量分别为 18.16、1.991、1.175、0.586、2.922、1.235、3.610、1.531 mg • g^{-1} 的供试品约 0.15 g，共 6 份，精密称定，置具塞锥形瓶中，分别精密加入混合对照品储备液 5 mL，精密加甲醇 100 mL，密塞，称定重量，超声处理（功率 200 W，40 kHz）30 min，放冷，再称定重量，用甲醇溶液补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，制得加样回收供试品溶液，进样测定，结果黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的平均回收率（n = 6）分别为 99.1%、98.7%、101.2%、99.5%、101.0%、100.9%、99.0%、101.1%，*RSD* 分别为 1.3%、1.4%、1.1%、1.8%、1.0%、1.5%、1.8%、0.90%。

2.8 专属性试验

分别取混合对照品溶液、阴性样品溶液、供试品溶液进样测定，结果显示阴性样品色谱中，在与对照品及供试品色谱对应保留时间处无相应的色谱峰，表明方法专属性良好，见图 1。

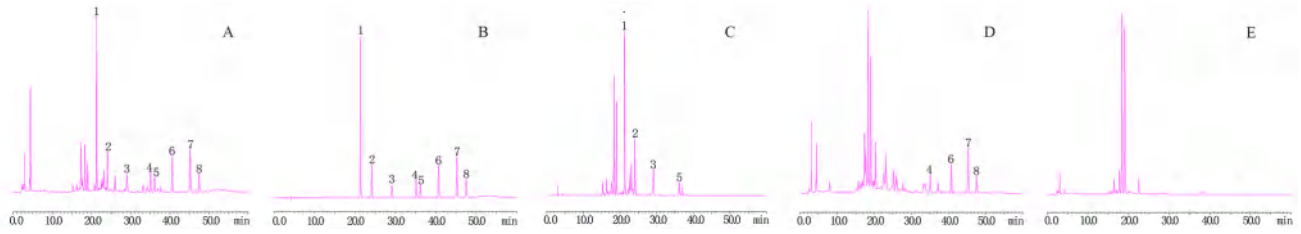


图 1 供试品（A）、混合对照品（B）、缺大黄阴性样品（C）、缺黄芩阴性样品（D）、总阴性样品（E）溶液的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of sample（A），mixed reference（B），negative sample without Rhei Radix Et Rhizoma（C），negative sample without Scutellariae Radix（D）and negative sample（E）

1. 黄芩苷（baicalin）；2. 汉黄芩苷（wogonoside）；3. 黄芩素（baicalein）；4. 大黄酸（rhein）；5. 汉黄芩素（wogonin）；6. 大黄素（emodin）；7. 大黄酚（chrysophanol）；8. 大黄素甲醚（physcion）

2.9 耐用性试验

分别采用 Luna C_{18}、Gemini-NX C_{18}、Kromasil C_{18} 色谱柱，取供试品（批号：A03055M）按“2.2.2”项下方法制备，分别进样。用不同色谱柱记录的色谱图中待测组分的色谱峰与相邻色谱峰之间的分离度均大于 1.5。不同色谱柱测得供试品中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚平均含量的 *RSD* 分别为 0.25%、0.54%、1.2%、1.7%、0.96%、0.38%、0.70%、0.51%，结果表明色谱柱类型对含量测定结果影响较小。

2.10 供试品的含量测定

取 7 批供试品，按“2.2.2”项下方法制备，平行测定 3 次，记录峰面积，结果见表 2。

3 讨论

3.1 波长的选择

通过二极管阵列检测器（DAD）在 200 ～ 400 nm 波长下扫描分析各成分的紫外光谱图，结果显示黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚分别在 276、273、274、274、258、266、277、266 nm 波长处有最大吸收，其中 274 nm 处 8 种成分的吸收峰高度接近，峰形较好，因此选用 274 nm 波长作为检测波长。

3.2 提取溶剂的考察

分别考察用水、不同浓度的甲醇（10%、50%、75%、100%）和乙醇（10%、50%、75%、100%）等作为提取溶剂，超声处理（200 W，40 kHz）30 min 的提取效果，发现用 100% 甲醇作为提取溶剂时各组分的含量最高，因此，选用 100% 甲醇作为提取溶剂能够提取完全，且溶液的稳定性较好。

3.3 提取方法的考察

分别采用超声处理、浸置过夜、加热回流 1

表 2　样品含量测定 (mg・g^{-1}，n = 3)

Tab 2　Determination of sample (mg・g^{-1}，n = 3)

样品批号	黄芩苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
A03055M	18.16	1.991	1.175	0.586	2.922	1.235	3.610	1.531
B03004M	14.67	1.734	1.333	0.720	2.650	1.284	3.166	1.464
B03014M	18.23	2.109	1.398	0.747	2.969	1.338	3.467	1.545
B03027M	17.86	1.897	1.205	0.569	2.892	1.199	3.693	1.474
B03009M	17.45	1.691	1.255	0.546	2.795	1.195	3.376	1.501
B03026M	18.07	1.872	1.144	0.606	2.812	1.267	3.550	1.447
B03023M	17.40	1.890	1.275	0.597	2.822	1.253	3.421	1.486

h，发现超声处理、浸置过夜制得供试品中各组分含量均较加热回流高，放置过夜处理供试品耗时长，而超声处理（200 W，40 kHz）30 min，操作简单，快速，方便，可以常温操作，因此，超声处理（200 W，40 kHz）30 min 作为该供试品的提取方法。

3.4　*流动相的选择*

采用梯度洗脱，分别考察了甲醇 -0.1% 磷酸、乙腈 -0.1% 磷酸、甲醇 - 水、乙腈 - 水等不同流动相系统，发现甲醇 - 水、乙腈 - 水等不含酸系统部分组分的峰形不好，有拖尾现象，在含酸系统中能很好地分离并能改善无酸系统的拖尾现象，其中乙腈 -0.1% 磷酸较甲醇 -0.1% 磷酸系统柱压低且出峰时间适中，因此该研究采用乙腈 -0.1% 磷酸为流动相。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：1671-1672.

[2] 胡晋娟，凌向阳 . HPLC 测定清泻丸中大黄素、大黄酚的含量 [J]. 广西中医学院学报，2009，12（1）：53-55.

[3] 丘文珍 . HPLC 法测定清泻丸中黄芩苷的含量 [J]. 中草药 2002，33（6）：512-513.

[4] 樊点莲，张涛 . 清泻丸中 4 种游离蒽醌含量的同步测定 [J]. 中国药物与临床，2015，15（9）：1353-1354.

[5] 叶刚，杨锐 . 一测多评法测定清泻丸中 4 种蒽醌类成分的含量 [J]. 中药材，2014，37（7）：1276-1278.

[6] 胡淑萍，周新蓓，欧阳荣，等 . 高效液相色谱法测定如意金黄散中大黄素、大黄酚的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志，2003，9（2）：19-20.

[7] 蔡洪鲲，刘小芬，蒋范任，等 . RP-HLPC 法同时测定藿香正气水中 6 种有效成分的含量 [J]. 中南药学，2014，12（6）：577-581.

[8] 蒋范任，蔡洪鲲，周翀，等 . 反相高效液相色谱法同时测定栀子金花丸中栀子苷、小檗碱、黄芩苷、大黄酸、大黄素、大黄酚的含量 [J]. 中南药学，2015，15（2）：172-176.

[9] 李云霞，郭艳玲，段树卿，等 . 新健胃片质量控制方法的研究 [J]. 药物分析杂志，2014，34（1）：163-168.

[10] 胡小祥，陈新明，何艳，等 . HPLC 法同时测定通窍耳聋丸中 7 个成分的含量 [J]. 药物分析杂志，2021，41（8）：1381-1388.

[11] 王文涛，曹晓燕，胡苏莹，等 . 不同产地黄芩中 5 个黄酮类成分的比较分析 [J]. 中药材，2021，44（7）：1381-1388.

[12] 许学丽，宋迪，王洪明，等 . HPLC 同时测定炎可宁片中 9 种成分的含量 [J]. 食品与药品，2020，22（6）：490-494.

[13] 王晓月，鲁婧，尹江涛，等 . HPLC 法同时测定黄芩射干汤中 8 种有效成分的含量 [J]. 中华中医药学刊，2021，39（3）：148-150.

[14] 曾浩洋，王莉，阿不拉江・克依木，等 . 高效液相色谱法同时测定新疆宽裂龙蒿中 3 种香豆素含量 [J]. 中南药学，2020，18（6）：990-993.

[15] 蔡洪鲲，刘小芬，蒋范任，等 . 反相高效液相色谱法同时测定归脾丸（浓缩丸）中甘草苷、阿魏酸、甘草酸铵、去氢木香内酯的含量 [J]. 中南药学，2014，12（12）：1242-1245.

（收稿日期：2022-01-06；修回日期：2022-02-22）

超高效液相色谱 - 四极杆线性离子阱串联质谱法测定他达拉非原料药中潜在基因毒性杂质的含量

刘家兴[1]，李丽美[1]，杨庆云[1]，臧清策[1]，吴松[1]，张瑞萍[1*]，再帕尔·阿不力孜[1, 2]（1. 中国医学科学院/北京协和医学院药物研究所 天然药物活性物质与功能国家重点实验室，北京 100050；2. 中央民族大学 生物成像与系统生物学研究中心，北京 100081）

摘要：目的 建立超高效液相色谱 - 四极杆线性离子阱串联质谱法测定他达拉非原料药中潜在的基因毒性合成工艺杂质 T2 的含量。**方法** 采用 Waters ACQUITY UPLC-AB SCIEX QTRAP 5500 液质联用仪，ACQUITY UPLC HSS T3（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）色谱柱，以 0.02 mol·L^{-1} 乙酸铵（含 0.1% 乙酸）- 乙腈为流动相进行梯度洗脱，流速 0.35 mL·min^{-1}，进样量 5 μL，柱温 25 ℃。ESI 正离子多反应监测（MRM）模式测定，离子对为 *m/z* 427.1 → 135.0，外标法定量。**结果** 该杂质在 0.10 ～ 80 ng·mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好。检测限和定量限分别为 25 pg·mL^{-1} 和 80 pg·mL^{-1}，加样回收率在 90% ～ 110%，精密度、稳定性试验的 *RSD* 值均小于 10%，说明该方法适用于他达拉非潜在基因毒性杂质 T2 的检测。含量测定结果显示，TDLF01、TDLF02 原料药中 T2 杂质含量低于检测限，符合毒理学关注阈值的要求。**结论** 该方法快速、灵敏、准确，可用于他达拉非原料药中潜在基因毒性杂质 T2 的含量测定。

关键词：超高效液相色谱 - 四极杆线性离子阱串联质谱法；他达拉非；基因毒性杂质；含量测定
中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1426-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.035

Determination of genotoxic impurity in tadalafil raw materials by UPLC-q/LIT-MS

LIU Jia-xing[1], LI Li-mei[1], YANG Qing-yun[1], ZANG Qing-ce[1], WU Song[1], ZHANG Rui-ping[1*], Zeper Abliz[1, 2] (1. *State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines*, *Institute of Materia Medica*, *Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College*, *Beijing* 100050; 2. *Centre for Bioimaging and System Biology*, *Minzu University of China*, *Beijing* 100081)

Abstract: Objective To establish an UPLC-q/LIT-MS method for the determination of intermediate impurity T2 produced in the synthesis of tadalafil raw materials. **Methods** The separation was operated on an ACQUITY UPLC HSS T3 column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) with 0.02 mol·L^{-1} ammonium acetate including 0.1% acetic acid (A) and acetonitrile (B) as the mobile phase at Waters ACQUITY UPLC-AB SCIEX QTRAP 5500 platform. The flow rate was 0.35 mL·min^{-1}. The injection volume was 5 μL. The column temperature was 25 ℃ and the data were acquired in ESI positive ion mode. The scan mode was MRM and the quantitative transition was *m/z* 427.1 → 135.0. **Results** The linear concentration range was from 0.10 to 80 ng·mL^{-1}, the limit of detection was 25 pg·mL^{-1} and the limit of qualification was 80 pg·mL^{-1}. The average recovery was at 90% ～ 110%. The *RSD* of precision and stability was less than 10%. The content of T2 impurities in TDLF01 and TDLF02 was below the limit of detection, which met the TTC threshold. **Conclusion** The method is fast, sensitive and accurate, which can reliably control the quality of the intermediate impurity in tadalafil raw materials.
Key words: UPLC-q/LIT-MS; tadalafil; genotoxic impurity; content quantification

基金项目：中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目（No. 2016-I2M-3-010）。
作者简介：刘家兴，男，硕士研究生，主要从事药物分析研究，email：liujiaxing0925@outlook.com *通信作者：张瑞萍，女，研究员，博士研究生导师，主要从事药物分析及代谢组学研究，email：rpzhang@imm.ac.cn

他达拉非（tadalafil，TDF），化学名：6-（1，3-苯间二氧戊环-5-基）-2，3，6，7，12，12a-六氢化-2甲基-（6R，12aR）-吡嗪并[1'2'：1，6]吡啶并[3，4-b]吲哚-1，4-二酮，可以特异性长效抑制磷酸二酯酶5（PDE5），是一种非激素类抗男性勃起功能障碍（ED）药，与其他治疗ED的药物相比，该药具有活性高、不良反应少、半衰期长等优点[1]。他达拉非于2003年11月在美国上市，2005年5月在中国上市[2]。他达拉非的化合物专利ZL95192078.2已于2015年1月到期，所以研究突破专利的新工艺对于他达拉非仿制药在中国上市具有重要价值，迫切需要开展他达拉非仿制药的质量控制方法研究。

文献报道的他达拉非的合成路线主要有7条[2-3]，其工业化生产路线是以*D*-色氨酸甲酯盐酸盐为起始原料，与胡椒醛进行Pictet-Spengler反应后再经酰化反应、亲核取代及关环反应制得他达拉非（见图1）[4]。其中，（1*R*，3*R*）-1-（1，3-苯并二氧戊环-5-基）-2-（2-氯乙酰基）-1，2，3，4-四氢-9H-吡啶并[3，4-b]吲哚-3-羧酸甲酯（T2），是基于该路线合成他达拉非过程产生的中间体物质，作为合成他达拉非最后一步反应的原料，不可避免会作为杂质存在于终产品中。

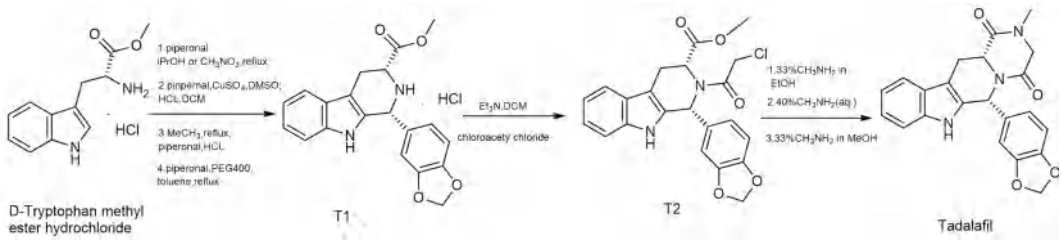


图1　他达拉非工业合成路线

Fig 1　Industrial synthetic route of tadalafil

该杂质结构中含有羰基取代的卤代烷基，该基团不仅具有强吸电子特性，还具有强电负性，会产生具有强亲电性的碳原子，易与DNA等生物大分子发生烷基化反应，被纳入欧盟发布的具有基因毒性的警示结构[5]。本课题组采用欧盟委员会的欧洲化学品局联合研究中心（Joint Research Centre of European Chemicals Bureau）开发的免费毒性预测平台Toxtree（http：//toxtree.sourceforge. net/）进一步预测T2的致癌性和遗传毒性，评价结果为阳性，按照2020年版《中国药典》四部通则9306遗传毒性杂质控制指导原则，T2属于第3类杂质，需要进行毒理学关注阈值限度控制以及进一步的毒理学实验评价。本研究旨在建立一种基于UPLC-q/LIT-MS技术的专属性强、灵敏度高的他达拉非原料药中潜在基因毒性杂质T2的定量测定方法。

1　仪器与试药

分析天平（XPE205，Mettler Toledo，USA）；ACQUITY UPLC超高效液相色谱仪（Waters，USA）；四极杆-线性离子阱串联质谱仪（QTRAP 5500，AB SCIEX，USA）；四极杆-飞行时间串联质谱仪（Triple TOF 5600＋，AB SCIEX，USA）；涡旋混合器（MS3，IKA）；单通道微量移液器（Eppendorf，USA）；Captiva 96孔板过滤装置（Agilent，USA）；杂质对照品（自制）；他达拉非原料药（批号分别为TDLF01、TDLF02，自制）；甲醇、乙腈（LC-MS纯，Fisher）；乙酸铵（分析纯，Sigma）；其余试剂为分析纯；水为娃哈哈纯净水。

2　方法与结果

2.1　分析条件

2.1.1　色谱条件　采用ACQUITY UPLC HSS T3柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）；流动相A为0.02 mol·L^{-1}乙酸铵溶液（含0.1%乙酸），流动相B为乙腈，梯度洗脱（0～1 min，70%→21% A；1～6.5 min，21%→20%A；6.5～8 min，20%→70%A）；流速：0.35 mL·min^{-1}；柱温：25 ℃；进样量：5 μL。

2.1.2　质谱条件　四极杆-线性离子阱串联质谱仪、四极杆-飞行时间串联质谱仪，配有TurboIonspray（ESI）离子源及Analyst1.5.1分析软件。所使用的各种气路均为氮气。离子源温度500 ℃；离子源喷射电压5.0 kV；雾化气压力50 psi；辅助气压力50 psi；气帘气压力25 psi。定量分析采用Multiquant 3.0.3软件进行数据处理。

2.1.3　目标离子的选择　采用Triple TOF 5600＋质谱仪正离子检测模式在*m/z* 100～500内全扫描，采集得到的杂质中间体的MS^2质谱图如图2所示。采用QTRAP 5500质谱仪的MRM模式进

行定量数据采集，用于杂质定量测定的离子对为 *m/z* 427.1 → *m/z* 135.0，去簇电压为 80 V，碰撞能量为 30 eV。

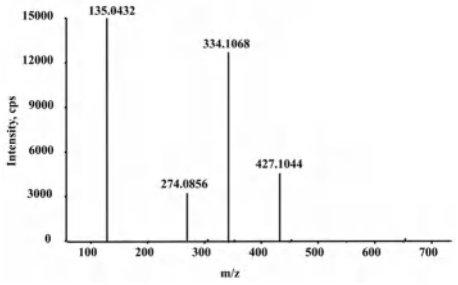


图 2 杂质中间体的 MS/MS 质谱图

Fig 2 MS/MS spectrum of the genotoxic impurity

2.2 溶液制备

2.2.1 杂质对照品储备溶液配制 精密称取杂质对照品适量于量瓶中，加乙腈超声溶解并定容，摇匀，配制成 1 mg • mL^{-1} 的杂质对照品储备液。

2.2.2 原料药供试品溶液配制 分别精密称取他达拉非原料药 TDLF01 供试品 3 份，每份 10 mg，置于 10 mL 量瓶中，加乙腈超声溶解，并定容至刻度，摇匀，配制成 1 mg • mL^{-1} 的原料药供试品储备液一。

分别精密称取他达拉非原料药 TDLF02 供试品 3 份，每份 5 mg，置于 5 mL 量瓶中，加乙腈超声溶解，并定容至刻度，摇匀，配制成 1 mg • mL^{-1} 的原料药供试品储备液二。

分别稀释上述原料药供试品储备液至含他达拉非 5.00 μg • mL^{-1}，作为杂质含量测定的原料药供试品溶液。

2.3 *方法学考察*

2.3.1 专属性考察 分别将空白溶剂、杂质对照品储备溶液、原料药供试品溶液进样测定，得到 XIC 色谱图如图 3 所示。杂质中间体的保留时间在 3.08 min 左右，空白溶剂与待测样品中均没有干扰杂质中间体含量测定的物质存在，专属性良好。

2.3.2 线性试验 精密量取杂质对照品储备液，用乙腈稀释制成 0.10、0.50、0.80、1.0、5.0、8.0、10、50 和 80 ng•mL^{-1} 系列对照品溶液，依次进样。以峰面积为纵坐标，质量浓度为横坐标，绘制标准曲线，得回归方程 $Y = 9.25\times10^{3}X + 238$（$r = 0.9996$）。结果表明，中间体化合物在 0.10 ～ 80 ng • mL^{-1} 内与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.3 检测限与定量限 取 0.10 ng • mL^{-1} 的对照品溶液，逐级稀释，依次进样，以 *S/N* = 3 时的浓度为检测限，检测限为 25 pg • mL^{-1}，*S/N* = 10 时的浓度为定量限，定量限为 80 pg • mL^{-1}。

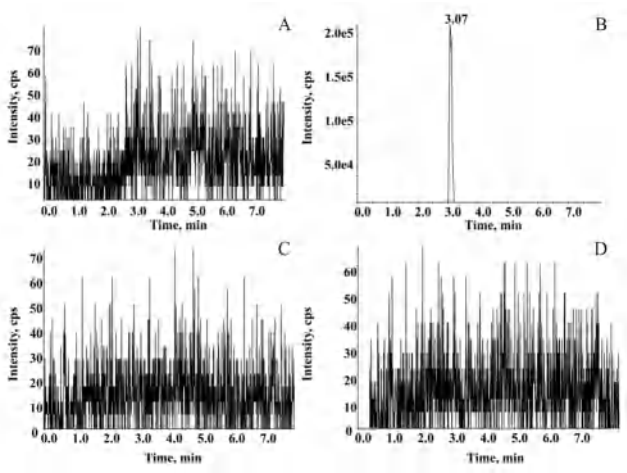


图 3 杂质 T2 的 XIC 色谱图

Fig 3 XICs of the genotoxic impurity

A. 空白溶剂（blank solution）；B. 杂质对照品（reference solution）；C. 原料药 TDLF01（TDLF01 solution）；D. 原料药 TDLF02（TDLF02 solution）

2.3.4 精密度

① 日内精密度：精密稀释“2.2.1”项下杂质对照品储备液，用乙腈稀释至 0.50、5.0、50 ng • mL^{-1} 3 个质量浓度，平行制备 5 份样品，每个样品一日测定 3 次，结果其峰面积 *RSD* 分别为 3.1%、5.0%、3.4%，结果说明日内精密度良好。

② 日间精密度：精密稀释“2.2.1”项下杂质对照品储备液，用乙腈稀释至 0.50、5.0、50 ng • mL^{-1} 3 个质量浓度，平行制备 5 份样品，连续测定 3 d，结果其峰面积 *RSD* 分别为 8.2%、7.4%、3.6%，结果说明日间精密度良好。

2.3.5 稳定性

① 4 ℃放置稳定性：精密稀释“2.2.1”项下杂质对照品储备液，用乙腈稀释至 5.00 ng • mL^{-1}，在 4 ℃下放置 0、2、4、6、8 h，进样测定，结果峰面积 *RSD* 为 4.3%；取“2.2.1”项下的原料药供试品溶液，重复上述操作，结果峰面积 *RSD* 为 5.9%，说明溶液在 4 ℃放置 8 h 内基本稳定。

② 室温放置稳定性：精密稀释“2.2.1”项下杂质对照品储备液，用乙腈稀释至 5.00 ng•mL^{-1}，在室温下放置 0、12、24 h，进样测定，结果峰面积 *RSD* 为 7.1%；取“2.2.2”项下原料药供试品溶液，重复上述操作，结果峰面积 *RSD* 为 5.2%，说明溶液室温放置 24 h 内基本稳定。

2.3.6 加样回收试验 精密称取“2.2.2”项下原料药 9 份，每份 1.00 mg，置于 2 mL 量瓶中，精密加入 0.12、0.15、0.18 mL 2.00 μg • mL^{-1} 杂质

对照品溶液，用乙腈超声溶解并定容至刻度，摇匀，每个样品平行制备 3 份。分别稀释上述溶液至含他达拉非 5.00 μg • mL^{-1}，进样测定，获得相应的杂质峰面积，计算回收率及对应 *RSD*，结果显示，加样回收率均在 90% ～ 110%，*RSD* 均小于 10%，表明方法加样回收率满足要求。

2.3.7　耐用性考察　对分析条件进行细微调整，考察了柱温 23 ℃与 28 ℃，流速 0.3 mL • min^{-1} 与 0.4 mL • min^{-1} 的影响，发现杂质的 XIC 图中，色谱峰形无明显变化，保留时间及峰面积发生微小改变，*RSD* 值均小于 5%，表明分析条件的微小变动不影响 T2 杂质的检测，方法的耐用性良好。

2.4　杂质含量测定

按“2.2.2”项下方法操作，精密配制 2 个批次的原料药供试品溶液，每个批次平行制备 3 份，按“2.1”项下方法依次测定，结果其含量均低于检测限。

3　讨论

基因毒性杂质因其能对 DNA 或 RNA 中嘌呤、嘧啶碱基或者磷酸双酯骨架上的 N 原子或 O 原子等进行亲电进攻，从而造成 DNA 双链断裂，空间构象改变等结构异常，进而产生诱导突变、致癌等毒性而受到广泛关注 [6]。他达拉非合成工艺杂质（T2）具有基因毒性的警示结构，存在潜在的致癌风险，为保障用药安全，有必要对该杂质进行严格的限量控制。毒理学关注阈值（TTC）[7] 的提出进一步规范了对于基因毒性杂质的监管。2006 年 1 月由辉瑞、强生、葛兰素史克等国际制药企业中的研发人员组成的美国药物研究和制造商协会（Pharmaceutical Research and Manufacturers of America，PhRM）专家小组在 Lutz Müller 等的领导下首次提出了“阶段化 TTC”的概念，即根据不同的暴露时间，设定不同的控制限度 [8]，对于有些基因毒性基团，如黄曲霉素类、偶氮苯类、*N*- 亚硝基物类因具有较高的致癌风险，需要进行特殊的限度控制。人用药物注册技术要求国际协调会（ICH）基因毒性杂质研究指南 M7（R1）对于基因毒性杂质监管要求较为宽松 [9]，这可以为根据他达拉非的用药剂量和用药周期制订合理的杂质控制标准提供参考。

4　结论

本研究建立了他达拉非原料药中具有潜在基因毒性杂质 T2 的定量分析方法。该方法简单、快速、回收率好、灵敏度高，填补了国内该方面研究的空白，有助于对他达拉非仿制药合成过程中的质量参数进行有效监测。根据《基因毒性杂质限度指南》，基因毒性杂质限度水平应该小于 1.50 μg • d^{-1}，结合本制剂的用法用量，按每日服用最大量 20 mg 计算，以本方法分析时原料药中杂质含量相当于 375 pg • mL^{-1}。本方法的定量限低于该含量水平，因此适用于他达拉非潜在基因毒性杂质 T2 的检测，可以满足高于 TTC 要求杂质限度的准确分析。

参考文献

[1] 郭兴辉 . HPLC 法测定他达拉非片含量和有关物质 [J]. 中国药师，2015，18（5）：870-872.

[2] 钱彭飞 . 他达拉非的合成工艺及有关物质研究 [D]. 苏州：苏州大学，2016.

[3] 伍普华，廖麟，谢义鹏 . 他达拉非杂质的合成 [J]. 中国药物化学杂志，2017，27（3）：215-220.

[4] 伍普华，谢义鹏 . 他达拉非合成路线图解 [J]. 中国药物化学杂志，2015，36（5）：407-410.

[5] Benigni R，Bossa C，Tcheremenskaia O，et al. Development of structural alerts for the in vivo micronucleus assay in rodents [R]. Luxembourg：Office for Official Publications of the European Communities，2009.

[6] Benigni R，Bossa C. Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity：a review with implications for predictive toxicology [J]. Chem Rev，2011，111（4）：2507-2536.

[7] Kroes R，Kleiner J，Renwick A. The threshold of toxicological concern concept in risk assessment [J]. Toxicol Sci，2005，86（2）：226-230.

[8] Muller L，Mauthe RJ，Riley CM，et al. A rationale for determining，testing，and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity [J]. Regul Toxicol Pharmacol，2006，44（3）：198-211.

[9] Barber C，Amberg A，Custer L，et al. Establishing best practise in the application of expert review of mutagenicity under ICH M7 [J]. Regul Toxicol Pharmacol，2015，73（1）：367-377.

（收稿日期：2021-09-10；修回日期：2021-11-18）

基于染色法和 HPLC 法测定龙葵不同部位中多酚含量

孟莹[1]，王晓红[1]，刘晓利[2]，张琪[1]，卢甜甜[1]，程忠哲[1*]（1. 潍坊医学院 药学院，山东 潍坊 261053；2. 淄博市疾病预防控制中心，山东 淄博 255000）

摘要：目的 采用染色法测定龙葵不同部位的总酚酸含量；采用高效液相色谱（HPLC）法同时测定龙葵不同部位 5 个酚酸类化合物 [绿原酸、咖啡酸、没食子酸、(*E*) - 阿魏酸和原儿茶酸] 及 1 个黄酮化合物（芦丁）的含量。**方法** 采用三氯化铁 - 铁氰化钾染色法测定龙葵不同部位的总酚酸含量；采用 HPLC 梯度洗脱，分段波长的方法同时测定 6 个多酚类成分的含量。**结果** 染色法方法学结果显示总酚酸（没食子酸）在其线性范围内与测定值线性关系良好（r = 0.9985），加样回收率为 103.70%，*RSD* 为 2.7%，不同部位总酚酸以熟果中最高 [（7040±195）μg • g^{-1}，0.70%]，其次为叶 [（4430±120）μg • g^{-1}，0.44%]、青果 [（2720±97）μg • g^{-1}，0.27%]，茎中最低 [（810±9）μg • g^{-1}，0.08%]。HPLC 方法学结果显示各成分在各自线性范围内与峰面积线性关系良好（r ≥ 0.9993），加样回收率在 95.58% ～ 108.41%，*RSD* 在 0.34% ～ 4.5%。**结论** 染色法和 HPLC 法准确、稳定、可靠，可为龙葵药材的质量控制及物质基础研究提供依据。

关键词：龙葵；高效液相色谱法；染色法；酚酸；黄酮
中图分类号：R917 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1430-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.036

Determination of polyphenols in different parts of *Solanum nigrum* L. by staining and HPLC method

MENG Ying[1], WANG Xiao-hong[1], LIU Xiao-li[2], ZHANG Qi[1], LU Tian-tian[1], CHENG Zhong-zhe[1*] (1. *School of Pharmacy, Weifang Medical University, Weifang Shandong* 261053; 2. *Zibo Center for Disease Control and Prevention, Zibo Shandong* 255000)

Abstract: Objective To determine the content of total phenolic acid in different parts of *Solanum nigrum* L. by staining, and to determine the contents of 5 phenolic acids [chlorogenic acid, caffeic acid, gallic acid, (*E*)-ferulic acid, and protocatechuic acid] and 1 flavonoid (rutin) in different parts of *Solanum nigrum* L. by HPLC. **Methods** The content of total phenolic acid in different parts of *Solanum nigrum* L. was determined by ferric chloride-potassium ferricyanide staining. The content of 6 polyphenols was determined by HPLC gradient elution with segmented wavelength. **Results** Methodology of staining showed that the linear range of the total phenolic acid (gallic acid) was good (r = 0.9985), the recovery was 103.70%, and *RSD* was 2.7%. The highest total phenolic acid was found in the mature fruits [(7040±195) μg • g^{-1}, 0.70%], followed by the leaf [(4430±120) μg • g^{-1}, 0.44%], green fruits [(2720±97) μg • g^{-1}, 0.27%], and the stem [(810±9) μg • g^{-1}, 0.08%]. The content of total phenolic acid in the mature fruits was the highest. Methodology investigation of HPLC showed good linearity (r ≥ 0.9993). The recoveries were 95.58% ～ 108.41% with *RSD* of 0.34% ～ 4.5%. **Conclusion** Staining and HPLC are accurate, stable and reliable, which provides the scientific basis for the quality control and material basis research of *Solanum nigrum* L..

Key words: *Solanum nigrum* L.; HPLC; staining; phenolic acid; flavonoid

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81803704）。
作者简介：孟莹，女，在读硕士研究生，主要从事药物分析研究，email：myng_tina@163.com *通信作者：程忠哲，男，副教授，主要从事中药分析研究，email：chengzhzh@wfmc.edu.cn

龙葵为茄科茄属植物龙葵（*Solanum nigrum* L.）的全草部分，是一种药食两用的植物，作为传统的中药材，常用于治疗疔疮、痈肿、丹毒、跌打扭伤等疾病[1]。天然药物化学研究表明从龙葵中分离鉴定出的化学成分有生物碱、酚酸、黄酮等[2]。其中酚酸类具有抑菌[3]、抗病毒[4]、抗氧化[5]、降血压[6]等作用；黄酮类具有抗炎、抗病毒[7-8]、抗自由基[9]、抗脂质过氧化[10]、拮抗血小板活化因子[11]、血管舒张[12]、抗急性胰腺炎[13]等作用。研究表明，绿原酸具有抗病毒、抗氧化、抗肿瘤等活性[14]。咖啡酸具有抗炎、抗氧化等活性[15]。没食子酸可以抗糖尿病、抗肝纤维化、抗肿瘤等[16]。（*E*）-阿魏酸能够降血脂、抗血栓、抗氧化[17]。原儿茶酸可以发挥调节肝糖异生[18]、抗炎、抗病毒等作用[19]。芦丁具有抗病毒[7-8]、抗自由基等活性[9]。目前龙葵中各成分的定量研究多集中于生物碱和皂苷类化合物[20-22]，针对其酚酸成分的含量研究尚未见报道，采用染色法测定龙葵中总酚酸及 HPLC 法同时定量龙葵全草各部位（熟果、青果、茎、叶）中多种酚酸类化合物和黄酮类化合物的相关文献均未见报道。故本实验首先采用三氯化铁 - 铁氰化钾染色法[5, 23-24]研究龙葵不同部位（熟果、青果、茎、叶）中总酚酸含量的分布。然后，采用 HPLC 分段波长法同时定量龙葵不同部位潜在的 5 种酚酸类指标成分 [绿原酸、咖啡酸、没食子酸、（*E*）- 阿魏酸、原儿茶酸] 及 1 种黄酮类（芦丁）成分，为龙葵的质量控制及进一步开发提供参考。

1 仪器与试药

LC-20A 高效液相色谱仪，配有紫外检测器（SPD-20A）、UV-2700 紫外分光光度计（日本岛津公司），KQ3200DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司），AR153CN 电子天平 [奥豪斯仪器（上海）有限公司]，200T 多功能粉碎机（永康市铂欧五金制品有限公司）。芦丁对照品（批号：100080-200707，纯度：90.5%，中国食品药品检定研究院），没食子酸（批号：C12211832）、（*E*）- 阿魏酸（批号：C12085953）对照品（纯度≥ 99%，上海麦克林生化科技有限公司），绿原酸对照品（批号：PS000627，纯度＞ 98.0%，成都普思生物科技股份有限公司），原儿茶酸对照品（批号：W09A11B111046，纯度≥ 97%，上海源叶生物科技有限公司），咖啡酸对照品（批号：BQZ406，纯度：99.65%，上海毕得医药科技股份有限公司），十二烷基硫酸钠、铁氰化钾（上海麦克林生化科技有限公司），无水三氯化铁（国药集团化学试剂有限公司），浓盐酸（烟台远东精细化工有限公司），水为娃哈哈纯净水，色谱甲醇（MeOH）、色谱乙腈（ACN）（Sigma-Aldrich），其他试剂均为分析纯。龙葵全草，2020 年 9 月采于山西省运城市垣曲县，经潍坊医学院药学院王晓红（讲师）鉴定为茄科属植物龙葵 *Solanum nigrum* L. 的全草。

2 三氯化铁 - 铁氰化钾染色法定量分析

2.1 溶液的配制

2.1.1 显色剂 ① 0.3% 十二烷基硫酸钠（SDS）：精密称取 SDS 0.300 g，加水 100 mL 溶解，制得 0.3%SDS 溶液。② 0.1 mol • L^{-1} 盐酸：精密量取浓盐酸 4.1 mL，加超纯水至 500 mL，制得 0.1 mol • L^{-1} 的稀盐酸溶液。③ 0.9% $K_3[Fe(CN)_6]$ 试液：精密称取 $K_3[Fe(CN)_6]$ 粉末 0.450 g，加超纯水至 50 mL，得 0.9%$K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液。④ 0.6% $FeCl_3$ 试液：精密称取 $FeCl_3$ 固体 0.300 g，加超纯水至 50 mL，制得 0.6%$FeCl_3$ 溶液。

2.1.2 供试品溶液 称取过五号筛的样品粉末 0.1 g，加入 2 mL 50% 甲醇水溶液，称重，超声 20 min，补足失重，12 000 r • min^{-1} 离心 10 min，取出上清液，待用。

2.1.3 没食子酸对照品溶液 精密称定没食子酸对照品 5 mg 于 25 mL 量瓶中，用甲醇定容，配制成质量浓度为 200 μg • mL^{-1} 的对照品储备液，再稀释 10 倍得工作溶液，4 ℃保存，待用。

2.2 方法学考察

2.2.1 线性关系考察 分别精密量取“2.1.3”项下没食子酸对照品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.2、1.6、2 mL 于 25 mL 量瓶中，加入 2 mL 0.3% SDS 溶液，再加入 1 mL 0.9% $K_3[Fe(CN)_6]$ 与 0.6% $FeCl_3$ 的等比混合溶液，摇匀，暗处静置 5 min 后以 0.1 mol • L^{-1} 盐酸定容。暗处静置 20 min，在 400 ～ 800 nm 内进行光谱扫描，结果显示没食子酸在 720 nm 波长处吸光度值最大，结果如图 1 所示。以没食子酸质量浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标作线性回归，得到 $y = 0.5749x + 0.1151$，$r = 0.9985$，线性范围 0.16 ～ 1.6 μg • mL^{-1}。

2.2.2 精密度试验 将 0.6 mL 含有 20 μg • mL^{-1} 没食子酸的对照品溶液显色后连续测定 6 次，计算得含量 *RSD* 为 0.24%，表明本法精密度良好。

2.2.3 稳定性试验 提取液置于室温下分别于 0、1、2、4、6、8、12、24 h 后显色处理，测定吸光度值，计算含量 *RSD* 为 4.0%。表明供试品溶液室温条件下 24 h 内稳定性良好。

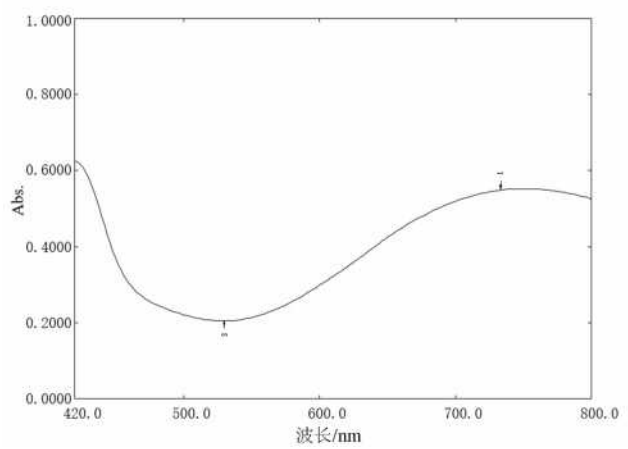


图 1　没食子酸显色后紫外 - 可见吸收光谱

Fig 1　UV-vis absorption spectra of gallic acid after the coloration

2.2.4　重复性试验　分别吸取 6 份 100 μL 供试品溶液于 25 mL 量瓶中，显色，测定吸光度值，计算 6 份供试品溶液含量的 *RSD* 为 4.1%，表明重复性良好。

2.2.5　加样回收试验　分别吸取 100 μL 供试品液 6 份，按 1∶1 水平精密加入没食子酸对照品溶液适量，显色，测定吸光度值，计算加样回收率，结果总酚酸的平均加样回收率为 103.70%，*RSD* 为 2.7%。

2.3　样品含量测定

按“2.1.2”项下方法配制龙葵不同部位供试品溶液，精密吸取 100 μL 于 25 mL 量瓶中，显色，测定吸光度值，计算不同部位总酚酸含量。熟果、叶、青果、茎中总酚酸含量依次为（7040±195）μg·g^{-1}、（4430±120）μg·g^{-1}、（2720±97）μg·g^{-1}、（810±9）μg·g^{-1}，占比分别为 0.70%、0.44%、0.27%、0.008%。

3　HPLC 定量分析

3.1　色谱条件

Kromasil 100-5C$_{18}$（150 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱；流动相分别为 0.1% 甲酸水溶液（A）和甲醇（B）；梯度洗脱（0.01 ～ 11 min，5%B；11 ～ 20 min，5% → 20%B；20 ～ 30 min，20% → 30%B；30 ～ 40 min，30% → 45%B；40 ～ 45 min，45% → 70%B；45 ～ 48 min，70% → 90%B；48 ～ 53 min，90% → 90%B；53 ～ 53.1 min，90% → 5%B；53.1 ～ 58.1 min，5% → 5%B）；流速 1 mL·min^{-1}；柱温 30 ℃；进样量 20 μL；检测波长 274 nm（没食子酸）、258 nm（原儿茶酸）、320 nm[绿原酸、咖啡酸、（*E*）- 阿魏酸、芦丁]。

3.2　溶液配制

3.2.1　供试品溶液　称取过五号筛的样品粉末 0.1 g，加入 2 mL 50% 甲醇溶液，称重，超声 20 min，补足失重，12 000 r·min^{-1} 离心 10 min，取上清液，旋蒸至干，加入 50% 甲醇溶液 500 μL 涡旋复溶，过 0.22 μm 滤膜备用。

3.2.2　混合对照品溶液　精密称定对照品没食子酸、原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、（*E*）- 阿魏酸和芦丁适量，加 50% 甲醇溶液溶解，配制成质量浓度分别为 25、100、300、15、30 和 250 μg·mL^{-1} 的混合对照品溶液，4 ℃保存。

3.3　方法学考察

3.3.1　专属性试验　取“3.2.2”项下混合对照品溶液和由茎、叶、青果、熟果粉末按“3.2.1”项下方法配制的供试品溶液分别进样分析。没食子酸、原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、（*E*）- 阿魏酸和芦丁的保留时间分别为 7.00、15.49、25.19、27.00、35.39、40.83 min，各化合物分离度良好且无明显干扰，如图 2 所示。

3.3.2　线性关系考察　精密量取“3.2.2”项下混合对照品溶液适量，稀释为 6 个质量浓度梯度的混合对照品工作溶液，进样测定，以峰面积为纵坐标，质量浓度为横坐标进行线性回归，各组分在其线性范围内与峰面积线性关系良好。以信噪比 *S/N* ≥ 3 时的浓度为检测限（LOD），信噪比 *S/N* ≥ 10 时的浓度为定量限（LOQ），结果如表 1 所示。

表 1　6 种成分线性关系

Tab 1　Linear relationships of 6 components

成分	回归方程	*r*	线性范围 /（ng·mL^{-1}）	LOD/（ng·mL^{-1}）	LOQ/（ng·mL^{-1}）
没食子酸	$y = 74.733x + 7200.2$	0.9993	$2.5\times10^{2} \sim 2.5\times10^{4}$	48	160
原儿茶酸	$y = 85.665x - 15086$	0.9998	$1.0\times10^{3} \sim 1.0\times10^{5}$	156	520
绿原酸	$y = 66.128x + 32814$	0.9998	$3.0\times10^{3} \sim 3.0\times10^{5}$	25	50
咖啡酸	$y = 123.94x - 3584.9$	0.9997	$1.5\times10^{2} \sim 1.5\times10^{4}$	9	30
（*E*）- 阿魏酸	$y = 116.95x + 50228$	0.9995	$3.0\times10^{2} \sim 3.0\times10^{4}$	6	20
芦丁	$y = 31.641x - 25030$	0.9998	$2.5\times10^{3} \sim 2.5\times10^{5}$	85	170

3.3.3　精密度试验　将“3.2.2”项下的混合对照品溶液稀释 1 倍，连续进样 6 次，分别测得没食

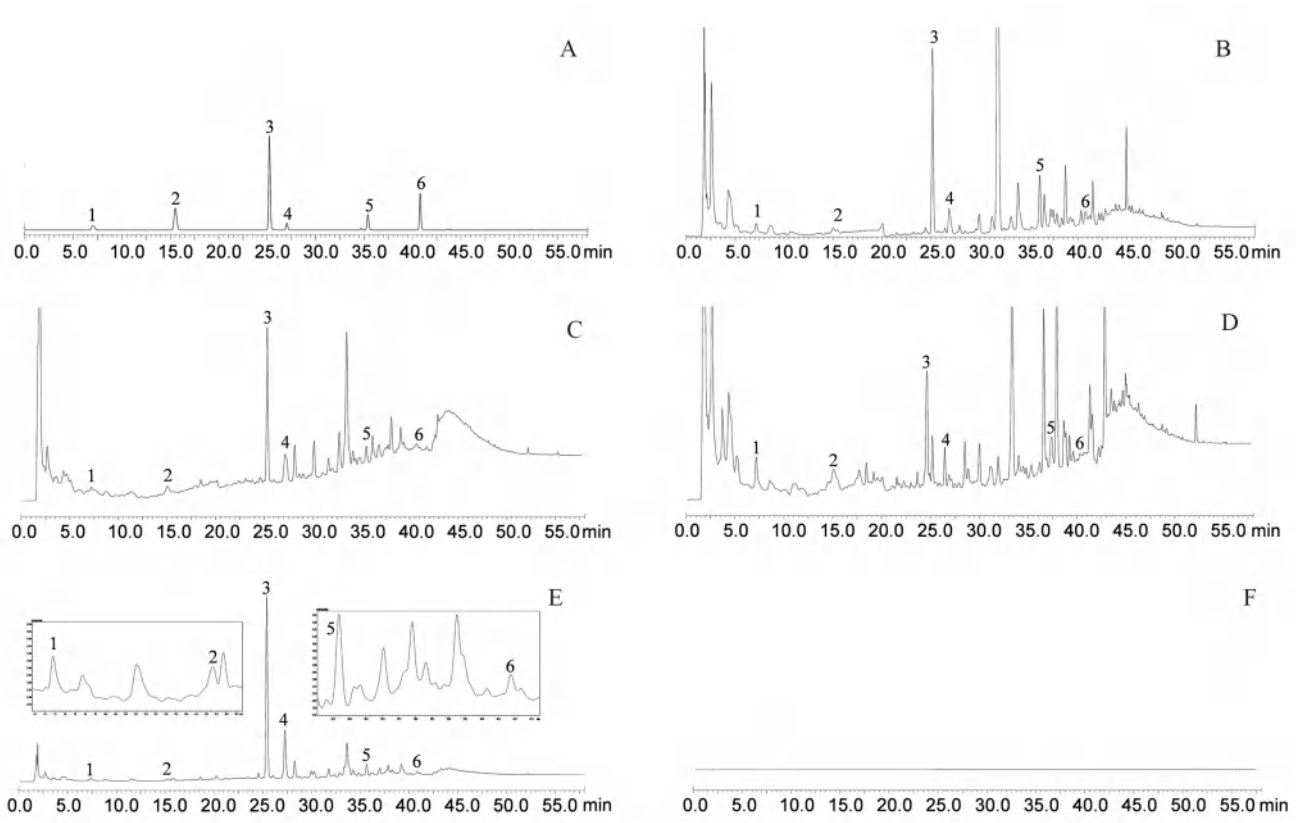


图 2　对照品和供试品代表性 HPLC 色谱图

Fig 2　Typical HPLC chromatograms of reference and samples

A. 对照品（reference）；B. 供试品（叶）(sample of leaf)；C. 供试品（青果）(sample of green fruit)；D. 供试品（茎）(sample of stem)；E. 供试品（熟果）(sample of mature fruit)；F. 空白溶剂（blank solvent）；1. 没食子酸（gallic acid）；2. 原儿茶酸（protocatechuic acid）；3. 绿原酸（chlorogenic acid）；4. 咖啡酸（caffeic acid）；5.（*E*）-阿魏酸 [（*E*）-ferulic acid]；6. 芦丁（rutin）

子酸、原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、（*E*）-阿魏酸、芦丁含量的 *RSD* 分别为 2.1%、1.8%、1.9%、2.0%、1.8%、2.0%，表明仪器精密度良好，将上述溶液连续 3 d 进样，测得这 6 种成分含量 *RSD* 分别为 1.7%、2.1%、1.8%、2.8%、2.3%、2.7%，表明仪器日间精密度良好。

3.3.4　稳定性试　按“3.2.1”项下方法配制龙葵全草供试品溶液，置室温下分别于 0、1、2、4、8、12、24 h 后进样分析，测得没食子酸、原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、（*E*）-阿魏酸、芦丁含量 *RSD* 分别为 4.9%、3.9%、4.1%、4.8%、5.1%、2.2%。表明供试品溶液室温条件下 24 h 稳定性良好。

3.3.5　重复性试验　取按“3.2.1”项下方法平行配制的 6 份龙葵全草供试品溶液进样分析，测得没食子酸、原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、（*E*）-阿魏酸、芦丁含量 *RSD* 分别为 3.0%、3.2%、1.7%、0.80%、3.5%、2.3%，说明本法重复性良好。

3.3.6　加样回收试验　称取龙葵熟果 0.05 g，平行 3 份，按“3.2.1”项下方法制备供试品溶液，分别按照 50%、100%、150% 水平精密加入混合对照品溶液，进样测定，计算加样回收率，结果 6 种成分的平均加样回收率均在 95.58% ～ 108.41%，*RSD* 在 0.34% ～ 4.5%。

3.4　样品含量测定

按“3.2.1”项下方法配制不同部位供试品溶液，进样分析，结果见表 2，含量热图如图 3 所示。

表 2　龙葵各部位中各组分含量测定结果 (μg·g^{-1}，*n* = 3)

Tab 2　Content of 6 components in *Solanum nigrum* L. (μg·g^{-1}，*n* = 3)

部位	没食子酸	原儿茶酸	绿原酸	咖啡酸	（*E*）-阿魏酸	芦丁
青果	9.39±0.59	9.04±0.26	123.25±0.84	25.47±0.27	6.50±0.07	9.65±0.30
熟果	14.67±0.83	11.27±0.19	890.27±9.20	159.35±1.60	30.75±0.27	27.65±0.24
茎	7.26±0.58	3.54±0.19	21.13±0.24	3.60±0.02	18.00±0.28	19.15±0.38
叶	17.59±0.42	8.72±0.75	364.95±3.36	42.17±0.42	1.56±0.08	56.65±0.97

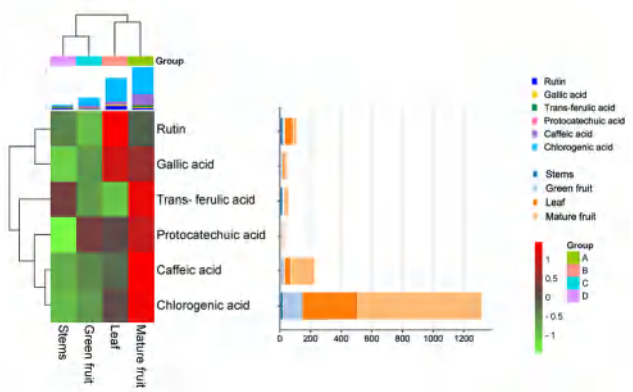


图 3 成分含量热图

Fig 3 Heatmap of component content

3.5 样品数据统计分析

样品中 5 种酚酸成分含量的差异采用方差分析进行研究。由于茎中 5 种酚酸类成分含量无较大差异，因此选择熟果、叶和青果中 5 种酚酸类成分含量采用 IBM SPSS Statistics 24.0 软件进行无重复数据的两因素方差分析，结果如表 3 所示，表 3 中成分的显著性 $P = 0.044$ 证明了在置信区间 95% 范围内熟果、叶和青果各部位酚酸的含量差异具有统计学意义（$P < 0.05$）。

表 3 方差分析结果

Tab 3 Analysis of variance

源	Ⅲ类平方和	自由度	均方	F	显著性
修正模型	548 447.248[a]	6	91 407.875	3.234	0.064
截距	196 070.234	1	196 070.234	6.936	0.030
部位	92 588.254	2	46 294.127	1.638	0.253
成分	455 858.993	4	113 964.748	4.031	0.044
误差	226 149.517	8	28 268.690		
总计	970 666.998	15			
修正后总计	774 596.765	14			

注：a. $R^2 = 0.708$（调整后 $R^2 = 0.489$）。

Note：[a. $R^2 = 0.708$ (adjusted $R^2 = 0.708$)]

4 讨论

研究表明，龙葵中含有酚酸和黄酮等活性成分，但其含量研究尚未见报道。龙葵通常为全草入药，不同部位中酚酸类化合物的含量可能存在差异。

酚酸类化合物在抗氧化、抗肿瘤、抑菌、护肝、提高免疫力等方面表现出生物活性 [25]，因此多种药用植物采用酚酸类化合物作为质量控制指标。如《中国药典》（2020 年版）[26] 中冬葵果以总酚酸作为质量控制指标。本实验对龙葵中总酚酸含量进行测定，结果表明龙葵不同部位均含有总酚酸。其中熟果的含量最高，其次为叶，青果，茎中最低。药典规定冬葵果总酚酸不低于 0.15%，提示总酚酸可以作为龙葵质量控制的指标之一。

进一步采用 HPLC 分段波长法同时定量研究龙葵不同部位 6 个多酚含量。分段波长法在提高检测灵敏度的同时，又使分析物附近干扰峰减少，有利于提高分离度。本实验选取多酚类化合物中活性较高的绿原酸、咖啡酸、没食子酸、（E）- 阿魏酸、原儿茶酸及芦丁进行含量研究。结果显示，6 种活性成分在不同部位中均有检出。所有部位中绿原酸含量最高，其次为咖啡酸、芦丁、（E）- 阿魏酸、没食子酸，原儿茶酸最低。不同部位中 6 种成分总和熟果含量最高，其次为叶、青果，茎中最低（见图 3 左上）。绿原酸在熟果中含量最高（0.089%），其次为叶（0.036%），青果（0.012%），茎中最低（0.002%），药典规定杜仲叶、忍冬藤绿原酸含量分别不低于 0.08%、0.10%，提示绿原酸可以作为龙葵质量控制的指标之一；咖啡酸在熟果中含量最高（0.016%），其次为叶（0.004%），青果（0.003%），茎中最低（0.0004%），药典规定蒲公英咖啡酸含量分别不低于 0.02%，熟果中含量接近，提示其可以作为龙葵质量控制的指标之一。绿原酸和咖啡酸在龙葵中含量与《中国药典》规定较高或相近，可以作为主要质量控制指标，其他 4 个酚酸类成分 [（E）- 阿魏酸、没食子酸、原儿茶酸及芦丁] 可以作为次要质量控制指标。

本实验采用三氯化铁 - 铁氰化钾染色法测定了不同部位的总酚酸，结果各部位均含有总酚酸。其中熟果、叶和青果总酚酸含量高于《中国药典》对冬葵果总酚酸含量的规定。进一步采用 HPLC 分段波长法同时定量龙葵不同部位中 5 种酚酸类化合物和 1 种黄酮类化合物的含量，发现绿原酸和咖啡酸与《中国药典》中的规定较高或接近，因此，绿原酸、咖啡酸可以作为龙葵潜在的主要质量控制指标。（E）- 阿魏酸、没食子酸，原儿茶酸及芦丁可以作为龙葵潜在的次要质量控制指标。为龙葵的质量控制研究及进一步开发提供参考。

参考文献

[1] 宋文娟，顾伟 . 龙葵药理学研究进展 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2018，20（2）：304-308.

[2] 李玲，郑重飞，孙敬勇，等 . 茄属植物化学成分及生物活性研究进展 [J]. 中草药，2016，47（6）：1016-1033.

[3] Sánchez-Maldonado AF，Schieber A，Gänzle MG. Structure-function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria [J]. J Appl Microbiol，2011，111（5）：1176-1184.

[4] Weng JR，Lin CS，Lai HC，et al. Antiviral activity of Sambucus Formosana Nakai ethanol extract and related phenolic acid constituents against human coronavirus NL63 [J]. Virus Res，2019，273：197767.
[5] 杨艳俊，杨秀东，王亚红 . 景天三七总酚酸的提取工艺及抗氧化性研究 [J]. 吉林化工学院学报，2020，37（3）：33-37.
[6] Murata Y，Nagaki K，Kofuji K，et al. Functions of chitosan-ferulic acid salt for prevention of hypertension [J]. Food Sci Technol Res，2010，16（5）：437-442.
[7] 王艳芳，王新华，朱宇同，等 . 芦丁对甲型流感病毒抑制作用实验研究 [J]. 中医药学刊，2005，24（5）：827.
[8] 金鸣，臧宝霞，吴伟，等 . 芦丁拮抗血小板活化因子与受体结合的作用 [J]. 中草药，2005，36（3）：390-392.
[9] 顾洪雁，张媛英，翟静，等 . 维生素 C 和芦丁对力竭运动小鼠组织自由基代谢的影响 [J]. 中国临床康复，2005，29（44）：132-134.
[10] 孟芳，刘瑞，白怀，等 . 槲皮素、芦丁及葛根素抑制 HDL 氧化修饰作用的研究 [J]. 四川大学学报（医学版），2004，46（6）：836-838.
[11] 陈文梅，金鸣，吴伟，等 . 芦丁抑制家兔血小板激活因子诱导血小板活化作用的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志，2002，22（4）：283-285.
[12] 周新妹，姚慧，夏满莉，等 . 槲皮素与芦丁对离体大鼠主动脉环的舒张作用及机制 [J]. 浙江大学学报（医学版），2006，49（1）：29-33.
[13] 田洁，宋少刚，王宇翎，等 . 芸香苷对急性胰腺炎大鼠磷脂酶 A_2 和 Ca^{2+} 浓度的影响 [J]. 安徽医药，2006，10（2）：88-90.
[14] 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.
[15] 张雯，孙雅丽，王琳，等 . 咖啡酸及其衍生物药理作用研究进展 [J]. 动物医学进展，2021，42（8）：103-106.
[16] 郑雪花，杨君，杨跃辉 . 没食子酸药理作用的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志，2017，37（1）：94-98，102.
[17] 张欣，高增平 . 阿魏酸的研究进展 [J]. 中国现代中药，2020，22（1）：138-147.
[18] 王玲倩 . 原儿茶酸调节肝糖异生及其机制研究 [D]. 武汉：湖北大学，2019.
[19] 胡睿智，贺宇佳，李柏珍，等 . 原儿茶酸的生理功能及其在畜禽生产中的应用 [J]. 动物营养学报，2019，31（11）：4978-4985.
[20] 丁霞，朱浩，张战运 . 超声醇提龙葵总皂苷工艺及定量测定研究 [J]. 中成药，2011，33（8）：1442-1444.
[21] 罗习珍，陈来，刘建军，等 . 高效液相色谱法测定龙葵中的澳洲茄胺 [J]. 时珍国医国药，2009，20（2）：273-274.
[22] 蒋新宇，杨辉，赵宇 . 龙葵中甾体类生物总碱的含量测定 [J]. 食品科学，2006，27（8）：224-227.
[23] 赵海龙，李斌鑫，董玉 . 紫外可见分光光度法测定大鼠血清中蒙药协日嘎 -4 总酚酸的含量 [J]. 疾病监测与控制，2020，14（1）：1-4.
[24] 何峰，余明丽，姚光哲，等 . 川参通注射液中总酚酸、总黄酮及单糖大类成分的含量测定 [J]. 贵州医科大学学报，2020，45（6）：668-671，688.
[25] 乔丽萍，傅瑜，叶兴乾，等 . 酚酸生物活性研究进展 [J] 中国食品学报，2013，13（10）：144-152.
[26] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：120.

（收稿日期：2022-01-30；修回日期：2022-03-25）

《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 E-mail）。

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。

医院药学

吸入性糖皮质激素治疗儿童哮喘安全性的网状 meta 分析

申丽红[1]，胡利华[1]，尉耘翠[2]，刘小会[1]，王晓玲[1*]，向莉[3*]（1. 医院药学部；2. 临床研究中心；3. 过敏反应科，国家儿童医学中心/首都医科大学附属北京儿童医院，北京 100045）

摘要：目的 采用网状 meta 分析比较布地奈德（BUD），氟替卡松（FP），倍氯米松（BDP），环索奈德（CIC）治疗儿童哮喘的安全性。**方法** 计算机检索 PubMed，The Cochrane Library，Embase，万方数据，中国知网，中国生物医学文献数据库及临床试验注册平台（ClinicalTrials.gov），搜集相关随机对照试验、队列研究等。检索截止时间为 2021 年 12 月 31 日。由两位研究者独立筛选文献，提取资料并进行风险偏倚评估后，采用 StataMP 17 软件进行网状 meta 分析。**结果** 纳入 32 项研究，涉及病例数 17 109 例。大剂量氟替卡松雾化吸入总不良事件发生情况优于大剂量氟替卡松干粉剂 [*OR* = 0.22，95%*CI*（0.05，0.88）]；小剂量氟替卡松干粉剂口腔念珠菌病发生情况优于小剂量布地奈德气雾剂 [*OR* = 0.11，95%*CI*（0.01，0.99）] 和安慰剂 [*OR* = 0.44，95%*CI*（0.21，0.92）]；小剂量环索奈德气雾剂剂口腔念珠菌病发生情况优于小剂量布地奈德气雾剂”[*OR* = 0.15，95%*CI*（0.02，0.92）]。**结论** 较大剂量吸入氟替卡松时，与干粉剂相比，雾化吸入器可降低总不良事件发生率；使用气雾剂吸入小剂量药物时，与布地奈德相比，环索奈德可降低口腔念珠菌病发生率。受纳入研究数量及质量等的限制，上述结论尚待更多高质量研究予以验证。

关键词：哮喘；儿童；吸入性糖皮质激素；布地奈德；氟替卡松；倍氯米松；环索奈德；网状 meta 分析

中图分类号：R725.6，R459.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1436-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.037

支气管哮喘是一个严重的全球健康问题，是儿童中常见的慢性炎症性疾病，可导致气道高反应性，常表现为咳嗽、胸闷及喘息，给家庭、社会带来严重的疾病和经济负担 [1]。调查研究显示，1990 年、2000 年、2010 年我国 16 个城市中 14 岁以下儿童哮喘患病率分别为 0.96%、1.66% 和 2.38%，呈显著上升趋势 [2]。

儿童哮喘确诊后需要长期规律治疗，2021 年全球哮喘防治创议指出：为获得更好的预后，哮喘确诊后需要尽早开始含有吸入性糖皮质激素（ICS）的控制治疗。当前 ICS 类药物主要包括布地奈德（budesonide，BUD），氟替卡松（fluticasone，FP），倍氯米松（beclomethasone，BDP），环索奈德（ciclesonide，CIC）。其吸入装置主要分为压力定量气雾剂（pMDI）或定量气雾剂（MDI），干粉吸入剂（DPI），雾化吸入器，即气雾剂、干粉剂和雾化器三大类。

儿童处于特殊生长时期，而 ICS 的使用具有广泛性和特殊性，其长期使用的安全性得到了高度重视，这同时也影响了儿童哮喘的用药依从性和长期控制。当前，对于 4 种常用 ICS 及不同装置及剂量的安全性，已有相关的两两对比、三项对比或与安慰剂比较的系统评价 [3-4]，但尚未有 4 种 ICS 的整体排序结果。

网状 meta 分析可通过直接比较和间接比较相结合，量化比较相同主题的两种以上不同干预措施的相对优势并对其优劣进行排序，产生较高质量的循证医学依据。故本研究将应用网状 meta 分析方法进行排序，为临床 ICS 用药提供一定的循证依据，促进哮喘儿童合理用药。

基金项目：国家呼吸系统疾病临床医学研究中心呼吸专项（No.HXZX-202107）。

作者简介：申丽红，女，在读硕士研究生，主要从事儿童哮喘研究，email：1976169329@qq.com *通信作者：王晓玲，女，主任药师，主要从事儿科药学方面的工作，email：wangxiaoling@bch.com.cn；向莉，女，主任医师，主要从事儿童过敏性疾病、儿童过敏原及肺功能研究，email：drxiangli@163.com

1 资料与方法

1.1 文献纳入标准

① 根据哮喘诊断确诊为哮喘患儿（0 ～ 18 岁），非急性发作；② 国内外已发表的 ICS 之间或与安慰剂对比治疗的相关研究；③ 试验设计为随机对照试验（randomized controlled trial，RCT），队列研究（cohort study）等；④ 提供完整数据或可转化为 meta 分析所需数据；⑤ 研究时间≥ 12 周；⑥ 语言限制为中文和英文。

1.2 文献排除标准

① 合并有其他严重疾病者；② 数据不完整，质量较差，样本量＜ 80；③ 重复发表及无法获得全文的文献；④ 个案、综述类文献。

1.3 文献检索

计算机检索英文数据库（PubMed，The Cochrane Library，Embase）和中文数据库 [万方数据（WanFang Data），中国知网（CNKI），中国生物医学文献数据库（CBM）]，并补充检索临床试验注册平台（ClinicalTrials.gov）。检索时间为建库至 2021 年 12 月 31 日。关键词包括：budesonide，fluticasone，beclomethasone，ciclesonide，inhaled corticosteroid，randomized controlled trial，RCT，cohort study，布地奈德，氟替卡松，倍氯米松，环索奈德，吸入性糖皮质激素，随机，RCT，队列等。为获取资料更全面，同时检索了相关系统评价参考文献中的临床研究。

1.4 文献筛选及质量评价

检索上述数据库后，用 NoteExpress 软件对所得文献进行剔重，由两名研究员独立阅读题目和摘要，对所有文献进行归纳整理并标注纳入及排除原因。初筛完成后，将所得文献进行全文阅读并标注纳入及排除原因，保留通过复筛的文献即为纳入文献。

采用 Cochrane 协作网偏倚风险工具（Cochrane Collaboration’s tool for assessing the risk of bias in randomized trials，RoB）和纽卡斯尔 - 渥太华量表（Newcastle-Ottawa Scale，NOS）分别对 RCT 和非 RCT 研究进行评估。Cochrane 偏倚风险工具评价维度包括随机序列生成、分配序列隐藏、参与者和工作人员的盲法、结果的盲法、不完整结果数据及其他偏倚来源。NOS 通过三大块八个条目的方法评价队列研究和病例对照研究，包括研究人群选择、可比性、暴露评价或结果评价，采用了星极系统的半量化原则，满分为 9 颗星。该步骤由两人独立完成，结果不一致时进行协商，无法统一时由第三人进行判断。

1.5 文献资料提取

由两名研究员仔细阅读全文，对文献中研究对象信息进行提取，提取信息包括研究员，发表年份，人群，总样本量，男 / 女样本量，每组样本量，研究设计类型，年龄范围，疗程，观察指标，使用药物类型及剂量，给药装置等。并将结果进行交叉核对，意见不统一时二人协商确保信息正确，或由第三人提出解决方案。

1.6 统计方法

本研究采用基于频率学框架实现网状 meta 分析。使用 StataMP 17 中的 network 及 mvmeta 软件包进行数据处理。所有结局指标均为二分类变量，故采用比值比（odds ratio，*OR*）及 95% 可信区间（confidence interval，*CI*）作为统计分析的效应量，当 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。存在闭合环时分别拟合不一致性模型和一致性模型，并采用节点劈裂法（node-splitting method）进行局部不一致性检验。设定 $P > 0.05$ 为不存在不一致性，采用一致性模型进行分析；$P < 0.05$ 为存在不一致性，采用不一致性模型分析，并分析不一致性来源。使用 StataMP 17 绘制网状关系图、森林图、累积概率图、累积排序概率图下面积图（surface under the cumulative ranking，SUCRA）、联赛图及漏斗图等（SUCRA 值的范围为从 0 到 1）。

2 结果

2.1 文献筛选

通过以上数据库检索共获得中英文文献 6941 篇，经 NoteExpress 剔重 2990 篇，阅读文献题目和摘要后排除 3811 篇，初筛获得 140 篇文献，阅读全文后排除 108 篇（排除原因如下：非临床研究 9 篇，数据不足 20 篇，疗程不足 12 周 14 篇，研究内容不符 31 篇，重复或其他原因 34 篇），最终获得文献 32 篇，包括 31 篇 RCTs，1 篇队列研究；31 篇英文文献，1 篇中文文献。

2.2 文献基本特征及偏倚风险评估结果

共纳入 32 项研究，包括 13 项双臂研究，11 项三臂研究，6 项四臂研究，2 项五臂研究。研究药物包括安慰剂（placebo，PBO），BUD，FP，BDP，CIC。研究的吸入装置包括气雾剂，干粉剂，雾化吸入器。研究药物剂量分为大剂量和小剂量，故将多臂研究进行了必要的臂合并，最终涉及 17 种干预措施。储物罐多适用于年龄较小的患儿故未作为分组依据。本研究共纳入病例数 17 109 例，其中男性 10 980 例，女性 6129 例。

本研究所分析的安全性指标为总不良事件、药物相关不良事件、严重不良事件、口腔念珠菌病等，纳入的 RCT 研究和队列研究结局指标将合并进行网状 meta 分析。纳入文献基本信息见表 1。

表 1 纳入 32 项研究的基本信息

Tab 1 Basic information of the 32 included studies

纳入研究	女性占比 /%	研究设计	年龄 / 岁	干预时间	装置	结局指标	干预措施	
Allen 1998[5]	25.0	随机双盲	4 ～ 11	1 年	干粉剂	②④	PBO（87）	B-FP- 小（181）
Shapiro 1998[6]	22.3	随机双盲	6 ～ 18	12 周	干粉剂	④	PBO（103）	B-BUD- 小（202） B-BUD- 大（99）
Baker 1999[7]	35.6	随机双盲	0.5 ～ 8	12 周	雾化吸入器	③	PBO（95）	C-BUD- 小（193） C-BUD- 大（193）
Bisgaard 1999[8]	33.8	随机双盲	0.5 ～ 4	12 周	气雾剂	①④	PBO（81）	A-FP- 小（156）
Kemp 1999[9]	34.0	随机双盲	0.5 ～ 8	12 周	雾化吸入器	③	PBO（92）	C-BUD- 小（174） C-BUD- 大（93）
LaForce 2000[10]	28.5	随机双盲	4 ～ 11	12 周	干粉剂	④	PBO（78）	B-FP- 小（164）
de Benedictis 2001[11]	27.7	随机双盲	4 ～ 11	1 年	干粉剂	①		B-BDP- 大（173） B-FP- 大（170）
Shapiro 2001[12]	35.0	随机双盲	6 ～ 17	12 周	干粉剂	①③	PBO（91）	B-BUD- 小（183）
Scott 2001[13]	35.1	随机双盲	0.5 ～ 8	12 周	雾化吸入器	①	PBO（187）	C-BUD- 小（268） C-BUD- 大（188）
Mendelson 2002[14]	35.4	随机双盲	0.5 ～ 8	12 周	雾化吸入器	①④	PBO（95）	C-BUD- 小（99） C-BUD- 大（97）
Ruff 2003[15]	40.1	随机双盲	6 ～ 12	12 周	气雾剂	①	PBO（107）	A-BDP- 小（212）
Verona 2003[16]	28.0	随机双盲	4 ～ 11	1 年	干粉剂	②④		B-FP- 小（267） B-FP- 大（261）
Bisca 2003[17]	37.1	随机双盲	6 ～ 16	12 周	雾化吸入器，干粉剂	①		C-BUD- 大（75） B-BDP- 大（76）
Delacourt 2003[18]	28.5	随机	0.5 ～ 6	12 周	雾化吸入器	②③		C-BDP- 大（62） C-BUD- 大（68）
Carlsen 2005[19]	31.9	随机双盲	1 ～ 4	12 周	气雾剂	①②③	PBO（81）	A-FP- 小（79）
Berger 2005[20]	38.3	随机双盲	0.5 ～ 1	12 周	雾化吸入器	①	PBO（49）	C-BUD- 小（48） C-BUD- 大（44）
Levy 2006[21]	44.4	随机双盲	4 ～ 11	12 周	气雾剂	①②	PBO（81）	A-FP- 小（160）
Chen 2006[22]	39.7	随机双盲	0 ～ 11	5 年	干粉剂	③	PBO（974）	B-BUD- 小（1000）
Gelfand 2006[23]	36.0	随机双盲	4 ～ 11	12 周	干粉剂	①②	PBO（254）	B-CIC- 小（764）
Silverman 2006[24]	40.1	随机双盲	5 ～ 10	3 年	干粉剂	③	PBO（977）	B-BUD- 小（1004）
Ferguson 2007[25]	31.3	随机双盲	6 ～ 9	1 年	干粉剂	①②③④		B-FP- 小（114） B-BUD- 小（119）
von Berg 2007[26]	36.4	随机双盲	6 ～ 11	12 周	气雾剂，干粉剂	①③④		A-CIC- 小（416） B-BUD- 小（205）
Vermeulen 2007[27]	32.5	随机双盲	12 ～ 17	12 周	气雾剂	①		A-CIC- 大（272） A-BUD- 大（131）
Skoner 2008[28]	32.8	随机双盲	5 ～ 8.5	1 年	气雾剂	①④	PBO（221）	A-CIC- 小（440）
EFC6695 2009[29]	40.7	随机双盲	4 ～ 11	12 周	气雾剂	①③	PBO（163）	A-CIC- 小（338）
Pedersen 2009[30]	34.7	随机双盲	6 ～ 11	12 周	气雾剂	①④		A-CIC- 小（494） A-FP- 小（250）
BY9010/CA-101 2010[31]	41.0	随机双盲	4 ～ 11	1 年	气雾剂	①③	PBO（84）	A-CIC- 小（79） A-CIC- 大（76）
Pedersen 2010[32]	33.9	随机双盲	6 ～ 11	12 周	气雾剂	①③④	PBO（146）	A-CIC- 小（927）
Brand 2011[33]	37.4	随机双盲	2 ～ 6	12 周	气雾剂	④	PBO（246）	A-CIC- 小（746）
马杏娟 2015[34]	44.2	随机数字表	4 ～ 13	1 年	气雾剂	①④		A-BUD- 小（43） A-CIC- 小（43）
Oliver 2016[35]	37.6	随机双盲	5 ～ 11	12 周	干粉剂	①②③	PBO（119）	B-FP- 小（474）
Wu 2020[36]	36.2	队列研究	0 ～ 2	12 周	雾化吸入器	①④		C-BUD- 大（389） C-FP- 大（389）

注（Note）：①. 总不良事件（total adverse events）；②. 药物相关不良事件（drug-related adverse events）；③. 严重不良事件（serious adverse events）；④. 口腔念珠菌病（oral candida）；A. 气雾剂（metered dose inhalers）；B. 干粉剂（dry powder inhalers）；C. 雾化吸入器（nebulized inhaler）；小. 小剂量（low dose）；大. 大剂量（high dose）；FP 小，CIC 小，BDP 小（≤ 200 μg•d^{-1}）；BUD 小（≤ 500 μg•d^{-1}）。

文献偏倚风险结果见图 1。结果显示，分配序列隐藏、参与者和工作人员的盲法、不完整结果数据及其他偏倚来源存在高风险，其他均为中低风险。纳入 31 项 RCT 研究中有 12 项存在高风险，其余均评估为中低风险，1 项队列研究 NOS 评分为满分 9 颗星。

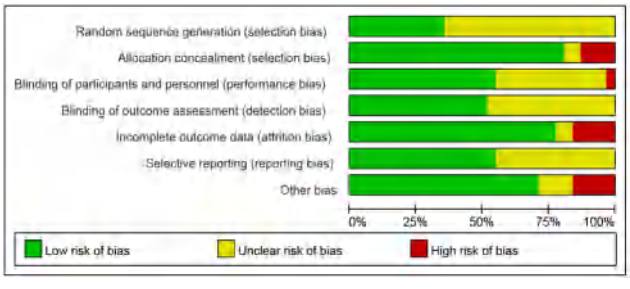


图 1 纳入 RCT 文献的风险偏倚评估

Fig 1 Risk of bias of RCTs

2.3 纳入研究的网状关系图

各结局指标中，有 22 个研究统计了总不良事件[8, 11-15, 17, 19-21, 23, 25-32, 34-36]；7 个研究统计了药物相关不良事件[5, 16, 18, 19, 21, 23, 25, 35]；13 个研究统计了严重不良事件[7, 9, 12, 18-19, 22, 24-26, 29, 31-32, 35]；

14 个 RCT 统计了口腔念珠菌病事件 6[5, 6, 8, 10, 14, 16, 25-26, 28, 30, 32-34, 36]。4 种 ICS 治疗儿童哮喘安全性的主要结局指标网状关系见图 2。图中每个节点代表一种干预措施，节点之间线条代表两干预措施存在直接比较，节点大小代表干预措施总样本量，线条粗细代表直接比较的研究数。

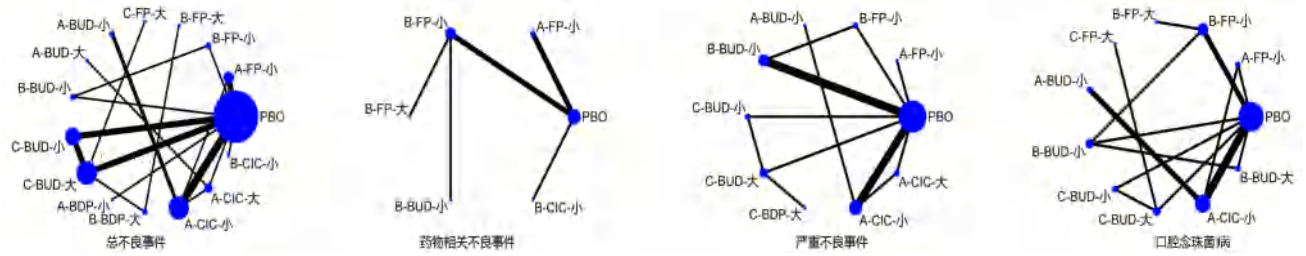


图 2　网状关系图

Fig 2　Reticular diagram

注（Note）：A. 气雾剂（metered dose inhalers）；B. 干粉剂（dry powder inhalers）；C. 雾化吸入器（nebulized inhaler）；小 . 小剂量（low dose）；大 . 大剂量（high dose）；FP 小、CIC 小、BDP 小表示剂量≤ 200 μg • d^{-1}；BUD 小表示剂量≤ 500 μg • d^{-1}。

2.4　不一致性检验

将结局拟合不一致性模型，其中总不良事件（P = 0.5246）、严重不良事件（P = 0.5898）、口腔念珠菌病（P = 0.8909）的 P 值大于 0.05，整体无不一致性，同时节点劈裂法检验显示局部不存在不一致性（P > 0.05），故均采用一致性模型分析。药物相关不良事件网状关系图未形成闭合环，节点劈裂法检验显示局部不存在不一致性（P > 0.05），故采用一致性模型进行分析。

2.5　网状 meta 分析结果及排序

2.5.1　总不良事件　网状 meta 分析结果显示，“C-FP- 大”总不良事件发生情况优于“B-FP- 大”[OR = 0.22，95%CI（0.05，0.88）]，差异有统计学意义，其余组间比较差异均无统计学意义。

2.5.2　药物相关不良事件　网状 meta 分析结果显示，各干预措施药物相关不良事件发生情况的组间比较差异均无统计学意义。

2.5.3　严重不良事件　网状 meta 分析结果显示，“B-BUD- 小”严重不良事件发生情况低于 PBO[OR = 0.72，95%CI（0.58，0.91）]，差异有统计学意义，其余组间比较差异均无统计学意义。

2.5.4　口腔念珠菌病　网状 meta 分析结果显示，“B-FP- 小”口腔念珠菌病发生情况优于“A-BUD- 小”[OR = 0.11，95%CI（0.01，0.99）] 和 PBO[OR = 0.44，95%CI（0.21，0.92）]，“A-CIC- 小”口腔念珠菌病发生情况优于“A-BUD- 小”[OR = 0.15，95%CI（0.02，0.92）]，差异有统计学意义，其余组间比较差异均无统计学意义。

2.5.5　安全性排序　不同干预措施治疗儿童哮喘总不良事件的 SUCRA 评分（评分越高代表对应的干预措施安全性越好）及优劣顺序见表 2。

2.6　发表偏倚检验

绘制校正比较漏斗图进行发表偏倚检验，若无小样本效应（发表偏倚）则点位应围绕零位线对称。漏斗图显示，药物相关不良事件、严重不良事件、口腔念珠菌病指标的大多数点位均可落在漏斗内，左右较对称，回归线斜率小，说明存在发表偏倚的可能性较小（见图 3），而总不良事件的点位表现出不对称，提示可能存在一定的发表偏倚，经 Egger’s 检验后 P 值为 0.432，大于 0.05，故认为该结局指标不存在发表偏倚。

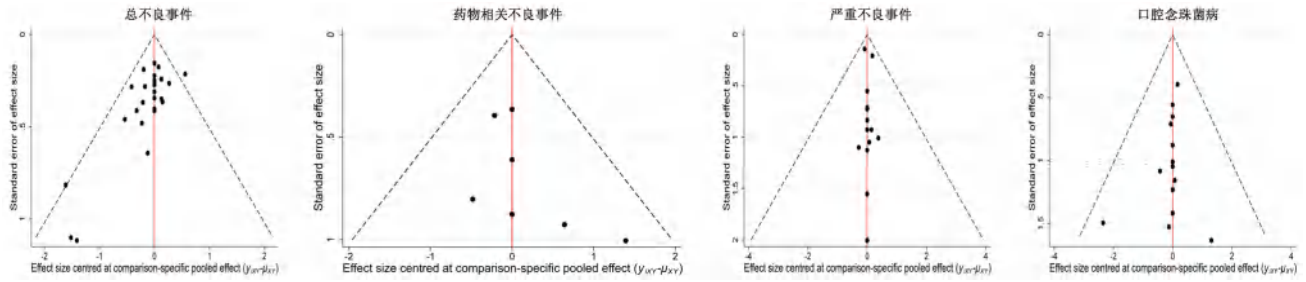


图 3　各结局指标的校正比较漏斗图

Fig 3　Adjusted comparison funnel plots for each outcome

3　讨论

目前我国儿童哮喘的总体控制水平尚未达到理想水平，儿童哮喘诊治仍然面临较大的挑战。2021 年全球哮喘防治创议指南及我国《儿童支气

表 2 SUCRA 评分及排序表

Tab 2 SUCRA and ranking

排序	总不良事件		药物相关不良事件		严重不良事件		口腔念珠菌病	
	干预措施	SUCRA	干预措施	SUCRA	干预措施	SUCRA	干预措施	SUCRA
1	C-FP- 大	97.4	B-CIC- 小	72.9	B-FP- 小	77.6	C-FP- 大	92.4
2	A-BDP- 小	82.0	B-BUD- 小	71.1	A-FP- 小	71.5	B-BUD- 小	77.9
3	B-CIC- 小	71.4	B-FP- 小	46.1	B-BUD- 小	64.8	B-FP- 小	73.8
4	A-CIC- 小	64.0	B-FP- 大	45.6	C-BUD- 小	62.7	A-CIC- 小	61.7
5	PBO	57.0	PBO	35.6	C-BDP- 大	50.7	B-FP- 大	55.4
6	A-FP- 小	56.6	A-FP- 小	28.8	C-BUD- 大	49.1	C-BUD- 大	44.9
7	A-BUD- 大	54.2			PBO	46.7	PBO	41.0
8	C-BUD- 小	47.0			A-CIC- 大	32.2	A-FP- 小	36.4
9	A-BUD- 小	43.7			A-CIC- 小	30.0	B-BUD- 大	30.9
10	B-FP- 大	36.2			A-BUD- 小	14.6	C-BUD- 小	23.8
11	B-BUD- 小	33.7					A-BUD- 小	11.7
12	B-BDP- 大	30.8						
13	C-BUD- 大	27.4						
14	A-CIC- 大	25.1						
15	B-FP- 小	23.4						

注（Note）：A. 气雾剂（metered dose inhalers）；B. 干粉剂（dry powder inhalers）；C. 雾化吸入器（nebulized inhaler）；小 . 小剂量（low dose）；大 . 大剂量（high dose）；FP 小、CIC 小、BDP 小表示剂量≤ 200 μg • d^{-1}；BUD 小表示剂量≤ 500 μg • d^{-1}。

管哮喘诊断与防治指南（2016 年版）》均认为儿童哮喘缓解期长期控制的首选药物为 ICS，ICS 的疗效已得到广泛肯定。

ICS 可通过吸入操作及不同的吸入装置输送至器官、支气管、肺泡，进而控制哮喘症状，降低哮喘的发作率、病死率等。肺小气道为吸入药物的重要作用部位，根据《稳定期慢性气道疾病吸入装置规范应用中国专家共识》，通过将吸入药物的粒径控制在 2 ～ 5 μm，将吸气流速控制在 30 L • min^{-1} 左右、增加每次吸气容积、延长用药后屏气时间等措施可以提高药物在肺小气道中的沉积率 [37]。但有 meta 分析 [38] 结果显示，不同 ICS 粒径大小对哮喘儿童疗效及安全性差异均无统计学意义。而本研究结果显示，较大剂量吸入 FP 时，雾化吸入器的总不良事件发生率低于干粉剂，但该结局指标存在一定发表偏倚，结论仍需进一步高质量研究验证。

同时本研究结果显示，使用气雾剂吸入小剂量药物时，CIC 口腔念珠菌病发生率低于 BUD，提示与 BUD 相比，CIC 口腔安全性方面可能具有优势。值得一提的是，据文献报道 CIC 是一种新型高效药物，属于糖皮质激素前药，具有口腔沉积率低、蛋白结合率高等特点，且在肺部被内源性酯酶分解后才得到活性代谢物——去异丁酰基环索奈德（Des-CIC），在口腔不良反应方面可能存在良好前景，本研究结果对该理论提供了一定支持。CIC 在美国和欧洲已分别被批准应用于 4 岁以上和 12 岁以上哮喘患者，国内尚未将 CIC 用于儿童。RCTs 的安全性研究结果显示，短期研究中（12 ～ 24 周）CIC 与 PBO 相似，长期研究中（12 个月）CIC 与 FP 相似 [3]。另有研究结果显示，FP 气雾剂在中高剂量时可导致约 7.7% 的人群产生下丘脑 - 垂体 - 肾上腺（HPA）轴的抑制 [39]。在途径、疗程、剂量参数中，剂量是产生 HPA 轴抑制的独立危险因素。目前针对Ⅲ期临床试验的系统评价表明，CIC 治疗儿童哮喘的疗效和安全性与 BUD 和 FP 相当 [40]。Kelly 等 [41] 进行了涉及 1041 例样本的 RCT 研究，试验组吸入 BUD 400 μg • d^{-1}，对照组吸入奈多罗米 16 mg • d^{-1} 或 PBO，治疗 4 ～ 6 年，结果显示 BUD 使儿童成年后身高降低约 1.2 cm，治疗前两年呈现剂量依赖性，尤其是在青春期前的哮喘儿童中。陈联辉等 [42]meta 分析结果显示哮喘儿童使用 ICS 不会明显影响成年终身高，而李颖 [43] 的 meta 分析结果显示 ICS 治疗半年后对身高抑制作用较明显，随时间增长抑制作用减少。目前普遍认为其有短暂生长抑制，但长期影响仍存在争议。

本研究的局限性：

① CIC 为单一制剂，为避免不同 β 受体激动剂影响，未纳入复合制剂研究，故近年文献较少；且限制样本量为 80 以上，可能遗漏样本量小但质量高的研究。

② 部分结局指标排序差距不大，结果不稳定，随样本量改变其排序结果也可能发生变化。

③ 纳入研究质量参差不齐，12 篇文献评估为高风险。

④ 纳入研究中有 19 篇为多臂研究，分类干预措施时对其中部分研究进行了必要的臂合并，若臂之间存在差异可能影响结果。

综上，雾化吸入器可能具有更好的安全性；对于无法耐受口腔不良事件的患儿，CIC 可能具有良好前景。故或可在临床医师和临床药师评估后针对患儿不良反应发生类型、是否耐受、合并口腔疾病情况等来适当调整 ICS 类型及剂量，进行有针对性的药物治疗管理服务 [44]。未来应更多地关注 CIC 在儿童哮喘中的应用。作为哮喘患儿长期控制的首选药物，受纳入研究数量及质量影响，ICS 的合理用药仍需要进一步高质量的研究验证。

参考文献

[1] 张偲莹，高宗石，吴丽宏，等 . 中国 1990—2019 年儿童青少年哮喘疾病负担变化趋势 [J]. 中国学校卫生，2022，43（1）：1-6.

[2] 刘传合，洪建国，尚云晓，等 . 中国 16 城市儿童哮喘患病率 20 年对比研究 [J]. 中国实用儿科杂志，2015，30（8）：596-600.

[3] Blaiss M，Berger W，Chipps B，et al. Safety of ciclesonide in children with asthma：a review of randomized controlled trials [J]. Allergy Asthma Proc，2021，42（6）：471-480.

[4] Cazeiro C，Silva C，Mayer S，et al. inhaled corticosteroids and respiratory infections in children with asthma：a meta-analysis [J]. Pediatrics，2017，139（3）：e20163271.

[5] Allen DB，Bronsky EA，LaForce CF，et al. Growth in asthmatic children treated with fluticasone propionate [J]. J Pediatr，1998，132（31）：472-477.

[6] Shapiro G，Bronsky EA，LaForce CF，et al. Dose-related efficacy of budesonide administered via a dry powder inhaler in the treatment of children with moderate to severe persistent asthma [J]. J Pediatr，1998，132（6）：976-982.

[7] Baker JW，Mellon M，Wald J，et al. A multiple-dosing，placebo-controlled study of budesonide inhalation suspension given once or twice daily for treatment of persistent asthma in young children and infants [J]. Pediatrics，1999，103（2）：414-421.

[8] Bisgaard H，Gillies J，Groenewald M，et al. The effect of inhaled fluticasone propionate in the treatment of young asthmatic children. a dose comparison study [J]. Am J Respir Crit Care Med，1999，160（1）：126-131.

[9] Kemp JP，Skoner DP，Szefler SJ，et al. Once-daily budesonide inhalation suspension for the treatment of persistent asthma in infants and young children [J]. Ann Allergy Asthma Immunol，1999，83（3）：231-239.

[10] LaForce CF，Pearlman DS，Ruff ME，et al. Efficacy and safety of dry powder fluticasone propionate in children with persistent asthma [J]. Ann Allergy Asthma Immunol，2000，85（5）：407-415.

[11] de Benedictis FM，Teper A，Green RJ，et al. Effects of 2 inhaled corticosteroids on growth：results of a randomized controlled trial [J]. Arch Pediatr Adolesc Med，2001，155（11）：1248-1254.

[12] Shapiro GG，Mendelson LM，Pearlman DS. Once-daily budesonide inhalation powder（Pulmicort Turbuhaler）maintains pulmonary function and symptoms of asthmatic children previously receiving inhaled corticosteroids [J]. Ann Allergy Asthma Immunol，2001，86（6）：633-640.

[13] Scott MB，Ellis MH，Cruz-Rivera M，et al. Once-daily budesonide inhalation suspension in infants and children ＜ 4 and or ≥ 4 years of age with persistent asthma [J]. Ann Allergy Asthma Immunol，2001，87（6）：488-495.

[14] Mendelson L，Cook D，Cruz-Rivera M，et al. Twice-daily budesonide inhalation suspension in infants and children ＜ 4 and ≥ 4 years of age with persistent asthma [J]. J Asthma，2002，39（3）：227-237.

[15] Ruff ME，Szefler SG，Meltzer EO，et al. Efficacy and safety of extrafine beclomethasone dipropionate aerosol therapy in children with asthma：a twelve-week placebo-controlled trial. [J]. Pediatr Asthma Allergy Immunol，2003，16（1）：1-13.

[16] Verona E，Petrov D，Cserhati E，et al. Fluticasone propionate in asthma：a long term dose comparison study [J]. Arch Dis Child，2003，88（6）：503-509.

[17] Bisca N，Cernatescu I，Dragomir D，et al. Comparison of the efficacy and safety of beclometasone dipropionate suspension for nebulization and beclometasone dipropionate via a metered-dose inhaler in paediatric patients with moderate to severe exacerbation of asthma [J]. Respir Med，2003，97（Suppl B）：S15-S20.

[18] Delacourt C，Dutau G，Lefrancois G，et al. Comparison of the efficacy and safety of nebulized beclometasone dipropionate and budesonide in severe persistent childhood asthma [J]. Respir Med，2003，97（Suppl B）：S27-S33.

[19] Carlsen KC，Stick S，Kamin W，et al. The efficacy and safety of fluticasone propionate in very young children with persistent asthma symptoms [J]. Respir Med，2005，99（11）：1393-1402.

[20] Berger WE，Qaqundah PY，Blake K，et al. Safety of budesonide inhalation suspension in infants aged six to twelve months with mild to moderate persistent asthma or recurrent wheeze [J]. J Pediatr，2005，146（1）：91-95.

[21] Levy AL，Given JT，Weinstein SF，et al. Efficacy and safety of fluticasone propionate hydrofluoroalkane inhalation aerosol in four-to eleven-year-old children with asthma：a randomized，double-blinded，placebo-controlled study [J]. Pediatr Asthma Allergy Immunol，2006，19（2）：106-117.

[22] Chen YZ，Busse WW，Pedersen S，et al. Early interven-

tion of recent onset mild persistent asthma in children aged under 11 yrs：the steroid treatment as regular therapy in early asthma（START）trial [J]. Pediatr Allergy Immunol，2006，17（Suppl 17）：7-13.

[23] Gelfand EW，Georgitis JW，Noonan M，et al. Once-daily ciclesonide in children：efficacy and safety in asthma [J]. J Pediatr，2006，148（3）：377-383.

[24] Silverman M，Sheffer AL，Diaz PV，et al. Safety and tolerability of inhaled budesonide in children in the Steroid treatment as regular therapy in early asthma（START）trial [J]. Pediatr Allergy Immunol，2006，17（Suppl 17）：14-20.

[25] Ferguson AC，Van Bever HP，Teper AM，et al. A comparison of the relative growth velocities with budesonide and fluticasone propionate in children with asthma [J]. Respir Med，2007，101（1）：118-129.

[26] von Berg A，Engelstätter R，Minic P，et al. Comparison of the efficacy and safety of ciclesonide 160 microg once daily vs. budesonide 400 microg once daily in children with asthma [J]. Pediatr Allergy Immunol，2007，18（5）：391-400.

[27] Vermeulen JH，Gyurkovits K，Rauer H，et al. Randomized comparison of the efficacy and safety of ciclesonide and budesonide in adolescents with severe asthma [J]. Respir Med，2007，101（10）：2182-2191.

[28] Skoner DP，Maspero J，Banerji D. Assessment of the long-term safety of inhaled ciclesonide on growth in children with asthma [J]. Pediatrics，2008，121（1）：e1-e14.

[29] Efficacy and safety of ciclesonide (CIC) administered twice daily in pediatric patients with asthma. https：//clinicaltrials. gov/ct2/show/results/NCT00392288.[2022-4-8].

[30] Pedersen S，Engelstätter R，Weber H，et al. Efficacy and safety of ciclesonide once daily and fluticasone propionate twice daily in children with asthma [J]. Pulm Pharmacol Ther，2009，22（3）：214-220.

[31] Efficacy of Ciclesonide Inhaled Once Daily Versus Other Corticosteroids Used for treatment of mild Asthma in children (4 to 11 Years) (BY9010/CA-101) (POPCICLE). https：//clinicaltrials. gov/ct2/show/results/NCT00163293. [2022-4-8].

[32] Pedersen S，Potter P，Dachev S，et al. Efficacy and safety of three ciclesonide doses vs placebo in children with asthma：the rainbow study [J]. Respir Med，2010，104（11）：1618-1628.

[33] Brand PL，Luz García-García M，Morison A，et al. Ciclesonide in wheezy preschool children with a positive asthma predictive index or atopy [J]. Respir Med，2011，105（11）：1588-1595.

[34] 马杏娟 . 环索奈德与布地奈德治疗儿童支气管哮喘的临床观察 [J]. 中国药房，2015，26（3）：322-325.

[35] Oliver AJ，Covar RA，Goldfrad CH，et al. Randomized trial of once-daily fluticasone furoate in children with inadequately controlled asthma [J]. J Pediatr，2016，178：246.

[36] Wu Z，Bian X，Hui L，et al. Nebulized step-down budesonide vs. fluticasone in infantile asthma：a retrospective cohort study [J]. Exp Ther Med，2020，19（3）：1665-1672.

[37] 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，中国慢性阻塞性肺疾病联盟 . 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.

[38] El Baou C，Di Santostefano RL，Alfonso-Cristancho R，et al. Effect of inhaled corticosteroid particle size on asthma efficacy and safety outcomes：a systematic literature review and meta-analysis [J]. BMC Pulm Med，2017，17（1）：31.

[39] Cavkaytar O，Vuralli D，Arik YE，et al. Evidence of hypothalamic-pituitary-adrenal axis suppression during moderate-to-high-dose inhaled corticosteroid use [J]. Eur J Pediatr，2015，174（11）：1421-1431.

[40] Blaiss M，Berger W，Chipps B，et al. Review of efficacy of ciclesonide for the treatment of asthma in children [J]. Allergy Asthma Proc，2021，42（6）：461-470.

[41] Kelly HW，Sternberg AL，Lescher R，et al. Effect of inhaled glucocorticoids in childhood on adult height [J]. N Engl J Med，2012，367（10）：904-912.

[42] 陈联辉，陈珊珊，梁黎，等 . 儿童哮喘及吸入性糖皮质激素对成年终身高影响的系统评价和 Meta 分析 [J]. 中国当代儿科杂志，2015，17（11）：1242-1247.

[43] 李颖 . 吸入糖皮质激素对哮喘儿童身高影响的 meta 分析 [D]. 重庆：重庆医科大学，2015.

[44] 胡利华，向莉，赵立波，等 . 药师进行儿童哮喘药物治疗管理的实践与思考 [J]. 安徽医药，2020，24（11）：2306-2309.

（收稿日期：2022-01-05；修回日期：2022-03-06）

时间序列模型在门诊患者抗菌药物使用率预测中的应用

王娜，闵芳芳（安徽医科大学附属滁州医院（滁州市第一人民医院），安徽　滁州　239000）

摘要：目的　探讨时间序列模型在门诊患者抗菌药物使用率预测中的应用，为医院的管控提供参考。**方法**　基于 2014 年 1 月—2020 年 12 月的门诊患者抗菌药物使用率数据构建求和自回归移动平均（ARIMA）模型和指数平滑模型，利用 2021 年 1—9 月数据验证两种模型的预测效果。**结果**　拟合最佳的 ARIMA 模型为 ARIMA（0，1，0），（0，1，1）$_{12}$ 模型，模型的 R^2 为 0.827，RMSE 为 2.400，MAPE 为 9.351，MAE 为 1.933，BIC 为 1.811，Ljung-Box Q ＝ 14.373，P ＝ 0.641，残差符合白噪声序列，验证 2021 年 1—9 月平均预测误差为 11.20%。拟合最佳的指数平滑法模型为 Holt-Winters 加法模型，模型的 R^2 为 0.932，RMSE 为 1.919，MAPE 为 6.926，MAE 为 1.523，BIC 为 1.461，模型残差序列的 Ljung-Box 统计量 Q ＝ 18.320，P ＝ 0.246，验证 2021 年 1—9 月平均相对误差为 10.15%。**结论**　Holt-Winters 加法模型能更好地模拟医院门诊患者抗菌药物使用率趋势，可为决策提供预测数据支持。

关键词：抗菌药物使用率；时间序列；预测；ARIMA 模型；指数平滑模型

中图分类号：R969.3，R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)06-1443-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.038

抗菌药物在感染性疾病中起着不可或缺的作用，如果滥用会诱导耐药菌的产生，同时给治疗带来难度，增加患者经济负担，浪费医疗资源。门诊患者抗菌药物使用率是医院抗菌药物管理中的一项管控指标。统计预测在现代医院管理中是至关重要的、科学的、决策性工具[1-2]。科学地预测门诊抗菌药物使用率，可以提高医院工作的客观性和正确性。本研究通过收集 2014 年 1 月—2020 年 12 月的门诊患者使用抗菌药物的数据，建立求和自回归移动平均（autoregressive integrated moving average，ARIMA）模型和指数平滑模型，并通过 2021 年 1—9 月数据进行验证比较预测效果，确定门诊使用抗菌药物使用的最优模型，为医院科学管理提供决策性依据。

1　资料与方法

1.1　资料来源

利用 PASS 系统，统计某三甲医院 2014 年 1 月—2021 年 9 月的门诊患者使用抗菌药物的月度数据，包括总例次、同期门诊总例次、同期门诊抗菌药物使用例次（均不含急诊例次）。门诊患者抗菌药物使用率（%）＝（门诊患者使用抗菌药物例次 ÷ 同期门诊总例次）×100%。

1.2　方法

以该院 2014 年 1 月—2020 年 12 月累计 84 个月的门诊抗菌药物使用率为建模数据，由 SPSS 22.0 软件作出的时间序列图可知，医院月门诊抗菌药物使用率存在季节周期性，分别建立 ARIMA 模型和指数平滑模型，再利用 2021 年 1—9 月的数据验证所建立的模型的预测效果。对预测值的评价用相对误差，最优模型评价指标包括稳定系数（R^2）、均方根误差（RMSE）、平均绝对误差百分比（MAPE）、平均绝对误差（MAE）以及正态化的 BIC，其中 R^2 越大，其余评价指标越小，即可确立[3]。Ljung-Box（18）检验结果 P ＞ 0.05，提示残差序列系白噪声，可以利用时间序列进行模型拟合[4-5]。

1.3　统计学方法

利用 Excel 2017 软件建立门诊患者抗菌药物使用率的数据库，采用 SPSS 22.0 软件中的时间序列对数据进行统计分析。不同年份门诊患者抗菌药物使用率的趋势变化分析采用趋势 χ^2 检验，检验水准 α ＝ 0.05，以 P ＜ 0.05 为差异具有统计学意义。

2　结果与分析

2.1　门诊抗菌药物使用的情况

2.1.1　各年度医院抗菌药物使用率　门诊就诊患者共计 3 076 536 例次，其中使用抗菌药物 712 473 例次，门诊患者抗菌药物使用率为 23.16%，平均每月抗菌药物使用率为 25.09%，超过国家规定（三级综合医院抗菌药物使用率≤ 20%）[6]。经趋势 χ^2 检验发现门诊患者医院抗菌药物使用率呈逐年下降趋势，由 2014 年的 35.17% 下降至

作者简介：王娜，女，主管药师，主要从事临床药学工作，email：441585420@qq.com

2020 年的 17.28%，差异有统计学意义（$\chi^2 = 44306.82$，$P < 0.001$）（见表 1）。

表 1 2014—2020 年门诊患者抗菌药物使用情况

年份	门诊人数	抗菌药物使用人数	抗菌药物使用率 /%
2014	314 887	110 742	35.17[a]
2015	341 845	102 135	29.88
2016	346 258	93 421	26.98
2017	462 767	92 552	20.00
2018	498 114	95 354	19.14
2019	582 035	126 593	21.75
2020	530 630	91 676	17.28[a]
总计	3 076 536	712 473	23.16

注：[a] 表示两者间差异有统计学有意义。

2.1.2 抗菌药物的月使用率 7 年平均门诊患者抗菌药物使用率统计结果显示，1 月抗菌药物使用率最高（30.72%），其次是 2 月（28.38%），8 月使用率最低（20.43%）。使用率呈现出一定的规律性，1—2 月、11—12 月使用率较高，3—9 月使用率较低，见图 1。

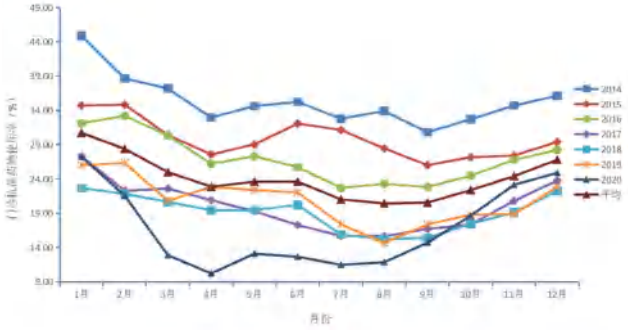


图 1 2014—2020 年门诊患者医院抗菌药物使用率月波动图

2.2 时间序列的平稳化

从医院 2014 年 1 月—2020 年 12 月门诊抗菌药物使用率的时间序列图知晓该序列门诊患者每年都有使用抗菌药物的高峰月份，呈现季节周期，逐年小幅递减趋势，系不平稳序列（见图 2）。对门诊抗菌药物使用率序列图，经一阶差分和一阶季节性差分处理后，基本消除趋势和周期性影响，显示序列趋向平稳（见图 3）。该序列的一阶差分和一阶季节性差分的相关系数分析提示是平稳时间序列（见图 4）。

2.3 ARIMA 模型的构建

应用 SPSS 22.0 时间序列建模器中的专家建模器，方法仅限 ARIMA 模型同时考虑季节性因素，自动拟合出 ARIMA 最优模型 ARIMA（0，1，0），（0，1，1）$_{12}$（见表 2）。残差序列通过白噪声检验（Ljung-Box $Q = 14.373$，$P > 0.05$）。对 ARIMA（0，1，0），（0，1，1）$_{12}$ 模型的残差序列进行相关性分析，结果显示相关系数具有平

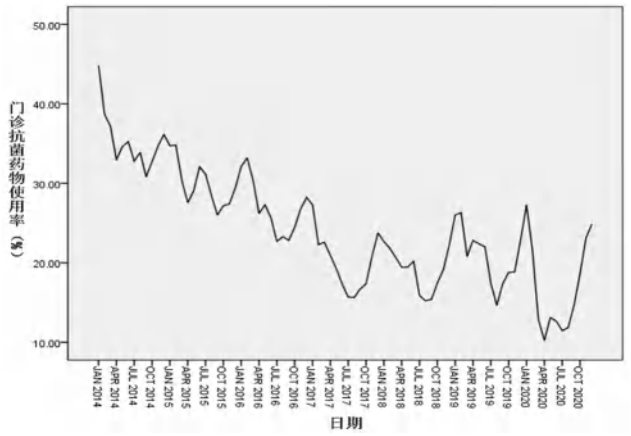


图 2 门诊抗菌药物使用率时间趋势图

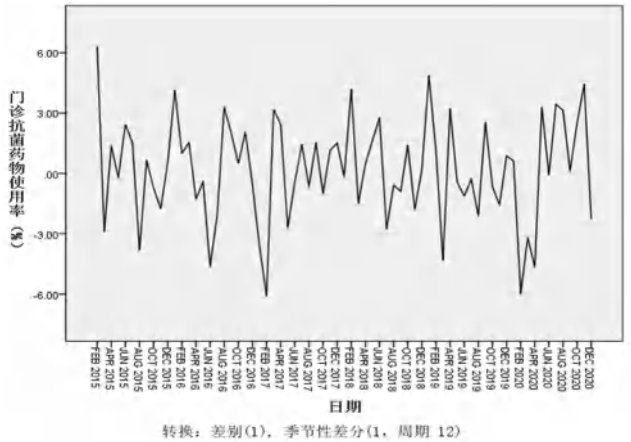


图 3 门诊抗菌药物使用率一阶差分和一阶季节性差分的时间趋势图

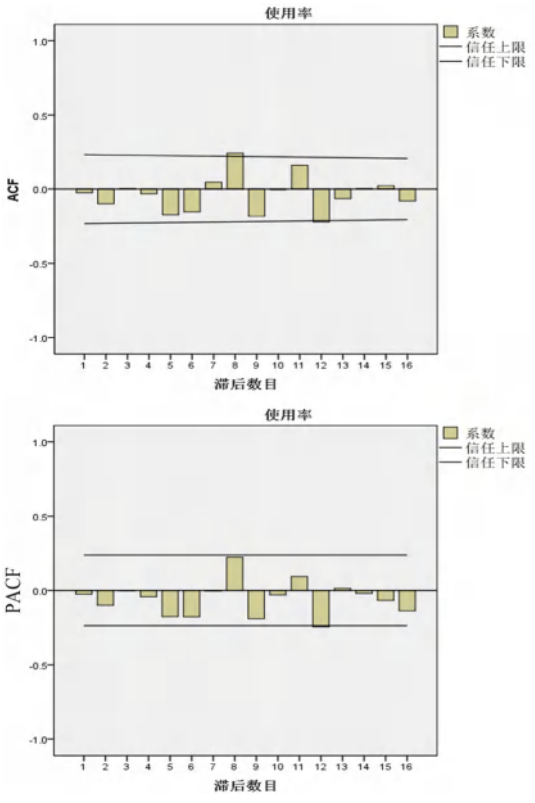


图 4 门诊抗菌药物使用率一阶差分和一阶季节性差分序列的自相关系数和偏自相关系数

表 2　ARIMA 模型和指数平滑模型的拟合指标统计量比较

模型类型	R^2	RMSE	MAPE	MAE	正态化 BIC	Ljung-Box Q（df）	P 值
ARIMA 模型指标值	0.827	2.400	9.351	1.933	1.811	14.373（17）	0.641
指数平滑模型							
简单季节	0.923	2.032	7.139	1.569	1.523	15.069（16）	0.520
Holt-Winters 乘法	0.903	2.293	8.065	1.704	1.818	25.355（15）	0.045
Holt-Winters 加法	0.932	1.919	6.926	1.523	1.461	18.320（15）	0.246

稳性，几乎都在 0 值附近随机游走，表明该残差序列为白噪声；则可用 ARIMA（0，1，0），（0，1，1）$_{12}$ 模型进行预测，如图 5。利用该模型预测 2021 年 1—9 月门诊抗菌药物使用率，预测误差在－ 0.12% ～ 0.27%，除 1 月外，门诊抗菌药物使用率实际值都在 ARIMA 模型预测值 95%*CI* 内（见表 3 及图 6）。

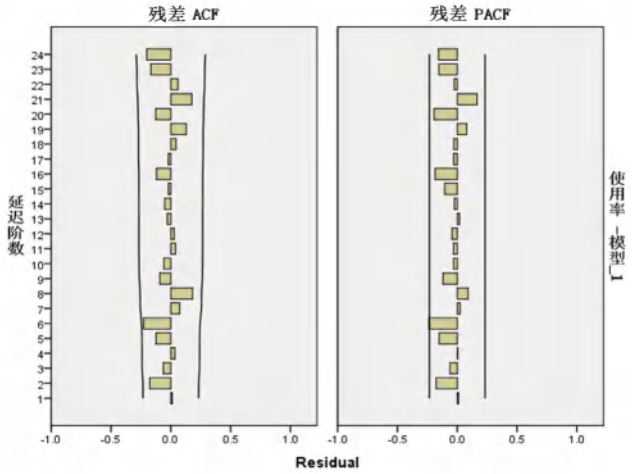


图 5　残差序列的自相关图（A）和偏自相关图（B）

表 3　ARIMA 模型对 2021 年门诊抗菌药物使用率的实际值与预测值比较

月份	实际值	预测值	95%*CI*	误差	相对误差 /%
1 月	22.12	27.33	（22.74，31.92）	5.21	0.24
2 月	19.23	24.47	（17.99，30.96）	5.24	0.27
3 月	15.87	19.31	（11.36，27.25）	3.44	0.22
4 月	14.35	17.90	（8.73，27.07）	3.55	0.25
5 月	18.27	18.94	（8.69，29.19）	0.67	0.04
6 月	18.78	18.66	（7.43，29.89）	－ 0.12	－ 0.01
7 月	14.63	16.01	（3.88，28.14）	1.38	0.09
8 月	17.46	15.36	（2.39，28.32）	－ 2.10	－ 0.12
9 月	16.46	16.98	（3.22，30.73）	0.52	0.03
平均误差预测					11.20

2.4　指数平滑模型的构建

根据图 1 可知，门诊患者抗菌药物使用率呈波动式下降并且有明显的季节变化。根据其季节变动确立周期为 12，分别建立简单季节、Holt-Winters 乘法和 Holt-Winters 加法模型。3 种模型比较评价指标显示，Holt-Winters 加法模型的平稳 R^2 最大，为 0.932；RMSE、MAPE、MAE 及正态化 BIC 最小，分别为 1.919、6.926、1.523、1.461，所以最优拟合模型为 Holt-Winters 加法模型。模型残差序列的 Ljung-Box Q ＝ 18.320，P ＝ 0.246，拟合效果最好，见表 2。

对 Holt-Winters 加法模型的残差序列进行相关性分析，结果显示相关系数具有平稳性，几乎都在 0 值附近随机游走，可见 Holt-Winters 加法模型的残差序列具有平稳性（见图 7）。

运用 Holt-Winters 加法模型回代 2014—2020 年门诊抗菌药物使用率，结果显示门诊抗菌药物使用率均在 95%*CI* 内，2021 年 1—9 月的门诊抗菌药物使用率预测值与实际值相比，其相对误差在－ 0.11% ～ 0.27%，平均相对误差为 10.15%，见图 8 及表 4。

表 4　Holt-Winters 加法模型对 2021 年门诊抗菌药物使用率的实际值与预测值比较

月份	实际值	预测值	95%*CI*	误差	相对误差 /%
1 月	21.12	25.91	（22.09，29.72）	3.79	0.17
2 月	19.23	23.57	（18.17，28.97）	4.34	0.23
3 月	15.87	20.17	（13.56，26.78）	4.30	0.27
4 月	14.35	18.06	（10.43，25.69）	3.71	0.26
5 月	18.27	18.79	（10.26，27.32）	0.52	0.03
6 月	18.78	18.79	（9.45，28.13）	0.01	0.00
7 月	14.63	16.20	（6.11，26.30）	1.57	0.11
8 月	17.46	15.62	（4.83，26.41）	－ 1.84	－ 0.11
9 月	16.46	15.74	（4.29，27.18）	－ 0.72	－ 0.04
平均误差预测					10.15

2.5　模型比较

两种模型对门诊抗菌药物使用率预测值比较预测效果见表 5。结果显示，Holt-Winters 加法模型平均相对误差（10.15%）比 ARIMA 模型（11.20%）的小，单从误差情况来看，Holt-Winters 加法比 ARIMA 模型更适合预测门诊抗菌药物的使用。

从 Holt-Winters 加法模型和 ARIMA 模型评价指标来看，Holt-Winters 加法模型的 R^2 高于 ARIMA 模型的值；其他指标 RMSE、MAE、MAPE、正态化的 BIC（贝叶斯规则）低于 ARIMA 模型的值。虽然两种模型的拟合效果类似。但是

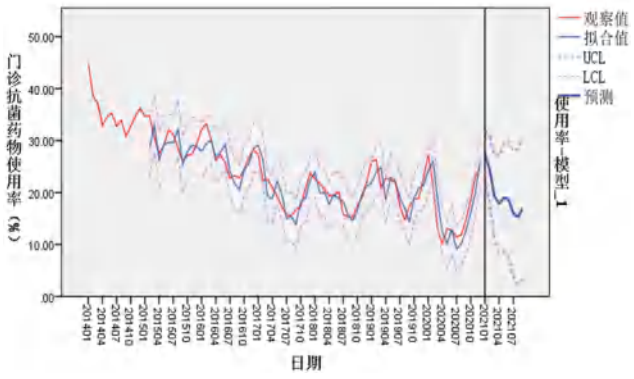


图 6 ARIMA 模型对门诊抗菌药物使用率的实际值与预测值的时间序列

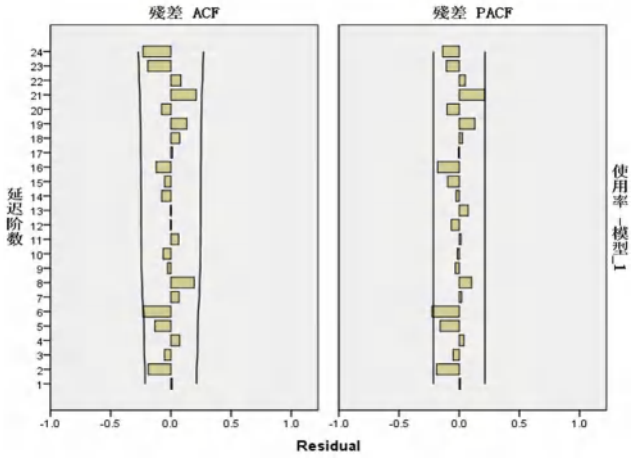


图 7 Holt-Winters 相加法模型的残差序列相关系数图

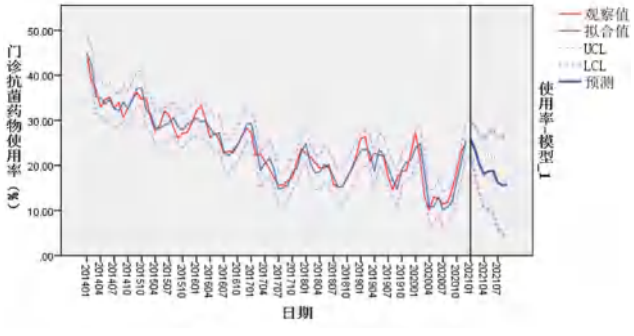


图 8 Holt-Winters 加法模型对门诊抗菌药物使用率实际值与预测值的时间序列

表 5 两种模型对 2021 年 1—9 月门诊抗菌药物使用率的预测值

月份	实际值	ARIMA 模型		Holt-Winters 加法模型	
		预测值	相对误差 /%	预测值	相对误差 /%
1 月	22.12	27.33	0.24	25.91	0.17
2 月	19.23	24.47	0.27	23.57	0.23
3 月	15.87	19.31	0.22	20.17	0.27
4 月	14.35	17.90	0.25	18.06	0.26
5 月	18.27	18.94	0.04	18.79	0.03
6 月	18.78	18.66	− 0.01	18.79	0.00
7 月	14.63	16.01	0.09	16.20	0.11
8 月	17.46	15.36	− 0.12	15.62	− 0.11
9 月	16.46	16.98	0.03	15.74	− 0.04
平均预测误差			11.20		10.15

结合两种模型相对误差情况看，Holt-Winters 加法模型更适用于预测该院的门诊抗菌药物使用趋势。

3 讨论

3.1 抗菌药物使用率较高的原因

抗菌药物使用率较高，可能存在以下原因 [7-8]：

① 患者对抗菌药物过度依赖，在就诊期间主动要求医师开具抗菌药物。建议药师走进社区，开展宣传抗菌药物合理使用的活动，提高群众对抗菌药物的认识。

② 医师对抗菌药物过度依赖，对细菌耐药性认识浅薄，加上对患者满意度的担心，忽略了检验的重要性。在院内开展抗菌药物合理使用的专题讲座，让医师认识滥用抗菌药物导致细菌耐药性的严重性。医师需掌握病毒、缺乏感染依据等无指征使用抗菌药物的危害。当患者要求开具抗菌药物时，做好沟通工作。使用抗菌药物前，需要有细菌感染证据，病原学检查必不可少。医院应重视实验室建设和检验医学人才的培养，以缩短病原微生物的检查时间。随着人口老龄化，老年患者“多病共存”现象较普遍，医师需提高自身业务能力。医院应对各科室开展有针对性的理论和实践培训。为控制抗菌药物使用，医院出台了相关政策，将抗菌药物使用纳入绩效考核，实施奖惩制度。

③处方审核系统不够全面、专题讲座不到位、点评结果临床不接受或不重视、药师自身技能不够专业。处方前置审核系统设置抗菌药物规则需精细化。临床药师定期开展抗菌药物合理使用的专题讲座。开展门急诊及住院抗菌药物点评，医院加强监管力度，对点评结果给予反馈。提高临床药师、审方药师自身技能，为抗菌药物的合理使用保驾护航。药师可利用统计工具来预测抗菌药物使用率、细菌耐药性等，为医院管理决策提供预测数据支持。

3.2 时间序列的可行性和局限性

时间序列系基于时间的历史数据，预测其未来变化趋势的统计方法，在卫生 [9-10]、环境 [11]、金融 [12] 等领域广泛应用。常见的时间序列预测模型是 ARIMA 模型和指数平滑模型，两者均可利用数据的过去值、现在值，短期预测未来值 [13]。

本研究利用专家建模器中的 ARIMA 模型和季节性指数平滑模型构建门诊抗菌药物使用率预测模型。依据模型评价指标和平均误差比较，基于 7 年的数据筛选出最优预测模型为 Holt-Winters 加法模型。该模型残差序列的 Ljung-Box 统计量差异无统计学意义，符合白噪声序列，提示可以

预测拟合。利用该模型对 2021 年 1—9 月医院门诊抗菌药物使用率进行预测，真实值均在预测范围内，平均相对误差为 10.15%。随着预测时间的延长，预测值的 95%*CI* 开口也随之增大，从侧面也说明模型适用于短期预测。

该研究说明 Holt-Winters 加法模型更适合预测该院门诊抗菌药物的使用，与柳海环等 [14] 报道的不一致。可能是由于医院类型、医院环境不同，门诊抗菌药物使用率的变化走向不同，所以构建的模型不一。因为门诊抗菌药物的使用受诸多因素影响，包括季节因素、人为因素（如医师和患者）以及社会突发事件等。比如新型冠状病毒肺炎疫情期间医院管控门诊，减少了门诊就诊人数，也减少了交叉感染，从而减少门诊抗菌药物的使用，抗菌药物使用率降低。这也是时间序列模型的不足，未考虑外界因素的影响 [15]，所以在工作中应考虑把相关影响因素纳入模型。鉴于模型基于历史数据预测，因此需要不断地更新数据，修正模型参数或重新拟合模型得到最优模型，预测才能更准确，才能为医院管控提供更真实的数据和有效的建议。

3.3　利用预测模型，推进精细化管理

预测模型可以动态监测和预警门诊抗菌药物的使用情况。医院管理者可根据门诊抗菌药物使用的季节变化，合理调配资源（包括人、物资、财）。在门诊抗菌药物使用高峰期，医院管理者可安排多一些医师上门诊，避免医师因过度疲劳而导致诊疗质量的下降，同时缩短患者的等候时间 [16]。若门诊抗菌药物使用率的预测值超出置信区间，从侧面表明了医师开具的抗菌药物处方很可能存在不适宜的现象，应及时采取干预措施，加大力度处方点评和整治 [14]。该模型有利于药房合理的调配抗菌药物，可避免库存不足，出现应急叫药的处境，同时也可避免因积压出现过期造成浪费的现象，使资源配置合理化，有助于推进医院精细化管理，提升医院的整体管理水平和综合竞争能力 [17]。

参考文献

[1] 董波，王惠慈 . 统计预测 • 统计决策 • 医院管理（一）[J]. 中国医院统计，2003，10（2）：104-106.

[2] Martinez EZ，Silva EA，Fabbro AL. A Sarima forecasting model to predict the number of cases of dengue in Campinas，State of São Paulo，Brazil [J]. Rev Soc Bras Med Trop. 2011，44（4）：436-440.

[3] 黄晓亮，谢易娴 . 新冠肺炎疫情对广东省住院量的影响分析 [J]. 中国卫生统计，2021，38（3）：344-347.

[4] Rosychuk RJ，Klassen TP，Voaklander DC，et al. Seasonality patterns in croup presentations to emergency departments in Alberta，Canada：a time series analysis [J]. Pediatric Emergency Care，2011，27（4）：256-260.

[5] 宇方，陈婷婷 . 指数平滑法预测某医院感染现患率模型的建立及应用 [J]. 解放军预防医学杂志，2020，38（3）：23-26.

[6] 国家卫生计生委办公厅 . 2013 年全国抗菌药物临床应用专项整治活动方案 [S]. 2013-05-06.

[7] 罗颖，曾以萍 . 临床抗菌药物滥用现状分析及对策研究 [J]. 华西医学，2013，28（7）：1127-1131.

[8] 李鑫，左静，廖丽娜，等 . 抗菌药物用药规则的精细化设置在门诊处方前置审核中的应用实践 [J]. 实用药物与临床，2020，23（3）：286-288.

[9] 刘伟军，张千彧，李帅帅，等 . 基于 SPSS 统计软件的医用装备诊疗检查需求预测的 ARIMA 模型构建与应用研究 [J]. 中国医学装备，2020，17（9）：135-139.

[10] 赵棋锋，马珊珊，王吉玲，等 . 指数平滑法与 ARIMA 模型对流感样病例流行趋势的预测效果比较 [J]. 预防医学，2020，32（4）：381-383，387.

[11] 王法溧，何晓宇，方泽兴，等 . 基于长时间序列遥感数据的阿伯德尔国家公园生态环境质量评价 [J]. 地球信息科学学报，2019，21（9）：1479-1489.

[12] 温玉莲，林培光 . 基于行业背景差异下的金融时间序列预测方法 [J]. 南京大学学报（自然科学），2021，57（1）：90-100.

[13] 汪鹏，彭颖，杨小兵 . ARIMA 模型与 Holt-Winters 指数平滑模型在武汉市流感样病例预测中的应用 [J]. 现代预防医学，2018，45（3）：385-389.

[14] 柳海环，柳海琛，吴晨帆，等 . 运用时间序列模型预测门诊患者抗菌药物使用率趋势 [J]. 中国药房，2017，28（23）：3197-3200.

[15] 彭荣荣，刘芸男，杨小丽，等 . 基于时间序列分析的单采血小板临床需求预测模型研究 [J]. 首都医科大学学报，2020，41（2）：231-236.

[16] 汤洁，杨晨红，曾荣，等 . 某皮肤病专科医院门诊人次的时间序列预测及应用 [J]. 中国卫生统计，2019，36（1）：87-89.

[17] 马丽卿，李木清，何可，等 . 医院精细化管理的实践应用 [J]. 现代医院，2020，20（3）：337-340.

（收稿日期：2022-01-02；修回日期：2022-02-14）

黄芩苷领域的文献计量研究及其可视化分析

惠玉玉[1, 2]，王敏[1, 2]，田文丽[1, 2]，邓秀平[1, 2]，刘志东[1, 2*]（1. 天津中医药大学中医药研究院 组分中药国家重点实验室，天津 301617；2. 天津中医药大学现代中药发现与制剂技术教育部工程研究中心，天津 301617）

摘要：目的 采用文献计量学的方法对黄芩苷领域相关文献进行计量研究和可视化分析，发掘该研究领域近年来的研究热点和未来研究趋势。**方法** 通过 R 语言软件对 Web of Science 数据库核心集中黄芩苷的研究论文和综述进行计量学研究，分析该领域年发文量趋势、国家机构间合作、期刊合作、研究热点和未来研究趋势。**结果** 共发现 1069 篇文献，从 1998 年到 2010 年发文量占比 24.23%，2011 到 2021 年发文量占比 75.77%，黄芩苷领域的发展主要依赖于中国，且与其他各国合作密切。关键词共现图显示黄芩苷的研究主要集中在抗肿瘤、抗氧化、抗炎、神经保护、细胞通路研究等。主题演化词发现黄芩苷领域的研究从早年的提取分离、物理性质研究，演变为现在的基因表达、氧化应激、抗凋亡以及制剂方面的研究。**结论** 黄芩苷的研究热点为疾病的分子机制研究和制剂的改善，未来可在这些方向进行深度研究。

关键词：黄芩苷；R 语言；文献计量学；可视化分析
中图分类号：R95 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1448-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.039

Bibliometrics and visualization of baicalin related studies

HUI Yu-yu[1, 2], WANG Min[1, 2], TIAN Wen-li[1, 2], DENG Xiu-ping[1, 2], LIU Zhi-dong[1, 2*] (1. *State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine*, *Research Center for Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617; 2. *Engineering Research Center for Modern Chinese Medicine Discovery and Preparation*, *Ministry of Education*, *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617)

Abstract: Objective To quantitatively analyze and visualize related literatures on baicalin, and explore the hot spots in research and trends in recent years through bibliometrics. **Methods** Through R language and VOS viewer software, the research and review articles of baicalin in the core of the Web of Science database were analyzed quantitatively, and the results were presented in a visual form. The trend of the annual publication in this field, cooperation among countries and institutions, and journals, the hot spots in research, and future research trends were all analyzed. **Results** Totally 1069 documents were found, including articles published from 1998 to 2010 (24.23%) and articles published from 2011 to 2021(75.77%). The development in the field mainly took place in Asian countries especially in China. There were close cooperations between countries. The keywords co-occurrence showed that the research of baicalin mainly focused on anti-tumor, anti-oxidation, anti-inflammatory, neuroprotection, cell pathway research, etc. The subject heading analysis found that the research in the field of baicalin evolved from the early years of extraction and separation and physical properties to the current research on gene expression, oxidative stress, anti-apoptosis and preparations. **Conclusion** The research hotspots and future trends of baicalin include the molecular mechanism of baicalin in diseases and the research on baicalin preparations.

Key words: baicalin; R language; bibliometrics; visual analysis

基金项目：中央引导地方科技发展专项（No. 21ZYJDJC00020）。

作者简介：惠玉玉，女，在读硕士研究生，主要从事药剂学研究，email：944044257@qq.com *通信作者：刘志东，男，博士研究生导师，研究员，主要从事眼用新型给药系统、缓控释制剂以及经典名方中药复方制剂的研究，email：lonerliuzd@163.com

黄芩苷（baicalin）是从中药黄芩干燥根中提取获得的黄酮类化合物，其来源稳定、高效低毒、质量可控且生物学功能多。研究表明，黄芩苷在抗癌、抗氧化、抗炎、保护神经等方面显示出较好的药理作用[1-4]。在胰腺癌的治疗中，黄芩苷被鉴定为一种通过 JNK/Foxo1/BIM 通路抑制胰腺癌进展的新型调节剂[1]。在抗氧化方面的研究中，不同剂量的黄芩苷治疗高胆固醇血症大鼠，可以有效地降脂、减轻脂肪肝，并且是一种良好的氧化剂，从而用于预防和治疗动脉粥样硬化和冠心病[2]。在抗炎方面的研究中，通过监测黄芩苷对脂多糖（LPS）介导的血管炎症的影响，发现黄芩苷能抑制 LPS 诱导的屏障破坏、细胞黏附分子（CAM）的表达以及单核细胞向人内皮细胞的黏附 / 跨内皮迁移，同时可以抑制 phorbol-12-myristate 13-acetate 和 LPS 诱导的内皮细胞蛋白 C 受体的脱落，并且在体内抑制 LPS 诱导的高渗透性和白细胞迁移，表明黄芩苷通过抑制高渗透性、CAM 的表达以及白细胞的黏附和迁移而发挥抗炎作用[5]。然而，关于黄芩苷的文献计量和科学计量研究在数据库中还未见报道，这使得研究者对黄芩苷研究领域缺乏全面的了解。本文对黄芩苷近 20 年来的研究进行科学计量和系统总结，以期发现该领域的研究热点和未来研究趋势。

文献计量学是一种常用于研究某领域发展状况及预测未来研究热点的有效方法，能够快速掌握和跟踪领域发展[6]。目前，文献计量学分析中，CiteSpace 和 VOSviewer 等软件已经被人们广泛应用，但这类软件分析方法存在缺陷，且无法分析超大量数据[7]。R 语言是一门新兴的计算机语言，用于文献计量研究具有全面性、便利性、快捷性等优点。例如，疼痛和炎症共病的文献计量发现自 1981 年以来，世界范围内对该类研究逐渐变得广泛，其中最深入的研究方向为神经病理疼痛[8]。抑郁症相关领域的文献计量中，发现生活环境及社会压力与抑郁症的发生发展密切相关，突发关键词显示海马体的深入研究将是抑郁症领域未来的热点趋势[9]。血管钙化的文献计量发现，该领域的主要研究热点是血管钙化在慢性肾脏病或心血管疾病患者中的分子机制和预后，未来研究的重点将聚焦于血管内治疗和针对血管钙化信号通路的新药开发[10]。

本研究利用 Web of Science 数据库，使用 R 语言的 Bibliometrix 包[11]，对数据库中黄芩苷领域的文献进行计量分析，为黄芩苷的研究热点和未来趋势提供指导和帮助。分析流程图见图 1。

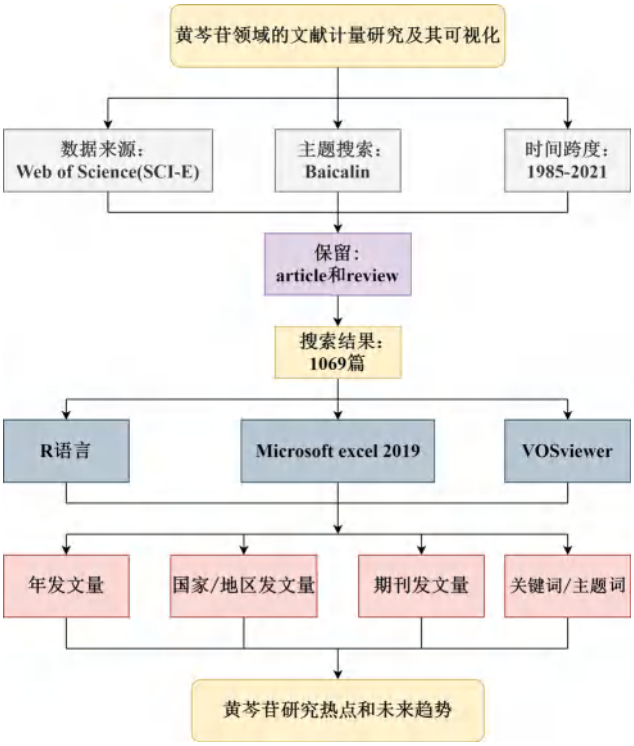


图 1　黄芩苷领域的文献计量研究及其可视化分析流程图

Fig 1　Flow chart of bibliometrics and visualization of baicalin-related literatures

1　方法

文献来源：Web of Science 核心集数据库；检索策略：主题为 baicalin；文献索引日期：1985 年 1 月 1 日到 2021 年 6 月 27 日；文献下载格式：纯文本；文献下载内容：全记录与引用的参考文献。使用 R 软件（version 4.1.0）中文献计量学包 Bibliometrix（version 3.13）或文献计量学分析软件 VOSviewer（version 1.6.16）对原始文献数据的年发文量、国家 / 地区发文量及合作、机构合作、关键词进行分析。基于科学计量学分析的结果，对所分析出来的研究热点和未来趋势进一步讨论。

2　结果

经过搜索和筛选，共获得 1069 篇关于黄芩苷的文献，其中研究论文占 97.85%，综述占 2.15%。

2.1　年份

由图 2 可知，从 1998 年至 2021 年，有关黄芩苷的文章年发文量整体的增长越来越快。1998 年到 2005 年黄芩苷领域的年发文量增长速度缓慢，整体处于平稳阶段，共有 77 篇关于黄芩苷研究的文章；2006 到 2017 年，发文量处于缓慢上涨阶段。随着黄芩苷被广泛关注，相关研究逐步增加。从 2018 年开始，年发文量突破 100 篇，2018 到 2020

年共发表英文文章 350 篇。整体看来，黄芩苷的研究还未达到平台期，还处于一个增长的态势。

2.2 国家 / 地区发文量与国家 / 地区间合作关系分析

如图 3a 所示，1069 篇文献来自 42 个国家 / 地区。其中 860 篇来自中国，占所有文献的 80.45%，其次是美国（7.76%）、韩国（5.89%）、中国台湾（3.74%）、日本（3.55%）、印度和意大利（各占 1.03%），发文量均高于 10 篇。图 3b 显示了国家 / 地区间的合作关系，目前，国际上有关于黄芩苷的研究合作中，中国发文量最多，为 104 篇，占总合作数量的 71.7%，与中国合作最为密切的国家为美国（60 篇）。发文量和合作关系均表明，目前中国和美国为研究黄芩苷的主要国家。

2.3 期刊发文量与期刊间合作关系分析

如图 4a 所示，*International immunopharmacology* 发表了 23 篇，占比 2.15%；*European journal of pharmacology* 发表了有关黄芩苷的文章 20 篇，占比 1.87%；*Journal of ethnopharmacology* 和 *PLoS one* 各发表 19 篇，各占比 1.78%；*Phytotherapy research* 发表了有关黄芩苷的文章 18 篇，占比 1.68%。期刊统计显示，目前关于黄芩苷的研究主要集中于药理方向。期刊的合作关系见图 4b。期刊之间的合作错综复杂，紧密联系，说明期刊的共同合作不断推动着黄芩苷研究领域的发展。

2.4 关键词与主题词分析

通过运行 VOSviewer 软件中的共现分析类型，分析类型选所有关键词，进行黄芩苷的可视化图谱分析。如图 5a 所示，所分析的文献研究内容均以“baicalin”为中心或基础而展开，包括“expression”“in-vitro”“apoptosis”“activation” 和“flavonoids”等。其中关键词“baicalin”出现的频次最多为 811 次，其他高频次的关键词还有“apoptosis”（n = 100）和“inflammation”（n = 61）等。同时，图中也发现了有关黄芩苷的研究主要有体外研究、药物动力学、脑中风、神经保护、细胞通路、急性肺损伤等。关于黄芩苷研究的主题词的演变见图 5b。将其按时间分为 3 个阶段，从 1998 年到 2005 年，有关黄芩苷的研究主要为细胞凋亡、抗炎活性、提取分离、生物利用度；从 2005 年到 2013 年，黄芩苷的研究主要为纳米粒子、氧化应激、治疗胰腺炎等；从 2013 年至 2021 年，黄芩苷的研究演化为体外研究、基因表达和抗凋亡等。

2.5 被引频次 Top10 文章分析

我们分析了黄芩苷领域被引用次数 Top10 的文章。如表 1 所示，其中有 3 篇文章是关于黄芩苷抗炎的研究，包括黄芩苷抗炎机制的研究、与趋化因子结合的研究、对炎症性疾病的治疗研究等；3 篇文章研究内容与黄芩苷抗癌作用有关，包括治疗膀胱癌的研究、诱导前列腺癌细胞凋亡等的研究。被引用次数高达 599 次，被引频次前 10 的文章大多集中于欧美国家，这表明我国在黄芩苷的研究中，虽然发文量最多，但是研究深度还有所欠缺。

3 讨论

通过对年发文量进行可视化分析，结果显示，1998 年黄芩苷被人们发现，2018 年黄芩苷的年发文量出现爆发式增长，且处于持续上升阶段，表明黄芩苷的研究处于广泛被探索的阶段。中国在黄芩苷的研究中占据核心地位，是参与国际合作最密切的国家，预示着中医药的发展将会走向世界，形成以中国为领导地位的合作平台。

期刊的文献计量分析发现，目前关于黄芩苷的研究主要发表于药理方向的期刊。文献总结了黄芩的抗肿瘤研究成果，其中黄芩苷作为其主要的生物活性成分，不仅具有细胞抑制作用，而且在体外对各种人类肿瘤细胞系具有细胞毒性，并在体内抑制肿瘤生长。最重要的是，它对正常上皮细胞、外周血细胞和骨髓细胞几乎没有毒性 [12]。将不同浓度的黄芩苷与膀胱癌细胞一起孵育，发现黄芩苷具有很强的抗肿瘤细胞增殖和抑制肿瘤生长的活性，提示黄芩有望成为一种治疗膀胱癌的中药 [13]。同时，研究被引文献还发现，黄芩苷具有抗炎和抗 HIV-1 的活性，其通过干扰 HIV-1 Env 与趋化因子辅助受体的相互作用阻止 HIV-1 进入靶细胞，提示黄芩苷有望成为抗 HIV-1 的药物 [14]。黄芩苷通过减弱 NF-κB 的活性和抑制包括单核细胞趋化蛋白在内的几种炎性细胞因子和趋化因子的表达来清除活性氧（ROS）和改善抗氧化状态的能力，在糖尿病、心血管疾病、炎症性肠病、痛风和类风湿关节炎、哮喘、神经退行性疾病、肝肾疾病、脑脊髓炎等疾病中显示出抗氧化和抗炎作用 [15]。

关键词共现结果表明黄芩苷相关研究主要集中在抗氧化、神经保护、抗肿瘤等方向。在抗氧化的研究中，黄芩苷可以通过结合泊洛沙姆形成可注射的水凝胶，通过显著的抗氧化活性，用于伤口愈合的治疗 [16]。在神经保护的研究中，黄芩苷被腹腔注射于小鼠脑外伤减重模型，结果显示黄芩苷可以通过激活 Akt/Nrf2 通路在创伤性脑损伤小

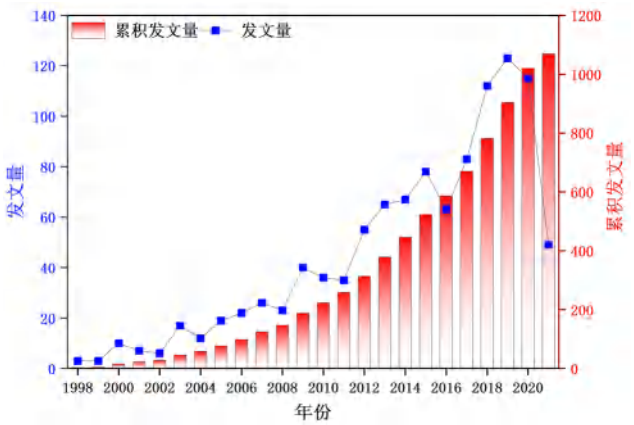


图 2　黄芩苷领域发文量及累积发文量图

Fig 2　Number and cumulative number of publications in the field of baicalin

鼠模型中提供神经保护作用[17]。在抗肿瘤的研究中，证实了非毒性剂量的黄芩苷可以显著抑制卵巢癌细胞的成球能力，并可以抑制卵巢癌干细胞标志物（CD133 和 ALDH1A1）的表达[18]。关键词发展演化图谱显示，黄芩苷的研究方向是从抗炎活性、提取分离、生物利用度开始的，随着纳米技术的出现，2006 年到 2013 年期间黄芩苷的研究集中在利用纳米载药技术对黄芩苷进行修饰，以提高其水溶性。有研究利用纳米技术，有效地将黄芩苷制备成具有极高包封率的近球形颗粒，不仅改善了黄芩苷的物理性质，而且能成功将黄芩苷靶向到肝脏部位[19]。2014 年以后，黄芩苷领域的研究演变为体外研究、基因表达等。黄芩苷可以抑制 HMGB1/

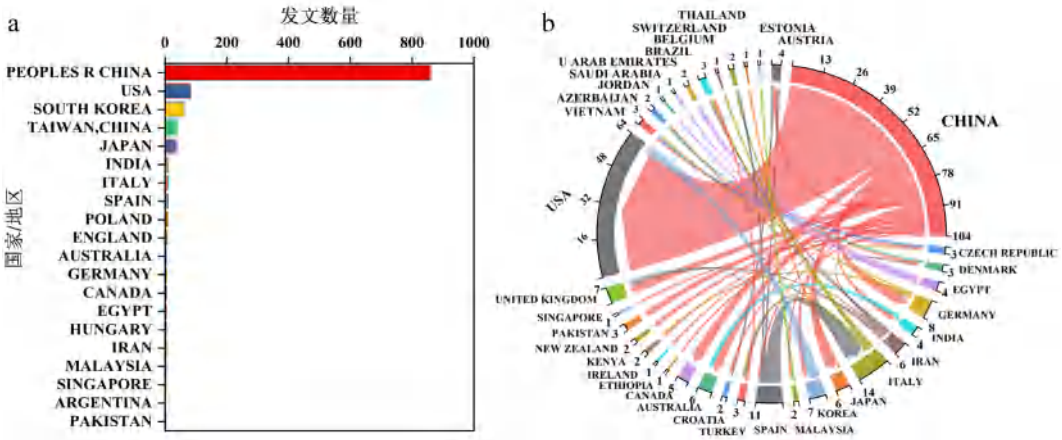


图 3　国家发文量图谱（a）和国家合作关系图谱（b）

Fig 3　Publications in various countries（a）and cooperations among countries（b）

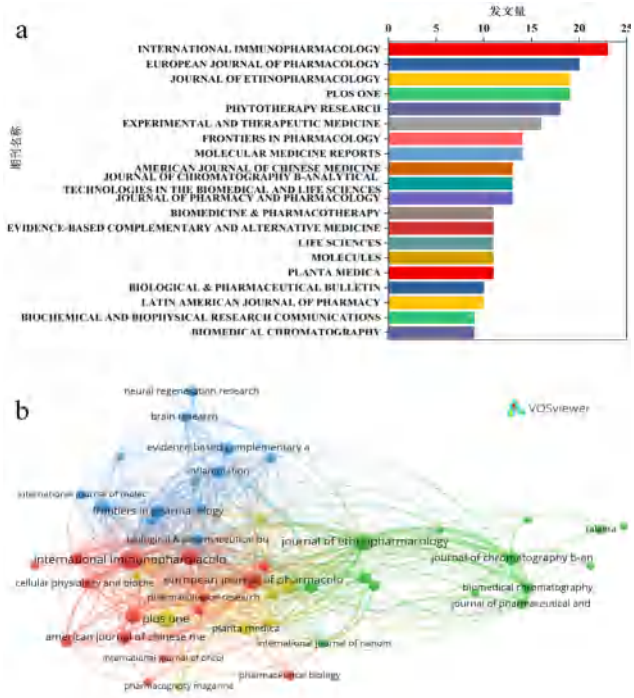


图 4　期刊发文量（a）和期刊合作关系图谱（b）

Fig 4　Publications in journals（a）and cooperations among journals（b）

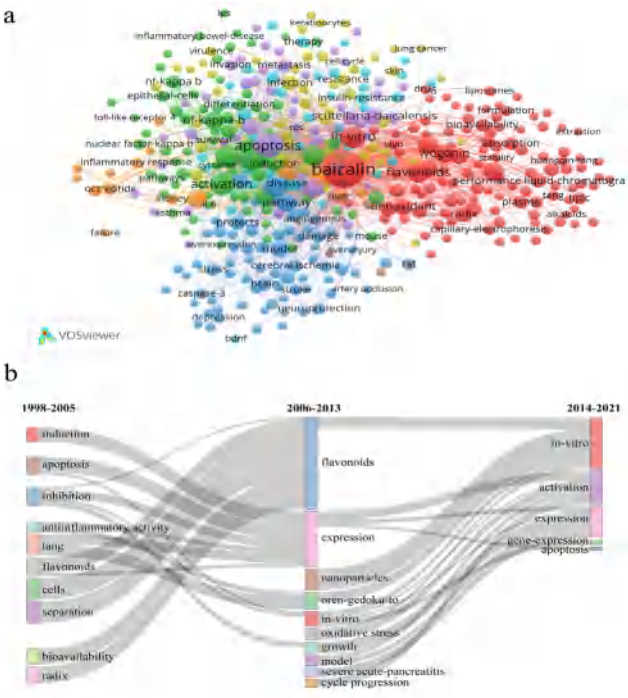


图 5　图 5 关键词共现图（a）和主题词演化图（b）

Fig 5　Keywords co-occurrence（a）and change in subject heading（b）

表 1 黄芩苷领域文献被引前 10

Tab 1 Top 10 cited articles in the field of baicalin

排名	被引频次	文献名称	发表年份	期刊		
				名称	国家	影响因子（2020）
1	599	New therapeutic aspects of flavones：The anticancer properties of scutellaria and its main active constituents wogonin，baicalein and baicalin	2008	*Cancer Treatment Reviews*	England	12.111
2	291	Antioxidant and free radical scavenging effects of baicalein，baicalin and wogonin	2000	*Anticancer Research*	Greece	2.480
3	258	Antitumor effects of Scutellariae radix and its components baicalein，baicalin，and wogonin on bladder cancer cell lines	2000	*Urology*	USA	2.641
4	237	Wogonin，baicalin，and baicalein inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions induced by nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide	2001	*Biochemical Pharmacology*	England	5.853
5	186	Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by a flavonoid，baicalin	2000	*Cancer Letters*	Ireland	8.673
6	180	Mechanisms in mediating the anti-inflammatory effects of baicalin and baicalein in human leukocytes	2003	*European Journal of Pharmacology*	Netherlands	4.431
7	180	The flavonoid baicalin exhibits anti-inflammatory activity by binding to chemokines	2000	*Immunopharmacology*	Netherlands	4.202
8	174	Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry	2000	*Biochemical and Biophysical Research Communications*	USA	3.572
9	153	Comparative pharmacokinetics of baicalin after oral administration of pure baicalin，Radix scutellariae extract and Huang-Lian-Jie-Du-Tang to rats	2007	*Journal of Ethnopharmacology*	Ireland	4.361
10	148	Therapeutic potentials of baicalin and its aglycone，baicalein against inflammatory disorders	2017	*European Journal of Medicinal Chemistry*	France	6.51

TLR/NF-κB 通路，显著抑制血清、海马血浆和一些炎性因子水平，进而显示出较好的抗抑郁作用 [20]。而且，黄芩苷也可以有效地触发细胞凋亡、抑制转移并增强乳腺癌的化学敏感性，这意味着黄芩苷可能是治疗乳腺癌的有希望的药物 [21]。

此外，由于良好的药物代谢、分布特性以及低毒性的特点，黄芩苷在成药性方面具有重要的意义。黄芩苷的口服生物利用度为 25% 左右，无首过消除作用，通过结肠转换为黄芩素被吸收，在体内通过酶的作用又转换为黄芩苷发挥药理作用 [22-24]。黄芩苷对病理状态的组织也呈现良好的分布性。对于脑缺血再灌注损伤，黄芩苷给药后在脑部分布明显增多，而正常生理状态下则主要分布在其他脏器 [25]。研究也发现，静脉推注黄芩苷可以透过血脑屏障，并在之后取出的脑脊液或者脑透析液中检测到黄芩苷 [26]。同时，黄芩苷对于动物具有低毒性，无不良反应 [27-28]，表明黄芩苷在成药性方面具有重要意义 [29]。

4 结论

本研究对 Web of Science 数据库核心集收录的有关黄芩苷的研究论文和综述进行了可视化分析，发现亚洲国家对黄芩苷的研究较广泛和深入，其中中国表现最为突出且与美国等其他国家合作密切；研究主要集中在抗肿瘤、抗氧化、抗炎、神经保护、细胞通路研究等方向，关键词演化表明黄芩苷的抗炎、抗氧化和抗肿瘤研究贯穿于整个研究过程，这一结论也与总被引次数最多的文章与发文量最多的期刊内容一致。本文通过文献计量的方法，确定了黄芩苷抗癌、抗氧化、抗炎的分子机制以及纳米制剂研究可能是黄芩苷未来的发展热点，对黄芩苷的深入研究和未来研究选题具有一定的参考意义。

参考文献

[1] Huang Q，Zhang JS，Peng JB，et al. Effect of baicalin on proliferation and apoptosis in pancreatic cancer cells [J]. Am J Transl Res，2019，11（9）：5645-5654.

[2] Zhang ZL，Cui L，Yao HQ，et al. Baicalin exerts lipid-lowering，fatty liver attenuating and anti-oxidation properties in hypercholesterolemic rats induced with a high-cholesterol diet [J]. Int J Clin Exp Med，2018，11（5）：4575-4584.

[3] Li YY，Song K，Zhang HL，et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of baicalin in cerebrovascular and neurological disorders [J]. Brain Res Bull，2020，164：314-324.

[4] Huang LJ，Jia SS，Sun XH，et al. Baicalin relieves neuropathic pain by regulating alpha（2）-adrenoceptor levels in rats following spinal nerve injury [J]. Exp Ther Med，

2020，20（3）：2684-2690.
[5] Lee W，Ku SK，Bae JS. Anti-inflammatory effects of baicalin，baicalein，and wogonin in vitro and in vivo [J]. Inflammation，2015，38（1）：110-125.
[6] 陈勇，陈燚，裴植，等 . 基于文献计量的数字孪生研究进展分析 [J]. 中国机械工程，2020，31（7）：797-807.
[7] Zhong D，Luo S，Zheng L，et al. Epilepsy occurrence and circadian rhythm：a bibliometrics study and visualization analysis via CiteSpace [J]. Front Neurol，2020：984.
[8] Xiong HY，Zhang ZJ，Wang XQ. Bibliometric analysis of research on the comorbidity of pain and inflammation [J]. Pain Res Manag，2021，2021：6655211.
[9] Xu D，Wang YL，Wang KT，et al. A scientometrics analysis and visualization of depressive disorder [J]. Curr Neuropharmacol，2021，19（6）：766-786.
[10] Dong Q，Liang Q，Chen Y，et al. Bibliometric and visual analysis of vascular calcification research [J]. Front Pharmacol，2021，12：690392.
[11] Aria M，Cuccurullo C. Bibliometrix：an R-tool for comprehensive science mapping analysis [J]. J Informetr，2017，11（4）：959-975.
[12] Li WM. New therapeutic aspects of flavones：the anticancer properties of Scutellaria and its main active constituents Wogonin，Baicalein and Baicalin [J]. Cancer Treat Rev，2009，35（1）：57-68.
[13] Ikemoto S，Sugimura K，Yoshida N，et al. Antitumor effects of scutellariae radix and its components baicalein，baicalin，and wogonin on bladder cancer cell lines [J]. Urology，2000，55（6）：951-955.
[14] Li BQ，Fu T，Dongyan Y，et al. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry [J]. Biochem Biophys Res Commun，2000，276（2）：534-538.
[15] Dinda B，Dinda S，DasSharma S，et al. Therapeutic potentials of baicalin and its aglycone，baicalein against inflammatory disorders [J]. Eur J Med Chem，2017，131：68-80.
[16] Liu GT，Bao ZT，Wu J. Injectable baicalin/F127 hydrogel with antioxidant activity for enhanced wound healing [J]. Chinese Chem Lett，2020，31（7）：1817-1821.
[17] Fang J，Wang HD，Zhou J，et al. Baicalin provides neuroprotection in traumatic brain injury mice model through AKT/NRF2 pathway [J]. Drug Des Devel Ther，2018，12：2497-2508.
[18] Li YC，Wang D，Liu JS，et al. Baicalin attenuates yap activity to suppress ovarian cancer stemness [J]. Onco Targets Ther，2020，13：7151-7163.
[19] Ahmed IS，Rashed HM，Fayez H，et al. Nanoparticle-mediated dual targeting：an approach for enhanced baicalin delivery to the liver [J]. Pharmaceutics，2020，12（2）：107.
[20] Liu L，Dong Y，Shan X，et al. Anti-depressive effectiveness of baicalin in vitro and in vivo [J]. Molecules，2019，24（2）：326.
[21] Zeng AN，Liang X，Zhu SM，et al. Baicalin，a potent inhibitor of NF-kappa b signaling pathway，enhances chemosensitivity of breast cancer cells to docetaxel and inhibits tumor growth and metastasis both in vitro and in vivo [J]. Front Pharmacol，2020，11：879.
[22] 龚明涛，虞丽芳，陈庆华，等 . 黄芩苷在大鼠体内的口服生物利用度屏障研究 [J]. 中国药学杂志，2008，43（17）：1332-1335.
[23] 刘伶文，司磊，任树勇，等 . 人肠道菌对黄芩苷的生物转化 [J]. 天然产物研究与开发，2012，24（10）：1437-1440.
[24] Akao T，Kawabata K，Yanagisawa E，et al. Balicalin，the predominant flavone glucuronide of scutellariae radix，is absorbed from the rat gastrointestinal tract as the aglycone and restored to its original form [J]. J Pharm Pharmacol，2000，52（12）：1563-1568.
[25] 肖兰，张晓杰，王峰，等 . 正常及脑缺血 - 再灌注大鼠静脉注射清开灵后黄芩苷在脑，肝，肺中的分布 [J]. 中南药学，2006，4（3）：166-169.
[26] Huang H，Zhang Y，Yang R，et al. Determination of baicalin in rat cerebrospinal fluid and blood using microdialysis coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B，2008，874（1-2）：77-83.
[27] 张喜平，程琪辉，张宇 . 黄芩苷胶囊小鼠急性毒性试验 [J]. 医学研究杂志，2006，35（9）：16-19.
[28] 张喜平，程琪辉，沈培红，等 . 黄芩苷类注射剂安全性与急性毒性实验研究 [J]. 医学研究杂志，2007，36（7）：15-21.
[29] 柴玉爽，雷帆，邢东明，等 . 黄芩苷对模式识别受体 TLR2/4-NOD2 的作用及其成药性意义 [J]. 中国中药杂志，2013，38（16）：2639-2644.

（收稿日期：2021-10-16；修回日期：2021-11-16）

Ⅳ型心肾综合征患者 IL-35 血浓度及药学意义的探讨

白运焕，陈葶，王涛，王涵，何茂胜，邓娜，陈茂杰*（徐州市中心医院，江苏 徐州 221000）

摘要：目的 检测Ⅳ型心肾综合征（Ⅳ-CRS）患者白细胞介素 35（IL-35）的血清浓度，分析其与心肾受损指标之间的关系，探讨 IL-35 的药学意义。**方法** 108 例慢性肾脏病患者进行心肾临床常规检查包括血清 IL-35 浓度、血肌酐（SCr）、超敏 C 反应蛋白（hs-CRP），计算估计肾小球滤过率（eGFR）；超声心动图检查室间隔厚度（IVST），左心室后壁厚度（LVPWT），左室射血分数（EF），二尖瓣舒张晚期血流速度（A）与二尖瓣舒展早期血流速度（E）的比值（A/E）。以 IL-35 作因变量，其他指标作自变量进行相关分析。**结果** 血清 IL-35 水平：正常对照组为（110.32±27.60）pg·mL^{-1}，非 CRS 组为（89.25±20.12）pg·mL^{-1}，CRS 组为（77.71±25.23）pg·mL^{-1}，组间比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。CRS 患者的心脏改变：心肌肥厚占比 33.3%，舒张功能异常占比 78.2%，收缩功能异常占比 38.4%。IL-35 与 IVST、LVPWT、A/E、hs-CRP 成负相关关系；与 eGFR、EF 成正相关关系。**结论** 慢性肾脏疾病患者的 IL-35 血清浓度与肾功能、心脏受损指标（如心肌肥厚、心室收缩和舒张功能不全等）成负相关，提示 IL-35 在Ⅳ-CRS 中对心肾有保护作用，有望开发成治疗慢性肾脏疾病的候选生物制剂。

关键词：慢性肾脏疾病；IL-35；心肾综合征
中图分类号：R96 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1454-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.040

Serum level of indoxyl sulfate and its pharmacological significance in patients with type Ⅳ cardiorenal syndrome

BAI Yun-huan, CHEN Ting, WANG Tao, WANG Han, HE Mao-sheng, DENG Na, CHEN Mao-jie*
(*Xuzhou Central Hospital*, *Xuzhou Jiangsu* 221000)

Abstract: Objective To determine the serum level interleukin 35 (IL-35) indices with Ⅳ cardiorenal syndrome, and to explore the pharmacological significance of IL-35. **Methods** Totally 108 patients with chronic kidney disease (CKD) were recruited. The serum IL-35, serum of creatinine, high-sensitivity C-reactive protein, eGFR, Interventricular septal thickness (IVST), left ventricular posterior wall thickness (LVPWT), left ventricular ejection fraction (EF), and the ratio of the late mitral valve diastolic blood flow velocity to the early mitral valve dilatation blood flow velocity (A/E) were detected. IL-35 was used as the dependent variable, and other indicators served as independent variables for the correlation analysis. **Results** The serum level of IL-35 of all patients in the CKD groups was obviously higher than that of the control group. The serum level of IL-35 was (110.32±27.60) pg·mL^{-1} in the control group, (89.25±20.12) pg·mL^{-1} in the non-CRS group, and (77.71±25.23) pg·mL^{-1} in the CRS group.The comparison between the groups was statistically significant ($P<0.05$). Changes in CRS patients covered 33.3% cardiac hypertrophy, 78.2% abnormal diastolic function, and 38.4% abnormal systolic function in Ⅳ cardiorenal syndrome. Significant negative correlation was detected among the serum IL-35 and IVST, LVPWT, A/E, and hs-CRP, while positive correlation with eGFR and EF. **Conclusion** IL-35 in CKD patients is negatively correlated with renal function and cardiac impairment indicators such as myocardial hypertrophy,

基金项目：徐州市科技计划项目（No. KC18186）。
作者简介：白运焕，女，主治医师，主要从事慢性肾衰竭替代治疗研究，email：baixiaomei@163.com *通信作者：陈茂杰，男，主任医师，主要从事慢性肾衰竭替代治疗研究，email：1552855899@qq.com

ventricular systolic and diastolic dysfunction, suggesting that IL-35 may protect the heart and kidney in IV-CRS and can be used as candidate biologics for CKD.

Key words: chronic kidney disease; IL-35; Ⅳ cardiorenal syndrome

心肾综合征（cardiorenal syndrome，CRS）是因心脏或肾脏病变和功能失调后相互影响，一个器官发生原发性病变导致另一器官受损所出现的临床症候群。临床上心肾综合征分为五型[1]：Ⅰ型为急性心脏损害引起的肾脏功能改变，Ⅱ型为慢性心脏损害引起的肾脏功能改变，Ⅲ型是急性肾脏疾病引起的心脏损害，Ⅳ型为慢性肾脏疾病（慢性肾小球肾炎）引起的心脏损害，Ⅴ型是急性或者慢性的全身性疾病（系统性红斑狼疮、淀粉样变）引起心肾同时损害。心血管疾病是慢性肾脏病（chronic kidney disease，CKD）患者的主要死亡原因，Ⅳ型心肾综合征（Ⅳ-CRS）是最常见的类型，具体发病机制复杂，缺乏有效治疗，故寻找新的治疗方法和药物尤为重要。白细胞介素 35（interleukin-35，IL-35）是 IL-12 家族的新成员，是一种具有潜在治疗前景的新型抗炎因子，成为细胞因子研究的新热点，近年来在心血管疾病研究逐渐受到关注[2]，有报道维持性血液透析患者血清 IL-35 水平与心脑血管疾病相关，IL-35 可能成为维持性血液透析患者心脑血管疾病新的标志物[3]。关于未透析的 CKD 患者血清 IL-35 与Ⅳ-CRS 的关系尚未见报道，本研究对未透析的 CKD 患者血 IL-35 水平与Ⅳ-CRS 进行研究，特报道如下。

1　对象与方法

1.1　研究对象

随机选择 2019 年 1 月—2020 年 1 月在徐州市中心医院肾内科住院的未行肾脏替代治疗的 CKD 患者 108 例（男 58 例，女 50 例，年龄 20 ～ 78 岁）。另选 20 例健康自愿者为正常对照组，平均年龄（48.42±2.16）岁，男 11 例，女 9 例。排除标准：患肾脏病前已有心脏疾病患者；近 1 年行心肺复苏等抢救措施的危重症患者，严重外伤、重症系统疾病、精神疾病、多脏器衰竭、合并恶性肿瘤、急慢性炎症反应性疾病、入院 48 h 内死亡者及合并其他影响心肾功能的基础性疾病者。

1.2　研究方法

所有入组者采集空腹静脉血按说明书酶联免疫法测定血清 IL-35 浓度，全自动生化分析仪（德国罗氏公司）测定血清肌酐（SCr）、超敏 C 反应蛋白（hs-CRP），计算估计肾小球滤过率（eGFR）[mL/（min • 1.73 m^{-2}）]。酶联免疫法测定血清细胞因子 IL-35（试剂盒均由南京贝斯特生物科技有限公司提供）。用彩色二维超声仪行心脏检查舒张末室间隔厚度（IVST），左室后壁厚度（LVPWT），测定左室射血分数（EF），舒张晚期最大血流速度（A 峰）与舒张早期最大血流速度（E 峰）的比值（A/E）。以 IL-35 作为因变量，心脏指标（IVST、LVPWT、A/E、EF）、hs-CRP 和 eGFR 作为自变量进行相关分析。

1.3　统计学处理

应用 SPSS 20.0 软件系统进行统计分析，结果用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。计量资料采用单因素方差分析（One-way ANOVA），两样本均数的比较采用 t 检验，相关分析采用 Spearman 相关分析，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　CRS 组和非 CRS 组血清 IL-35 及其他指标的比较

慢性肾脏病患者 108 例，其中 78 例有心脏结构和功能改变，达到Ⅳ-CRS 诊断标准[1]，hs-CRP 为炎性指标代表，IL-35 为抗炎指标。具体结果见表 1。

表 1　CRS 组和非 CRS 组血清 IL-35 及其他实验室指标的比较

Tab 1　Serum IL-35 and other laboratory indexes in CRS and non-CRS groups

组别	例数	SCr/（μmol • L^{-1}）	eGFR/[mL（min • 1.73 m^{-2}）]	hs-CRP/（mg • L^{-1}）	IL-35/（pg • mL^{-1}）
正常对照组	20	67.41±10.26	110.75±1.09	2.25±1.42	110.32±27.60
非 CRS 组	30	387.26±20.41[a]	47.41±5.12[a]	9.72±3.04[a]	89.25±20.12[a]
CRS 组	78	404.11±21.77[a]	45.41±7.02[a]	11.18±4.19[ab]	77.71±25.23[ab]

注：与正常对照组比较，[a]$P < 0.05$；与非 CRS 组比较，[b]$P < 0.05$。

Note：Compared with the normal control group，[a]$P < 0.05$；compared with the non-CRS group，[b]$P < 0.05$.

2.2 非 CRS 组和 CRS 组心脏超声结果比较

心脏超声结果显示，CRS 组 IVST、LVPTW、EF、A/E 明显异常，与正常对照组及非 CRS 组比较差异有统计学意义（$P < 0.05$）。对 CRS 组进行分析，心肌肥厚 26 例（33.3%），舒张功能异常 61 例（78.2%），收缩功能异常 30 例（38.4%）。详见表 2。

表 2 CRS 组和非 CRS 组心脏超声结果的比较

Tab 2 Cardiac ultrasound results between CRS and non-CRS group

组别	例数	IVST/mm	LVPWT/mm	A/E /（m/s）	EF/%
正常对照组	20	8.41±0.44	8.13±0.24	0.74±0.12	65.23±5.43
非 CRS 组	30	8.99±0.14	8.46±0.93	0.84±0.11	58.44±3.12
CRS 组	78	10.74±0.37[ab]	9.85±0.68[ab]	1.19±0.07[ab]	45.22±1.44[ab]

注：与正常对照组比较，[a]$P < 0.05$；与非 CRS 组比较，[b]$P < 0.05$。

Note：Compared with the normal control group，[a]$P < 0.05$；compared with the non-CRS group，[b]$P < 0.05$。

2.3 血 IL-35 与心肾损伤指标相关分析

Spearman 相关分析显示，IL-35 与 IVST、LVPWT、A/E、hs-CRP 成明显负相关，与 EF 和 eGFR 成正相关，提示 IL-35 有心肾保护作用，结果见表 3。

表 3 IL-35 与心肾指标相关性分析

Tab 3 Correlation between IL-35 and heart and kidney indexes

统计值	IVST	LVPWT	EF	A/E	hs-CRP	eGFR
r 值	− 0.313	− 0.315	0.402	− 0.422	− 0.709	0.507
P 值	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

3 讨论

Ⅳ型 CRS 为原发性 CKD 导致心脏结构与功能变化[4]，主要包含三种类型的心脏损害即左心室肥厚、左室舒张和左室收缩功能障碍，终末期肾脏病患者心脏损害发生率高达 85%。本组资料显示，Ⅳ型 CRS 中心肌肥厚占比 33.3%，舒张功能异常占比 78.2%，收缩功能异常占比 38.4%。目前研究认为Ⅳ型 CRS 的发病机制极为复杂[5-6]，主要有如下几个方面：

① CKD 所致水钠潴留加重心脏容量负荷；肾血流下降使肾素 - 血管紧张素 - 醛固酮轴的激活，外周血管收缩血压升高加重心脏压力负荷使左室肥厚[7]。

② 钙磷代谢障碍加速血管和心肌硬化使心脏收缩和舒张功能减退。

③ 尿毒症毒素的长期潴留，其对动脉壁的作用可能是直接的或由慢性炎症和氧化应激介导的。

④ CKD 患者存在免疫紊乱，T 淋巴细胞数量的减少且功能受损，细胞因子失调，增加了内皮功能障碍，血管钙化等风险。

以上多种因素相互作用，在 CKD 患者机体中产生复杂的生理和病理生理过程，使Ⅳ型 CRS 患者心力衰竭和心肌梗死等终末事件的发生率增加。本病目前缺乏有效治疗，寻找一种同时能保护心肾的药物极为重要。

IL-35 是新近发现的 Treg 细胞在体外和体内发挥其最大的免疫调节活性的重要细胞因子，由 α 链 p35 和 β 链 EB 病毒诱导基因 3（EBI3）组成的异源二聚体蛋白。IL-35 能产生新型 iTR35 细胞级联放大机体的免疫调节，增强 Treg 细胞作用，诱导产生大量抑制性细胞因子，有效抑制炎症反应，对心肌纤维化及炎症性心肌病的恢复起到重要作用[8]。在未患 CKD 疾病患者的研究中发现 IL-35 在心力衰竭、冠心病、病毒性心肌炎、扩张性心肌病、血管炎等心血管疾病都有一定的保护作用[9-13]。本组资料显示 CKD 患者的血 IL-35 浓度与正常对照组相比明显降低（$P < 0.05$）。与心肾受损指标作相关分析，结果显示，血 IL-35 与 IVST、LVPWT、A/E、hs-CRP 成明显负相关，与 EF、eGFR 成正相关。以往对 IL-35 研究大多针对非肾性心损害，本文研究了 IL-35 在原发性 CKD 导致心脏损害患者的血浓度变化，加深了对Ⅳ型 CRS 发病因素及 IL-35 的认识，结果提示 IL-35 是心肾的保护机制之一。

参考文献

[1] Uduman J. Epidemiology of cardiorenal syndrome [J]. Adv Chronic Kidney Dis，2018，25（5）：391-399.

[2] Lin Y，Huang Y，Lu Z，et al. Decreased plasma IL-35 levels are related to the left ventricular ejection fraction in coronary artery diseases [J]. PLoS One，2012，7（12）：e52490.

[3] 王玉红，杨瑞芳，林善丽，等 . 维持性血液透析患者血

清 IL-35 与心脑血管疾病的关系 [J]. 滨州医学院学报，2016，39（2）：106-108.
[4] Sessa C，Granata A，Gaudio A，et al. Vascular dysfunction in cardiorenal syndrome type 4 [J]. G Ital Nefrol，2020，37（1）：2020-vol1.
[5] Pinheiro da Silva AL，Vaz da Silva MJ. Type 4 cardiorenal syndrome [J]. Rev Port Cardiol，2016，35（11）：601-616.
[6] Tumlin JA，Costanzo MR，Chawla LS，et al. Cardiorenal syndrome type 4：insights on clinical presentation and pathophysiology from the eleventh consensus conference of the Acute Dialysis Quality Initiative（ADQI）[J]. Contrib Nephrol，2013，182：158-173.
[7] Ding J，Tang Q，Luo B，et al. Klotho inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy，fibrosis，and dysfunction in mice through suppression of transforming growth factor-β1 signaling pathway [J]. Eur J Pharmacol，2019，859：172549.
[8] Tang TT，Zhu ZF，Wang J，et al. Impaired thymic export and apoptosis contribute to regulatory T-cell defects in patients with chronic heart failure [J]. PLoS One，2011，6（9）：e24272.
[9] 张传峰，苑海涛 . 病毒性心肌炎患者血清 IL17、IL35 水平变化及意义 [J]. 山东医药，2014，54（31）：28-30.
[10] 台适，周胜华，刘启明，等 . 冠心病患者血浆白细胞介素 -35 水平及临床意义的探讨 [J]. 临床心血管病杂志，2014，30（1）：81-84.
[11] 黄斯斯，伍伟锋，林松，等 . 扩张型心肌病患者外周血单个核细胞白细胞介素 -35 表达及分泌的初步研究 [J]. 临床心血管病杂志，2010，26（2）：97-100.
[12] 曾卫华，杨春丽，贺慧为，等 . 白介素 -35 对脂多糖所致内皮祖细胞损伤的保护作用研究 [J]. 当代医学，2020，26（29）：15-17.
[13] Lin Y，Huang Y，Lu Z，et al. Decreased plasma IL-35 levels are related to the left ventricular ejection fraction in coronary artery diseases [J]. PLoS One，2012，7（12）：e52490.

（收稿日期：2021-10-20；修回日期：2021-11-11）

利用医院卫生技术评估对 2018—2020 年南京地区 67 家医院保肝药物使用现状及趋势进行分析

彭苗苗[1, 2]，刘慧[1]（1. 南京大学医学院附属鼓楼医院药学部，南京 210008；2. 南京临床药学中心，南京 210008）

摘要：目的 了解 2018—2020 年南京地区保肝药物使用现状、趋势，为临床医师合理选用保肝药物提供参考。**方法** 根据江苏省医药情报研究所提供的数据，对南京地区保肝药物总销售金额，各品种销售金额及排序，每年增长情况，用药频度（DDDs），限定日费用（DDC）等进行统计分析，按照医院卫生技术评估（HB-HTA）评分细则，对 13 种保肝药物进行临床综合评价，将评分结果排序，并跟 DDDs 排序进行比对，探讨保肝药物临床选择与临床综合评价的一致性。**结果** 跟 2018 年相比，保肝药物总销售金额在 2019 年上升 13.26%，2020 年下降 3.49%，近三年 DDDs 排名前四位的保肝药物为复方甘草酸苷、水飞蓟素、甘草酸二铵、多烯磷脂酰胆碱。HB-HTA 评分在 57 分以上的保肝药为熊去氧胆酸、水飞蓟素、双环醇、联苯双酯、多烯磷脂酰胆碱、甘草酸二铵、腺苷蛋氨酸、复方甘草酸苷、异甘草酸镁，可供临床优先选择；水飞蓟素、多烯磷脂酰胆碱、异甘草酸镁、*N*- 乙酰半胱氨酸和硫普罗宁 HB-HTA 评分排序跟 DDDs 排序的差值在 0 ～ 2，表明两者排序一致性较好。**结论** 南京地区保肝药物使用频率最高的品种是复方甘草酸苷，HB-HTA 评分最高的是熊去氧胆酸，水飞蓟素、多烯磷脂酰胆碱等 5 种保肝药物的 HB-HTA 评分排序跟 DDDs 排序一致性较好。

关键词：保肝药物；销售金额；用药频度；限定日费用；医院卫生技术评估
中图分类号：R95 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)06-1457-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.041

基金项目：南京大学医院管理研究所课题项目；南京鼓楼医院医学发展医疗救助基金会资助项目（No. NDYG2020042）；天晴医院药学基金科研项目（No. Q202006）；南京临床药学中心课题。
作者简介：彭苗苗，女，主管药师，主要从事临床药学工作，email：pengmiaomiao1984@126.com

Status quo and trend of the use of hepatoprotective drugs in 67 hospitals in Nanjing areas from 2018 to 2020 by hospital health technology assessment

PENG Miao-miao[1, 2], LIU Hui[1] (1. *Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University*, *Department of Pharmacy*, *Nanjing* 210008; 2. *Nanjing Medical Center for Clinical Pharmacy*, *Nanjing* 210008)

Abstract: Objective To determine the status quo and trend of the use of hepatoprotective drugs in Nanjing areas from 2018 to 2020 to provide reference for rational hepatoprotective drugs. **Methods** According to the data provided by Jiangsu Institute of Medical Information, the total consumption of hepatoprotective drugs in Nanjing areas, the consumption ranking, annual growth, defined daily doses system (DDDs), defined daity cost (DDC), etc., were analyzed. According to HB-HTA scoring rules, 13 hepatoprotective drugs were comprehensively evaluated, and the scores were sorted and compared with DDDs to determine the consistency between clinical selection and comprehensive evaluation of liver protective drugs. **Results** Compared with 2018, the total consumption of hepatoprotective drugs increased by 13.26% in 2019, and then decreased by 3.49% in 2020. The top four hepatoprotective drugs in the DDD list in the past three years included compound glycyrrhizin, silymarin, diammonium glycyrrhizinate, and polyene phosphatidylcholine. Hepatoprotective drugs with HB-HTA scores above 57 included ursodeoxycholic acid, silymarin, dicyclol alcohol, biphenyl diester, polyene phosphatidylcholine, diammonium glycyrrhizinate, adenosine methionine, compound glycyrrhizin and magnesium isoglycyrrhizinate, indicating clinical preference. The difference in HB-HTA and DDDs for silymarin, polyene phosphatidylcholine, magnesium isoglycyrrhizate, *N*-acetylcysteine and tioponin was between 0 and 2, indicating good consistency. **Conclusion** Compound glycyrrhizin is the most frequently used hepatoprotective drug in Nanjing areas. Ursodeoxycholic acid has the highest HB-HTA score. HB-HTA scores of silymarin, polyene phosphatidylcholine and other 5 hepatoprotective drugs are consistent with DDDs.

Key words: hepatoprotective drug; sales amount; DDDs; DDC; HB-HTA

保肝药物主要用于改善肝脏功能、促进肝细胞再生和增强肝脏解毒功能[1]。临床上使用保肝药物的标准参差不齐，品种选择、使用的数量、使用疗程也存在不规范之处，保肝药物的合理使用是今后临床工作的一个重点。医院卫生技术评估（HB-HTA）是基于医院层面为管理决策开展的卫生技术评估（HTA），可以辅助医院管理者和临床医技科室在新药遴选、准入、使用等方面等进行决策，是国际上常用的政策分析工具[2]。本文就南京地区 67 家医院保肝药物的使用情况及趋势进行调查分析，将保肝药物临床选择倾向性结合 HB-HTA 评分结果对其一致性展开讨论，为相关临床科室保肝药物合理使用提供参考。

1 资料

保肝药物数据来自江苏省医药情报研究所提供的 2018—2020 年南京地区 67 家医院保肝药物使用情况的统计，包括医院名称、使用年份、药品名称、规格、单价、使用数量、销售总金额、生产厂家等信息。

2 方法

2.1 DDDs、DDC、排序比计算方法

按照世界通用方法，采用世界卫生组织推荐的限定日剂量（DDD）的方法，根据 2015 年版《中国药典》、第 17 版《新编药物学》及各保肝药物说明书，结合临床常规用药剂量确定各保肝药物 DDD（mg）值（以下指标仅对西药部分进行分析），用药频率（DDDs）＝总用药量（mg）/DDD（mg）值，DDDs 值越大说明对该保肝药的使用频率高，选择倾向性越大；限定日费用（DDC）＝年消耗金额（元）/ DDDs 值，DDC 表示日均费用，值越大表示患者的经济负担越重。HB-HTA 评分排序是药物临床综合评估结果的排序，排名越靠前提示该药物临床选择的优先级别越高，HB-HTA 评分排序跟 DDDs 排序的差值在 0 ～ 2，

可以判定为药物的临床选择优先级别与临床选择倾向性一致性较好，临床用药选择合理性较高。

2.2 HB-HTA 评估方法

参考《中国医疗机构药品评价与遴选快速指南》[3] 中的评分方法，对 13 种保肝药物进行综合评价，从药学特征、有效性、安全性、经济性及其他属性五个方面进行综合评估，评分依据参照药品说明书、国内外保肝药物用药指南 / 规范、国家基本药物目录、国家医保目录及 Drugbank 等相关网站信息。为方便统计，将评分表中“一、药学特征”项下的“适应证”编号为 1.1，“药理作用”编号为 1.2，“体内过程”编号为 1.3，“药剂学和使用方法”编号为 1.4，“一致性评价”编号为 1.5；“二、有效性”编号为 2.1；“三、安全性”项下的“不良反应分级或 CTCAE 分级”编号为 3.1，“特殊人群”编号为 3.2，“药物相互作用所致不良反应”编号为 3.3，“其他”编号为 3.4；“四、经济性”项下的“同通用名药品”编号为 4.1，“主要适应证可替代药品”编号为 4.2；“五、其他属性”项下的“国家医保”编号为 5.1，“基本药物”编号为 5.2，“贮藏条件”编号为 5.3，“药品有效期”编号为 5.4，“全球使用情况”编号为 5.5，“生产企业情况”编号为 5.6。

因本研究统计的数据是同一通用名药品的总价及总量，同一通用名药品包括原研药品和不同厂家的仿制药品，所以“1.5 一致性评价”“5.6 生产企业状况”内容没有纳入评分；“4.1 同通用名药品”也没有纳入评分，故本研究使用 HB-HTA 评分表总分为 87 分。同一通用名药品包括不同厂家或同一厂家生产的口服剂型和注射剂型时，计算贮藏条件和有效期评分，参照不同厂家和不同剂型的药品说明书，评分取平均值。“2.1 有效性”评分主要参考的指南和共识包括：亚太地区肝病学会药物性肝损伤（2021）、酒精性肝病防治指南（2018）、非酒精性脂肪性肝病防治指南（2018 年）、慢性乙型肝炎防治指南（2019）、药物性肝损伤基层诊治指南（2019）、甘草酸制剂肝病临床应用专家共识、多烯磷脂酰胆碱在肝病临床应用的专家共识、英国胃肠病学会 / 英国 PBC 协作组原发性胆汁性胆管炎治疗及管理指南（2018）等，评分依据选择指南或共识推荐的最高级别。其中经济性评分中，“4.2 主要适应证可替代药品”，日均费用参照本研究计算出的 DDC 值。

HB-HTA 评分表总分为 100 分，当评分结果用于药品调出时，有 3 种推荐建议。60 分以下建议为调出；60 ～ 70 分根据临床是否有替代治疗药物，建议为暂时保留或调出；70 分以上建议为保留。因本研究总分为 87 分，故标准制订为：47 分以下建议为调出；47 ～ 57 分根据临床是否有替代治疗药物，建议为暂时保留或调出；57 分以上建议为保留。

3 结果

3.1 南京地区 67 家医院保肝药物各品种的 DDDs 及排序、销售金额和 DDC

从表 1 可以看出，DDDs 排序中，复方甘草酸苷连续三年排名第一，水飞蓟素 2018 年排名第二，2019 年和 2020 年降为第四位；甘草酸二铵 2018 年排名第三，2019 年和 2020 年上升为第二位；多烯磷脂酰胆碱 2018 年排名第四，2019 年和 2020 年上升为第三。提示临床对以上保肝药物的选择具有倾向性。

从表 2 可以看出，2018—2020 年保肝药物的品种及数量未发生变化，均为 13 个。*N*- 乙酰半胱氨酸、异甘草酸镁的销售金额连续三年均排在第一位、第二位；还原型谷胱甘肽的销售金额在 2018 年排在第三位，2019 年和 2020 年下降为第四位；而熊去氧胆酸的销售金额 2018 年排在第五位，2019 年和 2020 年上升为第三位。2019 年各保肝药品的销售金额除水飞蓟素和硫普罗宁较 2018 年下降，其余药品均有不同程度的上升，而 2020 年保肝药品销售金额较 2019 年均呈下降趋势。DDC 排名前三位的药品连续三年均是 *N*- 乙酰半胱氨酸、腺苷蛋氨酸、异甘草酸镁。总销售金额，2019 年较 2018 年增长 13.25%，2020 年较 2019 年下降 3.49%。

3.2 HB-HTA 评分结果汇总

按照 HB-HTA 评分细则，对 13 种保肝药物进行临床综合评价，结果见表 3。复方甘草酸单铵、*N*- 乙酰半胱氨酸、还原型谷胱甘肽、硫普罗宁这 4 种保肝药品评分在 47 ～ 57 分，建议暂时保留；熊去氧胆酸、水飞蓟素、双环醇、联苯双酯、多烯磷脂酰胆碱、甘草酸二铵、腺苷蛋氨酸、复方甘草酸苷、异甘草酸镁这 9 种保肝药品评分较高，可以优先供临床选用。

由表 4 可以看出，水飞蓟素、多烯磷脂酰胆碱、异甘草酸镁、*N*- 乙酰半胱氨酸和硫普罗宁这 5 种药物，HB-HTA 评分排序跟 DDDs 排序的差值在 2 以内，临床选择倾向性跟 HB-HTA 评分排序波动不大，可以初步判定为药物选择合理性较好。

表 1 2018—2020 年南京地区各医院保肝药物 DDDs 及排序

Tab 1 DDDs and ranking of hepatoprotective drugs in hospitals in Nanjing area from 2018 to 2020

药品名称	DDD 值 /mg	2018 年		2019 年		2020 年	
		DDDs（×10^4）	排序	DDDs（×10^4）	排序	DDDs（×10^4）	排序
复方甘草酸苷	140.00	303.60	1	344.48	1	323.08	1
水飞蓟素	350.00	256.41	2	256.25	4	250.78	4
甘草酸二铵	300.00	241.69	3	288.46	2	282.87	2
多烯磷脂酰胆碱	800.00	228.19	4	262.79	3	277.52	3
双环醇	112.50	156.42	5	183.03	5	171.83	6
还原型谷胱甘肽	1350.00	124.97	6	144.24	7	136.34	7
熊去氧胆酸	750.00	123.58	7	162.10	6	198.92	5
异甘草酸镁	150.00	54.26	8	63.58	8	57.70	8
复方甘草酸单铵	100.00	35.80	9	32.81	9	39.87	9
N- 乙酰半胱氨酸	8000.00	20.99	10	24.39	11	22.67	12
腺苷蛋氨酸	1250.00	20.49	11	27.88	10	34.15	10
联苯双酯	33.75	19.01	12	22.48	12	23.06	11
硫普罗宁	400.00	5.65	13	4.05	13	2.41	13

表 2 2018—2020 年南京地区各医院保肝药物销售金额及 DDC

Tab 2 Consumption sum and DDC of hepatoprotective drugs in hospitals in Nanjing from 2018 to 2020

药品名称	2018 年			2019 年			2020 年			合计	
	销售金额 / 万元	排序	DDC/ 元	销售金额 / 万元	排序	DDC/ 元	销售金额 / 万元	排序	DDC/ 元	金额 / 万元	排序
N- 乙酰半胱氨酸	10 295.58	1	490.38	11 916.63	1	488.64	11 047.21	1	487.29	33 259.43	1
异甘草酸镁	5262.41	2	96.99	5829.31	2	91.68	5283.53	2	91.57	16 375.24	2
还原型谷胱甘肽	3803.12	3	30.43	4085.30	4	28.32	3864.08	4	28.34	11 752.50	4
多烯磷脂酰胆碱	3753.85	4	16.45	3946.79	5	15.02	3613.38	5	13.02	11 314.02	5
熊去氧胆酸	3261.83	5	26.39	4248.88	3	26.21	5126.08	3	25.80	12 636.78	3
双环醇	2601.59	6	16.63	2849.87	6	15.57	2605.44	7	15.16	8056.89	7
复方甘草酸苷	2562.53	7	8.44	2664.29	8	7.73	2310.93	8	7.15	7537.75	8
腺苷蛋氨酸	2141.93	8	104.56	2770.85	7	99.39	3182.51	6	93.18	8095.29	6
水飞蓟素	1751.39	9	6.83	1661.90	11	6.49	1642.25	10	6.55	5055.55	9
复方甘草酸单铵	1470.96	10	41.09	1804.63	9	55.01	1571.39	11	39.41	4846.98	10
甘草酸二铵	1454.63	11	6.02	1681.47	10	5.83	1709.40	9	6.04	4845.49	11
硫普罗宁	45.93	12	8.13	29.20	12	7.21	16.64	13	6.90	91.77	12
联苯双酯	14.82	13	0.78	23.28	13	1.04	19.23	12	0.83	57.32	13
合计	38 420.56	—	—	43 512.38	—	—	41 992.07	—	—	123 925.01	—

表 3 HB-HTA 各条目评分结果汇总

Tab 3 Summary of scores for HB-HTA items

药品名称	一、药学特征				二、有效性	三、安全性				四、经济性	五、其他属性					总分
	1.1	1.2	1.3	1.4	2.1	3.1	3.2	3.3	3.4	4.2	5.1	5.2	5.3	5.4	5.5	
熊去氧胆酸	3	3	3	6	18	7	7	1	3	11	5	3	3	2.5	3	78.5
双环醇	1	3	3	6	13	7	7	3	3	11	3	1	3	3	1	68
水飞蓟素	1	3	3	6	13	7	3	3	3	13	2	3	2.5	2.5	2	67
多烯磷脂酰胆碱	1	3	3	5	11	7	7	3	3	13	2.5	1	1.5	2	3	66
联苯双酯	1	2	2	6	6	7	4	3	3	15	5	3	3	3	1	64
腺苷蛋氨酸	1	3	3	5	13	7	5	3	3	9	2	1	3	2	2	62
异甘草酸镁	1	3	3	4	18	7	2	3	3	9	2	1	2.5	2	1	61.5
复方甘草酸苷	1	3	3	5	14	7	5	2	1	9	2.5	1	2.5	2	3	61
甘草酸二铵	1	3	3	5	11	7	2	3	2	13	2.5	3	2	2	1	60.5
N- 乙酰半胱氨酸	1	3	3	4	18	6	2	1	3	7	1	1	3	2	2	57
还原型谷胱甘肽	1	3	2	5	11	6	3	1	2	9	2	1	2	1.5	3	52.5
硫普罗宁	1	2	2	5	6	7	2	1	3	13	3	1	1.5	1.5	1	50
复方甘草酸单铵	1	3	1	4	11	7	1	3	3	9	1	1	2	1.5	1	49.5

表 4 HB-HTA 排序与 DDDs 排序的差值比较

Tab 4 HB-HTA sorting and DDDs sorting

药品名称	HB-HTA 排序	2018 年 DDDs 排序	2019 年 DDDs 排序	2020 年 DDDs 排序	HB-HTA 与 DDDs 排序差值
熊去氧胆酸	1	7	6	5	4 ～ 6
双环醇	2	5	5	6	3 ～ 4
水飞蓟素	3	2	4	4	1
多烯磷脂酰胆碱	4	4	3	3	0 ～ 1
联苯双酯	5	12	12	11	6 ～ 7
腺苷蛋氨酸	6	11	10	10	4 ～ 5
异甘草酸镁	7	8	8	8	1
复方甘草酸苷	8	1	1	1	7
甘草酸二铵	9	3	2	2	6 ～ 7
N- 乙酰半胱氨酸	10	10	11	12	1 ～ 2
还原型谷胱甘肽	11	6	7	7	4 ～ 5
硫普罗宁	12	13	13	13	1
复方甘草酸单铵	13	12	9	9	1 ～ 4

4 讨论

4.1 保肝药物使用现状及趋势

2019 年保肝药物总销售金额较 2018 年有增长趋势，而 2020 年较 2019 年下降，2020 年医保目录跟 2018 年医保目录相比，主要区别有如下几点：首先，双环醇、复方甘草酸单铵和 *N*- 乙酰半胱氨酸从医保目录中剔除，其余药物无变化，医保目录的变化可能是这三种药物用量及其销售金额在 2020 年呈下降趋势的原因之一；其次，2020 年初新型冠状病毒肺炎疫情爆发，非紧急情况及择期手术患者不能收治入院，导致住院患者人数急剧减少；最后由于医院合理用药管理和临床药师的介入，临床保肝药物的使用越来越规范、合理，所以药品总销售金额及用量有下降趋势。

自 2005 年起，原卫计委开始进行临床药师培训工作，各医院逐步开展临床药学工作，临床药师参与查房、患者用药宣教、医嘱审核、处方合理性点评等工作，并取得了重要成果，在促进临床合理用药过程中发挥举足轻重的作用 [4-5]。另外，国家集中采购药品政策是药品价格下降的重要原因，自 2018 年 12 月首轮国家药品集中采购试点开展以来，药品集中采购政策在全国有序推进，带量采购降低了药品价格、减轻了群众用药负担 [6]，但是 2020 年江苏省执行的国家第 1 ～ 4 批集中采购药品目录中不含本研究中的 13 种保肝药品，药品价格变化不大，故保肝药物总价下降主要考虑跟药品使用总量下降直接相关。

DDDs 排名前四位的保肝药物包含两种甘草酸制剂，即复方甘草酸苷和甘草酸二铵。甘草酸制剂作用机制主要是能够对高迁移率族蛋白 1 产生抑制作用，从而阻断炎性反应 [7-8]，可以显著降低谷丙转氨酶、谷草转氨酶和总胆红素 [9]。复方甘草酸苷 DDDs 连续三年排名第一位，使用频率较高。甘草酸二铵在国家基本药物目录内，也是临床使用频率较高的保肝药物。异甘草酸镁因 DDC 较高，销售金额连续三年排第二位，仅次于 *N*- 乙酰半胱氨酸，因价格较高临床选择倾向性不高。水飞蓟素的 DDDs 在 2018 年排名第二位，2019 年和 2020 年下降为第四位，其具有抗氧化活性，可增强肝细胞的修复能力和再生能力。有研究表明，水飞蓟素用于蕈导致的肝损伤病死率为 5.8%，优于对照组（14.1%）[10]。水飞蓟素因其价格较便宜，DDC 较低，且在国家基本药物目录内，临床使用频率较高。多烯磷脂酰胆碱主要是通过直接影响膜结构使受损的肝功能和酶活力恢复正常，在化学结构上与重要的内源性磷脂一致，而在功能上优于后者，所以安全性较高，少数患者可能会对注射剂型中的苯甲醛过敏，禁用于新生儿和早产儿，该药品 2018 年 DDDs 排名第四位，2019 年和 2020 年上升为第三位，表明临床选择倾向性较高。

N- 乙酰半胱氨酸销售金额连续三年排第一位，是对乙酰氨基酚过量的解毒剂，临床上越早应用效果越好 [11]。有文献报道，*N*- 乙酰半胱氨酸不良反应发生率为 28.92%[12]，且有致血管性水肿 [13] 和过敏性休克 [14] 的风险。因其价格较高且不良反应发生率较高限制了其临床使用，DDDs 三年排名在第十到十二位，临床选择倾向性不高。熊去氧胆酸 HB-HTA 评分最高，该药具有细胞保护作用，无潜在的毒性，安全性较高 [15]，可用于妊娠期胆汁淤积性肝病，并且是指南推荐唯一治疗原发性胆汁性肝硬化有效的药物 [16]。熊去氧胆酸 DDDs 和销售金额呈逐年上升趋势，可能与其安全有效 [17]，被国家基本药物目录收载，临床逐渐倾向于选择该药品有关。

4.2 HB-HTA 评分对保肝药物使用现状及趋势的评价

HTA 作为卫生政策和管理决策的基础工具和方法，广泛应用于临床指南制订、医疗保险政策、药品价格谈判、新技术准入等领域。HB-HTA 是在医院环境中开展 HTA，在公立医院药品 “零加成” 的背景下，药品加成取消，医保支付模式改革，HB-HTA 能帮助医院基于循证证据作出符合

本院情况的药品采购和使用决策，从而促进药物合理使用、缓解医保经费压力[18]。2021 年国家卫生健康委药政司委托国家药物和卫生技术综合评估中心等机构制定了《药品临床综合评价管理指南》，推荐从安全性、有效性、经济性、创新性、适宜性、可及性六个维度对药品进行临床综合评价，与 HB-HTA 评分细则中具体内容一致。今后，医院药品管理会对 HB-HTA 产生更大的需求。

研究结果显示，熊去氧胆酸、水飞蓟素、双环醇、联苯双酯、多烯磷脂酰胆碱、甘草酸二铵、腺苷蛋氨酸、复方甘草酸苷、异甘草酸镁的 HB-HTA 评分较高，可供临床优先选择；水飞蓟素、多烯磷脂酰胆碱、异甘草酸镁、*N*- 乙酰半胱氨酸和硫普罗宁 5 种药物的 HB-HTA 评分排序跟 DDDs 排序的一致性较好，临床选择合理性较高。本研究一致性评价的方法仅从临床综合评价方面为评判临床选择保肝药物是否合理提供参考，而保肝药物临床合理应用的影响因素较多，还需要综合考虑患者的生化指标特点、对所选保肝药物的敏感性及基础疾病状况，个体化选择保肝药物。

HB-HTA 评分可以为临床医师选择保肝药物品种时提供参考，而为确保保肝药物临床合理应用，需要医疗机构药事管理委员会、医务处和临床药师共同推进该项工作，通过加大保肝药物处方点评，并利用审方软件及投入更多的临床药师参与审方，以优化医疗资源[19]。在目前医保支付方式变更的背景下，全国在推进 DRGs 付费的落地实施，临床药师更应助力知识库的完善，在药物选择方面加强对临床医师的培训，协助临床医师规范临床路径中的药品选择，从而提高临床医师在 DRGs 考核中的效率得分，提升医疗价值[20]。但是本研究结果具有一定的时效性，随着药品循证依据及相关信息的变更、国家政策的变化，各保肝药的 HB-HTA 评分会有所变动。

参考文献

[1] 中华医学会感染病学分会，肝脏炎症及其防治专家共识专家委员会 . 肝脏炎症及其防治专家共识 [J]. 中国实用内科杂志，2014，34（2）：152-162.

[2] 吕兰婷，傅金澜，林夏，等 . 中国医院卫生技术评估的困境与出路 [J]. 中国医院管理，2019，39（2）：7-10.

[3] 健康中国研究中心药品与健康产品专家委员会 . 中国医疗机构药品评价与遴选快速指南 [J]. 医药导报，2020，39（11）：1457-14665

[4] 刘杨从，张韶辉，郭珩，等 . 新医改形势下药师参与住院药费控制成效分析 [J]. 中国医院药学杂志，2018，38（2）：189-191.

[5] 张晓丽，侯旭敏，潘雁，等 . 制度＋科技管理模式下的合理用药效果评价 [J]. 中国医院，2016，20（10）：56-58.

[6] 谢金平，张雪瑞，张赫，等 . 国家药品集中采购政策的主要利益相关者分析 [J]. 中国药房，2021，32（2）：2677-2682.

[7] 甘草酸制剂肝病临床应用专家委员会 . 甘草酸制剂肝病临床应用专家共识 [J]. 临床肝胆病杂志，2016，32（5）：844-852.

[8] Mahmoud AM，AI Dera HS. 18β-glycyrrhetinic acid exerts protective effects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity：potential role of PPARγ and Nrf2 upregulation [J]. Genes Nutr，2015，10（6）：41.

[9] 晏泽辉，王宇明，汤勃，等 . 异甘草酸镁联合核苷类似物治疗慢性乙型肝炎的荟萃分析 [J]. 中华肝脏病杂志，2014，22（2）：108-112.

[10] Enjalbert F，Rapior S，Soulé N，et al. Treatment of amatoxin poisoning：20-year retrospective analysis [J]. J Toxicol Clin Toxicol，2002，40（6）：715-757.

[11] 陈帅，杨长青 . 药物性肝损伤治疗的进展与困惑 [J]. 临床肝胆病杂志，2021，37（11）：2505-2509.

[12] 陈大宇，卞晓洁，刘金春，等 . 1857 名非对乙酰氨基酚肝损患者应用乙酰半胱氨酸注射液的不良反应监测结果及分析 [J]. 中国医院药学杂志，2022，42（3）：208-312.

[13] 王鑫璐，李艳娇，宋燕青，等 . 乙酰半胱氨酸注射液致血管性水肿 1 例分析 [J]. 中国药物警戒，2020，17（5）：305-307.

[14] 龚婧如，朱亚虹，陆惠平，等 . 乙酰半胱氨酸注射液致过敏性休克 1 例 [J]. 医药导报，2018，37（12）：1533-1534.

[15] 尤梅桂 . 熊去氧胆酸的研究概况 [J]. 药学研究，2021，40（3）：199-202.

[16] 中华医学会肝病学分会，中华医学会消化病学分会，中华医学会感染病学分会 . 原发性胆汁性肝硬化诊断和治疗共识（2015）[J]. 临床肝胆病杂志，2015，31（12）：1980-1988.

[17] 闫文婷，韩子岩 . 熊去氧胆酸治疗原发性胆汁性胆管炎的早期肝胆生化应答 [J]. 中华风湿病学杂志，2021，25（7）：467-471.

[18] 王庆，张蓉 . 医院卫生技术评估在药品管理中的应用现状与发展思路 [J]. 中国药房，2020，31（7）：773-777.

[19] 吴明如，李歆，葛卫红 . 价值医疗背景下医院医保管理与临床药学服务协作模式构建初探 [J]. 中南药学，2021，19（5）：981-985.

[20] 孙雪林，张亚同，胡欣 . 临床药师在 DRG 实施中的作用思考 [J]. 中国合理用药探索，2020，17（8）：8-10.

（收稿日期：2021-11-08；修回日期：2022-01-20）

肺癌患者使用阿美替尼后出现横纹肌溶解症的用药分析

欧阳丽辉[1]，何鸽飞[1]，黄娟娟[1]，孙吉[1]，彭六保[2]，冯金辉[1*]（1. 长沙市第一医院临床药学室，长沙 410005；2. 中南大学湘雅二医院药学部，长沙 410011）

摘要：阿美替尼是我国首个获批的拥有自主知识产权的第三代 EGFR-TKI 抑制剂，现已纳入医保报销；由于其上市时间短，临床用药经验不足，在老年人尤其是合并使用多种药物人群中的安全性值得关注。临床药师从 1 例肺癌患者使用阿美替尼后出现横纹肌溶解症的严重不良反应案例出发，追根溯源，逐步分析阿美替尼引起横纹肌溶解症的原因及可能存在的药物相互作用，并提出专业性意见，为临床提供参考。

关键词：阿美替尼；横纹肌溶解症；用药分析

中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)06-1463-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.06.042

肺癌是我国最常见的恶性肿瘤，也是导致癌症患者死亡的主要原因[1]。肺癌可分为非小细胞肺癌（nonsmall-cell lung cancer，NSCLC）和小细胞肺癌，其中 NSCLC 占 85% 左右[2]，NSCLC 患者中，亚洲人群最常见驱动基因突变为表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）突变，发生率在 30% ～ 40%[3]，但是大多数患者在使用第一或二代 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂（tyrosine kinase inhibitors，TKI）如吉非替尼、阿法替尼等 9 ～ 14 个月后出现耐药，T790M 是耐药突变的主要类型，约占 60%[3]。第三代 EGFR-TKI 可有效抑制 EGFR T790M 耐药突变，同时对 EGFR 敏感性突变具有良好抑制效果，临床上可用于 EGFR 敏感突变的 NSCLC 的一线治疗，也可用于继发 T790M 耐药突变的 NSCLC 的治疗[4]。

阿美替尼为我国首个获批的拥有自主知识产权的第三代 EGFR-TKI，是 2020 年 3 月 31 日批准的 1 类创新药，用于既往经 EGFR-TKI 治疗时或治疗后出现疾病进展，并且经检测确认存在 EGFR T790M 突变阳性的局部晚期或转移性 NSCLC 成人患者[5]。2021 年通过国家医保谈判后价格降到 167 元 / 片，医保报销 70%，大大减轻了患者用药负担，成为我国 NSCLC 患者的新选择。第三代 EGFR-TKI 具有良好的耐受性和安全性[4]，但由于阿美替尼上市时间短，临床用药经验不足，到目前为止，未见其导致横纹肌溶解症（rhabdomyolysis，RM）这类严重不良反应的文献报道，所以，笔者从药学视角，多方位分析本案例中严重不良反应发生的原因及应对措施，供临床参考。

1　临床资料

74 岁女性患者，身高 145 cm，体质量 50 kg，2021 年 1 月确诊为“左肺浸润性腺癌并脑转移、骨转移、T1cN1M1 Ⅳ期、EGFR 第 19 外显子缺失”，排除禁忌后，于 1 月 23 日开始使用“甲磺酸阿美替尼片 110 mg qd”靶向治疗，2 月 8 日出现反复恶心、呕吐，伴乏力，后逐渐出现尿量减少，伴有双下肢大腿酸痛，症状逐渐加重，为求进一步诊治，于 2 月 15 日入本院急诊。患者起病以来精神、食欲、睡眠欠佳，大便正常，小便少，体质量无明显减轻。既往有高血压病史 20 年余，使用苯磺酸左氨氯地平片 2.5 mg qd、厄贝沙坦氢氯噻嗪片（150 mg/12.5 mg）1 片 qd 控制血压；有冠心病心绞痛型心功能Ⅱ级病史 3 年余，使用复方丹参滴丸 270 mg tid、硫酸氢氯吡格雷片 75 mg qd、阿托伐他汀钙片 10 mg qd 治疗；有甲状腺功能减退病史 10 余年，口服左甲状腺素片 50 μg qd 治疗，疾病控制可。

患者入院当日检查结果回报，血常规正常，尿常规：尿潜血＋＋＋，肝肾功能：谷丙转氨酶 77.7 $U \cdot L^{-1}$ ↑，谷草转氨酶 311.8 $U \cdot L^{-1}$ ↑，尿素氮 25.17 $mmol \cdot L^{-1}$ ↑，肌酐 748.6 $umol \cdot L^{-1}$ ↑；肌酶学：肌红蛋白 295.2 $\mu g \cdot L^{-1}$ ↑，肌酸激酶同工酶 193.9 $IU \cdot L^{-1}$ ↑，肌酸激酶 12 208.4

基金项目：湖南省医学会医学科研基金 - 临床药学项目重点课题（No.HMA202001006）。

作者简介：欧阳丽辉，女，硕士，主管药师，主要从事临床药学与药物经济学研究，email：oulihuisunny@126.com　*通信作者：冯金辉，女，副主任药师，主要从事药品不良反应监测，email：147700215@qq.corn

U • L^{-1} ↑；肌红蛋白 295.2 μg • L^{-1} ↑；血脂：三酰甘油 3.61 mmol•L^{-1} ↑，总胆固醇 4.7 mmol•L^{-1}，高密度脂蛋白胆固醇 0.89 mmol • L^{-1}，低密度脂蛋白胆固醇 3.43 mmol • L^{-1} ↑；电解质：血清钾 2.73 mmol • L^{-1} ↓，血清钠 121.5 mmol • L^{-1} ↓，氯 82.8 mmol • L^{-1} ↓；心电图：窦性心律；肺部 CT 对比 1 月 4 日片：左肺下叶占位，较前有减小；头部核磁：脑内腔隙性梗死灶，脑萎缩，未见急性梗死灶。临床考虑阿美替尼引起的 RM 合并急性肾损伤（acute kidney injury，AKI），立即停药，予以积极补液、止呕、护肝等对症支持治疗。经过 15 d 的治疗，患者肝肾功能、肌酶学逐渐回落，见图 1。家属到本院药学门诊咨询后期治疗方案的事宜。

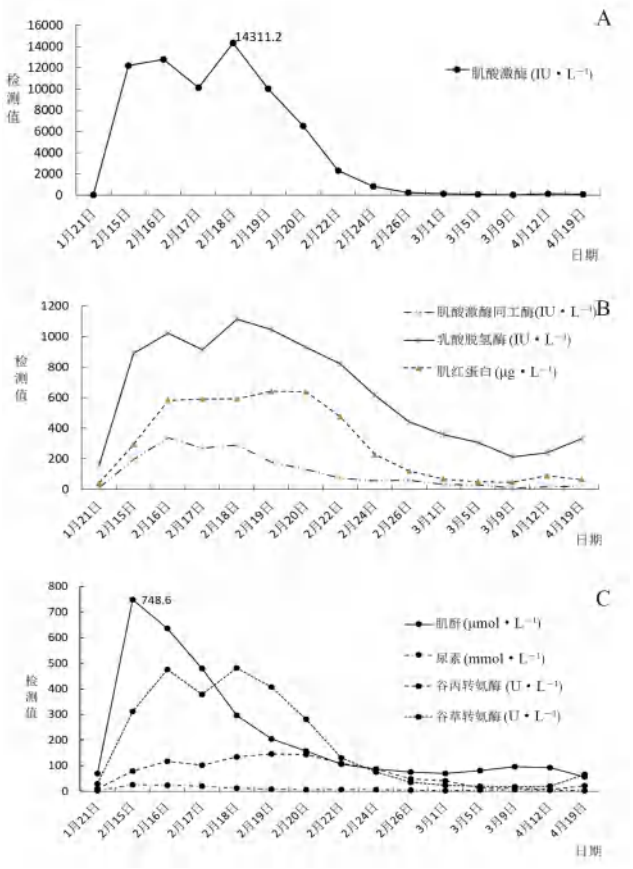


图 1 肌酸激酶（A），肌酸激酶同工酶、乳酸脱氢酶、肌红蛋白（B）及肝肾功能（C）变化图

Fig 1 Change of creatine kinase（A），creatine kinase isoenzyme，lactate dehydrogenase and myoglobin（B），liver and kidney function（C）

2 分析与讨论

2.1 RM

RM 是一种以横纹肌破坏，细胞内成分如肌红蛋白、肌酸激酶、电解质等大量释放入血，导致机体内环境紊乱、急性肾功能损伤等组织器官功能损伤的临床综合征 [6-7]。目前没有统一的诊断标准，普遍认为 RM 的症状有肌痛或乏力等肌肉症状并伴有肌酸激酶显著增高（超过正常上限 10 倍）、血肌酐升高，常有尿色变深及肌红蛋白尿，可引起急性肾衰竭 [6]。该患者入院时有乏力、肌痛等伴少尿症状，查肌酸激酶 12 208.4 U • L^{-1}（正常值：10 ～ 190 U • L^{-1}）远远超过正常上限值的 10 倍，肌酐 748.6 μmol • L^{-1}（正常值：44 ～ 80 μmol • L^{-1}），计算肌酐清除率 4.59 mL • min^{-1}，达到了 AKI 3 期的标准，符合 RM 的特征。

2.2 RM 发生的原因分析

根据我国药品不良反应事件分析方法遵循的五条原则 [8]：

① 患者加用阿美替尼后出现 RM。

② 符合阿美替尼已知不良反应类型：阿美替尼说明书提到“在 283 例患者中，不良反应导致 9.5% 的患者暂停治疗，其中发生率最高的为肌酸激酶升高（4.9%），阿美替尼与他汀类药物合用有可能增加本例患者肌酸激酶升高和 / 或肌肉症状的风险”，本例患者肌酸激酶升高符合阿美替尼已知不良反应类型，而联合阿托伐他汀，RM 发生风险增加。实际上，在一项低剂量阿托伐他汀的多中心临床试验中 [9]，每日服用 10 mg 阿托伐他汀组（5168 例）与安慰剂组（5137 例）比较，RM 发生率差异无统计学意义，低剂量阿托伐他汀组仅报道了 1 例非致命性的 RM 病例，且该患者有过酗酒和发热性疾病。有学者认为，与他汀类药物在代谢上具有相同的肝细胞色素 P450 系统（Cytochrome P450 或 CYP450）同工酶的药物，同时服用可能会增加他汀类药物的血浆浓度 [10]；阿美替尼和阿托伐他汀均主要通过 CYP3A4 代谢，两者合用有可能存在代谢性药物相互作用，引起阿托伐他汀血药浓度升高。《2019 台湾专家共识声明：他汀类药物不耐受》[11] 中提到，存在以下情况更有可能是他汀相关疾病，如服用他汀后 4 周内发生疼痛，对称性髋部屈肌与大腿疼痛，停用他汀 2 周内症状改善，更换另一种他汀后再次发生同样症状。该患者服用他汀 3 年余，未发生过不良反应，单纯用他汀不能解释现在的严重不良反应。因此，笔者认为阿美替尼是导致患者 RM 的主要原因，阿托伐他汀是次要原因。

③ 停药后对症处理 15 d 后有好转。

④ 之后未再使用。

⑤ 患者头部核磁、心电图未发现急性心肌梗死、脑梗死的证据，不考虑本身疾病引起。所以，RM 可能是阿美替尼引起的不良反应。

2.3 AKI 发生的原因分析

AKI 是由各种病因引起短时间内肾功能快速减退而导致的临床综合征，表现为肌酐清除率下降，伴有氮质产物如肌酐、尿素氮等潴留，水、电解质和酸碱平衡紊乱，重者出现多系统并发症。AKI 符合下列标准之一即可诊断[12]：① 48 h 内血清肌酐上升 ≥ 26.5 μmol • L^{-1}；② 确定或推测过去 7 d 内血清肌酐较基础值升高 ≥ 50%；③ 尿量减少，6 h 内尿量 ≤ 0.5 mL/（kg • h）。AKI 是 RM 常见的并发症，由于发生 RM 后，肌红蛋白可对肾脏产生直接毒性，其降解产物亚铁血红素引起的氧化应激反应对肾脏造成很强的氧化损伤，引起的肾脏血管收缩、肾小管肌红蛋白管型形成也是引起 AKI 发生的重要因素[6]。但该患者既往无肾脏基础疾病，高血压、冠心病等基础疾病控制可，并无导致肾功能恶化的证据；阿美替尼和阿托伐他汀均主要经肝脏代谢后由粪便排泄，对泌尿系统影响较小，说明书分别提到泌尿系统不良反应为蛋白尿和尿白细胞阳性，该患者尿常规未见蛋白尿和白细胞，因此，考虑 AKI 是继发于 RM。

2.4 处理对策和建议

RM 合并肾损伤主要的治疗措施：去除诱因，静脉补液、利尿，病情较重者应早期进行透析[13]。该患者经过停用口服药品后积极补液及对症支持治疗，最终病情好转，治愈出院。出院时，针对该患者抗肿瘤治疗方案和他汀类药物的选择，临床药师提出以下建议：

2.4.1 抗肿瘤治疗方案选用奥希替尼 ① 患者诊断明确，为左肺浸润性腺癌并脑转移、骨转移、T1cN1M1 Ⅳ期、EGFR 第 19 外显子缺失，属于Ⅳ期 EGFR 阳性的 NSCLC 脑转移患者，经过阿美替尼的治疗，影像学结果显示肺内、颅内病灶有所控制，提示治疗有效；② 第三代 EGFR-TKI 药物奥希替尼、阿美替尼和伏美替尼在临床研究中显示出良好的颅内转移病灶控制效果，因此成为无症状脑转移患者治疗的首选药物[14]。伏美替尼 2021 年 3 月上市，当时不可获得，药师认为可以选择奥希替尼。与阿美替尼相比，两者不良反应有区别，阿美替尼肌酸激酶增高常见[15]，奥希替尼仅见个例报道[16-17]，但奥希替尼需关注严重不良反应间质性肺炎、Q-T 间期延长等[18]。

2.4.2 他汀类药物选择氟伐他汀 ① 奥希替尼主要通过 CYP3A4 和 CYP3A5 代谢，也是这些酶的竞争性抑制剂，所以这些酶的诱导剂或抑制剂均可影响奥希替尼血药浓度；辛伐他汀、洛伐他汀、阿托伐他汀经肝脏 CYP3A4 代谢，氟伐他汀主要经 CYP2C9 代谢，瑞舒伐他汀约 10% 经 CYP2C9 代谢，普伐他汀、匹伐他汀不通过 CYP3A4 代谢[19]，因此，不经 CYP 3A4 代谢的他汀类药物可以选择。② 奥希替尼还是 P- 糖蛋白和乳腺癌耐药蛋白（BCRP）的抑制剂，与瑞舒伐他汀（一种敏感的 BCRP 底物）合并使用后，可使后者的血药浓度升高。③ 有他汀类所致横纹肌溶解病史的患者存在复发风险，一项观察性研究纳入了 7924 例门诊接受他汀类药物治疗的患者，发现氟伐他汀的肌肉症状发生率最低[20]。所以综合药物相互作用特点及肌毒性的大小，建议选择氟伐他汀。

2.4.3 其他注意事项 用药期间仍需注意有无皮疹、腹泻、恶心、干燥、甲沟炎和口腔炎的发生，特别是有无咳嗽、咳痰等症状，警惕间质性肺炎，监测血常规、心电图、肌酸激酶、肝肾功能等指标，关注药品不良反应。

3 总结

从本案例可以看出，阿美替尼引起的 RM 经对症治疗后可恢复。在使用阿美替尼时，应警惕其与 CYP3A4 诱导剂、抑制剂和经此酶代谢的药物之间的相互作用。在既往使用他汀类药物的患者中，要注意发生肌肉毒性的风险增加，必须联合使用时，应选择相互作用少、肌肉毒性更小的他汀类药物，并加强疗效和不良反应的监测。

参考文献

[1] Xia C，Dong X，Li H，et al. Cancer statistics in China and United States，2022：profiles，trends，and determinants [J]. Chin Med J，2022，135（5）：584-590.

[2] 欧阳丽辉，彭六保，袁铁流 . 培美曲塞在非小细胞肺癌患者中维持治疗的成本效果分析 [J]. 中国医院药学杂志，2015，35（17）：1575-1580.

[3] 中国临床肿瘤学会肿瘤生物标志物专家委员会，《中国非小细胞肺癌患者 EGFR T790M 基因突变检测专家共识》制定专家组 . 中国非小细胞肺癌患者 EGFR T790M 基因突变检测专家共识 [J]. 中华医学杂志，2018，98（32）：2544-2551.

[4] 许雯雯，朱宇熹 . 第三代 TKIs 在 EGFR 突变非小细胞肺癌中的应用 [J]. 肿瘤防治研究，2021，48（12）：1129-1134.

[5] 国家药品监督管理局 . 国家药监局批准甲磺酸阿美替尼片上市 [OL]. https：//www. nmpa. gov. cn/yaopin/ypjgdt/20200331172101492. html. 2020-3-31/2020-3-30.

[6] 洪月，涂晓文 . 横纹肌溶解症及其所致急性肾损伤研究进展 [J]. 中国中西医结合肾病杂志，2018，19（5）：466-467.

[7] 高楚淇，孙荣欣，单媛媛，等 . 调脂药相关横纹肌溶解综合征患者合并症及合并用药分析 [J]. 中南药学，2020，18（9）：1584-1590.
[8] 国家食品药品监督管理局药品安全监管司，国家药品不良反应监测中心 . 药品不良反应报告和监测工作手册 [M]. 2012：45-51.
[9] Peter S，Bjorn D，Neil R，et al. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations，in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial—Lipid Lowering Arm（ASCOT-LLA）：a multicentre randomised controlled trial [J]. Lancet，2003，2：1-10.
[10] Thompson PD，Panza G，Zaleski A，et al. Statin-associated side effects [J]. J Am Coll Cardiol，2016，67：2395-2410.
[11] Chien SC，Chen PS，Huang YH，et al. 2019 Taiwan Society of Lipids and Atherosclerosis expert consensus statement on statin intolerance [J]. J Formos Med Assoc，2019，118（10）：1385-1392.
[12] 陈灏珠，钟南山，陆再英 . 内科学 [M]. 9 版 . 北京：人民卫生出版社，2018：512-518.
[13] 徐鹏博，李天，王友箫，等 . 横纹肌溶解致急性肾损伤诊治进展 [J]. 人民军医，2018，61（11）：1056-1059.
[14] 中国医师协会肿瘤医师分会，中国医疗保健国际交流促进会肿瘤内科分会 . Ⅳ 期原发性肺癌中国治疗指南（2021 年版）[J]. 中华肿瘤杂志，2021，43（1）：39-59.
[15] Lu S，Wang Q，Zhang G，et al. Efficacy of aumolertinib（HS-10296）in patients with advanced EGFR T790M ＋ NSCLC：updated post-national medical products administration approval results from the APOLLO registrational trial [J]. J Thorac Oncol，2022，17（3）：411-422.
[16] Sugimoto H，Matsumoto S，Tsuji Y，et al. Elevated serum creatine kinase levels due to osimertinib：a case report and review of the literature [J]. J Oncol Pharm Pract，2022，28（2）：489-494.
[17] Parafianowicz P，Krishan R，Beutler BD，et al. Myositis——a common but underreported adverse effect of osimertinib：Case series and review of the literature [J]. Cancer Treat Res Commun，2020，25：100254.
[18] Soria JC，Ohe Y，Vansteenkiste J，et al. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer [J]. N Engl J Med，2018，378（2）：113-125.
[19] 胡大一，郭晓蕙，廖玉华，等 . 血脂异常老年人使用他汀类药物中国专家共识 [J]. 中华内科杂志，2015，54（5）：467-477.
[20] Bruckert E，Hayem G，Dejager S，et al. Mild to moderate muscular symptoms with high-dosage statin therapy in hyperlipidemic patients——the PRIMO study [J]. Cardiovasc Drugs Ther，2005，19：403.

（收稿日期：2022-09-01；修回日期：2022-04-20）

声明

近一段时间通过搜索引擎搜索《中南药学》，出现了很多假冒网站，骗取读者文章或者钱财，我刊声明，《中南药学》杂志的官方网站为：http://znyx.cbpt.cnki.net/，作者可以直接输入我刊网址或者从中国知网首页“作者投稿服务”搜索《中南药学》杂志进行注册投稿。其他网址均为仿冒，我刊也未与任何投稿服务网站合作，请作者不要将自己的文章交给他人或者通过其他中间网站投向我刊，由此造成的损失，作者自己承担后果。特此声明！

《中南药学》编辑部

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

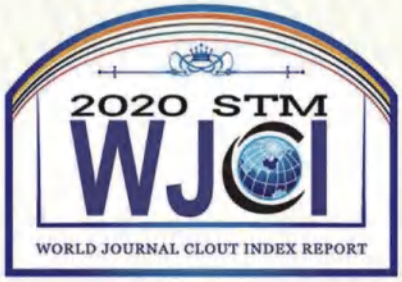
曾春辉　湖南天士力民生药业有限公司总经理
黎鸠鸠　湖南一格制药有限公司总经理

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