中南药学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊　2003 年 4 月创刊　第 20 卷　第 7 期（总第 198 期）　2022 年 7 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

中药一致性评价关键技术——中药光谱技术专题

（1467）中药一致性评价关键技术——中药光谱量子指纹评价中药一致性的理论与应用 …… 孙国祥，杨婷，孙万阳，等

（1478）中药一致性评价新技术——中药太赫兹光谱发展及其量子指纹图谱在中药一致性评价中的应用 …… 杨惠智，杨婷，孙万阳，等

自纳米乳技术提高难溶性药物生物利用度专题

（1487）美洛昔康磷脂复合物过饱和自纳米乳的制备及体外质量评价 …… 王艳艳，赵文轩，贾皓月，等

（1496）含游离蛋黄卵磷脂的姜黄素自纳米乳的制备及体外质量评价 …… 王艳艳，赵文轩，孟丽园，等

血液肿瘤精准治疗专题

（1503）R-CHOP 方案序贯自体造血干细胞移植在中高危弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的应用：单中心回顾性分析 …… 贤晓敏，蓝晓凤，刘玄勇，等

（1510）苯达莫司汀治疗边缘区淋巴瘤的单中心回顾性研究 …… 蓝晓凤，贤晓敏，刘玄勇，等

（1515）R-CDOP 方案在初治弥漫大 B 细胞淋巴瘤的疗效分析 …… 陈丽萍，刘玄勇，贤晓敏，等

研究论文

（1521）养心生脉颗粒对异丙肾上腺素诱导的小鼠心肌缺血及焦虑样行为的影响 …… 张明倩，崔爽，梁五林，等

（1527）基于 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术的 3 种蒿属植物化学成分比较研究 …… 毕玥琳，张诗芸，冯欣，等

（1533）健脾消癌方的 HPLC-Q-TOF/mF 指纹图谱分析及多指标含量测定 …… 王容容，柏正平，杨静，等

（1540）猴耳环消炎片指纹谱效学分析…… 赵斯尘，王晓东，吴灏，等

（1545）金银花提取物增强抗 CD19 CAR-T 细胞肿瘤杀伤活性 …… 单贺珍，董石，李晓瑞，等

（1550）基于大数据网络的金嗓开音胶囊治疗咽炎作用机制预测及体外验证 …… 任美，周瑞，唐志书，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
睢大贇　肇丽梅　翟　青　黎　敏
颜　苗　潘卫三　魏高文

（1558）多糖类肝素湿品沉淀可保存时长的研究
…… 田志鹏，杜曦，王亮，等

（1564）孟鲁司特钠片酸降解未知杂质结构及来源分析
…… 张琳琳，刘阿利，张继环，等

（1569）UPLC-MS/MS 法快速测定多效唑在麦冬中的残留及其对麦冬化学成分的影响 …… 俞磊明，张娜，李琦，等

（1574）甘肃黄芪种植区根际土壤固氮细菌群落结构特征及多样性考察
…… 牟建平，滕宝霞，史中飞，等

（1579）热毒宁注射液速发型过敏反应机制研究
…… 袁东琴，姜康，张宇，等

（1584）蒙药醋浸甘草对四氯化碳联合高脂饮食诱导的大鼠肝纤维化的改善作用 …… 萨出拉，包书茵，那生桑，等

（1590）玄归滴丸联合布洛芬治疗痛经的药效作用特点
…… 胡静，孟凡钰，王彬，等

综述

（1597）黄芪及其复方制剂减轻抗肿瘤药物毒副作用的研究进展
…… 袁霞，黄敏，张尊建，等

（1605）糖皮质激素在重型及危重型 COVID-19 患者中的应用进展
…… 王蒙蒙，任戎，李丽，等

（1610）菟丝子的研究进展及质量标志物（Q-marker）的预测分析
…… 徐长丽，石芸，梁裕莎，等

（1617）生物胺类物质药理及理化测定方法研究进展
…… 林新丽，吴殷囡，谭力，等

（1625）LC-MS/MS 检测尿液类固醇激素在疾病研究中的应用
…… 张潇莉，杨娜，葛佳佳，等

（1631）鞘脂代谢与肿瘤免疫治疗研究的新进展…… 谭亲友，唐科

药物分析与检验

（1639）基于高效液相色谱指纹图谱及一测多评法的复方珍珠解毒口服液质量评价 …… 谢百波，苏加乐，里艳茹，等

（1644）高效液相色谱法测定盐酸可乐定中有机杂质的含量
…… 刘慧颖，张耀文，蒋丹丹，等

（1648）盐酸曲美他嗪原料药中有关物质测定方法的研究
…… 杨西邈，孙国祥，产运霞

医院药学

（1653）4 种常见碳青霉烯类耐药革兰氏阴性杆菌检出率与抗菌药物使用强度的相关性研究 …… 王广钊，蒙光义，林传钟，等

（1659）基于分子连接性指数的高频抗新型冠状病毒肺炎中药物质基础研究 …… 吴月峰，朱志飞，陈定芳，等

青年编委（按姓氏笔画排列）

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

编辑：邬志娟　彭金飞　李　科
陆窈窈

本刊声明：

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

除非特别声明，本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点。

（1669）基于知信行模式的院外延伸药学服务对糖尿病患者用药依从性及血糖控制水平的影响 …… 周君，万树平

（1674）某院 453 份口服药品说明书和循证数据库中药物 - 酒精相互作用信息比较分析 …… 徐哲，王文沛，刘悦，等

药物与临床

（1679）益肺养阴方治疗肺结核合并 2 型糖尿病患者的临床疗效分析 …… 施利，裴异

（1684）溴隐亭及多巴丝肼对颅脑损伤长期昏迷患者的促醒治疗临床观察 …… 黄云峰，向鹏，梅敏，等

（1687）不同剂量阿托伐他汀治疗慢性硬膜下血肿的疗效和安全性的 meta 分析 …… 甘雄，王文茜，潘国洪，等

临床药师在临床

（1693）临床药师参与 1 例妊娠期乳腺癌新辅助化疗的病例分析 …… 刘冬苗，李杨，鲁文茹，等

药事管理

（1698）采用 PDCA 循环管理规范重点监控药品合理使用的实践 …… 陈刚，袁玉丽，黄秋明

（1703）药师医师双点评模式在重点监控药品监管中的实践 …… 陈学增，刘嘉欣，刘云娣，等

药品不良反应

（1707）雷珠单抗致锥体外系反应并文献复习 …… 华之卉，高帅鹏，任雅芳，等

（1710）1 例阿托伐他汀钙片致溶血性贫血的病例分析 …… 谈仪炯，任文倩，姚霜霜，等

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*246*zh*P*25.0*41*2022-7

本期责任编辑：李科，陆窈窈，彭金飞，邬志娟

英文编辑：周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 20, Number 7 July 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

(1468) Key technology of TCM consistency evaluation——the applying and theory of TCM spectral quantum fingerprint to evaluate TCM quality consistency
…… *SUN Guo-xiang, YANG Ting, SUN Wan-yang, et al*

(1478) Key technology of TCM quality consistency evaluation——Development of terahertz spectroscopy and evaluation of TCM consistency by THz quantum fingerprints
…… *YANG Hui-zhi, YANG Ting, SUN Wan-yang, et al*

(1488) Preparation and in vitro quality evaluation of meloxicam phospholipid complex supersaturated self-nanoemulsion
…… *WANG Yan-yan, ZHAO Wen-xuan, JIA Hao-yue, et al*

(1496) Preparation of curcumin self-nanoemulsifying drug delivery system containing free egg phospholipid and in vitro quality evaluation
…… *WANG Yan-yan, ZHAO Wen-xuan, Meng Li-yuan, et al*

(1504) Sequential autologous hematopoietic stem cell transplantation with R-CHOP regimen in medium and high risk diffuse large B-cell lymphoma: a single center retrospective study
…… *XIAN Xiao-min, LAN Xiao-feng, LIU Xuan-yong, et al*

(1510) Efficacy and safety of bendamustine for patients with marginal zone lymphoma: a single center retrospective study
…… *LAN Xiao-feng, XIAN Xiao-min, LIU Xuan-yong, et al*

(1515) Therapeutic efficacy of R-CDOP regimen for diffusive large B-cell lymphoma …… *CHEN Li-ping, LIU Xuan-yong, XIAN Xiao-min, et al*

(1521) Effect of Yangxin Shengmai granules on myocardial ischemia and anxiety like behaviors induced by isoproterenol in mice
…… *ZHANG Ming-qian, CUI Shuang, LIANG Wu-lin, et al*

(1527) Chemical compounds in Artemisiae scopariae herba, Artemisiae argyi folium and Artemisia waltonii based on UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS …… *BI Yue-lin, ZHANG Shi-yun, FENG Xin, et al*

(1534) HPLC-Q-TOF/mF fingerprints and multi-component determination of Jianpi Xiaoai decoction
…… *WANG Rong-rong, BAI Zheng-ping, YANG Jing, et al*

(1540) Fingerprint spectroscopic analysis of *Archidendron clypearia* antiphlogistic tablets
…… *ZHAO Si-chen, WANG Xiao-dong, WU Hao, et al*

(1545) Lonicera japonica extract enhances the tumor killing activity of anti-CD19 CAR-T cell …… *SHAN He-zhen, DONG Shi, LI Xiao-rui, 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.

(1550) Mechanism of Jinsang Kaiyin capsules for pharyngitis based on bioinformatic data and in vitro experimental validation
…… *REN Mei, ZHOU Rui, TANG Zhi-shu, et al*

(1559) Research on the storage time of wet solid heparin
…… *TIAN Zhi-peng, DU Xi, WANG Liang, et al*

(1564) Structure and source analysis of unknown impurities from acid degradation of montelukast sodium tablets
…… *ZHANG Lin-lin, LIU A-li, ZHANG Ji-huan, et al*

(1569) Rapid determination of paclobutrazol residues by UPLC-MS/MS and their effect on chemical constituents in Ophiopogonis Radix
…… *YU Lei-ming, ZHANG Na, LI Qi, et al*

(1574) Structural characteristics and diversity of rhizosphere soil nitrogen-fixing bacterial community in *Astragalus membranaceus* cultivation area in Gansu
…… *MU Jian-ping, TENG Bao-xia, SHI Zhong-fei, et al*

(1579) Mechanism of rapid allergic reaction induced by Reduning injection
…… *YUAN Dong-qin, JIANG Kang, ZHANG Yu, et al*

(1584) Effect of Mongolian vinegar soaked licorice on liver fibrosis induced by carbon tetrachloride combined with high fat diet in rats
…… *SA Chu-la, BAO Shu-yin, NA Sheng-sang, et al*

(1590) Efficacy of Xuangui dripping pills combined with ibuprofen for dysmenorrhea …… *HU Jing, MENG Fan-yu, WANG Bin, et al*

(1597) Research progress in Astragali Radix and its compound preparations in alleviating antitumor drugs-induced toxicity
…… *YUAN Xia, HUANG Min, ZHANG Zun-jian, et al*

(1605) Application of glucocorticoids in severe and critical COVID-19 patients
…… *WANG Meng-meng, REN Rong, LI Li, et al*

(1610) Research status of Cuscuta semen and the prediction of quality markers
…… *XU Chang-li, SHI Yun, LIANG Yu-sha, et al*

(1617) Pharmacological and physicochemical determination of biogenic amines
…… *LIN Xin-li, WU Yin-nan, TAN Li, et al*

(1625) Detection of steroid hormones in the urine by LC-MS/MS
…… *ZHANG Xiao-li, YANG Na, GE Jia-jia, et al*

(1631) Research advances in sphingolipid metabolism and tumor immunotherapy
…… *TAN Qin-you, TANG Ke*

(1639) Quality evaluation of compound Zhenzhu Jiedu oral liquid by HPLC fingerprints and quantitative analysis of multi-components with single marker
…… *XIE Bai-bo, SU Jia-le, LI Yan-ru, et al*

(1644) Determination of organic impurities in clonidine hydrochloride by HPLC
…… *LIU Hui-ying, ZHANG Yao-wen, JIANG Dan-dan, et al*

(1648) Determination of related substances in the raw materials of trimetazidine dihydrochloride …… *YANG Xi-miao, SUN Guo-xiang, CHAN Yun-xia*

(1653) Correlation between detection rate of 4 common carbapenem-resistant organism and antimicrobial use density
…… *WANG Guang-zhao, MENG Guang-yi, LIN Chuan-zhong, 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.

(1659) Material basis of high frequency Chinese medicine for anti-COVID-19 based on molecular connectivity index ····· *WU Yue-feng, ZHU Zhi-fei, CHEN Ding-fang, et al*

(1669) Effect of out-of-hospital pharmaceutical care on medication compliance and blood glucose control in diabetic patients based on knowledge-attitude-practice model ····· *ZHOU Jun,WAN Shu-ping*

(1674) Comparison of drug-ethanol interactions in 453 oral drug instructions and evidence-based databases ····· *XU Zhe, WANG Wen-pei, LIU Yue, et al*

(1679) Clinical effect of Yifei Yangyin prescription for patients with pulmonary tuberculosis complicated with type 2 diabetes ····· *SHI Li, PEI Yi*

(1684) Clinical observation of patients with long-term coma due to craniocerebral injury treated with bromocryptotine and doserazid ····· *HUANG Yun-feng, XIANG Peng, MEI Min, et al*

(1687) Meta-analysis of the efficacy and safety of different doses of atorvastatin for chronic subdural hematoma ····· *GAN Xiong, WANG Wen-xi, PAN Guo-hong, et al*

(1698) Practice of standardizing rational use of key monitoring drugs by PDCA cycle management ····· *CHEN Gang, YUAN Yu-li, HUANG Qiu-ming*

中药一致性评价关键技术——中药光谱技术专题

【编者按】

中药光谱技术是控制中药质量的简便快捷方法之一，信息全面，特征性强。中药紫外光谱指纹图谱（UVFP）是由 $\pi \rightarrow \pi^*$，$n \rightarrow \pi^*$ 和 $n \rightarrow \sigma^*$ 化学键的价电子跃迁产生，是不同化合物紫外光谱（UV）的叠加，主要定性定量评价不饱和化学键和长共轭体系化学物质的整体质量。傅里叶红外光谱（FTIR）主要反映 C-H、O-H、N-H、C-C 等饱和单键振动信息，不饱和化学键吸收峰信息并不多。中红外光谱能定量检测中药中饱和与不饱和化学键总信息，表征单键性质约占光谱峰面积的 80% 以上。因此中药 UVFP 和 FTIR 结合具有互补性，其反映的中药质量信息更可靠。中药光谱量子指纹图谱首先把 FTIR 和 UV 光谱不同信号点进行量值合并（复量子），让量子指纹峰具备类似色谱峰的定量信息，实现连续的快速整体定量。中药太赫兹（THz）光谱技术是一种新兴先进控制技术，目前本课题组采用 UVFP 和 FTIR 及 THz 光谱量子指纹图谱成功评价了 30 多种药材和中成药的质量一致性。

【特邀专家简介】

孙国祥，男，博士，教授，博士研究生导师。核心技术“系统指纹定量法”获 2012 年“中国百篇最具影响国内学术论文”，是中药指纹学奠基人，基于定量指纹图谱提出和倡导中药标准制剂模式，倡导“指标精准定量和定量指纹检查相结合”的中药一致性评价方法。2003 年在日本分析科学最早发表定量指纹理论论文。承担国家自然科学基金重大计划《中药指纹图谱在线专家系统》，研制铁霜安神丸；发表学术论文 420 余篇，其中 SCI 收载 70 余篇。现任中国色谱学会理事，《中南药学》副主编，《色谱》《药学学报》等期刊编委。作为首席科学家带领全国复方甘草片厂家开展中药复方制剂一致性评价，能提供中药一致性评价核心技术和计算机评价软件。

中药一致性评价关键技术——中药光谱量子指纹评价中药一致性的理论与应用

孙国祥[1*]，杨婷[1*]，孙万阳[2*]，张江镭[1]，周恺宁[1]，蒲道俊[3]，陈振鸿[4]（1.沈阳药科大学药学院，沈阳 110016；2.暨南大学药学院，广州　510632；3.西南药业股份有限公司，重庆　400038；4.新疆富沃药业有限公司，新疆　沙雅　842200）

摘要：目的　提出中药光谱量子指纹图谱理论和数据处理的五种模式，将中药光谱量子指纹图谱作为中药固体制剂质量一致性评价的关键技术之一。**方法**　对近红外光谱和中红外光谱的测定方法和特点进行总结，用流动注射法对中药混合提取液以 5 m 空心 PEEK 管（内径 0.12～0.18 mm）在线测定中药全成分紫外光谱（190 ～ 400 nm），从而获得中药紫外量子指纹图谱。以咳特灵胶囊为例，建立其傅里叶红外光谱（FTIR）、紫外光谱（UV）和差示扫描量热法（DSC）量子指纹图谱并采用不同整合方法评价其质量。**结果**　用中药系统指纹定量法的 S_m、P_m 评价 FTIR、UV 和 DSC 量子指纹图谱，评价结果明显不同，这可清晰反映不同厂家生产的咳特灵胶囊的质量差别。按照 FTIR 联用系数 $\eta \approx 0.8$ 整合红外和紫外量子指纹图谱的评价结果（IRUV）更为客观和准确。按照 IRUV-DSC（1∶1）进一步融合会使中药质量评价更为科学和可靠。**结论**　中药光谱量子指纹图谱是对传统光谱的数字化赋值处理，充分利用 FTIR 和 UV 对中药进行整体定性和整体定量的简捷快速分析方法，可为中药复方制剂一致性评价提供新思路。

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81573586，No.81703696）。

[*] **通信作者：**孙国祥，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药指纹学和中药一致性评价研究，email：gxswmwys@163.com；杨婷，女，博士研究生，主要从事中药质量控制方法研究，email：17863523526@139.com；孙万阳，男，副研究员，硕士研究生导师，主要从事中药药理和代谢组学研究，email：wanyangsun@jnu.edu.cn@163.com

关键词：中药光谱量子指纹图谱；红外量子指纹图谱；紫外量子指纹图谱；DSC 量子指纹图谱；咳特灵胶囊；中药一致性评价
中图分类号：R284 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)07-1468-11
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.001

Key technology of TCM consistency evaluation—— Theory and application of spectral quantum fingerprints in quality consistency evaluation of TCM

SUN Guo-xiang[1*], YANG Ting[1*], SUN Wan-yang[2*], ZHANG Jiang-lei[1], ZHOU Kai-ning[1], PU Dao-jun[3], CHEN Zhen-hong[4] (1. *College of Pharmacy*, *Shenyang Pharmaceutical University*, *Shenyang* 110016; 2. *College of Pharmacy*, *Jinan University*, *Guangzhou* 510632; 3. *Southwest Pharmaceutical Co.*, *Ltd.*, *Chongqing* 400038; 4. *Xinjiang Fuwo Pharmaceutical Co.*, *Ltd.*, *Shaya Xinjiang* 842200)

Abstract: Objective To propose 5 models of spectral quantum fingerprint theory and data processing methods of traditional Chinese medicine (TCM), and to evaluate the quality consistency of TCM solid formulations with the spectral quantum fingerprints as a key technology. **Methods** The methods and characteristics of near infrared spectrum and mid-infrared spectrum were summarized. The UV spectra (190 ～ 400 nm) of the whole chemical components of TCM were determined online by flow injection method in 5 m hollow PEEK tubes (ID: 0.12 ～ 0.18 mm) for the mixed extracts of TCM to obtain the UV quantum fingerprints. The FTIR, UV, and DSC quantum fingerprints of Keteling capsules were established. **Results** The FTIR, UV and DSC quantum fingerprints were evaluated with S_m and P_m from TCM systematically quantified fingerprint method, and the evaluation results were significantly different. This clearly reflected the difference in the quality of Keteling capsules produced by different manufacturers. When the FTIR spectral association coefficient was 0.8, the comprehensive evaluation of UV and IR quantum fingerprints (IRUV) were objective and accurate. The IRUV-DSC (1∶1) fusion made the results more reliable and scientific in TCM quality evaluation. **Conclusion** Quantum fingerprints of TCM spectra are a digital assignment of traditional spectra, and a simple and rapid analysis of the overall qualification and overall quantification of TCM by making full use of FTIR and UV spectra. It provides the comprehensive information of TCM quality and a key technology for TCM quality consistency evaluation.

Key words: traditional Chinese medicine spectral quantum fingerprint; infrared quantum fingerprint; ultraviolet quantum fingerprint; DSC quantum fingerprint; Keteling capsule; TCM consistency evaluation

中药是中华民族几千年文化的瑰宝，有着悠久的历史，经过数千年医疗实践，中药的安全性、有效性已得到验证，但是在国际上尚未得到普遍认可，未进入世界主要临床体系。在现有条件下，采用几个化学成分定量分析的方法无法适用于成分复杂的中药体系，很难找到中药质量标志物，也无法代表中药质量。要解决这一难题就需要建立质量控制新方法和新模式，加强中药质量评价的科学化与标准化。中药面临着伟大复兴，开创中药光谱量子指纹评价体系，有望把中药发展成为世界性医药文化的主体之一。目前，应用现代仪器分析手段，如 2019 年 4 月孙国祥教授提出基于中药整体化学成分系统的光谱量子指纹图谱技术是中药质量一致性评价的一种简捷新方法。量子指纹图谱概念始于中药的傅里叶红外光谱（FTIR）研究，其测定快速，指纹特征性强，是开展中药原料药和中成药质量控制的简单易行的方法，建立红外量子指纹图谱可使其定性和定量功能产生质的飞跃[1-9]，继而用于中药一致性评价。红外量子化过程本身就是对红外光谱的色谱化，量子峰参数赋值后具有色谱峰的基本信息。

1　中药红外光谱指纹图谱

中药具有复杂性，大部分中药材药效成分不明确，在实际工作中多针对其中含量较多或特征指标成分定量，而红外光谱能全面有效地反映各类型化学单键和不饱和化学键的整体信息，因此通过红外量子指纹图谱能有效地反映中药整体化学成分的质量[10-14]。经特殊溶剂提取的红外光谱指纹图谱量子指纹化后能鉴别药材质量特征，如药材的种属、形态、产地和采收期等；能对药材重要活性成分进行识别、定性和定量，它能按照官能团量子指纹特征峰类型对化合物进行官能团分类的定性和定量分析，尤其是对能反映中药质量并可作为质量控制的指标成分的定性和定量，简便快捷，测试成本低。建立红外量子指纹图谱要进行仪器精密度、方法重复性、样品稳定性、线性范围、定量限和检测限的考察，以确保该方法的可靠性和专属性，全面有效地反映药材的质量和药效。红外量子指纹图谱改变了红外光谱的连续性特征，变成了分立的量子指纹峰，为建立中药红外量子指纹图谱提供了大量特征信息数据，对其精确分析进行评价可揭示数据背后的质量变异而作为中药进行的质控依据。研究中药红外量子指纹图谱对中药定性定量能适应中药信息质控要求，也是数字化中药红外量子化的现代中药质量控制模式和一种重要技术工具与强有力的技术载体平台。

1.1　中药红外光谱指纹图谱原理

红外光谱主要反映 C-H、O-H、N-H、C-C 等饱和键的结构信息，不饱和化学键所产生的红外吸收峰信息并不多。几乎所有有机化合物都有红外吸收信号，因此将中药看成多种有机化合物构成的简单混合物，红外光谱指纹图谱可以对其中所含有机化合物进行整体定性定量分析。中红外光谱分析技术在药物的官能团鉴定方面有着广泛作用，特征信息丰富使其主要用于定性鉴别，但实际应用却忽视了其整体定量功能。近红外光谱应用于定量检测较多，但需要烦琐的数学建模工作。中药原料药物和制剂中包含上百种化学物质成分，测定一定波数范围中红外指纹图谱和近红外指纹图谱能获得其总化学组分叠加信息，可作为整体定量鉴定中药质量的技术手段。中红外光谱能定量检测中药中饱和与不饱和化学键的总信息，尤其是表征单键性质（占光谱的 80% 以上）。在确定温度条件下，在 400 ～ 4000 cm^{-1} 中红外区和 4000 ～ 12 000 cm^{-1} 近红外区图谱能对饱和化学键能产生很好的响应，这为中红外指纹图谱定量检测中药整体化学物质组分提供了重要的基础保证。中药红外光谱指纹图谱的特点有：① 很多物质在近红外区域的吸收系数小，故样品无需用溶剂稀释即可以直接测定，便于生产过程的实时监测；② 适用于漫反射技术，近红外区内光散射效应大，且穿透深度大，使得近红外光谱技术可以用漫反射技术直接测定样品，中红外区也可以用漫反射法 ATRS 法测定；③ 近红外光可以在玻璃或石英介质中穿透；④ FTIR 和近红外光谱可以用于样品定性，也可以得到精度很高的定量检测；⑤ 测定中药材及制剂的固体粉末的中红外光谱，不需用有机试剂提取分离，与干燥的溴化钾粉末压片后可直接进行检测鉴定和定量分析。

1.2　中药红外光谱量子指纹化原理

1.2.1　光谱量子指纹概念与特征　记录不同红外波长（λ）单色光照射物质时对红外光产生的吸光度（A）则得 $A \sim \lambda$ 红外吸收连续光谱。因连续曲线抹杀了红外光量子被吸收的特征，红外量子指纹图谱把红外吸收光谱看成是依次对红外光子的吸光点到基线（$A = 0$）的垂线集合，把连续红外波长（波数）的对应纵坐标合并成简单线状量子谱。红外量子指纹图谱的基本属性如下：

① 红外量子指纹的平面性：把基线（$A = 0$）到吸收顶点连线称为红外单量子指纹谱，红外吸收光谱则变为顺序排列的基线垂线绘制而成的黑色平面图；② 红外量子指纹的加和性：把 $n = j$ 个波长对应的吸光度加和赋值到最后一个波长上的吸光度上，称为红外吸光复量子指纹（峰高不变或为合并点最大吸光度），则吸收光谱可变成垂直基线（$A = 0$）的分散线状或棒状复量子指纹线谱；③ 红外量子指纹的单一性：红外吸收光谱用量子指纹线谱表示，不同波长对应的量子指纹是具有专属性的，其顶点连线为原始吸收光谱；④ 红外量子指纹的特征性：量子指纹图谱能简单明确地表达红外光量子被吸收的特征，是吸收光谱真实的还原表征和简化描述；⑤ 红外量子指纹的定量性：红外量子指纹峰符合朗伯 - 比尔定律，无论是单量子指纹还是复量子指纹，因此可进行定量分析；⑥ 红外量子指纹的拓展性：红外量子指纹技术可拓展到任何连续信号曲线的量子化处理，如 NIR、热重分析（TG）、DSC、电化学指纹图谱等。

1.2.2　红外量子指纹信息化赋值规则　红外量子指纹是采用不同的吸光度点进行合并的方法，量子指

纹峰包括：峰号（P_{kn}），峰位（σ_i），半峰宽（$W_{1/2}$），峰高（H_i），峰面积（A），峰面积百分比（P%），能执行峰匹配，能进行整体定性和定量计算，符合国际通用的 *.cdf 文件特征，b 为合并点总数，见（1 ～ 3）式。红外量子指纹峰点信息是进行红外量子指纹一致性评价的物理基础信息，是对光谱连续信号量子化的物理信号进行数字信息化赋值处理的结果。红外量子化不单是连续信号进行线状化变化过程，更重要的是对产生连续信号图谱的物质基础所反映和表达的物理信息的整合与简化。红外量子指纹峰信息化是进行红外量子指纹计算的物质基础，是信息化处理的核心技术。因此红外光谱量子化是一个数字化赋值过程。红外量子指纹的定性定量结果基本与合并点数多少无关或影响甚微，原因在于是对原始信息的并合操作具有加和性。因此红外量子化是一种把连续信号进行色谱量子峰的变换过程，红外量子指纹峰点具备国际分析学会定制的 *.cdf 文件的基础信息。红外量子化是一个数字化赋值过程，是对连续信号数字化、全值信息化、原始信号完整化的色谱化变换。该方法完全适合于紫外光谱、DSC 曲线和电化学指纹图谱。

$$H_i = A_{max} \quad (1)$$

$$A = \sum_{i=1}^{b} A_i = A_{b1} + A_{b2} + ... + A_{bn} \quad (2)$$

$$W_{1/2} = b/200 \quad (3)$$

1.2.3　红外量子指纹操作　红外光谱包括紫外光谱吸收光谱曲线，以及其他连续信号（DSC）的 *.csv 与 *.txt 原始文件导入“中药光谱量子指纹一致性数字化评价系统 4.0”软件，可执行表 1 中的量子化操作命令，实现量子指纹化。2019 年 4 月孙国祥教授提出并开展中药 FTIR、UV 及 DSC 方面的量子指纹方法研究，2020 年 10 月拓展到中药电化学指纹图谱的评价。

表 1　量子化命令和功能

Tab 1　Quantized command and function for quantum fingerprints

量子指纹命令	使用“中药光谱量子指纹一致性数字化评价系统 4.0”软件	特征与示例
间隔抹除法（隔抹谱）	把连续光谱设定简并量子点宽 a 和抹除量子点宽 b，光谱总数据点为 n 则转换为 m 个量子指纹谱。从光谱起始抹除 b 宽度量子线的信号全部简并到紧邻 a 宽度量子线上，循环抹除 b 和简并操作（$a + b$），直至最末光谱点信号数。特点：① 运行极快且不损失数据点信息；② 用简并量子率 K 和特征量子指纹数 m 描述简并过程，即 n 个数据点被简并为 m 个量子指纹。该方法获得量子隔抹谱，但当 $b = 0$ 时获得全息量子基谱（为台阶谱），此时谱图无切割具有全信息。定义简并量子率 $K = a/(a + b)$(4)；特征量子指纹数 $m = n/(a + b)$(5)	用间隔抹除法获得香烟（37 峰）和复方甘草片量子指纹图谱（45 峰）见图 1，该法总并合点数为 $a + b$
定点合并法	是多数据点 b 循环合并在该区间最末一个固定点的光谱量子线上，特点：① 量子峰高为末位点光谱信号，称末位峰高法；② 峰面积为各合并点的信号总和（信号负值需先基线校正）；③ 半峰宽为合并总数据点数 b 除以 200；④ 用线状或棒状图表达红外量子指纹谱线；⑤ 易于量子峰点匹配，当用区间 b 内最大峰高时称为最大峰高法，最大峰高法与末位峰高法的 P_m 差异不大，建议采用最大峰高法	该法最常用、最好用且信息最全，见图 2A，其中 S1 是末位峰高法，S1-H 是最大峰高法，均获得 56 个量子指纹峰
特征简并法	设置 p 点构成一个亚区，简并获得 q 个量子峰（棒图），合并点数 $b = p/q$。特点：① 量子峰高为简并区内最大峰高，峰位在末点；② 简并点数 p 为特征峰数 q 的三倍以上为好；③ 量子半峰宽为 $b/200$；④ 当 $P = q$ 时每点都成量子指纹而得黑色全息谱；⑤ 在 $P < q$ 时可出现 464 或 931 等全部原始数据点。该法最大峰数为原始数据点	特征简并法是获得多量子峰的一种好方法，获得谱图保留原谱特征性很强，因此称为特征简并法，见图 2B，当 $P = 120$ 和 $q = 10$ 获得 70 个量子指纹峰
智能量子化	设置区间起点 x_1 和终点 x_2 并预设量子指纹合并点数 b，首先：① 设置合并点数 b；② 设置量子化区间【x_1；x_2】，其他区间只有量子基线；③ 在【x_1；x_2】完成定点合并法。对红外目标化合物定量时可针对特别指纹峰进行红外量子化，精准快捷	智能量子化也称区间量子化，见图 2C，智能量子化 2000 ～ 4000 cm^{-1} 区间时 $b = 15$ 获得 30 个量子指纹峰
导数量子化法	该法可实现：① 转换为 n 阶导数谱，可得正负谱，用于中药种属鉴别；② 转换为 n 阶导数绝对值谱，全部正谱峰，适于中药指纹量子化运算而不抵消定量信息；③ n 点移动数据平滑（移动平均线法）；④ 吸光度谱转化为透光率谱；⑤ 透光率谱转换为吸光度谱；⑥ 导数光谱能消除权重大组分光谱占比大的难题	图 2D 是复方甘草片 FTIR 光谱的四阶导数绝对值谱，之后用定点合并法 $b = 10$ 获得 83 个量子指纹峰

1.2.4　中药红外指纹图谱的测定　获取中药红外光谱的方法有：① 溴化钾压片法，中药取样量推荐为 6 mg（线性范围考虑在 1 ～ 12 mg，取样量太低，会导致称量误差太大），该法定量准确度高；② 液体池法，需要扣除溶剂的红外吸收；③ ATRS 法，获得红外光谱的定量特征容易产生一定的误差，需要进一步研究。主要推荐前两种方法测定中药 FTIR 光谱。

1.2.5　红外量子指纹定性定量计算　连续红外光谱和连续仪器分析信号经量子指纹变换后获得的

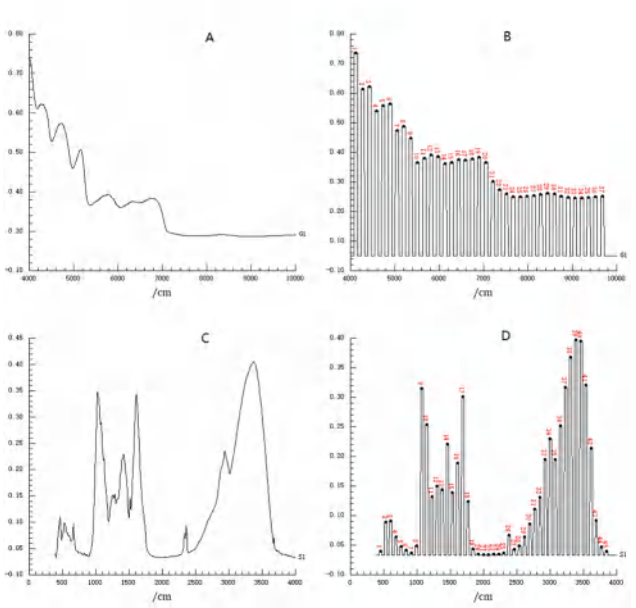


图 1　香烟的近红外光谱（A）与量子指纹图谱（B，$a = b = 20$）及复方甘草片的 FTIR 光谱（C）与量子指纹图谱（D，$a = b = 10$）

Fig 1　Near-infrared spectrum（A）and quantum fingerprint of cigarette（B，$a = b = 20$）and FTIR spectrum（C）and quantum fingerprint of compound licorice tablet（D，$a = b = 10$）

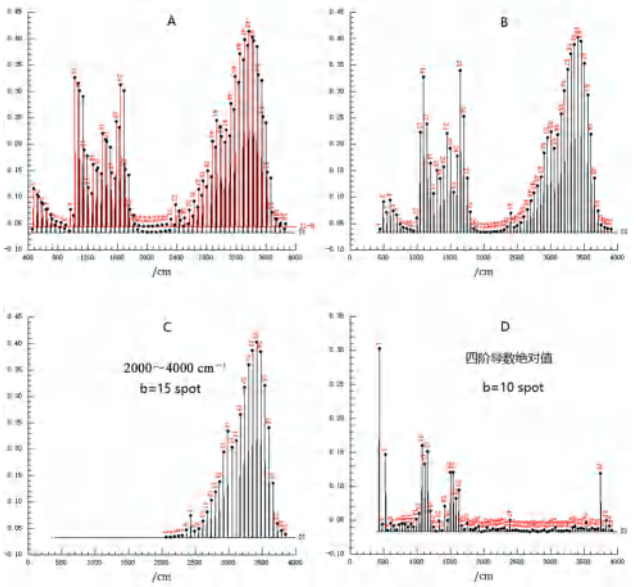


图 2　复方甘草片的 FTIR 量子指纹图谱

Fig 2　FTIR quantum fingerprint of compound licorice tablets

A. 末位峰高法 S1-H 得 56 峰（the last peak height method S1-H to obtain 56 peaks）；B. 特征简并法 $P = 120$ 和 $q = 10$ 得 70 峰 [characerized method（$P = 120$ and $q = 10$ to obtain 70 peaks）]；C. 智能量子化 2000 ～ 4000 cm^{-1}（$b = 15$ 得 30 峰）[intelligent quantization 2000 ～ 4000 cm^{-1}（$b = 15$ to obtain 30 peaks）]；D. 四阶导数绝对值谱（$b = 10$ 得 83 峰）[fourth-order derivative absolute value spectrum（$b = 10$ to obtain 83 peaks）]

量子指纹信息能执行符合复杂性科学规律的系统指纹定量法进行整体定性定量计算。用宏定性相似度 S_m 对红外量子指纹定性鉴别计算；用宏定量相似度 P_m（经称样量校正）对红外量子指纹整体定量计算，见（6 ～ 8）式，其中 y_i 代表标准量子峰积分面积，x_i 代表被测量子峰积分面积。光谱量子指纹图谱实质上是对光谱进行色谱化赋值过程，是一种数学处理方式，原理是光谱吸光度的加和性。不同数据点合并量子化后，整体定量误差的差别很小。

2　中药紫外光谱指纹图谱（UVFP）

UVFP 是反映中药化学组分中的 $\pi \rightarrow \pi^*$，$n \rightarrow \pi^*$ 和 $n \rightarrow \sigma^*$ 化学键价电子跃迁信息，是不同化学物质紫外光谱的叠加，因此 UVFP 能定性定量评价具有不饱和化学键和长共轭体系化学物质的整体质量。以 UV 光谱各点为评价单元（190 ～ 400 nm）对中药进行整体定性定量分析，由于不同的化学成分体系紫外吸收曲线具有指纹特征，故 UVFP 可用于中药及其制剂质量鉴定。在建立对照指纹图谱后用系统指纹定量（SQFM）法对样品进行质量评级。UVFP 能弥补单一紫外波长或几个紫外波长检测时对不饱和键的信息缺失，避开溶剂的末端吸收，UVFP 具有全信息特征。众多研究人员使用 UVFP 研究各种样品之间的异同，如半夏药材、丹皮、复方丹参片滴丸、热毒宁注射液甚至不同种类醋等 [15-20]，均证明 UVFP 对反映样品信息具有特异性。

2.1　中药 UVFP 测定装置

使用自动进样 HPLC，管路采用流动注射分析（FIA）方式采集 UVFP，即用空管路替代色谱柱（Peek tube 长 5000 mm，i.d.0.12/0.18 mm），以 DAD 采集在线紫外信号至样品无吸收为止（通常 190 ～ 400 nm），在 Agilent 1100（1260）高效液相色谱系统下完成分析。该系统流动相与试样间混合状态高度重现，具有稳定和极高重现性的特点。该方法单针测定样品可在 1 min 内完成，快速、准确。

2.2　标准（对照）UVFP 生成方法

标准（对照）UVFP 生成方法有两种：

① 平均值法：采用 15 批以上有代表性的中药原料（药材、提取物、配方颗粒等）或各类中成药经优化的提取方法获得的供试液所测得紫外光谱全峰点通过均值法计算得到标准（对照）UVFP，是一个平均化模式；② 用道地药材（标准药材）或标准中成药制剂的 2 ～ 6 份供试液直接进样测定标准（对照）紫外 UVFP，一般为测定 6 张紫外光谱指纹图谱的平均化模式。第二种方法更可取，更易实现随行对照定量（随行对照测

定时为双样双针以上测定）。通过单标或双标校正法来排除不同仪器间的系统误差，所建立的对照 UVFP 可作为直接定性定量分析的标准依据，因此建立紫外指纹系统的单标或双标校正法技术可实现对紫外光谱指纹在质量控制和一致性评价的广泛应用。

2.3　紫外指纹定量法（QUFM）

QUFM 是以光谱点为计算单元，用宏定性相似度 S_m 监测紫外指纹数量和分布比例，见（6）式；用宏定量相似度 P_m 监测紫外指纹含量状况及多成分紫外吸收叠加状况，见（7）式，同时用变动系数 α 限定紫外指纹变异性，见（8）式，它代表以 C 计量的 P 的误差大小。x_i 与 y_i 分别为样品和对照 UVFP 各峰点吸光度，m_{RFP} 和 m_i 分别为对照 UVFP 和样品的进样质量。用 S_m、P_m 和 α 鉴定中药质量为经典的 8 级质量分类法，也可以用限度法进行控制。QUFM 能弥补红外指纹法对不饱和化学键的检测信息缺失，一般不饱和化学键对红外指纹的贡献率约为 20%。QUFM 适用于红外和紫外光谱的量子化指纹对中药质量的一致性评价和控制。

2.4　紫外光谱、红外光谱、色谱联用模型

中药中有紫外吸收的化合物总质量约占中药成分的 20% 左右，因此中药成分的 80% 并未得到有效检测（单一紫外波长检测的 HPLC 指纹图谱反映的成分质量则更少）。中药红外光谱指纹图谱反映的不饱和化学键约占图谱面积的 20% 左右。紫外（190 ～ 400 nm）和红外光谱（400 ～ 4000 cm^{-1}）联用控制中药质量的一个基本控制模型见（9 ～ 11）式，其中最常用的红外光谱联用系数 $\eta \approx 0.8$，这一数值也可以通过 HPLC 紫外定量数据和红外光谱的试验数据来测定后再确定。HPLC 指纹图谱的检测数据本质上仍然只是对中药中不到 20% 质量的物质组分进行质量控制。因此用紫外检测的 HPLC 指纹图谱和紫外全指纹谱及红外光谱指纹图谱三者联用技术的融合模式见（12 ～ 14）式，其中 $\bar{S}_m$、$\bar{P}_m$、$\bar{\alpha}$ 是 HPLC 多波长 HPLC 指纹图谱经 SQFM 评价后的融合结果参数，紫外和红外光谱总联用系数仍为 $\eta \approx 0.8$，也可以通过试验数据测定。因此由 HPLC 控制的中药质量必须补偿 80% 以上光谱控制的质量份额，才具有整体质量控制的倾向和科学性意义。色谱和光谱联用建立的基础应该在 HPLC 检测条件的多指标成分的精准定量完成后，进行综合评价中药质量。

$$S_m=\frac{1}{2}\left(S_F+S_F'\right)=\frac{1}{2}\left(\frac{\sum_{i=1}^{n}x_iy_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n}x_i^2}\sqrt{\sum_{i=1}^{n}y_i^2}}+\frac{\sum_{i=1}^{n}\frac{x_i}{y_i}}{\sqrt{n\sum_{i=1}^{n}\left(\frac{x_i}{y_i}\right)^2}}\right) \tag{6}$$

$$P_m=\frac{1}{2}(C+P)\frac{m_{RFP}}{m_i}=\frac{1}{2}\left(\frac{\sum_{i=1}^{n}x_iy_i}{\sum_{i=1}^{n}y_i^2}+\frac{\sum_{i=1}^{n}x_i}{\sum_{i=1}^{n}y_i}S_F\right)\frac{m_{RFP}}{m_i}\times 100\% \tag{7}$$

$$\alpha=\left|1-\frac{\gamma_x}{\gamma_y}\right|=\left|1-\frac{P}{C}\right| \tag{8}$$

$$S_{m\text{-}IRUV}=\eta S_{m\text{-}IR}+(1-\eta)S_{m\text{-}UV} \tag{9}$$

$$P_{m\text{-}IRUV}=\eta P_{m\text{-}IR}+(1-\eta)P_{m\text{-}UV} \tag{10}$$

$$\alpha_{IRUV}=\eta\alpha_{IR}+(1-\eta)\alpha_{UV} \tag{11}$$

$$S_{m\text{-}SLC}=(1-\eta)\bar{S}_m+\eta S_{m\text{-}IRUV} \tag{12}$$

$$P_{m\text{-}SLC}=(1-\eta)\bar{P}_m+\eta P_{m\text{-}IRUV} \tag{13}$$

$$\alpha_{SLC}=(1-\eta)\bar{\alpha}+\eta\alpha_{IRUV} \tag{14}$$

中药红外光谱和紫外光谱突出反映了两类宏观定性定量信息，以红外光谱对紫外光谱检测的信号信息进行全方位补偿。第一步，以红外光谱能够检测 80% 单键信息补偿紫外光谱仅检测 20% 不饱和键的单一功能。两者按（9 ～ 11）式 η 权融合后评价中药光谱指纹反映的整体质量。第二步，采用多波长 HPLC 综合指纹图谱与光谱指纹图谱综合整合，即用五波长下三参数平均值 $\bar{S}_m$、$\bar{P}_m$ 和 $\bar{\alpha}$ 值与两类光谱法 $S_{m\text{-}IRUV}$、$P_{m\text{-}IRUV}$ 和 $\alpha_{m\text{-}IRUV}$ 按（12 ～ 14）式 η 权融合后重新评价中药质量。由于红外光谱突出反映化学指纹单键信息，因此色谱和光谱指纹谱综合定量评价结果更准确。充分利用平行五波长 HPLC 定量指纹图谱（PFW-HPLC-FP）和 IRUV 指纹谱联合鉴定中药质量，具有全面、充分和准确可靠的特点，可为中药质量控制和一致性评价实践提供重要方法。

2.5　紫外全指纹定量法的双标校正原理（见图 3）

在紫外全指纹定量法中双标校正原理为：

① 把建立紫外 RFP 系统称为第一色谱系统（the first chromatographic system，FCS），也称初指纹系统（色谱系统 1）。选择两个固定浓度的对照品（C_1，C_2），测定其色谱峰面积（A_1，A_2），则分别计算得到（f_1，f_2，f_{d1}），见式（15 ～ 17），分别称为标 1，标 2 和双标在初指纹系统的定量校正系数，三者越大表明灵敏度越大。建立 RFP 对应测试样品质量或浓度，可用称样量用 m_{RFP}（g）或质量浓度表示 [$C_{RFP} = m_{RFP}/V$（$mg \cdot mL^{-1}$）]，这是紫外全指纹定量法的重要特征质量参数。

② 把发生显著变动后的色谱系统称为第二色谱系统（the second chromatographic system，SCS），也称新指纹系统。仍然选择前面的两个固定浓度的对照品溶液分别为 C_1'，C_2'，测定

$$f_1=\frac{A_1}{C_1} \quad (15) \qquad f_2=\frac{A_2}{C_2} \quad (16) \qquad f_{d1}=\sqrt{\frac{A_1A_2}{C_1C_2}} \quad (17)$$

$$f_1'=\frac{A_1'}{C_1'} \quad (18) \qquad f_2'=\frac{A_2'}{C_2'} \quad (19) \qquad f_{d1}=\sqrt{\frac{A_1'A_2'}{C_1'C_2'}} \quad (20)$$

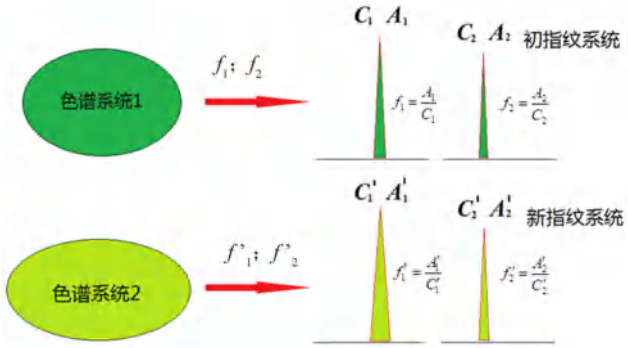


图 3　紫外全指纹定量法双标校正原理图

Fig 3　Schematic diagram of double-standard calibration of UV fingerprint quantitative method

其色谱峰面积分别为 A_1'，A_2'，分别计算得到（f_1'，f_2'，f_{di}），见式（18～20），分别称为标 1，标 2 和双标在新指纹系统的定量校正系数，三者越大表明灵敏度越大。

③ 双标相对定量校正因子（f_{qi}）把新指纹系统与初指纹系统的绝对定量校正因子之比称为相对定量校正因子，见（21～23）式，一般在 0.97 到 1.03，说明两个系统定量误差基本在 ±3% 以内，f_{qi} 越接近 1 越好。设立这个相对定量校正因子的初衷是考虑把 RFP 系统定量性质平移到新色谱系统。经过双标校正后，在第一个色谱系统建立的紫外全指纹定量标准就可以直接对校正后的系统进行定量分析。在新测定色谱系统下，$P_m' = P_m/f_{di}$，是用已建立的标准直接计算测定样品的定量相似度。

④ 全紫外光谱校正法，如果使用标 1 和标 2 的全紫外光谱进行校正，应该计算新指纹系统标 1 指纹图谱与初指纹系统标 1 紫外光谱作为标准指纹的宏定量相似度，并考虑浓度改变 C_1，C_1' 校准值，见（24）式，同法处理标 2 并计算双标校正因子见（25～26）式。

$$f_{q1}=\frac{f_1'}{f_1} \quad (21) \qquad f_{q2}=\frac{f_2'}{f_2} \quad (22)$$

$$f_{qi}=\frac{f_{di}}{f_{d1}}=\sqrt{f_{q1}f_{q2}} \quad (23) \qquad f_{q1}=P_{m1}\frac{C_1}{C_1'} \quad (24)$$

$$f_{q2}=P_{m2}\frac{C_2}{C_2'} \quad (25) \qquad f_{qi}=\sqrt{f_{q1}f_{q2}}=\sqrt{P_{m1}P_{m2}\frac{C_1C_2}{C_1'C_2'}} \quad (26)$$

2.6　UVFP 主要类型和特点

依据中药样品提取方法，可建立水溶性成分 UVFP、脂溶性成分 UVFP、全成分 UVFP 及特征有效组分群 UVFP。提取方法的恒定性决定 UVFP 的稳定性和重现性特征。UVFP 具有测定快速（测定中药混合液的 DAD 在线光谱的分析时间＜ 1 min），稳定性和重现性好，定量信息丰富（因波长范围宽 190 ～ 400 nm），定量准确度高和数字化特征显著等特征。因此 UVFP 尽管定性特征性单一，但所提供峰点的定量信息具有全面性和整体性，其能全面反映中药中化学成分中不饱和化学键产生的定量叠加全信息，从整体角度考虑其比 HPLC 紫外单波长检测的指纹图谱具有更全面和更准确的特点。其分析方法价廉、数据信息全面易得。用不同溶剂提取样品，如水、无水乙醇、甲醇、氯仿、石油醚、环已烷，以及提取溶剂中加入一定比例的助溶剂十二烷基硫酸钠（SDS）或者环糊精都是提高提取效率的方法。测定 UVFP 时最好每 1 nm 或 0.5 nm 波长采集一个紫外光谱数据点。

2.7　光谱量子指纹图谱评价软件

“中药光谱量子指纹一致性数字化评价系统 4.0”是国内外第一个针对红外光谱和紫外光谱以及 DSC 曲线等连续信号曲线进行量子指纹化操作的计算机评价软件，导入文件格式为 *.csv 文件和 *.txt 文件，均能实现“1.2.3”项下的全部量子指纹操作，这些方法均适用于连续信号文件曲线的量子指纹信息化的数据赋值处理。能执行量子指纹的系统指纹定量法对中药进行质量一致性评价。该软件与 FTIR 和 THz 光谱仪形成整合系统如下：“LZ9000FTIR 中药红外量子指纹一致性评价系统”和“LZ9000THz 中药太赫兹量子指纹一致性评价系统”。主要使用药都（本溪）一致科技有限公司开发的“中药光谱量子指纹一致性数字化评价系统 4.0”软件，中药企业可选以上系统作为中药快速检验和评价综合质量的方法之一。

3　咳特灵光谱量子指纹图谱研究

咳特灵原名榕扑慢支合剂，是一种中西复方制剂，由广州市红十字医院与广州市药检所于 20 世纪 70 年代初发明，是攻克老年慢性支气管炎、慢性气管炎中的一项重要科研成果，1981 年经广东省卫生厅批准更名为咳特灵片（胶囊）。尽管目前有多种评价方法用来控制它的质量，但现有方法费时费力且成本较高，为了探索更优的评价方法，本研究采用 FTIR、UV、DSC 进行整合评价不同来源的 17 批咳特灵胶囊样品质量。咳特灵胶囊 S1 ～ S2 来自厂家 A，S3 ～ S5 来自厂家

B，S6 ～ S9 来自厂家 C，S10 和 S11 来自厂家 D，S12 ～ S13 来自厂家 E、S14、S15、S16、S17 分别来自厂家 F、G、H、I。光谱级的 KBr 来自大茂化学试剂（中国天津）。

3.1　仪器和分析条件

3.1.1　FTIR 分析　使用 iCAN-9 傅里叶变换红外光谱仪（中国天津能谱科技有限公司）、C0-400 液压机（振达工具）进行了 FTIR 光谱实验，波数范围为 4000 ～ 500 cm^{-1}。收集光谱并扫描 32 次，光谱分辨率为 8 cm^{-1}，测量过程室温保持 25 ℃。

3.1.2　UV 分析　UV 光谱数据由 Agilents 1100 型液相色谱仪（美国安捷伦）获得，该系统配备 DAD 检测器和中空的 PEEK 管（5000 mm×0.12 mm）。光谱范围设置为 190 ～ 400 nm，间隔为 2 nm。以流动注射分析法为分析方法，以乙腈 - 水（50∶50，*V/V*）溶液为载体，温度（35±0.15）℃，流速 0.6 mL・min^{-1}，进样量 3 μL。

3.1.3　DSC 分析　采用 DSC-500B（上海研锦科学仪器有限公司）进行 DSC 分析，使用铟、锡和锌标准物质对设备进行校准。将 5 mg 样品放入坩埚中，在加热速率为 10 ℃・min^{-1} 时测量在 40 ～ 500 ℃的热流率数据。每个样品重复 3 次以确保准确性。

3.2　样品制备

3.2.1　FTIR 样品　精密称取 6 mg 胶囊内容物和 150 mg 干燥 KBr 超细粉分别放入玛瑙研钵中，充分混合并研磨。准确称取 100 mg 混合物，转移到模具中，在 15 MPa 下按压 3 min 使其成均匀薄片，扣除背景干扰后记录相应的光谱图。

3.2.2　UV 样品　取胶囊内容物混合均匀，然后精确称取 0.4 g，向其中加入 80% 甲醇 10 mL，超声 10 min 后得到原液，测定时将原液稀释 50 倍。

3.2.3　DSC 样品　取胶囊内容物混合均匀，精确称取 5 mg，将其放入铝坩埚中并使其分布平整均匀。

3.3　结果和讨论

3.3.1　FTIR 指纹分析　FTIR 仪器精密度通过对同一样品连续测试 6 次而获得，重复性通过分析从一个批次样品制备的 6 份样品提取物来检查。接着利用样品指纹图谱宏定量相似度 P_m 对方法进行验证，P_m 的 *RSD* 值小于 0.44%，表明该方法可行。

在 4000 ～ 400 cm^{-1} 内检测 17 批咳特灵胶囊的 FTIR 指纹图谱并进行 9 点平滑，见图 4A。推断出 2924 cm^{-1} 处的峰和 2862 cm^{-1} 是脂肪族 $-CH_3$ 和 $-CH_2$ 的伸缩振动峰，2361 cm^{-1} 是脂肪族三键的伸缩振动峰，1607 cm^{-1} 峰归因于 C ＝ O 多酚羰基和 C ＝ C 芳环的伸缩，1518 cm^{-1} 是碳芳香环骨架的伸缩振动峰。O-C 吸收峰在 1253 cm^{-1} 和 1022 cm^{-1}，776 cm^{-1} 为 -CH 的面外弯曲振动峰。

3.3.2　FTIR-QFP 建立与评价　分别采用 b ＝ 5、10、20 和 50 点定点合并法生成量子指纹图谱，并使用 t 检验进行统计分析，发现不同合并点数的结果差异无统计学意义，最后确定选择 10 点融合技术（最大峰高法）生成量子指纹图谱得 83 个峰，见图 4B。结果 17 批咳特灵胶囊的 S_m 高于 0.928，P_m 范围为 56.2% ～ 51.7%，见表 1。样品被分为 6 个等级，其中 8 个批次（S3、S4、S5、S6、S7、S10、S12、S13）≤ 4 级，7 个批次（S1、S2、S9、S11、S14、S15、S17）为 5 ～ 6 级，只有 2 个批次（S8 和 S16）为 7 级或 8 级，见表 2。从图 4A 可以看出，同一厂家不同批次的光谱基本相同，而不同厂家 FTIR 光谱差异较大，这表明 FTIR 及其量子指纹图谱可用于制剂质量等级评价。

表 2　3 种量子指纹图谱分别评价咳特灵胶囊质量结果

Tab 2　Three quantum fingerprints in evaluating the quality of Keteling capsules

No.	FTIR-QFP			UV-QFP			DSC-QFP		
	S_m	P_m/%	等级	S_m	P_m/%	等级	S_m	P_m/%	等级
S1	0.976	67.1	6	0.999	101.9	1	0.973	114.8	3
S2	0.982	64.0	6	0.998	88.2	3	0.955	126.6	5
S3	0.948	93.1	2	0.998	88.1	3	0.954	96.6	2
S4	0.953	94.5	2	0.994	169.0	8	0.972	101.7	2
S5	0.943	90.0	2	0.999	141.2	7	0.982	100.1	2
S6	0.956	101.2	1	0.975	30.2	8	0.959	91.1	2
S7	0.973	98.5	1	0.986	37.6	8	0.973	113.0	3
S8	0.982	151.7	8	0.997	143.9	7	0.784	76.1	5
S9	0.982	123.7	5	0.999	157.1	8	0.969	124.6	5
S10	0.982	101.5	1	0.999	147.4	8	0.958	83.1	4
S11	0.981	122.5	5	0.988	38.8	8	0.971	108.5	3
S12	0.979	94.5	2	0.988	38.8	8	0.930	99.0	2
S13	0.949	102.8	2	0.988	31.1	8	0.965	73.5	5
S14	0.953	73.6	5	0.989	31.3	8	0.963	98.0	2
S15	0.978	132.9	6	0.998	202.0	8	0.958	87.3	3
S16	0.946	56.2	7	0.996	166.9	8	0.863	86.2	3
S17	0.928	120.9	5	0.997	84.6	4	0.961	84.3	4
平均值	0.960	99.3	1	0.993	99.9	1	0.960	97.9	1
RSD/%	1.9	25.8	—	0.70	58.8	—	2.9	16.2	—

3.3.3　UV 指纹分析　精确吸取 3.0 μL 的 S1 供试品溶液，以 0.6 mL・min^{-1} 的流速用于紫外检测。进样 6 次并记录色谱图来评估仪器精密度。平行制备 6 个 S1 样品供试液，分别测试以评估方法重复性。在供试品溶液准备后的 0、0.5、1、1.5、2

和 2.5 h 将 3.0 μL S1 进样并记录色谱图进行稳定性分析。在 250 nm 处的峰面积和保留时间的 *RSD* 均小于 1.5%，结果表明本方法符合要求。

3.3.4　UV-QFP 建立与评价　17 批咳特灵胶囊的 UV 见图 5A，使用定点合并法 2 点融合技术获得紫外量子指纹图 5B（32 个量子指纹峰）。17 批样品 UV-QFP 在 190 ～ 400 nm 内被清晰区分，尤其是来自不同厂家的样品指纹信息差异相对较大。样品分析结果显示 S_m 均高于 0.975，但 P_m 变化很大，样品分为 5 个等级，其中 13 批样品（S4、S5、S6、S7、S8、S9、S10、S11、S12、S13、S14、S15、S16）属于 7 级和 8 级，4 批样品低于 4 级（S1、S2、S3 和 S17）。一方面，质量等级显示不饱和化合物含量的波动，这可能是由于在检测波长范围内各种物质的含量明显不同造成的。另一方面，UV-QFP 评价结果与其他评价结果之间的差异可能是由于非共有组分、不饱和键和发色团对 UV 光谱的影响。这进一步说明使用单一检测技术单方面提供化学模式或特征，会限制中药整体的综合质量评价结果。

3.3.5　DSC 分析　为了探索合适的咳特灵胶囊 DSC 检测条件，对加热速率和重量分别进行了考察。首先精密称取 5.0 mg 内容物，加热速率分别为 5、10、20 ℃ • min^{-1} 测定 DSC 谱。结果表明加热速率过高或过低都会影响峰位的识别。随着加热速率增加，放热峰形状变大，并向高温区移动。通过比较不同升温速率曲线，确定选择 10 ℃ • min^{-1} 作为加热速率。然后分别称量 2.25、4.09、6.05、8.21、10.17 和 12.07 mg 样品进行测试，以样品质量为自变量，与 P_m 进行线性回归得回归方程为 $P_m = 8.39m - 42.32$，$r = 0.9932$。结果表明，在 2.25 ～ 12.07 mg 内样品质量与 P_m 呈现良好的线性关系。通过比较，最终选择峰位适中、峰形良好的条件（取样 5.0 mg）进行 DSC 试验。

3.3.6　热重变化和状态变化的过程分析　DSC 试验中 17 批咳特灵胶囊的 DSC 曲线见图 6A，均有三个阶段，显示一个吸热峰和两个放热峰。吸热峰 66 ～ 101 ℃是样品吸附水的蒸发。第一个放热峰位于 228 ～ 352 ℃，第二个放热峰位于 359 ～ 496 ℃区域，两个放热峰都伴随着样品质量显著下降。结合峰值及样品实时状态显示，均由样品热分解导致，第一个放热过程产生焦化现象，第二个放热宽峰是因样品燃烧所致。

3.3.7　DSC-QFP 建立与评价　通过 $b = 100$ 点的定点合并法得到 17 个样品 DSC 图见图 6A，其 DSC-QFP 见图 6B，并将其划分为 5 个质量等级，见表 1。其中 $S_m > 0.863$，P_m 范围为 73.5% ～ 126.6%，结果表明 DSC 揭示的质量等级跨度反映了所有样品总化学物质的变化特征，能够反映样品全物质的相似程度。

3.4　FTIR-QFP、UV-QFP 和 DSC-QFP 的整合评价

本文按照（9 ～ 11）式采用 FTIR 联用系数 $\eta \approx 0.8$ 融合模型评价结果见表 3，以此表征咳特灵胶囊全物质组分的质量评价。DSC 反映的是全物质质量的相变过程，所以使用 DSC 和 IRUV 的结果进行等权融合，从而得到以全物质组分为基础的两种原理的综合评价结果。

表 3　FTIR ＋ UV 融合和 3 种量子指纹整合评价结果

Tab 3　Integrated evaluation of FTIR ＋ UV and 3 quantum fingerprints

No.	0.8FTIR ＋ 0.2UV ＝ IRUV			IRUV-DSC（1 ∶ 1）			质量
	S_m	P_m/%	Grade	S_m	P_m/%	Grade	
S1	0.981	74.1	5	0.977	94.4	2	很好
S2	0.985	68.8	6	0.970	97.7	1	极好
S3	0.958	92.1	2	0.956	94.4	2	很好
S4	0.961	109.4	2	0.967	105.6	2	很好
S5	0.954	100.2	1	0.968	100.2	1	极好
S6	0.960	87.0	3	0.959	89.1	3	好
S7	0.976	86.3	3	0.974	99.7	1	极好
S8	0.985	150.1	8	0.885	113.1	3	好
S9	0.985	130.4	6	0.977	127.5	5	中等
S10	0.985	110.7	3	0.972	96.9	1	极好
S11	0.982	105.8	2	0.977	107.1	2	很好
S12	0.981	83.4	4	0.955	91.2	2	很好
S13	0.957	88.5	3	0.961	81.0	4	良好
S14	0.960	65.1	6	0.962	81.6	4	良好
S15	0.982	146.7	7	0.970	117.0	4	良好
S16	0.956	78.3	5	0.910	82.3	4	良好
S17	0.942	113.6	3	0.951	99.0	1	极好
平均值	0.967	99.4	1	0.963	98.7	1	极好
RSD/%	1.486	25.4	—	2.586	12.8	—	—

IRUV 整合结果显示所有样品 S_m 高于 0.942，P_m 分布于 65.1% ～ 150.1%，这表明所有样品的定性相似度很高，同时 P_m 仍然能够对样品进行有效地区分质量。3 种光谱量子指纹图谱整合 IRUV-DSC（1 ∶ 1）的 S_m 均大于 0.885，P_m 位于 81.0% ～ 127%，见图 7，3 种量子指纹图谱的融合 IRUV-DSC（1 ∶ 1）评价结果中和了单一或者两种图谱整合评价结果，具有更科学更准确的特点。

4　结论

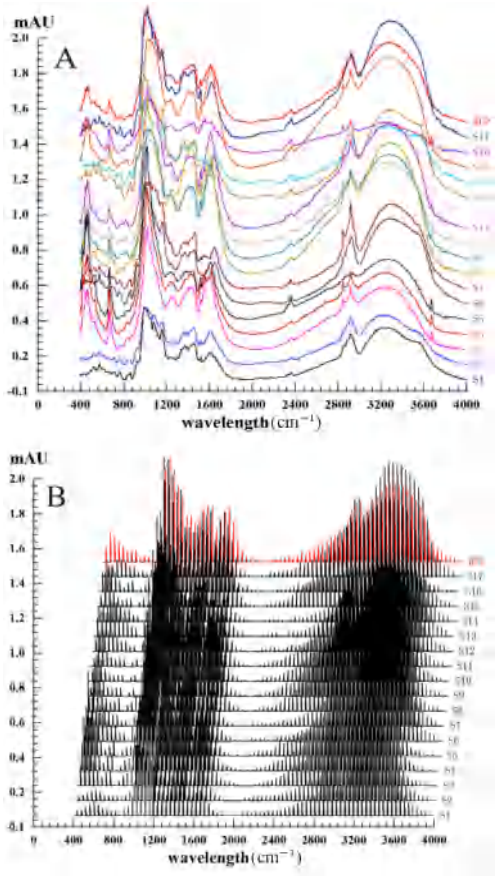


图 4　FTIR 指纹图谱（A）及 FTIR 量子指纹图谱（B）

Fig 4　FTIR fingerprint（A）and FTIR quantum fingerprint（B）

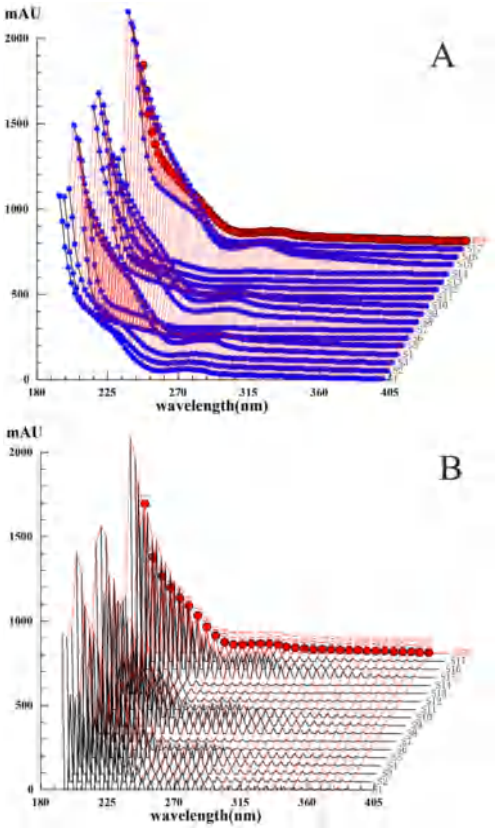


图 5　UV 指纹图谱（A）及 UV 量子指纹图谱（B）

Fig 5　UV fingerprint（A）and UV quantum fingerprint（B）

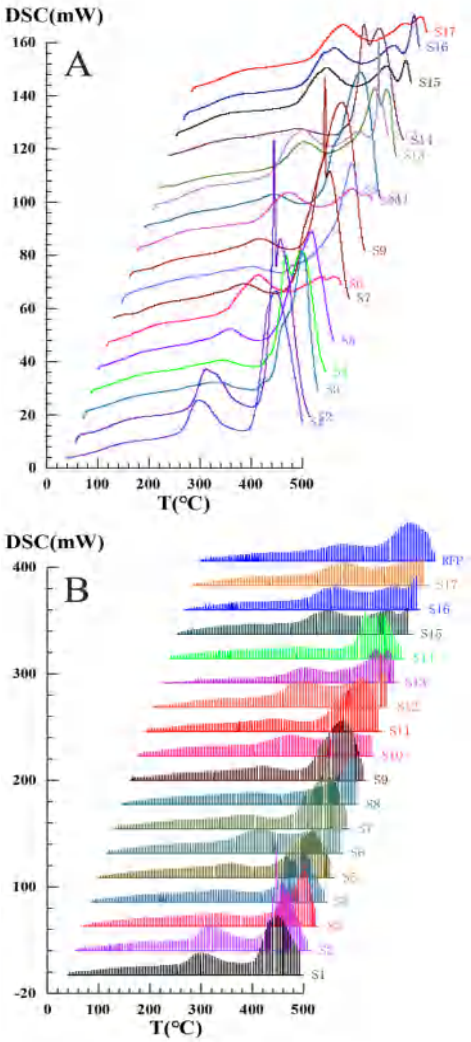


图 6　DSC 指纹图谱（A）和 DSC 量子指纹图谱（B）

Fig 6　DSC fingerprints（A）and DSC quantum fingerprints（B）

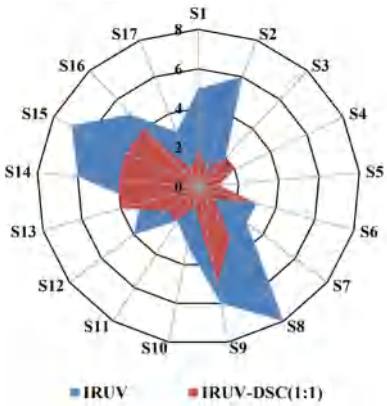


图 7　FTIR ＋ UV 整合和 3 个量子指纹图谱的整合的评价等级图

Fig 7　Integrated evaluation ranking of FTIR ＋ UV integration and 3 quantum fingerprints

采用指标化学成分定量分析无法适用于复杂中药体系，很难找到中药质量标志物，也根本无法代表中药质量。建立质量控制新方法和新模式，探寻中药质量评价的科学化与标准化十分重要。

应用现代仪器分析手段，基于中药整体化学成分系统之上的光谱量子指纹图谱技术是中药质量一致性评价的一种简捷新方法。量子指纹图谱概念始于中药红外光谱研究，特别是 FTIR 测定快速，指纹特征性强，是开展中药原料药和中成药质量控制的简单易行方法，红外量子指纹使其定性和定量功能产生质的飞跃。UV 只能检测带有长共轭体系的非饱和化合物含量，但 FTIR 主要揭示化合物中单键的伸缩振动峰和单键为主的转动能级跃迁。因此将 UV 指纹图谱与 FTIR 指纹图谱相结合可以有效相互补充。DSC 主要反映物质相变，可监测全部物质在相变过程中能量吸收或释放，补充及弥补 UV 和 FTIR 无法检测到的整体物质。总之，由于检测角度、范围和化合物的差异，单一 FTIR、UV、DSC 指纹图谱方法可能会导致评估结果出现偏差，因此，基于 3 种检测方法获得量子指纹图谱进行整合策略，是考虑到全部物质的物理变化和能量变化的总特征，是一种更优越的全质量控制方法。光谱量子化操作过程本身就是对光谱连续信号的色谱化处理，是一种观念和概念创新，中药光谱量子指纹图谱用于中药一致性评价大有可为。

参考文献

[1] Chang Q，Lan LL，Gong DD，et al. Evaluation of quality consistency of herbal preparations using five-wavelength fusion HPLC fingerprint combined with ATR-FTIR spectral quantized fingerprint：Belamcandae Rhizoma antiviral injection as an example [J]. J Pharm Biomed Anal，2022，214（30）：114733.

[2] Xu ST，Lan LL，Dai TT，et al. Comprehensive quality evaluation of compound bismuth aluminate Tabts by multiple fingerprint profiles combined with quantitative analysis and antioxidant activity [J]. Microchem J，2022，176（5）：107237.

[3] Li X，Lan L，Gong D，et al. Evaluating quality consistency of Mingmu Dihuang Pill by 3 kinds of quantum fingerprint combined with anti-oxidation profiling [J]. Microchem J，2022，175（4）：107195.

[4] Yang T，Yang HZ，Ling GX，et al. Evaluating the quality consistency of Keteling capsules by three-dimensional quantum fingerprints and HPLC fingerprint [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc，2022，270（5）：120820.

[5] Li X，Zhang F，Wang X，et al. Evaluating the quality consistency of Rong’e Yishen oral liquid by UV ＋ FTIR quantum profilings and HPLC fingerprints combined with 3-dimensional antioxidant profiles [J]. Microchem J，2021，170（11）：106715.

[6] Gong D，Chen JY，Li X，et al. A smart spectral analysis strategy-based UV and FTIR spectroscopy fingerprint：application to quality evaluation of compound liquorice Tabts [J]. J Pharmaceut Biomed Anal，2021，202（5）：114172.

[7] Wang X，Liu X，Wang J，et al. Study on multiple fingerprint profiles control and quantitative analysis of multi-components by single marker method combined with chemometrics based on Yankening tablets [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc，2021，253（15）：119554.

[8] Yan H，Sun GX，Zhang J，et al. Overall control herbal medicine in best consistency [J]. J Pharmaceut Biomed，2021，195（20）：113867.

[9] Yang FL，Chu TT，Zhang Y，et al. Quality assessment of licorice（*Glycyrrhiza glabra* L.）from different sources by multiple fingerprint profiles combined with quantitative analysis，antioxidant activity and chemometric methods [J]. Food Chem，2020，324（15）：126854.

[10] 王亚敏，张卓勇，汤彦峰，等 . 近红外光谱技术在中药鉴别及分析中的应用 [J]. 首都师范大学学报（自然科学版），2004，25（3）：41-45.

[11] 吝伟 . 化学计量学在中成药红外指纹图谱研究方面的应用 [D]. 石家庄：河北师范大学，2012.

[12] 白雁，鲍红娟，主东，等 . 红外光谱和聚类分析法在药用菊花产域分类鉴别中的应用 [J]. 中药材，2006，29（7）：663-663.

[13] 田进国，朱文荣，任健，等 . 中药配方颗粒红外指纹图谱的研究 [J]. 中成药，2003，25（12）：3-7.

[14] 苏燕评，刘小芬 . 醉鱼草红外指纹图谱的研究 [J]. 海峡药学，2011，23（4）：34-35.

[15] 黄涛，甫志锦，陈后江，等 . 半夏药材紫外指纹图谱共有峰率和变异峰率双指标序列分析 [J]. 大理学院学报，2014，13（2）：20-25，93.

[16] 袁久荣，岳春华，邹华彬，等 . 丹皮紫外指纹图谱共有峰率和变异峰率双指标序列分析 [J]. 世界科学技术，2004，6（6）：31-35，83.

[17] 莫志江，张丽娟 . 不同复方丹参片（滴丸）紫外吸收光谱的相关分析 [J]. 中国中药杂志，2005，30（7）：507-510.

[18] 伍蕊嗣，刘涛，付春梅，等 . 基于紫外指纹图谱的热毒宁注射液质量研究 [J]. 中草药，2017，48（3）：499-504.

[19] 孟庆华，王微波，胡育筑 . 紫外光谱相似度及其在中药注射液质量控制中的应用 [J]. 中国中药杂志，2007，32（3）：206-210.

[20] 蒋剑波，周志刚，彭利军 . 湘西原香醋紫外光谱指纹图谱特性分析 [J]. 食品科学，2012，33（6）：162-165.

（收稿日期：2022-05-06；修回日期：2022-06-02）

中药一致性评价新技术——中药太赫兹光谱发展及其量子指纹图谱在中药一致性评价中的应用

杨惠智[1]，杨婷[1]，孙万阳[2*]，郭萍[1*]，孙国祥[1*]，李茜[3]，李晓辉[3]（1. 沈阳药科大学药学院，沈阳　110016；2. 暨南大学药学院，广州　510632；3. 江门太赫兹光谱研究院，广东　江门　529000）

摘要：目的　综述太赫兹光谱在中药质量控制中的应用，提出用中药太赫兹光谱量子指纹评价甘草质量的一致性。**方法**　依据文献综述太赫兹光谱原理和其在中药质量控制中的实际应用进展，采用太赫兹量子指纹图谱用系统指纹定量法评价甘草药材质量的一致性情况。**结果**　太赫兹光谱技术是近年来新兴光谱分析手段，其具有瞬态性、宽带性、相干性、低能性、强穿透性等独特性质，可直接、无损害地应用于中药的整体定性和定量分析。太赫兹光谱量子指纹化技术能给出峰号、峰位、半峰宽、峰高、峰面积和峰面积百分比等符合国际通用的 *.cdf 文件格式，把无序的太赫兹光谱指纹变成规律化的量子指纹图谱而实现对甘草药材质量的一致性评价。**结论**　太赫兹光谱量子指纹图谱技术能有效评价甘草药材质量，其可做为中药质量一致性评价的一种可行技术。

关键词：太赫兹光谱；中药太赫兹光谱量子指纹图谱；甘草；中药一致性评价
中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1478-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.002

Key technology of TCM quality consistency evaluation——Development of terahertz spectroscopy and evaluation of TCM consistency by THz quantum fingerprints

YANG Hui-zhi[1], YANG Ting[1], SUN Wan-yang[2*], GUO Ping[1*], SUN Guo-xiang[1*], LI Qian[3], LI Xiao-Hui[3] (1. *College of Pharmacy*, *Shenyang Pharmaceutical University*, *Shenyang*　110016; 2. *College of Pharmacy*, *Jinan University*, *Guangzhou*　510632; 3. *Jiangmen THz Spectrum Research Institute*, *Jiangmen*　*Guangdong*　529000)

Abstract: Objective　To review the application of terahertz spectroscopy in the quality control of traditional Chinese medicine (TCM), and to evaluate the quality consistency of licorice by terahertz quantum fingerprint (TQFP). **Methods**　Based on the principle of terahertz spectroscopy and its progress in the application in TCM quality control, the TQFP was used to evaluate the consistency of licorice quality by the systematically quantified fingerprint method (SQFM). **Results**　Terahertz spectroscopy, as a new spectral method in recent years, has unique properties such as being transient, broadband, coherent, low-energy, and penetrating. It could be directly and harmlessly applied in the qualitative and quantitative research of TCM. The TQFP provided peak number, peak position, half-peak width, peak height, peak area and peak area percentage in accordance with the common international *. cdf file format, which turned the disordered terahertz fingerprints into regular quantum fingerprints and ensured the consistency evaluation of licorice. **Conclusion**　TQFP can effectively evaluate the quality of licorice, and can be used as a feasible technology for the evaluation of quality consistency of TCM.

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81703696，No.81573586）。
作者简介：杨惠智，女，硕士研究生，主要从事中药质量控制方法研究，email：1276760674@qq.com　*通信作者：孙国祥，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药指纹学和中药一致性评价研究，email：gxswmwys@163.com；孙万阳，男，副研究员，硕士研究生导师，主要从事中药药理和代谢组学研究，email：wanyangsun@jnu.edu.cn@163.com；郭萍，女，讲师，主要从事中药质量控制研究，email：guoping20023@163.com

Key words: terahertz spectroscopy; terahertz spectroscopy quantum fingerprint of traditional Chinese medicine; licorice; quality consistency evaluation of traditional Chinese medicine

中药因其资源丰富、疗效显著而备受关注[1-2]，但中药材自身质量不稳定、缺乏药效发挥机制阐释及相对成熟的质控方法[3]，其药效和毒性也一直有争议。因此，为让中药获得国际广泛认可，中药材鉴别和质控技术变得尤为重要。通常，中药作为复杂样品体系，其大多数有机分子化学键振动吸收频率均在普通的红外光谱波段，但有机分子间弱相互作用等振动的吸收频率却在太赫兹波段[4]，即中药可借助太赫兹指纹图谱实现鉴别的目的，这为中药质控方法提供了一种新途径。本文将介绍太赫兹光谱技术相关理论和系统研究技术在中药测量中的应用，主要包括数据预处理、特征提取、分类器选择和太赫兹量子指纹化等。最后讨论该技术存在的问题及其在中药方面的应用前景。太赫兹光谱技术在中药领域中的应用包括种间鉴定、同种药材规格或产地鉴定、同种药材不同加工品的鉴别、中药提取物的鉴别等，在方法上大致分为定性、定量两大方面。孙国祥教授于 2020 年 11 月提出太赫兹量子指纹图谱，为太赫兹光谱在中药整体定量方面的应用开辟了新途径。

1　太赫兹光谱技术用于中药测定的原理

1.1　太赫兹光谱技术相关理论

1.1.1　太赫兹波概述　太赫兹波是一种频率位于 0.1 ～ 10 THz（1 THz ＝ 1×10^{12} Hz）的电磁波，一般波长在 30 μm ～ 3 mm，对应波数为 333 ～ 33.3 cm^{-1}，见图 1，具有电子学与光子学双重特性[5]。其产生方法为电子学和光学方法两大类，电子学方法以真空电子学为基础，适用于太赫兹成像技术，而光电导天线、光学整流以及光泵浦太赫兹波气体激光器等方法可以产生太赫兹脉冲，在太赫兹光谱技术应用中较为广泛[6-7]。近年来，太赫兹硬件技术突破限制，填补了从微波波段与红外波段之间的电磁波空白，令太赫兹技术的研究迅速成为热点话题。太赫兹波探测技术同时可获得相位信息，辅助红外光谱分析，利用光电导采样和自由空间电光采样等方式实现[7]。太赫兹辐射源不仅是太赫兹研究的基础和核心内容，更是在太赫兹光谱技术在实际应用中起着决定性作用。根据太赫兹光谱带宽特点，将太赫兹辐射源化分为宽频带连续太赫兹波辐射源和窄频带脉冲太赫兹辐射源两类，其光源与传统产生的光源相比，具有瞬态性、宽带性、相干性、低能性、强穿透性等独特性质[8]。

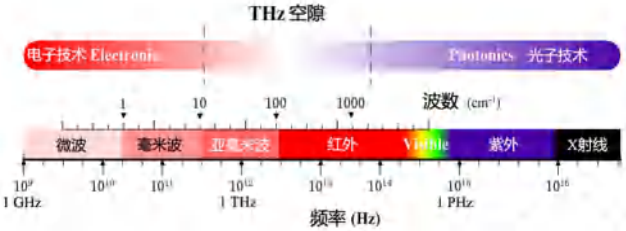


图 1　太赫兹光波数和频段范围图

Fig 1　Wave number and frequency band range of terahertz spectroscopy

1.1.2　太赫兹时域光谱系统　太赫兹时域光谱技术[9]（terahertz time domain spectroscopy，THz-TDS）是太赫兹光谱技术应用在中药鉴定和定量方面具有代表性的检测手段（结构示意图见图 2）。THz-TDS 是利用透射式或反射式两类方法[8]得到携带样品信息的时域谱，其谱经傅里叶变化，获得样品相关光学参数。THz-TDS 系统由飞秒激光器、太赫兹发射装置、太赫兹探测器和时间延迟控制系统组成[7]。透射谱在 THz-TDS 鉴定中药领域中被广泛应用，适于测定吸收太赫兹波较少的固体。其透射式原理为飞秒激光器产生激光脉冲，利用分束镜分为两个串列的光路：一路作为抽运光来激发太赫兹发射装置产生太赫兹波，经透射通过样品到达探测器；另一光路则作为探测光，在时间延迟系统控制下，与携带样品信息的太赫兹波共线通过太赫兹探测器，最后信号输入锁相放大器，进一步由计算机接收处理。由于单个太赫兹脉冲时间与采样一次时间不在一个数量级上，需要逐步重复采样，从而获得整个太赫兹时域波形（见图 3）。

1.1.3　光学参数的获得　一般基于 THz-TDS 系统来对中药定性或定量时，太赫兹透射光谱提取光学参数是应用最广泛的方法。其主要提取的思路为分别测量样品置于光路下得到的太赫兹信号和无样品下得到的太赫兹信号，分别定义为实测信号和参考信号[5]。为获得单独包含样品信息谱线，实测信号和参考信号常用去卷积运算[6]。即先利用傅里叶变换运算方法将直接获得的时域转化成频域，在频域基础上，比较两者得到包含样品厚度信息的透射率，再根据相关运算公式得到折射率、吸收系数、消光系数、介电常数等光学参数[5，7，9]。

折射率、消光系数、吸收系数等参数都受样品厚度的影响，因此利用太赫兹光谱技术鉴定中药或是测定中药中成分的含量，都需要先对样品进行处理。通常，中药固体样品要保持厚度一致，对于中药的液体制剂每次测量时，取一定的体积，确保太

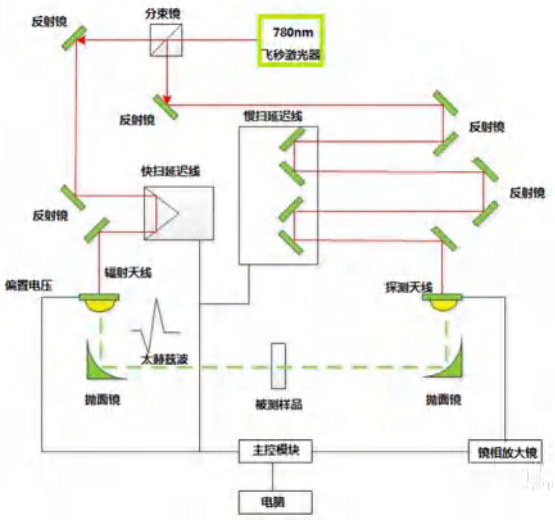


图 2　LZ9000 THz 中药太赫兹量子指纹一致性评价系统的太赫兹主机结构示意图

Fig 2　THz host structure of LZ9000 THz quantum fingerprints of TCM for the quality consistency evaluation

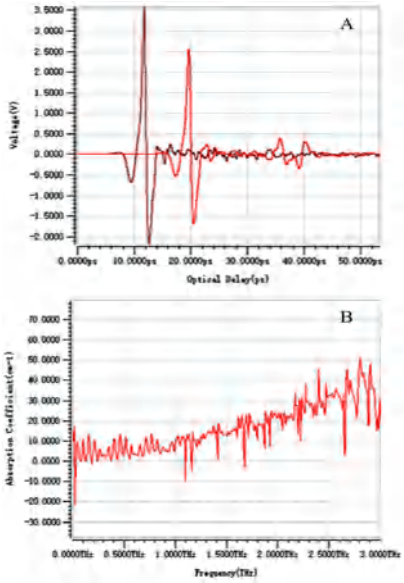


图 3　中药太赫兹时域光谱（A）和中药太赫兹吸收系数谱（B）

Fig 3　Terahertz time domain spectrum（A）and terahertz absorption coefficient spectrum of TCM（B）

赫兹波的光程基本一致。由于中药样品大多数为固态，一般先将其处理制成固态粉末，再采用压片法进行样品制备。赵峰等[10]研究表明太赫兹光谱技术在中药鉴别应用上的作用机制表现为一个与中药种类和样品厚度有关的太赫兹光波低通滤波器。因中药材样品厚度难标准化，需对厚度进行归一化数据处理。孙国祥教授提出不充高纯氮气来隔绝水蒸气的措施，通过使用空气空白校正即可保证太赫兹光谱峰位的绝对重现性，认为所充氮气流压力会导致激光束聚焦位置偏移从而使太赫兹峰位偏移，在不充氮气条件下试验会获得非常好的太赫兹光谱重现性，这为中药太赫兹量子指纹图谱进行整体定性和定量分析带来了可能性。由于太赫兹激光光源每天开机时可能不完全一致，这可能导致太赫兹定性和定量指纹峰的峰位变化，成为太赫兹光谱定量峰变动性的一个影响因素。

通常，在样品制备过程需要注意以下四点[5]：

① 样品颗粒直径大小是出现散射效应问题的关键，多数太赫兹吸收谱线的偏移是因散射效应引起的。当粉末粒径与太赫兹波长相近时，往往会引发散射效应。因此为防止散射问题出现，一般样品粉碎处理后，还需过 200 目筛（孔径为 75 μm）。

② 水在太赫兹波段敏感，为防止在中药鉴定时，水对实测信号谱图的影响，制备过程需确保样片干燥。在中药粉碎前，进行样品干燥操作，还需注意实验环境的干燥性。样片制备好后，将其放入真空干燥箱中储存，等待测量。

③ 样片的厚度要保持在 1 ～ 1.2 mm（质量 0.2 ～ 0.3 g），样品过厚太赫兹波穿透时信号强度衰减严重，不易被末端接收器接收；样品过薄，又会造成太赫兹波在样品内部的反复反射现象，可能导致与主脉冲信号重叠从而令吸收峰判定为弱峰。

④ 因聚乙烯粉末在太赫兹波段信号吸收弱且具有很好的黏性等性质，可以将其作为压片法中的黏合剂或分散剂。另外，当聚乙烯粉末作为分散剂时，其具有稀释样品、扩大太赫兹光谱的有效范围等作用。

液体池法（0.5 mm 光程）适合于中药多组分定量分析，因为液体的均匀性和可重复性为定性和定量带来了可行性，但太赫兹光谱定量需要使用太赫兹量子化指纹软件。药品太赫兹光谱测定以液体池法测定吸光系数谱最为有效，原理类似紫外分光光度法。

太赫兹光谱采用光谱量子化方法会增加和简化整体定性和整体定量信息，可使用“中药光谱量子指纹一致性数字化评价系统 4.0”软件。该软件可对 UV、FTIR、NIR、拉曼光谱（RAMAN）、DSC 和电化学等一切连续信号的 *.CSV 文件使用量子化处理模式。

1.2　太赫兹光谱数据处理方法

1.2.1　预处理　应用太赫兹光谱技术时，为确保数据的准确性、重复性，一般会在傅里叶计算之前进行切趾和零填充[11]等处理。前者通过降低噪声和排除信号伪影来改善频谱质量，后者借助增加更多光谱数据点，来平滑光谱内光谱特征；借助澄清形状来提高峰值拟合。但随着研究人员对数学处理方式不断深入探索，为解决太赫兹光谱图中所存在的与样品无直接关系的信号问题，如仪器系统本身的噪声、背景噪声、温度变化以及

在多次检测过程中样品摆放位置不同引入的无关信号等，一般采用化学计量法去进行后续光谱特征的识别和判定，同样为提高后期数学建模的可靠性，还可采用 Savitzky-Golay 卷积平滑法、标准正态变量变换、多元散射校正、导数谱、归一化、波长选取等[1，4-5，7]数学处理方法。

1.2.2　太赫兹光谱的理论研究　太赫兹光谱的理论研究主要包括两个方面：① 采用量子化学计算方式对研究对象进行仿真，并结合太赫兹光谱的实验数据，分析吸收峰振动来源；② 数学建模思想，即化学计量法，对实验数据深度分析，实现研究对象的定量、定性分析[12]。

① 太赫兹量子化学理论：量子化学是基于量子计算和信息处理上的基础化学，其本质是借求解薛定谔方程中的波函数，从微观说明电子 - 原子体系稳定状态，以达到对物质结构和化学反应理论探究的目的[5，7，9，12]。通过量子化学法模拟得到理论吸收光谱，与实验谱比较并结合可视化软件分析太赫兹光谱中吸收峰振动模式来指认吸收峰来源。

单电子体系可完整表征体系中的电子结构与相互作用关系，但中药是一个化学成分复杂的混合物体系，具有多电子原子特点，故计算可能烦琐。采用不同的近似方法处理，又可能会造成体系方向和精确度不同等问题[13]，因此可通过从头算分子轨道算法、半经验分子轨道理论、密度泛函理论[5]等方式来改进。

除计算方法的选择影响着模拟谱图结论，基组的选择也同样影响模型的准确性和计算的复杂程度。基组越大越精确，但耗时，通常根据实际情况具体分析选择性价比高的基组，其类型一般有斯莱特基型轨道（Slater-type orbital，STO）、高斯型轨道（Gaussian-type orbital，GTO）、压缩高斯型轨道（Contracted GTO）、最小基组（minimal basis set）、劈裂价键基组（split-valence basis set）、极化函数（polarization function）、弥散函数（dispersion function）[5]等。

Gaussian 是应用于太赫兹光谱检测领域较为广泛的量子化软件[14]，其适用于仿真单分子或多聚体等有限分子体系，难模拟晶体形态；在计算晶体结构周期体系时，选用比 Gaussian 软件更有优势的 Materials Studio 软件中的 CASTEP 模块。CASTEP 模块以密度泛函平面波赝势方法为理论基础，不光可优化晶体体系、寻得最低能量，还可与太赫兹光谱对应，计算吸光度、透射率等光学参数。通常，两个软件仿真过程都分为构造模型、分子结构优化、频率计算三个步骤进行。段瑞鑫等[15]基于 THz-TDS，结合泛函密度理论（DFT）和 HIPHOP 模型，成功对降糖类药物进行了功能基团的识别和分子结构的解析。

② 化学计量学理论：当某些中药材的太赫兹图谱具有明显的光学特征，某些物质具有固有属性特点的特征吸收峰时，其可以直接对中药材进行定性。因此面对简单中药光谱时，可采用传统吸收峰提取法[16]确定吸收峰特征信息，包括寻峰和拟合两个独立步骤。目前，常用的寻峰算法有简单比较寻峰法、导数寻峰法、小波变换、对称零面积变换法等。

沙琳等[17]研究表明天然牛黄和人工牛黄的太赫兹吸收谱线存在较大差异，可作为直接鉴定的依据。Li 等[18]发现三七与当归、厚朴与百倍鹅掌柴、川穹与藁本以及当归与毛当归等 4 组中药材的太赫兹光谱图存在吸收峰重叠无法识别的情况。当中药光谱差异较小且复杂时，往往需要采用化学计量法，其基于模式识别方式进行，根据分类的方式会分为有监督学习和非监督学习方法[19]。神经网络和支持向量机[5]（support vector machines，SVM）为典型的有监督学习法，广泛应用于太赫兹光谱技术鉴定中药，如陈艳江等[1]在得到中药炙甘草和生甘草、南柴胡和北柴胡、山豆根和北豆根等 3 组中药太赫兹谱图后，利用 3 种不同的函数构建 SVM，并同时建立误差反传神经网络（BP 神经网络）进行中药的定性，结果表明 SVM 是实现太赫兹光谱技术对中药快速、精确分类的有效方法之一。而非监督学习方法，如聚类分析被用来表征中药太赫兹光谱的特征，借助从高维空间寻得低维流形的降维思想，客观识别中药[5]。

太赫兹光谱结合化学计量法用于中药的定性、定量大多都是先将已预处理后的实验数据，再经特征提取、分类器的选择、评估与优化等几个步骤来全面分析样本信息。特征提取本质是对光谱测量数据成分的分解、重组和选择，寻找能概括数据特点的特征。其主要方法有数据降维处理的主成分分析（PCA）法和用于非线性特征的自编器模型法，此外还有独立成分分析模型（independent componet analysis，ICA）等[5，7]。杨玉平等[20]利用 THz-TDS 鉴别两类红花和牛黄，并用 PCA 法对获得的光谱数据进行分类识别，结果证明主成分得分图可以很好地反映光谱之间的差异性，分类鉴别准确率几乎都为 100%。

SVM 是目前用于太赫兹鉴定方面应用最为广泛的分类器，具有结构风险最小化的概念，有保障模型学习能力强且有泛化能力的特点[1，5，7，9]。简单来说，SVM 就是基于一组已知样本建立校正模型，对预测集进行估计的分类技术。随机森林（RF）法还

可以通过一系列决策树来估计最后的结果，避免过拟合问题发生。以上方法大多需要经验丰富的实验工作者自行设计特征提取器等，对变化的数据具有一定局限性。而深度学习方法利用非线性的结构将数据变得更为抽象，其自动提取特征的特点，适用于大样本、非线性的大数据运算，代表方法有卷积神经网络（CNN）和深度神经网络（DNN）等[21]，使太赫兹光谱技术应用于中药鉴别时准确率更高，测量速度更快。

构建的模型常借混淆矩阵或 K 交叉验证法[5]来进行评估和优化。前者是一种误差矩阵，可观察每个类别的预测准确率与混淆的错误类别，除了准确率外，还将精准率和召回率作为其指标，更为准确地衡量分类器的准确度。后者作为聚类分析的算法之一，适用于检验模型泛化能力，即先将数据分为 K 组，得 *k* 个子集，再利用子集分别做一次验证集，以其平均值作为验证方法的评价指标，衡量分类器的优劣[8]。太赫兹波谱具有大量待挖掘的光谱数据点，适合于采用高维数据的聚类分析法，可利用 *t*-SNE、K 均值聚类算法等算法，将高维数据转换成低维，再进行可视化计算，实现直观化、客观化反映中药的测量结果[5-7]。Tang 等[8]曾因 *t*-SNE 具有对不同数据集敏感性的弊端，提出了改进算法 Large Vis，此方法既解决大量数据的聚类问题，又解决高维数据聚类问题。

2　太赫兹光谱技术在中药中的应用前景

2.1　太赫兹光谱技术在中药定性分析中的应用

中药化学成分复杂，长久以来中药质量控制（包括原材料的识别、鉴定、有效成分确定等）困扰着中药界的科研人员，阻碍中药现代化进程[22]。中药材从来源分类为植物、动物以及矿物质，其中植物为主要来源，由此可确定大多数中药材成分为有机物。研究表明，有机分子间弱相互作用、大分子骨架振动以及晶体或晶格的低频电磁响应等生物大分子的振动和转动能级都落在太赫兹波段[23]。这些反映分子整体结构和相关环境信息的振动模式，说明太赫兹光谱具有中药这种混合物体系的“宏观指纹特征”，同时太赫兹光谱技术还可获得中药的色散信息，可与红外光谱的信息互补，作为辅助鉴定工具。因为太赫兹辐射的电磁波具有瞬态性、低能性、宽带性、相干性等特点，不光克服了传统鉴定方法上过于主观性、片面性的问题，还能有效抑制背景辐射噪音的干扰，且太赫兹脉冲相干性可检测样品中不同成分的细微变化，能对样品分子异构体进行区别。目前太赫兹光谱技术在中药鉴定领域的应用，分为以下四个方面：不同种类中药材鉴定、同种药材的规格或产地鉴别、同种药材不同加工品的鉴别、提取物的鉴别[8]。

2.1.1　不同种类的中药材的鉴别　张蕾等[24]以当归、茯苓、枳实和板蓝根为检测对象，利用 THz-TDS 得到中药样品的吸收光谱图和色散曲线，比较发现不同种类的药材吸收峰位置、吸收系数等光学参数存在差异。寇天一[25]根据人参和西洋参所含人参皂苷在太赫兹光谱上有不同的指纹特征，利用太赫兹光谱技术进行鉴别，同时结合 MATLAB 软件识别两者光谱图，通过 PCA 算法成功分类鉴定了人参和西洋参。证实太赫兹光谱应用于不同种类中药材鉴定是可行的。赵春喜等[26]测量了中药三七和甘草的太赫兹谱线，两者的吸收峰差异很大，可作为鉴定方法。

2.1.2　同种药材的规格或产地鉴别　刘丽萍等[27]运用太赫兹时域系统，对不同产地的天麻素进行了鉴别，结果证实了不同产地的天麻素对太赫兹波谱图影响不大，只导致其特征峰值响应强度的不同。李瑞凯等[28]基于 THz-TDS，结合 PCA 与 K 均值聚类算法分别对来自同一产地、厂家的 3 组中草药（巴戟天、粉防己、猪苓）真伪品药材进行鉴定。结果表明 3 组真伪中药差别判定率为 100%，说明太赫兹光谱技术能够精准地区分中草药的真伪，在中草药质量品鉴应用前景巨大。杨玉平等[20]利用 THz-TDS 系统分别对藏红花和草红花、天然牛黄和人工牛黄两组药材及其伪品进行测量，结合 PCA 对太赫兹光谱识别分类，红花类有明显聚类趋势，鉴别准确率都为 100%；而天然牛黄和人工牛黄判别准确率分别为 100% 和 90%。研究表明太赫兹光谱技术结合 PCA 可区分种间、种内的中药，为中草药的质量控制提供新思路。章龙[7]在获得黄连、大黄、蒲黄、人工牛黄、掺杂牛黄和天然牛黄的 6 种物质 THz-TDS 光谱图后，构建 RF 模型和 3 种参数优化 SVM 模型，对其吸收光谱图进行分类鉴别。结果显示，两种模型下的鉴别准确率均可达到 95%。但由于牛黄药材昂贵，样品数据量小导致 RF 模型识别精准性下降，故又提出合成少数类过采样技术（SMOTE）的 RF 模式，解决了数据不平衡导致的识别率低下的问题，为太赫兹光谱技术对稀有中药的鉴别提供了新方法。

2.1.3　同种药材不同加工品的鉴别　太赫兹光谱技术同样能够鉴别同种药材不同加工品，李小霞等[29]通过对同一产地 4 种不同制法工艺的附子片样品进行 THz-TDS 测量，证实了不同制片方法令太赫兹折射率存在明显差异，借此能够对其不同加工品进行定性判别。杨帅等[30]利用 PCA 鉴定

了大黄炮制品的不同性，而胡清宇[31]基于太赫兹光谱技术结合 PCA 对生大黄、熟大黄、大黄炭和酒大黄进行测量与鉴定，其 4 种物质的太赫兹光谱反映出中药炮制品中基础物质成分间的相互作用信息，借此将不同炮制品区分开来。

2.1.4　中药提取物的鉴别　关于太赫兹光谱在中药提取物鉴别方面的应用较少，张蕾等[24]将 5 个不同厂家生产的银杏叶提取物样本与符合国家标准规定下的标准银杏叶提取物的太赫兹吸收谱与色散曲线进行比较，结果发现谱图与色散曲线存在差异。他们指出这种差异源于生产工艺和提取辅料不同。从现有的研究成果可以看出，太赫兹光谱技术可以应用于鉴定中药，为中药质量标准体系的建立提供一条新途径。

2.2　太赫兹光谱技术在中成药鉴别中的应用

随着生产工艺技术的进步，为提高患者用药依从性和能够自主控制中药发挥疗效，按处方将中药饮片制成不同剂型的中药制剂，供临床应用。由于制成中成药后，往往失去了中药材或中药饮片外观形态，传统“一看，二摸，三品尝”的鉴别方式明显不适用[23]。太赫兹的低能性、强穿透性、瞬态性等特点决定了太赫兹光谱技术可应用在混合物体系更为复杂的中成药鉴别中，有着安全检查、无损检测等优势。

胡清宇等[31]对 4 种中药大黄炮制品做太赫兹谱线图，结合化学计量学处理得到结果证实太赫兹光谱技术对中药炮制品成分十分敏感，能够把基础成分含量不同的炮制品区分出来。江保峰等[32]以百令胶囊和金水宝胶囊两种中成药为检测对象，用 THz-TDS 系统对 10 批不同批次药进行检测，采用 PCA 和聚类分析进行识别分类，结果百令胶囊聚类准确率为 100%，金水宝胶囊为 90%，由此说明太赫兹光谱技术可作为中成药鉴别的新兴分析手段。此项研究还呈现同种中成药不同批次药间的吸收谱图差异性大，故这种差异性可作为鉴别药品稳定性的指标，太赫兹光谱技术与其他现代鉴别技术互补，更加完善化合物整体性信息，为中成药的质量管控体系的建立提供新途径。

2.3　太赫兹光谱技术在中药定量分析中的应用

相对于太赫兹光谱技术在中药领域定性鉴别的应用，其在定量分析中的应用情况更少。一般使用太赫兹光谱技术进行定量分析时，分为以下两种情况：谱图显示明显特征吸收峰，可采用线性的单变量校准方法；太赫兹光谱图中包含多个变量参数相关光谱特征时，可结合化学计量法（偏最小二乘法、最小二乘支持向量机等）进行多元化分析[9, 19]。马品等[33]运用太赫兹光谱技术，利用天麻药材中含水量与吸收系数成正相关线性关系，实现对药品水分含量的检测。郭昌盛等[34]在折射率谱的基础上，建立与贝壳粉质量百分比相关的偏最小二乘回归模型，回归得到结果为贝壳粉含量的均方误差为 1.2%，说明太赫兹光谱技术可用于中药定量分析。

2.4　太赫兹光谱技术在中药材中重金属和农药残留检测中的应用

中药中的重金属和农药残留是中药质量控制重点关注之一，太赫兹波段涵盖着物质丰富的理化性质信息，太赫兹光谱技术新兴对中药重金属、农残检测方式带来了新突破。

颜志刚等[35]利用太赫兹光谱技术对农药残留进行检测研究。马卿效等[12]系统性地阐述太赫兹光谱技术在农药检测领域的研究进展，通过农药鉴定和识别、农药指纹数据库的建立、农药的定量与定性分析、农药理论计算等多方面来证实太赫兹波段用于中药的农药残留检测的可行性，可对中药残留农药定性和定量。李斌等[36]基于 THz-TDS，以重金属代表的铅为检测对象，结合区间 - 偏最小二乘法和遗传算法 - 偏最小二乘法预测建模，用单变量校准法，即重金属铅的含量与透射光谱的吸收系数关系，对土壤中的重金属含量定量。为太赫兹光谱技术应用于中药重金属检测与应用技术的开发提供理论依据。

2.5　太赫兹光谱量子指纹图谱评价中药一致性

孙国祥教授在 2019 年 4 月提出中药 FTIR 量子指纹图谱概念的基础上，于 2020 年 11 月 16 日将量子指纹图谱技术直接应用于中药太赫兹光谱量子指纹一致性评价中，并开展了香烟、甘草、陈皮、砂仁、广藿香和复方甘草片太赫兹光谱量子指纹图谱一致性评价研究。将“中药光谱量子指纹图谱一致性数字化评价系统 4.0”软件与华讯方舟科技有限公司太赫兹光谱仪联用形成“LZ9000 THz 中药太赫兹量子指纹一致性评价系统”，该系统正成为中药质量一致性评价的一种可行策略与方法。

3　太赫兹光谱量子指纹图谱评价不同产地甘草质量一致性

3.1　样品制备

精密称取 200 mg 甘草粉末（在 60 ℃ 干燥箱内干燥 2 h），置压片模具中，用 24 MPa 压 1 min，制成直径为 13 mm 的圆形薄片，记录压片后的重量以及样品片的厚度。

3.2　测定条件

CCT-1800 太赫兹时域光谱仪（中国深圳华讯方舟科技有限公司）；DHG-9070A 电热鼓风干燥

箱（上海一恒科学仪器有限公司）；HY-12 压片机（天津天光光学仪器有限公司）；LAB 214 i 分析天平 [艾德姆衡器（武汉）有限公司]。聚乙烯粉末（HDPE，粒度 120 μm；上海冠步机电科技有限公司）。将太赫兹时域光谱仪开启并打开测试工作站，仪器预热 30 min 后，将测试片放在样品架上，通入氮气除去样品仓中的水汽后，获取氮气参考谱线。把制备的样品放置在样品架上进行扫描测定，每片测定 1 次，平均次数 100。

3.3　数据处理

用“LZ9000 THz 中药太赫兹量子指纹一致性评价系统”进行处理，将太赫兹吸收系数谱导入系统中，选取 0.2 ～ 10 THz，用定点合并法（最大峰高法），合并点数 10 个点，转化成 THz 量子指纹图谱后，再计算其 P_m 值。

3.4　甘草太赫兹量子指纹图谱建立与评价

测定 13 产地 85 批次甘草药材太赫兹光谱，全部用定点合并法（最大峰高法）按 10 点合并成一个太赫兹量子指纹峰（共 197 个量子指纹峰），按平均值法生成标准甘草太赫兹量子指纹图谱 RFP，见图 4。采用系统指纹定量法，用 RFP 评价 85 批甘草质量等级见表 1。除 S6、S12、S70 和 S82 的样品 $S_m \leqslant 0.950$，其余样品的 S_m 波动不大（0.950 ～ 0.985），并且 α 均 $\leqslant 0.05$，这说明甘草样品的化学成分种类和分布比例十分相似。样品的 P_m 相较之下波动略大（98.9% ～ 116.6%），表明甘草样品整体含量存在差异性，是甘草样品质量等级划分的主要影响因素。采用系统指纹定量法，成功将 85 批甘草样品划分成四个等级：S2、S3、S5、S7、S8、S13、S14、S16、S17、S20、S24、S26 ～ S36、S38 ～ S40、S42、S45、S48 ～ S50、S52、S53、S55 ～ S64、S66 ～ S69 和 S71 ～ S85 划分为Ⅰ类；S1、S4、S6、S9 ～ S12、S15、S18、S19、S21、S22、S25、S33、S37、S46、S47、S51、S54、S65、S70、S77 和 S82 划分为Ⅱ类；S23、S41 和 S44 划分为Ⅲ类；S43 划分为Ⅳ类。

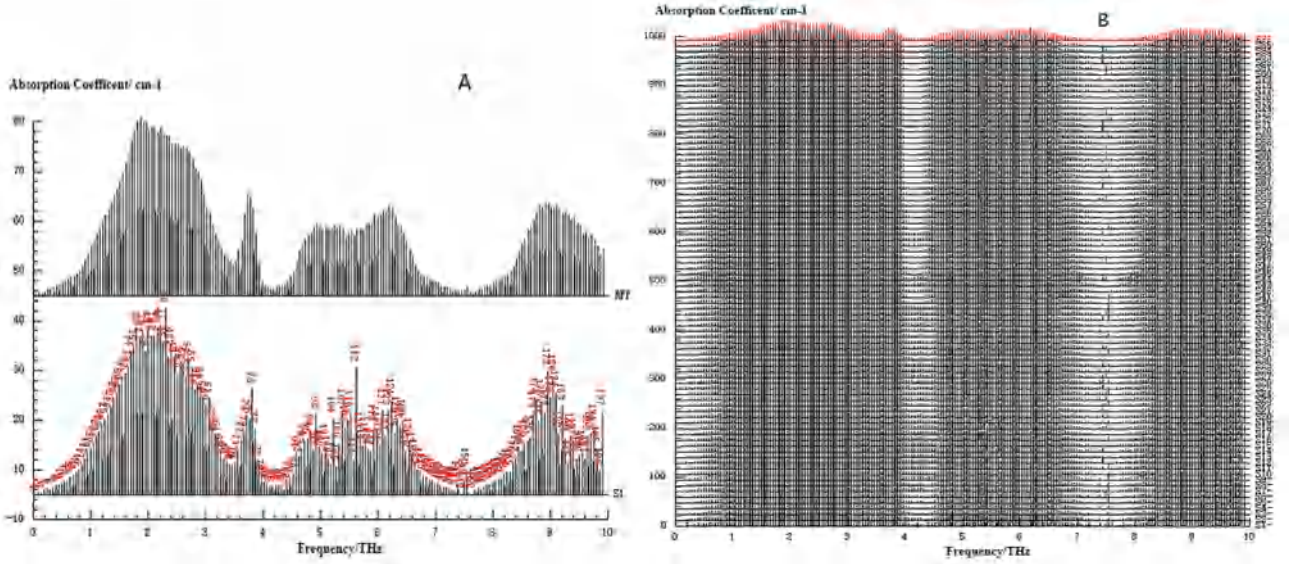


图 4　甘草太赫兹光谱标准量子指纹图谱（A）和 85 批甘草太赫兹光谱量子指纹图谱（B）

Fig 4　Terahertz standard quantum fingerprints of licorice（A）and terahertz quantum fingerprints of 85 batches of licorice（B）

利用均值法获得各产地下两种生态模式样品评价结果，以更清晰地分析产地样品信息，结果见表 2。值得注意的是，在整体样品 S_m 波动极小（0.955 ～ 0.982），α 均 $\leqslant 0.05$ 的情况下，哈萨克斯坦和乌兹别克斯坦人工栽培生长模式下的样品与野生生长的样品相比较，人工栽培的样品 P_m 值更趋近于 RFP 的 P_m（100%）。并且这两产地下人工栽培生长的样品比野生生长的样品质量评价等级高。说明在哈萨克斯坦和乌兹别克斯坦地区人为控制甘草生长，可能会使其内在质量更加稳定。在中国产地野生生长的甘草，除阿克苏地区 P_m 值为 93.5%，余下地区样品 P_m 均 $\geqslant$ 95.0%，说明在国内产地野生生长的甘草样品内在物质总含量相似性程度高。然而，在中国内蒙古地区人工栽培下生长的样品 P_m 为 111.3%，远远超过其他地区，显示出该地区甘草成分含量的极大差异性。同样，以 S_m、P_m 和 α 为指标鉴别各产地甘草样品的质量，将其划分为三类：野生生长模式下的吉尔吉斯斯坦、土库曼斯坦、中国内蒙古、中国库尔勒、中国沙雅、中国甘肃、中国伊犁、中国莎车、富沃和中国喀什地区甘草样品以及人工栽培生长模式下的哈萨克斯坦、乌兹别克斯坦和吉尔吉斯斯坦地区的甘草样品被划分为Ⅰ

表 1　用 THz 光谱量子指纹图谱评价 13 个产地 85 批甘草质量的一致性

Tab 1　Quality consistency evaluation of 85 batches of licorice from 13 origins by THz quantum fingerprints

编号	S_m	P_m/%	α	等级	编号	S_m	P_m/%	α	等级	编号	S_m	P_m/%	α	等级
S1	0.974	93.5	0.007	2	S30	0.976	96.7	0.021	1	S59	0.979	97.4	0.020	1
S2	0.982	95.4	0.004	1	S31	0.974	97.0	0.003	1	S60	0.967	97.6	0.010	1
S3	0.981	95.6	0.011	1	S32	0.978	102.3	0.022	1	S61	0.977	103.8	0.012	1
S4	0.977	94.0	0.013	2	S33	0.975	93.4	0.001	2	S62	0.978	103.3	0.014	1
S5	0.950	97.7	0.017	1	S34	0.971	98.9	0.011	1	S63	0.972	102.5	0.015	1
S6	0.938	99.9	0.019	2	S35	0.974	100.3	0.016	1	S64	0.980	97.1	0.014	1
S7	0.965	101.5	0.007	1	S36	0.982	100.9	0.012	1	S65	0.973	105.0	0.010	2
S8	0.979	98.7	0.006	1	S37	0.963	91.8	0.009	2	S66	0.977	102.6	0.023	1
S9	0.971	106.4	0.012	2	S38	0.961	98.6	0.007	1	S67	0.975	99.9	0.018	1
S10	0.971	90.2	0.023	2	S39	0.974	98.6	0.024	1	S68	0.980	96.4	0.018	1
S11	0.964	94.5	0.024	2	S40	0.974	98.3	0.009	1	S69	0.973	101.4	0.016	1
S12	0.945	96.3	0.024	2	S41	0.982	113.9	0.019	3	S70	0.907	96.8	0.012	2
S13	0.975	96.0	0.016	1	S42	0.983	101.5	0.004	1	S71	0.978	103.0	0.028	1
S14	0.968	98.6	0.017	1	S43	0.973	116.6	0.023	4	S72	0.972	98.7	0.014	1
S15	0.970	94.6	0.015	2	S44	0.966	113.1	0.024	3	S73	0.962	102.1	0.021	1
S16	0.968	96.1	0.025	1	S45	0.981	99.6	0.012	1	S74	0.970	96.3	0.008	1
S17	0.974	97.2	0.010	1	S46	0.974	105.2	0.019	2	S75	0.975	99.7	0.013	1
S18	0.973	94.8	0.012	2	S47	0.958	108.1	0.005	2	S76	0.977	101.0	0.015	1
S19	0.972	94.0	0.021	2	S48	0.982	101.5	0.012	1	S77	0.976	91.1	0.016	2
S20	0.964	98.3	0.026	1	S49	0.974	104.1	0.001	1	S78	0.978	101.5	0.016	1
S21	0.969	93.9	0.003	2	S50	0.980	101.3	0.010	1	S79	0.970	98.5	0.016	1
S22	0.965	91.9	0.010	2	S51	0.978	106.9	0.020	2	S80	0.966	99.3	0.026	1
S23	0.964	89.9	0.009	3	S52	0.982	99.5	0.003	1	S81	0.971	102.8	0.021	1
S24	0.970	98.8	0.017	1	S53	0.974	100.2	0.007	1	S82	0.939	106.5	0.021	2
S25	0.975	94.9	0.008	2	S54	0.981	107.6	0.017	2	S83	0.980	100.4	0.018	1
S26	0.978	97.3	0.013	1	S55	0.980	99.1	0.009	1	S84	0.965	96.4	0.012	1
S27	0.974	98.9	0.007	1	S56	0.981	100.2	0.021	1	S85	0.973	97.8	0.028	1
S28	0.985	96.9	0.003	1	S57	0.982	102.4	0.016	1	RFP	1.000	100.0	0.000	1
S29	0.985	101.7	0.013	1	S58	0.955	96.2	0.017	1					

表 2　不同产地甘草鉴别结果

Tab 2　Determination of licorice from different producing areas

产地	生长方式	编号	S_m	P_m/%	α	等级	产地	生长方式	编号	S_m	P_m/%	α	等级
哈萨克斯坦	野生生长	S1 ～ S3	0.979	94.8	0.007	2	中国新疆伊犁	野生生长	S28 ～ S30	0.982	98.4	0.012	1
吉尔吉斯斯坦	野生生长	S4 ～ S6	0.955	97.2	0.016	1	中国新疆莎车	野生生长	S31 ～ S33	0.976	97.6	0.009	1
土库曼斯坦	野生生长	S7 ～ S9	0.972	102.2	0.008	1	中国新疆喀什	野生生长	S34 ～ S36	0.976	100.0	0.013	1
乌兹别克斯坦	野生生长	S10 ～ S12	0.960	93.7	0.024	2	哈萨克斯坦	人工栽培	S37 ～ S40	0.968	96.8	0.012	1
中国内蒙古	野生生长	S13 ～ S15	0.971	96.4	0.016	1	中国内蒙古	人工栽培	S41 ～ S44	0.976	111.3	0.018	3
中国甘肃	野生生长	S16 ～ S18	0.972	96.0	0.016	1	乌兹别克斯坦	人工栽培	S45 ～ S48	0.974	103.6	0.012	1
中国新疆库尔勒	野生生长	S19 ～ S21	0.968	95.4	0.017	1	吉尔吉斯斯坦	人工栽培	S49 ～ S52	0.979	103.0	0.009	1
中国新疆阿克苏	野生生长	S22 ～ S24	0.966	93.5	0.012	2	中国新疆沙雅	人工栽培	S53 ～ S85	0.971	100.1	0.016	1
中国新疆沙雅	野生生长	S25 ～ S27	0.976	97.0	0.009	1							

类；野生生长模式下哈萨克斯坦、乌兹别克斯坦和中国库尔勒地区的甘草样品被划入Ⅱ类；人工栽培生长的中国内蒙古地区甘草样品为Ⅲ类。

4　展望与结语

目前，太赫兹光谱技术作为一个新兴光谱分析手段，在药学领域中的应用尚处于起步阶段，大多数的成果也在实验室研究阶段。除与太赫兹光谱仪器庞大、成本昂贵等自身发展局限性相关外，还与试验操作环境的高要求，样品制备条件的高标准以及中药现阶段缺乏太赫兹标准数据库，不利于中药的大样本系统研究，相关算法不完善等因素有关[7，19，37]。太赫兹光谱技术因自身特殊性质，可监测中药从中药材制饮片、再制成中成药的变化过程，实现鉴别中药中有效成分和有害成分的目的，为完善中药质量标准体系打下基础。从 2012 年到 2020 年共举办了五届全国太赫兹科学技术与应用学术交流会，有力推动了太赫兹科学技术的发展和应用。本文推出的太赫兹光谱量子指纹图谱技术可在中药一致性评价中使用，可能会成为一种新策略。

参考文献

[1] 陈艳江，刘艳艳，赵国忠，等 . 基于支持向量机的中药太赫兹光谱鉴别 [J]. 光谱学与光谱分析，2009，29（9）：2346-2350.

[2] 郝海平，郑超湳，王广基 . 多组分、多靶点中药整体药代动力学研究的思考与探索 [J]. 药学学报，2009，44（3）：270-275.

[3] 陈修平，寻克丽，王一涛 . 中药复方药效物质基础的系统药理学评价 [J]. 中草药，2010，41（1）：1-5.

[4] 张卓勇 . 太赫兹光谱技术在化合物表征与药物分析中的应用 [J]. 光谱学与光谱分析，2020，40（S1）：299-300.

[5] 周林 . 基于太赫兹光谱与化学计量学的植物药和食品检测技术研究 [D]. 成都：电子科技大学，2020.

[6] 田珺宏 . 中药太赫兹光谱分析与鉴定关键技术研究 [D]. 成都：电子科技大学，2018.

[7] 章龙 . 基于太赫兹光谱技术与化学计量学方法的中药识别研究 [D]. 南京：南京林业大学，2020.

[8] Tang J，Liu JZ，Zhang M，et al. Visualizing large-scale and high-dimensional data [C]. Proceedings of the 25th International Conference on World Wide Web，2016.

[9] 汪景荣 . 化学计量学结合太赫兹时域光谱技术在大黄真伪鉴别中的应用研究 [D]. 北京：首都师范大学，2014.

[10] 赵峰，李静玲，袁敏杰，等 . 基于太赫兹透射谱的中药材特征提取方案 [J]. 太赫兹科学与电子信息学报，2018，16（2）：212-217.

[11] Smith RM，Arnold MA. Terahertz time-domain spectroscopy of solid samples：principles，applications，and challenges [J]. Appl Spectrosc Rev，2011，46（8）：636-679.

[12] 马卿效，李春，李天莹，等 . 太赫兹光谱技术在农药检测领域的研究进展 [J]. 激光与光电子学进展，2020，57（13）：81-89.

[13] 笪良国，张倩茹 . 量子化学计算方法及其在结构化学中的应用 [J]. 淮南师范学院学报，2007，9（3）：101-103.

[14] Wang G，Shen J，Jia Y. Vibrational spectra of ketamine hydrochloride and 3，4-methylenedioxymethamphetamine in terahertz range [J]. J Appl Phys，2007，102（1）：13106.

[15] 段瑞鑫，赵红卫，朱亦鸣 . 基于太赫兹技术的药物检测 [J]. 物理，2013，42（11）：781-787.

[16] 何伟健 . 太赫兹光谱吸收峰提取与深度学习识别算法研究 [D]. 广州：广东工业大学，2020.

[17] 沙琳，赵国忠，耿玉珍，等 . 太赫兹辐射在中草药鉴别中的应用研究 [A]// 中国光学学会光电技术专业委员会成立二十周年暨第十一届全国光电技术与系统学术会议论文集 [C]. 北京：2005.

[18] Li PF，He MX，Xu Z，et at. Terahertz spectrum clustering of traditional Chinese medicine based on first derivative characteristics [J]. Journal of Measurement Science and Instrumentation，2017，8（4）：371-377.

[19] 杨霏，张放，宋茂江，等 . 中药材太赫兹光谱数据分析方法综述 [J]. 中华中医药学刊，2019，37（11）：2632-2635.

[20] 杨玉平，张成，刘海顺，等 . 两类红花和牛黄的太赫兹光谱法真伪鉴别分析 [J]. 光谱学与光谱分析，2019，39（1）：45-49.

[21] 胡其枫，蔡健 . 基于深度学习的太赫兹时域光谱识别研究 [J]. 光谱学与光谱分析，2021，41（1）：94-99.

[22] 郝海平，郑超湳，王广基 . 多组分、多靶点中药整体药代动力学研究的思考与探索 [J]. 药学学报，2009，44（3）：270-275.

[23] 田珺宏，周俊，郑潇潇，等 . 基于太赫兹时域光谱仪的中药材鉴定技术研究 [J]. 中国医疗设备，2018，33（7）：9-13.

[24] 张蕾 . 中草药太赫兹（THz）谱 [D]. 北京：首都师范大学，2004.

[25] 寇天一 . 基于太赫兹光谱的人参和西洋参鉴别 [J]. 光学仪器，2020，42（5）：27-32.

[26] 赵春喜 . 室温下中草药的太赫兹谱分析 [J]. 科技信息，2010（12）：7.

[27] 刘丽萍，王煜斐，杨霏，等 . 基于太赫兹时域光谱技术的天麻素检测 [J]. 中药材，2018，41（4）：909-911.

[28] 李瑞凯，侯凯旋，张丽娜，等 . 基于太赫兹时域光谱的 3 种中药材真伪鉴别 [J]. 河北大学学报（自然科学版），2020，40（4）：379-384.

[29] 李小霞，邓琥，廖和涛，等 . 室温下中药附子的太赫兹波谱分析 [J]. 激光与红外，2013，43（11）：1282-1285.

[30] 杨帅，左剑，刘尚建，等 . 太赫兹光谱技术在中药大黄炮制品检测中的应用研究 [J]. 光谱学与光谱分析，2016，36（12）：3870-3874.

[31] 胡清宇，姚锦平，李德成 . 太赫兹光谱技术在中药大黄炮制品检测中的应用价值分析 [J]. 世界最新医学信息文摘，2018，18（72）：265-267.

[32] 江保锋，左剑，张存林 . 太赫兹时域光谱技术在中成药质量控制中的应用 [J]. 光谱学与光谱分析，2020，40（S1）：231-232.

[33] Pin MA，Yuping Y. Determination of moisture content of gastrodia elata bi by terahertz spectroscopy [J]. Journal of Terahertz Science and Electronic Information Technology，2017，15（1）：26-28，53.

[34] 郭昌盛，郝国徽，刘建军，等 . 珍珠粉和贝壳粉的太赫兹时域谱定量检测 [J]. 计量学报，2013，34（1）：63-67.

[35] 颜志刚，侯迪波，曹丙花，等 . 吡虫啉和代森锰锌的太赫兹光谱研究 [J]. 传感技术学报，2007，20（10）：2264-2267.

[36] 李斌，赵春江 . 基于太赫兹光谱的土壤重金属铅含量检测初步研究 [J]. 农业机械学报，2016，47（z1）：291-296.

[37] 高梅，贾茹 . 太赫兹时域光谱技术在中药鉴别中的研究进展 [J]. 广东化工，2019，46（22）：59-60.

（收稿日期：2022-05-01；修回日期：2022-05-20）

自纳米乳技术提高难溶性药物生物利用度专题

【编者按】

自乳化释药系统（self-emulsifying drug delivery system，SEDDS）是一种脂质给药系统，它是一种由无水各向异性的油、表面活性剂和助表面活性剂组成的透明均一、各向同性混合物。SEDDS 在水溶液中稀释轻度搅拌后，可以自发乳化形成 *O/W* 或 *W/O* 乳状液。与传统的亚稳态乳剂相比，SEDDS 是一种热力学稳定的配方。自乳化制剂容易在胃肠道中扩散，胃和肠的消化运动提供了自乳化所必需的搅动。目前本课题组已经进行了多种难溶性药物自纳米乳的研究，并针对传统自纳米乳进行优化和改进，进一步提高了自纳米乳的稳定性和生物利用度。

【特邀专家简介】

杨星钢，男，博士，沈阳药科大学药学院教授，博士研究生导师。主要从事长效植入剂、口服缓控释制剂等药物新剂型的研究。发表学术论文 100 余篇，其中 SCI 收载 40 余篇。出版教材、专著 10 余部，获得中国发明专利授权 10 余项。兼任中药制药过程新技术国家重点实验室副主任，辽宁省药学会第八、九届药剂学专业委员会委员，世界中医药学会联合会中药药剂委员会第三届理事会理事，《中南药学》《中国药剂学杂志》编委等。

美洛昔康磷脂复合物过饱和自纳米乳的制备及体外质量评价

王艳艳[1]，赵文轩[2]，贾皓月[2]，宁婧歧[2]，杨星钢[2*]（1. 江苏联合职业技术学院连云港中医药分院，江苏　连云港 222006；2. 沈阳药科大学药学院，沈阳　110016）

摘要：目的　制备美洛昔康磷脂复合物过饱和自纳米乳（MLX-PC-S-SNEDDS），并对其进行体外质量评价。**方法**　首先将美洛昔康（MLX）与磷脂制备成美洛昔康磷脂复合物（MLX-PC），然后将其制成自纳米乳化给药系统，同时加入沉淀抑制剂使体系达到一定过饱和度。以粒径、粒径分散系数（PDI）与载药量为评价指标，采用星点设计联合归一化法综合优选最佳处方。并以体外溶出度和稳定性为指标进行体外评价。**结果**　制备的美洛昔康自纳米乳（MLX-SNEDDS）、美洛昔康过饱和自纳米乳（MLX-S-SNEDDS）、MLX-PC-S-SNEDDS 均为黄色透明均一的油状液，乳滴呈类球形且分布均匀，粒径均小于 30 nm，Zeta 电位分别为（－1.44±0.11）、（－5.56±0.61）、（－7.07±0.88）mV，制剂的稳定性良好，乳化后粒径无明显变化。MLX-S-SNEDDS 和 MLX-PC-S-SNEDDS 载药量分别为 4.82 mg • mL^{-1} 和 8.73 mg • mL^{-1}。MLX-PC-S-SNEDDS 在提高 MLX 载药量同时显著提高体外溶出速率及溶出程度。**结论**　成功制备了粒径均一、载药量较高和稳定性好的 MLX-PC-S-SNEDDS，可提高患者服药顺应性，为改善难溶性药物水溶性提供了有益参考，在提高药物的生物利用度方面更具潜力。

关键词：美洛昔康；自乳化；纳米乳；过饱和；磷脂复合物；体外质量评价
中图分类号：R943　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1487-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.003

基金项目：江苏省青蓝工程项目资助（2019 年）。
作者简介：王艳艳，女，副教授，主要从事药物制剂及制药设备研究，email：wyy8127@163.com　*通信作者：杨星钢，男，教授，主要从事缓控释给药系统的研究，email：yangxg123@163.com

Preparation and in vitro quality evaluation of meloxicam phospholipid complex supersaturated self-nanoemulsion

WANG Yan-yan[1], ZHAO Wen-xuan[2], JIA Hao-yue[2], YANG Xing-gang[2*] (1. *Lianyungang TCM Branch of Jiangsu Union Technical Institute, Lianyungang Jiangsu* 222006; 2. *School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang* 110016)

Abstract: Objective To prepare the meloxicam (MLX) phospholipid complex (MLX-PC) supersaturated self-nanoemulsion and evaluate its quality in vitro. **Methods** MLX and phospholipid were prepared into MLX-PC, which was further made into the nano-emulsifying drug delivery system. At the same time, precipitation inhibitor was added to reach a certain degree of supersaturation. Based on the particle size, particle size dispersion coefficient (PDI) and drug loading, the optimal formulation was evaluated by the central composite design normalization method. The dissolution rate and stability in vitro were used as the indexes for in vitro evaluation. **Results** The prepared meloxicam self-nanoemulsion (MLX-SNEDDS), and meloxicam supersaturated self-nanoemulsion (MLX-S-SNEDDS), meloxicam phospholipid complex supersaturated self-nanoemulsion (MLX-PC-S-SNEDDS) were all yellow, transparent and uniform oily liquids, with spherical emulsion droplets and uniform distribution. The particle diameters were all less than 30 nm, and the Zeta potentials were (－1.44±0.11) mV, (－5.56±0.61) mV, and (－7.07±0.88) mV, respectively. The stability of the formulations was well, and the particle size hardly changed after the emulsification. The drug loadings of MLX-S-SNEDDS and MLX-PC-S-SNEDDS were 4.82 mg • mL^{-1} and 8.73 mg • mL^{-1}. MLX-PC-S-SNEDDS could significantly increase the dissolution rate and degree in vitro while increasing the MLX drug loading. **Conclusion** MLX-PC-S-SNEDDS with uniform particle size, high drug loading and good stability is prepared, which can improve patients'drug compliance, provide reference for improving the water solubility of insoluble drugs and the bioavailability of drugs.

Key words: meloxicam; self-emulsification; nanoemulsion; supersaturation; phospholipid complex; in vitro quality evaluation

美洛昔康（meloxicam，MLX）是非甾体抗炎药（NSAIDs）之一，常用于风湿性关节炎或骨关节炎等炎症性疾病，是环氧合酶 -2（COX-2）的选择性抑制剂[1]，具有抗炎、镇痛和解热的作用。由于 MLX 属于 BCS Ⅱ类药物，水溶性差，溶出速率限制了吸收而导致生物利用度过低。

自纳米乳给药系统（self-nano emulsifying drug delivery systems，SNEDDS）是由油相、表面活性剂和助表面活性剂组成的各向同性且热力学稳定的混合体系，在胃肠道的蠕动下自发形成粒径小于 100 nm 的 *O/W* 型微乳[2]。SNEDDS 可以有效改善难溶性药生物利用度差的问题，但是口服 SNEDDS 存在药物沉淀和吸收减少的风险。过饱和自纳米乳（supersaturated self-nanoemulsifying drug delivery system，S-SNEDDS）通过使用沉淀抑制剂可避免药物沉淀[3-4]，促进其吸收。磷脂复合物[2, 5]（phospholipid complex，PC）可提高药物的亲脂性，提高了药物在 SNEDDS 的油相中的溶解度，从而增加其载药量，同时 SNEDDS 在介质的自发乳化分散性能也能解决 PC 因黏稠的质地而不易均匀分散的问题。

目前利用沉淀抑制剂使自纳米乳形成过饱和[6]或者将 PC 与自纳米乳体系相结合的研究[7]均有不少报道，但将三者相结合的研究鲜有报道，因此本文考虑将三者相结合制备成美洛昔康磷脂复合物过饱和自纳米乳（MLX-PC-S-SNEDDS），以期提高 MLX 的载药量、溶解度和生物利用度。

1 材料

1.1 试药

美洛昔康（MLX，纯度：98%，天津希恩思奥普德科技有限公司）；油酸聚乙二醇甘油酯（Labrafil M 1944 CS）、二乙二醇单乙基醚（Transcutol HP）[嘉法狮（上海）贸易有限公司]；聚氧乙烯氢化蓖麻油（Cremophor RH40）、聚乙烯吡络烷酮 -K30（PVP K30）、聚丙烯酸树脂 L100（Eudragit L100）、共聚维酮 S-630（PS-630）[巴斯夫（中国）有限公司]；大豆卵磷脂（Lecithin High Potency）（山东优索化工科技有限

公司）；聚乙烯已内酰胺 - 聚醋酸乙烯酯 - 聚乙二醇接枝共聚物（Soluplus）、聚氧乙烯 35 蓖麻油（Kolliphor ELP）、聚氧乙烯蓖麻油（Cremophor EL）、脂肪醇聚氧乙烯醚（AEO-9）（德国 BASF 公司）；棕榈酸异丙酯（IPP）（临沂绿森化工有限公司）；油酸（Oleic acid，天津市恒兴化学试剂有限公司）；辛酸 / 癸酸甘油三酯（GTCC，KLK 吉隆坡甲洞集团公司）；吐温 80（Tween 80，天津市恒兴化学试剂有限公司）；肉豆蔻异丙酯（IPM，广州享安精细化工有限公司）；羟丙甲纤维素 E15LV（HPMC E15LV）、羟丙甲纤维素 K4M（HPMC K4M）（上海卡乐康辅料有限公司）；聚乙二醇 400（PEG400，天津市光复精细化工研究所）；β- 环糊精（β-CD，淄博千汇生物科技有限公司）；异丙醇（分析纯）、甲醇（色谱级）（山东禹王化学试剂有限公司）。

1.2　仪器

ZRS-7G 型药物溶出度仪（天津天大天发科技有限公司）；XW-80A 旋涡混合器（上海青浦泸西仪器厂）；XS105 型电子分析天平（梅特勒 - 托利多仪器有限公司）；UV-8000 紫外可见分光光度计（上海元析仪器有限公司）；TS-100 恒温摇床（捷呈实验仪器）；TG16MW 台式高速离心机（湖南赫西仪器装备有限公司）；SMD200-2 电子分析天平（奥豪斯国际贸易有限公司）；PB-10 pH 计（美国 Sartorius 公司）；Nano ZS90 粒度测定仪（英国马尔文公司）；KQ-250DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；JEM-2100 透射电子显微镜（日本电子株式会社）；DF-101S 集热式恒温磁力搅拌器（巩义市予华仪器有限责任公司）。

2　方法

2.1　MLX 在不同辅料中的饱和溶解度测定

称取过量的 MLX 置于 EP 管中，分别加入 2 mL 各辅料，涡旋混匀，（37±0.5）℃、100 r • min^{-1} 恒温振荡 72 h。达到平衡后，12 000 r • min^{-1} 离心 10 min 取上清液，用甲醇稀释到合适倍数，过滤，用 UV 法在 361 nm 处测定 MLX 在不同辅料中的吸光度，计算其溶解度，平行操作 3 次。其中，由于 Cremophor RH40 在室温下为固体，需要先将其在 40 ℃下水浴加热熔化后再进行试验。

2.2　三元相图绘制

将表面活性剂和助表面活性剂按照一定的质量比（K_m）分别为 4∶1、3∶1、2∶1、1∶1、1∶2、1∶3 进行混合，再与油相按照比例分别为 1∶9、2∶8、3∶7、4∶6、5∶5、6∶4、7∶3、8∶2、9∶1 进行混匀，固定体系质量为 1 g，缓慢滴入 37 ℃水浴磁力搅拌下 100 mL 蒸馏水中，观察其乳化状态。以油相、表面活性剂、助表面活性剂分别为三元相图的三个顶点，用 Origin 8.0 软件绘制三元相图 [8-10]。以能够形成的微乳区域面积大小为指标，利用 Image J 软件对三元相图内乳化面积大小进行相对计算，进而确定适合的三相以及各组分比例。

2.3　星点设计联合归一化法综合评定进行多指标处方优化

以 Labrafil M 1944 CS 用量百分比（X_1）与表面活性剂与助表面活性剂的比例 K_m（X_2）作为考察因素。效应指标分别为粒径（Y_1）、粒径分散系数（PDI，Y_2）与载药量（Y_3）。采用 Design Expert 10.0.7 软件进行二因素、五水平星点设计。用归一化法对数据进行标准化处理，利用熵值法方法计算得到标准化数据和权重系数，并以综合评分 Y 表达最终效应，并建立数学模型进行优化与预测分析 [11-13]，对 MLX-SNEDDS 处方进行优化。

2.4　沉淀抑制剂筛选

2.4.1　沉淀抑制剂种类的筛选　精密称 MLX-SNEDDS 处方中各组分，分别加入 2% 的各类沉淀抑制剂，超声搅拌使其混合均匀，形成 MLX-S-SNEDDS。将油状浓缩物分别加入装有 100 mL 0.1 mol • L^{-1} HCl 溶液的锥形瓶中，（37±0.5）℃、100 r • min^{-1} 恒温振荡，并于 5、15、30、45、60、90、120、180、240 min 分别取样 1 mL，不补液，用甲醇稀释并过滤，在 361 nm 处测定吸光度，计算其药物浓度，比较加入不同的沉淀抑制剂后提高和维持药物浓度的能力，筛选出合适的沉淀抑制剂。

2.4.2　沉淀抑制剂用量的确定　基于“2.4.1”项下试验结果，固定其他条件不变，分别加入 0.5%、1%、2%、3% 的 Soluplus，筛选出 Soluplus 的用量。

2.5　MLX-S-SNEDDS 的制备及载药量的测定

按优化后的处方比例称取油相、表面活性剂和助表面活性剂，磁力搅拌使其混匀置于西林瓶中，得到澄明均一的空白 SNEDDS。按比例精密称取 Soluplus 加入到空白 SNEDDS 中，超声搅拌至均匀分散，使其溶解，得到澄清透明的 S-SNEDDS。将过量 MLX 加入 S-SNEDDS，涡旋充分混匀，得 MLX-S-SNEDDS。于（37±0.5）℃、100 r • min^{-1} 恒温振荡 72 h 后，12 000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液，用甲醇稀释至合适倍数，过滤，361 nm 处测定吸光度，计算 MLX-S-SNEDDS 的载药量。

2.6　MLX-PC 和 MLX-PC-S-SNEDDS 的制备工艺研究

经测定，“2.5”项下 MLX-S-SNEDDS 的载药量较低，因此考虑将其制成 MLX-PC，以期提高载药量。磷脂是体内生物膜的主要成分，将其与药物复合形成药物 -PC，可改善药物的溶解性和稳定性，提高生物利用度 [14-15]。采用溶剂蒸发法制备 MLX-PC[16]，精密称取 MLX 与适量的大豆卵磷脂于四氢呋喃中，水浴磁力搅拌一定时间，采用旋转蒸发法仪回收溶剂，真空干燥即得 MLX-PC。以载药量为评价指标，对可能影响结果的药脂比、反应时间、反应温度、药物质量浓度等反应条件进行单因素考察，确定 MLX-PC 制备工艺。

MLX-PC-S-SNEDDS 的制备及载药量的测定同“2.6”项下方法，将制得的过量 MLX-PC 加入至空白 S-SNEDDS 中，计算 MLX-PC-S-SNEDDS 的载药量。

MLX-PC 油 / 水分配系数的测定采用经典摇瓶法，取适量 MLX-PC，加入 2 mL 水相饱和的正辛醇，再分别加入 18 mL 正辛醇饱和的 pH 7.4 PBS、pH 6.8 PBS、蒸馏水、pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 1.2 HCl，（37±0.5）℃、100 r • min^{-1} 恒温振荡 72 h，平衡后将水层和正辛醇层分离开，测定正辛醇层和水层中的 MLX 吸光度，计算其浓度，并与 MLX 的 log*P* 进行比较。

2.7　*三种美洛昔康自纳米乳递药系统的质量评价*

2.7.1　形态与分布　分别取 MLX-SNEDDS、MLX-S-SNEDDS、MLX-PC-S-SNEDDS 各 1 g，将其缓慢滴入（37±0.5）℃水浴的 100 mL 蒸馏水中，缓慢搅拌使其完全乳化。分别取少量乳液喷洒到铜网上，自然晾干，再滴加 2% 浓度的磷钨酸负染载药铜网，用滤纸吸去多余负染色液，风干后使用 JEM-2100 透射电镜观察三种制剂的形态。

2.7.2　粒径与 Zeta 电位的测定　同“2.8.1”项下方法操作，缓慢搅拌使其完全乳化。经微孔滤膜过滤（0.45 μm），马尔文粒度分析仪测定其粒径及 Zeta 电位。

2.7.3　自乳化效率　通过目测法观察自乳化体系在不同稀释倍数（50、100、200 mL 蒸馏水）和不同种类分散介质（100 mL 蒸馏水、pH 1.2 HCl、pH 7.4 PBS）中完全乳化所需的时间，测定乳化后乳液的粒径及 PDI，以作为评价制剂自乳化效率的指标。具体操作方法如下：取 MLX-SNEDDS、MLX-S-SNEDDS、MLX-PC-S-SNEDDS 各 1 g，分别将其缓慢滴入（37±0.5）℃水浴的分散介质中，观察成乳时间，测定并记录其粒径及 PDI。

2.7.4　稳定性考察

① 物理稳定性试验：分别取适量 MLX-SNEDDS、MLX-S-SNEDDS、MLX-PC-S-SNEDDS 于 5 mL 离心管中，12 000 r • min^{-1} 离心 15 min，观察制剂外观是否变化，是否出现分层现象。

② 冷热循环试验：分别取适量 MLX-SNEDDS、MLX-S-SNEDDS、MLX-PC-S-SNEDDS 于西林瓶中，密封避光贮存，每 12 h 将西林瓶交替放置于 37 ℃和 4 ℃的条件下，分别在 0、1、5、10 d 时取适量制剂，观察制剂外观是否变化，并测量其粒径和药物含量的变化情况。

③ 留样观察试验：分别取适量 MLX-SNEDDS、MLX-S-SNEDDS、MLX-PC-S-SNEDDS 于西林瓶中，常温避光储存，分别于 0、1、3、5 个月取样观察外观是否变化，测量其粒径和药物含量的变化情况。

④ 形成自纳米乳后的稳定性：同“2.7.2”项下方法操作，缓慢搅拌使其完全乳化。室温下放置 48 h，观察 24 h 及 48 h 时自纳米乳的状态，是否出现油水分离，是否出现药物析出等现象。

2.7.5　体外溶出度的考察　取一定量的 MLX-SNEDDS、MLX-S-SNEDDS、MLX-PC-S-SNEDDS 灌入胶囊中（相当于 MLX 7.5 mg），同时取等剂量的原料药于胶囊中用作对照，按照 2020 年版《中国药典》桨法规定测定溶出度，以 900 mL 的 pH 1.2 HCl、pH 7.4 PBS 作为溶出介质，设定温度为（37±0.5）℃，转速为 100 r • min^{-1}，分别于 5、15、30、45、60、90、120、180、240 min 取样 5 mL，同时用等温同体积的相应介质进行补液，过滤（0.45 μm），取续滤液稀释至合适浓度测定吸光度值，并计算其累积溶出百分率。

3　结果

3.1　*美洛昔康在不同辅料中的溶解度*

测定 MLX 在不同辅料中的溶解度，结果见表 1。MLX 在油相油酸和 Labrafil M 1944 CS 中的溶解度较其他油相中高，在表面活性剂中溶解度均较好，特别是在 Tween 80、Cremophor RH40、AEO-9 中，助表面活性剂中，MLX 在 Transcutol HP、PEG400 中溶解度较大。选择对药物溶解度较好的辅料进一步利用三元相图来进行油相、表面活性剂、助表面活性剂的筛选。

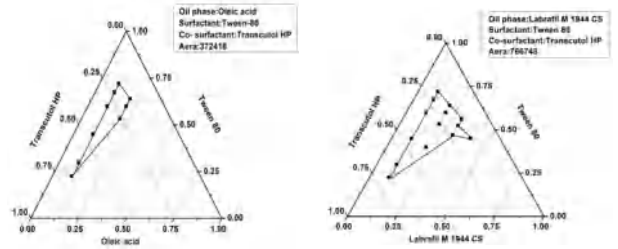
3.2　*三元相图绘制*

3.2.1　油相的筛选　选择对药物溶解度比较好的油酸、Labrafil M 1944 CS 作为油相，固定 Tween 80 为表面活性剂，Transcutol HP 为助表面活性剂，绘制三元相图。由图 1 可知，当油相为 Labrafil M 1944 CS 时，三元相图的自乳化面积最大。

表 1　MLX 在不同辅料中的溶解度

Tab 1　Solubility of MLX in different excipients

类别	辅料	溶解度 /（mg・mL^{-1}）
油相	油酸	2.435±0.03
	IPM	0.151±0.09
	IPP	0.172±0.10
	GTCC	0.244±0.12
	Labrafil M 1944 CS	1.072±0.05
表面活性剂	Tween 80	11.902±0.06
	Cremophor EL35	4.423±0.15
	Kolliphor ELP	1.274±0.06
	AEO-9	7.194±0.12
	Cremophor RH40	7.188±0.20
助表面活性剂	PEG400	1.765±0.18
	Transcutol HP	3.351±0.04
	Ethanol	0.278±0.15
	Isopropanol	0.215±0.12



A　　B

图 1　油相为油酸（A）和 Labrafil M 1944CS（B）的三元相图

Fig 1　Tertiary phase diagrams of oleic acid（A）and Labrafil M 1944CS（B）

3.2.2　表面活性剂的筛选　选择对药物溶解度前 3 位的 Tween 80、AEO-9、Cremophor RH40 作为表面活性剂，油酸和 Labrafil M 1944 CS 为油相、Transcutol HP 为助表面活性剂，绘制三元相图。由图2可知，当表面活性剂为 Cremophor RH40时，不论油相为油酸或 Labrafil M 1944 CS，相较于其他表面活性剂，三元相图的自乳化面积最大。

3.2.3　助表面活性剂的筛选　固定 Cremophor RH40 为表面活性剂，油酸和 Labrafil M 1944 CS 为油相，以 Transcutol HP、PEG400 为助表面活性剂，绘制三元相图并观察乳化情况。由图 3 可知，当油相为 Labrafil M 1944 CS，表面活性剂为 Cremophor RH40，助表面活性剂为 Transcutol HP 时，三元相图的自乳化面积最大。因此确定最终处方为 Labrafil M 1944 CS、Cremophor RH40、Transcutol HP。

3.3　星点设计联合总评“归一值”进行多指标处方优化

3.3.1　星点设计及结果　运用星点设计进行处方优化，考察指标的水平见表 2，根据星点设计得到的处方进行试验，结果见表 3。

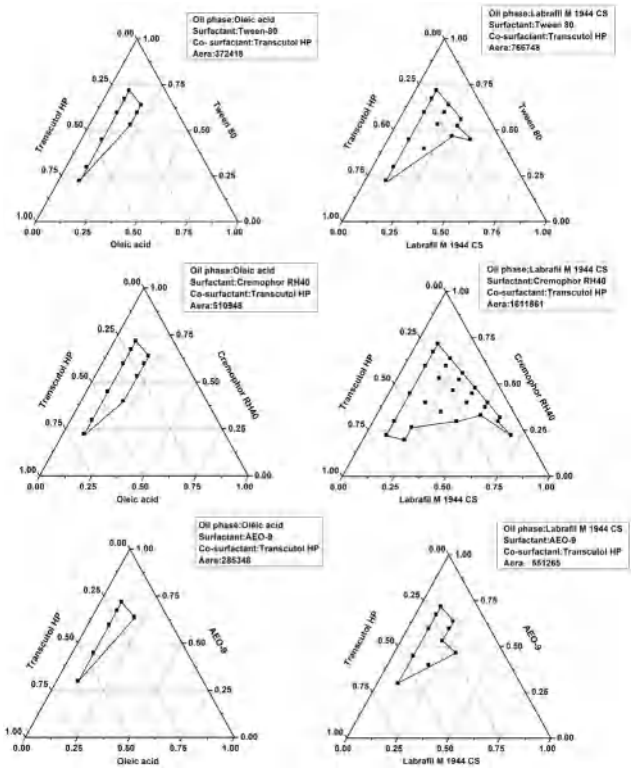


图 2　不同表面活性剂的三元相图

Fig 2　Ternary phase diagrams of different surfactants

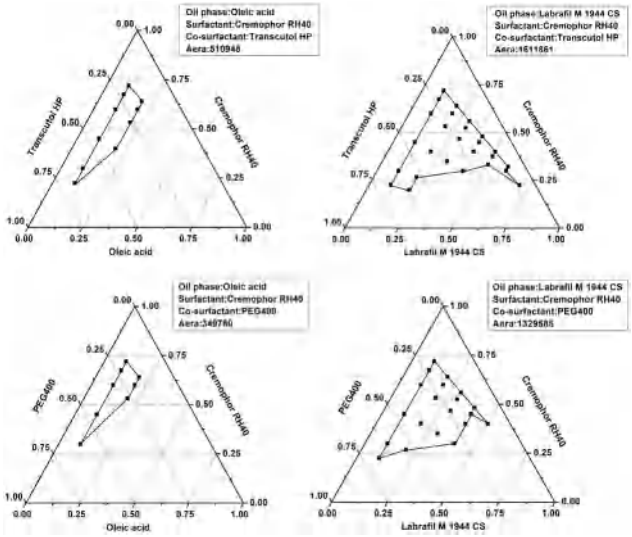


图 3　不同助表面活性剂的三元相图

Fig 3　Ternary phase diagrams of different co-surfactants

表 2　星点设计的自变量水平

Tab 2　Level of independent variable in the central composite design

因素	水平				
	－1.414	－1	0	＋1	＋1.414
X_1	9.64	20	45	70	80.36
X_2	0.38	1	2.5	4	4.62

3.3.2　归一化法综合评定　利用归一化法对数据进行标准化处理，使得每个指标均标准化为 0～1 之间的“归一值”，对取值越小越好的因素（粒径）和取值越大越好的因素（载药量）采用

表 3　星点设计的试验结果

Tab 3　Central composition design

No.	X_1	X_2	Y_1/nm	Y_2	Y_3/（mg•mL^{-1}）
1	80.36	2.50	74.64	0.51	0.77
2	9.64	2.50	17.83	0.11	4.58
3	70.00	4.00	95.28	0.23	1.41
4	45.00	0.38	196.17	0.18	2.77
5	45.00	4.62	35.03	0.06	2.98
6	45.00	2.50	35.80	0.10	2.99
7	20.00	4.00	21.31	0.05	4.83
8	45.00	2.50	35.36	0.10	2.90
9	20.00	1.00	22.02	0.06	4.09
10	70.00	1.00	99.51	0.23	1.20
11	45.00	2.50	35.53	0.08	3.97
12	45.00	2.50	35.75	0.09	4.06
13	45.00	2.50	36.85	0.10	3.31

Hassan 方法分别进行数学转换求“归一值” d_{min} 和 d_{max}，公式如下：

$$d_{min} = (Y_{max} - Y_i) / (Y_{max} - Y_{min})$$

$$d_{max} = (Y_i - Y_{min}) / (Y_{max} - Y_{min})$$

选用熵值法对标准化后的效应指标进行权重计算。熵值是不确定性的一种度量，信息量越大，不确定性就越小，熵也就越小；信息量越小，不确定性越大，熵也越大。因而利用熵值携带的信息进行权重计算，结合各项指标的变异程度[17]，利用信息熵这个工具，计算出各项指标的权重，为多指标综合评价提供依据。

使用 SPSS AU 进行计算。使用熵值法对 Y_1、Y_2、Y_3 等 3 项进行权重计算，权重值分别是 0.251、0.238、0.511。并且各项间的权重相对较为均匀，均在 0.333 附近，其中 Y_3 权重最大。根据上述方法计算得到的标准化数据和权重系数，星点设计各响应值最后得到综合评分，综合评分（Y）= Y_1× 权重系数（Y_1）+ Y_2× 权重系数（Y_2）+ Y_3× 权重系数（Y_3）。结果如表 4 所示。

表 4　处方的综合评分

Tab 4　Comprehensive scores of formulations

No.	X_1	X_2	Y_1/nm	Y_2	Y_3/（mg•mL^{-1}）	Y
1	80.36	2.50	74.64	0.51	0.77	0.17
2	9.64	2.50	17.83	0.11	4.58	0.94
3	70.00	4.00	95.28	0.23	1.41	0.37
4	45.00	0.38	196.17	0.18	2.77	0.17
5	45.00	4.62	35.03	0.06	2.98	0.74
6	45.00	2.50	35.80	0.10	2.99	0.72
7	20.00	4.00	21.31	0.05	4.83	1.00
8	45.00	2.50	35.36	0.10	2.90	0.71
9	20.00	1.00	22.02	0.06	4.09	0.90
10	70.00	1.00	99.51	0.23	1.20	0.33
11	45.00	2.50	35.53	0.08	3.97	0.85
12	45.00	2.50	35.75	0.09	4.06	0.87
13	45.00	2.50	36.85	0.10	3.31	0.75

3.3.3　数据模型拟合分析及处方优化　使用 Design Expert 10.0.7 软件对试验结果与考察因素进行分析，对综合评分（Y）进行二项式拟合。经拟合回归，得到模型方程：$Y = 0.78 - 0.29X_1 + 0.12X_2 - 0.015X_1X_2 - 0.076X_1^2 - 0.13X_2^2$。

对模型进行 ANOVA 分析，模型的 P 值小于 0.05，这说明模型参数的显著性检验通过，失拟值大于 0.05，说明该方程拟合度良好。因此可表明该模型能够准确预测自纳米乳的处方最佳组成。

3.3.4　处方验证　以载药量最大、粒径和 PDI 最小为优化目标，预测的最佳处方为：Labrafil M 1944 CS 20%，Cremophor RH40 40%，Transcutol HP 40%。预测综合评分 $Y = 0.997$。按照优化后的处方制备 MLX-SNEDDS，对预测处方进行验证，综合评分 $Y = 0.952$，偏差值为－4.73%，表明所建拟合的模型具有较好的预测结果。

3.4　沉淀抑制剂筛选

3.4.1　沉淀抑制剂种类　在 MLX-SNEDDS 中分别加入 2% 不同的沉淀抑制剂，将所制得的不同 MLX-S-SNEDDS 加入介质中，经稀释后形成了澄清透明，略带微蓝乳光的纳米乳液体。由图 5 可知，MLX-SNEDDS 中药物的质量浓度在 15 min 时就迅速降到了 23.41 μg • mL^{-1}，加入 PVP K30、β-CD、Eudragit L100、HPMC E15LV 的制剂中 MLX 的浓度在 15 min 时都迅速沉降到 20.00 μg • mL^{-1} 左右，因此可看出这些沉淀抑制剂对药物没有抑制沉淀的作用。而加入 HPMC K4M、PS-630 以及 Soluplus 的 SNEDDS 中 MLX 在 60 min 时的质量浓度分别为 36.07、33.72、43.48 μg • mL^{-1}，说明 HPMC K4M、PS-630、Soluplus 对 MLX 有不同程度的抑制沉淀作用，其中以 Soluplus 的效果最好。

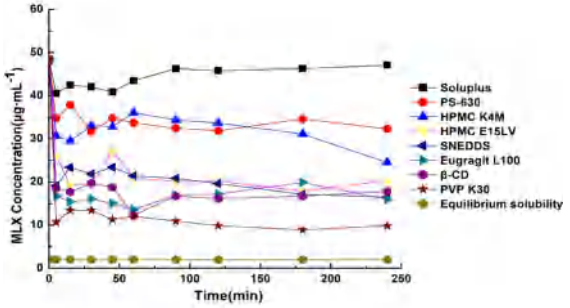


图 5　不同沉淀抑制剂沉淀的效果

Fig 5　Effect of different precipitation inhibitors on inhibition of preparation

3.4.2　沉淀抑制剂用量的确定　为了考察沉淀抑制剂的用量对抑制沉淀的作用的影响，对处方中的 Soluplus 用量进行进一步试验，结果如图 6 所示，Soluplus 用量的变化对促过饱和作用没有明显差异，由于 Soluplus 在制剂中完全溶解所需时间较长，因此选择 0.5% 的用量。

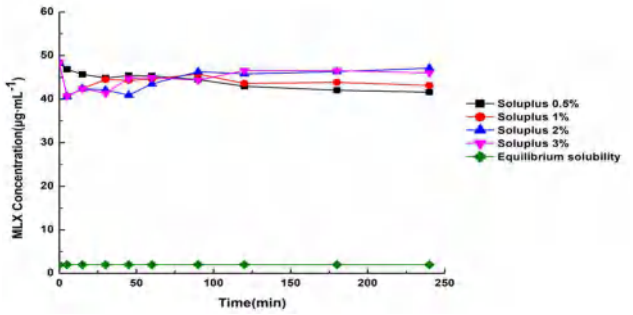


图 6　沉淀抑制剂的用量对于抑制沉淀的作用的影响

Fig 6　Effect of different amounts of Soluplus on the inhibition of preparation

3.5　MLX-S-SNEDDS 载药量的测定

平均载药量为 4.82 mg • mL^{-1}，与 MLX-SNEDDS 一致，沉淀抑制剂能对纳米乳中的 MLX 有沉淀抑制作用，但并不能增加药物载药量。

由于 MLX 每日服用量为 7.5 mg，若制成胶囊，以现在的载药量计算，则需服用约 3 粒 500 μL 的胶囊，因此应考虑提高载药量以减少服用体积，增加顺应性。考虑将 MLX 先制成 MLX-PC，提高其脂溶性，从而提高 MLX 在 S-SNEDDS 给药系统中的载药量。

3.6　MLX-PC 的制备工艺研究

3.6.1　单因素考察

① 药脂比的选择：设定药脂比（MLX 和 PC 的质量比）为 1∶3、1∶2、1∶1、2∶1，药物的质量浓度为 4 mg•mL^{-1}，在 40 ℃条件下反应 1 h，载药量分别为 7.80、7.40、6.06、5.46 mg • mL^{-1}，以载药量为评价指标，其他条件不变，药脂比为 1∶3 时，载药量最大。

② 反应时间的选择：设定反应时间为 0.5、1、1.5、2 h，药物的质量浓度为 4 mg • mL^{-1}，药脂比为 1∶3，在 40 ℃条件下反应至试验设计的时间，载药量分别为 6.84、6.97、7.43、5.06 mg • mL^{-1}，以载药量为评价指标，其他条件不变，反应时间为 1.5 h 时，载药量最大。

③ 反应温度的选择：设定反应温度为 25、40、50、60 ℃，药物的质量浓度为 4 mg • mL^{-1}，药脂比为 1∶3，在各温度条件条件下反应 1.5 h，载药量分别为 7.93、8.00、8.18、7.61 mg•mL^{-1}，以载药量为评价指标，其他条件不变，反应温度为 50 ℃时，载药量最大。

④ 药物质量浓度的选择：设定药物质量浓度分别为 4、6、8、10 mg • mL^{-1}，药脂比为 1∶3，在 50 ℃下反应 1.5 h，载药量分别为 8.20、8.71、8.42、7.72 mg • mL^{-1}，以载药量为评价指标，其他条件不变，当药物质量浓度为 6 mg • mL^{-1} 时，载药量最大。

3.6.2　MLX-PC-S-SNEDDS 载药量的测定

MLX-PC 按自纳米乳的制备方法制成 MLX-PC-S-SNEDDS，和 MLX-S-SNEDDS 相比，平均载药量从 4.82 mg • mL^{-1} 变成了 8.73 mg • mL^{-1}，约提高了一倍，可以减少服用体积。

3.6.3　油 / 水分配系数的测定　与 MLX 进行对比，MLX-PC 在正辛醇饱和的 pH 7.4 PBS、pH 6.8 PBS、蒸馏水、pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 1.2 HCl 中 log*P* 分别由 0.67、0.84、1.26、2.22、2.31 增大到 1.62、2.20、2.56、2.73、2.81，说明将 MLX 制备成 MLX-PC 后药物在油相中的溶解度变大，脂溶性增加，可预期药物在体内的吸收增加，从而提高生物利用度。

3.7　制剂质量评价

3.7.1　外观与形态　MLX-SNEDDS、MLX-S-SNEDDS、MLX-PC-S-SNEDDS 三种制剂均为黄色透明且均一的油状液体，其中 MLX-PC-S-SNEDDS 颜色会更深，可能是加入了磷脂的缘故。乳化后的纳米乳，乳液微粒呈类球形。

3.7.2　粒径与 Zeta 电位的测定　MLX-SNEDDS、MLX-S-SNEDDS、MLX-PC-S-SNEDDS 的粒径分别为（18.71±1.04）、（18.30±0.48）、（23.07±0.28）nm，Zeta 电位分别为（－1.44±0.11）、（－5.56±0.61）、（－7.07±0.88）mV，PDI 分别为（0.086±0.03）、（0.11±0.03）、（0.132±0.03）。MLX-SNEDDS 和 MLX-S-SNEDDS 乳化后的微粒粒径相似，MLX-PC-S-SNEDDS 粒径则有所增大。三种制剂的 Zeta 电位皆为负值，绝对值依次增大。

3.7.3　稳定性考察　观察 MLX-SNEDDS、MLX-S-SNEDDS、MLX-PC-S-SNEDDS 乳化后形成的纳米乳在 24 h 及 48 h 的状态，可看出 MLX-S-SNEDDS、MLX-PC-S-SNEDDS 到 48 h 时仍然是均一、澄清透明的状态，无沉淀析出。而 MLX-SNEDDS 在 24 h 时虽然未出现油水分离现象，但已经出现略微浑浊，48 h 时在烧杯底部能发现明显沉淀物。

表 5　不同稀释倍数对自乳化效率的影响 (n = 3)

Tab 5　Effect of dilution multiple on self-emulsification efficiency (n = 3)

稀释倍数	制剂	自乳化时间 /s	粒径 /nm	PDI
50	MLX-SNEDDS	25.99±2.81	17.44±0.36	0.177±0.11
	MLX-S-SNEDDS	26.28±3.23	17.93±0.23	0.086±0.01
	MLX-PC-S-SNEDDS	26.63±0.74	27.36±0.60	0.151±0.02
100	MLX-SNEDDS	25.54±3.12	20.33±0.45	0.062±0.05
	MLX-S-SNEDDS	26.80±2.81	17.19±0.48	0.112±0.03
	MLX-PC-S-SNEDDS	27.39±1.46	29.23±0.62	0.159±0.03
200	MLX-SNEDDS	25.29±2.48	19.93±0.09	0.081±0.06
	MLX-S-SNEDDS	24.21±3.93	19.91±0.61	0.108±0.07
	MLX-PC-S-SNEDDS	26.88±2.44	27.90±0.48	0.132±0.07

3.7.4　自乳化效率　稀释倍数的影响：结果如表 5 所示，不同稀释倍数对制剂的自乳化时间以及 PDI 没有显著影响，自乳化时间均小于 30 s，MLX-SNEDDS 与 MLX-S-SNEDDS 自乳化后的粒径相差不大，而 MLX-PC-S-SNEDDS 的粒径则明显增大。

稀释介质的影响：不同稀释介质下，三种制剂的自乳化时间以及粒径分布相差不大，且自乳化时间均小于 30 s，MLX-PC-S-SNEDDS 乳化后的粒径大于 MLX-SNEDDS 与 MLX-S-SNEDDS，可能是由于药物与磷脂形成了复合物的缘故。

3.7.5　物理稳定性试验　MLX-SNEDDS、MLX-S-SNEDDS、MLX-PC-S-SNEDDS 经过高速离心后，未观察到制剂有分层或者析出的现象，外观依然是黄色透明且均一的油状液体。

3.7.6　冷热循环试验　MLX-SNEDDS、MLX-S-SNEDDS、MLX-PC-S-SNEDDS 经过冷热循环后仍然为黄色透明的均一油状液。乳化后进行粒径以及药物含量的测定，结果显示，经过冷热循环后制剂的粒径、PDI 以及药物含量没有明显变化，说明所制备的制剂有较好的稳定性，温度变化对制剂的影响较小。

3.7.7　留样观察试验　经过长期放置以后，制剂的外观、粒径以及 PDI 均无明显变化，说明制剂经过长期放置以后，稳定性良好。

3.7.8　体外溶出度的考察　结果如图 7 所示，在 pH 1.2 HCl、pH 7.4 PBS 介质中，三种制剂相比于 MLX 原药，均明显提高了药物的溶出速率和溶出程度。在体外溶出结果中，三种制剂的溶出行为并没有显著区别，但在 pH 7.4 PBS 中三种制剂的累积溶出百分率大于在 pH 1.2 HCl 中的。这是由于 MLX 本身的理化性质决定的，在 pH 7.4 PBS 中溶解度大于 pH 1.2 HCl。

4　讨论

促过饱和物质的筛选试验证明，对 MLX 起抑制沉淀作用的沉淀抑制剂有 HPMC K4M、PS-630、Soluplus，HPMC 可以与 MLX 上的羟基形成氢键作用 [18]，但由试验结果可知 HPMC E15LV 对 MLX 没有明显的沉淀抑制作用，说明氢键并不是 HPMC K4M 抑制药物的晶核长大的主要原因。据有关文献报道 [19]，分子量及黏度大小对沉淀抑制剂抑制药物沉淀的作用有关，对 HPMC 来说，分子量越高，黏度越大，这可能对药物晶体的成核以及长大形成了更多的空间位阻，从而起到抑制药物沉淀的作用，而 HPMC K4M 的分子量及黏度均远大于 HPMC E15LV，这可能是 HPMC K4M 能对 MLX 起到沉淀抑制作用的主要原因。

PS-630 是乙烯吡咯烷酮和乙烯醋酸酯的共聚物，相比于 PVP，由于加入了醋酸乙烯酯基团，PS-630 增加了疏水性，而疏水性可以使 PS-630 能够对药物的晶体表面的吸附作用更强，从而达到抑制药物沉淀的作用。这可能是 PS-630 相比于 PVP K30 具有更好的抑制沉淀作用的原因 [20]。

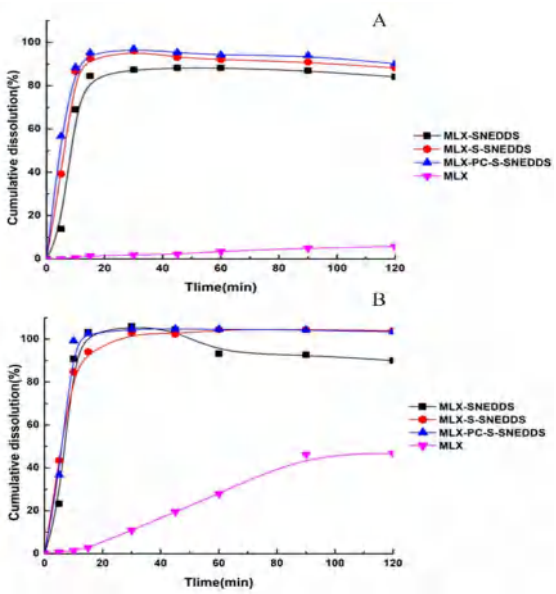


图 7　三种制剂在 pH 1.2 HCl（A）和 pH 7.4 PBS（B）中的体外溶出曲线

Fig 7　In vitro dissolution curve of the three preparations in pH 1.2 HCl（A）and pH 7.4 PBS（B）

Soluplus 是聚乙烯醇己内酰胺 - 聚乙烯醇 - 聚乙二醇接枝共聚物，其结构中既具有作为其主链的亲水性的 PEG 6000，又具有侧链中疏水的乙酸乙烯醋与乙烯基己内酰，因此 Soluplus 具有两亲性，属于一种非离子表面活性剂 [21]，可能与 MLX-S-SNEDDS 中的起乳化作用的表面活性剂 Cremophor RH40 形成了混合胶束，从而抑制药物晶体的聚集及晶核的长大 [22]，达到抑制药物沉淀的效果。

自乳化后所形成的纳米乳粒径以及 Zeta 电位是影响自纳米乳化体系稳定性的重要因素，且粒径大小同时也对溶出速率有影响。可以看出三种制剂的粒径较小，均小于 30 nm，纳米乳微粒分散均匀，PDI 均小于 0.200。粒径越小，所形成的纳米乳油水界面面积越大，乳滴粒子的表面自由能越大，这时就有降低界面自由能的趋势，驱使小乳滴聚集形成大乳滴，通过降低比表面积来减少总油水界面面积。纳米乳微粒带电荷后，由于带有同种电荷，乳滴间会产生静电斥力，Zeta 电位绝对值越大，则静电斥力越强，可以阻止乳滴间的聚集引起沉降，对增强体系稳定性有很大意义。同时，根据 Stokes 方程，粒径越小，沉降速度越小，越有利于自纳米乳乳化后体系的稳定。此三种因素使纳米乳成为动力学稳定系统。MLX-SNEDDS、MLX-S-SNEDDS、MLX-PC-S-SNEDDS

乳化后的Zeta电位均为负值，绝对值依次增大。虽数值均较小，但对制剂形成自纳米乳后的稳定性进行考察，发现只有MLX-SNEDDS在乳化后24 h时出现略微浑浊，48 h时在烧杯底部能发现明显沉淀物。可能是由于其Zeta电位绝对值较低，乳滴间斥力不足以与降低表面自由能的趋势相平衡，因此MLX-SNEDDS制剂稳定性不够好。

体外溶出试验证明在不同pH值的介质中，MLX-SNEDDS、MLX-S-SNEDDS、MLX-PC-S-SNEDDS均能显著提高MLX的溶出度。在pH 7.4 PBS溶出曲线中，MLX-SNEDDS在40 min时累积溶出百分率开始下降，这可能是由于制剂在pH 7.4 PBS迅速乳化几乎完全溶出后，乳滴粒子附近药物浓度迅速升高，导致部分药物结晶析出，表现为溶出度降低。MLX-SNEDDS乳化后Zeta电位绝对值仅为1.44，体系稳定性不够，微粒容易聚集沉降，且MLX在水中几乎不溶，可以预见在胃肠道内被大量稀释后，表面活性剂与助表面活性剂对药物的增溶能力大大下降，容易形成沉淀。而MLX-S-SNEDDS、MLX-PC-S-SNEDDS中加入了沉淀抑制剂，同时Soluplus的两亲性质可能对MLX有一定增溶作用，能在一定程度下维持过饱和状态，提高了稳定性。

此外，载药量方面相较MLX-S-SNEDDS的4.82 mg • mL^{-1}，MLX-PC-S-SNEDDS载药量为8.73 mg • mL^{-1}，结合磷脂本身的性质使得药物制成PC后容易穿过细胞膜，MLX-PC-S-SNEDDS在提高生物利用度上更有潜力。

参考文献

[1] Pawlukianiec C，Gryciuk ME，Mil KM，et al. A new insight into meloxicam：assessment of antioxidant and anti-glycating activity in in vitro studies [J]. Pharmaceuticals（Basel），2020，13（9）：240.

[2] 陈绪龙，梁新丽，丁海波，等 . 姜黄素过饱和自纳米乳的制备与体外质量评价 [J]. 中国中药杂志，2020，45（15）：3672-3680.

[3] Abo Enin HA，Abdel-Bar HM. Solid super saturated self-nanoemulsifying drug delivery system（sat-SNEDDS）as a promising alternative to conventional SNEDDS for improvement rosuvastatin calcium oral bioavailability [J]. Expert Opin Drug Del，2016，13（11）：1513-1521.

[4] Park H，Ha ES，Kim MS. Current status of supersaturable self-emulsifying drug delivery systems [J]. Pharmaceutics，2020，12（4）：365.

[5] 张红敏，李琬晴，高静，等 . 羟基喜树碱 - 磷脂复合物的制备、表征及细胞毒性评价 [J]. 国际药学研究杂志，2017，44（7）：714-721.

[6] 赖章婷 . 水飞蓟宾可过饱和自纳米乳体系的构建及体内外性能稳定机制探讨 [D]. 南昌：江西中医药大学，2020.

[7] Elnaggar Y，Shehata EM，Galal S，et al. Self-emulsifying preconcentrates of daidzein-phospholipid complex：design，in vitro and in vivo appraisal [J]. Nanomedicine-UK，2017，12（8）：893-910.

[8] Alayoubi A，Aqueel MS，Cruz CN，et al. Application of in vitro lipolysis for the development of oral self-emulsified delivery system of nimodipine [J]. Int J Pharm，2018，553（1-2）：441-453.

[9] Van Staden D，Du Plessis J，Viljoen J. Development of a self-emulsifying drug delivery system for optimized topical delivery of clofazimine [J]. Pharmaceutics，2020，12（6）：523.

[10] Leichner C，Baus RA，Jelkmann M，et al. In vitro evaluation of a self-emulsifying drug delivery system（SEDDS）for nasal administration of dimenhydrinate [J]. Drug Deliv Transl Re，2019，9（5）：945-955.

[11] 吴昕怡，刘秀薇，屈云慧，等 . Box-Behnken设计 - 响应面法优化滇龙胆药材产地初加工工艺 [J]. 中国药房，2020，31（15）：1830-1835.

[12] 蒋爱，李国源，王鑫，等 . 星点设计 - 效应面法优化紫杉醇 - 白桦脂酸混合纳米混悬剂 [J]. 中草药，2019，50（4）：852-859.

[13] 兰太进，常明，李巧凤，等 . 基于CRITIC法计算权重系数的星点设计 - 效应面法优化雷公降压颗粒成型工艺的研究 [J]. 中药材，2019，42（6）：153-156.

[14] Biswas S，Mukherjee PK，Kar A，et al. Optimized piperine-phospholipid complex with enhanced bioavailability and hepatoprotective activity [J]. Pharm Dev Technol，2021，26（1）：69-80.

[15] Singh SK，Rashid M，Bhalala K，et al. A novel nanosized phospholipid complex of Biochanin A for improving oral bioavailability：preparation and in-vitro/in-vivo characterizations [J]. J Drug Deliv Sci Technol，2021，61：102254.

[16] 唐岚，吴兰，孙伯璇，等 . 栀子苷磷脂复合物的制备及评价 [J]. 浙江工业大学学报，2018，46（1）：110-113，118.

[17] Ye J. Fuzzy cross entropy of interval-valued intuitionistic fuzzy sets and its optimal decision-making method based on the weights of alternatives [J]. Expert Syst Appl，2011，38（5）：6179-6183.

[18] Raghavan S，Trividic A，Davis A，et al. Crystallization of hydrocortisone acetate：influence of polymers [J]. Int J Pharm，2001，212（2）：213-221.

[19] Kestur US，Lee H，Santiago D，et al. Effects of the molecular weight and concentration of polymer additives，and temperature on the melt crystallization kinetics of a small drug molecule [J]. Cryst Growth Des，2010，10（8）：3585-3595.

[20] Rasenack N，Hartenhauer H，Müller BW. Microcrystals for dissolution rate enhancement of poorly water-soluble drugs [J]. Int J Pharm，2003，254（2）：137-145.

[21] Lee DR，Ho MJ，Jung HJ，et al. Enhanced dissolution and oral absorption of tacrolimus by supersaturable self-emulsifying drug delivery system [J]. Int J Nanomedicine，2016，11：1109-1117.

[22] 宋莎，俞洪珍，朱春柳，等 . 可形成过饱和胶束的环孢素A渗透泵片的研究 [J]. 药学学报，2019，54（1）：22-28.

（收稿日期：2021-08-22；修回日期：2021-10-07）

含游离蛋黄卵磷脂的姜黄素自纳米乳的制备及体外质量评价

王艳艳[1]，赵文轩[2]，孟丽园[2]，宁婧岐[2]，杨星钢[2*]（1. 江苏联合职业技术学院连云港中医药分院，江苏　连云港 222006；2. 沈阳药科大学药学院，沈阳　110016）

摘要：目的　制备含游离蛋黄卵磷脂的姜黄素自纳米乳（EP-CUR-SNEDDS），并对其进行体外质量评价。**方法**　先将姜黄素（CUR）制备成姜黄素自纳米乳（CUR-SNEDDS），采用星点设计 - 响应曲面法确定最佳处方。再加入蛋黄卵磷脂（EP）使体系稳定，制备成 EP-CUR-SNEDDS，以粒径与 Zeta 电位为评价指标确定最优处方，并以溶出度和稳定性为指标进行体外评价。**结果**　制备的 CUR-SNEDDS、EP-CUR-SNEDDS 均为澄清透明均一的油状液，乳滴呈类球形且分布均匀，粒径均小于 30 nm，Zeta 电位分别为（－ 0.97±1.43）mV、（－ 35.63±0.81）mV。室温长期放置下，CUR-SNEDDS 颜色略有加深、药物少量析出，处于不稳定状态；而 EP-CUR-SNEDDS 稳定性良好，乳化后粒径无明显变化。EP-CUR-SNEDDS 相较于 CUR-SNEDDS，在显著提高姜黄素的体外溶出速率及程度的同时制剂更加稳定。**结论**　成功制备了粒径均一、载药量较高和稳定性好的 EP-CUR-SNEDDS，在提高药物的生物利用度方面更具潜力。

关键词：姜黄素；自乳化；纳米乳；游离磷脂；体外质量评价
中图分类号：R943　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1496-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.004

Preparation of curcumin self-nanoemulsifying drug delivery system containing free egg phospholipid and in vitro quality evaluation

WANG Yan-yan[1], ZHAO Wen-xuan[2], Meng Li-yuan[2], NING Jing-qi[2], YANG Xing-gang[2*] (1. *Lianyungang TCM Branch of Jiangsu Union Technical Institute, Lianyungang Jiangsu* 222006; 2. *School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang* 110016)

Abstract: Objective To prepare the curcumin self-nanoemulsifying drug delivery system containing free egg phospholipid (EP-CUR-SNEDDS) and evaluate its in vitro quality. **Methods** First, curcumin was prepared into curcumin self-nanoemulsifying drug delivery system (CUR-SNEDDS). The optimal formulation was evaluated by central composite design-response surface methodology. EP was added to stabilize the system. The particle size and Zeta potential were used as evaluation indexes to determine the optimal prescription. The dissolution rate and stability in vitro were used as the indexes for the in vitro evaluation. **Results** The prepared CUR-SNEDDS, and EP-CUR-SNEDDS were all transparent with uniform oily liquids, with emulsion droplets being spherical and uniformly distributed. The particle diameters were all less than 30 nm, and the Zeta potentials were (－ 0.97±1.43) mV, and (－ 35.63±0.81) mV respectively. After long-term storage at room temperature, the color of CUR-SNEDDS was slightly deepened and a small amount was precipitated, indicating an unstable state. The EP-CUR-SNEDDS was stable, and the particle size had no obvious change after the emulsification. Compared with CUR-SNEDDS, EP-CUR-SNEDDS had higher dissolution rate and degree of curcumin in vitro, and were more stable preparation. **Conclusion** EP-CUR-SNEDDS with uniform particle size, high drug loading and good stability has been prepared, with better potential in bioavailability.

Key words: curcumin; self-emulsification; nanoemulsion; free phospholipid; in vitro quality evaluation

基金项目：江苏省青蓝工程项目资助（2019 年）。
作者简介：王艳艳，女，副教授，主要从事药物制剂及制药设备的研究，email：wyy8127@163.com　*通信作者：杨星钢，男，教授，主要从事缓控释给药系统的研究，email：yangxg123@163.com

姜黄素（curcumin，CUR）是多酚类化合物，大多存在于姜科植物中，具有抗炎[1]、抗肿瘤[2]、抗氧化[3]等多种生物活性[4]，具有良好的临床应用前景。目前，对 CUR 的研究主要集中在增加其溶解度，提高溶出度及渗透能力，以达到提高其生物利用度的目的，如脂质体、纳米粒[5]、固体分散体[6]。脂质体的缺点是包封率低、存储稳定性差，纳米粒易出现颗粒 - 颗粒聚集现象，固体分散体的稳定性不高，在长期贮存过程中经常出现老化现象。

自纳米乳给药系统（SNEDDS）是一种由油相、表面活性剂和助表面活性剂组成的各向同性混合物，在胃肠道的蠕动下自发形成粒径小于 100 nm 的 *O/W* 型纳米乳。SNEDDS 可以有效改善低溶性药物生物利用度差的问题[7]，但是口服 SNEDDS 存在药物沉淀和吸收减少的风险。传统方法通过添加沉淀抑制剂解决药物沉淀的问题，这些方法能够抑制纳米乳剂的沉淀，但无法改善药物本身跨膜扩散的问题。本文通过添加游离磷脂作为联合乳化剂[8]，既能够增加制剂稳定性，也能提高生物利用度。

1　材料

1.1　试药

姜黄素（CUR，麦克林科技有限公司）；中链甘油三酯（KLK，吉隆坡甲洞集团公司）；肉豆蔻酸异丙酯、棕榈酸异丙酯（临沂绿森化工有限公司）；蓖麻油（印度阿达尼集团）；油酸聚乙二醇甘油酯、辛酸葵酸聚乙二醇甘油酯、二乙二醇单乙醚（纯化级）(法国 GATTEFOSSE 公司）；聚氧乙烯蓖麻油、聚氧乙烯 40 氢化蓖麻油、聚氧乙烯 35 蓖麻油、脂肪醇聚氧乙烯醚（德国 BASF 公司）；吐温 80（天津市恒兴化学试剂有限公司）；聚乙二醇 200（天津市博迪化工有限公司）；大豆磷脂（大豆磷脂 -A，山东优索化工科技有限公司；大豆磷脂 -B，德国利宝益公司）；蛋黄卵磷脂（EP，艾伟拓医药科技有限公司）。

1.2　仪器

XPE 分析天平（瑞士梅特勒 - 托利多仪器有限公司）；DF-101S 型集热式磁力搅拌器（郑州生化有限公司）；KQ-250DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；TS-100B 恒温振荡箱（捷呈试验仪器）；UV-8000 紫外可见分光光度计（上海元析仪器有限公司）；SMD200-2 电子分析天平（奥豪斯国际贸易有限公司）；TG16MW 台式高速离心机（湖南赫西仪器装备有限公司）；Nano ZS90 粒度测定仪（英国马尔文公司）；XW-80A 旋涡混合器（上海青浦泸西仪器厂）；ZRS-6G 型药物溶出度仪（天津天大天发科技有限公司）；KQ-250DE 型数控超声波清器（昆山市超声仪器有限公司）；透射电子显微镜（日本 Hitachi 公司）。

2　方法与结果

2.1　CUR 在不同辅料中的溶解度

分别称取适量的油相、表面活性剂和助表面活性剂置于离心管中，依次加入过量的 CUR，涡旋超声直至药物不再溶解，于 37 ℃、100 r • min^{-1} 恒温振荡 72 h 后，12 000 r • min^{-1} 离心 10 min，上清液用无水乙醇稀释至适当浓度，过 0.45 μm 微孔滤膜后在 427 nm 处测定 CUR 在各辅料中的吸光度，计算其溶解度，平行操作 3 次，结果见表 1。选择对药物溶解能力较好的油相油酸聚乙二醇甘油酯、蓖麻油，表面活性剂聚氧乙烯蓖麻油、聚氧乙烯 40 氢化蓖麻油、辛酸葵酸聚乙二醇甘油酯，助表面活性剂聚乙二醇 200、二乙二醇单乙醚、异丙醇，利用三元相图进行筛选。

表 1　CUR 在不同辅料中的溶解度 (n = 3)

Tab 1　Saturated solubility of CUR in different excipients (n = 3)

种类	名称	溶解度 /（mg • mL^{-1}）
油相	中链甘油三酯	0.690±0.001
	肉豆蔻酸异丙酯	0.470±0.001
	棕榈酸异丙酯	0.310±0.000
	油酸聚乙二醇甘油酯	1.780±0.0031
	蓖麻油	1.880±0.003
表面活性剂	聚氧乙烯 35 蓖麻油	2.960±0.004
	聚氧乙烯 40 氢化蓖麻油	40.200±0.050
	吐温 80	0.690±0.001
	聚氧乙烯蓖麻油	147.200±0.042
	辛酸葵酸聚乙二醇甘油酯	170.610±0.000
	脂肪醇聚氧乙烯醚	31.650±0.000
助表面活性剂	聚乙二醇 200	36.660±0.019
	二乙二醇单乙醚	65.360±0.036
	异丙醇	1.510±0.001
	甘油	0.640±0.000

2.2　辅料的筛选

将表面活性剂和助表面活性剂按照质量比（K_m）分别为 3∶1、2∶1、1∶1、1∶2、1∶3 进行混合，再与油相按照比例分别为 1∶9、2∶8、3∶7、4∶6、5∶5、6∶4、7∶3、8∶2、9∶1 进行混匀，缓慢滴入 37 ℃水浴磁力搅拌下 100 mL 蒸馏水中，观察其乳化状态。以油相、表面活性剂、助表面活性剂分别为三元相图的三个顶点，用 Origin 8.0 软件绘制三元相图。以能够形成的

微乳区域面积大小为指标，利用 Image J 软件对三元相图内乳化面积大小进行相对计算，进而确定适合的三相。

2.2.1　油相的筛选　选择对药物溶解度较好的蓖麻油、油酸聚乙二醇甘油酯作为油相，固定聚氧乙烯 40 氢化蓖麻油为表面活性剂，异丙醇为助表面活性剂，绘制三元相图。由图 1A 与图 1B 可知，当油相为油酸聚乙二醇甘油酯时，三元相图的自乳化面积最大。

2.2.2　表面活性剂的筛选　通过预试验结果发现表面活性剂辛酸葵酸聚乙二醇甘油酯乳化能力差，乳化过程中会出现白色絮状物且不溶于水，故不对油酸聚乙二醇甘油酯 - 辛酸葵酸聚乙二醇甘油酯 - 异丙醇的体系进行考察。选取聚氧乙烯蓖麻油、聚氧乙烯 40 氢化蓖麻油作为表面活性剂，油酸聚乙二醇甘油酯固定为油相、异丙醇固定为助表面活性剂，绘制三元相图。由图 1C 与图 1D 可知，当表面活性剂为聚氧乙烯蓖麻油时，乳化区域面积最大，故选择聚氧乙烯蓖麻油为表面活性剂。

2.2.3　助表面活性剂的筛选　固定聚氧乙烯蓖麻油为表面活性剂，油酸聚乙二醇甘油酯为油相，以二乙二醇单乙醚、聚乙二醇 200、异丙醇为助表面活性剂，绘制三元相图。由图 1E、图 1F、图 1G 可知，当油相为油酸聚乙二醇甘油酯，表面活性剂为聚氧乙烯蓖麻油，助表面活性剂为异丙醇时，三元相图的自乳化面积最大。因此最终确定处方为油酸聚乙二醇甘油酯、聚氧乙烯蓖麻油、异丙醇。

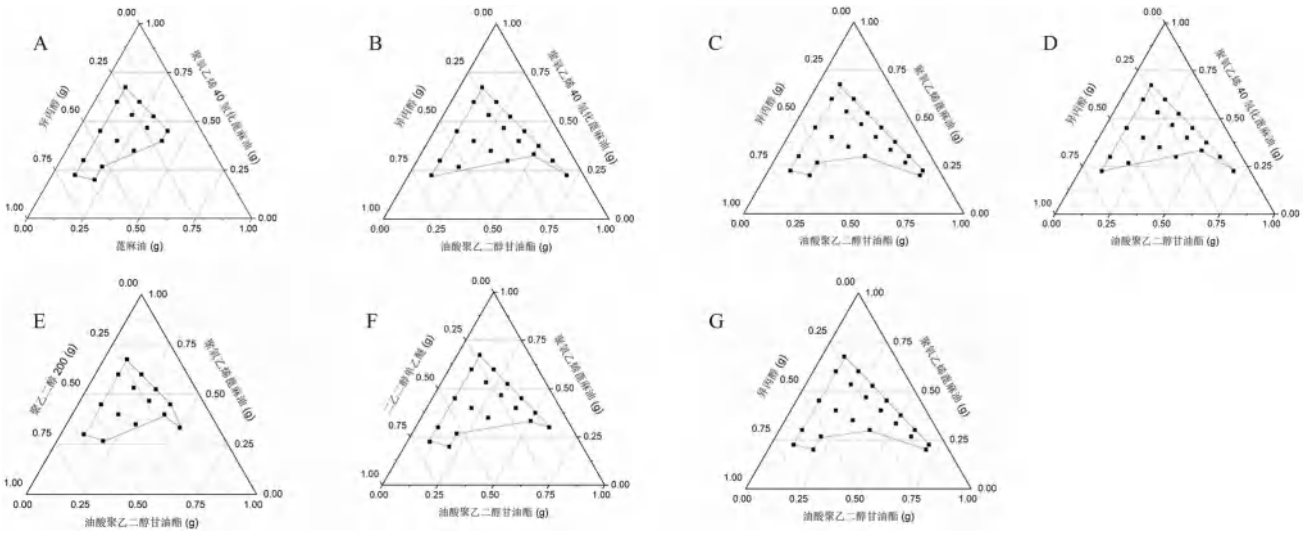


图 1　三元相图

Fig 1　Ternary phase diagrams

2.3　星点设计法优化处方

以油相的比例 X_1（%）以及混合表面活性剂的比例 X_2（K_m）为自变量，以载药量 Y_1（mg • mL^{-1}）与乳化后的粒径 Y_2（nm）为响应值，采用 Design Expert 8.0 软件，根据星点设计 - 响应面法进行处方比例的考察。

2.3.1　星点设计及结果　运用星点设计进行处方优化，考察指标的水平代码值和实际操作值见表 2，根据星点设计得到的处方进行试验，结果如表 3 所示。

表 2　星点设计的自变量水平

Tab 2　Levels of independent variable in the central composite design

自变量	水平				
	− 1.414	− 1	0	＋ 1	＋ 1.414
X_1	3.79	10	25	40	46.21
X_2	0.17	1	3	5	5.83

2.3.2　数据模型拟合分析及处方优化　使用 Design Expert 8.0 软件对试验结果与考察因素进行分析，以油酸聚乙二醇甘油酯用量百分比（X_1）和表面活性剂与助表面活性剂的比例 K_m（X_2）作

表 3　星点设计的试验结果 (n = 3)

Tab 3　Central composition design (n = 3)

No.	X_1	X_2	Y_1/（mg • mL^{-1}）	Y_2/nm
1	25.00	3.00	23.87±0.021	27.03±0.067
2	10.00	1.00	18.69±0.021	18.54±1.269
3	46.21	3.00	14.47±0.021	53.34±0.289
4	10.00	5.00	29.90±0.000	17.56±0.092
5	25.00	0.17	5.86±0.014	99.86±0.280
6	3.79	3.00	34.18±0.021	16.64±0.917
7	25.00	5.83	20.45±0.021	21.93±0.355
8	40.00	1.00	12.88±0.021	120.54±5.225
9	25.00	3.00	21.43±0.042	30.56±0.478
10	25.00	3.00	19.57±0.000	16.57±0.262
11	25.00	3.00	18.67±0.042	18.96±0.023
12	25.00	3.00	21.40±0.042	22.97±0.133
13	40.00	5.00	17.65±0.000	29.04±0.190

为考察因素，对饱和载药量（Y_1，mg • mL^{-1}）和乳化后的粒径（Y_2，nm）进行二项式拟合。经拟合回归，得到模型方程：

$Y_1 = 20.99 - 5.74X_1 + 4.58X_2 - 1.61X_1X_2 + 1.93X_1^2 - 3.66X_2^2$（$R^2 = 0.9458$，$P = 0.0003$）

$Y_2 = 23.22 + 20.67X_1 - 25.34X_2 - 22.63X_1X_2 + 5.51X_1^2 + 18.46X_2^2$（$R^2 = 0.9526$，$P = 0.0002$）

对模型进行 ANOVA 分析，模型的 P 均值小于 0.05，这说明模型参数的显著性检验通过，失拟值均大于 0.05，说明该方程拟合度良好，该模型能够准确预测自纳米乳的处方最佳组成。

2.3.3　处方验证　以载药量最大、粒径最小为优化目标，预测的最佳处方为油酸聚乙二醇甘油酯 10%，聚氧乙烯蓖麻油 73.67%，异丙醇 16.33%。预测响应值载药量 Y_1 为 31.25 mg • mL^{-1}，粒径 Y_2 为 16.57 nm。按照优化后的处方制备 CUR-SNEDDS，对预测处方进行验证，载药量为（31.31±0.02）mg • mL^{-1}，粒径为（16.17±0.04）nm，表明所拟合的模型具有较好的预测结果。

2.4　游离磷脂的种类筛选

固定磷脂与 CUR 的质量比为 1∶1，考察不同种类的磷脂对 CUR-SNEDDS 的影响。

含游离磷脂的 CUR-SNEDDS 的制备：称取 2.0 g CUR-SNDEES 于不同的西林瓶中，分别向西林瓶中添加大豆磷脂 -a 60 mg、大豆磷脂 -b 60 mg、蛋黄卵磷脂 60 mg，37 ℃水浴搅拌，超声使其溶解得到含游离磷脂的 CUR-SNEDDS，备用。

吸取含游离磷脂的 CUR-SNEDDS 500 μL，缓慢加入 37 ℃水浴搅拌的 50 mL 纯净水中，得到其自乳化溶液，用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤，测定乳化后的粒径及电位。

由表 4 可知，不同种类磷脂的添加对制剂粒径的变化基本无影响。蛋黄卵磷脂相比较于大豆磷脂而言，具有显著提高制剂电位绝对值，增加其稳定性的作用。

表 4　含游离磷脂的姜黄素自纳米乳的粒径和 Zeta 电位 ($n = 3$)

Tab 4　Particle size and Zeta potential of CUR-SNEDDS containing free phospholipids ($n = 3$)

种类	粒径 /nm	Zeta 电位 /mV
大豆磷脂 -A	13.37±0.52	－0.24±0.14
大豆磷脂 -B	17.21±0.13	－1.59±0.53
蛋黄卵磷脂	17.34±0.90	－25.23±0.38

2.5　游离磷脂用量的确定

基于“2.4”项下试验结果，固定其他条件不变，分别向西林瓶中添加不同质量蛋黄卵磷脂（分别按磷脂与 CUR 质量比为 0.5∶1、1∶1、1.5∶1、2∶1），37 ℃水浴搅拌，超声使其完全溶解得到含游离磷脂的 CUR-SNEDDS，移取 0.5 mL 浓缩液缓慢加入 37 ℃水浴搅拌的 50 mL 蒸馏水后，测定其粒径及 Zeta 电位。

由表 5 可知制剂的粒径随着药脂比的增加无明显变化，制剂的 Zeta 电位绝对值随着质量比的增加逐渐增加。当质量比大于 1 时，Zeta 电位显示出良好的结果；当 EP 与 CUR 质量比为 2∶1 时，为最优处方。故最终制剂处方确定为 CUR∶油酸聚乙二醇甘油酯∶聚氧乙烯蓖麻油∶异丙醇∶蛋黄卵磷脂＝ 2.8%∶9.2%∶67.6%∶14.9%∶5.5%。

表 5　磷脂用量对 EP-CUR-SNEDDS 粒径和 Zeta 电位的影响 ($n = 3$)

Tab 5　Influence of phospholipid dosage on EP-CUR-SNEDDS particle size and Zeta potential ($n = 3$)

脂药比（m_{EP}/m_{CUR}）	粒径 /nm	Zeta 电位 /mV
0.5∶1	17.19±0.13	－0.35±0.40
1∶1	17.80±0.41	－25.23±0.38
1.5∶1	16.08±1.08	－28.87±3.49
2∶1	16.30±0.62	－32.67±2.05

2.6　制剂质量评价

2.6.1　制备　按优化后的处方分别称取油相油酸聚乙二醇甘油酯、表面活性剂聚氧乙烯蓖麻油、助表面活性剂异丙醇于西林瓶中，37 ℃水浴搅拌均匀得到空白的 SNEDDS。准确称量 30 mg CUR 加入空白的 SNEDDS 中，水浴搅拌均匀，超声使药物完全溶解，得到橙黄色澄清透明的 CUR-SNEDDS。

称蛋黄卵磷脂 60 mg 加入 1 g CUR-SNEDDS（含有 CUR 30 mg）中，水浴搅拌超声使其完全溶解，得到橙红色澄清透明的 EP-CUR-SNEDDS。

2.6.2　形态与粒径　观察发现制备得到的浓缩液无异物、不浑浊、呈澄清透明状。将乳化后的浓缩液稀释至适宜浓度后，滴加到铜网上，自然晾干后滴加磷钨酸溶液负染，除去多余的染色剂风干后在透射电镜下观察微乳的形态结构。

在透射电镜下观察 EP-CUR-SNEDDS 乳化后的纳米乳，如图 2 所示，乳液微粒呈类球形，粒径大小约为 20 nm。

2.6.3　粒径分布与 Zeta 电位的测定　取浓缩液 1 g，缓慢加入 37 ℃水浴搅拌的 100 mL 纯净水中，得到 CUR 自乳化溶液，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后，测定乳化后的粒径及电位。

如图 3 ～ 4 所示，CUR-SNEDDS、EP-CUR-SNEDDS 的粒径分别为（15.72±0.30）、（16.30±0.62）nm，Zeta 电位分别为（－0.97±1.43）、（－35.63±0.81）mV。CUR-SNEDDS 与 EP-

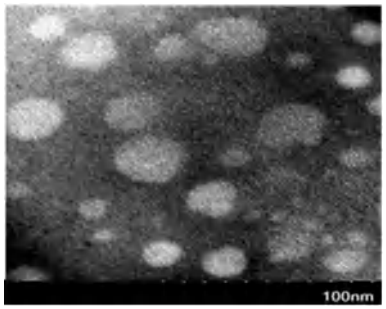


图 2　EP-CUR-SNEDDS 透射电镜照片

Fig 2　Transmission electron microscopy of EP-CUR-SNEDDS

CUR-SNEDDS 乳化后的微粒粒径相似。两种制剂的 Zeta 电位皆为负值，EP-CUR-SNEDDS 的电位绝对值大幅增大。

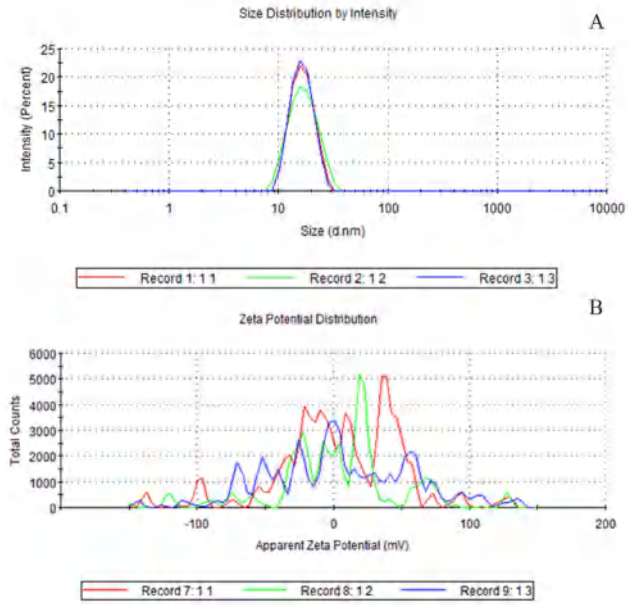


图 3　CUR-SNEDDS 的粒径分布（A）和 Zeta 电位（B）

Fig 3　Particle size distribution（A）and Zeta potential（B）of CUR-SNEDDS

2.6.4　稳定性考察

① 稀释对微乳稳定性的影响：取 1 g 浓缩液缓慢匀速的滴加入 50、100、250 mL 蒸馏水后，测定微乳的粒径，室温下放置 48 h，观察有无出现分层及药物析出现象。将乳液置于离心管中，4000 r • min^{-1} 离心 15 min，观察有无出现分层及药物析出现象。

② 不同分散介质对微乳稳定性的影响：取 1 g 浓缩液缓慢匀速地滴入 100 mL 蒸馏水、pH 6.8 磷酸盐缓冲液、pH 1.2 HCl 溶液后，用马尔文粒度分析仪测定微乳的粒径，于室温下放置 48 h，观察是否出现分层及药物析出现象。随后将乳液置于离心管中，4000 r • min^{-1} 离心 15 min，观察有无出现分层及药物析出现象。

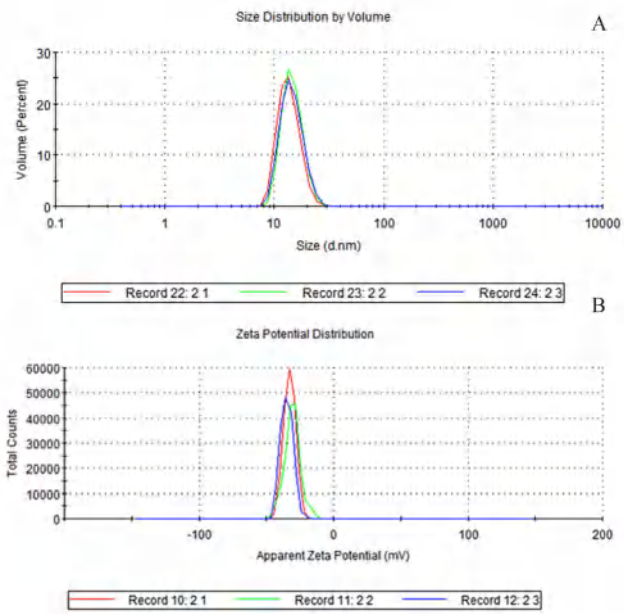


图 4　EP-CUR-SNEDDS 的粒径分布（A）和 Zeta 电位（B）

Fig 4　Particle size distribution（A）and Zeta potential（B）of EP-CUR-SNEDDS

如表 6 ～ 7 所示，CUR-SNEDDS、EP-CUR-SNEDDS 在不同体积或介质的溶液中乳化后，乳液粒径未发生明显变化。CUR-SNEDDS 48 h 内出现少量药物沉淀，离心后药物析出略微增加，表明 CUR-SNEDDS 的稳定性不佳，EP-CUR-SNEDDS 无沉淀产生，稳定性良好。CUR-SNEDDS 48 h 内在 pH 1.2 HCl 溶液中未见沉淀，离心后不发生分层现象，而在 pH 6.8 PBS 和水溶液中出现药物析出现象，说明介质的种类对制剂的稳定性影响较为明显。EP-CUR-SNEDDS 48 h 内在不同介质均未见沉淀，离心后不发生分层现象，说明介质的种类对制剂的稳定性无显著影响。

2.6.5　自乳化效率　通过目测法观察自乳化体系在不同稀释倍数（50、100、250 mL 蒸馏水）和不同种类（100 mL 蒸馏水、pH 1.2 HCl、pH 7.4 PBS）分散介质中完全乳化所需的时间，测定乳化后乳液的粒径及多分散系数（PDI），以作为评价制剂自乳化效率的指标。具体操作方法如下：取浓缩液各 1 g，分别将其缓慢滴入（37±0.5）℃水浴的分散介质中，观察成乳时间。

结果如表 6 ～ 7 所示，不同稀释倍数与介质对制剂的自乳化时间没有显著影响，自乳化时间均小于 70 s，CUR-SNEDDS 与 EP-CUR-SNEDDS 自乳化后的粒径相差不大。

表 6　不同稀释体积对自乳化效率和粒径的影响 (n = 3)

Tab 6　Effect of dilution solution on self-emulsification efficiency and particle size (n = 3)

稀释体积 /mL	制剂	自乳化时间 /s	粒径 /nm
50	CUR-SNEDDS	65.29±0.06	16.09±0.13
	EP-CUR-SNEDDS	62.35±0.87	13.85±0.67
100	CUR-SNEDDS	67.46±0.50	16.71±0.09
	EP-CUR-SNEDDS	63.46±0.94	14.67±1.45
250	CUR-SNEDDS	66.63±1.39	16.97±0.49
	EP-CUR-SNEDDS	68.44±0.07	16.74±2.24

表 7　不同稀释介质对自乳化效率和粒径的影响 (n = 3)

Tab 7　Effect of dilution medium on self-emulsification efficiency and particle size (n = 3)

稀释介质	制剂	自乳化时间 /s	粒径 /nm
蒸馏水	CUR-SNEDDS	67.46±0.50	16.64±0.13
	EP-CUR-SNEDDS	63.46±0.94	15.15±1.33
pH 1.2 HCl	CUR-SNEDDS	67.91±1.27	17.22±0.16
	EP-CUR-SNEDDS	66.41±0.06	15.98±0.47
pH 6.8 PBS	CUR-SNEDDS	68.87±0.83	17.29±0.29
	EP-CUR-SNEDDS	66.18±1.02	14.89±0.21

2.6.6　留样观察试验　将制备得到的浓缩液于室温条件下放置 6 个月，观察其是否为均一、澄清透明的油状液体；是否出现分层、药物析出等不稳定现象，并在 3 个月及 6 个月时测定其在 37 ℃水中乳化效率及乳化后的粒径。

结果如表 8 所示，CUR-SNEDDS 在室温长期放置下粒径和乳化时间未发生明显变化，但其颜色略有加深、药物少量析出，制剂处于不稳定状态。EP-CUR-SNEDDS 均无明显变化，说明制剂长期放置稳定性良好。

2.7　体外溶出度的考察

取 1 g 浓缩液灌入 00 号透明胶囊壳中（相当于 CUR 30 mg），同时取等剂量的原料药于 00 号透明胶囊壳中用作对照，按照 2020 年版《中国药典》桨法规定测定制剂的溶出度，以 900 mL 的 pH 1.2 HCl 溶液作为溶出介质，设定温度为（37±0.5）℃，转速为 50 r • min^{-1}，分别于 5、10、15、20、30、45、60 min 取样 5 mL，同时用等温同体积的相应介质进行补液，0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液稀释至合适浓度测定吸光度值，并计算其累积溶出百分率。

表 8　留样观察试验结果 (n = 3)

Tab 8　Retention sample observation experiments (n = 3)

时间 /d	制剂	外观	粒径 /nm	自乳化时间 /s
0	CUR-SNEDDS	未分层、无析出	16.71±0.09	67.46±0.50
	EP-CUR-SNEDDS	未分层、无析出	16.30±0.62	63.46±0.94
90	CUR-SNEDDS	未分层、析出	16.64±0.13	68.63±1.39
	EP-CUR-SNEDDS	未分层、无析出	15.89±0.54	70.68±0.20
180	CUR-SNEDDS	分层、析出	17.30±0.35	72.79±0.33
	EP-CUR-SNEDDS	未分层、无析出	14.67±1.45	68.79±0.35

结果如图 5 所示，EP-CUR-SNEDDS 和 CUR-SNEDDS 在 20 min 的累积释放度达到 80% 以上，而原料药在释放介质中 60 min 内的累积释放度都不到 20%。由图 5 可知，EP-CUR-SNEDDS 的释放速度略高于 CUR-SNEDDS 的释放速度，表明 EP-CUR-SNEDDS 和 CUR-SNEDDS 制剂均能显著提高 CUR 的溶出速率及溶出度。

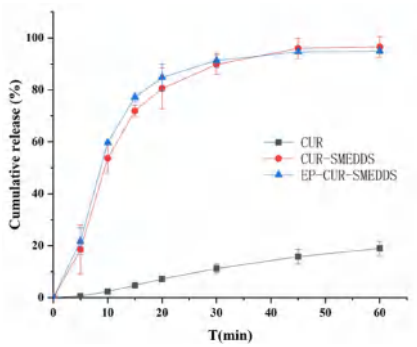


图 5　CUR 及两种制剂在 pH 1.2 HCl 中的体外溶出曲线（n = 3）

Fig 5　In vitro dissolution curve of CUR and two preparations in pH 1.2 HCl（n = 3）

3　讨论

稳定性试验发现，制剂添加磷脂后处于更加稳定的状态，无药物析出现象，其原因为磷脂可作为表面活性剂发挥其增溶作用，增加药物溶解度 [9-10]；磷脂有可能在溶液中形成脂质体，将药物包裹其中，抑制药物的析出 [11]；还可能因为磷脂与纳米乳或药物发生相互作用形成复合物胶束，抑制药物的沉淀 [12]。

制剂 Zeta 电位绝对值越大，表明颗粒带有更多的负或正电荷，颗粒间的静电斥力越大，颗粒不易聚集成团，从而使整个体系能够稳定，在提高药物的生物利用度方面更具潜力。在吸收过程中，药物的溶出速率和药物在胃肠道壁的透过速率是影响其吸收的两个限速过程。本文从制剂的

角度提高了 CUR 的体外溶出速率，其体内吸收情况较为复杂[13-14]，有待进一步研究。

磷脂可在磷脂酶的作用下水解产生游离脂肪酸，而游离脂肪酸被小肠上皮细胞吸收后可以再合成为甘油三酸酯，并与磷脂、胆固醇、载脂蛋白等合成肠道脂蛋白。在药物淋巴转运的过程中，药物可通过与这些脂蛋白的疏水性核心结合而被摄入肠道淋巴系统。因此，磷脂及其水解产生的脂肪酸可以通过促进脂蛋白的生成来促进药物的淋巴转运[15-17]。此外，磷脂作为细胞膜的重要组成部分，可提高肠上皮细胞膜的流动性，从而增加药物或载体的膜渗透性。因此，磷脂作为联合表面活性剂不仅可以通过提高药物及乳滴的渗透性改善药物的胃肠吸收，还可以通过增强药物的淋巴转运，从而提高药物的生物利用度[8，18]。

参考文献

[1] Chen L，Hu C，Hood M，et al. A novel combination of vitamin C，curcumin and glycyrrhizic acid potentially regulates immune and inflammatory response associated with coronavirus infections：a perspective from system biology analysis [J]. Nutrients，2020，12（4）：1193.

[2] Deeb D，Jiang H，Gao X，et al. Curcumin sensitizes prostate cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2L by inhibiting nuclear factor-kappaB through suppression of IkappaBalpha phosphorylation [J]. Mol Cancer Ther，2004，3（7）：803-812.

[3] Zhang J，Hou X，Ahmad H，et al. Assessment of free radicals scavenging activity of seven natural pigments and protective effects in AAPH-challenged chicken erythrocytes [J]. Food Chem，2014，145：57-65.

[4] Sanitá PV，Pavarina AC，Dovigo LN，et al. Curcumin-mediated anti-microbial photodynamic therapy against Candida dubliniensis biofilms [J]. Lasers Med Sci，2018，33（4）：709-717.

[5] Mei L，Zhang Z，Zhao L，et al. Pharmaceutical nanotechnology for oral delivery of anticancer drugs [J]. Adv Drug Deliv Rev，2013，65（6）：880-890.

[6] Chuah AM，Jacob B，Jie Z，et al. Enhanced bioavailability and bioefficacy of an amorphous solid dispersion of curcumin [J]. Food Chem，2014，156：227-233.

[7] Zaichik S，Steinbring C，Caliskan C，et al. Development and in vitro evaluation of a self-emulsifying drug delivery system（SEDDS）for oral vancomycin administration [J]. Int J Pharm，2019，554：125-133.

[8] 廖恒锋，廉春放，高越，等 . 磷脂对自微乳口服吸收、淋巴转运和体外特征的影响 [J]. 中南药学，2021，19（1）：7-14.

[9] 田静，刘建平，郗园，等 . 蜂蜡、卵磷脂对刺五加混悬剂稳定性的影响 [J]. 中国药科大学学报，2002，33（4）：35-38.

[10] 王小梅，黄少烈，李小兵 . 磷脂体系的开发与应用 [J]. 广州大学学报（自然科学版），2003，2（6）：527-531.

[11] 穆筱梅，梁世强 . 脂质体的制备方法及其研究进展 [J]. 时珍国医国药，2008，19（7）：1784-1786.

[12] 梅方义，曹栋 . 新型卵磷脂 / 非离子表面活性剂混合胶束的制备研究 [J]. 食品工业科技，2012，33（6）：336-339.

[13] Liu A，Lou H，Zhao L，et al. Validated LC/MS/MS assay for curcumin and tetrahydrocurcumin in rat plasma and application to pharmacokinetic study of phospholipid complex of curcumin [J]. J Pharm Biomed Anal，2006，40（3）：720-727.

[14] Sharma RA，McLelland HR，Hill KA，et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral Curcuma extract in patients with colorectal cancer [J]. Clin Cancer Res，2001，7（7）：1894-1900.

[15] Fricker G，Kromp T，Wendel A，et al. Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery [J]. Pharm Res，2010，27（8）：1469-1486.

[16] Avachat AM，Patel VG. Self nanoemulsifying drug delivery system of stabilized ellagic acid-phospholipid complex with improved dissolution and permeability [J]. Saudi Pharm J，2015，23（3）：276-289.

[17] Zhang J，Peng Q，Shi S，et al. Preparation，characterization，and in vivo evaluation of a self-nanoemulsifying drug delivery system（SNEDDS）loaded with morin-phospholipid complex [J]. Int J Nanomedicine，2011，6：3405-3414.

[18] Fan Z，Wu J，Fang X，et al. A new function of Vitamin E-TPGS in the intestinal lymphatic transport of lipophilic drugs：enhancing the secretion of chylomicrons [J]. Int J Pharm，2013，445（1-2）：141-147.

（收稿日期：2022-01-05；修回日期：2022-02-20）

血液肿瘤精准治疗专题

【编者按】

自从利妥昔单抗出现，利妥昔单抗联合 CHOP 作为基础的一线化疗方案显著提高了 B 细胞淋巴瘤的有效率，但对于存在高危因素的患者而言，仍难以取得满意疗效，这部分患者后期一旦出现复发，治疗难度将明显增大、生存机会降低，寻找新型治疗药物或治疗手段来提高治疗效果、降低复发率有重要意义。苯达莫司汀作为一种双功能烷化剂对比传统烷化剂有着高效低毒的特点；阿霉素脂质体是一种新型蒽环类药物，具有高通透性及强滞留效应，在肿瘤组织中浓度更高，可以更好地杀灭肿瘤细胞，在降低心脏毒性上更有优势；自体造血干细胞移植在复发难治性淋巴瘤中的地位已得到肯定，在高危弥漫大 B 细胞淋巴瘤的一线巩固治疗中值得进一步应用。本专题通过回顾性分析探索苯达莫司汀、阿霉素脂质体以及自体造血干细胞移植在淋巴瘤应用中的价值。

【特邀专家简介】

郭智，男，教授，硕士研究生导师，国家感染性疾病临床医学研究中心（深圳市第三人民医院 / 南方科技大学第二附属医院）血液内科主任、主任医师、广东省杰出青年医学人才，致力于淋巴瘤 / 白血病等血液肿瘤规范化治疗，尤其擅长淋巴瘤精准治疗及造血干细胞移植工作。担任中国抗癌协会肿瘤血液病专委会常委；中国抗癌协会肿瘤与微生态青委会主任委员；广东省预防医学会血液肿瘤专委会主任委员；湖北省免疫学会肿瘤与微生态专委会副主任委员；中华中医药学会免疫学分会副秘书长；中华中医药学会血液病分会委员等学术任职。牵头制订肠道微生态与造血干细胞移植相关性中国专家共识等，在 SCI 及核心期刊发表论著 100 余篇，主编《临床移植实践及血液肿瘤诊断与治疗》《临床肿瘤诊断与治疗》《肿瘤与微生态》，参编《国家基本药物实用指南》等专著 9 部。

R-CHOP 方案序贯自体造血干细胞移植在中高危弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的应用：单中心回顾性分析

贤晓敏[1, 2]，蓝晓凤[1, 2]，刘玄勇[1, 2]，陈丽萍[1, 2]，刘志淑[2]，谢晶[1, 2]，王月乔[2]，王强[1]，郭智[1, 2*]

（1. 武汉科技大学医学院，武汉　430065；2. 国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院深圳医院，广东　深圳　518116）

摘要：目的　分析 R-CHOP 方案序贯自体造血干细胞移植（Auto-HSCT）治疗初治中高危弥漫大 B 细胞淋巴瘤（DLBCL）的疗效与安全性。**方法**　回顾性分析接受 R-CHOP 方案化疗后达到完全缓解（CR）的初治中高危 DLBCL 患者的临床资料，序贯 Auto-HSCT 治疗的为移植组（$n = 25$），选择同期不序贯 Auto-HSCT 治疗的为对照组（$n = 50$），比较两组患者的疗效。**结果**　移植组 2 年无复发生存期（RFS）率为 79.1%，2 年总生存期（OS）率为 92%；对照组 2 年 RFS 率为 54.7%，2 年 OS 率为 89.9%；移植组的 2 年 RFS 率显著高于对照组（$P = 0.039$），但 2 年 OS 率差异无统计学意义。**结论**　对于初治中高危 DLBCL 患者，经过 R-CHOP 方案化疗获得 CR 后，序贯 Auto-HSCT 巩固治疗可提高患者的 RFS 率，且安全性良好。

关键词：R-CHOP 方案；自体造血干细胞移植；弥漫大 B 细胞淋巴瘤；无复发生存期

中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1503-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.005

基金项目：深圳市卫生系统科研项目（No. SZLY2018003）；北京白求恩医学基金（No. BQE-TY-SSPC1-S-08）。

作者简介：贤晓敏，女，主治医师，主要从事肿瘤防治工作，email：214141314@qq.com　*__通信作者：__郭智，男，主任医师，主要从事血液肿瘤方向及造血干细胞移植工作，email：guozhi77@126.com

Sequential autologous hematopoietic stem cell transplantation with R-CHOP regimen in medium and high risk diffuse large B-cell lymphoma: a single center retrospective study

XIAN Xiao-min[1, 2], LAN Xiao-feng[1, 2], LIU Xuan-yong[1, 2], CHEN Li-ping[1, 2], LIU Zhi-shu[2], XIE Jing[1, 2], WANG Yue-qiao[2], WANG Qiang[1], GUO Zhi[1, 2*] (1. *College of Medicine*, *Wuhan University of Science and Technology*, *Wuhan* 430065; 2. *National Cancer Center/ National Clinical Research Cancer for Cancer/ Cancer Hospital & Shenzhen Hospital*, *Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College*, *Shenzhen Guangdong* 518116)

Abstract: Objective To determine the efficacy and safety of R-CHOP regimen autologous hematopoietic stem cell transplantation (Auto-HSCT) for primary medium and high risk diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). **Methods** The clinical data of newly treated medium and high risk DLBCL patients who received complete remission (CR) after R-CHOP regimen were analyzed retrospectively. The sequential Auto-HSCT treatment group served as the transplantation group ($n = 25$), while the non sequential Auto-HSCT treatment group served as the control group ($n = 50$). The curative effects of the two groups was compared. **Results** In the transplantation group, the two-year relapse-free survival (RFS) rate was 79.1%, and the two-year overall survival (OS) was 92%. In the control group, the two-year RFS rate was 54.7%, and the two-year OS rate was 89.9%. The two-year RFS rate of the transplantation group was significantly higher than that of the control group ($P = 0.039$), but no significant difference was found in the two-year OS rate. **Conclusion** For patients with medium and high risk DLBCL, after CR is obtained with R-CHOP regimen, sequential Auto-HSCT consolidation treatment significantly improves the RFS rate of patients safely.

Key words: R-CHOP regimen; autologous hematopoietic stem cell transplantation; diffuse large B-cell lymphoma; relapse-free survival

弥漫性大B细胞淋巴瘤（DLBCL）是一组异质性很强的肿瘤，为最常见的非霍奇金淋巴瘤类型，约占成人非霍奇金淋巴瘤病理类型的30%[1-2]。R-CHOP方案（利妥昔单抗、环磷酰胺、阿霉素、长春新碱、强的松）为初治DLBCL患者的一线化疗方案，5年生存率为50%～70%[3]；尽管R-CHOP方案极大地提高了DLBCL患者的生存率，但仍有20%的患者最终会难治，30%的患者会复发[3-4]。目前自体造血干细胞移植（Auto-HSCT）已广泛应用于DLBCL的巩固治疗，无论是在DLBCL的一线巩固治疗，还是在复发难治淋巴瘤的挽救治疗，均占据了重要地位，能延长患者的无进展生存期（progression-free survival，PFS）及总生存期（overall survival，OS）[5]。临床上亦已开展了Auto-HSCT作为巩固治疗应用于一线化疗达到完全缓解（CR）的淋巴瘤患者的相关试验，结果表明可改善患者生存及预后[6]。2018版造血干细胞移植治疗淋巴瘤中国专家共识[7]指出，对于治疗后达到CR的年轻高危DLBCL患者，推荐Auto-HSCT作为一线巩固治疗方案。但到目前为止，美国国立综合癌症网络（National Comprehensive Cancer Network，NCCN）指南尚未推荐Auto-HSCT作为治疗后达到CR的DLBCL患者的一线巩固治疗方案。因此，针对化疗后达到CR的DLBCL患者，是否采用序贯Auto-HSCT巩固治疗尚处于探索阶段，未形成标准巩固治疗方案。本中心于2018年1月已开展把Auto-HSCT作为一线巩固治疗应用于经R-CHOP方案化疗达到CR的初治中高危DLBCL患者的工作，现把25例序贯Auto-HSCT巩固治疗的患者临床资料进行分析，旨在探讨Auto-HSCT对初治中高危DLBCL患者巩固治疗的疗效。

1 资料与方法

1.1 一般资料

对2018年1月至2021年1月在中国医学科学院肿瘤医院深圳医院血液肿瘤科既往经过R-CHOP方案化疗后达到CR的初治中高危（IPI评分≥3分）DLBCL患者资料进行回顾性分析。依据是否序贯Auto-HSCT巩固治疗分为移植组和对照组。所有患者经本院病理科病理组织活检及免疫组织化学染色确诊为DLBCL，并

对肿瘤组织中的MYC、Bcl-2、Bcl-6进行检测（双表达淋巴瘤是指MYC和Bcl-2/Bcl-6蛋白过表达，本研究中双表达淋巴瘤的截断值定义为：MYC ≥ 40%，Bcl-2 ≥ 50%，Bcl-6 ≥ 30%）。所有患者均行骨髓穿刺及骨髓活检检查明确骨髓是否受累。所有患者初诊时均进行Ann Arbor分期、ECOG评分，依据国际预后指数（international prognostic index，IPI）进行危险度分层。所有患者均无重要脏器功能不全，治疗过程中均定期采用增强CT或PET-CT检查评价患者的疗效。本研究排除中枢侵犯患者、“双打击”或“三打击”患者（即经荧光原位杂交提示MYC和Bcl-2/Bcl-6重排阳性）及拒绝随访患者。

1.2　Auto-HSCT 动员前治疗方案

R-CHOP方案化疗后序贯Auto-HSCT巩固治疗的即为移植组；化疗后不序贯Auto-HSCT巩固治疗的即为对照组。移植组所有患者移植前总的化疗周期数为163个，中位化疗周期数为6个（范围：6 ～ 7个）；对照组所有患者总的化疗周期数为345个，中位化疗周期数为7个（范围：6 ～ 8个），两组患者的化疗周期数比较差异无统计学意义（P = 0.121）。4个周期R-CHOP方案化疗后行外周血干细胞采集术。R-CHOP方案为：利妥昔单抗375 mg•m^{-2}，第0日；环磷酰胺（CTX）750 mg•m^{-2}，阿霉素（ADM）50 mg•m^{-2}或阿霉素脂质体30 mg•m^{-2}，长春新碱（VCR）1.4 mg•m^{-2}，第1日；泼尼松（PDN）60 mg•m^{-2}，第1 ～ 5日。治疗期间定期监测血常规、肝肾功能、电解质、心肌酶、心电图等检验检查指标。患者每两周期化疗后均进行疗效评估。

1.3　Auto-HSCT 的动员

所有移植组患者移植前经影像学检查评估均达到CR状态。动员前移植组所有患者造血功能及心肺肝肾功能均恢复正常。动员方案采用化疗药物联合粒细胞集落刺激因子（granulocyte-colony stimulating factor，G-CSF），其中有15例采用单药环磷酰胺化疗；10例采用EAC方案（依托泊苷＋环磷酰胺＋阿糖胞苷）化疗。皮下注射G-CSF的最佳时机为待外周血白细胞降低至最低值时，剂量为5 ～ 10 μg/（kg•d），连续用药3 ～ 5 d至外周血白细胞超过5.0×10^{9}•L^{-1}时进行造血干细胞采集。采用外周血细胞分离机进行外周造血干细胞分离。本研究对每位移植组患者进行外周血干细胞采集1 ～ 3次。造血干细胞采集结束后放置于－80 ℃的环境保存。

1.4　预处理方案

预处理方案为BUCY方案或者BEAM方案。其中采用BUCY方案15例，采用BEAM方案10例。具体方案如下：

① BUCY方案：白消安3.2 mg/（kg•d）－6 d ～ －4 d，环磷酰胺35 mg/（kg•d）－3 d ～ －2 d；② BEAM方案：卡莫司汀300 mg/（m^{2}•d）－8 d，依托泊苷100 ～ 150 mg/（m^{2}•d）－7 d ～ －4 d，阿糖胞苷200 ～ 400 mg/（m^{2}•d）－7 d ～ －4 d，马法兰140 mg/（m^{2}•d）－2 d。

1.5　造血干细胞回输及支持治疗

预处理结束后24 h回输自体造血干细胞，回输后加强支持治疗。所有移植组患者均预防性使用药物预防常见的感染：左氧氟沙星预防消化道感染，更昔洛韦预防巨细胞病毒感染，氟康唑预防真菌感染，复发磺胺甲噁唑预防卡氏肺孢子菌病。每日密切监测患者体温、血尿常规指标、生化指标等。血红蛋白＜ 60 g•L^{-1}时予输注红细胞治疗，血小板＜ 20×10^{9}•L^{-1}时予输注血小板治疗。

1.6　疗效评估及随访

通过增强CT或PET-CT等影像学检查结果，根据2014年Lugano修订版淋巴瘤疗效评价标准判断治疗效果[8]，分为CR、部分缓解（PR）、疾病稳定（SD）和疾病进展（PD）。采用美国国立癌症研究所常见毒性分级标准CTCAE 4.0评价药物不良反应，分为Ⅰ～Ⅳ级。通过查阅住院病历、门诊病历或电话等方式进行随访，随访截止时间为2021年12月31日。第1 ～ 2年每3 ～ 6个月复查增强CT或PET-CT，第3 ～ 5年每6个月复查增强CT或每12个月复查PET-CT。主要研究终点为无复发生存期（relapse-free survival，RFS）：疾病缓解至初次复发的时间。次要研究终点为OS：从随机化开始至（因任何原因）死亡的时间。

1.7　统计学方法

使用SPSS 25.0软件进行统计学处理，计量资料的组间比较采用两独立样本的t检验或秩和检验；计数资料比较采用χ^2检验；生存分析采用Kaplan-Meier法绘制生存曲线，分析RFS及OS。P ＜ 0.05为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　患者临床特征

本研究共筛选出78例接受化疗后达到CR的初治中高危DLBCL患者，其中1例患者继发中枢神经系统肿瘤，2例患者拒绝随访，因此经纳入排除标准共排除3例患者，最终75例患者纳入研究分析。75例患者中，25例患者化疗后序贯Auto-HSCT巩固治疗，即移植组（n = 25），50

例患者化疗后不序贯 Auto-HSCT 巩固治疗，即对照组（n = 50）。在移植组中，男性 15 例（60%），女性 10 例（40%），中位年龄 50 岁（34.5 ～ 60.5 岁），≥ 60 岁 7 例；在对照组中，男性 21 例（42%），女性 29 例（58%），中位年龄 54 岁（43.75 ～ 65.25 岁），≥ 60 岁有 22 例。两组在年龄、性别、细胞起源、B 症状、IPI 评分、Ann Arbor 分期、淋巴结及淋巴结外侵犯、骨髓侵犯、Ki-67、肿瘤大小、是否双表达等分布上差异均无统计学意义（P > 0.05），见表 1。

表 1　移植组与对照组患者的一般资料 [n(%)]

Tab 1　General information of patients in the transplant group and the control group [n(%)]

项目	特征	移植组（n = 25）	对照组（n = 50）	P
年龄 / 岁	≥ 60	7（28）	22（44）	0.180
	< 60	18（72）	28（56）	
性别	男	15（60）	21（42）	0.141
	女	10（40）	29（58）	
细胞起源	non-GCB	20（80）	39（78）	0.842
	GCB	5（20）	11（22）	
B 症状	有	17（68）	43（86）	0.066
	无	8（32）	7（14）	
IPI 评分 / 分	3	19（76）	44（88）	0.181
	≥ 4	6（24）	6（12）	
Ann Arbor 分期	Ⅰ～Ⅱ	8（32）	23（46）	0.246
	Ⅲ～Ⅳ	17（68）	27（54）	
侵犯部位	淋巴结	10（40）	29（58）	0.141
	淋巴结外侵犯	15（60）	21（42）	
骨髓侵犯	有	6（24）	13（26）	0.857
	无	19（76）	37（74）	
Ki-67	≥ 70%	17（68）	32（64）	0.731
	< 70%	8（32）	18（36）	
肿瘤大小 /cm	≥ 7.5	5（20）	6（12）	0.356
	< 7.5	20（80）	44（88）	
双表达	有	9（36）	16（32）	0.729
	无	16（64）	34（68）	

2.2　造血干细胞的造血重建

25 例移植组患者最终输注的 $CD34^+$ 细胞中位数为 $7.43\times10^6\cdot kg^{-1}$（$1.91\times10^6$ ～ $21.16\times10^6\cdot kg^{-1}$），单核细胞中位数为 $7.58\times10^8\cdot kg^{-1}$（$1.37\times10^8$ ～ $15.75\times10^8\cdot kg^{-1}$）。所有移植患者在移植期间均未发生严重并发症，均获得造血重建。中性粒细胞 > $0.5\times10^9\cdot L^{-1}$ 的中位时间为 12 d（5 ～ 19 d），血小板≥ $20\times10^9\cdot L^{-1}$ 的中位时间为 15.4 d（10 ～ 22 d）。

2.3　两组治疗效果比较及生存分析

随访截至 2021 年 12 月 31 日，移植组的中位随访时间为 26 个月（13 ～ 34 个月），4 例患者在随访过程中出现疾病复发，复发率为 16%；其中 2 例患者因疾病进展死亡，病死率为 8%。其余 21 例移植患者在截至随访终点时均为无复发生存。对照组的中位随访时间为 24.5 个月（17 ～ 35 个月），截至随访终点，有 21 例患者在观察随访期间出现疾病复发进展，复发率为 42%；复发患者均选用后线治疗方案继续治疗，其中 6 例患者死于肿瘤复发进展导致的多器官衰竭，病死率为 12%。其余 29 例移植患者在截至随访终点时均为无复发生存。移植组的 2 年 RFS 率显著高于对照组（79.1% *vs* 54.7%，P = 0.039），见图 1；而移植组和对照组 2 年 OS 率差异无统计学意义（92% *vs* 89.9%，P = 0.722），见图 2。进一步对年龄、性别、细胞起源、骨髓侵犯、B 症状、IPI 评分、Ann Arbor 分期、淋巴结及淋巴结外侵犯、Ki-67、肿瘤大小、是否双表达等单因素进行亚组分析，结果见表 2。两组在不同年龄、性别、骨髓侵犯、B 症状、IPI 评分、Ann Arbor 分期、淋巴结及淋巴结外侵犯、Ki-67、肿瘤大小、是否双表达的 2 年 RFS 率差异无统计学意义（均 P > 0.05）。亚组分析显示，在 non-GCB 型患者中，移植组 2 年 RFS 率高于对照组（81.8% *vs* 51.7%，P = 0.021），见图 3。另外，将 25 例移植组患者根据不同的预处理方案分为两个亚组，采用 BEAM 方案的为移植组 1（n = 10），采用 BUCY 方案的为移植组 2（n = 15），两亚组间进行 RFS、OS 分析，结果提示移植组 1 与移植组 2 的 2 年 RFS 率、OS 率差异均无统计学意义（67.5% *vs* 83%，P = 0.656，90% *vs* 93.3%，P = 0.792），分别见图 4、图 5。

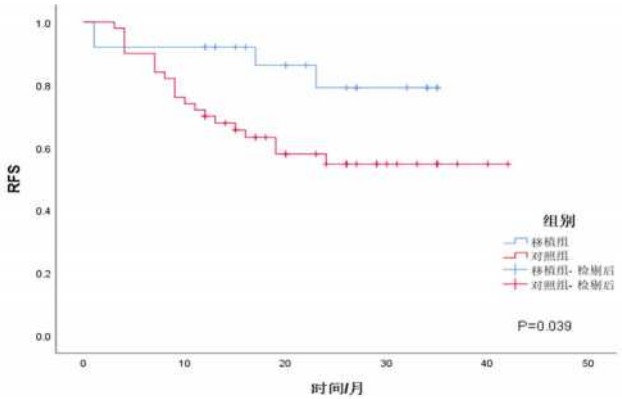


图 1　移植组与对照组患者的无复发生存曲线

Fig 1　Relapse-free survival curves of patients in both groups

2.4　不良反应

25 例移植组患者均未发生移植相关死亡事件，所有患者在移植后均出现血液系统不良反应，其中粒细胞缺乏伴发热 20 例（80%），肺部感染 6 例（24%），败血症 2 例（8%），上述不良反应经抗菌药物治疗后感染得到控制；其他不良反应包括低钾血症 8 例（32%），恶心呕吐 8 例（32%），

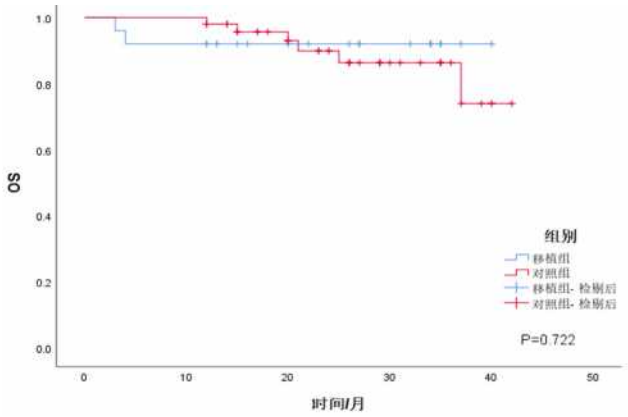


图 2　移植组与对照组患者的总生存曲线

Fig 2　Overall survival curves of patients in both groups

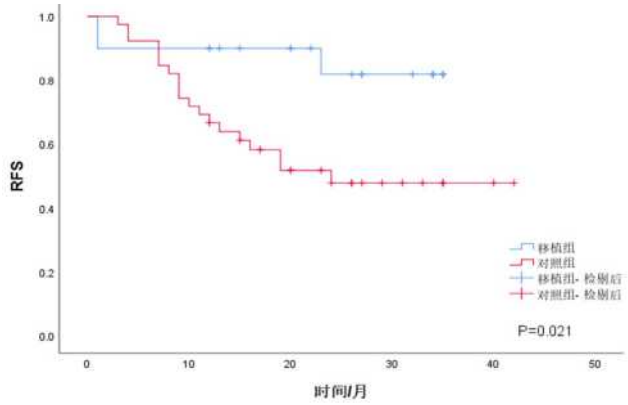


图 3　移植组与对照组 non-GCB 型患者的无复发生存曲线

Fig 3　Relapse-free survival curves of non-GCB patients in both groups

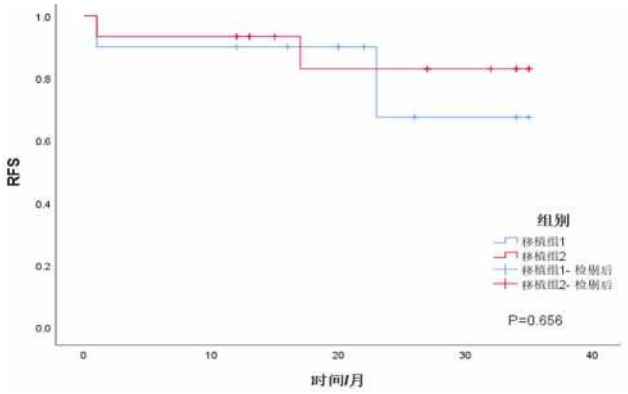


图 4　移植组 1 与移植组 2 患者的无复发生存曲线

Fig 4　Relapse-free survival curves of patients in the transplantation group 1 and group 2

腹泻 4 例（16%），口腔溃疡 2 例（8%），周围神经炎 2 例（8%），Ⅰ～Ⅱ度肝功能损伤 2 例（8%），肛周感染 1 例（4%），心功能不全 1 例（4%）；予对症治疗后均痊愈。对照组在化疗过程中出现粒细胞缺乏伴发热 14 例（28%），恶心呕吐 26 例（52%），肺部感染 8 例（16%），Ⅰ～Ⅱ度肝功能损伤 8 例（16%），皮疹 4 例（8%），胃肠道感染 3 例（6%）；上述不良反应经对症治疗后均痊愈。

3　讨论

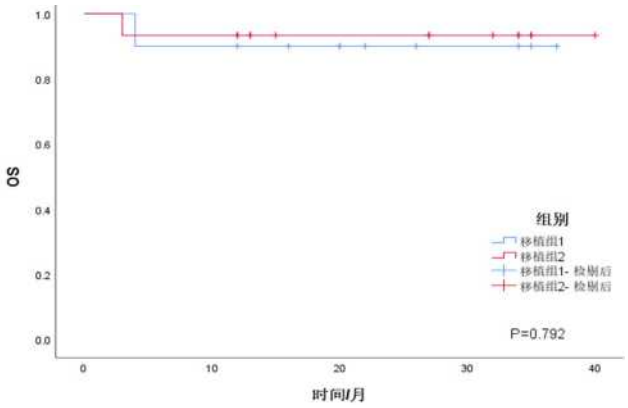


图 5　移植组 1 与移植组 2 患者的总生存曲线

Fig 5　Overall survival curves of patients in the transplantation group 1 and transplantation group 2

表 2　移植组与对照组患者 2 年 RFS 率的比较 (%)

Tab 2　2-year RFS rates between transplant group and control group (%)

项目	特征	移植组（n = 25）	对照组（n = 50）	P
年龄 / 岁	≥ 60	85.7	38.5	0.222
	< 60	79.7	67.7	0.228
性别	男	74.3	53.6	0.262
	女	85.7	55.4	0.061
细胞起源	non-GCB	81.8	51.7	0.021
	GCB	50.0	81.8	0.840
B 症状	有	87.5	42.9	0.128
	无	72.6	61.7	0.138
IPI 评分 / 分	3	79.2	58.7	0.081
	≥ 4	83.3	33.3	0.294
Ann Arbor 分期	Ⅰ～Ⅱ	80.0	59.8	0.161
	Ⅲ～Ⅳ	79.4	50.8	0.125
侵犯部位	淋巴结	83.3	59.7	0.119
	淋巴结外侵犯	74.3	46.8	0.131
骨髓侵犯	有	66.7	23.1	0.258
	无	82.1	66.9	0.121
Ki-67	≥ 70%	66.2	47.9	0.163
	< 70%	98.0	65.7	0.080
肿瘤大小 /cm	≥ 7.5	80.0	16.7	0.124
	< 7.5	78.9	61.5	0.099
双表达	有	51.9	12.5	0.695
	无	81.8	77.1	0.054

DLBCL 患者经标准一线 R-CHOP 方案化疗后存在部分复发难治，虽有挽救治疗方案，如后线化疗方案、靶向药物联合化疗、程序性死亡受体 -1（programmed death-1，PD-1）抑制剂等，但效果均不太理想 [9]。基于 DLBCL 存在着高异质性、易复发进展等特点 [10]，为进一步减少肿瘤复发进展，可选用非细胞毒性药物方案对化疗后达到 CR 的 DLBCL 患者进行巩固治疗。但真实世界的研究结果却不尽如人意，多项研究证实应用利妥昔单抗、来那度胺或靶向药物对 DLBCL 患者进行巩固治疗并不能明显改善患者的预后 [11-12]；亦有

研究表明应用 PD-1 抑制剂对 DLBCL 患者进行巩固治疗仅在中高危、non-GCB 型 DLBCL 患者时表现出潜在的优势，但不能改善患者的 OS[13]；且目前 PD-1 抑制剂应用于 DLBCL 巩固治疗尚处于初始阶段，无标准治疗方案。目前急需为化疗后获得 CR 的 DLBCL 患者寻找有效的巩固治疗方案，以提高患者的生存及预后。

Auto-HSCT 为在疾病缓解期采集自身的造血干细胞，经预处理后回输入患者体内的一种治疗方法，其能重建患者的免疫功能及造血功能，进一步杀死肿瘤细胞，提高疾病的治疗效果 [14]。因 Auto-HSCT 具有快速恢复免疫功能及造血功能、移植并发症少、安全有效、经济等特点，近年来 Auto-HSCT 已被广泛应用于 DLBCL 的治疗，尤其是 Auto-HSCT 在 DLBCL 患者巩固治疗已成为研究的热点。有研究证实 Auto-HSCT 无论在 DLBCL 患者巩固治疗，还是挽救复发治疗，均获得了较好的疗效 [5, 15]。Kim 等 [16] 分析了 Auto-HSCT 应用于高危 DLBCL 患者的疗效，将高危 DLBCL 患者分为移植组（$n = 81$）及非移植组（$n = 138$），分析结果提示移植组的 PFS 率与 OS 率均显著优于非移植组（76.6% *vs* 63.3 %，$P = 0.007$；85% *vs* 75.8%，$P = 0.038$），进一步肯定了 Auto-HSCT 治疗 DLBCL 的疗效。Yoon 等 [17] 的随机对照研究显示，把 58 例中高危、一线 R-CHOP 方案化疗 6 周期达到 CR 的 DLBCL 患者随机分为两组，治疗组接受 Auto-HSCT 巩固治疗，对照组不接受 Auto-HSCT 巩固治疗，结果提示治疗组的 PFS 率明显较对照组延长（66% *vs* 39%，$P = 0.004$）。周佳思等 [6] 回顾性分析了 40 例初治中高危 DLBCL 患者的临床资料，所有患者接受 6 周期 R-CHOP 方案化疗均达到 SD，把序贯 Auto-HSCT 治疗的为移植组（$n = 24$），不序贯 Auto-HSCT 治疗的为对照组（$n = 16$），结果显示移植组预计 3 年的 PFS 率与 OS 率均高于对照组（78.8% *vs* 38%，85.7% *vs* 50%，均 $P < 0.05$）。本研究回顾性分析既往经过 R-CHOP 方案化疗后达到 CR 的初治中高危 DLBCL 患者，结果显示移植组 2 年 RFS 率优于对照组（79.1% *vs* 54.7%，$P = 0.039$），移植组获益。虽然上述研究及本研究均提示对于初治中高危 DLBCL 的患者经过 R-CHOP 方案化疗后序贯 Auto-HSCT 巩固治疗能使 PFS 或 OS 获益，但均为小样本回顾性分析报告。然而，一项来自 Schmitz 等 [18] 的前瞻性临床研究，随机把年轻、中高危的侵袭性 B 细胞非霍奇金淋巴瘤（non-Hodgkin’s lymphoma，NHL）患者分为 R-CHOEP-14 组及 R-MegaCHOEP 序贯 Auto-HSCT 组，比较两组的临床疗效，结果提示两组 3 年的 PFS 率差异无统计学意义（61.4% *vs* 69.5%，$P = 0.14$）。此研究对 Auto-HSCT 作为侵袭性 B 细胞 NHL 患者巩固治疗提出了质疑，因此，未来需更多的大规模前瞻性研究评估 Auto-HSCT 在中高危 DLBCL 患者巩固治疗中的地位。

本研究亚组分析显示，对于存在 non-GCB 型预后不良因素的 DLBCL 患者，化疗后序贯 Auto-HSCT 巩固治疗更能改善 2 年的 RFS（81.8% *vs* 51.7%，$P = 0.021$）。考虑可能原因为 non-GCB 型患者肿瘤细胞内信息传导通路被抑制，导致肿瘤细胞的凋亡受阻，不利于病情的转归 [19]。进一步表明 non-GCB 型是患者独立的预后不良因素。廖已函等 [20] 对 80 例 DLBCL 患者进行回顾性分析，单因素分析结果亦显示 non-GCB 型患者为影响预后的独立危险因素。因此认为，伴有 non-GCB 型预后不良因素的 DLBCL 患者较 GCB 型患者更容易出现复发难治，也可能是序贯 Auto-HSCT 巩固治疗更容易获益的人群。另外，Kim 等 [21] 分析了预处理方案采用 BEAM 方案或 BUCY 方案的 65 例接受 Auto-HSCT 的非霍奇金淋巴瘤患者，结果表明 BEAM 方案与 BUCY 方案的生存结果相似。本研究对预处理方案分别采用 BEAM 方案或 BUCY 方案的 25 例移植组患者进行 RFS、OS 分析，结果提示 2 年 RFS 率、OS 率差异均无统计意义，提示两种预处理方案无明显差别，疗效相当。与上述的研究结果亦相符。

Auto-HSCT 治疗 DLBCL 患者的疗效确切，安全性相对较好。多项研究提示 Auto-HSCT 的主要不良反应为Ⅲ～Ⅳ级骨髓抑制、胃肠道反应、肝功能损伤等，予对症治疗后均好转 [15, 22]。本研究所有移植患者均未发现移植相关死亡，主要不良反应为粒细胞缺乏伴发热，部分出现了肺部感染、败血症、胃肠道反应及其他Ⅰ～Ⅱ级比较轻微的反应，经对症治疗后均痊愈。安全数据与上述研究安全数据相符，进一步提示序贯 Auto-HSCT 巩固治疗为安全可控的。本研究总体不良反应发生率较低、程度较轻，考虑与样本量偏少有关。

本研究存在的局限性：① MYC、Bcl-2 和 / 或 Bcl-6 重排为影响预后的不良因素 [23-24]，本研究未能把此类 DLBCL 患者纳入分析，而这个预后不良因素可能会影响 RFS、OS 的分析结果；② 单因素分析提示两组的 non-GCB 型患者 2 年的 RFS 对比差异有统计学意义，但未能进一步运用 COX 比例风险回归模型校正混杂因素，而这因素亦可能会影响 RFS、OS 的分析结果；③ 本研究

为小样本单中心回顾性分析，虽两组患者的基线水平相当，但因样本量小，随访时间过短，最终分析的 OS 无明显差异。后续需开展更多的大样本、多中心前瞻性研究以进一步探讨该方案的疗效及安全性。

参考文献

[1] Bachanova V，Sarhan D，Defor TE，et al. Haploidentical natural killer cells induce remissions in non-Hodgkin lymphoma patients with low levels of immune-suppressor cells [J]. Cancer Immunol Immunnother，2018，67（3）：483-494.

[2] Perry AM，Diebold J，Nathwani BN，et al. Non-Hodgkin lymphoma in the developing world：review of 4539 cases from the International non-hodgkin lymphoma classification project [J]. Haematologica，2016，101（10）：1244-1250.

[3] Coiffier B，Sarkozy C. Diffuse large B-cell lymphoma：R-CHOP failure-what to do? [J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program，2016，2016（1）：366-378.

[4] Aziz B，Nazar T，Akhlaq S. The frequency of occurrence of hepatocellular carcinoma after direct antiviral therapy in hepatitis C virus patients [J]. Pak J Med Sci，2019，35（1）：101-105.

[5] Al-Mansour Z，Li H，Cook JR，et al. Autologous transplantation as consolidation for high risk aggressive T-cell non-Hodgkin lymphoma：a SWOG 9704 intergroup trial subgroup analysis [J]. Leuk Lymphoma，2019，60（8）：1934-1941.

[6] 周佳思，陆滢 . RCHOP 方案化疗序贯自体造血干细胞移植治疗中高危弥漫大 B 细胞淋巴瘤的疗效分析 [J]. 现代实用医学，2020，32（3）：364-366，376，封 3.

[7] 中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会，中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组，中国临床肿瘤学会抗淋巴瘤联盟 . 造血干细胞移植治疗淋巴瘤中国专家共识（2018 版）[J]. 中华肿瘤杂志，2018，40（12）：927-934.

[8] Cheson BD，Fisher RI，Barrington SF，et al. Recommendations for initial evaluation，staging，and response assessment of hodgkin and non-hodgkin lymphoma：the Lugano classification [J]. Clin Oncol，2014，32（27）：3059-3068.

[9] Thuresson PO，Vander VN，Gupta P，et al. A systematic review of the clinical efficacy of treatments in relapsed or refractory diffuse large B cell lymphoma [J]. Adv Ther，2020，37（12）：4877-4893.

[10] Perry，Anamarija M，Diebold，et al. Non-hodgkin lymphoma in the developing world：review of 4539 cases from the international non-hodgkin lymphoma classification project [J]. Haematologica，2016，101（10）：1244-1250.

[11] Thieblemont C，Tilly H，Gomes Da SM，et al. Lenalidomide maintenance compared with placebo in responding elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with first-line rituximab plus cyclophosphamide，doxorubicin，vincristine，and prednisone [J]. J Clin Oncol，2017，35（22）：2473-2481.

[12] Mondello P，Mian M. Frontline treatment of diffuse large B-cell lymphoma：beyond R-CHOP [J]. Hematol Oncol，2019，37（4）：333-344.

[13] 刘玄勇，郭智，谢晶，等 . PD-1 抑制剂在弥漫大 B 细胞淋巴瘤维持治疗中的作用：单中心回顾性病例对照研究 [J]. 中国癌症防治杂志，2021，13（4）：359-364.

[14] 曹琳琳，丁凯阳，宋浩，等 . 自体造血干细胞移植治疗恶性淋巴瘤的疗效及影响因素 [J]. 中国组织工程研究，2021，25（13）：1993-1998.

[15] 范丹，刘强，肖方，等 . 自体造血干细胞移植治疗弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者的疗效分析 [J]. 中国实验血液学杂，2021，29（4）：1163-1168.

[16] Kim Y R，Kim S J，Cheong J W，et al. The different roles of molecular classification according to upfront autologous stem cell transplantation in advanced-stage diffuse large B cell lymphoma patients with elevated serum lactate dehydrogenase [J]. Ann Hematol，2016，95（9）：1491-1501.

[17] Yoon JH，Kim JW，Jeon YW，et al. Role of frontline autologous stem cell transplantation in young，high-risk diffuse large B-celllymphoma patients. Korean [J]. Intern Med，2015，30（3）：362-371.

[18] Schmitz N，Nickelsen M，Ziepell M，el al. Conventional chemotherapy（CHOEP-14）withfituximaborhigh-dose chemotherapy（MegaCHOEP）with rituximab for young，high-risk patients with aggressive B-cell lymphoma：flu open-label，randomised，phase 3 trial（DSHNHL 2002-1）[J]. Lancet Oncol，2012，13（12）：1250-1259.

[19] 韩颖，秦燕，何小慧，等 . 370 例晚期弥漫大 B 细胞淋巴瘤的临床特征和预后分析 [J]. 中华肿瘤杂志，2018，40（6）：456-461.

[20] 廖已函，王星月，魏小红，等 . 弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者的预后及其影响因素 [J]. 实用癌症杂志，2020，35（8）：1386-1389.

[21] Kim JE，Lee DH，Yoo C，et al. BEAM or BuCyE high-dose chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in non-Hodgkin’s lymphoma patients：a single center comparative analysis of efficacy and toxicity [J]. Leuk Res，2011，35（2）：183-187.

[22] 伍艳兰，刘利，黄斯勇，等 . 自体造血干细胞移植治疗 B 细胞淋巴瘤的临床研究 [J]. 国际输血及血液学杂志，2017，40（6）：468-475.

[23] Petrich AM，Nabhan C，Smith SM. MYC-associated and dou-ble-hit lymphomas：a review of pathobiolog，prognosis，and ther-apeutic approaches [J]. Cancer，2014，120（24）：3884-3895.

[24] 钟幸，余娜莎，刘志良，等 .“双表达”与”双打击”淋巴瘤临床特征、生存及预后因素分析 [J]. 实用癌症杂志，2022，37（1）：150-153.

（收稿日期：2022-02-28；修回日期：2022-04-15）

苯达莫司汀治疗边缘区淋巴瘤的单中心回顾性研究

蓝晓凤[1, 2]，贤晓敏[1, 2]，刘玄勇[1, 2]，陈丽萍[1, 2]，王月乔[2]，王强[1]，郭智[1, 2*]（1.武汉科技大学医学院，武汉　430065；2. 国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院深圳医院，深圳　518116）

摘要：目的　探讨苯达莫司汀治疗边缘区淋巴瘤的有效性及安全性。**方法**　收集 2020 年 6 月至 2021 年 12 月在我院接受苯达莫司汀为基础治疗方案的边缘区淋巴瘤患者的临床信息，共 29 例。回顾性分析苯达莫司汀为基础治疗方案在初治及复发难治边缘区淋巴瘤的客观缓解率（ORR）、安全性及相关预后因素。**结果**　29 例边缘区淋巴瘤患者接受苯达莫司汀为基础方案治疗，完全缓解（CR/CRu）14 例（48.3%），部分缓解（PR）10 例（34.5%），疾病稳定（SD）5 例（17.2%），疾病进展（PD）0 例，ORR 为 82.8%，初治患者客观缓解率为 94.7%，复发难治患者客观缓解率为 60.0%，接受苯达莫司汀单药治疗（6 例）患者 ORR 达 66.7%；接受苯达莫司汀联合利妥昔单抗治疗（23 例）患者 ORR 达 87.0%。各亚组间的 ORR 差异有统计学意义（$P < 0.05$），主要与年龄（< 70 岁、≥ 70 岁）、治疗线数（初治、复发难治）有关。不良反应主要为骨髓抑制和胃肠道反应，均可控。**结论**　苯达莫司汀为基础治疗方案在边缘区淋巴瘤患者中疗效佳，且不良反应可控，可以作为初治及复发难治边缘区淋巴瘤的选择。

关键词：苯达莫司汀；边缘区淋巴瘤；疗效；安全性
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1510-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.006

Efficacy and safety of bendamustine for patients with marginal zone lymphoma: a single center retrospective study

LAN Xiao-feng[1, 2], XIAN Xiao-min[1, 2], LIU Xuan-yong[1, 2], CHEN Li-ping[1, 2], WANG Yue-qiao[2], WANG Qiang[1], GUO Zhi[1, 2*] (1. *College of Medical*, *Wuhan University of Science and Technology*, *Wuhan* 430065; 2. *National Cancer Center/ National Clinical Research Cancer for Cancer/ Cancer Hospital & Shenzhen Hospital*, *Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College*, *Shenzhen Guangdong* 518116)

Abstract: Objective To determine the efficacy and safety of bendamustine for patients with marginal zone lymphoma (MZL). **Methods** The clinical data of 29 MZL patients treated with bendamustine in our hospital from June 2020 to December 2021 were collected. The overall objective response rate (ORR), disease control rate (DCR), safety and related prognostic factors of bendamustine-based were treatment regimens analyzed retrospectively. **Results** Among the 29 MZL patients, 14 (48.3%) showed complete response (CR/CRu), 10 (34.5%) partial response (PR), 5 (17.2%) stable response (SD), and none had progressive response (PD). The ORR was 82.8%. The ORR of newly treated patients was 94.7%, and that of refractory patients was 60.0%. The ORR of 6 patients receiving bendamustine alone was 66.7%, while the ORR of 23 patients receiving bendamustine combined with rituximab reached 87.0%. The difference in ORR among subgroups was significantly related to age (< 70 years old, ≥ 70 years old) and the number of treatments (initial treatment, recurrence and refractory treatment) ($P < 0.05$). The main adverse reactions included bone marrow suppression and gastrointestinal reaction, which were all controllable. **Conclusion** Bendamustine-based treatment has

基金项目：吴阶平医学基金项目（No. 32067502020-10-17）。
作者简介：蓝晓凤，女，主治医师，主要从事肿瘤诊治工作，email：407168565@qq.com　*通信作者：郭智，男，主任医师，主要从事血液肿瘤方向及造血干细胞移植工作，email：guozhi77@126.com

good efficacy and controllable adverse reactions in MZL patients, which can be an option for initial and recurrent refractory MZL.

Key words: bendamustine; marginal zone lymphoma; efficacy; safety

边缘区淋巴瘤（marginal zone lymphoma，MZL）是一种惰性B细胞淋巴瘤，起源于淋巴结和其他淋巴组织中的边缘区B细胞[1-2]。根据MZL中引发疾病的B细胞的位置不同，世界卫生组织（WHO）将其分为3种亚型，分别为脾脏边缘区淋巴瘤（SMZL）、黏膜相关淋巴样组织边缘区淋巴瘤（MALT）和淋巴结边缘区淋巴瘤（NMZL）[3-4]。其中，最常见的是MALT，占MZL的70%，而SMZL和NMZL各占MZL的20%和10%[5]。MZL是常见的B细胞非霍奇金淋巴瘤（non-Hodgkin's lymphoma，NHL），占成人NHL的8%～15%[6]，MZL的发病率也随年龄呈指数增长[7-8]。此外，MZL临床表现广泛，发展缓慢，但常常复发，无法治愈，部分可转变为侵袭性淋巴瘤[9-10]。因此，寻找一种疗效好、毒副作用低并可获得较长缓解期和可耐受的治疗方案尤为重要。苯达莫司汀是一种氮芥衍生物，兼具烷化剂和抗代谢双重功能[11]。2008年美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）批准了苯达莫司汀在慢性淋巴细胞白血病以及惰性B细胞NHL治疗中的应用[12]。随着临床治疗经验的增加，苯达莫司汀逐渐被应用于淋巴增生性疾病的临床治疗。然而该药在国内上市时间较短[13]，其用于MZL治疗的有效性和安全性尚未有多中心、大规模的临床数据和经验支持。本文就苯达莫司汀在MZL治疗的有效性及安全性进行观察和评价，为该药用于MZL的临床治疗提供数据。

1　材料与方法

1.1　临床资料

共纳入2020年6月至2021年12月中国医学科学院北京协和医院肿瘤医院深圳医院血液淋巴瘤科应用苯达莫司汀单药或联合利妥昔单抗治疗的29例MZL患者进行回顾性分析，其中男性14例，女性15例；中位年龄57岁（年龄35～84岁）；≥70岁11例，＜70岁18例；根据Ann Arbor临床分期标准，Ⅰ/Ⅱ期10例，Ⅲ/Ⅳ期19例；其中结外边缘区淋巴瘤21例（眼眶8例/胃肠6例/腮腺4例/鼻咽2例/舌根1例），结内边缘区淋巴瘤8例；初治19例，复发难治10例；有大包块4例，没有大包块25例；IPI评分≥3分11例，＜3分18例；乳酸脱氢酶（LDH）正常16例，高于正常13例；有B症状（不明原因体质量下降10%，发热38 ℃，盗汗）4例，没有B症状25例；骨髓累及8例，不累及21例；接受苯达莫司汀单药治疗6例，联合利妥昔单抗治疗23例。

纳入标准：① 病理诊断明确的MZL，至少有1个可测量的病灶，符合RECIST1.1标准；② 患者的临床资料、疾病特点、治疗方式等相关资料能够在该院病历查询系统、影像及检验查询系统得到详细记录；③ 患者年龄≥18岁；④ 为初治或复发难治MZL，接受苯达莫司汀单药或联合利妥昔单抗治疗；⑤ 全身功能状态评分（ECOG）≤2；⑥ 每例患者至少完成2个周期化疗，至少有1次疗效评估。

排除标准：① 合并其他恶性肿瘤病史；② 有肝、肾或其他器官功能性障碍；③ 伴有精神性疾病；④ 处于妊娠期或哺乳期；⑤ 乙肝病毒DNA定量大于2000 IU·mL^{-1}；⑥ 病历资料不全和随访不到者。

1.2　治疗方案

6例患者接受苯达莫司汀单药治疗，24例患者接受苯达莫司汀联合利妥昔单抗治疗，苯达莫司汀具体剂量为90 mg·m^{-2}，第1、2日使用，利妥昔单抗剂量为375 mg·m^{-2}，第0日使用，每28日为1个周期。治疗期间监测血常规、肝肾功能和消化道反应等。每2个周期后评估疗效，若治疗有效可继续用药达6～8个周期，如治疗无效或毒性不能耐受则按NCCN或CSCO指南更换相应的后线治疗方案。

1.3　疗效及不良反应评价

每2个周期治疗结束后行增强CT或PET-CT扫描，参照非霍奇金淋巴瘤疗效评价标准，分为完全缓解（CR）、未确定的完全缓解（CRu）、部分缓解（PR）、疾病稳定（SD）和疾病进展（PD）；以客观缓解率（ORR、CR/CRu＋PR）作为评价近期疗效的主要指标。采用电话或门诊随访，随访截止至2022年2月28日；无进展生存期（PFS）定义为从苯达莫司汀治疗开始至PD或任何原因导致的死亡；缓解持续时间（DOR）

定义为苯达莫司汀治疗达到 PR 或 CR/CRu 至客观证据证实疾病进展的时间；评价为 CR/CRu、PR、SD 的患者还需要经 4 周后的疗效确认，以后每 2 个月随访 1 次，并行相关检查。不良反应分级参照美国国立癌症研究所制订的通用不良反应术语标准（CTC-AE）5.0 版本。

1.4　统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计软件对研究数据进行统计处理。计数资料采用频数进行统计描述，非正态分布的资料以中位数表示，率的比较采用卡方检验，$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　近期疗效

29 例患者共计治疗 120 个周期，中位疗程为 5 个周期。治疗 2 ～ 4 周期后均可评价，其中 CR/CRu 14 例（48.3%），PR 10 例（34.5%），SD 5 例（17.2%），PD 0 例，总客观缓解率（ORR）为 82.8%。卡方检验分析近期疗效与年龄（＜ 70 岁、≥ 70 岁）、治疗线数（初治、复发难治）相关（$P < 0.05$），见表 1。

表 1　29 例边缘区淋巴瘤患者的临床特征与疗效分析

Tab 1　Clinical characteristics and efficacy of 29 MZL patients

	特征	*n*（%）	CR/CRu[*n*（%）]	PR[*n*（%）]	SD	PD	ORR[*n*（%）]	*P*
总体		29	14（48.3）	10（34.5）	5	0	24（82.8）	
性别	男	14（48.3）	6（42.9）	6（42.9）	2	0	12（85.7）	0.684
	女	15（51.7）	8（53.3）	4（26.7）	3	0	12（80.0）	
年龄 / 岁	≥ 70	11（37.9）	4（36.4）	2（18.2）	5	0	6（54.5）	0.002
	＜ 70	18（62.1）	10（55.6）	8（44.4）	0	0	18（100）	
分期	Ⅰ～Ⅱ	10（34.5）	8（80.0）	0	2	0	8（80.0）	0.775
	Ⅲ～Ⅳ	19（65.5）	6（31.6）	10（52.6）	3	0	16（84.2）	
骨髓累及	累及	8（27.6）	2（25.0）	4（50.0）	2	0	6（75.0）	0.495
	不累及	21（72.4）	12（57.1）	6（28.6）	4	0	18（85.7）	
B 症状	有	4（13.8）	2（50.0）	0	2	0	2（50.0）	0.658
	没有	25（92.6）	14（56.0）	9（36.0）	4	0	23（92.0）	
LDH	正常	16（44.4）	10（62.5）	6（0.375）	0	0	16（100）	0.917
	高于正常	13（55.6）	4（30.8）	4（30.8）	5	0	8（61.5）	
IPI 评分	≥ 3	11（22.2）	6（54.5）	2（18.2）	3	0	8（72.7）	0.264
	＜ 3	18（77.8）	8（44.4）	8（44.4）	2	0	16（88.9）	
肿瘤大小 /cm	≥ 7.5	4（14.8）	2（50.0）	0	2	0	2（50.0）	0.620
	＜ 7.5	25（86.2）	12（48.0）	10（40.0）	3	0	22（88.0）	
Ki-67	≥ 30%	13（44.8）	6（46.2）	4（30.8）	3	0	10（76.9）	0.453
	＜ 30%	16（55.2）	8（50.0）	6（37.5）	2	0	14（87.5）	
方案	单药	6（20.7）	0	4（66.7）	2	0	4（66.7）	0.241
	BR	23（79.3）	14（60.9）	6（26.1）	3	0	20（87.0）	
分型	结外 MZL	21（72.4）	10（47.6）	6（28.6）	5	0	16（76.2）	0.129
	结内 MZL	8（27.6）	4（50.0）	4（50.0）	0	0	8（100）	
治疗线数	初治	19（65.5）	12（63.2）	6（31.6）	1	0	18（94.8）	0.019
	复发难治	10（34.5）	2（20.0）	4（40.0）	4	0	6（60.0）	

2.2　随访结果

随访截至 2022 年 2 月 28 日，29 例患者中位随访时间为 12 个月（3 ～ 20 个月），由于随访时间较短，仅 2 例出现 PFS 终点事件（均为 PD），PFS 和 OS 结果未成熟。

2.3　不良反应

29 例患者主要不良反应为骨髓抑制和胃肠道反应。最常见骨髓抑制为中性粒细胞减少（44.8%）、白细胞减少（37.9%）、血小板减少（34.5%）、贫血（6.9%）；胃肠道反应（26.7%）以恶心、呕吐、食欲下降为主，均为 1、2 级；其他为皮疹（3.4%）。3/4 级不良反应为中性粒细胞减少（20.7%）、白细胞减少（6.9%），未出现 3/4 级非血液学毒性，详见表 2。

3　讨论

MZL 分型较多且具有不同的临床和病理学特征，病程进展慢，易复发，危害患者的生命安全。常规治疗方案效果有限，甚至有些治疗药物容易出现耐药，给临床用药和治疗增加了极大的难度。

表 2　苯达莫司汀治疗 MZL 不良反应分析

Tab 2　Adverse reactions of bendamostine for MZL

不良反应	1 级	2 级	3 级	≥ 4 级	总数 [*n*（%）]
白细胞减少	3	6	2	0	11（37.9%）
中性粒细胞减少	3	4	4	2	13（44.8%）
血小板减少	4	0	4	2	10（34.5%）
贫血	2	0	0	0	2（6.9%）
恶心	2	1	0	0	3（10.3%）
呕吐	2	0	0	0	2（6.9%）
食欲下降	2	1	0	0	3（10.3%）
皮疹	1	0	0	0	1（3.4%）

苯达莫司汀化学名为 4-[5-[双（2- 氯乙基）氨基]-1- 甲基苯并咪唑 -2- 基] 丁酸盐，它独特的结构使其兼具了烷化剂和抗代谢双重功能。苯达莫司汀主要作用机制有以下四个方面：第一，通过氮芥与其衍生物作用形成亲电子基，这些电子基团形成共价键和富电子的亲核基，使得 DNA 单双链交联，最终干扰 DNA 的合成，阻碍其功能发挥；第二，通过诱导类似 DNA 碱基切除修复的独特机制，最终达到作用目的；第三，从多方面诱导细胞凋亡；第四，通过抑制细胞有丝分裂调控细胞周期点，导致有丝分裂紊乱 [14-16]。国外已有临床研究提示苯达莫司汀可用于血液系统肿瘤的治疗，并证实了其在慢性淋巴细胞白血病、霍奇金淋巴瘤、NHL 和乳腺癌等多种恶性肿瘤治疗中的疗效 [17-18]。然而该药在国内上市时间还不长，尚需要更多的临床研究数据来证实其对国内人群的有效性和安全性。

本研究中纳入 29 例以苯达莫司汀单药或苯达莫司汀联合利妥昔单抗的 MZL 患者，共计治疗 120 个周期，中位疗程 5 个周期，治疗 2 个周期以上的患者均纳入统计分析。结果显示 CR/CRu 占比 48.3%，PR 占比 34.5%，SD 占比 17.2%，PD 为 0，相较于国内较早期报道的临床研究结果 CR 为 24%，PR 为 52%，SD 为 12%，PD 为 12%，CR 率、ORR 更高 [19]；其次，本研究的 ORR 为 86.21%，相较于 Salar 等 [20] 的研究结果（ORR 为 100%，CR 为 98%）略低，可能是因为两个研究对于最终纳入统计分析的患者临床基线等不尽相同；也可能是纳入本研究样本量少产生的偏差；但本研究结果与 Morigi 等 [21] 报道的一项单中心回顾性研究结果（65 例，其 ORR 为 89.2%）以及王亚文等 [22] 报道的同类型研究结果（ORR 为 90.0%，CR 为 60.0%）接近，提示苯达莫司汀用于 MZL 治疗的有效性。BRIGHT 研究是一项Ⅲ期的开放标签的非劣研究，研究对比了苯达莫司汀联合利妥昔单抗（BR）与 R-CHOP 或 R-CVP 标准治疗初治惰性非霍奇金淋巴瘤（iNHL）或套细胞淋巴瘤的安全性及有效性，初步研究结果显示，一线使用 BR 方案所取得的 CR 率并不低于 R-CHOP/R-CVP（31% *vs* 25%），安全性不亚于标准治疗 [23]。BRIGHT 研究的长期随访显示，BR 组的 PFS、EFS 和 DOR 显著优于 R-CHOP/R-CVP 组，OS 无显著差异，安全性结果与之前报道的一致 [24]。本研究初治和复发难治 MZL 患者 CR 率达 63.2% 和 20%，初治患者取得明显高于 BRIGHT 研究的 CR 率，复发难治患者亦取得不错的 CR 率。同时，本研究观察到苯达莫司汀对不同年龄分组（年龄＜ 70 岁、≥ 70 岁）、治疗线数（初治、复发难治）患者的疗效差异有统计学意义，后续可考虑入组更多病例，设置对照组，增加随访时间进行验证。本研究随访时间较短，PFS 和 OS 结果未成熟，故本次未纳入统计。

本次 29 例患者主要不良反应为骨髓抑制和胃肠道反应。其中 16 例出现骨髓抑制（55.2%）；8 例患者出现胃肠道反应（27.60%），1 例患者出现皮疹（3.4%），3/4 级不良反应主要为中性粒细胞减少（20.7%）、白细胞减少（6.9%），未出现 3/4 级非血液学毒性，与其他同类型研究一致 [25]，提示不良反应可控。

本研究通过对 29 例以苯达莫司汀为基础治疗方案的 MZL 患者临床数据进行统计分析，结果提示该药用于 MZL 的疗效佳、不良反应可控、安全性高，可以作为初治及复发难治 MZL 的选择。但由于本研究样本量小，存在一定的局限性，需要更多的大样本随机对照研究进行验证。

参考文献

[1] Rossi D，Bertoni F，Zucca E. Marginal zone lymphomas [J]. N Engl J Med，2022，386（6）：568-581.

[2] Singh R，Shaik S，Negi BS，et al. Non-Hodgkin’s lymphoma：a review [J]. J Family Med Prim Care，2020，9（4）：1834-1840.

[3] Swerdlow SH，Campo E，Pileri SA，et al. The 2016 revision of the world health organization classification of lymphoid neoplasms [J]. Blood，2016，127（20）：2375-2390.

[4] Cheah CY，Zucca E，Rossi D，et al. Marginal zone lymphoma：present status and future perspectives [J]. Haematologica，2022，107（1）：35-43.

[5] Nakamura S，Ponzoni M. Marginal zone B-cell lymphoma：lessons from western and eastern diagnostic approaches [J]. Pathology，2020，52（1）：15-29.

[6] 皇荣，范磊 . 边缘区淋巴瘤的诊断和治疗进展 [J]. 临床荟萃，2017，32（12）：1013-1016.
[7] Cerhan JR，Habermann TM. Epidemiology of marginal zone lymphoma [J]. Ann Lymphoma，2021，doi：10.21037/aol-20-28.
[8] Liu W，Liu J，Song Y，et al. Burden of lymphoma in China，2006-2016：an analysis of the global burden of disease study 2016 [J]. J Hematol Oncol，2019，12（1）：115.
[9] Lunning MA，Vose JM. Management of indolent lymphoma：where are we now and where are we going [J]. Blood Rev，2012，26（6）：279-288.
[10] Montoto S，Fitzgibbon J. Transformation of indolent B-cell lymphomas [J]. J Clin Oncol，2011，29（14）：1827-1834.
[11] Bogeljic PM，Milunovic V，Misura JK，et al. Bendamustine：an old drug in the new era for patients with non-Hodgkin lymphomas and chronic lymphocytic leukemia [J]. Acta Clin Croat，2018，57（3）：542-553.
[12] Hoy SM. Bendamustine：a review of its use in the management of chronic lymphocytic leukaemia，rituximab-refractory indolent non-Hodgkin’s lymphoma and multiple myeloma [J]. Drugs，2012，72（14）：1929-1950.
[13] 苯达莫司汀治疗淋巴瘤中国专家共识（2020 年版）[J]. 白血病 • 淋巴瘤，2020（1）：1-2.
[14] Beeharry N，Rattner JB，Bellacosa A，et al. Dose dependent effects on cell cycle checkpoints and DNA repair by bendamustine [J]. PLoS One，2012，7（6）：e40342.
[15] Leoni LM，Bailey B，Reifert J，et al. Bendamustine（Treanda）displays a distinct pattern of cytotoxicity and unique mechanistic features compared with other alkylating agents [J]. Clin Cancer Res，2008，14（1）：309-317.
[16] Leoni LM，Hartley JA. Mechanism of action：the unique pattern of bendamustine-induced cytotoxicity [J]. Semin Hematol，2011，48（Suppl 1）：S12-S23.
[17] Gil L，Kazmierczak M，Kroll-Balcerzak R，et al. Bendamustine-based therapy as first-line treatment for non-Hodgkin lymphoma [J]. Med Oncol，2014，31（5）：944.
[18] Knauf WU，Lissitchkov T，Aldaoud A，et al. Bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia：updated results of a randomized phase iii trial [J]. Br J Haematol，2012，159（1）：67-77.
[19] 闵琦，王华庆，钱正子，等 . 注射用盐酸苯达莫司汀单药治疗利妥昔单抗耐药的 B 细胞惰性淋巴瘤 [J]. 中国肿瘤临床，2014，41（19）：1239-1243.
[20] Salar A，Domingo-Domenech E，Panizo C，et al. First-line response-adapted treatment with the combination of bendamustine and rituximab in patients with mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma（Malt2008-01）：a multicentre，single-arm，phase 2 trial [J]. Lancet Haematol，2014，1（3）：e104-e111.
[21] Morigi A，Argnani L，Lolli G，et al. Bendamustine-rituximab regimen in untreated indolent marginal zone lymphoma：Experience on 65 patients [J]. Hematol Oncol，2020，38（4）：487-492.
[22] 王亚文，徐佳岱，孜古丽 • 麦合麦提，等 . 苯达莫司汀联合利妥昔单抗治疗初治边缘区 B 细胞淋巴瘤的疗效和安全性研究：一项基于倾向性评分匹配的多中心回顾性研究 [J]. 临床血液学杂志，2022，35（1）：35-40.
[23] Flinn IW，van der Jagt R，Kahl BS，et al. Randomized trial of bendamustine-rituximab or R-CHOP/R-CVP in first-line treatment of indolent NHL or MCL：the BRIGHT study [J]. Blood，2014，123（19）：2944-2952.
[24] Flinn IW，van der Jagt R，Kahl B，et al. First-line treatment of patients with indolent non-Hodgkin lymphoma or mantle-cell lymphoma with bendamustine plus rituximab versus R-Chop Or R-Cvp：results of the bright 5-year follow-up study [J]. J Clin Oncol，2019，37（12）：984-991.
[25] 宋腾，张会来，王华庆，等 . 盐酸苯达莫司汀治疗利妥昔单抗耐药的 B 细胞惰性淋巴瘤多中心Ⅲ期临床研究 [J]. 中国肿瘤临床，2015，42（20）：1025-1030.

（收稿日期：2022-02-28；修回日期：2022-04-15）

R-CDOP 方案在初治弥漫大 B 细胞淋巴瘤的疗效分析

陈丽萍[1, 2]，刘玄勇[1, 2]，贤晓敏[1, 2]，谢晶[1, 2]，蓝晓凤[1, 2]，庄佳玲[1, 2]，王月乔[2]，王强[1]，郭智[1, 2*]
（1. 武汉科技大学医学院，武汉　430065；2. 国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院深圳医院，广东　深圳　518116）

摘要：目的　评价 R-CDOP 方案（利妥昔单抗＋环磷酰胺＋聚乙二醇脂质体阿霉素＋长春新碱＋泼尼松）在初治弥漫大 B 细胞淋巴瘤（DLBCL）中的有效性及安全性。**方法**　回顾性分析某院血液肿瘤科于 2018 年 1 月至 2021 年 12 月收治的 111 例初治的 DLBCL 患者的临床资料，中位年龄 52 岁（21 ～ 80 岁），R-CDOP 方案化疗（R-CDOP 组）80 例，同期使用 R-CHOP 方案（利妥昔单抗＋环磷酰胺＋吡柔比星＋长春新碱＋泼尼松）化疗（R-CHOP 组）31 例，主要研究终点是客观缓解率、无进展生存时间；次要研究终点是一般不良反应以及心脏毒性。**结果**　R-CDOP 组和 R-CHOP 组患者的客观缓解率分别为 92.5% 和 83.9%（$P = 0.312$）；R-CDOP 组和 R-CHOP 组患者的中位无进展生存时间分别为 36 个月和 24 个月（$P = 0.111$）；但亚组分析显示在 IPI 评分≥ 3 分、肿块≥ 7.5 cm 的患者中，R-CDOP 组较 R-CHOP 组可看到一定的疗效优势，中位无进展生存时间分别为 30.6 个月和 16.0 个月（$P = 0.039$）、33.7 个月和 11.5 个月（$P = 0.027$）。主要毒副反应（血液毒性、胃肠道反应、肝功能损伤）两组相近；心脏毒性的发生率 R-CDOP 组较 R-CHOP 组更少（17.5% *vs* 48.3%，$P < 0.001$）。**结论**　在总体 DLBCL 人群中，R-CDOP 方案与 R-CHOP 方案疗效相当，但在心脏毒性方面前者安全性更高。同时，对于 IPI 评分≥ 3 分、大包块的 DLBCL 患者，R-CDOP 方案也显示出了一定的无进展生存时间获益优势。

关键词：聚乙二醇脂质体阿霉素；弥漫大 B 细胞淋巴瘤；无进展生存时间；心脏毒性
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1515-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.007

Therapeutic efficacy of R-CDOP regimen for diffusive large B-cell lymphoma

CHEN Li-ping[1, 2], LIU Xuan-yong[1, 2], XIAN Xiao-min[1, 2], XIE Jing[1, 2], LAN Xiao-feng[1, 2], ZHUANG Jia-ling[1, 2], WANG Yue-qiao[2], WANG Qiang[1], GUO Zhi[1, 2*] (1. *College of Medical*, *Wuhan University of Science and Technology*, *Wuhan* 430065; 2. *National Cancer Center/ National Clinical Research Cancer for Cancer/ Cancer Hospital & Shenzhen Hospital*, *Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College*, *Shenzhen Guangdong* 518116)

Abstract: Objective To evaluate the efficacy and safety of R-CDOP regimen (rituximab ＋ cyclophosphamide ＋ pegylated liposomal adriamycin ＋ vincristine ＋ prednisone) for diffusive large B-cell lymphoma (DLBCL). **Methods** Clinical data of 111 patients with DLBCL were collected retrospectively. The median age was 52 (21 － 80 years old), including 80 patients treated with R-CDOP regimen (the R-CDOP group), and 31 treated with R-CHOP regimen (the R-CHOP group). The primary endpoints included objective response rate (ORR) and progress-free survival (PFS). Secondary endpoints covered adverse events and cardiotoxicity. **Results** The ORR was 92.5% *vs* 83.9% for the R-CDOP group and the R-CHOP group, without significant difference in both groups ($P = 0.312$). The median PFS was 36 months *vs* 24 months for the R-CDOP group and the R-CHOP group ($P = 0.111$). Subgroup

基金项目：吴阶平医学基金项目（No. 32067502020-10-17）；深圳市“医疗卫生三名工程”项目（No. SZSM201612085）。
作者简介：陈丽萍，女，主治医师，主要从事肿瘤诊治工作，email：tomato.chen@163.com　*通信作者：郭智，男，主任医师，主要从事血液肿瘤方向及造血干细胞移植工作，email：guozhi77@126.com

analysis showed the median PFS among patients with international prognostic index (IPI) ≥ 3 and large mass (d ≥ 7.5 cm) in the R-CDOP group was better than that in the R-CHOP group. The median PFS was 30.6 months and 16.0 months (P = 0.039), *vs* 33.7 months and 11.5 months (P = 0.027). There were no significant differences in the hematological toxicity, nausea, vomit, and abnormal liver function between the two groups. The difference in the incidence of cardiotoxicity was significant between the two groups (P < 0.001). **Conclusion** R-CDOP regimen has similar efficacy as R-CHOP regimen in the overall DLBCL patients, but can reduce cardiotoxicity. In the meanwhile, the R-CDOP regimen shows better efficacy in DLBCL patients at IPI ≥ 3 and with large mass.

Key words: pegylated liposomal adriamycin; diffusive large B-cell lymphoma; progress-free survival; cardiotoxicity

弥漫大B细胞淋巴瘤（diffuse large B-cell lymphoma，DLBCL）的发病率约占非霍奇金淋巴瘤的30%，是其最常见的亚型。利妥昔单抗的出现开启了淋巴瘤靶向治疗的新纪元，目前R-CHOP方案（利妥昔单抗＋环磷酰胺＋长春新碱＋阿霉素＋泼尼松）为DLBCL的标准一线治疗方案，5年生存率可达60%[1-2]。但R-CHOP方案对部分患者的疗效欠佳，主要是因为DLBCL是一种组织学类型、临床表现以及生物学行为有显著差异的淋巴细胞肿瘤[3]。目前，国际预后指数（international prognostic index，IPI）作为最常用的预后指标[4]，可以将DLBCL进行进一步的危险分层，对治疗方案的选择亦有一定的指导作用。但随着研究的不断深入，人们发现DLBCL的生物学特性愈加复杂，预后因素除IPI之外，是否合并大包块（d ≥ 7.5 cm）、细胞起源类型（生发中心型GCB、非生发中心型non-GCB）、有无淋巴结外侵犯（睾丸、乳腺、骨骼、胃肠道）、免疫组化类型、是否合并双/三打击等多种因素亦明显影响患者的预后[5]。对于合并高危因素的DLBCL患者，R-CHOP方案难以获得满意的疗效，因而探讨新型的治疗方案十分必要。此外，DLBCL也是一类老年人多见的恶性淋巴瘤，由于老年患者常伴随一些心脏基础疾病[6]，而蒽环类药物又存在心脏限制性毒性，使得这类患者难以接受足疗程及强度的治疗，进而影响R-CHOP方案在这类患者中的最终疗效。因此，寻求安全、疗效可靠的药物代替常规蒽环类药物对老年DLBCL患者而言尤为重要。聚乙二醇脂质体阿霉素（pegylated liposomal adriamycin，PLA）以脂质体作为外壳包裹普通阿霉素，具有毒性小、能够提高药物疗效的优点，前期多项研究已证实其在治疗获得性免疫缺陷综合征引起的卡波西肉瘤、卵巢癌、复发或转移性乳腺癌和多发性骨髓瘤等疾病中的安全性及有效性[7-10]。PLA的亲肿瘤组织，而在心肾分布浓度较低的特点，减轻了阿霉素在相应脏器的毒性作用，同时增加了肿瘤组织中阿霉素的浓度，提高了对肿瘤组织的靶向性，有助于提高药物杀伤肿瘤作用的同时减轻重要脏器的损伤[11]。但在非霍奇金淋巴瘤的治疗中，PLA的临床应用仍处于探索阶段。本研究回顾性分析我院血液肿瘤科R-CDOP方案对比R-CHOP方案治疗初诊的DLBCL的疗效及安全性差异，以期进一步探讨PLA在DLBCL患者中的治疗价值。

1 资料和方法

1.1 病例资料

回顾性分析我院血液肿瘤科2018年1月至2021年12月收治的111例初诊的DLBCL患者。纳入标准：经病理诊断的初诊DLBCL患者；至少完成2个周期的治疗，有1次疗效评价；临床资料完整。采集的信息主要包括患者的一般临床资料，包括性别、年龄、细胞起源（生发中心型、非生发中心型）、基线血生化检查资料、影像学资料（全身增强CT或PET-CT检查结果）、IPI评分、肿瘤分期、骨髓侵犯情况、B症状、有无大包块（定义为病灶长径≥ 7.5 cm）、Ki-67等。排除明确有严重冠心病、心律失常的患者。所有患者均签署知情同意书。

1.2 治疗方案

R-CDOP组80例，中位治疗周期为6个周期（2～8个周期）；R-CHOP组31例，中位治疗周期为6个周期（2～8个周期）。R-CDOP方案：利妥昔单抗375 mg·m^{-2}，第0日；环磷酰胺750 mg·m^{-2}，第1日；长春新碱1.4 mg·m^{-2}（最大剂量2.0 mg·m^{-2}），第1日；PLA 25～30

mg·m^{-2}或35～40 mg·m^{-2}，第1日；泼尼松60 mg·m^{-2}，第1～5日。R-CHOP方案：利妥昔单抗375 mg·m^{-2}，第0日；环磷酰胺750 mg·m^{-2}，第1日；长春新碱1.4 mg·m^{-2}（最大剂量2.0 mg·m^{-2}），第1日；吡柔比星50 mg·m^{-2}，第1日；泼尼松60 mg·m^{-2}，第1～5日。患者每2周期行全身CT平扫＋增强或PET-CT检查。每个治疗周期前后均监测患者的血常规、肝肾功能等指标、心电图和超声心动图以及患者治疗后出现的所有不良反应。

1.3　疗效评价及安全性评估

根据2014年Lugano修订版淋巴瘤疗效评价标准[12]进行疗效评价，分为完全缓解（CR）、部分缓解（PR）、疾病稳定（SD）和疾病进展（PD）。随访截止至2022年1月31日。以客观缓解率（ORR，CR＋PR）及无进展生存时间（PFS）为主要研究终点，其中ORR定义为至少获得PR及以上疗效的比例，PFS定义为初次治疗至初次复发的时间。根据美国国立癌症研究所常见毒性分级标准CTCAE 5.0版本进行安全性评估[13]。

1.4　统计学分析

采用SPSS 26.0软件进行统计分析。通过SPSS描述中的图形检验进行正态分布性检验，两组间基线数据的比较采用独立样本t检验；将患者性别、年龄、分期、细胞起源、IPI评分、大包块、侵犯部位等纳入单因素分析，采用Kaplan-Meier生存分析。以$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　基线资料特征

本研究共纳入111例DLBCL患者，R-CDOP组80例，R-CHOP组31例。R-CDOP组中男性44例，女性36例，中位年龄53岁（21～80岁），≥60岁34例；R-CHOP组中男性19例，女性12例，中位年龄52岁（28～73岁），≥60岁9例。R-CDOP组与R-CHOP组在性别、年龄、疾病分期、细胞起源、IPI评分、淋巴结外侵犯等分布上差异无统计学意义，见表1。

2.2　疗效评估

80例患者使用R-CDOP方案化疗后，CR 45例，PR 29例，SD 5例，PD 1例，完全缓解率为56.3%，ORR为92.5%。31例患者使用R-CHOP方案化疗后，CR 19例，PR 7例，SD 4例，PD 1例，完全缓解率为61.3%，ORR为83.9%。两组患者ORR比较，差异无统计学意义（$P=0.312$），见表2。

表1　R-CDOP组和R-CHOP组患者的临床基线特征

Tab 1　Clinical characteristics of patients in the R-CDOP group and the R-CHOP group

特征		R-CDOP组（$n=80$）	R-CHOP组（$n=31$）	P
性别	男	44	19	0.184
	女	36	12	
年龄/岁	≥60	34	9	0.206
	<60	46	22	
分期	Ⅰ～Ⅱ	33	13	0.898
	Ⅲ～Ⅳ	47	18	
细胞起源	GCB	22	15	0.654
	non-GCB	54	15	
	缺失	4	1	
IPI评分	≥3	28	10	0.576
	<3	52	21	
肿瘤大小/cm	≥7.5	26	5	<0.0001
	<7.5	54	26	
侵犯部位	淋巴结	30	13	0.443
	淋巴结外侵犯	50	18	

表2　R-CDOP组与R-CHOP组的疗效评估[n(%)]

Tab 2　Efficacy of the R-CDOP group and the R-CHOP group [n(%)]

指标	R-CDOP组（$n=80$）	R-CHOP组（$n=31$）
肿瘤总体评估		
完全缓解（CR）	45（56.3）	19（61.3）
部分缓解（PR）	29（36.2）	7（22.6）
稳定（SD）	5（6.3）	4（12.9）
进展（PD）	1（1）	1（3.2）
客观缓解率		
CR＋PR	74（92.5）	26（83.9）

2.3　无进展生存情况

R-CDOP组中位随访时间为30个月（3～36个月），R-CHOP组中位随访时间为30个月（4～36个月）。R-CDOP组和R-CHOP组中位无进展生存时间（mPFS）分别为36个月和24个月（$P=0.111$），见图1。但亚组分析提示，在IPI评分≥3分的患者中，R-CDOP组mPFS高于R-CHOP组（30.6个月 *vs* 16.0个月，$P=0.039$），见图2；在肿块≥7.5 cm的患者中，R-CDOP组mPFS高于R-CHOP组（33.7个月 *vs* 11.5个月，$P=0.027$），见图3。R-CDOP组和R-CHOP组不同性别、年龄、疾病分期、侵犯部位患者的mPFS差异无统计学意义（$P>0.05$），见表3。

2.4　安全性评估

两组患者主要出现的一般不良反应为血液学毒性、肝功能异常、胃肠道反应、口腔黏膜炎

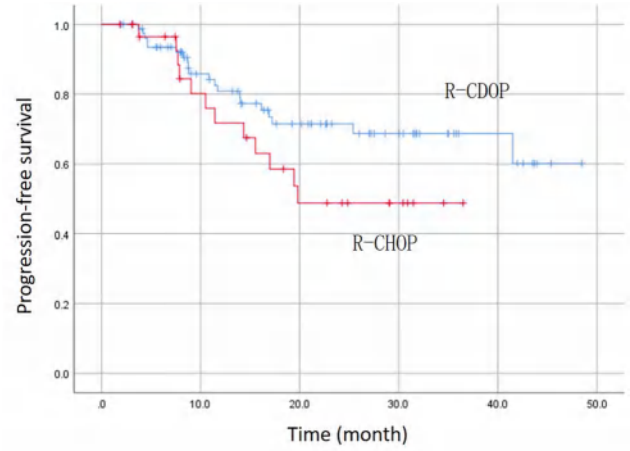


图 1　R-CDOP 组和 R-CHOP 组患者的无进展生存曲线

Fig 1　Progress-free survival curve of patients in the R-CDOP group and the R-CHOP group

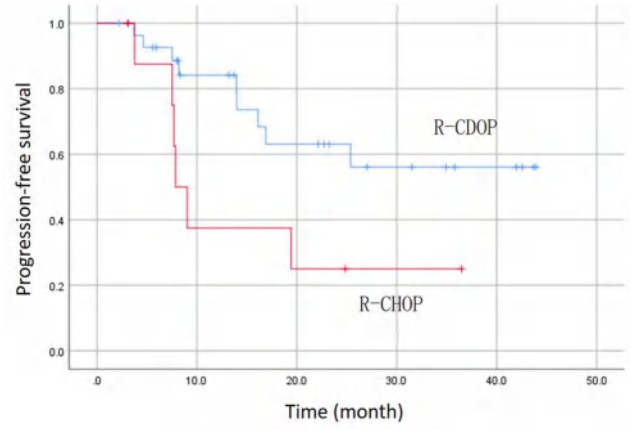


图 2　R-CDOP 组和 R-CHOP 组在 IPI 评分≥ 3 分患者中的无进展生存曲线

Fig 2　Progress-free survival curve of patients with IPI ≥ 3 in the R-CDOP group and the R-CHOP group

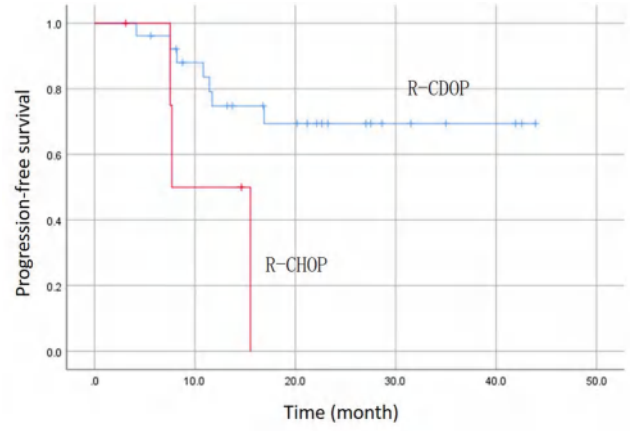


图 3　R-CDOP 组和 R-CHOP 组在肿瘤≥ 7.5 cm 患者中的无进展生存曲线

Fig 3　Progress-free survival curve of patients with tumors larger than 7.5 cm in the R-CDOP group and the R-CHOP group

等，经积极治疗后均好转。无治疗相关死亡事件。R-CHOP 组的心脏毒性发生率明显高于 R-CDOP 组（$P < 0.001$），见表 4。治疗前后两组患者均未出现心脏射血分数＜ 50% 和下降幅度＞ 10%。

表 3　R-CDOP 组和 R-CHOP 组患者 mPFS 的比较

Tab 3　mPFS between the R-CDOP group and the R-CHOP group

特征		mPFS/ 月		P
		R-CDOP 组（$n = 80$）	R-CHOP 组（$n = 31$）	
ITT		36.3	24.1	0.111
性别	男	39.2	23.3	0.274
	女	31.8	21.5	0.227
年龄 / 岁	≥ 60	34.8	24.0	0.201
	＜ 60	35.6	21.7	0.379
分期	Ⅰ～Ⅱ	33.4	25.4	0.701
	Ⅲ～Ⅳ	36.0	21.9	0.076
IPI 评分	≥ 3	30.6	16.0	0.039
	＜ 3	37.7	26.7	0.519
肿瘤大小 /cm	≥ 7.5	33.7	11.5	0.027
	＜ 7.5	36.2	25.8	0.357
侵犯部位	淋巴结	31.8	23.7	0.834
	淋巴结外侵犯	37.3	22.1	0.052

表 4　R-CDOP 组和 R-CHOP 组患者心电图异常比较

Tab 4　ECG abnormalities in patients in the R-CDOP group and the R-CHOP group

心电图异常	R-CDOP 组（$n = 80$）	R-CHOP 组（$n = 31$）	P
T 波改变	5	10	
ST-T 改变	6	2	
传导阻滞	3	1	
室性早搏	0	1	
心律不齐	0	1	
心脏毒性发生率 /%	17.5	48.3	＜ 0.001

3　讨论

利妥昔单抗的出现，极大地改善了 DLBCL 患者的生存状态 [14]，但对于高危患者、伴相关预后不良因素的患者，R-CHOP 方案仍难以满足临床需求，且心脏毒性也在一定程度上限制了部分患者的使用。因此对 DLCBL 患者进一步分层治疗、选择合适的治疗方案（或药物）对于提高部分有高危因素或伴有预后不良因素的 DLBCL 患者的疗效是当前探索的热点。

在一项Ⅲ期临床研究中，研究团队对 DA-EPOCH-R 方案和 R-CHOP 方案一线治疗 DLBCL 的疗效和毒副作用进行了比较，发现 DA-EPOCH-R 方案两年的 PFS 率为 75.5% *vs* 78.9%（$P = 0.65$）；两年的总生存率为 85.7% *vs* 86.5%（$P = 0.65$）；3 ～ 4 级的毒副作用 DA-EPOCH-R 组明显升高（$P < 0.001$）[15]。结果提示，强烈化疗方案 DA-EPOCH-R 较 R-CHOP 方案不能进

一步提高患者的生存时间，同时还增加了毒副作用。国内的一项Ⅲ期临床研究结果表明，对比R-CHOP-14 方案和 R-CHOP-21 方案治疗新诊断的 DLBCL 患者，两种方案 3 年 PFS 率（63.2% *vs* 66.1%，$P = 0.447$）和 3 年总生存期（OS）率（77.5% *vs* 77.6%，$P = 0.903$），R-CHOP-21 方案在 IPI ≥ 3 分的患者预后更差 [16]，提示双周剂量密集型方案较 R-CHOP-21 方案不能进一步提高患者的生存，而且高危患者的预后更不理想。对于存在大包块的局限期 DLBCL 患者，目前指南推荐予以 6 个周期 R-CHOP 方案和受累野放疗，现有的临床研究也表明该治疗方案可以提高患者的 OS，但随着随访时间的延长，由于放疗导致的第二肿瘤的发生，使得这种治疗方式的生存优势逐渐丧失 [17]。一项国内的研究结果显示，对于存在大包块的 DLBCL，R-CHOP 方案治疗的有效率低，并且容易复发 [18]。另外，多项 R-CHOP ＋ X 药物临床研究亦未显示出优势。PYRAMID 试验结果显示硼替佐米联合 R-CHOP 对比 R-CHOP 治疗 DLBCL，两组的 2 年 PFS 率及 OS 率差异无统计学意义 [19]；PHOENIX 试验显示伊布替尼联合 R-CHOP 对比 R-CHOP 治疗初诊的 non-GCB 亚型 DLBCL，两组的无事件生存期（EFS）率差异无统计学意义 [20]；上海瑞金医院的一项Ⅱ期临床研究结果显示，西达苯胺联合 R-CHOP 在初诊老年 DLBCL 患者中的 ORR 为 90.3%，但 3 ～ 4 级的中性粒细胞减少症的发生率高达 60.5%[21]。从目前的研究结果来看，对于存在高危因素的 DLBCL 患者，强烈化疗方案、双周密集型方案以及在 R-CHOP 方案基础上加用 X 药物的探索均以失败告终。

为了探讨 PLA 在伴有不良预后因素的 DLBCL 患者中的治疗价值及优势，本研究回顾性分析了 111 例初诊 DLBCL 患者的治疗情况，对比 R-CHOP 方案，选择 PLA 替代普通阿霉素的 R-CDOP 方案在 ORR（92.5% *vs* 83.9%，$P = 0.312$）上可以看到获益趋势。对比国内其他同行的研究结果，吴晓爽等 [22] 研究报道 R-CDOP 方案的 ORR 为 87.0%，考虑结果存在差异的原因可能是两个研究纳入的研究人群的基线不一致。常莹莹等 [23] 研究报道的 R-CDOP 方案的 ORR 为 94.6%，与本研究结果比较相近。本研究进一步对患者的一些临床特征，如年龄、肿瘤分期、大包块、肿瘤侵犯部位、高 IPI 评分等进行亚组分析，结果表明在 IPI 评分≥ 3 分的患者中，R-CDOP 组 mPFS 高于 R-CHOP 组（30.6 个月 *vs* 16.0 个月）（$P = 0.039$）；在肿块≥ 7.5 cm 的患者中，R-CDOP 组 mPFS 高于 R-CHOP 组（33.7 个月 *vs* 11.5 个月）（$P = 0.027$）。对于 IPI 评分≥ 3 分、大包块这两种预后不良的 DLBCL 患者，R-CDOP 方案延长了患者的 mPFS。本研究结果提示，在今后的临床实践中可以对伴有以上这两种预后不良因素的 DLBCL 患者使用 PLA 以提高患者 ORR，延长患者的 mPFS。在本研究中，PLA 体现出明显治疗优势的原因可能是因为 IPI 评分较高的患者大多肿瘤分期较晚、肿瘤负荷较大，并且因包块太大，普通蒽环类药物难以透入，标准的一线治疗治愈率相对较低，而 PLA 的平均颗粒直径较小，易透过肿瘤组织，同时因肿瘤组织中缺乏功能性淋巴引流，药物可在肿瘤组织中聚集 [24]。

除疗效外，不良反应也是化疗过程中特别需要关注的一个方面。临床研究和实践观察显示，蒽环类药物导致的心脏毒性往往是不可逆的，这极大地限制了蒽环类药物的临床应用。有研究显示，使用阿霉素多程治疗后，当累积剂量达到 550 $mg \cdot m^{-2}$ 时，心脏毒性的发生率更高，病死率可达 48%[25]。PLA 是一种新型的蒽环类药物，具有高通透性及强滞留效应，因此在肿瘤组织中的浓度更高，可以达到更好的杀灭肿瘤细胞的作用。同时研究显示，PLA 在心肌组织中的药物浓度仅为肿瘤组织中的 1/4，可降低阿霉素的心脏毒性作用 [26]。在一项 R-CDOP 治疗方案的临床研究中，研究者纳入 50 例患者（中位年龄 76 岁，其中心肌缺血占 35%，左室肥厚占 13%），以心脏毒性为主要研究终点，结果显示未观察到左室射血分数基线值的显著变化，PLA 的心脏毒性较阿霉素明显减少 [27]。本研究中 R-CDOP 组有 14 例出现心电图的改变，其中 5 例是 T 波改变，6 例 ST-T 改变，3 例传导阻滞，无心脏射血分数基线值的显著变化，均为 1 ～ 2 级毒性，心脏毒性的发生率为 17.5%，相较于 R-CHOP 组的心脏毒性发生率 48.3% 明显减少（$P < 0.001$）。因此，对于老年患者或者有心脏基础疾病的 DLBCL 患者，PLA 替代普通阿霉素的 R-CDOP 方案是一种可行的选择。

本研究为单中心回顾性分析，虽最终纳入的两组患者基线水平相当，但随访时间相对较短，同时样本量较少，未能分析患者的 OS 率。因此，需要进一步扩大样本量进行多中心的数据分析，以证实及探索该方案的疗效与安全性。

参考文献

[1] Sehn LH，Salles G. Diffuse large B-cell lymphoma [J]. N Engl J Med，2021，384：842-858.

[2] Spinner MA，Advani RH. Current frontline treatment of diffuse large B-cell lymphoma [J]. Oncology，2022，36（1）：51-58.

[3] 李喆，岑洪 . 弥漫大 B 细胞淋巴瘤分型研究进展 [J]. 中国癌症防治杂志，2021，13（6）：672-676.

[4] Liu Y，Barta SK. Diffuse large B-cell lymphoma：2019 update on diagnosis，risk stratification，and treatment [J]. Am J Hematol，2019，94（5）：604-616.

[5] Susanibar-Adaniya S，Barta SK. 2021 Update on diffuse large B cell lymphoma：a review of current data and potential applications on risk stratification and management [J]. Am J Hematol，2021，96（5）：617-629.

[6] Di M，Huntington SF，Olszewski AJ. Challenges and opportunities in the management of diffuse large B-cell lymphoma in older patients [J]. Oncologist，2021，26（2）：120-132.

[7] 马军，朱军，石远凯，等 . 脂质体阿霉素治疗恶性淋巴瘤和多发性骨髓瘤的中国专家共识（2019 年版）[J]. 临床肿瘤学杂志，2019，24（5）：445-453.

[8] Cesarman E，Damania B，Krown SE，et al. Kaposi sarcoma [J]. Nat Rev Dis Primers，2019，5（1）：10.

[9] Maeda O，Kajiyama H，Shibata K，et al. Pegylated liposomal doxorubicin/oxaliplatin chemotherapy can overcome cisplatin resistance in spectrin alpha Ⅱ -overexpressing ovarian carcinoma [J]. Anticancer Res，2020，40（5）：2497-2507.

[10] Schettini F，Giuliano M，Lambertini M，et al. Anthracyclines strike back：rediscovering non-pegylated liposomal doxorubicin in current therapeutic scenarios of breast cancer [J]. Cancers（Basel），2021，13（17）：4421.

[11] 中国医师协会肿瘤医师分会乳腺癌学组 . 聚乙二醇化脂质体多柔比星不良反应管理中国专家共识（2020 版）[J]. 中华肿瘤杂志，2020，42（8）：617-623.

[12] Cheson BD，Fisher RI，Barrington SF，et al. Recommendations for initial evaluation，staging，and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma：the Lugano classification [J]. J Clin Oncol，2014，32（27）：3059-3068.

[13] Cancer N. Common Terminology Criteria for Adverse Events（CTCAE）v5.0，2017 [EB/OL]. https：//ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/ctc.htm#ctc_50/2017-11-27/2022-02-28.

[14] Coiffier B，Thieblemont C，van Den Neste E，et al. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial，the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients：a study by the Groupe d’Etudes des Lymphomes de l’Adulte [J]. Blood，2010，116（12）：2040-2045.

[15] Bartlett NL，Wilson WH，Jung SH，et al. Dose-adjusted EPOCH-R compared with R-CHOP as frontline therapy for diffuse large B-cell lymphoma：clinical outcomes of the phase Ⅲ intergroup trial Alliance/CALGB 50303 [J]. J Clin Oncol，2019，37（21）：1790-1799.

[16] Li X，Huang H，Xu B，et al. Dose-dense rituximab-CHOP versus standard rituximab-CHOP in newly diagnosed chinese patients with diffuse large B-cell lymphoma：a randomized，multicenter，open-label phase 3 trial [J]. Cancer Res Treat，2019，51（3）：919-932.

[17] Held G，Murawski N，Ziepert M，et al. Role of radiotherapy to bulky disease in elderly patients with aggressive B-cell lymphoma [J]. J Clin Oncol，2014，32（11）：1112-1118.

[18] 王友群，唐小万 . CHOP 方案联合美罗华治疗弥漫大 B 细胞淋巴瘤 78 例回顾性分析 [J]. 中华全科医学，2018，16（6）：916-918.

[19] Leonard JP，Kolibaba KS，Reeves JA，et al. Randomized phase Ⅱ study of R-CHOP with or without bortezomib in previously untreated patients with non-germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma [J]. J Clin Oncol，2017，35（31）：3538-3546.

[20] Younes A，Sehn LH，Johnson P，et al. Randomized phase Ⅲ trial of ibrutinib and rituximab plus cyclophosphamide，doxorubicin，vincristine，and prednisone in non-germinal center B-cell diffuse large B-cell lymphoma [J]. J Clin Oncol，2019，37（15）：1285-1295.

[21] Zhang MC，Fang Y，Wang L，et al. Clinical efficacy and molecular biomarkers in a phase Ⅱ study of tucidinostat plus R-CHOP in elderly patients with newly diagnosed diffuse large B-cell lymphoma [J]. Clin Epigenetics，2020，12（1）：160.

[22] 吴晓爽，陈清江，张旭东 . 含聚乙二醇脂质体阿霉素的 R-CDOP 方案一线治疗弥漫大 B 细胞淋巴瘤的疗效及安全性 [J]. 实用药物与临床，2020，23（11）：992-997.

[23] 常莹莹，朱斌 . 含聚乙二醇脂质体多柔比星的 R-CDOP 方案治疗弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的临床应用评价 [J]. 实用肿瘤杂志，2021，36（5）：429-434.

[24] Orlowski RZ，Nagler A，Sonneveld P，et al. Randomized phase Ⅲ study of pegylated liposomal doxorubicin plus bortezomib compared with bortezomib alone in relapsed or refractory multiple myeloma：combination therapy improves time to progression [J]. J Clin Oncol，2007，25（25）：3892-3901.

[25] Bhagat A，Kleinerman ES. Anthracycline-induced cardiotoxicity：causes，mechanisms，and prevention [J]. Adv Exp Med Biol，2020，1257：181-192.

[26] Gabizon A，Goren D，Horowitz AT，et al. Long-circulating liposomes for drug delivery in cancer therapy：a review of biodistribution studies in tumor-bearing animals [J]. Adv Drug Deliv Rev，1997，24（2）：337-344.

[27] Luminari S，Viel E，Ferreri AJM，et al. Nonpegylated liposomal doxorubicin combination regimen in patients with diffuse large B-cell lymphoma and cardiac comorbidity. Results of the HEART01 phase Ⅱ trial conducted by the Fondazione Italiana Linfomi [J]. Hematol Oncol，2018，36（1）：68-75.

（收稿日期：2022-02-28；修回日期：2022-04-28）

研究论文

养心生脉颗粒对异丙肾上腺素诱导的小鼠心肌缺血及焦虑样行为的影响

张明倩[1]，崔爽[1]，梁五林[1]，郭凡帆[1]，欧文静[1]，伍永鸿[1]，张仲毅[2]，贾占红[1]，张硕峰[1*]（1.北京中医药大学中药学院，北京　102488；2.秦皇岛市山海关药业有限责任公司，河北　秦皇岛　066000）

摘要：目的　探究养心生脉颗粒对异丙肾上腺素（ISO）诱导的小鼠心肌缺血损伤的改善作用及焦虑样行为的影响。**方法**　72 只昆明小鼠随机分为空白组，模型组，养心生脉颗粒 3.15、6.30、12.60 g·kg^{-1} 组及阳性药组（复方丹参片 0.432 g·kg^{-1} 和地西泮 0.001 g·kg^{-1}），连续灌胃给药 8 d，除空白组外，其余各组小鼠于第 5 日给药 30 min 后，采用首次腹腔注射 ISO（60 mg·kg^{-1}），第 6 ～ 8 日腹腔注射 ISO（50 mg·kg^{-1}）法制备小鼠心肌缺血模型，于第 7 日造模 8 h 后进行高架十字迷宫实验、明暗箱实验和旷场实验，于第 8 日灌胃给药 1 h 后，监测心电图 0.5、5、10、15、20 min ST 段的变化，取各组小鼠血清检测血清乳酸脱氢酶（LDH）、肌酸激酶（CK）水平。**结果**　行为学结果显示，与空白组相比，模型组小鼠进入高架十字迷宫开放臂次数、滞留时间和旷场运动轨迹总路程均显著降低（$P < 0.01$），在明暗箱中明箱停留的次数和时间以及进入旷场中心区域的次数和时间均明显减少，但差异无统计学意义；与模型组相比，养心生脉颗粒各给药组均可明显改善小鼠进入高架十字迷宫开放臂次数、滞留时间和旷场运动轨迹总路程（$P < 0.05$，$P < 0.01$），明箱停留的次数和时间以及进入旷场中心区域的次数和时间有升高的趋势，但效果均不显著。心电图及心肌酶谱结果显示，与模型组相比，养心生脉颗粒各给药组均能显著抑制 ISO 诱导的心电图 ST 段抬高以及血清心肌酶 LDH、CK 活力的升高（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。**结论**　养心生脉颗粒对 ISO 诱导小鼠心肌缺血损伤具有保护作用，并能够逆转其焦虑样行为。

关键词：心肌缺血；焦虑；养心生脉颗粒

中图分类号：R284　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1521-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.008

Effect of Yangxin Shengmai granules on myocardial ischemia and anxiety like behaviors induced by isoproterenol in mice

ZHANG Ming-qian[1], CUI Shuang[1], LIANG Wu-lin[1], GUO Fan-fan[1], OU Wen-jing[1], WU Yong-hong[1], ZHANG Zhong-yi[2], JIA Zhan-hong[1], ZHANG Shuo-feng[1*] (1. *School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing*　102488; 2. *Qinhuangdao Shanhaiguan Pharmaceutical Limited Company*, *Qinghuangdao*　*Hebei*　066000)

Abstract: Objective　To determine the effect of Yangxin Shengmai granules on isoproterenol-induced myocardial ischemia and anxiety-like behaviors in mice. **Methods**　Totally 72 KM mice were randomly divided into a blank group, a model group, 3 Yangxin Shengmai granules groups at 3.15, 6.30, and 12.60 g·kg^{-1} and a positive group (compound Danshen tablets 0.432 g·kg^{-1} and diazepam 0.001 g·kg^{-1}). The drug were given intragastrically for 8 days continuously. Except

基金项目：国家科技重大专项（No.2014ZX09304306）；北京市自然科学基金（No.7144222）。

作者简介：张明倩，女，硕士，主要从事中医药防治心脑血管疾病研究，email：2467149869@qq.com　*通信作者：张硕峰，男，教授，主要从事中医药防治心脑血管疾病研究，email：shuofengzhang@sina.com

for the blank group, mice in the other groups were injected isoproterenol hydrochloride (ISO) (60 mg • kg^{-1}) intraperitoneally 30 min after the administration on the 5th day, and ISO (50 mg • kg^{-1}) intraperitoneally on the 6th － 8th day. The elevated cross maze experiment, light-dark box test and open field experiment were conducted 8 h after the modeling on the 7th day. Electrocardiogram (ECG) was monitored for 0.5, 5, 10, 15 and 20 min after the intragastric administration on the 8th day. The serum of the mice in each group was taken to detect the levels of serum lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK). **Results** The behavioral results showed that compared with the blank group, the number of open arms and residence time in the elevated cross maze, and the total distance in the open field of model group were significantly reduced ($P < 0.01$). The number of staying in the light box and residence time in the light-dark box test and those of entering the central area of the open field were reduced, but without significance. Compared with the model group, each dose group of Yangxin Shengmai granules significantly improved the number of open arms and residence time in the elevated cross maze, and the total distance in the open field ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the number and time of staying in the lignt box in the light-dark box test and those of entering the central area of open field tended to increase without significance. ECG and myocardial enzyme spectrum showed that compared with the model group, each dose group of Yangxin Shengmai granules significantly inhibited the elevation of ECG ST segment and increased the serum myocardial enzyme LDH and CK activities ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Yangxin Shengmai granules protect against ISO-induced myocardial ischemia in mice, and can reverse the anxiety-like behaviors.

Key words: myocardial ischemia; anxiety; Yangxin Shengmai granule

心血管疾病（cardiovascular disease，CVD）具有高发病率、高致残率和高病死率的特点，是世界范围内引起死亡的主要原因[1]，心肌缺血（myocardial ischemia，MI）作为冠状动脉疾病谱系的一部分，是指由于冠状动脉供血和心肌耗氧量之间供需失衡，导致心脏供氧减少，心肌能量代谢不正常的一种病理综合征[2-3]。临床发现，心肌缺血患者常伴发焦虑抑郁等情绪障碍，其发病率远高于正常人群，患者长期忧思恐惧、睡眠不足、紧张焦虑会增加疾病的发病率，影响疾病康复进程及患者生活质量[4]。

异丙肾上腺素（isoproterenol hydrochloride，ISO）是一种合成儿茶酚胺，高剂量服用可能会由于心肌耗氧量增大，冠状动脉强烈收缩，外周阻力加大，心率加快，导致心肌缺血缺氧及心室功能障碍[5-6]。此外，一些临床观察证明，心率与焦虑或恐慌症存在联系，而恐慌症患者的 *β*- 肾上腺素受体功能发生了改变。Leo 等[7]研究证明，*β*- 肾上腺素能受体激动剂 ISO 可升高心率，并且可能通过调节精神状态的外周信号即细胞外囊泡诱发类似焦虑样行为，而慢性焦虑又是心律失常和猝死的独立危险因素[8]，故本实验采用外源性儿茶酚胺类药物 ISO 构建小鼠心肌缺血合并焦虑模型，避免了传统手术造模复合慢性焦虑模型操作难度大、操作强度无标准等特点，较好的模拟了临床缺血性心脏病伴焦虑样状态的表现。

养心生脉颗粒以生脉散为基础方，由人参、麦冬、丹参、五味子、龙眼肉等 14 味中药组成，具有益气养阴、活血祛瘀之效，临床应用该药治疗冠心病心绞痛取得了良好的效果，该药多味单药具有镇静安神的作用，在抗焦虑抑郁方面已有较深入的研究，为养心生脉颗粒临床治疗伴焦虑抑郁的冠心病患者提供了依据，故本研究观察中药养心生脉颗粒对 ISO 诱导的小鼠心肌缺血的保护作用及焦虑样行为的药效学作用，现报道如下。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 KM 小鼠 72 只，体质量 19 ～ 22 g [北京斯贝福实验动物技术有限公司，动物合格证号：SYXK（京）2019-0010]，饲养温度为（22±2）℃，自由获取食物和饮用水，适应性饲养 3 d。

1.2 试药

养心生脉颗粒（秦皇岛市山海关药业有限责任公司，批号：20210206，规格：14 g/ 袋）；盐酸异丙肾上腺素（上海源叶生物科技有限公司，批号：K2308B46335，HPLC ≥ 98%）；复方丹参片（上海凯合荣图们药业有限公司，批号：202010125，规格：0.32 g/ 片）；地西泮（北京益民药业有限公司，

批号：20180403，规格：2.5 mg/ 片）。乳酸脱氢酶测定试剂盒（批号：20210901）、肌酸激酶测定试剂盒（批号：20210901）（凯基生物技术有限公司）。

1.3　仪器

信息化集成化信号采集与处理系统（成都泰盟软件有限公司，型号：BL-420I），酶标仪（赛默飞世尔科技有限公司，型号：MuttiSkan Mk3），低温高速离心机（德国 Eppendorf AG 公司，型号：Centrifuge 5810），Noldus EthoVision XT9 采集分析系统（荷兰 Noldus 公司），Milli-Q 超纯水系统（默克密理博实验室设备有限公司，型号：Milli-QAdvantage）。

2　方法

2.1　模型建立与给药

72 只小鼠随机分为空白组，模型组，阳性药组，养心生脉颗粒低、中、高（3.15、6.30、12.60 g・kg^{-1}）剂量组，每组 12 只。阳性药组小鼠给予复方丹参片（0.432 g・kg^{-1}）和地西泮（0.001 g・kg^{-1}），剂量为 0.02 mL・g^{-1}，养心生脉颗粒组剂量均为 0.04 mL・g^{-1}，各给药组小鼠连续灌胃给药 8 d。空白组、模型组小鼠给予等量的去离子水。第 5 日给药 30 min 后，除空白组外其余各组小鼠腹腔注射 60 mg・kg^{-1} ISO，第 6 ～ 8 日腹腔注射 50 mg・kg^{-1} ISO，构建急性心肌缺血模型（空白组小鼠腹腔注射等量生理盐水），于第 7 日造模 8 h 后进行行为学检测，第 8 日造模后立即监测 20 min 内小鼠心电图 ST 段变化，然后取血，检测血清心肌酶的变化。

2.2　行为学检测

2.2.1　高架十字迷宫实验　实验开始时，将小鼠面对开放臂放至迷宫的中心区，用 Noldus EthoVision 摄像并实时跟踪记录小鼠 5 min 内分别进入开放臂次数（OE）、封闭臂次数（CE）、开放臂滞留时间（OT）和封闭臂滞留时间（CT），由上述指标计算出：OT 占比（%）＝ OT/（OT ＋ CT）×100%；OE 占比（%）＝ OE/（OE ＋ CE）×100%。

2.2.2　明暗箱实验　实验开始时，将小鼠放入明箱中，使其背朝通道，摄像系统记录下小鼠 5 min 内的活动情况，并记录小鼠进入明箱的次数和进入明箱的时间。

2.2.3　旷场实验　将小鼠置于 Nodlus 自主活动仪中央，规格为 45 cm×45 cm×100 cm，应用 Nodlus EthoVision 动物轨迹与动物行为智能分析系统观察并记录 5 min 内小鼠进入中心区域的时间和次数及运动轨迹的总距离。测试完成后用酒精棉擦拭箱底，以免前一只小鼠遗留气味对下一只实验小鼠产生影响。

2.3　心电图 ST 段变化

各组小鼠末次灌胃给药 1 h 后，10% 水合氯醛麻醉小鼠，运用 BL-420I 生物功能实验系统，采用标准肢导联，黑色皮下针头插于右下肢皮下，白色皮下针头插于右上肢皮下，红色皮下针头插于左下肢皮下，空白组小鼠腹腔注射生理盐水，其余各组小鼠腹腔注射 ISO，观测小鼠Ⅱ导联心电图 20 min，分析 0.5、5、10、15、20 min 时小鼠心电图，得到各组小鼠各阶段 ST 段变化值。

2.4　血清 CK、LDH 检测

上述心电图检测完成后，立即眼球取血，室温凝置 2 h 后，低温冷冻离心机 3000 r・min^{-1}，4 ℃离心 10 min，取上清液，按 CK 和 LDH 试剂盒说明书检测其相应水平。

2.5　统计学处理

应用 SPSS 23.0 软件进行统计学处理，采用单因素方差分析（One Way ANOVA），选择最小显著差法（LSD），对各组均数进行两两比较。结果用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　养心生脉颗粒对 ISO 致心肌缺血模型小鼠行为学的影响

高架十字迷宫结果显示，与空白组相比，模型组小鼠进入开放臂次数和滞留时间显著降低（$P < 0.05$），而各给药组小鼠较模型组显著升高（$P < 0.05$，$P < 0.01$），以养心生脉颗粒中剂量组升高最为显著（见表 1）。

表 1　养心生脉颗粒对 ISO 致心肌缺血模型小鼠高架十字迷宫的影响（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1　Effect of Yangxin Shengmai granules on the elevated plus maze in myocardial ischemia model mice induced by ISO（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	OE 占比 /%	OT 占比 /%
空白组	12	44.16±12.26	26.09±12.87
模型组	12	28.09±12.56*	11.84±8.36*
养心生脉颗粒低剂量组	12	42.27±17.51$^{\#}$	26.59±13.74$^{\#}$
养心生脉颗粒中剂量组	12	47.45±13.13$^{\#\#}$	31.88±19.70$^{\#\#}$
养心生脉颗粒高剂量组	10	43.42±21.40$^{\#}$	23.16±22.04
阳性药组	12	41.76±15.12$^{\#\#}$	24.30±10.30$^{\#}$

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

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

明暗箱实验结果显示，与空白组相比，模型

组小鼠明箱停留的次数和时间均降低，各给药组较模型组相比有升高的趋势，但效果较模型组均不显著（见表 2）。

表 2　养心生脉颗粒对 ISO 致心肌缺血模型小鼠明暗箱的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effect of Yangxin Shengmai granules on the light-dark box in myocardial ischemia model mice induced by ISO ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	进入明箱的时间 /s	进入明箱的次数 / 次
空白组	12	159.27±14.35	27.25±6.40
模型组	12	137.70±38.29	24.50±8.29
养心生脉颗粒低剂量组	12	147.58±36.77	22.67±9.79
养心生脉颗粒中剂量组	12	160.01±27.23	26.33±7.37
养心生脉颗粒高剂量组	10	153.96±35.42	22.90±3.65
阳性药组	12	173.34±67.84#	16.00±8.69

注：与模型组比较，#$P<0.05$。

Note：Compared with the model group，#$P<0.05$.

旷场实验结果显示，与空白组相比，模型组小鼠总路程显著降低（$P<0.01$）；与模型组相比，养心生脉颗粒中剂量组和阳性药组小鼠的总路程显著升高（$P<0.01$），模型组小鼠进入中心区域的次数和时间较空白组减少，养心生脉颗粒低剂量及阳性药组小鼠进入中心区域的次数和时间较模型组增加，但差异无统计学意义（见表 3 及图 1）。

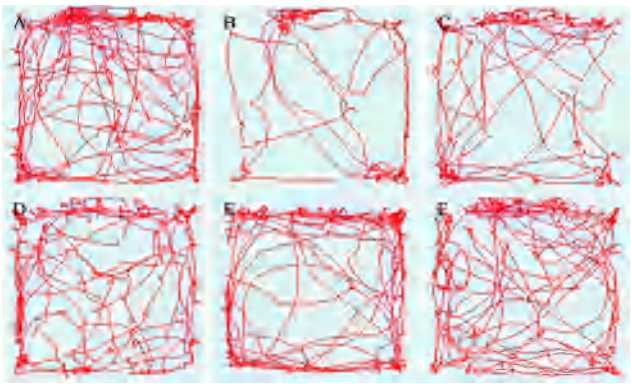


图 1　各组大鼠运动轨迹图

Fig 1　Movement track of all groups

A. 空白组（blank group）；B. 模型组（model group）；C ～ E. 养心生脉颗粒 2.1、4.2、8.4 g•kg^{-1} 组（Yangxin Shengmai granules at 2.1，4.2，and 8.4 g • kg^{-1} group）；F. 阳性药组（positive group）

表 3　养心生脉颗粒对 ISO 致心肌缺血模型小鼠旷场活动的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Effect of Yangxin Shengmai granules on the open field activity in myocardial ischemia model mice induced by ISO ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	总路程 /cm	进入中心区域的时间 /s	进入中心区域的次数 / 次
空白组	12	1906.18±426.06	15.54±8.94	13.92±6.92
模型组	12	1378.07±419.31**	14.59±9.32	9.58±5.28
养心生脉颗粒低剂量组	12	1314.75±302.84	18.64±17.76	11.33±8.27
养心生脉颗粒中剂量组	12	1823.14±302.07##	13.66±8.52	12.50±6.64
养心生脉颗粒高剂量组	10	1648.81±302.09	9.70±8.25	8.50±6.65
阳性药组	12	1807.98±389.37##	15.00±6.73	13.08±5.36

注：与空白组比较，**$P<0.01$；与模型组比较，##$P<0.01$。

Note：Compared with the blank group，**$P<0.01$；compared with the model group，##$P<0.01$.

3.2　养心生脉颗粒对 ISO 致心肌缺血模型小鼠心电图的影响

心电图结果显示，模型组小鼠心电图 ST 段逐渐增大，15 ～ 20 min 时 ST 段变化值大于 0.05 mV。在注射 ISO 5 ～ 20 min 时，不同剂量给药组均能显著抑制 ISO 诱导的心电图 ST 段抬高（$P<0.05$，$P<0.01$）（见表 4）。

表 4　养心生脉颗粒对 ISO 致心肌缺血模型小鼠心电图的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Effect of Yangxin Shengmai granules on ECG in myocardial ischemia model mice induced by ISO ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	不同时间 ST 段抬高程度 /mV				
		0.5 min	5 min	10 min	15 min	20 min
模型组	9	0.0798±0.0384	0.1200±0.0319	0.1478±0.0384	0.1529±0.0438	0.2033±0.0590
养心生脉颗粒低剂量组	12	0.0573±0.0191	0.0750±0.0177**	0.0963±0.0297**	0.1092±0.0362*	0.1223±0.0411*
养心生脉颗粒中剂量组	12	0.0610±0.0149	0.0812±0.0316**	0.0913±0.0374**	0.1043±0.0458*	0.1208±0.0546*
养心生脉颗粒高剂量组	10	0.0752±0.0382	0.0892±0.0442*	0.0972±0.0454**	0.1288±0.0699	0.1629±0.0985
阳性药组	12	0.0567±0.0150	0.0667±0.0142**	0.0810±0.0177**	0.0947±0.0397*	0.1325±0.0866*

注（Note）：与模型组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$（Compared with the model group，*$P<0.05$，**$P<0.01$）。

3.3　养心生脉颗粒对 ISO 致心肌缺血模型小鼠 LDH 和 CK 活力的影响

心肌酶谱结果显示，与空白组相比，模型组小鼠血清 LDH、CK 活力显著升高（$P<0.01$），养心生脉颗粒各给药组小鼠 LDH 均降低，以养心生脉颗粒低剂量组 LDH 降低最为显著（$P<0.01$），各给药组 CK 活力均显著降低，以养心生脉颗粒中剂量组 CK 降低最为显著，且与阳性药组水平相当（$P<0.01$）（见表 5）。

表 5　养心生脉颗粒对 ISO 致心肌缺血模型小鼠 LDH 和 CK 活力的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 5　Effect of Yangxin Shengmai granules on the serum LDH and CK content in myocardial ischemia model mice induced by ISO ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	LDH/（U·L^{-1}）	CK/（U·mL^{-1}）
空白组	12	3159.92±380.37	2.23±0.73
模型组	12	3732.18±219.85**	5.06±0.66**
养心生脉颗粒低剂量组	12	3144.51±276.89$^{\#\#}$	3.88±0.60$^{\#\#}$
养心生脉颗粒中剂量组	12	3483.62±472.04$^{\#}$	2.60±0.87$^{\#\#}$
养心生脉颗粒高剂量组	10	3410.40±248.65$^{\#}$	2.91±0.76$^{\#\#}$
阳性药组	12	3344.89±394.46$^{\#\#}$	2.39±0.96$^{\#\#}$

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

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

4　讨论

近年来，随着生物 - 心理 - 社会医学模式的发展，焦虑、抑郁等负性情绪障碍在心血管疾病的发生发展中越来越受到关注。临床上，患者由于疾病症状反复、长期服药带来的药物不良反应以及治疗费用高等问题，心理负担加重，长期处于压力刺激下，容易出现焦虑、抑郁等心理问题。严重焦虑、抑郁不仅会导致患者病情反复、疗效欠佳，影响患者生活质量，而且会增加心血管不良事件发生的风险 [9]。心血管疾病早期自主神经主要表现为副交感神经兴奋下降，交感神经兴奋性上升，后期自主神经失衡进展为副交感神经的慢性、持续性损伤过程，而焦虑可引起交感神经活动增加，加重平衡向交感系统倾斜，从而使冠状动脉发生痉挛、狭窄，使心率变异性降低 [10]，同时焦虑可促使机体处于应激状态，增加儿茶酚胺类激素的释放，作用于肾上腺素能 α 和 β 受体，可增加血小板聚集，降低心肌造血能力，而心肌缺血缺氧可激活交感神经，导致大量儿茶酚胺进入循环系统，使机体代谢紊乱，神经内分泌失调 [11-12]。

目前建立心肌缺血伴焦虑模型多采用结扎冠状动脉左前降支结合慢性不可预见性刺激（chronic unpredicted mild stress，CUMS）的复合模型，该模型手术操作难度大，病死率高，加之 CUMS 实验方法多样，实际操作困难，方法选择与实验强度没有统一标准，若强度较大，容易造成动物物理性损伤，增加模型动物病死率，同时模型过重，可能影响药物作用效果 [13]。儿茶酚胺类药物 ISO 诱导小鼠心肌缺血模型是评价药物对心肌缺血损伤作用的经典模型之一 [14]，此外，据报道，经过 ISO 刺激，能够模拟慢性压力状态下儿茶酚胺类激素释放，使小鼠产生焦虑样行为，其行为学表现与 CUMS 小鼠一致，此造模方法简单易操作，能够较好地模拟心肌缺血患者伴焦虑的临床特征，避免复合模型中操作多样化、难度较大、操作强度无标准等特点 [15]，故采用外源性儿茶酚胺类药物 ISO 造模，构建心肌缺血伴焦虑模型，为后续临床及基础研究提供了一种新思路。

高架十字迷宫实验、明暗箱实验和旷场实验是研究动物焦虑样行为较为成熟经典的方法，是判断焦虑动物模型建立成功的主要手段 [16]。本实验行为学结果发现，ISO 诱导心肌缺血模型小鼠在高架十字迷宫中进入开放臂次数和滞留时间，以及在旷场实验中运动轨迹总路程均显著降低，且在旷场实验中心区域以及明暗箱实验中明箱停留的次数和时间均有降低的趋势，表明 ISO 诱导心肌缺血模型小鼠表现出显著地焦虑样行为，经养心生脉颗粒预处理后，小鼠进入开放臂、明箱和中心区域的次数和时间、旷场运动轨迹总路程的增加均可反映小鼠焦虑水平降低，探究行为活动增加。

ISO 为人工合成的 β 受体强效激动剂，大剂量应用能够使交感神经过度兴奋，增加心脏负荷和外周阻力，导致心脏供血不足，心肌发生不可逆性缺血性损伤 [14]。β- 肾上腺素能受体激活不仅会增加心率，还会增加左心室收缩力，从而刺激心脏的活动 [17]，通过加速心率，ISO 会引起左心室心内膜下心肌灌注损伤，导致继发性心内膜下心肌严重缺血造成心肌细胞损害，心电图表现为 ST 段抬高或压低及 T 波改变，正常心电等电位线无明显的正向或负向偏移，而心肌缺血状态下的异常电流可引起缺血部位 ST 段偏移，因此，ST 段的偏移程度可以反映心肌缺血及损伤的程度，是用于评价心肌缺血变化的敏感指标 [18-19]。本实验结果发现，ISO 组小鼠心电图 ST 段偏移程度逐渐增大，15 ～ 20 min 时，ST 段变化值大于 0.05 mV，提示心肌缺血模型建立成功。经养心生脉颗粒干预后能显著抑制 ISO 诱导的心电图 ST 段抬高，有效改善心肌缺血性损伤。

ISO 诱导心肌缺血与心肌细胞膜通透性改变有关，儿茶酚胺类脂质过氧化产物可对心肌细胞膜造成不可逆性损伤，使细胞膜的功能和完整性丧失，导致 LDH 及 CK 等心肌酶从组织渗透到血液中 [20]，LDH 和 CK 特异性较高，少量心肌组织损伤或坏死都会引起血清 LDH 和 CK 活性水平

升高，故血清中 CK 和 LDH 活性增加对评判心肌损伤具有重要意义[21]。本研究发现，养心生脉颗粒预处理可有效逆转 ISO 诱导心肌缺血小鼠血清心肌酶 CK 和 LDH 的升高，提示养心生脉颗粒对 ISO 所致小鼠心肌缺血损伤具有保护作用。

综上，养心生脉颗粒对 ISO 诱导小鼠心肌缺血具有保护作用，同时能够改善其焦虑样行为。

参考文献

[1] Zhao D，Liu J，Wang M，et al. Epidemiology of cardiovascular disease in China：current features and implications [J]. Nat Rev Cardiol，2019，16（4）：203-212.

[2] 孙佳，潘洁，秦兰，等 . 荭草提取物对异丙肾上腺素诱导大鼠急性心肌缺血的作用及机制 [J]. 贵州医科大学学报，2021，46（3）：275-280.

[3] Corina BI，Maria PR，Octavia S，et al. Comparative protective effect of nigella sativa oil and vitis vinifera seed oil in an experimental model of isoproterenol-induced acute myocardial ischemia in rats [J]. Molecules，2021，26（11）：3221.

[4] 王俊力，李立为，田强强，等 . 舒心口服液治疗稳定性冠心病合并焦虑的疗效及对睡眠影响 [J]. 医药导报，2021，40（6）：776-781.

[5] Wei H，Li H，Wan SP，et al. Cardioprotective effects of malvidin against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats：a mechanistic study [J]. Med Sci Monitor，2017，23：2007.

[6] Feng LF，Ren JL，Li YF，et al. Resveratrol protects against isoproterenol induced myocardial infarction in rats through VEGF-B/AMPK/eNOS/NO signalling pathway [J]. Free Radic Res，2019，53（1）：82-93.

[7] Leo G，Guescini M，Genedani S，et al. Acute isoproterenol induces anxiety-like behavior in rats and increases plasma content of extracellular vesicles [J]. Physiol Behav，2015，142：79-84.

[8] Khalsaahib S，Hassanpour MS，Strober M，et al. Interoceptive anxiety and body representation in anorexia nervosa [J]. Front Psychiatry，2018，9：444.

[9] 孟泳铮，余秀兰，宋珺，等 . 活血安神方治疗冠心病伴焦虑抑郁的疗效观察 [J]. 中医药导报，2021，27（9）：117-120，124.

[10] 谷体心，李敏，张慧杰，等 . “双心医学” 联合药物对改善冠心病伴抑郁和焦虑患者心率变异性与心功能的作用 [J]. 药物生物技术，2020，27（3）：257-260.

[11] 刘俊飞，任建明，孟宪磊 . 合并抑郁、焦虑对老年冠心病患者 PCI 术后自主神经功能的影响 [J]. 国际精神病学杂志，2021，48（2）：279-282.

[12] McEwen BS，Bowles NP，Gray JD，et al. Mechanisms of stress in the brain [J]. Nat Rev Neurosci，2015，18（10）：1354.

[13] 赵谦，王安娜，高雪松，等 . 慢性不可预知性温和应激致抑郁样大鼠模型的研究进展 [J]. 实验动物与比较医学，2020，40（4）：344-353.

[14] Zhang JY，Yu J，Chen Y，et al. Exogenous hydrogen sulfide supplement attenuates isoproterenol-induced myocardial hypertrophy in a sirtuin 3-dependent manner [J]. Oxid Med Cell Longev，2018，2018（4）：1-17.

[15] 张影，鲁艳杰，刘莹，等 . 异丙肾上腺素诱导的慢性应激焦虑样行为学检测 [J]. 承德医学院学报，2021，38（3）：181-186.

[16] 孙君辉，凌沛学，蒋秋燕，等 . 焦虑大鼠模型的应用及研究进展 [J]. 食品与药品，2011，13（11）：438-441.

[17] Silvia BŞ，Elena PA，Nastasia P，et al. Polyphenolic compounds，antioxidant，and cardioprotective effects of pomace extracts from fetească neagră cultivar [J]. Oxid Med Cell Longev，2018，2018：1-11.

[18] Collins P，Billings CG. Isoprenaline-induced changes in regional myocardial perfusion in the pathogenesis of myocardial necrosis [J]. Br J Exp Pathol，1976，57（6）：637.

[19] 荆焰，杨芳炬，邓文龙，等 . LLN 对大鼠急性心肌缺血损伤的作用及作用机制研究 [J]. 中药药理与临床，2009，25（5）：22-24.

[20] Boarescu PM，Boarescu I，Bocsan IC，et al. Experimental model of acute myocardial infarction for evaluation of prevention and rehabilitation strategies in cardiovascular diseases-a pilot study [J]. Balneo Res J，2019，10（3）：288-293.

[21] Hassan MQ，Akhtar M，Ahmed S，et al. Nigella sativa protects against isoproterenol-induced myocardial infarction by alleviating oxidative stress，biochemical alterations and histological damage [J]. Asian Pac J Trop Bio，2017，7（4）：294-299.

（收稿日期：2021-11-07；修回日期：2022-01-28）

基于 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术的 3 种蒿属植物化学成分比较研究

毕玥琳[1]，张诗芸[1]，冯欣[1]，杜小伟[2]，瓮学智[3*]，孙毅坤[1*]（1. 北京中医药大学中药学院，北京　102400；2. 北京市丰台区食品药品安全监控中心，北京　100071；3. 北京市药品检验研究院，北京　102206）

摘要：目的　基于 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术比较 3 种蒿属植物化学成分的差异。**方法**　3 种蒿属植物 75% 甲醇提取物分析采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱（1.7 μm，2.1 mm×150 mm）；流动相为 0.1% 甲酸水溶液和乙腈，梯度洗脱；柱温 40 ℃，电喷雾离子源在正负离子模式下交替扫描对色谱流出物进行质谱检测，利用相关文献及二级质谱信息对各植物中化合物进行鉴别。**结果**　茵陈中共检测出 32 种化学成分，艾叶中共检测出 36 种化学成分，藏龙蒿中共检测出 33 种化学成分，包括黄酮、有机酸、香豆素类成分。**结论**　本试验利用 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 法对 3 种蒿属植物中的化学成分进行鉴别与区分，为蒿属植物的开发与利用奠定了基础。

关键词：茵陈；艾叶；藏龙蒿；UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS；化学成分
中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1527-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.009

Chemical compounds in Artemisiae scopariae herba, Artemisiae argyi folium and Artemisia waltonii based on UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS

BI Yue-lin[1], ZHANG Shi-yun[1], FENG Xin[1], DU Xiao-wei[2], WENG Xue-zhi[3*], SUN Yi-kun[1*] (1. *School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102400; 2. *Beijing Fengtai Food and Drug Safety Monitoring Center*, *Beijing* 100071; 3. *Beijing Institute for Drug Control*, *Beijing* 102206)

Abstract: Objective To compare the chemical conponents in Artemisiae scopariae herba, Artemisiae argyi folium and Artemisia waltonii by UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS. **Methods** Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} column (1.7 μm, 2.1 mm×150 mm) was used to analyze 75% methanol extracts of the three Artemisia plants at 40 ℃ , the mobile phase was comprised of 0.1% formic acid aqueous solution and acetonitrile in the gradient elution. The electrospray ion source alternately scanned the chromatographic effluent in the positive and negative ion mode for mass detection. Relevant literatures and MS/MS information were used to identify compounds in various plants. **Results** Totally 32 chemical constituents were identified in Artemisiae scopariae herba; 36 chemical constituents were detected in Artemisiae argyi folium; and 33 chemical constituents were found in Artemisia waltonii, including flavonoids, coumarins, and organic acids, etc. **Conclusion** UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS can identify and distinguish the chemical components in the three Artemisia plants, which lays a foundation for the development and utilization of Artemisia plants.

Key words: Artemisiae scopariae herba; Artemisiae argyi folium; Artemisia waltonii; UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS; chemical constituents

基金项目：中国西藏自治区科技攻关项目（No.XZ201801-GA-16）。
作者简介：毕玥琳，女，在读硕士研究生，主要从事中药分析研究，email：biyuelin1023@163.com　*通信作者：瓮学智，男，主管药师，主要从事中药鉴定与中药质量评价研究，email：627307592@qq.com；孙毅坤，男，博士研究生导师，主要从事中药质量评价研究，email：sunyk@bucm.edu.cn

蒿属（*Artemisia*）为菊科（Compositae）春黄菊族（Anthemideae）蒿亚族（Artemisiinae）植物，是该族中第一大属。我国蒿属植物分布广泛，在温带、热带、山区、草原、荒漠等地区均有分布，种类众多，且大部分均为草本植物，常具有特殊香气。该属中的许多植物具有抗炎、止血、利尿、解毒等功效，在医药业具有较高的经济价值。

茵陈（Artemisiae scopariae herba）、艾叶（Artemisiae argyi folium）、藏龙蒿（Artemisia waltonii）同为蒿属植物，形态相似，不易从外表进行鉴别，且 3 种药材经炮制过后更加难以区分，经常在中药材市场及临床应用中发生混淆 [1-2]。茵陈是一种代表性的蒿属植物药，来源于茵陈蒿（*Artemisia capillaris* Thunb.）或滨蒿（*Artemisia scoparia* Waldst.et Kit.）的干燥地上部分，主要分布于陕西、山西、河北等地，其味微苦微辛，能泄能降，在治疗肝胆湿热、清利脾胃、通利小便方面疗效显著，也常用于治疗热结黄疸等症 [3]。艾叶来源于植物艾（*Artemisiae argyi* Levl. et Vant.）的干燥叶，在我国东北、华北、华东、西南等地有广泛分布，为温性药，可以暖气血、温经脉、散寒湿，临床上多以复方配伍使用，善于安胎，治疗痛经等妇科疾病，同时，艾叶也是灸法的主要药用材料之一 [4]。藏龙蒿是菊科蒿属的植物，与牛尾蒿和野艾蒿同为野艾蒿的原植物，是中国的一种特有植物，分布于青海、四川、云南、西藏，其地上部分可以用来治疗皮肤病、疫疽、炭疽、虫病等疾病 [5]。近年来的研究表明，3 种药材的功效有一定程度的相似，但其成分是否存在差异，差异是否影响到药理作用，尚未见有相关文献报道。

UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术具有高灵敏度、高分离能力的特点，常被用于中药材及中药复方复杂化学成分的鉴定 [6-7]。

目前，蒿属植物之间的差异鉴别研究主要集中于外观鉴别，本研究采用 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术，依据相关数据库及相关文献，结合化合物准分子离子峰、碎片离子及保留时间分别鉴别 3 种蒿属植物中所含有的化合物，为 3 种蒿属植物之间的鉴别提供了新的思路与方法。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Thermo Scientific Q Exactive 质谱仪、Xcalibur 工作站、Vanquish Duo UHPLC System for Dual LC Workflows 液相系统、Pico 17 高速离心机（美国 Thermo Scientific 公司）；CPA225D 电子天平（德国 SARTORIUS 公司）；KQ5200DA 超声波清洗机（中国昆山舒美公司）。

1.2 试药

质谱级乙腈（中国赛默飞世尔科技有限公司）、质谱级甲酸（美国 ROE 公司）；水为屈臣氏饮用水；茵陈（批号：67248413259）、艾叶（批号：10036376822278）（北京同仁堂）及藏龙蒿（河北安国药材市场）均由北京市药品检验研究院常增荣主任药师鉴定。

2 方法

2.1 样本制备

将 3 种植物样品剪碎（直径 0.1 ～ 0.2 cm），临用前分别称取 0.2 g，加 75% 的甲醇 10 mL 浸没，超声 30 min，将提取液于 4828 g 离心 10 min 后取出上清液，将上清液稀释 5 倍后，再次于 4828 g 离心 10 min 后取出上清液，即得。

2.2 检测条件

2.2.1 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱（1.7 μm，2.1 mm×150 mm，Milford，MA，USA），柱温 40 ℃，进样量 5 μL，流速 0.3 mL • min^{-1}。流动相为 0.1% 甲酸水溶液（A）和乙腈（B），洗脱程序：0 ～ 2 min，5%B；2 ～ 17 min，5% ～ 98%B；17 ～ 20 min，98%B。

2.2.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子化源（ESI）；正负离子交替扫描；扫描模式为：全扫描 / 数据依赖的二级扫描（Full scan/ddMS^2），扫描范围为 *m/z* 100 ～ 1300 Da，毛细管温度为 350 ℃。正模式下的喷雾电压为 3800 V，负模式下的喷雾电压为 3200 V，鞘气为 35 arb，辅助气 15 arb，MS^2 采用低、中、高的 3 种碰撞能量对母离子进行二级碎裂。考虑到不同结构化合物在正负离子模式下需要的能量不一样，同时为了增加碎片离子的多样性，正离子模式碰撞能为 20 V、40 V、60 V，负离子模式碰撞能为 30 V、50 V、70 V。一级质谱分辨率：70 000 FWHM（Full Width at Half Maximum），二级质谱分辨率：17 500 FWHM。

3 结果

3 种蒿属植物样品按照“2.2”项下条件进行 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 分析，在正离子模式下和负离子模式下对其进行检测，得到 3 种植物在正、负离子模式下的 BPI 图，分别见图 1、2。将检测所得的准分子离子峰、碎片离子、保留时间等信息与相关文献数据进行分析和鉴定，得出茵陈、艾叶、藏龙蒿的化学成分，并对这三者的化学成分进行比较，若是化合物响应值低于 1×10^{-4}，则认定化合物未检出，鉴定结果见表 1、2，图 3 为 3 种蒿属植物中化合物成分差异的

韦恩图。结果共鉴定出 45 种化合物，包括有机酸类 17 个，黄酮类 17 个，香豆素类 4 个，氨基酸类 2 个，萜类 2 个等。

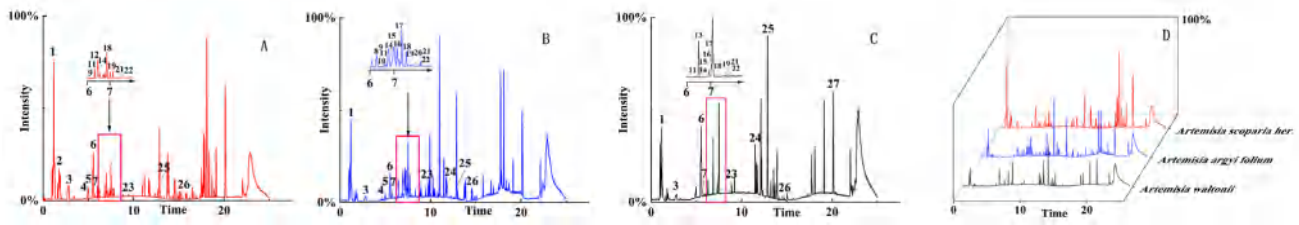


图 1　茵陈（A）、艾叶（B）、藏龙蒿（C）正离子模式下离子流图及其对比图（D）

Fig 1　Total ion current chromatograms of Artemisiae scopariae herba（A），Artemisiae argyi folium（B）and Artemisia waltonii（C）in positive ion mode and their comparison（D）

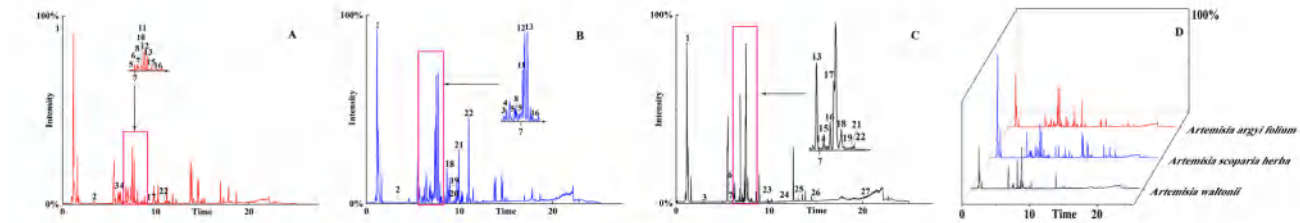


图 2　茵陈（A）、艾叶（B）、藏龙蒿（C）负离子模式下离子流图及其对比图（D）

Fig 2　Total ion current chromatograms of Artemisiae scopariae herba（A），Artemisiae argyi folium（B）and Artemisia waltonii（C）in negative ion mode and their comparison（D）

表 1　3 种植物中化学成分的 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 正离子鉴定结果 [13-20]

Tab 1　Identified chemical constituents of Artemisiae scopariae herba，Artemisiae argyi folium and Artemisia waltonii by UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS in positive ion mode[13-20]

No.	理论值（*m/z*）	碎片离子（*m/z*）	分子式	化合物名	t_R（error）/min（$\times 10^{-6}$）		
					茵陈	艾叶	藏龙蒿
1	116.0706	102.1556，87.1049，70.0659	$C_5H_9NO_2$	脯氨酸 [13]	1.18（－2.58）	1.18（－2.58）	1.26（－2.58）
2	165.0546	123.0443，119.0494，95.0496	$C_9H_8O_3$	对香豆酸 [15]	1.64（－1.21）	－	－
3	166.0862	120.0810，103.0546，149.0599	$C_9H_{11}NO_2$	苯丙氨酸 [17]	2.82（－0.60）	2.84（0.60）	2.80（－1.20）
4	207.0652	190.0767，163.0390，135.0442	$C_{11}H_{10}O_4$	滨蒿内酯 [14]	4.95（0.00）	4.96（2.41）	－
5	355.1024	163.0390，145.0286，135.0442	$C_{16}H_{18}O_9$	1- 咖啡酰奎宁酸 [13]	5.56（0.28）	5.61（0.00）	5.60（0.28）
6	355.1021	163.0390，135.0442，117.0337	$C_{16}H_{18}O_9$	绿原酸 [14]	5.59（0.00）	5.61（0.00）	5.60（－0.56）
7	179.0339	151.0391，135.0441，123.0442	$C_9H_6O_4$	7，8- 二羟基香豆素 [13]	－	6.38（0.51）	－
8	177.0546	163.0392，145.0284，135.0443	$C_{10}H_8O_3$	7- 甲氧基香豆素 [18]	6.55（－1.96）	6.54（0.00）	－
9	369.1180	177.0546，161.1324，145.0286	$C_{17}H_{20}O_9$	阿魏酰奎宁酸 [15]	－	6.55（－1.08）	－
10	465.1028	303.0498，285.0389	$C_{21}H_{20}O_{12}$	金丝桃苷 [14]	6.75（－1.08）	6.85（－1.51）	6.63（－1.51）
11	433.1129	415.1017，397.0920，379.0811，337.0704，323.0912，313.0706，295.0603，283.0601	$C_{21}H_{20}O_{10}$	牡荆素 [14]	6.79（1.15）	－	－
12	611.1606	345.0605，303.0497，153.0181	$C_{27}H_{30}O_{16}$	quercetin-3-*O*-robinoside[17]	－	－	6.83（－1.31）
13	595.1657	287.0549，153.0184，85.0296	$C_{27}H_{30}O_{15}$	山柰酚 -3-*O*- 芸香糖苷 [20]	6.95（－1.51）	6.95（－0.67）	6.97（－1.51）
14	465.1028	303.0498，285.0410，229.0497	$C_{21}H_{20}O_{12}$	异槲皮苷 [15]	7.01（－1.08）	7.06（－1.51）	7.05（－1.51）
15	625.1763	479.2037，317.0654，302.0420	$C_{28}H_{32}O_{16}$	水仙苷 [13]	7.29（－0.96）	7.32（－0.32）	7.32（－0.48）
16	517.1341	355.1515，163.0389，135.0441	$C_{25}H_{24}O_{12}$	二咖啡酰奎尼酸或其同分异构体 [20]	－	7.48（－0.19）	7.43（0.19）
17	479.1184	317.0653，302.0419，153.0181	$C_{22}H_{22}O_{12}$	异鼠李素 -3-*O*- 葡萄糖苷 [15]	7.50（－1.46）	7.59（－2.09）	7.64（－0.42）
18	355.1016	377.0844，163.0391，135.0442	$C_{16}H_{18}O_9$	隐绿原酸 [16]	7.71（0.00）	7.74（0.00）	7.75（－2.54）
19	179.0339	135.0438，119.0493，105.0702	$C_9H_6O_4$	6，7- 二羟基香豆素 [13]	－	7.76（0.00）	－
20	146.0600	118.0654，117.0571，91.0547	C_9H_7NO	4- 甲酰基吲哚 [14]	7.94（－1.37）	7.95（－0.68）	7.95（－0.68）
21	317.0652	302.0420，285.0391，168.0054	$C_{16}H_{12}O_7$	茵陈色原酮 [13]	7.98（－0.95）	8.03（－0.95）	7.98（－1.63）
22	593.1865	477.0523，447.1283，285.0755	$C_{28}H_{32}O_{14}$	genkwanin-4’-*O*-glucosy-Rhamnoside[19]	8.67（－0.51）	8.67（－1.52）	8.7（－2.87）
23	285.0758	270.0523，242.0547，229.1225，153.0109	$C_{16}H_{12}O_5$	芫花素 [21]	－	11.54（0.35）	11.53（0.70）

续表 1

No.	理论值（*m/z*）	碎片离子（*m/z*）	分子式	化合物名	t_R（error）/min（×10^{-6}）		
					茵陈	艾叶	藏龙蒿
24	149.1325	131.0856，121.1014，107.0860	$C_{11}H_{16}$	Carvacrol 或其同分异构体 [14]	12.91（0.00）	12.91（0.00）	12.91（－0.67）
25	279.2319	95.0860，119.0860，105.0703	$C_{18}H_{30}O_2$	亚麻酸或其同分异构体 [13]	14.63（2.15）	14.65（0.00）	14.68（2.15）
26	135.1168	107.0859，105.0703，91.0548	$C_{10}H_{14}$	*p*-Cymene[19]	—	—	20.06（－0.74）

表 2　3 种植物中化学成分的 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 负离子鉴定结果 [13-21]

Tab 2　Identified chemical constituents of Artemisiae scopariae herba，Artemisiae argyi folium and Artemisia waltonii by UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS in negative ion mode[13-21]

No.	理论值（*m/z*）	碎片离子（*m/z*）	分子式	化合物名	t_R（error）/min（×10^{-6}）		
					茵陈	艾叶	藏龙蒿
1	191.0561	191.0558，93.0335，87.0077	$C_7H_{12}O_6$	奎宁酸 [18]	1.23（2.09）	1.23（2.09）	1.22（1.57）
2	353.0878	191.0558，179.0347，173.0454，135.0442，85.0284	$C_{16}H_{18}O_9$	新绿原酸 [14]	3.35（－4.25）	3.36（－3.97）	—
3	593.1512	593.1528，473.1101，383.0783，353.0677，325.0727，297.0774	$C_{27}H_{30}O_{15}$	apigenin-6，8-Di-*C*-hexoside[19]	6.03（－2.70）	5.98（－4.72）	6.07（0.84）
4	353.0878	191.0558，179.0351，173.0088，161.0244，135.0444	$C_{16}H_{18}O_9$	绿原酸 [14]	6.13（－4.25）	6.14（－3.97）	6.11（0.28）
5	367.1034	193.0504，191.0558，173.0452	$C_{17}H_{20}O_9$	5-freuoylquinicacid[13]	6.54（－2.72）	6.55（－1.91）	6.54（－2.18）
6	153.0193	109.0286，91.0179，65.0385	$C_7H_6O_4$	原儿茶酸 [18]	6.83（3.92）	—	—
7	431.0984	341.0676，311.0569，283.0618，269.0466，161.0240	$C_{21}H_{20}O_{10}$	牡荆素 [14]	6.97（－2.09）	—	—
8	463.0882	301.0355，300.0283，271.0257	$C_{21}H_{20}O_{12}$	quercetin-3-*O*-glucoside[21]	6.98（－2.38）	6.90（－2.59）	7.07（－3.89）
9	461.0725	341.0669，298.0495，285.0410	$C_{21}H_{18}O_{12}$	luteolin-7-glycuronicacid[15]	—	7.15（－2.60）	—
10	593.1501	593.1525，285.0410，284.0333	$C_{20}H_{34}O_{20}$	kaempferol-3-*O*-rhamnosyhexose[21]	7.24（－3.71）	—	7.24（－4.05）
11	515.1195	353.0892，191.0558，179.0346，161.0238，135.0444	$C_{25}H_{24}O_{12}$	异绿原酸 b[17]	7.38（－1.36）	7.33（－0.97）	7.43（－1.55）
12	353.0878	191.0558，179.0345，173.0452，161.0237，135.0443	$C_{16}H_{18}O_9$	隐绿原酸 [17]	7.47（－4.25）	7.47（－1.98）	7.49（－0.85）
13	515.1196	353.0884，191.0558，179.0346，173.0451，135.0444	$C_{25}H_{24}O_{12}$	异绿原酸 a[21]	7.64（－1.36）	7.67（－0.39）	7.70（－1.55）
14	529.1563	179.0347，161.0293，135.0443	$C_{23}H_{30}O_{14}$	3-caffeoyl-5-feruoylquicinicacid[16]	—	—	7.79（－1.32）
15	187.0976	143.1071，125.0963，97.0648，83.0491	$C_9H_{16}O_4$	壬二酸 [19]	8.04（1.60）	—	8.04（2.14）
16	515.1197	353.0884，191.0557，179.0345，173.0450，161.0238，135.0443	$C_{25}H_{24}O_{12}$	异绿原酸 c[13]	8.19（－1.36）	8.20（－1.16）	8.20（－1.55）
17	677.1512	515.1190，353.0886，191.0557，135.0443	$C_{34}H_{30}O_{15}$	3，4，5-三咖啡酸奎宁酸 [13]	8.64（－1.51）	—	8.65（－2.66）
18	287.0561	151.0038，135.0443，107.0128	$C_{15}H_{12}O_6$	eriodictyolchalcone[19]	—	8.88（－1.39）	—
19	345.0616	330.0388，315.0147，287.0196，271.0243，165.9898	$C_{17}H_{14}O_8$	5，7，3’，5’-tetrahydroxy-6，4’-dimethoxyflavone[14]	—	8.96（－1.74）	—
20	345.0616	330.0387，315.0152，287.0201，259.0252，136.9871	$C_{17}H_{14}O_8$	5，7，4’，5’-tetrahydroxy-6，3’-dimethoxyflavone[16]	—	9.28（－3.19）	9.30（－1.74）
21	329.0667	314.0436，299.0201，271.0252	$C_{17}H_{14}O_7$	棕矢车菊素 [21]	—	9.90（－1.52）	9.91（0.00）
22	343.0823	328.0595，313.0362，298.0125	$C_{18}H_{16}O_7$	异泽兰黄素 [13]	10.99（0.87）	11.00（－1.46）	10.98（－1.75）

3.1　有机酸类化合物

3 种植物中均含有大量的有机酸类化合物，经数据库相关数据比对，发现负离子模式下化合物 **2**、**4**、**12** 为绿原酸及其同分异构体，经本课题前期工作及大量文献验证 [14，17]，化合物 **2**、**4**、**12** 分别为新绿原酸，绿原酸及隐绿原酸。隐绿原酸由一分子的奎尼酸和一分子的咖啡酸酯化生成，一级质谱结果显示，在负离子模式下准分子离子 *m/z* 353.0878 $[M-H]^-$，二级碎片离子信息为 *m/z* 191.0558、179.0345、173.0452、161.0237、

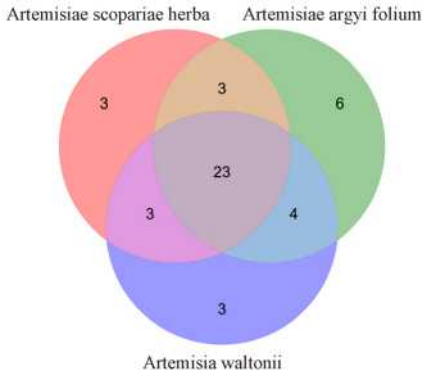


图 3　茵陈、艾叶、藏龙蒿差异化合物韦恩图

Fig 3　Venn diagram of differential compounds in Artemisiae scopariae herba，Artemisiae argyi folium and Artemisia waltonii

135.0443，其裂解途径为酯键断裂得到奎尼酸碎片离子峰 *m/z* 191.0558 $[M-C_9H_6O_3-H]^-$ 以及咖啡酸碎片离子峰 *m/z* 179.0345 $[M-C_7H_{10}O_5-H]^-$，奎尼酸继续脱去一分子 H_2O 生成 *m/z* 173.0452 $[M-C_9H_6O_3-H_2O-H]^-$，而咖啡酸继续脱去 CO_2 得到碎片离子 *m/z* 135.0443 $[M-C_7H_{10}O_5-CO_2-H]^-$，其可能的裂解途径见图 4。

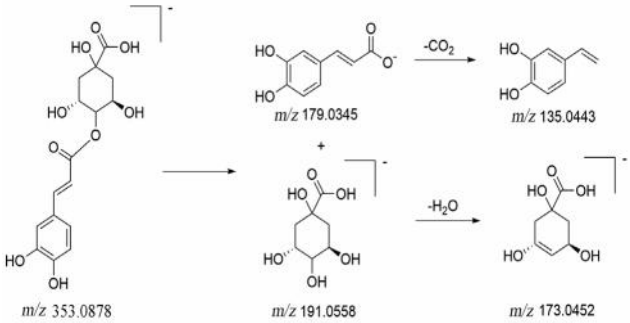


图 4　隐绿原酸的裂解途径

Fig 4　Fragmentation pathways of cryptochlorogenic acid

茵陈、藏龙蒿共有的化合物壬二酸是一种有机酸化合物，分子式为 $C_9H_{16}O_4$，其在负离子模式下准分子离子峰 *m/z* 187.0976 $[M-H]^-$ 峰强高达 1.24×10^7，二级质谱图中所显示的碎片分别为 *m/z* 143.1071、125.0963、97.0684、83.0491，推测其裂解途径为化合物先脱去一分子 CO_2，生成 *m/z* 143.1071 $[M-CO_2-H]^-$，再脱去一分子 H_2O 生成 *m/z* 125.0963 $[M-H_2O-CO_2-H]^-$，进而脱去甲基生成 *m/z* 97.0684 $[M-C_2H_4-H_2O-CO_2-H]^-$ 以及 *m/z* 83.0491 $[M-C_3H_6-H_2O-CO_2-H]^-$。其可能的裂解途径见图 5。

3.2　黄酮类化合物

金丝桃苷是一种黄酮醇类化合物，是 3 种植物的共有化合物，与异槲皮素苷互为同分异构体，结合数据库与相关文献 [14-15] 及两峰保留时

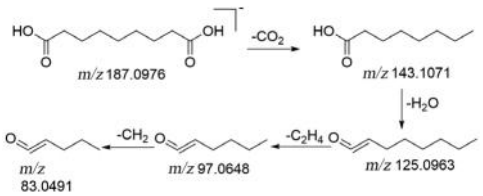


图 5　壬二酸的裂解途径

Fig 5　Fragmentation pathways of azelaic acid

间，确定正离子模式下化合物 **10** 为金丝桃苷，化合物 **14** 为异槲皮苷。金丝桃苷在正离子模式下，准分子离子峰为 *m/z* 465.1028，其二级碎片离子信息为 *m/z* 303.0498、285.0389。推测其裂解途径为准分子离子 *m/z* 465.1034 $[M+H]^+$ 失去一个半乳糖，得到碎片离子 *m/z* 303.0498 $[M-C_6H_{10}O_5+H]^+$，再失去一个羟基得到碎片离子 *m/z* 285.0389 $[M-C_6H_{10}O_5-OH+H]^+$，其可能的裂解途径见图 6。

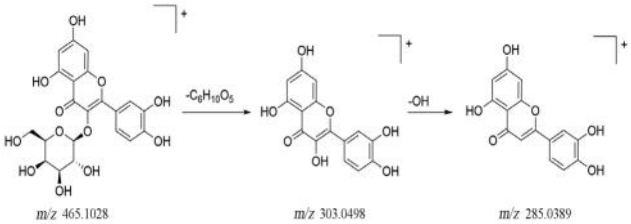


图 6　金丝桃苷的裂解途径

Fig 6　Fragmentation pathways of hyperoside

从 3 种植物中均鉴定出异泽兰黄素，该化合物二级质谱主要丢失 $-CH_3$，$-OCH_2$ 等基团。负离子模式中的化合物 **22** 准分子离子峰为 *m/z* 343.0823，其脱去一分子的 $-CH_3$ 生成碎片离子 *m/z* 328.0595 $[M-CH_3-H]^-$，再脱去一分子 $-OCH_2$ 则生成碎片离子 *m/z* 298.0125 $[M-CH_3-OCH_2-H]^-$。同时，该化合物还可以直接脱去一分子 $-OCH_2$ 生成 $[M-OCH_2-H]^-$，其裂解途径见图 7。

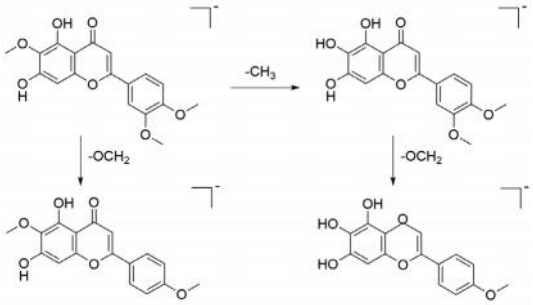


图 7　异泽兰黄素的裂解途径

Fig 7　Fragmentation pathways of isozelanthin

茵陈特有的牡荆素，其在正离子模式下的准分子离子峰为 *m/z* 433.1129，该化合物有 3 种裂解方向，其一为 A 环上所连接的葡萄糖苷发生裂解，生成碎片 *m/z* 313.0706 $[M-C_4H_8O_4+H]^+$，再

脱去一分子羰基生成黄酮苄基离子 *m/z* 283.0601 $[M-C_4H_8O_4-CHO+H]^+$，黄酮 B 环发生 RDA 裂解，裂解为 *m/z* 119.0494，165.0184 两个碎片离子。其二为化合物连续脱掉三分子水，分别生成碎片 *m/z* 415.1017，397.0920 以及 379.0811。其三为化合物 B 环所连接的糖被破坏生成碎片 *m/z* 337.0704 $[M-C_2H_8O_4+H]^+$，进而失去一个亚甲基生成碎片 *m/z* 323.0912$[M-C_2H_8O_4-CH_2+H]^+$。其裂解途径见图 8。

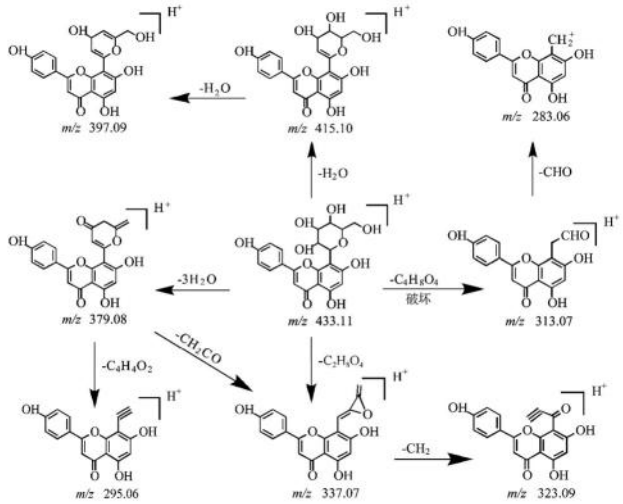


图 8　牡荆素的裂解途径

Fig 8　Fragmentation pathways of vitexin

4　讨论

本研究从 3 种蒿属植物中共鉴定出 45 种化学成分，其中 3 种植物的共有成分有 23 种，包括绿原酸、异泽兰黄素、金丝桃苷等化合物。茵陈特有成分 3 种（对香豆酸、原儿茶酸、牡荆素），艾叶特有成分 6 种（阿魏酰奎宁酸、7，8- 二羟基香豆素、6，7- 二羟基香豆素、luteolin-7-glycuronic acid、eriodictyol chalcone、5，7，3’，5’-tetrahydroxy-6，4’-dimethoxyflavone），藏龙蒿特有成分 3 种（quercetin-3-*O*-robinoside、*p*-cymene、3-caffeoyl-5-feruoylquicinic acid）。3 种蒿属植物虽为同属，但其基原不同，成分也不相同。茵陈特有成分对香豆酸可以增加细菌膜外的渗透性，有利于药物通过细胞膜进入内部，以增强药物抗菌作用 [22]。近期，有学者证实茵陈与艾叶共有成分 6，7- 二甲氧基香豆素对苯丙氨酸代谢路径中的苯丙氨酸羟化酶、氨基酸氧化酶及酪氨酸转氨酶的活性具有调节作用，从而干预酒精诱导的原代肝细胞损伤，可能是两种蒿属植物发挥保肝利胆功效的物质基础 [23]。茵陈色原酮为 3 种蒿属植物所共有成分，有研究发现，茵陈色原酮可以通过提高体内肝细胞乙醛脱氢酶（ALDH）水平，提升肝脏将乙醛降解为乙酸的能力，对急性肝损伤具有良好的保护作用 [24]。同时，茵陈色原酮可以通过抑制 MyD88 和 TIRAP 介导的 Akt、脂多糖（LPS）诱导的核因子 κB（NF-κB）和促分裂原活化的蛋白激酶（MAP）激活的炎症基因的表达来发挥抗炎作用 [25]。

本试验采用 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术建立了一种快速区别茵陈、艾叶与藏龙蒿的方法，与传统的色谱方法相比，本方法虽然受提取方法及质谱检测限的限制而无法鉴别出更多的化合物，但其用时更短，对碎片离子具有更高的准确性，更强的灵敏度，常用于中药或复杂物质中化合物的鉴定、筛选及定量分析，该法可为 3 种蒿属植物的鉴别研究及质量标准的建立提供参考，同时也为更多蒿属植物的开发以及药源植物的拓展提供了思路。

参考文献

[1] 肖军，吴庆红 . 常见蒿属药用植物的比较概述 [J]. 生物学教学，2016，41（12）：7-8.

[2] 林有润 . 中国古本草书艾蒿类植物的初步考订 [J]. 植物研究，1991（1）：1-24.

[3] 刘玉萍，邱小玉，刘烨，等 . 茵陈的药理作用研究进展 [J]. 中草药，2019，50（9）：2235-2241.

[4] 曹玲，于丹，崔磊，等 . 艾叶的化学成分、药理作用及产品开发研究进展 [J]. 药物评价研究，2018，41（5）：918-923.

[5] 现代青海省药品检验所，青海省藏医药研究所 . 中国藏药 [M]. 上海：上海科学技术出版社，1996：129-132.

[6] 李晨，吕婧，杨龙飞，等 . 基于 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 整合网络药理学探讨金银花抗 RSV 肺炎的作用机制 [J]. 中国医院药学杂志，2021，41（8）：769-776.

[7] 吕嘉苇，蒋希羽，庄楷，等 . 基于 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 的益气活血固肾颗粒化学成分分析 [J]. 时珍国医国药，2021，32（3）：548-550.

[8] 吴昊，张晨宁，向延柳，等 . 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术分析砂连和胃胶囊的化学成分 [J]. 中南药学，2020，18（9）：1535-1542.

[9] 曲玉霞，曹一佳，杨天歌，等 . 高效液相色谱法测定四臣止咳颗粒中 6 种成分的含量 [J]. 中南药学，2020，18（10）：1698-1701.

[10] 巩仔鹏，陈亭亭，侯靖宇，等 . 基于 UHPLC/Q-TOF/MS 分析羊耳菊有效组分的入血成分 [J]. 中国药理学通报，2017，33（11）：1605-1610.

[11] 刘英波，鲁丹，潘年松，等 . 软水蓼不同目数超微粉体溶出物的化学成分分析 [J]. 食品工业科技，2020，41（16）：220-226.

[12] 陆超，吴磊，刘志辉 . LC-MS/MS 法同时测定芪雪浸膏剂中 9 种成分的含量 [J]. 中南药学，2017，15（9）：

1313-1318.
[13] 谷瑶，梁忠云，陈松武，等 . 广西野生艾叶挥发油成分的 GC-MS 分析 [J]. 南方农业，2020，14（28）：13-15.
[14] 董岩，刘洪玲，王新芳 . 山东猪毛蒿挥发油化学成分的气相色谱 - 质谱研究 [J]. 中成药，2006，28（11）：1641-1644.
[15] 刘峻山，巩丽丽 . GC-MS 法分析茵陈挥发油主要成分 [J]. 化学分析计量，2014，23（4）：17-19.
[16] 谢韬，刘净，梁敬钰，等 . 滨蒿化学成分研究 [J]. 中国中药杂志，2005，30（17）：1390-1391.
[17] Han B，Xin Z，Ma S，et al. Comprehensive characterization and identification of antioxidants in Folium Artemisiae Argyi using high-resolution tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci，2017，1063：84-92.
[18] 王晓琴，周成江，张娜，等 . 野艾蒿化学成分研究 [J]. 中药材，2011，34（2）：234-236.
[19] Xia JX，Zhao BB，Zan JF，et al. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in Artemisiae Argyi Folium by HPLC-MS/MS and discovery of antioxidant ingredients based on relevance analysis [J]. J Pharm Biomed Anal，2019，175：112734.
[20] 吉双，卢桂荣，孟大利，等 . 艾叶的化学成分（Ⅱ）[J]. 沈阳药科大学学报，2010，26（7）：548-550.
[21] 黄丽平，徐远航，邓敏贞，等 . 茵陈的化学成分、药理作用机制与临床应用研究进展 [J]. 天然产物研究与开发，2021，33：676-690.
[22] 马宏宇，孙奕，吕阿丽，等 . 茵陈蒿化学成分的分离与鉴定 [J]. 中国药物化学杂志，2010，20（1）：61-63，69.
[23] 张姣姣，张婷，吴灿，等 . 茵陈色原酮对小鼠急性乙醇性肝损伤的保护作用研究 [J]. 抗感染药学，2011，8（4）：257-261.
[24] Khan S，Choi RJ，Shehzad O，et al. Molecular mechanism of capillarisin-mediated inhibition of MyD88/TIRAP inflammatory signaling in in vitro and in vivo experimental models [J]. J Ethnopharmacol，2013，145（2）：626-637.
[25] 张爱华 . 基于细胞代谢组学的茵陈蒿汤主要血中移行成分 6，7- 二甲氧基香豆素对酒精诱导原代肝细胞损伤的保护作用 [D]. 哈尔滨：黑龙江中医药大学，2015.

（收稿日期：2021-09-08；修回日期：2021-11-05）

健脾消癌方的 HPLC-Q-TOF/mF 指纹图谱分析及多指标含量测定

王容容[1]，柏正平[1]，杨静[1]，王其美[1]，陈林[2*]，卢林竹[3]，蒋益兰[1*]（1. 湖南省中医药研究院附属医院，长沙　410006；2. 湖南省中医药研究院中药研究所，长沙　410031；3. 湖南中医药大学，长沙　410028）

摘要：目的　建立健脾消癌方的高效液相色谱（HPLC）指纹图谱和多组分含量测定方法，采用飞行时间质谱对其主要化学成分进行结构鉴定。**方法**　制备 10 批健脾消癌方冻干粉，采用指纹图谱相似分析软件，对 10 批次样品指纹图谱的共有峰进行处理，评价不同批次样品间的质量差异；并采用高效液相色谱法串联飞行时间质谱对其主要化学成分进行结构鉴定，筛选出 34 种功效成分；最后对芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、野黄芩苷、新橙皮苷、甘草酸铵 6 种指标性成分进行定量分析。**结果**　健脾消癌方的 HPLC 指纹图谱有 10 个共有峰。10 批健脾消癌方的 HPLC 指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均≥ 0.900，说明指纹图谱重复性好，制备工艺较为稳定。定量分析结果表明 10 批健脾消癌方中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、野黄芩苷、新橙皮苷、甘草酸铵的质量分数范围分别为 1.80 ～ 2.55、12.90 ～ 17.86、3.49 ～ 5.28、1.26 ～ 1.82、6.93 ～ 9.47、1.05 ～ 1.51 mg • g^{-1}。**结论**　建立的健脾消癌方指纹图谱和含量测定方法分离度好、准确度高，可为该经验方制剂的研发及质量控制提供参考。

关键词：健脾消癌方；指纹图谱；高效液相色谱 - 四极杆飞行时间串联质谱；质量控制研究
中图分类号：R917，R284　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1533-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.010

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81774287）；中国博士后科学基金面上项目（No.2020M672499）；长沙市自然科学基金资助项目（No.kq2014205）；湖南省自然科学基金青年项目（No.2021JJ40316）；湖南省自然科学基金面上项目（No.2020JJ4413）。
作者简介：王容容，女，博士，主治医师，主要从事肿瘤病中西医结合防治临床与基础研究，email：745323799@ qq.com　*通信作者：蒋益兰，女，教授，主任医师，博士研究生导师，主要从事中医药防治恶性肿瘤的临床与基础研究，email：tianshangren624@163.com；陈 林，女，副研究员，主要从事中药质量控制与创新药物方向研究，email：635711793@ qq.com

HPLC-Q-TOF/mF fingerprints and multi-component determination of Jianpi Xiaoai decoction

WANG Rong-rong[1], BAI Zheng-ping[1], YANG Jing[1], WANG Qi-mei[1], CHEN Lin[2*], LU Lin-zhu[3], JIANG Yi-lan[1*] (1. *Affiliated Hospital of Hunan Institute of Traditional Chinese Medicine*, *Changsha* 410006; 2. *Institute of Chinese Medicine of Hunan Institute of Traditional Chinese Medicine*, *Changsha* 410031; 3. *Hunan University of Traditional Chinese Medicine*, *Changsha* 410028)

Abstract: Objective To establish HPLC fingerprints and multi-component content determination method for Jianpi Xiaoai decoction, and to identify its main chemical components by time of flight mass spectrometry. **Methods** Ten batches of reference materials for Jianpi Xiaoai decoction were prepared. Fingerprint similarity was analyzed to process the common peaks of the fingerprints of 10 batches of samples respectively, and to evaluate the quality difference between them. The main chemical components were identified by high performance liquid chromatography tandem time of flight mass spectrometry, and 34 active components were screened out. Finally, quantitative analysis was conducted on 6 indicator components, namely brassicin, naringin, hesperidin, scutellarin, neohesperidin and ammonium glycyrrhizinate. **Results** There were 10 common peaks in the HPLC fingerprints of Jianpi Xiaoai decoction. The similarity between the HPLC fingerprints and the control fingerprints of the 10 batches of Jianpi Xiaoai decoction was ≥ 0.900, indicating good reproducibility stable preparation. Quantitative analysis showed that the mass fractions of narirutin, naringin, hesperidin, baicalin, neohesperidin and ammonium glycyrrhizinate in the 10 batches of Jianpi Xiaoai decoction were 1.80 to 2.55, 12.90 to 17.86, 3.49 to 5.28, 1.26 to 1.82, 6.93 to 9.47, and 1.05 to 1.51 mg • g^{-1}, respectively. **Conclusion** The established reference fingerprint of Jianpi Xiaoai decoction and the content determination are highly accurate and well separated, which can provide experimental basis for the development and quality control of the empirical prescription.

Key words: Jianpi Xiaoai decoction; fingerprint; HPLC-Q-TOF/mF; quality control research

健脾消癌方是湖南省名中医蒋益兰教授防治大肠癌的经验方。全方由人参、白术、枳实、蛇舌草、半枝莲、重楼、甘草等 13 味药物组成。方中人参为君，合白术、茯苓、甘草为四君子汤益气健脾，以健生化之源，而疗诸虚不足，从而达到扶正固本的目的；黄芪甘温，益气补虚健脾为臣；枳实、郁金行气除痞，白花蛇舌草、半枝莲、重楼、藤梨根清热解毒、消痈散结，法半夏燥湿化痰，薏苡仁健脾渗湿，以上共用之为佐；甘草调和诸药为使。全方药物配伍精要，攻补兼施，共奏益气健脾、化瘀解毒之功，顺应了大肠癌患者“虚、瘀、毒”并存的病机特点。全方扶正祛邪，标本同治，在大肠癌和大肠癌术后巩固治疗中取得满意的临床疗效。临床研究表明，本方能降低大肠癌患者术后复发转移率，提高生存质量，延长生存期 [1-3]。动物实验研究结果表明，健脾消癌方能有效延长大肠癌裸鼠生存期，降低裸鼠肝转移率，降低肝组织血管内皮生长因子（VEGF）和血管内皮生长因子受体（VEGFR-2）蛋白表达 [4-5]；可通过调节基质金属蛋白酶（MMP）-9、基质金属蛋白酶抑制剂 -1（TIMP-1）、VEGF 等因子影响血管生成 [6]；可通过调控 TGF-β 非 Smad 信号通路 PTEN-PI3K/AKt 信号通路抑制肿瘤血管形成，从而降低结肠癌裸鼠模型转移率，提高裸鼠体质量，抑制瘤体生长等 [7]；并可通过逆转转化生长因子 -β（TGF-β）诱导的上皮 - 间质转化（EMT）过程防治大肠癌转移 [8-10]。中药复方由多味药物配伍而成，其有效成分多，具有多成分、多靶点、多途径的作用特点。对中药复方中多成分及其含量进行分析鉴定是中药复方现代化质量控制的重要手段和趋势 [11]。鉴于健脾消癌方防治大肠癌疗效确切，有必要对其进行全面的质量控制研究。本实验拟对健脾消癌方的指纹图谱和多组分含量测定进行研究，以全面控制该复方的质量，通过建立健脾消癌方的高效液相色谱（HPLC）指纹图谱，并进一步采用高效液相色谱串联飞行时间质谱对其主要化学成分进行结构鉴定，对其指标成分

进行定量分析，以期为健脾消癌方制剂的研发和质量控制奠定基础。

1　材料

1290 高效液相串联四极杆飞行时间质谱 6530、Agilent 1200 高效液相色谱仪（安捷伦科技有限公司），XPE105 型析天平（精度：0.01 mg）、AL204 型万分之一电子天平、XPE105 型十万分之一电子天平（梅特勒 - 托利多仪器有限公司），HH 电热恒温水浴锅（江苏中大仪器科技有限公司），101-2AB 电热恒温鼓风干燥箱（北京中兴伟业仪器有限公司），SJIA-10N-50A 冷冻干燥机（宁波双嘉化器有限公司），KM-500DB 型超声波清洗器（昆山美美超声仪器有限公司）。对照品野黄芩苷（批号：110842-200403，纯度：96.8%）、甘草酸铵（批号：110731-201720，纯度：97.6%）、毛蕊异黄酮葡萄糖苷（批号：110920-201606，纯度：95.4%）、新橙皮苷（批号：11857-201703，纯度：97.6%）、柚皮苷（批号：110772-202116，纯度：98.5%）、腺苷（批号：110879-200202，纯度：98.9%）（中国食品药品检定研究院），芸香柚皮苷（成都克洛玛生物科技有限公司，批号：CHB180917，纯度：98.1%），甲醇为色谱纯（安徽天地高纯溶剂有限公司），纯水（华润怡宝饮料有限公司），甲酸（色谱纯，天津市科密欧化学试剂有限公司）。

人参（*Panax ginseng* C. A. Meyer），白术（*Atractylodes Macrocephala* Koidz.），茯苓 [*Poria cocos*（Schw.）Wolf]，甘草（*Glycyrrhiza uralensis* Fisch），法半夏 [*Pinellia ternata*（Thunb.）Breit]，黄芪 [*Astragalus membranaceus*（Fisch.）Bge.]，白花蛇舌草（*Hedyotis diffusa* Willd），半枝莲（*Scutellaria barbata* D.Don），枳实（*Citrus aurantium* L.），郁金（*Curcuma.wenyujin* Y. H. Chen et C.Ling），重楼 [*Paris polyphylla Smith* var. *chinenisi*（Franch）Hara]，薏苡仁 [*Coix lacryma-jobi* L.var.*mayuen*（Roman.）Stapf]，藤梨根（*Actinidia chinensis* Planchon），均由湖南省中医药研究院提供，经湖南省中医药研究院附属医院药剂科田其学主任药师鉴定均符合 2020 版《中国药典》要求。制备 10 批健脾消癌方冻干粉所用的各饮片均源自道地产地或主产区。

2　方法与结果

2.1　健脾消癌方冻干粉的制备

称取人参 10 g，白术 10 g，茯苓 15 g，甘草 6 g，法夏 9 g，黄芪 15 g，蛇舌草 15 g，半枝莲 16 g，枳实 10 g，郁金 10 g，重楼 10 g，薏苡仁 30 g，藤梨根 15 g，按 10 倍生药量加水，煎煮 1 h，保存药液，药渣再加入 8 倍量水，煎煮 1 h，合并药液，浓缩成近 2 倍水量时，放置过夜，去沉淀，继续浓缩成 1.5 g • mL^{-1} 备用。将其置于真空冷冻干燥机中，经预冷、抽真空、一次升华、冻干 72 h，即得健脾消癌方冻干粉。

2.2　溶液的制备

2.2.1　供试品溶液制备　精密称量健脾消癌方冻干粉（样品 S1）0.5 g 于 50 mL 具塞锥形瓶中，精密加入 50% 甲醇 10 mL，称重，超声处理 30 min（功率 400 W，频率 40 kHz），放冷，称重，用 50% 甲醇补足减少的重量，摇匀，过 0.22 μm 微孔滤膜，取续滤液，即得。

2.2.2　样品溶液制备　按照“2.1”项下冻干粉制备方法，分别制备人参、白术、茯苓、甘草、法夏、黄芪、蛇舌草、半枝莲、枳实、郁金、重楼、薏苡仁、藤梨根冻干粉。按“2.2.1”项下方法分别制备对应药材的样品溶液。

2.2.3　对照品溶液　取芸香柚皮苷、橙皮苷、野黄芩苷、新橙皮苷、柚皮苷、甘草酸铵对照品适量，精密称定，置于不同量瓶中，加入甲醇稀释至刻度，摇匀，制成质量浓度分别为 1.09、1.02、1.01、1.03、1.02、1.02 mg • L^{-1} 的单一对照品储备液。

分别精密量取各对照品储备液适量，置于同一 20 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，得质量浓度为 0.05 mg • L^{-1} 的混合对照品溶液。

2.2.4　色谱条件　色谱柱为 Welch UItimate AQ-C_{18}（5 μm，4.6 mm×250 mm），流动相为甲醇（A）0.1% 甲酸水溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 26 min，5%A；26 ～ 45 min，5% ～ 30%A；45 ～ 63 min，30% ～ 40%A；63 ～ 78 min，40% ～ 48%A；78 ～ 93 min，48% ～ 70%A；93 ～ 108 min，70% ～ 95%A；108 ～ 113 min，95% ～ 100%A），进样量 5 μL，柱温 30 ℃，流速 1 mL • min^{-1}，检测波长 254 nm。

2.3　方法学考察

2.3.1　精密度　取健脾消癌方冻干粉（样品 S1）供试品溶液，连续测定 6 次，以 4 号峰（柚皮苷）为参照峰，计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 均≤ 10.0%，表明仪器精密度良好。

2.3.2　重复性　取健脾消癌方冻干粉（样品 S1）适量，按“2.2.1”项下方法平行制备供试品溶液 6 份，进样测定，以 4 号峰（柚皮苷）为参照峰，计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 均≤ 10.0%，表明该方法重复性良好。

2.3.3　稳定性　取健脾消癌方冻干粉（样品 S1）的供试品溶液适量，分别于制备后 0、3、6、9、12、15、18、21、24 h 进样测定，以 4 号峰（柚皮苷）

为参照峰，计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 均≤ 10.0%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4　指纹图谱的建立

按“2.2.1”项下方法制备 10 批健脾消癌方冻干粉（样品 S1 ～ S10）的供试品溶液，进样测定，记录各样品色谱图，见图 1。

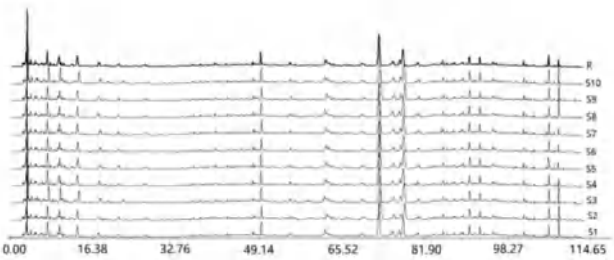


图 1　10 批健脾消癌方的 HPLC 指纹图谱

Fig 1　HPLC fingerprint of 10 batches of Jianpi Xiaoai decoction

2.4.1　参照峰的选定　在 10 批健脾消癌方冻干粉指纹图谱中，柚皮苷色谱峰保留时间适中、峰面积大且稳定、分离度好，故选用柚皮苷（峰 4）为参照峰。

2.4.2　相似度评价及色谱峰归属　将 10 批健脾消癌方（样品 S1 ～ S10）的指纹图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件（2004 版）中，以样品 S1 色谱图为参照图谱，利用中位数法，设置时间窗宽度 0.5 min，进行多点校正并生成对照指纹图谱（R），计算相似度 [11]。结果共标记了 10 个共有峰，10 批样品的 HPLC 指纹图谱与对照指纹图谱的相似度分别为 0.981、0.967、0.935、0.976、0.987、0.988、0.988、0.981、0.935、0.987、1.000，表明各批样品之间差异较小，制备工艺稳定，见表 1。

表 1　10 批健脾消癌方特征谱图相似度

Tab 1　Similarity of characteristic spectrum of 10 batches of Jianpi Xiaoai decoction

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱
S1	1.000	0.945	0.877	0.978	0.964	0.969	0.968	1.000	0.877	0.964	0.981
S2	0.945	1.000	0.880	0.933	0.956	0.961	0.959	0.945	0.880	0.956	0.967
S3	0.877	0.880	1.000	0.884	0.890	0.889	0.887	0.877	1.000	0.890	0.935
S4	0.978	0.933	0.884	1.000	0.956	0.966	0.962	0.978	0.884	0.956	0.976
S5	0.964	0.956	0.890	0.956	1.000	0.987	0.990	0.964	0.890	1.000	0.987
S6	0.969	0.961	0.889	0.966	0.987	1.000	0.997	0.969	0.889	0.987	0.988
S7	0.968	0.959	0.887	0.962	0.990	0.997	1.000	0.968	0.887	0.990	0.988
S8	1.000	0.945	0.877	0.978	0.964	0.969	0.968	1.000	0.877	0.964	0.981
S9	0.877	0.880	1.000	0.884	0.890	0.889	0.887	0.877	1.000	0.890	0.935
S10	0.964	0.956	0.890	0.956	1.000	0.987	0.990	0.964	0.890	1.000	0.987
对照指纹图谱	0.981	0.967	0.935	0.976	0.987	0.988	0.988	0.981	0.935	0.987	1.000

将样品 S10 的色谱图与各样品色谱图进行比较，确定峰 1 为白术、法夏、茯苓、甘草、黄芪、人参、蛇舌草、藤梨根、薏苡仁、重楼共有峰；峰 2 为半枝莲、枳实、蛇舌草共有峰；峰 3 归属于枳实；峰 4 归属于枳实；峰 5 归属于半枝莲；峰 6 归属于枳实；峰 7 归属于枳实；峰 8 归属于半枝莲；峰 9 为蛇舌草，重楼共有峰；峰 10 为法半夏，甘草共有峰。根据对照品信息指认了 6 个色谱峰，分别为 3 号峰（芸香柚皮苷），4 号峰（柚皮苷），5 号峰（橙皮苷），6 号峰（野黄芩苷），7 号峰（新橙皮苷），10 号峰（甘草酸铵），见图 2 ～ 3。

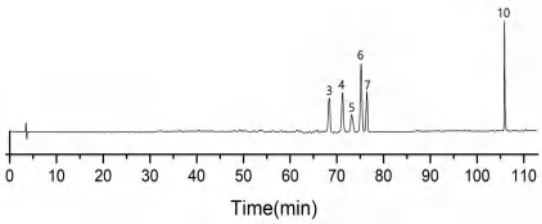


图 2　混合对照品 HPLC 图

Fig 2　HPLC chromatogram of mixed reference substance

3. 芸香柚皮苷（brassicin）；4.（S）柚皮苷（naringin）；5. 橙皮苷（hesperidin）；6. 野黄芩苷（scutellarin）；7. 新橙皮苷（neohesperidin）；10. 甘草酸铵（ammonium glycyrrhetate）

2.5　健脾消癌方 LC-MS 分析

液相条件同“2.2.4”项下离子化方式：电喷雾离子化（ESI）；ESI 源温度 325 ℃；脱溶剂 350 ℃；源电压 4.0 kV；检测电压 1.0 kV；碰撞电压 130 V；雾化气（N_2）流速为 8 L • min^{-1}。通过正负模式质谱分析发现，复方在负离子模式下的质谱信息响应较好，见图 4，根据其质谱信息和裂解规律，文献数据进行结构鉴定，共确定 34 个化学成分，结果见表 2。

2.6　多指标成分的含量测定

2.6.1　线性关系考察　精密吸取“2.2.3”项下各单一对照品储备液适量，分别稀释成一系列不同质量浓度的溶液，按“2.2.4”项下方法进样测定，记

表 2　健脾消癌方的 LC-MS 分析结果

Tab 2　LC-MS of Jianpi Xiaoai decoction

峰号	t_R/min	离子模式	实测 *m/z*	分子式	二级特征碎片	鉴定结果	来源
1	6.750	$[M-H]^-$	191.0198	$C_6H_8O_7$	111.0103，147.0320	柠檬酸	藤梨根
2	7.660	$[M-H]^-$	989.3359	$C_{34}H_{18}N_6O_3$	179.0584，31.1136，503.1683，665.2233，827.2814	未知	
3	8.267	$[M-H]^-$	243.0622	$C_9H_{12}N_2O_6$	200.0597，152.0383，130.9701，110.0285	尿苷	茯苓 / 法夏
4	11.266	$[M-H]^-$	389.1173	$C_{16}H_{22}O_{11}$	137.0619，209.0489，323.0327	未知	
5	11.300	$[M+HCOO]^-$	312.0989	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	266.1040，134.0614，117.0347	腺苷	法夏
6	15.478	$[M-H]^-$	282.0918	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	150.0447	鸟苷	法夏
7	16.961	$[M-H]^-$	344.0516	$C_{16}H_{11}NO_8$	150.0465	未知	
8	31.485	$[M-H]^-$	389.1212	$C_{17}H_{18}N_4O_7$	101.0280，139.0439，147.0485，165.0620，183.0726，209.0526，227.0637	未知	
10	44.357	$[M-H]^-$	339.0845	$C_{13}H_{16}N_4O_5S$	177.0240	未知	
11	47.491	$[M-H]^-$	515.1626	$C_{22}H_{28}O_{14}$	161.0278，469.1511	未知	
12	48.300	$[M+HCOO]^-$	531.1551	$C_{21}H_{10}O_{14}$	177.0243，485.1472	未知	
13	55.511	$[M-H]^-$	593.1703	$C_{27}H_{30}O_{15}$	353.0781，473.1229	维采宁 -2	半枝莲
14	56.387	$[M-H]^-$	163.0443	$C_9H_8O_3$	119.0532	4- 香豆酸	藤梨根
15	57.702	$[M-H]^-$	649.2748	$C_{38}H_{38}N_2O_8$	174.9612，242.9482，347.1954，443.2229，605.2839	未知	
16	59.757	$[M-H]^-$	595.1882	$C_{27}H_{32}O_{15}$	287.0660，151.0087	圣草次苷	枳实
17	59.858	$[M-H]^-$	741.2534	$C_{38}H_{38}N_4O_{10}$	151.0081，271.0717，339.0842，459.1479，621.1913	未知	
18	61.038	$[M-H]^-$	491.1320	$C_{29}H_{20}N_2O_6$	268.0485，283.0715	未知	
19	61.341	$[M-H]^-$	417.1367	$C_{21}H_{22}O_9$	255.0747，135.0131，119.0542	甘草苷	法夏 / 甘草
20	62.790	$[M-H]^-$	549.1805	$C_{26}H_{30}O_{13}$	417.1344，255.0745，135.0132	芹糖甘草苷	法夏
21	63.295	$[M-H]^-$	463.1236	$C_{21}H_{20}O_{12}$	287.0660，269.0553，243.0729，225.0649，193.0396，181.0185，167.0037，153.0241，139.0077	红花素 7-*O*- 葡糖苷酸	半枝莲
22	64.070	$[M-H]^-$	623.2229	$C_{29}H_{36}O_{15}$	461.1849，179.0396，161.0295	毛蕊花糖苷	半枝莲
23	66.025	$[M-H]^-$	579.1946	$C_{27}H_{32}O_{14}$	271.0719，151.0090	芸香柚皮苷	枳实
24	68.114	$[M-H]^-$	579.1911	$C_{27}H_{32}O_{14}$	271.0698，151.0078	柚皮苷	枳实
25	69.294	$[M-H]^-$	609.2005	$C_{28}H_{34}O_{15}$	301.0796	橙皮苷	枳实
26	69.664	$[M-H]^-$	623.2199	$C_{29}H_{36}O_{15}$	461，1813，315.1182，251.1182，179.0396，161.0290	毛蕊花糖苷异构体	半枝莲
27	70.102	$[M-H]^-$	461.0789	$C_{21}H_{18}O_{12}$	285.0414，267.0313，239.0358，175.0239，166.9980，136.9869	野黄芩苷	半枝莲
28	71.383	$[M-H]^-$	609.1992	$C_{28}H_{34}O_{15}$	301.0796	新橙皮苷	枳实
29	83.413	$[M+HCOO]^-$	639.2017	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.2018，473.1536，285.0829	山柰酚 -3-O-（6-*O*-*α*-*L*- 鼠李糖基）-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷	蛇舌草
30	84.997	$[M-H]^-$	461.0829	$C_{21}H_{18}O_{12}$	285.0463，257.0320，241.0554，213.0591，175.0296，145.0347	异黄芩素 7-*O*-*β*-*D*- 葡糖苷酸	半枝莲
31	88.266	$[M-H]^-$	1017.4450	$C_{41}H_{14}N_8O_{25}$	277.1021，607.2902，885.3972	未知	
32	90.018	$[M+HCOO]^-$	845.5108	$C_{42}H_{72}O_{14}$	799.5034，637.4463，475.3898，161.0481，119.0373	人参皂苷 Rg_1	人参
33	91.939	$[M-H]^-$	1059.4508	$C_{44}H_{16}N_6O_{27}$	867.3827，927.4046，999.4292	未知	
34	102.486	$[M-H]^-$	821.4104	$C_{42}H_{62}O_{16}$	351.0593，469.3353，627.3578，645.3691，759.4006	甘草酸铵	甘草

录色谱峰面积，以峰面积为纵坐标，对照品质量浓度为横坐标，绘制标准曲线，当仪器信噪比（*S/N*）＝ 3 时为检测限，*S/N* ＝ 10 时为定量限。结果见表 3，6 种成分在相应质量浓度范围内与峰面积呈良好线性关系。

2.6.2　精密度试验　取混合对照品溶液，连续进样 6 次，结果芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、野黄芩苷、新橙皮苷、甘草酸铵峰面积的 *RSD* 分别为 2.3%、0.67%、6.7%、0.70%、0.19%、4.2%，表明仪器精密度良好。

表 3　健脾消癌方中 6 种指标成分的线性关系考察

Tab 3　Linearity of 6 components in Jianpi Xiaoai decoction

成分	线性回归方程	R^2	范围 /（mg・mL^{-1}）	检测限 /（μg・mL^{-1}）	定量限 /（μg・mL^{-1}）
芸香柚皮苷	$y = 2\times10^6x + 1.66\times10^4$	0.9999	0.011 ～ 4.352	0.78	2.72
柚皮苷	$y = 2\times10^6x + 3.72\times10^4$	0.9995	0.010 ～ 5.105	0.73	2.55
橙皮苷	$y = 1\times10^6x + 1.61\times10^4$	0.9999	0.010 ～ 4.072	1.02	3.39
新橙皮苷	$y = 2\times10^6x + 1.26\times10^4$	0.9998	0.010 ～ 4.120	0.74	2.58
野黄芩苷	$y = 4\times10^6x - 5.33\times10^4$	0.9999	0.010 ～ 4.024	0.50	1.68
甘草酸铵	$y = 4\times10^6x + 2.46\times10^4$	0.9997	0.020 ～ 3.054	0.51	1.71

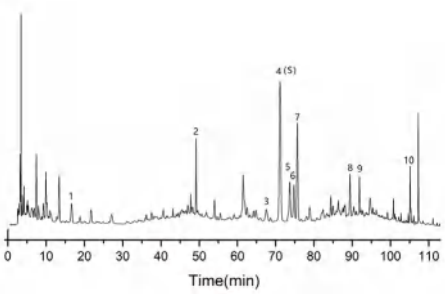


图 3　健脾消癌方 HPLC 指纹图谱色谱图

Fig 3　HPLC fingerprint chromatogram of Jianpi Xiaoai decoction

3. 芸香柚皮苷（brassicin）；4（S）. 柚皮苷（naringin）；5. 橙皮苷（hesperidin）；6. 野黄芩苷（scutellarin）；7. 新橙皮苷（neohesperidin）；10. 甘草酸铵（ammonium glycyrrhetate）

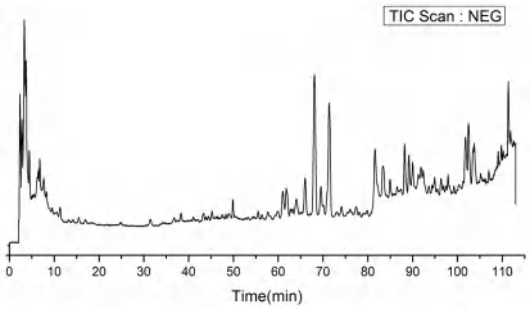


图 4　健脾消癌方总离子流色谱图

Fig 4　Total ion flow chromatogram of Jianpi Xiaoai decoction

2.6.3　稳定性试验　取同一健脾消癌方冻干粉（样品 S1）供试品溶液，分别于制备后 0、3、6、9、12、15、18、21、24 h 进样测定，结果芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、野黄芩苷、新橙皮苷、甘草酸铵峰面积的 *RSD* 分别为 2.2%、1.3%、5.6%、0.80%、0.30%、3.9%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6.4　重复性试验　取同一健脾消癌方冻干粉（样品 S1）的供试品溶液 6 份，进样测定，记录色谱图，结果芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、野黄芩苷、新橙皮苷、甘草酸铵平均质量分数分别为 1.59、12.97、2.94、1.33、6.96、0.93 mg・g^{-1}，*RSD* 分别为 4.8%、8.9%、5.2%、5.0%、8.6%、3.7%，表明该方法重复性良好。

2.6.5　加样回收试验　称取已知各指标成分含量的健脾消癌方冻干粉（样品 S1）约 0.125 g，精密称定，平行 6 份，分别按照样品中相对应成分含量 1∶1 加入各对照品溶液。制备供试品溶液后进行测定，结果芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷、甘草酸铵、橙皮苷、野黄芩苷的平均加样回收率分别为 101.58%、102.94%、103.48%、100.05%、99.32%、100.08%，*RSD* 分别为 2.2%、2.2%、3.0%、0.50%、5.3%、4.8%，表明该方法准确可靠。

2.6.6　样品测定　取 10 批健脾消癌方冻干粉（样品 S1 ～ S10），制备供试品溶液，进行测定，计算 6 个指标成分的含量。结果 10 批健脾消癌方冻干粉中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、野黄芩苷、新橙皮苷、甘草酸铵质量分数范围分别为 1.80 ～ 2.55、12.90 ～ 17.86、3.49 ～ 5.28、1.26 ～ 1.82、6.93 ～ 9.47、1.05 ～ 1.51 mg・g^{-1}，见表 4。

表 4　10 批健脾消癌方中 6 个指标成分的含量 (mg・g^{-1})

Tab 4　Content of 6 components in 10 batches of Jianpi Xiaoai decoction (mg・g^{-1})

序号	芸香柚皮苷	柚皮苷	橙皮苷	野黄芩苷	新橙皮苷	甘草酸铵
S1	1.88	15.73	5.03	1.82	8.34	1.05
S2	2.33	17.86	5.28	1.64	9.05	1.43
S3	1.80	12.90	3.49	1.26	6.93	1.13
S4	2.20	16.83	4.61	1.65	9.04	1.51
S5	2.03	14.92	4.14	1.47	8.03	1.28
S6	2.42	17.47	4.85	1.70	9.47	1.46
S7	2.17	16.01	4.53	1.51	8.60	1.22
S8	2.55	16.99	4.79	1.64	9.19	1.28
S9	2.06	14.78	4.14	1.39	7.99	1.15
S10	2.31	16.95	4.60	1.60	9.15	1.29

3　讨论

本文首次建立了健脾消癌方中芸香柚皮苷、野黄芩苷等 6 种活性成分含量的 HPLC-Q-TOF-mF 法，该方法分离度好、准确度高，对于控制健脾消癌方配伍前后化学成分性质和含量变化及作用具有重要意义。6 种活性成分中，野黄芩苷来源于半枝莲，芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷来源于枳实，甘草苷来源于甘草 / 法夏。研究表明，野黄芩苷能够抑制结肠肿瘤干细胞的体外和体内分化，其作用机制在于下调 hedgehog 信号通路活性 [12]；野黄芩苷与顺氯氨铂（DDP）联用可提高肺癌 A549/DDP 细胞对 DDP 的敏感性，抑制克隆

形成，其机制可能与下调 c-met 蛋白表达有关[13]；熊果酸能抑制结肠癌细胞增殖及诱导结肠癌细胞凋亡[14]；β- 谷甾醇通过与大肠癌中的 p53-MDM2 相互作用，抑制多药耐药，还可以协同吉西他滨调节细胞凋亡和通过抑制 Akt/GSK-3β 信号转导抑制上皮 - 间质转化发挥抗胰腺癌活性[15]；人参皂苷是人参发挥抗癌活性的主要成分，如人参皂苷 Rh_2、人参皂苷 -Rh_4-qt、人参皂苷 -Rh_5-qt 和人参二醇都具有诱导肿瘤细胞周期停滞，促进肿瘤细胞凋亡，抑制肿瘤生长，抗肿瘤血管生成的作用，并在免疫浸润、慢性炎症损伤、肠道菌群、化疗耐药等研究中展示出良好的潜力[16]；异甘草素可抑制骨肉瘤细胞的增殖、凋亡和迁移[17]。当然，复方中药配伍后的化学成分并不是单味药物化学成分的简单相加，其提取过程中各化学成分也会产生变化，这可能是复方配伍的精髓，也是研究开发复方新药的有效依据。本课题组后续将尝试增加皂苷类、酚酸类及多糖类的指标成分，对健脾消癌方的有效成分和作用机制进一步研究，将名老中医经验方制备方式、方法标准化。经验方物质基础的研究对中药复方制剂的开发起着关键作用[18]。本研究建立的 10 批健脾消癌方冻干粉 HPLC 指纹图谱相似度高、分离度好，对芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、野黄芩苷、新橙皮苷、甘草酸铵 6 种指标性成分进行定性和定量分析，较为全面地反映了该复方化学成分信息，可为该复方药效活性物质作用机制研究提供科学依据，为健脾消癌方复方制剂的研发提供参考。

参考文献

[1] 蒋益兰，潘博，仇湘中 . 健脾消癌饮配合化疗治疗大肠癌术后 40 例总结 [J]. 湖南中医杂志，2001，17（5）：9-10.

[2] 蒋益兰，俞天俊，赵晔 . 健脾消癌方治疗老年中晚期大肠癌临床观察 [J]. 中国中医药信息杂志，2014，21（3）：94-96.

[3] 王容容，王其美，蒋益兰，等 . 健脾消癌方联合化疗治疗晚期转移性结直肠癌的临床研究 [J]. 中华中医药杂志，2016，31（5）：1732-1736.

[4] 王容容，李勇敏，王其美，等 . 裸鼠盲肠黏膜下注射 HCT116 细胞建立结肠癌原位种植及转移模型的研究 [J]. 北京中医药大学报，2017，40（10）：845-848.

[5] 李勇敏，谭小宁，蒋益兰，等 . 健脾消癌方对结直肠癌转移模型裸鼠血管内皮生长因子与血管内皮抑素表达的影响 [J]. 中草药，2016，47（16）：2883-2886.

[6] 杨晓，蒋益兰，李勇敏，等 . 健脾消癌方对大肠癌肝转移裸鼠模型肝组织 MMP-9、TIMP-1 表达的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志，2016，22（10）：1323-1325.

[7] 王容容，谭小宁，李勇敏，等 . 健脾消癌方对大肠癌肝转移裸鼠模型肝组织 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（6）：177-181.

[8] 谭小宁，李勇敏，罗吉，等 . 健脾消癌方对人结直肠癌裸鼠转移模型肿瘤组织上皮间质转化及转化生长因子 β 的影响 [J]. 中医杂志，2017，58（24）：2137-2140.

[9] 何兰，简小兰，蒋益兰，等 . 健脾消癌方及拆方对结肠癌原位种植瘤裸鼠模型钙黏蛋白、波形蛋白表达的影响 [J]. 中华中医药学刊，2018，36（6）：1324-1327.

[10] 罗吉，罗燕，李勇敏，等 . 健脾消癌方对结肠癌 TGF-β/LncRNA-ATB/miR-200a 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（6）：161-166.

[11] 孟岩，李焐仪，单家明，等 . 经典名方小承气汤物质基准的 HPLC 指纹图谱分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（4）：130-136.

[12] 雷楠，熊思会，谭溧，等 . 野黄芩苷通过 hedgehog 信号通路抑制结肠肿瘤干细胞分化的研究 [J]. 中国中药杂志，2020，45（7）：1676-1683.

[13] 邵中一，罗敏，崔明超，等 . 野黄芩苷通过下调 c-met 逆转肺癌 A549/DDP 细胞顺铂耐药 [J]. 中国现代应用药理，2021，38（4）：415-419.

[14] 单建贞 . 藤梨根有效成分对结肠癌细胞增殖抑制作用及相关机制的研究 [D]. 杭州：浙江大学，2010.

[15] Wang Z，Zhan Y，Xu J，et al. β-Sitosterol reverses multidrug resistance via BCRP suppression by Inhibiting the p53-MDM2 interaction in colorectal cancer [J]. J Agric Food Chem，2020，68（12）：3850-3858.

[16] 王领，倪敏，江滨 . 人参皂苷抗结直肠癌作用机制的研究进展 [J]. 中国肿瘤外科杂志，2019，11（5）：370-373.

[17] Li CJ，Zhou X，Sun C，et al. Isoliquiritigenin inhibits the proliferation，apoptosis and migration of osteosarcoma cells [J]. Oncol Rep，2019，41（4）：2502-2510.

[18] 邓哲，刘德文，杜杰，等 . 经典名方研发建议的梳理和探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（17）：181-186.

（收稿日期：2021-12-27；修回日期：2022-03-15）

猴耳环消炎片指纹谱效学分析

赵斯尘[1]，王晓东[2]，吴灏[1]，彭维[1]，陈曌[2]，苏薇薇[1]，王永刚[1*]（1. 中山大学生命科学学院/广东省中药上市后质量与药效再评价工程技术研究中心，广州　510275；2. 广州白云山花城药业有限公司，广州　510555）

摘要：目的　研究猴耳环消炎片体外抑制耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）的药效物质基础。**方法**　建立并分析 17 批猴耳环消炎片的指纹图谱，研究其体外抑制 MRSA 的药效活性，采用灰色关联和偏最小二乘回归分析技术建立谱效方程，进行谱效学分析。**结果**　17 批猴耳环消炎片的指纹图谱相似度在 0.927 以上，指纹谱效分析表明没食子酸、表没食子儿茶素、儿茶素、槲皮苷、7- 没食子酰特利色黄烷是猴耳环消炎片抑制 MRSA 的主要成分。**结论**　建立的指纹图谱及其谱效学技术为猴耳环消炎片的质量控制提供了理论与实验依据。

关键词：猴耳环消炎片；指纹图谱；谱效学分析；耐甲氧西林金黄色葡萄球菌
中图分类号：R284，R286　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1540-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.011

Fingerprint spectroscopic analysis of *Archidendron clypearia* antiphlogistic tablets

ZHAO Si-chen[1], WANG Xiao-dong[2], WU Hao[1], PENG Wei[1], CHEN Zhao[2], SU Wei-wei[1], WANG Yong-gang[1*] (1. *Guangdong Engineering and Technology Research Center for Quality and Efficacy Re-evaluation of Post-marketed Traditional Chinese Medicine*, *School of Life Sciences*, *Sun Yat-sen University*, *Guangzhou* 510275; 2. *Guangzhou Baiyunshan Huacheng Pharmaceutical Co.*, *LTD.*, *Guangzhou* 510555)

Abstract: Objective To determine the pharmacodynamic compounds of *Archidendron clypearia* antiphlogistic tablets. **Methods** The fingerprints of 17 batches of *Archidendron clypearia* antiphlogistic tablets were established. The methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (MRSA) inhibiting experiments in vitro were conducted. Grey correlation analysis and partial least squares regression analysis were used to connect the HPLC fingerprints with the inhibition of MRSA in vitro by building spectrum-efficacy equation model. **Results** The similarity of the common peaks in the 17 batches *Archidendron clypearia* antiphlogistic tablets was greater than 0.927. Spectrum-efficacy correlation analysis clarified that gallic acid, epigallocatechin, catechin, quercetin and 7-*O*-galloyltricetiflavan were the main pharmacodynamic compounds. **Conclusion** The established fingerprints and spectrum-efficacy correlation provide theoretical and experimental basis for the quality control of *Archidendron clypearia* antiphlogistic tablets.

Key words: *Archidendron clypearia* antiphlogistic tablet; fingerprint; spectrum-efficacy correlation analysis; methicillin-resistant *staphylococcus aureus*

南药猴耳环 [*Archidendron clypearia*（Jack）I. C. Nielsen] 是豆科含羞草亚科猴耳环属植物猴耳环的干燥叶，具有消炎镇痛，抑制耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（methicillin-resistant *staphylococcus aureus*，MRSA）、黄嘌呤氧化酶、流感病毒、*β*-淀粉样聚集活性，治疗上呼吸道感染、细菌性肠炎等多种药理作用[1-4]。猴耳环消炎片是由猴耳环提取制成的中药制剂，已在临床使用多年，现阶段在《中国药典》中仅对猴耳环消炎片的没食子酸（不低于 5.0%）、槲皮苷（不低于 0.20%）含量进

基金项目：中山大学成果转化项目（No.33000-71011065）。
作者简介：赵斯尘，女，主要从事中药与天然药物研究，email：zhaosch@mail.sysu.edu.cn　*通信作者：王永刚，男，主要从事中药与天然药物研究，email：wangyg@mail.sysu.edu.cn

行控制，无法全面反映猴耳环消炎片的质量情况，及安全性、有效性。

中药指纹图谱是一种基于中药化学成分系统研究、全面反映药物化学信息的技术，建立猴耳环消炎片的指纹图谱可较全面地反映猴耳环消炎片的化学信息。细菌耐药是全球医学界共同关注的问题，其中 MRSA 是一种临床上常见的多重耐药菌，威胁人类健康[5]。本团队前期研究表明猴耳环可降低 MRSA 的耐药性[6-7]。因此，本文首先基于高效液相色谱法（HPLC）构建了猴耳环消炎片指纹图谱，确证了 14 个共有峰的化学成分，然后以体外抑菌活性为指标衡量药物有效成分的抗菌效力。最后采用指纹谱效学分析技术，将其指纹图谱与体外抑制 MRSA 的药效相关联，确定了猴耳环消炎片的药效物质基础，为猴耳环消炎片的质量控制提供了理论与实验依据。

1　材料

1.1　仪器

Thermo SCIENTIFIC 液相色谱仪（包括二元泵、自动进样器、柱温控制模块、UV 检测器均为 DIONEX Ultimate 3000）；SHIMADZU 超快速高效液相色谱仪（包括二元泵 LC-20AD-XR，自动进样器 SIL-20AD-XR，柱温控制模块 CTO-20A）；AB SCIEX 高分辨串联质谱（Triple TOF 5600＋）；超纯水机（Millipore Simplicity，美国密里博公司）；精密移液器（德国 Eppendorf 公司）；Sartorius 电子天平（十万分之一，BP211D）；灭菌锅（GR 60DA）；DensiCHEK Plus 比浊仪（VITEK2）；恒温培养箱（常州诺基仪器有限公司）；C_{18} 色谱柱（150 mm×4.6 mm，3.5 μm；Agilent ZORBAX Eclipse Plus C_{18}、Waters Symmetry C_{18}、太玮科技 JADE-PAK ODS-AQ）。

1.2　试药

磷酸（批号：P1508038，HPLC 级 85% ～ 90%，阿拉丁）；甲酸（批号：0001408600，UH-PLC/MS，Sigma）；乙腈、甲醇（HPLC 级，Fisher Scientific）；肉汤培养基（OXOID）；无菌 96 孔板（康宁）；哥伦比亚血平板（广东环凯微生物科技有限公司）。

没食子酸（批号:C13O9C72105，纯度≥98%）、杨梅苷（批号：D01031EA14，纯度≥98%）(上海源叶生物科技有限公司)；表没食子儿茶素（批号：MUST-21042810，纯度：98.71%）、没食子儿茶素（批号：MUST-21041804，纯度：98.57%）、儿茶素（批号：DST210225，纯度：98%）(成都德思特生物科技有限公司)；槲皮素（批号：3467，纯度：99.3%）、槲皮苷（批号：5634，纯度：98.0%）（NATURE STANDARD CO.，LTD.）；金丝桃苷（批号：11521-201809，纯度：94.9%，中国食品药品检定研究院）；表儿茶素没食子酸酯（批号：A1921031，纯度≥ 98%，阿拉丁）。

猴耳环消炎片（17 批，S1 ～ S17）由广州白云山花城药业有限公司提供；MRSA（3 株，SM1 ～ M3）由中山大学附属第一院临床检验科微生物检验室鉴定并提供。

2　方法与结果

2.1　猴耳环消炎片指纹图谱的构建

2.1.1　混合对照品溶液的制备　分别精密称取适量对照品，加 75% 甲醇制成每毫升含没食子酸 450 μg、金丝桃苷 4 μg、表没食子儿茶素 15 μg、槲皮素 5 μg、没食子儿茶素 15 μg、杨梅苷 5 μg、儿茶素 10 μg、表儿茶素没食子酸酯 10 μg、槲皮苷 40 μg 的混合对照品溶液。

2.1.2　供试品溶液的制备　取消炎片 10 片，除去薄膜衣，研细，精密称取 0.240 g，置 25 mL 量瓶中，用 75% 甲醇溶解，定容至刻度，摇匀，0.45 μm 滤膜过滤，收集续滤液即得。

2.1.3　色谱条件　C_{18} 色谱柱（150 mm×4.6 mm，3.5 μm）；柱温 25 ℃，流速 1.0 mL • min^{-1}；流动相为乙腈（A）和 pH 为 2.00 的磷酸溶液（B），梯度洗脱：0 → 10 min，5% ～ 10%A，10 → 65 min，10% ～ 25%A。检测波长：0 → 5.5 min 为 240 nm，5.5 → 65 min 为 208 nm。

2.1.4　方法学考察

① 专属性试验：取适量猴耳环消炎片、片剂辅料（淀粉、滑石粉、硬脂酸镁等按比例复配）按“2.1.2”项下方法制样分析。如图 1 所示，溶剂 75% 甲醇和辅料对分析无干扰，专属性较好。

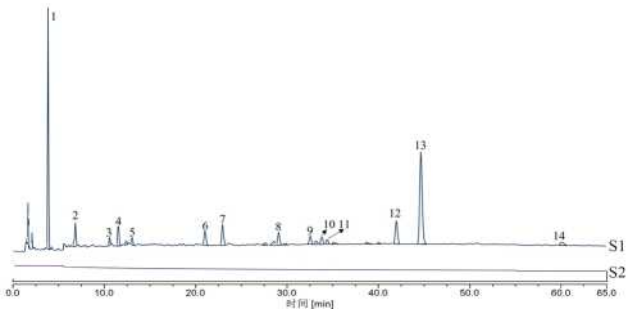


图 1　猴耳环消炎片（S1）和辅料（S2）的指纹图谱

Fig 1　Fingerprints of *Archidendron clypearia* antiphlogistic tablets（S1）and excipients（S2）

② 精密度试验：取同一供试品溶液连续进样分析 6 次。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012.1 版》进行相似度评价，以槲皮苷（12 号峰）为参照峰（S 峰），计算其他色谱峰的相对峰面积及其相对保留时间。结果 6 次指纹图谱的

相似度均为 1.000，且 14 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 值分别在 0.030% ～ 0.35% 和 0.84% ～ 2.5%，表明仪器精密度满足要求。

③ 方法重复性：取猴耳环消炎片平行制备 6 份供试品溶液并分析，结果 6 次指纹图谱的相似度均为 1.000，且 14 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 值分别在 0.060% ～ 0.45% 和 1.4% ～ 3.6%，表明方法的重复性满足要求。

④ 稳定性试验：取同一供试品溶液，于制备后的 0、8、16、24、32、40、48、56、64、72 h 测定，结果 10 次指纹图谱的相似度不低于 0.999，14 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 值分别在 0.21% ～ 0.57% 和 1.8% ～ 4.6%，表明供试品溶液在 72 h 内稳定性良好。

⑤ 耐用性试验：取同一供试品溶液，以来自不同厂家的 3 种 C_{18} 色谱柱分析，不同色谱柱间指纹图谱的相似度均为 1.000，且 14 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 值分别在 0.060% ～ 0.60% 和 0.90% ～ 5.71%。表明 Waters Symmetry C_{18}、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C_{18}、太玮科技 JADE-PAK ODS-AQ 3 种色谱柱均满足分析要求。

2.1.5 猴耳环消炎片指纹图谱共有峰的确证　收集猴耳环消炎片 17 批制备供试品溶液并分析。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012.1 版》进行相似度评价，以编号 S1 的指纹图谱为参照谱，进行峰匹配得到 14 个共有峰，17 批指纹图谱（见图 2）的相似度在 0.927 ～ 0.995。通过对照品比较（见图 3），确证了 1 号峰为没食子酸（$C_7H_6O_5$），2 号峰为没食子儿茶素（$C_{15}H_{14}O_7$），4 号峰为表没食子儿茶素（$C_{15}H_{14}O_7$），5 号峰为儿茶素（$C_{15}H_{14}O_6$），9 号峰为杨梅苷（$C_{21}H_{20}O_{12}$），10 号峰为金丝桃苷（$C_{21}H_{20}O_{12}$），11 号峰为表儿茶素没食子酸酯（$C_{22}H_{18}O_{10}$），12 号峰为槲皮苷（$C_{21}H_{20}O_{11}$），14 号峰为槲皮素（$C_{15}H_{10}O_7$）；利用 LC-TOF /MS /MS 技术手段 [8-10]，指证了 3 号峰为木犀草苷（$C_{21}H_{20}O_{11}$）异构体，6 号峰为 5，7，3'，4'，5'- 五羟基黄烷（$C_{15}H_{14}O_6$），7、8 号峰为 EGCG（$C_{22}H_{18}O_{11}$）异构体，13 号峰为 7- 没食子酰特利色黄烷（$C_{22}H_{18}O_{11}$）。

2.2 谱效学分析

2.2.1 猴耳环消炎片体外抑 MRSA 活性　菌株复苏与传代后，选取对数生长期的 MRSA 加入生理盐水，调整菌液浓度为 0.5 麦氏单位，用 M-H 肉汤培养基稀释 100 倍，精密移取 50 μL 于 96 孔板各孔中。将 17 批猴耳环消炎片和空白对照（辅料）分别用 M-H 肉汤培养基进行倍比稀释，加 50 μL 至上述含菌液的 96 孔板中，最终 MRSA 接种量约为 1.0×10^6 CFU • mL^{-1}。将 96 孔板于 37 ℃恒温培养 20 h，取澄清孔及其 2 倍、4 倍、8 倍浓度孔中溶液，于血琼脂平板上划线涂布。将血琼脂平板于 37 ℃培养 24 h 后，血琼脂平板无菌落生长的浓度，即为最小杀菌浓度（minimum bactericidal concentration，*MBC*），*MBC* 结果如图 4 所示（处理重复 3 次）。

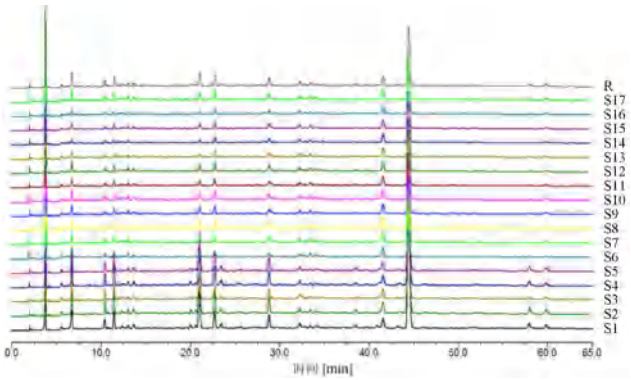


图 2　猴耳环消炎片（S1 ～ S17）及其对照模式（R）的指纹图谱叠加图

Fig 2　Stacking fingerprint of *Archidendron clypearia* antiphlogistic tablets（S1 ～ S17）and its comparison diagram（R）

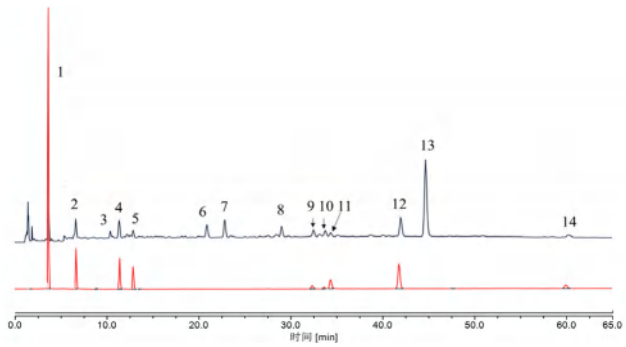


图 3　猴耳环消炎片和混合对照品的指纹图谱叠加图

Fig 3　Stacking fingerprint of *Archidendron clypearia* antiphlogistic tablets and mixed reference

注（Note）：1. 没食子酸（gallic acid）；2. 没食子儿茶素（gallocatechin）；4. 表没食子儿茶素（epigallocatechin）；5. 儿茶素（catechin）；9. 杨梅苷（myricetrin）；10. 金丝桃苷（hyperin）；11. 表没食子儿茶素（epicatechin gallate）；12. 槲皮苷（quercetrin）；14. 槲皮素（quercetin）。

2.2.2 关联分析

① 灰色关联分析：灰色关联分析法分析各成分对于体外抗 MRSA 活性的影响程度，以 *MBC* 平均值的倒数为因变量，14 个共有峰峰面积进行初值化处理后作为自变量，进行分析。针对 14 个评价项，关联结果如表 1 所示，关联度大于 0.8 的成分有 12 个，表明这 12 个成分与体外抑 MRSA 关联度较高。

② 偏最小二乘回归（partial least squares，

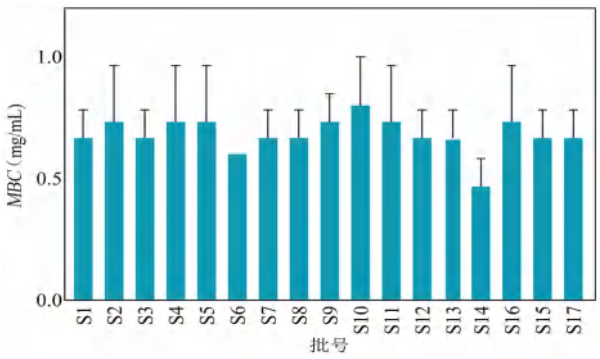


图 4　17 批猴耳环消炎片体外抑制 MRSA 活性的影响

Fig 4　Inhibition of 17 batches of *Archidendron clypearia* antiphlogistic tablets on MRSA in vitro

表 1　猴耳环消炎片指纹图谱共有峰与体外抗 MRSA 活性的关联度

Tab 1　Correlation between common peaks in the fingerprints of *Archidendron clypearia* antiphlogistic tablets and in vitro inhibition of MRSA

峰号	成分	关联度值
1	没食子酸	0.968
12	槲皮苷	0.951
10	金丝桃苷	0.951
11	表儿茶素没食子酸酯	0.932
5	儿茶素	0.926
14	槲皮素	0.900
9	杨梅苷	0.894
7	EGCG（$C_{22}H_{18}O_{11}$）异构体 1	0.885
2	没食子儿茶素	0.852
4	表没食子儿茶素	0.842
13	7- 没食子酰特利色黄烷	0.830
3	木犀草苷异构体（$C_{21}H_{20}O_{11}$）	0.826
6	5，7，3'，4'，5'- 五羟基黄烷（$C_{15}H_{14}O_6$）	0.758
8	EGCG（$C_{22}H_{18}O_{11}$）异构体 2	0.644

PLS）：由于多元线性回归中，14 个共有峰多重共线性严重（方差膨胀因子大于 10），因此使用 PLS 回归，建立猴耳环消炎片的谱 - 效关系模型。PLS 回归以 *MBC* 平均值的倒数为因变量 *Y*，将共有峰峰面积初值化处理后作为自变量 *X*，研究多个自变量 *X* 对于因变量 *Y* 的影响关系。PLS 回归拟合方程为 $Y = 0.815 + 2.223X_1 - 2.143X_2 - 0.422X_3 + 2.285X_4 + 0.612X_5 - 0.116X_6 - 2.937X_7 + 0.233X_8 - 0.519X_9 - 0.616X_{10} + 0.208X_{11} + 0.912X_{12} + 2.369X_{13} - 1.403X_{14}$。用 R 方值、预测误差均方根（the root of mean square error prediction，RMSEP）对拟合效果进行评价，R 方值为 0.95，RMSEP 值为 0.038（见图 5），表明该模型拟合效果较好。PLS 回归方程以各自变量的系数值为权重系数反映各个自变量所对应的化学成分的相对重要性（见图 6）。猴耳环 PLS 回归方程中系数大于 0.6 的活性成分为没食子酸（共有峰 1）、7- 没食子酰特利色黄烷（共有峰 13）、表没食子儿茶素（共有峰 4）、槲皮苷（共有峰 12）和儿茶素（共有峰 5）。

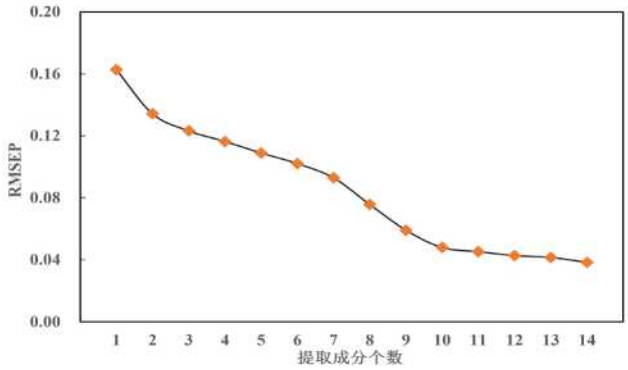


图 5　RMSEP 评估的拟合图

Fig 5　Fitting diagram of RMSEP evaluation

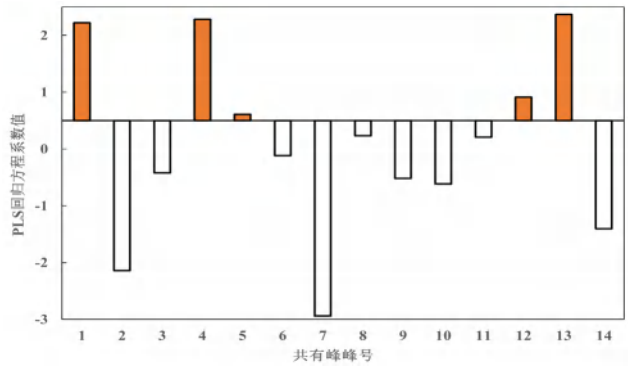


图 6　PLS 回归方程系数值的柱状图

Fig 6　Histogram of coefficients in PLS regression equation

③ 综合分析：综合灰色关联分析及 PLS 回归分析结果，绘制 Venn 图（见图 7），表明没食子酸、表没食子儿茶素、槲皮苷、7- 没食子酰特利色黄烷、儿茶素是猴耳环消炎片抗 MRSA 的主要药效物质基础。

图 7　灰色关联分析结果和 PLS 回归分析结果的 Venn 图

Fig 7　Venn diagram of analysis results of grey correlation and PLS regression

注（Note）：蓝色圆圈表示所有共有成分；红色圆圈表示灰色关联度大于 0.8 的成分；绿色圆圈表示 PLS 回归方程中系数大于 0.6 的成分；三个圆圈交叠的区域为灰色关联度大于 0.8 且 PLS 回归方程中系数大于 0.6 的成分（Blue circles indicate all common chemical compounds. Red circles represent the compounds with grey correlation degree over 0.8. Green circles represent the compounds with coefficient value over 0.6 in the PLS regression equation. The overlapping area of three circles is the compounds with grey correlation degree value over 0.8 and coefficient value over 0.6 in the PLS regression equation）。

3 讨论

中药指纹图谱技术涉及多种方法，其中HPLC分辨率高、灵敏度高、色谱柱可反复利用等优点，是中药指纹图谱的首选方法。本实验建立的HPLC指纹图谱，方法准确灵敏，稳定性和重复性好，指认和确证了14个共有成分，占总峰面积的90%以上，可用于猴耳环消炎片的质量控制。在此基础上，以体外抑菌活性衡量药物有效成分的抗菌效力，该方法操作简便、条件易于控制，已广泛应用于新药研究和指导临床用药。

中药谱效学以系统的化学成分研究和药理学研究为依托，在指纹图谱的基础上对应药效结果进行综合分析。本文首先通过灰色关联分析从共有成分中筛选灰色关联度大于0.8的化学成分；然后通过PLS回归分析筛选PLS回归拟合方程中系数大于0.6的化学成分，最后综合灰色关联分析和PLS回归分析，表明没食子酸、7-没食子酰特利色黄烷、儿茶素、槲皮苷、表没食子儿茶素是主要药效成分，这与文献报道吻合[11-16]。没食子酸与儿茶素具有与不同化合物联合增效的潜在应用。Mehrzadi等[17]研究表明没食子酸（200 mg • kg^{-1}）与槲皮素（75 mg • kg^{-1}）联合给药治疗博来霉素诱导的肺纤维化大鼠的疗效显著优于单独给药。Qin等[18]研究表明将儿茶素（128 μg•mL^{-1}）和表儿茶素没食子酸酯（16 μg•mL^{-1}）联合可显著增强体外苯唑西林抗MRSA的作用。7-没食子酰特利色黄烷为猴耳环的特有成分，是猴耳环发挥免疫调节和抗炎作用的潜在成分[19]。槲皮苷可通过抑制金黄色葡萄球菌Sortase A靶点影响细菌黏附[20]。

据此，阐明了猴耳环消炎片体外抑MRSA的主要药效物质基础。本研究为猴耳环消炎片的质量控制提供了理论与实验依据。

参考文献

[1] Nguyen TD，Pham DV，Phuong TT，et al. Xanthine oxidase inhibitors from *Archidendron clypearia*（Jack.）I. C. Nielsen：Results from systematic screening of vietnamese medicinal plants [J]. Asian Pac J Trop Med，2017，10（6）：549-556.

[2] Wang YX，Duan ZK，Chang YY，et al. Triterpenes from *Archidendron clypearia*（Jack）I. C. N. with anti-*β*-amyloid aggregation activity [J]. Nat Prod Res，2021，35（16）：2789-2792.

[3] 刘小莉，刘琳，文花. 猴耳环消炎颗粒治疗小儿细菌性肠炎60例 [J]. 实用中西医结合临床，2016，16（8）：29-31.

[4] Su WW，Liu C，Zhou Q，et al. *Pithecellobium clypearia* Benth extract and application for preparing anti-microbial agent：EP3456335B1 [P]. 2020-10-14.

[5] 黄巧玉，邱小婷，赖远花. 本院2017年多重耐药菌检出现状及耐药性分析 [J]. 中南药学，2019，162（7）：1160-1163.

[6] 刘翀，王永刚，李沛波，等. 南药猴耳环作为抗生素佐剂的研究进展 [J]. 中山大学学报（自然科学版），2020，59（04）：1-6.

[7] 刘博宇. 两种岭南特色中药抗耐药金葡菌的活性及其活性物质研究 [D]. 广州：中山大学，2014.

[8] 陈昱桦. 猴耳环化学成分的分离与鉴定 [J]. 天津药学，2015，27（6）：5-8.

[9] Wang YX，Ren Q，Yan ZY，et al. Flavonoids and their derivatives with *β*-amyloid aggregation inhibitory activity from the leaves and twigs of *Pithecellobium clypearia benth* [J]. Bioorg Med Chem Lett，2017，27（21）：4823-4827.

[10] Liu C，Huang H，Zhou Q，et al. *Pithecellobium clypearia* extract enriched in gallic acid and luteolin has antibacterial activity against MRSA and reduces resistance to erythromycin，ceftriaxone sodium and levofloxacin [J]. J Appl Microbiol，2020，129（4）：848-859.

[11] 王永刚，刘博宇，苏薇薇，等. 猴耳环提取物及其在制备抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌药物中的应用：CN103385912A [P]. 2013-07-24.

[12] Lee DS，Eom SH，Kim YM，et al. Antibacterial and synergic effects of gallic acid-grafted-chitosan with *β*-lactams against methicillin-resistant *staphylococcus aureus*（MRSA）[J]. NRC Res Press，2014，60（10）：629-638.

[13] 肖康康，覃容欣，李斌，等. 儿茶素类化合物增强*β*-内酰胺类抗生素抗MRSA的作用 [J]. 中国抗生素杂志，2012，37（5）：397-404.

[14] Salha H. M. Al-Zahrani. Antibacterial activities of gallic acid and gallic acid methyl ester on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. J Am Sci，2012，8（2）：7-12.

[15] Bharti B，Neha S，Rita K. ChemInform abstract：gallic acid：a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications [J]. ChemInform，2015，46（23）：27540-27557.

[16] Guo VY，Wang NL，Bo L，et al. Chemical constituents from *Pithecellobium clypearia* and their effects on T lymphocytes proliferation [J]. JCPS，2007（3）：208-213.

[17] Mehrzadi S，Hosseini P，Mehrabani M，et al. Attenuation of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in wistar rats by combination treatment of two natural phenolic compounds：quercetin and gallic acid [J]. Nutr Cancer，2021，73（10）：2039-2049.

[18] Qin RX，Xiao KK，Li B，et al. The combination of catechin and epicatechin callate from fructus crataegi potentiates beta-lactam antibiotics against methicillin-resistant *staphylococcus aureus*（MRSA）in vitro and in vivo [J]. Int J Mol Sci，2013，14（1）：1802-1821.

[19] 付元凤. 猴耳环的化学成分研究及对咪喹莫特诱导小鼠银屑病模型的干预作用 [D]. 上海：上海中医药大学，2019.

[20] 柳秉润. 槲皮苷对金黄色葡萄球菌Sortase A的抑制作用及其机制研究 [D]. 吉林：吉林大学，2015.

（收稿日期：2021-08-09；修回日期：2021-10-20）

金银花提取物增强抗 CD19 CAR-T 细胞肿瘤杀伤活性

单贺珍[1]，董石[1]，李晓瑞[3]，董宇曦[1]，刘秀盈[1]，何宇[1]，王建勋[1, 2*]（1. 北京中医药大学生命科学学院，北京　102488；2. 深圳北京中医药大学研究院，广东　深圳　518172；3. 中国农业大学生物学院，北京　100193）

摘要：目的　探究金银花提取物对抗 CD19 CAR-T 细胞肿瘤杀伤活性以及细胞因子释放的影响。**方法**　利用抗 CD19 CAR-T 细胞与肿瘤细胞 Raji 细胞（或 Raji-Luc 细胞）共培养体系，通过荧光素酶与凋亡检测法测定对照组与金银花处理组的抗 CD19 CAR-T 细胞的杀伤效率；采用 CFSE 染色法检测增殖能力，并通过流式细胞术测定细胞因子的释放水平与 PD-1 蛋白的表达水平。**结果**　T 细胞转导组 CD19 CAR 分子的表达率为 65.7%，表明抗 CD19 CAR-T 细胞制备成功。10 mg • mL^{-1} 金银花提取物与抗 CD19 CAR-T 细胞联合组杀伤 Raji 细胞的效力最佳，且优于 CD19 CAR-T 细胞组、金银花与未转导 T 细胞联合组、未转导 T 细胞组与金银花处理组。并且在 1∶2、1∶4、1∶8 与 1∶16 效靶比条件下，金银花提取物均可以增强抗 CD19 CAR-T 细胞的肿瘤杀伤能力，改善抗 CD19 CAR-T 细胞的增殖能力，促进 Granzyme B 的分泌而抑制 IFN-γ 与 IL-10 的释放。进一步研究发现，金银花提取物可以抑制 CD19 CAR-T 细胞表达 PD-1 蛋白。**结论**　10 mg • mL^{-1} 的金银花提取物可以有效提高抗 CD19 CAR-T 细胞体外杀伤肿瘤的效力，促进抗 CD19 CAR-T 细胞增殖，并特异性调节细胞因子的释放，下调 PD-1 蛋白的表达。

关键词：金银花；B 细胞淋巴瘤；抗 CD19 CAR-T 细胞
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1545-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.012

Lonicera japonica extract enhances the tumor killing activity of anti-CD19 CAR-T cells

SHAN He-zhen[1], DONG Shi[1], LI Xiao-rui[3], DONG Yu-xi[1], LIU Xiu-ying[1], HE Yu[1], WANG Jian-xun[1, 2*] (1. *School of Life Sciences*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Bejing* 102488; 2. *Research Institute of Shenzhen*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Shenzhen Guangdong* 518172; 3. *College of Biological Sciences*, *China Agricultural University*, *Beijing* 100193)

Abstract: Objective To determine the effect of Lonicera japonica extract on the tumor killing, cytotoxicity and cytokine release of anti-CD19 CAR-T cell functions. **Methods** Based on the co-culture system of successfully prepared anti-CD19 CAR-T cells and Raji cells (or Raji-Luc cells), the killing efficiency was determined by luciferase and cell apoptosis detection. And the proliferation ability was detected by CFSE staining, while the release level of cytokines and PD-1 expression were detected by flow cytometry. **Results** The transfection efficiency of CD19 CAR molecules on T cells was 65.7%, indicating the successful construction of anti-CD19 CAR-T cells . Under the same effector-target (E∶T) ratio, the combination of 10 mg • mL^{-1} Lonicera japonica extract and anti-CD19 CAR-T cells was more effective against Raji cells than the anti-CD19 CAR-T cell group, Lonicera japonica-treated T cell group, T cell group, and Lonicera japonica group. Moreover, Lonicera japonica extract also significantly increased the cytotoxicity of anti-CD19 CAR-T cells at E ∶ T of 1∶2, 1∶4, 1∶8 and 1∶16. At the same time, the self-renewal ability of anti-CD19 CAR-T cells was improved, and the secretion of Granzyme B was promoted and the release of IFN-γ and IL-10 was inhibited by Lonicera japonica. In particularly, PD-1 expression in anti-CD19 CAR-T cells was alleviated by Lonicera japonica extract.

基金项目：北京市双一流高层次人才科研启动经费项目（No.9011451310032）。
作者简介：单贺珍，女，硕士研究生，主要从事中医药抗肿瘤活性研究，email：Pekshan2012@163.com　*通信作者：王建勋，男，教授，博士研究生导师，主要从事中医药遗传学与分子生物学机制研究，email：Jianxun.Wang@bucm.edu.cn

Conclusion Lonicera japonica extract may at 10 mg • mL^{-1} increase the cell killing efficacy of anti-CD19 CAR-T cells in vitro, improve the self-renewal ability of anti-CD19 CAR-T cells, specifically regulate cytokines release and downregulate PD-1 expression level.

Key words: Lonicera japonica; B cell lymphoma; anti-CD19 CAR-T cell

嵌合抗原受体（chimeric antigen receptor，CAR）T 细胞免疫疗法是抗肿瘤领域的一种新型细胞疗法。近年来，多款抗 CD19 CAR-T 细胞产品陆续获批上市，它对 B 细胞恶性淋巴瘤的疗效显著，特别是弥漫性大 B 细胞淋巴瘤，完全有效率可达 54%[1]。然而，抗 CD19 CAR-T 细胞疗法的不良反应不可忽视，比如神经毒性和细胞因子综合征（cytokine release syndrome，CRS），严重者甚至会危及患者的生命 [2]。

中药金银花（Lonicera japonica，LJ）具有清热解毒、抗炎消肿的功效，临床上广泛用于发热、扁桃体炎、肺炎、鼻炎及皮疹等 [3]。有体外实验表明，金银花提取物可以阻碍脂多糖诱导神经小胶质细胞与免疫巨噬细胞分泌炎症因子 [4-5]，抑制补体活性 [6]。这提示金银花可能有助于缓解抗 CD19 CAR-T 细胞导致的 CRS。

因此，本实验将金银花水煎剂与抗 CD19 CAR-T 细胞联合处理表达 CD19 的 Burkitt’s 淋巴瘤细胞（Raji 细胞），以探究金银花对抗 CD19 CAR-T 细胞肿瘤杀伤能力，细胞因子释放以及程序性死亡蛋白（programmed death-1，PD-1）表达的影响，以期为恶性 B 细胞淋巴瘤患者提供新的治疗方案。

1 材料

1.1 仪器

流式细胞分析仪（LSRFortessa SORP，BD）；酶标仪（Epoch 2TC，BioTek）；细胞自动计数仪（Invitrogen Countess II FL，ThermoFisher）。

1.2 试药

RPMI 1640 培养基、AIMV 培养基、胎牛血清（FBS）（Gibco 公司）；CD3-APC 抗体、PD-1-PE 抗体、c-Myc-PE 抗体、Human CD8/NK Panel 检测试剂盒、CFSE 荧光染料（Bio-Legend 公司）；细胞凋亡检测试剂盒（北京金普来生物科技有限公司）；Bright-Lumi Ⅱ 萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂盒（碧云天生物技术公司）；金银花中药饮片 [中国北京同仁堂（集团）有限公司]。

1.3 细胞系

Burkitt’s 淋巴瘤细胞（Raji 细胞，美国 ATCC 细胞库）；Raji- 荧光素酶标记细胞（Raji-Luc，北京维通达公司）；外周血单个核细胞（Peripheral blood mononuclear cell，PBMC，为健康志愿者提供）。本研究获得北京中医药大学医学与实验动物伦理委员会审理与批准，审批号为 2022 BZYLL0102。

2 方法

2.1 金银花提取物的制备 [7]

称取金银花 30 g，以 8 倍量去离子水浸泡 30 min，加热煮沸 2 h，以三层纱布过滤。最后水浴浓缩至 300 mL，即获得质量浓度为 100 mg • mL^{-1} 的金银花水煎剂，0.22 μm 滤膜过滤。

2.2 抗 CD19 CAR-T 细胞的构建与转导率测定 [8]

采用 Ficoll 密度梯度离心法分离人外周血中的 PBMC，以含有 10%FBS 的 AIMV 培养基培养。T 细胞激活则通过 CD3 单克隆抗体与白介素 -2（IL-2）刺激处理，继续培养 48 h 后，转导抗 CD19 CAR 反转录病毒（实验室前期制备并保存）得到抗 CD19 CAR-T 细胞。48 h 后通过 c-Myc-PE 染色与流式细胞术检测 c-Myc 阳性细胞，即获得 CD19 CAR 的转导效率。

2.3 荧光素酶检测法测定靶细胞活率

将抗 CD19 CAR-T 细胞或 T 细胞依照 1∶8 效靶比与 4×10^4 个 Raji-Luc 细胞置于 96 孔培养皿 100 μL 体系中，给药组分别给予 5、10、20 mg • mL^{-1} 金银花水煎剂干预。37 ℃共同培养 12 h 后，每孔加入 100 μL 荧光素酶底物，孵育 3 min 后使用酶标仪的化学发光模式检测。根据下列公式计算不同组别的细胞杀伤效率：细胞杀伤效率（%）＝（靶细胞组检测值－实验组检测值）/ 靶细胞组检测值 ×100%。

2.4 Annexin V 染色法检测靶细胞凋亡

将抗 CD19 CAR-T 细胞依照 1∶2、1∶4、1∶8、1∶16 效靶比与 2.4×10^5 个 Raji 细胞共同培养 12 h 后，以 CD3-APC 抗体标记 T 细胞，Annexin-FITC 标记早期凋亡细胞后，通过流式细胞术测定 Raji 细胞的凋亡比例。根据下列公式计算不同组别的细胞杀伤效率：细胞杀伤效率（%）＝（实验组 FITC 阳性率－靶细胞组 FITC 阳性率）/（1－靶细胞组 FITC 阳性率）×100%。

2.5 CFSE 染色法测定效应细胞增殖

将抗 CD19 CAR-T 细胞与 3 μmol • L^{-1} 羟基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺脂（CFSE）孵育染色

30 min，流式细胞术检测 0 h 的 FITC 通道荧光强度；之后抗 CD19 CAR-T 细胞按照 1∶8 效靶比与 2.4×10^5 个 Raji 细胞共同培养 12 h，以 CD3-APC 抗体标记 T 细胞，检测 12 h 的 FITC 通道荧光强度。

2.6　CBA 多因子流式细胞术检测细胞因子释放水平

将抗 CD19 CAR-T 按照 1∶8 效靶比与 2.4×10^5 个 Raji 细胞共同培养 12 h 后，收取培养基上清液，按照 Human CD8/NK Panel 检测试剂盒说明书操作并检测。

2.7　流式细胞术检测 PD-1 的表达水平

将抗 CD19 CAR-T 按照 1∶8 效靶比与 2.4×10^5 个 Raji 细胞共同培养 12 h 后，以 CD3-APC 抗体标记 T 细胞，PD-1-PE 抗体标记 PD-1 蛋白，抗体孵育 1 h 后采用流式细胞术检测。

2.8　数据统计与分析

采用 Graphpad Prism 9 软件进行统计学分析，两组之间采用 t 检验，$P<0.05$ 则表明差异有统计学意义。

3　结果

3.1　抗 CD19 CAR-T 细胞的成功制备

抗 CD19 CAR-T 细胞的构建是通过基因重组技术将载有 CD19 CAR 的反转录病毒转导至 T 细胞，使其可以识别肿瘤细胞表面的 CD19 从而特异性杀伤肿瘤，其中 CD19 CAR 的分子结构主要包括 CD19 的单链可变片段（scFv）、CD8 铰链区、CD28 共刺激域以及 CD3ζ 结构域（见图 1A）。转染 48 h 后采用 c-Myc 抗体标记 CD19 CAR 分子以评估病毒的转导效率，结果发现 T 细胞中 CD19 CAR 分子的表达率为 65.7%（见图 1B）。

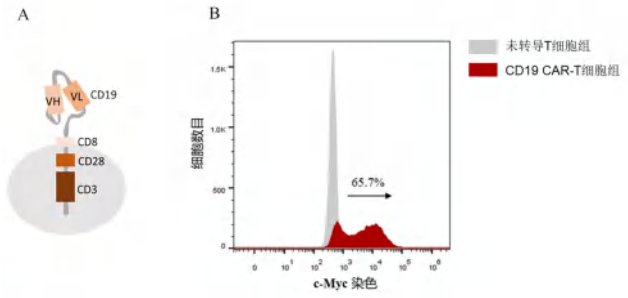


图 1　靶向 CD19 的嵌合抗原受体（CAR）的分子结构（A）及其表达率（B）

Fig 1　Structure（A）and transduction efficiency（B）of anti-CD19 chimeric antigen receptor（CAR）

A. 靶向 CD19 的 CAR 分子结构（anti-CD19 CAR structure）；B. CD19 CAR 分子结构的表达率（transduction efficiency of CD19 CAR）

3.2　金银花提取物提高抗 CD19 CAR-T 细胞肿瘤杀伤活性

为了探究金银花提取物是否会影响抗 CD19 CAR-T 细胞的体外细胞毒性，将效应细胞与 Raji-Luc 共培养，给药组给予金银花提取物干预 12 h，通过荧光素酶检测法测定 Raji-Luc 的存活率。浓度摸索实验发现，10 mg·mL^{-1} 的金银花提取物可以促进抗 CD19 CAR-T 细胞杀伤肿瘤，优于 5 mg·mL^{-1} 和 20 mg·mL^{-1} 两个质量浓度组（见图 2A）。于是将 10 mg·mL^{-1} 作为后续实验中金银花提取物的最佳干预浓度。此外，还发现金银花与抗 CD19 CAR-T 细胞联合杀伤 Raji-Luc 的效果显著优于两者的单独应用，即两者具有叠加效应，也强于未转导 T 细胞与金银花联用组以及未转导 T 细胞组（见图 2B）。

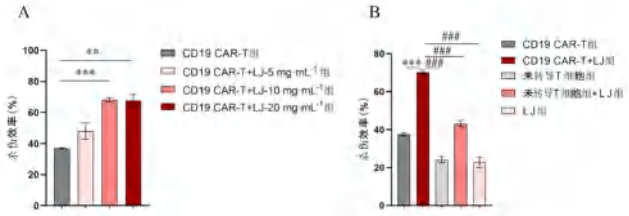


图 2　荧光素酶检测法测定抗 CD19 CAR-T 对 Raji-Luc 的杀伤效率（$n=3$）

Fig 2　Killing efficienc of anti-CD19 CAR-T cells against Raji-Luc measured by luciferase assay（$n=3$）

A. 不同浓度金银花提取物处理的抗 CD19 CAR-T 对 Raji-Luc 的杀伤效率（the lysis ability of anti-CD19 CAR CAR-T cells treated with LJ at different concentrations on Raji-Luc）；B. 1∶8 效靶比时不同处理组的效应细胞对 Raji-Luc 细胞的杀伤效率（the lysis ability of effector cells on Raji-Luc at an E∶T ratio of 1∶8）

注：与 CD19 CAR-T 组相比，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$；与 CD19 CAR-T＋LJ 组相比，$^{###}P<0.001$。

Note：Compared with the CD19 CAR-T group，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$；compared with the CD19 CAR-T ＋ LJ group，$^{###}P<0.001$.

进一步通过流式细胞术的方法检测了不同效靶比条件下，10 mg·mL^{-1} 的金银花提取物是否均会影响抗 CD19 CAR-T 细胞对 Raji 细胞的促凋亡作用，结果显示，1∶2、1∶4、1∶8 与 1∶16 效靶比水平下，金银花与抗 CD19 CAR-T 细胞联合应用组的肿瘤杀伤活性均显著高于抗 CD19 CAR-T 细胞组（见图 3）。

3.3　金银花提取物促进抗 CD19 CAR-T 细胞的增殖

CAR-T 细胞增殖能力同体内抗肿瘤的持久性密切相关[9]，于是通过 CFSE 染色法测定了经 10 mg·mL^{-1} 金银花提取物处理的抗 CD19 CAR-T 细胞，结果显示，与靶细胞共培养 12 h 后，同抗 CD19 CAR-T 细胞组相比，金银花联合应用组的 CFSE 荧光峰图向左偏移（见图 4），即金银花提取物提高了抗 CD19 CAR-T 细胞的增殖能力。

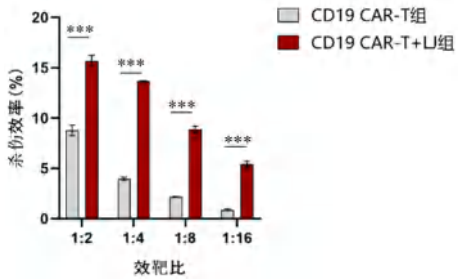


图 3　细胞凋亡检测法测定抗 CD19 CAR-T 对 Raji 细胞的杀伤效率（$n = 3$）

Fig 3　Killing efficiency of anti-CD19 CAR-T cells against Raji cells measured by cell apoptosis assay（$n = 3$）

注：与 CD19 CAR-T 组相比，$^{***}P < 0.001$。

Note：Compared with the CD19 CAR-T group，$^{***}P < 0.001$.

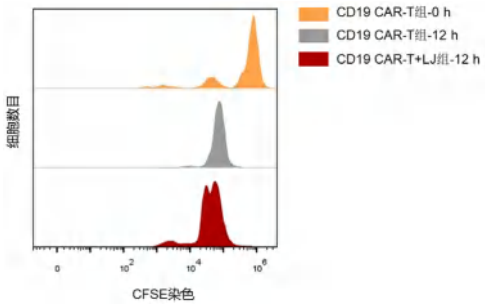


图 4　CFSE 染色测定抗 CD19 CAR-T 细胞的增殖能力

Fig 4　Proliferation ability of anti-CD19 CAR-T cell measured by CFSE staining

3.4　金银花提取物双向调控细胞因子的分泌

细胞因子的释放水平是指征 CAR-T 细胞功能的标志之一，于是对抗 CD19 CAR-T 细胞与 Raji 细胞共培养体系中白介素 -2（IL-2）、白介素 -6（IL-6）、白介素 -10（IL-10）、肿瘤坏死因子 α（TNF-α）、干扰素 γ（IFN-γ）以及颗粒酶 B（Granzyme B）的水平进行检测。结果发现经 10 mg • mL^{-1} 金银花提取物处理后，Granzyme B 显著上调，IL-2 与 TNF-α 有表达升高的趋势；同时 IFN-γ 与 IL-10 显著下调，IL-6 表达有降低的趋势（见图 5）。

3.5　金银花提取物下调 PD-1 蛋白的表达

为了进一步阐明金银花提取物增强抗 CD19 CAR-T 细胞肿瘤杀伤能力的可能原因，对抗 CD19 CAR-T 细胞活性相关的免疫检查点 PD-1 蛋白进行检测，结果发现，同对照组相比，经 10 mg • mL^{-1} 金银花处理的抗 CD19 CAR-T 细胞的 PD-1 阳性率发生降低（见图 6）。

4　讨论

CD19 是 B 细胞的生物标志物，属于免疫球蛋白超家族，并在多数慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病以及 B 细胞淋巴瘤病例中高水平，且为血液肿瘤治疗的潜在靶点[10]。针对

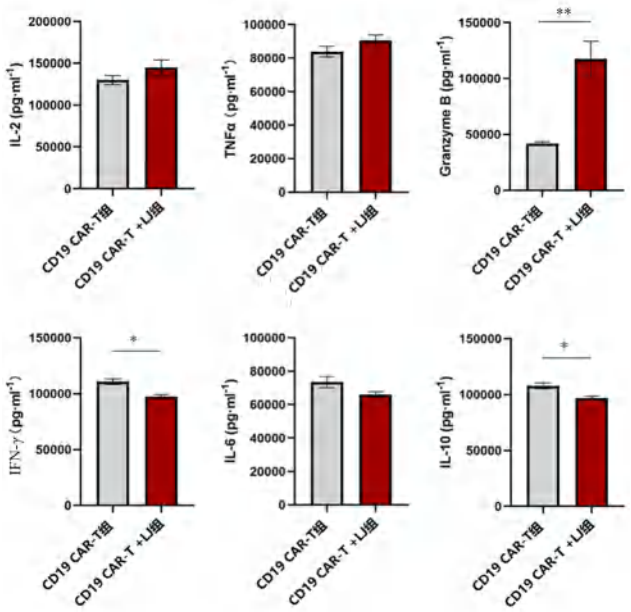


图 5　金银花提取物特异性调控细胞因子的分泌水平（$n = 3$）

Fig 5　Expression level of cytokines regulated by Lonicera japonica extract（$n = 3$）

注：与 CD19 CAR-T 组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

Note：Compared with the CD19 CAR-T group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$.

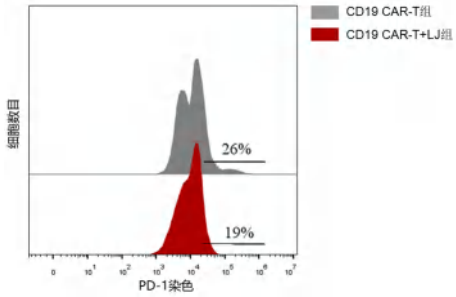


图 6　流式细胞术检测 PD-1 蛋白表达的阳性率

Fig 6　Expression of PD-1 detected by flow cytometry

CD19 靶标设计的抗 CD19 CAR-T 细胞可以特异性识别高表达 CD19 的 B 细胞淋巴瘤并激活自身 T 细胞的功能，进而精准清除癌变细胞[2]。Raji 细胞是取自 Burkitt’s 淋巴瘤患者的癌变 B 细胞，可作为评估靶向 CD19 CAR-T 细胞效力的靶细胞。基于成功制备的抗 CD19 CAR-T 细胞与 Raji 细胞共培养体系，实验发现 10 mg • mL^{-1} 金银花提取物有助于提高抗 CD19 CAR-T 细胞的细胞毒性，改善抗 CD19 CAR-T 细胞的增殖，提示金银花提取物与抗 CD19 CAR-T 细胞的联合疗法具有良好的抗肿瘤疗效，有可能进一步提高 B 细胞淋巴瘤的临床治愈率。

此外，在体内杀伤靶细胞过程中，抗 CD19 CAR-T 细胞与自免疫 T 细胞的激活会导致血清中免疫刺激细胞因子的增加，如 Granzyme B、IL-6、IL-10、TNF-α、IFN-γ、IFN-β 等[11]，介导对肿瘤

的杀伤作用。而这些细胞因子过度的级联释放会导致受试者发生细胞因子风暴，是 CAR-T 细胞疗法的不良反应之一。研究表明金银花提取物对细胞因子的调控是双向的，它促进 Granzyme B 的分泌，而抑制 IFN-γ 与 IL-10 的释放，对 IL-2、TNF-α 与 IL-6 的表达无显著影响。Granzyme B 是丝氨酸蛋白酶家族成员之一，常在效应 T 细胞中表达并介导对靶细胞的促凋亡作用[12]，而金银花提取物的处理促进了抗 CD19 CAR-T 细胞释放 Granzyme B，进一步揭示了金银花与抗 CD19 CAR-T 细胞的联合应用具有最佳肿瘤杀伤能力的原因；有研究表明干扰素 IFN-γ 水平的高低对 CAR-T 细胞的疗效无显著影响，并且抑制 IFN-γ 不仅可以减轻细胞因子相关的毒性，还能够通过减少免疫检查点蛋白的表达来增强 T 细胞增殖[13]，金银花提取物的干预明显抑制了抗 CD19 CAR-T 细胞分泌 IFN-γ，说明金银花可能会在不影响杀伤效果的同时减轻抗 CD19 CAR-T 细胞疗法引发的 CRS 症状，也解释了经金银花处理的抗 CD19 CAR-T 细胞自我更新能力得到提高的原因。

PD-1 是重要的免疫检查点之一，当抗 CD19 CAR-T 细胞暴露于肿瘤细胞环境时，会诱导自身 PD-1 蛋白的表达上调[14]，PD-1 信号通路的激活则会降低抗 CD19 CAR-T 细胞对肿瘤细胞的杀伤活性以及细胞增殖能力[15]，导致肿瘤免疫逃逸的发生。而 10 mg • mL^{-1} 金银花提取物处理可以下调由 Raji 细胞刺激诱发的抗 CD19 CAR-T 细胞中 PD-1 的表达，这说明金银花提取物有可能通过下调 PD-1 蛋白的表达从而增强抗 CD19 CAR-T 细胞肿瘤杀伤活性以及细胞增殖能力。

综上，本项研究证实了金银花提取物可以提高抗 CD19 CAR-T 细胞体外杀伤肿瘤的效力，且特异性调控细胞因子的释放水平并下调免疫检查点 PD-1 的表达。这一发现将有助于改善抗 CD19 CAR-T 细胞疗法的效果与降低不良反应的发生率，也拓展了中药金银花的临床应用范围。然而，金银花调控抗 CD19 CAR-T 细胞功能的有效成分与内在分子机制尚不清晰，有待中药物质基础学研究与生物信息学分析加以阐释，为金银花与抗 CD19 CAR-T 细胞联合疗法的临床转化提供更夯实的证据。

参考文献

[1] Neelapu SS，Locke FL，Bartlett NL，et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma [J]. N Engl J Med，2017，377（26）：2531-2544.

[2] Abramson JS. Anti-CD19 CAR T-cell therapy for B-cell non-hodgkin lymphoma [J]. Transfus Med Rev，2020，34（1）：29-33.

[3] 广妍鹭 . 浅析金银花的药理作用与临床应用 [J]. 中国医药指南，2018，16（35）：164-165.

[4] 宋亚玲，王红梅，倪付勇，等 . 金银花中酚酸类成分及其抗炎活性研究 [J]. 中草药，2015，46（4）：490-495.

[5] Kwon SH，Ma SX，Hong SI，et al. Lonicera japonica THUNB. extract inhibits lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses by suppressing NF-κB signaling in BV-2 microglial cells [J]. J Med Food，2015，18（7）：762-775.

[6] 倪付勇，刘露，宋亚玲，等 . 金银花中抗补体活性酚酸类成分的研究 [J]. 中国中药杂志，2015，40（2）：269-274.

[7] 吴俊伟，罗音久，武煊，等 . 均匀设计法优化金银花水煎液絮凝提取工艺的研究 [J]. 中国兽药杂志，2006，40（8）：23-25.

[8] 朱晶晶，张静，王萍，等 . 血必净注射液增强抗 CD19 CAR-T 细胞肿瘤杀伤活性的研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志，2021，28（2）：209-213.

[9] Porter DL，Hwang WT，Frey NV，et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia [J]. Sci Transl Med，2015，7（303）：303ra139.

[10] Scheuermann RH，Racila E. CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy [J]. Leuk Lymphoma，1995，18（5-6）：385-397.

[11] Zhang WY，Liu Y，Wang Y，et al. Excessive activated T-cell proliferation after anti-CD19 CAR T-cell therapy [J]. Gene Ther，2018，25（3）：198-204.

[12] Kashyap D，Garg VK，Goel N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis：role in cancer development and prognosis [J]. Adv Protein Chem Struct Biol，2021，125：73-120.

[13] Stefanie RB，Sonika V，Rebecca L，et al. Blocking IFN-γ in CAR-T reduces checkpoint inhibitors and cell-mediated toxicity without compromising therapeutic efficacy in CD19 ＋ malignancies [J]. Blood，2021，138（1）：1723.

[14] Zhang R，Deng Q，Jiang YY，et al. Effect and changes in PD-1 expression of CD19 CAR-T cells from T cells highly expressing PD-1 combined with reduced-dose PD-1 inhibitor [J]. Oncol Rep，2019，41（6）：3455-3463.

[15] Lee YH，Lee HJ，Kim HC，et al. PD-1 and TIGIT down-regulation distinctly affect the effector and early memory phenotypes of CD19-targeting CAR T cells [J]. Mol Ther，2022，30（2）：579-592.

（收稿日期：2022-03-10；修回日期：2022-04-12）

基于大数据网络的金嗓开音胶囊治疗咽炎作用机制预测及体外验证

任美[1]，周瑞[1*]，唐志书[1]，苏洁[1]，刘妍如[1]，胡锦航[1]，宋忠兴[1]，石丽[2]，王文宏[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/秦药特色资源研究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；2. 西安碑林药业股份有限公司，西安 712000）

摘要：目标 采用网络药理学和分子对接技术预测分析金嗓开音胶囊治疗咽炎的活性成分及作用机制，并进行初步的体外验证。**方法** 通过 TCMSP、Swiss TargetPrediction、Uniprot 等数据库和文献挖掘获取金嗓开音胶囊的活性成分与作用靶点，利用 GeneCards 等数据库检索咽炎疾病作用靶点，韦恩图分析获得活性成分与疾病靶点交集，应用 STRING 数据库和 Cytoscape 3.9.1 软件构建蛋白互作网络图，通过拓扑方法分析出关键靶点，对其进行 GO 和 KEGG 通路富集分析并构建可视化的“药物 - 成分 - 靶点 - 通路”网络图，筛选关键成分、靶点进行分子对接研究。最后，建立细胞炎性模型，采用 MTT、ELISA、Western blot 法对核心靶点进行验证。**结果** 检索到金嗓开音胶囊活性成分共 251 个，靶点 1101 个，咽炎相关疾病靶点 1459 个，筛选出 PTGS2、TNF、IL-6 等核心靶点 25 个，槲皮素、木犀草素、*β*- 谷甾醇等关键成分 10 个，涉及 MAPK 信号通路、TNF 信号通路及 IL-17 信号通路等。分子对接结果表明，金嗓开音胶囊中的槲皮素、山柰酚、*β*- 谷甾醇等主要活性成分与 PTGS2、TNF、IL-6 等关键靶点具有较强结合力，MTT、ELISA 实验结果表明，金嗓开音胶囊对脂多糖诱导的巨噬细胞炎性模型具有一定的保护作用，并可抑制炎性因子 NO、TNF-*α* 及 IL-6 的表达，Western blot 实验结果显示金嗓开音胶囊可抑制 PTGS2、TNF-*α* 及 IL-6 蛋白的表达。**结论** 金嗓开音胶囊可能通过多成分、多靶点、多通路影响炎症和免疫调节，从而发挥治疗咽炎的作用。

关键词：金嗓开音胶囊；咽炎；网络药理学；分子对接；细胞实验

中图分类号：R285 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)07-1550-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.013

Mechanism of Jinsang Kaiyin capsules for pharyngitis based on bioinformatic data and in vitro experimental validation

REN Mei[1], ZHOU Rui[1*], TANG Zhi-shu[1], SU Jie[1], LIU Yan-ru[1], HU Jin-hang[1], SONG Zhong-xing[1], SHI Li[2], WANG Wen-hong[2] (1. *Shaanxi University of Chinese Medicine Co-construction Collaborative Innovation Center of Chinese Medicine Resources Industrialization by Shaanxi & Education Ministry/State Key Laboratory of Research & Development of Characteristic Qin Medicine Resources* (*Cultivation*)*/Shaanxi Innovative Drug Research Center, Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712083; 2. *Xi'an Beilin Pharmaceutical Co*., *Ltd*, *Xi'an* 712000)

Abstract: Obiective To determine the mechanism of Jinsang Kaiyin capsules for pharyngitis by network pharmacology and molecular docking, and to validate in vitro experiments. **Methods** The active components and corresponding targets were obtained from TCMSP, Swiss TargetPrediction, Uniprot and other databases and literature mining. The targets of pharyngitis were searched with GeneCards and other databases, and the intersections of active components and disease targets were analysed by Venn diagram. The protein-protein interaction network between the active components and the disease targets

基金项目：国家自然科学基金青年项目（No.81803946）；陕西省教育厅 2020 年度重点科学研究计划（协同创新中心项目）（No.20JY010）；陕西省 2020 年重点研发计划社会发展领域（No.2020SF-034）；国家中药材产业技术体系咸阳综合试验站补贴项目（No.2019JCW-06）。

作者简介：任美，女，硕士，主要从事中药抗风湿抗肿瘤药理研究，email：REAL0116@163.com *通信作者：周瑞，女，副教授，主要从事中药药理作用机制研究，email：zhouruiswg@126.com

was constructed with STRING database and Cytoscape 3.9.1 software. The core targets were identified by topological analysis. GO and KEGG pathway enrichment analysis were performed on the core targets, and the visualized "drug-ingredient-target-pathway" network map was constructed. The core components and targets were screened for molecular docking. Finally, cellular inflammation models were established and the core targets were validated by MTT, ELISA and Western blot. **Results** Totally 251 active components, 1101 targets and 1459 pharyngitis-related disease targets were retrieved. Totally 25 core targets (such as PTGS2, TNF and IL-6) and 10 core components (such as quercetin, luteolin and *β*-sitosterol) were screened, involving MAPK signaling pathway, TNF signaling pathway and IL-17 signaling pathway, etc. The molecular docking showed that the main active components in Jinsang Kaiyin capsules, such as quercetin, kaempferol and *β*-sitosterol, had stable binding power to core targets such as PTGS2, TNF and IL-6. The MTT and ELISA results showed that lipopolysaccharide-induced macrophage inflammation model was improved by Jinsang Kaiyin capsules, and the expression levels of cytokines NO, TNF-*α* and IL-6 were significantly decreased by Jinsang Kaiyin capsules. Western blot results showed that Jinsang Kaiyin capsules inhibited the expression of PTGS2, TNF-*α* and IL-6 protein. **Conclusion** Jinsang Kaiyin capsules are effective for pharyngitis via multiple components, targets and pathways to influence the inflammation and immunity regulate.

Key words: Jinsang Kaiyin capsule; pharyngitis; network pharmacology; molecular docking; cell experiment

咽炎是一种主要由感染引起的常见自限性疾病[1]，包含急性咽炎与慢性咽炎等。急性咽炎为咽部黏膜及黏膜下组织的急性炎症，常累及咽部的淋巴组织，随病情进展常可涉及整个咽腔，其病因多与细菌感染、病毒感染破坏巨噬细胞等免疫细胞功能有关[2]。慢性咽炎为咽部黏膜、黏膜下及淋巴组织的弥漫性炎症，常由急性咽炎迁延日久而来[3]。临床上治疗咽炎首选抗菌药物和激素药物，但此类药物的耐药性及不良反应危害患者健康。中成药治疗咽炎以其作用温和持久、不良反应少等特点日益受到广大患者关注。

中医学认为，急性咽炎为"急喉痹"，临床常见风热外袭型急喉痹，症状多为咽喉肿痛、吞咽不利等[4]。慢性咽炎被称为"慢喉痹"，归属于"喉痹"的虚症[5]，该病以清热解毒，疏风利咽为治则。金嗓开音胶囊由金银花、连翘、玄参、板蓝根、赤芍、黄芩、桑叶、菊花、前胡、苦杏仁、牛蒡子、泽泻、胖大海、僵蚕、蝉蜕、木蝴蝶 16 味中药组成，全方奏以清肺解毒、滋阴泄火、利喉开音为功效，通过清除肺热、泻火解毒可达治本之功，通过利喉开音可达治标之用[6]，临床上观察发现此药能明显改善咽炎患者机体的炎症反应[7]，减轻咽炎疾病症状，效果良好。

金嗓开音胶囊药味组成较多，其治疗咽炎的核心作用成分和作用机制研究复杂。网络药理技术和分子对接方法对于研究中药多成分、多靶点整体治疗疾病的机制提供了很好的技术[8]。因此，本研究利用网络药理学方法，从"药物 - 成分 - 靶点 - 通路"复杂网状结构探究金嗓开音胶囊治疗咽炎的关键作用靶点、药物成分、信号通路等，为金嗓开音胶囊治疗咽炎提供理论参考。

1　材料

1.1　数据库

TCMSP（http：//tcmspw.com/tcmsp.php）、Drugbank（https：//www.drugbank.ca/）、化学专业数据库（http：//www.organchem.csdb.cn.）、SwissTarget Prediction（http：//www.swisstargetprediction.ch/）、Uniprot（https：//www.uniprot.org）、OMIM（https：//omim.org/）、Genecards（https：//www.genecards.org/）、STRING（http：//cn.string-db.org）。

1.2　试药

金嗓开音胶囊药粉（西安碑林药业股份有限公司，批号：JD12108004）；RPMI 1640（批号：2048221）、胎牛血清（批号：1803122）、PBS（批号：UB150259）（Biological Industries 公司）；二甲亚砜（DMSO，批号：HG/T5345-2018，天津市科密欧化学试剂有限公司）；无水对氨基苯磺酸（SUL，批号：DC5BA0731）、*N*-1- 萘乙二胺盐酸盐（NED，批号：DC07BA1002）[生工生物工程（上海）股份有限公司]；亚硝酸钠（$NaNO_2$，天津市科密欧化学试剂有限公司）。小鼠 TNF-*α* ELISA 试剂盒（批号：EMC102a）、小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒（批号：EMC004）（欣博盛生物科技有限公司）；BCA 蛋白定量盒（批号：W9219，

天根生化科技有限公司）。COX-2 抗体（批号：M03101750）、IL-6 抗 体（批 号：M09022841）（沈阳万类生物科技有限公司），β-actin（批号：I0004I56）、TNF-α（批号：00101479）、兔二抗（批号：20000258）、鼠二抗（批号：20000144）（武汉三鹰技术有限公司）。

1.3 细胞

小鼠腹腔巨噬细胞 RAW264.7（中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所）。

2 方法

2.1 网络药理学与分子对接

2.1.1 金嗓开音胶囊成分及作用靶点收集 在 TCMSP[9] 以口服生物利用度（OB）≥ 30% 和类药性（DL）≥ 0.18 为条件筛选金嗓开音胶囊所含药物的有效成分，再利用 Drugbank 数据库、化学专业数据库和文献 [10-11] 进一步完善药物活性成分和靶点收集，并在 TCMSP、Swiss TargetPrediction 数据库中获取有效成分靶点，筛选后在 Uniprot 数据库进行靶点矫正。

2.1.2 疾病相关靶点筛选 将急性咽炎（acute pharyngitis）、亚急性咽炎（subacute pharyngitis）和慢性咽炎（chronic pharyngitis）输入 OMIM 数据库和 Genecards 数据库检索，以“relevance score ≥ 10”为筛选条件得到疾病靶点，合并后获得咽炎疾病相关靶点。

2.1.3 交集靶点 Venny 分析 将药物靶点与疾病靶点输入韦恩图制作软件 Venny 2.1.0，获取交集靶点。

2.1.4 PPI 网络构建 将交集靶点导入 STRING 数据库限定物种为“Homo sapiens”，获取蛋白互作信息，导入 Cytoscape 中，通过 Network Analyzer 工具进行拓扑分析，以大于 degree 均值为条件筛选核心靶点。

2.1.5 GO 与 KEGG 通路富集分析 将核心靶点导入 STRING 数据库，限定物种为“Homo sapiens”，经上述数据库转化得到 GO 与 KEGG 通路，并运用微生信进行可视化分析。

2.1.6 “药物 - 成分 - 靶点 - 通路”网络的构建 将金嗓开音胶囊中药物 - 成分 - 靶点网络与 KEGG 富集的代谢通路的结果相整合，在 Cytoscape 3.9.1 中构建“药物 - 成分 - 靶点 - 通路”网络图。

2.1.7 分子对接 通过 UniProt 数据库检索核心靶点的三维结构，通过 PDB 数据库下载核心靶点蛋白的分子结构，在 UCSF Chimera 1.15rc 软件中保存为 mol2 格式。在 UCSF Chimera 1.15rc 软件中打开大分子靶点蛋白与小分子配体的 mol2 格式，通过应用软件中的 AutoDock Vina 板块进行分子对接获得结合能，并对结合模式进行可视化。

2.2 体外实验

2.2.1 细胞培养与药物配制 RAW264.7 细胞复苏后置于 37 ℃、5%CO_2 的恒温培养箱中培养，当细胞增殖到约 80% 时传代。金嗓开音胶囊药粉溶于 PBS 中配成质量浓度为 10 mg • mL^{-1} 的溶液，过 0.22 μm 微孔滤膜后备用。

2.2.2 细胞毒性 于对数期收集生长状态良好的 RAW264.7 细胞，以 1×10^5 个细胞 / 孔铺于 96 孔板中，培养 4 h 后，进行对照组（培养基培养）和给药组（金嗓开音胶囊 20、50、100、200、400、500 μg • mL^{-1}）分组，培养 24 h。弃去上清液，加入 0.5 μg • mL^{-1} MTT，孵育 4 h；弃去上清液，加入 DMSO 溶解后，用酶标仪于 492 nm 检测吸光度（A）并计算细胞存活率。

2.2.3 细胞分组 基于“2.2.2”处理后，将 RAW264.7 细胞分为对照组：培养基培养；模型组：LPS（1 μg • mL^{-1}）；给药组：LPS（1 μg • mL^{-1}）＋金嗓开音胶囊 50 μg • mL^{-1}；LPS（1 μg • mL^{-1}）＋金嗓开音胶囊 100 μg • mL^{-1}；LPS（1 μg • mL^{-1}）＋金嗓开音胶囊 200 μg • mL^{-1}。

2.2.4 细胞活力 于对数期收集生长状态良好的 RAW264.7 细胞，在 96 孔板中铺板密度为 1×10^5 个细胞 / 孔，培养 4 h 后，按“2.2.3”项下分组处理，培养 24 h。弃去上清液，加入 0.5 μg • mL^{-1} MTT，孵育 4 h；弃去上清液，加入 DMSO 溶解后，用酶标仪于 492 nm 检测 A 值并计算细胞存活率。

2.2.5 试剂盒检测细胞 IL-6、TNF-α、NO 水平 于对数期收集生长状态良好的 RAW264.7 细胞，在 96 孔板中铺板密度为 1×10^5 个细胞 / 孔，培养 4 h 后，以“2.2.3”项下分组处理，24 h 后收集细胞上清液。根据 IL-6、TNF-α ELISA 试剂盒和 Griess 试剂盒说明书操作，分别检测各组细胞上清中 IL-6、TNF-α 和 NO 的水平。

2.2.6 蛋白免疫印迹（Western blot）实验 于对数期收集生长状态良好的 RAW264.7 细胞，在 6 孔板中铺板密度为 4×10^6 个细胞 / 孔。分组设置与处理同“2.2.3”项下，培养 24 h 后低温下提取细胞总蛋白。蛋白样品在 SDS-PAGE 凝胶上进行电泳，后将蛋白从凝胶电转到 PVDF 膜，封闭后置于一抗中在 4 ℃冰箱孵育过夜，TBST 洗膜 30 min 后，将二抗于室温摇床上孵育 1 h，用 TBST 洗膜 30 min 后，于凝胶成像仪（BIO-RAD 化学发光凝胶成像系统）成像曝光，定量分析。

2.2.7 统计分析 采用 GraphPad Prism 9.0 软件对数据进行统计分析。实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采

用单因素方差分析（one-way ANOVA），组间比较采用 t 检验，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　网络药理学预测研究

3.1.1　金嗓开音胶囊成分获取与筛选　金嗓开音胶囊药物活性成分中，板蓝根有效成分共有 39 个，蝉蜕有 18 个，赤芍 29 个，黄芩 36 个，僵蚕 14 个，金银花 23 个，菊花 20 个，苦杏仁 19 个，连翘 23 个，木蝴蝶 18 个，牛蒡子 8 个，胖大海 5 个，前胡 24 个，桑叶 29 个，玄参 6 个，泽泻 9 个。活性成分部分结果见表 1。

3.1.2　金嗓开音胶囊成分潜在靶点与咽炎潜在靶点预测　经 Uniprot 矫正靶点，筛选得到金嗓开音胶囊有效成分靶点共 1101 个，咽炎去重筛选后共 1459 个疾病靶点。

3.1.3　金嗓开音胶囊与咽炎核心靶点分析及 PPI 网络构建　将金嗓开音胶囊成分靶点与咽炎疾病靶点输入 Venny 2.1.0 中，得到交集靶点 167 个。将交集靶点导入 STRING 数据库，构建 PPI 网络后，利用 Cytoscape 3.9.1 软件进行拓扑分析，选取此条件下 degree ＞ 2median（82）并采用拓扑特征值中心介度值（Betweenness Centrality）、紧密度（Closeness Centrality）筛选得到 25 个关键靶点基因作为核心靶点，可以看出 *IL-6*、*AKT1*、*TNF*、*TP53* 等可能为治疗咽炎的核心靶点，见图 1（25 节点 300 条边）。

3.1.4　GO 与 KEGG 通路富集分析　在 GO 富集分析结果中，总共富集到 888 条生物过程（BP），67 项分子功能（MF），23 项细胞组分（CC）。以基因数排名前 10 进行条形图绘制，见图 2。提示金嗓开音胶囊中的活性成分发挥治疗咽炎作用可能与调节体内细胞过程、相关蛋白的结合及调控相关信号受体有关。

炎症反应的特征是协调激活各种信号通路，调节促炎介质和抗炎介质的表达。KEGG 分析后得到 156 条相关的信号通路，关系最紧密的前 20 条信号通路由气泡图呈现，见图 3。结果显示 MAPK 信号通路、TNF 信号通路、IL-17 信号通路等可能与金嗓开音胶囊治疗咽炎的作用机制相关。

3.1.5　药物 - 成分 - 靶点 - 通路相互作用网络构建与关键成分筛选　以金嗓开音胶囊药物、成分、作用靶点与相关通路为基础，导入 Cytoscape 3.9.1 中，绘制和构建药物 - 成分 - 靶点 - 通路网络图，其中黄色为中药，蓝色为中药活性成分，红色为中药作用于疾病的靶点，绿色为可能与咽炎治疗相关的通路，图案大小与 degree 值成正相关，见图 4，degree 值排名前 10 成分，见表 2。

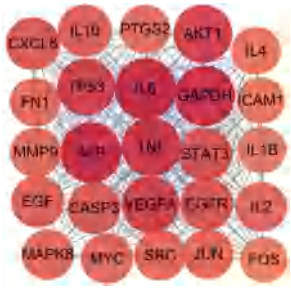


图 1　PPI 网络

Fig 1　Protein-protein interaction network

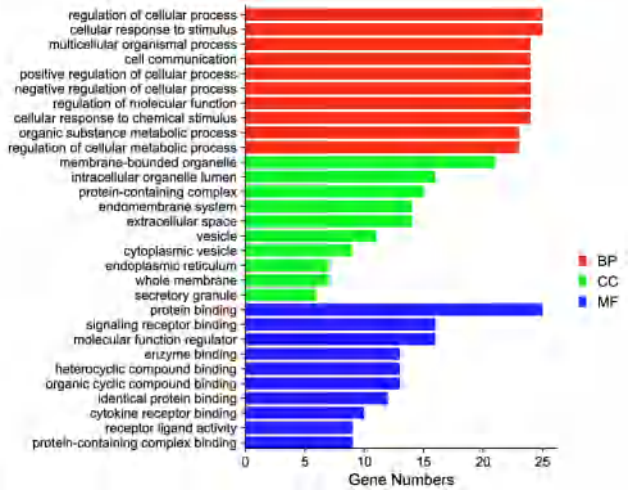


图 2　GO 功能富集分析

Fig 2　GO function enrichment analysis

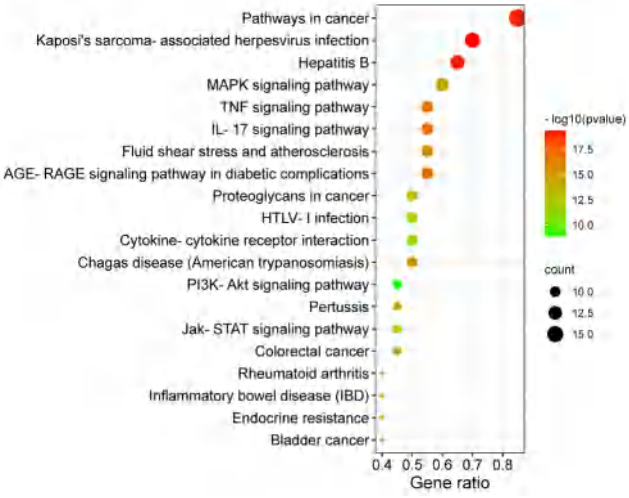


图 3　KEGG 通路富集分析

Fig 3　KEGG pathway enrichment analysis

3.1.6　分子对接　根据“3.1.5”项下结果选取核心靶点蛋白 PTGS2、JUN、TNF、AKT1、MMP9、MAPK8、IL-6 的蛋白受体与度值排名前十的活性成分槲皮素、木犀草素、β- 谷甾醇、山柰酚等小分子配体进行分子对接验证。分子对接结果如表 3。药物分子与靶点结合所需能量越少，对接分数越小，预测其在体内结合的可能性及稳定性更大 [12]。由表 3 可知，核心成分与靶点均有

表 1　金嗓开音胶囊药物活性成分

Tab 1　Active components in Jinsang Kaiyin capsule

中药	有效成分	ID
板蓝根	*β*-谷甾醇，谷甾醇，甜橙黄酮，金合欢素，扶桑甾醇，喹叨啉，食脂素，异牡荆素，高车前苷元，半齿泽兰素	MOL000358，MOL000359，MOL001803，MOL001689，MOL001800，MOL001756，MOL001792，MOL002322，MOL001735，MOL001733
蝉蜕	丝氨酸，鸟氨酸，天冬氨酸，苯丙氨酸，异亮氨酸，苏氨酸，氨基丁酸，赖氨酸，酪氨酸，缬氨酸	CT1，CT2，CT3，CT4，CT5，CT6，CT7，CT8，CT9，CT10
黄芩	金合欢素，汉黄芩素，黄芩素，红花素，鲨烯，榄核莲黄酮，*β*-谷甾醇，谷甾醇，去甲汉黄芩素，豆甾醇	MOL001689，MOL000173，MOL002714，MOL002910，MOL001506，MOL002932，MOL000358，MOL000359，MOL000525，MOL000449
赤芍	鞣花酸，芍药吉酮，芍药新苷，芍药苷，黄芩素，黄芩苷，*β*-谷甾醇，谷甾醇，菠菜固醇，豆甾醇	MOL001002，MOL001918，MOL001921，MOL001924，MOL002714，MOL002776，MOL000358，MOL000359，MOL004355，MOL000449
僵蚕	白僵菌素，亮氨酸，羟基犬尿素，棕榈烯酸，十六碳酰胺，赖氨酸，beauverolide D，beauverolide E，beauverolide F，beauverolide H	JC1，JC2，JC3，JC4，JC5，JC6，JC7，JC8，JC9，JC10
金银花	十八碳二烯，茄红素，黄烷酮，*β*-胡萝卜素，金圣草（黄）素，*β*-谷甾醇，山柰酚，豆甾醇，木犀草素，槲皮素	MOL001494，MOL002707，MOL002914，MOL002773，MOL003044，MOL000358，MOL000422，MOL000449，MOL000006，MOL000098
菊花	金合欢素，蒙花苷，金圣草（黄）素，异鼠李素，山柰酚，木犀草素，槲皮素，*β*-谷甾醇，鲨烯，半齿泽兰素	MOL001689，MOL001790，MOL003044，MOL000354，MOL000422，MOL000006，MOL000098，MOL000358，MOL001506，MOL001733
苦杏仁	雌酮，谷甾醇，豆甾醇，巨头鲸鱼酸，甘草查尔酮 B，光甘草定，苦杏仁，丁二酸二异辛酯，左旋千金藤啶碱，顺式 -11，14- 二十碳二烯酸	MOL010921，MOL000359，MOL000449，MOL005030，MOL004841，MOL004903，MOL004908，MOL010922，MOL012922，MOL002211
连翘	汉黄芩素，连翘苷，贯叶金丝桃素，加贯叶金丝桃素，*β*-谷甾醇，山柰酚，牛蒡子苷，木犀草素，荷包牡丹碱，槲皮素	MOL000173，MOL003305，MOL003347，MOL003348，MOL000358，MOL000422，MOL000522，MOL000006，MOL000791，MOL000098
木蝴蝶	鞣花酸，*N*-反式阿魏酰酪胺，甲氧基黄芩素，汉黄芩素，黄芩素，金圣草（黄）素，*β*-谷甾醇，豆甾醇，槲皮素	MOL001002，MOL012101，MOL012108，MOL000173，MOL002714，MOL002776，MOL003044，MOL000358，MOL000449，MOL000098
牛蒡子	neoarctin A，牛蒡苷，*β*-谷甾醇，山柰酚，鲨烯，*β*-胡萝卜素，洋蓟素，（3*R*，4*R*）-3，4-bis[（3，4-dimethoxyphenyl）methyl]oxolan-2-one，	MOL010868，MOL000522，MOL000358，MOL000422，MOL001506，MOL002773，MOL007326，MOL003290
胖大海	*β*-谷甾醇，谷甾醇，sterculin A，flexricin P-1，methyl（*E*）-nonadec-10-enoate	MOL000358，MOL000359，MOL006327，MOL010205，MOL009729
前胡	甚孢菌素，前胡内酯，异欧前胡素，珊瑚菜素，*β*-谷甾醇，谷甾醇，含白芷灵，紫花前胡苷，丹参酮ⅡA，槲皮素	MOL013095，MOL001941，MOL001942，MOL002644，MOL000358，MOL000359，MOL004653，MOL004792，MOL007154，MOL000098
桑叶	东莨菪苷，*β*-胡萝卜素，桑呋喃 G，红厚壳（种）内酯，异热马酮，槲皮素，*β*-谷甾醇，山柰酚，豆甾醇，鲨烯	MOL001771，MOL002773，MOL003842，MOL003847，MOL003851，MOL000098，MOL000358，MOL000422，MOL000449，MOL001506
玄参	14- 去氧 -12（*R*）- 磺酸基穿心莲内酯，harpagoside_qt，柳杉酚，*β*-谷甾醇，谷甾醇，scropolioside D，paeoniflorin_qt，scropolioside D_qt	MOL007658，MOL007662，MOL002222，MOL000358，MOL000359，MOL007659，MOL001925，MOL007660，MOL007657
泽泻	谷甾醇，泽泻醇 B，泽泻醇 B 单乙酸酯，泽泻醇 B 乙酸酯，16*β*-甲氧基泽泻醇 B 单乙酸酯，泽泻醇 B，泽泻醇 C，泽泻醇 C 单乙酸酯，1- 亚油酸甘油酯，[（1*S*，3*R*）-1-[（2*R*）-3，3-dimethyloxiran-2-yl]-3-[（5*R*，8*S*，9*S*，10*S*，11*S*，14*R*）-11-hydroxy-4，4，8，10，14-pentamethyl-3-oxo-1，2，5，6，7，9，11，12，15，16-decahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl] butyl] acetate	MOL000359，MOL000830，MOL000831，MOL000832，MOL000849，MOL000853，MOL000854，MOL000856，MOL002464，MOL000862

注（Note）：有效成分大于 10 个的中药只列出其中 10 个有效成分（Active components are more than 10，only 10 are listed）.

较好的对接效果，部分结合模式可视化见图 5。

3.2　体外实验

3.2.1　细胞毒性检测结果　MTT 检测结果表明，金嗓开音胶囊在实验浓度范围内并未对细胞有损伤，见图 6。最终选择金嗓开音胶囊 50、100、200 μg·mL^{-1} 进行后续实验。

表 2　Degree 值排名前 10 成分

Tab 2　Top 10 components of degree values

ID	成分	degree	BC	CC
MOL000098	槲皮素（quercetin）	107	0.0655	0.5074
MOL000006	木犀草素（luteolin）	58	0.0374	0.4904
MOL000358	*β*- 谷甾醇（*β*-sitosterol）	50	0.0332	0.4680
MOL000422	山柰酚（kaempferol）	50	0.0152	0.4596
MOL000173	汉黄芩素（wogonin）	39	0.0170	0.4596
MOL002714	黄芩素（baicalein）	27	0.0150	0.4596
MOL002773	*β*- 胡萝卜素（*β*-carotene）	24	0.0105	0.4476
MOL000449	豆甾醇（stigmasterol）	15	0.0076	0.4289
MOL001689	金合欢素（acacetin）	14	0.0039	0.4253
MOL001506	鲨烯（supraene）	14	0.0121	0.4576

3.2.2　细胞活力检测结果　模型组细胞活性较对照组下降，而 LPS ＋金嗓开音胶囊组 200 μg • mL^{-1} 较模型组细胞活性升高，说明金嗓开音胶囊对 LPS 损伤的细胞有一定的保护作用（见图 7）。

3.2.3　金嗓开音胶囊对 RAW264.7 细胞 NO、IL-6、TNF-*α* 的影响　基于活力检测结果，深入探讨金嗓开音胶囊对炎性因子表达影响，发挥抗炎作用机制。由表 4 可知，与对照组比较，模型组 NO、IL-6、TNF-*α* 水平显著升高，可初步表明 RAW264.7 细胞炎症模型制备成功。给药后观察到 NO 水平降低明显，且呈剂量相关性；IL-6、TNF-*α* 与模型组相比，表达量减少。由此可初步推测金嗓开音胶囊通过抑制炎性因子分泌改善细胞活力，提高机体免疫力，发挥抗咽炎作用。

表 3　核心成分与各靶点的分子对接分数

Tab 3　Molecular docking scores

成分	对接分值 /（kcal • mol^{-1}）						
	PTGS2	JUN	TNF	AKT1	MMP9	MAPK8	IL-6
槲皮素（quercetin）	－ 8.9	－ 6.3	－ 9.2	－ 5.9	－ 9.3	－ 6.3	－ 6.4
木犀草素（luteolin）	－ 9.3	－ 6.4	－ 8.6	－ 6.0	－ 9.2	－ 7.4	－ 6.8
β- 谷甾醇（*β*-sitosterol）	－ 8.7	－ 6.9	－ 9.1	－ 7.1	－ 8.0	－ 7.2	－ 6.1
山柰酚（kaempferol）	－ 8.1	－ 6.3	－ 9.1	－ 5.7	－ 6.0	－ 6.4	－ 6.1
汉黄芩素（wogonin）	－ 8.2	－ 6.3	－ 9.1	－ 5.8	－ 8.2	－ 7.6	－ 6.0
黄芩素（baicalein）	－ 9.1	－ 6.3	－ 9.3	－ 6.5	－ 8.4	－ 7.8	－ 6.4
β- 胡萝卜素（*β*-carotene）	－ 6.7	－ 5.3	－ 7.3	－ 6.5	－ 7.7	－ 7.3	－ 6.3
豆甾醇（stigmasterol）	－ 8.3	－ 6.5	－ 10.2	－ 6.6	－ 7.5	－ 8.4	－ 6.4
金合欢素（acacetin）	－ 9.4	－ 6.1	－ 8.6	－ 6.0	－ 8.8	－ 7.8	－ 6.2
鲨烯（supraene）	－ 6.2	－ 4.1	－ 4.1	－ 5.3	－ 5.6	－ 7.8	－ 3.6

3.2.4　金嗓开音胶囊对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞蛋白表达影响　根据分子对接结果，进一步验证金嗓开音胶囊对 RAW264.7 细胞作用的具体分子机制，Western blot 法观察金嗓开音胶囊下调 RAW264.7 细胞中 PTGS2（COX-2）、IL-6 及 TNF-*α* 蛋白表达，结果见图 8。结合上述细胞相关实验结果，有力证实了金嗓开音胶囊具有抗炎作用，并且可能是通过降低 PTGS2、IL-6 及 TNF-*α* 蛋白表达发挥抗咽炎作用。

4　讨论

咽炎是各种微生物感染咽部而产生炎症的统称。中医认为咽炎症候以肺肾阴虚、阳虚、气滞血瘀痰凝等为主 [3]，治疗应从养阴清肺、行气健脾、疏肝理气、燥湿化痰功效的中药入手 [13]。金嗓开音胶囊具有清肺、滋阴等功效，可作为控制咽腔局部症状且改善机体整体状况的潜在治疗药物。

网络药理学结果显示，金嗓开音胶囊治疗咽炎的关键化合物包括槲皮素、木犀草素、*β*- 谷甾醇等 251 个成分，PPI 网络分析得到 *PTGS2*、*TNF*、*IL-6* 等 25 个关键咽炎治疗靶点。从 GO 与 KEGG 分析结果看，金嗓开音胶囊通过干预机体刺激免疫应答、蛋白结合等功能，调控癌症通路、病毒感染、MAPK 通路、TNF 信号通路、IL-17 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等免疫、炎症反应相关通路，发挥治疗咽炎的作用。癌症通路、病毒感染等在网络中连接的靶点较多，提示抑制这些通路对咽炎向咽癌或者病毒感染方向发展有一定的阻滞作用。咽炎发生与机体内 IL-6、TNF 等炎症因子释放的增加关系密切，其中 IL-6 联合转化生长因子（TGF）-*β* 使 Th17 分化从而分泌 IL-17，上调 Th17/Treg 平衡使其病态导致炎症的发生 [14]。PTGS2（COX-2）通过协调慢性炎症导致部分促肿瘤信号通路的激活，如 TNF/TNF-r、EGF/EGF-r 或 S100/RAGE，也可通过激活 PI3K 信号通路刺激基质金属蛋白酶（MMP）的表达，诱导肿瘤侵袭，使炎症反应加重 [15]。金嗓开音胶囊中槲皮素可抑制炎症产生酶（COX 和 LOX）的产生，阻断 IL-6 的分泌 [16]，减轻炎症症状。金合欢素可显著降低炎症介质 IL-1*β*、TNF-*α*、IL-6、

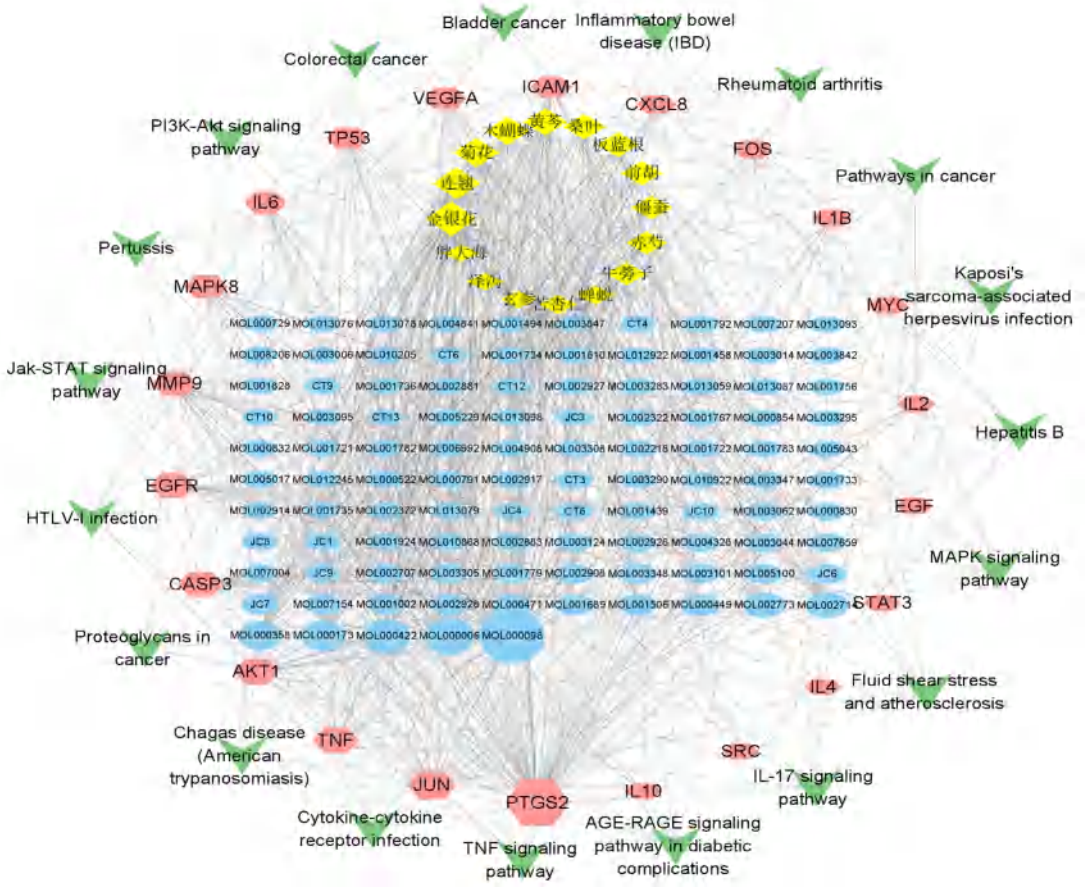


图 4　“药物 - 成分 - 靶点 - 通路”网络

Fig 4　“Drug-ingredient-target-pathway” network

图 5　部分金嗓开音胶囊有效成分与核心受体对接

Fig 5　Docking of effective components in Jinsang Kaiyin capsules with core receptors

A. 槲皮素与 IL-6（quercetin and IL-6）；B. 汉黄芩素与 PTGS2（wogonin and PTGS2）；C. 汉黄芩素与 IL-6（wogonin and IL-6）；D. 山柰酚与 TNF（kaempferol and TNF）；E. 豆甾醇与 TNF（stigmasterol and TNF）

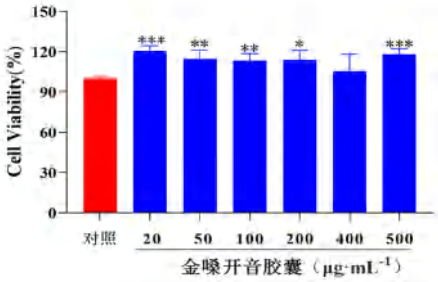


图 6　金嗓开音胶囊对 RAW264.7 细胞活力影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Fig 6　Effect of Jinsang Kaiyin capsules on the viability of RAW264.7 cells（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

注：与对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$。

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

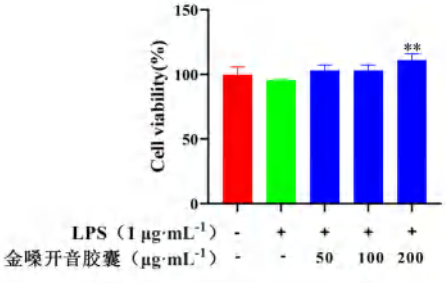


图 7　金嗓开音胶囊对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞活力的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Fig 7　Effect of Jinsang Kaiyin capsules on the viability of RAW264.7 cells induced by LPS（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

注：与模型组比较，$^{**}P<0.01$。

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

表 4　金嗓开音胶囊对 RAW264.7 细胞 NO、IL-6、TNF-*α* 的影响 ($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

Tab 4　Effect of Jinsang Kaiyin capsule on NO，IL-6，TNF-*α* in RAW264.7 cells ($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

组别	NO/（pg・mL^{-1}）	IL-6/（pg・mL^{-1}）	TNF-*α*/（pg・mL^{-1}）
对照组	0.5967±0.179	12.89±3.66	188.38±8.76
模型组	13.378±0.31$^{\#\#\#}$	1266.58±108.98$^{\#\#\#}$	4037.2±65.91$^{\#\#}$
LPS ＋金嗓开音胶囊 50 μg・mL^{-1}	5.206±0.17$^{\#\#\#***}$	1106.16±39.16$^{\#\#\#**}$	3487.53±30.7$^{\#\#**}$
LPS ＋金嗓开音胶囊 100 μg・mL^{-1}	2.7039±0.12$^{\#\#\#***}$	1079.04±41.51$^{\#\#\#*}$	3243.5±144.5$^{\#\#*}$
LPS ＋金嗓开音胶囊 200 μg・mL^{-1}	1.7967±0.23$^{\#\#\#***}$	1072.83±38.16$^{\#\#\#*}$	3155.52±38.2$^{\#\#**}$

注：与对照组比较，$^{\#\#}P<0.01$，$^{\#\#\#}P<0.001$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$。

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

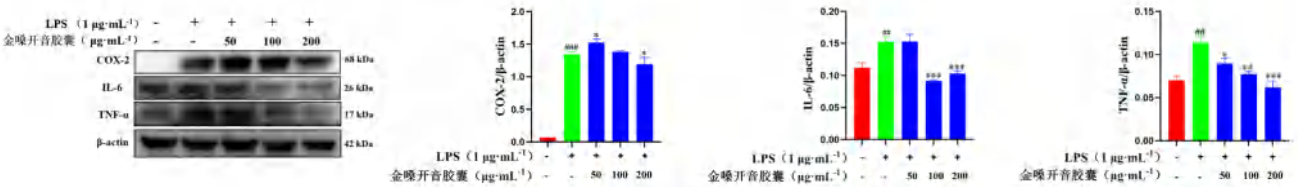


图 8　RAW264.7 细胞 PTGS2（COX-2）、TNF-*α*、IL-6 蛋白表达水平图（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig 8　Expression levels of PTGS2（COX-2），TNF-*α*，and IL-6 protein in RAW264.7 cells（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

注：与对照组比较，$^{\#\#}P<0.01$，$^{\#\#\#}P<0.001$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$。

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

iNOS mRNA 水平表达以及 PTGS2 蛋白表达 [17]。*β*- 胡萝卜素、木犀草素通过调控 MAPK/AP-1 和 JAK-STAT 等信号通路抑制 IL-6、IL-17、TNF-*α* 等产生，并增加 IL-10 的水平 [18-19]，发挥抗炎作用。而 *β*- 谷甾醇可明显抑制由炎症诱发巨噬细胞分泌的 MMP9 蛋白表达 [20]，调节炎症反应，提高机体免疫力。山柰酚对炎症介质 PTGS1/2 酶有很强的抑制作用，还可抑制 ERK、p38 和 JNK 通路的激活，减轻其不良影响 [21]。金嗓开音胶囊治疗咽炎主要通过抑制炎症因子的表达及相关通路的调控来发挥药理作用，而这些炎症因子及通路在治疗咽炎的关键靶点及主要通路中均有体现。

分子对接结果显示槲皮素、木犀草素等作用成分与靶点 *PTGS2*、*JUN*、*TNF*、*AKT1*、*MMP9*、*MAPK8*、*IL-6* 等有着良好的结合活性，反映了金嗓开音胶囊治疗咽炎的主要机制可能与以上作用成分和靶点关系密切。木犀草素、黄芩素、金合欢素均与 PTGS2 强烈结合，即与 PTGS2 靶点形成稳定的复合物，Western blot 实验结果显示金嗓开音胶囊可下调 PTGS2 蛋白表达，推测上述成分很有可能是金嗓开音胶囊作用于此靶点的药效物质。JUN（c-jun）为 AP1 蛋白产物，AP1 被激活后的表达与免疫炎症疾病的发生发展有着密切的关系 [22]，*β*- 谷甾醇等稳定结合 JUN 后可能参与调控咽炎的发生发展。TNF、IL-6 与槲皮素、木犀草素、*β*- 谷甾醇、山柰酚、汉黄芩素、黄芩素、豆甾醇等结合牢固，说明金嗓开音胶囊关键成分可能通过影响 TNF、IL-6 的促炎因子表达，发挥治疗咽炎作用，在细胞实验中证实了金嗓开音胶囊可抑制 TNF、IL-6 表达。AKT1 是 AKT 的主要亚型之一，是调节细胞存活信号通路的中心节点，PI3K 为 AKT 上游蛋白，两者组成 PI3K-Akt 信号通路，其持续激活会导致细胞异常增殖和恶性转化 [23]，槲皮素、木犀草素等作用成分与 AKT1 结合后可能参与此信号通路调节，影响咽炎疾病相关免疫细胞生长。

综上所述，本研究基于网络药理学和分子对接方法，对金嗓开音胶囊多成分、多靶点、多途径、多效应的抗咽炎机制进行了分析，并在体外进行实验验证，结果表明金嗓开音胶囊可能通过抑制 PTGS2、IL6、TNF-*α*、NO 等炎性介质表达调控免疫细胞发挥抗咽炎作用。本研究初步为金嗓开音胶囊在咽炎的治疗中提供了理论支持。后续将进行动物咽炎模型实验相关机制探究。

参考文献

[1] Sykes EA，Wu V，Beyea MM，et al. Pharyngitis：approach to diagnosis and treatment [J]. Can Fam Physician，2020，66（4）：251-257.

[2] Cots JM，Alos JI，Barcena M，et al. Recommendations for management of acute pharyngitis in adults [J]. Enferm Infecc Microbiol Clin，2016，34（9）：585-594.

[3] 叶哲，林基伟，吴海滨，等 . 王孟庸从肾论治慢性咽炎经验 [J]. 中国中医药信息杂志，2021，28（3）：114-116.

[4] 急喉喑的诊断依据、证候分类、疗效评定——中华人民共和国中医药行业标准《中医内科病证诊断疗效标准》

（ZY/T001.1-94）[J]. 辽宁中医药大学学报，2019，21（12）：197.
[5] 余瑜 . 中医治疗慢性咽炎研究进展 [J]. 实用中医药杂志，2012，28（7）：604-605.
[6] 柯希振 . 金嗓系列胶囊临床应用体会总结 [J]. 临床医药实践，2009，18（14）：1632-1633.
[7] 杨中元，时文杰，张炜 . 金嗓开音胶囊联合头孢他美酯治疗急性咽炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床，2020，35（7）：1442-1445.
[8] 苏洁，周瑞，王梅，等 . 基于网络药理学的秦七风湿方干预骨性关节炎活性成分及作用机制预测 [J]. 中国现代中药，2022：1-14.
[9] 赵苗青，李丰，石彬彬，等 . 系统药理学（Ⅵ）——TCMSP 数据库及其应用 [J]. 中医药信息，2020，37（3）：22-29.
[10] 但彩云，崔诗遥，李聪慧，等 . 白僵蚕活性成分及其药用功效的研究概况 [J]. 蚕桑通报，2021，52（1）：1-5.
[11] 赵子佳，周桂荣，王玉，等 . 蝉蜕的化学成分及药理作用研究 [J]. 吉林中医药，2017，37（5）：491-493.
[12] 吴丰旭 . 蛋白 - 蛋白 / 小分子相互作用的分子模拟新方法研究 [D]. 武汉：华中师范大学，2019.
[13] 杨艾，何旭东，张耀武，等 . 慢性咽炎的发病机制及药物治疗进展 [J]. 中国药事，2021，35（7）：808-813.
[14] Narazaki M，Tanaka T，Kishimoto T. The role and therapeutic targeting of IL-6 in rheumatoid arthritis [J]. Expert Rev Clin Immunol，2017，13（6）：535-551.
[15] Tudor D V，Baldea I，Lupu M，et al. COX-2 as a potential biomarker and therapeutic target in melanoma [J]. Cancer Biol Med，2020，17（1）：20-31.
[16] Li Y，Yao J，Han C，et al. Quercetin，inflammation and immunity [J]. Nutrients，2016，8（3）：167.
[17] Ren J，Yue B，Wang H，et al. Acacetin Ameliorates experimental colitis in mice via inhibiting macrophage inflammatory response and regulating the composition of gut microbiota [J]. Front Physiol，2020，11：577237.
[18] Li R，Hong P，Zheng X. beta-carotene attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation via inhibition of the NF-kB，JAK2/STAT3 and JNK/p38 MAPK signaling pathways in macrophages [J]. Anim Sci J，2019，90（1）：140-148.
[19] Aziz N，Kim MY，Cho JY. Anti-inflammatory effects of luteolin：a review of in vitro，in vivo，and in silico studies [J]. J Ethnopharmacol，2018，225：342-358.
[20] Yang Q，Yu D，Zhang Y. beta-sitosterol attenuates the intracranial aneurysm growth by suppressing TNF-alpha-mediated mechanism [J]. Pharmacology，2019，104（5-6）：303-311.
[21] Devi KP，Malar DS，Nabavi SF，et al. Kaempferol and inflammation：from chemistry to medicine [J]. Pharmacol Res，2015，99：1-10.
[22] 贺小举 . 转录因子 NF-κB、AP-1 在清肺培元颗粒干预免疫低下肺部感染 BALB/c 小鼠模型免疫与炎症进程中的作用研究 [D]. 郑州：河南中医学院，2014.
[23] Spangle JM，Roberts TM，Zhao JJ. The emerging role of PI3K/AKT-mediated epigenetic regulation in cancer [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer，2017，1868（1）：123-131.

（收稿日期：2021-12-01；修回日期：2022-03-26）

多糖类肝素湿品沉淀可保存时长的研究

田志鹏[1, 2]，杜曦[1, 2*]，王亮[1]，兰舫[1]，张灿[1]（1. 河北常山生化药业股份有限公司，石家庄　050800；2.河北省多糖类药物工程技术研究中心，石家庄　050800）

摘要：目的　研究多糖类肝素湿品可允许的保存时长，以解决企业生产过程中遇到的产品因滞留和冻干设备故障中间产品无法保存的问题。**方法**　以公司自产的肝素钠、达肝素钠、依诺肝素钠为原料，分别使用乙醇将产品从溶液中沉淀出来的湿样固体样品为样本，与对应干品进行对比，考察这几类肝素在湿样固体状态下保存 10 日、20 日、30 日、3 个月、6 个月、9 个月、12 个月产品质量是否产生变化。**结果**　与固体粉末样品比，多糖类肝素湿品沉淀的分子量、效价、双糖等没有发生变化。**结论**　肝素钠及低分子肝素在以湿样固体状态下存放 12 个月，其分子量、效价、双糖结果不发生变化。

关键词：肝素钠；达肝素钠；依诺肝素钠；保存方式；存放时长
中图分类号：TQ464，R94　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1558-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.014

基金项目：国家发展和改革委 2021 年支持先进制造业和现代服务业发展专项；石家庄市科学技术研究与发展计划项目（No.211490132A）。
作者简介：田志鹏，男，硕士，工程师，主要从事肝素及低分子肝素抗凝药物研究，email：250693789@qq.com　*通信作者：杜曦，男，硕士，工程师，副主任研究员，主要从事肝素及低分子肝素抗凝药物研究，email：duxilzjt@163.com

Research on the storage time of wet solid heparin

TIAN Zhi-peng[1, 2], DU Xi[1, 2*], WANG Liang[1], LAN Fang[1], ZHANG Can[1] (1. *Hebei Changshan Biochemical Pharmaceutical Co., Ltd, Shijiazhuang* 050800; 2. *Hebei Research Center for Polysaccharide Drug Engineering Technology, Shijiazhuang* 050800)

Abstract: Objective To determine the permissible storage time for polysaccharide heparin to solve the problem that the intermediate products cannot be saved due to the product retention and freeze-drying equipment failure. **Methods** Heparin sodium, dalteparin sodium, and enoxaparin sodium produced by our company were used as raw materials. Wet solid samples separately precipitated from the solution by ethanol were used as samples and compared with solid powder samples to determine whether the qualities of the samples changed when heparins was stored in wet solid state after 10, 20, and 30 days, 3, 6, and 9 months. **Results** The molecular weight, potency, disaccharide and other results of wet solid heparin didn't change. **Conclusion** When heparin sodium and low molecular weight heparin are stored in wet solid state, their molecular weight, potency and disaccharide do not change within 12 months.

Key words: heparin sodium; dalteparin sodium; enoxaparin sodium; storage method; storage time

肝素钠，作为一种抗凝血、抗血栓的药物已存在百年之久，其中低分子肝素作为抗凝血剂，是最常用于血栓栓塞的预防和治疗药物[1]。2020 年世界卫生组织在“疑似新型冠状病毒感染时针对严重急性呼吸道感染的临床处理临时指导”中曾建议，可通过给予肝素以预防新型冠状病毒肺炎患者的静脉血栓栓塞。2022 年最新的研究表明使用高于预防剂量的依诺肝素治疗新型冠状病毒肺炎患者，可将其住院时间缩短 20% 以上，缓解超过 65% 病例的症状。

肝素的粗品通常来源于猪肠黏膜（牛源和羊源肝素与猪源肝素同样有着类似的理化性质和结构[2-3]）。肝素粗品经过盐解，热变性，提纯，氧化得到肝素钠精品。肝素平均分子量约 16 000 道尔顿（Da），并且有相似的抗Ⅹa 与抗Ⅱa 因子活性。低分子量肝素（LMWH）重均分子量通常在 8000 以下，小于 8000 的级分不少于 60%，且抗Ⅹa 因子大于抗Ⅱa 因子活性。两者皆通过结合 ATⅢ抑制凝血酶的活性，达到抗凝血、抗血栓的作用[4-7]。

目前对于肝素类原料产品的保存方式仅限于固体干燥粉末，且需要密封置于阴凉，干燥处存放。而将肝素钠、达肝素钠、依诺肝素钠以溶液状态存放，存在染菌风险，随着时间的延长，产品会有一个自然分解过程，重均分子量逐渐变低，低分子组分逐渐增多。本文用到的肝素钠及两种代表性低分子量肝素产品（达肝素钠、依诺肝素钠）均为我公司自制。达肝素钠为亚硝酸降解法制备[8]，依诺肝素钠为β-消除降解法制备[9]。通过将多糖类肝素产品从其溶液中分离，加乙醇进行液封保存，并将此法长期保存的样品与干燥粉末的分子量、效价、双糖进行对比，考察肝素产品的质量变化，以提供一种新的保存方式和可存放的时限，解决企业生产过程中遇到的产品因滞留和冻干设备故障中间产品无法保存的问题。

1　材料

1.1　试药

肝素钠、达肝素钠、依诺肝素钠（原料药，河北常山生化药业股份有限公司）；依诺肝素钠对照品（批号：6.0，欧洲药品质量管理局 EDQM）；氯化钠（河北华晨药业）；乙醇（梅河口市阜康酒精有限公司）；醋酸铵、亚硝酸钠、三羟甲基氨基甲烷、硫酸、氢氧化钾（分析纯，天津永大化学试剂有限公司）；乙二胺四乙酸二钠、硫酸钠、磷酸二氢钾、醋酸钙（分析纯）、牛血清白蛋白（含量≥ 98%，Vetec Sigma-Aldrich）；硝酸锂（分析纯，Aladdin 试剂）；抗凝血酶 ATⅢ、FⅩa 因子、发色底物 S-2765，发色底物 S-2238（意大利 Chromogenix）；乙腈（色谱纯，美国 Merck）；肝素酶Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ（含量＞99%，北京艾德豪克）。

1.2　仪器

OS20-S 数显顶置电子搅拌器（大龙兴创实验仪器）；FE28 型 pH 计、PL602-L 电子天平（Mettler Toledo）；DZF-6210 真空干燥箱（上海一恒）；U3000 高效液相色谱仪（美国 Thermo Scientific）；2414 示差折光检测器（美国 Waters）；384 DMS 酶标仪（美国美谷分子仪器）；S2 型 96 孔通道紫

外检测器（上海美杏高德生物）；色谱柱（Waters Xbridge Beh 200A Sec，Waters Spherisorb Sax）；UV-8000 紫外可见分光光度计（上海元析仪器）。

2　方法

2.1　试验步骤

分别取一定量肝素钠、达肝素钠、依诺肝素钠样品，加入纯化水搅拌溶解（1∶10 以内），并补加溶液体积 1% 的氯化钠，以模拟生产过程中产品溶液状态。加入 4 倍以上 95% 乙醇进行搅拌沉淀，边加入边快速搅拌。加入完毕继续搅拌 15 min，随后静置 8 h 以上，分离底部沉淀并将上清溶液除尽。沉淀使用少量乙醇进行液封保证完全隔离空气，置于 15 ～ 25 ℃保存。分别于第 10 日、20 日、30 日、3 个月、6 个月、9 个月、12 个月取样，检测分子量、效价、双糖。

2.2　检测方法

2.2.1　分子量及效价　肝素钠分子量、效价检测方法参照《中国药典》2020 年版[10-11]；达肝素钠及依诺肝素钠分子量、效价检测方法参照欧洲药典 EP10.5[12] 并进行优化。

2.2.2　双糖　依诺肝素钠双糖检测方法参考欧洲药典 EP 10.5[12]：

① 色谱条件：流动相 A 为磷酸二氢钠溶液（取磷酸二氢钠 0.280 g，加水 950 mL 使溶解，用磷酸调节 pH 值至 3.0，加水稀释至 1000 mL），流动相 B 为高氯酸钠磷酸二氢钠溶液（取高氯酸钠 140 g，加流动相 A 950 mL 使溶解，用磷酸调节 pH 值至 3.0，用流动相 A 稀释至 1000 mL）；柱温：50 ℃；流速：0.8 mL • min^{-1}；进样量：10 μL；检测器：紫外检测器，检测波长：234 nm。

② 溶液配制

肝素酶溶液：取肝素酶Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ适量，分别加 pH 7.0 磷酸钾缓冲液制成 0.4 IU • mL^{-1} 的溶液。将其按 1∶1∶1 的体积比混合，得到混合肝素酶溶液。

供试品溶液（酶解）：取供试品适量，加水制成 20 mg•mL^{-1} 的溶液，取 20 μL，加入 pH 7.0 醋酸钙溶液 70 μL 和肝素酶混合液 100 μL 混匀，置 25 ℃恒温环境中放置 48 h 以上。

对照品溶液（酶解）：取对照品适量，加水制成 20 mg•mL^{-1} 的溶液，取 20 μL，加入 pH 7.0 醋酸钙溶液 70 μL 和肝素酶混合液 100 μL 混匀，置 25 ℃恒温环境中放置 48 h 以上。

空白溶液：取水 20 μL，与供试品溶液同时同法进行酶解，作为空白溶液。

取空白溶液、供试品溶液（酶解）、对照品溶液（酶解）各 10 μL，注入液相色谱仪，进行测定。

肝素钠、达肝素钠双糖检测方法参考依诺肝素钠双糖检测方法。

3　结果与讨论

3.1　肝素钠检测结果

3.1.1　肝素钠分子量结果　肝素钠分子量检测结果见表 1，根据《中国药典》2020 版肝素钠分子量与分布检测描述，重均分子量应在标示值 ±500 范围内，肝素钠长期的检测结果 *RSD* 为 0.50%，可认为分子量未发生较大波动，测量结果有较高准确度。肝素钠以本文方式存放，分子量 12 个月内不会发生变化。

表 1　肝素钠分子量及分布检测结果

Tab 1　Molecular weight and distribution of heparin sodium

肝素钠	重均分子量	＞ 24 000/%
干品	17 133	14.6
保存 10 日	17 112	14.2
保存 20 日	17 187	14.5
保存 30 日	17 109	14.0
保存 3 个月	17 123	15.0
保存 6 个月	17 128	14.3
保存 9 个月	17 148	14.3
保存 12 个月	16 919	14.1
平均值	17 104	14.3
RSD/%	0.50	2.3

3.1.2　肝素钠效价结果　肝素钠效价检测结果见表 2，肝素钠的效价检测属于生化药品的检测范围，存在较大的波动，根据《中国药典》2020 版肝素钠生物测定法描述，我们把效价的 *RSD* 值＜ 5.0% 认为样品稳定未发生较大变化。肝素钠长期存放后的效价检测结果 *RSD* 值为 1.6%，可认为肝素钠以本文方式保存 12 个月，效价不会发生变化。

表 2　肝素钠效价检测结果

Tab 2　Heparin sodium potency

肝素钠	抗Ⅱa 因子效价 /（IU • mg^{-1}）
干品	218.4
保存 10 日	225.7
保存 20 日	219.2
保存 30 日	219.8
保存 3 个月	227.2
保存 6 个月	225.0
保存 9 个月	227.5
保存 12 个月	221.0
平均值	223.6
RSD/%	1.6

3.1.3　肝素钠双糖结果　肝素钠双糖检测结果见表 3。肝素钠的双糖重复单元由己糖醛酸（HexA）和葡萄糖胺（GlcN）组成。己糖醛酸（HexA）包

括*β-D-*葡萄糖醛酸（GlcA）和*α-L-*艾杜糖醛酸（IdoA），可以发生 2-*O-*硫酸基（2S）取代。葡萄糖胺（GlcN）可发生 *N-*乙酰化（GlcNAc）、*N-*硫酸化（GlcNS），3-*O-*硫酸化（3S）和 6-*O-*硫酸化（6S）修饰。生化药品由于其本身的特殊性、双糖检测的复杂性，以及受肝素酶的裂解程度差异等因素的影响较大，易存在较大的分析方法检测误差。通过肝素酶Ⅰ、Ⅱ 和Ⅲ 的联合酶解可将肝素钠完全降解为二糖基本组成单元，其中糖醛酸变为不饱和糖醛酸（ΔUA）。我们把含量较少的糖醛酸 2-*O* 脱硫酸翻转产物△ⅣSgal、△ⅡSgal（含量不足 1%）认为存在即可。*RSD* 值不大于 10%，认为样品双糖结构未发生较大变化。由表 3 肝素钠双糖检测结果可知，8 种基础二糖组成单元△ⅣA（ΔUA-GlcNA）、△ⅣS（ΔUA-GlcNS）、△ⅡA（ΔUA-GlcNAc6S）、△ⅢA（ΔUA2S-GlcNAc）、△ⅡS（ΔUA-GlcNS6S）、△ⅢS（ΔUA2S-GlcNS）、△ⅠA（ΔUA2S-GlcNAc6S）、△ⅠS（ΔUA2S-GlcNS6S），丝氨酸氧化 1 形态△ Glyserox1，其检测结果 *RSD* 值均＜ 10%，可认为其结构组成均未发生明显变化。即肝素钠以本文方式保存 12 个月，双糖结构不会发生变化。

表 3　肝素钠双糖检测结果

Tab 3　Heparin sodium disaccharide

肝素钠	△ⅣA	△ Glyserox1	△ⅣSgal	△ⅣS	△ⅡA	△ⅢA	△ⅡSgal	△ⅡS	△ⅢS	△ⅠA	△ⅠS
干品	3.77	1.64	0.07	3.05	3.40	1.74	0.52	10.71	7.12	1.51	61.86
保存 10 日	3.68	1.61	0.10	3.19	3.44	1.81	0.54	10.79	7.09	1.51	62.04
保存 20 日	3.70	1.62	0.07	3.12	3.45	1.76	0.53	10.87	7.10	1.51	62.15
保存 30 日	3.37	1.56	0.11	2.79	3.03	1.63	0.61	10.04	6.87	1.49	63.31
保存 3 个月	3.40	1.51	0.09	2.82	3.12	1.62	0.54	10.06	7.30	1.52	62.87
保存 6 个月	3.24	1.45	0.07	2.79	3.12	1.56	0.46	10.68	7.33	1.49	63.65
保存 9 个月	3.66	1.51	0.08	3.10	3.63	1.80	0.69	10.91	7.11	1.56	62.87
保存 12 个月	3.84	1.54	0.07	3.10	3.60	1.79	0.66	10.91	7.11	1.54	62.96
平均值	3.56	1.54	—	2.99	3.34	1.71	—	10.61	7.13	1.52	62.84
RSD/%	6.1	3.9	—	6.0	7.4	6.0	—	3.7	2.1	1.7	0.92

3.2　达肝素钠检测结果

3.2.1　达肝素钠分子量结果　达肝素钠分子量检测结果见表 4，我国对达肝素，依诺肝素这两种低分子肝素品种暂未收录，低分子量肝素的分子量测定误差较大，对其分子量及分布的检测测定值应在标示值 ±3.3%，达肝素钠重均分子量应在标示值 ±200[12]。达肝素钠长期的检测结果 *RSD* 为 1.0%，可认为分子量未发生较大波动，测量结果有较高准确度。达肝素钠以本文方式存放 12 个月，分子量不会发生变化。

3.2.2　达肝素钠效价结果　达肝素钠效价检测结果见表 5，达肝素钠的效价检测属于生化药品的检测范围，存在较大的波动，所以我们定义效价的 *RSD* 值＜ 5.0% 认为样品是稳定未发生较大变化的。根据达肝素钠长期的效价检测结果，其抗Ⅹa 因子效价，抗Ⅱa 因子效价，抗Ⅹa：抗Ⅱa 因子 *RSD* 值分别为 2.0%、2.9%、2.6%。认为达肝素钠长期以本文方式保存，效价 12 个月内不会发生变化。

3.2.3　达肝素钠双糖结果　达肝素钠双糖检测结果见表 6。达肝素钠非还原端（NRE）的主要结构为 2-*O-*硫酸 -*α-L-*艾杜糖醛酸，还原端主要结构为 6-*O-*硫酸 -2，5- 内醚 -*D-*甘露糖醇。使用肝素酶Ⅰ、Ⅱ 和Ⅲ 的联合降解可将达肝素完全酶解为二糖基本组成单元。我们把含量较少的来源于肝素和蛋白质连接域的寡糖结构△ Glyserox1，糖醛酸 2-*O* 脱硫酸翻转产物△ⅣSgal（含量不足 1%）认为存在即可。其他组分 *RSD* 值不大于 10%，我们认为样品双糖结构未发生较大变化。由表 6 达肝素钠长期的双糖检测结果，主峰糖结构△ⅡA-ⅣSglu ＋ⅠS；8 种基础二糖组成单元△ⅣA、△ⅣS、△ⅡA、△ⅢA、△ⅡS、△ⅢS、△ⅠA、△ⅠS，特征双糖△ⅡM、△ⅠM，特

表 4　达肝素钠分子量及分布检测结果

Tab 4　Molecular weight and distribution of dalteparin sodium

达肝素钠	重均分子量	＜ 3000/%	＞ 8000/%
干品	6189	11.0	22.0
保存 10 日	6064	10.9	21.7
保存 20 日	6131	10.8	22.5
保存 30 日	6210	10.3	22.7
保存 3 个月	6239	10.1	23.3
保存 6 个月	6126	10.5	23.0
保存 9 个月	6156	10.2	22.3
保存 12 个月	6189	10.0	22.7
平均值	6159	10.4	22.6
RSD/%	1.0	3.3	2.3

表 5　达肝素钠效价检测结果

Tab 5　Dalteparin sodium potency

达肝素钠	抗Ⅹa因子/（IU·mg^{-1}）	抗Ⅱa因子/（IU·mg^{-1}）	抗Ⅹa∶抗Ⅱa
干品	135.1	62.2	2.2
保存 10 日	134.2	61.1	2.2
保存 20 日	133.4	62.1	2.1
保存 30 日	134.1	61.3	2.2
保存 3 个月	133.1	61.0	2.2
保存 6 个月	131.2	60.4	2.2
保存 9 个月	127.4	59.1	2.2
保存 12 个月	129.1	57.0	2.3
平均值	131.8	60.3	2.2
RSD/%	2.0	2.9	2.6

征四糖△ⅠS-ⅠM；糖醛酸 2-O 脱硫酸翻转产物△ⅡSgal 检测结果 *RSD* 值均＜ 10%，可认为其结构组成均未发生变化。所以达肝素钠以本文方式保存 12 个月，双糖结构不会发生变化。

3.3　依诺肝素钠检测结果

3.3.1　依诺肝素钠分子量结果　依诺肝素钠分子量检测结果见表 7，依诺肝素钠重均分子量应在标示值 ±150 范围内 [13]，而依诺肝素钠长期的分子量及分布检测结果 *RSD* ＜ 1.2%，我们认为分子量未发生较大波动，测量结果有较高准确度。依诺肝素钠以本文方式存放 12 个月，分子量不会发生变化。

表 6　达肝素钠双糖检测结果

Tab 6　Dalteparin sodium disaccharide

达肝素钠	△ⅣA	△Glyserox1	△ⅣSgal	△ⅣS	△ⅡM	△ⅡA	△ⅢA	△ⅡSgal	△ⅡS	△ⅢS	△ⅠM	△ⅠA	△ⅡA-ⅣSglu＋ⅠS	△ⅡA-ⅡSgal	△ⅠS-ⅠM
干品	2.01	0.56	0.20	1.65	1.99	3.38	1.24	2.64	8.05	4.48	1.01	1.47	57.41	3.11	6.48
保存 10 日	1.70	0.47	0.21	1.36	2.06	3.19	1.17	2.62	8.10	4.25	0.92	1.41	57.35	3.35	6.74
保存 20 日	1.87	0.54	0.24	1.51	2.13	3.50	1.24	2.60	8.38	4.39	0.96	1.47	56.31	3.41	6.56
保存 30 日	2.13	0.58	0.20	1.64	1.95	3.21	1.21	2.43	7.57	4.32	1.11	1.59	58.88	3.24	6.09
保存 3 个月	1.94	0.49	0.21	1.68	1.96	3.35	1.33	2.65	7.88	4.11	1.10	1.54	57.74	3.43	5.81
保存 6 个月	1.96	0.58	0.22	1.48	1.93	3.05	1.18	2.94	7.99	3.93	1.13	1.52	57.57	3.72	5.99
保存 9 个月	2.27	0.76	0.10	1.60	1.69	3.45	1.49	2.96	7.74	4.54	1.07	1.55	56.88	3.01	5.59
保存 12 个月	2.02	0.51	0.23	1.58	1.74	3.35	1.3	2.38	8.09	4.31	1.07	1.53	55.81	3.28	5.58
平均值	1.98	—	—	1.55	1.92	3.30	1.27	2.65	7.96	4.26	1.05	1.52	57.22	3.35	6.05
RSD/%	9.2	—	—	7.0	8.3	4.8	8.8	8.5	3.3	4.6	7.6	3.9	1.8	6.5	7.5

表 7　依诺肝素钠分子量及分布检测结果

Tab 7　Molecular weight and distribution of enoxaparin sodium

依诺肝素钠	重均分子量	＜ 2000/%	2000 ～ 8000/%	＞ 8000/%
干品	4410	16.4	72.8	10.8
保存 10 日	4440	16.4	72.5	11.1
保存 20 日	4411	16.6	72.5	10.8
保存 30 日	4428	16.4	72.7	10.9
保存 3 个月	4436	16.5	72.5	11.0
保存 6 个月	4464	16.2	72.6	11.2
保存 9 个月	4437	16.3	72.7	11.0
保存 12 个月	4451	16.3	72.6	11.1
平均值	4438	16.4	72.6	11.0
RSD/%	0.40	0.80	0.10	1.2

3.3.2　依诺肝素钠效价结果　依诺肝素钠效价检测结果见表 8，依诺肝素钠的效价检测属于生化药品的检测范围，存在较大的波动，所以我们定义效价的 *RSD* 值＜ 5.0% 认为样品是稳定的。根据依诺肝素钠长期的效价检测结果，其抗Ⅹa 因子效价，抗Ⅱa 因子效价，抗Ⅹa ∶抗Ⅱa 因子 *RSD* 值分别为 1.0%、1.3%、0.0%。我们认为依诺肝素钠以本文方式保存 12 个月，效价不会发生变化。

表 8　依诺肝素钠效价检测结果

Tab 8　Enoxaparin sodium potency

依诺肝素钠	抗Ⅹa因子/（IU·mg^{-1}）	抗Ⅱa因子/（IU·mg^{-1}）	抗Ⅹa ∶抗Ⅱa
干品	99.0	27.7	3.6
保存 10 日	100.3	27.8	3.6
保存 20 日	99.3	27.4	3.6
保存 30 日	102.1	28.1	3.6
保存 3 个月	99.4	28.5	3.5
保存 6 个月	99.8	27.7	3.6
保存 9 个月	101.1	28.3	3.6
保存 12 个月	99.6	27.9	3.6
平均值	100.2	28.0	3.6
RSD/%	1.0	1.3	0.0

3.3.3　依诺肝素钠双糖结果　依诺肝素钠双糖检测结果见表 9。肝素酶Ⅰ，Ⅱ和Ⅲ联合酶切依诺肝素钠的 1，4- 糖苷键，并在二糖和寡糖的 NRE 处留下不饱和的 Δ4，5- 糖醛酸残基（△ UA）。但是其中一些特殊结构，如 GlcN 残基上的 3-*O*- 磺基和 1，6- 脱水衍生物，可能会阻碍肝素酶的活性使其生成不饱和四糖而不是二糖。除依诺肝素钠的原始 NRE

和 RE 以外，其大多数结构特征均可从酶解产物中推导出。我们把含量较少的糖醛酸 2-*O* 脱硫酸翻转产物△ⅣSgal，丝氨酸氧化 1 形态△ Glyserox1，四糖△ⅡA-ⅣSglu（含量不足 1%）认为存在即可，其余组分 *RSD* 值不大于 10%，认为样品双糖结构未发生较大变化。由表 9 依诺肝素钠长期的双糖检测结果可知，8 种基础二糖组成单元△ⅣA、△ⅣS、△ⅡA、△ⅢA、△ⅡS、△ⅢS、△ⅠA、△ⅠS，含 1.6 结构组分△ⅠS（1，6），△ⅠS-ⅠSid（1，6），三糖结构△ⅠS-ⅠdoA2S，四糖结构△ⅡA-ⅡSglu，糖醛酸 2-*O*- 脱硫酸翻转产物△ⅡSgal 检测结果 *RSD* 值均＜ 10%，认为结构组成均未发生变化。所以依诺肝素钠以本文方式常温保存 12 个月，双糖结构不会发生变化。

表 9　依诺肝素钠双糖检测结果

Tab 9　Enoxaparin sodium disaccharide

依诺肝素钠	△ⅣA	△ Glyserox1	△Ⅳ Sgal	△ⅣS	△ⅡA	△ⅢA	△Ⅱ Sgal	△ⅡS	△ⅢS	△ⅠS（1，6）	△ⅠA	△ⅡA-ⅣSglu	△ⅠS	△ⅡA-ⅡSglu	△ⅠS-ⅠdoA2S	△ⅠS-ⅠSid（1.6）
干品	2.27	0.45	0.36	3.05	3.81	1.88	1.35	10.61	6.72	1.36	1.53	0.42	59.45	2.22	1.05	1.18
保存 10 日	2.43	0.39	0.29	2.76	3.58	1.57	1.29	9.80	6.82	1.24	1.56	0.46	62.38	2.49	1.01	1.20
保存 20 日	2.26	0.41	0.34	2.81	3.79	1.82	1.23	10.18	6.30	1.32	1.56	0.45	62.23	2.48	1.02	1.06
保存 30 日	2.42	0.41	0.33	2.65	3.76	1.64	1.49	10.60	6.89	1.37	1.56	0.53	60.83	2.42	1.12	1.29
保存 3 个月	2.33	0.42	0.34	2.72	3.76	1.69	1.37	9.90	6.50	1.37	1.57	0.50	61.23	2.46	1.18	1.41
保存 6 个月	2.24	0.40	0.34	2.70	3.42	1.81	1.26	10.02	6.83	1.32	1.63	0.51	62.18	2.48	1.08	1.28
保存 9 个月	2.19	0.42	0.22	2.70	3.81	1.61	1.29	10.04	6.49	1.31	1.72	0.46	62.94	2.45	0.99	1.30
保存 12 个月	2.13	0.10	0.28	2.60	3.35	1.59	1.45	10.78	6.94	1.39	1.58	0.52	61.98	2.49	1.24	1.11
平均值	2.29	—	—	2.71	3.64	1.68	1.34	10.19	6.68	1.33	1.60	—	61.97	2.47	1.09	1.24
RSD/%	5.0	—	—	2.5	5.2	6.1	7.4	3.6	3.7	3.8	3.7	—	1.2	1.0	8.6	9.8

4　结论

本文提供了一种新的多糖类药物保存方式，并研究了产品在此状态下允许的保存时限问题，解决了企业生产肝素钠及低分子肝素过程中产品因突发事件或设备故障导致滞留而又无法以干燥固体粉末状态进行储存和转运的问题。取 12 个月内样品，检测其分子量、效价及结构双糖方面，并与相应干燥粉末状态检测数据进行对比，我们确认将多糖类肝素产品使用有机溶剂（甲醇、乙醇、丙酮）从其溶液中分离，除尽上清并使用乙醇进行液封，隔离空气，15 ～ 25 ℃环境下进行保存，12 个月内其分子量、效价及双糖结构不会发生变化。但是在考察过程中发现，6 个月后，肝素钠、达肝素钠和依诺肝素钠有轻微程度的颜色加深现象，如果后续工艺没有氧化步骤，建议将保存时间控制在 6 个月内。本文考察的保存温度在 15 ～ 25 ℃，接近车间真实生产环境温度，增加了此保存方式的适用性。不同肝素制剂的保存通常建议在 30 ℃以下或阴凉处，较低的温度能增加产品的稳定性。如果条件允许，将肝素湿品沉淀贮藏于 2 ～ 8 ℃环境低温冷藏库，将更有益于产品的长时间保存。

参考文献

[1] McLean J. The thromboplastic action of cephalin [J]. Am. J. Physiol，1916，41：50-257.

[2] Li F，Guoyun L，Bo Y. Structural characterization of pharmaceutical heparins prepared from different animal tissues [J]. J Pharm Sci，2013，102（5）：1447-1457.

[3] Kalib S，Akihiro O，Li F，et al. Analysis of heparins derived from bovine tissues and comparison to porcine Intestinal Heparins [J]. Clin Appl Thromb-Hem，2016，22（6）：520-527.

[4] Liu XY，Ange KS，Wang XH，et al. Parent heparin and daughter LMW heparin correlation analysis using LC-MS and NMR [J]. Analytica Chimica Acta，2017，961：1-99.

[5] Elaine G，Barbara M，Trevor W. Heparin and low-molecular-weight heparin [J]. Thromb Haemost，2008，99（5）：807-818.

[6] Jawed F，Debra H，Christopher S. Biochemical and pharmacologic heterogeneity in low molecular weight heparins Impact on the therapeutic profile [J]. Curr Pharm Des，2004，10（9）：983-999.

[7] Damus PS，MHicks M，Roberg RD. Rosenberg. Anticoagulant action of heparin [J]. Nature，1973，246（5432）：355-357.

[8] 河北常山生化药业股份有限公司 . 一种达肝素钠制备工艺：CN102558393[P]. 2013-05-29.

[9] 河北常山生化药业股份有限公司 . 一种依诺肝素钠的制备工艺：CN102050888[P]. 2011-12-07.

[10] 中国药典 2020 年版 . 二部 [S]. 2020：637.

[11] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：191-192.

[12] European Pharmacopoeia10.5[S]. 2019：2338-2339，2502-2504.

[13] 李京，王悦，李颖颖，等 . 低分子肝素质量标准研究 [J]. 中国药学杂志，2014，49（24）：2210-2218.

（收稿日期：2022-01-25；修回日期：2022-04-19）

孟鲁司特钠片酸降解未知杂质结构及来源分析

张琳琳[1, 2, 3]，刘阿利[1, 2, 3]，张继环[1, 2, 3]，王雪[1, 2, 3]，张贵民[2, 3*]（1. 鲁南贝特制药有限公司，山东　临沂　276006；2. 国家手性制药工程技术研究中心，山东　临沂　276006；3. 山东省手性制药技术创新中心，山东　临沂　276006）

摘要：目的　对孟鲁司特钠片酸降解试验中出现的两个未知杂质峰进行结构及来源分析，以保证药品质量与安全。**方法**　采用 Waters XBridge phenyl 柱（4.6 mm×150 mm，3.5 μm），以 0.01 mol • L^{-1} 醋酸铵（用冰醋酸调节 pH 值至 5.5）- 乙腈（45∶55）为流动相对孟鲁司特钠片酸降解未知杂质进行分离，电喷雾离子源正负离子模式测定未知杂质分子量，进行结构鉴定；通过高效液相色谱进一步确认未知杂质结构和来源。**结果**　2 个未知杂质为同一分子结构的两种存在型式，且为孟鲁司特钠与溶剂甲醇反应所得，并非孟鲁司特钠片自身酸降解产物。**结论**　通过对孟鲁司特钠片酸降解未知杂质进行研究，为后续质量控制提供参考和指导。

关键词：高效液相色谱串联质谱法；高效液相色谱法；孟鲁司特钠片；酸降解试验；未知杂质
中图分类号：R927.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1564-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.015

Structure and source analysis of unknown impurities from acid degradation of montelukast sodium tablets

ZHANG Lin-lin[1, 2, 3], LIU A-li[1, 2, 3], ZHANG Ji-huan[1, 2, 3], WANG Xue[1, 2, 3], ZHANG Gui-min[2, 3*] (1. *Lunan Better Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi Shandong* 276006; 2. *National Engineering and Technology Research Center of Chirality Pharmaceutics*, *Linyi Shandong* 276006; 3. *Shandong Technology Innovation Center of Chirality Pharmaceutics*, *Linyi Shandong* 276006)

Abstract: Objective To analyze the structure and source of unknown impurities in the acid degradation test of montelukast sodium tablets to ensure drug quality and safety. **Methods** A Waters XBridge phenyl column (4.6 mm×150 mm，3.5 μm) was used to separate unknown impurities of montelukast sodium tablets in the acid degradation with 0.01 mol • L^{-1} ammonium acetate (adjusted to pH 5.5 with glacial acetic acid)-acetonitrile (45∶55) as the mobile phase. The molecular weight of the unknown impurities were determined in the positive and negative ion mode by electrospray ionization, and the structures were identified. The structure and source of the unknown impurities were further confirmed by high performance liquid chromatography. **Results** The two unknown impurities were different forms of the same molecular structure, which were formed by the reaction of montelukast sodium with methanol, not the acid degradation products. **Conclusion** Reference and guidance are provided for the quality control of the unknown impurities from acid degradation of montelukast sodium tablets.

Key words: high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; high performance liquid chromatography; montelukast sodium tablet; acid degradation test; unknown impurity

孟鲁司特钠（montelukast sodium），化学名 1-[[[（*R*）-3-[（*E*）-2-（7-氯-2-喹啉基）乙烯基]-*α*-[2-（1-羟基-1-甲基乙基）苯乙基]苄基]硫基]甲基]环丙乙酸钠盐，是一种广泛应用的选择性白三烯受体拮抗剂。该药物具有高效、低毒、安全性好的优点，主要应用于成人和儿童哮喘的预防和长期治疗，能够缓解哮喘急性发作，减少激素用量，提高患者用药的依从性[1-2]。孟鲁司特钠还可用于治疗儿童急性呼吸道感染后咳嗽，可以有效减轻咳嗽症状，降低炎症反应程度，具有较好的应用价值[3]。近年来，

作者简介：张琳琳，女，助理工程师，主要从事化学药物研发分析工作，email：zhagchangxin@163.com　*通信作者：张贵民，男，高级工程师，主要从事药物研发及工程化研究，email：Lunanzhangguimin@163.com。

由于口服有效、毒副作用小，孟鲁司特钠在临床上单独或与其他药物联合应用治疗多种呼吸系统疾病[4]。

孟鲁司特钠最早由默克公司于 1998 年在美国申请上市，商品名 SINGULAIR（顺尔宁），1999 年在中国上市[5]。目前国内有关孟鲁司特钠片降解产物的研究较少，主要对其中 4 种杂质进行了测定[6]。在孟鲁司特钠一致性评价研究过程中发现，除文献[7]中报道的特定杂质峰（杂质 B，BP2020）外，其酸降解色谱图中又出现了 2 个未知杂质峰，此前并未有相关报道。随着人们对药物安全性的日益关注，药物中的杂质研究已成为药品质量控制的重要环节。因此，为保证用药安全，本文采用高效液相色谱串联质谱法（HPLC-MS/MS）和高效液相色谱法（HPLC）对酸降解试验中产生的未知杂质进行初步的结构解析与来源分析，为后续相关质量控制研究提供参考。

1　仪器与试药

1.1　仪器

Waters ACQ-2489 高效液相色谱仪（美国 Waters），高效液相色谱-质谱联用仪（高效液相色谱仪：Thermo-vanquish flex；质谱仪：Thermo-Q Exactive），XS105 电子天平、S 210K pH 计（梅特勒-托利多）。

1.2　试药

孟鲁司特钠片（批号：200401，自制），甲醇、乙腈（色谱纯，英国莱德化学有限公司或默克公司；默克公司的甲醇和乙腈仅在未知杂质来源分析中使用，其他试验中均使用英国莱德化学有限公司的甲醇和乙腈），磷酸、醋酸铵、盐酸、氢氧化钠、磷酸氢二钾、冰醋酸（分析纯，国药集团），纯化水（自制）。

2　方法

2.1　HPLC 条件

色谱柱：采用 Waters XBridge phenyl 柱（苯基键合硅胶为填充剂，4.6 mm×150 mm，3.5 μm）；流动相 A：0.02 mol • L^{-1} 磷酸氢二钾溶液（用磷酸调节 pH 值至 5.5），流动相 B：甲醇-乙腈（1∶1），梯度洗脱（0 ～ 20 min，50% ～ 30%A；20 ～ 25 min，30%A；25 ～ 30 min，30% ～ 50%A；30 ～ 35 min，50%A）；检测波长：254 nm；流速：1.0 mL • min^{-1}；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。

2.2　HPLC-MS/MS 条件

2.2.1　色谱条件　采用 Waters XBridge phenyl 柱（苯基键合硅胶为填充剂，4.6 mm×150 mm，3.5 μm）；流动相：0.01 mol • L^{-1} 醋酸铵（用冰醋酸调节 pH 值至 5.5）-乙腈（45∶55）；检测波长：254 nm；流速：0.3 mL • min^{-1}；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。

2.2.2　质谱条件　电喷雾离子源（ESI）；正负离子模式；雾化电压：＋3.8 kV；鞘气流速：30 mL • min^{-1}；辅助气流速：8 mL • min^{-1}；毛细管温度：320 ℃；辅助气温度：310 ℃；扫描模式：Full mass-dd MS^2；扫描范围（*m/z*）：200 ～ 2000。

2.3　溶液配制

2.3.1　供试品溶液　避光操作，取本品粉末适量（约含主成分 10 mg），精密称定，置 10 mL 量瓶内，加 6 mL 稀释剂 [甲醇-水（9∶1）] 超声使溶解，用稀释剂稀释至刻度，摇匀，离心后取上清液滤过，取续滤液作为供试品溶液。

2.3.2　酸降解样品溶液　避光操作，取本品粉末适量（约含主成分 10 mg），精密称定，置 10 mL 量瓶内，加 6 mL 稀释剂超声溶解，再加入 1 mL 1 mol • L^{-1} 的盐酸溶液，50 ℃加热 5 min 后，冷却，加入 1 mol • L^{-1} 的氢氧化钠溶液中和，用稀释剂稀释至刻度，摇匀，离心后取上清液滤过，取续滤液作为酸降解样品溶液。

3　结果与讨论

3.1　HPLC 分析

取“2.3”项下供试品溶液和酸降解样品溶液分别注入高效液相色谱仪，按“2.1”项下条件检测，色谱图见图 1。未破坏的孟鲁司特钠样品色谱图（见图 1A）中只有一个响应极高的主峰 1，其保留时间为 15.007 min，为孟鲁司特峰；酸降解后的孟鲁司特钠色谱图（见图 1B）显示，除了主峰 1 外，还出现 3 个比较明显的色谱峰。其中峰 4 为已知孟鲁司特钠特定杂质峰（杂质 B，BP2020）。在 20.570 min、24.508 min 处的杂质峰 2 以及杂质峰 3 为新出现的未知杂质峰，分别命名为杂质 1、杂质 2。

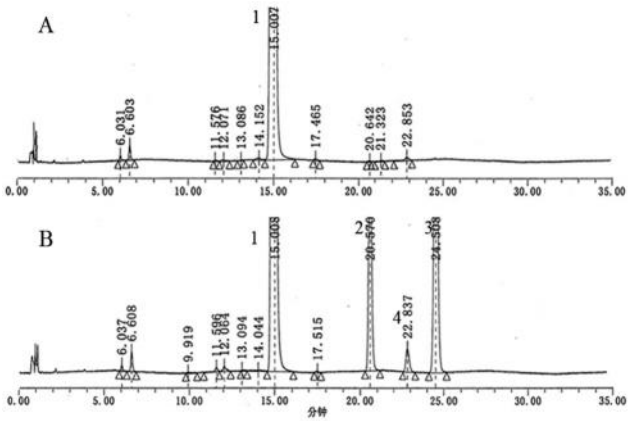


图 1　孟鲁司特钠片高效液相色谱图

Fig 1　HPLC chromatogram of montelukast sodium tablets

A. 未破坏（undegraded）；B. 酸降解（acid degradation）；1. 孟鲁司特（montelukast）；2. 杂质 1（impurity 1）；3. 杂质 2（impurity 2）；4. 杂质 B（impurity B）

3.2　未知杂质结构解析

3.2.1　未知杂质质谱信息　为分析 2 个未知杂质可能的结构及其生成路线，取“2.3”项下酸降解样品溶液，采用“2.2”项下 HPLC-MS/MS 条件获得未知杂质母离子（$[M+H]^+$）与二级碎片离子信息，结果见表 2 及图 2。

表 2　孟鲁司特钠片酸降解未知杂质质谱结果

Tab 2　Mass spectra of unknown impurities from acid degradation of montelukast sodium tablets

杂质	保留时间 /min	母离子 $[M+H]^+$ /（*m/z*）	主要碎片离子 /（*m/z*）
杂质 1	28.45	600.233 89	454.1935、422.1667、380.1204、292.0884、278.0731、131.0856
杂质 2	42.10	600.235 72	454.1439、422.1668、380.1211、292.0886、278.0732、131.0857

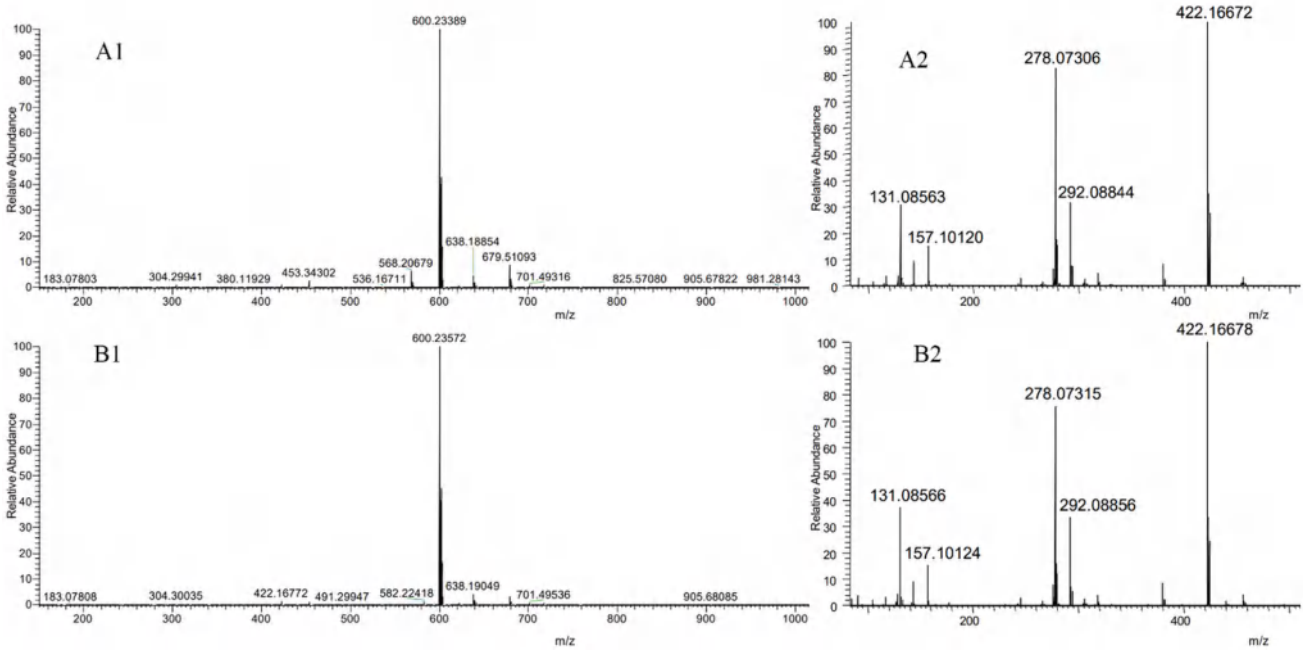


图 2　孟鲁司特钠片酸降解未知杂质质谱图

Fig 2　Mass spectra of unknown impurities in the montelukast sodium tablets under acid degradation

A1. 杂质 1 母离子（impurity 1 parent ion）；A2. 杂质 1 碎片离子（impurity 1 fragment ion）；B1. 杂质 2 母离子（impurity 2 parent ion）；B2. 杂质 2 碎片离子（impurity 2 fragment ion）

孟鲁司特钠片酸降解后出现的 2 个未知杂质分子量相同，均为 599.2，较孟鲁司特（585.2）大 14，与亚甲基（$-CH_2-$）分子量相当，初步推测两者可能为孟鲁司特在酸性条件下与溶剂甲醇的反应产物，可能的反应机制见图 3；而且 2 个未知杂质的碎片峰离子丰度相当，分子峰及碎片峰峰形均相似，杂质峰的分子量与分子碎片分子量均高度吻合，初步判断两者为同一结构，色谱图中显示双峰可能为结构中的羧酸基团不完全解离所致，即 2 个未知杂质可能为同一结构的两种存在型式（酸型和解离型），两种型式之间存在解离平衡，见图 4。

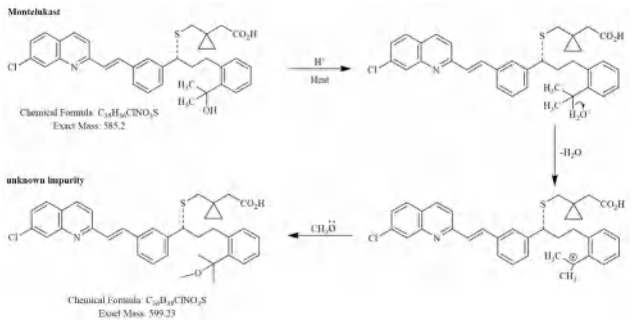


图 3　未知杂质可能的反应机制

Fig 3　Possible reaction mechanism of unknown impurity

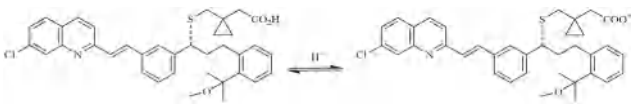


图 4　未知杂质之间可能存在的解离平衡

Fig 4　Possible dissociation equilibrium between the unknown impurities

3.2.2　未知杂质质谱解析　假设未知杂质为孟鲁司特与甲醇在酸性条件下反应脱水生成，可能的结构如图 3 所示，对其进行质谱解析。因其在结构上与孟鲁司特相近，结合孟鲁司特的裂解规律[8]，推断其可能的裂解途径如图 5 所示。由图中 A 线断裂后，失去 A 线右侧 $C_{12}H_{18}O$ 基团后生成碎片 *m/z* 422.1，元素组成为 $C_{24}H_{21}ClNO_2S^+$，该碎片脱去 $C_6H_{10}O_2S$ 基团后继续丢失两个氢生成碎片 *m/z* 278.1。由图中 B 线断裂后，失去 $C_6H_{10}O_2S$ 基团后生成碎片 *m/z* 454.2，进而失去一分子甲醇

得到碎片 *m/z* 422.2，元素组成为 $C_{29}H_{25}ClN^+$，一方面可能按照途径 a 进行碎裂，失去 $C_{10}H_{12}$ 基团后生成碎片 *m/z* 292.1，元素组成为 $C_{19}H_{15}ClN^+$；另外可能按照途径 b 生成碎片 *m/z* 157.1，进一步丢失 C_2H_2，生成碎片 *m/z* 131.1。从图中可以看出，未知杂质可能的裂解碎片分子量与质谱图中二级碎片分子量相当，具有较高的吻合度，因此推断 2 个未知杂质确为孟鲁司特与甲醇在酸性条件下的反应产物。

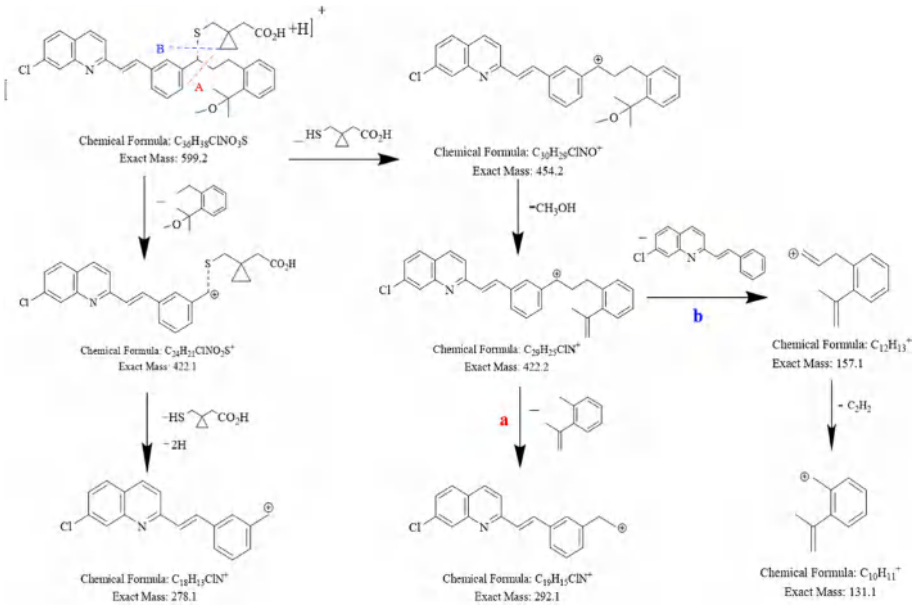


图 5　未知杂质可能的裂解途径

Fig 5　Possible fragmentation pathway of unknown impurities

3.2.3　未知杂质存在型式确认　由于 2 个未知杂质的分子量和质谱碎片高度吻合，推测两者可能为同一结构的两种存在形式，若推测成立，则在不同 pH 值的酸性条件下，两种形式存在解离平衡，通过调节流动相的 pH 值，2 个未知杂质的比例可能会发生变化。因此通过试验进一步验证上述解析的合理性。

用磷酸调节流动相 A 的 pH 值分别为 3.0、4.5、4.8、5.0、5.5、5.7、6.0、6.5、6.8，其余色谱条件均同“2.1”项下 HPLC 条件，取“2.3.1”项下酸降解样品溶液，依次进样，记录色谱图。通过调节流动相 pH 值，液相色谱图杂质 1 和杂质 2 峰的峰面积比例发生显著变化，见表 3。

表 3　不同 pH 值流动相条件未知杂质峰面积

Tab 3　Peak area of unknown impurity under different pH conditions of the mobile phase

流动相	峰面积			
pH 值	杂质 1	杂质 2	杂质 1 ∶杂质 2	杂质 1 ＋杂质 2
3.0	2 211 181	0	100∶0	2 211 181
4.5	1 205 732	1 120 855	52∶48	2 336 587
4.8	1 217 034	1 169 259	51∶49	2 376 293
5.0	1 200 161	1 197 320	50∶50	2 397 481
5.5	1 195 602	1 217 187	50∶50	2 412 789
5.7	1 190 161	1 260 161	49∶51	2 450 322
6.0	1 160 855	1 295 732	47∶53	2 456 587
6.5	0	2 556 307	0∶100	2 556 307
6.8	0	2 568 923	0∶100	2 568 923

当流动相 A 的 pH 值在 3.0 时，色谱图中两个未知杂质中只有杂质 1 峰，说明 2 个未知杂质在低 pH 环境中只有未解离型式稳定存在；当流动相 A 的 pH 值在 3.5 ～ 6.0 时，色谱图中始终存在杂质 1 和杂质 2，并随着 pH 值的升高，杂质 2 峰的峰面积相对增大，而杂质 1 峰的峰面积相对减小；当流动相 A 的 pH 值≥ 6.5 时，色谱图中未知杂质峰完全转变成杂质 2 峰，说明未知杂质的羧酸根已完全解离，此时主要以解离型存在。在不同的 pH 值环境中，两个杂质比例不同，出峰时间也略有差异，因此，判断杂质 1 与杂质 2 之间存在解离平衡，在一定 pH 条件下可以相互转化，即杂质 1 与杂质 2 为同一分子结构的两种存在型式，杂质 1 以酸的型式存在，杂质 2 以解离的型式存在。

3.3　未知杂质来源分析

为进一步验证酸降解试验中产生的未知杂质为孟鲁司特在酸性条件下与溶剂甲醇反应所得，分别使用来自不同厂家的甲醇和乙腈配制甲醇 - 水（9∶1）、乙腈 - 水（9∶1）作为溶剂，按“2.3”

项下制得酸降解样品溶液，同“2.1”项下 HPLC 条件进行检测，见图 6。图 6A1 与图 6A2 中均存在 4 个明显的色谱峰，分别为主峰、杂质 B 峰和 19.3 min、25.6 min 的 2 个未知杂质峰，使用不同厂家的甲醇的酸降解色谱图无明显差异；而图 6B1 与图 6B2 中仅存在主峰和杂质 B 峰，在 19.3 min 和 25.6 min 的两个未知杂质峰均未出现，而且使用不同厂家的乙腈的酸降解色谱图也无明显差异。因此进一步确认未知杂质为孟鲁司特钠在酸性条件下与溶剂甲醇的反应产物。

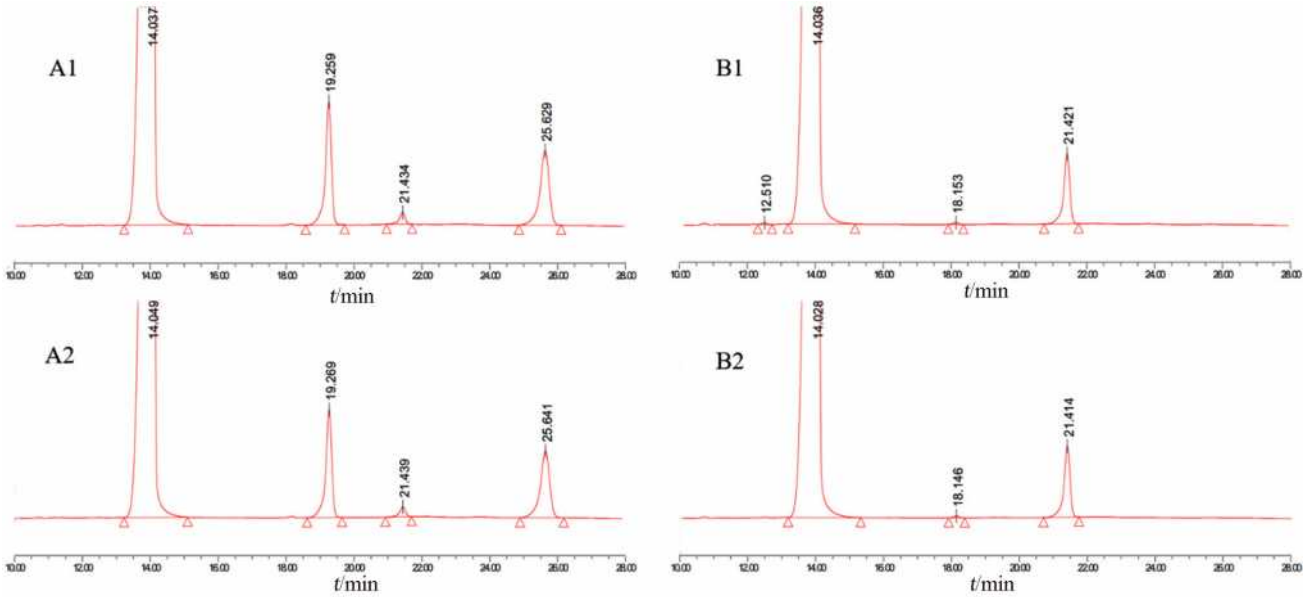


图 6　孟鲁司特钠片酸降解高效液相色谱图

Fig 6　HPLC chromatogram of montelukast sodium tablets under the acid degradation

A1. 甲醇（methanol，莱德化学）；A2. 甲醇（methanol，默克）；B1. 乙腈（acetonitrile，莱德化学）；A2. 乙腈（acetonitrile，默克）

4　结论

本文采用 HPLC-MS/MS 法对孟鲁司特钠片酸降解试验中出现的未知杂质进行定性分析，推测其结构以及可能的反应机制；通过调节流动相的 pH 值进行液相分析，确定 2 个未知杂质为同一结构的两种存在型式（酸型和解离型）；进一步来源分析表明未知杂质为孟鲁司特钠在酸性条件下与溶剂甲醇的反应产物，并非孟鲁司特钠片自身的酸降解产物。本品在加速和长期试验考察过程中均未检出此未知杂质，说明此杂质不影响产品质量，且在制剂生产、储存、运输过程中不会接触到强酸和高温环境，因此在后续的质量控制研究中无需关注。

值得注意的是，现行 USP43 和 BP2020 收载的孟鲁司特钠片质量标准中有关物质检查项下，使用的溶剂为甲醇 - 水（3∶1），流动相为乙腈 - 甲醇（2∶3），都涉及甲醇。建议在试验中应注意避免高温及强酸环境，供试品溶液临用配制，以免引入其他杂质。

参考文献

[1] 王芳 . 孟鲁司特钠治疗小儿哮喘的应用与临床有效性探究 [J]. 中国处方药，2017，15（3）：76-77.

[2] 武玉清，张洪泉 . 白三烯受体拮抗剂孟鲁司特的研究进展 [J]. 国际药学研究杂志，2003，30（5）：284-287.

[3] 黎敏，邱华，吴赞 . 孟鲁司特钠治疗儿童急性呼吸道感染后咳嗽疗效观察 [J]. 海南医学，2019，30（18）：2397-2399.

[4] 陆洁，章晓骅 . 孟鲁司特的临床应用进展 [J]. 今日药学，2020，30（4）：75-78.

[5] 徐利水 . 孟鲁司特钠制剂的质量研究 [D]. 杭州：浙江工业大学，2015.

[6] 王益华，俞俊萍，来丽丽 . 孟鲁司特钠片降解产物的 HPLC 法测定研究 [J]. 中外医疗，2014（8）：23-24.

[7] 冯莹 . 孟鲁司特钠制剂及质量控制研究 [D]. 郑州：河南大学，2012.

[8] 王英新，刘玲，李树英，等 . HPLC-MS/MS 法分析孟鲁司特钠颗粒中的有关物质 [J]. 中国药科大学学报，2019，50（3）：330-336.

（收稿日期：2021-12-12；修回日期：2022-01-18）

UPLC-MS/MS 法快速测定多效唑在麦冬中的残留及其对麦冬化学成分的影响

俞磊明[1]，张娜[2]，李琦[1]，朱光明[1]，黄维[1]，王卫华[3]，姜云耀[2*]（1. 上海市药材有限公司，上海　200082；2. 清华大学药学院 中药研究院，北京　100084；3. 清华大学药学院 药物药学技术中心代谢平台，北京　100084）

摘要：目的　建立超高效液相色谱质谱联用（UPLC-MS/MS）技术快速测定麦冬中多效唑的残留，研究多效唑对麦冬整体化学成分、总皂苷、总黄酮的影响，为麦冬多效唑残留检测及麦冬药材质量控制提供参考。**方法**　采用 UPLC-MS/MS 技术快速测定麦冬中多效唑的含量，色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH C_{18} 色谱柱（50 mm×2.1 mm，1.7 μm）；流动相为乙腈（A）和 0.1% 的甲酸水溶液（B），洗脱梯度（0 ～ 3 min：20% ～ 100%A；3 ～ 5 min：100%A；5.1 ～ 8 min：20%A）；流速为 0.2 mL • min^{-1}；柱温为 30 ℃；电喷雾正离子电离模式，多反应监测法测定；采用 UPLC-QTOF-MS 植物代谢组学技术测定多效唑对麦冬整体化学成分的影响；采用紫外分光光度计测定多效唑对麦冬总皂苷和总黄酮的影响。**结果**　多效唑在 0.002 ～ 5 ng 与峰面积线性关系良好，平均加样回收率为 97.80%，*RSD* 为 1.8%；14 个川麦冬药材样品中均检出多效唑残留，残留量在 0.002 ～ 0.05 mg • kg^{-1}；UPLC-QTOF-MS 代谢组学结果显示多效唑施用后麦冬整体化学成分与清水对照组不同，总皂苷和总黄酮定量结果显示，多效唑施用组总黄酮含量降低。**结论**　该方法简便、快速，可用于检测麦冬中多效唑的残留，多效唑施用后对麦冬整体成分及总黄酮含量有一定的影响。

关键词：麦冬；多效唑；残留检测；UPLC-MS/MS；化学成分
中图分类号：R284　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1569-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.016

Rapid determination of paclobutrazol residues by UPLC-MS/MS and their effect on chemical constituents in Ophiopogonis Radix

YU Lei-ming[1], ZHANG Na[2], LI Qi[1], ZHU Guang-ming[1], HUANG Wei[1], WANG Wei-hua[3], JIANG Yun-yao[2*] (1. *Shanghai Traditional Chinese Medicine Co., Ltd*, *Shanghai* 200082; 2. *School of Pharmaceutical Sciences*, *Tsinghua University*, *Traditional Chinese Medicine Institute*, *Beijing* 100084; 3. *Drug Metabolism Platform*, *School of Pharmaceutical Sciences*, *Tsinghua University*, *Engineer Center of Pharmaceutical Technology*, *Beijing* 100084)

Abstract: Objective To rapidly determine paclobutrazol residues in Ophiopogonis Radix by UPLC-MS/MS, to determine the effect of paclobutrazol application on the whole chemical compositions, total saponins and total flavonoids of Ophiopogonis Radix, and provide reference for the detection of paclobutrazol residues and quality control of Ophiopogonis Radix. **Methods** The analysis was performed on a Waters Acquity UPLC BEH C_{18} analytical column (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm). Mobile phase A was acetonitrile, and mobile phase B was 0.1% formic acid-water. The gradient elution was 0 － 3 min: 20% － 100%A, 3 － 5 min: 100%A, and 5.1 － 8 min: 20% A. The flow rate was 0.2 mL • min^{-1}. The column temperature was 30 ℃ . Electrospray positive ion mode was used for multi-reaction monitoring, UPLC-QTOF-MS was used to determine the effect of paclobutrazol on the chemical compositions of Ophiopogonis Radix. The effect of paclobutrazol on total saponins and flavonoids of Ophiopogonis Radix was determined by UV spectrophotometer. **Results** Good

作者简介：俞磊明，男，工程师中级，主要从事中药研究，email：Yulm@shstcm.com　*通信作者：姜云耀，男，助理研究员，主要从事中药药理研究，email：yunyao86@126.com

linearity was showed at 0.002 － 5 ng for paclobutrazol. The average recovery of paclobutrazol was 97.80%, and the *RSD* was 1.8%. The residues of paclobutrazol were detected in 14 cultivated products of Ophiopogonis Radix, and the residues ranged from 0.002 － 0.05 mg • kg^{-1}. UPLC-QTOF-MS metabolomics showed that the overall chemical compositions of Ophiopogonis Radix after the paclobutrazol treatment were different from those in the water control group. Quantitative results of total saponins and total flavonoids showed that the content of total flavonoids in the paclobutrazol treatment group was decreased. **Conclusion** This method is rapid and simple, which can be used for the determination of paclobutrazol residues in Ophiopogonis Radix. Paclobutrazol may affect the compositions of Ophiopogonis Radix and the content of total flavonoids.

Key words: Ophiopogonis Radix; paclobutrazol; residue determination; UPLC-MS/MS; chemical composition

中药麦冬为百合科沿阶草属植物麦冬 *Ophiopogon japonicus*（*L.f*）Ker-Gawl. 的干燥块根[1]，在《神农本草经》中被列为上品。麦冬味甘、微苦、性凉，有养阴生津、清心除烦的功效，且有抗血栓、抗衰老、降血糖、免疫调节、心肌保护等药理活性[2]。近年来，麦冬市场需求不断扩大，为确保产量，麦冬栽培品中农药、植物生长调节剂的使用越来越频繁。据报道，四川栽培的麦冬（川麦冬）植物生长调节剂用量较大[3-4]，过度使用植物生长调节剂影响麦冬的品质和安全性。多效唑是麦冬种植中广泛应用的三唑类植物生长延缓剂，对麦冬块根增产效果显著[5]，目前已成为麦冬药材种植中普遍施用的生长激素。本研究建立了 UPLC-MS/MS 法测定麦冬中多效唑残留情况，同时采用 UPLC-QTOF-MS 及紫外分光光度法对麦冬进行整体成分分析、总黄酮及总皂苷含量测定，探讨多效唑对麦冬化学成分的影响，以期为麦冬药材的质量控制及多效唑残留检测提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

超高效液相色谱仪（ACQUITY UPLC，美国沃特世公司）；三重四极杆质谱仪（Qtrap 4500，美国 AB SCIEX 公司）；分析天平（BSA224S，赛多利斯科学仪器有限公司）；超声波清洗器（SB25-12DTD，宁波新芝生物科技股份有限公司）；中草药粉碎机（天津市泰斯特仪器有限公司）；离心机（美国赛默飞世尔科技公司）；超高效液相 - 串联四极杆飞行时间高分辨质谱仪（Waters Synapt G2 Si，美国沃特世公司）；UV-2600 紫外分光光度计（岛津仪器苏州有限公司）。

1.2 试药

所有麦冬药材由上海市药材有限公司提供，经清华大学中药研究院特聘研究员陈军力鉴定为百合科沿阶草属植物麦冬 *Ophiopogon japonicus*（*L.f*）Ker-Gawl. 的干燥块根；多效唑对照品（纯度≥ 95%，批号：Q21M9F61825，上海源叶生物科技有限公司）；鲁斯可皂苷元（纯度≥ 98%，批号：111909-201906，中国食品药品检定研究院）；橙皮苷（纯度≥ 98%，批号：K09S11L123847，上海源叶生物科技有限公司）；甲醇、乙腈、甲酸、异丙醇（均为质谱纯，美国 Thermo Fisher 公司）；水为超纯水，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 UPLC-MS/MS 快速测定麦冬中多效唑的残留

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取多效唑对照品适量，置 25 mL 量瓶中，用甲醇定容至刻度，配制成 1 μg • mL^{-1} 的多效唑对照品储备液，4 ℃冷藏待用。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取麦冬药材粉末 0.2 g，加 1.5 mL 异丙醇，超声提取 30 min（功率 50 kHz，100 W），13 000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液 1 mL，浓缩至干，加入 100 μL 50% 的甲醇复溶，13 000 r • min^{-1} 离心 10 min，取上清液，作为供试品溶液备用。

2.1.3 色谱和质谱条件 色谱柱：Waters Acquity UPLC BEH C_{18} 色谱柱（50 mm×2.1 mm，1.7 μm）；流动相：乙腈（A）-0.1% 的甲酸水溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 3 min：20% ～ 100%A；3 ～ 5 min：100%A；5.1 ～ 8 min：20%A），流速 0.2 mL • min^{-1}，柱温 30 ℃，进样量 10 μL。电喷雾正离子电离模式，多反应监测法测定，参数如下：气帘气（CUR）30 psi，离子源温度（TEM）500 ℃；锥孔电压（IS）5500 V；辅助气（GS1、GS2）50 psi。质谱采集参数见表 1，色谱图见图 1。

表 1　目标化合物质谱检测离子和采集参数

Tab 1　Spectrum acquisition parameters for target compound

参数	值
Q1	294.3
Q3	70.1
DP/V	120
CE/V	46
CXP/V	11

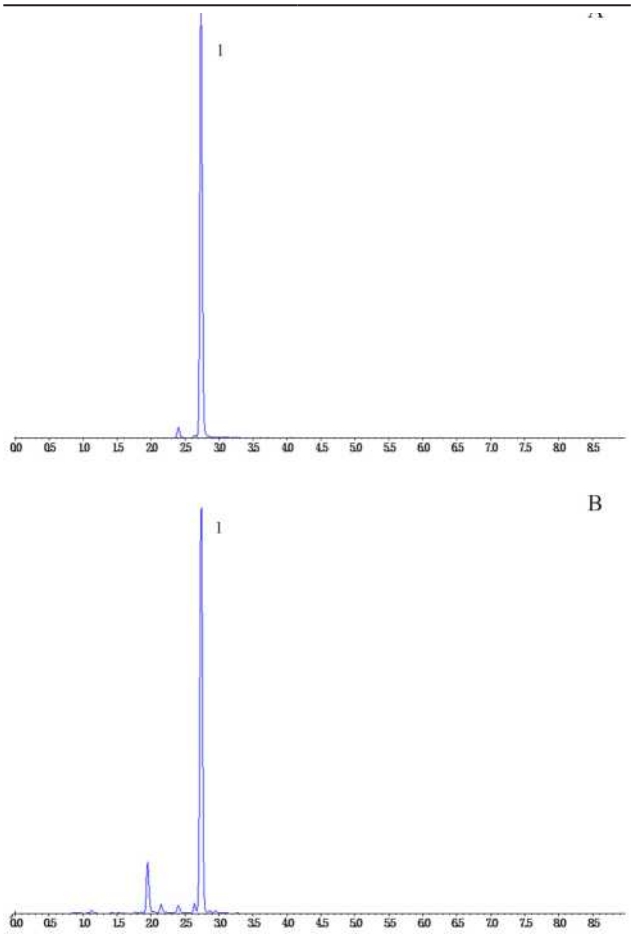


图 1　多效唑对照品（A）和麦冬样品（B）的 UPLC-MS/MS 色谱图

Fig 1　UPLC-MS/MS chromatograms of paclobutrazol（A）and Ophiopogonis Radix（B）

1. 多效唑（paclobutrazol）

2.1.4　线性关系考察　精密吸取多效唑对照品储备液，用 50% 甲醇稀释成质量浓度为 500、200、50、10、2、0.5、0.2 ng•mL^{-1}的多效唑对照品溶液，按“2.1.3”项下色谱条件测定。以多效唑对照品进样量（ng）为横坐标，定量离子对峰面积为纵坐标进行线性回归，得到多效唑的回归方程为 $Y = 87.02X + 5.354$（$r = 0.9973$）。结果表明，多效唑在 0.002 ～ 5 ng 与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.5　精密度试验　精密吸取多效唑对照品溶液 10 μL，按“2.1.3”项下色谱条件连续进样 6 次，记录对照品峰面积。结果多效唑峰面积的 *RSD* 值为 0.80%，表明仪器精密度良好。

2.1.6　稳定性试验　取 11 号麦冬药材样品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液。分别于 0、2、4、8、12、24 h 按“2.1.3”项下色谱条件测定。结果显示，多效唑峰面积的 *RSD* 值为 1.4%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.7　重复性试验　取 11 号麦冬药材样品，按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液。按“2.1.3”项下色谱条件测定，计算质量分数。结果显示，多效唑峰面积的 *RSD* 值为 1.1%，表明该方法重复性良好。

2.1.8　加样回收试验　取 11 号麦冬药材样品 6 份，每份约 0.1 g，精密称定，分别加入相当于供试品中多效唑含量 100% 的对照品。按“2.1.2”项下方法制备成供试品溶液，进样测定，并计算回收率和 *RSD* 值。结果多效唑平均回收率为 98.0%，*RSD* 值为 1.8%，表明该方法的加样回收率良好。

2.1.9　样品含量测定　取 16 批麦冬药材样品，按“2.1.2”项下方法制备成供试品溶液，按“2.1.3”项下色谱条件测定，计算各样品中多效唑的含量。结果见表 2，在四川栽培的麦冬药材样品中全部检测到多效唑的残留，而在湖南和上海的野生麦冬样品中均未检测到多效唑的残留。

表 2　麦冬样品中多效唑残留情况

Tab 2　Content of paclobutrazol in Ophiopogonis Radix

样品编号	产地	多效唑含量 /（mg • kg^{-1}）
1	四川绵阳三台县	0.006
2	四川绵阳三台县	0.012
3	四川绵阳三台县	0.013
4	四川绵阳三台县	0.015
5	四川绵阳	0.015
6	四川绵阳	0.015
7	四川绵阳	0.049
8	四川绵阳	0.016
9	四川绵阳	0.019
10	四川（万仕城 1 号）	0.007
11	四川（万仕城 2 号）	0.027
12	四川（代代为本特级）	0.005
13	四川（代代为本一级）	0.002
14	四川（代代为本一级）	0.014
15	湖南（野生）	未检出
16	上海（野生）	未检出

2.2　多效唑对麦冬整体化学成分的影响研究

2.2.1　供试品溶液的制备　采用 UPLC-QTOF-MS 植物代谢组学法初步研究多效唑施用与否对麦冬整体化学成分的影响，麦冬样品信息见表 3。

取麦冬药材样品粉末 0.2 g 于 15 mL 离心管中，加入 5 mL70% 甲醇溶液，超声提取 30 min，混匀，取 1 mL 超声提取液 12 000 r • min^{-1} 离心 15 min 后，取上清液备用。另等量吸取各供试品溶液 100 μL，混匀，制成质量控制（quality control，QC）样品，用于监测分析系统和方法的稳定性。

表 3　施用不同浓度多效唑的麦冬样品信息

Tab 3　Information of Ophiopogonis Radix samples treated with different concentrations of paclobutrazol

样品编号	多效唑施用量 /（g • m^{-2}）
D0	0
D1	1.0
D2	4.0
D3	8.0

2.2.2　检测条件　色谱条件：Waters ACQUITY BEH C_{18} 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm），流动相为 0.1% 的甲酸水溶液（A）-0.1% 的甲酸乙腈溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 5 min，2% ～ 40%B；5 ～ 17 min，40% ～ 98%B；17 ～ 20 min，98%B；20.1 ～ 21 min，2%B），流速为 0.3 mL • min^{-1}，柱温 40 ℃，进样量 2.0 μL。质谱条件：离子源为电喷雾（electrospray ionization，ESI）源；采用 MS^E 负离子扫描模式，毛细管电压 2.0 kV，离子源温度 120 ℃，脱溶剂气温度 450 ℃，脱溶剂气流速 800 L • h^{-1}，锥孔电压 40 V，锥孔气流速 50 L • h^{-1}，采集模式质量范围 *m/z* 50 ～ 1500，扫描时间 0.2 s，高能通道碰撞电压 10 ～ 75 V，亮氨酸 - 脑啡肽 *m/z* 556.2615$[M-H]^-$作质量实时校正。

2.2.3　数据采集与分析

① 数据采集：分析样品前测试空白溶剂样品，扣除色谱柱和系统中的残留污染干扰。连续进样 10 次 QC 样品，待仪器检测稳定后，进行实际样品检测。实际样品随机排列，并按采样数量等间隔插入 QC 样品。

② 数据分析：将 LC-MS 的原始数据导入 Progenesis QI 软件（Version 2.0，Waters）进行预处理，得到包含保留时间、质荷比和峰强度的二维数据矩阵，保存为 .csv 格式，MetaboAnalyst 4.0（https：//www.metaboanalyst.ca）网站有监督的偏最小二乘判别分析（partial least square discriminant analysis，PLS-DA），通过多元统计分析判断多效唑施用对麦冬整体化学成分的影响。多元统计分析结果见图 2，结果中清水对照组麦冬与多效唑不同浓度的麦冬分布在不同区域，可见，施用多效唑对麦冬整体化学成分存在显著的影响。

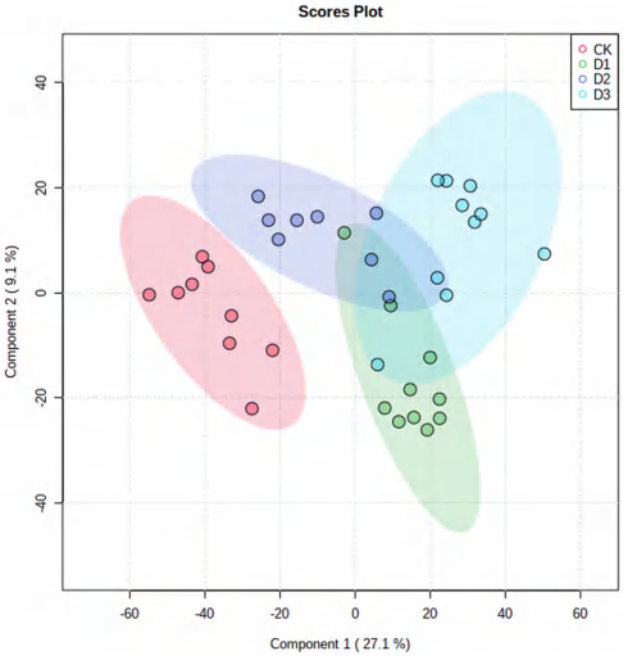


图 2　多效唑对麦冬整体化学成分影响的多元统计分析（PLS-DA）

Fig 2　Multivariate statistical analysis of the effect of paclobutrazol on the whole chemical constituents of Ophiopogonis Radix（PLS-DA）

2.3　多效唑对麦冬总皂苷和总黄酮的影响

采用紫外分光光度法对“2.2.1”项下的麦冬药材进行总皂苷和总黄酮的含量测定，分析多效唑施用对麦冬总皂苷和总黄酮的影响。总皂苷样品制备及检测方法参照 2020 年版《中国药典》，总黄酮样品制备及检测方法参考文献报道 [6]，采用橙皮苷为对照品进行测定。结果见表 5，施用多效唑后麦冬总黄酮含量明显降低，而麦冬总皂苷含量无变化。

表 5　多效唑施用量对麦冬总皂苷、总黄酮的影响 (n = 3)

Tab 5　Effect of paclobutrazol on total saponins and flavonoids of Ophiopogonis Radix (n = 3)

样品编号	总皂苷含量 /%	总黄酮含量 /%
D0	0.40	0.021
D1	0.40	0.014
D2	0.40	0.014
D3	0.40	0.014

3　讨论

3.1　测定方法的考察

本研究前期采用液相方法检测麦冬药材中多效唑残留情况，发现色谱峰无法准确定量，故选择采用质谱仪建立麦冬多效唑残留的检测方法。考察了甲醇、80% 甲醇、异丙醇 3 种不同提取溶剂对麦冬中多效唑残留提取效率的影响，结

果发现异丙醇提取效率最高，故提取溶剂选择异丙醇。多效唑残留在果蔬和土壤中的检测报道较多，近几年，中药材尤其是川麦冬中多效唑残留检测方法研究增多，大都采用液相色谱 - 质谱联用方法。由于样品中多效唑残留量较低，文献报道的麦冬多效唑检测方法多采用液液萃取法和 QuEChERS 法提取 [7-8]，方法复杂，且耗时长。本研究采用异丙醇为溶剂，直接超声提取，浓缩富集后测定，方法更加简便、快捷。

3.2　麦冬药材中多效唑残留分析

多效唑是一种三唑类植物生长调节剂，20 世纪 80 年代研制出后被广泛用于块根类植物增产，其机制是通过抑制植物内源性激素赤霉素的合成提高植物组织中吲哚乙酸氧化酶活性，从而减弱植物顶端分裂活性，促进植物块根形成 [9]。多效唑具有低毒性，人体每日允许摄入量为 0.1 $mg \cdot kg^{-1}$，我国规定部分果蔬中多效唑检出限量为 0.05 $mg \cdot kg^{-1}$[10-11]。中药材中尚无相关限量标准，据报道，多效唑施用后在土壤中残留情况较为严重，残留年限可达 2 年，对土壤微生物及后茬作物均有影响 [12-14]。因此，加快建立中药材多效唑残留限量标准，对中药材安全性控制和土壤环境安全保护均有一定的价值。本研究检测结果中四川麦冬栽培品普遍可检出多效唑残留，残留量在 0.002 ～ 0.05 $mg \cdot kg^{-1}$，而湖南和上海的野生麦冬则无多效唑残留检出。这说明，川麦冬药材栽培品施用多效唑情况较为普遍，药材种植过程中多效唑施用量各不相同。据文献报道，川麦冬种植过程存在多效唑滥用情况，有学者采用质谱法测定了 60 批川麦冬中 108 种植物生长激素残留，其中多效唑检出率高达 100%，检出质量浓度在 0.004 18 ～ 0.0639 $mg \cdot kg^{-1}$，在 108 种激素中施用情况最为严重 [15]。也有学者采用 QuEChERS 提取与反相色谱 - 质谱联用方法测定麦冬药材中多效唑和烯效唑的残留，在 33 批药材样品中多效唑的检出率为 94%，而烯效唑的检出率仅为 27%，多效唑残留量在 0.02 ～ 0.208 $mg \cdot kg^{-1}$[7]。本研究结果与文献报道具有高度一致性。因此，本研究建立的快速测定麦冬多效唑残留的方法可为中药材生长调节剂限量评估提供研究基础，为国家监管部门形成针对中药材生长激素残留限量的标准提供一定参考。

3.3　施用多效唑对麦冬成分的影响

本试验通过 UPLC-QTOF-MS 植物代谢组学技术和多元统计分析方法研究多效唑施用对麦冬整体化学成分的影响，发现多效唑施用后对麦冬的化学成分存在影响，通过测定麦冬总皂苷、总黄酮的含量，初步判断施用多效唑后麦冬总黄酮含量下降。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：162-163.

[2] 彭婉，马骁，王建，等 . 麦冬化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药，2018，49（2）：477-488.

[3] 余翠翠，王晖，隋春，等 . 四川三台麦冬产区生长调节剂使用情况调研及残留研究 [J]. 中国现代中药，2019，21（12）：1669-1674.

[4] 许艳秋，王广成，高立明，等 . 麦冬种植中植物生长调节剂使用情况、残留现状及其影响概述 [J/OL]. 农药学学报，https：//doi. org/10.16801/j. issn. 1008-7303. 2021.0121.

[5] 雷飞益，杨正明，张亚琴，等 . 基于多效唑减量和川麦冬优质高产的施肥量研究 [J]. 植物营养与肥料学报，2019，25（6）：1064-1072.

[6] 魏明 . 麦冬提取物中总黄酮的含量测定 [J]. 中国医药科学，2015，5（9）：58-59，66.

[7] 翟宇瑶，段万里，申国安，等 . QuEChERS- 反相高效液相色谱 - 串联质谱法测定麦冬中多效唑、烯效唑 [J]. 现代药物与临床，2019，34（3）：591-595.

[8] 苟琰，高驰，邓晶晶，等 . QuEChERS 结合 GC-MS/MS- 内标法测定川麦冬中多效唑残留量 [J]. 中国药房，2019，30（3）：323-327.

[9] 陶玲，李红彦，陈华林，等 . 基于药材性状、产量及有效成分含量综合评价多效唑对麦冬质量的影响 [J]. 中药材，2019，42（10）：2231-2234.

[10] 马晨，张群，段云，等 . 荔枝上植物生长调节剂使用与残留现状分析 [J]. 热带农业科学，2019，39（4）：67-75.

[11] 李典晏，褚能明，张雪梅，等 . 烯效唑、多效唑在果蔬中的残留限量及检测技术研究进展 [J]. 南方农业，2019，13（1）：92-95.

[12] 赵锋，李光耀，黄璐璐，等 . 多效唑在花生和土壤中的残留分析及消解动态 [J]. 南方农业学报，2017，48（8）：1421-1426.

[13] 黄琦，黄战威，陈振威，等 . 气相色谱 - 质谱法快速检测芒果园土壤中多效唑 [J]. 南方农业学报，2015，46（6）：1042-1046.

[14] 王娟，胡西洲 . 气相色谱 - 串联质谱法测定土壤中多效唑农药残留 [J]. 安徽农业科学，2015，43（18）：135-136.

[15] 李瑞珥 . 麦冬中农药残留风险评估及多效唑对其品质影响研究 [D]. 北京：中国农业科学院，2020.

（收稿日期：2021-12-09；修回日期：2022-03-09）

甘肃黄芪种植区根际土壤固氮细菌群落结构特征及多样性考察

牟建平[1, 2]，滕宝霞[1, 2*]，史中飞[1, 2]，马尚贤[3]，贺晓文[1, 2]，赖晶[1, 2]，朱玲[1, 2]，肖静[1, 2]，曾小梅[1, 2]
（1. 甘肃省药品检验研究院，兰州　730060；2. 国家药监局中药材及饮片质量控制重点实验室，兰州　730060；3. 广河县人民医院，甘肃　临夏　731300）

摘要：目的　考察甘肃 6 个黄芪种植区黄芪根际土壤微生物固氮细菌群落结构特征。**方法**　采用高通量测序技术对 *nifH* 基因进行测序，分析黄芪根际土壤固氮细菌群落结构及多样性。**结果**　甘肃黄芪的 6 个种植区根际土壤固氮细菌分属于 2 个域、2 个界、7 个门、12 个纲、20 个目、28 个科、36 个属，共 51 个种，结构特征主要为变形菌门（Proteobacteria）和蓝藻菌门（Cyanobacteria），其中变形菌门为优势菌门，相对丰度在 74.3% ～ 98.3%。在纲分类水平上，陇西、漳县、渭源和通渭 4 个地区采集的样本中以 α- 变形菌纲为优势菌纲，相对丰度分别为 93.0%、85.4%、71.2% 和 97.2%；靖远采集的样本为 γ- 变形菌纲和 α- 变形菌纲，相对丰度为 56.6% 和 31.7%，宕昌采集的样本为 Unclassified-p-Proteobacteria 和 δ- 变形菌纲，相对丰度分别为 44.4% 和 30.3%。**结论**　甘肃 6 个黄芪种植区根际土壤中，靖远和宕昌根际土壤固氮细菌群落多样性和丰度与其他 4 个地区有明显的差异，宕昌的固氮细菌多样性和丰度差异性最大。

关键词：黄芪；根际土壤；*nifH* 基因；固氮细菌多样性；高通量测序
中图分类号：S154.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1574-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.017

Structural characteristics and diversity of rhizosphere soil nitrogen-fixing bacterial community in *Astragalus membranaceus* cultivation area in Gansu

MU Jian-ping[1, 2], TENG Bao-xia[1, 2*], SHI Zhong-fei[1, 2], MA Shang-xian[3], HE Xiao-wen[1, 2], LAI Jing[1, 2], ZHU Ling[1, 2], XIAO Jing[1, 2], ZENG Xiao-mei[1, 2] (1. *Gansu Institute for Drug Control*, *Lanzhou* 730060; 2. *NMPA Key Laboratory for Quality Control of Traditional Chinese Medicine and Prepared Slices*, *Lanzhou* 730060; 3. *Guanghe People's Hospital*, *Linxia Gansu* 731300)

Abstract: Objective To examine the structural characteristics of the rhizosphere soil microbial nitrogen-fixing bacterial community of *Astragalus membranaceus* in *Astragalus membranaceus* growing areas in Gansu. **Methods** The *nifH* gene was sequenced by high-throughput sequencing technology to determine the community structure and diversity of nitrogen-fixing bacteria in rhizosphere soil of *Astragalus membranaceus*. **Results** The rhizosphere soil nitrogen-fixing bacteria in the 6 cultivation areas of *Astragalus membranaceus* in Gansu fell under 2 domains, 2 kingdoms, 7 phyla, 12 orders, 20 classes, 28 families, 36 genera, and 51 species.Then structural characteristics were maily Proteobacteria and Cyanobacteria, of which Proteobacteria was the dominant phylum with relative abundance at 74.3% — 98.3%. At the phylum level, *A*lphaproteobacteria were the dominant phylum in the samples collected from Longxi, Zhangxian, Weiyuan and Tongwei, with relative abundance of 93.0%, 85.4%, 71.2%, and 97.2%, respectively; Gammaproteobacteria and Alphaproteobacteria were collected from Jingyuan, with relative abundance of 56.6% and 31.7%, respectively; samples from Dangchang were Unclassified-p-Proteobacteria and DeltaProteobacteria, with relative abundance of 44.4% and 30.3%, respectively.

基金项目：国家药监局中药材及饮片质量控制重点实验室项目（No.2020GSMPA-KL03）。
作者简介：牟建平，男，硕士，工程师，主要从事药品检验和相关方法研究工作，email：837506034@qq.com　*通信作者：滕宝霞，女，主任药师，主要从事药品检验和相关方法研究工作，email：Tengbx66@163.com

Conclusion Among the samples from 6 *Astragalus membranaceus* planting areas in Gansu, the diversity and abundance of nitrogen-fixing bacteria in rhizosphere soil of Jingyuan and Dangchang are significantly different from those in the other 4 areas, and the diversity and abundance of nitrogen-fixing bacteria in Dangchang are the highest.

Key words: *Astragalus membranaceus*; rhizosphere soil; *nifH* gene; nitrogen-fixing bacterial diversity; high-throughput sequencing

黄芪在我国广泛种植使用，多数中成药以黄芪作为君药。《中国药典》2020 年版一部收载黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus*（Fisch.）Bge.var. *mongholicus*（Bge.）Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus*（Fisch.）Bge. 的干燥根 [1]。黄芪药材的质量不仅与药材的基因型有关，还会受到特定生态环境的影响，根际微生物群落在植物和土壤之间发挥着重要作用，良好的根际微生物多样性能够维持土壤微生态的平衡，保证植株正常生长，土壤微生物作为评估土壤生态系统的重要指标，对植物生长具有重要意义 [2]。近年来对药用植物与根际微生物关系的研究得到了高度重视，不仅有助于分析并阐明药用植物与根际有益微生物及有害微生物相互作用的机制等基础理论 [3]，而且也有助于解决药用植物病害防治、连作障碍等生产实际问题，从而提高药用植物的产量和品质 [4]。本文基于高通量测序技术，测定了甘肃 6 个黄芪产区的黄芪根际土壤固氮菌多样性，分析根际土壤固氮菌群落结构和组成，为进一步分析根际固氮菌种群结构影响土壤养分释放和黄芪生长提供资料。

1　材料与方法

1.1　样本收集

选择甘肃省陇西县、漳县、靖远县、渭源县、通渭县和宕昌县 6 个黄芪广泛的种植区，均为蒙古黄芪，于黄芪开花生长时期，收集其根际土壤，先挖出根系，抖掉与根系松散结合的土壤，将与根系结合的土壤使用无菌刷子刷下来作为根际土壤，装入无菌封口袋，标记，采样信息见表 1。

表 1　样品采集信息

Tab 1　Sample collection information

样品编号	采集地点	经度	纬度	海拔 /m
LX	陇西县菜子镇	104° 28' 14"	35° 8' 42"	2153
ZX	漳县殪虎桥镇	104° 15' 6"	34° 47' 42"	2269
JY	靖远县北湾镇	104° 38' 42"	36° 34' 44"	1373
WY	渭源县会川镇	103° 58' 37"	35° 7' 11"	2235
TW	通渭县陇山镇	105° 40' 68"	35° 29' 8"	1986
TC	宕昌县南阳镇	104° 20' 21"	35° 55' 47"	2318

1.2　DNA 抽提和 PCR 扩增

根据 E.Z.N.A. soil DNA kit（Omega Bio-tek，Norcross，GA，U.S.）说明书进行微生物群落总 DNA 抽提，使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的提取质量，使用 NanoDrop2000 测定 DNA 浓度和纯度；固氮菌使用引物：*nifH* F（5'-AAAGGYGGWATCGGYAARTCCACCAC-3'）和 *nifH* R（5'-TTGTTSGCSGCRTACATSGCCATCAT-3'）进行 PCR 扩增，扩增程序如下：95 ℃预变性 3 min，40 个循环（95 ℃变性 30 s，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 45 s），然后 72 ℃稳定延伸 10 min，最后在 4 ℃进行保存（PCR 仪：ABI GeneAmp 9700 型）。PCR 反应体系为：5×FastPfu 缓冲液 4 μL，dNTPs（2.5 mmol • L^{-1}）2 μL，上下游引物（5 μmol • L^{-1}）各 0.8 μL，FastPfu DNA 聚合酶 0.4 μL，模板 DNA 10 ng，补足至 20 μL。每个样本 3 个重复。

1.3　IlluminaMiseq 测序

将同一样本的 PCR 产物混合后使用 2% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物，利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit（Axygen Biosciences，Union City，USA）进行回收产物纯化，2% 琼脂糖凝胶电泳检测，并用 Quantus Fluorometer（Promega，USA）对回收产物进行检测定量。使用 NEXTFLEX Rapid DNA-Seq Kit 进行建库。利用 Illumina 公司的 Miseq PE300/NovaSeq PE250 平台进行测序。

1.4　数据处理

使用 fastp（https：//github.com/OpenGene/fastp，version 0.20.0）软件对原始测序序列进行质控 [5]，使用 FLASH（http：//www.cbcb.umd.edu/software/flash，version 1.2.7）软件进行拼接 [6]；使用 UPARSE 软件（http：//drive5.com/uparse/，version 7.1）[3]，根据 97% 的相似度对序列进行 OTU 聚类并剔除嵌合体 [7-8]。利用 RDP classifier（http：//rdp.cme.msu.edu/，version 2.2）对每条序列进行物种分类注释 [9]，比对 Silva 16S rRNA 数据库（v138），设置比对阈值为 70%。

2　结果与分析

2.1　序列统计和微生物多样性分析

通过对样品高通量数据统计，甘肃 6 个黄芪种植区样品（LX、ZX、JY、WY、TW、TC）的 *nifH* 基因测序分别得到 17 047、20 428、15 599、19 898、12 494、15 854 条序列；从稀释曲线（见图 1）可以看出，6 个黄芪种植地区样品的稀释曲线均趋于平缓，说明测序趋于饱和，取样基本合理，能够比较真实地反映出这 6 个地区土壤样品中的固氮菌微生物群落，结合各样品覆盖率，覆盖度均高于 99%，测序结果包含了大多数固氮菌微生物类群，能够反应固氮菌微生物群落结构组成。ACE 指数、Chao 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数代表了菌群的丰度和微生物多样性，从表 2 可以看出，TC 固氮菌的 ACE 指数、Chao 指数和 Shannon 指数最大，说明 TC 黄芪根际土壤固氮菌群落丰富度和多样性高于其他样本。

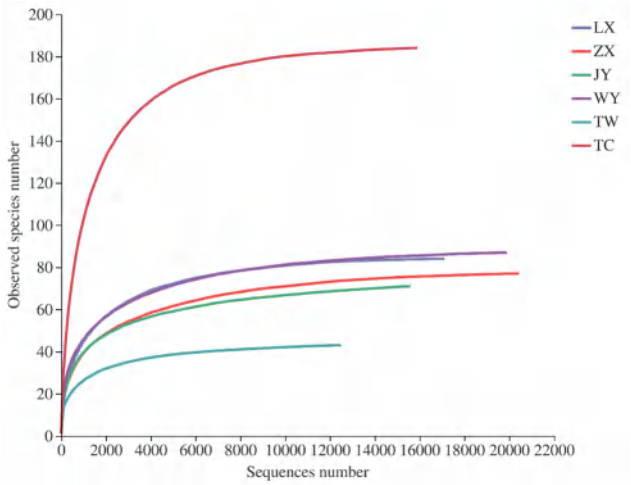


图 1　固氮菌多样性指数稀释曲线图

Fig 1　Dilution curve of nitrogen-fixing bacterial diversity index

表 2　不同黄芪种植地区土壤固氮菌多样性指数分析

Tab 2　Diversity index of soil nitrogen-fixing bacteria in different *Astragalus membranaceus* planting areas

样品	Shannon 指数	Simpson 指数	ACE 指数	Chao 指数	覆盖度 /%
WY	2.5427	0.1302	88.703	87.6	99.98
LX	2.2575	0.1968	84.629	84.1	99.99
TW	2.0419	0.1943	45.034	44.5	99.97
TC	2.7987	0.1919	185.618	185.5	99.96
ZX	2.2908	0.1858	78.606	77.6	99.98
JY	1.8843	0.3355	76.157	74.5	99.95

2.2　土壤细菌群落结构分析

6 个甘肃黄芪种植区域根际土壤中固氮细菌分属于 2 个域、2 个界、7 个门、12 个纲、20 个目、28 个科、36 个属，共 51 个种。6 个不同地区根际土壤中固氮菌的分布情况见表 3。

表 3　不同种植区土壤根际固氮菌在分类水平上的物种分布

Tab 3　Species distribution of rhizosphere nitrogen-fixing bacteria in different planting areas

样品	域	界	门	纲	目	科	属	种
LX	2	2	6	11	14	16	18	21
ZX	2	2	6	10	14	15	19	23
JY	1	1	5	9	13	15	19	22
WY	1	1	4	7	12	15	21	27
TW	2	2	4	7	10	12	13	16
TC	2	2	7	12	18	24	30	37

甘肃黄芪的 6 个种植区其根际土壤固氮菌群落在门类水平上主要类群为变形菌门（Proteobacteria）和蓝藻菌门（Cyanobacteria）。其中变形菌门的相对丰度分别为 LX（97.2%）、ZX（86.8%）、JY（98.3%）、WY（74.3%）、TW（98.0%）和 TC（91.1%）；蓝藻菌门的相对丰度分别为 LX（0.2%）、ZX（12.8%）、JY（0.4%）、WY（25.4%）、TW（1.8%）和 TC（2.0%）；6 个种植区的优势菌门均为变形菌门，其中 3 个地区 ZX、WY 和 TW 的第二优势菌门为蓝藻门，其他 3 个地区以未知菌门 Unclassified-k-norank-d-Bacteria 为第二优势菌门，见图 2。

由图 3 可知，甘肃黄芪的 6 个种植区其根际土壤固氮细菌群落在纲类水平上主要类群为 *α*- 变形菌纲（Alphaproteobacteria）、*γ*- 变形菌纲（Gammaproteobacteria）、Unclassified-p-Proteobacteria 和 *δ*- 变形菌纲（DeltaProteobacteria）等，在 6 个种植区中 LX、ZX、WY 和 TW 4 个地区的优势菌纲均为 *α*- 变形菌纲，相对丰度分别为 93.0%、85.4%、71.2% 和 97.2%；JY 的优势菌纲为 *γ*- 变形菌纲和 *α*- 变形菌纲，相对丰度为 56.6% 和 31.7%，TC 的优势菌纲为未知的 Unclassified-p-Proteobacteria 和 *δ*- 变形菌纲（DeltaProteobacteria），相对丰度为 44.4% 和 30.3%。

由图 4 可知，甘肃 6 个主要的黄芪种植区黄芪根际土壤固氮细菌群落在属水平上包括斯科曼氏球菌属（*Skermanella*）、念珠藻属（*Nostoc*）、地杆菌属（*Geobacter*）、氮氢单胞菌属（*Azohydromonas*）、*Unclassified-c-Gammaproteobacteria*、*Unclassified-p-Proteobacteria*、*Unclassified-k-norank-d-Bacteria*、*Unclassified-c-Alphaproteobacteria*、*Unclassified-f-Rhodospirillaceae*、*Unclassified-Opitutaceae* 等，相对丰度最高的菌属为斯科曼氏球菌属（*Skermanella*），4 个种植区 LX、ZX、WY 和 TW 的占比均在 75% 以上，JY 以未知属 *Unclassified-k-norank-d-Bacteria* 为优势菌，TC 以未知菌属 *Unclassified-p-proteobacteria*

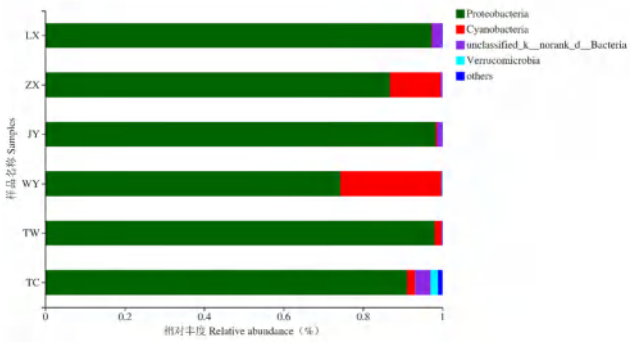


图 2　门水平的优势固氮菌相对丰度

Fig 2　Relative abundance of dominant nitrogen-fixing bacteria at the phylum level

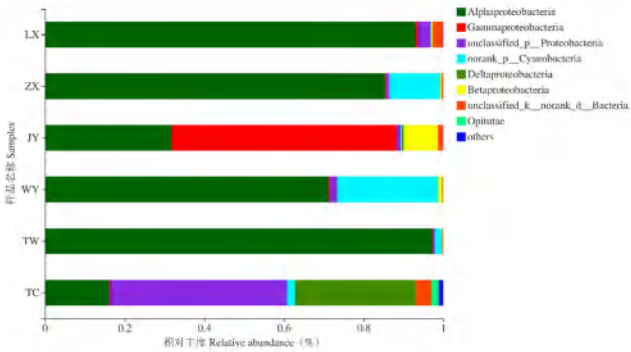


图 3　纲水平的优势固氮菌相对丰度

Fig 3　Relative abundance of dominant nitrogen-fixing bacteria at the class level

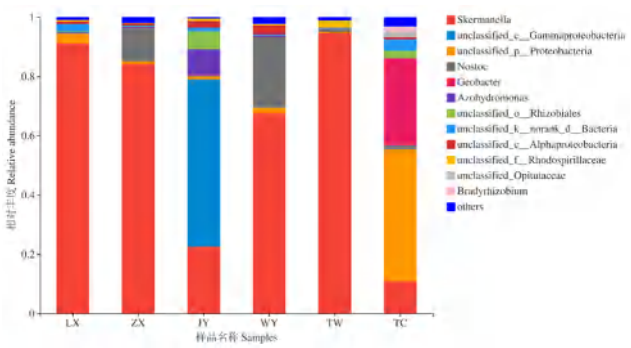


图 4　属水平的优势固氮菌相对丰度

Fig 4　Relative abundance of dominant nitrogen-fixing bacteria at the genus level

为优势菌。其中，LX 的优势菌为斯科曼氏球菌属（*Skermanella*，91.1%）、*Unclassified-p-Proteobacteria* 属（3.2%）　和 *Unclassified-f-Rhodospirillaceae* 属（2.5%）；ZX 的优势菌为斯科曼氏球菌属（*Skermanella*，84.1%）和念珠藻属（*Nostoc*，11.3%）；JY 的优势菌为 *Unclassified-c-Gammaproteobacteria*（56.4%）、斯科曼氏球菌属（*Skermanella*，22.5%）和氮氢单胞菌属（*Azohydromonas*，8.6%）；WY 优势菌为斯科曼氏球菌属（*Skermanella*，67.5%）、念珠藻属（*Nostoc*，23.9%）和 *Unclassified-c-Alphaproteobacteria* 属（3.0%）；TW 的优势菌为斯科曼氏球菌属（*Skermanella*，94.5%）和 *Unclassified-f-Rhodospirillaceae* 属（2.5%）；TC 优势菌为 *Unclassified-p-proteobacteria* 属（44.4%）、地杆菌属（*Geobacter*，29.4%）和斯科曼氏球菌属（*Skermanella*，10.9%）。

2.3　固氮菌群落的相关性分析

根际土壤微生物的 OTU 韦恩图，LX、ZX、JY、WY、TW、TC 土壤样本中分别检测到固氮菌 84、77、71、87、43 和 184 个 OTU，其中共有的 OTU 为 12 个，特有的 OTU 依次为 23、16、31、23、6 和 135 个，见图 5。

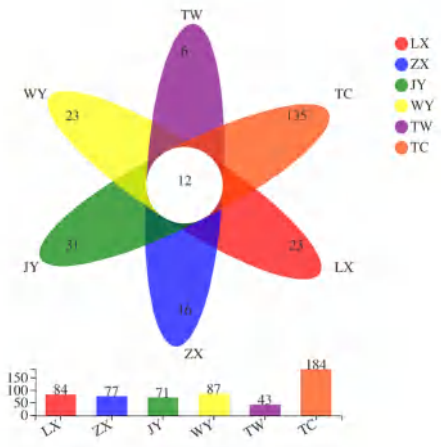


图 5　根际土壤固氮菌 OTU venn 图

Fig 5　OTU venn diagram of rhizosphere soil nitrogen-fixing bacteria

根际土壤微生物的属水平韦恩图，LX、ZX、JY、WY、TW、TC 土壤样本中分别检测到固氮菌 18、19、19、21、13 和 30 个属，其中共有的属为 8 个，TC 特有的属为 6 个，WY 和 JY 特有的属各有 1 个，其余 3 个地区为 0 个，见图 6。

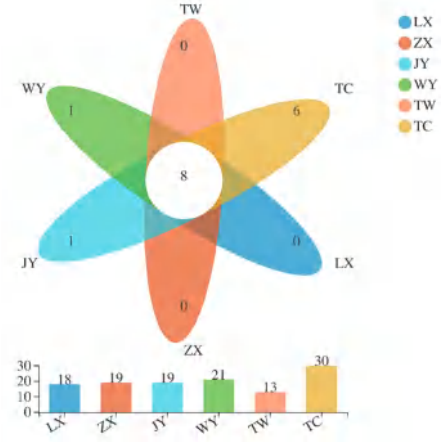


图 6　根际土壤固氮菌属水平 venn 图

Fig 6　Genus venn diagram of rhizosphere soil nitrogen-fixing bacteria

2.4　基于种水平的主坐标分析

分析 6 个不同黄芪种植地区根际土壤微生物群落组成，分别对根际土壤样品的种水平的固氮菌群落进行主坐标分析。不同种植区分散或聚集的分布情况，结果见图 7。6 个不同黄芪种植区根际土壤固氮菌主要在 PC1（贡献率为 74.55%）上分离，其中 JY 和 TC 两个黄芪种植地区的固氮菌群落结构组成与其他 4 个地区的差异较大。

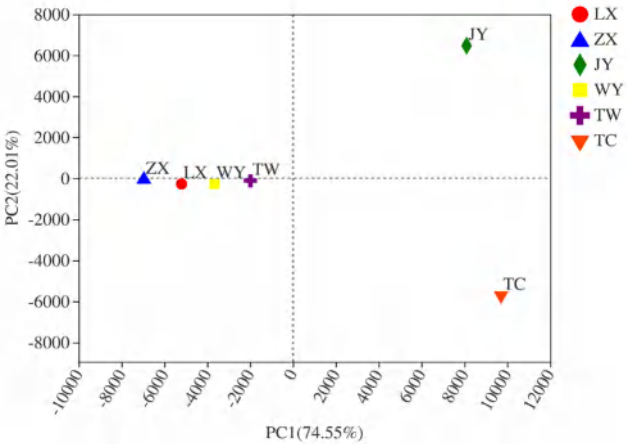


图 7　根际土壤中细菌群落主成分分析图

Fig 7　Principal component analysis of nitrogen-fixing bacterial community in rhizosphere soil

3　讨论

豆科作物根际固氮细菌种类丰富 [10]，生物固氮是豆科植物的一个重要特性，通过生物固氮可以利用自然界的氮气提高中药材的氮素供应需求，从而有效地避免因不合理的人工施肥对黄芪等豆科中药材质量的不利影响 [11]。相关研究表明，固氮菌能够固氮是因为其体内含有一种具有特殊功能的蛋白质固氮酶，能够大量定殖在植物组织内部，固定的氮可以直接被植物吸收和利用 [12]；固氮菌能够产生植物激素类物质，如分泌刺激植物生长的激素类物质吲哚乙酸、细胞分裂素等 [13]；固氮菌还具有促进植物根际的生理变化和对植物病害的防治作用 [12]。

甘肃黄芪的 6 个主要种植区的根际土壤固氮细菌群落在门类水平上主要类群为变形菌门和蓝藻菌门，优势菌群均为变形菌门，变形菌门可以通过同化根系分泌物中的碳水化合物，为自身生长提供碳源，结果变形菌门相对丰度最高，说明这类固氮细菌可以利用根系土中的碳源并与黄芪形成一定的共生关系，促进蒙古黄芪的生长 [14]。对 6 个地区采集的样本的结果比较发现，在靖远县和宕昌县采集的样本中微生物群落结构与其他 4 个地区的差异较大，靖远县海拔较其他地区低，而宕昌县的土壤以暗棕壤、黑钙土、红褐土、高山草甸土为主，属湿凉半干旱和温寒半湿润区，固氮细菌的群落差异可能与海拔、土壤类型及气候特点相关。生物固氮菌的应用可以显著提高豆科类中药材的质量，利用豆类植物与根瘤菌的共生固氮效应满足黄芪对氮素的需求，对提高药材质量以及生态的发展可持续性具有重要意义 [15-16]。

本文初步探讨甘肃黄芪种植根际土壤固氮细菌的群落结构和多样性，为黄芪根际固氮微生物调节土壤养分的策略，提升黄芪产量和药用成分的研究提供基础。从黄芪的品质与固氮菌的互作角度思考，筛选出能够提高黄芪品质的固氮微生物，优化黄芪种植生产的管理措施及施肥方式，平衡微生物固氮作用与施肥措施的高效协同作用，通过改变黄芪根系分泌物的组成，改善黄芪生长土壤的理化性质，提高黄芪的产量和品质，为黄芪的高效栽培和绿色种植提供一定的基础，提高黄芪的栽培经济效益 [17]。

参考文献

[1] 《中国药典》2020 年版 . 一部 [S]. 2020：315-316 .

[2] 彭政，郭秀芝，徐扬，等 . 药用植物与根际微生物互作的研究进展与展望 [J]. 中国中药杂志，2020，45（9）：2023-2030.

[3] 肖艳红，李菁，刘祝祥，等 . 药用植物根际微生物研究进展 [J]. 中草药，2013，44（4）：497-504.

[4] 孙海峰，康宝玲，高彦云，等 . 基于 ARISA 指纹图谱技术的浑源黄芪根际微生物菌群特征剖析 [J]. 中草药，2016，47（12）：2157-2162.

[5] Chen S，Zhou Y，Chen Y，et al. Fastp：an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor [J]. Bioinformatics，2018，34（17）：i884-i890.

[6] Magoč T，Salzberg SL. FLASH：fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. Bioinformatics，2011，27（21）：2957-2963.

[7] Edgar RC. UPARSE：highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nat Methods，2013，10（10）：996-998.

[8] StackebrandtE，Goebel BM. Taxonomic note：a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology [J]. Int J Syst Bacteriol，1994，44（4）：846-849.

[9] Wang Q，Garrity GM，Tiedje JM，et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy [J]. Appl Environ Microbiol，2007，73（16）：5261-5267.

[10] 童帅 . 水稻、小麦内生固氮菌固氮酶 nifH 基因多样性及其活性研究 [D]. 北京：中国农业科学院，2020.

[11] 黄荣韶，玉永雄，胡艳，等 . 接种根瘤菌对鸡骨草幼苗生长、结瘤和固氮能力的影响 [J]. 广西农业生物科学，2006（3）：252-255.

[12] 王玉虎，赵明敏，郑红丽 . 植物内生固氮菌及其固氮机理研究进展 [J]. 生物技术进展，2022，12（1）：17-26.
[13] 孙苗苗，刁治民，王恒生 . 禾草内生固氮菌的研究现状及应用前景 [J]. 青海草业，2013，22（1）：35-41.
[14] 李冰圳，李国斌，苏优拉，等 . 蒙古黄芪不同生育期黄酮类成分积累及其根际微生物多样性研究 [J]. 西北植物学报，2020，40（5）：828-837.
[15] 唐凯，高晓丹，贾丽娟，等 . 浑善达克沙地生物土壤结皮及其下层土壤中固氮细菌群落结构和多样性 [J]. 微生物学通报，2018，45（2）：293-301.
[16] 郑超，刘扬，陶羽，等 . 中央戈壁石下生物土壤结皮固氮细菌群落结构和多样性 [J/OL]. 微生物学通报，2021，48（6）：1920-1929.
[17] 冯晓敏，杨永，胡跃高，等 . 豆科 ‖ 燕麦对作物根际土壤固氮微生物的影响 [A]// 2018 中国作物学会学术年会论文摘要集 [C]. 中国作物学会，2018.

（收稿日期：2022-03-19；修回日期：2022-05-31）

热毒宁注射液速发型过敏反应机制研究

袁东琴[1, 2]，姜康[3]，张宇[1]，李冬[1, 2]，贺佳敏[1, 2]，范广俊[1, 2]，孙娜[1*]（1.大连医科大学附属第二医院药学部，辽宁　大连　116023；2.大连医科大学药学院，辽宁　大连　116044；3.复旦大学附属金山医院，上海　200540）

摘要：目的　探讨热毒宁注射液诱导的速发型过敏反应的特点，并初步探究其致敏机制。**方法**　以大鼠嗜碱性细胞白血病细胞（RBL-2H3）作为热毒宁注射液诱发速发型过敏反应的评价模型。采用中性红染色法观察致敏时细胞脱颗粒的形态变化，测定β-氨基己糖苷酶（β-hex）的释放率来反映细胞的脱颗粒程度，MTT 法评价致敏时的细胞活力；ELISA 法测定白介素 -4（IL-4）含量的变化，Fluo-3 AM Ca^{2+}荧光探针探究 Ca^{2+}荧光强度的变化。**结果**　热毒宁注射液可以引起 RBL-2H3 脱颗粒，剂量依赖性地增加细胞内β-hex 以及 IL-4 的释放率，但是对细胞活力并没有影响；同时，热毒宁注射液作用于 RBL-2H3 后，Fluo-3 AM Ca^{2+}荧光探针的荧光强度先增加后减弱，细胞内 Ca^{2+}浓度呈现先增加后减少的趋势。**结论**　热毒宁注射液通过调节细胞内 Ca^{2+}的浓度引起 RBL-2H3 脱颗粒，诱导β-hex 以及 IL-4 等相关炎性介质的产生，从而引发速发型过敏反应。

关键词：热毒宁注射液；大鼠嗜碱性细胞白血病细胞；脱颗粒；速发型过敏反应
中图分类号：R284　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1579-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.018

Mechanism of rapid allergic reaction induced by Reduning injection

YUAN Dong-qin[1, 2], JIANG Kang[3], ZHANG Yu[1], LI Dong[1, 2], HE Jia-min[1, 2], FAN Guang-jun[1, 2], SUN Na[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University*, *Dalian Liaoning* 116023; 2. *College of Pharmacy*, *Dalian Medical University*, *Dalian Liaoning* 116044; 3. *Jinshan Hospital Affiliated to Fudan University*, *Shanghai* 200540)

Abstract: Objective To determine the characteristics and allergy mechanism of rapid allergic reactions induced by Reduning injection. **Methods** Rat basophil leukemia cells (RBL-2H3) was used as the evaluation rat model of anaphylaxis induced by Reduning injection. Neutral red staining was used to observe the morphological changes in cell degranulation. The release rate of β-hexosaminidase（β-hex）was used to reflect the degranulation degree of the cells. The cell viability was evaluated by MTT assay. The content of IL-4 was measured by ELISA, and

基金项目：辽宁省科学技术计划项目（No.2019-ZD-0921）。
作者简介：袁东琴，女，硕士，主要从事临床药学工作，email：17806170363@163.com　*__通信作者：__孙娜，女，主管药师，主要从事药学工作，email：17709875898@163.com

the fluorescence intensity of Ca^{2+} was detected by Fluo-3 Am Ca^{2+} fluorescent probe. **Results** Reduning injection induced the degranulation of RBL-2H3, increased the release rate of *β*-hex and IL-4, but had no effect on the cell viability. When Reduning injection acted on RBL-2H3, the fluorescence intensity of Ca^{2+} increased first and then decreasd, indicating that the intracellular Ca^{2+} concentration increased first and then decreased. **Conclusion** Reduning injection can induce the degranulation of RBL-2H3 by regulating the concentration of intracellular Ca^{2+}, and induce the production of inflammatory mediators such as *β*-hex and IL-4, leading to rapid allergic reactions.

Key words: Reduning injection; rat basophil leukemia cells; degranulation; rapid allergic reactions

中药注射剂因起效快、生物利用度高，被广泛应用于临床治疗中，但是相关不良反应的报道也逐年增加。不良反应病例报告调查结果显示，中药注射剂引起的不良反应占中药引起的所有不良反应的 40% 以上 [1]，过敏反应是其中占比较高的一项不良反应 [2]。目前，中药注射剂的过敏反应已成为我国公众关注的主要问题之一，但是由于中药注射剂成分复杂，对于其引发的过敏反应的特点及其机制研究并没有形成统一的定论，因此，建立一种简单、可靠的方法来预测中药注射剂的过敏反应具有广泛应用前景。

热毒宁注射液是目前常用的一类清热解毒类中药注射液，由青蒿、金银花和栀子 3 味常用中药精制而成，具有清热、疏风、解毒的功效，临床主要用于治疗外感风热所致的感冒、咳嗽及急性支气管炎等 [3]，目前已将热毒宁注射液加入到新型冠状病毒肺炎（COVID-19）的诊疗方案中 [4]。

随着热毒宁注射液临床应用范围的扩大，有关不良反应的研究报道也逐渐增多。热毒宁注射液最常见的不良反应是过敏反应，临床表现主要为皮肤瘙痒和斑丘疹等，大多数不良反应发生在用药后 30 min 内 [5-6]；且血清免疫毒理学研究表明，热毒宁注射液过敏反应可能是由免疫球蛋白 E（IgE）介导的Ⅰ型过敏反应 [7]，但也有研究显示临床使用剂量下，热毒宁注射液及其主要成分绿原酸单次给药不会诱导大鼠嗜碱性粒细胞白血病细胞（RBL-2H3）释放组胺 [8]。因研究方法和手段的单一性导致热毒宁注射液过敏反应的研究并没有形成统一的定论，因此本研究以 RBL-2H3 作为评价模型，探讨热毒宁注射液对 RBL-2H3 的影响及其可能的致敏机制，为进一步的基础研究及临床安全用药提供参考。

1 材料

1.1 细胞和试药

RBL-2H3（武汉普诺赛生命科技有限公司）。热毒宁注射液（批号：200714，江苏康缘药业股份有限公司），钙离子载体 A23187（批号：128M4161M）、*β*- 氨基己糖苷酶（*β*-hex）底物溶液（批号：SLBR7548V）（美国 Sigma 公司），0.33% 中性红染料（批号：201904216，北京索莱宝科技有限公司），MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒（批号：SC122-01，北京赛文创新科技有限公司），大鼠白介素 4（IL-4）ELISA 试剂盒（批号：E-EL-R0014c，武汉伊莱瑞特生物科技有限公司），Fluo-3 AM Ca^{2+}荧光探针（批号：S1056，上海碧云天生物技术有限公司）。

1.2 仪器

CO_2 培养箱 MCO-20AIC（日本 Sanyo 公司），多功能酶标仪 SpectraMax190（美国 Molecular Devices 公司），倒置显微镜 DMI1（中国 Leica 公司），倒置荧光显微镜 Leica DMI8（德国徕卡公司）。

2 方法

2.1 细胞培养及分组

RBL-2H3 采用含 10% 胎牛血清、1% 青 - 链霉素双抗的 DMEM 培养基，于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养，传代比例为 1∶3，每 2 ～ 3 日传代一次。实验分组为：对照组（正常细胞未加药处理），热毒宁注射液（25、50、100、200 μL•mL^{-1}）处理组，阳性对照组（钙离子载体 A23187，1 μmol • L^{-1}）。

2.2 细胞脱颗粒

2.2.1 *β*-hex 释放率的测定　取对数期的 RBL-2H3，以 1×10^5/ 孔接种于 24 孔板孵育过夜，弃上清液，用 Tyrode’s buffer 溶液洗涤细胞两次，在室温下加入 Tyrode’s buffer 溶液、不同浓度的热毒宁注射液和 1% Triton X-100、钙离子载体 A23187 孵育 1 h，冰浴 10 min 终止反应，取 50 μL 上清液于 96 孔板中，同时加入 50 μL 的 *β*-hex 底物溶液孵育 1 h，加入 Na_2CO_3/$NaHCO_3$ 缓冲液，5 min 内于酶标仪上 405 nm 处检测各组 *OD* 值。

2.2.2　中性红染色　取“2.2.1”项下 24 孔板，用 Tyrode’s buffer 溶液洗涤细胞两次，加入中性红染色（0.33%）孵育 5 min，弃上清液，倒置显微镜下观察脱颗粒的 RBL-2H3 并拍照。

2.3　细胞活力测定

取对数期的 RBL-2H3，以 1×10^4/孔接种于 96 孔板孵育过夜，每孔加入不同浓度的热毒宁注射液孵育 1 h，每孔加入 20 μL MTT 工作液，孵育 4 h，弃上清液，加入 100 μL DMSO 孵育 15 min，待结晶全部溶解时于酶标仪上 570 nm 处检测各组 *OD* 值。

2.4　ELISA 法检测 IL-4 的释放量

取对数期的 RBL-2H3，以 1×10^6/孔接种于 6 孔板，孵育过夜，每孔加入 Tyrode’s buffer 溶液、不同浓度的热毒宁注射液和钙离子载体 A23187 孵育 1 h。使用 ELISA 试剂盒检测上清液中 IL-4 的含量。

2.5　细胞内 Ca^{2+}浓度测定

取对数期的 RBL-2H3，以 5×10^4/孔接种于 24孔板，孵育过夜，用 PBS 洗涤细胞两次，加入 3.5 mmol・L^{-1} Fluo-3 AM Ca^{2+}孵育 30 min，用 PBS 清洗两次，加入 1 mL PBS 孵育 20 min，热毒宁注射液在初始成像后 10 s 加入到孔中，在倒置荧光显微镜下拍摄不同时间（0、30、50、70、90 s）的荧光图片。

2.6　统计分析

所有计量资料均以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用 SPSS 20.0 统计学软件，组间比较采用单因素方差分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义；其中 Ca^{2+}相对荧光强度曲线运用 Image J 软件分析 90 s 内的细胞荧光图片，以 F/F_0 为纵坐标，绘制相对荧光强度变化曲线图。

3　结果

3.1　热毒宁注射液引起 RBL-2H3 脱颗粒

3.1.1　热毒宁注射液对 *β*-hex 释放的影响　如图 1 所示，与对照组相比，随着热毒宁注射液浓度的增加，*β*-hex 的释放率显著增加，且呈剂量依赖性，其中热毒宁注射液浓度在 100、200 μL・mL^{-1} 时，*β*-hex 的释放率分别为（17.39±2.464）%，（26.39±4.391）%（$P<0.01$）。由此可见，热毒宁注射液可剂量依赖性地引起 *β*-hex 的释放率增加。

3.1.2　RBL-2H3 脱颗粒后的细胞形态变化　如图 2 所示，用中性红染液对处理之后的细胞进行染色，从倒置显微镜中可以观察到，正常的 RBL-2H3 呈梭形，细胞膜完整（见图 2A）；而用热毒宁注射液处理的细胞出现脱颗粒现象（见图 2B），细胞体积变大，细胞膜破裂，细胞内有空泡产生；图 2C 为 1% Triton X-100 裂解的细胞，细胞已无清晰形态，细胞内颗粒变少，而细胞外可看到一些被染色的颗粒。

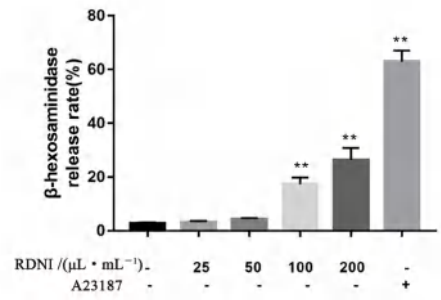


图 1　热毒宁注射液对 *β*-hex 释放率的影响

Fig 1　Effect of Reduning injection on the releasing rate of *β*-hex

注：与对照组比较，$^{**}P<0.01$。

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

3.2　热毒宁注射液对细胞活力的影响

采用 MTT 法检测热毒宁注射液对 RBL-2H3 活力的影响，结果如图 3 所示，热毒宁注射液在 25、50、100、200 μL・mL^{-1} 时，对细胞的活性无明显影响。

3.3　热毒宁注射液对 IL-4 释放的影响

如图 4 所示，随着热毒宁注射液浓度的增加，IL-4 的释放浓度与对照组相比显著增加，且呈剂量依赖性，其中热毒宁注射液浓度在 50、100、200 μL・mL^{-1} 时，IL-4 的释放浓度分别为（8.009±1.1）pg・mL^{-1}、（12.62±0.88）pg・mL^{-1}、（15.13±1.1）pg・mL^{-1}，与对照组比较差异均有统计学意义（$P<0.01$）。

3.4　热毒宁注射液对细胞内 Ca^{2+}的影响

从图 5 中，可以明显观察到，RBL-2H3 在不同浓度的热毒宁注射液作用下，细胞内荧光强度发生明显改变，在热毒宁注射液作用细胞 30 s 时，Ca^{2+}荧光强度明显增强，而随着作用时间的推移，Ca^{2+}荧光强度呈现降低的趋势。

运用 Image J 软件分析 90 s 内记录的各细胞荧光图片的荧光强度，以 F/F_0 为纵坐标，绘制 RBL-2H3 在热毒宁注射液作用下细胞的相对荧光强度变化曲线。如图 6 所示，细胞在作用 30 s 内有一定荧光强度增加的趋势，随着作用时间的推移，细胞的荧光强度开始逐渐降低，表明胞内 Ca^{2+}浓度在升高之后逐渐降低。

4　讨论

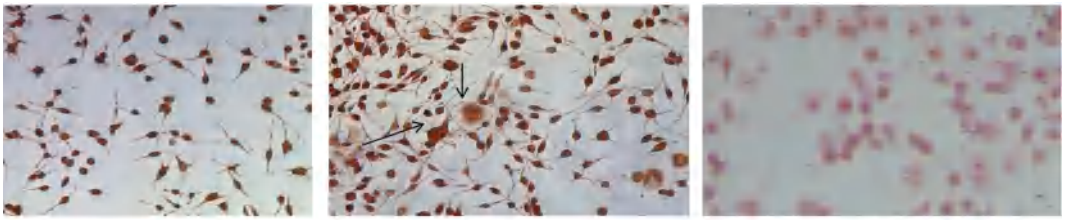


图 2　RBL-2H3 脱颗粒后的细胞形态变化（×10）

Fig 2　Morphological change of RBL-2H3 after degranulation（×10）

A. 正常的 RBL-2H3（normal RBL-2H3）；B. 200 μL • mL^{-1} 热毒宁注射液处理的细胞（RBL-2H3 treated with 200 μL • mL^{-1} Reduning injection）；C. 1% Triton X-100 裂解的细胞（RBL-2H3 treated with 1% Triton X-100）

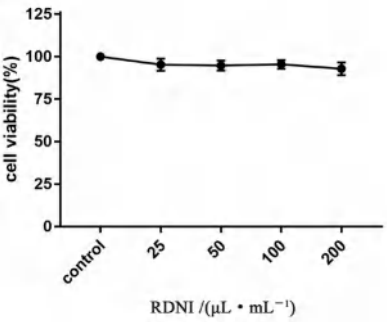


图 3　热毒宁注射液对细胞活力的影响

Fig 3　Effect of Reduning injection on cell viability

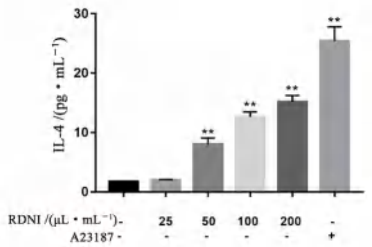


图 4　热毒宁注射液对 IL-4 释放的影响

Fig 4　Effect of Reduning injection on IL-4 release

注：与对照组比较，$^{**}P < 0.01$。

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

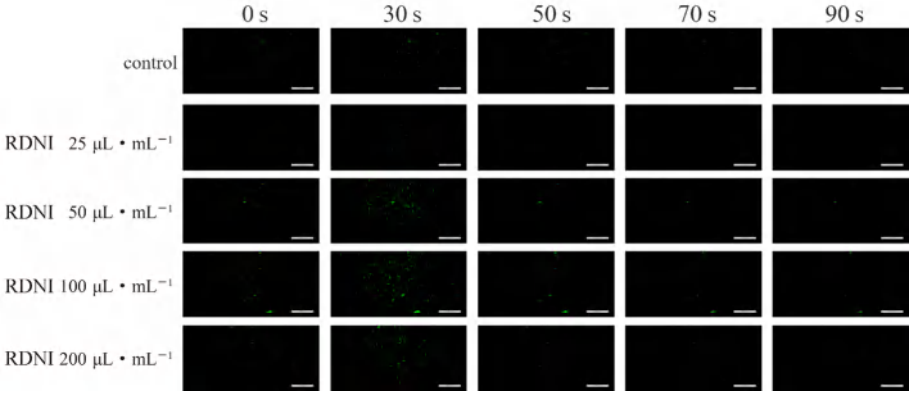


图 5　热毒宁注射液对 RBL-2H3 荧光强度的影响（×10）

Fig 5　Effect of Reduning injection on the fluorescence intensity of RBL-2H3（×10）

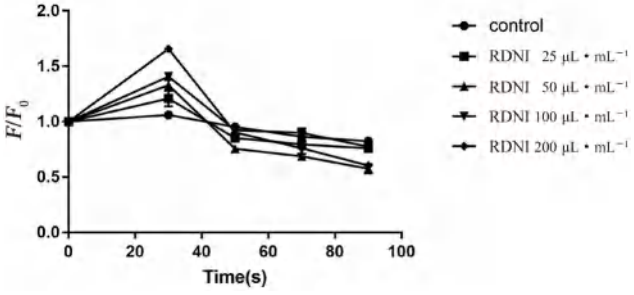


图 6　RBL-2H3 相对荧光强度变化曲线

Fig 6　Change curve of relative fluorescence intensity of RBL-2H3

中药注射剂诱发的过敏反应已引起广泛关注，虽然目前已有大量研究探索中药注射剂过敏反应的特点及其致敏机制，如有关双黄连注射液[9-10]、清开灵注射液[11]的研究，但是由于中药注射剂成分以及制备工艺等的复杂性，对于其引发的过敏反应的特点及其机制研究并没有形成统一的定论，目前通过检测相关炎性介质的含量变化，并深入探究其致敏机制已成为研究的趋势。

自从 1981 年以来，RBL-2H3 已被广泛用作肥大细胞模型，RBL-2H3 易培养且对 FcεRI 介导的机制具有特异性反应等特点[12]，近些年兴起的检测药物致敏性的体外模型[13]，为了探究热毒宁注射液引起的速发型过敏反应的特点及其机制，本研究选用 RBL-2H3 作为细胞模型，研究发现在用不同浓度的热毒宁注射液与 RBL-2H3 孵育 30 min，通过中性红染色可明显看出细胞出现脱

颗粒现象。脱颗粒是肥大细胞发生过敏反应时的重要现象，细胞脱颗粒之后，由中性红染色法或者甲苯胺蓝染色法可以明显看出细胞有空泡形成，由此可见，热毒宁注射液引起 RBL-2H3 脱颗粒，推断热毒宁注射液可能会引起速发型过敏反应。

同时选用过敏反应的重要标志物 β-hex、IL-4 作为释放介质的检测指标 [14]，对热毒宁注射液引发的速发型过敏反应进行综合评价。研究发现随着热毒宁注射液浓度的升高，β-hex 以及 IL-4 的释放率明显增加，且呈剂量依赖性。研究表明热毒宁注射液可引起 RBL-2H3 的脱颗粒，但是如果实验所设置的药物浓度对细胞有毒性作用，影响细胞的活力，同样会使细胞出现脱颗粒现象，为排除此影响因素，选用 MTT 法探究所设置浓度下热毒宁注射液对细胞活力的影响，研究表明在热毒宁注射液所设置浓度下对细胞活力并没有影响，进一步证实热毒宁注射液可引起 RBL-2H3 的脱颗粒，引发速发型过敏反应。

钙运动与肥大细胞脱颗粒的机制密切相关，当肥大细胞被激活时，细胞间 Ca^{2+}浓度增加，释放细胞质颗粒中包含的炎症介质，引起肥大细胞脱颗粒 [15]。本研究用 Fluo-3 AM Ca^{2+}荧光探针探究热毒宁注射液作用于 RBL-2H3 时，细胞内 Ca^{2+}浓度变化，结果细胞均在作用 30 s 内有一定荧光强度增加的趋势，随着作用时间的推移，细胞的荧光强度开始逐渐降低，表明胞内钙离子浓度在致敏 90 s 内逐渐升高之后逐渐降低，提示热毒宁注射液可能通过调节 Ca^{2+}内流而引起 RBL-2H3 的脱颗粒。

综上所述，热毒宁注射液可剂量依赖性地引起 RBL-2H3 脱颗粒，其机制可能是通过调节细胞内 Ca^{2+}浓度而发挥作用，本研究进一步证实了热毒宁注射液过敏反应患者的血清免疫毒理学研究结果，为探究热毒宁注射液诱发的速发型过敏反应提供一定的实验依据，其具体的作用机制，需要进一步深入研究。

参考文献

[1] Wang HN，Ye XH，Gao QB，et al. Pharmacovigilance in traditional Chinese medicine safety surveillance [J]. Pharmacoepidemiol Drug Safe，2009，1（5）：357-361.

[2] Liao X，Robinson N. Methodological approaches to developing and establishing the body of evidence on post-marketing Chinese medicine safety [J]. Chin J Integr Med，2013，19（7）：494-497.

[3] Zhang GP，Li YF，Chen TF，et al. Comparative study of the efficacy and pharmacokinetics of reduning injection and atomization inhalation [J]. Biomed Pharmacother，2019，118：109226.

[4] Wang YZ，Han LZ，Zhang W，et al. The curative effect of Reduning injection combined with Xuanfeibaidu formula on COVID-19：a protocol for systematic review and meta-analysis [J]. Medicine，2020，99（46）：e22830.

[5] 孙盼盼，张宁，刘艳霞 . 热毒宁注射液不良反应文献计量研究 [J]. 实用药物与临床，2019，22（2）：1193.

[6] 余舒乐，王梦雷，丁跃辉，等 . 2017 年江苏省 1452 例热毒宁注射液不良反应报告分析 [J]. 药物流行病学杂志，2019，28（12）：800-804.

[7] 常艳鹏，萧伟，谢雁鸣，等 . 热毒宁注射液过敏反应患者的血清免疫毒理学研究 [J]. 中医杂志，2014，55（14）：1234.

[8] 张雪莲，邓生林，侯杏桃，等 . 热毒宁注射液及所含绿原酸的致敏性研究 [J]. 西南国防医药，2017，27（3）：228-231.

[9] Han JY，Zhao Y，Zhang YS，et al. RhoA/ROCK signaling pathway mediates shuanghuanglian injection-induced pseudo-allergic reactions [J]. Front Pharmacol，2018，9：87.

[10] Zhang Q，Cai CK，Li J，et al. Baicalin and rutin are major constituents in Shuanghuanglian injection involving anaphylactoid reaction [J]. J Tradit Chin Med，2017，37（3）：412-420.

[11] Gao Y，Qi RJ，Zhang XY，et al. Qing-Kai-Ling injection induces immediate hypersensitivity reaction via the activation of anaphylatoxin C3 [J]. Front Pharmacol，2020，9（10）：1524.

[12] Falcone FH，Wan D，Barwary N，et al. RBL cells as models for in vitro studies of mast cells and basophils [J]. Immunol Rev，2018，282（1）：47-52.

[13] Muñoz-Cano R，Picado C，Valero A，et al. Mechanisms of anaphylaxis beyond IgE [J]. J Investig Allergol Clin Immunol，2016，26（2）：73-82.

[14] Lin YY，Wang J，Hou YJ，et al. Isosalvianolic acid C-induced pseudo-allergic reactions via the mast cell specific receptor MRGPRX2 [J]. Int Immunopharmacol，2019，71（71）：22-26.

[15] Zhao TT，Hu SL，Ma PY，et al. Neohesperidin suppresses IgE-mediated anaphylactic reactions and mast cell activation via Lyn-PLC-Ca^{2+} pathway [J]. Phytother Res，2019，33（8）：3-8.

（收稿日期：2022-01-02；修回日期：2022-02-18）

蒙药醋浸甘草对四氯化碳联合高脂饮食诱导的大鼠肝纤维化的改善作用

萨出拉[1, 2]，包书茵[1]，那生桑[3*]，奥乌力吉[1*]（1.内蒙古民族大学，内蒙古　通辽　028000；2. 内蒙古中蒙医药研究院，呼和浩特　010020；3. 内蒙古医科大学，呼和浩特　010059）

摘要：目的　探讨醋浸甘草对四氯化碳（CCl_4）联合高脂饮食诱导的大鼠肝纤维化的改善作用。**方法**　采用皮下注射 40% ～ 60% CCl_4 橄榄油溶液（0.3 mL/100 g）联合高脂饮食，持续 5 周，建立大鼠肝纤维化模型。造模结束后，大鼠分为醋浸甘草低剂量（0.8 g • kg^{-1}）、中剂量（2.5 g • kg^{-1}）、高剂量（5 g • kg^{-1}）给药组，阳性组 [秋水仙碱（1.5 mg • kg^{-1}）] 及醋液组（2 mL • kg^{-1}），连续给药 4 周。通过全自动化仪检测大鼠血清丙氨酸氨基转移酶（ALT）和天门冬氨酸氨基转氨酶（AST）水平，通过放射免疫分析法检测血清透明质酸（HA），采用酶联免疫法（ELISA）测定血清层粘连蛋白（LN）和Ⅲ型前胶原肽（PⅢP）水平；通过 HE 和 Masson 染色法观察肝组织病理学形态变化及免疫组化法检测肝组织细胞色素 CYP2E1 及转录因子 Nrf2 表达。**结果**　第 6 周时大鼠肝纤维化模型建立成功。与模型组相比，给药组的各检测指标 ALT、AST、HA、LA、PⅢP 及 CYP2E1、Nrf2 水平均有所降低（$P < 0.05$）；肝脏病理组织切片图片显示，阳性组和给药组（低、中、高）的肝纤维化明显减轻。**结论**　醋浸甘草对四氯化碳联合高脂饮食诱导的大鼠肝纤维化具有明显改善作用，并且高剂量组与阳性组疗效相近。

关键词：蒙药；醋浸甘草；四氯化碳；高脂饮食；肝纤维化
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1584-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.019

Effect of Mongolian vinegar soaked licorice on liver fibrosis induced by carbon tetrachloride combined with high fat diet in rats

SA Chu-la[1, 2], BAO Shu-yin[1], NA Sheng-sang[3*], AO Wu-li-ji[1*] (1. *Inner Mongolia Minzu University*, *Tongliao Inner Mongolia* 028000; 2. *Mongolian Medicine Research Institute of Inner Mongolia Autonomous Region*, *Hohhot* 010020; 3. *Inner Mongolia Medical University*, *Hohhot* 010059)

Abstract: Objective To determine the improve effect of vinegar soaked licorice on liver fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl_4) combined with high fat diet in rats. **Methods** Subcutaneous injection of 40% － 60% CCl_4 olive oil solution (0.3 mL/100 g) combined with a high fat diet was used for 5 weeks to establish the rat model with liver fibrosis. After the modeling, the rats were divided into a low dose (0. 8 g • kg^{-1}), a medium dose (2. 5 g • kg^{-1}), a high dose (5 g • kg^{-1}) group, a colchicine (1.5 mg • kg^{-1}) positive group, and a vinegar group (2 mL • kg^{-1}). The serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels in the rats were measured automatically. The serum hyaluronic acid (HA) was detected by radioimmunoassay, the serum laminin (LN) and procollagen type Ⅲ peptide (PⅢP) levels were measured by enzyme-linked immunoassay. Liver histopathological morphological changes were observed by HE and Masson staining, and expressions of cytochrome CYP2E1 and transcription factor Nrf2 were detected by

基金项目：内蒙古蒙药标准化项目（No. MB2019）；蒙医防治优势病种经典方药研发平台及质量体系建设和示范研究（No. 2018YFC1708200）。
作者简介：萨出拉，女，博士研究生，主要从事蒙药质量标准研究，email：1432177058@qq.com　*通信作者：那生桑，男，教授，主要从事蒙药质量标准及现代化研究，email：nasang56@sina.com；奥乌力吉，男，教授，主要从事质量标准及创新研发研究，email：wuliji@126.com

immunohistochemistry. **Results** The rat liver fibrosis model was established successfully at the 6th week. Compared with the model group, the levels of ALT, AST, HA, LA, PⅢP, CYP2E1 and Nrf2 of all the examined indexes in the dosing group were decreased ($P < 0.05$). As shown in the pictures of liver pathological tissue sections, the liver fibrosis was significantly alleviated in the positive group and the 3 administration groups. **Conclusion** Vinegar soaked licorice can significantly improve the liver fibrosis induced by carbon tetrachloride combined with high-fat diet in rats, and the effect of the high-dose group is similar to that of the positive group.

Key words: Mongolian medicine; vinegar soaked licorice; carbon tetrachloride; high-fat diet; liver fibrosis

肝纤维化主要表现为肝内细胞外基质增生或过度沉积，随着病情的发展演变为肝硬化，在此进程中及时介入治疗、去除刺激因素则可逆转肝纤维化的发展，因此通过抗纤维化来阻断肝硬化[1]。据文献报道甘草活性成分能够有效防治肝纤维化[2]，且国内对甘草酸代谢产物的研究成为热点。口服甘草酸后，由胆汁排泄进入肠道，一部分被排泄，另一部分甘草酸经肠道菌群作用水解为甘草次酸；甘草次酸经肠肝循环再次进入肝脏发挥药效。而患者肠道菌群混乱，甘草酸不能被正常水解，从而药效降低。因此，通过蒙药炮制甘草，将促进甘草次酸的水解，从而提高药效，可为研发有效治疗肝纤维化的药物奠定基础。

醋浸甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 或光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 的干燥根和根茎的炮制加工品；其具有抗炎、抗氧化、免疫调节、抗病毒及保肝作用等生物活性[3]。在老蒙医专著《蒙药医语》中记载“甘草主治肝硬化，颇有疗效”[4]，经了解关键技术在于独特的蒙医炮制；在《内蒙古蒙药炮制规范》地方标准已起草醋浸甘草质量标准草案。因本实验通过四氯化碳（CCl_4）联合高脂饮食诱导肝纤维化，初步验证蒙药醋浸甘草对肝纤维化改善作用。

1　材料

1.1　实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠（220 ～ 250 g）(上海斯莱克实验动物有限公司；动物合格证号：20170005049408)。在正常光周期环境中（昼夜交替 12 h），温度（24±2）℃，湿度（50±5）%，对大鼠供应正常饲料和饮用水，置于笼内适应性饲养 7 d。

1.2　试药

甘草药材（共 3 批次，批号：181113，甘肃岷县，批号：181210，新疆伊犁，批号：181211，内蒙古包头，均购自亳州康美中药城），经内蒙古医科大学药学院教授渠弼鉴定为豆科科植物甘草（*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.）的根，种植品，蒙药名希和日 - 额布斯。

CMC-Na、CCl_4（货号：30036328、10006464，国药集团）；橄榄油、白酒、食用醋（超市采购）；高脂饲料（货号：D12492，华雅思创生物有限公司）；秋水仙碱（货号：C90102-1g，上海吉至生化科技有限公司）；谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST），血清透明质酸（HA）、层粘连蛋白（LN）和Ⅲ型前胶原肽（PⅢP）检测试剂盒（ELK Biotechnology）；4% 多聚甲醛、Masson 三色染色液（武汉谷歌生物科技有限公司）；苏木精染液、伊红染液（珠海贝索生物技术有限公司）；封闭用羊血清、DAB 显色液（北京中杉金桥）；CYP2E1 抗体、NRF2 抗体（Affinity）；无水乙醇、二甲苯、中性树胶、戊巴比妥钠（国药集团）；Goat Anti-Rabbit IgG HRP（H ＋ L）二抗（货号：111-035-045，Jackson ImmunoResearch）。

1.3　仪器

分析天平（美国 OHAUS）；离心机（Eppendorf）；酶标仪（Thermo）；石蜡包埋机、冷却台（浙江科迪仪器设备）；石蜡切片机（Thermo scientific）；展片机、烤片机（天津天利航空机电）；恒温培养箱（上海精宏）；倒置显微镜（Olympus 公司）；雪花制冰机（雪科）；漩涡混合器（齐林贝尔）；烘箱（上海精宏）。

2　方法

2.1　甘草炮制方法与给药液的制备

2.1.1　甘草的炮制方法　取甘草药材，除去杂质，水浸泡 2 d，切厚片，干燥，食醋浸泡 1 d 冷透，趁湿加压蒸煮 20 h，干燥；用时碎成粉末；品名为醋浸甘草，在内蒙古蒙药炮制规范（2020 年版）载入。

2.1.2　醋浸甘草（给药液）制备　取醋浸甘草粉末（过三号筛）约 0.2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 70% 乙醇 100 mL，密塞，称定

重量，超声处理（功率 250 W，频率 40 kHz）30 min，放冷，再称定重量，用 70% 乙醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液；按照 2020 年版《中国药典》甘草项下的方法测定 3 批醋浸甘草含甘草次酸（$C_{30}H_{46}O_4$）含量为均不少于 0.90%。将炮制品粉碎，临用时用 0.5% CMC-Na 溶液研磨，制成一定黏度的混悬液，备用（灌胃）。

2.2　大鼠造模、分组及给药

2.2.1　大鼠肝纤维化造模　随机将大鼠分为 2 组，对照组（control）13 只，模型组 69 只。模型组大鼠皮下注射 40% ～ 60% CCl_4 橄榄油溶液，0.3 mL/100 g，首剂加倍，每周 2 次，连续注射 5 周，同时给予高脂饲料和 10% 乙醇，第 5 周时成功肝纤维化造模。对照组大鼠供应正常饲料和饮用水，第 2、4、5 周的时候，随机选择 3 只大鼠处死，病理染色判断模型进展。在注射后第 5 周，眼眶取血，转入无抗凝剂的管子，室温静置 30 min，然后 4 ℃ 静置 3 ～ 4 h，用移液器吸取上层淡黄色血清，转入离心管中，4 ℃条件下离心（3000 g，15 min），小心取上清液转入新的管子，ELISA 检测 ALT、AST、HA、LN 和 PⅢP。

2.2.2　分组及给药　随机将造模成功大鼠分为 6 组，分别为模型组（model）、阳性组（Col）、醋液组（Vin）、给药组（低、中、高）。阳性组给予秋水仙碱 1.5 mg • kg^{-1}，皮下注射；醋液组给予醋液 2 mL • kg^{-1}，灌胃给药；给药组（低剂量 0.8 g • kg^{-1}、中剂量 2.5 g • kg^{-1}、高剂量 5 g • kg^{-1}）灌胃给药，持续 4 周。

2.3　样本收集

给药 4 周后，大鼠禁食水 16 h，先给予大鼠麻醉，腹主动脉取血，转入无抗凝剂的管子，室温静置 30 min，然后 4 ℃静置 3 ～ 4 h。吸取上层淡黄色血清，转入新的离心管中，4 ℃条件下离心（3000 g，15 min），小心取上清液转入新的管子。取肝脏，用 4% 多聚甲醛固定保存，观察肝脏变化。

2.4　肝功能及肝纤维化指标测定

血清全自动生化分析仪测定肝功能指标 ALT、AST、HA、LN 和 PⅢP 水平。

2.5　肝组织病理学检测

取各鼠相同部位肝叶，10% 甲醛固定进行 HE 和 Masson 染色，光学显微镜下观察肝组织纤维化程度。

2.6　肝组织中 CYP2E1 和 Nrf2 的测定

取材，选取待染色切片，烤片，62 ℃ 1 h；切片脱蜡，复水；抗原修复；封闭内源性过氧化物酶；孵育抗体；DAB 显色 1 min，自来水终止显色，镜检；苏木素复染；脱水，透明；中性树胶封片；进行 200 倍视野采集图片。

2.7　统计分析

实验结果采用 SPSS 19.0 软件分析数据进行单因素方差分析，作图软件为 Graphpad prism 5，$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　大鼠肝纤维化造模结果

给药前大鼠血清检测结果表明，与对照组比较，模型组的大鼠血清 ALT、AST、HA、LN 和 PⅢP 均显著升高（$P < 0.05$）（见图 1）。

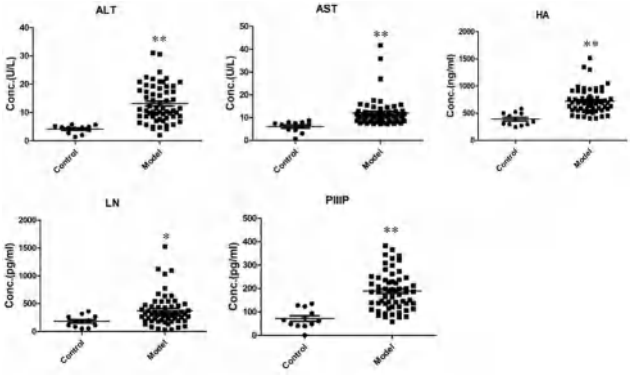


图 1　给药前大鼠血清 ELISA 检测结果

Fig 1　ELISA detection in rat serum before the administration

注：与对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

大鼠肝纤维化造模 HE 染色结果见图 2，大鼠肝纤维化模型组第 2 周空泡变性较多（大空泡为主），因脂肪变受压致使结构变形（大致轮廓可见），大量炎症细胞浸润；第 4 周炎症细胞浸润，纤维沉淀清晰可见；第 5 周结构紊乱，边界不清晰，肝细胞坏死严重，纤维沉淀较多。对照组结构清晰，形态正常，肝索间隙扩张。

大鼠肝纤维化造模 Masson 染色结果所示，大鼠肝组织模型组第 2 周中央静脉和汇管区有较淡的蓝色（纤维化沉淀），大空泡变性为主，较多炎症细胞浸润；第 4 周空泡变性严重，有炎症细胞浸润，有较多纤维化增生和沉淀，肝细胞坏死较多；第 5 周肝细胞之间的桥接和肝中央静脉部分纤维化增生明显，空泡变小，变多，肝细胞有大量死亡。空白对照组无特殊性变化，结构和形态基本正常，少量肝索间隙增大。

3.2　大鼠肝功能及肝纤维化指标的影响

与对照组比较，模型组大鼠血清 ALT、AST、HA、LN 及 PⅢP 水平均显著升高；与模型组比较，阳性组大鼠血清 ALT、AST、HA、LN 及 PⅢP 的水平均显著降低，给药组 SD 大鼠血清 ALT、AST、HA、LN 及 PⅢP 的水平均显著降低（见图 3）。

3.3　肝病理组织形态观察

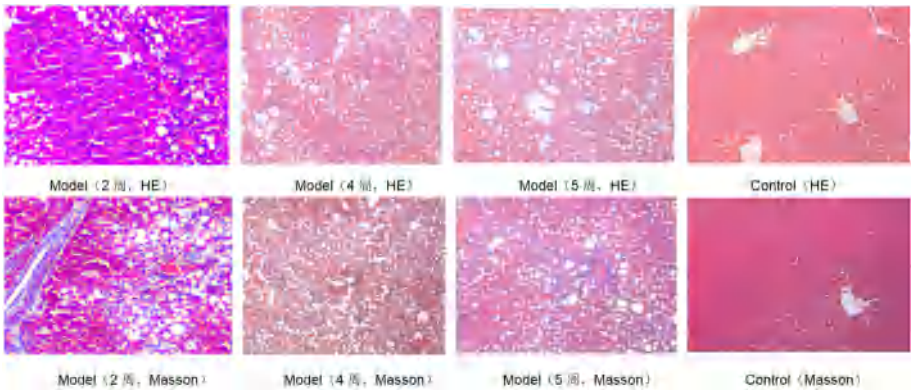


图 2　给药前大鼠肝纤维化造模后 HE 染色和 Masson 染色（×200）

Fig 2　HE staining and Masson staining after hepatic fibrosis modeling in rats before the administration（×200）

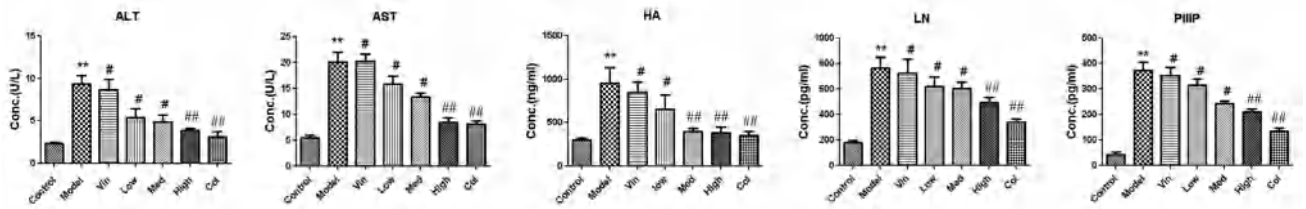


图 3　大鼠肝纤维化肝功能及肝纤维化指标影响

Fig 3　Effect of hepatic fibrosis on liver function and indexes of hepatic fibrosis in rats

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

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

HE 结果显示（见图 4）：对照组肝索间隙增大；模型组有肝细胞增生和纤维化增生，结构紊乱，肝索间隙增大；醋液组和模型组的病理变化相似；阳性组结构基本正常，有少量肝细胞和纤维增生；低、中、高浓度组的样本结构逐渐好转，胶原纤维增生，随着浓度的增加，逐渐减少。Masson 结果显示（见图 5）：对照组门静脉区有少量蓝色（显示有少量的纤维存在），模型组汇管区和中央静脉有粗大的纤维化着色（蓝色），醋液组和模型组几乎无差别（有较多的蓝色存在）；秋水仙碱组肝索间隙增大，结构有点紊乱，有少量纤维存在（蓝色区域）；低、中、高浓度甘草浸液存在一定的量效关系，随剂量增大，组织间隙减小，桥接纤维着色变淡、变细。根据上述说明，醋浸甘草对大鼠纤维化模型具有治疗效果。

3.4　肝组织 CYP2E1 和 Nrf2 水平的影响

如图 6 ～ 7 所示，模型组大鼠 CYP2E1 和 Nrf2 阳性表达明显为棕色；且位于细胞胞浆中。秋水仙碱组大鼠组织中少见棕色；不同剂量给药后，肝组织中 CYP2E1 和 Nrf2 的表达不同程度地减少。定量分析结果如图 8 所示，与对照组相比，模型组大鼠肝组织的 CYP2E1 和 Nrf2 水平显著升高（$P < 0.05$）；与模型组相比，阳性组大鼠肝组织的 CYP2E1 和 Nrf2 水平显著下降（$P < 0.05$），给药组大鼠肝组织 CYP2E1 和 Nrf2 的水平有所下降（$P < 0.05$）；而醋液组几乎没变化。给药组高剂量效果略等同于阳性组，说明醋浸甘草有明显改善肝纤维化作用，且呈剂量依赖性。

4　讨论

蒙医药是我国传统医药学的重要组成部分，是蒙古族人经验的积累，将有毒、锐性强等药物，经炮制后可降低或消除药物的毒副作用、改变或缓和药性，提高药物疗效 [5-6]，蒙药炮制在保证蒙药疗效、用药安全等方面发挥重要作用 [7]。《蒙药医语》中记载“甘草具有抗肝硬化作用” [2]，可应用蒙医炮制方法炮制甘草，从而治疗肝纤维化 [8]。肝纤维化是临床多发的疾病，也是慢性肝病进展为肝硬化的必要环节，可常规中西药治疗肝纤维化临床效果不显著，本研究为研发具有独特的蒙药醋浸甘草有效治疗肝纤维化的药物奠定基础。

甘草是蒙医常用的药材，具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、降血脂、改善胰岛素抵抗以及调节免疫功能等诸多作用 [9-12]；尤其在国内外抗纤维化方面研究的较多；有文献报道表明，利用多种方法改造或修饰化学结构获得甘草次酸及其衍生物，从而提高甘草次酸的生物利用度 [13-18]。也有研究报道 [19]，甘草酸由于肠道菌群紊乱不能被正常水解，在临床上出现假醛固酮增多症，应用被限制。根据实验结果初步推测蒙医炮制醋浸甘草可减少假醛固酮增多症，从而有效改善肝纤维化。本实

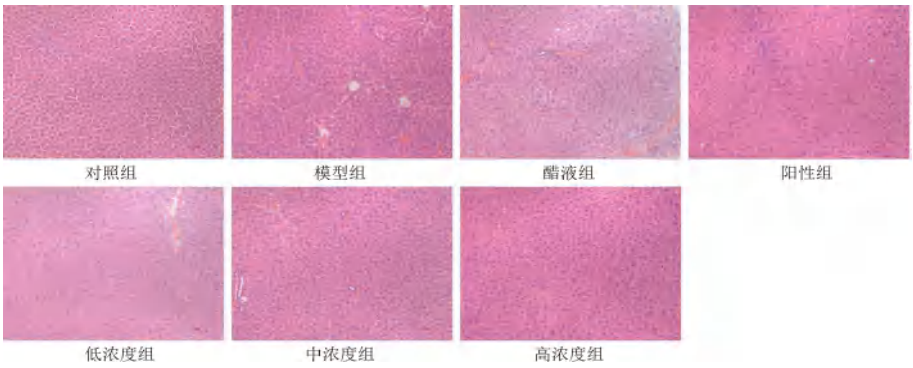


图 4　大鼠肝纤维化造模后 HE 染色图（×200）

Fig 4　HE staining after the modeling of hepatic fibrosis in rats（×200）

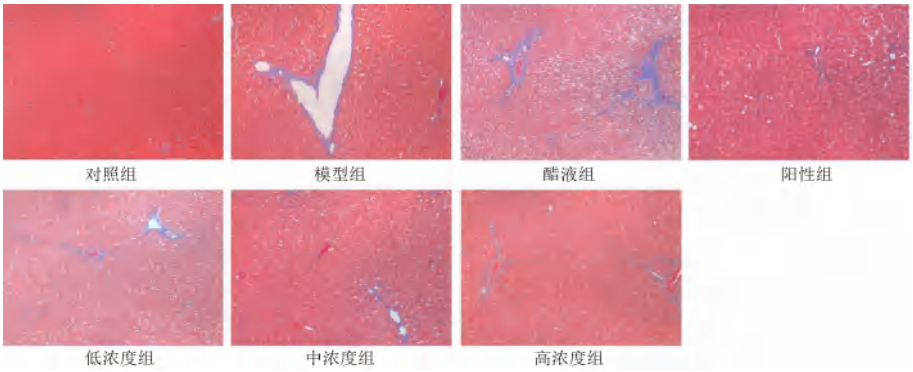


图 5　大鼠肝纤维化造模后 Masson 染色图（×200）

Fig 5　Masson staining after the modeling of hepatic fibrosis in rats（×200）

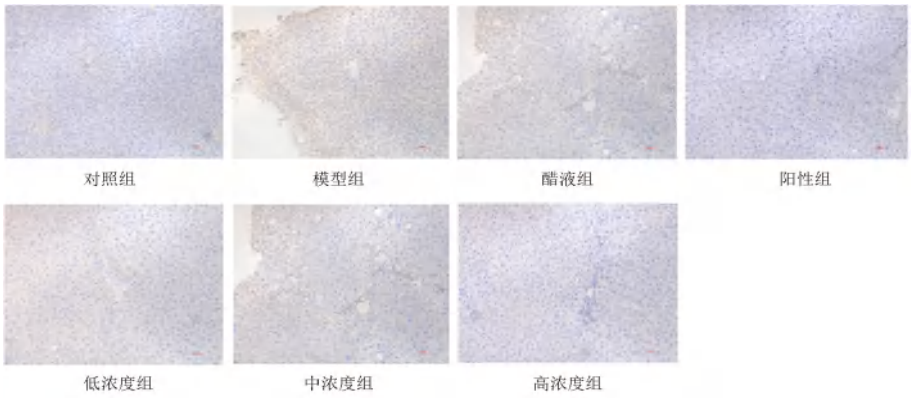


图 6　大鼠肝纤维化造模后肝组织 CYP2E1 免疫组化染色图（×200）

Fig 6　Immunohistochemical staining of CYP2E1 in liver tissue of rats with hepatic fibrosis（×200）

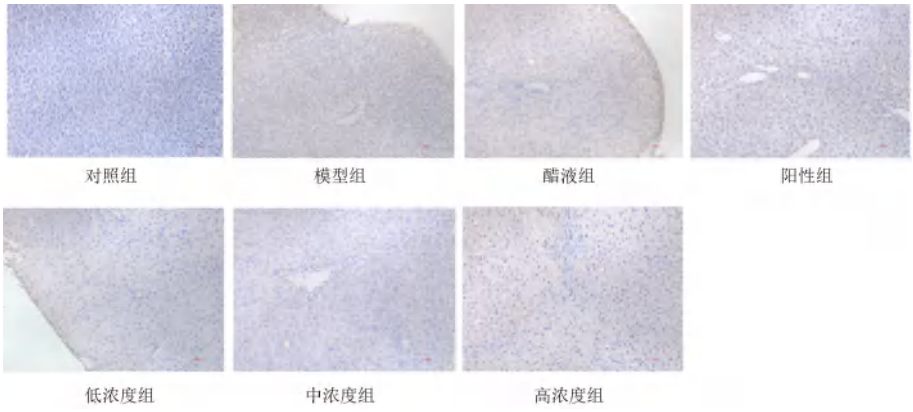


图 7　大鼠肝纤维化造模后肝组织 Nrf2 免疫组化染色图（×200）

Fig 7　Immunohistochemical staining of Nrf2 in liver tissue of rats with hepatic fibrosis（×200）

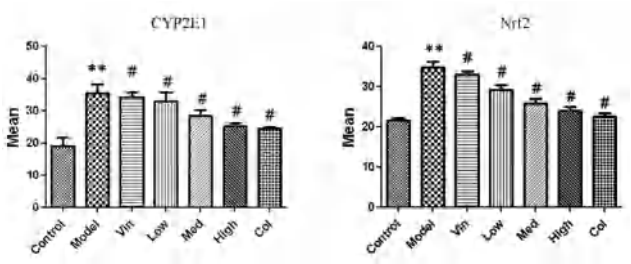


图 8　大鼠肝纤维化造模后肝组织 CYP2E1 和 Nrf2 水平的影响

Fig 8　Effect of hepatic CYP2E1 and Nrf2 in rats with hepatic fibrosis

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

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

验采用化学毒性的 CCl_4 与高脂饮食联合诱发肝纤维化动物模型，此造模方法应用广泛，费用低，操作简易，造模成功率较高[20-23]。结果表明，与对照组相比较，模型组肝功能指标（ALT、AST）显著增加，肝纤维化指标（HA、LA、PⅢP）明显升高；通过观察 HE 和 Masson 染色发现第 5 周时模型组大鼠肝细胞坏死严重，肝纤维化明显增生；说明 CCl_4 与高脂饮食联合成功诱导大鼠肝纤维化模型。与模型组对比，给药组肝功能和肝纤维化（ALT、AST、HA、LA、PⅢP）等指标显著降低；肝组织细胞色素 CYP2E1 与转录因子 Nrf2 水平显著降低，说明给药后大鼠肝纤维化明显改善；与模型组对比，醋液组差异无统计学意义，说明醋液对肝纤维化无明显影响。

综上，本研究蒙药醋浸甘草饮片与修饰甘草衍生物化学结构相比操作简单、费用低，且蒙医临床实践发现疗效较好[8]，具有鲜明的民族特色。并初步验证醋浸甘草能有效改善 CCl_4 高脂联合诱导的大鼠肝纤维化作用，为研发有效治疗肝纤维化的蒙药醋浸甘草提供理论依据。

参考文献

[1] 朱世超，郑学敏 . 甘草次酸衍生物抗肝纤维化的实验研究 [J]. 中草药，2017，48（17）：3554-3559.

[2] 夏海珊，陈少茹 . 肝纤维化的发病机制和药物治疗现况 [J]. 中国医药导报，2014，11（18）：162-168.

[3] 康蕾，李学强，王凤荣 . 18β- 甘草次酸结构修饰及生物活性研究进展 [J]. 中草药，2012，43（7）：1430-1442.

[4] 陈希日布 . 蒙药医语 [M]. 北京：民族出版社，1998：3，153.

[5] 吴香杰 . 蒙药炮制学 [M]. 呼和浩特：内蒙古人民出版社，2011，7：12.

[6] 乌兰其其格，蒙药炮制是提高疗效的关键 [J]. 中国民族民间医药，2013，3（1）：17.

[7] 包勒朝鲁，那生桑 . 论蒙药炮制发展进程 [J]. 中华中医药杂志，2021，36（7）：4339-4341.

[8] 海银梅，那生桑 . 陈希日布扎木苏及其蒙医学术思想 [J]. 中国蒙医药杂志，2019，131（9）：17-20.

[9] Gao C，Dai FJ，Cui HW，et al. Synthesis of novel heterocyclicring-fused 18β-glycyrrhetinic acid derivatives with antitumor and antimetastatic activitiy [J]. Chem Biol Durug Des，2014，84（2）：223-233.

[10] Ming LJ，Yin AC. Therapeutic effects of glycyrrhizic acid [J]. Nat Prod Commun，2013，8（3）：415-418.

[11] Wang CY，Kao TC，Lo WH，et al. Glycyrrhizic acid and 18β-glycyrrhetinic acid modulate lipopolysac-charide-induced inflamm atory response by suppression of NF-kB through PI3K Pl10δ and PilOγ inhibitions [J]. J Agric Food Chem，2011，59（4）：7726-7733.

[12] 尤丽丽，曹东慧 . 18β 甘草次酸对 K19-C2mE 转基因鼠胃肿瘤的抑制作用及其机制 [J]. 吉林大学学报，2016，42（2）：221-225.

[13] 张娜，崔晓燕 . 甘草次酸衍生物的合成及其抗肝癌活性 [J]. 中国实验方剂学杂志，2015，21（19）：37-41.

[14] 张娜，赵秀梅 . 美法仑 - 甘草次酸复合物的合成及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. 现代药物与临床，2016，31（7）：929-933.

[15] 孟艳秋，刘立伟 . 甘草次酸 C3、C30 衍生物的合成及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. 现代药物与临床，2015，30（6）：610-615.

[16] 周长升 . 18 β- 甘草次酸抑制肝癌细胞生长的实验研究 [J]. 中国普通外科杂志，2016，25（8）：1168-1174.

[17] 郝秀静，阳辉 . 18β- 甘草次酸哌嗪衍生物抗肝癌 SMMC-7721 细胞活性研究 [J]. 西安交通大学学报，2016，37（6）：795-809.

[18] 钟里科 . 18β- 甘草次酸哌嗪衍生物 A30 抑制 SMMC-7721 肝癌细胞增殖 [J]. 细胞与分子免疫学杂志，2017，33（9）：1212-1216.

[19] 李立文，张嘉丽，董杨，等 . 甘草酸、甘草次酸假性醛固酮作用和药物相互作用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报，2018，20（10）：216-220.

[20] 李艳 . 黄芪总黄酮对四四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的影响 [J]. 中成药，2019，41（7）：1710-1713.

[21] 覃仁武 . 苦参碱对硫代乙酰胺诱导的肝纤维化大鼠的影响 [J]. 中成药，2020，42（3）：764-767.

[22] 张晨宇 . 苦瓜皂苷对 CCl_4 诱导大鼠肝纤维化的保护作用 [J]. 中成药，2020，42（9）：2455-2458.

[23] 郭羽轩 . 睡莲花总黄酮对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的防治作用 [J]. 中草药，2020，51（19）：4983-4990.

（收稿日期：2021-12-19；修回日期：2022-03-12）

玄归滴丸联合布洛芬治疗痛经的药效作用特点

胡静，孟凡钰，王彬，李雪丽，张琳，庄朋伟*（天津中医药大学中药学院，天津市中药药理学重点实验室，天津301617）

摘要：目的　探讨玄归滴丸联合布洛芬治疗痛经的药效作用特点和安全性。**方法**　利用小鼠热板实验、缩宫素诱导的小鼠痛经模型以及大鼠离体子宫平滑肌收缩实验进行药效评价，通过考察痛阈值、扭体次数、扭体潜伏期、子宫收缩张力、收缩频率等指标比较实验各组药效特点；通过大体形态观察以及 HE 染色方法考察小鼠肠道出血及病理变化，比较单独应用与联合用药对肠道损伤的差异，采用实时荧光定量 PCR 检测肠道内白介素 -1β（IL-1β）、白介素 6（IL-6）、肿瘤坏死因子（TNF-α）的 mRNA 水平，初步探讨肠道出血机制。**结果**　药效实验结果显示，联合用药低剂量组与单用高剂量布洛芬相比，热板实验痛阈值差异没有统计学意义，均在给药后 0.25、0.5、1、2 h 痛阈值显著升高；小鼠扭体实验中，与模型组相比，各给药组扭体次数、子宫系数均显著降低，联合用药低剂量组子宫壁厚度减轻，炎性细胞减少；离体子宫平滑肌实验表明，与单独应用相比，联合用药显著改善子宫收缩张力、收缩频率、活动力。用药安全方面，玄归滴丸单独应用对小鼠肠道无明显影响，而高剂量布洛芬组黏膜受损，产生大量杯状细胞，联合用药则明显减轻。与布洛芬高剂量相比，联合用药组炎症细胞因子的表达水平均显著下调。**结论**　玄归滴丸联合布洛芬具有显著治疗痛经的作用，并可能通过抑制炎症反应降低肠道出血风险，为其临床增效减毒作用提供一定的数据支撑。

关键词：玄归滴丸；布洛芬；联合应用；痛经；药效；安全性
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1590-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.020

Efficacy of Xuangui dripping pills combined with ibuprofen for dysmenorrhea

HU Jing, MENG Fan-yu, WANG Bin, LI Xue-li, ZHANG Lin, ZHUANG Peng-wei* (*Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine*, *College of Chinese Materia Medica*, *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617)

Abstract: Objective To determine the efficacy and safety of Xuangui dripping pills (XGDP) combined with ibuprofen (IBU) for dysmenorrhea. **Methods** The efficacy was evaluated with mouse hot plate test, oxytocin-induced mouse dysmenorrhea model, and rat isolated uterine smooth muscle contraction test. The pain threshold, number of writhings, writhing latency, uterine contraction tension, contraction frequency, and other indicators were compared in the experiment groups. The intestinal hemorrhage and pathological changes of mice were recorded by gross morphological observation and HE staining to compare the difference in intestinal damage by single application and combination medication. The mRNA levels of interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor (TNF-α) in the intestine were detected by real-time fluorescence quantitative PCR to determine the mechanism of intestinal bleeding. **Results** Pharmacodynamic experiments showed no significant difference in the pain threshold between the low-dose combination group and the high-dose IBU alone group. After the administration, the pain thresholds were significantly increased at 0.25, 0.5, 1, and 2 h. The mouse writhing experiment showed that compared with the model group, the number of writhings and uterine coefficients in each administration group were significantly decreased. In the low-dose combination group the uterine wall was thiner and inflammatory cells decreased. The isolated uterine

作者简介：胡静，女，硕士研究生，主要从事中药药理学研究，email：hj19831367230@163.com　*__通信作者：__庄朋伟，男，教授，主要从事中药药理学研究，email：zhuangpengwei@163.com

smooth muscle experiment showed that combined medication decreased the isolated uterus contraction tension, frequency, and activity in rats. Medication safety test showed that XGDP had no significant effect on the intestinal tract of the mice, while high-dose IBU caused mucosal damage and produced many goblet cells. Compared with high-dose IBU group, the expression of inflammatory cytokines in the combination group was significantly down-regulated. **Conclusion** XGDP combined with IBU has obvious therapeutic effect on dysmenorrhea and may reduce the risk of intestinal bleeding by inhibiting the inflammation, which provides data support for its clinical efficacy and toxicity reduction.

Key words: Xuangui dripping pill; ibuprofen; combination application; dysmenorrhea; efficacy; safety

原发性痛经是青春期女性的常见病和多发病，常伴随痉挛性、阵发性疼痛，临床常用非甾体抗炎药（NSAIDs）治疗，其中布洛芬（IBU）最为常用，尽管治疗效果显著，但布洛芬引起胃肠道并发症的风险不容忽视。临床调查显示，定期服用治疗剂量布洛芬的人发生消化道出血的可能性是不服用的 3 倍 [1-2]。中药也常用于痛经的治疗，如由当归、延胡索、干姜组成的玄归滴丸，具有温经散寒、化瘀止痛功效，可用于治疗寒凝血瘀引起的经期小腹疼痛，伴月经量少、有血块、畏寒肢凉等症状 [3-4]。有研究发现玄归滴丸的有效成分可以有效降低子宫缩宫素受体的表达 [5]，具有良好的镇痛、抗炎作用 [6]，且文献报道玄归止痛滴丸对大鼠、小鼠均无明显的急性、长期毒性作用 [7]。但中药往往存在起效慢、作用缓和等缺点，因此中西药联合应用在临床防病治病过程中展现了巨大优势。基于上述问题，从中西药联合应用出发，通过比较玄归滴丸、布洛芬与联合用药在镇痛效果、缩宫素致小鼠扭体反应、离体子宫平滑肌收缩的抑制作用，明确联合用药与单独用药治疗痛经作用的优势与特点，通过比较玄归滴丸、布洛芬和联合用药对肠道出血风险的安全性，明确联合用药是否具有降低 NSAIDs 肠道出血风险的潜在作用，为临床中西药联合应用、增效减毒提供数据支撑。

1　材料

1.1　实验动物

ICR 小鼠，雌性，体质量（20±2）g；SD 大鼠，雌性，体质量（200±10）g [北京维通利华实验动物技术有限公司，许可证号：SCXK（京）2016-0006]。饲养于天津中医药大学动物中心动物屏障系统，温度 20 ～ 26 ℃，相对湿度 40% ～ 70%，气压恒定，昼夜 12 h 交替。

1.2　试药

玄归滴丸（天津中新药业第六中药厂，批号：609002，每丸 40 mg）；布洛芬（福建太平洋制药有限公司，批号：190317、201216，规格：0.3 g）；缩宫素注射液（上海全宇生物科技动物药业有限公司，批号：200407）；苯甲酸雌二醇注射液（宁波第二激素厂，批号：200804）；醋酸地塞米松（天津力生制药股份有限公司，批号：1710043）；4% 组织固定液（Solarbio，P1110）；Eastep Super 总 RNA 提取试剂盒（上海普洛麦格生物产品有限公司）；FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix、SuperReal PerMix Puls（SYBR Green）(天根生化科技北京有限公司)；引物委托上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.3　仪器

热板仪（淮北正华生物仪器设备有限公司）；DZKW-D-2 电热恒温水浴锅（北京市永光明医疗仪器有限公司）；张力换能器（规格：0 ～ 50 g；批号：MLTF050/ST）；分析天平（上海精密科学仪器有限公司天平仪器厂）；离心机（Eppendorf 5424R，made in Germany）；Scientz-48L 冷冻型高通量组织研磨器（宁波新芝生物科技股份有限公司）；核酸分析仪（基因有限公司，NanoDrop One）；PCR 扩增仪（Bio-rad T100 Thermal Cycler）；实时荧光定量 PCR 仪（Bio-rad CFX96 Real-time System）。

2　方法

2.1　玄归滴丸联合布洛芬的药效作用

2.1.1　对小鼠镇痛效果的影响　智能热板仪的温度调节为（50±0.5）℃，ICR 小鼠置于智能热板仪上，小鼠足底在接触热板至因痛出现舔后足的时间定为痛阈值。筛选反应潜伏期在 10 ～ 30 s 内的合格小鼠 48 只，随机分为 6 组，正常对照组，玄归滴丸组（4 倍临床等效剂量，624 mg • kg^{-1}），布洛芬高剂量组（200 mg • kg^{-1}），布洛芬低剂量组（100 mg • kg^{-1}），联合用药高剂量组（布洛芬 200 mg • kg^{-1} ＋玄归滴丸 624 mg • kg^{-1}），联合用药低剂量组（布洛芬 100 mg • kg^{-1} ＋玄归滴丸 624 mg•kg^{-1}），每组 8 只。预先测试小鼠痛阈值，

连续灌胃给药 3 d，末次给药后，分别测定给药后 0、0.25、0.5、1、2 h 各小鼠的痛阈两次，比较各组给药后不同时间点痛阈值差异。

2.1.2　对缩宫素所致小鼠痛经的影响　将 48 只小鼠随机分成 6 组，正常对照组、模型组、玄归滴丸组、布洛芬高剂量组、布洛芬低剂量组、联合用药低剂量组。灌胃给予相应药物（剂量同“2.1.1”项下）连续 7 d，同时第 5、6 日腹腔注射苯甲酸雌二醇 20 mg • kg^{-1}（0.1 mL/10 g），第 7 日灌胃给药 30 min 后，腹腔注射缩宫素（0.1 mL • 10 g^{-1}）。测定并记录注射缩宫素后 30 min 内小鼠的扭体次数、扭体潜伏期。观察结束后，处死并解剖小鼠取子宫，精确取各组动物同侧同位段的新鲜子宫，生理盐水冲洗 2 次，拭干，称取子宫的质量，计算子宫系数 [子宫系数（%）＝子宫质量 / 体质量 ×100%]，取另一侧子宫置于 4% 组织固定液中固定，进行石蜡包埋，HE 染色，分析各组之间的病理差异。

2.1.3　对大鼠离体子宫平滑肌的影响　取未孕健康雌性 SD 大鼠，于实验前 24 h 腹腔注射苯甲酸雌二醇（2 mg • kg^{-1}），以增加子宫平滑肌对药物的敏感性。迅速剖腹，取出子宫，立即置于盛有台式液的玻璃皿中。取一侧子宫的中段 1 cm，轻柔剥离结缔组织和脂肪组织，一端固定于盛有台式液 45 mL 的麦氏浴槽的钩上；另一端与张力换能器相连，下为（37±1）℃的恒温浴箱。进入 LabChart 生物信号采集系统，选择张力通道，待标本稳定后，在浴槽中加入缩宫素 0.2 mL，诱发子宫平滑肌痉挛性收缩。

将大鼠随机分为 4 组，正常对照组，玄归滴丸组（0.3789 mg • mL^{-1}，试药均为蒸馏水配制），布洛芬高剂量组（0.1754 mg • mL^{-1}），联合用药低剂量组（0.5495 mg • mL^{-1}）。加入缩宫素 15 min 后，从麦氏浴槽上方加入各组受试液 0.4 mL，观察并记录 10 min 时子宫收缩幅度（最大值）和频率变化。记录离体子宫平滑肌收缩频率、收缩张力，计算离体子宫活动力，分析联合用药后对子宫痉挛性收缩的影响（子宫活动力＝子宫平均收缩张力 × 子宫收缩频率）。

2.2　玄归滴丸联合布洛芬对肠道出血风险的影响

2.2.1　分组及给药　ICR 小鼠 60 只，依据文献方法 [8] 和前期预实验结果，随机分为 5 组，分别为正常对照组、玄归滴丸组、布洛芬高剂量组、布洛芬低剂量组、联合用药低剂量组，受试药物以蒸馏水为溶剂配制成对应浓度的混悬液。各组小鼠腹腔注射地塞米松（75 mg • kg^{-1}）连续 4 d，最后一次注射地塞米松 1 h 后各组小鼠灌胃给予相应药物（剂量同“2.1.1”项下）。给药 8 h 后处死小鼠，分离出整个肠道，观察肠道是否有出血点。取小鼠部分结肠病变组织，在 4% 组织固定液中固定，石蜡包埋，HE 染色，分析各组之间的病理差异。

2.2.2　肠道组织生化指标检测　按照试剂盒要求提取小鼠结肠病变组织样本中的 RNA，利用核酸分析仪检测总 RNA 的浓度，对 RNA 进行反转录合成 cDNA，以 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 反应，扩增条件如下：95 ℃预变性 15 min；95 ℃变性 10 s，60 ℃退火 30 s，循环反应 40 次；循环完成后，将温度升至 95 ℃，持续 30 s，然后升至 65 ℃，持续 5 s，最后加热至 95 ℃。以 GADPH 作为内参，使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行数据的相对定量分析，比较各组炎性细胞因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 表达的差异。内参与目的基因引物序列如表 1 所示。

表 1　引物序列

Tab 1　Primer sequence

引物	序列
GADPH	F：TGCACCAACTGCTTAGC
	R：GGCATGGACTGTGGTCATGAG
TNF-α	F：ATGTCTCAGCCTCTTCTCATTC
	R：GCTTGTCACTCGAATTTTGAGA
IL-1β	F：TCGCAGCAGCACATCAACAAGAG
	R：AGGTCCACGGGAAAGACACAGG
IL-6	F：CTTCTTGGGACTGATGCTGGTGAC
	R：AGGTCTGTTGGGAGTGGTATCCTC

2.3　统计学处理

所有数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，实验数据采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 8.0.2 统计软件进行单因素方差分析，多组间两两比较进行多重比较 t 检验，$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3　结果

3.1　对小鼠痛阈值的影响

如图 1 所示，正常对照组各个时间点及各组 0 h 痛阈值均无显著差异；与正常对照组相比，玄归滴丸给药后 0.5 h、1 h 痛阈值显著升高（$P < 0.01$），其他各组给药后各时间点痛阈值均显著升高（$P < 0.05$，$P < 0.01$），并且联合用药低剂量组与布洛芬高剂量组相比，差异没有统计学意义（$P > 0.05$）。结果提示玄归滴丸与布洛芬联合用药提高了痛阈值。

3.2　对缩宫素所致小鼠痛经模型的影响

3.2.1　对小鼠扭体反应和子宫质量的影响　如图 2 所示，与正常对照组比较，模型组小鼠扭体次数明

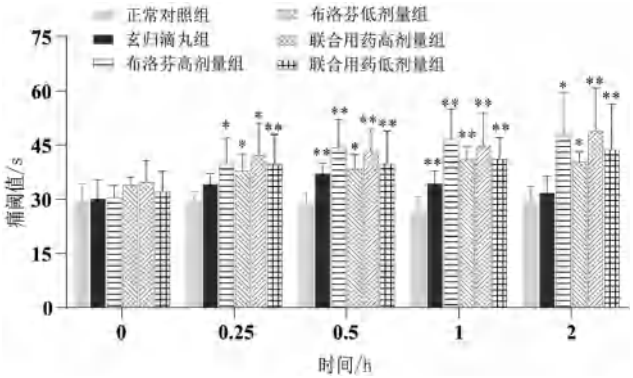


图 1　玄归滴丸与布洛芬镇痛效果比较研究（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Fig 1　Analgesic effect of XGDP and IBU（$\bar{x}\pm$s，$n=8$）

注（Note）：与正常对照组相比，$^{*}P<0.05$，$^{*}P<0.01$（*vs* the normal control group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$）。

显增多（$P<0.01$），子宫系数显著变大（$P<0.01$），说明模型制备成功。与模型组比较，玄归滴丸组扭体次数显著减少（$P<0.01$），潜伏时间、子宫系数差异不明显（$P>0.05$）；布洛芬高、低剂量组和联合用药低剂量组扭体次数均显著减少（$P<0.01$），子宫系数均显著变小（$P<0.01$）。各组扭体发生率由高到低排序为：玄归滴丸组＞布洛芬组＞联合用药低剂量组。表明联合用药对缩宫素所致小鼠的疼痛具有明显的抑制效果。

3.2.2　子宫病理结果　如图 3 所示，与正常对照组相比，模型组子宫壁增厚，腺体内有中性粒细胞团，炎性细胞浸润，说明模型制备成功；与模型组相比，玄归滴丸组，布洛芬高、低剂量组和联合用药低剂量组子宫壁厚度减轻，炎性细胞减少。

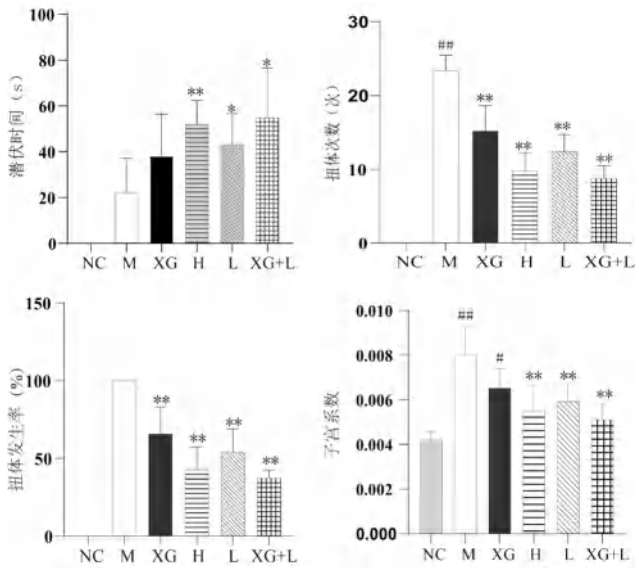


图 2　药物对小鼠扭体反应的影响（$\bar{x}\pm$s，$n=8$）

Fig 2　Effect of drugs on the writhing responses of mice（$\bar{x}\pm$s，$n=8$）

注（Note）：NC. 正常对照组（normal control group）；M. 模型组（model group）；XG. 玄归滴丸组（XGDP group）；H. 布洛芬高剂量组（high-dose IBU group）；L. 布洛芬低剂量组（low-dose IBU group）；XG＋L. 联合用药低剂量组（low-dose combination group）；与模型组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，与正常对照组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$（*vs* the model group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；*vs* the normal control group，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$）。

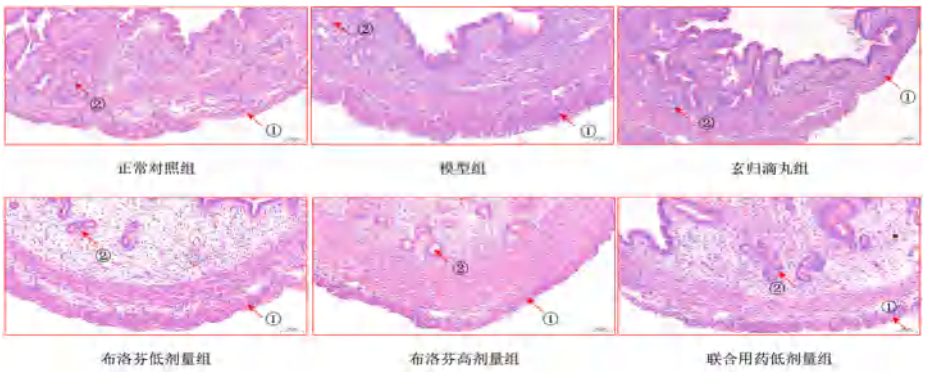


图 3　子宫病理图（HE 染色，×10）

Fig 3　Pathology of uterus（HE staining，×10）

注（Note）：①子宫壁（uterine wall）；②子宫腺（uterine gland）。

3.3　对离体子宫平滑肌的影响

3.3.1　对大鼠离体子宫收缩张力的影响　与正常对照组比较，加入缩宫素后，子宫平滑肌呈现强烈且持续的收缩，各组大鼠子宫平均收缩张力、张力最大值与最小值均较造模前显著提高（$P<0.001$），表明缩宫素能够引起离体子宫的痉挛性收缩（见表 2）。与造模后比较，正常对照组对子宫收缩张力无明显变化（$P>0.05$），而单独给予布洛芬、玄归滴丸以及联合用药均可显著降低子宫平均收缩张力、张力最大值和最小值（$P<0.01$，$P<0.001$），且联合用药降低大鼠离体子宫收平均缩张力的作用比玄归滴丸降低更明显（$P<0.001$）（见表 3）。

表 2　缩宫素对大鼠离体子宫收缩张力的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effect of oxytocin on the contraction tension of rat uterus in vitro ($\bar{x}\pm s$)

组别	平均收缩张力 /g		最大张力值 /g		最小张力值 /g	
	造模前	造模后	造模前	造模后	造模前	造模后
正常对照组	3.19±0.17	6.17±0.05**	4.95±0.34	6.42±0.09**	1.43±0.14	5.93±0.04**
玄归滴丸组	1.05±0.37	4.11±0.17**	1.61±0.65	4.63±0.18**	0.50±0.06	3.59±0.16**
布洛芬高剂量组	2.19±0.34	5.62±0.15**	4.36±0.68	5.87±0.16**	0.02±0.17	5.38±0.05**
联合用药低剂量组	1.75±0.12	4.06±0.13**	2.19±0.23	4.61±0.12**	1.32±0.09	3.51±0.14**

注：与造模前比较，$^{**}P<0.001$。

Note：*vs* before the model，$^{**}P<0.001$.

表 3　玄归滴丸联合布洛芬对大鼠离体子宫收缩张力的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Effect of XGDP combined with IBU on contraction tension of rat uterus in vitro ($\bar{x}\pm s$)

组别	平均收缩张力变化值 /g		最大张力值变化值 /g		最小张力值变化值 /g	
	造模前后差值	给药前后差值	造模前后差值	给药前后差值	造模前后差值	给药前后差值
正常对照组	2.98±0.16	－0.01±0.10	1.47±0.39	0.02±0.15	4.50±0.18	0.01±0.09
玄归滴丸组	3.06±0.36	－2.73±0.22**	3.03±0.69	－2.71±0.36**	3.09±0.15	－2.75±0.29**
布洛芬高剂量组	3.43±0.22	－3.39±0.19**	1.50±0.72	－3.29±0.20**	5.36±0.32	－3.50±0.19**
联合用药低剂量组	2.31±0.07	－3.35±0.10**##	2.42±0.16	－3.64±0.17**##	2.20±0.10	－3.06±0.13**##

注：与正常对照组比较，$^{**}P<0.001$；与玄归滴丸组比较，$^{\#\#}P<0.01$。

Note：*vs* the normal control group，$^{**}P<0.001$；*vs* the XGDP group，$^{\#\#}P<0.01$.

3.3.2　对大鼠离体子宫收缩频率与活动力的影响　由表 4 可见，正常对照组大鼠离体子宫收缩频率与活动力在给药前后无显著变化（$P>0.05$）；玄归滴丸组与布洛芬组给药后小鼠子宫收缩频率、子宫活动力均显著降低（$P<0.01$，$P<0.001$），且与玄归滴丸相比，联合用药对降低大鼠离体子宫收缩频率和活动力具有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.01$），与布洛芬相比，联合用药低剂量无统计学意义（$P>0.05$）。

表 4　玄归滴丸联合布洛芬对大鼠离体子宫收缩频率和活动力的影响比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Effect of XGDP on the contraction frequency and activity of the rat uterus in vitro ($\bar{x}\pm s$)

组别	收缩频率 /（次 /10 min）		活动力 /（次 /10 min）	
	造模前后差值	给药前后差值	造模前后差值	给药前后差值
正常对照组	12±2.12	－2±6.29	112.64±17.44	－12.47±38.38
玄归滴丸组	8±1.48	－5±3.83*	67.23±5.35	－58.95±9.42**
布洛芬高剂量组	10±2.68	－7±3.80*	90.15±14.55	－83.44±15.23**
联合用药低剂量组	9±3.23	－9±3.35**#	62.79±7.82	－73.69±7.13**##

注：与正常对照组比较，$^{*}P<0.01$，$^{**}P<0.001$；与玄归滴丸组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

Note：*vs* the normal control group，$^{*}P<0.01$，$^{**}P<0.001$；*vs* the XGDP group，$^{\#}PP<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$.

3.4　玄归滴丸联合布洛芬对肠道出血风险的影响

3.4.1　对肠道出血发生率的影响　取肠道组织进行观察，结果见图 4，与正常对照组相比，玄归滴丸对小鼠肠道没有产生宏观损伤；布洛芬高剂量组小鼠下消化道出现了严重出血和宏观病变，而联合用药组减轻了肠道出血风险。肠道出血发生率由低到高：正常对照组≈玄归滴丸组（0%）＜联合用药组（25.00%）＜布洛芬低剂量组（41.67%）＜布洛芬高剂量组（100%）。

3.4.2　对小鼠肠道病理的影响　肠道病理切片 HE 染色结果如图 5，正常组小鼠的肠组织结构清晰，黏膜完整。玄归滴丸组的肠组织黏膜上皮细胞完整，绒毛清晰；布洛芬高剂量组小鼠肠道组织病变明显，主要表现为局部黏膜层丢失，杯状细胞增多；而联合用药组的肠组织黏膜层损伤减轻。

3.4.3　对肠道组织中 TNF-α、IL-1β、IL-6 的影响　肠道的炎性细胞因子 mRNA 水平表达结果如图 6 所示，与正常对照组相比，玄归滴丸组 TNF-α、IL-1β、IL-6 的表达水平无显著变化（$P>0.05$），布洛芬低、高剂量组和联合用药组中 TNF-α、IL-6 的表达水平均有不同程度的升高（$P<0.05$，$P<0.01$），联合用药组中 IL-1β 的表达有上升趋势，但差异无统计学意义；与布洛芬高剂量组相比，联合用药组中 TNF-α、IL-1β、IL-6 的表达水平均显著下降（$P<0.05$，$P<0.01$）。结果表明玄归滴丸与低剂量布洛芬联合应用会显著减轻布洛芬高剂量所带来的肠道出血炎性症状。

图 4　玄归滴丸对小鼠肠道出血的影响（$n = 12$）

Fig 4　Effect of XGDP on the intestinal bleeding in mice（$n = 12$）

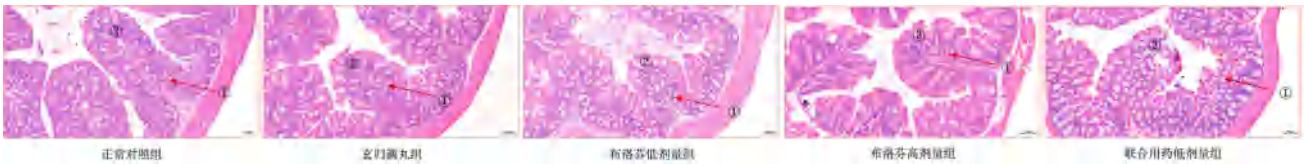


图 5　玄归滴丸与布洛芬对小鼠肠道病理的影响（HE 染色，×10）

Fig 5　Effect of XGDP and IBU on the intestinal pathology in mice（HE staining，×10）

注：① 杯状细胞（goblet cell）；② 黏膜层（mucous layer）。

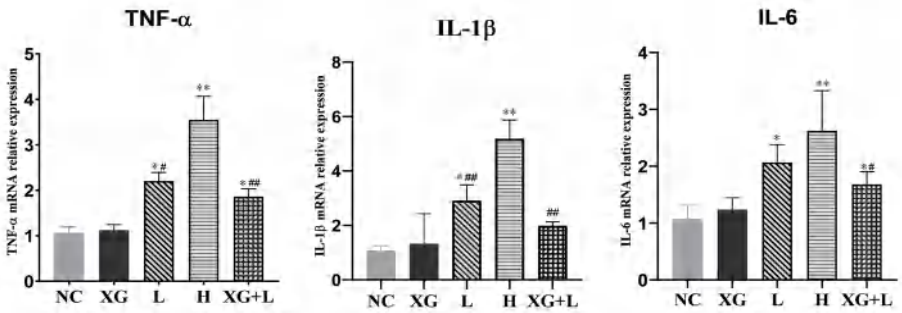


图 6　玄归滴丸对肠道组织中 TNF-α，IL-1β 及 IL-6 表达的影响

Fig 6　Effect of XGDP on the expression of TNF-α，IL-1β，and IL-6 in the intestinal tissues

注（Note）：与正常对照组相比，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与布洛芬高剂量组相比，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$（*vs* the normal control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；*vs* the high-dose ibuprofen group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$）。

4　讨论

原发性痛经的主要病理过程为子宫平滑肌、血管痉挛，子宫腔压力增大，血流量减少，子宫进一步缺血缺氧加剧挛缩状态，引起剧烈疼痛[9]。玄归滴丸源于古方玄归汤，是治疗妇女痛经之良药。前期对月舒滴丸（玄归滴丸）治疗实验性痛经模型进行了药效学研究，发现月舒滴丸对子宫收缩具有明显的缓解作用，同时具有良好的镇痛、抗炎作用[6]。布洛芬可明显抑制子宫内膜前列腺素的合成，减少子宫平滑肌收缩，达到缓解疼痛的效果。临床上常采用中西医结合或联合疗法治疗原发性痛经，可增加疗效，减少不良反应，提高治愈率。如在临床研究上，元胡止痛滴丸、温经散寒活血方、少腹逐瘀颗粒等中成药联合布洛芬共同治疗原发性痛经均具有明显的疗效，有一定的临床推广应用价值[9-11]。

在前期预实验中，为确定玄归滴丸镇痛效果的最佳量效关系，设置玄归滴丸低（临床等效剂量，156 mg • kg^{-1}）、中（312 mg • kg^{-1}）、高（624 mg • kg^{-1}）3 个剂量组，最终选择玄归滴丸临床等效 4 倍剂量组进行后期实验。利用热板实验确定玄归滴丸、布洛芬和联合用药具有显著的镇痛效果，利用缩宫素诱导的痛经模型和离体子宫平滑肌实验对治疗痛经药效进行了进一步研究，实验得出高剂量布洛芬与低剂量布洛芬联合玄归滴丸的镇痛效果相比没有显著差异。玄归滴丸和布洛芬联合用药能显著升高机体痛阈值，降低痛经模型扭体次数，舒张子宫平滑肌，从而治疗痛经。

在确定药效的基础上，研究联合用药的安全性。高剂量布洛芬（200 mg • kg^{-1}）在抗炎镇痛的同时有明显的胃肠道不良反应（胃溃疡、十二指肠溃疡、小肠炎症、出血等）。根据文献，高剂量地塞米松（75 mg • kg^{-1}）通过诱导小鼠 GR 信号，可明显加重布洛芬在小鼠小肠中的急性毒性所诱导的

小肠损伤，而本身没有明显的不良反应，更方便观察小肠发生病变的宏观现象[8]。目前，在肠道出血风险分析中，引起肠道损伤的原因主要围绕在氧化损伤、炎症介质、微生态平衡失调、胃肠道黏膜免疫功能受损等方面[12]。通过 HE 染色结果可知，肠道出血伴随着炎症的发生，细胞因子是炎症发生的主要参与者，所以检测肠道组织中炎症细胞因子在肠道出血时的变化情况，可以进一步说明玄归滴丸、布洛芬以及联合用药在肠道出血风险上的差异。IL-1β 由巨噬细胞产生，能够引起炎症介质和蛋白的释放，进而引起肠道炎症反应和局部组织的损伤，并与 IL-6，TNF-α 有协同作用[13]。IL-6 是细胞因子的核心成员，能促进 T 淋巴细胞增殖，刺激细胞毒性 T 细胞反应，同时还能间接促进单核细胞和巨噬细胞的增殖，加剧机体炎症反应[14-15]。研究发现，TNF-α 的表达上调，可以破坏肠道上皮细胞进而造成组织病理损伤[16]。本研究结果表明，高剂量布洛芬通过激活 IL-1β、IL-6、TNF-α 的高表达，引起较为严重的肠道出血，而联合用药后的肠道出血症状较之减轻。

综上，玄归滴丸联合低剂量布洛芬应用可以达到增强疗效的作用，且在此基础上可以显著降低肠道出血的发生率，显示出中西药联合应用的安全性和潜在的增效减毒作用，为临床联合用药实现增效减毒作用提供一定的实验数据支撑，但本文未深入探究所其涉及的机制问题，还需进行后续研究。

参考文献

[1] Lanas A，Sopeña F. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and lower gastrointestinal complications [J]. Gastroenterol Clin North Am，2009，38（2）：333-352.

[2] van Wijck K，Lenaerts K，van Bijnen AA，et al. Aggravation of exercise-induced intestinal injury by ibuprofen in athletes [J]. Med Sci Sport Exer，2012，44（12）：2257-2262.

[3] 韩德承 . 玄归滴丸治疗原发性痛经 [J]. 开卷有益（求医问药），2014（5）：22.

[4] 高小芳 . 玄归滴丸 [Z]. 2013.

[5] 方玲，刘欣宇，代娜，等 . 月舒滴丸对大鼠子宫内膜及平滑肌细胞 OTR 表达的影响 [J]. 辽宁中医药大学学报，2014，16（11）：26-29.

[6] 姜国云，高小芳，周鸿，等 . 月舒滴丸对实验性痛经模型的药效学研究 [J]. 湖北中医药大学学报，2012，14（6）：17-20.

[7] 林昱，李新田，张琰，等 . 玄归止痛滴丸的毒理学实验 [J]. 中国药师，2010，13（9）：1277-1279.

[8] Lu Z，Lu Y，Wang X，et al. Activation of intestinal GR-FXR and PPARα-UGT signaling exacerbates ibuprofen-induced enteropathy in mice [J]. Arch Toxicol，2018，92（3）：1249-1265.

[9] 张珂，胡晓明，马玉瑶，等 . 元胡止痛滴丸联合布洛芬治疗原发性痛经的临床研究 [J]. 现代药物与临床，2018，33（8）：2023-2026.

[10] 金燕，祝炳军，顾唯，等 . 温经散寒活血方联合布洛芬缓释胶囊治疗原发性痛经临床研究 [J]. 新中医，2021，53（9）：78-81.

[11] 樊志芳，冯国芹 . 少腹逐瘀颗粒联合布洛芬治疗原发性痛经的临床研究 [J]. 现代药物与临床，2020，35（12）：2450-2454.

[12] 高兰，颜晓静，李征军，等 . 醋炙降低甘遂对小鼠胃肠道氧化损伤作用机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19（10）：257-260.

[13] Impellizzeri D，Siracusa R，Cordaro M，et al. Therapeutic potential of dinitrobenzene sulfonic acid（DNBS）-induced colitis in mice by targeting IL-1β and IL-18[J]. Biochem Pharmacol，2018，155：150-161.

[14] Nikolaus S，Waetzig GH，Butzin S，et al. Evaluation of interleukin-6 and its soluble receptor components sIL-6R and sgp130 as markers of inflammation in inflammatory bowel diseases [J]. Int J Colorectal Dis，2018，33（7）：927-936.

[15] Hermanns HM，Wohlfahrt J，Mais C，et al. Endocytosis of pro-inflammatory cytokine receptors and its relevance for signal transduction. [J]. Biol Chem，2016，397（8）：695-708.

[16] Harrison OJ，Srinivasan N，Pott J，et al. Epithelial-derived IL-18 regulates Th17 cell differentiation and Foxp3^{+} Treg cell function in the intestine [J]. Mucosal Immunol，2015，8（6）：1226-1236.

（收稿日期：2021-12-05；修回日期：2022-01-21）

综述

黄芪及其复方制剂减轻抗肿瘤药物毒副作用的研究进展

袁霞[1]，黄敏[2]，张尊建[1*]，黄寅[1*]（1. 中国药科大学药物质量与安全预警教育部重点实验室，南京　210009；2. 南通大学附属医院中医科，江苏　南通　226000）

摘要：药物治疗是目前应对肿瘤的有效手段之一，但在获得疗效的同时往往也会引发多种毒副作用，制约了其临床应用。黄芪为传统补益中药，主要含皂苷、黄酮及多糖等成分，具有提高免疫力、抗氧化、抗炎等作用，在肿瘤的中医治疗中应用广泛。现代医学和药理学研究发现，黄芪的单体成分、注射液及复方在减轻抗肿瘤药物的毒副作用方面效果显著。本文综述了近年来黄芪及其复方制剂在预防和治疗化学制剂、免疫抑制剂等抗肿瘤药物诱导的胃肠道、肝、肾、心脏等靶器官毒性中的作用及机制研究进展，以期为黄芪的深入开发和临床合理应用提供参考。

关键词：黄芪；抗肿瘤；药物毒性；中西药联用；减毒
中图分类号：R282　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1597-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.021

Research progress in Astragali Radix and its compound preparations in alleviating antitumor drugs-induced toxicity

YUAN Xia[1], HUANG Min[2], ZHANG Zun-jian[1*], HUANG Yin[1*] (1. *Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance*, *Ministry of Education, China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 210009; 2. *Department of TCM*, *the Affiliated Hospital of Nantong University*, *Nantong Jiangsu* 226000)

Abstract: Pharmacotherapy is effective for tumors. Unfortunately, antitumor drugs often cause various side effects, thereby limiting their clinical applications. Astragali Radix (AR) is a traditional Chinese medicine (TCM), which mainly contains saponins, flavonoids, and polysaccharides, and possessed such biological functions, as immune-enhancing, antioxidant, and anti-inflammatory. AR is widely used in TCM treatment of tumors. Modern medical and pharmacological studies had demonstrated that AR components, injections, and formulations play essential roles in reducing the toxicity induced by antitumor drugs. This paper reviewed the research progress in the effect and mechanism of AR and its compound preparations in the prevention and treatment of antitumor drugs-induced multi-organ toxicity, including gastrointestinal reactions, hepatotoxicity, renal injury, and cardiotoxicity. We aim to provide reference for the in-depth development and clinical rational application of AR.

Key words: Astragali Radix; antitumor; drug toxicity; herb-drug combination; toxicity reduction

恶性肿瘤是严重危害人类健康的常见病。2020 年全球新增肿瘤病例 1930 万，死亡近 1000 万，预计到 2040 年全球病例将达 2840 万 [1]。在我国，形势也不容乐观，新增肿瘤病例占全球的 24%，而死亡人数占 30%[1]。药物治疗仍是目前最有效的抗肿瘤疗法之一，包括传统的细胞毒性药物和新型分子靶向药物。但是，常用的抗肿瘤药物均会引起不同程度的不良反应，如肠炎、腹

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81773861）；中央高校基本科研业务费项目（No.2632021ZD23）。
作者简介：袁霞，女，硕士研究生，主要从事体内药物分析研究，email：yuanxia516@163.com　*通信作者：黄寅，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事药物代谢组学研究，email：huangyin@cpu.edu.cn；张尊建，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药的体内外质量分析与评价，email：zunjianzhangcpu@hotmail.com

泻、心律不齐等，不仅降低了患者的生活质量，也限制了药物的临床使用[2-6]。因此，采用有效方法预防和治疗抗肿瘤药物的不良反应具有重要的临床意义。

近年来，随着中医药的发展，中西药联用实现减毒增效的肿瘤治疗方案已得到广泛应用[7-8]。黄芪是益气扶正之要药，能使有形之血生于无形之气，强肝肺而健脾胃[9]。现代药理学研究表明，黄芪有增强机体免疫力、抗肿瘤、保护心血管等活性[10]。临床研究发现，黄芪能有效减轻多种抗肿瘤药物的不良反应，如黄芪注射液能防治肺癌、胃癌等化疗的毒副反应，明显降低白细胞下降、贫血、血小板下降、胃肠道反应、肝肾功能损伤等不良反应的发生率[11]。廖开莲等[12]发现黄芪注射液可减轻顺铂化疗的肾毒性，提升患者生存质量。本文对黄芪防治抗肿瘤药物毒副作用的研究进展进行综述，以期为黄芪的深入开发和临床应用提供参考。

1　黄芪主要成分及复方制剂

黄芪（Astragali Radix）为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus*（Fisch.）Bge. var. *mongholicus*（Bge.）*Hsiao* 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus*（Fisch.）Bge. 的干燥根，始载于《神农本草经》，具有补气固表、利水消肿、托毒排脓生肌等功效[13]。黄芪的主要化学成分有皂苷、黄酮、多糖、氨基酸、生物碱、有机酸以及多种微量元素[14-15]，其中，皂苷、黄酮和多糖类物质是其主要活性成分，临床广泛用于心血管、肾脏、消化道等疾病的治疗[16-17]。黄芪的皂苷类成分主要为黄芪皂苷Ⅰ～Ⅷ，具有抗氧化、抗纤维化、降脂和降血糖等活性[18]；黄芪多糖具有免疫调节、抗病毒、抗炎和抗氧化等功效，已被开发为黄芪多糖注射液[19]；黄芪的黄酮类成分包括毛蕊异黄酮苷、山柰酚、毛蕊异黄酮和芒柄花素等，可直接清除羟自由基和超氧阴离子自由基，发挥抗肿瘤、抗突变、抑制动脉粥样硬化等作用[20]。

《古代经典名方目录（第一批）》[21]中共有名方100首，其中包含黄芪的有11首（见表1）。黄芪在制剂中多发挥补气升阳、益气补血等作用，可用于治疗血痹虚劳、肺肾阴亏、脾胃虚弱等多种病症[22-23]。其在中西药联用抗肿瘤方面也发挥着重要作用[24-28]，如黄芪桂枝五物汤辅助铂类、紫杉醇类药物治疗恶性肿瘤，能显著减轻化疗诱导的神经毒性，改善患者的中医证候疗效[29]；当归补血汤可减轻原发性恶性骨肿瘤化疗所致的骨髓抑制，在一定程度上升高血细胞数，提高患者免疫力[30]；圣愈汤能明显改善晚期结肠癌化疗相关性中度贫血，改善患者生存质量[31]。

表 1 《古代经典名方目录（第一批）》中含有黄芪的经典名方

Tab 1　Prescriptions containing Astragali Radix in the Catalogue of Ancient Classical Prescriptions (the first batch)

方名	处方	功效	黄芪作用
黄芪桂枝五物汤	黄芪三两，芍药三两，桂枝三两，生姜六两，大枣十二枚	益气温经，和血通痹	君药，甘温益气，补在表之卫气
清心莲子饮	黄芩、麦门冬（去心）、地骨皮、车前子、甘草（炙）各半两，石莲肉（去心）、白茯苓、黄芪（蜜炙）、人参各七钱半	清心利湿，益气养阴	君药，健脾补气，生津止渴
三痹汤	川续断、杜仲（去皮，切，姜汁炒）、防风、桂心、细辛、人参、茯苓、当归、白芍药、甘草各一两，秦艽、生地黄、川芎、川独活各半两，黄芪、川牛膝各一两	益气活血，补肾散寒，祛风除湿	君药，益气生津，虚热，清除烦渴
升阳益胃汤	黄芪二两，半夏（汤洗）、人参（去芦）、甘草（炙）各一两，防风、白芍药、羌活、独活各五钱，橘皮（连穰）四钱，茯苓、泽泻、柴胡、白术各三钱，黄连二钱	益气升阳，清热除湿	君药，补脾益气，升举阳气
当归补血汤	黄芪一两，当归二钱（酒洗）	补气生血	君药，大补肺脾之气，以资生血之源
托里消毒散	人参、川芎、白芍、黄芪、当归、白术、茯苓、金银花各一钱，白芷、甘草、皂角针、桔梗各五分	清热解毒，益气养血	君药，托里排毒，消肿敛疮
升陷汤	生黄芪六钱，知母三钱，柴胡一钱五分，桔梗一钱五分，升麻一钱	补益肺气，举陷升提	君药，大补元气，升阳
当归饮子	当归（去芦）、白芍药、川芎、生地黄（洗）、白蒺藜（炒，去尖）、防风（去芦）、荆芥穗各一两，何首乌、黄芪（去芦），甘草（炙）各半两	养血润燥，祛风止痒	臣药，益气实卫固表
保元汤	人参一钱，黄芪二钱，甘草五分，肉桂二分	益气温阳	臣药，固腠理而补元气，增强补气之功
当归六黄汤	当归、生地黄、熟地黄、黄柏、黄芩、黄连各等分，黄芪加一倍	滋阴泻火，固表止汗	佐药，益气实卫固表，固未定之阴
圣愈汤	生地黄、熟地黄、川芎、人参各三分，当归身、黄芪各五分	益气，补血，摄血	佐药，益气生血，益气活血

2　抗肿瘤药物的毒副作用

传统抗肿瘤药物以细胞毒性药物为主，选择性差且毒性大[32-33]；其在抑制肿瘤细胞的同时，也对健康细胞造成一定程度损伤，进而伤及人体重要系统和器官，引发胃肠道反应、肝肾毒性等[34-36]。新型分子靶向药物具有选择性高和疗效

好等特点，临床优势明显，但仍会引起心血管损伤、皮肤毒性等不良反应[37-39]。目前临床常用的抗肿瘤药物及相关不良反应主要如下。

2.1 骨髓抑制

骨髓抑制是抗肿瘤药物常见的毒副反应，发生率高达 79.2%[40]，由于抗肿瘤药物常影响骨髓造血干细胞的增殖与分化，导致外周血细胞凋亡，使患者出现血红蛋白、白蛋白或血小板减少等症状[41]。一项接受化疗的患者骨髓抑制发生率与其所用抗肿瘤药物相关性的调查研究显示，临床上易引起骨髓抑制的抗肿瘤药物有烷化剂、抗代谢抗肿瘤药物和铂类药物等[42]。

2.2 胃肠道反应

抗肿瘤药物能刺激胃肠道或大脑呕吐中枢，引起胃肠道不良反应，约 87.7% 的患者会同时出现食欲下降、咽喉干燥、恶心、呕吐、腹泻、便秘等两种或多种症状[43]。其中，蒽环类药物、顺铂常引起患者恶心和呕吐，而腹泻则常见于伊立替康、氟尿嘧啶等药物的治疗中[44-45]。

2.3 神经系统损伤

化疗造成的神经毒性则可引起神经功能紊乱，主要表现为痒感和尖锐痛感、麻木、平衡感减弱等，常与氧化应激、炎症、凋亡及离子通道的变化等相关[46]。据澳大利亚一项肿瘤患者健康状况调查显示，在 2016 年 5 月至 2019 年 3 月期间接受药物治疗的肿瘤患者中，神经毒性发生率达 76.5%[47]。其中，神经系统损伤高发生率的抗肿瘤药物有紫杉烷类药物、长春碱类药物和铂类药物等[48]。

2.4 肝毒性

肝脏作为药物代谢的主要器官，抗肿瘤药物引起的肝损伤较常见，肝脏毒性与线粒体功能受损、药物代谢失调、异常信号转导通路的激活等因素有关，主要表现为血清转氨酶、胆红素等指标显著升高[49]。临床上，拉帕替尼（57.9%）[50]、阿霉素（30.4%）[51]、他莫昔芬（24.7%）[52]、阿那曲唑（24.6%）[53] 等药物肝毒性的发生率较高。

2.5 肾毒性

肾脏是大部分药物排泄的重要器官，易受高浓度抗肿瘤药物及其代谢物的损伤[54]。由于患者肾小球滤过率下降、肾小管功能障碍，常出现蛋白尿、少尿、血尿等症状，甚至发展为肾衰竭，主要由氧化应激失衡、肾小管上皮细胞内钙超载引起[55]。肾毒性是顺铂、奈达铂化疗时常见的不良反应，发生率分别约为 37.5% 和 35.1%[56]。

2.6 心脏毒性

心脏毒性常见于蒽环类、烷化剂及部分靶向药物治疗中，包括心律失常、心室射血分数降低，甚至心力衰竭，其机制涉及氧化应激、能量代谢和细胞损伤等方面[57]。蒽环类药物、酪氨酸激酶抑制剂舒尼替尼等药物心脏毒性的发生率较高，约为 8.6%[58] 和 9.7%[59]。

2.7 肺毒性

肺毒性是抗肿瘤药物治疗的毒副作用之一，发生率约为 2.8%[60]。抗肿瘤药物及其代谢产物可通过血行经过肺脏，引起相关性肺损伤，导致肺部间质性炎症和肺纤维化，表现为咳嗽、胸闷、呼吸衰竭和急性呼吸窘迫综合征等[61]，常见于卡莫司汀、博来霉素、甲氨蝶呤、吉他西滨等药物[62]。

2.8 其他

此外，化疗还会引起脱发、过敏反应、皮肤毒性等[63-65]。因此，加强其不良反应监测并采取有效防治措施，对保障临床用药安全具有重要意义。

3 黄芪及其复方制剂对抗肿瘤药物的减毒作用

现有临床和药学研究已提供诸多证据（见表 2）表明黄芪的活性成分、黄芪注射液、黄芪复方制剂可有效预防或缓解多种抗肿瘤药物诱导的骨髓抑制、胃肠道不良反应以及心脏和肝肾毒性等。

3.1 黄芪减轻抗肿瘤药物致胃肠道不良反应

中医学观点认为，抗肿瘤药物属“外邪”之物，为苦寒之品，会攻伐脾胃[66]；同时，肿瘤患者体内的瘀血痰浊等病理产物也严重阻碍了脾胃的升清降浊，导致出现恶心呕吐、食欲不振、腹泻等症状[67]。有临床试验证实，黄芪注射液能明显减轻乳腺癌患者化疗引起的恶心、呕吐等胃肠道不良反应，改善患者生活质量[68-69]。黄芪多糖可显著提升结直肠癌患者化疗后淋巴细胞的转化率，改善胃肠道功能，提高治疗效果[70]。黄芪多糖与长春瑞滨和顺铂等联用，也能有效缓解晚期非小细胞肺癌患者因化疗引起的疲劳、恶心呕吐、食欲不振等症状，并维持营养状态[71]。此外，以黄芪为主药的药膳，如芪药鸡金粥，也被报道对胃肠黏膜损伤有治疗作用[72]。以上研究表明，黄芪具大补脾肺之气、健运脾胃之功效，能有效防治抗肿瘤药物所致胃肠道不良反应[73]。

3.2 黄芪减轻抗肿瘤药物致肝毒性

肝主疏泄，维持气血津液运行。当药物性肝损伤发生时，肝气疏泄功能失常，津液输布和代谢平衡受阻[74]。黄芪具有益气固表、补气护肝的作用[75-76]。有临床研究发现，对接受化疗的肿瘤患者辅助给予黄芪注射液 4 周，其肝脏损伤情况得到明显的缓解[77]。黄芪多糖也被证明能有效防治乳腺癌患者因长期使用他莫昔芬引起的非酒精性脂肪肝，减轻肝脏氧化应激反应，进而恢复肝功能[78]。在正常小鼠体内，黄芪多糖可显著降低血清 ALT、

表 2　黄芪及其复方制剂减轻抗肿瘤药物的毒副作用

Tab 2　Astragali Radix and its compound preparations in alleviating antitumor drugs-induced toxicity

药物	毒副作用	化疗药物	干预对象	作用与机制	文献
黄芪甲苷	肾损伤	顺铂	BALB/c 小鼠	通过激活 FXR 途径抑制 NLRP3 蛋白表达，减轻炎症反应从而减轻小鼠肾毒性	[87]
	心脏损伤	氟尿嘧啶	SD 大鼠	降低大鼠 Bax 和半胱氨酸蛋白酶 -3（Caspase-3）的表达，升高 Bcl-2 的表达，改善凋亡，减轻氟尿嘧啶诱导的心脏损伤	[91]
	骨髓抑制	环磷酰胺	昆明小鼠	使小鼠血清白介素（IL）-2、IL-4 的含量增加，改善环磷酰胺所致小鼠的免疫力低下和骨髓抑制	[104]
黄芪总黄酮	肾损伤	顺铂	喉鳞状细胞癌荷瘤小鼠	减少荷瘤小鼠皮质髓质区域中的透明管型的数量，减轻肾小管的坏死程度，减轻顺铂致肾毒性	[88]
黄芪多糖	胃肠道不良反应	奥沙利铂、氟尿嘧啶	结直肠癌患者	辅助化疗，降低结直肠癌患者恶心呕吐、食欲不振、腹胀、腹痛、腹泻等胃肠道不良反应的发生率	[70]
	肝损伤	环磷酰胺、多西紫杉醇和表柔比星	昆明小鼠	降低小鼠血清转氨酶谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）的活性，降低 Caspase-3 蛋白的表达，拮抗肝损伤	[79]
	肝损伤	阿霉素	乳腺癌荷瘤小鼠	提高乳腺癌荷瘤小鼠免疫力，抑制氧化应激水平，改善肝功能	[80]
	心脏损伤	阿霉素	C57BL/6J 小鼠	通过激活 PI3k/Akt 信号通路，抑制 p38MAPK 信号通路降低炎症因子的表达，减轻阿霉素造成的心脏毒性	[92]
	心脏损伤	化疗药物	乳腺癌及恶性淋巴瘤患者	降低患者血浆脑钠肽（BNP）和血小板 α 颗粒膜蛋白 -140（GMP-140）水平，升高左室射血分数（LVEF）和血浆一氧化氮（NO）水平，发挥心脏保护作用	[90]
	骨髓抑制	环磷酰胺	BALB/c 小鼠	上调 FOS 的表达，增加小鼠的骨髓细胞、外周红细胞和白细胞数，减轻环磷酰胺诱导的骨髓抑制	[102]
注射用黄芪多糖	胃肠道不良反应	长春瑞滨、顺铂	非小细胞肺癌患者	改善非小细胞肺癌患者因化疗引起的胃肠道不良反应，如恶心、呕吐和食欲不振等	[71]
	肝损伤	他莫昔芬	乳腺癌患者	抑制乳腺癌患者氧化应激水平，改善肝功能和脂质代谢	[78]
	骨髓抑制	紫杉醇、顺铂	宫颈癌患者	增加宫颈癌患者白细胞、红细胞和血小板数，减轻化疗所致的骨髓抑制	[100]
黄芪注射液	肝损伤	化疗药物	恶性肿瘤患者	降低恶性肿瘤患者血清 ALT、AST 活性，减轻肝脏受损程度	[77]
	肾脏损伤	化疗药物	恶性肿瘤患者	减轻恶性肿瘤患者蛋白尿的增高程度，降低尿素氮（BUN）、肌酐（Scr）水平，减轻化疗所致肾损伤	[84]
	胃肠道不良反应	环磷酰胺、甲氨蝶呤和氟尿嘧啶	乳腺癌患者	减轻乳腺癌患者的胃肠道不良反应，如腹泻、便秘、恶心、呕吐、食欲不振等症状	[68]
	胃肠道不良反应	环磷酰胺、甲氨蝶呤和氟尿嘧啶	乳腺癌患者	改善乳腺癌患者的胃肠道功能，提升患者食欲，缓解乏力	[69]
	肾损伤	顺铂	恶性肿瘤患者	降低恶性肿瘤患者的 BUN、Scr 水平，改善肾功能	[85]
	骨髓抑制	紫杉醇	胃癌患者	降低胃癌患者白细胞、血红蛋白抑制的发生率，减轻紫杉醇诱导的骨髓抑制	[99]
黄芪水煎剂	肝损伤	顺铂	H_{22} 肝癌荷瘤小鼠	上调 NF-κB、Caspase-3 的表达，降低小鼠的血清 ALT、AST 活性，发挥保肝作用	[81]
芪药鸡金粥	胃肠道不良反应	氟尿嘧啶	Wistar 大鼠	上调化疗后大鼠胃肠道 Claudin-1 及 JAM-1 蛋白水平，抑制 IκBα 蛋白的表达，减轻大鼠的胃肠黏膜损伤程度	[72]
健脾解毒汤	肾损伤	奥沙利铂	胃癌患者	降低胃癌患者的 BUN、Scr 水平，提高机体免疫力，防治奥沙利铂致肾损伤	[86]
芪附汤	心脏损伤	阿霉素	SD 大鼠	提高阿霉素致心脏毒性大鼠的超氧化物歧化酶（SOD）和谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）活性，降低丙二醛（MDA）含量，减少氧化应激，保护心脏	[93]
当归补血汤	心脏损伤	阿霉素	S_{180} 肉瘤荷瘤小鼠	提高小鼠心肌 SOD 活力，降低 MDA 含量，减轻阿霉素引起的心脏损伤	[94]

AST、Caspase-3 水平，有效改善环磷酰胺、多西紫杉醇和表柔比星诱导的肝损伤，发挥保肝作用[79]。此外，黄芪多糖还能通过抑制机体氧化应激，减轻阿霉素对乳腺癌荷瘤小鼠肝脏引起的损伤[80]。在 H_{22} 肝癌荷瘤小鼠模型中，与单用顺铂化疗相比，联用黄芪水煎剂可上调小鼠核因子 -κB（NF-κB）和 Caspase-3 的表达，诱导肿瘤细胞的凋亡，并显著降低 ALT、AST 水平，减轻小鼠的肝损伤程度[81]。

3.3　黄芪减轻抗肿瘤药物致肾毒性

抗肿瘤药物易损伤肾脏或留滞于肾，导致肾脏

亏虚[82]。黄芪具有益气补肾、利水脱毒之功效[83]，研究表明黄芪可有效保护肾细胞的结构与功能[84]。临床上铂类药物的肾毒性较为常见。研究表明，黄芪注射液能有效防治顺铂引起的肾毒性，降低肿瘤患者的血清 BUN、Scr 水平，提高患者免疫力[85]。黄芪复方健脾解毒汤与奥沙利铂联用治疗胃癌患者，可以减轻奥沙利铂诱导的肾毒性，改善患者预后[86]。有研究认为，黄芪甲苷能通过激活法尼醇 X 受体（FXR）途径，抑制 NLRP3 炎症体信号通路分子的表达，减轻炎症反应，从而防治顺铂诱导的肾损伤[87]。Cui 等[88]以喉鳞状细胞癌荷瘤小鼠为研究对象，对刺芒柄花素、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷等 8 种黄酮类成分防治顺铂所致肾损伤作用进行药效学评价，并结合网络药理学发现黄酮类成分通过调控氧化应激、肿瘤和代谢相关通路发挥肾脏保护作用。

3.4　黄芪减轻抗肿瘤药物致心脏毒性

多种常用抗肿瘤药物具有心脏毒性。这类药物性多温燥，易耗伤人体气血津液，导致心血不足[89]。临床上，黄芪多糖辅助蒽环类药物治疗乳腺癌及恶性淋巴瘤患者时，联用组患者的血浆 BNP、GMP-140 水平明显低于常规组，而血浆 NO 和 LVEF 水平则高于常规组，表明黄芪多糖可有效防治蒽环类药物引起的心脏损伤[90]。基于动物模型的研究也证实，黄芪甲苷可通过抑制心肌细胞凋亡，进而减轻氟尿嘧啶引起的心脏损伤[91]；黄芪多糖可通过激活磷脂酰肌醇 3 激酶（PI3K）- 蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶（Akt）信号通路减少细胞凋亡，并抑制 p38 丝裂原活化蛋白激酶（p38MAPK）信号通路降低炎症因子的表达，减轻阿霉素所致小鼠心力衰竭[92]。此外，以黄芪为主药的复方制剂芪附汤[93]、当归补血汤[94]均能提高心肌细胞的 SOD 和 GSH-Px 的活性，降低 MDA 的含量，减少氧化应激而减轻阿霉素所致的心脏毒性。总之，黄芪能通过抗氧化应激、抗凋亡等多种机制，减轻抗肿瘤药物诱导的心脏损伤，保护心血管系统，提高治疗的总体效果[95-96]。

3.5　黄芪减轻抗肿瘤药物致骨髓抑制

骨髓抑制根据病机要素可归于“疲劳”“血虚”的范畴，因此补虚化瘀是其有效的治疗策略[97]。黄芪能益气养血、扶正祛邪，改善药物所致骨髓抑制，促进骨髓造血，提高机体免疫力[98]。临床上，在给予胃癌患者紫杉醇联用黄芪注射液治疗中，发现黄芪注射液可在一定程度上调节患者外周血 T 淋巴细胞亚群的比例，提高血红蛋白水平和白细胞数，防治Ⅱ度及Ⅱ度以上骨髓抑制[99]。宫颈癌患者在给予紫杉醇和顺铂化疗的基础上，加以黄芪多糖辅助治疗，患者的白细胞数、红细胞数和血小板数明显增加，骨髓抑制的发生率显著降低[100]。动物研究发现，黄芪中的有效成分可从多个角度恢复并促进骨髓的造血功能，增加白细胞数，抑制骨髓抑制[101]。例如黄芪多糖能上调环磷酰胺所致骨髓抑制小鼠凋亡基因 *FOS* 的表达，增加骨髓细胞数、外周红细胞数和白细胞数，有效抑制细胞凋亡并恢复小鼠的骨髓造血功能[102]。白细胞介素可与造血细胞表面的受体结合，调控造血细胞的增殖分化[103]；黄芪皂苷能提高环磷酰胺诱导的贫血小鼠血清中的 IL-2 和 IL-4 含量，并促进造血干细胞的生长和骨髓造血，有效改善环磷酰胺诱导的免疫失调和骨髓抑制[104]。

4　小结与展望

随着中医药的发展，黄芪的药效作用及机制得到不断的探索，关于黄芪对抗肿瘤药物减毒作用的研究也逐渐增多。已有的动物和临床研究均证实黄芪的活性成分、黄芪注射液及黄芪复方制剂可通过降低炎症因子的表达、抗氧化、抗细胞凋亡等机制，多靶点、多途径地预防或治疗抗肿瘤药物所致的不良反应，对多系统、多脏器发挥功能调节和保护作用。黄芪与化疗药物联合使用能增强抗肿瘤效果、改善临床症状，具有广阔的研究前景。

目前，黄芪与抗肿瘤药物联用的研究仍处于起步阶段，还有诸多问题有待深入探索，如黄芪减毒作用的分子靶点及相关证据尚不充足，尽管一些经典的途径被认为是可能相关的机制，但仍需要进一步完善和探索，为治疗提供更多的理论依据；发挥药效作用的活性成分及其有效剂量亦不明确，中药多靶点的作用特点也使药效指标不清楚；证据多为经典方的临床应用经验及小样本的试验设计，尚缺乏规范、系统的大样本、多中心的临床试验证据。未来应进一步结合临床试验，借助网络药理学、分子生物学以及药物代谢组学、基因组学、蛋白组学等现代研究理念和技术手段，对黄芪的活性成分及药效作用机制进行更深入的研究，以更好地发挥中西药联用减毒增效的优势。

参考文献

[1] Sung H，Ferlay J，Siegel RL，et al. Global cancer statistics 2020：GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin，2021，71（3）：209-249.

[2] Babiker HM，McBride A，Newton M，et al. Cardiotoxic effects of chemotherapy：a review of both cytotoxic and molecular targeted oncology therapies and their effect on the cardiovascular system [J]. Crit Rev Oncol Hematol，2018，126：186-200.

[3] Hassanshahi M，Su YW，Fan CM，et al. Methotrexate chemotherapy-induced damages in bone marrow sinusoids：an in

vivo and in vitro study [J]. J Cell Biochem，2019，120（3）：3220-3231.
[4] Tsuda Y，Tsoi K，Parry MC，et al. Impact of chemotherapy-induced necrosis on event-free and overall survival after preoperative MAP chemotherapy in patients with primary high-grade localized osteosarcoma [J]. Bone Joint J，2020，102（6）：795-803.
[5] Dessalvi CC，Deidda M，Mele D，et al. Chemotherapy-induced cardiotoxicity：new insights into mechanisms，monitoring，and prevention [J]. J Cardiovasc Med，2018，19（7）：315-323.
[6] Hauner K，Maisch P，Retz M. Side effects of chemotherapy [J]. Urologe B，2017，56（4）：472-479.
[7] Cao S，Yan M，Hou Z，et al. Danshen modulates Nrf2-mediated signaling pathway in cisplatin-induced renal injury [J]. Curr Med Sci，2017，37（5）：761-765.
[8] Wang Z，Qi F，Cui Y，et al. An update on Chinese herbal medicines as adjuvant treatment of anticancer therapeutics [J]. Biosci Trends，2018，12（3）：220-239.
[9] Zhong JP. Effect of Xiao Chaihu Tang combined with intravenous chemotherapy on tumor markers and immune function in patients with advanced breast cancer [J]. J Hainan Med Univ，2017，23（5）：103-107.
[10] Zhang C，Yang X，Wei J，et al. Ethnopharmacology，phytochemistry，pharmacology，toxicology and clinical applications of Radix Astragali [J]. Chin J Integr Med，2021，27（3）：229-240.
[11] 周坚，刘时觉，林建武，等 . 黄芪注射液对肿瘤化疗减毒作用的临床观察 [J]. 浙江中医杂志，2007，42（3）：179-180.
[12] 廖开莲，欧阳周 . 黄芪注射液防护顺铂肾毒性 79 例临床观察 [J]. 医学临床研究，2002，19（6）：461-462.
[13] Fu J，Wang Z，Huang L，et al. Review of the botanical characteristics，phytochemistry，and pharmacology of Astragalus membranaceus（Huangqi）[J]. Phytother Res，2014，28（9）：1275-1283.
[14] Wang D，Li R，Wei S，et al. Metabolomics combined with network pharmacology exploration reveals the modulatory properties of Astragali Radix extract in the treatment of liver fibrosis [J]. Chin Med，2019，14（1）：1-16.
[15] 李静，王利，彭文，等 . 黄芪治疗肾脏疾病的研究进展 [J]. 中南药学，2017，15（1）：85-87.
[16] Li K，Zhang R，Li SY，et al. Potential quality evaluation approach for the absolute growth years' wild and transplanted Astragali Radix based on anti-heart failure efficacy [J]. Chin J Nat Med，2020，18（6）：460-471.
[17] Liu J，Zhao ZZ，Chen HB. Review of Astragali Radix [J]. Chin Herb Med，2011，3（2）：90-105.
[18] Ren S，Zhang H，Mu Y，et al. Pharmacological effects of astragalosideⅣ：a literature review [J]. J Tradit Chin Med，2013，33（3）：413-416.
[19] He XJ，Shu J，Xu L，et al. Inhibitory effect of Astragalus polysaccharides on lipopolysaccharide-induced TNF-α and IL-1β production in THP-1 cells [J]. Molecules，2012，17（3）：3155-3164.
[20] 魏秋芳，王惠霞 . 黄芪总黄酮多靶点调控治疗糖尿病及其并发症的研究进展 [J]. 中南药学，2020，18（8）：1348-1356.
[21] 国家中医药管理局关于发布《古代经典名方目录（第一批）》的通知 [EB/OL]. http：//kjs. satcm. gov. cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107. html，2018-04-16.
[22] 王艳杰，康芯荣，张雨薇，等 . 当归补血汤抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中国医学装备，2017，14（8）：165-169.
[23] 张兰会，赵参军，吴昊，等 . 升阳益胃汤加减在晚期胃癌阳虚湿阻证化疗患者中的作用 [J]. 世界中医药，2020，15（24）：3792-3796.
[24] 田君，姚学权，吴晓宇，等 . 黄芪桂枝五物汤防治奥沙利铂的周围神经毒性的系统评价及 Meta 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19（22）：325-330.
[25] 王磊，许小敏，伍筱铭，等 . 当归补血汤防治化疗副作用的中医学机制 [J]. 时珍国医国药，2017，28（11）：2708-2710.
[26] 付林，刘翔 . 大肠癌术后化疗联合加味升阳益胃汤的临床疗效 [J]. 世界华人消化杂志，2016，24（14）：2274-2278.
[27] 刘粉叶，王均宁 . 圣愈汤配方颗粒防治化疗所致骨髓抑制效果观察 [J]. 山东医药，2011，51（19）：101-102.
[28] 张保国，刘庆芳 . 黄芪桂枝五物汤现代临床应用 [J]. 中成药，2010，32（5）：837-840.
[29] 王惠玲，赵艳莉，李成军，等 . 黄芪桂枝五物汤联合中药药浴治疗恶性肿瘤患者化疗后周围神经毒性的临床效果 [J]. 临床医学研究与实践，2019，4（16）：112-113.
[30] 吴龙武 . 当归补血汤对防治原发性恶性骨肿瘤患者化疗导致的骨髓抑制的辅助疗效观察 [D]. 福州：福建中医药大学，2020.
[31] 王若进，李绍旦，王朴，等 . 加减圣愈汤改善晚期结肠癌患者肿瘤化疗相关性中度贫血的临床研究 [J]. 中医药导报，2021，27（2）：49-52.
[32] Lheureux S，Clarisse B，Launay-Vacher V，et al. Evaluation of current practice：management of chemotherapy-related toxicities [J]. Anticancer Drugs，2011，22（9）：919-925.
[33] Rao KV，Faso A. Chemotherapy-induced nausea and vomiting：optimizing prevention and management [J]. Am Health Drug Benefits，2012，5（4）：232-240.
[34] Miltenburg NC，Boogerd W. Chemotherapy-induced neuropathy：a comprehensive survey [J]. Cancer Treat Rev，2014，40（7）：872-882.
[35] Dadban SM，Dabidi RV，Farazmandfar T. Effect of continuous aerobic exercise on Bax/Bcl-2 ratio and doxorubicin-induced liver toxicity in aging model rats [J]. J Mazandaran Univ Med Sci，2018，28（165）：36-46.
[36] Urrutia-Maldonado E，Abril-Molina A，Alés-Palmer M，et al. Chemotherapy-induced liver injury in children [J]. An Pediatr（Engl Ed），2019，91（4）：256-263.
[37] Rhea IB，Oliveira GH. Cardiotoxicity of novel targeted chemotherapeutic agents [J]. Curr Treat Options Cardiovasc Med，2018，20（7）：1-10.
[38] Babar T，Blomberg C，Hoffner E，et al. Anti-HER2 cancer therapy and cardiotoxicity [J]. Curr Pharm Des，2014，20（30）：4911-4919.

[39] Porta C，Paglino C，Imarisio I，et al. Uncovering Pandora’s vase：the growing problem of new toxicities from novel anticancer agents. The case of sorafenib and sunitinib [J]. Clin Exp Med，2007，7（4）：127-134.
[40] Chen ZG，Chen WB，Wang J，et al. Pretreated baseline neutrophil count and chemotherapy-induced neutropenia may be conveniently available as prognostic biomarkers in advanced gastric cancer [J]. Intern Med J，2015，45（8）：854-859.
[41] Lucas D，Scheiermann C，Chow A，et al. Chemotherapy-induced bone marrow nerve injury impairs hematopoietic regeneration [J]. Nat Med，2013，19（6）：695-703.
[42] 李德爱，王大志，张书瑜，等 . 抗肿瘤药物与化疗患者发生骨髓抑制情况的药物流行病学研究 [J]. 中国药学杂志，2010，45（24）：1968-1970.
[43] 何海燕，朱京慈，彭娜，等 . 肿瘤化疗病人消化道症状的调查研究 [J]. 护理研究，2011，25（4）：300-302.
[44] Dranitsaris G，Molassiotis A，Clemons M，et al. The development of a prediction tool to identify cancer patients at high risk for chemotherapy-induced nausea and vomiting [J]. Ann Oncol，2017，28（6）：1260-1267.
[45] McQuade RM，Stojanovska V，Abalo R，et al. Chemotherapy-induced constipation and diarrhea：pathophysiology，current and emerging treatments [J]. Front Pharmacol，2016，7：414.
[46] Waseem M，Kaushik P，Tabassum H，et al. Role of mitochondrial mechanism in chemotherapy-induced peripheral neuropathy [J]. Curr Drug Metab，2018，19（1）：47-54.
[47] Battaglini E，Goldstein D，Grimison P，et al. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity in cancer survivors：predictors of long-term patient outcomes [J]. J Natl Compr Canc Netw，2021，19（7）：821-828.
[48] Shah A，Hoffman EM，Mauermann ML，et al. Incidence and disease burden of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in a population-based cohort [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry，2018，89（6）：636-641.
[49] Adrienne H，Erzsébet PZ. Chemotherapy induced liver toxicity in children with malignant diseases [J]. Bull Med Sci，2018，91（1）：37-41.
[50] Jin YM，Ji MH，Seo I，et al. Risk factors associated with the incidence and time to onset of lapatinib-induced hepatotoxicity [J]. Breast Cancer Res Tr，2019，178（1）：239-244.
[51] Damodar G，Smitha T，Gopinath S，et al. An evaluation of hepatotoxicity in breast cancer patients receiving injection doxorubicin [J]. Ann Med Health Sci Res，2014，4（1）：74-79.
[52] Lin Y，Liu JL，Zhang XH，et al. A prospective，randomized study on hepatotoxicity of anastrozole compared with tamoxifen in women with breast cancer [J]. Cancer Sci，2014，105（9）：1182-1188.
[53] Wang JJ，Wu YL，Dong M，et al. Observation of hepatotoxicity during long-term gefitinib administration in patients with non-small-cell lung cancer [J]. Anticancer Drugs，2016，27（3）：245-250.
[54] Aldossary SA. Review on pharmacology of cisplatin：clinical use，toxicity and mechanism of resistance of cisplatin [J]. Biomed Pharmacol J，2019，12（1）：7-15.
[55] Izzedine H，Perazella MA. Anticancer drug-induced acute kidney injury [J]. Kidney Int Rep，2017，2（4）：504-514.
[56] 陈煜 . 铂类抗肿瘤药物不良反应及防治措施 [J]. 临床合理用药杂志，2019，12（28）：120-122.
[57] Modesto DSV，Modesto DSLA. Cardiotoxicity in chemotherapeutic agents [J]. Russ Open Med J，2021，10（1）：106-106.
[58] Cardinale D，Colombo A，Bacchiani G，et al. Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy [J]. Circulation，2015，131（22）：1981-1988.
[59] Narayan V，Keefe S，Haas N，et al. Prospective evaluation of sunitinib-induced cardiotoxicity in patients with metastatic renal cell carcinoma [J]. Clin Cancer Res，2017，23（14）：3601-3609.
[60] Tvsvgk T，Handa A，Kumar K，et al. Chemotherapy-associated pulmonary toxicity—case series from a single center [J]. South Asian J Cancer，2021，10（4）：255-260.
[61] Suresh K，Naidoo J，Lin CT，et al. Immune checkpoint immunotherapy for non-small cell lung cancer：benefits and pulmonary toxicities [J]. Chest，2018，154（6）：1416-1423.
[62] Nici L，Santos-Moore A，Kuhn C，et al. Modulation of bleomycin-induced pulmonary toxicity in the hamster by the antioxidant amifostine [J]. Cancer，2015，83（9）：2008-2014.
[63] Kennedy LB，Salama AKS. A review of cancer immunotherapy toxicity [J]. CA Cancer J Clin，2020，70（2）：86-104.
[64] Alexander JL，Wilson ID，Teare J，et al. Gut microbiota modulation of chemotherapy efficacy and toxicity [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol，2017，14（6）：356-365.
[65] Lacouture ME，Anadkat M，Jatoi A，et al. Dermatologic toxicity occurring during anti-EGFR monoclonal inhibitor therapy in patients with metastatic colorectal cancer：a systematic review [J]. Clin Colorectal Cancer，2018，17（2）：85-96.
[66] Shahid F，Farooqui Z，Khan F. Cisplatin-induced gastrointestinal toxicity：an update on possible mechanisms and on available gastroprotective strategies [J]. Eur J Pharmacol，2018，827：49-57.
[67] 金文晶，高启龙 . 从五脏一体观探讨瑞戈非尼所致腹泻 [J]. 中医临床研究，2020，12（12）：146-148.
[68] 汪东杰，汪丽艳，黄炜 . 黄芪注射液对乳腺癌患者辅助化疗后胃肠道不良反应及营养状态的影响 [J]. 新中医，2019，51（10）：138-141.
[69] 郑华 . 探析黄芪注射液对乳腺癌患者辅助化疗后胃肠道不良反应和营养状态的影响 [J]. 中国医药指南，2018，16（2）：173-174.
[70] 谢华辉，乔建国，罗靖，等 . 黄芪多糖与白介素 -2 联合 FOLFOX4 化疗方案用于晚期结直肠癌治疗的临床研究 [J]. 肿瘤药学，2016，6（6）：418-422.
[71] Guo L，Bai SP，Zhao L，et al. Astragalus polysaccharide injection integrated with vinorelbine and cisplatin for patients with advanced non-small cell lung cancer：effects on quality of life and survival [J]. Med Oncol，2012，29（3）：1656-1662.

[72] 陈婷玉 . 从 TLR4/NF-κB 通路探讨芪药鸡金粥对化疗后大鼠胃肠道紧密连接蛋白的影响 [D]. 福州：福建中医药大学，2017.
[73] 林梅英，关莹，侯恩存 . 黄芪注射液对化疗副作用的拮抗作用的临床观察 [J]. 广州中医药大学学报，2006，23（2）：127-129.
[74] Fu B，Wang N，Tan HY，et al. Multi-component herbal products in the prevention and treatment of chemotherapy-associated toxicity and side effects：a review on experimental and clinical evidences [J]. Front Pharmacol，2018，9：1394.
[75] 王轶珊，吴江，吴娜，等 . 参芪扶正注射液对 NSCLC 并胸腔积液患者化疗中癌疲乏性及毒副反应的影响 [J]. 医学临床研究，2018，35（6）：1238-1240.
[76] Jung Y，Jerng U，Lee S. A systematic review of anticancer effects of Radix Astragali [J]. Chin J Integr Med，2016，22（3）：225-236.
[77] 吴继萍，杨晓红 . 黄芪注射液治疗肿瘤化疗所致肝损伤 23 例 [J]. 云南医药，1998，19（5）：389-389.
[78] 智英辉，杨永强，黄雷，等 . 注射用黄芪多糖对雌激素受体阳性乳腺癌患者长期接受他莫昔芬治疗后所致非酒精性脂肪肝及不适症状群的影响 [J]. 现代中西医结合杂志，2020，29（28）：3128-3132.
[79] Wen L，Gao FF，Li Q，et al. Protective effect of Astragalus polysaccharides on liver injury induced by several different chemotherapeutics in mice [J]. Asian Pac J Cancer Prev，2014，15（23）：10413-10420.
[80] 汪蓓，毛艳，杨淼 . 黄芪多糖对阿霉素治疗小鼠乳腺癌的增效减毒机制研究 [J]. 中国医院药学杂志，2017，37（6）：497-501.
[81] 安方玉，史旭锋，颜春鲁，等 . 黄芪水煎剂对荷 H_{22} 肝癌小鼠瘤组织凋亡及肝损伤调控的作用机制 [J]. 华西药学杂志，2020，35（4）：392-396.
[82] Green DM，Wang M，Krasin M，et al. Kidney function after treatment for childhood cancer：a report from the St. Jude Lifetime Cohort Study [J]. J Am Soc Nephrol，2021，32（4）：983-993.
[83] Wu JS，Li YF，Li YY，et al. Huangqi decoction alleviates alpha-naphthylisothiocyanate induced intrahepatic cholestasis by reversing disordered bile acid and glutathione homeostasis in mice [J]. Front Pharmacol，2017，8：938.
[84] 段萍，王再谟 . 黄芪在恶性肿瘤化疗中的增效减毒作用的临床研究 [J]. 中国中西医结合杂志，2002，22（7）：515-517.
[85] 陆素琴 . 黄芪注射液对顺铂所致肾毒性的防护观察 [J]. 湖北中医杂志，2004，26（8）：12-13.
[86] Pei X，Yi JH，Wei MZ. Study on the mechanism of JianPiJieDu prescription promoting oxaliplatin in the treatment of gastric cancer [J]. J Hainan Med Univ，2016，22（16）：115-119.
[87] 巩佳威，宋燕青，高欢，等 . 黄芪甲苷经 FXR-NLRP3 途径保护顺铂诱导的小鼠肾损伤研究 [J]. 中国药学杂志，2021，56（13）：1054-1058.
[88] Cui JJ，Zheng XW，Yang DL，et al. Astragali radix total flavonoid synergizes cisplatin to inhibit proliferation and enhances the chemosensitivity of laryngeal squamous cell carcinoma [J]. RSC Adv，2019，9（42）：24471-24482.
[89] Wang LJ，Wang LY，Zhou XX，et al. Qishen Yiqi dropping pills ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice via enhancement of cardiac angiogenesis [J]. Med Sci Monit，2019，25：2435-2444.
[90] 孔嘉欣，苏旭春，戴诗蕾，等 . 黄芪多糖防治蒽环类药物心脏毒性的临床观察 [J]. 中国医药导报，2017，14（20）：136-139.
[91] 李沅洋，杨书凤，周湘忠 . 黄芪甲苷减轻 5- 氟尿嘧啶诱导大鼠心肌细胞凋亡的实验研究 [J]. 辽宁中医杂志，2021，48（1）：183-186.
[92] Cao Y，Ruan Y，Shen T，et al. Astragalus polysaccharide suppresses doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating the PI3k/Akt and p38MAPK pathways [J]. Oxid Med Cell Longev，2014，2014：674219.
[93] 于彩娜，范颖，林庶茹 . 芪附汤对阿霉素心脏毒性损伤的保护作用及其抗氧化机制 [J]. 中国实验方剂学杂志，2011，17（8）：193-196.
[94] 陈鹊汀，刘智勤，朱惠学，等 . 当归补血汤对阿霉素化疗荷瘤小鼠的增效减毒作用 [J]. 时珍国医国药，2012，23（2）：349-350.
[95] 孔嘉欣，苏旭春，闫冰川，等 . 黄芪多糖注射液防治蒽环类药物心脏毒性临床观察 [J]. 新中医，2013，45（7）：109-111.
[96] 王雪丽，陈亚男，黄厚芹，等 . 黄芪甲苷通过抑制 MerTK 缓解阿霉素引起的心脏毒性 [J]. 蚌埠医学院学报，2021，46（6）：717-721.
[97] Hassanshahi M，Hassanshahi A，Khabbazi S，et al. Bone marrow sinusoidal endothelium：damage and potential regeneration following cancer radiotherapy or chemotherapy [J]. Angiogenesis，2017，20（4）：427-442.
[98] Kwon C，Yoo H，Bang S，et al. Effect of Astragalus membranaceus extract against improvement of myelosuppression and quality of life in 5-fluorouracil treated mice [J]. Korean J Intern Med，2007，28（2）：304-320.
[99] 张琼 . 足三里穴位注射黄芪注射液对胃癌化疗患者免疫功能的影响 [D]. 南京：南京中医药大学，2014.
[100] Bao WR，Zhang QW，Zheng HM，et al. Radix Astragali polysaccharide RAP directly protects hematopoietic stem cells from chemotherapy-induced myelosuppression by increasing FOS expression [J]. Int J Biol Macromol，2021，183：1715-1722.
[101] 郑召鹏，杨卫兵，李宁，等 . 注射用黄芪多糖预防非小细胞肺癌化疗后骨髓抑制的疗效观察 [J]. 中草药，2013，44（2）：208-209.
[102] 李明尧，朱土福，张春宁 . 注射用黄芪多糖对宫颈癌化疗患者骨髓抑制的效果分析 [J]. 广州医药，2016，47（5）：36-38.
[103] Guo B，Zhang L，Chiorazzi N，et al. IL-4 rescues surface IgM expression in chronic lymphocytic leukemia [J]. Blood，2016，128（4）：553-562.
[104] 梁可，马进，曲怡，等 . 黄芪皂苷对小鼠化疗贫血模型白介素 -2、白介素 -4 和白介素 -6 的影响 [J]. 中国医药导报，2015，12（18）：16-18.

（收稿日期：2021-11-09；修回日期：2022-01-04）

糖皮质激素在重型及危重型 COVID-19 患者中的应用进展

王蒙蒙[1]，任戎[1]，李丽[1]，任萌[1]，李虎玲[1]，延阔[1]，耿彤[1]，李汉卿[1]，章彦文[3]，喻雨[3]，孙双勇[1*]，王玉丽[2, 4, 5*]（1. 天津医药集团研究院有限公司，天津　300171；2. 天津大学化学工程与技术学院，系统生物工程教育部重点实验室，天津　300072；3. 天津医科大学研究生院，天津　300070；4. 释药技术与药代动力学国家重点实验室，天津　300463；5. 中国医学科学院 药物代谢新技术创新单元，北京　100730）

摘要：新型冠状病毒（SARS-CoV-2）导致的肺炎（COVID-19）疫情给人类健康带来了严重威胁，已成为国际突发公共卫生事件。目前尚无治疗 COVID-19 的特效药物。细胞因子风暴、急性呼吸窘迫综合征（ARDS）和脓毒症是导致 COVID-19 患者死亡的主要原因。糖皮质激素常用于治疗急性呼吸窘迫综合征和脓毒症患者，已被广泛应用于重症 COVID-19 患者。但糖皮质激素在 COVID-19 患者中的应用仍存在争议。本文综述了糖皮质激素治疗 COVID-19 的临床应用，以期为合理使用糖皮质激素治疗 COVID-19 患者提供临床依据。

关键词：糖皮质激素；SARS-CoV-2；COVID-19；中药；甲泼尼龙；地塞米松

中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1605-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.022

Application of glucocorticoids in severe and critical COVID-19 patients

WANG Meng-meng[1], REN Rong[1], LI Li[1], REN Meng[1], LI Hu-ling[1], YAN Kuo[1], GENG Tong[1], LI Han-qing[1], ZHANG Yan-wen[3], YU Yu[3], SUN Shuang-yong[1*], WANG Yu-li[2, 4, 5*] (1. *Research Institute of Tianjin Pharmaceutical Group Co., Ltd.*, *Tianjin* 300171; 2. *Key Laboratory of Systems Bioengineering* (*Ministry of Education*), *School of Chemistry Engineering and Technology*, *Tianjin University*, *Tianjin* 300072; 3. *School of Graduate, Tianjin Medical University*, *Tianjin* 300070; 4. *State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics*, *Tianjin* 300463; 5. *Research Unit for Drug Metabolism*, *Chinese Academy of Medical Sciences*, *Beijing* 100730)

Abstract: The corona virus disease 2019 (COVID-19) caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) had posed a serious threat to the health of people around the world and had become an international public health emergency and presented an unprecedented challenge. At present, no specific drugs were very effective. Cytokine storm, acute respiratory distress syndrome and sepsis are the main causes of death among COVID-19 patients. Glucocorticoids are commonly used for acute respiratory distress syndrome and septic people and are also widely used for patients with severe COVID-19. The use of glucocorticoids in COVID-19 treatment remains controversial. This article reviewed the clinical application of glucocorticoids for COVID-19 to provide reference for rational application of glucocorticoids in the future.

Key words: glucocorticoid; SARS-CoV-2; COVID-19; traditional Chinese drug; methylprednisolone; dexamethasone

新型冠状病毒（SARS-CoV-2）感染所致的肺炎（COVID-19）为新发急性呼吸道传染病，已在 200 多个国家和地区迅速蔓延，目前已成为全球性重大公共卫生事件，迄今尚无特效治疗方法[1-3]。人类感染了 SARS-CoV-2 后常见体征有呼吸道症状、发热、咳嗽、气促和呼吸困难等。

作者简介：王蒙蒙，女，硕士，主要从事药理研究，email：wangmengmengx@163.com　*通信作者：孙双勇，男，博士，主要从事新药药理与药物评价研究，email：sunshuangyong@163.com；王玉丽，女，博士，研究员，主要从事中药新药研发、中药药理筛选与成药性研究、中药大品种二次开发，email：yuliwang6@163.com

在较严重的病例中，感染可导致肺炎、严重急性呼吸综合征、肾衰竭，甚至死亡。SARS-CoV-2 是β属的冠状病毒，由于β属冠状病毒不是人类的常见病原体，人类缺乏对 SARS-CoV-2 的天然免疫力。目前还没有特异性抗病毒药物，最新报道的默克与 Ridgeback 公司开发的口服抗 SARS-CoV-2 药 molnupiravir 在Ⅲ期临床试验中降低住院率或死亡风险率约 50%[4]；辉瑞研制的口服药 Paxlovid 在临床试验中显示在出现症状后 3 d 内服用可将住院率或病死率降低 89%[5]。目前对患者进行的辅助性治疗方法主要是糖皮质激素（glucocorticoids，GCs）、抗细胞因子、免疫调节剂和康复者血浆疗法，迄今为止，糖皮质激素是治疗严重急性 COVID-19 患者的最佳疗法 [6]。

糖皮质激素是机体内极为重要的一类调节分子，它对机体的发育、生长、代谢以及免疫功能等起着重要调节作用，是机体应激反应最重要的调节激素，药理剂量糖皮质激素主要有抗炎、免疫抑制、抗毒和抗休克等作用 [7]。糖皮质激素具有强大的免疫抑制和抗炎作用，在紧急或危重情况下，糖皮质激素往往为首选，但其不良反应较多，会引起血糖升高、皮疹、感染、骨质疏松、股骨头坏死和向心性肥胖等不良反应 [8]。《新型冠状病毒肺炎诊疗方案（试行第八版修订版）》中指出对于氧合指标进行性恶化、影像学进展迅速、机体炎症反应过度激活状态的患者，可酌情短期内使用糖皮质激素 [9]。但目前糖皮质激素用于治疗 COVID-19 患者仍存在争议，应严格掌握适应证，权衡利弊，合理选择用药时机，保证患者安全、科学用药 [10]。本文综述了糖皮质激素在重型及危重型 COVID-19 患者中的临床应用，以期为临床用药提供参考。

1 糖皮质激素治疗 COVID-19 的药理作用

SARS-CoV-2 通过病毒表面刺突蛋白与人类血管紧张素转换酶 2（ACE2）受体结合进入细胞，感染肺上皮细胞，经复制在人体扩散，免疫系统被过度激活，免疫系统失衡，引起多种组织和器官损伤。免疫系统被激活到极限程度或者失去控制，淋巴细胞和巨噬细胞持续被激活和扩增，分泌大量的炎症细胞因子，导致机体出现“细胞因子风暴”[11]。

SARS-CoV-2 通过与人体细胞表面的 ACE2 相结合而感染人体细胞。而 ACE2 在生理情况下是维持呼吸系统、心血管系统以及重要器官功能平衡的保护酶。大量 SARS-CoV-2 入侵机体时，ACE2 在短时间内被消耗，丧失了对机体呼吸系统、心血管系统等重要器官的保护作用，患者病情可能迅速恶化并出现多器官功能衰竭，因此，对患者给予 ACE2 激活可能成为有效的治疗方式之一。瑞金医院的科研人员发现低剂量的糖皮质激素对人上消化道上皮细胞系（GES-1）和人单核细胞系（THP-1）中的 ACE2 均有激活作用，对细胞因子白介素 6（IL-6）有抑制作用，临床常用的糖皮质激素能显著激活 ACE2 表达并且抑制巨噬细胞分泌 IL-6，其中氢化可的松作用最强，其次是泼尼松龙、地塞米松和甲泼尼龙，中、低剂量糖皮质激素可以激活 ACE2 并降低 IL-6 的水平，抑制细胞因子风暴，在呼吸系统和消化系统中发挥保护作用 [12]。

2 糖皮质激素在 COVID-19 治疗中的应用

COVID-19 可能包括两个主要阶段：第一个阶段为病毒复制高峰期，此阶段病毒对肺部有直接损伤（主要但不限于）；第二个阶段为炎症反应失调，可能导致全身性影响和预后恶化 [13]。所有支持糖皮质激素用药的证据都是在第二阶段发现的，此时炎症反应失调可导致器官损伤。当先天免疫反应对抗病毒复制阶段早期使用糖皮质激素可能是有害的，因为它会延长 SARS-CoV-2 的复制时间，增加病毒载量，使正常的先天免疫失调，从而可能导致更严重的肺损伤，即使在没有合并症的年轻受试者中都可能导致住院率和需要呼吸支持的重症病例数量增加 [14]。因此，仅在重症或危重症 COVID-19 患者中推荐使用糖皮质激素，本文综述了在治疗重症 COVID-19 患者过程中应用较多的两种糖皮质激素：甲泼尼龙和地塞米松。

2.1 甲泼尼龙在 COVID-19 治疗中的应用

文献报道使用甲泼尼龙治疗可明显降低感染 SARS-CoV-2 合并急性呼吸窘迫综合征（ARDS）患者的死亡风险 [15]。李威等 [16] 回顾性分析了发热病区 288 例 COVID-19 患者中 112 例由轻型、普通型转重型、危重型患者使用小剂量甲泼尼龙琥珀酸钠治疗的情况。87 例患者在加重 48 h 内（Ⅰ组）使用甲泼尼龙琥珀酸钠治疗，治愈率为 96.55%，病死率为 3.45%；25 例患者在加重在 48 h 后（Ⅱ组）使用甲泼尼龙琥珀酸钠治疗，治愈率为 20%，病死率为 80%，由此可知，小剂量甲泼尼龙琥珀酸钠治疗 COVID-19 最佳窗口期为轻型、普通型转重型、危重型后 48 h 内。日本的 Juntendo University 团队回顾性分析甲泼尼龙治疗重型 COVID-19 患者的疗效，发现血浆置换联合甲泼尼龙是治疗老年重症患者的有效方法 [17]。研究表明，高剂量（80 mg）甲基强的松龙治疗 COVID-19 患者可延长 SARS-CoV-2 的转录时间

（调整后的 $HR = 0.67$，95%CI：0.46 ～ 0.96，$P = 0.031$）；低剂量（40 mg）甲基强的松龙治疗则不然（调整后的 $HR = 0.72$，95%CI：0.48 ～ 1.08，$P = 0.11$）[18]。据报道，重症 COVID-19 患者病死率的增加与使用高剂量而非低剂量糖皮质激素治疗有关 [19]。

2.2　地塞米松在 COVID-19 治疗中的应用

研究发现早期使用地塞米松治疗可以改变患者系统免疫反应，减少中度至重度 ARDS 患者的机械通气时间和总病死率 [20]。牛津大学纽菲尔德人口健康学系在英国 176 家医院开展了针对 COVID-19 疗法的大规模随机、对照开放性临床试验（RECOVERY 试验），共纳入 6425 例患者 [21]，其中 2104 例患者接受口服或者静脉注射地塞米松治疗（6 mg・d^{-1}，最长 10 d），4321 例患者作为对照组，接受常规治疗。地塞米松组共有 482 例（22.9%）患者、对照组共有 1110 例（25.7%）患者在分组后 28 d 内死亡。在接受有创机械通气的患者中，地塞米松组（29.3%）的病死率低于常规治疗组（41.4%）；在接受氧疗而非有创机械通气的患者中，地塞米松组的病死率（23.3%）同样低于对照组（26.2%）。而未接受任何呼吸支持的患者中，两组的病死率差异无统计学意义，分别为 17.8% 和 14.0%。结果表明，使用地塞米松可降低接受有创机械通气或仅接受吸氧治疗患者的 28 d 病死率，而未接受呼吸支持的患者则没有获益。自 RECOVERY 试验发布以来，糖皮质激素药物的使用已在全球范围内广泛用于治疗严重的 COVID-19。然而，地塞米松在接受机械通气或补充氧气治疗的患者中获益最大，而在无低氧血症的患者中未见获益。世界卫生组织（WHO）对 RECOVERY 试验以及其他 6 项试验数据进行了荟萃分析，其中一些试验由于 RECOVERY 数据的公布而取消，荟萃分析显示仅推荐在需要补充氧气（常规氧疗和机械通气）的重症或危重症 COVID-19 患者中使用糖皮质激素。WHO 发布了关于 COVID-19 治疗的两项建议：对于重症和危重症 COVID-19 患者，应开始全身糖皮质激素治疗，推荐每日口服或静脉注射 6 mg 地塞米松或每 8 h 静脉注射 50 mg 氢化可的松，持续 7 ～ 10 d；其次，不建议在非重症 COVID-19 患者中使用糖皮质激素 [22-23]。

3　糖皮质激素联合中药在 COVID-19 治疗中的应用

在我国抗击 COVID-19 的疫情过程中，中医药起到了至关重要的作用。中医药具有多成分、多靶点、多环节等优势，中医认为感染 SARS-CoV-2 属于“湿毒”，采用“泻下通腑法”，可减轻重症患者炎症反应，提高免疫力，保护重要脏器 [24]。例如《新型冠状病毒肺炎诊疗方案（试行第八版修订版）》中推荐使用的中成药血必净注射液可降低重症肺炎患者血浆中 IL-6 和肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）水平，用于重症 COVID-19 患者的辅助治疗 [25-26]。中西医结合疗法是目前较高效的一种方法，使用糖皮质激素治疗的同时，合理运用中药，在增强疗效的同时还能减少激素的用量及不良反应 [27-29]。董红建等 [30] 选取重症社区获得性肺炎导致 ARDS 患者 63 例，观察组（31 例）在常规治疗基础上采用甲泼尼龙（100 mg・d^{-1} ivgtt）联合参芪扶正注射液（250 mL・d^{-1} ivgtt）治疗，对照组在常规治疗基础上采用甲泼尼龙（100 mg・d^{-1} ivgtt）治疗，疗程均为 3 d。治疗后，两组血清白介素 1β（IL-1β）、IL-6、C 反应蛋白（CRP）、TNF-α 及动脉血二氧化碳分压（$PaCO_2$）水平均较治疗前降低，观察组均低于对照组；动脉血氧分压（PaO_2）和血氧饱和度（SpO_2）水平均较治疗前升高，观察组均高于对照组，差异有统计学意义，总有效率观察组（80.65%）高于对照组（68.75%）。参芪扶正注射液主要成分为党参和黄芪。现代药理学研究证明黄芪具有增强机体免疫力、保肝、利尿、抗应激、降压和广泛抗菌作用 [31]；党参具有增强机体免疫力、抗氧化、自由基消除能力等作用 [32]。秦娅蓝等 [33] 纳入在重庆市收治的 COVID-19 重症（重型和危重型）患者 47 例，在常规治疗基础上，A 组（21 例）给予热毒宁注射液（10 mL・d^{-1} ivgtt，5 ～ 7 d）联合甲泼尼龙治疗（1 ～ 2 mg/（kg・d）ivgtt，3 ～ 5 d），B 组（26 例）给药甲泼尼龙治疗，用法用量同 A 组。治疗后 A 组患者氧合指数和白细胞（WBC）、IL-6、IL-17、CRP 等炎症指标水平较 B 组明显降低（$P < 0.05$），IL-4 水平明显升高（$P < 0.05$），并且住院时间、入住 ICU 时间明显缩短（$P < 0.05$）。

4　使用糖皮质激素治疗存在的问题

糖皮质激素治疗相关的不良反应通常取决于治疗的剂量和持续时间 [23-34]。常见的不良反应包括体质量增加、糖尿病、肌肉减少症、骨质疏松症，并可能导致高血压、动脉粥样硬化、心血管疾病和血栓栓塞发病率的增加。此外，治疗剂量的糖皮质激素会增加继发感染风险，并可能导致伤口愈合受损、精神障碍和下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴（HPA）受抑制，从而有继发肾上腺功能不

全的风险[35]。因此，糖皮质激素用于治疗 SARS-CoV-2 感染仍存在争议。WHO 的相关重症感染临床指南[36]建议，非特殊原因，严重急性呼吸道感染患者应避免常规使用糖皮质激素。

在 COVID-19 患者中使用糖皮质激素的其他临床研究尚无定论，并存在一些局限性，包括效力不足、缺乏明确的临床进展指标或对潜在不良反应的调查不足等[37]。控制病毒感染需要充分的免疫反应，而糖皮质激素具有免疫抑制作用，可能会延缓机体对病毒的清除和存在继发感染风险，特别是在免疫功能低下的患者中，会增加继发感染和其他并发症的风险。有研究表明，持续使用中高剂量糖皮质激素进行慢性治疗可能会增加感染风险[38]。在一项对 399 名住院 COVID-19 患者的研究中，49.6% 有细菌重复感染，主要是克雷伯菌和金黄色葡萄球菌，用糖皮质激素治疗的患者重复感染的风险几乎增加了 3 倍[39]。在患有类风湿关节炎、炎症性肠病、慢性阻塞性肺疾病和哮喘的 COVID-19 患者中，长期使用糖皮质激素与住院率或病死率增加有关[40-42]。糖皮质激素治疗应局限于已证实免疫系统过度激活的重症 COVID-19 患者，回顾性研究表明，19% ～ 26% 的 COVID-19 患者（45% 的重症患者）使用了糖皮质激素，目前存在滥用糖皮质激素的风险[43-44]。总之，目前的研究证据不支持 COVID-19 患者常规全身使用糖皮质激素，特别不建议在儿童患者中全身使用糖皮质激素。

5 讨论

近期发现 SARS-CoV-2 的阿尔法、德尔塔、拉姆达、奥密克戎等变异病毒的传染力和致病力增强。目前对 COVID-19 的治疗仍然是一种挑战，临床实践中已经显示小剂量糖皮质激素在 COVID-19 救治中的有效性和安全性[45]。瑞金医院团队开展的基础研究为糖皮质激素用于重症 COVID-19 患者的治疗提供了重要的数据支持[12]。但是糖皮质激素用于治疗 COVID-19 合并糖尿病或其他疾病（如肥胖、高血压和心血管疾病）时，仍需进一步的临床试验评估。我国对糖皮质激素在 COVID-19 中的应用一直保持谨慎态度，糖皮质激素的不良反应与应用糖皮质激素的剂量及周期成正相关。糖皮质激素联合中药治疗严重急性 COVID-19 患者可减少糖皮质激素的用量，提高患者的治愈率，减轻不良反应。时间是糖皮质激素治疗 COVID-19 有效性的关键因素，充分准确判断窗口期、及时干预，合理使用糖皮质激素以及联合中药优势，可以降低危重症患者病死率，提高治愈率。

参考文献

[1] 詹菁，刘倩，张雨竹，等 . 新型冠状病毒 2019-nCoV 的一些初步认识 [J]. 环境化学，2020，39（2）：283-291.

[2] Sabetkish N，Rahmani A. The overall impact of COVID-19 on healthcare during the pandemic：a multidisciplinary point of view [J]. Health Sci Rep，2021，4（4）：e386.

[3] 张树森，陈光裕，蔡志刚，等 . 糖皮质激素在新型冠状病毒肺炎中的应用 [J]. 国际呼吸杂志，2021，41（17）：1305-1310.

[4] Mahase E. Covid-19：molnupiravir reduces risk of hospital admission or death by 50% in patients at risk，MSD reports [J]. BMJ，2021，375：n2422.

[5] Mahase E. Covid-19：Pfizer’s paxlovid is 89% effective in patients at risk of serious illness，company reports [J]. BMJ，2021，375：n2713.

[6] Robinson PC，Morand E. Divergent effects of acute versus chronic glucocorticoids in COVID-19 [J]. Lancet Rheumatol，2021，3（3）：e168-e170.

[7] 宁光 . 糖皮质激素临床应用基本原则 [J]. 中国实用内科杂志，2013，33（10）：756-759.

[8] 赵籥陶，黄慈波 . 糖皮质激素的合理使用 [J]. 临床药物治疗杂志，2010，8（1）：23-28.

[9] 中华人民共和国国家卫生健康委员会 . 新型冠状病毒肺炎诊疗方案（试行第八版修订版）[EB/OL].（2021-04-14）[2022-1-11]. http：//www. gov. cn/zhengce/zhengceku/2020-08/19/5535757/files/da89edf7cc9244fb-b34ecf6c61df40bf. Pdf.

[10] 安浩宇 . 糖皮质激素药理作用及在临床应用过程中的不良反应分析 [J]. 世界最新医学信息文摘，2019，19（75）：51-52.

[11] Lu R，Zhao X，Li J，et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus：implications for virus origins and receptor binding [J]. Lancet，2020，395（10224）：565-574.

[12] Xiang Z，Liu J，Shi D，et al. Glucocorticoids improve severe or critical COVID-19 by activating ACE2 and reducing IL-6 levels [J]. Int J Biol Sci，2020，16（13）：2382-2391.

[13] Cruz AF，Ruiz-Antorán B，Múñez Rubio E，et al. The right time for steroids in Covid-19 [J]. Clin Infect Dis，2021，72（8）：1486-1487.

[14] Sarzani R，Spannella F，Giulietti F，et al. Possible harm from glucocorticoid drugs misuse in the early phase of SARS-CoV-2 infection：a narrative review of the evidence [J]. Intern Emerg Med，2021，doi: 10.1007/s11739-021-02860-3.

[15] Hu XS，Hu CH，Zhong P，et al. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome in COVID-19 patients outside Wuhan：a double-center retrospective cohort study of 197 cases in Hunan，China [J]. World J Clin Cases，2021，9（2）：344-356.

[16] 李威，柳德兵 . 甲泼尼龙琥珀酸钠治疗新型冠状病毒肺炎的有效窗口期 [J]. 武汉大学学报（医学版），2020，41（6）：870-874.

[17] Matsushita Y，Kusaoi M，Hiki M，et al. Combination therapy with plasma exchange and glucocorticoid may be

effective for severe COVID-19 infection：a retrospective observational study [J]. Ther Apher Dial，2021，25（4）：390-400.

[18] Hu Z，Li S，Yang A，et al. Delayed hospital admission and high-dose corticosteroids potentially prolong SARS-CoV-2 RNA detection duration of patients with COVID-19 [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis，2021，40（4）：841-848.

[19] Li X，Xu S，Yu M，et al. Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 inpatients in Wuhan [J]. J Allergy Clin Immunol，2020，146（1）：110-118.

[20] Villar J，Ferrando C，Martínez D，et al. Dexamethasone treatment for the acute respiratory distress syndrome：a multicentre，randomised controlled trial [J]. Lancet Respir Med，2020，8（3）：267-276.

[21] RECOVERY Collaborative Group. Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19 [J]. N Engl J Med，2021，384（8）：693-704.

[22] Sterne JAC，Murthy S，Diaz JV，et al. Association between administration of systemic corticosteroids and mortality among critically ill patients with COVID-19：a meta-analysis [J]. JAMA，2020，324（13）：1330-1341.

[23] Alexaki VI，Henneicke H. The role of glucocorticoids in the management of COVID-19 [J]. Horm Metab Res，2021，53（1）：9-15.

[24] 郑悦，芮庆林 . 中医药治疗重型新型冠状病毒肺炎思路探讨 [J]. 实用中医内科杂志，2021，35（10）：45-49.

[25] 刁云锋，张士俊，赵万勇，等 . 血必净注射液对重症肺炎患者血浆 IL-6 和 TNF-*α* 水平的影响 [J]. 中草药，2017，48（6）：1188-1191.

[26] 陈丽，张安，李群堂，等 . 血必净联合人免疫球蛋白在重型及危重型新型冠状病毒肺炎中的应用价值 [J]. 中华危重病急救医学，2021，33（4）：399-404.

[27] 宗阳，丁美林，马世堂，等 . 以血管紧张素转换酶Ⅱ（ACE2）为受体挖掘治疗新型冠状病毒肺炎（COVID-19）潜在中药及单体成分 [J]. 中草药，2020，21（5）：1123-1129.

[28] 张铁军，许浚，申秀萍，等 . 疏风解毒胶囊治疗新型冠状病毒肺炎（COVID-19）的基础研究及抗 COVID-19 中药新药研发思路 [J]. 中草药，2020，9（51）：2273-2282.

[29] 王继超，林龙熠，李博腾，等 . 中药防治新型冠状病毒肺炎（COVID-19）的研发进展 [J]. 沈阳药科大学学报，2021，38（7）：751-761.

[30] 董红建，谭捷 . 糖皮质激素联合参芪扶正注射液辅治重症社区获得性肺炎致 ARDS 患者效果观察及对血清炎性因子、血气指标影响 [J]. 临床误诊误治，2019，32（11）：25-29.

[31] 朱庆立 . 参芪扶正注射液治疗肺脾气虚型肺癌 180 例疗效观察 [J]. 中国当代医药，2012，19（17）：94-94.

[32] 李红，李宪，李秀秀，等 . 参芪扶正注射液对急性呼吸窘迫综合征患者治疗效果分析 [J]. 中国社区医师，2018，34（5）：98-99.

[33] 秦娅蓝，宋玉燕，周璐，等 . 热毒宁联合甲泼尼龙治疗重症新型冠状病毒肺炎临床疗效评价 [J]. 中国药业，2020，29（9）：19-22.

[34] Timmermans S，Souffriau J，Libert C. A general introduction to glucocorticoid biology [J]. Front Immunol，2019，10：1545.

[35] Huscher D，Thiele K，Gromnica-Ihle E，et al. Dose-related patterns of glucocorticoid-induced side effects [J]. Ann Rheum Dis，2009，68（7）：1119-1124.

[36] World Health Organization. Clinical management of severe acute respiratory infection（SARI）when COVID-19 disease is suspected：interim guidance，13 March 2020 [R/OL]. WHO，2020. https：//apps. who. int/iris/handle/10665/331446.

[37] Angus DC，Derde L，Al-Beidh F，et al. Effect of hydrocortisone on mortality and organ support in patients with severe COVID-19：the REMAP-CAP COVID-19 corticosteroid domain randomized clinical trial [J]. JAMA，2020，324（13）：1317-1329.

[38] Favalli EG，Bugatti S，Klersy C，et al. Impact of corticosteroids and immunosuppressive therapies on symptomatic SARS-CoV-2 infection in a large cohort of patients with chronic inflammatory arthritis [J]. Arthritis Res Ther，2020，22（1）：290.

[39] Bahl A，Johnson S，Chen NW. Timing of corticosteroids impacts mortality in hospitalized COVID-19 patients [J]. Intern Emerg Med，2021，16（6）：1593-1603.

[40] Brenner EJ，Ungaro RC，Gearry RB，et al. Corticosteroids，but not TNF antagonists，are associated with adverse COVID-19 outcomes in patients with inflammatory bowel diseases：results from an international registry [J]. Gastroenterology，2020，159（2）：481-491. e3.

[41] Gianfrancesco M，Hyrich KL，Al-Adely S，et al. Characteristics associated with hospitalisation for COVID-19 in people with rheumatic disease：data from the COVID-19 global rheumatology alliance physician-reported registry [J]. Ann Rheum Dis，2020，79（7）：859-866.

[42] Schultze A，Walker AJ，MacKenna B，et al. Risk of COVID-19-related death among patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma prescribed inhaled corticosteroids：an observational cohort study using the OpenSAFELY platform [J]. Lancet Respir Med，2020，8（11）：1106-1120.

[43] Xu XW，Wu XX，Jiang XG，et al. Clinical findings in a group of patients infected with the 2019 novel coronavirus（SARS-Cov-2）outside of Wuhan，China：retrospective case series [J]. BMJ，2020，368：m606.

[44] Huang C，Wang Y，Li X，et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan，China [J]. Lancet，2020，395（10223）：497-506.

[45] 李新刚，关春爽，鹿星梦，等 . 糖皮质激素在早期干预快速进展新型冠状病毒肺炎患者的临床研究 [J]. 中国药物警戒，2021，18（10）：910-914，919.

（收稿日期：2021-11-02；修回日期：2022-02-11）

菟丝子的研究进展及质量标志物（Q-marker）的预测分析

徐长丽[1]，石芸[2]，梁裕莎[1]，金俊杰[3]，周越[4]，李伟东[2]，秦昆明[1*]（1. 江苏海洋大学药学院，江苏　连云港　222005；2. 南京中医药大学药学院，江苏　南京　210046；3. 南京海源中药饮片有限公司，江苏　南京　210061；4. 连云港市中医院药剂科，江苏　连云港　222005）

摘要：菟丝子作为传统补益肝肾类中药，在历代中药文献中常用于肾虚引起的各种生殖系统疾病。现代药理学研究表明，菟丝子中含有多种化学成分，主要有黄酮类、酚酸类、多糖类以及微量元素等，并具有广泛的药理作用，对于男女生殖系统、内分泌系统、免疫系统疾病具有良好的防治作用。本文对近些年来关于菟丝子化学成分与药理作用的研究进展进行概述，并从成分特有性、传统药效相关性、传统药性相关性、化学成分可测性等几个方面对菟丝子质量标志物进行预测分析，最终得出可将菟丝子中金丝桃苷、槲皮素、山柰酚、异鼠李素等黄酮类成分，绿原酸等酚酸类成分以及多糖类成分作为菟丝子的质量标志物，为菟丝子今后的质量标准研究与开发提供参考。

关键词：菟丝子；化学成分；药理作用；质量标志物
中图分类号：R285.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1610-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.023

Research status of Cuscuta semen and the prediction of quality markers

XU Chang-li[1], SHI Yun[2], LIANG Yu-sha[1], JIN Jun-jie[3], ZHOU Yue[4], LI Wei-dong[2], QIN Kun-ming[1*] (1. *School of Pharmacy*, *Jiangsu Ocean University*, *Lianyungang Jiangsu* 222005; 2. *School of Pharmacy*, *Nanjing University of Chinese Medicine*, *Nanjing* 210046; 3. *Nanjing Haiyuan Prepared Slices of Chinese Crude Drugs Co.*, *Ltd*, *Nanjing* 210061; 4. *Department of Pharmacy*, *Lianyungang Hospital of Traditional Chinese Medicine*, *Lianyungang Jiangsu* 222005)

Abstract: Cuscuta semen is a traditional Chinese medicinal material that nourishes the liver and kidneys. It is most often for reproductive system diseases caused by kidney deficiency in traditional Chinese medicine books in many dynasties. Modern pharmacology shows that Cuscuta semen contains many chemical components, mainly flavonoids, phenolic acids, polysaccharides and some trace elements, with wide range of pharmacological effects and good prevention and treatment effects in male and female reproductive disorders, endocrine system diseases, and immune system diseases. This article summarized the research on the chemical compositions and pharmacological mechanism of Cuscuta semen in recent years from component specificity, correlation of traditional medicinal effects, correlation of traditional medicinal properties, and component measurability. It is concluded that flavonoids such as hyperoside, quercetin, kaempferol, and isorhamnetin, and phenolic acids such as chlorogenic acid and polysaccharides may serve as quality markers for Cuscuta semen. Prediction of the quality markers for Cuscuta semen provides references for future research and development of Cuscuta semen.

Key words: Cuscuta semen; chemical composition; pharmacological; mechanism; Q-marker

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81573603）；江苏省高校自然科学研究重大项目（No.21KJA360005）；江苏省六大人才高峰项目（No.SWYY-108）；江苏海洋大学研究生科研与实践创新计划项目（No.KYCX2021-079）。
作者简介：徐长丽，女，在读硕士研究生，主要从事中药质量标准研究，email：xuchangli199y@163.com　*通信作者：秦昆明，男，研究员，硕士研究生导师，主要从事中药炮制机制与质量标准研究，email：qinkm123@126.com

菟丝子为旋花科植物南方菟丝子 *Cuscuta australis* R.Br. 或菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam. 的干燥成熟种子，在我国大部分地区都有分布，为寄生植物。菟丝子最早记载于《神农本草经》[1]，被列为上品，现收载于《中国药典》2020 年版一部 [2]。菟丝子作为临床常用的补益类中药，具有滋补肝肾、固精缩尿、安胎、明目等功效，常用于治疗阳痿遗精、腰膝酸软、目昏耳鸣、肾虚胎漏、脾肾虚泻等病症，外用还可以治疗白癜风。现代药理研究证实，菟丝子中黄酮类成分对于卵巢损伤、少弱精子等生殖系统疾病有确切疗效；多糖类成分具有降血糖、抗衰老等作用 [3]。

基原不同、产地不同的同一种中药材在质量上存在一定差异，这在一定程度上影响中药材疗效的发挥。《中国药典》2020 年版一部中对于菟丝子仅以金丝桃苷作为检测指标，不能充分为菟丝子药材质量标准的建立提供支持，需进一步建立科学、可靠的质量评价方法。基于此，刘昌孝院士 [4] 提出了质量标志物（Q-marker）概念，以进一步规范中药材及中药产品质量标准及评价。本文对近些年来关于菟丝子化学成分以及药理作用机制进行综述，并从菟丝子成分特有性、传统药效、传统药性和化学成分可测性对菟丝子 Q-marker 进行预测分析，为揭示菟丝子药效物质基础，建立专属性质量标准奠定了基础。

1　菟丝子化学成分

1.1　黄酮类成分

菟丝子中黄酮类成分是含量最高且种类最多的一类活性成分。目前，已从菟丝子的提取物中分离并鉴定出多种黄酮类成分，主要有金丝桃苷、紫云英苷、异槲皮苷、异鼠李素、山柰酚、槲皮素及其衍生的苷元等。张燕丽等 [5] 通过 RP-HPLC 法同时测定了菟丝子中金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、山柰酚、槲皮素和异鼠李素 6 种活性成分的含量，结果表明 9 个不同产地的菟丝子中均含有以上 6 种成分，但各成分含量之间差异较大。孙向明等 [6] 采用 UPLC-Q-TOFMS/MS 技术得到 10 种与菟丝子雌激素样作用相关的 Q-marker，并对金丝桃苷、槲皮素、芹菜素、山柰酚、异鼠李素 5 种成分进行了含量测定。菟丝子中主要黄酮类成分可见表 1。

1.2　酚酸类成分

菟丝子中酚酸类成分主要发挥抗炎、抗菌、提高免疫力的作用，包括绿原酸、异绿原酸、咖啡酸、对 - 香豆酸、隐绿原酸、肉桂酸等 [7-11]。

表 1　菟丝子中主要的黄酮类成分

Tab 1　Main flavonoids in Cuscuta semen

序号	化合物		化学式	平均含量 /（mg • g^{-1}）	参考文献
	中文名称	英文名称			
1	金丝桃苷	hyperoside	$C_{21}H_{20}O_{12}$	0.4105	[4]
2	槲皮素	quercetin	$C_{15}H_{10}O_7$	0.1815	[4]
3	山柰酚	kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	0.0436	[4]
4	异槲皮苷	isoquercitrin	$C_{21}H_{20}O_{12}$	0.1985	[4]
5	异鼠李素	isorhamnetin	$C_{16}H_{12}O_7$	0.0515	[4]
6	紫云英苷	astragalin	$C_{21}H_{20}O_{11}$	0.2864	[4]
7	芹菜素	apigenin	$C_{15}H_{10}O_5$	0.1104	[5]
8	槲皮苷	quercitrin	$C_{21}H_{20}O_{11}$	0.6333	[6]
9	芦丁	rutin	$C_{27}H_{30}O_{16}$	0.2929	[7]

陈蕾等 [8] 采用 HPLC 法对菟丝子中酚酸类成分进行定量分析，结果测得菟丝子中咖啡酸平均含量为 0.0733 mg • g^{-1}、对 - 香豆酸的平均含量为 0.0907 mg • g^{-1}。王亚楠等 [10] 采用全时段多波长融合指纹图谱方法，对不同产地的菟丝子中酚酸类和黄酮类成分进行测定，得到绿原酸的平均含量为 1.1188 mg • g^{-1}、异绿原酸 C 的平均含量为 0.0610 mg • g^{-1}。

1.3　多糖类成分

菟丝子中多糖类成分含量也较高，通过对菟丝子提取物中几种多糖结构进行分析，发现这些多糖均是由葡萄糖、半乳糖、鼠李糖、甘露糖以及葡萄糖醛酸等组成的杂多糖 [12]。徐丽媛等 [13] 采用 PMP 衍生化结合 HPLC 法测定菟丝子多糖中单糖的组成，发现菟丝子多糖中的主要单糖成分为甘露糖、葡萄糖、半乳糖、半乳糖醛酸、木糖、阿拉伯糖等。王展等 [14] 采用离子交换色谱法与凝胶层析法对菟丝子多糖进行分离纯化，后通过光谱分析等方法研究其结构特征，首次在菟丝子提取物中得到 H6、H8 两个多糖类化合物。

1.4　木脂素类成分

菟丝子中含有多种木脂素类成分，包括菟丝子苷 C（cuscutoside C）[15]、*D*- 松脂素（*D*-pinoresinol）、*D*- 芝麻素（*D*-sesamin）[16] 等。He 等 [17] 采用 HPLC-DAD-MS 以及 HPLC-UV 对菟丝子和南方菟丝子进行成分鉴定，最后得到两者共有的木脂素类成分：菟丝子苷 A（cuscutoside A）、菟丝子苷 D（cuscutoside D）、*D*- 松脂醇 -4-*O*- 吡喃葡萄糖（*D*-pinoresinol-4-*O*-glucoside）以及新菟丝子苷 C（neocuscutoside C）。

1.5　其他化学成分

菟丝子还含有 *β*- 谷甾醇、胡萝卜苷等甾体类成分 [17]；含有 2- 戊基呋喃、十二烷、冰片

等挥发性成分[18]。Wang 等[19]从菟丝子原植物的 95% 乙醇提取物中分离获得莱豆酸（phaseic acid）、松脂醇（pinoresinol）、7*α*-羟基谷甾醇（7-hydroxysitosterol）等萜类化合物。此外，菟丝子中还含有生物碱类、脂肪酸、氨基酸类以及一些微量元素[20]。

2 菟丝子主要药理作用机制研究

现代药理学研究发现，菟丝子中所含有的黄酮类成分、酚酸类成分、多糖类成分对生殖系统、心血管系统、内分泌系统、免疫系统等疾病具有多种药理作用[3]。多项动物实验均表明菟丝子在雄性生殖系统疾病、肾虚型排卵障碍、绝经后骨质疏松、肝损伤、糖尿病等疾病中均具有较好的干预作用。

2.1 对生殖系统的作用

苗明三等[21]通过实验探讨了菟丝子总黄酮对多囊卵巢大鼠的卵巢保护功能，结果表明菟丝子总黄酮能明显升高多囊卵巢大鼠卵泡刺激素的分泌，同时降低其睾酮、雌激素、促黄体生成素的分泌，从而通过抑制卵巢颗粒细胞的异常凋亡，改善多囊卵巢综合征模型大鼠的卵巢功能。

朱晓南等[22]对肾虚排卵障碍模型大鼠分别给予菟丝子和菟丝子黄酮进行实验观察。结果表明：在反应卵泡发育、生长和排卵的性激素指标上证实了两者均可在一定程度上逆转羟基脲导致的肾虚排卵障碍，且菟丝子黄酮的促排卵作用可能优于菟丝子。马红霞等[23]通过检测促分裂原活性蛋白激酶（MAPK）下游分子 ERK1/2 的磷酸化水平，发现菟丝子总黄酮能刺激滋养细胞信号通路的活化，促进早孕期人细胞滋养细胞的增殖，进一步证明了菟丝子总黄酮是发挥补肾安胎作用的主要药效成分。

菟丝子总黄酮能明显改善大鼠的体质量、脏器指数，提高精子数量与活动率[24]。对于氢化可的松通过增强大鼠体内氧化应激而出现少弱精子症，菟丝子总黄酮可以提升大鼠体内氧化自由基的清除能力，减轻大鼠体内氧化应激损伤；促进睾酮的分泌、提高睾丸内酸性磷酸酯酶、乳酸脱氢酶、琥珀酸脱氢酶的活性;降低丙二醛（MDA）的含量、提高谷胱甘肽（GSH）和总超氧化物歧化酶（T-SOD）的水平，并下调 *Fas* 和 *Fasl* 的基因表达，从而减少精细胞的凋亡，增加精子的数目，提高精子的活性[25]。

2.2 对内分泌系统的作用

有研究报道菟丝子总黄酮通过上调下丘脑 - 垂体 - 性腺轴中雌激素受体（ER）的表达以及卵巢中促黄体生成素受体（LHR）的表达以调控下丘脑 - 垂体 - 性腺轴的功能紊乱，但对卵巢中的卵泡刺激激素受体基因（*FSHR*）表达没有影响，说明菟丝子黄酮类成分在调节内分泌功能障碍时发挥了一定的作用[26]。彭申明等[27]研究了菟丝子总黄酮对内分泌衰退痴呆模型小鼠学习记忆功能的影响，结果显示雌激素和菟丝子总黄酮具有良好的抑制神经细胞凋亡的作用，表明菟丝子总黄酮可能通过促进或增强下丘脑 - 垂体 - 性腺轴功能，达到增加雌激素水平和改善内分泌系统功能的目的。

李道中等[28]将菟丝子多糖静脉注射入四氧嘧啶致糖尿病模型小鼠体内后，观察小鼠的血糖、体质量、肝糖原含量、游泳时间、免疫器官的质量情况，发现菟丝子多糖能显著降低模型小鼠的血糖、增加体质量、增加肝糖原含量、延长游泳时间、增加脾脏和胸腺质量，这说明菟丝子多糖对糖尿病小鼠具有良好的治疗作用。

2.3 对免疫系统的作用

通过现代药理学理论建立衰老模型小鼠，研究菟丝子多糖对衰老模型小鼠血清、肝、肾组织中 MDA、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶以及脑组织中脂褐质的影响，结果表明，菟丝子多糖能提高衰老模型小鼠的免疫功能，对氧自由基、活性氧、脂质过氧化具有清除作用，同时增强体液免疫功能[29]。

徐何方等[30]以菟丝子乙醇提取物（即以黄酮类化合物为主的提取物）给药，观察其对肾阳虚证模型大鼠免疫功能的影响，结果发现菟丝子醇提物不仅增加了模型大鼠的胸腺、脾脏质量，还增强了其体内巨噬细胞的吞噬功能。这表明菟丝子醇提物可以改善肾阳虚证模型大鼠的免疫功能，具有显著的免疫调节作用。金丝桃苷作为菟丝子黄酮类主要成分，不仅在化学性肝损伤中起到关键作用，在免疫性肝损伤中也具有一定疗效，其作用机制可能与其清除自由基、增强机体抗脂质过氧化能力、抑制炎症因子的释放以及调节 T 细胞亚群使其平衡从而减轻肝细胞的损伤有关[31]。

2.4 对心血管系统的作用

动脉粥样硬化是一种慢性炎症反应，其发生机制主要是由于血管内皮的损伤，而血管内皮损伤是导致内皮细胞功能障碍的主要原因。刘海云等[32]比较了菟丝子黄酮对损伤血管及正常血管

内皮细胞增殖活性的影响，证实了菟丝子黄酮能够保护受损伤的血管内皮细胞，并通过对受损的内皮细胞合成分泌一氧化氮、一氧化氮合酶和内皮素的影响研究，进一步揭示了菟丝子黄酮保护血管内皮细胞可能的作用机制。研究发现黄酮类成分异鼠李素是通过抗炎、抗氧化应激以及抗细胞凋亡等多因素共同发挥作用从而实现对血管内皮细胞的保护[33]。

2.5　对骨与软骨的作用

胡晓梅等[34]探讨了局部使用菟丝子总多糖对家兔关节软骨全层缺损Ⅱ型胶原表达的影响，采用多种方法进行评估后表明：菟丝子总多糖凝胶发挥了促进软骨修复与临时基质结合体的作用，使家兔缺损的关节软骨得以修复，其机制可能是菟丝子总多糖促进了Ⅱ型胶原的表达。另有研究证明，菟丝子总多糖可促进 TGF-β_1 参与调节骨折修复[35]。

绝经后骨质疏松症是生殖激素水平的变化引起的一种疾病，其发病机制是由于雌激素水平降低，使得成骨细胞的活性降低、破骨细胞的活性增加，导致骨密度下降，进而发生脆性骨折。菟丝子提取物能够促进小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 增殖，提高碱性磷酸酶活性和钙盐沉积，并上调 Col-I、BMP2 和 Smad4 蛋白表达，其作用机制可能与调节 BMP2/Smad4 信号通路有关[36]。有研究人员通过建立去卵巢大鼠导致的骨质疏松模型，证明了菟丝子多糖可以通过促进骨形成和抑制骨吸收，从而治疗雌激素缺陷性骨质疏松症[37]。

2.6　保肝明目作用

菟丝子作为传统的明目中药，在治疗眼科疾病的组方中应用颇多且效果显著，主要是通过补益肝肾的作用发挥明目功效。临床常组方用于治疗黄斑变性[38]、糖尿病性视网膜病变[39]、白内障[26]等眼科疾病。从现代药理学研究来看，菟丝子在眼科疾病的作用主要是通过其黄酮类成分发挥的。Du 等[40]研究发现山柰酚通过抗氧化途径发挥保护视网膜色素上皮的作用，从而预防黄斑变性的发生。槲皮素通过抑制丝裂原活化蛋白激酶和蛋白激酶 B 使核因子 -κB 信号失活，以此来抑制视网膜血管内皮生长因子（VEGF）诱导的视网膜感光细胞过度炎症反应[41]。有报道在降糖药物的基础上加用菟丝子组方治疗单纯型和增殖型糖尿病视网膜病，结果表明：菟丝子组方对患者视力、眼底微血管瘤、眼底出血和渗出均有改善[42]。

采用雷公藤多苷构建慢性肝损伤模型大鼠，在给予其菟丝子醇提物后，结合动物行为学、血清学、肝组织病理学对模型大鼠进行评价，结果表明雷公藤多苷与菟丝子醇提物配伍后能显著降低雷公藤多苷的肝毒性，其减毒作用的机制是菟丝子能够抵抗雷公藤多苷引起的诱导细胞大量凋亡，继而导致肝细胞凋亡、坏死，保护肝损伤[43]。酚酸类成分绿原酸也具有抗炎、抗氧化和肝保护作用，有研究表明绿原酸可通过增强 Nrf2 介导的抗氧化作用以及抑制 NLRP3 炎性体的激活对急性肝损伤产生保护作用[44]。

此外，菟丝子还具有治疗尿频、小儿遗尿症、痛经[45]及保护小脑神经元[46]等作用。在外用功效上，菟丝子可使白癜风受损区酪氨酸酶活性升高，单胺氧化酶活性降低，血清胆碱酯酶活性增加，从而刺激黑色素细胞合成，恢复白癜风病损区功能，使其色素再生，证实了菟丝子在白癜风治疗中的功效[47]，菟丝子主要成分与药理作用机制如图 1 所示。

图 1　菟丝子主要成分与药理作用机制

Fig 1　Main components and pharmacological mechanism of Cuscuta semen

3 菟丝子 Q-marker 预测分析

3.1 基于植物近缘及其成分特有性的 Q-marker 预测分析

据统计菟丝子属 *Cuscuta* Linn. 植物约有 170 种，广泛分布于全世界暖温带，我国有 8 种，南北均产 [48]。之前的研究证实了菟丝子属植物中共同含有黄酮类、多糖类、木脂素类等多种化合物 [49]。在贵州省、四川省的地方炮制标准中，曾收载以菟丝子属植物金灯藤（*Cuscuta japonica* Choisy）为菟丝子品种基原，功效等同菟丝子。贵州省、重庆市、四川省、河北省的炮制标准单独收载以金灯藤为基原的药材称为大菟丝子 [50]。2020 年版《中国药典》收载的菟丝子为旋花科植物南方菟丝子（*Cuscuta australis* R.Br.）或菟丝子（*Cuscuta chinensis* Lam.）的干燥成熟种子。菟丝子中成分多样，含有黄酮类、多糖类、酚酸类、木脂素类等成分，以黄酮类成分种类与含量最多。林慧彬等 [51] 测定了不同寄主条件下菟丝子与南方菟丝子的化合物差异，结果表明菟丝子与南方菟丝子中均含有金丝桃苷、槲皮素、山柰酚、异鼠李素这几种黄酮类化合物，但成分含量与比例有一定差异。

有研究在菟丝子醇提物中得到菟丝子苷 C（cuscutoside C）和菟丝子苷 D（cuscutoside D），并进一步通过光谱分析阐明了其结构 [14]。在之后的研究中，研究者从定性定量方面分析了菟丝子与南方菟丝子成分的差异，通过 HPLC-DAD-MS 得到两者的木脂素类成分，包括其特有成分菟丝子苷 A（cuscutoside A）和菟丝子苷 D（cuscutoside D）[16]。但目前对于这几种菟丝子中特有木脂素类成分只在结构鉴别方面有报道，在成分活性方面研究尚浅，对于能否纳入菟丝子 Q-marker 的筛选范围还有待进一步探索。通过以上文献分析可将菟丝子中金丝桃苷、槲皮素、山柰酚、异鼠李素等黄酮类成分作为筛选菟丝子 Q-marker 的重要参考。

3.2 基于传统药效相关性的 Q-marker 预测分析

菟丝子具有补益肝肾、固精缩尿、安胎、明目、止泻等功效，外用可消风祛斑，临床上常用于肝肾不足、腰膝酸软、阳痿遗精、遗尿尿频、肾虚胎漏、胎动不安、目昏耳鸣、脾肾虚泻等症。现代药理学研究表明，菟丝子中黄酮类成分在改善女性卵巢功能、男性生殖障碍、眼部疾病方面具有显著疗效 [20-25，39]；菟丝子中多糖类成分在改善绝经后骨质疏松、促进软骨修复、治疗糖尿病等方面的作用机制已有报道 [28，30]；菟丝子中酚酸类成分可提高免疫力、抗菌、抗病毒。由此可见，菟丝子中黄酮类、多糖类、酚酸类成分现代药效作用与传统药效相符合，可考虑将含量较高的黄酮类成分如金丝桃苷、槲皮素、紫云英苷、芦丁、山柰酚以及酚酸类成分绿原酸、多糖类成分作为筛选菟丝子 Q-marker 的关键成分。

3.3 基于传统药性相关性的 Q-marker 预测分析

中药性味归经是中药的基本属性，也是临床处方开药的重要依据，因此与中药 Q-marker 密切相关。菟丝子性辛、味甘，平，归肝、肾、脾经。辛味药的成分多为挥发油类、苷类和生物碱类，归肝、心、脾、肺经，其功效表现为能够散表邪、散里寒、散结滞，行气、行血、润燥 [52]。甘味药多入肾经，滋补肾脏，既可以滋补阳气，又能补益阴气，其成分多以糖类、蛋白质、氨基酸等居多。辛、甘两性药性集于菟丝子一身，“辛甘化阳”，辛主通阳，甘主益气，两者相伍主要用于男性阳气不足之症，在妇科、眼科等疾病治疗上亦有一定成效 [53]，这与菟丝子现代药效学研究结果相符合。通过以上对菟丝子药性的分析上来看，可将黄酮类成分中金丝桃苷、紫云英苷、槲皮素、山柰酚以及多糖类成分作为菟丝子 Q-marker 的筛选参考。

3.4 基于化学成分可测性的 Q-marker 预测分析

通过单个色谱方法或多种色谱方法联用的方法对中药化学成分进行质量评价已较为普遍。在《中国药典》2020 年版一部中采用 HPLC 对菟丝子进行含量测定，以金丝桃苷含量为质量评价指标。胡丽萍等 [7] 利用 HPLC-UV-MS 法同时测定了菟丝子中绿原酸、金丝桃苷、槲皮苷、山柰酚、异鼠李素 5 种化合物。高智席等 [9] 利用（HPLC-CL）测定菟丝子中芦丁、山柰素、槲皮素和异鼠李素含量，方法简便，重复性好。谭喜莹等 [54] 对 15 个产地的菟丝子药材进行 HPLC 检测并建立指纹图谱，结果显示：15 个产地的菟丝子有 18 个共有峰且相似度较好，但各谱峰峰面积有一定差异，最终通过对照品叠加法，确认了绿原酸、对 - 香豆酸、槲皮素、山柰酚等 4 个主要共有成分。孟蔚等 [55] 研究不同寄主的菟丝子指纹图谱，通过对比发现各指纹图谱相似度较高，进一步分析得到不同寄主的菟丝子中均具有金丝桃苷、槲皮素、山柰酚、异鼠李素等 10 种共有成分，但在成分含量上有所差异。综合现有的文献数据，基于菟丝子中化学成分的可测性，可将绿原酸、对 - 香豆酸、金丝桃苷、槲皮素、山柰酚纳入菟丝子 Q-marker 的筛选范围。

4 结语

随着现代科学技术的发展，对菟丝子化学成

分和药理作用机制的研究不断深入，发现菟丝子在内分泌系统、心血管系统、骨及软骨等方面的疾病治疗中具有一定的作用。本文在对菟丝子化学成分与药理作用研究现状进行综述的同时，结合 Q-marker 研究的核心内容，通过对其成分特有性、传统药效相关性、传统药性相关性以及成分可测性进行系统分析，为菟丝子 Q-marker 的筛选及确定提供了依据（见图 2）。最后得出可考虑将菟丝子中金丝桃苷、槲皮素、山柰酚等成分作为菟丝子 Q-marker。但是，这些成分并不是菟丝子的特征性成分，金丝桃苷等黄酮类成分在野马追、黄蜀葵花、山楂叶等中药中均有分布；绿原酸在金银花、菊花、蒲公英等中药中也广泛存在。因此，对于菟丝子 Q-marker 的研究，还需要在此基础上，对黄酮类、酚酸类、多糖类以及一些菟丝子特有木脂素类化合物进行进一步的成分 - 药效相关性研究，建立更加科学、合理的菟丝子质量标准，以使菟丝子更好地发挥临床疗效。

图 2　菟丝子 Q-marker 的预测分析

Fig 2　Predictive analysis of Cuscuta semen Q-marker

参考文献

[1] 顾观光 . 神农本草经 [M]. 北京：学苑出版社，2002：36-37.

[2] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：322.

[3] 王焕江，赵金娟，刘金贤，等 . 菟丝子的药理作用及其开发前景 [J]. 中医药学报，2012，40（6）：123-125.

[4] 刘昌孝，陈士林，肖小河，等 . 中药质量标志物（Q-marker）：中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药，2016，47（9）：1443-1457.

[5] 张燕丽，孟凡佳，田园，等 . PUR PLISH 法同时测定不同产地菟丝子中 6 种主要活性成分含量 [J]. 化学工程师，2019，33（5）：29-33.

[6] 孙向明，宋辉，阎新佳，等 . 菟丝子雌激素样作用质量标志物的筛选及含量测定 [J]. 中草药，2020，51（10）：2671-2679.

[7] 胡丽萍，王跃飞，宋殿荣，等 . HPLC-UV-MS 法同时测定菟丝子中 5 种成分的含量 [J]. 中药材，2010，33（8）：1277-1279.

[8] 陈蕾，赵陆华，谭喜莹 . HPLC 法同时测定菟丝子药材中酚酸和黄酮类成分含量 [J]. 药学与临床研究，2018，26（2）：101-103.

[9] 高智席，周光明，唐国风，等 . 高效液相色谱分离柱后化学发光法同时测定菟丝子中黄酮类成分 [J]. 药物分析杂志，2008，28（3）：476-479.

[10] 王亚楠，包永睿，王帅，等 . 基于多波长融合的菟丝子多成分定量方法研究 [J]. 中南药学，2021，19（3）：517-521.

[11] Shen J，Jia Q，Huang X，et al. Development of a HPLC-MS/MS method to determine the 13 elements of semen cuscutae and application to a pharmacokinetic study in rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2019，2019：1-11.

[12] 王展 . 菟丝子多糖的分离纯化，结构分析和生物活性研究及一些多糖方法学的研究 [D]. 上海：中国科学院上海药物研究所，2000.

[13] 徐丽媛，李志猛，杨蕾，等 . 菟丝子多糖含量测定方法的研究 [J]. 北京中医药大学学报，2011，34（8）：548-551.

[14] 王展，鲍幸峰，方积年 . 菟丝子中两个中性杂多糖的化学结构研究 [J]. 中草药，2001，32（8）：675-678.

[15] He XH，Yang WZ，Meng AH，et al. Two new lignan glycosides from the seeds of Cuscuta chinensis [J]. J Asian Nat Prod Res，2010，12（11）：934-939.

[16] Donnapee S，Li J，Yang X，et al. Cuscuta chinensis Lam.：a systematic review on ethnopharmacology，phytochemistry and pharmacology of an important traditional herbal medicine [J]. J Ethnopharmacol，2014，157：292-308.

[17] He XH，Yang WZ，Ye M，et al. Differentiation of Cuscuta chinensis and Cuscuta australis by HPLC-DAD-MS analysis and HPLC-UV quantitation [J]. Planta Med，2011，77（17）：1950-1957.

[18] 侯冬岩，李铁纯，于冰 . 两种菟丝子挥发性成分的比较

研究 [J]. 质谱学报，2003，24（2）：343-345.
[19] Wang J，Tan D，Wei G，et al. Studies on the chemical constituents of Cuscuta chinensis [J]. Chem Nat Compound，2016，52（6）：1133-1136.
[20] 朱玉梅，许静，王霞英，等 . 菟丝子及其 3 种炮制品的微量元素分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20（6）：74-77.
[21] 苗明三，彭孟凡，闫晓丽 . 菟丝子总黄酮对多囊卵巢综合征大鼠模型的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（5）：143-150.
[22] 朱晓南，宗利丽，张宸铭，等 . 菟丝子及其主要成分黄酮对肾虚排卵障碍大鼠的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20（8）：169-172.
[23] 马红霞，尤昭玲，刘华，等 . 菟丝子总黄酮对早孕期人细胞滋养细胞增殖能力的影响及其信号机制 [J]. 中药材，2009，32（6）：939-943.
[24] 刘倩，田元春，宾彬，等 . 菟丝子黄酮对生殖系统的保护作用研究进展 [J]. 中医药导报，2020，26（12）：148-151，156.
[25] 孙晶晶，吴秀娟，鲍军，等 . 菟丝子总黄酮对氢化可的松致大鼠少弱精子症的治疗作用及其机制 [J]. 华西药学杂志，2016，31（1）：14-17.
[26] Ke J，Duan R. Effects of flavonoids from semen cuscutae on the hippocampal-hypothalamic-pituitary-ovarian sex hormone receptors in female rats exposed to psychological stress [J]. Clin Exp Obstet Gyn，2013，40（2）：271-274.
[27] 彭申明，陈勤，陈逸青，等 . 菟丝子总黄酮对内分泌衰退痴呆模型小鼠学习记忆功能的影响及保护作用机制 [J]. 激光生物学报，2014，23（3）：218-226.
[28] 李道中，彭代银，张睿，等 . 菟丝子多糖对糖尿病小鼠的治疗作用 [J]. 安徽医药，2008，12（10）：900-901.
[29] 蔡曦光，葛斌，许爱霞，等 . 菟丝子多糖对衰老小鼠脂质过氧化的影响 [J]. 中国新药与临床杂志，2005，24（7）：521-524.
[30] 徐何方，杨颂，李莎莎，等 . 菟丝子醇提物对肾阳虚证模型大鼠免疫功能的影响 [J]. 中药材，2015，38（10）：2163-2165.
[31] 黄凯，耿淼，王建华，等 . 金丝桃苷对免疫性肝损伤小鼠的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志，2015，21（19）：137-141.
[32] 刘海云，崔艳茹，刘海菊，等 . 菟丝子黄酮对氧化损伤的人脐静脉内皮细胞的保护作用 [J]. 时珍国医国药，2014，25（1）：51-53.
[33] Li WL，Chen ZG，Yan M，et al. The protective role of isorhamnetin on human brain microvascular endothelial cells from cytotoxicity induced by methylglyoxal and oxygen-glucose deprivation [J]. J Neurochem，2016，136（3）：651-659.
[34] 胡晓梅，王俊锋，杨松涛，等 . 菟丝子总多糖对家兔全层关节软骨缺损Ⅱ型胶原表达的影响 [J]. 实用医院临床杂志，2011，8（1）：23-25.
[35] 李绪松，郑臣校，付光明 . 局部应用菟丝子总多糖对家兔骨折修复中 TGF-β1 表达的实验研究 [J]. 江西中医学院学报，2012，24（1）：61-63.
[36] 王翔宇，冯晓云，任红叶，等 . 菟丝子提取物通过 BMP2/Smad4 信号通路对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响 [J]. 中华中医药杂志，2019，34（6）：2687-2689.
[37] Liu HJ，Zhang H，Fan HD，et al. The preventive effect of Cuscutae Semen polysaccharide on bone loss in the ovariectomized rat model [J]. Biomed Pharmacother，2020，130：110613.
[38] 张敏，宁学玲，宁学洪 . 西药联合驻景丸加减方治疗年龄相关性黄斑变性的临床观察 [J]. 广东医学院学报，2016，34（3）：305-307.
[39] 张雪倩，李高彪，周云云，等 . 通络驻景丸理论渊源及其在眼科的临床应用 [J]. 中国中医眼科杂志，2018，28（1）：52-54.
[40] Du WW，An YL，He XD，et al. Protection of kaempferol on oxidative stress-induced retinal pigment epithelial cell damage [J]. Oxi Med Cell Longev，2018，2018：1-14.
[41] Lee M，Yun S，Lee H，et al. Quercetin mitigates inflammatory responses inducedby vascular endothelial growth factor in mouse retinal photor eceptor cells through suppression of nuclear factor kappa B [J]. Int J Mol Sci，2017，18（11）：E2497
[42] 章瑾 . 中西医结合治疗糖尿病视网膜病变 96 例 [J]. 中国中医药科技，2008，15（1）：43.
[43] 刘泽洲 . 菟丝子醇提物、雷公藤多苷配伍降低大鼠肝毒性的实验研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2015.
[44] Shi A，Shi HT，Wang Y，et al. Activation of Nrf2 pathway and inhibition of NLRP3 inflammasome activation contribute to the protective effect of chlorogenic acid on acute liver injury [J]. Int Immunopharmacol，2018，54：125-130.
[45] 宋晓钰，姜玉婷 . 菟丝子总黄酮的药理作用及其治疗痛经的研究 [J]. 医学信息，2020，33（8）：29-31.
[46] 阿依木古丽，蔡勇 . 菟丝子提取物对小脑中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 [J]. 西北民族大学学报，2007，28（67）：47-51.
[47] 沈丽，黄云英，王雪妮，等 . 菟丝子外用对实验性豚鼠白癜风的药效 [J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18（16）：199-202.
[48] 中国科学院中国植物志编委会 . 中国植物志 [M]. 北京：科学出版社，1979.
[49] 周麟林 . 菟丝子属植物化学成分和药理活性 [J]. 国外医药（植物药分册），2003，18（6）：239-243.
[50] 药智网 . 中药饮片炮制规范数据库 [DB/OL]. https：//www. yaozh. com/，2021-02-08.
[51] 林慧彬，林建群，路宁，等 . 菟丝子及南方菟丝子的质量控制研究 [J]. 中药材，2007，30（11）：1446-1449.
[52] 孙玉平，张铁军，曹煌，等 . 中药辛味药性表达及在临证配伍中的应用 [J]. 中草药，2015，46（6）：785-790.
[53] 张静雅，曹煌，龚苏晓，等 . 中药甘味的药性表达及在临证配伍中的应用 [J]. 中草药，2016，47（4）：533-539.
[54] 谭喜莹，陆红柳，赵陆华，等 . 菟丝子药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国药学杂志，2008，43（1）：14-17.
[55] 孟蔚，王英震，管仁伟，等 . 不同寄主的菟丝子 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中华中医药杂志，2015，30（4）：1079-1082.

（收稿日期：2021-09-10；修回日期：2021-11-08）

生物胺类物质药理及理化测定方法研究进展

林新丽[1, 2]，吴殷因[3]，谭力[1]，孟长虹[1]，汪玉馨[1*]，史清水[1*]（1. 江苏省食品药品监督检验研究院，南京 210019；2. 中国药科大学药物分析教研室，南京　211198；3. 江苏鼎泰药物研究股份有限公司，南京　211800）

摘要：生物胺广泛存在于食品及动植物体内，具有一定的生物学活性，适量生物胺在体内具有调节人体新陈代谢的功能，摄入过量则会产生不良反应。药品中许多复杂基质药物如中药、抗菌药物、生化药物等都提取自动植物体或通过发酵生产，且其制备、储存过程中可能引入或产生生物胺，因此其安全性及测定方法的研究具有重要意义。考察生物胺含量和不良反应之间的量效关系，建立简便高效的生物胺检测方法以控制其含量，探究其与临床用药安全性的相关性可为临床安全用药提供依据。故本文根据生物胺的生物学活性和理化性质，综述了近年来国内外生物胺的药理和理化分析方法，为确定生物胺的测定方法和限量标准提供参考。

关键词：生物胺；药理研究；理化测定方法

中图分类号：O657.72，R927.2　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1617-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.024

Pharmacological and physicochemical determination of biogenic amines

LIN Xin-li[1, 2], WU Yin-nan[3], TAN Li[1], MENG Chang-hong[1], WANG Yu-xin[1*], SHI Qing-shui[1*] (1. *Jiangsu Institute for Food and Drug Control*, *Nanjing* 210019; 2. *Department of Pharmaceutical Analysis*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 211198; 3. *Jiangsu Tripod Preclinical Research Laboratories Co.*, *Ltd*, *Nanjing* 211800)

Abstract: Biogenic amines exist in food, animals and plants widely, demonstrating certain biological activities. Metabolism in the human body can be regulated by an appropriate amount of biogenic amines while excessive intake may cause adverse reactions. Many complex matrix drugs, such as traditional Chinese medicine, antibiotics and biochemical drugs, are extracted from animals and plants, or produced by fermentation, and biogenic amines may be introduced or produced in the process of preparation or storage. So research on their safety and determination is important. To determine the dose-response relationship between the content of biogenic amines and adverse reactions, and explore clinical drug safety, a simple and efficient detection method of biogenic amines to control their content in drugs was established to provide evidence for clinical safe usage. According to the biological activity and physicochemical properties of biogenic amines, this study summarized the pharmacological and physicochemical determination of biogenic amines home and abroad in recent years, to provide reference for the analysis methods and limit standards of biogenic amines.

Key words: biogenic amine; pharmacological research; physicochemical determination

生物胺广泛存在于自然界中，其可由游离氨基酸经脱羧酶催化脱羧产生，也可以由醛酮类化合物氨基化脱氨基产生[1-3]。内源性生物胺在体内发挥着基本的生理功能，如参与免疫炎症反应，调节血压，调控血糖，促进遗传物质的合成等，但其在体内过度蓄积则会损害人体神经系统及心血管系统，引起不良反应。同时由于许多复杂基质药物如中药、抗菌药物、生化药物等都提取自

基金项目：江苏省市场监督管理局科技项目计划（No.KJ21125030）。

作者简介：林新丽，女，硕士研究生，主要从事药物分析和药理研究，email：lin252025@126.com　*通信作者：汪玉馨，女，副主任药师，主要从事药检、药理、毒理研究，email：wyx_carrie@163.com；史清水，男，主任药师，主要从事药品质量控制研究，email：qsshi@126.com

动植物体，其生产、发酵和储藏过程中可能引入或分解产生生物胺，如在体内叠加或蓄积，均有可能对临床用药安全造成风险[4]，因此需通过建立可靠的检测方法，对药物中的生物胺类物质进行质控，明确各生物胺的量效关系，拟订适宜的控制策略，从而提高临床用药的安全性。

1　生物胺的研究概况

从生物胺的来源可知，其结构由上级化合物决定，具有多样性，不同结构的生物胺具有不同的功能，其中组胺的研究最受关注，其他种类的生物胺研究报道较少。相较而言，生物胺在食品领域研究较多，而在药品领域相关研究较少，故亟需在药品领域建立适宜的分析测定方法，并进行质量控制及研究。为了更好地了解各类生物胺的研究现状，本文先对不同种类生物胺的特性进行汇总。

1.1　生物胺的分类及质量控制

生物胺可被看作氨分子上的氢被不同基团取代，如脂肪基团、芳香基团或杂环烃基团等[5]。根据结构分类，常见的组胺属于杂环胺类；酪胺、苯乙胺、章鱼胺等被列为芳香族胺；腐胺、尸胺、精胺、亚精胺等被列为脂肪族胺。根据其构成分类，组胺、酪胺、苯乙胺等被列为单胺；胍丁胺、尸胺、腐胺及亚精胺等被列为多胺，见表 1。

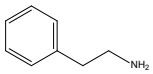
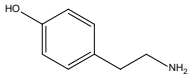
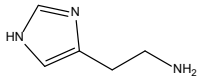
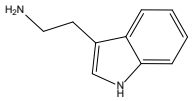
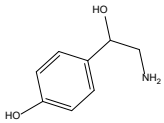
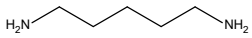
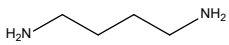
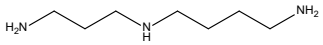
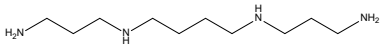
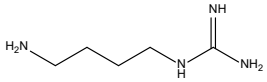
研究表明，部分食源性疾病的公共卫生问题与生物胺类物质有关，在欧洲和美国多达 40% 的病例报告可归因于组胺过量[6]，表 1 所列几种常见的生物胺均可在食品中检出，其含量是评价食物新鲜度的指标之一[7]。因此，不同国家和地区对食品中的部分生物胺含量制订了限值，以保障食品的安全[8]，特别是生鲜鱼类、罐头及发酵产品等，还明确了生产过程和终产品中生物胺的含量限值。但是不同地区限值标准差异显著，标准中，组胺限值最低为 50 μg • g^{-1}，最高可达 400 μg • g^{-1}，甚至同种食品不同地区的组胺限值差距较大，例如金枪鱼中的组胺限值最低为 50 μg • g^{-1}，限值最高为 200 μg • g^{-1}[9]。

当然，生物胺限值制订存在一定困难，影响因素较多，比如肠道分解生物胺的效率、耐受性等均存在个体差异性，不同生物胺协同作用从而存在毒性叠加的可能性等。因此，有必要对多种生物胺的不良反应进行深入研究，明确其药理活性与不良反应的量效关系，从而为其限值的制订提供基础和佐证。

1.2　生物胺类物质的不良反应

表 1　几种常见的生物胺

Tab 1　Several common biogenic amines

名称	分子式	结构式	相对分子质量
苯乙胺	$C_8H_{11}N$		121.18
酪胺	$C_8H_{11}NO$		137.18
组胺	$C_5H_9N_3$		111.14
色胺	$C_2H_{12}N_2$		160.21
章鱼胺	$C_8H_{11}NO_2$		153.17
尸胺	$C_5H_{14}N_2$		102.18
腐胺	$C_4H_{12}N_2$		88.15
亚精胺	$C_7H_{19}N_3$		145.20
精胺	$C_{10}H_{26}N_4$		202.34
胍丁胺	$C_5H_{14}N_4$		130.79

虽然生物胺在调节神经系统、控制生长代谢和稳定生物膜等方面具有积极作用，但其也可引起如心悸、腹泻、偏头痛等不良反应。其中杂环胺类化合物组胺的不良反应最为常见，其可激动受体亚型（H_1、H_2 和 H_3 受体）进而引起全身效应。H_1 受体的激活会导致过敏反应，发作迅速；H_1、H_2 受体的激活会扩张小动脉和小静脉，外周阻力降低，外周血管和毛细血管扩张，回心血量减少，血压快速下降，常见表现即为低血压[10]；H_3 受体的激活则会促进中枢神经系统的神经递质释放，与多种中枢神经疾病联系密切，严重时可损伤中枢神经[11]，表现为恶心、呕吐和头痛。

部分芳香族生物胺具有血管收缩作用，酪胺、苯乙胺、色胺和章鱼胺能够使交感神经系统释放去甲肾上腺素，刺激血管平滑肌，血压上升[12]。高水平的酪胺可引起的中毒症状与组胺类似，具体表现为心律加快、呼吸频率增加和偏头痛，长期摄入会干扰葡萄糖稳态，从而升高血糖水平，甚至中毒性肿胀。苯乙胺毒性较强，易引发偏头痛和精神类疾病。色胺促进 5- 羟色胺和多巴胺释放，5- 羟色胺具有升压作用，可引起高血压。

同属脂肪族胺的尸胺和腐胺，较组胺和酪胺的生物活性低，具有刺激生长发育的作用，但均有一定的腐蚀性和毒性，高水平腐胺和尸胺的中毒症状主要有低血压、心动过缓、呼吸困难和四肢轻微麻痹瘫痪。尸胺和腐胺还可增加其他生物胺的毒性，组胺本身在低水平下可能不会造成毒性，但在高浓度的腐胺和尸胺存在的情况下，组胺相关代谢酶的活性降低，毒性增强，可致呼吸系统受损，严重时危害生命[13]。胍丁胺随环境的变化会分解，在胍丁胺酶催化作用下分解为腐胺，腐胺是精胺和亚精胺的前体[14]，存在潜在危害。

低剂量的精胺和亚精胺不会引起人体的中毒反应，中剂量精胺会使心肌变性，降低血浆钾水平，高剂量精胺会使肾功能受损，高剂量亚精胺会降低体内的血浆肌酐、无机磷酸盐和钙，另外，精胺、亚精胺还能与亚硝酸盐反应生成致癌物质[15]。

1.3　药物中的生物胺来源

药物（如抗菌药物、中药注射剂和多肽类生化药等）中由于物料的来源多提取自动植物体，或通过生产、发酵、储存过程存在引入生物胺类杂质的可能性[16]。虽然人体肠道可分解一定量的生物胺，但生物胺类物质蓄积过量会产生不良反应。苏喆等[17]检测了三家企业的鹿瓜多肽注射剂，检出组胺、苯乙胺、腐胺和尸胺，其中尸胺的浓度较高，范围在 0.265% ～ 0.333%，超过毒性学关注阈值（TTC）2 类遗传毒性杂质的限值。Li 等[18]检测了 84 批牛或猪胸腺中提取的胸腺多肽注射剂，所有样品中均存在腐胺和亚精胺，多数样品中检出色胺、苯乙胺、尸胺、组胺、酪胺和精胺，少量样品中检出多巴胺，其中，组胺含量高的样品降压效应的不合格率较高，故组胺含量与降压物质密切相关。牛慧玲等[19]在疏血通注射液中检出腐胺、尸胺和酪胺，疏血通注射液是以动物提取制成的中药材为原料，动物体内的组织器官中含有氨基酸，氨基酸脱羧形成生物胺，引起急性降压的不良反应。因此有必要建立生物胺类杂质的检测方法，对可能含有或产生生物胺类杂质的药物开展安全性筛查，控制生物胺类杂质的限值，以提高此类药物质量，减少不良反应的发生，保证用药的安全。

2　生物胺类物质的药理学测定方法

目前在药品质量控制中，《中国药典》2020 年版[20]针对组胺类物质，设置降压物质检查项，通过判断制剂引起麻醉猫血压下降的程度或其引起豚鼠离体回肠收缩的程度来考察并控制组胺类物质。除此之外，国内外研究者还采用了药理学测定方法进行生物胺类物质量效关系的测定，并比较了不同种属动物模型的灵敏度及重现性。

2.1　颈动脉直接测压法

颈动脉直接测压法用于降压物质检查，动物麻醉状态下在血管内插入压力传感器测量血压，比较组胺对照品与供试品引起猫的血压变化程度，判定降压物质是否符合标准。该方法普遍以猫为实验对象，但猫的来源、遗传背景和寄生虫携带等情况复杂，近年来有研究者探索其他实验动物在降压物质检查中应用的可行性。

嵇扬等[21]以比格犬为实验对象，比较了猫和比格犬对降压物质的灵敏度和重现性，结果表明比格犬的灵敏度不符合规定且重现性较猫差，无法用于降压物质检查；黎家敏等[22]以实验兔为实验对象，比较了不同品种的实验兔和猫对降压物质的反应，结果表明实验兔对降压物质不敏感，不同品种的实验兔降压作用存在差异，无法用于降压物质检查。从实验准确性和经济角度考虑猫更适用，猫较小动物更接近人体，较大动物更方便操作，麻醉期间可以保持一定的灵敏度，血管壁坚韧不易损坏，便于手术操作，可反复使用，适用于对药物体内作用的分析，心搏力强，血压恒定，能获得完好的血压曲线。

颈动脉直接测压法优点在于是在动脉内直接进行血压测定，压力传感器插入动物血管内测量血压，所以测得值准确性更高；不足之处在于麻醉对实验结果有影响：不仅麻醉程度具有个体差异性，麻醉期间动物的多项生理指标也会改变，因此，需设立灵敏度检测来衡量在该麻醉条件下实验动物是否达到灵敏度要求。

2.2　豚鼠离体回肠法

豚鼠离体回肠法作为颈动脉直接测压法的补充方法，收录于《中国药典》[23]2015 年版，通过豚鼠离体回肠给药，比较组胺对照品与供试品引起收缩的程度，判定降压物质是否符合标准。

近年来有研究者通过上述两种方法对生化药中的降压物质检查进行比较。王婷婷等[24]以不同浓度组胺对照品模拟不同水平的样品，采用猫和豚鼠进行实验，两种方法均有较高的灵敏度和准确度，供试品注射用糜蛋白酶在一定浓度范围内对豚鼠离体回肠的收缩反应无干扰作用，与颈动脉直接测压法相比，专属性和重复性良好。吴贤生等[25]分别用两种方法进行注射用促肝细胞生长素的安全性检查，根据《中国药典》2020 年版

判定标准，豚鼠离体回肠法检查组胺类物质符合规定，但是颈动脉直接测压法检查却发生了明显降压反应，结果表明，组胺类物质检查合格仍可能会出现降压物质检查不符合规定的情况。比较两种方法，豚鼠离体回肠法准确度良好，且灵敏度更高，可作为颈动脉直接测压法的补充方法，但不能简单以豚鼠离体回肠法来替代颈动脉直接测压法结果。

豚鼠离体回肠法优点在于专属性高、反复给药重现性较好，豚鼠为常规实验动物，易于购得；但其操作复杂，耗时较长，对实验条件温度和通气要求严格，以此方法考查降压物质需用颈动脉直接测压法复检。

2.3 尾动脉间接测压法

颈动脉直接测压法不能满足长时间和反复多次的慢性实验，尾动脉间接测压法则可以克服这个难题。通过实验大鼠尾部或肢体动脉处装备压脉套，连接可以检测出动脉收缩压和舒张压的检测器，可直接测定血压值。

随着研究的深入，该方法得到进一步优化，Daugherty 等 [26] 开发了多通道高通量血压计，可同时测量多达 8 只小鼠或大鼠的血压，通过体积压力记录仪测定鼠尾收缩压、舒张压、心率、平均血压、尾血流量和尾血容量，可以获得更准确的血压参数，弥补原方法上的不足。

尾动脉间接测压法不会对动物造成损伤，动物在无麻醉状态下测定各项生理指标，避免了麻醉和应激反应对实验结果的干扰，并且可以连续长时间的实验 [27]；但血压值为间接获得，灵敏度低，血压若急剧变化可能检测不到，因此不适用于血压变化反应灵敏的药物实验。

2.4 植入式遥感监测系统

植入式遥感监测系统是在动脉中植入传感器，通过传感器装置直接测量动脉血压的技术，目前用于动物研究的血压感应装置有生理盐水填充导管、传感器导管、血压遥测系统等，这些装置可远程监测血压变化量 [28]，与尾动脉间接测压法一样都是在动物有意识的情况下测定血压变化。

梁月琴等 [29] 对比了尾动脉间接测压法和植入式遥感监测大鼠血压的差别，前者具有操作简便且适用范围广的优点，但动物生理状况及环境因素对结果有较大影响，难以精确测量及动态观察血压，数据准确性较低；后者遥测系统设备昂贵，大部分实验室不具备相适应的硬件，但是能够检测出更详尽的数据供参考，例如监测动物的即时血压情况等，动态数据更能反映真实的药理作用。

植入式遥感监测系统优点在于实时获取准确的数据，能够捕获血压的快速变化；缺点在于传感器植入动物的手术难度高，为防止手术部位感染，对手术环境及术后护理要求很高，导致实验周期变长。

3 生物胺类物质的理化测定方法

药理学测定方法虽能从整体角度评估生物胺类物质的药理学效应，但由于动物实验存在实验对象稳定性难以保证，实验技术要求高、过程复杂、耗时长等问题，且无法明确不良反应的物质基础，因此有必要建立灵敏、高效、快速的生物胺检测方法，为生物胺类物质的快速筛查，生成过程监测及与不良反应相关性的探究提供技术手段。

由于生物胺是一类可见及紫外光吸收度低、化合物极性大的小分子化合物，药品中少量生物胺的测定容易受多种因素干扰，难以进行直接检测，因此，常采用提取效率高、消除基质干扰的前处理方法，通过对少量的分析物富集从而提高信号强度，再配合快速便捷、灵敏度高的分析方法进行定量测定。本文对目前生物胺含量测定的前处理方法和仪器分析方法进行总结。

3.1 样品前处理方法

3.1.1 固相萃取（SPE） SPE 是以固相物作为萃取剂将目标化合物从样品中吸附出来，从而使目标物与基质分离，再通过洗脱剂使得目标物与固相萃取剂分离，最终获得富集的目标物。王芳等 [30] 建立了 SPE 结合气相色谱法测定腌肉中 5 种生物胺，在选择固相萃取柱时，比较了强阳离子交换柱（SCX）、强阴离子交换柱、C_{18} 固相萃取柱的萃取效果，结果发现 SCX 固相柱萃取生物胺萃取效果好，有较高的回收率，样品前处理步骤简单，灵敏度高，结果重现性好。郑捷等 [31] 以固相萃取作为前处理，与高效液相色谱法联用检测了羊肉风干肠中的 6 种生物胺，对比液液萃取和固相萃取，发现固相萃取更适用于样品前处理，回收率更高，符合生物胺简便高效的检测要求。

3.1.2 基质固相分散萃取（MSPD） MSPD 适用于固体、半固体的前处理，该方法样品与有机物使用量少、萃取剂及目标物接触面积大。MSPD 虽与 SPE 的填料相似，但分离原理不同，MSPD 主要是根据目标物在基质中的分散情况与溶剂的极性不同分离目标物，其中样品基质、洗脱剂与

萃取剂是 MSPD 的重要影响因素。Calbiani 等[32]比较了 SPE 和 MSPD 两种技术，SPE 法使用了两种固定相的固相萃取柱，分别为 C_{18} 和 -CN，结果表明，以 -CN 为固定相的 SPE 法和 MSPD 法净化效果良好，生物胺与杂质分离效果显著，回收率相当，MSPD 技术优势在于耗时更短，还可用于黏性样品（生物组织等）的前处理。

3.1.3　液液萃取与液相微萃取　液液萃取根据物质在两相中的分配系数不同的原理，将目标物从一相转移到另一相而达到分离。成本低是液液萃取的优势，但由于萃取液用量大，处理废液是液液萃取需要解决的难题之一，萃取过程中费时费力，损耗样品，回收率和重复性不尽如人意，常规的液液萃取在生物胺检测过程中不作为首选考虑。Ramos 等[34]利用盐析辅助液液萃取制备样品，盐析可以将水与水混溶的有机溶剂分离，有益于有机化合物与无机化合物的萃取，保证了高回收率。相比常规的液液萃取程序，盐析辅助液液萃取溶剂消耗少，操作步骤简易，能够有效避免目标物的流失，实验的关键因素是萃取前 pH 与提取时间的准确控制。

液相微萃取的提出弥补了液液萃取的不足之处，该方法采用微量溶剂置于溶液中，实现对于目标物的微萃取，萃取过程中采用一次性纤维膜，可避免交叉污染，达到高度净化样品的效果[33]。韦彩云等[35]利用超声辅助分散液相微萃取分离生物胺，优化萃取和分析条件，用于检测米酒中生物胺的含量，该方法萃取使用有机溶剂较少，回收率良好。

3.1.4　离子对萃取　离子对萃取是在适宜的 pH 条件下，生物胺与其带相反电荷的离子对试剂反应生成疏水性离子对，极性变小，进入有机相，经反萃取将生物胺阳离子释放到酸性溶液中[36]。采用离子对萃取与液质联用法，Chatzimitakos 等[37]等通过使用离子对试剂将生物胺萃取到有机溶剂中，然后进行反萃取获得 NMR 光谱，定量不同基质样品中生物胺的准确性和重现性良好。Ochi 等[38]定量测定了鲭鱼片中的生物胺，采用离子对固相萃取纯化样品，无需衍生化和 pH 调节，通过 C_{18} 色谱柱分离直接检测 8 种生物胺，方法经过验证显示出良好的准确性。

3.2　仪器分析方法

由于生物胺类物质是强极性化合物，使用常规色谱柱分析时无法有效保留且分离能力差，同时部分生物胺不具备紫外或者荧光发色基团，使用紫外检测器或荧光检测器无法检测，因此，直接使用高效液相色谱法（HPLC）对生物胺进行检测的难度较大，需要通过衍生化试剂处理后进行测定。目前文献中常见的衍生化试剂有丹磺酰氯[39]、邻苯二甲醛[40]等，本文按照衍生化方法反应原理、实验条件、实验样品、优势及不足对研究进行分类，见表 2。这些衍生化方法适用的化合物范围不同，每种方法都有其相对的优势和不足，实际应用中需根据目标物特性评估最佳衍生化策略。

表 2　常见衍生化试剂及其实验方法

Tab 2　Common derivatization reagents and experiment methods

衍生化试剂	衍生化原理	检测方法	反应 pH	反应时间 /min	样品基质	优势	不足
丹磺酰氯[41-42]（DNS-Cl）	DNS-Cl 可与伯胺和仲胺上的活泼氢反应，与生物胺的氨基反应生成荧光产物	LC-MS/MS、HPLC-UV	弱碱性	30～60	补气中药材、黄连提取物	国标规定可使用的衍生化试剂，可降低生物胺极性，稳定性高，应用广泛	操作过程耗时耗力
邻苯二甲醛[40，42]（OPA）	OPA 在还原剂巯基乙醇存在下与生物胺迅速反应产生具有很强荧光的异吲哚衍生物	LC-MS/MS、HPLC	弱碱性	1～2	发酵酒、黄连提取物	是一种通用的荧光试剂，衍生化反应过程时间短	衍生化产物稳定性低
芴甲氧羰酰氯（Fmoc-Cl）[42]	Fmoc-Cl 对碱性比较敏感，与生物胺的氨基反应生成荧光产物	LC-MS/MS	酸性	60	黄连提取物	酸性条件下具有一定优势	衍生化过程中副反应较多，易产生干扰物质
4- 二甲胺偶氮苯磺酰氯[42]（Dabsyl-Cl）	Dabsyl-Cl 与生物胺的氨基反应生成稳定的荧光产物	LC-MS/MS	弱碱性	60	黄连提取物	反应过程操作简单	衍生化反应不稳定，产物随反应物比例的变化会不同
Marfey 试剂[42]	与手性分子中的氨基发生取代反应，衍生化得到含两个或以上手性中心的光学异构体	LC-MS/MS	弱碱性	60	黄连提取物	适用于分离对映异构体	衍生化效果通常不理想

样品经衍生化后使用 HPLC 检测分析，虽然可以通过降低生物胺极性改善色谱分离情况，提高检测的灵敏度，但存在衍生化过程复杂、衍生化反应可产生未知杂质等缺点而影响生物胺检测的准确性，表 3 列举了目前成功应用于生物胺检测的 6 种检测方法。多种方法联用为生物胺的检测提供了选择和参考，但实际应用中某一种方法并非适合所有样品，需根据实际待测样品选择适宜的组合进行生物胺类物质检测。

表 3　联用检测技术在生物胺测定中的应用

Tab 3　Application of joined detection technology in the determination of biogenic amines

检测方法	预处理方法	分析条件	检测时间 / min	生物胺种类	检测范围（r^2）	优势
UHPLC-FLD[43]	经丹磺酰氯衍生化后过滤进样分析	流动相 A 为 0.01 mol • L^{-1} 甲酸铵溶液，B 为乙腈，梯度洗脱，FLD 激发波长 330 nm，发射波长 520 nm	18	色胺、苯乙胺、腐胺、尸胺、组胺、酪胺、亚精胺、精胺	0.06 ～ 0.59 μg • mL^{-1}（0.984 ～ 0.999）	使用粒径更小的色谱柱，配合耐高压的色谱仪，大大减少分析时间，高效便捷，是分离复杂基质中生物胺的理想选择[44]
HPLC-MS/MS[45-46]	经苯甲酰氯衍生化后过滤进样分析	流动相 A 为水，B 为乙腈（0.1% 甲酸），梯度洗脱，以同位素标记为内标	48	酪胺、色胺、组胺、苯乙胺、尸胺、腐胺、乙醇胺、精胺、亚精胺、*β*-丙氨酸、甲基丙基胺、3-甲基丁胺、2-甲基丁胺、3-（甲基硫）丙胺	检测限 0.05 μg • kg^{-1}	可以避免常规色谱技术的主要缺点，对色谱无法准确分离的生物胺进行定量，具有广泛的分析物相容性和高分析性能，是目前直接检测生物胺普遍的选择[47-48]
	超纯水稀释后过滤，进样分析	流动相 A 为 0.1% 甲酸溶液，B 为甲醇，梯度洗脱	4.1	组胺、5-羟色胺、多巴胺、肾上腺素、去甲肾上腺素	0.5 ～ 1000 ng • mL^{-1}（＞ 0.998）	
SFC-DAD[49]	经丹磺酰氯衍生化后过滤进样分析	流动相 A 为 CO_2，B 为正己烷 - 异丙醇 - 氢氧化铵（70∶30∶15，*V/V/V*），梯度洗脱，检测波长 254 nm，背压 2000 psi	7	苯乙胺、酪胺、色胺、精胺、尸胺、腐胺、组胺、亚精胺	72 ～ 224 ng • mL^{-1}（0.9995 ～ 1.0000）	采用超临界流体作为流动相，介质黏度小，传质速率高，结合液相色谱的硬件设施和控制软件，更好地控制检测过程的稳定性，缩短了分析时间，消耗的溶剂更少，可作为液相色谱法检测生物胺的一种补充方法
GC-MS[50]	经 IBCF 衍生化后用聚丙烯酸酯 SPME 纤维萃取，直接进样分析	GC 进样口温度 250 ℃，载气为氦气，程序升温	25	甲胺、二甲胺、丙胺、丁胺、异丁胺、苯乙胺、腐胺、尸胺、酪胺、组胺	0.1 ～ 1 μg • mL^{-1}（0.991 ～ 0.999）	可供选择的固定相较多，不同的生物胺挥发性存在差异，经衍生化后可选择兼容多种生物胺衍生化物的固定相进行分离，具有分析时间短、分离效果好、灵敏度高的特点
CE-MS[50]	将样品超声过滤后进样分析	在毛细管中进行分离生物胺，电解质为 100 mmol • L^{-1} 甲酸，分离电压 30 kV	15	精胺、亚精胺、腐胺、组胺、尸胺、乙醇胺、三乙胺、苯乙胺、酪胺	0.075 ～ 2.500 μg • mL^{-1}（＞ 0.99）	样品无需衍生化，预处理方法更便捷
CE-UV[51]	经三次液液萃取后，氮气吹干，复溶进样分析	在毛细管中进行分离生物胺，电解质为 12 mmol • L^{-1} Im 和 10 mmol • L^{-1} *α*-CD，分离电压 15 kV，检测波长 200 nm	10	苯乙胺、组胺、色胺、5-羟色胺、章鱼胺、多巴胺、去甲基肾上腺素、肾上腺素、肌肽、腐胺、尸胺、精胺、亚精胺	1 ～ 150 μmol • L^{-1}	通过样品离子与背景离子 UV 性质的差异，能同时检测脂肪族、芳香族和杂环族生物胺。适合组分简单和基质纯净度高的样品及热不稳定性的分析物[52]

4　结论与展望

复杂基质药物如中药、抗菌药物、生化药物等原料取自动植物体机体、组织或体液，来源复杂、提取物不明确、稳定性差、易腐败，部分药物产生涉及微生物发酵或动物源性原料贮存，游离氨基酸均极易通过脱羧反应降解为生物胺，且其种类较多，故建立高效简便的检测方法用于生物胺类物质的定性定量测定是有效控制生物胺含量的前提。在此基础上，进一步探究生物胺种类、浓度与不良反应的相关性，明确各生物胺类物质剂量 - 效应关系变化，可以为临床不良反应的分析控制提供科学的参考数据。因此，根据样品类

型与所测生物胺的特点选取适宜的前处理与检测方法进行系统研究，并结合临床应用探究各种生物胺类物质的不良反应发生的可能性，进一步明确原料及制剂工艺及存在条件的影响和质控要求，可以为药物的安全性评估、风险因素排查分析、临床安全用药提供支持和保障。

参考文献

[1] Sivamaruthi BS，Kesika P，Chaiyasut C. A narrative review on biogenic amines in fermented fish and meat products [J]. J Food Sci Technol，2021，58（5）：1623-1639.

[2] Park YK，Lee JH，Mah JH. Occurrence and reduction of biogenic amines in traditional Asian fermented soybean foods：a review [J]. Food Chem，2019，278：1-9.

[3] Martuscelli M，Esposito L，Mastrocola D. Biogenic amines' content in safe and quality food [J]. Foods，2021，10（1）：100.

[4] Feddern V，Mazzuco H，Fonseca FN，et al. A review on biogenic amines in food and feed：toxicological aspects，impact on health and control measures [J]. Anim Prod Sci，2019，59（4）：608-618.

[5] Doeun D，Davaatseren M，Chung MS. Biogenic amines in foods [J]. Food Sci Biotechnol，2017，26（6）：1463-1474.

[6] Visciano P，Schirone M，Paparella A. An overview of histamine and other biogenic amines in fish and fish products [J]. Foods，2020，9（12）：1795-1809.

[7] Sedaghati M，Mooraki N. Biogenic amines in sea products [J]. J Surv Fish Sci，2019，6（1）：1-8.

[8] Omer AK，Mohammed RR，Ameen PSM，et al. Presence of biogenic amines in food and their public health implications：a review [J]. J Food Prot，2021，84（9）：1539-1548.

[9] DeBeer J，Bell JW，Nolte F，et al. Histamine limits by country：a survey and review [J]. J Food Pro，2021，84（9）：1610-1628.

[10] Hattori Y，Hattori K，Matsuda N. Regulation of the cardiovascular system by histamine [J]. Handb Exp Pharmacol，2017，241：239-258.

[11] Schlicker E，Kathmann M. Role of the histamine H3 receptor in the central nervous system [J]. Handb Exp Pharmacol，2017，241：277-299.

[12] Linares DM，Ladero V，Rio BD，et al. Biogenic amines in dairy products [J]. Crit Rev Food Sci Nutr，2011，51（7）：691-703.

[13] 张敏，赵晓娟，曾晓房，等 . 食品中腐胺和尸胺检测方法研究及应用进展 [J]. 食品工业，2019，40（4）：215-219.

[14] Kosonen R，Barua S，Kim JY，et al. Role of agmatine in the application of neural progenitor cell in central nervous system diseases：therapeutic potentials and effects [J]. Anat Cell Biol，2021，54（2）：143-151.

[15] Hernandez-Orte P，Lapena AC，Pena-Gallego A，et al. Biogenic amine determination in wine fermented in oak barrels：factors affecting formation [J]. Food Res Int，2008，41（7）：697-706.

[16] Eggen I，Gregg B，Rode H，et al. Control strategies for synthetic therapeutic peptide APIs Part I：analytical considerations [J]. Biopharm Int，2014，26（3）：25-31.

[17] 苏喆，周朝东，马冰，等 . 鹿瓜多肽注射剂质量评价与研究 [J]. 中国药科大学学报，2020，51（4）：479-487.

[18] Li Y，Yang H，Liao H，et al. Simultaneous determination of ten biogenic amines in a thymopolypeptides injection using ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci，2013，929：33-39.

[19] 牛慧玲，王一博，李庆忠，等 . 疏血通注射液降压作用研究 [J]. 中国药品标准，2012，13（6）：411-413.

[20] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：182-183.

[21] 嵇扬，张癸荣，姜春来 . 比格狗与猫对组胺降压作用敏感性的比较研究 [J]. 中国药品标准，2004，5（2）：38-39.

[22] 黎家敏，马佳丽，杨春，等 . 实验兔和猫在降压物质检查中的比较研究 [J]. 实验动物科学，2020，37（5）：5-12.

[23] 中国药典 2015 年版 . 四部 [S]. 2015：158-159.

[24] 王婷婷，朴晋华，张蕻，等 . 注射用糜蛋白酶中组胺类物质检查方法学研究 [J]. 中国药品标准，2018，19（6）：36-40.

[25] 吴贤生，黄甘泉，杨嘉俊，等 . 注射用促肝细胞生长素中组胺类物质检查和降压物质检查的比较研究 [J]. 实验动物科学，2019，36（2）：67-72.

[26] Daugherty A，Rateri D，Hong L，et al. Measuring blood pressure in mice using volume pressure recording，a tail-cuff method [J]. J Vis Exp，2009，27：e1291-e1293.

[27] Erken HA，Erken G，Genç O. Blood pressure measurement in freely moving rats by the tail cuff method [J]. Clin Exp Hypertens，2013，35（1）：11-15.

[28] Van Vliet BN，Chafe LL，Antic V，et al. Direct and indirect methods used to study arterial blood pressure [J]. J Pharmacol Toxicol Methods，2000，44（2）：361-373.

[29] 梁月琴，王蕾，张明升，等 . 清醒大鼠血压不同测量方法的结果比较 [J]. 山西医科大学学报，2005，36（3）：282-284.

[30] 王芳，罗敏，陶文波，等 . 固相萃取 - 气相色谱法测定腌肉中 5 种生物胺 [J]. 理化检验（化学分册），2018，54（5）：512-515.

[31] 郑捷，李素，赵冰，等 . 固相萃取 - 高效液相色谱法测定羊肉风干肠中生物胺 [J]. 食品工业，2015，36（3）：286-289.

[32] Calbiani F，Careri M，Elviri L，et al. Rapid assay for analyzing biogenic amines in cheese：matrix solid-phase dispersion followed by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry [J]. J Agric Food Chem，2005，53（10）：3779-3783.

[33] Diuzheva A，Locatelli M，Tartaglia A，et al. Application of liquid-phase microextraction to the analysis of plant and herbal samples [J]. Phytochem Anal，2020，31（6）：687-699.

[34] Ramos RM，Valente IM，Rodrigues JA. Analysis of biogenic amines in wines by salting-out assisted liquid-liquid extraction and high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection [J]. Talanta，2014，124：146-151.

[35] 韦彩云 . 分散液相微萃取技术在液相色谱分析中的应用研究 [D]. 信阳：信阳师范学院，2010.

[36] Karami M，Yamini Y，Asl YA. On-chip ion pair-based dispersive liquid-liquid extraction for quantitative determination of histamine H_2 receptor antagonist drugs in human urine [J]. Talanta，2020，206：120235-120271.

[37] Chatzimitakos T，Exarchou V，Ordoudi SA，et al. Ion-pair assisted extraction followed by ^{1}H NMR determination of biogenic amines in food and biological matrices [J]. Food Chem，2016，202：445-450.

[38] Ochi N. Simultaneous determination of eight underivatized biogenic amines in salted mackerel fillet by ion-pair solid-phase extraction and volatile ion-pair reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A，2019，1601：115-120.

[39] 张来颖，于秋红，张志荣，等 . 柱前衍生 - 高效液相色谱法测定发酵型饮品中的 8 种生物胺 [J]. 中国卫生检验杂志，2018，28（17）：2057-2063.

[40] 杜赛，王若燕，高何刚，等 . 柱后衍生 - 液相色谱法快速检测发酵酒中的生物胺 [J]. 中国卫生检验杂志，2017，27（13）：1840-1842.

[41] 张宁，王雅琪，王鑫娜，等 . 柱前衍生化 RP-HPLC 法鉴别及测定 9 种补气药中的生物胺 [J]. 药物分析杂志，2017，37（10）：1791-1798.

[42] Lkhagva A，Shen CC，Leung YS，et al. Comparative study of five different amine-derivatization methods for metabolite analyses by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A，2020，1610：460536-460473.

[43] Angulo MF，Flores M，Aranda M，et al. Fast and selective method for biogenic amines determination in wines and beers by ultra high-performance liquid chromatography [J]. Food Chem，2020，309：125689-125706.

[44] Mayer HK，Fiechter G，Fischer E. A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese [J]. J Chromatogr A，2010，1217（19）：3251-3257.

[45] Mayr CM，Schieberle P. Development of stable isotope dilution assays for the simultaneous quantitation of biogenic amines and polyamines in foods by LC-MS/MS [J]. J Agric Food Chem，2012，60（12）：3026-3032.

[46] Zhang W，Wang X，Yang S，et al. Simultaneous quantification of five biogenic amines based on LC-MS/MS and its application in honeybee venom from different subspecies [J]. Biomed Chromatogr，2020，34（2）：e4740-e4764.

[47] Sirocchi V，Caprioli G，Ricciutelli M，et al. Simultaneous determination of ten underivatized biogenic amines in meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry（HPLC-MS/MS）[J]. J Mass Spectrom，2014，49（9）：819-825.

[48] de Jong WH，de Vries EG，Kema IP. Current status and future developments of LC-MS/MS in clinical chemistry for quantification of biogenic amines [J]. Clin Biochem，2011，44（1）：95-103.

[49] Gong X，Qi N，Wang X，et al. Ultra-performance convergence chromatography（UPC^2）method for the analysis of biogenic amines in fermented foods [J]. Food Chem，2014，162：172-175.

[50] Woźniakiewicz M，Woźniakiewicz A，Nowak PM，et al. CE-MS and GC-MS as “Green” and complementary methods for the analysis of biogenic amines in wine [J]. Food Anal Methods，2018，11（9）：2614-2627.

[51] 何梨梨 . 对三类不同化学结构生物胺同时分离检测的 CE 方法研究 [D]. 上海：东华大学，2017.

[52] Chiu TC，Lin YW，Huang YF，et al. Analysis of biologically active amines by CE [J]. Electrophoresis，2006，27（23）：4792-4807.

（收稿日期：2021-11-08；修回日期：2022-02-18）

LC-MS/MS 检测尿液类固醇激素在疾病研究中的应用

张潇莉[1]，杨娜[2]，葛佳佳[2]，朱怀军[2]，何骏[1]，葛卫红[1, 2*]（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）

摘要：内源性类固醇激素具有维持新陈代谢、调节性功能等多种生理作用。其种类较多，且相关标志物的精确定量在内分泌及相关代谢性疾病的筛查与诊断中具有重要意义。液相色谱串联质谱（LC-MS/MS）技术因灵敏度高、特异性强、可同时检测多种物质等特点在临床类固醇激素检测领域显示极大潜力。尿液区别于其他复杂生物基质，具有无创收集、前处理简单、代谢产物丰度较高、24 h 尿排泄浓度稳定等优势。相比于临床应用较为广泛的血清类固醇激素定量研究，尿液类固醇激素的临床定量研究正逐步展开，尚缺少整体性综述。本文简要综述了近年来尿液类固醇激素测定领域的 LC-MS/MS 技术及临床应用，旨在进一步揭示基于 LC-MS/MS 技术的尿液类固醇激素检测在临床研究中的意义。

关键词：LC-MS/MS；尿液；类固醇激素；疾病

中图分类号：R446.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1625-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.025

Detection of steroid hormones in the urine by LC-MS/MS

ZHANG Xiao-li[1], YANG Na[2], GE Jia-jia[2], ZHU Huai-jun[2], HE Jun[1], GE Wei-hong[1, 2*] (1. *Drum Tower Clinical Medical College*, *Nanjing University of Traditional Chinese Medicine*, *Nanjing* 210008; 2. *Department of Pharmacy*, *Nanjing Drum Tower Hospital*, *Affiliated Hospital of Medical School of Nanjing University*, *Nanjing* 210008)

Abstract: Endogenous steroid hormones have important functions such as maintaining the metabolism and regulating sexual functions. There are many types of endogenous steroid hormones, and the accurate quantification of related markers is important in the screening and diagnosis of endocrine and related metabolic diseases. Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has shown great potential in clinical steroid hormone detection due to its high sensitivity, strong specificity, and the ability to detect multiple substances simultaneously. Urine is different from other complex biological substrates. It has unique advantages such as non-invasive collection, simple pre-processing, high concentration of metabolites, and stable 24-hour urine excretion concentration. Unlike the widely used quantitative study of blood steroid hormones in clinical practice, the clinical quantitative study of urine steroid hormones is lacking. This article briefly reviewed the clinical application of LC-MS/MS in urine steroid hormone determination in recent years, aiming to reveal the significance of urine steroid hormone detection by LC-MS/MS in clinical research.

Key words: LC-MS/MS; urine; steroid hormones; disease

类固醇激素是一类由胆固醇经一系列酶催化代谢产生的脂溶性小分子化合物，主要包括性激素和皮质激素[1]。内源性类固醇激素的变化在内分泌疾病及相关代谢性疾病的筛查与诊断中具有重要参考价值，其精确定量分析对于临床研究是十分必要的。目前，临床常用检测类固醇激素的方法主要是免疫分析法[2]，但随着液相色谱串联质谱（liquid chromatography tandem mass spectrometry，LC-MS/MS）技术的不断发展，其因高通量、高灵敏度和高特异性，适用范围广、

作者简介：张潇莉，女，在读硕士研究生，主要从事临床药学研究，email：zxl17853148879@163.com　*通信作者：葛卫红，女，硕士，主任药师，主要从事医院药学研究，email：geyaoxue@163.com

检测周期短，并且具有同时定性定量分析多种激素的优势[3]，已逐渐替代免疫分析方法，成为临床检测与疾病筛查及诊断中重要的新技术。

与血清、血浆样本相比，尿液样本可以被非侵入性地连续收集，患者更易接受，且尿液前处理相对简单[4]。尿液排泄作为人体排泄的重要途径，尿液中涵盖大量内源性极性代谢产物。通过对尿液样本进行定量，可提供一个较为完整的代谢概况。例如，24 h 尿儿茶酚胺的结果可比血儿茶酚胺更加精准地反映交感神经和肾上腺髓质的功能[5]。临床诊断库欣综合征时，24 h 尿游离皮质醇能够避免皮质醇的瞬时变化，避免血中皮质醇结合球蛋白浓度改变而影响皮质醇测定结果，且在大剂量地塞米松抑制试验中 24 h 尿游离皮质醇对库欣综合征诊断的灵敏度和特异性都高于血皮质醇[6]。5- 羟吲哚乙酸的定量检测可用于神经内分泌肿瘤患者的监测和诊断，虽然其可以在血样中被定量分析，但临床通常采用尿液样本进行检测[7]。因此，利用 LC-MS/MS 技术检测尿液样本中的内源性物质具有一定优势，且已成为临床检测的一个重要方向。本文主要就 LC-MS/MS 技术在尿液类固醇激素测定中的研究及临床应用进行综述。

1 基于 LC-MS/MS 技术的尿液类固醇激素定量方法的研究现状

LC-MS/MS 技术是一种结合液相色谱与质谱的定性和定量的分析技术。该技术具有液相色谱的高效分离性能和串联质谱的高灵敏度、高特异性检测的特点，可实现多种成分的同时测定，适用于血清、尿液等复杂生物样本的分析检测[8]。目前，利用 LC-MS/MS 技术在尿液中检测内源性类固醇激素正在迅速发展，其前处理不断优化，灵敏度不断提高，检测数量也逐渐增多。

尿液中涵盖大量的内源性极性代谢产物，在分析检测前通常需要进行前处理以去除干扰性小分子。常用的前处理方法主要有蛋白质沉淀法、液液萃取法和固相萃取法，但上述方法均存在操作时间长，处理步骤复杂等缺点[9]。随着尿液前处理方法的不断优化，出现并行样品处理、柱交换和在线固相萃取等技术。这些技术可提高检测灵敏度，增加检测种类，缩短处理时间，提高效率且不影响检测质量，已在生物分析应用中获得认可。例如 Naldi 等[10]开发并验证了一种基于全自动的在线固相萃取进行样品提取和定量的 LC-MS/MS 法，能同时检测尿液和水样中多种类固醇激素，分离分析只需 10 min，节省大量时间并减少流程错误。Son 等[11]建立了一种新的 LC-MS/MS 方法，使用 β- 葡萄糖醛酸苷酶和固相萃取进行处理并提取，可用于检测和分析尿液中的 39 种类固醇激素。

新色谱技术的应用促进了 LC-MS/MS 技术检测类固醇激素的发展，例如超高效液相色谱法（UPLC）、整体色谱法及亲水相互作用色谱法等，不仅能提供更高的灵敏度和分离效率，运行时间缩短，同时能最大限度地减少基质效应。传统色谱柱采用 3 μm 或 5 μm 的颗粒进行填充，而超高效液相色谱法的引入使高效小颗粒色谱柱应用于检测，其通常填充＜ 2 μm 的颗粒。与传统色谱柱相比，高效小颗粒色谱柱能提供更高的稳定性，减少溶剂使用量，增加灵敏度[12]。如 Zhou 等[13]采用 UPLC-ESI-MS 法同时检测尿液样本中 14 种类固醇激素，该方法经过全面验证，各激素提取回收率均大于 87%，灵敏度更高。Dmitrieva 等[14]利用 UPLC-HRMS 技术检测 9 种尿类固醇激素，采用分散液液微萃取法提取，该方法容易操作且不需大量有毒有机溶剂。

质谱电离技术的发展可以提高 LC-MS/MS 技校检测的特异性、灵敏度和稳定性。其中大气压光化学电离技术作为大气压化学电离、电喷雾电离技术的补充，是更具有选择性，在类固醇激素分析中展现出优势，能减少基质效应、提高灵敏度[15]，但电喷雾电离技术在检测尿类固醇激素方面的应用更广泛，其与三重四极杆仪相结合测定类固醇激素有着更高的灵敏度与特异性，且化学衍生化可以提高类固醇激素的电离效率，提高灵敏度，并有助于适合的监测模式。如 Berg 等[16]开发建立的 LC-ESI-MS/MS 法可检测尿液中 27 种雌激素相关代谢物，该方法经过验证，定量检测灵敏度可达到 pg 级。Dai 等[17]建立了新的 LC-ESI-MS/MS 法，使用氘 4-（二甲氨基）- 苯甲酸衍生化试剂，提高电离效率与检测灵敏度，能检测到 24 种尿类固醇激素。

综上，样品前处理的优化，色谱条件的发展，灵敏准确的质谱仪都在加快 LC-MS/MS 技术的发展，也使尿液类固醇激素的检测有了更大的进步。这些应用均表明 LC-MS/MS 技术具有准确可靠的多分析物分析的潜力。

2 尿液类固醇激素检测的临床应用及研究进展

2.1 皮质激素

皮质激素来源于肾上腺皮质，包括糖皮质激素和盐皮质激素，其在许多生理过程中起到至关重要的作用。皮质激素代谢的改变是引起盐皮质激素过多综合征、先天性肾上腺皮质增生症和肾上腺功能不全的原因。研究发现，库欣综合征、

多囊卵巢综合征、甲状腺功能亢进、妊娠高血压、先兆子痫及抑郁症[18-22]等疾病也与体内这种改变有关。

先天性肾上腺皮质增生症是一种常染色体隐性疾病，体内 21 羟化酶缺乏会导致皮质醇和醛固酮合成受阻，两者体内代谢的改变引起疾病的发生。利用 LC-MS/MS 法对尿液中的皮质醇及其代谢物进行定量分析，可有效降低诊断假阳性率，提高筛查诊断准确性。如 Pussard 等[23]建立的 LC-MS/MS 法成功检测尿液中内源性皮质醇、雄激素及 17-羟孕酮等，其结果可用于诊断先天性肾上腺皮质增生症，并能应用于患者激素替代治疗的定期监测。Kosicka 等[24]利用新建立的 LC-MS/MS 法对尿皮质醇和可的松及其代谢物进行定量，该方法经过充分验证，符合欧洲药品管理局的要求，可用于先天性肾上腺皮质增生症、库欣综合征等临床样本的分析。

人体内缺乏 11*β*-羟基类固醇脱氢酶，无法将皮质醇转化为皮质酮，导致皮质醇在体内蓄积而引起库欣综合征。24 h 尿游离皮质醇是皮质醇综合分泌的指标，也是库欣综合征的合理筛查标志物[6]。灵敏准确的 LC-MS/MS 法检测尿游离皮质醇对于库欣综合征的筛查诊断十分有利。最近的一项研究发现，通过 LC-MS/MS 法测定的 24 h 尿游离皮质醇在临床实践中具有优越的诊断性能，其准确度与内分泌学会指南建议的诊断方法的准确度相同[25]，这表明测定 24 h 尿游离皮质醇能够更加方便准确地鉴别库欣综合征。例如，Ceccato 等[26]建立了标准化的 LC-MS/MS 分析方法测定尿液中游离皮质醇的浓度，并评估该方法用于诊断库欣综合征的灵敏度及特异性，通过实验得到了库欣综合征患者不同发病阶段的皮质醇水平参考范围，该范围为库欣综合征的对症治疗提供了一些参考。LC-MS/MS 法可以避免免疫分析法检测皮质醇时的干扰问题。LC-MS/MS 法在尿液中检测皮质醇的假阴性率较免疫分析法低，能更加方便、快速地获得结果。Bianchi 等[27]利用 LC-MS/MS 法检测库欣综合征患者的尿液样本，其皮质醇检测结果能满足临床医师对患者实验室数据的要求，且准确度更高。因此，利用 LC-MS/MS 法检测尿液皮质激素在体内水平的变化，对库欣综合征的筛查与诊断十分有利。

慢性压力和重度抑郁症与皮质醇代谢有关，为了更好地了解抑郁症，Zhai 等[22]利用 LC-MS/MS 法定量分析健康成人和抑郁症患者尿液中的 5 种皮质激素（皮质醇、可的松、四氢皮质醇、异源四氢皮质醇和四氢可的松），结果表明糖皮质激素水平在抑郁症患者中产生了显著变化，并发现了患者体内 11*β*-羟基类固醇脱氢酶Ⅱ型活性降低，5*α*-还原酶途径出现功能障碍。体内皮质醇代谢的变化以及酶活性的改变为寻找抑郁症的潜在病因提供了新的想法。

多囊卵巢综合征与雄激素和皮质醇代谢物排泄增强以及 5*α*-还原酶活性增加有关，皮质激素生成增多是其重要的致病途径。Cuzzola 等[28]基于新开发的 LC-MS/MS 法测定多囊卵巢综合征患者的游离总糖皮质激素，激素定量分析结果可用于支持与皮质醇代谢相关病理的临床诊断。

上述疾病均可以通过监测皮质醇、可的松及相关代谢物在体内的水平变化来筛查诊断，因此利用灵敏、准确、高效的 LC-MS/MS 法用于检测尿液皮质激素水平变化，对先天性肾上腺皮质增生症、库欣综合征等疾病进行方便筛查、及早诊断与治疗十分重要。

2.2　性激素

2.2.1　雌激素　雌激素是体内常见的甾体类固醇激素，包括雌酮、雌二醇、雌三醇等，主要由卵巢产生，也可由雄激素经芳香化转化产生。雌激素具有广泛而重要的生理作用，不仅作用于女性生殖系统，而且对内分泌、心血管、中枢神经系统、骨骼、皮肤及附属物等均有明显的影响[29]。内源性雌激素的定量分析在多种疾病的诊断治疗中至关重要，包括女性生殖器模糊、多囊卵巢综合征、卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜癌和前列腺癌等[30-33]。最近的研究发现雌激素及代谢物在女性盆底功能障碍性疾病，中枢神经系统疾病（如阿尔茨海默病、帕金森病），骨质疏松等骨骼疾病以及糖尿病[34-36]等疾病病因解释中起到很大作用。

考虑到儿童和老年人体内雌激素浓度较低，临床诊断和流行病学研究都需要高灵敏度和高特异性的方法，且检测样本应具有方便采集、非侵入性特点，为此研究者们进行了一系列研究。例如，Coburn 等[37]利用 LC-MS/MS 法检测血清、血浆和尿液中雌激素水平，该研究发现血清和尿液中雌激素及其代谢物测定值之间具有一致性，且单个代谢物的尿液浓度与血清浓度相关，并证明了尿液和血清中雌激素图谱的一致性，结果证实尿液是流行病学研究中的一种适合替代物。Faupel 等[38]对比了 LC-MS/MS 法、放射性免疫分析法和酶相关免疫吸附剂检测法测定尿液中雌激素及代谢物水平，其结果表明 LC-MS/MS 法更适合于测定绝经后女性的雌激素及代谢物绝对或相对数量或水平变化，还能更全面地了解雌激素代谢物的特征。综上，与血清相比，尿液中雌激

素的浓度相对较高，并且其采集是无创性的，参与研究者更容易接受。因此，选择尿液样品测定雌激素及其代谢物具有明显优势。

对雌激素及其代谢物进行定量分析对于阐明其致癌机制以及在子宫内膜癌和乳腺癌的早期诊断、筛查、预防和治疗领域的进一步应用具有重要意义。例如，Zhao 等[39]利用 LC-MS/MS 法检测子宫内膜癌患者与健康女性尿液中 7 种内源性雌激素代谢物（2- 羟基雌二醇、2- 羟基雌酮、4- 羟基雌二醇、4- 羟基雌酮、16α- 羟基雌二酮、2- 甲氧基雌二醇和 2- 甲氧基雌酮），发现与健康女性相比，子宫内膜癌患者体内 4- 羟基雌二醇增多，2- 甲氧基雌酮和 2- 甲氧基雌二醇减少，其中 4- 羟基雌二醇在体内的高表达可能成为子宫内膜癌高危人群的筛查指标。这为子宫内膜癌患者尿液生物标志物的发现提供了独特的见解，为子宫内膜癌的早期筛查提供了新的方法，该结果还需要广大研究者进一步研究确认。

乳腺癌患者体内雌激素代谢物同样失衡。Berg 等[40]建立了一种新的 LC-MS/MS 法在极少量尿液中检测 27 种雌激素及其代谢物，对该方法进行充分验证后用于检测乳腺癌患者的尿雌激素及代谢物浓度。结果表明内源性雌激素代谢的不平衡与乳腺癌发展风险增加有关，这为临床寻找评估乳腺癌风险的潜在生物标志物，尽快实现早期发现和治疗乳腺癌提供了新的思路。这些研究对于加快 LC-MS/MS 法应用于临床检测提供了更加令人信服的证据。阐明雌激素及其代谢物在体内的变化特征对于上述疾病的临床研究与诊断十分关键，因此，利用准确特异的 LC-MS/MS 法来评估体内雌激素及代谢物浓度有利于及早发现各种疾病，进而进行积极有效的临床干预。

2.2.2 雄激素 雄激素又称为男性激素，包括睾酮、二氢睾酮、雄烯二酮等，主要是由睾丸合成和分泌，肾上腺和卵巢也分泌少量。其主要功能为促进男性性器官与精子发育成熟，促进蛋白质合成，加快骨骼肌生长，抑制体内脂肪增加等。人体内雄激素代谢紊乱会引起肥胖、代谢综合征、2 型糖尿病和骨质疏松，也会增加心血管、脑血管（如中风和短暂性缺血发作）和动脉粥样硬化等疾病的风险[41-44]。监测尿液雄激素代谢物水平变化对于研究激素替代疗法对骨质疏松症和性腺功能减退的影响以及前列腺癌等癌症早期预后的潜在生物标志物十分重要。

人体内 5α- 还原酶可催化睾酮转化为二氢睾酮，当二氢睾酮在前列腺和皮肤内积累到一定程度，会引起许多病理改变，如前列腺增生症、痤疮、女性多毛、男性脱发等[45]。进一步明确雄激素水平变化与不同疾病之间的关系，有助于及早预防并对症治疗。例如，Im 等[46]通过监测尿液内源性雄激素浓度研究非那雄胺治疗脱发的疗效，其开发建立一种高灵敏度高特异性的 LC-MS/MS 法，同时定量分析尿雄激素和前列腺素，并测定男性脱发组和正常对照组患者尿液中两种激素的浓度差异，从而分析该药物的治疗效果。该定量分析方法在雄激素代谢相关的炎症疾病中的应用也具有巨大潜力。

精确检测内源性雄激素有助于我们进一步了解并更好地治疗代谢紊乱。对此，Wang 等[47]开发了同时量化尿液中 15 种类固醇激素葡萄糖醛酸苷的 LC-MS/MS 法，结果发现尿液中脱氢表雄酮排泄增加后，患者开始出现肾上腺功能亢进症状（如多毛、脱发、痤疮、高血压等），这一发现为肾上腺功能亢进的早期鉴别诊断提供了新的思路，加快了临床尿液样本检测雄激素及其代谢物的进展，也为肾上腺功能亢进与多囊卵巢综合征区分鉴别提供了思路。多囊卵巢综合征患者体内睾酮和孕酮增多，产生与肾上腺功能亢进相似症状，仅通过临床症状无法准确鉴别，因此对疑似人群进行内源性雄激素和孕激素定量检测，有助于该疾病的鉴别诊断[48]。利用 LC-MS/MS 技术对多囊卵巢综合征患者尿液中睾酮、脱氢表雄酮、雄烯二酮等雄激素进行定量能将多囊卵巢综合征与其他疾病区分开，提高诊断准确性。

有研究表明，类固醇激素如硫酸和葡萄糖醛酸的结合形式，在尿液中的浓度要比血浆或血清中的更高[45]。内源性雄激素硫酸和葡萄糖醛酸结合物可作为控制兴奋剂滥用的指标。因此，Strahm 等[49]开发了一种快速灵敏的 LC-MS/MS 法，用于同时分离和量化尿睾酮、还原胆烷醇酮及脱氢表雄酮等的硫酸和葡萄糖醛酸结合物，该方法适用于检测运动员尿液中雄激素结合物，以检验其是否服用兴奋剂。尿液的快速获取与简单处理缩短了获知检测结果的时间，因此，采用 LC-MS/MS 法检测尿液中雄激素水平是大型赛事的最佳选择。

3 总结与展望

目前，LC-MS/MS 法已成为临床实验室用于临床疾病诊断标志物测定的有力武器之一。深入了解人体内源性类固醇激素的变化将有助于更好地筛查和诊断相关疾病。LC-MS/MS 法因其高灵敏度和高特异性等特点，使同时监测多种内源性物质成为可能，在多种内分泌和代谢疾病的早期诊断和监测中具有重要意义。利用准确特异的 LC-MS/MS 法检测尿液样本中类固醇激素能

全面阐述其整体代谢轮廓，也使研究者们更加关注尿类固醇激素与临床疾病的关联。本文中提及的方法均经过充分验证，但较多研究在临床相关疾病诊疗中的实际应用还需在大规模人群中验证，且方法提供的参考价值等问题有待进一步确定。LC-MS/MS 技术测定尿类固醇激素正在发展中，很多色谱、质谱技术并未应用检测，本综述仅简要介绍了近年来应用于检测尿类固醇激素的方法。由于 LC-MS/MS 技术检测尿液样本中内源性孕激素的研究极少，且未应用于临床，因此本文并未涵盖所有类固醇激素，尿液孕激素的检测未过多阐述。相信随着 LC-MS/MS 技术检测尿液类固醇激素的不断完善，研究者们将开发建立更多方法用于检测尿液中的所有类固醇激素，为内分泌及代谢相关疾病寻找潜在的生物标志物，加快 LC-MS/MS 技术检测尿液类固醇激素在临床中的应用。

参考文献

[1] Yoshimoto FK，Zhou Y，Peng HM，et al. Minor activities and transition state properties of the human steroid hydroxylases cytochromes P450c17 and P450c21，from reactions observed with deuterium-labeled substrates [J]. Biochemistry，2012，51（36）：7064-7077.

[2] Wudy SA，Schuler G，Sánchezguijo A，et al. The art of measuring steroids：principles and practice of current hormonal steroid analysis [J]. Steroid Biochem，2017，179：88-103.

[3] 徐玲燕，杜娟，吴伟，等 . LC-MS/MS 在临床内源性类固醇激素分析中的方法研究和应用进展 [J]. 药物分析杂志，2018，38（7）：1106-1115.

[4] Wang T，Tang L，Lin R，et al. Individual variability in human urinary metabolites identifies age-related，body mass index-related，and sex-related biomarkers [J]. Mol Genet Genomic Med，2021，9（8）：e1738.

[5] Santos TS，Figueira A，Rocha J，et al. Diagnosis and treatment of neuroendocrine tumors-a serie of 13 clinical cases（2014—2017）[J]. Int J Cardiol，2019，2：100019.

[6] Lu L，Chen JH，Zhu HJ，et al. Comparison of efficacy between the serum cortisol and 24 hour urine free cortisol in combined dexamethasone suppression test in the diagnosis of Cushing syndrome [J]. Zhonghua Yixue Zazhi，2016，96（27）：2150-2154.

[7] Adaway JE，Dobson R，Walsh J，et al. Serum and plasma 5-hydroxyindoleacetic acid as an alternative to 24-h urine 5-hydroxyindoleacetic acid measurement [J]. Ann Clin Biochem，2016，53（5）：554-560.

[8] Rodríguez-Morató J，Pozo ÓJ，Marcos J，et al. Targeting human urinary metabolome by LC-MS/MS：a review [J]. Bioanalysis，2018，10（7）：489-516.

[9] Keevil，Brian G. LC-MS/MS analysis of steroids in the clinical laboratory [J]. Clin Biochem Nutr，2016，49（13-14）：989-997.

[10] Naldi AC，Fayad PB，Prévost M，et al. Analysis of steroid hormones and their conjugated forms in water and urine by on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chem Cent J，2016，10（1）：30.

[11] Son HH，Yun WS，Cho SH. Development and validation of an LC-MS/MS method for profiling 39 urinary steroids（estrogens，androgens，corticoids，and progestins）[J]. Biomed Chromatogr，2020，34（2）：e4723.

[12] Honour JW，Conway E，Hodkinson R，et al. The evolution of methods for urinary steroid metabolomics in clinical investigations particularly in childhood [J]. Steroid Biochem，2018，181：28-51.

[13] Zhou Y，Cai Z. Determination of hormones in human urine by ultra-high-performance liquid chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom，2019，34（1）：7899-7905.

[14] Dmitrieva E，Temerdashev A，Azaryan A，et al. Quantification of steroid hormones in human urine by DLLME and UHPLC-HRMS detection [J]. Chromatogr B，2020，1159：122390.

[15] Keevil，Brian G. Novel liquid chromatography tandem mass spectrometry（LC-MS/MS）methods for measuring steroids [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab，2013，27（5）：663-674.

[16] Berg C，Venter G，Westhuizen F，et al. Development and validation of LC-ESI-MS/MS methods for quantification of 27 free and conjugated estrogen-related metabolites [J]. Anal Biochem，2019，590（1）：113531.

[17] Dai W，Huang Q，Yin P，et al. Comprehensive and highly sensitive urinary steroid hormone profiling method based on stable isotope-labeling liquid chromatography mass spectrometry [J]. Anal Biochem，2012，84（23）：10245-10251.

[18] Pignatti E，CE Flück. Adrenal cortex development and related disorders leading to adrenal insufficiency [J]. Mol Cell Endocrinol，2021，527（2）：111206.

[19] Chaudhry HS，Singh G. Cushing Syndrome [EB/OL]. Treasure Island（FL）：StatPearls Publishing，2021 Jul 30.

[20] Vassiliadi DA，Barber TM，Hughes BA，et al. Increased 5α-reductase activity and adrenocortical drive in women with polycystic ovary syndrome [J]. Clin Endocrinol Metab，2009，94（9）：3558-3566.

[21] Hoshiro M，Ohno Y，Masaki H，et al. Comprehensive study of urinary cortisol metabolites in hyperthyroid and hypothyroid patients [J]. Clin Endocrinol，2010，64（1）：37-45.

[22] Zhai X，Chen F，Zhu C，et al. A simple LC-MS/MS method for the determination of cortisol，cortisone and tetrahydro-metabolites in human urine：assay development，validation and application in depression patients [J]. Pharm Biomed Anal，2015，107：450-455.

[23] Pussard E，Travers S，Bouvattier C，et al. Urinary steroidomic profiles by LC-MS/MS to monitor classic 21-hydroxylase deficiency [J]. Steroid Biochem Mol Biol，2019，198（1）：105553.

[24] Kosicka K，SiemiaTkowska A，DPaKa，et al. Detailed analysis of cortisol，cortisone and their tetrahydro-and allo-tetrahydrometabolites in human urine by LC-MS/MS [J]. Pharm Biomed Anal，2017，140：174-181.

[25] Filippo C，Mattia B，Marialuisa Z，et al. Screening tests for Cushing’s syndrome：urinary free cortisol role measured by LC-MS/MS [J]. Clin Endocrinol Metab，2015（10）：3856-3861.

[26] Ceccato F，Antonelli G，Barbot M，et al. The diagnostic performance of urinary free cortisol is better than the cortisol：cortisone ratio in detecting de novo Cushing’s syndrome：the use of a LC-MS/MS method in routine clinical practice [J]. Eur J Endocrinol，2014，171（1）：1-7.

[27] Bianchi L，Campi B，Sessa MR，et al. Measurement of urinary free cortisol by LC-MS-MS：adoption of a literature reference range and comparison with our current immunometric method [J]. Endocrinol Invest，2019，42（11）：1299-1305.

[28] Cuzzola A，Mazzini F，Petri A. A comprehensive study for the validation of a LC-MS/MS method for the determination of free and total forms of urinary cortisol and its metabolites [J]. Pharm Biomed Anal，2014，94：203-209.

[29] Patel S，Homaei A，Raju AB，et al. Estrogen：the necessary evil for human health，and ways to tame it [J]. Biomed Pharmacother，2018，102：403-411.

[30] Xu XL，Deng SL，Lian ZX，et al. Estrogen receptors in polycystic ovary syndrome [J]. Cells，2021，10（2）：459.

[31] Brown SB，Hankinson SE. Endogenous estrogens and the risk of breast，endometrial，and ovarian cancers [J]. Steroids，2015，99（A）：8-10.

[32] Starek-Świechowicz B，Budziszewska B，Starek A. Endogenous estrogens-breast cancer and chemoprevention. [J]. Pharmacol Rep，2021，73（6）：1497-1512.

[33] Black A，Pinsky PF，Grubb RL，et al. Sex steroid hormone metabolism in relation to risk of aggressive prostate cancer [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev，2014，23（11）：2374-2382.

[34] Johnston SL. Pelvic floor dysfunction in midlife women [J]. Climacteric，2019，22（3）：1-7.

[35] Russell JK，Jones CK，Newhouse A. The role of estrogen in brain and cognitive aging [J]. Neurotherapeutics，2019，16（3）：649-665.

[36] Mdpa B，Ghwa B. Role of estrogen in type 1 and type 2 diabetes mellitus：a review of clinical and preclinical data [J]. Can J Diabetes，2020，44（5）：448-452.

[37] Coburn SB，Stanczyk FZ，Falk RT，et al. Comparability of serum，plasma，and urinary estrogen and estrogen metabolite measurements by sex and menopausal status [J]. Cancer Causes Control，2018，30（1）：75-86.

[38] Faupel-Badger JM，Fuhrman BJ，Xu X，et al. Comparison of liquid chromatography-tandem mass spectrometry，RIA，and ELISA methods for measurement of urinary estrogens [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev，2010，19（1）：292-300.

[39] Zhao H，Jiang Y，Liu Y，et al. Endogenous estrogen metabolites as biomarkers for endometrial cancer via a novel method of liquid chromatography-mass spectrometry with hollow fiber liquid-phase microextraction. [J]. Horm Metab Res，2015，47（2）：158-164.

[40] Berg C，Venter G，Westhuizen F，et al. Development and validation of LC-ESI-MS/MS methods for quantification of 27 free and conjugated estrogen-related metabolites [J]. Anal Biochem，2019，590：113531.

[41] Barrientos G，Llanos P，Basualto-Alarcón C，et al. Androgen-regulated cardiac metabolism in aging men [J]. Front Endocrinol，2020，11：316.

[42] Abi-Ghanem C，Robison LS，Zuloaga KL. Androgens’effects on cerebrovascular function in health and disease [J]. Biol Sex Differ，2020，11（1）：35.

[43] Takov K，Wu J，Denvir MA，et al. The role of androgen receptors in atherosclerosis [J]. Mol Cell Endocrinol，2018，465：82-91.

[44] Chen JF，Lin PW，Tsai YR，et al. Androgens and androgen receptor actions on bone health and disease：from androgen deficiency to androgen therapy [J]. Cells，2019，8（11）：1318.

[45] Madersbacher S，Sampson N，Culig Z. Pathophysiology of benign prostatic hyperplasia and benign prostatic enlargement：a mini-review [J]. Gerontology，2019，65（5）：458-464.

[46] Im E，Lew BL，Lee MY，et al. Simultaneous determination of androgens and prostaglandins in human urine using ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chromatogr B，2019，1109：45-53.

[47] Wang R，Hartmann MF，Wudy SA. Targeted LC-MS/MS analysis of steroid glucuronides in human urine [J]. Steroid Biochem Mol Biol，2021，205：105774.

[48] Sanchez-Garrido MA，Tena-Sempere M. Metabolic dysfunction in polycystic ovary syndrome：pathogenic role of androgen excess and potential therapeutic strategies [J]. Mol Metab，2020，35：100937.

[49] Strahm E，Kohler I，Rudaz S，et al.Isolation and quantification by high-performance liquid chromatography-ion-trap mass spectrometry of androgen sulfoconjugates in human urine [J]. Chromatogr A，2008，1196-1197：153-160.

（收稿日期：2022-01-05；修回日期：2022-02-22）

鞘脂代谢与肿瘤免疫治疗研究的新进展

谭亲友[1, 2, 3]，唐科[1, 2*]（1.桂林医学院附属医院临床药学与临床药理学教研室，广西　桂林　541001；2. 桂林医学院药学院，广西　桂林　541001；3. 中美健康与疾病脂质研究中心，广西　桂林　541001）

摘要：免疫治疗用于肿瘤治疗取得了十分显著的成就，近年来肿瘤相关巨噬细胞与免疫治疗相结合治疗肿瘤是国内外研究的热点，尤其是 T 细胞，其在肿瘤免疫方面新的作用机制非常值得研究。鞘脂作为一种重要的脂质成分，其在肿瘤免疫治疗方案中的地位越来越受关注。本文就鞘脂代谢在肿瘤免疫治疗中对肿瘤相关巨噬细胞、T 细胞的作用进行综述，以便更加清晰地将鞘脂代谢与肿瘤微环境相关细胞群结合，为肿瘤提供新的治疗方向。

关键词：鞘脂类；肿瘤相关巨噬细胞；T 细胞；免疫治疗；肿瘤
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1631-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.026

Research advances in sphingolipid metabolism and tumor immunotherapy

TAN Qin-you[1, 2, 3], TANG Ke[1, 2*] (1. *Department of Clinical Pharmacy and Clinical Pharmacology*, *Affiliated Hospital of Guilin Medical College*, *Guilin Guangxi* 541001; 2. *School of Pharmacy*, *Guilin Medical College*, *Guilin Guangxi* 541001; 3. *China-US Lipid Research Center for Health and Disease*, *Guilin Guangxi* 541001)

Abstract: Immunotherapy has been used in tumor treatment with remarkable achievements. In recent years, combination of tumor-associated macrophages and immunotherapy in cancer treatment is a hot research topic home and abroad. The new mechanism of action T cells in tumor immunity is worth studying. As an important lipid component, sphingolipids in the immune regimens for tumor therapy are gaining attention. This paper reviewed the effect of sphingolipid metabolism in tumor immunotherapy on tumor-associated macrophages and T cells to better integrate sphingolipid metabolism with tumor microenvironment-related cell populations and provide new therapeutic approaches for tumors.

Key words: sphingolipid; tumor-associated macrophage; T cell; immunotherapy; tumor

2018 年诺贝尔医学奖或生理学奖颁给了免疫检查点，极大地推动了免疫治疗在治疗肿瘤之中的进程。肿瘤细胞与免疫系统之间具有十分复杂的联系，肿瘤的增殖、侵袭与迁移均受到免疫系统的控制，而肿瘤细胞可以通过促进免疫抑制微环境的形成而获得逃避这种控制的能力。为了突破免疫耐受性的局限，深入发掘肿瘤引起的免疫抑制机制，近年来，人们聚焦于肿瘤微环境（tumor microenvironment，TME）中的多种抑制性细胞群。在免疫系统中，各种参与免疫的细胞都具有各自的作用，首先，抗原呈递细胞（antigen-presenting cells，APC）保留肿瘤抗原并将其呈递给 T 细胞效应器，激活 T 细胞使肿瘤细胞死亡。$CD8^+$记忆 T 细胞能够作用于肿瘤细胞，导致其被免疫系统杀灭，而负责自我耐受的调节性 T 细胞（regulatory T cell，Treg）能够阻断 $CD8^+$ T 细胞、B 细胞、APC 和自然杀伤细胞（natural killer cell，NK），并在很大程度上受到肿瘤细胞和巨噬细胞释放的趋化因子的引诱（见图 1）。

T 细胞在肿瘤、自身免疫以及感染中激活免疫反应，其作为抗肿瘤功能的关键媒介，能特异性地识别和反应肿瘤表达的抗原。在 $CD4^+$

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 81360665，81760747，82160765）；广西自然科学基金面上基金项目（No. 2015GXNSFA A139114，2018GXNSFAA050147）；广西自然科学基金青年基金资助项目（No. 2013GXNSFBA019 174）。
作者简介：谭亲友，男，博士，教授，硕士研究生导师，主要从事临床药学、体内药物分析与临床药物动力学、鞘脂代谢研究，email：84081045@qq.com　*通信作者：唐科，男，硕士研究生，主要从事临床药学、体内药物分析与临床药物动力学研究，email：tqy1013@126.com

Thelper（Th）和 CD8$^+$T 细胞引起的效应性反应往往受到 Treg 细胞抑制。因此，确定哪些因素能够刺激 T 细胞起到肿瘤抗原反应常作为肿瘤免疫治疗的长期目标，而在 TME 中，能够使肿瘤特异性细胞溶解的 CD8$^+$T 细胞往往代表不足或者功能失调，因此，无法消除恶性细胞。此外，由于 Treg 细胞在肿瘤中累积，并且功能成熟度低，进而支持免疫抑制性 TME。

肿瘤相关巨噬细胞（tumor-associated macrophages，TAMs）是 TME 中重要的细胞群，在 TME 中被积极招募，并发挥双重作用：M1 巨噬细胞释放 Th1 细胞因子，包括白介素（interleukin，IL）-12 和肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）-α，抑制肿瘤的发展和转移等，而 M2 巨噬细胞释放 Th2 细胞因子，如 IL-6、IL-10 和转化生长因子（transforming growth factor，TGF）-β，有利于肿瘤扩张，促进血管生成并抑制 T 细胞活化 [1-3]。近年来，TAMs 在肿瘤发生发展过程中的相关研究火热，但其具体的作用机制依然需要进一步研究。近期对于 TAMs 的研究聚焦于促进 TAMs 使其从抑制炎症性 M2 极化到促进炎症性 M1 从而发挥抗肿瘤作用。此外，TAMs 在免疫抗肿瘤作用已有相关研究与报道，提示 TAMs 在肿瘤治疗中具有良好的前景。

鞘脂类（sphingolipids）是脂质的重要组成部分，其在细胞膜上调控许多生理功能。鞘脂组学的研究已成为研究热点，鞘脂类物质代谢密切参与炎症反应及调控细胞凋亡、增殖，其代谢组学能够为多种疾病从生理及病理方面研究提供依据。鞘脂代谢组学在细胞信号传导中是一个必不可少的部分，在调节细胞增殖、分化和凋亡的动态平衡中具有举足轻重的地位 [4]。肿瘤细胞具有免疫逃逸的能力，能够通过诱导肿瘤相关炎性细胞增殖、募集和浸润等功能，避开免疫系统的监视，而鞘脂类能够通过其代谢产物发挥促进肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤细胞增殖、提升免疫系统功能的作用。鞘脂在 TME 中的细胞群具有不同于正常细胞的高表达，在 TAMs 与 T 细胞中异常表达的鞘脂类具有提高免疫治疗靶向性的潜力，但国内外针对于鞘脂调控 TAMs 与 T 细胞在肿瘤免疫治疗中的文献尚未有系统性的报道，因此，本文对鞘脂代谢在肿瘤免疫治疗中对肿瘤相关巨噬细胞、T 细胞的作用进行综述。

1 肿瘤与 T 细胞、TAMs 及鞘脂的机制研究

1.1 肿瘤与 T 细胞

免疫抑制性 TME 是肿瘤的特征之一，是肿瘤免疫逃避的基础 [5]。T 细胞是免疫系统的核心细胞，对于免疫系统抵抗肿瘤的发生发展具有十分重要的作用。T 细胞通过其 T 细胞受体（T-cell receptors，TCRs）识别肿瘤相关的抗原并产生反应，从而发挥杀伤肿瘤细胞的作用。Wei 等 [6] 发现效应 T 细胞在 TME 中具有促进免疫反应从而杀伤肿瘤的作用，而在 TME 中的 Treg 细胞对免疫反应发挥抑制作用，这往往与肿瘤的进展有关。效应 T 细胞和 T 细胞之间的功能平衡是决定免疫控制肿瘤有效性的一个关键因素。细胞表面 CD8 表达的 T 细胞是抗癌免疫反应中最强大的效应器，是目前肿瘤免疫疗法的骨干。T 淋巴细胞能有效地浏览和扫描身体几乎所有的部位，并能够识别出体内不需要的或外来的物质。效应 T 细胞是高度熟练的迁移者，对免疫监视和对适应性免疫的发展至关重要。T 细胞浸润的程度和 TME 的构成相关，肿瘤的特点研究指出 CD8$^+$T 细胞的高度浸润，对肿瘤细胞的杀伤作用更好。T 细胞在体内稳态中的代谢对抗肿瘤具有促进作用，葡萄糖代谢调节细胞信号和合成代谢程序，以支持肿瘤特异性 T 细胞功能，因此葡萄糖代谢是 T 细胞发挥功能的重要调节因素之一。在肿瘤中，包括葡萄糖在内的营养物质的竞争常常发生，对于 T 细胞的功能具有竞争调节作用 [7]。如果限制效应器 CD8$^+$T 细胞中的葡萄糖或糖酵解代谢物磷酸烯醇丙酮酸（phosphoenolpyruvate，PEP）则会抑制抗肿瘤反应的发生 [8-10]（见图 1）。不仅如此，CD8$^+$T 细胞还可以利用肌酐作为碳源来支持细胞增殖 [11]。多年来，人们致力于研究通过激活自身免疫系统的 T 细胞以杀伤肿瘤，但是 T 细胞对肿瘤的效果并不像预期的那样好，有研究认为是 T 细胞进入功能失调或衰竭状态，导致出现持久的抑制性受体表达、功能性效应或记忆 T 细胞（memory T cells）不定的转录状况 [12]。因此，如何更好地激活 TME 中的 T 细胞或者逆转其受体抑制性表达还需要进一步研究和探索。自然杀伤性 T 细胞（natural killer T cell，NKT）是先天性 T 细胞的一个亚群，它表达某些自然杀伤性细胞受体，在治疗过程中发挥重要作用，并充当先天以及适应性免疫系统的桥梁。NKT 作为大量 Th1、Th2 和 Th17 细胞因子的早期产生者，能直接介导细胞毒性 [13-15]（见图 1），此外，NKT 被证明在肿瘤监视、血癌、炎症性疾病中起到重要作用。NKT 与传统的 CD4$^+$T 和 CD8$^+$T 细胞不同，其是由在非经典的Ⅰ类主要组织相容性复合的背景下呈现的糖脂抗原激活的，类似组织相容性复合体（histocompatibility complex，MHC）的分子 CD1d，能够作为 NKT 的有效激活剂。人类 NKT 激活后可对许多肿瘤表现出强大的抗肿瘤活性。

1.2　肿瘤与 TAMs

营养缺乏、酸性和缺氧环境等是 TME 的主要特征，对肿瘤的发生发展具有推动作用。此外，TME 中免疫细胞失去了抗肿瘤的能力，并拮抗抗肿瘤的活性。肿瘤基质（tumor stroma，TS）包含多种细胞集团，而巨噬细胞作为构成 TS 的重要细胞集团之一，发挥着重要作用。TAMs 往往指的是 TME 中的巨噬细胞，是 TME 的重要组成部分，在多种肿瘤的 TME 中都能够检测到，且细胞群数量占整个 TME 中细胞数量的一半 [16]，被认为是“肿瘤前巨噬细胞”，发挥纽带作用将炎症和肿瘤联系起来，参与多种生理调控过程。不仅如此，TAMs 还发挥着促进持续的基质转换以及抑制适应性免疫等，最终对疾病进展产生重要影响。近年来，越来越多的证据表明 TAMs 和肿瘤的不良预后相关 [17-18]。在不同的治疗方法或肿瘤类型中，TAMs 可起到增强或拮抗治疗方法的效应，也可在治疗后驱动机体修复起到一定作用。M0 是静息状态下巨噬细胞的表型，其通过诱导可以转化为两种极化表型：一种为 M1 型巨噬细胞，在干扰素 -γ（interferon-γ，IFN-γ）联合脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）共同的刺激下诱导极化而来，能够分泌 IL-1、IL-6、TNF-α、一氧化氮合酶（induced NOS，iNOS）等促进炎症反应的因子，并激活 Th1 型免疫反应，特点是表达 IL-12 及 IL-23，而低表达 CD163 及 IL-10（经典型活化）[19]；另一种是 M2 型巨噬细胞，具有免疫抑制功能，并能释放抗炎细胞因子增强 Th2 型免疫反应，特点是高表达 CD163、IL-10 及 arginase-1（ARG-1），低表达 IL-12 及 IL-23[1-3]。巨噬细胞的不同极化类型能够发挥不同的生理作用，因此，逆转 TAMs 中极化表型是免疫抗肿瘤的新思路。尽管人们对于 M1 型与 M2 型巨噬细胞产生条件开展了广泛的研究，但是对于 M1 型与 M2 型巨噬细胞极化的下游分子及调控机制仍不够深入，尤其是 M1 型与 M2 型巨噬细胞之间的转换机制，因此对于相关机制存在进一步研究的价值（见图 2）。

1.3　肿瘤与鞘脂代谢

细胞内的信号转导分子有很多种，其中鞘脂代谢产物是细胞膜上的一类特殊的信号分子，参与调控细胞生长等各个阶段。鞘脂类作为生物活性分子，在肿瘤细胞的死亡和存活中发挥着关键作用。同时鞘脂类也参与其他的细胞反应，如慢性炎症、保护肠道病原体等，肠道病原体的保护以及肠道内容物的内在保护都与肿瘤发生有关 [20]。鞘脂代谢是细胞的一种代谢形式，其产物有神经酰胺（ceramide，Cer）、鞘氨醇（sphingosine，SPH）和 1- 磷酸鞘氨醇（sphingosine-1-iphosphate，S1P）等，这些物质往往表现为相对平衡的状态 [4]。许多炎症介质都参与了肿瘤发生发展的过程，除了细胞因子和趋化因子外，脂质介质作为与炎症有关的信号分子也引起了人们的注意。S1P 是一种多变的脂质介质，可调节细胞生存和迁移、免疫细胞招募、血管生成和淋巴管生成，同时在炎症和肿瘤中也发挥着重要作用。血液和淋巴组织中的 S1P 浓度调节着淋巴细胞的贩运，参与炎症反应过程。此外，在 TME 中往往伴随着高浓度的 S1P，这也表明鞘脂组学与免疫的关联性。鞘氨醇激酶（sphingosine kinase，SphK）分为两种亚型，即 SphKl 和 SphK2[21]，均出现于哺乳动物体内。前者通过作用于 SPH 从而提升 S1P 的浓度，对细胞生长起到促进作用，同时还能够减弱细胞凋亡的发生；后者则能够催化 S1P 生成从而提升 SPH 浓度，其调控的生理作用也与之相反 [22]。越来越多的证据表明，SphK1 作为细胞内合成 S1P 的关键酶，被公认是细胞增殖和存活的重要信号分子 [23]，对肿瘤的发展过程具有促进作用。

2　鞘脂在肿瘤中的作用

2.1　鞘脂代谢、T 细胞与 TAMs 在肿瘤中的相互作用

随着研究的深入，发现不同的肿瘤 TME 中浸润的 T 细胞和 TAMs 与鞘脂代谢组学之间具有一定的关联性，因此深入研究三者在不同肿瘤中的相互作用能够为免疫治疗肿瘤提供新的思路。Vaena 等 [24] 研究了鞘脂代谢产物 Cer 的水平与 T 细胞之间的关系，通过遗传和药物手段来调控 Cer 的代谢，以控制 Cer 的表达水平，Cer 可以防止有丝分裂并恢复衰老的中央记忆 T 细胞，恢复效应性 T 细胞的功能，抑制肿瘤的生长和 $CD8^+$ T 细胞转移。近年来聚焦于逆转 TME 中 TAMs M2 表型以破除 TME 中的免疫抑制状态对于预防肿瘤免疫逃逸、转移和重启巨噬细胞 M1 表型的抗肿瘤功能是一个良好的策略，且在肝癌中已经得到了证明 [25]。SPHK1/S1P 能够参与免疫炎症反应，并发挥调控作用，巨噬细胞等免疫细胞群体对其具有感知能力，从而激活免疫系统发挥免疫作用 [26-27]。S1P 通常传递到细胞外发挥作用，其调控的生理作用往往需要结合其受体后发生 [28-29]。而细胞内 S1P 通过 SphK1 合成，当细胞发生凋亡，依赖 caspase 的途径将会刺激 SphK1，从而介导凋亡发生的细胞分泌出大量 S1P 作为募集巨噬细胞等吞噬细胞的“find me”信号分子。

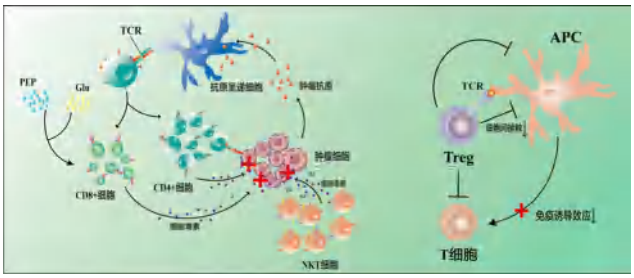


图 1　肿瘤中 T 细胞作用

Fig 1　Role of T cells in tumors

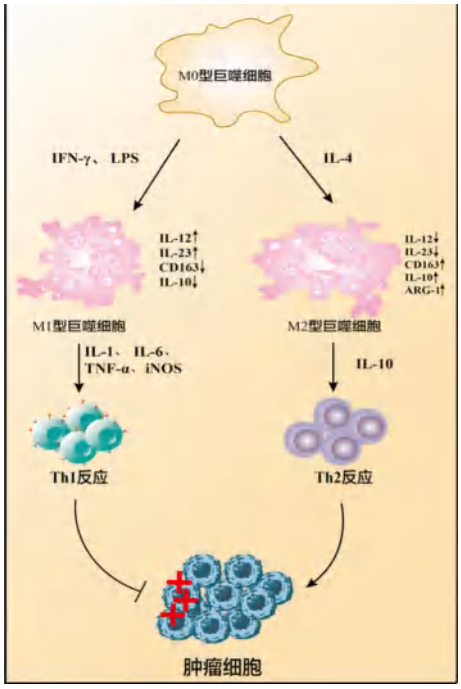


图 2　肿瘤中 TAMs 极化机制图

Fig 2　Mechanism of TAMs polarization in tumors

研究表明 S1P 从凋亡细胞释放后不仅能够调控巨噬细胞的极化作用，还能发挥多种生理作用，例如降低炎症因子水平等 [30]。不仅如此，S1P 还可以通过作用于 S1PR1 从而诱导巨噬细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-X 的表达，从而发挥减少巨噬细胞凋亡的作用。巨噬细胞相关炎症因子的表达和释放也被发现可以通过 S1P 作用于 S1PR1 后所抑制，并由此诱导巨噬细胞向抵御炎症的表型或者向 M2 型极化 [31-32]。

2.2　鞘脂代谢在不同肿瘤中的作用

2.2.1　细胞淋巴瘤　套细胞淋巴瘤（mantle cell lymphoma，MCL）是非霍奇金淋巴瘤的一种侵袭性亚型，尽管临床上使用联合化疗治疗 MCL 取得了不错的疗效，但由于其复发率高，中位生存期仍为 5 年左右。Lee 等 [33] 研究发现 S1P 是 MCL 的重要组成部分，且在 MCL 细胞中是上调的。SphK1 通过靶向 S1PR1 受体作为治疗靶点或敲除负责生成 S1P 的 SphK1，能够在人类 MCL

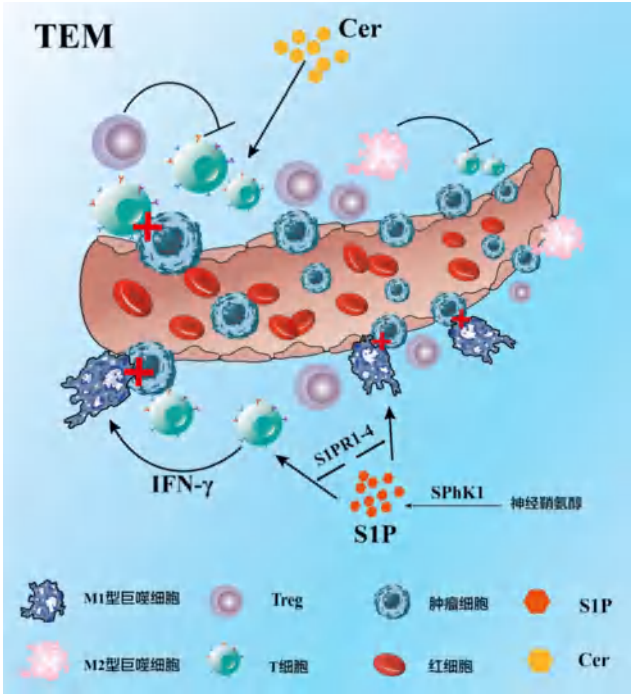


图 3　TME 中鞘脂、T 细胞及 TAMs 相互作用机制图

Fig 3　Mechanism of interaction between sphingolipids，T cells and TAMs in TME

中显著增加 NKT 的激活，由此证明 S1P 信号能够改变 CD1d 依赖性的抗原处理和呈递，从而减少 MCL 的免疫反应。同时，阻断 S1P 信号或敲除 SphK1 会导致 NKT 介导的 MCL 杀伤。此外，SphK1 的活动和 B 细胞淋巴瘤发出的 S1P 信号有助于逃避淋巴瘤的检测。S1P 通过 5 个不同的 G 蛋白偶联受体（S1PR1-5）发出的信号，已成为致癌的一个重要调节因素正在被广泛地研究。TAMs 虽然已被认为是某些实体癌的标志和预后不良的预测因素，但在血液系统肿瘤，如在淋巴性恶性肿瘤（包括 B 细胞淋巴瘤）中是有利于肿瘤还是杀灭肿瘤的作用还不清楚。因此，在 MCL 的发展过程中的 TAMs 具有深入研究的价值。Le 等 [34] 通过研究鼠源 MCL 细胞系与人源 MCL 细胞系发现，MCL 的微环境中存在 TAMs 的浸润，并且 MCL 细胞能促使单核细胞衍生的巨噬细胞向 M2 样表型极化，不仅如此，被 MCL 极化的 M2 样巨噬细胞分泌的 IL-10 通过激活 STAT1 信号来促进 MCL 的生长，而使用 IL-10 中和抗体、氟达拉滨或通过短发夹 RNA 干扰技术来抑制 STAT1 的生长信号，从而抑制 MCL 的生长。由此可见，TAMs 在干预治疗中的重要性。

2.2.2　乳腺癌　乳腺癌（breast cancer，BC）是在女性高发的恶性肿瘤，据世界卫生组织国际癌症研究中心（International Agency for Research on Cancer）统计，其发病率占女性发病的 23%。每

年有 46 万女性因患乳腺癌而死亡，占所有女性恶性肿瘤死亡的 13.7%[35]。对于乳腺癌的研究一直是国内外的热点，随着科技与医疗的进步，乳腺癌已能够尽早的进行诊断并通过治疗干预，但是对其高的发病率以及乳腺癌的一种分型：三阴性乳腺癌（triple negative breast cancer，TNBC）[36]的治疗，除手术以外，没有更好的治疗方法。随着研究的深入，发现在乳腺癌肿瘤组织中 SphKl 的 mRNA 水平要远远高于正常组织 [37]。而 SphKl 蛋白水平也与肿瘤的发展级别相关，是潜在的肿瘤恶性分级指标，同时也能通过 S1P 及其下游信号激活 ERK 和抑制 p38-MAPK 通路而参与调控乳腺癌细胞的病理生理过程。Olesch 等 [38] 研究发现，在乳腺癌小鼠模型中，增加 $CD8^+$ T 细胞的丰度，延迟了肿瘤的发展并提高了治疗成功率；研究还发现 S1PR4 能够促进乳腺癌的进展，限制 $CD8^+$ T 细胞的数量并影响 $CD8^+$ T 细胞的增殖和生存。S1P 通过 S1PR4 限制 $CD8^+$ T 细胞的扩增，发挥促进肿瘤进程的作用。不仅如此，S1P 和 S1P 受体（S1P receptors，S1PRs）还能调节淋巴细胞从胸腺向血液和淋巴结（lymph nodes，LNs）的迁移，选择性地增强了人类和鼠类 $CD4^+$ T 细胞穿过淋巴内皮细胞（lymphatic endothelial cells，LECs）的迁移。T 细胞的 S1PR1 和 S1PR4 以及 LECs 的 S1PR2，都是跨越 LEC 和进入 LECs 所需的，迁移穿过 LECs 并进入淋巴管和 LNs，S1PR1 和 S1PR4 对 T 细胞的运动性有不同的调节作用。S1P 梯度不仅能作为 T 细胞的趋化信号还能够调节 LECs 以促进 T 细胞在 TME 中的募集。S1P 信号的作用还能够使 T 细胞和 LECs 共同参与免疫反应，并且 S1PR1 促进 $CD4^+$ T 细胞传入的淋巴 TME，而下调 S1P 则能够阻止这一点 [39]。除此之外，TAMs 能够介导多种机制对乳腺癌的发生、发展、转移和对治疗药物的反应发挥调控作用，在一项乳腺癌流行病学研究中发现，TME 中 TAMs 的数量与临床预后成负相关 [40]。乳腺癌中的 TAMs 包括几个亚群，显示出肿瘤内的异质性。具有 M1 样表型的 TAMs 是位于血管周围的迁移性 TAMs，显示出促进转移的特征。然而，M2 样 TAMs 是位于侵袭边界和缺氧区，显示促进血管生成的特征 [41]。乳腺癌中的 M1 巨噬细胞与肿瘤细胞凋亡增加、转移减少和肿瘤侵袭有关 [42-43]，而 M2 型则与侵袭、转移等有关。在乳腺癌 TME 中，TAMs 常以 M2 型存在，并发挥促进乳腺癌进程的作用。关于乳腺癌中基因表达分析数据显示其浸润的 TAMs 为 M2 特征 [44-46]。随着研究深入，发现乳腺癌细胞能够分泌相关分子诱导 TAMs 的 M2-like 表型，特别是在基底型乳腺癌中。对于 TAMs 极化机制，研究发现 miRNA 的调节也能够促进 TAMs 极化，其中 miR-146a 促进 M2 表型 [47-48]，而在乳腺癌的脑转移中同样也观察到 M2 样极化的发生 [49]。

2.2.3　肝细胞癌　肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）具有发现迟、死亡多的特点，到目前为止治疗方案依旧非常有限。因此，迫切需要新的治疗方法和手段来延长患者生命。操纵免疫系统来治疗肿瘤已成为一些肿瘤的标准且最有效的治疗方法。肝脏是巨噬细胞的主要聚集部位，受到骨髓细胞的监督，包括血液中的单核细胞，它们扫描肝脏血管，并最终浸润到肝脏。TME 中浸润白细胞的重要构成为 TAMs，其主导了与肿瘤相关的炎症 [50]，从而导致肝纤维化及肝癌的发生。Huang 等 [51] 发现巨噬细胞在协调免疫反应方面发挥着重要作用，其功能失调牵涉到 HCC 以及其他实体恶性肿瘤。巨噬细胞在 HCC 的 TME 中含量很高，其通过调节免疫反应来控制肿瘤的发生。TAMs 已被证明可以通过促进免疫抑制来促进 HCC 的发展并具有推动肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移和维持肿瘤细胞的干性的作用。因此，更好地了解 TAMs 调控 HCC 的机制将有助于开发新的和更有效的针对 TAM 的 HCC 治疗方法。HCC 患者在传统的肝切除术或肝移植术后，用靶向 TAMs 的药物进行辅助治疗，可能对患者的预后发挥积极作用。Cer 是鞘磷脂信号转导途径的生物递质，具有促凋亡和抑制肿瘤活性，作为鞘脂代谢中心分子在调节肿瘤细胞生长和死亡方面具有至关重要的作用。Li 等 [52] 制备了纳米脂质体负载 C6 Cer（nanoliposome-loaded C6-ceremide，LipC6），发现 LipC6 能够通过活性氧（ROS）信号转导以 TAMs 为靶点激活抗肿瘤免疫；减少 TAMs 数量，诱导其从 M2 向 M1 的转变，并降低 TAMs 抑制抗肿瘤免疫反应的能力，同时增加 $CD8^+$ T 细胞的活性；结果还表明注射 LipC6 能有效阻断效应性 $CD8^+$ T 细胞的脱敏作用，使免疫反应重新对肿瘤细胞发挥细胞毒性作用。这种对肿瘤抗原特异性（tumor antigen specificity，TAS）$CD8^+$ T 细胞的免疫调节功能可能是由 LipC6 间接作用产生的，因为在给予 LipC6 干预后的 TAS T 细胞中没有检测到 TAS T 细胞受体 - Ⅰ（T-cell receptor- Ⅰ，TCR- Ⅰ）的直接激活。因此，LipC6 不仅是一种杀伤性试剂，也是一种强有力的免疫调节因子。不仅如此，LipC6 还能作为活性氧清除剂在 TME 中改变巨噬细胞功能。Li 等 [52] 研究为鞘脂类靶向作用于肝

癌 TME 中的 TAMs 和 T 细胞提供了新的治疗策略，也为鞘脂代谢组学与免疫抗肿瘤疗法的结合奠定了基础。

2.2.4 肺癌 肺癌 5 年内的生存率不足 20%，通常由小细胞肺癌（small cell lung cancer，SCLC）和非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC）两类组成。SCLC 约占肺癌的 15%，可以通过其神经内分泌特征来识别。NSCLC 是指包括除 SCLC 以外的任何类型的肺癌，约占所有肺癌类型的 85%。目前还不清楚是否能通过以 NSCLC 的分类方法有效地将异质性的肿瘤亚群进行区分，并在此基础上指导相应的治疗策略[53]，因此寻找新的 NSCLC 肿瘤标志物或药物靶点十分重要。神经酰胺合成酶（ceramide synthase，CerSs）是一组调控 Cer 合成的酶，在鞘脂代谢组学中具有重要的意义。到目前为止，在哺乳动物中已经发现了 6 种 CerSs（CerS1 ～ CerS6）。作为鞘脂代谢的关键调节者，CerSs 突出了其独特的特征，并在调节细胞程序性死亡、抑制肿瘤和调节生物体生物学的许多方面具有作用。Qian 等[54]通过数据库分析了 CerS1 ～ CerS6 在 NSCLC 中的作用，发现 CerS3 可能具有抑制 NSCLC 细胞生长的能力。与正常细胞相比，CerS6 在 NSCLC 中过度表达。在移植的 NSCLC 细胞中，下调 CerS6 水平后发现，其肺部转移有了明显改善。此外，CerS2、CerS3、CerS4 和 CerS5 的高 mRNA 表达水平与 NSCLC 的预后改善相关。由此看来，CerSs 可能能够作为 NSCLC 肿瘤检测和治疗的新思路。在肺癌 TEM 中 T 细胞与 TAMs 是两个庞大的免疫细胞群，因此聚焦于探究 T 细胞与 TAMs 在肺癌中的相互作用可能是一个具有治疗前景的方向。基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases，MMPs）是一组内肽酶，通过依赖于锌离子（Zn^{2+}）而发挥作用。MMPs 具有降解细胞外基质（extracellular matrix，ECM）中的各种蛋白质的能力，在许多生物学过程中发挥着组织重塑和生长，创伤修复、组织防御机制和免疫应答等作用[55]。Xu 等[56]研究发现 TAMs 通过产生 MMPs（包括 MMP-9 和 MMP-2）和降解 ECM 从而促进肺癌细胞的侵袭性，而 MMP-9 的表达与淋巴结转移、肿瘤的发展和预后有关。源自 TAMs 的趋化因子（包括 CCL18、MIP-3α、CCL5、CXCL8 和 CCL22）通过与肿瘤细胞中的同源受体结合，在肿瘤进展中发挥关键作用。TAMs 还可以通过产生 IL-8、血管内皮生长因子（VEGF）等促血管生成因子，促进肺癌周围血管的生成。不仅如此，肺癌化疗耐药性与 TAMs 之间已被证明有很强的相关性。顺铂或卡铂治疗诱导肿瘤细胞分泌 IL-6 和 / 或前列腺素 E2（prostaglandin E2，PGE2），通过激活 STAT3、STAT1 和 STAT6 信号通路介导 M2 巨噬细胞极化，并抵抗细胞毒性化疗。在 TME 中，巨噬细胞不仅失去了抗肿瘤特性，而且还阻碍了其他免疫细胞的免疫调节功能。TAMs 上调 PD-L1 的表达，以抑制 T 细胞的毒性和吞噬作用。$CD8^+$ T 细胞受到 TAMs 的驱赶，因此不能在肿瘤细胞附近活动。此外，TAMs 产生细胞因子和其他蛋白质来维持免疫抑制，包括 CCL-22、CCL-17 等。因此，靶向 TAMs 可能是肺癌研究的前沿，也是肺癌治疗的一种新策略。

3 鞘脂代谢在肿瘤免疫治疗中的应用前景

鞘脂生物学和代谢的相关机制已有研究，并将其初步运用于免疫抗肿瘤，鞘糖脂是鞘脂组学成员之一，鞘糖脂能够在质膜上形成功能簇，与受体、黏附分子和信号分子结合，从而干扰免疫细胞的激活。在不同的肿瘤中鞘糖脂的表达均有所不同，特别是神经节苷脂的代谢和表达的深度异常，针对这一特征，能够使其作为免疫反应的理想潜在靶点。鞘糖脂在正常的组织中也有表达，在一些肿瘤中，神经节苷脂总水平高于相应健康组织（如乳腺肿瘤组织和正常乳腺组织），特定的鞘糖脂会在特定类型的癌症中积累，如黑色素瘤中的 GD3、GD2 和 GM3，神经母细胞瘤中的 GD2。来源相似但在侵袭性 / 转移潜能（以及人类癌症的预后）方面具有不同表型的肿瘤或肿瘤细胞系的鞘糖脂水平差异很大。已有报道发现，GM3（Neu5Gc）在健康细胞中罕见，但在肿瘤细胞中高表达，因此被认为具有开发成疫苗的潜力。同时，神经节苷脂 GD2 已经被确定为神经母细胞瘤免疫治疗的主要靶点。CAR-T 细胞对于血液系统的肿瘤的治疗取得了很好的成效，但依然面临着一些问题，主要有两个：选择最佳的抗原靶点和避免副作用，由于神经节苷脂在实体瘤中的异常表达，且 GD2-CAR-T 细胞在体外被证实具有良好的杀伤视网膜母细胞的作用，因此认为神经节苷脂是 CAR-T 治疗的抗原，GD2-CAR-T 细胞已被建议作为转移性视网膜母细胞瘤 CAR-T 细胞治疗的靶点[57]。

鞘脂代谢在肿瘤免疫治疗中已取得了不错的成绩，而 TAMs 与 T 细胞在肿瘤发展过程中的相关机制研究也渐渐清晰，是否能够将鞘脂组学运用到肿瘤的免疫治疗中值得进一步探索。TME 中所募集的免疫相关细胞群体的作用十分复杂，导致其浸润的相关免疫细胞群体的复杂性，肿瘤细胞是“十分聪明”的细胞，其通过运用免疫逃逸

机制来逃避免疫系统的检查。因此，运用 TME 中 TAMs 以及 T 细胞来杀伤肿瘤十分关键，如何更好地运用这“两把武器”值得思考，而鞘脂及其代谢产物与两者的相关性为肿瘤靶点治疗提供了更多的选择，也为更好地使用这“两把武器”提供了新的思路，越来越多研究证明鞘脂与 TAMs 或 T 细胞的结合运用于抗肿瘤免疫治疗中取得了良好的进展，为靶向肿瘤药物的研发开拓了新的方向。

参考文献

[1] Lan C，Huang X，Lin S，et al. Expression of M2-polarized macrophages is associated with poor prognosis for advanced epithelial ovarian cancer [J]. Technol Cancer Res Treat，2013，12（3）：259-267.

[2] Zhou D，Huang C，Lin Z，et al. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways [J]. Cell Signal，2014，26（2）：192-197.

[3] Li N，Qin J，Lan L，et al. PTEN inhibits macrophage polarization from M1 to M2 through CCL2 and VEGF-A reduction and NHERF-1 synergism [J]. Cancer Biol Ther，2015，16（2）：297-306.

[4] Gomez-Muñoz A，Presa N，Gomez-Larrauri A，et al. Control of inflammatory responses by ceramide，sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate [J]. Prog Lipid Res，2016，61：51-62.

[5] Sharma P，Hu-Lieskovan S，Wargo JA，et al. Primary，adaptive，and acquired resistance to cancer immunotherapy [J]. Cell，2017，168（4）：707-723.

[6] Wei J，Zheng W，Chapman NM，et al. T cell metabolism in homeostasis and cancer immunity [J]. Curr Opin Biotechnol，2021，68：240-250.

[7] Geltink RIK，Kyle RL，Pearce EL. Unraveling the complex interplay between T cell metabolism and function [J]. Annu Rev Immunol，2018，36：461-488.

[8] Chang CH，Qiu J，O’sullivan D，et al. Metabolic competition in the tumor microenvironment is a driver of cancer progression [J]. Cell，2015，162（6）：1229-1241.

[9] Gemta LF，Siska PJ，Nelson ME，et al. Impaired enolase 1 glycolytic activity restrains effector functions of tumor-infiltrating $CD8^+$ T cells [J]. Sci Immunol，2019，4（31）：eaap9520.

[10] Ho PC，Bihuniak JD，Macintyre AN，et al. Phosphoenolpyruvate is a metabolic checkpoint of anti-tumor T cell responses [J]. Cell，2015，162（6）：1217-1228.

[11] Wang T，Gnanaprakasam JNR，Chen X，et al. Inosine is an alternative carbon source for $CD8^+$-T-cell function under glucose restriction [J]. Nat Metab，2020，2（7）：635-647.

[12] Thommen DS，Schumacher TN. T cell dysfunction in cancer [J]. Cancer Cell，2018，33（4）：547-562.

[13] Gorini F，Azzimonti L，Delfanti G，et al. Invariant NKT cells contribute to chronic lymphocytic leukemia surveillance and prognosis [J]. Blood，2017，129（26）：3440-3451.

[14] Kawano T，Nakayama T，Kamada N，et al. Antitumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human V alpha24 NKT cells [J]. Cancer Res，1999，59（20）：5102-5105.

[15] Terabe M，Berzofsky JA. The role of NKT cells in tumor immunity [J]. Adv Cancer Res，2008，101：277-348.

[16] Gambardella V，Castillo J，Tarazona N，et al. The role of tumor-associated macrophages in gastric cancer development and their potential as a therapeutic target [J]. Cancer Treat Rev，2020，86：102015.

[17] Yang X，Feng W，Wang R，et al. Repolarizing heterogeneous leukemia-associated macrophages with more M1 characteristics eliminates their pro-leukemic effects [J]. Oncoimmunology，2018，7（4）：e1412910.

[18] Wei X，Pu J，Guo Z，et al. Tumor-associated macrophages promote the proliferation and migration as well as invasion of sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma cells [J]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi，2017，33（5）：617-622.

[19] Jinushi M，Komohara Y. Tumor-associated macrophages as an emerging target against tumors：creating a new path from bench to bedside [J]. Biochim Biophys Acta，2015，1855（2）：123-130.

[20] Kroll A，Cho HE，Kang MH. Antineoplastic agents targeting sphingolipid pathways [J]. Front Oncol，2020，10：833.

[21] Maceyka M，Sankala H，Hait NC，et al. SphK1 and SphK2，sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism [J]. J Biol Chem，2005，280（44）：37118-29.

[22] Spiegel S，Milstien S. Functions of the multifaceted family of sphingosine kinases and some close relatives [J]. J Biol Chem，2007，282（4）：2125-2129.

[23] Sheu JJ，Lee CC，Hua CH，et al. LRIG1 modulates aggressiveness of head and neck ancers by regulating EGFR-MAPK-SPHK1 signaling and extracellular matrix remodeling [J]. Oncogene，2014，33（11）：1375-1384.

[24] Vaena S，Chakraborty P，Lee HG，et al. Aging-dependent mitochondrial dysfunction mediated by ceramide signaling inhibits antitumor T cell response [J]. Cell Rep，2021，35（5）：109076.

[25] Wu L，Zhang X，Zheng L，et al. RIPK3 orchestrates fatty acid metabolism in tumor-associated macrophages and hepatocarcinogenesis [J]. Cancer Immunol Res，2020，8（5）：710-721.

[26] Korbelik M，Banáth J，Sun J，et al. Ceramide and sphingosine-1-phosphate act as photodynamic therapy-elicited damage-associated molecular patterns：cell surface exposure [J]. Int Immunopharmacol，2014，20（2）：359-365.

[27] Dehne N，Mora J，Namgaladze D，et al. Cancer cell and macrophage cross-talk in the tumor microenvironment [J]. Curr Opin Pharmacol，2017，35：12-19.

[28] Nagahashi M，Yamada A，Katsuta E，et al. Targeting the SphK1/S1P/S1PR1 Axis that links obesity，chronic inflammation，and breast cancer metastasis [J]. Cancer Res，2018，78（7）：1713-1725.

[29] Nagahashi M，Ramachandran S，Kim EY，et al. Sphin-

gosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 1 promotes breast cancer progression by stimulating angiogenesis and lymphangiogenesis [J]. Cancer Res，2012，72（3）：726-735.

[30] Joshi JC，Joshi B，Rochford I，et al. SPHK2-Generated S1P in CD11b（＋）macrophages blocks sting to suppress the inflammatory function of alveolar macrophages [J]. Cell Rep，2020，30（12）：4096-4109. e5.

[31] Shapouri-Moghaddam A，Mohammadian S，Vazini H，et al. Macrophage plasticity，polarization，and function in health and disease [J]. J Cell Physiol，2018，233（9）：6425-6440.

[32] Hughes JE，Srinivasan S，Lynch KR，et al. Sphingosine-1-phosphate induces an antiinflammatory phenotype in macrophages [J]. Circ Res，2008，102（8）：950-958.

[33] Lee MS，Sun W，Webb TJ. Sphingosine kinase blockade leads to increased natural killer T cell responses to mantle cell lymphoma [J]. Cells，2020，9（4）：1030.

[34] Le K，Sun J，Khawaja H，et al. Mantle cell lymphoma polarizes tumor-associated macrophages into M2-like macrophages，which in turn promote tumorigenesis [J]. Blood Adv，2021，5（14）：2863-2878.

[35] Merino BJA，Torres TM，Ros MLH. Breast cancer in the 21st century：from early detection to new therapies [J]. Radiologia，2017，59（5）：368-379.

[36] Ismail-Khan R，Bui MM. A review of triple-negative breast cancer [J]. Cancer Control，2010，17（3）：173-176.

[37] Tsuchida J，Nagahashi M，Nakajima M，et al. Breast cancer sphingosine-1-phosphate is associated with phospho-sphingosine kinase 1 and lymphatic metastasis [J]. J Surg Res，2016，205（1）：85-94.

[38] Olesch C，Sirait-Fischer E，Berkefeld M，et al. S1PR4 ablation reduces tumor growth and improves chemotherapy via $CD8^+$ T cell expansion [J]. J Clin Invest，2020，130（10）：5461-5476.

[39] Xiong Y，Piao W，Brinkman CC，et al. CD4 T cell sphingosine 1-phosphate receptor（S1PR）1 and S1PR4 and endothelial S1PR2 regulate afferent lymphatic migration [J]. Sci Immunol，2019，4（33）：eaav1263.

[40] Obeid E，Nanda R，Fu YX，et al. The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression（review）[J]. Int J Oncol，2013，43（1）：5-12.

[41] Laoui D，Movahedi K，Van Overmeire E，et al. Tumor-associated macrophages in breast cancer：distinct subsets，distinct functions [J]. Int J Dev Biol，2011，55（7-9）：861-867.

[42] Arlauckas SP，Garris CS，Kohler RH，et al. In vivo imaging reveals a tumor-associated macrophage-mediated resistance pathway in anti-PD-1 therapy [J]. Sci Transl Med，2017，9（389）：eaal3604.

[43] Ring A，Nguyen C，Smbatyan G，et al. CBP/β-Catenin/FOXM1 is a novel therapeutic target in triple negative breast cancer [J]. Cancers（Basel），2018，10（12）：525.

[44] Ojalvo LS，King W，Cox D，et al. High-density gene expression analysis of tumor-associated macrophages from mouse mammary tumors [J]. Am J Pathol，2009，174（3）：1048-1064.

[45] Pucci F，Venneri MA，Biziato D，et al. A distinguishing gene signature shared by tumor-infiltrating Tie2-expressing monocytes，blood "resident" monocytes，and embryonic macrophages suggests common functions and developmental relationships [J]. Blood，2009，114（4）：901-914.

[46] Movahedi K，Laoui D，Gysemans C，et al. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C（high）monocytes [J]. Cancer Res，2010，70（14）：5728-5739.

[47] Sousa S，Brion R，Lintunen M，et al. Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status [J]. Breast Cancer Res，2015，17（1）：101.

[48] Stewart DA，Yang Y，Makowski L，et al. Basal-like breast cancer cells induce phenotypic and genomic changes in macrophages [J]. Mol Cancer Res，2012，10（6）：727-738.

[49] Rippaus N，Taggart D，Williams J，et al. Metastatic site-specific polarization of macrophages in intracranial breast cancer metastases [J]. Oncotarget，2016，7（27）：41473-41487.

[50] Mantovani A，Marchesi F，Malesci A，et al. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology [J]. Nat Rev Clin Oncol，2017，14（7）：399-416.

[51] Huang Y，Ge W，Zhou J，et al. The Role of tumor associated macrophages in hepatocellular carcinoma [J]. J Cancer，2021，12（5）：1284-1294.

[52] Li G，Liu D，Kimchi ET，et al. Nanoliposome C6-ceramide increases the anti-tumor immune response and slows growth of liver tumors in mice [J]. Gastroenterology，2018，154（4）：1024-1036. e9.

[53] Relli V，Trerotola M，Guerra E，et al. Abandoning the notion of non-small cell lung cancer [J]. Trends Mol Med，2019，25（7）：585-594.

[54] Qian H，Deng J，Lu C，et al. Ceramide synthases：insights into the expression and prognosis of lung cancer [J]. Exp Lung Res，2021，47（1）：37-53.

[55] Wang X，Khalil RA. Matrix metalloproteinases，vascular remodeling，and vascular disease [J]. Adv Pharmacol，2018，81：241-330.

[56] Xu F，Wei Y，Tang Z，et al. Tumor-associated macrophages in lung cancer：friend or foe?（review）[J]. Mol Med Rep，2020，22（5）：4107-4115.

[57] Giussani P，Prinetti A，Tringali C. The role of sphingolipids in cancer immunotherapy [J]. Int J Mol Sci，2021，22（12）：6492.

（收稿日期：2022-02-15；修回日期：2022-04-20）

药物分析与检验

基于高效液相色谱指纹图谱及一测多评法的复方珍珠解毒口服液质量评价

谢百波[1, 2, 3]，苏加乐[2, 3]，里艳茹[1]，臧新钰[1]，李映[1]，寻园[1]，周骅[1, 2, 3]，程林友[2, 3*]（1. 北京慧宝源生物技术股份有限公司，北京　102206；2. 广西慧宝源医药科技有限公司，广西　钦州　535008；3. 抗肿瘤药物开发国家地方联合工程研究中心，广西　钦州　535008）

摘要：目的　建立复方珍珠解毒口服液的高效液相色谱指纹图谱，并采用一测多评法（QAMS）测定样品中绿原酸、甘草苷、落新妇苷的含量，为完善该药品的质量标准提供依据。**方法**　采用 Agilent 5TC-C_{18}（2）（250 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱，以乙腈 -0.5% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱，检测波长 220 nm，体积流量 0.8 mL•min^{-1}，进样量 10 μL，柱温 30 ℃。测定 10 批次样品，得到指纹图谱并进行相似度评价。采用 QAMS，以绿原酸为参照物，计算甘草苷、落新妇苷的相对校正因子及含量，与外标法测定结果进行比较，验证 QAMS 的准确性。**结果**　10 批次样品的指纹图谱的相似度在 0.990 ～ 0.999，共标定 10 个共有峰，并指认了 3 个成分。建立的 QAMS 重现性好，计算值和实测值之间无明显差异。**结论**　本研究建立的检测方法准确可靠、简便快捷、重复性和稳定性良好，可应用于复方珍珠解毒口服液整体质量评价。

关键词：复方珍珠解毒口服液；HPLC 指纹图谱；一测多评法；绿原酸；甘草苷；落新妇苷
中图分类号：R927.2　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1639-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.027

Quality evaluation of compound Zhenzhu Jiedu oral liquid by HPLC fingerprints and quantitative analysis of multi-components with single marker

XIE Bai-bo[1, 2, 3], SU Jia-le[2, 3], LI Yan-ru[1], ZANG Xin-yu[1], LI Ying[1], XUN Yuan[1], ZHOU Hua[1, 2, 3], CHENG Lin-you[2, 3*] (1. *Beijing Hebabiz Biotechnology Co., Ltd., Beijing* 102206; 2. *Guangxi Hebabiz Pharmaceutical Co., Ltd., Qinzhou Guangxi* 535008; 3. *National and Region Joint Engineering Center for Anticancer Drug Development, Qinzhou Guangxi* 535008)

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprint for compound Zhenzhu Jiedu oral liquid (CPDOL) and determine the contents of chlorogenic acid, liquiritin and astilbin in the samples with quantitative analysis of multi-components with single marker (QAMS) to provide a scientific basis for quality standard improvment. **Methods** Agilent 5TC-C_{18} (2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column was used. Acetonitrile-0.5% phosphoric acid aqueous solution was used as the mobile phase with gradient elution. The detection wavelength was 220 nm, the flow rate was 0.8 mL • min^{-1}, the injection volume was 10 μL, and the column temperature was 30 ℃ . The HPLC fingerprints of 10 batches of samples were obtained and the similarity was evaluated. The relative correction factors of liquiritin and astilbin were determined with chlorogenic acid as the internal standard. The content of each component was calculated in CPDOL. At the same time, the accuracy of QAMS method was investigated by comparing the results with those of traditional external standard method. **Results** The similarity between the fingerprints of 10 batches of samples and the reference fingerprints ranged from 0.990 to 0.999. Ten mutual peaks were marked. Based

基金项目：国家海洋局“十三五”北海市海洋经济创新发展示范项目（No.Bhsfs001-2）。
作者简介：谢百波，男，副研究员，主要从事中药天然药物药效物质基础、质量控制及新药开发研究，email：baiboxie@163.com
*通信作者：程林友，男，副研究员，主要从事中药质量控制和二次开发研究，email：chenglinyou@huibaoyuan.com.cn

on the identification of the common peaks, 3 components [chlorogenic acid (peak 1), liquiritin (peak 4), and astilbin (peak 5)] were identified and quantified by QAMS. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate, reliable, reproducible and stable, which can be used to improve the quality standard of CPDOL.

Key words: compound Zhenzhu Jiedu oral liquid; HPLC fingerprint; quantitative analysis of multi-components with single marker; chlorogenic acid; liquiritin; astilbin

目前，中药指纹图谱已广泛应用在中药的质量评价和控制中[1-5]。指纹图谱因模糊性、整体性的双重特点在中药质量控制中具有很高的应用价值[6-7]。多指标成分的含量测定和“一测多评法（quantitative analysis of multi-components with single marker，QAMS）”则为中药的整体质量研究提供了更多的选择，此方法已被《中国药典》收载用于多种提取物或制剂的质量控制，进一步验证了 QAMS 的应用价值[8-10]。因此，将指纹图谱、多指标成分含量测定和 QAMS 结合起来，将更能反映药品的整体质量[11-13]。

复方珍珠解毒口服液（compound Zhenzhu Jiedu oral liquid，CPDOL）主要由珍珠层粉、地黄、土茯苓、金银花、龟甲、甘草等 6 味中药组成，具有清热凉血、养阴解毒的作用，适用于因热毒淤阻肌肤所致的轻型粉刺，症见皮疹，以红色丘疹、黑头或白头粉刺为主，伴有少量脓头[14]。复方珍珠解毒口服液药效的发挥是多成分共同作用的结果，而现行的药品质量标准 [国家食品药品监督管理总局 WS-5267（B-0267）-2014Z] 仅以金银花中的绿原酸的含量作为质控指标，不能实现对药品的整体质量评价，无法保证产品的质量可控性和一致性。

本研究利用 HPLC 法建立复方珍珠解毒口服液的指纹图谱，同时采用 QAMS 测定绿原酸（金银花）、甘草苷（甘草）、落新妇苷（土茯苓）3 种有效成分的含量，为复方珍珠解毒口服液的整体质量评价和标准完善提供依据。

1　仪器和试药

安捷伦 1260 infinit Ⅱ 高效液相色谱仪 [安捷伦科技（中国）有限公司]、岛津 LC20A 高效液相色谱仪 [岛津企业管理（中国）有限公司]、KQ-500DA 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）、RE52AA 型旋转蒸发仪（郑州长城科工贸易有限公司）、GH-202 型分析天平（A&D Company，Limited）。

乙腈、甲醇（色谱级，赛默飞世尔科技中国有限公司）；纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司）。绿原酸对照品（批号：110753-201716，纯度：99.3%）、甘草苷对照品（批号：111610-201607，纯度：93.1%）、落新妇苷对照品（批号：111798-201504，纯度：93.9%）（中国食品药品检定研究院）；复方珍珠解毒口服液（批号：181001、180602、180901、180902、181101、181102、181103、181201、181202、190302，广西慧宝源医药科技有限公司，规格：10 mL/10 支）。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱：Agilent 5TC-C_{18}（2）（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈（A）-0.5% 磷酸水溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 10 min，10% ～ 20%A；10 ～ 15 min，20% ～ 30%A；15 ～ 30 min，30%A；30 ～ 40 min，30% ～ 10%A）；检测波长：220 nm；流速：0.8 mL • min^{-1}；进样量：10 μL；柱温：30 ℃；理论塔板数按绿原酸峰计算不低于 50 000，结果见图 1，空白溶液无干扰。

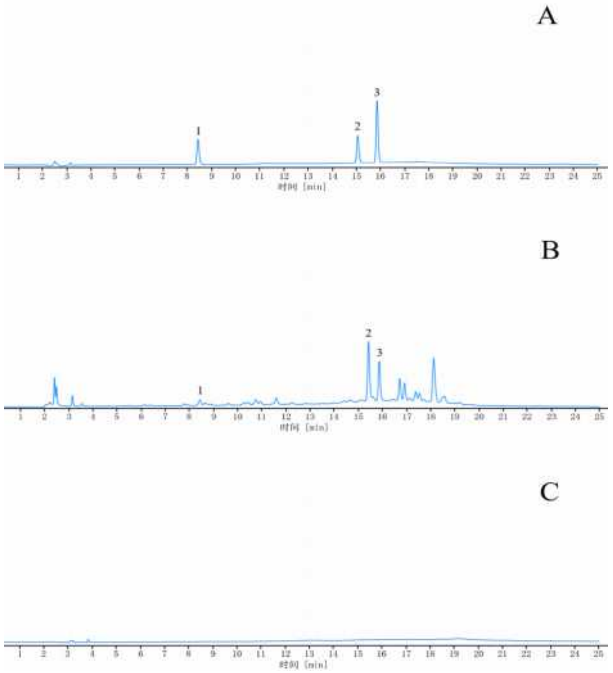


图 1　混合对照品（A）、复方珍珠解毒口服液样品（B）和空白溶液（C）的 HPLC 色谱图

Fig 1　HPLC chromatogram of mixed reference substance（A），CPDOL sample（B），and blank solution（C）

1. 绿原酸（chlorogenic acid）；2. 甘草苷（liquiritin）；3. 落新妇苷（astilbin）

2.2　溶液的制备

2.2.1　混合对照品溶液　分别精密称取对照品绿原酸 5.13 mg、甘草苷 1.74 mg、落新妇苷 3.94 mg，置于 100 mL 量瓶中，加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，得绿原酸为 51.3 μg • mL^{-1}、甘草苷为 16.2 μg • mL^{-1}、落新妇苷为 37.0 μg•mL^{-1} 的混合对照品溶液，4 ℃下保存，备用。

2.2.2　供试品溶液　精密量取复方珍珠解毒口服液 5 mL，用 50% 甲醇定容至 100 mL 的量瓶中，摇匀，即得。

2.3　指纹图谱的建立

2.3.1　精密度试验　取“2.2.1”项下的混合对照品溶液，重复进样 6 次，记录绿原酸、甘草苷、落新妇苷的峰面积积分值，计算相对峰面积 *RSD* 值，结果依次为 0.36%、0.38%、0.41%，表明仪器的精密度良好。

2.3.2　稳定性试验　取样品（批号：190302）按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，分别于 0、4、8、12、24 h 后精密吸取 10 μL，按“2.1”项下色谱条件测定。结果绿原酸、甘草苷、落新妇苷峰面积积分值的 *RSD* 依次为 1.7%、1.9%、1.4%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.3　重复性试验　取样品（批号：190302），按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，计算绿原酸、甘草苷、落新妇苷峰面积积分值的 *RSD*，结果分别为 0.77%、1.1%、0.98%，表明方法的重复性良好。

2.3.4　指纹图谱的建立、相似度评价及共有峰指认　取 10 批样品（S1 ～ S10），按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，并将其指纹图谱导入国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 版》，以 S1 为参照，使用平均数进行自动匹配，加以多点校正，生成指纹图谱共有模式。10 批样品均具有基本一致的特征峰，共标定出 10 个共有峰。精密吸取混合对照品溶液进样测定，通过与对照品的保留时间进行比对，指认了绿原酸（1 号峰）、甘草苷（4 号峰）、落新妇苷（5 号峰）。色谱分析结果见图 2。

以共有模式作为对照指纹图谱，采用《中药指纹图谱相似度评价系统 2012 版》对复方珍珠解毒口服液样品指纹图谱进行相似度的评价。结果 10 个批次样品的相似度均大于 0.990，表明 10 批样品具有良好的一致性，本方法可用于综合评价复方珍珠解毒口服液的整体质量（见表 1）。

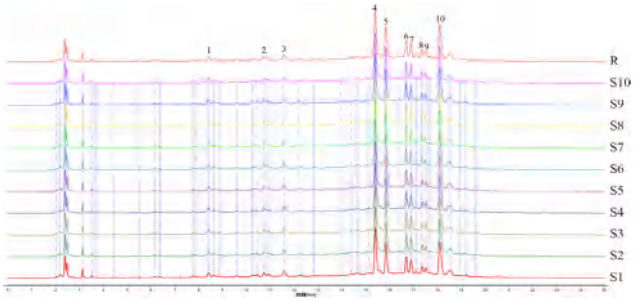


图 2　10 批复方珍珠解毒口服液样品的 HPLC 的指纹图谱及其对照指纹图谱（R）

Fig 2　HPLC fingerprint of 10 batches of CPDOL samples and reference fingerprint（R）

1. 绿原酸（chlorogenic acid）；4. 甘草苷（liquiritin）；5. 落新妇苷（astilbin）

表 1　10 批复方珍珠解毒口服液样品指纹图谱相似度

Tab 1　Fingerprints similarity of 10 batches of CPDOL samples

批号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照峰
S1	1.000										
S2	0.999	1.000									
S3	0.997	0.998	1.000								
S4	0.995	0.996	0.999	1.000							
S5	0.996	0.997	0.999	1.000	1.000						
S6	0.998	0.999	0.998	0.997	0.998	1.000					
S7	0.993	0.995	0.992	0.991	0.992	0.994	1.000				
S8	0.993	0.993	0.991	0.990	0.990	0.993	0.999	1.000			
S9	0.987	0.988	0.991	0.991	0.991	0.988	0.995	0.995	1.000		
S10	0.993	0.993	0.990	0.990	0.991	0.993	0.999	0.999	0.996	1.000	
对照峰	0.998	0.998	0.998	0.997	0.998	0.998	0.998	0.997	0.995	0.997	1.000

2.4　QAMS 测定 3 种成分含量

2.4.1　线性关系考察　吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 5、4、3、2、1、0.5 mL，分别置于 10 mL 量瓶中，用 50% 甲醇溶液稀释至刻度，摇匀，过 0.45 μm 滤膜后，按照“2.1”项下色谱条件分别进样，记录峰面积。以质量浓度（*X*）为横坐标，峰面积（*Y*）为纵坐标绘制标准曲线，对其进行线性回归，得回归方程。绿原酸：$Y = 8.993X + 0.3042$，$r = 0.9997$，线性范围为 2.547 ～ 25.471 μg•mL^{-1}；甘草苷：$Y = 29.70X + 0.0413$，$r = 0.9999$，线性范围为 0.810 ～ 8.100 μg • mL^{-1}；落新妇苷：$Y = 24.08X + 0.0499$，$r = 0.9998$，线性范围为

1.662 ～ 16.621 μg・mL^{-1}。结果表明各成分在各自的质量浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.4.2　加样回收试验　分别精密量取已知含量的供试品溶液（批号：190302）9 份，每份取 5 mL，分别加入相当于绿原酸、甘草苷、落新妇苷含量的 150%、100%、50% 倍的各对照品溶液，按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样测定，计算加样回收率，结果绿原酸低、中、高浓度的平均回收率分别为 107%、105%、105%，RSD 分别为 0.49%、0.82%、0.36%；甘草苷低、中、高浓度的平均回收率分别为 99%、93%、104%，RSD 分别为 1.7%、1.8%、1.2%；落新妇苷低、中、高浓度的平均回收率分别为 93%、106%、102%，RSD 分别为 0.85%、0.74%、0.43%；表明方法的回收率较好。

2.4.3　相对校正因子的计算[15]　吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 8、10、15、20、25 μL，按“2.1”项下方法测定，记录峰面积，以绿原酸为参照物，计算甘草苷、落新妇苷的相对校正因子（RCF）。计算公式为 $f_{s/i} = A_sC_i/A_iC_s$，其中 A_s 为绿原酸对照品峰面积，A_i 为待测成分对照品峰面积，C_s 为绿原酸对照品质量浓度，C_i 为待测成分对照品质量浓度。结果甘草苷、落新妇苷的相对校正因子分别为 0.2798 和 0.3160，*RSD* 分别为 0.53% 和 0.34%。结果见表 2。

表 2　以绿原酸为参照对其余 2 个成分的相对校正因子

Tab 2　RCF for the two components with chlorogenic acid as reference

进样体积 /μL	$f_{绿原酸/甘草苷}$	$f_{绿原酸/落新妇苷}$
8	0.2798	0.3158
10	0.2805	0.3160
15	0.2817	0.3172
20	0.2779	0.3144
25	0.2789	0.3167
均值	0.2798	0.3160
RSD/%	0.53	0.34

2.4.4　方法耐用性考查及待测成分峰的定位　按“2.2.2”项下方法处理样品，进样检测，考查不同柱温 [室温（26.9 ℃）、30 ℃、40 ℃]，不同规格的色谱柱及不同品牌的高效液相色谱仪（见表 3）的变化来测定样品。结果显示，柱温对样品的检测没有明显的影响，不同色谱柱以及不同色谱仪不影响样品的分离，方法耐用性好。

QAMS 能否有效应用的关键在于待测成分色谱峰的定位是否准确。本试验采用相对保留值定位方法考察不同色谱柱及高效液相色谱仪各成分之间相对保留值的重现性。结果显示在不同的仪器和色谱柱中，各指标成分相对保留时间的 *RSD* 均小于 2%，色谱峰定位准确，重现性良好（见表 3）。

表 3　不同仪器和色谱柱相对保留时间的比较

Tab 3　Relative retention time of different instruments and chromatographic columns

仪器	色谱柱	相对保留时间		
		绿原酸	甘草苷	落新妇苷
安捷伦 1260	Agilent 5TC-C_{18}（2）	1	0.658	0.632
	Xselect HSS C_{18} SB	1	0.659	0.634
岛津 LC20A	Agilent 5TC-C_{18}（2）	1	0.659	0.633
	Xselect HSS C_{18} SB	1	0.657	0.632
均值		1	0.658	0.633
RSD/%		0	0.15	0.15

2.4.5　外标法与 QAMS 的含量测定结果　分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液，10 批复方珍珠解毒口服液样品（S1 ～ S10）按照“2.2.2”项下方法制备，注入高效液相色谱仪，按照“2.1”项下色谱条件测定。采用外标法测定复方珍珠解毒口服液中绿原酸、甘草苷、落新妇苷 3 种成分的含量；以绿原酸为参照物，采用 QAMS 测定甘草苷和落新妇苷 2 种有效成分的含量。结果表明，使用外标法和 QAMS 测定复方珍珠解毒口服液中 3 种成分的含量基本一致，说明 QAMS 在复方珍珠解毒口服液多指标成分质量控制中的应用是可靠、稳定、准确的。结果见表 4。

表 4　QAMS 法与外标法测定复方珍珠解毒口服液中 3 种成分的含量 (mg・mL^{-1})

Tab 4　Determination of 3 components in 10 batches of CPDOL by QAMS and external standard method (mg・mL^{-1})

批次	绿原酸	甘草苷			落新妇苷		
		QAMS	外标法	*RSD*/%	QAMS	外标法	*RSD*/%
S1	0.818	0.229	0.234	0.68	0.617	0.623	0.65
S2	0.831	0.233	0.236	0.77	0.616	0.628	1.35
S3	0.838	0.230	0.233	1.05	0.608	0.615	0.77
S4	0.823	0.234	0.236	0.52	0.613	0.622	0.98
S5	0.833	0.228	0.234	1.90	0.610	0.620	1.10
S6	0.834	0.234	0.237	0.98	0.625	0.635	1.13
S7	0.845	0.238	0.240	0.72	0.635	0.646	1.27
S8	0.822	0.240	0.240	0.47	0.615	0.606	1.03
S9	0.824	0.238	0.237	0.22	0.612	0.625	1.45
S10	0.837	0.240	0.236	1.20	0.619	0.623	0.51

3　讨论

本研究在进行 HPLC 分析时，比较了水饱和正丁醇萃取法和甲醇提取法制备供试品。经比较发现，甲醇提取法所得图谱出峰数量多、信息量较大，成分干扰少，故选择甲醇超声处理供试品溶液。

通过二极管阵列检测器（DAD）在 190 ～ 600 nm 波长下对样品进行全波长扫描，发现在 220 nm 波长下，图谱基线平稳、色谱峰较多、峰形较好，所提供的信息最丰富，因此选择

220 nm 作为指纹图谱的检测波长。

考察甲醇 - 水、乙腈 - 水、乙腈 -0.05% 醋酸水溶液、乙腈 -0.05% 磷酸水溶液和乙腈 -0.05% 甲酸水溶液 5 种流动相系统。最后，综合考虑峰形、分离度、出峰数等因素选择乙腈 -0.5% 磷酸水溶液作为流动相。

复方珍珠解毒口服液组方包括 6 味药材，成分复杂，采用 220 nm 作为检测波长建立指纹图谱，虽然信息量较其他波长更为丰富，但仍难以涵盖全方所有药味。本研究建立的 QAMS，在原有质量标准控制绿原酸含量的基础上，拟最大限度选择合适的标志性成分，尽量涵盖组方中大多数药味。在组方的 6 味药材中，珍珠层粉 [16] 和龟甲 [17] 的主要标志性成分利用 HPLC 方法难以检识；地黄的主要成分梓醇等在本研究中未能检测到。上述成分的检测或需要更精确的检测仪器比如 HPLC-MS。因此，本研究选择了绿原酸（金银花的标志性成分）[18]、甘草苷（甘草的标志性成分）[19] 和落新妇苷（土茯苓的标志性成分）[20] 作为研究对象，建立的 QAMS 涵盖了组方中的 3 味药材。在今后的研究中，应对珍珠层粉、龟甲、地黄等进行深入研究，优化检测方法，必要时采用 HPLC-MS 方法，或进一步开发多波长指纹图谱 [21]、不同极性部位指纹图谱 [22-23] 等方法，并深入研究其谱效关系 [24-25]。在此基础上，将谱效关系和分子对接方法结合起来 [26-27]，研究并确认其与功能主治相关的有效成分，将对该药品的质量控制研究起到更好的指导作用，以期全面控制该药品的质量一致性，保证用药安全。

参考文献

[1] 任晓蕾，霍金海，张树明，等 . 川菊止痛胶囊高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中南药学，2019，17（8）：1233-1236.

[2] 郭庆，许东亚，程世云 . 肺宁颗粒高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中南药学，2019，17（10）：1695-1698.

[3] 苏瑞，唐志书，刘峰，等 . 脑心通胶囊 HPLC-DAD 指纹图谱研究 [J]. 中南药学，2019，17（1）：1-4.

[4] 郑艳春，李云霞，李春花 . 颈复康片高效液相色谱指纹图谱的研究 [J]. 中南药学，2019，17（6）：811-814.

[5] 于颖超，倪健，高利利，等 . 芪箭颗粒的高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中南药学，2020，18（2）：231-234.

[6] 刘东方，赵丽娜，李银峰，等 . 中药指纹图谱技术的研究进展及应用 [J]. 中草药，2016，47（22）：4085-4094.

[7] 邹纯才，鄢海燕 . 我国中药色谱指纹图谱相似度评价方法 30 年（1988—2017 年）研究进展与展望 [J]. 中国中药杂志，2018，43（10）：1969-1977.

[8] 王智民，高慧敏，付雪涛，等 . “一测多评” 法中药质量评价模式方法学研究 [J]. 中国中药杂志，2006，31（23）：1925-1928.

[9] 朱晶晶，王智民，高慧敏，等 . 一测多评法在中药质量评价中的应用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2016，22（16）：220-228.

[10] 杨洋，黄良永，朱美玲，等 . 一测多评法在中国药典 2015 年版中的应用 [J]. 中南药学，2017，15（12）：1738-1741.

[11] 李丹丹，裴文菡，郭泰麟，等 . 不同道地来源大黄药材的多指标成分测定，指纹图谱研究及一致性评价 [J]. 中南药学，2020，18（4）：123-129.

[12] 张羽，李云霞，郑艳春，等 . 高效液相色谱法同时测定黄芪精颗粒中 3 种黄酮类成分及其指纹图谱研究 [J]. 中南药学，2019，17（4）：87-92.

[13] 杨忠杰，王博，王隆隆，等 . 基于高效液相色谱指纹图谱及化学模式识别的疮疡生肌散质量控制研究 [J]. 中南药学，2020，18（7）：1168-1172.

[14] 国家药品监督管理局标准 [S]. WS-5267（B-0267）-2014Z.

[15] 王智民，钱忠直，张启伟，等 . 一测多评法建立的技术指南 [J]. 中国中药杂志，2011，36（6）：657-658.

[16] 乔艺涵，孟雪丹，索亚然，等 . 珍珠层粉氨基酸指纹图谱的构建及氨基酸含量测定的研究 [J]. 世界科学技术：中医药现代化，2019，21（7）：1353-1363.

[17] 刘俐，何清湖，唐宇，等 . 龟甲的现代研究进展 [J]. 湖南中医杂志，2020，36（7）：181-183.

[18] 吴娇，王聪，于海川 . 金银花中的化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（4）：225-234.

[19] 李葆林，麻景梅，田宇柔，等 . 甘草中新发现化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 中草药，2021，52（8）：2438-2448.

[20] 王建平，张海燕，傅旭春 . 土茯苓的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 海峡药学，2013，25（1）：42-44.

[21] 任培培，孙国祥，孙丽娜 . 附子理中丸多波长融合 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志，2009，29（3）：411-415.

[22] 王艳慧，周琳琳，雷敬卫，等 . 香砂养胃丸（浓缩丸）不同极性部位 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志，2017，37（11）：1937-1948.

[23] 蔡跃辉，叶财发，曾棋平，等 . 复方首乌藤合剂中多糖的高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中南药学，2020，18（3）：493-496.

[24] 李慧，包永睿，王帅，等 . 基于灰色关联分析的茜草醇提物抗氧化，抗肝癌谱效关系研究 [J]. 中南药学，2019，17（6）：815-819.

[25] 张序晴，彭兰，李赛，等 . 附子 - 甘草对离体蛙心的影响及其指纹图谱研究 [J]. 中南药学，2019，17（2）：42-47.

[26] Zheng G，Gan L，Jia LY，et al. Screen of anti-migraine active compounds from Duijinsan by spectrum-effect relationship analysis and molecular docking [J]. J Ethnopharmacol，2021，279：114352.

[27] Wang YL，Hu G，Qian Z，et al. Screening and characterizing tyrosinase inhibitors from Salvia miltiorrhiza and Carthamus tinctorius by spectrum-effect relationship analysis and molecular docking [J]. J Anal Methods Chem，2018：2141389.

（收稿日期：2022-02-05；修回日期：2022-04-02）

高效液相色谱法测定盐酸可乐定中有机杂质的含量

刘慧颖，张耀文，蒋丹丹，隋晓璠*，孙苓苓（辽宁省药品检验检测院，辽宁省检验检测认证中心，化学药品质量研究与评价国家重点实验室，沈阳　110023）

摘要：目的　对盐酸可乐定有机杂质进行分析和测定，对两家企业的原料质量进行考察。**方法**　结合工艺和影响因素试验结果，建立适合分析有机杂质的 HPLC 方法，并进行验证。确定选用 Waters C8 色谱柱，0.22% 辛烷磺酸钠 - 甲醇 - 磷酸（600 ∶ 400 ∶ 1，用 1 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 3.0）为流动相，紫外检测波长为 220 nm。**结果**　杂质 A、杂质 B、2，6- 二氯苯胺的线性范围分别为 2.29 ～ 18.29 ng（r = 1.000）、2.22 ～ 17.79 ng（r = 1.000）和 2.29 ～ 18.33 ng（r = 1.000）；平均回收率分别为 96.51%、100.31% 和 91.29%，重复性考察的 *RSD* 分别为 1.5%、1.0% 和 2.8%。两家企业原料药均未检出有机杂质。**结论**　该方法可用于盐酸可乐定的药品质量控制。

关键词：有机杂质；杂质 A；杂质 B；2，6- 二氯苯胺；盐酸可乐定
中图分类号：R927.2　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1644-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.028

Determination of organic impurities in clonidine hydrochloride by HPLC

LIU Hui-ying, ZHANG Yao-wen, JIANG Dan-dan, SUI Xiao-fan*, SUN Ling-ling (*Liaoning Institute for Drug Control*, *Liaoning Inspection*, *Testing and Certification Center*, *State Key Laboratory of Chemical Drug Quality Research and Evaluation*, *Shenyang* 110023)

Abstract: Objective To determine and analyze the organic impurities in clonidine hydrochloride, and investigate the quality of raw materials from two manufacturers. **Methods** A suitable HPLC method for analyzing organic impurities was established and verified based on the synthesis process and influence factor investigation. Organic impurities were separated on a Waters C8 column, the ternary mobile phase consisting of 0.22% sodium octane sulfonate-methanol-phosphoric acid (600 ∶ 400 ∶ 1, pH was adjusted to 3.0 with 1 mol • L^{-1} sodium hydroxide solution), and the detection wavelength was 220 nm. **Results** The linear calibration curves were obtained at 2.29 ～ 18.29 ng for impurity A, 2.22 ～ 17.79 ng for impurity B, and 2.29 ～ 18.33 ng for 2, 6-dichloroaniline, respectively. The mean recoveries of the three compounds were 96.51%, 100.31% and 91.29%, and the *RSD*s of repeatability were 1.5%, 1.0% and 2.8%, respectively. No organic impurities were detected in the raw materials from two manufcturers. **Conclusion** This method can be used for the quality control of clonidine hydrochloride.

Key words: organic impurity; impurity A; impurity B; 2, 6-dichloroaniline; clonidine hydrochloride

盐酸可乐定，化学名为 2-[（2，6- 二氯苯基）亚氨基] 咪唑烷盐酸盐，又名氯压定，被广泛用于抗高血压。现行质量标准《中国药典》（ChP）2020 年版二部中采用 TLC 法对有关物质进行检查 [1]，但该法操作较烦琐，灵敏度低，显色不明显且维持时间短，无法确切反映该药的杂质情况。因此，为保证本品的安全性，有必要建立灵敏度和准确度更高的有机杂质检测方法 [2-4]。

原料药的有机杂质可能来源于起始原料、副反应产物、中间体、降解产物及反应中使用的有

基金项目：国家药典委员会 2020 年国家药品标准提高研究（No.2020H031）；辽宁省自然基金资助计划（No.2020-MS-074）。
作者简介：刘慧颖，女，硕士，副主任药师，主要从事化学药品质量控制和标准研究，email：wzmlhy@163.com　*通信作者：隋晓璠，女，博士，主任药师，主要从事药剂学及药品标准研究，email：sxf3490@163.com

机试剂等[4]。生产企业提供的资料显示，盐酸可乐定的合成工艺为 1- 乙酰基 -2- 咪唑啉酮（简称杂质 B）与 2，6- 二氯苯胺进行缩合反应，生成中间体 1- 乙酰基 -2-（2，6- 二氯苯胺）-2-（4，5- 二氢咪唑）（简称杂质 A），经氯化氢乙醇溶液成盐后，再以醇解反应生成盐酸可乐定。因此，本文以 2 个起始原料和中间体（结构见图 1）为研究目标，结合影响因素试验，探寻盐酸可乐定的稳定性和降解途径。

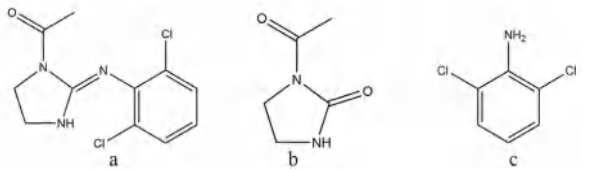


图 1　杂质 A（a）、杂质 B（b）和 2，6- 二氯苯胺（c）的化学结构

Fig 1　Chemical structures of impurity A（a），impurity B（b）and 2，6-dichloroaniline（c）

美国药典[5]（USP）和英国药典[6]（BP）均以 HPLC 法对盐酸可乐定的有机杂质进行检查。其中，BP 对杂质 A 和 2，6- 二氯苯胺进行了定位，USP 则按外标法对杂质 A 和 2，6- 二氯苯胺进行限度控制。本研究将综合考察不同条件的色谱行为，优化检测条件，依据相关的指导原则[7-9]建立有机杂质的检测方法，并对两家生产企业提供的药品质量进行评价。

1　仪器与试药

1.1　仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪配备 2489 UV 检测器和 2998 PDA 检测器（美国 Waters 公司），AS10200AD 超声波处理器（Auto Science 公司），XP205 天平、S400 Seven excellent 型 pH 计（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

1.2　试药

盐酸可乐定对照品（批号：100071-201607，纯度：100%，中国食品药品检定研究院），杂质 A 对照品（批号：R148AD，纯度：99%，USP），杂质 B 对照品（批号：H1929181，纯度：98%，Aladdin），2，6- 二氯苯胺（批号：SJGSF-YT，纯度：99.9%，TGI），盐酸可乐定（企业 A，批号：170502、191101；企业 B，批号：20180401、20180402、20191101），甲醇、乙腈为色谱纯，其他试剂均为分析纯，水为超纯水。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱：Waters C8（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相：0.22% 辛烷磺酸钠 - 甲醇 - 磷酸（600∶400∶1，用 1 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 3.0），检测波长：220 nm，流速：1.0 mL • min^{-1}，进样量：50 μL。记录色谱图至主成分峰保留时间的 4 倍。

2.2　溶液的制备

2.2.1　对照品溶液的制备　取杂质 A、杂质 B、2，6- 二氯苯胺和盐酸可乐定对照品各约 18 mg，精密称定，置 100 mL 量瓶中，加乙腈 1 mL 使溶解，加水稀释至刻度，摇匀。精密量取 1 mL 置 100 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，精密量取 1 mL 置 20 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，制成含各对照品均为 90 ng • mL^{-1} 的溶液。

2.2.2　灵敏度溶液的制备　精密量取对照品溶液 3 mL，置 10 mL 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀即得。

2.2.3　供试品溶液和对照溶液的制备　取本品约 18 mg，精密称定，置 200 mL 量瓶中，加水溶解并定容至刻度，摇匀，作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 1 mL 置 100 mL 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，作为对照溶液。

2.3　系统适用性试验

取对照品溶液进样测定，可乐定与杂质 A、杂质 B、2，6- 二氯苯胺的分离度均大于 1.5；取灵敏度溶液进样测定，杂质 A、杂质 B、2，6- 二氯苯胺和可乐定色谱峰的信噪比均大于 10，符合要求。

2.4　专属性试验和影响因素试验

取空白溶剂（水）进样，结果对已知杂质和可乐定的检出均无影响。

取盐酸可乐定样品（企业 A，批号：170502）进行酸、碱、氧化、光照、高温破坏，配制过程具体如下：

① 酸破坏：称取样品约 11.5 mg，置 25 mL 量瓶中，加 2 mol•L^{-1} 盐酸溶液 2 mL，放置 24 h，加 2 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液 2 mL 中和，加水溶解并稀释至刻度，摇匀即得。

② 碱破坏：称取样品约 11.5 mg，置 25 mL 量瓶中，加 2 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液 2 mL，放置 24 h，加 2 mol • L^{-1} 盐酸溶液 2 mL 中和，加水溶解并稀释至刻度，摇匀即得。

③ 氧化破坏：称取样品约 11.5 mg，置 25 mL 量瓶中，加 30% 过氧化氢溶液 1 mL，放置 24 h，加水溶解并稀释至刻度，摇匀即得。

④ 高温破坏：取样品适量，置 120 ℃加热 4 h，称取约 11.5 mg，置 25 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀即得。

⑤ 光照破坏：取样品置日光下照射 5 d，称取约 11.5 mg，置 25 mL 量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀即得。

取各破坏溶液 10 μL，按拟订的方法进样测定，结果除在氧化条件下有较大降解外，在酸、碱、高温和光照条件下均较稳定。降解产物均能与主峰较好的分离，均无杂质 A、杂质 B 和 2，6-二氯苯胺产生，结果见图 2。

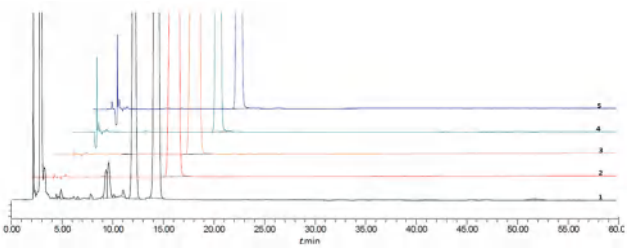


图 2　影响因素试验的色谱图

Fig 2　HPLC chromatogram of influencing factors test

1. 氧化破坏（oxidation destruction）；2. 光照破坏（light destruction）；3. 高温破坏（heat destruction）；4. 碱破坏（alkali destruction）；5. 酸破坏（acid destruction）

2.5　检出限和定量限

取对照品溶液，用水逐步稀释，测得盐酸可乐定的检测限（以 3 倍信噪比计）为 0.223 ng，杂质 A、杂质 B、2，6-二氯苯胺的定量限（以 10 倍信噪比计）分别为 0.185 ng、0.236 ng 和 0.687 ng。

2.6　线性关系考察

精密称取杂质 A 18.66 mg、杂质 B 18.15 mg、2，6-二氯苯胺 18.33 mg 和盐酸可乐定对照品 17.86 mg，分别置 100 mL 量瓶中，加乙腈 1 mL 使溶解，加水稀释至刻度，摇匀，作为储备液。精密量取 1 mL 储备液置 100 mL 量瓶中，加水定容至刻度，摇匀。分别精密量取 0.5、1.0、1.5、2.0、4.0 mL 置 20 mL 量瓶中，加水定容至刻度，摇匀，进样测定，记录色谱图。以绝对进样量为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，结果见表 1，可乐定和各已知杂质在试验范围内与峰面积线性关系良好。

2.7　准确度和重复性

取盐酸可乐定（企业 A，批号：170502）约 18.5 mg，精密称定，置 200 mL 量瓶中，精密加入“2.6”项下杂质 A、杂质 B 和 2，6-二氯苯胺的储备液 0.1 mL，加水溶解并定容至刻度，摇匀，得供试品溶液。精密量取 0.1 mL 置 100 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，即得对照溶液。同法制备 6 份，进样测定，计算杂质 A、杂质 B 和 2，6-二氯苯胺的平均回收率分别为 96.51%、100.31% 和 91.29%，重复性的 *RSD* 分别为 1.5%、1.0% 和 2.8%，供试品溶液中均未检出未知杂质，表明方法的准确度和重复性良好。

表 1　盐酸可乐定已知杂质线性关系考察 ($n = 5$)

Tab 1　Linearity of identified impurities in clonidine hydrochloride ($n = 5$)

化合物	回归方程	r	线性范围 /ng
可乐定	$y = 2.911\times10^3x - 94.14$	1.000	2.23 ～ 17.86
杂质 A	$y = 5.176\times10^3x + 916.9$	1.000	2.29 ～ 18.29
杂质 B	$y = 4.654\times10^3x - 1.430\times10^3$	1.000	2.22 ～ 17.79
2，6-二氯苯胺	$y = 3.246\times10^3x - 586.3$	1.000	2.29 ～ 18.33

2.8　中间精密度

按“2.7”项下方法配制供试品溶液和对照溶液，分别由不同分析人员在不同时间于 3 台仪器上按“2.1”项下方法测定，结果杂质 A、杂质 B 和 2，6-二氯苯胺测得量的 *RSD* 分别为 1.4%、2.0% 和 2.8%，均未检出未知杂质。

2.9　溶液稳定性

取供试品溶液，分别于 0、5、10、20 h 测定，结果表明供试品溶液在 20 h 内稳定，均未检出未知杂质；杂质 A、杂质 B 在 20 h 内均较稳定（峰面积的 *RSD* 分别为 2.8% 和 1.8%），但 2，6-二氯苯胺随放置时间延长而减少（峰面积的 *RSD* 为 8.6%），稳定性较差。为保证 2，6-二氯苯胺定量的准确性，进一步考察了该杂质在 6 h 内的峰面积，计算峰面积的 *RSD* 为 2.7%，表明该杂质在 6 h 内是稳定的，因此，试验溶液应在 6 h 内测定。

2.10　耐用性

取盐酸可乐定（企业 A，批号：170502），按照拟订的标准制备供试品溶液、对照溶液和杂质对照品溶液，改变流动相 pH 值（2.8、3.0、3.2）和色谱柱 [Waters SunFire C8（250 mm×4.6 mm，5 μm）、Agilent Zorbax Eclipse Plus C8（250 mm×4.6 mm，5 μm）和 Agela Venusil XBP C8（200 mm×4.6 mm，5 μm）] 分别进样测定，结果各已知杂质与可乐定均有较好的分离效果，供试品溶液均未检出杂质。

2.11　测定结果

对 5 批盐酸可乐定样品的有机杂质进样测定，结果均未检出杂质，表明两家企业对该药的质量控制较好（见图 3）。

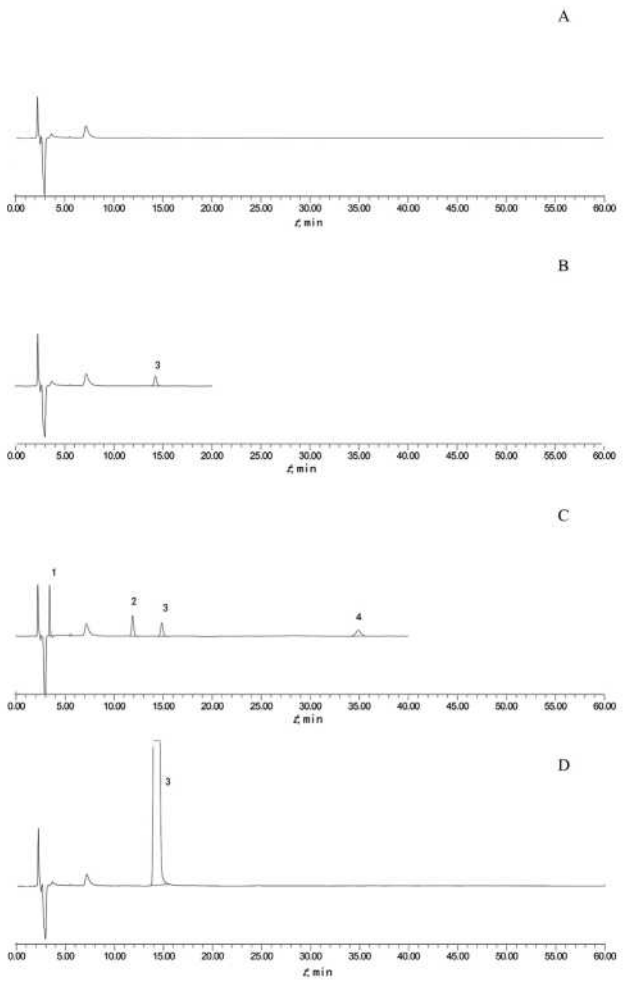


图 3　样品测定代表性色谱图

Fig 3　Representative chromatogram of sample determination

A. 水（water）；B. 对照溶液（control solution）；C. 对照品溶液（reference solution）；D. 供试品溶液（sample solution）

1. 杂质 B（impurity B）；2. 杂质 A（impurity A）；3. 可乐定（clonidine）；4. 2，6- 二氯苯胺（2，6-dichloroaniline）

3　讨论

3.1　检测波长的选择

选用二极管阵列检测器，分别对破坏试验样品溶液和杂质对照品溶液进行紫外光谱扫描，发现各已知杂质和降解产物在紫外末端均有较大吸收，为了减少流动相中有机溶剂的影响，同时保持与 ChP 中盐酸可乐定品种相关检测方法的统一，方便日常操作，故选择在 220 nm 波长处进行检测。

3.2　流动相的选择

本文比较了盐酸可乐定在 ChP（盐酸可乐定片的含量测定）和 USP 不同色谱条件下已知杂质和降解产物的检出情况，因丙基硅基凝胶色谱柱应用较少，故未对 BP 条件进行试验。结果：① USP 流动相：杂质 B 出峰时间较快（3 min 以前）；可乐定出峰时间较快，随流动相 pH 值的增大（3.0、6.9、7.6）而略有增加（2.5 min、4.5 min、5.2 min）；降解杂质几乎在主峰前集中出峰，分离度差，不利于定量检查；杂质 A 的出峰时间受流动相 pH 值的影响较大，随 pH 的增大（3.0、6.9、7.6）而增加（2.8 min、24.6 min、28.5 min）。② ChP 流动相：杂质 B 出峰时间在 3 min 左右，调整流动相比例为水相 - 甲醇（60∶40）时，各已知杂质和降解产物能完全分离，且不受溶剂干扰，故本文最终采用 ChP 方法，并对其进行优化。

3.3　已知杂质的定量方法

结合各已知杂质的线性试验结果，计算杂质 A、杂质 B 和 2，6- 二氯苯胺相对可乐定的校正因子分别为 0.57、0.64 和 0.90，为保证结果的准确性，未采用自身对照法定量。耐用性试验表明，在不同色谱柱上 3 个杂质的相对保留时间略有不同，易造成定位不准。故最终选择外标法分别对杂质 A、杂质 B 和 2，6- 二氯苯胺定位和定量。

3.4　其他

本文分别考察了混合杂质对照品溶液和盐酸可乐定对照品溶液在 C8（Waters C8 和 Agilent C8）和 C18（Agilent Zorbax SB C18 和 Agilent SB-Aq）色谱柱上的检出情况，结果 C8 柱有更佳的分离效果和出峰时间。故选择 C8 色谱柱进行样品检测。基于可乐定和各杂质限度的响应值，为保证定量的准确性和满足灵敏度的要求，确定供试品质量浓度为 90 μg • mL^{-1}。氧化破坏试验中，在相对可乐定保留时间约 3.5 倍时，有降解产物检出，因此，采集样品时在此基础上适当延长记录时间，记录色谱图至主峰保留时间的 4 倍。考察杂质 A 在不同溶剂中的稳定性，结果表明，杂质 A 在甲醇 - 水混合溶剂中不稳定，逐渐转化为可乐定，易造成结果偏低，无法反映原料中该杂质的真实量值；杂质 A 在水和乙腈中相对稳定，为避免乙腈干扰杂质 B 的检出，最终选定水作为供试品制备的溶剂。

本文建立的盐酸可乐定有机杂质的测定方法操作简便，为其质量标准的提升提供了参考。

参考文献

[1]　中国药典 2020 年版 . 二部 [S]. 2020：1065-1066.

[2]　ICH Q6A. Specifications：test procedures and acceptances criteria for new drug substances and new drug products：chemical substances [EB/OL]. https：//database. ich. org/sites/default/files/Q6A%20Guideline. pdf.

[3]　韦日伟，王昆，吴先富，等 . 药物中有关物质检测方

法的研究进展及应用[J]. 中国药师，2015，18（5）：851-855.
[4] 胡昌勤，张夏 . 化学药品杂质谱控制的现状与展望[J]. 药学学报，2019，54（12）：2214-2231.
[5] 美国药典[S]. USP42NF47：1081-1082.
[6] 英国药典[S]. 2021，I：633-634.
[7] ICH Q3A（R2）. Impurities in New Drug Substances [EB/OL]. https：//database. ich. org/sites/default/files/Q3A-%28R2%29%20Guideline. pdf.
[8] ICH Q3B（R2）. Impurities in New Drug Products [EB/OL]. https：//database. ich. org/sites/default/files/Q3B%28R2%29%20Guideline. pdf.
[9] 国家食品药品监督管理局 . 化学药物杂质研究的技术指导原则 [EB/OL]. [2005-03]. https：//www. nmpa. gov. cn/wwwroot/gsz05106/03. pdf.

（收稿日期：2022-03-09；修回日期：2022-04-12）

盐酸曲美他嗪原料药中有关物质测定方法的研究

杨西邈[1, 2]，孙国祥[1*]，产运霞[2]（1. 沈阳药科大学药学院，沈阳 110016；2. 北京福元医药股份有限公司，北京 101104）

摘要：目的 建立测定盐酸曲美他嗪原料药中有关物质的方法。**方法** 采用高效液相色谱法，色谱柱为 Phenomenex Gemini C18（150 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为 0.287% 庚烷磺酸钠溶液（用 10% 磷酸调节 pH 值至 3.2）- 甲醇，梯度洗脱；流速为 1.2 mL • min^{-1}；检测波长为 240 nm；柱温为 30 ℃；进样量为 10 μL。**结果** 在选定的色谱条件下，曲美他嗪主峰与各杂质峰分离度均良好；有关物质 A、B、C、D、E、F、H、J 和 K 在质量浓度 0.4 ～ 8 mg • L^{-1} 内与峰面积均呈良好的线性关系（r 在 0.9998 ～ 1.000，n = 7）；采用外标法和一线多评法计算有关物质回收率均在 90% ～ 108%（n = 3）。**结论** 该方法准确、专属性强，可为盐酸曲美他嗪原料药的质量控制提供依据。

关键词：高效液相色谱法；一线多评法；有关物质；方法学验证
中图分类号：R927 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)07-1648-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.029

Determination of related substances in the raw materials of trimetazidine dihydrochloride

YANG Xi-miao[1, 2], SUN Guo-xiang[1*], CHAN Yun-xia[2] (1. *College of Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang* 110016; 2. *Beijing Fuyuan Pharmaceutical Co., Ltd, Beijing* 101104)

Abstract: Objective To determine the related substances in the raw materials of trimetazidine dihydrochloride. **Methods** High performance liquid chromatography was used. A Phenomenex Gemini C18 (150 mm×4.6 mm, 5 μm) column was used at 30 ℃ . The mobile phase was 0.287% sodium heptanesulfonate solution (adjusting pH to 3.2 with 10% phosphoric acid)-methonal with gradient elution at a flow rate of 1.2 mL • min^{-1}. The detection wavelength was 240 nm and the injection volume was 10 μL. **Results** The peak of trimetazidine and each impurity was well separatd under this condition. The standard curves of impurity A, B, C, D, E, F, H, J, and K were linear at 0.4 ～ 8 mg • L^{-1} (r between 0.9998 and 1.000, n = 7). The recoveries calculated by the external standard method and multi-markers assay with monolinear method ranged 90% ～ 108% (n = 3).

作者简介：杨西邈，女，主要从事药物质量控制研究，email：39724789@qq.com *通信作者：孙国祥，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药指纹学研究和药物质量控制研究，email：gxswmwys@163.com

Conclusion The method is accurate and specific, which provides a reference for the quality control of trimetazidine dihydrochloride.

Key words: high performance liquid chromatography; multi-markers assay by monolinear method; related substance; method validation

曲美他嗪（trimetazidine），化学名为 1-（2，3，4- 三甲氧基苄基）哌嗪，结构式见图 1[1-2]，是近年来发现的抗心肌缺血药物，可优化心肌细胞的能量代谢，改善患者心功能，同时能抑制氧自由基，使缺血心肌细胞维持正常活动，在心力衰竭患者的治疗中发挥着重要作用[3-4]。本文根据合成工艺和降解机制[5-6]，选择 9 种[7-8]主要的有关物质 A、B、C、D、E、F、H、J、K（结构见图 1），建立盐酸曲美他嗪有关物质的测定方法，并采用一线多评法[9]对方法进行验证和评估[10]。为盐酸曲美他嗪原料药的质量控制提供依据。

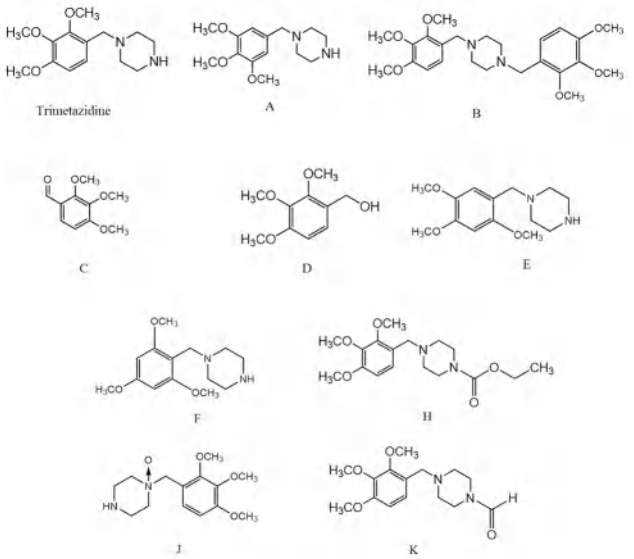


图 1　曲美他嗪及有关物质的化学结构式

Fig 1　Chemical structures of trimetazidine and its related substances

1　材料

1.1　仪器与试药

高效液相色谱仪（型号：LC-2010CHT 及 LC-20AT，日本岛津公司）；电子分析天平（型号：MS105DU 及 ML204，梅特勒 - 托利多仪器有限公司）；pH 酸度计（型号：FE20，梅特勒 - 托利多仪器有限公司）；电热鼓风干燥箱（型号：DHG101-1A，郑州长城科工贸易有限公司）；药品光照试验箱（型号：SHH-300GD-2，重庆市永生试验仪器厂）。

甲醇（色谱纯，Burdick & Jackson）；庚烷磺酸钠（色谱纯，Fisher Chemical）；氢氧化钠（分析纯，北京市光复科技发展有限公司）；磷酸、盐酸、30% 过氧化氢（分析纯，北京化工厂）；盐酸曲美他嗪对照品（批号：100889-201302，质量分数 99.9%，中国食品药品检定研究院）；有关物质 A（批号:35069，质量分数 94.9%）、B（批号：35343，质量分数 99.7%）、C（批号：45715，质量分数 99.9%）、D（批号：41708，质量分数 99.0%）、E（批号：23180，质量分数 99.9%）、F（批号：27212，质量分数 99.2%）、H（批号：25681，质量分数 98.2%）对照品（LGC），有关物质 J（批号：QM-6A01，质量分数 96.7%）、K 对照品（批号：QM-6A03，质量分数 99.6%）（北京福元医药股份有限公司）。盐酸曲美他嗪原料药（批号：QM0171101、QM0171102 和 QM0171104，北京福元医药股份有限公司）。

2　方法与结果

2.1　溶液的制备

2.1.1　稀释溶液　以体积分数为 40% 的甲醇水溶液为稀释溶液。取稀释溶液作为空白对照溶液。

2.1.2　对照品溶液　取盐酸曲美他嗪对照品约 10 mg，精密称定，置 25 mL 量瓶中，用稀释溶液溶解并稀释至刻度；精密量取 1 mL 置 100 mL 量瓶中，加稀释溶液稀释至刻度，摇匀，即得。

2.1.3　杂质对照品定位溶液　分别精密称取杂质 A ～ F、H、J 和 K 对照品适量，用稀释溶液溶解并稀释制成质量浓度均为 400 mg • L^{-1} 的溶液，即得。

2.1.4　杂质混合溶液　精密量取上述各杂质对照品定位溶液 5 mL 置同一 250 mL 量瓶中，用稀释溶液稀释至刻度，摇匀，即得。

2.1.5　系统适用性溶液　取盐酸曲美他嗪对照品约 40 mg，精密称定，置 10 mL 量瓶中，用适量稀释溶液溶解，加入杂质混合溶液 5 mL，用稀释溶液稀释至刻度，摇匀，即得。

2.1.6　原料药供试品溶液　取盐酸曲美他嗪原料药约 40 mg，精密称定，置 10 mL 量瓶中，用稀释溶液溶解并稀释至刻度，摇匀，即得。

2.2　色谱条件[11-12]

色谱柱为 Phenomenex Gemini C_{18} 柱（150

mm×4.6 mm，5 μm）；以 0.287% 庚烷磺酸钠溶液（用 10% 磷酸调节 pH 值至 3.2）- 甲醇（体积比为 643∶357）为流动相 A，甲醇为流动相 B，梯度洗脱（0 ～ 50 min，95% ～ 75%A；50 ～ 52 min，75% ～ 95%A；52 ～ 60 min，95%A）；流速为 1.2 mL • min^{-1}；检测波长为 240 nm；柱温为 30 ℃；进样量为 10 μL。

2.3　*方法学考察*

分别取“2.1”项下空白对照溶液和系统适用性溶液进样测定，记录色谱图。曲美他嗪峰与相邻杂质峰的分离度大于 1.5，色谱图见图 2。

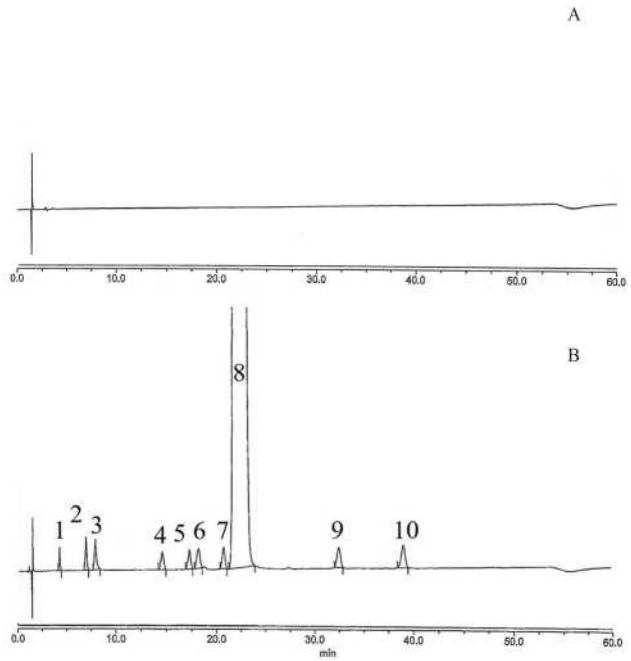


图 2　空白对照溶液（A）和系统适用性溶液色谱图（B）

Fig 2　Chromatograms of blank control solution（A）and system suitability（B）

1. 杂质 D（impurity D）；2. 杂质 J（impurity J）；3. 杂质 C（impurity C）；4. 杂质 H（impurity H）；5. 杂质 A（impurity A）；6. 杂质 K（impurity K）；7. 杂质 E（impurity E）；8. 曲美他嗪（trimetazidine）；9. 杂质 F（impurity F）；10. 杂质 B（impurity B）

2.4　*专属性试验*

2.4.1　酸破坏试验　取盐酸曲美他嗪原料药约 200 mg，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加 1 mol • L^{-1} 盐酸溶液 5 mL，室温放置 24 h，加 1 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液 5 mL 中和，用稀释溶液稀释至刻度，摇匀，即得。

2.4.2　碱破坏试验　取盐酸曲美他嗪原料药约 200 mg，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加 1 mol • L^{-1} 氢氧化钠溶液 5 mL，室温放置 24 h，加 1 mol • L^{-1} 盐酸溶液 5 mL 中和，用稀释溶液稀释至刻度，摇匀，即得。

2.4.3　氧化破坏试验　取盐酸曲美他嗪原料药约 200 mg，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加 30% 过氧化氢溶液 5 mL，60 ℃放置 1 h，取出，放冷，用稀释溶液稀释至刻度，摇匀，即得。

2.4.4　高温破坏试验　取盐酸曲美他嗪原料药适量，置量瓶中，在 105 ℃放置 6 h，取出，放冷，精密称取 200 mg 置 50 mL 量瓶中，用稀释溶液溶解并稀释至刻度，摇匀，即得。

2.4.5　光照破坏试验　取盐酸曲美他嗪原料药适量，置透明量瓶中，在 5000 lx 条件放置 5 d，取出，放冷，精密称取 200 mg 置 50 mL 量瓶中，用稀释溶液溶解并稀释至刻度，摇匀，即得。

上述处理方法均平行配制空白对照溶液。将破坏后的样品溶液和空白对照溶液分别进样测定，色谱图见图 3。盐酸曲美他嗪在酸、碱、高温和光照条件下稳定性均良好，仅在氧化破坏条件下发生降解，所产生的降解产物在选定的色谱条件下与主峰达到良好的分离，空白无干扰，说明该方法专属性良好。

2.5　*线性关系考察*

分别精密量取“2.1.4”项下杂质混合溶液 1、2、4、5、8、10、16 mL，置 20 mL 量瓶中，用稀释溶液稀释至刻度，摇匀，即得质量浓度约为 0.4、0.8、1.6、2.0、3.2、4.0 和 6.4 mg • L^{-1} 的对照品溶液。将上述对照品溶液与“2.1.4”项下的杂质混合溶液进样测定，记录色谱图。以各成分质量浓度（C，mg • L^{-1}）为横坐标，峰面积（A）为纵坐标，用加权最小二乘法进行线性回归运算，得回归方程、相关系数及线性范围见表 1；采用一线多评法 [9] 进行评估，结果见表 2，可靠度 $R_{(i)}$ 均大于 96.2%，表明有关物质 A ～ F、H、J 和 K 在质量浓度 0.4 ～ 8 mg • L^{-1} 与峰面积呈良好线性关系。

表 1　有关物质的回归方程、相关系数和线性范围结果

Tab 1　Regression equation，correlation coefficient and linear range of related substances

化合物	回归方程	相关系数 r	线性范围 /（mg • L^{-1}）
曲美他嗪	$A = 7.719\times10^3C - 322.4$	0.9999	0.408 ～ 8.160
杂质 A	$A = 7.531\times10^3C - 200.5$	1.0000	0.381 ～ 7.615
杂质 B	$A = 1.235\times10^4C - 574.2$	1.0000	0.469 ～ 9.386
杂质 C	$A = 2.437\times10^4C - 699.4$	1.0000	0.418 ～ 8.360
杂质 D	$A = 4.973\times10^3C + 100.5$	1.0000	0.511 ～ 10.214
杂质 E	$A = 1.086\times10^4C - 642.0$	0.9999	0.397 ～ 7.944
杂质 F	$A = 1.015\times10^4C - 609.4$	0.9998	0.398 ～ 7.968
杂质 H	$A = 9.793\times10^3C - 57.9$	1.0000	0.451 ～ 9.022
杂质 K	$A = 1.172\times10^4C + 94.5$	1.0000	0.457 ～ 9.137
杂质 I	$A = 1.006\times10^4C - 334.0$	1.0000	0.451 ～ 9.017

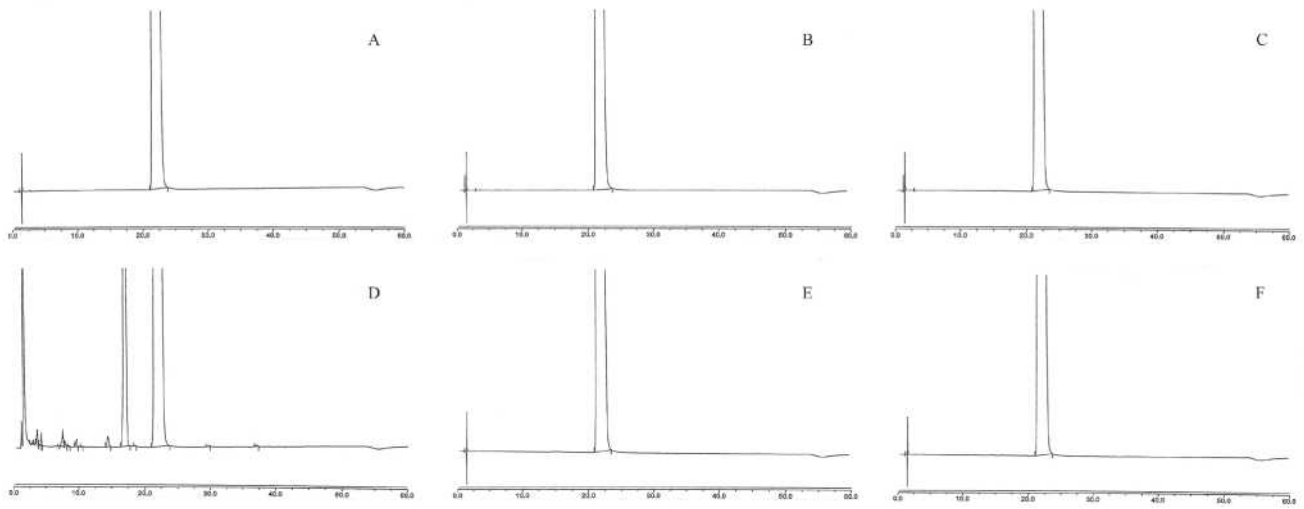


图 3　专属性试验降解产物 HPLC 色谱图

Fig 3　HPLC of destruction products of specificity test

A. 未破坏（undestroyed）；B. 酸破坏（destroyed by acid）；C. 碱破坏（destroyed by alkali）；D. 氧化破坏（destroyed by oxidization）；E. 高温破坏（destroyed by high temprature）；F. 光照破坏（destroyed by light）；4. 杂质 H（impurity H）；5. 杂质 A（impurity A）；8. 曲美他嗪（trimetazidine）；9. 杂质 F（impurity F）；10. 杂质 B（impurity B）

表 2　有关物质一线多评法各项参数值

Tab 2　Related substances by multi-markers assay by monolinear method

化合物	C_0	$b_{ai} = a/C_0$	f_i	f_{si}	RE（b）/%	1%b_i	f''_{si}	可靠度 $R_{(i)}$/%
曲美他嗪	4.2840	75.2568	7794.26	1.0000	0.98	77.19	1.0000	—
杂质 A	3.9980	50.1251	7581.13	1.0281	0.67	75.31	1.0250	96.45
杂质 B	4.9275	116.5297	12 462.53	0.6254	0.95	123.46	0.6252	96.39
杂质 C	4.3890	159.3529	24 532.35	0.3177	0.66	243.73	0.3167	96.45
杂质 D	5.3625	18.7413	4991.74	1.5614	0.38	49.73	1.5522	96.50
杂质 E	4.1705	153.9384	11 017.94	0.7074	1.44	108.64	0.7105	96.24
杂质 F	4.1830	145.6610	10 298.66	0.7568	1.46	101.53	0.7603	96.23
杂质 H	4.7365	12.2327	9805.23	0.7949	0.13	97.93	0.7882	96.51
杂质 K	4.7970	19.6998	11 739.70	0.6639	0.17	117.20	0.6586	96.51
杂质 J	4.7340	70.5534	10 132.55	0.7692	0.71	100.62	0.7671	96.45

2.6　重复性试验

精密称定同一批盐酸曲美他嗪原料药 6 份，每份约 40 mg，按“2.1.6”项下方法制备供试品溶液，进样测定，按外标法和一线多评法分别计算有关物质的含量，结果见表 3，两种方法计算结果差异小，结果表明方法重复性良好。

2.7　回收试验

取盐酸曲美他嗪原料药 9 份，每份约 80 mg，精密称定，平均分成 3 组，分别置于 20 mL 量瓶中，每组分别加入杂质混合溶液 5、10 和 15 mL，

表 3　有关物质重复性试验结果

Tab 3　Repeatability of related substances with different methods

序号	化合物峰面积			一线多评法 /%			外标法 /%		
	杂质 A	杂质 B	未知杂质	杂质 A	杂质 B	未知杂质	杂质 A	杂质 B	未知杂质
1	2441	9725	1071	0.008	0.022	0.003	0.009	0.024	0.003
2	2802	9120	1112	0.010	0.020	0.004	0.010	0.022	0.004
3	2641	9463	1078	0.009	0.021	0.004	0.010	0.023	0.004
4	2459	9385	1142	0.009	0.021	0.004	0.009	0.023	0.004
5	2519	9757	1002	0.009	0.022	0.003	0.009	0.024	0.003
6	2223	8875	1155	0.008	0.020	0.004	0.008	0.022	0.004
平均值	2514	9388	1093	0.009	0.021	0.004	0.009	0.023	0.004
RSD/%	7.8	3.7	5.1	—	—	—	—	—	—

用稀释溶液溶解并稀释至刻度，摇匀，配制成相当于有关物质限度质量浓度 50%、100% 和 150% 的溶液，进样测定，按加校正因子的主成分外标法和一线多评法计算回收率，结果见表 4。

表 4　有关物质回收试验计算结果 (%)

Tab 4　Recovery of related substances with different methods (%)

化合物	一线多评法					外标法				
	低	中	高	均值	*RSD*	低	中	高	均值	*RSD*
杂质 A	102.0	101.6	100.4	101.3	1.1	102.5	102.1	100.9	101.8	1.1
杂质 B	101.0	99.6	99.7	100.1	0.81	99.6	98.2	98.3	98.7	0.81
杂质 C	97.1	97.4	97.8	97.4	0.96	98.7	99.1	99.5	99.1	0.96
杂质 D	101.2	99.7	99.8	100.2	0.96	99.8	98.3	98.4	98.8	0.96
杂质 E	105.1	102.6	105.0	104.2	1.3	100.9	98.6	100.8	100.1	1.3
杂质 F	103.7	98.6	100.2	100.8	2.6	101.9	97.1	98.6	99.2	2.6
杂质 H	102.9	103.4	103.2	103.1	0.65	98.6	99.0	98.8	98.8	0.65
杂质 J	105.9	104.9	106.2	105.6	2.0	98.9	98.0	99.2	98.7	2.0
杂质 K	98.0	97.9	97.2	97.7	1.2	102.5	102.1	100.9	101.8	1.2

2.8　稳定性试验

取盐酸曲美他嗪对照品约 10 mg，精密称定，置 25 mL 量瓶中，用稀释溶液溶解并稀释至刻度；精密量取 1 mL 置 100 mL 量瓶中，用适量稀释溶液溶解，加入杂质混合溶液 50 mL，用稀释溶液稀释至刻度，摇匀，即得对照品混合溶液。将此溶液在室温下放置，分别于 0、3、8、12、16、20 和 24 h，分别按 “2.2” 项下色谱条件进样分析，记录有关物质 A、B、C、D、E、F、H、J、K 及曲美他嗪的色谱峰面积，计算 *RSD* 分别为 1.5%、1.1%、1.0%、0.50%、0.60%、0.40%、1.1%、1.1%、1.3% 和 0.6%，表明对照品混合溶液在 24 h 内稳定性良好。

取盐酸曲美他嗪原料供试品溶液，在室温下放置，分别于 0、3、8、12、16、20 和 24 h，分别按 “2.2” 项下色谱条件进样分析，样品中均未检出杂质峰，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.9　样品测定

取盐酸曲美他嗪对照品溶液 10 μL，注入液相色谱仪，调节检测灵敏度使曲美他嗪的色谱峰高约为满量程的 20%，再取盐酸曲美他嗪供试品溶液，进样测定，3 批样品均未检测到有关物质。

3　讨论

试验过程中发现，盐酸曲美他嗪及各杂质峰的保留时间容易随室温的变化而发生漂移，在试验进行中应尽量控制实验室的温度，并使用柱温控制效果较好的高效液相色谱仪进行分析。用加校正因子的主成分外标法和一线多评法分别计算重复性和回收率结果，结果表明两种方法测定的有关物质基本一致。为节省对照品用量，并减少标准曲线配制过程，同时使计算结果更加准确可靠，可采用一线多评法作为盐酸曲美他嗪有关物质的计算方法。

参考文献

[1] 齐陈泽，姚献东，孙旭东 . 曲美他嗪及其盐酸盐的生产方法：中国，101575321A [P]. 2019-11-11.

[2] 王玉生，曲峰 . 一种简单的曲美他嗪及其药用盐的制备方法：中国，1715275A [P]. 2006-01-04.

[3] 陈辰，胡松 . 盐酸曲美他嗪联合米力农治疗老年心衰患者的临床疗效研究 [J]. 新疆医科大学学报，2019，42（7）：883-886.

[4] 陆跃良 . 盐酸曲美他嗪治疗冠心病效果分析 [J]. 人人健康，2019（9）：257.

[5] 郭江，刘涛 . 盐酸曲美他嗪的合成 [J]. 淮海工学院学报（自然科学版），2012，21（3）：30-32.

[6] 王文浩，张欣，徐萍 . 盐酸曲美他嗪合成方法的改进 [J]. 中国药物化学杂志，2003，13（4）：219-221.

[7] 朱墨，张波，郭亚兵 . 一种制备盐酸曲美他嗪的方法：中国，102010386A [P]. 2011-04-13.

[8] 张金科 . LC-MS 及 HPLC 快速定性分析盐酸曲美他嗪制备过程中杂质 [J]. 食品与药品，2016，18（1）：27-29.

[9] 闫慧，孙国祥，孙万阳，等 . 中药一致性评价关键技术——定量指纹图谱联合一线多评法研究 [J]. 中南药学，2021，19（11）：2237-2244.

[10] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：480-483.

[11] EP 10.0 [S]. 2019：4100-4101.

[12] BP 2021 [S]. 2021：1741-1744.

（收稿日期：2021-11-20；修回日期：2022-01-19）

医院药学

4 种常见碳青霉烯类耐药革兰氏阴性杆菌检出率与抗菌药物使用强度的相关性研究

王广钊[1]，蒙光义[1*]，林传钟[2]，李杨[1]，韦凤华[1]，丘丹萍[3]（1. 玉林市第一人民医院药学部，广西　玉林 537000；2. 广州市花都区人民医院药学部，广州　510800；3. 玉林市第一人民医院检验科，广西　玉林　537000）

摘要：目的　探讨本院 4 种常见碳青霉烯类耐药革兰氏阴性杆菌（CRO）检出率与抗菌药物使用强度（AUD）的相关性，为降低其耐药性和促进临床合理使用抗菌药物提供参考。**方法**　收集和统计 2012—2019 年度广西某综合性三级甲等医院住院病区抗菌药物的使用情况，监测 4 种常见革兰氏阴性杆菌对碳青霉烯耐药率的变迁情况，采用 Pearson 相关方法分析 4 种常见 CRO 检出率与抗菌药物使用强度的相关性。**结果**　2012—2019 年 4 种常见 CRO 的各年度检出率均无明显变化趋势。其中耐碳青霉烯大肠埃希菌（CRECO）的检出率与莫西沙星、多西环素的使用强度成正相关（P 均＜ 0.05）；耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌（CRKPN）的检出率与环丙沙星的使用强度成负相关（P 均＜ 0.05）；耐碳青霉烯铜绿假单胞菌（CRPAE）的检出率与亚胺培南和头孢哌酮舒巴坦的使用强度成正相关（P 均＜ 0.05），而与环丙沙星的使用强度成负相关（P 均＜ 0.05）；耐碳青霉鲍曼不动杆菌（CRAB）的检出率与亚胺培南、头孢哌酮舒巴坦和多西环素的使用强度成正相关（P ＜均 0.05）。**结论**　CRO 的检出率与抗菌药物使用强度息息相关，临床诊治中需要加强抗菌药物合理使用的管控，减少细菌耐药性的产生，改善不断恶化的临床多重耐药菌或广泛耐药菌感染形势。

关键词：碳青霉烯类耐药；革兰氏阴性杆菌；检出率；抗菌药物使用强度；相关性
中图分类号：R446.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1653-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.030

Correlation between detection rate of 4 common carbapenem-resistant organism and antimicrobial use density

WANG Guang-zhao[1], MENG Guang-yi[1*], LIN Chuan-zhong[2], LI Yang[1], WEI Feng-hua[1], QIU Dan-Ping[3] (1. *Department of Pharmacy*, *First People's Hospital of Yulin*, *Yulin　Guangxi*　537000; 2. *Department of Pharmacy*, *People's Hospital of Huadu District*, *Guangzhou*　510800; 3. *Department of Clinical Laboratory*, *First People's Hospital of Yulin*, *Yulin　Guangxi*　537000)

Abstract: Objective　To determine the correlation between detection rate of 4 common carbapenem-resistant organism (CRO) and antimicrobial use density (AUD) to reduce drug resistance and provide reference for reasonable antibiotics use. **Methods**　AUD of antibacterial drugs commonly used in the inpatient sections of a comprehensive 3A hospital in Guangxi from 2012 to 2019 was collected. The 4 common CROs were constantly monitored, and Pearson correlation was used to analyze the correlation between the dection rate of 4 common CRO and AUD. **Results**　The annual detection rates of 4 common CRO showed no significant change from 2012 to 2019. The detection rate of carbapenem resistant *Escherichia coli* was positively correlated with the AUD of moxifloxacin and doxycycline (P ＜ 0.05).

基金项目：玉林市科学研究与技术开发计划科技攻关项目（玉市科 20202007）。
作者简介：王广钊，男，在读硕士研究生，主要从事临床药学与合理用药方面的研究，email：gxmuwgz@sina.com　*通信作者：蒙光义，男，副教授，副主任药师，主要从事临床药学与合理用药方面的研究，email：gxmu-mgy@163.com

The detection rate of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* was negatively correlated with the AUD of ciprofloxacin ($P < 0.05$). The detection rate of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* was positive correlated with antimicrobial use density of imipenem and cefoperazone/sulbactam ($P < 0.05$), but negatively with that of ciprofloxacin ($P < 0.05$). The detection rate of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* was positively correlated with the AUD of imipenem, cefoperazone/sulbactam and doxycycline ($P < 0.05$). **Conclusion** The detection rates of CRO are closely related to the AUD. It is necessary to control the use of antibiotics, to reduce antimicrobial resistance.

Key words: carbapenem-resistant organism; gram-negative bacillus; detection rate; antimicrobial use density; correlation

CHINET 中国细菌耐药监测网 2005—2019 年数据[1-4]显示大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌是医院感染中最常见的 4 种革兰氏阴性杆菌，虽然铜绿假单胞菌对碳青霉烯的耐药率呈平稳下降趋势、大肠埃希菌对碳青霉烯的耐药率仍处于较低水平，但肺炎克雷伯菌和鲍曼不动杆菌对碳青霉烯的耐药率均呈上升趋势，给临床抗感染治疗带来了巨大挑战。本文通过研究分析 2012—2019 年广西某综合性三级甲等医院住院病区中 4 种常见碳青霉烯类耐药革兰氏阴性杆菌（CRO）的检出率变化趋势，探讨其与各品种抗菌药物使用强度（AUD）的相关性，从而为临床诊治和防控广泛耐药菌株的感染和规范抗菌药物的合理使用提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 菌株来源

4 种常见 CRO 来源于 2012—2019 年该院住院病区临床科室送检的各种标本，主要包括痰、气管抽吸物、伤口分泌物、血液、尿液、肺泡灌洗液、胸腹水等，剔除同一患者相同部位的重复菌株。

1.2 菌株分离及药敏试验

细菌培养和鉴定参照《全国临床检验操作规程》（第 3 版），使用法国生物梅里埃公司的 VITEK2-compact 自动细菌鉴定仪和 VTIKE GP 鉴定卡进行病原菌鉴定及微量稀释法进行药敏分析。药敏试验及结果判断标准参考美国临床实验室标准化协会（CLSI 2011—2019 年）制定的标准进行评定，将药敏试验结果判定为耐药、中介、敏感。质控菌株：大肠埃希菌 ATCC25922、肺炎克雷伯菌 ATCC700603 和铜绿假单胞菌 ATCC27853（国家卫生计生委临床检验中心）。

1.3 抗菌药物 AUD

从医院信息系统中提取 2012—2019 年医院住院患者常用抗菌药物的年消耗量，根据世界卫生组织（WHO）制定的 Guidelines for Anatomical Therapeutic Chemical（ATC）classification and DDD assignment 23rd edition（2020）推荐的日限定剂量（DDD）来计算用药频度（DDDs），用药频度（DDDs）＝某药年销售总量 / 该药的 DDD 值，抗菌药物 AUD ＝ DDDs×100/（同期出院患者人数 × 同期患者平均住院天数）。

1.4 统计学处理

运用 WHONET 5.5 软件分析细菌耐药监测数据，采用 SPSS Statistics 17.0 统计软件对数据进行统计学分析。采用线性回归分析（linear regression）评估 4 种常见 CRO 对碳青霉烯的耐药率、抗菌药物 AUD 随时间的变化趋势。数据资料符合双变量正态分布，细菌耐药率与抗菌药物 AUD 的相关性采用 Pearson 相关分析，检验水准 $\alpha = 0.05$，$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 种常见 CRO 检出率的变化趋势

2012—2019 年共检出大肠埃希菌 15 116 株、肺炎克雷伯菌 7412 株、铜绿假单胞菌 7583 株和鲍曼不动杆菌 4936 株，4 种主要 CRO 的各年度检出率均无明显变化趋势（$P > 0.05$）。其中耐碳青霉烯大肠埃希菌（CRECO）、耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌（CRKPN）、耐碳青霉烯铜绿假单胞菌（CRPAE）和耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌（CRAB）的检出率分别为 0.7% ～ 2.1%、2.0% ～ 15.3%、10.9% ～ 28.9% 和 18.3% ～ 67.3%；CRAB 检出率最高，除 2012 年和 2013 年外其他年度均大于 50%。结果见表 1。

2.2 常用抗菌药物 AUD 的变化趋势

2012—2019 年医院住院病区常用的 17 种抗菌药物中，哌拉西林他唑巴坦、阿莫西林克拉维酸钾、头孢曲松、美罗培南、莫西沙星和多西环素的 AUD 基本呈逐年升高趋势（P 均 < 0.05）；而哌拉西林、头孢西丁、头孢他啶、磷霉素的

表 1　2012—2019 年 4 种常见 CRO 检出率的变化趋势 (%)

Tab 1　Change in the detection rate of 4 common CROs from 2012 to 2019 (%)

年份	CRECO	CRKPN	CRPAE	CRAB
2012 年	1.0（10/1040）	2.0（8/401）	10.9（51/466）	18.3（32/175）
2013 年	0.8（7/923）	5.5（21/385）	11.6（45/389）	29.0（123/424）
2014 年	1.2（15/1293）	5.1（44/868）	21.2（179/843）	54.1（322/595）
2015 年	1.3（17/1340）	15.3（152/994）	28.9（331/1145）	67.3（457/679）
2016 年	0.7（11/1624）	11.0（91/824）	27.6（357/1295）	64.0（309/483）
2017 年	2.1（40/1916）	11.6（116/1001）	26.3（230/873）	54.8（306/558）
2018 年	1.0（19/1928）	5.2（69/1315）	19.0（212/1115）	51.7（403/780）
2019 年	2.0（45/2253）	3.0（46/1549）	17.0（263/1545）	60.0（573/955）
β 值	0.123	0.247	1.112	4.813
P 值	0.137	0.762	0.338	0.062

AUD 基本总体呈逐年下降趋势（P 均 < 0.05）；其余抗菌药物 AUD 呈现平稳趋势。结果见表 2。

2.3　4 种常见 CRO 检出率与抗菌药物 AUD 的相关性

Pearson 相关分析结果显示，CRECO 的检出率与莫西沙星、多西环素的使用强度成正相关（$P < 0.05$）；CRKPN 的检出率与环丙沙星的使用强度成负相关（$P < 0.05$）；CRPAE 的检出率与亚胺培南、头孢哌酮舒巴坦的使用强度成正相关（$P < 0.05$），而与环丙沙星的使用强度成负相关（$P < 0.05$）；CRAB 的检出率与亚胺培南、头孢哌酮舒巴坦、多西环素的使用强度成正相关（$P < 0.05$）。结果见表 3。

表 2　2012—2019 年住院病区常用抗菌药物 AUD

Tab 2　AUD of commonly-used antibacterial drugs in hospital inpatient wards from 2012—2019

抗菌药物	AUD								变化趋势	
	2012 年	2013 年	2014 年	2015 年	2016 年	2017 年	2018 年	2019 年	β 值	P 值
哌拉西林	0.115	0.055	0.077	0.065	0.088	0.041	0.004	0.000	− 0.014	0.009
哌拉西林他唑巴坦	5.022	4.505	5.906	7.304	9.129	11.053	10.529	10.913	1.055	< 0.001
阿莫西林克拉维酸钾	1.209	0.924	1.271	2.777	3.320	3.027	3.844	5.243	0.579	< 0.001
头孢哌酮舒巴坦	1.944	3.171	4.003	4.927	6.454	3.099	3.421	3.208	0.106	0.653
头孢西丁	2.595	2.782	3.311	3.239	3.470	1.313	0.456	0.380	− 0.392	0.033
头孢呋辛	5.843	7.125	6.524	6.474	7.086	6.391	6.684	7.050	0.077	0.288
头孢他啶	2.372	2.709	2.092	2.097	0.588	0.880	0.971	1.049	− 0.275	0.010
头孢曲松	0.311	0.322	0.639	0.949	1.632	2.999	2.744	2.125	0.388	0.003
亚胺培南	0.344	0.314	0.582	0.749	0.832	0.445	0.346	0.445	0.006	0.850
美罗培南	0.113	0.239	0.429	0.776	1.341	1.602	1.356	1.609	0.240	< 0.001
庆大霉素	0.066	0.362	0.096	0.059	0.059	0.284	0.047	0.685	0.040	0.291
阿米卡星	0.369	0.295	0.227	0.311	0.319	0.318	0.219	0.227	− 0.013	0.132
环丙沙星	0.098	0.081	0.056	0.034	0.029	0.020	0.058	0.095	− 0.003	0.565
左氧氟沙星	9.425	7.679	8.538	8.644	10.603	8.724	4.814	3.675	− 0.620	0.083
莫西沙星	0.496	0.391	0.445	0.432	0.619	1.616	1.434	1.617	0.200	0.006
多西环素	0.050	0.216	0.278	0.384	0.210	0.438	0.442	0.556	0.072	0.003
磷霉素	0.693	0.575	0.468	0.673	0.552	0.188	0.296	0.378	− 0.054	0.036

3　讨论

CHINET 中国细菌耐药性监测数据[1-4]显示，2012—2019 年 CRECO 的检出率为 1.0% ～ 3.0%，维持在相对较低的耐药率水平（$P = 0.444$）；CRPAE 的检出率为 23.6% ～ 30.7%，呈现平稳趋势（$P = 0.778$）；但 CRKPN 的检出率为 11.8% ～ 29.5%、CRAB 的检出率为 61.4% ～ 79.0%，均呈现逐年上升趋势（$P < 0.001$）。而该院 2012—2019 年 CRECO、CRKPN、CRPAE 和 CRAB 的检出率分别为 0.7% ～ 2.1%、2.0% ～ 15.3%、10.9% ～ 28.9% 和 18.3% ～ 67.3%，4 种常见 CRO 的各年度检出率均无明显变化趋势。与 CHINET 中国细菌耐药监测网监测结果相比，该院 4 种常见 CRO 的整体检出率相对低，特别是 CRKPN、CRPAE 检出率在 2015 年分别达到峰值 15.3%、28.9% 后，在 2016 年出现拐点逐步降低，2019 年分别低至 3.0%、17.0%。可能与该院为了提高抗菌药物的合理使用水平，2016 年起成立了由传染病专家、微生物专家、临床医师和临床药师组成的多学科抗感染团队，开展抗菌药物医嘱专项点评、多学科进入临床宣讲以及加强感控管理等有关。因此，减少抗菌药物的不合理使用可能是减少 CRO 传播的有效措施。

国内相关研究[5-7]发现 CRO 主要来源于重症医学科、呼吸内科、神经外科和神经内科等科室患者所送检的呼吸道标本、血标本、尿液标本，

表 3　抗菌药物 AUD 与 4 种常见 CRO 检出率的 Pearson 相关分析

Tab 3　Pearson correlation analysis between AUD and the detection rate of 4 common CROs

抗菌药物	CRECO		CRKPN		CRPAE		CRAB	
	r 值	*P* 值	*r* 值	*P* 值	*r* 值	*P* 值	*r* 值	*P* 值
哌拉西林	－0.521	0.185	0.090	0.831	－0.026	0.951	－0.391	0.338
哌拉西林他唑巴坦	0.603	0.113	0.230	0.583	0.485	0.224	0.645	0.084
阿莫西林克拉维酸钾	0.519	0.188	0.106	0.803	0.348	0.399	0.651	0.081
头孢哌酮舒巴坦	－0.305	0.463	0.657	0.077	0.752	0.031	0.722	0.043
头孢西丁	－0.583	0.129	0.356	0.386	0.214	0.611	－0.064	0.881
头孢呋辛	－0.094	0.824	0.070	0.870	0.096	0.821	0.397	0.331
头孢他啶	－0.347	0.399	－0.239	0.569	－0.539	0.168	－0.630	0.094
头孢曲松	0.570	0.141	0.214	0.611	0.424	0.296	0.516	0.191
亚胺培南	－0.133	0.754	0.702	0.052	0.815	0.014	0.723	0.043
美罗培南	0.575	0.136	0.296	0.476	0.534	0.173	0.698	0.054
庆大霉素	0.615	0.104	－0.322	0.437	－0.306	0.460	0.037	0.931
阿米卡星	－0.208	0.621	0.291	0.484	0.008	0.985	－0.409	0.314
环丙沙星	－0.105	0.805	－0.877	0.004	－0.915	0.001	－0.657	0.077
左氧氟沙星	－0.406	0.318	0.454	0.259	0.326	0.431	－0.120	0.777
莫西沙星	0.727	0.041	－0.099	0.816	0.107	0.800	0.309	0.456
多西环素	0.737	0.037	0.223	0.596	0.497	0.210	0.746	0.034
磷霉素	－0.622	0.100	0.018	0.967	－0.208	0.622	－0.331	0.423

以 50 岁以上的男性患者检出比例最高，可能与这些科室患者病情比较严重、住院时间长、免疫力低下、使用抗菌药物种类繁杂及时间长、且较多接受气管插管、气管切开和动静脉置管等侵袭性操作有关。

CRO 通常对临床常见的抗菌药物高度耐药，大部分是仅对多黏菌素和替加环素敏感的广泛耐药菌株[4]。有研究显示[5-6]，4 种常见 CRO 仅对多黏菌素 B、替加环素、米诺环素、阿米卡星敏感。其中 CRE 和 CRAB 对头孢菌素类及其加酶抑制剂类、喹诺酮类等抗菌药物耐药率均 ≥ 76.9%[7]，CRECO 和 CRKPN 对临床大多数常用抗菌药物如第三、四代头孢菌素类、*β*- 内酰胺类 / 酶抑制剂类、喹诺酮类等耐药率均 ≥ 90%[8]，CRO 耐药问题异常严重。CRO 对碳青霉烯耐药机制较复杂，由多种耐药机制共同发挥作用，主要由产碳青霉烯酶引起，可能同时合并产超广谱 *β*- 内酰胺酶（ESBLs）和 / 或头孢菌素酶（AmpC 酶）、外排泵过度表达、膜孔蛋白突变或者缺失、细胞膜通透性降低等[8-10]。其中大肠埃希菌、铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药以产 B 类的金属酶为主，而产 A 类 KPC 酶、D 类 OXA-23 酶分别是介导肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要机制[10-11]。

本次研究发现，哌拉西林他唑巴坦、阿莫西林克拉维酸钾、头孢曲松、美罗培南、莫西沙星、多西环素的使用强度呈逐年升高趋势；而哌拉西林、头孢西丁、头孢他啶、磷霉素的使用强度总体呈逐年下降趋势，侧面说明了随着细菌耐药性的增加、新型广谱抗菌药物的普及，医师在治疗感染患者中更倾向于选择加酶的或者能够覆盖厌氧菌的广谱抗菌药物，因此个体化治疗重要性凸显。

细菌耐药水平与抗菌药物的使用量存在宏观的量化关系，两者息息相关，抗菌药物的选择性压力加速了细菌耐药性的产生[12-13]。此次研究发现，CRPAE、CRAB 的检出率与亚胺培南的使用强度均成正相关（$r = 0.815$，$P < 0.05$；$r = 0.723$，$P < 0.05$），与美罗培南的使用强度无明显相关性；CRECO、CRKPN 的检出率与亚胺培南、美罗培南的使用强度无明显相关性；提示高强度使用亚胺培南可能会导致铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌对碳青霉烯的耐药率不断升高。国内陈泳伍等[14]的研究也表明 CRPAE 检出率与碳青霉烯类抗菌药物、美罗培南、亚胺培南 AUD 成中度正相关。有研究表明 CRAB 检出率与碳青霉烯类抗菌药物 AUD 成正相关[15-16]。一项重症监护病房（ICU）大数据分析显示，碳青霉烯类药物 AUD 分别与鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌对亚胺培南 / 西司他丁的耐药性成显著正相关，但与肺炎克雷伯杆菌对亚胺培南 / 西司他丁的耐药性无相关性[17]。李新芳等[18]研究也表

明 CRECO、CRKPN 的检出率与碳青霉烯的使用强度无相关性，与本研究结果相似。而本研究发现 CRPAE、CRAB 的检出率与亚胺培南的使用强度成正相关，但与美罗培南的使用强度无相关性，可能与亚胺培南特异性诱导铜绿假单胞菌的微孔蛋白 *OprD* 基因表达下降，阻碍亚胺培南进入铜绿假单胞菌菌体内，特异性引起菌株对亚胺培南耐药，而美罗培南与微孔蛋白 *OprD* 基因表达无明显相关性有关 [13，19-20]；亚 *MIC* 浓度的亚胺培南诱导鲍曼不动杆菌 *ponA* 基因表达下降的幅度较美罗培南、多尼培南大 [21]，鲍曼不动杆菌对亚胺培南的特异性外膜孔蛋白 *CarO* 基因 [22]、43 kDa *OMP* 基因 [23] 的表达缺失或下调等综合因素导致亚胺培南更容易诱导鲍曼不动杆菌对碳青霉烯耐药有关。但郑伟等 [12]、毛东阳等 [24] 研究显示 CRKPN、CRECO 的检出率与碳青霉烯类抗菌药物使用强度显著相关，与本文研究结果有差异。虽然国内外大量研究表明既往使用碳青霉烯类抗菌药物是诱导产生 CRO 超级细菌的独立危险因素 [25-27]，但细菌耐药率与抗菌药物 AUD 相关性的研究结果差异性较大，与细菌耐药机制复杂，受多种因素综合影响有关，提示不同种类抗菌药物 AUD 对 CRO 影响各不相同。

本研究还发现，CRECO 的检出率与莫西沙星、多西环素的使用强度成正相关，CRPAE 的检出率与头孢哌酮舒巴坦的使用强度成显著正相关，CRAB 的检出率与头孢哌酮舒巴坦、多西环素的使用强度成显著正相关。提示高强度使用莫西沙星、多西环素、头孢哌酮舒巴坦等抗菌药物可能会增加 CRECO、CRPAE、CRAB 的检出率，因此临床诊疗中需要规范合理使用莫西沙星、多西环素、头孢哌酮舒巴坦等抗菌药物以延缓 CRECO、CRPAE、CRAB 的产生。

CRO 通常是广泛耐药菌株，可供选择的抗菌药物较少，治疗非常棘手。因此针对 CRO 感染的抗菌治疗首先应该结合患者临床症状、体征和辅助检查来区分是感染还是定殖，然后根据药敏结果、抗菌药物的 PK/PD、患者肝肾功能等多种因素综合分析，选取合适的抗菌药物治疗 [9]。然而对于采用联合多种抗菌药物治疗 CRO 感染的临床疗效和病原微生物学是否更佳，尚缺乏充分的循证依据 [28]，但相关专家共识更倾向于推荐采用以多黏菌素或替加环素为基础的联合用药方案 [9-10，29]。多黏菌素雾化吸入联合全身静脉用药治疗 CRO 肺部感染，可以改善临床治愈率，减少病死率 [30]；替加环素鞘内 / 脑室内给药联合全身静脉给药对 CRAB、CRKP 引起的颅内感染显示出了良好的治疗效果 [31]；头孢他啶阿维巴坦、亚胺培南雷巴坦、美罗培南瓦博巴坦等新研发的药物，在治疗 CRE 感染的部分研究中有不错疗效，有待进一步研究 [32]。

本研究仍存在一定的局限性。首先，该研究仅在一家三级医院开展，而 CRO 的检出率和抗菌药物 AUD 在各医院之间可能差异很大，因此需要多中心研究来进一步证实。此外，本研究的菌株来自 2012 ～ 2019 年该院住院病区临床科室送检的各种标本，未能很好地区分是社区获得性的菌株还是医院获得性的菌株。最后，引起革兰氏阴性杆菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的发生与多种因素有关，抗菌药物的选择性压力只是其中之一，其他因素有待进一步研究。

CRO 的检出率与抗菌药物 AUD 息息相关，面对 CRO 感染的严峻挑战，临床诊治中需要通过开展抗菌药物科学化管理和多学科联合诊疗模式，规范合理使用抗菌药物，控制耐药菌株的产生及传播 [14，33]。

参考文献

[1] 胡付品，郭燕，朱德妹，等 . 2005—2014 年 CHINET 中国细菌耐药性监测网 5 种重要临床分离菌的耐药性变迁 [J]. 中国感染与化疗杂志，2017，17（1）：93-99.

[2] 胡付品，郭燕，朱德妹，等 . 2016 年中国 CHINET 细菌耐药性监测 [J]. 中国感染与化疗杂志，2017，17（5）：481-491.

[3] 胡付品，郭燕，朱德妹，等 . 2017 年 CHINET 中国细菌耐药性监测 [J]. 中国感染与化疗杂志，2018，18（3）：241-251.

[4] Hu FP，Yan G，Yang Y，et al. Resistance reported from China antimicrobial surveillance network（CHINET）in 2018 [J]. Eur J Clin Microbiol，2019，38（12）：2275-2281.

[5] 李爽，郭小兵，王若，等 . 河南省某医院耐碳青霉烯类革兰氏阴性杆菌的临床分布及耐药谱 [J]. 中国感染控制杂志，2020，19（1）：14-19.

[6] 储从家，吴惠玲，李杰芬，等 . 某医院 2014—2017 年耐碳青霉烯类革兰氏阴性杆菌分布及耐药性 [J]. 中国微生态学杂志，2019，31（10）：1219-1222.

[7] 李彩华，陈维忠，胡晓峰，等 . 耐碳青霉烯类革兰阴性菌分布特征及耐药性分析 [J]. 中华医院感染学杂志，2018，28（5）：650-653.

[8] 徐红云，刘春林，陈弟，等 . 2010—2016 年耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌及大肠埃希菌临床分布及其耐药特征 [J]. 中国感染控制杂志，2018，17（8）：688-692.

[9] 王明贵 . 广泛耐药革兰阴性菌感染的实验诊断、抗菌治

疗及医院感染控制：中国专家共识 [J]. 中国感染与化疗杂志，2017，7（1）：82-92.
[10] β- 内酰胺类抗生素 /β- 内酰胺酶抑制剂复方制剂临床应用专家共识（2020 年版）[J]. 中华医学杂志，2020（10）：738-747.
[11] Wang Q，Wang X，Wang J，et al. Phenotypic and genotypic characterization of carbapenem resistant enterobacteriaceae：data from a longitudinal large scale CRE study in China（2012-2016）[J]. Clin Infect Dis，2018，67（suppl_2）：S196-S205.
[12] 郑伟，茅一萍，韩方正，等 . 大肠埃希菌及肺炎克雷伯菌耐药性与抗菌药物使用强度相关性 [J]. 中国感染控制杂志，2017，16（7）：606-609.
[13] 姚屹瑾，方洁，孙景勇，等 . 碳青霉烯类抗菌药物使用强度与 4 种常见革兰阴性病原菌耐药性的相关性 [J]. 医药导报，2018，37（3）：315-318.
[14] 陈泳伍，张圣雨，鲁怀伟，等 . 碳青霉烯类抗菌药物专档管理对碳青霉烯类抗菌药物使用强度影响及 CRO 检出率相关分析 [J]. 中国医院药学杂志，2019，39（16）：1678-1681.
[15] 王娜，郭海霞，冯欣，等 . 碳青霉烯类抗菌药物对鲍氏不动杆菌耐药性的影响研究 [J]. 中华医院感染学杂志，2015，25（24）：5578-5580.
[16] 肖淑珍，徐桂婷，方洁，等 . 鲍曼不动杆菌耐药性与抗菌药物使用情况的相关性分析 [J]. 中国感染与化疗杂志，2013，13（6）：446-449.
[17] Meyer E，Gastmeier P，Deja M，et al. Antibiotic consumption and resistance：data from Europe and Germany [J]. Int J Med Microbiol，2013，303（6-7）：388-395.
[18] 李新芳，顾华芳，顾永华，等 . 肠杆菌科细菌耐药性与抗菌药物使用强度的相关性分析 [J]. 中华医院感染学杂志，2016，26（1）：16-18.
[19] 骆俊，朱德妹 . 铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素耐药机制的研究进展 [J]. 中国感染与化疗杂志，2008，8（1）：76-79.
[20] 梁文，李博，董萌萌，等 . 铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素耐药机制研究进展 [J]. 中国抗生素杂志，2013，38（9）：641-646.
[21] 魏星，游德红，郑兰，等 . 多重耐药鲍曼不动杆菌中 ponA 表达及其对碳青霉烯类抗生素诱导反应观察 [J]. 山东医药，2020，60（20）：24-28.
[22] 周娇娇，朱惠莉 . 鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗生素的耐药机制 [J]. 中国感染与化疗杂志，2014，14（5）：446-450.
[23] 王珏鑫，余广超，温旺荣，等 . 鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药机制研究进展 [J]. 中国抗生素杂志，2016，41（11）：824-828.
[24] 毛东阳，蔡晓锐，陈浩浩，等 . 抗菌药物使用强度对大肠埃希菌耐药性的影响 [J]. 中国现代应用药学，2019，36（17）：2187-2190.
[25] Kuo HY，Chang KC，Kuo JW，et al. Imipenem：a potent inducer of multidrug resistance in Acinetobacter baumannii [J]. Int J Antimicrob Ag，2012，39（1）：33-38.
[26] 李鹏，李铁，张付华，等 . 耐碳青霉烯类肠杆菌医院感染风险分析 [J]. 中华医院感染学杂志，2015，25（11）：2417-2419.
[27] Wang Q，Zhang Y，Yao X，et al，Risk factors and clinical outcomes for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae nosocomial infection [J]. Eur J Clin Microbiol，2016，35（10）：1679-1689.
[28] Kirati K，Khachen K，Surasak S，et al. Comparative efficacy and safety of treatment options for MDR and XDR Acinetobacter baumannii infections：a systematic review and network meta-analysis [J]. J Antimicrob Chemoth，2018，73（1）：22-32.
[29] 胡必杰 . 中国碳青霉烯耐药革兰氏阴性杆菌（CRO）感染预防与控制技术指引 [J]. 中华医院感染学杂志，2019，29（13）：2075-2080.
[30] 吴俊，赵子文 . 耐碳青霉烯类革兰阴性菌感染的治疗药物与联合抗菌策略进展 [J]. 中华医院感染学杂志，2016，26（9）：2152-2156.
[31] 陈玥，李佳安，朱曼，等 . 替加环素鞘内 / 脑室内给药治疗多重耐药菌颅内感染的文献分析 [J]. 中国临床药学杂志，2021，30（1）：46-50.
[32] 张露方，耿荣华，曲芬 . 耐碳青霉烯肠杆菌科细菌的流行病学特点以及抗生素应用策略 [J]. 中国抗生素杂志，2019，44（9）：1008-1014.
[33] 蒙光义，王冬晓，钟丽球，等 . 肺炎克雷伯菌耐药率变迁与抗菌药物使用强度的相关性分析 [J]. 中国医院药学杂志，2019，39（16）：1639-1644.

（收稿日期：2022-01-02；修回日期：2022-02-10）

基于分子连接性指数的高频抗新型冠状病毒肺炎中药物质基础研究

吴月峰[1, 2, 3, 4]，朱志飞[1, 2, 3, 4]，陈定芳[1, 2, 3, 4]，刘有志[1, 2, 3, 4]，袁筱[1, 2, 3, 4]，樊启猛[1, 2, 3, 4]，孟蕾[1]，范习之[1]，周晋[1, 2, 3, 4*]，贺福元[1, 2, 3, 4*]（1. 湖南中医药大学药学院，长沙　410208；2. 中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室，长沙　410208；3. 中医药超分子机理与数理特征化实验室，长沙　410208；4.中药药性与药效国家中医药管理局重点实验室，长沙　410208）

摘要：目的　基于分子连接性指数（MCI）探讨临床高频使用的治疗新型冠状病毒肺炎（COVID-19）中药的物质基础。**方法**　利用中药系统药理学数据库与分析平台（TCMSP）建立高频抗 COVID-19 中药化学成分数据库，将成分分为 9 类，分析成分信息，统计成分出现频次。计算各成分（群）0 ～ 8 阶平均 MCI。根据夹角余弦法计算成分（群）MCI 相似度。计算 12 味抗 COVID-19 中药 0 ～ 8 阶物芯指数（CI），对 12 味中药的 CI 值进行聚类分析。**结果**　将豆甾醇 3-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷、*β*- 桉叶醇、*β*-daucosterol 等 86 个高相似度的成分作为潜在的抗 COVID-19 药效成分。成分群与总成分之间的相似度在 0.685 ～ 1.000；根据 CI 值，12 味中药可以很好的分为 4 组。**结论**　初步推测高频抗 COVID-19 中药的有效成分以有机酸、萜类、糖及苷类和黄酮为主；通过 CI 进一步分析各组高频中药的配伍规律，可以提炼出“厚朴 - 苦杏仁 - 麻黄 - 生姜 - 陈皮”复方、“草果 - 葶苈子 - 广藿香”复方、“赤芍 - 甘草 - 苍术”复方治疗 COVID-19。这为治疗 COVID-19 的药物筛选提供了参考依据。

关键词：新型冠状病毒肺炎；高频；中药；物质基础；分子连接性指数；物芯指数

中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1659-11

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.031

Material basis of high frequency Chinese medicine for anti-COVID-19 based on molecular connectivity index

WU Yue-feng[1, 2, 3, 4], ZHU Zhi-fei[1, 2, 3, 4], CHEN Ding-fang[1, 2, 3, 4], LIU You-zhi[1, 2, 3, 4], YUAN Xiao[1, 2, 3, 4], FAN Qi-meng[1, 2, 3, 4], MENG-Lei[1], FAN Xi-zhi[1], ZHOU-Jin[1, 2, 3, 4*], HE Fu-yuan[1, 2, 3, 4*] (1. *College of Pharmacy*, *Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha* 410208; 2. *Hunan Key Laboratory of Druggability and Preparation Modification of Traditional Chinese Medicine*, *Changsha* 410208; 3. *Laboratory of Supramolecular Mechanism and Mathematic-Physics Characterization for Chinese Materia Medica*, *Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha* 410208; 4. *Property and Pharmacodynamic Key Laboratory of TMC*, *State Adminstration of Chinese Medicine*, *Changsha* 410208)

Abstract: Objective　To determine the material basis of traditional Chinese medicine with high frequency for COVID-19 based on molecular connectivity index (MCI). **Methods**　Traditional Chinese medicine database and analysis platform (TCMSP) were used to establish the chemical composition database of traditional Chinese medicine against COVID-19 with high frequency. The components were divided into 9 categories, and the frequency was analyzed. The average MCI of each component (group) in 0 ～ 8 order was calculated. MCI similarity of component (group) was calculated according to the angle chord method. The core index (CI) at 0 ～ 8 order of the 12 herbs was calculated, and the

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81903759）；湖南省教育厅科学研究项目（No.21A0256，No. 20C1408）；湖南省自然科学基金青年项目（No.2021JJ40398）；长沙市科学技术局项目（No.kq2004059，No. kq2014085）；湖南省研究生科研创新项目（No.2020CX37）。

作者简介：吴月峰，男，在读硕士研究生，主要从事中药质量分析与评价研究，email：yuefen_g@163.com　*__通信作者：__周晋，女，博士，副教授，主要从事药物制剂质量评价研究与中医药超分子与数理特征化的研究，email：hnzhoujin@sina.com；贺福元，男，博士，教授，主要从事中药药理学、中药药剂学、中医药超分子与数理特征化的研究，email：pharmsharking@tom.com

CI values of 12 herbs were clustered. **Results** Totally 86 components with high similarity, such as stigmasterol 3-*O*-*β*-*D*-glucopyranoside, *β*-eudesmol, and *β*-daucosterol were used for COVID-19. The similarity between component groups and total components was 0.685 ～ 1.000. According to cluster analysis of CI values, the 12 herbs were well divided into 4 groups. **Conclusion** Effective components in high-frequency Chinese medicines for COVID-19 mainly include organic acids, terpenoids, sugars, glycosides and flavonoids. The potentials of decoctions for COVID-19 are found by analyzing the CI values of high frequency Chinese medicine in each group, such as decoction of Magnoliae Officinalis Cortex, Armeniacae Semen Amarum, Ephedrae Herba, Zingiberis Rhizoma Recens and Citri Reticulatae Pericarpium, decoction of Tsaoko Fructus, Descurainiae Semen Lepidii Semen and Pogostemonis Herba, and decoction of Paeoniae Radix Rubra, Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma and Atractylodis Rhizoma. This study provides a reference for drug screening against COVID-19.

Key words: COVID-19; high frequency; Chinese medicine; material basis; molecular connectivity index; core index

新型冠状病毒肺炎（coronavirus disease 2019，COVID-19）[1]是由严重急性呼吸综合征冠状病毒 2（severe acute respiratory syndromecoronavirus 2，SARS-CoV-2）引起的急性传染病，主要通过呼吸道传播，人被感染后常出现呼吸道症状、发热、咳嗽、气促和呼吸困难等体征，严重可致死亡，即使是无症状患者同样具有隐蔽的传染能力，且病毒变异迅速，这使得 COVID-19 在全球快速蔓延。而中药（复方）通过多成分 - 多靶点 - 多通路发挥作用，在改善症状、缩短病程、延缓疾病进展和降低病死率等方面体现出明确疗效和独特优势 [2]。探寻中药抗 COVID-19 的物质基础是战胜 COVID-19 的一种有效手段，值得深入研究。本文旨在通过计算高频抗 COVID-19 单味中药成分（群）的 0 ～ 8 阶 MCI 及 MCI 相似度，筛选潜在的抗 COVID-19 的有效成分（群），为高频抗 COVID-19 中药的物质基础研究提供依据。

1 资料与方法

1.1 资料纳入与排除

统计《COVID-19 诊疗方案（试行第八版）》（简称《诊疗方案》）中药频次，其中高频中药包括广藿香（7 次）、甘草（7 次）、生石膏（6 次）、苍术（5 次）、麻黄（5 次）、草果（4 次）、厚朴（4 次）、苦杏仁（4 次）、葶苈子（4 次）、茯苓（3 次）、赤芍（3 次）、生姜（3 次）、陈皮（3 次），把这 13 味高频中药纳入资料，排除生石膏（TCMSP 库没有收集成分），在中药数据库及分析平台（TCMSP）检索其余 12 味中药所含成分信息，共检索到 1526 个成分，剔除 372 个重复成分后，一共得到 1154 个成分。

1.2 原理

分子连接性指数（MCI）是一种将成分结构用数值表示的拓扑指数，把 MCI 与药理活性相关联，可定量描述分子结构信息和分子结构与理化性质、生物活性之间的构效关系 [3-5]，具有分子结构数字化、构效关系定量化、数值可加和性和 MCI 相似度可识别性（筛选质量标志物）等特点。基于 Kier 等学者提出的 MCI 理论 [6]，目前团队已有的软件程序可计算到 26 层级 0 ～ 8 阶 MCI。

在前期研究中，本团队通过分析鱼腥草挥发油的气质联用图谱和计算鱼腥草挥发油成分的 1 阶 MCI 找寻质量标志物 [7]，基于 MCI 与脑梗死面积关联性研究治疗脑梗死的药物 [8]，并基于 MCI 探寻了归肝经中药的“印迹模板”特征 [9]。综上，笔者拟用 MCI 研究高频抗 COVID-19 中药的物质基础。

1.3 方法

1.3.1 MCI 和物芯指数（CI）计算 MCI 是为隐氢分子图中（在结构式中去掉氢原子）单个原子或相邻原子间成键原子点价（δ）的乘积平方根倒数的总和 [10]。MCI 通式可表示为 [8]：

$$^{m}\chi = \sum_{j=1}^{n}\prod_{i=1}^{m+1}(\delta_i)_j^{-1/2}$$

式中，m 代表不同的阶项，δ 表示构成键的原子的点价，i 表示分子中依次排列的非氢原子，j 为 m 阶项下 $m+1$ 非氢原子的组合形式，n 为 m 阶项下 $m+1$ 非氢原子的所有组合形式。计算项目可分为 0 阶项 MCI（$^{0}\chi$）、1 阶项 MCI（$^{1}\chi$）、m 阶项 MCI（$^{m}\chi$）。

多成分体系的中药则用 CI 来表征，表示中药所含成分（群）的 MCI 与其对应质量百分数的几何平均，CI 用公式可表示为 [11]：

$$\mathrm{CI} = \sum_{l=1}^{p}(^{m}\chi_l \cdot P_l)$$

其中 ${}^{m}\chi_{l}$ 表示 l 化合物的 m 阶项 MCI，P_l 表示 l 化合物的占比，p 为中药中化合物总数。

1.3.2　高频抗 COVID-19 中药成分划分及频数百分比分布　根据中药有效成分的特征，将成分划分为黄酮类、有机酸类、萜类、甾体类、苯丙素类、生物碱类、糖类及苷类、酚类和其他类等 9 类成分群，统计 12 味中药各类成分频数百分比分布。

1.3.3　高频抗 COVID-19 中药成分 MCI 及其与总成分相似度计算　先计算高频抗 COVID-19 中药各个成分的 0 ～ 8 阶 MCI，再根据夹角余弦法，计算抗 COVID-19 中药各个成分的 0 ～ 8 阶 MCI 矩阵与总成分 0 ～ 8 阶 MCI 矩阵的相似度。根据相似度，筛选苍术、草果、葶苈子、茯苓、广藿香和陈皮等中药（成分数量≤ 100）相似度居前 10% 的成分，筛选赤芍、厚朴、苦杏仁、麻黄、甘草和生姜等中药（成分数量＞ 100）相似度居前 5% 的成分。用 Chem 3D 19.0 软件打开（成分）在 TCMSP 数据库的 .MOL2 格式文件，得到成分的分子式、结构式、InChI 编号，将 InChI 编号导入 Scifinder 数据库中，核实成分英文名称及其对应的中文名称。

1.3.4　高频抗 COVID-19 中药成分群 MCI 及与总成分 MCI 相似度计算　计算高频抗 COVID-19 中药各个成分群的 0 ～ 8 阶平均 MCI，再根据夹角余弦法，计算高频抗 COVID-19 中药各个成分群的 0 ～ 8 阶 MCI 矩阵与总成分 0 ～ 8 阶 MCI 矩阵的相似度。

1.3.5　高频抗 COVID-19 中药 CI 分析　计算 12 味中药的高频抗 COVID-19 中药各个成分群的 0 ～ 8 阶 CI 及平均 CI 值，运用 IBM SPSS Statistics 26 进行聚类分析，把“苍术”“赤芍”“草果”“厚朴”“苦杏仁”“麻黄”“葶苈子”“茯苓”“广藿香”“甘草”“生姜”和“陈皮”选入变量中，选择个案分析，进行 Q 型聚类分析。最小聚类数为 2，最大聚类数为 4，聚类方法选择瓦尔德法，测量区间选择平方欧氏距离，根据相似性对中药进行分类。

2　结果

2.1　《诊疗方案》中高频抗 COVID-19 中药各类成分占总成分的比例统计

《诊疗方案》中高频抗 COVID-19 中药所含各类成分出现频次占总成分频数的比例见表 1。在 12 味高频抗 COVID-19 中药中，共有的成分群为有机酸、其他类，黄酮出现频次比大小前三排序为甘草＞广藿香＞陈皮，有机酸出现频次比大小前三排序为茯苓＞葶苈子＞苦杏仁，萜类出现频次比大小前三排序为生姜＞广藿香＞厚朴，糖及苷类出现频次比大小前三排序为赤芍＞草果＞苍术。

表 1 《诊疗方案》高频抗 COVID-19 中药各类成分占总成分的比例

Tab 1　Proportion of components in total components of the traditional Chinese medicine with high frequency for COVID-19

中药	黄酮 /%	有机酸 /%	萜类 /%	甾体 /%	苯丙素 /%	生物碱 /%	糖及苷类 /%	酚类 /%	其他类 *%	成分总数 / 个
苍术	2.04	4.08	26.53	16.33	—	—	16.33	2.04	32.65	49
赤芍	3.36	9.24	7.56	5.04	—	0.84	21.01	18.49	34.45	119
草果	8.47	8.47	18.64	10.17	—	—	18.64	20.34	15.25	59
厚朴	0.72	4.32	41.01	0.72	0.72	—	—	5.04	47.48	139
苦杏仁	1.77	18.58	8.85	6.19	1.77	5.31	5.31	4.42	47.79	113
麻黄	5.79	8.26	28.37	1.65	0.55	4.96	2.75	1.93	45.73	363
葶苈子	4.48	28.36	—	10.45	—	14.93	11.94	5.97	23.88	67
茯苓	—	29.41	11.76	38.24	—	2.94	11.76	—	5.88	34
广藿香	13.83	1.06	44.68	—	—	2.13	8.51	4.26	25.53	94
甘草	53.57	1.43	14.64	0.36	0.36	1.07	1.43	4.64	22.50	280
生姜	0.38	4.91	57.36	1.13	0.38	1.51	0.75	10.57	23.02	265
陈皮	9.52	6.35	19.05	14.29	1.59	1.59	6.35	3.17	38.10	63

注（Note）：* 主要指小分子烷烃、烯烃、酯类、醚类（* mainly refers of small molecular alkanes，alkenes，esters，ethers）。

2.2　《诊疗方案》中高频抗 COVID-19 中药所含成分 MCI 计算及其 MCI 相似度计算

通过 MCI 相似度的筛选，得到了与总成分 MCI 相似度高的成分共 100 个，剔除重复的成分后，共有 86 个成分，列出高相似度成分的 MOL 编号、成分名称、分子式、部分 MCI、MCI 相似度及来源，见表 2。

在高频抗 COVID-19 中药中，豆甾醇 3-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷、*β*- 谷甾醇和 3-*O*- 葡萄糖苷等成分 0 ～ 8 阶 MCI 矩阵相似度较高，可能是潜在的抗 COVID-19 药效成分。其中 *β*-daucosterol、桉叶油醇、9-*epi*-*β*-caryophyllene、*α*- 松油醇、（*R*）-*p*-menth-1-en-4-ol、4- 萜烯醇、isocaryophyllene、*β*- 紫罗兰酮、光甘草定、二氢 -*β*- 紫罗兰酮和 *α*- 布藜烯等 11 个成分是高相似度且多个中药所共有的成分。

表 2 《诊疗方案》中高频抗 COVID-19 中药所含成分的分子式、部分 MCI 及其相似度

Tab 2 Molecular formulas，partial MCI and similarity of components of the traditional Chinese medicine with high frequency for COVID-19

MOL 编号	成分名称	分子式	MCI			MCI 相似度及来源
			0 阶	1 阶	2 阶	
MOL000185	豆甾醇 3-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷	$C_{35}H_{58}O_6$	29.690	19.439	18.470	0.998（苍术）
MOL000032	*β*- 桉叶醇	$C_{15}H_{26}O$	11.975	7.328	7.967	0.997（苍术）
MOL000087	*β*- 谷甾醇 3-*O*- 葡萄糖苷	$C_{35}H_{60}O_6$	29.690	19.439	18.470	0.997（苍术）
MOL000183	（2*R*，4a*R*，8a*R*）-decahydro-*α*，*α*，4a-trimethyl-8-methylene-2-naphthalenemethanol	$C_{15}H_{26}O$	11.975	7.328	7.967	0.997（苍术）
MOL000084	*β*-daucosterol	$C_{35}H_{60}O_6$	29.690	19.439	18.470	0.997（苍术） 0.973（草果）
MOL006990	（1*S*，2*S*，4*R*）-trans-2-hydroxy-1，8-cineole-*β*-*D*-glucopyranoside	$C_{16}H_{28}O_7$	16.991	10.676	10.965	0.995（赤芍）
MOL007009	4-*O*- 没食子酰白芍苷	$C_{30}H_{32}O_{15}$	32.474	21.280	20.681	0.994（赤芍）
MOL006993	1-*O*-*β*-*D*-glucopyranosyl-8-*O*-benzoylpaeonisuffrone	$C_{23}H_{28}H_{10}$	23.596	15.678	15.151	0.993（赤芍）
MOL006995	（1*R*，3*R*，6*S*，8*S*，9*S*）-9-[（benzoyloxy）methyl]-1-（*β*-*D*-glucopyranosyloxy）-8-methoxy-6-methyl-7-oxatricyclo[4.3.0.0^{3,9}]nonan-4-one	$C_{24}H_{30}H_{11}$	25.173	16.637	15.844	0.992（赤芍）
MOL007004	芍药内酯苷	$C_{23}H_{28}O_{11}$	24.466	16.099	15.640	0.992（赤芍）
MOL007023	没食子酰芍药苷	$C_{30}H_{32}O_{15}$	32.104	21.250	21.427	0.992（赤芍）
MOL000121	正癸醛	$C_{10}H_{20}O$	8.113	5.019	5.750	0.982（草果）
MOL000122	桉叶油醇	$C_{10}H_{18}O$	8.113	5.019	5.750	0.982（草果） 0.981（生姜）
MOL000088	*β*- 谷甾醇	$C_{29}H_{50}O$	29.690	19.439	18.470	0.973（草果）
MOL000091	daucosterin	$C_{35}H_{60}O_6$	29.690	19.439	18.470	0.973（草果）
MOL000093	daucosterol	$C_{35}H_{60}O_6$	29.690	19.439	18.470	0.973（草果）
MOL000193	9-*epi*-*β*-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	7.682	5.360	4.723	0.992（厚朴） 0.986（麻黄）
MOL005968	neoisodihydrocarveol acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	8.975	5.774	4.613	0.989（厚朴）
MOL005948	1，3，5- 三异丙基苯	$C_{15}H_{24}$	8.431	5.109	4.772	0.986（厚朴）
MOL000118	*α*- 松油醇	$C_{10}H_{18}O$	7.397	4.826	3.915	0.983（厚朴） 0.967（苦杏仁） 0.982（陈皮）
MOL000922	（*R*）-*p*-menth-1-en-4-ol	$C_{10}H_{18}O$	6.690	4.343	3.430	0.983（厚朴） 0.980（陈皮）
MOL000608	4- 萜烯醇	$C_{13}H_{20}O$	8.594	5.037	4.768	0.981（厚朴） 0.978（陈皮）
MOL003535	1，1，6- 三甲基 -1，2- 二氢萘	$C_{13}H_{16}$	14.535	9.651	8.208	0.977（厚朴）
MOL001556	isocaryophyllene	$C_{15}H_{24}$	19.292	12.901	12.290	0.988（苦杏仁） 0.986（麻黄） 0.983（生姜）
MOL002363	*β*- 紫罗兰酮	$C_{13}H_{20}O$	17.715	11.952	11.549	0.983（苦杏仁） 0.988（麻黄） 0.977（生姜）
MOL007207	衡州乌药碱	$C_{17}H_{19}NO_3$	15.405	10.024	8.821	0.979（苦杏仁）
MOL004908	光甘草定	$C_{20}H_{20}O_4$	8.975	5.774	4.613	0.964（苦杏仁） 0.990（甘草）
MOL006221	野黑樱苷	$C_{14}H_{17}NO_6$	13.828	9.059	8.240	0.963（苦杏仁）
MOL006312	guaiazulene	$C_{15}H_{18}$	11.000	7.092	6.677	0.992（麻黄）
MOL005110	香堇酮	$C_{13}H_{18}$	9.475	6.094	6.166	0.992（麻黄）
MOL010789	1，2- 二氢 -1，5，8- 三甲基萘	$C_{13}H_{16}$	9.422	6.198	5.681	0.991（麻黄）
MOL010742	2，3，4- 三甲基 -5- 苯基噁唑烷	$C_{12}H_{17}NO$	10.129	6.698	5.993	0.990（麻黄）
MOL001772	二氢 -*β*- 紫罗兰酮	$C_{13}H_{22}O$	10.768	6.432	6.436	0.988（麻黄） 0.985（生姜）
MOL010787	反式 -*β*- 紫罗兰酮	$C_{13}H_{20}O$	10.768	6.432	6.436	0.987（麻黄）
MOL011855	schizonol	$C_{10}H_{16}O_2$	9.353	5.410	5.868	0.987（麻黄）

续表 2

MOL 编号	成分名称	分子式	MCI			MCI 相似度及来源
			0 阶	1 阶	2 阶	
MOL003573	A- 二去氢菖蒲烯	$C_{15}H_{20}$	11.000	7.092	6.708	0.986（麻黄）
MOL003594	2- 甲基 -5-（2- 丙烯基）-2- 环己烯 -1- 醇乙酸酯	$C_{12}H_{18}O_2$	10.715	6.503	6.184	0.984（麻黄）
MOL003520	*β*-damascenone	$C_{13}H_{18}O$	10.768	6.487	6.150	0.984（麻黄）
MOL000677	（＋）- 菖蒲烯	$C_{15}H_{22}$	11.000	7.092	6.708	0.984（麻黄）
MOL002526	*α*- 布藜烯	$C_{15}H_{24}$	11.000	7.092	6.677	0.983（麻黄） 0.979（生姜）
MOL002207	新蛇床内酯	$C_{12}H_{18}O_2$	9.966	6.826	5.727	0.983（麻黄）
MOL010780	麻黄嗯唑酮	$C_{11}H_{13}NO_2$	10.129	6.698	5.993	0.982（麻黄）
MOL010766	3- 甲基菲	$C_{15}H_{12}$	10.251	7.343	6.628	0.980（麻黄）
MOL002092	2，4- 二叔丁基酚	$C_{14}H_{22}O$	11.259	7.223	5.675	0.979（葶苈子）
MOL001760	*β*-*D*-Glucopyranose，1-thio-，1-[（1*E*，3*E*）-*N*-（sulfooxy）-3-butenimidate]，potassium salt（1：1）	$C_{10}H_{17}NO_9S_2 \cdot K$	6.690	4.326	3.534	0.968（葶苈子）
MOL000295	alexandrin	$C_{35}H_{60}O_6$	11.853	6.621	7.826	0.963（葶苈子）
MOL003907	erysimoside	$C_{35}H_{52}O_{14}$	9.845	6.223	4.941	0.953（葶苈子）
MOL003905	毒毛花苷 K	$C_{36}H_{54}O_{14}$	16.723	10.918	10.228	0.953（葶苈子）
MOL003913	helveticoside	$C_{29}H_{42}O_9$	15.598	10.308	7.252	0.952（葶苈子）
MOL002035	山柰酚 7-*O*- 葡萄糖苷	$C_{21}H_{20}O_{11}$	15.598	10.308	7.252	0.947（葶苈子）
MOL000300	ergosta-7，9（11），24（28）-trien-21-oic acid，3-hydroxy-4，4-dimethyl-，（3*α*，5*β*）-	$C_{30}H_{45}O_3$	8.853	5.113	4.112	0.996（茯苓）
MOL000298	麦角固醇	$C_{28}H_{44}O$	12.768	7.390	6.398	0.968（茯苓）
MOL000279	啤酒甾醇	$C_{28}H_{46}O_3$	12.577	8.041	7.345	0.966（茯苓）
MOL002524	（－）-*β*- 榄香烯	$C_{15}H_{24}$	8.975	5.774	4.613	0.987（藿香）
MOL000204	*cis*-*β*-elemene diastereomer	$C_{15}H_{24}$	12.724	7.032	8.381	0.986（藿香）
MOL003937	*γ*- 杜松烯	$C_{15}H_{24}$	10.008	6.058	5.494	0.983（藿香）
MOL002835	（±）-*δ*- 杜松烯	$C_{15}H_{24}$	18.845	12.532	10.823	0.983（藿香）
MOL005899	*γ*-himachalene	$C_{15}H_{24}$	14.983	10.080	9.289	0.981（藿香）
MOL001606	valencene	$C_{15}H_{24}$	17.430	11.456	10.397	0.981（藿香）
MOL000035	*β*- 桉叶烯	$C_{15}H_{24}$	16.723	10.918	10.206	0.981（藿香）
MOL005895	*rel*-（1*R*，2*S*，5*S*，6*S*，10*R*）-3-（1-methylethyl）tricyclo [4.3.1.12，5] undec-3-en-10-ol	$C_{14}H_{22}O$	18.845	12.532	10.801	0.980（藿香）
MOL000170	反式 -*β*- 愈创木烯	$C_{15}H_{24}$	16.560	11.045	9.867	0.976（藿香）
MOL002850	2，6- 二叔丁基 -4- 甲基苯酚	$C_{15}H_{24}O$	8.431	5.109	4.772	0.993（甘草）
MOL004823	licoagropin	$C_{22}H_{24}O_2$	5.983	3.805	3.239	0.991（甘草）
MOL004833	phaseolinisoflavan	$C_{20}H_{20}O_4$	5.983	3.788	3.365	0.989（甘草）
MOL004978	4'-*O*-methylglabridin	$C_{21}H_{22}O_4$	8.483	4.999	5.323	0.989（甘草）
MOL005003	licoagrocarpin	$C_{21}H_{22}O_4$	16.305	10.770	7.839	0.989（甘草）
MOL004974	3'- 甲氧基光甘草定	$C_{21}H_{22}O_5$	13.974	10.293	9.829	0.989（甘草）
MOL004966	3'- 羟基 -4'-*O*- 甲基光甘草定	$C_{21}H_{22}O_5$	30.618	19.903	18.633	0.989（甘草）
MOL004874	甘草宁 V	$C_{19}H_{20}O_4$	11.268	6.828	7.608	0.988（甘草）
MOL004872	甘草宁 T	$C_{24}H_{30}O_5$	22.499	14.570	14.738	0.988（甘草）
MOL004911	光甘草素	$C_{20}H_{18}O_4$	8.552	5.788	5.194	0.987（甘草）
MOL004811	粗毛甘草素 C	$C_{21}H_{24}O_5$	13.828	9.059	8.240	0.987（甘草）
MOL004812	粗毛甘草素 D	$C_{22}H_{26}O_5$	13.405	9.131	8.571	0.987（甘草）
MOL004891	shinpterocarpin	$C_{20}H_{18}O_4$	7.776	4.495	5.019	0.987（甘草）
MOL000209	（1*R*，3a*R*，4*R*，7*R*）-1，2，3，3a，4，5，6，7-octahydro-1，4-dimethyl-7-（1-methylethenyl）azulene	$C_{15}H_{24}$	11.121	7.792	7.005	0.986（生姜）
MOL000169	*α*- 愈创木烯	$C_{15}H_{24}$	45.341	29.785	29.308	0.985（生姜）
MOL003393	*β*- 愈创木烯	$C_{15}H_{24}$	15.665	10.062	8.344	0.981（生姜）
MOL004581	myrtenyl acetate	$C_{12}H_{18}O_2$	14.795	9.668	7.710	0.980（生姜）
MOL012774	4-[（1*R*）-2，6，6-trimethyl-2-cyclohexen-1-yl]-2-butanone	$C_{13}H_{22}O$	14.795	9.668	7.710	0.980（生姜）
MOL010947	*cis*-calamenene	$C_{15}H_{22}$	10.552	6.630	5.796	0.979（生姜）

续表 2

MOL 编号	成分名称	分子式	MCI			MCI 相似度及来源
			0 阶	1 阶	2 阶	
MOL000615	（＋）-δ- 杜松烯	$C_{15}H_{24}$	19.811	12.922	11.250	0.978（生姜）
MOL000474	caryophyllene oxide	$C_{15}H_{24}O$	17.079	11.062	9.051	0.977（生姜）
MOL000696	β- 松油醇	$C_{10}H_{18}O$	14.276	9.542	9.120	0.977（陈皮）
MOL002138	*p*-cymen-8-ol	$C_{10}H_{14}O$	15.853	10.490	9.819	0.977（陈皮）
MOL002944	（*E*）-linalol pyranoxide	$C_{10}H_{18}O_2$	22.706	15.001	12.270	0.974（陈皮）

2.3 《诊疗方案》中高频抗 COVID-19 中药各类成分 0 ～ 8 阶平均 MCI 及 MCI 相似度分析

通过公式计算高频抗 COVID-19 中药各类成分 0 ～ 8 阶平均 MCI，见表 3。在 12 味高频抗 COVID-19 中药中，黄酮 0 ～ 8 阶平均 MCI 大小排序前三为赤芍＞甘草＞葶苈子，有机酸 0 ～ 8 阶平均 MCI 大小排序前三为茯苓＞广藿香＞苍术，萜类 0 ～ 8 阶平均 MCI 大小排序前三为茯苓＞赤芍＞草果，甾体 0 ～ 8 阶平均 MCI 大小排序前三为甘草＞葶苈子＞赤芍，糖及苷类 0 ～ 8 阶平均 MCI 大小排序前三为茯苓＞甘草＞赤芍，酚类 0 ～ 8 阶平均 MCI 大小排序前三为广藿香＞赤芍＞甘草。

表 3 《诊疗方案》高频抗 COVID-19 中药各类成分 0 ～ 8 阶 MCI 平均值统计

Tab 3　Mean MCI at 0 ～ 8 order of components of the traditional Chinese medicine with high frequency for COVID-19

中药	黄酮	有机酸	萜类	甾体	苯丙素	生物碱	糖及苷类	酚类	其他类 *
苍术	3.077	5.531	2.813	3.847	—	—	4.074	2.752	3.913
赤芍	4.964	1.771	4.357	4.337	—	1.068	4.447	3.510	2.461
草果	2.787	3.022	3.478	2.479	—	—	2.645	2.871	1.637
厚朴	0.279	1.860	1.134	1.027	0.862	—	—	1.133	1.601
苦杏仁	0.732	2.417	1.758	3.604	1.000	2.133	1.473	1.473	1.937
麻黄	1.394	1.706	1.265	1.706	2.013	1.208	2.247	1.566	1.583
葶苈子	3.394	1.591	—	6.109	—	3.406	1.364	2.422	1.541
茯苓	—	7.111	5.487	3.727	—	6.097	7.529	—	8.085
广藿香	2.573	5.974	2.628	—	—	3.216	2.056	4.044	2.909
甘草	3.819	2.905	3.371	6.196	2.619	3.873	4.503	3.335	3.667
生姜	1.607	1.995	1.434	1.107	0.605	2.103	2.056	2.085	2.283
陈皮	1.976	0.819	1.280	1.262	0.594	0.957	2.046	0.686	1.775

注（Note）：* 主要指小分子烷烃、烯烃、酯类、醚类（*mainly refers of small molecular alkanes，alkenes，esters，ethers）。

《诊疗方案》中高频抗 COVID-19 中药成分群 0 ～ 8 阶 MCI 相似度结果见图 1，黄酮、有机酸、萜类、甾体、苯丙素、生物碱、糖及苷类、酚类与总成分之间的相似度分别在 0.754 ～ 1.000，0.853 ～ 0.999，0.932 ～ 1.000，0.748 ～ 0.996，0.764 ～ 0.975，0.685 ～ 0.997，0.820 ～ 0.998，0.787 ～ 1.000。

2.4 《诊疗方案》中高频抗 COVID-19 中药 CI 分析

《诊疗方案》高频抗 COVID-19 中药各类成分 0～8阶 CI 值分析见表4，苍术、赤芍和甘草 0～8 阶 CI 及 CI 平均值较为接近，0 ～ 8 阶 CI 平均值分别为 3.662、3.319、3.698；草果、葶苈子和广藿香 0 ～ 8 阶 CI 及 CI 平均值较为接近，0 ～ 8 阶 CI 平均值分别为 2.723、2.426、2.752；厚朴、苦杏仁、麻黄、生姜和陈皮 0 ～ 8 阶 CI 及 CI 平均值较为接近，0 ～ 8 阶 CI 平均值分别为 1.378、1.947、1.495、1.735、1.517。

对表 4 内的数据进行聚类分析，结果见图 2。如图所示，12味中药可以较好的分为4组，麻黄、陈皮、厚朴、苦杏仁和生姜分为一组（1 组），草果、广藿香和葶苈子分为一组（2 组），赤芍、甘草和苍术分为一组（3 组），茯苓单独为一组（4 组）；2 组和 3 组也可以进一步聚为一类。

3　讨论

本文计算了高频抗 COVID-19 中药成分 0 ～ 8 阶 MCI 和 MCI 矩阵相似度，筛选出 MCI 相似度高的有 86 个成分，其中相似度高的成分包括 β- 桉叶醇、β- 石竹烯、山柰酚 7-*O*- 葡萄糖苷、β- 谷甾醇和豆甾醇等。药理研究显示，β- 桉叶醇具有抗炎、镇静、镇痛等药理作用[12]，通过 p38 丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）和核因子活化 B 细胞 κ 轻链增强子（NF-κB）通路对抗肥大细胞介导的炎症反应[13]，同时有抑制新型冠状病毒活性的作用[14]。β- 石竹烯具有抗炎、局麻、抗焦虑等药理作用[15]，还可作为新型冠状病毒 SARS-CoV-2 蛋白酶抑制剂[16]。山柰酚 7-*O*- 葡萄糖苷

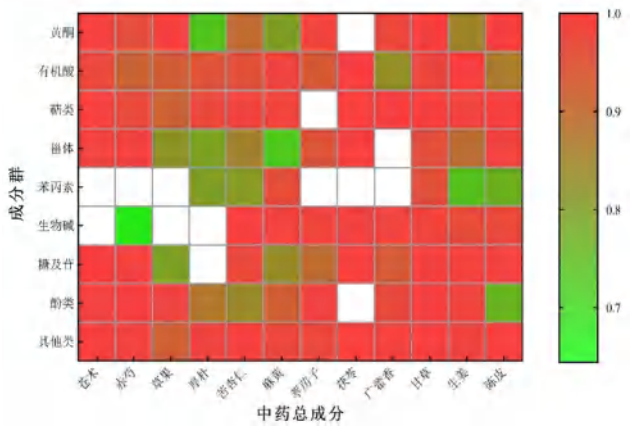


图 1 《诊疗方案》高频抗 COVID-19 中药各类成分与总成分的 MCI 相似度的热图分析

Fig 1　Heat map analysis of MCI similarity between components and total components for the traditional Chinese medicines against COVID-19 with high frequency in ‘Diagnosis and treatment plan’

具有抗氧化、抗炎、抗菌等[17-19]药理作用，*β*- 谷甾醇具有抗菌、抗炎、抗氧化等[20]药理活性，豆甾醇具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化等[21]药理活性，山柰酚 7-*O*- 葡萄糖苷的苷元及*β*- 谷甾醇和豆甾醇是化湿败毒方的主要活性成分，涉及肿瘤坏死因子（TNF）、磷脂酰肌醇 3- 激酶（PI3K）- 蛋白激酶 B（Akt）、MAPK 等信号通路[22]；它们也是柴苓汤中与血管紧张素转化酶Ⅱ亲和力最高的前三位候选药物[23]。光甘草定[24]具有抗炎、抗氧化、神经保护等药理活性，野黑樱苷[25]是清肺排毒汤主要的有效成分，它们也可作为潜在的抗 COVID-19 活性药物，潜在靶点为白细胞介素（IL）-6、MAPK1、MAPK8、IL-1*β* 和 NF-*κ*B 的 p65 亚单位（RELA）[26]，涉及 TNF、Toll 样受体（TLR）、缺氧诱导因子 -1（HIF-1）等信号通路。

表 4 《诊疗方案》高频抗 COVID-19 中药各类成分 0 ～ 8 阶 CI 值分析

Tab 4　CI at 0 ～ 8 order of components of the traditional Chinese medicine with high frequency for COVID-19

药材	0 阶 CI	1 阶 CI	2 阶 CI	3 阶 CI	4 阶 CI	5 阶 CI	6 阶 CI	7 阶 CI	8 阶 CI	0 ～ 8 阶 CI 平均值
苍术	3.607	2.272	2.190	2.295	2.584	2.988	3.512	4.163	9.345	3.662
赤芍	3.756	2.373	2.078	2.090	2.286	2.659	3.270	4.066	7.289	3.319
草果	3.406	2.121	1.903	1.875	1.976	2.160	2.415	2.712	5.935	2.723
厚朴	2.378	1.461	1.230	1.094	1.056	1.047	1.081	1.073	1.984	1.378
苦杏仁	3.466	2.221	1.743	1.457	1.330	1.328	1.428	1.621	2.929	1.947
麻黄	2.543	1.566	1.308	1.152	1.101	1.099	1.155	1.224	2.310	1.495
葶苈子	3.422	2.176	1.768	1.625	1.641	1.794	2.054	2.462	4.891	2.426
茯苓	5.047	3.102	2.988	3.221	3.790	4.664	5.890	7.657	14.959	5.702
广藿香	3.098	1.912	1.759	1.788	1.963	2.274	2.676	3.165	6.132	2.752
甘草	4.226	2.612	2.383	2.391	2.579	2.970	3.567	4.380	8.177	3.698
生姜	2.581	1.572	1.395	1.290	1.298	1.345	1.461	1.544	3.126	1.735
陈皮	2.635	1.590	1.320	1.168	1.115	1.103	1.138	1.174	2.408	1.517

中药材成分群往往是同一母核的多成分衍生物类，其药理作用有规律可循，MCI 相似度（成分群与总成分相似度）高则表示成分群的作用趋势与整体成分一致；反之则表示作用趋势相对独立，那么相似度高的成分可能为中药的质量标志物。

MCI 相似度（总成分群和总成分）高的成分群包括有机酸、萜类、其他类，有机酸类，例如广藿香的酚酸类有抗病毒的活性[27]，葶苈子的异硫氰酸、酚酸类和脂肪酸等活性成分具有止咳祛痰和抗炎活性[28]。香草酸、原儿茶酸、迷迭香酸、丁香酸、没食子酸等有机酸类成分均可作为潜在的治疗 COVID-19 的药物[29-31]。萜类如苍术的*β*- 桉叶醇、苍术醇、苍术酮等成分具有抗病毒的活性[32]。赤芍的芍药内酯苷、芍药苷等单萜苷类成分可作为赤芍清热凉血、散瘀止痛的质量标志物（Q-marker）[33]，茯苓的茯苓酸等三萜类成分是其发挥利水渗湿、安神定志、止渴化痰功效的 Q-marker[34]。甘草酸、甘草次酸等三萜类化合物可作为甘草解毒、祛痰、止痛的 Q-marker，其中甘草酸可作为新的抗 COVID-19 的药物[35-36]。其他类，如生姜的挥发油（姜精油、姜醇、姜油树脂）和二苯基庚烷类成分有抗炎镇痛、提高免疫的功效[37]，陈皮的挥发油能止咳平喘[38]。有机酸类、萜类重要靶点为环氧合酶 1、人酪氨酸激酶蛋白、一氧化氮合酶、聚 [ADP- 核糖] 聚合酶 1 等，多调控抗病毒通路、抗炎通路、免疫通路和神经中枢通路[39]。

MCI 高相似度的成分群其次是糖及苷类、黄酮、酚类，然后是生物碱、甾体成分。糖及苷类如葶苈子的糖及苷类成分（强心苷类、硫苷类）等活性成分具有较好的止咳平喘、强心和抗炎活性[28，40]，茯苓多糖是茯苓发挥利水渗湿、安神定志、止渴化痰等传统功效的 Q-marker[34]，苦杏仁苷等苷类成分是苦杏仁发挥止咳平喘、抗炎等

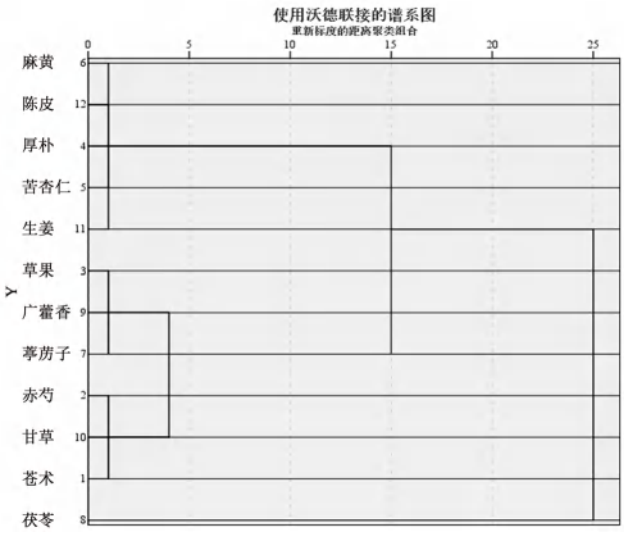


图 2 《诊疗方案》高频抗 COVID-19 中药各类成分 0 ～ 8 阶平均 MCI 聚类分析

Fig 2　Cluster analysis of 0 ～ 8 order MCI average values for the components of traditional Chinese medicines against COVID-19 with high frequency in ‘ Diagnosis and treatment plan’

药效作用的指标性成分 [41]。黄酮类成分如广藿香的黄酮类具有较好的抗病毒活性 [27]。甘草的甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、光甘草定和查耳酮 A 等黄酮类作为甘草抗炎、抗病毒、调节免疫等药理活性的物质基础 [35，42]。生姜的姜辣素（姜黄酮、姜酚、姜烯酮）有抗炎镇痛、提高免疫的功效 [37]。赤芍的山柰酚、山柰酚 -3，7- 二 -*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷、二氢芹菜素等黄酮类化合物可作为赤芍活血化瘀的物质基础 [43]。陈皮的柚皮素和陈皮素等黄酮类成分与 SARS-CoV-2 C30 内肽酶、SARS-CoV-2 主要蛋白酶和血管紧张素转化酶Ⅱ受体有结合潜力，通过抗病毒、抗炎、调控细胞凋亡、调节免疫等途径，发挥抑制肺纤维化的作用 [44]。酚类物质如厚朴的厚朴酚、和厚朴酚等酚性化合物具有明显的抗炎、镇痛、抗病原微生物等药理活性 [45]。赤芍的 1，2，3，4，6- 五没食子酰基葡萄糖（PGG），丹皮酚，原儿茶酸等酚类物质有抗血栓作用 [43，46]。Elmi 等 [47] 研究表明槲皮素、儿茶素、芦丁、山柰酚等黄酮多酚化合物对 SARS-CoV-2 主蛋白酶、SARS-CoV-2 受体结合结构域、人型弗林蛋白酶这三个靶点有很好的亲和力。生物碱类如麻黄的麻黄碱类生物碱类成分具有发汗、平喘、利尿作用 [48]。甾体类如麻黄和生姜的 *β*- 谷甾醇、谷甾醇可能为抑制 SARS-CoV-2 的主要成分 [49]。

中药多成分是一个有机整体，CI 反映了中药多成分体系特征。通过对 CI 值进行聚类分析，可以得到治疗 COVID-19 潜在的药对配伍，为临床用药提供依据。CI 聚类分析结果表明，12 味高频抗 COVID-19 中药可以很好地分为 4 类：其中组 2（草果、葶苈子和广藿香）与组 3（苍术、赤芍和甘草）可以进一步聚为一类，组 1（厚朴、苦杏仁、麻黄、生姜和陈皮）与组 2、组 1 与组 3 之间 CI 值具有较大差异。通过进一步分析各组中药的配伍规律，可以提炼出“厚朴 - 苦杏仁 - 麻黄 - 生姜 - 陈皮”复方、“草果 - 葶苈子 - 广藿香”复方和“赤芍 - 甘草 - 苍术”复方，从 CI 聚类分析的角度反映高频抗 COVID-19 中药的用药与配伍特点。这可为中医药治疗疫病提供资料及依据。

组 1 中药主要作用在肺、脾胃、大肠部位，功效以辛温解表、理气止咳为主。麻黄厚朴汤由厚朴、麻黄、杏仁、陈皮、生姜、甘草和半夏组成，其中组 1 中药是麻黄厚朴汤的重要组成。该方主治“咳而脉浮”者，对缓解患者咳嗽、咳痰的症状有积极的作用 [50]。方中厚朴为君药，能降肺气，而麻黄解表散寒为臣药，苦杏仁化痰并助厚朴降气平喘，生姜辛温以助通降肺气，陈皮理气健脾，调中。有研究表明麻黄能通过减轻细胞因子风暴，缓解患者由于细胞因子风暴所导致的急性呼吸窘迫综合征和多器官衰竭的症状 [51]。苦杏仁能抑制肺部炎症以减少肺上皮分泌并预防肺阻塞 [52]。陈皮可能通过抗病毒、抗炎、调控细胞凋亡、调节免疫等途径，发挥抑制肺纤维化的作用 [44]。麻黄常配伍苦杏仁，代表方如麻杏石甘汤，是抗病毒的基础方剂。厚朴与苦杏仁配伍使厚朴酚、和厚朴酚和苦杏仁苷在大鼠体内吸收均增加 [53]，生姜 - 陈皮药对配伍前后可提高指标性成分的含量 [54]，这与厚朴 - 苦杏仁、生姜 - 陈皮配伍发挥协同作用是一致的。

组 2 中药主要作用在肝、肺、脾胃部位，功效以化湿行气，泻下为主。组 2 的草果常配伍藿香以芳香化湿，治疗中焦湿浊不化 [55]，代表方如草果饮（治脾寒疟疾）、木香流气饮（诸气痞滞不通、喘急咳嗽）；咸味药葶苈子和辛味药藿香、草果配伍能从“咸辛泻肺脾”的角度治疗 COVID-19，这符合“汤液经法图”的配伍规律 [56]。此外，组 2 中的藿香芳香化浊，和中止呕，是藿香正气散的君药，该方适用于 COVID-19 患者湿温初起，发热倦怠，乏力伴胃肠不适的症状 [57]。葶苈子是葶苈大枣泻肺汤的君药，用于泄肺去痰、利水平喘，治疗肺痈，通过抑制细胞因子风暴和炎症损伤治疗 COVID-19[58]。通过对藿香正气散、葶苈大枣泻肺汤和麻杏石甘汤等方剂的合并重组得到了抗 COVID-19 复方化湿败毒方。

组 3 中药也作用在肝、肺、脾胃部位，功效

主要为清热化痰、活血止痛、补气。组 3 的苍术常常配伍甘草[59]，代表方如平胃散（功效为燥湿运脾，行气和胃），平胃散中的苍术燥湿运脾为君药，甘草为使药，甘草能助脾运化，调和诸药，益气健脾和中。研究表明，平胃散合并麻杏石甘汤对 COVID-19 有良好的疗效[60]；组 3 的苍术、赤芍是苍术芍药汤的重要组成，该方能治痢疾痛甚者；组 3 的赤芍、甘草组成芍药甘草汤，赤芍养血敛阴，柔肝止痛；甘草健脾益气，缓急止痛，两者配伍发挥调和肝脾，缓急止痛的作用。他们对于 COVID-19 患者“血瘀”“气虚”的症状也能有一定的作用，有学者研究表明，赤芍有效降低血黏度，抑制 D- 二聚体水平上升，进而改善 COVID-19 患者“血瘀”情况[61-62]。甘草可增强患者免疫力，预防肺纤维化[63]。因此，综合组 3 三味药材的两两配伍组方功效，可以挖掘出“赤芍 - 甘草 - 苍术”复方是潜在的治疗 COVID-19 的复方。

4　结论

本研究建立了基于 MCI 的抗 COVID-19 中药的物质基础研究方法，并应用这一方法于治疗 COVID-19 的药物筛选研究中，结合已有文献研究，笔者发现抗 COVID-19 作用显著的成分（群）以及潜在的抗 COVID-19 复方。中药通常以复方的形式治疗 COVID-19，而中药复方治疗 COVID-19 的物质基础尚未得到充分的阐明，中药新靶点的发现（中药复方是否作用于与西药不同的新靶点）、药物网络代谢动力学（中药如何通过多成分 - 多靶点发挥作用）、中药方剂的配伍原理及中药药理学等领域是中医药现代化的亟需突破的地方。接下来我们会结合药物网络代谢动力学、中药配伍、中药药理来探讨抗 COVID-19 中药（复方）的物质基础，阐明中药有效成分群在人体的网络代谢规律及协同作用，揭示中药作用的物质基础，再根据这些研究基础开发新型的治疗 COVID-19 的药物。

参考文献

[1] 国家卫生健康委办公厅，国家中医药管理局办公室 . 关于印发新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案（试行第八版）的通知 [EB/OL].（2020-08-18）[2021-04-16]. www. gov. cn/zhengce/zhengceku/2021-04/15/content_5599795. html.

[2] 邓卫宁，王利娜，崔艳丽 . 抗新型冠状病毒肺炎药物靶点的研究进展 [J]. 现代药物与临床，2020，35（3）：401-404.

[3] Kier LB，Hall LH，Murray WJ，et al. Molecular connectivity. 1. relationship to nonspecific local anesthesia [J]. J Pharm Sci，1975，64（12）：1971-1974.

[4] Avram S，Buiu C，Duda-Seiman D，et al. Evaluation of the pharmacological descriptors related to the induction of antidepressant activity and its prediction by QSAR/QRAR methods [J]. Mini-Rev Med Chem，2012，12（6）：467-476.

[5] Milicevic A，Sinko G. Development of a simple QSAR model for reliable evaluation of acetylcholinesterase inhibitor potency [J]. Eur J Pharm Sci，2021，160：105757.

[6] Kier LB，Hall LH. Molecular connectivity in chemistry and drug research [M]. Massachusetts：Academic Press Inc，1976：16-22.

[7] Liu W，Zhang X，Fani S，et al. A novel concept of Q-markers：molecular connectivity index [J]. Phytomedicine，2018，45：36-40.

[8] 陈思阳，王韧，李文姣，等 . 治疗脑梗死类药物结构拓扑指数与脑梗死面积关联性的研究 [J]. 中国药学杂志，2019，54（16）：1305-1310.

[9] 范诗琪，李森，刘金玲，等 . 基于分子连接性指数探归肝经中药成分“印迹模板”的特征 [J]. 中国中药杂志，2017，42（2）：390-395.

[10] Estrada E. Physicochemical interpretation of molecular connectivity indices [J]. J Phys Chem A，2002，106（39）：9085-9091.

[11] 潘雪，樊启猛，余格，等 . 基于超分子“印迹模板”特性的中药质量标志物研究模式的思考 [J]. 中草药，2019，50（19）：4569-4575.

[12] 张明发，沈雅琴 . 苍术抗炎、抗肿瘤和免疫调节作用的研究进展 [J]. 药物评价研究，2016，39（5）：885-890.

[13] Seo M，Kim S，Kang T，et al. The regulatory mechanism of β-eudesmol is through the suppression ofcaspase-1 activation in mast cell-mediated inflammatory response [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol，2011，33（1）：178-185.

[14] Aanouza I，Belhassan A，El-Khatabi K，et al. Moroccan medicinal plants as inhibitors against SARS-CoV-2 main protease：computational investigations [J]. J Biomol Struct Dyn，2021，39（8）：2971-2979.

[15] 刘晓宇，陈旭冰，陈光勇 .β- 石竹烯及其衍生物的生物活性与合成研究进展 [J]. 林产化学与工业，2012，32（1）：104-110.

[16] Narkhede R，Pise A，Cheke R，et al. Recognition of natural products as potential inhibitors of COVID-19 main protease（Mpro）：in-silico evidences [J]. Natur Prod Bioprosp，2020，10：297-306.

[17] Tchabo W，Ma Y，Kwaw E，et al. Impact of extraction parameters and their optimization on the nutraceuticals and antioxidant properties of aqueous extract mulberry leaf [J]. Int J Food Prop，2018，21（1）：717-732.

[18] Lee S，Shin J，Han H，et al. Kaempferol 7-*O*-β-*D*-glucoside isolated from the leaves of Cudrania tricuspidata inhibits LPS-induced expression of pro-inflammatory mediators through inactivation of NF-κB，AP-1，and JAK-STAT in RAW 264.7 macrophages [J]. Chem-Biol Interact，2018，284：101-111.

[19] Tofighi Z，Molazem M，Doostdar B，et al. Antimicrobial activities of three medicinal plants and investigation of flavo-

noids of Tripleurospermum disciforme [J]. Iran J Pharm Res，2015，14（1）：225-231.
[20] 陈元堃，曾奥，罗振辉，等 .β- 谷甾醇药理作用研究进展 [J]. 广东药科大学学报，2021，37（1）：148-153.
[21] 周志远，卢群，刘洋，等 . 豆甾醇的研究及开发进展 [J]. 中国当代医药，2015，22（24）：15-17.
[22] Tao Q，Du J，Li X，et al. Network pharmacology and molecular docking analysis on molecular targets and mechanisms of Huashi Baidu formula in the treatment of COVID-19 [J]. Drug Dev Ind Pharm，2020，46（8）：1345-1353.
[23] Yang L，Li Y，Miao J，et al. Network pharmacology studies on the effect of Chai-Ling decoction in coronavirus disease 2019 [J]. Tradit Med Res，2020，5（3）：145-159.
[24] 赵焱，张利鹏 . 光甘草定生物学活性研究进展 [J]. 国际中医中药杂志，2015，37（9）：860-864.
[25] 刘伟，葛广波，王永丽，等 . 基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术研究清肺排毒汤化学成分及小鼠组织分布 [J]. 中草药，2020，51（8）：2035-2045.
[26] Xia S，Zhong Z，Gao B，et al. The important herbal pair for the treatment of COVID-19 and its possible mechanisms [J]. Chin Med-Uk，2021，16（1）：25.
[27] 马川，彭成，李馨蕊，等 . 广藿香化学成分及其药理活性研究进展 [J]. 成都中医药大学学报，2020，43（1）：72-80.
[28] 徐明，张静，邱建平，等 . 葶苈子的炮制历史沿革及其药理作用研究进展 [J]. 中医药导报，2021，27（10）：132-137.
[29] Elsbaey M，Ibrahim MAA，Bar FA，et al. Chemical constituents from coconut waste and their in silico evaluation as potential antiviral agents against SARS-CoV-2 [J]. S Afr J Bot，2021，141：278-289.
[30] Kumar VR，Garg R，Kumar M，et al. Queen of herbs Tulsi（Ocimum Sanctum）immunomodulatory activities and systemic symptomatic treatment of novel coronavirus（COVID-19）[J]. Int J Pharm Pharm Sci，2020，9（11）：490-495.
[31] Rathinavel T，Meganathan B，Kumarasamy S，et al. Potential COVID-19 drug from natural phenolic compounds through in silico virtual screening approach [J]. Biointerface Res App，2021，11（3）：10161-10173.
[32] 庄丹，秦靖，王慧阳，等 . 苍术的药效成分研究进展 [J]. 生物加工过程，2021，19（3）：306-313.
[33] 王倩，李柳潼，马永犇，等 . 白芍与赤芍化学成分和药理作用比较研究及质量标志物的预测分析 [J]. 中国新药杂志，2021，30（12）：1093-1098.
[34] 邓桃妹，彭代银，俞年军，等 . 茯苓化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中草药，2020，51（10）：2703-2717.
[35] 李娜，张晨，钟赣生，等 . 不同品种甘草化学成分、药理作用的研究进展及质量标志物（Q-Marker）预测分析 [J]. 中草药，2021，52（24）：7680-7692.
[36] 葛孚晶，曾晨鸣，严芳洁，等 . 甘草酸：一种治疗新型冠状肺炎的潜在药物 [J]. 药学学报，2021，56（5）：1211-1216.
[37] 王欢欢，孔巧丽，郭琴，等 . 生姜的古代文献沿革分析及现代药理研究进展 [J]. 中药新药与临床药理，2021，32（10）：1582-1590.
[38] 李皓翔，梅全喜，赵志敏，等 . 陈皮广陈皮及新会陈皮的化学成分药理作用和综合利用研究概况 [J]. 时珍国医国药，2019，30（6）：1460-1463.
[39] 罗晶，殷宁，黄小英，等 . 芳香中药防治新型冠状病毒肺炎作用机制探究 [J]. 江西中医药大学学报，2020，32（3）：66-73.
[40] 孙凯，李铣 . 葶苈子化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 中草药，2002，33（7）：100-102.
[41] 赵玉升，胡杰，吴佳姝，等 . 苦杏仁炮制方法及药理作用研究进展 [J]. 中医药导报，2021，27（3）：175-180.
[42] 邓桃妹，彭灿，彭代银，等 . 甘草化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的探讨 [J]. 中国中药杂志，2021，46（11）：2660-2676.
[43] 吴玲芳，王子墨，赫柯芊，等 . 赤芍的化学成分和药理作用研究概况 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（18）：198-206.
[44] 崔琳琳，宋亚刚，苗明三 . 基于网络药理学和分子对接的陈皮干预 COVID-19 的可能机制 [J]. 中药药理与临床，2020，36（5）：28-33.
[45] 谭珍媛，邓家刚，张彤，等 . 中药厚朴现代药理研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（22）：228-234.
[46] 赵继荣，杨涛，赵宁，等 . 赤芍抗血栓物质基础及相关机制研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志，2021，28（3）：137-140.
[47] Elmi A，Sayem S，Ahmed M，et al. Natural compounds from Djiboutian medicinal plants as inhibitors of COVID-19 by in silico investigations [J]. Int J Curr Pharm Res，2020，12（4）：52-57.
[48] 张梦婷，张嘉丽，任阳阳，等 . 麻黄的研究进展 [J]. 世界中医药，2016，11（9）：1917-1921.
[49] 杜帅琳，王玉，张玲，等 . 基于网络药理学和分子对接探讨散寒化湿宣肺方抗新型冠状病毒活性化合物的初步研究 [J]. 中国中医急症，2020，29（12）：2069-2072.
[50] 李婷婷，徐庆，张建中 . 厚朴麻黄汤辅助治疗 COPD 加重期痰浊阻肺证疗效及对患者中医症候、血气指标和肺功能的影响 [J]. 四川中医，2021，39（11）：93-96.
[51] 宗阳，姚卫峰，居文政 . 基于细胞因子风暴和中医“湿毒犯肺”理论挖掘抗新型冠状病毒肺炎中药 [J]. 药学学报，2020，55（6）：1091-1097.
[52] 方克勇 . 苦杏仁苷对慢性阻塞性肺疾病小鼠肺组织上皮间质转化的作用及机制研究 [D]. 长春：吉林大学，2018.
[53] 王星晨，勾楠，郑东梅，等 . 基于药代动力学研究厚朴 - 苦杏仁配伍在大鼠体内的相互作用 [J]. 中南药学，2021，19（5）：808-813.
[54] 楚玉，张科卫，胡许欣，等 . 生姜 - 陈皮药对的 HPLC 指纹图谱及指标性成分研究 [J]. 中药材，2016，39（7）：1594-1597.
[55] 邱模炎，熊莉莉，王怡菲，等 . 草果古今应用考略及其

防治疫病作用[J]. 天津中医药，2020，37（9）：984-989.
[56] 金锐 . 从“汤液经法图”角度探讨中医治疗新型冠状病毒肺炎的组方配伍共性规律[J]. 中国医院用药评价与分析，2020，20（6）：645-647.
[57] 张玉，陈孝，张毕奎，等 . 新型冠状病毒肺炎临床合理用药专家共识[J]. 中国医院药学杂志，2020，40（6）：593-605.
[58] 刘京华，谭旺晓，王斯维，等 . 基于网络药理学探讨葶苈大枣泻肺汤治疗新型冠状病毒肺炎的作用机制[J]. 山东科学，2020，33（5）：1-13.
[59] 王贵民 . 李东垣脾胃病用药配伍的数据分析[J]. 中国中医药现代远程教育，2016，14（16）：61-63.
[60] 赖逸贵，李甜英，王强，等 . 运用《温热病指南集》风温理论诊治新型冠状病毒肺炎[J]. 陕西中医药大学学报，2020，43（4）：14-18.
[61] 王倩飞，王晨曦，梅建强，等 . 中医对新型冠状病毒肺炎 D- 二聚体升高的认识及防治[J]. 中华危重病急救医学，2020，32（5）：622-624.
[62] 车艳，徐林，姚健，等 . 血必净对肺挫伤患者 D- 二聚体及 C- 反应蛋白的影响[J]. 天津中医药，2016，33（12）：732-735.
[63] 朱元章，何志高，张明 . 中药防治新型冠状病毒肺炎（COVID-19）恢复期肺纤维化的作用[J]. 中成药，2021，43（8）：2224-2229.

（收稿日期：2021-11-26；修回日期：2022-03-11）

基于知信行模式的院外延伸药学服务对糖尿病患者用药依从性及血糖控制水平的影响

周君[1]，万树平[2*]（1. 常州市武进人民医院药学部，江苏　常州　213004；2. 常州市武进中医医院药学部，江苏　常州　213000）

摘要：目的　探究基于知信行模式的院外延伸药学服务对糖尿病患者用药依从性及血糖控制水平的影响。**方法**　自本院 2018 年 1 月—2020 年 1 月收治的 2 型糖尿病患者中选取符合纳入排除标准的患者 150 例，分为研究组、对照组，各 75 例，对照组行常规药学干预，研究组接受基于知信行模式的院外延伸药学服务。两组患者干预均持续 1 年。对比两组患者干预前后用药依从性及血糖控制水平变化，以及糖尿病相关知识、信念、行为变化。**结果**　研究组失访 1 例、退出 2 例，对照组失访 3 例、退出 2 例，其余患者均顺利完成研究。实施 1 年后，研究组用药依从性优良率较实施前提高，且高于对照组同期水平（$P < 0.05$）。实施 1 年后，两组患者 FPG、2 hPG、HbA1c 水平均较实施前下降，研究组实施 1 年后 FPG、2 hPG、HbA1c 水平低于对照组（$P < 0.05$）。实施 1 年后，两组患者糖尿病知信行调查表各项目评分及总分均较实施前升高，研究组实施 1 年后糖尿病知信行调查表各项目评分及总分均高于对照组（$P < 0.05$）。**结论**　基于知信行模式的院外延伸药学服务不仅能够提高糖尿病患者对血糖管理的知识、信念及行为，还可改善其用药依从性并提高血糖控制水平。

关键词：知信行模式；药学服务；糖尿病；依从性；血糖控制
中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1669-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.032

Effect of out-of-hospital pharmaceutical care on medication compliance and blood glucose control in diabetic patients based on knowledge-attitude-practice model

ZHOU Jun[1],WAN Shu-ping[2*] (1. *Department of Pharmacy*, *Changzhou Wujin People's Hospital*, *Changzhou Jiangsu* 213004; 2. *Department of Pharmacy*, *Changzhou Wujin Hospital of Traditional Chinese Medicine*, *Changzhou Jiangsu* 213000)

作者简介：周君，男，主管药师，主要从事医院药学研究，email：492527730@qq.com　*通信作者：万树平，男，副主任药师，主要从事医院药学与医院管理研究，email：wansp5289@163.com

Abstract: Objective To determine the influence of out-of-hospital pharmaceutical care on medication compliance and blood glucose control in diabetic patients based on knowledge-attitude-practice (KAP) model. **Methods** Totally 150 patients who were admitted to our hospital from January 2018 to January 2020 and met the inclusive criteria for type 2 diabetes were selected. They were divided into a study group and a control group, 75 patients in each group. The patients in the control group received routine pharmaceutical intervention, while those in the study group received out-of-hospital pharmaceutical service based on KAP model. Patient intervention in both groups lasted one year. The changes in medication compliance and blood glucose level as well as the changes in diabetes mellitus-related knowledge, belief and behaviors before and after the intervention were compared. **Results** One patient was lost to the follow-up and 2 withdrew from the study group, while 3 in the control group lost to the follow-up and 2 withdrew. All other patients completed the study. One year after the implementation, the excellent and good rate of medication compliance in the study group was improved compared with that before the implementation, higher than that of the control group in the same period ($P < 0.05$). The levels of FPG, 2 hPG and HbA1c in both groups were decreased compared with those before the implementation. The levels of FPG, 2 hPG and HbA1c in the study group were lower than those in the control group ($P < 0.05$). The scores and total scores of each item in the diabetes KAP questionnaire of the two groups were higher than those before the implementation. The scores and total scores of the study group were higher than those of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The out-of-hospital pharmaceutical care based on KAP model not only improves the knowledge, belief and behaviors of diabetic patients as to blood glucose management, but also improves their medication compliance.

Key words: knowledge-attitude-practice model; pharmaceutical service; diabete mellitus; compliance; blood glucose control

糖尿病是威胁人类生命健康的第三大疾病，目前，全球范围内糖尿病患者数量超过 4.15 亿，而我国糖尿病患者占全球患者总数的 1/3 以上，同时，随着我国经济的发展、老龄化的加剧与居民生活习惯的改变，我国糖尿病患者数量呈逐年上升趋势 [1]。与糖尿病严峻流行现状相对应的是我国较低的糖尿病控制率，流行病学调查结果显示，我国糖尿病患者糖化血红蛋白（HbA1c）达标率仅为 30% ～ 35%，血糖控制不良率高达 41.35%[2]。血糖控制不佳不仅是导致患者糖尿病相关并发症发生风险上升的重要危险因素，也是导致患者年诊疗次数增加、年医疗费用上涨的主要原因。因此，对于糖尿病患者而言，开展药学服务尤其是院外延伸药学服务以提高其用药依从性，是保证血糖控制效果的重要手段，在此基础上，结合知信行模式，自知识、信念、行为三个层次提高糖尿病患者自我管理能力，也是改善患者血糖控制水平的有效方法 [3-4]。本研究旨在明确基于知信行模式的院外延伸药学服务对糖尿病患者用药依从性及血糖控制水平的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料

筛选本院 2018 年 1 月—2020 年 1 月收治的 2 型糖尿病患者。纳入标准：① 参照我国 2 型糖尿病防治指南中相关标准，明确 2 型糖尿病诊断 [5]；② 接受 2 型糖尿病药物治疗或胰岛素治疗时长≥ 1 个月；③ 年龄≥ 18 岁；④ 意识清，能够良好配合研究；⑤ 居住于医院周边，能够满足≥ 1 年的随访需求。排除标准：① 合并严重肝肾功能不全；② 合并心脑血管、神经系统重大疾病；③ 合并意识障碍或精神异常；④ 合并 1 型糖尿病。共选取符合条件的患者 150 例，在征得其知情同意后，使用随机数字表法将患者分别纳入研究组、对照组，各 75 例，两组一般资料比较差异无统计学意义（$P > 0.05$），具有可比性，见表 1。本研究已征得本院医学伦理委员会审核批准（批准号：武医伦理委〔2020〕74 号）。

1.2 干预方法

两组患者均由同组内分泌科医师开具治疗处方，包括单用二甲双胍、单用胰岛素注射、二甲双胍联合胰岛素注射等。

表 1　患者一般临床资料比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Baseline clincal characteristics of patients ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	年龄 / 岁	病程 / 年	BMI/（kg・m^{-2}）	性别 [n（%）]	
					男	女
研究组	75	55.71±9.42	3.61±0.75	22.65±1.37	47（62.67）	28（37.33）
对照组	75	56.03±9.95	3.54±0.69	22.81±1.42	44（58.67）	31（41.33）
t/c^2		0.202	0.595	0.702	0.251	0.251
P		0.840	0.553	0.484	0.616	0.616

对照组接受常规药学服务：

① 用药合理性评估：根据患者个体情况及用药情况评估糖尿病处方的合理性，重点关注联合用药及药物相互作用，若发现不合理处方则交由内分泌科医师重新开具；② 用药指导：发放药物时同步向患者介绍用药方法及注意事项，嘱患者定期复查；③ 定期随访：通过电话随访或即时通信软件随访等模式，每季度随访 1 次，重点调查患者用药情况，随访时强调定期复查、遵医嘱用药的重要性，并建议患者重视血糖监测。

研究组在常规药学服务的基础上接受基于知信行模式的院外延伸药学服务：

① 知识服务：向患者详细介绍糖尿病的病因、症状、诊治、并发症、注意事项等相关知识，提高患者对疾病的认知，同时发放糖尿病宣传教育手册、视频等，嘱患者居家自行阅读或与他人分享，强化患者记忆；同时耐心讲解药学服务的内容、药师在用药管理中扮演的角色等，使患者逐步接受临床药师这一角色，并了解药学服务的重要性与必要性。此外，知识服务以电话沟通、微信推送等多种形式进行院外延伸，电话沟通频次≥ 1 次 / 月，微信推送≥ 1 条 / 周，以巩固患者对糖尿病、糖尿病用药及药学服务的认知。② 信念服务：通过语言鼓励、讲解成功病例等形式提高患者战胜糖尿病、有效血糖管理的信心，同时鼓励患者家属共同参与患者用药管理及血糖管理，帮助患者更好地控制血糖。此外，每月组织糖尿病患者血糖管理经验交流分享会≥ 1 次，嘱患者积极分享自身血糖控制的经验、心得，药师根据患者分享情况查漏补缺，同时及时纠正患者不良用药习惯及血糖控制思路。③ 行为服务：帮助患者建立健康的饮食食谱、运动计划，并建议患者建立用药记录手册、血糖记录手册、随访手册，鼓励患者自行记录每日运动情况、饮食情况、用药情况及血糖水平，以建立良好的自我血糖管理习惯。根据患者血糖控制情况设定门诊复诊周期，1 周～ 1 个月不等，每次复诊时药师根据患者自身记录情况及血糖水平，协助医师调整血糖管理用药方案。

两组药学服务均持续 1 年。

1.3　观察指标

分别于药学服务实施前、药学服务实施 1 年后，评价两组患者用药依从性、血糖控制水平变化，并比较两组患者糖尿病相关知识、信念、行为变化。用药依从性评价标准 [6]：① 有无忘记服药；② 有无未按剂量服药；③ 病情缓解时是否自行停药；④ 病情加重时是否自行停药；≥ 2 项为肯定回答则判定为依从性差，1 项肯定回答、0 项肯定回答分别判定为依从性良、优，依从性优良率＝（优＋良）/ 总例数 ×100%。血糖控制水平根据患者空腹血糖（FPG）、餐后 2 h 血糖（2 hPG）、HbA1c 水平变化予以分析。糖尿病相关知识、信念、行为变化调查采用自制糖尿病患者知信行调查表，知识调查表包括是否知晓空腹及餐后血糖正常范围、是否知晓糖尿病仅可控制不可根治等 7 项内容，知晓计 1 分，不知晓计 0 分，总分 0 ～ 7 分；信念调查表包括是否相信自己能够有效血糖管理、是否相信自己能够有效控制饮食等共 5 项内容，相信计 1 分，不相信计 0 分，总分 0 ～ 5 分；行为调查表包括是否定量进食、是否定期锻炼、是否每周监测血糖等共 6 项内容，肯定回答计 1 分，否定回答计 0 分，总分 0 ～ 6 分；知信行调查表总分越高则表明患者对糖尿病的知识了解、信念及健康行为越佳。

1.4　统计学分析

使用 SPSS 22.0 统计学软件分析本研究相关数据，计数资料以百分比表示，并采用卡方检验（χ^2 检验），计量资料均符合正态分布，以（平均数 ± 标准差）即（$\bar{x}\pm s$）表示，采用双侧 t 检验，当 $P < 0.05$ 时，认为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　研究完成情况

研究组失访 1 例、退出 2 例，对照组失访 3 例、退出 2 例，其余患者均顺利完成研究。

2.2　用药依从性

实施 1 年后，研究组用药依从性优良率较实施前提高，且高于对照组同期水平（$P < 0.05$）。见表 2。

表 2　研究组与对照组药学服务实施前后用药依从性变化比较

Tab 2　Medication compliance between the study group and the control group

组别	时期	依从性（n）			优良率 /%
		优	良	差	
研究组（n = 72）	实施前	11	26	35	51.39
	实施 1 年后	44	24	4	94.44*
对照组（n = 70）	实施前	12	28	30	57.14
	实施 1 年后	21	27	22	68.57#

注：与实施前比较，*P < 0.05；与研究组比较，#P < 0.05。

Note：Compared with before the implementation，*P < 0.05；compared with the study group，#P < 0.05.

2.3　血糖控制水平

实施 1 年后，两组患者 FPG、2 hPG、HbA1c 均较实施前下降，实施 1 年后研究组 FPG、2 hPG、HbA1c 低于对照组（P < 0.05）。见表 3。

2.4　知信行调查评分

实施 1 年后，两组患者糖尿病知信行调查表各项目评分及总分均较实施前升高，研究组实施 1 年后糖尿病知信行调查表各项目评分及总分均高于对照组（P < 0.05）。见表 4。

表 3　研究组与对照组药学服务实施前后血糖控制水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Blood glucose and glycosylated hemoglobin levels of both groups before and after the implementation ($\bar{x}\pm s$)

组别	时期	FPG/（mmol・L^{-1}）	2 hPG/（mmol・L^{-1}）	HbA1c/%
研究组（n = 72）	实施前	12.75±1.94	17.61±2.15	10.83±1.54
	实施 1 年后	7.11±1.36*	11.23±1.47*	7.49±1.22*
对照组（n = 70）	实施前	12.81±2.04	17.43±1.96	10.74±1.61
	实施 1 年后	9.50±1.62*#	14.59±1.68*#	7.97±1.31*#

注：与实施前比较，*P < 0.05；与研究组比较，#P < 0.05。

Note：Compared with before the implementation，*P < 0.05；compared with the study group，#P < 0.05.

表 4　研究组与对照组药学服务实施前后糖尿病知信行调查评分比较 (分，$\bar{x}\pm s$)

Tab 4　KAP scores of both groups before and after the implementation (分，$\bar{x}\pm s$)

组别	时期	评分项目			总分
		知识	信念	行为	
研究组（n = 72）	实施前	3.64±0.37	1.95±0.16	2.31±0.25	7.90±0.99
	实施 1 年后	6.23±0.51*	4.18±0.22*	4.81±0.39*	15.22±1.24*
对照组（n = 70）	实施前	3.52±0.41	1.97±0.15	2.40±0.23	7.89±1.05
	实施 1 年后	4.45±0.42*#	2.83±0.21*#	3.52±0.29*#	10.80±1.13*#

注：与实施前比较，*P < 0.05；与研究组比较，#P < 0.05。

Note：Compared with before the implementation，*P < 0.05；compared with the study group，#P < 0.05.

3　讨论

糖尿病相关并发症是影响患者生活质量乃至生存质量的重要因素，合理控制患者血糖水平是控制病情进展、预防糖尿病并发症的重要手段[7-8]。然而，超过 60% 的糖尿病患者血糖水平控制不佳，较低的用药依从性被认为是影响患者血糖控制水平的重要原因[9]。

临床实践中，部分糖尿病患者血糖水平稳定后常自行停药，另有部分患者对药物治疗期望较高，一旦短期内血糖控制水平未达理想范围，即有可能自行提高药物用量或改用其他药物，上述行为不仅会导致血糖控制水平不佳，还有可能增加低血糖等糖尿病并发症风险，从而威胁患者生命安全[10-11]。目前临床药师未能充分地在糖尿病患者随访管理中发挥重要作用[12]。为解决传统药学服务的弊端，本研究尝试采用知信行模式的院外延伸药学服务，一方面旨在提高健康教育的科学性，强化患者对疾病的认知、观念，提升患者自我管理意识；另一方面旨在发挥临床药师的主观能动性，将药师转变为糖尿病患者血糖控制环节中的重要角色，通过定期随访、监督乃至调整药物剂量，为患者血糖水平的有效控制做出重要贡献[13-14]。

通过 1 年的实践，笔者发现研究组用药依从性显著提高，而接受常规药学服务的对照组用药依从性则未见明显变化。这一结果在进一步印证了常规药学服务局限性的同时，体现了出院外延伸药学服务的明显优势，这一模式强调院外药学服务的持续提供，定期监测血糖、定期随访监督等环节能够使患者获得被动管理，而被动管理的落实也有助于患者主动自我管理意识及能力的提升[15-16]。同时，具备专业药学知识的临床药师能够为患者提供详细的用药指导、联合用药评估、药物疗效监测等服务，能够增加患者对药物的了解、提高患者对用药重要性的认知，且有助于降

低药物不良反应发生风险[17-18]，也有助于患者用药依从性的提升。随着患者用药依从性的提高，1 年后研究组 FPG、2 hPG 及 HbA1c 水平较对照组降低更为明显，意味着研究组患者血糖控制水平更为理想，显现出院外延伸药学服务在改善糖尿病患者血糖控制效果方面的积极作用。此外，1 年后研究组知信行调查表各项目评分及总分均更高，而这一变化也有助于患者长期自我管理能力的提高，以及远期糖尿病相关并发症的预防。

综上所述，基于知信行模式的院外延伸药学服务不仅能够提高糖尿病患者对血糖管理的知识、信念及行为，还可改善其用药依从性并提高血糖控制水平，有望降低患者远期糖尿病并发症发生风险，值得进一步关注及推广。

参考文献

[1] 韩冰，杨其莲，喻轶群，等 . 药学服务对糖尿病患者血糖控制效果和用药依从性的影响 [J]. 中国药房，2017，11（15）：131-134.

[2] Johnson M，Jastrzab R，Tate J，et al. Evaluation of an academic-community partnership to implement MTM services in rural communities to improve pharmaceutical care for patients with diabetes and/or hypertension [J]. J Manag Care Spec Pharm，2018，24（2）：132-141.

[3] 刘洋洋，张冰，郑颖，等 . 药学服务对糖尿病患者用药依从性及血糖控制的影响分析 [J]. 中国医院药学杂志，2019，39（23）：2437-2440.

[4] Deters MA，Laven A，Castejon A，et al. Effective interventions for diabetes patients by community pharmacists：a meta-analysis of pharmaceutical care components [J]. Ann Pharmacother，2018，52（2）：198-211.

[5] Fazel MT，Bagalagel A，Lee JK，et al. Impact of diabetes care by pharmacists as part of health care team in ambulatory settings：a systematic review and meta-analysis [J]. Ann Pharmacother，2017，51（10）：890-907.

[6] 李芳，肖翠兰，袁利华 . 药学服务对糖尿病患者的影响研究 [J]. 中国继续医学教育，2020，12（12）：127-128.

[7] Lum ZK，Siaw MYL，Lee MJX，et al. Impact of pharmaceutical care on mental well-being and perceived health among community-dwelling individuals with type 2 diabetes [J]. Qual Life Res，2019，28（12）：3273-3279.

[8] 冒长青，沈卫华，厉宇容，等 . 药学服务对上海市金山区部分糖尿病病人用药行为的影响 [J]. 药学服务与研究，2018，18（4）：78-80.

[9] 李悦悦，刘荣，许颖 . 基于回顾性研究的糖尿病患者围手术期血糖管理分级药学服务制度的建立 [J]. 药学服务与研究，2020，20（1）：28-31.

[10] Priyadi A，Muhtadi A，Suwantika AA，et al. An economic evaluation of diabetes mellitus management in South East Asia [J]. J Adv Pharm Edur Res，2019，9（2）：53-74.

[11] Rocha WH，Teodoro JÁ，Assis Acurcio F，et al. Influence of pharmaceutical services organization on the availability of essential medicines in a public health system [J]. J Comp Eff Res，2021，10（6）：519-532.

[12] 潘凤珍，张平，张金梅 . 院内外延伸药学服务对 2 型糖尿病患者治疗效果及不良反应发生率的影响 [J]. 中国药物警戒，2017，14（12）：764-768.

[13] Jarab AS，Mukattash TL，Al-Azayzih A，et al. A focus group study of patient’s perspective and experiences of type 2 diabetes and its management in Jordan [J]. Saudi Pharm J，2018，26（3）：301-305.

[14] Xu Y，Gallagher PJ，Tan CWY，et al. Impact of team-based pharmaceutical care on the humanistic outcomes among patients with long-tanding diabetes：an interim analysis of a randomized，controlled，multicenter study [J]. J Am Coll Clin Pharm，2021，4（6）：680-688.

[15] 李喜艳，梁锦琴 . 糖尿病全程化药学服务干预对患者临床疗效药物不良事件及用药依从性的影响 [J]. 山西医药杂志，2019，48（4）：489-491.

[16] 蔡培珊，李杰，曹捷，等 . 2 型糖尿病患者药学监护路径的建立及应用 [J]. 中国药师，2019，22（11）：81-84.

[17] Kang M，Bang JS. Pharmacists’perception for the current and future pharmaceutical services [J]. Korean J Clin Pharm，2017，27（4）：228-237.

[18] Babar Z-U-D，Kousar R，Murtaza G，et al. Randomized controlled trials covering pharmaceutical care and medicines management：a systematic review of literature [J]. Res Social Adm Pharm，2018，14（6）：521-539.

（收稿日期：2021-11-23；修回日期：2022-01-20）

某院 453 份口服药品说明书和循证数据库中药物 - 酒精相互作用信息比较分析

徐哲，王文沛，刘悦，刘一*，张斌，黄琳，封宇飞（北京大学人民医院 药剂科，北京 100044）

摘要：目的 了解北京大学人民医院住院药房口服药品与酒精相互作用（DEI）的信息，为促进 DEI 信息完善及临床合理用药提供建议。**方法** 收集 453 份口服药品说明书中的 DEI 信息，对含 DEI 信息的药品分类统计，并整理 DEI 信息标注位置和警示程度。同时，在 Lexicomp、Micromedex 数据库中检索药物 DEI 警示信息。对说明书和循证数据库中 DEI 信息进行比较分析。**结果** 453 份说明书中含 DEI 信息的药品有 91 种，说明书 DEI 信息标注在注意事项、药物相互作用的一个或多个项目下。在 Lexicomp 和 Micromedex 数据库中检索到含 DEI 信息的药品分别有 107 种和 55 种。剔除在说明书和两个数据库中重复的药品，共检索到含 DEI 信息药品 137 种。在说明书及 Lexicomp 和 / 或 Micromedex 数据库同时存在 DEI 信息药品有 61 种，说明书无 DEI 信息而在数据库检索到含 DEI 信息药品 46 种，仅在说明书存在 DEI 信息药品 30 种。**结论** 说明书和循证数据库 DEI 警示信息存在差异、互为补充，说明书 DEI 信息标注的规范性和完整度有待提高。医师和药师应辨证参考，尽量规避 DEI 用药风险，促进临床合理用药。

关键词：口服药品说明书；循证数据库；药物 - 酒精相互作用信息
中图分类号：R95 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)07-1674-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.033

Comparison of drug-ethanol interactions in 453 oral drug instructions and evidence-based databases

XU Zhe, WANG Wen-pei, LIU Yue, LIU Yi*, ZHANG Bin, HUANG Lin, FENG Yu-fei (*Department of Pharmacy*, *People's Hospital of Peking University* , *Beijing* 100044)

Abstract: Objective To study the information of oral drug ethanol interactions (DEI) in inpatient pharmacy of People's Hospital of Peking University, and to provide suggestion for improving DEI information and rational drug use. **Methods** DEI information in 453 oral drug instructions was collected, drugs containing DEI information were classified, and DEI information labeling location and warning degree was sorted out. Drug DEI warning information was retrieved in Lexicomp and Micromedex databases. **Results** DEI information from instructions and evidence-based databases was compared. Totally 91 out of the 453 drugs contained DEI information in the instructions, and the DEI information was labeled under one or more items of cautions and drug interactions. Totally 107 and 55 drugs containing DEI information were retrieved from Lexicomp and Micromedex databases, respectively. Totally 137 drugs containing DEI information were retrieved excluding the duplicated drug instructions in both databases. There were 61 drugs with DEI information in the manuals and Lexicomp and/or Micromedex databases, 46 drugs with DEI information in the databases but not in the instructions, and 30 drugs with DEI information in the manuals alone. **Conclusion** The warning information in the manual and in evidence-based database is different and complementary. The standardization and integrity of DEI information in drug labels need to be improved. Physicians and pharmacists should avoid the risk of DEI medication and promote rational drug use.

Key words: oral drug instruction; evidence-based database; information of drug-ethanol interaction

基金项目：北京大学医院研究与发展基金（No.RDY2019-39）。
作者简介：徐哲，女，主要从事合理用药研究，email：13504031692@163.com *通信作者：刘一，女，硕士，副主任药师，主要从事临床药理学和药物分析学研究，email：lyi1267@126.com

用药安全一直是临床和监管部门高度重视的问题之一，影响用药安全的因素有很多，包括药品质量、用法用量、药物不良反应和药物相互作用等。然而，药物与非药物的相互作用容易被忽略，由药物与酒精相互作用（drug-ethanol interaction，DEI）导致的药品安全事件时有发生[1-2]。有关 DEI 的研究尚不充分，刘雅娟等[3]对药品说明书的 DEI 信息标注情况进行了调研，但并未结合循证数据库进行相关分析。Lexicomp[4]和 Micromedex[5]是两个常用的循证数据库，Beckett 等[6]的研究发现 Lexicomp 和 Micromedex 数据库中 Drug Interaction 模块是获取药品 DEI 信息的有效来源。本研究对北京大学人民医院住院药房口服药品说明书中的 DEI 信息标注情况进行调研分析，并将药品说明书 DEI 信息与 Lexicomp 和 Micromedex 数据库中 DEI 信息进行对比，以期为完善说明书 DEI 信息和临床用药提供参考，为促进合理用药提供依据。

1　资料与方法

1.1　资料

收集我院口服药品说明书中的 DEI 信息，包括药品通用名称、商品名称、规格、厂家、DEI 信息标注位置、DEI 信息表述语和 DEI 警示分级等。同时，检索并获取 Lexicomp 及 Micromedex 数据库中的 DEI 信息。

1.2　方法

1.2.1　药品说明书中 DEI 警示分级　鉴于目前药品说明书中无 DEI 分级标准，参考 Lexicomp 和 Micromedex 数据库 DEI 分级标准，将说明书 DEI 信息警示程度由高到低分为 4 级。若表述中有“禁止、不得、严禁”字样，DEI 警示分级为 1 级；若表述中有“谨慎、慎用、不建议”字样，DEI 警示分级为 2 级；若表述中提示可能会对机体产生影响，但并未明确提出能否与酒精同服建议时，其 DEI 警示分级为 3 级；若表述中包含 DEI 信息，但提示酒精对药物无药动学和药效学影响的情况，其 DEI 警示分级为 4 级。

1.2.2　循证数据库中 DEI 警示分级　Lexicomp 数据库的 DEI 警示分级包括禁用、考虑修改方案、监测治疗、无需改变。Micromedex 数据库的 DEI 警示分级包括禁止、严重、中等、微弱。两个数据库中 DEI 警示程度由高到低分别用 1、2、3、4 表示。

1.2.3　统计方法　参考《新编药物学》[7]、《中国药典·临床用药须知》[8]（2015 年版）对药物进行分类，再将药品说明书、Lexicomp 及 Micromedex 数据库中获取的 DEI 信息录入 Microsoft Excel 2019 软件中，进行统计分析。

2　结果与分析

2.1　药品说明书中 DEI 信息标注情况和警示分级

共收集口服药品说明书 453 份，其中含 DEI 信息的药品有 91 种，无 DEI 信息的药品 362 种。在 91 份含 DEI 信息的药品说明书中，DEI 信息单独标注在注意事项 47 份、药物相互作用 32 份、禁忌 3 份、警告 1 份、药物代谢动力学 1 份，有 4 份 DEI 信息同时出现在药物相互作用、注意事项 2 个项目下，2 份 DEI 信息出现在药物相互作用、注意事项和禁忌 3 个项目下，1 份 DEI 信息同时出现在药物相互作用、注意事项和药物过量 3 个项目下。

91 份含 DEI 信息的药品中，DEI 警示分级为 1、2、3、4 的药品分别有：22 种、21 种、45 种和 3 种。我们发现，同一通用名称、不同剂型的药物 DEI 警示程度存在不一致情况（如帕罗西汀、布洛芬）；同一通用名称及厂家，不同规格的药物 DEI 警示程度存在不一致情况（如喹硫平）；同一通用名称及剂型，不同厂家药物 DEI 警示程度也存在不一致现象（如硝酸异山梨酯、氯沙坦钾）。

2.2　循证数据库中 DEI 信息

453 种口服药品中，有 392 种药品可在 Lexicomp 数据库中检索到，其中含 DEI 信息药品有 107 种，DEI 警示分级为 1、2、3、4 的依次有：13 种、17 种、76 种和 1 种。在 Micromedex 数据库中，可检索到药品 354 种，其中含 DEI 信息的药品有 55 种，DEI 警示分级为 1、2、3、4 的依次有：2 种、22 种、27 种和 4 种。

2.3　药品说明书与循证数据库中 DEI 信息对比分析

由图 1 可知，Lexicomp 中含 DEI 信息的药品最多，其次是药品说明书，Micromedex 中最少。删除药品说明书与循证数据库中重复的药品后，含 DEI 信息的药品共 137 种。Lexicomp 中含 DEI 信息的 107 种药品中，有 41 种可同时在说明书及 Micromedex 中检索到，有 20 种仅可在说明书检索到，有 14 种仅在 Micromedex 中检索到，其余 32 种在说明书或 Micromedex 中未检索到。说明书中含 DEI 信息的 91 种药品中，有 41 种可同时在 Lexicomp 及 Micromedex 中检索到，有 20 种仅可在 Lexicomp 中检索到，其余 30 种在两个循证数据库中均未检索到。Micromedex 中含 DEI

信息的 55 种药品，有 41 种可同时在 Lexicomp 及说明书中检索到，有 14 种仅可在 Lexicomp 中检索到。

说明书及 Lexicomp 和 / 或 Micromedex 中均包含 DEI 信息的 61 种药品，说明书无 DEI 信息、Lexicomp 和 / 或 Micromedex 中包含 DEI 信息的 46 种药品，及仅在说明书中包含 DEI 信息的 30 种药品，详见表 1 ～ 3。

3　讨论

3.1　药品说明书 DEI 信息标注规范性有待提高

由本研究结果可知，药品说明书对于 DEI 信息标注位置缺乏统一标准，且存在同一通用名称，不同厂家、规格或剂型的药物说明书 DEI 警

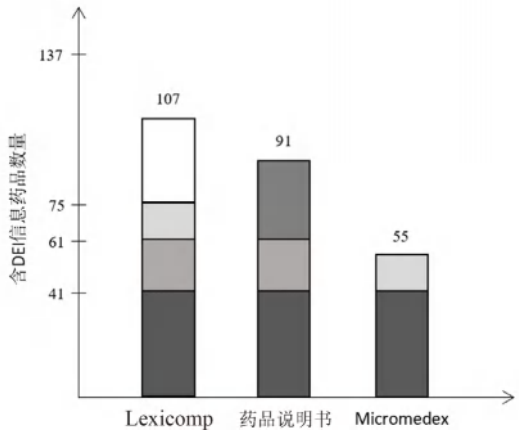


图 1　说明书和循证数据库中纳入含 DEI 信息药品数量

Fig 1　Number of drugs containing DEI information in both instructions and evidence-based databases

表 1　说明书及 Lexicomp 和 / 或 Micromedex 中均包含 DEI 信息的药物列表

Tab 1　List of medications with DEI information in both the manuals and Lexicomp and/or Micromedex

药物类别	通用名称	警示分级		
		说明书	Lexicomp	Micromedex
抗精神病及抗抑郁药	文拉法辛、帕罗西汀（2 种缓释规格）	1	2	4
	喹硫平（25 mg）	1	3	3
	西酞普兰片（3 个厂家）	2	2	3
	度洛西汀	2	2	2
	帕罗西汀	2	2	4
	喹硫平（200 mg）	2	3	3
	氯米帕明	3	3	3
	曲唑酮	3	3	2
	氟哌噻吨 / 美利曲辛	3	3	无
心血管系统药物	阿司匹林、硝酸甘油	3	3	3
	氯沙坦钾 / 氢氯噻嗪、厄贝沙坦 / 氢氯噻嗪（国产）、氯沙坦钾（进口）、单硝酸异山梨酯（3 个厂家）、硝酸异山梨酯（厂家 1）、硝苯地平（控释）、复方盐酸阿米洛利	3	3	无
镇静催眠抗惊厥药	佐匹克隆	1	1	无
	唑吡坦	2	2	2
	阿普唑仑、地西泮	2	3	3
	艾司唑仑	2	3	无
	劳拉西泮	3	3	3
	氯硝西泮	3	3	2
降糖药	二甲双胍（3 个厂家）	1	1	3
	格列美脲（2 个厂家）、格列吡嗪、格列齐特	3	3	2
解热镇痛抗炎药	对乙酰氨基酚（2 种规格）	1	3	2
	尼美舒利、布洛芬（胶囊）	1	3	无
	布洛芬（混悬液）	3	3	无
抗帕金森药	司来吉兰	1	1	无
	金刚烷胺	3	1	3
	巴氯芬	3	3	无
	溴隐亭	3	3	3
抗癫痫药	奥卡西平	1	3	无
	苯妥英钠	2	3	3
	左乙拉西坦	4	3	无
抗感染药	替硝唑	1	1	2
	甲硝唑	1	2	1
	异烟肼	1	3	2
中枢镇痛药	曲马多	2	2	2

续表 1

药物类别	通用名称	警示分级		
		说明书	Lexicomp	Micromedex
	氨酚羟考酮	3	2	2
免疫抑制药	他克莫司（2 种规格）	3	2	2
抗组胺药	西替利嗪	2	3	2
	氯雷他定	4	3	无
骨骼肌	替扎尼定	3	3	3
抗代谢药	甲氨蝶呤	3	2	3

注：无 DEI 信息，用“无”表示。

Note：No DEI information is displayed，the value is none.

表 2　说明书无 DEI 信息、Lexicomp 和 / 或 Micromedex 含 DEI 信息药品列表

Tab 2　Drugs in Lexicomp and/or Micromedex containing DEI information but not in the instruction

药物类别	通用名称	警示分级	
		Lexicomp	Micromedex
心血管系统药物	厄贝沙坦氢氯噻嗪（进口）、氯沙坦钾（国产）、硝酸异山梨酯（厂家 2）、硝苯地平（2 个厂家）、吲达帕胺（2 个厂家）	3	无
	维拉帕米	3	3
抗精神病及抗抑郁药	利培酮（2 个厂家）、曲唑酮	3	2
	奥氮平	3	3
	米氮平	1	3
	舍曲林	2	3
	氟西汀	2	无
	阿立哌唑	3	无
解热镇痛抗炎药	布洛芬混悬液、美洛昔康、布洛芬胶囊、塞来昔布（2 个厂家）、双氯芬酸钠	3	无
	洛索洛芬	3	/
抗癫痫药	托吡酯	1	1
	加巴喷丁、拉莫三嗪、左乙拉西坦（2 个剂型）	3	无
抗感染药物	泊沙康唑	1	2
	复方磺胺甲噁唑	4	2
	米诺环素	3	无
	利奈唑胺	1	无
	沙利度胺	1	无
抗组胺药	依巴斯汀	3	/
	异丙嗪	3	无
周围血管扩张药	西地那非	3	无
	吡贝地尔	1	/
中枢性镇痛药	洛芬待因	3	3
抗凝血药	华法林钠（2 种规格）	3	3
利尿剂	氢氯噻嗪（2 个厂家）	3	无
骨骼肌松弛药	乙哌立松	3	/
平喘药	茶碱	3	无
抗眩晕药	氟桂利嗪	3	无
镇静催眠抗惊厥	苯巴比妥	3	3

注：数据库中检索不到的药品，用“/”表示；无 DEI 信息，用“无”表示。

Note：Drugs that cannot be retrieved in the database are represented by “/”；No DEI information is displayed，the value is none.

表 3　仅在说明书中含 DEI 信息药品不同警示分级列表

Tab 3　Drugs with DEI information of warning grades in the instructions

药品说明书 DEI 警示分级	药物名称
1	多烯磷脂酰胆碱、复方益肝灵、美敏伪麻、复方盐酸伪麻黄碱、氨酚伪麻美芬（日）/ 氨麻美敏（夜）
2	氟伐他汀、瑞舒伐他汀（2 个厂家）、辛伐他汀（国产）、丙戊酸钠口服液、利福平、琥珀酸亚铁、左卡尼汀
3	匹伐他汀、辛伐他汀（进口）、替米沙坦、氨氯地平（进口）、卡维地洛、普罗帕酮、比索洛尔（2 个厂家）、阿卡波糖、恩格列净、瑞格列奈、那格列奈、丙戊酸钠缓释片、维生素 B_2（2 个厂家）、别嘌醇
4	氨氯地平（国产）

示信息不一致的情况。和 Lexicomp、Micromedex 数据库中明确的 DEI 分级标准不同，说明书中并无统一的 DEI 警示分级标准。因此，建议监管部门参考美国现行《人用处方药和生物制品说明书的用法用量部分形式和内容规范化指南》[9]，制定药品说明书 DEI 信息标注项目规范，并参考循证数据库 DEI 警示分级情况，建立 DEI 警示分级标准，以便药品生产企业在说明书中明确标注药物 DEI 分级，为临床用药提供参考。

3.2 药物在说明书和循证数据库中 DEI 警示信息存在差异

说明书及 Lexicomp 和 / 或 Micromedex 数据库均含有 DEI 信息的药物有 61 种，DEI 警示情况存在差异。如表 1 所示，对乙酰氨基酚在说明书、Lexicomp 和 Micromedex 中 DEI 警示分级依次为 1、3、2。说明书中的 DEI 警示级别最高，明确表示禁止该药物与酒精同服。酒精可增加对乙酰氨基酚的肝毒性，使对乙酰氨基酚更多转化为其毒性代谢物，导致肝细胞坏死 [10]。再如，他克莫司在说明书、Lexicomp 和 Micromedex 中 DEI 警示分级依次为 3、2、2。循证数据库中的 DEI 警示级别最高。酒精可增加他克莫司的全身吸收，使血药浓度增高；他克莫司与视觉及神经系统紊乱有关，这种情况因喝酒而加重 [11]。

若药物在说明书和循证数据库 DEI 警示程度存在差异，建议以最高警示程度为准，这样可以最大程度避免 DEI 用药风险。

3.3 部分药品仅在数据库中含 DEI 信息

表 2 中有 46 种药物在说明书中未标注 DEI 信息，而在 Lexicomp 和 / 或 Micromedex 中有 DEI 信息。利培酮、米氮平、托吡酯、泊沙康唑、利奈唑胺和吡贝地尔等药物在数据库中有较高的 DEI 警示分级，应当引起重视。例如，由于酒精可增加包括利奈唑胺在内的单胺氧化酶抑制剂的毒副作用，利奈唑胺在 Lexicomp 中 DEI 警示分级为 1 级 [12]。

4 小结

本研究发现药品说明书 DEI 信息标注规范性和完整性还有待完善，药品说明书与循证数据库 DEI 信息存在差异、互为补充。建议监管部门完善药品说明书和标签的管理规定，定期组织专家结合循证证据完善药物 DEI 信息，药品生产企业及时更新完善药品说明书。医师诊疗和药师发药交代过程中，更要辨证参考药品说明书和循证证据，尽量规避 DEI 用药风险。

参考文献

[1] 张杨，郭倩，孙一琦，等 . 医疗机构用药安全的风险因素及其管理实践 [J]. 现代药物与临床，2022，37（1）：192-196.

[2] 徐旭 . 酒与药物相互作用引起的不良反应 [J]. 实用药物与临床，2008，11（3）：173-174.

[3] 刘雅娟，徐宏，李雪松，等 . 我院 131 份药品说明书 [药物 - 乙醇相互作用] 信息标注情况调查 [J]. 中国药房，2018，29（13）：1845-1849.

[4] Wolters Kluwer. Lexicomp® interactions [Internet]. Hudson，OH：Wolters Kluwer [2021；cited 12 Dec 2021]. ＜ http：//online. lexi. com/lco/action/interact ＞ .

[5] Truven Health Analytics. Micromedex® solutions drug interactions [Internet]. Greenwood Village，CO：Truven Health Analytics[2021；cited 12 Dec 2021]. ＜ https：//www. micromedexsolutions. com/micromedex2/librarian ＞ .

[6] Beckett RD，Stump CD，Dyer MA. Evaluation of drug information resources for drug-ethanol and drug-tobacco interactions [J]. J Med Libr Assoc，2019，107（1）：62-71.

[7] 陈新谦，金有豫，汤光 . 新编药物学 [M]. 18 版 . 北京：人民卫生出版社，2019：39-42.

[8] 国家药典委员会 . 中华人民共和国药典：临床用药须知 [S]. 2015 年版 . 北京：中国医药科技出版社，2015：39-40.

[9] FDA. Guidance for industry dosage and administration section of labeling for human prescription drug and biological products：contentand format[EB/OL].（2010-03-22）[20180523]. http//www. fda. gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm075066.

[10] 张楠，赵侠，崔一民，等 . 乙醇与药物相互作用的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志，2017，33（4）：381-384.

[11] Calza AM，Lübbe J. Tacrolimus ointment-associated alcohol intolerance in infants receiving ethanol-containing medication [J]. Br J Dermatol，2005，152（3）：569.

[12] Preskorn，Sheldon H. MD drug-drug interactions（DDIs）in Psychiatric Practice，Part 6：Pharmacodynamic Considerations [J]. J Psychiatr Pract，2019，25（4）：290-297.

（收稿日期：2022-01-18；修回日期：2022-02-21）

药物与临床

益肺养阴方治疗肺结核合并 2 型糖尿病患者的临床疗效分析

施利，裴异*（南华大学附属长沙中心医院，长沙　410007）

摘要：目的　分析中药益肺养阴方联合常规西医化疗治疗肺结核合并 2 型糖尿病患者的临床疗效及安全性。**方法**　纳入 2018 年 1 月至 2020 年 3 月就诊的肺结核合并 2 型糖尿病的患者，分为试验组及对照组，试验组予益肺养阴方＋标准化疗方案治疗，对照组单纯使用标准化疗方案，比较两组患者的临床疗效及安全性。**结果**　试验组及对照组各纳入 36 例患者，两组患者治疗前基线资料无明显差异。在临床疗效方面，两组患者治疗后总有效率无明显差异（$\chi^2 = 0.116$，$P = 0.773$），但试验组 1 月末痰菌阴转率高于对照组（84.4% *vs* 60%，$\chi^2 = 4.623$，$P = 0.032$），3 月末及 6 月末空洞闭合率高于对照组（3 月末 $\chi^2 = 4.246$，$P = 0.039$；6 月末 $\chi^2 = 4.112$，$P = 0.043$），3 月末平均糖化血红蛋白改善水平优于对照组（$t = -2.182$，$P = 0.032$）。在安全性方面，试验组患者总不良反应发生率（$Z = -2.181$，$P = 0.029$）、肝功能异常（13.88% *vs* 30.55%，$P = 0.012$）和胃肠道反应发生率（11.11% *vs* 33.33%，$P = 0.047$）均低于对照组。**结论**　益肺养阴方加减联合常规西医标准方案可提高初治肺结核合并 2 型糖尿病患者早期的痰菌阴转率、肺部空洞闭合率，降低糖化血红蛋白水平、减少不良反应发生率，值得临床推广应用。

关键词：肺结核；糖尿病；益肺养阴方；临床疗效
中图分类号：R286　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1679-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.034

Clinical effect of Yifei Yangyin prescription for patients with pulmonary tuberculosis complicated with type 2 diabetes

SHI Li, PEI Yi* (*Changsha Central Hospital Affiliated of University of South China*, *Changsha* 410007)

Abstract: Objective To determine the clinical efficacy and safety of Yifei Yangyin prescription combined with conventional western medicine chemotherapy for type 2 diabetic patients with tuberculosis. **Methods** Clinical data of type 2 diabetic patients with tuberculosis were collected from January 2018 to March 2020. The patients were divided into an experimental group and a control group according to inclusion and exclusion criteria. The experimental group was treated with Yifei Yangyin prescription ＋ standard chemotherapy, while the control group was treated with standard chemotherapy alone. The clinical efficacy and safety of both groups were compared. **Results** Thirty-six patients were enrolled in the experimental and control groups respectively, and there was no significant difference in the baseline data before the treatment between the two groups. In terms of clinical efficacy, there was no significant difference in the total effective rate between the two groups after the treatment ($\chi^2 = 0.116$, $P = 0.773$). The negative transformation rate of sputum bacteria in the experimental group was higher than that in the control group after one month treatment (84.4% *vs* 60%, $\chi^2 = 4.623$, $P = 0.032$). The cavity closure rate was higher than that in the control group 3 and 6 months after the treatment ($\chi^2 = 4.246$ after 3 month treatment, $P = 0.039$; $\chi^2 = 4.112$ after 6 month treatment, $P = 0.043$), the average improvement level of glycated hemoglobin was better than that of the control group after 3 month treatment ($t = -$

基金项目：湖南省中医药管理局项目（No. 201890）。
作者简介：施利，女，主治医师，主要从事肺结核、耐药结核、结核合并糖尿病研究，email：124463122@qq.com　*通信作者：裴异，女，主任医师，主要从事肺结核、难治性结核、耐药结核方面研究，email：1113284116@qq.com

2.182, $P = 0.032$). In terms of safety, the incidence of total adverse reactions ($Z = -2.181$, $P = 0.029$), abnormal liver function incidence rate (13.88% *vs* 30.55%, $P = 0.012$) and gastrointestinal reactions incidence rate (11.11% *vs* 33.33%, $P = 0.047$) in the experimental group was all lower than that in the control group. **Conclusion** Yifei Yangyin prescription combined with conventional western medicine standard regimen can improve the rate of negative transformation of sputum bacteria and the rate of pulmonary cavity closure, reduce the level of glycated hemoglobin and the incidence of adverse reactions in the early stage of tuberculosis in type 2 diabetic patient.

Key words: tuberculosis; diabetes mellitus; Yifei Yangyin prescription; clinical curative effect

近年来，全球肺结核与糖尿病疾病负担日趋严重，在中国，这两种疾病形势更为严峻。2020 年我国糖尿病患者数量接近 1.3 亿，居全球第一[1]，肺结核患者数量达 84.2 万，居全球第二[2]。糖尿病与肺结核两者相互影响，促进发病，给社会带来严重的经济负担，为公共医疗卫生事业发展面临的严峻挑战之一[3]。一方面，糖尿病是肺结核的高危因素，可导致机体免疫系统功能下降，神经 - 内分泌功能紊乱，为结核分枝杆菌在机体内的定居、生存、增殖继而形成结核病灶创造条件，使空洞形成多，痰菌阳性率高，病程进展快，容易复发及形成耐药，治疗难度大，预后差[4-6]。另一方面，活动性肺结核可以诱导出现胰岛素抵抗和应激性高血糖，加重糖尿病代谢紊乱，促使糖尿病患者机体免疫进一步低下，增加糖尿病并发症发生风险，明显升高致死率、致残率[7]，故肺结核合并糖尿病是临床结核科医师面临的棘手问题之一。

肺结核属于中医“肺痨”范畴，糖尿病属于中医“消渴”范畴。中医治疗肺结核和糖尿病历史悠久。益肺养阴方为我院中西医结合治疗肺结核合并糖尿病的有效经验方，结合西医化疗，效果良好。本研究拟探讨益肺养阴方加减治疗肺结核合并糖尿病的疗效，现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取在 2018 年 1 月至 2020 年 3 月于南华大学附属长沙中心医院就诊的肺结核合并 2 型糖尿病并服用中药益肺养阴方治疗的患者为试验组，采用倾向性评分按照年龄 ±2 岁条件匹配同期就诊的肺结核合并 2 型糖尿病但未服用中药治疗的患者为对照组，根据纳入和排除标准，纳入试验组和对照组患者各 36 例。

1.2 纳入排除标准

纳入标准：① 2 型糖尿病诊断标准符合《中国 2 型糖尿病防治指南（2017 年版）》诊断标准[8]。② 初治肺结核诊断标准符合我国《WS288-2017 肺结核诊断》[9] 诊断标准，且分枝杆菌快培阳性。③ 试验组使用西医标准方案联合中药益肺养阴方随症加减方案治疗，且中药益肺养阴方服药疗程不短于 1 个月；对照组仅使用西医标准化初治方案，治疗期间未服用任何中药。

排除标准：① 孕妇和哺乳者；② 合并严重的心、肝、肾疾病及肺尘埃沉着病、精神病、癫痫病、获得性免疫缺陷综合征；③ 合并肿瘤、免疫功能低下疾病及近 3 个月内服用免疫抑制剂者；④ 合并糖尿病视网膜病变者；⑤ 合并肺外结核者；⑥ 临床资料不全，对结果判定有影响者；⑦ 治疗期间服用其他中药方剂者。

退出标准：① 发现有耐药者；② 同时合并非结核分枝杆菌感染者；③ 治疗中出现重要器官功能异常或严重不良反应无法耐受标准方案或需要停药者。

1.3 治疗方案

对照组给予标准化初治方案 3HR（L2）ZE/9HR（L2）E 治疗（强化期治疗 3 个月，巩固期治疗 9 个月；H：异烟肼，R：利福平，L：利福喷丁；Z：吡嗪酰胺，E：乙胺丁醇）。试验组在标准化初治方案基础上加用益肺养阴方（随症加减）。抗结核药物剂量根据患者体质量及血药浓度是否达标而调整。糖尿病的降糖治疗包括口服降糖药或注射胰岛素，采取个体化降糖方案，使血糖尽量控制在理想水平。

1.4 观察指标

每月复查一次血常规、肝肾功能、电解质及痰分枝杆菌培养，每三个月复查一次糖化血红蛋白（HbA1c）、肺部高分辨 CT。

1.5 治疗结果评估

1.5.1 有效性评估　以痰培养阴转率为主要疗效指标，以肺部空洞闭合率及 HbA1c 改善水平为次要疗效指标。培养阴转定义为治疗基线时痰培养阳性，治疗期间至少连续两次痰培养为阴性，且间隔 28 d 以上。培养阴转时间定义为患者出现培养阴转后从基线到首次阴转的时间。肺部病灶转归评估：① 完全吸收；② 显著吸收指病灶吸收面积≥原病灶 1/2；③ 吸收指病灶吸收面积＜原病灶 1/2；④ 不变指病灶无明显改变；⑤ 恶化指病灶扩大或播散。治疗结

局包括，① 治愈：治疗结束后连续两次痰培养阴性，间隔至少 28 d，无治疗失败证据；② 完成疗程：完成治疗结束后无治疗失败证据；③ 治疗失败：在治疗 5 月末痰菌未阴转或阴转后再次出现细菌学阳性（复阳）；④ 死亡：在治疗过程中由于各种原因所致的死亡；⑤ 丢失：患者未治疗或者治疗过程中由于任何原因中断治疗连续 2 个月以上；⑥ 退组：因不良反应需要更改治疗方案或中断治疗 2 个月以上者。

1.5.2　安全性评估　收集患者血常规、尿常规、肝肾功能、电解质、心电图、不良事件（adverse event，AE）及治疗过程中出现相关的不适主诉。AE 定义为患者开始治疗后出现的与治疗有因果关系的相关不良医学事件，AEs 的严重程度按照美国传染病研究所修改的《关于成人和儿童不良事件严重程度分级表》最新版本进行分级。其中 1 ～ 2 级为轻度 AE，3 ～ 5 级为严重 AE，严重 AE 指治疗过程中发生危及生命或死亡、需要住院治疗、延长住院时间、伤残、导致畸形等的事件。

1.6　数据管理和分析

收集患者的人口学及临床数据，包括年龄、性别、身高、体质量指数（BMI）、病史、实验室检测结果、病原学和影像学结果等信息。采用 SPSS 21.0 软件进行数据处理和统计学分析。计数资料以构成比（%）表示，计量资料根据数据是否呈正态分布以 “$\bar{x}\pm s$” 或中位数（四分位数）[M（Q_1，Q_3）] 表示。分类变量的比较采用卡方检验或 Fisher’s 确切概率检验，连续变量的比较采用 Wilcoxon 秩和检验，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　患者基线资料

本研究共纳入 72 例患者，对照组与试验组各 36 例，两组患者一般基线特征无明显差异（见表 1）。

2.2　患者疗效分析

两组患者中，试验组有 32 例完成治疗并治愈停药，2 例退组（1 例药物过敏，1 例并发肝功能损伤），2 例治疗失败（2 例痰菌复阳），总有效率 88.89%。对照组有 30 例完成治疗并治愈停药，4 例退组（1 例合并非结核分枝杆菌，1 例合并视力下降，2 例合并肝功能损伤），2 例治疗失败（1 例痰菌复阳，1 例出现利福平耐药），总有效率 83.33%。两组患者治疗总有效率差异无统计学意义（$\chi^2 = 0.116$，$P = 0.773$）。对完成治疗的患者痰菌阴转率、肺部空洞闭合率及糖化血红蛋白情况进一步分析结果显示，试验组患者 1 月末痰菌阴转率高于对照组（$\chi^2 = 4.623$，$P = 0.032$）；从第 2 月末开始两组患者痰菌阴转率差异无统计学意义（见表 2）。在空洞闭合方面，试验组患者 3 月末及 6 月末空洞闭合率高于对照组（3 月末 $\chi^2 = 4.246$，$P = 0.039$；6 月末 $\chi^2 = 4.112$，$P = 0.043$），但在 12 月末两组患者空洞闭合率无明显差异（$\chi^2 = 0.955$，$P = 0.329$）（见表 3）。在血糖控制方面，试验组患者 3 月末平均糖化血红蛋白改善水平优于对照组（$t = -2.182$，$P = 0.032$），但在 6 月末和 12 月末两组患者比较差异无统计学意义（见表 3）。

表 1　两组患者基线资料比较 ($n = 36$)

Tab 1　Baseline data between the two groups ($n = 36$)

变量	试验组	对照组	χ^2/t	P
男性	23（63.89）	24（66.67）	0.091	0.763
年龄 / 岁	45（38 ～ 59）	46（37 ～ 58）	1.355	0.179
BMI/（kg・m^{-2}）	21.73±2.25	22.17±3.07	− 2.13	0.832
吸烟	19	17	0.222	0.637
饮酒	5	8	0.845	0.358
合并乙肝 *	1	2	0.343	0.558
糖尿病病程 / 月	43（13 ～ 79）	36（12 ～ 96）	− 1.257	0.212
周围神经炎 *	3	2	0.212	0.645
降血糖方案				
口服降糖药	16	15	0.057	0.812
胰岛素	11	10	0.067	0.795
口服降糖药＋胰岛素	9	11	0.277	0.599
糖化血红蛋白 /%	8.94±1.11	8.74±2.38	0.227	0.821
肺部空洞				
无空洞	14（38.89）	12（33.33）	0.241	0.624
合并空洞	22（61.11）	24（66.67）		

注（Note）：* 表示采用 Fisher 检验（* represents Fisher’s test）。

表 2　两组患者痰培养阴转情况

Tab 2　Sputum culture conversion in both groups during the treatment

组别	痰菌阴转率 /%					
	1 月末	2 月末	3 月末 *	4 月末	5 月末	12 月末
试验组（$n = 21$）	84.4	90.6	96.9	100	100	100
对照组（$n = 22$）	60	75	90	100	100	100
χ^2	4.623	0.683	1.193	—	—	—
P	0.032	0.409	0.275	—	—	—

注（Note）：* 表示采用 Fisher 检验（* represents Fisher’s test）。

2.3　患者不良反应分析

在安全性方面，试验组 36 例患者发生了 64 次 AE，其中 2 例患者发生了 2 次 3 级及以上 AE（1 例为过敏性皮炎，1 例为肝功能损伤），余 62 次 AE 均为 1 级或 2 级；对照组 36 例患者中发生了 79 次 AE，3 例患者发生了 3 次 3 级及以上 AE（1 例为视神经炎，2 例为肝功能损伤），余 76 次 AE 均为 1 级或 2 级。对照组总不良反应发生率明显高于试验组（$Z = -2.181$，$P = 0.029$）；同时对照组肝功能异常发生率（13.88% *vs* 30.55%，$P = 0.012$）和胃肠道反应发生率（11.11% *vs* 33.33%，$P = 0.047$）均高于试验组，余不良反应发生率无明显差异。

3　讨论

现代中医学家认为肺痨的致病因素有内因和外因，外因系指感染痨虫，痨虫入侵为患，内因

表 3　两组患者肺部空洞闭合及糖化血红蛋白控制情况

Tab 3　Pulmonary cavity closure and glycosylated hemoglobin control in 2 groups

组别	空洞闭合率 /%			糖化血红蛋白 /%		
	3 月末	6 月末 *	12 月末	3 月末	6 月末 *	12 月末
试验组（n = 21）	76.2	100	100	7.79±0.82	8.07±1.19	7.96±0.90
对照组（n = 22）	45.5	81.8	95.5	8.33±0.79	8.37±1.55	8.09±1.93
χ^2/t	4.246	4.112	0.955	− 2.182	− 1.304	− 0.594
P	0.039	0.043	0.329	0.032	0.196	0.555

注（Note）：* 表示采用 Fisher 检验（* represents Fisher’s test）。

表 4　两组患者治疗期间不良反应分类 (n = 36)

Tab 4　Classification of AE in the two groups during treatment (n = 36)

组别	肝功能异常	肌酐升高 *	高尿酸血症 *	胃肠道反应	周围神经炎	过敏性皮炎	骨髓抑制	视神经炎 *	电解质紊乱 *	精神症状 *
试验组 [n（%）]	5（13.88）	4（11.11）	33（91.67）	4（11.11）	3（8.33）	6（16.67）	4（11.11）	2（5.56）	2（5.56）	1（2.78）
对照组 [n（%）]	11（30.55）	3（8.33）	34（94.44）	12（33.33）	5（13.88）	3（8.33）	8（22.22）	1（2.78）	2（5.56）	0（0.00）
χ^2/t	6.368	0.156	0.212	3.938	0.141	0.508	0.900	0.343	0.000	1.000
P	0.012	0.693	0.645	0.047	0.708	0.476	0.343	0.558	1.000	0.317

注（Note）：* 表示采用 Fisher 检验（* represents Fisher’s test）。

系指先天禀赋不足，后天失于调养，正气不足，抗病能力低下，其病位在肺，病机为阴虚，并确立了杀虫补虚的两大治疗原则，即“一则杀其虫，以绝其根本，一则补其虚，以复其真元”，立意“补虚培元”以固本、“治痨杀虫”以祛邪[10-11]。对于消渴病，历来医家认为，消渴病之本在于阴虚，素体阴虚，阴津亏损，五脏虚弱是消渴病发生的基本病理[12]。冷雪等[13]通过对 2 型糖尿病中医证型的流行病学调查研究和分析同样发现，2 型糖尿病患者以气阴两虚型最为常见，故养阴补虚同样是消渴病的重要治疗原则之一。益肺养阴方由黄芪、黄精、白术、百部、丹参、白及、玉竹、沙参、麦冬组成。方中黄芪补益肺气、益卫固表、生肌敛疮；黄精补气养阴，润肺益肾；白术健脾益气，止汗；三药配伍共为君药，彰显补气益肺、化腐生新之功。百部温润肺气、杀虫疗疮；丹参活血祛瘀，凉血消痈；白及收敛止血，消肿生肌；三药合奏达杀虫化瘀、止血之功。玉竹、沙参、麦冬养阴生津润燥，清热化痰润肺，三药携手可达养阴清肺生津之效。上述诸药合用，共奏益气养阴、补肺杀虫之功，令气阴两复，润肺生津，痨虫诛灭，诸证可平。近年来，已发表的现代药理研究结果表明，中药在加强西药对结核杆菌的杀菌抑菌作用之外，可同时增强肺结核患者的免疫功能[14]，具有促进病灶吸收及空洞闭合、缓解临床症状、减轻化疗副作用等疗效[15-17]。黄芪是最常用的补气、调节免疫的中药之一，可通过调节活性氧磷代谢、免疫细胞的生长、分化过程、抗氧化等，在信号分子、转录因子、受体和酶等多种化合物的参与下共同发挥免疫调节功能[18]。黄精具有调节免疫、抗氧化、保护肝脏、降血糖、调血脂等多种药理作用[19]。白术主要提取物白术多糖具有免疫调节、胃肠黏膜保护、肝脏保护以及抑菌、降血糖、抗氧化等药理作用[20]。百部可能通过调控结核病信号通路，激活细胞凋亡进程，干预细胞凋亡通路中的多种蛋白的表达，诱导含结核分枝杆菌巨噬细胞和树突状细胞的自主凋亡进程，降低结核分枝杆菌活性，清除机体受损组织[21]。丹参提取物丹参酮Ⅱ磺酸钠可通过抑制炎症反应、细胞凋亡及氧化应激降低糖尿病大鼠血糖水平和改善肾组织损伤[22]。

在本研究中，笔者通过观察益肺养阴方联合化疗治疗初治肺结核合并糖尿病患者，结果显示虽两组患者总治疗有效率无明显差异，但试验组患者在 1 月末的痰菌阴转率、3 月末和 6 月末的空洞闭合率均高于对照组，同时 3 月末的糖化血红蛋白的控制优于对照组。早期的痰菌阴转可降低结核病传播风险，对控制结核意义重大，而痰菌阳和肺部空洞患者是结核传播的主要人群。肺结核合并糖尿病患者具有痰菌阳性率高、空洞形成多等临床特点。本研究结果显示试验组患者 1 月末的痰菌阴转率、3 月末和 6 月末的空洞闭合率均高于对照组，可减少患者结核传播风险，对结核防控意义深远。高血糖与结核病预后不良有关，血糖越高，越有利于结核分枝杆菌生长[23]。Yoon 等[24]研究显示，血糖控制差的患者在 2 个月的强化期治疗后痰培养未阴转的可能性是血糖控制良好的结核病患者的两倍。因此，更好地控制血糖水平有利于加速痰菌阴转。本研究结果显示，试验组患者 3 月末的糖化血红蛋白控制优于对照组，可促进患者早期的痰菌阴转。分析试验组患者血糖控制优于对照组的原因，考虑可能与黄精、白术及丹参等药的降血糖作用有关[19-20，22]。

抗痨药物不良反应发生率高，临床中以高尿酸血症、药物性肝损伤、胃肠道反应、药物性皮炎及骨髓抑制等多见。降低药物不良反应可减少患

者中断治疗的发生，从而提高患者依从性和治愈率[25-27]。二甲双胍和 α- 糖苷酶抑制剂是治疗 2 型糖尿病的常用药，两者的常见不良反应均为胃肠道反应。研究显示，二甲双胍与抗结核药物联用时约 30% 的患者会出现胃肠道反应[6]，因此减轻合并 2 型糖尿病的肺结核患者胃肠道反应发生具有积极的临床意义。本研究中，两组均有一定比例患者使用口服降糖药物，可能增加了患者胃肠道反应的发生率，但两组患者治疗基线时降糖方案无明显差别，不影响两组患者安全性评估。本研究结果显示，试验组患者胃肠道反应发生率低于对照组，提示益肺养阴方可减少患者胃肠道反应发生率。抗结核药物性肝损伤是抗结核治疗过程中最常见的不良反应，发生率约为 2% ～ 28.0%[28]，严重影响患者的依从性及愈后，增加患者疾病负担。本研究中试验组患者肝功能异常发生率低于对照组，提示益肺养阴方可降低患者肝功能异常发生率。

本研究存在一定的不足。首先，因本研究为回顾性研究，病例中未详细记录患者的中医症状，故无法评估两组患者中医症候改善情况；其次，随访时间较短，无法评估两组患者两年内结核复发率有无异同；最后，入组病例偏少，需扩大样本量进一步证实研究结果。

综上，益肺养阴方加减联合常规西医标准方案可提高初治肺结核合并 2 型糖尿病患者早期痰菌阴转率、肺部空洞闭合率及降低糖化血红蛋白水平，减轻不良反应发生率，值得临床推广应用。

参考文献

[1] International Diabetes Foundation. Diabetes Atlas [M]. 9th ed. Brussels，Belgium：IDF，2020.

[2] World Health Organization. Global tuberculosis report，2020. WHO/CDS/TB/2020. Geneva，Switzerland：WHO，2020.

[3] Noubiap JJ，Nansseu JR，Nyaga UF，et al. Global prevalence of diabetes in active tuberculosis：a systematic review and meta-analysis of data from 2.3 million patients with tuberculosis [J]. Lancet Glob Health，2019，7（4）：e448-e460.

[4] Lutfiana NC，van Boven J，Masoom ZM，et al. Diabetes mellitus comorbidity in patients enrolled in tuberculosis drug efficacy trials around the world：a systematic review [J]. Br J Clin Pharmacol，2019，85（7）：1407-1417.

[5] Huangfu P，Ugarte-Gil C，Golub J，et al. The effects of diabetes on tuberculosis treatment outcomes：an updated systematic review and meta-analysis [J]. Int J Tuberc Lung Dis，2019，23（7）：783-796.

[6] 结核病与糖尿病共病的治疗管理专家共识 [J]. 中国防痨杂志，2021，43（1）：12-22.

[7] van Crevel R，Dockrell HM. TANDEM：understanding diabetes and tuberculosis [J]. Lancet Diabetes Endocrinol，2014，2（4）：270-272.

[8] 中华医学会糖尿病学分会 . 中国 2 型糖尿病防治指南（2017 年版）[J]. 中华糖尿病杂志，2018，10（1）：4-67.

[9] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 . 肺结核诊断标准（WS 288-2017）[J]. 新发传染病电子杂志，2018，3（1）：59-61.

[10] 王聪聪，余学庆，马锦地，等 . 现代名老中医诊疗肺痨常见证候及其特征研究 [J]. 新中医，2017，49（9）：139-142.

[11] 戴磊，张琳玲，黎伟林，等 . 肺结核中医证候研究进展 [J]. 中西医结合研究，2019，11（6）：313-315.

[12] 庞国明，王凯锋，谢卫平，等 . 中医药治疗 2 型糖尿病临床研究进展 [J]. 光明中医，2020，35（21）：3481-3484.

[13] 冷雪，谷丽艳，朱芳 . 2 型糖尿病中医证型流行病学调查及其中医病因病机初探 [J]. 中华中医药杂志，2015，30（3）：732-735.

[14] 任慧惠，李小平 . 中医辅助治疗对耐多药肺结核患者细胞免疫状态的影响 [J]. 现代中西医结合杂志，2018，27（27）：3021-3023，3024.

[15] 黄子鑫 . 中医辨证论治联合常规化疗对阴虚内热型肺痨患者的临床观察 [J]. 光明中医，2018，33（10）：1472-1473.

[16] 黄舒然，葛海波 . 中医辨证论治联合化疗对肺结核患者疗效、毒副反应及依从性的影响 [J]. 亚太传统医药，2017，13（21）：111-112.

[17] 董一帆 . 中医药预防肺结核初治治疗中肝损害的效果 [J]. 健康大视野，2019（14）：125-126.

[18] 刘子菡，王喻淇，杨爱琳，等 . 基于网络药理学研究黄芪增强免疫功能的机制 [J]. 中南药学，2020，18（10）：1661-1667.

[19] 赵文莉，赵晔，Yiider T. 黄精药理作用研究进展 [J]. 中草药，2018，49（18）：4439-4445.

[20] 杨颖，魏梦昕，伍耀业，等 . 白术多糖提取分离、化学组成和药理作用的研究进展 [J]. 中草药，2021，52（2）：578-584.

[21] 束沛，郑忻，席瑞，等 . 百部治疗结核病的网络药理学分子机制研究 [J]. 辽宁中医药大学学报，2021，23（3）：107-113.

[22] 岳薇薇，阿克拜尔·乌普，王卫群 . 丹参酮ⅡA 磺酸钠联合达格列净对糖尿病大鼠肾损伤的改善作用及其机制研究 [J]. 中南药学，2020，18（12）：1966-1971.

[23] Aftab H，Christensen DL，Ambreen A，et al. Tuberculosis-related diabetes：is it reversible after complete treatment? [J]. Am J Trop Med Hyg，2017，97（4）：1099-1102.

[24] Yoon YS，Jung JW，Jeon EJ，et al. The effect of diabetes control status on treatment response in pulmonary tuberculosis：a prospective study [J]. Thorax，2017，72（3）：263-270.

[25] 周小花，黄堃，董平，等 . 上海市 2020 年抗结核药物不良反应报告分析 [J]. 上海医药，2021，42（21）：24-27.

[26] 李娜，陈洁，罗季，等 . 抗结核药物不良反应 376 例分析 [J]. 昆明医科大学学报，2021，42（4）：117-121.

[27] 姚雷娜，胡宾 . 抗结核药物所致肝损伤的不良反应分析及风险因素研究 [J]. 临床肺科杂志，2022，27（1）：62-67.

[28] 抗结核药物性肝损伤诊治指南 [J]. 中华结核和呼吸杂志，2019，42（5）：343-352.

（收稿日期：2021-12-05；修回日期：2022-03-21）

溴隐亭及多巴丝肼对颅脑损伤长期昏迷患者的促醒治疗临床观察

黄云峰，向鹏，梅敏，樊天禹（南华大学附属长沙中心医院，长沙　410004）

摘要：目的　观察在常规治疗基础上联合溴隐亭和多巴丝肼对颅脑损伤长期昏迷微意识状态患者的促醒治疗效果。**方法**　以 2010 年 1 月－2021 年 5 月在我院进行治疗的 48 例颅脑损伤术后 1 月仍昏迷、评估为微意识状态患者进行随机分组研究，分为观察组与对照组，对照组患者接受营养支持、扩血管、高压氧以及功能锻炼等常规治疗，观察组患者接受与对照组相同的常规治疗，并加用溴隐亭和多巴丝肼联合治疗。**结果**　治疗 3 个月后，观察组与对照组格拉斯哥（GCS）评分分别为（10.86±2.43）、（8.49±3.06），差异具有统计学意义（$P = 0.021$），两组分别与治疗前比较 GCS 评分差异均具有统计学意义（$P < 0.05$）。治疗 6 个月后，观察组与对照组患者 GCS 评分分别为（11.97±3.69）、（9.87±3.56），差异具有统计学意义（$P = 0.005$），并且观察组与治疗前比较 GCS 评分差异具有统计学意义（$P < 0.01$）。治疗 6 个月后观察组患者意识恢复 7 例（25.93%），而对照组患者仅有 2 例（9.52%），差异具有统计学意义（$P = 0.004$）。治疗后对照组重残率为 33.33%，明显比观察组（14.81%）高，差异具有统计学意义（$P = 0.022$）。治疗后观察组与对照组中持续性植物状态的患者分别为 5 例（18.52%）、9 例（42.86%），差异具有统计学意义（$P = 0.030$）。两组均死亡 1 例。**结论**　在常规治疗的基础上联用溴隐亭和多巴丝肼对颅脑损伤后长期昏迷微意识状态患者有良好促醒作用，可改善患者预后。

关键词：溴隐亭；多巴丝肼；长期昏迷；颅脑损伤；促醒
中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1684-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.035

Clinical observation of patients with long-term coma due to craniocerebral injury treated with bromocryptotine and doserazid

HUANG Yun-feng, XIANG Peng, MEI Min, FAN Tian-yu (*Changsha Central Hospital*, *University of South China*, *Changsha* 410004)

Abstract: Objective To observe the effect of bromocryptotine and doserazid combination on patients with long-term coma and micro-consciousness after brain injury. **Methods** Totally 48 patients with long-term coma after craniocerebral injury treated in our hospital from January 2010 to May 2021 were selected as the subjects. They were randomly divided into an observation group and a control group. Patients in the control group received nutrition support, blood vessel expansion, hyperbaric oxygen therapy and functional exercise routine treatment, while patients in the observation group received bromocriptine and benserazide combination therapy besides the same routine therapy. **Results** After 3 months of treatment, the GCS scores of the observation group and the control group were (10.86±2.43) and (8.49±3.06) with significant difference ($P = 0.021$). The differences as compared with those before the treatment in both groups were significant ($P < 0.05$). After 6 months of treatment, the GCS scores of the observation group and the control group were (12.97±3.69) and (9.87±3.56) with significant difference ($P = 0.005$). The difference in the observation group before and after the treatment was significant ($P < 0.01$). After 6 months of treatment 7 patients in the observation group recovered consciousness(25.93%), while in the control group had only 2 (9.52%) (*P*

基金项目：湖南省自然科学基金面上项目（No.2020JJ4637）。
作者简介：黄云峰，男，硕士，副主任医师，主要从事神经外科重症研究，email：1033475315@qq.com

= 0.004). After the treatment, the disability rate in routine treatment group was 33.33%, much higher than that of the observation group (14.81%) (P = 0.022). After the treatment, 5 patients (18.52%) and 9 patients (42.86%) were in persistent vegetative state with significant difference (P = 0.030). One patient died in both groups. **Conclusion** Besides routine treatment, the combination of bromocystine and doserazid has a good effect on awakening and improving the prognosis of patients with long-term coma and micro-consciousness after brain injury.

Key words: bromocriptine; benserazide; long-term coma; craniocerebral injury; awaking effect

颅脑创伤昏迷主要源于致伤因素对脑干网状结构及其投射纤维的损伤或对皮质的弥散性损伤，患者出现认知、觉醒及知觉丧失被称为昏迷，持续 1 个月以上的患者称为长期昏迷，重型颅脑创伤导致长期昏迷的发生率为 0.52% ～ 7.33%，平均为 2.90%[1]，若不采取及时的救治措施，患者往往因神经损伤而导致预后不佳，甚至危及生命。本研究以 2010 年 1 月—2021 年 5 月在我院进行救治的 48 例颅脑损伤长期昏迷患者为对象，探讨在常规治疗基础上联合溴隐亭和多巴丝肼对颅脑损伤长期昏迷微意识状态患者的促醒作用。现报告如下。

1　资料与方法

1.1　一般资料

纳入的 48 例患者为我院 2010 年 1 月—2021 年 5 月所收治的颅脑损伤后（车祸伤 34 例，坠落伤 14 例）所致长期昏迷的患者，男性患者共计 30 例，女性患者共计 18 例，男女患者比例为 1∶0.6。患者的年龄为 22 ～ 67 岁，平均年龄为（40.8±13.4）岁。患者初次入院时经头颅 CT 或 MRI 检查和神经外科医师证实颅脑损伤，脑挫裂伤伴硬膜下血肿 23 例，脑干损伤 9 例，基底节区损伤 10 例，弥漫性轴索损伤 6 例，格拉斯哥（GCS）评分在 3 ～ 9 分，入院后患者处于昏迷状态，接受常规治疗后未见苏醒，患者的心、肺、肝、肾功能基本正常、生命体征正常，根据标准[2]评估为微意识状态方纳入本研究。

将纳入患者随机分为观察组与对照组，观察组患者男性 17 例，女性 10 例，平均年龄（41.2±12.6）岁，GCS 评分为（6.24±2.67）分，脑挫裂伤伴硬膜下血肿 13 例，脑干损伤 5 例，基底节区损伤 6 例，弥漫性轴索损伤 3 例。对照组患者男性 13 例，女性 8 例，平均年龄（42.1±11.8）岁，GCS 评分（6.31±2.54）分，脑挫裂伤伴硬膜下血肿 9 例，脑干损伤 4 例，基底节区损伤 5 例，弥漫性轴索损伤 3 例。两组患者的性别、年龄、GCS 评分等差异无统计学意义（P > 0.05），具体见表 1。

1.2　方法

入院时患者接受开颅手术、清除血肿并减压，术后运用适量脱水剂、护胃等治疗，生命体征稳定，患者术后 1 个月仍昏迷则开始进行分组研究，GCS 评分基线以入组时间的 GCS 评分为准，经评估为微意识状态[2]。对照组患者进行肠外营养支持治疗，使用胞磷胆碱、神经节苷脂等营养脑神经，使用适量尼莫地平等扩血管，对患者采取高压氧吸入治疗并运用神经电刺激结合针灸进行康复性治疗，由康复科医师协助对患者进行肢体活动康复治疗。观察组患者在接受与对照组患者相同的治疗外加用溴隐亭和多巴丝肼进行促醒治疗：采用鼻饲管注入，初始剂量：溴隐亭 1.25 mg/ 次（1/2 片）和多巴丝肼 125 mg/ 次（1/2 片），3 次 • d^{-1}，7 d 为 1 个疗程，每下一疗程增加溴隐亭 2.5 mg、多巴丝肼 125 mg，逐渐增至最高剂量溴隐亭 7.5 mg/ 次、多巴丝肼 250 mg/ 次。维持最高剂量 2 个疗程后逐渐减量（一周每次剂量减 1/2 片）至初始剂量，再维持治疗 4 周再停药，总疗程一般为 15 周，患者若出现血细胞减少、低血压、胃肠道出血等严重不良反应则立即停药。

1.3　疗效评定

参照微意识状态评分标准[2]，主要依据 1995 年全国脑血管疾病学术会议修订标准联合 GCS 评分标准进行疗效评定。

1.4　统计学方法

将数据录入统计学分析软件 SPSS 25.0 进行统计学分析与处理。计数资料均采用 χ^2 检验，计量资料用均数 ± 标准差表示，采用 t 检验，以 P < 0.05 为差异有统计学意义。组间比较采用方差分析，相关分析采用 Spearman 直线相关检验。

2　结果

治疗 1 个月后，观察组患者的 GCS 评分与对照组比较，差异无统计学意义（χ^2 = 2.216，P = 0.075），与治疗前比较差异具有统计学意义（P < 0.05）。干预治疗 3 个月和 6 个月后，观察组与对照组 GCS 评分比较差异具有统计学意义，并且两组分别与治疗前比较差异均具有统计学意义（P < 0.05，P < 0.01）。具体结果见表 2。

表 1　对照组与观察组患者一般情况比较

Tab 1　Basic informantion of patients in the control group and the observation group

组别	病例数 /n	性别 [n（%）]		年龄 / 岁	GCS 评分 / 分
		男	女		
观察组	27	17（62.96）	10（37.04）	41.2±12.6	6.24±2.67
对照组	21	13（61.90）	8（38.09）	42.1±11.8	6.31±2.54
t 或 χ^2	—	0.006		2.371	1.673
P	—	0.940		0.587	1.427

表 2　对照组与观察组治疗后 GCS 评分情况比较 (分)

Tab 2　GCS score between the control group and the observation group after the treatment (score)

组别	治疗前	治疗 1 个月	治疗 3 个月	治疗 6 个月
观察组	6.24±2.67	8.04±2.78*	10.86±2.43*	11.97±3.69**
对照组	6.31±2.54	7.86±2.57	8.49±3.06*	9.87±3.56*
χ^2	1.673	2.216	2.913	3.875
P	1.427	0.075	0.021	0.005

注：与治疗前比较，$^*P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

参照 1995 年全国脑血管疾病学术会议修订标准联合 GCS 评分标准进行疗效评定，结果见表 3。治疗 6 个月后观察组患者意识恢复 7 例（25.93%），而对照组患者仅有 2 例（9.52%），两组比较差异具有统计学意义（$\chi^2 = 8.202$，$P = 0.004$）。对照组重残率、持续性植物状态明显比观察组高，差异具有统计学意义（$P < 0.05$）。此外，两组治疗中均死亡 1 例。

表 3　对照组与观察组患者治疗后疗效比较 [n (%)]

Tab 3　Post-treatment efficacy of the control group and the observation group [n (%)]

组别	意识恢复	中残	重残	植物状态	死亡
观察组	7（25.93）	10（37.04）	4（14.81）	5（18.52）	1（3.70）
对照组	2（9.52）	2（9.52）	7（33.33）	9（42.86）	1（4.76）
χ^2	8.202	2.895	5.212	4.704	1.313
P	0.004	0.089	0.022	0.030	0.252

3　讨论

重型颅脑损伤的患者由于原发性脑组织损伤导致昏迷，而继发性血肿压迫脑组织带来二次损伤，及时解除血肿、降低颅内压、保持脑灌注对降低患者病死率有重要作用；有些因素如低血糖也可导致昏迷 [3]；对于长期昏迷的患者，常规治疗包括吸氧、营养支持、扩血管以及功能锻炼等，伤后行高压氧可缓解脑部缺氧、减轻脑水肿、减小脑梗死面积并减轻自由基对脑的损伤和抑制神经细胞凋亡的作用 [4]；通过声光电等康复手段刺激网状结构的上行激活系统，使外周传入的感觉形成新的神经传导通路 [5-6]。

重型颅脑损伤的未苏醒患者 3 ～ 4 周后需进行综合性治疗，以促进患者脑组织和神经功能的恢复并预防并发症的发生，此后可加用儿茶酚胺类等促醒治疗药物 [7-8]。有学者提出，颅脑损伤部位远离胞体处损伤轴突，一般不会引起神经元死亡，而且有机会发生轴突再生，因此在患者病情基本稳定后尽早进行促醒治疗有助于患者预后 [9-10]。溴隐亭是一种多巴胺受体激动剂，能作用于脑内多巴胺受体突触后膜，增加其敏感性，多巴丝肼为左旋多巴与苄丝肼混合而成，苄丝肼和左旋多巴能阻止外周多巴脱羧成多巴胺，提高中枢多巴胺水平 [11-12]。溴隐亭联合多巴丝肼，可以促进患者意识恢复，并一定程度上改善言语肢体功能 [13]。在本研究中，对照组患者治疗 1 个月疗效并不显著，治疗 6 个月后 GCS 评分有所改善（$P < 0.01$），但治疗 6 个月观察组与对照组比较，差异有统计学意义（$P = 0.005$）；观察组患者治疗 1 个月后，GCS 评分与治疗前比差异有统计学意义（$P < 0.05$），并且改善了 6 个月后 GCS 评分。在本研究中，溴隐亭联合多巴丝肼促醒治疗效果较佳，一定程度改善了患者的预后。

参考文献

[1] 中华医学会神经外科学分会颅脑创伤专业组，中华医学会创伤学分会神经损伤专业组 . 颅脑创伤长期昏迷诊治中国专家共识 [J]. 中华神经外科杂志，2015，31（8）：757-760.

[2] Giacino JT，Ashwal S，Childs N，et al. The minimally conscious state：defination and diagnostic criteria [J]. Neurology，2002，58（3）：349-353.

[3] 杨丽娟，齐晓涟 . 警惕低血糖脑病的发生 [J]. 中南药学，2013，11（2）：154.

[4] Vlodavsky E，Palzur E，Soustiel JF. Hyperbaric oxygen therapy reduces neuroinflammation and expression of matrix metalloproteinase-9 in the rat model of traumatic brain injury [J]. Neuropathol Appl Neurobiol，2006，32（1）：40-50.

[5] 谢瑛 . 颅脑损伤后持续植物状态的促醒康复治疗 [J]. 临床和实验医学杂志，2007，6（1）：25-26.

[6] 中华医学会神经外科学分会，中国神经外科重症管理协作组 . 中国重型颅脑创伤早期康复管理专家共识（2017）[J]. 中华医学杂志，2017，97（21）：1615-1623.

[7] Kim MS，Rhee JJ，Lee SJ，et al. Akinetic mutism responsive to bromocriptine following subdural hematoma evacuation in a patient with hydrocephalus [J]. Neurol Med Chir，2007，47（9）：419-423.

[8] Caner H，Altinors N，Benli S，et al. Akinetic mutism after fourth ventricle choroid plexus papilloma：treatment with a dopamine agonist [J]. Surg Neurol，1999，51（2）：181-184.

[9] Fischer C，Luaute J. Evoked potentials for the prediction of vegetative state in the acute stage of coma [J]. Neuropsychol Rehabil，2005，15（34）：372-380.

[10] 张赛 . 重视颅脑创伤后慢性病变过程研究和康复治疗 [J].

中华神经外科杂志，2012，28（2）：109-111.
[11] Kamptfl A，Frant G，Aichner F，et al. The Persistent vegetative state after closed head injury：clinical and magnetic resonance imaging findings in 42 patients [J]. J Neurosurg，1998，88（5）：809-816.
[12] Giacino JT，Whyte J，Bagiella E，etal. Placebo-controlled trial of amantadine for severe traumatic brain injury [J]. N Engl J Med，2012，366（9）：819-826.
[13] 党圆圆，杨艺，何江弘，等 . 严重意识障碍疾病的药物治疗进展 [J]. 中华神经医学杂志，2013，12（10）：1077-1080.

（收稿日期：2022-01-05；修回日期：2022-05-02）

不同剂量阿托伐他汀治疗慢性硬膜下血肿的疗效和安全性的 meta 分析

甘雄[1]，王文茜[1]，潘国洪[1]，吴玥[2]，严军平[3*]（1. 汉川市人民医院临床药学部，湖北　汉川　431600；2. 武汉大学人民医院药学部，武汉　430060；3. 汉川市人民医院儿科，湖北　汉川　431600）

摘要：目的　探讨不同剂量阿托伐他汀治疗慢性硬膜下血肿（CSDH）的疗效和安全性，为临床治疗提供循证参考。**方法**　计算机检索 PubMed、Embase、Web of Science、Cochrane Library、CBM、CNKI、维普和万方等数据库，收集不同剂量阿托伐他汀治疗慢性硬膜下血肿的随机对照试验，检索时限均为从建库至 2022 年 1 月。对纳入研究的质量进行评价，然后使用 RevMan 5.4 软件和 GEMTC 软件进行直接和网络 meta 分析。**结果**　共纳入有效文献 14 篇，累计 1519 名患者，直接 meta 分析的结果显示：① 治疗后日常生活活动能力（ADL）评分方面，40 mg 较 20 mg 阿托伐他汀疗效更显著（$P < 0.05$），而 20 mg 较 10 mg 阿托伐他汀疗效无明显差异（$P = 0.57$）；② 复发率方面，40 mg 较 20 mg 阿托伐他汀更低（$P = 0.008$）；③ 神经功能恢复方面，20 mg 阿托伐他汀组较未使用阿托伐他汀组疗效更显著（$P = 0.006$），阿托伐他汀网状 meta 分析的结果显示：在总有效率方面，40 mg 最佳，其次为 20 mg，最后是 10 mg；在不良反应发生方面 40 mg 最高，其次为 20 mg，最后是 10 mg。**结论**　在不同剂量的阿托伐他汀中，40 mg 在有效性、ADL 评分、复发率方面均优于其他低剂量，但药物不良反应发生率也更高。

关键词：阿托伐他汀；不同剂量；慢性硬膜下血肿；meta 分析
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1687-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.036

Meta-analysis of the efficacy and safety of different doses of atorvastatin for chronic subdural hematoma

GAN Xiong[1], WANG Wen-xi[1], PAN Guo-hong[1], WU Yue[2], YAN Jun-ping[3*] (1. *Department of Clinical Pharmacy*, *Hanchuan People's Hospital*, *Hanchuan Hubei* 431600; 2. *Department of Pharmacy*, *Renmin Hospital of Wuhan University*, *Wuhan* 430060; 3. *Department of Pediatrics*, *Hanchuan People's Hospital*, *Hanchuan Hubei* 431600)

Abstract: Objective To determine the efficacy and safety of different doses of atorvastatin for chronic subdural hematoma (CSDH), and to provide evidence-based reference for clinical treatment. **Methods** The databases of PubMed, Embase, Web of Science, Cochrane Library, CBM, CNKI, VIP and Wanfang were searched. The randomized controlled trials of different doses of atorvastatin for chronic subdural

基金项目：孝感市自然科学计划项目（No.XGKJ2021010078）。
作者简介：甘雄，男，硕士，主管药师，主要从事循证药学、药物经济学研究，email：1329173587@qq.com　*通信作者：严军平，男，副主任医师，主要从事儿科疾病诊疗与合理用药研究，email：819653582@qq.com

hematoma were collected from the establishment of the databases to January 2022. The quality of the included research was evaluated. RevMan 5.4 software and GEMTC software were used for the direct and network meta-analysis. **Results** Totally 14 valid literatures involving 1519 patients were included. The direct meta-analysis showed that：① 40 mg atorvastatin had better effect than that of 20 mg in activities daily living (ADL) after the treatment, but there was no significant difference between 20 mg and 10 mg atorvastatin ($P = 0.57$). ② In terms of recurrence rate, 40 mg atorvastatin was lower than 20 mg , and the difference was significant ($P = 0.008$). ③ In terms of neurological recovery, the 20 mg atorvastatin group had a more significant effect than the non-atorvastatin group, with significant difference ($P = 0.006$). The network meta-analysis showed that atorvastatin had a significant effect on the total effective rate: 40 mg was the best, followed by 20 mg, and 10 mg respectively. As to adverse reactions, 40 mg was the highest, followed by 20 mg, and 10 mg respectively. **Conclusion** Among different doses of atorvastatin, 40 mg is better than other lower doses in effectiveness, ADL score and recurrence rate, but the incidence of adverse drug reactions is also higher.

Key words: atorvastatin; different dose; chronic subdural hematoma; meta-analysis

慢性硬膜下血肿（chronic subdural hematoma，CSDH）一般指患者头部外伤 3 周后，硬脑膜与蛛网膜之间出现的包膜血肿现象，是神经外科的常见疾病，其发病率呈逐年上升的趋势，这与老年社会的到来和预期平均寿命提高有关 [1]。一般人群每年的估计发病率为 13.5/100 000 人，65 岁以上的老年人每年可达 58.1/100 000 人，CSDH 多发于老年人，偶见部分年轻人 [1-2]。目前 CSDH 的治疗效果仍不理想，对老年人 CSDH 的长期随访研究发现，即使在标准治疗后 1 年，这种疾病的病死率也可以达到 32%[3]。随着老年人结构比例的逐年增加，心脑血管疾病患者的数量也在不断增加，因此抗凝剂的使用非常普遍，难治性或复发性 CSDH 的数量正在增加。根据近年来的文献研究结果，CSDH 的形成主要包括硬脑膜局部炎性出血、局部高纤溶、血肿腔内高渗压、血肿囊反复再出血等理论 [4]。

近年来，他汀类药物被用于调节血管生成和修复神经损伤 [5-6]。阿托伐他汀可激活 Akt 途径、Notchl 途径和内皮型一氧化氮合酶，提高外周血内皮祖细胞和血管生成因子水平，促进血管生成和功能性血管的形成 [6-7]，改善 CSDH 预后。Wang 等 [8] 认为阿托伐他汀能通过促进血肿包膜新生血管形成，从而改善 CSDH 的血液引流，减少 CSDH 的炎症反应，有效降低 CSDH 的复发；Li 等 [9] 提出阿托伐他汀不仅可以调节炎症细胞因子，也能促进血管生成，大大降低肿瘤坏死因子 -*α*、IL-6 水平以及 *VEGF* 基因的表达，使血肿缩小。

目前 CSDH 的药物治疗主要以他汀类药物和地塞米松的循证依据较为充足，且他汀类药物治疗 CSDH 的循证报道为阿托伐伐他汀，鲜有其他种类的他汀类药物。虽然国内外有关于阿托伐他汀治疗 CSDH 效果的系统评价，但尚无不同剂量给药在疗效和安全性方面的评价。故他汀类药物在治疗 CSDH 患者中的具体剂量尚未统一，虽然 Wang 等 [10] 研究表明与接受高剂量阿托伐他汀相比，低剂量阿托伐他汀能更有效促进血管生成和血管成熟，降低硬膜下血肿和改善大鼠模型的神经功能缺陷，但是仅仅局限于动物实验。本文通过检索国内外相关研究，采用 meta 分析方法评价不同剂量阿托伐他汀治疗 CSDH 的临床的有效性和安全性，旨在为临床治疗 CSDH 提供新的循证医学证据。

1 资料与方法

1.1 文献检索

运用计算机检索 Web of Science、PubMed、Cochrane Library、Embase、CNKI、维普和万方等数据库，检索时限为从建库至 2022 年 1 月。检索词包括“阿托伐他汀”“硬膜下血肿”“硬膜下出血”“剂量”“随机临床试验”“Atorvastatin”“Subdural hematoma”“Dose”“Randomized clinical trial”中英文主题词，同时结合各自相关自由词进行检索。纳入所有随机对照试验（RCT）文献。

1.2 纳入标准

① 研究类型：RCTs；② 研究对象：患者均经头颅 CT 或 MRI 检查，符合 CSDH 的诊断标准 [11]；③ 干预措施：不同剂量的阿托伐他汀之间对比以及阿托伐他汀组与常规治疗组对比；④ 主要结局指标：总有效率，次要结局指标：日常生活活动能力（ADL）评分、复发率、神经功能恢复、不良反应。

1.3 文献筛选以及数据提取

剔除重复发表的文献，首先阅读文题和摘要排除不相关文章，然后阅读全文检出符合纳入标准的

文献。提取数据并进行质量评价由两位研究者交叉核对，如有分歧应讨论或由第三位研究者协助解决。

1.4　文章质量的评价

对符合纳入标准的文献使用 Cochrane 协作网的风险偏倚评估工具进行文献质量评价，包括随机序列产生、分配隐藏、对研究者和受试者施盲、研究结局的盲法评价、结果数据的完整性、选择性报告研究结果和其他偏倚等方面内容。

1.5　数据处理

采用 Cochrane 协作网提供的 Revman 5.4 软件进行 meta 分析。采用 Cochrane Q 检验评估各项随机对照的异质性，若研究结果 $P > 0.1$ 且 $I^2 < 50\%$ 表明研究间的异质性较低，采用固定效应模型；反之，采用随机效应模型，并分析研究间存在异质性的原因，制作漏斗图进行发表偏倚的分析。二分类变量资料采用优势比（RR），连续性变量则使用加权均数差（WMD）来表示，各效应量均以 95% 的置信区间（*CI*）来表示。

其次，采用 GEMTC 软件[12]进行网状 meta 分析，通过 DerSimonian-Laird 随机效应模型和蒙特卡罗马尔科夫模型（Monte Carlo MarkovChain，MCMC）进行合并。对于二分类变量，使用 *OR*/*RR* 及 95%*CI* 为疗效分析统计量；对于连续性变量，使用 MD 及其 95%*CI* 为统计量。并且采用等级概率图（rank probability plot）对有效性、药物不良反应进行排序。

2　结果

2.1　文献纳入的流程

本文通过数据库检索得到 622 篇相关发表文献，排除 344 篇重复发表的文献，得到 278 篇初筛合格的文献，进一步阅读文章题目和摘要，不符合标准文献有 90 篇，对剩余的 188 篇文献进行全文浏览，根据本文纳入的标准排除文献 174 篇，最终得到可用于 meta 分析的有效文献 14 篇。

2.2　文献一般情况与质量评价

纳入的 14 篇文献有 9 篇[13-21]为中文文章，5 篇[22-26]为外文文章，均为 RCTs，其中受试者有 1519 例（治疗组 763 例，对照组 756 例），其中 7 篇[15-17，19-20，23，26]文章采用随机数字表法，1 篇[13]采用数字奇偶法，其余 6 篇[14，18，21-22，24-25]未提及具体分配方法；1 篇[23]提及双盲法，其余研究均未提及盲法未描述受试者的失访或退出情况，均无选择性报道研究结果；方法学具体纳入文献的资料见表 1，对文献使用 Cochrane 质量评价标准进行评价，结果见图 1。

2.3　直接比较 meta 分析

2.3.1　ADL 评分　有 6 篇文献[13，15，17，19-21]报道了

图 1　纳入文献的质量评价

Fig 1　Quality evaluation of the included literature

ADL 评分，分析 6 项研究统计学异质性明显（$P = 0.03$，$I^2 = 95\%$），对其进行敏感性分析发现剔除张亮亮[13]的研究，进行亚组分析异质性明显降低，采用固定效应模型对其进行 meta 分析，结果显示 40 mg 阿托伐他汀较 20 mg 阿托伐他汀改善 ADL 评分效果更显著（WMD = 5.17，95%*CI*：3.49 ～ 6.85），$P < 0.000\ 01$]，另外 20 mg 阿托伐他汀较 10 mg 阿托伐他汀改善效果无明显差异（WMD = − 0.27，95%*CI*：− 1.21 ～ 0.67，$P = 0.57$），见图 2。

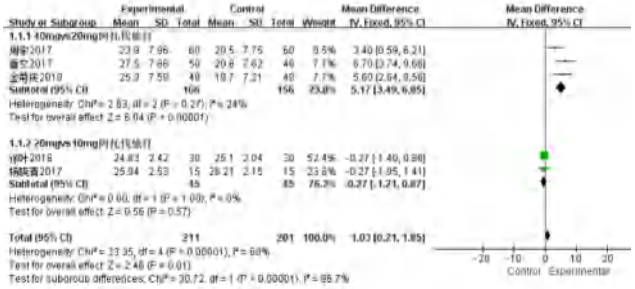


图 2　两组患者 ADL 评分比较的森林图

Fig 2　Forest plot of ADL scores of both groups

2.3.2　复发率　有 7 篇文献[15，17，22-26]报道了复发率，分析 7 项研究统计学无明显异质性（$P = 0.86$，$I^2 = 0\%$），采用固定效应模型对其进行 meta 分析，结果显示治疗后，40 mg 阿托伐他汀比 20 mg 阿托伐他汀复发率更低（*OR* = 0.22，95%*CI*：0.07 ～ 0.68，$P = 0.008$），而 20 mg 阿托伐他汀较常规治疗复发率更低（*OR* = 0.31，95%*CI*：0.19 ～ 0.49，$P < 0.000\ 01$），见图 3。

2.3.3　神经功能恢复　有 4 篇文献[22-24，26]报道了神经功能恢复，分析 4 项研究统计学无明显异质性（$P = 0.36$，$I^2 = 7\%$），采用固定效应模型对其 meta 分析，结果显示 20 mg 阿托伐他汀比常规

表 1　纳入文献的基本特征

Tab 1　Basic characteristics of the included literature

纳入研究	研究时间 / 周	年龄 / 岁	样本量		干预措施		结局指标
			试验组	对照组	试验组	对照组	
张亮亮 2018[13]	12	67.15±5.32	50	50	40 mgA ＋常规治疗	20 mgA ＋常规治疗	①②
杨治涛 2019[14]	4	67.6±6.5	63	63	40 mgA ＋常规治疗	20 mgA ＋常规治疗	①
周宇 2017[15]	12	67.2±7.3	60	60	40 mgA ＋常规治疗	20 mgA ＋常规治疗	①②④⑤
赵英歌 2017[16]	4	57.52±3.41	41	41	20 mgA ＋常规治疗	10 mgA ＋常规治疗	①⑤
潘文 2017[17]	12	67.5±7.0	58	48	40 mgA ＋常规治疗	20 mgA ＋常规治疗	①②④⑤
宋艳艳 2018[18]	4	62.5±8.3	32	32	20 mgA ＋常规治疗	10 mgA ＋常规治疗	①⑤
金菊庆 2018[19]	12	70.4±3.1	48	48	40 mgA ＋常规治疗	20 mgA ＋常规治疗	①②⑤
杨晓清 2017[20]	12	66.8±6.7	15	15	20 mgA ＋常规治疗	10 mgA ＋常规治疗	①②⑤
徐叶 2018[21]	12	66.8±6.7	30	30	20 mgA ＋常规治疗	10 mgA ＋常规治疗	①②⑤
David 2016[22]	12	79.5	12	12	20 mgA ＋常规治疗	常规治疗	①③④
Jiang 2018[23]	8	67	98	98	20 mgA ＋常规治疗	常规治疗	③④
Tang 2018[24]	12	59.7±15.4	125	120	20 mgA ＋常规治疗	常规治疗	③④
Xu 2016[25]	24	96.59±28.59	39	63	20 mgA ＋常规治疗	常规治疗	①④
Liu 2016[26]	24	63.33±10.08	92	76	20 mgA ＋常规治疗	常规治疗	③④

注（Note）：A. 阿托伐他汀（atorvastatin）；常规治疗（conventional treatment）：甘露醇脱水降颅压（dehydration of mannitol），抗癫痫治疗（antiepileptic therapy），糖皮质激素治疗（glucocorticoid），血管紧张素转化酶抑制剂（ACEI/ARB），手术治疗（surgical treatment）等；结局指标（primary outcome）：① 总有效率（total effective rate），② 日常生活能力量表评分（ADL score），③ 神经功能恢复（neurological recovery），④ 复发率（recurrence rates），⑤ 不良反应（adverse events）。

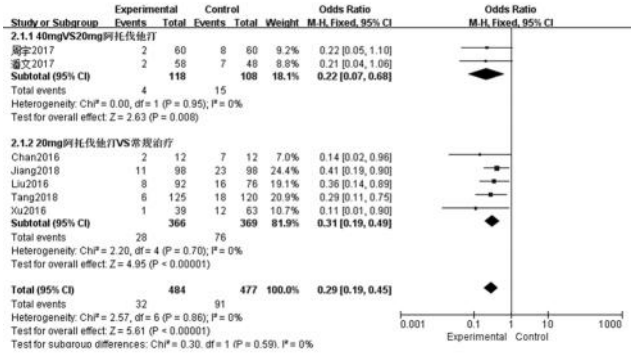


图 3　两组患者复发率比较的森林图

Fig 3　Forest plot of recurrence rates of both groups

治疗神经功能恢复更明显（*OR* ＝ 1.84，95%*CI*：1.19 ～ 2.84，*P* ＝ 0.006），见图 4。

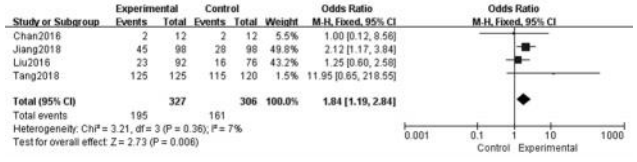


图 4　两组患者神经功能恢复比较的森林图

Fig 4　Forest plot of neurological recovery of both groups

2.4.1　总有效率　有 11 篇文献[13-22，25]报道了总有效率，结果只有 10 mg 阿托伐他汀的总有效率与常规治疗相比差异无统计学意义（*OR* ＝ 2.37，95%*CI*：0.47 ～ 13.22），而 20 mg 阿托伐他汀和 40 mg 阿托伐他汀总有效率均显著优于常规治疗（见表 2），等级排名中，40 mg 阿托伐他汀效果最佳，其次为 20 mg 阿托伐他汀，最后为 10 mg 阿托伐他汀，见图 5。

2.4　网状 meta 分析

表 2　总有效率的网状 meta 分析结果

Tab 2　Network meta-analysis of total effective rate

A（*n* ＝ 118）	2.88（1.31，6.52）	10.16（3.73，29.09）	0.42（0.08，2.12）
0.35（0.15，0.76）	B（*n* ＝ 387）	3.53（1.96，6.76）	0.15（0.03，0.57）
0.10（0.03，0.27）	0.28（0.15，0.51）	C（*n* ＝ 279）	0.04（0.01，0.19）
2.37（0.47，13.22）	6.69（1.76，32.38）	23.66（5.37，134.58）	D（*n* ＝ 369）

注（Note）：A. 10 mg 阿托伐他汀＋常规治疗（10 mg atorvastatin ＋ conventional treatment）；B. 20 mg 阿托伐他汀＋常规治疗（20 mg atorvastatin ＋ conventional treatment）；C. 40 mg 阿托伐他汀＋常规治疗（40 mg atorvastatin ＋ conventional treatment）；D. 常规治疗（conventional treatment），字母以下的单元格数据表示两种治疗措施比较的 *OR*（95%*CI*），当 95%*CI* 不包含 1 时，表明两种治疗措施之间比较具有统计学意义，*n* 为每种治疗措施的病例数（The cell data under the capital letters represents the *OR*（95%*CI*）of the comparison between the two treatment measures. When the 95%*CI* does not contain 1，shows that the comparison between the two treatment measures is statistically significant；"*n*" represents the number of cases of each treatment measure）。

2.4.2　不良反应发生率　有 7 篇文献[15-21]报道了阿托伐他汀不良反应发生率，结果 10 mg 阿托伐他汀与 20 mg 阿托伐他汀相比差异无统计学意义（*OR* ＝ 0.32，95%*CI*：0.09 ～ 1.03），与 40 mg 阿托伐他汀相比差异具有统计学意义（*OR* ＝ 0.18，95%*CI*：0.04 ～ 0.76）（见表 3），而等级概率排名中显示 40

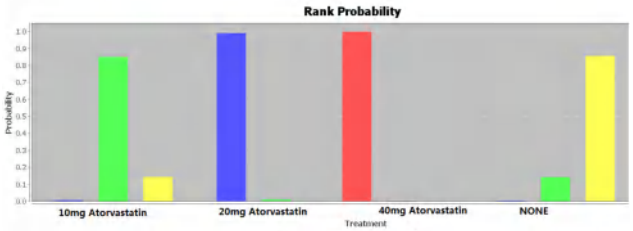


图 5　总有效率的等级概率图

Fig 5　Grade probability plot of total effective rate

mg 阿托伐他汀不良反应发生率最高，其次为 20 mg 阿托伐他汀，最后为 10 mg 阿托伐他汀，见图 6。

表 3　不良反应的网状 meta 分析结果

Tab 3　Network meta-analysis of adverse reaction

A（n = 118）	3.08（0.97，11.39）	5.48（1.32，25.96）
0.32（0.09，1.03）	B（n = 274）	1.84（0.78，4.04）
0.18（0.04，0.76）	0.54（0.25，1.29）	C（n = 166）

注（Note）：A.10 mg 阿托伐他汀＋常规治疗（10 mg atorvastatin ＋ conventional treatment）；B.20 mg 阿托伐他汀＋常规治疗（20 mg atorvastatin ＋ conventional treatment）；C.40 mg 阿托伐他汀＋常规治疗（40 mg atorvastatin ＋ conventional treatment）。

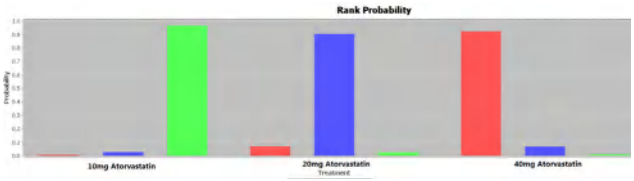


图 6　不良反应的等级概率图

Fig 6　Graded probability of adverse events

2.5　发表偏倚分析

选取不同剂量阿托伐他汀在总有效率方面对比的 11 项研究进行漏斗图的绘制，以检验本研究是否存在发表偏倚，漏斗图的结果见图 7。图形以 *OR* 为中心，结果显示样本图形各点较为对称，无明显发表偏倚。

3　讨论

CSDH 的发生、发展及吸收的机制尚不十分清楚。研究显示 CSDH 患者多为颅脑损伤后桥静脉或静脉窦、蛛网膜颗粒损伤所致的硬膜下腔出血。当出血持续 3 周以上时，血肿会被包膜包围形成血肿 [27]。其中继发性炎症、血肿形成、外膜血管生成和反复再出血是 CSDH 发生发展的关键因素。

阿托伐他汀是一种他汀类药物，能抑制 3- 羟基 -3- 甲基戊二酰辅酶 A 还原酶，并通过降低低密度脂蛋白胆固醇水平发挥作用。阿托伐他汀已被证明不仅是局部炎症抑制剂，也是血管生成成熟剂 [28-29]，在动物实验中发现阿托伐他汀可以增加血管生成素和血管内皮生长因子的表达，从而促进血管成熟，修复受损的血管内皮细胞 [30-31]。但目前对于他汀类治疗 CSDH 患者的具体剂量尚未统一，本文通过 meta 分析比较不同剂量阿托伐他汀治疗 CSDH 的疗效，进一步探讨 10 mg、20 mg 与 40 mg 阿托伐他汀对 CSDH 患者总有效率、ADL 评分、神经功能恢复和复发率以及不良反应的影响，以更好地指导临床用药。

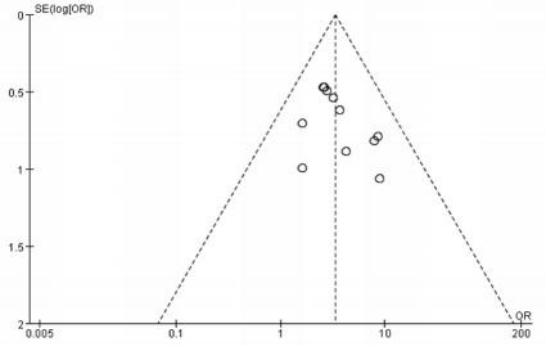


图 7　总有效率发表偏倚的漏斗图

Fig 7　Total efficiency publication bias

本研究共纳入 14 项 RCT 研究，涉及 1519 名患者，对不同剂量阿托伐他汀从有效性和安全性对比发现：① 在 ADL 评分方面，40 mg 阿托伐他汀改善效果更好，20 mg 阿托伐他汀较 10 mg 阿托伐他汀改善效果无明显差异；② 在复发率方面，40 mg 阿托伐他汀较 20 mg 阿托伐他汀治疗后复发率更低；③ 神经功能恢复方面，20 mg 阿托伐他汀与常规治疗神经功能恢复更明显；④ 总有效率方面，通过网络 meta 分析的等级排名中，40 mg 阿托伐他汀效果最佳，其次为 20 mg 阿托伐他汀，最后为 10 mg 阿托伐他汀；⑤ 不良反应发生率方面，40 mg 阿托伐他汀不良反应发生率最高，其次为 20 mg 阿托伐他汀，最后为 10 mg 阿托伐他汀。大剂量的阿托伐他汀可能会增加不良反应，主要为消化道不良反应和肝功能异常，消化道不良反应表现为恶心呕吐、腹泻、腹胀、便秘等，肝功能异常表现为转氨酶升高，不良反应多发生在开始用药后 3 个月之内并且呈剂量依赖性，通过降低用药剂量或停药，转氨酶可以恢复至用药前水平。如转氨酶升高水平超过正常上限 3 倍，应立即停药，必要时给予护肝对症治疗。

本研究仍然存在局限性：① 纳入的文献质量不足，高质量研究不多，文章质量低产生偏倚和误差的可能性较大；② 由于纳入研究的治疗周期不等且都较短，多数研究未进行长期随访观察，因此不同剂量阿托伐他汀治疗 CSDH 临床获益以及安全性需要更长周期跟踪随访；③ 各研究的研究对象也有差异，如年龄、体质量指数、是否手术也增加了偏倚风险；④ 考虑阳性结果文章相对容易发表的情况，故可能存在对真实值的过高估计。

综上所述，40 mg 阿托伐他汀高剂量在有效性、ADL 评分和复发率方面，优于低剂量，但不良反

应发生率高于低剂量组。1519 名患者发生 67 例不良反应，其中胃肠道不良反应有 29 例次，最为常见，其次肝功能异常为 16 例次，大多无需特殊处理，安全性可控。目前，关于阿托伐他汀高剂量选择的研究并不多，临床大多数 CSDH 患者应用剂量为 20 mg，阿托伐他汀的安全剂量可以高达每日 80 mg，而且 CSDH 患者多为老年人常常伴有高血脂，多数服用他汀类药物降脂，从长期获益角度来进行剂量的选择，可考虑在临床开展更多不同剂量阿托伐他汀治疗 CSDH 的有效性和安全性的研究。

参考文献

[1] Sahyouni R，Goshtasbi K，Mahmoodi A，et al. Chronic subdural hematoma：a historical and clinical perspective [J]. World Neurosurg，2017，108（12）：948-953.

[2] Ou Y，Dong J，Wu L，et al. The clinical characteristics，treatment，and outcomes of chronic subdural hematoma in young patients [J]. World Neurosurg，2019，125：e1241-e1246.

[3] Miranda LB，Braxton E，Hobbs J，et al. Chronic subdural hematoma in the elderly：not a benign disease [J]. Neurosurg，2011，114（1）：72-76.

[4] Wang D，Jiang R，Liu L，et al. Membrane neovascularization and drainage of subdural hematoma in a rat model [J]. Neurotrauma，2010，27（8）：1489-1498.

[5] Chen J，Cui X，Zacharek A，et al. Increasing Ang1/Tie2 expression by simvastatin treatment induces vascular stabilization and neuroblast migration after stroke [J]. Cell Mol Med，2009，13（7）：1348-1357.

[6] Chen J，Zacharek A，Li A，et al. Atorvastatin promotes presenilin-1 expression and Notch1 activity and increases neural progenitor cell proliferation after stroke [J]. Stroke，2008，39（1）：220-226.

[7] Ma Y，Chen Z，Zou Y，et al. Atorvastatin represses the angio-tensin 2-induced oxidative stress and inflammatory response in dendritic cells via the PI3K/Akt/Nrf 2 pathway [J]. Oxidative Med Cell Longevity，2014，2014：148798.

[8] Wang D，Li T，Tian Y，et al. Effects of atorvastatin on chronic subdural hematoma：a preliminary report from three medical centers [J]. J Neurol Sci，2014，336（1-2）：237-242.

[9] Li T，Wang D，Tian Y，et al. Effects of atorvastatin on the inflammation regulation and elimination of subdural hematoma in rats [J]. J Neurol Sci，2014，341（1-2）：88-96.

[10] Wang D，Li T，Wei H，et al. Atorvastatin enhances angiogenesis to reduce subdural hematoma in a rat model [J]. J Neurol Sci，2016，362：91-99.

[11] 陈孝平，汪建平 . 外科学 [M]. 8 版 . 北京：人民卫生出版社，2013：205-206.

[12] 胡荣明，张超，曾宪涛 . 应用 GeMTC 软件实现网状 Meta 分析 [J]. 湖北医药学院学报，2014，33（1）：36-40.

[13] 张亮亮，胡建刚 . 阿托伐他汀 40 mg 日剂量治疗慢性硬膜下血肿的效果评价 [J]. 海峡药学，2018，30（10）：130-131.

[14] 杨治涛 . 不同剂量阿托伐他汀对慢性硬膜下血肿的疗效及安全性 [J]. 健康之友，2019（17）：152-153.

[15] 周宇，陈淳，邓发斌，等 . 不同剂量阿托伐他汀对慢性硬膜下血肿的疗效及安全性评价 [J]. 中国药房，2017，28（5）：663-667.

[16] 赵英歌，李斐 . 不同剂量阿托伐他汀对亚急性硬膜下血肿的疗效及对 hs-CRP 水平的影响 [J]. 检验医学与临床，2017，14（21）：3175-3177.

[17] 潘文，王振强，高原，等 . 不同剂量阿托伐他汀辅助钻孔引流术治疗慢性硬膜下血肿的疗效及安全性 [J]. 中国老年学杂志，2017，37（24）：6162-6164.

[18] 宋艳艳 . 不同剂量阿托伐他汀钙对慢性硬膜下血肿的疗效对比研究 [J]. 健康大视野，2018（12）：77-78.

[19] 金菊庆，王正德 . 不同剂量阿托伐他汀联合钻孔引流术治疗老年慢性硬膜下血肿效果比较 [J]. 中国乡村医药，2018，25（12）：3-4.

[20] 杨晓清，曾上飞，王朝晖 . 不同剂量阿托伐他汀治疗慢性硬膜下血肿研究 [J]. 中国现代医生，2017，55（1）：80-83.

[21] 徐叶 . 不同剂量阿托伐他汀治疗慢性硬膜下血肿研究 [J]. 中国城乡企业卫生，2018，33（4）：132-133.

[22] Chan DY，Chan DT，Sun TF，et al. The use of atorvastatin for chronic subdural haematoma：a retrospective cohort comparison study [J]. Br J Neurosurg，2017，31（1）：72-77.

[23] Jiang R，Zhao S，Wang R，et al. Safety and Efficacy of Atorvastatin for chronic subdural hematoma in Chinese patients：a randomized clinical trial [J]. JAMA Neurol，2018，75（11）：1338-1346.

[24] Tang R，Shi J，Li X，et al. Effects of atorvastatin on surgical treatments of chronic subdural hematoma [J]. World Neurosurg，2018，117：e425-e429.

[25] Xu M，Chen P，Zhu X，et al. Effects of atorvastatin on conservative and surgical treatments of chronic subdural hematoma in patients [J]. World Neurosurg，2016，91：23-28.

[26] Liu H，Luo Z，Liu Z，et al. Atorvastatin may attenuate recurrence of chronic subdural hematoma [J]. Front Neurosci，2016，28（10）：303-309.

[27] Weigel R，Hohenstein A，Schilling L. Vascular endothelial growth factor concentration in chronic subdural hematoma fluid is related to computed tomography appearance and exudation rate [J]. J Neurotrauma，2014，31（7）：670-673.

[28] Wang B，Sun L，Tian Y，et al. Effects of atorvastatin in the regulation of circulating EPCs and angiogenesis in traumatic brain injury in rats [J]. J Neurol Sci，2012，319（1-2）：117-123.

[29] Araujo FA，Rocha MA，Mendes JB et al. Atorvastatin in-hibits in flammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF，TNF-alpha and TGF-beta1 [J]. Biomed Pharmacother，2010，64（1）：29-34.

[30] Wang D，Li T，Wei H，et al. Atorvastatin enhances angiogenesis to reduce subdural hematoma in a rat model [J]. J Neurol Sci，2016，362：91-99.

[31] Liu HF，Qi XW，Ma LL，et al. Atorvastatin improves endothelial progenitor cell function and reduces pulmo-nary hypertension in patients with chronic pulmonary heart disease [J]. Exp Clin Cardiol，2013，18（1）：e40-43.

（收稿日期：2022-02-21；修回日期：2022-04-11）

临床药师在临床

临床药师参与 1 例妊娠期乳腺癌新辅助化疗的病例分析

刘冬苗[1, 2]，李杨[1]，鲁文茹[1]，谢聪[1*]（1. 南方医科大学南方医院药学部，广州　510515；2. 深圳市龙岗区第三人民医院药学部，广东　深圳　518115）

摘要：临床药师参与并分析和讨论 1 例妊娠期乳腺癌患者新辅助治疗全过程，为此类特殊患者提供用药参考。本案例中，临床药师根据循证医学证据，考虑患者耐受和胎儿安全，建议采用白蛋白结合型紫杉醇联合阿霉素脂质体和环磷酰胺作为新辅助化疗方案，并在整个治疗过程对患者可能出现的药物不良反应进行监护并实时关注胎儿健康状态。最终患者在整个新辅助化疗过程未发生明显不良反应，于妊娠晚期顺利剖宫产一活婴，婴儿情况良好。

关键词：乳腺癌；妊娠期；白蛋白结合型紫杉醇；阿霉素脂质体；新辅助化疗

中图分类号：R737.9　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1693-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.037

世界卫生组织癌症研究机构（IARC）发布的数据显示，2020 年乳腺癌新发病例高达 226 万例，占比 11.7%，其发病率和病死率在女性恶性肿瘤中均列榜首[1]。妊娠相关乳腺癌（pregnancy assisted breast cancer，PABC）是乳腺癌的特殊类型，包括妊娠期间确诊的乳腺癌即妊娠期乳腺癌（breast cancer in pregnancy，BCP）及产后 1 年内确诊的乳腺癌，约占所有乳腺癌患者的 0.2% ～ 3.8%。对于肿块较大（＞ 5 cm）、腋窝淋巴结转移、有保乳意愿但肿瘤大小与乳房体积比例大难以保乳等患者可实施新辅助化疗，目的在于通过全身化疗使肿瘤缩小，为后续手术或放疗创造有利的条件。由于妊娠的特殊性，目前对于妊娠期行新辅助化疗的报道较少。对于 BCP 患者，临床上医师既要考虑患者因素，如临床获益和耐受程度，也要兼顾胎儿安全，如化疗药物暴露是否会增加胎儿致畸、胎儿生长受限、胎死宫内等风险，诊疗难度明显增大。本文报道了 1 例妊娠 18 周$^{+5}$ 初诊断为乳腺癌的患者在接受了 5 个周期新辅助化疗后，在妊娠 35 周$^{+4}$ 顺利行剖宫产一活婴的病例。临床药师从循证学出发，查阅大量资料，对其化疗方案、药物剂型、药物剂量、辅助用药等进行深度分析讨论，并密切关注患者妊娠情况，监护药物对母体及胎儿的不良反应，为该类患者的临床决策提供了参考依据。

1　病例概况

患者，女，30 岁，身高 155 cm，体质量 58 kg，体质量指数 24.1 kg • m^{-2}，体表面积 1.59 m^2，以“发现左侧乳房肿块 6 月余，妊娠 18 周$^{+5}$，确诊左侧乳腺癌 7 d”主诉入院。患者 2020 年 12 月无意中发现左侧乳房外上限肿块，外院行左侧乳腺穿刺活检，未发现肿瘤细胞。2021 年 1 月患者妊娠。2021 年 5 月患者自觉肿块进行性增大，外院行左侧乳腺及左腋窝淋巴结穿刺活检，病理示浸润性导管癌，淋巴结见肿瘤组织。2021 年 6 月患者就诊于本院。入院体格检查：两侧乳房不对称，左乳外上限肿块，直径约 9 cm，皮肤红肿，皮温高；左腋窝淋巴结肿大，大小约 2.5 cm×1.5 cm。于本院再行左侧乳腺肿块及左腋窝淋巴结穿刺活检，经病理学会诊后确诊为左乳浸润性导管癌，左侧腋窝淋巴结转移。免疫组化结果显示：雌激素受体（ER）（弱＋，约 3%）、孕激素受体（PR）（弱＋，约 2%）、HER-2（0）、Ki-67（＋ 80%）。心脏彩超及心电图无异常，Barthel 指数 100 分。产科超声：孕 18 周$^{+5}$。否认家族性遗传病史，否认家族性肿瘤病史。否认食物药物过敏史及烟酒史。

经多学科联合会诊后，于患者妊娠 19 周予 TAC（紫杉类＋蒽环类＋环磷酰胺）方案化疗，具体药物见表 1。

基金项目：广东省医院协会药学科研专项基金（恒瑞）（编号：2021YXQN01）。

作者简介：刘冬苗，女，主管药师，主要从事临床药学方面的研究，email：249108150@qq.com　*通信作者：谢聪，男，博士，主管药师，主要从事生物药剂学与药代动力学方面的研究，email：chuncuixc@126.com

表 1　患者所用具体药物

Tab 1　Specific medicine used by the patient

化疗周期（Q3W）	所用药物及剂量	给药途径	妊娠期用药安全
D1	注射用紫杉醇（白蛋白结合型）300 mg ＋ 0.9% 氯化钠注射液 100 mL	静脉滴注	孕妇慎用
D1	盐酸阿霉素脂质体注射液 40 mg ＋ 5% 葡萄糖注射液 250 mL	静脉滴注	孕妇慎用
D1	注射用环磷酰胺 0.8 g ＋ 0.9% 氯化钠注射液 100 mL	静脉滴注	孕妇慎用
D1	盐酸帕洛诺司琼注射液 0.25 mg ＋ 0.9% 氯化钠注射液 20 mL	静脉推注	可能安全
D1	地塞米松磷酸钠注射液 5 mg	静脉推注	可能有害
D1 ～ 2	地塞米松片 3.75 mg	口服	可能有害
D1 ～ 2	艾司奥美拉唑镁肠溶片 20 mg	口服	可能有害
D1 ～ 2	注射用还原型谷胱甘肽 1 g ＋ 0.9% 氯化钠注射液 250 mL	静脉滴注	无
D1	美司钠注射液 0.4 g ＋ 0.9% 氯化钠注射液 100 mL	静脉滴注	可能安全
D2	聚乙二醇化重组人粒细胞刺激因子注射液 6 mg	皮下注射	无

期间患者未诉特殊不适，出院后复查血常规、肝肾功能均无明显异常。患者于妊娠 22 周、25 周、28 周、31 周按期复查心脏彩超及胎儿二级产科彩超，均无异常，遂按原方案进行第 2 ～ 5 周期化疗，在完成第 5 周期化疗出院后，患者偶感咳嗽、胸闷，无发热，返院完成相关检验检查，肿瘤科医师综合呼吸科及产科意见，暂停化疗，予头孢呋辛抗感染治疗并择期行剖宫产手术。最终患者在妊娠 35 周 $^{+4}$ 行剖宫产一活婴，胎儿 Apgar 评分 9 ～ 10 分，一般情况好。

2　分析

2.1　化疗指征判断

患者入院时妊娠 18 周 $^{+5}$，属于妊娠中期，左乳浸润性导管癌诊断明确。根据肿瘤大小、淋巴结转移情况及现有的影像学检查，分期为局部晚期，但不能排除有远处转移（Ⅳ期），乳腺外科评估不适宜手术治疗，肿瘤科评估具有术前新辅助化疗适应证。患者为首次妊娠，有强烈生育意愿，治疗目标为尽可能地控制肿瘤病情，同时尽量减少胎儿损伤。临床药师查阅相关指南和共识：专家组建议孕周＜ 13 周的 BCP 患者考虑终止妊娠，而对于孕 13 周～ 34 周的 BCP 患者可根据病情实施手术或化疗，胎儿重要器官的发育在妊娠中晚期基本已经完成，此时进行细胞毒药物治疗不会增加先天性畸形的发生率，考虑骨髓抑制可能增加分娩后母亲及新生儿的感染和出血风险，最后一个化疗周期和分娩之间应留出 3 周的时间窗 [2-4]。

2.2　化疗方案选择

对于“HER-2 阴性乳腺癌术前化疗”，指南推荐蒽环联合紫杉方案：TAC（1A），AT（2A）[5]。蒽环类对于 BCP 患者具有相对充足的循证学依据，紫杉醇获得欧洲肿瘤内科学会（ESMO）推荐，而环磷酰胺早期使用致畸率为 18%，中晚期使用致畸率为 1%[4]。该患者心脏彩超及心电图均显示其左心功能正常，既往无心血管疾病史，家族无心脏病史，无使用蒽环类药物禁忌，医师和临床药师充分告知患者妊娠期间接受抗肿瘤治疗可能存在的风险后，确定采用 TAC 方案。

2.3　化疗药物剂型选择

白蛋白结合型紫杉醇及阿霉素脂质体用于乳腺癌新辅助化疗有较多的循证学证据。在国外开展的两项研究表明阿霉素脂质体用于局部晚期乳腺癌新辅助化疗有效 [6-7]，我国一项对比研究也表明阿霉素脂质体与表柔比星在乳腺癌新辅助化疗中的疗效相当且毒性较小 [8]。基于这些研究，我国有专家共识阐述阿霉素脂质体作为新辅助化疗的短期应用可取，其在早期乳腺癌的应用也将越来越明确 [9]。而白蛋白结合型紫杉醇用于乳腺癌新辅助治疗已获得指南推荐 [5]，虽然其周围神经病变的发生率较高，但毒性具剂量依赖性，若治疗期间患者出现不可耐受的周围神经毒性，可根据《紫杉类药物相关周围神经病变规范化管理专家共识》进行调整剂量等干预措施，且有研究表明剂量下调可降低毒性而不会影响病理学完全缓解（pCR）率 [10]。

对于新型制剂用于 BCP 患者，没有指南或共识给出明确的意见。医师倾向于使用循证学依据较多的溶液型制剂，但有研究显示新辅助治疗中白蛋白结合型紫杉醇比溶液型紫杉醇有更高的 pCR 率，尤其是对三阴性乳腺癌患者 [10]。阿霉素脂质体是将阿霉素包封于聚乙二醇化脂质体中的制剂，具有靶向性、缓释作用、良好的组织相容性及低心脏毒性等优点。鉴于白蛋白结合型紫杉醇及阿霉素脂质体这两种新型制剂上市时间相对较短，暂未找到其用于 BCP 患者的相关报道。阿霉素及紫杉醇均为 P- 糖蛋白（P-gp）底物，胎盘中 P-gp 通常高表达，游离的阿霉素及紫杉醇具

有高蛋白结合力，可受到 P-gp 外排[11-12]。有离体双灌注人胎盘子叶模型实验比较了三种紫杉醇制剂 Taxol（溶液型）、Abraxane（白蛋白结合型）和 Genexol-PM（聚合物胶束）进入胎儿循环的速率，以及在胎盘中的累积程度，结果表明仅在用 Genexol-PM 灌注时胎盘有更高的紫杉醇吸收，而用 Abraxane 灌注的紫杉醇吸收与 Taxol 相当[13]。有实验比较溶液型阿霉素及其两种脂质体制剂（pH 敏感型 [L-DOX] 和聚乙二醇化型 [PL-DOX]）在人胎盘绒毛膜癌细胞中的细胞摄取和毒性，结果表明 PL-DOX 的毒性明显低于其他制剂，且在整个灌注过程中基本保持在母体循环中。PL-DOX 在表面形成空间屏障并阻碍其与细胞表面分子的非特异性相互作用，以及随后的内吞作用，使其具有更低的胎盘透过率[14]。

基于以上研究，临床药师建议使用白蛋白结合型紫杉醇及阿霉素脂质体，最终，医师采纳临床药师建议，化疗方案使用白蛋白结合型紫杉醇和阿霉素脂质体。

2.4　化疗药物剂量确定

3 周方案的新辅助化疗研究中白蛋白结合型紫杉醇以 260 mg • m^{-2} 给药[15]，阿霉素脂质体以 35 mg • m^{-2} 给药[6-8]，指南推荐环磷酰胺以 500 mg • m^{-2} 给药[5]。医师倾向于对妊娠患者实施初始剂量减少作为胎儿保护措施，临床药师意识到妊娠期间，患者的表观分布容积、细胞色素酶 P450 酶活性、血浆白蛋白浓度、血浆容量等都会发生变化，不应该事先减少剂量。研究显示娠娠期间阿霉素的浓度 - 时间曲线下面积（*AUC*）降低了 5.2%，阿霉素暴露量下降可能获得更低的心脏毒性风险，但随着孕周的增加，胎儿逐渐发育，氧耗逐渐增加，相应加重心肺负荷，这是否会抵消妊娠期间阿霉素暴露量下降带来的心脏获益未知。而对于紫杉醇，娠娠期间 *AUC* 下降达 27.4%，而血药浓度超过阈值的时间降低了 10.9%，峰浓度（C_{max}）降低了 36.8%[16]。紫杉醇的药代动力学行为是非线性的，有文献认为其药代动力学参数的变化可能不会改变疗效，而是对不良反应有影响，较低的 C_{max} 和 *AUC* 意味着妊娠人群与未妊娠人群相比毒性风险更低，但这是否会转化为疗效下降尚不清楚[17]。最终医师权衡获益与风险，选择白蛋白结合型紫杉醇以 185 mg • m^{-2} 给药，阿霉素脂质体以 25 mg • m^{-2} 给药，环磷酰胺以 500 mg • m^{-2} 给药。

2.5　辅助用药选择

恶心、呕吐是化疗药物常见的不良反应。根据指南，含蒽环类和环磷酰胺的化疗方案具有高致吐风险，发生恶心呕吐的概率＞90%，可选 NK-1 受体拮抗剂＋ 5-HT3 受体拮抗剂＋地塞米松 ± 奥氮平作为预防方案[18-19]。上市后有阿瑞匹坦与异环磷酰胺合用出现了神经毒性的报道[20]，环磷酰胺为异环磷酰胺的同分异构体，不确定阿瑞匹坦与其是否存在相互作用，在获得更多安全性数据之前，临床药师不推荐使用这类药物。5-HT3 受体拮抗剂已被广泛用于妊娠导致的恶心和呕吐。对于必须接受医源性早产的胎儿，产前应用地塞米松可促胎肺成熟，提升新生儿 Apgar 评分[21]，最终医师选择 5-HT3 受体拮抗剂＋地塞米松作为止吐方案。临床药师查阅文献发现，与 1 代相比，2 代 5-HT3 受体拮抗剂帕洛诺司琼与 5-HT3 受体结合能力更强，预防化疗所致急性恶心呕吐的疗效更好[22]。医师接纳临床药师建议，选用帕洛诺司琼。

还原型谷胱甘肽是谷胱甘肽主要的活性状态，能与亲电子基与自由基等有害物质结合，从而产生解毒和保护细胞的作用[23]。在一项还原型谷胱甘肽治疗妊娠期肝内胆汁淤积症的效果观察研究中，研究组早产、羊水污染、新生儿 Apgar ≤ 7 分发生率均显著低于对照组，表明孕期使用还原型谷胱甘肽是安全的[24]。美司钠具有巯基可与环磷酰胺有毒代谢物丙烯醛结合形成无毒的化合物，也可与 4-OH- 环磷酰胺和 4-OH- 异环磷酰胺结合，从而避免膀胱炎的发生，静脉使用后，仅少量药物以硫化物的形式存在于全身血液循环中，故临床药师认为其在妊娠期使用是安全的。另外一项质子泵抑制剂（PPI）对孕妇体外子宫肌层的松弛作用的研究表明 PPI 会减少子宫肌层平滑肌的自发收缩[25]，因此临床药师建议分娩前 3 周停止使用艾司奥美拉唑。化疗进行到第 4 周期时医师咨询临床药师是否可以使用右雷佐生作为预防蒽环类心脏毒性的药物。右雷佐生有潜在遗传毒性，2014 年英国药品与保健品管理局（MHRA）警示右雷佐生的使用限制：乳腺癌患者在开始使用右雷佐生前，应已累积接受至少 300 mg • m^{-2} 阿霉素的剂量，该患者整个新辅助治疗期间接受阿霉素的剂量不会超过此剂量，因此药师不推荐患者此阶段使用右雷佐生。

患者每个化疗周期结束 24 h 后均预防性皮下注射聚乙二醇重组人粒细胞集落刺激因子注射液（PEG-rhG-GSF）。尽管粒细胞集落刺激因子

（G-CSF）在妊娠期间的有效性和安全性尚未确立，但有研究称 G-CSF 的使用不会影响新生儿的结局[26]，且有共识指出对于接受粒细胞减少性发热（FN）高危化疗方案的患者推荐预防性使用 G-CSF，而患者所使用的 TAC 方案，为常见的可引发高 FN 发生风险的化疗方案，可使用 PEG-rhG-GSF 预防中性粒细胞减少的发生[27]。临床药师和医师认为该患者使用 G-CSF 潜在获益大于对胎儿的潜在危险，予以使用。

3　小结

随着乳腺癌的高发，BCP 发病率也随之增加，与分娩后再对病情进行评估和治疗相比，妊娠期间接受任何有效干预都显示出总体生存率提高的趋势[28]，因此妊娠期接受细胞毒药物治疗也越来越常见。阿霉素脂质体及白蛋白结合型紫杉醇用于乳腺癌新辅助治疗已多有研究[6-8，10，15]，但用于 BCP 患者的新辅助化疗鲜有报道。虽有证据证明在妊娠中晚期使用化疗药物相对安全，但妊娠期接受化疗仍有风险，如可能导致胎儿宫内发育受限、神经系统发育迟缓以及不得不接受医源性早产导致胎儿出生体重过轻等问题，故化疗期间需密切监测母亲及胎儿各项指标，临床药师要对不良反应进行监控，发现异常及时处理，以减少不良事件的发生。

在本例患者的新辅助治疗过程中，临床药师查询国内外指南共识及相关文献，参与治疗方案的制订，对使用中的药物实施药学监护并记录用药日志，积极与患者沟通，对患者进行用药教育，以保证患者用药安全，并从循证学方面对患者实施化疗的指征、方案、剂型、剂量以及辅助用药进行分析讨论。BCP 的治疗难点在于必须兼顾患者治疗的有效性及胎儿的安全性，随着药物纳米制剂载体的问世，化疗过程中药物的选择尤为关键，需要临床药师积极参与，为临床医师提供建议，实施个体化治疗。特殊人群如儿童、老人、妊娠妇女等是临床药师在临床工作中需要重点监护的对象，临床药师须不断学习，与时俱进，不断提高自身业务水平，才能在多学科诊疗中发挥作用，为患者提供更全面的药学服务。

参考文献

[1] Sung H，Ferlay J，Siegel RL，et al. Global cancer statistics 2020：GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin，2021，71（3）：209-249.

[2] Peccatori FA，Azim J，Orecchia R，et al. Cancer，pregnancy and fertility：ESMO clinical practice guidelines for diagnosis，treatment and follow-up [J]. Ann Oncol，2013，24：160-170.

[3] National Comprehensive Cancer Network. Clinical practice guidelines in oncology：breast cancer.（version 1，2021）[EB/OL].（2021-01-15）https：//www. nccn. org/patients.

[4] 中华医学会外科学分会乳腺外科学组 . 妊娠相关性乳腺癌临床诊治专家共识 [J]. 中华临床医师杂志，2020，14（5）：321-325.

[5] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会 . 中国临床肿瘤学会乳腺癌诊疗指南 [M]. 北京：人民卫生出版社，2020：133-170.

[6] Gil-Gil MJ，Bellet M，Morales S，et al. Pegylated liposomal doxorubicin plus cyclophosphamide followed by paclitaxel as primary chemotherapy in elderly or cardiotoxicity-prone patients with high-risk breast cancer：results of the phase Ⅱ CAPRICE study [J]. Breast Cancer Res Treat，2015，151（3）：597-606.

[7] Gogas H，Papadimitriou C，Kalofonos HP，et al. Neoadjuvant chemotherapy with a combination of pegylated liposomal doxorubicin（Caelyx）and paclitaxel in locally advanced breast cancer：a phase Ⅱ study by the Hellenic Cooperative Oncology Group [J]. Ann Oncol，2002，13（11）：1737-1742.

[8] Dong M，Luo L，Ying X，et al. Comparable efficacy and less toxicity of pegylated liposomal doxorubicin versus epirubicin for neoadjuvant chemotherapy of breast cancer：a case-control study [J]. Onco Targets Ther，2018，11：4247-4252.

[9] 李南林，张强，刘红 . 多柔比星脂质体治疗乳腺癌青海会议专家共识 [J]. 中华肿瘤防治杂志，2019，26（19）：1405-1409.

[10] Untch M，Jackisch C，Schneeweiss A，et al. Nab-paclitaxel improves disease-free survival in early breast cancer：GBG 69-geparsepto [J]. J Clin Oncol，2019，37（25）：2226-2234.

[11] Mir O，Berveiller P，Ropert S，et al. Emerging therapeutic options for breast cancer chemotherapy during pregnancy [J]. Ann of Oncol，2008，19（4）：607-613.

[12] Mir O，Berveiller P，Rouzier R，et al. Chemotherapy for breast cancer during pregnancy：is epirubicin safe [J]. Ann of Oncol，2008，19（10）：1814-1815.

[13] Ali S，Albekairi NA，Al Enazy S，et al. Formulation effects on paclitaxel transfer and uptake in the human placenta [J]. Nanomedicine，2021，33：102354.

[14] Soininen SK，Repo JK，Karttunen V，et al. Human placental cell and tissue uptake of doxorubicin and its liposomal formulations [J]. Toxicol Lett，2015，239（2）：108-114.

[15] 余峰，刘晶晶，张晟，等 . 白蛋白紫杉醇用于乳腺癌新辅助化疗的二期临床研究 [J]. 中华乳腺病杂志，2014，8（4）：236-243.

[16] Van Hasselt JGC，Van Calsteren K，Heyns L，et al. Opti-

mizing anticancer drug treatmentin pregnant cancer patients：pharmacokinetic analysis of gestation-induced changes for doxorubicin，epirubicin，docetaxel and paclitaxel [J]. Ann Oncol，2014，25（10）：2059-2065.

[17] Spencer CM，Faulds D. Paclitaxel. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer [J]. Drugs，1994，48（5）：794-847.

[18] National Comprehensive Cancer Network. Clinical practice guidelines in oncology：Antiemesis.（Version 1，2021）[EB/OL].（2020-12-23）https：//www. nccn. org/patients.

[19] 中国抗癌协会肿瘤临床化疗专业委员会，中国抗癌协会肿瘤支持治疗专业委员会 . 肿瘤药物治疗相关恶心呕吐防治中国专家共识 [J]. 中国医学前沿杂志，2019，11（11）：16-26.

[20] Howell JE，Szabatura AH，Hatfield Seung A，et al. Characterization of the occurrence of ifosfamide-induced neurotoxicity with concomitant aprepitant [J]. J Oncol Pharm Pract，2008，14（3）：157-162.

[21] 王黎秋 . 产前应用地塞米松促胎肺成熟治疗对糖尿病妊娠患者结局的影响 [J]. 现代诊断与治疗，2020，31（7）：1086-1088.

[22] 张田，李超，倪倩 . 5-HT3 受体拮抗剂预防高度化疗所致急性恶心呕吐的网状 Meta 分析 [J]. 中国药学杂志，2019，54（14）：1194-1202.

[23] 李晓晖，文娱陈，云艳 . 注射用还原型谷胱甘肽临床用药情况分析 [J]. 海峡药学，2020，32（1）：202-204.

[24] 周学梅 . 还原型谷胱甘肽治疗妊娠期肝内胆汁淤积症的效果观察 [J]. 中国妇幼保健，2017，32（9）：1885-1887.

[25] Terranova C，Petrella C，Improta G，et al. Relaxant effect of proton pump inhibitors on in vitro myometrium from pregnant women [J]. Eur J Pharm Sciences，2014，52：125-131.

[26] Cardonick E，Irfan F，Torres N. The use of neupogen（filgrastim）or neulasta（pegfilgrastim）during pregnancy when chemotherapy is indicated for maternal cancer treatment [J]. J Cancer Ther，2012，3（2）：157-161.

[27] 中国抗癌协会肿瘤临床化疗专业委员会，中国抗癌协会肿瘤支持治疗专业委员会 . 肿瘤化疗导致的中性粒细胞减少诊治专家共识 [J]. 中国肿瘤临床，2019，46（17）：876-882.

[28] Yu HH，Cheung PS，Leung RC，et al. Current management of pregnancy-associated breast cancer [J]. Hong Kong Med J，2017，23（4）：387-394.

（收稿日期：2021-11-01；修回日期：2021-12-28）

《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，从 2022 年 1 月 1 日开始，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（第一作者或通信作者）：

① 国家级基金项目核心研究论文每篇奖励 1000 ～ 2000 元。

② 省部级基金项目核心研究论文每篇奖励 500 ～ 800 元。

3. 投稿要求和注意事项

① 投稿请直接登陆官网（http：//znyx.cbpt.cnki.net）首页，点击“作者投稿系统”栏，按要求填写有关内容和项目后直接进行投稿，注明“基金论文投稿”。

② 论文写作参考本刊投稿须知，项目要齐全，包括中英文标题，中英文作者及作者单位（包括邮编、所在地、单位名称、科室名称），中英文摘要及关键词，正文，图表（图表标题中英文对照）；稿件所附图片一律要求使用原始清晰图片（像素不能低于 200）。

③ 来稿请在署名下标明：基金项目（项目来源及编号）；作者简介（包括姓名、性别、学位、技术职称、是否研究生导师、主要研究方向和 email）。

④ 来稿须附单位推荐证明（明确注明“同意推荐、内容真实、无一稿两投、不涉及保密及署名争议问题”）和基金项目合同书扫描件。

药事管理

采用 PDCA 循环管理规范重点监控药品合理使用的实践

陈刚，袁玉丽，黄秋明（武汉科技大学附属孝感医院 孝感市中心医院药学部，湖北 孝感 432000）

摘要：目的 促进医院重点监控药品临床合理使用。**方法** 采用 PDCA 循环对重点监控药品的使用进行管理，并对 PDCA 循环管理前（2018 年 4 月—2018 年 9 月）、管理后（2018 年 10 月—2019 年 3 月）我院重点监控药品使用情况进行分析，评价管理效果。**结果** 采取 PDCA 循环管理后，我院重点监控药品使用金额下降幅度达 32.37%，重点监控药品金额占比由 19.83% 降至 13.12%；全院药占比降幅达 3.83%，患者人均重点监控药品费用下降 35.71%；使用金额排名前 20 的重点监控药品总使用金额下降幅度达 42.18%；大部分临床科室重点监控药品占比下降比例在 3.63% ～ 81.51%，重点监控药品占比达标科室由 2 个增加到 16 个。**结论** PDCA 循环管理能有效减少重点监控药品的使用，明显降低药品费用，促进临床合理用药。

关键词：重点监控药品；PDCA 循环管理；合理用药

中图分类号：R95 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)07-1698-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.038

Practice of standardizing rational use of key monitoring drugs by PDCA cycle management

CHEN Gang, YUAN Yu-li, HUANG Qiu-ming (*Department of Pharmacy*, *Xiaogan Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology*, *Xiaogan Center Hospital*, *Xiaogan Hubei* 432000)

Abstract: Objective To promote rational use of key monitoring drugs. **Methods** PDCA cycle management was used to manage the use of key monitoring drugs. The use of key monitoring drugs before (April 2018 to September 2018) and after (October 2018 to March 2019) PDCA cycle management in our hospital was analyzed, so as to evaluate the management effects. **Results** After PDCA cycle management, consumption sum of key monitoring drugs decreased by 32.37%. The proportion of key monitoring drugs in all drugs fell from 19.83% to 13.12%. The drug ratio reduced by 3.83%, and per capita cost of key monitoring drugs lowered by 35.71%. The consumption sum of top 20 key monitoring drugs dropped by 42.18%. The decline proportion of key monitoring drugs in most clinical departments reached 3.63% ～ 81.51%, and the number of clinical departments with the proportion of key monitored drugs reached standard upped from 2 to 16. **Conclusion** PDCA cycle management can effectively reduce the use of key monitoring drugs, with significantly reduce drug cost, which has promoted clinical rational drug use.

Key words: key monitoring drug; PDCA cycle management; rational drug use

随着医改的逐渐深入和医保控费压力的增大，切实加强重点监控药品的管理、减轻患者的药品费用负担和降低医保的不合理支出已成为医疗机构管理中的重点。国家卫健委和各省（自治区、直辖市）卫健委相继出台要求做好重点监控药品管理工作的政策文件[1-2]。2019 年 7 月，

基金项目：孝感市自然科学计划项目（No. XGKJ2020010021）。

作者简介：陈刚，男，硕士，主管药师，主要从事医院药学工作，email：770981534@qq.com

国家卫健委会同国家中医药局关于印发《第一批国家重点监控合理用药药品目录（化药及生物制品）》的通知中要求医疗机构制订本机构重点监控合理用药药品目录和重点监控合理用药药品管理制度，对纳入目录中的全部药品开展处方点评[3]。

为做好重点监控药品的管理工作，促进临床合理用药，我院采用 PDCA 循环对重点监控药品的合理使用进行管理。本文重点介绍了 PDCA 循环在我院重点监控药品规范化管理中的应用，通过对实施 PDCA 循环管理前后的重点监控药品使用情况进行回顾性分析，评价管理成效，以期为医疗机构规范重点监控药品合理使用提供借鉴，亦可为药师参与临床治疗团队，充分发挥其在药物治疗学中的作用提供契机，促进药学服务转型。

1　资料与方法

1.1　数据收集

通过医院信息管理系统（HIS 系统），提取我院 2018 年 4 月—2018 年 9 月（PDCA 循环管理前）与 2018 年 10 月—2019 年 3 月（PDCA 循环管理后）重点监控药品使用情况，包括药品名称、数量、销售金额等信息。我院重点监控药品目录主要包括中药注射剂、质子泵抑制剂、营养支持类药、维生素类药、神经营养类药、免疫调节剂和其他等七大类。运用 Excel 2010 软件对 PDCA 循环管理前后我院重点监控药品使用金额、重点监控药品金额占比、全院药占比、人均住院重点监控药品费用、人均住院药品费用、人均住院重点监控药品占比、重点监控药品单品种使用金额和重点监控药品使用科室情况等指标进行统计分析[4]。药占比（%）＝全院药品使用总金额 / 全院医疗总收入 ×100%；重点监控药品占比（%）＝重点监控药品使用金额 / 全院药品使用总金额 ×100%。

1.2　计划阶段（Plan）

1.2.1　现状调查　我院 2018 年 4 月—2018 年 9 月药占比为 32.89%，重点监控药品占比为 19.83%，进入全院药品使用金额前 20 位的重点监控药品品规数有 9 个，重点监控药品使用金额为 3492.39 万元，住院人均药品费用为 3578.26 元，其中住院人均重点监控药品占比为 25.74%，重点监控药品占比达标的科室仅有 2 个。

1.2.2　原因分析　采用头脑风暴法[5]，从人、机、物、法和环等五个方面进行原因分析，绘制鱼骨图[6-11]，见图 1。通过绘制柏拉图[12]，筛选出重点监控药品不合理使用的主要原因为管理组织和制度不健全、未拟订考核奖惩制度、未开展专项点评、医师合理用药意识不强以及信息系统不完善等，见图 2。针对不合理使用的主要原因制订质量改进计划和对策，以半年度为时间节点，进行效果确认。

图 1　重点监控药品不合理使用的鱼骨图分析

Fig 1　Fishbone analysis of irrational use of key monitoring drugs

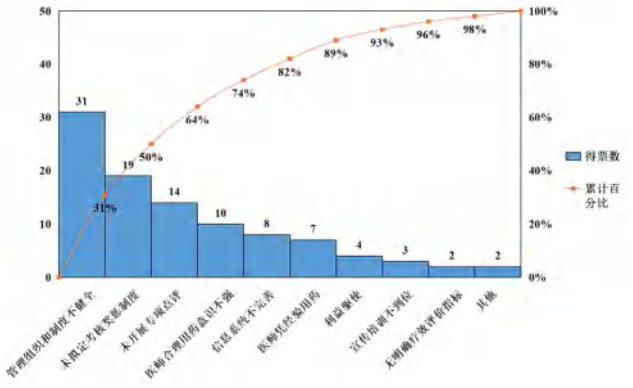


图 2　重点监控药品不合理使用主要原因的柏拉图分析

Fig 2　Plato analysis of main causes of irrational use of key monitoring drugs

1.3　执行阶段（Do）

1.3.1　健全重点监控药品管理组织和管理制度　在药事管理与药物治疗学委员会下设立重点监控药品管理小组，负责制订重点监控药品管理制度、政策与措施。在临床科室设立由主任、医师和护士组成的药事管理小组，负责科室内药事管理的督查、反馈与整改，构建了重点监控药品的三级质控体系。并根据国家相关文件精神，制订《重点监控药品临床使用管理细则》。

1.3.2　建立重点监控药品预警监控机制　通过建立重点监控药品监测、评价和超常预警制度，对其临床使用的安全性、有效性、合理性和经济性进行监测、分析、评估，并定期对使用异常的重点监控药品按使用数量和使用金额分别进行排名公示，充分发挥监督作用。根据临床使用情况，对用量异常和点评使用不合理的品种及时采取限停限控措施，并

“约谈”相关重点监控药品供应商。

1.3.3 实行重点监控药品目标值管理 根据各临床科室既往重点监控药品使用金额占比和全院总体监控目标值，结合临床科室的疾病覆盖范围和重点监控药品的绝对适应证，按层级划分临床科室重点监控药品使用金额占比目标值，并与临床科室负责人签订责任状。药学部定期统计分析临床科室重点监控药品使用情况，上报评审评价办进行绩效考核，并及时在医院 OA 网和《用药安全时讯》上发布，由医务部牵头对连续不达标的科室进行重点督查，并制订整改方案。

1.3.4 开展重点监控药品处方（医嘱）专项点评 利用临床药师工作站系统，点评小组按照《处方管理办法》和《医疗机构处方审核规范》的要求，每月对重点监控药品处方（医嘱）开展专项点评，重点关注适应证不适宜或超适应证用药、用法用量不适宜、溶媒及给药浓度不适宜、疗程过长、有用药禁忌、联合用药及重复给药等现象。针对使用数量和金额排名前 10 位的重点监控药品，全部纳入点评范围，并覆盖到全院临床科室和处方（医嘱）医师。例如，在开展的质子泵抑制剂专项点评中，随机抽取 100 份病历进行点评，结果发现不合理病历 18 份，合理率为 82%，其中适应证不适宜 16 份（88.89%），疗程过长及用法用量不适宜 2 份（11.11%）。点评结果和整改意见及时反馈给临床科室，并与医师绩效考核、评先评优和职称晋升挂钩。

1.3.5 建立重点监控药品替代目录 在保证临床治疗需要的前提下，基于药品说明书、相关诊疗指南、专家共识以及临床路径等证据，临床药师充分发挥专业优势，积极挖掘可替代重点监控药品的药品，首选国家基本药物，建立替代目录，并推送给医师。

1.3.6 推进重点监控药品管理信息化 积极推进信息化建设，HIS 系统中对重点监控药品进行标记，医师站开具重点监控药品时弹出警示框。依据医师和临床药师达成的共识，及时在合理用药监测系统中进行内规则修订，调整警示信号。根据药品绝对适应证，选择性开放专业科室使用，严格控制证据级别不高的相对适应证。通过临床药师工作站系统，对用量异常的药品、科室和医师实现精准点评，并随时与医师线上交流，及时反馈点评结果。

1.3.7 完善重点监控药品绩效考核机制 将药占比和重点监控药品金额占比纳入综合目标考核，分月和季度对科室进行绩效考核。对于不达标的科室，将当月绩效工资按照医院绩效考核相关规定扣减相应比例，用于奖励改进效果明显的科室。

1.4 检查阶段（Check）

成立了以医务部、门诊办公室、药学部和评审评价办多方合作的督查小组，药学部组织专项点评并形成负面清单，医务部和门诊办公室根据负面清单对医师个人进行约谈、扣罚绩效、暂停 / 取消处方权、取消评先评优和延迟晋升资格等措施，评审评价办将负面清单纳入综合目标考核。定期统计分析重点监控药品的使用情况，及时了解执行措施的有效性，以便适时调整执行措施，在 PDCA 循环管理结束后，整体分析我院重点监控药品的使用情况，评价 PDCA 循环管理的效果。

1.5 处理阶段（Action）

对有效的执行措施进行标准化，并建立了一套标准化管理流程。每月由处方点评小组负责专项点评并形成负面清单，上报医务部、门诊办公室和评审评价办，分别对医师和所在科室进行惩罚和绩效考核，并及时将整改意见反馈给临床科室药事管理小组。根据临床药师和医师达成的共识，及时进行内规格修订，完善信息管理系统。在满足临床治疗的前提下，组织临床药师挖掘可替代重点监控药品的药品，并及时推送给临床医师。虽然取得了明显的成效，大部分科室的重点监控药品占比呈大幅下降，但未完全达标，且有个别品种使用金额和个别科室重点监控药品占比不降反升，在下一轮 PDCA 循环管理中应重点关注以期得到解决。

2 结果

经过 PDCA 循环管理后，我院重点监控药品使用金额下降幅度达 32.37%，重点监控药品金额占比降幅达 33.85%。进入全院药品使用金额排名前 20 位的重点监控药品品规数从 9 个降至 3 个，排名前 10 位的重点监控药品使用金额下降 23.97%。全院药占比降幅达 3.83%。住院人均药品费用下降 7.89%，住院人均重点监控药品费用下降 35.71%。使用金额排名前 20 位的重点监控药品总使用金额降幅达 42.18%，8 个品种降幅大于 50%。绝大部分临床科室的重点监控药品占比呈明显下降趋势，重点监控药品占比达标科室由 2 个增加到 16 个。具体见表 1 ～ 3。

3 讨论

PDCA 循环管理是一种科学、全面、有效的质量管理方法。我院将其引入到重点监控药品的管理中，通过根因分析，制订行政干预和技术干预相结合的对策，两者相辅相成，对重点监控药

表 1　我院药品及重点监控药品使用情况

Tab 1　Drugs and key monitoring drugs in our hospital

项目	管控前	管控后	变化幅度 /%
重点监控药品使用金额 / 万元	3492.39	2361.86	－ 32.37
药品使用总金额 / 万元	17 612.24	18 005.56	2.23
进入全院药品使用金额前 20 位的重点监控药品品规数 / 个	9	3	－ 66.67
排名前 10 位的重点监控药品使用金额 / 万元	1392.75	1058.86	－ 23.97
重点监控药品金额占比 /%	19.83	13.12	－ 33.85
全院药占比 /%	32.89	31.63	－ 3.83
出院人数 / 人	36 478	38 652	5.96
住院人均重点监控药品费用 / 元	921.16	592.21	－ 35.71
住院人均药品费用 / 元	3578.26	3296.04	－ 7.89
住院人均重点监控药品占比 /%	25.74	17.97	－ 30.21

表 2　使用金额排名前 20 位的重点监控药品使用情况

Tab 2　Top 20 key monitoring drugs

排序	药品名称	规格	管控前金额 / 万元	管控后金额 / 万元	变化金额 / 万元	变化幅度 /%
1	奥拉西坦注射液	5 mL：1 g	206.33	147.43	－ 58.90	－ 28.54
2	丹红注射液	20 mL	170.26	37.31	－ 132.95	－ 78.09
3	注射用艾司奥美拉唑钠	40 mg	165.47	96.56	－ 68.91	－ 41.64
4	单唾液酸四己糖神经节苷脂注射液	2 mL：40 mg	133.69	55.28	－ 78.41	－ 58.65
5	注射用丹参多酚酸盐	100 mg	130.34	18.70	－ 111.64	－ 85.66
6	复方氨基酸注射液（15AA）	250 mL：20 g	130.11	140.99	10.88	8.36
7	参芎葡萄糖注射液	100 mL：0.1 g	124.18	35.76	－ 88.42	－ 71.20
8	丙氨酰谷氨酰胺注射液	50 mL：10 g	112.42	59.15	－ 53.27	－ 47.39
9	脑苷肌肽注射液	5 mL	111.22	77.96	－ 33.26	－ 29.91
10	舒肝宁注射液	2 mL	108.70	12.44	－ 96.26	－ 88.55
11	注射用骨肽	25 mg	100.12	101.12	1.00	1.00
12	注射用兰索拉唑	30 mg	96.14	98.88	2.74	2.85
13	血必净注射液	10 mL	96.07	6.27	－ 89.80	－ 93.47
14	单唾液酸四己糖神经节苷脂钠注射液	2 mL：20 mg	94.33	66.24	－ 28.09	－ 29.78
15	注射用泮托拉唑钠	60 mg	94.30	82.12	－ 12.18	－ 12.92
16	谷红注射液	5 mL	92.25	114.54	22.29	24.16
17	氨基酸注射液	250 mL：12.5 g	91.10	83.76	－ 7.34	－ 8.06
18	痰热清注射液	10 mL	89.91	18.51	－ 71.40	－ 79.42
19	注射用小牛血去蛋白提取物	0.4 g	89.33	66.23	－ 23.10	－ 25.86
20	注射用丹参多酚酸盐	50 mg	80.42	20.27	－ 60.15	－ 74.79
合计			2316.73	1339.54	－ 977.19	－ 42.18

品实行“多管齐下”的管理，取得了一定的成效，现将我院重点监控药品管理经验总结如下。

依据国家政策和相关治疗指南，组织临床药师和临床专家对我院原辅助用药目录进行了修订，经药事管理与药物治疗学委员会讨论通过，确定将 58 种药品（89 个品规）纳入我院重点监控药品目录并对目录实施动态调整，目录中药品主要分为中药注射剂、质子泵抑制剂、营养支持类药、维生素类药、神经营养类药、免疫调节剂和其他等七大类。为加强重点监控药品管理，适时将 2016 年制定的《辅助用药管理规定》修订为《重点监控药品临床使用管理细则》，完善了我院重点监控药品管理制度。同时充分运用临床科室副主任 / 护士长、医师和护士构成的三级质控体系和临床科室药事管理小组微信群，适时推送国家相关政策文件，保证国家政策下达的时效性。

将重点监控药品纳入月度和季度综合目标考核，与绩效挂钩。根据医院整体监控目标，结合疾病覆盖范围和重点监控药品绝对适应证，划定各临床科室重点监控药品使用金额占比目标值。药学部按月和季度对临床科室重点监控药品占比进行分析，上报评审评价办进行绩效考核，并在医院 OA 网和《用药安全时讯》上及时发布分析报告，对于持续不达标的科室进行重点督查。

表 3　临床科室重点监控药品占比变化情况

Tab 3　Changes in the proportion of key monitoring drugs in clinical departments

科室名称	重点监控药品占比 /%		变化幅度 /%	目标值 /%
	管控前	管控后		
口腔科	30.46	5.63	－81.51	10
肛肠科	46.24	9.44	－79.58	10
儿科Ⅱ	6.01	1.24	－79.32	10
耳鼻喉科	18.81	5.35	－71.57	10
内分泌科Ⅰ	19.43	6.45	－66.79	10
呼吸内科Ⅱ	17.07	5.68	－66.75	10
呼吸内科Ⅰ	15.49	5.49	－64.60	10
心内科Ⅰ	23.37	9.01	－61.46	10
心内科Ⅱ	38.38	17.18	－55.23	10
呼吸内科Ⅲ	13.68	6.47	－52.69	10
感染科Ⅰ	22.04	11.78	－46.55	10
普外科Ⅲ	22.97	12.74	－44.54	10
骨科Ⅰ	29.76	16.74	－43.75	15
眼科	48.94	27.77	－43.26	15
妇科Ⅱ	11.19	6.48	－42.11	10
妇科Ⅰ	11.67	7.19	－38.38	10
急诊儿科	12.62	7.92	－37.24	10
内分泌科Ⅱ	26.98	17.03	－36.87	10
中医科、老年医学科	31.56	20.06	－36.43	10
新生儿科	23.45	15.20	－35.17	10
普外科Ⅰ	34.29	22.23	－35.17	15
皮肤科	29.57	19.90	－32.69	10
儿科Ⅲ	0.44	0.30	－30.56	10
骨科Ⅱ	35.09	24.64	－29.78	15
感染科Ⅱ	13.45	9.57	－28.81	10
综合 ICU	19.34	13.81	－28.63	10
儿科Ⅰ	10.72	7.68	－28.38	10
消化内科Ⅰ	35.47	26.46	－25.39	15
急诊内科	27.18	20.33	－25.19	10
产科	15.11	11.57	－23.45	15
骨科Ⅲ / 手外科	46.83	36.71	－21.61	15
普外科Ⅱ	27.16	21.36	－21.35	15
肾内科	14.99	11.79	－21.32	10
康复科	63.38	50.33	－20.58	25
泌尿外科	18.21	14.57	－20.01	10
急诊外科 / 整形外科、烧伤科	54.92	45.00	－18.05	25
消化内科Ⅱ	26.74	22.42	－16.16	15
肿瘤科Ⅱ	24.45	20.54	－15.98	15
肿瘤科Ⅰ	18.40	15.53	－15.60	15
胸心外科 / 血管外科	20.15	17.29	－14.19	15
神经内科Ⅰ	37.37	32.21	－13.80	25
神经内科Ⅱ	43.48	40.32	－7.27	25
神经外科	34.22	32.97	－3.63	25
血液内科	21.92	23.63	7.80	15

为了提高处方点评质量和同质化，组织临床药师和临床专家根据药品说明书、相关诊疗指南、专家共识以及临床路径制订点评标准。加强处方点评人员的业务学习，对点评人员进行集中培训，选送青年药师参加湖北省医院药师处方审核能力培训班。对于临床医师有异议的点评结果，提交药事管理与药物治疗学委员会进行讨论，形成院内共识。

提升药师在临床治疗团队中的影响力，在保证临床治疗需要的前提下，基于药品说明书、相关诊疗指南、专家共识以及临床路径等证据，临床药师发挥自身专业优势，积极挖掘可替代重点监控药品的药品，首选国家基本药物，建立替代目录，并推送给医师。

借助医院信息化建设，在信息系统中标记重点监控药品，医师站开具处方（医嘱）时弹出警示框。依据医师和临床药师达成的共识，及时进行内规则修订，调整警示信号。根据药品绝对适应证，选择性开放专业科室使用，严控证据级别不高的相对适应证，避免了对重点监控品的“一刀切”式管控，保证了临床的治疗需要。

经过 PDCA 循环管理后，取得了一定成效，但是由于制订对策的局限性，仍存在一些不足，下一轮 PDCA 将从以下方面进行改进：① 通过总体药占比控制，进一步优化药品结构，帮助临床科室确定用药目录，纳入临床路径管理，增强医师参与重点监控药品管控的主动性和积极性；② 加大支持药师参与医药护治疗团队的力度，充分发挥药师在药物治疗学中的作用，变“事后干预”为“事前预防”，使药师成为临床药物治疗中促进合理用药、控制医药费用不合理增长不可缺少的专业队伍；③ 我院是三级综合医院，西医占据主导位置，大部分医师对中医理论认知缺乏，导致中药注射剂滥用严重，点评难度大，亟需进一步规范；④ 重点监控药品的合理使用离不开医师、患者及家属的参与和配合，发挥药师在合理用药中的专业优势，加大对医师、患者及家属的宣传教育力度。

重点监控药品管理是三级公立医院绩效考核的重要组成部分 [13]，我院采用 PDCA 循环管理有效减少了重点监控药品的使用，明显降低了患者药费负担。但如何借助药师的专业优势，充分发挥医药护治疗团队的作用，让重点监控药品发挥治疗作用的同时又避免滥用，仍是医疗机构药事管理工作中的重点。

参考文献

[1] 国家卫生计生委，国家发展改革委，财政部，等 . 关于印发控制公立医院医疗费用不合理增长的若干意见的通 知 [EB/OL]. [2015-10-27]（2022-04-08）http：//www.nhc.gov.cn/cms-search/xxgk/getManuscriptXxgk.htm?id ＝0038da2bf8fe43d69511fb675e205d37.

[2] 国务院办公厅 . 国务院办公厅关于完善公立医院药品集中采购工作的指导意见 [EB/OL]. [2015-02-28]. http：//www.gov.cn/zhengce/content/2015-02/28/content_9502.htm.

[3] 国家卫健委，国家中医药局 . 关于印发第一批国家重点监控合理用药药品目录（化药及生物制品）的通知 [EB/OL]. [2019-07-01]（2022-04-08）http：//www.nhc.gov.cn/yzygj/s7659/201907/d356ce8a4ba1461ca66c544724dffc5e.shtml.

[4] 孙梦茹，王莉英，钱春艳，等 . 我院辅助用药合理使用的管控实践 [J]. 中国药房，2018，29（17）：2310-2314.

[5] 诸永兴，张永珍，陈兆红 .“头脑风暴法”和“二八”法则在低年资护士带教中的应用及思考 [J]. 中国卫生产业，2017，14（31）：68-70.

[6] 罗美凤，李娟，钱霞 . PDCA 循环法在我院辅助用药管理中的应用成效分析 [J]. 药品评价，2016，13（20）：27-30.

[7] 杨香瑜，张韶辉，郭珩，等 . 基于 PDCA 循环管理促进医院重点监控药品合理应用 [J]. 医药导报，2018，37（11）：1429-1431.

[8] 郑利光，施祖东，赵电红，等 . 实施 PDCA 循环管理前后医院辅助用药应用分析及管理效果探讨 [J]. 中国医院用药评价与分析，2018，18（5）：687-690.

[9] 张敬一，李泽，王作君，等 . 医疗机构重点监控药品的监管与思考 [J]. 中国药师，2017，20（11）：2042-2045.

[10] 聂娟，潘洁 . 我院临床重点监控品种使用分析及管控对策思考 [J]. 中南药学，2018，16（2）：247-250.

[11] 秦艳娥，钟慧，陈彪，等 .PDCA 循环管理干预骨科Ⅰ类切口手术围术期抗菌药物预防应用的效果评价 [J]. 中国药房，2017，28（5）：690-694.

[12] 李波，姜黎，吴倪，等 . 四川省某区县级医疗机构重点监控药品 PDCA 管理模式及其效果评估研究 [J]. 中南药学，2018，16（8）：1155-1160.

[13] 国务院办公厅 . 国务院办公厅关于加强三级公立医院绩效考核工作的意见 [EB/OL]. [2019-01-30]（2022-04-08）http：//www.gov.cn/zhengce/content/2019-01/30/content_5362266.htm.

（收稿日期：2022-04-08；修回日期：2022-05-12）

药师医师双点评模式在重点监控药品监管中的实践

陈学增，刘嘉欣，刘云娣，吴衡*（广州中医药大学第一附属医院，广州　510405）

摘要：目的　探讨医疗机构药师医师双点评模式的构建及其在重点监控药品的监管效果。**方法**　在药事管理与药物治疗委员会下设处方点评专家组（负责对处方点评工作提供专业技术咨询并负责处方终评）和处方点评工作小组。工作小组由药师组（临床药师、门诊和住院高年资药师）和医师组（高年资临床主治医师）组成，建立药师医师双点评模式。采用回顾性对比分析方法，考察实施双点评模式前后，本院重点监控药品的使用情况与医嘱合理性。**结果**　实施双点评模式后，本院重点监控药品金额占比从 4.89% 下降至 4.00%，人均重点药品费用下降 14.39%；重点监控药品不合理用药医嘱比例由 38.49% 下降至 5.63%（$P = 0.013$）。**结论**　本院构建的药师医师双点评模式在重点监控药品监管中成效显著，促进了临床合理用药，降低了医疗成本，具有可行性。

关键词：药师医师双点评模式；重点监控药品；合理用药

中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1703-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.039

随着药品零加成、“两票制”等以“控费”为核心思想的政策落地，中国医疗卫生体制改革进入“深水区”，如何减轻患者经济负担，缓解“看病贵”，促进合理用药，已成为医疗行业关注的焦点 [1]。2019 年 7 月，国家卫健委和国家中医药局发布了《第一批国家重点监控合理用药药品目录（化药及生物制品）》，自此重点监控药品的监管成为各级医疗机构的重要药事管理内容 [2-4]。

基金项目：广东省中医药管理局面上项目（No. 20221152）。

作者简介：陈学增，男，主管药师，主要从事医院药学和临床药学研究，email：465832397@qq.com　*通信作者：吴衡，男，主管药师，主要从事医院药学和临床药学研究，email：531081647@qq.com

本院依据国家政策要求，并结合医院实际情况建立了本院的重点监控药品目录，并进行动态监管和开展处方医嘱专项点评。目前普遍认为处方点评有利于促进合理用药和提升药师能力[5-8]。传统的点评模式由药师单独对处方医嘱进行点评，实践发现药师临床思维局限，点评结果与医师意见常存在争议，对规范医师处方行为的效果并不令人满意[9-10]。近年来，部分医疗机构已经看到上述问题，对重点监控药品和其他特殊药品的专项点评模式及方法进行改变和探索[11]，如沈爱宗[2]和王英等[12]开展的多部门协作的处方点评模式。然而，上述模式涉及的部门和人员较多，对于部分医院来说操作流程烦琐，可行性不高。基于“以病人为中心”和“控费”的理念，为进一步加强重点监控药品的管理，促使药学工作更加贴近临床，同时不断提高临床医师的合理用药水平，实现医药知识相长，本院药学部开展“药师医师双点评模式”，以期为丰富医疗机构处方专项点评模式，完善重点监控药品的监管体系提供参考。

1　资料与方法

1.1　机构设置

1.1.1　双点评模式处方点评小组　由药师和医师组成点评小组。临床药学组组长担任处方点评小组组长，临床药师，门诊和住院药房高年资药师作为固定成员。以取得主治医师 3 年以上的各级临床科室医师作为纳入处方点评小组条件，并按专业和业务类别分为 3 类：西医内科、西医外科和中医科。每月开展处方点评前由医务科按人名循环抽取各类别临床医师 1 名，作为机动成员，共同组成当月的处方点评小组。

1.1.2　处方点评专家组　专家组由本院的处方点评专家小组成员组成，负责为处方点评工作提供专业技术咨询。处方点评专家组包括组长、副组长和组员。其中组长由医务科科长担任，副组长由药学部副主任担任，组员包括院感科主任、微生物室主任、质管科主任以及临床科室高级职称人员等，共计 20 人。

1.1.3　监管和考核部门　医务科为医院行政干预部门，负责全院医务人员处方权的培训和考核，并监管不合理用药医师的处方权；质管科负责对每月不合理处方医师和科室的绩效进行处罚。

1.2　处方点评流程（见图 1）

① 双点评模式的抽样方法：各门、急诊和住院科室按重点监控药品使用金额的比例来抽取相应的处方和病例数，比如肿瘤科本月重点监控药品使用金额占所有门诊科室的 15%，占所有住院科室的 20%，重点监控药品每月门急诊点评处方数和医嘱点评数为 100，则肿瘤科本月处方抽取数为 15 份，病历抽取数为 20。② 处方点评小组人员分组方法：将处方点评小组中的中药师和中医师组成中药点评组，西药师和西医内科、外科医师组成西药点评组，两组点评人员对各组处方逐一点评，填写处方点评表。③ 重点监控药品分组：将医院的重点监控药品目录按药品属性分为中药类和西药类重点监控药品，如将大株红景天、艾迪注射液、康艾注射液等药品纳入中药重点监控药品组，将《关于印发第一批国家重点监控合理用药药品目录（化药及生物制品）的通知》中的 20 个药品纳入西药重点监控药品组，按不同药品类别分别抽取处方和病历，若该病历和处方同时有两类药物，则由中药组和西药组同时点评该病历和处方。

处方点评工作小组对重点监控药品处方和医嘱进行初点，并将初点结果及时在处方点评工作微信群里发布，对处方出点评结果有异议的相关科室（医师）应在 1 周内填写处方申诉表。处方点评专家组结合处方点评初评结果和相关科室（医师）反馈意见进行综合评价，形成终评报告。处方终评结果交予医务科进行公示（院内网 OA）并在院周会上通报，同时质管科对当月不合格处方医师和科室进行绩效考核。

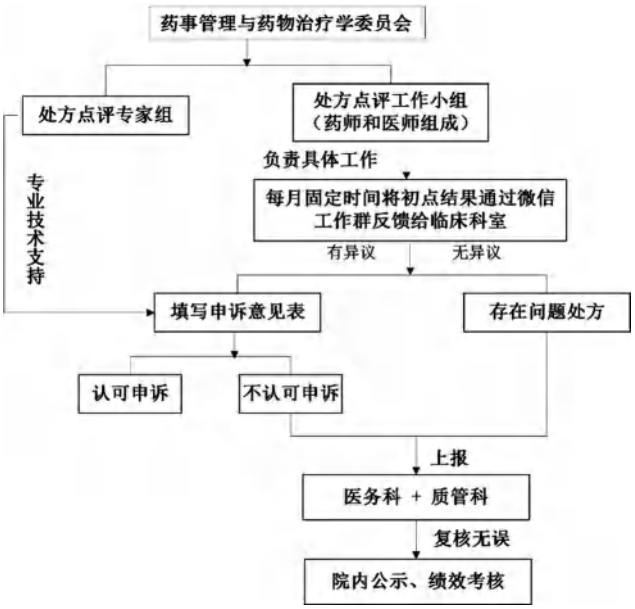


图 1　本院处方点评工作流程

1.3　资料来源及分组

本院于 2019 年 11 月开展重点监控药品监管并

进行药师医师双点评模式。本研究利用医院信息管理系统（HIS 系统）、药师工作站和合理用药监测系统，回顾性分析 2019 年 7—9 月临床科室重点监控药品使用金额、数量情况并抽取 278 份住院患者病历作为干预前资料，抽取 2020 年 7—9 月重点监控药品数据以及 284 份病历作为干预后资料。

1.4　统计学方法

应用 Excel 建立干预前和干预后数据库，以 SPSS 25.0 统计软件对数据进行处理，计数资料比较采用 χ^2 检验。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　双点评模式实施前后重点监控药品销售金额、品种及占比情况

双点评模式实施后，本院重点监控药品金额、排名前 10 位重点监控药品情况、人均重点监控药品金额等均较实施前显著下降，详见表 1 和表 2。

表 1　本院药品及重点监控药品在双点评模式实施前后的使用情况

项目	实施前	实施后	变化幅度 /%
重点监控药品金额 / 元	7 652 537.11	6 449 611.39	－ 15.72
所有药品金额 / 元	156 389 728.20	161 385 772.70	3.19
重点监控药品占比 /%	4.89	4.00	－ 18.33
出院人数	10 994	10 823	－ 1.56
人均重点监控药品金额 / 元	696.06	595.92	－ 14.39
进入全院药品金额前 30 位的重点监控药品数 / 个	8	5	－ 37.50

表 2　金额排名前 10 位的重点监控药品在双点评模式实施前后的使用情况

药品名称	规格	实施前 / 元	实施后 / 元	变化幅度 /%
大株红景天注射液	5 mL	1 049 568	793 208	－ 24.43
注射用红花黄色素	50 mg	878 837.32	794 463.63	－ 9.60
康艾注射液	20 mL	785 801.25	697 869.12	－ 11.19
参芪扶正注射液	250 mL	685 602.28	663 156.34	－ 3.27
奥拉西坦注射液	20 mL：4 g	439 488.00	266 744.80	－ 39.31
艾迪注射液	10 mL	408 234.43	347 208.56	－ 14.95
康艾注射液	10 mL	325 150.00	316 400.00	－ 2.69
前列地尔注射液	2 mL：2 μg	320 106.69	202 415.49	－ 36.77
长春西汀注射液	5 mL：30 mg	244 517.60	231 325.60	－ 5.40
依达拉奉注射液	10 mL：15 mg	201 713.61	166 480.23	－ 17.47
合计		5339 019.18	4479 271.77	－ 16.10

2.2　双点评模式实施前后重点监控用药不合理医嘱点评结果及分析

开展双点评模式后，重点监控药品不合理用药医嘱比例由 38.49% 下降至 5.63%（$P = 0.013$），各类不合理用药问题均明显下降，具体情况见表 3。

表 3　重点监控药品不合理用药医嘱使用情况

问题类型	实施前（$n = 278$）		实施后（$n = 284$）	
	医嘱数	占比 /%	医嘱数	占比 /%
适应证不适宜	7	2.52	2	0.70
药品品种不适宜	5	1.80	0	0.00
用法用量不适宜	32	11.51	4	1.41
联合用药不适宜	14	5.04	1	0.35
给药途径不适宜	10	3.60	3	1.06
溶媒选择不适宜	25	8.99	4	1.41
用药疗程不适宜	14	5.04	2	0.70
合计	107	38.49	16	5.63

3　讨论

3.1　双点评模式有助于加强药师和医师沟通，提升专业技水平，实现优势互补

以往由药学部单一点评的传统模式，存在药师与医师沟通不足。药师点评处方和病历，属于事后点评，由于专业背景和临床思维的差异，其观点很容易让医师排斥，难以有效合作，而医师点评则往往流于形式，尺度把控不严，达不到提升合理用药的预期效果。双点评模式的开展，能使医师和药师实现有效沟通，在交流过程中，药师能跳出说明书的局限和滞后性，通过积极查阅文献，最新诊疗指南、专家共识等权威资料，并结合临床病情变化，打破以“药”为中心的传统思维视角；医师能够发挥临床专长，从临床角度看待问题，弥补处方点评的局限性。同时医师也能拓宽专科诊疗规范以外的其他疾病用药认知度，规避常见药物在某些疾病或病情中的使用禁忌，更加关注药物之间的相互作用，有助于提升安全合理用药知识和非专科用药水平。双点评模式能够实现优势互补，扬长避短，最终实现医、药知识相长。

3.2　双点评模式有助于降低医疗支出，保障用药安全，促进合理用药

双点评模式通过提高医师的参与度来提升处方和医嘱点评质量。在实施前，本院重点监控药品的不合理用药问题较为突出，通过医师参与点评后，重点监控药品使用不合理的问题显著改善。尤其是中药注射剂类药物的不合理率下降明显，如注射用红花黄色素配置时溶媒体积过低，大株红景天注射液用于非心血淤阻冠心病，香菇多糖每日一次等不合理用药情况明显下降。在上述中药注射剂类药物用药日趋规范的同时，其用量也明显下降，如大株红景天注射液和注射用红花黄的用量较双点评模式实施前分别下降了 24.23% 和 9.6%。中药注射剂用量下降后，其相

关药物不良反应上报例数，由实施前的 15.6 例 / 月，下降至 9.86 例 / 月，减少了用药风险，保障了用药安全。然而不足的是，实施后部分医嘱中仍存在用法用量不适宜等问题，接下来本院将在各个科室逐步推广处方前置审核系统，利用信息化手段进一步规范医嘱开具的规范性。

双点评模式在改善医师处方习惯、规范医师用药行为以及控制医疗成本上发挥了重要作用。实施双点评模式后，本院重点监控药品支出同期减少 1 202 925.72 元，人均重点监控药品费用首次下降至 600 元以内。由于医师团队的加入，医师对自身的用药行为也有评判权利，点评结果在执行时，临床也更容易接受。同时在点评过程中，由双方共同制订的合理用药原则逐渐渗透到医师的日常诊疗过程中，临床用药行为趋于规范合理。加之有处方点评专家组的保障，处方点评在讨论、沟通、学习和提升的氛围中开展，医、药有效结合，促进了医院的合理用药，提高了医疗质量安全，保障了广大患者的利益。

4 结论

药师医师双点评模式的建立是对传统以药学部和药师为主导的点评模式的突破和创新。该模式能真正将医药融合，让药师深入到临床药物治疗实践工作中，让医师了解并参与药事管理工作，不断提高药师的审方能力及医师的合理用药水平，真正体现“以病人为中心”的药学服务价值。在该模式基础上，后续我们将进一步通过信息化手段，实行重点监控药品使用超常预警与动态监测制度，对不合理用药中的用法用量、溶媒选择、用药疗程等通过人工智能实现快速审核，减少人工审核工作量，保证点评工作精准、快速、高效地开展。

参考文献

[1] 张雅娟，毛振宾 . 药品零加成背景下公立医院的逐利机制与优化策略 [J]. 河南师范大学学报（哲学社会科学版），2021，48（1）：102-112.

[2] 沈爱宗，张圣雨，陈泳伍，等 . 本院多部门协作处方点评模式在重点监控药品管理中的实践 [J]. 中国药房，2020，31（13）：1646-1649.

[3] 黎赛，盛小燕，梁椅文，等 . 本院重点监控药品管理实践和干预措施探讨 [J]. 中国药房，2018，29（22）：3029-3034.

[4] 吴美玲，叶云，赵昕，等 . 医院重点监控药品管理的探索与实践 [J]. 中国现代应用药学，2021，38（12）：1509-1513.

[5] 张珏 . 处方点评发展现状 [J]. 天津药学，2018，30（4）：62-65.

[6] 陈启迪，满延萍，邝煜宏 . 基于循证药学点评模式的抗菌药物适应证研究 [J]. 中国处方药，2021，19（9）：62-63.

[7] 马燕，申新田，朱晓倩 . 医院处方点评制度下的医保药品合理应用研究 [J]. 中国医院用药评价与分析，2021，21（8）：1000-1002.

[8] 张春兰，付燕，沈宁，等 . 本院儿童门急诊医师分级处方行为分析 [J]. 中国药业，2017，26（23）：86-88.

[9] 许甜甜，李向阳 . 处方点评管理模式存在的问题及分析 [J]. 海峡药学，2020，32（1）：215-217.

[10] 王锣园，张燕，戴建峰，等 . 探讨中药处方点评工作流程、现状及解决对策 [J]. 中医药管理杂志，2019，27（6）：18-20.

[11] 翟瑞玲，刘艳芝，黄维刚 . 医师参与的抗菌药物专项处方点评模式的建立与效果分析 [J]. 中国医院用药评价与分析，2015，15（7）：965-968.

[12] 王英，鲁科峰，梁斌鑫 . 多部门协作处方点评模式在重点监控药品监督中的应用 [J]. 中医药管理杂志，2021，29（14）：87-89.

（收稿日期：2021-10-09；修回日期：2022-01-20）

药品不良反应

雷珠单抗致锥体外系反应并文献复习

华之卉[1, 2]，高帅鹏[3]，任雅芳[2, 4]，刘秋莲[1, 2]，葛春丽[1, 2]，陈楠[1, 2*]（1. 河南中医药大学人民医院（郑州人民医院）药学部，郑州　450003；2. 河南中医药大学第五临床医学院，郑州　450003；3. 鲁山县人民医院药剂科，河南　鲁山　467300；4. 河南中医药大学人民医院（郑州人民医院）神经内科，郑州　450003）

关键词：雷珠单抗；锥体外系反应；不良反应

中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1707-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.040

雷珠单抗注射液是重组人源化抗血管内皮生长因子（VEGF）单克隆抗体，能抑制 VEGF-A 受体从而阻断眼底新生血管生成，这正是其用于治疗湿性（新生血管性）年龄相关性黄斑变性（AMD）的关键因素 [1]。目前，雷珠单抗已在各大眼底病指南中作为眼底新生血管性疾病的推荐用药 [2]。

既往观点认为眼部使用抗 VEGF 药物的剂量极小，产生的不良反应也多为注射操作引起，且由于血眼屏障的存在，药物不会进入体循环引起多系统不良反应 [3]。但近年来越来越多的研究表明，局部注射抗 VEGF 药物可导致全身血浆游离 VEGF 的水平大大降低，并有可能持续至治疗后一个月 [4]。全身性抑制作用是导致抗 VEGF 药物全身不良反应的重要因素。

本文结合 1 例糖尿病黄斑水肿患者玻璃体内注入雷珠单抗注射液后出现锥体外系反应，回顾国内外文献并进行分析，以期为临床安全用药提供参考。

1　病例资料

患者，男，44 岁，因“血糖高 10 年，视物模糊、手足麻木 3 年，加重伴胸闷 10 d”入住本院，先后入住内分泌代谢科、肾内科、眼科，于 2021 年 1 月 16 日行双眼玻璃体腔注药术，于颞上侧角膜缘后约 4.0 mm 处垂直巩膜进针注入雷珠单抗注射液 0.5 mg，术后生命体征稳定。玻璃体腔注药后约 6 h，患者出现头部不自主抖动，神经内科会诊建议完善头颅磁共振成像（MRI）、磁共振血管成像（MRA）。术后第 1 日，头颅 MRI 回示：双侧额叶皮层下区、侧脑室旁、右侧半卵圆中心、双侧放射冠区散在缺血灶改变。头部不自主抖动无缓解，再次请神经内科会诊。术后第 2 日神经内科会诊考虑锥体外系反应，原因待查：药物性？代谢性？建议转科，明确锥体外系反应原因。当日转入神经内科，转入后查体：患者头部及双上肢不自主抖动，可间断出现双手舞动。四肢肌力 5 级，双上肢肌张力稍高，双下肢肌张力正常，腱反射（＋＋），双侧巴氏征阴性。神经内科医师向药师发来咨询：患者目前的锥体外系症状是否和药物有关？药师查阅相关资料，考虑雷珠单抗与锥体外系发生具有时间逻辑关系，药物相关因素不能排除，建议积极完善检查，排除疾病相关因素，必要时给予对症治疗。医师拟完善脑电图检查，排除癫痫，患者及家属拒绝。给予改善循环、控制血压、肾保护等对症支持治疗。术后第 4 日，患者头部及双上肢不自主抖动较前减轻，无双手不自主舞动。术后第 5 日头部及双上肢不自主抖动基本消失。术后第 6 日转入肾内科继续治疗。之后未再出现头部及双上肢不自主抖动及双上肢舞动。药师和医师讨论后，考虑该患者锥体外系反应与雷珠单抗使用关系较大，为药物性锥体外系反应。

2　分析与探讨

2.1　雷珠单抗与锥体外系反应的关联性评价

首先，经询问，患者无帕金森病家族史及相关环境因素，既往糖尿病 10 年余，发现高血压、糖尿病黄斑水肿 3 个月，无双上肢及头部不自主抖动史。其次，患者发病前应用的药物为既往长期使用的降糖药物，一直以来并未出现类似不良反应。再次，除雷珠单抗外，其他药物（包括入院后新加的妥布霉素地塞米松滴等滴眼剂）均在发病时至症状缓解后仍然使用。最后，玻璃体内

基金项目：河南省医学科技攻关计划项目（No.2018020846）。

作者简介：华之卉，女，硕士，副主任药师，主要从事临床药学工作，email：zhihui19998@126.com　*通信作者：陈楠，女，硕士，主任药师，主要从事医院药学和临床药学工作，email：13598878231@163.com

注入雷珠单抗后，约 6 h 出现锥体外系反应，未进行对症治疗，该反应持续 5 d 消失（期间未再次使用雷珠单抗），这既符合药物与不良反应出现的时间顺序，也符合药物代谢规律。对上述病例采用“诺氏评估量表法”[5] 和“国家药品不良反应监测中心不良反应因果关系判断标准”进行不良反应因果关系评价，诺氏评估量评分为 5 分，国家国家药品不良反应监测中心不良反应因果关系判断标准结果为很可能，考虑该患者发生锥体外系反应与雷珠单抗的因果关系是很可能，见表 1、2。

表 1　诺氏药物不良反应评估量表

相关问题	问题分值			得分
	是	否	未知	
1. 该 ADR 先前是否有结论性报告	＋1	0	0	0
2. 该 ADR 是否在使用可疑药物后发生的	＋2	－1	0	2
3. 该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂后得到缓解	＋1	0	0	1
4. 该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现	＋2	－1	0	0
5. 是否存在其他原因引起该 ADR	－1	＋2	0	2
6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现	－1	＋1	0	0
7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度	＋1	0	0	0
8. 该 ADR 是否随剂量增加而加重，或随剂量减少而缓解	＋1	0	0	0
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药并出现过类似反应	＋1	0	0	0
10. 是否存在任何客观证据证实该反应	＋1	0	0	0

注：总分≥ 9 分为肯定；5 ～ 8 分为很可能；1 ～ 4 分为可能；≤ 0 分为可疑。

表 2　药品不良反应因果关系评价结果

内容	结果
用药与不良反应 / 事件的出现有无合理的时间关系	是
反应是否符合该药已知的不良反应类型	是
停药或减量后，反应 / 事件是否消失或减轻	是
再次使用可疑药品后是否再次出现同样反应 / 事件	未再使用
反应 / 事件是否可用并用药的作用、患者病情的进展、其他治疗的影响来解释	否

2.2　雷珠单抗不良反应报道情况

目前，雷珠单抗仅供眼玻璃体内注射使用，以玻璃体出血、视网膜色素上皮撕裂及视网膜色素上皮脱离等眼部不良反应报道最多，这也是抗 VEGF 类药物眼部注射不可避免的不良反应类型；其他系统不良反应以心血管意外、神经系统尤其是脑血管意外（脑缺血、脑梗死等）报道较多，是说明书外信号强度及报告数目最多的严重不良反应信号。其中，神经系统不良反应还有血管性痴呆、偏头痛等[6]。雷珠单抗的全身不良反应与药物进入血液循环引起全身 VEGF 水平下降有关。例如，抗 VEGF 药物导致血管内一氧化氮耗竭、血小板聚集及前列环素水平降低进而导致血管内皮的再生能力被抑制[6]。

笔者以雷珠单抗、锥体外系、震颤 / 抖动等为关键词，在万方、中国知网、PubMed 等数据库进行检索，仅查找到 1 例怀疑雷珠单抗导致帕金森病（锥体外系疾病）的报道。该病例为一名 72 岁的年龄相关性黄斑变性患者，每月接受 0.5 mg 雷珠单抗的玻璃体内给药治疗，为期 3 个月，随访 2 个月，未发现异常。2 年后由于疾病进展，患者再次接受每月 0.5 mg 雷珠单抗的玻璃体内给药治疗，为期 6 个月。第二周期治疗停药后 3 个月，患者因左手间歇性震颤就诊于运动障碍诊所，之后因震颤和运动迟缓加重导致步态障碍和疲劳，使用左旋多巴 / 卡比多巴改善症状。雷珠单抗的强化玻璃体内给药与帕金森相关症状和体征的发作之间存在很强的生物学合理性和时间关系，这表明抗 VEGF 药物可能作为额外的危险因素，加速帕金森病相关神经变性进程，持续而强烈给予 VEGF 抑制会导致患者多巴胺能神经元退化[7]。

以其他 VEGF 抑制剂如贝伐单抗、阿柏西普，锥体外系反应、神经退行性疾病等进行检索发现一项来自意大利 ADR 自发报告系统研究，报告了 3 例玻璃体内注射贝伐单抗及 1 例阿柏西普导致的锥体外系综合征病例[8]。同样，在美国食品药品监督管理局的不良事件报告系统中，也报告了 3 例使用贝伐单抗后发生神经退行性疾病的病例[9]。

2.3　锥体外系反应可能的发生机制

有研究证据表明，VEGF 信号途径可以直接和间接改善多巴胺神经元的存活[10-12]。在实验模型中，VEGF 的给药可抑制帕金森模型中多巴胺神经元的丢失，尤其是在黑质和纹状体中多巴胺神经元的丢失[13]，这也可能是预防多巴胺神经元死亡和帕金森进展的潜在治疗靶点。

血浆游离 VEGF 水平的降低也导致色素上皮衍生因子（PEDF）的降低，PEDF 是一种神经保护蛋白，可促进细胞存活[14]。此外，低水平的 VEGF 可能会损害神经组织的灌注，导致局部缺血和自由基产生[13]。抑制 VEGF 还会导致神经元突触功能和可塑性下降，从而导致神经元信号传导受损[15]。VEGF 具有神经保护作用，可抑制细胞凋亡，刺激神经发生并激活抗氧化剂[12，16]。吴玉斌等[17]研究发现 *VEGF* 基因表达的功能多态性与中国汉族人群发生帕金森病的风险增加相关。具体而言，雷珠单抗与 VEGF-A 结合，

VEGF-A 是 VEGF 家族的五种亚型之一，也是血管通透性最强的诱导剂之一，在几种体外和体内帕金森病模型中均显示出神经保护作用[10，18-19]。两者结合后，增加神经退行性疾病的风险。

Sultana 等[1]通过对世界卫生组织（WHO）国际自发报告 VigiBase 数据库中 VEGF 相关不良反应数据进行分析，指出目前的研究提示玻璃体内使用雷珠单抗与帕金森氏病存在潜在信号。玻璃体内长期使用抗 VEGF 药物可能会导致 VEGF 水平持续而持久的抑制，而这又可能在具有较高基线此类事件风险的人群中触发了神经退行性事件。目前观察到的可疑神经系统事件的发作可能与患者暴露的高累积剂量抗 VEGF 药物有关，这也支持了抗 VEGF 药物增加这类人群神经退行性疾病风险的论点。本报道中患者仅使用一次就发生锥体外系反应，可能与其糖尿糖长期控制不佳有关。

3　结语

尽管目前这些发现似乎都表明玻璃体内使用抗 VEGF 药物可能会增加神经退行性疾病的风险，但这种风险很可能主要与基线神经退行性疾病风险较高的人有关（如阿尔茨海默病的家族史，帕金森病，无法控制的糖尿病等）以及正常剂量下有过度抑制 VEGF 风险的人[1]。但目前报道病例数较少，仍需要大型药物流行病学研究予以证实。鉴于玻璃体内抗 VEGF 药物对于预防或减慢视网膜新生血管疾病患者的失明非常有效，若证实玻璃体内抗 VEGF 药物增加潜在的神经退行性疾病的风险，对于有任何潜在神经退行性疾病的风险患者，在使用此类药物时均应进行预期益处与风险的权衡。

参考文献

[1] Sultana J，Scondotto G，Cutroneo PM，et al. Intravitreal anti-VEGF drugs and signals of dementia and parkinson-like events：analysis of the vigibase database of spontaneous reports [J]. Front Pharmacol，2020，11：1-9.

[2] Freund KB，Korobelnik JF，Devenyi R，et al. Treat-and-extend regimens with anti-VEGF agents in retinal diseases：a literature review and consensus recommendations [J]. Retina，2015，35（8）：1489-1506.

[3] Bhisitkul RB. Vascular endothelial growth factor biology：clinical implications for ocular treatments [J]. Br J Ophthalmol，2006，90（12）：1542-1547.

[4] Avery RL，Castellarin AA，Steinle NC，et al. Systemic pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravitreal aflibercept，bevacizumab，and ranibizumab [J]. Retina 2017，37（10）：1847-1858.

[5] 康红，单媛媛，牛金虎，等 . 甲泼尼龙致严重多形性红斑 1 例 [J]. 中南药学，2021，19（11）：2480-2482.

[6] 杨洋，祝伟伟，李康琪，等 . 基于 FAERS 数据库雷珠单抗注射液不良反应信号挖掘 [J]. 中国医院药学杂志，2021，41（12）：1244-1248，1254.

[7] Gianluca T，Ilaria M，Cutroneo PM，et al. Long-term intravitreal ranibizumab as a potential additional risk factor for neurodegeneration in parkinson’s disease：a case report [J]. Front Pharmacol.，2018，9：608-613.

[8] Cutroneo PM，Giardina C，Ientile V，et al. Overview of the safety of anti-VEGF drugs：analysis of the Italian spontaneous reporting system [J]. Drug Saf，2017，40（11）：1131-1140.

[9] Shamloo BK，Chhabra P，Freedman AN，et al. Novel adverse events of bevacizumab in the US FDA adverse event reporting system database：a disproportionality analysis [J]. Drug Saf，2012，35（6）：507-518.

[10] Silverman WF，Krum JM，Mani N，et al. Vascular，glial and neuronal effects of vascular endothelial growth factor in mesencephalic explant cultures [J]. Neuroscience，1999，90（4）：1529-1541.

[11] Pitzer MR，Sortwell CE，Daley BF，et al. Angiogenic and neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor（VEGF165）：studies of grafted and cultured embryonic ventral mesencephalic cells [J]. Exp Neurol，2003，182（2）：435-445.

[12] Yasuhara T，Shingo T，Kobayashi K，et al. Neuroprotective effects of vascular endothelial growth factor（VEGF）upon dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson’s disease [J]. Eur J Neurosci，2015，19（6）：1494-1504.

[13] Sheikh MA，Malik YS，Xing ZK，et al. Polylysine-modified polyethylenimine（PEI-PLL）mediated VEGF gene delivery protects dopaminergic neurons in cell culture and in rat models of Parkinson’s Disease（PD）[J]. Acta Biomater，2017，54：58-68.

[14] Sanchez A，Wadhwani S，Grammas P. Multiple neurotrophic effects of VEGF on cultured neurons [J]. Neuropeptides，2010，44（4）：323-331.

[15] Sharma P，Srivastava P，Seth A，et al. Comprehensive review of mechanisms of pathogenesis involved in Alzheimer’s disease and potential therapeutic strategies [J]. Prog Neurobiol，2019，174：53-89.

[16] Storkebaum E，Carmeliet P. VEGF：a critical player in neurodegeneration [J]. J Clin Invest，2004，113（1）：14-18.

[17] 吴玉斌 . 中国汉族人群 VEGF 基因多态性与帕金森病的相关性研究 [D]. 青岛：青岛大学，2017.

[18] Tian YY，Tang CJ，Wang JN，et al. Favorable effects of VEGF gene transfer on a rat model of Parkinson disease using adeno-associated viral vectors [J]. Neurosci Lett，2007，421（3）：239-244.

[19] Yue X，Hariri DJ，Caballero B，et al. Comparative study of the neurotrophic effects elicited by VEGF-B and GDNF in preclinical in vivo models of Parkinson’s disease [J]. Neuroscience，2014，258：385-400.

（收稿日期：2021-09-10；修回日期：2021-11-05）

1 例阿托伐他汀钙片致溶血性贫血的病例分析

谈仪炯[1]，任文倩[2]，姚霜霜[2]，黄云鸿[2]，冯晓云[2]，范能光[2*]，刘芳[2*]（1. 上海交通大学附属第一人民医院临床药学科，上海　200080；2.上海交通大学附属第一人民医院内分泌代谢科，上海　200080）

关键词：阿托伐他汀钙；溶血性贫血；不良反应
中图分类号：R541.4　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2022)07-1710-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.07.041

阿托伐他汀钙片是临床常用的他汀类药物，国内外指南均推荐他汀类药物作为治疗动脉粥样硬化性心血管疾病（ASCVD）及血脂管理的一线药物[1-3]。通常阿托伐他汀钙片引起的不良反应症状较轻，如皮疹、肝功能异常、肌肉疼痛等。而阿托伐他汀钙片致溶血性贫血发生率低，早期表现缺乏特异性，临床对其普遍认识不足，易误诊、漏诊而延误治疗。本文通过对 1 例应用阿托伐他汀钙片后出现药物性溶血性贫血（DHA）的病例进行分析讨论，总结 DHA 的发病机制及监护要点，提高临床对该类不良反应的认识，保障患者安全用药。

1　病例资料

患者，男性，57 岁，因口干、多饮、多尿，视力模糊半个月伴体重下降，于 2021 年 9 月 29 日至本院门诊就诊，查随机血糖 27 mmol • L^{-1}↑，予阿卡波糖片 100 mg tid 口服联合德谷胰岛素注射液 14 U 睡前皮下注射。微量法自测空腹血糖（FBG）8 mmol • L^{-1}↑，餐后 2 h 血糖（2 h PBG）13 mmol • L^{-1}↑，为求进一步控制血糖于 9 月 30 日入院。体格检查：体温 36.1 ℃，心率 77 次 •min^{-1}，呼吸 18 次 •min^{-1}，血压 113/58 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa）。身高 173.5 cm，体质量 69.9 kg，体质量指数 23 kg•m^{-2}。患者神志清楚，回答切题，全身皮肤黏膜未见异常，无肝掌，全身浅表淋巴结无肿大。余未见明显异常。既往史及用药史：平素体健，否认高血压、冠心病等疾病，初发糖尿病，既往未曾服药。过敏史：否认食物、药物过敏史。

2　治疗经过

入院第 1 日（9 月 30 日）查血常规：血红蛋白 125.0 g • L^{-1} ↓，生化常规：总胆红素 44.7 μmol • L^{-1} ↑，乳酸脱氢酶 174.0 U • L^{-1}，血肌酐 65.4 μmol • L^{-1}，余指标正常。血管超声提示动脉粥样硬化，予阿托伐他汀钙片 20 mg qn po 调脂稳定斑块治疗。心电图提示房颤，心超显示右房左心室增大，射血分数 55%。予达比加群酯胶囊 110 mg bid po 抗凝治疗。入院微量法测中餐后血糖 14.2 mmol • L^{-1} ↑，晚餐前血糖 17.5 mmol • L^{-1} ↑，目前血糖较高，降糖方案调整为德谷门冬双胰岛素注射液早 10 U 晚 8 U，餐前皮下注射联合阿卡波糖片 50 mg tid、二甲双胍片 500 mg bid、达格列净片 10 mg qd、维格列汀片 50 mg bid 口服控制血糖。根据血糖水平调整用药方案。

入院第 9 日（10 月 8 日），患者出现头晕、视物模糊、乏力等症状，测血压 95/59 mmHg，心率 86 次 •min^{-1}，皮肤轻度黄染，查血常规：血红蛋白 88.0 g • L^{-1} ↓，红细胞平均体积 108.8 fL ↑，网织红细胞计数 0.35×10^{12} • L^{-1} ↑，网织红细胞百分比 13.65% ↑，生化常规：总胆红素 52.3 μmol • L^{-1} ↑，乳酸脱氢酶 198.3 U • L^{-1}，血肌酐 59.3 μmol • L^{-1}，余指标正常。凝血常规：凝血酶原时间 13.1 s ↑，凝血酶时间 41.8 s ↑，纤维蛋白原浓度 4.79 g • L^{-1} ↑。查抗核抗体抗可提取核抗原抗体（ANA ＋ ENA）等自身免疫抗体均阴性。患者出现高胆红素血症并伴有凝血功能异常，血红蛋白较前明显下降，结合用药史及血常规、肝功能表现，考虑溶血性贫血可能，予停用达比加群胶囊及阿托伐他汀钙片，并予维生素 K_1 注射液对症治疗。同时行抗人球蛋白（Coombs）试验明确诊断。患者红细胞平均体积升高，加用复合维生素 B 片 1 片 tid、叶酸片 5 mg tid 治疗。

入院第 12 日（10 月 11 日），患者病情尚稳

基金项目：国家自然科学基金面上项目（No.81770802）。
作者简介：谈仪炯，男，硕士，主管药师，主要从事临床药学研究，email：517933922@qq.com　*通信作者：范能光，男，博士，主治医师，主要从事内分泌临床和教学工作，email：fannengguang@163.com；刘芳，女，博士研究生导师，主任医师，主要从事内分泌临床、科研和教学工作，email：liufangstar@163.com

定，皮肤仍轻度黄染，血压 101/64 mmHg，心率 76 次 •min^{-1}，未诉特殊不适。查血常规：血红蛋白 88.0 g • L^{-1} ↓，红细胞平均体积 110.5 fL ↑，网织红细胞计数 0.33×10^{12} • L^{-1} ↑，网织红细胞百分比 12.87% ↑，生化常规：总胆红素 28.90 μmol • L^{-1} ↑，乳酸脱氢酶 160.80 U • L^{-1}，血肌酐 53.80 μmol • L^{-1} ↓，余指标正常。凝血常规：凝血酶原时间 12.4 s，凝血酶时间 25.5 s ↑，纤维蛋白原浓度 5.22 g • L^{-1} ↑。

入院第 15 日（10 月 14 日），查血浆游离血红蛋白浓度 65.1 mg • L^{-1} ↑，Coombs 试验阴性，血红蛋白 93.0 g • L^{-1} ↓，红细胞平均体积 110.5 fL ↑，网织红细胞计数 0.287×10^{12} • L^{-1} ↑，网织红细胞百分比 10.92% ↑，提示停药后贫血有所好转。生化常规：总胆红素 13.4 μmol • L^{-1} ↑，乳酸脱氢酶 149.7 U • L^{-1}，血肌酐 54.9 μmol • L^{-1}，余指标均正常。患者降糖方案调整为德谷门冬双胰岛素注射液早 10 U 晚 6 U 皮下注射，西格列汀 100 mg qd。目前血糖控制较平稳，血红蛋白较前回升，总胆红素恢复至正常水平，一般情况可，予出院。

10 月 22 日门诊随访，复查血红蛋白 127.0 g • L^{-1} ↓，红细胞平均体积 106.6 fL，网织红细胞计数 0.15×10^{12} • L^{-1}，网织红细胞百分比 3.93%，生化常规：总胆红素 11.2 μmol•L^{-1} ↑，乳酸脱氢酶 141.4 U • L^{-1}，血肌酐 61.3 μmol • L^{-1}，余指标均正常。考虑患者房颤病史，加用达比加群胶囊 110 mg bid 抗凝治疗，11 月 5 日复查生化常规：总胆红素 9.10 μmol • L^{-1} ↑，乳酸脱氢酶 148.1 U • L^{-1}，血肌酐 52.1 μmol • L^{-1}，余指标均正常。11 月 6 日复查血红蛋白 137.0 g • L^{-1}，红细胞平均体积 101.7 fL ↑。

3　讨论

3.1　关联性评价

患者为中年男性，入院第 1 日，血红蛋白 125.0 g • L^{-1} ↓，总胆红素 44.7 μmol • L^{-1} ↑，在加用阿托伐他汀钙片调脂稳定斑块、达比加群胶囊治疗房颤的第 9 日，出现了血红蛋白的明显下降及总胆红素的进一步升高，结合患者血浆游离血红蛋白浓度的升高及服药后出现头晕、视物模糊、乏力等临床症状，考虑 DHA 可能性较大。由于其他药物均为既往使用，阿托伐他汀钙片及达比加群胶囊为该不良反应的怀疑药物。在停用两药后患者血红蛋白升高，总胆红素下降。达比加群胶囊，患者门诊随访再次使用后未出现 DHA，因此考虑阿托伐他汀钙片的关联性更大，使用诺氏（Naranjo’s）评估量表对药物不良反应关联性进行评价 [4]，评分为 8 分，关联性为很可能有关，具体评分见表 1。

表 1　诺氏药物不良反应评估量表

相关问题	问题分值			评分
	是	否	未知	
1. 该 ADR 先前是否有结论性报告	＋1	0	0	＋1
2. 该 ADR 是否是在使用可疑药物后发生的	＋2	－1	0	＋2
3. 该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂后得到缓解	＋1	0	0	＋1
4. 该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现	＋2	－1	0	0
5. 是否存在其他原因能单独引起该 ADR	－1	＋2	0	＋2
6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现	－1	＋1	0	0
7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度	＋1	0	0	0
8. 该 ADR 是否随着剂量的增加而加重，或随剂量减少而缓解	＋1	0	0	0
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现类似反应	＋1	0	0	0
10. 是否存在任何客观证据证实该反应	＋1	0	0	＋1
总分				8

注：总分值≥ 9 分为肯定；总分值 5 ～ 8 分为很可能有关；总分值 1 ～ 4 分为可能有关；总分值≤ 0 为可疑的。

3.2　阿托伐他汀钙片不良反应情况

阿托伐他汀钙能显著抑制羟甲基戊二酰辅酶 A（HMG-CoA）还原酶从而有效降低总胆固醇和低密度脂蛋白。其主要不良反应有肝功能异常、肌痛和皮疹，其他不良反应还包括瘙痒、头晕、肌酸激酶升高、恶心呕吐、胃不适、腹痛等 [5]。在国内外指南、专家共识及药品说明书中未提及他汀类药物导致的 DHA，仅有少量的个案报道 [6-8]。

3.3　阿托伐他汀钙片致 DHA 的机制

该患者在服用阿托伐他汀钙片第 9 日出现头晕、视物模糊、乏力等临床症状，血红蛋白降至 88 g • L^{-1} ↓，达贫血标准，结合网织红细胞计数及百分比、血胆红素的升高，符合《自身免疫性溶血性贫血诊断与治疗中国专家共识》（2017 年版）相关诊断标准 [9]，因此考虑为药物免疫性溶血性贫血。

药物免疫性溶血目前按发生机制主要分为四类，即免疫复合物机制、药物吸附、非免疫性蛋白吸附和药物诱导的自身免疫性溶血 [10]。阿托伐他汀钙片引起 DHA 的免疫机制属于免疫复合物型。有文献报道阿托伐他汀钙片可引起线状 IgA 大疱病 [11]。与该药诱发 DHA 的机制类似，均和

自身免疫因素有关。阿托伐他汀钙片首次进入机体后与血清蛋白结合形成抗原，刺激机体产生相应的抗体，一般是 IgG、IgM 型抗体。再次使用该药时，药物与抗体形成免疫复合物非特异性吸附到红细胞膜上并激活补体，破坏红细胞，引起红细胞溶解，从而导致血管内溶血[12-13]。

3.4 不良反应的监护

阿托伐他汀钙片是临床常用的调脂药物，目前，国内外报道阿托伐他汀钙引起 DHA 的案例很少，不易引起临床的重视。一旦发生 DHA，应立即停用可疑药物，在无肾上腺皮质激素使用禁忌情况下首选激素治疗，每日的常用剂量为口服泼尼松 1 mg • kg^{-1}[14]。对于激素治疗效果不佳、重型的 DHA 可静脉用丙种球蛋白，同时输注洗涤红细胞纠正贫血，必要时可行血浆置换。对于使用阿托伐他汀钙片后发生 DHA 的患者，若需服用调脂药物时不宜选用他汀类药物，建议选用依折麦布，该药为胆固醇吸收抑制剂，目前尚无诱发 DHA 的报道。本例患者在服用阿托伐他汀钙片后出现了头晕、视物模糊、乏力等症状，皮肤轻度黄染，第 9 日复查血常规及生化常规时出现了血红蛋白的明显下降、红细胞平均体积升高及胆红素的升高。由于在停药、给予复合维生素 B，叶酸纠正贫血后患者血红蛋白明显提升，红细胞平均体积及胆红素均恢复正常水平，本例患者未给予糖皮质激素、丙种球蛋白及血浆置换治疗。

4 小结

阿托伐他汀钙片引起的 DHA 发生率低，早期症状不典型，容易漏诊、误诊。本次病例报道提示，临床在使用阿托伐他汀钙时，应注意以下几点：① 初次使用阿托伐他汀钙片时应关注患者的临床表现，出现头晕、视物模糊、乏力等不典型症状时应予以重视，特别是皮肤、巩膜等出现黄染时应特别重视，分析原因并给予及时处理；② 用药过程中定期监测血常规及生化常规，及时发现可能存在的不良反应；③ 一旦考虑阿托伐他汀钙片引起的 DHA，应立即停药，根据病情需要给予激素、输血等治疗。如需再次服用调脂药物时可选用依折麦布进行治疗。

参考文献

[1] 中华医学会，中华医学会杂志社，中华医学会全科医学分会，等 . 血脂异常基层诊疗指南（2019 年）[J]. 中华全科医师杂志，2019，18（5）：406-416.

[2] 廖玉华，程翔，黄恺，等 . ASCVD 患者逆转斑块他汀治疗专家共识 [J]. 临床心血管病杂志，2015，31（1）：1-5.

[3] Handelsman Y，Jellinger PS，Guerin CK，et al. Consensus Statement by the American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology on the Management of Dyslipidemia and Prevention of Cardiovascular Disease Algorithm-2020 Executive Summary [J]. Endocr Pract，2020，26（10）：1196-1224.

[4] 郑飞跃，吴燕，饶跃峰，等 . 诺氏评估量表在药物不良反应评价中的作用及实例分析 [J]. 中国药学杂志，2012，47（8）：650-652.

[5] 张燕芬，张雪萌 . 浅析他汀类药物的不良反应 [N]. 中国医药报，2021-08-17（003）.

[6] Newman CB，Preiss D，Tobert JA，et al. Statin safety and associated adverse events：a scientific statement from the American Heart Association [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol，2019，39（2）：e38-e81.

[7] 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.

[8] 李晟，荆忱，付涛 . 匹伐他汀钙片致溶血性贫血 1 例 [J]. 药物流行病学杂志，2018，27（7）：487-489.

[9] 中华医学会血液学分会红细胞疾病（贫血）学组 . 自身免疫性溶血性贫血诊断与治疗中国专家共识（2017 年版）[J]. 中华血液学杂志，2017，38（4）：265-267.

[10] Arndt PA. Drug-induced immune hemolytic anemia：the last 30 years of changes [J]. Immunohematology，2014，30（2）：44-54.

[11] 张敏 . 阿托伐他汀引起线状 IgA 大疱病 1 例 [J]. 国外医学皮肤性病学分册，2002，28（3）：199-200.

[12] Jager U，Barcellini W，Broome CM，et al. Diagnosis and treatment of autoimmune hemolytic anemia in adults：recommenda-tions from the First International Consensus Meeting [J]. Blood Rev，2020，41：100648.

[13] 李翠莹，范秀 . 药物性抗体引起免疫性溶血反应的探讨 [J]. 临床输血与检验，2018，20（1）：4-6.

[14] Garratty G. Immune hemolytic anemia caused by drugs [J]. Expert Opin Drug Saf，2012，11（4）：635-642.

（收稿日期：2021-11-18；修回日期：2021-12-22）