◆ 中国科技核心期刊
◆ 美国CA、波兰IC收录期刊
◆ 中国核心期刊（遴选）数据库收录期刊
◆ 科技期刊世界影响力指数收录期刊

ISSN 1672-2981
CN 43-1408/R

中南药学

ZHONGNAN YAOXUE

2022年9月 第20卷 第9期
Volume 20 Number 9 September 2022

CENTRAL SOUTH PHARMACY

◆植物内生真菌活性次生代谢产物研究专题
◆ cGAS-STING 信号通路在重大疾病中的研究进展专题
◆ 传统中药的现代化研究进展专题
◆ 中成药处方审核的证据与标准专题

9
2022

ISSN 1672-2981
09>
9 771672 298224

中南药学 第二十卷 第九期 第1963~2216页 二〇二二年九月

中国科技核心期刊

（中国科技论文统计源期刊）

收录证书

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

中南药学

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

特颁发此证书。

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

2021年12月

证书编号：2020-G599-2463
有效期至：2022年12月

中南药学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊　2003 年 4 月创刊　第 20 卷　第 9 期（总第 200 期）　2022 年 9 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

植物内生真菌活性次生代谢产物研究专题

（1963）薄叶卷柏内生真菌 *Clonostachys rogersoniana* 次生代谢产物研究 …… 彭伟伟，旷敏，许立，等

（1969）美丽薄子木内生真菌 *Rhytidhysteron* sp. BZM-9 化学成分研究 …… 张莎，旷敏，彭伟伟，等

（1975）植物根际土壤真菌 *Trichoderma velutinum* 的化学成分研究 …… 旷敏，彭伟伟，许立，等

cGAS-STING 信号通路在重大疾病中的研究进展专题

（1982）cGAS-STING 信号通路在神经退行性疾病中的研究进展 …… 张琳洁，于永生

（1991）cGAS-STING 信号通路在自身免疫性疾病中的作用 …… 邓珊珊，章越凡

（1996）cGAS-STING 信号通路在心脏相关疾病中的作用 …… 李新宇，李铁军

传统中药的现代化研究进展专题

（2000）经典名方半夏厚朴汤研究进展…… 王龙，高鑫，郭栩廷，等

（2008）中药配方颗粒研发生产中若干关键问题研究进展 …… 王龙，高鑫，闫信豪，等

（2015）中药九蒸九晒炮制技术研究进展 …… 吴思俊，王龙，赵铭威，等

中成药处方审核的证据与标准专题

（2023）基于药性量化分析的寒热并用型感冒中成药的客观识别与特征研究 …… 杨寿圆，杨彦彪，金锐

（2029）社区医院中成药不适宜联用目录清单的建立及用药调研 …… 王宇光，卢云涛，孔令伟，等

研究论文

（2033）替诺福韦、依非韦伦对拉米夫定在大鼠体内药动学的影响 …… 余史丹，汪硕闻，唐原君，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

（2041）苯并芘促进 *FHIT*、*CDH13* 基因启动子区甲基化及机制研究 …… 武岳，张梦迪，李君，等

（2046）杯苋甾酮通过拟雌激素样作用抑制破骨细胞分化 …… 谢景春，赵玥，黄立慧，等

（2052）基于 UPLC-Q/TOF-MS 法研究“建昌帮”炆何首乌主成分差异 …… 王艳霓，邹宏，骆利平，等

（2059）基于血清代谢组学的芍甘附子汤治疗类风湿关节炎作用机制研究 …… 赵一颖，董琳琳，丰晨然，等

（2068）紫草多糖脂质体的制备及其评价 …… 齐和日玛，苏日娜，成日青，等

（2072）八角莲木脂素和黄酮类化学成分研究 …… 张欣，曹瑞，冯改利，等

（2076）中药材大蓟及混伪品的傅里叶变换红外光谱鉴别研究 …… 单圣男，解玫莹，王兰，等

（2082）三种快速检测大黄炭炮制程度的光谱技术的比较 …… 徐茂玲，孙静，杨丽，等

（2089）蒲公英提取物对白念珠菌的抑制作用及机制研究 …… 杨建婷，梁引库，王全华

（2094）基于双波长指纹图谱和含量测定的经典名方百合地黄汤物质基准的质量评价研究 …… 狄志彪，刘洋，刘峰，等

综述

（2100）罗沙司他与同类 HIF-PHI 及 ESA 在肾性贫血治疗中的分析比较 …… 陈珩，马俊龙，唐励静

（2106）MAP4K1 影响 T 细胞在肿瘤微环境中的功能研究进展 …… 刘秀盈，刘静静，朱晶晶，等

（2110）健脾祛湿中药治疗高尿酸血症的作用机制研究进展 …… 曹慧雅，李凯文，李阁，等

（2117）细胞焦亡与心肌缺血再灌注损伤及中药单体干预研究进展 …… 王益民，李焱，王怡斐，等

药物分析与检验

（2123）甘草饮片、水煎液、配方颗粒的 UPLC 指纹图谱相关性研究 …… 钟文峰，张兰兰，胡懿，等

（2129）尿素含量测定方法的比较…… 李颖，刘雁鸣，郑金凤，等

（2133）基于高效液相色谱法对淡豆豉发酵过程中 6 种异黄酮含量的动态分析 …… 曹冬英，谢思静，曾思婷，等

（2138）高效液相色谱法测定奥氮平双羟萘酸盐一水合物中二甲基亚砜和二甲基甲酰胺的残留量 …… 王锦，周三云，曹婉，等

（2141）良验益真咀嚼片高效液相色谱指纹图谱的建立及 4 种成分的含量测定 …… 马群，姚东，胡北，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

（2147）GC-MS 法测定吡拉西坦氯化钠注射液中 21 种邻苯二甲酸酯类塑化剂 …… 张迪，岳青阳，李尚颖，等

（2151）气相色谱 - 质谱法测定沙格列汀中的 3 种甲磺酸酯类杂质 …… 刘小琼，曹杰永，刘春亮，等

（2155）高效液相色谱法测定辐状肋柱花中 10 种成分的含量 …… 李维业，刘学良，刘安平，等

药品不良事件信号监测专题

（2160）基于 FAERS 数据库的司美格鲁肽不良事件信号挖掘研究 …… 吴玥，陈力，何绪成

（2164）基于 FAERS 数据库的低分子肝素与磺达肝癸不良事件信号挖掘研究 …… 孔苗，何绪成，舒亚民，等

医院药学

（2171）药师干预对 2 型糖尿病患者临床结局影响的 meta 分析 …… 李杰，陈晓菲，张卫，等

（2179）妊娠期甲状腺功能减退患者合理用药现况的多组结构方程模型分析 …… 李轶凡，王安妮，冯欣

（2185）沃诺拉赞与兰索拉唑对照治疗糜烂性食管炎的系统评价 …… 谢星星，余志刚，刘学，等

（2191）新型静脉用药调配中心调配模式的实践与应用效果 …… 彭珍珍，邓小云，张毕奎，等

（2195）血清 IL-6，IL-10 与非小细胞肺癌患者免疫治疗皮肤毒性的相关性分析 …… 张欣，高洁，张慧勤，等

药品不良反应

（2199）卡瑞利珠单抗相关不良反应文献分析 …… 乔逸，陈苏宁，郭桂萍，等

（2204）信迪利单抗致白癜风样色素脱失 1 例及文献复习 …… 于志媛，娄彦妮，贾立群，等

（2208）乌拉地尔致剥脱性皮炎 1 例 …… 李孝容，王谦，练娜

临床药师在临床

（2211）临床药师参与 1 例血液透析患者经皮冠状动脉介入术后消化道出血的药学监护 …… 何阳，汤莹昕，吴亮

药事管理

（2214）放射性药品监管现状及思考 …… 李衡，刘轶，张秋华，等

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。

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*254*zh*P*25.0*46*2022-9

本期责任编辑：彭金飞，陆窈窈，邬志娟，李科

英文编辑：周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 20, Number 9 September 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

(1964) Secondary metabolites of endomycete fungus *Clonostachys rogersoniana* from *Selaginella delicatula* ····· *PENG Wei-wei, KUANG Min, XU Li, et al*

(1969) Chemical contituents of endomycete fungus *Rhytidhysteron* sp. BZM-9 from *Leptospermum brachyandrum* ····· *ZHANG Sha, KUANG Min, PENG Wei-wei, et al*

(1975) Chemical constituents of plant rhizosphere soil fungus *Trichoderma velutinum* ····· *KUANG Min, PENG Wei-wei, XU Li, et al*

(1982) Research progress in cGAS-STING signaling pathway for neurodegenerative disorders ····· *ZHANG Lin-jie, YU Yong-sheng*

(1991) Role of cGAS-STING signaling pathway in autoimmune diseases ····· *DENG Shan-shan, ZHANG Yue-fan*

(1996) Role of cGAS-STING signaling pathways in heart-related diseases ····· *LI Xin-Yu, LI Tie-Jun*

(2001) Research progress in classic prescription Banxia Houpu decoction ····· *WANG Long, GAO-Xin, GUO Xu-ting, et al*

(2008) Research progress in some key problems in the development and production of traditional Chinese medicine formula granules ····· *WANG Long, GAO Xin, YAN Xin-hao, et al*

(2015) Research progress in repeatedly steamed and sundried of traditional Chinese medicine ····· *WU Si-jun, WANG Long, ZHAO Ming-wei, et al*

(2024) Objective identification and characteristics of Chinese patent medicine for cold with both cooling and warming properties based on quantitative analysis ····· *YANG Shou-yuan, YANG Yan-biao, JIN Rui*

(2029) Survey of list of Chinese patent medicine unsuitable for combination use in community hospitals ····· *WANG Yu-guang, LU Yun-tao, KONG Ling-wei, et al*

(2033) Effect of tenofovir and efavirenz on the pharmacokinetics of lamivudine in rats ····· *YU Shi-dan, WANG Shuo-wen, TANG Yuan-jun, et al*

(2041) Benzo(a)pyrene promotes the methylation of the promoter regions of *FHIT* and *CDH13* genes and related mechanism ····· *WU Yue, ZHANG Meng-di, LI Jun, et al*

Postal code
42-290

Printed by
Changsha city Kaifu district Shanjun printing Factory

Publish
Editorial Office of Central South Pharmacy

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

Price
￥ 25.00 an issue
￥ 300.00 a year

CSSN
ISSN 1672-2981
CN43-1408/R

Copyright 2022 by the Central South Pharmacy

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

(2046) Cyasterone inhibits osteoclast differentiation by estrogen-like effect ····· *XIE Jing-chun, ZHAO Yue, HUANG Li-hui, et al*

(2052) Principal components of stewed *Polygonum multiflorum* with "Jianchang-bang" based on UPLC-Q/TOF-MS ····· *WANG Yan-ni, ZOU Hong, LUO Li-ping, et al*

(2059) Mechanism of Shaogan Fuzi decoction for rheumatoid arthritis based on serum metabonomics ····· *ZHAO Yi-ying, DONG Lin-lin, FENG Chen-ran, et al*

(2068) Preparation and evaluation of Arnebiae Radix polysaccharide liposomes ····· *Qiherima, Surina, CHENG Ri-qing, et al*

(2072) Lignans and flavonoids from the roots and rhizomes of *Dysosma versipellis* ····· *ZHANG Xin, CAO Rui, FENG Gai-li, et al*

(2076) Identification and quality study of *Cirsium japonicum* and its adulterants by FT-IR ····· *SHAN Sheng-nan, XIE Mei-ying, WANG Lan, et al*

(2082) Three spectroscopic methods for the rapid assessment of the processing degree of rhubarb charcoal ····· *XU Mao-ling, SUN Jing, YANG Li, et al*

(2089) Inhibition effect of dandelion extract on *Candida albicans* and its mechanism ····· *YANG Jian-ting, LIANG Yin-ku, WANG Quan-hua*

(2095) Quality evaluation of the classic famous prescriptions Baihe Dihuang decoction based on dual wavelength fingerprint spectrum and content determination ····· *DI Zhi-biao, LIU Yang, LIU Feng, et al*

(2100) Role of roxadustat and other HIF-PHIs and ESA in renal anemia ····· *CHEN Heng, MA Jun-long, TANG Li-jing*

(2106) Research progress in MAP4K1 affecting the function of T cells in tumor micro-environment ····· *LIU Xiu-ying, LIU Jing-jing, ZHU Jing-jing, et al*

(2110) Research progress in the mechanism of traditional Chinese medicine for hyperuricemia in invigorating the spleen and dispelling dampness ····· *CAO Hui-ya, LI Kai-wen, LI Ge, et al*

(2117) Research progress in cell pyroptosis and myocardial ischemia-reperfusion injury and intervention with traditional Chinese medicine monomer ····· *WANG Yi-min, LI Yan, WANG Yi-fei, et al*

(2123) Correlation study on UPLC fingerprint of licorice pieces, decoction and formula granules ····· *ZHONG Wen-feng, ZHANG Lan-lan, HU Yi, et al*

(2129) Comparison of content determination methods for urea ····· *LI Ying, LIU Yan-ming, ZHENG Jin-feng, et al*

(2133) Dynamic change of 6 isoflavones in the fermentation of Sojae Seman Praeparatum by HPLC ····· *CAO Dong-ying, XIE Si-jing, ZENG Si-ting, et al*

(2138) **Determination of residual dimethylsulfoxide and dimethylformamide in olanzapine embonate monohydrate by high performance liquid chromatography** ····· *WANG Jin, ZHOU San-yun, CAO Wan, et al*

(2141) **HPLC fingerprints of Liangyan Yizhen chewable tablets and content determination of 4 constituents** ····· *MA Qun, YAO Dong, HU Bei, et al*

(2147) **Determination of 21 phthalic acid ester plasticizers in piracetam sodium chloride injection by GC-MS** ····· *ZHANG Di, YUE Qing-yang, LI Shang-ying, et al*

(2151) **Determination of three methanesulfonate impurities in saxagliptin by GC-MS** ····· *LIU Xiao-qiong, CAO Jie-yong, LIU Chun-liang, et al*

(2155) **Determination of 10 components in *Lomatogonium rotatum* by HPLC** ····· *LI Wei-ye, LIU Xue-liang, LIU An-ping, et al*

(2160) **Signal data mining of semaglutide adverse events based on FAERS** ····· *WU Yue, CHEN Li, HE Xu-cheng*

(2165) **FAERS-based data mining of low molecular weight heparin and fondaparinux adverse events** ····· *KONG Miao, HE Xu-cheng, SHU Ya-min, et al*

(2171) **Meta-analysis of the influence of pharmacist intervention on clinical outcomes of patients with type 2 diabetes** ····· *LI Jie, CHEN Xiao-fei, ZHANG Wei, et al*

(2179) **PRECEDE model of rational drug use in patients with hypothyroidism during pregnancy: a multi-group structural equation model analysis** ····· *LI Yi-fan, WANG An-ni, FENG Xin*

(2185) **Systematic review of vonoprazan versus lansoprazole for erosive esophagitis** ····· *XIE Xing-xing, YU Zhi-gang, LIU Xue, et al*

(2191) **Practice and application of new pharmacy intravenous admixture service dispensing mode** ····· *PENG Zhen-zhen, DENG Xiao-yun, ZHANG Bi-kui, et al*

(2195) **Correlation between serum expression of IL-6 and IL-10 and severity of immunotherapy-related dermal toxicity in patients with non-small cell lung cancer** ····· *ZHANG Xin, GAO Jie, ZHANG Hui-qin, et al*

(2199) **Literature review of adverse reactions induced by camrelizumab** ····· *QIAO Yi, CHEN Su-ning, GUO Gui-ping, et al*

(2214) **Current situation and reflection of radiopharmaceuticals** ····· *LI Heng, LIU Yi, ZHANG Qiu-hua, et al*

植物内生真菌活性次生代谢产物研究专题

【编者按】

植物内生真菌作为一类独特的微生物，其生境的独特性和物种的多样性造就了其次生代谢产物结构与生物学功能的多样性，是具有重大潜在应用价值、尚待开发的天然药物资源宝库。过去半个世纪，天然药物化学的研究主要集中在传统药用植物的活性成分研究，而对处于植物内部的特殊生存环境中的内生真菌研究相对较少，至今被系统研究过的植物内生真菌不到其全部的 20%，因此以植物内生真菌为研究对象，发掘具有重要生理活性的天然小分子化合物的研究成为近年来天然药物化学领域的研究热点。本课题组近年来一直从事传统药用植物及其内生真菌活性化学成分研究，本专题主要是对几株药用植物来源的内生真菌次生代谢产物的相关研究成果进行报道。

【专题主持人】

邹振兴，男，博士后，副教授，硕士研究生导师，中南大学湘雅药学院药学实验中心副主任，湖南省药学会第七届中药与天然药物委员会青年委员会副主任委员，国家自然科学基金 / 湖南省科技厅评审专家。主要从事天然药物化学教学科研工作，研究方向为传统中药和重要药用植物及其内生真菌新颖活性先导化合物的发现。近 5 年发表 SCI 论文 40 余篇，担任《中南药学》青年编委以及 *Chin Chem Lett*、*Fitoterapia*、*Molecules* 等国际期刊审稿专家；主持国家自然科学青年基金，湖南省自然科学面上基金和青年基金，湖南省高新技术产业科技创新引领计划子课题，河南省“揭榜挂帅”科技项目，海南省重点研发项目，中国博士后基金面上项目，以及企业合作横向课题等；申请国家发明专利 5 项，已授权 1 项。

薄叶卷柏内生真菌 *Clonostachys rogersoniana* 次生代谢产物研究

彭伟伟[1, 2]，旷敏[1, 2]，许立[1, 2]，郑雨婷[1, 2]，桑子焕[1, 2]，秦思雨[1, 2]，邹振兴[1, 2*]（1. 中南大学湘雅药学院，长沙　410013；2. 慢病诊疗小分子药物发现与转化湖南省重点实验室，长沙　410013）

摘要：目的　研究薄叶卷柏内生真菌 *Clonostachys rogersoniana* 的次生代谢产物。**方法**　利用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱和半制备型高效液相色谱等现代色谱技术分离纯化 *Clonostachys rogersoniana* 的大米发酵产物，运用 HR-ESI-MS、NMR 等技术鉴定化合物结构。采用微量肉汤稀释法评价所有单体化合物对 4 种临床常见的致病菌（金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、粪肠球菌 *Enterobacter faecalis*、铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 和大肠埃希菌 *Escherichia coli*）的抗菌活性。**结果**　从 *Clonostachys rogersoniana* 大米发酵产物的乙酸乙酯萃取部位中分离得到 11 个化合物，分别鉴定为 indole-3-acetic acid（**1**）、*N*-acetyltryptamine（**2**）、（1*S*，3*S*）-1-methyl-2，3，4，9-tetrahydro-1H-pyrido[3，4-b]indole-3-carboxylic acid（**3**）、（1*R*，3*S*）-1-methyl-2，3，4，9-tetrahydro-1H-pyrido[3，4-b]indole-3-carboxylic acid（**4**）、4-methoxyphenylacetic acid（**5**）、4-hydroxybenzoic acid（**6**）、hydroquinone（**7**）、4-hydroxyphenylacetic acid（**8**）、clonostachydiol（**9**）、2，3-dihydroxypropyl pentadecanoate（**10**）和

基金项目：湖南省自然科学基金面上项目（No. 2021JJ30917）；湖南省高新技术产业科技创新引领计划（No. 2020GK4083）；湖南省科教联合基金项目（No. 2019JJ70043）；中南大学研究生科研创新项目（No. 2021zzts0994，No. 1053320212725）。

作者简介：彭伟伟，男，硕士研究生，主要从事天然药物化学研究，email：pww199802@163.com　*通信作者：邹振兴，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事天然药物化学研究，email：zouzhenxing@csu.edu.cn

daucosterol（**11**）。体外抗菌实验结果显示化合物 **3** 和 **4** 对 *Staphylococcus aureus* 具有中等抑制活性，*MIC* 值分别为 16 和 8 μg • mL^{-1}。**结论** 化合物 **1** ～ **11** 均为首次从该属真菌中分离得到。

关键词：薄叶卷柏；内生真菌；*Clonostachys rogersoniana*；次生代谢产物；抗菌活性
中图分类号：R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)09-1964-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.001

Secondary metabolites of endomycete fungus *Clonostachys rogersoniana* from *Selaginella delicatula*

PENG Wei-wei[1, 2], KUANG Min[1, 2], XU Li[1, 2], ZHENG Yu-ting[1, 2], SANG Zi-huan[1, 2], QIN Si-yu[1, 2], ZOU Zhen-xing[1, 2*] (1. *Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha* 410013; 2. *Hunan Key Laboratory of Diagnostic and Therapeutic Drugs for Chronic Diseases, Changsha* 410013)

Abstract: Objective To determine the secondary metabolites from *Clonostachys rogersoniana*, an endomycete from *Selaginella delicatula*. **Methods** The rice fermentation product of *Clonostachys rogersoniana* was isolated and purified by silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 gel column chromatography and semi-preparative HPLC. The structure of these compounds were identified by HR-ESI-MS and NMR. The antibacterial activity of monomer compounds against four clinically common pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Enterobacter faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*) was evaluated by broth dilution method. **Results** Totally 11 compounds were isolated from the ethyl acetate extract of *Clonostachys rogersoniana*, which were identified as indole-3-acetic acid (**1**), *N*-acetyltryptamine (**2**), (1*S*, 3*S*)-1-methyl-2, 3, 4, 9-tetrahydro-1H-pyrido[3, 4-b]indole-3-carboxylic acid (**3**), (1*R*, 3*S*)-1-methyl-2, 3, 4, 9-tetrahydro-1H-pyrido[3, 4-b]indole-3-carboxylic acid (**4**), 4-methoxyphenylacetic acid (**5**), 4-hydroxybenzoic acid (**6**), hydroquinone (**7**), 4-hydroxyphenylacetic acid (**8**), clonostachydiol (**9**), 2, 3-dihydroxypropyl pentadecanoate (**10**) and daucosterol (**11**). Compounds **3** and **4** showed moderate inhibition against *Staphylococcus aureus,* with *MIC* values being 16 and 8 μg • mL^{-1}, respectively. **Conclusion** All the compounds have been isolated from this genus for the first time.

Key words: *Selaginella delicatula*; endomycete fungus; *Clonostachys rogersoniana*; secondary metabolite; antimicrobial activity

内生真菌普遍存在于植物的内部组织中[1]。常见的内生真菌有助于植物克服非生物因素（高温和盐度、干旱、金属毒性和光）以及生物因素（草食动物、昆虫、线虫和病原体）的有害影响以更好地生存[2]。在植物内生真菌和植物宿主的共生环境中，内生真菌一方面从植物宿主吸收自己所需的营养物质，另一方面在代谢过程中产生一系列活性物质促进植物生长发育，使植物宿主抵抗外界不利影响[3]。这些次生代谢产物在医学和农业应用等方面有极大的价值[4]。然而，许多内生真菌种群在这方面仍未被研究，这意味着植物内生真菌仍然是值得我们继续探索，为寻找结构新颖、活性显著的天然产物的资源宝库。

薄叶卷柏（*Selaginella delicatula*）为卷柏科卷柏属植物，具有活血调血、清热解毒等功效。目前从该属植物中分离得到的化学成分超过 300 个[5]，结构类型涉及双黄酮类[6]、木脂素类、生物碱类以及炔酚类[7]等，部分化合物表现出良好的生物活性，如细胞毒活性[8]、抗炎活性[9]、抗菌活性[10]以及抗氧化作用[11]等。然而目前针对该科属植物内生真菌的研究鲜有报道。课题组前期从薄叶卷柏根部分离筛选得到一株具有较好抗菌活性的内生真菌，经过 ITS 鉴定该菌株为 *Clonostachys rogersoniana*，其大米发酵粗提物对 *Staphylococcus aureus* 和 MRSA（methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*）有较好的抑制活性（*MIC* 值均为 1 mg • mL^{-1}）。为了挖掘 *Clonostachys rogersoniana* 的抗菌活性代谢产物，

本研究进一步对其进行放大发酵，运用多种现代色谱和光谱技术，从中分离鉴定得到 11 个单体化合物（结构式见图 1）。

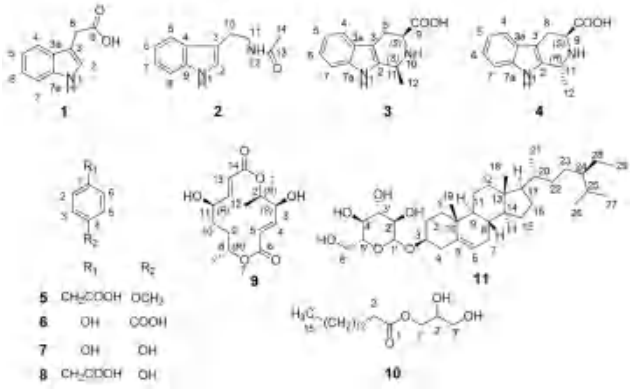

图 1　化合物 **1** ～ **11** 的化学结构

Fig 1　Chemical structures of compounds **1** ～ **11**

1　材料

Agilent 1290 型高效液相色谱 -Agilent 6500 series Q-TOF 质谱联用仪、Agilent 1100 半制备型液相色谱仪（美国安捷伦公司）；Bruker AV-400/AV-500/AV-600 型核磁共振仪（德国 Bruker 公司）；Agela Innoval ODS-2 半制备色谱柱（10 mm×250 mm，10 μm）；安东帕旋光仪 MCP 500（奥地利安东帕有限公司）；SQP 电子分析天平（北京赛多利斯科学仪器有限公司）；Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶（美国 GE 公司）；ODS 反相 C_{18} 填料（日本 YMC 公司）；80 ～ 100 目、200 ～ 300 目柱层析硅胶（青岛海洋化工有限公司）；EYELAN-1100S-W 旋转蒸发仪（日本东京理化器械株式会社）；所用试剂均为分析纯。抗菌实验所用的细菌材料（*Staphylococcus aureus* ATCC29213，*Enterobacter faecalis* ATCC29212，*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 和 *Escherichia coli* ATCC25922）由中南大学湘雅二医院提供。万古霉素（批号：V871983，规格：250 mg）、硫酸阿米卡星（批号：A837351，规格：1 g）（上海麦克林生化科技有限公司）。

薄叶卷柏植株于 2019 年采摘自湖南省常德市石门县壶瓶山，由湘雅药学院徐康平副教授鉴定为卷柏属植物薄叶卷柏（*Selaginella delicatula*）。该实验菌株分离自薄叶卷柏根部，委托擎科生物有限公司进行 ITS 测序，鉴定为粉红螺旋聚孢霉（*Clonostachys rogersoniana*）。目前菌种保存于中南大学湘雅药学院天然药物化学教研室（菌种保存编号为 *Clonostachys rogersoniana* BYJB-1）。

2　方法与结果

2.1　菌株培养与发酵

将目标菌株接种至液体培养基中，置于恒温培养箱内摇床 5 d（180 r • min^{-1}，28 ℃），得到种子液，将种子液接种到 500 mL 锥形瓶内（每瓶加入 200 g 大米，200 mL 超纯水，于 121 ℃高压蒸汽灭菌 25 min 并冷却至室温），于 28 ℃恒温条件下静置培养 28 d。

2.2　发酵产物的分离纯化

Clonostachys rogersoniana 的大米发酵物用乙酸乙酯浸提，提取 3 次，每次 2 d。合并提取液减压浓缩得到浸膏 32 g，浸膏经硅胶柱层析（200 ～ 300 目），依次用石油醚 - 乙酸乙酯（1∶0、10∶1、5∶1、2∶1、1∶1、0∶1）、乙酸乙酯 - 甲醇（100∶1 ～ 0∶1）梯度洗脱得到 5 个组分（Fr.1 ～ Fr.5）。Fr.2（6.5 g）经反相柱层析，以甲醇 - 水（5∶95 ～ 100∶0）梯度洗脱得到 8 个组分（Fr.2-1 ～ Fr.2-8）。Fr.2-7 经过反复重结晶纯化得到化合物 **10**（20.7 mg）。Fr.2-8 经过反复重结晶纯化得到化合物 **11**（5.6 mg）。Fr.2-5 经 Sephadex LH-20 凝胶柱层析，半制备型高效液相色谱（20% ～ 50% 乙腈洗脱 30 min，2 mL•min^{-1}）纯化得到化合物 **9**（29.8 mg）。Fr.2-2 经 Sephadex LH-20 凝胶柱层析，半制备型高效液相色谱（20% ～ 30% 乙腈洗脱 40 min，2 mL • min^{-1}）纯化得到化合物 **5**（8.0 mg）、**6**（12.3 mg）、**7**（13.2 mg）和 **8**（9.4 mg）。Fr.3（3.5 g）经反相柱层析，以甲醇 - 水（5∶95 ～ 100∶0）梯度洗脱得到 6 个组分（Fr.3-1 ～ Fr.3-6）。Fr.3-2 经 Sephadex LH-20 凝胶柱层析，半制备型高效液相色谱（15% ～ 25% 乙腈洗脱 30 min，2 mL • min^{-1}）纯化得到化合物 **1**（4.7 mg）。Fr.3-3 经 Sephadex LH-20 凝胶柱层析，半制备型高效液相色谱（25% ～ 35% 乙腈洗脱 30 min，2 mL • min^{-1}）纯化得到化合物 **2**（4.1 mg）、**3**（4.6 mg）和 **4**（6.2 mg）。

2.3　结构确证

化合物 **1**：白色粉末（甲醇），易溶于甲醇。HR-ESI-MS 显示 *m/z* 176.0715 $[M+H]^+$，提示分子式为：$C_{10}H_9NO_2$（calcd. for $C_{10}H_{10}NO_2$，176.0712）。^{1}H-NMR（500 MHz，DMSO-d_6）δ_H：10.77（1H，s，-COOH），7.55（1H，d，J = 8.0 Hz，H-4），7.31（1H，d，J = 8.0 Hz，H-7），7.19（1H，s，H-2），7.02（1H，t，J = 7.0 Hz，H-6），6.93（1H，t，J = 7.0 Hz，H-5），3.44（2H，s，H-8）；^{13}C-NMR（125 MHz，DMSO-d_6）δ_C：118.3（C-2），128.3（C-3），111.3（C-3a），119.6（C-4），120.1（C-5），123.7（C-6），111.5（C-7），136.5（C-7a），34.9（C-8），178.9（C-9）。以上数据与文献 [12] 报道基本一致，故鉴定为 indole-3-acetic acid。

化合物 **2**：黄色油状液体（甲醇），易

溶于二氯甲烷和甲醇。HR-ESI-MS 显示 *m/z* 203.1176 [M + H]$^+$，提示分子式为：$C_{12}H_{14}N_2O$（calcd. for $C_{12}H_{15}N_2O$，203.1184）。^{1}H-NMR（600 MHz，DMSO-d_6）δ_H：10.80（1H，s，H-1），7.93（1H，s，H-12），7.54（1H，d，J = 7.8 Hz，H-4），7.32（1H，d，J = 7.8 Hz，H-7），7.14（1H，s，H-2），7.06（1H，t，J = 7.2 Hz，H-6），6.97（1H，t，J = 7.2 Hz，H-5），3.30（2H，t，J = 7.8 Hz，H-11），2.80（2H，t，J = 7.8 Hz，H-10），1.80（3H，s，H-14）；^{13}C-NMR（150 MHz，DMSO-d_6）δ_C：121.4（C-2），112.3（C-3），118.7（C-4），118.7（C-5），123.0（C-6），111.8（C-7），136.7（C-8），127.7（C-9），25.7（C-10），39.9（C-11），169.5（C-13），23.2（C-14）。以上数据与文献[13]报道基本一致，故鉴定为 *N*-acetyltryptamine。

化合物 **3**：黄色油状液体（甲醇），易溶于二氯甲烷和甲醇。HR-ESI-MS 显示 *m/z* 231.1135 [M + H]$^+$，提示分子式为：$C_{13}H_{14}N_2O_2$（calcd. for $C_{13}H_{15}N_2O_2$，231.1134）。－108°（*c* 0.3，MeOH）。^{1}H-NMR（600 MHz，DMSO-d_6）δ_H：11.02（1H，s，-COOH），7.43（1H，d，J = 7.8 Hz，H-4），7.32（1H，d，J = 7.8 Hz，H-7），7.07（1H，t，J = 7.8 Hz，H-6），6.99（1H，t，J = 7.8 Hz，H-5），3.54（1H，dd，J = 4.8，12 Hz，H-8a），3.11（1H，dd，J = 4.8，12 Hz，H-8b），4.45（1H，q，J = 6.6 Hz，H-11），2.73（1H，t，J = 12 Hz，H-9），1.58（3H，d，J = 6.6 Hz，H-12）；^{13}C-NMR（150 MHz，DMSO-d_6）δ_C：133.5（C-2），107.4（C-3），126.7（C-3a），118.4（C-4），119.2（C-5），121.7（C-6），111.6（C-7），136.8（C-7a），24.1（C-8），58.3（C-9），49.5（C-11），17.9（C-12），169.5（-COOH）。以上 NMR 及旋光数据与文献[14]报道基本一致，故鉴定为（1*S*，3*S*）-1-methyl-2，3，4，9-tetrahydro-1H-pyrido[3，4-b]indole-3-carboxylic acid。

化合物 **4**：黄色油状液体（甲醇），易溶于二氯甲烷和甲醇。HR-ESI-MS 显示 *m/z* 231.1139 [M + H]$^+$，提示分子式为：$C_{13}H_{14}N_2O_2$（calcd. for $C_{13}H_{15}N_2O_2$，231.1134）。－75°（*c* 0.3，MeOH）。^{1}H-NMR（600 MHz，DMSO-d_6）δ_H：11.02（1H，s，-COOH），7.43（1H，d，J = 7.8 Hz，H-4），7.32（1H，d，J = 7.8 Hz，H-7），7.07（1H，t，J = 7.8 Hz，H-6），6.99（1H，t，J = 7.8 Hz，H-5），3.54（1H，dd，J = 4.8，12 Hz，H-8a），3.11（1H，dd，J = 4.8，12 Hz，H-8b），4.45（1H，q，J = 6.6 Hz，H-11），2.73（1H，t，J = 12 Hz，H-9），1.58（3H，d，J = 6.6 Hz，H-12）；^{13}C-NMR（150 MHz，DMSO-d_6）δ_C：133.5（C-2），107.4（C-3），126.7（C-3a），118.4（C-4），119.2（C-5），121.7（C-6），111.6（C-7），136.8（C-7a），24.1（C-8），53.4（C-9），46.7（C-11），17.9（C-12），170.5（-COOH）。以上 NMR 及旋光数据与文献[15]报道基本一致，故鉴定为（1*R*，3*S*）-1-methyl-2，3，4，9-tetrahydro-1H-pyrido[3，4-b]indole-3-carboxylic acid。

化合物 **5**：白色粉末（甲醇），易溶于甲醇。HR-ESI-MS 显示 *m/z* 167.0708 [M + H]$^+$，提示分子式为：$C_9H_{10}O_3$（calcd. for $C_9H_{11}O_3$，167.0708）。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ_H：9.34（1H，s，-COOH），7.05（2H，d，J = 8.4 Hz，H-2，6），6.71（2H，d，J = 8.4 Hz，H-3，5），3.60（3H，s，-OCH_3），3.53（2H，s，H-7）；^{13}C-NMR（150 MHz，DMSO-d_6）δ_C：130.7（C-1），124.9（C-2/6），115.6（C-3/5），156.7（C-4），39.8（C-7），172.5（C-8），52.0（-OCH_3）。以上数据与文献[16]报道基本一致，故鉴定为 4-methoxyphenylacetic acid。

化合物 **6**：白色粉末（甲醇），易溶于甲醇。HR-ESI-MS 显示 *m/z* 139.0386 [M + H]$^+$，提示分子式为：$C_7H_6O_3$（calcd. for $C_7H_7O_3$，139.0395）。^{1}H-NMR（600 MHz，DMSO-d_6）δ_H：7.78（2H，d，J = 8.4 Hz，H-3/5），6.79（2H，d，J = 7.8 Hz，H-2/6）。通过高分辨质谱分析，和对照品进行 TLC 分析，以及和文献[17]氢谱数据对比，判断化合物 **6** 为 4-hydroxybenzoic acid。

化合物 **7**：白色粉末（甲醇），易溶于甲醇。HR-ESI-MS 显示 *m/z* 111.0442 [M + H]$^+$，提示分子式为：$C_6H_6O_2$（calcd. for $C_6H_7O_2$，111.0446）。^{1}H-NMR（600 MHz，DMSO-d_6）δ_H：7.04（2H，d，J = 8.0 Hz，H-3/5），6.69（2H，d，J = 7.6 Hz，H-2/6）。通过高分辨质谱分析，和对照品进行 TLC 分析，以及和文献[18]氢谱数据对比，判断化合物 **7** 为 hydroquinone。

化合物 **8**：白色粉末（甲醇），易溶于甲醇。HR-ESI-MS 显示 *m/z* 153.0549 [M + H]$^+$，175.0365 [M + Na]$^+$，170.0813 [M + NH_4]$^+$，提示分子式为：$C_8H_8O_3$（calcd. for $C_8H_9O_3$，153.0552，$C_8H_8O_3Na$，175.0371，$C_8H_8O_3NH_4$，170.0812）。^{1}H-NMR（600 MHz，DMSO-d_6）δ_H：7.04（2H，d，J = 8.4 Hz，H-3/5），6.77（2H，d，J = 8.0 Hz，H-2/6），3.44（2H，s，H-7）。通过高分辨质谱分析、与对照品进行 TLC 对比分析以及与文献[19]氢谱数据对比分析，判断化合物 **8** 为 4-hydroxyphenylacetic acid。

化合物 **9**：白色粉末（甲醇），易溶于甲醇。HR-

ESI-MS 显示 *m/z* 285.1349 $[M+H]^+$，提示分子式为：$C_{14}H_{20}O_6$（calcd. for $C_{14}H_{21}O_6$，285.1338）。+ 103°（*c* 0.1，MeOH）。^{1}H-NMR（600 MHz，DMSO-d_6）δ_H：6.67（1H，dd，*J* = 4.2，15.6 Hz，H-12），6.48（1H，dd，*J* = 8.4，15.6 Hz，H-4），5.92（1H，dd，*J* = 1.2，16.2 Hz，H-5），5.78（1H，dd，*J* = 1.8，16.2 Hz，H-13），5.69（1H，d，*J* = 6.0 Hz，3-OH），5.05（1H，d，*J* = 4.6 Hz，11-OH），5.02（1H，m，H-2），4.72（1H，m，H-11），4.46（1H，m，H-3），3.96（1H，m，H-8），1.82（1H，m，H-10a），1.57（1H，m，H-10b），1.44（2H，m，H-9），1.33（3H，d，*J* = 6.6 Hz，H-15），1.13（3H，d，*J* = 6.6 Hz，H-16）；^{13}C-NMR（150 MHz，DMSO-d_6）δ_C：71.2（C-2），74.8（C-3），147.5（C-4），123.4（C-5），164.7（C-6），69.1（C-8），25.6（C-9），28.1（C-10），68.1（C-11），152.8（C-12），119.9（C-13），164.9（C-14），17.5（C-15），17.2（C-16）。以上 NMR 及旋光数据与文献[20]报道基本一致，故鉴定为 clonostachydiol。

化合物 **10**：白色粉末（甲醇），易溶于甲醇。HR-ESI-MS 显示 *m/z* 317.2686 $[M+H]^+$，提示分子式为：$C_{18}H_{36}O_4$（calcd. for $C_{18}H_{37}O_4$，317.2692）。^{1}H-NMR（500 MHz，DMSO-d_6）δ_H：0.86（3H，t，*J* = 7.0 Hz，H-15），1.20～1.27（s，-CH_2-），1.51（2H，m，H-3），2.28（2H，t，*J* = 7.5 Hz，H-2），3.36（1H，m，H-3'b），3.62（1H，m，H-3'a），3.90（1H，m，H-1'b），4.03（1H，m，H-1'a），4.61（1H，m，H-2'）；^{13}C-NMR（125 MHz，DMSO-d_6）δ_C：172.9（C-1），33.5（C-2），24.4（C-3），28.5（C-4），28.7（C-5），28.9（C-6），29.0（C-7），29.0（C-8），29.0（C-9），29.1（C-10），29.3（C-11），32.3（C-12），32.3（C-13），22.1（C-14），13.9（C-15），65.5（C-1'），69.31（C-2'），62.6（C-3'）。以上数据与文献[21]报道基本一致，故鉴定为 2，3-dihydroxypropyl pentadecanoate。

化合物 **11**：白色粉末（甲醇），易溶于二氯甲烷和甲醇。HR-ESI-MS 显示 *m/z* 577.4462 $[M+H]^+$，提示分子式为：$C_{35}H_{60}O_6$（calcd. for $C_{35}H_{61}O_6$，577.4468）。^{1}H-NMR（500 MHz，DMSO-d_6）δ_H：0.66（3H，s，H-18），0.80（3H，d，*J* = 6.5 Hz，H-26），0.81（3H，d，*J* = 6.5 Hz，H-27），0.83（3H，t，*J* = 8.3 Hz，H-29），0.90（1H，m，H-9），0.92（3H，m，H-21），0.96（1H，m，H-24），1.03（1H，m，H-14），1.06（1H，m，H-22a），1.07（3H，s，H-19），1.04（1H，m，H-15a），1.09（1H，m，H-1a），1.12（1H，m，H-17），1.15（2H，m，H-23），1.19（1H，m，H-12a），1.21（2H，m，H-28），1.24（1H，m，H-16a），1.32（1H，m，H-22b），1.34（1H，m，H-20），1.43（1H，m，H-8），1.45（2H，m，H-11），1.53（1H，m，H-7a），1.57（1H，m，H-15b），1.59（1H，m，H-2a），1.64（1H，m，H-25），1.83（1H，m，H-16b），1.88（1H，m，H-1b），1.90（1H，m，H-2b），1.95（1H，m，H-7b），2.00（1H，m，H-12b），2.24（1H，m，H-4a），2.39（1H，m，H-4b），3.22（1H，t，*J* = 8.3 Hz，H-20），3.27（1H，m，H-50），3.35（1H，m，H-40），3.38（1H，m，H-30），3.57（1H，m，H-3），3.70（1H，dd，*J* = 12.0，5.1 Hz，H-6a），3.81（1H，dd，*J* = 12.0，2.6 Hz，H-6b），4.38（1H，d，*J* = 7.8 Hz，H-10），5.36（1H，m，H-6）；^{13}C-NMR（125 MHz，DMSO-d_6）δ_C：36.8（C-1），29.3（C-2），76.8（C-3），38.1（C-4），140.5（C-5），121.2（C-6），31.4（C-7），31.4（C-8），49.6（C-9），36.2（C-10），20.6（C-11），38.3（C-12），41.9（C-13），56.2（C-14），23.9（C-15），27.8（C-16），55.4（C-17），11.7（C-18），19.1（C-19），35.5（C-20），18.6（C-21），33.3（C-22），25.4（C-23），45.1（C-24），28.7（C-25），19.7（C-26），18.9（C-27），22.6（C-28），11.8（C-29），100.8（C-1'），73.51（C-2'），76.8（C-3'），70.1（C-4'），76.8（C-5'），61.1（C-6'）。以上数据与文献[22]报道基本一致，故鉴定为 daucosterol。

2.4 抗菌活性评价

根据美国临床和实验室标准协会（CLSI）的 M07-A9 方案，采用微量肉汤稀释法[23]测定单体化合物对 4 种常见的临床致病菌（*Staphylococcus aureus*、*Enterobacter faecalis*、*Pseudomonas aeruginosa* 和 *Escherichia coli*）的体外抗菌活性。从新鲜的琼脂平板中选择 3 ～ 5 个形态相同的供试菌菌落，转移到 MHB（Mueller-Hinton Broth）培养基中，在 225 r • min^{-1} 的摇瓶中以 37 ℃的温度培养，使细菌悬浮液 ≥ 0.5 麦克法兰标准的浊度。对所制得的细菌悬浮液用含 0.1 mg • mL^{-1} 刃天青的 MHB 培养液稀释至约 1×10^6 CFU • mL^{-1} 菌液。用生物级 DMSO 溶解单体化合物，配成母液质量浓度为 1024 μg • mL^{-1}。第一孔取 25 μL 的母液，再取 75 μL 肉汤，两者混匀至第一孔质量浓度为 256 μg • mL^{-1}；第二至第七孔依次从上一孔取 50 μL 混合液和 50 μL 肉汤逐级稀释至质量浓度为 128、64、32、16、8、4 μg • mL^{-1}，最后一孔加入肉汤 50 μL，再向每一孔加入 50 μL 菌液；最终每一孔质量浓度依次为 128、64、32、16、8、4、2、0 μg • mL^{-1}。同时设置万古霉素和硫酸阿

米卡星为阳性对照，以 DMSO 为溶剂对照。每组设 3 次重复。96 孔培养板放置于 37 ℃培养箱培养 18 ～ 24 h。

抑菌实验结果显示化合物 **3** 和 **4** 对 *Staphylococcus aureus* 具有中等抑制活性（*MIC* 值分别为 16 和 8 μg • mL^{-1}）。化合物 **1** ～ **11** 在最大质量浓度 128 μg • mL^{-1} 下对 *Enterobacter faecalis*、*Pseudomonas aeruginosa* 和 *Escherichia coli* 均未显示出抑菌活性。

3　讨论

本文对薄叶卷柏内生真菌 *Clonostachys rogersoniana* 大米发酵物开展了较为系统的化学成分研究，共分离得到 11 个化合物，包括 4 个生物碱（**1** ～ **4**），4 个酚酸类化合物（**5** ～ **8**），1 个大环内酯（**9**），1 个脂肪酸类化合物（**10**）以及 1 个甾体化合物（**11**）。对于化合物 **10**，目前我们仅确定其平面结构。抗菌实验结果显示化合物 **3** 和 **4** 对 *Staphylococcus aureus* 具有中等抑制活性。本研究结果不仅丰富了菌株 *Clonostachys rogersoniana* 的化学成分多样性，亦为薄叶卷柏内生真菌的进一步开发利用提供了一定的实验依据。

参考文献

[1] Strobel G，Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products [J]. Microbiol Mol Biol Rev，2003，67（4）：491-502.

[2] Gunatilaka AAL. Natural products from plant-associated microorganisms：distribution，structural diversity，bioactivity，and implications of their occurrence [J]. J Nat Prod，2006，69（3）：509-526.

[3] Dissanayake RK，Ratnaweera PB，Williams AE，et al. Antimicrobial activities of endophytic fungi of the Sri Lankan aquatic plant *Nymphaea nouchali* and chaetoglobosin A and C，produced by the endophytic fungus *Chaetomium globosum* [J]. Mycology，2016，7（1）：1-8.

[4] Aly AH，Debbab A，Proksch P. Fungal endophytes：unique plant inhabitants with great promises [J]. Appl Microbiol Biotechnol，2011，90（6）：1829-1845.

[5] 谢洋，徐康平，邹振兴，等 . 卷柏属植物化学成分多样性研究进展 [J]. 中南药学，2017，15（2）：129-142.

[6] Zou ZX，Tan GS，Zhang GG，et al. New cytotoxic apigenin derivatives from *Selaginella doederleinii* [J]. Chin Chem Lett，2017，28（5）：931-934.

[7] Xu KP，Zou H，Li FS，et al. Two new selaginellin derivatives from *Selaginella tamariscina* Spring [J]. J Asian Nat Pro Res，2011，13（4）：356-360.

[8] Jung YJ，Lee EH，Lee CG，et al. AKR1B10-inhibitory *Selaginella tamariscina* extract and amentoflavone decrease the growth of A549 human lung cancer cells in vitro and in vivo [J]. J Ethnopharmacol，2017，202：78-84.

[9] Dat LD，Zhao BT，Hung ND，et al. Lignan derivatives from *Selaginella tamariscina* and their nitric oxide inhibitory effects in LPS-stimulated RAW 264.7 cells [J]. Bioorg Med Chem Lett，2017，27（3）：524-529.

[10] 鲁曼霞，黄可龙，施树云，等 . 兖州卷柏化学成分及体外抗菌活性研究 [J]. 天然产物研究与开发，2009，21（6）：973-975.

[11] Wang CJ，Hu CP，Xu KP，et al. Effects of selaginellin on homocysteine-induced senescence in human umbilical vein endothelial cells [J]. J Cardiovasc Pharmacol，2010，55（6）：560-566.

[12] 曾瑶波，刘晓玲，李创军，等 . 斑蝥化学成分及体外抗肿瘤活性研究 [J]. 中国中药杂志，2016，41（5）：859-863.

[13] Li Y，Li XF，Kim DS，et al. Indolyl alkaloid derivatives，*N*-b-acetyltryptamine and oxaline from a marine-derived fungus [J]. Arch Pharmacal Res，2003，26（1）：21-23.

[14] Li XN，Chu C，Cheng DP，et al. Two alkaloids from *Asparagus cochinchinensis* [J]. Chem Nat Compd，2014，50（2）：326-328.

[15] Yang L，Jiang ST，Zhou QG，et al. Chemical constituents from the flower of *hosta plantaginea* with cyclooxygenases inhibition and antioxidant activities and their chemotaxonomic significance [J]. Molecules，2017，22（11）：1825.

[16] Li XJ，Gao JM，Chen H，et al. Toxins from a symbiotic fungus，*Leptographium qinlingensis* associated with *Dendroctonus armandi* and their in vitro toxicities to *Pinus armandi* seedlings [J]. Eur J Plant Pathol，2012，134（2）：239-247.

[17] Teles YCF，Ribeiro J，Bozza PT，et al. Phenolic constituents from *Wissadula periplocifolia* Presl. and anti-inflammatory activity of 7，4’-di-*O*-methylisoscutellarein [J]. Nat Prod Res，2016，30（16）：1880-1884.

[18] Chuang TH，Chan HH，Wu TS，et al. Chemical constituents and biological studies of the leaves of *Grevillea robusta* [J]. Molecules，2011，16（11）：9331-9339.

[19] Luo J，Zhang CH，Zhu HM，et al. A new chromene from the fruiting bodies of *Chroogomphus rutilus* [J]. Nat Prod Res，2015，29（8）：698-702.

[20] Grabley S，Hammann P，Thiericke R，et al. Secondary metabolites by chemical-screening. clonostachydiol，a novel anthelmintic macrodiolide from the fungus *Clonostachys cylindrospora* [J]. J Antibiot，1993，46（2）：343-345.

[21] Sabudak T，Isik E，Oksuz S. Lipid constituents of *Trifolium resupinatum* var. *Microcephalum* [J]. Nat Prod Res，2007，21（9）：828-833.

[22] Lendl A，Werner I，Glasl S，et al. Phenolic and terpenoid compounds from *Chione venosa* var. [J]. Phytochemistry，2005，66（19）：2381-2387.

[23] Zhao L，Liu H，Huo L，et al. Structural optimization and antibacterial evaluation of rhodomyrtosone B analogues against MRSA strains [J]. Med Chem Comm，2018，9（10）：1698-1707.

（收稿日期：2022-06-05；修回日期：2022-08-06）

美丽薄子木内生真菌 *Rhytidhysteron* sp. BZM-9 化学成分研究

张莎[1, 2]，旷敏[1, 2]，彭伟伟[1, 2]，郑雨婷[1, 2]，许立[1, 2]，曾广源[1, 2]，邹振兴[1, 2*]（1.中南大学湘雅药学院，长沙　410013；2. 慢病诊疗小分子药物发现与转化湖南省重点实验室，长沙　410013）

摘要：目的　研究美丽薄子木内生真菌 *Rhytidhysteron* sp. BZM-9 乙酸乙酯部位的化学成分。**方法**　采用硅胶柱、ODS、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱和 Pre-HPLC 进行分离纯化，利用 HR-ESI-MS、NMR 等方法鉴定化合物的结构。并运用 MTT 法及 96 孔板二倍稀释法对部分化合物进行活性评价。**结果**　从菌株 *Rhytidhysteron* sp. BZM-9 中分离出 15 个化合物，分别鉴定为 alternariol（**1**）、porric acid E（**2**）、3-ethyl-5，7-dihydroxy-3，6-dimethylphthalide（**3**）、5-羟基-7-甲氧基-4，6-二甲基-2-苯并呋喃酮（**4**）、6-formyl-7-hydroxy-5-methoxy-4-methylphalide（**5**）、4-hydroxy-6-methoxy-5-methylphthalide（**6**）、2-甲基-5-甲氧羰甲基-7-羟基色原酮（**7**）、2-（2'-hydroxypropyl）-5-methyl-7-hydroxychromone（**8**）、altechromones A（**9**）、4-*O*-methylscleron（**10**）、pilobolusate（**11**）、aspergillusphenols A（**12**）、苔色酸甲酯（**13**）、1H-indole-3-carboxaldehyde（**14**）、ergosta-4，6，8（14），22-tetraen-3-one（**15**）。活性测试结果显示，化合物 **12** 对肝癌细胞 SMMC7721 具有增殖抑制作用（IC_{50} = 0.338 μmol • L^{-1}），同时对耐甲氧金黄色葡萄球菌也表现出较强的抑制活性（*MIC* = 6.25 μg • mL^{-1}）。**结论**　所有化合物均为首次从该属真菌中分离得到。化合物 **12** 表现出了一定的抗肿瘤、抗菌活性。

关键词：内生真菌；美丽薄子木；*Rhytidhysteron* sp. BZM-9；化学成分；抗菌活性；细胞毒活性
中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-1969-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.002

Chemical constituents of endomycete fungus *Rhytidhysteron* sp. BZM-9 from *Leptospermum brachyandrum*

ZHANG Sha[1, 2], KUANG Min[1, 2], PENG Wei-wei[1, 2], ZHENG Yu-ting[1, 2], XU Li[1, 2], ZENG Guang-yuan[1, 2], ZOU Zhen-xing[1, 2*] (1. *Xiangya School of Pharmaceutical Sciences*, *Central South University*, *Changsha* 410013; 2. *Hunan Key Laboratory of Diagnostic and Therapeutic Drugs for Chronic Diseasess*, *Changsha* 410013)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents of the ethyl acetate extract of endomycete fungus *Rhytidhysteron* sp. BZM-9 from *Leptospermum brachyandrum*. **Methods** Silica gel, ODS, Sephadex LH-20 column chromatography and Pre-HPLC were used for the isolation and purification. The structures were elucidated on the basis of HR-ESI-MS and NMR spectroscopic evidence. The cytotoxicity and antibacterial activity of some compounds were evaluated by MTT method and double dilution method in the 96-well plate. **Results** Totally 15 compounds were isolated and identified as alternariol (**1**), porric acid E (**2**), 3-ethyl-5,7-dihydroxy-3,6-dimethylphthalide (**3**), 5-hydroxy-7-methoxy-4, 6-dimethylphthalide (**4**), 6-formyl-7-hydroxy-5-methoxy-4-methylphalide (**5**), 4-hydroxy-6-methoxy-5-methylphthalide (**6**), 2-methyl-5-methoxycarbonylmethyl-7-hydroxychromanone (**7**), 2-(2'-hydroxypropyl)-5-methyl-7-hydroxychromone (**8**), altechromones A (**9**), 4-*O*-methylscleron (**10**), pilobolusate (**11**), aspergillusphenols A (**12**), methyl orsellinate (**13**), 1H-indole-3-carboxaldehyde (**14**), and ergosta-4, 6, 8 (14), 22-tetraen-3-one (**15**). The activity

基金项目：湖南省自然科学基金项目（No. 2021JJ30917）；湖南省高新技术产业科技创新引领计划（No. 2020GK4083）；河南省“揭榜挂帅”科技项目（No. 211110110300）；海南省重点研发项目（No. ZDYF2022SHFZ048）；湖南省科教联合基金项目（No. 2019JJ70043）。
作者简介：张莎，女，硕士研究生，主要从事天然药物化学研究，email：ad8879789@163.com　*__通信作者：__邹振兴，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事天然药物化学研究，email：zouzhenxing@csu.edu.cn

test showed that compound **12** not only had good proliferation inhibition against liver cancer cells SMMC7721 (IC_{50} = 0.338 μmol • L^{-1}), but also significant inhibition against MRSA (*MIC* = 6.25 μg • mL^{-1}). **Conclusion** All the compounds are isolated from the genus of *Rhytidhysteron* for the first time. Compound **12** shows certain antitumor and antibacterial activities.

Key words: endomycete fungus; *Leptospermum brachyandrum*; *Rhytidhysteron* sp. BZM-9; chemical component; antibacterial activity; cytotoxic activity

植物内生真菌是天然产物的重要资源，它们栖息在宿主植物的不同器官、组织内，对宿主植物本身不会引起任何疾病[1]。从微生物，尤其是植物内生真菌和海洋微生物中寻找和发现活性新颖的先导化合物已成为当前的研究热点[2-3]。近年来，内生真菌产生的多种生物活性代谢物具有重要的社会经济价值，在农业（作为生物肥料 / 生物刺激剂）和环境（生物修复）中被广泛应用[2]。

美丽薄子木（*Leptospermum brachyandrum*）为桃金娘科（Myrtaceae）鱼柳梅属（*Leptospermum*）小乔木或灌木，原产于澳大利亚。由于其观赏及药用价值引入我国，目前在广东、广西等地广泛种植。研究显示，桃金娘科植株富含精油及间苯三酚类成分，具有较好的抗菌活性[4-8]。但目前国内外关于该科植物美丽薄子木的化学成分及其内生真菌的研究鲜少。课题组前期通过组织分离法从美丽薄子木植物中分离出一株内生真菌，经 ITS 测序鉴定为 *Rhytidhysteron* sp. BZM-9。经文献检索发现，目前国内外对于该属真菌的化学成分研究较少，仅报道几个色原酮[9]及螺二萘成分[10-12]。因此，为了进一步探明其化学多样性，本文利用现代色谱及光谱技术从中分离鉴定出 15 个化合物（见图 1），并对部分化合物进行了抗菌和细胞毒活性评价。

1　材料

Bruker AV-400/AV-500/AV-600 型核磁共振仪（德国 Bruker 公司）；Agilent 1290 UPLC-6545 accurate mass Q-TOF 色谱 - 质谱联用仪、Agilent 1200 型分析高效液相色谱仪、Agilent 1100 型半制备型高效液相色谱仪（美国 Agilent 科技公司）；YMC-pack ODS-A 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；YMC-pack ODS-A 色谱柱（250 mm×10 mm，10 μm）；C_{18} 反相硅胶（40 ～ 75 μm，日本 Kasugai）；硅胶（60 ～ 100 目，200 ～ 300 目，青岛海洋化工有限公司）；Sephadex LH-20 凝胶（德国 Healthcare Uppsala Swedeb）；所用试剂均为分析纯。

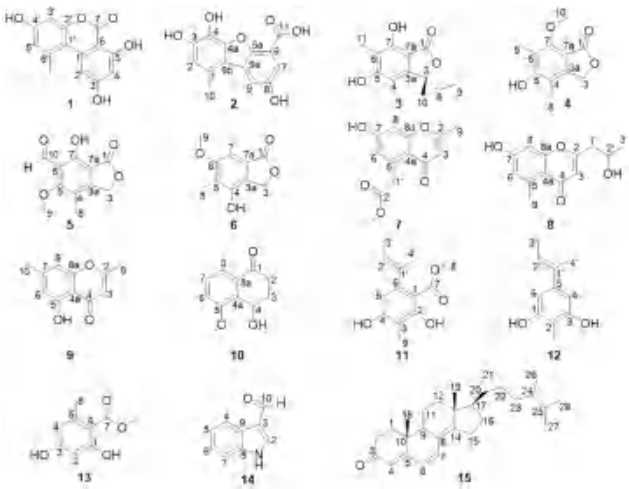

图 1　化合物 **1** ～ **15** 的化学结构

Fig 1　Structures of compounds **1** ～ **15**

HepG2 和 SMMC-7721 肝癌细胞（中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心）；实验菌株 MRSA（Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*）及 *Escherichia coli* 来自广东省微生物培养中心。

实验目标菌株分离自美丽薄子木枝叶，美丽薄子木枝叶于 2016 年 9 月采自中国科学院华南植物园，由华南植物园王发国副研究员鉴定。该真菌由北京擎科新业生物技术有限公司经 ITS 序列分析鉴定为 *Rhytidhysteron* sp. BZM-9，目前该样品标本保存于中南大学湘雅药学院天然药物化学实验室。

2　菌株的发酵、萃取及其代谢产物的分离

用接种环挑取适量菌丝接种至装有 200 mL PDB 的三角瓶中，在恒温培养摇床中培养 5 d（28 ℃，130 r • min^{-1}），制备得到种子液。将种子液接种至无菌大米培养基中，共培养 60 瓶，室温下静态发酵培养 30 d，得到固体发酵物。发酵完成后用乙酸乙酯将大米发酵物萃取 3 次，将有机溶剂减压蒸发获得粗提物浸膏（50 g）。

乙酸乙酯浸膏经硅胶柱层析，采用 PE-EA-MeOH（100∶0∶0 ～ 0∶0∶100）梯度洗脱，得到 10 个组分（Fr. A ～ Fr. J）。Fr. F 再经硅胶柱层析，以 CH_2Cl_2-MeOH（100∶0 ～ 0∶100）梯度洗

脱，得到 8 个组分（Fr. F-1 ～ Fr. F-8）。Fr. F-3 经反复硅胶柱层析及 Pre-HPLC 得到化合物 **1**（20.3 mg）、**2**（15.8 mg）、**7**（3.5 mg）、**8**（5.8 mg）和 **9**（10.3 mg）。Fr. F-4 经 Sephadex LH-20 柱层析，甲醇洗脱，得到 4 个组分（Fr. F-4-1 ～ Fr. F-4-4）。Fr. F-4-2 依次经硅胶柱层析、Pre-HPLC 得到化合物 **3**（7.3 mg）、**4**（2 mg）、**5**（6.6 mg）和 **6**（1.6 mg）。Fr. F-5 经 ODS 柱层析，采用 MeOH-H_2O（20∶80 ～ 100∶0）梯度洗脱，得到 8 个组分（Fr. F-1 ～ Fr. F-8）。Fr. F-2 经 Pre-HPLC 得到化合物 **14**（2.1 mg）。Fr. F-3 依次经硅胶柱层析、Pre-HPLC 得化合物 **10**（5.4 mg）。

Fr.E 经 ODS 柱层析，采用 MeOH-H_2O（20∶80 ～ 100∶0）梯度洗脱，得到 8 个组分（Fr. E-1 ～ Fr. E-8）。Fr. E-5 经反复硅胶柱层析，再通过 Pre-HPLC 得到化合物 **11**（2.3 mg）和 **13**（3.5 mg）；Fr. E-6 依次经硅胶柱层析、Pre-HPLC 得到化合物 **12**（8.5 mg）；Fr. E-7 经反复硅胶柱层析得到化合物 **15**。

3 结构鉴定

化合物 **1**：白色无定型粉末，易溶于甲醇和二甲基亚砜（DMSO），HR-ESI-MS *m/z*：259.0608 [M＋H]$^+$。^{1}H-NMR（600 MHz，CD_3OD）δ：7.24（1H，d，J＝2.4 Hz，H-6），6.69（1H，d，J＝3.0 Hz，H-5'），6.60（1H，d，J＝3.0 Hz，H-3'），6.35（1H，d，J＝2.4 Hz，H-4），2.75（3H，s，6'-CH_3）。^{13}C-NMR（150 MHz，CD_3OD）δ：140.0（C-1），98.9（C-2），166.2（C-3），102.2（C-4），166.9（C-5），105.8（C-6），167.6（C-7），111.0（C-1'），154.5（C-2'），102.7（C-3'），159.9（C-4'），118.6（C-5'），139.8（C-6'），25.9（6'-CH_3）。以上数据与文献报道 [13] 基本一致，化合物 **1** 鉴定为 alternariol。

化合物 **2**：褐色固体，易溶于甲醇和 DMSO，HR-ESI-MS *m/z*：275.0555 [M ＋ H]$^+$。^{1}H-NMR（600 MHz，CD_3OD）δ：7.23（1H，d，J ＝ 1.8 Hz，H-9），6.68（1H，s，H-2），6.35（1H，d，J ＝ 1.8 Hz，H-7），2.66（3H，s，H-10）。^{13}C-NMR（150 MHz，CD_3OD）δ：126.9（C-1），116.3（C-2），146.3（C-3），130.9（C-4），141.3（C-4a），164.8（C-5a），97.5（C-6），100.6（C-7），165.0（C-8），104.2（C-9），139.1（C-9a），109.8（C-9b），23.9（C-10），165.4（C-11）。以上数据与文献报道 [14] 基本一致，化合物 **2** 鉴定为 porric acid E。

化合物 **3**：黄色固体，易溶于甲醇和 DMSO，HR-ESI-MS *m/z*：223.0987 [M ＋ H]$^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：6.39（1H，s，H-4），1.97（3H，s，H-11），1.89（1H，m，H-8a），1.80（1H，m，H-8b），1.48（3H，s，H-10），0.64（3H，t，J ＝ 7.2 Hz，H-9）。^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：169.3（C-1），86.6（C-3），99.5（C-4），163.2（C-5），111.4（C-6），155.2（C-7），153.5（C-3a），103.5（C-7a），32.5（C-8），8.6（C-9），26.2（C-10），8.1（C-11）。以上数据与文献报道 [15] 基本一致，化合物 **3** 鉴定为 3-ethyl-5，7-dihydroxy-3，6-dimethylphthalide。

化合物 **4**：白色针状晶体，易溶于甲醇和 DMSO，HR-ESI-MS *m/z*：209.0814 [M ＋ H]$^+$。^{1}H-NMR（500 MHz，DMSO-d_6）δ：5.20（2H，s，H-3），3.85（3H，s，H-10），2.09（3H，s，H-9），2.06（3H，s，H-8）。^{13}C-NMR（125 MHz，DMSO-d_6）δ：169.2（C-1），68.5（C-3），113.7（C-4），162.4（C-5），118.4（C-6），155.8（C-7），147.3（C-3a），107.4（C-7a），11.8（C-8），9.6（C-9），62.4（C-10）。以上数据与文献报道 [16] 基本一致，化合物 **4** 鉴定为 5- 羟基 -7- 甲氧基 -4，6- 二甲基 -2- 苯并呋喃酮。

化合物 **5**：黄色固体，易溶于甲醇和 DMSO，HR-ESI-MS *m/z*：223.0626 [M ＋ H]$^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：10.18（1H，s，H-10），5.35（2H，s，H-3），3.92（3H，s，H-9），2.01（3H，s，H-8）。^{13}H-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：172.5（C-1），70.1（C-3），114.8（C-4），168.5（C-5），121.0（C-6），160.9（C-7），152.5（C-3a），104.9（C-7a），9.2（C-8），61.8（C-9），190.6（C-10）。以上数据与文献报道 [17] 基本一致，化合物 **5** 鉴定为 6-formyl-7-hydroxy-5-methoxy-4-methylphalide。

化合物 **6**：黄色固体，易溶于甲醇和 DMSO，HR-ESI-MS *m/z*：223.0626 [M ＋ H]$^+$。^{1}H-NMR（600 MHz，CD_3OD）δ：6.91（1H，s，H-7），5.22（2H，s，H-3），3.87（3H，s，H-9），2.16（3H，s，H-8）。^{13}C-NMR（150 MHz，CD_3OD）δ：172.8（C-1），68.3（C-3），150.0（C-4），120.2（C-5），161.1（C-6），96.8（C-7），123.5（C-3a），126.9（C-7a），7.9（C-8），55.0（C-9）。以上数据与文献报道 [18] 基本一致，化合物 **6** 鉴定为 4-hydroxy-6-methoxy-5-methylphthalide。

化合物 **7**：白色固体，易溶于甲醇和 DMSO，HR-ESI-MS *m/z*：271.0582 [M ＋ Na]$^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：6.71（1H，d，J ＝ 2.4

Hz，H-6），6.65（1H，d，J ＝ 2.4 Hz，H-8），5.96（1H，s，H-3），4.03（2H，s，H-1'），3.55（3H，s，-OCH_3），2.28（3H，s，H-9）。^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：164.7（C-2），118.9（C-3），178.2（C-4），137.4（C-5），110.8（C-6），161.1（C-7），102.1（C-8），114.2（C-4a），159.5（C-8a），19.9（C-9），40.1（C-1'），171.6（C-2'），51.7（-OCH_3）。以上数据与文献报道[19]基本一致，化合物 **7** 鉴定为 2- 甲基 -5- 甲氧羰甲基 -7- 羟基色原酮。

化合物 **8**：白色固体，易溶于甲醇和 DMSO，HR-ESI-MS *m/z*：235.0968 [M ＋ H] $^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：6.66（1H，d，J ＝ 2.4 Hz，H-8），6.62（1H，d，J ＝ 2.4 Hz，H-6），5.97（1H，s，H-3），4.03（1H，m，H-2'），2.65（3H，s，H-9），2.58（2H，m，H-1'），1.15（3H，d，J ＝ 6.4 Hz，H-3'）。^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：165.3（C-2），112.0（C-3），178.8（C-4），141.8（C-5），116.9（C-6），161.4（C-7），101.1（C-8），114.9（C-4a），159.6（C-8a），43.3（C-1'），64.5（C-2'），23.9（C-3'），22.9（5-CH_3）。以上数据与文献报道[20]基本一致，化合物 **8** 鉴定为 2-（2'-hydroxypropyl）-5-methyl-7-hydroxychromone。

化合物 **9**：白色固体，易溶于甲醇和 DMSO，HR-ESI-MS *m/z*：213.0507 [M ＋ H] $^+$。^{1}H-NMR（600 MHz，CD_3OD）δ：6.64（1H，d，J ＝ 2.4 Hz，H-6），6.63（1H，d，J ＝ 2.4 Hz，H-8），6.00（1H，s，H-3），2.71（3H，s，H-10），2.32（3H，s，H-9）。^{13}C-NMR（150 MHz，CD_3OD）δ：166.7（C-2），115.6（C-3），182.1（C-4），163.2（C-5），118.1（C-6），143.7（C-7），101.7（C-8），111.4（C-4a），161.5（C-8a），19.9（C-9），23.2（C-10）。以上数据与文献报道[21]基本一致，化合物 **9** 鉴定为 altechromones A。

化合物 **10**：浅黄色固体，易溶于甲醇和 DMSO，HR-ESI-MS *m/z*：193.0864 [M ＋ H] $^+$。^{1}H-NMR（600 MHz，DMSO-d_6）δ：7.44（1H，dd，J ＝ 7.8，1.8 Hz，H-8），7.41（1H，t，J ＝ 7.8 Hz，H-7），7.28（1H，dd，J ＝ 7.8，1.8 Hz，H-6），5.10（1H，t，J ＝ 3.6 Hz，H-4），3.85（3H，s，-OCH_3），2.96（1H，m，H-2a），2.41（1H，m，H-2b），2.11（2H，m，H-3）。^{13}C-NMR（150 MHz，DMSO-d_6）δ：198.3（C-1），32.7（C-2），30.6（C-3），58.9（C-4），157.3（C-5），116.5（C-6），129.4（C-7），118.0（C-8），133.5（C-9），132.6（C-10），56.4（-OCH_3）。以上数据与文献报道[22]基本一致，化合物 **10** 鉴定为 4-*O*-methylscleron。

化合物 **11**：浅黄色固体，易溶于甲醇和 DMSO，HR-ESI-MS *m/z*：237.1121 [M ＋ H] $^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：6.18（1H，s，H-5），5.21（1H，m，H-2'），3.75（3H，s，H-8），1.95（3H，s，H-9），1.77（3H，s，H-4'），1.67（3H，d，J ＝ 6.4 Hz，H-3'）。^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：103.7（C-1），160.7（C-2），109.4（C-3），160.5（C-4），109.3（C-5），146.8（C-6），171.3（C-7），52.4（C-8），8.6（C-9），138.7（C-1'），120.6（C-2'），14.1（C-3'），18.7（C-4'）。以上数据与文献报道[23]基本一致，化合物 **11** 鉴定为 pilobolusate。

化合物 **12**：深褐色固体，易溶于甲醇和 DMSO，HR-ESI-MS *m/z*：179.1071 [M ＋ H] $^+$。^{1}H-NMR（500 MHz，DMSO-d_6）δ：9.03（2H，br s，1/3-OH），6.32（2H，s，H-4，H-6），5.72（1H，q，J ＝ 6.5 Hz，H-2'），1.90（3H，s，H-3'），1.86（3H，s，H-4'），1.70（3H，d，J ＝ 6.5 Hz，H-7）。^{13}C-NMR（125 MHz，DMSO-d_6）δ：156.3（C-1），109.1（C-2），156.3（C-3），103.8（C-4），141.5（C-5），103.8（C-6），8.9（C-7），135.5（C-1'），120.6（C-2'），14.5（C-3'），15.7（C-4'）。以上数据与文献报道[24]基本一致，化合物 **12** 鉴定为 aspergillusphenols A。

化合物 **13**：淡黄色固体，易溶于甲醇和 DMSO，HR-ESI-MS *m/z*：183.0656 [M ＋ H] $^+$。^{1}H-NMR（600 MHz，DMSO-d_6）δ：6.15（1H，d，J ＝ 2.4 Hz，H-4），6.14（1H，d，J ＝ 2.4 Hz，H-2），3.79（3H，s，-OCH_3），2.27（3H，s，H-8）。^{13}C-NMR（150 MHz，DMSO-d_6）δ：161.6（C-1），100.9（C-2），167.4（C-3），110.8（C-4），141.2（C-5），106.1（C-6），170.7（C-7），22.5（C-8），52.2（-OCH_3）。以上数据与文献报道[25]基本一致，化合物 **13** 鉴定为苔色酸甲酯。

化合物 **14**：黄色固体，易溶于甲醇和 DMSO，HR-ESI-MS *m/z*：146.0401 [M ＋ H] $^+$。^{1}H-NMR（600 MHz，DMSO-d_6）δ：12.14（1H，br s，-NH-），9.93（1H，s，H-10），8.29（1H，s，H-2），8.09（1H，d，J ＝ 7.8 Hz，H-4），7.52（1H，d，J ＝ 7.8 Hz，H-7），7.25（2H，m，H-5/6）。^{13}C-NMR（150 MHz，DMSO-d_6）

δ：139.0（C-2），118.6（C-3），123.9（C-4），122.6（C-5），120.8（C-6），112.9（C-7），137.5（C-8），124.6（C-9），185.5（C-10）。以上数据与文献报道[26]基本一致，化合物**14**鉴定为1H-indole-3-carboxaldehyde。

化合物**15**：黄色固体，易溶于氯仿，HR-ESI-MS *m/z*：393.3153 $[M + H]^+$。^{1}H-NMR（500 MHz，$CDCl_3$）δ：6.61（1H，d，J = 9.5 Hz，H-7），6.02（1H，d，J = 9.5 Hz，H-6），5.74（1H，s，H-4），5.24（2H，m，H-22/23），1.06（3H，d，J = 6.5 Hz，H-21），1.00（3H，s，H-19），0.96（3H，s，H-18），0.93（3H，d，J = 7.0 Hz，H-28），0.84（6H，d，J = 6.5 Hz，H-26/27）。^{13}C-NMR（125 MHz，$CDCl_3$）δ：34.1（C-1/C-2），199.5（C-3），123.0（C-4），124.5（C-5），124.4（C-6），134.0（C-7），164.4（C-8），44.3（C-9），36.8（C-10），19.0（C-11），35.6（C-12），44.0（C-13），156.1（C-14），25.4（C-15），27.7（C-16），55.7（C-17），19.0（C-18），16.7（C-19），39.3（C-20），21.1（C-21），135.0（C-22），132.5（C-23），42.9（C-24），33.1（C-25），20.0（C-26），19.7（C-27），17.7（C-28）。以上数据与文献报道[27]基本一致，化合物**15**鉴定为ergosta-4，6，8（14），22-tetraen-3-one。

4 生物活性测定

4.1 抗肿瘤活性测定

以阿霉素（上海爱研化工科技有限公司，批号：AYCB1087）为阳性对照，测试了化合物**3**～**6**和**11**～**13**对两种肝癌细胞（HepG2和SMMC-7721）的增殖抑制活性。首先将HepG2和SMMC-7721细胞株在含10%新生牛血清的RPMI 1640培养液中，于37 ℃、5% CO_2的培养箱内培养。收集对数生长期的两种肝癌细胞，以1×10^4个细胞/孔接种于96孔板，贴壁培养24 h后。每孔分别加入2 μL待测化合物，阴性对照组和空白组分别加入等体积DMSO和培养液。培养48 h后，再加入20 μL MTT溶液，继续孵育4 h。弃去上清液，每孔加入150 μL DMSO，结晶充分溶解后，用酶标仪在490 nm波长处测定各孔吸光度值，并计算IC_{50}值。

结果显示，只有化合物**12**对SMMC7721细胞显示出较强的细胞毒活性（IC_{50} = 0.338 μmol·L^{-1}），其活性相当于阳性对照阿霉素（IC_{50} = 0.3 μmol·L^{-1}），其余化合物在测试的最大浓度下（≥ 80 μmol·L^{-1}）均未显示出增殖抑制活性。

4.2 抗菌活性测定

以万古霉素（上海麦克林生化科技有限公司，批号：V871983）为阳性对照，参考美国临床实验室标准委员会（CLSI20150）标准，采用96孔板二倍稀释法测试化合物**3**～**6**和**11**～**14**对MRSA及*Escherichia coli*的最低抑菌浓度（*MIC*）值。结果显示，仅化合物**12**对MRSA显示出较好的抑制活性（*MIC* = 6.25 μg·mL^{-1}），其余化合物在测试的最大质量浓度下（≥ 50 μg·mL^{-1}）对MRSA及*Escherichia coli*均未显示出抑制活性。

5 结果与讨论

植物内生真菌具有普遍性和多样性，自然界几乎所有的植物组织中均含有内生真菌，其参与植物生长过程中的重要环节，不仅能代谢产生与宿主植物相同或相似的代谢产物，自身还能生成许多活性代谢物，是活性先导化合物的重要来源。

本研究从美丽薄子木植物内生真菌*Rhytidhysteron* sp. BZM-9乙酸乙酯提取物中共分离鉴定出15个化合物，包括6个酚酸类、4个苯酞类、3个色原酮、1个吲哚生物碱及1个甾体，以上所有化合物均为首次从该属真菌中分离得到。活性测试结果显示化合物**12**可能为抗菌或抗肿瘤药物开发提供先导化合物。以上研究结果不仅丰富了*Rhytidhysteron*属真菌化学成分多样性，也为进一步开发美丽薄子木内生真菌的次生代谢产物提供一定的研究基础。

参考文献

[1] Zhao J，Shan T，Mou Y，et al. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi [J]. Mini Rev Med Chem，2011，11（2）：159-168.

[2] Tiwari P，Bae H. Endophytic fungi：key insights，emerging prospects，and challenges in natural product drug discovery [J]. Microorganisms，2022，10（2）：360.

[3] Chen G，Wang HF，Pei YH. Secondary metabolites from marine-derived microorganisms [J]. J Asian Nat Prod Res，2014，16（1）：105-122.

[4] Costa MS，Araujo NJS，de Freitas TS，et al. GC-FID analysis and antibacterial activity of the calyptranthes concinna essential oil against MDR bacterial strains [J]. Separations，2020，7（1）：10.

[5] Silva AD，Uetanabaro APT，Lucchese AM. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Myrcia alagoensis*（Myrtaceae）[J]. Nat Prod Commun，2013，8（2）：269-271.

[6] Lee YS，Kim J，Shin SC，et al. Antifungal activity of

Myrtaceae essential oils and their components against three phytopathogenic fungi [J]. Flavour Frag J，2008，23（1）：23-28.

[7] Wu Y，Liu JW，Liu C，et al. Antibacterial triketone-phloroglucinol-triketone adducts from *Myrtus communis* [J]. Chem Biodivers，2020，17（11）：e2000708.

[8] Liu R，Liu XY，Li M，et al. Eurobusones A-D，four antibacterial formyl phloroglucinol meoterpenoids from *Eucalyptus robusta* [J]. Fitoterapia，2022，157：105131.

[9] Chokpaiboon S，Choodej S，Boonyuen N，et al. Highly oxygenated chromones from mangrove-derived endophytic fungus *Rhytidhysteron rufulum* [J]. Phytochemistry，2016，122：172-177.

[10] Pudhom K，Teerawatananond T，Chookpaiboon S. Spirobisnaphthalenes from the mangrove-derived fungus *Rhytidhysteron* sp. AS21B [J]. Mar Drugs，2014，12（3）：1271-1280.

[11] Pudhom K，Teerawatananond T. Rhytidenones A-F，spirobisnaphthalenes from *Rhytidhysteron* sp. AS21B，an endophytic fungus [J]. J Nat Prod，2014，77（8）：1962-1966.

[12] Siridechakorn I，Yue ZW，Mittraphab Y，et al. Identification of spirobisnaphthalene derivatives with anti-tumor activities from the endophytic fungus *Rhytidhysteron rufulum* AS21B [J]. Bioorgan Med Chem，2017，25（11）：2878-2882.

[13] Aly AH，Edrada-Ebel R，Indriani ID，et al. Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense* [J]. J Nat Prod，2008，71（6）：972-980.

[14] Tian YQ，Lin XP，Zhou XF，et al. Phenol derivatives from the sponge-derived fungus *Didymellaceae* sp. SCSIO F46 [J]. Front Chem，2018，（6）：536.

[15] Klaiklay S，Rukachaisirikul V，Aungphao W，et al. Depsidone and phthalide derivatives from the soil-derived fungus *Aspergillus unguis* PSU-RSPG199 [J]. Tetrahedron Lett，2016，57（39）：4348-4351.

[16] 余振喜，王钢力，边巴次仁 . 萝卜秦艽化学成分的研究Ⅰ [J]. 中国中药杂志，2005，31（8）：656-658.

[17] Alvarenga MAD，Fo RB，Gottlieb OR，et al. Dihydroisocoumarins and phthalide from wood samples infested by fungi [J]. Phytochemistry，1978，17（3）：511-516.

[18] Martin JA，Vogel E. The synthesis of zinniol [J]. Tetrahedron，1980，36（6）：791-794.

[19] 徐文峰，陈刚，李占强，等 . 掌叶大黄化学成分的分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报，2013，30（11）：837-839.

[20] Khamthong N，Rukachaisirikul V，Tadpetch K，et al. Tetrahydroanthraquinone and xanthone derivatives from the marine-derived fungus *Trichoderma aureoviride* PSU-F95 [J]. Arch Pharm Res，2012，35（3）：461-468.

[21] Kimura Y，Mizuno T，Nakajima H，et al. Altechromones A and B，new plant growth regulators produced by the fungus，*Alternaria* sp. [J]. Biosci Biotech Biochem，1992，56（10）：1664-1665.

[22] Liao HX，Zheng CJ，Huang GL，et al. Bioactive polyketide derivatives from the mangrove-derived fungus *Daldinia eschscholtzii* HJ004 [J]. J Nat Prod，2019，82（8）：2211-2219.

[23] Rajachan OA，Kanokmedhakul S，Kanokmedhakul K，et al. Bioactive depsidones from the fungus *Pilobolus heterosporus* [J]. Planta Med，2014，80（17）：1635-1640.

[24] Sureram S，Kesornpun C，Mahidol C，et al. Directed biosynthesis through biohalogenation of secondary metabolites of the marine-derived fungus *Aspergillus unguis* [J]. RSC Advances，2013，（3）：1781-1788.

[25] 冯玲，沈月毛 . 滑桃树茎皮的化学成分 [J]. 天然产物研究与开发，2005，17（3）：294-297.

[26] Zhou HF，Jian RJ，Kang J，et al. Anti-inflammatory effects of caper（*Capparis spinosa* L.）fruit aqueous extract and theisolation of main phytochemicals [J]. J Agr Food Chem，2010，58（24）：12717-12721.

[27] Fujimoto H，Nakamura E，Okuyama E，et al. Six immunosuppressive features from an Ascomycete，*Zopfiella longicaudata*，found in a screening study monitored by immunomodulatory activity [J]. Chem Pharm Bull，2004，52（8）：1005-1008.

（收稿日期：2022-07-10；修回日期：2022-08-15）

植物根际土壤真菌 *Trichoderma velutinum* 的化学成分研究

旷敏[1, 2]，彭伟伟[1, 2]，许立[1, 2]，郑雨婷[1, 2]，桑子焕[1, 2]，秦思雨[1, 2]，邹振兴[1, 2*]（1. 中南大学湘雅药学院，长沙　410013；2. 慢病诊疗小分子药物发现与转化湖南省重点实验室，长沙　410013）

摘要：目的　对根际土壤真菌毛绒木霉 *Trichoderma velutinum* 次级代谢产物进行研究。**方法**　利用大孔树脂、正相硅胶、ODS、Sephadex LH-20 和 Pre-HPLC 等现代色谱技术对菌株毛绒木霉的固体发酵物乙酸乙酯提取部位化学成分进行分离纯化；利用 NMR、HR-ESI-MS 等波谱学技术对化合物的结构进行表征。**结果**　从 *Trichoderma velutinum* 中共分离鉴定了 13 个化合物：chaetoglobosin E（**1**）、chaetoglobosin Fex（**2**）、armochaetoglobin S（**3**）、7-*O*-acetylarmochaetoglobin S（**4**）、cyclo-（*L*-Trp-*D*-Ile）（**5**）、cyclo-（*L*-Trp-*L*-Leu）（**6**）、cyclo-（*L*-Trp-*L*-Phe）（**7**）、cyclo-（*L*-Trp-*L*-Trp）（**8**）、cyclo-（*L*-Ile-*L*-Phe）（**9**）、cyclo-（*L*-Leu-*L*-Phe）（**10**）、2'-*O*-methyladenosine（**11**）、*β*-adenosine（**12**）、*N*-acetyltryptamine（**13**）。**结论**　化合物 **1** ～ **10** 为首次从木霉属真菌中分离得到。

关键词：根际土壤真菌；毛绒木霉；化学成分；细胞松弛素；二酮哌嗪
中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-1975-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.003

Chemical constituents of plant rhizosphere soil fungus *Trichoderma velutinum*

KUANG Min[1, 2], PENG Wei-wei[1, 2], XU Li[1, 2], ZHENG Yu-ting[1, 2], SANG Zi-huan[1, 2], QIN Si-yu[1, 2], ZOU Zhen-xing[1, 2*] (1. *Xiangya School of Pharmaceutical Sciences*, *Central South University*, *Changsha* 410013; 2. *Hunan Key Laboratory of Diagnostic and Therapeutic Drugs for Chronic Diseases*, *Central South University*, *Changsha* 410013)

Abstract: Objective To determine the secondary metabolites of the rhizosphere soil fungus *Trichoderma velutinum*. **Methods** The chemical constituents of ethyl acetate extraction of the solid fermentation product of *Trichoderma velutinum* were separated and purified by modern chromatographic techniques such as macroporous resin, silica gel, ODS, Sephadex LH-20 and Pre-HPLC. The structures of the compounds were characterized by spectroscopic techniques such as NMR and HR-ESI-MS. **Results** Totally 13 compounds were isolated and identified as chaetoglobosin E (**1**), chaetoglobosin Fex (**2**), armochaetoglobin S (**3**), 7-*O*-acetylarmochaetoglobin S (**4**), cyclo-(*L*-Trp-*D*-Ile) (**5**), cyclo-(*L*-Trp-*L*-Leu) (**6**), cyclo-(*L*-Trp-*L*-Phe) (**7**), cyclo-(*L*-Trp-*L*-Trp) (**8**), cyclo-(*L*-Ile-*L*-Phe) (**9**), cyclo-(*L*-Leu-*L*-Phe) (**10**), 2'-*O*-methyladenosine (**11**), *β*-adenosine (**12**), and *N*-acetyltryptamine (**13**). **Conclusion** Compounds **1** ～ **10** have been isolated from *Trichoderma* for the first time.

Key words: rhizosphere soil fungus; *Trichoderma velutinum*; chemical constituent; cytochalasin; diketopiperazine

基金项目：湖南省自然科学基金项目（No. 2021JJ30917）；湖南省高新技术产业科技创新引领计划（No. 2020GK4083）；河南省“揭榜挂帅”科技项目（No. 211110110300）；海南省重点研发项目（No. ZDYF2022SHFZ048）；湖南省科教联合基金项目（No. 2019JJ70043）。
作者简介：旷敏，女，硕士研究生，主要从事天然药物化学研究，email：207211027@csu.edu.cn　*__通信作者：__邹振兴，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事天然药物化学研究，email：zouzhenxing@csu.edu.cn

微生物代谢是发现天然活性产物的一大重要途径，目前为止，从微生物天然产物中分离出的具有生物活性的化合物有 1 万多种 [1-2]。其中，植物根际土壤真菌因其强大的次生代谢能力、潜在的物种多样性及便于发酵和遗传等优势，逐渐成为继植物内生真菌之后研究者们关注的焦点。植物根际土壤真菌是指生存于植物根系活动区域的真菌，它们同植物根系紧密联系，又广泛参与土壤生态中营养物质的循环，其代谢途径独特，能够产生结构新颖、生物活性显著的次生代谢产物 [3]。据统计，植物根际土壤真菌目前研究偏重于农业应用，其化学成分研究存在较大的探索空间 [4-5]。

木霉属真菌是普遍存在于土壤中的一种常见植物根际微生物。在自然界中，木霉属真菌多通过化学途径帮助植物抵抗虫害，具有强大的代谢能力。目前，木霉属真菌已被发现数百种次生代谢产物，主要包括萜类、环肽类、二酮哌嗪类、生物碱类及聚酮类化合物，且大多具有较好的抗肿瘤、抗菌等药理活性 [6-7]。现有研究表明，木霉属真菌能产生众多结构独特的活性分子，具有极大的挖掘价值。本研究前期从药用植物根际土壤样本中分离筛选出一株木霉属真菌 *Trichoderma velutinum*，化学丰度筛选显示其代谢产物丰富，且经文献调研发现 *Trichoderma velutinum* 的次级代谢产物成分研究稀少，因此，有必要对其化学成分进行深入探索。将其进行大规模固体发酵并用乙酸乙酯冷浸提取发酵产物，利用各色谱层析手段进一步分离纯化获得 13 个化合物，其中包括 4 个细胞松弛素、6 个二酮哌嗪、1 个 *N*-acetyltryptamine 和 2 个腺苷类化合物。化学结构如图 1 所示。

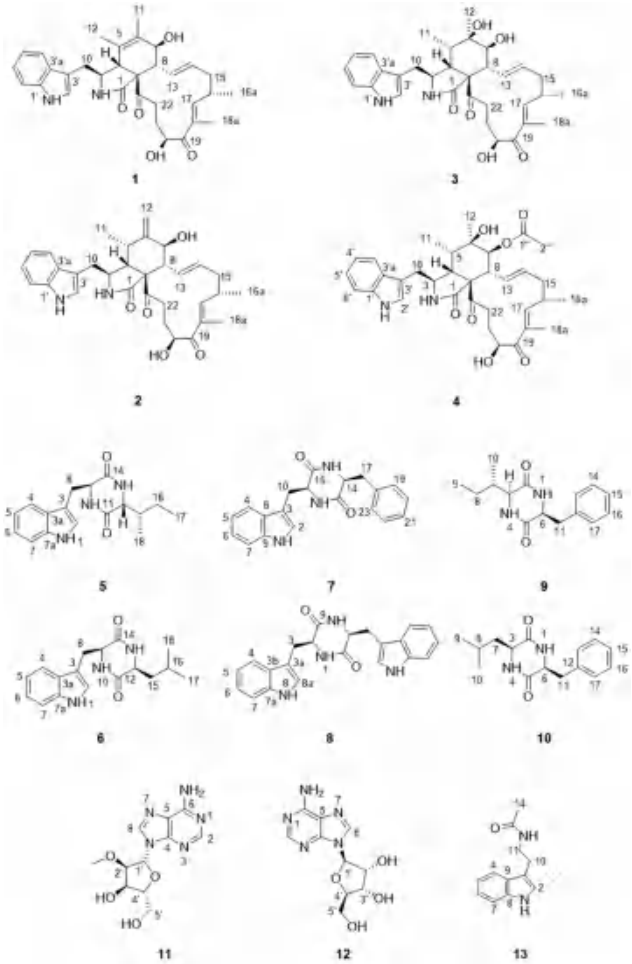

图 1　化合物 **1** ～ **13** 的结构

Fig 1　Structures of compounds **1** ～ **13**

1　材料

Agilent 1290 型高效液相色谱 -Agilent 6500 series Q-TOF 质谱联用仪（美国安捷伦公司）；Bruker AV-400/AV-500/AV-600 型核磁共振仪（德国 Bruker 公司）；Autopol IV-T 全自动旋光仪（美国鲁道夫公司）；X-6 熔点测定仪（北京泰克仪器有限公司），安捷伦 1100 半制备型液相色谱仪（美国安捷伦科技有限公司）；高压灭菌锅（上海博迅实业有限公司医疗设备厂）；ODS 反相 C_{18} 填料（日本 YMC 公司）；Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶（美国 GE 公司）；柱色谱硅胶（80 ～ 100 目、200 ～ 300 目、300 ～ 400 目，青岛海洋化工有限公司）；大孔树脂（HPD-100 型大孔吸附树脂，沧州宝恩吸附材料科技有限公司）；Innoval ODS-2 半制备色谱柱（10 μm，10 mm×250 mm）；旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂）；二甲基亚砜（DMSO）、无水乙醇、甲醇、乙酸乙酯、石油醚、二氯甲烷试剂均为市售分析纯，乙腈为色谱纯。万古霉素（批号：V871983，规格：250 mg）、硫酸阿米卡星（批号：A837351，规格：1 g）(上海麦克林生化科技有限公司)。

本实验的真菌于 2019 年 7 月从湖南省江华县大玗镇长山村海拔 520 m 的深绿卷柏根际土壤中分离得到，通过 ITS 序列比对鉴定为 *Trichoderma velutinum*，目前该菌株保存于中南大学湘雅药学院天然药物化学实验室。抗菌活性测试菌株来自于中南大学湘雅二医院，分别为大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853、金黄色葡萄球菌 ATCC29213、粪肠球菌 ATCC29212。

2　方法与结果

2.1　菌株发酵

将菌株从－ 80 ℃冰箱的 30% 甘油水溶液中接种到 PDA 培养基上复苏，再接种到 4 L 灭菌液

体培养基中，于 28 ℃恒温摇床中以 150 r • min^{-1} 震荡培养 7 d，将此种子液倒入 40 L 灭菌大米固体培养基中于室温下培养 28 d。

2.2 发酵产物的分离纯化

采用乙酸乙酯将固体培养基浸泡提取 3 次，减压浓缩得到浸膏 78 g。首先通过大孔树脂层析将粗提物划分为 20% 乙醇、80% 乙醇、100% 乙醇 3 个部位。选取 80% 馏分（30 g）通过硅胶柱层析（以石油醚 - 二氯甲烷 - 甲醇三相体系梯度洗脱）划分为 5 个组分（Fr.1 ～ Fr.5）。Fr.2 经过 ODS 柱层析（以水 - 甲醇体系梯度洗脱），得到 Fr.2.1 ～ Fr.2.8，Fr.2.3 和 Fr.2.4 经过 Sephadex LH-20 柱色谱（以甲醇等度洗脱）得到化合物 **1**（20.1 mg）、**2**（4.0 mg）、**3**（3.2 mg）和 **4**（3.1 mg）。Fr.3 经过 ODS 柱层析（以水 - 甲醇体系梯度洗脱），得到 Fr.3.1 ～ Fr.3.5。Fr.3.2 再通过小体积硅胶柱梯度洗脱得到 Fr.3.2.2，再利用半制备型高效液相色谱（以纯水 - 乙腈为流动相）得到化合物 **5**（2.1 mg）和 **6**（3.0 mg）。Fr.3.3 经过 Sephadex LH-20 柱色谱 [以二氯甲烷 - 甲醇（1∶9）等度洗脱] 得到 Fr.3.3.2，经过半制备型高效液相色谱（以纯水 - 乙腈为流动相）得到化合物 **7**（2.2 mg）、**8**（2.0 mg）和 **13**（5.7 mg）。Fr.3.4 经过 Sephadex LH-20 柱色谱（以甲醇等度洗脱）得到 Fr.3.4.3 和 Fr.3.4.4，通过重结晶得到化合物 **9**（1.4 mg）和 **10**（1.5 mg）。Fr.4 经过反相硅胶柱层析，得到两个白色沉淀为化合物 **11**（6.5 mg）和 **12**（2.4 mg）。

2.3 结构鉴定

化合物 **1**：白色粉末，易溶于 DMSO，＋ 150°（*c* 0.10，MeOH），HR-ESI-MS 显示：*m/z* 531.2857 [M ＋ H]$^+$，结合 ^{1}H-NMR 和 ^{13}C-NMR 谱推测该化合物的分子式为 $C_{32}H_{38}N_2O_5$；^{1}H-NMR（600 MHz，DMSO-d_6）δ_H：8.10（1H，s，NH-2），3.32（1H，m，H-3），2.79（1H，s，H-4），3.64（1H，m，H-7），4.50（1H，d，*J* ＝ 11.4 Hz，OH-7），1.97（1H，m，H-8），2.34（1H，m，H-10*α*），2.70（1H，m，H-10*β*），1.51（3H，s，H-11），1.10（3H，s，H-12），6.22（1H，dd，*J*＝19.8，13.2 Hz，H-13），5.06（1H，m，H-14），2.36（1H，m，H-15*α*），1.97（1H，m，H-15*β*），2.70（1H，m，H-16），1.01（3H，d，*J*＝9.6 Hz，C-16a），6.27（1H，d，*J* ＝ 14.4 Hz，H-17），1.71（3H，s，C-18a），4.76（1H，m，H-20），4.89（1H，d，*J* ＝ 9.6 Hz，OH-20），1.76（2H，m，H-21），2.70（1H，m，H-22*α*），2.93（1H，m，H-22*β*），10.92（1H，s，NH-1'），7.05（1H，s，H-2'），7.40（1H，d，*J* ＝ 12.0 Hz，H-4'），6.98（1H，t，*J* ＝ 11.4，10.8 Hz，H-5'），7.06（1H，t，*J* ＝ 10.2，8.4 Hz，H-6'），7.34（1H，d，*J* ＝ 12.6 Hz，H-7'）；^{13}C-NMR（150 MHz，DMSO-d_6）δ_C：173.9（C-1），57.1（C-3），49.3（C-4），125.5（C-5），133.5（C-6），67.7（C-7），50.9（C-8），61.6（C-9），31.9（C-10），14.7（C-11），16.2（C-12），128.5（C-13），133.4（C-14），40.7（C-15），32.9（C-16），19.8（C-16a），148.3（C-17），135.1（C-18），12.0（CH_3-18a），204.1（C-19），70.1（C-20），30.5（C-21），36.5（C-22），210.3（C-23），136.2（C-1'），123.6（C-2'），109.9（C-3'），117.9（C-4'），118.5（C-5'），121.1（C-6'），111.6（C-7'），127.1（C-3'a）。以上核磁及旋光数据与文献报道 [8] 基本一致，故鉴定化合物 **1** 为 chaetoglobosin E。

化合物 **2**：白色粉末，易溶于甲醇，＋ 60°（*c* 0.10，MeOH），HR-ESI-MS 显示：*m/z* 531.2864 [M ＋ H]$^+$，结合 ^{1}H-NMR 和 ^{13}C-NMR 谱推测该化合物的分子式为 $C_{32}H_{38}N_2O_5$；^{1}H-NMR（600 MHz，CD_3OD）δ_H：3.45（1H，m，H-3），2.58（1H，m，H-4），2.54（1H，m，H-5），3.79（1H，d，*J* ＝ 10.8 Hz，H-7），1.85（1H，m，H-8），2.56（1H，m，H-10*α*），2.83（1H，m，H-10*β*），1.02（3H，d，*J*＝6.6 Hz，H-11），5.06（1H，s，H-12*α*），5.24（1H，s，H-12*β*），6.05（1H，dd，*J*＝17.4，9.6 Hz，H-13），5.18（1H，m，H-14），2.41（1H，m，H-15*α*），1.98（H，m，H-15*β*），2.84（1H，m，H-16），0.91（3H，d，*J* ＝ 4.8 Hz，H-16a），6.15（1H，d，*J* ＝ 9.6 Hz，H-17），1.78（3H，s，H-18a），4.63（1H，m，H-20），1.41（1H，m，H-21*α*），1.58（1H，m，H-21*β*），2.76（2H，m，H-22），6.99（1H，s，H-2'），7.48（1H，d，*J* ＝ 7.8 Hz，H-4'），7.02（1H，t，*J* ＝ 6.6 Hz，H-5'），7.08（1H，t，*J* ＝ 6.6 Hz，H-6'），7.33（1H，d，*J* ＝ 7.8 Hz，H-7'）；^{13}C-NMR（150 MHz，CD_3OD）δ_C：176.8（C-1），54.2（C-3），48.2（C-4），34.7（C-5），150.2（C-6），71.9（C-7），50.5（C-8），64.3（C-9），32.8（C-10），13.9（C-11），114.4（C-12），129.3（C-13），136.8（C-14），42.2（C-15），33.3（C-16），12.5（C-16a），151.2（C-17），135.8（C-18），20.3（C-18a），205.8（C-19），72.3（C-20），31.6（C-21），38.2（C-22），210.6（C-23），138.0

（C-1'），125.6（C-2'），110.4（C-3'），119.4（C-4'），120.3（C-5'），122.6（C-6'），112.7（C-7'），129.3（C-3'a）。以上核磁及旋光数据与文献报道[9]基本一致，故鉴定化合物 **2** 为 chaetoglobosin Fex。

化合物 **3**：白色粉末，易溶于甲醇，－15.0°（*c* 0.53，MeOH），HR-ESI-MS 显示：*m/z* 549.2967 [M＋H]$^+$，结合 ^{1}H-NMR 和 ^{13}C-NMR 谱推测该化合物的分子式为 $C_{32}H_{40}N_2O_6$；^{1}H-NMR（600 MHz，CD_3OD）δ_H：3.81（1H，dd，*J*＝9.0，4.8 Hz，H-3），2.50（1H，m，H-4），2.03（1H，m，H-5），3.16（1H，d，*J* ＝ 12.0 Hz，H-7），2.63（1H，dd，*J* ＝ 12.0，10.2 Hz，H-8），2.80（1H，dd，*J*＝14.4，4.8 Hz，H-10*α*），2.97（1H，dd，*J* ＝ 14.4，4.8 Hz，H-10*β*），1.03（3H，d，*J* ＝ 7.2 Hz，H-11），1.22（3H，s，H-12），5.95（1H，dd，*J* ＝ 16.2，10.2 Hz，H-13），5.12（1H，dt，*J* ＝ 15.6，10.8，2.4 Hz，H-14），2.41（1H，m，H-15*α*），1.99（1H，m，H-15*β*），2.75（1H，m，H-16），1.02（3H，d，*J* ＝ 7.2 Hz，H-16a），6.19（1H，d，*J*＝9.6 Hz，H-17），1.77（3H，s，H-18a），4.66（1H，dd，*J* ＝ 6.6 Hz，4.8 Hz，H-20），1.89（1H，s，OH-20），1.36（1H，m，H-21*α*），1.60（1H，m，H-21*β*），1.83（1H，m，H-22*α*），2.50（1H，m，H-22*β*），7.03（1H，s，H-2'），7.50（1H，d，*J*＝7.8 Hz，H-4'），7.03（1H，t，*J*＝7.2 Hz，H-5'），7.08（1H，t，*J*＝7.8 Hz，H-6'），7.33（1H，d，*J* ＝ 7.2 Hz，H-7'）；^{13}C-NMR（150 MHz，CD_3OD）δ_C：176.9（C-1），54.5（C-3），45.9（C-4），40.2（C-5），74.2（C-6），73.7（C-7），47.4（C-8），65.8（C-9），33.5（C-10），13.6（C-11），24.9（C-12），129.4（C-13），135.1（C-14），42.1（C-15），34.7（C-16），20.3（C-16a），150.1（C-17），136.5（C-18），12.5（C-18a），205.8（C-19），72.6（C-20），31.9（C-21），38.7（C-22），210.1（C-23），138.1（C-1'），125.8（C-2'），110.0（C-3'），119.4（C-4'），120.3（C-5'），122.7（C-6'），112.7（C-7'），129.6（C-3'a）。以上核磁及旋光数据与文献报道[10]基本一致，故鉴定化合物 **3** 为 armochaetoglobin S。

化合物 **4**：白色粉末，易溶于甲醇，＋14.5°（*c* 0.34，MeOH），HR-ESI-MS 显示：*m/z* 591.3073 [M＋H]$^+$，结合 ^{1}H-NMR 和 ^{13}C-NMR 谱推测该化合物的分子式为 $C_{34}H_{42}N_2O_7$；^{1}H-NMR（600 MHz，CD_3OD）δ_H：3.78（1H，m，H-3），2.76（1H，m，H-4），1.98（1H，m，H-5），4.74（1H，d，*J* ＝ 12.0 Hz，H-7），2.91（1H，m，H-8），2.83（1H，dd，*J* ＝ 14.4，5.4 Hz，H-10*α*），2.86（1H，dd，*J* ＝ 14.4，4.8 Hz，H-10*β*），1.03（3H，d，*J* ＝ 7.8 Hz，H-11），1.15（3H，s，H-12），5.98（1H，m，H-13），5.16（1H，dt，*J* ＝ 15.6，10.8，3.0 Hz，H-14），2.34（1H，m，H-15*α*），1.97（1H，m，H-15*β*），2.76（1H，m，H-16），1.02（3H，d，*J* ＝ 7.2 Hz，H-16a），6.21（1H，d，*J* ＝ 9.0 Hz，H-17），1.77（3H，s，H-18a），4.71（1H，t，*J*＝5.4 Hz，H-20），1.46（1H，m，H-21*α*），1.68（1H，m，H-21*β*），2.64（1H，m，H-22*α*），2.92（1H，m，H-22*β*），7.06（1H，s，H-2'），7.51（1H，d，*J*＝7.8 Hz，H-4'），7.02（1H，t，*J*＝7.2 Hz，H-5'），7.09（1H，t，*J*＝7.2 Hz，H-6'），7.33（1H，d，*J*＝7.8 Hz，H-7'），1.98（3H，s，H-2''）；^{13}C-NMR（150 MHz，CD_3OD）δ_C：176.4（C-1），55.3（C-3），44.9（C-4），41.9（C-5），73.9（C-6），75.0（C-7），46.2（C-8），65.2（C-9），33.0（C-10），13.4（C-11），24.9（C-12），128.6（C-13），135.5（C-14），41.9（C-15），34.6（C-16），20.2（C-16a），150.0（C-17），136.4（C-18），12.4（C-18a），205.6（C-19），72.7（C-20），32.3（C-21），38.9（C-22），210.3（C-23），138.1（C-1'），125.5（C-2'），110.5（C-3'），119.4（C-4'），120.2（C-5'），122.3（C-6'），112.6（C-7'），129.2（C-3'a），172.5（C-1''），21.0（C-2''）。以上核磁及旋光数据与文献报道[10]基本一致，故鉴定化合物 **4** 为 7-*O*-acetylarmochaetoglobin S。

化合物 **5**：白色粉末，易溶于甲醇，＋77.3°（*c* 0.50，EtOH），HR-ESI-MS 显示：*m/z* 300.1717 [M＋H]$^+$，结合 ^{1}H-NMR 和 ^{13}C-NMR 谱推测该化合物的分子式为 $C_{17}H_{21}N_3O_2$；^{1}H-NMR（600 MHz，CD_3OD）δ_H：7.07（1H，s，H-2），7.31（1H，d，*J* ＝ 10.2 Hz，H-4），6.99（1H，t，*J* ＝ 8.4 Hz，H-5），7.06（1H，t，*J* ＝ 8.4 Hz，H-6），7.61（1H，d，*J*＝9.6 Hz，H-7），3.21（1H，dd，*J*＝17.4，4.8 Hz，H-8*α*），3.42（1H，dd，*J* ＝ 18.0，6.0 Hz，H-8*β*），4.31（1H，dd，*J*＝5.4，1.8 Hz，H-9），3.63（1H，dd，*J* ＝ 5.4，2.4 Hz，H-12），1.22（1H，m，H-15），0.38（1H，m，H-16*α*），0.55（1H，m，H-16*β*），0.52（3H，t，*J* ＝ 7.8 Hz，H-17），0.60（3H，d，*J* ＝ 8.4 Hz，H-18）；^{13}C-NMR（150 MHz，CD_3OD）δ_C：125.9（C-2），109.9（C-3），129.6（C-3a），120.1（C-4），120.2（C-5），122.6（C-6），138.2（C-7），112.6（C-

7a），40.1（C-8），57.5（C-9），169.3（C-11），61.1（C-12），170.2（C-14），30.4（C-15），24.5（C-16），11.9（C-17），15.3（C-18）。以上核磁与旋光数据与文献报道[11]基本一致，故鉴定化合物 **5** 为 cyclo-（*L*-Trp-*D*-Ile）。

化合物 **6**：白色粉末，易溶于甲醇，－10.6°（*c* 0.14，MeOH），HR-ESI-MS 显示：*m/z* 300.1716 [M＋H]$^+$，结合 ^{1}H-NMR 和 ^{13}C-NMR 谱推测该化合物的分子式为 $C_{17}H_{21}N_3O_2$；^{1}H-NMR（600 MHz，CD_3OD）δ_H：7.06（1H，s，H-2），7.31（1H，d，*J* ＝ 7.8 Hz，H-4），6.99（1H，t，*J* ＝ 16.8 Hz，7.2Hz，H-5），7.07（1H，t，*J* ＝ 16.8，7.2 Hz，H-6），7.59（1H，d，*J*＝7.8 Hz，H-7），3.11（1H，dd，*J* ＝ 14.4，4.2 Hz，H-8*α*），3.48（1H，dd，*J* ＝ 14.4，3.6 Hz，H-8*β*），4.27（1H，dd，*J* ＝ 4.2，3.6 Hz，H-9），3.57（1H，dd，*J*＝10.2，4.8 Hz，H-12），0.17（1H，ddd，*J*＝13.8，10.2，4.8 Hz，H-15*α*），0.66（1H，ddd，*J*＝13.8，9.6，4.2 Hz，H-15*β*），1.14（1H，m，H-16），0.46（3H，d，*J* ＝ 6.6 Hz，H-17），0.60（3H，d，*J* ＝ 6.6 Hz，H-18）；^{13}C-NMR（150 MHz，CD_3OD）δ_C：126.0（C-2），109.6（C-3），129.4（C-3a），120.2（C-4），120.3（C-5），122.6（C-6），137.9（C-7），112.6（C-7a），45.2（C-8），54.3（C-9），170.0（C-11），57.6（C-12），170.7（C-14），24.7（C-15），30.8（C-16），21.4（C-17），23.4（C-18）。以上核磁与旋光数据与文献报道[12]基本一致，故鉴定化合物 **6** 为 cyclo-（*L*-Trp-*L*-Leu）。

化合物 **7**：白色针晶，易溶于 DMSO，－249.5°（*c* 1.00，MeOH），mp：281 ℃，HR-ESI-MS 显示：*m/z* 334.1560 [M ＋ H]$^+$，结合 ^{1}H-NMR 和 ^{13}C-NMR 谱推测该化合物的分子式为 $C_{20}H_{19}N_3O_2$；^{1}H-NMR（600 MHz，DMSO-d_6）δ_H：10.89（1H，s，H-1），6.96（1H，s，H-2），7.48（1H，d，*J* ＝ 8.4 Hz，H-4），6.98（1H，t，*J* ＝ 7.8 Hz，H-5），7.08（1H，t，*J* ＝ 7.2 Hz，H-6），7.32（1H，d，*J*＝8.4 Hz，H-7），2.52（1H，dd，*J* ＝ 14.4，5.4 Hz，H-10*α*），2.81（1H，dd，*J* ＝ 14.4，4.2 Hz，H-10*β*），3.98（1H，m，H-11），7.92（1H，s，H-12），3.89（1H，m，H-14），7.70（1H，s，H-15），2.45（1H，dd，*J* ＝ 13.2，4.8 Hz，H-17*α*），1.83（1H，dd，*J* ＝ 13.2，7.2 Hz，H-17*β*），7.16（1H，m，H-19），6.70（1H，m，H-20），7.17（1H，m，H-21），6.70（1H，m，H-22），7.16（1H，m，H-23）；^{13}C-NMR（150 MHz，DMSO-d_6）δ_C：120.9（C-2），108.8（C-3），118.5（C-4），118.8（C-5），124.5（C-6），111.4（C-7），127.6（C-8），136.1（C-9），29.7（C-10），55.3（C-11），166.3（C-13），55.7（C-14），170.0（C-15），166.9（C-16），39.9（C-17），136.5（C-18），128.1（C-19），129.8（C-20），126.5（C-21），129.8（C-22），128.1（C-23）。以上核磁与旋光数据与文献报道[13]基本一致，故鉴定化合物 **7** 为 cyclo-（*L*-Trp-*L*-Phe）。

化合物 **8**：白色簇晶，易溶于甲醇，－108°（*c* 0.30，MeOH），mp：242 ℃，HR-ESI-MS 显示：*m/z* 373.1669 [M ＋ H]$^+$，结合 ^{1}H-NMR 和 ^{13}C-NMR 谱推测该化合物的分子式为 $C_{22}H_{20}N_4O_2$；^{1}H-NMR（600 MHz，CD_3OD）δ_H：4.06（1H，dd，*J* ＝ 7.2，4.2 Hz，H-2），2.18（1H，dd，*J*＝14.4，7.2 Hz，H-3*α*），2.92（1H，dd，*J* ＝ 14.4，4.2 Hz，H-3*β*），7.44（1H，d，*J* ＝ 7.8 Hz，H-4），7.02（1H，t，*J* ＝ 7.2 Hz，H-5），7.10（1H，t，*J* ＝ 7.2 Hz，H-6），7.31（1H，d，*J*＝8.4 Hz，H-7），6.48（1H，s，H-8a）；^{13}C-NMR（150 MHz，CD_3OD）δ_C：57.0（C-2），31.5（C-3），109.5（C-3a），128.7（C-3b），119.8（C-4），120.2（C-5），122.7（C-6），112.6（C-7），138.2（C-7a），126.1（C-8a），169.9（C-9）。以上核磁与旋光数据与文献报道[14]基本一致，故鉴定化合物 **8** 为 cyclo-（*L*-Trp-*L*-Trp）。

化合物 **9**：白色针晶，易溶于 DMSO，HR-ESI-MS 显示：*m/z* 261.1611 [M ＋ H]$^+$，结合 ^{1}H-NMR 和 ^{13}C-NMR 谱推测该化合物的分子式为 $C_{15}H_{20}N_2O_2$；^{1}H-NMR（600 MHz，DMSO-d_6）δ_H：8.10（1H，s，NH-1），3.57（1H，m，H-3），7.88（1H，s，NH-4），4.20（1H，m，H-6），1.39（1H，m，H-7），0.59（1H，m，H-8*α*），0.56（1H，m，H-8*β*），0.56（3H，m，H-9），0.54（3H，d，*J* ＝ 7.2 Hz，H-10），2.84（1H，dd，*J* ＝ 13.8，5.4 Hz，H-11*α*），3.16（1H，dd，*J* ＝ 13.8，4.2 Hz，H-11*β*），7.17 ～ 7.23（1H，m，H-13），7.17～7.23（1H，m，H-14），7.17～7.23（1H，m，H-15），7.17 ～ 7.23（1H，m，H-16），7.17 ～ 7.23（1H，m，H-17）；^{13}C-NMR（150 MHz，DMSO-d_6）δ_C：166.4（C-2），58.7（C-3），166.3（C-5），55.0（C-6），37.8（C-7），23.1（C-8），11.8（C-9），14.4（C-10），37.6（C-11），136.3（C-12），130.4（C-13），127.9（C-14），126.5（C-15），127.9（C-16），130.4（C-17）。以

上核磁数据与文献报道[15]基本一致，故鉴定化合物 **9** 为 cyclo-（*L*-Ile-*L*-Phe）。

化合物 **10**：白色针晶，易溶于 DMSO，－29.8°（*c* 0.10，MeOH），mp：284 ℃，HR-ESI-MS 显示：*m/z* 261.1605 [M ＋ H]$^+$，结合 ^{1}H-NMR 和 ^{13}C-NMR 谱推测该化合物的分子式为 $C_{15}H_{20}N_2O_2$；^{1}H-NMR（600 MHz，DMSO-d_6）δ_H：8.11（1H，s，NH-1），3.46（1H，m，H-3），8.08（1H，s，NH-4），4.17（1H，m，H-6），0.09（1H，m，H-7α），0.73（1H，m，H-7β），1.40（1H，m，H-8），0.62（3H，d，J ＝ 6.6 Hz，H-9），0.59（3H，d，J ＝ 6.6 Hz，H-10），2.84（1H，dd，J ＝ 13.2，4.8 Hz，H-11α），3.13（1H，dd，J ＝ 13.2，3.6 Hz，H-11β），7.12 ～ 7.28（1H，m，H-13），7.12～7.28（1H，m，H-14），7.12～7.28（1H，m，H-15），7.12 ～ 7.28（1H，m，H-16），7.12 ～ 7.28（1H，m，H-17）；^{13}C-NMR（150 MHz，DMSO-d_6）δ_C：167.6（C-2），55.5（C-3），166.3（C-5），52.3（C-6），43.7（C-7），22.9（C-8），22.8（C-9），21.4（C-10），38.5（C-11），136.3（C-12），130.5（C-13），128.2（C-14），126.8（C-15），128.2（C-16），130.5（C-17）。以上核磁与旋光数据与文献报道[16]基本一致，故鉴定化合物 **10** 为 Cyclo-（*L*-Leu-*L*-Phe）。

化合物 **11**：白色粉末，易溶于 DMSO，HR-ESI-MS 显示：*m/z* 282.1209 [M ＋ H]$^+$，结合 ^{1}H-NMR 和 ^{13}C-NMR 谱推测该化合物的分子式为 $C_{11}H_{15}N_5O_4$；^{1}H-NMR（600 MHz，DMSO-d_6）δ_H：8.39（1H，s，H-2），8.14（1H，s，H-8），6.00（1H，d，J ＝ 5.4 Hz，H-1'），4.34（1H，m，H-2'），4.36（1H，m，H-3'），3.98（1H，m，H-4'），3.66（1H，dd，J ＝ 12，3.6 Hz，H-5'α），3.57（1H，dd，J ＝ 12，3.6 Hz，H-5'β），3.30（3H，s，O-CH_3），7.35（1H，s，NH_2-6）；^{13}C-NMR（150 MHz，DMSO-d_6）δ_C：139.7（C-2），149.0（C-4），119.3（C-5），156.2（C-6），152.6（C-8），82.5（C-1'），85.8（C-2'），68.8（C-3'），86.5（C-4'），61.5（C-5'），57.5（O-CH_3）。以上核磁数据与文献报道[17]基本一致，故鉴定化合物 **11** 为 2'-*O*-methyladenosine。

化合物 **12**：白色粉末，易溶于 DMSO，HR-ESI-MS 显示：*m/z* 268.1053 [M ＋ H]$^+$，结合 ^{1}H-NMR 和 ^{13}C-NMR 谱推测该化合物的分子式为 $C_{10}H_{13}N_5O_4$；^{1}H-NMR（600 MHz，DMSO-d_6）δ_H：8.16（1H，s，H-2），8.37（1H，s，H-8），5.90（1H，d，J ＝ 6.0 Hz，H-1'），4.63（1H，m，H-2'），4.17（1H，m，H-3'），3.99（1H，m，H-4'），3.58（1H，m，H-5'α），3.69（1H，m，H-5'β），7.38（2H，s，NH_2-6），5.25（1H，s，OH-5'），5.47（1H，s，OH-2'），5.50（1H，s，OH-3'）；^{13}C-NMR（150 MHz，DMSO-d_6）δ_C：152.5（C-2），149.1（C-4），119.5（C-5），156.2（C-6），139.6（C-8），88.0（C-1'），73.6（C-2'），70.8（C-3'），86.1（C-4'），61.8（C-5'）。以上核磁数据与文献报道[18]基本一致，故鉴定化合物 **12** 为 β-adenosine。

化合物 **13**：黄色油状物，易溶于甲醇，HR-ESI-MS 显示：*m/z* 203.1188 [M ＋ H]$^+$，结合 ^{1}H-NMR 和 ^{13}C-NMR 谱推测该化合物的分子式为 $C_{12}H_{14}N_2O$；^{1}H-NMR（600 MHz，CD_3OD）δ_H：6.91（1H，s，C-2），7.55（1H，d，J ＝ 7.8 Hz，C-4），7.08（1H，t，J ＝ 7.2 Hz，C-5），6.99（1H，t，J ＝ 7.2 Hz，C-6），7.31（1H，d，J ＝ 7.8 Hz，C-7），3.46（2H，t，J ＝ 7.2 Hz，C-10），2.93（2H，t，J ＝ 6.6 Hz，C-11），1.91（3H，s，C-14）；^{13}C-NMR（150 MHz，CD_3OD）δ_C：122.4（C-2），113.4（C-3），119.4（C-4），119.7（C-5），123.5（C-6），112.4（C-7），138.3（C-8），128.9（C-9），26.3（C-10），41.7（C-11），173.4（C-13），22.7（C-14）。以上核磁数据与文献报道[19]基本一致，故鉴定化合物 **13** 为 *N*-acetyltryptamine。

2.4　抗菌活性评价

采用 96 孔板倍比稀释法，分别制备金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）、粪肠球菌（*Enterococcus faecalis*）、铜绿假单孢菌（*Pseudomonas aeruginosa*）和大肠埃希菌（*Escherichia coli*）的悬浮液并稀释至 1×10^6 CFU • mL^{-1} 备用。将 13 个样品用生物级 DMSO 溶解制备成 1024 μg • mL^{-1} 的母液，取母液置 96 孔板第一孔并用肉汤稀释至 128 μg • mL^{-1}，倍比稀释后各孔质量浓度分别为 128、64、32、16、8、4、2、0 μg • mL^{-1}，再于每孔中加入菌液，使每孔最终质量浓度为 64、32、16、8、4、2、1、0 μg • mL^{-1}，置于 30 ℃ 恒温培养箱中培养 8 h 并观察细菌生长情况。以盐酸万古霉素和硫酸阿卡米星为阳性对照，以同等浓度 DMSO 作为阴性对照，目视观察法读取 *MIC* 值。结果表明化合物 **1** ～ **13** 在质量浓度 64 μg•mL^{-1} 下对 4 个测试菌株均未显示出抑制活性。

3　讨论

植物根际土壤真菌作为一类独特的微生物资源，参与植物体及周围生态的物质循环，植物

根际分泌物及根际土壤能够为其提供充足碳源和可利用元素，同时根际土壤真菌大多能通过化学途径为植物体提供生物防治作用，因此其具有强大的产活性代谢产物的潜力。再者，植物根际土壤真菌物种多样，能提供丰富的研究资源，具备极大的研究前景。本研究从植物根际土壤真菌 *Trichoderma velutinum* 的代谢产物中分离得到 13 个化合物，其中化合物 **1** ～ **10** 为首次从木霉属真菌中分离得到。虽然本研究中化合物 **1** ～ **13** 对所测 4 株致病菌均未表现出抑制作用，但经文献检索发现细胞松弛素类化合物 **1** ～ **3** 对人前列腺癌细胞和小鼠黑色素瘤细胞具有较好的增殖抑制活性 [20-22]；二酮哌嗪化合物 **9** ～ **10** 具有良好的抗炎活性 [23]。本研究丰富了木霉属真菌化学成分多样性，可为土壤真菌资源的开发利用提供参考。

参考文献

[1] Tiwari P，Srivastava Y，Bae H. Trends of pharmaceutical design of endophytes as anti-infective [J]. Curr Top Med Chem，2021，21（17）：1572-1586.

[2] Tan RX，Zou WX. Endophytes：a rich source of functional metabolites [J]. Nat Prod Rep，2001，18（4）：448-459.

[3] 苏贝贝，张英，道日娜 . 4 种豆科植物根际土壤真菌群落特征与土壤理化因子间相关性分析 [J]. 草地学报，2021，29（12）：2670-2677.

[4] 郑元仙，杨敏，王继明，等 . 烤烟根腐病对烟株根际土壤真菌群落结构的影响 [J]. 中国烟草科学，2021，42（2）：50-55.

[5] 张一，李晓明，尚卓，等 . 红树林植物木榄根际土壤真菌 *Penicillium* sp. MA-37 的化学成分研究 [J]. 海洋科学，2013，37（2）：7-11.

[6] Reino JL，Guerrero RF，Hernández-Galán R，et al. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma* [J]. Phytochem Rev，2008，7（1）：89-123.

[7] Zhang JL，Tang WL，Huang QR，et al. *Trichoderma*：a treasure house of structurally diverse secondary metabolites with medicinal importance [J]. Front Microbiol，2021，12：723828.

[8] Sekita S，Yoshihira K，Natori S，et al. Chaetoglobosins，cytotoxic 10-（indol-3-yl）-[13] cytochalasans from *Chaetomium* spp. Ⅲ. structures of chaetoglobosins C，E，F，G，and J [J]. Chem Pharm Bull，1982，30（5）：1629-1638.

[9] Li W，Yang X，Yang Y，et al. Anti-phytopathogen，multi-target acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities of metabolites from endophytic *Chaetomium globosum* [J]. Nat Prod Res，2016，30（22）：1-4.

[10] Chen C，Tong Q，Zhu H，et al. Nine new cytochalasan alkaloids from *Chaetomium globosum* TW1-1（Ascomycota，Sordariales）[J]. Sci Rep，2016，6：18711.

[11] Kimura Y，Sawada A，Kuramata M，et al. Brevicompanine C，cyclo-（*D*-Ile-*L*-Trp），and cyclo-（*D*-Leu-*L*-Trp），plant growth regulators from *Penicillium brevi-compactum* [J]. J Nat Prod，2005，68（2）：237-239.

[12] Hu XY，Li XM，Yang SQ，et al. Three new sesquiterpenoids from the algal-derived fungus *Penicillium chermesinum* EN-480 [J]. Mar Drugs，2020，18（4）：194.

[13] 郑彩娟，邵长伦，王开玲，等 . 一株软珊瑚共附生真菌 *Aspergillus versicolor*（ZJ-2008015）的次级代谢产物及其生物活性研究 [J]. 中国海洋药物，2012，31（2）：7.

[14] Shiono Y，Akiyama K，Hayashi H. New okaramine congeners，Okamines J，K，L，M and related compounds，from *Penicillium simplicissimum* ATCC 90288 [J]. J Agric Chem Soc Japan，1999，63（11）：1910-1920.

[15] Stark T，Hofmann T. Structures，sensory activity，and dose/response functions of 2，5-diketopiperazines in roasted cocoa nibs（Theobroma cacao）[J]. J Agric Food Chem，2005，53（18）：7222-7231.

[16] 陈修文，李长伟，华威，等 . 深海来源曲霉 16-02-1 的代谢产物及其抗肿瘤抗真菌活性初步测评 [J]. 中国海洋药物，2013，32（3）：1-10.

[17] Li H，Xiao J，Gao YQ，et al. Chaetoglobosins from *Chaetomium globosum*，an endophytic fungus in Ginkgo biloba，and their phytotoxic and cytotoxic activities [J]. J Agric Food Chem，2014，62（17）：3734-3741.

[18] Domondon DL，He W，De Kimpe N，et al. Beta-adenosine，a bioactive compound in grass chaff stimulating mushroom production. [J] Phytochemistry，2004，65（2）：181-187.

[19] Yong L，Xi FL，Dong SK，et al. Indolyl alkaloid derivatives，Nb-acetyltryptamine and oxaline from a marine-derived fungus [J]. Arch Pharm Res，2003，26（1）：21-23.

[20] Chen J，Zhang W，Guo Q，et al. Bioactivities and future perspectives of chaetoglobosins [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2020，2020：8574084.

[21] Zaghouani M，Gayraud O，Jactel V，et al. Multifaceted study on a cytochalasin scaffold：lessons on reactivity，multidentate catalysis，and anticancer properties [J]. Chemistry，2018，24（62）：16686-16691.

[22] Zhang Z，Min X，Huang J，et al. Cytoglobosins H and I，new antiproliferative cytochalasans from deep-sea-derived fungus *chaetomium globosum* [J]. Mar Drugs，2016，14（12）：233.

[23] Hwang JT，Jang HJ，Kim JH，et al. Lactococcus lactis KR-050L inhibit IL-6/STAT3 activation [J]. Appl Microbiol，2017，122（5）：1412-1422.

（收稿日期：2022-06-05；修回日期：2022-07-10）

cGAS-STING 信号通路在重大疾病中的研究进展专题

【编者按】

天然免疫系统是人体免疫系统的第一道防线，在防御病毒、细菌、寄生虫入侵，控制感染方面发挥重要作用。在过去的十多年研究中，人们逐渐认识到天然免疫系统与人类的重大疾病密切相关，而 cGAS-STING 信号通路在其中发挥着重要作用，但是该领域的研究才刚起步，cGAS-STING 信号通路在人体的重大疾病中的作用有待进一步被发现。本专栏综述该通路在神经系统、心血管、消化系统、肿瘤等方面的研究进展，旨在为国内从事相关基础和临床研究的医药工作者了解该领域的最新动态，提供新的科研思路。

【专题主持人】

章越凡，男，药理学博士，上海大学医学院副教授，中国卒中学会新药研发与评价分会委员，中国老年学和老年医学学会营养食品分会委员，中国药理学会会员，上海市药理学会心血管专业委员会委员，主要从事心脑血管相关疾病的创新药物研发及相关机制研究，先后发表研究论文 40 余篇，其中 SCI 论文 20 余篇，获得专利授权 10 余项，完成 973 课题、国家科技重大新药创制、国家自然科学基金、上海市基金等科研项目 10 余项，获得上海市药学会二等奖、上海市浦东新区科技进步奖三等奖等多项学术奖励。

cGAS-STING 信号通路在神经退行性疾病中的研究进展

张琳洁，于永生*（上海大学医学院，上海　200444）

摘要：cGAS-STING 信号通路是机体重要的宿主固有免疫反应相关通路。进入胞浆中的外源性 DNA 或自体胞浆 DNA 可以激活环磷酸鸟苷 - 磷酸腺苷酸合成酶（cGAS）和干扰素基因刺激因子（STING），启动下游级联反应，最后导致 I 型干扰素和炎症因子的大量表达。现有的研究显示，cGAS-STING 信号通路不仅参与抗病毒感染和肿瘤的免疫保护过程，在神经退行性疾病的发生中也发挥重要作用。本文就 cGAS-STING 信号通路在神经退行性疾病中的作用及其机制展开综述，旨在为这类疾病治疗提供新靶点。

关键词：环磷酸鸟苷 - 磷酸腺苷酸合成酶；干扰素基因刺激因子；神经退行性疾病
中图分类号：R741　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-1982-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.004

Research progress in cGAS-STING signaling pathway for neurodegenerative disorders

ZHANG Lin-jie, YU Yong-sheng* (*School of Medicine*, *Shanghai University*, *Shanghai* 200444)

Abstract: The cGAS-STING signaling is a key pathway intrinsic host immune responses. Exogenous DNA entering the cytoplasm or autologous cytoplasmic DNA may activate the cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) and stimulator of interferon gene (STING), initiating a downstream cascade reaction that leads to the massive expression of type I interferon and pro-inflammatory factors. Current studies

作者简介：张琳洁，女，硕士研究生，主要从事脂肪肝等代谢疾病研究，email：zhanglinjie0121@163.com　*通信作者：于永生，男，副研究员，硕士研究生导师，主要从事心血管疾病、脂肪肝等代谢疾病的机制研究，email：yuyongsheng@shu.edu.cn

showed the cGAS-STING signaling pathway was not only involved in immune protection against the viral infections and tumors but also played an important role in the development of neurodegenerative diseases. This review focused on the role of cGAS-STING signaling pathway in the neurodegenerative disorders, aiming to provide new targets for disease treatment.

Key words: cyclic adenosine-adenosine synthase; stimulator of interferon gene; neurodegenerative disorder

先天免疫系统是人体的第一道防线，先天免疫系统中的模式识别受体（pattern recognition receptors，PRRs）通过对微生物病原体特定的分子结构进行识别启动机体的防御系统[1]。环磷酸鸟苷 - 磷酸腺苷酸合成酶（cyclic adenosine-adenosine synthase，cGAS）作为一种胞内模式识别受体，通过激活干扰素基因刺激因子（stimulator of interferon gene，STING）通路，激发和影响先天免疫系统[2]。

目前已经证实，cGAS-STING 信号通路作为先天免疫传感器在许多病理和生理过程的作用日益扩大，包括防御微生物感染、抗肿瘤免疫、细胞衰老、自噬以及自身免疫等[3-4]。近年来的研究表明 cGAS-STING 信号通路在神经系统疾病，尤其是神经退行性疾病方面也起到了重要作用。本文就 cGAS-STING 信号通路在神经退行性疾病中的作用及其潜在治疗意义进行综述。

1　cGAS-STING 信号通路

cGAS 属于核苷酸转移酶家族成员，能够检测到胞质中的双链 DNA（double-stranded DNA，dsDNA），Sun 等[5]首次通过生化分离和质谱定量分析鉴定出 cGAS，也证明了 cGAS 是一种触发Ⅰ型干扰素（type Ⅰ interferon，IFN-Ⅰ）通路的胞质 DNA 传感器。Civril 等[6]测定了猪的 cGASMab21 晶体结构，证明 cGAS 是由一个非结构化 N 末端延伸和一个高度保守的 Mab21 核苷酸转移酶结构域组成的。同期另一项研究中，利用鼠源 cGAS-DNA 结构模型阐明了 cGAS 的催化机制，当胞质 DNA 出现时，就会引起 cGAS 构象改变，cGAS 的活性口袋从无活性的关闭构象转变为具有活性的开放构象，促使 cGAS-DNA 复合物形成，该复合物促进三磷酸鸟苷（guanosine triphosphate，GTP）和三磷酸腺苷（adenosine-triphosphate，ATP）转化为 2’3’- 环鸟苷酸 - 腺苷酸（2’3’-cyclic GMP-AMP，cGAMP）[7]。cGAS 的激活依赖于 DNA 结构[8]。当 DNA 为＞ 45 bp 的片段时，能够有效地促进人源 cGAS 活化，而鼠源 cGAS 可被短至 20 bp 的 DNA 激活[9]。

Ishikawa 等[10]在抗病毒免疫研究中发现并首次报道了 STING 对固有免疫反应至关重要。STING 是主要定位于内质网的跨膜接头蛋白，广泛表达于多种细胞类型。cGAS 被细胞质 DNA 激活后生成的 cGAMP 与 STING 相互作用，诱导 STING 转移到高尔基体发生下游级联反应。STING 蛋白的羧基末端能够激活蛋白激酶 IκB（protein kinase IκB，IKK）和 TANK 结合激酶 1（TANK binding kinase 1，TBK1），一方面激活核因子 κB（nuclear factor kappa-B，NF-κB），诱导白细胞介素 -6（interleukin-6，IL-6）和肿瘤坏死因子 -α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）的释放，另一方面还可启动干扰素转录因子调节因子 3（interferon transcription factor regulator 3，IRF3）转录通路，诱导 IFN 产生，并在表达后发挥有效的抗病毒作用[11]（见图 1）。

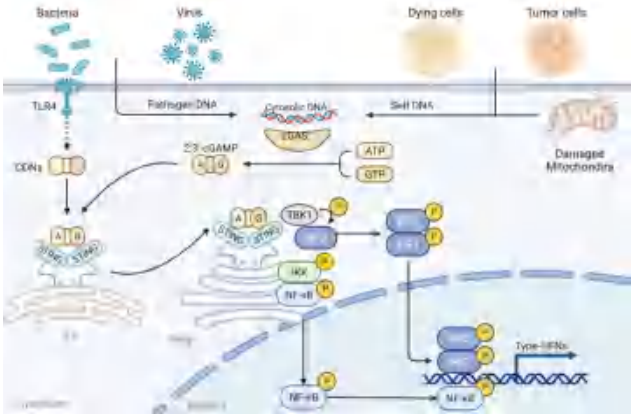

图 1　cGAS-STING 信号通路机制图

Fig 1　Mechanism of cGAS-STING signaling pathway

对 STING 的结构进行分析后发现，跨膜连接器环中的一些残基是产生 IFN-Ⅰ所必需的，这表明了跨膜结构域在 STING 的激活中能够起到一定的作用[12]。STING 在与 cGAMP 结合后会关闭其二聚体角，相对于跨膜结构域扭曲 180°，然后释放 C 端尾巴密码子（C-terminaltail，CTT），并形成稳定的聚合物。通过 X 射线晶体证明，CTT 可以直接与 IRF3 结合，参与 STING 的配体结合和磷酸化的过程，磷酸化后的 STING 能够募集 IRF3。

cGAS-STING 信号通路的激活因素包括外源性因素和内源性因素。cGAS 可以对来自病毒、细菌的外源 DNA 作出反应，启动先天免疫系统，起到防止感染的作用。例如，Ⅰ型单纯疱疹病毒（herpes simplex virus 1，HSV-1）能在野生型小鼠

肺成纤维细胞和小鼠骨髓来源的巨噬细胞（bone marrow derived macrophages，BMDMs）中诱导产生 IFN-β，在体内实验中，HSV-1 对 *STING*$^{-/-}$小鼠有致命的感染性 [13]，因此在实验中 HSV-1 经常作为激活剂用于激活 cGAS-STING 信号通路。某些含有 dsDNA 的细菌也可以激活 cGAS-STING 信号通路，如淋病奈瑟球菌（*Neisseria gonorrhoeae*）先由 Toll 样受体 -4（Toll-like receptors 4，TLR4）诱导产生 IFN，进入 BMDMs 胞质后再激活 cGAS，并产生 IFN 反应 [14]；单核细胞性李斯特菌（*Listeria monocytogenes*）可激活 cGAS，引起人类骨髓细胞中的 IFN 表达，此研究也证明了李斯特菌中的环二核苷酸（cyclic dinucleotides，CDN）可以直接触发 STING 而不依赖于 cGAS[15]。

cGAS-STING 信号通路激活的内源性原因包括自身 DNA 的清除缺陷和线粒体应激。3’-核酸修复外切酶 1（three prime repair exonuclease 1，TREX1），是胞质中主要的 3’-5’限制性核酸外切酶，TREX1 表达的核酸酶活性对于维持先天免疫系统识别自身 DNA 的免疫耐受发挥重要作用，人源 *TREX1* 基因的突变会引起一系列自身免疫性疾病的发生 [16]。当细胞质中来源于细胞核泄漏或病原体的 DNA 没有及时被 TREX1 清除就会使 cGAS-STING 信号通路激活 [16]。由于线粒体是氧化呼吸的场所，线粒体 DNA（mitochondrial DNA，mtDNA）很容易受到呼吸过程中由电子传递链产生的活性氧造成的损伤，所以线粒体通过相应的自噬机制来清除受损线粒体 [17]。异常的线粒体自噬会导致胞质 DNA 的积累，mtDNA 释放到细胞质从而激活 cGAS-STING 信号通路 [9]。线粒体转录因子 A（transcription factor A mitochondrial，TFAM）是 mtDNA 结合蛋白，能控制 mtDNA 的分离、丰度和类核苷酸结构 [9]。TFAM 缺乏会使线粒体基因组紊乱和线粒体应激，导致 mtDNA 逃逸到细胞质中，从而通过 cGAS-STING 信号通路诱导干扰素刺激基因（interferon-stimulated genes，ISGs）表达和 IFN 的产生 [18]。关于 mtDNA 泄漏到胞质中的原因，目前认为可能是 B 淋巴细胞瘤 -2（B-cell lymphoma-2，BCL-2）基因相关蛋白（BCL-2 associated X protein，BAX）诱导线粒体外膜上的孔洞形成，增加线粒体内膜的通透性，从而导致线粒体大分子（包括 mtDNA）逃逸 [19]。

cGAS-STING 信号通路同时也受到负性调节，当病原微生物感染导致的细胞凋亡通路被活化时，可以激活多个凋亡效应蛋白酶。活化的凋亡蛋白酶切割多条天然免疫通路中的关键蛋白（cGAS、IRF3）以及线粒体抗病毒信号蛋白（mitochondrial antiviral-signaling protein，MAVS），并使这些蛋白完全失活，避免细胞因子的过度产生 [20]。提示天然免疫稳态的维持存在互相制约的精密调节。

2　cGAS-STING 信号通路在神经退行性疾病中的作用

在中枢神经系统（central nervous system，CNS）中，小胶质细胞作为最主要的中枢固有免疫细胞，其功能和状态与脑内炎症水平密切相关，而星形胶质细胞可以对炎症信号作出反应并促进炎症，参与调控生理状态和病理状态下神经系统的多个生命进程 [21]。小胶质细胞、星形胶质细胞都表达 cGAS，通过识别 DNA 介导 IFN 表达 [22-23]。其中，小胶质细胞是激活 cGAS-STING 信号通路的主要细胞类型。小胶质细胞受到来自病毒或受损 mtDNA 的激活，启动 cGAS-STING 信号通路，分泌 IFN，作用于神经元上的干扰素 A 受体（interferon A receptor，IFNARs），引发神经元抗病毒防御机制（见图 2）。与此同时，星形胶质细胞也被启动，以缓解炎症。然而这一通路的过度激活却会导致神经炎症。

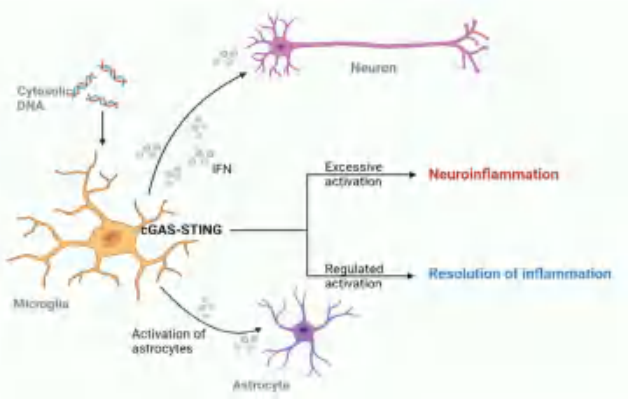

图 2　小胶质细胞中的 cGAS-STING 信号通路激活

Fig 2　Activation of cGAS-STING signaling pathway in the microglia

虽然 cGAS-STING 信号通路在神经系统中的作用近年来才逐渐被揭示，但作为治疗神经退行性疾病的新靶点，其作用和未来前景不容忽视。本文将对常见的神经退行性疾病中 cGAS-STING 信号通路的相关研究进展进行阐述。

2.1　毛细血管扩张性共济失调综合征

核酸的识别在防御中枢神经系统病原体中发挥着重要作用，但先天免疫机制的触发也是主要神经退行性疾病的一个重要致病因素。毛细血管扩张性共济失调综合征（ataxia telangiectasia，A-T）是一种由于缺乏 DNA 损伤修复过程中的 ATM（ataxia telangiectasia-mutated）激酶而引起的常染色体隐性遗传病，临床表现较为广泛，主要有意向性震颤、

眼皮肤毛细血管发育不全、协调功能障碍和平衡障碍等。A-T 患者的细胞表现出放射敏感性，基因组不稳定性增加，伴有端粒磨损加剧、线粒体功能障碍和早衰[24]。Song 等[25]认为在 A-T 中，DNA 修复机制的缺乏导致 ss/dsDNA 在胞质积累，并被先天免疫系统识别，通过 STING 来诱导信号转导，引起小胶质细胞激活和神经毒性细胞因子的分泌。这种新型炎症级联可能是一种广泛适用于多种疾病的神经炎症诱导机制。Aguado 等[24]的研究中，使用人类的类脑器官精确地模拟了 A-T 的神经损害表型，发现使用 STING 抑制剂 H-151，可有效地抑制自身 DNA 诱导的衰老相关分泌表型（senescence-associated secretory phenotype，SASP）激活，并恢复了 A-T 类脑器官的神经病理学特征[24]，既验证了抑制 cGAS-STING 信号通路可以作为 A-T 神经病理学的有效治疗靶点，又表明 STING 抑制剂可能用于其他与早衰和自身 DNA 诱导的 SASP 激活相关的神经系统疾病。

2.2 阿尔茨海默病（Alzheimer’s disease，AD）

AD 是一种表现为进行性认知衰退和记忆丧失的神经退行性疾病[26]。AD 的典型病理特征是细胞外 *β*- 淀粉样蛋白（amyloid *β*-protein，A*β*）的积累导致的神经纤维缠结[27]。而 A*β* 源于 *β* 淀粉样前体蛋白（*β*-amyloid precursor protein，APP）的裂解以及高磷酸化微管相关蛋白 Tau（microtubule-associated protein tau，MAPT）的细胞内沉积[28]。淀粉样蛋白级联假说受到广泛认可，该假说认为 A*β* 累积是导致神经元损伤级联效应的主要原因[29]。然而，越来越多的证据表明，单靠淀粉样蛋白级联不能解释 AD 的其他发病机制和病理过程，有人提出，大脑中的炎症和免疫反应可能加速 AD 疾病进展并成为发病的基础，而脑内固有的小胶质细胞是参与神经元和突触损伤的关键因素[30]。

作为中枢神经系统的常驻吞噬细胞，小胶质细胞主要通过释放降解酶对 A*β* 进行降解[31]。据研究表明，长期持续的 A*β* 识别和降解导致的先天性免疫激活会引发神经炎症，从而导致神经退行性病变的进一步发展[32]。炎症是细胞衰老的标志之一，并且已在 AD 小鼠模型的大脑中观察到 SASP 与神经炎症高度相关[33]。有证据表明，AD 过程中小胶质细胞呈现神经退行性表型（microglial neurodegenerative phenotype，MGnD），MGnD 表型下的小胶质细胞失去传感功能[34]，星形胶质细胞和小胶质细胞都呈现吞噬功能障碍、脂质代谢异常等衰老表现[33，35]。髓系细胞触发受体 2（triggering receptor expressed on myloid cell，TREM2）是一种感受 A*β* 积累和神经元损伤的受体，能够诱导小胶质细胞从 M1 表型极化为 M2 表型[36]，促进小胶质细胞清除 A*β* 积累，从而减少神经炎症。Xu 等[37]系统研究了 cGAMP 激活后，通过刺激 STING 依赖性免疫从而诱导 TREM2 上调，TREM2 表达在蛋白质和 mRNA 水平上诱导增强了 BV2 小鼠小胶质细胞体外和原代小胶质细胞体外对 A*β* 的吞噬效率，减少了 A*β* 斑块和神经元死亡。也就是说，cGAMP 的治疗可以在 TREM2 依赖机制中增加 M2 表型与 M1 表型的比率，改善 AD 小鼠模型中的神经炎症。因此，在 AD 背景下，增强天然免疫可以减缓神经退行性疾病的进程，表明 cGAMP 在 AD 免疫治疗中有巨大的应用潜力。值得注意的是，虽然在此研究中，cGAMP 处理后明显上调了 STING 和 IRF3 的表达，证明了 AD 小鼠大脑存在 cGAMP-STING-IRF3 信号通路的激活，但 cGAMP 激活后，增强了 BV2 小鼠小胶质细胞体外对 A*β* 的吞噬效率，这一现象并不能证明是由 cGAMP 依赖于 STING 而实现的。

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（nicotinamide adenine dinucleotide，NAD^+）是 AD 神经元中 DNA 修复和线粒体自噬等多个过程的关键，在细胞代谢中起着核心作用[38]。许多神经退行性疾病（包括 AD）的相关组织中 NAD^+ 水平较低，研究发现补充 NAD^+ 前体烟酰胺核糖（NAD^+ precursor nicotinamide riboside，NR）可有效增加 NAD^+，并对小鼠模型中的许多 AD 特征产生有益影响[39]。以往的研究证实 AD 存在线粒体自噬现象，自噬过程中释放到胞浆中的 DNA 导致 cGAS-STING 信号通路异常激活[40]。Hou 等[41]将 cGAS-STING 信号通路与 AD 联系起来，发现在 *APP/PS1* 双转基因小鼠模型中，补充 NR 可使线粒体自噬过程中释放到胞质中的 DNA 减少，从而减少 cGAS-STING 信号通路感知 DNA 后的激活；进一步的研究也证明了 NR 通过抑制 cGAS-STING 信号通路降低 AD 小鼠大脑的神经炎症和细胞衰老，改善 AD 小鼠的学习记忆和突触可塑性。

2.3 帕金森病（Parkinson disease，PD）

PD 是一种常见的神经退行性疾病，临床表现为静止性震颤、肌强直、运动功能减退和步态异常。其致病原因有环境因素和遗传因素等，*PINK1* 或 *Parkin* 基因的突变会导致家族性帕金森病，由 *PINK1/Parkin* 介导的线粒体自噬缺陷引起的受损线粒体积累可能促进 PD 的发生[42]。炎症被认为是 PD 病理的关键驱动因素[43]，Sliter 等[44]研究发现 *Parkin* 和 *PINK1* 可以减缓 STING 诱导的炎症反应，由耗竭性运动（exhaustive exercise，

EE）或 mtDNA 突变诱导的线粒体应激引起的炎症可以通过 STING 的敲除而得以抑制，还证明了 STING 的缺失可阻止积累突变 mtDNA 的小鼠的炎症、运动缺陷和神经衰退的发生。对 72 名 PD 患者和 58 名健康对照者的全基因组数据集的 meta 分析显示，PD 患者黑质区中 STING 水平较高，支持了 cGAS-STING 信号通路可能与 PD 发病机制有关的结论 [45]。近期研究显示，STING 蛋白在含有错误折叠 *α*- 突触核蛋白（*α*-synuclein）的小鼠小胶质细胞中高表达，而 cGAS-STING 信号通路介导的一系列炎症反应会诱发小胶质细胞破坏更多的多巴胺神经元，表明 cGAS-STING 信号通路或许能作为特发性帕金森病或其他人类 *α*- 突触核蛋白疾病的潜在药物靶点 [46]。

2.4 肌萎缩侧索硬化（amyotrophic lateral sclerosis，ALS）

约 4% 的家族性 ALS 患者中存在 *TDP-43* 突变 [47]，*TDP-43* 在细胞质中的累积是 ALS 的重要标志之一，这一特征与 ALS 患者的神经炎症性细胞因子表征相关联，主要表现为 NF-*κ*B 和 IFN-Ⅰ通路水平的升高 [48-49]。最新研究中，Yu 等 [50] 通过对 iPSC 分化的运动神经细胞及 ALS 患者样品进行系统分析发现，TDP-43 通过在线粒体的累积，诱导 mtDNA 向细胞质释放后激活 cGAS-STING 信号通路，引起 NF-*κ*B 通路激活和 IFN-Ⅰ水平升高。相反，使用 STING 抑制剂 H-151 处理可以减轻炎症并改善神经退行性症状，而且敲除 cGAS 和 STING 能够完全阻断由 *TDP-43* 基因 Q331K 点突变诱导转基因 ALS 模型的炎性因子表达，cGAS 抑制剂 RU.521 也能够达到类似效果。进一步对 *TDP-43* A315T 点突变的 ALS 模型小鼠进行分析，该模型小鼠脑内、脊髓及血清的 cGAMP 水平均高于对照小鼠，敲除 STING 后小鼠的运动功能也显著性改善 [50]。这些结果为 *TDP-43* 突变诱导神经炎症提供了完整的机制阐述，为使用 SITNG 抑制剂对 ALS 患者进行干预提供了理论和实验基础。

2.5 C 型尼曼 - 皮克病（Niemann-Pick disease type C）

C 型尼曼 - 皮克病是一种罕见的神经退行性疾病，长期以来被认为是一种胆固醇代谢和分布的疾病。然而近期研究发现，C 型尼曼 - 皮克病与 STING 相关，Chu 等 [51] 通过定量蛋白质组学，确定了溶酶体膜蛋白尼曼 - 皮克型 C1（NPC1）作为 STING 转运的辅助因子，NPC1 蛋白的丢失通过阻断溶酶体降解“促进”STING 信号传递。在 *Npc1*$^{-/-}$小鼠小脑中，*STING* 基因缺失显著降低了小胶质细胞的激活，并减轻了浦肯野神经元的缺失，从而改善了运动功能。这一研究或许能够为 C 型尼曼 - 皮克病患者提供一种有效的治疗靶点。

2.6 亨廷顿病（Huntington disease，HD）

HD 是一种常染色体显性的神经退行性疾病，由 *Huntingtin* 基因中多谷氨酰胺（polyglutamine，PolyQ）编码的 CAG 重复序列的扩展引起 [52]。该疾病严重影响大脑纹状体，导致肌肉萎缩、运动和认知障碍、精神障碍和神经变性 [53]。突变 *Huntingtin* 基因（mutant huntingtin，mHtt）聚集并引起广泛损伤，影响转录调控、DNA 修复和核胞质转运等细胞过程 [54]。全基因组关联研究（genome-wide association studies，GWASs）显示，DNA 氧化损伤、DNA 修复和线粒体功能的相关通路与疾病的发病年龄相关 [55]。HD 病理过程中的细胞质 DNA 和炎症反应已经被报道，有证据表明在 HD 患者死后纹状体中 cGAS-STING-IRF3 信号通路被激活 [56]。当 cGAS 活性增强，炎症相关基因和自噬蛋白表达增加，cGAS 的缺失可降低 HD 纹状体细胞的炎症和自噬反应，提示 cGAS 可促进 HD 的炎症反应，可能是 HD 的治疗靶点 [57]。近期研究发现的 STING 稳态维持蛋白 TOLLIP 能够在无病原菌感染状态下维持 STING 蛋白的稳定，TOLLIP 敲低或者敲除可显著降低 STING 的表达，从而抑制了 DNA 刺激引起的 cGAS-STING 信号通路激活 [58]。相关研究表明 PolyQ 富集蛋白的积累与 HD 的发生密切相关 [59]，当细胞过表达 HTTq74（PolyQ 富集蛋白）后，它能够竞争性与 TOLLIP 相互作用，从而抑制 TOLLIP-STING 相互作用，导致 STING 被溶酶体降解。在 HD 小鼠疾病模型中（zQ175），中脑皮层中有大量 PolyQ 蛋白聚集，同时也发现 STING 蛋白在大脑中也被显著降解 [58]，STING 蛋白的稳定在 HD 发生中的功能或许具有研究价值。

2.7 多发性硬化（multiple sclerosis，MS）

MS 是一种以脱髓鞘为特征的神经退行性疾病，免疫系统攻击神经纤维的保护鞘髓磷脂，导致炎症和神经损伤 [60]。MS 的病理特征是炎症伴脱髓鞘、星形胶质细胞增生和神经退行性改变。该疾病可进展到继发性进行性多发性硬化（secondary progressive multiple sclerosis，SPMS）阶段，其特征为持续的、不可逆的神经功能衰退、脑容量减少和轴突丢失，小部分患者为原发性进行性多发性硬化（primary progressive multiple sclerosis，PPMS）[61]。免疫调节疗法如 IFN 和利妥昔单抗可预防或延缓 MS 的进展 [62]。Mathur 等 [60] 研究发现抗病毒药物更昔洛韦可通过激活 cGAS-STING 信号通路诱导小胶质细胞产生 IFN 反应，抑制炎症，在 MS 模型中起到保护作用。

Johnson 等[63]使用微粒包裹的 cGAMP 治疗实验性变态反应性脑脊髓炎（experimentally allergic encephalomyelitis，EAE）小鼠模型，cGAMP 表现出 IFN 依赖性免疫抑制作用，促进了 MS 患者外周单核血细胞中的 IFN 以及免疫调节因子 IL-27 和 IL-10，这项研究揭示了 cGAMP 的免疫调节作用，表明 STING 激动剂可能是一种治疗 MS 的新方法。

3 cGAS-STING 信号通路相关调控剂

对于大多数发展过程中涉及神经炎症水平升高和促炎细胞因子增多的神经退行性疾病，抑制 cGAS-STING 信号通路或许可以作为一种干预手段。

3.1 靶向 cGAS 的通路抑制剂

cGAS 作为 cGAS-STING 信号通路的启动因子，抑制其活性可以阻止下游通路激活，可能对神经退行性疾病的治疗起到一定作用。相关抑制剂阻止 cGAS 激活的方式主要是结合 cGAS 的活性位点，与 ATP 或 GTP 底物或产物 cGAMP 竞争，或是干扰 DNA 与 cGAS 结合，从而干扰 cGAS 的初始激活步骤。

An 等[64]筛选了一系列抗疟药物，如羟氯喹（hydroxychloroquine，HCQ）和阿奎平（quinacrine），这些药物通过插入 cGAS-dsDNA 的结合凹槽，选择性阻断 cGAS-dsDNA 相互作用，抑制 IFN-β 的产生；基于以上研究，该团队继续合成了第二代分子 X6，其在体外和体内活性都有改善，具有更好的溶解性和口服利用度。实验证明，X6 可使 *Trex1*$^{-/-}$小鼠心肌细胞中 cGAMP 产生明显减少[65]。其他具有相似作用机制的化合物，如 Suramin[66] 和 A151[67]，同样作为竞争性的 cGAS 抑制剂，通过与 dsDNA 结合域相互作用干扰 cGAS-DNA 结合物产生。Vincent 等[68]通过对 12 万个化合物进行高通量筛选，最终发现化合物 RU.365 和 RU.521 可以占据 cGAS 的活性位点，降低 cGAS 对底物 ATP 和 GTP 的亲和力。同时实验证明，RU.521 可以降低 *Trex1*$^{-/-}$小鼠 BMDMs 中 *Ifnb1* mRNA 的表达水平。尽管 PF-06928125 在生化检测中显示可以与 cGAS 结合，但在细胞检测中抑制活性较低，可能与细胞内 ATP 和 GTP 水平较高有关。靶向 cGAS 的 cGAS-STING 信号通路抑制剂总结见表 1。

表 1 靶向 cGAS 的抑制剂

Tab 1 Inhibitors targeting cGAS

抑制剂	机制	影响	动物 / 细胞模型	参考文献
RU.365/RU.521	占据 cGAS 的活性位点，降低 cGAS 对底物 ATP 和 GTP 的亲和力	降低 cGAS 对 ATP 和 GTP 的亲和力，抑制 2’3’-cGAMP 产生，降低 IFN-β 的水平	*Trex1*$^{-/-}$小鼠的 BMDMs	[68]
PF-06928215		抑制细胞活性	/	[69]
G150		抑制人源 THP-1 细胞活性	人源 THP-1 细胞、小鼠 RAW264.7 细胞	[70]
Compound S3	与 cGAS 的 dsDNA 结合域相互作用干扰 cGAS-DNA 结合物产生	尚不明确	/	[71]
羟氯喹		抑制 IFN-β 产生	THP-1 细胞	[64]
阿奎平		抑制 IFN-β 产生	THP-1 细胞	[64]
Suramin		抑制 2’3’-cGAMP 合成，降低 IFN-β 水平	THP-1 细胞	[66]
X6		抑制 IFN-β 产生	*Trex1*$^{-/-}$小鼠、源自系统性红斑狼疮患者的外周血单个核细胞（PBMCs）	[65-66]
A151		抑制 IFN-β 产生	THP-1 细胞、*Trex1*$^{-/-}$细胞	[67]
CU.76	插入 DNA 结合表面 Zn 环附近的凹槽中，通过构象变化抑制 cGAS 的二聚化	干扰 cGAS 的初始激活步骤	THP-1 细胞	[70]

3.2 靶向 STING 蛋白的抑制剂

Mukai 等[72]发现 STING 蛋白 N 段半胱氨酸 88/91 位（Cys88/91）的棕榈酰化对高尔基体上 STING 多聚体的形成发挥了关键作用，因此，控制棕榈酰化可能是调控 STING 活性的一种方法。通过基于细胞的化学筛选，Haag 等[73]鉴定了两种硝基呋喃衍生物（C-178、C-176），它们能与 STING 蛋白 Cys91 之间形成共价键，抑制 STING 蛋白的棕榈酰化，从而阻止 STING 蛋白组装成多聚体，阻断下游信号传导。该团队又通过其他筛选方式得到了化合物 H-151，其作用机制与 C-178 相同，可显著降低 *Trex1*$^{-/-}$小鼠的全身炎症反应[73]。在另一项研究中，Hansen 等[74]发现硝基脂肪酸（NO_2-FAs）可以抑制 cGAS-STING 信号通路，NO_2-FAs 是通过在病毒感染过程中向不饱和脂肪酸中加入二氧化氮（NO_2）而产生的内源性物质，可以共价修饰 STING 蛋白的 Cys88 和 Cys91，抑制棕榈酰化，导致通路失活。此外，NO_2-FAs 还能有效减少自免疫疾病患者成纤维细胞中 IFN 的生成。

除此之外有一些作用于其他位点的化合物也被证明对 cGAS-STING 信号通路有抑制作用。

Li 等[75]从药用植物 *Aster tataricus* 中发现了环肽 Astin C，Astin C 与 STING 的 C 端激活口袋和 2’3’-cGAMP 竞争，特异性结合到 STING 的 C 端激活位点从而抑制 IRF3 募集。正是由于上述机制，Astin C 使 *Trex1*$^{-/-}$小鼠的 IFN 水平明显降低。Siu 等[76]通过自动配体识别系统识别了另一种抑制剂 Compound 18。Compound 18 与 2’3’-cGAMP 结合位点结合，抑制 2’3’-cGAMP 诱导的 IFN-*β* 分泌。

以 STING 蛋白为靶点的 cGAS-STING 信号通路抑制剂总结见表 2。

表 2　靶向 STING 蛋白的抑制剂

Tab 2　Inhibitors targeting STING proteins

抑制剂	机制	影响	动物 / 细胞模型	参考文献
Astin C	特异性结合到 STING 的 C 端激活位点从而抑制 IRF3 募集	抑制 cGAMP 诱导的 IFN-*β* 分泌	*Trex1*$^{-/-}$小鼠、人类成纤维细胞	[75]
Compound 18	与 STING 的 2’3’-cGAMP 结合位点结合	抑制 cGAMP 诱导的 IFN-*β* 分泌	THP-1 细胞	[76]
C-176/C-178	抑制 STING 蛋白的棕榈酰化，从而阻止 STING 蛋白组装成多聚体	降低 STING 激动剂介导的血清中 IFN 和 IL-6 水平升高，抑制细胞中 STING 的激活	*Trex1*$^{-/-}$小鼠、鼠源 BMDMs	[73]
H-151		抑制 STING 棕榈酰化，降低 TBK1 磷酸化水平	*Trex1*$^{-/-}$小鼠	[73]
NO_2-FAs		导致通路失活，减少 IFN 产生	鼠源 BMDMs、THP-1 细胞	[74]

4　总结与展望

通过对 cGAS-STING 信号通路在神经系统中的作用机制研究，可以更好地理解该通路在神经退行性疾病中的重要作用。cGAS-STING 信号通路作为潜在的分子靶标，为相应疾病的药物研发提供新策略。大多数神经退行性疾病都伴有高水平的神经炎症，抑制 cGAS-STING 信号通路为其治疗提供了新途径。例如在 PD 和 A-T 的病理过程中，由于 DNA 修复机制缺陷等原因导致的小胶质细胞激活，诱导产生神经炎症，可以使用 STING 抑制剂阻断 cGAS-STING 信号通路，改善炎症信号，有望减轻神经细胞的损伤，从而改善神经退行性症状，恢复患者运动能力。而对于 MS 和 AD，尤其是在 AD 的早期，神经炎症主要表现为对神经产生损伤，考虑到 cGAMP 表现出 IFN 依赖性免疫抑制作用可以减轻神经炎症，在未来研究中，或许可以借助 cGAMP 等 STING 激动剂来增强天然免疫这一思路，同时结合临床试验和已知治疗手段，明确 cGAS-STING 信号通路在中枢神经系统的具体作用，为药物开发及临床治疗策略的制订奠定基础。

参考文献

[1] Pandey S，Kawai T，Akira S. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol，2014，7（1）：a016246.

[2] Hopfner KP，Hornung V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS-STING signalling [J]. Nat Rev Mol Cell Biol，2020，21（9）：501-521.

[3] Jiang M，Chen P，Wang L，et al. cGAS-STING，an important pathway in cancer immunotherapy [J]. J Hematol Oncol，2020，13（1）：81-91.

[4] Berger G，Marloye M，Lawler SE. Pharmacological modulation of the STING pathway for cancer immunotherapy [J]. Trends Mol Med，2019，25（5）：412-427.

[5] Sun L，Wu J，Du F，et al. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type Ⅰ interferon pathway [J]. Science，2013，339（6121）：786-791.

[6] Civril F，Deimling T，de Oliveira Mann CC，et al. Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS [J]. Nature，2013，498（7454）：332-337.

[7] Gao P，Ascano M，Wu Y，et al. Cyclic [G（2’，5’）pA（3’，5’）p] is the metazoan second messenger produced by DNA-activated cyclic GMP-AMP synthase [J]. Cell，2013，153（5）：1094-1107.

[8] Herzner AM，Hagmann CA，Goldeck M，et al. Sequence-specific activation of the DNA sensor cGAS by Y-form DNA structures as found in primary HIV-1 cDNA [J]. Nat Immunol，2015，16（10）：1025-1033.

[9] Andreeva L，Hiller B，Kostrewa D，et al. cGAS senses long and HMGB/TFAM-bound U-turn DNA by forming protein-DNA ladders [J]. Nature，2017，549（7672）：394-398.

[10] Ishikawa H，Barber GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling [J]. Nature，2008，455（7213）：674-678.

[11] Fitzgerald KA，McWhirter SM，Faia KL，et al. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway [J]. Nat Immunol，2003，4（5）：491-496.

[12] Burdette DL，Monroe KM，Sotelo-Troha K，et al. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP [J]. Nature，2011，478（7370）：515-518.

[13] Kalamvoki M，Roizman B. HSV-1 degrades，stabilizes，requires，or is stung by STING depending on ICP0，the US3 protein kinase，and cell derivation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2014，111（5）：611-617.

[14] Andrade WA，Agarwal S，Mo S，et al. Type Ⅰ interferon induction by Neisseria gonorrhoeae：dual requirement of cyclic GMP-AMP synthase and Toll-like receptor 4 [J]. Cell Rep，2016，15（11）：2438-2448.

[15] Hansen K，Prabakaran T，Laustsen A，et al. Listeria monocytogenes induces IFNbeta expression through an IFI16-，cGAS-and STING-dependent pathway [J]. EMBO J，2014，33（15）：1654-1666.
[16] Gehrke N，Mertens C，Zillinger T，et al. Oxidative damage of DNA confers resistance to cytosolic nuclease TREX1 degradation and potentiates STING-dependent immune sensing [J]. Immunity，2013，39（3）：482-495.
[17] Fang EF，Scheibye-Knudsen M，Chua KF，et al. Nuclear DNA damage signalling to mitochondria in ageing [J]. Nat Rev Mol Cell Biol，2016，17（5）：308-321.
[18] West AP，Khoury-Hanold W，Staron M，et al. Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response [J]. Nature，2015，520（7548）：553-557.
[19] McArthur K，Whitehead LW，Heddleston JM，et al. BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis [J]. Science，2018，359（6378）：6047.
[20] Ning X，Wang Y，Jing M，et al. Apoptotic caspases suppress type Ⅰ interferon production via the cleavage of cGAS，MAVS，and IRF3 [J]. Mol Cell，2019，74（1）：19-31.
[21] Linnerbauer M，Wheeler MA，Quintana FJ. Astrocyte crosstalk in CNS inflammation [J]. Neuron，2020，108（4）：608-622.
[22] Cox DJ，Field RH，Williams DG，et al. DNA sensors are expressed in astrocytes and microglia in vitro and are upregulated during gliosis in neurodegenerative disease [J]. Glia，2015，63（5）：812-825.
[23] Chen K，Lai C，Su Y，et al. cGAS-STING-mediated IFN-I response in host defense and neuroinflammatory diseases [J]. Curr Neuropharmacol，2022，20（2）：362-371.
[24] Aguado J，Chaggar HK，Gomez-Inclan C，et al. Inhibition of the cGAS-STING pathway ameliorates the premature senescence hallmarks of Ataxia-Telangiectasia brain organoids [J]. Aging Cell，2021，20（9）：e13468.
[25] Song X，Ma F，Herrup K. Accumulation of cytoplasmic DNA due to ATM deficiency activates the microglial viral response system with neurotoxic consequences [J]. J Neurosci，2019，39（32）：6378-6394.
[26] Sarlus H，Heneka MT. Microglia in Alzheimer's disease [J]. J Clin Invest，2017，127（9）：3240-3249.
[27] Li F，Wang N，Zheng Y，et al. cGAS-stimulator of interferon genes signaling in central nervous system disorders [J]. Aging Dis，2021，12（7）：1658-1674.
[28] Scheltens P，de Strooper B，Kivipelto M，et al. Alzheimer's disease [J]. The Lancet，2021，397（10284）：1577-1590.
[29] Masters CL，Bateman R，Blennow K，et al. Alzheimer's disease [J]. Nat Rev Dis Primers，2015，1：15056.
[30] VanItallie TB. Alzheimer's disease：innate immunity gone awry? [J]. Metabolism，2017，69：41-49.
[31] Heneka MT. Inflammasome activation and innate immunity in Alzheimer's disease [J]. Brain Pathol，2017，27（2）：220-222.
[32] Ennerfelt HE，Lukens JR. The role of innate immunity in Alzheimer's disease [J]. Immunol Rev，2020，297（1）：225-246.
[33] Zhang P，Kishimoto Y，Grammatikakis I，et al. Senolytic therapy alleviates Abeta-associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model [J]. Nat Neurosci，2019，22（5）：719-728.
[34] Krasemann S，Madore C，Cialic R，et al. The TREM2-APOE pathway drives the transcriptional phenotype of dysfunctional microglia in neurodegenerative diseases [J]. Immunity，2017，47（3）：566-581.
[35] Bussian TJ，Aziz A，Meyer CF，et al. Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline [J]. Nature，2018，562（7728）：578-582.
[36] Jiang T，Zhang YD，Chen Q，et al. TREM2 modifies microglial phenotype and provides neuroprotection in P301S tau transgenic mice [J]. Neuropharmacology，2016，105：196-206.
[37] Xu Q，Xu W，Cheng H，et al. Efficacy and mechanism of cGAMP to suppress Alzheimer's disease by elevating TREM2 [J]. Brain Behav Immun，2019，81：495-508.
[38] Hou Y，Lautrup S，Cordonnier S，et al. NAD^+ supplementation normalizes key Alzheimer's features and DNA damage responses in a new AD mouse model with introduced DNA repair deficiency [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2018，115（8）：1876-1885.
[39] Fang EF，Lautrup S，Hou Y，et al. NAD^+ in aging：molecular mechanisms and translational implications [J]. Trends Mol Med，2017，23（10）：899-916.
[40] Fang EF，Hou Y，Palikaras K，et al. Mitophagy inhibits amyloid-beta and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease [J]. Nat Neurosci，2019，22（3）：401-412.
[41] Hou Y，Wei Y，Lautrup S，et al. NAD^+ supplementation reduces neuroinflammation and cell senescence in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease via cGAS-STING [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2021，118（37）：e2011226118.
[42] Newman LE，Shadel GS. Pink1/Parkin link inflammation，mitochondrial stress，and neurodegeneration [J]. J Cell Biol，2018，217（10）：3327-3329.
[43] Herrero MT，Estrada C，Maatouk L，et al. Inflammation in Parkinson's disease：role of glucocorticoids [J]. Front Neuroanat，2015，9：32.
[44] Sliter DA，Martinez J，Hao L，et al. Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation [J]. Nature，2018，561（7722）：258-262.
[45] Zhao M，Wang B，Zhang C，et al. The DJ1-Nrf2-STING axis mediates the neuroprotective effects of Withaferin A in Parkinson's disease [J]. Cell Death Differ，2021，28（8）：2517-2535.
[46] Hinkle JT，Patel J，Panicker N，et al. STING mediates neurodegeneration and neuroinflammation in nigrostriatal α-synucleinopathy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2022，119（15）：e2118819119.

[47] Sreedharan J，Blair IP，Tripathi VB，et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis [J]. Science，2008，319（5870）：1668-1672.
[48] Wang R，Yang B，Zhang D. Activation of interferon signaling pathways in spinal cord astrocytes from an ALS mouse model [J]. Glia，2011，59（6）：946-958.
[49] Zhao W，Beers DR，Bell S，et al. TDP-43 activates microglia through NF-kappaB and NLRP3 inflammasome [J]. Exp Neurol，2015，273：24-35.
[50] Yu CH，Davidson S，Harapas CR，et al. TDP-43 triggers mitochondrial DNA release via mPTP to activate cGAS/STING in ALS [J]. Cell，2020，183（3）：636-649.
[51] Chu TT，Tu X，Yang K，et al. Tonic prime-boost of STING signalling mediates Niemann-Pick disease type C [J]. Nature，2021，596（7873）：570-575.
[52] Tabrizi SJ，Ghosh R，Leavitt BR. Huntingtin lowering strategies for disease modification in Huntington's disease [J]. Neuron，2019，101（5）：801-819.
[53] Kim A，Lalonde K，Truesdell A，et al. New avenues for the treatment of Huntington's disease [J]. Int J Mol Sci，2021，22（16）：8363-8412.
[54] Maiuri T，Hung CLK，Suart C，et al. DNA repair in Huntington's disease and Spinocerebellar Ataxias：somatic instability and alternative hypotheses [J]. J Huntingtons Dis，2021，10（1）：165-173.
[55] Correia K，Harold D，Kim KH，et al. The Genetic Modifiers of Motor OnsetAge（GeM MOA）website：genome-wide association analysis for genetic modifiers of Huntington's disease [J]. J Huntingtons Dis，2015，4（3）：279-284.
[56] Jauhari A，Baranov SV，Suofu Y，et al. Melatonin inhibits cytosolic mitochondrial DNA-induced neuroinflammatory signaling in accelerated aging and neurodegeneration [J]. J Clin Invest，2020，130（6）：3124-3136.
[57] Sharma M，Rajendrarao S，Shahani N，et al. Cyclic GMP-AMP synthase promotes the inflammatory and autophagy responses in Huntington disease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2020，117（27）：15989-15999.
[58] Pokatayev V，Yang K，Tu X，et al. Homeostatic regulation of STING protein at the resting state by stabilizer TOLLIP [J]. Nat Immunol，2020，21（2）：158-167.
[59] Barker RA，Fujimaki M，Rogers P，et al. Huntingtin-lowering strategies for Huntington's disease [J]. Expert Opin Investig Drugs，2020，29（10）：1125-1132.
[60] Mathur V，Burai R，Vest RT，et al. Activation of the STING-dependent type Ⅰ interferon response reduces microglial reactivity and neuroinflammation [J]. Neuron，2017，96（6）：1290-1302.
[61] Cree BAC，Arnold DL，Chataway J，et al. Secondary mrogressive multiple sclerosis：new insights [J]. Neurology，2021，97（8）：378-388.
[62] Reich DS，Lucchinetti CF，Calabresi PA. Multiple sclerosis [J]. N Engl J Med，2018，378（2）：169-180.
[63] Johnson BM，Uchimura T，Gallovic MD，et al. STING agonist mitigates experimental autoimmune encephalomyelitis by stimulating type Ⅰ IFN-dependent and-independent immune-regulatory pathways [J]. J Immunol，2021，206（9）：2015-2028.
[64] An J，Woodward JJ，Sasaki T，et al. Cutting edge：antimalarial drugs inhibit IFN-beta production through blockade of cyclic GMP-AMP synthase-DNA interaction [J]. J Immunol，2015，194（9）：4089-4093.
[65] An J，Woodward JJ，Lai W，et al. Inhibition of cyclic GMP-AMP synthase using a novel antimalarial drug derivative in Trex1-deficient mice [J]. Arthritis Rheumatol，2018，70（11）：1807-1819.
[66] Wang M，Sooreshjani MA，Mikek C，et al. Suramin potently inhibits cGAMP synthase，cGAS，in THP1 cells to modulate IFN-β levels [J]. Future Med Chem，2021，10（11）：1301-1317.
[67] Steinhagen F，Zillinger T，Peukert K，et al. Suppressive oligodeoxynucleotides containing TTAGGG motifs inhibit cGAS activation in human monocytes [J]. Eur J Immunol，2018，48（4）：605-611.
[68] Vincent J，Adura C，Gao P，et al. Small molecule inhibition of cGAS reduces interferon expression in primary macrophages from autoimmune mice [J]. Nat Commun，2017，8（1）：750-762.
[69] Hall J，Brault A，Vincent F，et al. Discovery of PF-06928215 as a high affinity inhibitor of cGAS enabled by a novel fluorescence polarization assay [J]. PLoS One，2017，12（9）：e0184843.
[70] Lama L，Adura C，Xie W，et al. Development of human cGAS-specific small-molecule inhibitors for repression of dsDNA-triggered interferon expression [J]. Nat Commun，2019，10（1）：2261.
[71] Zhao W，Xiong M，Yuan X，et al. In silico screening-based discovery of novel inhibitors of human cyclic GMP-AMP synthase：a cross-validation study of molecular docking and experimental testing [J]. J Chem Inf Model，2020，60（6）：3265-3276.
[72] Mukai K，Konno H，Akiba T，et al. Activation of STING requires palmitoylation at the Golgi [J]. Nat Commun，2016，7：11932.
[73] Haag SM，Gulen MF，Reymond L，et al. Targeting STING with covalent small-molecule inhibitors [J]. Nature，2018，559（7713）：269-273.
[74] Hansen AL，Buchan GJ，Ruhl M，et al. Nitro-fatty acids are formed in response to virus infection and are potent inhibitors of STING palmitoylation and signaling [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2018，115（33）：7768-7775.
[75] Li S，Hong Z，Wang Z，et al. The cyclopeptide Astin C specifically inhibits the innate immune CDN sensor STING [J]. Cell Rep，2018，25（12）：3405-3421.
[76] Siu T，Altman MD，Baltus GA，et al. Discovery of a novel cGAMP competitive ligand of the inactive form of STING [J]. ACS Med Chem Lett，2019，10（1）：92-97.

（收稿日期：2022-05-06；修回日期：2022-07-08）

cGAS-STING 信号通路在自身免疫性疾病中的作用

邓珊珊，章越凡*（上海大学医学院，上海　200444）

摘要：天然免疫是机体抵御病原体侵害的第一道防线，而机体感知病原体存在则有赖于核酸识别机制。cGAS-STING 信号通路是天然免疫系统中重要的模式识别及效应通路之一，主要负责识别存在于胞浆中的 DNA 分子，并激活下游信号通路产生Ⅰ型干扰素和其他炎症因子。近年来，越来越多的研究表明核酸受体 cGAS 介导的天然免疫通路 cGAS-STING 信号通路异常激活与自身免疫性疾病的发生与发展有紧密的联系。本文就 cGAS-STING 信号通路的激活过程及其在自身免疫性疾病中的相关作用与治疗药物展开综述，旨在为自身免疫性疾病的预防与治疗提供参考。

关键词：cGAS-STING 信号通路；自身免疫性疾病；天然免疫
中图分类号：R593.2　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-1991-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.005

Role of cGAS-STING signaling pathway in autoimmune diseases

DENG Shan-shan, ZHANG Yue-fan* (*School of Medicine*, *Shanghai University*, *Shanghai* 200444)

Abstract: Innate immunity is the first line of defense against pathogens, and the perception of pathogens depends on the mechanism of nucleic acid recognition. cGAS-STING signaling pathway is an important pattern recognition and effect pathway in the innate immune system, which is mainly responsible for recognizing DNA molecules in the cytoplasm and activating downstream signaling pathways to produce type I interferons and other inflammatory factors. In recent years, more and more studies have shown that abnormal activation of cGAS-STING signaling pathway mediated by nucleic acid receptor cGAS is closely related to the occurrence and development of autoimmune diseases. This article reviewed the activation process of cGAS-STING signaling pathway and its role in autoimmune diseases and therapeutic drugs, to provide theoretical basis and research direction for the prevention and treatment of autoimmune diseases.

Key words: cGAS-STING signaling pathway; autoimmune disease; innate immunity

自身免疫性疾病（autoimmune disease，AID）是一类由于机体自身免疫耐受被打破导致机体针对自身抗原发生免疫反应，造成组织器官损伤或功能障碍的疾病，通常表现为自身反应性 T 细胞、B 细胞过度活化、自身抗体大量产生等症状[1]。常见的 AID 有系统性红斑狼疮（systemic lupus erythematosus，SLE）、类风湿关节炎（rheumatoid arthritis，RA）、银屑病（psoriasis）等。Ⅰ型干扰素（type Ⅰ interferons，IFN-Ⅰ）和自身核酸都被认为是 AID 发病机制的关键性驱动因素[2]。由环磷酸鸟苷 - 磷酸腺苷酸（cyclic GMP-AMP，cGAMP）合成酶（cyclic GMP-AMP synthase，cGAS）介导的 cGAS-STING 信号通路是一类典型的天然免疫通路，能够识别机体自身 DNA，并诱导 IFN-Ⅰ的产生[3]。因此 cGAS-STING 信号通路在 AID 中的作用引起了人们极大的兴趣。

目前，临床上对于 AID 的治疗方法还较为局限，主要集中于病理组织损伤治疗及免疫系统抑制疗法。这类治疗手段虽然能起到一定的治疗作用，但长期来看对患者的不良影响更大。近年来随着免疫疗法的兴起，有研究人员也开始尝试对 AID 不同免疫信号通路涉及的作用靶点有针对性地开发治疗药物。鉴于 cGAS-STING 信号通路与 AID 之间的紧密联系，靶向调节 cGAS-STING 信

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 81971017）。
作者简介：邓珊珊，女，硕士研究生，主要从事药物作用机制研究，email：dss341415926@163.com　*通信作者：章越凡，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事药物作用机制及靶点研究，email：zhangyuefan@126.com

号通路的抑制剂有望成为治疗 AID 的候选药物。现对 cGAS-STING 信号通路及其在 AID 中的功能和应用进行综述，旨在为 AID 的研究和治疗提供思路。

1　cGAS-STING 信号通路

cGAS-STING 信号通路的信号传递过程可简要分为 3 个阶段：双链 DNA（double-stranded DNA，dsDNA）的感知、胞内信号转导和免疫应答激活（见图 1）。

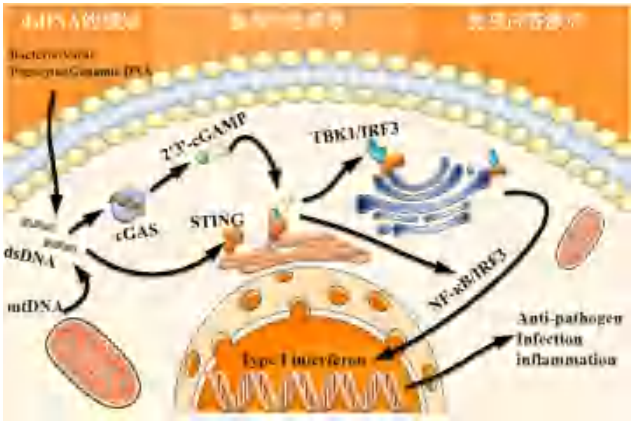

图 1　cGAS-STING 信号通路

Fig 1　cGAS-STING signaling pathway

1.1　dsDNA 的感知阶段

dsDNA 的感知阶段主要由细胞 DNA 传感器 cGAS 参与完成。目前除 cGAS 外，尚未有研究表明已报道的 DNA 受体是否为不依赖 DNA 序列的通用型受体 [4]，而 cGAS 作为一种广谱胞质 DNA 识别受体可借助一种不依赖于 DNA 序列的方式识别并结合 dsDNA，催化 ATP 和 GTP 生成 2’3’-cGAMP [5]。值得注意的是，这一阶段只有当较长片段的 dsDNA 引发的信号超过一定的信号阈值时，cGAS 信号才能启动 [6]。即在 cGAS 有限或 dsDNA 片段序列较短的情况下，cGAS 难以被激活，这种激活方式为细胞提供了一种重要的潜在保护机制。

1.2　胞内信号转导阶段

cGAMP 可作为第二信使结合并激活定位于内质网上的干扰素基因刺激因子（stimulator of interferon gene，STING），导致 STING 构象发生变化 [7]。有研究发现 STING 可直接结合 dsDNA，也可被其上游含有两个 3’-5’ 磷酸二酯键的原核 CDNs（cyclic dinucleotides，CDNs）及 2’3’-cGAMP 诱导活化 [8]。cGAMP 与 STING 的结合促进了 STING 向高尔基体转运，在转运过程中，活化的 STING 可招募 TANK 结合激酶 1（TANK-binding kinase 1，TBK1）形成 STING-TBK1 复合物，随后催化干扰素调节因子 3（interferon regulatory factor 3，IRF3）磷酸化和二聚化，且 TBK1 也能在一定程度上催化核因子 NF-κB 的转位 [7, 9]；活化的 STING 亦可直接激活下游 IκB 激酶（inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase，IKK），导致 NF-κB 被释放 [9]。

1.3　免疫应答激活阶段

IRF3、NF-κB 被激活后进入细胞核，从而诱导 IFN-Ⅰ、干扰素刺激基因（interferon-stimulated gene，ISG）以及其他几种炎症介质、促凋亡基因和趋化因子的基因表达 [9]。完成信号转导的 STING 随后发生磷酸化、泛素化等修饰，活性受到抑制，防止天然免疫反应的过度激活 [10]。

2　cGAS-STING 信号通路与 AID

一方面，原本位于细胞核或者线粒体的自体 DNA 泄漏到胞质或是自身 DNA 清除机制存在缺陷，都有可能导致 cGAS-STING 信号通路异常激活从而触发 AID。正常情况下，细胞内存在的胞质外切酶（cytoplasmic exonuclease enzymes，DNase）可以清除胞质内冗余的 DNA，从而将胞质内的 DNA 水平维持在 cGAS 的激活阈值之下，避免自身免疫反应的发生 [11]。当 DNase 存在缺陷时，细胞质内积累的异常 DNA 不能被及时清除，胞质内 DNA 水平达到激活阈值，导致 cGAS-STING 信号通路过度激活，机体自身免疫平衡被打破，IFN-Ⅰ持续产生，进而诱发慢性炎症和 AID 的发生 [12]。另一方面，一些与 STING 激活直接相关的基因（如 *TMEM173* 基因）发生突变也有可能导致 cGAS-STING 信号通路激活异常，从而导致 AID 的发生 [13]。

2.1　cGAS-STING 信号通路与 SLE

SLE 是一种常见的累及多脏器的 AID，通常表现为 IFN-Ⅰ水平增加和凋亡细胞清除缺陷。SLE 的免疫异常几乎覆盖整个免疫系统，被认为是 AID 的原型，但 SLE 的确切病因目前还尚不明确。现有研究表明，SLE 与核酸酶活力存在缺陷相关 [14-15]。*DNase*Ⅱ$^{-/-}$鼠由于体内过量积累 IFN-Ⅰ，导致其在胚胎期死亡 [16]，而 *DNase*Ⅱ和 *STING* 双缺失的小鼠却可以存活，且未产生狼疮的现象 [17]。上述研究结果提示 *DNase* 缺失导致的狼疮是依赖于 STING 信号通路的。

cGAS-STING 信号通路参与 SLE 的发生发展。前期的临床调查显示，SLE 患者血清中的 dsDNA 水平明显高于健康对照组 [18]，部分 SLE 患者血清中 cGAMP 水平、cGAS 及免疫刺激因子的浓度都有所升高 [19]，表明 cGAS 可能参与了识别结合 SLE 患者体内自身 dsDNA 产生 cGAMP 从而诱导炎症反应的过程。但 Kato 等 [18] 后续开展的研究显示，SLE 患者血清中并不存在 STING

激动剂 2’3’-cGAMP，且 dsDNA 储存在凋亡衍生膜泡（apoptosis-derived membrane vesicle，AdMV）中，该膜泡结构能有效防止胞外核酸酶的降解并持续激活 cGAS-STING 信号通路，促进 IFN 和白细胞介素 6（IL-6）等炎性因子的释放。以上结果提示，dsDNA 激活 STING 通路并不一定只是通过 cGAS 介导，不排除有 dsDNA 直接激活 STING 的可能性，且 cGAS-STING 信号通路的持续激活很可能与细胞凋亡有关。另有研究显示，钙相关信号蛋白也参与了调控 SLE 患者体内 STING 通路，从而调节其免疫应答水平 [20]。但关于 cGAS-STING 信号在 SLE 中发挥的作用还存在争议。在一项降植烷（pristane，TMPD）诱导的 SLE 小鼠模型实验中，cGAS 和 STING 缺陷非但不能使小鼠免于患病，反而还导致小鼠自身抗体产生增加以及蛋白尿水平的升高 [21]。总体而言，SLE 潜在的病理机制存在相当大的异质性，cGAS-STING 信号通路在 SLE 发病不同阶段中的作用是不一样的，在很大程度上取决于正在研究的 SLE 动物模型种类及疾病发展的阶段。

2.2 cGAS-STING 信号通路与 STING 相关婴儿期起病的血管病

STING 相关婴儿期起病的血管病（STING-associated vasculopathy with onset in infancy，SAVI）是由于与 STING 激活相关的基因发生突变而表现出由 IFN-Ⅰ信号增强引起的慢性炎症和血管病变 [22]。国内外关于 SAVI 病例的报道基本都与 STING 编码基因（*TMEM173* 基因）变异有关，临床表现以新生儿期炎症性肺部疾病、皮肤血管病变、活动耐力下降等为主 [23-24]。相关的 SAVI 小鼠模型研究也显示，cGAS-STING 信号通路的过度激活会导致小鼠出现与 SAVI 患者症状相似的无菌性炎症、免疫系统功能紊乱和重症肺炎 [25]。STING 编码基因的突变导致 STING 过度激活，诱导大量 IFN-Ⅰ产生，IFN-Ⅰ与干扰素受体结合后，经过 Janus 激酶（janus kinase，JAK）- 信号传导与转录激活因子（signal transducer and activator of tran ions，STAT）（JAK-STAT）信号通路进一步级联活化，产生炎症风暴，从而对 STING 高表达的组织造成严重持久的损伤 [22, 26]。有研究报道采用 JAK 抑制剂可有效抑制患者体内 STAT 二聚体活化以控制 cGAMP 诱导的 STING 转录，并在一定程度上抑制炎症 [27]，提示 JAK 抑制剂有望成为 cGAS-STING 信号通路过度激活的治疗药物，但 JAK 抑制剂的安全性和有效性仍需要大量的临床试验验证。

2.3 cGAS-STING 信号通路与 RA

RA 是以破坏性与对称性关节病变、关节滑膜炎为特征的慢性自身免疫性疾病 [28]。有研究指出，RA 患者成纤维细胞样滑膜细胞中胞质 dsDNA 表达增加，且 dsDNA 和 cGAS 的表达与类风湿滑膜炎的严重程度相关，RA 患者细胞的 *cGAS* 或 *STING* 被敲除后细胞因子表达减少 [29]，这表明 cGAS-STING 信号通路介导了 RA 的炎症反应。在另一项研究中发现，cGAS 可通过激活蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）和细胞外调节蛋白激酶（extracellular regulated protein kinase，ERK）信号通路，促进 RA 成纤维细胞样滑膜细胞的炎症反应 [30]。尽管 AKT 信号通路的激活有可能会抑制 STING 通路下游的激活 [31]，但目前关于 RA 中 cGAS 激活 AKT 和 ERK 信号通路是否与 cGAS-STING 信号通路激活调控有关尚未得到验证。综上，cGAS-STING 信号通路与 RA 的发生发展有着密切的联系。

2.4 cGAS-STING 信号通路与银屑病

银屑病是一种慢性炎症性皮肤病，通常伴随着包括 RA、自身免疫性甲状腺炎等多种 AID 在内的并发症，与先天性和适应性免疫反应有关 [32]。有研究发现，在银屑病患者皮肤中 DNA 氧化损伤情况加重，银屑病样小鼠血浆中 cfDNA（circulating free DNA，cfDNA）水平有所增加，且银屑病患者皮肤中存在 STING 及其相关基因表达上调的现象 [33-35]。初步机制研究表明，在银屑病患者皮肤的巨噬细胞和角质形成细胞中，STING 作为自身 DNA 传感器诱导炎症反应，介导免疫细胞释放 TNF-α 或 H_2O_2，产生的 TNF-α、H_2O_2 可促进 DNA 释放到角质形成细胞胞质中，同时抑制 dsDNA 诱导产生的 STING 蛋白降解 [34]。在一项 STING 拮抗剂 H-151 的体内外抗银屑病作用研究中发现，局部给予 H-151 能减轻咪喹莫特诱导的银屑病皮肤损伤，并减轻炎症的发生，其作用机制为通过抑制角质形成细胞和免疫细胞中的 STING/NF-κB 信号转导，抑制皮肤的炎症，减轻银屑病的症状 [35]。

2.5 cGAS-STING 信号通路与其他 AID

有研究显示，Aicardi-Goutières 综合征（Aicardi-Goutières syndrome，AGS）的病理机制与 cGAS-STING 信号通路密切相关 [12]。AGS 是由于某些核酸酶基因突变缺失，导致核酸酶活性降低或丧失，核酸在胞浆内大量堆积，STING-TBK1-IRF3/NF-κB 等信号通路过度活化，最终导致 IFN-Ⅰ水平显著升高 [11]。现已确认血管和肺综合征（vascular and pulmonary syndrome，VAPS）患者与 *STING* 外显子突变有关 [9]，原发性胆汁性肝病也与 cGAS-STING 信号通路激活有关 [36]。

3 cGAS-STING 信号通路抑制剂在 AID 中的研究

自 2013 年首次发现 cGAS 是胞质识别 DNA 受体以来[37]，后续相继发现了众多小分子化合物对因 cGAS-STING 信号通路异常引发的 AID 有疗效。Hansen 等[38]报道了 STING 抑制剂硝基脂肪酸能抑制 SAVI 患者成纤维细胞中 IFN-Ⅰ的产生。有研究报道 STING 抑制剂 SN-011 已被证实可以抑制 SAVI 疾病相关的 STING 突变体激活活性，并且可调节 *TREX*$^{-/-}$小鼠免疫紊乱，提高小鼠存活率[39]。在 HSV-1 感染的 *TREX*$^{-/-}$小鼠中，小分子环肽 Astin C 可特异性抑制 cGAS-STING 信号通路及胞质 DNA 所诱发的炎症反应，显著降低小鼠自身免疫炎症反应[40]。Haag 等[41]报道了三种靶向 STING 蛋白的高效特异性小分子抑制剂 C-176、C-178 和 H-151，这些小分子可与人和小鼠细胞 STING 蛋白中的 Cys91 发生共价结合，阻断 STING 活化所诱导的棕榈酰化，阻碍 STING 多聚体复合物形成，抑制下游免疫应答激活，减弱小鼠自身炎症疾病的病理特征。该类化合物活性强且分子量低，药理实验结果显示能够有效阻断机体天然免疫反应的信号通路，是靶向 cGAS-STING 信号通路治疗 AID 极具潜力的候选药物。An 等[42]研究发现，在 AGS 小鼠模型中，作为抑制 cGAS 与 DNA 相互作用的化合物 X6 疗效优于羟氯喹，可显著降低小鼠脾脏细胞 *ISGs* 的表达，同时 X6 在降低 SLE 患者外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cells，PBMCs）*ISGs* 表达方面也明显优于羟氯喹。该结果表明，X6 通过抑制 cGAS-STING 信号通路激活治疗 AGS 和 SLE 具有明显优势。近期有研究发现，周期蛋白依赖性激酶抑制剂帕博西尼可直接靶向 STING Y167，通过阻断 STING 二聚化抑制其激活，后续研究结果表明帕博西尼对葡聚糖诱导的肠炎或 *TREX*$^{-/-}$小鼠的自身炎症性疾病具有保护作用[43]。

4 展望

综上所述，cGAS-STING 信号通路作为 DNA 传感器通路为 AID 启动和发病的关键途径，因此针对 cGAS-STING 信号通路开发调控该信号通路治疗 AID 的药物显得尤为重要。就理论而言，与现有阻断 IFN-Ⅰ下游信号通路（如 JAK 抑制剂）的治疗药物相比，cGAS 及 STING 抑制剂可能更具优势，因为其他识别细胞质内核苷酸的信号通路相对完整。但值得注意的是，cGAS-STING 信号通路作为机体天然免疫系统的重要防御机制，除了参与常见 AID 的发生发展过程，它还在因 cGAS-STING 信号通路异常激活诱发的非酒精性脂肪性肝炎、慢性阻塞性肺疾病、脑缺血和帕金森病等疾病进程中发挥着重要作用，且在抗病毒、抗感染、抗肿瘤等方面也有广泛的作用，因此在使用阻断 cGAS-STING 信号通路的免疫抑制药物时有可能会导致相关并发症恶化，机体免疫功能失调，增加病原微生物感染风险，长期使用甚至有可能导致肿瘤发病率提高。近些年对 cGAS-STING 信号通路在 AID 中的作用机制研究较为深入，但由于 AID 发病机制的复杂性及实验模型的差异性等不可避免的因素，目前在该方向的药物临床转化效率还有待提升。因此，阐明 cGAS-STING 信号通路在不同类型的 AID 中发挥的不同作用机制非常必要，有助于我们进一步了解 AID 的发生机制，为 AID 的预防和治疗寻找更多潜在的方法。

参考文献

[1] Chervonsky AV. Influence of microbial environment on autoimmunity [J]. Nat Immunol，2010，11（1）：28-35.

[2] Wahren-Herlenius M，Dörner T. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease [J]. Lancet，2013，382（9894）：819-831.

[3] Kwon J，Bakhoum SF. The cytosolic DNA-sensing cGAS-STING pathway in cancer [J]. Cancer Discov，2020，10（1）：26-39.

[4] Wu J，Chen ZJ. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids [J]. Annu Rev Immunol，2014，32：461-488.

[5] Ma R，Ortiz Serrano TP，Davis J，et al. The cGAS-STING pathway：the role of self-DNA sensing in inflammatory lung disease [J]. FASEB J，2020，34（10）：13156-13170.

[6] Hopfner KP，Hornung V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS-STING signalling [J]. Nat Rev Mol Cell Bio，2020，21（9）：501-521.

[7] David C，Frémond ML. Lung inflammation in STING-associated vasculopathy with onset in infancy（SAVI）[J]. Cells，2022，11（3）：318.

[8] Abe T，Harashima A，Xia T，et al. STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense [J]. Molecular Cell，2013，50（1）：5-15.

[9] Bao T，Liu J，Leng JY，et al. The cGAS-STING pathway：more than fighting against viruses and cancer [J]. Cell Bioscie，2021，11（1）：209.

[10] Konno H，Konno K，Barber GN. Cyclic dinucleotides trigger ULK1（ATG1）phosphorylation of STING to prevent sustained innate immune signaling [J]. Cell，2013，155（3）：688-698.

[11] Gao D，Li T，Li XD，et al. Activation of cyclic GMP-AMP synthase by self-DNA causes autoimmune diseases [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2015，112（42）：E5699-5705.

[12] Giordano AMS，Luciani M，Gatto F，et al. DNA damage contributes to neurotoxic inflammation in Aicardi-Goutières

syndrome astrocytes [J]. J Exp Med，2022，219（4）：20211121.
[13] Siedel H，Roers A，Rösen-Wolff A，et al. Type I interferon-independent T cell impairment in a Tmem173 N153S/WT mouse model of STING associated vasculopathy with onset in infancy（SAVI）[J]. Clin Immunol，2020，216：108466.
[14] Coke LN，Wen H，Comeau M，et al. Arg206Cys substitution in DNASE1L3 causes a defect in DNASE1L3 protein secretion that confers risk of systemic lupus erythematosus [J]. Ann Rheum Dis，2021，80（6）：782-787.
[15] Kisla Ekinci RM，Balci S，Ozcan D，et al. Monogenic lupus due to DNASE1L3 deficiency in a pediatric patient with urticarial rash，hypocomplementemia，pulmonary hemorrhage，and immune-complex glomerulonephritis [J]. Eur J Med Gene，2021，64（9）：104262.
[16] Nagata S，Kawane K. Autoinflammation by endogenous DNA [J]. Adv Immunol，2011，110：139-161.
[17] Ahn J，Gutman D，Saijo S，et al. STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2012，109（47）：19386-19391.
[18] Kato Y，Park J，Takamatsu H，et al. Apoptosis-derived membrane vesicles drive the cGAS-STING pathway and enhance type I IFN production in systemic lupus erythematosus [J]. Ann Rheum Dis，2018，77（10）：1507-1515.
[19] An J，Durcan L，Karr RM，et al. Expression of cyclic GMP-AMP synthase in patients with systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis Rheumatol，2017，69（4）：800-807.
[20] Mathavarajah S，Salsman J，Dellaire G. An emerging role for calcium signalling in innate and autoimmunity via the cGAS-STING axis [J]. Cytokine Growth Factor Rev，2019，50：43-51.
[21] Motwani M，Mcgowan J，Antonovitch J，et al. cGAS-STING pathway does not promote autoimmunity in murine models of SLE [J]. Front Immunol，2021，12：605930.
[22] Melki I，Rose Y，Uggenti C，et al. Disease-associated mutations identify a novel region in human STING necessary for the control of type I interferon signaling [J]. J Allergy Clin Immun，2017，140（2）：543-552. e5.
[23] Frémond ML，Crow YJ. STING-mediated lung inflammation and beyond [J]. J Clin Immunol，2021，41（3）：501-514.
[24] 于仲勋，钟林庆，宋红梅，等 . 干扰素基因刺激蛋白相关婴儿期起病的血管病一例 [J]. 中华儿科杂志，2018，56（3）：179-185.
[25] Bouis D，Kirstetter P，Arbogast F，et al. Severe combined immunodeficiency in stimulator of interferon genes（STING）V154M/wild-type mice [J]. J Allergy Clin Immun，2019，143（2）：712-725. e5.
[26] Konno H，Chinn IK，Hong D，et al. Pro-inflammation associated with a gain-of-function mutation（R284S）in the innate immune sensor STING [J]. Cell Rep，2018，23（4）：1112-1123.
[27] 张颖，陈超越，付妤 . cGAS-STING 信号通路在自身免疫性疾病中的研究进展 [J]. 现代免疫学，2022，42（3）：254-258.
[28] Cush JJ. Rheumatoid arthritis：early diagnosis and treatment [J]. Med Clin North Am，2021，105（2）：355-365.
[29] Wang J，Li R，Lin H，et al. Accumulation of cytosolic dsDNA contributes to fibroblast-like synoviocytes-mediated rheumatoid arthritis synovial inflammation [J]. Int Immunopharmacol，2019，76：105791.
[30] Wang Y，Su GH，Zhang F，et al. Cyclic GMP-AMP synthase is required for cell proliferation and inflammatory responses in rheumatoid arthritis synoviocytes [J]. Mediators Inflamm，2015，2015：192329.
[31] Wu SY，Zhang Q，Zhang F，et al. HER2 recruits AKT1 to disrupt STING signalling and suppress antiviral defence and antitumour immunity [J]. Nat Cell Biol，2019，21（8）：1027-1040.
[32] Vashist S，Mahajan VK，Mehta KS，et al. Association of psoriasis with autoimmune disorders：results of a pilot study [J]. Indian Dermatol Online J，2020，11（5）：753-759.
[33] Basavaraj KH，Vasu Devaraju P，Rao KS. Studies on serum 8-hydroxy guanosine（8-OHdG）as reliable biomarker for psoriasis [J]. J Eur Acid Dermatol Venereol，2013，27（5）：655-657.
[34] Yu Y，Xue X，Tang W，et al. Cytosolic DNA mediated STING-dependent inflammation contributes to the progression of psoriasis [J]. J Invest Dermatol，2022，142（3 Pt B）：898-906. e4.
[35] Pan Y，You Y，Sun L，et al. The STING antagonist H-151 ameliorates psoriasis via suppression of STING/NF-κB-mediated inflammation [J]. Br J Pharmacol，2021，178（24）：4907-4922.
[36] Li QM，Tian SR，Liang JD，et al. Therapeutic development by targeting the cGAS-STING pathway in autoimmune disease and cancer [J]. Front Pharmacol，2021，12：779425.
[37] Sun LJ，Wu JX，Du FH，et al. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway [J]. Science，2013，339（6121）：786-791.
[38] Hansen AL，Buchan GJ，Rühl M，et al. Nitro-fatty acids are formed in response to virus infection and are potent inhibitors of STING palmitoylation and signaling [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2018，115（33）：E7768-E7775.
[39] Hong Z，Mei JH，Li CH，et al. STING inhibitors target the cyclic dinucleotide binding pocket [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2021，118（24）：e2105465118.
[40] Li SL，Hong Z，Wang Z，et al. The Cyclopeptide Astin C specifically inhibits the innate immune CDN sensor STING [J]. Cell Rep，2018，25（12）：3405-3421. e7.
[41] Haag SM，Gulen MF，Reymond L，et al. Targeting STING with covalent small-molecule inhibitors [J]. Nature，2018，559（7713）：269-273.
[42] An J，Woodward JJ，Lai W，et al. Inhibition of cyclic GMP-AMP synthase using a novel antimalarial drug derivative in Trex1-deficient mice [J]. Arthritis Rheumatol，2018，70（11）：1807-1819.
[43] Gao JN，Zheng MG，Wu XY，et al. CDK inhibitor palbociclib targets STING to alleviate autoinflammation [J]. EMBO Rep，2022，23（6）：e53932.

（收稿日期：2022-06-17；修回日期：2022-08-20）

cGAS-STING 信号通路在心脏相关疾病中的作用

李新宇，李铁军*（上海大学医学院，上海　200444）

摘要：第二信使环鸟苷酸 - 腺苷酸（cGAMP）由环磷酸鸟苷 - 磷酸腺苷酸合成酶（cGAS）催化磷酸鸟苷（GMP）和磷酸腺苷（AMP）产生。cGAMP 激活干扰素基因刺激因子（STING），后者激活信号级联反应，产生Ⅰ型干扰素（IFN-Ⅰ）和其他免疫介质。最近研究证实 cGAS-STING 信号通路与心脏相关疾病密切相关，包括心力衰竭、心肌梗死、心肌炎、由肥胖引起的心脏功能障碍、心脏衰老等。在心脏损伤时，大量的损伤相关分子模式（DAMPs）分子如线粒体 DNA（mtDNA）和细胞 DNA 释放到组织细胞中，诱导 cGAS-STING 信号通路过度激活，过量的 IFN-Ⅰ信号等炎症因子加重心脏相关疾病。本文综述了 cGAS-STING 信号通路在心脏相关疾病中的作用，为心脏相关疾病的治疗研究提供新的思路。

关键词：cGAS-STING；心脏相关疾病；炎症反应
中图分类号：R54　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-1996-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.006

Role of cGAS-STING signaling pathways in heart-related diseases

LI Xin-Yu, LI Tie-Jun* (*School of Medicine*, *Shanghai University*, *Shanghai* 200444)

Abstract: The second messenger cyclic GMP-AMP (cGAMP) is generated by cyclic guanosine-adenylate synthase (cGAS) catalyzes GMP and AMP. cGAMP activates the stimulator of interferon genes (STING), which in turn activates a signaling cascade leading to the production of type Ⅰ interferons (IFN-Ⅰ) and other immune mediators. Recent studies have demonstrated that the cGAS-STING signaling pathway is closely related to heart-related diseases, including heart failure, myocardial infarction, myocarditis, obesity-induced cardiac dysfunction, cardiac aging, and so on. During heart injury, many damage-associated pattern molecules such as mitochondrial DNA and cell DNA are released into tissue cells, activating the cGAS-STING signaling pathway. When the cGAS-STING signaling pathway is over-activated, inflammatory factors such as excessive IFN-Ⅰ signals may aggravate heart-related diseases. This article reviewed the role of cGAS-STING signaling pathway in heart-related diseases, aiming to provide new ideas for the treatment of heart-related diseases.

Key words: cGAS-STING; heart-related disorder; inflammatory reaction

据统计，心脑血管系统疾病中心脏相关疾病仍是其致死的主要原因，如何降低致死率，减缓疾病进程，改善患者预后，是全球科学家们亟需攻克的医疗难题。天然免疫是机体抵御病毒、细菌以及微生物的第一道防线[1]。近年来，科学家发现天然免疫在心脏相关疾病中发挥重要作用。cGAS-STING 信号通路是一种新发现的天然免疫信号通路，它通过识别细胞质中的病毒或细菌 DNA，并与 DNA 传感器环磷酸鸟苷 - 磷酸腺苷酸合成酶（cGAS）结合而启动信号传导[2]。最近研究发现，cGAS-STING 信号通路在诸多心脏相关疾病如心力衰竭、心肌梗死、心肌炎、肥胖引起的心脏功能障碍、心脏衰老中被显著激活[3]。由此可见，cGAS-STING 信号通路的激活与心脏相关疾病的发生发展有密切的联系。为更好地了解 cGAS-STING 信号通路在心脏相关疾病中的作用，本综述就 cGAS-STING 信号通路及其抑制剂在心脏相关疾病中的研究进展进行概述。

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 81971017）。
作者简介：李新宇，男，硕士研究生，主要从事心脑血管药物作用机制研究，email：lxy02130225@163.com　*通信作者：李铁军，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事心脑血管药物作用机制研究，email：ltj204@163.com

1　cGAS-STING 信号通路

cGAS-STING 信号通路是介导天然免疫的主要信号通路之一，它可以抵御不同类型病原体的感染，包括 DNA 病毒、逆转录病毒、细菌和寄生虫等[4]，这些感染物的 DNA 分子或由感染引起宿主产生的 DNA 分子能够有效激活 cGAS-STING 信号通路，引起机体的天然免疫[2]。

然而，cGAS-STING 信号通路的作用并不局限于抗击病原体感染，自身 DNA[包括基因组和线粒体 DNA（mtDNA）] 也可以激活 cGAS-STING 信号通路[5]。越来越多的证据表明，cGAS-STING 信号通路在许多生理和病理进程中发挥着重要的作用，包括宿主抵御外界的感染、肥胖、自然衰老以及自身免疫和炎症相关疾病[6]。

2　cGAS-STING 信号通路在心脏相关疾病中的作用

在心脏相关疾病中，当 cGAS-STING 信号通路被过度激活时，可产生的大量Ⅰ型干扰素（type Ⅰ interferons，IFN-Ⅰ）、白细胞介素 6（interleukin-6，IL-6）、干扰素（interferon，IFN），从而导致心肌细胞凋亡、免疫炎性细胞浸润和细胞因子的大量产生，扩大心肌梗死面积，加重心肌炎的相关症状，引起以内皮功能障碍为特征的微血管损伤、氧化应激、心肌重塑和纤维化等病变，对相关心脏疾病产生有害影响，见图 1。cGAS-STING 信号通路被过度激活而产生的细胞因子，可能是导致心脏相关疾病中的炎症和其他病理损伤的主要诱因之一[7]。

2.1　心力衰竭（heart failure，HF）

心力衰竭是一种复杂的临床综合征，其症状表现为阵发性夜间呼吸困难、运动耐量降低、疲倦、运动后恢复时间增加以及踝关节肿胀、心输出量减少和 / 或心内压升高[8]。在非缺血性压力负荷诱导的心力衰竭小鼠中，小鼠表现为心肌肥厚、心功能不全和纤维化，同时心肌组织中 STING、α 干扰素（type α interferon，IFNα）和 β 干扰素（type β interferon，IFNβ）的表达增加。在 STING 敲除小鼠中，IFNα 和 IFNβ 表达水平恢复到基线水平，全身性和局部心脏持续性慢性低度无菌性炎症减轻，氧化应激明显减弱。新生大鼠心肌细胞经血管紧张素Ⅱ（AngⅡ）处理后，STING、IFNα 和 IFNβ 水平明显升高[9]。另一方面，心力衰竭引起的心肌肥大中，心肌细胞发生内质网（ER）应激，随后激活 STING，导致下游 TANK 结合激酶 1（TANK-binding kinase 1，TBK1）- 干扰素调节因子 3（interferon regulatory factor 3，IRF3）和核因子 -κB（nuclear factor-kappa B，NF-κB）信号通路激活，大量有生物活性的 IRF3 和 NF-κB 进入细胞核中，诱导 IFN-Ⅰ表达，促进炎性细胞因子表达[10]，表达的炎性细胞因子可进一步增强转化生长因子 -β（transforming growth factor-β，TGF-β）水平，导致心肌组织的纤维化[11]。有研究证明，cGAS-STING 信号通路在心脏的压力负荷过大诱导的心力衰竭中，心力衰竭细胞分泌的自体 DNA 参与 cGAS-STING 信号通路的传导，促进心脏的病理性重构和功能障碍，加速心力衰竭的发展[12]。

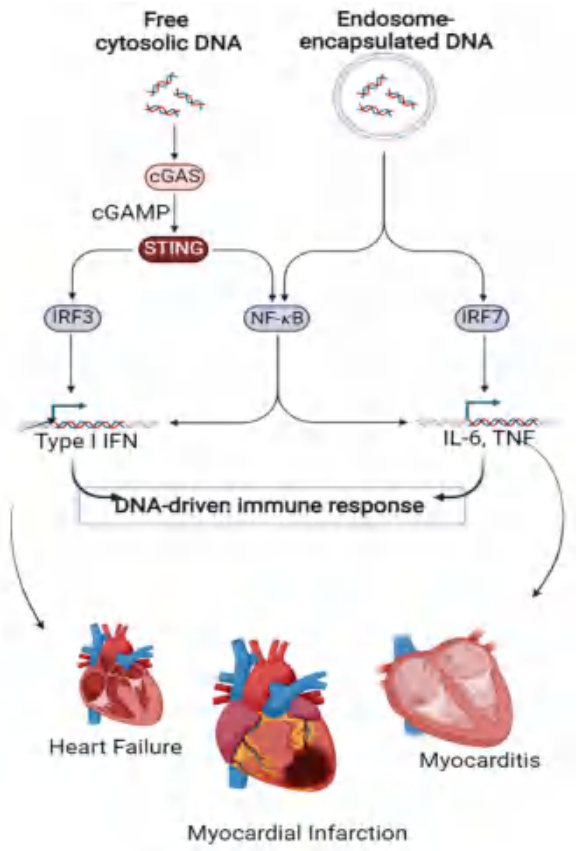

图 1　cGAS-STING 信号通路在心脏相关疾病中的作用

Fig 1　Role of cGAS-STING signaling pathways in heart-related diseases

在心力衰竭的动物模型中，受外界超负荷压力诱导，导致 cGAS-STING 信号通路激活和随后的 IFN-Ⅰ的表达增加[13]。在心力衰竭引起心肌肥厚的患者中，STING 表达也明显上调，并与巨噬细胞浸润、心肌纤维化和炎症反应增加成正相关[14]。在使用 AngⅡ处理的心肌细胞和主动脉弓缩窄术小鼠模型中，cGAS-STING 信号通路明显激活，IRF3 和 NF-κB 表达增多，这些通路和 ER 应激激活与错误折叠的蛋白质反应密切相关[15]。cGAS-STING 信号通路的抑制或失活减少了心脏肥大、纤维化、细胞凋亡，抑制了炎性细胞浸润和炎性细胞因子的产生，提高了心力衰竭实验动物的生存率。

2.2　心肌梗死（mycardiol ischemia，MI）

心肌梗死是由于冠状动脉发生急性、进行性缺血缺氧所引起的心肌细胞坏死，常并发心律失常、心源性休克或心力衰竭，常常会危及到生命[16]。心肌梗死是全球主要死亡原因之一。在心肌梗死中，大量心肌细胞死亡导致炎症反应的发生，广泛的炎症反应会进一步促进梗死灶的扩大和心肌的不良重塑。有研究表明，小鼠在心肌梗死期间，大量死亡心肌细胞释放的自身 DNA，通过 cGAS-STING 信号通路激活浸润的白细胞中的炎症反应，诱导 IFN 的产生[17]。而当使用 cGAS-STING 信号通路的抑制剂或阻断剂时，可以有效改善心脏功能，提高小鼠存活率。King 等[18]研究表明，IFN 诱导心肌细胞吞噬外源 DNA 激活 cGAS-STING 信号通路，促进 IFN-Ⅰ的产生，扩张左心室和增加心肌梗死面积，并加速外周和心肌中的炎症来减慢心肌梗死后的心脏愈合。而当抑制 cGAS-STING 信号通路时，则能有效改善小鼠的心室重构，抑制心肌梗死面积的扩大和瘢痕形成，改善左心室功能，减少 IFN-Ⅰ的产生，维持心肌功能，减少心肌纤维化，减轻心肌梗死症状[19]。这些研究证实了，抑制 cGAS-STING 信号通路的过度激活，能够显著改善心肌梗死的症状，对于心肌梗死的治疗具有重要的作用。

2.3 心肌炎

心肌炎是指以心肌炎症为特征的心脏疾病，以心肌功能不全为主要特征[20]。先天性和适应性免疫系统均参与心肌炎的发生和发展，外界感染或自身免疫反应诱发心肌炎激活了 cGAS-STING 信号通路，促进 IFN-Ⅰ的产生从而发挥抗病毒作用[21]。然而，当 cGAS-STING 信号通路被过度激活时，大量炎性细胞因子的释放会促进心肌细胞的凋亡，免疫炎性细胞的浸润，进一步加重心肌炎症。有研究证明，通过抑制 cGAS-STING 信号通路，可以降低 STING 的表达，减少 IFN-Ⅰ的产生，抑制心内膜纤维化及炎症反应[22]。因此，在心肌炎的发展过程中，使 cGAS-STING 信号通路处于适度激活状态，对控制病程、减少心肌纤维化具有积极的作用[23]。但是如何使 cGAS-STING 信号通路处于适度激活状态，既发挥抗病毒功能，又不损坏心肌组织，仍需进一步研究。

2.4 肥胖引起的心脏功能障碍

肥胖导致心脏的病变，最初表现为心脏负荷增加引起的心脏重塑，随后逐渐加重，可导致失代偿性心脏肥大和心肌收缩功能障碍[24]。由肥胖因素引起的心脏功能障碍中，氧化应激损伤、低度炎症、心肌细胞凋亡和其他形式的死亡、选择性和非选择性自噬缺陷，均与 cGAS-STING 信号通路过度激活密切相关[25]。研究表明，高脂肪饮食能够激活 cGAS-STING 信号通路，使得心脏稳态失衡，从而影响细胞自噬和线粒体自噬[26]。其中，cGAS-STING 信号通路的信号传导是免疫反应、促炎细胞因子释放和自噬诱导的关键调节因素。在肥胖患者的心肌细胞中，cGAS-STING 信号通路被激活，使得 NF-κB、TBK1 和 IRF3 的相应表达增加，从而释放 IFN-1 和诱导干扰素刺激基因（interferon-stimulated gene，ISG）的转录上调，进一步导致心脏纤维化、胰岛素抵抗和氧化应激等[27]。

2.5 心脏衰老

心脏衰老是心脏功能结构随着年龄的增长而逐步变差的过程。在老年人心脏病中常伴随舒张功能障碍和左心室肥厚，以及瓣膜钙化和纤维化引起的主动脉瓣狭窄[28]。其中血流动力学超负荷和心肌缺血是心脏衰老的关键致病因素。研究表明，血流动力学超负荷和心肌缺血会损害心脏组织包括心肌细胞、成纤维细胞和内皮细胞，导致自身 DNA 的广泛释放，通过与模式识别受体结合，激活 cGAS-STING 信号通路，诱导 STING 表达上调，IFN 的表达增加[29]。目前，cGAS-STING 信号通路已被确定为衰老相关分泌表型（senescence-associated secretory phenotype，SASP）调节剂。当自身 DNA 释放到细胞质中时，SASP 程序通过 cGAS-STING 信号通路激活[30]。衰老相关炎症反应的激活在心脏衰老中起着关键作用，所以以 cGAS-STING 信号通路作为作用靶点，可能成为一种新的干预心脏衰老的策略。

3 小结与展望

综上所述，损伤相关模式分子过度激活 cGAS-STING 信号通路，对心力衰竭、心肌梗死、心肌炎、肥胖引起的心脏功能障碍、心脏衰老等心脏相关疾病产生重要影响[31]。动物实验表明，使用 cGAS-STING 信号通道抑制剂，可减少 IFN 的产生并改善心脏功能[32]。由于心血管系统涉及全身，加上心脏相关疾病的发生机制复杂，同时 cGAS-STING 信号通道和心脏相关疾病作用的机制研究尚不全面和深入。但是，我们相信随着对 cGAS-STING 信号通道的研究深入，将为心脏相关疾病的治疗提供更多的思路，也为心血管系统疾病的治疗提供更多的作用靶点。

参考文献

[1] Kaur BP，Secord E. Innate immunity [J]. Immunol Allergy Clin North Am，2021，41（4）：535-541.

[2] Domizio JD，Gulen MF，Saidoune F，et al. The cGAS-STING pathway drives type I IFN immunopathology in COVID-19 [J]. Nature，2022，603（7899）：145-151.

[3] Oduro PK，Zheng X，Wei J，et al. The cGAS-STING signaling in cardiovascular and metabolic diseases：future novel target option for pharmacotherapy [J]. Acta Pharm Sin B，2022，12（1）：50-75.
[4] Bao T，Liu J，Leng J，et al. The cGAS-STING pathway：more than fighting against viruses and cancer [J]. Cell Biosci，2021，11（1）：209.
[5] Zhang X，Bai XC，Chen ZJ. Structures and mechanisms in the cGAS-STING innate immunity pathway [J]. Immunity，2020，53（1）：43-53.
[6] Paul BD，Snyder SH，Bohr VA. Signaling by cGAS-STING in neurodegeneration，neuroinflammation，and aging [J]. Trends Neurosci，2021，44（2）：83-96.
[7] Hu D，Cui YX，Wu MY，et al. Cytosolic DNA sensor cGAS plays an essential pathogenetic role in pressure overload-induced heart failure [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol，2020，318（6）：H1525-H1537.
[8] Borlaug BA. Evaluation and management of heart failure with preserved ejection fraction [J]. Nat Rev Cardiol，2020，17（9）：559-573.
[9] Luo W，Wang Y，Zhang L，et al. Critical role of cytosolic DNA and its sensing adaptor STING in aortic degeneration，dissection，and rupture [J]. Circulation，2020，141（1）：42-66.
[10] Moretti J，Blander JM. Detection of a vita-PAMP STINGs cells into reticulophagy [J]. Autophagy，2018，14（6）：1102-1104.
[11] Zhang Y，Chen W，Wang Y. STING is an essential regulator of heart inflammation and fibrosis in mice with pathological cardiac hypertrophy via endoplasmic reticulum（ER）stress [J]. Biomed Pharmacother，2020，125：110022.
[12] Ling S，Xu JW. NETosis as a pathogenic factor for heart failure [J]. Oxid Med Cell Longev，2021，2021：6687096.
[13] 向启中，张青海，郑昭芬 . cGAS-STING 信号通路在心血管疾病中的作用 [J]. 中国细胞生物学学报，2022，44（2）：332-340.
[14] Yan M，Li Y，Luo Q，et al. Mitochondrial damage and activation of the cytosolic DNA sensor cGAS-STING pathway lead to cardiac pyroptosis and hypertrophy in diabetic cardiomyopathy mice [J]. Cell Death Discov，2022，8（1）：258.
[15] Ding C，Song Z，Shen A，et al. Small molecules targeting the innate immune cGAS-STING-TBK1 signaling pathway [J]. Acta Pharm Sin B，2020，10（12）：2272-2298.
[16] DeFilippis AP，Chapman AR，Mills NL，et al. Assessment and treatment of patients with type 2 myocardial infarction and acute nonischemic myocardial injury [J]. Circulation，2019，140（20）：1661-1678.
[17] Rech L，Abdellatif M，Pöttler M，et al. Small molecule STING inhibition improves myocardial infarction remodeling [J]. Life Sci，2022，291：120263.
[18] King KR，Aguirre AD，Ye YX，et al. IRF3 and type I interferons fuel a fatal response to myocardial infarction [J]. Nat Med，2017，23（12）：1481-1487.
[19] 代帅 . 蛋白激酶 TBK1/IKK-ε 抑制剂氨来占诺可改善小鼠急性心肌梗死后心功能 [D]. 济南：山东大学，2019.
[20] Moslehi J，Lichtman AH，Sharpe AH，et al. Immune checkpoint inhibitor-associated myocarditis：manifestations and mechanisms [J]. J Clin Invest，2021，131（5）：e145186.
[21] An J，Woodward JJ，Lai W et al. Inhibition of cyclic GMP-AMP synthase using a novel antimalarial drug derivative in trex1-deficient mice [J]. Arthritis Rheumatol，2018，70（11）：1807-1819.
[22] Motwani M，Pesiridis S，Fitzgerald KA. DNA sensing by the cGAS-STING pathway in health and disease [J]. Nat Rev Genet，2019，20（11）：657-674.
[23] Hu S，Gao Y，Gao R，et al. The selective STING inhibitor H-151 preserves myocardial function and ameliorates cardiac fibrosis in murine myocardial infarction [J]. Int Immunopharmacol，2022，107：108658.
[24] daSilva-deAbreu A，Alhafez BA，Lavie CJ，et al. Interactions of hypertension，obesity，left ventricular hypertrophy，and heart failure [J]. Curr Opin Cardiol，2021，36（4）：453-460.
[25] Qiao JT，Cui C，Qing L，et al. Activation of the STING-IRF3 pathway promotes hepatocyte inflammation，apoptosis and induces metabolic disorders in nonalcoholic fatty liver disease [J]. Metabolism，2018，81：13-24.
[26] Mao Y，Luo W，Zhang L，et al. STING-IRF3 triggers endothelial inflammation in response to free fatty acid-induced mitochondrial damage in diet-induced obesity [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol，2017，37（5）：920-929.
[27] Bai J，Liu F. The cGAS-cGAMP-STING pathway：a molecular link between immunity and metabolism [J]. Diabetes，2019，68（6）：1099-1108.
[28] Shirakabe A，Ikeda Y，Sciarretta S，et al. Aging and autophagy in the heart [J]. Circ Res，2016，118（10）：1563-1576.
[29] Uryga AK，Grootaert MOJ，Garrido AM，et al. Telomere damage promotes vascular smooth muscle cell senescence and immune cell recruitment after vessel injury [J]. Commun Biol，2021，4（1）：611.
[30] Glück S，Guey B，Gulen MF，et al. Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence [J]. Nat Cell Biol，2017，19（9）：1061-1070.
[31] Rech L，Rainer PP. The innate immune cGAS-STING-pathway in cardiovascular diseases-a mini review [J]. Front Cardiovasc Med，2021，8：715903.
[32] Li N，Zhou H，Wu H，et al. STING-IRF3 contributes to lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction，inflammation，apoptosis and pyroptosis by activating NLRP3 [J]. Redox Biol，2019，24：101215.

（收稿日期：2022-07-08；修回日期：2022-09-02）

传统中药的现代化研究进展专题

【编者按】

传统中药理论多是基于口传心授的经验总结，缺少可以量化的标准，严重影响到中药理论的传承与发展，因此，亟需采用现代技术对传统中药理论的若干关键问题开展研究。有鉴于此，本专题综述了中药配方颗粒研发工艺、质量标准及相关法规，并对其口感问题，溶解性差以及配方颗粒与传统汤剂的药效一致性问题进行分析讨论；总结归纳了经典名方“半夏厚朴汤”的历史沿革、处方配伍、化学成分、现代药理学研究等方面进展，为经典名方的现代化制剂研究提供参考。并以具体品种为例，详细讨论了古法所述“九蒸九晒”的概念以及现代中药工业化炮制过程中“九蒸九晒”的应用；以期为类似主题的研究提供借鉴。

【专题主持人】

李文龙，男，博士，先后在浙江大学、Duquesne University、北京大学从事博士后研究工作。现任天津中医药大学副研究员，博士研究生导师。长期从事中药质量控制和中药制药工艺研究，发表论文 100 多篇，其中 SCI 收录 40 余篇，申报专利 10 余项。主持中药标准化项目等课题 30 余项。曾获山东省科技进步奖、浙江省药学会医药科技奖、陆婉珍近红外光谱奖青年奖。参与编写《电感耦合等离子体质谱应用实例》《新编中国药材学》《中药制药工艺学》等专著、教材 3 部。目前担任中华中医药学会炮制分会委员、中药制药工程分会委员兼副秘书长；中国仪器仪表学会药物质量分析与过程控制分会理事；中国颗粒学会青年理事、生物颗粒专委会委员；中国中药协会中药智能制造专业委员会专家委员；担任《中南药学》《中国实验方剂学杂志》《中草药》等期刊编委、青年编委。

经典名方半夏厚朴汤研究进展

王龙[1, 2]，高鑫[1, 2]，郭栩廷[1]，钟淑梅[3]，吴卫刚[3]，李元祥[4]，李文龙[1, 2*]（1. 天津中医药大学 中药制药工程学院，天津　301617；2. 组分中药国家重点实验室，天津　301617；3. 九信（武汉）中药研究院有限公司，武汉　430050；4. 怀化学院 化学与材料学院，湖南　怀化　418008）

摘要：半夏厚朴汤由半夏、厚朴、苏叶、茯苓、生姜五味药物组成，是用于治疗痰气交阻所致“梅核气”的经典名方。其行气降逆、宜通郁结、化痰祛饮功效显著，已收录于《古代经典名方目录（第一批）》中。现代研究表明半夏厚朴汤具有抗抑郁、镇静催眠、镇呕止吐、改善肠胃等多种药理学作用，临床应用大多通过加减或联合化学药物改善胃肠功能、慢性咽炎、咽喉炎、慢性阻塞性肺疾病、甲状腺结节、抑郁症等疾病。本文通过查阅文献，总结归纳半夏厚朴汤的历史沿革、处方配伍、化学成分、现代药理学研究等方面的研究进展，以期为半夏厚朴汤的现代化制剂研究提供理论参考。

关键词：经典名方；半夏厚朴汤；历史沿革；药理作用；临床应用

中图分类号：R286　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2000-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.007

基金项目：国家重点研发计划中医药现代化专项（No.2019YFC1711500）；河北省产业创新创业团队（No.215A2501D）。

作者简介：王龙，男，硕士研究生，主要从事经典名方开发和质量控制研究，email：iam7890@163.com　*通信作者：李文龙，男，副研究员，博士研究生导师，主要从事中药质量控制技术研究，email：wshlwl@tjutcm.edu.cn

Research progress in classic prescription Banxia Houpu decoction

WANG Long[1, 2], GAO-Xin[1, 2], GUO Xu-ting[1], ZHONG Shu-mei[3], WU Wei-gang[3], LI Yuan-xiang[4], LI Wen-long[1, 2*] (1. *College of Pharmaceutical Engineering of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617; 2. *State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617; 3. *Jiuxin* (*Wuhan*) *Institute of Traditional Chinese Medicine Co*., *Ltd*., *Wuhan* 430050; 4. *School of Chemistry and Materials Engineering*, *Huaihua University*, *Huaihua Hunan* 418008)

Abstract: Banxia Houpu decoction is composed of five medicinal materials: Pinelliae Rhizoma, Magnoliae Officinalis Cortex, Perillae Folium, Poria and Zingiberis Rhizoma Recens. It is a classic prescription for "plum pneumonia". Due to obvious effect of promoting the circulation of stagnant knots and resolving phlegm, it has been included in the "Catalogue of Ancient Classics (First Batch)". Modern studies have shown that Banxia Houpu decoction has various pharmacological effects such as antidepressant, sedative and hypnotic, anti-vomiting and antiemetic effect, and can improve the function of the gastrointestinal system. Now it is commonly used for improving the gastrointestinal function, chronic pharyngitis, laryngitis, chronic obstructive pulmonary disease, thyroid nodules, and depressive disorder as modified prescription or combined use with other drugs, consistent with the clinical application in ancient times. This paper reviewed the literatures and summarized the historical evolution, compatibility, chemical composition, modern pharmacological research and clinical application of Banxia Houpu decoction to provide theoretical reference for its modernized formulation research.

Key words: classic prescription; Banxia Houpu decoction; historical evolution; pharmacology research; clinical application

古代经典名方是指至今仍广泛应用、疗效确切、具有特色与优势的古代中医典籍所记载的方剂[1]。2018 年，国家中医药管理局同国家药品监督管理局正式发布《古代经典名方目录（第一批）》（以下简称《目录》）；同年 6 月，国家药品监督管理局发布《古代经典名方中药复方制剂简化注册审批管理规定》（以下简称《管理规定》）。《目录》与《管理规定》的发布对中药古代经典名方开发具有里程碑意义[2]，极大地激发了科研院所、制药企业对经典名方的研发热情。

半夏厚朴汤是《目录》100 首经典名方之一，出自汉代张仲景所著的《金匮要略》，由半夏、厚朴、茯苓、苏叶、生姜五味中药组成，其中半夏为君药，厚朴为臣药，茯苓、生姜、苏叶为佐药，全方具有行气解郁、降逆化痰的功效。在中医临床上，半夏厚朴汤常用于痰气凝结所致"梅核气"的治疗[3]，临床常通过加减或联合化学药物改善胃肠功能、慢性咽炎、咽喉炎、慢性阻塞性肺疾病、甲状腺结节、抑郁症等疾病[4-6]。现代药理学研究表明，半夏厚朴汤具有镇呕止吐、抑制炎症反应、抑制胃酸、抑制胃肠道平滑肌痉挛、调节超氧化物歧化酶水平等作用[7-11]。通过文献检索发现，关于半夏厚朴汤临床应用文献较多，但其物质基础及质量控制研究鲜有报道，为了该经典名方现代制剂的开发，以更安全有效发挥临床作用，本文检索分析了古今文献，从历史沿革、处方分析、化学成分研究及现代药理学研究进行综述，以期为半夏厚朴汤的现代制剂开发提供参考。

1 历史沿革

半夏厚朴汤又名厚朴汤、四七汤和大七气汤[12]，其历史沿革见表 1。半夏厚朴汤最早记载于汉代张仲景所著《金匮要略·妇人杂病脉证并治第二十二》："妇人咽中如有炙脔，半夏厚朴汤主之"[13]。原处方组成及用量制法记载：半夏（一升）、厚朴（三两）、茯苓（四两）、生姜（五两）、干苏叶（二两），上五味，以水七升，煮取四升，分温四服，日三夜一服[13]。后世医家常沿用此方或加减使用。经检索古籍文献分析发现，半夏厚朴汤在处方名称、药味组成、用法用量上有变化，处方功效主治以行气解郁、降逆化痰为主，用于治疗痰气凝结所致的"梅核气"。如孙思邈的《千金翼方》[14] 中记载的半夏汤相比于原方减少了苏

叶，但增加了降气散满的厚朴用量，治疗部位增至心胸。值得注意的是，李东垣《兰室秘藏》[15]所记载的半夏厚朴汤与原方为同名异方，该方增加了温中散寒的吴茱萸、肉桂及破气的青皮、清热的黄芩等药材，主治翻胃吐痰，胸满肋痛，嘈杂吐涎。厚朴汤首见于宋代宋徽宗赵佶编纂的《圣济总录》[16]，其处方与主治均未改变。而宋代陈师文主持撰写的《太平惠民和剂局方》中四七汤增添一味大枣，功在“补中养脾，调和百药”[19]。陈言所著的《三因极一病证方论》中大七气汤[17]，处方组成并未改变，但功能主治增加了“脏气不平，憎寒发热，心腹胀满，傍冲两胁”。

表 1　半夏厚朴汤历史沿革

Tab 1　Historical evolution of Banxia Houpu decoction

朝代	作者	书名	方名	原方组成	用法	功效主治
汉	张仲景	《金匮要略方论》[13]	半夏厚朴汤	半夏（一升）、厚朴（三两）、茯苓（四两）、生姜（五两）、干苏叶（二两）	上五味，以水七升，煮取四升，分温四服，日三夜一服	妇人咽中如有炙脔
唐	孙思邈	《千金翼方》[14]	半夏汤	半夏（一升，汤洗）、生姜（五两）、茯苓（四两）、厚朴（四两）	右四味㕮咀，以水六升煮取三升，分三服	妇人胸满，心下坚，咽中帖帖，如有炙脔，咽之不下，吐之不出
唐	孙思邈	《备急千金要方》[18]	半夏厚朴汤	半夏（一升）、厚朴（三两）、茯苓（四两）、生姜（五两）、干苏叶（二两）	右五味㕮咀，以水七升煮取四升，分四服，日三夜一	妇人胸满，心下坚，咽中帖帖，如有炙肉脔，咽之不下
金	李东垣	《兰室秘藏》[15]	半夏厚朴汤	红花、苏木（各半分）、吴茱萸、干生姜、黄连（各一分）、木香、青皮（各二分）、肉桂、苍术、白茯苓、泽泻、柴胡、陈皮、生黄芩、草豆蔻仁、生甘草（各三分）、京三棱、当归梢、猪苓、升麻（各四分）、神曲（六分）、厚朴（八分）、半夏（一钱）、桃仁（七个）、昆布（少许）	上㕮咀，作一服，水三盏，煎至一盏，去渣，稍热服	翻胃吐痰，胸满肋痛，嘈杂吐涎
宋	赵佶	《圣济总录》[16]	厚朴汤	半夏（一升）、厚朴（三两）、茯苓（四两）、生姜（五两）、干苏叶（二两）	上五味，以水七升，煮取四升，分温四服，日三夜一服	妇人咽中如有炙脔
宋	陈师文	《太平惠民和剂局方》[19]	四七汤	紫苏叶（二两）、厚朴（三两）、茯苓（四两）、半夏（五两）、姜（七片）、大枣（一枚）	上㕮咀。每服四钱，水盏半，煎至六分，去滓，热服，不拘时候	喜、怒、悲、思、忧、恐、惊之气，结成痰涎，状如破絮，或如梅核，在咽喉之间，咳不出，咽不下
宋	陈言	《三因极一病证方论》[17]	大七气汤	半夏（五两）、白茯苓（四两）、厚朴（三两）、紫苏（二两）、姜（七片）	上剉散。每服四钱，水盏半，去滓，食前服	喜怒不节，忧思兼并，多生悲恐，或时振惊，致脏气不平，憎寒发热，心腹胀满，傍冲两胁，上塞咽喉，有如炙脔，吞咽不下，皆七气所生

2　处方组成分析

2.1　*君药*

半夏厚朴汤中半夏性味辛温，入脾、胃、肺经，功能燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结[20]，为方中君药。晋代葛洪所著《肘后备急方》中记载[21]“凡用半夏，皆汤洗五六度，去滑”。南北朝时期陶弘景所著《本草经集注》中也有所记载[22]：“半夏有毒，用之必须生姜，此是取其所畏，以相制而”。可见半夏需与生姜炮制后方可使用，以减少毒性。而现代临床常用半夏不同炮制品，如清半夏、姜半夏、法半夏[23]。由于其炮制方法、辅料不同，其功能主治也存在差异。李陆杰等[24]认为经典名方中半夏使用何种炮制品应根据处方临床主治进行选择，如半夏厚朴汤主治“梅核气”，由痰气凝结所致，方中半夏化痰，厚朴降逆气，故应使用姜半夏，增强其温中化痰、降逆止呕之功效。

2.2　*臣药*

厚朴性味苦、辛、温，入脾、胃、肺、大肠经，功能燥湿消痰、下气除满[24]，为方中臣药。厚朴首次记载于《神农本草经》：“厚朴，味苦温，治中风伤寒头痛，寒热惊气，血痹死肌，去三虫”。其性味与现代相近，但主治相差较大，《神农本草经》所记载主治更偏向解表，现所用功效是理气化湿。厚朴炮制方法首见于《神农本草经辑注》[25]：“用之削去上甲错皮”，即除去粗皮。后来出现了姜厚朴的炮制品，其炮制方法于《中国药典》中均有规定。对于使用何种炮制品，钱锦秀等[26]认为经典名方中厚朴的选择应结合炮制变迁以及药物发挥作用来综合

确定。李煜等[27]认为半夏厚朴汤没有明确标注其所用炮制品，但根据其功效，应选择“姜厚朴”。

2.3 佐药

茯苓性味甘、淡、平，归心、肺、脾、肾经，功能利水渗湿，健脾宁心。紫苏叶性味辛、温，归肺、脾经，有解表散寒、行气和胃之功效。生姜性味辛、温，功能温中止呕，止咳化痰，解表散寒，为“止呕要药”。三者共为佐药，生姜助正驱邪，增强其止呕化痰之功效；茯苓渗湿，助其消痰；紫苏叶之辛香，散其郁气。

纵观全方，《医宗金鉴》：“半夏、厚朴、生姜，辛以散结，苦以降逆，茯苓佐半夏，以利饮行涎，紫苏芳香，以宣通郁气，俾气舒涎去，病自愈矣”。

2.4 剂量及制法

“中医不传之秘在于量”，方剂是否有效在于剂量[28]。目前关于半夏厚朴汤剂量的争议在于一两等于 13.8 g 还是 3 g[29-30]。施铮等[31]基于系统评价，以临床疗效为指标，考察当下临床剂量折算下半夏厚朴汤的有效性，发现一两等于 3 g 有效性较好。李煜等[27]统计近 10 年半夏厚朴汤的文献，得到半夏平均使用量为 12.5 g，厚朴为 11.6 g，紫苏叶为 9.9 g，茯苓为 15.6 g，基本符合一两等于 3 g 的换算制度。笔者认为，半夏厚朴汤应以目前主流一两等于 3 g 换算，即姜半夏 15 g，厚朴 9 g，紫苏叶 6 g，生姜 15 g，茯苓 12 g。

关于水量，汉代一升等于现代 200 mL[32]，即制法为上述五味药材加 1400 mL 水，煎煮至 800 mL。

3 化学成分研究

目前，关于半夏厚朴汤药理作用及临床应用较多，对于化学成分多集中在各单味药材，但其全方化学成分研究较少。半夏具有燥湿化痰、降逆止呕等功效，中医临床常用于治疗咳喘痰多、呕吐等疾病[33]，其所含化学成分主要包括生物碱类、多糖、挥发油、有机酸、半夏蛋白、氨基酸以及微量元素等[33-36]，总有机酸、生物碱、多糖等大类成分可能为其活性成分[37]，但其中草酸钙针晶、凝集素蛋白以及溶血磷脂酰胆碱类化合物可能为毒性成分[38]。对于其炮制品，相较于生品，生物碱、氨基酸、蛋白质以及糖类含量有所下降[22，39]，法半夏中未见有溶血磷脂酰胆碱类物质，可能是炮制后毒性降低的原因之一[40]。

厚朴主产于我国云贵地区[41]，具有燥湿消痰、下气除满之功效，化学物质丰富，目前已发现多种活性成分，主要有苯丙素和木脂素类、挥发油、苷类、黄酮类和生物碱等[42-45]，其中厚朴酚、和厚朴酚等脂溶性成分含量较高，2020 年版《中国药典》也将其作为控制厚朴药材质量的指标成分。已有研究表明，厚朴酚具有改善海马体受损，调节神经营养因子[46]，调节 5- 羟色胺、下丘脑 - 垂体 - 肾上腺素轴等作用。

茯苓是中医临床应用最广泛的中药之一，有“十方九苓”之说[47]，根据其用药部位不同可分为茯苓、茯苓皮、茯神等。现代药理研究表明，茯苓具有抗肿瘤、利尿、抗氧化、抗炎等生物活性[48-50]，以三萜类及多糖为主要活性物质[51-55]，除此之外还有甾醇类、挥发油以及氨基酸类化合物[56-59]。茯苓中硫酸茯苓多糖可以缓解海马神经元损伤，调节神经营养因子水平，发挥抗抑郁作用[60]。紫苏叶有较高的食用及药用价值，现代药理学研究表明紫苏叶有抗炎、抑制炎症因子释放、抑菌、调节免疫等作用[61-64]，其富含多种活性物质，如挥发油、黄酮、酚酸、三萜等化合物[65-68]。目前有研究发现，紫苏中紫苏醛可以调节细胞因子，改善脂多糖诱导的小鼠抑郁样行为[69]；其迷迭香酸可以促进海马齿状回细胞增殖，进而减轻抑郁小鼠的症状[70]。生姜同为药食两用的药材，具有温中止呕、止咳化痰等功效，被称为“呕家圣药”，其挥发油、姜辣素成分含量最高，是主要的活性物质[71-72]，具有抗炎、抗菌、抗氧化等药理作用[73-76]。目前，有研究人员发现生姜中姜黄素可以降低促炎细胞因子、调节 5- 羟色胺、血清皮质酮水平，继而发挥抗抑郁等作用[77-78]。

4 现代药理学研究

《古代经典名方中药复方制剂申报资料要求》中规定需提交非临床安全性研究资料，故其现代药理作用对经典名方开发有重要意义，目前关于半夏厚朴汤药理作用集中在镇静催眠、抗抑郁、镇呕止吐、改善肠胃等方面。

4.1 镇静催眠

失眠是当前第二常见的精神类疾病，失眠的症状表现为频繁而持续的入睡困难和睡眠维持困难并导致睡眠感不满意，可以分为入睡困难（difficulty initiating sleep，DIS）、维持睡眠困难（difficulty maintaining sleep，DMS）和清醒困难（early morning awakening，EMA）[79]。尤其在新型冠状病毒疫情全球流行的当下，社会、工作以及休闲娱乐均产生了前所未有的变化，对当下人们睡眠和心理健康都造成了重大影响[80]。Xu 等[81]招募了 125 名新型冠状病毒肺炎康复患者，对其进行心理状态检测，发现 26.45% 的患者在康复后存在失

眠情况。目前，关于失眠机制研究主要分为以下几种：① 下丘脑 - 垂体 - 肾上腺素轴功能失调，具体表现为促肾上腺释放激素和皮质素分泌增加，从而影响睡眠 [82]；② 迷走神经张力变化；③ 褪黑激素系统功能下降；④ 炎症因子水平升高；⑤ 中枢神经递质紊乱 [83]。沈淑洁等 [84] 基于 ^{1}H-NMR 技术对半夏厚朴汤进行代谢组学研究，通过对比大鼠尿液和血清内源性代谢产物，表明半夏厚朴汤与戊巴比妥钠有类似的镇静催眠作用，并推测半夏厚朴汤镇静催眠作用可能是通过调节谷氨酰胺等含量，以减轻脑内神经兴奋性从而起到调整睡眠的作用。刘文瑜等 [85] 运用半夏厚朴汤加减联合黛力新治疗思虑过度型失眠症患者 25 例，结果显示联合半夏厚朴汤改善睡眠质量、思虑过度的效果更好。

4.2 抗抑郁

抑郁症是一种常见的精神障碍性疾病，主要表现为情绪低落、思维迟缓、身体疲劳、丧失兴趣、存在自残或自杀倾向或行为 [86]。目前，半夏厚朴汤已经用于治疗胃癌术后抑郁症、产后抑郁症、青年抑郁症和卒中后抑郁症等多种抑郁症类型 [87]。现代研究表明，半夏厚朴汤可通过多种途径减轻抑郁症状，如抑制神经炎症反应、神经保护、促进脑源性神经营养因子分泌表达、调节神经递质及减轻氧化应激等 [88-92]。苏慧琳等 [93] 建立脂多糖诱导小胶质细胞炎症模型，发现半夏厚朴汤可以通过调控 Akt/NF-κB/JAK2/SAT3 信号通路显著降低 NO、TNF-α、IL-1β、iNOS 含量，升高 IL-4、IL-10 的含量，同时抑制 LPS-DMEM 引起的 SH-SY5Y 细胞的凋亡。高宗等 [94] 通过建立卒中后抑郁大鼠模型，以大鼠体质量、水平运动得分、TNF-α、IL-1β、IL-18 水平等为评价指标，发现半夏厚朴可改善卒中后抑郁大鼠的抑郁症状，其机制可能与促进细胞因子分泌有关。刘作龙等 [95] 采用分子对接技术结合 LC-MS/MS 筛选预测出半夏厚朴汤中 25 种化合物可通过抑制 PDE4 蛋白发挥抗抑郁作用，并通过 LC-MS 联用技术从不同方法提取的半夏厚朴汤中检测出 5 个潜在有效成分。

4.3 镇呕止吐

呕吐是一种复杂的反应，现代临床将其引发途径分为五种 [96]，中医临床则认为是胃失和降、胃气上逆所致 [97]。其机制可能与抑制呕吐中枢兴奋并抑制胃肠道平滑肌痉挛相关。黄世文等 [98] 以顺铂为模型药物建立化疗呕吐家兔模型，发现半夏厚朴汤高剂量组能有效延长呕吐潜伏时间，其止吐作用可能与抑制胃泌素分泌以及促进表皮生长因子有关。除此之外，半夏厚朴汤加减对晨起干呕 [7]、妊娠呕吐 [99] 均有治疗效果。对于单味药物，半夏中所含的生物碱、半夏蛋白以及多糖都具有止呕活性，其作用机制与中枢抑制有关。方中生姜广泛用于治疗恶心、呕吐，已有研究发现其可通过多种途径用于治疗肿瘤化疗恶心与呕吐 [100]。

4.4 改善肠胃

研究表明，半夏厚朴汤常用于治疗胃食管反流病、咽喉反流性疾病、慢性浅表性胃炎、胆汁反流性胃炎等上消化道疾病 [101]。吴建平等 [102] 研究了半夏厚朴汤治疗功能性消化不良，证明半夏厚朴汤与氟西汀抗抑郁效果相似，且有促进胃排空和消除蠕动的效果。陶双友等 [103] 研究了西药铝酸镁和半夏厚朴汤的中西结合治疗功能性消化不良的效果，将多种不同作用机制的药物结合使用，铝酸镁可与胃酸结合，而半夏厚朴汤可激活胆碱能神经元从而释放乙酰胆碱，增强胃排空。半夏厚朴汤的中西医结合在治疗胆汁反流性胃炎有显著疗效。马朋杰等 [104] 基于 Cajal 间质细胞观察了加减半夏厚朴汤对腰椎骨折后大鼠胃肠动力的影响，发现半夏厚朴汤加减可促进空肠组织表达 c-kit 蛋白，以增强胃肠排空能力。

4.5 其他药理作用

半夏厚朴汤经过加减还可治疗假性球麻痹吞咽困难 [105]、反流性咽喉炎 [106-107] 和阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征 [108]。有研究发现，半夏厚朴汤可通过刺激神经肽神经，改善声音嘶哑、喉咙和食道异物感以及吞咽反射障碍 [109]。近年来，有学者研究发现半夏厚朴汤对痰湿阻肺型慢性阻塞性肺疾病有治疗作用，其可以有效抑制炎症反应，改善肺功能 [110]。

5 总结与展望

近年来，失眠、抑郁等问题愈发严重，半夏厚朴汤除了主治“梅核气”之外，当前主要用于抑郁症的治疗，且疗效显著，因此，该方有很高的开发价值。目前，有研究发现肠道微生物群可能通过肠 - 脑轴在情绪调节和情绪处理中发挥作用，与焦虑和抑郁的病因特别相关 [111]。同时，半夏厚朴汤在调节肠胃功能方面发挥很大作用，因此其是否存在通过调节肠道微生物菌群进而改善抑郁症状的作用机制，值得深入研究。

质量控制是保证药品一致性的关键，也是保证有效性的前提。经检索文献，关于半夏厚朴汤质量控制、药效物质基础研究鲜有报道，目前对于半夏厚朴汤质量控制停留在多成分含量测定以及工艺考察方面 [112-113]。其次，半夏、茯苓的质量控制方

法仍不完善，其现代制剂开发过程中，如何保持与原方药效一致是一个值得思考的问题。Wang 等[114]通过指标成分含量测定及抗痉挛活性比较，研究了半夏厚朴汤颗粒与传统汤剂的一致性，发现标准颗粒与传统汤剂相比，其质量标志物含量以及解痉活性均存在差异。刘昌孝院士提出的“物质 - 药代 - 功效”关联的中药开发思路可以有效解决药效物质基础不清楚、体内作用机制不明确等关键问题[115]，以指导经典名方开发研究。

参考文献

[1] 国家药监局关于发布《中药注册分类及申报资料要求》的通告（2020 年第 68 号）[EB/OL]. https：//www. nmpa. gov. cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20200928164311143. html.（2020-09-28）.

[2] 杨洪军，黄璐琦 . 经典名方的研发——中医药传承发展的突破口之一 [J]. 中国现代中药，2018，20（7）：775-779.

[3] 刘忠文 . 从半夏厚朴汤治疗梅核气讨论其运用扩展 [J]. 中国中医基础医学杂志，2015，21（2）：192-194.

[4] 温桂荣 . 半夏厚朴汤治疗杂病探微 [J]. 中华中医药杂志，2014，29（4）：1143-1145.

[5] 黄仕文，樊巧玲，袁冬平，等 . 半夏厚朴汤实验及临床研究 [J]. 中医药信息，2009，26（5）：79-82.

[6] 丁德正 . 半夏厚朴汤治疗精神疾病举隅 [J]. 中华中医药杂志，2013，28（12）：3597-3599.

[7] 陈昊，王伟明 . 半夏厚朴汤加减治疗晨起干呕的临床经验 [J]. 中国民族民间医药，2015，24（7）：164，167.

[8] 陈世旺，田旭东 . 半夏厚朴汤治疗胃食管反流病的 Meta 分析 [J]. 中国临床研究，2014，27（9）：1080-1082.

[9] 肖琳，李岩 . 加减半夏厚朴汤治疗伴心理因素功能性消化不良随机对照研究 [J]. 中国中西医结合杂志，2013，33（3）：298-302.

[10] 黄跃康 . 半夏厚朴汤加味治疗慢性浅表性胃炎 60 例 [J]. 实用中医药杂志，2010，26（3）：163.

[11] 黄世敬，陈宇霞，张颖 . 厚朴治疗抑郁症及抗抑郁机理探讨 [J]. 世界中西医结合杂志，2015，10（7）：1023-1026.

[12] 陈朝阳，韩新民 . 半夏厚朴汤研究进展 [J]. 河南中医，2021，41（6）：848-853.

[13] 张仲景 . 金匮要略方论 [M]. 北京：人民卫生出版，2012：87.

[14] 孙思邈 . 千金翼方 [M]. 北京：人民卫生出版社，1955：256.

[15] 李东恒 . 兰室秘藏 [M]. 北京：人民卫生出版社，2005：19.

[16] 赵佶 . 圣济总录 [M]. 北京：人民卫生出版社，2013：1427.

[17] 陈言 . 三因极一病证方论 [M]. 北京：人民卫生出版社，1957：107.

[18] 孙思邈 . 备急千金要方 [M]. 北京：中国医药科技出版社，2011：50.

[19] 刘景源 . 太平惠民和剂局方 [M]. 北京：人民卫生出版社，2007：16.

[20] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：123.

[21] 沈澎晨 . 肘后备急方校注 [M]. 北京：人民卫生出版社，2016：10.

[22] 陶弘景 . 本草经集注 [M]. 北京：人民卫生出版社，1994：354.

[23] 袁海建，贾晓斌，印文静，等 . 炮制对半夏毒性成分影响及解毒机制研究报道分析 [J]. 中国中药杂志，2016，41（23）：4462-4468.

[24] 李陆杰，陈仁寿，施铮，等 . 经典名方中半夏炮制品的使用刍议 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（7）：1-7.

[25] 马继兴 . 神农本草经辑注 [M]. 北京：人民卫生出版社，1995：270.

[26] 钱锦秀，孟武威，刘晖晖，等 . 经典名方中厚朴的本草考证 [J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28（10）：306-317.

[27] 李煜，陈仁寿，李陆杰，等 . 经典名方半夏厚朴汤的古代文献分析与考证 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（18）：8-17.

[28] 刘艳，邸继鹏，郭丛，等 . 经典名方复方制剂开发热的冷思考 [J]. 中国实验方剂学杂志，2022：1-5. DOI：10. 13422/j. cnki. syfjx. 20220552.

[29] 傅延龄，宋佳，张林 . 论张仲景对方药的计量只能用东汉官制 [J]. 北京中医药大学学报，2013，36（6）：365-369.

[30] 陈畅，程锦堂，刘安 . 经典名方研发策略 [J]. 中国中药杂志，2017，42（9）：1814-1818.

[31] 施铮，陈仁寿，韩江，等 . 基于系统评价的半夏厚朴汤剂量折算验证 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（6）：178-184.

[32] 邱隆 . 中国历代度量衡单位量值表及说明 [J]. 中国计量，2006（10）：46-48，76.

[33] 王依明，王秋红 . 半夏的化学成分，药理作用及毒性研究进展 [J]. 中国药房，2020，31（21）：2676-2682.

[34] 袁海建，李国银，姜俊，等 . 半夏 - 厚朴药对抗肿瘤功效物质基础及作用机制研究新思路 [J]. 中草药，2018，49（8）：1924-1931.

[35] 杨冰月，李敏，敬勇，等 . 半夏及其炮制品化学成分及功效的差异研究 [J]. 中草药，2018，49（18）：4349-4355.

[36] 郝鹏飞，吴琼，张超云，等 . 超高效液相 - 质谱联用测定不同产地半夏中 10 种成分含量及质控指标筛选 [J]. 中国医院药学杂志，2021，41（1）：46-51，62.

[37] 赵丽，张成，潘倩倩，等 . 半夏的化学成分和药理活性的研究 [J]. 广州化工，2022，50（8）：15-17，26.

[38] 翟兴英，张凌，李冰涛，等 . 采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析半夏药材中的化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（7）：173-183.

[39] 张跃进，孟祥海，许玲，等 . 不同炮制方法对半夏化学成分含量的影响研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2008，14（12）：21-23.

[40] 崔美娜，钟凌云，兰泽伦，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析多物料多流程炮制对半夏化学成分的影响 [J]. 中草药，2021，52（24）：7428-7437.

[41] 刘芳，李奇娟，刘巧，等 . 基于 LC-TOF-MS 分析不同品种和产地厚朴中化学成分的轮廓差异 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（10）：121-126.

[42] 荆文光，杜杰，王继永，等 . 厚朴化学成分研究进展 [J]. 中国现代中药，2018，20（6）：764-774.
[43] 顾宁宁，王玉龙，陈志明，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 与 HPLC 对厚朴进行成分分析及含量测定 [J]. 现代中药研究与实践，2018，32（1）：10-12，16.
[44] 赵慧，严颖，邹立思，等 . 基于 UPLC-Triple TOF-MS/MS 技术分析厚朴化学成分 [J]. 中国药学杂志，2017，52（20）：1824-1831.
[45] 卓越，王建农，邹本良，等 . 厚朴水溶性成分分离 [J]. 中国实验方剂学杂志，2015，21（9）：39-41.
[46] Mantsui N，Akae H，Hirashima N，et al. Magnolol enhances hippocampal neurogenesis and exerts antidepressant-like effects in olfactory bulbectomized mice [J]. Phytother Res，2016，30（11）：1856-1861.
[47] 李慧敏，贺凯，郑慧，等 . 中医药健脾的保健作用机制及药食资源 [J]. 中草药，2020，51（3）：780-787.
[48] 张年，李兆星，李娟，等 . 茯苓的化学成分与生物活性研究进展 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2019，21（2）：220-233.
[49] 崔鹤蓉，王睿林，郭文博，等 . 茯苓的化学成分，药理作用及临床应用研究进展 [J]. 西北药学杂志，2019，34（5）：694-700.
[50] 徐硕，姜文清，邝咏梅，等 . 茯苓的化学成分及生物活性研究进展 [J]. 西北药学杂志，2016，31（3）：327-330.
[51] 张超伟，张钰，苏珊，等 . 茯苓类药材本草学，化学成分和药理作用研究进展 [J]. 湖北农业科学，2021，60（2）：9-14，19.
[52] 刘惠知，吴胜莲，张德元，等 . 茯苓药物成分提取分离及其药用价值研究进展 [J]. 中国食用菌，2015，34（6）：1-6.
[53] 张晓娟，左冬冬，范越 . 茯苓化学成分，质量控制和药理作用研究进展 [J]. 中医药信息，2014，31（1）：117-119.
[54] 杨鹏飞，刘超，王洪庆，等 . 茯苓的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志，2014，39（6）：1030-1033.
[55] 王坤凤 . 茯苓化学成分及质量控制方法研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2014.
[56] 胡朝暾，唐霞，肖震，等 . 茯苓发酵液中蛋白质的电泳分离与质谱分析 [J]. 中草药，2016，47（13）：2269-2276.
[57] 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.
[58] 沈玉萍，李军，贾晓斌 . 中药茯苓化学成分的研究进展 [J]. 南京中医药大学学报，2012，28（3）：297-300.
[59] 王帅，姜艳艳，朱乃亮，等 . 茯苓化学成分分离与结构鉴定 [J]. 北京中医药大学学报，2010，33（12）：841-844.
[60] 张建英，汤娟，张倩，等 . 硫酸茯苓多糖对抑郁症大鼠海马 AMPA 受体表达的影响 [J]. 中国临床心理学杂志，2019，27（6）：1086-1091.
[61] 周勤梅，朱德伟，罗孟兰，等 . 紫苏属植物的化学成分及其生物活性研究进展 [J]. 中华中医药学刊，2019，37（8）：1826-1831.
[62] 何育佩，郝二伟，谢金玲，等 . 紫苏药理作用及其化学物质基础研究进展 [J]. 中草药，2018，49（16）：3957-3968.
[63] 杨慧，马培，林明宝，等 . 紫苏叶化学成分，抗炎作用及其作用机制研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志，2017，31（3）：279-286.
[64] 代沙 . 紫苏叶抗氧化物质提取，含量测定及抗氧化活性研究 [D]. 成都：四川农业大学，2013.
[65] 钟萍，汪镇朝，刘英孟，等 . 紫苏叶挥发油化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（13）：215-225.
[66] 王宇宁，樊晖，梁克利 . 紫苏叶化学成分及其体外抗炎活性 [J]. 中成药，2021，43（6）：1500-1503.
[67] 张运晖，赵瑛，欧巧明 . 紫苏叶化学成分及生物活性研究进展 [J]. 甘肃农业科技，2020，（12）：69-76.
[68] 亢倩丽，李壮壮，范珊珊，等 . 基于 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 的紫苏叶与紫苏梗化学成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（13）：156-162.
[69] Ji WW，Wang SY，Ma ZQ，et al. Effects of perillaldehyde on alternations in serum cytokines and depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration [J]. Pharmacol Biochem Behav，2014，116：1-8.
[70] Ito N，Yabe T，Gamo Y，et al. Rosmarinic acid from perillae herba produces an antidepressant-like effect in mice through cell proliferation in the hippocampus [J]. Biol Pharm Bull，2008，31（7）：1376-1380.
[71] 刘怡妙，凌悦，徐旭，等 . 生姜的研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中草药，2022，53（9）：2912-2928.
[72] Liu Y，Liu J，Zhang Y. Research progress on chemical constituents of *Zingiber officinale* Roscoe [J]. Bio Med Res Int，2019，2019：1-21.
[73] 周鹏发，李万志，文喜艳 . 生姜化学成分和药理活性的研究进展 [J]. 中兽医医药杂志，2021，40（1）：93-96.
[74] 强姝婷，国慧，熊浩荣，等 . 生姜多类型化学物质与药理作用及药食同源研究进展 [J]. 江苏农业学报，2021，37（1）：259-266.
[75] 赵文竹，张瑞雪，于志鹏，等 . 生姜的化学成分及生物活性研究进展 [J]. 食品工业科技，2016，37（11）：383-389.
[76] 刘丹，张程慧，安容慧，等 . 生姜主要生物活性成分提取及应用研究进展 [J]. 食品工业科技，2016，37（20）：391-395，400.
[77] Fan C，Song Q，Wang P，et al. Curcumin protects against chronic stress-induced dysregulation of neuroplasticity and depression-like behaviors via suppressing IL-1β pathway in rats [J]. Neuroscience，2018，392：92-106.
[78] Zhang W，Guo Y，Han W，et al. Curcumin relieves depressive-like behaviors via inhibition of the NLRP3 inflammasome and kynurenine pathway in rats suffering from chronic unpredictable mild stress [J]. Int Immunopharmacol，2019，67：138-144.
[79] van Someren EJW. Brain mechanisms of insomnia：new perspectives on causes and consequences [J]. Physiol Rev，2021，101（3）：995-1046.
[80] Morin CM，Bjorvatn B，Chung F，et al. Insomnia，anxiety，and depression during the COVID-19 pandemic：an international collaborative study [J]. Sleep Med，2021，

87：38-45.
[81] Xu F，Wang X，Yang Y，et al. Depression and insomnia in COVID-19 survivors：a cross-sectional survey from Chinese rehabilitation centers in Anhui province [J]. Sleep Med，2022，91：161-165.
[82] Thomson F，Craighead M. Innovative approaches for the treatment of depression：targeting the HPA axis [J]. Neurochem Res，2008，33（4）：691-707.
[83] 程国良，钱彦方，李静，等 . 失眠机制研究进展 [J]. 世界睡眠医学杂志，2016，3（3）：174-179.
[84] 沈淑洁，郭春华，刘少磊，等 . 基于 -1H-NMR 技术的半夏厚朴汤镇静催眠代谢组学研究 [J]. 中国中药杂志，2016，41（8）：1511-1515.
[85] 刘文瑜，易志红，陈利江，等 . 半夏厚朴汤联合黛力新治疗思虑过度型失眠症 25 例 [J]. 浙江中医杂志，2021，56（3）：204.
[86] Yuan Y，Min HS，Lapane L，et al. Depression symptoms and cognitive impairment in older nursing home residents in the USA：a latent class analysis [J]. Int J Geriatr Psychiatry，2020，35（7）：769-778.
[87] 毛梦迪，尚立芝，许二平 . 半夏厚朴汤治疗抑郁症研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（23）：37-43.
[88] Jia KK，Zheng YJ，Zhang YX，et al. Banxia-houpu decoction restores glucose intolerance in CUMS rats through improvement of insulin signaling and suppression of NLRP3 inflammasome activation in liver and brain [J]. J Ethnopharmacol，2017，209：219-229.
[89] 吕昊哲，李庆云 . 半夏厚朴汤对慢性应激抑郁模型大鼠脑源性神经营养因子（BDNF）的影响 [J]. 中医药信息，2008（4）：49-50.
[90] 李南，赵献敏，杜彩霞，等 . 加味半夏厚朴汤对抑郁大鼠的干预作用 [J]. 中医学报，2018，33（12）：2379-2382.
[91] Li LF，Yang J，Ma SP，et al. Magnolol treatment reversed the glial pathology in an unpredictable chronic mild stress-induced rat model of depression [J]. Eur J Pharmacol，2013，711（1-3）：42-49.
[92] 童瑶，邹军，倪力强，等 . 4 种中药复方对大鼠实验性急性应激行为及下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴的影响 [J]. 中国中药杂志，2005，30（23）：1863-1866.
[93] 苏慧琳，陈雅明，白浩东，等 . 半夏厚朴汤对脂多糖诱导神经炎症损伤的保护机制 [J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28（9）：1-8.
[94] 高宗，杨家应，张念平，等 . 半夏厚朴汤对卒中后抑郁大鼠的干预机制研究 [J]. 陕西中医，2021，42（12）：1671-1675.
[95] 刘作龙，咸瑞卿，付杰，等 . 分子对接技术结合 LC-MS/MS 筛选半夏厚朴汤抗 PDE4 有效成分 [J]. 食品与药品，2020，22（3）：187-191.
[96] 孟丽荣，吴丽娟 . 浅述恶心，呕吐的发生机制，引发途径和药物治疗 [J]. 包头医学，2007，31（1）：12-13.
[97] 林昶，杨长福，杨红梅，等 . 半夏厚朴汤的现代药理研究进展 [J]. 贵阳中医学院学报，2016，38（6）：92-95，99.
[98] 黄仕文，袁冬平，吴颢昕，等 . 半夏厚朴汤对化疗呕吐家兔外周血中 EGF 及 Gas 的影响 [J]. 浙江中医药大学学报，2010，34（1）：60-61.
[99] 张运凯，雷成菊 . 半夏厚朴汤加味治疗妊娠呕吐的临床疗效 [J]. 湖北民族学院学报（医学版），2009，26（2）：63-64.
[100] Lua PL，Salihah N，Mazlan N. Effects of inhaled ginger aromatherapy on chemotherapy-induced nausea and vomiting and health-related quality of life in women with breast cancer [J]. Complement Ther Med，2015，23（3）：396-404.
[101] Tatsumi L，Suzuki T，Yamada K，et al. Kampo，A Japanese traditional medicinal system for psychiatric conditions：a narrative review [J]. Pharmacopsychiatry，2019，52（6）：251-260.
[102] 吴建平，李岩 . 功能性消化不良与精神心理因素关系的探讨及半夏厚朴汤的干预治疗 [J]. 世界最新医学信息文摘，2016，16（75）：177.
[103] 陶双友，崔琦珍，罗琦，等 . 中西医结合治疗胆汁反流性胃炎 41 例疗效分析 [J]. 四川中医，2009，27（6）：78-79.
[104] 马朋杰，刘魏，黄杰烽，等 . 基于 ICC 探索半夏厚朴汤加减对腰椎骨折后大鼠胃肠动力的影响及作用机制 [J]. 中国中医急症，2016，25（12）：2209-2212.
[105] 黄必胜，黄必德 . 半夏厚朴汤加减治疗假性球麻痹吞咽困难 50 例 [J]. 山东中医杂志，2014，33（1）：25-26.
[106] 江坚，王蓉，郑妮亚，等 . 半夏厚朴汤加减联合奥美拉唑治疗反流性咽喉炎疗效观察 [J]. 海南医学，2018，29（6）：853-854.
[107] 姚文峰，李皓琳，孙志强，等 . 半夏厚朴汤加减方联合奥美拉唑治疗反流性咽喉炎临床观察 [J]. 实用中医药杂志，2019，35（9）：1119-1120.
[108] 连乐燊，蒋紫云，刘小虹，等 . 半夏厚朴汤对阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者炎症反应，氧化应激，血管内皮功能障碍的影响 [J]. 广州中医药大学学报，2020，37（9）：1636-1640.
[109] Naito T，Itoh H，Takeyama M. Effects of Hange-koboku-to（Banxia-Houpu-tang）on neuropeptide levels in human plasma and saliva [J]. Biol Pharm Bull，2003，26（11）：1609-1613.
[110] 李彬，白辉辉 . 半夏厚朴汤对痰湿阻肺型慢性阻塞性肺疾病急性期肺功能及微观指标的影响 [J]. 陕西中医，2019，40（4）：466-468.
[111] Simpson CA，Diaz-arteche C，Eliby D，et al. The gut microbiota in anxiety and depression-a systematic review [J]. Clin Psychol Rev，2021，83：101943.
[112] 李玲玲，陈盛君，李松，等 . 经典名方半夏厚朴汤物质基准量值传递分析 [J]. 中国现代中药，2022：1-18，DOI：10. 13313/j. issn. 1673-4890. 20220214004.
[113] 何瑞欣，井山林，张晓云，等 . 经典名方半夏厚朴汤物质基准制备工艺研究 [J]. 中医药学报，2021，49（6）：44-50.
[114] Wang H，Zhao J，Ouyang Y，et al. Evaluation of the similarity of dispensing granules of Banxia Houpu Tang with traditional decoction by chemical analysis and spasmolytic activity [J]. Arab J Chem，2021，14（9）：103305.
[115] 刘昌孝，张铁军 . 基于“物质 - 药代 - 功效”关联的中药创新研发思路 [J]. 中草药，2022，53（1）：1-7.

（收稿日期：2022-06-12；修回日期：2022-06-30）

中药配方颗粒研发生产中若干关键问题研究进展

王龙[1, 2]，高鑫[1, 2]，闫信豪[1]，蔡通祥[3]，张坤[3]，李元祥[4]，李文龙[1, 2*]（1. 天津中医药大学 中药制药工程学院，天津　301617；2. 组分中药国家重点实验室，天津　301617；3. 四川浦华中药科技有限公司，成都　611130；4 . 怀化学院化学与材料学院，湖南　怀化　418008）

摘要：中药配方颗粒是 20 世纪 80 年代发展起来的一种由中药饮片转化而来的新剂型，作为中药饮片的补充，其具有剂量小、携带储存方便的特点，已被大多数人接受并使用。但是，中药配方颗粒口感及质量问题是未来发展所面对的挑战，因此其研发工艺、质量标准需要进一步完善，才能不断促进中药现代化，应用规范化，制备工艺标准化。本文旨在对中药配方颗粒的相关法规，口感问题，溶解性差以及与传统汤剂是否一致等方面进行综述，以期为配方颗粒研发生产若干关键问题提供对策。

关键词：中药配方颗粒；口感；溶解性；质量标准

中图分类号：R283.627　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2008-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.008

Research progress in some key problems in the development and production of traditional Chinese medicine formula granules

WANG Long[1, 2], GAO Xin[1, 2], YAN Xin-hao[1], CAI Tong-xiang[3], ZHANG Kun[3], LI Yuan-xiang[4], LI Wen-long[1, 2*] (1. *College of Pharmaceutical Engineering of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617; 2. *State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617; 3. *Sichuan Puhua Traditional Chinese Medicine Technology Co.*, *Ltd*, *Chengdu* 611130; 4. *School of Chemistry and Materials Engineering*, *Huaihua University*, *Huaihua Hunan* 418008)

Abstract: Traditional Chinese medicine (TCM) formula granules are a new dosage form developed in the 1980s after the transformation of TCM slices, and are now accepted and used by most people as a supplement to medicinal slices. They have the characteristics of small dose, easy storage and portable. However, the taste and quality of TCM formula granules are the challenges of future development. Their research and development process and quality standards need further improvement to continuously promote the modernization, application and preparation standardization of TCM. This paper aims to review the regulations for Chinese medicine dispensing granules, texture, poor solubility and consistency with TCM slices to provide strategies for further development of TCM formula granules.

Key words: traditional Chinese medicine formula granule; texture; solubility; quality standard

中药是我国的传统药物，在我国传承延续了上千年，新型冠状病毒肺炎疫情暴发以来，我国主张“坚持中西医并重、中西药并用”，取得了良好的效果，凸显出中医药防治疫情的优势[1]。传统中药饮片的服用方式为水煎煮，然而传统汤剂质量标准尚不完善、煎煮服用不方便且费时费力，难以满足现代人的快节奏生活，中药配方颗粒的出现很好地解决了这个问题。中药配方颗粒是在中医药理论指导下，采用现代提取、浓缩、分离等工艺将传统中药饮片制成的提取物与适当的辅料或药材细粉制成的供中医临床调剂使用的粉状或颗粒状产品[2]。因其用水冲服即可，大大节省

基金项目：国家重点研发计划中医药现代化专项（No.2019YFC1711500）；河北省产业创新创业团队（No.215A2501D）。

作者简介：王龙，男，硕士研究生，主要从事中药配方颗粒工艺和质量控制研究，email：iam7890@163.com　*通信作者：李文龙，男，副研究员，博士研究生导师，主要从事中药质量控制技术研究，email：wshlwl@tjutcm.edu.cn

了时间，相比传统汤剂，提高了患者依从性。

中药颗粒剂型最早可追溯到 20 世纪 40 年代的日本，以复方颗粒为主，单味药材颗粒主要配合复方颗粒使用[3]。在 20 世纪 80 年代，张志伟提出汤剂剂型改革设想：常用中药规范炮制后，分别以水煎煮，经高速离心分离除杂，低温浓缩，冷冻干燥制成规定量的干颗粒；在使用时，按照处方配伍，取各单味颗粒混合使用[4]。尽管中药配方颗粒已经使用了几十年，但是，关于配方颗粒的争议声不断，其仍存在口感不佳、在水中的溶解度较低、是否与传统复方汤剂等效以及质量如何控制等问题，还需要对中药配方颗粒进一步深入研究。

1　相关法律法规

中药配方颗粒的发展需要得到法律的支持，配方颗粒已经在中国台湾、日本以及韩国广泛使用，并且早已经有了相对完善的法律支持[5-7]。国内从 1987 年开始研制颗粒，2001 年国家药品监督管理局发布《中药配方颗粒管理暂行规定》正式命名“中药配方颗粒”，并被纳入中药饮片管理，实行批准文号管理[8]。为完善颗粒剂的安全生产与使用管理，从 1993 年至今，国家也陆续出台了许多政策，其中，2015 年发布的《中药配方颗粒管理办法（征求意见稿）》第一次明确规范了中药配方颗粒的生产要求，但是关于中药配方颗粒的相关法律规定还不是特别完善，比如对私自经营售卖中药配方颗粒的药店的规范化管理以及对药厂生产配方颗粒无统一的工艺路线规定等，这些都需要完整的法律法规来保证中药配方颗粒的质量。直至 2021 年，国家药品监督管理局发布《关于结束中药配方颗粒试点工作公告》[9]，至此，中药配方颗粒完成了从研发生产到临床应用，经历了 20 年的试点工作后，从国家层面制定出台技术要求，作为中药配方颗粒的技术指导，以规范其生产，引导产业健康发展，更好地满足中医临床要求。其发展历程见图 1。

图 1　中药配方颗粒政策发展历程

Fig 1　Development history of policy of TCM formula granule

2　口感问题

2.1　中药产生苦涩口感的原因

口感是口服制剂重要的考察因素之一[10]。大多数中药最显著的特点之一就是气味奇特，且具有苦涩味，虽然被制成颗粒状，但是由于导致中药的苦涩口感的物质基础较为复杂，仍存在难以接受的特殊气味和苦涩口感，进而影响患者的用药依从性[11]。苦味的味蕾比其他味觉的味蕾分布更密集，与此同时，苦味受体的种类也更为丰富，目前已经发现 25 种，且单一物质也可能会激活多种苦味受体[12]。涩味通常被认为是明矾或多酚类物质引起口腔上皮细胞起皱、收缩的感觉，并非味觉[13]。目前其作用机制尚不明确，多认为是多酚类物质与唾液蛋白相互作用导致口腔润滑性降低，引起口腔摩擦力增加，进而刺激感受器，产生并感知涩味[14]。

2.2　口感评价技术

常用的评价口感方式为人体感官评价，其通过志愿者口尝由低到高含量的药物溶液，再对药物不同口感进行评分[15-16]。感官评价法优点在于对药物口感感知最真实直接，研究人员也可以更清楚地对受试人员感受进行总结。但是这种方式存在一定局限性：测试过程费时；一些有毒性及有刺激性气味的药物不适合志愿者亲身尝试；感官评价存在带有主观因素的缺点，受志愿者个体差异、身体情况等原因影响，不仅会导致偏差，也不能代表多数人的感受[17]。

化学评价主要是测定药物中特征性化学成分的浓度。化学评价弥补了感官评价的一些缺陷，但其检测的成分比较单一，同时不同物质对药物口感贡献度不同，因此不能模拟真正的口腔环境中多种成分和味觉感受器之间的相互作用。电子舌是一种新型人工智能感官评价技术，由味觉传感器、信号处理系统和模式识别系统三部分组成[18]。目前已经广泛用于中药口感评价[19-20]，但其往往要求样品浓度稀释数倍才能够测定，此外，

模式识别比较单一，导致其结果可比性较差。

为了更精准地进行评价，国内外有人开发了生物评价法[21-22]，根据小动物的反应以及感官评价或者化学评价相结合的手段对口感进行评价，可以更加全面、系统准确地反映药物在口腔内的真实口感。

2.3 矫味与掩味技术

成年人或许可以接受药物的一些苦涩味，但是对于未成年人特别是儿童而言，可能就会引起呕吐反应导致拒绝的行为，从而降低用药依从性[23]。配方颗粒可通过在生产过程中加入某些辅料从而减轻或者消除部分难以接受的味道，例如添加矫味剂[24-26]、包合技术[27-28]、微囊或微球化[29-31]等。

添加矫味剂是最简单、方便的矫味方法[32]。在矫味剂中使用最广泛的为甜味剂，其原理是通过增加甜味以混淆味觉传感器[33]。吴飞等[34]以康儿灵颗粒为研究对象，加入阿斯巴甜增加了颗粒的甜味而减少苦味，且不影响其质量检查，其工艺简单，但有一定的局限，例如阿斯巴甜稳定性较差，可降解为苯丙氨酸，所以苯丙酮尿症患者禁用[35]；含蔗糖的配方颗粒也不利于糖尿病患者的顺应性[36]。

包合技术是通过范德华力将客体药物分子全部或部分包入具有空腔结构的主体分子中，避免药物分子直接与味蕾接触，从而达到掩味效果[37]。赵立平等[38]研究发现矫味剂和甜味剂对盐酸西替利嗪的掩味效果不是很好，于是用β-环糊精进行包合，结果发现掩味效果良好，并且包合率达到了 85.1%。锦灯笼具有清热、利咽、化痰、利尿的功效，其味酸、苦，殷莉梅等[39]采用β-环糊精包合锦灯笼提取物，使用研磨法添加适量辅料制备成固体分散体，经感官评价，显示包含物可明显降低苦味。

微球化是遮蔽中药苦涩味的技术之一。微球化是将中药配方颗粒溶解或分散在天然或合成高分子材料制成的微球中，从而减少药物与味蕾的接触[40]。王优杰等[41]认为用环糊精进行包合需要使用大量的辅料，以复方双黄连为模型药物，采用喷雾干燥法，加入少量的辅料，制备微球，达到掩味目的。仇敏等[42]考察了不同组成原理的中药汤剂伴侣对 5 种不良味感突出的中药汤剂的抑制苦味的适宜性，不同辅料的掩味特点不同，多种辅料相结合，科学调配可以实现“一方一策，精准掩味”的效果。与矫味剂和包合技术比较，制微球技术可以避免加入过量的甜味剂，且不易造成辅料的浪费，是目前看来比较合适的改善口感的方法，但由于中药成分的复杂性，笔者认为未来可以使用多种方式结合的手段来掩盖中药的苦涩味。

3 溶解性问题

3.1 溶解性的测量方法

溶解性主要是观察药物在溶剂中的溶解度，常见的测量溶解度的方法有平衡法和动力学法，两种方法都是将待测物放入溶剂中使之溶解，从不饱和状态到饱和状态，不同点是，平衡法检测的是饱和溶液的上层清液，而动力学法检测的则是沉淀物的出现。胡程耀等[43]对这两种方法进行了评价，指出了平衡法存在耗时长，样品消耗多以及劳动强度大等不足，而动力学法所需样品量少，检测速度快，更适合新药的检测。

3.2 提高溶解度的方法

对于颗粒剂来说，增加其在水中溶解度的方法主要有：通过物理手段减小颗粒的粒径、通过化学手段形成包合物增强难溶性颗粒的亲水性、形成固体分散体提高溶解度。

一般来说，对于难溶性药物，减小颗粒的粒径，使比表面积增大，能有效促进溶解。章臣桂等[44]通过比较超微粉碎与普通粉碎技术制备参附强心丸，然后对其溶出度进行检查，证明用超微粉碎技术制出来的参附强心丸的粒径更小，溶出度更高。环糊精的分子结构具有内疏水、外亲水的特点，因此能够很好地包合药物，又能溶于水。李小平[45]制备甲氧苄啶时加入环糊精进行包合发现其溶解度达到了 5.26 mg • mL^{-1}。姚陪陪等[46]使用 2-SBE-β-CD 包合光甘草定，发现在水中溶解度可达到 83 mg•mL^{-1}，其包合物在胃液、肠液中的溶出率显著高于光甘草定及其物理混合物，且包合物对 HepG2 细胞的抗增殖活性显著提高。固体分散体是利用某种方法将难溶性药物高度分散在固体分散材料中形成的一种固体分散物。根据 Nernst-Noyes-Whitney 方程，溶出速率随着分散度的增加而提高，聚乙二醇具有良好的水溶性，且熔点低，毒性小，化学性质稳定，能与多种药物配伍[47]。蒋沅岐等[48]将双氢青蒿素制备成固体分散体后，体外溶解度增加了 30 倍，在纯水中 30 min 溶出度高达 94.51%，且体内动力学研究表明其生物利用度提高了 2.94 倍，固体分散体明显促进了药物的体内吸收。

4 中药配方颗粒与传统饮片是否等效

相比传统汤剂，在疗效相似的情况下，配方颗粒中有效成分的含量及种类更为明确，且服用方便，但同时也有人提出了质疑，认为传统汤剂煎煮过程中，药材中各成分之间会发生相互作用而增强药效，若将传统汤剂制成颗粒，这种药材

间的相互作用无法形成，达不到某种效果[49]。为了证明中药配方颗粒的药效，靳凤云等[50]采用HPLC法测定华盖散传统汤剂与颗粒汤剂中指标成分的含量，发现配方颗粒中指标成分的含量比传统汤剂的高很多。王杰等[51]将六味地黄的传统汤剂与颗粒剂中指标成分进行比较，通过HPLC法对6个指标成分（毛蕊花糖苷、尿素囊、丹皮酚、马钱苷、茯苓酸、23-乙酰泽泻醇B）进行定量分析，结果发现，毛蕊花糖苷和尿素囊的含量：配方颗粒≈传统饮片；马钱苷、茯苓酸和23-乙酰泽泻醇的含量：配方颗粒＞传统饮片；丹皮酚的含量：传统汤剂＞配方颗粒。由此可知，由于不同成分的化学性质不同，提取率不同，同时在煎煮过程中其中某些化学物质可能会发生促进增溶等情况。因此，针对含有挥发性等不稳定物质的配方颗粒，应进行工艺参数优化，以达到最优效果。

为解决配方颗粒中指标成分含量与传统汤剂等效的问题，出现了一种改良剂型——复方颗粒，即将配好的药材合煎之后制成颗粒。宋晓宁等[52]采用HPCE内标法测定戊己丸的传统汤剂、配方颗粒汤剂、复方颗粒汤剂的有效成分含量并进行比较，发现传统汤剂和复方颗粒汤剂的有效成分含量一致，与配方颗粒汤剂的差别较大，证明了复方颗粒可用于临床治疗的合理性。同时，杨玉琴等[53]对四逆汤三种剂型（传统汤剂、配方颗粒、复方颗粒）中生物碱含量进行研究，得到的结果是生物碱含量大小为复方颗粒＝传统汤剂＜配方颗粒。邓轶渊等[54]总结了复方合煎液与单味中药煎煮后合并的差异性，认为药材合煎时有些成分之间发生反应，可能会产生增溶现象，也可能会发生阻溶的情况。虽然复方颗粒的有效成分与传统汤剂接近，但是中药治病讲究配伍，目前看来并不便于医师对症下药，这个问题仍需得到进一步探究。笔者认为，复方合煎与分煎时化学成分存在差异，会导致其药效以及临床效果上存在差异，因此需要进行有针对性的理论和实验研究，以提供研究数据，增强可信度。

5 配方颗粒质量标准与控制问题

5.1 质量标准问题

目前，国家已出台了200个中药配方颗粒标准，有力地促进了其生产质量及行业的稳定发展，但较多的品种标准仍需完善，虽然各省积极制定地方标准，但仍受执行范围的影响。其次，《关于结束中药配方颗粒试点工作的公告》中规定[9]，对于中药配方颗粒国家标准没有规定的，允许省级药品监督管理部门根据《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》自行制定标准，待国家药品标准发布后，即行废止相应省级标准。截止2022年5月，各省共发布4507个中药配方颗粒标准，涉及400多个品种，导致在没有统一的国家标准前，各省可能投入大量时间、资金制定重复的中药配方颗粒质量标准，造成资源浪费。

5.1.1 质量标准专属性问题 炮制作为中医药的特色，相同药材因其不同炮制过程具有不同的功效[55]，不同的炮制品可通过外观性状，气味等鉴别，但其经过煎煮、浓缩、分离、干燥、制粒等工艺，外观形态发生了改变，所以其质量专属性考察尤为重要[56]。以国家标准中苦杏仁及其炮制品为例，其质量标准中仅区别于特征图谱的检查，其特征峰与对照药材特征峰相似度极高，因此无法通过标准中对药材及其不同炮制品进行准确鉴别。徐玉玲等[57]提出增加原药材“炮制痕迹”的概念，以实现对不同炮制品的专属性鉴别。

5.1.2 标准汤剂标准统计学问题 中药饮片标准汤剂是以中医理论为指导、临床应用为基础，经现代提取技术，标准化工艺制备的单味中药饮片水煎液，用于保障用药准确性和剂量的一致性[58]。在中药配方颗粒研发过程中，标准汤剂作为标准参照，通过考察出膏率、指标成分含量测定及转移率、指纹或特征图谱一致性等指标，对原料药材、中间体及成品制备过程中量值传递和物料平衡进行全面研究。例如，采用HPLC或GC法，比较各批次标准汤剂指纹图谱的相似度，确定终产品指纹图谱相似度的可接受范围；或比较主要成分峰的个数，规定其相对保留时间及峰的比例。用相似度评价软件生成标准汤剂对照指纹或特征图谱，并标注其样品浓度。

《中药配方颗粒质量控制及标准制定要求》对标准汤剂提出了研究要求，建议使用不少于15批主产区或道地产区的饮片，在水提、分离、浓缩后应确定其出膏率、指标成分含量和指标成分转移率的允许范围或含量限度，如±3SD或±30%，但其中范围标准是否有统计学意义并不清楚，同时对于其要求15批样品是否足够也尚不明确。Gu等[59]统计了近年来中药标准汤剂研究数据，提出当前标准范围前提是转移率或出膏率应服从正态分布，例如，转移率反映了标准汤剂制备过程中指标成分的转移，其值通常在0～100%。然而，在煎煮过程中经常会发生化学反应，导致指标成分的降解或合成，难以判断是否服从正态分布；基于此，作者提出了将数据平方根反正弦变换后可以使数据接近正态分布，在此基础上，计算$\bar{x}$±3SD或$\bar{x}$±30%并设定此为

标准范围更为合理。平方根反正弦变换公式如下：

$$\overline{X}' = \arcsin\sqrt{\overline{X}} \qquad (1)$$

式（1）中，X 表示转换前出膏率或转移率，$\overline{X}'$ 表示转换后出膏率或转移率。

表 1 为茵陈标准汤剂三种指标成分转移率及出膏率平方根反正弦变换后计算的标准范围结果。

表 1　茵陈标准汤剂平方根反正弦变换前后指标成分转移率及出膏率标准范围 (%)[60]

Tab 1　Range of transfer rate of index components and dry matter yield rate before and after the square root arcsine transformation of *Artemisiae Scopariae Herba* standard decoction (%) [60]

指标	批数	$\bar{x}\pm3SD$		$\bar{x}\pm30\%$	
		转换前	转换后	转换前	转换后
芦丁转移率	15	－0.65 ～ 63.37	24.79 ～ 93.25	21.95 ～ 40.77	41.31 ～ 76.73
金丝桃苷转移率	15	－3.05 ～ 59.77	21.15 ～ 90.09	19.85 ～ 36.87	38.93 ～ 72.31
3，5- 二咖啡酰奎宁酸转移率	15	－4.67 ～ 49.33	15.77 ～ 81.17	15.63 ～ 29.03	33.93 ～ 63.01
出膏率	15	8.39 ～ 31.13	30.82 ～ 60.94	13.83 ～ 25.69	32.12 ～ 59.64

5.2　质量控制

5.2.1　中药配方颗粒混合均匀度　混合过程是配方颗粒制备的关键环节之一。但目前混合工艺缺乏质量检测与控制技术，混合时间仍依赖于人工经验，原药材质量差异、工艺波动等因素对混合状态的影响，往往会导致配方颗粒批内质量一致性差 [61-62]。近红外（near infrared，NIR）光谱技术因其快速无损、绿色等特点，已成功应用于制药领域。吴思俊等 [63] 采用 NIR 光谱技术对不同粒径的清咽片原辅料混合过程进行监测，考察了不同粒径物料对混合过程终点的影响，并基于移动块标准偏差算法和偏最小二乘回归算法对其混合终点实现精准判断。杨婵等 [64] 采用 NIR 光谱技术结合移动窗 F 检验算法，以乌梅提取物粉末 - 糊精为参照对象，通过 6 个取样点综合分析，实现了对混合过程的在线监测。

NIR 光谱技术在药物混合过程中仍存在一些问题 [65]：中药粉末相较于化学药品吸湿性和黏性更强，所以混合过程中更容易出现结块等现象，进而导致在线监测过程异常。同时，通过建立定量模型来预测混合均匀度时，需要大量样品进行建模，对于不同样品又需要建立不同模型，在有新样品超出范围时，又需进行模型更新。

5.2.2　中药配方颗粒溶化性　中药配方颗粒的溶化性不仅关系有效成分的溶出和临床药效，也反应了生产企业的制药工艺水平。《中国药典》2020 年版四部检查颗粒剂溶化性的方法为：取供试品 10 g（中药单剂量包装取 1 袋），加热水 200 mL，搅拌 5 min，立即观察，可溶颗粒应全部溶化或轻微浑浊 [66]。但实际检验中主要靠检测人员视觉判断，必然存在一定的主观性，若为深色溶液，目视法则更难判断。于佳琦等 [67] 采用在线浊度传感技术，对 105 批市售中药颗粒溶化过程中的溶液浑浊程度进行量化，并建立分级评价标准，为配方颗粒溶化程度提供了可量化的数据。在此基础上，于佳琦等 [68] 还提出了两种在线传感器联用，在区分溶液浑浊度的同时又可以实时分析溶液中粒径的变化，使颗粒溶化过程直观化。

5.2.3　中药配方颗粒一致性评价　中药配方颗粒质量一致是其安全性和有效性的前提，相同品种配方颗粒即使同一厂家生产，其不同批次产品间也会出现差异 [69]。中药配方颗粒生产过程受人为因素影响较大，具有很强的可调节性，生产过程的微调甚至有助于弥补原料药材的质量波动，从而实现“变化的原料＋适配的工艺＝稳定的产品”的目的。而阐明量值传递规律可以为配方颗粒工艺研究以及质量评价奠定基础。张智勇等 [70] 通过比较三七提取液与其制剂中活性成分，阐明了生产过程中皂苷类成分的转移规律，为其工艺优化及评价提供了参考。但量值传递研究中，多关注化学成分变化，由于某些成分含量较低，或缺少对照品等因素，仅依靠传统分析技术并不能对其完全进行表征。化学计量学是通过统计学或数学方法建立化学体系中测量值与整体状态之间的联系，对于中药制备工艺一致性评价具有重要意义 [71]。吴思俊等 [72] 结合多种光谱技术与化学计量学方法，对盐酸青藤碱不同制备工艺进行系统评价，为中药产品质量一致性评价提出了新策略。因此，笔者认为，应在量值传递研究的基础上，引入多源数据融合技术，多尺度对其制备工艺进行表征，以保证中药配方颗粒质量一致。

6　展望

中药配方颗粒是中药现代化的重要发展趋势之一，既遵循了中药的辨证论治、随证加减的配伍原则，保留了传统汤剂的治疗手段，又解决了汤剂煎煮耗时的问题，携带更方便。经过 20 年的试点，中药配方颗粒在研发、生产工艺、质量标准等方面积累了很多经验，取得了快速发展。但中药配方颗粒研究过程中，部分药材因其性质或价格问题，并不适宜制成中药配方颗粒 [73]。笔

者认为，加强对中药材的系统化管理，建立从药材种植到临床应用的全程质量控制体系，通过对制备工艺的理解和改进，提升口感和溶解度，深入研究单煎与合煎差异机制，加强中药配方颗粒整体质量评价方法研究。深入研究，浅出标准，尽快出台更全面的国家标准，中药配方颗粒的发展会有更广阔的前景。近年来，国家出台了一系列鼓励开发古代经典名方的政策法规，相信我国中医药将逐渐形成以复方颗粒为主，单味颗粒为补充的局面，实现辨证论治与随证加减的真正统一，让中医药更好地为人类健康作贡献。

参考文献

[1] 李菲菲，吴倩文，顾昱昊，等 . 中医药防治新冠肺炎疫情现状引发的对中药监管科学的一些思考 [J]. 中国食品药品监管，2020（3）：10-21.

[2] 李松林，宋景政，徐宏喜 . 中药配方颗粒研究浅析 [J]. 中草药，2009，40（S1）：1-7.

[3] 温雅心，董玲，杨丽，等 . 中药配方颗粒的发展现状及国际化对策探讨 [J]. 中国现代中药，2021，23（8）：1319-1325.

[4] 张志伟 . 汤剂剂型改革探讨 [J]. 上海中医药杂志，1984，（8）：30-31，12.

[5] 杨瑾，加茂智嗣，能濑爱加 . 汉方药在日本的发展现状 [J]. 中草药，2016，47（15）：2771-2774.

[6] 林端宜 . 台湾地区中药浓缩制剂品质管制概况 [J]. 中国中药杂志，1992，17（9）：569-571.

[7] Byung ML. 韩国传统医药概况 [J]. 亚太传统医药，2005，（1）：21-24.

[8] 何军，朱旭江，杨平荣，等 . 中药配方颗粒的现状与发展新思路 [J]. 中草药，2018，49（20）：4717-4725.

[9] 国家药品监督管理局 .《关于结束中药配方颗粒试点工作的公告》[EB/OL].（2021-02-10）[2022-06-07]. https：//www.nmpa. gov. cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20210210145856159. html.

[10] Szejtli J，Szente L. Elimination of bitter，disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins [J]. Eur J Pharm Biopharm，2005，61（3）：115-125.

[11] 刘斌斌，简晖，田佳明，等 . 中药矫味与掩味技术的研究进展及问题分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2016，22（16）：229-234.

[12] 肖珍，李周，孙杨杨，等 . 中成药掩味技术研究进展 [J]. 中国中药杂志，2021，46（2）：333-339.

[13] 林俊芝，张定堃，段渠，等 . 中药涩味的形成原理及掩蔽技术的研究概况 [J]. 中草药，2014，45（18）：2716-2721.

[14] 韩雪，郑玉，谢兴亮，等 . 中药多酚涩味的内涵认识与掩蔽方法研究进展 [J/OL]. 中国中药杂志：1-11. DOI：10.19540/j. cnki. cjcmm. 20211118.303.

[15] 姜红，张定堃，林俊芝，等 . 生物检测方法在制剂口感评价中的应用进展 [J]. 中成药，2017，39（3）：588-592.

[16] 张璐，高晓洁，桂新景，等 . 基于经典人群口感评价方法的苦度评价中评价员分级探索 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（2）：12-18.

[17] Immohr LI，Dsichinger A，Kuhl P，et al. Early pediatric formulation development with new chemical entities：opportunities of e-tongue besides human taste assessment [J]. Int J Pharm，2017，530（1-2）：201-212.

[18] 李学林，李慧玲，刘瑞新，等 . 电子舌用于药物掩味效果评价的研究 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2013，15（7）：1532-1537.

[19] 刘瑞新，李慧玲，李学林，等 . 基于电子舌的穿心莲水煎液的掩味效果评价研究 [J]. 中草药，2013，44（16）：2240-2245.

[20] 李学林，康欢，田亮玉，等 . 不同类型掩味剂对龙胆、苦参、穿心莲、莲子心 4 种中药水煎液的抑苦效能及抑苦规律评价 [J]. 中草药，2018，49（22）：5280-5291.

[21] Han X，Jiang H，Han L，et al. A novel quantified bitterness evaluation model for traditional Chinese herbs based on an animal ethology principle [J]. Acta Pharm Sin B，2018，8（2）：209-217.

[22] Ali J，Chiang M，Lee J B，et al. Is rat a good model for assessment of particulate-based taste-masked formulations? [J]. Eur J Pharm Biopharm，2020，146：1-9.

[23] 王鑫，张定堃，林俊芝，等 . 口腔给药系统中口感的评价方法研究进展 [J]. 中草药，2015，46（14）：2167-2172.

[24] 蒲俊安，郑淘，李灿，等 . 蔗糖对七味白术散治疗菌群失调腹泻小鼠肠道细菌多样性的影响 [J]. 食品与生物技术学报，2017，36（6）：583-589.

[25] 陆影，曾敬其，马金辰，等 . 中药大品种制造关键质量属性表征：滋味质量属性的小儿感冒口服液口感配方优化策略研究与应用 [J/OL]. 中国中药杂志，2022，43（13）：3488-3494.

[26] 周光姣，黄翔，冯学花 . 复方五花颗粒制备工艺的优化 [J]. 中成药，2019，41（6）：1389-1391.

[27] 施钧瀚，张杏芬，仇继玺，等 . β- 环糊精对几种苦味中药的掩味作用考察 [J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19（12）：1-4.

[28] 李颖，曾茂贵，郑笈，等 . 星点设计 - 效应面法优化鱼腥草挥发油 -β- 环糊精包合物的制备工艺 [J]. 中草药，2014，45（13）：1855-1862.

[29] 胡雪莲，黄华，李英博，等 . 流化床包衣法制备盐酸小檗碱掩味微囊 [J]. 中国医药工业杂志，2013，44（4）：362-365.

[30] 王志，魏莉，陈挺 . 银黄口腔崩解片的制备工艺研究 [J]. 中草药，2008，39（4）：515-518.

[31] Zhao X，Ai Y，Hu Y，et al. Masking the perceived astringency of proanthocyanidins in beverages using oxidized starch hydrogel microencapsulation [J]. Foods，2020，9（6）：756.

[32] 魏晓嘉，万国慧，李佳园，等 . 中药制剂矫味技术及评价方法的研究进展 [J]. 中国药房，2021，32（8）：1009-1013.

[33] Soejarto DD，Addo EM，Kinghorn AD. Highly sweet compounds of plant origin：from ethnobotanical observations to wide utilization [J]. J Ethnopharmacol，2019，243：112056.

[34] 吴飞，王优杰，张继全，等 . 康儿灵颗粒的矫味研究 [J]. 中国新药杂志，2014，23（6）：701-705.
[35] 蒋晓彤，陈国松，姜玲玲，等 . 高效液相色谱法同时检测 6 种甜味剂 [J]. 食品科学，2011，32（6）：165-168.
[36] 孙立霞，申向荣，赵晓霞，等 . 中药口服制剂中辅料应用的常见问题 [J]. 中成药，2021，43（11）：3129-3132.
[37] 何燕，聂金媛，黄霁，等 . 国内外口服制剂掩味技术的研究进展 [J]. 中国新药杂志，2010，19（8）：671-675.
[38] 赵立平，曹德英，冯香萍，等 . 盐酸西替利嗪 -β- 环糊精包合物的研制 [J]. 华西药学杂志，2004，19（1）：30-32.
[39] 殷莉梅，韩静，潘岳峰，等 . 锦灯笼含片矫味工艺的研究 [J]. 中国中药杂志，2008，33（13）：1635-1637.
[40] 刘聪燕，瞿鼎，黄萌萌，等 . 中药配方颗粒掩味技术研究的思考 [J]. 中华中医药杂志，2016，31（9）：3658-3661.
[41] 王优杰，冯怡，徐德生 . 中药复方掩味技术初步研究 [J]. 中国中药杂志，2007，32（13）：1285-1288.
[42] 仇敏，杨静，王晓宇，等 . 中药汤剂伴侣用于经典名方抑苦掩味的适宜性研究 [J]. 中草药，2022，53（8）：2292-2301.
[43] 胡程耀，黄培 . 固体溶解度测定方法的近期研究进展 [J]. 药物分析杂志，2010，30（4）：761-766.
[44] 章臣桂，金兆祥，高军，等 . 超微粉碎与普通粉碎制备的参附强心丸的溶出度的研究 [J]. 中草药，2005，36（8）：54-56.
[45] 李小平 . 甲氧苄啶固体分散体和包合物的制备及其性质研究 [D]. 成都：西华大学，2013.
[46] 姚培培，樊金玲，李德锋，等 . 光甘草定 / 环糊精包合物的制备和性质 [J/OL]. 食品科学：1-15[2022-06-09]. http：//kns. cnki. net/kcms/detail/11.2206. ts. 20211109.1053.034. html.
[47] 张军，唐粤鹏，陈剑 . 甘草素固体分散体的制备及体内药动学研究 [J]. 中南药学，2022，https://kns.cnki.net/kcms/detail/43.1408.r.20220531.1623.006.html.
[48] 蒋沅岐，田成旺，周钰通，等 . 双氢青蒿素固体分散体的制备及其生物利用度研究 [J]. 中草药，2022，53（4）：1013-1020.
[49] 李嘉和 . 从中药单味提取说起 [J]. 中成药研究，1983（10）：42.
[50] 靳凤云，贺祝英，赵杨，等 . HPLC 测定华盖散传统汤剂与颗粒汤剂中盐酸麻黄碱、苦杏仁苷、甘草酸、甘草苷的含量 [J]. 中成药，2008，30（1）：80-86.
[51] 王杰，刘冰，周军，等 . 六味地黄配方颗粒与传统汤剂中 6 种有效成分的比较研究 [J]. 中草药，2015，46（19）：2887-2891.
[52] 宋晓宁，靳凤云，张杰，等 . HPCE 内标法比较戊己丸不同汤剂中 4 种有效成分量的差异 [J]. 中草药，2014，45（11）：1573-1576.
[53] 杨玉琴，梁光义，秦利芬，等 . 3 种剂型四逆汤中总生物碱的含量研究 [J]. 安徽农业科学，2011，39（30）：18526-18527，18530.
[54] 邓轶渊，高文远，陈海霞，等 . 中药复方合煎与分煎的差异性研究进展 [J]. 中草药，2005，36（12）：1909-1911.
[55] 吴思俊，彭璐，吴卫刚，等 . 黄芪炮制技术研究进展 [J]. 中国民族民间医药，2019，28（22）：74-77.
[56] 王智民，叶祖光，肖诗鹰，等 . 对中药配方颗粒发展的几点建议和应用前景分析 [J]. 中国中药杂志，2004，29（1）：5-7.
[57] 徐玉玲，雷燕莉，曾立，等 . 中药配方颗粒品种统一标准的有关问题探讨 [J]. 中草药，2020，51（20）：5389-5394.
[58] 陈士林，刘安，李琦，等 . 中药饮片标准汤剂研究策略 [J]. 中国中药杂志，2016，41（8）：1367-1375.
[59] Gu S，Lin P，Ou R，et al. Discussion on several statistical problems in establishing quality standards of standard decoctions [J]. Chinese Herb Med，2022，14（1）：36-47.
[60] 倪丽丽，戴莹，窦志华，等 . 茵陈标准汤剂量值传递规律研究 [J]. 中草药，2020，51（11）：2954-2966.
[61] 王小亮，贾建忠，杨欣，等 . 近红外透射光谱法快速测定布洛芬缓释胶囊释放度 [J]. 药物分析杂志，2012，32（10）：1898-1902.
[62] 吴思俊，仇萍，彭晓珊，等 . 在线监测技术在药物混合过程中的应用进展 [J]. 中南药学，2019，17（9）：1425-1430.
[63] 吴思俊，张智勇，李正，等 . 基于近红外光谱技术的清咽片简化模拟混合过程终点判断方法研究 [J]. 药学学报，2020，55（6）：1257-1264.
[64] 杨婵，徐冰，张志强，等 . 基于移动窗 F 检验法的中药配方颗粒混合均匀度近红外分析研究 [J]. 中国中药杂志，2016，41（19）：3557-3562.
[65] 薛忠，徐冰，张志强，等 . 药物粉末混合过程在线监控技术研究进展 [J]. 中国药学杂志，2016，51（2）：91-95.
[66] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：6.
[67] 于佳琦，徐冰，黄雨妍，等 . 基于在线浊度传感器的中药颗粒剂溶化性评价和分类研究 [J]. 中国中药杂志，2020，45（2）：259-266.
[68] 于佳琦，徐冰，李婉婷，等 . 两种在线传感器评价中药配方颗粒溶化性研究 [J]. 中华中医药杂志，2020，35（5）：2395-2400.
[69] 黄照博，王龙，康瑶，等 . 桂枝茯苓胶囊的溶出度测试及评价研究 [J/OL]. 中国中药杂志：1-11[2022-06-19]. DOI：10.19540/j. cnki. cjcmm. 20220127.301.
[70] 张智勇，王龙，冯绘敏，等 . 三七原料药材与注射用血栓通（冻干）中皂苷类成分对比分析及转移规律研究 [J]. 质谱学报，2022，43（3）：326-335.
[71] 侯一哲，黎翩，肖红敏，等 . 血塞通滴丸皂苷类成分含量测定及批次一致性评价研究 [J]. 中草药，2019，50（11）：2552-2559.
[72] 吴思俊，王龙，吴红根，等 . 基于多源数据融合技术的盐酸青藤碱制备工艺一致性评价方法研究 [J]. 分析测试学报，2022，41（1）：121-127.
[73] 王晨，时政，刘钱，等 . 不适宜制备中药配方颗粒的中药材品种探讨 [J]. 中草药，2021，52（18）：5775-5781.

（收稿日期：2022-06-09；修回日期：2022-06-25）

中药九蒸九晒炮制技术研究进展

吴思俊[1, 2]，王龙[1, 2]，赵铭威[1]，钟淑梅[3]，吴卫刚[3]，李文龙[1, 2*]（1.天津中医药大学中药制药工程学院，天津　301617；2. 组分中药国家重点实验室，天津　301617；3.九信（武汉）中药研究院有限公司，武汉　430050）

摘要：中药炮制是在中医药理论的指导下，根据临床辨证施治的用药需求及药材本身性质将中药材加工成中药饮片的传统方法和技术，在增效减毒、改变药性等方面发挥着重要作用，是中医用药的特点之一。传统炮制的手段十分丰富，其中又以耗时漫长、工序复杂的“九蒸九晒”炮制方法为典型。该文以查阅相关文献、咨询专业学者等为主要方法，考证探究了古法所述“九蒸九晒”的概念以及现代中药制药中“九蒸九晒”的应用，并选取炮制前后药性药效发生较大改变的何首乌为实例，对近年来关于“九蒸九晒”的炮制机制及效果的研究情况进行综述，对相关的研究方法及评价标准等内容提出建议以供参考。

关键词：九蒸九晒；古法炮制；何首乌；增效减毒

中图分类号：R283.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2015-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.009

Research progress in repeatedly steamed and sundried of traditional Chinese medicine

WU Si-jun[1, 2], WANG Long[1, 2], ZHAO Ming-wei[1], ZHONG Shu-mei[3], WU Wei-gang[3], LI Wen-long[1, 2*] (1. *College of Pharmaceutical Engineering of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617; 2. *State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617; 3. *Jiuxin (Wuhan) Institute of Traditional Chinese Medicine Co*., *Ltd*, *Wuhan* 430050)

Abstract: Under the guidance of traditional Chinese medicine (TCM) theory, processing is a feature of TCM, TCM into decoction pieces based on specific demand and properties of TCM, which plays an important role in effect-enhancement and toxicity-reduction, and drug properties changement. Traditional processing methods vary greatly, which include the repeatedly steamed and sundried, characterized by time-consuming and complex operation processes. This paper explored the concept of “repeatedly steamed and sundried” and its application in modern TCM. *Polygonum multiflorum* was taken as an example, the properties and efficacy of which have changed greatly before and after the processing. The paper reviewed the research on the processing mechanism and effect of this method in recent years to provide reference for relevant research and evaluation standards.

Key words: repeatedly steamed and sundried; ancient processing; *Polygonum multiflorum*; effect-enhancing and toxicity-reducing

蒸、晒是中药传统炮制中两种常规技术。蒸一般指将净选后的药材装入蒸制容器中用水蒸气进行加热，一般以蒸透为度。晒可去除药材中所含水分，减小体积，已便于保存和运输。“九蒸九晒”又称“九蒸九曝”，是古代本草中常见的一种药材炮制方法，该法将蒸晒结合并反复运用，使药材最大限度发挥疗效并减轻其毒副作用。历代本草中记载的运用“九蒸九晒”法进行炮制的药材

基金项目：河北省省级科技计划资助项目（No.21372503D）；国家重点研发计划中医药现代化专项（No.2019YFC1711500）；河北省产业创新创业团队（No.215A2501D）。

作者简介：吴思俊，男，在读博士研究生，主要从事中药质量控制和制药过程分析技术研究，email：wusijun_996@163.com

[*] **通信作者：**李文龙，男，副研究员，博士研究生导师，主要从事中药质量控制和制药过程分析技术研究，email：wshlwl@tjutcm.edu.cn

有多种，多为植物根、根状茎及果实种子，其目的除起到增效减毒作用外，少部分药材为满足便于食用的需求也常使用此法。然而在现代中药制药过程中，“九蒸九晒”炮制法因过程烦琐，效率较低，不再为多数企业采用，只有少数厂家坚持此法炮制。目前国内关于“九蒸九晒”的研究较少，主要集中在部分药材，其中最具代表性的为“四大九蒸货”，即地黄、黄精、何首乌、大黄[1]。

1　古法九蒸九晒考证

1.1　九蒸九晒的最初记载

九蒸九晒炮制方法发展历史悠久，其最早记载于南北朝时期，梁·陶弘景《本草经集注》中就有关于胡麻九蒸九晒炮制法的记录，即“服食家当九蒸、九曝、熬、捣，饵之断谷，长生，充饥”[2]。文献中首次提出九蒸九曝，表明古人在那时就已开始探索九蒸九晒并且积累了一定的用药经验，才能得出胡麻经此法炮制后可增强补益之功的结论。由于与“三”一样，常作泛指，代指多次，因而古籍记载中“九蒸九晒”的“九”不能确指为蒸晒九次，可能大于九次，也有可能在两次到九次之间，具体蒸晒次数需依据药材的颜色、形态和光泽进行判断。并且古语中“九”具有多方面的含义，有表示准确数，有表示行为多次反复，也有因音同“久”而指代长时间。

1.2　九蒸九晒的历代发展

随着中医药事业的迅速发展，唐宋时期，九蒸九晒炮制法得到了广泛的应用。在本草著作中记载的九蒸九晒品达十余种，其中，较为常用的中药材有地黄、黄精、何首乌、大黄、豨莶等[3]。明清时期，九蒸九晒炮制法的发展达到鼎盛，针对药材进行的单纯九蒸九晒逐渐衍生为加入辅料以改变药性增强药效，对于毒性药物还可减轻其毒副作用，据古代医书记载的常用辅料有黄酒、黑豆、砂仁等[4]。

2　代表性中药材九蒸九晒历史考证

2.1　地黄九蒸九晒考证

地黄是我国“四大怀药”之一，也是应用传统九蒸九晒法进行炮制的药材之一。炮制前的干地黄清热凉血、养阴生津，炮制后的熟地黄具有补血滋阴、益精填髓的功效，主要用于治疗心悸怔忡、血虚萎黄、月经不调、崩漏下血等[5]。地黄的九蒸九晒炮制方法始见于唐代孙思邈《千金翼方》，而后在数本本草著作中皆有记载（见表 1）。从古籍记载中不难发现，地黄九蒸九晒不一定指严格意义上的九次蒸晒过程，也可能是长时间的反复蒸晒，直至“色黑如漆，味甘如饴”为止，其目的是为改变生地黄性寒凉血的特点，使其药性温和。

表 1　本草中关于地黄九蒸九晒方法记载

Tab 1　Records of repeatedly steamed and sundried for Rehmanniae Radix

朝代	出处	方法
唐	《千金翼方》	“造干地黄法……古法九遍止”[6]
宋	《本草图经》	“今干之法……下肥地黄浸漉令浹，饭上蒸洒三四过，时时浸漉转蒸讫，又暴使汁尽，其地黄当光黑如漆，味甘如饴糖，须瓷器内受之，以其脂揉喜暴润也”[2]
元	《汤液本草》	“地黄假火力蒸九次，故能补肾中元气”[7]
明	《本草纲目》	“熟地黄拣取沉水肥大者……九蒸九晒乃止”[8]
清	《本草述》	“地黄九蒸九晒方熟”[9]
民国	《增订伪药条辨》	“一经蒸晒，其色便黑……中心微黄者次之”[10]

2.2　黄精九蒸九晒考证

黄精在我国已有几千年的用药历史，具有补气养阴、健脾润肺、滋肾填精的功效，主要用于治疗脾胃气虚、肺虚燥咳、腰膝酸软、精血不足等症状。黄精始载于《名医别录》，被誉为“气血双补之王”[11]。然而，黄精生品具有刺激咽喉的不良反应，《食疗本草》记载：“蒸之，若生则刺人咽喉，曝使干，不尔朽坏”。黄精生品服用时会产生口舌麻木、咽喉不适等症状，并且生黄精或黄精的汁液可使皮肤瘙痒，所以生黄精应经炮制消除其刺激咽喉等不良反应后才可服用。关于黄精炮制方法的相关记载较为丰富，自南北朝至今，共记载了 20 余种黄精炮制方法，较为经典的有单蒸、重蒸、九蒸九晒、酒蒸、黑豆制等[12]。其中，九蒸九晒炮制法应用最为广泛（见表 2）。生黄精益脾润肺、去除风湿，经九蒸九晒后药性发生改变，可滋肾阴、补气血，不仅可有效去除生品服用时的麻感，还增强了其补益之功。

表 2　本草中关于黄精九蒸九晒方法记载

Tab 2　Records of repeatedly steamed and sundried for Polygonatum cyrtonema

朝代	出处	方法
唐	《食疗本草》	“饵黄精可取瓮子……即暴之第一遍，蒸之亦如此，九蒸九曝”[2]
五代后蜀	《蜀本草》	“今人服用，以九蒸九曝为胜”[2]
明	《救荒本草》	“山中人采根，九蒸九暴……令极熟。若不熟，则刺人喉咽，久食长生辟谷。”[13]
明	《本草蒙筌》	“九蒸九曝，可以代粮，又名米脯”[6]
明	《本草纲目》	“黄精二斤……九蒸九晒，为末”[8]
清	《本草从新》	“黄精去须，要九蒸九晒用”[14]
清	《得配本草》	“洗净泥沙，蒸晒九次用”[15]

2.3　何首乌九蒸九晒考证

何首乌用药历史悠久，滋补之功显著，早在

明朝《本草纲目》中记载“此物气温味苦涩，苦补肾，温补肝，涩能收敛精气，所以能养血益肝，固精益肾，健筋骨，乌发，为滋补良药”[16]。然而，生品何首乌具有一定的毒副作用，服用不当可能会对人体造成损伤。因此，在服用前对生首乌进行适当的炮制处理是至关重要的一环。纵观古今，何首乌九蒸九晒炮制经历了一段漫长的历史演变。在唐代以前，何首乌的炮制方法主要是净制、切制。唐代开始使用黑豆制何首乌。黑豆味甘，性平，入肾经，经黑豆制后的何首乌滋补肝肾、乌须发的功效得到增强。通过查阅古代本草著作，自唐代《仙授理伤续断秘方》中记载黑豆制何首乌后相继出现了多种炮制方法，如酒制、泔制、九蒸九晒等[17]。其中，宋代开创了何首乌九蒸九晒的历史先河，九蒸九晒炮制古法从此得到了广泛重视。传统认为，生首乌经反复蒸晒后味甘性温，一方面可改善其药性，增强滋补功能，另一方面还可减弱毒性。表 3 记录了古代本草著作中关于何首乌九蒸九晒的方法。明清之前，何首乌九蒸九晒只是单纯使用清蒸法，强调反复蒸晒后方可服用，其目的为起到增效减毒的作用。随着中医药事业的发展，明清时期，该法逐渐演变为使用黑豆多次蒸制，相较于唐代黑豆制何首乌，前者更加注重蒸晒的次数和程度，以达到充分消除生品毒副作用的目的，经九蒸九晒炮制工艺后的何首乌具有补肝肾、益精血、强筋骨、乌须发等功效。

表 3 本草中关于何首乌九蒸九晒方法记载

Tab 3 Records of repeatedly steamed and sundried for Polygonum multiflorum

朝代	出处	方法
宋	《太平圣惠方》	“九蒸九曝捣罗为末”[6]
宋	《本草图经》	“九蒸九曝，乃可服”[2]
明	《本草品汇精要》	“九蒸九曝并勿犯铁器”[18]
明	《本草纲目》	“何首乌赤白各一斤……如此九蒸九晒，乃用”[8]
清	《得配本草》	“以黑豆拌，蒸晒九次用。”[15]
清	《本草纲目拾遗》	“黑豆……今人以制何首乌，取以引入肾经也……”[19]
民国	《本草正义》	何首乌……则必以九蒸九晒方能味厚入阴、填塞善守”[20]

2.4 大黄九蒸九晒考证

大黄属中药常用泻下药之一，性味苦寒，主要是以清泻为功，荡涤肠胃积滞，推陈出新，从而达到安和五脏的效果，此外，大黄还具有抗菌消炎、清热泻火、凉血解毒的功效。大黄在我国用药历史悠久，始载于《神农本草经》，多产于甘肃、四川等地。然而，生大黄气味重浊，走而不守，直达下焦，其泻下作用竣烈，易伤胃气，所以服用前需经炮制，以纠正生品过偏之性，更好地满足临床用药需求[21]。有相关著作记载的大黄炮制方法种类众多，从汉代首次记载的去皮酒蒸法，再到唐代衍生出的米下蒸、醋煎、酒蒸、酒炒等炮制方法。发展至宋代时，大黄炮制方法得到了进一步扩充，九蒸九晒法、醋炒、酒洗蒸、灰色煨、皂荚水煮等炮制方法相继出现，其中九蒸九晒大黄（俗称九制大黄）在民间应用颇为广泛，历代医家对其倍加推崇和肯定（见表 4）。宋明时期，大黄多用九蒸九晒法进行处理，明代多以酒为辅料反复蒸制大黄，因酒性热，主发散，大黄经酒蒸之后可大幅减弱药材本身的寒性并能缓解其竣下之力，适合老人、小孩等体质虚弱的患者服用。

表 4 本草中关于大黄九蒸九晒方法记载

Tab 4 Records of repeatedly steamed and sundried for rhubarb

朝代	出处	方法
宋	《圣济总录》	“九蒸九暴干”[6]
宋	《博济方》	“醋浸两宿，于甑上蒸九度”[6]
明	《鲁府禁方》	“用酒拌九蒸九晒为末”[6]
明	《寿世保元》	“酒蒸九次，极黑”[6]

3 中药材炮制中九蒸九晒的现代研究

3.1 九蒸九晒应用概况

历史上，关于运用九蒸九晒炮制法进行处理中药材的相关记载众多，这种传统的炮制古法被不少医家提倡和推广。然而，在现代化生产中，九蒸九晒炮制法因太过烦琐且生产效率很低，再加上患者用药需求量大、制药生产效率要求高、相关部门监管严格、企业运营压力大等众多因素，故在现代制药生产过程中已经很少用到这种传统炮制方法。但是仍然有少数企业因一些药材药效的要求坚持使用九蒸九晒工艺进行炮制。如四川省川源药业有限公司至今仍使用九蒸九晒炮制何首乌，其炮制工艺已于 2011 年被列入眉山市非物质文化遗产名录。山西广誉远国药有限公司仍采用九蒸九晒法炮制地黄。

3.2 地黄九蒸九晒现代研究

古代九蒸九晒法炮制地黄时要求蒸制过程忌铁、铝，只能用铜。每次蒸制前选优质个大者洗净、润透，用特殊工艺处理后装入蒸笼。第一次蒸制两日两夜，然后取出晾干，拌入黄酒、砂仁两种辅料，用手揉搓均匀，再晒一日晾一夜，以

此类推至九蒸九晒，耗时二十余天才能制成。显然，若严格按照古代传统九蒸九晒法炮制地黄对大多数企业来说并不现实。根据 2020 年版《中国药典》记载，地黄炮制方法有两种[22]：① 取生地黄，照酒炖法炖至酒吸尽，取出，晾晒至外皮黏液稍干时，切厚片或块，干燥，即得（每 100 kg 生地黄用黄酒 30 ～ 50 kg）；② 取生地黄，照蒸法蒸至黑润，取出，晒至约八成干时，切厚片或块，干燥，即得。药典中共收载鲜地黄及其炮制品生地黄、酒炖地黄、清蒸地黄。虽然关于九蒸九晒炮制地黄的生产应用很少，但相关领域学者并未停止对这种炮制古法的研究探索。

现代研究发现，运用九蒸九晒法炮制地黄会对其化学成分及含量变化产生巨大影响，于临床上则体现在改善疗效上。孟祥龙等[23]运用 HPLC 法探究经九蒸九晒炮制后熟地黄中化学成分的含量变化。随着蒸晒次数的增加，熟地黄中梓醇、益母草苷、毛蕊花糖苷、蔗糖、水苏糖及棉子糖含量均减少，地黄苷 A 及地黄苷 D 略有增加，5-羟甲基糠醛（5-HMF）、葡萄糖、果糖、甘露三糖含量均增加。并且研究发现地黄经第 3 次、第 4 次及第 6 次蒸晒后相关化合物含量波动较大。5-HMF 是一种由呋喃环组成的小分子化合物，通过毒理学研究发现该化合物具有皮肤、黏膜和呼吸道刺激性，并且可以诱导Ⅰ型超敏反应的发生[24-26]。5-HMF 含量的减少可有效缓解地黄对眼睛、皮肤和黏膜的刺激作用。炮制后熟地黄中的多糖成分含量明显高于生地黄，地黄多糖的积累可增强药物免疫调节、抗肿瘤、降血糖作用[27-28]。为进一步了解地黄九蒸九晒后其中环烯醚萜苷类化学成分的变化规律，刘明等[29]采用 HPLC 法测定熟地黄蒸晒不同次数后益母草苷和梓醇两种成分的含量。结果发现，随着蒸晒次数的增加，益母草苷和梓醇含量均减少。通过学者们的研究探索，可以证实使用九蒸九晒炮制地黄能起到增效减毒的作用。但是，中药是一个极其复杂的多组分体系，若仅根据几种化学成分含量变化就对药效改变下定论并不严谨，关于九蒸九晒的具体作用机制还有待进一步的研究探索。此外，古代本草中多次记载，地黄需反复蒸晒至“黑如漆，甘如饴”，虽然目前大多数企业没有采用九蒸九晒古法炮制，但是在制药过程中，将地黄炮制至“黑如漆，甘如饴”这个程度是有必要的。但是，如何将炮制品颜色控制为漆黑色，并让其甜度达到饴糖程度，最终实现将药材外观性状、味觉信息与药物内部关键成分含量相关联，通过控制药材外观性状和气味信息从而控制炮制程度是一个需要解决的问题。为解决该问题，先进的分析仪器和数据分析算法的引入是很有必要的，这将有利于相关研究的探索与推进。

3.3 黄精九蒸九晒现代研究

从古至今，黄精炮制方法众多，其中以九蒸九晒为主，该法系将鲜黄精洗去泥土，除去须根蒸一日，取出晾干，晒一日再蒸，如此重复 9 次，直到内心现黑色，浊润时为止，最后取出晒干或用微火烘干。近现代，在古法炮制基础上衍生出许多新的黄精炮制方法，例如酒蒸法、熟地汁蒸法等。普通的黄精加工是将黄精晒至须根干脆易折，根茎内部由白变微黄稍软时，反复揉搓至须根脱落，根茎呈半透明、无硬心时，再晒干即可。酒黄精是取净黄精，照酒炖法或酒蒸法炖透或蒸透，稍晾，切厚片干燥后即得，每 100 kg 黄精用黄酒 20 kg[22]。

由于生黄精中黏液质含量较高，在服用时对喉咙有明显的刺激作用。因此，最大限度地减轻其不良反应是古今黄精炮制方法发展的初衷之一[30]。有研究表明，黄精在反复蒸晒的过程中刺激性气味会减弱并且黏液质会发生分解，进而消除服用时的不良反应[31]。王进等[32]运用气质联用技术探究黄精炮制前后挥发性成分的含量变化。研究发现黄精经蒸晒后正己醛、莰烯等成分含量明显减少。除起到减毒作用外，反复蒸晒黄精还能积累有效成分，增强药效。在黄精的药效物质中，多糖占据着重要地位。黄精多糖可以提高人体免疫功能，降血糖，并且具有良好的抗菌、抗病毒活性[33-34]。胡叶青等[35]采用紫外可见分光光度法测定九华黄精九蒸九晒炮制过程中总多糖含量并探究其变化规律。结果显示，随着蒸晒次数的增加，栽培和野生九华黄精中总多糖含量呈现先增加后减少趋势，其中野生黄精总多糖含量由一蒸一晒的 22.18% 降至九蒸九晒的 12.67%，当蒸晒 5 次时含量最高，达到 32.81%。

4 何首乌九蒸九晒现代研究

4.1 生首乌与制首乌

中药何首乌为蓼科植物何首乌（*Fallopia multiflora* 或者 *Polygonum multiflorum* Thunb.）的干燥块根，主产于河南、湖北、贵州等地，其主要活性成分有大黄素、大黄素甲醚、二苯乙烯苷等[36]。何首乌有生首乌与制首乌之分。生首乌多直接切片入药，味甘、苦、涩，性平，具有解毒、

消痈、润肠通便等功效，常用于治疗瘰疬疮痈、风疹瘙痒、肠燥便秘等。制首乌性微温，味甘、涩，具有补肝肾、乌须发、强筋骨等功效，用于血虚萎黄、须发早白、腰膝酸软等症状。古方中何首乌入药多为炮制品，很少有毒副作用的相关报道，近年来，大量的临床报道显示患者服用未经炮制或炮制不当的何首乌后有肝损伤的风险，主要为肝毒性[37-38]。这有可能与近代以来炮制工艺的不断简化有关。因此在挖掘和继承传统炮制的基础上进行炮制方法的研究显得尤为重要。

4.2 何首乌炮制方法

4.2.1 何首乌传统炮制方法 《本草纲目》中关于九蒸九晒何首乌的记载最为详细，即取生首乌与赤白芍各一斤，先用竹刀削去粗皮，淘米水浸泡一夜后切片，取三斗黑豆，用水浸泡，于砂锅中将何首乌和黑豆交替铺展直至铺尽，蒸至黑豆熟透后，取出黑豆后将何首乌晒干，然后取新鲜黑豆复蒸之，如此重复九次即得。传统认为何首乌经九蒸九晒炮制后，一方面可改变药性增强滋补之功，另一方面还能降低自身毒性，最终起到增效减毒的目的。何首乌也被誉为最具代表性的“四大九蒸中药”之一[39]。

4.2.2 何首乌现代炮制方法 随着制药生产工艺的发展，何首乌传统炮制工艺逐渐简化，传统九蒸九晒炮制法多不采用而是用一蒸一晒代之。据2020 年版《中国药典》记载，制首乌是由两种方法制得：① 清蒸或将何首乌片与黑豆汁拌匀后蒸，蒸制外表皮呈棕褐色，晒干既得；② 将生首乌片与黑豆汁拌匀，置于非铁质容器内炖至汁液吸尽[22]。每 100 kg 何首乌用黑豆 10 kg。与传统何首乌九蒸九晒法相比，现代炮制法可谓获得了极大的简化。

4.2.3 何乌首古今炮制法异同点 古今何首乌炮制方法虽存在差异，但却有异曲同工之妙[40]。两种炮制方法的相同点在于：① 两种方法都以黑豆作为辅料，黑豆性温，能起到活血、滋补肝肾的作用，可有效缓解何首乌致泻的不良反应，并能增强其滋润补肾、乌须发的功效；② 在炮制过程中都忌用铁器，有研究表明，何首乌中的鞣质能与铁产生化学反应，忌用铁器，能有效防止在炮制过程中产生某些化学成分从而对何首乌的药性药效产生不良影响。黑豆辅之和忌用铁器是何首乌炮制过程中最为关键的因素，现代炮制方法在开拓创新的基础上很好地继承了这两点。关于两种炮制方法的区别也存在两点：① 传统炮制工艺要求黑豆与何首乌隔层铺展，而现代炮制方法并没有强调这一点；② 炮制时间上的悬殊。与传统九蒸九晒法相比，现代炮制方法虽然节省了大量工序和时间，但是两种方法制得的炮制品在质量上的具体差异还需做更加深入的探究。

4.3 关于何首乌九蒸九晒实现增效减毒的现代研究进展

4.3.1 概述 炮制何首乌的核心目的是“增效减毒”[41-43]。炮制“减毒与增效”的双重效果主要通过几个途径实现，即“减有毒成分以减毒，增有效成分以增效”“高毒低效物质转化为低毒高效物质”和“借助外源炮制辅料以增效减毒”等。古代对于中药炮制的质量控制，主要以制品外观性状为主。而现代在外观性状的基础上加上化学物质的含量作为质量控制手段，不仅在外观上有保证，还能保证关键药效物质的含量符合临床治疗的要求。但由于中药不同于西药，是一种成分极为复杂的混合物质，成分及含量都有很大的不确定性，大部分作用机制还不明确，种种原因导致关于九蒸九晒作用机制的研究在一定程度上缺乏科学性，只能够根据各种实验结果进行合理猜测。从而使得相关研究报道较少，且始终难有实质性进展。

4.3.2 研究方法存在的问题

① 取样：现代研究在取材时只取一个地区的样品，且都采用了同一批样品进行实验，尽管在该特定批次的药材中具有较好的重复性，但没有考虑到产地、季节、土壤、气候等因素对何首乌中成分的影响，使得单个实验代表性不强。

② 有效成分：中药是成分复杂的混合物质，药效也表现在很多方面。且中药药材的临床使用多为诸多药材组合而成的药方，药物之间也存在有药效的相互影响。这些因素导致九蒸九晒增效减毒作用的实现难以确定衡量标准，即便确定，单一成分的变化也不足以说明整体药效的改变。

③ 炮制方法：不同研究中对于何首乌九蒸九晒的炮制方法不尽相同，是否用黑豆汁浸泡炮制，浓度如何，是否“忌铁”，是否将炮制中产生的汁水回加到何首乌中，炮制时间长短等。由于中药本身的复杂性，在九蒸九晒炮制过程中采用统一的标准是不合理的。但是需要对炮制过程工艺进行详尽研究，探究炮制工艺与产品质量间的内在关联，从而挖掘炮制方法的影响机制。然而，目前九蒸九晒机制研究尚不深入，也存在对炮制次数产生的质疑。由于九蒸九晒本身并不一

定指九次蒸晒，很可能只是泛指多次或长时间，实际上九蒸九晒何时结束应当有其他的认定方式。因而从研究的出发点、实验结果的总结等角度而言，不少现代研究得出的结果并不科学，无法指导九蒸九晒炮制方法的应用。

④ 结果认定：一些实验中测得的成分含量变化实际上并无清晰明显的规律，不能说明该物质的含量变化是由九蒸九晒的炮制方法导致的，该结果的得出实际上可能存在一定的主观性。

4.3.3　致毒性的机制认识　近年来，大量的临床报道显示服用未经炮制或炮制不当的何首乌存在肝损伤的风险 [44-45]。何首乌的毒性主要为肝毒性 [46-48]。目前对何首乌致毒性的机制认识主要有以下几种观点：① 何首乌中含有的主要成分如蒽醌类、鞣质类物质，对肝脏有一定毒性作用，其中以结合蒽醌在肝毒性中占据主导地位；② 何首乌可能诱导或抑制肝脏中肝药酶的表达，从而增加其他药物毒性，亦或与遗传性肝脏代谢酶缺陷有关；③ 在机体代谢过程中，产生某种肝毒性物质，引起肝细胞脂质过氧化致肝细胞坏死；④ 何首乌导致肝损伤的生物学机制可能是由炎症应激和代谢通路发生紊乱共同作用的结果。

4.3.4　增效减毒作用的原理猜想　药典中对于含量测定部分，何首乌主要测定二苯乙烯苷与结合蒽醌的含量，制首乌主要测定二苯乙烯苷与游离蒽醌的含量。近年来，一些学者围绕九蒸九晒炮制法对何首乌增效减毒的作用原理进行了探究，研究重点主要是围绕何首乌炮制前后化学成分含量的变化规律。葛朝亮等 [49] 对何首乌九蒸九晒后主要成分的含量进行分析，结果显示炮制后二苯乙烯苷含量呈梯度下降，游离蒽醌含量上升。杨文宇等 [50] 采用传统的黑豆共蒸法进行何首乌九蒸九晒炮制，研究发现，制首乌中二苯乙烯苷含量从炮制前的 3.56% 下降至 1.42%，游离蒽醌含量从炮制前的 0.067% 上升至炮制后的 0.11%，而水分及醇溶性浸出物的含量无显著变化。张曼华 [51] 发现制首乌中二苯乙烯苷、鞣质、儿茶素含量低于生品，游离蒽醌含量高于生品，另外研究还发现，何首乌经炮制后产生了新的化学成分，包括 5-羟基麦芽酚、5-HMF、2，3-二氢 -3，5-二羟基 -6-甲基 -4-氢 - 吡喃 -4-酮（DDMP）、3，5-二羟基 -2-甲基 -4-氢 - 吡喃 -4-酮、琥珀酸。然而，目前没有明确的证据显示何首乌在炮制后是如何实现增效减毒作用的。

就减毒而言，依据学界对于何首乌肝毒性机制的认识，提出以下几种可能 [52-53]。蒽醌成分可能是造成肝损伤的主要成分，其中蒽酚衍生物在结肠部分能够形成高活性的蒽酮，吸收后可引起肝损伤。而九蒸九晒通过反复长时间的蒸晒，将有毒物质分解，或是改变其结构而使其变为无毒物质，或抑制药材中某些酶的活性。二苯乙烯苷作为何首乌中的主要成分，也是主要活性成分，常作为何首乌药效成分研究，但近期也有人提出 [54]，二苯乙烯苷也可能是造成肝损伤的原因之一。

对于增效作用，具体到何首乌中二苯乙烯苷及蒽醌类物质的含量变化上，结合文献资料，推测与以下几个因素有关：① 现代药理学研究表明 5-HMF 具有抗氧化、改善学习记忆、抗过敏、保护神经细胞、抗炎等药理作用，而二苯乙烯苷具有降血脂、抗衰老、抑制肿瘤等功能，因此，可能与制何首乌补肝肾、强筋骨、乌须发的功用有关；② 何首乌生品及制品中二苯乙烯苷存在顺反异构，也可能是其他某种未知物质存在立体异构，且两种异构体的效果差异较大，在炮制过程中生品中活性分子不稳定，受加热时间和温度等的影响，发生构型的变化；③ 药材中存在大量结构相似的物质，反复蒸晒使得这些物质之间相互转化，并由于条件的限定，出现某一种特定成分含量的逐渐上升，从而导致药效的增强；④ 二苯乙烯苷及蒽醌类物质在何首乌中都存在分解、合成两个互逆的过程，反复的蒸晒过程通过改变外界温湿度等条件导致其含量的变化；⑤ 何首乌的作用机制很可能是多种物质以一定含量比例共同作用的结果，药效与各种物质含量的比例相关性较强，而使用九蒸九晒炮制方法能较大程度地增强这种作用；⑥ 药材生品中存在的毒性成分在其含量降低时转变为其他有效成分。

此外，我们认为炮制过程中加入的辅料对于增效减毒具有较大影响，如辅料能提供合成有效成分必要的物质，或能吸收毒性成分等。探讨辅料本身在炮制中所起的作用，也需要进一步的研究。

5　总结与展望

本文通过对九蒸九晒这一传统药材炮制方式的探究，考查了该法的概念及古今应用，并就其增效减毒的具体作用机制进行了文献的查阅与思考。九蒸九晒本指对于药材进行反复多次长时间的蒸晒，以实现减少有毒成分、增强药效、便于保存等目的。

纵观近年关于何首乌炮制工艺简化的文献，其研究基础大多停留在炮制前后各类成分含量变

化与工艺参数的关系分析上，这种单纯化学成分的变化并不能全面揭示整个单味中药饮片功效或毒性的改变。同时，由于何首乌成分复杂，二苯乙烯苷、磷脂类、蒽醌苷类等各成分及其含量比例差异都有可能产生一定的毒性作用，目前其毒性物质基础尚难以揭示。因此中药炮制生为熟引起的药效或毒性的改变与其内在物质基础的变化有关，但是对其炮制机制的研究不应局限在化学成分的复杂性，如何将炮制工艺关联生物学指标与中医临床疗效是根本。何首乌等药材炮制机制的阐释应在化学成分改变的基础上，重视增效减毒相关指标评价，综合运用适宜的技术方法，形成基于急性及长期试验的毒理学研究与关联生物学指标的药效学评价体系，为炮制机制阐释提供参考依据。现代对九蒸九晒增效减毒改变药性作用的机制研究尚有较大欠缺，存在研究方法不严谨、实验结果主观性较强等诸多问题。笔者认为可以从以下几个方面着手研究：① 加强对中药九蒸九晒前后吸收代谢的相关研究，根据药效成分在胃肠道内的吸收与代谢情况对炮制机制进行深入探索；② 加深炮制方法的理解与工艺研究，例如探究生品是否去皮、炮制器皿、炮制温度和时间对炮制品质量的影响；③ 关于中药炮制过程中所用辅料的相关研究需要引起重视；④ 借助较为先进的分析技术（电子舌、电子鼻、电子眼、近红外光谱技术等），获取并充分挖掘炮制过程产生的信息，从而提升炮制过程控制水平和丰富炮制品质量评价方法；⑤ 蒸晒时间是一个非常重要的炮制过程参数，在实际炮制过程中，不同药材的蒸晒时间往往不同，但目前还是多依赖工人经验来确定具体的蒸晒用时，并没有统一的标准。近年来，已有学者就蒸晒用时和蒸晒次数进行了探究，采取的评价指标主要是根据药材炮制前后的药效学指标和有效成分含量变化。笔者认为，炮制成本同样是一个重要的评价标准，当炮制品质量达到预期时，需要准确及时地进行炮制终点以降低生产成本。

参考文献

[1] 赵晖，苗艳艳，苗明三 . 中药九蒸九晒的分析和思考 [J]. 时珍国医国药，2018，29（11）：2713-2714.

[2] 唐慎微 . 证类本草 [M]. 北京：中国中医药出版社，2011.

[3] 严淑婷，樊浩，李若岚，等 . 中药“九蒸九晒”的历史沿革及现代研究 [J]. 中国药师，2020，23（1）：136-141.

[4] 彭星星，王德群，彭华胜 . 历代本草中“九蒸九晒”药材加工的沿革与变迁浅谈 [J]. 皖西学院学报，2018，34（2）：92-99.

[5] 杜珂，高晓霞，王锋，等 . 基于药效物质基础的熟地黄质 - 效评价研究进展 [J]. 中草药，2019，50（6）：1477-1484.

[6] 王孝涛 . 历代中药炮制法汇典（古代部分）[M]. 南昌：江西科学技术出版社，1998.

[7] 王好古 . 汤液本草 [M]. 北京：中国科技医药出版社，2011.

[8] 李时珍 . 本草纲目 [M]. 刘衡如，刘山水，校注 . 北京：华夏出版社，2013.

[9] 刘若金 . 本草述校注 [M]. 张琳叶，郑怀林，胡玲，校注 . 北京：中医古籍出版社，2005.

[10] 曹炳辉 . 增订伪药条辨 [M]. 刘德荣，点校 . 福州：福建科学技术出版社，2004.

[11] 朱巧，邓欣，张树冰，等 . 黄精多糖的提取工艺、组分分析与含量测定研究进展 [J]. 中南药学，2017，15（11）：1586-1590.

[12] 易思荣，全健，李品明，等 . 黄精的炮制研究进展 [J]. 中华中医药杂志，2017，32（10）：4575-4578.

[13] 朱橚 . 救荒本草 [M]. 倪根金，校注 . 北京：中国农业出版社，2008.

[14] 吴仪洛 . 本草从新 [M]. 上海：上海卫生出版社，1957.

[15] 严洁，施雯，洪炜 . 得配本草 [M]. 北京：人民卫生出版社，2009.

[16] 周杨静，唐俊峰，高峰，等 . 基于“九蒸九晒”炮制法的何首乌主要化学成分含量变化及对大鼠肝脏的影响实验研究 [J]. 中南药学，2020，18（4）：543-548.

[17] 王亭，龚千锋 . 何首乌炮制后化学成分及药理作用的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（2）：220-226.

[18] 刘文泰 . 本草品汇精要 [M]. 曹晖，校注 . 北京：华夏出版社，2004.

[19] 赵学敏 . 本草纲目拾遗 [M]. 北京：中国中医药出版社，2007.

[20] 张山累 . 本草正义 [M]. 太原：山西科学技术出版社，2013.

[21] 李会芳，王伽伯，曲毅，等 . 大黄炮制前后致泻效价的比较 [J]. 中国中药杂志，2012，37（3）：302-304.

[22] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：124-126，306-307.

[23] 孟祥龙，马俊楠，张朔生，等 . 熟地黄炮制（九蒸九晒）过程中药效化学成分量变化及炮制辅料对其影响研究 [J]. 中草药，2016，47（5）：752-759.

[24] Zirbes L，Nguyen BK，De Graaf DC，et al. Hydroxymethylfurfural：a possible emergent cause of honey bee mortality [J]. J Agric Food Chem，2013，61（49）：11865-11870.

[25] Svendsen C，Husoy T，Glatt H，et al. 5-Hydroxymethylfurfural and 5-sulfooxymethylfurfural increase adenoma and flat ACF number in the intestine of Min/ ＋ mice [J]. Anticancer Res，2009，29（6）：1921-1926.

[26] 林琳 . RBL-2H3 细胞评价 5-HMF 及其二聚体 OMBF 的体外免疫毒性以及 PLNA 评价 3 种中药注射液的免疫原性 [D]. 北京：北京协和医学院，2018.

[27] Kwak M，Yu K，Lee PC-W，et al. Rehmannia glutinosa polysaccharide functions as a mucosal adjuvant to induce dendritic cell activation in mediastinal lymph node [J]. Int J Biol Macromol，2018，120（1）：1618-1623.
[28] 彭辉，张华龙 . 地黄多糖对乳鼠心肌细胞缺氧 / 复氧损伤后氧化应激和细胞凋亡的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2016，22（23）：155-160.
[29] 刘明，李更生，王慧森，等 . 地黄九蒸九晒炮制过程中益母草苷的含量测定及其动态变化 [J]. 中国药学杂志，2009，44（9）：658-660.
[30] 易思荣，全健，李品明，等 . 黄精的炮制研究进展 [J]. 中华中医药杂志，2017，32（10）：4575-4578.
[31] 吴毅，王栋，郭磊，等 . 三种黄精炮制前后呋喃类化学成分的变化 [J]. 中药材，2015，38（6）：1172-1176.
[32] 王进，岳永德，汤锋，等 . 气质联用法对黄精炮制前后挥发性成分的分析 [J]. 中国中药杂志，2011，36（16）：2187-2191.
[33] Sun TT，Zhang H，Li Y，et al. Physicochemical properties and immunological activities of polysaccharides from both crude and wine-processed Polygonatum sibiricum [J]. Int J Biol Macromol，2019，143（1）：255-264.
[34] Cai JL，Zhu YL，Zuo YJ et al. Polygonatum sibiricum polysaccharide alleviates inflammatory cytokines and promotes glucose uptake in highglucose-and high-insulin-induced 3T3L1 adipocytes by promoting Nrf2 expression [J]. Mol Med Rep，2019，20（4）：3951-3958.
[35] 胡叶青，胡云飞，吴其国 . 九华黄精九蒸九晒炮制过程中总多糖的含量变化研究 [J]. 佛山科学技术学院学报（自然科学版），2019，37（6）：58-62.
[36] 王浩，杨健，周良云，等 . 何首乌化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（13）：192-205.
[37] 唐志芳，马国，梅全喜 . 何首乌肝毒性研究进展 [J]. 时珍国医国药，2017，28（7）：1722-1725.
[38] 方红玫，朱延焱 . 何首乌有效成分、毒性作用和相关研究进展 [J]. 国际药学
[39] 杨磊，张曼华，陈文明，等 . 基于经典与现代炮制方法对何首乌主要化学成分变化规律研究 [J]. 中华中医药杂志，2018，33（2）：770-772.
[40] 吴志勇 . 探讨《本草纲目》与现代何首乌的炮制方法 [J]. 亚太传统医药，2006，9（1）：80.
[41] 翟旭峰，李柯，娄勇军，等 . 中药何首乌炮制前后特征化学成分的分析 [J]. 中南药学，2016，14（7）：704-708.
[42] 成颜芬，聂欣，谭睿，等 . 基于经典“九蒸九晒”法不同炮制程度何首乌的化学质量概貌评价 [J]. 中国中药杂志，2019，44（23）：5151-5158.
[43] 涂灿，蒋冰倩，赵艳玲，等 . 何首乌炮制前后对大鼠肝脏的损伤比较及敏感指标筛选 [J]. 中国中药杂志，2015，40（4）：654-660.
[44] 崔鹤蓉，柏兆方，宋海波，等 . 从古今炮制方法演变探讨何首乌毒性的潜在影响因素 [J]. 中国中药杂志，2016，41（2）：333-339.
[45] 郜丹，李晓菲，尹萍，等 . 基于炮制减毒思想的何首乌肝毒性物质基础初步研究 [J]. 中草药，2017，48（10）：2044-2050.
[46] Tam HT，Niranjana MH，Dayanand DL，et al. Attributes of Polygonum multiflorum to transfigure red biotechnology [J]. Appl Microbiol Biot，2019，103（8）：3317-3326.
[47] Yang JQ，He YQ，Zou JY，et al. Effect of Polygonum Multiflorum Thunb on liver fatty acid content in aging mice induced by *D*-galactose [J]. Lipids Health Dis，2019，18（1）：128-135.
[48] Yang JB，Liu Y，Wang Q，et al. Characterization and identification of the chemical constituents of Polygonum multiflorum Thunb. by high-performance liquid chromatography coupled with ultraviolet detection and linear ion trap FT-ICR hybrid mass spectrometry [J]. J Pharmaceut Biomed，2019，172（1）：149-166.
[49] 葛朝亮，程钢，余剑萍，等 .“九蒸九晒”传统炮制对何首乌主要化学成分的影响 [J]. 现代中药研究与实践，2017，31（3）：43-47.
[50] 杨文宇，陈祥贵，石泓，等 . 何首乌九蒸九晒炮制过程中质量指标的变化 [J]. 时珍国医国药，2015，26（10）：2414-2418.
[51] 张曼华 . 何首乌九蒸九晒炮制工艺与质量标准研究 [D]. 长沙：湖南中医药大学，2018.
[52] 李春雨，何琴，唐进法，等 . 免疫应激介导的何首乌“九蒸九晒”炮制减毒作用及代谢组学研究 [J]. 药学学报，2017，52（7）：1069-1076.
[53] 俞捷 . 何首乌肝脏不良反应的研究进展 [J]. 中草药，2010，41（7）：1206-1209.
[54] 吴芳，崔真真，郭玲燕，等 . 何首乌炮制与肝毒性研究进展 [J]. 药学研究，2022，41（6）：391-393.

（收稿日期：2022-05-02；修回日期：2022-07-03）

中成药处方审核的证据与标准专题

【编者按】

中成药处方审核是医院药学工作的重要组成，但长期以来，中成药处方审核点评的证据不健全、标准不清晰，影响了其深入发展。其中，中成药联合用药不适宜的界定是其难点，例如寒热冲突、解表与滋补联用等。但是，并非所有中成药均由药性纯粹且单一的寒性药或热性药组成，寒热并用型的组方其实很常见。那么，这些中成药怎样界定？是否可以不进行寒热冲突的审核？怎样通过简明扼要的方式，让医师了解那些会被界定为寒热冲突的联用组合？本专题通过中成药组分的寒热药性量化分析，界定寒热并用型感冒中成药，分析其审核特点；通过基于全品种建立中成药不适宜联用目录并调研分析，来协助临床开展处方合理化行动，为上述工作难点提供解决方案。

【专题主持人】

金锐，男，中药学博士，中国中医科学院西苑医院药学部副主任药师，临床中药师，信息药师。具有中西药联合培养教育背景，中华中医药学会医院药学专业委员会青年委员、中国科协科普专家、《中南药学》青年编委。主要从事中药临床药学和中医药基本理论的研究，主持省部级课题 1 项，市级课题 2 项，以第一作者发表学术文章 50 余篇，SIC 收录 1 篇，主笔专家共识 4 个，主编学术专著 2 部和科普专著 3 部。率先在国内开展中药处方合理性评价标准的探索研究，形成了系列成果；率先在国内开展“汤液经法图”的科学研究，阐明了中医组方配伍的五味补泻原理。运营公众号“小金药师说药事”，原创科普文章 700 余篇，2019 年人民日报社获选“荣耀医者”科普影响力十大人物。

基于药性量化分析的寒热并用型感冒中成药的客观识别与特征研究

杨寿圆[1]，杨彦彪[1]，金锐[2*]（1. 兰州市第一人民医院，兰州　730050；2. 中国中医科学院西苑医院，北京　100091）

摘要：目的　采用数理分析方法识别寒热并用型感冒中成药，并进行组方和功效特征分析，为中成药处方审核和合理用药提供参考。**方法**　筛选出国家医保目录、基药目录中所有解表剂，以及“药智网”中功能主治含有“解表”“外感”“感冒”“上呼吸道感染”及其等价概念的感冒类中成药。数据清洗后，借鉴中药药性理论研究中关于复方寒热之性的相关方法，拟订“三分运算法”和“君臣药性法”两种数学方法，设定阈值区间，计算寻找寒热并用型中成药。以两种计算结果的交集作为最终遴选药品，分析组方和功效特征。**结果**　筛选得到感冒类中成药 180 种，通过“三分运算法”得到寒热并用型感冒类中成药 43 个，通过“君臣药性法”得到寒热并用型感冒类中成药 72 个，两者交集为 29 个，包括感冒清热颗粒、桑姜感冒片、芎菊上清丸、小柴胡颗粒、防风通圣丸等。这些中成药大多含有荆芥 - 薄荷、桑叶 - 紫苏等寒热并用的配伍组合，其说明书功效表述上也存在不明示寒热属性，或同时标有“散寒”和“清热”的两者兼顾特点。**结论**　感冒类中成药里存在较多的寒热并用品种，可用于寒热夹杂型、寒包火型复杂感冒，应在单纯的辛温解表和辛凉解表之外，另设亚类予以管理。在中成药处方审核时，应对寒热并用型感冒中成药的适应证、药品遴选、联合用药等事项予以特殊对待，设置特定规则。

关键词：感冒；中成药；寒热并用；处方审核；药性；数学分析

中图分类号：R288　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2023-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.010

基金项目：首都卫生发展科研专项（No. 首发 2020-2-2081）。

作者简介：杨寿圆，女，主管中药师，主要从事中药临床药学工作，email：shouyuanyang@163.com　*通信作者：金锐，男，博士，副主任药师，主要从事中药临床药学工作，email：jinrui9862@126.com

Objective identification and characteristics of Chinese patent medicine for cold with both cooling and warming properties based on quantitative analysis

YANG Shou-yuan[1], YANG Yan-biao[1], JIN Rui[2*] (1. *The First People's Hospital of Lanzhou*, *Lanzhou* 730050; 2. *Xiyuan Hospital*, *China Academy of Chinese Medical Sciences*, *Beijing* 100091)

Abstract: Objective To use mathematical analysis to identify Chinese medicine for cold, whose compositions contain both cooling and warming property, and to analyze formulation and efficacy to provide reference for the prescription review of Chinese patent medicine and rational drugs use. **Methods** We selected all the diaphoretic recipes from the National Medical Insurance Catalogue (2021) and National Essential Drugs Catalogue (2018). We also selected the Chinese patent medicines for cold which contained concepts such as symptoms of common cold, or upper respiratory tract infection from Yaozhi Database. After data cleaning, we learned from the relevant methods on the properties of Traditional Chinese Medicine (TCM) and proposed two mathematical methods, namely "Tripartite algorithm" and "monarch herb property method". We set the threshold interval to find Chinese patent medicines with both cooling and warming property. The overlapping part of the two calculations was counted, and the formula and efficacy patterns were analyzed. **Results** We obtained 180 species Chinese patent medicine for cold: 43 species via "Tripartite algorithm", 72 species by "monarch herb property method", and 29 species overlapped: Ganmao Qingre granules, Sangjiang cold tablets, Qiongju Shangqing pill, Xiaochaihu granules, Fangfeng Tongshen pill, etc. Most of these Chinese patent medicines included Fineleaf Schizonepeta Herb-Mentha haplocalyx Briq, mulberry leaf-Perilla and other cooling-warming drug combinations, and the instructions did not clearly state both properties, or both marked "scatter cold" and "clear heat" characteristics. **Conclusion** Chinese patent medicines with both cooling and warming property should be distinguished from other medicines, and managed as subcategory. In the prescription review of such Chinese patent medicines with cooling and warming property, we should establish different rules for indications, drug selection, combination medication and others.

Key words: common cold; Chinese patent medicine; drug use with cooling and warming property; prescription review; herb property; mathematical analysis

感冒又称伤风、冒风、伤寒、冒寒、重伤风等，是最常见的外感病之一。从《国家基本医疗保险、工伤保险和生育保险药品目录（2021 年）》（以下简称国家医保目录）分类角度看，感冒中成药分为辛凉解表剂、辛温解表剂、表里双解剂、扶正解表剂、祛暑解表剂五类。从《国家基本药物目录（2018 年）》（以下简称基药目录）分类角度看，感冒类中成药分为辛凉解表剂、辛温解表剂、表里双解剂、扶正解表剂、清热解毒剂五类。其中辛温解表剂与辛凉解表剂是最主要的两个类别，分别用于风寒感冒和风热感冒。

但是，从临床角度看，寒热错杂证是感冒的重要证型，寒热并用是治疗感冒的常见方法。有研究结合临床经验或具体医案，分析病因病机，认为感冒患者中初感于寒者居多，随着病情进展，很快化热，表现为寒热错杂证，治疗须寒热并用[1-6]。另研究发现小儿因其"脏腑娇弱，易虚易实，易寒易热""稚阴稚阳"等生理特点，感冒多见寒热错杂证，采用寒热并用法，疗效肯定[6-8]。

寒热并用型感冒处方在临床感冒治疗中常见，从中成药组方实际看，很多感冒中成药组方也呈现出寒热并用的特点，但其具体识别方法业内尚无明确标准[9-12]。本文尝试在中医药理论体系下，借鉴中药药性理论研究中关于复方药性的研究方法，建立数学模型，识别寒热并用型感冒中成药并分析其组方特点，为中成药联用的寒热冲突评价提供参考。

1 资料与方法

1.1 资料来源

第一步：筛选出国家医保目录、基药目录中所有解表剂；在药智网"主治与功能"中搜索含

有“解表”“外感”“感冒”“上呼吸道感染”四个同义词的感冒中成药，共得到处方 626 首。

第二步：删除含有西药成分的中西药复方制剂。同一通用名的计为 1 首处方。如清热解毒颗粒和清热解毒口服液，处方组成相同，只是剂型不同，记为 1 首处方。最后得到处方 180 首。

1.2 数据同质化处理

单味药的药性寒热参照《中国药典》，药典未收录药物参考《中药大辞典》《中华本草》《全国中草药汇编》等[13-16]。

为更清晰地体现寒热变化作用倾向，在统计药性时，忽略药性大热、大寒、微寒、微热、温、微温之区别，只分寒热两大类。将大热、温、微热、微温都标记为热性，将大寒、凉、微寒都标记为寒性，平性药物不变。如生姜性温，附子大热，防风性温，在统计时均将其标记为热性；石膏性大寒，柴胡性微寒，葛根性凉，在统计时均将其标记为寒性。

对以炮制品入药的，其药性寒热仍赋以生品的药性寒热，如处方中是麸炒白术在统计药性时参考白术，统计为热性。对于单味药提取物的药性也参考原药的药性，如薄荷脑在统计其药性时参考薄荷，统计为寒性。

1.3 数学方法的构建

在中药药性理论关于寒热药性的研究中，对复方寒热药性的界定方法主要有两大类：

第一类是基于方中每一味药的四气五味等药性特征，量化分析全方的分类方法[16-23]。如颜素容等[18]基于单味药的药性指标，分析消渴方寒凉类和温热类方剂的药性特征；王学臣等[19]基于单味药的四气五味设定量化指数，认为半夏泻心汤药偏于热性但整体药性平和，这种分类方法将模糊抽象的概念具体化、标准化，既没有脱离中医药理论体系，又具有客观化和数字化，但是设定准确的量化尺度是其难点。

第二类是基于中医药理论中的君臣药组方原则，以传统方解为主的分类方法[9-12，24-26]。如王艺霖等[9]认为麻杏石甘汤中麻黄辛温宣肺定喘，石膏辛甘寒清肺胃之里热而生津，故全方寒热并用，解表清里；张国铎[24]认为温经汤是从热论治瘀血的代表方，原因之一是方中吴茱萸、生姜、桂枝都能温经散寒暖血，这种分类方法要求分类者有较高的中医药综合能力，能够抓住主要矛盾，简便易行，但方法较为模糊，主观性较强。

本课题组在上述相关研究基础上，根据前期研究经验[27-31]，开发并定义了两种不同的寒热并用型中成药的识别方法，命名为“三分运算法”和“君臣药性法”。本研究将同时采取这两种不同的方法遴选寒热并用型中成药，并取其交集为最终的结果。

其中，三分运算法是基于全方寒性、热性和平性药味数占比的计算方法，侧重于考虑全方中寒性中药与热性中药的权重高低。君臣药性法是基于处方中君臣药药性分布的计算方法，侧重于抓住主要矛盾，以全方中君臣药的寒热分布特征来确定全方的主导药性。具体方法如下：

1.3.1 三分运算法 标记出处方中每味药物的药性寒热，将寒性药味总数记为 X，平性药味总数记为 Y，热性药味总数记为 Z。采用三分运算法统计处方的药性寒热：$Y < (X + Z)$ 时，如果 $X/(X + Z) \leqslant 1/3$ 则将该处方药性标记为热性，如果 $X/(X + Z) \geqslant 2/3$ 则将该处方药性标记为寒性，如果 $1/3 < X/(X + Z) < 2/3$ 则将该处方标记为寒热并用；$Y \geqslant (X + Z)$ 时，将处方标记为寒热并用。

如麻黄止嗽丸 / 胶囊，处方：橘红性热、麻黄性热、桔梗性平、川贝母性寒、五味子（醋蒸）性热、茯苓性平、细辛性热。方中寒性药一味，即 X 为 1；平性药两味，即 Y 为 2；热性药四味，即 Z 为 4，代入三分运算法：$Y < (X + Z)$，$X/(X + Z) \leqslant 1/3$，该处方药性标记为热性。

又如小儿解感颗粒 / 片，处方：大青叶性寒、柴胡性寒、黄芩性寒、荆芥性热、桔梗性平、甘草性平，方中寒性药三味，即 X 为 3；平性药两味，即 Y 为 2；热性药一味，即 Z 为 1，代入三分运算法：$Y < (X + Z)$，$X/(X + Z) \geqslant 2/3$，该处方药性标记为寒性。

再如芎菊上清丸 / 颗粒 / 片，处方：川芎性热、菊花性寒、黄芩性寒、栀子性寒、炒蔓荆子性寒、黄连性寒、薄荷性寒、连翘性寒、荆芥穗性热、羌活性热、藁本性热、桔梗性平、防风性热、甘草性平、白芷性热。方中寒性药七味，即 X 为 7；平性药两味，即 Y 为 2；热性药六味，即 Z 为 6，代入三分运算法：$Y < (X + Z)$，$1/3 < X/(X + Z) < 2/3$，处方药性标记为寒热并用。$Y \geqslant (X + Z)$ 时，处方标记为寒热并用，本次统计 $Y > (X + Z)$ 的有两个，即芙蓉抗流感片 / 颗粒 / 胶囊和清热消炎宁胶囊 / 片，其处方成分都只有一味平性药，$Y = (X + Z)$ 的只有一个，即娃娃宁。

1.3.2 君臣药性法 参考《中国药典》《中华人民共和国药品管理法》《药品说明书和标签管理规定》《关于印发中药、天然药物处方药说明书格式内容书写要求及撰写指导原则的通知》等法规标准和

药品说明书中以君臣佐使排序的书写惯例[15，32-33]，标记出每首处方中前三味药物的药性，处方药味数少于三味的，根据实际药味数判断，本次统计中有三种药属于这种情况。处方标记为寒性的有三种情况：三味药都为寒性；两味药为寒性、一味药为平；一味药为寒性、两味药为平性。处方标记为热性的有三种情况：三味药都为热性；两味药为热性、一味药为平；一味药为热性、两味药为平性。三味药中既有寒性药又有热性药，则将处方标记为寒热并用。如银翘解毒丸，金银花性寒、连翘性寒、薄荷性寒，处方标记为寒性；娃娃宁中琥珀性平、天竺黄性寒、钩藤性寒，处方标记为寒性；七味螃蟹甲丸中螃蟹甲性平、诃子性平、石灰华性寒，处方标记为寒性。又如感冒疏风丸 / 颗粒 / 胶囊，处方前三味药炙麻黄绒、苦杏仁、桂枝性热，处方标记为热性；麻黄止嗽丸中橘红、麻黄性热，桔梗性平，处方标记为热性；小儿暑感宁糖浆中香薷性热，佩兰、扁豆花性平，处方标记为热性。再如桑姜感冒胶囊 / 片 / 颗粒前三味药中桑叶、菊花性寒，紫苏叶性热，处方标记为寒热并用；回春散前三味药中麝香性热、牛黄性寒、制天麻性平，则处方标记为寒热并用。

2　结果

2.1　三分运算法统计结果

用三分运算法统计，结果见表 1。该 180 首处方中寒性为主处方最多，为 107 首（59.44%），代表性中成药包括小儿解表口服液、葛兰香口服液、风热感冒颗粒等；寒热并用处方次之，为 43 首（23.89%），代表性中成药包括桑姜感冒颗粒、清热感冒颗粒、小柴胡片等；热性为主处方最少，为 30 首（16.67%），代表性中成药包括辛芩颗粒、表实感冒颗粒、风寒感冒颗粒等。

表 1　三分运算法结果

Tab 1　Tripartite algorithm method

序号	药性	数量 / 首	占比 /%
1	寒性为主	107	59.44
2	寒热并用	43	23.89
2	热性为主	30	16.67

2.2　君臣药性法统计结果

用君臣药性法分析这 180 首处方（见表 2），也是寒性为主处方最多，为 85 首（47.22%），代表性中成药包括小儿豉翘清热颗粒、翠莲解毒片、桑菊感冒丸等；寒热并用次之，为 72 首（40.00%），代表性中成药包括芎菊上清丸、双活感冒胶囊、芙朴感冒颗粒等；热性为主处方最少，为 23 首（12.78%），代表性中成药包括感冒疏风片、四季感冒片、九味羌活丸等。

表 2　君臣药性法结果

Tab 2　Monarch herb property method

序号	药性	数量 / 首	占比 /%
1	寒性为主	85	47.22
2	寒热并用	72	40.00
3	热性为主	23	12.78

2.3　寒热并用型感冒中成药的组方和功效特点

本文的两种方法各有优势，相互补充，两种方法均识别为寒热并用型感冒中成药的品种才能最终入选。本文中三分运算法和君臣药性法均识别为寒热并用的有 29 首（见表 3）。

表 3　寒热并用感冒中成药

Tab 3　Chinese patent medcines for cold with both cooling and warming property

名称	说明书中前三位药	寒性药 - 平性药 - 热性药比例
芙蓉抗流感片 / 颗粒 / 胶囊	木芙蓉叶	0：1：0
清热消炎宁胶囊 / 片	九节茶干浸膏	0：1：0
芙朴感冒颗粒 / 胶囊	芙蓉叶、厚朴、陈皮	2：0：2
感冒清热颗粒 / 片 / 胶囊	荆芥穗、薄荷、防风	5：1：5
寒喘祖帕颗粒	小茴香、芹菜子、神香草	4：1：4
回春散	麝香、牛黄、天麻	10：7：10
清感穿心莲片	穿心莲、买麻藤	1：0：1
桑姜感冒胶囊 / 片 / 颗粒	桑叶、菊花寒、紫苏	3：0：3
参苏丸 / 片 / 胶囊	党参、紫苏叶、葛根	3：4：4
小儿保安丸	姜半夏、木香、薄荷	9：6：13
甘和茶	黄芩、甘草、青皮	2：2：3
小柴胡片 / 胶囊 / 颗粒 / 丸	柴胡、姜半夏、黄芩	2：2：3
正柴胡饮胶囊 / 合剂 / 颗粒	柴胡、防风、赤芍	2：1：3
柴连口服液	麻黄、柴胡、广藿香	2：1：3
百咳静	陈皮、麦冬、前胡	7：2：7
感冒解热颗粒	麻黄、菊花、白术	4：0：5
治咳片	桔梗、紫苏子、连翘	4：2：5
感冒解毒颗粒	紫苏叶、前胡、防风温	7：0：6
芎菊上清丸 / 片 / 颗粒	川芎、菊花、黄芩	7：2：6
止咳平喘糖浆 / 颗粒	麻黄、苦杏仁、石膏	5：2：4
宝咳宁颗粒	紫苏叶、桑叶、前胡	8：2：6
莱阳梨止咳糖浆	莱阳梨清膏、麻黄提取液、杏仁腈溶液	4：1：3
防风通圣丸 / 颗粒	防风、荆芥穗、薄荷	9：2：6
克感额日敦片	诃子、川楝子、栀子	3：2：2
双活感冒胶囊	羌活、独活、黄芩	3：0：2
小儿感冒宁颗粒	薄荷、荆芥穗、苦杏仁	8：2：5
小儿清肺化痰颗粒	麻黄、石膏、苦杏仁	5：0：3
通宣理肺丸 / 膏 / 颗粒 / 片	紫苏叶、麻黄、前胡	3：3：5
保济丸	钩藤、菊花、蒺藜	6：1：9

寒热并用型感冒中成药组方中多有寒热并用的药物配伍组合，如感冒清热颗粒、防风通圣丸里面的薄荷 - 荆芥，桑姜感冒胶囊、宝咳宁颗粒里面的桑叶 - 紫苏，通宣理肺膏、小儿清肺化痰

颗粒中的前胡 - 苦杏仁等。

寒热并用型感冒中成药在主治描述中多用“感冒”“流行性感冒”“外感病”等，而没有风寒感冒、风热感冒的明确定位，如芎菊上清丸、小柴胡片、小儿感冒宁颗粒、芙蓉抗流感片等。该类中成药在功效描述中既有“散寒”又有“清热”字样，如感冒清热颗粒、桑姜感冒颗粒、正柴胡饮胶囊、感冒解毒颗粒、双活感冒胶囊等。

寒热并用型感冒中成药没有在说明书中标明风寒感冒或风热感冒禁用，只有小柴胡片、芙蓉抗流感片在有些厂家说明书中提示风寒感冒不适用，但其他厂家的说明书中无此提示。

有些药物说明书中为治疗风寒感冒或风热感冒，但从组方药味角度看，依然具有一定的寒热并用特点。如通宣理肺丸是经典的发散风寒药，全方由十一味中药组成，其中黄芩、前胡和枳壳 3 个药性为寒凉或微寒的中药，桔梗、茯苓和甘草 3 个平性药，紫苏叶、半夏、陈皮、苦杏仁、麻黄 5 个药为温性或微温的中药，方中寒性药：热性药：平性药的比例为 3：5：3，寒性药占非平性药的比例为 5/8，接近三分运算法中 2/3 的临界线；处方中前三味药物，紫苏叶性热、前胡性寒、桔梗性平。本文将其纳入寒热并用范畴，对于这类药物在临床使用和处方点评时应予以注意。

3 讨论

3.1 寒热并用型感冒中成药的划分对处方审核 / 点评的指导意义

寒热冲突是中成药处方联合用药审核 / 点评的难点之一 [33-36]，2018 年的《中成药临床合理用药处方点评北京共识》指出：治疗同一疾病（寒证或热证），不同寒热药性的中成药不宜同时服用（寒热错杂症除外）。在实际点评过程中，药师往往会选择药性单纯的寒性中成药或热性中成药来点评。实际临床诊疗过程中，根据不同季节 / 不同地区感冒的发病传变机制，寒热并用法在治疗感冒时也常常被使用。所以，本文对寒热并用型感冒中成药的界定，有利于规范中成药寒热冲突的审核和点评。并在既往共识和现有实际工作的基础上，形成以下建议内容：

建议一：寒热并用型感冒中成药，不宜直接纳入寒热冲突的判定。

建议二：寒热并用型感冒中成药，与其他成分重复度低（低于 30%）的寒性中成药或热性中成药联合使用时，可不判定为寒热冲突。但建议减量联用。

建议三：寒热夹杂型感冒，应首选寒热并用型感冒中成药，而不是将寒性中成药与热性中成药联合使用。

例如，热性的感冒疏风片与寒性的抗感解毒胶囊联用，建议点评为寒热冲突。因为风寒感冒颗粒和风热感冒颗粒是两种药性、功能主治相反的药物。又如，感冒清热颗粒属于寒热并用型感冒中成药，当其与板蓝根颗粒联用时，可不点评为寒热冲突，因为从成分看，感冒清热颗粒由五味热性药（荆芥穗、防风、紫苏叶、苦杏仁、白芷）和五味寒性药（薄荷、柴胡、葛根、苦地丁、芦根）以及一味平性药（桔梗）组成，而板蓝根颗粒是由单味药组成的纯粹的寒性感冒中成药。从说明书功效看感冒清热颗粒既能散寒，又能清热；而板蓝根颗粒侧重于清热利咽。两者的联用可不定位寒热冲突。

实际上，查阅历年医保目录可知，感冒清热颗粒在 2017 版中属于辛温解表剂，在 2018 版中变成了辛凉解表剂，而到 2019 版中又回到了辛温解表剂，凸显出这一寒热并用品种的定位矛盾。从本文可知，感冒清热颗粒属于典型的寒热并用类感冒药，既不适合归于辛温解表，也不适合归于辛凉解表，而应该归于“寒热并用解表类”。鉴于临床实际以及寒热并用型感冒中成药的组方功效特点，建议在中成药的药品管理时，在解表剂下另设“寒热并用类”，以便更准确地定位和指导临床，同时也可为其他涉及寒热错杂病机的中成药处方点评提供参考。

3.2 三分运算法和君臣药性法的合理性和局限性

研究中成药的药性离不开单味药的药性。为保证识别方法准确可行，课题组借鉴了前期国内药性研究的大量工作，参考国内目前关于中药复方制剂药性研究的两大类方法以及中医对寒热错杂型感冒的认识，并以三分运算法和君臣药性法两种方法作为寒热并用型中成药的识别方案，其中，三分运算法侧重于全方药性的定性判断，君臣药性法侧重于抓主要矛盾后的定性判断，两者相互印证得到最终结果。对于界定寒热并用型中成药这个研究目的来说，此方法是具有合理性的。

同时，这两种方法也具有局限性。主要是忽略了单味药之间的用量差异和炮制对中药寒热的影响，只考虑从共性方面理解寒热，忽略寒、热、温、凉、大热、大寒、微温、微热之间的程度差异，以及不同寒性或热性中药之间的差异。这些局限性可作为下一步工作的切入点。

参考文献

[1] 何光明，申保国 . 寒热并用治疗普通感冒的探讨 [J]. 陕西中医，2011，32（3）：306-308.

[2] 王保申，陈清 . 感冒证治体会 [J]. 吉林中医药，2006，26（5）：11-12.

[3] 吕明圣，崔红生，任培中，等 . 寒包火理论探源及其在肺系疾病中的应用 [J]. 中医学报，2021，36（9）：1863-1867.
[4] 王林静，刘楠 . 浅论温病治疗中的寒热并用 [J]. 四川中医，2003，21（2）：6-7.
[5] 陈氏红明 . 李赛美运用经方寒温并用方辨治疑难杂病临床经验整理与探讨 [D]. 广州：广州中医药大学，2016.
[6] 段金宏，李小芹，邢磊，等 . 寒热并用治疗小儿感冒 [J]. 现代中医药，2015，35（5）：67，77.
[7] 罗世杰，马党会 . 马献图教授儿科经验拾零 [J]. 陕西中医学院学报，2000，23（1）：11-12.
[8] 王建平，王欣，张明霞 . 中医药治疗小儿高热临床体会 [J]. 中医药临床杂志，2010，22（4）：359-360.
[9] 王艺霖，刘志龙 .《伤寒论》寒热并用法举隅 [J]. 光明中医，2021，36（11）：1783-1784.
[10] 罗鑫，常克，孙香娟，等 . 常克以新麻汤“寒热并用”治疗小儿咳嗽经验 [J]. 中国中西医结合儿科学，2021，13（2）：170-172.
[11] 龙建新 . 试述寒热并用在方剂中的作用 [J]. 河北中医，2005，27（2）：111-112.
[12] 郭玮，曾智辉 . 试述寒热并用在方剂配伍中的作用 [J]. 山西中医，2009，25（1）：37-38.
[13] 国家中医药管理局《中华本草》编委会 . 中华本草精选本 [M]. 上海：上海科学技术出版社，1998.
[14] 南京中医药大学 . 中药大辞典 [M]. 上海：上海科技出版社，2003.
[15] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020.
[16]《全国中草药汇编》编写组 . 全国中草药汇编 [M]. 北京：人民卫生出版社，1976.
[17] 赵同同 . 多元统计分析与中医方剂研究 [D]. 北京：清华大学，2007.
[18] 颜素容，王耘，乔延江 . 方剂药性特征的表述方法及其应用 [J]. 北京中医药大学学报，2010，33（5）：297-299.
[19] 王学臣，王象鹏 . 基于多维宏观量化方法的半夏泻心汤组方规律探讨 [J]. 亚太传统医药，2016，12（4）：85-87.
[20] 孙燕，郑丰杰，李宇航，等 . 基于中药四性理论的“量化组方”研究 [J]. 世界中医药，2015，10（1）：17-21.
[21] 高晶晶 . 基于量化组方研究的方剂寒热属性可视化分析平台构建 [D]. 北京：北京中医药大学，2009.
[22] 胡波，蒋永光 . 中药方剂性味配伍的研究现状及展望 [J]. 江苏中医药，2007，39（11）：89-91.
[23] 龙伟 .“计算中药学”在中药药性及复方研究中的应用 [D]. 北京：北京协和医学院，2011.
[24] 张国铎 .《金匮要略》从寒热论治瘀血组方解析 [J]. 吉林中医药，2011，31（5）：461-463.
[25] 闫波，孙国祥，孙万阳，等 . 中药寒热温凉四性研究方法与思路 [J]. 中南药学，2016，14（6）：572-580.
[26] 范甜，周爽，甘文平，等 . 中成药治疗感冒的用药规律分析 [J]. 中药新药与临床药理，2021，32（8）：1217-1223.
[27] 张冰，金锐，黄建梅，等 . 基于“三要素”的中药药性认知模式构建与实践 [J]. 中国中药杂志，2012，37（15）：2344-2348.
[28] 金锐，王宇光，薛春苗，等 . 中成药处方点评的标准与尺度探索（九）：寒热并用 [J]. 中国医院药学杂志，2017，37（3）：201-206
[29] 金锐，张冰 . 系统涌现性意义下的中药药性认知 [J]. 中华中医药杂志，2015，30（4）：977-979.
[30] 金锐，张冰，刘小青，等 . 基于药性构成“三要素”数理分析模式的中药药性寒热生物学表征差异研究 [J]. 中西医结合学报，2011，9（7）：715-724.
[31] 金锐，张冰，中药药性理论复杂性特征分析 [J]. 中国中药杂志，2012，37（21）：3340-3343.
[32] 国家食品药品监督管理局 . 药品说明书和标签管理规定 [S]. 2006-03-10.
[33] 国家食品药品监督管理局 . 关于印发中药、天然药物处方药说明书格式内容书写要求及撰写指导原则的通知 [S]. 2006-06-02.
[34] 金锐，王宇光，薛春苗，等 . 北京地区基层医疗机构中成药处方点评共识报告（2018 版）[J]. 中国医院药学杂志，2018，38（18）：1877-1887，1892.
[35] 金锐，鄢丹，杨欣妤，等 . 中成药处方点评专家共识的编写思路、依据与方法 [J]. 中南药学，2019，17（8）：1204-1207.
[36] 金锐，赵奎君，郭桂明，等 . 中成药临床合理用药处方点评北京共识 [J]. 中国中药杂志，2018，43（5）：1049-1053.

（收稿日期：2022-07-02；修回日期：2022-08-10）

社区医院中成药不适宜联用目录清单的建立及用药调研

王宇光[1]，卢云涛[1]，孔令伟[1*]，金锐[2*]（1.北京交通大学社区卫生服务中心，北京 100044；2.中国中医科学院西苑医院，北京 100091）

摘要：目的 构建基于我院药品目录的中成药不适宜联用品种目录清单，选取最常见不适宜联用组合，随访既往用药患者，为基层医疗机构的处方用药和审核点评提供依据。**方法** 首先，根据中医药基本理论和专家共识，形成了以“重复用药”“寒热冲突”和“配伍禁忌”为主的“三位一体”的联合用药评价体系，并基于我院用药品种形成不适宜联用目录。经医院伦理委员会通过后，于 2021 年、2022 年分两次开展中成药重复用药的电子处方筛选，选择高频次组合进行处方收集和患者随访，修订完善中成药不适宜联用目录。**结果** 我院目前共有中成药 125 种（含 2 种中西药复方制剂和 1 种按西药管理的中药提取物制剂），根据专家共识，共识别出重复用药组合 51 组、寒热冲突组合 102 组、解表与滋补的不当联用组合 260 组、十八反十九畏配伍禁忌组合 20 组，共计 428 组（重复计减 5 组）。在电子病历系统中收集 2020 年 10 月—12 月的处方 9276 张和 2022 年 1 月—6 月的处方 18 179 张，寻找到出现频次大于 5 例的中成药重复用药组合 4 种，分别为强力枇杷露＋复方甘草片（16 例）、维 C 银翘片＋连花清瘟胶囊（14 例）、加味逍遥丸＋八珍益母丸（20 例）、人参归脾丸＋加味逍遥丸（13 例）。联系患者进行随访，共发出问卷 42 份，共回收问卷 22 份，其中 15 份选择“安全有效”，2 份选择“有效但有轻微副作用”，5 份选择“效果不佳”。**结论** 建立了我院中成药不适宜联用目录，提高医师处方用药的合理性。

关键词：中成药；联合用药；重复用药；寒热冲突；问卷调研
中图分类号：R288 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)09-2029-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.011

Survey of list of Chinese patent medicine unsuitable for combination use in community hospitals

WANG Yu-guang[1], LU Yun-tao[1], KONG Ling-wei[1*], JIN Rui[2*] (1. *Beijing Jiaotong University Community Health Center, Beijing* 100044; 2. *Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing* 100091)

Abstract: Objective To establish a list of unsuitable combinations of Chinese patent medicines based on the drug catalogue of our hospital, to provide reference for prescription review and rational drug use. **Methods** Firstly, according to the basic theory of Traditional Chinese Medicine (TCM) and consensus reports, a combination drug use evaluation system based on “repeated drug use”, “cold and heat conflict” and “compatibility” was established. An unsuitable combination drug use catalogue was constructed based on the drug varieties in our hospital. The unsuitable combinations with the highest frequency were selected retrospectively from the electronic medical record system of hospital patient medication from October to December 2020. A follow-up investigation was conducted on patients through the family medical team, whose results we revised and used to improve the catalogue of unsuitable combinations. **Results** Totally 125 Chinese patent medicines in our hospital were confirmed (including 2 compound preparations of Chinese and Western medicine and 1 Chinese medicine extract

基金项目：首都卫生发展科研专项（No. 首发 2018-3P-7045，No. 首发 2020-2-2081）；北京市海淀区卫生健康发展科研培育计划项目（No. HP2021-99-70101）。

作者简介：王宇光，女，主管药师，主要从事中药合理用药研究，email：wfyuguang@126.com *通信作者：孔令伟，女，主任医师，主要从事医院管理研究，email：lwkong@bjtu.cn；金锐，男，副主任药师，主要从事中药临床药学和中医药基础理论研究，email：jinrui9862@126.com

preparation). According to the consensus report, a total of 428 unsuitable combination groups were identified, including 51 repeated drug use combinations, 102 cold and heat conflict combinations, 260 improper combinations of relieving cold symptoms and nourishing, and 20 incompatible and counteractive combinations. In the electronic case system, 9276 prescriptions from October to December 2020 and 18 179 prescriptions from January to June 2022 were collected. Four repeated combinations of Chinese patent medicines in more than 5 patients were found: Qiangli Pipa Lu + Fufang Gancao tablets (16 patients), Wei C Yinqiao Tablets + Lianhua Qingwen capsules (14 patients), Jiawei Xiaoyao pills + Bazhen Yimu pills (20 patients), and Renshen Guipi pills + Jiawei Xiaoyao pills (13 patients). Patients were contacted for follow-up. Totally 42 questionnaires were delivered and 22 questionnaires were answered: 15 chose "safe and effective", 2 "effective but with slight side effects", and 5 "poor effect".

Conclusion The catalogue of Chinese patent medicines unsuitable for combination use in our hospital is established. The rationality of doctors' prescriptions is improved, and the drug publicity and education are highly praised by doctors and patients.

Key words: Chinese patent medicine; medicine combination; repeated medication use; cold and heat conflict; questionnaire survey

作为中医药治疗的重要组成部分，中成药在基层医疗使用情况复杂，临床合理使用面临很大挑战。一方面，中成药品种数目益增多，其在基层医疗机构的临床使用量也越来越大，其中联合用药又占有很大比重。据初步统计，基层医疗机构的中成药处方占全部处方的 50% 以上，其中又有 70% 以上的处方涉及联合用药 [1]。另一方面，中成药联合使用的合理性评价方法存在较大欠缺，对于联用药物是否属于重复用药、是否存在药性冲突等问题，始终没有客观化、标准化的评价方法，而主要是依据个人经验的主观判定。所以，基层医疗机构亟需一个科学、简要的中成药不适宜联用目录，为临床医师处方用药、药师处方点评和医保控费提供参考。

从临床实际看，中成药联合用药时容易出现不合理用药问题，其中尤以重复用药、寒热冲突、药势冲突等最为常见 [2-3]。例如，治疗咳嗽的通宣理肺丸与羚羊清肺丸的联用属于寒热冲突（一热一寒），强力枇杷露与苏黄止咳胶囊的联用属于药势冲突（一敛一宣），感冒清热颗粒与杞菊地黄丸的联用也属于药势冲突（一解表一滋补）等。这些不合理联用会影响临床治疗的有效性和安全性，应作为处方点评和审核的重点。

同时，中成药不同于中药饮片处方，由于组方配伍固定且可查，故其功效特征和适应证也基本固定；同时，中成药说明书也是经过国家药品监督管理局批准的法律文书，用法用量和配伍禁忌方面也有据可查 [4]。根据这些文本语义信息，再加上对组方药味的相似度、君臣佐使的分析，便可形成对于中成药联用后合理性的客观评价。本研究旨在前期专家共识基础上，构建中成药不适宜用药的科学评价体系，并基于我院药品目录，形成我院中成药不适宜用药目录清单。

1 构建我院中成药不适宜联用目录

2018 年，北京市卫健委社区处方点评工作组主持编写了《北京市基层医疗机构中成药处方点评共识报告（2018 版）》[2]（以下简称《共识报告》），规定了基层医疗机构的中成药处方合理性审查工作的基本流程和规范，也界定了中成药适应证不适宜、遴选药品不适宜、用法用量不适宜、联合用药不适宜等多种不合理用药的评价标准，为社区开展中成药合理用药工作提供了参考。

我院目前共有中成药 125 种（含 2 种中西药复方制剂和 1 种按西药管理的中药提取物制剂），根据《共识报告》的推荐建议，将这 125 种中成药两两配伍后形成的重复用药组合、寒热冲突组合、解表与滋补不当联用组合和违反"十八反、十九畏"的配伍禁忌组合，逐一寻找和识别出来。

1.1 重复用药识别

《共识报告》第 23 条陈述规定："治疗目的相同、位于医保目录同一功效亚类，尤其是含有相同君药、或含有至少 3 种相同中药成分（以炮制品计）、或含有的相同中药成分（以炮制品计）数量占比超过 30% 的两个中成药足量联用时，应当视为重复用药；内服联合外用时、先后交替使用或减量（与说明书标准量相比减少 30% 以上）联用时、急危重症抢救用药时，可不视为重复用药" [2]。该条共识的认可度为高，推荐度为高。考虑到实际操作难易度，笔者将其进行简化，采取重复药味占比超过 30% ＋功效重复的双因素判

别方法[2-3]，共识别得到 51 组重复用药的联用组合，包括柏子养心丸＋心神宁片（重复药味占比 66.7%/30.8%，功效均含有养血和安神）、补中益气丸＋八珍益母丸（重复药味占比 50.0%/44.4%，功效均含有益气）、牛黄降压丸＋安脑片（重复药味占比 50.0%/46.7%，功效均含有清热、祛痰和安神）、稳心颗粒＋血塞通胶囊（成分全包含，功效均含有活血化瘀）、速效救心丸和复方丹参滴丸（重复药味占比 50.0%/33.3%，功效均含有行气和活血化瘀）、维 C 银翘片＋连花清瘟颗粒（重复药味占比 30.8%/30.8%，功效均含有解表和清热解毒）、加味逍遥丸＋八珍益母丸（重复药味占比 55.6%/55.6%，功效均含有健脾益气和养血）等，将这些中成药的足量联用认定为重复用药。

同时，不同重复用药组合的严重程度不同，应根据药品联用的不良反应风险、功效互补程度和医师执业类别等情况，给予分类管理。例如，柏子养心丸与人参健脾丸虽符合界定为重复用药的条件，但由于重复药味非毒烈性饮片，且两个中成药的主要适应证不同，若中医科经准确辨证后用于气虚失眠合并腹泻的患者，则可不视为重复用药，但也建议酌情减量。

1.2 寒热冲突识别

《共识报告》第 26 条陈述规定："治疗同一疾病（中医或西医概念）的寒性中成药与热性中成药不宜联合使用，明确诊断为寒热错杂证的处方除外"[2]。根据要求，通过中成药说明书功能主治、药味组成和注意事项的信息，共识别得到药性纯粹的热性中成药 6 个（通宣理肺丸、艾附暖宫丸、良附丸、附子理中丸、复方小活络丸、藿香正气水），药性纯粹的寒性中成药 17 个（牛黄上清胶囊、连花清瘟胶囊、复方青黛胶囊、蓝芩口服液、康妇炎胶囊、牛黄清胃丸、地榆槐角丸、龙胆泻肝丸、霍胆丸、连翘败毒丸、羚羊清肺丸、小儿咽扁颗粒、复方金钱草颗粒、小儿感冒宁合剂、金莲花胶囊、清开灵片、消银颗粒），这两类中成药之间的任意组合均为寒热冲突，共计 102 种组合。

1.3 解表与滋补不当联用的识别

《共识报告》第 22 条陈述规定："无论是否发热，感冒期间均不宜服用滋补类中成药，包括但不限于以熟地黄、阿胶、制何首乌、女贞子、淫羊藿为君臣药，同时在药品说明书上标示"感冒期间不宜服用"或等价概念的滋补类中成药。可用于气虚、表虚外感的平补固表类中药（包括但不限于党参、甘草、桂枝）不在此列"[2]。根据要求，共识别得到滋补性和温补性中成药 13 个（同仁乌鸡白凤丸、坤宝丸、六味地黄丸、八珍益母丸、仙灵骨葆胶囊、石斛夜光丸、人参归脾丸、八珍益母胶囊、杞菊地黄丸、金匮肾气丸、补中益气丸、知柏地黄丸、附子理中丸），解表药 20 个（通宣理肺丸、感冒清热颗粒、藿香正气水、霍胆丸、小儿肺热咳喘口服液、强力枇杷露、芎菊上清丸、小儿咽扁颗粒、连花清瘟胶囊、小儿感冒宁合剂、黄氏响声丸、防风通圣丸、连翘败毒丸、复方鲜竹沥液、金莲花胶囊、清开灵片、消咳喘片、苏黄止咳胶囊、维 C 银翘片、羚羊清肺丸），这两类中成药之间的任意组合均为解表与滋补不当联用，共计 260 种组合。

1.4 十八反、十九畏配伍禁忌组合的识别

《共识报告》第 27 条陈述规定："由于存在争议，十八反、十九畏可暂不作为中成药配伍禁忌的点评内容，但应当向临床医师提示；同时，含有其中毒性中药的中成药仍需按照含毒性饮片中成药严格管理"[2]。根据要求，共识别到含有川乌、草乌或附子的中成药 4 个（附子理中丸、金匮肾气丸、复方小活络丸和尪痹颗粒），含有半夏或贝母的中成药 5 个（藿香正气水、黄氏响声丸、柏子养心丸、复方鲜竹沥液和香砂六君丸），这两类药物的联合使用违反了"十八反、十九畏"配伍禁忌，共计 20 组。我院药品目录中没有含有海藻、京大戟、甘遂、芫花和藜芦成分的中成药，故不存在其他的十八反、十九畏配伍情况。

1.5 不适宜联用目录清单的制作与使用

确定了基于我院目录的中成药重复用药、寒热冲突、解表与滋补的不当联用和十八反、十九畏配伍禁忌的药品联用组合之后，将所有信息制作成一张不适宜联用目录表单，经院办同意后，打印放置在临床医师的诊室，以供临床医师开具处方时参考。

2 真实社区用药患者的用药调研

确定不适宜联用目录清单之后，积极与信息部门协调，在药师发药或医师处方信息系统中，搜索在一定时间段内开具了这些不适宜联用药品组合的患者，记录其姓名、年龄、性别、处方日期、处方药品名称等信息，明确患者是否为家医签约患者，寻找联系方式，开展随访调研工作。

自 2020 年起，在医院伦理委员会审查备案之后，课题组分阶段进行了两次真实用药患者的随访调研。目标人群为治疗方案中包含表 1 中任意重复用药组合的患者。第一次调研是在 2021 年 3 月，对在 2020 年 10 月 1 日至 12 月 31 日的 9276 张处方进行系统分析，筛选出发生频次大于 5 例的重复用药组合 2 种，包括强力枇杷露与复方甘

草片的联用处方 16 例（男 8 例，女 8 例，年龄 19 ～ 78 岁），维 C 银翘片与连花清瘟胶囊的联用处方 14 例（男 11 例，女 3 例，年龄 19 ～ 64 岁）。第二次调研是在 2022 年 7 月，对在 2022 年 1 月 1 日至 6 月 30 日的 18 179 张处方进行系统分析，筛选出发生频次大于 5 例的重复用药组合 2 种，包括加味逍遥丸和八珍益母丸的联用处方 20 例（男 0 例，女 20 例，年龄 20 ～ 59 岁），加味逍遥丸和人参归脾丸的联用处方 13 例（男 1 例，女 12 例，年龄 25 ～ 81 岁）。

在系统中检索患者的联系方式，对留有联系方式的患者，采用短信形式发出调研，希望患者通过短信回复数字的形式简要告知服药效果：1 为安全有效，2 为有效但有轻微副作用，3 为效果不佳。在 24 h 内收集有效问卷，计算回收率。问卷发出和返回的数量，以及患者回复的情况见表 1。由此可知，两次问卷的整体回收率为 52.4%。在不同重复用药组合的回收问卷中，均有患者认为此类治疗方案“有效但有轻微副作用”或“效果不佳”，占 25% ～ 40%。其中，第一次调研的感冒类中成药联用，疗程不超过 7 d，选择“有效但有轻微副作用”或“效果不佳”的患者占 40%。第二次调研的补益类中成药联用，疗程均在 20 d 以上，选择“有效但有轻微副作用”或“效果不佳”的患者占 25%。

表 1　两次患者随访和问卷调研的结果

Tab 1　Patient follow-up and questionnaire surveys

调研时间	联用组合	目标患者 / 例	发出问卷 / 份	收回问卷 / 份	收回问卷反馈情况
第一次调研（2021 年）	强力枇杷露＋复方甘草片	16	11	5	3 例选择“安全有效”，2 例选择“效果不佳”
	维 C 银翘片＋连花清瘟胶囊	14	7	5	3 例选择“安全有效”，1 例选择“有效但有轻微副作用”，1 例选择“效果不佳”
第二次调研（2022 年）	加味逍遥丸＋八珍益母丸	20	14	8	6 例选择“安全有效”，2 例选择“效果不佳”
	人参归脾丸＋加味逍遥丸	13	10	4	3 例选择“安全有效”，1 例选择“有效但有轻微副作用”

依据此结果，完善中成药不合理联用目录。在重复用药组合强力枇杷露＋复方甘草片、维 C 银翘片＋连花清瘟胶囊、加味逍遥丸＋八珍益母丸、人参归脾丸＋加味逍遥丸的备注区域增加提示性语言为：“部分患者服用后效果不佳或出现轻微副作用”，提示临床医师应关注上述药品联用的必要性。

3　讨论

中成药是在中医药理论指导下，有着明确适应证和功效特点的成方制剂，在社区医疗机构应用广泛。目前，很多社区医疗机构的中成药品种占比、金额占比都超过了半数，临床应用广泛，不合理用药高发，是社区药学工作的重点。对于中成药的合理使用，长期以来缺少技术标准，给基层药师的工作带来很大困惑。2018 年版的专家共识发表后，为社区药师的药学工作提供了指导性文件，促进社区药师开展中成药用药合理性评价和干预工作。

同时，对于药师评价干预的不合理处方，是否真的存在疗效不佳，或药害风险增加的情况，长期以来也缺少数据支持。所以，开展不合理处方用药患者的随访调研，收集用药后的有效性和安全性信息，积累某些特定不合理处方类型的真实世界循证数据，对于中成药处方审核与点评的深入发展具有重要意义。但是，也需要看到，不合理用药的潜在风险是很复杂的，有些风险很快就能表现出来，而另一些风险并不一定能够通过短期的随访发现，而不同患者的基础疾病和合并用药的不同也会对随访结果产生干扰。所以，怎样开展不合理用药潜在风险的真实世界研究，怎样将这种研究的结果用于指导处方审核和点评，将是未来一段时间的工作重点。

本研究开展的初步随访调研，在一定程度上佐证了中成药重复用药存在的潜在风险，体现了药学点评工作的价值。但是，由于目前我院已经实施了严格的处方审核与点评，包括重复用药在内的不合理处方数已经大幅降低，故筛选得到的样本量有限。未来可继续联合区域内的其他医疗机构，开展大样本的、同质化的患者随访研究，提高研究证据的可信度。

参考文献

[1] 朱静，许建国 . 12460 张急诊中成药处方分析 [J]. 中国医院用药评价与分析，2012，12（12）：1120-1123.

[2] 金锐，王宇光，薛春苗，等 . 北京地区基层医疗机构中成药处方点评共识报告 [J]. 中国医院药学杂志，2018，38（18）：1877-1887.

[3] 王宇光，金锐 .《北京地区基层医疗机构中成药处方点评共识报告（2018 版）》的解读 [J]. 中南药学，2019，17（8）：1207-1209.

[4] 朱昊如，闫盈盈，郑虎占，等 . 改进德尔菲法构建中成药重复用药评价标准 [J]. 中国药学杂志，2017，52（20）：1867-1870.

（收稿日期：2022-07-05；修回日期：2022-08-02）

研究论文

替诺福韦、依非韦伦对拉米夫定在大鼠体内药动学的影响

余史丹[1, 2]，汪硕闻[3]，唐原君[3]，李红霞[1]，竺东杰[1]，范国荣[2, 3*]（1. 联勤保障部队第906医院药剂科，浙江 宁波　315040；2.上海市药物（中药）代谢产物研究重点实验室，上海　200433；3. 上海交通大学附属第一人民医院临床药学科，上海　200080）

摘要：目的　建立一种快速、灵敏的 UFLC-MS/MS 方法测定大鼠血浆中拉米夫定的浓度，并研究联合给予富马酸替诺福韦酯、依非韦伦对拉米夫定在大鼠体内血浆药动学的影响。**方法**　以阿昔洛韦为内标，采用 96 孔板甲醇蛋白沉淀法处理血浆样品。采用 Agilent ZORBAX SB-Aq 色谱柱（4.6 mm×150 mm，5 μm）进行分离，以水（含 25 mmol • L^{-1} 乙酸铵＋ 0.1% 甲酸）- 甲醇为流动相，流速 1 mL • min^{-1}，3∶7 分流，梯度洗脱。采用电喷雾离子源（ESI），正离子模式下检测。将 12 只 SD 大鼠随机分为单独给药组（拉米夫定 32 mg • kg^{-1}）和联合给药组（拉米夫定 32 mg • kg^{-1} ＋富马酸替诺福韦酯 21 mg • kg^{-1} ＋依非韦伦 43 mg • kg^{-1}），每组 6 只，雌雄各半，给药后于不同时间点采集血样，测定拉米夫定的血药浓度。采用 DAS 2.0 软件以非房室模型计算药动学参数，并进行统计学分析。**结果**　拉米夫定在 10.26 ～ 2052 ng • mL^{-1} 与峰面积呈现良好的线性关系（r ＝ 0.9995），日内和日间精密度均小于 10%，准确度为 92.23% ～ 103.10%。与单独给药组相比，联合给药组拉米夫定的药动学参数 C_{max}、t_{max}、$t_{1/2}$ 及 $AUC_{0\sim\infty}$ 差异均无统计学意义。**结论**　建立的 UFLC-MS/MS 法快速、灵敏、专属性强，适用于大鼠血浆中拉米夫定浓度的测定。单剂量给药富马酸替诺福韦酯、依非韦伦对拉米夫定在大鼠体内的药动学行为无明显影响，提示联用后不存在显著的药动学相互作用。

关键词：富马酸替诺福韦酯；依非韦伦；拉米夫定；药动学；UFLC-MS/MS；大鼠
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2033-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.012

Effect of tenofovir and efavirenz on the pharmacokinetics of lamivudine in rats

YU Shi-dan[1, 2], WANG Shuo-wen[3], TANG Yuan-jun[3], LI Hong-xia[1], ZHU Dong-jie[1], FAN Guo-rong[2, 3*] (1. *Department of Pharmacy*, *No.* 906 *Hospital of Joint Logistic Support Force of PLA*, *Ningbo Zhejiang* 315040; 2. *Shanghai Key Laboratory for Pharmaceutical Metabolite Research*, *Shanghai* 200433; 3. *Department of Clinical Pharmacy, Shanghai General Hospital,Shanghai Jiao Tong University School of Medicine*, *Shanghai* 200080)

Abstract: Objective To develop a sensitive and rapid UFLC-MS/MS method for the quantitative determination of lamivudine in rat plasma, and to determine the potential effect of tenofovir disoproxil fumarate and efavirenz on the pharmacokinetics of lamivudine. **Methods** Plasma samples were pretreated by methanol on 96-well plates and acyclovir was selected as the internal standard. The chromatographic separation was conducted on an Agilent ZORBAX SB-Aq column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) with gradient elution of 25 mmol • L^{-1} ammonium acetate solution containing 0.1% formic acid and methanol. The flow rate was 1 mL • min^{-1} and 30% of post-column eluent was injected into

基金项目：Global Health Grant OPP1070754 from the Bill and Melinda Gates Foundation（Grant No. OPP1070754）；国家科技重大专项（No.2014ZX095 07008-001-004）。
作者简介：余史丹，女，硕士，主要从事体内药物分析研究，email：387908755@qq.com　*通信作者：范国荣，男，博士，主任药师，主要从事临床药学和体内药物分析研究，email：guorfan@163.com

the mass spectrometer, equipped with electrospray ionization (ESI) source under positive mode. Totally 12 rats were randomized into 2 groups (3 males and 3 females rats in each group). Rats in group A were orally administered lamivudine (32 mg • kg^{-1}), while those in group B were orally administered lamivudine (32 mg • kg^{-1}), tenofovir disoproxil fumarate (21 mg • kg^{-1}) and efavirenz (43 mg • kg^{-1}) in combination. Blood samples were collected at different time points after the drug administration and the plasma concentrations of lamivudine were determined. The pharmacokinetic parameters were calculated with DAS 2.0 software in a non-compartmental model. **Results** Lamivudine showed excellent linearity at 10.26 ～ 2052 ng • mL^{-1} (r = 0.9995). The intra- and inter-day precisions were less than 10% and the accuracy ranged from 92.23% to 103.10%. There was no statistical significance in the pharmacokinetic parameters of lamivudine between both groups, such as C_{max}, t_{max}, $t_{1/2}$, and $AUC_{0\sim\infty}$. **Conclusion** The established UFLC-MS/MS method is fast, sensitive and robust, and is suitable for the determination of lamivudine in the rat plasma. Single-dose administration of tenofovir disoproxil fumarate and efavirenz has no significant effect on the pharmacokinetic behaviors of lamivudine in rats, indicating no pharmacokinetic interaction after the administration in combination.

Key words: tenofovir disoproxil fumarate; efavirenz; lamivudine; pharmacokinetics; UFLC-MS/MS; rat

获得性免疫缺陷综合征，简称艾滋病，是由人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus，HIV）感染引起的一种严重威胁人类健康的传染性疾病[1]。高效抗逆转录病毒治疗法（highly active antiretroviral therapy，HAART）是现阶段艾滋病治疗最为有效的方法。国家推荐用于成人及青少年抗病毒治疗的三联疗法一般包括两种核苷类逆转录酶抑制剂（nucleoside reverse transcriptase inhibitors，NRTIs）和一种非核苷类逆转录酶抑制剂（non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors，NNRTIs）[2-3]。其中，富马酸替诺福韦酯、拉米夫定联合依非韦伦为目前临床上推荐的初始抗病毒疗法的首选方案，疗效显著、不良反应少[4-6]。富马酸替诺福韦酯与拉米夫定同属于核苷类逆转录酶抑制剂。富马酸替诺福韦酯水溶性好，口服后水解生成替诺福韦，竞争性地结合逆转录酶从而抑制 HIV 病毒复制[7]。拉米夫定口服吸收良好，代谢生成三磷酸拉米夫定，阻断病毒 DNA 链的合成和延长从而发挥抗病毒作用[8]。依非韦伦作为一种选择性非核苷类逆转录酶抑制剂，对 HIV-1 逆转录酶产生非竞争性抑制作用，阻碍病毒复制而发挥疗效[9]，三者联用协同发挥抗病毒作用。

降低用药剂量，减少不良反应发生率、增加依从性和降低耐药的发生是目前艾滋病治疗新方案的研究方向。本试验研究的新型抗艾滋病复方药物（拉米夫定 300 mg ＋富马酸替诺福韦酯 200 mg ＋依非韦伦 400 mg）是何志明院士团队基于反馈系统控制平台体系（Feedback System Control，FSC）对临床常用的多种抗病毒药物进行筛选、重组和剂量优化得到的高效、低毒的药物组合[10]。与目前临床上常用的一线治疗方案（拉米夫定 300 mg ＋富马酸替诺福韦酯 300 mg ＋依非韦伦 600 mg）相比，组合相同，剂量较低，有利于减轻药物不良反应，降低用药成本，提高患者用药依从性[11-13]。

药物联合使用常可达到增效减毒的目的，但也存在疗效降低、毒副作用增强等风险，药动学相互作用是导致其发生的重要机制之一[14-15]。已有研究报道联用替诺福韦及地达诺新后拉米夫定的 $AUC_{0\sim\infty}$ 保持不变，C_{max} 降低，t_{max} 增加，但差异不具有统计学意义[16]。Jiang 等[17]对大鼠口服恩替卡韦和拉米夫定后拉米夫定的药动学进行研究，未发现显著药物相互作用。Ceckova 等[18]研究发现联用依非韦伦后拉米夫定的血浆清除率（CL）显著降低，$t_{1/2}$ 延长，$AUC_{0\sim\infty}$ 增加，减少了其在大鼠体内的肾脏排泄。目前拉米夫定联用富马酸替诺福韦酯、依非韦伦后是否存在药动学相互作用尚未见相关报道。

本实验建立了一种快速、灵敏的 UFLC-MS/MS 法测定大鼠血浆中拉米夫定的浓度，并应用于研究新型抗艾滋病复方药物中富马酸替诺福韦酯、依非韦伦对拉米夫定在大鼠体内药动学行为的影响，探讨可能存在的药动学相互作用，为抗病毒药物临床安全、合理使用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

SHIMADZU UFLC-20A（配备CBM-20A控制器，DGU-20A3在线脱气机，LC-20AD高压梯度泵，SIL-20A自动进样器和CTO-20AC柱温箱，日本岛津公司），API 4000三重四级杆串联质谱仪、Analyst 1.6色谱质谱工作站（美国AB Sciex公司），SCILOGEX MX-S涡旋混合器（美国Scilogex公司），SORVALL LEGEND Micro 21R冷冻离心机（美国Thermo Scientific公司），XS205 Dual Range电子分析天平（瑞士METTLER TOLEDO公司），SK5200H超声仪（上海科导超声仪器有限公司），Hi-Tech水纯化系统（上海和泰仪器有限公司）。

1.2　试药

替诺福韦对照品（含量＞99%，批号：MO426AS）、依非韦伦对照品（含量＞99%，批号：MO202AS）、拉米夫定对照品（含量＞99%，批号：MO222AS）、内标阿昔洛韦对照品（含量＞99%，批号：JO610AS）、富马酸替诺福韦酯原料药（含量＞98%，批号：MB1237）、依非韦仑原料药（含量＞98%，批号：MB3218）、拉米夫定原料药（含量＞98%，批号：MB1889）(大连美仑生物技术有限公司)。

甲醇（色谱纯，德国Merck）；乙酸铵（分析纯，上海泰坦化学有限公司）；甲酸（色谱纯，上海安谱公司）；水为Hi-Tech水纯化系统自制的去离子超纯水（18.2 MΩ）。

1.3　实验动物

SPF级成年、健康Sprague-Dawley大鼠，180～220 g，雌雄兼顾 [上海西普尔 - 必凯实验动物有限公司，许可证号：SCXK（沪）2013-0016]。所有的动物实验均符合海军军医大学动物伦理委员会规定。

2　方法与结果

2.1　分析条件

2.1.1　色谱条件　色谱柱Agilent ZORBAX SB-Aq（4.6 mm×150 mm，5 μm），柱温30 ℃，流动相A为含0.1%甲酸和25 mmol • L^{-1}乙酸铵的去离子水，流动相B为甲醇，梯度洗脱（0.01～0.30 min，40%～70%B；0.31～2.40 min，70%B；2.41～3.00 min，40%B）；流速1 mL • min^{-1}，柱后分流比3∶7，进样量5 μL，分析时间3 min。

2.1.2　质谱条件　采用电喷雾离子源（ESI），正离子检测模式，选择多反应监测（MRM）方式进行一/二级质谱分析。源参数：源电压5500 V，Gas1 50 psi，Gas2 45 psi，CUR 20 psi，CAD 10 psi，离子源温度500 ℃；各化合物的一/二级离子和质谱特征性参数见表1，二级质谱图见图1。

表1　各分析物及内标用于定量分析的离子通道及优化后的质谱参数

Tab 1　Mass parameters and MRM transitions optimized for quantitative analysis of each analyte and the internal standard

分析物	母离子/子离子	去簇电压（DP）/V	入口电压（EP）/V	碰撞电压（CE）/V	出口电压（CXP）/V
富马酸替诺福韦酯	520.2/270.1	70	10	36	20
替诺福韦	288.3/176.4	75	10	34	10
依非韦伦	316.0/244.0	71	10	20	15
拉米夫定	230.3/111.9	50	7	15	19
阿昔洛韦（IS）	226.1/152.2	44	9	15	12

2.2　溶液配制

2.2.1　对照品溶液的配制　精密称取拉米夫定对照品约10 mg，置于10 mL棕色量瓶中，加入50%甲醇配制成质量浓度为1 mg • mL^{-1}的储备液。将储备液用50%甲醇溶液逐级稀释得到拉米夫定质量浓度分别为100、200、500、1000、5000、10 000、18 000、20 000 ng • mL^{-1}的系列工作溶液，同法配制含拉米夫定质量浓度为300、2500和16 000 ng • mL^{-1}的质控工作溶液。

2.2.2　内标阿昔洛韦溶液的配制　精密称取阿昔洛韦对照品约10 mg，置于10 mL量瓶中，加50%甲醇溶解并定容，得质量浓度为1 mg • mL^{-1}的标准储备液。用50%甲醇水溶液稀释后得质量浓度为1000 ng • mL^{-1}的内标阿昔洛韦工作溶液。以上所有溶液均置于－20 ℃保存。

2.3　血浆样品的前处理

血浆样品采用96孔板（美国Waters）蛋白沉淀高通量前处理方法。每一批次分析样品随行标准曲线的配制，质控样品和实测样品的加样均在同一块96孔板上完成。采用自动多通道移液器（瑞士INTEGRA）在孔内准确加入50 μL血浆、5 μL内标阿昔洛韦溶液（1000 ng • mL^{-1}）和150 μL甲醇进行蛋白沉淀，96孔板封盖并涡旋振荡3 min，置于正压装置（美国Waters）下滤过提取5 min，随后移取滤液至进样小瓶中，自动进样5 μL进行UFLC-MS/MS分析，峰面积内标法定量检测。

2.4　方法学考察

2.4.1　专属性实验　通过对6批不同来源SD大

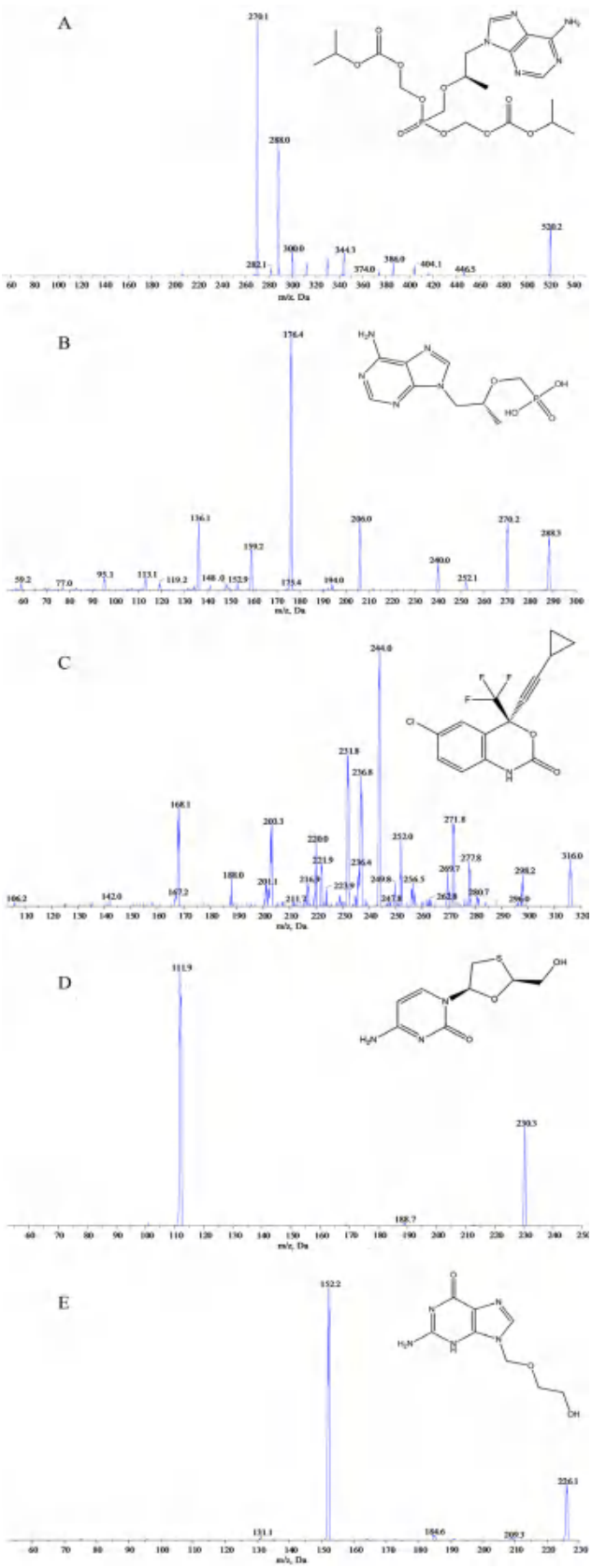

图 1　各分析物及内标的离子质谱图

Fig 1　Product ion mass spectra of each analyte and the internal standard

A. 富马酸替诺福韦酯（tenofovir disoproxil fumarate）；B. 替诺福韦（tenofovir）；C. 依非韦伦（efavirenz）；D. 拉米夫定（lamivudine）；E. 阿昔洛韦（acyclovir）

鼠空白血浆、空白血浆标准添加定量下限（lower limit of quantitation，LLOQ）浓度水平标准溶液、实测血浆样品进行比较以考察方法的专属性。结果 SD 大鼠血浆样品中拉米夫定及内标阿昔洛韦的保留时间分别为 2.20、1.95 min，血浆内源性及其他物质对分析物及内标的测定无明显干扰，如图 2 所示，表明该方法专属性良好。

2.4.2　LLOQ 和线性范围　精密吸取拉米夫定工作溶液 5 μL，加入 SD 大鼠空白血浆 45 μL，配制成含拉米夫定约 10、20、50、100、500、1000、1800 和 2000 ng • mL^{-1} 的血浆样品，按“2.3”项下方法操作，进样分析。以分析物与内标的峰面积比值（Y）对相应的质量浓度（X）进行加权（$1/\chi^2$）线性回归，得拉米夫定的标准曲线方程为 $Y = 0.0271X + 0.0528$（$r = 0.9995$）。结果表明，SD 大鼠血浆中拉米夫定在 10.26 ～ 2052 ng • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好，LLOQ 为 10.26 ng • mL^{-1}（$S/N > 10$）。

2.4.3　精密度和准确度实验　配制含拉米夫定的 LLOQ 样品和低、中、高 3 个浓度水平的质控样品（每一浓度平行配制 6 份），按“2.3”项下方法处理后进样分析，连续 3 d 分别进样 3 个分析批进行测定。根据当日建立的标准曲线分析 LLOQ 样品和质控样品，将测得浓度与理论浓度比较，计算准确度及日内、日间精密度。结果显示，拉米夫定日内、日间精密度 *RSD* 均小于 10%，准确度为 92.23% ～ 103.10%，表明该方法准确、可靠，且重复性好，结果见表 2。

2.4.4　回收率及基质效应　配制含拉米夫定低、中、高 3 个浓度水平的质控样品（每一浓度平行配制 6 份），按“2.3”项下方法处理，进样检测得峰面积 A；另取 6 批不同来源的 SD 大鼠空白血浆样品，按“2.3”项下方法加入沉淀剂制备空白基质上清液，加入相应浓度的质控工作溶液（每批次每一浓度平行配制 3 份，共 6 批），进样分析得峰面积 B；直接进样分析相应浓度的质控工作溶液得峰面积 C；按 $A/B \times 100\%$ 计算各浓度水平下拉米夫定及内标阿昔洛韦的提取回收率，按 $B/C \times 100\%$ 计算各浓度水平下拉米夫定及内标阿昔洛韦的基质基质因子，进一步计算得经内标归一化的基质因子，结果见表 3。拉米夫定在低、中、高 3 个质控浓度下的回收率及基质效应均较一致。

2.4.5　稀释效应　配制含拉米夫定质量浓度为 3200、8000、16 000 和 32 000 ng • mL^{-1} 的 SD

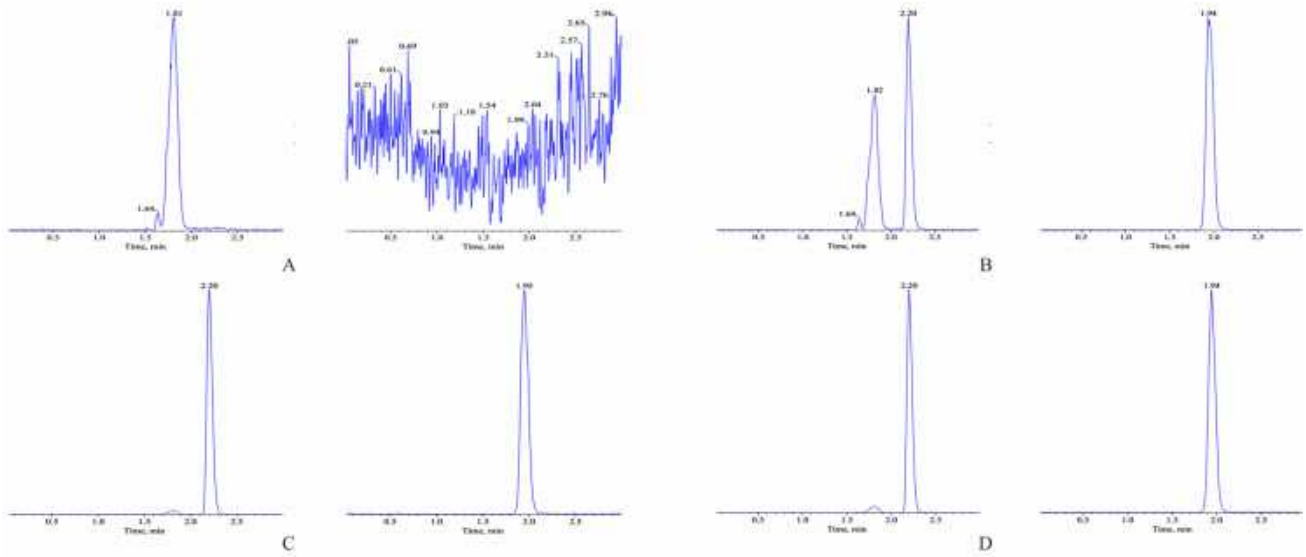

图 2　大鼠血浆中拉米夫定及内标阿昔洛韦的典型图谱

Fig 2　Representative MRM chromatogram of lamivudine and the internal standard in the rat plasma

A. 空白血浆（blank plasma）；B. 空白血浆加 LLOQ 水平拉米夫定（blank plasma with lamivudine at LLOQ level）；C. 单独给药组实测血浆（plasma after the single administration of lamivudine）；D. 联合给药组实测血浆（plasma after the combination administration）

表 2　SD 大鼠血浆中拉米夫定的日内、日间精密度及准确度

Tab 2　Precision and accuracy of lamivudine in SD rat plasma

加入量 /（ng • mL^{-1}）	日内精密度			日间精密度		
	测得量 /（ng • mL^{-1}）	准确度 /%	*RSD*/%	测得量 /（ng • mL^{-1}）	准确度 /%	*RSD*/%
10.00	9.52±0.46	92.23±4.50	4.9	9.89±0.54	95.84±5.22	5.4
30.00	31.66±0.40	102.26±1.28	1.3	31.92±1.04	103.10±3.35	3.3
250.00	257.20±8.04	99.69±3.11	3.1	261.61±8.67	101.40±3.36	3.3
1600.00	1602.40±38.10	97.04±2.31	2.4	1665.07±62.68	100.84±3.80	3.8

表 3　SD 大鼠血浆中拉米夫定及内标阿昔洛韦的回收率和基质效应

Tab 3　Recovery and matrix effect of lamivudine and IS in SD rat plasma

分析物	加入量 /（ng • mL^{-1}）	回收率 /%		内标归一化基质因子 /%	
		测得值	*RSD*	测得值	*RSD*
拉米夫定	30.00	101.15±4.45	4.4	86.41±3.27	3.8
	250.00	105.58±4.16	3.9	82.46±0.83	1.0
	1600.00	102.22±1.32	1.3	83.50±1.33	1.6
阿昔洛韦（IS）	100.00	98.12±2.49	2.5	—	—

大鼠血浆质控样品各 5 份，分别用空白血浆稀释 2、5、10 和 20 倍，按“2.3”项下方法处理后进行 UFLC-MS/MS 分析。结果显示，血浆稀释 2、5、10、20 倍后测得值与理论值的平均相对误差（*RE*）分别为 0.70%、1.74%、2.33% 和 2.53%，*RSD* 值均小于 5%，表明高质量浓度血浆样品经稀释后不影响测定。

2.4.6　残留　配制标准添加定量上限（upper limit of quantification，ULOQ）质量浓度（2000 ng • mL^{-1}）水平的血浆样品，按“2.3”项下方法处理后进样分析。通过进样标准添加 ULOQ 水平的血浆样品后，紧接着连续进样空白溶剂估计残留。结果表明，在该分析方法下，空白溶剂中拉米夫定峰面积与相应分析批 ULOQ 峰面积之比均小于 15%，且不超过内标的 1.5%。

2.4.7　交叉串扰　吸取拉米夫定储备液适量，用 50% 甲醇稀释制得其 ULOQ 溶液（2000 ng • mL^{-1}）。取水代空白血浆 50 μL，按“2.3”项下方法制备不含内标的 ULOQ 样品及仅含内标的 IS 样品。结果表明，拉米夫定、内标各通道间无交叉串扰，如图 3 所示。

2.4.8　稳定性　配制低、高质量浓度（30、1600 ng • mL^{-1}）的拉米夫定血浆标准样品，按“2.3”项下方法操作处理后进样分析，考察样品处理、进样

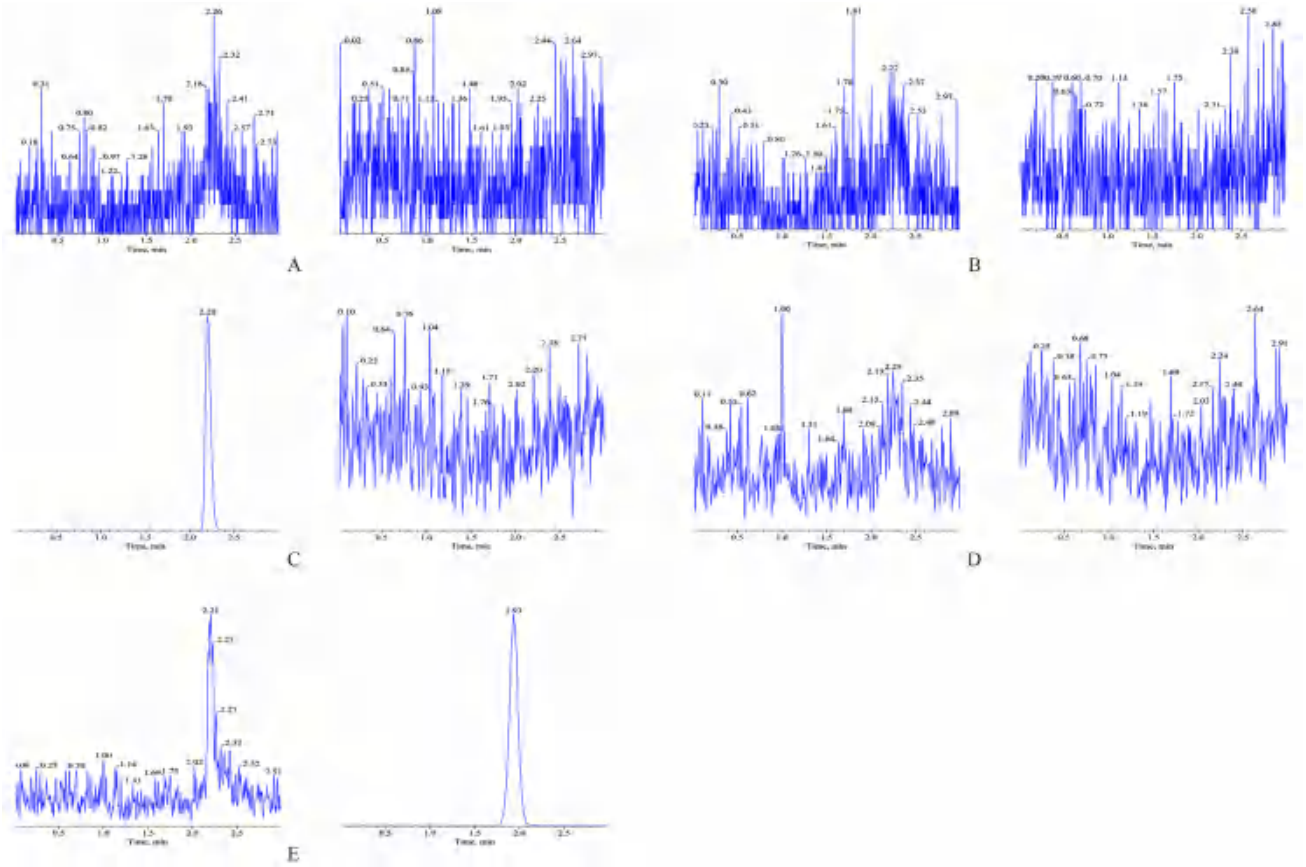

图 3　拉米夫定及内标阿昔洛韦的典型图谱

Fig 3　Representative MRM chromatogram of lamivudine and acyclovir（IS）

A. 富马酸替诺福韦酯对照品溶液（standard solution of tenofovir disoproxil fumarate）；B. 替诺福韦对照品溶液（standard solution of tenofovir）；C. 拉米夫定对照品溶液（standard solution of lamivudine）；D. 依非韦伦对照品溶液（standard solution of efavirenz）；E. 阿昔洛韦对照品溶液（standard solution of acyclovir）

分析及储存过程中的稳定性。含拉米夫定的血浆样品室温下放置 4 h 稳定，*RE* 为－ 3.37% ～ 6.44%，*RSD* ＜ 2.3%；处理后样品在自动进样器中放置 12 h 稳定，*RE* 为－ 1.57% ～ 7.21%，*RSD* ＜ 4.6%；样品经三次冻融循环（－ 80 ℃）后稳定，*RE* 为－ 2.22% ～ 10.61%，*RSD* 均＜ 3.2%；样品在－ 80 ℃冰箱冷冻保存 60 d 后稳定，*RE* 为－ 1.26% ～ 3.17%，*RSD* 均＜ 0.87%。结果表明，拉米夫定血浆样品在样品处理、分析及储存过程中稳定性良好。

2.5　*药动学研究*

选用 12 只成年、健康 SD 大鼠，雌雄各半，随机分为单独给药组和联合给药组。禁食过夜后，分别灌胃给药拉米夫定 32 mg • kg^{-1}，拉米夫定 32 mg • kg^{-1} ＋富马酸替诺福韦酯 21 mg • kg^{-1} ＋依非韦伦 43 mg • kg^{-1}（等效剂量通过体表面积法换算而得），于给药前（空白对照）及给药后 5 min、15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h 从大鼠眼眶取血 300 μL 置于涂有肝素的 EP 管中，6500 r • min^{-1} 离心 5 min，取上清液置于－ 80 ℃冰箱保存。血浆样品按“2.3”项下方法处理后进行 UFLC-MS/MS 分析。以非房室模型（统计矩法）经 DAS 2.0 软件计算药动学参数。采用独立样本 *t* 检验对药动学参数进行统计学分析，以 *P* ＜ 0.05 为差异有统计学意义。平均血药浓度 - 时间曲线见图 4，药动学参数见表 4。

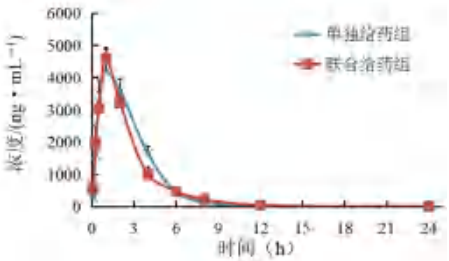

图 4　SD 大鼠单独给药和联合给药后血浆中拉米夫定的平均药 - 时曲线

Fig 4　Mean plasma concentration-time curves of lamivudine in SD rat plasma after a single and combination administration

表 4　SD 大鼠单独给药和联合给药后拉米夫定的药动学参数

Tab 4　Pharmacokinetic parameters of lamivudine in SD rats after a single and combination administration

药动学参数	单独给药	联合给药	P 值
C_{max}/（ng・mL^{-1}）	4178.95±415.01	4598.86±420.87	0.112
t_{max}/h	1.00±0.00	1.00±0.00	—
$t_{1/2z}$/h	1.50±0.08	1.63±0.21	0.170
$MRT_{0\sim t}$/h	2.58±0.25	2.55±0.29	0.810
$MRT_{0\sim\infty}$/h	2.64±0.27	2.64±0.29	0.999
$AUC_{0\sim\tau}$/（ng・h・mL^{-1}）	14 917.86±2071.63	13 728.50±1934.01	0.328
$AUC_{0\sim\infty}$/（ng・h・mL^{-1}）	14 965.11±2085.18	13 800.86±1949.32	0.341
CLz/F/[L/（h・kg）]	2.17±0.29	2.36±0.38	0.350
Vz/F/（L・kg^{-1}）	4.70±0.73	5.49±0.60	0.069

从表 4 中可以看出，单独给药组和联合给药组大鼠血浆中拉米夫定均于给药后 1 h 达峰，C_{max} 分别 为 4178.95 ng・mL^{-1} 和 4598.86 ng・mL^{-1}，$AUC_{0\sim\tau}$ 分别为 14 917.86 ng・h・mL^{-1} 和 13 728.50 ng・h・mL^{-1}，$t_{1/2z}$ 分别为 1.50 h 和 1.63 h，P 值均大于 0.05，药动学参数变化差异无统计学意义，提示联合使用替诺福韦与依非韦伦对拉米夫定在大鼠体内的药动学行为无明显影响。

3　讨论

文献报道生物基质中拉米夫定的测定多采用高效液相色谱法（HPLC-UV）、液相色谱 - 质谱串联法（LC-MS/MS）等，存在灵敏度低[19]、血浆用量大[20-21]、样品前处理过程烦琐[22-23]、分析时间长[24-25]等局限。本实验建立了一种快速、简便、专属性好的 UFLC-MS/MS 方法测定大鼠血浆中拉米夫定的浓度，分析时间仅为 3 min，分析过程中血浆用量少，仅需 50 μL。通过考察不同有机溶剂（甲醇、乙腈），分别按 1∶2、1∶3、1∶5（血浆样品∶有机溶剂）沉淀蛋白处理，结果表明使用甲醇 1∶3 沉淀蛋白时，拉米夫定的色谱峰峰形良好，基质干扰小，灵敏度及回收率等均符合分析要求。同时采用 96 孔板系统对血浆样品进行蛋白沉淀处理，显著缩短了样品处理时间，提高了样品处理效率，实现了大规模样品的高通量分析。

本研究首次考察了富马酸替诺福韦酯、依非韦伦对拉米夫定在大鼠体内药动学过程的影响。结果表明，联用替诺福韦、依非韦伦使拉米夫定的 C_{max}、CL 增加，$AUC_{0\sim\infty}$ 减少，但差异无统计学意义（$P>0.05$），提示无显著药动学相互作用存在。拉米夫定主要以原形药物由肾小球滤过、肾小管分泌排泄，部分通过有机阳离子转运系统经肾脏排出，约占其总清除量的 70%[26]。作为转运体 OCT2、MATE1 和 MATE2-K 的底物，当与此类转运体抑制剂联用时可降低拉米夫定的肾脏清除率[27-28]。替诺福韦系统代谢极少，主要通过肾小球滤过及活性小管分泌（OAT1 和 OAT3 转运至基底膜肾小管上皮细胞，由 MRP4 分泌至肾小管管腔）联合作用排泄[29-30]。尽管替诺福韦、拉米夫定均主要经肾脏消除，但本研究结果提示无显著药动学相互作用存在，与 Kearney 等[16]报道的研究结果一致，分析原因可能与其排泄过程中的药物转运蛋白不同有关。研究报道，一定浓度的依非韦伦可通过抑制 MATE1、OCT1、OCT2 和 MRP2 转运体而减少拉米夫定在大鼠肾脏中的排泄[18]，但在本研究中未观察到拉米夫定 CL、$t_{1/2}$、$AUC_{0\sim\infty}$ 等药动学参数的显著变化，考虑与本实验中给药剂量较低（依非韦伦 400 mg）有关，需进一步探究。拉米夫定、富马酸替诺福韦酯及依非韦伦联合用于艾滋病抗病毒治疗，临床上需长期给药[31]。本实验仅考察了单剂量富马酸替诺福韦酯、依非韦伦对拉米夫定的影响，具有一定的局限性，针对多剂量富马酸替诺福韦酯、依非韦伦对拉米夫定药动学影响及其具体作用机制有待后续进一步研究。

参考文献

[1] Robbins MR. Recent recommendations for management of human immunodeficiency virus-positive patients [J]. Dent Clin North Am，2017，61（2）：365-387.

[2] 中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心 . 国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册 [M]. 4 版 . 北京：人民卫生出版社，2016.

[3] 中华医学会感染病学分会艾滋病丙型肝炎学组，中国疾病预防控制中心 . 中国艾滋病诊疗指南（2021 年版）[J]. 中华内科杂志，2021，60（12）：1106-1128.

[4] 吴雪韵，沈银忠 . 艾滋病抗病毒治疗新进展 [J]. 传染病信息，2019，32（1）：81-87.

[5] Avihingsanon A，Maek-A-Nantawat W，Gatechompol S，et al. Efficacy and safety of a once-daily single-tablet regimen of tenofovir，lamivudine，and efavirenz assessed at 144 weeks among antiretroviral-nave and experienced HIV-1-infected

Thai adults [J]. Int J Infect Dis，2017，61：89-96.
[6] Abhyankar D，Shedage A，Gole M，et al. Pharmacokinetics of fixed-dose combination of tenofovir disoproxil fumarate，lamivudine，and efavirenz：results of a randomized，crossover，bioequivalence study [J]. Int J Std Aids，2017，28（5）：491-498.
[7] 朱玉平，王海勇，刘运美 . 替诺福韦前药研究概况 [J]. 国际药学研究杂志，2012，39（5）：414-419.
[8] 张兆颖 . 拉米夫定临床研究进展 [J]. 抗感染药学，2005，2（1）：4-6.
[9] 王珍燕，卢洪洲 . HIV-1 非核苷类反转录酶仰制剂依非韦伦 [J]. 世界临床药物，2007，28（11）：680-683.
[10] Weiss A，Berndsen RH，Ding XT，et al. A streamlined search technology for identification of synergistic drug combinations [J]. Sci Rep，2015，5：14508.
[11] Dubrocq G，Rakhmanina N. The pharmacokinetics，pharmacodynamics，and clinical role of fixed dose combination of tenofovir disoproxil fumarate，lamivudine and reduced dose efavirenz（TLE-400）in treating HIV-1 infection [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol，2018，14（8）：773-779.
[12] 李辉，曹应琼，程亚光，等 . 依非韦伦 400 mg 剂量进行艾滋病抗病毒治疗的研究进展 [J]. 中国艾滋病性病，2021，27（8）：903-906.
[13] Dravid M，Rathod N. Efficacy and safety of a single-tablet regimen containing tenofovir disoproxil fumarate 300 mg，lamivudine 300 mg and efavirenz 400 mg as a switch strategy in virologically suppressed HIV-1-infected subjects on nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-containing first-line antiretroviral therapy in Pune，India [J]. HIV Med，2020，21（9）：578-587.
[14] 田志浩，艾则孜江 • 艾尔肯，韦鲜花 . 体内药物相互作用机制及其评价方法的研究进展 [J]. 现代药物与临床，2021，36（10）：2192-2199.
[15] Xia H，Gao L，Gong X，et al. The challenge of potential drug-drug interactions among people living with HIV on antiretroviral therapy：a cross-sectional study in selected provinces in China [J]. Front Pharmacol，2020，11：800.
[16] Kearney B，Flaherty J，Sayre J，et al. A multiple-dose，randomized，crossover，drug interaction study between tenofovir DF and lamivudine or didanosine [A]// The 1st IAS conference on HIV pathogenesis and treatment [C]. Argentina：Buenos Aires，2001：8-11.
[17] Jiang Q，Liu Y，Wang Y，et al. Simultaneous determination of entecavir and lamivudine in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study [J]. RSC Advances，2016，6（75）：70990-70998.
[18] Ceckova M，Reznicek J，Deutsch B，et al. Efavirenz reduces renal excretion of lamivudine in rats by inhibiting organic cation transporters（OCT，Oct）and multidrug and toxin extrusion proteins（MATE，Mate）[J]. PLoS One，2018，13（8）：e0202706.
[19] Jiang Q，Liu Y，Wang Y，et al. Simultaneous determination of entecavir and lamivudine in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study [J]. RSC Adv，2016，6（75）：70990-70998.
[20] Valluru RK，Reddy PBB，Sumanth KS，et al. High throughput LC-MS/MS method for simultaneous determination of tenofovir，lamivudine and nevirapine in human plasma [J]. J Chromatogr B：Anal Technol Biomed Life Sci，2013，931：117-126.
[21] Waitt C，Olagunju A，Nakalema S，et al. Plasma and breast milk pharmacokinetics of emtricitabine，tenofovir and lamivudine using dried blood and breast milk spots in nursing African mother-infant pairs [J]. J Antimicrob Chemother，2018，73（4）：1013-1019.
[22] Rao N，Ch VK，Ch AK，et al. A simultaneous method for quantitative determination of lamivudine and zidovudine in human plasma by using tandem mass spectrometry and its application to pharmacokinetic studies [J]. Der Pharmacia Sinica，2013，4（6）：32-42.
[23] Reddy S，Thomas L，Santoshkumar KS，et al. A LC-MS/MS method with column coupling technique for simultaneous estimation of lamivudine，zidovudine，and nevirapine in human plasma [J]. J Anal Sci Technol，2016，7（1）：1-10.
[24] Nandi U，Das A，Roy B，et al. Development and validation of an HPLC-UV method for simultaneous determination of zidovudine，lamivudine，and nevirapine in human plasma and its application to pharmacokinetic study in human volunteers [J]. Drug Test Anal，2013，5（6）：485-491.
[25] Hassib ST，Taha EA，Elkady EF，et al. RP-LC method for the determination of seven antiviral drugs and bioanalytical application for simultaneous determination of lamivudine and penciclovir in human plasma [J]. Chromatographia，2018，81（2）：289-301.
[26] Takubo T，Moriya T，Hirayama S，et al. Studies on the metabolic fate of lamivudine（I）：absorption，metabolism and excretion of lamivudine in rats [J]. Drug Metab Pharmacokinet，2007，12（2）：85-91.
[27] Müller F，König J，Hoier E，et al. Role of organic cation transporter OCT2 and multidrug and toxin extrusion proteins MATE1 and MATE2-K for transport and drug interactions of the antiviral lamivudine [J]. Biochem Pharmacol，2013，86（6）：808-815.
[28] Li Q，Ye Z，Zhu P，et al. Indinavir alters the pharmacokinetics of lamivudine partially via inhibition of multidrug and toxin extrusion protein 1（MATE1）[J]. Pharm Res，2018，35（1）：14.
[29] 孙涛，刘晓茜，张丽军 . 替诺福韦的药动学研究进展 [J]. 中国药房，2015，26（26）：3734-3736.
[30] Ray AS，Cihlar T，Robinson KL，et al. Mechanism of active renal tubular efflux of tenofovir [J]. Antimicrob Agents Chemother，2006，50（10）：3297-3304.
[31] 徐海侠，李春兰 . 艾滋病病人抗病毒治疗服药依从性与生存质量的相关性 [J]. 中国艾滋病性病，2018，24（3）：238-240.

（收稿日期：2022-01-20；修回日期：2022-03-11）

苯并芘促进 *FHIT*、*CDH13* 基因启动子区甲基化及机制研究

武岳[1]，张梦迪[2, 4]，李君[2, 3, 4]，王冬雪[2, 6]，白图雅[2, 4]，吕晓丽[2, 4]，胡玉霞[2, 3, 4]，高峰[2, 4]，周树宏[4, 5]，李京慧[2]，范兴业[2]，常福厚[2, 4]，王光[1*]（1. 内蒙古医科大学附属医院，呼和浩特　010020；2. 内蒙古医科大学药学院，呼和浩特　010110；3. 内蒙古医科大学新药安全评价研究中心，呼和浩特　010110；4. 内蒙古自治区新药筛选工程研究中心，呼和浩特　010110；5. 内蒙古医科大学基础医学院，呼和浩特　010110；6. 上海中医药大学交叉科学研究院，上海　201210）

摘要：目的　探讨苯并芘（BaP）对脆性组氨酸三联体（*FHIT*）、T- 钙黏蛋白（*CDH13*）基因启动子区甲基化的影响及可能机制。**方法**　选取 DNA 甲基转移酶抑制剂 5- 氮杂 -2'- 脱氧胞苷作为阳性对照组，采用甲基化特异性 PCR（MSP）法检测不同浓度 BaP（0、0.1、1、10 μmol • L^{-1}）作用于 HepG2 细胞后对 *FHIT*、*CDH13* 基因甲基化的影响；采用 RT-qPCR、Western blot 法检测 BaP 作用于 HepG2 细胞后对 *FHIT*、*CDH13* 基因以及 DNA 甲基化转移酶 1（DNMT1）、转录因子 Sp1 的 mRNA 与蛋白表达的影响。**结果**　与对照组相比，阳性对照组中 *CDH13*、*FHIT* 基因呈现非甲基化状态，随着 BaP 浓度的增加，*FHIT*、*CDH13* 基因甲基化条带（M 条带）亮度逐渐增强，非甲基化条带（U 条带）亮度逐渐减弱，MSP 法检测结果表明 BaP 可能有促进 *FHIT*、*CDH13* 基因甲基化的作用。RT-qPCR 与 Western blot 法检测结果显示随着 BaP 浓度的增加，*FHIT*、*CDH13* 基因的 mRNA 与蛋白表达量逐渐减少，与对照组相比，BaP 中、高剂量组中 *FHIT*、*CDH13* 的表达显著降低（$P < 0.05$）；DNMT1、Sp1 的 mRNA 与蛋白表达显著增加（$P < 0.05$）。**结论**　BaP 具有促甲基化的作用，其机制可能是通过促进 Sp1，进而促进 DNMT1 的表达，使 DNMTs 活性被增强或浓度过大，增强了原有的甲基化状态，从而促进 *FHIT*、*CDH13* 基因启动子区甲基化。

关键词：苯并芘；DNA 甲基化；脆性组氨酸三联体；T- 钙黏蛋白
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2041-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.013

Benzo(a)pyrene promotes the methylation of the promoter regions of *FHIT* and *CDH13* genes and related mechanism

WU Yue[1], ZHANG Meng-di[2, 4], LI Jun[2, 3, 4], WANG Dong-xue[2, 6], BAI Tu-ya[2, 4], LV Xiao-li[2, 4], HU Yu-xia[2, 3, 4], GAO Feng[2, 4], ZHOU Shu-hong[4, 5], LI Jing-hui[2], FAN Xing-ye[2], CHANG Fu-hou[2, 4], WANG Guang[1*] (1. *The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University*, *Hohhot* 010020; 2. *School of Pharmacy*, *Inner Mongolia Medical University*, *Hohhot* 010110; 3. *Research Center for New Drug Safety Evaluation*, *Hohhot* 010110; 4. *Research Center for New Drug Screening Engineering*, *Inner Mongolia Autonomous Region*, *Hohhot* 010110; 5. *School of Basic Medicine*, *Inner Mongolia Medical University*, *Hohhot* 010110; 6. *Institute of Interdisciplinary Sciences*, *Shanghai University of Traditional Chinese Medicine*, *Shanghai* 201210)

Abstract: Objective　To determine the effect and mechanism of benzo(a)pyrene (BaP) on the methylation of promoter regions of fragile histidine triad (*FHIT*) and T-cadherin (*CDH13*) genes. **Methods**　DNA methyltransferase inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine was selected as the positive control group. Methylation specific polymerease chain reaction (MSP) was used to detect the effect of different concentrations of BaP (0, 0.1, 1, and 10 μmol • L^{-1}) on the methylation of *FHIT* and *CDH13* genes on HepG2 cells. RT-qPCR and Western blot were used to detect the effect of different

基金项目：内蒙古自治区高等学校科学研究项目（No. NJZY21593）；内蒙古医科大学“三位一体”创新创业培育项目（No. SWYT2021034）；内蒙古医科大学大学生科技创新“英才培育”项目（No. YCPY2022098）。
作者简介：武岳，男，主要从事药学方面的研究工作，email：956427674 @qq.com　*__通信作者：__王光，男，主要从事临床检验学研究，email：wangguang0471@sina.com

concentrations of BaP (0, 0.1, 1, and 10 μmol • L^{-1}) on HepG2 cells and further on the mRNA and protein expression of *FHIT*, *CDH13*, DNMT1, and Sp1. **Results** Compared with the control group, *CDH13* and *FHIT* genes showed non-methylated status in the positive control group. With the increase of BaP concentration, the brightness of *FHIT* and *CDH13* gene methylation bands gradually increased, while the brightness of unmethylated bands (U bands) gradually decreased. MSP showed that BaP promoted the methylation of *FHIT* and *CDH13* genes. RT-qPCR and Western blot showed that with the increase of BaP concentration the mRNA and protein expressions of *FHIT* and *CDH13* genes gradually decreased. Compared with the control group, the expressions of *FHIT* and *CDH13* genes in the BaP medium and high dose groups were significantly decreased ($P < 0.05$); the mRNA and protein expressions of DNMT1 and Sp1 greatly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** BaP can promote the methylation of *FHIT* and *CDH13* genes promoter regions, whose mechanism is to promote the expression of DNMT1 by promoting Sp1. When the activity of DNMTs is enhanced or the concentration is too high, the original methylation is enhanced.

Key words: benzo(a)pyrene; DNA methylation; fragile histidinetriad; T-cadherin/H-cadherin

肝癌是世界上常见的恶性肿瘤之一，我国肝癌的发病率和病死率均居世界首位[1]。肝癌的发生也和其他肿瘤一样是环境因素和遗传因素共同作用的结果，已有研究表明肿瘤相关基因启动子异常甲基化可以作为肿瘤发生的敏感生物标志物[2-3]。

DNA甲基化为DNA化学修饰的一种形式，能够在不改变DNA序列的前提下，改变遗传表现。脆性组氨酸三联体（fragile histidinetriad，*FHIT*）基因是一个抑癌基因[4]。T-钙黏蛋白（T-cadherin/H-cadherin，*CDH13*）是非典型的钙黏素家族中的一员[5]。研究表明*FHIT*、*CDH13*可能成为恶性肿瘤风险评估和监测预后的新的分子生物学标志物[6]。此外，本课题组前期研究发现*FHIT*、*CDH13*基因甲基化在肝癌患者中高表达，提示*FHIT*、*CDH13*基因甲基化可能与肝癌的发生发展关系密切[7]。

苯并芘 [benzo(a)pyrene，BaP] 是一种常见的环境污染物。在流行病学研究中，环境中高水平的BaP暴露会增加肝细胞癌（human hepatocellular carcinoma，HCC）的风险，表明BaP可能是诱发HCC的原因之一[8]。但是关于BaP作用于HepG2细胞对*FHIT*、*CDH13*基因启动子区甲基化的影响尚未见报道。本研究选取DNA甲基转移酶抑制剂5-氮杂-2'-脱氧胞苷（5-Aza-2'-deoxycytidine，5-Aza-CdR）作为阳性对照，通过MSP法检测BaP对*FHIT*、*CDH13*基因甲基化的情况，同时采用RT-qPCR和Western blot法检测BaP对*FHIT*、*CDH13*、DNMT1、Sp1 mRNA和蛋白表达的影响并对其机制进行初步探讨，为肝癌分子标记物的筛选及致癌机制的探讨提供参考。

1 材料

BaP（美国Sigma公司），DMEM高糖培养基、胎牛血清（美国Gibco公司），DNA提取酚试剂（中国Solarbio公司），5-Aza-CdR（中国上海源叶公司），EZ DNA Methylation-Gold试剂盒（中国南京博尔迪生物有限公司），甲基化特异性PCR试剂盒（中国天根生化科技有限公司），*FHIT*、*CDH13*、DNMT1、Sp1和*β*-actin兔单克隆抗体（英国Abcam公司），RevertTra Ace qPCR RT kit、SYBR Green Realtime PCR Master Mix试剂盒（日本TOYOBO公司）。人肝癌细胞株HepG2（北京协和基础医学研究所）。

2 方法

2.1 细胞培养及处理

人肝癌HepG2细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中，置于含5% CO_2的37 ℃培养箱中常规培养，倒置显微镜观察细胞生长情况，当细胞达到80%～90%融合时，胰蛋白酶消化制成细胞悬液后以适当的密度接种于细胞培养6孔板中并摇匀。选取DNA甲基转移酶抑制剂5-Aza-CdR作为阳性对照组，实验分为对照组、阳性对照组及不同浓度BaP（0.1、1、10 μmol•L^{-1}）组。分别用0.1、1、10 μmol•L^{-1} BaP，5-Aza-CdR处理细胞24 h，对照组不加任何药物处理。然后收集细胞进行下一步的检测实验。

2.2 甲基化特异性PCR（MSP）法检测*FHIT*、*CDH13*基因甲基化情况

采用酚氯仿法提取DNA，根据DNA Methylation-Gold试剂盒说明书对DNA进行甲基化修饰，并进行扩增，扩增引物见表1，PCR条件如下：变性（95 ℃，5 min），退火（94 ℃ 20 s、64 ℃ 30 s、72 ℃ 20 s，35个循环），延伸（72 ℃ 10 min）。PCR产物在2%琼脂糖凝胶中电泳分析，应用UVP凝胶成像系统观察电泳结果。

表 1　MSP 中 *FHIT*、*CDH13* 基因的引物序列、产物片段大小及退火温度

Tab 1　Primer sequences of *FHIT* and *CDH13* genes in MSP，product fragment size and annealing temperature

基因		引物序列	条带长 /bp	退火温度 /℃
FHIT[9]	M	（Forward）5'-TTG GGG CGC GGG TTT GGG TTT TTA-3'	74	55.5
		（Reverse）5'-CGT AAA CGA CGC CGA CCC CAC TA-3'		
	U	（Forward）5'-TTG GGG TGT GGG TTT GGG TTT TTA-3'	74	55.5
		（Reverse）5'-CAT AAA CAA CAC CAA CCC CAC TA-3'		
CDH13[10]	M	（Forward）5'-TTG TGG GGT TGT TTT TTG T-3'	243	64.0
		（Reverse）5'-TTC TTT TCA TTC ATA CAC ACA-3'		
	U	（Forward）5'-TCG CGG GGT TCG TTT TTC GC-3'	243	59.0
		（Reverse）5'-GAC GTT TTC ATT CAT ACA CGC G-3'		

2.3　荧光实时定量 PCR（RT-qPCR）法检测 *FHIT*、*CDH13*、*DNMT1*、*Sp1* mRNA 表达情况

将细胞按“2.1”项下方法处理后，收集细胞，按 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA，使用 Nanodrop2000 测定 RNA 纯度及浓度，根据反转录试剂盒说明书合成 cDNA。引物序列见表 2，使用 RT-qPCR 法进行扩增，反应程序如下：95 ℃ 2 min，90 ℃ 20 s，55 ℃ 30 s，68 ℃ 50 s（40 个循环），采用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法计算检测基因 mRNA 的相对表达量，实验重复 3 次。

表 2　*FHIT*、*CDH13*、*DNMT1* 及 *Sp1* 基因的引物序列

Tab 2　Primer sequence of *FHIT*，*CDH13*，*DNMT1*，and *Sp1* gene

基因	正向引物序列	反向引物序列
FHIT	5'-GGACAGTGGTGGAAAAACATTT-3'	5'-TCCTCATAGATGCTGTCATTCC-3'
CDH13	5'-GAGACATTGTCACTGTTGTGTC-3'	5'-GAGCCTCGATGATCAGTTCATA-3'
Sp1	5'-TCACTCCATGGATGAAATGACA-3'	5'-CAGAGGAGGAAGAGATGATCTG-3'
DNMT1	5'-CGGCAGACCATCAGGCATTCTAC-3'	5'-CACACCTCACAGACGCCACATC-3'
β-actin	5'-GGATGTCCACGTCACACTTC-3'	5'-CACTCTTCCAGCCTTCCTTC-3'

2.4　Western blot 法检测 FHIT、CDH13、DNMT1、Sp1 蛋白表达情况

将细胞处理 24 h 后，蛋白裂解液裂解细胞提取各组细胞总蛋白，BCA 法测定蛋白质浓度，定量后进行 SDS-PAGE 垂直电泳，湿法 PVDF 转膜，封闭液封闭 20 min，在 4 ℃下一抗（1∶5000）孵育过夜，TBST 清洗 3 次，二抗避光孵育 1 h，红外荧光扫描成像系统检测，扫描后应用 Image J 软件进行分析。

2.5　统计分析

采用 SPSS 22.0 对数据进行统计分析，计量资料组间差异采用单因素方差分析法进行检验，数据采用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）来表示，并采用 Graphpad Prism 统计分析软件作图，$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　BaP 对 *FHIT*、*CDH13* 基因甲基化的影响

FHIT 基因扩增对接基因中原始序列的位置为：195—283（来自 GenBank 序列号 U76263），甲基化岛 5 个[9]。*CDH13* 扩增对接基因中原始序列的位置为－265—－247，甲基化岛 6 个[10]。采用 MSP 法检测不同浓度的 BaP（0、0.1、1、10 μmol • L^{-1}）处理 24 h 后的 HepG2 细胞，结果显示阳性对照组（5-Aza-CdR 组）中 *CDH13*、*FHIT* 基因呈现非甲基化状态，随着 BaP 浓度增加，*FHIT*、*CDH13* 基因甲基化条带（M 条带）亮度逐渐增强，而非甲基化条带（U 条带）亮度逐渐减弱，且均呈剂量依赖性，高剂量组呈现完全甲基化状态（见图 1）。表明 BaP 可促进 *FHIT*、*CDH13* 基因启动子区域的甲基化。

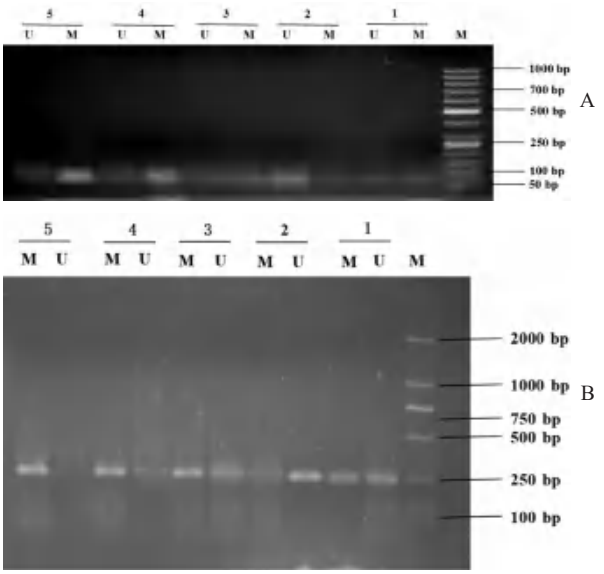

图 1　*FHIT* 基因（A）和 *CDH13* 基因（B）MSP 电泳图

Fig 1　MSP electropherogram of *FHIT* genes (A) and *CDH13* genes (B)

注（Note）：1. 对照组（control group）；2. 阳性对照组（positive control group）；3. 0.1 μmol • L^{-1} BaP 组（BaP 0.1 μmol • L^{-1} group）；4. 1 μmol • L^{-1} BaP 组（BaP 1 μmol • L^{-1} group）；5. 10 μmol • L^{-1} BaP 组（BaP 10 μmol • L^{-1} group）；M. 甲基化条带（methylated band）；U. 非甲基化条带（unmethylated band）。

3.2　BaP 处理后 *FHIT*、*CDH13*、*DNMT1*、*Sp1* mRNA 表达情况

将对照组中 *FHIT*、*CDH13*、*DNMT1*、*Sp1* mRNA 表达量设置为 1，与对照组比较（见图 2），阳性对照组 *FHIT*、*CDH13*、*DNMT1*、*Sp1* mRNA 及 BaP 1 μmol • L^{-1} 和 10 μmol • L^{-1} 组中 *FHIT*、*CDH13*、*DNMT1*、*Sp1* 的表达差异均具有统计学意义（$P < 0.05$，$P < 0.001$）。结果表明 BaP 中、高剂量组可以显著下调 *FHIT*、*CDH13* mRNA 表达量，而上调 *DNMT1*、*Sp1* mRNA 表达量。

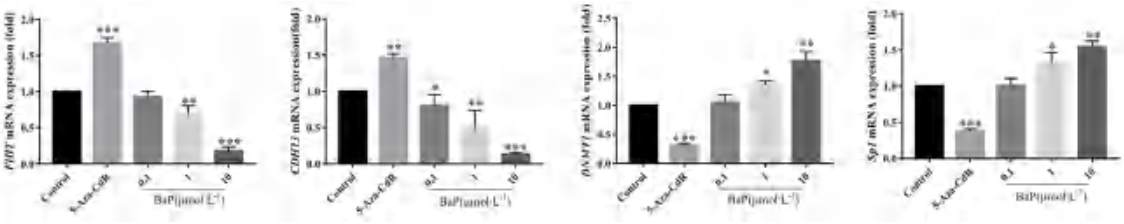

图 2　不同浓度 BaP 处理后 *FHIT*、*CDH13*、*DNMT1* 及 *Sp1* 基因 mRNA 表达的情况（$n = 3$）

Fig 2　mRNA expression of *FHIT*，*CDH13*，*DNMT1* and *Sp1* at different concentrations of BaP（$n = 3$）

注（Note）：与对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$（Compared with the control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）。

3.3　BaP 处理后 FHIT、CDH13、DNMT1、Sp1 蛋白表达情况

与对照组相比，BaP 0.1 μmol • L^{-1} 蛋白表达虽降低，但差异无统计学意义（$P > 0.05$），阳性对照组表达显著升高（$P < 0.05$）。BaP 1 μmol • L^{-1} 和 10 μmol • L^{-1} 组较对照组 FHIT、CDH13 蛋白表达显著减低，而 DNMT1、Sp1 蛋白表达显著增加（见图 3）（$P < 0.05$）与 RT-qPCR 结果一致。表明 BaP 可能通过增加 DNMT1、Sp1 蛋白表达而抑制 FHIT、CDH13 蛋白表达。

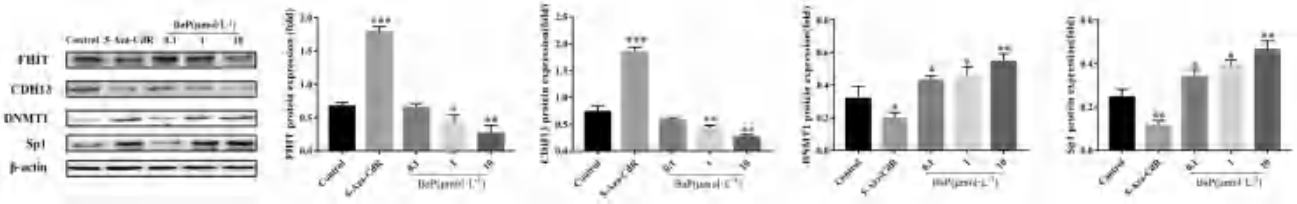

图 3　不同浓度 BaP 处理后 FHIT、CDH13、DNMT1 及 Sp1 基因蛋白表达的情况（$n = 3$）

Fig 3　Protein expression of FHIT，CDH13，DNMT1 and Sp1 at different concentrations of BaP（$n = 3$）

注（Note）：与对照组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$（Compared with the control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）。

4　讨论

DNA 甲基化是重要的表观遗传修饰方式之一，参与调节胚胎发育、转录、染色质结构、X 染色体失活、基因组印记和染色体稳定等多项生命活动[11]。近年来国内外学者对 *FHIT*、*CDH13* 基因甲基化与肝癌的关系进行了大量的研究，研究表明 *FHIT*、*CDH13* 基因甲基化与恶性肿瘤的发生发展密切相关[12]。此前，Tuoya 等[7]的实验也证实了 *FHIT*、*CDH13* 基因在肝癌患者中呈现高甲基化状态。BaP 是国际公认的环境污染物，被列为Ⅰ类致癌物，已有研究报道 BaP 可以促进肝癌的发生和进展[13]，但其具体机制尚未清晰。Jiang 等[14]研究发现，BaP 诱导的 DNA 甲基化改变可能会导致与空气污染相关肺癌中异常的 DNA 甲基化，这些 DNA 甲基化改变可能影响肺癌的发生和进展。本实验以 DNA 甲基转移酶抑制剂 5-Aza-CdR 为阳性对照组，通过采用甲基化特异性 PCR 法检测不同浓度 BaP 作用于 HepG2 细胞后 *FHIT*、*CDH13* 基因的甲基化情况，结果表明 BaP 可增强 *FHIT*、*CDH13* 基因甲基化水平，且具有浓度依赖性，本实验结果佐证了之前的研究内容也弥补了的 BaP 对 HepG2 细胞内的 *FHIT*、*CDH13* 甲基化水平的研究空白。

DNA 甲基化和去甲基化可通过 DNA 甲基转移酶（DNMT）进行调控，两个 DNMT 家族 DNMT3 和 DNMT1 分别负责甲基化的建立和维持[15]。Robert 等[16-17]研究发现 DNMT1 和 DNMT3b 协同作用抑制肿瘤的 CpG 岛高甲基化。DNMT1 负责将已经发生变化的基因 DNA 甲基化信息传递于子代细胞，使得异常 DNA 甲基化模式继续发生和延续[18]。Leu 等[19]在卵巢癌的研究中，沉默 DNMT1 后 3 个无活性 *TWIST*、*RASSF1A* 和 *HIN-1* 基因发生部分去甲基化，并恢复了基因的表达。本实验结果发现随着 BaP 浓度的升高，DNMT1 的蛋白及 mRNA 表达逐渐增加，高剂量组 BaP 对 DNMT1 蛋白及 mRNA 表达增加最为明显，但抑癌基因 *FHIT*、*CDH13* 无论是蛋白表达还是 mRNA 表达都逐渐减少，表明 BaP 可能通过显著增加甲基化转移酶 DNMT1 的活性使 *FHIT*、*CDH13* 表达减少，从而发挥促甲基化的作用。

DNMT1 活性的改变与其表达水平和功能性激活有关，其表达水平主要受核转录因子 Sp1 的调控。Song 等[20]研究发现 DNA 甲基转移酶 DNMT1 与 Sp1 结合并引起一些 *Sp1* 靶基因的抑制，同时 Sp1 还可以通过与 DNMT1 相互作用而促进特定位点的甲基化[21]。为了进一步探究 BaP 抑制 DNMT1 表达的机制，采用 RT-qPCR、Western blot 法对其进行验证，结果表明 BaP 暴露后，细胞中 *Sp1* mRNA 与蛋白表达均显著增高。有研究指出对 DNMT1 的表达抑制机制可能是通过抑制 Sp1 的活性而实现的[22]。由于 Sp1 在 DNMT1 上有结合位点，所以 BaP 可能通过上调 Sp1 蛋白与 mRNA 的表达发挥促进作用，可能最终会导致 DNMT1 的活性增强，从而促进 *FHIT*、*CDH13* 基因甲基化作用。

综上所述，本研究发现 BaP 可能会通过增强 Sp1 促进 DNMT1 活性，调控 *FHIT*、*CDH13* 基因甲基化表达，影响 *FHIT*、*CDH13* 基因的表达水平，从而发挥促甲基化作用。但 BaP 如何调控 Sp1 和 DNMT1 及其下游信号通路有待进一步研究。

参考文献

[1] Zhang Y，Zheng T，Zhang W. Report of cancer incidence and mortality in China，2012 [J]. Adv Mod Oncol Res，2018，4（3）：1-7.

[2] Hao X，Luo H，Krawczyk M，et al. DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of common cancers [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2017，114（28）：7414-7419.

[3] Villanueva A，Portela A，Sayols S，et al. DNA methylation-based prognosis and epidrivers in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology，2015，61（6）：1945-1956.

[4] Li Q，Ding L，Jing N，et al. Folate deficiency and aberrant DNA methylation and expression of *FHIT* gene were associated with cervical pathogenesis [J]. Oncol Lett，2018，15（2）：1963-1972.

[5] Lin YL，Xie PG，Ma JG. Aberrant methylation of *CDH13* is a potential biomarker for predicting the recurrence and progression of non-muscle-invasive bladder cancer [J]. Med Sci Monit，2014，20：1572.

[6] Chung CM，Lin TH，Chen JW，et al. A genome-wide association study reveals a quantitative trait locus of adiponectin on *CDH13* that predicts cardiometabolic outcomes [J]. Diabetes，2011，60（9）：2417-2423.

[7] Tuoya A，Wang D，Xing Y，et al. Relationship between Methylation of *FHIT* and *CDH13* gene promoter region and liver cancer [J]. Curr Med Sci，2020，40：502-509.

[8] Su Y，Zhao B，Guo F，et al. Interaction of benzo [a] pyrene with other risk factors in hepatocellular carcinoma：a case-control study in Xiamen，China [J]. Ann Epidemiol，2014，24（2）：98-103.

[9] Sato M，Mori Y，Sakurada A，et al. The H-cadherin（*CDH13*）gene is inactivated in human lung cancer [J]. Hum Genet，1998，103（1）：96-101.

[10] Zöchbauer-Müller S，Fong KM，Maitra A，et al. 5’CpG island methylation of the *FHIT* gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer [J]. Cancer Res，2001，61（9）：3581-3585.

[11] Koch A，Joosten SC，Feng Z，et al. Analysis of DNA methylation in cancer：location revisited [J]. Nat Rev Clin Oncol，2018，15（7）：459-466.

[12] Huang T，Chen X，Hong Q，et al. Meta-analyses of gene methylation and smoking behavior in non-small cell lung cancer patients [J]. Sci Rep，2015，5（1）：1-8.

[13] Salem ML，El-Ashmawy NE，Abd El-Fattah EE，et al. Immunosuppressive role of benzo [a] pyrene in induction of lung cancer in mice [J]. Chem Biol Interact，2021，333：109330.

[14] Jiang CL，He SW，Zhang YD，et al. Air pollution and DNA methylation alterations in lung cancer：a systematic and comparative study [J]. Oncotarget，2017，8（1）：1369.

[15] Dawson MA，Kouzarides T. Cancer epigenetics：from mechanism to therapy [J]. Cell，2012，150（1）：12-27.

[16] Robert MF，Morin S，Beaulieu N，et al. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells [J]. Nat Genet，2003，33（1）：61-65.

[17] Sowińska A，Jagodzinski PP. RNA interference-mediated knockdown of DNMT1 and DNMT3B induces CXCL12 expression in MCF-7 breast cancer and AsPC1 pancreatic carcinoma cell lines [J]. Cancer Lett，2007，255（1）：153-159.

[18] Zhang Y，Chen F，Sun Y，et al. Effects of DNMT1 silencing on malignant phenotype and methylated gene expression in cervical cancer cells [J]. J Exp Clin Cancer Res，2011，30（1）：1-8.

[19] Leu YW，Rahmatpanah F，Shi H，et al. Double RNA interference of DNMT3b and DNMT1 enhances DNA demethylation and gene reactivation [J]. Cancer Res，2003，63（19）：6110-6115.

[20] Song J，Ugai H，Kanazawa I，et al. Independent repression of a GC-rich housekeeping gene by Sp1 and MAZ involves the same cis-elements [J]. J Biol Chem，2001，276（23）：19897-19904.

[21] Estève PO，Chin HG，Pradhan S. Molecular mechanisms of transactivation and doxorubicin-mediated repression of survivin gene in cancer cells [J]. J Biol Chem，2007，282（4）：2615-2625.

[22] Yu J，Peng Y，Wu LC，et al. Curcumin down-regulates DNA methyltransferase 1 and plays an anti-leukemic role in acute myeloid leukemia [J]. PLoS One，2013，8（2）：e55934.

（收稿日期：2022-02-20；修回日期：2022-05-12）

杯苋甾酮通过拟雌激素样作用抑制破骨细胞分化

谢景春[1]，赵玥[2]，黄立慧[3]，程禄萍[2]，金奇[4]，谢保平[2*]（1. 于都县人民医院烧伤整形外科，江西　赣州　342399；2. 赣南医学院心脑血管疾病防治教育部重点实验室，江西　赣州　341000；3. 赣南医学院第一附属医院信息科，江西　赣州　341000；4. 赣南医学院科研处，江西　赣州　341000）

摘要：目的　探讨杯苋甾酮的拟雌激素样作用及其抑制破骨细胞分化的作用机制。**方法**　采用 CCK-8 试剂检测杯苋甾酮对 MCF-7 和 RAW264.7 细胞增殖的影响；用酒石酸酸性磷酸酶染色（TRAP）检测杯苋甾酮对破骨细胞分化的影响，并用雌激素受体阻断剂 ICI182780（ICI）阻断；用 qRT-PCR 和 Western blot 检测杯苋甾酮对 MCF-7 和破骨细胞中 ER*α* mRNA 和蛋白水平表达以及破骨细胞分化相关基因表达的影响；用分子对接验证杯苋甾酮与 ER*α* 的相互作用关系。**结果**　杯苋甾酮（5、10 μmol • L^{-1}）可显著促进 MCF-7 细胞的增殖以及 ER*α* mRNA 和蛋白水平的表达；且实验剂量下杯苋甾酮可显著抑制破骨细胞分化以及 *TRAP* 和 *RANK* 的表达，上调 ER*α* 基因与蛋白水平的表达；ICI 可以阻断杯苋甾酮对 MCF-7 细胞增殖和破骨细胞分化的影响，上调 *TRAP* 和 *RANK* 的表达；分子对接发现杯苋甾酮与 17-*β* 雌二醇对 ER*α* 共同作用位点是在 Glu-353 和 His-524。**结论**　杯苋甾酮具有拟雌激素样作用，并可通过 ER*α* 信号通路抑制破骨细胞分化。

关键词：破骨细胞；杯苋甾酮；雌激素受体；骨质疏松症
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2046-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.014

Cyasterone inhibits osteoclast differentiation by estrogen-like effect

XIE Jing-chun[1], ZHAO Yue[2], HUANG Li-hui[3], CHENG Lu-ping[2], JIN Qi[4], XIE Bao-ping[2*] (1. *Department of Burns and Plastics Surgery, People's Hospital of Yudu County, Ganzhou Jiangxi* 342399; 2. *Key Laboratory of Prevention and Treatment of Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases, Ministry of Education, Gannan Medical University, Ganzhou Jiangxi* 341000; 3. *Department of Informatics, The First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou Jiangxi* 341000; 4. *Department of Research, Gannan Medical University, Ganzhou Jiangxi* 341000)

Abstract: Objective To determine whether cyasterone has an estrogen-like effect and the mechanism of action of cyasterone in inhibiting osteoclast differentiation. **Methods** The effect of cyasterone on the proliferation of MCF-7 cells and RAW264.7 cells was detected by CCK-8 reagent. The effect of cyasterone on the osteoclast differentiation was detected by TRAP staining and blocked by ICI182780 (ICI). Western blot and qRT-PCR were used to detect the effect of cyasterone on the expression of ER*α* mRNA and protein in MCF-7 and osteoclast cells, including the expression of osteoclast differentiation-related genes, and computer simulation docking to confirm the interaction of cyasterone and ER*α*. **Results** Cyasterone (5, 10 μmol • L^{-1}) obviously promoted the proliferation of MCF-7 cells and the expression of ER*α* mRNA and protein. Cyasterone at the experimental dose greatly inhibited the osteoclast differentiation, as well as the expression of *TRAP* and *RANK*, and up-regulated the expression of ER*α* gene and protein. ICI blocked the effect of cyasterone on the

基金项目：江西省教育厅科学技术研究项目（No.GJJ180809；No.GJJ201510；No.GJJ15094）；赣南医学院校级课题（No.YB201901）；赣南医学院心脑血管疾病防治教育部重点实验室开放基金（No.XN202025）。
作者简介：谢景春，男，硕士，住院医师，主要从事骨重塑在整形外科中的研究，email：1278204416@qq.com　*__通信作者：__谢保平，男，硕士，实验师，主要从事中药防治老年病机制研究，email：m18932446096_1@163. com

proliferation of MCF-7 and osteoclast differentiation, and up-regulated the expression of *TRAP* and *RANK*. Computer simulation showed that the co-action sites of cyasterone and 17-*β* estradiol on ER*α* were Glu-353 and His-524. **Conclusion** Cyasterone has an estrogen-like effect and inhibits the osteoclast differentiation through the ER*α* signaling pathway.

Key words: osteoclast; cyasterone; estrogen receptor; osteoporosis

骨质疏松症（osteoporosis，OP）是骨骼代谢失衡导致的疾病，其特征是骨量减少和骨组织微结构破坏，导致骨密度下降，骨脆性和骨折发生概率升高[1-2]。破骨细胞和成骨细胞功能失衡是 OP 的重要发病机制，其中破骨细胞是机体内唯一具有骨吸收功能的多核巨噬细胞。因此，破骨细胞常被作为抗 OP 药物研发和机制研究的靶细胞[3]。

雌激素受体（estrogen receptor，ER）是雌激素和植物雌激素（phytoestrogen，PE）抗骨质疏松作用的主要靶点，特别是 ER*α*。李伟娟等[4]报道淫羊藿苷通过 ER*α*/RANK 信号通路抑制 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化和骨吸收功能。Xie 等[5]研究发现齐墩果酸上调 ER*α* 的表达，并通过 ER*α*/miR-503/RANK 通路抑制破骨细胞分化和骨吸收功能。提示 ER*α* 信号通路在破骨细胞分化和抗 OP 中扮演了重要的角色。

杯苋甾酮（结构见图 1）是川牛膝中抗 OP 的有效成分之一，有研究表明杯苋甾酮可显著增加去卵巢 SD 大鼠胫骨的骨密度和最大应力[6]。纪亲龙等[7]研究显示，杯苋甾酮能显著抑制 M-CSF 和 RANKL 诱导的小鼠源性单核巨噬细胞（BMMs）向破骨细胞分化。然而，未见杯苋甾酮抑制破骨细胞分化和抗 OP 的机制研究，特别是在 ER 信号通路上的研究。因此，本研究拟用 MCF-7 细胞证实杯苋甾酮的拟雌激素样作用，并用 ER 竞争性阻断剂 ICI 阻断 ER，用 TRAP 染色、qRT-PCR、Western blot 和分子对接等方法证实杯苋甾酮通过 ER 信号通路抑制破骨细胞分化的机制，为杯苋甾酮抗 OP 的临床应用提供参考。

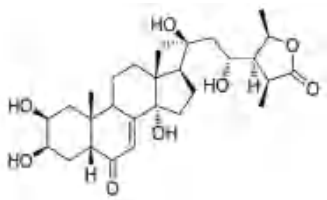

图 1　杯苋甾酮化学结构式

Fig 1　Chemical structure of cyasterone

1　材料

1.1　仪器

Varioskan Lux 型酶标仪、ABI7500 型聚合酶链式反应（PCR）仪、240i 型培养箱、ST-16R 型离心机（Thermo Fisher Scientific 公司），HWS12 型恒温水浴锅（上海一恒），EVOSFLCORE 型倒置显微镜（Life Technologies 公司），TS-1 型水平脱色摇床、Vortex-6 型旋涡混合器（江苏其林贝尔），UVP/Chemstudio 型多功能化学发光成像系统（Analytik Jena AG 公司），Trans-Blot 蛋白转印系统（Bio-Rad 公司）。

1.2　试药

杯苋甾酮对照品（成都曼思特生物科技有限公司，批号：A0699-20 mg，纯度≥ 98.83%）；ICI182780（Selleckchem 公司，批号：S119117，纯度≥ 99%）；TRizol 提取试剂（Life Technology 公司）；逆转录试剂盒（Thermo Fisher Scientific 公司，批号：00592018）；ER*α* 抗体和 GAPDH 抗体（武汉三鹰生物技术有限公司，货号分别为 21244-1-AP 和 10494-1-AP）；DMEM 高糖培养基（上海中乔新舟生物技术有限公司）；RANKL 诱导因子（PEPROTECH 公司，批号：0815612）；*α*MEM 完全培养基和无酚红 *α*MEM 培养基（武汉普诺赛生命科技有限公司）；青霉素和链霉素（北京索莱宝科技有限公司）；CCK-8 试剂（Biosharp 生物科技有限公司）；TRAP 染色试剂盒（Sigma 公司）；碳吸附胎牛血清（上海传秋生物，HT-FBS-500）；NovoStart® SYBR Green Color qPCR Super Mix（Novoprotein 公司，批号：0513471）。

1.3　细胞

小鼠白血病巨噬细胞 RAW264.7（上海中乔新舟生物技术有限公司）和人乳腺癌细胞 MCF-7（武汉普诺赛生命科技有限公司）。

2　方法

2.1　细胞培养

RAW264.7 细胞培养于含 10% FBS 和 1% 青霉素 / 链霉素的 DMEM 高糖培养基中。在 37 ℃ 和 5%CO_2 条件下培养，每两日换液一次，取传代培养 3 代的细胞用于后续实验。

2.2　细胞毒性检测

将 RAW264.7 细胞接种在 96 孔板中，每孔 3×10^3 个。实验分为空白组、各浓度（0.1、1、2.5、5、10、100 μmol•L^{-1}）杯苋甾酮组。培养 24 h 后，按分组给药处理 48 h，每孔加入 10 μL CCK-8 试剂，37 ℃避光孵育 2 h 后，采用酶标仪在 450 nm 波长下检测各孔的光密度（*OD*），计算细胞增殖率：细胞增殖率（%）＝（$OD_{实验组}$－$OD_{空白溶剂组}$）/（$OD_{空白组}$－$OD_{空白溶剂组}$）×100%。

2.3　杯苋甾酮对 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化的影响

将 RAW264.7 细胞接种在 96 孔板中，每孔 3×10^3 个。实验分为空白组、模型组、不同浓度（2.5、5、10 μmol • L^{-1}）杯苋甾酮组，并根据文献报道[4]，选用雌激素受体阻断剂 ICI 浓度为 1 μmol • L^{-1}，再设置模型组，ICI 组和杯苋甾酮（5 μmol • L^{-1}）＋ ICI 组，每组设置 3 个复孔。用 50 ng • mL^{-1} RANKL 和各浓度的药物 / 培养基处理各组细胞 5 d，每两日换液一次；按 TRAP 染色试剂盒说明书方法进行染色；在显微镜下观察和拍照，统计每组破骨细胞数目。

2.4　qRT-PCR 检测破骨细胞分化相关基因 *TRAP*、*RANK* 和 *ERα* 的表达

将 RAW264.7 细胞接种在 24 孔板中（每孔 1×10^4 个细胞）。常规培养 24 h 后，将 RAW264.7 细胞分为空白组、模型组、不同浓度（2.5、5、10 μmol • L^{-1}）杯苋甾酮组，每组均设置 3 个复孔。按“2.3”项下方法诱导 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞并加药处理，诱导 5 d 后采用 Trizol 法提取细胞中总 RNA，用核酸蛋白仪检测每组细胞中总 RNA 的浓度和质量后，取 1 μg 总 RNA 按逆转录试剂盒说明书方法逆转录为 cDNA，并以 cDNA 为模板，按 PCR 试剂盒说明书进行扩增。以 *GAPDH* 作为内参，破骨细胞分化相关基因 *TRAP*、*RANK* 和 *ERα* 的 mRNA 表达水平。引物序列及扩增产物大小见表 1。

2.5　破骨细胞中 ER*α* 蛋白表达水平测定

采用 Western blot 法进行检测。将 RAW264.7 细胞种植于 6 孔板（4×10^4 个 / 孔）中，培养 12 h 后，按“2.3”项下方法分组和诱导处理，每两日换液一次，诱导 5 d 后，用 RIPA 蛋白裂解液提取总蛋白，用 BCA 法测蛋白浓度，99 ℃变性 15 min，并置于－20 ℃冰箱保存备用。蛋白在 SDS-PAGE 凝胶中电泳；然后转至 PVDF 膜，以 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h；用 ER*α* 一抗和 GAPDH 一抗，4 ℃孵育过夜；用 TBST 清洗 3 次，每次 15 min，加入 HRP 标记二抗，室温孵育 1 h；TBST 清洗 3 次，每次 15 min，加入高敏 ECL 化学发光显色底物、UVP/Chemstudio 型多功能化学发光成像系统中成像，然后采用 Image J（v1.8.0）软件测定各蛋白条带的灰度值，以目的蛋白和内参 GAPDH 蛋白条带的灰度值表示目的蛋白的表达水平。

表 1　qRT-PCR 所需的引物序列

Tab 1　Primer sequences for qRT-PCR

基因	引物序列	产物大小 /bp
ERα（鼠源）	上游：5'-CTACTACCTGGAGAACGAGC-3'	88
	下游：5'-GCGTCGATTGTCAGAATTAGAC-3'	
RANK	上游：5'-GAAGATGCTTTGGTGGGTGT-3'	124
	下游：5'-TCAGTCGGGATCAGTGTGAG-3'	
TRAP	上游：5'-GACCACCTTGGCAATGTCTCTG-3'	262
	下游：5'-GGCTGAGGAAGTCTCTGAGTTG-3'	
GAPDH	上游：5'-CTCATGACCACAGTCCATGC-3'	155
	下游：5'-TTCAGCTCTGGGATGACCTT-3'	
ERα（人源）	上游：5'-CACTCAACAGCGTGTCTCCG-3'	470
	下游：5'-TATCCCACCTTTCATCATTCC-3'	

2.6　杯苋甾酮拟雌激素样实验

MCF-7 细胞培养于无酚红 *α*MEM 完全培养基（含 5% HT-FBS 和 1% 青霉素 / 链霉素）中培养 2 d，以耗尽内源性的拟雌激素[8]，取传代培养 3 代的细胞用于后续实验，将 MCF-7 细胞种植于 96 孔板，并根据杯苋甾酮对 RAW264.7 细胞毒性实验结果，分为空白组、各浓度（0.01、0.1、1、2.5、5、10 μmol • L^{-1}）杯苋甾酮组以及空白组＋ ICI（1 μmol • L^{-1}）组、杯苋甾酮（5 μmol • L^{-1}）＋ ICI（1 μmol • L^{-1}）组，每组平行设置 5 个复孔，用 CCK-8 试剂检测杯苋甾酮对 MCF-7 细胞增殖的影响，方法同“2.2”项下。将 MCF-7 细胞接种在 24 孔板中（每孔 1×10^4 个细胞）培养 24 h 后，分为空白组、各浓度（2.5、5、10 μmol • L^{-1}）杯苋甾酮组，每组设置 3 个复孔，各组细胞加入相应药液 / 培养基处理 2 d 后，按“2.4”项下方法检测细胞中 *ERα* mRNA 表达水平。将 MCF-7 细胞接种在 6 孔板中（每孔 1×10^5 个细胞）。培养 24 h 后，分为空白组和杯苋甾酮（5 μmol • L^{-1}）组，每组设置 3 个复孔。各组细胞加入相应药液 / 培养基处理 2 d 后，按“2.5”项下方法检测细胞中 ER*α* 蛋白表达水平。

2.7　杯苋甾酮与雌激素受体模拟对接

分子对接用 Moe.2019 将杯苋甾酮与 ER*α*（PDB：1ERE）对接，首先检查蛋白序列完整性，特别是对接口袋蛋白完整性，并对蛋白进行加氢加电荷和能量最小化处理，将杯苋甾酮分子能量

最小化后进行构型搜索；然后选择分子与蛋白对接模式，将构象搜索后得的杯苋甾酮与能量最小化后的 1ERE 蛋白在雌激素作用口袋处进行模拟对接，观察小分子和蛋白的相互作用位点。

2.8　统计学分析

运用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计学分析。计量资料采用（$\bar{x}\pm s$）表示，所有实验重复 3 次。各组数据符合正态分布，方差齐时采用单因素方差分析，Students' t 检验；方差不齐时采用非参数检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　杯苋甾酮对 RAW264.7 和 MCF-7 细胞增殖的影响

与空白组相比，杯苋甾酮 100 μmol • L^{-1} 显著抑制 RAW264.7 细胞的增殖（$P < 0.01$），其他浓度的杯苋甾酮对 RAW264.7 细胞增殖无明显影响，结果见图 2。因此，选用 2.5、5、10 μmol • L^{-1} 用于后续实验。

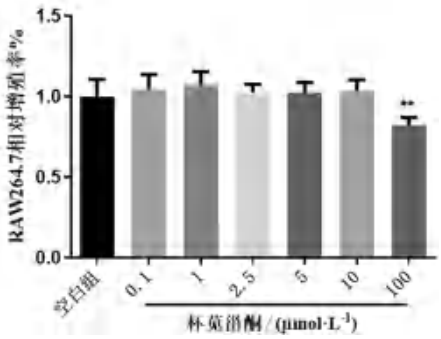

图 2　杯苋甾酮对 RAW264.7 细胞增殖的影响

Fig 2　Effect of cyasterone on the proliferation of RAW264.7 cells

注：与空白组比较，$^{**}P < 0.01$。

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

3.2　杯苋甾酮抑制破骨细胞分化及其相关基因的表达

与模型组相比，各浓度的杯苋甾酮显著抑制 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞（$P < 0.001$）。qRT-PCR 和 Western blot 结果表明，与空白组相比，模型组 TRAP 和 RANK 表达显著增加，提示破骨细胞诱导成功。与模型组相比，各浓度的杯苋甾酮显著抑制 *TRAP* 和 *RANK* 表达，且杯苋甾酮（5、10 μmol • L^{-1}）显著上调 ERα mRNA 和蛋白水平的表达（$P < 0.05$，$P < 0.01$，$P < 0.001$），并具有剂量依赖性，提示杯苋甾酮可能具有拟雌激素样作用，可通过 ER 信号抑制破骨细胞分化（见图 3）。

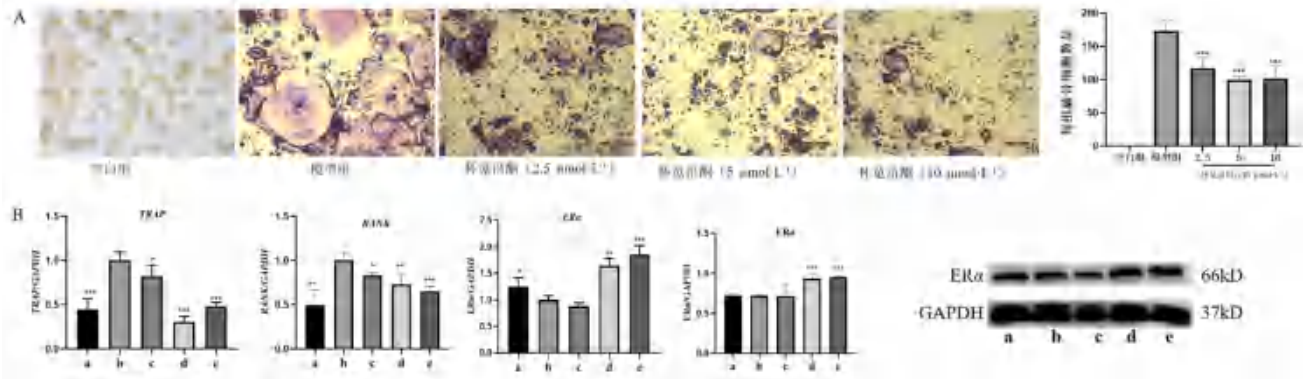

图 3　杯苋甾酮对破骨细胞分化（A）及其相关基因和蛋白表达（B）的影响

Fig 3　Effect of cyasterone on the differentiation of osteoclasts（A）and expression of related genes and protein（B）

注（Note）：a. 空白组（blank group）；b. 模型组（model group）；c. 杯苋甾酮（2.5 μmol • L^{-1}）组 [cyasterone（2.5 μmol • L^{-1}）group]；d. 杯苋甾酮（5 μmol • L^{-1}）组 [cyasterone（5 μmol • L^{-1}）group]；e. 杯苋甾酮（10 μmol • L^{-1}）组 [cyasterone（10 μmol • L^{-1}）group]；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$（compared with the model group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$）。

3.3　杯苋甾酮具有拟雌激素样作用

与空白组相比，5、10 μmol • L^{-1} 杯苋甾酮显著促进 MCF-7 细胞的增殖（见图 4A，$P < 0.05$），用 ER 受体阻断剂 ICI 阻断雌激素受体后，与杯苋甾酮（5 μmol • L^{-1}）组相比，杯苋甾酮（5 μmol • L^{-1}）＋ ICI（1 μmol • L^{-1}）抑制 MCF-7 细胞的增殖（$P < 0.01$），提示杯苋甾酮具有拟雌激素样作用。qRT-PCR 和 Western blot 检测结果表明，与空白组相比，各组杯苋甾酮显著促进 ERα mRNA 水平的表达，并具有剂量依赖性（$P < 0.05$，$P < 0.01$），且杯苋甾酮（5 μmol • L^{-1}）上调 ERα 蛋白水平的表达（$P < 0.05$），见图 4B。表明杯苋甾酮（5、10 μmol • L^{-1}）具有拟雌激素样作用，因此选择杯苋甾酮（5 μmol • L^{-1}）用于后续实验。

3.4　杯苋甾酮与 *ERα* 模拟对接

为了进一步验证杯苋甾酮的拟雌激素样作用，我们采用分子对接发现杯苋甾酮与 17-β 雌二醇具有相同的作用位点是在 Glu-353 和 His-524（见图 5A、图 5B）。此外，杯苋甾酮在 17-β 雌二醇作用口袋还有 Ala-350、Met-388 和 Met-421 等

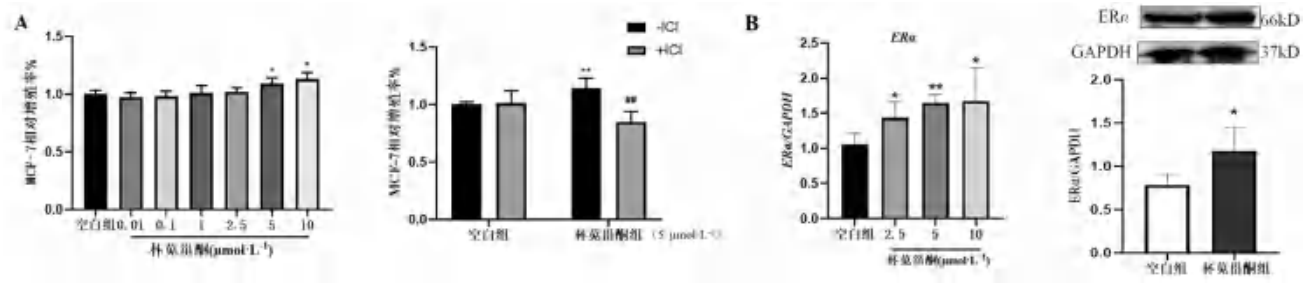

图 4　杯苋甾酮对 MCF-7 细胞增殖（A）和 ERα 表达（B）的影响

Fig 4　Effect of cyasterone on the proliferation of MCF-7 cells（A）and ERα expression（B）

注（Note）：与空白组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与杯苋甾酮（5 μmol • L^{-1}）比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$[Compared with the model group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；compared with the cyasterone group（5 μmol • L^{-1}），$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$]。

作用位点（见图 5B），进一步证实了杯苋甾酮具有拟雌激素样作用，提示杯苋甾酮可能通过 ER 信号通路抑制破骨细胞分化。

3.5　杯苋甾酮通过 ERα 信号通路抑制破骨细胞分化

采用 TRAP 染色和 qRT-PCR 检测 ICI 阻断 ER 后，杯苋甾酮对破骨细胞分化及其相关基因表达的影响。结果表明，与模型组相比，杯苋甾酮（5 μmol • L^{-1}）显著抑制破骨细胞的分化，以及 *TRAP* 和 *RANK* mRNA 水平的表达（$P < 0.05$，$P < 0.01$）；与杯苋甾酮组相比，杯苋甾酮＋ICI 组抑制破骨细胞分化的作用显著降低，上调 *TRAP* 和 *RANK* mRNA 水平的表达（$P < 0.01$），证实杯苋甾酮可能是通过 ER 信号通路抑制破骨细胞的分化（见图 6）。

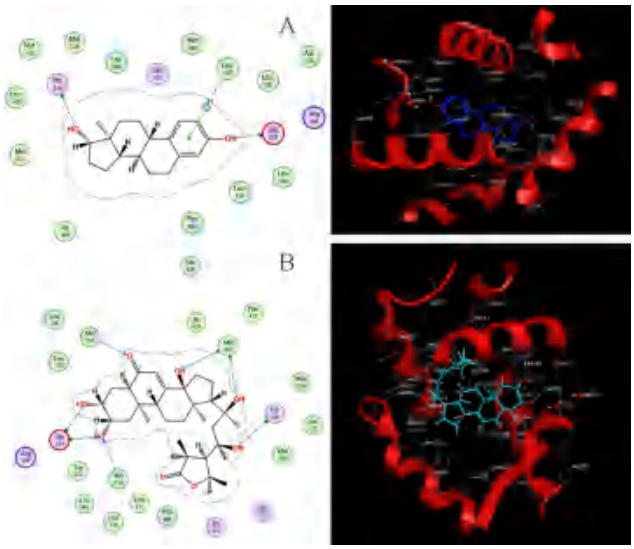

图 5　杯苋甾酮与 ERα 分子对接

Fig 5　Molecular docking of cyasterone and ERα

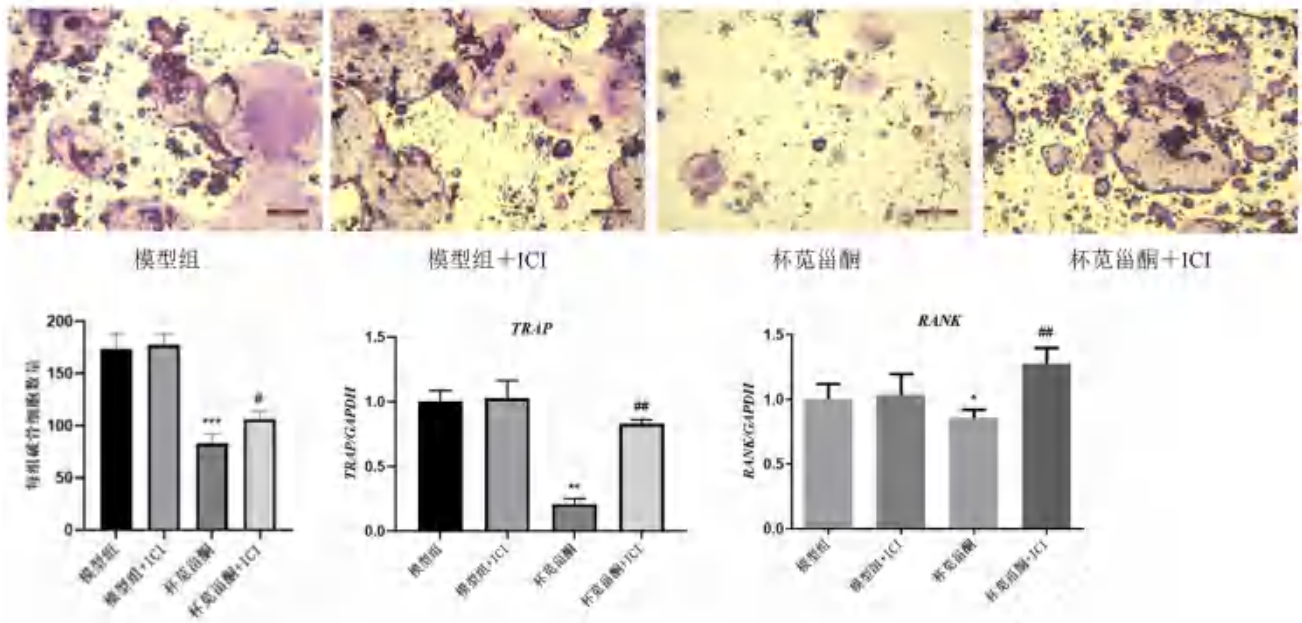

图 6　ICI 对杯苋甾酮抑制破骨细胞分化及其相关基因表达的影响

Fig 6　Effect of ICI on cyasterone inhibiting the osteoclast differentiation

注（Note）：与模型组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与杯苋甾酮（5 μmol • L^{-1}）比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$[Compared with the model group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；compared with the cyasterone group（5 μmol • L^{-1}），$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$]。

4 讨论

雌激素分泌不足是妇女绝经后诱发 OP 的主要原因。因此，雌激素替代疗法是治疗绝经后 OP 的主要方法。近年来，大量研究发现诸多中药含有 PE，有拟雌激素样作用，具有疗效好、副作用小、效优价廉的特点，并应用于 OP 的治疗 [9]。杯苋甾酮是一类甾体化合物，具有植物雌激素 *β*-蜕皮甾酮相似的结构 [10]。因此，本研究首先用 MCF-7 细胞证实了杯苋甾酮（5、10 μmol • L^{-1}）促进 MCF-7 细胞的增殖，上调 ER*α* mRNA 和蛋白水平的表达，且雌激素受体竞争性阻断剂 ICI 可阻断该作用，证实了杯苋甾酮具有拟雌激素样作用。其中，MCF-7 细胞是 ER 阳性表达的人源乳腺癌细胞，是 PE 和拟雌激素药物研究的主要靶细胞，一般来说，具有拟雌激素样作用的药物可以显著促进 MCF-7 细胞的增殖及其相关基因（*ERα* 和 *ERβ*）的表达 [11-12]。

ER 是雌激素和 PE 作用的直接靶点，特别是在破骨细胞和 OP 中，*ERα* 是发挥作用的主要靶点，有研究表明，在 *ERα* 敲除的去卵巢大鼠中，雌激素无抗 OP 作用，不能减少去卵巢大鼠骨丢失，而在敲除 *ERβ* 的去卵巢大鼠中，雌激素具有骨保护作用，且效果和对照组无差异 [13-15]。本研究通过 TRAP 染色和 qRT-PCR、Western blot 检测证实杯苋甾酮显著抑制 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞和 *TRAP*、*RANK* 基因的表达，上调 ER 信号通路上关键靶点 ER*α* 基因和蛋白水平的表达，而 ICI 阻断杯苋甾酮对破骨细胞分化的抑制效应。此外，分子对接发现杯苋甾酮与 17-*β* 雌二醇具有相同的作用位点是在 Glu-353 和 His-524，且杯苋甾酮在 17-*β* 雌二醇作用口袋还有 Ala-350、Met-388 和 Met-421 等作用位点，因此，本实验结果表明杯苋甾酮可能是通过 ER 通路抑制破骨细胞的分化，且 ER*α* 是杯苋甾酮的作用靶点。

参考文献

[1] 李劲平，谢保平，章文娟，等. 补骨脂素通过调控 $CD4^+$ T 细胞分化抑制 RAW264.7 向 OC 分化和骨吸收 [J]. 中国中药杂志，2018，43（6）：1228-1234.

[2] 谢保平，黄立慧，钟佳宁. 组蛋白修饰在破骨细胞分化中的作用 [J]. 中国骨质疏松杂志，2021，27（5）：753-758.

[3] Xu D，Lyu Y，Chen XW，et al. Fructus Ligustri Lucidi ethanol extract inhibits osteoclastogenesis in RAW264.7 cells via the RANKL signaling pathway [J]. Mol Med Rep，2016，14（5）：4767-4774.

[4] 李伟娟，谢保平，石丽颖，等. 从 ER*α*/RANK 通路探讨淫羊藿苷抑制 OC 分化作用 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（7）：121-126.

[5] Xie BP，Shi LY，Li JP，et al. Oleanolic acid inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis via ER alpha/miR-503/RANK signaling pathway in RAW264.7 cells [J]. Biomed Pharmacother，2019，117：109045.

[6] 栗会敏. 壮骨止痛胶囊 B 部分无水乙醇部位抗骨质疏松活性成分研究 [D]. 长沙：中南大学，2012.

[7] 纪亲龙，孔祥东，戚珊红，等. 杯苋甾酮抑制破骨分化和促进成骨分化的双向作用治疗骨质疏松症 [J]. 昆明医科大学学报，2018，39（5）：21-28.

[8] 赵莹莹，陈燕，韩杜菀，等. 地黄苦苷元的雌激素样活性筛选研究 [J]. 药学学报，2019，54（2）：308-312.

[9] 钟建春，谢兴文，李鼎鹏，等. 中药植物雌激素防治绝经后骨质疏松研究概况 [J]. 时珍国医国药，2021，32（7）：1723-1726.

[10] 赵丕文，牛建昭，王继峰，等. 异补骨脂素和蜕皮甾酮对人乳腺癌 T47D 细胞增殖及 ER 亚型表达的影响 [J]. 北京中医药大学学报，2007，30（4）：242-245.

[11] 徐彬人，蔡琨，许丽婷，等. 淡豆豉异黄酮在雌激素诱导的 MCF-7 细胞增殖过程中调控作用研究 [J]. 时珍国医国药，2020，31（10）：2358-2360.

[12] 蔡琳琳，姚明江，郭全，等. 柴桂龙牡汤含药血清对人乳腺癌细胞 MCF-7 的抑制作用及对雌激素受体 *α* 表达的影响 [J]. 中国药业，2018，27（12）：1-4.

[13] Garcla AJ，Tom C，Guemes M，et al. ER*α* signaling regulates MMP3 expression to induce FasL cleavage and osteoclast apoptosis [J]. J Bone Miner Res，2013，28（2）：283-290.

[14] Gou YS，Sun Z，Ma J，et al. 17*β*-estradiol inhibits ER stress-induced apoptosis through promotion of TFII-I-dependent Grp78 induction in osteoblasts [J]. Lab Invest，2014，94（8）：906-916.

[15] Nakamura T，Imai Y，Mstsumoto T，et al. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts [J]. Cell，2007，130（5）：811-823.

（收稿日期：2022-02-08；修回日期：2022-04-11）

基于 UPLC-Q/TOF-MS 法研究“建昌帮”炆何首乌主成分差异

王艳霓[1]，邹宏[2]，骆利平[1]，白璐[1]，蔡教邕[3]，李诗盈[3]，吕齐[3]，叶喜德[3*]（1. 江西德安县中医院药剂科，江西　九江　330400；2. 江西宜丰县人民医院药剂科，江西　宜春　336300；3. 江西中医药大学药学院，南昌　330006）

摘要：目的　比较炆何首乌与其他不同炮制品之间主成分的差异，为深入研究炆何首乌炮制机制提供数据支撑。**方法**　采用 UPLC-Q/TOF-MS 法检测何首乌不同炮制品中的化学成分，选择 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm），流动相 0.1% 甲酸水溶液（A）-0.1% 甲酸乙腈溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 18 min，5% ～ 40%B；18 ～ 30 min，40% ～ 95%B；30 ～ 35 min，95%B；35 ～ 35.1 min，95% ～ 5%B；35.1 ～ 38 min，5%B），电喷雾离子源（ESI），负离子模式，质谱扫描范围 *m/z* 100 ～ 1500，通过对照品、相对分子量、质谱裂解规律和文献信息，鉴定何首乌化学成分；利用 Marker view 软件，建立何首乌各炮制品主成分分析（PCA）模型，获取 PCA 得分图。**结果**　鉴定出何首乌不同炮制品中的 25 个化合物，PCA 分析显示不同何首乌炮制品之间的主成分差异较大。在负离子模式下，发现何首乌经炆制后有 15 个成分峰面积明显升高（*CI* ＞ 1.5），3 个明显降低（*CI* ＜ 0.5）；其主要成分 2，3，5，4'-四羟基二苯乙烯 -2-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷、大黄素甲醚、大黄素等均明显升高。**结论**　不同炮制方法对何首乌主要有效成分二苯乙烯苷、大黄素、大黄素甲醚等含量影响较大，尤其是何首乌炆制品，含量升高最明显，可为阐述“建昌帮”炆何首乌炮制机制提供数据支撑。

关键词：何首乌；炆法；化学成分；UPLC-Q/TOF-MS；主成分分析
中图分类号：R284　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2052-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.015

Principal components of stewed *Polygonum multiflorum* with “Jianchangbang” based on UPLC-Q/TOF-MS

WANG Yan-ni[1], ZOU Hong[2], LUO Li-ping[1], BAI Lu[1], CAI Jiao-yong[3], LI Shi-ying[3], LV Qi[3], YE Xi-de[3*] (1. *Department of Pharmacy*, *Hospital of Traditional Chinese Medicine of Dean County*, *Jiujiang Jiangxi* 330400; 2. *Department of Pharmacy*, *Hospital of People's Hospital of Yifeng County*, *Yichun Jiangxi* 336300; 3. *School of Pharmacy*, *Traditional Chinese Medicine of Jiangxi University*, *Nanchang* 330006)

Abstract: Objective To compare the principal components between stewed *Polygonum multiflorum* and other processed products, and to provide data support for processing mechanism. **Methods** UPLC-Q/TOF-MS was used to detect the chemical components in different processed products of *Polygonum multiflorum*. ACQUITY UPLC BEH C_{18} column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) was used. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid aqueous solution (A)-0.1% formic acid acetonitrile solution (B) with gradient elution (0 ～ 18 min, 5% ～ 40%B; 18 ～ 30 min, 40% ～ 95%B; 30 ～ 35 min, 95%B; 35 ～ 35.1 min, 95% ～ 5%B; and 35.1 to 38 min, 5%B). Electrospray ion source (ESI), negative ion mode, and the mass spectrum scanning range *m/z* 100 ～ 1500 were used. The chemical constituents of *Polygonum multiflorum* were identified by reference substance, relative molecular weight, mass spectrometry cleavage law and literature information. The principal component analysis (PCA) model of processed products of *Polygonum multiflorum* was established with marker view software, and the PCA score map was obtained. **Results** Totally 25 compounds in different processed

基金项目：江西省中医药管理局科技计划项目（No.2021Z010）。
作者简介：王艳霓，女，副主任中药师，主要从事中药学研究，email：410008409@qq.com　*通信作者：叶喜德，男，博士，教授，硕士研究生导师，主要从事中药学研究，email：552376722@ qq.com

products of *Polygonum multiflorum* were identified. PCA showed that the principal components of different processed *Polygonum multiflorum* were quite different. In the negative ion mode, the peak areas of 15 components increased significantly after stewing ($CI > 1.5$) and 3 decreased significantly ($CI < 0.5$). The main components 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-*O*-*β*-*D*-glucoside, emodin methyl ether and emodin all increased significantly. **Conclusion** Different processing methods have a great impact on the main effective components of *Polygonum multiflorum*, such as stilbene glycoside, emodin and emodin methyl ether. In particular, the content of *Polygonum multiflorum* stewed products increases most obviously, which can provide data support for the processing mechanism of stewed *Polygonum multiflorum* in "Jianchangbang".

Key words: *Polygonum multiflorum*; stewed; chemical constituent; UPLC-Q/TOF-MS; principal component analysis

何首乌来源于蓼科植物何首乌 *Polygonum miltiflorum* Thunb. 的干燥块根[1]，又名赤首乌、交藤根、夜合等，生品苦泄性平，具清热解毒、润肠通便、截疟之功，黑豆汁制何首乌味转甘厚而性温，具补肝肾、益精血、乌须发等功效。临床主要用其炮制品，常用于血虚萎黄、眩晕耳鸣、须发早白等证[2]。

何首乌炮制方法较多，主要有去黑皮、蒸、煮、黑豆制、酒制、醋制、姜汁制、甘草制、米泔水浸与麸炒等 30 余种炮制方法[3]。目前常以黑豆制和"九蒸九晒"制品应用于临床[4]，但历版《中国药典》主要以黑豆汁制[5]。炆何首乌为江西"建昌帮"特色炮制品之一。"建昌帮"为我国南方古药帮和中药炮制的重要流派，列为我国十三大药帮之一，常与"樟树药帮"合称为"江西药帮"[6]。但炆何首乌的应用，仍局限于地方经验。目前对何首乌的研究，主要以生品和黑豆汁制品为研究对象[7]。对于炆何首乌，除文献报道其饮片工艺外[8]，未见其他研究内容。同时，何首乌经炆制后是否增效减毒等问题，仍有待阐明。另一方面，炮制对中药成分变化的影响是优选饮片质量的重要依据，也是探讨炮制机制的一个关键因素。基于此，本研究借助现代分析技术和手段，运用 UPLC-Q/TOF-MS、Marker view 软件等多种分析方法，比较何首乌不同炮制品之间的主成分差异，探讨不同炮制方法对何首乌成分变化的影响，为优选何首乌中药饮片及研究炮制机制等提供数据支撑。

1 材料

1.1 仪器

Triple TOFTM5600 型液相色谱高分辨串联质谱仪（美国 AB SCIEX 公司，配备 DuoSpray TM 离子源，30A 型液相色谱系统），AE240 型 1/10 万电子分析天平（上海梅特勒 - 托利多仪器有限公司），TGL-16B 型高速冷冻离心机（上海安亭科学仪器厂），Raynger ST20 型红外测温仪（美国雷泰公司）。

1.2 试药

何首乌（安徽汇仁堂中药饮片有限公司，批号：20200573），经江西中医药大学龚千锋教授鉴定为蓼科植物何首乌 *Polygonum miltiflorum* Thunb. 的干燥块根。大黄素甲醚、二苯乙烯苷对照品（四川省维克奇生物科技有限公司，批号分别为 WKQ19030501、WKQ19012803，纯度均≥ 98%），大黄素对照品（成都曼思特生物科技有限公司，批号：MUST-18110810，纯度≥ 98%），水为自制双蒸水，甲醇、乙腈、甲酸为质谱纯。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

按 2020 年版《中国药典》炮制方法，分别制备何首乌生品、制何首乌、黑豆制品。

甘草制品：参照江西"樟树药帮"炮制法[9]，称取甘草 50 g，加水适量煎煮熬汁，连续两次，合并煎煮液；另取何首乌 50 g，用甘草汁将何首乌拌匀，放入电蒸锅内蒸制 1 h 后关火，取出，晾干，即得（何首乌原药材和甘草汁比为 10∶1）。

炆何首乌：参照江西"建昌帮"炮制法，称取何首乌 190 g、黑豆 20 g，将部分何首乌片放入炆药坛内，与黑豆隔离分层平铺，加清水至离坛顶 7 cm 左右，密闭加热炆制 8 h，取出，去除杂质，晾干，即得。

2.2 供试品溶液制备

称取何首乌不同炮制品粉末（过三号筛）各

50 mg，加甲醇 5 mL，于 50 ℃超声提取 30 min，取出，4000 r • min^{-1} 离心 15 min，取上清液，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得。

2.3　对照品溶液制备

称取二苯乙烯苷、大黄素、大黄素甲醚对照品各约 2 mg，加甲醇使溶解并分别定容于 10 mL 量瓶中，即得。吸取各对照品溶液适量，甲醇稀释，4000 r • min^{-1} 离心 15 min，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，待测。

2.4　色谱条件

Acquity UPLCBEHC$_{18}$ 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm），流动相 0.1% 甲酸水溶液（A）-0.1% 甲酸乙腈溶液（B），梯度洗脱（0 ～ 18 min，5% ～ 40%B；18 ～ 30 min，40% ～ 95%B；30 ～ 35 min，95%B；35 ～ 35.1 min，95% ～ 5%B；35.1 ～ 38 min，5%B），流速 0.25 mL • min^{-1}，柱温 40 ℃，进样量 2 μL。

2.5　质谱条件

参照文献 [10] 电喷雾离子源（ESI），负离子模式下检测：干燥雾化气（N_2）流速 10 L • min^{-1}，雾化器压力 275.8 kPa，喷嘴电压 500 V，毛细管电压 4 kV，干燥气温 325 ℃，保护气温 350 ℃，保护气流速 10 L • min^{-1}，扫描范围 *m/z* 100 ～ 1500。

2.6　数据分析

采用 Analyst TF 1.6 软件，对采集到的数据通过 Markerview 1.2.1 软件进行质谱峰分析、提取峰对齐及归一化等处理，利用主成分分析（PCA）查找何首乌不同炮制品与生品化合物谱图之间的差异，总离子流图见图 1。

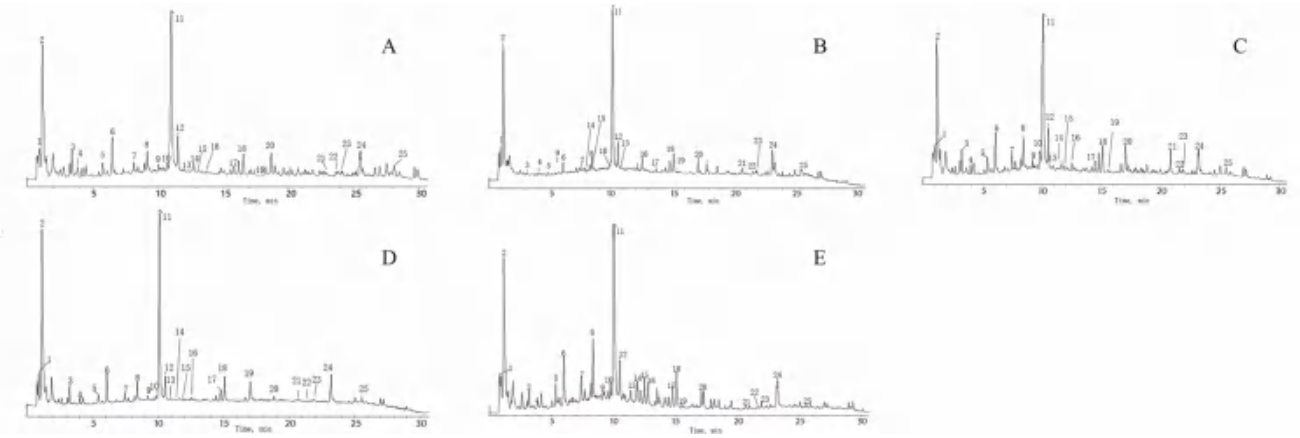

图 1　何首乌不同炮制品在负离子模式下 TIC 总离子流图

Fig 1　TIC total ion flow diagram of different processed products of *Polygonum multiflorum* under negative ion mode

A. 生品（raw product）；B. 制何首乌（prepared *Polygonum multiflorum*）；C. 甘草制品（licorice product）；D. 黑豆汁制品（black bean juice product）；E. 炆制品（stewed product）

2.7　UPLC-Q/TOF-MS 数据分析

经数据分析，发现炆何首乌与其他炮制品具有显著差异的主要成分为 25 个，结合对照品及相关文献各成分保留时间和质谱信息，鉴定出何首乌不同炮制品中共 25 种化学成分，见表 1。依照这些成分离子峰面积数据，将成分离子峰面积数据导入 Marker view 软件进行 PCA 处理，得分图见图 2。结果发现各组样本点之间离散性较小，表明不同批次何首乌样品自身差异较小，组内均一性良好；同一样品、不同何首乌炮制品之间被明显分成了 5 组，表明不同炮制品之间成分差异较大，并分布在不同象限，说明不同炮制方法对何首乌化学成分影响较大。

由图 2 可知，制何首乌、甘草制品、黑豆制品、炆制品和生品何首乌等均可区分开来，表明炮制前后何首乌化学谱发生了明显变化，其

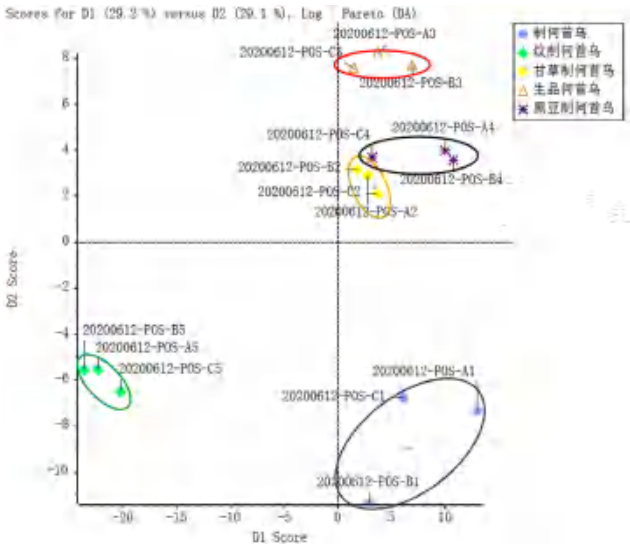

图 2　各炮制品 PCA 得分图

Fig 2　PCA score of each processed product

表 1　何首乌不同炮制品中化学成分的 UPLC-Q-TOF/MS 鉴定

Tab 1　Identification of chemical components in different processed products of Polygonum multiflorum by UPLC-Q-TOF/MS

No.	t_R/ min	计算值	$[M-H]^-$	误差值 /（$\times 10^6$）	二级碎片（MS/MS）	分子式	鉴定结果
1	1.12	341.1089	341.1083	－2.0	179.0555	$C_{12}H_{22}O_{11}$	蔗糖 [11]
2	1.13	179.0561	179.0569	2.8	161.0464	$C_6H_{12}O_6$	*D*- 葡萄糖 [11]
3	3.54	593.1301	593.1279	－3.7	425.0840、407.0751、289.0703、	$C_{30}H_{26}O_{13}$	原花青素 [12]
4	3.86	305.0667	305.0664	－0.8	125.0270	$C_{15}H_{14}O_7$	没食子儿茶素 [13]
5	5.36	577.1352	577.1333	－3.2	425.0854、407.0756、289.0709	$C_{30}H_{26}O_{12}$	原花青素 B_1[12]
6	6.03	289.0718	289.0719	0.6	245.0817、151.0415、109.0326	$C_{15}H_{14}O_6$	儿茶素 [13]
7	7.50	457.0776	457.0757	－4.2	169.0164	$C_{22}H_{18}O_{11}$	没食子儿茶素没食子酸酯 [13]
8	8.42	405.1191	405.1183	－2.9	243.0659、225.0555、215.0712、173.0614、137.0620	$C_{20}H_{22}O_9$	2，3，5，4'- 四羟基二苯乙烯 -2-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷 [14]
9	9.85	441.0827	441.0810	－0.2	289.0704、169.0152、125.0258	$C_{22}H_{18}O_{10}$	表儿茶素没食子酸酯 [13]
10	9.40	567.1719	567.1707	－2.1	243.0661	$C_{26}H_{32}O_{14}$	2，3，5，4'- 四羟基二苯乙烯 -2，4'-*O*- 二葡萄糖苷 [15]
11	10.54	557.1301	557.1281	－3.6	405.1178、313.0560 243.0663	$C_{27}H_{26}O_{13}$	2，3，5，4'- 四羟基二苯乙烯 -2-*β*-*D*-（6"-*O*- 没食子酰基）- 葡糖苷 [16]
12	10.82	375.1085	375.1076	－2.4	243.0656	$C_{19}H_{20}O_8$	2，3，5，4'- 四羟基二苯乙烯 -2-*O*- 木糖苷 [17]
13	10.10	421.1140	421.1125	－3.7	259.0609、241.0508	$C_{20}H_{22}O_{10}$	2，3，5，4'- 四羟基二苯乙烯 -2-*O*-（2"-*O*- 乙酰基）-*β*-*D*- 葡糖苷 [18]
14	11.44	461.1089	461.1076	－3.0	285.0709、270.0453	$C_{22}H_{22}O_{11}$	大黄素甲醚 -8-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷 [11]
15	11.97	393.1191	393.1181	－2.5	231.0665	$C_{19}H_{22}O_9$	polygonumoside E[19]
16	10.82	431.0984	431.0974	－3.0	186.4304、146.9027	$C_{21}H_{20}O_{10}$	大黄素 -8-*O*- 葡萄糖苷 [20]
17	14.14	299.0561	299.0556	－1.7	256.0459	$C_{16}H_{12}O_6$	*ω*- 羟基大黄素 -8- 甲醚 [21]
18	15.12	431.0984	431.0974	－1.2	186.4304、161.7148、146.9027	$C_{21}H_{20}O_{10}$	牡荆素 [11]
19	15.85	285.0405	285.0402	－0.8	150.9241、122.9509、	$C_{15}H_{10}O_6$	山柰酚 [14]
20	17.10	445.1140	445.1127	－3.0	283.0605、240.0422	$C_{22}H_{22}O_{10}$	大黄素甲醚 -8-*O*- 葡萄糖苷 [14]
21	17.11	283.0612	283.0611	－0.1	268.0370、240.0424、212.0479	$C_{16}H_{12}O_5$	大黄素甲醚 [11]
22	17.26	329.0667	329.0659	－2.4	314.0426、299.0188、271.0241	$C_{17}H_{14}O_7$	苜蓿素 [22]
23	21.94	671.1770	671.1751	－2.9	416.1091、254.0580	$C_{36}H_{32}O_{13}$	polygonumnolides C_1[23]
24	23.23	269.0456	269.0456	0.1	241.0497、240.0424、225.0551、210.0318、197.0606	$C_{15}H_{10}O_5$	大黄素 [14]
25	25.88	537.0827	537.0812	－2.9	254.0559	$C_{30}H_{18}O_{10}$	番泻苷元 A[11]

中炆制品尤为突出。通过 PCA 模式绘制载荷矩阵图（见图 3），以查找影响炆何首乌前后的化学标记物。载荷矩阵图中的点表示各个 *m*/*z* 质荷比、保留时间变量；其与中心点的距离远近，表示该变量为样品组分型所做出的贡献大小，偏离越远，其在不同样品中含量变化越大。其中二苯乙烯苷、大黄素甲醚等距离中心点较远，此类化学成分具有成为炆制何首乌质量评价指标的潜力。结合 UPLC-Q-TOF/MS 数据，发现炆何首乌与其他炮制品具显著差异的主要成分为 25 个，见表 1。

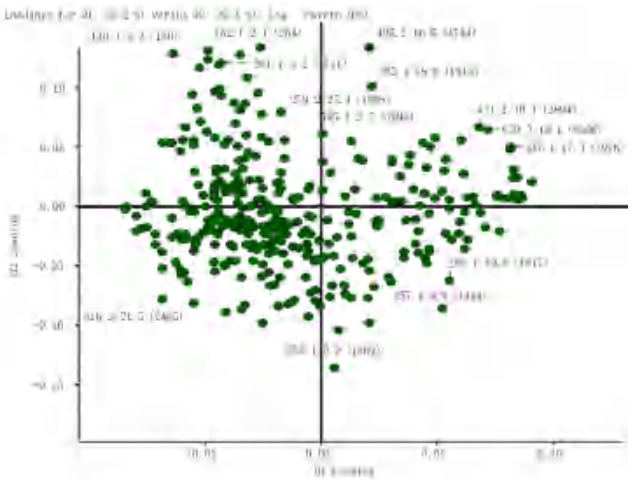

图 3　各炮制品 PCA 载荷图

Fig 3　PCA load diagram of each processed product

2.8　裂解规律分析

何首乌醇提液中化学成分，主要为二苯乙烯苷类、蒽醌类等，此外还存在黄酮、磷脂和苯丙素类等成分。

2.8.1　二苯乙烯苷（2，3，5，4'- 四羟基二苯乙烯 -2-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷）　运用 Peakview 软件在负离子模式下提取 t_R ＝ 8.42 min 和 $[M-H]^-$ 405.1195 离子，得到该化合物裂解 5 个碎片离子 243.0659 $[M-C_6H_{12}O_6]^-$、225.0555 $[M-H_2O]^-$、215.0712 $[M-CO]^-$、173.0614

$[M-CH_2CO]^-$、137.0620 $[M-C_7H_6O]^-$。母离子 $[M-H]^-$ 405.1183，依照对照品保留时间 8.42 min，其质谱分辨率误差为－2.9×10^6，推测该化合物分子式为 $C_{20}H_{22}O_9$，通过文献对上述信息进行比对分析[14]，与二苯乙烯苷化合物一致，鉴定为二苯乙烯苷，其裂解过程见图 4。

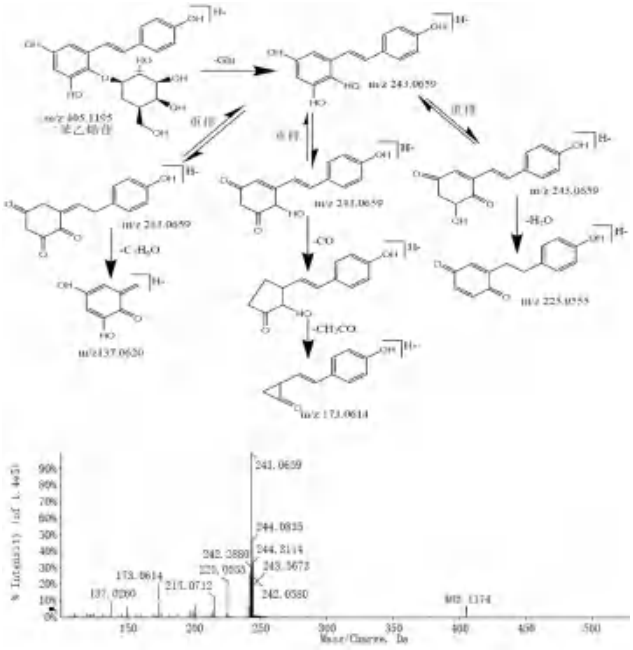

图 4　二苯乙烯苷裂解途径

Fig 4　Cleavage pathway of stilbene glycoside

2.8.2　大黄素　运用 Peakview 软件，在负离子模式下提取 t_R ＝ 23.23 min 和 $[M-H]^-$ 269.0456 离子，得该化合物 5 个碎片离子：241.0497 $[M-CO]^-$、240.0424 $[M-CHO]^-$、225.0551 $[M-CO_2]^-$、210.0318 $[M-CH_3]^-$、197.0606 $[M-CO_2]^-$，依照对照品保留时间 23.23 min，其质谱分辨率误差为 0.1×10^6，推测其分子式为 $C_{15}H_{10}O_5$。通过文献比对[14]，与大黄素化合物一致，确定为大黄素，其裂解过程见图 5。

2.8.3　大黄素甲醚　运用 Peakview 软件，在负离子模式下提取 t_R ＝ 17.11 min 和 $[M-H]^-$ 283.0612 离子，得该化合物 3 个碎片离子：268.0370 $[M-CH_3]^-$、240.0424 $[M-CH_3CO]^-$、212.0479 $[M-CO]^-$，与对照品保留时间 17.11 min 相比，其质谱分辨率误差为 0.1×10^6，推测分子式为 $C_{16}H_{12}O_5$。通过文献比对[11]，与大黄素化甲醚合物一致，确定为大黄素甲醚，其裂解过程见图 6。

2.9　在负离子模式下的何首乌离子峰面积炮制前后变化指数

何首乌经不同炮制方法制后的成分发生变化，在负离子模式下，依照色谱峰、保留时间、准分子离子、二级碎片及其裂变规律等信息，以峰面积为变化指数，来评价其对应的化合物含量变化情况[24]。变化指数（change index，*CI*）＝炮制品离子峰面积 / 对应保留时间的生品离子峰面积，依照所得值是否大于、小于或等于 1，来评价该离子峰对应成分含量在炮制后的变化情况（当 *CI* ＞ 1 时，表示炮制后含量增加；*CI* ＜ 1 表示炮制后降低；*CI* ＝ 1 表示炮制前后无变化）。

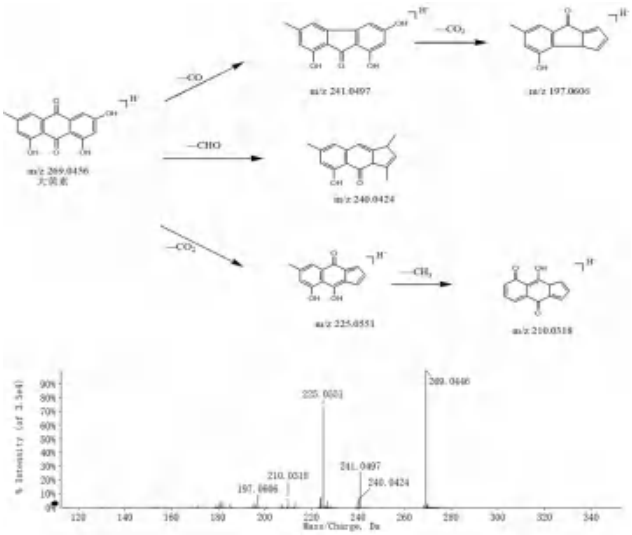

图 5　大黄素裂解途径

Fig 5　Cleavage pathway of emodin

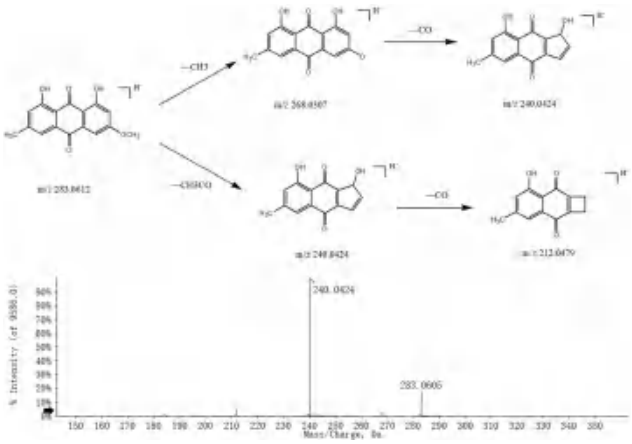

图 6　大黄素甲醚裂解途径

Fig 6　Cleavage pathway of emodin methyl ether

结果发现，何首乌炆制后未发现有新的成分，但不同炮制方法对何首乌中化合物含量差异较大。炆制后有 15 个成分峰面积明显升高（*CI* ≥ 1.5），3 个成分峰面积明显降低（*CI* ＜ 0.5），其中 2，3，5，4'- 四羟基二苯乙烯 -2-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷、大黄素甲醚、大黄素均明显升高。结果见表 2。

表 2　何首乌不同炮制品在负离子模式下的离子峰面积炮制前后变化指数

Tab 2　Ion peak area of different processed products of *Polygonum multiflorum* in negative ion mode before and after the processing

分子式	化合物	变化指数			
		制何首乌	甘草制品	黑豆制品	炆制品
蔗糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	0.84	1.14	0.97	1.06
D- 葡萄糖	$C_6H_{12}O_6$	3.38	1.42	0.64	2.62
原花青素	$C_{30}H_{26}O_{13}$	0.32	3.32	0.88	0.73
没食子儿茶素	$C_{15}H_{14}O_7$	0.15	1.10	0.29	0.20
原花青素 B_1	$C_{30}H_{26}O_{12}$	0.04	0.53	0.31	2.09
儿茶素	$C_{15}H_{14}O_6$	0.26	0.32	0.48	1.50
没食子儿茶素没食子酸酯	$C_{22}H_{18}O_{11}$	0.76	3.00	1.82	5.64
2，3，5，4'- 四羟基二苯乙烯 -2-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷	$C_{20}H_{22}O_9$	2.34	0.69	2.16	3.81
表儿茶素没食子酸酯	$C_{22}H_{18}O_{10}$	0.24	1.11	0.28	2.06
2，3，5，4'- 四羟基二苯乙烯 -2，4'-*O*- 二葡萄糖苷	$C_{26}H_{32}O_{14}$	0.26	0.31	0.40	2.42
2，3，5，4'- 四羟基二苯乙烯 -2-*β*-*D*-（6''-*O*- 没食子酰基）- 葡糖苷	$C_{27}H_{26}O_{13}$	0.52	1.21	0.33	1.35
2，3，5，4'- 四羟基二苯乙烯 -2-*O*- 木糖苷	$C_{19}H_{20}O_8$	0.18	1.24	0.32	2.33
2，3，5，4'- 四羟基二苯乙烯 -2-*O*-（2''-*O*- 乙酰基）-*β*-*D*- 葡糖苷	$C_{20}H_{22}O_{10}$	0.60	0.95	0.40	0.52
大黄素甲醚 -8-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷	$C_{22}H_{22}O_{11}$	0.22	1.09	0.27	2.15
polygonumoside E	$C_{19}H_{22}O_9$	0.63	2.70	0.69	2.93
大黄素 -8-*O*- 葡萄糖苷	$C_{21}H_{20}O_{10}$	0.67	0.02	0.66	2.11
异荭草素	$C_{21}H_{20}O_{11}$	0.04	0.94	0.18	0.37
ω- 羟基大黄素 -8- 甲醚	$C_{16}H_{12}O_6$	0.32	0.90	0.23	1.50
山柰酚	$C_{15}H_{10}O_6$	0.20	0.59	0.26	0.86
大黄素甲醚 -8-*O*- 葡萄糖苷	$C_{22}H_{22}O_{10}$	10.30	11.96	2.80	26.37
大黄素甲醚	$C_{16}H_{12}O_5$	3.81	7.59	3.68	4.44
苜蓿素	$C_{17}H_{14}O_7$	0.51	14.18	0.51	1.03
polygonumnolides C_1	$C_{36}H_{32}O_{13}$	1.03	1.77	0.27	1.50
大黄素	$C_{15}H_{10}O_5$	2.29	1.41	0.66	1.01
番泻苷元 A	$C_{30}H_{18}O_{10}$	0.21	1.17	0.20	0.33

3　讨论与小结

何首乌主含蒽醌类、二苯乙烯类、磷脂类、酚类和黄酮类等[25]，其中二苯乙烯苷、大黄素甲醚、大黄素甲醚等是其主要有效成分。何首乌生品以大黄素居多，经黑豆汁制后，其味转甘厚而性温，泻下作用减弱[26]。同时，卵磷脂类成分溶出增多，增强了补肝肾、益精血、乌须发等作用。由于何首乌炮制方法较多，而炆法又为江西“建昌帮”特色制法，目前对何首乌的研究，仍以蒸法、甘草制法和黑豆制法为主，炆何首乌除文献报道工艺和对其主要成分产生影响外[27]，并未深入研究，也未见炆制品与其他炮制品之间成分差异性研究的文献报道，炆何首乌炮制机制仍缺乏现代数据支撑。

本研究依照 PCA 软件分析，结合保留时间、质谱信息和文献资料，分离并鉴定出何首乌不同炮制品中 25 种主要化学成分。利用 PCA 模式识别绘制得分图，即可把何首乌不同炮制品明显区分开来。其中炆制品分离度尤为明显，表明炆法对何首乌化学成分的影响较大。同时，根据各样品在负离子模式下的离子峰面积变化指数结果，发现何首乌经炆制后，虽然未见新成分产生，但在同一条件下，发现 15 个成分峰面积升高（*CI* ＞ 1），7 个成分峰面积降低（*CI* ＜ 1），3 个成分峰面积变化指数近似 1；其中主要有效成分如 2，3，5，4'- 四羟基二苯乙烯 -2-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷、大黄素甲醚、大黄素等峰面积明显升高。为此，本研究选择二苯乙烯苷、大黄素甲醚、大黄素甲醚等为质量评价指标，比较不同炮制方法对何首乌主成分变化差异，目的是探讨不同炮制方法对何首乌成分变化的影响。结果表明，3 种成分含量变化情况分别为二苯乙烯苷含量：炆制品＞制品＞黑豆制品＞生品＞甘草制品；大黄素含量：制品＞甘草制品＞炆制品＞生品＞黑豆制品；大黄素甲醚含量：甘草制品＞炆制品＞制品＞黑豆制品＞生品。可见，何首乌经炆制后，其主要有效成分二苯乙烯苷均高于黑豆制品，由于该成分具保护神经、提高记忆力、抗衰老、降血脂等多种作用[28]。

因此，何首乌经炆制后，对其主要有效成分产生影响，但这种影响是否是药效增强的关键变化因素仍有待深入研究。

参考文献

[1] 中国药典 2015 年版 . 一部 [S]. 2015：246.

[2] 李欣，孟磊，魏胜利，等 . 不同产地何首乌药材质量及差异研究 [J]. 中国现代中药，2020，22（3）：384-390.

[3] 杨磊，张志国，周逸群，等 . 何首乌历代炮制方法考证 [J]. 中华中医药学刊，2020，38（9）：25-29.

[4] 刘梦娇，蒲俊安，戴冰，等 . 何首乌“九蒸九晒”炮制工艺优选及对 L02 肝细胞生长的影响 [J]. 中国中医药信息杂志，2020，27（4）：70-73.

[5] 王孝涛 . 历代中药炮制汇典（古代）[M]. 南昌：江西科学技术出版社，1998.

[6] 徐春娟，裴丽，陈荣 . 试析旴江医学的国际影响 [J]. 中医杂志，2013，54（4）：273-276.

[7] 易炳学，钟凌云，龚千锋 . 江西建昌帮炆法特色炮制及其现代研究思路 [J]. 时珍国医国药，2012，23（7）：1755-1756.

[8] 上官贤 . 建昌帮中药炮制全书 [M]. 南昌：江西教育出版社，2013：661-662.

[9] 龚千锋 . 樟树中药炮制全书 [M]. 南昌：江西科学技术出版社，1983.

[10] 罗益远 . 何首乌的品质评价研究 [D]. 南京：南京中医药大学，2016.

[11] Wang H，Song L，Feng S，et al. Characterization of proanthocyanidins in stems of *Polygonum multiflorum* Thunb. as strong starch hydrolase inhibitors [J]. Molecules，2013，18（2）：2255-2265.

[12] 周利，李佳兴，余意，等 . UPLC-MS/MS 法测定不同产地何首乌中儿茶素类成分的含量 [J]. 中药材，2018，41（7）：1582-1585.

[13] 张静娴，崔艳梅 . 中药何首乌的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志，2016，41（17）：3252-3255.

[14] Li SG，Chen LL，Huang XJ，et al. Five new stilbeneglycosides from the roots of *Polygonum multiflorum* [J]. J Asian Nat Prod Res，2013，15（11）：1145-1151.

[15] Kim HK，Choi YH，Choi JS，et al. A new stilbene glucoside gallate from the roots of *Polygonum multiflorum* [J]. Arch Pharm Res，2008，31（10）：1225-1229.

[16] Sun YN，Li W，Kim JH，et al. Chemical constituents-from the root of *Polygonum multiflorum* and their solubleepoxide hydrolase inhibitory activity [J]. Arch Pharm-Res，2015，38（6）：998-1004.

[17] 陈万生，杨根金，张卫东，等 . 制首乌中两个新化合物 [J]. 药学学报，2000，35（4）：273-276

[18] 颜世伦 . 制何首乌的化学成分研究 [D]. 天津：天津大学，2014.

[19] 袁炜，高增平，杨建波，等 . 何首乌化学成分的研究 [J]. 中草药，2017，48（4）：631-634.

[20] 刘振丽，李林福，巢志茂，等 . 何首乌炮制后化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发，2009，21（2）：239-241，248.

[21] Lee CC，Lee YL，Wang C，et al. *Polygonum multiflorum* decreases airway allergic symptoms in amurine model of asthma [J]. Am J Chin Med，2016，44（1）：133-147.

[22] Park SY，Jin ML，Chae SY，et al. Novel compoundfrom *Polygonum multiflorum* inhibits inflammatoryresponse in LPS-stimulated microglia by upregulating AMPK/NRF2 pathways [J]. Neurochem Int，2016，100（11）：21-29.

[23] Yang JB，Li L，Dai Z，et al. Polygonumnolides C_1-C_4 minor dianthrone glycosides from the roots of *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. J Asian Nat Prod Res，2016，18（9）：813-822.

[24] 颜晓静，郑博文，张毅达，等 . UPLC-Q-TOF/MS 分析孟河医派特色猪心血丹参炮制前后化学成分的变化 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（9）：109-116.

[25] 王宏杨，迟继铭，姜雪，等 . 何首乌提取物二苯乙烯苷药理及临床研究进展 [J]. 中华中医药学刊，2019，37（10）：2464-2469.

[26] 王丽 . 何首乌炮制后化学成分及药理作用分析 [J]. 中国现代药物应用，2020，14（6）：229-231.

[27] 谢婧，余意，张晶，等 . 制何首乌的炮制方法探索 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（8）：163-169.

[28] 朱艺，李琛，李洪亮，等 . 何首乌中相关蒽醌类化合物抗癌作用的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（18）：196-205.

（收稿日期：2022-01-30；修回日期：2022-03-15）

基于血清代谢组学的芍甘附子汤治疗类风湿关节炎作用机制研究

赵一颖[1]，董琳琳[1]，丰晨然[1]，石璐[1]，苗丰[1]，吴师月[1]，靖卫霞[2]，贾占红[1]，孙文燕[1*]，吕品[3*]
（1.北京中医药大学中药学院，北京　102488；2. 北京中医药大学第三附属医院，北京　100029；3. 中国生物技术股份有限公司，北京　100024）

摘要：目的　利用超高效液相色谱 - 高分辨串联质谱（UPLC-HRMS/MS）血清代谢组学技术，探讨中药复方芍甘附子汤治疗类风湿关节炎（RA）的作用机制。**方法**　建立胶原诱导型关节炎（CIA）大鼠模型，观察芍甘附子汤对 CIA 大鼠足跖肿胀度、关节炎指数（AI）评分、踝关节病理变化的影响。采用 UPLC-HRMS/MS 血清代谢组学技术对 CIA 大鼠的代谢物进行鉴定，并采用主成分分析、正交偏最小二乘判别分析进行多元分析，通过变量投影重要性值和 *t* 检验结果来筛选差异代谢物，利用 MetaboAnalyst 5.0 平台分析差异代谢物的代谢通路。**结果**　芍甘附子汤灌胃给药对 CIA 大鼠足跖肿胀度、AI 评分、踝关节病理变化有明显改善作用。血清代谢组学共筛选出 11 个芍甘附子汤治疗 RA 的血清内源差异代谢物，获取了组氨酸代谢和甘油磷脂代谢等代谢通路。**结论**　芍甘附子汤对 RA 具有治疗作用，可通过多个代谢途径，从整体上改善紊乱的代谢轮廓，初步阐释了芍甘附子汤治疗 RA 的代谢调控机制。

关键词：芍甘附子汤；类风湿关节炎；血清代谢组学；超高效液相色谱 - 高分辨串联质谱
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2059-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.016

Mechanism of Shaogan Fuzi decoction for rheumatoid arthritis based on serum metabonomics

ZHAO Yi-ying[1], DONG Lin-lin[1], FENG Chen-ran[1], SHI Lu[1], MIAO Feng[1], WU Shi-yue[1], JING Wei-xia[2], JIA Zhan-hong[1], SUN Wen-yan[1*], LYU Pin[3*] (1. *School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488; 2. *The Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 100029; 3. *China National Biotec Group Company Limited*, *Beijing* 100024)

Abstract: Objective To determine the mechanism of Chinese herbal compound Shaogan Fuzi decoction for rheumatoid arthritis (RA) by ultra-high performance liquid chromatography-high-resolution tandem mass spectrometry (UPLC-HRMS/MS) serum metabonomics technology. **Methods** The collagen-induced arthritis (CIA) rat model was established to observe the effect of Shaogan Fuzi decoction on the swelling of the foot and plantar, arthritis index (AI) score, and the pathological changes of the ankle joint. The metabolites of CIA rats were identified by UPLC-HRMS/MS serum metabonomics technology. Principal component analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis were used for the multivariate analysis. Differential metabolites were screened by the importance of variable projection and *t*-test, and the metabolic pathways of the differential metabolites were analyzed by MetaboAnalyst 5.0 platform. **Results** The intragastric administration of Shaogan Fuzi decoction significantly improved the degree of swelling in the foot and plantar, the AI score, and the pathological changes of the ankle joint in CIA rats. Totally 11 serum endogenous differential metabolites in the treatment of RA with Shaogan

基金项目：北京中医药大学科研发展基金（No. 2020-ZXFZJJ-022）。
作者简介：赵一颖，女，硕士研究生，主要从事中药抗炎与免疫药理研究，email：2678814342@qq.com　*通信作者：孙文燕，男，博士，副教授，主要从事中药抗炎与免疫药理、中药毒理研究，email：sunwy@bucm.edu.cn；吕品，女，硕士，主要从事免疫药理、分子病理研究，email：lvpin1@sinopharm.com

Fuzi decoction were screened out by serum metabolomics, and metabolic pathways such as histidine metabolism and glycerol-phospholipid metabolism were obtained. **Conclusion** Shaogan Fuzi decoction has therapeutic effect on RA, and can improve the disordered metabolic profiles on the whole through multiple metabolic pathways. The metabolic regulation mechanism of Shaogan Fuzi decoction for RA has been elucidated preliminarily.

Key words: Shaogan Fuzi decoction; rheumatoid arthritis; serum metabolomics; ultra-high performance liquid chromatography-high-resolution tandem mass spectrometry

类风湿关节炎（rheumatoid arthritis，RA）是一种自身免疫性疾病，其主要病理特征为滑膜过度增生和炎症、血管翳形成以及软骨破坏等，如未进行规范治疗，将导致关节损伤甚至残疾[1-2]。

RA 属中医“痹证”范畴[3]。芍甘附子汤出自《伤寒论》，由白芍、炙甘草、炮附子 3 味中药组成。方中白芍养血敛阴，柔肝止痛，可破阴结；甘草补中坚筋骨，缓急止痛，亦可减附子之毒；附子补火助阳，通脉散寒止痛。诸药共用，达温经通络、和营止痛、强筋健骨之效[4]。临床及本课题组前期实验研究表明，芍甘附子汤对 RA 有确切作用，但其作用机制尚未明确[5-6]。

代谢组学是一项快速发展的技术，已成为寻找潜在生物标志物和疾病发病机制的有效工具[7]，并成功应用于 RA 等炎症性疾病的研究[8-9]。因此，本研究利用超高效液相色谱 - 高分辨串联质谱（UPLC-HRMS/MS）代谢组学技术，对芍甘附子汤治疗 RA 的血清内源差异代谢物进行分析，以探讨芍甘附子汤治疗 RA 的作用机制，为进一步实验及临床研究提供依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 Wistar 雄性大鼠，体质量 190 ～ 210 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，质量合格证号：No.110011211106398478]。

1.2 试药

芍甘附子汤配方颗粒（全方由黑顺片 3 g、白芍 9 g、炙甘草 9 g 组成，购于北京中医药大学东方医院，由北京康仁堂药业制备）。按照成人日用剂量换算，大鼠的等效剂量为 2.1 g 生药 /（kg•d）。实验时准确称取与传统饮片相当量的配方颗粒，以蒸馏水充分溶解。

雷公藤多苷片（TGT，批号：2105113B，浙江得恩德制药股份有限公司，规格：10 mg/ 片），临床成人日用剂量为 1.5 mg • kg^{-1}，换算成大鼠的等效剂量为 9 mg • kg^{-1}，实验时以蒸馏水充分溶解。

牛Ⅱ型胶原（BCⅡ，批号：20022，美国 Chondrex 公司）；不完全弗氏佐剂（IFA，批号：F5506，美国 Sigma 公司）；质谱级甲醇、乙腈（美国 Fisher Scientific 公司）；甲酸、碳酸氢铵（美国 Sigma 公司）；超纯水（18.2 MΩcm）使用 Milli-Q 纯化水系统制备（Merck Millipore，USA）。

1.3 仪器

Triple TOF 6600 高分辨质谱系统 [美国 AB SCIEX 公司，配备 ACQUITY UPLC I-Class 超高效液相系统（美国 Waters 公司）以及 Analyst TF 数据采集软件（美国 AB SCIEX 公司）]；Centrifuge 5417R 离心机（德国 Eppendorf 公司）；Vortex Mixer T1 涡旋振荡器、TIMI-10K 微量迷你离心机（Titan SCIENTIFIC LAB）；Labconco 离心浓缩仪（美国 Labconco 公司）。

2 方法

2.1 芍甘附子汤治疗 RA 的药效研究

2.1.1 分组、造模及给药 SPF 级雄性 Wistar 大鼠适应性饲养 1 周后，随机选取 12 只作为正常组，其余 60 只分别于实验第 1 日和第 7 日，用 BCⅡ与 IFA 等量混合的乳剂尾根部皮内多点注射 0.2 mL 和 0.1 mL 进行造模，正常组注射生理盐水。实验第 21 日进行关节炎指数（AI）评分，评价模型是否成功。然后对造模成功大鼠依据随机分层分配法进行分组，分为模型组、芍甘附子汤组（2.1 g • kg^{-1}，以生药计）、雷公藤多苷片组（9 mg • kg^{-1}），每组 12 只。第 22 日开始给药，每日灌胃 1 次，正常组及模型组灌胃等量的生理盐水，连续 28 d。

2.1.2 足跖肿胀度测定及 AI 评分 于实验第 1、7、14、21、28、35、42、49 日采用足跖容积测量仪测定足跖肿胀度。实验第 21、28、35、42、49 日对模型组和各给药组进行 AI 评分。评分标准具体为：无关节红肿，0 分；足小趾关节红肿，1 分；趾关节及足跖关节肿胀，2 分；踝关节以

下足爪肿胀，3 分；包括踝关节在内的全部足爪肿胀，4 分。足跖肿胀度计算公式为：肿胀度＝致炎后足跖体积－致炎前足跖体积。

2.1.3　踝关节 HE 染色　各组大鼠末次给药 24 h 后，按 0.0033 mL • g^{-1} 腹腔注射 1.5% 戊巴比妥钠进行麻醉，腹主动脉取血，室温中静置 2 h，4 ℃、4000 r • min^{-1} 离心 10 min。收集血清，分装保存于－ 80 ℃冰箱备用。收集大鼠的双侧完整踝关节，4% 多聚甲醛固定，脱水，石蜡包埋，切片，苏木素 - 伊红（HE）染色，显微镜下观察各组大鼠踝关节组织病理变化。

2.1.4　数据处理　使用 SPSS 22.0 软件进行数据分析。实验数据以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组数据比较若服从正态分布且方差齐，采用单因素方差分析，否则采用非参数性检验；两组比较若服从正态分布且方差齐，采用 Student *t* 检验，否则采用非参数性检验。AI 评分采用 *Ridit* 分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.2　基于 UPLC-HRMS/MS 的芍甘附子汤血清代谢组学分析

2.2.1　含药血清制备　采用 BCⅡ与 IFA 尾根部注射，复制胶原诱导型类风湿关节炎（CIA）大鼠模型。首次注射后第 14 日选取造模成功大鼠，分为模型组、芍甘附子汤组，每组 6 只。给药组按等效剂量 2.1 g • kg^{-1} 灌胃芍甘附子汤药液（浓度 0.21 g • mL^{-1}），每日 2 次，连续灌胃 3 d。模型组给予等量的生理盐水。末次灌胃后 45 min，取血并分离血清，于－ 80 ℃冰箱保存，备用。

2.2.2　样本预处理　冰上操作，准确移取血清样本 50 μL 置于 1.5 mL 的 EP 管中，并记录其编号和取样量。加入 200 μL 冷甲醇（含内标，内标见表 1），涡旋振荡 2 min，低温下静置 10 min。在 4 ℃条件下 14 000 g 离心 15 min。吸取上清液 200 μL 置于新的 EP 管中，将样本低温离心浓缩后，置于－ 20 ℃冰箱中保存备用。在上机分析前，将浓缩后的提取液样本，用 100 μL 20% 甲醇溶液复溶，完全溶解后，振荡，离心，取上清液，进行正、负离子模式分析。

分别取 10 μL 各待测样本，混合后作为质量控制（QC）样本，用于监测样本检测过程中是否存在异常。空白样品为 20% 甲醇溶液。

先采集 1 个空白样本，再采集 2 个 QC 样本，然后开始实际样本检测（不同类型的样本，则随机采样，穿插进样），每 10 个样品采集一次 QC 样品和一次空白样本，直至全部实际样本分析完成后，最后采集 1 个 QC 样本。

表 1　血清样本分析用内标

Tab 1　Internal standard for serum sample analysis

英文简写	中文名	质量浓度 /（μg • mL^{-1}）
carnitine C2：0-d3	乙酰酰基肉碱 -d_3	0.16
carnitine C8：0-d3	辛酰肉碱 -d_3	0.10
carnitine C10：0-d3	癸酰肉碱 -d_3	0.10
carnitine C16：0-d3	棕榈酰肉碱 -d_3	0.15
LPC 19：0	溶血磷脂酰胆碱	0.75
FFA C16：0-d3	棕榈酸 -d_3	2.50
FFA C18：0-d3	硬脂酸 -d_3	2.50
CDCA-d4	鹅脱氧胆酸 -d_4	1.50
CA-d4	胆酸 -d_4	1.85
Trp-d5	色氨酸 -d_5	4.25
Phe-d5	苯丙氨酸 -d_5	3.50
SM 12：0	鞘磷脂	0.75
Choline-d4	胆碱 -d_4	2.00

2.2.3　检测条件

① 正离子模式色谱条件：色谱柱为 BEH C_8 柱（2.10 mm×100 mm，1.7 μm，美国 Waters 公司）；柱温为 50 ℃；进样体积为 10 μL；流动相为含 0.1% 甲酸水（A）、含 0.1% 甲酸乙腈（B），梯度洗脱程序：0 ～ 1 min，5%B；1 ～ 24 min，5% ～ 100%B；24.1 ～ 27.5 min，100%B；27.5 ～ 27.6 min，100% ～ 5%B；27.6 ～ 30 min，5%B；流速：0.35 mL • min^{-1}。

负离子模式色谱条件：色谱柱为 HSS T3 柱（2.10 mm×100 mm，1.8 μm，美国 Waters 公司）；柱温为 50 ℃；进样体积为 10 μL；流动相为含 0.1% 甲酸水（A）、含 0.1% 甲酸乙腈（B），梯度洗脱程序：0 ～ 1 min，5%B；1 ～ 18 min，5% ～ 100%B；18.1 ～ 22 min，100%B；22 ～ 22.1 min，100% ～ 5%B；22.1 ～ 25 min，5%B；流速：0.35 mL • min^{-1}。

② 质谱条件：电喷雾离子源 ESI 正、负离子模式，采用一级全扫描和 IDA 二级子离子扫描模式。离子源电压：正极 5000 V，负极 4500 V；雾化温度：650 ℃；气帘气压力：30 psi；雾化气压力：60 psi；辅助气压力：60 psi；MS 质量范围 *m/z*：100 ～ 1200 V；MS^2 质量范围 *m/z*：50 ～ 1200 V；TopN：12。

2.2.4　数据处理　获取 UPLC-HRMS/MS 图谱后，采用 Analyst TF 导出原始数据，使用 Markview 软件进行峰对齐后导入 One-MAP 平台进行峰表获取。将峰表信息导入 MetNormalizer R 包中进行 QC 数据标准化，矫正后的数据导入大连达硕与

中国科学院大连化学物理研究所代谢组学研究中心联合开发的代谢组学小分子化合物快速鉴定分析软件系统 OSI/SMMS 2.0，在 HMDB（Human Metabolome Databatabase）、Metlin（Metabolite Link）和 KEGG（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes）等数据库中检索并鉴定得到代谢物。将代谢物数据导入 SIMCA-P 14.1 软件进行主成分分析（PCA）和正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA），根据变量投影重要性（VIP）值＞1 和 t 检验（$P < 0.05$）筛选差异代谢物。将差异代谢物导入 MetaboAnalyst 5.0 数据库进行相关代谢通路分析。

3　结果

3.1　芍甘附子汤治疗 RA 的药效研究

3.1.1　芍甘附子汤对 CIA 大鼠足跖肿胀度及 AI 评分的影响　造模后，与正常组相比，CIA 大鼠足跖肿胀度、AI 评分显著升高（$P < 0.01$）。给药后，与模型组相比，芍甘附子汤组第 42、49 日足跖肿胀度明显降低（$P < 0.05$），AI 评分也明显降低（$P < 0.05$）；雷公藤多苷片组第 42、49 日足跖肿胀度明显降低（$P < 0.05$），第 28、35、42、49 日 AI 评分明显降低（$P < 0.05$），结果见图 1。

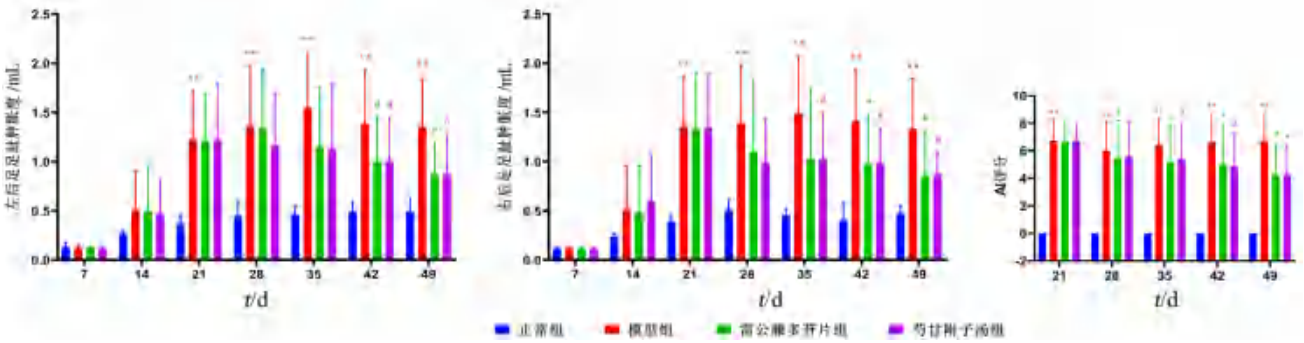

图 1　芍甘附子汤对 CIA 大鼠足跖肿胀度及 AI 评分的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 12$）

Fig 1　Effect of Shaogan Fuzi decoction on plantar swelling and AI score of CIA rats（$\bar{x} \pm s$，$n = 12$）

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

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

3.1.2　芍甘附子汤对 CIA 大鼠踝关节病理变化的影响　正常组大鼠踝关节组织结构正常完整，而模型组大鼠出现明显的病变和损伤，滑膜细胞排列紊乱，并伴随大量滑膜细胞增生、炎性细胞浸润、血管生成及软骨损伤等表现。经雷公藤多苷片和芍甘附子汤治疗后，滑膜组织病变均得到一定改善，表现为滑膜轻度增生，炎症细胞浸润减少（见图 2）。

3.2　芍甘附子汤血清代谢组学结果

3.2.1　QC 样本总离子流图的比较　将 QC 样品总离子流图（TIC）进行谱图重叠比较，结果各个色谱峰的保留时间和峰面积都重叠良好，说明色谱梯度合理，仪器稳定性良好（见图 3）。

3.2.2　单变量统计分析　使用变异系数分析（FC Analysis）和 t 检验对正、负离子模式下检测的所有代谢物进行差异分析，差异代谢物的筛选标准为 $FC > 1.5$，$P < 0.05$，采用火山图进行可视化分析（见图 4）。图中的每一点代表一个代谢物，平行于 Y 轴的两条直线分别是 $X = 0.58$ 和 $X = -0.58$，在 $X = -0.58$ 左侧的点是下调 1.5 倍以上的代谢特征，而在 $X = 0.58$ 右侧的点则是上调 1.5 倍以上的代谢特征。同时，平行于 X 轴有一条直线为 $Y = 1.30$，即 $-\log10(0.05)$，在直线以上的点表示显著性 $P < 0.05$ 的代谢特征。

3.2.3　多维统计分析

① PCA 分析结果：采用无监督分析法 -PCA 分析模型组和芍甘附子汤组的血清代谢谱，结果显示，两组血清样本代谢谱有明显的区分，表明两组间代谢轮廓存在差异，该模型能解释样本间代谢差异，即两组间血清内源性代谢物发生了明显的变化。

② OPLS-DA 分析结果：为了进一步研究 RA 大鼠在灌胃芍甘附子汤状态下内源性代谢物的变化，采用有监督的 OPLS-DA，图中 R^2X 表示 OPLS 模型的各主成分解释了多少 X 的方差，R^2Y 表示 OPLS 模型的各主成分解释了多少 Y 的方差，Q^2 表示做交互验证时 OPLS 模型的各主成分解释了多少 Y 的方差。在正、负离子模式下 R^2Y 分别为 0.83、0.83，R^2X 分别为 0.45、0.66，Q^2 分别为 0.75、0.79，发现在正、负离子模式下，模型组与芍甘附子汤组样本均能得到明显分离。表明该模型拟合度和预测能力都较理想。为防止模型出现过拟合，通过置换检验进行分析。图中 Q^2 在 Y 轴的截距小于 0，显示 OPLS-DA 模型的

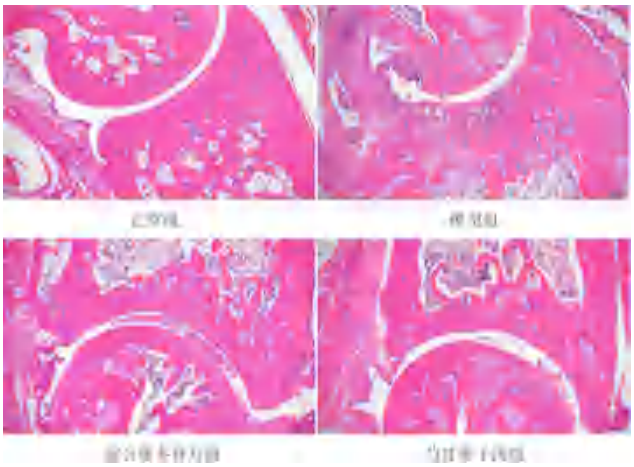

图 2　芍甘附子汤对 CIA 模型大鼠踝关节病理影响（HE，×40）

Fig 2　Effect of Shaogan Fuzi decoction on the pathological changes of ankle joints in CIA model rats（HE，×40）

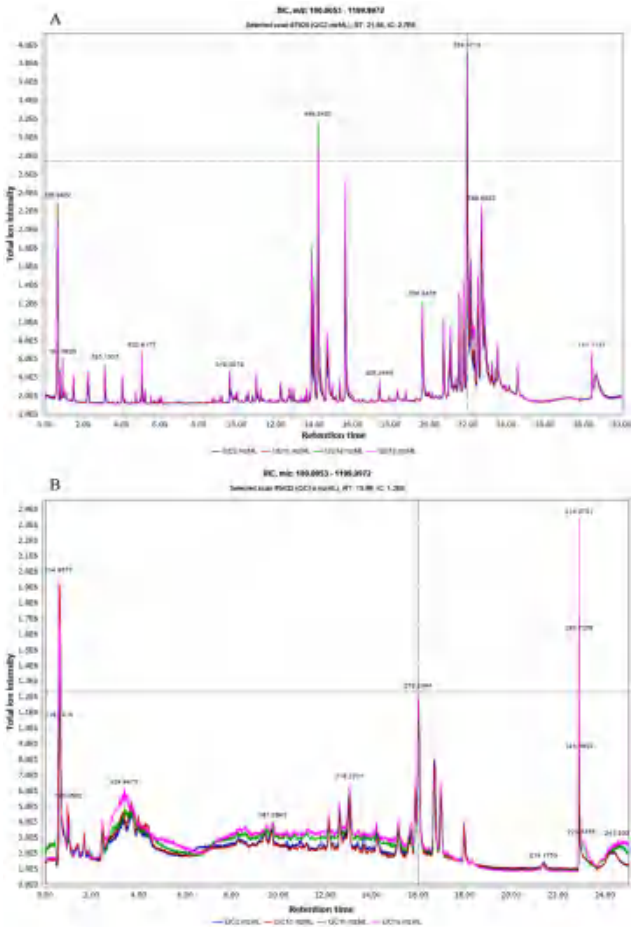

图 3　正离子（A）、负离子（B）条件下 QC 样本的 TIC

Fig 3　TIC of QC samples under positive ion（A）and negative ion（B）

验证没有出现过拟合。S-Plot 图显示了离子的分散度，离子离原点越远，则表明其在组间的差异越大（见图 5 ～ 6）。

3.2.4　差异代谢物筛选及其代谢通路分析　为进一步确定给药后 RA 大鼠血清内源性代谢物的差异，采用 OPLS-DA 模型中的 *VIP* ＞ 1 和 *t* 检验

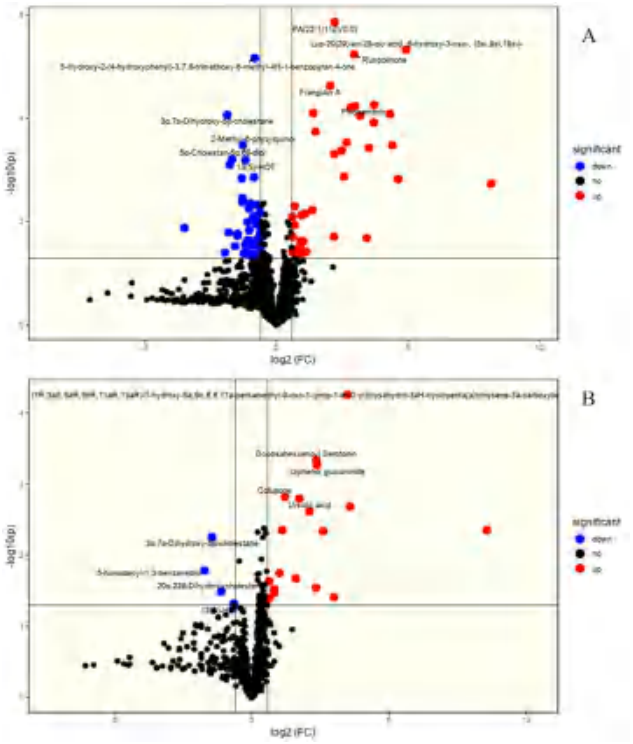

图 4　正离子（A）、负离子（B）条件下代谢物的火山图

Fig 4　Volcano map of metabolites under positive ion（A）and negative ion（B）

中 $P < 0.05$ 为标准来筛选，最终得到 11 个内源性差异代谢物（见表 2），其 3*α*，7*α*- 二羟基 -5*β*- 胆甾烷在正负离子模式下都有检测到。将 11 个内源性差异代谢物用 MetaboAnalyst 5.0 进行代谢通路富集分析，图中纵坐标轴为－ log（*P*），表示通路的显著性水平，*P* 越小即－ log（*P*）越大，节点颜色越深；横坐标轴为通路影响值（pathway impact），来自通路拓扑分析，表示代谢通路的影响程度重要性，以 pathway impact ＞ 0.1 为标准进行筛选，共得到两条主要代谢通路（见图 7），分别为组氨酸代谢、甘油磷脂代谢。将上述内源性差异代谢物导入 Cytoscape 的 Metscape 插件，构建“代谢物 - 反应 - 酶 - 基因”网络和代谢物相互作用网络（见图 8），图中红色六边形节点为代谢物，其中输入代谢物显示为深红色，粉色六角形节点为拓扑相关代谢物，灰色菱形节点为酶促反应，绿色方形节点为反应相关酶；蓝色圆形节点为基因。这个网络反映了生化信息从基因到代谢物的整个传递过程。发现芍甘附子汤可通过影响“代谢物 - 反应 - 酶 - 基因”调控相应的代谢途径，作用 *HDC*、*HNMT* 基因上调代谢物组胺，作用 *PLA2* 相关基因下调代谢物 PC[14：0/22：5（4Z，7Z，10Z，13Z，16Z）]、PC[18：0/22：6（4Z，7Z，10Z，13Z，16Z，19Z）]、PC[20：1

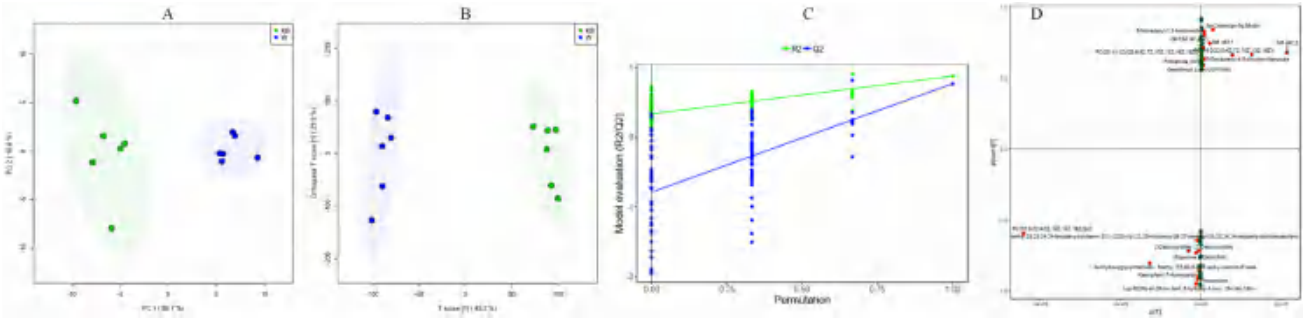

图 5　正离子模式的 PCA 得分图（A）、OPLS-DA 得分图（B）、置换检验图（n = 100）（C）及 S-plot 图（D）

Fig 5　PCA score map（A），OPLS-DA score map（B），permutation test map（n = 100）（C），and S-plot map（D）in positive ion mode

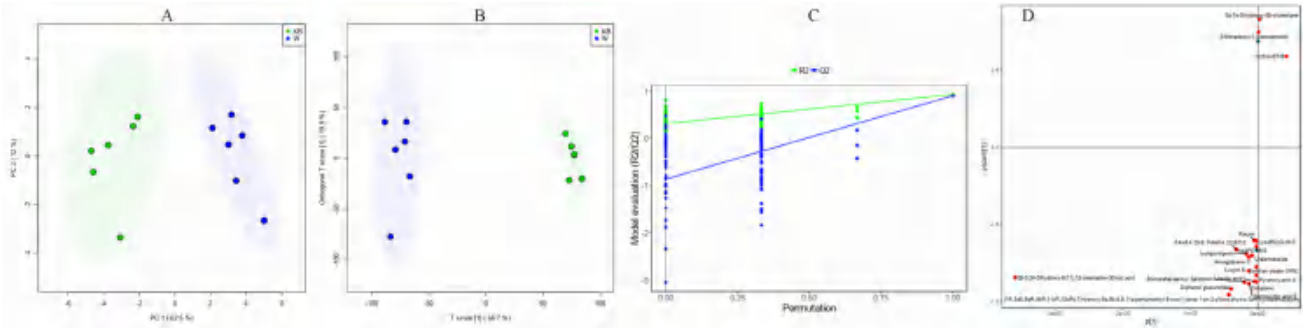

图 6　负离子模式的 PCA 得分图（A）、OPLS-DA 得分图（B）、置换检验图（n = 100）（C）及 S-plot 图（D）

Fig 6　PCA score map（A），OPLS-DA score map（B），permutation test map（n = 100）（C），and S-plot map（D）in negative ion mode

（11Z）/22：6（4Z，7Z，10Z，13Z，16Z，19Z）] 等磷脂酰胆碱和溶血磷脂酰胆碱 lysoPC（16：0），进而发挥治疗 RA 的作用。

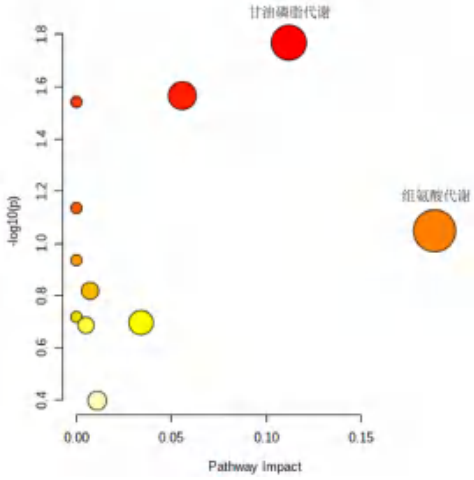

图 7　11 个内源差异代谢物代谢通路图

Fig 7　Metabolic pathways of 11 endogenous differential metabolites

4　讨论

本研究通过建立 CIA 大鼠模型，发现芍甘附子汤可明显改善 CIA 大鼠的足跖肿胀，并减轻其踝关节的滑膜增生、炎症细胞浸润、软骨损伤等病理损伤。但其治疗 RA 的作用机制尚不明确，限制了其临床应用和深入开发。

代谢组学通过对生物样品中的低分子量内源性代谢物进行综合分析，绘制疾病早期生化变化的扰动图，有助于在代谢水平上理解疾病发生和发展的机制，并提供疾病早期和差异代谢标志物的信息 [10-11]，为开发预测性生物标志物提供机会，从而可以对疾病进行早期干预并为阐明药物作用机制提供依据 [12]。本研究采用 UPLC-HRMS/MS 技术的代谢组学方法，探索芍甘附子汤治疗前后 CIA 大鼠血清内源代谢物的变化以及代谢途径。结果发现，治疗前后 CIA 大鼠血清内源代谢物水平出现显著差异，得到亚精胺、组胺、2'- 脱氧胞苷、犬尿酸、胆酸、3α，7α- 二羟基 -5β- 胆甾烷、20α，22β- 二羟基胆固醇等 11 个内源性差异代谢物，主要调控组氨酸代谢、甘油磷脂代谢等代谢通路。结合“代谢物 - 反应 - 酶 - 基因”网络，进一步发现芍甘附子汤可能是通过调控组氨酸代谢通路的组氨酸脱羧酶（HDC）、组胺 N 甲基转移酶（HNMT）等基因上调代谢物组胺，并调控甘油磷脂代谢通路的磷脂酶 A_2（PLA_2）相关基因下调代谢物磷脂酰胆碱和溶血磷脂酰胆碱，发挥治疗 RA 的作用。

组胺是一种短效局部介质，由 HDC 催化组氨酸脱羧合成产生 [13]，并通过 HNMT 进行甲基化或二胺氧化酶（DAO）进行氧化后在细胞内或细胞外降解 [14]。研究发现组胺具有抗炎作用，能够与组胺 2 型受体（H2R）结合，将辅助性 T 细胞 1（Th1）反应转换为 Th2 反应，从而上调抗炎细

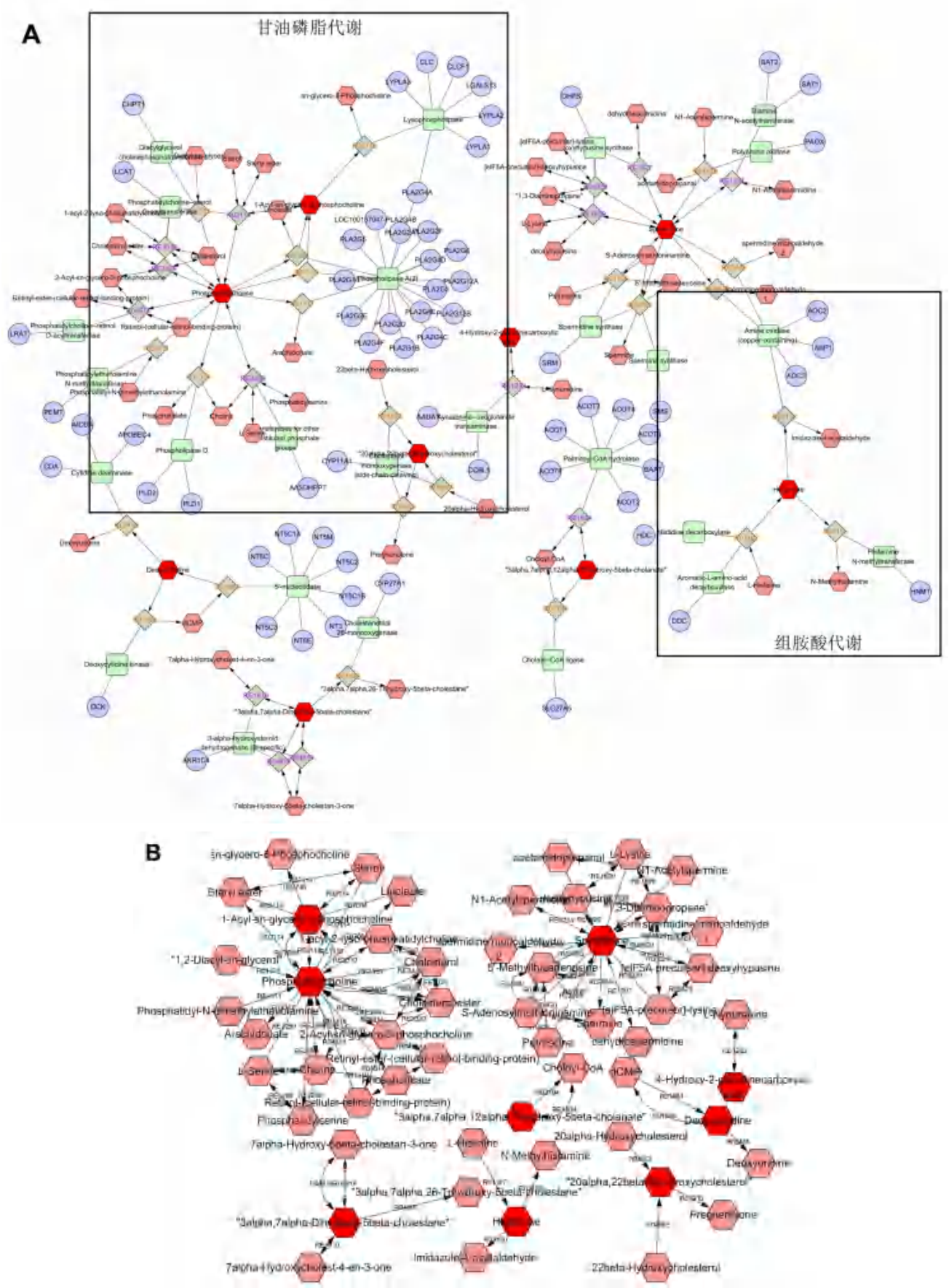

图 8　11 个差异代谢物的“化合物 - 反应 - 酶 - 基因”复合网络图（A）和代谢物相互作用网络（B）

Fig 8　"Compound-Reaction-Enzyme-Gene" composite network diagram（A）and metabolite interaction network（B）of 11 differential metabolites

表 2　血清内源性差异代谢物

Tab 2　Serum endogenous differential metabolites

序号	英文名	中文名	分子式	保留时间 /min	质荷比（*m/z*）	KEGG ID	*P*	*VIP*	FC	趋势	扫描模式
1	spermidine	亚精胺	$C_7H_{19}N_3$	0.55	146.16	C00315	0.0240	1.87	2.03	↑	＋
2	histamine	组胺	$C_5H_9N_3$	0.60	112.09	C00388	0.0117	2.05	1.63	↑	＋
3	2'-deoxycytidine	2’-脱氧胞苷	$C_9H_{13}N_3O_4$	0.72	228.10	C00881	0.0069	2.13	2.15	↑	＋
4	kynurenic acid	犬尿喹啉酸	$C_{10}H_7NO_3$	2.84	190.05	C01717	0.0466	1.71	0.61	↓	＋
5	cholic acid	胆酸	$C_{24}H_{40}O_5$	11.01	409.29	C00695	0.0402	1.73	0.43	↓	＋
6	lysoPC（16：0）	溶血磷脂酰胆碱	$C_{24}H_{50}NO_7P$	13.62	502.33	C04230	0.0291	1.86	0.45	↓	＋
7	3alpha，7alpha-dihydroxy-5beta-cholestane	3*α*，7*α*-二羟基-5*β*-胆甾烷	$C_{27}H_{48}O_2$	19.74	403.36	C05452	0.0056	2.29	0.37	↓	－
8	20alpha，22beta-dihydroxycholesterol	20*α*，22*β*-二羟基胆固醇	$C_{27}H_{46}O_3$	19.74	417.34	C05501	0.0325	1.89	0.47	↓	－
9	PC [14：0/22：5（4*Z*，7*Z*，10*Z*，13*Z*，16*Z*）]	－	$C_{44}H_{78}NO_8P$	21.07	780.55	C00157	0.0190	2.03	0.36	↓	＋
10	PC [18：0/22：6（4*Z*，7*Z*，10*Z*，13*Z*，16*Z*，19*Z*）]	－	$C_{48}H_{84}NO_8P$	21.56	856.58	C00157	0.0067	2.20	0.66	↓	＋
11	3alpha，7alpha-dihydroxy-5beta-cholestane	3*α*，7*α*-二羟基-5*β*-胆甾烷	$C_{27}H_{48}O_2$	21.67	405.37	C05452	0.0001	2.64	0.27	↓	＋
12	PC [20：1（11Z）/22：6（4*Z*，7*Z*，10*Z*，13*Z*，16*Z*，19*Z*）]	－	$C_{50}H_{86}NO_8P$	22.29	860.61	C00157	0.0112	2.12	0.58	↓	＋

胞因子白细胞介素（IL）-4、IL-10 等的分泌[15-16]，还可以激活 H1 受体介导的促炎核转录因子 -*κ*B（NF-*κ*B）发挥抗炎作用[17]。组胺 4 型受体（H4R）是新发现的受体，在国内外受到了高度关注，目前认为 H4R 在免疫反应中具有中心功能，它高表达在与炎症反应有关的组织，可影响各种免疫细胞的细胞活化、细胞迁移以及细胞因子和趋化因子的产生[17]。据报道 H4R 可在人类 RA 的滑膜上表达[18]，在胶原抗体诱导的关节炎（CAIA）和 CIA 模型中，H4R 缺陷小鼠和用 H4R 拮抗剂治疗的小鼠均可降低关节炎疾病的严重程度[19]。临床研究也表明 RA 患者血清中组胺水平显著降低，在局部滑液中甚至更低[20]。

磷脂是细胞膜的组成成分，其代谢产物参与维持正常的生理功能，磷脂代谢异常可能促进全身炎症[21]。甘油磷脂是参与许多生物调节过程的关键化合物，研究发现其参与 RA 的发病[22]，RA 炎症会通过影响磷脂代谢，进而触发产生中性粒细胞活性氧（ROS）[23]及蛋白水解酶释放，造成软骨组织破坏[24]。溶血磷脂酰胆碱是由 PLA_2 水解膜磷脂酰胆碱产生的，能调节内皮细胞炎症趋化因子的表达[25]，在炎症部位充当化学诱导剂并促进炎症反应[20]。PLA_2 能催化磷脂甘油分子上二位酰基，从而释放花生四烯酸等脂肪酸和溶血磷脂[26]，促进前列腺素、血小板活化因子等炎症介质的合成[27]，从而促进炎症反应。异常的磷脂分解代谢是 RA 的明确危险因素，可能促进全身炎症。据报道，甘油磷脂的分解代谢会影响中性粒细胞介导的微循环炎症反应，血清中溶血磷脂水平的紊乱可能会加剧 RA 的进展[28]，临床上使用 PLA_2 抑制剂可以达到治疗 RA 的目的[29]。溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 3（LPCAT3）是脂肪细胞分化过程中花生四烯酸进入甘油磷脂的关键酶，可促进过氧化物酶体增殖物激活受体 *γ*（PPAR*γ*）的激活[30]，而 PPAR*γ* 的过表达在体内可以明确改善关节炎大鼠的关节炎症及足跖肿胀度，在体外可以抑制成纤维样滑膜细胞炎症因子的表达[31]。本课题组前期实验研究发现，芍甘附子汤可能是通过调节 PPAR-*γ*/NF-*κ*B 信号通路，降低其下游环氧合酶 2、诱导型一氧化氮合酶、前列腺素 E_2、一氧化氮、肿瘤坏死因子 -*α*、IL-1*β*、IL-6 的表达水平[32]。

综上所述，本研究通过整合药效学和血清代谢组学方法，探讨了芍甘附子汤治疗 RA 的药效及代谢相关作用机制，发现芍甘附子汤可能通过调控组氨酸代谢、甘油磷脂代谢等代谢途径，从整体上纠正 RA 导致的代谢紊乱，为深入研究芍甘附子汤治疗 RA 的作用机制奠定了基础。

参考文献

[1] McInnes IB，Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. N Engl J Med，2011，365（23）：2205-2219.

[2] Smolen JS，Aletaha D，McInnes IB. Rheumatoid arthri-

tis [J]. Lancet，2016，388（10055）：2023-2038.
[3] 李满意，刘红艳，陈传榜，等 . 类风湿关节炎的中医证治 [J]. 风湿病与关节炎，2020，9（7）：52-56.
[4] 袁芳，侯秀娟，刘小平，等 . 芍甘附子汤加味对Ⅱ型胶原诱导性关节炎大鼠 OPG-RANKL 表达的影响 [J]. 中华中医药杂志，2015，30（5）：1661-1665.
[5] 郑炜，朱跃兰，马俊福，等 . 加味芍甘附子汤联合西药治疗类风湿关节炎寒湿痹阻证活动期患者 30 例临床观察 [J]. 中医杂志，2018，59（9）：760-764.
[6] 石璐 . 芍甘附子汤治疗类风湿关节炎的药效及作用机制初步研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2020.
[7] Zhong Z，Huang Y，Huang Q，et al. Serum metabolic profiling analysis of gout patients based on UPLC-Q-TOF/MS [J]. Clin Chim Acta，2021，515：52-60.
[8] Souto-Carneiro M，Tóth L，Behnisch R，et al. Differences in the serum metabolome and lipidome identify potential biomarkers for seronegative rheumatoid arthritis versus psoriatic arthritis [J]. Ann Rheum Dis，2020，79（4）：499-506.
[9] Li C，Chen B，Fang Z，et al. Metabolomics in the development and progression of rheumatoid arthritis：a systematic review [J]. Joint Bone Spine，2020，87（5）：425-430.
[10] Zhang A，Sun H，Wang X. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for disease：a systematic review [J]. Anal Bioanal Chem，2012，404（4）：1239-1245.
[11] Gika HG，Zisi C，Theodoridis G，et al. Protocol for quality control in metabolic profiling of biological fluids by U（H）PLC-MS [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci，2016，1008：15-25.
[12] Zhang Z，Yi P，Yang J，et al. Integrated network pharmacology analysis and serum metabolomics to reveal the cognitive improvement effect of BushenTiansui formula on Alzheimer’s disease [J]. J Ethnopharmacol，2020，249：112371.
[13] Maintz L，Novak N. Histamine and histamine intolerance [J]. Am J Clin Nutr，2007，85（5）：1185-1196.
[14] Schirmer B，Neumann D. The function of the histamine H4 receptor in inflammatory and inflammation-associated diseases of the gut [J]. Int J Mol Sci，2021，22（11）：6116.
[15] Hirasawa N，Ohtsu H，Watanabe T，et al. Enhancement of neutrophil infiltration in histidine decarboxylase-deficient mice [J]. Immunology，2002，107（2）：217-221.
[16] Garaczi E，Széll M，Jánossy T，et al. Negative regulatory effect of histamine in DNFB-induced contact hypersensitivity [J]. Int Immunol，2004，16（12）：1781-1788.
[17] Bäumer W，Rossbach K. Histaminals immunmodulator [Histamine as an immunomodulator] [J]. J Dtsch Dermatol Ges，2010，8（7）：495-504.
[18] Smuda C，Bryce PJ. New developments in the use of histamine and histamine receptors [J]. Curr Allergy Asthma Rep，2011，11（2）：94-100.
[19] Cowden JM，Yu F，Banie H，et al. The histamine H4 receptor mediates inflammation and Th17 responses in preclinical models of arthritis [J]. Ann Rheum Dis，2014，73（3）：600-608.
[20] Adlesic M，Verdrengh M，Bokarewa M，et al. Histamine in rheumatoid arthritis [J]. Scand J Immunol，2007，65（6）：530-537.
[21] Manzi S，Wasko MC. Inflammation-mediated rheumatic diseases and atherosclerosis [J]. Ann Rheum Dis，2000，59（5）：321-325.
[22] Fuchs B，Schiller J，Wagner U，et al. The phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ratio in human plasma is an indicator of the severity of rheumatoid arthritis：investigations by 31P NMR and MALDI-TOF MS [J]. Clin Biochem，2005，38（10）：925-933.
[23] Mittal M，Siddiqui MR，Tran K，et al. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury [J]. Antioxid Redox Signal，2014，20（7）：1126-1167.
[24] Hasunuma T，Kato T，Kobata T，et al. Molecular mechanism of immune response，synovial proliferation and apoptosis in rheumatoid arthritis [J]. Springer Semin Immunopathol，1998，20（1-2）：41-52.
[25] Law SH，Chan ML，Marathe GK，et al. An updated review of lysophosphatidylcholine metabolism in human diseases [J]. Int J Mol Sci，2019，20（5）：1149.
[26] Boilard E，Lai Y，Larabee K，et al. A novel anti-inflammatory role for secretory phospholipase A_2 in immune complex-mediated arthritis [J]. EMBO Mol Med，2010，2（5）：172-187.
[27] Nanda BL，Nataraju A，Rajesh R，et al. PLA_2 mediated arachidonate free radicals：PLA_2 inhibition and neutralization of free radicals by anti-oxidants——a new role as anti-inflammatory molecule [J]. Curr Top Med Chem，2007，7（8）：765-777.
[28] Li Y，Lv D，Liu R，et al. Non-target metabolomic analysis reveals the therapeutic effect of Saposhnikoviadivaricata decoction on collagen-induced arthritis rats [J]. J Ethnopharmacol，2021，271：113837.
[29] Magrioti V，Kokotos G. Phospholipase A_2 inhibitors for the treatment of inflammatory diseases：a patent review [J]. Expert Opin Ther Pat，2013，23（3）：333-344.
[30] Eto M，Shindou H，Koeberle A，et al. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 is the key enzyme for incorporating arachidonic acid into glycerophospholipids during adipocyte differentiation [J]. Int J Mol Sci，2012，13（12）：16267-16280.
[31] 占翔 . 微透析技术结合代谢组学探讨栀子苷干预佐剂性关节炎大鼠代谢紊乱的机制 [D]. 合肥：安徽中医药大学，2020.
[32] 董琳琳，丰晨然，赵一颖，等 . 基于 PPAR-γ/NF-κB 信号通路探究芍甘附子汤对胶原诱导性关节炎大鼠的干预作用及作用机制 [J]. 中南药学，2022，20（1）：45-51.

（收稿日期：2022-02-23；修回日期：2022-04-11）

紫草多糖脂质体的制备及其评价

齐和日玛[1]，苏日娜[1]，成日青[1]，塔娜[1]，李慧聪[1]，萨仁高娃[2*]（1.内蒙古医科大学药学院，呼和浩特 010110；2.内蒙古医科大学民族医药创新中心，呼和浩特　010110）

摘要：目的　制备紫草多糖脂质体，优化其处方工艺，并对其进行表征。**方法**　逆向蒸发法制备紫草多糖脂质体，采用超速离心 - 紫外分光光度法测定其包封率，以包封率为主要考察指标，研究膜材比、药脂比、超声时间等因素对脂质体包封率的影响；通过正交试验对处方进行优化，并进行质量评价。**结果**　紫草多糖脂质体优化后的制备处方工艺为药脂比 1∶4，膜材比 1∶8，超声持续时间 2 min，包封率为（80.62±1.09）%，平均粒径为（131.91±2.38）nm，PDI 为（0.134±0.012），Zeta 电位为（－ 18.13±0.14）mV，4 ℃放置 10 d 无沉淀生成。**结论**　优选处方稳定可行，制备的紫草多糖脂质体包封率高、粒径小且均匀。

关键词：紫草多糖；脂质体；包封率；单因素试验；正交设计
中图分类号：R943.4　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2068-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.017

Preparation and evaluation of Arnebiae Radix polysaccharide liposomes

Qiherima[1], Surina[1], CHENG Ri-qing[1], Tana[1], LI Hui-cong[1], Sarengaowa[2*] (1. *College of Pharmacy*, *Inner Mongolia Medical University*, *Hohhot* 010110; 2. *Medical Innovation Center for Nationalities*, *Inner Mongolia Medical University*, *Hohhot* 010110)

Abstract: Objective To prepare Arnebiae Radix polysaccharide liposomes, and to characterize and optimize the formulation of Arnebiae Radix polysaccharide liposomes. **Methods** Arnebiae Radix polysaccharide liposomes were prepared by reverse evaporation method and the entrapped efficiency was measured by ultracentrifugation method. Single factors such as the ratio of cholesterol to phospholipid, the ratio of drug to phospholipid, and the ultrasonic time were studied. And the orthogonal design was adopted to obtain the optimized prescription, and the quality was evaluated. **Results** The best prescription was as follows: the ratio of drug to phospholipid of 1∶4, the ratio of cholesterol to phospholipid was 1∶8, and the ultrasonic time was 2 min. The entrapped efficiency of Arnebiae Radix polysaccharide liposomes prepared according to the prescription was (80.62±1.09)%, the average particle size was (131.91±2.38) nm, the PDI was (0.134±0.012), and the Zeta potential was (－ 18.13±0.14) mV. **Conclusion** The Arnebiae Radix polysaccharide liposomes prepared according to the optimized formulation have higher entrapped efficiency with small and uniform particle size.

Key words: Arnebiae Radix polysaccharide; liposome; entrapped efficiency; single factor test; orthogonal design

紫草为中医和蒙医常用药材，最早记载于《神农本草经》，为紫草科软紫草属植物新疆紫草 *Arnebia euchroma*（Royle）Johnst. 和内蒙紫草 *Arnebia guttata* Bunge 的干燥根，具有清热凉血、活血解毒、透疹消斑的功效，用于治疗血热毒盛、斑疹紫黑、麻疹不透、疮疡、湿疹、水火烫伤[1]。紫草中含有萘醌类、单萜苯醌、苯酚类、酚酸类以及多糖类多种具有生物活性的成分[2]。多糖是一类非特异性的免疫作用增强化合物，能提高机体的免疫功能，具有抗衰老、抗肿瘤、抗病毒、抗辐射、降血糖及降血脂等功效，受到了越来越多的研究者的关注。已有研究表明紫草多糖具有

基金项目：内蒙古自治区自然科学基金（No. 2020MS08129）；内蒙古医科大学善学人才培养计划（No. ZY0201030，No.ZY0201016）。
作者简介：齐和日玛，女，博士，主要从事药物新剂型研究，email：qiherima@126.com　*通信作者：萨仁高娃，女，博士，副研究员，主要从事蒙药药效物质基础研究，email：nmgsaren@163.com

多种免疫增强功能，有明显地抑制单纯性疱疹病毒、非特异性抗炎的作用[3-4]。

目前大部分传统中药多糖制剂存在稳定性差、生物利用度低、易被降解及对细胞穿透力弱等缺点，影响了多糖药效的发挥。脂质体是由两亲性的磷脂或其他材料构建的双层囊泡，是重要的纳米载体之一，其结构与生物膜相似。脂质体可提高药物的生物利用度，减少药物的不利影响，同时具有低毒性、缓释作用、改善稳定性等优点[5]。本试验制备了紫草多糖脂质体，优化了其处方工艺，并对该制剂的质量进行了评价，以期提高紫草多糖的生物利用度及治疗效果，降低使用剂量，为紫草多糖新剂型的研发提供依据。

1　仪器与试药

1.1　试药

紫草多糖（自制[6]，纯度大于 90%），卵磷脂（上海易恩化学技术有限公司，批号：R005468），胆固醇（上海易恩化学技术有限公司，批号：R008055），葡萄糖对照品（北京奥博星生物技术有限责任公司，批号：20120728，供含量测定用），其他试剂均为国产分析纯。

1.2　仪器

TG16.6 型高速离心机（上海卢湘仪离心机仪器有限公司）；N-1300 旋转蒸发仪（上海爱郎仪器有限公司）；BSA124S 型电子天平 [赛多利斯科学仪器（北京）有限公司]；KQ5200DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；U-1901 紫外分光光度计（北京普析通用仪器有限责任公司）；SHB-IV 双 A 型循环水式多用真空泵（郑州长城科工贸有限公司）。

2　方法与结果

2.1　紫草多糖脂质体的制备

采用逆向蒸发法[7]，精密称取适量卵磷脂、胆固醇，溶于 10 mL 氯仿，超声使其完全溶解。采用旋转蒸发仪减压蒸发至圆底烧瓶内壁形成一层均匀薄膜，加入 10 mL 乙醚将薄膜溶解，加入适量紫草多糖质量浓度为 1.5 mg • mL^{-1} 的溶液（用 pH 为 7.4 的硫酸盐缓冲溶液配制），混匀，减压蒸发至乙醚挥发完全，即得紫草多糖脂质体混悬液，4 ℃保存备用。空白脂质体除不加紫草多糖外，其他条件同上。

2.2　检测波长的确定

精密称取干燥至恒重的葡萄糖对照品 100 mg，置 100 mL 量瓶中，加蒸馏水溶解并定容至刻度，从中吸取 10 mL 置 100 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，即得 0.1 mg • mL^{-1} 的对照品储备液。精密吸取对照品储备液 2 mL，加入 5% 苯酚溶液 1 mL，混匀，加入 5 mL 浓硫酸，混匀，沸水浴中加热 25 min，取出后冰水浴中冷却 5 min。另精密取蒸馏水 2 mL，同法操作作为空白对照，200 ～ 800 nm 进行扫描，结果在 485 nm 处出现最大的吸收峰，空白脂质体在此处无吸收，故选择检测波长为 485 nm。

2.3　脂质体包封率的测定

2.3.1　标准曲线的绘制　精密量取“2.2”项下的对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 分别置试管中，加蒸馏水至 1 mL，再加 5% 的苯酚溶液 1 mL，混匀，加浓硫酸 5 mL，摇匀，置于沸水浴 25 min，取出放置冰水浴 5 min。另精密取蒸馏水 2 mL，同法操作作为空白对照，在 485 nm 处测定其吸光度。以吸光度（A）为纵坐标，葡萄糖浓度（c）为横坐标，得回归方程 $A = 0.0105c - 0.1783$（$R^2 = 0.9995$），结果表明葡萄糖在 21.4 ～ 107.1 μg • mL^{-1} 与吸光度线性关系良好。

2.3.2　精密度试验　精密量取同一质量浓度紫草多糖溶液 1.0 mL，按上述方法进行显色，在 485 nm 处测定其吸光度，平行测定 6 次，结果吸光度值 *RSD* 为 0.12%，表明仪器精密度良好。

2.3.3　稳定性试验　精密量取同一质量浓度紫草多糖溶液 1.0 mL，按上述方法进行显色，分别在 0、30、60、90、120、160、180 min 于 485 nm 处测定吸光度，结果吸光度值 *RSD* 为 2.0%，表明供试液在显色后的 3 h 内稳定性良好。

2.3.4　加样回收试验　精密称取葡萄糖对照品溶液，分别配制成高、中、低（0.10、0.05、0.03 mg•mL^{-1}）3 个不同质量浓度，加入适量空白脂质体，于 485 nm 处测定其吸光度值。结果高、中、低质量浓度的平均加样回收率分别为 96.38%、95.86%、97.16%，*RSD* 值分别为 1.1%、0.29%、0.35%。

2.3.5　包封率的测定　采用超速离心法测定[8]：吸取 0.2 mL 脂质体至超速离心管中，以 8000 r • min^{-1} 超速离心 30 min，吸取上清液 0.1 mL，在 485 nm 处测定其吸光度，计算游离多糖的浓度。另取 0.2 mL 脂质体，破乳，测定脂质体中多糖总量，按下式计算包封率（*EE*）：EE（%）＝（$1 - c_f/c_t$）×100%，式中 c_f 为游离药物的量，c_t 为脂质体中药物的总量。

2.4　紫草多糖脂质体处方的单因素考察

2.4.1　药物与卵磷脂比（药脂比）考察　固定处方中胆固醇用量、水相缓冲溶液 pH 值、超声时间等，参考相关文献，选取药脂比为 1∶2、1∶4、1∶8，1∶10 制备脂质体，测定其包封率、粒度、多分散指数（PDI）及 Zeta 电位。结果如表 1 所示，

表 1　药脂比考察

Tab 1　Ratio of lecithin to drug

药脂比	包封率 /%	粒径 /nm	PDI	Zeta 电位 /mV
1∶2	76.69±0.01	169.41±0.79	0.246±0.031	－21.34±0.69
1∶4	81.99±0.01	162.54±1.96	0.306±0.032	－17.01±0.22
1∶8	50.20±0.01	174.42±1.86	0.348±0.009	－10.93±0.45
1∶10	46.54±0.01	307.48±2.48	0.260±0.020	－11.58±0.42

当药脂比为 1∶4 时，所制得的脂质体包封率高、粒径小。

2.4.2　胆固醇与卵磷脂比（膜材比）考察　固定其他条件，选取膜材比分别为 1∶2、1∶4、1∶8、1∶10 的紫草多糖脂质体，测定其包封率、粒度、PDI 及 Zeta 电位。结果如表 2 所示，当膜材比为 1∶8 时，所制得的脂质体包封率高，粒径小。

表 2　膜材比考察

Tab 2　Ratio of cholesterol to phospholipid

膜材比	包封率 /%	粒径 /nm	PDI	Zeta 电位 /mV
1∶2	40.27±0.01	229.52±3.21	0.285±0.062	－12.21±0.21
1∶4	68.21±0.01	226.21±5.49	0.285±0.018	－16.73±0.29
1∶8	78.70±0.01	157.34±1.77	0.260±0.036	－18.42±0.25
1∶10	71.76±0.01	187.03±4.30	1.122±0.018	－19.84±0.22

2.4.3　超声时间考察　固定处方中药量，水相缓冲液 pH 值，膜材比，制备不同超声处理时间的脂质体并对其进行表征，结果如表 3 所示，超声时间 2 min 制得的脂质体包封率最高。

表 3　超声时间考察

Tab 3　Ultrasonic time

超声时间 /min	包封率 /%	粒径 /nm	PDI	Zeta 电位 /mV
1	52.81±0.01	202.21±1.79	0.324±0.017	－16.25±0.21
2	70.76±0.01	180.23±2.63	0.234±0.021	－14.89±0.24
5	50.55±0.01	164.14±3.41	0.278±0.031	－15.03±0.19
10	30.82±0.01	170.22±2.84	0.157±0.029	－15.61±0.14

2.5　正交设计优化紫草多糖脂质体处方

在单因素考察结果的基础上，选择膜材比（A）、药脂比（B）、超声时间（C）3 个影响因素，每个影响因素设 3 个水平，以包封率为主要考察指标，进行正交试验。正交试验因素水平设计见表 4。选用 L_9（3^3）正交表，分别制得紫草多糖脂质体，测定其包封率，结果见表 5，方差分析见表 6。

表 4　正交试验因素水平设计

Tab 4　Factor and level

水平	膜材比（A）	药脂比（B）	超声时间（C）/min
1	1∶4	1∶2	2
2	1∶8	1∶4	5
3	1∶10	1∶8	1

根据表中极值（R）直观分析可知，各因素重要程度依次为药脂比（B）＞膜材比（A）＞超声时间（C），考虑到操作简便性，最终确定最佳处方为 $A_2B_2C_1$，即膜材比为 1∶8，药脂比为 1∶4，超声时间为 2 min。

表 5　正交试验结果

Tab 5　Orthogonal test

No..	A	B	C	包封率 /%
1	4∶1	2∶1	2	35.42
2	4∶1	4∶1	5	51.26
3	4∶1	8∶1	1	43.24
4	8∶1	4∶1	2	77.99
5	8∶1	8∶1	5	75.05
6	8∶1	2∶1	1	49.19
7	10∶1	8∶1	2	46.70
8	10∶1	2∶1	5	35.25
9	10∶1	4∶1	1	48.82
K_1	43.30	39.95	53.37	
K_2	57.65	59.35	53.85	
K_3	43.59	54.99	47.08	
K_j	14.35	19.40	6.77	

表 6　方差分析

Tab 6　Analysis of variance

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	P 值
A	1148.443	2	42.653	0.023
B	621.801	2	23.094	0.042
C	85.589	2	3.179	0.239
误差	26.925	2		

2.6　验证试验及质量评价

按“2.5”项下最优处方制备 3 批紫草多糖脂质体，测得包封率分别为 80.95%、79.14%、81.76%，制备工艺重复性良好，外观呈均匀褐色的透明混悬液，平均粒径为（131.91±2.38）nm，PDI 为（0.134±0.012），Zeta 电位为（－18.13±0.14）mV，见图 1。4 ℃放置 10 d 无沉淀生成，稳定性良好。

2.7　体外释放试验

制备与最优处方相同质量浓度的紫草多糖的 PBS 溶液（pH 7.4），取此溶液和紫草多糖脂质体混悬液各 5 mL 于处理好的透析袋中，密封，浸入至 200 mL pH 7.4 的 PBS 释放介质（透析液）中，37 ℃下 100 r • min^{-1} 恒温磁力搅拌，分别在 0.5、1、2、3、4、6、8、10、12、24 h 吸 取 1.0 mL 透析液，并立即补加空白释放介质 1.0 mL。测定吸光度，计算累积释放率，绘制体外释放曲线。

累积释放率（%）＝一定时间释放的药量 / 药物总量 ×100%

由图 2 可知，8 h 时紫草多糖溶液组释放率已达 82.43%，在 12 h 时已基本释放完全；紫草多糖脂质体释药过程可分为快速释药期和缓慢释药期，在 0 ～ 2 h 释药相对较快，与原料药的释

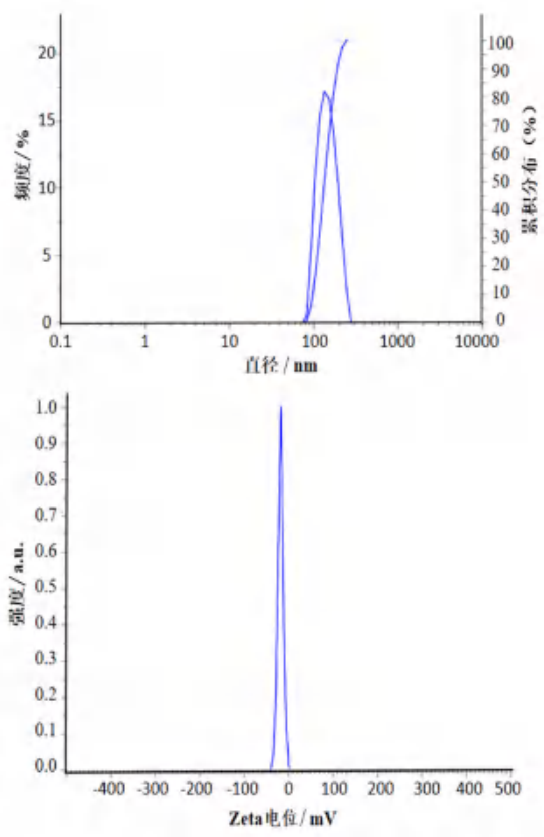

图 1　紫草多糖脂质体粒径分布和 Zeta 电位

Fig 1　Particle size distribution and potential of Arnebiae Radix polysaccharide liposomes

药基本一致，之后释放较溶液组变慢，在 6、12 h 时累积释放率分别为 57.88%、75.78%，24 h 时为 81.46%，表明制备的紫草多糖脂质体有一定的缓释作用[9]。

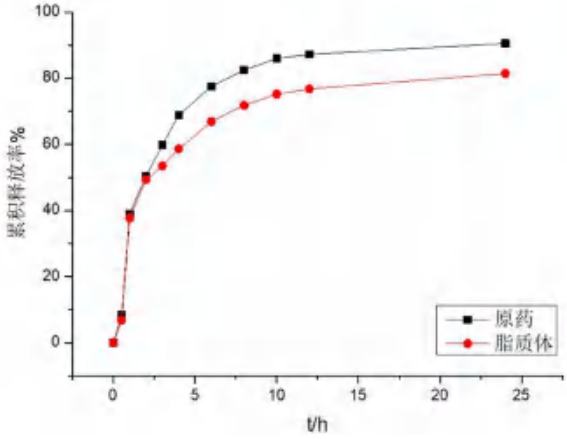

图 2　多糖原药及脂质体累积释放曲线

Fig 2　In vitro release curves of Arnebiae Radix polysaccharide liposomes

3　讨论

脂质体的制备方法有注入法、熔融法、薄膜分散法、超声分散法、逆向蒸发法、冷冻干燥法、高压乳匀法等。近年来，逆向蒸发法广泛应用在生物大分子和水溶性药物脂质体的制备，该法所制脂质体包封率高，方法简单、工艺可行[10-11]。本研究采用逆向蒸发法制备了紫草多糖脂质体，其最优处方工艺为膜材比 1∶8，药脂比 1∶4，超声持续时间 2 min，包封率可达（80.62± 1.09）%，平均粒径为（131.91±2.38）nm，PDI 为（0.134±0.012），Zeta 电位为（－18.13±0.14）mV，4 ℃放置 10 d 无沉淀生成，说明紫草多糖以脂质体为载体是可行的[12]。体外释药实验结果表明，与紫草多糖溶液相比，紫草多糖脂质体体外累积释放率降低，紫草多糖脂质体有一定的缓释作用。

后续本课题组将继续考察紫草多糖脂质体的活性、生物利用度、稳定性等，并与原药进行比较，对紫草多糖新剂型的研发及利用具有重要意义。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：355.
[2] 徐新刚，王宝珍，孙志蓉，等 . 新疆紫草的主要化学成分 [J]. 吉林大学学报（理学版），2010，48（2）：319-322.
[3] 张玉萌 . 紫草多糖的研究概况 [J]. 中国新医药，2004，3（4）：54-55.
[4] 陈详娜 . 紫草多糖的提取分离与活性研究 [D]. 杭州：浙江大学，2008.
[5] 姜慧妍，严思敏，吴秋惠，等 . 多糖的新型制剂研究进展 [J]. 中国中药杂志，2020，49（15）：4582-4588.
[6] Bo S，Dan M，Li WX，et al. Characterizations and immunostimulatory activities of a polysaccharide from *Arnebia euchroma*（Royle）Johnst. Roots [J]. Int J Biol Macromol，2019，125：791-799.
[7] 李淑梅，杨帆，李睿 . 黄芪多糖脂质体的制备 [J]. 光谱实验室，2008，25（2）：164-166.
[8] 苏瑾，王丹，胡孟洋，等 . 山药总多糖脂质体的制备及表征 [J]. 中国实验方剂学杂志，2016，22（16）：18-21.
[9] 张勇军，巴娟，巫辅达，等 . 玉屏风多糖脂质体的制备及表征研究 [J]. 动物医学进展，2019，40（7）：52-55.
[10] 张勇军，巫辅达，徐志高，等 . 黄芪多糖脂质体的制备及表征研究 [J] 中国兽医杂志，2019，55（7）：72-75.
[11] 隋小宇，李娟，翟伟宇，等 . 超滤法测定甘草次酸脂质体包封率 [J]. 中成药，2018，40（2）：478-480.
[12] 刘少静，盛耀光，康冬妮，等 . 黄芪多糖脂质体的制备及其性能评价 [J]. 现代中药研究与实践，2018，32（3）：54-57.

（收稿日期：2022-02-07；修回日期：2022-03-17）

八角莲木脂素和黄酮类化学成分研究

张欣，曹瑞，冯改利，张化为，姜祎，王薇，邓翀*（陕西中医药大学药学院，陕西　咸阳　712046）

摘要：目的　研究八角莲中木脂素和黄酮类化学成分。**方法**　采用硅胶柱色谱、葡聚糖凝胶 LH-20 柱色谱以及半制备型高效液相色谱等方法分离，根据 MS 和 NMR 等数据鉴定化合物的结构。**结果**　从八角莲中共分离鉴定了 5 个木脂素和 3 个黄酮类化合物，分别为爵床脂素 A（**1**）、山荷叶素葡萄糖苷（**2**）、arabelline（**3**）、鬼臼毒素 -4-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷（**4**）、落叶松树脂醇 -4-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷（**5**）、槲皮素（**6**）、山柰酚 3-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷（**7**）、槲皮素 -3-*O*-*α*-*L*- 鼠李糖苷（**8**）。**结论**　化合物 **1**、**3**、**5** 和 **8** 为首次从八角莲中分离鉴定。

关键词：八角莲；化学成分；木脂素；黄酮
中图分类号：R286　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2072-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.018

Lignans and flavonoids from the roots and rhizomes of *Dysosma versipellis*

ZHANG Xin, CAO Rui, FENG Gai-li, ZHANG Hua-wei, JIANG Yi, WANG Wei, DENG Chong*
(*School of Pharmacy*, *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046)

Abstract: Objective To determine the lignans and flavonoids in the roots and rhizomes of *Dysosma versipellis*. **Methods** The chemical constituents were separated by chromatography on silica gel, Sephadex LH-20 and semi-preparative HPLC. The structures were elucidated by spectroscopic methods, including MS and NMR spectral data ananlysis. **Results** Five lignans and three flavonoids were obtained from the roots and rhizomes of *Dysosma versipellis* and identified as justicidin A (**1**), diphyllin-4-*O*-*β*-*D*-glucoside (**2**), arabelline (**3**), podophyllotoxin-4-*O*-*β*-*D*-glucoside (**4**), lariciresinol-4-*O*-*β*-*D*-glucopyranoside (**5**), quercetin (**6**), kaempferol-3-*O*-*β*-*D*-glucoside (**7**) and quercetin-3-*O*-*α*-*L*-rhamnoside (**8**). **Conclusion** Compounds **1**, **3**, **5** and **8** have been isolated from *Dysosma versipellis* for the first time.

Key words: *Dysosma versipellis*; chemical constituent; lignan; flavonoid

八角莲（*Dysosma versipellis*）为小檗科（Berberidaceae）鬼臼属植物八角莲的干燥根及根茎[1]，又称旱八角、八角盘、独叶一枝花等，文献报道其主要化学成分为木脂素类、黄酮类和有机酸等[2-5]，具有抗肿瘤、抗菌和抗病毒等药理作用[6-8]。其中鬼臼毒素类木脂素是八角莲抗肿瘤的主要活性成分，受到国内外学者的重点关注。目前关于八角莲的化学成分研究并不系统，为进一步明确其化学成分，本文对八角莲醇提取物进行了系统研究，从中共鉴定了 8 个化合物（结构见图 1），包括木脂素类 5 个，黄酮类 3 个，分别为爵床脂素 A（**1**）、山荷叶素葡萄糖苷（**2**）、arabelline（**3**）、鬼臼毒素 -4-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷（**4**）、落叶松树脂醇 -4-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷（**5**）、槲皮素（**6**）、山柰酚 3-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷（**7**）、槲皮素 -3-*O*-*α*-*L*- 鼠李糖苷（**8**），其中，化合物 **1**、**3**、**5** 和 **8** 首次从八角莲中分离鉴定，具体结构见图 1。

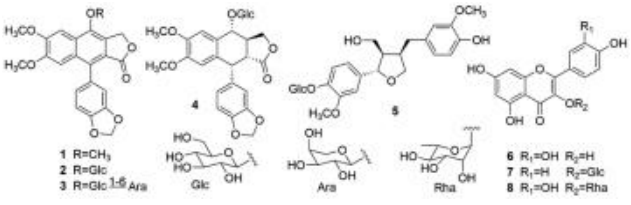

图 1　化合物 **1** ～ **8** 的结构图

Fig 1　Structures of compounds **1** ～ **8**

基金项目：陕西省科技厅自然科学研究基础计划项目（No. 2021JQ-742）；陕西中医药大学学科创新团队项目（No. 2019-YL12）。
作者简介：张欣，男，在读博士研究生，讲师，主要从事中药药效物质及制剂研究，email：277102745@qq.com　*通信作者：邓翀，男，博士，教授，主要从事中药炮制化学及原理研究，email：393494971@qq.com

1 材料

Bruker-AVANCE400 型核磁共振仪（布鲁克公司）；HH-2 恒温水浴锅（青岛聚创环保集团有限公司）；岛津 LC-6AD 型半制备液相色谱仪（检测器 SPD-20A）；CAPCELL PAK C_{18} MGⅡ 半制备色谱柱（10 mm×250 mm，5 μm）；6550Q-TOF 质谱仪（美国 Agilent Technologies）；Sephadex LH-20（GE 公司）；薄层色谱硅胶 GF_{254}、柱色谱用硅胶（青岛海洋化工厂）；色谱甲醇和乙腈（阿德马斯试剂公司）；甲醇、二氯甲烷、石油醚、乙酸乙酯等均为分析纯（天力化学试剂有限公司），水为娃哈哈纯净水。

八角莲药材于 2019 年 10 月购于陕西省安康市，经陕西中医药大学药学院王薇教授鉴定为小檗科 Berberidaceae 鬼臼属 *Dysosma* 植物八角莲 *Dysosma versipellis*（Hance）M. Cheng ex Ying 的根及根茎，标本（DV2019-1）保存于陕西中医药大学药学院中药标本馆。

2 提取分离

取干燥的八角莲根及根茎 7.2 kg，粉碎后以 90% 乙醇回流提取 3 次，各 2 h、1.5 h 和 1 h。减压回收乙醇，干燥至浸膏，分散于水中，分别用石油醚、乙酸乙酯和水饱和正丁醇萃取 3 次，得到石油醚部位 42.1 g，乙酸乙酯部位 206.3 g 和正丁醇部位 70.7 g。取乙酸乙酯部位 200 g，经硅胶柱色谱分离，以二氯甲烷 - 甲醇梯度洗脱（100∶0、70∶1、40∶1、20∶1、15∶1、8∶1、4∶1 和 2∶1）TLC 检测合并后，得到 F1 ～ F9 共 9 个组分。F2（8.3 g），经葡聚糖凝胶柱色谱分离，甲醇洗脱，得到化合物 **1**（10.2 mg）；F4（15.3 g）经葡聚糖凝胶柱色谱，甲醇洗脱，得到化合物 **6**（122.4 mg）。F5（19.6 g）经葡聚糖凝胶柱色谱分离，甲醇洗脱，TLC 检测合并后，得到 F5-1 ～ F5-5 共 5 个组分。F5-2（1.7 g）经半制备 HPLC 分离，甲醇 - 水（35∶65）洗脱，流速 1 mL • min^{-1}，得到化合物 **2**（47.5 mg，t_R = 50.3 min）；F5-3（0.7 g）经半制备 HPLC 分离，甲醇 - 水（39∶61）洗脱，流速 1 mL • min^{-1}，得到化合物 **4**（13.4 mg，t_R = 31.6 min）；F6（18.0 g）经葡聚糖凝胶柱色谱分离，甲醇洗脱，TLC 检测合并后，得到 F6-1 ～ F6-7 共 7 个组分。F6-3（0.4 g）经半制备液相色谱分离，甲醇 - 水（28∶72）洗脱，流速 1.5 mL • min^{-1}，得到化合物 **5**（16.9 mg，t_R = 41.7 min），F6-5（0.2 g）经半制备 HPLC 分离，甲醇 - 水（25∶75）洗脱，流速 1.0 mL • min^{-1}，得到化合物 **7**（8.0 mg，t_R = 18.4 min）和化合物 **8**（5.6 mg，t_R = 25.6 min）；F7（9.5 g）经葡聚糖凝胶柱色谱分离，甲醇洗脱，TLC 检测合并后，得到 F7-1 ～ F7-4 共 4 个组分。F7-1 经半制备 HPLC 分离，甲醇 - 水（16∶84）洗脱，流速 2 mL • min^{-1}，得到化合物 **3**（7.2 mg，t_R = 14.7 min）。

3 结构鉴定

化合物 **1**：白色粉末，ESI-MS *m/z* 395.1 $[M + H]^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，$CDCl_3$）δ：7.52（1H，s，H-5），7.04（1H，s，H-8），5.52（2H，s，H-11），6.80（1H，d，J = 1.7 Hz，H-2'），6.93（1H，d，J = 8.0 Hz，H-5'），6.76（1H，dd，J = 8.0，1.7 Hz，H-6'），6.03（2H，s，-OCH_2O-），3.79（3H，s，4-OCH_3），4.05（3H，s，6-OCH_3），4.11（3H，s，7-OCH_3）。^{13}C-NMR（100 MHz，$CDCl_3$）δ：134.7（C-1），119.5（C-2），124.7（C-3），147.7（C-4），100.8（C-5），151.8（C-6），150.6（C-7），106.4（C-8），126.0（C-9），130.7（C-10），66.8（C-11），169.8（C-12），128.8（C-1'），111.0（C-2'），147.7（C-3'，4'），108.4（C-5'），123.9（C-6'），101.4（-OCH_2O-），59.9（4-OCH_3），56.3（6-OCH_3），56.0（7-OCH_3）。以上数据与文献报道 [9] 基本一致，故鉴定化合物 **1** 为爵床脂素 A。

化合物 **2**：白色粉末，ESI-MS *m/z* 543.1 $[M + H]^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：8.18（1H，s，H-5），7.00（1H，s，H-8），5.75（1H，d，J = 15.2 Hz，H-11α），5.44（1H，d，J = 15.2 Hz，H-11β），6.91（1H，d，J = 1.6 Hz，H-2'），7.03（1H，d，J = 8.4 Hz，H-5'），6.81（1H，dd，J = 8.4，1.6 Hz，H-6'），6.13（2H，s，-OCH_2O-），3.67（3H，s，6-OCH_3），3.95（3H，s，7-OCH_3），4.74（1H，d，J = 7.1 Hz，H-1"），3.20 ～ 4.02（4H，m，H-2" ～ H5"），3.78（1H，dd，J = 10.5，2.0 Hz，H-6"），3.45（1H，dd，J = 10.5，4.2 Hz，H-6"）。^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：118.8（C-1），123.6（C-2），129.5（C-3），126.5（C-4），101.1（C-5），150.0（C-6），151.5（C-7），111.8（C-8），129.7（C-9），134.7（C-10），67.4（C-11），169.2（C-12），144.9（C-1'），105.5（C-2'），146.9（C-3'），146.9（C-4'），108.0（C-5'），123.6（C-6'），101.7（-OCH_2O-），55.2（6-OCH_3），55.9（7-OCH_3），101.1（C-1"），73.8（C-2"），76.4（C-3"），70.0（C-4"），77.3（C-5"），61.3（C-6"）。以上数据与文献报道 [10] 基本一致，故鉴定化合物 **2**

为山荷叶素葡萄糖苷。

化合物 **3**：白色粉末，ESI-MS *m/z* 675.2 [M＋H]$^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：8.20（1H，s，H-5），6.98（1H，s，H-8），5.67（1H，d，J ＝ 15.2 Hz，H-11α），5.42（1H，d，J ＝ 15.2 Hz，H-11β），6.91（1H，d，J ＝ 1.5 Hz，H-2'），7.02（1H，d，J ＝ 7.8 Hz，H-5'），6.80（1H，dd，J ＝ 1.5，7.8 Hz，H-6'），6.13（2H，s，-OCH_2O-），3.95（3H，s，6-OCH_3），3.67（3H，s，7-OCH_3），4.74（1H，d，J ＝ 7.6 Hz，H-1"），3.18 ～ 4.04（6H，m，H-2" ～ H-6"），4.16（1H，d，J ＝ 6.4 Hz，H-1'''），3.27 ～ 3.62（5H，m，H-2''' ～ H-6'''）。^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：134.8（C-1），119.1（C-2），126.5（C-3），145.0（C-4），101.8（C-5），151.4（C-6），149.9（C-7），105.0（C-8），129.9（C-9），119.1（C-10），67.2（C-11），169.2（C-12），128.3（C-1'），110.0（C-2'），146.8（C-3'），146.7（C-4'），107.9（C-5'），123.5（C-6'），101.1（-OCH_2O-），55.9（6-OCH_3），55.2（7-OCH_3），105.0（C-1"），73.5（C-2"），75.1（C-3"），70.0（C-4"），76.0（C-5"），67.4（C-6"），103.2（C-1'''），70.3（C-2'''），72.5（C-3'''），67.2（C-4'''），64.8（C-5'''）。以上数据与文献报道[11]基本一致，故鉴定化合物 **3** 为 arabelline。

化合物 **4**：白色粉末，ESI-MS *m/z* 523.3 [M＋H]$^+$，$[\alpha]_D^{20}$－ 8.6（*c* 0.14，MeOH）。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：4.50（1H，d，J ＝ 4.0 Hz，H-1），3.34（1H，m，H-2），2.87（1H，m，H-3），5.07（1H，d，J ＝ 9.0 Hz，H-4），7.35（1H，s，H-5），6.51（1H，s，H-8），4.64（1H，dd，J ＝ 8.3，6.4 Hz，H-11α），4.17（1H，dd，J＝8.3，6.4 Hz，H-11β），6.32（2H，s，H-2'，5'），5.99（2H，s，-OCH_2O-），3.68（9H，s，3'，4'，5'-OCH_3），4.30（1H，d，J ＝ 7.1 Hz，H-1"），3.26 ～ 4.02（4H，m，H-2"，3"，4"，5"），3.89（1H，dd，J＝11.1，2.1 Hz，H-6"），3.75（1H，dd，J ＝ 11.1，4.3 Hz，H-6"）。^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：43.1（C-1），44.3（C-2），38.6（C-3），77.1（C-4），109.0（C-5），146.9（C-6），146.6（C-7），108.1（C-8），131.8（C-9），131.3（C-10），70.0（C-11），174.5（C-12），136.4（C-1'），108.3（C-2'，6'），152.0（C-3'，5'），136.4（C-4'），101.1（-OCH_2O-），55.8（3'，5'-OCH_3），60.0（4'-OCH_3），101.8（C-1"），73.4（C-2"），77.1（C-3"），70.0（C-4"），76.6（C-5"），61.1（C-6"）。以上数据与文献报道[12]基本一致，故鉴定化合物 **4** 为鬼臼毒素 -4-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷。

化合物 **5**：无色胶状物，ESI-MS *m/z* 523.3 [M＋H]$^+$，$[\alpha]_D^{20}$ － 30.6（*c* 0.23，MeOH）。^{1}H-NMR（DMSO-d_6，400 MHz）δ：6.80（1H，overlapped，H-2），6.96（1H，d，J＝7.9 Hz，H-5），6.65（1H，overlapped，H-6），4.85（1H，m，H-7），2.44（1H，m，H-8），3.68（2H，m，H-9），6.80（1H，overlapped，H-2'），6.68（1H，d，J ＝ 7.7 Hz，H-5'），6.66（1H，overlapped，H-6'），3.15（1H，dd，J ＝ 4.9，13.4 Hz，H-7'a），2.57（1H，m，H-7'b），2.84（1H，m，H-8'），3.86（1H，d，J ＝ 6.9 Hz，H-9'a），3.56（1H，m，H-9'b），4.67（1H，d，J＝7.4 Hz，H-1"），3.20（1H，m，H-2"），3.17（1H，m，H-3"），3.16（1H，m，H-4"），3.04（1H，m，H-5"），3.55（1H，m，H-6"a），3.37（1H，m，H-6"b）；^{13}C-NMR（DMSO-d_6，100 MHz）δ：134.8（C-1），110.2（C-2），148.8（C-3），145.9（C-4），115.5（C-5），118.1（C-6），81.7（C-7），52.4（C-8），58.7（C-9），134.7（C-1'），112.9（C-2'），147.4（C-3'），144.7（C-4'），115.1（C-5'），120.5（C-6'），32.0（C-7'），41.9（C-8'），71.8（C-9'），100.1（C-1"），73.2（C-2"），77.0（C-3"），69.7（C-4"），76.9（C-5"），60.7（C-6"），55.6（3-OCH_3），55.5（3'-OCH_3）。以上数据与文献报道[13]基本一致，故鉴定化合物 **5** 为落叶松树脂醇 -4-*O*-*β*-*D*- 吡喃葡萄糖苷。

化合物 **6**：黄色粉末，ESI-MS *m/z* 303.1 [M＋H]$^+$。^{1}H-NMR（DMSO-d_6，400 MHz）δ：12.51（1H，br s，5-OH），6.20（1H，d，J ＝ 1.7 Hz，H-6），6.42（1H，d，J ＝ 1.7 Hz，H-8），7.69（1H，d，J＝1.9 Hz，H-2'），6.89（1H，d，J＝8.3 Hz，H-5'），7.54（1H，dd，J ＝ 1.9，8.4 Hz，H-6'）；^{13}C-NMR（DMSO-d_6，100 MHz）δ：147.2（C-2），136.2（C-3），176.3（C-4），161.2（C-5），98.6（C-6），164.3（C-7），93.8（C-8），156.6（C-9），103.5（C-10），122.4（C-1'），115.5（C-2'），147.2（C-3'），145.5（C-4'），115.5（C-5'），120.4（C-6'）。以上数据与文献报道[14]基本一致，故鉴定化合物 **6** 鉴定为槲皮素。

化合物 **7**：黄色粉末，ESI-MS：*m/z* 449.1 [M＋H]$^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，CD_3OD）δ：6.09（1H，d，J＝1.6 Hz，H-6），6.25（1H，d，J＝1.6 Hz，H-8），8.02（2H，d，J＝8.4 Hz，H-2'，6'），6.88（2H，d，

J = 8.4 Hz，H-3'，5'），5.11（1H，d，J = 7.4 Hz，H-1"），3.20 ～ 3.80（6H，H-2" ～ H-6"）。^{13}C-NMR（100 MHz，CD_3OD）δ：158.5（C-2），135.5（C-3），178.9（C-4），161.9（C-5），102.0（C-6），162.9（C-7），96.3（C-8），158.5（C-9），104.9（C-10），123.0（C-1'），132.3（C-2'，C-6'），116.3（C-3'，C-5'），159.1（C-4'），104.2（C-1"），75.9（C-2"），78.3（C-3"），71.5（C-4"），78.5（C-5"），62.8（C-6"）。以上数据与文献报道[15]基本一致，故鉴定化合物 **7** 为山柰酚 -3-*O*-*β*-*D*- 葡萄糖苷。

化合物 **8**：黄色粉末，ESI-MS：*m/z* 449.1 [M + H]$^+$。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO-d_6）δ：12.54（1H，br s，5-OH），6.39（1H，d，J = 1.8 Hz，H-6），6.68（1H，d，J = 1.8 Hz，H-8），7.34（1H，d，J = 2.0 Hz，H-2'），7.28（1H，d，J = 8.4 Hz，H-5'），7.30（1H，dd，J = 8.4，2.0 Hz，H-6'），5.29（1H，br s，Rha-H1），3.13 ～ 3.99（4H，m，Rha-H2 ～ H5），0.83（3H，d，J = 6.1 Hz，Rha-H6）。^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO-d_6）δ：156.9（C-2），134.9（C-3），178.4（C-4），161.5（C-5），98.4（C-6），161.5（C-7），92.7（C-8），156.6（C-9），105.5（C-10），121.1（C-1'），116.2（C-2'），149.0（C-3'），145.7（C-4'），115.9（C-5'），121.1（C-6'），102.3（C-1"），71.7（C-2"），70.5（C-3"），70.8（C-4"），71.1（C-5"），18.0（C-6"）。以上数据与文献报道[16]基本一致，故鉴定化合物 **8** 为槲皮素 -3-*O*-*α*-*L*- 鼠李糖苷。

4 讨论

本研究从八角莲中共分离鉴定了 8 个化合物，其中，5 个木脂素类化合物和 3 个黄酮类化合物，化合物 **1**、**3**、**5** 和 **8** 为首次从八角莲中分离鉴定。查阅文献后发现关于八角莲的系统化学成分研究较少，本研究进一步明确了八角莲的化学成分，为其后续药理活性研究奠定了物质基础。八角莲中报道的主要成分为鬼臼毒素类木脂素，该类物质具有抗肿瘤、抗病毒等多种生理活性，八角莲可作为该类化合物的重要来源，值得后续继续深入研究。

参考文献

[1] 江苏新医学院 . 中药大辞典 [M]. 上海：上海科学技术出版社，1998.

[2] 吕敏，苏艳芳，郭增军，等 . 八角莲属植物化学成分及生物活性研究概况 [J]. 西北药学杂志，2007，22（3）：152-153.

[3] 赵立春，何颖，岳桂华，等 . 八角莲属药用植物化学成分及生理活性研究进展 [J]. 中国民族民间医药，2009，18（13）：37-39.

[4] 马君，江露，陈虎，等 . 中药八角莲的研究进展 [J]. 湖北医药学院学报，2020，39（1）：96-100.

[5] 夏提古丽 • 阿不利孜，贾晓光，熊元君，等 . 八角莲的研究进展 [J]. 新疆中医药，2010，28（3）：69-72.

[6] 陈日道，段瑞刚，邹建华，等 . 八角莲愈伤组织中黄酮苷类化学成分研究 [J]. 中国中药杂志，2016，41（1）：87-91.

[7] 段瑞刚，李军伟，邹建华，等 . 八角莲愈伤组织中木脂素类化学成分研究 [J]. 中国药学杂志，2014，49（15）：1306-1309.

[8] Zheng Y，Xie YG，Zhang Y，et al. New norlignans and flavonoids of *Dysosma versipellis* [J]. Phytochem Lett，2016，16：75-81.

[9] 吴威巍，缪刘萍，王鑫杰，等 . 爵床中一个新的木脂体苷 - 爵床苷 E [J]. 中国医药工业杂志，2012，42（8）：669-670.

[10] 姜飞，田海妍，张建龙，等 . 八角莲的化学成分研究 [J]. 中草药，2011，42（4）：634-637.

[11] Al-Abed Y，Sabri S，Zarga MA. Chemical constituents of the flora of Jordan，part-B. Three new arylnaphthalene lignan glycosides from *haplophyllum buxbaumii* [J]. J Nat Prod，1990，53（5）：1152-1161.

[12] Gottumkkala VS，Dodda R，Jakka K，et al. Justicia lignans：part 7-two new diphyllin glycosides from *Justicia neesii* Ramamoorthy [J]. Indian J Chem，2001，40B：313-319.

[13] 阎新佳，郑威，温静，等 . 白花败酱草的木脂素类化学成分研究 [J]. 中国药学杂志，2017，52（13）：1126-1131.

[14] 李汝鑫，程锦堂，焦梦娇，等 . 钩藤叶化学成分研究 [J]. 中草药，2017，48（8）：1499-1505

[15] 张娇，李真，张丽，等 . 窝儿七化学成分的研究 [J]. 中南药学，2018，16（9）：1225-1228.

[16] 童胜强，黄娟，王冰岚，等 . 肿节风化学成分的研究 [J]. 中草药，2010，41（2）：198-201.

（收稿日期：2022-06-17；修回日期：2022-07-18）

中药材大蓟及混伪品的傅里叶变换红外光谱鉴别研究

单圣男[1, 2]，解玫莹[1, 2]，王兰[1, 2]，魏梦凌[1, 2]，刘想晴[3]，程旺兴[1, 2*]（1.安徽中医药大学药学院，合肥 230012；2.安徽省中医药科学院中药资源保护与开发研究所，合肥 230012；3.安徽中医药高等专科学校药学系，安徽 芜湖 241002）

摘要：目的 建立中药材大蓟及混伪品小蓟、奶蓟草等的傅里叶变换红外光谱（FT-IR）快速鉴别方法。**方法** 采用 FT-IR 法对红外图谱及二阶导图谱进行分析，计算红外光谱相似度，并结合化学计量学对样品进行定性分析，建立 SIMCA 分类模型探究大蓟及混伪品的种间差异。**结果** 大蓟的红外图谱较其他药材图谱红移近 30 个波数，根据 2890 cm^{-1}、2823 cm^{-1} 和 2500 ～ 1750 cm^{-1} 能对 3 种中药材进行初步鉴别；在相似度分析中，大蓟与奶蓟草、小蓟的相似度分别为 0.421 和 0.773，大蓟组间相似性较高（均大于 0.89）。大蓟及混伪品的聚类分析及主成分分析结果显示具有较好的聚集性，SIMCA 在训练集和验证集均有较高的识别正确率。**结论** 建立的 FT-IR 法可为中药大蓟的产地及真伪鉴定提供一种新方法。

关键词：大蓟；混伪品；傅里叶变换红外光谱；二阶导数；化学计量学
中图分类号：O657.33　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2076-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.019

Identification and quality study of *Cirsium japonicum* and its adulterants by FT-IR

SHAN Sheng-nan[1, 2], XIE Mei-ying[1, 2], WANG Lan[1, 2], WEI Meng-ling[1, 2], LIU Xiang-qing[3], CHENG Wang-xing[1, 2*](1. *School of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *Anhui Academy of Chinese Medicine Resources Protection and Development Institute*, *Hefei* 230012; 3. *Department of Pharmacy*, *Anhui Traditional Chinese Medicine College*, *Wuhu Anhui* 241002)

Abstract: Objective To establish a fast identification method of Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) for Chinese herbal medicine *Cirsium japonicum* and its mixed counterfeit products, such as *Cirsium japonicum*, *Cirsium setosum*, and *Silybum marianum*. **Methods** FT-IR was used to analyze the infrared spectrum and second-order conductivity spectrum, calculate the similarity of infrared spectrum, and combined with the pattern recognition technology of cluster analysis and principal component analysis to qualitatively analyze the samples, establishing soft independent modeling of class analogy (SIMCA), to explore the interspecific differences of artichoke and its adulterants. **Results** The infrared spectrum of *Cirsium japonicum* was redshifted by nearly 30 wave positions compared with that of other plants. Three plants could be identified according to 2890 cm^{-1}, 2823 cm^{-1} and 2500 ～ 1750 cm^{-1}. The similarity between *Cirsium japonicum* and *Silybum marianum* and *Cirsium setosum* was 0.421 and 0.773, the similarity between *Cirsium japonicum* groups was higher than 0.89. The cluster analysis and principal component analysis of artichoke and its adulterants have good aggregation, SIMCA pattern has high recognition accuracy in both training set and verification set. **Conclusion** The established FT-IR can provide a new method for the identification of origin and authenticity of *Cirsium japonicum*.

Key words: *Cirsium japonicum*; mixed counterfeit; FT-IR; second derivative; stoichiometry

基金项目：2019 年安徽高校自然科学研究项目（No.KJ2019A1089）。
作者简介：单圣男，女，硕士，主要从事中药质量控制与评价研究，email：3192300842@qq.com　*通信作者：程旺兴，男，博士研究生导师，主要从事中药质量控制与评价研究，email：wxcheng@ ahtcm.edu.cn

我国的中药资源种类丰富多样，且中药材根源繁杂，为了确保中药在临床使用的有效性和安全性，对中药进行鉴别和质量控制十分重要。大蓟为菊科植物蓟（*Cirsium japonicum* Fisch.ex DC.）的干燥地上部分，味甘、苦，性凉，具有凉血止血、散瘀解毒消痈的功效[1]。现代药理学表明大蓟具有凝血止血、降血压、抗肿瘤、抗骨质疏松、抗糖尿病、抑菌等药理活性[2-5]。大蓟的化学成分复杂多样，主要有黄酮及黄酮苷类、长链烯炔醇类、木脂素类、甾醇类和挥发油类等。研究表明，蒙花苷和柳穿鱼叶苷等成分是大蓟发挥凝血止血作用的主要活性物质[6]。大蓟在我国分布广泛，以江苏、浙江、四川分布最多[7]。大蓟既是传统中药，又是现代临床常用中药；市场上存在着大蓟的野生品、栽培品以及部分伪品，目前市场上主要的大蓟混伪品有大蓟同科同属的小蓟及同科不同属的奶蓟草等；蓟属植物在形态上具有很高的相似性，《中国药典》对大蓟的性状描述也仅以营养期为主，使得大蓟的鉴定困难；正品、伪品两者的功效不同，若混淆使用，会直接影响用药安全。因此对大蓟的真伪鉴别显得尤为重要。

常见的真伪鉴别有性状特征鉴别、显微鉴别、理化鉴别、分子鉴别等方法[8]。性状鉴别虽过程简单，成本低廉，但主观和经验主义色彩较浓，会导致通过量低或者结果无法量化，对鉴定结果会有影响。显微鉴别从细微结构进行分析，虽弥补了性状鉴别的不足，但由于植物组织特征的相似性高[9]，凭借显微解剖特征难以解决近缘种药材的鉴定问题。理化鉴别既定性又定量，是评价药材真伪性的特定标准指标，但由于目前中药大多数有效成分不明确，且并非单一成分，因此难以规定一个合理的数值标准，药典中尚有许多药材无定量指标。与传统方法相比，DNA 分子遗传标记技术能直接分析生物的基因型，且这种方式用量非常少，但目前绝大多数动植物的 DNA 序列尚未明确，加上提取的技术烦琐和相关试验的周期长，操作较为困难[10]。傅里叶变换红外光谱法（FT-IR）与传统鉴别方法相比具有快速、无损、易于处理、信噪比高、重复性好等特点[11]，广泛应用于鉴别食品、中草药等混合体系[12]，中药种类不同，其组成的化学物质存在一定差异，运用适当的化学前处理，就能得到含有不同化学组成的混合物[13]，使得中药材在化学物质上的差别或不同表现在红外光谱上，从而达到鉴别中药材的目的。而将不同中药材反映在红外图谱的差异特征转化为可用计算机进行数值分析的量化特征，再用数理统计方法进行分析，即可使红外光谱的应用向定量鉴别方向更进一步[14]。采用 FT-IR 法对大蓟和易混伪品进行鉴定的研究目前尚未见报道，本研究采用 FT-IR 法对大蓟及其混伪品进行鉴别，初步建立大蓟药材的真伪鉴别和质量评价方法。

1　仪器与试药

Nicolet iN10 MX 傅里叶变换红外光谱仪、DTGS 检测器（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；SMART ITR 附件（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；BJ-150 型高速多功能粉碎机（合肥亿心程试验设备有限公司）。无水乙醇（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）。

药材样品来源如表 1 所示，将 39 批样品放入烘箱中干燥，置于打粉机中进行粉碎，80 目筛过筛，备用。药材均由安徽中医药大学杨青山老师鉴定，所收集样品分别为菊科植物大蓟、小蓟和奶蓟草。

表 1　样品信息

Tab 1　Sample information

序号	植物名	收集地点	序号	植物名	收集地点
1	大蓟	安徽宣城 1	21	奶蓟草	河北安国
2	大蓟	安徽宣城 2	22	奶蓟草	广西桂林
3	大蓟	安徽宣城 3	23	奶蓟草	安徽
4	大蓟	安徽宣城 4	24	奶蓟草	甘肃
5	大蓟	安徽宣城 5	25	奶蓟草	河南
6	大蓟	安徽宣城 6	26	小蓟	四川荷花池市场 1
7	大蓟	安徽六安 1	27	小蓟	四川荷花池市场 2
8	大蓟	安徽六安 2	28	小蓟	重庆市场 1
9	大蓟	安徽安庆	29	小蓟	重庆市场 2
10	大蓟	安徽	30	小蓟	安徽亳州
11	大蓟	亳州康美市场 1	31	小蓟	安徽
12	大蓟	亳州康美市场 2	32	小蓟	河南
13	大蓟	江西樟树	33	小蓟	河南南阳
14	大蓟	江苏	34	小蓟	山东济宁
15	大蓟	河北 1	35	小蓟	山东临沂
16	大蓟	河北 2	36	小蓟	山东德州
17	大蓟	河南郑州 1	37	小蓟	山西
18	大蓟	河南郑州 2	38	小蓟	四川成都
19	大蓟	湖北	39	小蓟	河北安国
20	大蓟	云南			

2　方法

2.1　原始红外光谱的获取

取少量样品粉末，置于 SMART ITR 附件的金刚石表面，摊平，旋转附件旋钮将样品固定并压成透明薄片。扫描波数为 4000 ～ 500 cm^{-1}，每次试验对样品粉末进行 16 次扫描累加，扫描分辨率为 4 cm^{-1}，扫描过程中实时扣除二氧化碳和水蒸气的干扰，得到相应的红外光谱图及试验数据。

2.2　原始红外光谱图的预处理

样品的原始红外光谱图夹杂着仪器噪音和一些无效信息，会导致分析结果的准确性和精密度下降，所以应对原始图谱进行预处理，来减少各种干扰的影响。利用仪器自带的 OMNIC 9.0 分析软件，对采集的红外光谱图进行光滑处理、自动基线校正和纵坐标归一化处理得到标准图谱。

2.3　精密度试验

样品连续测定 5 次，得到红外光谱图并计算特征峰波数值 *RSD*，结果显示各特征峰波数值 *RSD* 均小于 1.4%，表明仪器精密度良好。

2.4　稳定性试验

样品每隔 30 min 进行一次光谱采集，测定 5 次，得到红外光谱图并计算特征峰波数值 *RSD*，结果显示各特征峰波数值 *RSD* 均小于 2.6%，表明该方法的稳定性较好。

2.5　重复性试验

将样品平行制备 5 份，分别测定，得到红外光谱图并计算特征峰波数值 *RSD*，结果显示各特征峰波数值 *RSD* 均小于 2.4%，表明方法重复性良好。

3　方法与结果

3.1　大蓟与混伪品的原始红外光谱图

图 1 中 A、B、C 为 39 批样品经光滑处理、自动基线校正和坐标归一化后的红外图谱，从图中可以看出，同一中药材红外光谱图的峰形相似。

3.2　大蓟与混伪品的红外光谱图

图 2 为奶蓟草、小蓟和大蓟的红外光谱图，大蓟及其混伪品的红外光谱图出现多个吸收峰，整体上基本相似，主要吸收峰在 3340 ～ 3270、2890、1705、1025、860 cm^{-1} 左右，吸收峰在 1800 ～ 500 cm^{-1} 内较为密集。3350 ～ 3250 cm^{-1} 频率低谱带宽的吸收峰推测是由氨基（—NH_2）和羟基（—OH）的缔合伸缩振动引起；2975 ～ 2887 cm^{-1} 的吸收峰推测为烷烃 C-H 伸缩振动；2135 cm^{-1} 附近为 C ≡ C 键，1725 ～ 1704 cm^{-1} 附近的吸收峰推测为苯环的碳骨架伸缩振动及 C ≡ N、C ＝ O 等伸缩振动 [15]；1600 ～ 1574 cm^{-1} 为酰胺Ⅱ带特征吸收峰；1051 ～ 1024 cm^{-1} 为 C-O 键伸缩振动；884 ～ 859 cm^{-1} 处推测为＝ CH 的面外弯曲振动吸收峰，636、637 cm^{-1} 为糖环骨架振动的指纹特征峰 [16]。可以看出其中样品的吸收峰的位置和强度具有一定的差异性。

通过对药材样品的红外光谱图分析，其主要特征为：奶蓟草样品在 4000 ～ 1800 cm^{-1} 内只出现了 3 个吸收峰，且在 2890 cm^{-1} 和 2823 cm^{-1} 处为 2 个尖峰，在 2500 ～ 1750 cm^{-1} 处相对平缓，无 C ≡ C 键，由此可以与大蓟、小蓟区分。小蓟在 2897 cm^{-1} 附近仅有 1 个吸收峰，且在 1250 cm^{-1} 附近出现多个明显的小峰。大蓟样品的红外光谱与伪品相比整体红移 30 个波数左右，可作为这 3 种药材的初步判断依据。

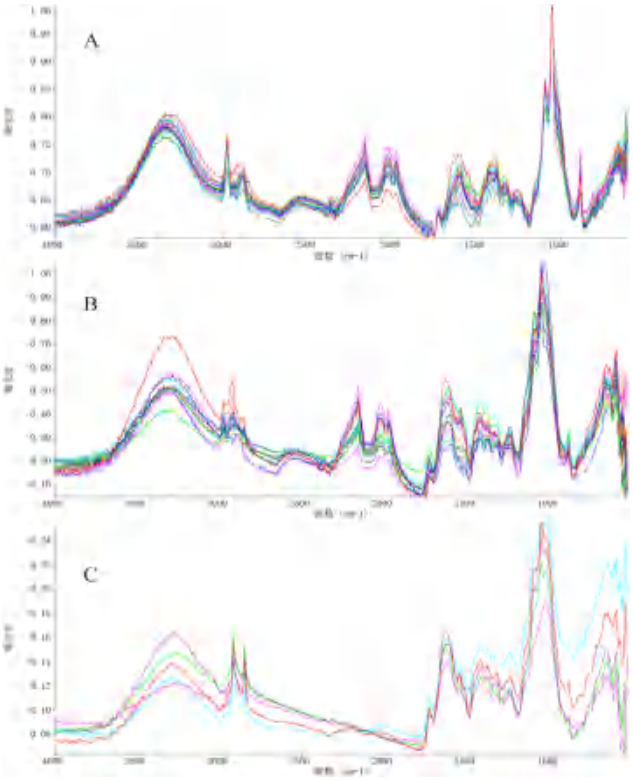

图 1　大蓟及混伪品的红外光谱汇总图

Fig 1　Infrared spectrum summary of *Cirsium japonicum* and its adulterants

A. 大蓟（*Cirsium japonicum*）；B. 小蓟（*Cirsium setosum*）；C. 奶蓟草（*Silybum marianum*）

3.3　大蓟及混伪品的二阶导数红外光谱

大蓟与混伪品的红外光谱图具有一定的差别，利用二阶导数红外光谱图可以提高谱图的分辨率，采用二阶导对大蓟、小蓟和奶蓟草的红外光谱图进行分析，可以使吸收峰的宽度变为原始宽度的 1/3，从而很好地将原始图形中重叠的峰分离，采用 Origin 进行二阶导，Savitsky-Golay 卷曲平滑法处理，得到特征峰明显、噪音小的二阶导图谱，进而对 3 种药材的图谱做进一步的观察；在红外图谱中，由于在 1800 cm^{-1} 之前会受—OH 的影响，而 800 cm^{-1} 之后基线漂移过大 [17]，因此选择 1800 ～ 800 cm^{-1} 进行二阶导处理。

大蓟与伪品在 1800 ～ 800 cm^{-1} 处的二阶导数红外光谱图见图 3，三者峰形和峰强均有明显差异，可用于鉴别。在 1800 ～ 1300 cm^{-1} 和 1200 ～ 800 cm^{-1} 处可以观察到 3 种中药材在二阶导图谱上的区别：区域 1 中，奶蓟草的吸收峰

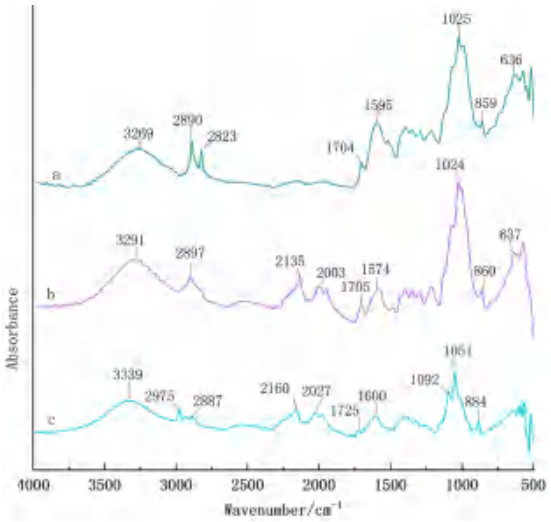

图 2　大蓟及混伪品的红外光谱图

Fig 2　Infrared spectra of *Cirsium japonicum* and its adulterants

a. 奶蓟草（*Silybum marianum*）；b. 小蓟（*Cirsium setosum*）；c. 大蓟（*Cirsium japonicum*）

明显比大蓟、小蓟吸收峰强，且在区域 2 中有 3 个明显向上的锯齿峰；小蓟与奶蓟草在区域 3 处的峰形不同，小蓟有 2 个向上锯齿峰，且在区域 5 中的吸收峰更强；从区域 4 和 6 中可以看出在此范围内大蓟的吸收峰相对其他图谱红移，且在 1800 ～ 800 cm^{-1} 处的吸收峰相对平缓。

3.4　大蓟及混伪品的相似度分析

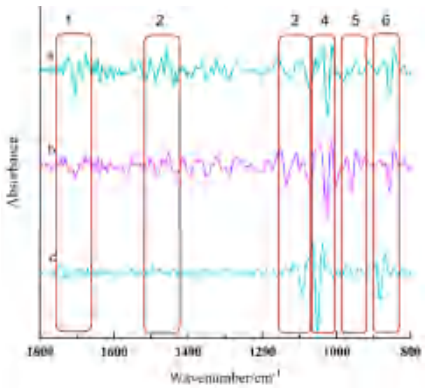

图 3　大蓟及混伪品的二阶导图谱

Fig 3　Second order guide map of *Cirsium japonicum* and its adulterants

a. 奶蓟草（*Silybum marianum*）；b. 小蓟（*Cirsium setosum*）；c. 大蓟（*Cirsium japonicum*）

采用 IBM SPSS26.0 统计对不同产地的大蓟进行相似度分析，结果见表 2；20 批大蓟的相似度均在 0.89 以上；大蓟与小蓟、奶蓟草药材进行相似度分析，结果见表 3，可以看出，大蓟与奶蓟草和小蓟的相似度分别为 0.421 和 0.773，奶蓟草与小蓟的相似度为 0.717；由此可知，不同产地大蓟的相似度均高于大蓟与奶蓟草或小蓟的相似度，可根据相似度对大蓟与伪品进行区分；其中大蓟和奶蓟草相似度较低，提示大蓟和奶蓟草的化学成分存在明显差异。

表 2　大蓟相似度结果

Tab 2　Similarity of *Cirsium japonicum*

	安徽亳城1	云南	湖北	河北1	安徽亳城2	河南郑州	安徽	康美市场1	安徽亳城3	安徽安庆	安徽六安1	安徽六安2	河南中原区	江西樟树	安徽亳城4	河北2	安徽亳城5	江苏	康美市场2	安徽亳城6
安徽亳城1	1.000																			
云南	0.933	1.000																		
湖北	0.912	0.987	1.000																	
河北1	0.919	0.936	0.892	1.000																
安徽亳城2	0.950	0.900	0.898	0.961	1.000															
河南郑州	0.925	0.905	0.894	0.948	0.916	1.000														
安徽	0.972	0.944	0.922	0.944	0.935	0.910	1.000													
康美市场1	0.973	0.905	0.954	0.983	0.916	0.900	0.910	1.000												
安徽亳城3	0.945	0.913	0.918	0.933	0.977	0.902	0.930	0.952	1.000											
安徽安庆	0.926	0.912	0.950	0.952	0.915	0.900	0.959	0.900	0.962	1.000										
安徽六安1	0.972	0.979	0.913	0.903	0.924	0.919	0.921	0.919	0.995	0.913	1.000									
安徽六安2	0.934	0.915	0.925	0.968	0.954	0.936	0.962	0.976	0.921	0.966	0.972	1.000								
河南中原区	0.900	0.934	0.964	0.984	0.933	0.990	0.900	0.990	0.944	0.978	0.945	0.979	1.000							
江西樟树	0.926	0.912	0.950	0.952	0.915	0.900	0.959	0.900	0.962	0.970	0.913	0.966	0.978	1.000						
安徽亳城4	0.918	0.900	0.896	0.963	0.909	0.912	0.942	0.972	0.937	0.947	0.950	0.958	0.958	0.947	1.000					
河北2	0.949	0.942	0.926	0.983	0.930	0.900	0.968	0.900	0.933	0.960	0.946	0.967	0.972	0.960	0.974	1.000				
安徽亳城5	0.923	0.963	0.937	0.978	0.972	0.951	0.977	0.951	0.963	0.977	0.954	0.959	0.941	0.977	0.953	0.958	1.000			
江苏	0.923	0.929	0.921	0.992	0.933	0.908	0.927	0.998	0.936	0.974	0.946	0.983	0.979	0.974	0.972	0.988	0.958	1.000		
康美市场2	0.919	0.959	0.938	0.933	0.883	0.954	0.925	0.954	0.872	0.921	0.906	0.955	0.944	0.921	0.891	0.925	0.979	0.943	1.000	
安徽亳城6	0.962	0.919	0.931	0.970	0.927	0.981	0.966	0.981	0.919	0.943	0.947	0.969	0.957	0.943	0.973	0.979	0.969	0.979	0.910	1.000

3.5　大蓟及混伪品的聚类分析模型的建立

使用 SPSS 26.0 对样品的红外光谱图进行聚类分析，结果见图 4；从图中可知，在欧氏距离为 20 时，39 批样品被分为两类，大蓟单独聚为一类，小蓟和奶蓟草聚为一类；当欧氏距离为 10 时，可将大蓟与混伪品分为 3 类，奶蓟草聚为一类，小蓟聚为一类，大蓟聚为一类；当欧式距离为 3 时，小蓟样品具有明显的地域倾向，同一产地的药材聚类时距离较近。

3.6　大蓟及混伪品的主成分分析

采用 PCA 法对大蓟及易混伪品的 FT-IR 图进行主成分分析，选取红外光谱在 1800 ～ 800 cm^{-1} 内的数据，利用 Origin 软件处理，得出主成分分

表 3　大蓟及混伪品的相似度结果

Tab 3　Similarity of *Cirsium japonicum* and its adulterants

植物名	大蓟	奶蓟草	小蓟
大蓟	1.000		
奶蓟草	0.421	1.000	
小蓟	0.773	0.717	1.000

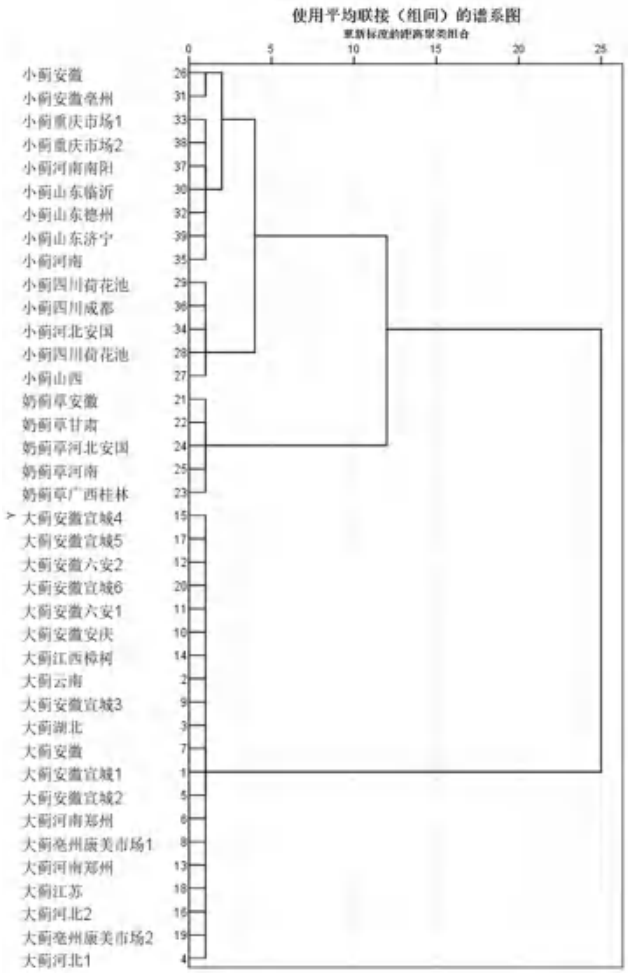

图 4　大蓟及混伪品的聚类分析图

Fig 4　Cluster analysis of *Cirsium japonicum* and its adulterants

析结果，根据特征值≥ 1 的原则 [18]，确定 2 个主成分，结果见表 4。主成分 1（PC1）的贡献率为 94.25%，主成分 2（PC2）的贡献率为 4.28%，前 2 个主成分 PC1 和 PC2 可以解释原变量 98.53% 的信息。即选取前 2 个主成分 PC1 和 PC2 绘制得分图，见图 5，横坐标代表主成分 1（PC1）的得分值，纵坐标代表主成分 2（PC2）的得分值，非常直观地观察到各类样本在主成分空间的分布情况。

表 4　大蓟及混伪品的主成分分析表

Tab 4　Principal component analysis of *Cirsium japonicum* and its adulterants

主成分数	特征值	方差百分比 /%	累计贡献率 /%
1	6204.71	94.25	94.25
2	282.05	4.28	98.53

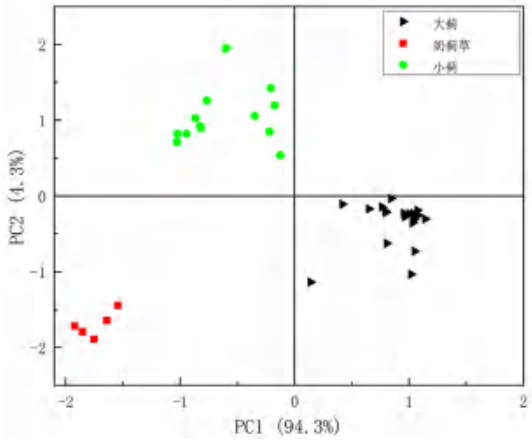

图 5　大蓟及混伪品的主成分分析图

Fig 5　Principal component analysis of *Cirsium japonicum* and its adulterants

由图 5 可知，大蓟和奶蓟草明显集中地聚为单独的两组，组间互不交叉，大蓟主成分 1 和 2 得分散点全部集中在第四象限，奶蓟草主成分 1 和 2 得分散点全部集中在第三象限，小蓟主成分 1 和 2 得分散点分布在第二象限，表明大蓟和奶蓟草在主成分空间图中载荷量有显著差异。小蓟分布较为分散，可能是不同产地的小蓟质量存在差异，该结果与聚类分析结果一致。

3.7　簇类独立软模式法（SIMCA）分类模型的建立与鉴别分析

通过 PCA 分析大蓟与混伪品有明显的聚类趋势，因此建立大蓟、小蓟与奶蓟草的分类识别模型，在 PCA 分析的基础上，39 批样品中随机选择 15 个大蓟、11 个小蓟和 3 个奶蓟草组成训练集，其余 5 个大蓟，3 个小蓟和 2 个奶蓟草作为验证集，建立 SIMCA 分类模型；模型效果用识别率和拒绝率表示，识别率是指某类样品有多少落在该模型的区域内，而拒绝率是指某类样品模型对于不属于该类的位置样品的拒绝程度 [19]。从表 5 中可以看出，在训练集中大蓟和奶蓟草 SIMCA 分类模型对样本的识别正确率为 100%，小蓟模型对样本的识别率为 90.91%，大蓟的拒绝率为 92.86%，有 1 个小蓟样品落在了大蓟模型范围内，使该模型出现了误判；在验证集中大蓟与奶蓟草模型、小蓟模型的识别率、拒绝率均为 100%。SIMCA 分类模型聚类分析图见图 6，大蓟与混伪品具有较高的独立性，基本实现完全分割。一般来说，SIMCA 分类模型的正确识别率在 60% 以上，说明该模型可行 [20]。因此，本研究建立的大蓟及混伪品的 SIMCA 分类识别模型可行。

表 5　SIMCA 模式的训练集与验证集结果

Tab 5　Training set and verification set of SIMCA mode

样品	主成分数	训练集		验证集	
		识别率 /%	拒绝率 /%	识别率 /%	拒绝率 /%
大蓟	4	100	92.86	100	100
小蓟	4	90.91	100	100	100
奶蓟草	1	100	100	100	100

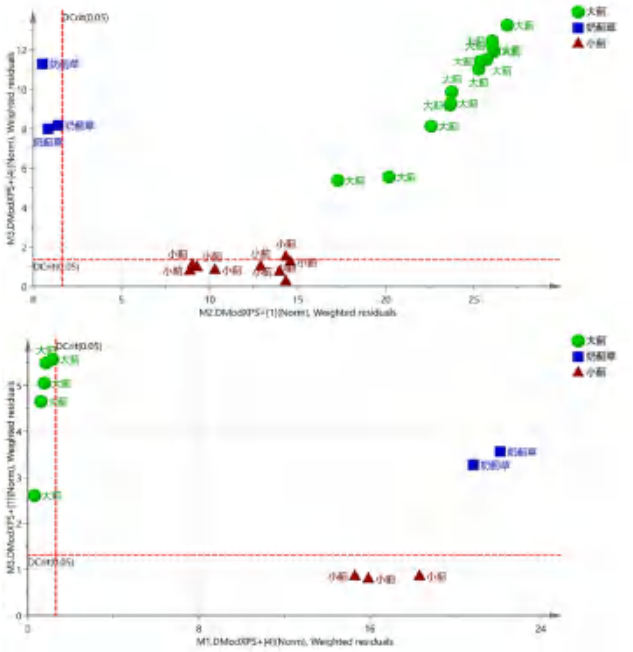

图 6　大蓟及混伪品训练集（A）和验证集（B）的 SIMCA 模式聚类图

Fig 6　SIMCA pattern clustering diagram of *Cirsium japonicum* and its adulterants training（A）andverification（B）set samples

4　讨论

本研究选取大蓟及混伪品小蓟、奶蓟草作为研究对象，对其进行鉴别研究，建立了一种方便、快捷、无损害的鉴别方法。在对红外光谱图的分析中发现，由于样品属于近缘物种，化学结构和化学组成都比较相似，因此原谱图之间的差异不是很明显；对红外图谱选取 1800 ～ 800 cm^{-1} 进行二阶导处理和相似度分析，能将大蓟、小蓟和奶蓟草区分。本研究采用了 FT-IR 技术结合聚类分析和 SIMCA 分类模式对 39 批大蓟及其混伪品进行分析研究，较好地实现了大蓟与小蓟、奶蓟草之间的分类鉴定。该方法避免了复杂的样品前处理过程，具有方便、快捷、准确等优点，有一定的可靠性和实用性，为大蓟及其混伪品的鉴别与质量研究提供了科学理论依据，具有广阔的应用前景。

参考文献

[1]　中国药典 2020 版 . 一部 [S]. 2020：26.

[2]　马新称，黄燕秋，肖雪，等 . 基于网络药理学预测大蓟治疗高血压的作用机制 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2019，21（5）：867-874.

[3]　姚亮亮，王晓珊，何军伟，等 . 大蓟炭中香叶木素诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡及其机制研究 [J]. 天然产物研究与开发，2017，29（5）：767-773.

[4]　李敏，苗明三 . 大蓟的化学、药理及临床应用特点 [J]. 中医学报，2016，31（2）：262-265.

[5]　姜力荣，姬志勤 . 大蓟地上组织化学成分及其抗真菌活性 [J]. 农药学学报，2018，20（3）：316-322.

[6]　陈叶青 . 凉血止血药炒炭时黄酮类成分的变化规律与止血作用的相关性研究 [D]. 南京：南京中医药大学，2016.

[7]　中国植物志编委会 . 中国植物志 [M]. 北京：科学出版社，1987：103.

[8]　朱昌丰，曾枝东 . 鉴别中药饮片真伪的意义与方法 [J]. 北方药学，2019，16（2）：10-11.

[9]　袁庆军，张文婧，姜丹，等 . 论中药分子鉴定的方法和原则 [J]. 植物分类与资源学报，2012，34（6）：607-613.

[10]　王钰，杨茜岚，梁政安，等 . 关于中药材真伪品、中药饮片鉴别技术的总结 [J]. 科学大众（科学教育），2016（12）：191-192.

[11]　张悦，陈莹，郭怡博，等 . 基于化学计量学的金钗石斛不同加工品和干燥品的红外光谱分析 [J]. 中南药学，2021，19（3）：431-438.

[12]　穆士乐 . 傅里叶红外光谱技术在熟制虾肉真伪鉴别及掺伪行为分析中的应用 [J]. 中国调味品，2019，44（11）：148-150.

[13]　张维方，樊克锋，雷敬卫，等 . 地黄药材的红外指纹图谱及多元统计分析 [J]. 光谱学与光谱分析，2021，41（11）：3392-3398.

[14]　康庆伟，邓菲，徐娟，等 . 基于红外技术对常用中药饮片真伪鉴别的研究 [J/OL]. http://cnki.scstl.org/KCMS/detail/detail.aspx?filename=SNAD000001690121&dbcode=SNAD.

[15]　王柯入，王成辉，李子仪，等 . 红外光谱结合化学计量学鉴别悬钩木主流品种 [J]. 中成药，2022，44（1）：142-147.

[16]　杨红霞，马芳，杜玉枝，等 . 藏药川西獐牙菜及其不同提取物的红外光谱分析 [J]. 光谱学与光谱分析，2014，34（11）：2973-2977.

[17]　李美雎，刘叶，尚军，等 . 青海不同产地羌活红外光谱分析 [J]. 青海草业，2021，30（2）：14-19.

[18]　吕雪娟，潘璐怡 . 不同品种茄子皮的红外光谱分析 [J]. 光谱学与光谱分析，2020，40（S1）：73-74.

[19]　吴鹏，宋海燕，杨威，等 . 基于近红外光谱的鸡蛋产地溯源 [J]. 食品工业科技，2020，41（22）：227-231.

[20]　杨佳，武彦文，李冰宁，等 . 近红外光谱结合化学计量学研究芝麻油的真伪与掺伪 [J]. 中国粮油学报，2014，29（3）：114-119

（收稿日期：2022-01-20；修回日期：2022-03-04）

三种快速检测大黄炭炮制程度的光谱技术的比较

徐茂玲[1]，孙静[2]，杨丽[2]，陈建波[3*]（1. 天津医科大学总医院药剂科，天津　300052；2. 北京中医药大学中药学院，北京　102488；3. 北京中医药大学生命科学学院，北京　102488）

摘要：目的　比较可见、近红外、中红外三种光谱技术用于大黄炭炮制程度评价的可行性，为大黄炭及其他炭药的快速质量检测提供参考。**方法**　改变加热温度（180 ～ 320 ℃）和加热时间（10 ～ 60 min）制备不同炮制程度的大黄炭，结合颜色特征与成分含量将大黄炭按照炮制程度分组，分别使用可见、近红外、中红外三种光谱技术对不同组大黄炭进行鉴别分析。**结果**　可见光谱显示大黄炭炮制程度增加时对可见光的反射能力降低。基于近红外光谱的 SIMCA 分类模型对不同炮制程度的大黄炭鉴别准确度最高。中红外光谱能够解释大黄炭炮制程度增加时常量成分变化规律。**结论**　近红外光谱可以直接检测大黄切片，反映炭化程度增加时物理与化学性质的变化，可用于大黄炭炮制程度快速评价与炮制过程在线监测。中红外光谱可以直接检测大黄粉末，识别不同炮制程度大黄炭的常量成分特征，可作为大黄炭炮制终点鉴别标准的指标之一。

关键词：大黄炭；炮制终点；可见光谱；近红外光谱；中红外光谱
中图分类号：R284　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2082-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.020

Three spectroscopic methods for the rapid assessment of the processing degree of rhubarb charcoal

XU Mao-ling[1], SUN Jing[2], YANG Li[2], CHEN Jian-bo[3*] (1. *Department of Pharmacy*, *General Hospital*, *Tianjin Medical University*, *Tianjin* 300052; 2. *School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488; 3. *School of Life Sciences*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488)

Abstract: Objective To rapidly assess the quality of rhubarb charcoal and other carbon medicine by comparing the feasibility of visible, near-infrared (NIR) and mid-infrared (MIR) spectroscopic techniques in evaluating the processing degree of rhubarb charcoal. **Methods** Rhubarb charcoal samples processed to different degrees were prepared by altering the baking temperature (180 ～ 320 ℃) and time (10 ～ 60 min). These rhubarb charcoal were divided into several groups according to the processing degrees by the color and composition features. Visible, NIR and MIR spectroscopic techniques were used to discriminate the rhubarb charcoal with different processing degrees. **Results** With the increase of the processing degree, the reflectance of visible lights on the surface of rhubarb charcoal slices decreased. The NIR-based SIMCA model showed the best identification accuracy of rhubarb charcoal samples processed to different degrees. Bulk chemical changes of rhubarb charcoal during the process were revealed by MIR spectroscopy. **Conclusion** NIR spectroscopy can measure the rhubarb charcoal slices directly and indicate both the physical and chemical changes as the processing degree increases. NIR spectroscopy can be used in the rapid assessment of the processing degree and the on-line monitoring of the processing process of rhubarb charcoal. MIR spectroscopy can measure the rhubarb charcoal powders directly and assign the organic and inorganic characteristics of rhubarb charcoal with different processing degrees. It is probable to

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 82003943）。
作者简介：徐茂玲，女，主管药师，主要从事中药质量与药品调剂研究，email：xumaolingx@163.com　*通信作者：陈建波，男，博士，主要从事中药分析与质量评价方法研究，email：chenjianbo@bucm.edu.cn

include MIR spectroscopy in the identification criterion for the processing endpoint of the rhubarb charcoal.

Key words: rhubarb charcoal; processing endpoint; visible spectroscopy; near-infrared spectroscopy; MIR spectroscopy

大黄为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. 或药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的根和根茎，具有泻下攻积、清热泻火、凉血解毒、逐瘀通经、利湿退黄等功效 [1]，是苦寒中药的典型代表。为了缓和生品的苦寒之性、减轻峻烈的泻下作用，大黄经常被炮制为各种饮片，例如酒大黄、熟大黄、大黄炭、清宁片等 [2-3]。其中，大黄炭具有凉血化瘀止血的功效，常用于血热有瘀出血症 [1]，对于上消化道出血、慢性炎症性肠病、慢性肾衰竭等急重症和难治疾病也有显著疗效 [3-5]。大黄炭炮制不足时，苦寒药性不能有效缓和；炮制过度时，药效物质严重损失，还可能生成新的毒性成分。因此，精确控制炮制程度，准确评价饮片质量，才能保证大黄炭临床使用的安全性、有效性与一致性。

现行《中国药典》规定大黄炭总蒽醌含量不低于 0.90%，游离蒽醌含量不低于 0.50%[1]。本课题组在前期调研中发现，不同饮片企业的大黄炭炮制工艺差异很大，炮制温度在 180 ～ 400 ℃，炮制时间在 5 ～ 50 min；不同企业或不同批次产品的总蒽醌含量最高相差 3 倍，游离蒽醌含量最高相差 5 倍；与各自使用的大黄药材相比，不同企业的大黄炭饮片的总蒽醌、游离蒽醌及结合蒽醌含量变化各异。由此可见，目前市场上大黄炭炮制程度与化学成分差异很大，现行标准难以保证饮片质量一致性。这种现象在大黄炭研究领域也有体现，虽然文献报道一致认为大黄炒炭后结合蒽醌、番泻苷等含量降低，但是游离蒽醌与没食子酸含量变化结论不一致 [6-9]。

本课题组前期研究表明，大黄炭活性成分在炮制过程中存在单向变化与双向变化两种模式 [10-11]：结合蒽醌、番泻苷等含量随炭化程度增加而持续减少，游离蒽醌、没食子酸、5-羟甲基糠醛等含量表现出先增后减的规律。造成生产和科研中大黄炭与大黄药材游离蒽醌含量相对高低混乱主要是因为目前大黄炭炮制终点指标不够明确、合理，导致饮片炮制程度不一致。虽然有研究表明游离蒽醌含量增加有利于提高大黄炭的抗炎、抗氧化活性 [12-13]，但是游离蒽醌含量达到极大值时大黄炭抗炎活性并非最高 [13]，性状特征也与传统经验标准有所区别 [11，14]。这也说明，大黄炭药效物质与作用机制还需要继续深入研究，不能简单将游离蒽醌含量达到极大值作为大黄炭炮制的终点指标。

颜色是目前大黄炭炮制终点判断的关键经验指标。现行药典规定生大黄外表皮“黄棕色或棕褐色”、切面“黄棕色至淡红棕色”，而大黄炭应炒至“表面焦黑色，内部焦褐色”[1]。各省级中药饮片炮制规范也采用颜色作为大黄炭的质量指标之一，饮片表面描述为炭黑色、黑褐色、焦褐色不等，内部描述为棕褐色、深褐色、深黄色不等。这表明大黄炭终点颜色判断具有相当的模糊性与波动性。有研究使用数码相机表征不同温度、不同时间炮制的大黄炭饮片及其粉末的红绿蓝值（RGB 值）[15]，表明客观量化的颜色数值有利于提高判断结果的可控性。大黄粉末显微特征主要为草酸钙晶体、淀粉粒和导管，研究表明炒炭后草酸钙簇晶数量降低、破碎程度增加，淀粉粒复粒减少、部分糊化与炭化，导管数量减少、部分呈棕黄色或者炭化 [16]。上述结果表明，除了蒽醌等有机小分子，颜色、有机和无机基质成分也有可能作为大黄炭炮制终点的客观量化指标。

在前期研究中，本课题组综合使用颜色指标、有机小分子指标、有机大分子和无机物指标将不同温度、不同时间烘制的大黄炭划分为不同炮制程度组 [11]。这种做法虽然可以获得较为充分的炮制程度评价参数，但是检验工作量大，物质和时间成本较高。因此，本研究尝试使用可见光谱、近红外光谱（NIR）、中红外光谱（MIR）建立简便快速的大黄炭炮制程度评价方法，在保证大黄炭临床使用安全性、有效性与一致性的前提下，尽可能降低检测成本、提高检测效率。

1 材料与方法

1.1 材料及其炮制

大黄药材采集于甘肃省甘南州卓尼县，经中国中药协会张世臣教授鉴定为蓼科植物唐古特大黄 *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. 的干燥根和根茎。实验室烘箱预热到设定烘制温度后，平铺放入约 100 g 大黄药材片（厚度 4 ～ 6 mm），立即开始计时，到设定烘制时间后取出放凉。大黄药材片在 180、200、220 和 240 ℃分别烘制 10、

20、30、40、50、60 min，在 280 ℃ 和 320 ℃ 分别烘制 10、20、30 min，共制备 30 份不同炮制程度的大黄炭片。可见光谱与 NIR 测试直接使用大黄药材与大黄炭片，MIR 测试使用通过药典四号筛的大黄药材与大黄炭粉末。

1.2　可见光谱测试

样品可见光谱测试使用 Lambda 950 UV/Vis/NIR 分光光度计（美国 PerkinElmer 公司），配有 150 mm 插入式积分球附件。大黄药材与大黄炭片直接置于积分球反射测量窗口，可见光谱扫描范围 380 ～ 780 nm，狭缝宽度 4 nm，数据点间隔 10 nm，积分时间 1 s。使用 Spectralon 参考白板（美国 Labsphere 公司）进行光谱背景校正。每个样品取样 3 次进行测试，取平均值，以反射率为光谱纵坐标。

1.3　NIR 测试

样品 NIR 测试所用仪器为 Frontier FT-IR/NIR 红外光谱仪（美国 PerkinElmer 公司），配有外置式近红外积分球附件。大黄药材与大黄炭片直接置于积分球反射测量窗口，光谱扫描范围 10 000 ～ 4000 cm^{-1}，光谱分辨率 16 cm^{-1}，每张光谱累加扫描 32 次。使用 Spectralon 参考白板进行光谱背景校正。每个样品取样 3 次进行测试，取平均值以反射吸光度为光谱纵坐标。

1.4　MIR 测试

样品 MIR 测试所用仪器为 Frontier FT-IR/NIR 红外光谱仪，配有内反射晶体为金刚石的通用型衰减全反射附件（ATR 附件）。大黄药材与大黄炭粉末直接置于 ATR 附件的内反射晶体表面，用装置自带压杆保证大黄粉末与晶体表面紧密接触 [压力显示值为（140±5）]，光谱扫描范围 4000 ～ 650 cm^{-1}，光谱分辨率 4 cm^{-1}，每张光谱累加扫描 16 次。使用空气进行光谱背景校正，扫描过程中自动扣除水蒸气和二氧化碳干扰，扫描完成后对光谱强度进行 ATR 校正（接触因子设为 0）。每个样品取样 3 次进行测试，取平均值以吸光度为光谱纵坐标。

1.5　数据处理与分析

可见光谱、NIR、MIR 的基本谱图数据处理使用 Spectrum v10.4 软件（美国 PerkinElmer 公司），PCA 分析使用 MATLAB R2016b 软件（美国 The MathWorks 公司），SIMCA 建模使用 Assure-ID v4.2 软件（美国 PerkinElmer 公司）。

2　结果

2.1　基于粉末色度与化学成分的大黄炭炮制程度分组

本研究所用 31 份大黄药材与不同炮制程度大黄炭样品粉末的颜色指标（色差仪测量的 L*、a*、b* 色度值）、有机小分子指标（高效液相色谱测量的结合蒽醌、游离蒽醌、番泻苷、没食子酸、5- 羟甲基糠醛等 14 种成分含量）、有机大分子和无机物指标（红外光谱反映的淀粉、纤维素、草酸钙等成分信息）参考文献 [11]。样品按照炮制程度分组时，首先根据药典与炮制规范关注的表面与断面颜色，分为表里均未变黑、只有表面变黑、表里均已变黑的 3 个水平；然后根据游离蒽醌含量水平，将表里均未变黑的样品再分为游离蒽醌含量相对于大黄药材没有明显变化、有明显增加的两类。基于上述方法，所有样品按照炭化程度从轻到重可以划分为 G1、G2、G3、G4 四组（代表性样品如图 1 所示）。

图 1　不同炮制程度大黄炭的代表性样品

Fig 1　Typical samples of rhubarb charcoal processed to different degrees

① G1 组包含原药材、180 ℃烘 10 ～ 60 min、200 ℃ 烘 10 ～ 30 min、220 ℃ 烘 10 ～ 20 min、240 ～ 320 ℃烘 10 min 共 15 个样品，这些样品表面颜色没有明显变深，结合蒽醌与番泻苷含量较高，游离蒽醌、没食子酸与 5- 羟甲基糠醛含量较低，纤维素、淀粉等有机大分子较多；

② G2 组包含 200 ℃烘 40 ～ 60 min、220 ℃烘 30 ～ 50 min、240 ℃烘 20 ～ 30 min 共 8 个样品，这些样品表面颜色加深但是没有变黑，结合蒽醌与番泻苷含量较低，游离蒽醌、没食子酸与 5- 羟甲基糠醛含量较高，纤维素、淀粉等有机大分子减少；

③ G3 组包含 220 ℃烘 60 min、240 ℃烘 40 min、280 ℃与 320 ℃烘 20 min 共 4 个样品，这些样品表面变黑、断面尚未变黑，结合蒽醌与番泻苷含量极低，游离蒽醌、没食子酸与 5- 羟甲基糠醛含量较低（与 G1 组相当），纤维素、淀粉等有机大分子进一步减少；

④ G4 组包含 240 ℃烘 50 ～ 60 min、280 ℃

与 320 ℃烘 30 min 共 4 个样品，这些样品表面与断面均变黑，几乎不含结合蒽醌、番泻苷、游离蒽醌、没食子酸与 5- 羟甲基糠醛等有机小分子，也几乎不含纤维素、淀粉等有机大分子，部分草酸钙分解为碳酸钙。

根据上述各组样品的颜色与成分特征，基本可以确定 G1 组炮制程度为“不及”、G4 组炮制程度为“太过”，而 G2 组和 G3 组炮制程度是否“适中”还需进一步的药效实验确定。

2.2　不同炮制程度大黄炭的可见光谱分析

已有研究使用色差仪等检测饮片颜色，但通常需要将样品制成粉末，而片状或块状饮片样品的直接分析有利于提高检测效率，还可能实现炮制过程的原位监测。难点在于，中药饮片表面一般是粗糙且不平整的，所以各角度均存在反射光线且比例不固定。本研究使用高性能的可见光谱仪和积分球，尽可能充分收集饮片表面反射光线，可以提高光谱测量精度，使片状或块状中药饮片样品可直接置于积分球的反射测量窗口进行测试。

如图 2 所示，炮制程度较轻的 G1 组大黄炭饮片在可见光的长波长侧反射率较高，与该组饮片表面主要为黄棕色的性状特征是相符的。随着炮制程度的增加，大黄炭饮片表面反射率不断下降，最后基本不反射可见光，这对应于大黄炭饮片表面颜色逐渐加深，最终变为黑色。对 380 ～ 780 nm 内的不同炮制程度大黄炭可见光谱进行主成分分析（PCA），结果第一主成分解释了 98.3% 的光谱方差，第二主成分解释了 1.1% 的光谱方差。如图 3 所示，不同炮制程度大黄炭可见光谱差异集中体现在主成分 1 上，而主成分 2 对于炮制程度鉴别几乎没有意义。也就是说，大黄炭炮制程度变化引起的可见光谱不同波长处变化是高度相关的，理论上一个参数（例如主成分 1 得分或者单波长反射率）就能反映不同炮制程度大黄炭可见光谱几乎全部差异。

2.3　不同炮制程度大黄炭的 NIR 分析

如图 2 和图 4 所示，大黄炭的炮制程度增加时，可见光谱的长波长侧反射率逐渐下降，NIR 的高波数侧反射率也逐渐下降（即反射吸光度逐渐上升）。此外，大黄炭的炮制程度增加时密度逐渐降低（质变轻），也可能影响 NIR 的基线形状。所以，随着炮制程度的增加，大黄炭 NIR 的高波数侧反射吸光度逐渐上升，且基线倾斜程度越来越大。如图 4 所示，随着炮制程度的增加，大黄炭 NIR 的低波数侧反射吸光度逐渐降低，吸收峰数目减少、位置移动，说明大黄炭炮制程度增加时的有机物种类变化与含量降低。

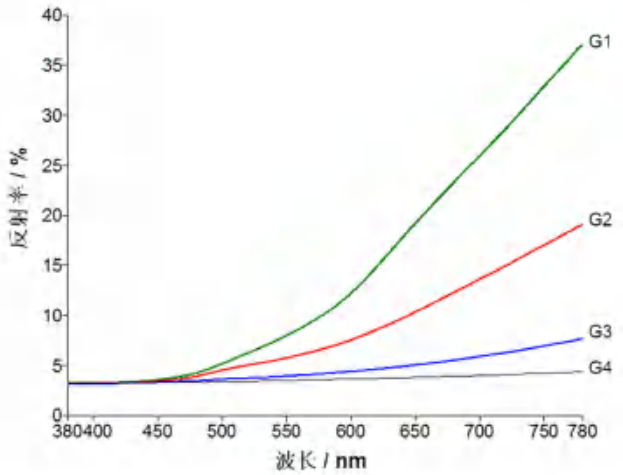

图 2　不同炮制程度大黄炭的平均可见光谱

Fig 2　Average visible spectra of rhubarb charcoal processed to different degrees

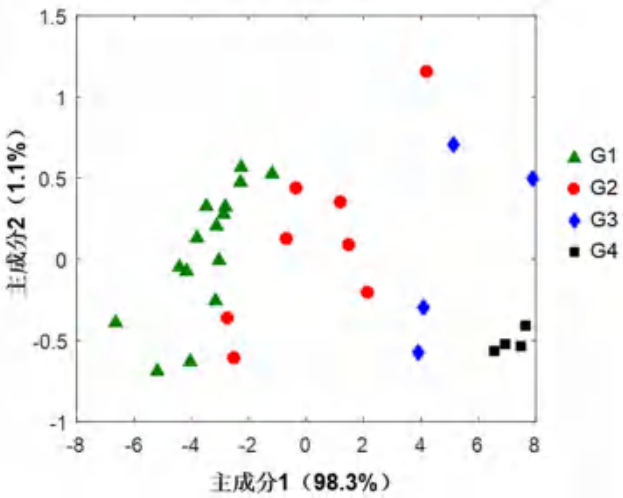

图 3　不同炮制程度大黄炭的可见光谱主成分得分图

Fig 3　PCA score plot of the visible spectra of rhubarb charcoal processed to different degrees

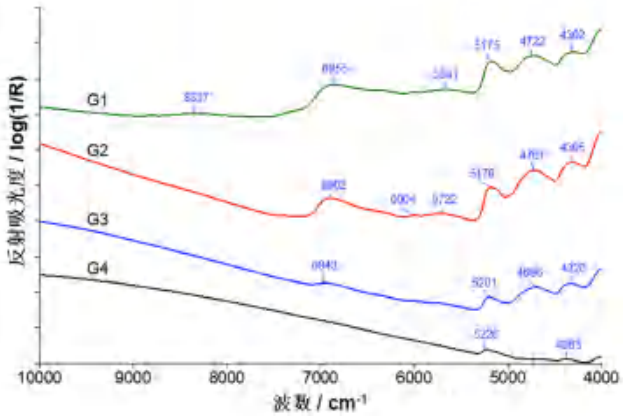

图 4　不同炮制程度大黄炭的平均近红外光谱

Fig 4　Average NIR spectra of rhubarb charcoal processed to different degrees

10 000 ～ 4000 cm^{-1} 内的不同炮制程度大黄炭 NIR 的 PCA 分析结果显示，第一主成分解释了 89.2% 的光谱方差，第二主成分解释了 10.3% 的光谱方差。也就是说，至少两个参数（例如主成分 1 与主成分 2 的得分）才能充分解释大黄炭炮制程度变化引起的 NIR 差异。如图 5 所示，主成分 1 和主成分 2 让大黄炭炮制程度呈现明显的拐点，便于在四组炮制程度明显不同的大黄炭样品之间划出明确的边界线，有利于大黄炭炮制程度的鉴别。

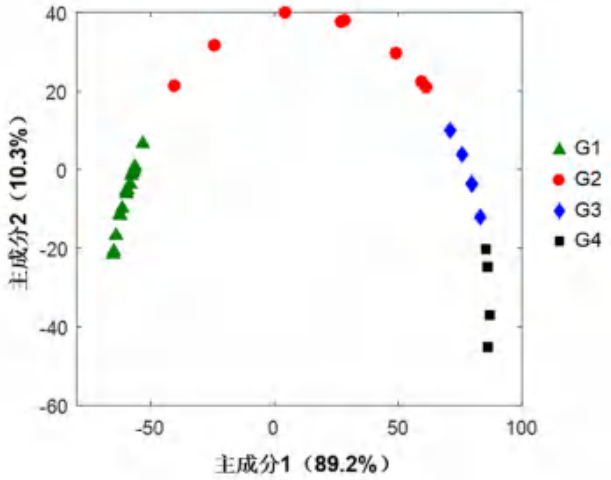

图 5　不同炮制程度大黄炭的近红外光谱主成分得分图

Fig 5　PCA score plot of the NIR spectra of rhubarb charcoal processed to different degrees

2.4　不同炮制程度大黄炭的 MIR 分析

如图 6 所示，G1 组大黄炭的 MIR 上 3330 cm^{-1} 与 2925 cm^{-1} 附近分别是 O-H 与 C-H 伸缩振动吸收峰，是各种有机成分的普遍特征峰；1607 cm^{-1}、1514 cm^{-1} 与 1445 cm^{-1} 是苯环骨架振动吸收峰，但是 1607 cm^{-1} 还包含了草酸钙 C ＝ O 伸缩振动吸收，而 1445 cm^{-1} 还包含了一些有机成分的 C-H 弯曲振动吸收；1365 cm^{-1} 是 C-H 弯曲振动吸收峰；1315 cm^{-1} 与后面 779 cm^{-1} 是草酸钙特征峰；1235 cm^{-1} 和 1145 cm^{-1} 主要是苷键、酯键等的 C-O 伸缩振动吸收峰；1024 cm^{-1} 附近主要是相互叠加的大分子和小分子糖类的 C-O 伸缩振动吸收峰，来自纤维素、淀粉等多种有机成分的贡献；824 cm^{-1} 与 767 cm^{-1} 是较弱的碳骨架振动吸收峰。炮制程度增加时，3000 cm^{-1} 与 1000 cm^{-1} 附近的有机物吸收峰逐渐降低，而 1610 cm^{-1}、1315 cm^{-1} 与 780 cm^{-1} 附近的草酸钙特征峰相对稳定。G3 和 G4 组大黄炭在 3000 cm^{-1} 附近的吸收峰主要来自草酸钙中结晶水的 O-H 伸缩振动吸收。

G1 组与 G2 组大黄炭饮片在 MIR 中的一个重要差异是 1145 cm^{-1} 附近的吸收峰，在加热到

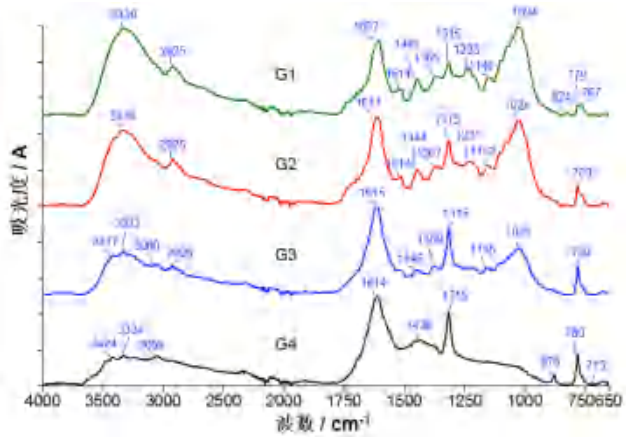

图 6　不同炮制程度大黄炭的平均中红外光谱

Fig 6　Average MIR spectra of rhubarb charcoal processed to different degrees

一定程度后会蓝移至 1150 cm^{-1} 以上。这一规律在相关研究中均有呈现[11, 13, 17]，说明该吸收峰可能是判断大黄炭饮片炮制程度是否为“不及”的重要指标。G2 组与 G3 组大黄炭饮片在 MIR 中的直观差异是后者在 3000 cm^{-1} 与 1000 cm^{-1} 附近的有机物吸收峰明显低于草酸钙特征峰。G3 组与 G4 组大黄炭饮片 MIR 的直观差异除了后者在 1000 cm^{-1} 附近的有机物吸收峰几乎消失，还在 1438 cm^{-1} 和 876 cm^{-1} 附近出现了碳酸钙特征峰（草酸钙分解所致）——这可能是判断大黄炭饮片炮制程度是否为“太过”的重要指标。综上，四组炮制程度明显不同的大黄炭样品的 MIR 具有可以直观发现的鉴别特征峰。

4000 ～ 650 cm^{-1} 内的不同炮制程度大黄炭 MIR 的 PCA 分析结果显示，第一主成分解释了 88.5% 的光谱方差，第二主成分解释了 8.5% 的光谱方差。也就是说，至少两个参数（例如主成分 1 与主成分 2 的得分）才能充分解释大黄炭炮制程度变化引起的 MIR 差异，这与上述 MIR 反映大黄炭多类有机和无机成分变化的观点相吻合。如图 7 所示，主成分 1 和主成分 2 有利于大黄炭炮制程度的鉴别，但是 G1 组与 G2 组一些样品较为相似，G3 组和 G4 组样品分布较为离散，可能是因为 MIR 反映的成分信息过于繁细、无机成分权重较大，反而不利于四组大黄炭样品之间明确边界的划分。

2.5　基于有监督模式识别的大黄炭炮制程度的光谱判断

使用光谱指纹图谱对中药进行自动鉴别需要建立相应的有监督模式识别方法。本研究使用基于 PCA 的 SIMCA 分类模型，分别建立了大黄炭饮片炮制程度的可见光谱、NIR、MIR 识别模

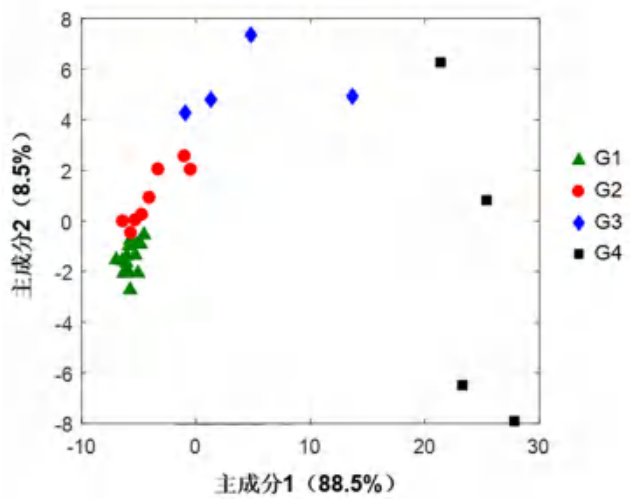

图 7　不同炮制程度大黄炭的中红外光谱主成分得分图

Fig 7　PCA score plot of the MIR spectra of rhubarb charcoal processed to different degrees

型。可见光谱模型使用的光谱范围为 380 ～ 780 nm，光谱强度不进行任何归一化处理。NIR 模型使用的光谱范围为 10 000 ～ 4000 cm^{-1}，光谱强度使用标准正态变量（SNV）进行归一化处理。MIR 模型使用的光谱范围为 4000 ～ 650 cm^{-1}（扣除没有样品吸收信号且 ATR 附件噪声较大的 2800 ～ 1800 cm^{-1} 区域），光谱强度使用 SNV 进行归一化处理。所有模型的类边界显著性水平为 0.05。模型使用交叉验证，同组样本作为阳性样本，其他组样本作为阴性样本。

如表 1 所示，三种光谱模型的大黄炭不同炮制程度组的识别率（正确识别组内样品的比例）均为 100%，即假阴性概率为 0。NIR 模型的所有组的拒绝率（正确拒绝组外样品的比例）也均为 100%，即假阳性概率为 0。MIR 模型的所有组的拒绝率均高于 90%，而可见光谱模型的最低拒绝率只有 73%。也就是说，NIR 模型对于不同炮制程度大黄炭的鉴别结果最准确，MIR 模型也基本能够准确鉴别，但是可见光谱模型的错判概率较高。三种光谱模型的准确度相对高低与前面 PCA 得分图（见图 3、5、7）显示的聚类明显程度相符。

表 1　不同炮制程度大黄炭的光谱 SIMCA 模型准确率

Tab 1　Accuracy of the spectral SIMCA models of rhubarb charcoal processed to different degrees

分组	样本数	可见光谱模型		NIR 模型		MIR 模型	
		识别率 /%	拒绝率 /%	识别率 /%	拒绝率 /%	识别率 /%	拒绝率 /%
G1	15	100	87	100	100	100	100
G2	8	100	73	100	100	100	95
G3	4	100	81	100	100	100	92
G4	4	100	96	100	100	100	96

3　讨论

虽然可见光谱能够客观量化地表征大黄炭饮片表面颜色变化，但是单调减少的反射率用于区分不同炮制程度大黄炭时存在一定的困难。如图 3 所示，四组炮制程度明显不同的大黄炭样品在可见光谱主成分 1 上的得分是连续分布的，很难在四组样品之间划出明确的边界线。考虑到不同大黄药材的表面颜色本身就存在很大的波动，将可见光谱用于源自不同大黄药材的大黄炭饮片炮制程度的横向比较仍有很大的不确定性。

NIR 区域的高波数端一般不低于 10 000 cm^{-1}（波长不长于 1 μm），非常接近可见光谱区域的长波长侧（780 nm）。样品可见光谱的长波长侧存在明显差异时，其 NIR 的高波数侧也会受到影响。除了颜色变化，样品的密度、粗糙度等发生变化时，也可能表现为 NIR 的基线变化。NIR 的低波数侧主要为 C-H、O-H 等含氢原子有机官能团的倍频与合频吸收峰。因此，与可见光谱相比，NIR 不仅能反映炮制程度对大黄炭饮片性状的影响，还能反映炮制程度对大黄炭饮片成分的影响。但是，NIR 非常依赖于数学模型，样品离散度过大（例如不同企业用不同药材、不同工艺制备的大黄炭饮片）可能降低模型准确性。

NIR 主要体现的是含氢原子的有机官能团的倍频与合频峰，而 MIR 主要体现的是含氢原子与不含氢原子的有机与无机官能团的基频峰，所以 MIR 的吸收峰数量更多、峰形更窄，因而指纹特征性更强，涵盖了更多有机与无机成分的结构与含量信息。在不依赖于数学模型的环境下，MIR 用于物质鉴别具有很好的耐用性与可靠性。因此，MIR（一般简称为“红外光谱”）是国际惯用的化学药物鉴别标准方法，理论上也可作为中药饮片炮制程度鉴别的标准方法之一。然而，MIR 测试固体样品时通常需要制成粉末（粉末可直接检测而无需溴化钾压片），不能用于片状或块状中药饮片样品的直接测试，所以在固体样品的测试速度与过程监测方面略逊于 NIR。再者，有些情况下样品的 MIR 信息太过丰富而复杂难解，有用信号

与无用信号混合在一起，反而可能增加模式识别的困难。

4　结论

明代陈嘉谟《本草蒙筌》指出“凡药制造，贵在适中，不及则功效难求，太过则气味反失”，说明了炮制终点判断对于中药饮片质量控制的重要性。汉代张仲景《金匮要略》已经提出“烧灰存性，勿令灰过”的炭药炮制终点判断原则，但是各种炭药“存性”的具体指标尚需深入研究。性状与显微结构等形性指标、指标成分与指纹图谱等化学指标、活性效价与限度等生物指标是中药质量评价最常用的几类指标。在大部分药效物质和作用机制不够明确的情况下，“形性 - 化学 - 生物”三性指标有机结合可以更全面地体现饮片质量，更准确地判断炮制终点[18-19]。然而，综合指标的全面检测需要较高的时间和物质成本。所以，建立简便、快速的炮制程度评价方法，对于中药饮片的终点判断与质量控制也是非常必要的。

本研究初步比较了可见光谱、NIR、MIR 用于大黄炭炮制程度快速检测的可行性与准确性。结果表明，大黄炭炮制程度增加时可见光谱单调变化（不同波长处的反射率均下降且高度相关），不同炮制程度组之间难以划清界限。NIR 与 MIR 反映的样品信息更加丰富，能够显示大黄炭炮制程度增加时存在的拐点，对于不同炮制程度组的鉴别结果较为准确。NIR 能够直接检测大黄切片，所以在大黄炭炮制程度快速评价与炮制过程在线监测方面具有较好的应用潜力。MIR 需要检测大黄粉末，在检测速度上略逊于 NIR，也难以用于炮制过程的在线分析。但是在不依赖于数学模型的条件下，MIR 可以根据多种有机与无机成分的特征峰直观区分不同炮制程度的大黄炭，因此可以作为大黄炭炮制终点的标准鉴别指标之一，补充性状鉴别（或显微鉴别）与色谱鉴别之间的缺失信息——未被色谱检测的大分子、无机物等的化学特征。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：24-25.

[2] 祝婷婷，刘晓，汪小莉，等 . 大黄不同方法炮制后药理作用及化学成分变化研究进展 [J]. 中国新药杂志，2016，25（8）：883-887.

[3] 孙艳群，林娜 . 大黄的炮制方法及临床应用 [J]. 时珍国医国药，2012，23（1）：179-181.

[4] 徐鼐 . 大黄炭临床应用研究近况 [J]. 中国老年保健医学，2016，14（2）：81-82.

[5] 朱诗塔，雷鹏，李新中，等 . 掌叶大黄不同炮制品指纹图谱与其止血作用的灰关联度分析 [J]. 中南药学，2009，7（1）：55-58.

[6] 颜永刚，尹立敏，王红艳，等 . HPLC 法同时测定大黄炮制品中 10 种化学成分的含量 [J]. 中国药房，2016，27（27）：3839-3842.

[7] 李会芳，孙琴，王伽伯，等 . 大黄炮制后化学组分转移规律研究 [J]. 山西中医学院学报，2011，12（6）：14-17.

[8] 郭东艳，柳小莉，唐志书，等 . 大黄不同炮制品化学成分转移规律研究 [J]. 现代中西医结合杂志，2014，23（18）：2016-2017.

[9] 李丽，肖永庆 . 大黄饮片炮制前后物质基础变化规律研究 [J]. 中华中医药杂志，2012，27（4）：803-813.

[10] 杨丽，温雅心，刘洋，等 . 大黄炭加热过程颜色特征与 14 种化学成分含量变化关系研究 [J]. 中国中药杂志，2020，45（17）：4230-4237.

[11] Yang L，Yang L，Pei W，et al. Color-reflected chemical regulations of the scorched rhubarb（Rhei Radix et Rhizoma）revealed by the integration analysis of visible spectrophotometry，fourier transform infrared spectroscopy and high performance liquid chromatography [J]. Food Chem，2022，367：130730.

[12] 杨丽 . 大黄炭“形性 - 化学 - 生物”三性指标关联机制与炮制传递规律研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2021.

[13] Yang L，Li T，Yang L，et al. Two-dimensional correlation spectroscopy indicates the infrared spectral markers of the optimum scorching degree of rhubarb（Rhei Radix et Rhizoma）to enhance the anti-inflammatory activity [J]. Spectrochim Acta，2022，270：120853.

[14] 杨丽，龚燚婷，许铭珊，等 . 基于“表里关联”的大黄炭炮制过程颜色和成分变化关系研究 [J]. 中草药，2020，51（22）：5705-5713.

[15] 李芹，黄群莲，傅秀娟，等 . 颜色量化分析在大黄炭品质评价中的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（3）：13-18.

[16] 龙全江，王晓莉，常承东 . 大蓟、大黄、石榴皮炭药炮制前后显微比较分析 [J]. 云南中医学院学报，1999，22（1）：26-28.

[17] Yang L，Yang L，Sun S，et al. Cascading chemical transitions of rhubarb（Rhei Radix et Rhizoma）during the scorching process revealed by heated ATR-FTIR spectroscopy and two-dimensional correlation analysis [J]. J Mol Struct，2020，1216：128307.

[18] 董玲，孙裕，裴纹萱，等 . 基于全程质量控制理念的中药标准化体系研究思路探讨 [J]. 中国中药杂志，2017，42（23）：4481-4487.

[19] 张世臣，孙裕，戴俊东，等 . 基于全程质量控制理念的工业饮片标准化体系建设研究 [J]. 中国中药杂志，2018，43（14）：2837-2844.

（收稿日期：2022-04-06；修回日期：2022-05-12）

蒲公英提取物对白念珠菌的抑制作用及机制研究

杨建婷[1]，梁引库[2]，王全华[1*]（1. 兵器工业五二一医院药剂科，西安　710065；2. 陕西理工大学生物科学与工程学院，陕西　汉中　723000）

摘要：目的　研究蒲公英提取物对白念珠菌（*Candida albicans*）的抑制作用及机制。**方法**　纸片抑菌法研究蒲公英提取物对白念珠菌的抑制作用；分光光度计测定蒲公英提取物最小抑菌浓度（*MIC*）并研究其抑菌动力学和细胞膜通透性；利用扫描电镜、核酸吸光度法研究蒲公英提取物对白念珠菌的抑菌机制。**结果**　蒲公英提取物对白念珠菌有良好的抑制作用，其 *MIC* 为 32.0 mg • mL^{-1}。抑菌动力学曲线分析表明蒲公英提取物主要作用于白念珠菌的对数生长期。扫描电镜发现蒲公英提取物可破坏白念珠菌的细胞结构，导致细胞表面凹陷，形成褶皱。核酸吸光度法结果发现蒲公英提取物可以增加白念珠菌细胞膜的通透性，从而抑制其生长。**结论**　蒲公英提取物对白念珠菌有较好的抑制效果，该抑制作用可能是其破坏细胞壁进而导致菌体内容物外泄，从而破坏菌体细胞膜结构，对细胞增长产生抑制作用，最终导致细胞死亡。

关键词：蒲公英；白念珠菌；抑菌作用；体外抑菌
中图分类号：R285.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2089-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.021

Inhibition effect of dandelion extract on *Candida albicans* and its mechanism

YANG Jian-ting[1], LIANG Yin-ku[2], WANG Quan-hua[1*] (1. *Department of Pharmacy*, *the* 521 *Hospital of Norinco Group*, *Xi'an* 710065; 2. *School of Biological Science & Engineering, Shaanxi University of Technology*, *Hanzhong Shaanxi* 723000)

Abstract: Objective To determine the inhibition effect of dandelion extract on *Candida albicans* (*C.albicans*) and related mechanism. **Methods** The inhibition effect of dandelion extract on *C. albicans* was studied by paper bacteriostasis method. The minimum inhibitory concentration (*MIC*) and antibacterial kinetics of dandelion extract were analyzed by spectrophotometer. On this basis, the cell membrane permeability of *C.albicans* was also studied. The bacteriostatic mechanism of dandelion extract on *C. albicans* was determined by scanning electron microscopy analysis and the UV absorption of nucleic acid method. **Results** The dandelion extract had a good bacteriostasis on *C.albicans*, with *MIC* of 32.0 mg • mL^{-1}. The bacteriostatic kinetic curve analysis showed that the inhibition on *C.albicans* mainly worked in its logarithmic growth phase. Scanning electron microscopy showed that dandelion extract destroyed the cell membrane structure of *C.albicans*, and caused the cell surface to sink and fold. The UV absorption of nucleic acid showed the dandelion extract increased the membrane permeability of *C.albicans* and therefore inhibited its growth. **Conclusion** The dandelion extract has obvious bacteriostasis on *C.albicans*, which destroys the cell membrane structure, promotes the leakage of cell content, and eventually inhibits cell growth resulting in cell death.

Key words: dandelion; *Candida albicans*; bacteriostasis; in vitro bacteriostasis

基金项目：陕西省教育厅重点实验室科研计划项目（No.18JS018）。
作者简介：杨建婷，女，博士，副主任药师，主要从事抗菌药物作用机制研究，email：446011643@qq.com　*通信作者：王全华，女，硕士，主要从事药理学研究，email：373239978@qq.com

临床上真菌感染性疾病不断增多，白念珠菌（又称白假丝酵母菌）是最常见的一种条件致病性真菌病原体，定植于人体的各个部位，其生长主要受宿主免疫力、压力、微生物菌落和其他因素的影响[1]。随着真菌耐药性不断升高且日益严重，开发新型抗白念珠菌的植物药成为近些年来的研究热点[2]。我国科学家经过几十年的探索，发现许多中草药具有抗真菌作用，对白念珠菌有抑制作用的中药有决明子、苦参、黄芩、乌梅等[3]。中草药活性成分抗白念珠菌的作用机制是通过破坏菌体的细胞壁、细胞膜和细胞质的形态和结构而达到抗真菌作用[4]。有研究发现，蒲公英提取物对金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌和大肠埃希菌等均有不同程度的抑制作用[5]。还有学者发现，通过水提、醇提、超声提取法等分别提取出蒲公英多糖、黄酮和酚酸等，利用平板打孔法研究各活性成分对沙门菌、痢疾杆菌、大肠埃希菌、葡萄球菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果，结果显示不同提取方法对四种菌的抑制作用不同[6]。本文在蒲公英提取物对细菌抑菌作用的研究基础上，研究其对真菌的抑制作用，以白念珠菌为研究对象，从最低抑菌浓度（*MIC*）、扫描电镜（SEM）、抑菌动力学、细胞膜通透性和对细胞壁葡聚糖合成的影响五个方面，研究蒲公英提取物对白念珠菌的抑制作用及机制，旨在从植物中寻找抗真菌药物，为开发广谱、高效、低毒的抗真菌药物提供参考。

1　材料

1.1　菌株

白念珠菌（*Candida albicans*，*C.albicans*，批号：ATCC10231，该菌株冻干菌种由陕西理工大学陕西省资源生物重点实验室菌种保藏中心提供），－80 ℃低温冰箱冻存，实验前复苏传代使用。

1.2　试药

氢氧化钠、浓盐酸（37%）、无水乙醇、戊二醛、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠、氯化钾（天津市富宇精细化工有限公司）；吐温 80（Tween 80）、二甲基亚砜（DMSO）（天津市光复精细化工研究所）；氯霉素（上海瑞楚生物科技有限公司）；葡萄糖、蛋白胨、酵母浸粉、琼脂粉（北京奥博星生物技术有限责任公司）；溴化钾（PIKE，光谱纯，北京英莱克科技发展有限公司）；蒲公英全草（汉中市中药材市场，经陕西理工大学吴三桥教授鉴定为菊科植物蒲公英）。

1.3　仪器

紫外分光光度计 UV250（日本岛津）；电热恒温培养箱 DHP-9162（上海一恒科学仪器有限公司）；立式压力蒸汽灭菌锅 LDZX-50KBS（上海申安医疗器械厂）；台式高速离心机 TGL-20（湖南湘仪仪器开发有限公司）；超低温冰箱－80 ℃ DW-86L338J（青岛海尔特种电冰柜有限公司）；超净工作台 SW-CJ-1F（苏州净化有限公司）；低温冷冻干燥机 SJIA-10N（宁波市双嘉仪器有限公司）；扫描电子显微镜 JSM-6390LV（日本电子公司）；红外光谱仪 FT-IR（美国 Nicolette 公司）；真空干燥箱 XMTD-8222（上海精宏实验设备有限公司）。

2　方法

2.1　蒲公英活性成分的提取分离与纯化

蒲公英有效成分根据图 1 工艺路线进行提取。提取样品Ⅰ经干燥后密封冻存。

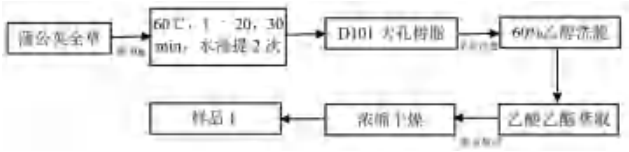

图 1　蒲公英活性成分的分离纯化工艺路线

Fig 1　Extraction and purification of active ingredients in dandelion

2.2　液相色谱分析条件

色谱柱：DiKMA Diamonsil C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流速：1.0 mL • min^{-1}；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。乙腈为流动相 A，0.1% 甲酸水溶液为流动相 B，使用梯度洗脱（0 ～ 10 min 92% B；10 ～ 24 min，92% → 86%B；24 ～ 35 min，86% → 77%B；35 ～ 56 min，77% → 76%B；56 ～ 60 min，76% → 68%B）[7]。

2.3　*MIC* 测定

将活化后的白念珠菌单菌落接种于沙式液体培养基，37 ℃、200 r • min^{-1} 培养 12 h，用沙式液体培养基将菌液浓度调至 1×10^7 CFU • mL^{-1}，配制 280 mg • mL^{-1} 蒲公英样品Ⅰ母液，备用。分别向装有 2 mL 沙式培养基的试管中加入蒲公英样品Ⅰ，使培养基中蒲公英样品Ⅰ最终质量浓度为 0、4.0、8.0、16.0、32.0、48.0、64.0 mg•mL^{-1}，以 0 mg • mL^{-1} 作为对照，按 5%（*V/V*）接入备用菌液，分别于 37 ℃、200 r • min^{-1} 培养 24 h，用分光光度计测 $A_{600\ nm}$ 值。与前一浓度相比较，当 $A_{600\ nm}$ 下降≥ 95% 时的样品的浓度即为蒲公英样品Ⅰ的 *MIC*[8]。每组设置 3 个平行。

2.4　SEM

用 1×10^7 CFU • mL^{-1} 菌液配制 280 mg • mL^{-1} 蒲公英样品Ⅰ母液，备用。取 2 mL 悬浮菌体，分别加入蒲公英样品Ⅰ母液，使溶液中蒲公英样品Ⅰ最终浓度为 0、0.5、1、2×*MIC*，以 0×*MIC* 作为

对照，分别于 37 ℃、200 r • min^{-1} 培养。当培养至 5 h 时，取 1 mL 的菌体样品，4 ℃、8000 r • min^{-1} 离心 6 min，PBS（pH 5.8）洗涤 2 次。加入 2.5% 戊二醛过夜固定，使用呈梯度浓度的乙醇溶液（50%、60%、70%、80%、90%）重悬浸泡 10 min，于 4 ℃、8000 r • min^{-1} 离心 6 min；乙醇重悬浸泡 10 min，4 ℃、8000 r • min^{-1} 离心 6 min，2 次，脱水，用真空冷冻干燥机干燥 12 h。镀金后上 SEM 观察 [9]。每组设置 3 个平行。

2.5　抑菌动力学分析

用 1×10^{7} CFU • mL^{-1} 菌液配制 280 mg • mL^{-1} 蒲公英样品Ⅰ母液，备用。分别向装有 4 mL 沙式液体培养基的试管中加入蒲公英样品Ⅰ，使培养基中蒲公英样品Ⅰ最终浓度为 0、1、3×*MIC*，以 0×*MIC* 作为空白对照，按 5%（*V*/*V*）接入备用菌液，分别于 37 ℃、200 r • min^{-1} 培养，每隔 3 h 取样 200 μL，测其 $A_{600\,nm}$ 值。每组设置 3 个平行。按式 1 计算白念珠菌存活率和抑菌率 [10-11]。

式 1：存活率（%）＝ $A_{600\,nm}$（加入抗菌样的吸光度）/$A_{600\,nm}$（未加入抗菌样的吸光度）×100%。

2.6　核酸吸光度法研究细胞膜通透性

按照“2.3”项下方法培养白念珠菌，将菌液于 6000 r • min^{-1} 离心 10 min，收集菌体，pH 5.8 PBS 洗 3 次。用含 0.01% Tween 80 的 pH 5.8 PBS 悬浮菌体，调整为 1×10^{9} CFU • mL^{-1}。分别向装有 2.5 mL 悬浮菌体的 10 mL 试管中加入蒲公英样品Ⅰ，使溶液中蒲公英样品Ⅰ最终浓度为 0、0.5、1、2×*MIC*，以 0×*MIC* 作为空白对照，37 ℃、200 r • min^{-1} 培养，分别于 0、1、2、4、6 h 取样 200 μL，6000 r • min^{-1} 离心 10 min 后测上清液 $A_{260\,nm}$ 值 [12]。每组设置 3 个平行。

2.7　数据分析

数据分析使用 SPSS 22.0、Origin 8.0 软件，物质结构式绘制使用 ChemDraw 软件，图片处理使用 Photoshops 5.0。数据进行统计学评估，使用单因素方差分析（ANOVA）来比较差异组，$P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

3　结果与分析

3.1　蒲公英抑菌成分的分离及鉴定

HPLC 分析蒲公英样品Ⅰ组分（见图 2），发现该组分在 280 nm 处主要有 8 种化合物，其保留时间依次为 21.5、27.9、30.3、37.2、38.9、39.8、44.7 和 66.2 min，相对百分含量分别为 11.45%、3.96%、10.48%、34.24%、3.91%、11.80%、3.65% 和 4.21%。经比对发现峰 1、峰 2、峰 3、峰 4、峰 5 和峰 6 依次被初步确定为 4- 香豆酸、阿魏酸、槲皮素戊糖苷、3，5- 二 -*O*- 咖啡酰奎尼酸、4，5- 二 -*O*- 咖啡酰奎宁酸和木犀草素，而峰 7 和峰 8 为未知化合物。

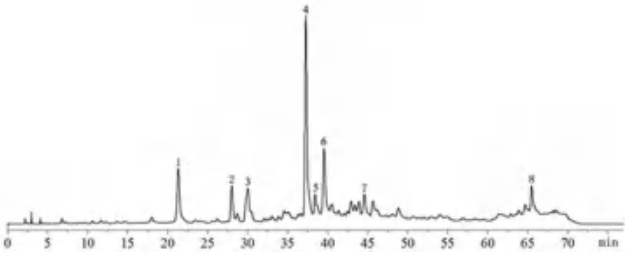

图 2　蒲公英样品Ⅰ的 HPLC 色谱图

Fig 2　HPLC chromatogram of dandelion sample Ⅰ

3.2　*MIC* 的测定

结果表明随着蒲公英样品Ⅰ质量浓度增加，白念珠菌 $A_{600\,nm}$ 逐渐下降，在 32.0 mg • mL^{-1} 时，菌液 $A_{600\,nm}$ 为对照的 0.048%，吸光值下降幅度达 95%。表明蒲公英提取物对白念珠菌的抑制率可达 95%，且随着浓度增加，菌液 $A_{600\,nm}$ 下降幅度均大于 95%。表明蒲公英提取物对白念珠菌的 *MIC* 值为 32.0 mg • mL^{-1}。

3.3　SEM 分析

SEM 观察发现，对照组处理 5 h 后，白念珠菌结构完整，外观饱满，菌体成近乎椭圆形，表面光滑，折光性好（见图 3A ～ C）。0.5×*MIC* 样品Ⅰ作用 5 h 后的白念珠菌细胞表面基本和空白对照组一样，但表面变得粗糙，折光性减弱（见图 3D ～ F）。1.0×*MIC* 样品Ⅰ处理白念珠菌 5 h 后，多数白念珠菌细胞不再呈现椭球形，结构基本完整，但表面有褶皱，部分菌体出现凹陷。表面比较粗糙，细胞体积开始缩小（见图 3G ～ I）。2.0×*MIC* 样品Ⅰ处理白念珠菌 5 h 后，全部白念珠菌细胞不再呈现椭球形，细胞形态结构不规则，细胞明显缩小，表面褶皱且极度粗糙，部分菌体出现严重凹陷，细胞膜破损，导致内容物外泄（见图 3K、L）；图 3J 显示，全部白念珠菌细胞明显缩小，表面褶皱、严重凹陷及细胞膜破损在图片上不甚明显，考虑是菌体细胞明显缩小，在放大 2000 倍时菌体形态变化扫描电镜不能显示出显著性差异。综上可知，样品Ⅰ能够使细胞体积缩小，结构不对称并且表面形成褶皱，从而破坏白念珠菌的正常形态。其原因可能是由于细胞内容物的大量外泄使得白念珠菌细胞壁、细胞膜凹陷，形成褶皱。

3.4　抑菌动力学分析

微生物生长包括四个时期：缓慢期、对数期、

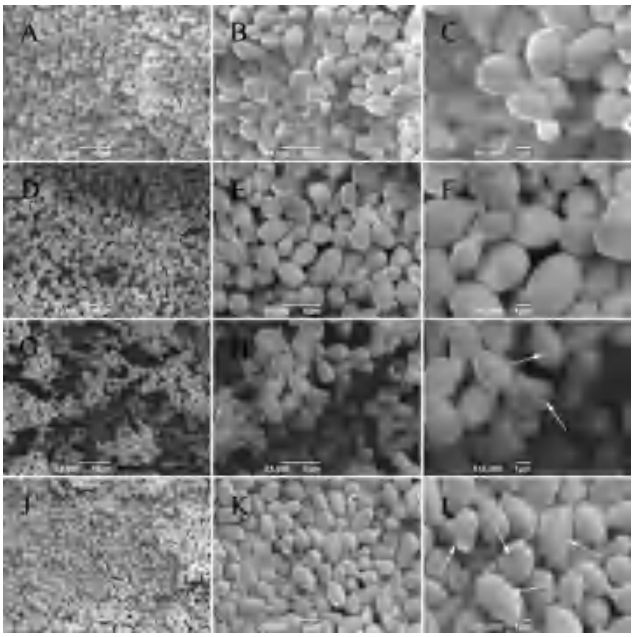

图 3　白念珠菌的 SEM 图像

Fig 3　SEM images of *C.albicans*

A ～ C. 经 0×*MIC* 样品Ⅰ处理 5 h（5 h after the treatment for with 0×*MIC* sample Ⅰ）；D ～ F. 经 0.5×*MIC* 样品Ⅰ处理 5 h（5 h after the treatment with 0.5×*MIC* sample Ⅰ）；G ～ I. 经 1.0×*MIC* 样品Ⅰ处理 5 h（5 h after the treatment with 1.0×*MIC* sample Ⅰ）；J ～ L. 经 2.0×*MIC* 样品Ⅰ处理 5 h（5 h after the treatment with 2.0×*MIC* sample Ⅰ）

稳定期和衰亡期。样品Ⅰ对白念珠菌生长周期的抑制可根据生长曲线中的指数期进行分析。白念珠菌对数生长期的动力学方程可表示为 [13]：

$$r = \mathrm{d}N/\mathrm{d}t = \mu N$$

其中，μ 是生长速率，N 为 t 时刻的微生物数量。

$$\mathrm{d}N/N = \int_{t_2}^{t_1} \mu \mathrm{d}t$$

假设微生物的比生长速率为一个常数，

$$\triangle t = t_2 - t_1$$

$$\ln[N_2/N_1] = \mu \triangle t$$

$$\mu = \ln[N_2/N_1]/\triangle t$$

抑菌动力学是通过绘制白念珠菌的抑制生长曲线来研究抗菌性能。样品Ⅰ对白念珠菌生长曲线的影响如图 4 所示，由图 4 可知，空白对照组的菌体生长状态良好，当加入样品Ⅰ后，菌液的光密度值降低，表明样品Ⅰ对白念珠菌有较好的抑制作用。当样品Ⅰ浓度为 1.0×*MIC* 时 $A_{600\ \mathrm{nm}}$ 随时间有明显变化，样品浓度为 3.0×*MIC* 时 $A_{600\ \mathrm{nm}}$ 变化不大，表明白念珠菌生长受到严重抑制，样品Ⅰ对白念珠菌的抑菌作用增强。分析样品Ⅰ对白念珠菌生长速率及白念珠菌的抑制率发现（见表 1），正常情况下白念珠菌的比生长速率为 0.05，分别加入 1.0×*MIC* 和 3.0×*MIC* 的样品Ⅰ后，其生长速率则分别减小到 0.02 和 0.00，加入 3.0×*MIC* 样品Ⅰ后白念珠菌基本不生长，其抑制率达到了 97.13%。由此可知样品Ⅰ对白念珠菌的抑制作用主要是作用于其对数期的生长，使白念珠菌的生长速度大幅度的降低，而抗菌效果取决于样品Ⅰ的浓度和作用时间 [10]。

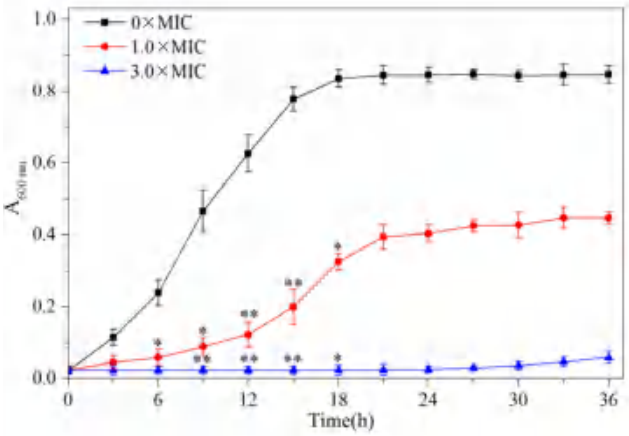

图 4　三种浓度的样品Ⅰ对白念珠菌的抑菌曲线

Fig 4　Antibacterial curves of three concentrations of sample Ⅰ on *C.albicans*

表 1　*C.albicans* 在不同浓度样品Ⅰ中的抑制率及比生长速率（对数生长期）

Tab 1　Inhibition rate and growth rate of *C.albicans* in different concentrations of sample Ⅰ (logarithmic growth phase)

浓度 /（mg・mL^{-1}）	$A_{600\ \mathrm{nm}}$（3 h）	$A_{600\ \mathrm{nm}}$（18 h）	比生长速率 /μ	抑制率（18 h）/%
0×*MIC*	0.11±0.02	0.84±0.02	0.05	0.00
1.0×*MIC*	0.05±0.02	0.33±0.02	0.02	61.06
3.0×*MIC*	0.02±0.01	0.02±0.01	0.00	97.13

3.5　细胞膜通透性分析

正常情况下，完整的细胞膜选择性通透，会阻挡胞内大分子物质外流。而当导致膜损伤的杀菌剂存在时，杀菌剂会破坏细胞膜，本来不能透过细胞膜的具有紫外吸收的核酸类物质便泄漏到培养液中，导致培养液在 260 nm 处的吸光度值增大。因此，通过测定培养液 260 nm 处的吸光度值能够预测菌体细胞膜的完整性。由图 5 可知，空白对照组（0×*MIC*）的培养液在 260 nm 波长的紫外吸光值随着培养时间的增加逐渐增大，表明白念珠菌在培养过程中伴随细胞膜破坏，菌体的死亡。分别加入 0、0.5、1.0、2.0×*MIC* 的样品Ⅰ后，培养液的紫外吸收值也随着培养时间的增加而增大，且都表现出在同一时间高于对照组的现象，且有些达到了显著水平。这表明蒲公英样品Ⅰ损坏了白念珠菌细胞膜，导致膜的通透性增

加，进而导致细胞死亡。

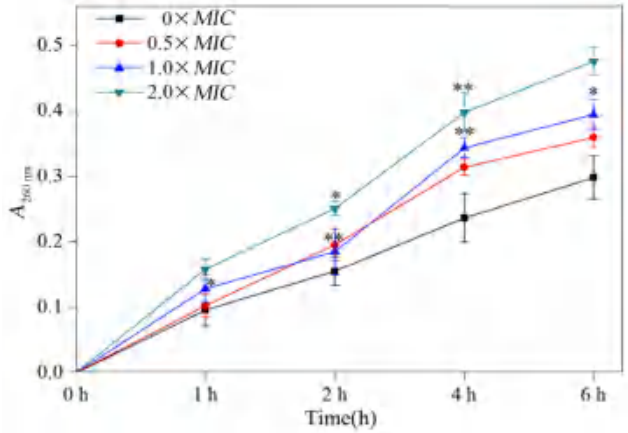

图 5　三种浓度的样品Ⅰ对白念珠菌细胞膜通透性的影响

Fig 5　Influence of samples Ⅰ at three concentrations on cell permeability of *C.albicans*

注（Note）：与空白对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$（Compared with the blank control group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$）。

4　讨论

白念珠菌细胞壁的主要成分是己糖或氨基己糖，对于维持细胞形态和胞内高渗状态起着重要作用。白念珠菌细胞膜主要由磷脂类、鞘脂类和麦角甾醇等组分构成，是一种渗透屏障，是小分子和信号传导的通路，并为各种功能蛋白提供基质结构。细胞壁和细胞膜对完成胞内外物资交换、营养物质吸收和生物合成等方面起重要作用，这些结构一旦被破坏，其功能作用丧失，将导致真菌细胞死亡[14]。抗真菌药物的作用机制包括作用于真菌细胞膜中甾醇合成、作用于真菌细胞壁合成、作用于核酸合成，其实质都是破坏菌体的超微结构。本文研究发现蒲公英提取物可以破坏白念珠菌的细胞膜，可能是其抗真菌活性的抑菌机制。但是，对中药抗白念珠菌作用机制的研究，不应该只局限于电镜观察细胞超微结构变化和对白念珠菌的宏观影响上，应从分子水平上探讨中药活性成分是如何作用于这些细胞结构并使其发生改变，尤其是对生物膜主要成分合成酶的影响，分离酶基因从基因层面揭示中药抗真菌作用机制。

White 等[15]研究发现，白念珠菌在受到外界环境的抑制时，其编码目标酶 *ERG11* 基因会发生改变改变，而细胞外排泵基因 *CDR1*、*CDR2* 和 *MDR1* 会过表达进而菌体死亡。Denning[16]研究发现，从溶菌芽孢杆菌 C3 分离得到的酰胺 B（ATB）可诱导细胞凋亡，ATB 通过抑制细胞 G_2/M 期细胞周期停滞的微管蛋白聚合而发挥作用的。表面活性剂对白念珠菌的作用，主要是对菌丝发育、细胞膜形态有强烈的影响，这种影响与肌动蛋白骨架的异常组织和随后的菌丝相关因子的极化转运缺陷有关[17]。细胞壁 *β*- 葡聚糖在白念珠菌生长过程中起到了重要作用[18-19]。卡泊芬净通过抑制白念珠菌细胞壁 *β*- 葡聚糖的合成，从而达到抑制白念珠菌增长的目的[20]。本研究分析了样品Ⅰ对白念珠菌的 *MIC* 值为 32.0 mg•mL^{-1}。抑菌动力学方程分析发现样品Ⅰ对白念珠菌的抑制作用主要是作用于其指数生长期。样品Ⅰ可破坏白念珠菌细胞结构，导致细胞表面凹陷，形成褶皱。细胞膜通透性分析发现，样品Ⅰ导致细胞内容物外泄。这进一步表明蒲公英提取物是通过作用于白念珠菌细胞的细胞壁，通过破坏细胞壁进而导致内容外泄而引起细胞凋亡的。

虽然在中药抗白念珠菌的研究方法和作用机制方面已经取得了不少进展，但仍然存在诸多未知领域，需要进一步深入探讨，为真菌疾病的治疗提供新的选择。

参考文献

[1] Nobile CJ，Johnson AD. *Candida albicans* biofilms and human disease [J]. Annu Rev Microbiol，2015，69（1）：71-92.

[2] 谷鹏飞，石宇奇，刘洋 . 中药抗白念珠菌作用的研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘，2016，16（42）：29-33.

[3] Bo S，Ting L，Liyan L，et al. The antibacterial activities of Sophora，Scutellaria and Ume on *Staphylococus aureus*，*E. coli* and *Candida albicans* [J]. Chinese Journal of Microecology，2010，22（6）：507-513.

[4] 郑玉荣，刘涛峰，张虹亚 . 中药成分抗白念珠菌的实验研究进展 [J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志，2011，10（6）：399-400.

[5] 邱志宏，张彩虹 . 蒲公英水提物对临床耐药菌体外抑菌作用的研究 [J]. 临床合理用药杂志，2018，11（35）：125-126.

[6] 侯京玲，周霄楠，赵兴华，等 . 几种蒲公英成分的提取及体外抑菌效果试验 [J]. 中国兽医杂志，2016，52（12）：53-55.

[7] 刘燕，兰瑞容，兑靖冬，等 . HPLC 法同时测定蒲公英中单咖啡酰酒石酸、绿原酸、咖啡酸、菊苣酸的含量 [J]. 中国药师，2017，20（9）：1677-1679.

[8] Szczepaniak J，Cieślik W，Romanowicz A，et al. Blocking and dislocation of Candida albicans Cdr1p transporter by styrylquinolines [J]. Int J Antimicrob Agents，2017，50（2）：171-176.

[9] Memariani H，Shahbazzadeh D，Sabatier J，et al. Mechanism of action and in vitro activity of short hybrid antimicrobial peptide PV3 against Pseudomonas aerugino-

sa [J]. Biochem Biophys Res Commun，2016，479（1）：103-108.
[10] 汪炜燕，周宁琳，王晓丹，等 . 硫脲壳聚糖 / 蒙脱土纳米中间体的合成及其对大肠杆菌抑菌性能的研究 [J]. 功能材料，2010，41（S1）：101-104.
[11] Moghayedi M，Goharshadi EK，Ghazvini K，et al. Kinetics and mechanism of antibacterial activity and cytotoxicity of Ag-RGO nanocomposite [J]. Colloids Surf B Biointerfaces，2017，159：366-374.
[12] Ma Q，Davidson PM，Critzer F，et al. Antimicrobial activities of lauric arginate and cinnamon oil combination against foodborne pathogens：improvement by ethylenediaminetetraacetate and possible mechanisms [J]. Lwt-Food Sci Technol，2016，72：9-18.
[13] Liu Y，Xie WH，Xie CL，et al. Thermokinetic study of the limited growth of bacteria [J]. Acta Phys-Chim Sin，1996，12（2）：156-158.
[14] 李亚婷，刘林波，黄燕杰，等 . 中药有效成分对白念珠菌生物膜作用的研究现状 [J]. 国际检验医学杂志，2016，37（17）：2439-2441.
[15] White TC，Marr KA，Bowden RA，et al. Clinical，cellular，and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance [J]. Clin Microbiol Rev，1998，11（2）：382-402.
[16] Denning D. Echinocandin antifungal drugs [J]. Lancent，2003，362（9390）：1142-1151.
[17] Yu Q，Zhang B，Ma F，et al. Novel mechanisms of surfactants against *Candida albicans* growth and morphogenesis [J]. Chem-Biol Interact，2015，227：1-6.
[18] 孟松，胡胜标，谢伟岸，等 . 藠头中活性物质对白念珠菌的抑制作用及其机制研究 [J]. 食品科学，2005（9）：101-105.
[19] Georgopapadakou NH. Update on antifungals targeted to the cell wall：focus on beta-1，3-glucan synthase inhibitors [J]. Expert Opin Investig Drugs，2001，10（2）：269-280.
[20] Stone EA，Fung HB，Kirsehenbaum HL. Caspofungin：anechinocan dinantifungalagents [J]. Clin Ther，2002，24（3）：351-377.

（收稿日期：2022-02-20；修回日期：2022-06-06）

基于双波长指纹图谱和含量测定的经典名方百合地黄汤物质基准的质量评价研究

狄志彪[1]，刘洋[1]，刘峰[2]，许刚[2]，刘琪琪[3]，姜盛楠[1]，王春柳[1]，李晔[1*]，张红[1*]（1. 陕西省中医药研究院，西安　710003；2. 陕西步长制药有限公司，西安　710075；3. 陕西中医药大学，陕西　咸阳　712000）

摘要：目的　建立百合地黄汤物质基准的高效液相色谱法（HPLC）双波长指纹图谱，并测定 3 种化学成分的含量。**方法**　采用 Kromasil 100-5-C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；以乙腈（A）-0.1% 磷酸水溶液（B）为流动相，梯度洗脱；流速：0.7 mL • min^{-1}；柱温：35 ℃；检测波长：203、320 nm；进样量：10 μL。选用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”对 15 批百合地黄汤物质基准的 HPLC 色谱图进行分析，建立双波长指纹图谱；同时测定其中 3 种主要成分的含量。**结果**　建立了百合地黄汤物质基准的 HPLC 双波长指纹图谱，波长分别为 203 nm 和 320 nm，其中共有峰分别有 16 个和 9 个；并测定了 3 种化学成分的含量，其中梓醇、地黄苷 D 和益母草苷的含量分别在 36.2126 ～ 48.8442 mg • g^{-1}、2.9734 ～ 4.8516 mg • g^{-1} 和 3.6128 ～ 5.0232 mg • g^{-1}。**结论**　本研究通过双波长指纹图谱和含量测定表征了百合地黄汤中鲜百合和鲜地黄汁的信息，为百合地黄汤物质基准及其制剂的质量评价体系建立提供了参考。

关键词：百合地黄汤；指纹图谱；经典名方；含量测定；物质基准
中图分类号：R286.02　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2094-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.022

基金项目：重大新药创制科技重大专项（No. 2018ZX09721005-004-007）。
作者简介：狄志彪，男，硕士，主要从事中药制剂方面研究，email：578953151@qq.com　*通信作者：李晔，女，研究员，主要从事中药新型给药系统研究，email：LiyeLsi@163.com；张红，女，研究员，主要从事中药药效物质基础研究，email：zhanghong919919@163.com

Quality evaluation of the classic famous prescriptions Baihe Dihuang decoction based on dual wavelength fingerprint spectrum and content determination

DI Zhi-biao[1], LIU Yang[1], LIU Feng[2], XU Gang[2], LIU Qi-qi[3], JIANG Sheng-nan[1], WANG Chun-liu[1], LI Ye[1*], ZHANG Hong[1*] (1. *Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an* 710003; 2. *Shaanxi Buchang Pharmaceutical Co., Ltd., Xi'an* 710075; 3. *Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi* 712000)

Abstract: Objective To determine 3 chemical components in Baihe Dihuang decoction by HPLC dual-wavelength fingerprint method. **Methods** Kromasil 100-5-C_{18} column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used. Acetonitrile (A) -0.1% phosphoric acid aqueous solution (B) was used as mobile phase in gradient elution, the flow rate was 0.7 mL • min^{-1}, the column temperature was 35 ℃, the detection wavelength was 203 nm, 320 nm, and the injection volume was 10 μL. The "Similarity Evaluation System of Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (2012 edition)" was used to analyze the HPLC chromatograms of 15 batches of Baihe Dihuang decoction material reference to establish dual-wavelength fingerprint. The contents of 3 main components were determined simultaneously. **Results** HPLC dual wavelength fingerprint of Baihe Dihuang decoction was established with the wavelength of 203 nm and 320 nm, and there were 16 and 9 common peaks, respectively. The contents of catalpol, rehmannioside D and leonurin ranged from 36.2126 ～ 48.8442 mg • g^{-1}, 2.9734 ～ 4.8516 mg • g^{-1} and 3.6128 ～ 5.0232 mg • g^{-1}, respectively. **Conclusion** This study characterized the information of fresh lily bulb and fresh rehmannia root juice in Baihe Dihuang decoction by dual wavelength fingerprint and content determination, providing a reference for the establishment of material reference and preparation quality evaluation system of Baihe Dihuang decoction.

Key words: Baihe Dihuang decoction; fingerprint; classic prescription; content determination; substance benchmark

百合地黄汤来源于东汉张仲景所著的《金匮要略》，由"百合七枚（擘），生地黄汁一升组成"[1]，原书中该方主要治疗百合病，原书言"百合病未经吐、下、发汗误治，病程虽长，而病情仍如初期，具备首条症状，病机为心肺阴虚内热者，主用百合地黄汤，润养心肺、凉血清热、兼能滋肾"。现代研究表明百合地黄汤具有良好抗抑郁、抗焦虑、调节亚健康状态、改善睡眠症状等作用[2-6]。

随着中医药行业的发展，国家中医药管理局发布了《古代经典名方目录（第一批）》[7]，百合地黄汤被收录于此。经典名方的研究主要包括物质基准的研究和制剂方面的研究，而物质基准的研究规定[8]除成型工艺外，其他制备方法应当与古代医籍记载基本一致，因此，如何建立完善的质量标准和制备工艺是亟待解决的关键问题。目前，对百合地黄汤的研究大多数集中在药理方面和临床应用方面，其中对治疗失眠、抗抑郁临床疗效及作用机制等方面的研究较多[9-11]。但有关百合地黄汤质量控制的研究较少，周菲等[12]虽研究了百合地黄汤物质基准，但其未严格按照古籍所记载进行研究。本研究遵循《金匮要略》《国家药监局综合司公开征求古代经典名方中药复方制剂及其物质基准申报资料要求（征求意见稿）意见》中有关物质基准的规定[13]以及相关文献资料[14-18]，最终确定处方组成以及煎煮工艺对百合地黄汤物质基准进行研究，并选用 HPLC-DAD 色谱仪建立了百合地黄汤物质基准的双波长指纹图谱，同时对其中 3 种化学成分进行了含量测定，旨在为经典名方百合地黄汤物质基准及其制剂开发的质量评价体系提供依据。

1 材料

1.1 试药

对照品：梓醇（纯度：99.6%，中国食品药品检定研究院，批号：110808-201711）；地黄苷 D（纯度：99.3%，批号：L21O10Y100752）、

益母草苷（纯度：98.0%，批号：L10A6Y2298）（上海源叶生物科技有限公司）。纯净水（娃哈哈食品有限公司）；乙腈、甲醇为色谱纯（Fisher Scientific）；其他试剂均为分析纯。

1.2　仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪（美国安捷伦公司）；HR1871 榨汁机（飞利浦）；SQP 型万分之一天平、SQP 型十万分之一天平（赛多利斯科学仪器有限公司）；KH-300D 型超声清洗器（昆山禾创超声仪器有限公司）。

1.3　药材

百合地黄汤处方中药材均来源于道地产区，地黄采自河南省焦作市，百合采自湖南省邵阳市隆回县，分别购买不同地区，不同时间段采摘的药材，经孟雪助理研究员鉴定药材分别为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch 的新鲜块根和百合科植物百合 *LiLium brownii* var.*viridulum* 的肉质鳞叶，各药材产地和信息见表 1，将各批次的单味药随机组合为 15 批百合地黄汤基准 S1 ～ S15。

表 1　百合地黄汤组方中药材产地信息

Tab 1　Origin information of Baihe Dihuang decoction

序号	样品	产地	样品	产地
S1	鲜地黄样 1	焦作市武陟县	鲜百合样 1	邵阳市隆回县
S2	鲜地黄样 1	焦作市武陟县	鲜百合样 2	邵阳市隆回县
S3	鲜地黄样 1	焦作市武陟县	鲜百合样 3	邵阳市隆回县
S4	鲜地黄样 2	焦作市博爱县	鲜百合样 4	邵阳市隆回县
S5	鲜地黄样 2	焦作市博爱县	鲜百合样 5	邵阳市隆回县
S6	鲜地黄样 2	焦作市博爱县	鲜百合样 1	邵阳市隆回县
S7	鲜地黄样 3	焦作市山阳区	鲜百合样 2	邵阳市隆回县
S8	鲜地黄样 3	焦作市山阳区	鲜百合样 3	邵阳市隆回县
S9	鲜地黄样 3	焦作市山阳区	鲜百合样 4	邵阳市隆回县
S10	鲜地黄样 4	焦作市武陟县	鲜百合样 5	邵阳市隆回县
S11	鲜地黄样 4	焦作市武陟县	鲜百合样 1	邵阳市隆回县
S12	鲜地黄样 4	焦作市武陟县	鲜百合样 2	邵阳市隆回县
S13	鲜地黄样 5	焦作市博爱县	鲜百合样 3	邵阳市隆回县
S14	鲜地黄样 5	焦作市博爱县	鲜百合样 4	邵阳市隆回县
S15	鲜地黄样 5	焦作市博爱县	鲜百合样 5	邵阳市隆回县

2　方法与结果

2.1　百合地黄汤物质基准的制备

按照上述随机组合的 S1 ～ S15，共 15 批次的百合地黄汤组方。根据《金匮要略》中百合地黄汤的煎煮工艺，将 120 g 鲜百合洗净并加入 400 mL 纯净水，浸泡 10 h，过滤，滤液弃去，药材中再加入 400 mL 水，煎煮至约为 200 mL，趁热滤过，并向滤液中加入鲜地黄汁 200 mL（鲜地黄直接榨汁取汁），共煎至约为 300 mL，并将煎煮液选用冷冻干燥法干燥，即得百合地黄汤物质基准。

2.2　百合地黄汤物质基准指纹图谱的建立

2.2.1　供试品溶液的制备

① 样品溶液的制备：精密称取制得的百合地黄汤物质基准适量（相当于 1 mL 百合地黄汤），加流动相（0.1% 磷酸水溶液∶乙腈＝ 99∶1）溶解，并定容至 10 mL 量瓶中，摇匀，经 0.45 μm 的滤膜过滤，即得供试品溶液。

② 地黄阴性样品制备：将鲜百合洗净并加入 400 mL 纯净水，浸泡 10 h，过滤，滤液弃去，药材中再加入 400 mL 纯净水，煎煮至约为 200 mL，趁热滤过，滤液中加入纯净水 200 mL，共煎至约为 300 mL，即得地黄阴性样品煎液。取上述液体 1 mL，置于 10 mL 量瓶中，加流动相（0.1% 磷酸水溶液∶乙腈＝ 99∶1），定容至刻度，摇匀，经 0.45 μm 的滤膜过滤，即得。

③ 百合阴性样品制备：取 200 mL 纯净水，并加入鲜地黄汁 200 mL，共煎至约为 300 mL，即得百合阴性样品煎液。取上述液体 1 mL，置于 10 mL 量瓶中，加流动相（0.1% 磷酸水溶液∶乙腈＝ 99∶1），定容至刻度，摇匀，经 0.45 μm 的滤膜过滤，即得。

2.2.2　对照品溶液的制备　取梓醇、地黄苷 D、益母草苷对照品适量，精密称定，加流动相溶液（0.1% 磷酸水溶液∶乙腈＝ 99∶1）分别制成相应浓度的对照品溶液，并吸取相应的各对照品溶液配制成含梓醇 797.796 μg・mL^{-1}、地黄苷 D 95.924 μg・mL^{-1}、益母草苷 131.908 μg・mL^{-1} 的混合对照品溶液，经 0.45 μm 的滤膜过滤，即得。

2.2.3　色谱条件　采用 Kromasil 100-5-C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；检测波长 203、320 nm；流速 0.7 mL・min^{-1}；柱温 35 ℃；流动相：乙腈（A）-0.10% 磷酸水溶液（B）；进样量 10 μL；梯度洗脱（0 ～ 20 min，2.0%A；20 ～ 60 min，2.0% ～ 20.0%A；60 ～ 70 min，20.0 ～ 40.0%A；70 ～ 80 min，40.0% ～ 90.0%A）。

2.2.4　精密度试验　称取百合地黄汤物质基准（S3）适量（相当于 1 mL 百合地黄汤），精密称定，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，连续进样 6 针，记录各色谱图，在 203 nm 时，以地黄苷 D 峰为参比峰，计算各共有峰相对保留时间 *RSD* 均小于 0.10%，相对峰面积 *RSD* 均小于 1.0%，在 320 nm 时，以峰 2 为参比峰，计算各共有峰相对保留时间 *RSD* 均小于 0.10%，相对峰面积 *RSD* 均小于 2.0%，表明该仪器精密度良好。

2.2.5　稳定性试验　称取百合地黄汤物质基准（S3）适量（相当于 1 mL 百合地黄汤），精密称定，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，分别在

0、3、6、11、16、23 h 后进样测定，记录色谱图，在 203 nm 时，以地黄苷 D 峰为参比峰，计算各共有峰相对保留时间 *RSD* 均小于 0.10%，相对峰面积 *RSD* 均小于 1.0%，在 320 nm 时，以峰 2 为参比峰，计算各共有峰相对保留时间 *RSD* 均小于 0.10%，相对峰面积 *RSD* 均小于 2.5%，表明供试品溶液在 23 h 内稳定性良好。

2.2.6　重复性试验　称取百合地黄汤物质基准（S3）适量（相当于 1 mL 百合地黄汤），精密称定（共 6 份），按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，进样测定，记录色谱图，在 203 nm 时，以地黄苷 D 峰为参比峰，计算各共有峰相对保留时间 *RSD* 均小于 0.10%，相对峰面积 *RSD* 均小于 5.0%，在 320 nm 时，以峰 2 为参比峰，计算各共有峰相对保留时间 *RSD* 均小于 0.10%，相对峰面积 *RSD* 均小于 4.0%，表明该方法重现性良好。

2.2.7　双波长指纹图谱的建立及共有峰归属　取 15 批百合地黄汤物质基准供试品溶液进样分析，分别记录 203 nm、320 nm 下的各色谱图。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”软件进行数据分析，指纹图谱 1：当波长为 203 nm 时，以 S1 的图谱为参照图谱，进行多点校正和全谱峰匹配，确定共有峰 16 个，并通过与混合对照品溶液对比，指认出其中 3 种化学成分，分别为梓醇（峰 1）、地黄苷 D（峰 5）和益母草苷（峰 8），见图 1。匹配后的 15 批样品色谱图，见图 2。对各样品进行相似度评价，S1 ～ S15 样品与对照图谱的相似度分别为 0.993、0.990、0.994、0.993、0.995、0.996、0.995、0.996、0.994、0.997、0.997、0.997、0.991、0.991、0.990，对样品中共有峰进行药材归属，其中峰 2、峰 9 来源于鲜百合，峰 1、3 ～ 8、10 ～ 16 均来源于鲜地黄汁，见图 3。指纹图谱 2：当波长为 320 nm 时，以 S1 的图谱为参照图谱，进行多点校正和全谱峰匹配，确定共有峰有 9 个，对样品中共有峰进行归属，其中峰 2、4、6、9 来源于鲜地黄汁，峰 1、3、5、7 ～ 8 均来源于鲜百合，见图 4，匹配后的 15 批样品色谱图，见图 5。对各样品进行相似度评价，S1 ～ S15 样品与对照图谱的相似度分别为 0.987、0.990、0.995、0.976、0.970、0.973、0.988、0.994、0.989、0.995、0.984、0.986、0.991、0.992、0.993。

2.3　百合地黄汤物质基准中化学成分的含量测定

2.3.1　色谱条件　采用 Kromasil 100-5-C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；检测波长 203 nm；流速 0.7 mL・min^{-1}；柱温 35 ℃；流动相：乙

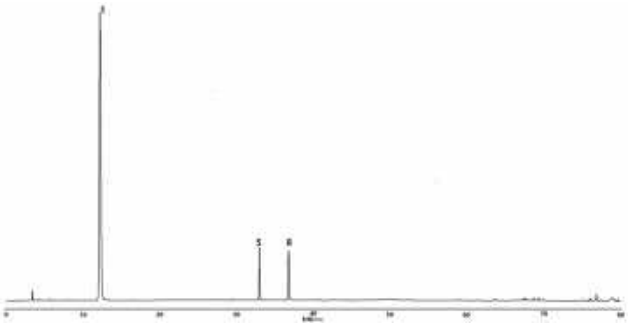

图 1　混合对照品 HPLC 图（203 nm）

Fig 1　HPLC diagram of mixed reference substance（203 nm）

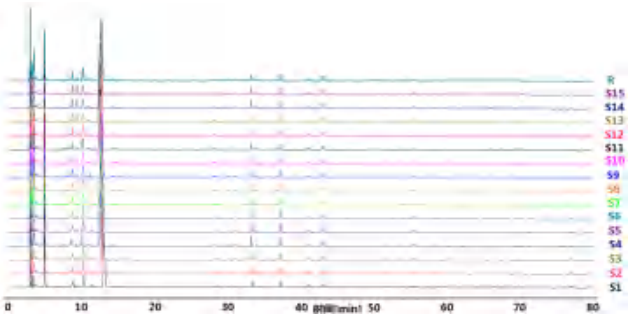

图 2　15 批百合地黄汤物质基准的指纹图谱（203 nm）

Fig 2　Fingerprints of 15 batches of primary standard of Baihe Dihuang decoction（203 nm）

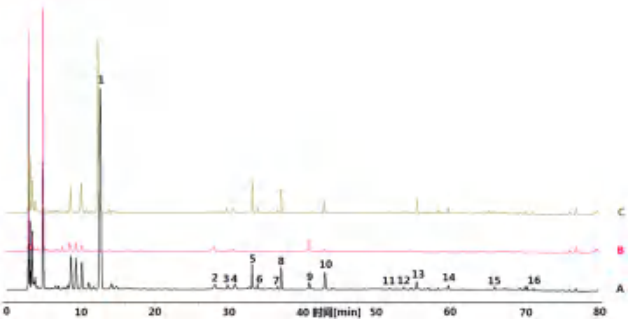

图 3　百合地黄汤物质基准指纹图谱共有峰归属（203 nm）

Fig 3　Attribution peak fingerprint of characteristic peak of primary standard of Baihe Dihuang decoction（203 nm）

A. 百合地黄汤物质基准（primary standard of Baihe Dihuang decoction）；B. 鲜百合（fresh lily bulbs）；C. 鲜地黄汁（fresh rehmannia juice）

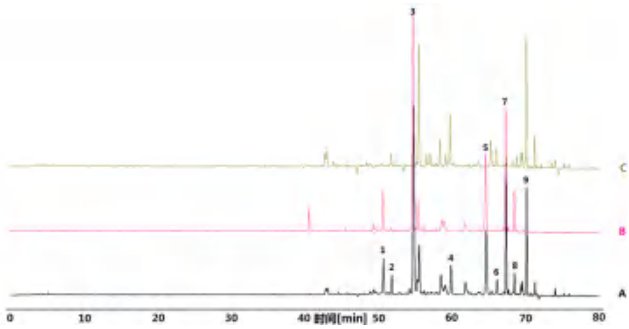

图 4　百合地黄汤物质基准指纹图谱共有峰归属（320 nm）

Fig 4　Attribution peak fingerprint of characteristic peak of primary standard of Baihe Dihuang decoction（320 nm）

A. 百合地黄汤物质基准（primary standard of Baihe Dihuang decoction）；B. 鲜百合（fresh lily bulbs）；C. 鲜地黄汁（fresh rehmannia juice）

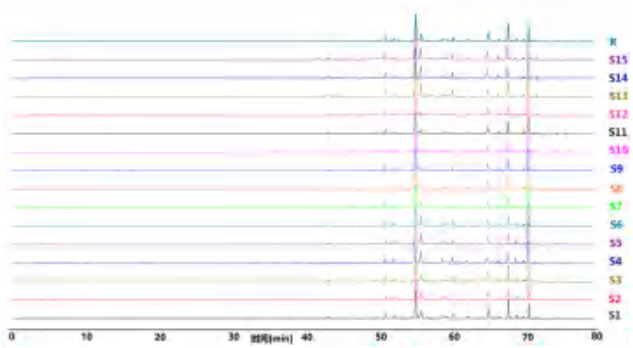

图 5　15 批百合地黄汤物质基准的指纹图谱（320 nm）

Fig 5　Fingerprints of 15 batches of primary standard of Baihe Dihuang decoction（320 nm）

腈（A）-0.10% 磷酸水溶液（B）；进样量 10 μL；梯度洗脱（0 ～ 20 min，2.0%A；20 ～ 60 min，2.0% ～ 20.0%A；60 ～ 70 min，20.0 ～ 40.0%A；70 ～ 80 min，40.0% ～ 90.0%A）。

2.3.2　线性关系　取梓醇、地黄苷 D 和益母草苷对照品适量，精密称定，加流动相溶液分别制成梓醇 797.796 μg • mL^{-1}、地黄苷 D 95.924 μg • mL^{-1} 和益母草苷 131.908 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液，即得。

精密吸取上述混合对照品溶液适量，分别稀释成质量浓度为母液的 1、1/2、1/4、1/8、1/16、1/32 的混合对照品溶液，按“2.3.1”项下色谱条件进样分析，并记录色谱图。以对照品溶液的质量浓度为横坐标（X），以峰面积值为纵坐标（Y），进行线性回归，得到线性回归方程为梓醇：$Y = 8.6387X + 32.157$（$R^2 = 0.9999$）、地黄苷 D：$Y = 6.1495X + 0.8544$（$R^2 = 1.000$）、益母草苷：$Y = 5.6197X + 2.5602$（$R^2 = 0.9999$），结果表明梓醇、地黄苷 D、益母草苷分别在 24.931 ～ 797.796 μg•mL^{-1}、2.998 ～ 95.924 μg•mL^{-1}、4.122 ～ 131.908 μg • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好。

2.3.3　精密度试验　称取百合地黄汤物质基准（S3）适量（相当于 1 mL 百合地黄汤），精密称定，制备供试品溶液，连续进样 6 针，记录各色谱图，以地黄苷 D 峰为参比峰，计算各共有峰相对保留时间 *RSD* 均小于 0.10%，相对峰面积 *RSD* 均小于 1.0%，表明该仪器精密度良好。

2.3.4　稳定性试验　称取百合地黄汤物质基准（S3）适量（相当于 1 mL 百合地黄汤），精密称定，制备供试品溶液，分别于 0、3、6、11、16、23 h 后进样测定，记录色谱图，以地黄苷 D 峰为参比峰，计算各共有峰相对保留时间 *RSD* 均小于 0.10%，相对峰面积 *RSD* 均小于 1.0%，表明供试品溶液在 23 h 内稳定性良好。

2.3.5　重复性试验　称取百合地黄汤物质基准（S3）适量（相当于 1 mL 百合地黄汤），精密称定（共 6 份），制备成供试品溶液，进样测定，记录色谱图，以地黄苷 D 峰为参比峰，计算各共有峰相对保留时间 *RSD* 均小于 0.10%，相对峰面积 *RSD* 均小于 5.0%，表明该方法重现性良好。

2.3.6　加样回收试验　称取已知含量的百合地黄汤物质基准（S3）适量（相当于 1 mL 百合地黄汤），精密称定，制备供试品溶液 6 份，每组分别添加地梓醇对照品溶液（1164.32 μg • mL^{-1}）、地黄苷 D 对照品溶液（342.59 μg • mL^{-1}）、益母草苷对照品溶液（659.54 μg • mL^{-1}）适量，进样测定，记录色谱图，计算各化合物的平均加样回收率及 *RSD* 值。结果显示梓醇低、中、高浓度的平均回收率分别为 94.42%、94.15%、96.01%，*RSD* 分别为 0.44%、1.5%、1.6%，地黄苷 D 低、中、高浓度的平均回收率分别为 95.05%、95.80%、100.9%，*RSD* 分别为 1.7%、0.80%、4.3%，益母草苷低、中、高浓度的平均回收率分别为 104.4%、101.9%、101.8%，*RSD* 分别为 0.27%、1.5%、2.1%，结果表明该方法准确性良好。

2.3.7　指标成分的含量测定　测定 15 批次百合地黄汤物质基准的干膏得量，即百合地黄汤物质基准的质量比对应百合地黄汤体积的数值，结果见表 2。

表 2　15 批百合地黄汤物质基准含量测定结果

Tab 2　Content of material reference in 15 batches of Baihe Dihuang decoction

样品	干膏得量 /（g • mL^{-1}）	含量 /（mg • g^{-1}）		
		梓醇	地黄苷 D	益母草苷
S1	0.15775	39.0402	2.9784	3.6234
S2	0.16465	39.7836	3.0583	3.6901
S3	0.17171	39.0411	2.9734	3.6128
S4	0.18223	36.2126	4.7343	4.9216
S5	0.18791	37.0760	4.8196	5.0204
S6	0.18654	37.1299	4.8516	5.0232
S7	0.14696	45.6770	3.8269	4.7569
S8	0.15723	45.7502	3.8503	4.7552
S9	0.15760	45.1853	3.7904	4.6896
S10	0.13931	48.5416	3.5146	3.8641
S11	0.14201	48.5526	3.5096	3.8642
S12	0.14213	48.8442	3.5338	3.8767
S13	0.16193	43.6940	4.0142	4.4478
S14	0.16469	43.8541	4.0384	4.4739
S15	0.16506	43.6299	3.6686	4.4357
平均值	—	42.8008	3.8108	4.3370
均值 ±30%	—	29.9606 ～ 55.6411	2.6676 ～ 4.9541	3.0359 ～ 5.6382

根据含量测定结果可知，15 批百合地黄汤中梓醇、地黄苷 D 和益母草苷的含量分别在 36.2126 ～ 48.8442 mg • g^{-1}、2.9734 ～ 4.8516

mg • g^{-1} 和 3.6128 ～ 5.0232 mg • g^{-1}。根据国家药品监督管理局发布的《国家药监局综合司公开征求古代经典名方中药复方制剂及其物质基准申报资料要求（征求意见稿）意见》[13] 规定，物质基准中指标性成分含量一般在均值的 70% ～ 130%，15 批次指标成分含量均稳定在均值 70% ～ 130%，无离散数据。

3 讨论

本研究按照古籍记载，选用鲜百合和地黄汁（经鲜地黄榨汁处理）入药，同时结合国家中医药管理局发布的关于《古代经典名方信息表（7 首方剂）》中剂量换算关系及古代度量衡演变过程 [19-20]，最终确定制备工艺为：将鲜百合洗净并加入 400 mL 纯净水，浸泡 10 h，过滤，滤液弃去，药材中再加入 400 mL 纯净水，煎煮至约为 200 mL，趁热滤过，收集滤液并加入 200 mL 鲜地黄汁，共煎至约为 300 mL，即得。

为提高百合地黄汤物质基准的质量控制研究，本文建立了 HPLC 的双波长指纹图谱，分析处方中特征化学成分的药材来源。相比单波长指纹图谱控制生产过程中的质量，双波长指纹图谱不但对处方的工艺进行了质量控制，而且可以准确的控制生产过程中原药材的质量，进而提高了生产效率和质量控制的效率。试验中选用 HPLC-DAD 高效液相色谱仪对样品进行了 200 ～ 400 nm 全波长扫描。研究发现，当波长为 203 nm 时共有峰数目最多，共有 16 个，通过对共有峰归属其中 14 个来源于鲜地黄汁，2 个来源于鲜百合药材；当波长为 320 nm 时，共有峰有 9 个，其中 5 个来源于鲜百合药材，4 个来源于鲜地黄汁。在 203 nm 和 320 nm 双波长下建立的指纹图谱，可以更加准确、全面地监控物质基准在生产过程中的质量。同时试验还对其中 3 种化合物进行了含量测定，分别为梓醇、地黄苷 D 和益母草苷，以提高百合地黄汤物质基准的质量的控制，以便更好地生产出合格、放心的产品。建立的双波长指纹图谱和多种化学成分的含量测定，为百合地黄汤物质基准的质量控制和复方制剂的制剂开发提供了可靠的质量控制方法，该方法稳定性和重现性均较好。

参考文献

[1] 张仲景.《金匮要略》[M]. 北京：中国古籍出版社，2018：125.

[2] 强亚，武嫣斐 . 百合地黄汤治疗阈下抑郁 48 例临床观察 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2015，13（2）：256-257.

[3] 方欢乐，韩宁娟，李晓明，等 . 百合地黄汤抗焦虑作用的研究 [J]. 海南医学院学报，2019，25（5）：326-329.

[4] 杨文奎，兰琴，张永杰 . 百合知母地黄汤合酸枣仁汤治疗甲亢不寐的临床效果 [J]. 中国医药导报，2017，38（19）：81-84.

[5] 新昕 . 百合地黄汤加减治疗阴虚型不寐的疗效分析 [J]. 中国医药指南，2018，16（33）：183-184.

[6] 杨蒙蒙，张怀亮 . 百合地黄汤治疗脑卒中后抑郁症的疗效探讨 [J]. 中国现代药物应用，2020，14（20）：213-215.

[7] 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.

[8] 国家药品监督管理局 . 关于发布古代经典名方中药复方制剂简化注册审批管理规定的公告（2018 年第 27 号）[EB/OL]. https：//www. nmpa. gov. cn/ zhuanti/ ypqxgg/ggzhcfg/20180601163901361. html.

[9] 赵慧敏 . 百合地黄汤合酸枣仁汤对抑郁症模型大鼠海马及炎症因子的影响 [D]. 呼和浩特：内蒙古医科大学，2019.

[10] 郑竹宏 . 百合地黄汤治疗失眠的作用机制研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2019.

[11] 马柯，张洪秀，董振飞，等 . 百合地黄汤治疗抑郁症的研究进展 [J]. 中成药，2019，41（4）：874-878.

[12] 周菲，林美斯，王琳，等 . 经典名方百合地黄汤物质基准制备及过程质量控制研究 [J]. 中草药，2019，50（16）：3824-3832.

[13] 国家药品监督管理局 . 国家药监局综合司公开征求古代经典名方中药复方制剂及其物质基准申报资料要求（征求意见稿）意见 . [EB/OL]. [2021/3/4]. https：//www. nmpa. Gov. cn/xxgk/zhqyj/zhqyjyp/20190327150101694. html.

[14] 范希然，李多多，许刚，等 . 百合地黄汤的历史沿革研究 [J]. 世界中医药，2020，15（23）：3660-3664.

[15] 朱建平，陈俣祯，高萌萌，等 . 基于 UPLC-Q-TOF/MS 法对鲜、干百合地黄汤化学成分的比较研究 [J]. 湖南中医药大学学报，2021，41（11）：1698-1704.

[16] 迟显苏，赵海军，王媛，等 . 基于文献考证及物质基准评价探讨中医经典名方现代化开发 [J]. 中华中医药杂志，2021，36（2）：643-647.

[17] 周菲，李锐，张春容，等 . 经典名方百合地黄汤的处方及本草考证 [J]. 时珍国医国药，2020，31（9）：2134-2136.

[18] 丁腾，孙宇宏，杜霞，等 . 经典名方百合地黄汤的化学成分与网络药理学研究 [J]. 中草药，2019，50（8）：1848-1856.

[19] 颜文强 . 历代中药度量衡演变考论 [J]. 老子学刊，2016（1）：137-144.

[20] 丘光明，邱隆，杨平 . 中国科学技术史 • 度量衡卷 [M]. 北京：科学出版社，2001：217，447.

（收稿日期：2022-02-05；修回日期：2022-04-07）

综述

罗沙司他与同类 HIF-PHI 及 ESA 在肾性贫血治疗中的分析比较

陈珩[1]，马俊龙[2]，唐励静[3]（1. 长沙市第一医院药剂科，长沙　410005；2. 中南大学湘雅三医院临床试验中心，长沙　410006；3. 南华大学附属第二医院药学部，湖南　衡阳　421001）

摘要：贫血是慢性肾脏病（CKD）常见并发症之一，同时也影响 CKD 进展，因此肾性贫血的治疗对于提高 CKD 患者的生活质量和生存率至关重要。罗沙司他作为我国首个上市的口服小分子缺氧诱导因子脯氨酰羟化酶抑制剂（HIF-PHI），临床应用时间相对较短，关于其安全性和有效性的评价还在不断完善。本文将通过分析比较罗沙司他与同类 HIF-PHI 及红细胞生成刺激剂（ESA）在肾性贫血中的治疗特点，推进罗沙司他的合理用药，为我国 HIF-PHI 的临床应用提供参考。

关键词：罗沙司他；小分子缺氧诱导因子脯氨酰羟化酶抑制剂；红细胞生成刺激剂；肾性贫血
中图分类号：R552　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2100-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.023

Role of roxadustat and other HIF-PHIs and ESA in renal anemia

CHEN Heng[1], MA Jun-long[2], TANG Li-jing[3] (1. *Department of Pharmacy*, *the First Hospital of Changsha*, *Changsha* 410005; 2. *Research Center for Clinical Trials*, *the Third Xiangya Hospital of Central South University*, *Changsha* 410006; 3. *Department of Pharmacy*, *the Second Affiliated Hospital of University of South China*, *Hengyang Hunan* 421001)

Abstract: Anemia is a general complication in chronic kidney disease (CKD), and it also affects the course of CKD. Therefore, the treatment of renal anemia is crucial to improving the quality of life and survival rate of CKD patients. Roxadustat, the first oral small-molecule hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor (HIF-PHI) in China, has a relatively short clinical application period. Research about its safety and efficacy is still going on for improvement. This review provided suggestions for the clinical application of HIF-PHI and promoted its rational use by analyzing and comparing the treatment characteristics of roxadustat, other HIF-PHIs and erythropoiesis-stimulating agent in renal anemia.

Key words: roxadustat; small-molecule hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor; erythropoiesis-stimulating agent; renal anemia

慢性肾脏病（chronic kidney disease，CKD）是指病程超过 3 个月的肾脏病变[1]。肾性贫血为 CKD 的常见并发症之一，是由各种肾脏疾病引发的红细胞生成素（erythropoietin，EPO）绝对或相对不足，以及尿毒症毒素影响红细胞生成所致。肾性贫血的临床诊断较为复杂，需明确几个方面：① 确实存在贫血；② 患者患有 CKD，并已有肾损伤；③ 已排除肾性贫血之外的其他贫血可能[2]。临床上通常使用红细胞生成刺激剂（erythropoiesis-stimulating agents，ESA）和铁剂对肾性贫血患者进行药物治疗。与 ESA 的替代疗法不同，近年来研究者发现缺氧诱导因子脯氨酰羟化酶抑制剂（HIF-PHI）可以通过促进 EPO 的内源性合成，治疗肾性贫血。罗沙司他是全球首个应用于临床上

基金项目：国家自然科学基金项目（No.82104172）。
作者简介：陈珩，女，硕士，主要从事临床药理学研究，email：chenwangxing0906@163.com

治疗肾性贫血的 HIF-PHI，于 2018 年在中国批准上市。本文将罗沙司他与同类 HIF-PHI 以及 ESA 进行比较，分析不同 HIF-PHI 的用法用量、对眼部疾病和肿瘤的影响以及对血脂的作用等，同时探讨罗沙司他与 ESA 在治疗时机、治疗低反应性、对铁剂的影响和导致的不良反应方面的差异，为临床上 CKD 患者的肾性贫血治疗提供参考。

1　罗沙司他与同类 HIF-PHI

在低氧条件下，缺氧诱导因子（HIF）刺激 EPO 的合成和释放，脯氨酰羟化酶（PHD）羟基化 HIF 的脯氨酸残基后，导致其被肿瘤抑制蛋白识别，从而发生降解。HIF-PHI 通过竞争 PHD 的必需底物 2- 氧戊二酸，抑制 PHD 活性，稳定 HIF 的表达，进而促进 EPO 的内源性合成，治疗肾性贫血 [3]。HIF-PHI 的设计主要围绕 2- 酮戊二酸（2-OG）展开，目前进入临床应用的均为其衍生物 [4]。罗沙司他作为全球首个用于治疗肾性贫血的 HIF-PHI，在中国率先获批上市，同时罗沙司他、达普司他、伐度司他、恩那司他和莫立司他目前已于日本上市。

1.1　用法用量和剂量调整

参照罗沙司他、达普司他、伐度司他、恩那司他和莫立司他的药品说明书，这 5 个药品均为口服药，基本情况见表 1。

表 1　HIF-PHI 基本情况

Tab 1　Basic information of HIF-PHI

类别	用法用量	剂量调整及停药处理
罗沙司他	① 每周 3 次；② 非透析患者：70 mg/ 次（体质量＜ 60 kg）或 100 mg/ 次（体质量＞ 60 kg）；③ 透析患者：100 mg/ 次（体质量＜ 60 kg）或 120 mg/ 次（体质量＞ 60 kg）；④ 最大剂量不超过 2.5 mg • kg^{-1}	① 常规每 4 周进行一次剂量调整；② 血红蛋白（Hb）在 2 周内增加＞ 20 g • L^{-1}，且 Hb ＞ 90 g • L^{-1}，则剂量应降低一个阶梯；③ Hb ≥ 130 g • L^{-1}，暂停给药；Hb ＜ 120 g • L^{-1} 时，剂量应降低一个阶梯恢复给药
达普司他	① 非透析患者：2 mg/ 次 qd（未使用 ESA 治疗）或 4 mg/ 次 qd（从 ESA 治疗转换）；② 透析患者：4 mg/ 次 qd；③ 最大剂量不超过 24 mg qd	① 常规不低于 4 周进行一次剂量调整；② Hb 在 4 周内增加＞ 20 g • L^{-1} 并急剧上升，应及时减量或停药；③ 停药后恢复给药，以比停药前至少低一级的剂量恢复给药
伐度司他	① 300 mg/ 次 qd；② 最大剂量不超过 600 mg	
恩那司他	① 非透析患者：2 mg/ 次 qd；② 透析患者：4 mg/ 次 qd；③ 最大剂量不超过 8 mg qd	
莫立司他	① 非透析患者：25 mg/ 次或 50 mg/ 次 qd（从 ESA 治疗转换）；② 透析患者：75 mg/ 次 qd；③ 最大剂量不超过 200 mg qd	

可以发现，用于 CKD 患者的肾性贫血治疗时，相比于其他 HIF-PHI，罗沙司他每周 3 次给药，更利于提高患者用药依从性；而达普司他和恩那司他用药剂量小，且达普司他的治疗窗更宽，提示达普司他具有更好的安全性。除伐度司他外，其余药品均根据患者是否接受透析进行给药剂量调整，并且达普司他和莫立司他提供了 ESA 治疗转换时的推荐给药剂量。同时 5 个药品的剂量调整周期均不低于 4 周，剂量调整按阶梯进行，停药后恢复使用比停药前至少低一级的剂量恢复给药。

1.2　对眼部疾病和肿瘤发生的作用

HIF-PHI 治疗肾性贫血的药理作用是内源性的，其具有除促进 EPO 产生之外的多重作用。研究发现经 HIF 调节的糖酵解酶可以诱导血管内皮生长因子（vascular endothlial growth factor，VEGF）的形成，增加血管通透性 [5]。VEGF 激活促生存信号通路，导致肿瘤发生发展，同时也促进视网膜和脉络膜血管生成，引发眼部疾病 [6]。

在日本的Ⅲ期临床试验中，眼科评估显示罗沙司他组和 ESA 组的新发或恶化的视网膜出血率相当，并且没有观察到具有临床意义的视网膜厚度变化 [7-8]。而 Chen 等 [9-10] 在中国发起的两项Ⅲ期临床试验中，均未报告患者眼部和肿瘤相关疾病的不良反应事件。

在几项Ⅱ期和Ⅲ期临床试验中，接受达普司他治疗的 CKD 患者，血管内皮生长因子（VEGF）水平与基线水平相似，没有明显上升 [11-12]。Ⅱ期临床试验结果显示只有当对健康参与者给予高剂量的达普司他（50 ～ 100 mg）时，血浆 VEGF 水平才会升高 [13]。在日本一项Ⅲ期临床试验中，对接受达普司他治疗 12 周、24 周的 CKD 患者进行了全面的眼科检查，未观察到临床显著变化，在达普司他治疗 24 周期间也未发现任何提示血管生成增强的眼部事件以及癌症、心肌梗死、脑卒中、死亡等不良事件 [14]。

一项Ⅱ期临床试验结果显示在第 12 周和治疗结束时，伐度司他组的 VEGF 水平与基线相比，平均变化差异没有统计学意义 [15]。在日本进行的一项多中心Ⅲ期临床试验中，与 ESA 组相比，伐度司他组视网膜疾病（13.0% *vs* 9.9%）和视网膜出血（9.9% *vs* 6.2%）的发生率更高，且在视网膜出血患者中未观察到血浆 VEGF 水平的显著变化；伐度司他组恶性肿瘤（4.3% *vs* 5.6%）的发生率略低 [16]。此外，日本另一项Ⅲ期临床试验显示伐度

司他组受试者视网膜出血轻微，24 周时患者血浆 VEGF 未升高 [17]。同时多项临床试验显示未观察到伐度司他的肿瘤相关性 [15，17]。

MIYABI 项目对接受莫立司他治疗的透析 CKD 日本患者进行了评估，其中 9.8% 的莫立司他组患者和 5.3% 的 ESA 组患者报告了良性、恶性和潜在性肿瘤发生；在未接受透析的患者中，两药肿瘤和眼部不良反应发生率相似（莫立司他分别为 3.7% 和 19.5%；ESA 分别为 4.9% 和 20.7%）；莫立司他组观察到血清 VEGF 升高，但其临床影响尚不清楚 [18]。

日本的Ⅲ期临床试验中显示恩那司他不会引起 VEGF 的变化；与 ESA 组相比，恩那司他组的视网膜疾病发生率更高，视网膜出血发生率相似，未发生中重度视网膜不良反应；一项临床试验中恩那司他组没有报告肿瘤相关不良反应，而另一项中恩那司他组的恶性或不明肿瘤事件的发生率与 ESA 组相似 [19-20]。临床前研究显示，高剂量的恩那司他（比治疗剂量高 10 倍）会诱导 VEGF 生成，但可能不影响肿瘤生长 [21]。

综上，罗沙司他在临床试验中目前未见 VEGF 相关报告；治疗剂量的达普司他、伐度司他和恩那司他不会升高 VEGF 水平；而治疗剂量的莫立司他出现了 VEGF 升高现象，但不具备临床意义；与治疗剂量不同，高剂量的达普司他和恩那司他会诱导 VEGF 生成，升高 VEGF 水平。同时，罗沙司他和达普司他未见明显的眼部和肿瘤相关不良反应；伐度司他和恩那司他可能会影响眼部疾病发生和肿瘤进展；莫立司他可能导致接受透析患者的肿瘤进展，但对非透析患者的影响与 ESA 相似。

1.3　对血脂的作用

CKD 患者出现血脂异常较为普遍，这与心血管事件的风险增加有关。研究证明 HIF 可以影响低密度脂蛋白（LDL）和极低密度脂蛋白（VLDL）的摄取，减轻缺氧诱导的脂质积累 [22]，并促进 3- 羟基 -3- 甲基戊二酸单酰辅酶 A（HMG-CoA）还原酶的降解，降低胆固醇合成 [23]。然而，目前尚不清楚 HIF-PHI 对血脂异常的疗效。

在中国进行的一项针对透析 CKD 患者的Ⅲ期临床试验中，接受 27 周罗沙司他治疗后，罗沙司他组血脂水平下降，总胆固醇（TC）、LDL、非高密度脂蛋白、高密度脂蛋白（HDL）和三酰甘油水平分别下降了 17%、24%、19%、9% 和 8%[10]。另外，研究者于日本开展的一项透析 CKD 患者Ⅲ期临床试验中，给予达普司他治疗 24 周后，受试者血脂水平下降，其中 TC、HDL、LDL 分别下降 8.96%、9.90% 和 11.18%[14]。研究显示治疗剂量的伐度司他不影响血脂水平 [15]。综上所述，罗沙司他和达普司他可以降低血脂水平，而伐度司他不影响血脂水平，其他两种药物暂时未报告对血脂的影响。因而，在临床中，罗沙司他和达普司他在与降血脂药物联合使用时，应注意调整给药剂量，以免联合使用时降血脂药物过量，导致不良反应。未来罗沙司他和达普司他是否可以通过降低血脂水平而改善心脑血管疾病还有待进一步证实。

2　罗沙司他与 ESA

ESA 为 EPO 类似物，是近 30 年来治疗肾性贫血的主要药物之一。ESA 目前主要有三代：第一代是重组人红细胞生成素（rHuEPO），为短效 ESA，国内上市的以重组人红细胞生成素 α（Epoetin α）和重组人红细胞生成素 β（Epoetin β）为代表；第二代以达依泊汀 α 为代表，其经糖基化修饰后，药物半衰期延长；第三代以持续性促红细胞生成素受体激活剂（CERA）为代表，经过聚乙二醇修饰，药物半衰期更长 [24]。

2.1　治疗时机

《肾性贫血诊断与治疗中国专家共识（2018 修订版）》建议非透析 CKD 患者在 Hb ＜ 100 g • L^{-1} 时开始使用 ESA 治疗，而透析 CKD 患者则需限制 Hb 在 90 ～ 100 g • L^{-1} 时接受 ESA 治疗 [25]。2021 年《中国肾性贫血诊治临床实践指南》推荐：① CKD 患者纠正绝对铁缺乏后，在 Hb ＜ 100 g • L^{-1} 时使用 ESA；② Hb ＜ 90 g • L^{-1} 时，在使用铁剂治疗的情况下，可一并使用 ESA 治疗；③ 尽量避免透析患者在 Hb ＜ 90 g • L^{-1} 时才开始使用 ESA 治疗 [2]。

在国内多中心Ⅲ期临床试验中，接受罗沙司他治疗的透析 CKD 患者 Hb 平均水平在（104±7）g • L^{-1}[9]，非透析 CKD 患者 Hb 水平在 70 ～ 100 g • L^{-1}[10]。2021 年《中国肾性贫血诊治临床实践指南》推荐接受罗沙司他治疗的时机为 Hb ＜ 100 g • L^{-1}。而在日本研究者发起的 4 项接受罗沙司他治疗的透析 CKD 患者的Ⅲ期临床试验中，一项 Hb 水平基线平均为 110 g•L^{-1}[8]，一项 Hb 水平＜105 g•L^{-1}[26]，两项 Hb 水平＜100 g • L^{-1}[27]。可以看出，在亚洲人群中，罗沙司他的治疗时机存在一定差异性。

两者比较而言，ESA 类药物诞生时间较早，临床使用经验丰富。而罗沙司他作为国内第一个上市的 HIF-PHI，临床应用时间相对较短，其治疗时机未来仍然需要更多的真实世界数据加以佐证。

2.2　治疗低反应性

在临床实践中，一些患者在使用较大剂量的ESA后，肾性贫血症状仍然没有改善，即考虑可能存在ESA低反应性。ESA低反应性是指按照体重给予适量的ESA治疗，患者一个月后Hb水平无明显上升；或者在ESA稳定治疗期，为达到Hb稳定需2次增加ESA的剂量且增加幅度超过50%。在对Epoetin α剂量研究的CHOIR试验二次分析中，研究者发现提高Epoetin α的剂量不能使ESA低反应性患者的Hb达到目标水平，相反会增加心脑血管不良事件的风险[28]，因此不能通过进一步提高ESA剂量来纠正ESA低反应性。研究显示铁缺乏、炎症、甲状旁腺功能亢进和营养不良等都可能造成ESA低反应性，目前临床针对此类患者主要采用纠正铁缺乏、改善炎症和优化透析等途径进行对症治疗[2]。

相比于ESA，尚不明确罗沙司他是否存在治疗低反应性，但已有相关研究证实其可以提高ESA低反应性患者的Hb水平：① 我国的一项回顾性研究中，22名ESA低反应性肾性贫血患者使用罗沙司他，3个月后其中17名患者Hb ≥ 110 g·L^{-1}，较基线水平显著升高[29]；② 一项纳入64名ESA低反应性血液透析患者的研究表明，使用罗沙司他不仅提高了Hb水平，还显著降低了甲状旁腺激素水平[30]。因此，罗沙司他的出现为ESA低反应性肾性贫血患者提供了新的治疗策略。

2.3 铁剂

缺铁可能导致ESA低反应性，CKD患者通常需要补充铁储备来最大限度地提高ESA的疗效[31]。在一项透析CKD患者的回顾性研究中，纳入的38 891名ESA低反应性患者缺铁率高达26.5%，而正常反应者为10.9%[32]。对于CKD患者，给予铁剂治疗，还可有效延缓ESA起始治疗时间，减少ESA用量[33]。

而罗沙司他不仅可以提高CKD患者的Hb水平，同时能更好地增强口服铁的吸收，提高血清铁的利用率，促进铁转运，调节铁代谢[34]。一项meta分析研究显示，与rHuEPO或安慰剂组相比，HIF-PHI显著降低铁蛋白水平和转铁蛋白饱和度（TSAT）；接受HIF-PHI治疗的患者其总铁结合力（TIBC）显著高于rHuEPO或安慰剂组[35]。Zhang等[36]研究显示在非透析CKD患者中，与安慰剂组相比，罗沙司他组的血清铁蛋白水平和血清铁调素水平显著降低，而透析患者中罗沙司他组和ESA组血清铁蛋白水平无显著差异；在透析和非透析CKD患者中，罗沙司他组的TSAT%差值显著低于安慰剂/ESA组，TIBC显著高于安慰剂/ESA组。

因此，在罗沙司他和铁剂联合治疗时，罗沙司他可以促进铁的利用，减轻缺铁性贫血，同时也能避免使用高剂量的铁剂导致不良反应发生率和病死率增加；单独使用罗沙司他时，需要监测铁代谢情况，必要时补充铁剂。而ESA治疗肾性贫血前应尽量纠正铁缺乏，与铁剂联合使用，铁剂可以增强ESA疗效，改善ESA低反应性，减少由于高剂量ESA导致的不良反应事件发生。

2.4 不良反应

ESA治疗肾性贫血的本质是补充EPO，激活促红细胞生成素受体，因此为了达到更高的Hb水平，往往使用高剂量的ESA，从而增加不良反应发生率。研究者发现心脑血管风险的增加与所使用的Epoetin α剂量有关，而并非是Hb水平[28]。此外，使用ESA治疗的患者，高血压发生率上升，其可能原因是ESA增加儿茶酚胺和血管紧张素Ⅱ的反应性，影响血管舒张功能，从而引起高血压[37]。一项回顾性研究显示随着ESA剂量增加，血液透析患者死亡风险显著升高[38]。ENHANCE试验和BEST证明使用高剂量的ESA提高Hb水平时，会加快肿瘤进展[39-40]。因此对于有特定危险因素（肿瘤、脑卒中或无症状的缺血性心脏病）的患者，如果使用ESA治疗，应降低预期Hb调整水平[41]。

一项Ⅱ期临床试验结果显示：在非透析CKD患者中，与接受Epoetin α治疗19周受试者相比，接受罗沙司他治疗的患者在包括需要住院的心力衰竭和不稳定型心绞痛、血栓栓塞、心肌梗死、脑卒中及死亡在内的不良反应发生率更低[42]。中国的一项Ⅲ期临床试验结果提示罗沙司他组与安慰剂组相比，常见的不良反应为高钾血症和代谢性酸中毒[10]，另一项研究提示罗沙司他组和Epoetin α组相似，其最常见的不良反应为上呼吸道感染（18.1% *vs* 11.0%），最常报告的严重不良事件是血管通路并发症（2.9% *vs* 3.0%）。在欧洲、美洲和亚洲的19个国家进行的一项和日本进行的两项Ⅲ期临床试验均报告罗沙司他组的安全性和ESA组相似[8，43-44]。另外在动物实验中，研究结果显示罗沙司他未促进VEGF敏感的NeuYD小鼠肿瘤的发生、进展或转移[45]，体外致癌性实验结果提示罗沙司他没有致癌潜力[46]。

由此可见，罗沙司他与ESA导致的不良反应类型相似，主要涉及到上呼吸道感染、心脑血管不良事件和死亡风险上升等，而不良反应发生率也与ESA相似甚至更低。但是，使用ESA导致肿瘤风险升高，而体外实验显示罗沙司他不影响肿瘤进展，且临床试验尚未报告罗沙司他与肿瘤进展的相关性证据，以上提示罗沙司他对存在肿瘤风险的肾性贫血患者有更好的安全性。而罗沙司他在血压稳

定性、心血管不良事件以及死亡风险等方面的安全性是否更好，还需要更多的临床试验证据证实。

3 小结

通过罗沙司他与同类 HIF-PHI 的比较可以发现，在肾性贫血治疗中不同 HIF-PHI 对患者 VEGF 水平以及眼部疾病和肿瘤发展的影响不同。因此在临床诊治中，需针对患者情况进行个体化用药。但由于目前缺乏更高级别的循证医学证据，尚无法完全确定 HIF-PHI 与 VEGF 水平、眼部疾病和肿瘤进展的关系。此外，罗沙司他可以内源性地将 EPO 水平提高到生理范围内或附近，同时增加 Hb 水平并改善铁稳态。因此与 ESA 替代疗法不同，罗沙司他在治疗过程中不需要大剂量使用，从而避免药物过量引起不良反应的发生。其次，研究显示罗沙司他与 ESA 常见不良反应类别相似，但 ESA 会升高肿瘤发生发展风险，因而罗沙司他可能更适合有肿瘤风险的肾性贫血患者。

目前，在我国上市的 HIF-PHI 类药物只有罗沙司他，因其临床应用时间较短，有效性和安全性评价还不够完善；给药时机、不良反应和药物相互作用等还需要更多的研究和临床实践来补充和明确。因此，本综述将罗沙司他与同类 HIF-PHI 及 ESA 进行分析比较，以期为促进临床上罗沙司他的合理用药和未来其他 HIF-PHI 类药物的使用提供一定的参考。

参考文献

[1] 胡娜平，李会会，刘美佑，等 . 黄芪多糖和羟基红花黄色素 A 单用及合用对慢性肾病大鼠肾细胞凋亡的影响 [J]. 中南药学，2016，14（2）：113-117.

[2] 中国医师协会肾脏内科医师分会肾性贫血指南工作组 . 中国肾性贫血诊治临床实践指南 [J]. 中华医学杂志，2021，101（20）：1463-1502.

[3] 白瑞，张蕾 . 低氧诱导因子脯氨酰羟化酶抑制剂治疗肾性贫血的研究进展 [J]. 实用医药杂志，2021，38（3）：272-276.

[4] Hirota K. HIF-α prolyl hydroxylase inhibitors and their implications for biomedicine：a comprehensive review [J]. Biomedicines，2021，9（5）：468.

[5] Locatelli F，Fishbane S，Block GA，et al. Targeting hypoxia-inducible factors for the treatment of anemia in chronic kidney disease patients [J]. Am J Nephrol，2017，45（3）：187-199.

[6] Amadio M，Govoni S，Pascale A. Targeting VEGF in eye neovascularization：what’s new?：a comprehensive review on current therapies and oligonucleotide-based interventions under development [J]. Pharmacol Res，2016，103：253-269.

[7] Akizawa T，Iwasaki M，Otsuka T，et al. Phase 3 study of roxadustat to treat anemia in non-dialysis-dependant CKD [J]. Kidney Int Rep，2021，6（7）：1810-1828.

[8] Akizawa T，Iwasaki M，Yamaguchi Y，et al. Phase 3，randomized，double-blind，active-comparator（darbepoetin alfa）study of oral roxadustat in CKD patients with anemia on hemodialysis in Japan [J]. J Am Soc Nephrol，2020，31（7）：1628-1639.

[9] Chen N，Hao C，Liu BC，et al. Roxadustat treatment for anemia in patients undergoing long-term dialysis [J]. N Engl J Med，2019，381（11）：1011-1022.

[10] Chen N，Hao C，Peng X，et al. Roxadustat for anemia in patients with kidney disease not receiving dialysis [J]. N Engl J Med，2019，381（11）：1001-1010.

[11] Meadowcroft AM，Cizman B，Holdstock L，et al. Daprodustat for anemia：a 24-week，open-label，randomized controlled trial in participants on hemodialysis [J]. Clin Kidney J，2019，12（1）：139-148.

[12] Holdstock L，Meadowcroft AM，Maier R，et al. Four-week studies of oral hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase inhibitor GSK1278863 for treatment of anemia [J]. J Am Soc Nephrol，2016，27（4）：1234-1244.

[13] Hara K，Takahashi N，Wakamatsu A，et al. Pharmacokinetics，pharmacodynamics and safety of single，oral doses of GSK1278863，a novel HIF-prolyl hydroxylase inhibitor，in healthy Japanese and Caucasian subjects [J]. Drug Metab Pharmacokinet，2015，30（6）：410-418.

[14] Tsubakihara Y，Akizawa T，Nangaku M，et al. A 24-week anemia correction study of daprodustat in Japanese dialysis patients [J]. Ther Apher Dial，2020，24（2）：108-114.

[15] Pergola PE，Spinowitz BS，Hartman CS，et al. Vadadustat，a novel oral HIF stabilizer，provides effective anemia treatment in nondialysis-dependent chronic kidney disease [J]. Kidney Int，2016，90（5）：1115-1122.

[16] Nangaku M，Kondo K，Ueta K，et al. Efficacy and safety of vadadustat compared with darbepoetin alfa in Japanese anemic patients on hemodialysis：a phase 3，multicenter，randomized，double-blind study [J]. Nephrol Dial Transplant，2021，36（9）：1731-1741.

[17] Nangaku M，Kondo K，Takabe S，et al. Vadadustat for anemia in chronic kidney disease patients on peritoneal dialysis：a phase 3 open-label study in Japan [J]. Ther Apher Dial，2021，25（5）：642-653.

[18] Akizawa T，Yamada T，Nobori K，et al. Molidustat for Japanese patients with renal anemia receiving dialysis [J]. Kidney Int Rep，2021，6（10）：2604-2616.

[19] Akizawa T，Nangaku M，Yamaguchi T，et al. A phase 3 study of enarodustat in anemic patients with CKD not requiring dialysis：the SYMPHONY HD study [J]. Kidney Int Rep，2021，6（7）：1840-1849.

[20] Akizawa T，Nangaku M，Yamaguchi T，et al. A phase 3 study of enarodustat（JTZ-951）in Japanese hemodialysis patients for treatment of anemia in chronic kidney disease：SYMPHONY HD study [J]. Kidney Dis（Basel），2021，7（6）：494-502.

[21] Fukui K，Shinozaki Y，Kobayashi H，et al. JTZ-951（enarodustat），a hypoxia-inducibe factor prolyl hydroxylase in-

hibitor，stabilizes HIF-α protein and induces erythropoiesis without effects on the function of vascular endothelial growth factor [J]. Eur J Pharmacol，2019，859：172532.

[22] Shen GM，Zhao YZ，Chen MT，et al. Hypoxia-inducible factor-1（HIF-1）promotes LDL and VLDL uptake through inducing VLDLR under hypoxia [J]. Biochem J，2012，441（2）：675-683.

[23] Hwang S，Nguyen AD，Jo Y，et al. Hypoxia-inducible factor 1α activates insulin-induced gene 2（Insig-2）transcription for degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl（HMG）-CoA reductase in the liver [J]. J Biol Chem，2017，292（22）：9382-9393.

[24] Fishbane S，Spinowitz B. Update on anemia in ESRD and earlier stages of CKD：core curriculum 2018 [J]. Am J Kidney Dis，2018，71（3）：423-435.

[25] 肾性贫血诊断与治疗中国专家共识（2018 修订版）[J]. 中华肾脏病杂志，2018，34（11）：860-866.

[26] Akizawa T，Otsuka T，Reusch M，et al. Intermittent oral dosing of roxadustat in peritoneal dialysis chronic kidney disease patients with anemia：a randomized，phase 3，multicenter，open-label study [J]. Ther Apher Dial，2020，24（2）：115-125.

[27] Akizawa T，Ueno M，Shiga T，et al. Oral roxadustat three times weekly in ESA-naïve and ESA-converted patients with anemia of chronic kidney disease on hemodialysis：results from two phase 3 studies [J]. Ther Apher Dial，2020，24（6）：628-641.

[28] Szczech LA，Barnhart HX，Inrig JK，et al. Secondary analysis of the CHOIR trial epoetin-alpha dose and achieved hemoglobin outcomes [J]. Kidney Int，2008，74（6）：791-798.

[29] 董建华，范文静，吴边，等 . 罗沙司他治疗血液透析患者红细胞生成素低反应性贫血的疗效观察 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志，2021，30（3）：211-216.

[30] Weir MR. Managing anemia across the stages of kidney disease in those hyporesponsive to erythropoiesis-stimulating agents [J]. Am J Nephrol，2021，52（6）：450-466.

[31] Batchelor EK，Kapitsinou P，Pergola PE，et al. Iron deficiency in chronic kidney disease：updates on pathophysiology，diagnosis，and treatment [J]. J Am Soc Nephrol，2020，31（3）：456-468.

[32] Cizman B，Smith HT，Camejo RR，et al. Clinical and economic outcomes of erythropoiesis-stimulating agent hyporesponsiveness in the post-bundling era [J]. Kidney Med，2020，2（5）：589-599. e581.

[33] Karaboyas A，Morgenstern H，Pisoni RL，et al. Association between serum ferritin and mortality：findings from the USA，Japan and European dialysis outcomes and practice patterns study [J]. Nephrol Dial Transplant，2018，33（12）：2234-2244.

[34] Tang M，Zhu C，Yan T，et al. Safe and effective treatment for anemic patients with chronic kidney disease：an updated systematic review and meta-analysis on roxadustat [J]. Front Pharmacol，2021，12：658079.

[35] Wang B，Yin Q，Han YC，et al. Effect of hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase inhibitors on anemia in patients with CKD：a meta-analysis of randomized controlled trials including 2804 patients [J]. Ren Fail，2020，42（1）：912-925.

[36] Zhang L，Hou J，Li J，et al. Roxadustat for the treatment of anemia in patients with chronic kidney diseases：a meta-analysis [J]. Aging（Albany NY），2021，13（13）：17914-17929.

[37] Agarwal R. Mechanisms and mediators of hypertension induced by erythropoietin and related molecules [J]. Nephrol Dial Transplant，2018，33（10）：1690-1698.

[38] Zhang Y，Thamer M，Stefanik K，et al. Epoetin requirements predict mortality in hemodialysis patients [J]. Am J Kidney Dis，2004，44（5）：866-876.

[39] Henke M，Laszig R，Rübe C，et al. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy：randomised，double-blind，placebo-controlled trial [J]. Lancet，2003，362（9392）：1255-1260.

[40] Leyland-Jones B，Semiglazov V，Pawlicki M，et al. Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy：a survival study [J]. J Clin Oncol，2005，23（25）：5960-5972.

[41] Locatelli F，Bárány P，Covic A，et al. Kidney disease：improving global outcomes guidelines on anaemia management in chronic kidney disease：a European renal best practice position statement [J]. Nephrol Dial Transplant，2013，28（6）：1346-1359.

[42] Provenzano R，Besarab A，Wright S，et al. Roxadustat（FG-4592）versus epoetin alfa for anemia in patients receiving maintenance hemodialysis：a phase 2，randomized，6-to 19-week，open-label，active-comparator，dose-ranging，safety and exploratory efficacy study [J]. Am J Kidney Dis，2016，67（6）：912-924.

[43] Provenzano R，Shutov E，Eremeeva L，et al. Roxadustat for anemia in patients with end-stage renal disease incident to dialysis [J]. Nephrol Dial Transplant，2021，36（9）：1717-1730.

[44] Akizawa T，Yamaguchi Y，Otsuka T，et al. A phase 3，multicenter，randomized，two-arm，open-label study of intermittent oral dosing of roxadustat for the treatment of anemia in Japanese erythropoiesis-stimulating agent-naïve chronic kidney disease patients not on dialysis [J]. Nephron，2020，144（8）：372-382.

[45] Seeley TW，Sternlicht MD，Klaus SJ，et al. Induction of erythropoiesis by hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitors without promotion of tumor initiation，progression，or metastasis in a VEGF-sensitive model of spontaneous breast cancer [J]. Hypoxia（Auckl），2017，5：1-9.

[46] Beck J，Henschel C，Chou J，et al. Evaluation of the carcinogenic potential of roxadustat（FG-4592），a small molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase in CD-1 mice and sprague dawley rats [J]. Int J Toxicol，2017，36（6）：427-439.

（收稿日期：2022-01-05；修回日期：2022-03-08）

MAP4K1 影响 T 细胞在肿瘤微环境中的功能研究进展

刘秀盈，刘静静，朱晶晶，冯义超，王建勋*（北京中医药大学生命科学学院，北京　102488）

摘要：目前，恶性肿瘤的发病率和病死率逐年上升，而就现有的治疗手段而言，能够治愈的寥寥无几，在机体抗肿瘤机制中，T 细胞介导的细胞免疫至关重要。丝裂原活化蛋白激酶 1（mitogen-activated protein kinase 1，MAP4K1）作为一种免疫抑制调节激酶，负调节 T 细胞表面特异的抗原受体信号，参与 T 细胞在肿瘤微环境中的活化、增殖、细胞迁移和效应等重要免疫过程，有望成为恶性肿瘤免疫治疗的新靶点。本文总结了以往关于 MAP4K1 影响 T 细胞在肿瘤微环境中的各方面功能的研究，有助于阐明 MAP4K1 在肿瘤免疫治疗中的重要意义，并为研发以 MAP4K1 为靶点的药物提供新的思路。

关键词：丝裂原活化蛋白激酶 1；造血祖激酶 1；T 细胞；肿瘤微环境；免疫治疗
中图分类号：R735　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2106-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.024

Research progress in MAP4K1 affecting the function of T cells in tumor micro-environment

LIU Xiu-ying, LIU Jing-jing, ZHU Jing-jing, FENG Yi-chao, WANG Jian-xun* (*School of Life Sciences*, *Beijing University of Traditional Chinese Medicine*, *Beijing* 102488)

Abstract: The incidence and mortality of malignant tumors is increasing every year, and very few can be cured with current therapies. As an immunosuppressive regulatory kinase, mitogen-activated protein kinase 1 (MAP4K1) negatively regulates the specific antigen receptors on the surface of T cells (TCR) signals. MAP4K1 is involved in the activation, proliferation, cell migration and effect of T cells in tumor micro-environment, and is expected to be a new target for the immunotherapy of malignant tumors. This paper summarized previous studies on various aspects of MAP4K1 affecting the function of T cells in tumor micro-environment, which helps to clarify the importance of MAP4K1 in tumor immunotherapy, and provides a new idea for the development of drugs targeting MAP4K1.

Key words: mitogen-activated protein kinase 1; hematopoietic progenitor kinase 1; T cell; tumor micro-environment; immunotherapy

肿瘤微环境（tumor micro-environment，TME）是指肿瘤细胞周围存在的微环境，包括位于肿瘤病灶中心、边缘或附近的非恶性细胞、血管、淋巴器官或淋巴结、神经、细胞间成分和代谢物。缺氧和免疫抑制是 TME 的标志，这一特殊的环境有利于肿瘤细胞在生物体内的生存和迁移，而对免疫细胞起着抑制作用，其中包括细胞免疫的主体——T 细胞[1]。丝裂原活化蛋白激酶 1（mitogen-activated protein kinase 1，MAP4K1）是一种免疫抑制调节激酶，在造血细胞中有限制性表达，是 MAPK 信号通路的重要组成部分[2]，本文就 MAP4K1 影响 T 细胞在 TME 中的功能的研究进展作一综述。

MAP4K1，亦称造血祖细胞激酶 1（hematopoietic progenitor kinase 1，HPK1），是一种造血细胞特异性表达的丝氨酸 - 苏氨酸激酶，是哺乳动物 Ste20 相关蛋白激酶 MAP4K 的家族成员，家族中包括 MAP4K1、MAP4K2、MAP4K3、MAP4K5、MAP4K6 等，它们具有高度相似的蛋白质结构，在 JNK-p38 MAPK 通路担任重要角色。MAP4K1

基金项目：高层次人才科研启动经费项目（No.9011451310032）。
作者简介：刘秀盈，女，硕士研究生，主要从事 RNAi 干扰优化 CAR-T 功能的研究，email：liuxiuying0105@163.com　*通信作者：王建勋，男，特聘教授，主要从事应用现代化基因与细胞治疗手段治疗血液疾病的临床转化研究，email：jianxun.Wang@bucm.edu.cn

由一个 N 末端的激酶结构域、SH3 结合的富含脯氨酸的中间基序和 C 末端的一个柠檬酸同源结构域组成，这表明激酶和支架功能在 MAP4K1 的各种活动中都可能是重要的[2-3]。

1 MAP4K1 是 T 细胞表面特异的抗原受体（TCR）信号的负调节因子

MAP4K1 是 TCR 信号下游 SH2 携带蛋白的一个激酶[4]。MAP4K1 缺失的 T 细胞不能磷酸化 SLP76 蛋白的第 376 号位点的丝氨酸，这导致激活蛋白 1（AP-1）和细胞外信号调节激酶（ERK）途径表达下调[5-8]。细胞生物学研究表明，细胞质中的 MAP4K1 在 TCR 激活时被招募到质膜上，而活性 MAP4K1 则使接头蛋白 SLP76 磷酸化，从而激活 SLP76 作为负调节蛋白 14-3-3p 的对接位点，进而引起蛋白酶体介导的 SLP76 的降解，最终破坏 TCR 信号复合体的稳定[2]。MAP4K1 缺失的 T 细胞在 TCR 信号通路中，ERK MAPK 活性、AP-1 和活化 T 细胞核因子（NFAT）介导的基因转录水平升高，从而导致白介素 2（IL-2）分泌水平升高[2, 9]。

2 MAP4K1 的缺失促进 T 细胞向肿瘤迁徙

被抗原激活的 T 细胞需要趋化信号来引导其向肿瘤迁移。在荷瘤 K46M 小鼠（*MAP4K1* 点突变体）的肿瘤引流淋巴结中发现趋化因子 CX3CL1 的转录水平升高，并且在 K46M 小鼠体内的肿瘤中观察到 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 肿瘤浸润淋巴细胞（TIL）增加以及在 K46E（*MAP4K1* 点突变体）小鼠体内的肿瘤中 $CD8^+$ TIL 增加，由此推论 MAP4K1 激酶活性的丧失可能是趋化因子介导的肿瘤趋化作用增强的原因[6]。抗原诱导的 $CD8^+$ 细胞毒性 T 淋巴细胞朝着不断增加的趋化因子梯度迁移，这一过程需要将 β2 整合素，淋巴细胞功能相关抗原 1（LFA-1）与其同源配体表达于内皮细胞上的细胞间黏附分子 -1（ICAM-1）结合[10]，LFA-1 与 ICAM-1 的亲和力由 TCR 和趋化因子受体提供的信号调节[11]。MAP4K1 通过与 SLP76 的 SH2 结构域结合，使其无法与脱颗粒适配蛋白（ADAP）形成超分子复合物[12]。在这个模型中，没有证据表明 MAP4K1 是通过其激酶活性介导负调控功能的，而是通过其蛋白支架能力与基于 ADAP 的 LFA-1 激活复合物竞争并破坏其最终产物的形成来实现的[13]。

3 MAP4K1 的缺失减缓 T 细胞耗竭

抗原的持续刺激、TME 中抑制性免疫细胞和细胞因子的存在、抑制性受体表达上调、T 细胞相关转录因子的变化以及代谢因素均可导致 T 细胞耗竭。如何防止 T 细胞耗竭，从而延长其效应功能，是目前免疫肿瘤学的重要研究内容。已有证据充分证明，胸腺细胞选择相关高迁移率盒蛋白（TOX）和核受体 4A1（NR4A1）是 T 细胞耗竭的驱动因素，进一步研究发现与野生型 T 细胞相比，*MAP4K1* 敲除的 T 细胞中 TOX 和 NR4A1 的表达水平显著降低，且 $CD8^+$ T 细胞耗竭由 MAP4K1-NFκB-Blimp1 信号级联驱动[14]。故而 MAP4K1 的缺失能够有效减缓 T 细胞耗竭。

4 MAP4K1 对调节性 T 细胞（Tregs）的影响

在肿瘤免疫的背景下，Tregs 抑制抗肿瘤免疫应答，*MAP4K1* 敲除的 Tregs 缺乏有效抑制 TCR 诱导的效应性 T 细胞增殖反应的能力。与野生型 Tregs 相比，*MAP4K1* 敲除的 Tregs 通过持续升高的 ERK MAPK 和 RelA 核因子 κB（NF-κB）磷酸化来响应 TCR 信号。多重细胞因子分析显示，在抗 CD3ε 和抗 CD28 嵌合抗原受体 T 细胞（CAR-T）的共刺激域交联的刺激下，*MAP4K1* 敲除的 Tregs 表现出异常的细胞因子表达，包括 IL-2、IFN-γ 和趋化因子如巨噬细胞炎性蛋白 1-α 和巨噬细胞炎性蛋白 1-β 的表达增加[15]。经过对 Tregs 的稳态水平进行评估，发现与野生型 Tregs 相比，*MAP4K1* 敲除的 Tregs 的稳态水平更高[2, 15]。

5 MAP4K1 的缺失增强 T 细胞杀伤肿瘤的能力

MAP4K1 敲除的 $CD4^+$ T 细胞可通过细胞间直接的相互作用或 IL-2 的介导改善 $CD8^+$ T 细胞活化的启动，促进 $CD8^+$ 效应细胞向记忆细胞的分化。$CD4^+$ T 细胞还协调树突状细胞激活 $CD8^+$ T 细胞，将肿瘤抗原交叉提呈给 $CD8^+$ T 细胞，或者通过诱导 IL-2 的产生来激活 $CD8^+$ T 细胞。值得注意的是，有研究发现 MAP4K1 缺失使小鼠肿瘤引流区淋巴结中 $CD4^+Ki67^+$（增殖细胞的相关抗原）和 $CD8^+Ki67^+$ T 细胞显著增加，这进一步证明了荷瘤小鼠 MAP4K1 激酶失活后 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞之间的正相互作用[6]。

MAP4K1 敲除使 $CD8^+$ T 细胞的扩增和效应功能更强大，这证明了 MAP4K1 的缺失在产生和维持有效的细胞毒性和记忆性 $CD8^+$ T 细胞中起关键作用的结论。*MAP4K1* 敲除的 $CD8^+$ T 细胞在肿瘤细胞刺激后表现出更高的激活状态和更高的 CD69 表达水平，并在体外刺激时显著增加 IFN-γ 和 TNF-α 的释放水平[16]。此外，*MAP4K1* 敲除的脾淋巴细胞在体外被相同肿瘤细胞再次攻击时表现出明显更好的回忆反应及更强的肿瘤杀伤能力[6]。

在 Lewis 肺癌模型中，输注 *MAP4K1* 敲除

的 T 细胞可以赋予宿主小鼠抵抗肺癌的能力，揭示了 MAP4K1 在 T 细胞对肿瘤抗原的固有反应中的重要性 [17]。如 K46E 和 K46M 小鼠中 GL261 胶质瘤和 1956 肉瘤的生长均得到了控制 [5-6]。其中，K46E 小鼠体内的 GL261 肿瘤中检测到更多的 $CD8^+$ T 细胞的浸润，IFN-γ 和 TNF-α 表达水平升高。同样，K46M 小鼠中 1956 肿瘤的生长速度被有效缓解，对此模型中 TIL 的分析结果显示，Treg 浸润显著减少，因此 $CD8^+$ Treg 细胞比率相应增加。定量 PCR 和转录组学分析显示，参与介导抗肿瘤免疫的免疫细胞标志物在 K46M 小鼠中升高，其中最显著的是 CD4、CD8、IFN-γ、TNF-α、颗粒酶 B、CD28（T 细胞共刺激分子）、CD11c 和 CD11b（黏附蛋白白细胞整合素家族成员，可用于标记白细胞）。在肿瘤抗原背景下抑制 MAP4K1 的功能使 $CD8^+$ T 细胞的数量和活性都得到改善，甚至能够诱导高亲和力 $CD8^+$ T 细胞反应，对肿瘤进行更有效的杀伤 [18]。

6　靶向 MAP4K1 的药物

目前并没有靶向 MAP4K1 的药物上市，6 项与之相关的临床试验，均为Ⅰ期试验，其中 5 项标注为 MAP4K1 的拮抗剂，1 项是通过基因编辑技术与 CAR-T 联用，详见表 1。

表 1　与 MAP4K1 相关的临床试验

Tab 1　Clinical trials related to MAP4K1

药物名称	研发阶段	疾病	是否与其他药物联用	作用机制
PF-07265028	Ⅰ期	晚期或转移性实体瘤（胃癌、胃食管连接癌、尿路上皮癌、非小细胞肺癌或头颈部鳞状细胞癌）	是，萨善利单抗	拮抗剂
NDI-101150	Ⅰ期	胃和食管交界处的胃食管连接部（GEJ）癌	是，帕博利珠单抗	拮抗剂
PRJ1-3024	Ⅰ期	复发 / 难治性实体瘤	否	拮抗剂
CFI-402411	Ⅰ期	晚期固体恶性肿瘤	是，帕博利珠单抗	拮抗剂
BGB-15025	Ⅰ期	晚期实体瘤	是，替雷利珠单抗	拮抗剂
XYF19 CAR-T	Ⅰ期	复发或难治性 $CD19^+$ 白血病或淋巴瘤	是，CD19 CAR-T	CRISPR 基因编辑

6.1　小分子拮抗药物

基因证据表明，MAP4K1 有可能成为免疫肿瘤学新的药物靶点，这刺激了大量制药公司以及学术研究机构进行以开发 MAP4K1 小分子激酶抑制剂为重点的临床前研究，结果表明在缺氧和富含腺苷的肿瘤微环境中，单独抑制 MAP4K1 或联合抗程序性死亡受体 1（PD-1）/ 程序性死亡受体 - 配体 1（PD-L1）的免疫治疗可能导致免疫耐受 [19-20]。在拮抗剂的研发过程中，鉴于有相当多的 Ste20 家族成员具有 MAP4K 的功能，并且它们的激酶结构域与 MAP4K1 有很高的序列同源性，因此想要开发一种高度选择性的小分子而不抑制 MAP4K1 的一个或多个密切相关的 Ste20 家族成员是极具挑战性的 [5，21-22]。拮抗剂在应用过程中的一大难点即全身用药的毒副作用，因此靶向给药系统仍需不断完善，以满足临床需求 [23]。

6.2　基因编辑

通过输注 *MAP4K1* 敲除的 T 细胞以获得强大的 T 细胞功能，目前仅在小鼠身上得到成功 [16]。CAR-T 疗法是目前炙手可热的免疫疗法，有研究表明针对人类表皮生长因子受体 2（HER2）、白细胞抗原分化簇 19（CD19）和 B 细胞成熟蛋白（BCMA）这 3 个靶点联合 *MAP4K1* 敲除的 CAR-T 细胞体内抗肿瘤功能均较联合 PD-1 敲除的 CAR-T 细胞显著增强 [14]。MAP4K1 激酶缺失增强 T 细胞功能的作用是 T 细胞自主的，而不是反映 *MAP4K1* 敲除树突状细胞对 T 细胞功能的影响 [4]，故在 T 细胞上单一的敲除 *MAP4K1* 应当能够得到明显的效果。将 *MAP4K1* 缺失的影响局限于受过基因编辑的 T 细胞，自身安全性较全身性用药有大大的提升，但是也增加了成本和制备时间。

6.3　蛋白降解靶向嵌合体（PROTACs）

降解靶蛋白是近些年抗肿瘤药物研发的新策略，与传统的直接功能抑制相比，在效率、作用持续时间和对抗补偿信号方面，靶蛋白的细胞降解提供了实质性的治疗优势。采用此类小分子药物预处理后，发现 MAP4K1 抑制和降解显著促进了 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞的增殖以及 IFN-γ 的分泌，增强了抗肿瘤的效果 [14]。与拮抗剂相似，如何克服其全身用药的毒副作用也是非常重要的。

7　展望

T 细胞是免疫应答的主体细胞，但免疫细胞活化后会释放非冗余的负调节因子（称为免疫检查点），这减弱了 T 效应细胞的活性，使过度刺激对宿主造成损害的可能性降到最低。虽然最著名的检查点是表达在 T 细胞表面的负协同受体，如细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4（CTLA-4）和 PD-1，但细胞内检查点也是存在的，其中 MAP4K1 备受关注，因为它与 TCR 信号有密切关系。本文总结得出 *MAP4K1* 的敲低能够减轻 T

细胞耗竭，增强 T 细胞功能及细胞因子的释放水平，提升 T 细胞的稳态水平。*MAP4K1* 缺失的 T 细胞表现出较低的 TCR 激活阈值，伴随的高反应性表型，因此与 PD-1 相似，MAP4K1 可能会是下一个肿瘤免疫治疗的热点研究对象。

如何抑制 MAP4K1 功能的方法并不成熟，由于家族成员结构相似，拮抗剂的研发也并不完全安全，已经有几个化合物被证实与家族多个成员均可产生反应，蛋白降解靶向嵌合体（PROTACs）的研发也是困难重重，基因编辑技术虽然热门但是距离能够在临床上应用也还有一段路要走。故而寻找更加安全和高效的靶向 MAP4K1 的抑制剂，研究如何安全、便捷地进行基因敲除的研究非常重要。

综上所述，本文总结了 MAP4K1 在 TME 中对 T 细胞功能影响的最新进展，这对研究与 MAP4K1 相关的肿瘤免疫治疗有重要意义，为开发以 MAP4K1 为靶点的药物以及抗肿瘤治疗提供了新的思路与方案。

参考文献

[1] Jin MZ，Jin WL. The updated landscape of tumor micro environment and drug repurposing [J]. Signal Transduct Target Ther，2020，5（1）：166.

[2] Wang XH，Li JP，Chiu LL，et al. Attenuation of T cell receptor signaling by serine phosphorylation-mediated lysine 30 ubiquitination of SLP-76 protein [J]. J Biol Chem，2012，287（41）：34091-34100.

[3] Kiefer F，Tibbles LA，Anafi M，et al. HPK1，a hematopoietic protein kinase activating the SAPK/JNK pathway [J]. EMBO J，1996，15（24）：7013-7025.

[4] Hernandez S，Qing J，Thibodeau RH，et al. The kinase activity of hematopoietic progenitor kinase 1 is essential for the regulation of T cell function [J]. Cell Rep，2018，25：80-94.

[5] Sawasdikosol S，Burakoff S. A perspective on HPK1 as a novel immune-oncology drug target [J]. ELIFE，2020，9：e55122.

[6] Liu JQ，Curtin J，You D，et al. Critical role of kinase activity of hematopoietic progenitor kinase 1 in anti-tumor immune surveillance [J]. PLoS One，2019，14（3）：e0212670.

[7] Ling P，Meyer CF，Redmond LP，et al. Involvement of hematopoietic progenitor kinase 1 in T cell receptor signaling [J]. J Biol Chem，2001，276：18908-18914.

[8] Lasserre R，Cuche C，Blecher-Gonen R，et al. Release of serine/threonine-phosphorylated adaptors from signaling microclusters down-regulates T cell activation [J]. J Cell Biol，2011，195（5）：839-853.

[9] Sauer K，Liou J，Singh SB，et al. Hematopoietic progenitor kinase 1 associates physically and functionally with the adaptor proteins B cell linker protein and SLP-76 in lymphocytes [J]. J Biol Chem，2001，276：45207-45216.

[10] Slaney CY，Kershaw MH，Darcy PK. Trafficking of T cells into tumors [J]. Cancer Res，2014，74（24）：7168-7174.

[11] Wang H，Chen Y，Lin P，et al. The CUL7/F-box and WD repeat domain containing 8（CUL7/ Fbxw8）ubiquitin ligase promotes degradation of hematopoietic progenitor kinase 1 [J]. J Biol Chem，2014，289（7）：4009-4017.

[12] Wang H，McCann FE，Gordan JD，et al. ADAP-SLP-76 binding differentially regulates supramolecular activation cluster（SMAC）formation relative to T cell-APC conjugation [J]. J Exp Med，2004，200（8）：1063-1074.

[13] Patzak IM，Königsberger S，Suzuki A，et al. HPK1 competes with ADAP for SLP-76 binding and via Rap1 negatively affects T-cell adhesion [J]. Eur J Immunol，2010，40（11）：3220-3225.

[14] Si JW，Shi XJ，Sun SH，et al. Hematopoietic progenitor kinase1（HPK1）mediates T cell dysfunction and is a druggable target for T cell-based immunotherapies [J]. Cancer Cell，2020，38（4）：551-566.

[15] Sawasdikosol S，Zha R，Fisher TS，et al. 859HPK1 influences regulatory T cell functions [J]. Immuno Horizons，2020，4：382-391.

[16] Yongjoon L，Seung HJ，Park AY，et al. Inhibition of the kinase activity of hematopoietic progenitor kinase 1 enhances anti-PD-1-induced reinvigoration of human tumor-infiltrating $CD8^+$ T cells [J]. J Immunother Cance，2020，8（Suppl 3）：A912-A912.

[17] Alzabin S，Pyarajan S，Yee H，et al. Hematopoietic progenitor kinase 1 is a critical component of prostaglandin E2-mediated suppression of the antitumor immune response [J]. Cancer Immunol Immunother，2010，59（3）：419-429.

[18] You D，Hillerman S，Locke G，et al. Enhanced antitumor immunity by a novel small molecule HPK1 inhibitor [J]. J Immunother Cancer，2021，9（1）：e001402.

[19] Sitkovsky MV. Lessons from the A2A adenosine receptor antagonist-enabled tumor regression and survival in patients with treatment-refractory renal cell cancer [J]. Cance Discov，2020，10（1）：16-19.

[20] Sitkovsky MV. Sufficient numbers of anti-tumor T cells is a condition of maximal efficacy of anti-hypoxia-A2-adenosinergic drugs during cancer immunotherapy [J]. Curr Opin Pharmacol，2020，53：98-100.

[21] Wang Y，Zhang K，Georgiev P，et al. Pharmacological inhibition of hematopoietic progenitor kinase 1 positively regulates T-cell function [J]. PLoS One，2020，15（12）：e0243145.

[22] Kumar S，Principe DR，Singh SK，et al. Mitogen-activated protein kinase inhibitors and T-cell-dependent immunotherapy in cancer [J]. Pharmaceuticals，2020，13（1）：9.

[23] 杨锦昱，谢锦珊，白菁钰，等 . 肿瘤微环境响应型药物递送系统研究进展 [J]. 中南药学，2021，19（6）：1219-1227.

（收稿日期：2022-03-13；修回日期：2022-05-23）

健脾祛湿中药治疗高尿酸血症的作用机制研究进展

曹慧雅，李凯文，李阁，王洋，王丹*，王涛*（天津中医药大学中医药研究院，天津　301617）

摘要：随着生活水平的提高，高尿酸血症患病率呈逐年上升趋势，成为继高血脂、高血压、高血糖之后的第四高，严重威胁人们的健康。中医理论体系认为脾肾亏虚为高尿酸血症的发病基础，故中医临床常用健脾祛湿类药物治疗此症。药理研究表明健脾祛湿中药可通过降尿酸、抗炎、抗氧化及调节肠道菌群等发挥防治高尿酸血症的作用。本文基于中医对高尿酸血症的认识和高尿酸血症临床治疗药物现状，对近些年健脾祛湿中药治疗高尿酸血症的作用及机制进行系统的阐述，以期为高尿酸血症的治疗及新药研发提供新思路。

关键词：高尿酸血症；健脾祛湿中药；作用机制

中图分类号：R284　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2110-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.025

Research progress in the mechanism of traditional Chinese medicine for hyperuricemia in invigorating the spleen and dispelling dampness

CAO Hui-ya, LI Kai-wen, LI Ge, WANG Yang, WANG Dan*, WANG Tao* (*Institute of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, *Tianjin* 301617)

Abstract: With the improvement of living standards, the prevalence of hyperuricemia is increasing year by year, becoming the fourth hyper after hyperlipidemia, hypertension and hyperglycemia, which seriously threatens people's health. The theoretical system of traditional Chinese medicine believes that the spleen-kidney deficiency is the basic pathogenesis for hyperuricemia, so traditional Chinese medicine of invigorating spleen and dispelling dampness has been used. Pharmacological studies have shown that traditional Chinese medicine that invigorates the spleen and removes the dampness for hyperuricemia functions through reducing the uric acid, anti-inflammation, antioxidation and regulating the intestinal flora. Based on the understanding of Chinese medicine for hyperuricemia and the current situation of clinical drugs for hyperuricemia, this review systematically summaried the role and mechanism of traditional Chinese medicine for hyperuricemia via invigorating the spleen and dispelling the dampness, which will provide new ideas for the treatment of hyperuricemia and the development of new drugs.

Key words: hyperuricemia; traditional Chinese medicine for invigorating spleen and dispelling dampness; mechanism

高尿酸血症（hyperuricemia，HUA）是由嘌呤代谢紊乱或者尿酸排泄不足引起的，血尿酸水平高于正常阈值（男性＞420 μmol・L^{-1}，女性＞360 μmol・L^{-1}）的代谢性疾病。流行病学研究表明，全球 HUA 患病率总体呈逐年上升趋势，尤其在发达国家与发展中国家的沿海地区，我国大陆普通人群 HUA 患病率已高达 17.4%[1-3]。HUA 是多种疾病的独立危险因素，如代谢综合征、心血管疾病、高血压和慢性肾脏病等，严重危害人类机体健康，因此降尿酸治疗已成为防治 HUA 的研究重点[4-6]。中药基于多途径多靶点的特点，在 HUA 的治疗上发挥独特优势，其中多

基金项目：天津市教委科研计划项目（No. 2019KJ085）。

作者简介：曹慧雅，女，在读硕士研究生，主要从事中药尿酸代谢调控研究，email：caohuiyabwcx@163.com　*通信作者：王丹，女，助理研究员，主要从事中药尿酸代谢调控研究，email：wangdan0048@tjutcm.edu.cn；王涛，男，研究员，主要从事中药代谢性疾病调控研究，email：wangtao@tjutcm.edu.cn

以健脾祛湿中药为主，能有效弥补目前临床药物的不足。随着研究的不断深入，健脾祛湿中药治疗 HUA 的相关作用及机制也愈发清晰。本文阐述了中医对 HUA 的认识和 HUA 临床治疗药物现状，针对健脾祛湿中药治疗 HUA 的作用及机制进行总结，以期为 HUA 的治疗提供参考。

1 中医对 HUA 的认识

HUA 是由机体尿酸代谢失衡而引起的疾病，中医将尿酸视为“浊物”，认为其不能留存在体内，否则预示着机体脏腑功能失调 [7]。在古代中医文献中，“高尿酸血症”这一名词并不存在。当一些临床特征如关节肿痛、尿路结石、蛋白尿、痛风性关节炎或者肾损伤等发生时，将其归为“历节病”“痛风”“痹证”等范畴 [8]。

HUA 和痛风的发病基础为肝脾肾亏虚，中医认为 HUA 的病位主要在肝、脾、肾上 [9]。在 HUA 的发生、发展过程中脾、肾两脏的清浊代谢紊乱贯穿始终。脾主运化水谷精微且兼主统血，肾脏主水液代谢，若脾失健运，肾阳不足，气化失司，则助湿生痰，痰浊蕴结，水液代谢失衡，尿酸蓄积在体内，久而牵连各脏腑功能受损。由此可知，调益脾肾在 HUA 的治疗中尤为重要。

HUA 和痛风的主要病机为湿浊瘀滞内阻。正如《张氏医通•痛风》中所称：“痛风一证，《黄帝内经灵枢》谓之贼风，《黄帝内经素问》谓之痹，《金匮要略方论》名曰历节，后世更名白虎历节。多因风寒湿气，乘虚袭于经络，气血凝滞所致”[10]。除此之外，HUA 和痛风也与饮食和免疫能力相关，在《素问》中有所体现：“膏粱之变，足生大疔”[11]。因此，中医在 HUA 的预防和治疗上以健脾祛湿、利湿泄浊为主，健脾法治疗疾病之根，利湿法治疗疾病之标，脾肾同治以正本，利湿化浊以清源，从而湿化瘀除，调益脾肾，恢复升清降浊的能力，达到治疗 HUA 的目的。

2 HUA 临床药物现状

降尿酸治疗是一个漫长的过程，需要将体内血尿酸水平控制在一定范围内。大部分 HUA 患者可以通过服用降尿酸药物来维持机体尿酸平衡。目前常用的降尿酸药物以西药为主，如苯溴马隆、非布司他、别嘌呤醇和 Rasburicase 等，虽降尿酸疗效显著，但只适宜短期服用，长期服用存在较多的不良反应，如肝损伤、肾功能异常等 [12-15]。因此研发安全性高、可长期服用且低毒的抗 HUA 药物迫在眉睫。

中医药以辩证施治为预防措施，在“整体观”和“治未病”的理论指导下，凸显出其在治疗 HUA 中一药多效、多作用靶点的特点 [16]。根据历代研究记载，中医临床多用利水渗湿药、清热药、祛风湿药及活血通络药治疗痛风和 HUA，如萆薢、肾茶、土茯苓、秦艽、虎杖、延胡索等 [17-18]。石晗等 [19] 对降尿酸的用药规律进行分析总结，发现临床常用归经肝脾肾的药物论治 HUA，佐证了中医对 HUA 病因、病机和病位判断的正确性。健脾祛湿类中药归肝、脾、肾经，功效为祛风除湿、燥湿健脾。HUA 表现为本虚标实，而健脾祛湿中药可以达到标本兼治的目的，即健脾以治本、祛湿以治标，在预防和治疗 HUA 上具有优势且意义重大。Chu 等 [20] 以祛湿类中药为研究对象，通过 Excel 筛选的方法统计其与尿酸代谢的关系，结果 65 种祛湿中药中有 16 种具有降尿酸作用。宋倩等 [21] 将 732 名痛风急性期患者服用中药的情况进行统计分析，发现健脾祛湿药的使用频率占 99.24%，且是处方配伍的关键。基于此，可以看出健脾祛湿中药有良好的应用前景。

3 健脾祛湿中药治疗 HUA 的作用机制

3.1 降尿酸作用

机体内尿酸的合成过程需要多种酶的参与，如黄嘌呤氧化酶（XOD）、腺苷脱氨酶（ADA）、磷酸核糖焦磷酸合成酶（PRS）、次黄嘌呤 - 鸟嘌呤磷酸核糖转移酶（HGPRT）和鸟嘌呤脱氢酶（GDA）等，在嘌呤代谢过程中这些酶活性异常是尿酸合成增多的主要原因。XOD 在嘌呤代谢过程中发挥重要的作用，它能将次黄嘌呤转变成黄嘌呤，进而转变成尿酸，是嘌呤代谢生成尿酸最终环节的关键限速酶。研究表明许多健脾祛湿中药可通过抑制尿酸合成酶降尿酸，常见的有菊苣、土茯苓、萆薢、薏苡仁和茯苓等。菊苣的功效是清肝利胆、利尿消肿 [22]，研究显示其可抑制 XOD、ADA 等多种嘌呤代谢酶的活性，从而阻碍尿酸生成，最终降低血清尿酸水平。萆薢和土茯苓两者均具有利水、健脾运湿的功效，多用于治疗 HUA 的复方中，如健脾渗湿方和复方土茯苓等 [23-24]。朱立然等 [25] 研究发现萆薢的有效成分萆薢总皂苷可显著降低 HUA 大鼠的尿酸水平，其机制可能是抑制 XOD 的活性。现代药理研究表明，土茯苓及其有效成分白藜芦醇对 HUA 小鼠的 XOD 活性有显著抑制作用，可增强机体抗氧化能力来降低血尿酸，保护肾脏 [26-27]。薏苡仁是健脾祛湿良药，其与土茯苓、木瓜组成的薏仁木瓜化浊汤能显著降低机体尿酸水平，其机制可能是抑制 XOD 的活性 [28]。

尿酸排泄多依赖肾脏和肠道尿酸转运蛋白，

少部分凭借小肠上皮细胞上分布的不以尿酸为底物的转运蛋白及相关支架蛋白，从而维持机体尿酸的动态平衡。有研究表明萆薢的有效成分皂苷可通过下调 HUA 小鼠肾脏尿酸转运蛋白 1（URAT1）和葡萄糖转运蛋白家族（GLUT9）的表达，上调有机阴离子转运蛋白 1（OAT1）和有机阴离子转运蛋白 3（OAT3）的表达以降低小鼠血尿酸水平 [29]。菊苣可通过调节“肠 - 肾”尿酸转运蛋白从而减少尿酸排泄。一方面，菊苣及其有效成分菊苣酸可通过调节肾脏尿酸转运蛋白促进尿酸排泄，达到降尿酸和保护肾脏的作用 [30-33]；另一方面，菊苣可以上调肠道尿酸分泌蛋白，即 ATP 结合盒蛋白 G 超家族成员 2（ABCG2）的表达，从而促进肠道尿酸的排泄 [31]。菊苣提取物还可通过干预肠道嘌呤转运蛋白 CNT2 的表达，有效抑制嘌呤核苷在肠道的重吸收，减少尿酸生成，进而达到降尿酸的作用 [34]。

利尿药茯苓具有健脾、利水渗湿的功效。现有研究发现，茯苓可通过上调 ABCG2 的表达发挥对 HUA 小鼠的降尿酸和肾脏保护作用。茯苓水提物及其有效成分茯苓多糖可显著降低 HUA 大鼠血尿酸水平，其作用机制可能是通过上调肾小管转运体 rOAT1 和 rOCT2 表达、下调尿酸转运体 1（rURAT1）的表达，从而抑制尿酸重吸收和促进尿酸分泌，达到抗 HUA 的目的 [35-36]。近期研究发现茯苓可能是通过影响 ABCG2、OAT1、OAT3 和八聚体结合转录因子 2（OCT2）的表达发挥降尿酸作用，从而减轻高尿酸血症引起的肾损伤，而非影响 URAT1 和 GLUT9 的表达 [37]。综上分析，健脾祛湿中药可通过抑制尿酸合成和增加尿酸排泄来降低尿酸水平，从而治疗 HUA。

3.2 抗炎

炎症是机体受损产生的一种反应，现有研究表明，慢性炎症是 HUA 相关疾病的基本病理特征 [38]。在高尿酸的刺激下会引发炎症，激活炎症信号通路，导致促炎因子水平失衡，如肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）、白细胞介素（IL）等。药理学研究证实健脾祛湿中药可通过抑制机体炎症反应进而改善高尿酸诱导的损伤。土茯苓中的黄酮类成分和多酚化合物（白藜芦醇）可通过抑制促炎因子的释放，缓解痛风性关节炎 [39-41]。黄酮类化合物通过抑制 NLRP3 炎性体轴活化，即下调肾组织中 NLRP3、凋亡相关点样蛋白（ASC）和半胱氨酸蛋白酶（Caspase-1）的表达，减少下游促炎因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 等的释放发挥抗痛风性关节炎的作用。白藜芦醇通过调整血清中上述促炎因子的分布，抑制 NF-κB（p65）的表达，降低机体炎症水平，进而缓解痛风性关节炎。萆薢不仅可显著降低血清炎症因子 IL-1 和 IL-6 的水平，还可抑制 TLR4/MYD88/NF-κB 信号通路的传导，进而抑制炎症的发生，缓解 HUA 和痛风性关节炎 [42-43]。肾茶水煎剂可通过降低血清炎症因子 IL-1β、IL-8 水平减轻机体炎症，从而控制急性痛风性关节炎 [44]。

延胡索的主要活性成分为生物碱，具有抗炎的药理作用，被证实可通过抑制 IL-6、TNF-α、IL-1β 和环氧合酶 2（COX-2）等炎症因子的表达以降低肾脏炎症反应，从而起到抗痛风作用 [45]。五苓散为健脾祛湿的经典名方，以茯苓、猪苓、泽泻和白术这四味健脾祛湿中药为主，研究结果显示，其在果糖诱导的 HUA 小鼠模型中通过抑制 TLR4/MyD88 信号通路和激活 NLRP3 炎症小体来阻止炎症因子 IL-1β 的产生，从而改善 HUA 引发的肾损伤 [46]。

同时，研究证实炎症因子过度释放会增大肠道通透性，造成肠屏障受损。健脾祛湿中药可通过调节炎症因子水平，维持肠道上皮完整性和通透性，调节多条信号通路从而改善 HUA。Bian 等 [47] 的研究发现高水平的脂多糖（LPS）可与 TLR4 特异性结合，促进 TLR4/MYD88/NF-κB 炎症级联反应，形成 LPS/TLR4 轴。而菊苣提取物改善 HUA 的机制恰是通过降低血清 LPS 浓度，调节 TLR4/Myd88/NF-κB 炎症通路，抑制 LPS/TLR4 轴和下调下游炎症因子 TNF-α 和 IL-6 的表达，缓解肾损伤和肠屏障通透性，从而治疗 HUA。综上分析，健脾祛湿中药可通过调节炎症因子水平，针对性地抑制炎症靶点和调节炎症信号通路，缓解肾肠炎症反应，从而改善 HUA。

3.3 抗氧化应激

氧化应激可定义为体内氧化能力与抗氧化能力失衡所致的机体组织损伤 [48]。已有研究表明，HUA 与氧化应激有着密不可分的联系。尿酸是一把双刃剑，当机体内尿酸水平正常时，尿酸充当抗氧化剂清除活性氧（ROS）；当尿酸水平异常时，其反过来成为促氧化剂，即促进氧化物的产生和抑制抗氧化物的生成，加重机体的氧化应激损伤 [49]。健脾祛湿中药可通过调节尿酸过多诱导的体内氧化应激状态从而防治 HUA 引起的机体损伤，如通过调节 ROS、丙二醛（MDA）、一氧化氮（NO）衍生物等氧化物及谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）、还原型谷胱甘肽（GSH）、超氧化物歧化酶（SOD）等抗氧化物来改善 HUA。

有学者研究发现，肾茶和菊苣提取物能通过抑制 XOD，降低 MDA 水平，升高 SOD 活性，提高抗氧化能力，减轻氧化应激对 HUA 小鼠造成的组织炎症损伤 [50-51]。土茯苓富含黄酮类等抗氧化成分，可通过促进尿酸排泄，升高抗氧化酶的活性以抵抗氧化应激对组织造成的损伤 [52]。降尿酸复方主要由党参、山药、粉萆薢、虎杖等健脾祛湿药组成 [53]。研究表明，降尿酸复方可通过调整大鼠血清抗氧化系统 NO、过氧化氢酶（CAT）、GSH-Px、SOD 与过氧化物系统 MDA 的水平发挥抗氧化作用，从而改善 HUA 大鼠体内氧化应激引起的损伤。

除此之外，中药还可通过调节抗氧化信号通路治疗 HUA 和痛风性关节炎，例如 Sirt1/p53 或 Nrf2/HO-1 等信号通路。有研究发现，秦艽醇提物可下调微小 RNA-34a（miR-34a）和 p53 蛋白的表达水平，靶向调控 Sirt1/p53 信号通路，从而减轻氧化应激介导的组织损伤，缓解痛风性关节炎 [54]。综上分析，健脾祛湿中药可通过调节氧化指标和抗氧化信号通路抑制氧化应激，缓解 HUA。

3.4 调节肠道菌群的平衡

研究表明，肠道微生物群在人类代谢健康与疾病的发生发展中发挥了重要作用，一旦紊乱会诱发多种代谢性疾病，包括肥胖、2 型糖尿病、心脏代谢疾病和肝代谢性疾病等 [55]。因此，近年来肠菌常作为治疗代谢性疾病的靶点出现在大众面前 [56]。据报道肠道微生物与尿酸代谢密切相关 [57]。任科雨等 [58] 应用细菌培养方法对 30 名 HUA 患者的粪便肠道菌群进行分析，结果发现相较于正常人，HUA 患者的总需氧菌、拟杆菌、大肠埃希菌等有害菌的数目增多，双歧杆菌及乳酸杆菌等有益菌的数目减少，且粪便菌群尿酸处理能力与乳酸杆菌、双歧杆菌含量成正相关，由此佐证了肠道菌群参与 HUA 的发生发展。现有的研究证实，一方面肠菌可将经肠道排泄后的部分尿酸分解，进而降低机体内的尿酸蓄积。如乳杆菌和假单胞菌，它们能合成尿酸酶和尿囊素酶，将尿酸降解为尿素 [59]。另一方面，肠菌可通过参与嘌呤的氧化代谢，减少尿酸生成和肠道对嘌呤的吸收，从而减轻 HUA 的恶化。例如产生嘌呤代谢的关键酶 XOD 的变形杆菌属大肠埃希菌，介导嘌呤发酵的梭菌属和通过吸收利用嘌呤，减少肠道对嘌呤的吸收从而降尿酸的乳酸杆菌（如 PA3）[60-62]。此外，中药经消化道后又会与肠菌相互作用，两者之间的作用关系会进一步影响尿酸的肠道排泄途径。因此，肠道菌群亦是中药治疗 HUA 的潜在武器。

现代药理研究发现，祛湿类药物可有效干扰肠道菌群紊乱 [63]。健脾祛湿中药可通过增加有益菌（如乳杆菌、双歧杆菌、乳酸菌和乳酸杆菌等）的种类和相对丰度，减少有害菌（大肠埃希菌）的种类和数目来调节肠道菌群结构，缓解 HUA[64-66]。宋克玉等 [67] 研究了党参和茯苓对肠道菌群的影响，结果表明两者对 HUA 的靶标性微生物均有较好的调节作用。党参能显著提高肠道乳杆菌水平，降低大肠埃希菌加快肌酐的水解和嘌呤的降解，发挥降尿酸作用。茯苓能显著提高肠道双歧杆菌的水平，从而增强肠屏障。蔡萌 [68] 研究发现菊苣能改善 HUA 鹌鹑的肠道菌群结构。菊苣能促进有益菌双歧杆菌的生长，抑制条件致病菌粪肠球菌的繁殖，从而降低尿酸水平。祛浊痛痹方由 11 种中药组成，以健脾祛湿中药土茯苓、川萆薢为君药，研究表明该复方可使肠道菌群发生显著变化，比如巴恩斯氏菌和嗜黏蛋白阿克曼菌，通过改变菌群丰度影响 XOD 活性，进而改善 HUA[69]。

在高尿酸环境中，内环境稳态被破坏，肠道菌群结构紊乱，肠菌代谢产物水平随之波动，例如短链脂肪酸（SCFAs）、氨基酸（AA）和脂多糖（LPS）等。这些与嘌呤代谢和炎症反应有关的代谢产物水平的改变会引起尿酸排泄减少、肠屏障受损和慢性炎症等。健脾祛湿中药可通过调节肠道菌群代谢产物从而抑制尿酸水平，维护肠屏障功能和减轻炎症反应，起到改善 HUA 的作用。在鹌鹑的 HUA 模型中，菊苣提取物可以调节肠菌结构，通过增加产生丁酸的有益菌（如瘤胃球菌、双歧杆菌和 *Erysipelotrichaceae*）维持肠屏障完整性，减少螺杆菌科数量维持肠屏障通透性，减少韦荣氏球菌科数量降低 LPS 产生，从而恢复肠道微生物群，降低炎症和血尿酸水平，改善 HUA[70]。多糖物质菊粉来自菊苣，具有抗炎、抗氧化的作用。研究发现，*UOX* 基因敲除 C57BL/6J 小鼠经菊粉干预后，嗜黏蛋白阿克曼菌与瘤胃球菌属菌群丰度有所提升，SCFAs 水平升高，炎症因子水平降低，减轻炎症和改善肠屏障受损，缓解 HUA[71]。白藜芦醇苷是白藜芦醇的前体化合物，Han 等 [72] 利用代谢组学技术整体评估白藜芦醇苷抗 HUA 的机制，发现肠道菌群代谢产物苯乙酰甘氨酸与马尿酸盐含量降低，推测其可能通过调节肠道菌群及其代谢物发挥降尿酸作用。综上分析，健脾祛湿中药可通过改善肠道菌群结构，调节肠菌代谢产物水平以防治 HUA。

4 总结与展望

随着 HUA 成为多发和高发的代谢疾病，研发防治 HUA 药物的重要性凸显出来。大量研究证实，中药可通过多途径、多靶点治疗 HUA，并具有副作用少，标本兼顾的优势，既能降低尿酸水平，又能保护器官免受损伤，在防治 HUA 上具有极大的研发潜力，其中尤以健脾祛湿中药为主。高尿酸血症的病机为脾虚湿盛，而健脾祛湿中药以健脾、祛风除湿为基本原则，脾肾同治，在众多中药中表现出独特优势（如茯苓、萆薢、菊苣和薏苡仁等）。本文基于近几年国内外学者的研究，总结了健脾祛湿中药从降尿酸、抗炎、抗氧化和调节肠道菌群等方面治疗 HUA 的作用及机制（见表 1），以期为未来的临床药物研究提供理论支撑。

表 1　健脾祛湿中药对 HUA 的作用及机制

Tab 1　Effect and mechanism of traditional Chinese medicine for invigorating the spleen and dispelling the dampness on hyperuricemia

名称	功效	作用机制	药理作用	参考文献
菊苣	清肝利胆、利尿消肿	XOD↓、ADA↓	降尿酸	[22]
		ABCG2↑、CNT2↓、OAT1↑，OAT3↑、GLUT9↓、URAT1↓		[30-34]
		LPS↓、TNF-*α*↓、IL-6↓	抗炎	[47]
		XOD↓、MDA↓、SOD↑	抗氧化应激	[51]
		双歧杆菌↑、粪球杆菌↓、瘤胃球菌↑、双歧杆菌↑、*Erysipelotrichaceae*↑、嗜黏蛋白阿克曼菌↑	调节肠道菌群	[68，70-71]
土茯苓	利水、健脾祛湿	XOD↓	降尿酸	[26-27]
		NLRP3↓、ASC↓、Caspase-1↓、IL-1*β*↓、IL-6↓、TNF-*α*↓、IL-12↓、p65↓	抗炎	[39-41]
		SOD↑、CAT↑、MDA↑、GSH↑、GSSG↑	抗氧化应激	[52]
		巴恩斯氏菌↑、嗜黏蛋白阿克曼菌↑	调节肠道菌群	[36]
肾茶	清热利湿	IL-1*β*↓、IL-8↓	抗炎	[44]
		XOD↓、MDA↓、SOD↑	抗氧化应激	[50]
萆薢	利水、健脾祛湿	XOD↓、GLUT9↓、URAT1↓、OAT1↑，OAT3↑	降尿酸	[25，29]
		IL-1↓、IL-6↓	抗炎	[42-43]
		NO↑、CAT↑、GSH-Px↑、SOD↑、MDA↓	抗氧化应激	[53]
		巴恩斯氏菌↑、嗜黏蛋白阿克曼菌↑	调节肠道菌群	[69]
茯苓	健脾、利水渗湿	ABCG2↑、CNT2↓、rOAT1↑、rOAT2↑、rURAT1↓、OAT3↑	降尿酸	[35-37]
		IL-1*β*↓	抗炎	[46]
		双歧杆菌↑	调节肠道菌群	[67]
薏苡仁	利水渗湿	XOD↓	降尿酸	[28]
虎杖	利湿退黄	NO↑、CAT↑、GSH-Px↑、SOD↑、MDA↓	抗氧化应激	[53]
		苯乙酰甘氨酸↓、马尿酸盐↓	调节肠道菌群代谢产物	[72]
秦艽	祛风利湿	miR-34a↓、p53↓	抗氧化应激	[54]
延胡索	活血化瘀	IL-1*β*↓、IL-6↓、TNF-*α*↓、COX-2↓	抗炎	[45]
猪苓	利水渗湿	IL-1*β*↓	抗炎	[46]
泽泻	利水渗湿	IL-1*β*↓	抗炎	[46]
白术	健脾益气、燥湿利水	IL-1*β*↓	抗炎	[46]
党参	补中益气、健脾益肺	NO↑、CAT↑、GSH-Px↑、SOD↑、MDA↓	抗氧化应激	[53]
		乳杆菌↑、大肠埃希菌↓	调节肠道菌群	[67]
山药	补脾养胃、补肾涩精	NO↑、CAT↑、GSH-Px↑、SOD↑、MDA↓	抗氧化应激	[53]

近些年对肠道菌群的研究如火如荼，中药是理想的肠道微生态调节剂，而尿酸代谢与肠道微生物又具有密不可分的联系，故以尿酸肠道代谢为切入点，肠道菌群为靶点系统阐述健脾祛湿中药 - 肠道菌群 -HUA 之间相互作用的机制将成为未来的研究方向之一。现今已有很多改善肠道菌群紊乱的方法，如益生菌、抗菌药物和粪菌移植技术等，未来可通过中药干预与这些方法联合使用从而改善 HUA，推动中药走向国际化。

参考文献

[1] Chen-Xu M，Yokose C，Rai SK，et al. Contemporary prevalence of gout and hyperuricemia in the united states and decadal trends：the national health and nutrition examination survey，2007-2016 [J]. Arthritis Rheumatol，2019，71（6）：991-999.

[2] Dehlin M，Jacobsson L，Roddy E. Global epidemiology of gout：prevalence，incidence，treatment patterns and risk factors [J]. Nat Rev Rheumatol，2020，16（7）：380-390.

[3] Huang J，Ma ZF，Zhang Y，et al. Geographical distribution of hyperuricemia in mainland China：a comprehensive sys-

tematic review and meta-analysis [J]. Glob Health Res Policy，2020，5（1）：52.
[4] Borghi C，Agabiti-Rosei E，Johnson RJ，et al. Hyperuricaemia and gout in cardiovascular，metabolic and kidney disease [J]. Eur J Intern Med，2020，80：1-11.
[5] Zhang S，Wang Y，Cheng J，et al. Hyperuricemia and cardiovascular disease [J]. Curr Pharm Des，2019，25（6）：700-709.
[6] Mallat SG，Al Kattar S，Tanios BY，et al. Hyperuricemia，hypertension，and chronic kidney disease：an emerging association [J]. Curr Hypertens Rep，2016，18（10）：74.
[7] 王嘉颖，高靖 . 从浊毒内蕴角度辨治“消渴合并尿酸浊”[J]. 临床合理用药杂志，2021，14（14）：162-163.
[8] 倪青，孟祥 . 高尿酸血症和痛风中医认识与治疗 [J]. 北京中医药，2016，35（6）：529-535.
[9] 钱玉中，李娜，苏于纳 . 高尿酸血症中医病名及病因病机的探讨 [J]. 中医药导报，2013，19（1）：111-112.
[10] 黄暹燕 .《张氏医通》治疗痹证的方药研究 [D]. 哈尔滨：黑龙江中医药大学，2016.
[11] 陈玥颖，薛鸾 . 高尿酸血症中医认识与治疗概述 [J]. 世界中西医结合杂志，2017，12（6）：881-884.
[12] 刘鹏，靳京，孟晓燕，等 . 高尿酸血症及其治疗药物与肾脏疾病相关性的研究进展 [J]. 药物评价研究，2021，44（9）：2013-2019.
[13] Kang EH，Hye PE，Anna S，et al. Cardiovascular risk associated with allopurinol vs. benzbromarone in patients with gout [J]. Eur Heart J，2021，42：4578-4588.
[14] Ko TM，Tsai CY，Chen SY，et al. Use of HLA-B*58：01 genotyping to prevent allopurinol induced severe cutaneous adverse reactions in Taiwan：national prospective cohort study [J]. BMJ，2015，351：h4848.
[15] 徐东，朱小霞，曾学军，等 . 痛风诊疗规范 [J]. 中华内科杂志，2020，59（6）：421-426.
[16] 杜敏，罗毅，刘思思 . 中医“治未病”理论在高尿酸血症中的干预治理价值 [J]. 中医临床研究，2020，12（29）：128-130.
[17] 龚汇智，顾宁 . 中药干预高尿酸血症和痛风量效关系研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报，2021，23（4）：179-182.
[18] 魏蔼玲，袁明昊，刘娟汝，等 . 中药在痛风疾病中的应用及其作用机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（19）：225-234.
[19] 石晗，佟雅婧，杨钊田，等 . 中医药降尿酸的用药规律 [J]. 世界中医药，2021，16（21）：3241-3245.
[20] 褚梦真，张冰，林志健，等 . 祛湿类单味中药对尿酸代谢的研究 [J]. 中国中药杂志，2019，44（7）：1485-1490.
[21] 宋倩，刘健，忻凌，等 . 基于数据挖掘的痛风急性期患者中药处方模式的研究 [J]. 世界科学技术中医药现代化，2017，19（12）：1935-1941.
[22] 朱春胜，张冰，林志健，等 . 菊苣降尿酸有效成分及机制研究 [J]. 中草药，2017，48（5）：957-961.
[23] 吴晶金，李玲玉，彭江云 . 健脾渗湿方对高尿酸血症大鼠肾保护作用的机制研究 [J]. 中医药导报，2017，23（6）：25-27.
[24] Xie ZJ，Wu HX，Jing XQ，et al. Hypouricemic andarthritis relapse-reducing effects of compound tufuling oral-liquid in intercritical and chronic gout：a doubleblind，placebo-controlled，multicenter randomized trial [J]. Medicine，2017，96（11）：6315.
[25] 朱立然 . 萆薢总皂苷对高尿酸血症大鼠尿酸转运蛋白表达的影响 [D]. 合肥：安徽中医药大学，2013.
[26] Liang GY，Nie YC，Chang YB，et al. Protective effects of Rhizoma smilacis glabrae extracts on potassium oxonate-and monosodium urate-induced hyperuricemia and gout in mice [J]. Phytomedicine，2019，59：152772.
[27] 刘顺，李赫宇，赵玲 . 白藜芦醇降血尿酸、抗炎作用研究进展 [J]. 药物评价研究，2016，39（2）：304-307.
[28] 刘涛 . 薏仁木瓜化浊汤对高尿酸血症小鼠的降尿酸作用及其机制研究 [D]. 广州：广东药科大学，2020.
[29] Zhu L，Dong Y，Na S，et al. Saponins extracted from Dioscorea collettii rhizomes regulate the expression of urate transporters in chronic hyperuricemia rats [J]. Biomed Pharmacother，2017，93：88-94.
[30] 李丽玉 . 基于肾脏排泄途径的菊苣降尿酸作用机制研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2015.
[31] 王雨，褚梦真，李文静，等 . 基于“肠 - 肾”途径的健脾祛湿中药抗痛风病研究 [J]. 世界中医药，2021，16（1）：13-19.
[32] 王雨，林志健，聂安政，等 . 菊苣提取物对高尿酸血症大鼠肾脏果糖转运体 9 表达的影响 [J]. 中国中药杂志，2017，42（5）：958-963.
[33] 邹丽娜，王雨，姜卓希，等 . 基于肾脏尿酸转运的中药降尿酸活性成分筛选及评价——以菊苣酸为例 [J]. 世界中医药，2021，16（1）：28-34.
[34] 白云飞 . 基于肠道嘌呤转运蛋白 CNT2 探讨菊苣提取物降尿酸作用机制 [D]. 北京：北京中医药大学，2018.
[35] 张双金，周燕，魏玉辉，等 . 茯苓水提物对高尿酸血症大鼠 rURAT1 rOAT1 和 rOCT2 表达的影响 [J]. 西部医学，2016，28（12）：1648-1651，1657.
[36] 邓耒娇，闫洁熙，王沛，等 . 茯苓多糖对高尿酸血症大鼠肾小管转运体 rURAT1、rOAT1 和 rOCT2 表达的影响 [J]. 西部中医药，2019，32（6）：10-14.
[37] Liang D，Yong T，Diao X，et al. Hypouricaemic and nephroprotective effects of in hyperuricemic mice by up-regulating ATP-binding cassette super-family G member 2 [J]. Pharm Biol，2021，59（1）：275-286.
[38] Zhou Y，Zhao M，Pu Z，et al. Relationship between oxidative stress and inflammation in hyperuricemia：analysis based on asymptomatic young patients with primary hyperuricemia [J]. Medicine（Baltimore），2018，97（49）：e13108.
[39] 金晓敏，张晓熙，郭璐，等 . 基于 NLRP3 炎性体轴探讨土茯苓总黄酮对痛风性关节炎的作用和机制 [J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（4）：90-95.
[40] Liang G，Nie Y，Chang Y，et al. Protective effects of Rhizoma smilacis glabrae extracts on potassium oxonate-and monosodium urate-induced hyperuricemia and gout in mice [J]. Phytomedicine，2019，59：152772.
[41] 王鹏 . 白藜芦醇抗急性痛风性关节炎疗效及机制研究 [D]. 青岛：青岛大学，2014.
[42] 谭唱 . 萆薢除痹汤对于高尿酸血症模型血清尿酸及小鼠肾脏尿酸转运盐蛋白 OAT1、URAT1 mRNA 表达的实验

研究 [D]. 南京：南京中医药大学，2014.
[43] 王红艳 . 基于 TLR/MyD88/NF-κB 通路探讨萆薢除痹汤对痛风性关节炎大鼠的分子作用机制 [D]. 南京：南京中医药大学，2016.
[44] 陈珠，杨彩霞，倪婉晔，等 . 肾茶对急性痛风性关节炎大鼠的抗炎作用研究 [J]. 环球中医药，2016，9（9）：1051-1054.
[45] 张旭，张权铭，董睿陶，等 . 延胡索提取物抗痛风作用 [J]. 中国老年学杂志，2021，41（6）：1297-1300.
[46] Yang Y，Zhang DM，Liu JH，et al. Wuling San protects kidney dysfunction by inhibiting renal TLR4/MyD88 signaling and NLRP3 inflammasome activation in high fructose-induced hyperuricemic mice [J]. J Ethnopharmacol，2015，169：49-59.
[47] Bian M，Wang J，Wang Y，et al. Chicory ameliorates hyperuricemia via modulating gut microbiota and alleviating LPS/TLR4 axis in quail [J]. Biomed Pharmacother，2020，131：110719.
[48] Liu N，Xu H，Sun Q，et al. The role of oxidative stress in hyperuricemia and xanthine oxidoreductase（XOR）inhibitors [J]. Oxid Med Cell Longev，2021，2021：1470380.
[49] Su HY，Yang C，Liang D，et al. Research advances in the mechanisms of hyperuricemia-induced renal injury [J]. Biomed Res Int，2020，2020：5817348.
[50] 蓝伦礼 . 肾茶对高尿酸血症及痛风性肾病肾损害的保护作用及机制研究 [D]. 广州：广州中医药大学，2016.
[51] 王雨，林志健，张冰 . 中药菊苣改善氧化应激性炎症介导的“肠 - 肾”尿酸排泄研究 [J]. 中华中医药杂志，2020，35（5）：2552-2557.
[52] Wang SW，Fang YJ，Yu XF，et al. The flavonoid-rich fraction from rhizomes of *Smilax glabra* Roxb. ameliorates renal oxidative stress and inflammation in uric acid nephropathy rats through promoting uric acid excretion [J]. Biomed Pharmacother，2019，111：162-168.
[53] 王毅兴，吴燕升，张春燕，等 . 降尿酸复方对高尿酸血症大鼠氧化应激及肾脏炎症状态的影响 [J]. 上海中医药大学学报，2018，32（3）：80-85.
[54] 杨彬，黄俊卿，孟庆良，等 . 秦艽醇提物对痛风性关节炎大鼠氧化应激损伤及 miR-34a/sirt1 轴的影响研究 [J]. 中药药理与临床，2019，35（5）：64-69.
[55] Fan Y，Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease [J]. Nat Rev Microbiol，2021，19（1）：55-71.
[56] Li J，Zhao FQ，Wang YD，et al. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension [J]. Microbiome，2017，5（1）：14.
[57] Wang J，Chen Y，Zhong H，et al. The gut microbiota as a target to control hyperuricemia pathogenesis：potential mechanisms and therapeutic strategies [J]. Crit Rev Food Sci Nutr，2021，62（14）：3979-3989.
[58] 任科雨，勇春明，金延春，等 . 青岛地区高尿酸血症患者的肠道菌群分析 [J]. 中国医师杂志，2014，16（12）：1649-1651，1656.
[59] Hsieh CY，Lin HJ，Chen CH，et al. Chronic kidney disease and stroke [J]. Lancet Neurol，2014，13（11）：1071.
[60] John KC. Role of host xanthine oxidase in infection due to enteropathogenic and Shiga-toxigenic *Escherichia coli* [J]. Gut Microbes，2013，4（5）：388-391.
[61] Karlsson JL，Barker HA. Tracer experiments on the mechanism of uric acid decomposition and acetic acid synthesis by Clostridium acidi-urici [J]. J Biol Chem，1949，178（2）：891-902.
[62] Xiang S，Fu J，Ye K，et al. Effect of PA3 on gut microbiota in an in vitro colonic simulation [J]. Food Sci Nutr，2019，7（12）：3883-3891.
[63] 倪跃，叶仲昊，赵胜男，等 . 祛湿药对肠道菌群的影响 [J]. 中医学报，2021，36（5）：983-988.
[64] 詹雅萍，李娴，朱香顺，等 . 双歧杆菌四联活菌辅助治疗对高尿酸血症的临床分析 [J]. 临床荟萃，2020，35（4）：344-347.
[65] 王家彬，潘力 . 降解核苷作用乳酸菌的筛选及其潜在降尿酸功能 [J/OL]. 食品科学：1-14[2022-04-17]. http：//kns.cnki. net/kcms/detail/11. 2206. TS. 20210723. 1738. 026. html.
[66] Ni C，Li X，Wang L，et al. Lactic acid bacteria strains relieve hyperuricaemia by suppressing xanthine oxidase activity via a short-chain fatty acid-dependent mechanism [J]. Food Funct，2021，12（15）：7054-7067.
[67] 宋克玉，江振友，严群超，等 . 党参及茯苓对小鼠肠道菌群调节作用的实验研究 [J]. 中国临床药理学杂志，2011，27（2）：142-145.
[68] 蔡萌 . 菊苣对非同源食饵诱导的鹌鹑高尿酸血症及肠道屏障损伤的影响研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2018.
[69] Gao Y，Sun J，Zhang Y，et al. Effect of a traditional Chinese medicine formula（CoTOL）on serum uric acid and intestinal flor a in obese hyperuricemic mice inoculated with intestinal bacteria [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2020，2020：8831937.
[70] 黄胜男，林志健，张冰，等 . 菊苣对高尿酸血症鹌鹑肠道微生态的影响 [J]. 中药西药与临床药理，2015，26（4）：447-451.
[71] Guo Y，Yu Y，Li H，et al. Inulin supplementation ameliorates hyperuricemia and modulates gut microbiota in Uox-knockout mice [J]. Eur J Nutr，2021，60（4）：2217-2230.
[72] Han B，Gong M，Li Z，et al. NMR-Based metabonomic study reveals intervention effects of polydatin on potassium oxonate-induced hyperuricemia in rats [J]. Oxid Med Cell Longev，2020，2020：6943860.

（收稿日期：2022-03-11；修回日期：2022-05-17）

细胞焦亡与心肌缺血再灌注损伤及中药单体干预研究进展

王益民[1]，李焱[2]，王怡斐[2]，苏文革[2*]（1. 山东中医药大学 第一临床医学院，济南　250000；2. 山东中医药大学附属医院，济南　250014）

摘要：细胞焦亡是发生心肌缺血再灌注损伤（MIRI）的重要机制之一，阐释 MIRI 中细胞焦亡的机制具有重要意义。近年来中药单体抑制 MIRI 中细胞焦亡的研究越来越多，本文对细胞焦亡在 MIRI 中的作用机制及中药单体干预研究进行综述，为治疗 MIRI 的新药发现提供参考。

关键词：细胞焦亡；心肌缺血再灌注损伤；中药单体
中图分类号：R542.2　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2117-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.026

Research progress in cell pyroptosis and myocardial ischemia-reperfusion injury and intervention with traditional Chinese medicine monomer

WANG Yi-min[1], LI Yan[2], WANG Yi-fei[2], SU Wen-ge[2*] (1. *the First Clinical Medical College of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan* 250000; 2. *Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan* 250014)

Abstract: Pyroptosis is an important mechanism of myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI). It is important to clarify the mechanism of pyroptosis in MIRI. In recent years, there are more and more studies on the inhibition of pyroptosis in MIRI by traditional Chinese medicine monomers. This article reviewed the mechanism of pyroptosis in MIRI and the intervention with traditional Chinese medicine monomers to provide a reference for the discovery of new drugs for MIRI.

Key words: cell pyroptosis; myocardial ischemia-reperfusion injury; traditional Chinese medicine monomer

急性心肌梗死（AMI）是导致全球心血管疾病患者死亡的主要原因之一，目前通过及时有效的溶栓、经皮冠状动脉介入（PCI）和冠状动脉旁路移植术（CABG）等治疗 AMI 取得了巨大进展，缺血心肌的血运重建可恢复心肌功能，但也会产生额外的心肌损伤，称为心肌缺血再灌注损伤（MIRI）[1-3]。临床上，MIRI 常发生在急性 ST 段抬高型心肌梗死患者中，会造成心肌的炎症反应、氧化应激、线粒体功能障碍、内质网应激、钙超载等，引起心肌的二次损伤，增加心肌梗死面积，从而降低再灌注治疗的获益[1，4]。MIRI 的确切分子机制目前尚未完全阐明，也没有有效的药物来控制和预防。近年来研究表明，细胞焦亡与多种心血管疾病密切相关，如 MIRI、动脉粥样硬化、心肌梗死、心力衰竭以及冠状动脉钙化等[5]。其中细胞焦亡在 MIRI 中具有重要作用，相关机制研究和药物研究都取得了很大的进展，本文就细胞焦亡在 MIRI 中的作用机制及中药单体干预研究进行综述。

1　细胞焦亡的分子机制

细胞焦亡是一种伴随炎症反应的程序性细胞死亡，其特征是 gasdermin D（GSDMD）介导的膜孔形成、细胞肿胀和细胞溶解，并释放大量的促炎介质，如白介素 -1β（IL-1β）和白介素 -18（IL-18）等。细胞焦亡是一种非特异性先天免疫反应，不仅在抗病原微生物感染中发挥着重要作用，而且与众多非病原微生物感染也密切相关[6]。

1.1　参与细胞焦亡的关键分子

细胞焦亡的发生涉及诸多分子的参与。先天免疫反应依赖于模式识别受体（PRRs）来识别病原体相关分子模式（PAMPs）和内源性损伤相关分子模式（DAMPs）。PRRs 家族主要包括 NOD 样受体

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81804045）；山东省医药卫生科技发展计划项目（No.202103010371）；济南市科技局临床医学科技创新计划（No.202019149）；泰山学者岗位建设资金资助项目（No.2018-35）。

作者简介：王益民，男，硕士研究生，主要从事中西医结合治疗心血管疾病研究，email：805774676@qq.com　*通信作者：苏文革，男，主任医师，博士，硕士研究生导师，主要从事中西医结合治疗心血管疾病研究，email：suwenge68@163.com

（NLRs）、Toll 样受体（TLRs）和 C 型血凝素受体（CLRs）。炎症小体在细胞焦亡中发挥着重要作用，参与细胞焦亡的炎症小体主要有 NLRs 家族、AIM2 和 Pyrin，其中 NLRs 家族包括 NLRP3、NLRP6 和 NLRP9 等，以 NLRP3 的相关研究最多 [7-9]。Caspase 家族是一类进化保守的半胱氨酸蛋白酶家族，在细胞质中多以酶原（pro-caspase）形式存在，根据其功能和结构域，可以将 caspase 家族成员分为炎性 caspase 和凋亡性 caspase[10-11]。在 gasdermin 家族中，人类拥有 gasdermin A（GSDMA）、gasdermin B（GSDMB）、gasdermin C（GSDMC）、GSDMD、gasdermin E（GSDME）和 DFNB59，其中 GSDMD 在细胞焦亡中被广泛研究，有“细胞焦亡的执行者”之称 [12-14]。

1.2 经典细胞焦亡途径

经典细胞焦亡途径是由 caspase-1 介导的，在 PRRs 接受到 PAMPs 和 DAMPs 刺激后，PRRs 发生寡聚化，与凋亡相关的微粒蛋白（ASC）和 pro-caspase-1 聚合形成炎症小体，并激活 caspase-1[13，15]。一方面，caspase-1 的激活使失活的 IL-1β 和 IL-18 的前体裂解，产生成熟的 IL-1β 和 IL-18；另一方面，激活的 caspase-1 作用于 GSDMD，并将其裂解为 N 末端和 C 末端产物，其中 N 末端结构域是脂质选择性的，可以在细胞膜上形成孔隙，释放 IL-1β、IL-18 等炎性细胞因子，从而引起细胞渗透压变化，导致炎症反应，并引起细胞膨胀、破裂、死亡 [16]。

1.3 非经典细胞焦亡途径

非经典细胞焦亡途径依赖于 caspase-11/4/5 介导，不需要炎症小体激活，可直接作为受体与脂多糖（LPS）等分子结合而激活，活化的 caspase-11/4/5 通过切割 GSDMD、释放成熟的 IL-1β 和 IL-18，从而诱导细胞焦亡的发生 [17]。此外，活化的 caspase-11/4/5 还可以通过 Pannexin-1/ATP/P2X7 通路，介导 NLRP3/ASC/caspase-1 活化，促进 IL-1β 和 IL-18 成熟和释放，诱导细胞焦亡的发生 [18]。

1.4 其他细胞焦亡途径

近年来研究发现，活化的 caspase-3 可通过切割 GSDME 并促进 GSDME-N 结构域向细胞膜聚集，来诱导细胞膜孔隙的形成，从而导致细胞焦亡 [19]。Caspase-8 对依赖于 NLRP3 的 caspase-1 通路起正向调节作用，还可以作为 caspase-3 的上游蛋白或者直接切割 GSDMD 或 GSDME 来诱导细胞焦亡 [20]。颗粒酶 A 或 B 可以取代 caspase 的“传统效应”，裂解 gasdermin 蛋白家族，进而诱导细胞焦亡 [21]。

2 细胞焦亡与 MIRI

MIRI 的病理生理学涉及多种细胞的参与，如心肌细胞、心肌成纤维细胞、血管内皮细胞、间充质细胞、巨噬细胞和淋巴细胞等 [22]。根据最新的研究结果，心房区域含有约 30.1% 的心肌细胞、24.3% 的心肌成纤维细胞和 12.2% 的血管内皮细胞；心室区域含有约 49.2% 的心肌细胞、15.5% 的心肌成纤维细胞和 7.8% 的血管内皮细胞 [23]。这三类细胞占整个心肌组织细胞总数的 70% 左右，深入了解这三类细胞在 MIRI 中的焦亡机制，可为 MIRI 的治疗提供新方向。

2.1 细胞焦亡与心肌细胞

心肌细胞的炎症和坏死在 MIRI 的病理生理过程中起关键作用。根据最新的研究，心肌缺血再灌注可诱导心肌细胞焦亡，其中氧化应激是关键诱导因素，并主要通过 caspase-11/GSDMD 信号通路来介导心肌细胞焦亡，这个过程伴随着成熟的 IL-18 的释放，并且 *GSDMD* 基因敲除和 GSDMD 抑制剂均可显著减轻心肌细胞焦亡所致的心肌损伤 [24]。有研究证明相关蛋白也可介导 MIRI 中的心肌细胞焦亡的发生，如水通道蛋白 4（AQP4）介导了 MIRI 中心肌细胞焦亡，AQP4 抑制剂可通过抑制心肌细胞焦亡来减轻 MIRI；甲基转移酶样蛋白 3（METTL3）通过 6- 甲基腺嘌呤（m6A）修饰促进 RNA 绑定蛋白 DiGeorge 关键区域 8（DGCR8）与 pri-miR-143-3p 的结合，从而增强 miR-143-3p 的表达，抑制蛋白激酶 C-epsilon（PRKCE）转录，导致 MIRI 中的心肌细胞焦亡 [25-26]。这些研究提示抑制 caspase-11/GSDMD 信号通路是治疗 MIRI 中心肌细胞焦亡的核心，未来的药物研究可以该通路作为研究对象；多种相关蛋白也参与到了 MIRI 中心肌细胞焦亡的发生，如 AQP4 和 METTL3 等，进一步探讨这些蛋白对焦亡的调控机制，可为 MIRI 的治疗提供新靶点。

2.2 细胞焦亡与心肌成纤维细胞

心肌成纤维细胞是心肌组织中含量最丰富的非心肌细胞，它可以感知心脏损伤或应激时释放的危险信号，在维持心脏正常功能方面具有重要作用 [27]。在心肌缺血再灌注中可通过活性氧（ROS）产生和 K^+ 外流介导心肌成纤维细胞中 NLRP3 炎症小体激活，诱导心肌成纤维细胞焦亡 [28]。近年来研究发现，长链非编码 RNA GAS5（LncRNA GAS5）的 DNMT1 沉默可以激活 NLRP3 炎症小体，导致心肌成纤维细胞焦亡，从而促进心肌纤维化的进展 [29]。在心肌成纤维细胞中，环氧合酶 -2（COX-2）参与了 NLRP3 炎症小体的激活，沉默 *COX-2* 基因或使用 COX-2 抑制

剂均降低了 NLRP3 炎症小体和下游细胞因子的表达和激活[30]。在缺氧 / 复氧（H/R）条件下，心肌成纤维细胞可分泌含有 miR-133a 的外泌体，递送到心肌细胞中，靶向 ELAV 样 RNA 结合蛋白 1（ELAVL1）并抑制心肌细胞焦亡[31]。由此可见，NLRP3 炎症小体的激活是 MIRI 时心肌成纤维细胞焦亡的关键，NLRP3 炎症小体是 MIRI 极具潜力的治疗靶点。另外，进一步揭示心肌成纤维细胞在 MIRI 时对心肌组织的自我保护机制，或许是未来的研究方向。

2.3 细胞焦亡与血管内皮细胞

血管内皮细胞对 H/R 的变化极为敏感，其功能障碍是导致 MIRI 的重要病理基础之一。有研究表明，在 H/R 诱导下，心肌微血管内皮细胞可发生焦亡，其机制与 NLRP3/caspase-1 介导的 IL-1β 分泌有关[32]。在小鼠 MIRI 模型中，自噬相关基因 *BECN1* 可以调节 caspase-4 介导心肌微血管内皮细胞焦亡[33]。也有研究指出，抑制促炎因子的释放、降低 ROS 表达和抑制 NLRP3 炎症小体的激活，可降低心肌血管内皮细胞的焦亡水平[34]。血管内皮细胞损伤可再次导致冠状动脉血管功能障碍，因此抑制 MIRI 中血管内皮细胞损伤极具意义。抑制血管内皮细胞内的炎症反应，降低 ROS 水平，进而降低血管内皮细胞的焦亡水平，可减轻 MIRI。

3 中药单体对 MIRI 中细胞焦亡的作用机制研究

3.1 黄酮类化合物

柚皮苷是存在于柚子皮、化橘红、骨碎补等中药材中的一种黄酮类化合物，研究发现柚皮苷具有抗炎、抗氧化应激、清除自由基等作用，对心脑血管疾病具有潜在的应用价值[35-36]。王婷婷等[37]研究发现，在雄性 SD 大鼠 MIRI 模型中，柚皮苷低剂量（10 mg•kg^{-1}）、中剂量（50 mg•kg^{-1}）、高剂量（100 mg • kg^{-1}）组心肌组织中 caspase-1、NLRP3、ASC 以及 GSDMD 蛋白的表达水平均比模型组降低，其发挥心肌保护作用与降低心肌组织的细胞焦亡水平有关。提示柚皮苷可通过抑制细胞焦亡进而减轻 MIRI，但其抑制细胞焦亡的具体调控机制尚不清楚，有待进一步验证。

芹菜素是存在于芹菜、车前子、络石藤等中药材中的一种黄酮类化合物，具有抗动脉粥样硬化、抗高血压以及抗自身免疫性心肌炎等多种药理学作用[38]。Li 等[39]研究发现在缺血 / 缺氧（I/H）处理的大鼠心肌细胞（H9C2 细胞系）模型中，芹菜素可呈剂量依赖性降低 NLRP3、caspase-1、GSDME-N、IL-1β 和 IL-18 的表达水平，其发挥心肌保护作用可能与抑制心肌细胞焦亡有关。然而芹菜素抑制 MIRI 中细胞焦亡的具体作用机制还需进一步研究。

木犀草素是存在于野菊花、金银花、紫苏叶等中药材中的一种黄酮类化合物，具有抗炎、抗高血压和心脏保护等作用[40]。Zhang 等[41]研究发现在雄性 SD 大鼠 MIRI 和 H/R 处理的 H9C2 细胞系模型中，木犀草素有效地抑制了心肌细胞中 NLRP3、ASC、caspase-1、Toll 样受体 4（TLR4）、髓样分化因子 88（MyD88）的表达，其心肌保护机制也可能与抑制 TLR4/MyD88/NF-κB/NLRP3 通路介导的细胞焦亡有关。体内外实验均显示木犀草素对 MIRI 具有较强的心脏保护作用，未来可进一步探索其临床应用价值。

3.2 萜类化合物

獐牙菜苷是从龙胆科植物獐牙菜中提取的一种环烯醚萜类化合物，具有强大的抗氧化和抗炎活性[42]。Li 等[43]研究发现在雄性 Wistar 大鼠 MIRI 和 H/R 处理的 H9C2 细胞系模型中，獐牙菜苷能抑制 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1（Keap1）并诱导核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）核易位，降低 NLRP3、ASC、caspase-1 和 IL-1β 的表达水平，能显著抑制心肌细胞焦亡，并发现通过抑制 Nrf2 的表达可以消除其对心肌细胞焦亡的抑制作用，推测獐牙菜苷可能通过调节 Keap1/Nrf2 轴抑制细胞焦亡，进而发挥心肌保护作用。研究还发现，獐牙菜苷对心肌细胞焦亡的抑制作用部分受 Keap1/Nrf2 轴的调节，这表明还有其他途径参与了抗焦亡作用，尚需要进一步的实验来确证其抗焦亡作用的最强或最具潜力的途径[43]。

3.3 香豆素类化合物

秦皮甲素是从中药秦皮中提取的一种香豆素类化合物，具有抗炎、抗氧化和抗血栓形成等多种药理学作用[44]。Xu 等[45]研究发现在雄性 SD 大鼠 MIRI 和接受氧气 - 葡萄糖剥夺 / 恢复（OGD/R）处理的新生大鼠心肌细胞（NRCM）模型中，秦皮甲素可通过 AKT/GSK3β/NF-κB 通路抑制 NLRP3 炎症小体介导的细胞焦亡，从而减轻 MIRI 和 OGD/R 诱导的心肌细胞损伤。同时还发现秦皮甲素（30 mg • kg^{-1}）治疗组在减轻再灌注心律失常、心肌损伤和恢复血流动力学功能方面与硝苯地平（10 mg • kg^{-1}）治疗组没有明显差异，这些结果证实了秦皮甲素可有效减轻 MIRI，是极具前途的治疗 MIRI 的候选药物。

3.4 醌类化合物

大黄素是从中药大黄根茎中提取的一种蒽醌类化合物，具有抗炎、抗氧化、免疫调节、抗纤维化等药理作用，在心血管疾病方面具有极大的应用潜力[46-47]。Ye 等[48]研究发现，在雄性 SD 大鼠

MIRI 和 H/R 处理的心肌细胞模型中，大黄素可减少心肌细胞中 ROS 的产生，降低 TLR4、MyD88、NF-κB、NLRP3 和 GSDMD-N 的表达，进而抑制心肌细胞焦亡，其作用是通过抑制 TLR4/MyD88/NF-κB/NLRP3 通路实现的。提示大黄素是治疗 MIRI 的候选药物，TLR4/MyD88/NF-κB/NLRP3 通路可能包含 MIRI 的重要治疗靶点。然而，大黄素介导的肝肾等器官毒性的细胞和分子机制仍不明确，还需要进一步研究其临床应用价值 [49-50]。

3.5 生物碱类化合物

胡椒碱是存在于黑胡椒和长胡椒中的一种生物碱类化合物，现有研究已经证实其具有抑制心肌纤维化、减少线粒体氧化应激、清除 ROS 以及扩张血管等诸多心脏保护作用 [51]。Guo 等 [52] 研究发现在雄性 SD 大鼠 MIRI 模型中，胡椒碱可降低心肌组织的细胞焦亡水平，其机制与胡椒碱抑制了 miR-383 的表达和促进 RP105/PI3K/AKT 通路的激活有关，并提示 miR-383 通过 RP105/PI3K/AKT 依赖的方式调节 MIRI 中的细胞焦亡。miRNA 是一种高度保守的非编码 RNA，可通过直接结合 3' UTR 来抑制靶 mRNA，从而导致心肌细胞焦亡和 MIRI[53]。胡椒碱可通过调控 miRNA，进而抑制 MIRI 中的细胞焦亡，为我们从 miRNA 角度研究细胞焦亡和 MIRI 之间的关系以及药物作用机制提供了思路。

3.6 酚类化合物

丹皮酚是从毛茛科植物牡丹的根皮中提取的一种酚类化合物，具有抗动脉粥样硬化、保护血管内皮细胞、保护心肌细胞以及抑制心肌纤维化等多种药理学作用 [54]。丁华胜等 [55] 研究发现在雄性 SD 大鼠 MIRI 模型中，丹皮酚预处理可呈剂量依赖性地抑制 TLR4 的表达及核转录因子 NF-κB 的活化，降低 NLRP3/ASC/caspase-1 介导的心肌组织的细胞焦亡水平，减轻 MIRI。丹皮酚作为治疗心血管疾病极具潜力的候选药物，未来可结合临床试验进一步评价其在 MIRI 中的治疗价值。

3.7 有机酸类化合物

肉桂酸是从中药肉桂皮中提取的一种有机酸类化合物，具有广泛的药理学作用，如抗氧化、抗炎、心脏保护、神经保护等，对心血管疾病具有潜在的治疗作用 [56-57]。Peng 等 [58] 研究发现在雄性 SD 大鼠 MIRI 模型中，肉桂酸能抑制 MIRI 后大鼠心肌的炎症反应，减轻心肌损伤，缩小心肌梗死面积，改善心功能，其机制主要表现为下调 NLRP3、ASC、IL-1β、caspase-1 和 GSDMD-N 蛋白的表达，显著抑制心肌组织中 NLRP3 炎症小体的激活和随后的心肌细胞焦亡。提示肉桂酸可通过抑制心肌细胞焦亡来减轻 MIRI，并具有良好的心肌保护活性，但其治疗和预防 MIRI 的能力尚需要进一步的系统评价和临床试验来验证。

3.8 苷类化合物

天麻素是从中药天麻中提取的一种糖苷类化合物，具有抗炎、抗氧化、清除自由基等多种药理学作用，广泛应用于心脑血管疾病的治疗 [59-60]。Sun 等 [32] 研究发现在雄性 C57BL/6J 小鼠 MIRI 和 H/R 处理的人心脏微血管内皮细胞系（HCMECs）模型中，天麻素可通过抑制 NLRP3/caspase-1 信号通路，降低心肌组织和 HCMECs 的焦亡水平，减少炎性细胞浸润，具有心肌保护作用。由此可见，天麻素可通过抑制经典细胞焦亡途径发挥心肌保护作用，然而天麻素调节细胞焦亡的深层分子机制还需进一步探索。

4 小结与展望

细胞焦亡是 MIRI 的重要机制之一，从细胞焦亡角度探讨 MIRI 的治疗或许是一个潜在策略 [61]。虽然目前还没有开发出治疗 MIRI 的特异性药物，但中药单体中多种天然化合物均显示出抗 MIRI 活性，为寻找特异性抗 MIRI 的药物提供了选择。多种中药单体抗 MIRI 已经进行了大量的基础研究，在发挥抗炎、抗氧化应激、抑制钙超载、调节心肌能量代谢、改善血管内皮功能以及调节线粒体功能等方面具有重要作用 [62]，但目前临床推广极少，也导致其实用价值下降。药物制剂的创新或许有利于药物的临床推广，可以考虑将中药单体与纳米药物递送系统相结合 [63]，在临床试验中以提高药物靶向性，并减少不良反应。

结合目前的研究，多种中药单体的体内外实验均显示出抗 MIRI 中细胞焦亡活性，为下一步开发治疗 MIRI 的特异性药物奠定了坚实基础。但我们仍然可以看到以下不足：

① 机制研究不深入：目前的研究多是基于聚合酶链式反应（PCR）和蛋白质印迹法（Western blot）来检测基因或蛋白表达的层面，未来可利用基因敲除或抑制关键蛋白等研究来验证中药单体的作用靶点，还可利用分子对接技术等结构药理学方法揭示中药单体的结合位点，进一步阐明中药单体的具体作用机制。

② 模型构建待改进：由于 MIRI 特定的发病状态，体外实验模型构建存在一定的难度。目前 OGD/R、H/R 等造模方式缺乏神经体液调节，并不能完全模拟 MIRI 期间的病理生理变化，可能会对实验结果造成一定的偏差。未来的研究可进一步改进实验模型，并选择公认的模型进行实验研究。

③ 药理研究不完善：除了完善对中药单体的药物效应动力学研究外，还应进一步研究药物代谢动力学以及药物毒理学等内容，完善对中药单体的药理学研究。

④ 临床试验尚缺乏：目前对中药单体的研究多是基于细胞实验和动物实验，尚未有临床试验的证据支持，未来还需要进一步的临床试验来证明中药单体的安全性和有效性。

总之，中医药在治疗 MIRI 中显示出巨大的应用潜力，虽然目前仍处于基础研究阶段，还存在诸多问题需要解决，但我们应开拓研究思路，进一步结合新技术、新方法，开发治疗 MIRI 的新药物。

参考文献

[1] Gunata M，Parlakpinar H. A review of myocardial ischaemia/reperfusion injury：pathophysiology，experimental models，biomarkers，genetics and pharmacological treatment [J]. Cell Biochem Funct，2021，39（2）：190-217.

[2] Chen M，Li X，Yang H，et al. Hype or hope：vagus nerve stimulation against acute myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Trends Cardiovasc Med，2020，30（8）：481-488.

[3] 黄兰松，刘燕，黄照河 . 细胞焦亡及其在心肌缺血再灌注损伤中作用机制 [J]. 临床心血管病杂志，2021，37（2）：182-186.

[4] Lu L，Ma J，Tang J，et al. Irisin attenuates myocardial ischemia/reperfusion-induced cardiac dysfunction by regulating ER-mitochondria interaction through a mitochondrial ubiquitin ligase-dependent mechanism [J]. Clin Transl Med，2020，10（5）：e166.

[5] Wang Q，Wu J，Zeng Y，et al. Pyroptosis：a pro-inflammatory type of cell death in cardiovascular disease [J]. Clin Chim Acta，2020，510：62-72.

[6] Hachim MY，Khalil BA，Elemam NM，et al. Pyroptosis：the missing puzzle among innate and adaptive immunity crosstalk [J]. J Leukoc Biol，2020，108（1）：323-338.

[7] de Torre-Minguela C，Mesa DCP，Pelegrin P. The NLRP3 and pyrin inflammasomes：implications in the pathophysiology of autoinflammatory diseases [J]. Front Immunol，2017，8：43.

[8] Rathinam VA，Jiang Z，Waggoner SN，et al. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses [J]. Nat Immunol，2010，11（5）：395-402.

[9] Heilig R，Broz P. Function and mechanism of the pyrin inflammasome [J]. Eur J Immunol，2018，48（2）：230-238.

[10] Van Opdenbosch N，Lamkanfi M. Caspases in cell death，inflammation，and disease [J]. Immunity，2019，50（6）：1352-1364.

[11] Kesavardhana S，Malireddi R，Kanneganti TD. Caspases in cell death，inflammation，and pyroptosis [J]. Annu Rev Immunol，2020，38：567-595.

[12] He WT，Wan H，Hu L，et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1beta secretion [J]. Cell Res，2015，25（12）：1285-1298.

[13] de Vasconcelos NM，Lamkanfi M. Recent insights on inflammasomes，gasdermin pores，and pyroptosis [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol，2020，12（5）：a036392.

[14] Kovacs SB，Miao EA. Gasdermins：effectors of pyroptosis [J]. Trends Cell Biol，2017，27（9）：673-684.

[15] Lu F，Lan Z，Xin Z，et al. Emerging insights into molecular mechanisms underlying pyroptosis and functions of inflammasomes in diseases [J]. J Cell Physiol，2020，235（4）：3207-3221.

[16] Broz P，Pelegrin P，Shao F. The gasdermins，a protein family executing cell death and inflammation [J]. Nat Rev Immunol，2020，20（3）：143-157.

[17] Shi J，Zhao Y，Wang Y，et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS [J]. Nature，2014，514（7521）：187-192.

[18] Wang K，Sun Q，Zhong X，et al. Structural mechanism for GSDMD targeting by autoprocessed caspases in pyroptosis [J]. Cell，2020，180（5）：941-955.

[19] Wang Y，Gao W，Shi X，et al. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin [J]. Nature，2017，547（7661）：99-103.

[20] Jiang M，Qi L，Li L，et al. Caspase-8：a key protein of cross-talk signal way in “PANoptosis” in cancer [J]. Int J Cancer，2021，149（7）：1408-1420.

[21] Zhou Z，He H，Wang K，et al. Granzyme A from cytotoxic lymphocytes cleaves GSDMB to trigger pyroptosis in target cells [J]. Science，2020，368（6494）：eaaz7548.

[22] Valikeserlis I，Athanasiou AA，Stakos D. Cellular mechanisms and pathways in myocardial reperfusion injury [J]. Coron Artery Dis，2021，32（6）：567-577.

[23] Litvinukova M，Talavera-Lopez C，Maatz H，et al. Cells of the adult human heart [J]. Nature，2020，588（7838）：466-472.

[24] Shi H，Gao Y，Dong Z，et al. GSDMD-mediated cardiomyocyte pyroptosis promotes myocardial I/R injury [J]. Circ Res，2021，129（3）：383-396.

[25] Jiang Q，Dong X，Hu D，et al. Aquaporin 4 inhibition alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by restraining cardiomyocyte pyroptosis [J]. Bioengineered，2021，12（1）：9021-9030.

[26] Wang X，Li Y，Li J，et al. Mechanism of METTL3-Mediated m（6）A modification in cardiomyocyte pyroptosis and myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Cardiovasc Drugs Ther，2022，doi：10.1007/s10557-021-07300-0.

[27] Smolgovsky S，Ibeh U，Tamayo TP，et al. Adding insult to injury-Inflammation at the heart of cardiac fibrosis [J]. Cell Signal，2021，77：109828.

[28] Kawaguchi M，Takahashi M，Hata T，et al. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Circulation，2011，123（6）：594-604.

[29] She Q，Shi P，Xu SS，et al. DNMT1 Methylation of LncRNA GAS5 leads to cardiac fibroblast pyroptosis via affecting NLRP3 Axis [J]. Inflammation，2020，43（3）：1065-1076.

[30] Zhang M，Lei YS，Meng XW，et al. Iguratimod alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury through inhibiting inflammatory response induced by cardiac fibroblast pyroptosis via COX2/NLRP3 signaling pathway [J]. Front Cell Dev Biol，2021，

9：746317.
[31] Liu N，Xie L，Xiao P，et al. Cardiac fibroblasts secrete exosome microRNA to suppress cardiomyocyte pyroptosis in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Mol Cell Biochem，2022，477（4）：1249-1260.
[32] Sun W，Lu H，Lyu L，et al. Gastrodin ameliorates microvascular reperfusion injury-induced pyroptosis by regulating the NLRP3/caspase-1 pathway [J]. J Physiol Biochem，2019，75（4）：531-547.
[33] Sun W，Lu H，Dong S，et al. Beclin1 controls caspase-4 inflammsome activation and pyroptosis in mouse myocardial reperfusion-induced microvascular injury [J]. Cell Commun Signal，2021，19（1）：107.
[34] Yang M，Lv H，Liu Q，et al. Colchicine alleviates cholesterol crystal-induced endothelial cell pyroptosis through activating AMPK/SIRT1 pathway [J]. Oxid Med Cell Longev，2020，2020：9173530.
[35] 任文彬，杨榕琳，郑文雄，等 . 柚皮功能性成分的应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报，2021，12（10）：3994-4000.
[36] 崔振雅，胡静，窦志英，等 . 砂烫骨碎补炮制工艺的研究 [J]. 中南药学，2019，17（10）：1658-1661.
[37] 王婷婷，张健，张再媛，等 . 柚皮苷抑制大鼠心肌缺血 / 再灌注损伤诱导的细胞焦亡 [J]. 中国病理生理杂志，2021，37（6）：1019-1026.
[38] Salehi B，Venditti A，Sharifi-Rad M，et al. The therapeutic potential of apigenin [J]. Int J Mol Sci，2019，20（6）：1305.
[39] Li W，Chen L，Xiao Y. Apigenin protects against ischemia-/hypoxia-induced myocardial injury by mediating pyroptosis and apoptosis [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim，2020，56（4）：307-312.
[40] Syahputra RA，Harahap U，Dalimunthe A，et al. The role of flavonoids as a cardioprotective strategy against doxorubicin-induced cardiotoxicity：a review [J]. Molecules，2022，27（4）：1320.
[41] Zhang X，Du Q，Yang Y，et al. The protective effect of Luteolin on myocardial ischemia/reperfusion（I/R）injury through TLR4/NF-kappaB/NLRP3 inflammasome pathway [J]. Biomed Pharmacother，2017，91：1042-1052.
[42] Ma LQ，Yu Y，Chen H，et al. Sweroside alleviated aconitine-induced cardiac toxicity in H9c2 cardiomyoblast cell line [J]. Front Pharmacol，2018，9：1138.
[43] Li J，Zhao C，Zhu Q，et al. Sweroside protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting oxidative stress and pyroptosis partially via modulation of the Keap1/Nrf2 Axis [J]. Front Cardiovasc Med，2021，8：650368.
[44] Ahmad I，Sharma S，Gupta N，et al. Antithrombotic potential of esculin 7，3'，4'，5'，6'-*O*-pentasulfate（EPS）for its role in thrombus reduction using rat thrombosis model [J]. Int J Biol Macromol，2018，119：360-368.
[45] Xu XN，Jiang Y，Yan LY，et al. Aesculin suppresses the NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis via the Akt/GSK3beta/NF-kappaB pathway to mitigate myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Phytomedicine，2021，92：153687.
[46] Zheng Q，Li S，Li X，et al. Advances in the study of emodin：an update on pharmacological properties and mechanistic basis [J]. Chin Med，2021，16（1）：102.
[47] 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）：641-647.
[48] Ye B，Chen X，Dai S，et al. Emodin alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting gasdermin D-mediated pyroptosis in cardiomyocytes [J]. Drug Des Devel Ther，2019，13：975-990.
[49] Wang C，Dai X，Liu H，et al. Involvement of PPARgamma in emodin-induced HK-2 cell apoptosis [J]. Toxicol In Vitro，2015，29（1）：228-233.
[50] Rossi M，Wen K，Caruso F，et al. Emodin scavenging of superoxide radical includes pi-pi interaction. X-Ray crystal structure，hydrodynamic voltammetry and theoretical studies [J]. Antioxidants（Basel），2020，9（3）：194.
[51] Haq IU，Imran M，Nadeem M，et al. Piperine：a review of its biological effects [J]. Phytother Res，2021，35（2）：680-700.
[52] Guo X，Hu S，Liu JJ，et al. Piperine protects against pyroptosis in myocardial ischaemia/reperfusion injury by regulating the miR-383/RP105/AKT signalling pathway [J]. J Cell Mol Med，2021，25（1）：244-258.
[53] Wei X，Peng H，Deng M，et al. MiR-703 protects against hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury via inhibiting the NLRP3/caspase-1-mediated pyroptosis [J]. J Bioenerg Biomembr，2020，52（3）：155-164.
[54] 杨山景，李凌军 . 丹皮酚药理作用与应用研究进展 [J]. 中药药理与临床，2021，doi：10.13412/j.cnki.zyyl.20211206.003.
[55] 丁华胜，黄燕，王凤媛 . 丹皮酚对心肌缺血再灌注损伤保护中 Toll 样受体 4、心肌焦亡影响的作用机制 [J]. 陕西中医，2021，42（12）：1659-1662.
[56] Liu J，Zhang Q，Li RL，et al. The traditional uses，phytochemistry，pharmacology and toxicology of *Cinnamomi ramulus*：a review [J]. J Pharm Pharmacol，2020，72（3）：319-342.
[57] Chen Y，Li Z，Pan P，et al. Cinnamic acid inhibits Zika virus by inhibiting RdRp activity [J]. Antiviral Res，2021，192：105117.
[58] Peng L，Lei Z，Rao Z，et al. Cardioprotective activity of ethyl acetate extract of *Cinnamomi Ramulus* against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats via inhibiting NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis [J]. Phytomedicine，2021，93：153798.
[59] Fu S，Chen L，Wu Y，et al. Gastrodin pretreatment alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury through promoting autophagic flux [J]. Biochem Biophys Res Commun，2018，503（4）：2421-2428.
[60] Liu Y，Gao J，Peng M，et al. A review on central nervous system effects of gastrodin [J]. Front Pharmacol，2018，9：24.
[61] Popov SV，Maslov LN，Naryzhnaya NV，et al. The role of pyroptosis in ischemic and reperfusion injury of the heart [J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther，2021，26（6）：562-574.
[62] 岳栋芳，李永芳 . 中药及其复方抗心肌缺血再灌注损伤的作用机制研究进展 [J]. 中药药理与临床，2022，doi：10.13412/j.cnki.zyyl.20220313.003.
[63] Shen M，Wang Y，Hu F，et al. Thrombolytic agents：nanocarriers in targeted release [J]. Molecules，2021，26（22）：6776.

（收稿日期：2022-02-25；修回日期：2022-05-12）

药物分析与检验

甘草饮片、水煎液、配方颗粒的 UPLC 指纹图谱相关性研究

钟文峰，张兰兰，胡懿，施文婷，黎桃敏，彭杰宝，梁志毅*（广东一方制药有限公司/广东省中药配方颗粒企业重点实验室，广东　佛山　528244）

摘要：目的　建立甘草饮片、水煎液、配方颗粒的 UPLC 指纹图谱，并分析其相关性和差异性。**方法**　采用 UPLC 法建立甘草饮片、水煎液、配方颗粒指纹图谱，建立三者指纹图谱共有模式，并进行相似度评价。结合皮尔逊相关性分析、热图聚类分析、主成分分析（PCA）及正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）评价三者 UPLC 指纹图谱的相关性。**结果**　甘草饮片、水煎液、配方颗粒的 UPLC 指纹图谱均确定了 12 个共有峰，并指认了 2、3、5、6、10 号峰分别为芹糖甘草苷、甘草苷、异甘草苷、甘草素和甘草酸；15 批甘草饮片、水煎液、配方颗粒指纹图谱与相应对照指纹图谱的相似度均大于 0.900，三者对照指纹图谱的相似度均大于 0.990；皮尔逊相关性分析结果显示，15 批甘草饮片、水煎液及其配方颗粒的 12 个共有峰均呈现显著的正相关性；热图聚类分析和 PCA 结果一致，甘草水煎液与配方颗粒更为接近；OPLS-DA 将样品分为 3 类，并筛选出 3 个 VIP 值大于 1 的差异性成分。**结论**　甘草饮片、水煎液、配方颗粒的主要化学成分组成基本一致，可为甘草配方颗粒生产过程的质量控制提供参考。

关键词：甘草；饮片；水煎液；配方颗粒；UPLC 指纹图谱；相关性
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2123-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.027

Correlation study on UPLC fingerprint of licorice pieces, decoction and formula granules

ZHONG Wen-feng, ZHANG Lan-lan, HU Yi, SHI Wen-ting, LI Tao-min, PENG Jie-bao, LIANG Zhi-yi* (*Guangdong Efong Pharmaceutical Co., Ltd*, *Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granule*, *Foshan Guangdong* 528244)

Abstract: Objective To establish the UPLC fingerprints of licorice pieces, decoction and formula particles, and analyze their correlation and difference. **Methods** The fingerprints of licorice pieces, decoction and formula particles were determined by UPLC method, the common pattern of the fingerprints was established, and the similarity was evaluated. The correlation of UPLC fingerprints was evaluated by Pearson correlation analysis, heat map cluster analysis, principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). **Results** The UPLC fingerprints of licorice pieces, decoction and formula particles identified 12 common peaks, and identified peaks 2, 3, 5, 6 and 10 as liquiritin apioside, liquiritin, isoliquiritin, liquiritigenin and glycyrrhizic acid, respectively. The similarity between the fingerprints of 15 batches of licorice pieces, decoction and formula particles and the corresponding control fingerprints was greater than 0.900, and the similarity of the three control fingerprints was greater than 0.990. Pearson correlation analysis showed that 12 common peaks of 15 batches of licorice pieces, decoction and formula particles showed significant positive correlation. The results of heat map cluster analysis and PCA were consistent, and the decoction of licorice was closer

基金项目：澳门特别行政区科学技术发展基金（No.0001/2020/AKP）。
作者简介：钟文峰，男，执业药师，主要从事中药制剂工艺研究，email：asfriend318@163.com　*通信作者：梁志毅，男，副主任中药师，主要从事中药配方颗粒标准与工艺研究，email：liangzy112@163.com

to the formula particles. OPLS-DA divided the samples into 3 categories and screened 3 differential components with VIP value greater than 1. **Conclusion** The main chemical components of licorice pieces, decoction and formula granule are basically the same, which can provide reference for the quality control of the whole production process of licorice formula particles.

Key words: licorice; pieces; decoction; formula granule; UPLC fingerprint; relevance

甘草在我国有“十方九草”之说，被称为中草药的国老[1]，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。其性平，味甘，归心、肺、脾、胃经，具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药的功效[2]。现代研究表明，甘草主要含有三萜类、黄酮类、多糖类、香豆素类、二苯乙烯类等化学成分，具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒、调节免疫、肝脏保护、抗纤维化等多种药理活性[3-7]。

甘草配方颗粒是由甘草饮片经水提、浓缩、干燥、制粒等现代制剂技术制成的一种颗粒剂，具有易于携带、免煎易服、疗效确切等优点。甘草在各类复方配伍中较为常见，目前关于甘草化学成分和药理作用的研究报道较多[3-8]，尚无甘草饮片与其相关制剂质量相关性研究的报道。本研究采用 UPLC 法分别建立甘草饮片、水煎液、配方颗粒的指纹图谱，并比较三者 UPLC 指纹图谱之间的相关性和差异性，探讨甘草配方颗粒制备过程中有效成分的量值传递情况，以期为其生产过程的质量控制和临床安全有效用药提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1290 型超高效液相色谱仪（美国安捷伦公司）；XP26 型百万分之一天平、ME204E 型万分之一天平（瑞士 METTLER TOLEDO 公司）；Milli-Q Direct 型超纯水系统（德国 Merck 公司）；SODA-12 型喷雾干燥仪（上海大川原干燥设备有限公司）；LGS20 型干法制粒机（南京迦南科技有限公司）；YRE-501 型旋转蒸发仪（巩义市予华仪器有限责任公司）；DLSB-5/20 型低温冷却液循环水泵（郑州长城科工贸有限公司）；KQ-500DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 试药

甘草苷（批号：111610-201908，纯度：95.0%）、甘草酸铵（批号：110731-202021，纯度：96.2%）（中国食品药品检定研究院），甘草素（批号：wkq18030505）、异甘草苷（批号：wkq18042008）、芹糖甘草苷（批号：wkq19021306）（纯度≥ 98%，四川省维克奇生物科技有限公司）；乙腈、甲醇为色谱纯（德国 Merck 公司），磷酸为色谱纯（天津市科密欧化学试剂有限公司），水为超纯水，其余试剂均为分析纯。甘草药材（编号 S1 ～ S15）经广东一方制药有限公司魏梅主任药师鉴定为正品，均为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎，其中 S1 ～ S8 来源于甘肃，S9 ～ S15 来源于内蒙古。甘草饮片（Y1 ～ Y15）由 15 批甘草药材按照 2020 年版《中国药典》一部甘草项下饮片炮制规定炮制[2]；甘草水煎液（T1 ～ T15）由 15 批甘草饮片按照《医疗机构中药煎药室管理规范》的相关煎煮要求制备；甘草配方颗粒（P1 ～ P15）由水煎液经浓缩、干燥、制粒等步骤制得。

2 方法与结果

2.1 色谱条件[9]

色谱柱：Acclaim RSLC 120 C_{18} 柱（100 mm× 2.1 mm，2.2 μm）；流动相：乙腈（A）-0.1% 磷酸溶液（B）梯度洗脱（0 ～ 1 min，5% ～ 27%A；1 ～ 2 min，27%A；2 ～ 10 min，27% ～ 46%A；10 ～ 16 min，46% ～ 64%A；16 ～ 24 min，64% ～ 95%A；24 ～ 25 min，95%A）；柱温：30 ℃；流速：0.3 mL • min^{-1}；进样体积：1 μL；检测波长：237 nm。

2.2 混合对照品溶液的制备

取甘草苷、异甘草苷、芹糖甘草苷、甘草素、甘草酸铵对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1 mL 分别含 81.700、76.930、76.930、107.310、136.191 μg 的混合对照品溶液（甘草酸重量＝甘草酸铵重量 /1.0207）。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 甘草饮片供试品溶液　取甘草饮片粉末（过三号筛）约 0.1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 70% 乙醇 50 mL，密塞，称重，超声处理（功率 250 W，频率 40 kHz）30 min，取出，放冷，再称重，用 70% 乙醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.3.2 甘草水煎液供试品溶液　精密吸取混合均匀的甘草水煎液 3 mL，置 25 mL 量瓶中，加 70% 乙醇适量，超声处理（功率 250 W，频率 40 kHz）30 min，取出，放冷，用 70% 乙醇定容至

刻度，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.3.3　甘草配方颗粒供试品溶液　取甘草配方颗粒，研细，取约 0.1 g，精密称定，照“2.3.1”项下方法制备，即得。

2.4　*方法学考察*

2.4.1　专属性试验　分别精密吸取空白溶剂、混合对照品溶液及供试品溶液，进样测定，结果如图 1 所示，供试品溶液色谱在与对照品溶液色谱相应的保留时间处具有相同的色谱峰，且空白溶剂无干扰，表明该方法专属性良好。

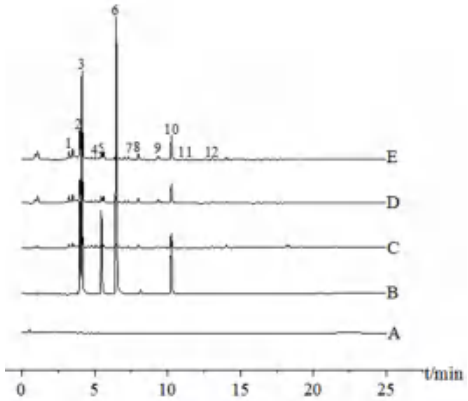

图 1　专属性试验 UPLC 色谱图

Fig 1　UPLC chromatogram of specific test

A. 空白溶剂（blank solution）；B. 混合对照品（mixed reference）；C. 饮片（pieces）；D. 水煎液（decoction）；E. 配方颗粒（formula granule）；2. 芹糖甘草苷（liquiritin apioside）；3（S1）. 甘草苷（liquiritin）；5. 异甘草苷（isoliquiritin）；6（S2）. 甘草素（liquiritigenin）；10（S3）. 甘草酸（glycyrrhizic acid）

2.4.2　精密度试验　精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液，连续进样 6 次，计算得各成分峰面积的 *RSD* 均小于 3.0%，表明仪器精密度良好。

2.4.3　稳定性试验　取甘草饮片（编号 Y1），精密称定，按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液，分别于制备 0、4、8、12、24 h 后进样测定，以 3 号峰、6 号峰、10 号峰为参照峰，计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 均小于 3.0%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.4　重复性试验　取甘草饮片（编号 Y1）6 份，精密称定，按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液，进样测定，以 3 号峰、6 号峰、10 号峰为参照峰，计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 均小于 3.0%，表明该方法重复性良好。

2.5　UPLC 指纹图谱的建立与相似度评价

2.5.1　指纹图谱的建立　分别取 15 批甘草饮片、水煎液和配方颗粒样品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，记录色谱图。采用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 版”对色谱图进行匹配，形成共有模式图，并分别建立对照指纹图谱 R1、R2、R3，见图 2 ～ 4。经过比较分析后确定甘草饮片、水煎液、配方颗粒的 UPLC 指纹图谱基本一致，均有 12 个共有峰。通过与对照品图谱对比，确定 2 号峰为芹糖甘草苷，3 号峰为甘草苷，5 号峰为异甘草苷，6 号峰为甘草素，10 号峰为甘草酸。

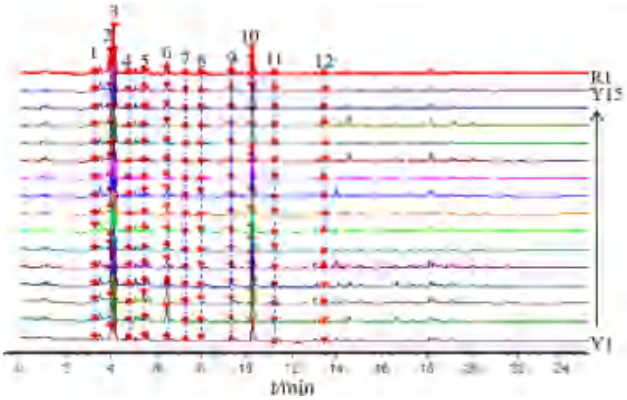

图 2　15 批甘草饮片的 UPLC 指纹图谱堆叠图

Fig 2　UPLC fingerprints of 15 batches of licorice pieces

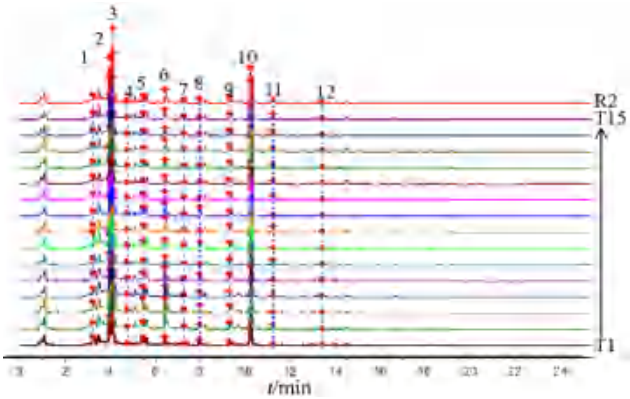

图 3　15 批甘草水煎液的 UPLC 指纹图谱堆叠图

Fig 3　UPLC fingerprints of 15 batches of licorice decoction

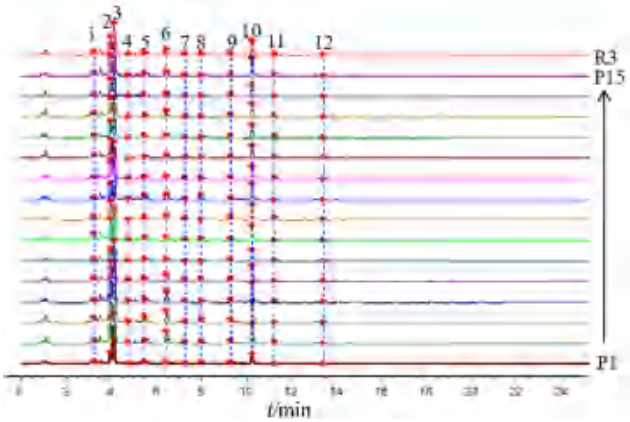

图 4　15 批甘草配方颗粒的 UPLC 指纹图谱堆叠图

Fig 4　UPLC fingerprints of 15 batches of licorice formula granules

2.5.2　相似度评价　将 15 批甘草饮片、水煎液、配方颗粒 UPLC 指纹图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 版”软件，计算各批次甘草饮片、水煎液、配方颗粒 UPLC 指纹图谱与

其对照指纹图谱的相似度，结果见表 1。15 批甘草饮片、水煎液、配方颗粒 UPLC 指纹图谱与其相应对照指纹图谱（R1、R2、R3）的相似度均大于 0.900，表明不同批次甘草饮片、水煎液、配方颗粒的主要化学成分组成基本一致，质量较为稳定。

表 1　甘草饮片、水煎液和配方颗粒 UPLC 指纹图谱的相似度评价

Tab 1　Similarity of licorice pieces，decoction and formula granules

饮片编号	相似度	水煎液编号	相似度	配方颗粒编号	相似度
Y1	0.978	T1	0.973	P1	0.973
Y2	0.996	T2	0.989	P2	0.989
Y3	0.985	T3	0.984	P3	0.983
Y4	0.995	T4	0.999	P4	0.999
Y5	0.997	T5	0.997	P5	0.997
Y6	0.987	T6	0.996	P6	0.996
Y7	0.994	T7	0.994	P7	0.994
Y8	0.981	T8	0.990	P8	0.990
Y9	0.980	T9	0.983	P9	0.983
Y10	0.998	T10	0.999	P10	0.999
Y11	0.960	T11	0.948	P11	0.945
Y12	0.999	T12	0.999	P12	0.999
Y13	0.947	T13	0.972	P13	0.971
Y14	1.000	T14	0.997	P14	0.997
Y15	0.992	T15	0.997	P15	0.997
R1	1.000	R2	1.000	R3	1.000

2.5.3　对照指纹图谱的比较　将 15 批甘草饮片、水煎液和配方颗粒指纹图谱生成的对照指纹图谱 R1、R2、R3 导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 版”软件，结果见表 2、图 5。与甘草饮片相比，水煎液和配方颗粒的相似度分别为 0.994 和 0.993，水煎液和配方颗粒指纹图谱相似度为 1.000，表明甘草饮片、水煎液与配方颗粒成分基本一致，指纹图谱相关性良好，在提取、浓缩、干燥、制粒过程中，其主要成分无明显变化。

表 2　甘草饮片、水煎液、配方颗粒对照指纹图谱的相似度评价

Tab 2　Similarity of reference fingerprints of licorice pieces，decoction，formula granules

类别	相似度
甘草饮片与水煎液	0.994
甘草饮片与配方颗粒	0.993
甘草水煎液与配方颗粒	1.000

2.6　化学模式识别分析

2.6.1　共有峰相关性分析　采用 SPSS 26.0 软件，以 15 批甘草饮片、水煎液和配方颗粒共 45 个样品各特征峰的“峰面积占比”值（各特征峰峰面积占特征峰总面积的比例）为变量进行皮尔逊相关性分析，结果见表 3。甘草饮片、水煎液、配方颗粒 12 个共有峰均具有极显著的正相关性。

2.6.2　热图聚类分析[10]　以 12 个共有峰的峰面积为变量，采用对数归一化法，以 Euclidean 平方距离为度量标准，利用 HemI 1.0 软件对 15 批甘草饮片、水煎液和配方颗粒 UPLC 指纹图谱进行热图和聚类分析，结果见图 6。热图聚类分析结果显示，甘草饮片、水煎液和配方颗粒中化学成分组成一致，45 批样品可聚为 3 类。Y1 ～ Y3、Y5、T1、T3 ～ T5、T9、P1、P2、P4、P5、P9 聚为一类，Y4、Y6 ～ Y15、T2、T6 ～ T8、T10 ～ T15、P3、P6 ～ P8、P10 ～ P15 聚为一类，P3 单独聚为一类。表明饮片、水煎液、配方颗粒三者之间无显著性差异，且水煎液与配方颗粒的内在成分含量更为接近。

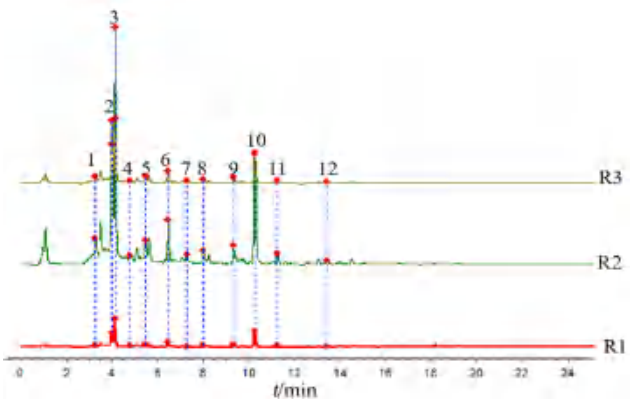

图 5　甘草饮片对照指纹图谱（R1）、水煎液对照指纹图谱（R2）和配方颗粒对照指纹图谱（R3）

Fig 5　Reference fingerprints of licorice pieces，decoction and formula granules by UPLC

2. 芹糖甘草苷（liquiritin apioside）；3（S1）. 甘草苷（liquiritin）；5. 异甘草苷（isoliquiritin）；6（S2）. 甘草素（liquiritigenin）；10（S3）. 甘草酸（glycyrrhizic acid）

表 3　甘草饮片、水煎液、配方颗粒指纹图谱共有峰的相关性分析

Tab 3　Correlation analysis of common peaks in fingerprints of licorice pieces，decoction and formula granules

峰名	饮片与水煎液	饮片与配方颗粒	水煎液与配方颗粒
峰 1	0.982**	0.983**	0.997**
峰 2（芹糖甘草苷）	0.899**	0.744**	0.940**
峰 3（甘草苷）	0.964**	0.877**	0.925**
峰 4	0.867**	0.774**	0.925**
峰 5（异甘草苷）	0.844**	0.855**	0.915**
峰 6（甘草素）	0.618*	0.898**	0.819**
峰 7	0.879**	0.963**	0.799**
峰 8	0.970**	0.950**	0.976**
峰 9	0.968**	0.958**	0.996**
峰 10（甘草酸）	0.846**	0.852**	0.948**
峰 11	0.974**	0.966**	0.991**
峰 12	0.937**	0.790**	0.625*

注：** 表示在 0.01 水平（双侧）上相关性显著，* 表示在 0.05 水平（双侧）上相关性显著。

Note：**Indicates significant correlation at 0.01 level（bilateral），*indicates significant correlation at 0.05 level（bilateral）.

2.6.3　主成分分析　采用 SPSS 26.0 软件，对 15 批甘草饮片、水煎液和配方颗粒共 45 个样品各特征峰峰面积的标准化值进行主成分分析，主成分结果以特征值＞ 1 为标准提取得到 3 个主成分 [11]，计算得特征值和方差贡献率见表 4，主成分因子载荷矩阵见表 5。由结果可知，前 3 个主成分累积贡献率为 82.807%，表明提取的 3 个主成分能反映甘草指纹图谱的大部分信息。主成分 1 的特征值为 6.205，方差贡献率为 51.705%，载荷较高的峰有峰 1、芹糖甘草苷、甘草苷、异甘草苷、甘草素、峰 7、峰 8、峰 9、甘草酸，表明这 9 个峰主要反映主成分 1 的信息；主成分 2 的特征值为 2.608，方差贡献率为 21.733%，载荷较高的峰有峰 11，表明这个峰主要反映主成分 2 的信息；成分 3 的特征值为 1.124，方差贡献率为 9.369%，载荷较高的峰有峰 4、峰 12，表明这 2 个峰主要反映主成分 3 的信息。由图 7 可知，甘草饮片与其他样品距离较远，表明甘草饮片水提液中的化学成分与饮片中的化学成分存在一定差异，这可能与溶剂极性有关；水煎液与配方颗粒样品相互交错，距离较小，表明甘草水煎液与配方颗粒之间差异较小 [12]。

2.6.4　正交偏最小二乘判别分析 [13]　采用 SIMCA 14.1 软件，以 15 批甘草饮片、水煎液和配方颗粒共 45 个样品各特征峰单位峰面积（峰面积与取样量的比值）为变量进行正交偏最小二乘判别分析，结果见图 8 ～ 9。由模型参数可知，数据矩阵的解释率参数 R^2X（cum）＝ 0.953，模型区分参数 R^2Y（cum）＝ 0.714，模型预测参数 Q^2 ＝ 0.609，均＞ 0.500，表明该数学模型稳定可靠 [14]。45 个样品可分成 3 类，以 VIP 值＞ 1 为提取标准，得到甘草苷、芹糖甘草苷和峰 12 是影响分类的主要标志性成分。

表 4　UPLC 指纹图谱主成分分析特征值及方差贡献率

Tab 4　Eigenvalues and variance contribution rate of principal component analysis of UPLC fingerprint

成分	初始特征值		
	特征值	方差贡献率 /%	累积贡献率 /%
1	6.205	51.705	51.705
2	2.608	21.733	73.437
3	1.124	9.369	82.807
4	0.859	7.157	89.964
5	0.528	4.399	94.363
6	0.277	2.310	96.673
7	0.163	1.359	98.032
8	0.121	1.012	99.044
9	0.055	0.456	99.500
10	0.038	0.316	99.816
11	0.013	0.106	99.922
12	0.009	0.078	100.000

表 5　UPLC 指纹图谱主成分因子载荷矩阵

Tab 5　Principal component factor loading matrix of UPLC fingerprint

峰号	成分		
	1	2	3
峰 1	0.684	－ 0.159	0.095
峰 2（芹糖甘草苷）	0.889	0.365	－ 0.005
峰 3（甘草苷）	0.938	－ 0.216	－ 0.083
峰 4	－ 0.149	－ 0.617	0.512
峰 5（异甘草苷）	0.893	－ 0.279	－ 0.061
峰 6（甘草素）	0.795	0.203	－ 0.004
峰 7	0.93	－ 0.163	0.143
峰 8	0.663	－ 0.673	－ 0.071
峰 9	0.724	0.613	0.030
峰 10（甘草酸）	0.883	0.258	0.058
峰 11	－ 0.092	0.955	0.006
峰 12	－ 0.007	0.260	0.901

3　讨论

中药配方颗粒是基于中药现代化、国际化形势下对传统中药饮片的一种补充 [15]。首批 160 个中药配方颗粒国家标准经国家药品监督管理局颁布，已于 2021 年 11 月 1 日正式实施，中药配方颗粒国家标准的落地执行将有助于实现安全性、有效性等多方面的整体质量控制。目前关于中药配方颗粒与其饮片、水煎液的对比研究，大多以单一成分的量值传递进行评价，无法全面反映其整体的质量传递情况。中药指纹图谱技术是国际公认的中药以及天然药物质量控制最为有效的手段，是评价中药优劣、真伪鉴别、质量控制和谱效关系研究的有效方法。目前应用指纹图谱技术结合化学计量学方法评价中药及其相关制剂质量已成为行业研究热点。

国家药品监督管理局颁布的甘草配方颗粒国家标准选用的药材基原为甘草，因此，仅对基原为甘草的甘草饮片、水煎液、配方颗粒指纹图谱相关性进行研究。研究结果表明，甘草饮片、水煎液、配方颗粒的 HPLC 指纹图谱均有 12 个共有峰，其对照指纹图谱间的相似度均大于 0.99，且各共有峰均成显著正相关，说明三者的化学组成基本一致。主成分分析和聚类分析均表明水煎液与配方颗粒的质量更为相近，OPLS-DA 筛选出 3 个导致三者质量差异的标志性成分，其中峰 12 未被指认，后期可采用高效液相 - 质谱联用技术对其进行分析。总体来说，甘草配方颗粒在其生产过程中，其主要成分并未发生明显变化，饮片、水煎液、配方颗粒三者间的质量基本一致。在配方颗粒国家标准研究中会对成品的稳定性进行考察，且饮片在适宜条件下保存的质量也较稳定，故猜测饮片和配方颗粒放置一段时间后，甘草饮片、水煎液、配方颗粒的质量基本不会发生变化，但还需后续进行实验验证。将指纹图谱技

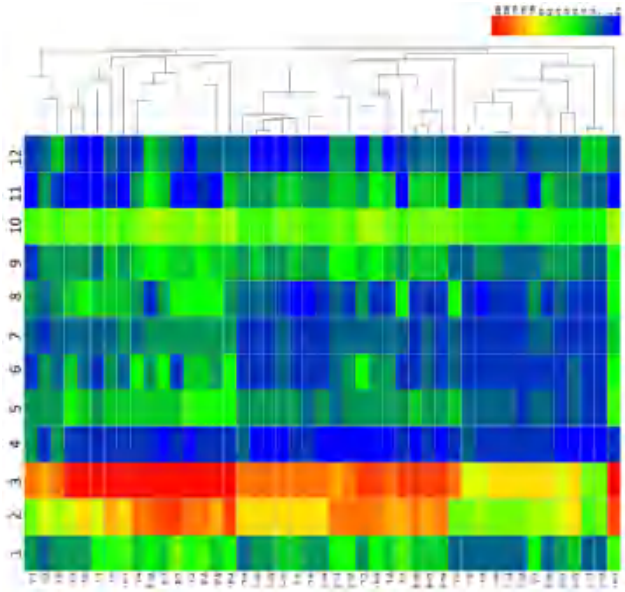

图 6　甘草饮片、水煎液和配方颗粒 UPLC 指纹图谱热图聚类分析图

Fig 6　Heat map cluster analysis of UPLC fingerprint of licorice pieces，decoction and formula granules

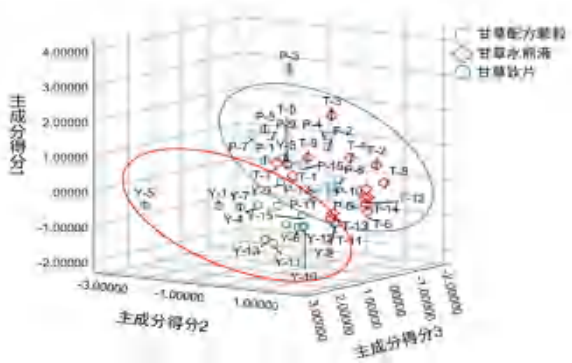

图 7　甘草饮片、水煎液和配方颗粒 UPLC 指纹图谱主成分得分图

Fig 7　PCA score plot of principal component analysis of UPLC fingerprint of licorice pieces，decoction and formula granules

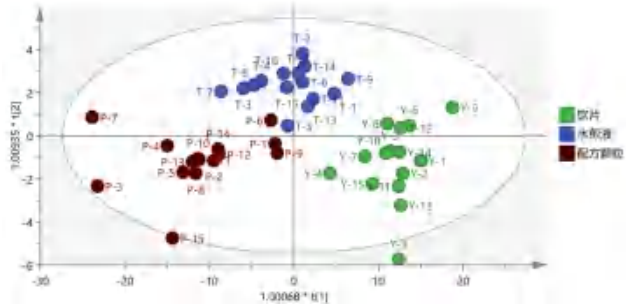

图 8　甘草饮片、水煎液和配方颗粒 UPLC 指纹图谱 OPLS-DA 得分图

Fig 8　OPLS-DA score plot of UPLC fingerprint of licorice pieces，decoction and formula granules

术应用于中药配方颗粒的生产过程监控，克服了单一成分信息量不全的缺点，能较全面地反映甘草饮片、水煎液和配方颗粒间的化学成分传递情况及其相关性和差异性，可为甘草配方颗粒的质量控制及临床使用提供参考。

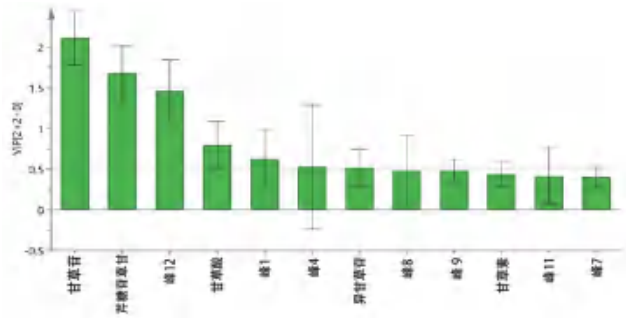

图 9　甘草饮片、水煎液和配方颗粒 UPLC 指纹图谱 VIP 值

Fig 9　VIP of UPLC fingerprint of licorice pieces，decoction and formula granules

参考文献

[1] 马帅，王诺，杨光，等 . 我国甘草及其制品进出境调查研究 [J]. 中国中药杂志，2017，42（11）：2193-2199.

[2] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：88-89.

[3] 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）：2660-2673.

[4] 马海娟，高简，张亚丽，等 . 基于 UPLC-MS^n 的甘草成分快速鉴定及质谱裂解途径研究 [J]. 中华中医药杂志，2018，33（3）：1120-1123.

[5] 孙立丽，游广娇，任晓亮，等 . 甘草化学成分快速定性分析与化学模式识别研究 [J]. 中华中医药杂志，2018，33（5）：2074-2079.

[6] 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.

[7] Huo XW，Yang S，Sun XK，et al. Protective effect of glycyrrhizic acid on alcoholic liver injury in rats by modulating lipid metabolism [J]. Molecules，2018，23（7）：E1623.

[8] 陈佳，聂黎行，胡晓茹，等 . 基于超高效液相色谱 - 四极杆飞行时间质谱法分析乌拉尔甘草与光果甘草化学成分差异 [J/OL]. 中国药物警戒 . https：//kns. cnki. net/kcms/detail/11.5219. R. 20211014.1627.004. html.

[9] 国家药典委员会 . 关于执行中药配方颗粒国家药品标准有关事项的通知 [EB/OL]. https：//www. chp. org. cn/gjydw/tz/15980. jhtml. 2021-04-29.

[10] 张志鹏，邓李红，李美洲，等 . 基于化学模式识别和熵权 TOPSIS 法分析槐角不同部位的差异 [J]. 中药材，2021，44（6）：1413-1419.

[11] 陶晓赛，龚海燕，谢彩侠，等 . 基于 UPLC 指纹图谱结合化学计量学评价不同产地盾叶薯蓣药材质量 [J]. 中草药，2021，52（1）：227-233.

[12] 裴科，宁燕，蔡皓，等 . 基于 UPLC 指纹图谱结合化学模式识别的川芎炮制前后对比研究 [J]. 中草药，2021，52（5）：1274-1283.

[13] 王素娟，贺凡珍，王乾蕾，等 . 消糖灵片的超高效液相色谱指纹图谱建立、含量测定及化学模式识别 [J]. 中南药学，2021，19（11）：2394-2395.

[14] 冯小慧，侯小涛，谢滟，等 . 结合化学计量学的厚藤 UPLC 指纹图谱研究 [J]. 中药材，2020，43（9）：2210-2213.

[15] 董力嘉，傅舒 . 中药配方颗粒现状研究 [J]. 中药与临床，2021，12（4）：85-89.

（收稿日期：2022-02-21；修回日期：2022-03-16）

尿素含量测定方法的比较

李颖[1, 2, 3]，刘雁鸣[1, 3*]，郑金凤[1, 3]，谢莹莹[1, 3]，张悦[1, 3]，刘杨[1, 3]，蒋赟[1, 3]（1. 湖南省药品检验检测研究院，长沙　410001；2. 湖南省药品审查核验中心，长沙　410209；3. 国家药品监督管理局药用辅料工程技术研究重点实验室，长沙　410001）

摘要：目的　寻求一种简便有效的测定尿素含量的方法。**方法**　采用凯氏定氮法、HPLC-CAD 法和 HPLC-UV 法测定尿素含量，并进行比较。**结果**　3 种方法测定尿素的含量结果基本一致，其中，传统凯式定氮法虽然成本低廉，但是操作过程烦琐，分析时间长，影响因素多；电喷雾（CAD）检测器相对于一般检测器，价格较高，市场普及率低；HPLC-UV 方法准确度与精密度均良好，简便易操作，且仪器普及率高。**结论**　3 种方法均可准确地测定尿素的含量，相比而言，HPLC-UV 法操作简便，仪器普及率高，更能广泛地应用到尿素含量的测定中，同时也可为建立尿素的质量标准提供参考。

关键词：尿素；凯氏定氮法；HPLC-CAD 法；HPLC-UV 法；含量测定
中图分类号：R917　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2129-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.028

Comparison of content determination methods for urea

LI Ying[1, 2, 3], LIU Yan-ming[1, 3*], ZHENG Jin-feng[1, 3], XIE Ying-ying[1, 3], ZHANG Yue[1, 3], LIU Yang[1, 3], JIANG Yun[1, 3] (1. *Hunan Institute of Drug Control*, *Changsha* 410001; 2. *Hunan Drug Inspection Center*, *Changsha* 410209; 3. *NMPA Key Laboratory for Pharmaceutical Excipients Engineering Technology Research*, *Changsha* 410001)

Abstract: Objective To find a simple and effective method for the content determination of urea. **Methods** The content of urea was determined by Kjeldahl method, HPLC-CAD method and HPLC-UV method. **Results** The results of the 3 methods to determine the content of urea were basically the same. Although the cost of traditional Kjeldahl method for the determination of urea content was low, the operation process was complicated and time-consuming, involving many influencing factors. Compared with the regular detectors, charged aerosol detectors were relatively more expensive with lower market application. The accuracy and precision of HPLC-UV method were both good, simple and easy operation with fair popularity. **Conclusion** All the 3 methods can be used to determine the urea content accurately and effectively. HPLC-UV method can be more widely used owing to easy operation and high popularity, which also provides a reference for the quality standard of urea.

Key words: urea; Kjeldahl method; HPLC-CAD method; HPLC-UV method; content determination

尿素又称碳酰胺、脲，在临床上作为脱水药、利尿药及角质软化药等；由于该药具有抗菌，使蛋白质溶解、变性，增加蛋白质水合，增加皮肤通透性等作用，作为辅料在药剂中主要用作透皮促进剂及助溶剂，以增加药物在水中的溶解度[1]。同时，尿素还可用于注射剂、口服制剂和外用制剂[2]。由于药用尿素的广泛应用，其需求量逐年上涨[3]。需对其含量测定《中国药典》（ChP2020）、欧洲药典（EP10.0）和日本药典（JP17）中均采用氮测定法[4-7]，仅美国药典（USP43）中采用 HPLC 法[8]。本文比较了凯氏定氮法、HPLC-CAD 法和 HPLC-UV 法 3 种测定尿素含量的方法，以寻找一种简便、有效、适用性高的方法。

基金项目：湖南省自然科学基金项目（No.2021JJ80034）。
作者简介：李颖，女，主管药师，主要从事化学药、药用辅料研究，email：328881879@qq.com　*通信作者：刘雁鸣，女，硕士，主任药师，主要从事化学药、药用辅料研究，email：380852839@qq.com

1　材料

1.1　仪器

凯氏定氮装置[4]；U3000 电喷雾高效液相色谱仪（CAD 检测器，赛默飞公司）；e2695 高效液相色谱仪（UV 检测器，Waters 公司）；MS105DU 电子天平（瑞士 Mettler-Toledo 公司）。

1.2　试药

尿素对照品（中国食品药品检定研究院，批号：100288-201903，纯度：99.8%）；缩二脲（麦克林，批号：C10871148，纯度：98%）；三聚氰酸（麦克林，批号：C10691090，纯度：98%）；缩三脲（上海旭东海普南通药业有限公司，批号：190601，纯度：99.0%）；乙腈（Merck 公司，批号：JA079030，色谱级）；收集尿素样品 9 批；水为实验室自制超纯水。

2　方法与结果

2.1　溶液配制

2.1.1　盐酸滴定液（0.2 mol • L^{-1}）　取盐酸 18 mL，加水至 1000 mL，摇匀。按照 ChP2020 年版通则 8006 盐酸滴定液标定。

2.1.2　系统适用性溶液　精密称取缩二脲、缩三脲、三聚氰酸和尿素适量，用 75% 乙腈溶解并稀释制成质量浓度分别为 0.005、0.005、0.005（约相当于 0.1% 的浓度）和 5.0 mg • mL^{-1} 的混合溶液，即得。

2.1.3　供试品溶液　取本品，加 75% 乙腈溶解并稀释制成每 1 mL 中含 0.2 mg 的溶液，摇匀，即得。

2.1.4　对照品溶液 1　精密称取尿素对照品 90.51 mg，至 10 mL 量瓶中，加 75% 乙腈溶解并稀释制成每 1 mL 中含 9.033 mg 尿素的溶液，作为对照品储备液。精密量取对照品储备液适量，用 75% 乙腈稀释制成质量浓度为 90.33、135.49、180.65、225.82、451.64 μg • mL^{-1} 的线性系列溶液。

2.1.5　对照品溶液 2　精密称取尿素对照品约 96.71 mg，至 10 mL 量瓶中，加 75% 乙腈溶解并稀释制成每 1 mL 中含 9.652 mg 尿素的溶液，作为对照品储备液。精密量取对照品储备液适量，用 75% 乙腈稀释制成质量浓度为 96.52、144.77、193.03、241.29、482.58 μg•mL^{-1} 的线性系列溶液。

2.2　凯氏定氮法

参考 ChP2020 四部尿素各论[4]下的含量测定项进行测定。

2.2.1　重复性测试　取同一批供试品（批号：20180301）共 6 份，按 ChP2020 四部的条件进行试验，结果见表 1。

2.2.2　含量测定　本品在 ChP2020 中的限度为：含 CH_4N_2O 不得少于 99.5%。第一次含量考察结果 6 份样品有 3 份未达到要求；根据其原理及试验操作过程[9-13]，课题组认为是否消解完全会直接影响含量测定结果，第二次对尿素含量测定进行考察时，对上述可能存在的问题进行了排除。严格控制消解时火炉的火力大小，使样品一直处于沸腾状态，样品完全消解，结果均能符合限度要求，且滴定结果的平行性好（*RSD* = 0.26%）。

表 1　重复性结果表 (%)

Tab 1　Repeatability (%)

名称	第一次含量考察	第二次含量考察
供试品 1-1	99.95	99.87
供试品 1-2	97.26	100.52
供试品 1-3	96.85	100.36
供试品 1-4	100.47	99.98
供试品 1-5	99.04	100.27
供试品 1-6	100.34	100.46
平均值	99.00	100.20
RSD	1.6	0.26

2.3　HPLC-CAD 法

2.3.1　色谱条件　色谱柱：Waters XBridge Amide（4.6 mm×250 mm，3.5 μm）；流动相：乙腈 - 水（94∶6）；流速：1.0 mL • min^{-1}；柱温：30 ℃；电喷雾检测器雾化温度：35 ℃；进样量 10 μL。

2.3.2　系统适用性试验　取空白溶剂（75% 乙腈）及“2.1”项下系统适用性溶液、对照品溶液及供试品溶液各 10 μL 注入液相色谱仪，按“2.3.1”项下色谱条件进样分析，记录色谱图。结果空白溶剂对主峰无干扰，各杂质峰之间以及与尿素主峰之间的分离度均满足要求。典型图谱见图 1。

2.3.3　线性关系试验　精密量取“2.1.4”项下线性系列溶液各 10 μL，进样测定，记录色谱图，以质量浓度（*X*）为横坐标，峰面积（*Y*）为纵坐标，绘制标准曲线，$Y = 0.013X - 0.5595$，$R^2 = 0.9997$。结果表明，尿素在 90.33 ～ 451.64 μg • mL^{-1} 内与峰面积的线性关系良好。

2.3.4　检测限和定量限　分别精密量取“2.1.4”项下对照品储备液适量，逐级稀释，精密吸取 10 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图。设定量限 *S/N* = 10，检测限 *S/N* = 3，结果检测限为 0.0020 μg • mL^{-1}，定量限为 0.0067 μg • mL^{-1}。

2.3.5　精密度试验　取同一批供试品溶液（批号：20180301），连续进样 6 次，测得尿素峰面积的 *RSD*（*n* = 6）为 0.56%，表明仪器精密度良好。

2.3.6　重复性试验　取同一批供试品（批号：20180301）共 6 份，分别按“2.1.3”项下方法制备，进样测定，计算尿素的含量为 99.11%，*RSD* 为 2.1%（*n* = 6），表明方法的重复性良好。

2.3.7　稳定性试验　取同一批供试品溶液，于 0、2、4、8、12 h 分别进样测定，记录色谱图，测

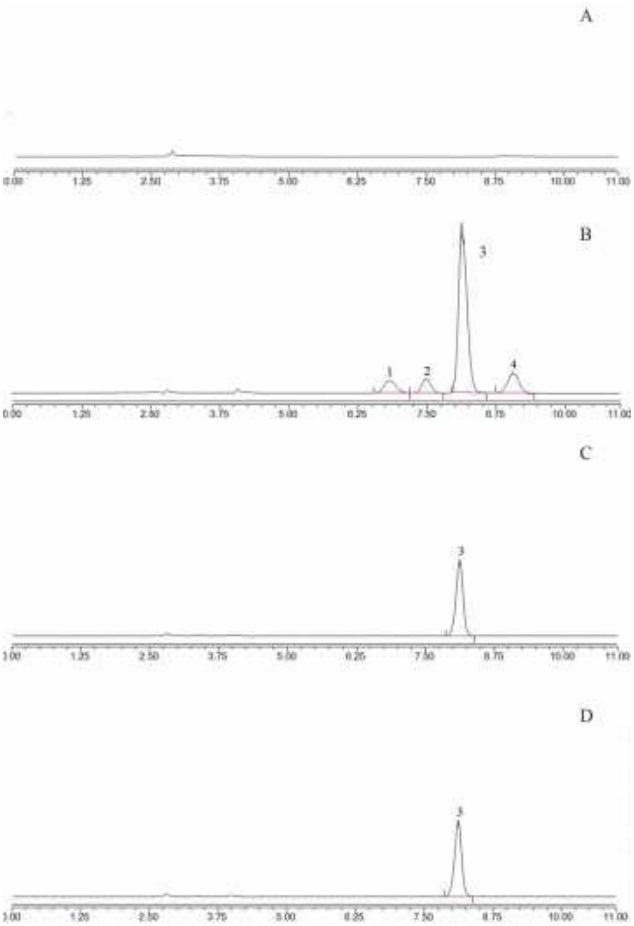

图 1　HPLC-CAD 典型色谱图

Fig 1　Typical chromatogram of HPLC-CAD

A. 空白溶剂（blank solution）；B. 系统适用性溶液（system suitability solution）；C. 对照品溶液（reference solution）；D. 供试品溶液（test solution）；1. 缩三脲（triuret）；2. 缩二脲（biuret）；3. 尿素（urea）；4. 三聚氰酸（cyanuric acid）

得尿素峰面积的 *RSD* 为 4.2%（$n = 5$），表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.3.8　回收试验　取同一批供试品（批号：20180301）共 6 份，每份约 0.25 g，精密称定，分别置于 50 mL 量瓶中，加 75% 乙腈溶解并稀释至刻度，摇匀，精密量取 0.5 mL，置 25 mL 量瓶中，精密加入尿素对照品储备液（9.033 mg • mL^{-1}）0.25 mL，加 75% 乙腈稀释至刻度，摇匀，作为回收率测定溶液，进样测定，计算尿素的平均回收率为 99.15%，*RSD* 为 1.4%（$n = 6$），表明本方法的回收率良好。

2.4　HPLC-UV 法

2.4.1　色谱条件　色谱柱：Waters XBridge Amide（4.6 mm×250 mm，3.5 μm）；流动相：乙腈-水（94∶6）；流速：1.0 mL • min^{-1}；检测波长：195 nm；柱温：30 ℃；进样量：10 μL。

2.4.2　系统适用性试验　取空白溶剂（75% 乙腈）、系统适用性溶液、对照品溶液及供试品溶液各 10 μL 注入液相色谱仪，按“2.4.1”项下色谱条件进样分析，记录色谱图。结果空白溶剂对主峰无干扰、各杂质峰之间以及与尿素主峰之间的分离度均满足要求。典型图谱见图 2。

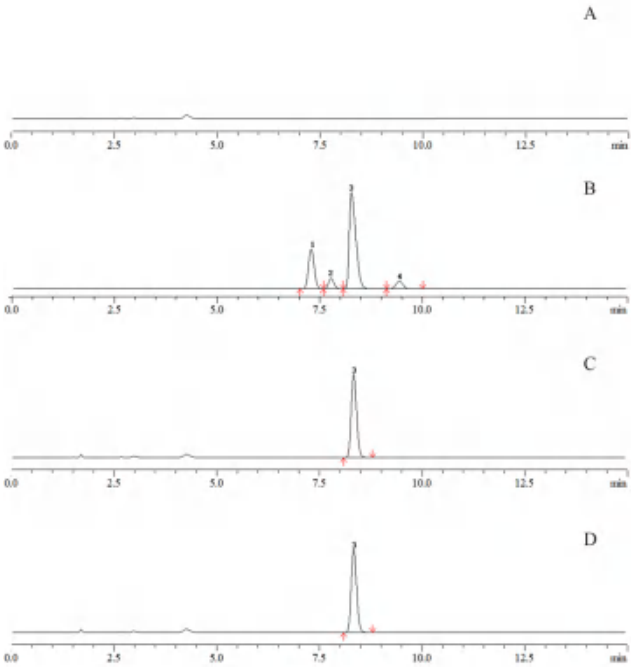

图 2　HPLC-UV 典型色谱图

Fig 2　Typical chromatogram of HPLC-UV

A. 空白溶剂（blank solution）；B. 系统适用性溶液（system suitability solution）；C. 对照品溶液（reference solution）；D. 供试品溶液（test solution）；1. 缩三脲（triuret）；2. 缩二脲（biuret）；3. 尿素（urea）；4. 三聚氰酸（cyanuric acid）

2.4.3　线性关系试验　精密量取“2.1.5”项下的线性系列溶液各 10 μL，分别注入液相色谱仪，记录色谱图，以质量浓度（X）为横坐标，峰面积（Y）为纵坐标，绘制标准曲线，$Y = 3.4385\times10^3X + 1.9593\times10^4$，$R^2 = 0.9996$。结果表明，尿素在 96.52 ～ 482.58 μg • mL^{-1} 内与峰面积的线性关系良好。

2.4.4　检测限和定量限　分别精密量取“2.1.5”项下对照品储备液适量，分别逐级稀释，精密吸取 10 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图。设定量限 $S/N = 10$，检出限 $S/N = 3$，结果检测限为 0.62 μg • mL^{-1}，定量限为 2.06 μg • mL^{-1}。

2.4.5　精密度试验　取同一批供试品溶液（批号：20180301），按“2.4.1”项下的色谱条件连续进样 6 次，记录色谱图，测得尿素峰面积的 *RSD* 为 0.42%（$n = 6$），表明仪器精密度良好。

2.4.6　重复性试验　取同一批供试品（批号：20180301）共 6 份，分别按“2.1.3”项下的方法制备供试品溶液，按“2.4.1”项下的色谱条件分别进样测定，计算尿素的含量为 99.81%，*RSD* 为

0.35%（$n = 6$），表明方法的重复性良好。

2.4.7　溶液稳定性试验　取同一批供试品溶液（批号：20180301），于 0、2、4、8、12 h 分别按“2.4.1”项下的色谱条件进样测定，记录色谱图，测得尿素峰面积的 *RSD* 为 0.30%（$n = 5$），表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.4.8　回收试验　取同一批供试品（批号：20180301）共 6 份，每份约 0.25 g，精密称定，分别置 50 mL 量瓶中，加 75% 乙腈溶解并稀释至刻度，摇匀，精密量取 0.5 mL，置 25 mL 量瓶中，精密加入尿素对照品储备液（9.652 mg • mL^{-1}）0.25 mL，加 75% 乙腈稀释至刻度，摇匀，作为回收率测定溶液，进样测定，计算尿素的回收率为 100.09%，*RSD* 为 0.96%（$n = 6$），表明本方法的回收率良好。

2.5　样品含量测定

取 9 批供试品，分别按照 3 种不同的方法进行测定，运用 SPSS 软件配对 *t* 检验对尿素含量的结果进行分析，结果见表 2 及表 3。

表 2　含量测定结果 (%)

Tab 2　Content determination (%)

厂家	批号	凯氏定氮法	HPLC-CAD 法	HPLC-UV 法
A	20180301	100.2	100.0	100.0
	20180302	100.4	100.0	100.1
	20180801	100.5	100.0	100.0
	20191101	100.4	100.0	100.1
	20191102	100.1	100.1	100.1
	20200301	100.5	100.0	100.2
B	20190521	100.3	100.0	100.1
C	20190316	99.9	99.5	99.7
D	5003M10P	99.7	99.0	98.9

表 3　3 种方法配对 *t* 检验

Tab 3　Paired *t*-test of the 3 methods

方法	成对差分					*t*	*Df*	*P*（双侧）
	均值	标准差	均值的标准误差	差分的 95% 置信区间				
				下限	上限			
凯氏定氮法 -HPLC-CAD 法	0.38	0.19	0.066	0.22	0.53	5.7	8	0.000
HPLC-UV 法 -HPLC-CAD 法	0.067	0.083	0.029	0.018	0.16	2.0	8	0.021
HPLC-UV 法 - 凯氏定氮法	− 0.31	0.23	0.075	− 0.48	− 0.14	− 4.13	8	0.003

综上，3 种含量测定方法测得的结果基本一致，配对 *t* 检验结果显示 *P* 均小于 0.05，表明 3 种方法间成显著相关。

3　讨论

本试验对尿素含量的测定方法进行了比较，结果表明采用 3 种方法测定尿素含量测定结果基本一致，互相证明了 3 种方法结果的可靠性。

传统凯氏定氮法测定尿素的含量，虽然成本低廉，但是操作过程烦琐，分析时间长，影响因素多，试验第一步消解为尿素与硫酸反应生成硫酸铵，凯氏烧瓶中的溶液在缓缓加热至溶液呈澄明的绿色，此时能明显观察到凯氏烧瓶中弥漫了白雾，火力需始终保持样品溶液在白雾中沸腾再保持加热 30 min。此时，火炉的火力控制不当，样品消解不完全会造成含量偏差过大。火力太大，白雾会冲出凯氏烧瓶，无法使样品反应完全；火力太小，样品达不到沸腾状态，也无法完全消解样品。另外，使用的定氮仪是采用通则 0704 氮测定法的装置，该装置搭建烦琐，且该试验需要加热蒸馏，“俟氨馏尽”，这样的字眼在试验过程中不能简单明了地判断，接收馏液不全，直接影响样品的含量。此外，ChP2020 采用的氮测定法是对含氮量的测定，而非针对尿素主成分本身，因此该方法的专属性存在一定的问题，可操作性差。HPLC-CAD 法可排除缩二脲、缩三脲和三聚氰酸等杂质的干扰，专属性强，准确度与精密度均良好，简便易操作 [14-15]；但电喷雾检测器在市场上的普及率相对较低，仪器的维护成本较高。HPLC-UV 法既能准确地测定尿素的含量，还可以测定除尿素外的其他杂质含量，且仪器的市场普及率高；综合考虑，认为 HPLC-UV 法更能广泛地应用到尿素含量的测定中。本研究可为尿素及其相关产品质量标准的建立及开发提供理论依据。

参考文献

[1] 罗明生，高天惠 . 药剂辅料大全 [M]. 成都：四川科学技术出版社，2006.

[2] 萧三贯 . 最新国家药用辅料标准手册 [M]. 北京：中国医药科技出版社，2006.

[3] 舒婕，徐希明 . 药用尿素的制备及其质量控制研究 [D]. 镇江：江苏大学，2014.

[4] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：95，675.

[5] 中国药典 2020 年版 . 二部 [S]. 2020：652.

[6] EP10.0 [S]. 2017：4149.

[7] JP Ⅹ Ⅷ [S]. 2017：1747.

[8] USP2021 [S]. 2021：4555.

[9] 刘军 . 食品中蛋白质凯氏定氮法测定比较 [J]. 食品安全导刊，2021，12：147，149.

[10] 费丽娜 . 浅谈凯氏定氮法测定食品中蛋白质的原理及注意事项 [J]. 中国药物经济学，2014，9（1）：171-172.

[11] 陈明，孙小方，周园，等 . 影响半微量凯氏定氮法测定粗蛋白结果的因素研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医，2012，55（19）：71-72.
[12] 李玫，尚明华，刘雪梅 . 影响凯氏定氮准确性的因素 [J]. 中国饲料，2003，14（9）：25.
[13] 施远国 . 凯氏定氮法测定饲料中粗蛋白含量的不确定度分析 [J]. 饲料工业，2007，28（7）：42-43.
[14] 赵恂，范青峰，陈雷，等 . 尿素及其有关物质含量的 HPLC-CAD 分析研究 [J]. 中国药品标准，2018，19（6）：453-458.
[15] 张大为，张瑶瑶 . 一种新型的采用 HILIC 色谱柱与电雾式检测器测定水体中尿素的方法 [J]. 广东化工，2016，12（43）：236，239-240.

（收稿日期：2022-02-11；修回日期：2022-04-06）

基于高效液相色谱法对淡豆豉发酵过程中 6 种异黄酮含量的动态分析

曹冬英，谢思静，曾思婷，隋利强*，徐伟*（福建中医药大学药学院，福建省中药炮制技术传承基地，福州 350122）

摘要：目的　分析淡豆豉发酵过程中 6 种异黄酮的含量动态变化，探讨淡豆豉不同发酵阶段的变化。**方法**　收集淡豆豉发酵过程不同阶段的样品，采用 Welch Ultimate XB-C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），以甲醇 -0.1% 甲酸为流动相进行梯度洗脱，检测波长为 254 nm，柱温为 30 ℃，流速为 0.8 mL • min^{-1}。采用高效液相色谱法，以大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素、染料木素为对照，对淡豆豉不同发酵阶段的 6 种异黄酮进行含量测定。**结果**　淡豆豉发酵过程中，大豆苷元等 3 种苷元的含量总体呈上升趋势，染料木苷等 3 种苷的含量总体呈下降趋势。结果提示，在淡豆豉发酵过程中存在苷到苷元的转化，并且在第二次闷制阶段对于苷元含量的积累有显著影响。**结论**　淡豆豉发酵过程中，闷制这一环节有利于有效成分的转化和累积，第二次闷制环节是非常有必要的。

关键词：淡豆豉；发酵；异黄酮；高效液相色谱法
中图分类号：R917　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2133-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.029

Dynamic change of 6 isoflavones in the fermentation of Sojae Seman Praeparatum by HPLC

CAO Dong-ying, XIE Si-jing, ZENG Si-ting, SUI Li-qiang*, XU Wei* (*College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fujian Traditional Chinese Medicine Processing Technology Heritage Base, Fuzhou* 350122)

Abstract: Objective　To determine the dynamic change of 6 isoflavones in the fermentation of Sojae Seman Praeparatum, and the change in different fermentation stages. **Methods**　Samples from different stages of the fermentation of Sojae Seman Praeparatum were collected. Welch Ultimate XB-C_{18} chromatographic column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used. The gradient elution was conducted out with methanol-0.1% formic acid as the mobile phase. The detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 30 ℃ , and the flow rate was 0.8 mL • min^{-1}. The content of 6 isoflavones in different fermentation stages of Sojae Seman Praeparatum were determined by HPLC, with daidzin, glycitin,

基金项目：福建省科技厅引导性项目（No.2021Y0036）。
作者简介：曹冬英，女，硕士，主要从事中药药效物质基础及作用机制研究，email：1061980460@qq.com　*通信作者：隋利强，男，硕士，副教授，主要从事中药炮制工艺与炮制原理研究，email：2007025@fjtcm.edu.cn；徐伟，男，博士，教授，主要从事中药药效物质基础及作用机制研究，email：xwfjtcm@sina.com

genistin, daidzein, glycitein, and genistein as the reference substances. **Results** During the fermentation of Sojae Seman Praeparatum, the content of 3 aglycones such as daidzein tended to increase while the content of three glycosides such as genistin tended to decrease. There was a conversion from glycoside to aglycone in the fermentation of Sojae Seman Praeparatum which significantly affected the accumulation of aglycone content in the second stuffy stage. **Conclusion** In the fermentation process of Sojae Seman Praeparatum, the process of suffocation is conducive to the transformation and accumulation of effective components, and the second suffocation process is very necessary.

Key words: Sojae Seman Praeparatum; fermentation; isoflavone; HPLC

淡豆豉，又名“香豉”“豆豉”“豉”，为豆科植物大豆 *Glycine max*（L.）Merr. 的干燥成熟种子（黑豆）的发酵加工品 [1]。其味苦、辛，性凉，归肺、胃经，有解表、除烦、宣发郁热的作用，在临床上主要用于感冒、寒热头痛、烦躁胸闷、虚烦不眠等症 [2]。

淡豆豉历代炮制方法有烧制、熬制、炒制、清酒制、醋蒸制、炒焦法、盐醋拌蒸法以及清蒸法等 [3-6]。2020 年版的《中国药典》收载的淡豆豉发酵方法为青蒿、桑叶加水煎煮，煎液拌入大豆，大豆吸汁后蒸透，晾凉，再用青蒿、桑叶渣闷制使发酵至黄衣上遍，除去药渣之后再进行闷制直到香气溢出，再略蒸，干燥即得淡豆豉成品 [1]。

淡豆豉在不同地区炮制方法略有差异，《全国中药炮制经验与规范集成》（2017 年版增修本）[7] 中一共收载了 42 种关于淡豆豉的炮制方法，其中 24 种方法是直接发酵不经过闷制，18 种方法经过发酵后再闷制。《全国中药饮片炮制规范辑要》（2016 年版）[8] 中则收载了 20 种淡豆豉的炮制方法，其中，直接发酵和经过发酵后再闷制的方法各 10 种。关于淡豆豉发酵过程中再闷制工艺合理性与否也存在争议。

淡豆豉中含有黄酮类、多糖类、豆豉纤溶酶、大豆皂苷、蛋白质等成分，其中异黄酮具有预防更年期、乳腺癌以及改善骨质疏松，预防心血管疾病、阿尔茨海默病等药理活性 [9]，并且在淡豆豉中主要以游离型的苷元和结合型的糖苷存在，故本文主要通过收集淡豆豉不同发酵阶段的样品，通过 HPLC 法测定 6 种异黄酮的含量，分析不同发酵阶段 6 种异黄酮含量动态变化，探讨发酵过程中再闷制环节的必要性，为淡豆豉的工艺和原理研究提供理论参考。

1 材料

LC-20A 型高效液相色谱仪（日本岛津公司）；SQP 型十万分之一分析天平（赛多利斯科学仪器有限公司）；大豆苷（批号：P14M10F83057）、大豆苷元（批号：C06N6Y5504）、黄豆黄苷（批号：P06J9F65073）、黄豆黄素（批号：G16J9C65571）、染料木苷（批号：P09M8F31018）、染料木素（批号：H30A9Z69019）（上海源叶生物科技有限公司，以上对照品纯度均大于 98%）；甲醇为色谱纯（德国 Merck 公司）；甲酸为色谱纯（上海阿拉丁试剂有限公司）。

黑豆（市售），经福建中医药大学车苏容副教授鉴定为豆科植物黑大豆 *Glycine max*（L.）Merr. 的成熟种子。桑叶（北京本草方源药业集团有限公司，批号：20170508）经福建中医药大学车苏容副教授鉴定为桑科植物桑 *Morus alba*（L.）的叶。青蒿（安徽顺和堂中药饮片有限公司，批号：171201）经福建中医药大学车苏容副教授鉴定为菊科植物黄花蒿 *Artemisia annua*（L.）的干燥地上部分。

2 方法与结果

2.1 淡豆豉样品的制备 [1]

黑大豆洗净，取青蒿、桑叶加水煎煮，纱布过滤，滤渣备用，煎液浓缩，冷却拌入净大豆，药汁吸尽后蒸透，取出，晾凉。置容器内，纱布覆盖，滤过的青蒿、桑叶渣均匀覆盖于纱布上，置于室温，闷制发酵，于发酵第 2 日、第 4 日、第 6 日、第 13 日分别取出部分黑豆留作淡豆豉样品，并标记为 Y-2、Y-4、Y-6、Y-13。

取发酵后的淡豆豉清洗稍晾，置于密闭容器内水浴 50 ～ 60 ℃，保温，进行第二次闷制发酵，分别在第二次发酵的第 3 日、第 9 日和第 15 日分别取出部分黑豆留作淡豆豉样品，并标记为 $Y_{闷}$-3、$Y_{闷}$-9、$Y_{闷}$-15。

取 Y-2、Y-4、Y-6、Y-13、$Y_{闷}$-3、$Y_{闷}$-9、$Y_{闷}$-15 共 7 份样品，干燥，粉碎，过二号筛。

2.2 色谱条件 [10-11]

采用 Welch Ultimate XB-C_{18} 色谱柱（4.6

mm×250 mm，5 μm），以甲醇（A）- 甲酸 0.1%（B）为流动相，梯度洗脱（0 ～ 7 min，25% ～ 30%A；7 ～ 12 min，30% ～ 45%A；12 ～ 20 min，45%A；20 ～ 27 min，45% ～ 60%A；27 ～ 33 min，60% ～ 75%A；33 ～ 35 min，75% ～ 25%A；35 ～ 40 min，25%A），流速为 0.8 mL • min^{-1}，柱温为 30 ℃，检测波长为 254 nm。理论塔板数均不低于 5000。样品和对照品 HPLC 色谱图见图 1。

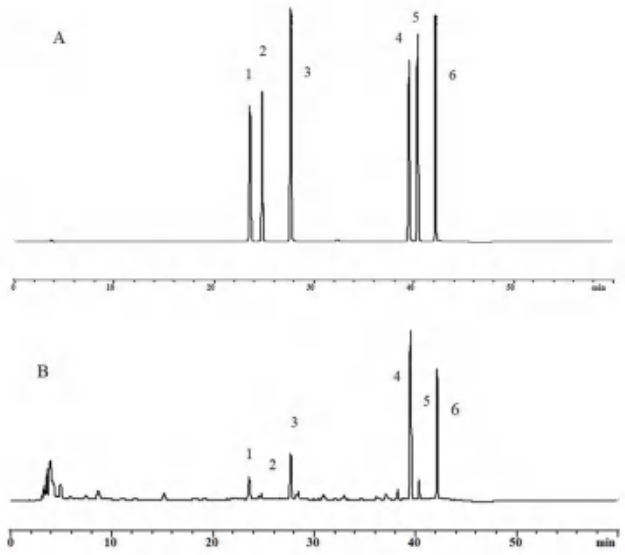

图 1　对照品及淡豆豉样品 HPLC 色谱图

Fig 1　HPLC chromatogram of reference substance and Sojae Seman Praeparatum sample

A. 混合对照品（mixed reference substance）；B. 淡豆豉样品（sample of Sojae Seman Praeparatum）；1. 大豆苷（daidzin）；2. 黄豆黄苷（glycitin）；3. 染料木苷（genistin）；4. 大豆苷元（daidzein）；5. 黄豆黄素（glycitein）；6. 染料木素（genistein）

2.3　混合对照品溶液的制备

取对照品大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素和染料木素适量，精密称定，置 50 mL 量瓶中，加入 70% 甲醇超声溶解，制成质量浓度分别为 730、1200、916、608、892 和 564 μg • mL^{-1} 的单一对照品储备液，备用。分别精密量取上述对照品储备液各 1 mL，置同一 10 mL 量瓶中，加 70% 甲醇至刻度混匀，得到质量浓度为大豆苷 73 μg • mL^{-1}、大豆苷元 120 μg • mL^{-1}、黄豆黄苷 91.6 μg • mL^{-1}、黄豆黄素 60.8 μg • mL^{-1}、染料木苷 89.2 μg • mL^{-1}、染料木素 56.4 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.4　供试品溶液的制备

依次取样品粉末（过二号筛）约 1 g，精密称定，分别置于 50 mL 锥形瓶中，精密加入 70% 甲醇 25 mL，称重，加热回流 30 min，放冷，再称重，用 70% 色谱甲醇补足减失的重量，摇匀，用 0.22 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液至进样瓶中备用。

2.5　标准曲线的制备

精密称取大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素、染料木素各对照品，加入 70% 甲醇超声溶解，定容至 5 mL 量瓶，再用 70% 甲醇稀释为不同梯度质量浓度的混合对照品溶液。按“2.2”项下的色谱条件测定。以大豆苷、大豆苷元、黄豆黄苷、黄豆黄素、染料木苷、染料木素的质量浓度（X）为横坐标，以峰面积（Y）为纵坐标绘制标准曲线，见表 1。

表 1　淡豆豉中 6 种异黄酮的线性范围考察结果

Tab 1　Linear range of 6 isoflavones in Sojae Seman Praeparatum

化合物	回归方程	线性范围 /（μg • mL^{-1}）	r
大豆苷	$Y = 5.25\times10^4X - 2.17\times10^3$	0.487 ～ 73	0.9999
大豆苷元	$Y = 9.16\times10^4X + 2.87\times10^3$	0.8 ～ 120	1.0000
黄豆黄苷	$Y = 4.49\times10^4X - 1.74\times10^3$	0.610 ～ 91.6	0.9999
黄豆黄素	$Y = 6.52\times10^4X - 7.12\times10^3$	0.405 ～ 60.8	0.9999
染料木苷	$Y = 6.11\times10^4X + 8.24\times10^3$	0.595 ～ 89.2	1.0000
染料木素	$Y = 1.43\times10^5X + 7.29\times10^4$	0.376 ～ 56.4	0.9997

2.6　精密度试验

精密吸取“2.3”项下的混合对照品溶液 10 μL，按照“2.2”项下的色谱条件连续进样 6 次测定，测得大豆苷元、大豆苷、黄豆黄素、黄豆黄苷、染料木素、染料木苷的峰面积 *RSD* 分别为 0.078%、0.062%、0.042%、0.23%、0.039%、2.5%。说明精密度良好。

2.7　重复性试验

称取淡豆豉粉末，按“2.4”项下的方法制备成供试品溶液，按照“2.2”项下的色谱条件进样 6 次，计算得大豆苷、大豆苷元、黄豆黄苷、黄豆黄素、染料木苷、染料木素峰面积的 *RSD* 分别为 3.0%、0.47%、2.6%、1.2%、2.8%、2.4%，结果表明方法重复性良好。

2.8　稳定性试验

精密称取编号为 $Y_{闷}$-15 的淡豆豉粉末，按“2.4”项下的方法制备成供试品溶液，分别在 0、2、4、8、12、24 h 按照“2.2”项下的色谱条件进样测定，计算大豆苷、大豆苷元、黄豆黄苷、黄豆黄素、染料木苷、染料木素峰面积的 *RSD* 值分别为 2.8%、1.9%、1.2%、0.71%、1.4%、1.2%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9　加样回收试验

取编号为 $Y_{闷}$-15 的淡豆豉粉末，精密称定约 1 g，每份加入等量的 6 份混合对照品溶液，按照“2.4”项下的方法制备供试品溶液，再按照“2.2”项下的色谱条件进样测定，计算大豆苷、大豆苷元、黄豆黄苷、黄豆黄素、染料木苷、染料木素的平均加样回收率为 103.66%、99.51%、101.40%、99.44%、103.89%、101.76%；*RSD* 分别为 3.7%、2.5%、3.7%、3.6%、3.3%、3.3%。

2.10　样品的含量测定

取编号为 Y-2、Y-4、Y-6、Y-13、$Y_{闷}$-3、$Y_{闷}$-9、$Y_{闷}$-15 的淡豆豉粉末样品，精密称取 1 g，分别置于 50 mL 锥形瓶中，再分别精密加入 70% 色谱甲醇 25 mL，加热回流 30 min，放冷，再称重，用 70% 色谱甲醇补足减失的重量，摇匀，用 0.22 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液至进样瓶中，按照“2.2”项下的方法进样测定，代入回归方程计算出每份样品中 6 种异黄酮的浓度以及 6 种异黄酮的含量，结果见表 2，用折线统计图表示 6 种异黄酮含量动态变化，见图 2。

表 2　淡豆豉不同发酵阶段 6 种异黄酮的含量 (n = 3)

Tab 2　Content of 6 isoflavones in different fermentation stages of Sojae Seman Praeparatum (n = 3)

样品	大豆苷 /%	大豆苷元 /%	黄豆黄苷 /%	黄豆黄素 /%	染料木苷 /%	染料木素 /%
Y-2	0.077 03	0.012 65	0.020 35	0.003 41	0.010 60	0.016 07
Y-4	0.036 97	0.038 54	0.014 34	0.013 30	0.080 86	0.021 98
Y-6	0.032 86	0.044 96	0.013 73	0.015 24	0.055 55	0.023 85
Y-13	0.025 11	0.055 81	0.009 52	0.016 04	0.042 28	0.036 22
$Y_{闷}$-3	0.009 37	0.088 08	0.007 21	0.022 01	0.015 13	0.037 70
$Y_{闷}$-9	0.006 76	0.090 75	0.005 79	0.026 36	0.009 80	0.047 21
$Y_{闷}$-15	0.008 11	0.085 93	0.006 70	0.022 55	0.012 06	0.045 70

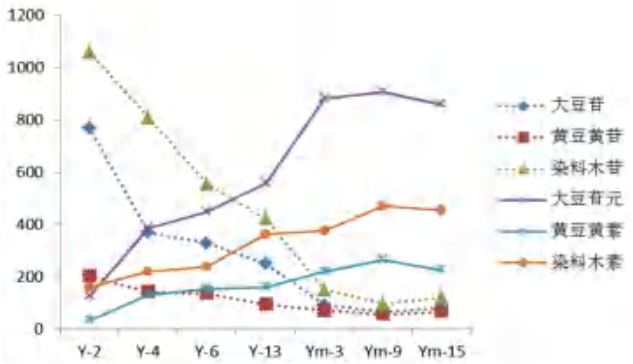

图 2　淡豆豉不同发酵阶段 6 种异黄酮含量动态变化趋势图

Fig 2　Dynamic change of 6 isoflavones in different fermentation stages of Sojae Seman Praeparatum

3　讨论

3.1　闷制过程中主要成分含量变化

由图 2 可直观看出，淡豆豉发酵过程中，大豆苷元、染料木素和黄豆黄素 3 种苷元含量总体呈上升趋势，以大豆苷元的变化趋势最显著；染料木苷、大豆苷和黄豆黄苷 3 种苷含量总体呈下降趋势，以染料木苷的下降趋势最显著。

大豆苷元从发酵开始，含量变化上升显著，第二次闷制的第 3 日含量上升最显著；染料木素在第一次闷制发酵阶段前 6 d 含量变化不大，第 13 日含量有明显上升趋势；黄豆黄素在第一次闷制发酵的前 4 d 含量增加最为显著，此 3 种苷元都是第二次闷制发酵阶段第 9 日含量达到峰值，到第二次闷制发酵阶段第 15 日含量有所下降，提示第二次闷制发酵阶段对于苷元含量的积累有显著影响，可尝试缩短闷制时间。染料木苷从发酵开始，含量持续下降，并且下降幅度最大；大豆苷在发酵第 4 日含量下降幅度最大，此后含量呈较缓下降趋势；黄豆黄苷在发酵前 6 d 含量下降不大，第 13 日有明显下降趋势。此 3 种苷类成分的含量都是第二次闷制发酵阶段第 9 日达到最低值，但在第 15 日都有所上升。结果提示，在淡豆豉发酵过程中存在苷到苷元的转化并且第二次闷制发酵的过程中苷和苷元会持续转化。

大豆苷具有良好的降血压和改善脑循环的作用；大豆苷元具有类雌激素样作用 [12]，对于治疗妇女更年期综合征等具有良好效果；黄豆黄苷具有抗病毒、抗菌的作用 [13]，可以防止骨质疏松和心脑血管疾病；黄豆黄素除了能够降低胃癌细胞的存活率 [14]，还可以诱发细胞程序性死亡；染料木苷具有抗增殖、抗肿瘤血管生成，以及诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡等作用 [15]；染料木素具有抗炎、抗菌、抗氧化、抗肿瘤、抗凋亡等活性 [16]。再闷制阶段有利于苷向苷元转化，该过程主要由于葡萄糖苷酶作用于糖苷型异黄酮的氧苷键，使其葡萄糖基团脱掉，供微生物代谢，使糖苷型异黄酮转化为异黄酮苷元。因大豆苷元、染料木素等异黄酮苷元较糖苷型异黄酮具有更高的生物活

性[17]，所以淡豆豉发酵后解表、除烦功效增强。

3.2 提取溶剂的优化

在前期试验的基础上，结合参考文献，对淡豆豉中 6 种异黄酮的提取溶剂进行了优化，比较了甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇、90% 甲醇的提取效果。结果显示，70% 甲醇提取效果较好，且杂质相对较少，故本试验采用 70% 甲醇作为提取溶剂。

3.3 小结

淡豆豉在不同地区炮制方法略有差异，对于发酵过程的闷制环节是否必要，不同学者也持有不同见解，本试验收集淡豆豉不同发酵阶段的样品，分析 6 种异黄酮含量动态变化，结果显示，淡豆豉发酵过程中存在苷到苷元的转化现象，再闷制环节有利于苷转化成苷元，并且大豆苷元、染料木素等异黄酮苷元较糖苷型异黄酮具有更高的生物活性。该结果提示，淡豆豉发酵过程再闷制是必要过程，是有利于药效成分转化的发酵阶段。后期试验可结合不同阶段解表、除烦作用的研究，对再闷制过程的必要性进一步分析探讨，结合淡豆豉发酵过程中药理作用的变化，为淡豆豉炮制工艺和炮制原理研究提供参考。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：342.

[2] 林王敏，翁倩倩，邓爱平，等 . 基于文献的淡豆豉发酵过程成分转化分析 [J]. 中国中药杂志，2021，46（9）：2119-2132.

[3] 林王敏，翁倩倩，邓爱平，等 . 淡豆豉的发酵工艺沿革及过程控制概述 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（11）：222-232.

[4] 钱浩良，陆晓庆，周品梁 . 淡豆豉炮制工艺的应用研究进展 [J]. 中医临床研究，2019，11（27）：133-134.

[5] 王思齐，王满元，关怀，等 . 淡豆豉炮制历史沿革的研究 [J]. 中国中药杂志，2018，43（7）：1985-1989.

[6] 乔明，张蓉，张厚宝 . 关于 2015 年版《中国药典》一部中淡豆豉炮制内容的商榷 [J]. 时珍国医国药，2016，27（8）：1961-1962.

[7] 曹晖，付静 . 全国中药炮制经验与规范集成（增修本）[M]. 北京：北京科学技术出版社，2017：506-509.

[8] 于江泳，张村 . 全国中药饮片炮制规范辑要（2016 版）[M]. 北京：人民卫生出版社，2016：178.

[9] 陈怡，刘洋，覃业优，等 . 淡豆豉的生理活性和生产工艺研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报，2020，11（17）：5948-5954.

[10] 曹冬英，李鹜，许文，等 . 4 种市售黑豆及成品淡豆豉中异黄酮含量分析 [J]. 药学研究，2020，39（10）：581-584.

[11] 王思齐，王满元，仇峰，等 . 基于发酵原理的淡豆豉异黄酮分析方法 [J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（15）：100-105.

[12] 周桃大豆苷元磷脂复合物之固体分散体的制备及评价 [D]. 呼和浩特：内蒙古医科大学，2019.

[13] 茹波，张月辉，张瑜 . 梯度洗脱高效液相色谱法同时测定大豆异黄酮中大豆苷和黄豆黄苷的含量 [J]. 实用药物与临床，2011，14（2）：138-140.

[14] 冯艳钰 . 黄豆黄素诱导人胃癌 AGS 细胞凋亡机制的研究 [D]. 大庆：黑龙江八一农垦大学，2020.

[15] Sun TH，Min HY，Baek SH，et al. Genistin attenuates cellular growth and promotes apoptotic cell death breast cancer cells through modulation of ERalpha signaling pathway [J]. Life Sci，2020，263（Suppl. 3）：118594.

[16] Rumman M，Pandey S，Singh B，et al. Genistein prevents hypoxia-induced cognitive dysfunctions by ameliorating oxidative stress and inflammation in the hippocampus [J]. Neurotox Res，2021，39（4）：1123-1133.

[17] 林玉敏，翁倩倩，黄璐琦，等 . 基于文献的淡豆豉发酵过程成分转化分析 [J]. 中国中药杂志，2021，46（9）：2119-2132.

（收稿日期：2022-03-01；修回日期：2022-04-02）

高效液相色谱法测定奥氮平双羟萘酸盐一水合物中二甲基亚砜和二甲基甲酰胺的残留量

王锦，周三云*，曹婉，高喜乐，王艳娟，李龙英（浙江圣兆药物科技股份有限公司，杭州　310051）

摘要：目的　建立了一种可以测定奥氮平双羟萘酸盐一水合物中二甲基亚砜和二甲基甲酰胺残留量的高效液相色谱方法。**方法**　以 5% 正己胺甲醇溶液为稀释剂，Agilent Zorbax Eclipse RX C_8（4.6 mm×250 mm，5 μm）为色谱柱，水和甲醇梯度洗脱，流速为 0.75 mL • min^{-1}，柱温为 35 ℃，紫外检测波长为 210 nm。**结果**　本法专属性良好；二甲基亚砜和二甲基甲酰胺的线性范围分别为 1.517 ～ 37.934 mg • L^{-1}（r = 0.9996）和 0.882 ～ 8.824 mg • L^{-1}（r = 0.9998），定量限分别为 15.284 ng 和 8.842 ng，检测限分别为 4.58 ng 和 2.65 ng，平均加样回收率分别为 95.2% ～ 119.4%（*RSD* 为 0.28% ～ 2.2%，n = 3）和 97.6% ～ 99.5%（*RSD* 为 0.31% ～ 1.4%，n = 3）。**结论**　该方法简便快速、准确度高、灵敏度高，可用于测定奥氮平双羟萘酸盐一水合物中二甲基亚砜和二甲基甲酰胺的残留量。

关键词：高效液相色谱法；二甲基亚砜；二甲基甲酰胺；奥氮平双羟萘酸盐一水合物
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2138-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.030

Determination of residual dimethylsulfoxide and dimethylformamide in olanzapine embonate monohydrate by high performance liquid chromatography

WANG Jin, ZHOU San-yun*, CAO Wan, GAO Xi-le, WANG Yan-juan, LI Long-ying (*Zhejiang Sundoc Pharmaceutical Science and Technology Co., Ltd, Hangzhou* 310051)

Abstract: Objective To determine the dimethylsulfoxide (DMSO) and dimethylformamide (DMF) residue in olanzapine embonate monohydrate by high performance liquid chromatography. **Methods** Agilent Zorbax Eclipse RX C_8 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used as the chromatographic column, with 5% *n*-hexylamine methanol solution as the diluent. Water and methanol were used as the mobile phase in a gradient elution mode, the flow rate was 0.75 mL • min^{-1}, the column temperature was 35 ℃, the detection wavelength was 210 nm. **Results** The method had good specificity. The linear ranges of DMSO and DMF were 1.517 ～ 37.934 mg • L^{-1} (r = 0.9996) and 0.882 ～ 8.824 mg • L^{-1} (r = 0.9998). The limits of quantification were 15.284 ng and 8.842 ng, the detection limits were 4.58 ng and 2.65 ng, and the average recoveries were 95.2% ～ 119.4% (*RSD* = 0.28% ～ 2.2%, n = 3) and 97.6% ～ 99.5% (*RSD* = 0.31% ～ 1.4%, n = 3). **Conclusion** The method is convenient, accurate and sensitive, and suitable for the determination of DMSO and DMF residue in olanzapine embonate monohydrate.

Key words: high performance liquid chromatography; dimethylsulfoxide; dimethylformamide; olanzapine embonate monohydrate

精神分裂症因其特殊性需长期治疗，目前给药依从性差是精神分裂症长期治疗的主要问题，礼来制药公司将活性成分奥氮平和双羟萘酸结合生成一种难溶性化合物（奥氮平双羟萘酸盐一水

作者简介：王锦，女，硕士，主要从事复杂制剂的质量研究及分析，email：wang_jin@sundoc.com　*通信作者：周三云，女，硕士，主要从事复杂制剂的质量研究及分析，email：zhou_sanyun@sundoc.com

合物），该难溶性化合物在注入肌肉后形成药物储库，持续缓慢地释放奥氮平，以达到延长给药周期的目的，解决了依从性差的问题，具有临床优势[1]，目前已在欧洲（商品名：Zypadhera）和美国（商品名：Zyprexa Relprevv）上市[2]。

原料药奥氮平双羟萘酸盐一水合物仅收录于欧洲药典[3]，《中国药典》尚未收载。目前合成该原料药的工艺溶剂主要有二甲基亚砜（DMSO）和二甲基甲酰胺（DMF），因二者的沸点较高，生产工艺中通过水洗较难去除完全，《中国药典》2020 年版四部通则中 0861 残留溶剂测定法[4]和 ICH Q3C（R5）均将 DMSO 和 DMF 分别列为第三类溶剂和第二类溶剂，限度依次为 0.5%、0.088%。本文根据公司实际使用需要，将原料药奥氮平双羟萘酸盐一水合物中 DMSO 限度收严至 0.3%。目前有多篇文献报道了 DMF 或 DMSO 残留量的检测方法，均采用气相色谱法[5-10]。奥氮平双羟萘酸盐一水合物熔点高达 210 ℃且熔融分解，极易污染气相色谱柱，气相直接进样不适用于该品种；而 DMSO 和 DMF 沸点较高，顶空进样同样不适用；DMSO 与 DMF 沸点极性相近，气相色谱较难实现两者的完全分离，已报道文献不能同时检出这两种组分。另有文献报道了水和废水中的 DMF、DMAC、DMSO 的 HPLC 分析方法[11]，但因水和废水与奥氮平双羟萘酸盐一水合物性质差异较大，该文献方法中的样品处理及色谱系统均不适用于奥氮平双羟萘酸盐一水合物中 DMSO 和 DMF 的检测，目前尚未见奥氮平双羟萘酸盐一水合物中 DMSO 和 DMF 残留量检测方法的文献报道。本文建立了一种测定奥氮平双羟萘酸盐一水合物中 DMSO 和 DMF 残留量的高效液相色谱方法，完成了方法学验证，该方法专属性好，简便灵敏，准确，具有较好的参考价值和现实意义。

1 材料

WATERS Arc 高效液相色谱仪（配有紫外检测器，美国 Waters 公司）；MSA225S-1CE-DA 电子分析天平（赛多利斯科学仪器有限公司）。

奥氮平双羟萘酸盐一水合物（浙江圣兆药物科技股份有限公司，批号分别为 P-3M、P-4M、P-5M）；正己胺、甲醇（色谱级，TEDIA）；DMSO [色谱级，GC 测定纯度≥ 99.9%，阿拉丁试剂（上海）有限公司]；DMF（色谱级，HPLC 测定纯度≥ 99.9%，TEDIA）；水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Agilent Zorbax Eclipse RX C_8（4.6 mm×250 mm，5 μm）；柱温：35 ℃；紫外检测器；波长：210 nm；流速：0.75 mL • min^{-1}；进样量：10 μL；流动相：水（A）和甲醇（B），梯度洗脱（0 ～ 8 min，10%B，8 ～ 15 min，10%B → 90%B，15 ～ 20 min，90%B，20 ～ 20.1 min，90%B → 10%B，20.1 ～ 30 min，10%B）。

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品储备液　取 DMSO 约 1500 mg、DMF 约 440 mg，精密称定，置于 100 mL 量瓶内，用甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀。精密移取上述溶液 1 mL，置于 50 mL 量瓶内，用甲醇稀释至刻度，摇匀，即得每 1 mL 中含 DMSO、DMF 约 300 μg、88 μg 的对照品储备液。

2.2.2 对照品溶液　精密移取对照品储备液 1 mL，置 20 mL 量瓶中，用 5% 正己胺甲醇溶液（以下简称稀释剂）稀释至刻度，得到每 1 mL 中含 DMSO、DMF 约 15 μg、4.4 μg 的对照品溶液。

2.2.3 样品溶液　准确称取适量样品，加稀释剂溶解并稀释制成每 1 mL 中含样品约 5 mg 的溶液。

2.3 系统适用性试验

依次取稀释剂进样 1 次、对照品溶液连续进样 6 次，记录色谱图，结果稀释剂在 DMSO 和 DMF 保留时间处均无干扰峰，DMSO 峰面积和 DMF 峰面积的相对标准偏差（*RSD*）分别为 1.5% 和 1.0%，DMSO 峰和 DMF 峰的分离度均大于 1.5，证明该方法系统适用性良好。

2.4 专属性试验

依次取稀释剂、对照品溶液及样品溶液分别进样，记录色谱图。结果表明，溶剂及样品溶液在 DMSO 和 DMF 保留时间处均无干扰，各组分分离良好，方法专属性好，见图 1。

2.5 检测限和定量限

精密量取对照品溶液用稀释剂稀释制成系列浓度溶液，取上述系列浓度溶液 10 μL 注入色谱仪，当 DMSO 和 DMF 信噪比（*S/N*）为 10 时，计算 DMSO 和 DMF 的定量限分别为 15.284 ng 和 8.842 ng。取定量限溶液，连续进样 6 针，DMSO 和 DMF 峰面积 *RSD* 分别为 1.3%、0.70%。

当 DMSO 和 DMF 的信噪比（*S/N*）为 3 时，计算 DMSO 和 DMF 的检测限分别为 4.58 ng 和 2.65 ng。

2.6 线性关系考察

分别量取对照品储备液适量，用稀释剂稀释制

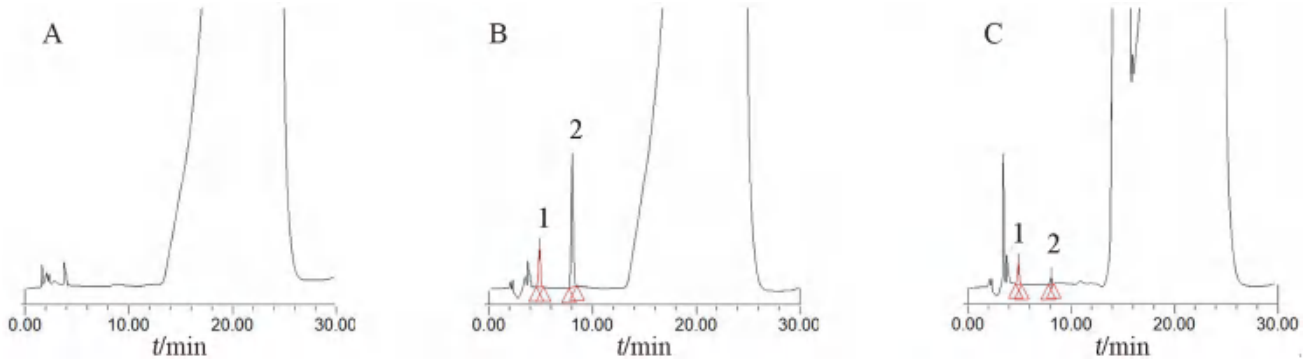

图 1　专属性试验色谱图

Fig 1　Chromatograms of specificity test

A. 稀释剂（blank dilute solution）；B. 对照品溶液（standard solution）；C. 样品溶液（sample solution）；1. DMSO；2. DMF

成 DMSO 质量浓度为 1.517、3.035、7.587、15.174、22.760、30.347、37.934 mg • L^{-1}，DMF 质量浓度为 0.882、2.206、4.412、6.618、8.824 mg • L^{-1} 的系列混合对照品溶液。分别进样分析，记录色谱图。以峰面积 Y 为纵坐标，质量浓度 X（mg • L^{-1}）为横坐标，进行线性回归。

得 DMSO 线性方程：$Y = 9.243\times10^3X - 652.5$，相关系数为 0.9996，表明 DMSO 在 1.517 ～ 37.934 mg • L^{-1} 内，峰面积与质量浓度线性关系良好。DMF 线性方程：$Y = 4.964\times10^4X - 2.092\times10^3$，相关系数为 0.9998；表明 DMF 在 0.882 ～ 8.824 mg • L^{-1} 内，峰面积与质量浓度线性关系良好。

2.7　回收试验

分别量取对照品储备液适量，用稀释剂稀释制成 DMSO 质量浓度为 1.527、7.634、15.084、30.347 mg • L^{-1}，DMF 质量浓度为 0.0824、2.206、4.412、5.295 mg • L^{-1} 的系列混合对照品溶液。精密称取 12 份已测定 DMSO 和 DMF 残留量的样品约 50 mg，每组 3 份，用上述系列混合对照品溶液定容至 10 mL。进样，记录色谱图，计算 DMSO、DMF 回收率。结果不同质量浓度 DMSO 的平均回收率在 95.2% ～ 119.4%，*RSD* 在 0.28% ～ 2.2%；不同质量浓度 DMF 的平均回收率在 97.6% ～ 99.5%，*RSD* 在 0.31% ～ 1.4%。表明该方法下 DMSO 和 DMF 的回收率良好。

2.8　重复性试验

取奥氮平双羟萘酸盐一水合物 6 份，按照“2.2.3”项下方法配制后进样测定，DMSO 和 DMF 含量分别为 0.0754% 和 0.0038%，*RSD* 分别为 1.2% 和 8.2%，结果表明方法重复性好。

2.9　耐用性考察

考察了流速为 0.65 mL•min^{-1} 和 0.85 mL•min^{-1}，柱温为 33 ℃和 37 ℃，起始流动相中有机相比例为 8% 和 12% 下的系统适用性，结果在上述各条件下，连续进样 6 针对照品溶液的 DMSO、DMF 峰面积 *RSD* 均小于 5%，DMSO 和 DMF 理论塔板数均大于 2000，拖尾因子均小于 2.0，各色谱峰间的分离度均大于 1.5，结果表明方法耐用性良好。

2.10　溶液稳定性

取对照品溶液，于室温下放置，分别在 0、24、55 h 进样测定，记录各组分的峰面积，计算 DMSO 和 DMF 峰面积 *RSD* 分别为 1.0%、0.68%，表明对照品溶液在室温下放置 55 h 内稳定。

2.11　样品的测定

取 3 批奥氮平双羟萘酸盐一水合物，按“2.2.3”项下方法配制测试，结果见表 1。

表 1　样品检测结果

Tab 1　Content of sample

批号	DMSO 含量 /%	DMF 含量 /%
P-3M	0.0754	0.0038
P-4M	0.0779	0.0038
P-5M	0.2497	0.0137

3　结论

本文建立了同时测定难溶性药物奥氮平双羟萘酸盐一水合物中 DMSO 和 DMF 残留量的高效液相色谱法，该方法可实现 DMSO 和 DMF 的完全分离，且样品处理简单，所需样品量少，对色谱系统、色谱柱无损害，操作方便，准确度和重复性好，可实现奥氮平双羟萘酸盐一水合物中 DMSO 和 DMF 残留量的准确定量，为其他药物中高沸点残留溶剂的测定提供了思路和参考。

参考文献

[1]　顾琼艳，吴美媛 . 奥氮平双羟萘酸盐长效注射剂体外溶出度的测定 [J]. 中国药师，2014，7（12）：2053-2056.

[2]　刘留成，伏世建，陈国广 . 奥氮平双羟萘酸盐的制备及体外释放度的研究 [J]. 海峡药学，2013，25（10）：

12-16.
[3] 欧洲药典 2020 年版 . 第二增补版 [S]. 2020：4677-4678.
[4] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：116-120.
[5] 郑超，王伯初，祝连彩 . 静态顶空气相色谱法测定有机残留溶剂二甲基亚砜 [J]. 分析化学，2011，39（7）：1117-1120.
[6] 汪倩雯，王建，孙建强，等 . 毛细管气相色谱法测定硫酸异帕米星中的残留溶剂 [J]. 海峡药学，2014，26（1）：64-66.
[7] 王晨，李东伟，崔晨辉，等 . 气相色谱法测定头孢妥仑匹酯中 *N*，*N*- 二甲基甲酰胺残留量 [J]. 中国抗生素杂志，2019，44（10）：1163-1166.
[8] 徐丽萍，吴嵘，翁志斌 . 克林霉素磷酸酯原料中 *N*，*N*- 二甲基甲酰胺测定的方法学考察 [J]. 抗感染药学，2014，34（6）：168-170.
[9] 王悦，李京，李颖颖，等 . 依诺肝素钠中残留 *N*，*N*- 二甲基甲酰胺的测定 [J]. 中国生化药物杂志，2014，34（6）：168-170.
[10] 程闽玥，王迪，金翔飞，等 . GC 法测定盐酸那拉曲坦起始原料吲哚 -5- 甲醛中的残留溶剂 [J]. 中南药学，2021，49（4）：723-726.
[11] 吴万秀，陈卫东，程诚 . 高效液相色谱法测定水和废水中的 DMF、DMAC、DMSO 研究 [J]. 环境科学与管理，2017，42（4）：131-133.

（收稿日期：2022-01-03；修回日期：2022-02-22）

良验益真咀嚼片高效液相色谱指纹图谱的建立及 4 种成分的含量测定

马群，姚东，胡北，许子华*（北部战区总医院，沈阳　110000）

摘要：目的　建立良验益真咀嚼片高效液相色谱（HPLC）指纹图谱，同时测定 4 种成分含量。**方法**　使用 HPLC 法，流动相为 0.2% 甲酸水溶液（A）- 乙腈（B），梯度洗脱；流速 0.8 mL • min^{-1}；检测波长 290 nm；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。**结果**　建立了良验益真咀嚼片的 HPLC 指纹图谱，标定了 13 个共有峰，共确定了毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、肉桂酸、桂皮醛、芒柄花素 6 个共有峰，12 批样品的相似度在 0.950 以上。测定了毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、桂皮醛、芒柄花素 4 种成分的含量，分别为 0.3026 ～ 0.3980 mg•g^{-1}、0.3567 ～ 0.5838 mg • g^{-1}、0.0336 ～ 0.0548 mg • g^{-1}、0.1791 ～ 0.2225 mg • g^{-1}。**结论**　首次建立了良验益真咀嚼片的 HPLC 指纹图谱及 4 种成分的含量测定方法，此方法准确、可靠，可为良验益真咀嚼片的质量标准的建立和评价提供参考。

关键词：良验益真咀嚼片；高效液相色谱法；指纹图谱；含量测定
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2141-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.031

HPLC fingerprints of Liangyan Yizhen chewable tablets and content determination of 4 constituents

MA Qun, YAO Dong, HU Bei, XU Zi-hua* (*General Hospital of Northern Theater Command*, *Shenyang* 110000)

Abstract: Objective　To establish the HPLC fingerprints of Liangyan Yizhen chewable tablets and determine the content of 4 constituents. **Methods**　HPLC was used with mobile phase of 0.2% formic acid aqueous solution (A)-acetonitrile (B), flowing at 0.8 mL • min^{-1} with gradient elution. The detection wavelength was 290 nm, the column temperature was 30 ℃ and the injection

基金项目：军委卫勤保障能力创新与生成专项 - 应用研究基础项目（No.20WQ032）。
作者简介：马群，男，主管药师，主要从事药物分析研究与医院制剂研发，email：maqun159@qq.com　*__通信作者：__许子华，男，副主任药师，主要从事药物分析研究，email：xuzihua-668585@163.com

volume was 10 μL. **Results** There were 13 common peaks in the fingerprints of 12 sample batches with the similarities over 0.950. According to the reference substance, calycosin-7-*O*-glycoside, ononin, calycosin, cinnamic acid, cinnamaldehyde and formononetin were identified. The content of calycosin-7-*O*-glycoside, ononin, cinnamaldehyde and formononetin was at 0.3026 － 0.3980 mg • g^{-1}, 0.3567 － 0.5838 mg • g^{-1}, 0.0336 － 0.0548 mg • g^{-1}, and 0.1791 － 0.2225 mg • g^{-1}, respectively. **Conclusion** An accurate and reliable method for the content determination in Liangyan Yizhen chewable tablets through HPLC fingerprint is established, which can provide reference for the quality control of Liangyan Yizhen chewable tablets.

Key words: Liangyan Yizhen chewable tablet; HPLC; fingerprint; content determination

我国寒区面积广阔，涵盖东北、西北、华北，约占我国陆地面积的 43.5%。我国东、北、西分别与朝鲜、俄罗斯、蒙古、巴基斯坦、印度接壤，边境线长，是国防战略要地。北部战区所辖的东北地区冬季寒冷期长、气温极低、气候条件恶劣，这种极端环境给官兵在户外训练、执行任务带来了极大困难 [1]。为了解决上述困难，本课题组依据中医学理论，利用中药“治未病”的特色优势，将寒冷损伤的医学干预前移，寻找具有机体产热作用、能够抵御寒冷、在寒冷环境下能够维持机体正常生理机能的有效中药方剂 [2]。课题组通过网络药理学及分子对接等药物虚拟筛选技术 [3]，选取了中医经典理论中具有温里散寒之功的良验益真方。此方源自唐代中医古籍《元和纪用经》中的良验益真散，由黄芪和肉桂两味药材组成，具有补火散寒、温肾之功效，及防治冻伤、促进机体产热之作用。方中以黄芪健脾益气，使清气升，精血得摄；以肉桂补火助阳，散寒；黄芪和肉桂先、后天互补，可使血止而真气得复。黄芪和肉桂的药效在既往的药理学研究中也得到了验证 [4-6]。在前期研究确证其具有产热功效的基础上，课题组经过系统深入的药效、安全性、质量控制和制备工艺研究，结合现代中药制剂的研究技术及各剂型的特点，以甘露醇、糊精作为辅料，研制开发了基于机体产热作用的提升寒区适应能力和战斗效能、预防寒冷损伤的北部战区总医院院内制剂——良验益真咀嚼片。本制剂服用运携方便、质量稳定，在冷暴露前后服用，可提高人体核心体温，促进肢端能力的恢复。

中药指纹图谱作为衡量制剂质量的重要依据 [7-8]，是一种综合的、宏观的、可量化的手段，可反映中药化学成分的整体组成和特征。为保证良验益真咀嚼片的质量，本研究按照中药指纹图谱研究的技术要求 [9-10]，建立了该制剂的 HPLC 指纹图谱，同时测定了制剂中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、芒柄花素及桂皮醛 4 种成分的含量，为良验益真咀嚼片的质量标准建立提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-16 系列高效液相色谱仪（配有 SPD-16 型紫外检测器、LC-16 型二元泵、SIL-16 型自动进样器、CTO-16 型柱温箱）（日本 Shimadzu 公司）；AUW 120D 十万分之一分析天平（日本 Shimadzu 公司）；KQ3200 型超声波清洗器（昆山超声仪器有限公司，150 W，40 kHz）。

1.2 试药

良验益真咀嚼片 [规格：每片重 0.55 g（相当于饮片 0.51 g），批号：20210607、20210608、20210609、20210610、20210611、20210615、20210617、20210621、20210623、20210628、20210701、20210705，北部战区总医院制剂研发室制备]；黄芪、肉桂 [九洲恒源（安国）药业有限公司]；甲醇、乙腈（色谱级，Sigma Aldrich，USA）；甲酸（分析纯，天津市永大化学试剂有限公司）；超纯水（北部战区总医院制剂室）。

毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品（批号：wkq 21010405，纯度≥ 98%）、芒柄花素对照品（批号：wkq20062208，纯度≥ 98%）、芒柄花苷对照品（批号：wkq19070106，纯度≥ 98%）、毛蕊异黄酮对照品（批号：wkq20100906，纯度≥ 98%）（四川维克奇生物科技有限公司），肉桂酸对照品（批号：110786-200503，纯度：98.8%）、桂皮醛对照品（批号：110710-202022，纯度：99.5%）（中国食品药品检定研究院）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Phenomenex Luna 5u C_{18}（2）100A（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为 0.2% 甲酸水溶液（A）- 乙腈（B），梯度洗脱方案见表 1；流速 0.8 mL • min^{-1}；检测波长 290 nm；柱温

30 ℃；进样量 10 μL。

表 1　梯度洗脱方案

Tab 1　Gradient elution

时间 /min	乙腈比例
0 ～ 15	15%
15 ～ 45	15%→30%
45 ～ 50	30%→35%
50 ～ 90	35%→50%
90 ～ 105	50%→90%
105 ～ 120	15%

2.2　溶液的制备

2.2.1　混合对照品溶液的制备　取各对照品适量，精密称定，置于棕色量瓶中，加入适量甲醇溶解，后用甲醇定容至刻度，作为各对照品储备液。精密量取适量各对照品储备液，加甲醇制成每 1 mL 分别含有毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、肉桂酸、桂皮醛 80、80、150、20、10、10 μg 的溶液，即得混合对照品溶液。

2.2.2　供试品溶液的制备　将良验益真咀嚼片研磨成细粉，取 5 g，精密称定置于具塞锥形瓶中，加入 25 mL 甲醇，称重，超声 20 min，放冷后甲醇补重，摇匀后静置 10 min，取上清液，0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液即得。

2.2.3　单味药供试品溶液的制备　按照良验益真咀嚼片制法中的药材提取工艺分别制备黄芪、肉桂单味药的提取浓缩液，各精密吸取 1 mL 置于 10 mL 量瓶中，使用甲醇定容后摇匀，0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液得到单味药供试品溶液。

2.3　指纹图谱方法学考察

2.3.1　精密度考察　取良验益真咀嚼片样品（批号：20210615，S6），按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，连续进样 6 次。以毛蕊异黄酮葡萄糖苷为参照峰，计算得各共有峰的相对保留时间 *RSD* ＜ 0.71%，相对峰面积 *RSD* ＜ 2.7%，表明仪器精密度良好。

2.3.2　稳定性考察　取良验益真咀嚼片样品（S6），按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，于 0、2、6、12、24、48 h 进样测定。以毛蕊异黄酮葡萄糖苷为参照峰，计算得其他各共有峰的相对保留时间 *RSD* ＜ 0.59%，相对峰面积 *RSD* ＜ 2.4%，表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.3.3　重复性考察　取良验益真咀嚼片样品（S6），按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，进样测定。以毛蕊异黄酮葡萄糖苷为参照峰，计算得其他各共有峰的相对保留时间 *RSD* ＜ 0.24%，相对峰面积 *RSD* ＜ 2.8%，表明方法重复性良好。

2.4　良验益真咀嚼片 HPLC 指纹图谱研究

2.4.1　指纹图谱的构建　取 12 批良验益真咀嚼片（S1 ～ S12），按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，记录色谱图。将色谱图导入中国药典委员会开发的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》（2012A 版）软件进行分析，选择 S6 作为参照图谱，以平均数法生成对照图谱，时间窗宽度为 0.1 min，经多点校正、Mark 峰匹配、自动匹配后生成对照指纹图谱 [11-13]，见图 1。以峰面积较大、对称性较好的 2 号峰（毛蕊异黄酮葡萄糖苷）作为参照峰，计算得其他各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，结果见表 2、3。

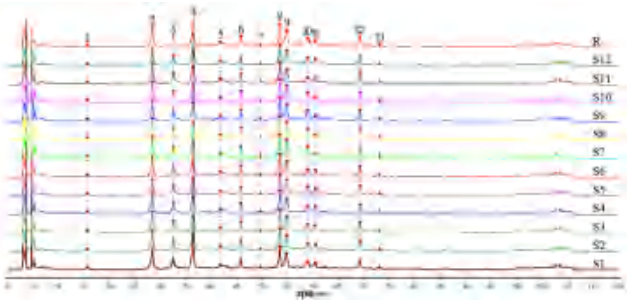

图 1　12 批次良验益真咀嚼片指纹图谱（S1 ～ S12）及其对照指纹图谱（R）

Fig 1　Fingerprints of 12 batches of Liangyan Yizhen chewable tablets（S1 ～ S12）and control（R）

2.4.2　共有峰的归属与指认　分别取“2.2.3”项下单味药供试品溶液和“2.2.1”项下混合对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样分析，确认共有 13 个共有峰，结果如图 2 所示。经对照品保留时间定位及色谱峰分析，共指认出 6 个特征峰，2 号峰为毛蕊异黄酮葡萄糖苷、6 号峰为芒柄花苷、8 号峰为毛蕊异黄酮、9 号峰为肉桂酸、10 号峰为桂皮醛、12 号峰为芒柄花素。其中，1 ～ 8 号、11 ～ 13 号峰来源于黄芪，9、10 号峰来源于肉桂。

2.4.3　指纹图谱相似度评价　将 12 批良验益真咀嚼片（S1 ～ S12）指纹图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》（2012A 版），生成对照指纹图谱并计算相似度，见表 4。结果显示 12 批良验益真咀嚼片样品相似度均大于 0.9，说明良验益真咀嚼片批次间一致性良好。

2.5　4 种成分含量测定

2.5.1　专属性考察　取“2.2.1”项下毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、桂皮醛、芒柄花素对照品储备液适量，使用甲醇配制成每 1 mL 分别含有

表 2　12 批良验益真咀嚼片共有峰的相对保留时间

Tab 2　Relative retention time of common peaks of 12 batches of Liangyan Yizhen chewable tablets

峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
S1	0.55	1	1.14	1.28	1.47	1.61	1.75	1.88	1.93	2.07	2.12	2.43	2.57
S2	0.55	1	1.15	1.28	1.47	1.61	1.75	1.88	1.92	2.07	2.12	2.43	2.57
S3	0.56	1	1.15	1.28	1.47	1.61	1.75	1.88	1.92	2.07	2.12	2.43	2.57
S4	0.56	1	1.15	1.28	1.47	1.61	1.74	1.88	1.92	2.07	2.12	2.43	2.57
S5	0.56	1	1.15	1.28	1.47	1.61	1.74	1.88	1.92	2.07	2.12	2.43	2.57
S6	0.56	1	1.15	1.28	1.47	1.61	1.75	1.88	1.92	2.07	2.12	2.43	2.57
S7	0.55	1	1.14	1.28	1.47	1.62	1.76	1.89	1.93	2.08	2.13	2.44	2.58
S8	0.55	1	1.14	1.28	1.47	1.62	1.76	1.89	1.93	2.08	2.13	2.45	2.59
S9	0.55	1	1.14	1.28	1.47	1.62	1.76	1.89	1.93	2.08	2.13	2.45	2.59
S10	0.55	1	1.14	1.28	1.47	1.61	1.75	1.88	1.93	2.08	2.13	2.44	2.58
S11	0.55	1	1.15	1.28	1.47	1.61	1.75	1.88	1.92	2.07	2.12	2.43	2.57
S12	0.56	1	1.15	1.28	1.47	1.61	1.74	1.88	1.92	2.07	2.12	2.43	2.57
RSD/%	0.45	0	0.17	0.08	0.10	0.34	0.37	0.25	0.18	0.22	0.23	0.31	0.31

表 3　12 批良验益真咀嚼片共有峰的相对峰面积

Tab 3　Relative peak areas of common peaks of 12 batches of Liangyan Yizhen chewable tablets

峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
S1	0.08	1	0.66	1.68	0.26	0.48	0.17	0.83	0.98	0.58	0.36	0.45	0.07
S2	0.09	1	0.70	1.72	0.26	0.48	0.13	0.85	0.98	0.53	0.33	0.40	0.06
S3	0.09	1	0.72	1.81	0.29	0.54	0.20	0.91	1.07	0.61	0.40	0.50	0.09
S4	0.09	1	0.71	1.79	0.28	0.51	0.18	0.89	1.05	0.58	0.38	0.47	0.07
S5	0.10	1	0.78	1.96	0.25	0.52	0.19	1.04	1.31	0.83	0.47	0.55	0.07
S6	0.09	1	0.72	1.80	0.28	0.53	0.17	0.89	1.06	0.56	0.41	0.50	0.09
S7	0.08	1	0.52	1.42	0.22	0.46	0.10	0.86	1.00	0.76	0.18	0.45	0.09
S8	0.10	1	0.68	1.52	0.23	0.48	0.13	0.97	1.15	0.83	0.23	0.51	0.10
S9	0.10	1	0.68	1.76	0.23	0.48	0.11	0.96	1.14	0.80	0.23	0.51	0.10
S10	0.08	1	0.64	1.51	0.19	0.35	0.04	0.78	0.90	0.58	0.30	0.44	0.09
S11	0.09	1	0.66	1.50	0.20	0.36	0.05	0.80	0.92	0.43	0.31	0.44	0.06
S12	0.10	1	0.79	1.96	0.29	0.55	0.21	1.03	1.33	0.77	0.50	0.59	0.10
RSD/%	8.83	0	10.13	10.50	14.40	13.49	40.16	9.36	12.77	20.42	29.23	10.97	20.13

表 4　12 批良验益真咀嚼片指纹图谱相似度结果

Tab 4　Fingerprint similarity of 12 batches of Liangyan Yizhen chewable tablets

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	R
S1	1.000	0.997	0.998	0.998	0.993	0.987	0.969	0.963	0.971	0.986	0.985	0.990	0.996
S2	0.997	1.000	0.995	0.996	0.991	0.987	0.970	0.963	0.973	0.989	0.990	0.988	0.996
S3	0.998	0.995	1.000	0.998	0.994	0.987	0.966	0.961	0.969	0.982	0.982	0.992	0.995
S4	0.998	0.996	0.998	1.000	0.995	0.984	0.964	0.959	0.967	0.981	0.982	0.990	0.994
S5	0.993	0.991	0.994	0.995	1.000	0.980	0.967	0.961	0.967	0.978	0.976	0.993	0.993
S6	0.987	0.987	0.987	0.984	0.980	1.000	0.966	0.961	0.970	0.987	0.990	0.987	0.991
S7	0.969	0.970	0.966	0.964	0.967	0.966	1.000	0.982	0.979	0.979	0.972	0.968	0.982
S8	0.963	0.963	0.961	0.959	0.961	0.961	0.982	1.000	0.995	0.972	0.966	0.964	0.979
S9	0.971	0.973	0.969	0.967	0.967	0.970	0.979	0.995	1.000	0.979	0.974	0.970	0.985
S10	0.986	0.989	0.982	0.981	0.978	0.987	0.979	0.972	0.979	1.000	0.997	0.980	0.993
S11	0.985	0.990	0.982	0.982	0.976	0.990	0.972	0.966	0.974	0.997	1.000	0.979	0.992
S12	0.990	0.988	0.992	0.990	0.993	0.987	0.968	0.964	0.970	0.980	0.979	1.000	0.993
R	0.996	0.996	0.995	0.994	0.993	0.991	0.982	0.979	0.985	0.993	0.992	0.993	1.000

毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、桂皮醛、芒柄花素 80、150、10、80 μg 的混合对照品溶液。取混合对照品溶液和供试品溶液，分别进样分析，结果显示供试品溶液的色谱图中 4 种待测组分色谱峰保留时间与混合对照品溶液一致，且分离度均大于 1.5，结果见图 3。

2.5.2　线性关系考察　精密量取“2.2.1”项下毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、桂皮醛、芒柄花素对照品储备液适量，用甲醇配制成一系列浓度的混合对照品溶液。精密吸取上述浓度的混合对

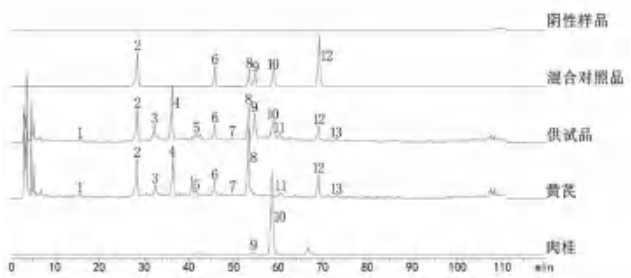

图 2　良验益真咀嚼片共有峰归属

Fig 2　Common peak attribution of Liangyan Yizhen chewable tablets

2. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷（calycosin-7-*O*-glycoside）；6. 芒柄花苷（ononin）；8. 毛蕊异黄酮（calycosin）；9. 肉桂酸（cinnamic acid）；10. 桂皮醛（cinnamaldehyde）；12. 芒柄花素（formononetin）

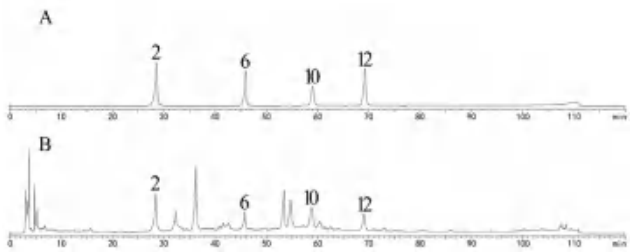

图 3　良验益真咀嚼片的 HPLC 色谱图

Fig 3　HPLC chromatogram of Liangyan Yizhen chewable tablets

A. 混合对照品（mixed reference substance）；B. 供试品（sample）；2. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷（calycosin-7-*O*-glycoside）；6. 芒柄花苷（ononin）；10. 桂皮醛（cinnamaldehyde）；12. 芒柄花素（formononetin）

照品溶液各 10 μL，注入液相色谱仪测定，以对照品的质量浓度（μg • mL^{-1}）为横坐标，峰面积值为纵坐标，求得回归方程，结果见表 5。

表 5　4 种成分线性关系

Tab 5　Linearity of 4 constituents

成分	回归方程	线性范围 /（μg • mL^{-1}）	r
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y = 2.83\times10^4X - 1.48\times10^5$	7.832 ～ 156.640	0.9998
芒柄花苷	$Y = 9.38\times10^3X - 9.04\times10^4$	14.70 ～ 294.00	0.9998
桂皮醛	$Y = 1.41\times10^5X - 8.17\times10^4$	0.84 ～ 16.80	0.9997
芒柄花素	$Y = 2.39\times10^4X - 1.28\times10^5$	8.056 ～ 164.420	0.9998

2.5.3　精密度试验　取“2.5.1”中浓度的混合对照品溶液，进样测定 6 次，记录各成分的峰面积，计算得到毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、桂皮醛、芒柄花素峰面积的 *RSD* 分别为 1.9%、2.1%、2.2%、1.7%，结果表明该仪器精密度良好。

2.5.4　稳定性试验　取良验益真咀嚼片（S6），按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，于 0、2、6、12、24、48 h 进行测定，计算得到毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、桂皮醛、芒柄花素峰面积的 *RSD* 分别为 0.72%、1.9%、1.7%、2.0%，表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.5.5　重复性试验　取同一批良验益真咀嚼片（S6），按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，进样测定，计算得到毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、桂皮醛、芒柄花素的平均含量分别为 0.3525、0.4038、0.0327、0.1945 mg • g^{-1}，*RSD* 分别为 0.54%、0.84%、0.97%、1.9%，表明该方法重复性良好。

2.5.6　加样回收试验　取已知成分含量的良验益真咀嚼片（S6），研成细粉，取 2.5 g，共 6 份，精密称定，分别精密加入毛蕊异黄酮葡萄糖苷溶液（0.3916 mg • mL^{-1}）2.2 mL、芒柄花苷溶液（0.294 mg • mL^{-1}）3.4 mL、桂皮醛溶液（0.4199 mg • mL^{-1}）0.2 mL、芒柄花素溶液（0.4028 mg • mL^{-1}）1.2 mL，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，计算得到毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、桂皮醛、芒柄花素的平均加样回收率分别为 103.71%、102.33%、101.49%、101.51%，*RSD* 分别为 1.8%、1.8%、2.8%、2.9%，表明该方法准确性良好。

2.5.7　样品含量测定　取各批次良验益真咀嚼片，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，计算样品中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、桂皮醛、芒柄花素 4 种成分的含量，结果见表 6。

表 6　12 批样品中 4 种成分含量测定结果 (mg • g^{-1}，$n = 2$)

Tab 6　Content determination of 4 constituents in 12 batches of sample (mg • g^{-1}，$n = 2$)

编号	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	芒柄花苷	桂皮醛	芒柄花素
S1	0.3596	0.4870	0.0384	0.2005
S2	0.3579	0.4882	0.0370	0.1999
S3	0.3980	0.5838	0.0419	0.2029
S4	0.3834	0.4347	0.0373	0.2030
S5	0.3175	0.5051	0.0510	0.2146
S6	0.3540	0.4035	0.0346	0.1925
S7	0.3510	0.4281	0.0539	0.2101
S8	0.3504	0.4867	0.0518	0.2093
S9	0.3514	0.5187	0.0548	0.2225
S10	0.3536	0.4252	0.0454	0.2050
S11	0.3831	0.4352	0.0336	0.1910
S12	0.3026	0.3567	0.0379	0.1791

3　讨论

3.1　定量指标的选择

本研究使用对照品指认出毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、肉桂酸、桂皮醛 6 个成分。其中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、芒柄花苷、毛蕊异黄酮来自黄芪，毛蕊异黄酮葡萄糖苷是药典中黄芪的指标性成分；肉桂酸、桂皮醛来自肉桂，桂皮醛是药典中肉桂的

指标性成分[14]。毛蕊异黄酮与肉桂酸的色谱峰相邻，由于二者色谱峰的分离度不佳，不能满足定量要求，因此未对其定量。综上所述，选择了毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、芒柄花苷、桂皮醛作为该制剂的定量指标，涵盖了黄芪和肉桂两味药材的指标性成分。

3.2　色谱条件的考察

在确定检测波长的试验中，对毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、肉桂酸、桂皮醛、芒柄花素对照品的甲醇溶液进行了全波长扫描，发现它们的最大吸收波长分别为 260、302、220、270、290、248 nm[15-16]，通过多波长扫描试验，最终选定波长为 290 nm，在此波长下，良验益真咀嚼片中的 6 个主要成分均有较好的紫外吸收，同时杂质对色谱峰的干扰较小。其他色谱条件优化试验中，主要考察的是流动相种类（乙腈、甲醇）、添加剂的种类（0.1% 磷酸、0.3% 磷酸、0.1% 甲酸、0.2% 甲酸）、流速、梯度洗脱比例等方面[15-16]。通过预试验，发现流动相的种类、流速、梯度洗脱比例对色谱峰的分离情况影响较大，添加剂的种类与浓度对色谱峰的峰形有一定影响，最终选定流动相为 0.2% 甲酸水溶液 - 乙腈进行梯度洗脱，各主要成分均能较好的分离，色谱行为较好。最终确定的色谱条件实现了指纹图谱的建立和多成分含量的同时测定。

3.3　供试品溶液制备溶剂的考察

本研究中供试品溶液的制备采用超声提取法，对溶剂种类（甲醇、水）、溶剂（纯甲醇、75% 甲醇、50% 甲醇、25% 甲醇、纯水）进行了考察[17]，根据试验结果，最终确定纯甲醇为最佳提取溶剂，此条件下各成分含量均较高，且色谱分离效果很好，溶剂效应较小。

4　结论

首次建立了良验益真咀嚼片的 HPLC 指纹图谱及 4 种成分的含量测定方法，此方法准确、可靠，可为良验益真咀嚼片的质量标准的建立和评价提供参考。

参考文献

[1] 单继城，刘蔚柯 . 战场自然环境对军事行动影响 [J]. 国防科技，2017，38（1）：108-112.

[2] 孙昱，孙国祥，李焕德 . 人用经验在中药新药申报中的应用研究与中药新药申报的拓展思考 [J]. 中南药学，2020，18（12）：1941-1944.

[3] 周文霞 . 网络药理学的研究进展和发展前景 [J]. 中国药理学与毒理学杂志，2015，29（5）：760-762.

[4] Zu YX，Lu HY，Liu WW，et al. Jiang Gui Fang activated interscapular brown adipose tissue and induced epididymal white adipose tissue browning through the PPARγ/SIRT1-PGC1α pathway [J]. J Ethnopharmacol，2020，248：112271.

[5] 刘子菡，王喻淇，杨爱，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.

[6] Lv Z，Shen J，Gao X，et al. Herbal formula Huangqi Guizhi Wuwu decoction attenuates paclitaxel-related neurotoxicity via inhibition of inflammation and oxidative stress [J]. Chin Med，2021，16（1）：76.

[7] 滕凯旋，傅豪，王中昌，等 . 基于物理指纹图谱的养胃颗粒浸膏质量一致性评价方法 [J]. 中草药，2022，53（3）：712-719.

[8] 徐瑞杰，薛蓉，梅茜，等 . 基于指纹图谱和网络药理学的枳实薤白桂枝汤质量标志物预测 [J]. 中草药，2022，53（2）：372-381.

[9] 金樟照，吴文军，祝明 . 中药色谱指纹图谱相关性研究方法初探 [J]. 中成药，2003，25（1）：10-12.

[10] 屠鹏飞 . 中药材指纹图谱的建立及技术要求实例解说 [J]. 中国药品标准，2000，1（4）：22-29.

[11] 吴琼，马群，胡北，等 . 牛蒡根提取物指纹图谱研究 [J]. 中南药学，2021，19（8）：1624-1628.

[12] 刘玉娟，王永洁，郭子右，等 . 复方黄芪乳膏高效液相色谱指纹图谱的建立及 3 种成分的测定 [J]. 中南药学，2021，19（11）：2377-2383.

[13] 王隆隆，杨忠杰，张海风，等 . 芪苓益肾颗粒高效液相色谱指纹图谱物质基准研究及 7 种成分含量测定 [J]. 中南药学，2021，19（12）：2633-2639.

[14] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2010：142，316.

[15] 郑云枫，李洋，段伟萍，等 . 一测多评法测定黄芪中异黄酮及苷类成分 [J]. 中草药，2021，52（10）：3104-3111.

[16] 张贵赋，廖鑫，龚年春，等 . 不同产地黄芪药材 HPLC 指纹图谱及其聚类研究 [J]. 湖南中医杂志，2021，37（8）：181-184.

[17] 刘思雨，敬应春，苏靖，等 . 傣药清风颗粒质量标准的研究 [J]. 沈阳药科大学学报，2021，38（12）：1319-1326.

（收稿日期：2022-02-14；修回日期：2022-03-16）

GC-MS 法测定吡拉西坦氯化钠注射液中 21 种邻苯二甲酸酯类塑化剂

张迪[1, 2]，岳青阳[1, 2]，李尚颖[1, 2]，隋晓璠[1, 2*]（1.辽宁省检验检测认证中心，沈阳　110036；2.辽宁省药品检验检测院/国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室，沈阳　110036）

摘要：目的　建立吡拉西坦氯化钠注射液中 21 种邻苯二甲酸酯类塑化剂的检测方法。**方法**　色谱柱为 DB-5MS，载气为氦气，流速为 1.0 mL • min^{-1}，进样口温度为 260 ℃，柱温为程序升温。电子轰击电离方式，离子源温度为 230 ℃；定量测定采用 MRM 模式。以 31 批吡拉西坦注射液为测定对象，测定邻苯二甲酸酯类塑化剂的含量。**结果**　21 种邻苯二甲酸酯类塑化剂分离良好，质量浓度在各自线性范围内与峰面积呈良好的线性关系，检测限为 1 ～ 20 ng • mL^{-1}，加样回收率为 90.4% ～ 103.0%。**结论**　该法分离效果好、准确、灵敏度高，可同时检测吡拉西坦氯化钠注射中 21 种邻苯二甲酸酯类塑化剂。

关键词：GC-MS；邻苯二甲酸酯类塑化剂；吡拉西坦氯化钠注射液
中图分类号：R917　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2147-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.032

Determination of 21 phthalic acid ester plasticizers in piracetam sodium chloride injection by GC-MS

ZHANG Di[1, 2], YUE Qing-yang[1, 2], LI Shang-ying[1, 2], SUI Xiao-fan[1, 2*] (1. *Liaoning Center for Inspection*, *Examination and Certification*, *Shenyang* 110036; 2. *Liaoning Institute for Drug Control/ NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Chemical Drug*, *Shenyang* 110036)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of phthalic acid ester plasticizers in piracetam sodium chloride injection. **Methods** The determination was performed on a DB-5MS column at the flow rate of 1.0 mL • min^{-1} with helium as the carrier gas, injector temperature at 260 ℃ by temperature programming. Electron impact (EI) ionization mode was used, and MRM was used for the quantity analysis. The assays of phthalic acid ester plasticizers in 31 batches of piracetam sodium chloride injection were determined. **Results** Totally 21 phthalic acid ester plasticizers were completely separated with good linearity under the condition of GC-MS. The average recoveries ranged 90.4% ～ 103.0%, and the detection limit ranged 1 ～ 20 ng • mL^{-1}. **Conclusion** The method is efficient, accurate and sensitive, and can be used for the simultaneous determination of 21 phthalic acid ester plasticizers in piracetam sodium chloride injection.

Key words: GC-MS; phthalic acid ester plasticizer; piracetam sodium chloride injection

邻苯二甲酸酯类（PAEs）塑化剂是世界上应用最广泛的塑化剂。毒理学研究发现，PAEs 的急性毒性较小，但可以干扰人类和其他动物的内分泌，具有雌激素活性，对人类具有生殖毒性、胚胎毒性和发育毒性等危害，长期低剂量接触，其危害不容忽视[1-2]，欧盟、美国、中国已经先后将 PAEs 列入优先控制污染物的黑名单[3-4]。

密封件一方面应满足包装系统对密封性的要求，另一方面还应与药品具有良好的相容性，即不可引入存在安全性风险的浸出物。生胶、橡胶

基金项目：辽宁省自然科学基金项目（No. 2020-MS-074）。
作者简介：张迪，女，主任药师，主要从事药品质量标准研究，email：zhangdi820112@163.com　*通信作者：隋晓璠，女，主要从事药品标准研究，email：sxf3490@163.com

颗粒、胶塞、聚丙烯塑料瓶和软袋的生产过程中常添加塑化剂，从而带来了塑化剂迁移入药物的风险，注射剂作为高风险制剂，有必要控制塑化剂的迁入。对产品塑化剂的迁移量考察是注射剂与其包材相容的要求，也为选择优良的胶塞和包装材料提供了参考。塑化剂现有的检测方法主要有 HPLC 法[5-6]、HPLC-MS 法[7]和 GC-MS 法[8-9]。本试验采用 GC-MS 法同时测定吡拉西坦氯化钠注射液中 21 种 PAEs 的含量，为吡拉西坦氯化钠注射液的包材相容性研究提供参考，也为其他注射剂的塑化剂迁移测定提供了一种通用的检测方法。

1　材料

1.1　仪器

气相色谱 - 质谱联用仪（气相色谱仪：日本岛津公司 GC2030，质谱检测器：日本岛津公司 TQ8050）。电子天平（XP205 美国 METTLER TOLEDO 公司，精度：0.000 01 g）。

1.2　试药

邻苯二甲酸二甲酯（DMP，批号：G163559，纯度：99.9%）、邻苯二甲酸二乙酯（DEP，批号：G1006212，纯度：100%）、邻苯二甲酸二异丙酯（DIPRP，批号：G1020025，纯度：100%）、邻苯二甲酸二烯丙酯（DAP，批号：G165742，纯度：98.3%）、邻苯二甲酸二丙酯（DPRP，批号：G145205，纯度：99.5%）、邻苯二甲酸二异丁酯（DIBP，批号：G141696，纯度：99.5%）、邻苯二甲酸二丁酯（DBP，批号：G167183，纯度：99.4%）、邻苯二甲酸二（2- 甲氧基）乙酯（DMEP，批号：G165429，纯度：98%）、邻苯二甲酸二异戊酯（DIPP，批号：G141698，纯度：99.4%）、邻苯二甲酸二（4- 甲基 -2- 戊基）酯（BMPP，批号：G146996，纯度：99.7%）、邻苯二甲酸二（2- 乙氧基）乙酯（DEEP，批号：G168054，纯度：91.7%）、邻苯二甲酸二戊酯（DPP，批号：G159523，纯度：98.9%）、邻苯二甲酸二己酯（DHXP，批号：G141694，纯度：97.9%）、邻苯二甲酸丁基苄基酯（BBP，批号：G132280，纯度：98.5%）、邻苯二甲酸二（2- 丁氧基）乙酯（DBEP，批号：G168879，纯度：99.3%）、邻苯二甲酸二环己酯（DCHP，批号：G141690，纯度：98.7%）、邻苯二甲酸二庚酯（DHP，批号：G166356，纯度：99.2%）、邻苯二甲酸二（2- 乙基）乙酯（DEHP，批号：G142368，纯度：99.3%）、邻苯二甲酸二苯酯（DPHP，批号：G795655，纯度：99.4%）、邻苯二甲酸二正辛酯（DNOP，批号：G124932，纯度：99.3%）、邻苯二甲酸二壬酯（DNP，批号：G132274，纯度：97.9%）（德国 Dr. Ehrenstorfer 公司）。正己烷（色谱纯，美国 Fisher 公司）。氦气（纯度＞ 99.99%）

31 批吡拉西坦氯化钠注射液，来自 9 个生产企业，均为 2021 年国家药品抽验计划抽取的样品。

2　方法与结果

2.1　色谱条件[8-9]

色谱柱为 DB-5MS 毛细管柱（30 m×0.25 mm，0.25 μm）。柱温为程序升温：初始温度为 60 ℃，维持 1 min 后，以 20 ℃ • min^{-1} 的速率升至 220 ℃，维持 1 min，再以 5 ℃ • min^{-1} 的速率升至 250 ℃，维持 1 min，再以 20 ℃ • min^{-1} 的速率升至 290 ℃，维持 20 min；进样口温度为 260 ℃；进样量为 1 μL；载气为氦气，流速为 1 mL • min^{-1}；电离方式：电子轰击源（EI）；离子源温度：230 ℃；采集模式：MRM；离子源电压 0.99 kV；溶剂延迟：3 min。21 种 PAEs 定性定量离子见表 1。

表 1　21 种 PAEs 定性定量离子表

Tab 1　Qualitative and quantitative ions in the 21 phthalic acid ester plasticizer

序号	化合物	定性离子	定量离子	辅助定量离子
1	DMP	163.00 ＞ 77.10	163.00 ＞ 133.10	163.00 ＞ 92.10
2	DEP	177.00 ＞ 149.10	177.00 ＞ 93.10	177.00 ＞ 121.10
3	DIPRP	209.00 ＞ 149.00	167.00 ＞ 149.10	191.00 ＞ 149.10
4	DAP	132.00 ＞ 104.10	132.00 ＞ 76.10	172.00 ＞ 144.10
5	DPRP	191.00 ＞ 149.10	209.00 ＞ 149.10	209.00 ＞ 191.10
6	DIBP	223.00 ＞ 149.00	167.00 ＞ 149.10	205.00 ＞ 149.00
7	DBP	223.00 ＞ 149.10	205.00 ＞ 149.10	223.00 ＞ 93.10
8	DMEP	176.00 ＞ 149.00	207.00 ＞ 59.00	176.00 ＞ 104.10
9	DIPP	237.00 ＞ 149.00	237.00 ＞ 93.10	219.00 ＞ 71.20
10	BMPP	167.00 ＞ 149.10	167.00 ＞ 93.00	167.00 ＞ 65.10
11	DEEP	193.00 ＞ 149.00	176.00 ＞ 149.00	193.00 ＞ 93.00
12	DPP	237.00 ＞ 149.00	219.00 ＞ 149.10	237.00 ＞ 93.10
13	DHXP	149.00 ＞ 65.10	149.00 ＞ 93.10	149.00 ＞ 121.00
14	BBP	206.00 ＞ 149.10	206.00 ＞ 93.10	206.00 ＞ 121.10
15	DBEP	193.00 ＞ 149.10	176.00 ＞ 149.10	193.00 ＞ 93.10
16	DCHP	167.00 ＞ 149.10	167.00 ＞ 93.10	167.00 ＞ 65.00
17	DHP	265.00 ＞ 149.10	247.00 ＞ 149.00	265.00 ＞ 93.10
18	DEHP	167.00 ＞ 149.00	167.00 ＞ 93.10	167.00 ＞ 121.00
19	DPHP	225.00 ＞ 77.10	225.00 ＞ 141.10	225.00 ＞ 115.10
20	DNOP	279.00 ＞ 149.10	261.00 ＞ 149.10	279.00 ＞ 121.10
21	DNP	167.00 ＞ 149.00	293.00 ＞ 149.00	167.00 ＞ 93.00

2.2　对照品储备液的制备

取 21 种塑化剂对照品各约 10 mg，精密称定，

置 100 mL 量瓶中，用正己烷溶解并稀释至刻度，摇匀，作为混合对照品储备液。

2.3　供试品溶液的制备

取本品 100 mL，置分液漏斗中，精密加正己烷 50 mL，振摇 20 min 后，取正己烷层，40 ℃以下蒸干后，精密加正己烷 2 mL 使溶解，摇匀，0.22 μm 滤膜滤过，即得。

2.4　系统适用性试验

精密量取混合对照品储备液适量，用正己烷稀释至质量浓度为 200 ng • mL^{-1} 的溶液作为系统适用性溶液，以正己烷作为空白溶液，取系统适用性溶液、空白溶液供试品溶液，进样测定，记录色谱图，见图 1。结果表明，溶剂不干扰 21 种 PAEs 的测定。

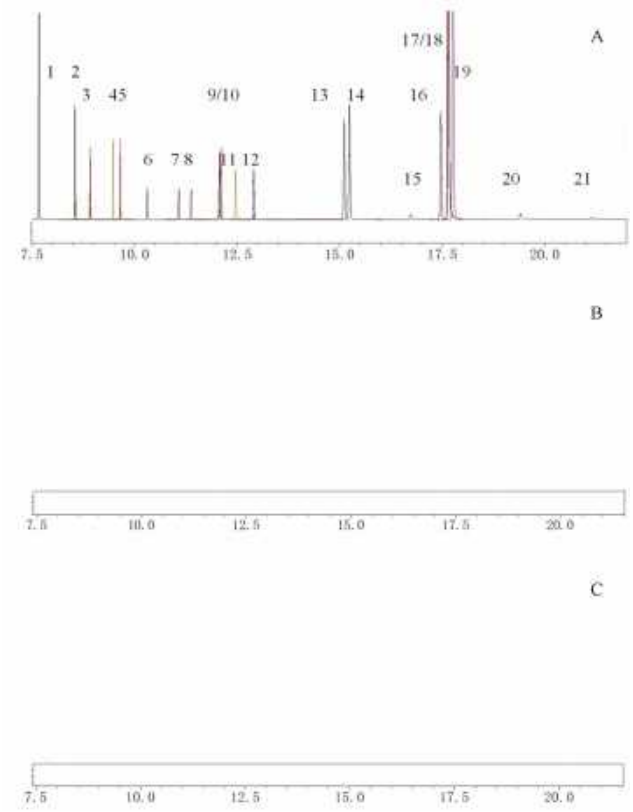

图 1　系统适用性溶液（A）、空白溶液（B）和供试品溶液（C）的混合离子色谱图

Fig 1　Mixed ion chromatogram of the reference substance（A），blank solution（B），and sample solution（C）

1. DMP；2. DEP；3. DIPRP；4 DAP；5. DPRP；6. DIBP；7. DBP；8. DMEP；9. DIPP；10. BMPP；11. DEEP；12. DPP；13. DHXP；14. BBP；15. DBEP；16. DCHP；17. DHP；18. DEHP；19. DPHP；20. DNOP；21.DNP

2.5　线性关系考察

精密量取混合对照品储备液适量，用正己烷逐步稀释至 5、10、20、10、200、500、1000、2000 ng • mL^{-1}，进样测定，各组分的线性方程、相关系数与线性范围结果见表 2。由表 2 可知，各组分在相应质量浓度与峰面积线性关系良好。

2.6　检测限和定量限

精密量取混合对照品储备液，用正己烷逐步稀释，进样测定，记录色谱图，当信噪比（*S/N*）≈ 3 时，为其检测限，当 *S/N* ≈ 10 时，为其定量限，结果见表 2。由表 2 可知，各成分的检测限均在 1 ～ 20 ng • mL^{-1}，定量限均在 3 ～ 60 ng • mL^{-1}。

2.7　加样回收试验

分别取 21 种 PAEs 对照品约 10 mg，置 100 mL 量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度，作为对照品储备液，分别取对照品储备液适量，精密加入吡拉西坦氯化钠注射液 100 mL，按“2.3”项下方法进行处理，分别制得低、中、高质量浓度（分别为 200、500、800 ng • mL^{-1}）的加样回收率供试品溶液，进样测定，计算各浓度的回收率。结果表明，低、中、高质量浓度的加样回收率在 90.4% ～ 103.0%，*RSD* 在 1.5% ～ 5.3%。

2.8　重复性

取本品，按“2.7”项下方法配制重复性试验样品溶液（50 ng • mL^{-1}），共 6 份，进样测定，将测定结果代入标准曲线计算 21 种 PAEs 含量。结果表明，各成分重复性良好，*RSD* 为 2.9% ～ 4.6%。

2.9　稳定性

取重复性样品溶液，分别在 0、2、4、8、12 h 时进样测定。结果表明，以正己烷为溶剂，21 种 PAEs 在 12 h 内稳定，各成分峰面积的 *RSD* 为 3.6% ～ 5.3%。

2.10　测定结果

取本品，按“2.3”项下方法进行处理，进样测定。同时考察在 40 ℃条件下倒置放置 1 个月后样品中 21 种 PAEs 的含量。结果表明，31 批吡拉西坦氯化钠注射液中 21 种 PAEs 均小于检测限，40 ℃条件下倒置放置 1 个月后，21 种 PAEs 均未检出。

3　讨论

根据化学药品注射剂与塑料包装材料相容性研究技术指导原则，21 种 PAEs 均按每日注射最大日暴露量（PDE）1.5 μg • d^{-1} 计，对应的分析评价阈值（AET）为 1.5 μg • d^{-1}。31 批样品在 40 ℃条件下倒置放置 1 个月后，21 种 PAEs 均未检出。说明吡拉西坦氯化钠注射液中的塑化剂无安全风险。

表 2　21 种 PAEs 线性关系、检测限和定量限

Tab 2　Linear relationship，detection limit and quantitation limit of the 21 phthalic acid ester plasticizer

化合物	线性方程	r	线性范围 /（ng • mL^{-1}）	检测限 /（ng • mL^{-1}）	定量限 /（ng • mL^{-1}）
DMP	$Y = 60.27X - 2098.2$	0.995	5 ～ 1000	1	3
DEP	$Y = 19.26X - 919.2$	0.993	5 ～ 1000	1	3
DIPRP	$Y = 7.831X - 476.5$	0.992	10 ～ 1000	2	6
DAP	$Y = 5.923X - 493.2$	0.993	20 ～ 1000	4	12
DPRP	$Y = 13.37X - 1002.1$	0.992	10 ～ 1000	2	6
DIBP	$Y = 8.145X - 627.8$	0.992	10 ～ 1000	2	6
DBP	$Y = 7.693X - 641.2$	0.992	10 ～ 1000	2	6
DMEP	$Y = 2.849X - 726.1$	0.991	100 ～ 2000	20	60
DIPP	$Y = 10.03X - 937.1$	0.992	10 ～ 1000	2	6
BMPP	$Y = 23.94X - 2240.5$	0.992	5 ～ 1000	1	3
DEEP	$Y = 3.634X - 944.2$	0.991	100 ～ 2000	20	60
DPP	$Y = 13.02X - 1263.6$	0.992	20 ～ 1000	4	12
DHXP	$Y = 41.07X - 4705.7$	0.991	10 ～ 1000	2	6
BBP	$Y = 14.39X - 1653$	0.992	10 ～ 1000	2	6
DBEP	$Y = 5.074X - 1705.4$	0.992	100 ～ 2000	20	60
DCHP	$Y = 41.54X - 4839.2$	0.993	10 ～ 1000	2	6
DHP	$Y = 11.99X - 4058.1$	0.992	100 ～ 2000	20	60
DEHP	$Y = 49.13X - 7829.4$	0.991	20 ～ 1000	4	12
DPHP	$Y = 33.45X - 5295.4$	0.991	20 ～ 1000	4	12
DNOP	$Y = 4.022X - 1714.2$	0.992	100 ～ 2000	20	60
DNP	$Y = 1.059X - 794.9$	0.999	100 ～ 2000	20	60

参考文献

[1] Chang JW，Yan BR，Chang MH，et al. Cumulative risk assessment for plasticizer—contaminated food using the hazard index approach [J]. Environmental Pollution，2014，189（2）：77-84.

[2] Yang JL，Li YX，Wang Y，et al. Recent advances in analysis of phthalate esters in foods [J]. TrAC Trends in Anal Chem，2015，72：10-26.

[3] 曹九超，金青哲 . 食用油中塑化剂的污染途径及分析方法的研究进展 [J]. 中国油脂，2013，38（5）：1-5.

[4] 国家卫生和计划生育委员会 . GB9685-2008 食品安全国家标准食品接触材料及制品用添加剂使用标准 [S]. 北京：中国标准出版社，2008.

[5] 黄轩 . 高效液相色谱法对食用油中塑化剂含量的测定 [J]. 中国食品，2021（13）：72-73.

[6] 陈海燕，李聪，霍丽斯，等 . 高效液相色谱法测定生活用纸杯中 16 种邻苯二甲酯含量的研究 [J]. 广东化工，2021，48（8）：266-268.

[7] 唐雷鸣，蒋玲波，王萍亚，等 . 二维液质联用技术测定饮料中 21 种邻苯二甲酸酯 [J]. 食品工业，2020，41（8）：304-307.

[8] 程满环，施邑 . 一次性塑料餐盒中塑化剂含量测定及迁移研究 [J]. 广州化工，2021，49（12）：102-104.

[9] 王斌，梁伟龙，林钦贤，等 . GC-MS 法测定广藿香油中塑化剂的含量 [J]. 药学研究，2021，40（3）：167-170.

（收稿日期：2022-06-05；修回日期：2022-08-10）

气相色谱 - 质谱法测定沙格列汀中的 3 种甲磺酸酯类杂质

刘小琼[1]，曹杰永[2]，刘春亮[3]，堵伟锋[4*]（1.安徽省药品审评查验中心，合肥　230051；2.合肥合源药业有限公司，合肥　230088；3.滁州市食品药品检验中心，安徽　滁州　239000；4.安徽省食品药品检验研究院，合肥　230051）

摘要：目的　建立气相色谱 - 质谱法检测沙格列汀中的甲磺酸甲酯（杂质 1）、甲磺酸乙酯（杂质 2）、甲磺酸异丙酯（杂质 3）的含量。**方法**　用 CP-SIL 8 CB 毛细管色谱柱，以氦气作为载气，应用电子轰击离子化离子源（EI）和离子监测模式（SIM），按照设定的气相色谱 - 质谱参数运行，对原料药沙格列汀中的 3 种甲磺酸酯类杂质进行检测。**结果**　3 种甲磺酸酯类在 0.1 ～ 1.0 μg • mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好。甲磺酸甲酯的检测限为 6.21 ng • mL^{-1}，平均回收率在 96.51% ～ 98.45%；甲磺酸乙酯的检测限为 6.14 ng • mL^{-1}，平均回收率在 95.21% ～ 98.91%；甲磺酸异丙酯的检测限为 6.17 ng • mL^{-1}，平均回收率在 94.48% ～ 96.45%。**结论**　该方法具有线性好、检测限低、准确度高等优势，可用于原料药沙格列汀中的 3 种甲磺酸酯类杂质的检测。

关键词：气相色谱 - 质谱；沙格列汀；甲磺酸甲酯；甲磺酸乙酯；甲磺酸异丙酯
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2151-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.033

Determination of three methanesulfonate impurities in saxagliptin by GC-MS

LIU Xiao-qiong[1], CAO Jie-yong[2], LIU Chun-liang[3], DU Wei-feng[4*] (1. *Anhui Center for Drug Evaluation & Inspection, Hefei* 230051; 2. *Hefei Cosource Pharmaceuticals Inc., Hefei* 230088; 3. *Chuzhou Institute for Food and Drug Control, Chuzhou Anhui* 239000; 4. *Anhui Institute for Food and Drug Control, Hefei* 230051)

Abstract: Objective To establish a GC-MS method for the simultaneous determination of methyl methanesulfonate, ethyl methanesulfonate and isopropyl methanesulfonate in saxagliptin. **Methods** The chromatographic column was CP-SIL 8 CB capillary column, and the carrier gas was high-purity helium. The ion source was electron impact ion source. The single ion monitor was used. **Results** At the concentration of 0.1 ～ 1.0 μg • mL^{-1}, the three methanesulfonate impurities showed a good linearity. Their average recoveries of methyl methanesulfonate, ethyl methanesulfonate and isopropyl methanesulfonate were 96.51% ～ 98.45%，95.21% ～ 98.91% and 94.48% ～ 96.45%, respectively. The limits of detection were 6.21, 6.14, and 6.17 ng • mL^{-1}, respectively. **Conclusion** The method is specific, sensitive and accurate, which can be used for the determination of methanesulfonate impurities in saxagliptin.

Key words: GC-MS; saxagliptin; methyl methanesulfonate; ethyl methanesulfonate; isopropyl methanesulfonate

沙格列汀是一种强效降糖药，其生产工艺是起始物料Ⅰ与甲磺酸反应得到中间体，中间体再与起始物料Ⅱ经过多步反应后生成。在生产过程中，中间体上的甲磺酸基团可能会与甲醇、乙醇、异丙醇等生成甲磺酸甲酯（MMS）、甲磺酸乙酯（EMS）、甲磺酸异丙酯（IMS）等甲磺酸酯类化合物，如图 1。甲磺酸酯类是一类典型的基因毒性物质，能破坏服用者体内的 DNA 结构，产生致癌物质，为了保证药品的安全性，药品监管系统不断完善基因毒性杂质控制的指导细则 [1-3]，药物研发以及药品生产企业不断探索甲磺酸酯类杂质的检验方法 [4-6]。目前已报道的甲磺酸酯类

作者简介：刘小琼，女，硕士，执业药师，主要从事药品审评、检查，email：1310653093@qq.com　*通信作者：堵伟锋，男，硕士，副主任药师，主要从事化学药品质量研究，email：cpudwf@163.com

的检验方法有气相色谱 - 质谱（GC-MS）法、液相色谱 - 质谱（LC-MS）法等，但运用 GC-MS 法检测沙格列汀中的基因毒性杂质尚未见报道，仅有 GC 法[7]测定的研究，可这种方法存在灵敏度低、检测限高的问题，对小剂量的沙格列汀制剂来说存在漏检出甲磺酸酯类杂质的可能，本文利用 GC-MS 对沙格列汀的甲磺酸酯类杂质进行检测，该法检测限更低，灵敏度和准确度更高，能更有效评价沙格列汀的安全性。

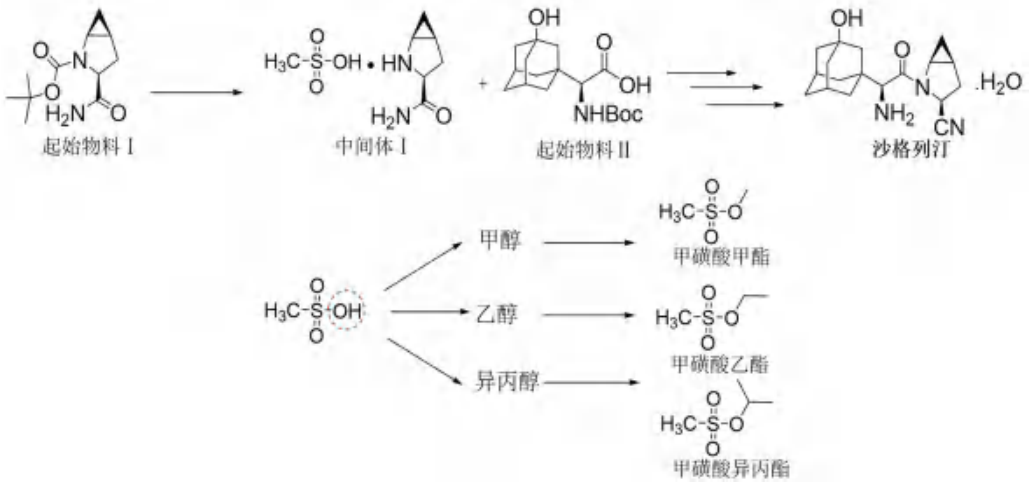

图 1　沙格列汀反应步骤及甲磺酸酯类的结构

Fig 1　Reaction of saxagliptin，and structure of methanesulfonates

1　仪器与试药

GCMS-QP2010 Plus 型气质联用仪（日本岛津公司），XS-105 型电子天平、MS105DU 型电子天平（精度：0.01 mg，瑞士梅特勒公司），KQ-500 超声清洗器（昆山市超声仪器有限公司），MMS 对照品（批号：I2009166，纯度：98.57%，上海阿拉丁生化科技股份有限公司），EMS 对照品（批号：AQX836，纯度：97.00%，上海毕得医药科技有限公司），IMS 对照品（批号：D8NRR0ED，纯度：99.06%，安徽泽升科技有限公司），沙格列汀（批号：SG-190801R1、SG-190901R1、SG-190902R1、SG-200401、SG-200402、SG-200403，合肥合源药业有限公司）。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

毛细管色谱柱（CP-SIL 8 CB，30.0 m×0.32 mm，1.0 μm）；质谱检测器；氦气作为载气。

参数设定情况：起始柱温 60 ℃，以 10 ℃ • min^{-1} 的速率升温至 150 ℃，保持 1 min，再以 30 ℃ • min^{-1} 速率升温至 200 ℃，保持 13 min；柱流速设定为 2.0 mL • min^{-1}；进样口温度设定为 200 ℃；分流比设定为 5∶1；进样量为 1.0 μL。

2.2　质谱条件

EI 离子源（设定为 70.0 eV）；SIM 检测模式。离子源的温度设定为 200 ℃，接口温度设定为 240 ℃；线性模式；MMS 的质荷比（*m/z*）设定为 80，EMS 的 *m/z* 设定为 79，IMS 的 *m/z* 为 123。

2.3　溶液的制备

混合对照品溶液：精密称取 3 种甲磺酸酯类对照品各适量置同一量瓶中，用甲醇溶解定容，制备成 3 种杂质的质量浓度均为 0.51 μg • mL^{-1} 的溶液。同时用作系统适用性溶液。

混合对照品母液：称取对照品 MMS、EMS 和 IMS 约 10 mg，精密称定，置同一量瓶中，用甲醇溶解定容至 100 mL，再从量瓶中精密量取 10.0 mL 置 200 mL 量瓶中，用甲醇稀释定容即可。

供试品溶液的制备：取待测供试品沙格列汀，用甲醇溶解并稀释定容成质量浓度为 1.7 mg • mL^{-1} 的溶液。

2.4　方法学考察

2.4.1　专属性考察　分别取空白溶剂（甲醇）、系统适用性溶液 1.0 μL 进样，以 SIM 模式采集，记录质谱图，结果如图 2，质谱图显示空白溶剂对 3 种甲磺酸酯类杂质的检测没有影响，专属性较好。

2.4.2　准确度考察　精密称取 3 份批号为 SG-200402 的沙格列汀原料药 170 mg，分别置于 3 个 100 mL 量瓶中，再分别向不同量瓶中移入 5.0、10.0 以及 15.0 mL 混合对照品母液，加甲醇溶解并定容，摇匀，即得到 50%、100%、150% 限度浓度供试品溶液，每个浓度平行制备 3 份。精密量取 1.0 μL 上述限度浓度供试品溶液以及混合对照品溶液，进样，计算。结果显示 MMS 在各限度浓度的平均回收率分别是 96.51%、98.45%、

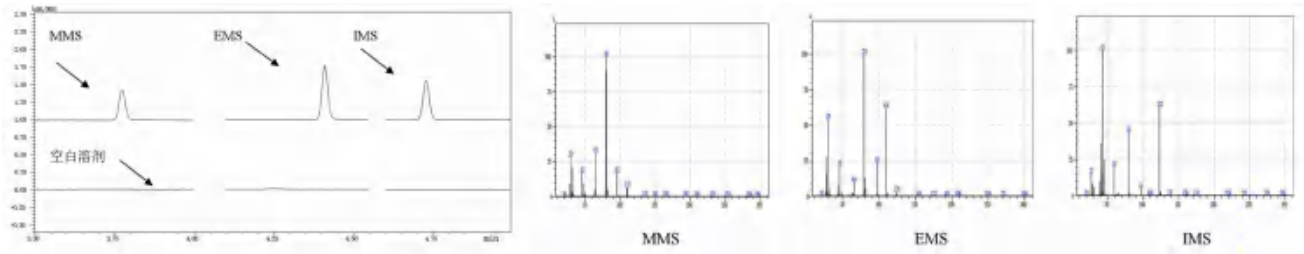

图 2　SIM 质谱图

Fig 2　SIM mass spectra

97.98%，*RSD* 均小于 2.0%；EMS 在各限度浓度的平均回收率分别是 95.21%、98.91%、98.50%，*RSD* 均小于 2.5%；IMS 在各限度浓度的平均回收率分别是 94.48%、96.45%、95.83%，*RSD* 均小于 2.0%。表明本方法的准确度好。

2.4.3　重复性考察　吸取 1.0 mL 混合对照品母液置 10 mL 量瓶中，用甲醇定容，摇匀作为备用液；向 10 mL 量瓶中加入 17 mg 批号为 SG-200402 的沙格列汀原料药，用甲醇溶解并定容，摇匀，作为不加杂质的样品；向 10 mL 量瓶中加入 17 mg 同批次沙格列汀原料药和 1.0 mL 混合对照品母液，用甲醇溶解并定容，摇匀，作为加限度浓度杂质的样品（相当于 100% 限度浓度供试液）。取上述备用液、6 份不加杂质的样品和加限度浓度杂质的样品各 1.0 μL，进样，计算。结果在不加杂质的情况下，样品中 3 种甲磺酸酯类未检出；在样品中加入限度浓度杂质后，3 种甲磺酸酯类的平均检出量分别为 0.030%、0.029% 和 0.029%，*RSD* 分别为 2.4%、2.4% 和 3.0%，表明本方法的重复性较好。

2.4.4　稳定性考察　取“2.4.2”项下 100% 限度浓度供试品溶液作为稳定性考察溶液，室温放置，分别于 4、8、12、16、20、24 h 后，进样测定，记录图谱，结果放置不同时间后的 3 种甲磺酸酯类杂质含量的 *RSD* 值分别为 2.8%、2.6%、3.3%，表明 24 h 内供试品溶液中杂质含量波动较小，溶液较稳定。

2.4.5　检测限与定量限考察　用甲醇逐级稀释混合对照品母液配制成不同浓度的溶液，分别精密量取上述浓度溶液各 1.0 μL，进样，按 *S/N* 为 3∶1 计算 MMS、EMS 和 IMS 的检测限分别为 6.21、6.14、6.17 ng • mL^{-1}；按 *S/N* 为 10∶1 计算 MMS、EMS 和 IMS 的定量限分别为 0.0261、0.0255 和 0.0255 μg • mL^{-1}。

2.4.6　线性考察　分别精密量取混合对照品母液 1.0、1.5、2.5、5.0、8.0、10.0 mL，置于 6 个 50 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，作为系列浓度对照品溶液。精密量取上述溶液各 1.0 μL，分别进样，记录图谱，计算，结果见表 1。MMS、EMS 和 IMS 分别在 0.1045 ～ 1.0448、0.1019 ～ 1.0185 和 0.1020 ～ 1.0203 μg • mL^{-1} 的质量浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

表 1　线性关系考察结果

Tab 1　Linearity

杂质	线性回归方程	r	线性范围 /（μg•mL^{-1}）
MMS	$y = 1.182\times10^4x - 2.235$	0.9993	0.1045 ～ 1.0448
EMS	$y = 2.063\times10^4x - 103.4$	0.9995	0.1019 ～ 1.0185
IMS	$y = 1.672\times10^4x - 56.96$	0.9986	0.1020 ～ 1.0203

2.4.7　耐用性考察　按照“2.4.3”项下备用液、不加杂质的样品和加限度浓度杂质样品的制法制备耐用性考察所需的测试溶液，单因素考察初始柱温、分流比、柱流速、离子源温度以及控制模式对测定结果的影响（见表 2）。精密量取上述测试溶液 1.0 μL，进样，计算。本方法耐用性考察情况见表 3。通过实验可以发现，在变动色谱条件后，不加杂质的样品依然未检出；加限度浓度杂质样品中的 3 种甲磺酸酯类的 *RSD* 在 3.9% ～ 6.6%，备用液的峰面积稳定，峰面积 *RSD* 的最大值为 5.0%，小于限度要求的 10%。表明色谱条件的变动不会影响检测结果，本检验方法的耐用性良好。

表 2　色谱参数变动情况

Tab 2　Changes of chromatographic conditions

色谱参数	规定值	变动值 1	变动值 2
初始柱温 /℃	60	55	65
分流比	5∶1	4∶1	6∶1
柱流速 /（mL • min^{-1}）	2.0	1.9	2.1
离子源温度 /℃	200	195	205
控制模式	线速模式	压力模式	

2.5　样品检测

对 6 批次沙格列汀原料药进行处理，按要求配制相应的供试品溶液，各取 1.0 μL 的混合对照品溶液和供试品溶液进样，结果见图 3。6 批次沙格列汀原料药中均未检出 3 种甲磺酸酯类杂质，满足杂质含量小于 0.03% 的限度要求。

表 3　耐用性考察情况

Tab 3　Durability test

化合物		原始条件测定值	初始柱温 /℃		分流比		柱流速 /（mL·min^{-1}）		离子源温度 /℃		压力模式	*RSD*/%
			55	65	4 ∶ 1	6 ∶ 1	1.9	2.1	195	205		
加限度浓度杂质的样品 /%	MMS	0.031	0.029	0.030	0.030	0.033	0.030	0.030	0.030	0.031	0.029	3.9
	EMS	0.030	0.028	0.029	0.029	0.032	0.029	0.029	0.029	0.030	0.026	5.4
	IMS	0.030	0.028	0.029	0.027	0.032	0.029	0.029	0.029	0.030	0.025	6.6
备用液峰面积的 *RSD* 值 /%	MMS	2.2	1.9	0.75	2.2	0.72	1.1	0.75	1.3	1.2	5.0	
	EMS	2.0	1.1	1.0	0.92	1.7	2.7	2.4	0.58	0.66	3.0	
	IMS	1.9	1.1	1.2	1.8	1.3	2.0	3.8	2.7	3.2	4.0	
不加杂质的样品						—						

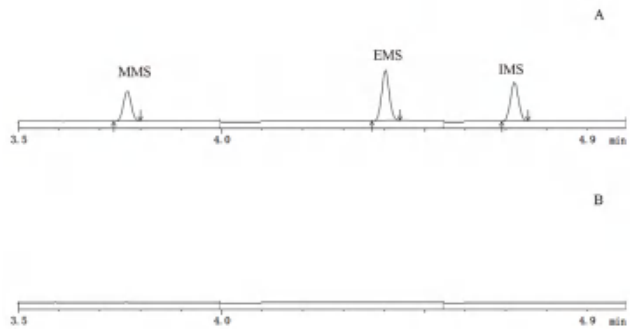

图 3　混合对照品溶液（A）和供试品溶液（B）的质谱图

Fig 3　Mass spectra of mixed reference（A）and test solution（B）

3　讨论

3.1　升温程序的确定

由于沙格列汀原料药中需要检测的基因毒性杂质较多，杂质间的差异性较大，为了更好地分离出被测组分，明确采取系统程序升温法开展实验。经过摸索[8-9]，发现按照“起始柱温 60 ℃，以 10 ℃·min^{-1} 的速率升温至 150 ℃，保持 1 min，再以 30 ℃·L^{-1} 速率升温至 200 ℃，保持 13 min”的程序进行升温，分离效果最好。

3.2　质谱定量离子的确定

本实验采用 SIM 监测模式，通过对空白溶液和系统适用性溶液进行质谱采集，观察采集图谱可以看出 MMS、EMS 在 *m/z* 80 和 *m/z* 79 处有最高丰度，故选定其作为相应杂质的定量离子；IMS 在 *m/z* 43 处有最高丰度，由于此处的检测结果容易受到系统及溶剂的影响，故选择丰度仅次于最高处的 *m/z* 123 作为定量离子[10]。

3.3　基因毒性杂质限度的确定

TTC 法是常用的基因毒性杂质限度制订方法，企业为了收紧和方便控制原料药中的基因毒性杂质，统一设定 TTC 值为 1.5 μg·d^{-1}，按照沙格列汀片的最大日剂量是 5 mg 计算，可得出基因毒性杂质的控制限度应为 0.03%[11-12]。本方法选择样品的质量浓度为 1.7 mg·mL^{-1}，若杂质达到控制上限 0.03% 时，对照品质量浓度是本方法选定的 0.51 μg·mL^{-1}，可直接比对样品和对照品中对应的甲磺酸酯类峰面积判定基因毒性杂质是否超出限度。

4　结论

本文采取的检验方法具有灵敏度高、准确度好等优势，运用 GC-MS 法检测沙格列汀原料药中的基因毒性杂质甲磺酸酯类，可大大提高药品的使用安全系数，降低患者的用药风险。

参考文献

[1] 周怡 . 化学药品标准中杂质控制及其限度的建立 [J]. 药物生物技术，2010，17（2）：181-184.

[2] 陈云，龚玉霞，吕兴祥，等 . 药物杂质研究综述 [J]. 质量与市场，2020（6）：40-42.

[3] 王维剑，刘斐，牛冲，等 . 药品杂质控制与评价研究进展 [J]. 药学研究，2016，35（11）：657-662.

[4] 易大为，邹宇，赵晓东，等 . GC-MS 法测定甲磺酸培氟沙星中甲磺酸酯杂质的研究 [J]. 中国抗生素杂志，2017，42（6）：521-525.

[5] 冯慧敏，杭太俊，高新桃，等 . LC-MS 法同时检测甲磺酸伊马替尼中 3 个磺酸酯基因毒杂质 [J]. 药物分析杂志，2014，34（12）：2202-2206.

[6] 王少敏，牛颖，代敏，等 . 顶空 - 气相色谱 - 质谱法同时测定 7 种甲磺酸酯类杂质 [J]. 郑州大学学报（理学版），2019，51（3）：104-108.

[7] 郑飞，华国栋 . 气相色谱法测定沙格列汀原料药中基因毒性杂质残留量 [J]. 国际药学研究杂志，2016，43（3）：575-577.

[8] 李炎，马旻新，曾实，等 . HS-GC-MS 同时测定沙芬酰胺中磺酸酯类基因毒性杂质 [J]. 中国现代应用药学，2019，19（36）：2431-2435.

[9] 李卉 . 沙格列汀中杂质的研究与控制 [D]. 上海：上海交通大学，2018.

[10] 陈忆玲，冯江江，杨海雪，等 . GC-MS 法测定甲磺酸中 3 中建磺酸烷基酯类遗传毒性杂质 [J]. 中国药科大学学报，2020，51（4）：472-478.

[11] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：480-483.

[12] ICH. M7 Mutagenic impurities：“M7（R1）：Assessment and Control of DNA Reactive（Mutagenic）Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk”[EB/OL].（2017）. https：//www. ich. org /page /multidisciplinary-guidelines.

（收稿日期：2022-07-01；修回日期：2022-08-12）

高效液相色谱法测定辐状肋柱花中 10 种成分的含量

李维业[1]，刘学良[2]，刘安平[1]，杨增亮[1]，苏媛[1]，韩达斌[2]，陈鹏[2]，石春兰[2]，王开祥[1]，问静[2]，邹存生[3]，郭宏英[3]，刘海青[2*]（1. 西宁市食品药品检验检测中心，西宁　810007；2. 青海省药品审评核查中心，西宁　810007；3. 三普药业有限公司，西宁　810016）

摘要：目的　建立高效液相色谱法同时测定辐状肋柱花中马钱苷酸、獐芽菜苦苷、当药苷、芦丁、当药黄素、木犀草素、苦龙胆脂苷、当药醇苷、槲皮素、8-羟基-1，3，5-三甲氧基呫酮的含量。**方法**　采用 Waters SunFirODS C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），乙腈-0.05% 磷酸溶液为流动相，进行梯度洗脱，流速 1.0 mL • min^{-1}，检测波长 254 nm，柱温 30 ℃。**结果**　10 种成分马钱苷酸、獐芽菜苦苷、当药苷、芦丁、当药黄素、木犀草素、苦龙胆脂苷、当药醇苷、槲皮素、8-羟基-1，3，5-三甲氧基呫酮均得到良好分离，线性关系良好（$r \geqslant 0.9993$），加样回收率均在 96.20% ～ 100.68%，$RSD < 2.9\%$。**结论**　该方法快捷简便、稳定可靠，可应用于辐状肋柱花及其制剂的质量控制，为建立藏药辐状肋柱花质量标准提供依据。

关键词：辐状肋柱花；马钱苷酸；獐芽菜苦苷；当药苷；当药黄素；芦丁；木犀草素；苦龙胆脂苷；当药醇苷；槲皮素；8-羟基-1，3，5-三甲氧基呫酮

中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2155-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.034

Determination of 10 components in *Lomatogonium rotatum* by HPLC

LI Wei-ye[1], LIU Xue-liang[2], LIU An-ping[1], YANG Zeng-liang[1], SU Yuan[1], HAN Da-bin[2], CHEN Peng[2], SHI Chun-lan[2], WANG Kai-xiang[1], WEN Jing[2], ZOU Cun-sheng[3], GUO Hong-ying[3], LIU Hai-qing[2*] (1. *Xining Center for Food and Drug Inspection & Testing*, *Xining* 810007; 2. *Qinghai Provincial Drug Evaluation and Verification Center*, *Xining* 810007; 3. *S&P Pharmaceutical Co., Ltd.*, *Xining* 810016)

Abstract: Objective　To simultaneously determine loganin, swertiamarin, sweroside, rutin, swertisin, luteolin, genticoside, mercaptoside, quercetin, and 8-hydroxy-1, 3, 5-trimethoxyxanthone in Lomatogonium rotatum by HPLC. **Methods**　Waters SunFirODS C_{18} column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used. Acetonitril-0.05% phosphoric acid solution was the mobile phase with gradient elution. The volume flow rate was 1.0 mL • min^{-1}, the detection wavelength was 254 nm and the column temperature was 30 ℃ . **Results**　The 10 components (loganin, swertiamarin, sweroside, rutin, swertisin, luteolin, genticoside, mercaptoside, quercetin, and 8-hydroxy-1, 3, 5-trimethoxyxanthone) were well separated and showed good linear relationship ($r \geqslant 0.9993$). The recoveries ranged 96.20% － 100.68%, $RSD < 2.9\%$. **Conclusion**　The method is fast, simple, stable and reliable. It can be used for the quality control of Lomatogonium rotatum and its preparations, providing a basis for establishing the quality standard of Tibetan medicine *Lomatogonium rotatum.*

Key words: *Lomatogonium rotatum*; loganin; swertiamarin; sweroside; swertisin; rutin; luteolin; genticoside; mercaptoside; quercetin; 8-hydroxy-1, 3, 5-trimethoxyxanthone

基金项目：青海省基础研究项目（No.2020-ZJ-747）。

作者简介：李维业，男，副主任药师，主要从药品检验、药品不良反应监测工作，email：11506762@qq.com　*通信作者：刘海青，男，主任药师，主要从事中藏药研究工作，email：QHDC1958@aliyun.com

辐状肋柱花为龙胆科肋柱花属辐状肋柱花 *Lomatogonium rotatum*（L.）Fries ex Nym. 的干燥全草，生长于海拔 3000 ～ 4100 m 的山坡、草地、灌丛中，在西藏、四川、青海、甘肃均有分布 [1-3]，具有清肝利胆，清热解毒和祛湿功效，可治急性黄胆型肝炎、急性肾盂肾炎、流行性感冒、胆病引起的发烧及疮疖痈毒 [4-8]。《藏药志》中记载："机合滴"包括辐状肋柱花、湿生扁蕾、椭圆叶花锚等多种药材 [9]，其化学成分常含有环烯醚萜类、黄酮类、呫酮类等多种成分。其中环烯醚萜类具有抗氧化、保肝利胆、解痉、抗焦虑、抗脑缺血损伤等生物活性，黄酮类具有抗氧化、抗肿瘤等活性，呫酮类具有保肝利胆、强心利尿等生物活性 [10-23]。

目前，辐状肋柱花在藏药制剂中使用广泛，但现有的研究主要集中在对其成分和临床药理作用的研究，缺乏对其质量检测和标准的研究，其相关研究文献较少，为了提高其临床应用价值，本研究采用高效液相色谱法对 3 批辐状肋柱花样品中 10 种成分的含量进行测定，方法操作简便、有效，可为今后进一步研究辐状肋柱花质量提供试验依据。

1　仪器与试药

1.1　仪器

Waterse2695 型高效液相色谱仪，Waters 2998 PDA 型二极管阵列检测器，Waters 2695 型 Empower 化学工作站（美国 Waters 公司）；XS105DU 梅特勒 - 托利多专业型 XS 分析天平（精度：0.01 mg，瑞士梅特勒 - 托利多仪器有限公司）；SB25-12DT 新芝超声波清洗机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；Milli-Q2355 超纯水机（美国密理博有限公司）。

1.2　试药

对照品马钱苷酸（纯度：97.5%）、獐芽菜苦苷（纯度：98.3%）、当药苷（纯度：99.27%），芦丁（纯度：91.7%）、木犀草素（纯度：99.1%）、槲皮素（纯度：99.8%）（中国食品药品检定研究院），对照品当药黄素（纯度：99.37%）、当药醇苷（纯度：100%）（成都普菲德生物技术有限公司），对照品苦龙胆脂苷（纯度：98.0%，上海源叶生物科技有限公司），对照品 8- 羟基 -1，3，5- 三甲氧基呫酮（中科院西北高原生物研究所孙洪发研究员提供）。甲醇、乙腈、磷酸为色谱纯；水为超纯水。3 批样品信息详见表 1，经青海省药品审评核查中心刘海青主任药师鉴定为龙胆科肋柱花属植物辐状肋柱花 *Lomatogonium rotatum*（Diels et Gilg）Fern 的干燥全草。

表 1　样品信息表

Tab 1　Sample information

样品编号	产地	供样单位
FZLZH001	青海互助北山国家森林公园	自采
FZLZH002	青海湟中	自采
FZLZH003	青海贵南县	青海省八一路药材市场

2　方法与结果

2.1　色谱条件与系统适用性试验

Waters SunFirODS C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），乙腈（A）-0.05% 磷酸（B）溶液为流动相，梯度洗脱（0 ～ 6 min，5% ～ 8%A；6 ～ 15 min，8% ～ 10%A；15 ～ 20 min，10% ～ 15%A；20 ～ 40 min，15% ～ 35%A；40 ～ 45 min，35% ～ 60%A）；流速 1.0 mL • min^{-1}；检测波长为 254 nm；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。在此色谱条件下，马钱苷酸、獐芽菜苦苷、当药苷、芦丁、当药黄素、木犀草素、苦龙胆脂苷、当药醇苷、槲皮素、8- 羟基 -1，3，5- 三甲氧基呫酮与样品中其他成分分离度均大于 1.5，理论板数不低于 5000（见图 1）。

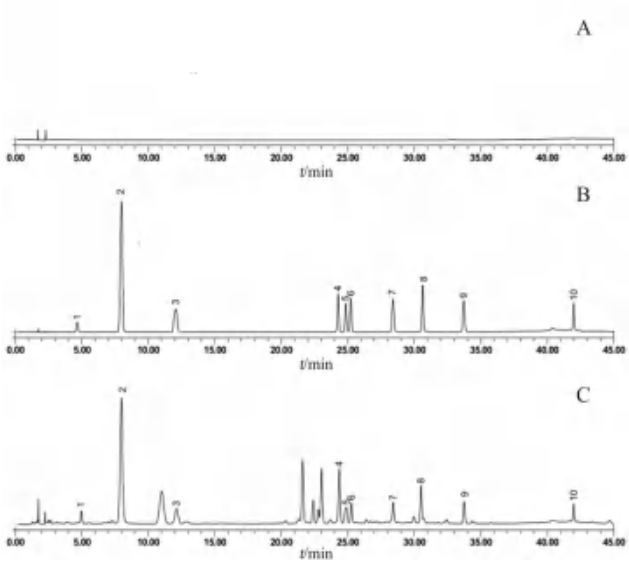

图 1　辐状肋柱花 HPLC 色谱图

Fig 1　HPLC chromatograms of *Lomatogonium rotatum*

A. 空白溶剂（blank solvent）；B. 混合对照品（mixed reference）；C. 供试品（sample）；1. 马钱苷酸（loganin）；2. 獐芽菜苦苷（swertiamarin）；3. 当药苷（sweroside）；4. 芦丁（rutin）；5. 当药黄素（swertisin）；6. 木犀草素（luteolin）；7. 苦龙胆脂苷（genticoside）；8. 当药醇苷（mercaptoside）；9. 槲皮素（quercetin）；10. 8- 羟基 -1，3，5- 三甲氧基呫酮（8-hydroxy-1，3，5-trimethoxyxanthone）

2.2　对照品溶液的制备

精密称取对照品马钱苷酸 12.50 mg，獐芽菜

苦苷 21.88 mg，当药苷 8.11 mg，芦丁 8.19 mg，当药黄素 11.86 mg，木犀草素 8.81 mg，苦龙胆脂苷 9.11 mg，当药醇苷 16.43 mg，槲皮素 8.03 mg，8-羟基 -1，3，5- 三甲氧基呫酮 10.68 mg 分别置 50、25、25、25、25、25、50、25、25、100 mL 量瓶中，加甲醇超声使溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照品储备液，再分别取各对照品储备液 2、6、2、2、1、2、1、2、1、1 mL 置 25 mL 量瓶中，加甲醇超声使溶解并稀释至刻度，摇匀，即得马钱苷酸、獐芽菜苦苷、当药苷、芦丁、当药黄素、木犀草素、苦龙胆脂苷、当药醇苷、槲皮素、8- 羟基 -1，3，5- 三甲氧基呫酮质量浓度分别为 0.019 50、0.206 43、0.025 76、0.024 03、0.018 86、0.007 14、0.052 18、0.026 63、0.012 82、0.018 86 mg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.3　供试品溶液的制备

取本品粉末（过三号筛）约 0.2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 25 mL，称定重量，超声处理 30 min（功率 250 W，频率 50 kHz），取出，放至室温，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.4　线性关系考察

精密吸取马钱苷酸、獐芽菜苦苷、当药苷、芦丁、当药黄素、木犀草素、苦龙胆脂苷、当药醇苷、槲皮素、8- 羟基 -1，3，5- 三甲氧基呫酮对照品储备液，以甲醇配制成不同质量浓度的系列混合对照品溶液，进样测定，以峰面积（y）对数值为纵坐标，质量浓度为横坐标（x），用外标两点法计算并绘制标准曲线，进行线性回归分析，计算回归方程及线性范围，结果见表 2，10 种成分在相应范围内与峰面积线性关系良好。

表 2　10 种成分的回归方程、线性范围及相关系数

Tab 2　Regression equation，linearity and correlation coefficients of 10 components

成分	回归方程	线性范围 /（μg • mL^{-1}）	r
马钱苷酸	$y = 7.685\times10^{7}x - 8.881\times10^{2}$	1.22 ～ 13.26	0.9998
獐芽菜苦苷	$y = 1.638\times10^{8}x - 2.184\times10^{5}$	20.64 ～ 541.53	0.9996
当药苷	$y = 1.311\times10^{8}x + 5.467\times10^{3}$	2.58 ～ 40.18	0.9993
芦丁	$y = 2.203\times10^{8}x + 1.199\times10^{5}$	2.40 ～ 43.85	0.9994
当药黄素	$y = 2.181\times10^{8}x + 1.564\times10^{4}$	1.89 ～ 17.54	0.9994
木犀草素	$y = 1.852\times10^{8}x + 2.999\times10^{4}$	2.66 ～ 18.77	0.9995
苦龙胆脂苷	$y = 3.972\times10^{9}x + 1.403\times10^{5}$	0.36 ～ 1.07	0.9996
当药醇苷	$y = 3.200\times10^{7}x + 2.615\times10^{4}$	5.22 ～ 156.02	0.9995
槲皮素	$y = 1.141\times10^{9}x - 5.989\times10^{3}$	0.32 ～ 2.82	0.9993
8- 羟基 -1，3，5- 三甲氧基呫酮	$y = 5.224\times10^{8}x + 3.722\times10^{3}$	0.55 ～ 1.32	0.9994

2.5　精密度试验

精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液，连续进样 6 次，记录峰面积，结果马钱苷酸、獐芽菜苦苷、当药苷、芦丁、当药黄素、木犀草素、苦龙胆脂苷、当药醇苷、槲皮素、8- 羟基 -1，3，5- 三甲氧基呫酮峰面积 *RSD* 分别为 0.62%、0.20%、0.70%、0.43%、0.45%、0.51%、2.0%、1.8%、0.43%、1.9%，表明仪器精密度良好。

2.6　稳定性试验

取同一供试品溶液（样品编号：FZLZH-001），分别于 0、2、4、8、16、24 h 按“2.1”项下色谱条件进行测定，记录峰面积，结果马钱苷酸、獐芽菜苦苷、当药苷、芦丁、当药黄素、木犀草素、苦龙胆脂苷、当药醇苷、槲皮素、8- 羟基 -1，3，5- 三甲氧基呫酮峰面积 *RSD* 分别为 0.62%、0.47%、0.56%、1.1%、0.39%、0.82%、0.71%、1.2%、0.93%、0.57%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7　重复性试验

取辐状肋柱花样品（样品编号：FZLZH-001）6 份，按“2.3”项下方法制备，进样测定，计算含量，结果马钱苷酸、獐芽菜苦苷、当药苷、芦丁、当药黄素、木犀草素、苦龙胆脂苷、当药醇苷、槲皮素、8- 羟基 -1，3，5- 三甲氧基呫酮的平均含量分别为 0.139%、5.613%、0.450%、0.474%、0.193%、0.203%、0.011%、1.738%、0.032%、0.013%，其 *RSD* 分别为 1.4%、1.2%、0.83%、0.71%、0.97%、1.1%、0.85%、1.4%、1.8%、3.4%，表明该方法重复性良好。

2.8　加样回收试验

称取辐状肋柱花样品（样品编号：FZLZH-001）6 份，每份 0.1 g，精密称定，置锥形瓶中，在每组中分别加入“2.2”项下的混合对照品溶液 5 mL，

按“2.3”项下方法制成供试品溶液，进样测定，计算回收率，结果得马钱苷酸、獐芽菜苦苷、当药苷、芦丁、当药黄素、木犀草素、苦龙胆脂苷、当药醇苷、槲皮素、8-羟基-1，3，5-三甲氧基呫酮的平均回收率分别为100.68%、96.55%、96.20%、98.88%、98.91%、96.20%、97.70%、98.10%、98.65%、99.45%，*RSD*分别为1.5%、2.7%、1.0%、1.4%、1.2%、1.2%、2.9%、1.5%、2.6%、1.8%。表明该方法的回收率良好。

2.9　样品含量测定

3批次辐状肋柱花药材粉末，按“2.3”项下方法制备成供试品溶液，进样分析，记录色谱图并计算各批次辐状肋柱花中10种待测成分的含量。结果3批次辐状肋柱花药材中马钱苷酸含量在0.121%～0.153%、獐芽菜苦苷含量在4.876%～6.286%、当药苷含量在0.364%～0.466%、芦丁含量在0.423%～0.509%、当药黄素含量在0.173%～0.203%、木犀草素含量在0.169%～ 0.217%、苦龙胆脂苷含量在0.009%～0.012%、当药醇苷含量在1.114%～1.738%、槲皮素含量在0.024%～0.032%，8-羟基-1，3，5-三甲氧基呫酮含量在0.011%～0.015%（见表3）。

表3　样品含量测定结果 (%)

Tab 3　Content determination of samples (%)

样品编号	马钱苷酸	獐芽菜苦苷	当药苷	芦丁	当药黄素	木犀草素	苦龙胆脂苷	当药醇苷	槲皮素	8-羟基-1，3，5-三甲氧基酮
FZLZH-01	0.139	5.613	0.450	0.474	0.193	0.203	0.011	1.738	0.032	0.013
FZLZH-02	0.121	4.876	0.466	0.423	0.203	0.217	0.012	1.675	0.024	0.011
FZLZH-03	0.153	6.286	0.364	0.509	0.173	0.169	0.009	1.114	0.030	0.015
均值	0.138	5.592	0.427	0.469	0.190	0.196	0.011	1.509	0.029	0.013

3　讨论

3.1　目标成分的选择

马钱苷酸、獐芽菜苦苷、当药苷、芦丁、当药黄素、木犀草素、苦龙胆脂苷、当药醇苷、槲皮素、8-羟基-1，3，5-三甲氧基呫酮等具有保肝、抗氧化、消除水肿、抗炎及清除自由基、抗高血脂、改善糖尿病性肾病变状况、抗微生物及肿瘤细胞等药理作用[24]，且在检测中有很好的分离度、重复性、稳定性等，故选择这10种成分作为辐状肋柱花的检测指标来进行研究，可以有效控制该药材的内在质量。

3.2　检测波长的确定

对10种成分的甲醇溶液进行全波长扫描，结果10种成分在210 nm和254 nm测定都有较好的吸收，但在254 nm可兼顾10个成分的最大吸收，且色谱图基线平稳，色谱峰峰形较好。故确定254 nm作为本试验的检测波长。

3.3　溶剂系统

试验中分别用甲醇-水-冰醋酸、乙腈-水-磷酸、甲醇-水-磷酸等流动相系统及流动相梯度经多次试验，结果以乙腈-0.05%磷酸为流动相系统梯度洗脱对10种成分的色谱峰分离度最好。

3.4　样品制备

试验中考察不同溶剂（水、乙醇、50%乙醇、甲醇、50%甲醇），不同溶剂用量（15、25、50 mL），不同提取方法（回流、超声、冷浸），不同提取时间（15、30、45、60 min）等对样品制备的影响，从混合对照品和样品中被测成分的分离情况、基线的稳定性及分析时间、含量、成本、时间等方面综合分析，结果样品提取以甲醇25 mL为溶剂、超声30 min处理效率最高，确定其为本研究的提取方法。

3.5　方法耐用性

试验对方法耐用性进行了考察，在标准条件的基础上，对流速、柱温、流动相比例及不同色谱柱进行考察。不同柱温、不同流速、不同色谱柱条件下测得的结果差异比较大，出现色谱峰的交换或重叠，最后确定流速为1.0 mL·min^{-1}，柱温为30 ℃，色谱柱型号为Waters SunFirODS C_{18}柱，在此条件下对样品含量测定结果重复性好。

3.6　其他成分测定

试验过程中还尝试开展了辐状肋柱花中没食子酸、山柰素、异荭草素、异牡荆素、齐墩果酸、熊果酸、1-羟基-3，4，5-三甲基呫酮等化学成分的含量测定试验，但由于这些成分含量较低、分离不好等，本文未将其作为辐状肋柱花的定量检测指标。

3.7　结果分析

试验结果发现，样品之间被测成分含量差距较大，分析其原因，一方面可能受产地、采收期等的影响，样品中各成分的含量有变化；另一方面，在干燥、储藏及运输过程中，花叶易脱落，从而造成含量变化较大，提示在药材采集后的干燥、储藏和运输等过程中，应特别注意避免花叶

脱落损失，以保证药材质量。本文采用 HPLC 法同时测定辐状肋柱花中 10 种主要有效成分含量的方法，并进行了方法学考察，该方法简便、高效、准确，为全面评估辐状肋柱花这种药用植物的质量和新药研究开发可提供一定的参考。

参考文献

[1] 中国科学院西北高原生物研究所 . 青海植物志（第 3 卷）[M]. 西宁：青海人民出版社，1996：86.

[2] 刘尚武，何廷农 . 肋柱花属的系统研究 [J]. 植物分类学报，1992，30（4）：289-319.

[3] 刘建全，邓德山，王伟 . 青海肋柱花属的染色体数目初报 [J]. 青海师范大学学报（自然科学版），1994，3：34-37.

[4] 中华人民共和国卫生部药典编委会 . 中华人民共和国卫生部药品标准藏药 [M]. 1995：45.

[5] 何文姬，张桢 . 藏药“蒂达”的基原植物药理作用 [J]. 中国民族民间医药，2013，22（23）：5.

[6] 文检，张艺，刘川，等 . 藏药“蒂达”的基原、药性及功效的考证 [J]. 中国中药杂志，2016，41（4）：609-612.

[7] 钟国跃，王昌华，刘翔，等 . 常用藏药“蒂达（藏茵陈）”的资源与使用现状调查 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2010，12（1）：122-128.

[8] 钟国跃，阳勇，冯婷婷，等 . 常用藏药“蒂达”（藏茵陈）基原物种药用合理性及资源利用价值评价 [J]. 中国中药杂志，2012，37（17）：2639-2645.

[9] 中国科学院西北高原生物研究所 . 藏药志 [M]. 青海：青海省人民出版社，1991.

[10] 宋萍，吴启勋，俞学荣 . RP-HPLC 法测定辐状肋柱花中獐牙菜苦苷的含量 [J]. 药物分析杂志，2009，29（6）：1013-1315.

[11] 宗铁强 . 辐状肋柱花乙酸乙酯萃取物化学成分及抑制肿瘤细胞增殖作用研究 [D]. 延吉：延边大学，2021.

[12] 宋英梅 . 辐状肋柱花石油醚提取物化学成分及其对肿瘤细胞抑制活性评价 [D]. 延吉：延边大学，2021.

[13] 孙建军，冬颖，于东升，等 . 蒙药肋柱花的抗炎活性部位研究 [J]. 内蒙古医科大学学报，2014，36（5）：452-454.

[14] 叶日贵，白梅荣，包明兰，等 . 蒙药肋柱花化学成分的研究 [J]. 北方药学，2014，11（12）：20-21.

[15] 李玉林，丁晨旭，王洪伦，等 . 辐状肋柱花的苷类成分 [J]. 西北植物学报，2006，26（1）：197-200

[16] 包同力嘎 . HPLC 法测定不同产地肋柱花中獐芽菜苦苷的含量 [J]. 辽宁中医杂志，2013，40（12）：2558-2559.

[17] 王秀梅，巴根那，白明纲 . 高效液相色谱法测定肋柱花中獐牙菜苦苷的含量 [J]. 内蒙古民族大学学报（自然版），2007，22（3）：320-322.

[18] 张召华，曾擎屹，林鹏程，等 . RP-HPLC 法同时测定藏药肋柱花中三种成分的含量 [J]. 湖北农业科学，2015，54（3）：687-689.

[19] 王秀梅，巴根那，白明纲 . HPLC 法测定肋柱花中木犀草素的含量 [J]. 中国民族医药杂志，2009，15（1）：38-39.

[20] 王振旺，龙平，张春红，等 . HPLC 测定肋柱花中獐牙菜苦苷和当药黄素的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19（10）：106-108.

[21] 孙兴姣，席琳图雅，那生桑，等 . 蒙药肋柱花 HPLC 指纹图谱的研究 [J]. 中草药，2019，50（7）：1703-1707.

[22] 陈玉兰，叶日贵，佟玉凤，等 . 蒙药肋柱花总黄酮提取工艺研究 [J]. 时珍国医国药，2014，25（7）：1544-1546.

[23] 巴根那，包明兰，王秀梅，等 . 蒙药肋柱花的质量标准研究 [J]. 国民族医药杂志，2018，24（4）：40-42.

[24] 余放争，董光平 . 獐芽菜属中的药用植物及其药理和化学研究综述 [J]. 中国民族民间医药杂志，1999，36（1）：53-55.

（收稿日期：2022-01-02；修回日期：2022-04-08）

药品不良事件信号监测专题

基于 FAERS 数据库的司美格鲁肽不良事件信号挖掘研究

吴玥[1]，陈力[1]，何绪成[2]（1. 四川大学华西第二医院药学部，成都　610041；2. 四川省彭州市第二人民医院药剂科，四川彭州　611934）

摘要：目的　基于美国食品药品监督管理局（FDA）不良反应事件报告系统（FAERS）数据库，分析司美格鲁肽的不良事件信号，为临床安全用药提供参考。**方法**　利用报告比值比法和比例报告比值法，分析 FAERS 数据库中 2019 年第 1 季度至 2021 年第 3 季度共 11 个季度关于司美格鲁肽的不良事件报告。**结果**　获得以司美格鲁肽为目标药物的不良事件的报告数 11 113 个，检测获得有效信号 193 个，共涉及 23 个系统器官分类，其中报告例次位于前 3 的为胃肠系统疾病（6480 例，58.31%），各类检查（如血葡萄糖升高、糖化血红蛋白升高及血葡萄糖降低等）（1461 例，13.15%），代谢及营养类疾病（1205 例，10.84%）。**结论**　司美格鲁肽的药品不良事件（ADE）主要集中在胃肠系统、各类检查和代谢及营养类疾病，建议临床用药时应注意监测患者的不良反应，及时采取相应措施。

关键词：司美格鲁肽；报告比值比法；比例失衡法；不良事件报告信号

中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2160-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.035

Signal data mining of semaglutide adverse events based on FAERS

WU Yue[1], CHEN Li[1], HE Xu-cheng[2] (1. *Department of Pharmacy, West China Second Hospital, Sichuan University*, *Chengdu* 610041; 2. *Department of Pharmacy, Second People's Hospital of Pengzhou, Pengzhou Sichuan* 611934)

Abstract: Objectives To analyze the adverse reaction signals of semaglutide based on the U. S. Food and Drug Administration (FDA) Adverse Event Reporting System (FAERS) database, and to provide reference for clinical safe medication. **Methods** The reporting odds ratio method and the proportional reporting odds method were used, and 11 quarters of adverse events reports on semaglutide in the FAERS database (from the first quarter of 2019 to the third quarter of 2021) were analyzed. **Results** Totally 11 113 reports of adverse events with semaglutide as the target drug were collected, and 193 valid signals were detected, involving 23 systems organs classes. The top three reported cases included gastrointestinal systemic diseases 6480 cases (58.31%), various examinations (such as elevated blood glucose, elevated glycated hemoglobin and low blood glucose, etc. 1461 cases (13.15%), and metabolic and nutritional diseases 1205 cases (10.84%). **Conclusion** Adverse events of semaglutide is mainly concentrated in the gastrointestinal system, various examinations, and metabolic and nutritional diseases. Patients should be monitored for adverse reactions during clinical medication, and corresponding measures should be taken in time.

Key words: semaglutide; reporting odds ratio method; proportional imbalance method; adverse events reporting signal

基金项目：国家自然科学基金项目（No.82073921）。

作者简介：吴玥，女，主要从事临床药学研究，email：1445472812@qq.com　*通信作者：陈力，男，硕士，副主任药师，主要从事临床药学与医院合理用药方面的研究，email：13674852@qq.com

胰高血糖素样肽-1（glucagon like peptide-1，GLP-1）是一种对血糖控制和体重调节具有重要作用的肠促胰岛激素[1]，通过模拟天然 GLP-1 激活 GLP-1 受体，以葡萄糖浓度依赖的方式增强胰岛素的分泌，抑制胰高血糖素分泌，并能够延缓胃排空，通过中枢性的食欲抑制，减少进食量，从而达到降低血糖的作用[2]。因此，胰高血糖素样肽-1 受体激动剂（glucagon like peptide-1，GLP-1RA）成为了近年来的新型降糖药。司美格鲁肽（semaglutide）每周给药一次，可以提高患者的依从性和生活质量[3]。在 2 型糖尿病的随机临床试验中，司美格鲁肽使普通患者的体重减轻量是其他 GLP-1RA 的 3 倍，肥胖患者的体重减轻量是其他 GLP-1RA 的 2 倍，接近 15 kg。在小型随机对照临床试验中，司美格鲁肽在三餐中平均降低约 25% 的能量摄入，还可以降低糖尿病患者的心血管不良事件的风险[4]，为全球第 3 个上市的每周注射 1 次的 GLP-1RA[5]。

近日，国家医保局公布 2021 年国家医保目录调整的结果，司美格鲁肽正式纳入医保并将进行国家谈判，该药即将在临床使用中出现井喷式增长。作为一种新型药物，目前对其安全性研究较少，本文将通过挖掘美国 FDA 不良事件报告系统（FDA adverse event reporting system，FAERS）对司美格鲁肽的不良反应进行研究，为临床用药提供参考。

1　资料与方法

1.1　数据来源

本研究提取美国 FAERS 数据库中 2019 年第 1 季度至 2021 年第 3 季度共 11 个季度的关于司美格鲁肽的不良反应报告，包括患者资料、药物使用信息、不良事件名称、结果、报告来源、日期和原发疾病等内容，将所得资料导入关系型数据库管理系统（MYSQL，版本 5.7）中，再删除重复项，筛选出以司美格鲁肽为首要怀疑药物的不良事件报告共 11 113 例。

1.2　数据标准化

药品不良事件（ADE）的分类和表达采用国际医学科学组织理事会《ICH 国际医学用语词典》（Medical Dictionary for Regulatory Activities，MedDRA）中药物不良反应术语集的首选系统器官分类（system organ class，SOC）和首选术语（preferred term，PT）。在 MedDRA 官方网站，将需要汉化的 SOC 和 PT 英文名导入，系统自动输出中英文映射表。本文中 SOC 和 PT 的中英文表达均按照该映射表，提高了研究的可信度与准确度。

1.3　数据挖掘方法

本研究主要采用的数据挖掘方法为比例失衡法中的报告比值比法（reporting odds ratio，ROR）和比例报告比值法（proportional reporting ratio，PRR），具有较高的灵敏性和可信度[6]。该方法以比例失衡法四格表为基础，通过 ROR 法与 PRR 法公式及阈值表格来计算 ROR 和 PRR 的数值[7]，如果目标药物与不良事件之间的频次和信号强度均大于阈值，则称为失衡（disproportionality），此时提示生成 1 个信号，计算得到的 ROR 值和 PRR 值的数值越大表示信号越强，提示目标药物越可能与目标不良事件存在关联，但并不代表两者之间一定存在可疑因果关系[8]。

2　结果

2.1　不良事件报告病例基本特征

从美国 FAERS 系统中得到以司美格鲁肽为目标药物的 ADE 共 7424 例，其中女性（4026，54.23%）多于男性（3244，43.70%）。在年龄分布上，平均年龄为 62.2 岁，中位年龄为 63 岁。报告者以消费者为主，共 4339 例，占 58.45%。美国报告数最多，有 6467 例，占 87.11%。具体报告情况见表 1。

表 1　2019—2021 年司美格鲁肽相关不良事件报告基本信息

Tab 1　Basic information of semaglutide related events from 2019 to 2021

信息	分类	报告例数	构成比 /%
性别	女	4026	54.23
	男	3244	43.70
	性别未知	154	2.07
年龄段 / 岁	＜ 18	3	0.04
	18 ～ 65	2541	34.23
	＞ 65	2037	27.44
	年龄未知	2843	38.29
报告者	医师	1485	20.00
	药师	636	8.57
	消费者	4339	58.45
	律师	1	0.01
	保健专业人士	950	12.80
	职业未知	13	0.18
报告国家（报告例数≥ 10）	美国	6467	87.11
	英国	153	2.06
	加拿大	144	1.94
	法国	81	1.09
	日本	70	0.94

2.2　ADE 累及器官

对提取到的以司美格鲁肽为目标药物的 ADE，通过 ROR 法和 PRR 法进行筛选，最终得到有效信号 192 个，涉及 23 个 SOC。其中报

告数最多的为胃肠系统疾病，共计 6480 例，占 58.31%。此外，各类检查（1461 例，13.15%）、代谢及营养类疾病（1205 例，10.84%）也相对较多。具体见表 2 及图 1。

表 2　SOC 项下司美格鲁肽 ADE 信号检测

Tab 2　ADE signals of semaglutide involved systems organs class

系统器官分类（SOC）	信号数（PT）	不良事件报告数（ADE）	报告数构成比 /%
胃肠系统疾病	54	6480	58.31
各类检查	15	1461	13.15
代谢及营养类疾病	19	1205	10.84
眼器官疾病	14	450	4.05
各类神经系统疾病	11	268	2.41
各类损伤、中毒及操作并发症	9	253	2.28
全身性疾病及给药部位各种反应	11	189	1.70
肝胆系统疾病	10	184	1.66
产品问题	3	103	0.93
肾脏及泌尿系统疾病	6	80	0.72
呼吸系统、胸及纵隔疾病	3	68	0.61
皮肤及皮下组织类疾病	4	65	0.58
感染及侵染类疾病	7	62	0.56
精神病类	2	48	0.43
良性、恶性及性质不明的肿瘤（包括囊状和息肉状）	7	41	0.37
内分泌系统疾病	2	35	0.31
各种肌肉骨骼及结缔组织疾病	3	29	0.26
社会环境	2	28	0.25
各种手术及医疗操作	2	23	0.21
耳及迷路类疾病	3	13	0.12
心脏器官疾病	2	11	0.10
血管与淋巴管类疾病	1	11	0.10
生殖系统及乳腺疾病	2	6	0.05
总计	192	11 113	100.00

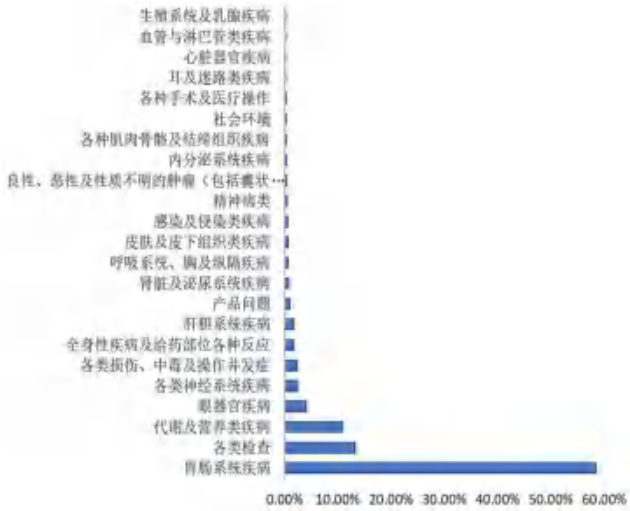

图 1　各 SOC 项下司美格鲁肽 ADE 信号的报告例数构成比

Fig 1　Proportion of reported cases of semaglutide ADE signal under each SOC

2.3　ADE 信号挖掘结果

对以司美格鲁肽为目标药物的 ADE 进行筛除，通过 ROR 法和 PRR 法筛选后，最终得到司美格鲁肽信号数为 193 个，PT 报告总数为 11 113 例。在有信号的 PT 中，分别按相应 ADE 发生频次（a 值）和信号强度（95%*CI* 下限）的前 20 位进行 PT 排序（具体数据见表 3、4）。其中较为常见的 ADE 为恶心、呕吐、腹泻、食欲减退等；而相关性较高的 ADE 为甲状腺髓样癌、嗳气、产品通信问题等。

表 3　司美格鲁肽报告数降序排列的前 20 位 ADE 信号

Tab 3　Top 20 ADE signals of semaglutide signal strength and reports in descending order

PT	报告例数	ROR 值
恶心	1597	7.36
呕吐	921	6.54
腹泻	861	3.82
食欲减退	606	7.54
体重降低	528	5.23
血葡萄糖升高 *	475	8.32
便秘	458	5.94
上腹痛	341	4.70
胰腺炎	305	21.71
腹痛	284	3.48
腹部不适	234	3.29
腹胀	232	6.42
嗳气	214	43.83
肠胃气胀	209	10.58
血葡萄糖降低	195	13.64
脱水	188	4.18
视物模糊	173	3.86
消化不良	146	4.25
糖化血红蛋白升高 *	128	12.40
视觉损害	117	2.09

注：* 为说明书中未提及的不良反应。

Note：*means adverse reactions not mentioned in the instructions.

3　讨论

本研究通过 ROR 法与 PRR 法得到的司美格鲁肽 ADE 与已知的安全信息基本一致，证实了本研究方法的可靠性，主要的 ADE 集中在胃肠系统、各类检查、代谢及营养类疾病等方面。

3.1　常见 ADE 信号分析

3.1.1　胃肠道问题　司美格鲁肽的常见不良事件为恶心、呕吐、腹泻、便秘等，胃肠道反应为最常见的不良反应，多数为轻中度。有研究显示，司美格鲁肽的胃肠道不良反应会随着用药次数而减轻，患者的耐受性增强，作为一种长效制剂，司美格鲁肽在胃肠道耐受方面优于短效制剂，提

表 4　司美格鲁肽信号强度前 20 位 ADE 信号

Tab 4　Top 20 ADE signals of smeclutide signal intensity

PT	报告例数	ROR 值
甲状腺髓样癌	9	48.31
嗳气	214	43.83
产品通信问题 *	67	41.79
食物厌恶 *	21	35.07
饥饿性酮酸中毒 *	5	29.13
糖尿病性视网膜病	39	28.63
体重减轻不足	34	24.80
视网膜病	40	22.22
胰腺炎	305	21.71
阻塞性胰腺炎	12	17.52
产品标签混淆 *	44	16.65
急性胆囊炎	31	14.82
贪食 *	22	14.43
血葡萄糖降低	195	13.64
慢性胆囊炎	8	13.28
甲状腺肿块	31	12.85
糖化血红蛋白升高 *	128	12.40
胆管结石	19	11.71
糖化血红蛋白降低	12	11.52
饿 *	45	11.47

注：* 为说明书中未提及的 ADE。

Note：*means ADE not mentioned in the instructions.

示在临床用药选择上，若患者胃肠道反应大，可考虑使用本品，以降低患者发生胃肠道不良反应的风险 [9]。

3.1.2　产品问题　在产品问题方面，产品通信问题及标签混淆的信号强度高，导致产品配发错误较多，临床上常见的 GLP-1RAs 包括艾塞那肽、度拉糖肽、利拉鲁肽和利司那肽，出现这些不良事件的原因可能是同类药品的通用名易混淆，如司美格鲁肽商品名为诺和泰，利拉鲁肽商品名为诺和力，医务人员在开药、取药等过程中易出现差错。医院药事管理中应加强易混淆药品管理。

3.1.3　胰腺的安全性　与健康人群相比，2 型糖尿病患者本身即存在胰腺炎发病率增高的风险，但仍存在少数接受 GLP-1RAs 的患者发生胰腺炎的案例报道 [10]。本研究也检测到司美格鲁肽具有胰腺炎及胰腺癌不良反应报告。一项关于利拉鲁肽的研究结果显示，胰腺炎的发生频数及信号强度均位于第二位 [11]，而本研究发现司美格鲁肽关于胰腺炎发生频数及信号强度位于第九位，提示司美格鲁肽的不良事件中胰腺炎构成比远低于利拉鲁肽。尽管目前对 GLP-1RAs 引起的胰腺炎还有争议，但现在仍然将胰腺炎作为此类药物的风险，所以若有胰腺炎病史的患者应考虑其他治疗糖尿病的方法，若用药后疑似出现胰腺炎，应立即停药，并采取相应措施。

3.1.4　甲状腺的安全性　司美格鲁肽的两种制剂在美国都收到了关于甲状腺 C 细胞肿瘤的官方警告 [12]。但这种 ADE 仅在啮齿动物上有研究，机制研究显示，啮齿类动物甲状腺 C 细胞中存在 GLP-1 受体，GLP-1 受体激动剂可以特异性作用于 GLP-1 受体激活甲状腺 C 细胞，分泌降钙素，上调降钙素基因表达，从而诱导 C 细胞增生和肿瘤形成 [13]。但因临床数据有限，尚未明确啮齿动物中甲状腺 C 细胞肿瘤是否与人类有相关性，所以人类使用本药后是否引发此种 ADE 尚不明确。本研究显示，甲状腺髓样癌虽然报告数较少，但关联性是最大的，所以临床用药上需要特别注意此种 ADE 的发生。

3.2　研究的局限性

首先，FAERS 数据来源大多数为美国、英国等欧洲国家，而亚洲国家报告的数据较少，不良反应的发生是否与国家、种族有关尚不明确，所以，研究结果可能与我国的情况有差异。其次，FAERS 数据库存在缺失、错误等情况，可能使结果出现误差。再次，本研究使用了比例失衡法中的 ROR 法、PRR 法，可能存在假阳性信号的情况。最后，虽然本研究中检测出的 ADE 信号表示司美格鲁肽与该 ADE 在统计学上具有相关性，但并不能代表它们在生物学上有因果联系，尚需进一步的临床试验进行探究 [14]。在本研究中出现的说明书中未提及的不良反应，如血葡萄糖升高、糖化血红蛋白升高，这些可能是由于糖尿病的原发疾病而引起的；而神经紧张不安、注射恐惧，这些可能是糖尿病引起的病痛或者用药给患者造成心理上的痛苦所引起的。

4　结论

本研究基于美国 FAERS 数据库，采用 ROR 法和 PRR 法对司美格鲁肽上市后的不良事件进行挖掘，结果与说明书基本一致。司美格鲁肽最常见的不良反应为恶心、呕吐、腹泻等，但大多为轻中度，且会随着用药次数而减轻。此外，对患有胰腺炎的患者应考虑使用其他抗糖尿病疗法。本研究对临床安全用药提供了一定的参考，丰富了司美格鲁肽的不良事件信息，有助于降低用药风险。

参考文献

[1]　Knudsen LB，Lau J. The discovery and development of liraglutide and semaglutide [J]. Front Endocrinol（Lausanne），2019，10：155.

[2]　中华医学会内分泌学分会，中华医学会糖尿病学分会 .

胰高糖素样肽 -1（GLP-1）受体激动剂用于治疗 2 型糖尿病的临床专家共识[J]. 中华内科杂志，2020，59（11）：836-846.
[3] Blundell J，Finlayson G，Axelsen M，et al. Effects of once-weekly semaglutide on appetite，energy intake，control of eating，food preference and body weight in subjects with obesity [J]. Diabetes Obes Metab，2017，19（9）：1242-1251.
[4] Gabery S，Salinas CG，Paulsen SJ，et al. Semaglutide lowers body weight in rodents via distributed neural pathways [J]. JCI Insight，2020，5（6）：e133429.
[5] 朱翊，封宇飞 . GLP-1 受体激动剂索马鲁肽的药理与临床评价 [J]. 临床药物治疗杂志，2018，16（3）：17-21，27.
[6] 代菲，舒丽芯，储藏，等 . 简述分析几种信号监测方法在药物不良事件中的应用[J]. 药学实践杂志，2012，30（5）：380-383.
[7] 张佳颖，常壤丹，陈力，等 . 比例失衡法在纳武利尤单抗不良反应信号挖掘中的应用[J]. 肿瘤药学，2019，9（5）：798-803.
[8] 张婧媛，白羽霞，韩晟，等 . 数据挖掘方法检测药品不良反应信号的应用研究 [J]. 药物不良反应杂志，2016，18（6）：412-416.
[9] 秦元，周俊凝，张春燕，等 . 索马鲁肽治疗 2 型糖尿病疗效与安全性的系统评价 [J]. 沈阳药科大学学报，2019，36（7）：626-641.
[10] 白云磊，党润芳 . 2 型糖尿病并发高甘油三酯血症患者发生急性胰腺炎的影响因素分析 [J]. 临床肝胆病杂志，2017，33（12）：2350-2354.
[11] 伏箫燕，陈力，陈成，等 . 基于 FAERS 数据库利拉鲁肽不良反应信号挖掘与分析 [J]. 中国医院药学杂志，2020，40（18）：1957-1961.
[12] Smits MM，Van Raalte DH. Safety of semaglutide [J]. Front Endocrinol（Lausanne），2021，12：645563.
[13] 尹华静，尹茂山，王寅，等 . 非临床甲状腺 C 细胞毒性的案例分析 [J]. 中国临床药理学杂志，2018，34（19）：2376-2379.
[14] 尚鹏辉，詹思延 . 数据挖掘在药品不良反应信号检出和分析中的应用（下）——药物流行病学研究新方法系列讲座（三）[J]. 中国药物应用与检测，2009，6（3）：187-190.

（收稿日期：2022-01-05；修回日期：2022-03-08）

基于 FAERS 数据库的低分子肝素与磺达肝癸不良事件信号挖掘研究

孔苗[1, 2, 3]，何绪成[4]，舒亚民[5]，陈力[1, 2*]（1. 四川大学华西第二医院 药学部/循证药学中心，成都　610041；2. 出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室，成都　610041；3. 三门峡市中心医院药学部，河南　三门峡　472000；4. 彭州市第二人民医院药剂科，成都　611934；5. 华中科技大学同济医学院附属同济医院药学部，武汉　430030）

摘要：目的　基于 FAERS 数据库对低分子肝素（依诺肝素、达肝素）和磺达肝癸进行不良事件信号挖掘，探索不同药物间不良反应发生的差异及其与药物的关联强度，为临床安全用药提供参考。**方法**　提取 FAERS 数据库 2016 年第一季度至 2021 年第二季度共 22 个季度的不良事件报告数据，利用报告比值比法（ROR）和综合标准法（MHRA）对依诺肝素、达肝素和磺达肝癸的不良事件报告进行信号挖掘。**结果**　三种药物共得到 406 个信号，累及 21 个不同的系统器官。依诺肝素主要集中于全身性疾病及给药部位各种反应和血管与淋巴管类疾病；达肝素主要集中于血管与淋巴管类疾病和胃肠系统疾病；磺达肝癸主要集中于血管与淋巴管类疾病和血液及淋巴系统疾病。依诺肝素、磺达肝癸与腹膜后出血事件的关联性最强，达肝素、磺达肝癸与颅内出血事件的关联性最强；未见达肝素引起过敏反应相关事件；未见磺达肝癸引起肝损伤相关事件。**结论**　本研究中依诺肝素、达肝素和磺达肝癸发生的不良事件所累及的系统疾病具有一定的差异，在患者存在相关风险疾病的情况下，可为临床选择合适的品种提供参考。

关键词：依诺肝素；达肝素；磺达肝癸；FAERS 数据库；信号；数据挖掘
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2164-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.036

基金项目：四川省科技计划项目（No. 2019JDR0163）。

作者简介：孔苗，女，硕士，主管药师，主要从事临床药学研究，email：459893009@qq.com　*__通信作者：__陈力，男，硕士，副主任药师，主要从事临床药学与医院合理用药研究，email：13674852@qq.com

FAERS-based data mining of low molecular weight heparin and fondaparinux adverse events

KONG Miao[1, 2, 3], HE Xu-cheng[4], SHU Ya-min[5], CHEN Li[1, 2*] (1. *Department of Pharmacy/Center for Evidence-Based Pharmacy*, *West China Second Hospital*, *Sichuan University*, *Chengdu* 610041; 2. *Key Laboratory of Birth Defects and Related Gynecological Diseases*, *Ministry of Education*, *Chengdu* 610041; 3. *Department of Pharmacy*, *Sanmenxia Central Hospital*, *Sanmenxia Henan* 472000; 4. *Department of Pharmacy*, *Pengzhou Second People's Hospital*, *Chengdu* 611934; 5. *Department of Pharmacy*, *Tongji Hosiptal*, *Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology*, *Wuhan* 430030)

Abstract: Objective To analyze and explore the adverse drug event differences of enoxaparin, dalteparin and fondaparinux based on FAERS database and offer a reference to clinical administration of heparin drugs. **Methods** We mined the adverse events signals of three heparin drugs using ROR and MHRA methods from the adverse events report data extracted from the FAERS database of 22 quarters from the first quarter of 2016 to the second quarter of 2021. **Results** Totally 406 signals was found from three heparin drugs which involved 21 different system organ classes. Enoxaparin mainly focused on general disorders and administration site conditions, and vascular disorders. Dalteparin mainly focused on vascular disorders and gastrointestinal disorders. Fondaparinux mainly focused on vascular disorders and blood and lymphatic system disorders. Among three heparin drugs, the correlation strength between dalteparin and retroperitoneal hemorrhage was the weakest, and the correlation strength between enoxaparin and intracranial hemorrhage was the weakest. There was no event related to allergic reaction caused by dalteparin and no event related to liver injury caused by fondaparinux. **Conclusion** The differences involved in adverse drug event of three heparin drugs are analyzed, which can offer a reference for clinical choice and promote rationality of drug use.

Key words: enoxaparin; dalteparin; fondaparinux; FAERS database; signal; data mining

肝素类药物在临床治疗中已被广泛应用于防治血栓形成或栓塞性疾病，也可用于血液透析、体外循环、导管介入术以及微血管手术等操作。低分子肝素（low molecular weight heparin，LMWH）是由普通肝素解聚制备而成的一类分子量较低的肝素类药物，平均分子量在 4.0 ～ 6.0 kD，其通过结合抗凝血酶使凝血因子Ⅹa 和Ⅱa 失活而起到抗凝作用 [1]。磺达肝癸，又叫磺达肝素，是继 LMWH 之后出现的人工合成类肝素，结构中含有肝素和 LMWH 的活性片段——戊糖结构，分子量 1700 kD，与抗凝血酶结合后可抑制凝血因子Ⅹa。该药起效迅速，半衰期 17 ～ 21 h，一日只需用药一次，药物相互作用少，且无需因个体调整剂量 [2-3]，但有研究表明磺达肝癸单独用于经皮冠状动脉介入治疗时反而增加导管内血栓和急性血栓并发症的风险 [4]，且该药目前尚无有效的拮抗剂，与 LMWH 相比两者各有优劣。LMWH 国内常见依诺肝素、达肝素和那屈肝素，上市种类较多，不同 LMWH 之间以及 LMWH 与磺达肝癸之间的治疗效果、使用风险、成本效益等差异值得关注 [5-6]。本研究基于真实世界数据，对比两种 LMWH（依诺肝素、达肝素）以及磺达肝癸在不同系统疾病中出现不良反应的差异，以期从药物安全性的角度为临床决策提供参考，优化患者个性化治疗。

本研究的数据来源于美国 FDA 建立的不良事件报告系统（FDA Adverse Event Reporting System，FAERS），那屈肝素未在美国上市，故不列入本次研究。该数据库包括了 FDA 收集的所有药物不良事件（adverse drug event，ADE）信息。医疗工作者（如医师、护士、药师）、药品生产企业人员、消费者（患者、家庭成员）均可自愿提交 ADE 报告，该数据库因其所含数据量大且免费对外开放，因此常被用于药品 ADE 信号挖掘研究 [7]。

1　数据与方法

1.1　数据提取

1.1.1　目标药物 ADE 源数据收集　下载 2016 年第一季度至 2021 年第二季度共 22 个季度的数据，

选择“个人信息记录”“不良事件记录”“药物使用记录”和“治疗结果记录”数据表，导入 MySQL 软件后进行数据处理。去除重复报告后，分别以“ENOXAPARIN”“LOVENOX”“DALTEPARIN”“FRAGMIN”“FONDAPARINUX”“ARIXTRA”为关键词进行检索，以获取以依诺肝素、达肝素、磺达肝癸为首要怀疑药物的 ADE 报告。

1.1.2　药品不良事件编码系统　FAERS 所上报的 ADE 编码基于《ICH 国际医学用语词典》（MedDRA）。MedDRA 通过 5 个等级的结构进行归属和关联，包括低位语（lowest level term，LTT）、首选语（preferred terms，PT）、高位语（high level term，HLT）、高位组语（high level group term，HLGT）、系统器官分类（system organ class，SOC）及相关中文术语[8]。ADE 报告中的术语均依据 MedDRA 中的 PT 进行编码，提取报告时采用 PT 对 ADE 报告进行限定。参照 MedDRA 23.0 版，可将 ADE 报告根据 PT 映射到对应的 SOC 和汉语语义，从而得到可作进一步计算和统计的基础数据[9]。

1.2　数据分析

1.2.1　信号挖掘方法　目前国际上存在多种成熟的 ADE 挖掘算法[10]，本研究采用的是 FDA 推荐的比例失衡法中的报告比值比法（reporting odds ratio，ROR）和英国药品和保健品管理局（medicines and healthcare products regulatory agency，MHRA）的综合标准法（简称 MHRA 法），分别计算 ROR 和比例报告比值比（proportional reporting ratio，PRR）。ROR 法和 MHRA 法具有计算简单、结果一致性好等特点[11]。此方法基于比例失衡法四格表，结合 ROR 法和 MHRA 法计算出 ROR 值和 PRR 值[10-12]。本研究的统计分析采用 Microsoft Excel 2019 软件。

1.2.2　数据筛选　当目标药物 ADE 发生的频率显著高于整个数据库的背景频率，且达到特定阈值时就产生了一个 ADE 信号。ROR 值和 PRR 值可分析不良反应与药物的关联强度，即 ROR 值和 PRR 值越大，目标药物与 ADE 的关联性越强[13]，具体标准为：ROR 法中目标药物 ADE 报告数不少于 3 例且 95% 的可信区间（95%*CI*）下限大于 1 的事件和 PRR 法中目标药物 ADE 报告数不少于 3 例且 PRR ≥ 2、c^2 ≥ 4 的事件[14]。

2　结果

2.1　纳入数据基本情况

从 2016 年第一季度至 2021 年第二季度共 22 个季度的 ADE 数据中，共获得首要怀疑药物为依诺肝素的 ADE 133 99 例次，报告数 4906 份；首要怀疑药物为达肝素的 ADE 2475 例次，报告数 784 份；首要怀疑药物为磺达肝癸的 ADE 2214 例次，报告数 801 份。每类药物对应的 ADE 报告中患者性别、年龄构成以及上报国家的基本信息见表 1。

表 1　目标药物 ADE 报告的基本信息

Tab 1　Basic information of ADE reports

信息	分类	依诺肝素	达肝素	磺达肝癸
性别	男	1643（33.49%）	281（35.84%）	200（24.97%）
	女	2438（49.69%）	406（51.79%）	295（36.83%）
	未知	825（16.82%）	97（12.37%）	306（38.2%）
年龄 / 岁	中位数	65	66	67
	平均数	61.14	62.92	64.81
年龄 / 岁	＜ 18	70（1.43%）	8（1.02%）	7（0.87%）
	18 ～ 64	1417（28.88%）	290（36.99%）	173（21.6%）
	≥ 65	1582（32.25%）	331（42.22%）	235（29.34%）
	未知	1837（37.44%）	155（19.77%）	386（48.19%）
上报国家（前六位）		美国 3377（68.83%）	英国 152（19.39%）	爱尔兰 218（27.22%）
		法国 850（17.33%）	美国 146（18.62%）	美国 170（21.22%）
		葡萄牙 78（1.59%）	加拿大 140（17.86%）	法国 143（17.85%）
		意大利 73（1.49%）	法国 92（11.73%）	意大利 113（14.11%）
		西班牙 63（1.28%）	瑞士 33（4.21%）	德国 31（3.87%）
		英国 51（1.04%）	德国 33（4.21%）	英国 30（3.75%）
合计		4906（100%）	784（100%）	801（100%）

2.2　纳入报告信号分析

根据阈值标准筛选信号，并排除产品问题、各类损伤、中毒及操作并发症、各种手术及医疗操作和社会环境等与药物无关的信号，最终获得有效信号 PT 和累及 SOC。经统计，依诺肝素 ADE 报告共挖掘得到信号 243 个（包含 5037 例次），涉及 20 个 SOC；达肝素 ADE 报告共挖掘得到信号 87 个（包含 651 例次），涉及 17 个 SOC；磺达肝癸 ADE 报告共挖掘得到信号 73 个（包含 797 例次），涉及 15 个 SOC。

2.2.1　三种药物 ADE 信号所累及的 SOC 比较　三种药物累及 SOC 与 ADE 数构成比见表 2 和图 1。三者均主要累及全身性疾病及给药部位各种反应、血管与淋巴管类疾病、胃肠系统疾病、血液及淋巴系统疾病和各类神经系统疾病等。依诺肝素累及的 SOC 种类最多，主要集中于全身性疾病及给药部位各种反应（26.03%）、血管与淋巴管类疾病（18.66%）；达肝素主要集中于血管与淋巴管类疾病（16.44%）、胃肠系统疾病（15.51%），未累及免疫系统疾病；磺达肝癸主要集中于血管与淋巴管类疾病（26.60%）、血液及淋巴系统疾病（17.44%），未累及肝胆系统疾病、代谢及营养类疾病、感染及侵染类疾病等。

表 2　三种药物累及系统信号数与不良事件数构成比

Tab 2　ADE signals and proportion in involved SOC of three heparin drugs

SOC	依诺肝素		达肝素		磺达肝癸	
	信号	不良事件例数 [*n*（%）]	信号数	不良事件例数 [*n*（%）]	信号数	不良事件例数 [*n*（%）]
全身性疾病及给药部位各种反应	32	1311（26.03）	3	11（1.69）	11	89（11.17）
血管与淋巴管类疾病	27	940（18.66）	9	107（16.44）	8	212（26.60）
胃肠系统疾病	24*	531（10.54）	14	101（15.51）	13	130（16.31）
血液及淋巴系统疾病	19	504（10.01）	7	72（11.06）	8	139（17.44）
皮肤及皮下组织类疾病	21	323（6.41）	7	27（4.15）	8	32（4.02）
各类检查	21	310（6.15）	10*	73（11.21）	2*	8（1.00）
呼吸系统、胸及纵隔疾病	11*	270（5.36）	8*	74（11.37）	4	54（6.78）
各类神经系统疾病	24	217（4.31）	8	65（9.98）	6	49（6.15）
肝胆系统疾病	10	153（3.04）	3	11（1.69）	—	—
妊娠期、产褥期及围产期状况	13*	143（2.84）	2*	8（1.23）	3*	14（1.76）
心脏器官疾病	12*	87（1.73）	3*	12（1.84）	1*	9（1.13）
各种肌肉骨骼及结缔组织疾病	5	82（1.63）	2*	15（2.3）	4*	27（3.39）
肾脏及泌尿系统疾病	7*	73（1.45）	1*	6（0.92）	1*	16（2.01）
代谢及营养类疾病	3*	31（0.62）	5*	38（5.84）	—	—
生殖系统及乳腺疾病	3*	18（0.36）	1*	3（0.46）	—	—
感染及侵染类疾病	4*	14（0.28）	2*	14（2.15）	—	—
免疫系统疾病	3	11（0.22）	—	—	2	12（1.51）
良性、恶性及性质不明的肿瘤	2*	9（0.18）	2*	14（2.15）	1*	3（0.38）
各种先天性家族性遗传性疾病	1*	3（0.06）	—	—	—	—
内分泌系统疾病	1*	7（0.14）	—	—	—	—
眼器官疾病	—	—	—	—	1*	3（0.38）
共计	243	5037（100）	87	651（100）	73	797（100）

注（Note）：* 表示说明书中未提及的 SOC（*means SOC not mentioned in the instruction）；“—”表示本研究未挖掘到信号的 SOC（means SOC not detected in the study）。

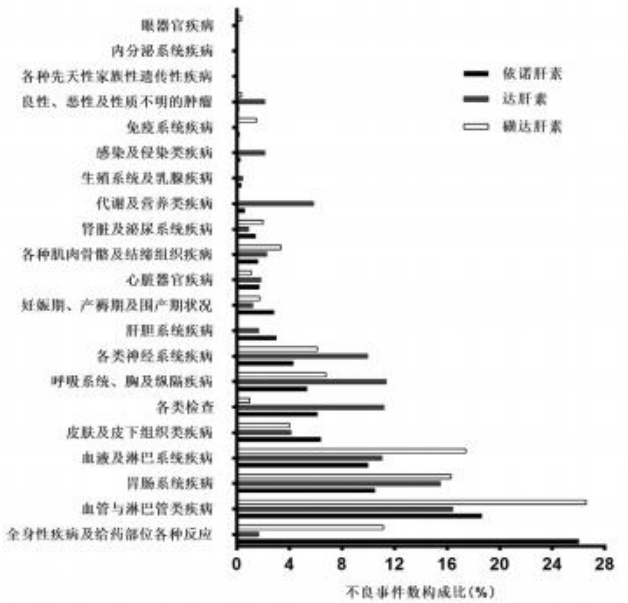

图 1　三种药物各系统不良事件数构成比分布

Fig 1　ADE proportion in involved SOC of three heparin drugs

2.2.2　三种药物的 ADE 信号比较　三种药物 ADE 报告数量排名前 20 位以及 ADE 信号强度排名前 20 位的 PT 分布如表 3、4 所示。

3　讨论

3.1　三种药物 ADE 发生的人口学特点

本次研究所纳入的三种药物的 ADE 报告数量中，依诺肝素最多，其次为磺达肝癸、达肝素。三种药物的 ADE 报告中患者的年龄段分布相似，平均年龄均在 60 多岁，报告国家主要集中于美国、法国、英国、意大利、德国。在性别方面，三种药物均呈现出女性不良事件发生比例多于男性的现象，这提示肝素类药物的不良反应可能存在性别相关性。一项研究观察到 290 名接受了心脏或骨科手术的患者中，术后发生肝素诱导的血小板减少症（heparin induced thrombocytopenia，HIT）的女性比例更高，该研究同时通过一项普通肝素和 LMWH 的随机对照试验研究 HIT 患者与性别的关系，最终得出结论为女性患 HIT 的风险更大，体现了肝素类药物不良反应的性别相关性 [15]，但此研究仅涉及 HIT 这一种不良反应，其他不良反应是否存在性别相关性有待继续研究。

3.2　三种药物 ADE 累及 SOC 及关联性比较

三种药物共同累及的 SOC 及其包含的主要 PT 分别为全身性疾病及给药部位各种反应（注射部位痛、注射部位青肿、装置相关损伤）、血液及淋巴系统疾病（贫血、血红蛋白减少、血小板减少）、血管与淋巴管类疾病（出血、血肿、出血性休克）、各类神经系统疾病（颅内出血、大脑出血、大脑血肿）、胃肠系统疾病（胃肠出血、腹壁血肿、黑便）。引起给药部位反应与皮下注射给

表 3　三种药物累 ADE 报告数前 20 位的 PT 比较

Tab 3　ADE reports in the top 20 of PT's frequency of three heparin drugs

依诺肝素		达肝素		磺达肝癸	
PT	报告数（ROR 值）	PT	报告数（ROR 值）	PT	报告数（ROR 值）
注射部位痛	289（5.12）	肺栓塞	32（11.61）	血肿	79（6.62）
注射部位青肿	281（17.58）	胃肠出血	28（7.51）	贫血	69（84.21）
出血	224（10.19）	血红蛋白降低 *	25（7.25）	出血	41（11.04）
装置相关损伤	201（51.4）	出血	24（6.69）	肺栓塞	35（11.44）
血肿	163（26.66）	贫血 *	22（3.38）	出血性休克	34（12.47）
贫血	152（3.75）	大脑出血	20（14.63）	大脑出血	25（103.78）
肺栓塞	123（7.04）	深静脉血栓形成	20（10.82）	药物相互作用 *	24（3.23）
注射部位肿块	122（12.5）	肝素诱导性血小板减少症	18（158.32）	血小板减少症	24（18.01）
血栓形成	115（6.55）	高钾血症	17（13.64）	黑便	23（4.1）
注射部位出血	105（6.66）	血栓形成	17（6.03）	肝素诱导性血小板减少症	22（6.24）
血红蛋白降低	103（4.73）	血肿	16（15.93）	血栓形成	21（27.2）
血小板减少症	93（3.91）	血小板减少症	16（4.21）	深静脉血栓形成	19（190.95）
低血压 *	92（2.03）	鼻衄	12（3.95）	呕血	18（3.2）
出血性休克	86（42.43）	黑便	12（14.28）	肌肉出血	17（10.12）
腹壁血肿	82（147.95）	上消化道出血	11（12.94）	直肠出血	17（7.33）
深静脉血栓形成	80（6.87）	脑血管意外 *	10（2.05）	腹壁血肿	16（10.05）
肝素诱导性血小板减少症	73（106.91）	呕血	10（11.08）	胃肠出血	16（19.73）
胃肠出血	70（2.94）	低钠血症	10（4.96）	血尿症 *	16（131.44）
斑丘疹	60（12.55）	血小板计数降低	10（2.69）	鼻衄	11（10.1）
注射部位血肿	48（70.26）	脓毒症 *	10（2.42）	注射部位青肿	11（165.05）

注（Note）：* 表示说明书中未提及的 ADE（*means ADE not mentioned in the instruction）。

表 4　三种药物累 ADE 报告强度前 20 位的 PT 比较

Tab 4　ADE reports in the top 20 of PT's signal strength of three heparin drugs

依诺肝素		达肝素		磺达肝癸	
PT	ROR 值（报告数）	PT	ROR 值（报告数）	PT	ROR 值（报告数）
抗 X 因子活性增加	565.49（8）	肝素诱导性血小板减少症	158.32（18）	肝素诱导性血小板减少症	190.95（22）
肝素诱导血小板减少试验阳性	340.11（7）	肌肉出血	69.95（9）	腹内血肿	190.32（9）
腹壁出血	175.22（8）	大脑血肿	50.4（7）	腹壁血肿	165.05（16）
腹壁血肿	147.95（82）	腹膜后出血	46.41（4）	肌肉出血	131.44（17）
大疱性出血性皮肤病	145.64（3）	腹内出血	46.25（4）	出血性休克	103.78（34）
不安全的胎儿心率波形 *	141.37（8）	腹壁血肿	41（4）	腹膜后血肿	96.33（8）
盆腔血肿	110.43（11）	卵巢过度刺激综合征 *	37.97（3）	自发性血肿	89.25（3）
胸壁血肿	109.02（11）	活化部分凝血活酶时间延长	37.18（4）	浅表性血栓性静脉炎	84.38（8）
肝素诱导性血小板减少症	106.91（73）	腹膜后血肿	36.45（3）	血肿	84.21（79）
蛋白 S 缺乏症 *	97.09（3）	出血性休克	30.02（10）	腹膜后出血	80.07（7）
腹内血肿	92.65（26）	血小板增多症	29.2（4）	交叉敏感反应	79.22（9）
腹膜后血肿	90.45（44）	低血容量性休克	20.98（4）	肌肉血肿	63.95（3）
腹膜后出血	88.02（45）	失血性贫血	19.04（5）	动脉出血	60.95（3）
肌肉血肿	76.14（21）	静脉炎	18.79（3）	低纤维蛋白原血症 *	57.99（3）
盆腔出血	72.82（3）	瘀斑	16.97（4）	抗磷脂综合征 *	56.96（3）
注射部位血肿	70.26（48）	心脏压塞 *	16.79（3）	注射部位血肿	51.67（6）
插管部位血肿	69.06（4）	血肿	15.93（16）	纤维蛋白 D- 二聚体升高 *	46.79（5）
乳房血肿 *	67.56（4）	胆汁淤积性肝炎 *	15.44（3）	低血容量性休克	36.13（7）
大脑动脉闭塞 *	57.82（13）	妊娠糖尿病 *	14.81（3）	腹膜出血	35.06（3）
注射部位血栓形成	56.15（3）	大脑出血	14.63（20）	小肠出血	34.10（3）

注（Note）：* 表示说明书中未提及的 ADE（*means ADE not mentioned in the instruction）。

药有关，皮下注射可能引起药液渗入毛细血管和刺激局部神经，出现皮下出血、瘀斑和疼痛，注射装置制备工艺、操作手法的差异也可影响这类 ADE 的发生风险 [16-17]，三种药物以依诺肝素 ADE 上报量最多。血液系统发生贫血、血红蛋白减少不排除为药物引起出血后所致。后三个 SOC 的主要 PT 均为出血相关事件。以上 ADE 与药品说明书收录的常见不良反应基本相同，说明本研究具有一定的可信度。其他上报量较多的 PT 如肺栓塞、深静脉血栓形成、血小板减少等无法与

原发疾病区别，在此不作讨论。

对比三种药物 ADE 所累及系统的差异，达肝素未累及免疫系统疾病，而依诺肝素和磺达肝癸累及该系统的 PT 包括交叉敏感反应、Ⅳ型超敏反应、赋形剂反应等过敏反应。检索相关文献发现，不同低分子肝素制剂的致敏性差异仍未有明确结论。起初有学者认为肝素分子量大小影响其致敏性，但后续研究推翻了此观点 [18-19]。一项系统评价虽然对不同 LWMH 和磺达肝癸引起迟发性过敏相关皮肤损害的因素进行分析，发现那屈肝素发生迟发性过敏的风险最高，但未统计到达肝素、磺达肝癸的数据 [20]，因此仍需要大规模的随机对照试验来比较不同 LMWH 以及磺达肝癸的致敏潜力。

肝胆系统疾病的不良事件数构成比分别为依诺肝素 3.04%，达肝素 1.69%，磺达肝癸 0%。依诺肝素和达肝素在该系统的主要 PT 有肝细胞损伤、肝损伤、胆汁淤积性肝炎，检索三种药物引起转氨酶升高的报告数分别为依诺肝素 23 例、达肝素 5 例、磺达肝癸 0 例。LMWH 主要在肝脏经脱硫和 / 或解聚作用代谢，而磺达肝癸约有 64% ～ 77% 通过肾脏以原形药物排泄 [21]，代谢途径不同可能是导致 LMWH 和磺达肝癸肝毒性不同的原因之一。

出血是肝素类药物最需要关注的 ADE。出血患者接受抗凝治疗的获益与其出血风险需要权衡，磺达肝癸因无解救剂逆转其效应，不被推荐用于出血高风险患者，LWMH 通常作为长期抗凝药治疗早期的桥接治疗，使用周期短且可用鱼精蛋白解救 [22]，被认为安全性较高，但仍有多起案例报道 LWMH 诱发患者自发性出血并导致死亡 [23]。本研究发现，依诺肝素、磺达肝癸与腹壁血肿、腹膜后出血、腹膜后血肿的关联性强于达肝素，达肝素、磺达肝癸与大脑出血、颅内出血的关联性强于依诺肝素。腹膜后出血和颅内出血因发病率和致死率高，被认为是重大出血事件，本研究为出血患者制订个体化 LMWH 治疗方案提供参考。

HIT 是肝素类药物引起的少见但非常严重的 ADE，属于特异性自身免疫性疾病，血小板释放的血小板第 4 因子（PF_4）与肝素结合形成复合物（PF_4-H），刺激机体免疫细胞产生应答，释放抗 PF_4-H 抗体（即 HIT 抗体），该抗体可在血液中存留 50 ～ 90 d，对血小板及内皮细胞造成损伤，以血小板减少及血栓形成为主要表现 [24-25]。本研究纳入的 HIT 相关报告分别为依诺肝素 73 例、达肝素 18 例、磺达肝癸 22 例，三种药物与 HIT 的关联度差异不大。但已有数据显示 LMWH 引发 HIT 的风险在 0.1% ～ 1.0%，而磺达肝癸只含有与抗凝血酶结合的戊糖结构，不具抗原性，理论上不与 PF_4 结合，无诱发 HIT 抗体的风险 [26-27]。我国 2017 版《肝素诱导的血小板减少症中国专家共识》[28] 提及，磺达肝癸对于既往有 HIT 病史的患者可能是安全的，即使证据不足也推荐对发生 HIT 的患者使用磺达肝癸治疗。故磺达肝癸引发 HIT 的风险需要更多的临床数据来证明。

3.3 研究方法的局限性

本研究通过对 FAERS 数据库中大量 ADE 报告的信号挖掘，能反映药品上市后的安全性，但其局限性在于：该数据库属于自发呈报系统，提交报告时 FDA 未严格要求证明 ADE 和药品之间的因果关系，可能会造成报告结果的随意性；填写 ADE 信息受不同报告者的主观判断影响，同一 ADE 来源于不同报告者时可能采用不同描述，即使通过术语标准化后仍无法消除，导致计算存在误差；上报国家多数来自于欧美国家，亚洲地区报告偏少，数据存在人种差异，不一定能真实反映中国用药人群的 ADE 情况。此外，ROR 和 MHRA 法虽然灵敏度高，但样本量大时容易出现假阳性信号，而且比例失衡法计算得出的关联性仅代表 ADE 与药物在统计学上有关联，并不意味着生物学上有必然的因果关系，其关联性仍需通过临床研究来进一步评估，但本研究经计算得出的结论仍可为未来展开药物 ADE 相关的基础研究时，提供一定的研究方向和思路。

4 结论

本研究借助 FAERS 数据库挖掘依诺肝素、达肝素和磺达肝癸的 ADE 信号，发现三者存在一定差异：在出血事件方面，依诺肝素、磺达肝癸与胃肠系统出血（尤其腹膜后出血事件）的关联性最强，达肝素、磺达肝癸与神经系统出血（尤其颅内出血事件）的关联性最强，提示对于存在腹膜出血倾向的器官损伤（如腹膜后肿瘤切除术后）的患者可优先考虑达肝素，对于近期有颅内出血史、脑手术史以及有脑出血高风险的患者，可优先考虑依诺肝素；在非出血事件方面，未见达肝素引起过敏反应相关事件，但由于 LMWH 和磺达肝癸的致敏机制及差异尚未明确，临床使用这类药物时仍需根据患者的个体风险进行选择；未见磺达肝癸引起肝损伤相关事件，患者出现肝功能损伤时可优先考虑该药。这些都可为存在相关风险疾病的患者在肝素类药物的选择上提供一定参考，以降低不良反应的发生，促进临床合理用药。

参考文献

[1] Frydman A. Low molecular weight heparins：an overview of their pharmacodynamics，pharmacokinetics and metabolism in humans [J]. Haemostasis，1996，26（Suppl 2）：24-38.

[2] Rupprecht HJ，Blank R. Clinical pharmacology of direct and indirect factor Ⅹa inhibitors [J]. Drugs，2010，70（16）：2153-2170.

[3] Donat F，Duret JP，Santoni A，et al. The pharmacokinetics of fondaparinux sodium in healthy volunteers [J]. Clin Pharmacokinet，2002，41（Suppl 2）：1-9.

[4] Mehta SR，Granger CB，Eikelboom JW，et al. Efficacy and safety of fondaparinux versus enoxaparin in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention：results from the OASIS-5 trial [J]. J Am Coll Cardiol，2007，50（18）：1742-1751.

[5] Lassen MR，Bauer KA，Eriksson BI，et al. Postoperative fondaparinux versus preoperative enoxaparin for prevention of venous thromboembolism in elective hip-replacement surgery：a randomised double-blind comparison [J]. Lancet，2002，359（9319）：1715-1720.

[6] Agnelli G，Bergqvist D，Cohen AT，et al. Randomized clinical trial of postoperative fondaparinux versus perioperative dalteparin for prevention of venous thromboembolism in high-risk abdominal surgery [J]. Br J Surg，2005，92（10）：1212-1220.

[7] Sakaeda T，Tamon A，Kadoyama K，et al. Data mining of the public version of the FDA adverse event reporting system [J]. Int J Med Sci，2013，10（7）：796-803.

[8] 吴斌，吴逢波，何治尧，等 . 基于美国 FDA 不良事件报告系统的硫唑嘌呤相关死亡事件数据挖掘研究 [J]. 中国药房，2019，30（21）：2993-2997.

[9] 黄佳，钟薇，王浩，等 . 基于美国 FAERS 数据库的恩美曲妥珠单抗不良事件信号挖掘与分析 [J]. 中国医院药学杂志，2022，42（1）：49-53.

[10] 任经天，王胜锋，侯永芳，等 . 常用药品不良反应信号检测方法介绍 [J]. 中国药物警戒，2011，8（5）：294-298.

[11] 吴圆圆，郑淑芬，钟诗龙 . 基于美国 FDA 不良事件数据库的利伐沙班不良反应信号挖掘 [J]. 中国药房，2021，32（14）：1764-1769.

[12] 刘卢路，章琦蕴芮，王志远，等 . 基于真实世界数据的硝苯地平不良反应信号挖掘研究 [J]. 中南药学，2019，17（7）：997-1000.

[13] 周健，陈力. 索拉非尼的不良反应信号挖掘 [J]. 中国医药导报，2018，15（14）：111-115.

[14] 张婧媛，白羽霞，韩晟，等 . 数据挖掘方法检测药品不良反应信号的应用研究 [J]. 药物不良反应杂志，2016，18（6）：412-416.

[15] Warkentin TE，Sheppard JA，Sigouin CS，et al. Gender imbalance and risk factor interactions in heparin-induced thrombocytopenia [J]. Blood，2006，108（9）：2937-2941.

[16] 张义静，邹蓉蓉，孙丽 . 腹壁改良式皮下注射低分子肝素钠按压时间对皮下出血的影响 [J]. 现代医学，2017，45（9）：1347-1349.

[17] 胡彩珍，余有，周凯潼，等 . 皮下注射低分子肝素钠注射液的不良反应及护理要点观察 [J]. 实用医技杂志，2021，28（9）：1168-1170.

[18] Ludwig RJ，Schindewolf M，Alban S，et al. Molecular weight determines the frequency of delayed type hypersensitivity reactions to heparin and synthetic oligosaccharides [J]. Thromb Haemost，2005，94（6）：1265-1269.

[19] Schindewolf M，Scheuermann J，Kroll H，et al. Low allergenic potential with fondaparinux：results of a prospective investigation [J]. Mayo Clin Proc，2010，85（10）：913-919.

[20] Schindewolf M，Recke A，Zillikens D，et al. Nadroparin carries a potentially high risk of inducing cutaneous delayed-type hypersensitivity responses [J]. Contact Dermatitis，2017，77（1）：35-41.

[21] Lieu C，Shi J，Donat F，et al. Fondaparinux sodium is not metabolised in mammalian liver fractions and does not inhibit cytochrome P450-mediated metabolism of concomitant drugs [J]. Clin Pharmacokinet，2002，41（Suppl 2）：19-26.

[22] Frontera JA，Lewin JJ，Rabinstein AA，et al. Guideline for reversal of antithrombotics in intracranial hemorrhage：a statement for healthcare professionals from the neurocritical care society and society of critical care medicine [J]. Neurocrit Care，2016，24（1）：6-46.

[23] Salemis NS，Oikonomakis I，Lagoudianakis E，et al. Enoxaparin-induced spontaneous massive retroperitoneal hematoma with fatal outcome [J]. Am J Emerg Med，2014，32（12）：1559. e1-3.

[24] 赵永强 . 肝素诱导的血小板减少症诊断与治疗常见问题 [J]. 中国实用内科杂志，2013，33（5）：366-368.

[25] Marchetti M，Zermatten MG，Bertaggia CD，et al. Heparin-induced thrombocytopenia：a review of new concepts in pathogenesis，diagnosis，and management [J]. J Clin Med，2021，10（4）：683.

[26] Papadopoulos S，Flynn JD，Lewis DA. Fondaparinux as a treatment option for heparin-induced thrombocytopenia [J]. Pharmacotherapy，2007，27（6）：921-926.

[27] Bhatt VR，Aryal MR，Shrestha R，et al. Fondaparinux-associated heparin-induced thrombocytopenia [J]. Eur J Haematol，2013，91（5）：437-441.

[28] 中国医师协会心血管内科医师分会血栓防治专业委员会，《中华医学杂志》编辑委员会 . 肝素诱导的血小板减少症中国专家共识（2017）[J]. 中华医学杂志，2018，98（6）：408-417.

（收稿日期：2022-02-05；修回日期：2022-04-05）

医院药学

药师干预对 2 型糖尿病患者临床结局影响的 meta 分析

李杰，陈晓菲，张卫，施晓卉，倪磊，蒋志涛*，徐子寒，柳春娣（张家港市中医医院药学部，江苏　张家港　215600）

摘要：目的　系统评价药师干预对 2 型糖尿病患者临床结局的影响。**方法**　检索 PubMed、Cochrane Library、Web of Science、Embase、知网、万方、维普数据库，时间为 2000 年 1 月—2021 年 8 月。搜索药师干预影响 2 型糖尿病患者临床结局的随机对照试验，提取资料并用 RevMan 5.4 版软件分析。**结果**　共纳入 20 项研究，包含 2818 名患者。结果显示，与对照组相比，药师干预能显著降低患者的糖化血红蛋白 [MD = 0.97，95%CI =（0.78，1.17），P < 0.000 01]、空腹血糖 [MD = 1.50，95%CI =（0.93，2.08），P < 0.000 01]、收缩压 [MD = 8.52，95%CI =（4.84，12.21），P < 0.000 01]、舒张压 [MD = 2.51，95%CI =（0.78，4.25），P = 0.005]、总胆固醇 [MD = 0.37，95%CI =（0.09，0.65），P = 0.009] 和低密度脂蛋白胆固醇 [MD = 0.20，95%CI =（0.12，0.28），P < 0.000 01]；但对三酰甘油 [MD = 0.06，95%CI =（－0.01，0.13），P = 0.11]、高密度脂蛋白胆固醇 [MD = 0.00，95%CI =（－0.03，0.03），P = 1.00]、体质量指数 [MD = 0.16，95%CI =（－0.03，0.35），P = 0.11] 的改善不明显；患者血糖达标率 [OR = 0.31，95%CI =（0.23，0.41），P < 0.000 01] 及用药依从性明显提升。**结论**　在现有证据下，药师干预能够明显改善 2 型糖尿病患者的血糖、血压、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇控制水平及用药依从性，但对三酰甘油、高密度脂蛋白胆固醇、体质量指数的改善并不明显。

关键词：药师；2 型糖尿病；干预；meta 分析
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2171-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.037

Meta-analysis of the influence of pharmacist intervention on clinical outcomes of patients with type 2 diabetes

LI Jie, CHEN Xiao-fei, ZHANG Wei, SHI Xiao-hui, NI Lei, JIANG Zhi-tao*, XU Zi-han, LIU Chun-di (*Department of Pharmacy, Zhangjiagang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhangjiagang Jiangsu* 215600)

Abstract: Objective　To systematically evaluate the effect of pharmacist intervention on the clinical outcomes of patients with type 2 diabetes. **Methods**　We searched PubMed, Cochrane Library, Web of Science, Embase, CNKI, Wanfang and VIP databases from January 2000 to August 2021. We retrieved randomized controlled trials of pharmacist intervention on clinical outcomes of patients with type 2 diabetes, extract the data and analyze with RevMan 5.4 software. **Results**　Twenty studies were included, involving 2818 patients. Compared with the control group, pharmacist intervention significantly reduced the glycosylated hemoglobin [MD = 0.97, 95%CI = (0.78, 1.17), P < 0.000 01], fasting blood glucose [MD = 1.50, 95%CI = (0.93, 2.08), P < 0.000 01], systolic blood pressure [MD = 8.52, 95%CI = (4.84, 12.21), P < 0.000 01], diastolic blood pressure [MD = 2.51, 95%CI = (0.78, 4.25), P = 0.005], total cholesterol [MD = 0.37, 95%CI = (0.09, 0.65), P =

基金项目：江苏省药学会——天晴医院药学科研项目（No. Q202056）。
作者简介：李杰，男，硕士，主管药师，主要从事临床药学工作，email：yztalijie@163.com　*__通信作者：__蒋志涛，男，硕士，副主任药师，主要从事医院药学工作，email：jzt880521@126.com

0.009] and low-density lipoprotein cholesterol [MD = 0.20, 95%CI = (0.12, 0.28), P < 0.000 01]; But for triglycerides [MD = 0.06, 95%CI = (− 0.01, 0.13), P = 0.11], high-density lipoprotein cholesterol [MD = 0.00, 95%CI = (− 0.03, 0.03), P = 1.00], and body mass index [MD = 0.16, 95%CI = (− 0.03, 0.35), P = 0.11], the improvement was not obvious without statistical difference. In addition, the blood glucose compliance rate of patients in the pharmacist intervention group [OR = 0.31, 95%CI = (0.23, 0.41), P < 0.000 01] and medication compliance were increased significantly. **Conclusion** Based on the existing evidence, pharmacist intervention can significantly improve the blood glucose, blood pressure, total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol control level and medication compliance of patients with type 2 diabetes, but it does not significantly improve triglycerides, high-density lipoprotein cholesterol, and body mass index.

Key words: pharmacist; type 2 diabetes; intervention; meta-analysis

2 型糖尿病（type 2 diabetes patients，T2DM）是一组因胰岛素分泌不足或胰岛素抵抗，以高血糖为特征的代谢性疾病。2019 年我国的糖尿病人数已达到 1.164 亿，位居全球第一 [1]。糖尿病及并其发症不仅降低了患者生活质量，增加了医疗费用支出，更给我国的卫生资源带来了巨大压力 [2]。鉴于糖尿病的疾病特征，最新版中国 2 型糖尿病防治指南指出以医师、护师、营养师、运动师为主的多学科管理团队能够从多维度有效控制血糖并延缓并发症发生，但并未关注药师的作用 [3]。多项研究显示，药师可通过解决患者的药物相关问题（drug related problems，DRP）、强化患者关于糖尿病知识的记忆、提高患者用药依从性等方式，改变患者血糖控制不佳的状况 [4-5]。本文旨在评价国内外药师对 2 型糖尿病患者进行干预的临床疗效，从而评价药师作为多学科管理团队中的一员在糖尿病管理中发挥的重要作用。

1 资料与方法

1.1 检索策略

计算机检索 PubMed、Cochrane Library、Web of Science、Embase、知网、万方、维普等数据库。检索时限均为 2000 年 1 月—2021 年 8 月。中文检索词为“药师”“临床药师”“2 型糖尿病”“干预”“管理”；英文检索词为“Pharmacist”“Clinical Pharmacist”“Diabetes type 2”“Diabetes mellitus type 2”“Type 2 diabetes”“Intervention”“Management”。

1.2 纳入标准

① 研究对象：确诊 2 型糖尿病的患者；② 研究类型：随机对照试验（randomized controlled trial，RCT）；③ 主要结局指标：糖化血红蛋白（HbA1c）；④ 次要结局指标：空腹血糖（FBG）、血糖达标率（HbA1c < 7%）、收缩压（SBP）、舒张压（DBP）、总胆固醇（TC）、三酰甘油（TG）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）、体质量指数（BMI）、用药依从性等。

1.3 排除标准

① 非随机对照试验；② 未报告结局指标的研究；③ 非英文、非中文发表的研究；④ 综述、回顾性研究、病例报告、临床试验研究；⑤ 无法获取原文的研究；⑥ 妊娠糖尿病或糖尿病合并妊娠患者。

1.4 文献筛选与资料提取

由两名研究者检索文献并进行筛选，排除不相关文献，剩余文献进行全文阅读并进一步排除不符合纳入标准的文献。筛选完成后由两名研究者各自对相关资料进行提取，提取资料包括纳入研究的基本信息、各研究的基线特征、干预措施以及结局指标等，并交叉核对结果。如出现意见不统一，与第三位研究者共同商议并达成共识。

1.5 纳入研究的偏倚风险分析

采用 Cochrane 手册推荐的 RCT 偏倚风险评价工具进行质量评价。由两名研究者独立进行，如出现意见不统一，与第三位研究者共同商议并达成共识。

1.6 统计学方法

采用 RevMan 5.4 版软件进行 meta 分析。采用 I^2 检验进行异质性分析，对异质性小的研究（$P > 0.1$，$I^2 \leqslant 50\%$）采用固定效应模型；对异质性较大的研究（$P \leqslant 0.1$，$I^2 > 50\%$）先通过亚组分析探究异质性来源，若异质性对结果无实质性影响，则采用随机效应模型。连续型变量采用均数差（mean difference，MD），二分类变量采用比值比（odds ratio，OR）表示合并效应量。区

间估计采用 95% 置信区间（confidence interval，*CI*），$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。对无法进行 meta 分析的结局指标进行描述性统计。采用 Stata 软件分析发表偏倚和敏感性，Egger’s 和 Begg’s 检验方法检测发表偏倚。

2　结果

2.1　文献筛选结果

根据制订的检索策略共获得文献 1567 篇，包括 295 篇中文文献、1272 篇英文文献，剔除重复文献后得 1181 篇。通过阅读标题、摘要和全文，排除不符合纳入标准的文献，最终纳入文献 20 篇，均为 RCT 研究。文献筛选流程见图 1。

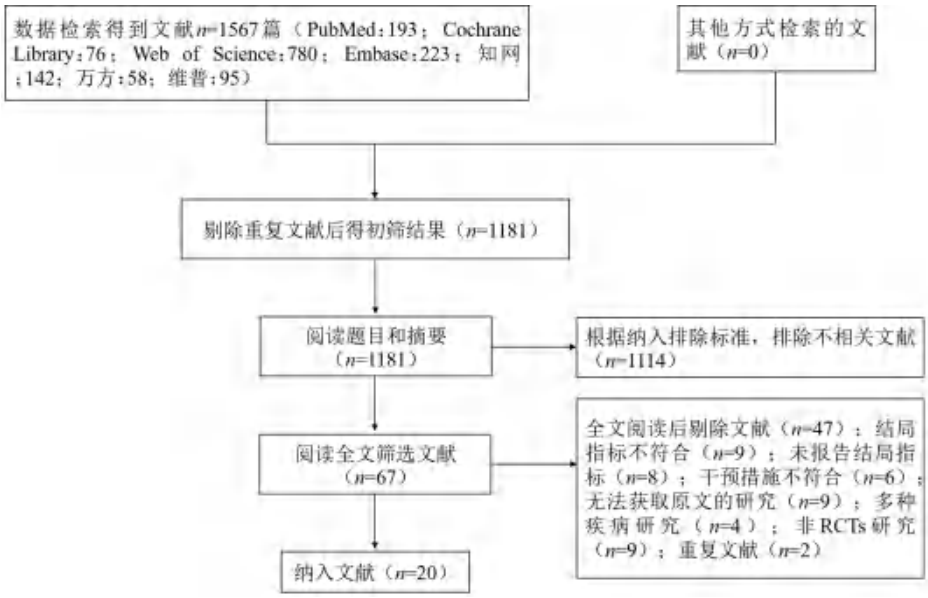

图 1　文献筛选流程图

Fig 1　Literature screening process

2.2　纳入文献的基本特征与质量评价

最终纳入文献 20 篇 [6-25]，文献基本特征见表 1，均为 RCT，研究样本量 65 ～ 322 例，干预时长从 5 ～ 22 个月。偏倚风险质量评估结果见图 2，20 个研究的随机化方法描述均较为清楚且报道了失访和退出情况，8 个研究描述了分配方案隐藏，20 个研究的实施偏倚风险较高，数据资料均较为完整，无选择性报告，其他偏倚来源尚不清楚。纳入文献质量偏上。

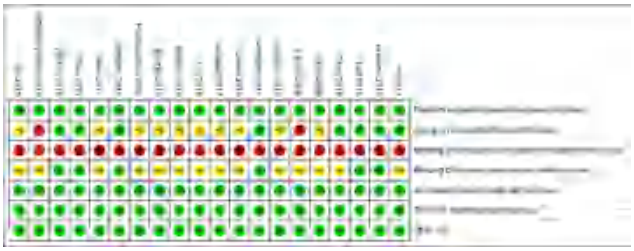

图 2　纳入文献的质量评价

Fig 2　Quality evaluation of included literature

2.3　干预措施

药师采用的干预措施包括：患者教育和咨询、定期随访、药物治疗方案优化（其他医护人员讨论制订修改药物治疗方案）、提供药物配送服务、识别并帮助解决 DRP 等，见表 2。其中，患者教育和咨询、定期随访是最常见的干预措施。

2.4　Meta 分析结果

2.4.1　HbA1c 下降值　共纳入 20 项研究 [6-25]，各研究间异质性显著（$I^2 = 78\%$，$P < 0.000\ 01$）。分析 20 个研究的纳入标准，按照患者基线 HbA1c 不同进行亚组分析，采用随机效应模型分析，结果见图 3。药师干预组降低 HbA1c 的幅度更大 [*MD* = 0.97，95%*CI* =（0.78，1.17），$P < 0.000\ 01$]。亚组分析显示，对基线 HbA1c ＞ 8% 组的患者，药师干预组 HbA1c 的降低幅度比对照组更大 [*MD* = 1.30，95%*CI* =（0.75，1.85），$P < 0.000\ 01$]；对基线 HbA1c ＞ 7% 组的患者，药师干预组降低 HbA1c 的效果优于对照组 [*MD* = 0.80，95%*CI* =（0.52，1.08），$P < 0.000\ 01$]；纳入标准未对 HbA1c 作要求组，药师干预组降低 HbA1c 的效果仍优于对照组 [*MD* = 1.00，95%*CI* =（0.60，1.39），$P < 0.000\ 01$]。对此 meta 分析进行敏感性分析，将纳入的 20 个研究逐一剔除后，虽然 *MD* 值及 95%*CI* 有细小变化，但并没有产生质的变化，对结论影响不大，提示结果较为可靠。

表 1　纳入文献基本特征 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Characteristics of the included studies ($\bar{x}\pm s$)

纳入研究	对照 / 干预		研究对象	干预时长及随访频率	结局指标
	样本量	年龄			
Ting 2021[6]	63/68	52.2±11.38/51.5±11.27	＞ 18 岁，2 型糖尿病患者，HbA1c ＞ 7%，至少服用一种降糖药	共 1 年，第 1、3、6、12 个月随访	(1)(11)
Javaid 2019[7]	52/83	50.4±7.7/50.3±10.5	＞ 18 岁，2 型糖尿病患者，HbA1c ＞ 8%	共 9 个月，每 3 个月随访 1 次	(1)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)
Michiels 2019[8]	162/160	66.3±10.9/65.1±11.4	＞ 18 岁，2 型糖尿病患者，HbA1c ＞ 7%	共 1 年，随访 7 次，前 6 个月每月随访 1 次，第 12 个月随访 1 次	(1)(3)(4)(5)(8)
Goruntla 2019[9]	155/151	59.2±8.7/57.4±8.9	18 ～ 75 岁，2 型糖尿病患者，使用口服降糖药或者胰岛素	共 1 年，第 3、6 个月随访 1 次	(1)(4)(7)(8)(10)(11)
Withidpanyawong 2019[10]	92/88	58.13±10.10/60.53±10.71	＞ 30 岁，2 型糖尿病患者，HbA1c ＞ 7%，使用口服降糖药	共 9 个月，每 3 个月随访	(1)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)
Sarayani 2018[11]	44/40	56.7±11.5/53.4±10.3	2 型糖尿病患者，HbA1c ＞ 7%，使用口服降糖药	共 16 次电话随访，第 3、9 个月记录指标	(1)(6)(7)(8)(9)(11)
Ayadurai 2018[12]	65/49	55±8.9/58±10	＞ 21 岁，2 型糖尿病患者，HbA1c ＞ 8% 或 FBG ＞ 7 mmol•L^{-1} 或餐后 2 h 血糖＞ 8.5 mmol • L^{-1}	共 8 个月，随访 5 次	(1)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)
Korcegez 2017[13]	77/75	62.22±9.54/61.80±10.38	2 型糖尿病患者，HbA1c ＞ 7%，至少使用一种降糖药	共 22 个月，随访 12 个月，每月 1 次	(1)(2)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)
Shao 2017[14]	99/100	59.20±10.34/58.86±10.59	＞ 18 岁，确诊 3 个月以上的 2 型糖尿病患者，至少使用一种降糖药	共 6 个月，每个月随访 1 次	(1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)
Lim 2016[15]	37/39	55.62±1.49/57.00±1.56	2 型糖尿病患者，HbA1c ＞ 8%	共 1 年，随访 8 次	(1)(2)(4)(5)(10)(11)
Chen 2016[16]	50/50	72.16±6.6/72.76±5.9	≥ 65 岁，2 型糖尿病患者，HbA1c ＞ 9%	共 8 个月，每个月随访 1 次	(1)
Butt 2016[17]	33/33	57.12±10.78/57.42±7.17	2 型糖尿病患者，HbA1c ＞ 8%	共 6 个月，第 3、6 个月随访	(1)(2)(3)(6)(7)(8)(9)(10)(11)
Jahangard 2015[18]	40/45	55.9±8.7/57.3±8.6	2 型糖尿病患者，HbA1c ＞ 7%，使用口服降糖药（胰岛素排除）	共 5 个月，每个月随访 1 次	(1)(4)(5)(10)(11)
Xin 2015[19]	113/114	59.2±14.2/58.8±14.4	≥ 18 岁，2 型糖尿病患者，过去 18 个月未使用过胰岛素	共 12 个月，每个月随访 1 次	(1)(3)(11)
Wishah 2015[20]	54/52	53.2±11.2/52.9±9.6	≥ 18 岁，2 型糖尿病患者，HbA1c ＞ 6.5% 的初诊患者，或 HbA1c ＞ 7% 的确诊患者	共 6 个月，第 3、6 个月随访	(1)(2)(6)(7)(8)(9)(10)(11)
Mourão 2013[21]	50/50	61.3±9.9/60.0±10.2	≥ 18 岁，2 型糖尿病患者，餐后 2 h 血糖≥ 10 mmol • L^{-1}，HbA1c ＞ 7%	共 6 个月，每个月随访 1 次	(1)(2)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)
Ali 2012[22]	63/65	66.8±10.2/66.4±12.7	＞ 18 岁，2 型糖尿病患者，HbA1c ＞ 7%，使用口服降糖药	共 12 个月，前 2 个月每月随访 1 次，后面每 3 个月随访 1 次	(1)(2)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(10)
Phumipamorn 2008[23]	67/63	55.90±13.67/52.27±11.15	≥ 18 岁，2 型糖尿病患者，HbA1c ＞ 7%	共 10 个月，每 2 个月随访 1 次	(1)(6)(7)(8)(9)(11)
Fornos 2006[24]	56/56	64.9±10.9/62.4±10.5	2 型糖尿病患者，使用口服降糖药 2 个月以上	共 13 个月，每个月随访 1 次	(1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)
Choe 2005[25]	29/36	52.2±11.2/51.0±9.0	＜ 70 岁，2 型糖尿病患者	共 24 个月，每个月随访 1 次	(1)

注：(1) HbA1c；(2) FBG；(3) 血糖达标率（blood glucose compliance rate）（HbA1c ＜ 7%）；(4) SBP；(5) DBP；(6) TC；(7) TG；(8) LDL-C；(9) HDL-C；(10) BMI；(11)用药依从性（medication compliance）。

表 2　药师对糖尿病患者的干预措施

Fig 2　Pharmacist intervention for diabetic patients

干预措施	研究数量 / 项
提供患者教育服务（糖尿病知识、药物知识、生活方式指导、用药依从性教育等），派发教育手册	20[6-25]
定期随访（以面对面或电话方式）	20[6-25]
与其他医护人员讨论制订修改药物治疗方案	8[7，13，15-16，20-22，25]
培训患者及其家属建立家庭血糖监测体系	2[7，10]
提供药物配送服务	3[6，8，15]
识别并帮助解决药物相关问题	6[7，10，11，13，16，24]
提供用药提醒服务（例如以电话、短信提醒）	5[9，20，18-19，23]

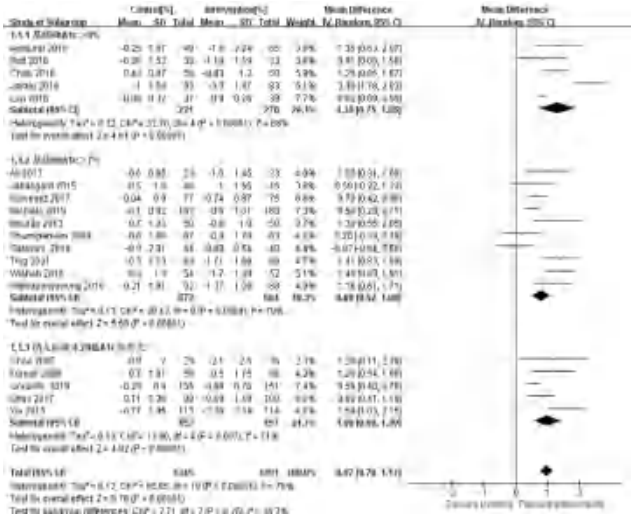

图 3　HbA1c 下降值的 meta 分析

Fig 3　Meta-analysis of HbA1c decline

2.4.2　FBG 下降值　共纳入 8 项研究[13-15，17，20-22，24]，各研究间异质性较明显（I^2 = 94%，P = 0.003），进行敏感性分析发现，其中 1 项研究[15]与其他 7 项研究相比差异较为显著。剔除该研究后，其余 7 项研究异质性明显降低（I^2 = 50%）。上述 7 项 RCTs 的 meta 分析结果见图 4，药师干预组降低 FBG 的效果优于对照组 [MD = 1.50，95%CI =（0.93，2.08），P < 0.000 01]。

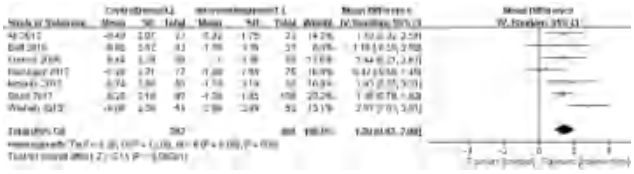

图 4　FBG 下降值的 meta 分析

Fig 4　Meta-analysis of FBG decline

2.4.3　血糖达标率　共纳入 7 项研究[7-8，12，14，17，19，24]，各研究间无明显异质性（I^2 = 31%，P = 0.19），采用固定效应模型分析，结果见图 5。药师干预下患者的血糖达标率要优于对照组 [OR = 0.31，95%CI =（0.23，0.41），P < 0.000 01]。

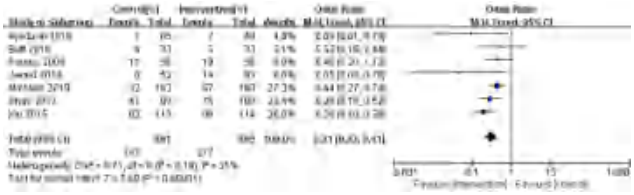

图 5　血糖达标率的 meta 分析

Fig 5　Meta-analysis of blood glucose compliance rate

2.4.4　SBP 下降值　共纳入 12 项研究[7-10，12-15，18，21-22，24]，各研究间异质性较明显（I^2 = 91%，P < 0.000 01），采用随机效应模型分析，结果见图 6。药师干预下患者的 SBP 降低幅度要大于对照组 [MD = 8.52，95%CI =（4.84，12.21），P < 0.000 01]。对此 meta 分析进行敏感性分析，将纳入的 12 个研究逐一剔除后，虽然 MD 值及 95%CI 有细小变化，但并没有产生质的变化，对结论影响不大，提示本 meta 分析结果较为可靠。

图 6　SBP 下降值的 meta 分析

Fig 6　Meta-analysis of SBP decline

2.4.5　DBP 下降值　纳入 11 项研究[7-8，10，12-15，18，21-22，24]，各研究间异质性较明显（I^2 = 81%，P < 0.000 01），采用随机效应模型分析，结果见图 7。药师干预下患者的 DBP 降低幅度要大于对照组 [MD = 2.51，95%CI =（0.78，4.25），P = 0.005]。对此 meta 分析进行敏感性分析，将纳入的 11 个研究逐一剔除后，虽然 MD 值及 95%CI 有细小变化，但并没有产生质的变化，对结论影响不大，提示本 meta 分析结果较为可靠。

图 7　DBP 下降值的 meta 分析

Fig 7　Meta-analysis of DBP decline

2.4.6　TC 下降值　纳入 12 项研究[7，10-14，17，20-24]，各研究间异质性较明显（I^2 = 82%，P < 0.000 01），采用随机效应模型分析，结果见图 8。药师干预组降低 TC 的效果要优于对照组 [MD = 0.37，95%CI =

（0.09，0.65），$P = 0.009$]。对此 meta 分析进行敏感性分析，将纳入的 12 个研究逐一剔除后，虽然 *MD* 值及 95%*CI* 有细小变化，但并没有产生质的变化，对结论影响不大，提示本 meta 分析结果较为可靠。

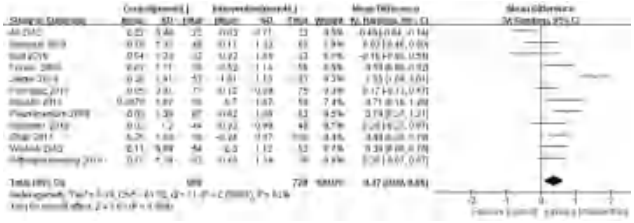

图 8　TC 下降值的 meta 分析

Fig 8　Meta-analysis of TC decline

2.4.7　TG 下降值　本文共纳入 13 项研究提供了 TG 数据[7, 9-14, 17, 20-24]，各研究间异质性较明显（$I^2 = 82\%$，$P < 0.000\ 01$），进行敏感性分析发现，其中 1 项研究[7]与其他 12 项研究相比差异较为显著。剔除该研究后，其余研究异质性明显降低（$I^2 = 41\%$）。余下 12 项 RCTs 的 meta 分析结果见图 9，两组对 TG 的改善效果相当 [*MD* = 0.06，95%*CI* =（－0.01，0.13），$P = 0.11$]。

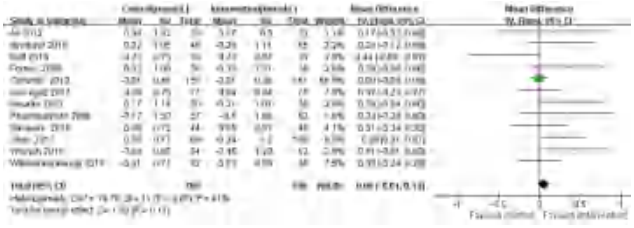

图 9　TG 下降值的 meta 分析

Fig 9　Meta-analysis of TG decline

2.4.8　LDL-C 下降值　纳入 14 项研究[7-14, 17, 20-24]，各研究间异质性较小（$I^2 = 39\%$，$P = 0.06$），采用固定效应模型分析，结果见图 10。药师干预组降低 LDL-C 的效果要优于对照组 [*MD* = 0.20，95%*CI* =（0.12，0.28），$P < 0.000\ 01$]。

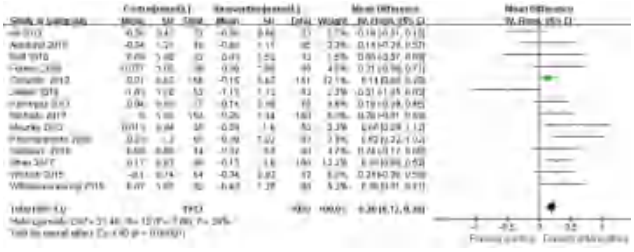

图 10　LDL-C 下降值的 meta 分析

Fig 10　Meta-analysis of LDL-C decline

2.4.9　HDL-C 增长值　本文共纳入 12 项 RCTs 进行 meta 分析，各研究间异质性较明显（$I^2 = 77\%$，$P < 0.000\ 01$），进行敏感性分析发现，其中 1 项研究[7]与其他 12 项研究相比差异较为显著。剔除该研究后，其余研究异质性明显降低（$I^2 = 42\%$）。余下 11 项 RCTs 的 meta 分析结果见图 11，两组对 HDL-C 的改善效果相当 [*MD* = 0.00，95%*CI* =（－0.03，0.03），$P = 1.00$]。

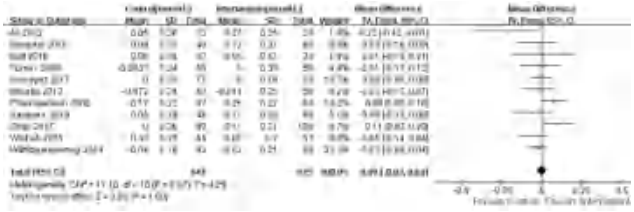

图 11　HDL-C 增长值的 meta 分析

Fig 11　Meta-analysis of HDL-C growth value

2.4.10　BMI 下降值　本文共纳入 13 项相关研究[7, 9-10, 12-15, 17-18, 20-22, 24]，各研究间异质性较小（$I^2 = 45\%$，$P = 0.04$），采用固定效应模型分析，结果见图 12。药师干预组对 BMI 的控制效果与对照组相当 [*MD* = 0.16，95%*CI* =（－0.03，0.35），$P = 0.11$]。

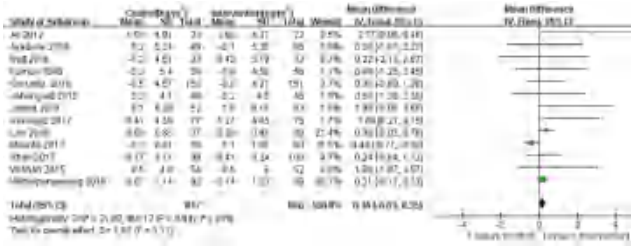

图 12　BMI 下降值的 meta 分析

Fig 12　Meta-analysis of BMI decline

2.4.11　用药依从性　有 13 项研究描述了患者用药依从性变化情况。由于不同文献用药依从性评价方法不同，故采用描述性分析。结果显示，所有研究中在药师干预下患者的用药依从性均能得到改善。

2.5　发表偏倚

采用 Stata 15.0 版软件对 HbA1c 下降值的结果进行偏倚风险分析，Begg’s 秩相关检验结果为 $Z = 1.01$，$P = 0.315$；Egger’s 检验结果为 $t = 1.50$，$P = 0.152$，提示不存在发表偏倚。

3　讨论

Meta 分析结果表明，在药师的积极干预下，患者的 HbA1c、FBG、SBP、DBP、TC 和 LDL-C 均明显降低，血糖达标率、用药依从性均显著提升，TG、HDL-C 和 BMI 变化并无显著性差异。本研究与文献报道[26-29]均表明，药师对 2 型糖尿病患者进行积极干预，能够改善患者的血糖、血压及部分血脂水平。对 2 型糖尿病患者而言，最重要的预防目标是延缓并发症的进展、降低致残

率和病死率，改善生存质量。强化血糖、血压及血脂控制可以降低糖尿病微血管和大血管病变及心血管死亡风险，给患者带来明显受益。一项10 年期的 RCT 研究表明，强化血糖控制能使糖尿病患者微血管疾病风险降低 24%，心肌梗死风险降低 15%，全因死亡风险降低 13%[30]；另一项RCT 研究证实，平均随访 8 年后，强化血压控制相较于对照组，能降低糖尿病患者 32% 的死亡风险 [31]，44% 的中风风险及 37% 的微血管疾病风险；另一项研究结果显示，4 年间积极的调脂治疗，每 1000 人中至少阻止了 37 次主要心血管事件，急性冠心病事件减少了 36%，卒中发生率减少了 48%[32]。因此，药师能够通过改善糖尿病患者的血糖、血压、血脂水平，延缓并发症的进展，提升患者生活质量。

多学科管理团队对以糖尿病为代表的慢性病进行协同诊治被证实是行之有效的模式。2020 年 2 月，国家卫健委颁布的《关于加强医疗机构药事管理促进合理用药的意见》，要求二级以上医疗机构拓展药学服务范围，将药师纳入家庭医师签约服务团队 [33]。2021 年 9 月，江苏省卫健委颁布的《关于印发江苏省家庭药师居家药学服务实施方案的通知》要求家庭医师签约团队中须配有药师，负责保证合理用药 [34]。尽管政府相关部门已认识到了药师在慢性病管理中的积极作用，并出台了一系列指导性的规划和建议，但就当下而言，社会大众甚至相当一部分的医疗工作者还未认识到药师的价值，在实际操作中将药师纳入联合管理团队的医疗机构少之又少。本研究通过系统评价，论证了药师干预能显著改善糖尿病患者的多项临床指标。当下我国的医师资源存在巨大缺口，医师为患者提供综合管理的时间并不宽裕，药师加入糖尿病联合管理团队参与治疗，能使患者得到更加优质的医疗服务，也为当下我国药学服务转型提供了方向。

本研究尚存在一定局限性：① 由于纳入研究数量较多，且在患者样本量、人种、入组标准、干预措施、干预时长、随访频率等各方面存在差异，导致多项结局指标在系统评价时显示存在显著异质性，虽然根据临床特征进行了亚组分析或敏感性分析，但仍可能影响结论的可靠性；② 所有研究对方案实施者及受试者的盲法提示高风险偏倚，这可能与干预措施在实际执行中难以做到盲法有关；③ 大部分研究在国外进行，仅有 3 篇在国内开展，分析得到的结果能否转化为可供中国参考的证据，有待进一步讨论；④ 检索文献语言限定为中、英文，可能存在纳入研究选择偏倚。尽管本研究存在上述局限，但我们在进行系统评价的过程中尽量减少了偏倚的产生。

基于本次系统评价，药师积极干预 2 型糖尿病患者的治疗，能够改善患者的血糖、血压及部分血脂水平，从而延缓并发症的发生，提高患者的生活品质。但以上结论受纳入研究方法学质量和样本质量限制，研究结果有待加强验证，后期将持续纳入更多设计严格、长期随访的大样本RCT 进一步评价药师干预糖尿病的有效性。

参考文献

[1] IDF Diabetes Atlas Committee. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045：Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas，9th edition [J]. Diabetes Res Clin Pract，2019，157：107843.

[2] 侯清涛，李芸，李舍予，等 . 全球糖尿病疾病负担现状 [J]. 中华糖尿病杂志，2016，24（1）：92-96.

[3] 中华医学会糖尿病学分会 . 中国 2 型糖尿病防治指南（2020 年版）[J]. 中华内分泌代谢杂志，2021，37（4）：311-398.

[4] Alkhoshaiban A，Hassan Y，Loganathan M，et al. Type II diabetic patients’satisfaction，medication adherence，and glycemic control after the application of pharmacist counseling program [J]. Arch Pharm Pract，2019，10（4）：127-136.

[5] Ip EJ，Shah B M，Yu J，et al. Enhancing diabetes care by adding a pharmacist to the primary care team [J]. Am J Health Syst Pharm，2013，70（10）：877-886.

[6] Ting CY，Ahmad Zaidi Adruce S，Lim CJ，et al. Effectiveness of a pharmacist-led structured group-based intervention in improving medication adherence and glycaemic control among type 2 diabetes mellitus patients：a randomized controlled trial [J]. Res Social Adm Pharm，2021，17（2）：344-355.

[7] Javaid Z，Imtiaz U，Khalid I，et al. A randomized control trial of primary care-based management of type 2 diabetes by a pharmacist in Pakistan [J]. BMC Health Serv Res，2019，24，19（1）：409.

[8] Michiels Y，Bugnon O，Chicoye A，et al. Impact of a community pharmacist-delivered information program on the follow-up of type-2 diabetic patients：a cluster randomized controlled study [J]. Adv Ther，2019，36（6）：1291-1303.

[9] Goruntla N，Mallela V，Nayakanti D. Impact of pharmacist-directed counseling and message reminder services on medication adherence and clinical outcomes in type 2 diabetes mellitus [J]. J Pharm Bioallied Sci，2019，11（1）：69-76.

[10] Withidpanyawong U，Lerkiatbundit S，Saengcharoen W.

Family-based intervention by pharmacists for type 2 diabetes：a randomised controlled trial [J]. Patient Educ Couns，2019，102（1）：85-92.

[11] Sarayani A，Mashayekhi M，Nosrati M，et al. Efficacy of a telephone-based intervention among patients with type-2 diabetes：a randomized controlled trial in pharmacy practice [J]. Int J Clin Pharm，2018，40（2）：345-353.

[12] Ayadurai S，Sunderland VB，Tee LBG，et al. Structured tool to improve clinical outcomes of type 2 diabetes mellitus patients：a randomized controlled trial [J]. J Diabetes，2018，10（12）：965-976.

[13] Korcegez EI，Sancar M，Demirkan K. Effect of a pharmacist-led program on improving outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus from northern cyprus：a randomized controlled trial [J]. J Manag Care Spec Pharm，2017，23（5）：573-582.

[14] Shao H，Chen G，Zhu C，et al. Effect of pharmaceutical care on clinical outcomes of outpatients with type 2 diabetes mellitus [J]. Patient Prefer Adher，2017，8（11）：897-903.

[15] Lim PC，Lim K，Embee ZC，et al. Study investigating the impact of pharmacist involvement on the outcomes of diabetes medication therapy adherence program Malaysia [J]. Pak J Pharm Sci，2016，29（2）：595-601.

[16] Chen JH，Ou HT，Lin TC，et al. Pharmaceutical care of elderly patients with poorly controlled type 2 diabetes mellitus：a randomized controlled trial [J]. Int J Clin Pharm，2016，38（1）：88-95.

[17] Butt M，Mhd Ali A，Bakry MM，et al. Impact of a pharmacist led diabetes mellitus intervention on HbA1c，medication adherence and quality of life：a randomised controlled study [J]. Saudi Pharm J，2016，24（1）：40-48.

[18] Jahangard-Rafsanjani Z，Sarayani A，Nosrati M，et al. Effect of a community pharmacist-delivered diabetes support program for patients receiving specialty medical care：a randomized controlled trial [J]. Diabetes Educator，2015，41（1）：127-135.

[19] Xin C，Xia Z，Jiang C，et al. Effect of pharmaceutical care on medication adherence of patients newly prescribed insulin therapy：a randomized controlled study [J]. Patient Prefer Adher，2015，18（9）：797-802.

[20] Wishah RA，Al-Khawaldeh OA，Albsoul AM. Impact of pharmaceutical care interventions on glycemic control and other health-related clinical outcomes in patients with type 2 diabetes：randomized controlled trial [J]. Diabetes Metab Syndr，2015，9（4）：271-276.

[21] Mourão AO，Ferreira WR，Martins MA，et al. Pharmaceutical care program for type 2 diabetes patients in Brazil：a randomised controlled trial [J]. Int J Clin Pharm，2013，35（1）：79-86.

[22] Ali M，Schifano F，Robinson P，et al. Impact of community pharmacy diabetes monitoring and education programme on diabetes management：a randomized controlled study [J]. Diabet Med，2012，29（9）：e326-333.

[23] Phumipamorn S，Pongwecharak J，Soorapan S，et al. Effects of the pharmacist’s input on glycaemic control and cardiovascular risks in Muslim diabetes [J]. Prim Care Diabetes，2008，2（1）：31-37.

[24] Fornos JA，Andrés NF，Andrés JC，et al. A pharmacotherapy follow-up program in patients with type-2 diabetes in community pharmacies in Spain [J]. Pharm World Sci，2006，28（2）：65-72.

[25] Choe HM，Mitrovich S，Dubay D，et al. Proactive case management of high-risk patients with type 2 diabetes mellitus by a clinical pharmacist：a randomized controlled trial [J]. Am J Manag Care，2005，11（4）：253-260.

[26] 杨婷，路敏，周颖，等 . 药师干预 2 型糖尿病管理的系统评价 [J]. 中国药房，2013，24（46）：4404-4406.

[27] Linda VE，Katja T，Liset VD，et al. Pharmacist-led self-management interventions to improve diabetes outcomes. A systematic literature review and meta-analysis [J]. Front Pharmacol，2017，14（8）：891.

[28] Allah B，Khan TM，Lee SWH，et al. Efficacy of pharmacist based diabetes educational interventions on clinical outcomes of adults with type 2 diabetes mellitus：a network meta-analysis [J]. Front Pharmacol，2018，10（9）：339.

[29] 赵先，王婧雯，宁泽琼，等 . 临床药师干预糖尿病患者治疗有效性的 Meta 分析 [J]. 西北药学杂志，2018，33（2）：234-240.

[30] Holman RR，Paul SK，Bethel MA，et al. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes [J]. N Engl J Med，2008，359（15）：1577-1589.

[31] Group UPDS. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes：UKPDS 38 [J]. BMJ，1998，317（7160）：703-713.

[32] Colhoun HM，Betteridge DJ，Durrington PN，et al. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study（CARDS）：multicentre randomised placebo-controlled trial [J]. Lancet，2004，364（9435）：685-696.

[33] 关于印发加强医疗机构药事管理促进合理用药的意见的通知 [EB/OL].（2020-2-21）[2022-2-14] http：//www.nhc. gov. cn/yzygj/s7659/202002/ea3b96d1ac094c47a1fc39cf00f3960e. shtml.

[34] 关于印发江苏省家庭药师居家药学服务实施方案的通知 [EB/OL].（2021-9-16）[2022-2-14] http：//wjw. jiangsu. gov. cn/art/2021/9/23/art_7335_10024738. html.

（收稿日期：2022-01-10；修回日期：2022-03-09）

妊娠期甲状腺功能减退患者合理用药现况的多组结构方程模型分析

李轶凡，王安妮，冯欣*（首都医科大学附属北京妇产医院/北京妇幼保健院，北京　100026）

摘要：目的　探讨影响妊娠期甲状腺功能减退患者合理用药行为的各项因素及其作用机制，为提升临床合理用药水平提供干预依据。**方法**　采用横断面研究问卷调查方式，应用单因素方差分析探索倾向因素、促成因素和加强因素的人口学特征，应用结构方程模型探索影响合理用药模型的拟合度和主要影响因子，采用多组结构方程探索不同教育水平下各潜变量的内部关联是否存在差异。**结果**　倾向因素得分（2.82±0.38）分、促成因素得分（2.31±0.54）分，加强因素得分（2.53±0.90）分。不同教育水平在倾向因素上存在显著差异。对合理用药行为影响倾向因素的总效应为 1.59，促成因素的总效应为 1.51，加强因素的总效应为 0.52。不同教育水平 PRECEDE 模型形态基本一致，结构权重检验不一致（$\Delta\chi^2 = 386.71$，$\Delta d_f = 23$，$P < 0.01$）。不同教育水平 PRECEDE 模型作用机制，路径系数均有统计学意义，但作用强度存在差异。**结论**　倾向因素对于妊娠期状腺功能减退患者用药行为影响最大，促成因素次之，加强因素影响效用最小，不同教育水平 PRECEDE 模型潜变量之间的路径系数存在差异。本研究使用结构方程模型对可能影响妊娠期甲状腺功能减退患者的主要因素进行了量化研究，为更有效地针对不同人群采取合理用药宣教方法提供了参考。

关键词：甲状腺功能减退；PRECEDE 模型；多组结构方程模型；合理用药
中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2179-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.038

PRECEDE model of rational drug use in patients with hypothyroidism during pregnancy: a multi-group structural equation model analysis

LI Yi-fan, WANG An-ni, FENG Xin* (*Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University/Beijing Maternal and Child Health Care Hospital, Beijing* 100026)

Abstract: Objective　To analyze the influence factors for rational drug use in patients with hypothyroidism during pregnancy and to provide evidence for targeted intervention in clinic. **Methods**　Online questionnaire for cross-sectional study was conducted. One-way analysis of variance was used to determine the demographic characteristics of propensity factors, contributing factors and strengthening factors. Structural equation models were established to explore the fit and main influence factors of the rational drug use model, and multi-group structural equation models were used to explore the latent variables at different levels of education and the difference in internal associations. **Results**　The propensity factor score was (2.82±0.38), the contributing factor score was (2.31±0.54), and the strengthening factor score was (2.53±0.90), with significant differences in tendencies among different education levels. The total effect of propensity factors on the rational drug use was 1.59, the total effect of contributing factors was 1.51, and the total effect of strengthening factors was 0.52. The shapes of PRECEDE models with different education levels were basically consistent, but the structural weight test was inconsistent ($\Delta\chi^2 = 386.71$, $\Delta d_f = 23$, $P < 0.01$). The mechanism and path coefficient of the PRECEDE model of rational drug use with

基金项目：中国药学会全国医药经济信息网科普研究重点项目 [No.CMEI2021KPYJ（JZX）00303]。
作者简介：李轶凡，女，主管药师，主要从事医院药学方向研究，email：liyifan@ccmu.edu.cn　*通信作者：冯欣，女，主任药师，硕士研究生导师，主要从事医院药学方向研究，email：fenxin1115@ccmu.edu.cn

different education levels were significantly different, and the intensity of action was also different. **Conclusion** Propensity factors have the greatest impact on the medication behavior of patients with hypothyroidism during pregnant, followed by strengthening factors, while contributing factors have the least effect. The path coefficients of the latent variables of the PRECEDE model with different education levels are different. Structural equation modeling was used to quantify the main factors that may affect patients with hypothyroidism during pregnancy, which provide a reference for more effective and rational drug use education methods for various population.

Key words: hypothyroidism; PRECEDE model; multi-group structural equation model; rational drug use

妊娠期甲状腺功能减退症（以下简称妊娠期甲减）指在妊娠期间发生的，由于甲状腺激素合成和分泌减少或组织利用不足导致的全身代谢减低综合征，是妊娠期最常见的甲状腺功能障碍[1]。妊娠期甲减不仅会使不良妊娠结局如流产、早产、子痫前期、胎盘早剥、贫血及糖代谢异常等的发生率增加，而且会对胎儿神经智力发育产生不良的影响[2]。研究表明，由于受自身疾病的影响，妊娠期甲减患者普遍存在服药依从性差的现象[3]，且患者经常在没有足够用药知识的情况下服用药物[4]。目前我国针对妊娠期甲减患者服药依从性的现况调查和影响因素的报道较少，致使健康干预缺乏良好的基础资料和数据来源。格林模式（predisposing，reinforcing，and enabling causes in educational diagnosis and evaluation，PRECEDE）是在健康教育与健康促进的研究与实践方面应用较为广泛的一种理论模式[5]。结构方程模型（structural equation modeling，SEM）是一种融合了因素分析和路径分析的多元统计技术，能够对多变量间的交互关系进行定量研究[6]。以往对于PRECEDE模型的调查结果主要是运用单因素分析法或多因素分析法寻找影响合理用药的倾向因素、促成因素和加强因素，未能深入计算PRECEDE模型中观测变量与结构变量间的关系参数。本文在基于PRECEDE模式，应用SEM，对模型因果关系相互作用机制进行深入分析，并应用多组分析比较不同教育程度的患者中合理用药模型的差别，从量化的角度研究妊娠期甲减患者合理用药水平，进一步提高妊娠期甲减患者科学用药。

1 对象与方法

1.1 研究对象

本次调研时间为2020年4月至2021年8月，研究对象为妊娠期甲减患者，问卷通过我院药事部微信公众平台采用网络问卷形式发放回收。纳入标准：年龄18～45周岁；符合临床妊娠期甲减诊断标准；自愿参与调查问卷与回访。

1.2 研究方法

1.2.1 问卷设计 PRECEDE问卷模式包括5个步骤：确定主要健康问题（社会学诊断、流行病学诊断），行为和环境诊断，教育学与组织诊断，管理诊断和政策诊断。将影响妊娠期甲减患者合理用药行为因素归纳为倾向因素、促成因素和加强因素三大类，包含研究对象对疾病相关知识的了解，对待用药和治疗的态度以及日常用药行为特征。促成因素即实现因素，包含研究对象可获得的用药知识教育和培训，医疗保障，生活环境特征。加强因素即强化因素，包含研究对象对提升合理用药认知行为所能获得的支持。并针对每一项因素分别设计题目进行调查，详见表1。问卷采用Likert 5级量表，将赞同程度或实际发生频率用数字量化，极不赞同计1分，不赞同计2分，一般计3分，赞同计4分，极为赞同计5分，同理实际发生频率，分值越高表示妊娠期甲减患者对于某测量影响因素的认同度越高。通过可靠性分析检测问卷的信度，通过探索性因子分析检测问卷的效度。

1.2.2 多组结构方程构建 根据PRECEDE模型为观念构架建立结构模型，其中潜变量包括合理用药倾向因素、促成因素、加强因素，具体题目得分为实测变量。通过因子载荷表明该因子在对应潜变量方差变化中的贡献程度，综合SEM各评价指标，包括增量拟合指标 $\Delta\chi^2$，Δd_f，卡方自由比（CMIN/DF），拟合优度指数（goodness of fit index，GFI），校正拟合优度指数（adjusted goodness of fit index，AGFI），比较拟合指数（comparative fit index，CFI），均方误差平方根（root mean square error of approximation，RMSEA），对所构建模型进行拟合效果评价。采用多组结构方程分析比较合理用药PRECEDE模型在无限制条件下拟合不同教育程度数据基准模型（M_1）和通过模型形态恒等性检验，假设各组间结构方程的路径系数相等的限定模型（M_2），检验PRECEDE模型在不同教育程度的患者中是

表 1　患者合理用药行为影响因素

Tab 1　Influencing factor of patients' safe medication behavior

影响因素	项目	项目评分区间	具体问题描述
倾向因素	对妊娠期甲减相关知识的了解	用法用量（2 ～ 10 分）	左甲状腺素片对妊娠期和哺乳期都是安全的
			左甲状腺素钠片需要晨起空腹服用
		用药疗程（3 ～ 15 分）	左甲状腺素钠片与碳酸钙、硫酸亚铁合用，可减少药物的吸收，减弱疗效，两者需至少间隔 4 h
			服用左甲状腺素片需要根据化验指标调整服药剂量
			服用左甲状腺素钠片指化验指标正常可以停药
		药品注意事项（2 ～ 10 分）	左甲状腺素钠需要终身服用
			左甲状腺素钠片与胰岛素合用可能使血糖控制恶化
		药物相互作用（2 ～ 10 分）	大豆粉、核桃、膳食纤维都可减少左甲状腺素在胃肠道的吸收
			葡萄柚汁可能延迟左甲状腺素的吸收
	日常用药行为特征	合理用药行为（8 ～ 40 分）	消炎药实质是抗菌药物
			与西药相比，中药更加安全有效
			新上市的药品比老药更加安全
			药品说明书中提示孕妇禁用的药物不应服用
			使用说明书以外用法是为了更好地治疗
			孕期用药对胎儿影响最大的是孕早期
			整个孕期都应适当补充叶酸
			孕期对钙铁等营养的需要量较大，单纯食补很难满足需要，可结合药物补充
促成因素	生活环境特征	合理用药态度（5 ～ 25 分）	参与义诊活动咨询身边有经验的医师或药师
			阅读医院或卫生服务中心发放的合理用药的宣传材料
			阅读手机端公众号推送的合理用药知识
			在医院或卫生服务中心听讲合理用药知识讲座
			在电视上观看相关合理用药知识的节目
	合理用药相关知识掌握情况	合理用药认识（9 ～ 45 分）	不混服中药西药，要错开半小时及以上
			每需要服用一个新药品，要亲自看一下药品说明书
			您会通过听相关讲座主动了解孕期用药安全知识
			您会通过手机、书籍主动了解孕期用药安全知识
			严格按照药品说明书中药品储存的条件储存药品
			关注医疗大 V、大医院的公众号或购买合理用药书籍以获取用药知识
			拨打大医院用药咨询中心电话或到现场去询问用药问题
			依照医师 / 药师 / 药品说明书要求按量服用药品，不自行加量或减量服用
			依照医师 / 药师 / 药品说明书要求按时服用药品，不漏服
加强因素	提升药品认知意识	提升认知主观愿望（4 ～ 20 分）	您是否有时忘记服药
			在过去的 1 周内，您是否有或几天忘记服药
			治疗期间，当您觉得症状加重或出现其他症状时，自行停药
			您是否未告知医师而自行减少药量或停止服药
			当您外出旅行或长时间离家时，您是否有时忘记随身携带药物
		提升依从性（4 ～ 20 分）	当您觉得自己的化验指标已经得到控制时，您是否停止过服药
			您是否觉得要坚持治疗计划有困难
			能坚持每日固定时间服用

否具有差异。

1.3　统计学方法

计量资料满足正态分布时采用均值 ± 标准差（$\bar{x}$±s）表示，不满足时用中位数与四分位数表示；计数资料采用频数和百分比表示，采用描述性分析及卡方检验。结构方程所采用的参数估计是最大似然估计法（maximum likelihood estimation，MLE）和适用非正态数据的加权最小二乘法（weighted least squares，WLS）对全部样本数据作单样本的结构方程模型拟合，采用多组结构方程模型（multi-group structural equation model，MSEM）拟合不同教育程度数据。描述性统计使用 Microsoft Excel 2016 和 SPSS 22.0 软件实现，结构方程的建立与计算使用 AMOS 24.0 软件实现，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　基本情况

本次研究共纳入有效调查问卷 517 份，其中 2020 年纳入 91 份，2021 年纳入 426 份，平均作答时间 415.62 s。信度检验问卷的 α 系数（Cronbach alpha）为 0.842，效度检验问卷 KMO（kaiser meyer olkin）值为 0.814，Bartlelt 球形检

验 $P < 0.001$。说明问卷具备较高的信度和效度。

2.2　受访者 PRECEDE 量化分析

受访者平均年龄为（30.98±3.49）岁，≥ 35 岁的高龄孕妇占比 16.63%。学历方面，博士 / 硕士（25.53%），本科 / 专科（69.44%），高中 / 初中 / 小学（5.03%），学历越高影响因素作用愈加明显。孕期接触吸烟 17 人（3.29%），孕期饮酒 65 人（12.57%），初产妇 396 人（76.60%）。孕周在 6 ～ 39 周，其中孕早期占比 76.21%，孕中期占比 22.05%，孕晚期占比 1.74%。调查问卷总体平均得分为（2.61±0.38）分。通过卡方检验对各分类变量和等级进行分析，可以得知，不同学历在倾向上差异存在统计学意义（$P < 0.05$）。详见表 2。

表 2　受访者信息及各影响因素得分情况

Tab 2　Respondent's information and the status of each influencing factor

分类	n（%）	倾向因素		促成因素		加强因素	
		得分 / 分	P	得分 / 分	P	得分 / 分	P
年龄组			0.48		0.1		0.405
＜ 35 岁	431（83.37）	2.82±0.39		2.29±0.53		2.52±0.89	
≥ 35 岁高龄孕妇	86（16.63）	2.82±0.35		2.40±0.60		2.57±0.97	
学历			0.04		0.876		0.864
博士 / 硕士	132（25.53）	2.84±0.34		2.34±0.49		2.55±0.95	
本科 / 专科	359（69.44）	2.83±0.39		2.30±0.56		2.52±0.90	
高中 / 初中 / 小学	26（5.03）	2.81±0.52		2.27±0.56		2.45±0.53	
孕期吸烟			0.387		0.458		0.992
不接触	500（96.71）	2.81±0.38		2.31±0.54		2.54±0.90	
接触	17（3.29）	3.00±0.40		2.29±0.67		2.21±0.67	
孕期是否饮酒			0.335		0.08		0.352
饮酒	452（87.43）	2.8±0.38		2.29±0.53		2.52±0.89	
不饮酒	65（12.57）	2.92±0.4		2.42±0.63		2.58±0.95	
已生育次数			0.484		0.274		0.304
未生育	396（76.6）	2.81±0.37		2.32±0.53		2.51±0.89	
1 胎及以上	121（23.4）	2.83±0.42		2.27±0.58		2.57±0.95	
孕期			0.595		0.622		0.875
＜ 12 周孕早期	394（76.21）	2.81±0.38		2.3±0.53		2.53±0.91	
12 ～ 28 周孕中期	114（22.05）	2.86±0.41		2.33±0.62		2.53±0.91	
≥ 28 周孕晚期	9（1.74）	2.75±0.33		2.47±0.27		2.58±0.26	

2.3　结构方程拟合结果

经过模型的构建、迭代拟合，最终确定模型，各潜变量和测量指标的负荷差异均有统计学意义（$P < 0.001$），详见图 1 及表 3。因数据呈非正态分布，故以加权最小二乘法计算具体模型的拟合指标，$\chi^2 = 314.288$，$d_f = 72$，GFI ＝ 0.931，AGFI ＝ 0.871，RMSEA ＝ 0.057，综合各项指标认为模型和调查数据拟合良好。结构方程模型潜变量间作用机制方面，倾向因素对合理用药行为影响的总效应为 1.59，促成因素的总效应为 1.51，加强因素的总效应为 0.52。

表 3　潜变量与测量指标载荷

Tab 3　Latent variable and measurement index load

影响因素	项目	每项平均分 / 分	方差	因子载荷	因素平均分 / 分
倾向因素	药物用法用量	3.09±0.93	0.86	0.50	2.82±0.38
	用药疗程	2.47±0.83	0.68	0.56	
	药品注意事项	3.07±0.87	0.76	0.52	
	药物相互作用	3.10±0.98	0.96	0.28	
	日常用药行为特征	2.76±0.44	0.19	0.17	
促成因素	生活环境特征	2.53±0.60	0.36	0.70	2.31±0.54
	合理用药相关知识掌握情况	1.95±0.69	0.47	0.63	
加强因素	提升认知主观愿望	2.46±1.11	1.24	0.94	2.53±0.9
	提升依从性	2.60±0.92	0.84	0.44	

2.4　不同教育情况合理用药 KAP 模型的比较

应用结构方程模型同时拟合不同教育情况的数据，各项拟合指标均符合拟合标准。教育水平高、中、低三组模型独立拟合指数相差不大，可

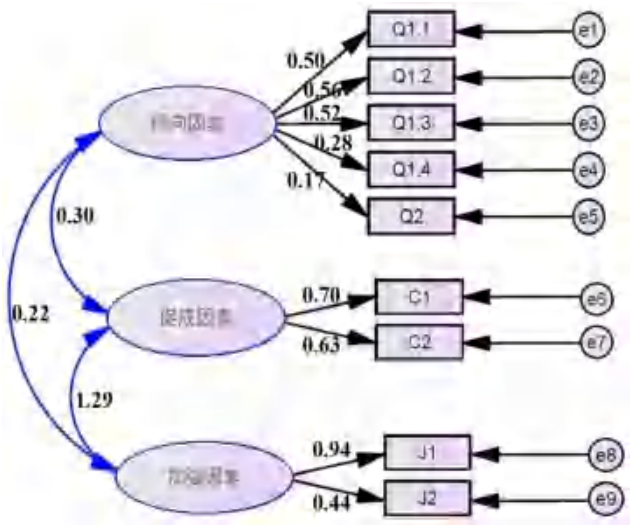

图 1　结构方程模型示意图

Fig 1　Schematic diagram of structural equation model

注：Q1.1. 药物用法用量；Q1.2. 用药疗程；Q1.3. 药品注意事项；Q1.4. 药物相互作用；Q2. 日常用药行为特征；C1. 生活环境特征；C2. 合理用药相关知识掌握情况；J1. 提升认知主观愿望；J2. 提升依从性；e. 残差。

Note：Q1.1. drug usage；Q1.2. drug course；Q1.3. drug Precautions；Q1.4. drug interactions；Q2. characteristics of drug use behavior；C1. characteristics of living environment；C2. knowledge of drug；J1. improve cognitive subjective desire；J2. improve drug compliance；e. residual.

以认为同一个 PRECEDE 模型适用于 3 个不同的群体。同时对 M_1（基线）模型和 M_2（限定）模型进行对比，$\Delta\chi^2 = 386.71$，$\Delta d_f = 23$，$P < 0.01$。说明不同教育情况的妊娠期甲减患者 PRECEDE 模型路径系数之间的差异具有显著性，即不同教育水平的 PRECEDE 模型参数的作用机制有所差异，详见表 4。通过比较不同教育情况合理用药 PRECEDE 模型作用机制，路径系数及作用强度差异均有统计学意义。详见表 5。

表 4　合理用药 PRECEDE 模型结构方程模型多组分析整体拟合效果

Tab 4　Overall fitting of multi-group analysis of the rational drug use PRECEDE model structural equation model

模型	χ^2	d_f	χ^2/d_f	GFI	AGFI	CFI	RMSEA
M（低）	181.501	72	2.52	0.925	0.860	0.939	0.055
M（中）	141.484	48	2.95	0.923	0.855	0.932	0.072
M（高）	28.877	24	1.20	0.872	0.792	0.928	0.091
M_1（基线）	495.807	144	3.44	0.944	0.842	0.861	0.039
M_2（限定）	685.0	192	3.57	0.927	0.863	0.932	0.035

3　讨论

3.1　妊娠期甲减患者合理用药 PRECEDE 量化分析

PRECEDE 模式以逻辑架构关系开展健康教育诊断、计划、实施与评价研究，被广泛应用于健康干预、教育评估等健康促进实践中，健康促进计划的设计应充分考虑影响研究人群行为关键的因素和不同因素可能促使人们做出改变的动力 [7]。合理用药指药品以适当的方法、适当的剂量、适当的时间准确用药 [8]。合理用药能否实现与倾向因素、促成因素和加强因素的作用密不可分。量化分析结果显示，倾向因素平均得分（2.82±0.38）分，得分率 56.40%。促成因素平均得分（2.31±0.54）分，得分率 46.2%，表明受访者有较强的行为动机获取合理用药知识，而相关知识掌握情况有所欠缺。加强因素平均得分（2.53±0.9）分，得分率 50.60%，表明现阶段合理用药知识引起了部分受访者的重视。卡方检验结果显示，不同学历在倾向上存在显著差异。分析原因为不同教育水平对合理用药的行为的差异可能与关注药学信息的频率和所能获取药学信息的质量有关。受访者获取知识途径的局限性相关，导致不能产生正确的药物使用观念，继而导致无法形成规范的药物使用行为。良好的知识水平与合理用药紧密相关，欧洲一项纳入 22 188 例受访者的研究显示，教育情况是影响患者自我药疗的关键因素 [9]。倾向因素往往发生在用药行为之前，是影响妊娠期甲减患者安全用药行为的关键因素，教育水平高的患者用药自主性更强，能够更清晰地认知药物正确用法。故相应的推进健康措施，应针对药物相互作用和药物注意事项开展，并根据不同教育水平、不同孕周定期推送用药建议。

表 5　不同教育情况合理用药 PRECEDE 模型作用机制比较

Tab 5　Mechanism of action of the PRECEDE model of rational drug use with different education levels

因素	促成因素			加强因素		
	直接效应	间接效应	总效应	直接效应	间接效应	总效应
倾向因素（高）	0.611	－0.001	0.61	0.097	－0.019	－0.019
倾向因素（中）	0.111	0.026	0.137	0.203	0.026	0.026
倾向因素（低）	0.316	0.182	0.498	0.216	0.191	0.191
促成因素（高）	－	－	－	0.283	0.240	0.240
促成因素（中）	－	－	－	0.335	0.352	0.352
促成因素（低）	－	－	－	0.322	0.107	0.107

3.2　合理用药 PRECEED 模型拟合效果

通过结构方程模型定量计算潜变量（倾向因素、促成因素、加强因素）之间的相关关系，综合 5 项评价指标检验模型的拟合度 [10]，可以认为模型和调查数据拟合良好，卡方值略高。倾向因素对合理用药行为影响的总效应为 1.59，倾向因素主要测量妊娠期甲减患者对疾病相关知识的了解，对待用药和治疗的态度以及日常用药行为特征。倾向因素是指先于行为产生的、某种行为的动机和愿望，或是诱发产生某些行为

的因素[5]。倾向因素中药物相互作用项平均分最低，左甲状腺素存在较为复杂的药物、食物相互作用[11]，例如其与碳酸钙、硫酸亚铁合用，可减少药物的吸收；其与胰岛素合用可能使血糖控制恶化。故此对妊娠期甲减患者有必要通过多重用药治疗管理门诊等模式定期回访，及时干预不合理用药行为，对提高患者安全用药认知水平具有重要意义。促成因素的总效应为 1.51，促成因素主要测量妊娠期甲减患者可获得的用药知识教育和培训，医疗保障，生活环境特征。促成因素是促成某种行为动机或愿望得以实现的因素，即实现因素所必须的环境条件。患者认为专业健康教育是其接受健康知识、建立正确行为的重要途径，而促成因素是实现行为所必需的技术与资源。故相应的推进健康措施为：应匹配患者的年龄、孕产史等信息建立妊娠期甲减的药学监护流程，并在流程中纳入健康教育和宣传体系，进而完善健康干预策略。特别是在疫情面临长期化、常态化发展的情况下，拟合线上线下优势推送与互动并重，开发药学智能服务系统云平台，有助于提升患者的信任度和药学服务质量。加强因素的总效应为 0.52，加强因素主要测量妊娠期甲减患者提升药品认知意识的主观愿望和依从性。加强因素存在于行为发生之后，是对行为积极的或消极的反馈，主要来自社会支持。来自朋友和家人的关爱及对健康行为的支持，会对个体保持健康行为起到积极的影响和作用[12]。故相应的推进健康措施应为：药师需进一步提升患者自身药品安全认知，通过科学普及的形式和渠道为妊娠期甲减患者营造更为安全的用药环境，从而达到提高强化因素在妊娠期甲减患者安全用药行为的作用程度。

3.3　合理用药 PRECEDE 模型的多组比较

此次研究采用结构方程多组分析，结果显示 PRECEDE 模型在三组不同教育水平的受访者中没有表现出明显差异，三组模型形态基本一致，说明不同教育水平可以使用同一个 PRECEDE 模型进行拟合。但结构权重检验不一致，不同教育水平的 KAP 模型参数不同，潜变量之间的路径系数存在差异。说明不同教育情况妊娠期甲减患者的倾向因素、促成因素、加强因素之间相互作用强度有所差异。直接作用方面结果提示，倾向因素有助于是建立积极正确的态度，态度是用药行为改变的动力，有助于提升合理用药行为的实质性改善。促成因素部分说明受访者的用药行为更多地受到态度和外界信息的影响，与已掌握的知识关联不大。因此不仅要重视知识的补充，同时也要注重信念和行为的干预，从而促进健康教育活动最佳的实施效果[7]。提示在开展健康教育和用药科普中，需引入有效可行的回访方式，评价患者合理用药行为的改变。

综上所述，由于用药行为非一日形成，且行为改变，受诸多因素影响，应用 PRECEDE 模式作为需求评估工具，诊断和评价影响某特定群体健康行为的倾向因素、促成因素及加强因素，从而客观判断特定群体科普需求具有一定的现实意义。针对文中提出的影响健康行为的倾向因素、促成因素和加强因素，可采取以下措施促进健康促进计划的实施：强化妊娠期甲减的相关知识，开展通俗易懂且行之有效的用药宣教及指导，动员患者主动学习知识，督促患者作出改变。

参考文献

[1] 金耀娟，李霞，李春容，等 . 妊娠合并甲状腺功能减退患者妊娠结局及妊娠期并发症情况临床研究 [J]. 中国妇幼保健，2020，35（7）：1197-1200.

[2] 常晓楠，赵楠，闫芳芳，等 . 左甲状腺素治疗妊娠期亚临床甲状腺功能减退症有效性的 Meta 分析 [J]. 临床药物治疗杂志，2020，18（5）：48-54.

[3] 蒋亚冰，张赵菊，彭婉平 . 服药依从性对妊娠合并甲状腺功能减退症孕妇甲状腺功能指标及妊娠结局的影响 [J]. 中国妇幼保健，2019，34（24）：5616-5619.

[4] 王晓方，何强，刘彩 . 基于计划行为理论视角下天津居民自我药疗行为影响因素研究 [J]. 药物流行病学杂志，2019，28（4）：241-244.

[5] Mosavi F，Aliakbari F，Rabiei L. Effect of education based on “PRECEDE” model on self-care behavior in hemodialysis patients [J]. J Educ Health Promot，2020，5（9）：69.

[6] 朱文龙，程慧健，杨来宝，等 . 江西省、上海市、青海省儿童家长预防接种知识、态度、行为调查及结构方程模型分析 [J]. 中华流行病学杂志，2021，42（2）：309-315.

[7] Bauer G，Davies JK，Pelikan J. The EUHPID health development model for the classification of public health indicators [J]. Health Promot Int，2006，21（2）：153-159.

[8] 杨玉慧，许秀丽，朱珠 . 医院药师关于出院带抗肿瘤药安全性的知识、态度及实践研究 [J]. 中国药学杂志，2020，55（6）：480-485.

[9] NiciósG，Olivar T，Rodilla V. Factors associated with self-medication in Spain；a cross-sectional study in different age groups [J]. Int J Pharm Prac，2018，26（3）：258-266.

[10] 贺哲，纪磊，唐尚锋，等 . 基于多组结构方程模型疟疾防治 KAP 模型 [J]. 中国公共卫生，2020，36（5）：826-830.

[11] 李轶凡，盖迪，韩朝宏，等 . 北京居民用药风险影响因素调查 [J]. 临床药物治疗杂志，2019，17（3）：59-63.

[12] Valtorta NK，Moore DC，Barron L，et al. Older adults’ social relationships and health care utilization：a systematic review [J]. Am J Public Health，2018，108（4）：e1-e10.

（收稿日期：2022-01-29；修回日期：2022-03-23）

沃诺拉赞与兰索拉唑对照治疗糜烂性食管炎的系统评价

谢星星[1]，余志刚[1]，刘学[1]，范玲[1*]，苟惠[2]，袁孝愧[3]（1. 雅安市人民医院药剂科，四川　雅安　625000；2. 西南医科大学附属医院药学部，四川　泸州　646000；3. 成都市第四人民医院药剂科，成都　610000）

摘要：目的　系统评价沃诺拉赞与兰索拉唑对照治疗糜烂性食管炎的疗效与安全性。**方法**　计算机检索中英文数据库中有关沃诺拉赞与兰索拉唑对照治疗糜烂性食管炎的临床随机对照试验，检索时限为建库至 2021 年 11 月；2 名研究者对纳入文献进行严格质量评价；采用 RevMan 5.3 软件对各效应指标进行 meta 分析。**结果**　纳入 5 篇临床随机、双盲、平行试验，共 1621 例，沃诺拉赞组 825 例，兰索拉唑组 796 例。Meta 分析显示：相比兰索拉唑组，疗程为 2 周的沃诺拉赞组糜烂性食管炎黏膜修复 / 愈合率差异有统计学意义（$RR = 1.10$，95%CI：1.04 ～ 1.16，$P < 0.05$），疗程 4 周和 8 周的沃诺拉赞组黏膜损伤修复 / 愈合率则差异无统计学意义（$P > 0.05$）；安全性方面，两组药物相关的总不良反应发生率、胃肠道症状、神经系统症状、鼻咽炎、上呼吸道感染发生率差异无统计学意义（$P > 0.05$）。**结论**　沃诺拉赞短期治疗糜烂性食管炎可迅速抑酸，促进食管黏膜修复 / 愈合的临床显著效果，安全性与传统质子泵抑制剂（PPIs）兰索拉唑相似，可作为 PPIs 耐药或疗效不佳的理想替代药物。但受文献样本量少、发表、选择性报道等偏倚风险因素影响，仍需大样本、多中心、严格设计的临床试验予以验证。

关键词：糜烂性食管炎；沃诺拉赞；兰索拉唑；随机对照试验；系统评价
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2185-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.039

Systematic review of vonoprazan versus lansoprazole for erosive esophagitis

XIE Xing-xing[1], YU Zhi-gang[1], LIU Xue[1], FAN Ling[1*], GOU Hui[2], YUAN Xiao-kui[3] (1. *Department of Pharmacy*, *Ya'an People's Hospital*, *Ya'an　Sichuan*　625000; 2. *Department of Pharmacy*, *the Affiliated Hospital of Southwest Medical University*, *Luzhou　Sichuan*　646000; 3. *Department of Pharmacy*, *the Fourth People's Hospital of Chengdu*, *Chengdu*　610000)

Abstract: Objective　To systematically evaluate the efficacy and safety of vonoprazan and lansoprazole for erosive esophagitis. **Methods**　Randomized controlled trials (RCTs) of vonoprazan and lansoprazole for erosive esophagitis in Chinese and English databases were searched up to November 2021. Two researchers conducted strict quality evaluation of the included literatures. RevMan 5.3 software was used for the meta-analysis of each index. **Results**　Five clinical randomized, double-blind, parallel trials were included. Totally 1621 patients were included, 825 in the vonoprazan group and 796 in the lansoprazole group. Compared with the lansoprazole group, the mucosal injury repair/healing rate of erosive esophagitis in the vonoprazan group was significantly effective after 2 weeks ($RR = 1.10$, 95%CI: 1.04 － 1.16, $P < 0.05$), while there was no significant difference in the mucosal injury repair/healing rate between 4 weeks and 8 weeks treatment in the vonoprazan group ($P > 0.05$). In terms of safety, there was no significant difference in the incidence of drug-related adverse reactions, gastrointestinal symptoms, neurological symptoms, nasopharyngitis, and the upper respiratory tract infection between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion**　In the short-term treatment of erosive esophagitis, vonoprazan has obvious clinical effect of rapidly inhibiting the acid and promoting the repair/healing of erosive

基金项目：四川省科技厅科技计划苗子工程重点项目（No.2022JDRC0146）；四川省医学会（恒瑞）科研基金专项科研课题（No. 2021HR26）。
作者简介：谢星星，男，硕士，主管药师，主要从事循证药学与个体化药物治疗研究，email：xiexingxing07@163.com　*通信作者：范玲，女，硕士，主管药师，主要从事临床药学与新药临床评价研究，email：fanlin1016@163.com

esophageal mucosa, whose safety is similar to that of traditional proton pump inhibitor lansoprazole, and can be used as an ideal alternative for proton pump inhibitors drug resistance or poor efficacy. However, due to possible risk factors of bias such as small sample size, selective publication and reporting, large sample size, multi-center and strictly designed clinical trials are needed for verification.

Key words: erosive esophagitis; vonoprazan; lansoprazole; randomized controlled trial; systematic review

过量的酸暴露被认为是酸相关疾病损伤的可能机制之一。由于胃食管反流病（GERD）的食管外反流研究和实践均未系统深入，其流行病学特点仍不清楚，就其典型症状（呃逆、反酸、烧心等）而言，其发病率在北美为 18.1% ～ 27.8%，在南美约为 23.1%，在欧洲为 8.8% ～ 25.9%，在中东为 8.7% ～ 33.1%，在澳洲约为 11.6%[1-2]。GERD 的临床表现由不适症状和 / 或并发症构成，表现部位不同其病理生理和临床特征亦不尽相同，根据内镜检查结果将 GERD 分为两种亚型：伴有黏膜损伤的糜烂性食管炎（EE）和无可见糜烂性食管炎的非糜烂性反流病（NERD），一般 NERD 只是胃食管反流的一种轻微形式，随着时间的推移，一部分 NERD 患者可能会发展成 EE[3-4]。质子泵抑制剂（PPIs）作为 GERD 的一线治疗药物已经使用了多年，但仍有一些问题需要改进，如起效缓慢、抑酸不足、夜间抑酸效果差、耐药、易受 *CYP2C19* 基因多态性影响等。有研究表明，三分之二的 EE 患者在首次使用 PPIs 后，由于反应缓慢，症状并没有得到充分缓解，一半的患者即使在治疗 3 d 后仍有症状 [5]。一项全国性的电话调查发现，在 1000 名每周至少有一次胃灼热经历的成年人中，服用 PPIs 后，仍有 79% 的人睡眠受到胃灼热症状的影响，其中 40% 的人第二日的活动能力因此受限 [6]。作为酸分泌途径的最后一步，质子泵上的胃 H^+/K^+-ATP 酶成为酸抑制的首选靶点，也是开发新药的主攻方向。沃诺拉赞（vonoprazan）为武田制药开发的新型钾离子（K^+）竞争酸阻滞剂，于 2014 年 12 月 16 日在日本获批用于 GERD 的治疗，主要通过 K^+竞争性方式可逆性抑制胃 H^+/K^+-ATP 酶活性，并长时间停留于胃壁细胞部位而发挥长效、快速的抑酸作用，且不受胃 pH 环境及 *CYP2C19* 基因多态性的影响 [7]。近年来，有学者通过一系列研究评价了这一新型酸抑制剂治疗酸相关疾病的有效性和安全性，但相比于兰索拉唑治疗 EE 疗效与安全性的循证评价少见，相关临床应用证据更是缺乏，因此，期望本研究结果对上述不足有所补充。

1 资料与方法

1.1 纳入标准

1.1.1 研究类型 临床双盲、随机对照试验（RCTs），语种为中、英文。

1.1.2 研究对象 临床诊断为 EE（年龄 ≥ 18 周岁），并以接受意向性分析为主的受试者。

1.1.3 干预措施 试验组为沃诺拉赞 20 mg • d^{-1} 口服，对照组为兰索拉唑 15 mg • d^{-1} 或 30 mg • d^{-1} 口服。

1.1.4 结局指标 疗效指标分别为 2、4、8 周糜烂性食管炎黏膜损伤修复 / 愈合率；安全性指标为与治疗药物相关的总不良反应发生率及胃肠道症状、神经系统症状、腹泻、腹胀、鼻咽炎、上呼吸道感染发生率。

1.2 排除标准

① 回顾性文献；② 无法提供有效数据；③ 统计方法不恰当；④ 病例分析；⑤ 综述及临床述评性文献。

1.3 检索策略

计算机检索 PubMed/Medline、Embase（via OVID）、EBSCO、中国知网（CNKI）、万方医学网、维普中文期刊全文数据库（VIP）及相关临床试验注册网中有关沃诺拉赞与兰索拉唑对照治疗 EE 的 RCTs，时限为建库至 2021 年 11 月。检索词以中英文对照，以 CNKI 检索为例：主题词（中英文扩展）erosive esophagitis（or EE or EO）或者糜烂性食管炎或者 gastroesophageal reflux disease（or GERD）胃食管反流病并含（and）vonoprazan（or TAK-438_305）或者沃诺拉赞或者沃诺拉生并含（and）lansoprazole 或者兰索拉唑并含（and）randomized clinical trials（or RCTs）或者随机对照试验；采用同名异形词相结合，主题词与自由词相结合的方式，默认扩展检索和模糊检索，并辅以手工检索。

1.4 文献筛选及数据提取

两名研究者根据纳入与排除标准独立评阅文献，对纳入文献进行筛选与数据提取，若遇分歧，通过协商讨论解决。对多篇数据相同的文献采用最新发表为入组原则。

1.5 文献质量评价

采用 Cochrane 系统评价手册 5.1.0 中 RCT 偏倚风险评估工具 [8]：对纳入文献中的受试者随机序列的产生方式、盲法实施的描述程度、分配隐

藏、结果数据完整性（如退出 / 失访率）、选择性报道偏倚风险及其他偏倚风险进行三级风险评估（低、不清楚、高），低偏倚风险说明文献数据可信度高，结果分析可靠，并结合 GRADEprofiler 系统中证据质量字母描述法[9]评价文献质量，“A”为高质量，“B”为中等质量，“C”为低质量，“D”为极低质量。

1.6　统计分析

采用 Cochrane 协作网推荐的 RevMan 5.3 软件对纳入文献进行 meta 分析，以风险比（risk ratio，*RR*）（计数资料）及其 95%*CI* 为疗效和安全性统计效应量。用 *Q* 检验对文献进行异质性评估，$P \geqslant 0.05$ 或 $I^2 \leqslant 50\%$ 表示研究具有同质性，各研究可以合并分析，采用固定效用模型（FEM）进行 meta 分析；反之，采用随机效应模型（REM）进行 meta 分析。采用漏斗图评估各效应量的发表偏倚。

2　结果

2.1　文献检索结果

根据检索策略，初步检索获文献 44 篇，通过去重处理排除 8 篇，阅读题目、摘要以及全文后，纳入英文文献 5 篇，最终进行 meta 分析 5 篇，详见图 1。

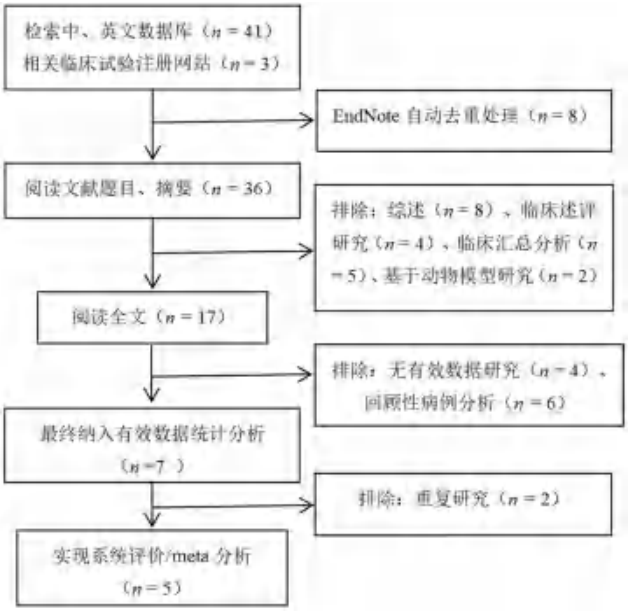

图 1　文献筛选流程图

Fig 1　Document screening flow chart

2.2　文献特征

2.2.1　文献基本信息　根据纳入与排除标准，共入选 5 篇[10-14]RCTs，均为英文文献，文献基本资料齐全，组间年龄、BMI、干预措施、洗脱期及双盲疗程等基线均衡，具有可比性（见表 1）。

表 1　纳入文献基本情况及入组患者各项指标基础水平

Tab 1　Basic data of the literature and the basic level of each index of the patients in the group

作者（时间）	组别	例数 /（*n*）	研究区域	年龄 / 岁	性别（男 / 女）	BMI/（kg・m^{-2}）	干预措施 /（mg・d^{-1}）	洗脱期 /d	双盲疗程 / 周	结局指标
Ashida[10]	VPZ	154	日本	58.3±13.86	115/39	—	20	3～7	8	①②③④⑤
（2015）	LPZ	140		55.8±13.92	99/41		30			
Ashida[11]	VPZ	207	日本	58.3±13.8	137/70	24.1±3.4	20	3～7	8	①②③④⑤
（2016）	LPZ	202		57.4±13.2	154/48	24.9±3.4	30			
Ashida[12]	VPZ	204	日本	56.8±13.6	160/44	—	20	—	24	④⑤
（2018）	LPZ	201		57.8±12.9	140/61		15			
Oshima[13]	VPZ	16	日本	—	9/7	23.3±3.14	20	—	2	①④⑤
（2019）	LPZ	16		—	8/8	23.3±3.341	30			
Xiao[14]	VPZ	244	中国（大陆、台湾）、	54.1±13.16	176/68	24.7±3.389	20	3～7	8	①②③④⑤
（2020）	LPZ	237	韩国、马来西亚	53.8±12.53	179/58	25.31±3.430	30			

注：VPZ ＝沃诺拉赞（vonoprazan）；LPZ ＝兰索拉唑（lansoprazole）；① 2 周黏膜损伤修复 / 愈合率（repair/healing rate of mucosal injury at 2 weeks）；② 4 周黏膜损伤修复 / 愈合率（repair/healing rate of mucosal injury at 4 weeks）；③ 8 周黏膜损伤修复 / 愈合率（repair/healing rate of mucosal injury at 8 weeks）；④ 与药物治疗相关总不良反应发生率（incidence of total adverse reactions associated with drug therapy）；⑤次要不良反应发生率，如胃肠道症状、神经系统症状、鼻咽炎、上呼吸道感染等（incidence of secondary adverse reactions，such as gastrointestinal symptoms，neurological symptoms，nasopharyngitis，upper respiratory tract infection，etc.）。

2.2.2　文献方法学质量特征　依次对 5 篇[10-14] RCTs 入组文献进行各条目下评估，仅 Oshima 等[13]的研究在“其他偏移”（如语言偏移）条目中存在高偏倚风险，GRADE 证据等级为 C，其余均按严格随机序列和盲法实施，偏倚风险评估为低，GRADE 证据等级为 A 或 B（见表 2）。

2.3　Meta 分析结果

2.3.1　疗效评价　采用 2 周、4 周、8 周沃诺拉赞与兰索拉唑对照组中 EE 患者的黏膜损伤愈合情况为疗效指标。

① 2 周黏膜损伤修复 / 愈合率　纳入 4 篇[10-11，13-14] RCTs，共 1060 例 EE 患者。异质性

表 2　Cochrane 各条目偏倚风险评估

Tab 2　Risk assessment of bias in Cochrane entries

作者	随机序列	盲法	分配隐藏	结果完整性	选择性报道	其他偏移	GRADE
Ashida[10]	L	L	U	L	U	U	A
Ashida[11]	L	L	U	U	U	U	B
Ashida[12]	L	L	U	U	U	U	A
Oshima[13]	L	L	U	U	U	H	C
Xiao[14]	L	L	U	L	L	U	A

注（Note）：L. 低偏移风险（low risk of bias）；U. 不清楚（unclear）；H. 高偏移风险（high risk of bias）。

检验（$P > 0.05$，$I^2 = 0\%$）满足同质性，采用 FEM 分析，结果显示两组 2 周黏膜损伤修复 / 愈合率差异有统计学意义（$RR = 1.10$，95%CI：1.04 ～ 1.16，$P = 0.0009$）（见图 2）。

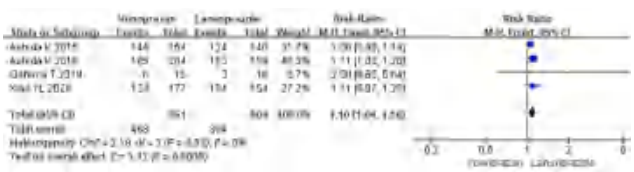

图 2　沃诺拉赞与兰索拉唑 2 周黏膜损伤修复 / 愈合率的对比分析森林图

Fig 2　Forest plot of repair/healing rate of mucosal injury at 2 weeks of vonoprazan and lansoprazole

②4 周黏膜损伤修复 / 愈合率　纳入 3 篇[10-11，14] RCTs，共 1091 例 EE 患者。异质性检验（$P > 0.05$，$I^2 = 0\%$）满足同质性，采用 FEM 分析，结果显示：两组 4 周黏膜损伤修复 / 愈合率差异无统计学意义（$RR = 1.03$，95%CI：0.99 ～ 1.07，$P = 0.14$）（见图 3）。

③8 周黏膜损伤修复 / 愈合率　纳入 3 篇[10-11，14] RCTs，共 1128 例 EE 患者。异质性检验（$P < 0.05$，

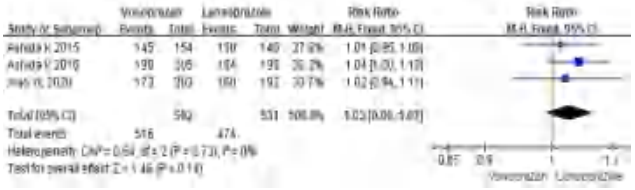

图 3　沃诺拉赞与兰索拉唑 4 周黏膜损伤修复 / 愈合率的对比分析森林图

Fig 3　Forest plot of repair/healing rate of mucosal injury at 4 weeks of vonoprazan and lansoprazole

$I^2 = 74\%$）提示存在异质性，采用 REM 分析，结果显示：两组 8 周黏膜损伤修复 / 愈合率差异无统计学意义（$RR = 1.06$，95%CI：0.99 ～ 1.12，$P = 0.09$）（见图 4）。

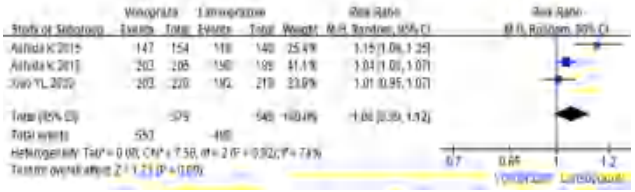

图 4　沃诺拉赞与兰索拉唑 8 周黏膜损伤修复 / 愈合率的对比分析森林图

Fig 4　Forest plot of repair/healing rate of mucosal injury at 8 weeks of vonoprazan and lansoprazole

2.3.2　安全性评价　对沃诺拉赞与兰索拉唑对照治疗 EE 中双盲实施期间发生率 > 2% 的药物不良反应（ADR）进行汇总评估，结果符合统计学要求的仅有与药物相关的总不良反应发生率及胃肠道症状、腹泻、腹胀、神经系统症状、鼻咽炎、上呼吸道感染的发生率，因此对这些不良事件发生率进行合并分析（见表 3）。

表 3　不良事件发生率合并 meta 分析结果

Tab 3　Meta-analysis of incidence of adverse events

ADR	研究数	Q 检验		统计模型	RR	95%CI	P
		I^2	P				
总 ADR 发生率	5[10-14]	0	0.98	FEM	1.03	0.89 ～ 1.19	> 0.05
胃肠道症状	4[10，12-14]	0	0.47	FEM	1.06	0.76 ～ 1.47	> 0.05
腹泻	3[10，12，14]	32	0.23	FEM	0.73	0.39 ～ 1.40	> 0.05
腹胀	3[10，12，14]	0	0.74	FEM	0.66	0.29 ～ 1.54	> 0.05
神经系统症状	3[12-14]	33	0.23	FEM	0.73	0.38 ～ 1.39	> 0.05
鼻咽炎	3[10-12]	0	0.98	FEM	0.94	0.65 ～ 1.36	> 0.05
上呼吸道感染	3[10-12]	23	0.27	FEM	1.23	0.47 ～ 3.27	> 0.05

2.4　发表偏移评估

选取纳入 5 篇 RCT[10-14] 的总 ADR 发生率为发表偏移评估指标并绘制漏斗图，结果显示该项指标的散点较多呈漏斗上层分布，但沿中心线对称仍不够理想，说明本研究中总 ADR 发生率评价指标可能存在发表偏倚风险，即证据来源可靠性欠佳，结果判定需谨慎（见图 5）。

2.5　敏感性分析

在上述疗效与安全性指标中，无论是否满足同质性，均逐一对权重比率差异较大的效应值进行敏感性校正，即分别对 2 周黏膜损伤修复 / 愈合率、腹泻、神经系统症状、总 ADR 发生率中权重比率差异较大的研究项剔除后再次进行统计分析，结果显示校验后的效应指标均差异无统计学意义，说明上述评价指标结果稳定（见表 4）。但受文献语言、选择以及样本量较小等因素影响，

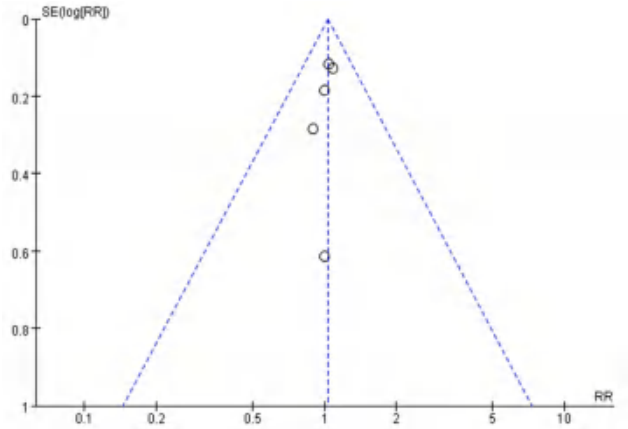

图 5　发表偏倚评估漏斗图

Fig 5　Funnel plot for evaluation of publication bias

应用结果仍需谨慎。

3　讨论

GERD 患者主要表现为胃灼热、反酸等典型症状，以及慢性咳嗽、胸痛、睡眠障碍等食管外症状，均对患者生活质量有较大影响 [15-16]。据报道，当 GERD 患者症状消失时，生活质量也会得到明显改善，且能达到与健康人相似的水平 [17]。因此，缓解症状对 GERD 患者的生活质量至关重要。EE 是一种由 GERD 引起的食管黏膜破裂（或损害）的食管炎性疾病，其表现为相邻黏膜有不明确分界线的蜕皮或红斑区域 [18]，胃酸暴露的增加、食管下括约肌松弛、食管清除功能（如食管运动）降低和食管黏膜防御机制受损是导致 EE 的主要诱因 [19]。除 PPIs 耐药及 *CYP2C19* 基因多态性等影响因素外，临床因酸抑制不足致使一些患者 EE 预后不良，复发率较高 [20]。临床研究表明，EE 的愈合率与 24 h 胃内 pH ＞ 4 保持时间直接相关，沃诺拉赞 20 mg 和 10 mg 的 pH ＞ 4 保持时间比分别为 83.4% 和 63.3%，而传统 PPIs 如埃索美拉唑 20 mg、雷贝拉唑 10 mg，兰索拉唑 30 mg 的 pH ＞ 4 保持时间比分别为 61.2%、65.1% 和 55.9%[18]。构效关系往往决定药物效用，沃诺拉赞亦是如此。一项有关沃诺拉赞的构效学研究证实，沃诺拉赞为一种不需要酸性环境激活的水溶性吡咯环化合物，可以速释剂型给药，给药后在胃内解环成小分子物质经胃黏膜、肠黏膜而快速吸收，血浆浓度迅速达到峰值，发挥快速抑酸作用（PPIs 需要 3 ～ 5 d 才能达到最大效果）[21]。

表 4　存在权重比率差异较大的效应指标敏感性分析结果

Tab 4　Sensitivity analysis of effect indicators with large difference in weight ratio

效应指标	剔除前			剔除后			校验结果
	RR	95%*CI*	*P*	*RR*	95%*CI*	*P*	
2 周黏膜损伤修复 / 愈合率	1.10	1.04 ～ 1.16	0.0009	1.09	1.03 ～ 1.15	0.002	稳定
腹泻	0.73	0.39 ～ 1.40	0.35	0.58	0.29 ～ 1.18	0.13	稳定
神经系统症状	0.73	0.38 ～ 1.39	0.34	2.38	0.51 ～ 12.21	0.26	稳定
总 ADR 发生率	1.03	0.89 ～ 1.19	0.71	1.03	0.88 ～ 1.20	0.71	稳定

本文首次对沃诺拉赞与阳性药物兰索拉唑对照治疗 EE 的随机、双盲对照试验进行系统评价，最终纳入 5 篇 RCTs 进行疗效与安全性评价。基于 RCTs 文献资料特点，通过严格的纳入与排除标准、文献追溯及质量评价、原始数据提取及清洗、第三方统计分析等措施最大限度地降低各项统计指标的偏倚风险，从文献质量评价层面，5 篇 RCTs 文献均属高质量研究，数据来源一致性良好、可信度较高。本文共涉及 1621 例 EE 患者，2 周、4 周、8 周的损伤黏膜修复 / 愈合率及腹泻、腹胀、鼻咽炎、上呼吸道感染等 10 项评估指标，各项指标 meta 分析前考察其异质性和发表偏倚情况，结果中仅 8 周黏膜损伤修复 / 愈合率的效应值存在异质性，分析其异质来源主要与入组文献中相关数据提供不完整及纳入病例数较少有关，结果可靠性可能存在一定风险，其余 9 项指标满足同质，受异质来源影响不大，分析结果较为稳定，但因纳入文献量整体较少，上述 10 项指标的效应值均存在不同程度的发表偏倚风险，因此本文结果以综合各项偏倚因素后所得。本文通过对 EE 患者进行 2 周、4 周、8 周的黏膜损伤修复 / 愈合率及腹泻、腹胀、鼻咽炎、上呼吸道感染等不良反应发生率进行合并统计分析，证实了与 30 mg • d^{-1} 兰索拉唑的给药方案相比，20 mg • d^{-1} 沃诺拉赞在 2 周黏膜损伤愈合率具有显著优势，而 4 周、8 周的黏膜损伤修复 / 愈合率两组差异则无统计学意义，基于此，沃诺拉赞短期快速抑酸效果得到进一步验证，这与 Iwakiri 等 [19] 对沃诺拉赞与兰索拉唑治疗 EE 的临床早期研究结果中 2 周后 EE 患者 FSSG 评分显著降低的结论相似。药物疗效肯定的同时，药物经济学则成为推广使用的重要考量因素，既往较多报道中 PPIs 治疗 EE 呈现出较高复发率以及需长期服药的问题，一定程度上加重了社会和患者的经济负担以及患者依从性的问题。在一项有关沃诺拉赞的成本 - 效用 [22] 研究中，与传统使用 PPIs（埃索美拉唑或雷贝拉唑）相比，沃诺拉赞具有较强的成本 - 效用优势，可成为患者初始治疗症状改善后长期巩固治疗的推荐方案。而根据本文结果，沃诺拉

赞治疗 EE 的成本 - 效用优势亦得到进一步证实，故本文推荐个体化的给予沃诺拉赞治疗 EE。但本文以下不足，可能对结果有一定影响：① 纳入文献较少，缺乏灰色或非传统来源证据；② 意向性分析人群未严格回溯性分析比较，受一次文献选择偏倚风险影响较大；③ 文献的收集及数据提取可能存在漏检或研究者主观判断不严格等情况。

综上，沃诺拉赞短期治疗 EE 具有迅速抑酸，改善反酸、黏膜愈合率高的显著疗效，且具备安全性高、长程巩固治疗费用低等特点，可作为 PPIs 耐药或疗效不佳的理想替代药物。但受文献样本量少、发表、选择性报道等偏倚风险因素影响，仍需大样本、多中心、严格设计的临床试验予以验证。

参考文献

[1] 胡志伟，吴继敏，汪忠镐 . 胃食管反流病的现状诊治难点及对策 [J]. 中华医学杂志，2016，96（12）：988-992.

[2] Yang X，Li Y，Sun Y，et al. Vonoprazan：a novel and potent alternative in the treatment of acid-related diseases [J]. Dig Dis Sci，2018，63（2）：302-311.

[3] Sakurai Y，Mori Y，Okamoto H，et al. Acid-inhibitory effects of vonoprazan 20 mg compared with esomeprazole 20 mg or rabeprazole 10 mg in healthy adult male subjects--a randomised open-label cross-over study [J]. Aliment Pharmacol Ther，2015，42（6）：719-730.

[4] 中国医师协会消化医师分会胃食管反流病专业委员会，中华医学会消化内镜学分会食管疾病协作组 . 2020 年中国胃食管反流病内镜治疗专家共识 [J]. 中华消化内镜杂志，2021，38（1）：1-12.

[5] Fass R. Erosive esophagitis and nonerosive reflux disease（NERD）：comparison of epidemiologic，physiologic，and therapeutic characteristics [J]. J Clin Gastroenterol，2007，41（2）：131-137.

[6] Ronkainen J，Talley NJ，Storskrubb T，et al. Erosive esophagitis is a risk factor for barrett’s esophagus：a community-based endoscopic follow-up study [J]. Am J Gastroenterol，2019，106（11）：1946-1952.

[7] Suzuki S，Gotoda T，Kusano C，et al. Seven-day vonoprazan and low-dose amoxicillin dual therapy as first-line Helicobacter pylori treatment：a multicentre randomised trial in Japan [J]. Gut，2020，69（6）：1019-1026.

[8] Higgins JPT，Green S. Cochrane handbook for systematic reviews of interventions version 5.1.0 [EB/OL]. [2016-03].（2011-03）www. cochranehandbook. org.

[9] Atkins D，Briss PA，Eccles M，et al. Systems for grading the quality of evidence and the strength of recommendations Ⅱ：pilot study of a new system [J]. BMC Health Serv Res，2005，5（1）：18-25.

[10] Ashida K，Sakurai Y，Nishimura A，et al. Randomised clinical trial：a dose-ranging study of vonoprazan，a novel potassium-competitive acid blocker，vs. lansoprazole for the treatment of erosive oesophagitis [J]. Aliment Pharmacol Ther，2015，42（6）：685-695.

[11] Ashida K，Akurai Y，Hori T，et al. Randomised clinical trial：vonoprazan，a novel potassium-competitive acid blocker，*vs*. lansoprazole for the healing of erosive oesophagitis [J]. Aliment Pharmacol Ther，2016，43（2）：240-251.

[12] Ashida K，Iwakiri K，Hiramatsu N，et al. Maintenance for healed erosive esophagitis：phase Ⅲ comparison of vonoprazan with lansoprazole [J]. World J Gastroenterol，2018，24（14）：1550-1561.

[13] Oshima T，Arai E，Taki M，et al. Randomised clinical trial：vonoprazan versus lansoprazole for the initial relief of heartburn in patients with erosive oesophagitis [J]. Aliment Pharmacol Ther，2019，49（2）：140-146.

[14] Xiao Y，Zhang S，Dai N，et al. Phase Ⅲ，randomised，double-blind，multicentre study to evaluate the efficacy and safety of vonoprazan compared with lansoprazole in Asian patients with erosive oesophagitis [J]. Gut，2020，69（2）：224-230.

[15] Bing AJ，Ngu MC，Breslin AB. Pathogenesis of chronic persistent cough associated with gastroesophageal refux [J]. Am J Respir Cirt Care Med，1994，149（31）：160-167.

]16] Jaspersen D，Kulig M，Labenz J，et al. Prevalence of extra oesophageal manifestations in gastro esophageal refux disease：an analysis based on the ProGERD study [J]. Aliment Pharmacol Ther，2003，17（9）：1515-1520.

[17] Bytzer P. Goals of therapy and guideline for treatment success in symptomatic gastroesophageal refux disease patients [J]. Am J Gastroenterol，2003，98（3 Suppl）：S31-39.

[18] Okanobu H，Kohno T，Mouri R，et al. Efficacy of vonoprazan 10 mg compared with 20 mg for the initial treatment in patients with erosive esophagitis：a randomized pilot study [J]. Esophagus，2021，18（3）：669-675.

[19] Iwakiri K，Sakurai Y，Shiino M，et al. A randomized，double-blind study to evaluate the acid-inhibitory effect of vonoprazan（20 mg and 40 mg）in patients with proton-pump inhibitor-resistant erosive esophagitis [J]. Therap Adv Gastroenterol，2017，10（6）：439-451.

[20] Uemura N，Kinoshita Y，Haruma K，et al. Rationale and design of the VISION study：a randomized，open-label study to evaluate the long-term safety of vonoprazan as maintenance treatment in patients with erosive esophagitis [J]. Clin Exp Gastroenterol，2018，11（3）：51-56.

[21] Murakami K，Sakurai Y，Shiino M，et al. Vonoprazan，a novel potassium-competitive acid blocker，as a component of first-line and second-line triple therapy for Helicobacter pylori eradication：a phase Ⅲ，randomised，double-blind study [J]. Gut，2016，65（9）：1439-1446.

[22] Yokoya Y，Igarashi A，Uda A，et al. Cost-utility analysis of a vonoprazan-first strategy versus esomeprazole-or rabeprazole-first strategy in GERD [J]. J Gastroenterol，2019，54（12）：1083-1095.

（收稿日期：2022-02-21；修回日期：2022-03-25）

新型静脉用药调配中心调配模式的实践与应用效果

彭珍珍，邓小云，张毕奎，齐倩如，漆艳玲，方平飞*（中南大学湘雅二医院药学部，长沙　410011）

摘要：目的　制订一组符合我院静脉用药调配中心（PIVAS）实际情况的合理、规范、科学的新型调配模式。**方法**　收集我院 PIVAS 采用传统调配模式和新型调配模式一个月的数据分别纳入对照组和观察组，进行统计分析比对。**结果**　采用新型模式的普通药物和抗菌药物平均排药核对时间和过程差错均显著少于传统模式组，各类药物采用新型配置复核模式后，减少了工作时间，除抗菌药物外，其他各类型药物配置复核过程中的差错数均低于传统模式。**结论**　新型调配模式提高了调配各环节工作效率，减少了差错率，符合我院 PIVAS 实际情况。

关键词：静脉用药调配中心；调配模式；应用效果
中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2191-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.040

Practice and application of new pharmacy intravenous admixture service dispensing mode

PENG Zhen-zhen, DENG Xiao-yun, ZHANG Bi-kui, QI Qian-ru, QI Yan-ling, FANG Ping-fei*
(*Department of Pharmacy*, *The Second Xiangya Hospital of Central South University*, *Changsha* 410011)

Abstract: Objective　To establish a rational and standardized new dispensing mode that is in line with the actual situation of pharmacy intravenous admixture service (PIVAS) in our hospital. **Methods**　Data of PIVAS in our hospital with traditional dispensing mode and new dispensing mode of one month were collected from a control group and an observation group respectively for statistical analysis and comparison. **Results**　The average medicine arrangement and checking time and process error of common antibiotics in the new model group was much shorter than that in the traditional model group. After the new dispensing and checking mode was adopted for all drugs, the working time was reduced. Except for antibiotics, the number of errors of other types of drugs was lower than that of the traditional model. **Conclusion**　The new deployment dispensing mode improves the working efficiency of each process and reduces the error rate, which accords with the actual situation of PIVAS in our hospital.

Key words: pharmacy intravenous admixture service; dispensing mode; application effect

静脉输注是一种直接、侵入性用药过程，因此静脉用药的安全性尤为重要[1-2]。静脉用药调配中心（pharmacy intravenous admixture service，PIVAS）的建立对于静脉用药安全调配具有重要的意义，PIVAS 是指在符合 GMP 标准、依据药物特性设计的操作环境下，由受过培训的药学技术人员，严格按照操作程序，进行包括全身静脉营养液、细胞毒性药物和抗菌药物等静脉用药物的调配，为临床药物治疗与合理用药提供服务的场所，其将原来分散在各个病区不洁净的环境中调配静脉滴注药物的模式转变为在药学监护下在洁净的环境中（万级洁净区、局部百级）集中调配、检查、分发的管理模式，可为临床提供安全、有效的静脉药物治疗服务，是现代医院药学工作的重要内容[3]。据不完全统计，我国已有 2000 余家医院建立了 PIVAS[4]。对 156 所样本医院共计 1 323 852 例住院患者进行统计研究，发现住院患者平均每床日使用输液瓶（袋）数为 3.76 瓶，平

作者简介：彭珍珍，女，硕士研究生，主管药师，主要从事医院药学研究，email：pengzhenzhen0525@163.com　*通信作者：方平飞，男，博士，副主任药师，硕士研究生导师，主要从事体内药物相互作用研究及药代动力学及医院药学研究，email：fangpingfei@csu.edu.cn

均每床日使用输液体积为 782.67 mL，人均输液时间为 7.39 d[5]，医院输液量仍然很高，对医院 PIVAS 输液配置效率和配置质量有较高的要求，而 PIVAS 的医院感染控制与调配工作各环节直接关系到输液成品质量，管理不当可直接造成患者输液反应的发生[6]。PIVAS 调配工作包括排药、核对、配置、复核工作环节，采用一套合适的调配模式将这些环节合理化、规范化和科学化，将有利于 PIVAS 工作的顺利开展，为住院患者提供安全、合理的用药。

1 资料与方法

1.1 背景资料

我院是一家大型综合性三级甲等医院，共有编制床位 3500 张，拥有 40 个临床科室，PIVAS 成立于 2009 年，负责全院肠外营养液、化疗药物及 9 个临床科室的普通药物和抗菌药物的配置，随着 PIVAS 规模不断发展，计划承担更多临床科室普通药物、抗菌药物的配置，配置量将大幅度增加。为了满足日益增长的输液成品产量，我院 PIVAS 将根据输液主药、溶媒种类、医嘱下达时间、临床需求等因素，制订一组符合医院实际情况的新型调配模式——肠外营养化疗药物采取传统单筐单瓶排药核对模式，普通药物、抗菌药物采取集中排药核对模式，并合并“配辅相结合”的配置复核模式。

1.2 排药核对模式

传统的单筐单瓶排药核对模式，即排药人员将每张输液标签贴在对应的溶媒瓶上，与标签上的主药一同放入一个药筐中，核对无误后将药框堆叠传入配置仓内。该模式的优点是操作过程简单，易于校正，但排药时间长，工作效率低，需要大量药筐，叠放的药筐堆放不易查找，不适用于产量较高的 PIVAS[7]。而集中排药核对模式，即系统自动将主药和溶媒的种类、规格、剂量完全一致的处方进行汇总，汇总主药和溶媒总数量，审方药师审核医嘱后打印集中调配汇总单，排药人员按汇总单拿药，集中排药核对模式提高了工作速度，减少了差错率，我院 PIVAS 根据不同药品种类的特点制订了匹配的排药核对模式。

1.2.1 肠外营养液和化疗药物　肠外营养液包含的药品种类繁多，每位患者的营养液不尽相同，而患者对化疗药物剂量呈现个性化需求。我院 PIVAS 负责全院肠外营养液和化疗药物的配置，长期医嘱集中在下午下达到 PIVAS，临时医嘱下达时间不集中，因此，肠外营养液和化疗药物并不适合采用集中排药核对模式，故仍采用单筐单瓶的排药核对模式。

1.2.2 普通药物和抗菌药物　PIVAS 仅负责普通药物和抗菌药物长期医嘱的配置，随机调取了我院一周内该类型药物的医嘱，经汇总分析发现，所有病区该类型药物的医嘱一致性比例较高（溶媒、品种、剂量完全一样），因此实行集中排药核对模式。审方药师审核医嘱打印汇总单后，由两个人进行集中贴签，贴签人员根据贴签机屏幕显示的信息选择对应的溶媒品种，匀速稳定地将溶媒放置在传送带上，贴签机按系统所录入处方信息打印在溶媒瓶上，排药人员在贴签机一端将汇总单进行扫描，根据汇总单上药品的信息排入药筐内，并将汇总单一起放入。排药人员依据统排汇总单进行摆药，最后核对人员进行核对并签名。

1.3 配置复核模式

我院 PIVAS 的配置复核流程采取“配辅相结合”模式，打破了配置复核僵化分开的流程，配置人员和辅助人员既有分工也有合作，尽其力负其责，简化了工作流程，保证配置质量，细化工作流程，提高工作效率。配置和复核都在配置仓内完成，在仓内即刻复核缩短了成品药液在 PIVAS 的滞留时间，洁净区完成复核相比控制区复核避免了空安瓿传出配置仓产生转移性污染。

1.3.1 肠外营养液　肠外营养液配置采取“一配一辅”模式，辅助人员首次核对进仓药品，配置人员再次核对并按照正确的顺序将药品加入相应的溶媒中，非整支药品需在输液标签上打钩确认已正确添加并签名。辅助人员需在配置人员加药时同步核对，监督配置人员加药顺序，确保加入药品的准确度和精确度，再将溶媒按正确顺序灌入营养袋中并签名。配置好的肠外营养液通过传出窗送出仓外，药师检查肠外营养液的颜色有无异常，有无渗漏，有无异物，并置于电子秤上进行称重，然后计算实际重量与理论重量的差值，再次判断肠外营养液的配置是否准确，并签字确认。

1.3.2 普通药物、抗菌药物和化疗药物　普通药物、抗菌药物和化疗药物的配置也是采用“配辅相结合”模式，辅助人员首先核对进仓药品并签字，做好无菌消毒处理，将即将配置的药品置于配置台上，配置人员再核对每单输液标和药品并依次配置，配置完毕后辅助人员检查空安瓿及溶媒的种类和数量，非整支药品检查残余药品量是否准确，并观察成品输液的澄明度、有无漏液，确认无误后输送出仓。由于部分普通药物成品输液含

有多种药品，且有非整支剂量，配置时间较长，“一配一辅”的搭配正好满足配置速度。而抗菌药物、化疗药物所配置输液虽为单一主药，但很多为难溶性粉针剂，配置速度较慢，因此采取“两配一辅”的搭配模式。各类药物调配模式内容见表 1。

表 1　各类型药物调配模式

Tab 1　Dispensing modes of various drugs

主药类型	排药核对模式	配置复核模式
肠外营养液	单筐单瓶	一配一辅
化疗药物	排药核对模式	两配一辅
普通药物	集中排药核对模式	一配一辅
抗菌药物	集中排药核对模式	两配一辅

2　各指标具体评估及分析结果

我院传统调配模式为所有药品单筐单瓶排药核对，无配辅复核模式，现用新型调配模式为单筐单瓶和集中排药核对模式相结合，并合并配辅相结合复核的模式。采用回顾性分析法，收集我院 PIVAS 新型调配模式实施前（2021 年 9 月）和实施后（2021 年 11 月）的数据，分别纳入对照组（传统调配模式）和观察组（新型调配模式），对各类型药物排药核对时间、配置复核时间、过程差错数进行统计对比分析。采用 SPSS 23.0 对数据进行统计学分析，数据资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间均数比较采用 t 检验，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2.1　各指标具体评估

2.1.1　排药核对时间　对照组和观察组排药核对时间均从药师拿到输液标签到完成所有核对。因只有普通药物和抗菌药物的排药核对模式进行了改进，且这两类药物同时排药核对，所以仅对这两类药物每天的排药核对时间进行统计分析。

2.1.2　配置复核时间　观察组和对照组配置复核时间均从配置人员在仓内配置第一支药物到所有药物在仓内复核完成为止，所有药物类型的配置复核模式都进行了改进，对所有类型的药物每天的配置复核时间进行统计分析。

2.1.3　过程差错数　每日统计观察组和对照组各类药品的排药核对、配置复核过程中出现的差错数。

2.2　分析结果

2.2.1　排药核对时间对比结果　普通药物及抗菌药物排药核对过程各指标对比见表 2，结果表明观察组的平均排药核对时间和过程差错均显著低于对照组（$P<0.05$），即普通药物和抗菌药物采用集中排药核对模式显著提高了工作效率。

表 2　普通药物及抗菌药物排药核对过程各指标对比

Tab 2　Indexes in medicine arrangement and checking of common antibiotics

组别	样本量 / 袋	平均耗时 /h	过程差错数 / 次
对照组	20 840	1.72±0.21	0.58±0.03
观察组	21 200	1.08±0.18	0.26±0.02
t 值		12.67	48.61
P 值		＜ 0.001	＜ 0.001

2.2.2　配置复核对比结果　配置复核对比结果见表 3，各观察组的平均配置复核时间均显著低于对照组（$P<0.05$）。即各类药品采用配辅相结合的配置复核模式后显著提高了工作效率。

表 3　各类型药物配置复核过程各指标对比

Tab 3　Indexes in dispensing and checking process of various drugs

组别	普通药物			抗菌药物		
	样本量 / 袋	平均耗时 /h	过程差错数 / 次	样本量 / 袋	平均耗时 /h	过程差错数 / 次
对照组	7490	1.57±0.23	0.080±0.003	7301	1.66±0.20	0.050±0.004
观察组	7650	1.26±0.19	0.055±0.001	7350	1.50±0.15	0.049±0.002
t 值		5.69	43.30		3.51	1.23
P 值		＜ 0.001	＜ 0.001		0.001	0.226

组别	化疗药物			肠外营养		
	样本量 / 袋	平均耗时 /h	过程差错数 / 次	样本量 / 袋	平均耗时 /h	过程差错数 / 次
对照组	6785	2.25±0.18	0.071±0.002	2684	2.09±0.18	0.231±0.01
观察组	6900	2.08±0.19	0.066±0.002	2717	1.84±0.17	0.177±0.01
t 值		3.56	9.68		5.53	20.91
P 值		＜ 0.001	＜ 0.001		＜ 0.001	＜ 0.001

2.2.3　过程差错数对比结果　具体数据及统计分析对比结果见表 2 和表 3，除抗菌药物外，其他各类型药物配置复核过程中的差错数均显著低于对照组。结果显示，在我院 PIVAS 采取新型调配模式后，在排药配置人员总数不变的情况下，排药核对和配置复核两个过程的工作效率显著提高，工作时间减少，工作差错数降低，新型配置模式对工作内容进行了规整，精简了工作环节，优化了工作流程，提高了调配人员专注力。

3　讨论

国内多数医院采取单一的单排模式或集中调配模式，相比于已报道的 PIVAS 调配模式 [8-10]，我院 PIVAS 通过对实际情况的摸索，不拘泥于单一的排药核对、配置复核模式，而是根据实际情况，不同药品类型匹配不同的调配模式，且比较了传统的配置复核模式和“配辅相结合”的配置复核模式，肯定了“配辅相结合”的配置复核模式的高效率、低差错的优势。

新型调配模式相比于传统模式，各个工作环节更精确化，调配流程中岗位更细化，需要调配人员能够胜任各个工作岗位，在新型调配模式制订过程中，为了保证工作效率及调配人员在各个工作岗位流转率，我们根据每个岗位工作难易程度制订了不同系数积分的绩效考核和智能化精细排班系统，绩效考核系统和排班系统的制订采用了 PDCA 循环管理模式，经过不断优化保障了新型调配模式的顺利实施。PIVAS 的发展也离不开先进软硬件系统的支持，我院 PIVAS 采用了输液配置扫描信息确认系统，药师在配置药物前 PDA 扫描每瓶输液标签上的二维码，如果该瓶输液停止了医嘱或批次不适宜，将语音播报提醒药师，保障了药师配置时的专注度和成品输液配置的准确性。智能贴签机的使用也降低了工作错误率，提高了贴签速度，国内很多医院 PIVAS 的发展也依托于先进的软硬件支持，天津医科大学总医院的智能贴签机在医嘱处方的溶媒发生更改时进行警示音提醒，若溶媒摆放错误，贴签机会停止工作等功能，实现了对溶媒的零差错识别 [11]；河北省人民医院的 PIVAS 运用医疗信息系统建立细胞毒性药物的全流程信息化闭环管理，提升了 PIVAS 的药学服务整体水平 [12]。

这套以智能化绩效考核和排班系统为依托，先进的软硬件为支持，传统单排和集中统排相结合，配置和复核一体化的 PIVAS 新型调配模式，符合我院实际情况，保证了药品调配质量，提高了调配效率，降低了工作差错，为住院患者提供安全用药。

参考文献

[1] 隗洁，隗慧芳 . 静脉用药集中调配的质量管理 [J]. 中国卫生标准管理，2016，7（18）：115-117

[2] 耿魁魁，吴凤芝，李民，等 . 掌上电脑全程扫描状态下静脉用药调配中心工作模式的转变 [J]. 中国药业，2019，28（1）：93-95.

[3] 刘新春，米文杰，王锦宏 . 静脉用药调配中心（室）教程 [M]. 上海：复旦大学出版社，2014.

[4] 吕红梅，吴永佩 . 我国静脉用药集中调配模式的创建与现状 [J]. 中国药房，2021，32（6）：641-646.

[5] 沈妤 . 静配中心优化院感控制管理对输液质量的影响分析 [J]. 当代护士（中旬刊），2017（2）：155-157.

[6] Wang H，Xie WH，Liu ZY，et al. Evaluation of the inpatient usage of intravenous infusion in 156 hospitals [J]. J Pharm Pract，2017，35（6）：573-576.

[7] 吴圣洁 . 应用 PDCA 管理减少静脉用药调配中心成品输液漏液的实践探索 [J]. 中国医疗管理科学，2019，9（6）：28-31.

[8] 张妍 . 新型排药模式在医院静配中心的应用效果 [J]. 中医药管理杂志，2020，28（18）：216-218.

[9] 李志宏，陈维红，李芳 . 山西省医院静脉用药调配中心运行现状和工作模式调查比较 [J]. 中国药房，2015，26（7）：945-948.

[10] 曹玉合，刘莉，向永在 . 集中统排模式在静脉用药调配中心应用效果分析 [J]. 社区医学杂志，2020，18（4）：300-303.

[11] 王竹云，张文军，翟旸 . 自动化建设提升我院 PIVAS 药学服务质量 [J]. 天津药学，2020，32（3）：74-76.

[12] 庞国勋，赵建群，靳会欣，等 . 信息系统优化在细胞毒药物全流程调配中的应用 [J]. 中南药学，2020，18（7）：1238-1242.

（收稿日期：2022-02-04；修回日期：2022-04-09）

血清 IL-6，IL-10 与非小细胞肺癌患者免疫治疗皮肤毒性的相关性分析

张欣[1, 2]，高洁[1, 2]，张慧勤[2]，孙文[2]，蒋晓东[1, 2*]（1. 南京医科大学连云港临床医学院，江苏　连云港　222061；2. 连云港市第一人民医院，江苏　连云港　222061）

摘要：目的　分析接受免疫治疗后发生皮肤毒性的非小细胞肺癌（NSCLC）患者血清中白细胞介素 -6（IL-6），白细胞介素 -10（IL-10）的表达水平与皮肤毒性严重程度的相关性。**方法**　选取 2019 年 9 月—2021 年 9 月我院发生免疫治疗相关皮肤毒性的 NSCLC 患者 105 例作为观察组，55 例健康体检者为对照组。分析 IL-6、IL-10 的表达水平与 NSCLC 患者的临床特征、各级别皮肤毒性的关系。**结果**　NSCLC 患者的血清 IL-6，IL-10 水平高于健康人群。血清 IL-6、IL-10 的水平与 NSCLC 患者的性别、年龄、吸烟史、病理类型无明显统计学相关性（$P > 0.05$），但随着肿瘤分期晚、ECOG 评分升高、发生远处转移，IL-6、IL-10 水平明显升高（$P < 0.05$）。根据皮肤毒性分为 G1 组、G2 组和 G3 组，免疫治疗前各组患者的血清 IL-6、IL-10 表达水平无明显差异，免疫治疗后 G3 组的 IL-6、IL-10 浓度显著高于 G1 组和 G2 组（$P < 0.05$）。**结论**　血清 IL-6、IL-10 的高表达水平与 NSCLC 患者高肿瘤负荷相关，免疫治疗过程中动态监测 IL-6、IL-10 的浓度变化有望提前识别治疗相关皮肤毒性的严重程度。

关键词：非小细胞肺癌；免疫治疗；皮肤毒性反应；白细胞介素 -6；白细胞介素 -10
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2195-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.041

Correlation between serum expression of IL-6 and IL-10 and severity of immunotherapy-related dermal toxicity in patients with non-small cell lung cancer

ZHANG Xin[1, 2], GAO Jie[1, 2], ZHANG Hui-qin[2], SUN Wen[2], JIANG Xiao-dong[1, 2*] (1. *Lianyungang Clinical College of Nanjing Medical University*, *Lianyungang Jiangsu* 222061; 2. *The First People's Hospital of Lianyungang*, *Lianyungan Jiangsu* 222061)

Abstract: Objective To determine the correlation between the severity of immunotherapy-related dermal toxicity and the levels of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10) in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Totally 105 patients with NSCLC with immunotherapy-related dermal toxicity in our hospital from September 2019 to September 2021 were selected as an observation group, while another 55 healthy subjects served as an control group. The correlation between the expression levels of IL-6 and IL-10 and the clinical characteristics and dermal toxicity of NSCLC patients was analyzed. **Results** The expression levels of IL-6 and IL-10 in the serum of NSCLC patients were higher than those in healthy subjects. The expression levels of IL-6 and IL-10 in the serum had no significant correlation with gender, age, smoking history, and pathological type of NSCLC patients ($P > 0.05$). However, the levels of IL-6 and IL-10 significantly increased with advanced tumor stage, increased ECOG score, and distant metastasis ($P < 0.05$). When groups were decided by dermal toxicity (G1/G2/G3), there was no significant difference in the expression levels of serum IL-6 and IL-10 in each group of patients before the immunotherapy, while the concentrations of IL-6 and IL-10 in group G3 were

基金项目：江苏省自然科学基金面上项目（No.BK20191211）；江苏省研究生科研与实践创新计划（No.SJCX21_1152）。
作者简介：张欣，女，硕士研究生，主要从事肺癌免疫治疗方面的研究，email：Zxin_96@163.com　*通信作者：蒋晓东，男，博士，主任医师，博士研究生导师，主要从事是恶性肿瘤免疫治疗及抗血管生成治疗方面的研究，email：jxdpaper@163.com

significantly higher than those of group G1 and G2 after the immunotherapy (P ＜ 0.05). **Conclusion** High expression levels of serum IL-6 and IL-10 are associated with high tumor burden in NSCLC patients. Dynamic monitoring of cytokine IL-6 and IL-10 concentrations during the immunotherapy may predict the severity of immune-related dermal toxicity.

Key words: non-small cell lung cancer; immunotherapy; dermal toxicity; IL-6; IL-10

非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC）是肺癌患者的主要病理类型，由于无典型症状以及早期筛查手段未普及等原因，大多数患者在确诊时已处于晚期，预后较差[1]。在过去10余年，以免疫检查点抑制剂为代表的免疫治疗在提高NSCLC患者生存预后方面发挥了显著作用，然而部分患者在接受免疫治疗后出现免疫相关的不良反应（immune-related adverse events，irAEs），其中免疫相关皮肤毒性反应较常见[2]。有研究发现一些细胞因子促进irAEs的发生，并且对irAEs的发生具有预测作用[3]。白细胞介素-6（IL-6）是一种免疫调节细胞因子，可以由不同类型的细胞分泌产生，在肿瘤细胞生长、炎症反应和自身免疫性疾病等方面发挥重要作用，可以介导不良反应的发生[4]。而白细胞介素-10（IL-10）同样是多功能细胞因子，可以诱导T细胞失能，抑制NK细胞的表达，此外，还可抑制组织相容性复合体（MHC-Ⅱ）类分子的表达，与炎症微环境相关[5]。本研究回顾性分析105例发生免疫相关皮肤毒性反应的患者血清中IL-6和IL-10的表达水平，观察不同程度的皮肤毒性患者中IL-6和IL-10的浓度变化，分析血清IL-6和IL-10在NSCLC患者免疫相关皮肤毒性发生、发展中的临床意义。

1　资料与方法

1.1　一般资料

选取2019年9月—2021年9月在我院规范接受免疫治疗，且病历资料详细记录发生皮肤毒性的105例肺癌患者为观察组。观察组纳入标准：①符合NSCLC诊断标准；②首次行免疫治疗。排除标准：①合并其他原发性恶性肿瘤患者；②自身免疫系统疾病、血液系统性疾病、严重肝肾功能障碍患者。本院同时期正常体检者55例为对照组。其年龄、性别及体质量指数均与观察组匹配。本研究经医院伦理协会审核通过（文件批号：KY-20210429001-01），患者及家属签署研究方案知情同意书。

1.2　观察指标

收集NSCLC患者的临床资料（年龄、性别、吸烟史、ECOG评分、组织病理类型、临床分期、有无远处转移），免疫治疗前的血清IL-6、IL-10浓度，发生皮肤毒性不良事件时的血清IL-6、IL-10浓度。由两名有经验的医师进行皮肤毒性分级评价，如有争议则综合第三名医师意见对疗效进行评定。依据中国临床肿瘤学会免疫检查点抑制剂相关的毒性管理指南（2019版）将皮肤毒性分级为轻度毒性（G1）、中度毒性（G2）、重度毒性（G3）[6]。

1.3　检测方法

使用EDTA抗凝管采集正常人及患者空腹静脉血6 mL，轻柔上下颠倒混匀，4 ℃、1500 g离心20 min，小心吸取上清液。采用酶联免疫吸附试验（ELISA）法按照ELISA试剂盒（上海广锐生物科技有限公司）说明书检测血清IL-6和IL-10的浓度。

1.4　统计方法

采用SPSS 26.0软件分析，计量资料均以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用独立样本t检验。计数资料以例（%）表示，组间比较采用χ^2检验。应用ROC曲线分析，并计算曲线下面积（AUC），分析血清IL-6、IL-10及两者联合指标对皮肤毒性分级的预测作用。P ＜ 0.05代表差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　NSCLC患者与健康人IL-6、IL-10的浓度比较

免疫治疗前NSCLC患者血清中IL-6、IL-10的水平分别为（19.49±5.29）pg·mL^{-1}和（42.94±15.47）pg·mL^{-1}。而健康群体分别为（2.92±1.57）pg·mL^{-1}和（3.21±1.91）pg·mL^{-1}。经独立t检验，NSCLC患者的IL-6及IL-10表达明显高于健康群体（P ＜ 0.05）（见图1）。

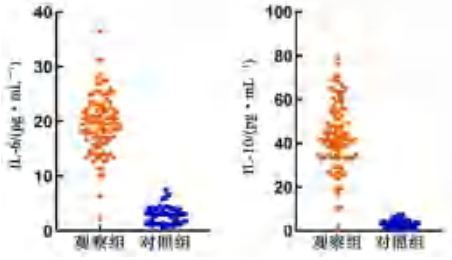

图1　NSCLC患者与健康群体血清IL-6、IL-10水平比较

Fig 1　Serum IL-6 and IL-10 level of NSCLC patients and healthy controls

2.2　血清 IL-6 和 IL-10 水平在不同临床特征的 NSCLC 患者中的变化

依据患者的性别、年龄、ECOG 评分、组织病理类型、临床分期、有无远处转移、吸烟史进行分组。分析发现 NSCLC 患者的 IL-6 与 IL-10 水平与性别、年龄、吸烟史、组织病理类型无明显关系（$P > 0.05$）。ECOG 评分高、分期更晚、有远处转移的患者血清中 IL-6、IL-10 的水平明显升高（$P < 0.05$）。结果见表 1。

表 1　血清 IL-6、IL-10 在不同临床特征的 NSCLC 患者中的变化

Tab 1　Changes in the serum IL-6 and IL-10 in NSCLC patients with different clinical manifestations

临床特征	IL-6/（pg•mL^{-1}）	*P*	IL-10/（pg•mL^{-1}）	*P*
性别		0.17		0.45
男	20.19±6.26		44.06±18.45	
女	18.78±4.01		41.80±11.75	
年龄 / 岁		0.87		0.17
≥ 60	19.42±4.99		41.03±15.86	
< 60	19.58±5.66		45.21±14.82	
ECOG 评分		< 0.001		0.01
0 ～ 1	17.33±4.64		39.47±13.27	
2	22.16±4.85		47.23±16.98	
组织病理类型		0.96		0.15
腺癌	19.52±4.80		45.25±16.04	
鳞癌	19.47±5.74		40.84±14.76	
分期		< 0.001		< 0.001
Ⅲ	16.01±4.85		35.83±12.89	
Ⅳ	21.55±4.41		47.14±15.40	
吸烟史		0.36		0.74
有	19.02±5.73		42.43±15.37	
无	19.97±4.81		43.46±15.69	
远处转移		< 0.001		< 0.001
是	21.92±4.16		47.84±15.31	
否	15.84±4.71		35.58±12.63	

2.3　血清 IL-6 和 IL-10 水平在各皮肤毒性分级组的变化

根据免疫治疗相关皮肤毒性分级标准，观察组的患者可以分为 G1 组（26 例），G2 组（46 例），G3 组（33 例）。统计分析发现这 3 个亚组接受免疫治疗前血清 IL-6 和 IL-10 的表达水平无明显差异（$P > 0.05$）（见图 2）。在患者接受免疫治疗发生皮肤毒性不良反应时复查 IL-6 和 IL-10，根据皮肤毒性分级分组进行配对 *t* 检验。患者的细胞因子会随着毒性分级有不同程度的变化。其中 G3 组的 IL-6 和 IL-10 水平升高较 G1、G2 组更加明显（$P < 0.05$）（见图 3）。

2.4　血清 IL-6 和 IL-10 水平对皮肤毒性的预测价值

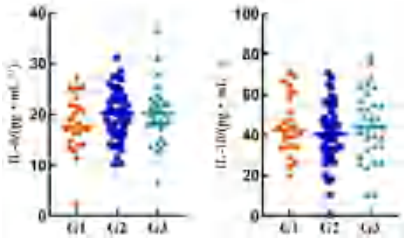

图 2　各皮肤毒性分级患者免疫治疗前 IL-6 和 IL-10 水平比较

Fig 2　Serum IL-6 and IL-10 level of each dermal toxicity grade before the immunotherapy

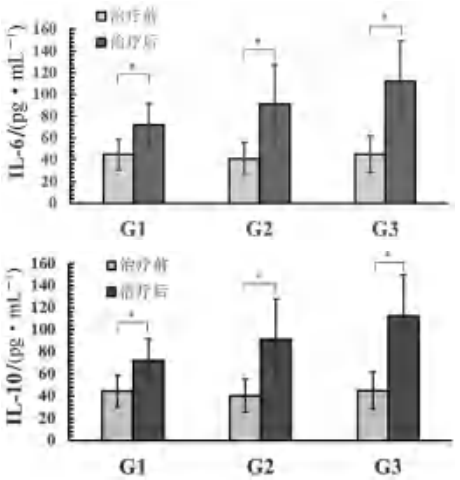

图 3　各组血清 IL-6 和 IL-10 浓度免疫治疗前后的变化（$^{*}P < 0.05$）

Fig 3　Change in the serum IL-6 and IL-10 concentrations before and after the immunotherapy in both groups（$^{*}P < 0.05$）

根据皮肤毒性管理指南，G3 及以上情况建议暂停免疫治疗。本研究当中以 G3 为阳性组，G1/G2 为阴性组绘制免疫治疗后 IL-6、IL10 表达的 ROC 曲线，并采用 SPSS 26.0 软件对这两个指标进行综合回归，建立 Logistic 评估模型获得预测概率后进行 ROC 分析。结果见表 2。

表 2　ROC 曲线分析结果

Tab 2　ROC curves

参数	*AUC*	95%*CI*	敏感度	特异度	*P* 值
IL-6	0.85	（0.763，0.936）	0.73	0.78	< 0.001
IL-10	0.69	（0.576，0.801）	0.56	0.85	< 0.001
IL-6/IL-10	0.88	（0.813，0.956）	0.85	0.82	< 0.001

3　讨论

肺癌的发病人数及死亡人数均占中国恶性肿瘤患者的首位，其中 NSCLC 患者约占肺癌人数的 85%，并且患者大多处于中晚期才被确诊，而发生远处转移的患者 5 年生存率仅有 6%[1, 7]。近年来，免疫治疗因为毒性小、疗效好等优点在 NSCLC 综合治疗中的地位日渐突出，已被批准用于治疗晚期 NSCLC 一线、二线治疗，并且晚期的 NSCLC 接受放化疗以后接受免疫治疗仍能

使临床获益[8]。免疫治疗主要是通过重新激活机体免疫系统发挥杀灭肿瘤的作用，但是打破免疫系统平衡会累及正常组织从而导致 irAEs 的发生。皮肤毒性是最常见的 irAEs 类型，40% 以上的 NSCLC 患者在接受免疫治疗后会出现皮肤毒性反应，影响患者生活，并且增加心理负担[6，9]。它的发生机制尚未完全清楚，有研究认为 irAEs 可能与自身免疫耐受、正常组织和肿瘤细胞存在共同抗原、产生自身抗体、直接结合正常细胞表面表达的免疫检查点分子激活补体以及炎性因子的水平增加有关[10-12]。

尽管有研究报道免疫相关皮肤毒性大多数为轻度且有自限性的，但仍有一些严重事件发生，干扰免疫治疗的疗效或需要终止治疗，甚至导致患者死亡[11]。因此，寻找有效的预测标志物协助临床医师提前识别重度皮肤毒性的患者，及时进行干预以及调整治疗方案等十分必要。

血清 IL-6、IL-10 是重要的炎症细胞因子，可以反映机体炎症病变程度。IL-6 既可以由淋巴细胞产生，也可以由非淋巴细胞合成。IL-10 也是由 B 细胞、单核细胞、巨噬细胞等细胞分泌的一种多效细胞因子，可从多个通路影响机体免疫反应。这两个细胞因子在维持体内细胞因子平衡状态具有重要作用。本研究对发生免疫相关皮肤毒性的 NSCLC 患者在治疗前后的血清中 IL-6、IL-8 浓度变化进行分析。发现各皮肤毒性分组的患者在接受免疫治疗前血清 IL-6 和 IL-10 的表达水平并无明显差异；在接受免疫治疗后，患者 IL-6、IL-10 表达水平均较治疗前升高，并且毒性分级越高，IL-6 和 IL-10 的升高会更加明显。既往研究发现 IL-6 依赖 JAK/STAT3 信号通路诱导炎性基因的转录，从而加重机体炎症反应。通常在 irAEs 发病早期 IL-6 会显著增高，在发生 G3 及以上级别 irAEs 患者的血清 IL-10 的表达明显升高[13-15]。

在本研究条件下发现细胞因子 IL-6、IL-10 的高表达与 NSCLC 患者的高肿瘤负荷有关，并且，IL-6、IL-10 的水平变化幅度与免疫相关皮肤毒性级别相符。因此，在 NSCLC 患者免疫治疗过程中动态监测细胞因子 IL-6、IL-10 的水平变化有望预估不良反应的严重程度，为临床诊治提供科学依据。但是本研究样本量较少，可能会降低研究结果的可靠性，后续需要多中心、大样本的临床研究进一步支持验证。

参考文献

[1] Siegel RL，Miller KD，Fuchs HE，et al. Cancer statistics，2021[J]. CA Cancer J Clin，2021，71（1）：7-33.

[2] 甘婉玲，韩辰燕，刘晓芯 . 肺癌患者免疫治疗所致皮肤毒性反应症状研究 [J]. 实用临床医药杂志，2021，25（22）：21-25.

[3] Kang JH，Bluestone JA，Young A. Predicting and preventing immune checkpoint inhibitor toxicity：targeting cytokines [J]. Trends Immunol，2021，42（4）：293-311.

[4] Ke W，Zhang L，Dai Y. The role of IL-6 in immunotherapy of non-small cell lung cancer（NSCLC）with immune-related adverse events（irAEs）[J]. Thorac Cancer，2020，11（4）：835-839.

[5] Wang H，Zhou F，Zhao C，et al. Interleukin-10 is a promising marker for immune-related adverse events in patients with non-small cell lung cancer receiving immunotherapy [J]. Front Immunol，2022，13：840313.

[6] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会 . 免疫检查点抑制剂相关的毒性管理指南 2019 [M]. 北京：人民卫生出版社，2019：14-23.

[7] Herbst RS，Morgensztern D，Boshoff C.The biology and management of non-small cell lung cancer [J]. Nature，2018，553（7689）：446-454.

[8] Spigel DR，Corinne FF，Gray JE，et al. Five-year survival outcomes from the PACIFIC trial：durvalumab after chemoradiotherapy in stage Ⅲ non-small-cell lung cancer [J]. J Clin Oncol，2022，40（12）：1301-1311.

[9] 吴丽霞，李胜利，杜秀平 . 晚期非小细胞肺癌患者免疫治疗的皮肤毒性反应：荟萃分析和系统评价 [J]. 现代肿瘤医学，2022，30（8）：1388-1393.

[10] Kennedy LB，Salama AKS. A review of cancer immunotherapy toxicity [J]. CA Cancer J Clin，2020，70（2）：86-104.

[11] 白日兰，崔久嵬 . 免疫检查点抑制剂治疗相关不良反应——新探索、新挑战 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，2021，28（5）：419-430.

[12] 樊剑，赵家义，韩一平 . 免疫检查点抑制剂相关毒性的机制及其治疗的研究进展 [J]. 国际呼吸杂志，2021，41（2）：154-160.

[13] Husain B，Kirchberger MC，Erdmann M，et al. Inflammatory markers in autoimmunity induced by checkpoint inhibitors [J]. J Cancer Res Clin Oncol，2021，147（6）：1623-1630.

[14] Nishikawa T，Hagihara K，Serada S，et al. Transcriptional complex formation of c-Fos，STAT3，and hepatocyte NF-1 alpha is essential for cytokine-driven C-reactive protein gene expression [J]. J Immunol，2008，180（5）：3492-3501.

[15] Phillips GS，Wu J，Hellmann MD，et al. treatment outcomes of immune-related cutaneous adverse events [J]. J Clin Oncol，2019，37（30）：2746-2758.

（收稿日期：2022-04-07；修回日期：2022-06-13）

药品不良反应

卡瑞利珠单抗相关不良反应文献分析

乔逸，陈苏宁，郭桂萍，王聪聪，葛洁，关月，王婧雯*（空军军医大学西京医院药剂科，西安　710032）

摘要：目的　探讨卡瑞利珠单抗致不良反应的一般规律和特点，为临床合理用药提供参考。**方法**　以“卡瑞利珠单抗”“不良反应”为检索词，检索建库至 2021 年 12 月 31 日中国知网、万方、维普、PubMed 等数据库，搜集病例资料，按照患者一般情况、用药情况、不良反应发生及转归等进行统计分析。**结果**　共收集 25 篇文献，包含 27 例卡瑞利珠单抗所致不良反应；累及系统器官主要为皮肤系统、呼吸系统、心血管系统、神经肌肉系统、内分泌系统以及牙龈等。评价结果为“很可能”的占 74.07%（20/27）；男女比例为 2.38∶1。发生时间在 1 ～ 21 d 的占 33.33%（9/27）。临床表现以皮肤系统损害（占 34.48%）为主，其中死亡 2 例。**结论**　卡瑞利珠单抗不良反应表现多样，医药护应该重视，提高临床合理用药水平，确保患者用药安全。

关键词：卡瑞利珠单抗；不良反应；文献分析

中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2199-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.042

Literature review of adverse reactions induced by camrelizumab

QIAO Yi, CHEN Su-ning, GUO Gui-ping, WANG Cong-cong, GE Jie, GUAN Yue, WANG Jing-wen*
(*Department of Pharmacy*, *Xijing Hospital*, *Air Force Medical University*, *Xi'an*　710032)

Abstract: Objective　To determine the general rules and characteristics of adverse drug reactions (ADRs) induced by camrelizumab to provide references for its rational clinical use. **Methods**　Base on such key words as “camrelizumab” and “adverse reaction”, literatures were searched from the databases of CNKI, Wanfang, VIP and PubMed from establishment of the database to 2021. The statistics and analysis were conducted based on the common information, medication, the occurrence and prognosis of ADRs in patients. **Results**　Totally 25 papers involving 27 ADRs were collected, involving the skin, respiratory system, cardiovascular system, neuromuscular system, endocrine system and the gum. Totally 20 (74.07%) patients were evaluated as “probable”, the ratio of male to female was 2.38∶1, the proportion of ADRs from day 1 to 21 was 33.33% (9/27). ADRs mainly occurred in the skin (34.48%), and 2 patients died. **Conclusion**　ADRs caused by camrelizumab are diversified, to which the clinicians, pharmacists, and nurses should pay attention to improve the rational drug use, and ensure the medication safety.

Key words: camrelizumab; adverse drug reaction; literature analysis

卡瑞利珠单抗是我国自主研发的人源化程序性死亡受体 1（PD-1），可与人 PD-1 结合并阻断 PD-1/ 程序性死亡配体 1（PD-L1）通路，恢复机体的抗肿瘤免疫力，从而形成肿瘤免疫治疗的基础[1]。卡瑞利珠单抗于 2019 年 5 月 29 日经国家药品监督管理局批准上市，用于至少经过二线系统化疗的复发或难治性经典型霍奇金淋巴瘤患者的治疗。最新修订的说明书适应证包括：用于既往接受过索拉非尼治疗和 / 或含奥沙利铂系统化疗的晚期肝细胞癌患者的治疗；联合培美曲塞和

基金项目：国家自然科学基金项目（No.72074218）。

作者简介：乔逸，男，副主任药师，硕士研究生导师，主要从事临床药学与药事管理研究，email：694305040@qq.com　*通信作者：王婧雯，女，副主任药师，博士研究生导师，主要从事医院管理药学研究，email：wangjingwen8021@ 163.com

卡铂用于表皮生长因子受体（EGFR）基因突变阴性和间变性淋巴瘤激酶（ALK）阴性的、不可手术切除的局部晚期或转移性非鳞状非小细胞肺癌（NSCLC）的一线治疗和既往接受过一线化疗后疾病进展或不可耐受的局部晚期或转移性食管鳞癌患者的治疗。作为一个新上市的国产 PD-1，卡瑞利珠单抗在临床疗效及不良反应等的数据仍在不断积累中[2]。常见不良反应如皮疹、转氨酶升高等，反应性皮肤毛细血管增生症的不良反应较为独特；为全面了解卡瑞利珠单抗不良反应的临床特点，本文收集文献报道的不良反应病例并进行分析，为临床合理用药提供参考。

1　资料来源

中文以“卡瑞利珠单抗”“不良反应”为检索词，英文以“Camrelizumab”“adverse reaction”“side effect”“case”为检索词分别检索中国知网、万方、维普数据库和 PubMed、Web of Science、Embase 数据库，检索时间从建库至 2021 年 12 月 31 日，收集卡瑞利珠单抗相关 ADR 的病例报告类文献。文献纳入标准：① ADR 与卡瑞利珠单抗相关；② 患者基本信息、临床表现及治疗等资料相对完整；③ 文献语种限汉语和英语。排除标准：① 非病例报告类文献；② 重复发表或含重复病例的文献。

2　方法与结果

2.1　方法

由两位研究者独立进行文献筛选，交叉核对后选定纳入分析的文献，遇到分歧讨论解决。卡瑞利珠单抗所致的 ADR 的报道中，初次检索共得到 33 篇，剔除综述性文献 3 篇及信息不全文献 5 篇，最终纳入本研究的文献 25 篇，收集病例 27 例。以 2021 年分布最多，为 21 例（77.78%），2020 年共 6 例（22.22%）。提取患者的性别、年龄、卡瑞利珠单抗用药指征、用药情况、ADR 名称、发生时间、临床表现、临床处置及转归等。利用 Excel 表格对研究内容进行归纳和分析，参考世界卫生组织不良反应术语集（WHOART）2015 中文更新版[3]及国家药品不良反应监测中心采用的评价标准进行统计分析[4]。

2.2　结果

共收集到 25 篇文献报道[2，5-28]，涉及 27 例患者，纳入卡瑞利珠单抗致不良反应类型 11 类，包括反应性毛细血管增生症 / 瘤、中毒性表皮坏死松解症、免疫相关性肺炎、免疫性心肌炎、牙龈反应性毛细血管瘤、肝功能障碍、心肌酸升高、高血压、急性肾损伤、血小板减少和糖尿病酮症酸中毒。具体结果见表 1。

表 1　卡瑞利珠单抗相关不良反应患者的临床资料

Tab 1　Clinical characteristics of patients with ADRs induced by camrelizumab

No.	ADR 名称	累及系统 / 器官	基本信息	基础疾病	剂量 / 用法 / 频次	总用量 / 疗程（次）	发生时间 / d	临床表现	处置	预后	相关性判定
1[2]	中毒性表皮坏死松解症	皮肤	女，58 岁	右肺腺癌	200 mg ivgtt q2w	200 mg/1	5	头部、面颈部、躯干、双上肢、会阴部大面积表皮剥脱，糜烂	注射用甲泼尼龙琥珀酸钠	死亡	可能
2[5]	反应性毛细血管增生症	皮肤	男，70 岁	右肺鳞癌	200 mg ivgtt q4w	600 mg/3	20	双手背多个鲜红色圆形丘疹	适当保护，随访观察	好转	可能
3[5]	反应性毛细血管增生症	皮肤	女，64 岁	右大腿滑膜肉瘤	200 mg ivgtt q2w	400 mg/2	15	躯干逐渐出现多个鲜红色丘疹	适当保护，随访观察	好转	肯定
4[5]	反应性毛细血管增生症	皮肤	男，54 岁	右肺腺癌	200 mg ivgtt q6w	800 mg/4	30	头部、上肢、躯干多个 2 ～ 4 mm 大红痣样、珍珠样、桑葚样血管增生物	适当保护，随访观察	好转	可能
5[6]	放射性肺炎	呼吸系统	男，64 岁	非小细胞肺癌	200 mg ivgtt q2w	1600 mg/8	84	发热、呼吸困难和咳嗽	服用泼尼松龙	痊愈	很可能
6[7]	牙龈反应性毛细血管瘤	牙龈	男，54 岁	肺癌	200 mg ivgtt q2w	2800 mg/14	180	上下颌牙龈生长	抗菌药物涂抹（四环素）、手术切除	痊愈	很可能
7[8]	血压升高	心血管	男，49 岁	左肺腺癌	200 mg ivgtt q2w	200 mg/1	1	血压升高	硝苯地平片、乌拉地尔、硝普钠	痊愈	很可能
8[9]	甲状腺功能减退	甲状腺	男，63 岁	右肺腺癌	200 mg ivgtt q2w	1600 mg/8	90	甲状腺功能减退、乏力、精神状态差、嗜睡	左甲状腺素片	痊愈	肯定
9[10]	免疫相关性肺炎	呼吸系统	女，49 岁	左肺腺癌	200 mg ivgtt q3w	800 mg/4	228	咳嗽、胸闷、呼吸困难	注射用甲泼尼龙琥珀酸钠	好转	很可能

续表 1

No.	ADR 名称	累及系统 / 器官	基本信息	基础疾病	剂量 / 用法 / 频次	总用量 / 疗程（次）	发生时间 / d	临床表现	处置	预后	相关性判定
10[11]	皮疹	皮肤	男，49 岁	鼻咽非角化型癌	200 mg ivgtt q3w	200 mg/1	5	全身皮疹	异丙嗪、地氯雷他定	好转	可能
11[12]	药物性肝损伤	肝脏	女，67 岁	食管鳞状细胞癌	200 mg ivgtt q3w	1000 mg/5	62	转氨酶升高	注射用甲泼尼龙琥珀酸钠、乙酰半胱氨酸、异甘草酸镁注射液	痊愈	很可能
12[13]	肌炎及横纹肌溶解综合征	皮肤肌肉	女，61 岁	原发性肝癌	200 mg ivgtt	200 mg/1	5	现双下肢无力及疼痛	还原性谷胱甘肽、多烯磷脂酰胆碱、碳酸氢钠	痊愈	肯定
13[14]	反应性毛细血管瘤	皮肤	男，72 岁	小细胞肺癌	200 mg ivgtt q3w	1000 mg/5	17	红色丘疹	适当保护，随访观察	好转	很可能
14[15]	反应性毛细血管增生症	皮肤	男，57 岁	左肺腺癌	200 mg ivgtt q3w	1000 mg/5	98	面部、颈部、背部多个血管痣	手术切除	好转	很可能
15[16]	反应性皮肤毛细血管增生症	皮肤	男，70 岁	小细胞神经内分泌癌	200 mg ivgtt q3w	600 mg/3	43	头部出现散在红色丘疹，出血	适当保护，随访观察	好转	很可能
16[17]	急性间质性肾炎	肾脏	男，62 岁	上皮性恶性肿瘤	200 mg ivgtt q2w	1600 mg/8	120	肌酐升高	注射用甲泼尼龙琥珀酸钠	好转	很可能
17[18]	反应性毛细血管增生症	皮肤	女，44 岁	结肠癌肝转移	200 mg ivgtt q2w	1200 mg/6	29	面部、颈部及胸前皮肤出现多个暗红色结节	云南白药胶，莫匹罗星	好转	很可能
18[19]	免疫检查点抑制剂相关性肺炎	呼吸系统	女，65 岁	胆管细胞癌	200 mg ivgtt q3w	800 mg/4	89	咳嗽，咳痰	注射用甲泼尼龙琥珀酸钠、氨溴索注射液，雾化吸入乙酰半胱氨酸溶液、布地奈德雾化混悬液	好转	很可能
19[20]	免疫相关骨骼肌和心肌损伤	肌肉，心血管	男，76 岁	小细胞肺癌	200 mg ivgtt q3w	200 mg/1	22	胸闷气促、乏力、行走困难、呼吸困难、右侧眼睑下垂	磷酸肌酸、三磷酸腺苷、丙种球蛋白	好转	很可能
20[21]	免疫相关性肺炎	呼吸系统	男，64 岁	肝癌	200 mg ivgtt q3w	1000 mg/5	100	胸闷气短、自觉心跳加快	注射用甲泼尼龙琥珀酸钠、比阿培南	死亡	很可能
21[22]	免疫性肺炎	呼吸系统	男，61 岁	右肺鳞癌	200 mg ivgtt q3w	1000 mg/5	80	咳嗽、活动后气促	注射用甲泼尼龙琥珀酸	痊愈	很可能
22[23]	免疫性心肌炎	心血管	男，73 岁	食管癌	200 mg ivgtt q3w	400 mg/2	22	胸闷、心悸、乏力	注射用甲泼尼龙琥珀酸	好转	很可能
23[24]	中毒性表皮坏死松解症	皮肤	男，51 岁	肝癌肺转移	200 mg ivgtt q3w	600 mg/3	60	发热、颜面部、胸部、双手掌、双脚掌皮疹伴大量大疱形成	注射用甲泼尼龙琥珀酸、亚胺培南西司他丁钠、丙酸氯倍他索乳膏	好转	很可能
24[25]	糖尿病酮症酸中毒 / 血小板减少	内分泌	男，68 岁	胃癌	200 mg ivgtt q2w	1200 mg/4	90	嗜睡、反应迟钝、恶心、呼出气体有烂苹果气味；血糖、二氧化碳、尿酮体、血小板异常	胰岛素、重组人白介素 -11	好转	很可能
25[26]	口腔反应性毛细血管瘤	牙龈	男，60 岁	非小细胞肺癌	200 mg ivgtt，使用 1 次		360	牙龈增生	手术切除	好转	很可能
26[27]	免疫相关性肺炎	呼吸系统	男，60 岁	食管鳞状细胞癌	200 mg ivgtt，使用 1 次		12	双肺多发磨玻璃影	口服泼尼松龙、氟康唑、莫西沙星	好转	很可能
27[28]	免疫性心肌炎	心血管系统	女，69 岁	非小细胞肺癌	200 mg ivgtt，使用 1 次		20	心动过速、房性早搏、房性心动过速、转氨酶升高	注射用甲泼尼龙琥珀酸钠	好转	很可能

2.3 患者国籍及年龄分布情况

27 例病例全部来自中国，其中男性 19 例，女性 8 例，男女比例为 2.38∶1。年龄在 44 ～ 76 岁，平均年龄为（61.25±8.30）岁；各年龄段中，45 ～ 64 岁占 62.96%，＞ 65 岁患者占 33.33%。

2.4 用药指征、用药剂量、用药周期、合并基础疾病及用药情况

27 例患者中，卡瑞利珠单抗用药指征为肺癌的 14 例（51.85%），肝癌的 3 例（11.11%），食管癌的 3 例（11.11%），胃癌、小细胞神经内分泌癌、皮肤肿瘤、骨肉瘤、肠癌、鼻癌、胆管癌各 7 例（25.93%）。27 例病例中，单次使用卡瑞利珠单抗均为 200 mg；1 例患者累计用药 2800 mg；3 例患者累计用药 1600 mg；2 例患者累计用药 1200 mg；5 例患者累计用药 1000 mg；3 例患者累计用药 800 mg；3 例患者累计用药 600 mg；2 例患者累计用药 400 mg；5 例患者累计用药 200 mg；3 例患者累计用药不详。27 例病例中，1 例患者的治疗周期为 q6w、1 例患者的治疗周期为 q4w、12 例患者的治疗周期为 q3w、9 例患者的治疗周期为 q2w、4 例患者的治疗周期不详。6 例患者有合并症记录，主要合并症是糖尿病、高血压、高脂血症、乙型肝炎；18 例患者有合并用药记录，合并药物 1 ～ 3 种，主要合并药物为紫杉醇、卡铂、依托泊苷、仑伐替尼、雷替曲塞、阿帕替尼、吉西他滨、多西他赛、贝伐珠单抗、阿帕替尼、阿卡波糖、非诺贝特、硝苯地平。

2.5 ADR 发生时间

27 例卡瑞利珠单抗相关 ADR 患者中，发生时间最短的为用药后 1 d，最长的为用药后 360 d，平均时间为用药后（69.89±80.20）d；用药后 1 ～ 21 d，共 9 例（33.33%）；用药后 22 ～ 42 d，共 4 例（14.81%）；用药后 43 ～ 63 d，共 3 例（11.11%）；用药后 64 ～ 84 d，共 2 例（7.41%）；大于 85 d，共 9 例（33.33%）。

2.6 ADR 累及器官 / 系统及其临床表现

ADR 中主要累及皮肤系统、呼吸系统、心血管系统、神经肌肉系统、内分泌系统、消化系统、泌尿系统、血液系统以及牙龈，具体分布如下：累及皮肤系统 10 例（包括反应性毛细血管增生症 / 瘤、中毒性表皮坏死松解症、皮疹）；累及呼吸系统 6 例（包括免疫相关性肺炎、放射性肺炎）；累及心血管系统 4 例（包括免疫性心肌炎、高血压）；累及神经肌肉系统 2 例（包括免疫相关骨骼肌炎、横纹肌溶解综合征）；累及内分泌系统 2 例（包括糖尿病酮症酸中毒、甲状腺功能减退）；累及牙龈 2 例（包括牙龈反应性毛细血管瘤）；累及消化系统 1 例（包括肝功能异常）；累及血液系统 1 例（包括血小板减少）；累及泌尿系统 1 例（包括急性间质性肾炎）。

2.7 ADR 处置与转归

27 例卡瑞利珠单抗相关 ADR 中，18 例停药处理，占 66.67%；9 例继续用药治疗，占 33.33%。27 例 ADR 中，其中 2 例患者是手术治疗；5 例患者是适当保护，随访观察；20 例患者给予相应药物治疗。18 例患者经处置后好转，占 66.67%；7 例患者经处置后痊愈，占 25.93%；2 例患者治疗无效死亡，占 7.41%。

2.8 ADR 相关性判定

27 例卡瑞利珠单抗相关 ADR 中，文献中根据评价标准判定为：肯定 3 例（11.11%），很可能 20 例（74.04%），可能 4 例（14.81%）。

3 讨论

3.1 性别与年龄

在收集的 27 例卡瑞利珠单抗引起的不良反应中，男性患者明显多于女性患者，具体原因尚不明确；年龄最大 76 岁，年龄最小 44 岁，以 45 岁以上的中老年人为主，共 26 例（96.3%）。结果与文献报道基本一致 [29]。

3.2 ADR 发生与时间的关系

从表 1 看出，卡瑞利珠单抗相关 ADR 多发生在用药后 1 ～ 21 d 或 85 d 后，发生 ADR 对出现于第 1 个用药周期内或大于 4 个用药周期。其中反应性毛细血管增生症 / 瘤多发生在用药后 15 ～ 98 d；免疫性心肌炎多发生在用药后 20 d；糖尿病酮症酸中毒与甲状腺功能减退多发生在用药后 90 d；牙龈反应性毛细血管瘤多发生在用药后 180 ～ 360 d；高血压多发生在用药后 1 d。

3.3 反应性皮肤毛细血管增生症 / 瘤

出现反应性皮肤毛细血管增生症 / 瘤的共 6 例，其原发病均为肺癌，ADR 主要表现为头面部、上肢、躯干出现多个 2 ～ 4 mm 大红痣，本文中 6 例患者均采用适当保护，随访观察的措施，文献报道反应性皮肤毛细血管增生症 / 瘤呈自限性，无需停药；对较大的结节或影响外观的结节，可以采取局部对症处理；而停药后，可以自行萎缩消退或坏死脱落 [30]。反应性皮肤毛细血管增生症 / 瘤其确切发生机制尚不清楚，可能是因为免疫检查点抑制剂用药后引起 $CD4^+$/$CD8^+$ T 细胞再激活，攻击了表皮和真皮的异常抗原，与正常皮肤组织产生交叉反应，导致和加速了炎症进程，但是特异性自身抗原是否会使 T 细胞渗透且定位于皮肤，尚无确切的证据 [31-33]。

3.4 免疫相关性肺炎

出现免疫相关性肺炎的共 6 例，主要表现为咳嗽、活动后气促、双肺多发磨玻璃影等。免疫相关性肺炎是免疫检查点抑制剂相关并发症的一种，常见症状为呼吸困难和咳嗽，33.3% 的患者无症状；免疫相关性肺炎无特征性放射学或病理学特征，CT 是首选的影像学检查方法 [19]。绝大部分免疫性肺炎在激素停药后恢复良好，少数预后不良者多与激素治疗后继发感染或肿瘤进展有关 [22]。本文中 6 例患者给予注射用甲泼尼龙琥珀酸钠、氨溴索注射液、雾化吸入乙酰半胱氨酸溶液、布地奈德雾化混悬液等进行治疗，均好转或痊愈。免疫相关性肺炎的发生机制尚不明确，可能与超敏反应、微环境稳态破坏和脱靶毒性等原因有关，免疫检查点抑制剂可能异常增强自身正常的免疫反应，导致免疫耐受失衡 [10，34]。

3.5 免疫相关性心肌炎

出现反免疫相关性心肌炎的共 3 例，主要表现为胸闷、心悸、气促、乏力、行走困难等。使用卡瑞利珠单抗的患者一旦出现免疫相关性心肌炎，应立即完善心脏、肌肉的影像学检查和心肌酶谱检测，必要时给予糖皮质激素、免疫球蛋白和其他免疫抑制剂等治疗 [35]。本文中 3 例患者给予注射用甲泼尼龙琥珀酸钠、磷酸肌酸、三磷酸腺苷、丙种球蛋白等进行治疗，均好转或痊愈。

4 总结

卡瑞利珠单抗作为我国自主研发人源化 PD-1，现已广泛应用于临床，为需要免疫治疗的肿瘤患者提供了新的选择，但其 ADR 不容忽视。卡瑞利珠单抗国内上市时间短，报道的 ADR 相对较少，药品生产、流通及使用部门应重视其引起的 ADR 并且积极上报，不断完善药品说明书。本研究纳入的 ADR 涉及皮肤系统、呼吸系统、心血管系统、神经肌肉系统、内分泌系统、消化系统、泌尿系统、血液系统以及牙龈等全身多个系统 / 器官，其中皮肤系统中反应性皮肤毛细血管增生症 / 瘤较为常见。综上，选择卡瑞利珠单抗治疗时，临床医师应严格按照说明书批准的适应证用药，加强对其 ADR 的认识；临床用药过程中应加强对卡瑞利珠单抗的药学监护，一旦发现，及时干预，以提高临床用药的安全性。

参考文献

[1] Markham A，Keam SJ. Camrelizumab：first global approval [J]. Drugs，2019，79（12）：1355-1361.

[2] 何琳，陈适，夏陈英，等 . 1 例卡瑞利珠单抗致中毒性表皮坏死松解症并文献复习 [J]. 中南药学，2021，19（8）：1751-1754.

[3] 国家药品不良反应监测中心 . 药品不良反应术语使用指南 [S]. 北京：2016.

[4] 国家食品药品监督管理局药品安全监管司，国家药品不良反应监测中心 . 药品不良反应报告和监测工作手册 [EB/OL].（2012-11）[2020-05-10]. http：//www. cdr-adr. org. cn/xzzx/hyzl/hyzl2013nd/201304/t20130426_5436. html.

[5] 龙方园，何芳，涂洁，等 . PD-1 抑制剂（卡瑞利珠单抗）致反应性毛细血管增生症三例并文献复习 [J]. 中国麻风皮肤病杂志，2020，36（4）：219-223.

[6] Chen Y，Huang ZQ，Xing LG，et al. Radiation recall pneumonitis induced by anti-PD-1 blockade：a case report and review of the literature [J]. Front Oncol，2020，10（561）：1-7.

[7] Yu Q，Wang WX. Camrelizumab（SHR-1210）leading to reactive capillary hemangioma in the gingiva：a case report [J]. World J Clin Cases，2020，8（3）：624-629.

[8] 王鹏，王晶，王建英 . 卡瑞利珠单抗致血压升高 1 例 [J]. 浙江实用医学，2020，25（5）：380-381.

[9] 陈刚，闫丽荣，王哲，等 . 1 例卡瑞利珠单抗致甲状腺功能减退不良反应分析 [J]. 肿瘤药学，2020，10（1）：125-128.

[10] 李小东，孙桢，李鹏，等 . PD-1 抑制剂卡瑞利珠单抗致免疫相关性肺炎 1 例 [J]. 中南药学，2021，19（1）：173-175.

[11] 任静，李永伟，胡志强，等 . 吉西他滨联合卡瑞利珠单抗致皮疹 1 例 [J]. 中南药学，2021，19（11）：2473-2475.

[12] 项敏敏，任伟芳，方忠宏，等 . 卡瑞利珠单抗联用阿帕替尼致药物性肝损伤 1 例 [J]. 中国新药与临床杂志，2021，40（7）：542-544.

[13] 王征，侯维，郑素军 . 卡瑞利珠单抗治疗原发性肝癌致肌炎及横纹肌溶解综合征一例报告 [J]. 北京医学，2021，43（9）：941-942.

[14] 梁宁，高薇，吴薇，等 . 卡瑞利珠单抗致反应性毛细血管瘤一例 [J]. 中华皮肤科杂志，2021，54（10）：904-905.

[15] 王超，赵黎明，桠涛 . 卡瑞利珠单抗致反应性毛细血管增生症 [J]. 药物不良反应杂志，2021，23（3）：160-162.

[16] 江玲，余意 . 卡瑞利珠单抗致反应性皮肤毛细血管增生症 1 例 [J]. 甘肃医药，2021，40（6）：574-576.

[17] 章斌，焦秀秀，沈波，等 . 卡瑞利珠单抗致急性间质性肾炎的病例报道及文献分析 [J]. 中南药学，2021，19（9）：1993-1995.

[18] 魏浩洁，孙翠玲，赵俞玲，等 . 卡瑞利珠单抗致毛细血管增生症 1 例 [J]. 中国药师，2021，24（4）：725-727.

[19] 张美玲 . 卡瑞利珠单抗致免疫检查点抑制剂相关性肺炎 1 例 [J]. 中国现代应用药学，2021，38（10）：1224-1225.

[20] 李琳，刘文辉，刘艺平，等 . 卡瑞利珠单抗致免疫相关骨骼肌和心肌损伤 [J]. 药物不良反应杂志，2021，23（8）：447-448.

[21] 徐珊珊，刘晓利，朱亚利，等 . 卡瑞利珠单抗致免疫相关性肺炎 1 例 [J]. 中国药师，2021，24（11）：2067-2069.

[22] 吕晓燕，刘子祺，李成敏 . 卡瑞利珠单抗致免疫性肺炎 1 例 [J]. 肿瘤药学，2021，11（4）：509-512.
[23] 孙莹，顾永丽，杨广胜，等 . 卡瑞利珠单抗致免疫性心肌炎 [J]. 药物不良反应杂志，2021，23（5）：268-270.
[24] 胡功利，李家伟，肖溢，等 . 临床药师对 1 例罕见卡瑞利珠单抗致中毒性表皮坏死松解症患者的用药分析 [J]. 中国药房，2021，32（21）：2672-2676.
[25] 续广娟，周琴，陈喆 . 注射用卡瑞利珠单抗致糖尿病酮症酸中毒合并血小板减少 1 例 [J]. 中国药师，2021，24（3）：531-534.
[26] Zhou JH，Mao QH，Li YN，et al. Oral reactive capillary hemangiomas induced by SHR-1210 in the treatmentof non-small cell lung cancer：a case report and literature review [J]. Bmc Oral Health，2021，21（1）：559.
[27] Li L，Lou AQ，Yu JX. Immune checkpoint inhibitor-related pneumonitis induced by camrelizumab：a case report and review of literature [J]. Ann Palliat Med，2021，10（7）：8460-8466.
[28] Chen YK，Jia YJ，Liu QH，et al. Myocarditis related to immune checkpoint inhibitors treatment：two case reports and literature review [J]. Ann Palliat Med，2021，10（7）：8512-8517.
[29] 景天闯，张丹，米婷婷，等 . 26 例卡瑞利珠单抗致药物不良反应报告分析 [J]. 中国合理用药探索，2021，10（18）：18-22.
[30] 王锋，秦叔逵 . 卡瑞利珠单抗致反应性皮肤毛细血管增生症临床诊治专家共识 [J]. 临床肿瘤学杂志，2021，25（9）：840-848.
[31] Belum VR，Benhuri B，Postow MA，et al. Characterisation and management of dermatologic adversevents to agents targeting the PD-1 receptor [J]. Eur J Cancer，2016，60：12-25.
[32] Gao J，He Q，Subudhi S，et al. Review of immune-related adverse events in prostate cancer patients treated with ipilimumab：MD anderson experience [J]. Oncogene，2015，34（43）：5411-5417.
[33] Sibaud V，Meyer N，Lamant L，et al. Dermatologic complications of anti-PD-1/PD-L1 immune checkpoint antibodies [J]. Curr Opin Oncol，2016，28（4）：254-263.
[34] 张思燚，谢长生 . 免疫检查点抑制剂相关肺炎的研究进展及管理策略 [J]. 肿瘤学杂志，2020，26（5）：391-395.
[35] Lyon AR，Yousaf N，Battisti N，et al. Immune checkpoint inhibitors and cardiovascular toxicity [J]. Lancet Onco，2018，19（9）：e447-e458.

（收稿日期：2022-01-17；修回日期：2022-03-15）

信迪利单抗致白癜风样色素脱失 1 例及文献复习

于志媛[1,2]，娄彦妮[1]，贾立群[1]，张中华[2]，屈俊[2]，柳芳[1*]（1.中日友好医院，北京　100029；2.解放军联勤保障部队第九八八医院，郑州　450042）

关键词：信迪利单抗；程序性死亡受体 -1 抑制剂；不良反应；白癜风；色素脱失
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2204-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.043

以程序性死亡受体 -1（programmed cell death 1，PD-1）和其配体（PD-1 ligand，PD-L1）抑制剂为代表的免疫治疗已经成为肿瘤治疗的重要手段。但随着临床的广泛使用，其免疫相关不良反应的报道也不断增多，涉及到皮肤、内分泌、呼吸等多个系统。其中 PD-1 抑制剂引起的白癜风样色素脱失（Vitiligo-like depigmentation，VLD）多发生在恶性黑色素瘤患者中，发生率为 3.4% ～ 25.7%[1-2]，而在其他肿瘤中属罕见事件。信迪利单抗是一款人源化 PD-1 抑制剂，由其引发的 VLD 不良反应只在黑色素瘤中有 2 例报道[3]，口腔癌中有 1 例[4]。本文报道 1 例鼻咽癌患者使用信迪利单抗联合 TP 方案发生 VLD 的病例，并结合文献复习讨论该不良反应的临床特点、处理措施和转归，以期为 PD-1 抑制剂不良反应的管理提供更多的药学支持。

1　病例介绍

患者 51 岁，女性，于 2020 年 9 月开始出现无明显诱因间断性鼻腔出血，头部 CT 提示：鼻咽肿物。鼻咽镜下活检提示：鼻咽癌（非角化性

基金项目：中日友好医院“菁英计划”人才培育工程项目（No.ZRJY2021-TD05）。
作者简介：于志媛，女，主管中药师，主要从事临床药学工作，email：yushanshan1213@126.com　*通信作者：柳芳，女，博士，副主任药师，主要从事临床药学工作，email：tcm_pharmacy@126.com

未分化型），Ki67（MIB-1）（90% ＋）。辅助检查提示：慢性乙型肝炎，EB病毒阳性，其他未见异常。鼻咽 MRI 和 PET-CT 提示：鼻咽右后壁代谢占位，右侧股骨上段髓腔内高代谢灶，颈部 2A 区代谢增高淋巴结，转移可能。经穿刺活检后排除股、颈转移。2020 年 12 月 31 日给予紫杉醇 210 mg d1 ＋顺铂 40 mg d1 ～ d3 ＋信迪利单抗 200 mg d1，每 21 日为一周期的治疗。首次化疗后出现Ⅳ度骨髓抑制，对症治疗后好转。2021 年 1 月 28 日行第二周期原方案，紫杉醇减量至 180 mg 治疗，过程顺利。2 月 26 日鼻咽、鼻窦 MRI 提示病灶较前稍有变小。3 月 23 日开始行头部放疗 33 次，放疗后出现放射性食管炎、口干、鼻道不通、流涕等，考虑为放疗后黏膜反应，给予对症处理后缓解。6 月 5 日继续行原方案第三周期治疗。7 月 1 日患者再次入院，查体发现其手背、脚背出现黄豆至花生大小白色斑片，外阴、肛周呈大片状白色斑片，有轻微瘙痒，皮肤科会诊诊断为 VLD，给予复方甘草酸苷片 75 mg tid，白芍总苷胶囊 0.6 g bid po；卤米松乳膏、他克莫司软膏适量 bid，外用涂抹。患者服用复方甘草酸苷片和白芍总苷胶囊 3 周后自行停药，手背、脚背涂抹上述两种外用乳膏 3 个月后白斑逐渐变淡，6 个月后基本消失。外阴、肛周因外用乳膏引起灼热刺痛，患者拒绝使用，白斑在发现一个月后达到稳定，之后无明显变化。期间继续原方案化疗联合免疫治疗，共 6 个周期，定期评效为稳定。

2　分析与讨论

2.1　信迪利单抗与 VLD 关联性评价

通过对患者出现 VLD 之前的整个用药进行梳理，并分析患者既往史和目前疾病进展情况，依据诺氏评估量表，评价为本例患者的相关性评分为 7 分，即 VLD 很可能与信迪利单抗相关，具体见表 1。

表 1　诺氏评估量表评价信迪利单抗与 VLD 的关联性结果

内容问题	问题分值			得分情况	评分理由
	是	否	未知		
1. 该 ADR 先前是否有结论性的报告	＋1	0	0	＋1	说明书有记载
2. 该 ADR 是否是在使用可疑药物后发生的	＋2	－1	0	＋2	VLD 是在信迪利单抗使用的第三周期后发生，与相关报道时间相符 [5]
3. 该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂后得到缓解	＋1	0	0	＋1	VLD 在使用免疫抑制药后减轻
4. 该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现	＋2	－1	0	0	没有停药
5. 是否存在其他原因能单独引起该 ADR	－1	＋2	0	＋2	患者既往有日光性皮炎和带状疱疹史，在放化疗过程中因免疫力低下而引起带状疱疹复发 3 次，但痊愈后疱疹部位并未出现色素脱失的情况；另考虑治疗时间为夏季，有日光性皮炎的可能，但患者以往被暴晒后会出现红疹，几日后消退为正常肤色，且外阴部不存在暴晒的可能，因此排除。重组人白介素 -2 有大剂量用于黑色素瘤和肾癌时引起白癜风的报道 [6]，但本例患者的剂量远小于报道的大剂量，且发生 VLD 前已使用 5 个月，无不良反应
6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现	－1	＋1	0	0	没有使用安慰剂测试
7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度	＋1	0	0	0	使用量为常规剂量，未测血药浓度
8. 该 ADR 是否随浓度增加而加重，或随剂量减少而缓解	＋1	0	0	0	剂量不变
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应	＋1	0	0	0	否
10. 是否存在任何客观证据证实该反应	＋1	0	0	＋1	皮肤科会诊确定为 VLD

注：总分≥ 9 分为肯定；5 ～ 8 分为很可能；1 ～ 4 分为可能有关；≤ 0 分为可疑。

2.2　PD-1 抑制剂致 VLD 的临床特点

通过检索中国知网、VIP、万方医学、PubMed 等数据库，有关 PD-1 抑制剂致 VLD 的个案报道文献共计 14 篇（见表 2）。其中，包含了信迪利单抗、帕博利珠单抗、纳武利尤单抗和 1 种抗 PD-1 临床试验用药，覆盖了黑色素瘤、肺鳞癌、肺腺癌、胆管癌、肉瘤、肾癌、急性髓系白血病、肝癌等多种恶性肿瘤 [4，7-19]。在非黑色素瘤的个案报道中，患者的中位年龄为 65 岁，男性多于女性，这与其他研究结果一致 [20]。VLD 出现的时间为 6 d 到 5 年不等，中位时间为 4.5 个月。而在黑色素瘤中有报道，纳武利尤单抗致 VLD 发生的中位时间为 5.4 周 [21]，帕博利珠单抗则为 8 个周期 [22]。VLD 的出现与剂量无明显相关性 [5]，可在 PD-1 治疗结束数月后依然存在。此类 VLD 多呈卵圆形或斑点状散在多发，阳光照射部位如面部、颈部、前臂、手为高发区域，不拘于阳光暴露区，但不同于常规白癜风，多数没有后者的 Koebner 现象 [23]。

表 2　PD-1 抑制剂致 VLD 的个案报道

药品	病种	性别	年龄 / 岁	发生时间	发生部位	处理措施	白斑转归	疾病进展	文献
①	急性髓系白血病	男	66	4 m	面、颈、胸、背、手臂、	无	第 2 个月稳定	—	[7]
①	肾癌	男	63	5 m	面、颈、躯干、手、前臂	避免日晒	—	—	[8]
①	肺腺癌	男	75	6 d	胸、背、靠近躯干的四肢	无	治疗结束后 5 个月稳定	6 周后疾病部分缓解	[9]
①	肾癌	女	66	9 m	背部	—	持续存在	18 个月后进展	[10]
①+②	肝癌	男	58	8 m	头皮、躯干、四肢	局部类固醇和他克莫司	14 个月时仍有显著进展	病情稳定	[11]
③	肺腺癌	男	63	5 m	手、阴囊	准分子激光和局部皮质类固醇	未改善，持续存在 25 个月以上	14 个月后脑转移	[12]
①+③	肺鳞癌	男	75	4 m	全身散在	—	持续存在，约占体表 25%	无疾病进展 8 个月	[13]
①+②	肾癌	男	63	5 m	前臂	防晒	15 个月后开始色素重染	27 个月完全缓解	[14]
③	胆管癌	男	60	3 m	手背、膝盖、小腿	—	13 个月后达到稳定	13 个月后进展	[14]
③	肺鳞癌	男	79	2 m	背、手臂、小腿	—	持续存在，3 个月后稳定	无疾病进展 9 个月，13 个月死亡	[14]
③	肺腺癌	女	72	3 m	唇周、发际线附近	—	7 个月后部分缩小后稳定	9 个月后进展	[15]
③	食管鳞癌	女	74	5 y	头、颈	—	—	一疗程后完全缓解，9 个月后进展；二疗程后完全缓解 .	[16]
③	肉瘤	女	30	6 m	全身性分布	局部和全身类固醇治疗	停止治疗 9 个月后仍持续存在	部分缓解	[17]
④	口腔鳞癌	男（老年）		6 m	手足、头面、躯干	—	—	—	[4]
⑤	黑色素瘤	男	71	2 m	手	避免日晒伤或晒黑，必要时涂擦类固醇乳膏	—	—	[18]
③	黑色素瘤	男	60	4 m	全身毛发、身体皮肤、痣	—	—	—	[19]
③	黑色素瘤	女	52	6 m	唇周、发际线附近、腰、背	无	4 个月后仍持续扩大	10 个月后失访	[15]

注：① 纳武利尤单抗；② 伊匹单抗；③ 帕博利珠单抗；④ 信迪利单抗；⑤ PD-1 临床试验用药；m 代表月；d 代表天；y 代表年；— 代表文中未描述。

PD-1 抑制剂所致的皮肤毒性通常较轻，对症治疗多可控制 [24-25]。中国专家提出可根据白斑的皮损面积划分危害等级并采用不同的处理措施：皮损＜ 10% 体表面积为 1 级，可不予处理；皮损占体表面积 10% ～ 30% 为 2 级，可暂停药物或使用糖皮质激素治疗，恢复至 1 级后再重启治疗；皮损＞ 30% 为 3 ～ 4 级，应停药并给予糖皮质激素治疗，待降至 1 级后再恢复用药 [26]。但激素使用不宜超过 6 周，必要时更换其他免疫调节剂（或）且永久停药。西班牙学会推荐局部涂擦类固醇激素并做好全面防晒 [27]。同时，有研究发现使用其他免疫调节剂（如钙调磷酸酶抑制剂）联合光疗及脱色素治疗有助于恢复正常颜色 [18，28]。但激素对 PD-1 抑制剂临床疗效的影响一直存有争议 [29]。PD-1 抑制剂引起的 VLD 多为 1 ～ 2 级，通常以日光保护（避免阳光暴晒或紫外线照射）为主要措施 [30]。表 2 中没有因 VLD 而停药的记录，大多数患者在采用防晒或者局部类固醇治疗后 VLD 得到控制，但很少消退。另外，多项研究表明，黑色素瘤中发生 VLD 的患者比未发生者客观缓解率明显提高 [2]，而未出现者的疾病进展和死亡风险是出现者的 2 ～ 4 倍 [1]。但在其他肿瘤患者中使用 PD-1 抑制剂发生 VLD 对癌症预后的影响尚无定论。

综上可见，VLD 可在 PD-1 抑制剂使用后的任何时间发生，建议加强患者教育，做到早识别早干预。值得思考的是，本例患者自身具有皮肤病史，其是否可能增加 PD-1 抑制剂导致 VLD 发生风险需要进一步探究。另外，当信迪利单抗与其他可能导致 VLD 发生的药物，如表皮生长因子受体抑制剂（吉非替尼 [31]、伊马替尼 [32]）、CDK 4/6 抑制剂 [33]（瑞博西尼）、干扰素、大剂量 IL-2[6] 等联用时，应加强用药监测。

参考文献

[1] Teulings HE，Limpens J，Jansen SN，et al.Vitiligo-like depigmentation in patients with stage Ⅲ-Ⅳ melanoma receiving immunotherapy and its association with survival：a systematic review and meta-analysis [J]. Clin Oncol，2015，33（7）：773-781.

[2] Hua C，Boussemart L，Mateus C，et al. Association of vitiligo with tumor response in patients with metastatic melanoma treated with pembrolizumab [J]. JAMA Dermatol，

2016，152（1）：45-51.
[3] 刘瑾 . 抗 PD-1 单抗治疗晚期恶性肿瘤的疗效及安全性分析 [D]. 杭州：浙江大学，2019.
[4] 张超，陶莹，胡佳丽，等 . 信迪利单抗注射液致白癜风 1 例 [J]. 中国现代应用药学，2021，38（19）：2431-2432.
[5] 李明，周博洋，李邻峰 . PD-1/PD-L1 抑制剂的皮肤不良反应 [J]. 中国麻风皮肤病杂志，2019，35（8）：509-512.
[6] Rosenberg SA，White DE. Vitiligo in patients with melanoma：normal tissue antigens can be targets for cancer immunotherapy [J]. J Immunother，1996，19（1）：81-84.
[7] Yin ES，Totonchy MB，Leventhal JS. Nivolumab-associated vitiligo-like depigmentation in a patient with acute myeloid leukemia：a novel finding [J]. JAAD Case Rep，2017，3（2）：90-92.
[8] Inigo NF，Carmen GV，Cristina GF，et al. Vitiligo-like depigmentation in a patient undergoing treatment with nivolumab for advanced renal-cell carcinoma [J].Acta Dermatovenerol Croat，2021，291（1）：54-55.
[9] Uenami T，Hosono Y，Ishijima M，et al. Vitiligo in a patient with lung adenocarcinoma treated with nivolumab：a case report [J]. Lung Cancer，2017，109：42-44.
[10] Lolli C，Medri M，Ricci M，et al. Vitiligo-like lesions in a patient treated with nivolumab for renal cell carcinoma [J]. Medicine，2018，97（52）：e13810.
[11] Rodríguez-Lomba E，Molina-López I，Suárez-Fernández R，et al. Vitiligo-like lesions and immune checkpoint inhibition therapy：is it truly an adverse event exclusive to patients with melanoma? [J].Clin Exp Dermatol，2018，43（5）：598-599.
[12] Yun SJ，Oh IJ，Park CK，et al. Vitiligo-like depigmentation after pembrolizumab treatment in patients with non-small cell lung cancer：a case report [J]. Transl Lung Cancer Res，2020，9（4）：1585-1590.
[13] 朱文婷，武馨，张晓红，等 . 晚期肺鳞状上皮细胞癌患者应用 PD-1 单抗治疗并发白癜风获长期生存 1 例 [J]. 癌症进展，2018，16（13）：1688-1689.
[14] Liu RC，Consuegra G，Chou S，et al. Vitiligo-like depigmentation in oncology patients treated with immunotherapies for nonmelanoma metastatic cancers [J]. Clin Exp Dermatol，2019，44（6）：643-646.
[15] 汪渝婷，陈岷，曾明辉 . 免疫检查点抑制剂致皮肤白癜风样色素脱失 2 例 [J]. 药物不良反应杂志，2021，23（6）：321-323.
[16] Wilkins MC，Elgamal M，Rybkin II. Pembrolizumab-Induced vitiligo in esophageal squamous cell carcinoma patient with durable complete response [J]. Cureus，2021，13（11）：e19739.
[17] Dumbrava EI，Ivan D，Subbiah V. Hypopigmented skin lesions after immunotherapy [J]. JAMA Oncol，2018，4（8）：1118-1119.
[18] 尹月，邱新野，刘颖，等 . 2 例黑色素瘤患者使用 PD-1 抗体致不良反应的分析及防治 [J]. 中国新药杂志，2019，28（14）：1789-1792.
[19] Wolner ZJ，Marghoob AA，Pulitzer MP，et al. A case report of disappearing pigmented skin lesions associated with pembrolizumab treatment for metastatic melanoma [J]. Br J Dermatol，2018，178（1）：265-269.
[20] Dousset L，Pacaud A，Barnetche T，et al. Analysis of tumor response and clinical factors associated with vitiligo in patients receiving anti-programmed cell death-1 therapies for melanoma：a cross-sectional study [J]. JAAD Int，2021，5：112-120.
[21] Freeman-Keller M，Kim Y，Cronin H，et al. Nivolumab in resected and unresectable metastatic melanoma：characteristics of immune-related adverse events and association with outcomes [J]. Clin Cancer Res，2016，22（4）：886-894.
[22] Sanlorenzo M，Vujic I，Daud A，et al. Pembrolizumab cutaneous adverse events and their association with disease progression [J]. JAMA Dermatol，2015，151（11）：1206-1212.
[23] Guida M，Strippoli S，Maule M，et al. Immune checkpoint inhibitor associated vitiligo and its impact on survival in patients with metastatic melanoma：an Italian melanoma intergroup study [J]. ESMO Open，2021，6（2）：100064.
[24] Passat T，Touchefeu Y，Gervois N，et al. Physiopathological mechanisms of immune-related adverse events induced by anti-CTLA-4，anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies in cancer treatment [J]. Bull Cancer，2018，105（11）：1033-1041.
[25] Porcu M，De Silva P，Solinas C，et al. Immunotherapy associated pulmonary toxicity：biology behind clinical and radiological features [J]. Cancers，2019，11（3）：e305.
[26] 倪军，黄淼，张力，等 . 非小细胞肺癌围手术期免疫治疗相关不良反应管理的临床诊疗建议 [J]. 中国肺癌杂志，2021，24（3）：141-160.
[27] Boada A，Carrera C，Segura S，et al. Cutaneous toxicities of new treatments for melanoma [J]. Clin Transl Oncol，2018，20（11）：1373-1384.
[28] Bae JM，Hong BY，Lee JH，et al. The efficacy of 308-nm excimer laser/light（EL）and topical agent combination therapy versus EL monotherapy for vitiligo：a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials（RCTs）[J]. J Am Acad Dermatol，2016，74（5）：907-915.
[29] Weber JS，Hodi FS，Wolchok JD，et al. Safety profile of nivolumab monotherapy：a pooled analysis of patients with advanced melanoma [J]. J Clin Oncol，2017，35（7）：785-792.
[30] 胡琪，于雪峰，黎雨，等 . 抗 PD-1/PD-L1 免疫检查点抑制剂的皮肤免疫相关不良反应的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学，2020，28（4）：652-655.
[31] Jalalat SZ，Cohen PR. Gefitinib-associated vitiligo：report in a man with parotid squamous cell carcinoma and review of drug-induced hypopigmentation [J]. Dermatol Online J，2013，19（10）：20020.
[32] Llamas-Velasco M，Fraga J，Kutzner H，et al. Hypopigmented macules secondary to imatinib for the treatment of chronic myeloid leukemia：a histopat-hologic and immunohistochemical study [J]. J Cutan Pathol，2014，41（5）：417-426.
[33] Chan OB，Su JC，Yazdabadi A，et al. Drug induced vitiligo-like depigmen-tation from a CDK 4/6 inhibitor [J]. Asia Pac J Clin Oncol，2022，18（2）：154-156.

（收稿日期：2022-04-01；修回日期：2022-05-17）

乌拉地尔致剥脱性皮炎 1 例

李孝容[1]，王谦[1]，练娜[2*]（1.西南医科大学附属中医医院临床药学，四川　泸州　646000；2. 西南医科大学附属中医医院皮肤科，四川　泸州　646000）

关键词：乌拉地尔；重症药疹；剥脱性皮炎；不良反应
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2208-03
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.044

乌拉地尔是一种选择性 α 受体阻滞剂，临床上主要用于高血压急危重症、围手术期高血压及难治性高血压的血压控制[1]。临床应用中尚未见其发生重症药疹的报道，现报道 1 例使用乌拉地尔后发生剥脱性皮炎的严重药品不良反应。

1　病例资料

患者，女，81 岁，2021 年 8 月 21 日因“脑梗死后遗症、慢性支气管炎急性发作”入老年病科治疗。既往史：高血压病 10 年余，血压最高达 157/96 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa），平素规律服用拉西地平片 4 mg qd，血压控制可；糖尿病 4 年，规律服用盐酸二甲双胍缓释片 1 g bid，未规律监测血糖；冠心病病史 3 个月，规律服用阿司匹林肠溶片 100 mg qd、阿托伐他汀钙片 20 mg qd；否认其他疾病史，否认药物、食物过敏史。入院查体：体温 36.7 ℃，脉搏 81 次 • min^{-1}，呼吸 20 次 • min^{-1}，血压 113/59 mmHg，身高 150 cm，体质量 45 kg，神经系统、胸腹部查体无明显阳性体征。入院后续用院外常规用药，加用头孢西丁 2 g q8h 抗感染，多索茶碱注射液 0.2 g ivgtt q12h 解痉平喘，吸入用乙酰半胱氨酸溶液 3 mL 雾化吸入 bid 祛痰，吸入用布地奈德混悬液 2 mL 雾化吸入 bid 抗炎等药物治疗。9 月 5 日患者因血压骤升至 188/104 mmHg，紧急予以注射用盐酸乌拉地尔 50 mg ＋ 50 mL 0.9% 氯化钠注射液微泵输入降压治疗，血压降至 152/95 mmHg，加用福辛普利钠片 10 mg qd 联合降压，血压波动在 133 ～ 146/92 ～ 105 mmHg，余治疗同前。9 月 8 日实验室检查：白细胞计数（WBC）$10.21\times10^{9}\cdot L^{-1}$↑，红细胞计数（RBC）$3.74\times10^{12}\cdot L^{-1}$↓，血红蛋白（Hb）114 $g\cdot L^{-1}$↓，红细胞比容（HCT）33.4%↓，中性粒细胞百分率（NEUT%）70.2%，血小板计数（PLT）$219\times10^{9}\cdot L^{-1}$，超敏 C 反应蛋白（hs-CRP）39.50 $mg\cdot L^{-1}$↑，蛋白质（PRO）＋。9 月 10 日患者血压再次骤升至 179/110 mmHg，再次予以注射用盐酸乌拉地尔（规格：50 mg/ 支，山东罗欣药业集团股份有限公司，批号：521012062）50 mg ＋ 50 mL 0.9% 氯化钠注射液微泵输入降压治疗，泵入约 15 min 时，家属呼叫医务人员，诉患者在泵入注射用盐酸乌拉地尔后即刻出现皮疹，并呈进行性增多，查体见患者胸背部及臀部散在针尖大小密集红色丘疹，颜色鲜红，部分融合成片，未见水疱、脓疱、糜烂、渗液等，患者未诉瘙痒、灼热、疼痛等症状。考虑乌拉地尔所致药品不良反应可能，立即停用乌拉地尔，予以苯海拉明 20 mg im st，维生素 C 2 g ivgtt st，葡萄糖酸钙 20 mL iv st 抗过敏治疗，患者诉皮疹无明显变化，复查：WBC $32.08\times10^{9}\cdot L^{-1}$↑，NEUT% 89.2%↑，Hb 100 $g\cdot L^{-1}$↓，PLT $127\times10^{9}\cdot L^{-1}$，hs-CRP 73.16 $mg\cdot L^{-1}$↑。皮肤科医师会诊考虑药物性皮炎，加用炉甘石薄荷脑洗剂外涂皮疹处。9 月 12 日，患者出现反复发热，体温波动在 36.3 ～ 38.6 ℃，实验室检查：WBC $27.10\times10^{9}\cdot L^{-1}$↑，NEUT% 83.4%↑；PRO 3 ＋。查体：胸背部、臀部红斑、丘疹数量较前明显增多，范围扩大，且密集融合成片，颜面部及四肢末端出现新发红斑及密集性丘疹，患者自觉皮肤瘙痒及灼热感明显。再次予以苯海拉明 20 mg im st ＋依巴斯汀片 10 mg po qd 抗过敏治疗。结合患者临床症状及辅助检查，皮肤科、临床药学会诊考虑感染性发热，予以完善血培养，哌拉西林他唑巴坦经验性抗感染治疗，待血培养结果回示调整抗感染用药。9 月 13 日，患者躯干、颜面部、四肢均出现红斑、丘疹密集性融合，呈弥漫性潮红，尤以躯干及四肢末端为甚，部分表面可见黄豆至胡豆大小张力性水疱，疱壁薄，疱液清亮，尼氏征（＋），实验室检查：

作者简介：李孝容，女，硕士，主管药师，主要从事医院药学工作，email：1254932228@qq.com　*通信作者：练娜，女，硕士，主治医师，主要从事中西结合皮肤性病学研究，email：747357613@qq.com

钠（Na^+）134 mmol • L^{-1}↓，总钙（Ca^{2+}）2.04 mmol • L^{-1}↓，无机磷（P）0.43 mmol • L^{-1}↓，镁（Mg^{2+}）0.70 mmol • L^{-1}↓。9 月 14 日，患者体温波动在 36.1 ～ 37.8 ℃，全身皮肤弥漫性潮红面积进一步扩散，受累面积达 95%，触诊皮温升高，压之不褪色，全身均有散在新发水疱，躯干及四肢屈侧多个水疱破溃，疱液无色、澄清、无味，破后表皮剥脱，尼氏征（＋），患者自觉全身皮肤灼热，皮肤剥脱处疼痛明显。皮肤科医师会诊后，诊断为药物所致剥脱性皮炎，结合患者现用药品均为入院前即使用品种或发生皮疹后仍旧续用品种，且皮疹为第二次使用乌拉地尔后即刻发生，故考虑乌拉地尔所致药物剥脱性皮炎可能性大，嘱避免再次使用乌拉地尔，加用注射用甲泼尼龙琥珀酸钠 60 mg ivgtt qd 治疗。9 月 15 日，患者未再发热，全身潮红症状稍有减轻，未见新发水疱，原发水疱基本破溃，可见薄层痂皮附着，部分痂皮撕脱，尼氏征（＋），同时出现四肢中度水肿，实验室检查：WBC 18.30×10^9 • L^{-1}↑，Hb 96 g • L^{-1}↓，hs-CRP 37.93 mg • L^{-1}↑；前白蛋白 105 mg • L^{-1}↓，总蛋白 51.1 g•L^{-1}↓，白蛋白 23.5 g•L^{-1}↓，降钙素原 0.674 ng • mL^{-1}↑；凝血功能及自身抗体谱未见明显异常。予以人血白蛋白 10 g ivgtt qd 纠正低蛋白血症，嘱加强营养。9 月 16 日，血培养结果回示无菌生长，患者全身无新发皮疹，躯干及双上肢表皮剥脱处开始结痂，可见片状鳞屑形成，尼氏征（＋），提示治疗有效。9 月 19 日，患者四肢远端温度低，伴中度水肿，全身皮疹颜色暗红，部分呈淡褐色，表皮剥脱处基本干燥结痂，基底面干燥，可见正常皮纹及少许新生皮岛，查体：尼氏征（±），复查血常规：WBC 13.12×10^9 • L^{-1}↑，NEUT% 82.1%↑，Hb 90 g • L^{-1}↓，hs-CRP 13.8 mg • L^{-1}↑，继续输注人血白蛋白纠正低蛋白血症，调整甲泼尼龙琥珀酸钠剂量为 40 mg ivgtt qd。9 月 24 日，全身皮疹颜色变为淡褐色，部分消退，多处表皮剥脱基底面可见正常皮纹及较多新生皮岛，周边附着少许干燥痂皮，尼氏征（－），四肢远端低温较前改善，伴轻度水肿，治疗有效，将甲泼尼龙琥珀酸钠减量至 20 mg ivgtt qd。9 月 27 日，患者皮疹消退，未见皮肤脱屑，停用激素，余治疗继续。

2 讨论

剥脱性皮炎表现为全身皮肤弥漫性红斑及脱屑受累面积不低于 90%[2]，其症状和体征为瘙痒、弥散性潮红及表皮剥脱，除了对患者皮肤黏膜造成损害外，常可引起电解质紊乱、低蛋白血症，严重者还会累及心、肝、肾等多脏器，危害巨大[3]，其常见病因包括原发性皮肤病、恶性肿瘤、药物，其中，约 20% 的剥脱性皮炎由药物使用引起[4]。结合本患者既往无银屑病、红皮病等相关原发性皮肤病病史及恶性肿瘤病史，考虑为药物所致剥脱性皮炎可能性大。剥脱性皮炎发生的潜伏期长短不一，可于用药的数小时及数月内出现[5-6]。追溯患者用药情况，其出现皮疹时虽然同期使用多种药物，但考虑发生皮疹后均未停药，且本例患者于初次使用乌拉地尔后第 5 日再次使用过程中迅速出现皮疹，后皮疹进展迅速，出现全身红斑、肿胀、脱屑，达体表面积的 95%，同时伴有体液和电解质紊乱、低蛋白血症、四肢皮温降低、尿蛋白增加、白细胞计数显著增高，符合剥脱性皮炎型药疹的发生特点，不良反应的发生与乌拉地尔使用存在明显的时间关联性。参考美国常见不良反应术语评定标准（CTCAE）5.0 版，本患者存在剥脱性皮炎时同时伴发体液和电解质紊乱，故判定该不良反应严重程度为分级 4。同时，剥脱性皮炎的发生、转归无法用其他并用药物的作用及患者病情进展和其他治疗影响来解释，通过停用乌拉地尔，使用甲泼尼龙等对症治疗后，症状得以改善，故考虑患者出现剥脱性皮炎与使用乌拉地尔相关。

综合查阅药品说明书及相关文献数据库，未见乌拉地尔所致剥脱性皮炎病例报道，故判定此药品不良反应类型为新的。采用诺氏评估量表法进行药品不良反应关联性评价[7]，详见表 1。该患者使用乌拉地尔引起的剥脱性皮炎型药疹的诺氏评分结果为 6 分，即乌拉地尔与剥脱性皮炎不良反应的因果关系为很可能有关。

剥脱性皮炎型药疹是药物引起的重症药疹之一，重症药疹的发病机制一般为免疫性和非免疫性，在系统用药或局部用药后激发，其中免疫介导为主要机制，且大多数药疹为Ⅳ型迟发性过敏反应[8]。剥脱性皮炎型药疹的发病机制尚未完全阐明，目前的研究认为其炎症过程可能涉及黏附分子和配体，且 T 淋巴细胞介导的过敏反应为剥脱性皮炎型药疹的常见原因，其中，以 Th1 型细胞因子浸润为主，趋化因子、细胞因子及细胞间黏附分子之间复杂的相互作用也对炎性细胞大量募集至皮肤及表皮更新起到重要作用[9]。另外，遗传相关因素如人类白细胞抗原（HLA）基因型也与剥脱性皮炎有不同程度的相关性[10]。既往研究表明乌拉地尔可通过刺激淋巴细胞与表皮细胞相互作用导致皮肤损伤[11]，但本病例报道乌拉地尔所致剥脱性皮炎为新的药品不良反应，其具体发病机制有待进一步研究。

表 1　乌拉地尔引起患者剥脱性皮炎型药疹的诺氏评估量表结果

相关问题	问题分值			乌拉地尔	
	是	否	未知	得分情况	评分理由
1. 该 ADR 先前是否有结论性报告	＋1	0	0	0	查询药品说明书及相关数据库未查见乌拉地尔引起剥脱性皮炎的报道
2. 该 ADR 是否在使用可疑药物后发生的	＋2	－1	0	＋2	患者的该反应是在使用乌拉地尔后发生的
3. 该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂后得到缓解	＋1	0	0	＋1	在停药并使用抗过敏治疗后患者该反应好转
4. 该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现	＋2	－1	0	0	出现该反应后患者未再次使用乌拉地尔，故该 ADR 是否再次出现情况未知
5. 是否存在其他原因能单独引起该 ADR	－1	＋2	0	＋2	分析患者用药情况，不存在其他原因能单独引起该 ADR
6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现	－1	＋1	0	0	患者未使用任何安慰剂
7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度	＋1	0	0	0	未测定乌拉地尔是否达到毒性浓度
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	未知
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应	＋1	0	0	0	未知该患者是否先前暴露于同类药物并出现过类似反应
10. 是否存在任何客观证据证实该反应	＋1	0	0	＋1	患者皮肤状况监测可视为该反应的客观证据
总分值				6 分	

对于剥脱性皮炎型药疹的治疗，及时停用可疑药物是关键，对症支持治疗是基础，系统早期足量地使用糖皮质激素是重点[12]。大部分患者经积极治疗预后良好。需要注意的是，由于大剂量糖皮质激素对机体免疫功能的抑制及可能诱发感染加重，不提倡大剂量激素冲击治疗。另外，联合大剂量静脉注射免疫球蛋白可能缩短皮损好转时间，可酌情选用[13-14]。本患者结合其病史、用药情况判定其剥脱性皮炎由乌拉地尔所致，予以及时停用乌拉地尔，系统足量地使用糖皮质激素，选用抗组胺药物苯海拉明联合依巴斯汀减轻患者瘙痒症状，白蛋白纠正低蛋白血症等一系列对症支持治疗后，患者全身皮疹及皮肤剥脱症状迅速好转，逐渐减量糖皮质激素，经治疗后，患者皮疹消退，未见皮肤脱屑，转归良好。

本文对 1 例使用乌拉地尔后发生剥脱性皮炎病例进行分析报道，提示临床医师警惕乌拉地尔所致的严重皮肤不良反应，为临床安全使用乌拉地尔提供参考。

参考文献

[1] 蔡洪流，付研，黄曼，等 . 盐酸乌拉地尔注射液临床应用专家共识 [J]. 中华急诊医学杂志，2013，22（9）：960-966.

[2] 杨子浩，许丹 . 急性泛发性发疹性脓疱病 / 剥脱性皮炎型药疹 [J]. 中国小儿急救医学，2019，26（5）：332-337.

[3] 包振宇，邹先彪 . 重症药疹的研究进展 [J]. 实用皮肤病学杂志，2015，8（2）：112-114，118.

[4] Roujeau JC，Stern RS. Severe adverse cutaneous reactions to drugs [J]. N Engl J Med，1994，331（19）：1272-1285.

[5] 曹艳云，徐顺明 . 剥脱性皮炎型药疹的诊疗 [J]. 世界临床药物，2013，34（6）：328-330.

[6] 张才华，王辉 . 伏立康唑致罕见剥脱性皮炎 1 例 [J]. 中国医院药学杂志，2018，38（16）：1770-1771.

[7] 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.

[8] 赵辨 . 中国临床皮肤病学 [M]. 2 版 . 南京：江苏凤凰科学技术出版社，2017：798-799.

[9] Okoduwa C，Lambert WC，Schwartz RA，et al. Erythroderma：review of a potentially life-threatening dermatosis [J]. Indian J Dermatol，2009，54（1）：1-6.

[10] Jung JW，Kim JY，Park IW，et al. Genetic markers of severe cutaneous adverse reactions [J]. Korean J Intern Med，2018，33（5）：867-875.

[11] Takehara Y，Igawa K，Satoh T，et al. Psoriasiform eruption induced by α1-adrenergic blocker，urapidil [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol，2007，21（4）：577-578.

[12] 周杰，李娇，杨荣杰，等 . 重症药疹的治疗进展 [J]. 中国麻风皮肤病杂志，2020，36（9）：566-570.

[13] 余炳前，王文菊，骆志成 . 重症药疹 112 例分析 [J]. 中国皮肤性病学杂志，2017，31（6）：623-626.

[14] Law EH，Leung M. Corticosteroids in Stevens-Johnson Syndrome toxic epidermal necrolysis：current evidence and implications for future research [J]. Ann Pharmacother，2015，49（3）：335-342.

（收稿日期：2022-02-16；修回日期：2022-05-06）

临床药师在临床

临床药师参与 1 例血液透析患者经皮冠状动脉介入术后消化道出血的药学监护

何阳，汤莹昕，吴亮*（六安市中医院药剂科，安徽　六安　237006）

摘要：经皮冠状动脉介入治疗（PCI）术后患者必须使用阿司匹林联合 P2Y12 抑制剂进行双联抗血小板治疗，若患者需血液透析，体外抗凝也将进一步增加出血风险。患者一旦发生消化道出血，兼顾缺血和出血风险将是临床工作的难题。临床药师通过参与 1 例血液透析合并 PCI 术后患者出现消化道出血的药学监护，对抗栓治疗的停用、重启以及药物选择提出合理建议，充分体现临床药师在临床多学科协作治疗中的作用。

关键词：经皮冠状动脉介入治疗；血液透析；消化道出血；临床药师

中图分类号：R97，R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2022)09-2211-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.045

1　病例概况

患者，男性，91 岁，身高 165 cm，体质量 48 kg，2021 年 2 月 2 日因“咳嗽喘闷 1 d”结合心电图拟以急性冠脉综合征入院治疗。患者既往慢性肾脏病 5 期 10 年，每周 3 次规律血液透析治疗；脑梗死病史 4 年。入院诊断：急性冠脉综合征；慢性肾脏病 5 期，肾性高血压；维持性血液透析；脑梗死后遗症期。

2　治疗经过

患者于入院当日行 PCI 术，放入药物涂层支架 1 枚，术后常规服用阿司匹林肠溶片 100 mg po qd、替格瑞洛片 90 mg po bid 抗血小板治疗；病程中患者因严重肾功能不全需血液透析，予依诺肝素钠注射液 10 mg 血液净化用预防体外循环凝血；同时予抗感染、强心、调脂、平喘等药物治疗。入院血压 140/75 mmHg（1 mmHg ＝ 0.133 kPa），查肾功能示：尿素 13.56 mmol • L^{-1}↑，血肌酐 704.52 μmol • L^{-1}↑；血常规示：血红蛋白（Hb）137.00 g • L^{-1}，红细胞（RBC）6.15×10^{12} • L^{-1}，红细胞比容（HCT）43.10%，血小板计数（PLT）178×10^{9} • L^{-1}（见图 1）；粪便隐血：阴性。2 月 9 日患者大便色黑，腹痛明显，血常规示：Hb 105.00 g • L^{-1}↓，RBC 4.62×10^{12} • L^{-1}，HCT 33.30%↓，PLT 186×10^{9} • L^{-1}；粪便隐血阳性，提示上消化道出血。临床停用阿司匹林、替格瑞洛抗血小板药物，予质子泵抑制剂（PPI）注射用艾司奥美拉唑钠 40 mg 静脉滴注 q8h 和注射用生长抑素 4.5 mg 静脉泵入 q8h 护胃和止血治疗。在临床药师建议下，停用依诺肝素体外抗凝，予无肝素透析。2 月 19 日由于患者出血进一步加重：血常规示 Hb 81 g • L^{-1}↓、RBC 3.52×10^{12} • L^{-1}、HCT 24.90%↓、PLT 86×10^{9} • L^{-1}↓，考虑严重消化道出血，分别于 2 月 19 日、2 月 22 日输注悬浮红细胞 1.5 U、2.0 U。2 月 25 日患者未再解黑便，电解质示血钙 1.74 mmol • L^{-1}，消化道出血相关症状、指标趋于稳定。同时患者体外通路出现血凝块，临床药师建议透析时恢复依诺肝素注射液血液净化，因患者透析器血凝块现象严重，依诺肝素剂量增加至 20 mg 并于透析结束后予鱼精蛋白中和预防出血。2 月 27 日患者右下肢静脉彩超提示右下肢静脉血栓形成，血常规示血红蛋白不再降低，已稳定 3 日，临床药师建议：① 暂不推荐全身抗凝治疗，可予地奥司明片 0.45 g po bid 以及抬高患肢、弹力袜等物理治疗预防血栓进一步加重；② 推迟抗血小板治疗的重启，临床采纳。3 月 8 日患者未再解黑便，出血相关指标稳定，同时心前区不适改善，透析器血凝块较前减少，病情好转予以出院。临床药师建议可恢复硫酸氢氯吡格雷片 75 mg po qd 出院抗血小板治疗，临床采纳。

3　分析讨论

3.1　临床药师参与患者抗血小板治疗方案的调整

作者简介：何阳，男，硕士，主管药师，主要从事抗凝专业临床药学工作，email：heyang0564@163.com　*通信作者：吴亮，男，副主任药师，主要从事临床药学工作，email：170800395@qq.com

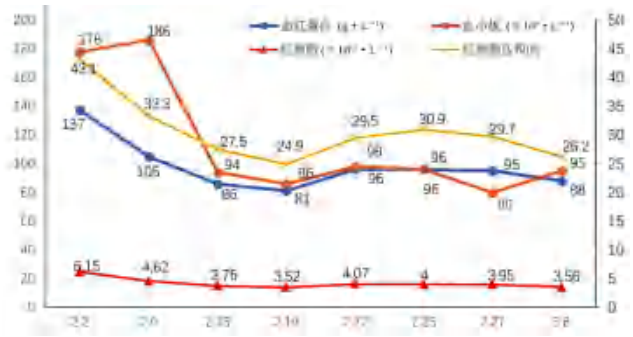

图 1　患者住院期间血红蛋白、血小板、红细胞、红细胞比容变化趋势图

对 PCI 术置入药物涂层支架的患者，若无禁忌证需要双联抗血小板治疗（DAPT）维持治疗至少 12 个月，PCI 术后中断 DAPT 会增加支架内血栓的风险。同时由于阿司匹林和氯吡格雷均通过肾脏清除，研究表明血液透析患者会对阿司匹林和氯吡格雷等药物治疗的抗血小板反应降低，且常表现出血小板高反应性（high on-treatment platelet reactivity，HPR），导致血小板活性抑制不足，血栓事件发生风险较高 [1-2]。另一方面，在抗栓治疗过程中出现消化道出血亦会增加死亡风险，因此需要综合评估缺血和出血风险，制订个体化的临床治疗方案。

2 月 2 日患者 PCI 术后常规给予阿司匹林联合替格瑞洛双联抗血小板治疗，由于其出血风险较高且未考虑使用氯吡格雷换用替格瑞洛，2 月 9 日患者出现消化道出血事件。根据相关指南建议，对于严重出血（BARC 出血分型≥ 3 型）的患者，应减少抗栓药物种类及剂量；当出血无法控制或可能威胁生命时，应立即停药并予输血等治疗。2 月 9 日患者 BARC 出血类型为 3a 型，属于严重出血，应减少抗栓药物种类及剂量，临床停用抗血小板药物治疗。2 月 19 日、2 月 22 日患者出血情况进一步加重，临床予输血治疗。2 月 27 日，患者控制出血稳定 3 日，能否恢复抗血小板治疗存在争议，临床药师认为虽然相关指南推荐控制出血后 3 ～ 5 日可恢复抗血小板治疗，但该患者肾功能严重不全，在 CRUSADE、HAS-BLED 等出血风险评分中皆属于出血高危风险 [2]，根据其特殊病情临床药师建议推迟重启抗血小板治疗，临床采纳。3 月 8 日，由于患者抗血小板药物已停用 1 个月，需重点考虑支架血栓形成风险。支架血栓形成虽发生率较低（30 d 内发生率 0.6%），但病死率高达 45%，其中肾功能不全、停用 DAPT 等属于高危患者 [3]。距 PCI 术后 7 d、1 个月、3 ～ 6 个月内支架血栓风险逐级上升，因此停用抗血小板治疗的时间不宜超过 1 个月。该患者 Hb 在不输血情况下已稳定 12 日，符合恢复抗血小板治疗指征，另外对于进行 DAPT 的上消化道出血患者，相关指南建议优先恢复单一抗血小板治疗（SAPT）。相对于阿司匹林，P2Y12 抑制剂联合 PPI 消化道出血的风险更低 [3]；同时新型 P2Y12 抑制剂替格瑞洛虽然相比氯吡格雷抗血小板疗效更优，但出血发生率也较高 [4]，因此临床药师建议先恢复氯吡格雷单一抗血小板治疗，临床采纳。

3.2　临床药师参与患者抗凝治疗方案的调整

患者入院时因慢性肾脏病 5 期行血液透析治疗，《血液透析临床实践指南》建议抗凝治疗可防止在过滤装置和体外通路中形成血栓。低分子肝素因给药方便以及生物相容性较好，成为常用的抗凝药物，但是当患者出血风险增加时，应尽快停止或减少抗凝治疗 [5]。因此 2 月 9 日患者发生消化道出血后，临床药师建议在停止 DAPT 的同时应停用依诺肝素体外抗凝，予无肝素血液透析 [6]，临床采纳。2 月 9 日至 2 月 24 日期间，由于长时间无肝素透析不能减轻血凝块的形成，在透析过程中血凝块一旦形成就会导致有效循环血量减少，透析器凝血检测和血液系统检测表现出低效率透析。透析过程中不使用抗凝剂是为尽量减少因抗凝造成的出血风险增加，但当出现管路凝血堵塞时造成凝血因子和血小板更多消耗，反而会增加出血风险 [7]，因此 2 月 25 日患者体外通路出现血凝块时需及时恢复体外抗凝。临床认为对于无肝衰竭的既往出血史患者，血液透析时使用枸橼酸盐局部抗凝，其抗凝效力几乎与肝素相当，且出血风险更低 [8]。但由于患者血钙浓度较低（1.74 mmol • L^{-1}），属于枸橼酸盐抗凝禁忌证，临床药师建议恢复依诺肝素体外抗凝。

2 月 27 日患者右下肢静脉彩超提示右下肢深静脉血栓（deep venous thrombosis，DVT）形成，相关指南建议 DVT 应积极开始抗凝治疗，但有出血并发症的患者应先稳定出血，需延迟或中止抗凝治疗。同时静脉活性药物治疗、物理治疗可一定程度改善 DVT 症状，预防血栓进一步加重 [9-10]。因此临床药师建议暂不全身抗凝，予地奥司明药物治疗及抬高患肢、弹力袜等物理治疗。

3.3　临床药师参与患者出院用药方案的制订

患者出院时服用氯吡格雷联合质子泵抑制剂（PPI）治疗，未予 DAPT 及全身抗凝治疗。文献建议 DAPT 期间因出血中断的患者，病情稳定后在确保安全的情况下应尽快恢复 DAPT，且患者

DAPT 评分大于 25 分，仅需短期 DAPT[11]。同时患者出血稳定后，下肢 DVT 也需要短期抗凝治疗。《2016 年急性冠状动脉综合征抗栓治疗合并出血防治多学科专家共识》提出，满足以下条件考虑出血已经得到控制：① 血流动力学稳定；② 不输血情况下，Hb 稳定；③ 尿素氮不继续升高；④ 肠鸣音不活跃；⑤ 便潜血转阴。综上所述，临床药师建议患者出院后 3 ～ 7 日复查血压、血常规、肾功能、粪便隐血等指标，指标稳定后可进行抗栓治疗：① 应用阿司匹林联合氯吡格雷治疗 3 个月，抗血小板治疗期间服用 PPI 3 ～ 6 个月，之后考虑继续或间断服用 PPI[12-13]；② 短期使用低分子肝素全身抗凝 3 个月，若仍有使用禁忌证可考虑植入下腔静脉滤器。

4 小结

PCI 术后由于伴随较高的支架血栓风险，需长期服用抗血小板药物，然而 DAPT 引起的消化道出血使临床面临艰难抉择，若患者同时因血液透析需体外抗凝，将进一步提高抗栓治疗难度。本次案例临床药师在患者恢复抗血小板药物的时机及药物选择、体内外抗凝的停用及重启提供药物服务意见，为临床安全、有效地用药提供保障。

参考文献

[1] Rubin GA，Kirtane AJ，Chen S，et al. Impact of high on-treatment platelet reactivity on outcomes following PCI in patients on hemodialysis：an ADAPTDES substudy [J]. Catheter Cardiovasc Interv，2020，96（4）：793-801.

[2] 中国医师协会心血管内科医师分会，中国医师协会心血管内科医师分会血栓防治专业委员会，中华医学会消化内镜学分会，等 . 急性冠状动脉综合征抗栓治疗合并出血防治多学科专家共识 [J]. 中华内科杂志，2016，55（10）：813-824.

[3] 中华医学会心血管病学分会介入心脏病学组，中国医师协会心血管内科医师分会血栓防治专业委员会，中华心血管病杂志编辑委员会 . 中国经皮冠状动脉介入治疗指南（2016）[J]. 中华心血管病杂志，2016，44（5）：382-400.

[4] 中国医师协会急诊医师分会，中华医学会急诊医学分会，全军急救医学专业委员会，等 . 急性上消化道出血急诊诊治流程专家共识（2020 版）[J]. 中华急诊医学杂志，2021，30（1）：15-24.

[5] Di Minno A，Spadarella G. Antithrombotic drugs，patient characteristics，and gastrointestinal bleeding：clinical translation and areas of research [J]. Blood Rev，2015，29（5）：335-343.

[6] Ashby D，Borman N，Burton J，et al. Renal association clinical practice guideline on haemodialysis [J]. BMC Nephrology，2019，20（1）：379-414.

[7] Zhang Y，Ning J，Li Y，et al. Low dose of argatroban saline flushes anticoagulation in hemodialysis patients with high risk of bleeding [J]. Clin Appl Thromb Hemost，2010，16（4）：440-445.

[8] Zerbi S，Pedrini LA. Anticoagulation and chronic hemodialysis [J]. G Ital Nefrol，2007，24（5）：381-395.

[9] 血液净化急诊临床应用专家共识组 . 血液净化急诊临床应用专家共识 [J]. 中华急诊医学杂志，2017，26（1）：24-36.

[10] 中国健康促进基金会血栓与血管专项基金专家委员会，中华医学会呼吸病学分会肺栓塞与肺血管病学组，中国医师协会呼吸医师分会肺栓塞与肺血管病工作委员会 . 医院内静脉血栓栓塞症防治与管理建议 [J]. 中华医学杂志，2018，98（18）：1383-1388.

[11] 中华医学会外科学分会血管外科学组 . 深静脉血栓形成的诊断和治疗指南（第三版）[J]. 中华普通外科杂志，2017，9（4）：250-257.

[12] Valgimigli M，Bueno H，Byrne RA，et al. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS [J]. Eur J Cardiothorac Surg，2018，53（1）：34-78.

[13] 中国医师协会心血管内科医师分会血栓防治专业委员会，中华医学会心血管病学分会介入心脏病学组，中华心血管病杂志编辑委员会 . 急性冠状动脉综合征特殊人群抗血小板治疗中国专家建议 [J]. 中华心血管病杂志，2018，46（4）：255-266.

（收稿日期：2022-01-02；修回日期：2022-03-05）

药事管理

放射性药品监管现状及思考

李衡[1]，刘轶[2, 3*]，张秋华[1]，兰文[2, 3]（1. 湖南省药品监督管理局，长沙 410013；2. 湖南省药品检验检测研究院，长沙 410001；3. 国家药品监督管理局药用辅料工程技术研究重点实验室，长沙 410001）

摘要：分析放射性药品的背景与特点，结合监管中缺陷的分析和存在的问题，对监管体制和生产企业及相关医疗机构分别提出相应建议，推进完善现有的监管机制，加强或调整监管方式、能力，以期促进核医学的发展和进步。

关键词：放射性药品；监管；思考；建议

中图分类号：R951 **文献标识码：**A **文章编号：**1672-2981(2022)09-2214-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.09.046

Current situation and reflection of radiopharmaceuticals

LI Heng[1], LIU Yi[2, 3*], ZHANG Qiu-hua[1], LAN Wen[2, 3] (1. *Hunan Medical Products Administration*, *Changsha* 410013; 2. *Hunan Institute for Drug Control*, *Changsha* 410001; 3. *NMPA Key Laboratory for Pharmaceutical Excipients Engineering Technology Research*, *Changsha* 410001)

Abstract: The background and characteristics of radiopharmaceuticals were analyzed, and the defects and existing problems in the supervision were analyzed. Corresponding suggestions were put forward for the supervision system, production enterprises and related medical institutions, so as to improve the existing supervision mechanism, and strengthen or adjust the supervision mode and ability to promote the development and progress of nuclear medicine.

Key words: radiopharmaceutical; supervision; reflection; proposal

放射性药品是指用于临床诊断或治疗的放射性核素制剂或其标记药物[1]。放射性药品是一类特殊的药品，除具备药品的特点外，还有放射性，利用其发射的射线进行疾病诊断和治疗。放射性药品主要用于心肌显像和心肌疾病的诊断、神经退行性疾病的诊断和恶性肿瘤的诊断、疗效评价和治疗等[2]。

1 背景与特点

我国放射性药品的研究大约从 20 世纪 50 年代才开始。随着中国核医学的快速发展和临床需求的增长，放射性药品的产值逐年增加。2020 年，中国放射性药品的市场规模约 44.56 亿元[3]。生产销售规模位于全国前三的企业依次为中国同福股份有限公司、东诚药业、上海欣科医药，至 2017 年底，中国大陆医疗机构装备回旋加速器近 110 台[2]。未来十年，我国放射性药物行业将继续呈现寡头竞争的局面，行业集中度有望进一步提高。目前，我国设有核医学科且有放射性药品临床应用的医院有 600 余家，拥有约 880 余台 PET/CT，80 余台 PET/MR[4]。

我国目前已获批进入临床应用的放射性药品品种有 38 个，2020 年版《中国药典》收载品种 30 个，其中 24 种为放射性药品制剂，6 种为非放射性配套药盒原料药。目前已发布质量控制指导原则 2 个[5]。

放射性药品是一类小众用药，与普通药品相比有其特殊性。药品监管部门对其监管所参考的法规与其他类型药品有所不同，所依据的是《放射性药品管理办法》。2022 年 1 月，国家药品监督管理局发布了《关于进一步加强放射性药品管

作者简介：李衡，女，硕士研究生，主要从事药品生产监管工作，email：764482653@qq.com *通信作者：刘轶，女，副主任药师，主要从事药品检验和药品标准研究，email：1124655@qq.com

理有关事宜的通告》[6]，对放射性药品生产和使用企业的质量控制体系、人员把关方面做了详细要求，体现了国家层面对放射性药品在新的历史时期、面临新发展背景的重视。

2　日常监督检查中发现的问题

湖南省现有 A 公司、B 公司两家放射性药品生产企业，另有共计 20 余家制备或使用放射性药品的医疗机构，其中 A 公司的生产销售份额在全省一直处于领先地位。2020 年至 2021 年通过对省内两家放射性药品生产企业及部分医疗机构进行日常监督检查，共发现一般缺陷 114 条。对存在的缺陷项进行分类，其中人员（机构）方面共计 14 条，占比 12%；设施设备方面共计 6 条，占比 6%；物料管理方面共计 39 条，占比 34%；生产检验方面共 32 条，占比 28%；文件管理方面共计 23 条，占比 20%（见图 1）。

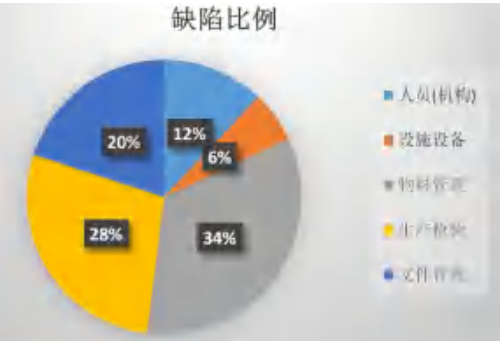

图 1　2020—2021 年湖南省两家放射性药品生产企业及部分医疗机构日常监督检查缺陷分布情况

Fig 1　Daily supervision and inspection of defects by two radioactive drug manufacturers and some medical institutions in Hunan Province from 2020 to 2021

3　检查中发现问题的分析

3.1　人员（机构）

放射性药品本质上是放射性核素与药品共同制备成的一类特殊药品，根据相关法规，生产企业或医疗机构放射性药品制剂部门的关键岗位技术人员应具有核医学或相关专业资质及工作经验，现状是这些人员具有很好的核物理专业背景，但对药品和药品生产，特别是药品生产质量管理规范（GMP）理念比较缺乏。使用环节多为医护人员，对核物理或核医药方面的知识也相对生疏，所以出现了生产和使用环节的操作人员都在各自岗位上出现真空地带，不能很好地将核物理与医药相结合，在理念上、风险点的把控上，存在一定的安全隐患。医疗机构的操作人员多为护理人员，对放射性药品的特性缺乏了解并且自我保护方面意识较弱。

3.2　设备设施

生产企业与医疗机构放射性药品制剂部门部分存在厂房或制备区洁净区内气流流向由非放射区向放射性区、由低污染区向高污染区流动的问题，空调净化系统的配置未充分考虑不同生产工艺、不同工序等方面可能存在交叉污染的问题，活性炭过滤器、除碘过滤器的规范管理的问题。另外设备的使用、维护、保养记录填写不及时或不规范，医疗机构在使用时，多数只配置简易的防护操作台，更谈不上布局合理性的问题。

3.3　物料管理

生产环节存在未按照规程对西林瓶、无菌注射用水进行进厂检验，工艺废水、废弃的发生器、检验废水、手套、擦拭废物未按照规程进行处理等问题。使用环节则包括医疗机构对放射性药品的领取、配药、废弃物的处理未按规程进行操作。

3.4　生产检验

检验记录填写不规范。起始物料、包材等未完全按现行质量标准进行进厂检验。由于检验力量薄弱，部分追索性检验项目无法完成。部分医疗机构未配备相应的场所、检验仪器和设备，未定期对已有的仪器设备进行定期校验。数据可靠性是每次 GMP 现场检查的重点核查内容，医疗机构较生产企业对该项目重视程度较差，大部分电子数据未按权限等级保存处理，可随意更改或删除，存在数据丢失的不安全隐患。

3.5　文件管理

部分医疗机构文件体系不完整；验证文件、工艺规程、检验规程、仪器设备的操作和校验规程缺乏或未及时修订等。

4　关于完善对放射性药品监管的建议

4.1　提高省级药监执法人员专业水平和监管能力

在我国，随着 SPE-CT、PET/CT 逐渐将进入国家医保目录和各省级医保目录，放射性药品的使用量将不断上升，加之 2021 年国家药品监督管理局将放射性药品的生产使用许可、日常监管均下放至省局药监部门，对省级药监执法人员的专业水平、监管能力均提出新的要求，因此，需适宜的加强或调整监管方式、能力。

4.2　强化事中事后监管

2022 年初，国家药品监督管理局下发了《关于进一步加强放射性药品管理有关事宜的通告》[6]，明确要求各省级药品监管部门应当加强事中事后监管，进一步加强放射性药品生产过程的监督检查，督促放射性药品生产企业和医疗机构落实放射性药

品质量安全主体责任，确保药品生产全过程持续符合法定要求。

4.3 推进和完善医疗机构使用或自备放射性药品备案制

医疗机构是放射性药品的使用机构，推进医疗机构备案制，一方面有利于监管部门摸清底数，为有效监管提供数据；另一方面对医疗机构有无形的鞭策作用，促进其自觉遵守有关规定，保障用药者的安全。

4.4 推进省级药品检验机构放射性药品检验专业人员检测能力建设

目前省级药品检验机构在人员、检验设施设备等方面均无法胜任放射性药品检验的工作任务，随着放射性药品生产使用监管职能下放至省级药监部门，其对应检验能力和水平亟需加强。省级药检部门应安排专业技术人员参加中国食品药品检定研究院或国家药品监督管理局授权的机构有关放射性药品检验知识及放射性药品管理相关法规的培训。

4.5 推进区域性供药中心的建设

鉴于放射性药品衰变期短、生产运输使用涉及到安全防护的特性，建议推进区域性供药中心，统一生产、专业运输、指导医护人员正确使用，确保这一特殊性药品的全程可控。

4.6 借鉴国际先进管理经验

我国放射性药品相关的政策法规比较滞后，目前缺乏科学、系统的放射性药品管理法规体系和研究指南，对行业的发展有一定的影响。美国建立了关于放射性药品研究的技术指导原则，欧盟也出台了《放射性药物研究指南》和《放射性药物非临床评价指导原则概念文件》等相关指南，国际上完善的放射性药品法规管理体系和修订机制值得我国学习[7]。

4.7 推进制订针对放射性药品的生产质量管理规范

我国可借鉴发达国家的有益经验，尽快制订针对放射性药品的生产质量管理规范，在操作人员、无菌处理、元器件的质量控制、生产步骤的自我验证、个人生产监督、产品发布授权和标签要求等方面给予放射性药品生产质量管理更强的针对性和更大的灵活性[8]，缩小生产企业和医疗机构之间在放射性药品生产质量管理方面的差别，促进放射性药品安全、合理应用。

5 对涉及放射性药品生产企业、医疗机构及使用单位的建议

5.1 加强人员培训

放射性药品生产关键岗位人员、使用单位相关医护人员，生产企业关键岗位人员应具有核物理类专业知识；医护人员则具有医药专业背景；质量控制人员应经过中国食品药品检定研究院或国家药品监督管理局授权的机构有关放射性药品检验知识的培训，并取得培训合格证书；应将核素防护及安全操作知识纳入相关人员继续培训范畴。

5.2 推进生产及使用单位各项制度及机构的完善

要求生产及使用单位建立本单位放射性药品研究委员会、建立放射性药品应急处置机制，成立放射性药品应急处置部门，应对突发性安全事件。

5.3 加强放射性药品生产企业、有制备放射性药品的医疗机构的生产质量管理

根据我国放射性药品生产质量管理的现状，应积极加强放射性药品生产企业、有制备放射性药品的医疗机构的生产质量管理，特别要注重提高有制备放射性药品的医疗机构的生产质量管理。

6 结语

通过对放射性药品生产企业和部分医疗机构的日常监督检查缺陷分析，探究进一步完善放射性药品监管的方法，促进我省核医学的发展和进步，以期为临床提供安全有效的放射性药品，更好地为人类健康服务。

参考文献

[1] 放射性药品管理办法 [EB/OL]. 中华人民共和国国务院令第 25 号，1989. http：//www. gov. cn/gongbao/content/2017/content_5219142. html.

[2] 张锦明，杜进 . 中国放射性药物制备的现状及展望 [J]. 同位素，2019，32（6）：178-185.

[3] 汤琦 . 国内外放射性药品市场分析 [J]. 张江科技评论，2021（6）：66-69.

[4] 国家卫生健康委关于调整 2018—2020 年大型医用设备配置规划的通知 [EB/OL]. 国家卫生健康委财务司，国卫财务函 [2020]315 号 . [2020-07-31]. http：//www. nhc. gov. cn/caiwusi/s 10743/202007/c710ab96137846928ba6154135e085d0. shtml.

[5] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：537-538.

[6] 国家药监局关于进一步加强放射性药品管理有关事宜的通告 [EB/OL]. 国家药品监督管理局 2022 年第 5 号 . 2022. https：//www. nmpa. gov. cn/yaopin/ypggtg/20220114170855106. html.

[7] 光红梅，王庆利 . EMA 对放射性诊断药品的非临床评价要求介绍 [J]. 中国新药杂志，2018，27（18）：2111-2115.

[8] Food and Drug Administration，HHS. Current good manufacturing practice for positron emission tomography drugs [J]. Fed Regist，2009，74（236）：65409-65436.

（收稿日期：2022-02-26；修回日期：2022-06-01）

致 谢

中南大学湘雅二医院
江苏恒瑞医药股份有限公司
长沙市中心医院

副理事长及单位

曾春辉　湖南天士力民生药业有限公司总经理
黎鸠鸠　湖南一格制药有限公司总经理

常务理事及单位

刘若辉　湖南千金湘江药业股份有限公司总经理
欧阳荣　湖南中医药大学第一附属医院药学部主任
雷艳青　湖南省脑科医院药学部主任
周玉生　南华大学附属第二医院副院长
李　专　长沙市第三医院副院长
田其学　湖南省中医药研究院附属医院药剂科主任
袁群莉　华润湖南瑞格医药有限公司副总经理
阳　波　南华大学附属第一医院药学部主任

理事及单位

周运奇　湖南五洲通药业有限责任公司董事长
杨贞皓　湖南省湘中制药有限公司总经理
刘　湘　湘潭市中心医院药学部
曾　强　岳阳市一人民医院党委书记
吴吉明　常德市第一人民医院副院长
谭东辉　湘南学院附属医院院长
肖政辉　湖南省儿童医院副院长
李　勇　南华大学附属南华医院临床药学科主任
林承雄　湖南怀仁大健康产业发展有限公司董事长
何　毅　株洲市中心医院副院长
彭　宏　新邵县人民医院院长
郭建军　湖南恒兴医药科技有限公司总经理

2020 STM WJCI

WORLD JOURNAL CLOUT INDEX REPORT

世界期刊影响力指数（WJCI）报告（2020科技版）

收录证书

This is certificate for

中南药学

（ISSNS：1672-2981）

to be indexed in

World Journal Clout Index Report(2020 STM)

项目联合研发单位 Project research units：

中国科学技术信息研究所 Institute of Scientific and Technical Information of China

《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司 Chinese Academic Journal(CD Edition) Electronic Publishing House Co.ltd

清华大学图书馆 Library of Tsinghua University

万方数据有限公司 Wanfang Data Co.Ltd

中国高校科技期刊研究会 Society of China University Journals

国内统一刊号：CN43-1408/R　广告经营许可证：4300004000764　邮发代号：42-290　定价：25.00元/册