



中南药 学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊 2003 年 4 月创刊 第 20 卷 第 12 期 (总第 203 期) 2022 年 12 月 20 日出版

顾问

周宏灏

主编

李焕德

社长

张毕奎

编辑部主任

邬志娟

主管单位

湖南省食品药品监督管理局

主办单位

湖南省药学会

编辑: 中南药 学编辑委员会

地址: 长沙市人民 中路 139 号中南

大学湘雅二医院内

出版: 中南药 学杂志社

发行: 湖南省报 刊发行局

印刷: 长沙建 华印务有限公司

订阅: 全国各地 邮局

定价: 每期 25.00 元, 全年 300.00 元

邮编: 410011

电话: (0731) 82258487/84895602

传真: (0731) 82258487

邮发代号: 42-290

投稿网址: <http://znyx.cbpt.cnki.net>

E-mail: znyxzz2003@vip.163.com

广告经营许可证: 4300004000764

中国标准连续 出版物号

ISSN 1672-2981

CN43-1408/R

2022 年版权 归《中南药 学》

编辑部所有

目 次

研究论文

- (2701) 马勃大黄栓对小鼠溃疡性结肠炎的治疗作用及机制研究
..... 郭子霞, 张楠, 邢媛, 等
- (2708) 基于网络药理学和蛋白验证技术探讨桔梗皂苷 D 通过调控 Hippo 信号通路对宫颈癌的作用机制 ... 马琳琳, 杨新鸣, 时思毛, 等
- (2715) 宽叶重楼的甾体皂苷类成分研究
..... 李天怡, 陆云阳, 刘杨, 等
- (2722) 基于海量文献挖掘的微生物 - 药物关系提取研究
..... 肖欣怡, 吴诚堃, 杨灿群
- (2729) 超声介导载和厚朴酚超声微泡的制备与体内评价
..... 王家玉, 李琳, 陈琳
- (2734) 复方硫酸新霉素温敏凝胶的制备及其对复发性口腔溃疡的作用
..... 王欢, 李正伟, 杨盟, 等
- (2740) 鬼针草化学成分及 α - 葡萄糖苷酶抑制活性研究
..... 姜李红, 张胜男, 龚桂芬, 等
- (2746) 秦皮乙素纳米结晶的制备与抗炎活性评价
..... 程雯, 朱洁, 张永帅, 等
- (2752) 刘寄奴化学成分及其水煎液抗菌活性的研究
..... 陈俊, 曹青青, 吕磊, 等
- (2758) 基于 UHPLC-Q-Exactive-Obitrap-MS 的柴胡疏肝丸的化学成分解析
..... 李宇, 张凯, 孙静, 等
- (2767) 大落新妇根、茎、叶挥发油成分的 GC-MS 分析及抗氧化能力测定
..... 张露, 邹娟, 叶江海, 等
- (2772) 基于网络药理学分析铁皮石斛花总黄酮抑制结肠癌作用机制及体外实验验证
..... 梁婉婷, 王新婷, 朱朋艳, 等
- (2781) 小柴胡颗粒抗人冠状病毒 229E 的活性研究及成分群筛选
..... 余祥翠, 刘宏, 郑如文, 等
- (2786) 基于动物实验和网络药理学探讨子芪抑瘤饮治疗卵巢癌的潜在机制
..... 耿子翔, 刘莹, 聂小丽, 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 丹 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 姜月芬 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 睢大箕 肇丽梅 翟 青
黎 敏 颜 苗 潘卫三 魏高文

- (2793) 黄芩甲苷纳米结构脂质载体的制备及其对肺癌作用的体内外研究
..... 陈敏燕, 原永芳, 吴飞华, 等
- (2799) 接骨木有效成分——莫诺苷对成骨细胞活性研究
..... 袁旭, 董培良, 韩华
- (2804) 聚烯丙基胺盐酸盐纳米粒制备工艺的研究与制剂学的初步评价
..... 熊峰, 苏峰, 鲁胜男, 等
- (2813) 紫花地丁提取物抗红色毛癣菌的作用研究
..... 王桂荣, 程丽丽, 朱南南, 等
- (2818) 天南星的化学成分研究..... 罗雨萌, 孙延平, 黎冠兰, 等
- (2823) 基于肠屏障功能探讨血府逐瘀胶囊防治卒中后抑郁作用研究
..... 郑舒, 金博文, 李东娜, 等
- (2831) 基于 AHP- 熵权法结合指纹图谱优选独活药渣的醇提工艺
..... 陈仕妍, 林伟雄, 罗毓, 等

含碘中药及方剂在甲状腺疾病中的研究进展专题

- (2837) 含碘中药治疗甲状腺疾病的作用机制探讨
..... 杨涛, 马思懿, 姜敏
- (2843) 海藻玉壶汤治疗甲状腺疾病的临床应用与药理作用研究进展
..... 马思懿, 杨涛, 姜敏

综述

- (2849) 扫描电子显微镜在药品质量控制中的应用..... 徐昕怡, 洪小栩
- (2856) 头孢他啶阿维巴坦在儿童感染中的应用及研究进展
..... 周宸玥, 王卓芸, 姚奇, 等
- (2863) 布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂个体化给药前景研究
..... 安姝润, 罗雪梅, 杨晓璇, 等
- (2869) 电化学分析法检测抗坏血酸、多巴胺和尿酸研究进展
..... 夏用恢, 李广利, 胡长平

药物分析与检验

- (2877) HS-GC-MS 结合保留指数法探讨白术麸炒过程中挥发性化学成分
的变化规律 王凡一, 高如汐, 郑威, 等
- (2887) 苦皮藤高效液相色谱指纹图谱及多指标成分含量测定
..... 胡家震, 赵婷婷, 何席呈, 等
- (2893) 高效液相色谱法测定曲咪新乳膏中硝酸咪康唑有关物质
..... 周天天, 张营, 谈仲川, 等
- (2897) 离子色谱法测定枸橼酸钾缓释片中枸橼酸的含量
..... 王森, 顾小燕, 李耕, 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: 郭志娟 彭金飞 李 科
陆窈窕

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。

(2901) 高效液相色谱法同时测定甲苯磺酸妥舒沙星中 4 种遗传毒性杂质的含量 陈鸿玉, 程雪清, 廖漾, 等

医院药学

(2906) 伏立康唑致肝损伤风险预测模型的构建与验证 刘丽春, 杨万枝, 彭杰成, 等

(2910) 利伐沙班在老年非瓣膜性房颤患者体内的群体药动学 张瑜, 王鲁君, 朱少静, 等

(2915) 发热门诊自助云药房建设与实践 田京辉, 张慧丽, 陈静静, 等

(2920) 国家集采背景下的南京某院心血管药物应用情况 张宁, 马红, 钱巧, 等

(2925) 利巴韦林用于慢性丙型肝炎病毒感染者的群体药动学文献分析 李国兴, 舒家华, 陈松, 等

药物与临床

(2931) 支气管哮喘患者 *STIP1* 基因 rs4980524 位点多态性与吸入性糖皮质激素疗效关系的研究 冯文玲, 李静, 蒲文, 等

(2936) 基于蒙特卡洛模拟探讨两性霉素 B 在真菌感染患者中的给药方案 马欢, 马攀, 陈勇川

(2941) 艾司氯胺酮复合丙泊酚抑制人工流产术体动反应的有效剂量研究 李双凤, 黄婷婉, 陈帅, 等

(2944) 甲苯磺酸瑞马唑仑在子宫病损电切术麻醉中的应用研究 张璇, 李亭仪, 郭志佳, 等

药品不良反应

(2950) 复方磺胺甲噁唑片致 DRESS 综合征 1 例及文献复习 谢小云, 竺嘉幸, 邹淑梅, 等

(2954) 硫唑嘌呤致重症肌无力患者肺部感染 1 例 王麦利, 刘新红, 刘丁萍, 等

(2957) 注射用己酮可可碱致过敏性休克 1 例并文献复习 宋菁菁, 周海英

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*258*zh*P*25.0*44*2022-12

本期责任编辑: 郭志娟, 陆窈窕, 彭金飞, 李科

英文编辑: 周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 20, Number 12 December 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

- (2701) Therapeutic effect of Mabo Dahuang suppository on ulcerative colitis in mice and related mechanism
..... GUO Zi-xia, ZHANG Nan, XING Yuan, et al
- (2708) Mechanism of platycodin D on cervical carcinoma by regulating Hippo signal pathway based on network pharmacology and targeted protein verification MA lin-lin, YANG Xin-ming, SHI Si-mao, et al
- (2715) Steroidal saponins from rhizomes of *Paris polyphylla* var. *latifolia*
..... LI Tian-yi, LU Yun-yang, LIU Yang, et al
- (2722) Microbe-drug interactions and extractions based on large-scaled literature mining XIAO Xin-yi, WU Cheng-kun, YANG Can-qun
- (2729) Preparation and in vivo evaluation of honokiol loaded ultrasound micro-bubble WANG Jia-yu, LI Lin, CHEN Lin
- (2734) Preparation of compound neomycin sulfate thermosensitive gel and its treatment of recurrent oral ulcer
..... WANG Huan, LI Zheng-wei, YANG Meng, et al
- (2740) Chemical constituents of *Bidens pilosa* and their α -glucosidase inhibitory activity
..... JIANG Li-hong, ZHANG Sheng-nan, GONG Gui-fen, et al
- (2747) Preparation, characterization and anti-inflammatory of esculetin nanocrystals CHENG Wen, ZHU Jie, ZHANG Yong-shuai, et al
- (2752) Antimicrobial activity of chemical constituents and water decoction of *Artemisia anomala* S. Moore
..... CHEN Jun, CAO Qing-qing, LYU Lei, et al
- (2758) Chemical compositions in Chaihu Shugan pills based on UHPLC-Q-Ex-active-Obitriap-MS LI Yu, ZHANG Kai, SUN Jing, et al
- (2767) GC-MS and antioxidant capacity of volatile oil from the roots, stems and leaves of *Astilbe grandis*
..... ZHANG Lu, ZOU Juan, YE Jiang-hai, et al
- (2772) Anti-colon cancer mechanism of total flavonoids of *Dendrobium candidum* flower based on network pharmacology and in vitro experimental verification
..... LIANG Wan-ting, WANG Xin-ting, ZHU Peng-yan, et al

Postal code

42-290

PublishEditorial Office of Central South
Pharmacy**Subscribe**Post office nationwide for
subscription 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.

(2781) Screening and validation of active components of Xiaochaihu granules
against human coronavirus 229E

..... YU Xiang-cui, LIU Hong, ZHENG Ru-wen, et al

(2786) Potential mechanism of Ziqi Yiliu decoction for ovarian cancer based on
animal experiment and network pharmacology

..... GENG Zi-xiang, LIU Ying, NIE Xiao-li, et al

(2793) Preparation of astragaloside-loaded nanostructured lipid carriers and
their effects on lung cancer in vitro and in vivo

..... CHEN Min-yan, YUAN Yong-fang, WU Fei-hua, et al

(2799) Effect of monosine on the activity of osteoblasts grafting

..... YUAN Xu, DONG Pei-liang, HAN Hua

(2804) Preparation of poly (allylamine) hydrochloride nanoparticles and pre-
liminary evaluation of pharmaceuticals

..... XIONG Feng, SU Feng, LU Sheng-nan, et al

(2813) Antifungal effect of *Viola yedoensis* Makino extract on *Trichophyton rubrum*

..... WANG Gui-rong, CHENG Li-li, ZHU Nan-nan, et al

(2818) Chemical constituents of *Arisaema erubescens* (Wall.) Schott

..... LUO Yu-meng, SUN Yan-ping, LI Guan-lan, et al

(2823) Effect of Xuefu Zhuyu capsules on poststroke depression based on intes-
tinal barrier function and related mechanism

..... ZHENG Shu, JIN Bo-wen, LI Dong-na, et al

(2831) Optimization for ethanol extraction of *Angelica Pubescens Radix* based on
AHP-entropy and fingerprint chromatogram

..... CHEN Shi-yan, LIN Wei-xiong, LUO Yu, et al

(2837) Study on the mechanism of iodine-containing traditional Chinese medi-
cine in the treatment of thyroid diseases

..... YANG Tao, MA Si-yi, JIANG Min

(2843) Clinical application and pharmacological effect of Haizao Yuhu decoction
for thyroid diseases

..... MA Si-yi, YANG Tao, JIANG Min

(2849) Application of scanning electron microscopy in drug quality control

..... XU Xin-yi, HONG Xiao-xu

(2856) Application and research progress of ceftazidime-avibactam for children's
infection

..... ZHOU Cheng-yue, WANG Zhuo-yun, YAO Qi, et al

(2864) Prospect of individualized administration of Bruton's tyrosine kinase
inhibitors

..... AN Shu-run, LUO Xue-mei, YANG Xiao-xuan, et al

(2869) Research progress in electrochemical detection of ascorbic acid, dopamine
and uric acid

..... XIA Yong-hui, LI Guang-li, HU Chang-ping

- (2877) **HS-GC-MS combined with the retention index method in determining the change of volatile components in Rhizoma Atractylodis Macrocephalae stir-fried with bran**
 WANG Fan-yi, GAO Ru-xi, ZHENG Wei, et al
- (2887) **HPLC fingerprint and multi-component determination of *Celastrus angulatus* Maxim.** HU Jia-zhen, ZHAO Ting-ting, HE Xi-cheng, et al
- (2893) **Determination of related substances of miconazole nitrate in triamcinolone acetate and miconazole nitrate neomycin sulfate cream by HPLC** ZHOU Tian-tian, ZHANG Ying, TAN Zhong-chuan, et al
- (2898) **Determination of potassium citrate sustained-release tablets by ion chromatography** WANG Miao, GU Xiao-yan, LI Geng, et al
- (2901) **Simultaneous determination of 4 genotoxic impurities in tosylloxacin tosylate hydrate by HPLC**
 CHEN Hong-yu, CHENG Xue-qing, LIAO Yang, et al
- (2906) **Construction and verification of risk prediction model of liver injury induced by voriconazole**
 LIU Li-chun, YANG Wan-zhi, PENG Jie-cheng, et al
- (2911) **Population pharmacokinetics of rivaroxaban in elderly patients with non-valvular atrial fibrillation**
 ZHANG Yu, WANG Lu-jun, ZHU Shao-jing, et al
- (2915) **Construction of self-service cloud pharmacy in fever clinics**
 TIAN Jing-hui, ZHANG Hui-li, CHEN Jing-jing, et al
- (2920) **Use of cardiovascular drugs in a hospital in Nanjing under national centralized purchase**
 ZHANG Ning, MA Hong, QIAN Qiao, et al
- (2925) **Population pharmacokinetics literature analysis of ribavirin in patients with chronic hepatitis C virus infection**
 LI Guo-xing, SHU Jia-hua, CHEN Song, et al
- (2931) **Association between rs4980524 locus polymorphism of *STIP1* gene and effectivity of inhaled glucocorticoids in patients with asthma**
 FENG Wen-ling, LI Jing, PU Wen, et al
- (2936) **Amphotericin B dosage regimen for patients with fungal infection by Monte Carlo simulation** MA Huan, MA Pan, CHEN Yong-chuan
- (2944) **Application of remazolam and propofol in electrotomy of uterine lesions**
 ZHANG Xuan, LI Ting-yi, GUO Zhi-jia, et al

研究论文

马勃大黄栓对小鼠溃疡性结肠炎的治疗作用及机制研究

郭子霞¹, 张楠², 邢媛³, 李炜¹, 张丹参^{4*} (1. 河北北方学院药学院, 河北 张家口 075000; 2. 河北医科大学第一医院中心实验室、河北省脑科学与精神心理疾病重点实验室, 石家庄 050031; 3. 河北医科大学第一医院神经内科、河北省脑老化与认知神经科学实验室, 石家庄 050031; 4. 河北科技大学化学与制药工程学院, 石家庄 050018)

摘要: **目的** 建立溃疡性结肠炎小鼠模型并探究马勃大黄栓对该模型的治疗作用及机制。**方法** 联用噻唑酮 (OXZ) 和 2, 4, 6-三硝基苯磺酸 (TNBS) 建立溃疡性结肠炎小鼠模型。将造模小鼠随机分为模型组, 柳氮磺胺吡啶栓组, 马勃栓组, 大黄栓组, 马勃大黄栓高、中、低剂量 (5 mg-2.5 mg、2.5 mg-1.25 mg、1.25 mg-0.625 mg) 组, 正常饲养的小鼠为正常对照组。各组栓剂给药 14 d。通过记录给药期间各组小鼠疾病活动指数 (DAI)、观察结肠黏膜损伤并评分 (CMDI)、HE 染色观察结肠组织病理学变化并评分 (HPS)、检测结肠组织中的髓过氧化物酶 (MPO) 活力, 评价马勃大黄栓对小鼠溃疡性结肠炎的治疗作用; 通过 ELISA 法检测血清 IL-1 β 及 IL-6 水平、免疫组织化学染色观察结肠 TNF- α 蛋白表达情况、免疫组织化学染色及 Western blot 法观察测定结肠 TLR4、MyD88、NF- κ B 蛋白表达情况, 探究马勃大黄栓治疗溃疡性结肠炎的作用机制。**结果** 与正常对照组小鼠相比, 模型组小鼠 DAI、结肠单位长度湿重、CMDI 及 HPS 评分均显著升高 ($P < 0.01$)。给药 14 d 后各给药组小鼠与模型组相比, 其症状及结肠损伤得到不同程度缓解, DAI、CMDI 及 HPS、MPO 活力均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与单用马勃、大黄治疗相比, 马勃大黄栓高剂量组小鼠 DAI、CMDI、HPS、MPO 活力、血清 IL-1 β 、IL-6 及结肠中 TNF- α 、TLR4、MyD88、NF- κ B 蛋白表达水平均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 联用 OXZ 和 TNBS 建立的溃疡性结肠炎小鼠模型具有稳定、迁延性特点; 马勃、大黄联用明显改善溃疡性结肠炎小鼠症状、减轻结肠损伤, 其抗炎作用机制可能与抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路有关。

关键词: 马勃; 大黄; 溃疡性结肠炎; 炎症; TLR4/MyD88/NF- κ B 通路

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2701-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.001

Therapeutic effect of Mabo Dahuang suppository on ulcerative colitis in mice and related mechanism

GUO Zi-xia¹, ZHANG Nan², XING Yuan³, Li Wei¹, ZHANG Dan-shen^{4*} (1. Department of Pharmacy, Hebei North University, Zhangjiakou Hebei 075000; 2. Central Laboratory, Hebei Key Laboratory of Brain Sciences and Psychiatric-Psychologic Diseases, The First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031; 3. Department of Neurology, Brain Aging and Cognitive Neuroscience Laboratory of Hebei, The First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031; 4. School of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018)

Abstract: Objective To establish a mouse model of ulcerative colitis and determine the therapeutic effect of Mabo Dahuang suppository on the model and its mechanism. **Methods** Ulcerative colitis mouse model was induced by combining oxazolone with 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid. The

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (No.82100863); 河北省重点研发计划项目生物医药专项 (No.20372509D); 河北省自然科学基金 (No.H2020208032, No.H2020206105, No.H2020206643); 河北省中医药类科研计划课题 (No.2020268)。

作者简介: 郭子霞, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药理学研究, email: 2389707795@qq.com ***通信作者:** 张丹参, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药药理学研究, email: zhangds2011@126.com

model mice were randomly divided into a model group, a sulfasalazine suppository group, a Mabo suppository group, a Dahuang suppository group, and Mabo Dahuang suppository three dose groups (5 mg-2.5 mg, 2.5 mg-1.25 mg, and 1.25 mg-0.625 mg). The mice fed normally served as the normal control group. The mice were given suppository continuously for 14 days. The therapeutic effect of Mabo Dahuang suppository on ulcerative colitis mice was evaluated with recorded disease activity index (DAI) during the administration, scores of the colon mucosa damage index (CMDI), histopathological changes of colon by HE staining, and the activity of myeloperoxidase (MPO) in the colon tissue. The serum IL-1 β and IL-6 levels were detected by ELISA. TNF- α protein expression in the colon was observed by immunohistochemical staining, the protein expression of TLR4, MyD88 and NF- κ B in the colon was determined by immunohistochemical staining and Western blot. **Results** Compared with the normal control group, the DAI, colon weight/length ratio, CMDI and HPS in the model group were significantly increased ($P < 0.01$). After 14 days of administration, compared with the model group, the symptoms and colon damage of the mice in each administration group were improved to different degrees, and the DAI, CMDI, HPS and MPO activity were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the use of *Lasiosphaera seu Calvatia* or *Rhei Radix et Rhizoma* alone, the DAI, CMDI, HPS and MPO activity, the serum IL-1 β and IL-6 levels and the protein expression of TNF- α , TLR4, MyD88 and NF- κ B in the colon of mice high dose in the combination suppository group were all decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The mouse model of ulcerative colitis induced by combining OXZ and TNBS is stable and persistent. *Lasiosphaera seu Calvatia* combined with *Rhei Radix et Rhizoma* can obviously improve the symptoms in mice with ulcerative colitis and reduce the colonic damage. The anti-inflammatory mechanism may be related to inhibiting TLR4/MyD88/NF- κ B pathways.

Key words: *Lasiosphaera seu Calvatia*; *Rhei Radix et Rhizoma*; ulcerative colitis; inflammatory; TLR4/MYD88/NF- κ B pathway

溃疡性结肠炎是一种慢性肠道炎症疾病,发病率有逐年增高的趋势。磺胺类药物、糖皮质激素、免疫抑制剂等治疗药物,因给药周期较长,长期用药易产生不良反应而限制了其临床应用^[1],目前临床采用中药方剂治疗溃疡性结肠炎有一定疗效,但起效较慢^[2]。大黄具有通经解瘀、收敛、抗炎功效^[3],马勃具有抗炎杀菌、外用止血功效^[4],曾有报道,两者配伍可用于治疗上消化道出血^[5],课题组前期研究证实大黄、马勃单独给药对溃疡性结肠炎小鼠有保护作用。本研究通过优化前期建立的溃疡性结肠炎小鼠模型,研究马勃、大黄两药联用对小鼠溃疡性结肠炎的治疗作用并探讨其作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级雄性昆明小鼠[斯贝福(北京)生物技术有限公司,许可证号SCXK(京)2019-0010],25~30 g,6周龄,饲养于河北北方学院药学院屏障动物中心。

1.2 试药

马勃、大黄(北京同仁堂药店),经河北北方学院医学院赵恒成教授鉴定分别为灰包科真菌脱皮马勃 *Lasiosphaera fenzlii* Reich 的干燥子实体和蓼科

植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根茎;噻唑酮(OXZ)、2,4,6-三硝基苯磺酸溶液(TNBS)、柳氮磺胺吡啶(SASP)(美国Sigma公司,批号分别为BCBL9644V、SLCG2384、075M4786);髓过氧化物酶(MPO)测试盒(南京建成生物工程研究所);HE染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);小鼠IL-1 β 、IL-6 ELISA试剂盒(武汉纯度生物科技有限公司);SP试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);TNF- α 抗体(武汉博士德生物科技有限公司,批号:B0S2544+2545BP450);TLR4抗体、NF- κ B抗体(Abcam公司,批号分别为GR247838-1、GR3236514-1);MyD88抗体(Affinity公司,批号:7627819)。

1.3 仪器

RBV-4融变时限检查仪(天津药典标准仪器厂);EG1150H生物组织包埋机、RM2245轮转式石蜡切片机、DM3000成像显微镜(德国Leica公司);3K30高速冷冻离心机(美国Sigma公司);FSH-2A型可调高速匀浆器(金坛市盛威实验仪器厂);735BI微型紫外分光光度计(上海光学仪器制造厂);Infinite M200 PRO Nano Quant酶标仪(瑞士Tecan公司);FM0530多色荧光和

化学发光成像系统 (Protein Simple 公司)。

2 方法

2.1 栓剂制备及项目检查

参考文献报道^[5]临床上马勃、大黄配伍比为 2:1。大黄给药剂量参考课题组前期大黄栓治疗小鼠溃疡性结肠炎的研究^[6]筛选出小鼠按体质量给药大黄 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，马勃给药剂量根据药典规定用量^[7]按人与小鼠体质量换算并结合文献报道马勃大黄配伍比确定为马勃 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，三个配比剂量组给药量分别为马勃 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、大黄 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、马勃 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、大黄 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、马勃 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、大黄 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。SASP 剂量按人与小鼠体质量换算为 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。马勃、大黄粉碎成粉状过六号筛，取 SASP、马勃、大黄粉，以 36 型混合脂肪酸甘油酯为基质，使用热熔法按照工艺流程^[6]制备各类含药栓剂：SASP 2.5 mg 栓、马勃 5 mg 栓、大黄 2.5 mg 栓、马勃大黄 (5 mg-2.5 mg、2.5 mg-1.25 mg、1.25 mg-0.625 mg) 栓及纯基质的空白栓。制备的栓剂按照药典规定进行项目检查^[6]，经检查各类栓剂重量差异及融变时限均符合药典规定。

2.2 动物造模、分组与给药

参考课题组前期联用 OXZ 和 TNBS 的造模方法^[8]进行改进：造模分为致敏期和灌肠期，灌肠期包括三个阶段 (P1 ~ P3)。致敏期 (d1 ~ d5)，小鼠腹部剃毛暴露皮肤，d1 ~ d2 涂抹 2.4%OXZ (溶于无水乙醇) 0.2 mL，d3 ~ d5 不做处理。灌肠期各阶段试剂及剂量如下，P1 (d6 ~ d8)：d6、d8 灌肠试剂为 0.4%OXZ (溶于 40% 乙醇)，d7 灌肠试剂为 0.3%TNBS (溶于 40% 乙醇)。P2 (d9 ~ d11)：d9、d11 灌肠试剂为 0.6%OXZ (溶于 40% 乙醇)，d10 灌肠试剂为 0.3%TNBS (溶于 40% 乙醇)。P3 (d12 ~ d20)：d14、d18 灌肠试剂为 0.4%TNBS (溶于 50% 乙醇)，其余 7 d 灌肠试剂为 0.8%OXZ (溶于 50% 乙醇)。灌肠操作如下：引导小鼠进入自制固定器中，将表面涂有液体石蜡的聚乙烯管插入小鼠肛门 4 cm 处，灌入 0.1 mL 不同浓度的 OXZ 或 TNBS 溶液。造模成功标准：小鼠出现稀软便血便、粪便黏肛、粪便潜血阳性^[9]；造模 d14，随机取模型小鼠 2 只，解剖截取结肠，与正常小鼠相比，肉眼可见模型小鼠结肠充血水肿、黏膜溃疡出血。

造模 20 d 结束后，给予栓剂治疗 14 d。将造模成功的 70 只小鼠按体质量随机分为 7 组：模型组，阳性对照 SASP (2.5 mg) 栓组，马勃 (5 mg) 栓组，大黄 (2.5 mg) 栓组，马勃大黄栓高、中、低剂量 (5

mg-2.5 mg、2.5 mg-1.25 mg、1.25 mg-0.625 mg) 组，每组 10 只。正常对照组小鼠 10 只。各给药组给予相应栓剂，正常对照组、模型组给予空白栓，栓剂直肠给药，塞入小鼠肛门 2 cm 处，给药后用纱布轻按肛门且保持头低位 10 min，1 次 $\cdot \text{d}^{-1}$ ，连续 14 d。

2.3 样本采集

小鼠治疗 d14 末次给药后，正常进食进水 2 h，之后 22 h 禁食不禁水。麻醉后心脏取血，室温静置后 $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 取血清，于 -80°C 保存备用。处死小鼠后，截取距肛门 2 cm 至盲肠末端结肠并沿肠系膜缘剪开，于冰上用冰生理盐水冲洗，除去肠内容物及表面残余血液，一部分用于组织病理学检查，剩余结肠部分于 -80°C 保存备用。

2.4 检测指标

2.4.1 小鼠疾病活动指数 (DAI) DAI 评分标准^[10]为：体质量不变记 0 分，下降 1% ~ 5% 记 1 分，下降 5% ~ 10% 记 2 分，下降 10% ~ 15% 记 3 分，下降 15% 以上记 4 分；粪便干燥坚硬记 0 分，松散不黏肛记 2 分，稀便记 3 分，水泻样便记 4 分；粪便隐血弱阳性记 1 分，阳性记 2 分，强阳性记 3 分，肉眼血便记 4 分。DAI = (体质量下降分数 + 大便性状分数 + 便血分数) / 3。给药期间记录小鼠体质量变化、大便性状及潜血情况，给药 d1、d7、d14 对小鼠进行 DAI 评分。

2.4.2 小鼠结肠单位长度湿重及黏膜损伤指数 (CMDI)、组织病理学评分 测量结肠长度、湿重，计算结肠单位长度湿重。肉眼观察结肠并参考文献怀宇等^[11]标准进行 CMDI 评分：结肠无损伤 0 分；结肠轻度水肿无溃疡 1 分；结肠充血且黏膜呈颗粒状 2 分；结肠黏膜溃疡形成，直径约 0 ~ 1 cm，3 分；结肠黏膜溃疡直径约 1 ~ 2 cm，肠管与外周脏器无粘连，4 分；结肠黏膜溃疡直径约 1 ~ 2 cm，肠管增厚，与周围脏器粘连严重，5 分。选取结肠病变部位将其置于固定液中固定，制作组织石蜡包埋块进行组织切片 HE 染色，根据镜下染色结果参考 Kihara 等^[12]评分标准进行结肠组织病理学评分 (histopathological score, HPS)。

2.4.3 小鼠结肠组织 MPO 活力 按照试剂盒说明书操作，称取“2.3”项下结肠组织，制备 5% 组织匀浆，使用紫外分光光度计测定吸光度值，计算 MPO 活力。

2.4.4 小鼠血清 IL-1 β 、IL-6 水平 取“2.3”项下血清，采用 ELISA 法，按照试剂盒说明书操作，使用酶标仪测定 IL-1 β 、IL-6 含量。

2.4.5 免疫组织化学染色检测结肠组织中

TNF- α 、TLR4、MyD88、NF- κ B 蛋白的表达 对“2.4.2”项下所制组织石蜡包埋块切片进行免疫组织化学染色,观察结肠组织中 TNF- α 、TLR4、MyD88、NF- κ B 蛋白表达情况,阳性表达呈棕色。每个切片选取高倍镜下 5 个不重叠视野,利用 Image Pro Plus 6.0 软件计算蛋白平均光密度(积分光密度/选定对象的面积)。

2.4.6 Western blot 法检测结肠组织 TLR4、MyD88、NF- κ B 蛋白表达量 结肠组织加入裂解液后匀浆提取组织蛋白,进行蛋白 BCA 定量后变性,蛋白样品经电泳、转膜、封闭、一抗孵育过夜,二抗孵育后滴加 ECL 显影。利用 Image J 软件测定各条带灰度值,以各目的蛋白与内参(β -actin)的比值作为各蛋白的相对表达量。

2.5 统计学处理

使用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 马勃大黄栓对溃疡性结肠炎小鼠 DAI 评分的影响

正常对照组及模型组给予空白栓,各给药组给予相应含药栓。与正常对照组相比,给予空白栓 d1、d7、d14,模型小鼠 DAI 评分均明显升高($P < 0.01$)。给药 14 d 结束后,与模型组相比,各给药组 DAI 评分均降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与马勃栓组、大黄栓组相比,马勃大黄栓高剂量组 DAI 评分明显降低($P < 0.01$)。结果见表 1。表明马勃大黄栓可改善溃疡性结肠炎小鼠症状,降低 DAI 评分。

3.2 马勃大黄栓对溃疡性结肠炎小鼠结肠单位长度湿重、CMDI 及 HPS 的影响

模型组小鼠结肠缩短,水肿,单位长度湿重增加($P < 0.01$),黏膜出现溃疡或坏死,上皮被破坏,固有层隐窝减少、出现炎症细胞浸润,提示造模成功。各给药组小鼠的结肠单位长度湿重、CMDI、HPS 与模型组相比均减小($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与马勃栓组和大黄栓组相比,马勃大黄栓高、中剂量组的结肠损伤减轻(见图 1),CMDI 和 HPS 均减小($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(见表 2)。表明马勃大黄栓可明显减轻溃疡性结肠炎小鼠结肠损伤。

3.3 马勃大黄栓对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织中 MPO 活力及血清 IL-1 β 、IL-6 水平的影响

与正常对照组相比,模型组小鼠结肠组织中 MPO 活力及血清 IL-1 β 、IL-6 含量均明显升高

表 1 马勃大黄栓对溃疡性结肠炎小鼠疾病活动指数(DAI)评分的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab 1 Effect of Mabo Dahuang suppository on the disease activity index (DAI) in mice with ulcerative colitis ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	DAI 评分		
	给药 d1	给药 d7	给药 d14
正常对照组	0.07 $\pm$ 0.14	0.03 $\pm$ 0.11	0.03 $\pm$ 0.11
模型组	2.63 $\pm$ 0.29**	2.40 $\pm$ 0.34**	2.03 $\pm$ 0.46**
SASP 栓组	2.76 $\pm$ 0.32	1.70 $\pm$ 0.33 ^{###}	0.87 $\pm$ 0.39 ^{###}
马勃栓组	2.76 $\pm$ 0.27	2.13 $\pm$ 0.17	1.60 $\pm$ 0.38 ^{#☆☆}
大黄栓组	2.63 $\pm$ 0.29	2.03 $\pm$ 0.29 [#]	1.57 $\pm$ 0.27 ^{#☆☆}
马勃大黄栓高剂量组	2.73 $\pm$ 0.31	1.87 $\pm$ 0.32 ^{###}	0.97 $\pm$ 0.37 ^{###△△▲▲}
马勃大黄栓中剂量组	2.67 $\pm$ 0.38	1.90 $\pm$ 0.35 ^{###}	1.30 $\pm$ 0.51 ^{##☆}
马勃大黄栓低剂量组	2.67 $\pm$ 0.31	2.03 $\pm$ 0.46 [#]	1.60 $\pm$ 0.54 ^{#☆☆}

注:与正常对照组相比,** $P < 0.01$;与模型组相比,[#] $P < 0.05$,^{###} $P < 0.01$;与马勃栓组相比,^{△△} $P < 0.01$;与大黄栓组相比,^{▲▲} $P < 0.01$;与 SASP 栓组相比,[☆] $P < 0.05$,^{☆☆} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the normal control group, ** $P < 0.01$; compared with the model group, [#] $P < 0.05$, ^{###} $P < 0.01$; compared with the Mabo suppository group, ^{△△} $P < 0.01$; compared with the Dahuang suppository group, ^{▲▲} $P < 0.01$; compared with the SASP suppository group, [☆] $P < 0.05$, ^{☆☆} $P < 0.01$ 。

($P < 0.01$)。与模型组相比,各给药栓组小鼠 MPO 活力及血清 IL-1 β 、IL-6 含量均降低($P < 0.01$)。与马勃栓、大黄栓组相比,马勃大黄栓高剂量组 MPO 活力及血清 IL-1 β 、IL-6 含量均明显降低($P < 0.01$)。与大黄栓组相比,马勃大黄栓中剂量组 IL-1 β 、IL-6 含量均降低($P < 0.05$)。结果见表 3。表明马勃大黄栓可明显降低 MPO 活力及炎症因子水平。

3.4 马勃大黄栓对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织中 TNF- α 、TLR4、MyD88、NF- κ B 蛋白阳性表达的影响

与正常对照组相比,在结肠固有层模型组 TNF- α 、TLR4、MyD88、NF- κ B 蛋白阳性表达均增强($P < 0.01$),其中 TNF- α 、TLR4、MyD88 主要在胞质及胞膜表达,NF- κ B 主要在胞质、胞核表达。与模型组相比,各给药组 4 种蛋白阳性表达均减弱($P < 0.01$)。与马勃栓、大黄栓组相比,马勃大黄栓高剂量组结肠 4 种蛋白阳性表达均减弱($P < 0.01$),见图 2~5 及表 4。表明马勃大黄栓可减弱 TNF- α 、TLR4、MyD88、NF- κ B 蛋白的表达。

3.5 马勃大黄栓对溃疡性结肠炎小鼠结肠 TLR4、MyD88、NF- κ B 蛋白表达水平的影响

与正常对照组相比,模型组小鼠结肠中 TLR4、MyD88、NF- κ B 蛋白表达水平均显著升高($P < 0.01$)。与模型组相比,除马勃栓组 MyD88 表达水平与模型组差异无统计学意义外,其他各给药组小鼠结肠 3 种蛋白表达水平均降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与马勃栓、大黄栓组相比,

表 2 马勃大黄栓对溃疡性结肠炎小鼠结肠湿重、黏膜损伤指数 (CMDI) 及组织病理学评分 (HPS) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)Tab 2 Effect of Mabo Dahuang suppository on colon wet weight, colon mucosa damage index (CMDI) and histopathological score (HPS) in mice with ulcerative colitis ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	结肠单位长度湿重 / ($\text{mg} \cdot \text{cm}^{-1}$)	CMDI	HPS
正常对照组	40.97 ± 8.81	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型组	85.76 ± 10.08**	4.40 ± 0.52**	6.40 ± 0.52**
SASP 栓组	53.40 ± 4.99 ^{##}	1.70 ± 0.48 ^{##}	1.80 ± 0.42 ^{##}
马勃栓组	78.06 ± 9.16 ^{#☆☆}	3.10 ± 0.57 ^{##☆☆}	5.00 ± 0.47 ^{##☆☆}
大黄栓组	61.16 ± 8.22 ^{###△△☆☆}	3.20 ± 0.42 ^{##☆☆}	5.30 ± 0.67 ^{##☆☆}
马勃大黄栓高剂量组	56.06 ± 7.79 ^{###△△}	1.90 ± 0.57 ^{###△△▲}	2.00 ± 0.47 ^{###△△▲}
马勃大黄栓中剂量组	56.81 ± 8.07 ^{###△△}	2.60 ± 0.52 ^{###△△☆☆}	4.00 ± 0.67 ^{###△△☆☆}
马勃大黄栓低剂量组	56.37 ± 4.00 ^{###△△}	3.20 ± 0.63 ^{##☆☆}	5.20 ± 0.63 ^{##☆☆}

注: 与正常对照组相比, ** $P < 0.01$; 与模型组相比, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; 与马勃栓组相比, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; 与大黄栓组相比, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$; 与 SASP 栓组相比, ^{☆☆} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the normal control group, ** $P < 0.01$; compared with the model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; compared with the Mabo suppository group, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; compared with the Dahuang suppository group, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$; compared with the SASP suppository group, ^{☆☆} $P < 0.01$ 。

表 3 马勃大黄栓对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织中 MPO 活力及血清 IL-1 β 、IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)Tab 3 Effect of Mabo Dahuang suppository on the colon tissue MPO activity and the serum IL-1 β and IL-6 levels in mice with ulcerative colitis ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	结肠 MPO 活力 / ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)	血清 IL-1 β / ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	血清 IL-6 / ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
正常对照组	0.13 ± 0.02	76.69 ± 8.06	84.42 ± 8.43
模型组	0.51 ± 0.03**	141.51 ± 13.79**	200.24 ± 10.91**
SASP 栓组	0.20 ± 0.02 ^{##}	92.15 ± 8.02 ^{##}	134.32 ± 10.36 ^{##}
马勃栓组	0.32 ± 0.04 ^{##☆☆}	111.09 ± 7.93 ^{##☆☆}	149.08 ± 9.06 ^{##☆☆}
大黄栓组	0.34 ± 0.03 ^{##☆☆}	117.67 ± 9.83 ^{##☆☆}	152.94 ± 10.15 ^{##☆☆}
马勃大黄栓高剂量组	0.26 ± 0.03 ^{###△△▲☆☆}	94.16 ± 9.80 ^{###△△▲}	135.50 ± 4.92 ^{###△△▲}
马勃大黄栓中剂量组	0.31 ± 0.02 ^{##☆☆}	106.39 ± 12.04 ^{###☆☆}	143.15 ± 9.00 ^{###☆☆}
马勃大黄栓低剂量组	0.33 ± 0.07 ^{##☆☆}	114.74 ± 9.18 ^{##☆☆}	153.66 ± 12.34 ^{##☆☆}

注: 与正常对照组相比, ** $P < 0.01$; 与模型组相比, ^{##} $P < 0.01$; 与马勃栓组相比, [△] $P < 0.01$; 与大黄栓组相比, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$; 与 SASP 栓组相比, ^{☆☆} $P < 0.05$, ^{☆☆} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the normal control group, ** $P < 0.01$; compared with the model group, ^{##} $P < 0.01$; compared with the Mabo suppository group, [△] $P < 0.01$; compared with the Dahuang suppository group, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$; compared with the SASP suppository group, ^{☆☆} $P < 0.05$, ^{☆☆} $P < 0.01$ 。

表 4 马勃大黄栓对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织中 TNF- α 、TLR4、MyD88、NF- κ B 蛋白阳性表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)Tab 4 Effect of Mabo Dahuang suppository on the positive expression of TNF- α , TLR4, MyD88 and NF- κ B protein in the colon tissue of mice with ulcerative colitis ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	TNF- α 平均光密度 × 100	TLR4 平均光密度 × 100	MyD88 平均光密度 × 100	NF- κ B 平均光密度 × 100
正常对照组	3.01 ± 0.50	0.63 ± 0.02	2.38 ± 0.25	1.94 ± 0.20
模型组	10.92 ± 1.46**	1.74 ± 0.14**	9.60 ± 0.47**	4.80 ± 0.58**
SASP 栓组	4.19 ± 0.41 ^{##}	0.89 ± 0.06 ^{##}	3.27 ± 0.40 ^{##}	2.54 ± 0.29 ^{##}
马勃栓组	6.05 ± 0.67 ^{##☆☆}	1.37 ± 0.09 ^{##☆☆}	4.61 ± 0.23 ^{##☆☆}	3.67 ± 0.48 ^{##☆☆}
大黄栓组	5.65 ± 0.43 ^{##☆☆}	1.25 ± 0.09 ^{##☆☆}	5.17 ± 0.39 ^{##☆☆}	3.44 ± 0.45 ^{##☆☆}
马勃大黄栓高剂量组	3.29 ± 0.37 ^{###△△▲}	0.83 ± 0.03 ^{###△△▲}	3.38 ± 0.40 ^{###△△▲}	2.37 ± 0.56 ^{###△△▲}
马勃大黄栓中剂量组	4.23 ± 0.44 ^{###△}	1.04 ± 0.06 ^{###△△▲☆☆}	4.11 ± 0.41 ^{###△△▲☆☆}	2.94 ± 0.61 ^{###△}
马勃大黄栓低剂量组	4.85 ± 0.35 ^{##}	1.29 ± 0.07 ^{##☆☆}	4.53 ± 0.32 ^{###△☆☆}	3.27 ± 0.36 ^{##☆☆}

注: 与正常对照组相比, ** $P < 0.01$; 与模型组相比, ^{##} $P < 0.01$; 与马勃栓组相比, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; 与大黄栓组相比, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$; 与 SASP 栓组相比, ^{☆☆} $P < 0.05$, ^{☆☆} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the normal control group, ** $P < 0.01$; compared with the model group, ^{##} $P < 0.01$; compared with the Mabo suppository group, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; compared with the Dahuang suppository group, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$; compared with the SASP suppository group, ^{☆☆} $P < 0.05$, ^{☆☆} $P < 0.01$ 。

马勃大黄栓高剂量组结肠中 3 种蛋白表达水平均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 结果见图 6 及表 5。表明马勃大黄栓可降低 TLR4、MyD88、NF- κ B 3 种蛋白表达水平, 与免疫组织化学染色结果一致。

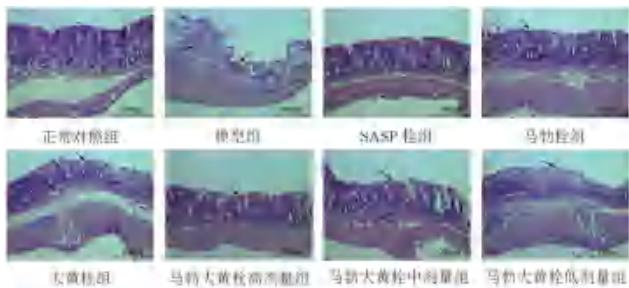


图 1 马勃大黄栓对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织病理学改变的影响 (HE, $\times 200$)

Fig 1 Effect of Mabo Dahuang suppository on the colon histopathological changes in mice with ulcerative colitis (HE, $\times 200$)

注: 箭头表示结肠上皮损伤, 固有层隐窝减少, 炎症细胞浸润。

Note: The arrows show colon epithelium damage, lamina propria crypt reduction and inflammatory cell infiltration.

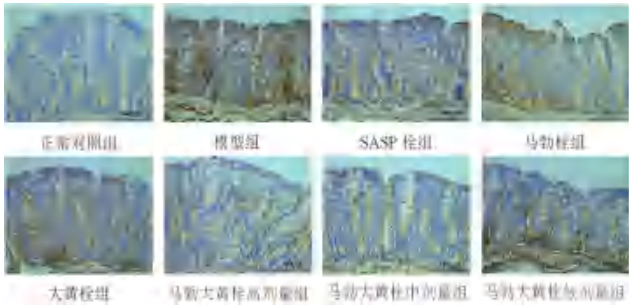


图 2 马勃大黄栓对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织中 TNF- α 蛋白阳性表达的影响 ($\times 400$)

Fig 2 Effect of Mabo Dahuang suppository on the positive expression of TNF- α protein in the colon tissue of mice with ulcerative colitis ($\times 400$)

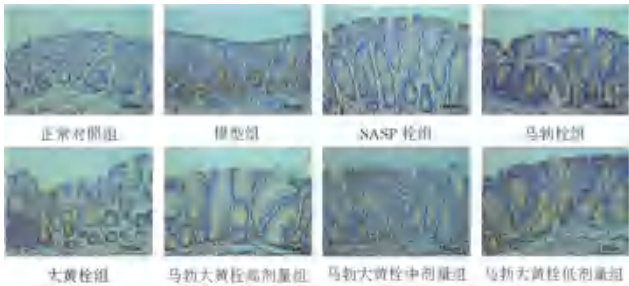


图 3 马勃大黄栓对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织中 TLR4 蛋白阳性表达的影响 ($\times 400$)

Fig 3 Effect of Mabo Dahuang suppository on the positive expression of TLR4 protein in the colon tissue of mice with ulcerative colitis ($\times 400$)

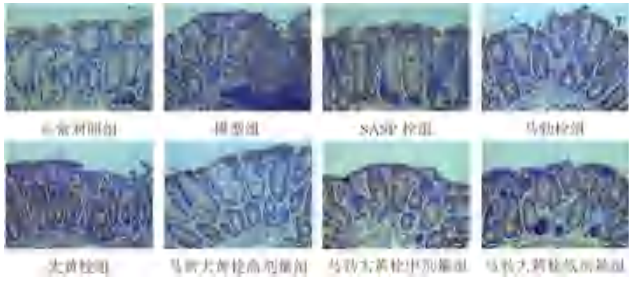


图 4 马勃大黄栓对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织中 MyD88 蛋白阳性表达的影响 ($\times 400$)

Fig 4 Effect of Mabo Dahuang suppository on the positive expression of MyD88 protein in the colon tissue of mice with ulcerative colitis ($\times 400$)



图 5 马勃大黄栓对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织中 NF- κ B 蛋白阳性表达的影响 ($\times 400$)

Fig 5 Effect of Mabo Dahuang suppository on the positive expression of NF- κ B protein in the colon tissue of mice with ulcerative colitis ($\times 400$)

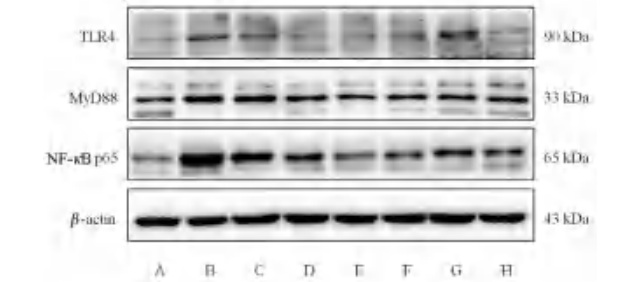


图 6 马勃大黄栓对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织中 TLR4、MyD88、NF- κ B 蛋白表达水平的影响

Fig 6 Effect of Mabo Dahuang suppository on the expression levels of TLR4, MyD88 and NF- κ B protein in the colon tissue of mice with ulcerative colitis

A. 正常对照组 (normal control group); B. 模型组 (model group); C. 马勃栓组 (Mabo suppository group); D. 大黄栓组 (Dahuang suppository group); E ~ G. 马勃大黄栓高、中、低剂量组 (Mabo Dahuang suppository high, medium, and low dose group); H. SASP 栓组 (SASP suppository group)

表 5 马勃大黄栓对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织中 TLR4、MyD88、NF- κ B 蛋白相对表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Tab 5 Effect of Mabo Dahuang suppository on the relative expression levels of TLR4, MyD88 and NF- κ B protein in the colon tissue of mice with ulcerative colitis ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	TLR4	MyD88	NF- κ B
正常对照组	0.64 $\pm$ 0.02	0.64 $\pm$ 0.09	0.52 $\pm$ 0.06
模型组	1.09 $\pm$ 0.07**	1.14 $\pm$ 0.12**	1.25 $\pm$ 0.12**
SASP 栓组	0.68 $\pm$ 0.11 ^{###}	0.78 $\pm$ 0.04 ^{###}	0.61 $\pm$ 0.09 ^{###}
马勃栓组	0.85 $\pm$ 0.06 [#]	0.98 $\pm$ 0.17	0.94 $\pm$ 0.09 ^{##} Δ Δ Δ
大黄栓组	0.77 $\pm$ 0.07 ^{###}	0.83 $\pm$ 0.21 ^{###}	0.74 $\pm$ 0.10 ^{###}
马勃大黄栓高剂量组	0.55 $\pm$ 0.11 ^{###} Δ Δ Δ Δ	0.57 $\pm$ 0.07 ^{###} Δ Δ Δ Δ	0.55 $\pm$ 0.05 ^{###} Δ Δ Δ Δ
马勃大黄栓中剂量组	0.69 $\pm$ 0.13 ^{###}	0.75 $\pm$ 0.11 ^{###} Δ Δ	0.61 $\pm$ 0.03 ^{###} Δ Δ
马勃大黄栓低剂量组	0.78 $\pm$ 0.25 ^{###}	0.90 $\pm$ 0.08 [#]	0.80 $\pm$ 0.06 ^{###} Δ Δ Δ

注: 与正常对照组相比, ** $P < 0.01$; 与模型组相比, [#] $P < 0.05$, ^{###} $P < 0.01$; 与马勃栓组相比, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$; 与大黄栓组相比, Δ $P < 0.05$; 与 SASP 栓组相比, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the normal control group, ** $P < 0.01$; compared with the model group, [#] $P < 0.05$, ^{###} $P < 0.01$; compared with the Mabo suppository group, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$; compared with the Dahuang suppository group, Δ $P < 0.05$; compared with the SASP suppository group, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$.

4 讨论

常用的溃疡性结肠炎动物造模方法为饮水中加入葡聚糖硫酸钠、采用 OXZ 或 TNBS 灌肠等, 这些方法所造的大多数为急性模型, 病变维持时间短, 易自愈^[13], 不符合该病病程长难治愈的特点。有研究者^[14-15]采用小鼠交替饮用含葡聚糖硫酸钠水与无菌水来制备慢性模型, 但造模周期长, 且小鼠因自由饮用量不同导致所造模型个体差异较大。本课题组前期联用 OXZ 与 TNBS 制备的溃疡性结肠炎小鼠模型病症可持续一个月左右^[8], 但因造模试剂浓度较高影响造模成功率, 因此本研究参考该法并尝试降低造模试剂 OXZ 溶液浓度, 优化后的造模方法制备出的溃疡性结肠炎小鼠模型病变维持时间相对较长, 符合临床上该病迁延难愈的特点。

溃疡性结肠炎病理进程的最终阶段为内外因素使肠道黏膜屏障受损造成机体免疫系统被过度激活, 从而导致一系列炎症反应^[16], 其中 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路参与了炎症反应的发生^[17]。阳性对照药 SASP 治疗溃疡性结肠炎主要发挥抗炎作用, 长期应用容易引起不良反应。马勃大黄两药联合用于治疗上消化道出血早有报道^[5]。在溃疡性结肠炎治疗中, 大黄单独用药其通经解瘀、抗炎、收敛的作用可能与大黄内蒽醌类物质、鞣质等成分相关^[18], 马勃单独用药其修复肠黏膜、止血等作用可能与其中类脂质、氨基酸及磷酸钠盐等成分相关^[19]。马勃大黄联用药效与阳性对照药 SASP 相似, 但两药联用可多方位、多靶点发挥协同治疗作用, 其作用机制可能与抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路减轻炎症反应有关。马勃大黄联用还具有中药作用温和的特性, 在本研究应用治疗周期内未见明显不良反应。本研究为中药联合应用治疗溃疡性结肠炎开辟了新的思路, 具有广泛的应用前景。

参考文献

- [1] Kobayashi T, Siegmund B, Le Berre C, et al. Ulcerative colitis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2020, 6 (1): 74.
- [2] 黄彪, 谢璐霜, 吴巧凤. 溃疡性结肠炎的中西医结合治疗进展及思考 [J]. 实用医学杂志, 2018, 34 (13): 2267-2269, 2274.
- [3] 毕超然, 张鹏, 朴春丽. 大黄临床应用及其用量 [J]. 吉林中医药, 2019, 39 (1): 28-31.
- [4] 丁晓桐, 汤清涵, 王裔惟, 等. 马勃的化学成分研究进展及其在创面修复中的应用 [J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37 (4): 609-618.
- [5] 陶文洲, 吕竞竞, 杨淑云, 等. 经纤维胃镜定位喷洒复方马勃液治疗上消化道出血的疗效观察 [J]. 中西医结合杂志, 1987, 1: 61.
- [6] 张丹参, 王倩, 田慧, 等. 大黄栓剂对两种溃疡性结肠炎模型小鼠的作用研究 [J]. 神经药理学报, 2015, 5 (1): 19-37.
- [7] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 52.
- [8] 宋晓敏, 张丹参, 庄忠宝, 等. 噁唑酮与三硝基苯磺酸联用诱导小鼠慢性溃疡性结肠炎模型 [J]. 神经药理学报, 2016, 6 (3): 17-23.
- [9] 李姿慧, 蔡荣林, 孙娟. 参苓白术散对溃疡性结肠炎脾虚湿困证大鼠结肠组织 TLR2、MyD88、COX-2 表达的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2021, 44 (1): 45-53.
- [10] 刘雨, 施丽婕, 杨洁, 等. 化瘀通阳方对溃疡性结肠炎大鼠血清 IL-1 β 、IFN- γ 表达的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30 (19): 2063-2067, 2122.
- [11] 文怀宇, 郑爽, 郎轶咏, 等. 灌肠散对大鼠溃疡性结肠炎的治疗作用研究 [J]. 中南药学, 2017, 15 (4): 443-446.
- [12] Kihara N, de la Fuente SG, Fujino K, et al. Vanilloid receptor-1 containing primary sensory neurones mediate dextran sulphate sodium induced colitis in rats [J]. Gut, 2003, 52 (5): 713-719.
- [13] Baydi Z, Limami Y, Khalki L, et al. An update of research animal models of inflammatory bowel disease [J]. Sci World J, 2021, 2021: 7479540.
- [14] Gadaleta RM, Garcia-Irigoyen O, Moschetta A. Exploration of inflammatory bowel disease in mice: chemically induced murine models of inflammatory bowel disease (IBD) [J]. Curr Protoc Mouse Biol, 2017, 7 (1): 13-28.
- [15] Kolios G. Animal models of inflammatory bowel disease: how useful are they really? [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2016, 32 (4): 251-257.
- [16] Bergemalm D, Andersson E, Hultdin J, et al. Systemic inflammation in preclinical ulcerative colitis [J]. Gastroenterology, 2021, 161 (5): 1526-1539. e9.
- [17] Zhang YF, Han DD, Yu S, et al. Protective effect of Iridoid Glycosides of the leaves of *Syringa oblata* Lindl. on dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis by inhibition of the TLR2/4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 7650123.
- [18] 郭子霞, 张丹参, 李炜. 大黄对溃疡性结肠炎治疗作用研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35 (9): 655.
- [19] 杨爱龙, 王瑞珩, 韩雪. 马勃灌肠液保留灌肠治疗溃疡性结肠炎的临床疗效 [J]. 中国肛肠病杂志, 2014, 34 (10): 40-42.

(收稿日期: 2022-05-21; 修回日期: 2022-06-17)

基于网络药理学和蛋白验证技术探讨桔梗皂苷 D 通过调控 Hippo 信号通路对宫颈癌的作用机制

马琳琳¹, 杨新鸣¹, 时思毛¹, 郭滢¹, 韩凤娟¹, 杨阳², 李奇玮^{3*} (1. 黑龙江中医药大学附属第一医院, 哈尔滨 150040; 2. 哈尔滨医科大学, 哈尔滨 150040; 3. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

摘要: **目的** 基于网络药理学、计算机模拟分子对接及蛋白靶向验证揭示桔梗皂苷 D 对宫颈癌的作用机制。**方法** 从药物成分入手, 基于反向对接及分子对接技术预测桔梗皂苷 D 在体内可能的作用靶标, 同时从疾病入手, 以“cervical carcinoma”为关键词汇总致病靶标。对两者结果取交集处理, 获取共有的蛋白成分的潜在靶标成分; 对潜在靶标进行体内作用关系分析 (PPI)、基因本体 (GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 信号通路富集分析。构建成分-靶标-疾病的相互作用网络, 通过分子对接软件模拟桔梗皂苷 D 与宫颈癌相关的靶蛋白的分子对接情况, 最后以结合能、动物实验及分子生物学技术初步验证预测结果。**结果** 桔梗皂苷 D 预测得到 299 个靶标, 与宫颈癌相关的疾病靶标 7140 个, 同时满足条件的靶蛋白 48 个, 包括骨形态发生蛋白-2 (BMP-2) 等。GO 分析显示桔梗皂苷 D 治疗宫颈癌可能涉及生物学途径 288 条、细胞组分 11 个、分子功能 31 条。KEGG 信号通路富集筛选得到 181 条信号通路 ($P < 0.05$), 其中主要涉及 Hippo 信号通路、癌症的途径、孕酮介导的卵母细胞成熟等。分子对接结果显示 Hippo 信号通路中 BMP-2 蛋白成分与桔梗皂苷 D 结合能稳定, 小于 $-5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。动物实验及 Western 结果与网络模拟结果基本一致。**结论** 桔梗皂苷 D 可能通过对 Hippo 信号通路中 BMP-2 等蛋白的直接调控发挥药效, 同时通过对癌症的途径、孕酮介导的卵母细胞成熟等过程等生物学过程的调控共同达到干预宫颈癌的目的。

关键词: 桔梗皂苷 D; 宫颈癌; 网络药理学; 信号通路; 分子对接技术

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2708-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.002

Mechanism of platycodin D on cervical carcinoma by regulating Hippo signal pathway based on network pharmacology and targeted protein verification

MA Lin-lin¹, YANG Xin-ming¹, SHI Si-mao¹, GUO Ying¹, HAN Feng-juan¹, YANG Yang², LI Qi-wei^{3*} (1. *The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040*; 2. *Harbin Medical University, Harbin 150040*; 3. *Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040*)

Abstract: Objective To determine the mechanism of platycodin D on cervical carcinoma based on network pharmacology, molecular docking technology and targeted protein verification. **Methods** From the drug structure component, the potential targets of platycodin D in vivo were predicted based on reverse docking and molecular docking technology. While cervical carcinoma were used as the key word to sort out known targets with of diseases. The intersection of the two potential targets was obtained, and analyzed by PPI, GO enrichment and KEGG pathway enrichment. An interaction network with components, targets and diseases was built to simulate the molecular docking of platycodin D and targets related to cervical carcinoma through molecular docking software. Finally

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No.81702564); 黑龙江省中医药科研项目 (No.ZHY18-060); 黑龙江中医药大学科研基金项目博士创新基金 (No.LBH-Z19214)。

作者简介: 马琳琳, 女, 硕士, 主治医师, 主要从事中医药防治妇科疾病研究, email: malinlin19831111@163.com *通信作者: 李奇玮, 男, 博士, 研究实习员, 主要从事方剂理论及配伍规律研究, email: liqiwei@hljucm.edu.cn

the verification was carried out with binding energy, animal experiments and molecular biology technology. **Results** Totally 299 potential proteins of platycodin D and 7140 disease targets related to cervical carcinoma were obtained. Totally 48 qualified targets, including BMP-2 (bone morphogenetic protein-2), were obtained by reverse docking platform Phrammapper. Go analysis showed that platycodin D involved 288 biological pathways, 11 cellular components and 31 molecular functions in the treatment of cervical carcinoma. The enrichment and screening of KEGG pathway screened 181 signal pathways ($P < 0.05$), mainly involved in the processes of Hippo signaling pathway, pathways in cancer and progesterone mediated oocyte maturation. Molecular docking showed that the binding energy between BMP-2 protein and platycodin D in Hippo signaling pathway was stable with binding energy less than $-5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$. The animal experiment and Western blot analysis showed basically consistent network simulation. **Conclusion** The mechanism of platycoside D in the treatment of cervical carcinoma may be directly related to the Hippo signaling pathway, which may exert its effect through the direct regulation of BMP-2 and other proteins in the Hippo signaling pathway. While intervention to cervical carcinoma can be achieved through the regulation of pathways in cancer and progesterone mediated oocyte maturation.

Key words: platycodin D; cervical carcinoma; network pharmacology; signal path; molecular docking technology

宫颈癌是女性第三常见的癌症，每年约有 53 万例新发病例^[1-9]。尽管国内已经实施了宫颈癌筛查计划和人乳头瘤病毒（HPV）疫苗接种，但宫颈癌仍然是中国女性生殖系统肿瘤中癌症相关死亡的最常见原因。HPV 是宫颈癌的必要原因，但不是充分原因，HPV 感染与从上皮内病变向浸润性癌过渡之间的确切分子机制尚不清楚，基于病毒感染前后的内源性代谢成分及主要发病靶标尚不可知。此外，还需要更多的研究来预测宫颈癌的预后。最新的研究成果表明 RacGAP1 可能是宫颈癌患者的潜在预后预测因子^[10]，RacGAP1 在宫颈癌组织中显著过表达，并且与宫颈癌预后不良有关，其可能是宫颈癌潜在的新型预后标志物，亦可能是治疗靶点。

桔梗皂苷 D 是桔梗的主要活性成分之一，具有多种生物学和药理学特性，包括抗动脉粥样硬化、抗病毒、抗炎、抗肥胖、调节免疫、保肝和抗肿瘤活性^[11-16]。近年来，桔梗皂苷 D 的抗肿瘤活性得到了广泛的研究，已被证明通过诱导细胞凋亡、细胞周期阻滞、自噬和抑制血管生成来抗肿瘤，通过靶向多种信号通路的侵袭和转移在癌症中经常被解除调控，这表明多靶点活性效应可能在桔梗皂苷 D 抗肿瘤过程中发挥重要作用。癌症是一种多方面的疾病，由遗传、表观遗传、代谢和信号异常组成，严重破坏细胞生长和死亡的正常状态。合理开发高选择性药物，特别是精准阻断其中一条关键信号通路，与抗肿瘤靶向治疗成

功密切相关，除此之外，癌症的多靶点预防已成为有效抗肿瘤治疗的新范例。本研究探讨对桔梗皂苷 D 治疗宫颈癌的抗肿瘤活性和分子机制，以期将其开发为潜在的肿瘤治疗先导药物。

1 材料

1.1 实验动物及细胞

30 只 8 周龄 SD 大鼠，SPF 级，雌性，体重质量 $(160 \pm 10) \text{ g}$ [辽宁长生生物技术股份有限公司，SCXK (辽) 2021-0010]，饲养环境温度 $(25 \pm 5) ^\circ\text{C}$ ，模拟昼夜光照，自由摄食与饮水；人宫颈癌细胞株 HeLa 购自于中国科学院上海生命科学研究所细胞库。

1.2 仪器

CO₂ 恒温细胞培养箱（美国 REVCO 公司）；低速台式离心机（湖南湘仪公司）；垂直正压式超净工作台（苏州净化公司）；电热恒温水浴锅（江苏太仓华利达设备公司）。

1.3 试剂

DMEM 培养基（美国 Corning 公司）；桔梗皂苷 D（中国食品药品检定研究院，批号：2011-11517，纯度：98%）；PVDF 膜（德国罗氏）；ECL 发光液和 RIPA 蛋白裂解液均（上海碧云天有限公司）；骨形态发生蛋白 -2（BMP-2）抗体、PPP2CA 抗体、YTAP1 抗体、Smad1 抗体（批号分别为 D220103、D210901、D210204、D210701，英国 Abcam 公司）；兔抗 β -action 多克隆抗体（bs-

0061R)、HRP 标记羊抗兔 (IgG bs-0295G-HRP)(北京博奥森生物技术有限公司); BCA 蛋白定量检测试剂盒 (美国 Thermo 公司)。

2 方法与结果

2.1 桔梗皂苷 D 数据库信息获取及体内作用靶标预测

由于桔梗皂苷 D 的类药性明确^[17], 故将其英文名称带入 PubChem 数据库下载专属的 SDF 文件, 并采用 ChemBio 3D Ultra 14.0 软件将其格式转换为 Mol2 文件; 采用 Phrammapper (<http://www.lilab-ecust.cn/phrammapper/>) 数据库对桔梗皂苷 D 进行数据库匹配及反向对接预测, 收集靶蛋白信息, 查找与之对应的靶基因名称。通过检测 Phrammapper 数据库获取桔梗皂苷 D 体内预测靶标共计 299 个, 现将前 20 位靶标列在表 1。

表 1 桔梗皂苷 D 体内预测的主要靶标成分 (前 20 个)

Tab 1 Main target components predicted by platycodin D in vivo (top 20)

序列号	蛋白名称	基因名称
1	galectin-7	LGALS7
2	fructose-bisphosphate aldolase A	Aldoa
3	uridine 5-monophosphate synthase	UMPS
4	heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8
5	baculoviral IAP repeat-containing protein 7	BIRC7
6	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme	AMD1
7	pancreatic alpha-amylase	AMY2
8	cellular retinoic acid-binding protein 2	CRABP2
9	mothers against decapentaplegic homolog 1	SMAD1
10	ephrin type-B receptor 4	EPHB4
11	transcriptional coactivator YAP1	YAP1
12	tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11	PTPN11
13	bone morphogenetic protein 2	BMP2
14	heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1
15	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	HMG2
16	thyroid hormone receptor beta	THRB
17	serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit	PPP2C
18	baculoviral IAP repeat-containing protein 4	XIAP
19	mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1
20	beta-secretase 1	BACE1

2.2 宫颈癌相关靶点信息获取

检索孟德尔遗传数据库 Omim (<https://www.omim.org/>), 检索关键词“cervical carcinoma”, 下载整理与宫颈癌发病相关的靶蛋白或基因名称。共得到已知的宫颈癌相关靶标 7140 个, 药物靶点 299 个。其中与桔梗皂苷 D 预测靶标结果一致的 48 个, 分别是 BMP-2、丝裂原活化蛋白激酶 1 等 (见表 2)。

表 2 桔梗皂苷 D 与宫颈癌预测靶标的共同结果

Tab 2 Common targets of platycodin D and cervical cancer prediction

序列号	靶蛋白名称	基因名称
1	adenine phosphoribosyltransferase	APRT
2	adenosine kinase	ADK
3	aldo-keto reductase family 1 member C2	AKR1C2
4	aldo-keto reductase family 1 member C3	AKR1C3
5	androgen receptor	AR
6	angiogenin	ANG
7	annexin A5	ANXA5
8	arylsulfatase A	ARSA
9	beta-secretase 1	BACE1
10	bone morphogenetic protein 2	BMP2
11	bone morphogenetic protein 7	BMP7
12	carbonic anhydrase 12	CA12
13	carbonic anhydrase 2	CA2
14	carnitine O-acetyltransferase	CRAT
15	transcriptional coactivator YAP1	YAP1
16	cathepsin F	CTSF
17	cathepsin G	CTSG
18	cathepsin K	CTSK
19	cathepsin S	CTSS
20	serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit	PPP2C
21	complement factor D	CFD
22	deoxycytidine kinase	DCK
23	dihydrofolate reductase	DHFR
24	dipeptidyl peptidase 4	DPP4
25	epidermal growth factor receptor	EGFR
26	eukaryotic translation initiation factor 4E	EIF4E
27	fibroblast growth factor receptor 2	FGFR2
28	glucose-6-phosphate isomerase	GPI
29	glutathione S-transferase mu 1	GSTM1
30	histone deacetylase 8	HDAC8
31	lanosterol synthase	LSS
32	macrophage migration inhibitory factor	MIF
33	mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1
34	mitogen-activated protein kinase 10	MAPK10
35	mitogen-activated protein kinase 14	MAPK14
36	mitogen-activated protein kinase 8	MAPK8
37	neuronal calcium sensor 1	NCSI
38	progesterone receptor	PGR
39	purine nucleoside phosphorylase	PNP
40	renin	REN
41	retinoic acid receptor alpha	RARA
42	retinoic acid receptor beta	RARB
43	thyroid hormone receptor alpha	THRA
44	thyroid hormone receptor beta	THRB
45	trafficking protein particle complex subunit 3	TRAPPC3
46	mothers against decapentaplegic homolog 1	SMAD1
47	triggering receptor expressed on myeloid cells 1	TREM1
48	uridine-cytidine kinase 2	UCK2

2.3 构建基于桔梗皂苷 D-成分预测靶标-宫颈癌病理靶标的网络示意图

采用维恩分析法获取同时满足桔梗皂苷 D 预测靶标结果和宫颈癌相关靶标结果的交集。利用可视化软件 Cytoscape 构建基于桔梗皂苷 D-成分预测靶标-宫颈癌病理靶标的网络示意图,明确桔梗皂苷 D 干预宫颈癌的体内作用网络。结果如图 1 所示,其中绿色代表桔梗皂苷 D、粉色代表桔梗皂苷 D 与宫颈癌的交集靶标、红色代表宫颈癌。

2.4 潜在靶蛋白互作分析及构建

将维恩分析结果以基因名称方式带入 STRING (<https://string-db.org/>) 蛋白数据库中,选定研究范围为人,进行蛋白互作分析,确定靶基因之间的调控及生理过程。如图 2 所示,该网络含有 48 个节点,98 条边,平均节点 degree 值为 4.08,聚类相关性为 0.503,蛋白作用富集 P 值为 10×10^{-16} ,由此提示各靶蛋白间互作关系显著,桔梗皂苷 D 可能通过与蛋白的之间关系和蛋白间的信号传递完成干预宫颈癌的目的。

2.5 GO 富集分析,分子对接验证

将潜在的靶蛋白基因名带入 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>),将靶蛋白基因名转换为相应的基因 ID 数据,再导入 R 语言进行基因注释分析,并绘制高级气泡分析图,明确桔梗皂苷 D 治疗宫颈癌的关键信号通路。

采用 Autodock 软件理论验证计算机模拟配体受体对接过程,通过评价桔梗皂苷 D 治疗宫颈癌过程中分子对接结合能大小,达到理论判定药物配体与蛋白受体结合可能性的目的。普遍认为,当分子对接分数小于 $-5.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 时,可认为配体与受体间可形成稳定结构^[18]。

采用 DAVID 平台对桔梗皂苷 D 治疗宫颈癌的干预过程进行 GO 富集分析,结果见图 3。得到 11 个细胞组分 (cellular component, CC) 信息,包括内容体腔、细胞器腔、内容酶体、溶酶体腔、细胞内细胞器腔、Shc-EGFR 复合物、细胞外间隙、核质、胞质等;288 条生物过程 (biological process, BP),包括细胞对激素刺激的反应、免疫反应的调节、Toll 样受体信号通路、细胞对内源性刺激的反应、对有机氮化合物的反应、免疫反应调节信号通路、免疫系统过程的调节、刺激反应的正向调节、对内源性刺激的反应、对肽类激素的反应、免疫应答的正向调节、免疫反应、对激素的反应、细胞对生长因子刺激的反应、酶联受体蛋白信号通路、Toll 样受体信号通路等;31 条

分子功能 (molecular function, MF) 过程,包括受体信号蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、MAP 激酶活性、RNA 聚合酶 II 转录因子活性-配体激活序列特异性 DNA 结合、糖蛋白结合、内肽酶活性、转录因子结合、蛋白多糖结合、类固醇激素受体、JUN 激酶活性、翻译起始因子结合、受体信号蛋白活性、碳水化合物衍生物结合。GO 信号通路富集筛选得到 181 条信号通路 ($P < 0.05$),涉及其中主要涉及 Hippo 信号通路、癌症的途径、孕酮介导的卵母细胞成熟过程等 (见图 3),其中 Hippo 信号通路 P 值最小,相关性最强。

众多靶蛋白成分中, BMP-2 所涉及的 Hippo 信号通路与宫颈癌相关性最高 (P 值最小,相关性最强),通过 Autodock 软件模拟分子对接过程验证理论对接可能,首先从 PDB 中下载蛋白晶体结构,对受体进行去水、去除不需要的杂原子等处理,保存为 pdb 文件作为受体结构。对配体分子进行电荷、质子化状态确认,并保存。然后启动 AutoDockTools,打开药物成分 pdb 文件,将药物分子加载到坐标窗口,选择药物成分作为 AutoDock4 对接的配体分子。保存成为 pdbqt 文件,选择拉马克遗传算法作为对接算法,保存成为 dpf 文件进行半柔性对接过程。以 BMP-2 与桔梗皂苷 D 的作用为例,确定结合能为 $-6.58 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 小于 $-5.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 这证明 BMP-2 与桔梗皂苷 D 可形成稳定结构^[18]。提示桔梗皂苷 D 治疗宫颈癌可能通过直接与 BMP-2 的结合完成有效干预宫颈癌的目的 (见图 4)。其他各靶标的对接能如表 3 所示。

表 3 桔梗皂苷 D 与 Hippo 信号通路各靶标对接能结果 ($\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)
Tab 3 Docking energy of platycodin D and Hippo signal pathway target ($\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)

成分	靶蛋白			
	BMP-2	YAP1	SMAD1	PPP2C
桔梗皂苷 D	-6.58	-6.15	-5.45	-5.16

2.6 模型复制、分组及给药

大鼠预饲养 1 周后,随机分为空白组、模型组和给药组,每组 10 只。模型组和给药组采用左侧腋窝处皮下注射人宫颈癌 HeLa 细胞建立宫颈癌大鼠模型^[19],每只大鼠 0.5 mL 、 1×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,空白组于左侧腋窝处皮下注射等体积生理盐水,肉眼可见大鼠左腋窝处有明显肿瘤结节生长即为造模成功。造模第 7 日,给药组灌胃剂量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,1 次 $\cdot \text{d}^{-1}$,空白组和模型组给予同体积生理盐水,2 周后无菌剥离移植



图 1 桔梗皂苷 D、宫颈癌疾病靶标及宫颈癌体内作用网络示意图
Fig 1 Platycodin D, cervical cancer target and cervical cancer in vivo action network

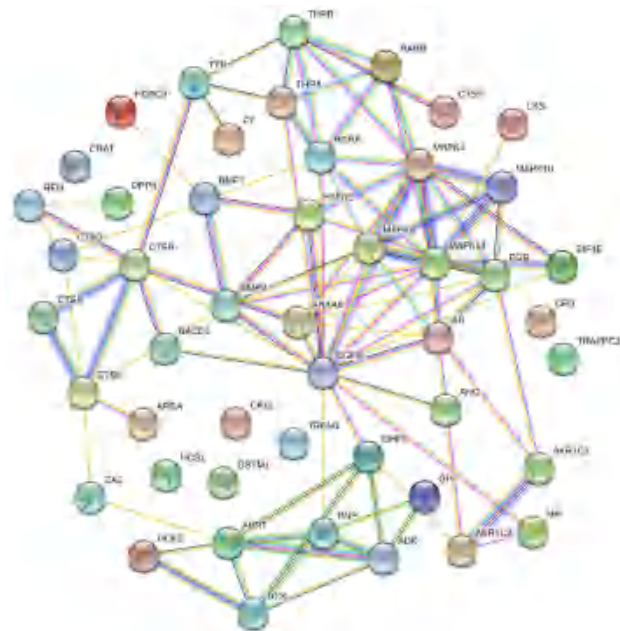


图 2 桔梗皂苷 D 治疗宫颈癌的 PPI 图
Fig 2 PPI of platycodin D for cervical cancer

瘤组织，用于相关指标的检测。

2.7 各组肿瘤体积、重量与抑瘤率比较

比较模型组和给药组肿瘤体积、重量与抑瘤率。结果显示，与模型组比较，给药组大鼠肿瘤体积减少，瘤重均显著降低，给药组抑瘤率为 $(75.66 \pm 9.58)\%$ ，见表 4。

2.8 Western blot 测定宫颈癌组织中 BMP-2 及相关蛋白含量表达

取液氮冻存的各组大鼠肿瘤组织 50 g，迅速

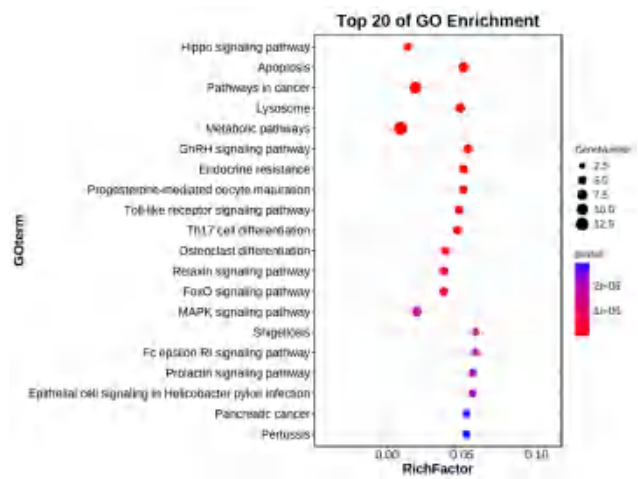


图 3 桔梗皂苷 D 治疗宫颈癌的 GO 富集分析结果
Fig 3 GO enrichment analysis of platycodin D for cervical cancer

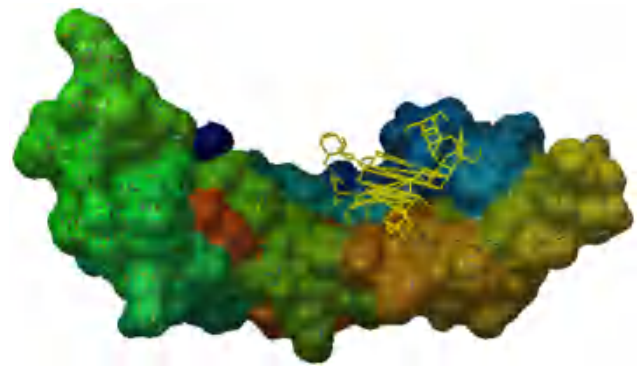


图 4 桔梗皂苷 D 与靶标 BMP-2 的计算机模拟分子对接结果
Fig 4 Computer simulation molecular docking of platycodin D and target BMP-2

表 4 各组肿瘤体积、重量与抑瘤率比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 4 Tumor volume, weight and tumor inhibition rate in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肿瘤体积 /mm ³	瘤重 /g	抑瘤率 /%
模型组	10	171.25 ± 20.65	0.41 ± 0.11	—
给药组	10	60.52 ± 12.68 ^{##}	0.20 ± 0.01 ^{##}	75.66 ± 9.58

注：与模型组比较，[#] $P < 0.05$ ，^{##} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$.

研磨至粉末状。以 20 mg 组织加入 100 μ L 比例，加入 RIPA 蛋白裂解液 ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)，冰上裂解组织 30 min， 4°C 14 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 取上清液。BCA 蛋白定量检测试剂盒测定上清液的蛋白浓度。各样品取 30 μ g 蛋白置于 SDS-PAGE 凝胶加样孔内进行电泳分离和转膜操作。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h，随后加入一抗， 4°C 条件下孵育过夜。二抗 (1 : 5000) 室温条件下孵育 1 h。将 ECL 化学发光检测试剂均匀滴至膜上，将 PVDF 膜放入显色液中显色，待条带显色清晰后用蒸馏水终止反应。用 ECL 将 PVDF 膜显色，进行 X 线

曝光,以凝胶成像系统进行结果读取与分析。结果见表 5, Hippo 信号通路中涉及的关键蛋白在模

型组和给药组都有显著变化(见图 5)。

表 5 大鼠宫颈癌组织中 Hippo 信号通路中靶蛋白表达结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 5 Expression of target proteins in Hippo signal pathway in cervical carcinoma tissues of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BMP-2	YAP1	SMAD1	PPP2C
空白组	10	2.69±0.17	5.64±0.14	1.96±0.11	4.68±0.13
模型组	10	6.69±0.13**	7.64±0.13*	4.96±0.24**	6.85±0.19**
给药组	10	4.01±0.21 [#]	6.19±0.09	1.98±0.16 ^{##}	4.71±0.21 [#]

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

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

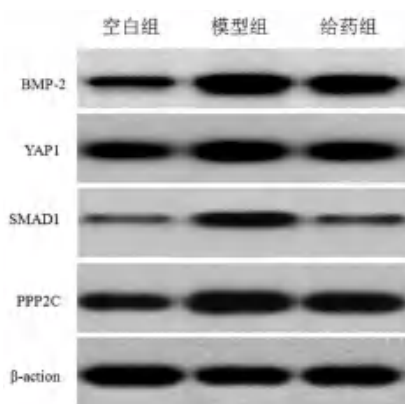


图 5 Hippo 信号通路中各蛋白表达

Fig 5 Protein expression in Hippo signal pathway

2.9 统计学处理方法

数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,实验结果用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。蛋白印迹结果用凝胶成像分析系统取图,并分析密度,结果以目标条带的密度与内参条带的密度之比表示。

3 讨论

本次基于网络药理学、代谢组学及分子生物学技术对桔梗皂苷 D 治疗宫颈癌的作用机制进行分析和研究,发现多个与桔梗皂苷 D 体内预测靶标及宫颈癌发病靶标的交集蛋白成分,如 BMP-2、组织蛋白酶 B (CTSB) 和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 等。其中 BMP-2 是位于 Hippo 信号通路中关键靶标成分,在 GO 富集分析中该靶标成分与宫颈癌高度相关,排在首位,由此推断桔梗皂苷 D 治疗宫颈癌过程中与 BMP-2 及 Hippo 密切相关。

BMP-2 是在细胞增殖、迁移和分化中发挥重要作用的生长因子。已有多个人类肿瘤报告显示,BMP 信号通路的多个成员失调与恶性肿瘤的生长和转移增强有关^[20-21]。BMP 内皮细胞前体调控因子 (BMPER) 是 BMP 发挥其全范围信号活性所必需的 BMP 调节剂。此外,BMPER 由内皮细胞及其祖细胞表达,并在这些细胞中具有促血

管生成的特征。有相关实验描述了 BMPER 在肺癌、结肠癌和宫颈癌标本以及来源于此类癌的细胞系中的表达。BMP7 在宫颈癌组织中高表达,BMP7 可能在宫颈癌的发生发展中发挥作用。敲低 BMP7 表达后,HeLa 细胞的增殖、侵袭、迁移能力减弱;这一作用可能是由于 BMP7/Smad1/5/9 信号通路受阻^[21]。

丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK),包括细胞外信号调节激酶 (ERK)、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 和 p38 亚组在细胞存活、增殖、分化、炎症和凋亡中发挥关键作用^[22]。有相关实验将活化的 ERK、JNK 和 p38 MAPK 从细胞质转移到细胞核,随后发现磷酸化转录因子以控制靶向基因表达^[23]。这证明了其与肿瘤发生和肿瘤治疗的重要性相一致,MAPK 信号与人类癌症高度相关^[24]。

本次网络药理学结合动物实验靶向验证的方法对桔梗皂苷 D 治疗宫颈癌的作用机制进行研究。从药物成分及疾病靶标数据库同时预测并取交集获得同时满足桔梗皂苷 D 及宫颈癌的靶蛋白基因,通过 GO 富集分析及 KEGG 富集分析聚焦与上述治疗过程中高度相关的 Hippo 信号通路及 BMP-2 靶蛋白基因,最终通过体外动物实验及 BMP-2 靶向验证证实其与宫颈癌结果的一致性,为后续中药抗肿瘤药物的相关研究奠定基础。

参考文献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65 (2): 87-108.
- [2] Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, et al. Human papillomavirus and cervical carcinoma [J]. Lancet, 2013, 382 (9895): 889-899.
- [3] 何闰华,詹磊,宋恩学,等. NLRC5 在宫颈癌中的表达及与宫颈癌患者预后的相关性研究 [J/OL]. 中华全科医学, 2022 (10): 1700-1703.
- [4] 章孟星,张易. 宫颈癌病人后装治疗真实体验的质性研究 [J]. 全科护理, 2022, 20 (27): 3844-3847.

- [5] Pogoda CS, Roden RB, Garcea RL. Immunizing against anogenital cancer: HPV vaccines [J]. PLoS Pathog, 2016, 12 (5): e1005587.
- [6] Bray F, Jemal A, Torre LA, et al. Long-term realism and cost-effectiveness: primary prevention in combatting cancer and associated inequalities worldwide [J]. J Natl Cancer Inst, 2015, 107 (12): djv273.
- [7] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66 (2): 115-132.
- [8] De Vuyst H, Alemany L, Lacey C, et al. The burden of human papillomavirus infections and related diseases in sub-saharan Africa [J]. Vaccine, 2013, 31 Suppl 5 (5): F32-46.
- [9] Okunade KS. Human papillomavirus and cervical carcinoma [J]. J Obstet Gynaecol, 2020, 40 (5): 602-608.
- [10] Zhang T, Wang C, Wang K, et al. RacGAP1 promotes the malignant progression of cervical carcinoma by regulating AP-1 via miR-192 and p-JNK [J]. Cell Death Dis, 2022, 13 (7): 604.
- [11] Li XG, Gao S, Yang WS, et al. Investigation of the inhibitory effect of platycodin D in human transitional cell carcinoma cell line 5637 [J]. Folia Biol (Praha), 2021, 67 (1): 37-47.
- [12] Lu Z, Song W, Zhang Y, et al. Combined anti-cancer effects of platycodin D and sorafenib on androgen-independent and PTEN-deficient prostate cancer [J]. Front Oncol, 2021, 11: 648985.
- [13] 许严伟, 耿胜男, 王越华, 等. 桔梗皂苷 D 对阿霉素治疗小鼠肺癌的导引机制 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (6): 1480-1489.
- [14] Chen D, Chen T, Guo Y, et al. Suppressive effect of platycodin D on bladder cancer through micro RNA-129-5p-mediated PABPC1/PI3K/AKT axis inactivation [J]. Braz J Med Biol Res, 2021, 54 (3): e10222.
- [15] Zhang J, Song N, Liu Y, et al. Platycodin D inhibits β -amyloid-induced inflammation and oxidative stress in BV-2 cells via suppressing TLR4/NF- κ B signaling pathway and activating Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. Neurochem Res, 2021, 46 (3): 638-647.
- [16] Choi YJ, Lee SJ, Kim HI, et al. Platycodin D enhances LDLR expression and LDL uptake via down-regulation of IDOL mRNA in hepatic cells [J]. Sci Rep, 2020, 10 (1): 19834.
- [17] 邓杏好, 谭梅英, 张维彬. 桔梗皂苷 D 的大鼠血浆药代动力学研究 [J]. 按摩与康复医学, 2018, 9 (11): 45-47.
- [18] Hsin KY, Ghosh S, Kitano H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. PLoS One, 2013, 8 (12): e83922.
- [19] 崔开颖, 赵素芬, 朱根海. 姜黄素对宫颈癌大鼠的影响及作用机制研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35 (11): 1142-1145.
- [20] Heinke J, Kerber M, Rahner S, et al. Bone morphogenetic protein modulator BMPER is highly expressed in malignant tumors and controls invasive cell behavior [J]. Oncogene, 2012, 31 (24): 2919-2930.
- [21] Wu CK, Wei MT, Wu HC, et al. BMP2 promotes lung adenocarcinoma metastasis through BMP receptor 2-mediated SMAD1/5 activation [J]. Sci Rep, 2022, 12 (1): 16310.
- [22] Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases [J]. Science, 2002, 298 (5600): 1911-1912.
- [23] Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2004, 68 (2): 320-344.
- [24] Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer [J]. Oncogene, 2007, 26 (22): 3291-3310.

(收稿日期: 2022-09-03; 修回日期: 2022-10-14)

宽叶重楼的甾体皂苷类成分研究

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

摘要: **目的** 研究宽叶重楼根茎的甾体皂苷类成分。**方法** 采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、中压制备液相色谱和半制备高效液相色谱等方法, 从宽叶重楼根茎 70% 乙醇提取物的正丁醇萃取部位分离化合物, 通过波谱分析和化学手段鉴定化学结构。**结果** 分离得到 7 个甾体皂苷类化合物, 分别鉴定为偏诺皂苷元-3-*O*- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-[α -L-吡喃鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-吡喃葡萄糖苷(1)、17-hydroxygracillin(2)、重楼皂苷 H(3)、重楼皂苷 VII(4)、薯蓣皂苷元-3-*O*- α -L-吡喃阿拉伯糖基-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-吡喃葡萄糖苷(5)、重楼皂苷 V(6)、重楼皂苷 II(7)。**结论** 化合物 2、3、5 和 6 为首次从宽叶重楼中分离得到。

关键词: 宽叶重楼; 甾体皂苷; 化学成分; 提取分离; 结构鉴定

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2715-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.003

Steroidal saponins from rhizomes of *Paris polyphylla* var. *latifolia*

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

Abstract: **Objective** To determine the saponin constituents from rhizomes of *Paris polyphylla* var. *latifolia*. **Methods** The compounds in the *n*-butanol fraction of 70% ethanol extract of rhizomes of *Paris polyphylla* var. *latifolia* were isolated and purified by silica gel, Sephadex LH-20, middle-pressure liquid chromatography and semi-preparative high pressure liquid chromatography. Their structures were identified by spectroscopic analysis and chemical methods. **Results** Totally 7 steroidal saponins were isolated and identified as pennogenin-3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-glucopyranoside (1), 17-hydroxygracillin (2), paris saponin H (3), polyphyllin VII (4), diosgenin-3-*O*- α -L-arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranoside (5), polyphyllin V (6), and polyphyllin II (7). **Conclusion** Compounds 2, 3, 5 and 6 have been isolated from this plant for the first time.

Key words: *Paris polyphylla* var. *latifolia*; steroidal saponin; chemical constituent; extraction and isolation; structure elucidation

重楼 (*Paris*) 是多年生草本植物, 归属于百合科 (Liliaceae), 共 33 个种及 15 个变种, 在中国约有 27 种及 15 个变种^[1]。2020 年版《中国药典》收录的药用重楼为百合科植物云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* 或七叶一枝花 *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* 的干燥根茎^[2], 具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊的功效。据统计,

目前已从重楼属植物中分离出 323 种化学成分, 主要包括甾体皂苷、胆甾醇、C₂₁ 类固醇、植物甾醇、昆虫激素、三萜类和其他次生代谢产物^[1]。药理学研究表明重楼属植物具有较高的药理活性和药用价值, 如抗肿瘤^[3]、抗感染^[4]、免疫调节^[5]、抑菌^[6]等。天然药物化学研究表明其中的主要活性成分为甾体皂苷, 亦称为重楼皂苷^[1]。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.81973192)。

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

宽叶重楼 (*Paris polyphylla* var. *latifolia*) 作为重楼属南重楼组的一个变种, 主要分布于我国山西、甘肃、安徽等地^[7], 在陕西省华阴市、耀州区、黄龙、镇巴县和秦岭南北坡也多有分布^[8]。目前关于宽叶重楼的甾体皂苷类成分研究有限, 课题组前期从陕西省太白县产宽叶重楼中分离得到 4 个甾体皂苷^[9-10], 为明确宽叶重楼的药效物质基础, 并对其甾体皂苷类成分进一步完善, 本文对陕产宽叶重楼根茎 70% 乙醇提取物的正丁醇萃取部位进行研究, 共分离并鉴定了 7 个甾体皂苷 (见图 1), 其中化合物 2、3、5 和 6 为首次从宽叶重楼中提取得到。

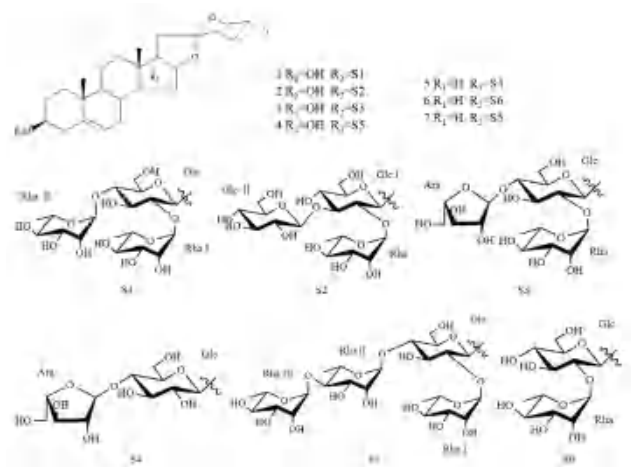


图 1 皂苷 1~7 的化学结构

Fig 1 Structures of saponins 1~7

1 材料

Quattro 质谱仪 (Waters 公司); Bruker AVANCE 800 型核磁共振波谱仪 (Bruker 公司); Gilson 2050 高效液相色谱仪 [配 YMC-Pack R&D ODS-A 半制备色谱柱 (20 mm×250 mm, 5 μm)]、ODS C₁₈ 柱 (Pharmacia 公司); Pure C-810 中压快速色谱柱 (瑞士 BUCHI 公司); Sephadex LH-20 凝胶 (GE 公司); 薄层色谱用硅胶 G、柱色谱硅胶 (100~200 目、300~400 目, 青岛海洋化工厂); 电子天平 (精度: 0.0001 g, 赛多利斯科学仪器有限公司); 低温冷却循环泵 (DLSB-40 型, 陕西爱信仪器有限公司); 隔膜真空泵 (V-100 型, 瑞士 BUCHI 公司); 旋转蒸发仪 (N-1300 型)、电热恒温水浴锅 (OSB-2100 型)(上海爱朗仪器有限公司); 电热鼓风干燥箱 (DHG-9240A 型, 上海一恒科学仪器有限公司); 色谱纯乙腈、甲醇 (天津科密欧公司); 氘代试剂 (Merck 公司); 显色剂 (10% 硫酸/乙醇); 其他试剂均为分析纯。

药材于 2021 年 8 月购自陕西省宝鸡市眉县天源中草药有限公司, 产地为陕西省宝鸡市眉县, 经空军军医大学药学院中药与天然药物学教研室

汤海峰教授鉴定为宽叶重楼 (*Paris polyphylla* var. *latifolia*) 的根茎, 药材标本 (编号: 20210802) 保存在该教研室标本室。

2 提取与分离

取宽叶重楼的干燥根茎 2.8 kg, 粉碎后用 70% 乙醇浸泡过夜, 70℃ 加热回流提取 5 次, 每次 2 h, 减压回收得浸膏共 611.7 g。将浸膏用适量水分散后, 以等体积石油醚萃取 5 次, 再用等体积水饱和正丁醇萃取 5 次, 减压回收得正丁醇层总皂苷 135.3 g。所得总皂苷经硅胶柱色谱分离, 用 $V_{\text{二氯甲烷}}:V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}$ (100:1:0.1~65:35:0.35) 为洗脱剂, 进行梯度洗脱, 合并后得到 19 个组分 (Fr.1~Fr.19)。

Fr.6 (1.54 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (洗脱剂为纯甲醇) 除去杂质, 得到 Fr.6-1~Fr.6-3。Fr.6-1 经过中压制备液相色谱, $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}$ (1:9~10:0) 为洗脱剂梯度洗脱, 得到 Fr.6-1-1~Fr.6-1-3。Fr.6-1-1 通过半制备高效液相色谱分离纯化, 45% 乙腈洗脱得到化合物 5 (8.0 mg, $t_R = 45.5$ min)。Fr.11 (2.8 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (洗脱剂为纯甲醇) 除去杂质, 得到 Fr.11-1~Fr.11-3。Fr.11-1 经中压制备液相色谱, $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}$ (1:9~10:0) 为洗脱剂梯度洗脱, 得到 Fr.11-1-1~Fr.11-1-6。Fr.11-1-1 通过半制备高效液相色谱分离纯化 (流速 15 mL·min⁻¹, 检测波长 206 nm; 以下均相同), 35% 乙腈洗脱得到化合物 1 (20.6 mg, $t_R = 18.5$ min)。Fr.11-1-2 通过 30% 乙腈洗脱得到化合物 6 (17.3 mg, $t_R = 20.5$ min)。Fr.13 (2.1 g) 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱 (洗脱剂为纯甲醇) 除去杂质, 得到 Fr.13-1~Fr.13-3。Fr.13-1 经过中压制备液相色谱, $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}$ (1:9~10:0) 为洗脱剂梯度洗脱, 得到 Fr.13-1-1~Fr.13-1-3。Fr.13-1-1 通过半制备高效液相色谱分离纯化, 30% 乙腈洗脱得到化合物 2 (23.0 mg, $t_R = 31.5$ min) 和化合物 3 (15.0 mg, $t_R = 35.5$ min)。Fr.13-1-2 通过 30% 乙腈洗脱得到化合物 4 (54.0 mg, $t_R = 20.5$ min) 和化合物 7 (50.0 mg, $t_R = 28.8$ min)。

3 结构鉴定

化合物 1: 白色无定形粉末, Liebermann-Burchard 和 Molish 鉴定反应呈阳性, 表明该化合物可能属于皂苷类化合物。ESI-MS 显示其准分子离子峰 m/z 907 $[M + Na]^+$ (正离子模式) 和 883 $[M - H]^-$ (负离子模式), 提示其相对分子质量为 884, 结合 ¹³C-NMR 谱确定化合物 1 的分子式为 C₄₅H₇₂O₁₇。分析化合物 1 的 ¹³C-NMR 和 DEPT 谱, 发现在 45 个碳信号中有 27 个碳信号归属于苷元部分。¹H-NMR 谱 (800 MHz, CD₃OD)

显示高场区中存在偏诺皂苷元的特征甲基氢信号, 分别为 δ_{H} 0.80 (3H, d, $J = 6.45$ Hz)、0.83 (3H, s)、0.89 (3H, d, $J = 7.26$ Hz)、1.05 (3H, s), 通过 HSQC 谱找到其对应碳信号 δ_{C} 17.5 (C-27)、17.5 (C-18)、9.1 (C-21)、19.8 (C-19)。此外还存在着 5 个特征季碳信号: δ_{C} 141.9 (C-5)、38.0 (C-10)、45.8 (C-13)、91.3 (C-17)、110.3 (C-22), 综合上述数据, 结合文献^[11]可以确定化合物 1 的苷元为偏诺皂苷元。

取化合物 1 (1.5 mg) 用 2 mL ($2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 三氟乙酸溶解, 按文献方法^[5]将所得单糖制备成三甲基硅醚化 *L*-半胱氨酸衍生物, 以标准糖衍生物为对照, 进行 GC 分析, 表明化合物 1 的单糖组成为 *D*-葡萄糖 (*D*-Glc) 和 *L*-鼠李糖 (*L*-Rha) (1:2)。3 个糖的端基氢信号均位于 $^1\text{H-NMR}$ 的低场区, 分别为 δ_{H} 4.50 (1H, d, $J = 7.81$ Hz, Glc H-1), δ_{H} 5.20 (1H, br s, Rha I H-1), δ_{H} 4.84 (1H, br s, Rha II H-1)。通过 HSQC 谱找到其对应的端基碳信号为 δ_{C} 100.4 (C-1, Glc), δ_{C} 102.3 (C-1, Rha I), δ_{C} 103.0 (C-1, Rha II)。在 HMBC 谱中, Glc 端基氢和苷元 C-3 存在远程相关, Rha I 端基氢和 Glc C-2 存在远程相关, Rha II 端基氢和 Glc C-4 存在远程相关, 表明 Rha I 和 Rha II 分别连在 Glc 的 2 位和 4 位上。通过分析葡萄糖端基氢耦合常数 ($J = 7.81 \text{ Hz} > 7.0 \text{ Hz}$) 确定其相对构型为 β 构型; 通过分析鼠李糖 C-5 化学位移值 (δ_{C} 69.8 Rha I, δ_{C} 70.6 Rha II) 确定其相对构型为 α 构型^[12-13]。通过综合分析 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、DEPT、HSQC 和 HMBC 谱图, 与文献中的化合物碳氢信号进行对比^[14], 从而确定了化合物 1 为已知化合物偏诺皂苷元-3-*O*- α -*L*-吡喃鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-[α -*L*-吡喃鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -*D*-吡喃葡萄糖苷。

化合物 2: 白色无定型粉末, Libermann-Burchard 和 Molish 鉴定反应呈阳性, ESI-MS 显示其准分子离子峰 m/z 924 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (正离子模式) 和 900 $[\text{M} - \text{H}]^-$ (负离子模式), 提示其相对分子质量为 901, 结合 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱确定化合物 2 的分子式为 $\text{C}_{45}\text{H}_{73}\text{O}_{18}$ 。通过与化合物 1 进行对照, 发现化合物 2 具有与化合物 1 基本一致的偏诺皂苷元特征信号, 如甲基氢信号 δ_{H} 0.79 (3H, d, $J = 6.42$ Hz)、0.83 (3H, s)、0.89 (3H, d, $J = 7.27$ Hz)、1.05 (3H, s), 分别与 $^{13}\text{C-NMR}$ 中的 δ_{C} 17.5 (C-27)、17.5 (C-18)、9.1 (C-21)、19.8 (C-19) 信号相关。在 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱中还存在 5 个季碳信号: δ_{C} 141.9 (C-5)、38.0 (C-10)、45.9 (C-13)、91.3 (C-17)、111.0 (C-22), 整理上述数据, 结合文

献^[11]可以确定化合物 2 的苷元为偏诺皂苷元。

将化合物 2 按照与化合物 1 同样的方法制备成衍生物, 与标准糖衍生物对比, 确定结构中含有 *D*-葡萄糖 (*D*-Glc) 和 *L*-鼠李糖 (*L*-Rha) (2:1)。3 个糖的端基氢信号均位于 $^1\text{H-NMR}$ 的低场区, 分别为 δ_{H} 4.51 (1H, d, $J = 7.86$ Hz, Glc I H-1), δ_{H} 4.47 (1H, d, $J = 7.85$ Hz, Glc II H-1), δ_{H} 5.27 (1H, br s, Rha H-1)。其对应的端基碳信号为 δ_{C} 100.3 (C-1, Glc I), δ_{C} 104.5 (C-1, Glc II), δ_{C} 102.5 (C-1, Rha)。通过结合 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、DEPT、HSQC 和 HMBC 谱图, 与文献中的化合物碳氢信号进行对比^[15], 最终确定化合物 2 为偏诺皂苷元-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-[α -*L*-吡喃鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -*D*-吡喃葡萄糖苷, 即已知化合物 17-hydroxygracillin。

化合物 3: 白色无定型粉末, Libermann-Burchard 和 Molish 鉴定反应呈阳性, ESI-MS 显示其准分子离子峰为 m/z 893 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (正离子模式) 和 869 $[\text{M} - \text{H}]^-$ (负离子模式)。结合 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱 (200 MHz, CD_3OD) 和 DEPT 谱数据分析确定化合物 3 的分子式为 $\text{C}_{44}\text{H}_{70}\text{O}_{17}$ 。将化合物 3 与化合物 1 进行对照, 发现两者具有基本一致的偏诺皂苷元特征信号, 如甲基氢信号分别为 δ_{H} 0.80 (3H, d, $J = 6.47$ Hz)、0.83 (3H, s)、0.89 (3H, d, $J = 7.24$ Hz)、1.05 (3H, s), 并分别与 $^{13}\text{C-NMR}$ 中的 δ_{C} 17.5 (C-27)、17.5 (C-18)、9.1 (C-21)、19.8 (C-19) 信号相关。在 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱的 NMR 谱中存在 5 个季碳信号: δ_{C} 141.9 (C-5)、38.0 (C-10)、45.9 (C-13)、91.3 (C-17)、111.0 (C-22), 整理上述数据, 结合文献^[11]可以确定化合物 3 的苷元为偏诺皂苷元。

将化合物 3 按照与化合物 1 同样的方法制备成衍生物, 与衍生化后的标准糖的保留时间进行对比, 确定结构中含有 *D*-葡萄糖 (*D*-Glc)、*L*-鼠李糖 (*L*-Rha) 和 *L*-呋喃阿拉伯糖 (*L*-Araf) (1:1:1)。3 个糖的端基氢信号均位于 $^1\text{H-NMR}$ 的低场区, 分别为 δ_{H} 4.50 (1H, d, $J = 7.80$ Hz, Glc H-1), 5.22 (1H, br s, Rha H-1), 5.02 (1H, d, $J = 1.91$ Hz, Araf H-1)。通过 HSQC 谱找到其对应的端基碳信号为 δ_{C} 100.4 (C-1, Glc), 102.1 (C-1, Rha), 110.0 (C-1, Araf)。通过分析 Glc 端基氢耦合常数 ($J = 7.80 \text{ Hz} > 7.0 \text{ Hz}$) 确定其相对构型为 β 构型, 通过分析鼠李糖 C-5 化学位移值 (δ_{C} 69.7) 确定其相对构型为 α 构型, 通过呋喃阿拉伯糖端基氢耦合常数 ($J = 1.91 \text{ Hz}$) 确定其相对构型为 α 构型^[16]。通过结合 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、DEPT、HSQC 和 HMBC 谱图, 与文献

中的化合物碳氢信号进行对比^[17], 最终确定化合物 **3** 为已知化合物重楼皂苷 H。

化合物 4: 白色无定型粉末, Libermann-Burchard 和 Molish 鉴定反应呈阳性, ESI-MS 显示其准分子离子峰 m/z 1053 $[M + Na]^+$ (正离子模式) 和 1029 $[M - H]^-$ (负离子模式)。结合 ^{13}C -NMR 谱 (200 MHz, CD_3OD) 和 DEPT 谱数据分析确定化合物 **4** 的分子式为 $C_{51}H_{82}O_{21}$ 。通过与化合物 **1** 对比发现, 两者具有相似的特征信号, 如高场氢信号: δ_H 0.80 (3H, d, $J = 6.39$ Hz)、0.83 (3H, s)、0.89 (3H, d, $J = 7.20$ Hz)、1.05 (3H, s), 5 个季碳信号: δ_C 141.9 (C-5)、38.0 (C-10)、45.8 (C-13)、91.3 (C-17)、111.0 (C-22), 整理上述数据, 结合文献^[11]可以确定化合物 **4** 的苷元为偏诺皂苷元。

将化合物 **4** 按照与化合物 **1** 同样的方法制备成衍生物, 通过 GC 分析, 与标准糖衍生物对比, 与衍生化后的标准糖的保留时间进行对比, 确定结构中含有 *D*-葡萄糖 (*D*-Glc) 和 *L*-鼠李糖 (*L*-Rha) (1:3)。4 个糖的端基氢信号均位于 1H -NMR 的低场区, 分别为 δ_H 4.50 (1H, d, $J = 7.80$ Hz, Glc H-1), δ_H 5.18 (1H, br s, Rha I H-1), δ_H 4.83 (1H, br s, Rha II H-1), δ_H 5.17 (1H, br s, Rha III H-1)。通过 HSQC 谱找到其对应的端基碳信号为 δ_C 100.3 (C-1, Glc), δ_C 102.4 (C-1, Rha I), δ_C 102.5 (C-1, Rha II), δ_C 103.2 (C-1, Rha III)。通过 HMBC 谱发现, Glc 端基氢和苷元 C-3 存在远程相关, Rha I 端基氢与 Glc C-2 存在远程相关, Rha II 端基氢与 Glc C-4 存在远程相关, Rha III 端基氢与 Rha II C-4 存在远程相关, 通过结合 1H -NMR、 ^{13}C -NMR、DEPT、HSQC 和 HMBC 谱图, 与文献中的化合物碳氢信号进行对比^[18], 最终确定化合物 **4** 为已知化合物重楼皂苷 VII。

化合物 5: 白色无定形粉末, Liebermann-Burchard 和 Molish 反应呈阳性, 表明该化合物可能属于皂苷类。ESI-MS 显示其准分子离子峰 m/z 730 $[M + Na]^+$ (正离子模式) 和 706 $[M - H]^-$ (负离子模式), 提示其相对分子质量为 707, 结合 ^{13}C -NMR 谱确定化合物 **5** 的分子式为 $C_{38}H_{50}O_{12}$ 。在氢谱高场区存在 4 个薯蓣皂苷元的特征氢信号, 分别为 δ_H 0.79 (3H, d, $J = 6.59$ Hz)、0.81 (3H, s)、0.96 (d, $J = 7.12$ Hz)、1.05 (3H, s), 由 HSQC 谱发现上述 4 个氢信号分别与 ^{13}C -NMR 中的 δ_C 17.5 (C-27)、16.8 (C-18)、14.9 (C-21)、19.8 (C-19) 相关。在 ^{13}C -NMR 谱中存在 4 个特征季碳信号: δ_C 142.0 (C-5)、38.0 (C-10)、41.4 (C-13)、110.6 (C-22), 整理上述数据, 结合文献^[11]所以确定化合物 **5** 的苷元为薯蓣皂苷元。

将化合物 **5** 按照与化合物 **1** 同样的方法制备成衍生物, 与衍生化后的标准糖的保留时间进行对比, 表明化合物 **5** 结构中含有 *D*-葡萄糖 (*D*-Glc) 和 *L*-呋喃阿拉伯糖 (*L*-Araf) (1:1)。两个糖的端基氢信号均位于 1H -NMR 的低场区, 分别为 δ_H 4.40 (1H, d, $J = 7.92$ Hz, Glc H-1), δ_H 5.05 (1H, d, $J = 1.90$ Hz, Araf H-1)。通过 HSQC 谱找到其对应的端基碳信号为 δ_C 102.4 (C-1, Glc), δ_C 109.8 (C-1, Araf)。通过结合 1H -NMR、 ^{13}C -NMR、DEPT、HSQC 和 HMBC 谱图, 与文献中的化合物碳氢信号进行对比^[19], 最终确定化合物 **5** 为已知化合物薯蓣皂苷元 -3-*O*- α -*L*-呋喃阿拉伯糖基 - (1 $\rightarrow$ 4)- β -*D*-吡喃葡萄糖苷。

化合物 6: 白色无定型粉末, Libermann-Burchard 和 Molish 鉴定反应呈阳性, ESI-MS 显示其准分子离子峰 m/z 745 $[M + Na]^+$ (正离子模式) 和 721 $[M - H]^-$ (负离子模式)。结合 ^{13}C -NMR 谱 (200 MHz, CD_3OD) 和 DEPT 谱数据分析确定化合物 **6** 的分子式为 $C_{39}H_{62}O_{12}$ 。在 1H -NMR (800 MHz, CD_3OD) 谱的高场区中存在薯蓣皂苷元的特征甲基氢信号, 分别为 δ_H 0.79 (3H, d, $J = 6.49$ Hz)、0.81 (3H, s)、0.96 (d, $J = 7.02$ Hz)、1.05 (3H, s), 通过分析其 HSQC 谱数据, 发现它们分别与 ^{13}C -NMR 中的 δ_C 17.5 (C-27)、16.8 (C-18)、14.9 (C-21)、19.8 (C-19) 信号相关。在 ^{13}C -NMR 谱的 NMR 谱中还存在 4 个季碳信号: δ_C 141.9 (C-5)、38.0 (C-10)、41.4 (C-13)、110.6 (C-22), 整理上述数据, 结合文献^[11]可以确定化合物 **6** 的苷元为薯蓣皂苷元。

将化合物 **6** 按照与化合物 **1** 同样的方法制备成衍生物, 与衍生化后的标准糖的保留时间进行对比, 确定结构中含有 *D*-葡萄糖 (*D*-Glc) 和 *L*-鼠李糖 (*L*-Rha) (1:1)。两个糖的端基氢信号均位于 1H -NMR 的低场区, 分别为 δ_H 4.47 (1H, d, $J = 7.78$ Hz, Glc H-1), δ_H 5.19 (1H, br s, Rha H-1)。通过 HSQC 谱找到其对应的端基碳信号为 δ_C 100.5 (C-1, Glc), δ_C 102.2 (C-1, Rha)。在 HMBC 谱中, Glc 端基氢与苷元 C-3 存在远程相关, Rha 端基氢与 Glc C-2 存在远程相关, 表明 Rha 连在 Glc 2 位上。通过分析葡萄糖端基氢耦合常数 ($J = 7.78$ Hz > 7.0 Hz) 确定其相对构型为 β 构型, 通过分析鼠李糖 C-5 的化学位移值 (δ_C 69.8) 确定其相对构型为 α 构型。通过结合 1H -NMR、 ^{13}C -NMR、DEPT、HSQC 和 HMBC 谱图, 与文献中的化合物碳氢信号进行对比^[20], 最终确定化合物 **6** 为已知化合物重楼皂苷 V。

化合物 7: 白色无定型粉末, Libermann-

Burchard 和 Molish 鉴定反应呈阳性, ESI-MS 显示其准分子离子峰 m/z 1037 $[M + Na]^+$ (正离子模式) 和 1013 $[M - H]^-$ (负离子模式)。结合 ^{13}C -NMR 谱 (200 MHz, CD_3OD) 和 DEPT 谱数据分析确定化合物 7 的分子式为 $\text{C}_{51}\text{H}_{82}\text{O}_{20}$ 。在 ^1H -NMR (800 MHz, CD_3OD) 谱的高场区中存在薯蓣皂苷元的特征甲基氢信号, 分别为 δ_{H} 0.79 (3H, d, $J = 6.50$ Hz)、0.81 (3H, s)、0.96 (3H, d, $J = 7.01$ Hz)、1.04 (3H, s), 通过分析其 HSQC 谱数据, 发现它们分别与 ^{13}C -NMR 中的 δ_{C} 17.5 (C-27)、16.8 (C-18)、14.9 (C-21)、19.8 (C-19) 信号相关。在 ^{13}C -NMR 谱的 NMR 谱中还存在 4 个季碳信号: δ_{C} 141.9 (C-5)、38.1 (C-10)、41.4 (C-13)、110.6 (C-22), 整理上述数据, 结合文献^[11]可以确定化合物 7 的苷元为薯蓣皂苷元。化合物 7 的 ^{13}C -NMR 谱中, 比化合物 6 多出两组甲基五碳糖信号。

将化合物 7 按照与化合物 1 同样的方法制备成衍生物, 与衍生化后的标准糖的保留时间进行对比, 确定结构中含有 D-葡萄糖 (D-Glc) 和 L-

鼠李糖 (L-Rha) (1 : 3)。4 个糖的端基氢信号均位于 ^1H -NMR 的低场区, 分别为 δ_{H} 4.49 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, Glc H-1), δ_{H} 5.18 (1H, br s, Rha I H-1), δ_{H} 4.83 (1H, br s, Rha II H-1), δ_{H} 5.17 (1H, br s, Rha III H-1)。通过 HSQC 谱找到其对应的端基碳信号为 δ_{C} 100.5 (C-1, Glc), δ_{C} 102.4 (C-1, Rha I), δ_{C} 102.6 (C-1, Rha II), δ_{C} 103.2 (C-1, Rha III)。在 HMBC 谱中, Glc 端基氢与苷元 C-3 存在远程相关, Rha I 端基氢与 Glc C-2 存在远程相关, Rha II 端基氢和 Glc C-4 存在远程相关, Rha III 端基氢和 Rha II C-4 存在远程相关。表明 Rha I 连在 Glc C-2 位上, Rha II 连在 Glc C-4 位上, Rha III 连在 Rha II C-4 位上。通过分析葡萄糖端基氢耦合常数 ($J = 7.87$ Hz > 7.0 Hz) 确定其相对构型为 β 构型。通过结合 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR、DEPT、HSQC 和 HMBC 谱图, 与文献中的化合物碳氢信号进行对比^[19], 最终确定化合物 7 为已知化合物重楼皂苷 II。7 个化合物的 ^{13}C -NMR 和 ^1H -NMR 数据见表 1、表 2。

表 1 化合物 1~7 的 ^{13}C -NMR 数据 (200 MHz, in CD_3OD)
Tab 1 ^{13}C -NMR data of compounds 1~7 (200 MHz, in CD_3OD)

编号	1	2	3	4	5	6	7		1	2	3	4	5	6	7
1	38.5	38.6	38.6	38.5	38.5	38.6	38.6	3-O-sugar	Glc	Glc I	Glc	Glc	Glc	Glc	Glc I
2	30.7	30.7	30.8	30.7	30.7	30.8	30.7	1	100.4	100.3	100.4	100.3	102.4	100.5	100.5
3	79.3	78.9	79.3	79.2	79.9	79.2	79.2	2	79.2	78.6	78.8	79.4	75.0	79.0	79.5
4	39.5	39.5	39.5	39.5	39.7	39.5	39.5	3	78.0	88.5	77.8	78.0	76.5	79.4	78.0
5	141.9	141.9	141.9	141.9	142.0	141.9	141.9	4	79.9	77.8	78.6	79.5	78.2	77.7	79.4
6	122.6	122.6	122.6	122.6	122.6	122.6	122.7	5	76.6	70.6	76.5	76.7	76.7	71.8	76.7
7	33.2	33.2	33.2	33.2	32.7	32.8	32.7	6	61.8	62.7	61.9	61.9	61.9	62.8	61.9
8	33.2	33.3	33.3	33.3	32.8	33.2	32.8		Rha I	Glc II	Rha	Rha I	Araf	Rha	Rha I
9	51.4	51.4	51.5	51.5	51.8	51.7	51.7	1	102.3	104.5	102.1	102.4	109.8	102.2	102.4
10	38.0	38.0	38.0	38.0	38.0	38.0	38.1	2	72.1	75.1	72.4	72.1	83.1	72.2	74.0
11	21.7	21.7	21.7	21.7	22.0	22.0	22.0	3	72.3	78.2	72.2	72.3	78.1	72.4	72.2
12	32.8	32.9	32.9	32.8	40.9	40.9	40.9	4	73.9	78.3	73.9	73.8	86.1	73.8	72.4
13	45.8	45.9	45.9	45.8	41.4	41.4	41.4	5	69.8	71.5	69.7	69.8	63.0	69.8	69.8
14	53.9	53.9	53.9	53.9	57.8	58.0	57.8	6	18.0	62.6	17.9	17.8		18.0	18.0
15	32.1	32.1	32.1	32.1	32.4	32.7	33.2		Rha II	Rha	Araf	Rha II			Rha II
16	90.5	90.5	90.5	90.5	82.2	82.2	82.2	1	103.0	102.5	110.0	102.5			102.6
17	91.3	91.3	91.3	91.3	63.7	63.7	63.7	2	72.4	72.1	83.2	72.9			72.9
18	17.5	17.5	17.5	17.5	16.8	16.8	16.8	3	72.2	72.3	78.1	73.0			72.9
19	19.8	19.8	19.8	19.8	19.8	19.8	19.8	4	73.7	73.9	85.9	80.8			80.8
20	45.5	45.5	45.5	45.5	42.9	42.9	42.9	5	70.6	69.9	63.0	69.1			69.1
21	9.1	9.1	9.1	9.1	14.9	14.9	14.9	6	17.8	18.1		18.6			18.6
22	110.3	111.0	111.0	111.0	110.6	110.6	110.6					Rha III			Rha III
23	32.5	32.5	32.5	32.5	33.2	32.4	32.4	1				103.2			103.2
24	29.4	29.4	29.4	29.4	29.9	30.0	29.9	2				72.1			72.4
25	31.3	31.3	31.3	31.3	31.4	31.4	31.5	3				72.4			73.8
26	67.7	67.7	67.7	67.7	67.9	67.9	67.9	4				73.9			72.4
27	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	5				70.4			70.4
								6				18.0			17.8

表 2 化合物 1 ~ 7 的 ^1H -NMR 数据 (800 MHz, in CD_3OD)
 Tab 2 ^1H -NMR data of compounds 1 ~ 7 (800 MHz, in CD_3OD)

编号	1	2	3	4	5	6	7
1	1.88 m, 1.08 m	1.89 m, 1.08 m	1.89 m, 1.08 m	1.89 m, 1.07 m	1.88 m, 1.08 m	1.87 m, 1.07 m	1.87 m, 1.07 m
2	1.92 m, 1.29 m	1.90 m, 1.28 m	1.92 m, 1.29 m	1.91 m, 1.29 m	1.92 m, 1.29 m	1.92 m, 1.29 m	1.91 m, 1.29 m
3	3.60 m	3.64 m	3.60 m	3.59 m	3.57 m	3.61 m	3.59 m
4	2.45 m	2.42 m	2.44 m	2.44 m	2.44 m, 2.26 m	2.44 m, 2.29 m	2.44 m, 2.29 m
5	—	—	—	—	—	—	—
6	5.39 br s	5.38 br s	5.38 br s	5.38 br s	5.38 br s	5.38 br s	5.38 br s
7	2.01 m, 1.63 m	2.00 m	2.01 m	2.00 m	1.57 m	1.65 m	1.56 m
8	1.64 m	1.64 m	1.64 m	1.64 m	1.98 m, 1.28 m	1.98 m, 1.28 m	1.98 m, 1.28 m
9	0.94 m	0.94 m	0.94 m	0.94 m	0.97 m	0.97 m	0.96 m
10	—	—	—	—	—	—	—
11	1.61 m, 1.51 m	1.61 m, 1.51 m	1.61 m, 1.51 m	1.61 m, 1.50 m	1.56 m	1.56 m	1.56 m
12	1.70 m, 1.34 s,	1.57 m, 1.35 m	1.56 m, 1.34 m	1.56 m, 1.34 m	1.77 m, 1.20 m	1.76 m, 1.20 m	1.72 m, 1.19 m
13	—	—	—	—	—	—	—
14	1.76 m	1.71 m	1.71 m	1.71 m	1.15 m	1.14 m	1.14 m
15	2.04 m, 1.25 m	2.04 m, 1.25 m	2.05 m, 1.26 m	2.04 m, 1.26 m	1.56 m	1.56 m	1.53 m
16	4.00 t	4.00 t	4.00 t	4.00 t	4.39 m	4.39 m	4.39 m
17	—	—	—	—	1.75 m	1.75 m	1.74 m
18	0.83 s	0.83 s	0.83 s	0.83 s	0.81 s	0.81 s	0.81 s
19	1.05 s	1.05 s	1.05 s	1.04 s	1.05 s	1.05 s	1.04 s
20	2.09 m	2.09 m	2.09 m	2.09 m	1.90 m	1.90 m	1.90 m
21	0.89 d (7.26)	0.89 d (7.27)	0.89 d (7.24)	0.89 d (7.20)	0.96 d (7.12)	0.96 d (7.02)	0.96 d (7.01)
22	—	—	—	—	—	—	—
23	1.68 m, 1.58 m	1.70 m, 1.55 m	1.69 m, 1.55 m	1.70 m, 1.56 m	1.68 m	1.70 m	1.69 m
24	1.62 m, 1.44 m	1.62 m, 1.44 m	1.62 m, 1.44 m	1.63 m, 1.44 m	1.42 m	1.62 m, 1.41 m	1.61 m, 1.41 m
25	1.60 m	1.60 m	1.60 m	1.60 m	1.59 m	1.59 m	1.59 m
26	3.48 m, 3.33 m	3.48 m, 3.33 m	3.48 m, 3.33 m	3.48 m, 3.33 m	3.44 m, 3.32 m	3.44 m, 3.32 m	3.44 m, 3.31 m
27	0.80 d (6.45)	0.79 d (6.42)	0.80 d (6.47)	0.80 d (6.39)	0.79 d (6.59)	0.79 d (6.49)	0.79 d (6.50)
3-O-sugar	Glc	Glc I	Glc	Glc	Glc	Glc	Glc I
1	4.50 d (7.81)	4.51 d (7.86)	4.50 d (7.80)	4.50 d (7.80)	4.40 d (7.92)	4.47 d (7.78)	4.49 d (7.87)
2	3.39 m	3.50 m	3.40 m	3.38 m	3.19 m	3.35 m	3.53 m
3	3.59 m	3.68 m	3.62 m	3.57 m	3.49 m	3.46 m	3.56 m
4	3.52 m	3.52 m	3.51 m	3.52 m	3.87 m	3.24 m	3.38 m
5	3.31 m	3.40 m	3.35 m	3.31 m	3.36 m	3.25 m	3.30 m
6	3.79 m, 3.64 m	3.85 m, 3.64 m	3.82 m, 3.70 m	3.79 m, 3.64 m	3.83 m	3.84 m	3.78 m
	Rha I	Glc II	Rha	Rha I	Araf	Rha	Rha I
1	5.20 br s	4.47 d (7.85)	5.22 br s	5.18 br s	5.05 d (1.90)	5.19 br s	5.18 br s
2	3.93 m	3.24 m	3.66 m	3.92 m	3.98 m	3.91 m	3.38 m
3	3.66 m	3.36 m	3.89 m	3.65 m	3.53 m	3.66 m	3.58 m
4	3.39 m	3.36 m	3.38 m	3.39 m	4.09 m	3.39 m	3.92 m
5	4.13 m	3.28 m	4.13 m	4.12 m	3.63 m	4.13 m	4.11 m
6	1.24 d (6.31)	3.89 m, 3.65 m	1.23 d (6.31)	1.24 d (6.46)		1.24 d (6.26)	1.24 d (6.32)
	Rha II	Rha	Araf	Rha II			Rha II
1	4.84 br s	5.27 br s	5.02 d (1.91)	4.83 br s			4.83 br s
2	3.83 m	3.92 m	3.97 m	3.77 m			3.77 m
3	3.62 m	3.64 m	3.86 m	3.75 m			3.74 m
4	3.41 m	3.39 m	4.07 m	3.54 m			3.54 m
5	3.93 m	4.13 m	3.61 m, 3.73 m	4.05 m			4.04 m
6	1.24 d (6.31)	1.24 d (6.24)		1.29 d (6.40)			1.29 d (6.19)
				Rha III			Rha III
1				5.17 br s			5.17 br s
2				3.92 m			3.64 m
3				3.66 m			3.38 m
4				3.39 m			3.38 m
5				3.70 m			3.69 m
6				1.26 d (6.23)			1.24 d (6.32)

4 结果与讨论

中药重楼由于其良好的药理活性而逐渐受到重视,市场需求逐渐增大,而其生长缓慢,导致民间对重楼属南重楼组野生资源进行了过度采掘,使中药重楼资源遭到严重破坏^[21-22]。因此,有必要寻找中药重楼基原植物的替代。南重楼组植物根茎在市场流通中通常被当作中药重楼使用,宽叶重楼作为重楼属南重楼组的一种变种,在陕西多地与中药重楼等效替用^[22-23]。鉴于此,有必要对宽叶重楼进行更为系统的研究,为陕产宽叶重楼作为药典收录重楼的替代资源提供一定的依据。

在重楼皂苷对抗胶质瘤的活性研究方面,本课题组前期发现重楼皂苷Ⅶ可以影响耐替莫唑胺胶质瘤细胞增殖、迁移及周期阻滞^[24],重楼皂苷H可以诱导耐替莫唑胺胶质瘤 SHG44R 细胞凋亡和焦亡^[25],并通过 A1 和 A3 腺苷受体介导的途径抑制神经胶质瘤细胞增殖^[26]。本课题分离并鉴定了 7 个甾体皂苷类化合物,其中化合物 2、3、5 和 6 为首次从宽叶重楼中分离得到的甾体皂苷类成分。本课题组^[11]发现,异螺甾烷型甾体皂苷 1~7 对多种胶质瘤细胞都有抑制作用,同时在宽叶重楼中可能仍存在着一定数目的新化合物,未来将对其开展进一步的化学和药理活性研究,以明确宽叶重楼治疗疾病的药效物质基础,为其开发和代替中药重楼作为基源植物提供更多的科学依据。

参考文献

- [1] Ding YG, Zhao YL, Zhang J, et al. The traditional uses, phytochemistry, and pharmacological properties of *Paris* L. (Liliaceae): a review [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 278: 114293.
- [2] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 271-272.
- [3] 聂琴,谭君,陈乾,等.重楼皂苷化学成分及抗肿瘤作用研究进展[J].肿瘤药学,2022,12(3): 337-343.
- [4] 武珊珊,高文远,段宏泉,等.重楼化学成分和药理作用研究进展[J].中草药,2004,35(3): 110-113.
- [5] 张小力,刘芹,刘宝瑞.重楼皂苷抗肿瘤及调节肿瘤免疫微环境研究进展[J].陕西中医,2021,42(11): 1640-1643.
- [6] 门玉芝,张颖颖,杨莹,等.重楼克感滴丸影响免疫功能及体外抑菌的实验研究[J].时珍国医国药,2012,23(2): 388-389.
- [7] 中国科学院中国植物志编委会.中国植物志[M].15卷.北京:科学出版社,1976: 353-354.
- [8] 程虎印,程江雪,王艳,等.陕产宽叶重楼的生药学研究[J].中国现代中药,2019,21(2): 188-193.
- [9] 华栋,刘杨,王夏茵,等.宽叶重楼化学成分研究[J].中南药学,2015,13(1): 43-46.
- [10] Hua D, Zhang W, Lu YY, et al. Steroidal saponins and lignan glycosides from the rhizomes of *Paris polyphylla* var. *latifolia* [J]. Biochem Syst Ecol, 2018, 81: 27-29.
- [11] 刘杨.南重楼和毛重楼的化学成分研究[D].西安:中国人民解放军空军军医大学,2018.
- [12] Tian X, Feng J, Tang H, et al. New cytotoxic triterpenoid saponins from the whole plant of *Clematis lasiantha* Maxim [J]. Fitoterapia, 2013, 90(10): 233-239.
- [13] Kasai R, Okihara M, Asakawa J, et al. ¹³C-NMR study of α - and β -anomeric pairs of d-mannopyranosides and l-rhamnopyranosides [J]. Tetrahedron, 1979, 35(11): 1427-1432.
- [14] Cheng ZH, Wu T, Yu BY. Steroidal glycosides from tubers of *Ophiopogon japonicus* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2006, 8(6): 555-559.
- [15] Luo XF, Lei F, He Y, et al. The synthesis of pennogenin 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-glucopyranoside [J]. J Asian Nat Prod Res, 2012, 14(4): 314-321.
- [16] Li HZ, Ding J, Cheng CR, et al. β -L-Arabinofuranosylation conducted by 5-O-(2-pyridinecarbonyl)-L-arabinofuranosyl trichloroacetimidate [J]. Carbohydr Res, 2018, 460: 1-7.
- [17] Yan T, Wang A, Hu G, et al. Chemical constituents of *Trillium tschonoskii* Maxim [J]. Nat Prod Res, 2021, 35(20): 3351-3359.
- [18] Dolma SK, Suresh PS, Singh PP, et al. Insecticidal activity of the extract, fractions, and pure steroidal saponins of *Trillium govanianum* Wall. ex D. Don for the control of diamond-back moth (*Plutella xylostella* L.) and aphid (*Aphis craccivora* Koch) [J]. Pest Manag Sci, 2021, 77(2): 956-962.
- [19] Li H, Yang XH, Liang HX, et al. The genus *Paris* (Trilliaceae) [M]. Beijing: Science Press, 1998: 193-194.
- [20] Kang LP, Huang YY, Zhan ZL, et al. Structural characterization and discrimination of the *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and *Paris vietnamensis* based on metabolite profiling analysis [J]. J Pharmaceut Biomed, 2017, 142: 252.
- [21] 成莉,甄艳,陈敏,等.扩大重楼药用资源研究进展[J].中国中药杂志,2015,40(16): 3121-3124.
- [22] 杨光义,胡培,叶方.重楼资源分布与可持续利用研究进展[J].中国药师,2016,19(1): 159-162.
- [23] 王跃虎,牛红梅,张兆云,等.重楼属植物的药用价值及其化学物质基础[J].中国中药杂志,2015,40(5): 833-839.
- [24] 邱鹏程,薛玉叶,孙光强,等.重楼皂苷Ⅶ对替莫唑胺耐药胶质瘤细胞增殖、迁移及周期阻滞的影响[J].中南药学,2022,20(3): 477-481.
- [25] 孙光强,薛玉叶,陆云阳,等.重楼皂苷H诱导耐替莫唑胺胶质瘤 SHG44R 细胞凋亡和焦亡的作用研究[J].中南药学,2022,20(5): 973-978.
- [26] Bi L, Liu Y, Yang Q, et al. Paris saponin H inhibits the proliferation of glioma cells through the A1 and A3 adenosine receptor-mediated pathway [J]. Int J Mol Med, 2021, 47(4): 30.

(收稿日期: 2022-09-06; 修回日期: 2022-10-20)

基于海量文献挖掘的微生物 - 药物关系提取研究

肖欣怡, 吴诚堃*, 杨灿群 (国防科技大学计算机学院, 长沙 410073)

摘要: **目的** 对海量文献进行智能挖掘分析, 从非结构化文本中提取微生物与药物相互作用关系。**方法** 首先, 通过命名实体识别方法, 定位生物医学文献中的微生物与药物实体, 在此基础上, 通过专家标注构建微生物 - 药物相互作用的金标准数据集; 其次, 构建基于大规模预训练模型的门控深度学习模型, 实现对生物医学文献中句子级别的微生物与药物相互作用关系的智能识别。**结果** 本文提出的微生物 - 药物关系提取方法能够在利用少数标注数据的情况下达到 73.13% 的 F1 分值, 以较小的标注代价取得了较好的识别效果。将本文方法应用于大规模的微生物 - 药物文献集合, 并通过实例分析验证了预测结果的有效性。**结论** 本研究提出基于文献挖掘的方法, 从海量文献中对微生物与药物的关系进行了智能提取, 并从模型评估和实例验证两个方面证明了其有效性。

关键词: 文献挖掘; 微生物 - 药物关系; 关系提取

中图分类号: TP391.1, TP18 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2022)12-2722-07

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.004

Microbe-drug interactions and extractions based on large-scaled literature mining

XIAO Xin-yi, WU Cheng-kun*, YANG Can-qun (School of Computer Sciences, National University of Defense Technology, Changsha 410073)

Abstract: **Objective** To detect the microbe-drug interactions by intelligent mining on massive literature. **Methods** Firstly, the named entity recognition method was used to locate microbes and drug entities from biomedical literatures, and a gold standard data set of microbe-drug interaction was labeled manually. Secondly, a deep learning model based on a large-scale pretrained model was constructed to achieve intelligent recognition of microbe-drug interactions at the sentence level in biomedical literatures. **Results** The microbe-drug interaction method proposed in this paper reached 73.13% F1 score, indicating a good recognition effect. Finally, the method was applied to a large-scale collection of microbe-drug-related literatures, and the effectiveness of the predicted data was verified by example analysis. **Conclusion** This study proposes a literature mining framework to intelligently identify the interactions between microbes and drugs from massive biomedical literatures, and demonstrates its effectiveness from model evaluation and example validation.

Key words: literature mining; microbe-drug interaction; relation identification

微生物在人体内广泛分布, 其在人体内的平衡稳态与人类的健康状况联系紧密^[1], 扮演着营养资源的供给者^[2]或代谢者^[3]、病原微生物的防御者^[4]等多重角色。微生物与药物的关系是复杂多样的, 一方面, 致病菌或病毒可能引起严重的人类疾病, 青霉素、阿司匹林等抗菌药物的出现和使用为其提供了治疗的手段; 另一方面, 抗菌

药物的大范围长期使用也引起了耐药性等问题, 出现病菌和病毒对药物的敏感性降低的现象, 从而导致药物疗效的下降。

对于微生物的研究, 传统生物学方法是由领域专业人员通过各种生物技术对微生物在人体内丰度进行研究^[5]。这些技术实验 (也称为“湿实验”) 通常操作难度较高、实验周期较长, 并

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (No. 31501073)。

作者简介: 肖欣怡, 女, 硕士研究生, 主要从事生物医药文献挖掘研究工作, email: 841384873@qq.com *通信作者: 吴诚堃, 男, 博士, 副研究员, 主要从事高性能生物医药应用研究, email: chengkun_wu@nudt.edu.cn

且对实验环境要求严苛。相关实验的过程、结果与研究的结论通常以科学文献的形式发表在专业的学术期刊或学术会议上。因此,有大量的微生物相关知识以非结构化文本的形式存储在生物医学文献中。目前主流的生物医学文献数据库主要包括对生物医学文献摘要进行存档的 PubMed 数据库和记录了生物医学文献全文存档的 PMC (PubMed Central) 数据库。PubMed 中收录了超过 3 千万篇摘要,PMC 数据库存档了超过 700 万篇全文。但是,由于这些海量的生物医学文献绝大部分是以非结构化的文本形式存储的,许多蕴含在其中的知识尚未得到充分的挖掘。

针对微生物-药物相关知识,目前的知识提取方法主要是人工对少量文献进行审编从而提取相关的知识。有研究收集整理了 1500 篇生物医学文献中的微生物与药物的关联数据,建立了第一个微生物-药物关联数据库 MDAD^[6]。Biofilms 数据库^[7]采用支持向量机算法进行抑制预测,最终记录了 5000 多种抗生物膜剂,以及这些药物靶向的 140 多种微生物。DrugVirus 数据库^[8]在免费提供的数据库中总结了靶向人类病毒的药物信息,构建了用于探索和分析广谱抗病毒药物和含广谱抗病毒药物-药物组合的综合交互式资源。通过领域专业人士手工从科学文献中收集信息的方法,虽然可以获取到高质量的生物医学知识,但通常效率较低,并且对标注者的专业背景和知识技能要求较高,获取数据的成本较高。总体而言,前述这些数据库的数据量极为有限,因此,需要我们探索利用自动化/半自动化的方法去获取更加全面的微生物-药物知识。

从文献中手动提取信息无法对大量的生物医学文献快速进行处理,仅仅依靠人工阅读处理是不现实的。随着人工智能技术的不断发展,计算机可以高效地对文本或图像中的信息进行提取。通过自动化的方式对文本中信息收集的必要性促进了自然语言处理工具的快速发展^[9],例如 DNorm^[10]在疾病实体的提取上具有较好的表现,tmChem^[11]可用于提取文本中的化合物实体,基于 Web 的 PubTator^[12]综合了多种实体识别工具并提供了对文本中生物医学实体提取的接口,PKDE4J^[13]用于对句子中两个实体的关系进行提取,以及 BioBERT^[14]等新的生物医学文本预训练模型。Park 等^[15]基于文本挖掘方法从大量生物医学文献摘要中提取微生物-疾病相互作用关系。该方法首先判断句子中两实体是否存在关联,然后对句子中两实体的关系描述词进行识别。另外,有研究尝试引入迁移学习的思想,利用相关领域

的大量训练数据,通过构建深度学习模型自动挖掘生物医学文献中的微生物-疾病关系,并利用预测结果构建了微生物-疾病关系数据库 MDIDB^[16]。因此,将文献挖掘应用到微生物-药物关系的研究中,可以更好地服务于大数据分析,快速高效地提取文献中结构化的微生物-药物知识。

目前,许多研究从图论的视角在现有微生物-药物关系数据的基础上构建异构网络,预测新的微生物-药物关系,例如基于相似性网络和 KATZ 指标计算的 HMDAKATZ^[17],基于多模态属性图和变分图自动编码器 Graph2MDA^[18]。这些网络通常采用的是二元网络,对于关系的分类较为简单。因此,通过文献挖掘的方式,不仅拓展微生物-药物关系类别以适用于多元关系预测,而且增加数据体量从而帮助预测更多未探索的微生物-药物关系,有利于后续的研究工作。

1 数据收集与处理

本文采用的数据处理流程主要包括原始文献收集、文本预处理、文本分析 3 个步骤。

1.1 原始文献收集

原始文献收集主要是收集与微生物相关的生物医学文献,本文采用 PubMed 和 PMC 文献数据库作为原始文献来源。PubMed 提供对关键词搜索结果的前一万篇文献的 PMID 列表供用户下载。在 PubMed 中检索“microorganism”“microbe”“microbial”“drug targets”“drug microbe”和“chemical”六组关键词得到 60 000 个生物医学文献的 PMID,去重后共 52 987 个 PMID,每一个 PMID 对应一篇文献。

通过 NCBI 提供的 ID 转换工具可获得其在 PMC 数据库中有全文记录的文献的 PMCID,并利用 FTP 工具对摘要和全文的 XML 文件进行下载和解析。对每篇文献的 PMID、摘要/全文进行存储。

1.2 实体提取

从文献中提取相关实体是文本预处理步骤的重点。本文主要关注微生物和药物实体,并且根据不同类型实体的特点,采用不同的工具和方法进行提取。图 1 展示了对微生物-药物关系进行文献挖掘的文本预处理流程。

1.2.1 微生物实体识别 对于微生物的实体提取,目前还没有微生物相关的实体提取工具,并且微生物的命名相比其他实体来说更为规范和稳定,因此采用微生物字典(见表 1)与物种识别工具 LINNAEUS 相结合的方法提取文献中人体相关的微生物。本文从现有微生物相关数据库中收集与整理了共 4277 条微生物信息,并将其作为

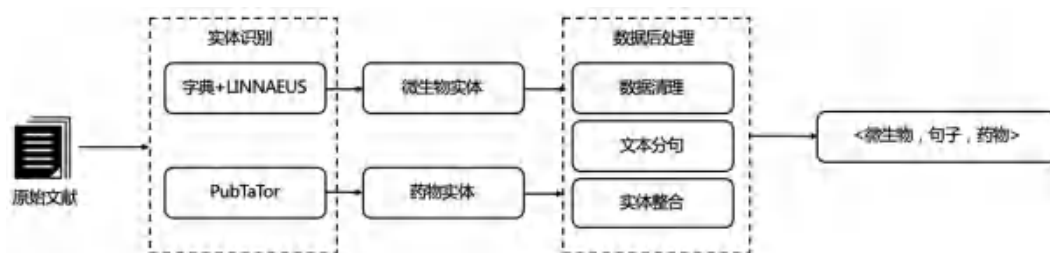


图1 文本预处理流程

Fig 1 Process of text preprocessing

本文中与人相关微生物的研究范围。

表1 微生物字典来源数据库

Tab 1 Source databases of microbe dictionary

数据库	访问网址	微生物数量
HMDAD	http://www.cuilab.cn/hmdad	292
VMH	https://www.vmh.life	819
Disbiome	https://disbiome.ugent.be	1622
MicroPhenoDB	http://www.liwzlab.cn/microphenodb	1782

1.2.2 药物实体识别 对于药物的实体识别, PubTaTor 提供了能快速提取文本中化合物和药物实体及相关归一化 ID 的 API 接口。本文重点关注已获批的药物, 但获取的实体识别结果包含了药物实体和化合物实体, 因此, 对于未收录在药物数据库 DrugBank 中的化合物不予保留。本文研究的药物范围包括从 DrugBank 数据库中选取的 14 594 条药物信息。

1.2.3 实体整合 通过上述命名实体识别方法提取得到文献中的微生物与药物实体, 并将其整合为描述微生物与药物关系的结构化三元组形式。本文中仅考虑句子级别的微生物-药物关系, 所以首先要对文献进行分句。实验中发现, 一些带有句号的缩写例如“spp.”“sp.”以及一些文献撰写中常用词组的缩写“Fig.”“et al.”等易被误判为句子结尾。因此, 在分句后对句子末尾含有对微生物后缀“spp.”“sp.”的句子与句子列表中的下一条句子进行合并。

在分句的同时将每篇文献中提取出来的微生物实体、药物实体按照位置对应到具体的句子当中, 从而获得<微生物, 句子, 药物>三元组。对于句子长度分布的长尾性, 本文中只保留小于 64 个词的句子的三元组。并且为了更好地追踪文献和微生物/药物实体, 将三元组结合文献 PMID, 微生物 ID, 药物 ID 以 JSON 格式保存。

1.3 数据标注与实体泛化

有监督的深度学习模型需要高质量的标注数据, 而目前相关研究缺少对微生物-药物相互作用关系的统一定义以及带标注的标准数据集。本文从微生物和药物相互之间产生的积极与消极影

响出发, 将微生物与药物相互作用关系定义为以下 5 种类别:

- ① D_POSITIVE: 指药物对微生物带来积极影响, 例如药物的服用促进了微生物的丰度, 药物的使用促进了某些微生物的生长等;
- ② D_NEGATIVE: 指药物对微生物带来消极影响, 例如药物的服用对某些致病微生物的抵抗作用, 药物的使用降低了微生物的丰度等;
- ③ M_POSITIVE: 指微生物对药物带来积极影响, 例如微生物可以促进人体对药物的吸收或者在人体内直接生产具有治疗效果的化合物等;
- ④ M_NEGATIVE: 指微生物对药物带来消极影响, 例如微生物对药物含量的降低作用, 微生物对药物的耐药性增加, 微生物的代谢消耗药物等;
- ⑤ NA: 未包含以上 4 种关系。

本文采用专家标注的方法构建了数据集大小为 1531 条数据的微生物-药物关系数据集, 其类别分布如图 2 所示。从图中可以看到, 5 个类别中数量最多的是 NA 类别, 占比 36%, 数量最少的是药物对微生物的积极影响 D_POSITIVE 类别, 占比 6%, 整体看来各个类别的分布是不平衡的。

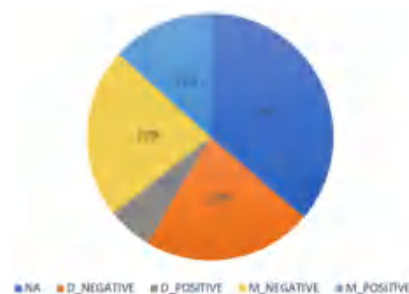


图2 标注数据集类别分布

Fig 2 Distribution of annotated dataset

为了保证模型的泛化性, 本文对句子中的微生物、药物实体词用泛化词进行替换。具体是将一个实例中的目标微生物和药物实体词分别替换成字符串“< MMICRO >”和“< DDRUG >”, 并将句子中出现的非目标微生物/药物实体替换成“MMICRO_i”和“DDRUG_i”, 其中 i 表示句子

中第 i 个微生物/药物实体词。对实例 “All *Staphylococcus* isolates were susceptible to gentamicin, and the second and third most susceptible isolate numbers

were to tobramycin and kanamycin (97.78% each) and streptomycin (95.56%), respectively.” 中的不同候选微生物/药物实体对的替换如表 2 所示。

表 2 微生物/药物实体泛化示例

Tab 2 Examples of microbe/ drug entity generalization

候选微生物药物对	实体泛化
(<i>Staphylococcus</i> , gentamicin)	All < MMICRO > isolates were susceptible to < DDRUG >, and the second and third most susceptible isolate numbers were to DDRUG0 and DDRUG1 (97.78% each) and DDRUG2 (95.56%), respectively.
(<i>Staphylococcus</i> , tobramycin)	All < MMICRO > isolates were susceptible to DDRUG0, and the second and third most susceptible isolate numbers were to < DDRUG > and DDRUG1 (97.78% each) and DDRUG2 (95.56%), respectively.
(<i>Staphylococcus</i> , kanamycin)	All < MMICRO > isolates were susceptible to DDRUG0, and the second and third most susceptible isolate numbers were to DDRUG1 and < DDRUG > (97.78% each) and DDRUG2 (95.56%), respectively.

2 基于 BioBERT 的微生物-药物关系提取

2.1 模型框架 (见图 3)

关系提取任务主要是对两个实体之间的关系进行分类。本文中综合利用大规模预训练模型 BioBERT^[14] 和 Gumble Tree-GRU^[19] 对上下文语境以及句子树状语法信息进行编码, 并基于深度学习模型构建微生物-药物关系分类器。

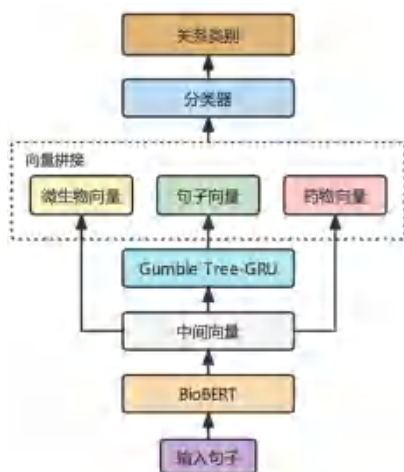


图 3 MDrl-BERT 模型结构

Fig 3 Structure of MDrl-BERT

2.1.1 BioBERT 编码层 BioBERT 通过大规模生物学语料学习得到预训练模型。本文采用 BioBERT 模型获取句子的特征表示。不同于常见的词嵌入, BioBERT 中对词的切分采用的是 WordPiece 分词方式, 将词表以外的词分解成多个由词表内词组成的小单元。本文中修改了 BioBERT 的词表来避免泛化词被分词, 并且将新定义类别 < MMICRO >, < DDRUG >, DDRUG, MMICRO 加入词表。将句子映射到词表 id 得到 x_{input} 后, 记录微生物和药物实体词的索引位置, 再输入 BioBERT。为了缓解过拟合的问题, 在 BioBERT 的输出加入 LayerNorm 层进行归一化, 具体公式见式 (1) ~ (2)。

$$\text{LayerNorm}(x) = \frac{[\bar{x} - E(x)]}{\sqrt{\text{Var}(x) + \varepsilon}} \quad (1)$$

$$h = \text{LayerNorm}[\text{BioBERT}(x_{\text{input}})] \quad (2)$$

2.1.2 Gumble Tree-GRU 编码层 为了充分理解句子的语义信息, 本文利用 Gumble Tree-GRU 来对句子的语法信息进行树状结构编码。Tree-GRU 是利用类似 GRU 的门控机制对树节点之间的信息传递进行控制, 简化 Tree-LSTM, 减少了模型参数量, 具体计算公式见式 (3) ~ (7)。

$$i_t = \sigma(W_i h_{t-1}^l + U_i h_{t-1}^r + b_i) \quad (3)$$

$$f_t = \sigma(W_f h_{t-1}^l + U_f h_{t-1}^r + b_f) \quad (4)$$

$$r_t = \sigma(W_r h_{t-1}^l + U_r h_{t-1}^r + b_r) \quad (5)$$

$$\tilde{h}_t = \tanh(W_h(r_t \odot h_{t-1}^l) + U_h(r_t \odot h_{t-1}^r) + b_h) \quad (6)$$

$$h_t = i_t \odot \tilde{h}_t + f_t \odot (h_{t-1}^l + h_{t-1}^r) \quad (7)$$

其中, h_{t-1}^l 与 h_{t-1}^r 为上一层节点的左子节点和右子节点表示的向量, σ 表示激活函数, $\odot$ 表示矩阵乘法。Gumble Tree-GRU 的主要思想是利用贪心算法来选择组合节点。在第 $(t-1)$ 层中, 首先对相邻的两个节点进行组合得到第 t 层的候选节点, 随后分别计算每一个组合的分数 π_i , 公式见式 (8)。

$$\pi_i = W_\pi \tanh(V_\pi q_i) \quad (8)$$

其中, q_i 表示 h_t 中的第 i 个向量。最后使用 Gumble Softmax 每个节点的概率。在每一层贪心地选取 y 最大的候选节点作为新的节点, 其余节点保持和第 $(t-1)$ 层中一样, 计算方式见式 (9), 通过多次迭代, 最后得到一个句子树的根节点向量 $\text{sent}_{\text{feat}}$ 作为句子的语法树表示。

$$y_i = \frac{\exp[\log(\pi_i) + g_i/\tau]}{\sum_{j=1}^k \exp[\log(\pi_j) + g_j/\tau]}, i = 1, \dots, k \quad (9)$$

2.1.3 关系分类层 为了更好地捕捉两个实体在句子之中的关系描述, 将微生物实体向量、句子向量、药物向量进行拼接组合, 从而更好地表示

微生物实体和药物实体之间的关系, 计算方式见式 (10), $micro_{feat}$ 表示 BioBERT 输出向量中微生物实体所在索引的词向量, $drug_{feat}$ 表示 BioBERT 输出向量中药物实体所在索引的词向量。

$$r = \text{concat}(micro_{feat}, sent_{feat}, drug_{feat}) \quad (10)$$

最后对拼接向量进行分类, 利用 ReLU 作为激活函数以及 Softmax 作为概率计算函数, 具体计算如式 (11) 所示, 取概率最高的 y 作为最终类别。

$$p(y|x) = \text{Softmax}[W_2 \text{ReLU}(W_1 r + b_1) + b_2] \quad (11)$$

本文中采用真实值与预测值的交叉熵作为损失函数, 对模型参数采用 AdamW 来进行优化, 同时采用线性学习率优化的方式来增加模型训练时的稳定性。

2.2 实验结果

本文使用 PyTorch 框架开发模型代码, 模型的性能表现采用精确率 (Precision)、召回率 (Recall) 和 F1 值进行评估, 其中 F1 表示对精确率和召回率的调和平均。由于涉及多个类别, 因此计算微平均值来衡量整体性能, 计算公式见式 (12) ~ (14)。

$$\text{Precision}_{\text{Micro}} = \frac{\sum_{i=1}^k \text{TP}_i}{\sum_{i=1}^k \text{TP}_i + \sum_{i=1}^k \text{FP}_i} \quad (12)$$

$$\text{Recall}_{\text{Micro}} = \frac{\sum_{i=1}^k \text{TP}_i}{\sum_{i=1}^k \text{TP}_i + \sum_{i=1}^k \text{FN}_i} \quad (13)$$

$$F1 = \frac{2 \times \text{Precision}_{\text{Micro}} \times \text{Recall}_{\text{Micro}}}{\text{Precision}_{\text{Micro}} + \text{Recall}_{\text{Micro}}} \quad (14)$$

模型采用的微生物-药物数据集中每一个实例都有一个特定的关系类别。实验中将数据集划分为训练集 (包含 1000 样本)、验证集 (包含 200 样本) 和测试集 (包含 331 样本)。

将模型训练的迭代次数设置成 10 次, 模型的 dropout 比率设置为 0.5, L2 正则化比率设置为 0.2, AdamW 优化器学习率设置为 0.0003, BioBERT 层学习率设置为 0.000 01, 模型训练的批大小设置为 8。相关参数通过手动调参和经验确定。

将本文模型与面向药物-药物关系提取的模型 BERE^[19] 进行比对, Wu 等^[16] 将 BERE 模型应用到了微生物-疾病关系提取中获得了较好的效果。MDrI 表示模型在微生物药物关系数据集上的表现。最终得到实验结果如表 3 所示, 表中结果均为在测试集上的结果。

表 3 结果显示, 从深度学习常用的评估指标精确率、召回率和 F1 值来看, 本文中的微生物-

表 3 BERE 与 MDrI-BERT 性能比较

Tab 3 Performance comparison of BERE and MDrI-BERT

模型	精确率 /%	召回率 /%	F1/%
BERE (MDrI)	60.03	68.72	64.27
MDrI-BERT (MDrI)	71.01	75.38	73.13

药物关系数据集在 MDrI-BERT 上表现要比 BERE 模型更加出色, 取得了 71.01% 的精确率, 并且在 F1 值上也比 BERE 高了约 9%。

2.3 错误分析

本文利用模型预测结果的混淆矩阵对测试集中被错误预测的实例进行了检查和分析, 如图 4 所示。混淆矩阵的主对角线表示每个类别中分类正确的实例数量, 其他区域表示分类错误的实例数量分布。

从图 4 中可以看到模型在 D_POSITIVE 类别上的表现较差, 可能是由数据不平衡所导致。D_POSITIVE 类别的实例数量仅占有所有数据的 6%, 少量的数据难以符合真实的数据分布, 从而导致模型能学到的信息较少, 对该类别的分类能力较差。图 4 中第一列显示部分其他类别被错误判断为 NA。我们统计了测试集中的类别数目, 测试集 331 个样本中共包含 195 个非 NA 类别 (D_POSITIVE, D_NEGATIVE, M_POSITIVE, M_NEGATIVE 类别) 的样本, 其中 33 个样本被错误识别为 NA 类别。这是由于训练数据中各个类别的不平衡, 从而降低了模型的召回率。

本文检查了 D_NEGATIVE 类别中被错误识别成 NA 的 26 个实例的句子, 发现从句子结构的角度来看, 这些句子大部分具有复杂从句结构并且包含表达消极影响含义的词汇, 或者存在较长的并列结构, 例如:

例 1: "A time kill assay was performed as above for < MMICRO > exposed to equal concentrations of NPBD and < DDRUG > sampled at 0, 4, 8 and 24 h." (消极含义)。

例 2: "It has recently proved to destroy the integrity of the cell membrane of carbapenem resistant < M-MICRO >, evidenced by a pronounced reduction in the intracellular < DDRUG > concentration, membrane potential, and pH with concomitant alteration in the morphology of the cell." (并列结构)。

例 3: "Moreover, furfural could increase the toxicity of < DDRUG > in < MMICRO > and the toxicity of phenols in Escherichia coli." (并列结构)。

从关系类别的角度来看, 模型不仅需要判断微生物与药物之间是否产生积极或消极作用, 而且需要进一步判别两者之间的主从关系, 即判断

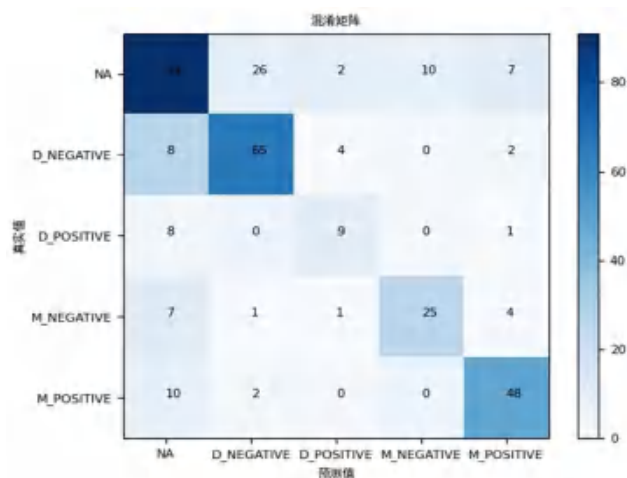


图4 微生物-药物关系测试集结果分布

Fig 4 Distribution of microbe-drug interactions on test set

微生物对药物产生影响还是药物对微生物产生影响,从而大大增加了模型识别的难度。除此之外,5个类别在数据中的分布的不平衡性、标注数据的有限规模也限制了精确率和召回率的提升。

从文本长度分布来看,模型在不同长度的句子上,对关系的识别性能不同。本文对测试集和验证集 531 个实例的预测结果进行统计,分析模型 F1 值与句子长度分布的关系,结果如图 5 中所示。由图 5 可知,模型在处理句子长度处于 40 至 50 个词的样本时表现较差,只取得了 66% 的 F1 值。通过检查发现,这些样本大多句式复杂,从句数量较多,并且类别大多为 NA,类别特征不明显,阻碍了模型性能的提升。另外,标注数量的有限性也对模型性能带来了一定的困难。相关结果可为后续工作提供良好的基础。

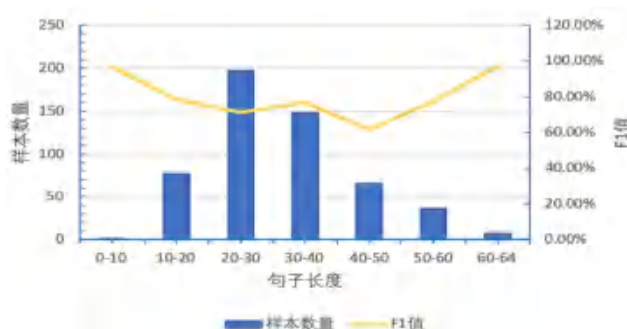


图5 基于文本长度的结果分布

Fig 5 Distribution of results based on sentence length

3 预测结果实例验证

本研究利用 MDri-BERT 模型对生物医学文献挖掘所提取的<微生物,句子,药物>实例进行分类得到预测数据共 48 530 条,表 4 中记录了预测结果中各个关系类别的数量分布。为了验证预测结果的正确性,从预测数据中抽取了部分数据进行实例分析。

表 4 预测结果类别分布

Tab 4 Category distribution of predicted results

类别	数量
NA	25 594
D_NEGATIVE	9314
D_POSITIVE	1230
M_NEGATIVE	5256
M_POSITIVE	7136

以药物万古霉素 (vancomycin) 为例,通过统计发现,预测结果中 7 次将葡萄球菌 (*Staphylococcus*) 与万古霉素的相互作用关系识别为 D_NEGATIVE 类别。通过检索文献发现,万古霉素常用于治疗被感染葡萄球菌的患者。此外有 158 个关于金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 对万古霉素产生消极作用 (M_NEGATIVE) 的预测实例。文献检索结果发现,万古霉素原先被成功用于治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA),但是近年来,开始发现了耐万古霉素金黄色葡萄球菌,意味着万古霉素对金黄色葡萄球菌的治疗作用逐渐下降。

新型冠状病毒从爆发以来严重地影响到人们的生活。本文针对新型冠状病毒,从出现次数大于 30 次的微生物-药物关系中获得了对新型冠状病毒产生消极影响 (D_NEGATIVE) 的 5 种药物:氯喹 (chloroquine)、羟氯喹 (hydroxychloroquine)、利巴韦林 (ribavirin)、槲皮素 (quercetin)、洛匹那韦 (lopinavir)。

为了验证预测结果的正确性,本文以这 5 种药物和 SARS-CoV-2 作为关键词,在 PubMed 数据库中检索相关文献,探索其对新型冠状病毒的治疗作用。表 5 展示了对每种药物的一条验证文献,且该文献未包含在文献挖掘的原始文献列表中。其证明了本文所提出模型的预测结果具有一定的正确性和参考价值。利用文献挖掘可以快速地将海量生物医学文献中的非结构化的文本转化为结构化的知识,为科研人员提供高效的信息获取渠道,从而提高科研的效率。

4 结论

目前,大部分微生物-药物数据库是以手工方式构建,覆盖范围有限,为更加全面深入地研究微生物与药物的相互作用,需要研究从海量相关文献自动提取微生物-药物相互作用知识的方法。本文的主要目标是利用文献挖掘方法,实现从大量非结构化生物医学文献自动识别微生物-药物关系。首先,采用命名实体识别方法标注生物医学文献中的药物和微生物实体,再经过数据清洗、实体位置对齐等步骤,将文本数据表示为结构化三元组形式的样本。从领域知识出发,本文对微

表 5 药物与新型冠状病毒相互作用关系预测结果的文献验证

Tab 5 Literature validation of drug-SARS-CoV-2 predicted interactions

药物	针对药物与新冠病毒的研究文献标题	PMID	是否在原始文献列表中
氯喹	Review: hydroxychloroquine and chloroquine for treatment of SARS-CoV-2 (COVID-19)	32363212	否
羟氯喹	Review: hydroxychloroquine and chloroquine for treatment of SARS-CoV-2	32363212	否
利巴韦林	Ribavirin therapy for severe COVID-19: a retrospective cohort study	32712334	否
槲皮素	Anti-inflammatory potential of quercetin in COVID-19 treatment	33509217	否
洛匹那韦	Lopinavir-ritonavir treatment for COVID-19 infection in intensive care unit	32809882	否

生物-药物相互作用类别进行了定义,并通过人工的方式标注了高质量数据集,同时构建了基于大规模预训练模型的门控深度学习模型有效地从非结构化的生物医学文献中提取出结构化的微生物-药物相互作用知识。另外,通过在线文献检索的方式对模型预测的微生物-药物关系进行验证,证明了本文提出的微生物-药物关系预测方法的有效性。未来的工作,将考虑引入跨句的关系提取来扩大两个实体之间关系描述的范围。

参考文献

- [1] The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome [J]. Nature, 2012, 486 (7402): 207-214.
- [2] Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine [J]. Science, 2005, 307 (5717): 1915-1920.
- [3] Gomes AC, Hoffmann C, Mota JF. The human gut microbiota: metabolism and perspective in obesity [J]. Gut Microbes, 2018, 9 (4): 308-325.
- [4] Bäckhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage [J]. PNAS, 2004, 101 (44): 15718-15723.
- [5] Zhang M, Ma W, Zhang J, et al. Analysis of gut microbiota profiles and microbe-disease associations in children with autism spectrum disorders in China [J]. Sci Rep, 2018, 8 (1): 1-9.
- [6] Sun Y, Zhang D, Cai S, et al. MDAD: a special resource for microbe-drug associations [J]. Front Cell Infect Mi, 2018, 8: 424.
- [7] Rajput A, Thakur A, Sharma S, et al. aBiofilm: a resource of anti-biofilm agents and their potential implications in targeting antibiotic drug resistance [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46 (D1): D894-D900.
- [8] Andersen PI, Ianevski A, Lysvand H, et al. Discovery and development of safein-man broad-spectrum antiviral agents [J]. Int J Infect Dis, 2020, 93: 268-276.
- [9] Singhal A, Leaman R, Catlett N, et al. Pressing needs of biomedical text mining in biocuration and beyond: opportunities and challenges [J]. Database (Oxford), 2016, 2016: 2016baw161.
- [10] Leaman R, Dogan RI, Lu Z. DNorm: disease name normalization with pairwise learning to rank [J]. Bioinformatics, 2013, 29 (22): 2909-2917.
- [11] Leaman R, Wei C, Lu Z. tmChem: a high performance approach for chemical named entity recognition and normalization [J]. J Cheminformatics, 2015, 7 (1): 1-10.
- [12] Wei C, Allot A, Leaman R, et al. PubTator central: automated concept annotation for biomedical full text articles [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47 (W1): W587-W593.
- [13] Song M, Kim WC, Lee D, et al. PKDE4J: entity and relation extraction for public knowledge discovery [J]. J Biomed Inform, 2015, 57: 320-332.
- [14] Lee J, Yoon W, Kim S, et al. BioBERT: a pre-trained biomedical language representation model for biomedical text mining [J]. Bioinformatics, 2020, 36 (4): 1234-1240.
- [15] Park Y, Lee J, Moon H, et al. Discovering microbe-disease associations from the literature using a hierarchical long short-term memory network and an ensemble parser model [J]. Sci Rep, 2021, 11 (1): 1-12.
- [16] Wu C, Xiao X, Yang C, et al. Mining microbe-disease interactions from literature via a transfer learning model [J]. BMC Bioinformatics, 2021, 22 (1): 1-15.
- [17] Zhu L, Duan G, Yan C, et al. Prediction of microbe-drug associations based on katz measure [C]. IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine, 2019: 183-187.
- [18] Deng L, Huang Y, Liu X, et al. Graph2MDA: a multi-modal variational graph embedding model for predicting microbe-drug associations [J]. Bioinformatics, 2022, 38 (4): 1118-1125.
- [19] Hong L, Lin J, Li S, et al. A novel machine learning framework for automated biomedical relation extraction from large-scale literature repositories [J]. Nat Mach Intell, 2020, 2 (6): 347-355.

(收稿日期: 2022-05-17; 修回日期: 2022-05-25)

超声介导载和厚朴酚超声微泡的制备与体内评价

王家玉, 李琳, 陈琳* (重庆医科大学附属妇女儿童医院药学部, 重庆市妇幼保健院药学部, 重庆 401147)

摘要: **目的** 研究超声介导载和厚朴酚超声微泡的体外性质以及对小鼠 H22 皮下移植瘤的抑制效果。**方法** 采用机械震荡法制备具有超声响应击破特性的和厚朴酚超声微泡, 使用星点效应面法对其处方进行优化。检测其一般性质, 包括载药率、包封率、体外释药性能、显影性能等。建立小鼠 H22 皮下移植瘤模型, 将荷瘤小鼠随机分为给药组和对照组, 隔日治疗 1 次, 连续治疗 7 d 后, 绘制各组小鼠的肿瘤生长曲线并计算肿瘤生长抑制率。**结果** 优化处方制备的和厚朴酚超声微泡载药率为 $(1.09 \pm 0.40)\%$, 包封率为 $(74.02 \pm 3.61)\%$, 平均粒径为 (308.6 ± 35.2) nm, 水囊实验微泡呈现良好的超声显影特性。治疗期间, 对照组的肿瘤体积增长较快, 而超声介导载和厚朴酚超声微泡组小鼠肿瘤增长最为缓慢。与超声处置空白微泡组相比, 超声介导载和厚朴酚超声微泡组小鼠的肿瘤质量显著减小, 具有统计学差异。**结论** 超声响应和厚朴酚微泡可抑制小鼠 H22 皮下移植瘤的生长, 在药物靶向递送方面展现出良好应用前景。

关键词: 和厚朴酚; 超声; 微泡; 体内评价

中图分类号: R445.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2729-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.005

Preparation and in vivo evaluation of honokiol loaded ultrasound microbubble

WANG Jia-yu, LI Lin, CHEN Lin* (Department of Pharmacy, Women and Children's Hospital of Chongqing Medical University, Department of Pharmacy, Chongqing Health Center for Women and Children, Chongqing 401147)

Abstract: Objective To determine the in vitro characteristics of honokiol loaded ultrasound microbubbles as well as their inhibitory effect on the H22 subcutaneous transplantation tumor in mice. **Methods** Mechanical shock method was used to prepare the honokiol ultrasound microbubbles. The response surface methodology was used to optimize the prescription. General properties were detected, including the loading capacity of drug, the encapsulation efficiency of drug, in vitro drug release performance and ultrasonic imaging. The H22 subcutaneous implanted tumor mouse model was established. The implanted mice were randomly divided into an administration group and a control group. The mice were treated every other day for consecutive 7 days. The tumor growth curve of each group was obtained and the tumor growth inhibition rate was calculated. **Results** The optimized prescription of honokiol ultrasound microbubbles was obtained. The loading capacity of drug was $(1.09 \pm 0.40)\%$, the encapsulation efficiency was $(74.02 \pm 3.61)\%$, and the average particle size was (308.6 ± 35.2) nm. During the treatment, the tumor volume of the control group increased rapidly, while the tumor growth of mice in the honokiol ultrasound microbubble group grew slowly. Compared with the blank microbubble group, the weight of tumor in the mice in honokiol ultrasound microbubble group were much smaller. **Conclusion** Honokiol ultrasound microbubbles can inhibit the growth of H22 subcutaneous tumor, showing good application prospects in drug targeted delivery.

Key words: honokiol; ultrasound; microbubble; in vivo evaluation

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No.8180112007); 重庆市渝中区科技局基础与前沿课题 (No.20180157); 重庆市妇幼保健院院级科研课题 (No.2020YJQN04)。

作者简介: 王家玉, 男, 硕士, 主管药师, 主要从事药物新剂型与新技术方面的研究, email: wongjiajia90@163.com *通信作者: 陈琳, 女, 博士, 主任药师, 主要从事临床药理学方面的研究, email: clfxmm@163.com

和厚朴酚(honokiol, HK)是从木兰科植物厚朴中提取的有效活性成分,属于脂溶性药物,具有抗炎、抗菌、抗病毒等药理作用^[1]。近年来多项研究表明, HK 对肿瘤新生血管的多个靶点具有活性,能够抑制乳腺癌、胃癌、卵巢癌等多种肿瘤细胞的生长,在抗肿瘤治疗中毒副作用低,是一种具有开发潜力的抗肿瘤小分子。但其水溶性低、易被氧化分解、消除半衰期短、生物利用度差,临床应用受到诸多限制^[2-3]。

载气微泡是一种新的药物递送体系,将携载药物和惰性气体的微泡注射入人体内部,然后在外部给予超声辐照,使其在靶部位被击破,进而实现药物在目标组织的靶向聚集,更好地发挥临床治疗作用。已有大量研究证实,磷脂载气微泡具有靶向释放药物、超声显影、稳定性高、生物相容性好以及生物安全性高等特性^[4-7]。

本课题组考虑构建一种载 HK 的超声微泡(honokiol liposome loaded ultrasound microbubble, HKMB)。选用 HK 为模型药物,以脂质微泡作为一种药物载体,将 HK 包入微泡,制备 HKMB,检测其特性。运用超声靶向微泡破裂使药物定位释放在靶组织,并通过体外和体内实验探讨其靶向释药特性。构建小鼠皮下移植瘤模型,评价 HKMB 在体内对肿瘤生长抑制作用。本研究为 HK 的靶向治疗提供了新思路。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

UV/Vis-2600 紫外分光光度计(日本岛津公司); Sartorius A200S 电子分析天平(德国赛多利斯公司); DF-101S 集热式恒温磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司); DKZ-450 型电热恒温振荡水槽(上海森信实验仪器有限公司); 光学显微镜(ECLIPSE 50i, 日本尼康公司); 多普勒超声诊断仪 Mylab90(意大利 Esaote 公司); 低温高速离心机 Fresco21(美国 Thermo Scientific Heraeus); 基因转染治疗仪(LIFU 仪, 重庆医科大学超声影像研究所自制, 频率 1 MHz, 焦距为 160 mm, 功率在 1.1 ~ 8.5 W 内可调)。

1.2 试剂

HK(质量分数 ≥ 98%, 西安昊轩生物科技有限公司); 磷脂(Lec, 质量分数 99%, 国药集团化学试剂有限公司); 甘油(Gly, 重庆川东试剂厂); 氟碳气体(全氟正戊烷, ElfAtochem 公司); H22 细胞由重庆医科大学超声影像研究所馈赠; 实验用水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。雄性 KM 小鼠, 体质量(20 ± 2) g, 动物合格证书 SCXK(渝) 2014-0003(重庆医科大学实验动物中心)。

2 方法与结果

2.1 HKMB 的制备

2.1.1 空白微泡(MB)的制备 采取机械震荡法制备微泡^[8-9], 称取适量 Lec、Gly, 加入 0.5 mL PBS (pH 7.4) 溶液, 然后将装有氟碳气体的针管插入液面下层注入其中排出空气, 50 °C 水浴孵化 2 h 后, 迅速涡旋 1 min, 放入冰水中固化, 2000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃去下层, 上层放入 4 °C 保存。

2.1.2 HKMB 的制备 称取适量 Lec、Gly 和 HK 原料药, 按照“2.1.1”项下方法制备。

2.2 HKMB 标准曲线

精密称取 HK 原料药 10.0 mg, 用无水乙醇定容至 50 mL 后, 分别取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 于 5 mL 量瓶中, 无水乙醇定容, 测定吸光度值(A)。根据紫外扫描图谱, HK 的最大吸收波长为 294 nm, 该波长处其他辅料对 HK 的含量测定基本无干扰。以吸光度值对质量浓度(C, μg·mL⁻¹)作线性回归, 得到标准曲线方程 $A = 0.1216C - 0.0014$, $r = 0.9998$, 表明 HK 在 4.0 ~ 28.0 μg·mL⁻¹ 内吸光度值与质量浓度线性关系良好。

2.3 HKMB 包封率和载药率的测定

取适量 HKMB 混悬液, 用 50% 乙醇溶液定容至 10 mL, 在 294 nm 处测定其吸光度值, 并计算出微泡中 HK 含量。按照下列公式计算得包封率(EE)和载药率(LE)。

EE 是微泡中所包载的 HK 含量占投入 HK 总量的百分比。LE 是微泡中所包载 HK 质量与 Lec 质量的比值, 按照下列公式计算。

$$EE(\%) = \frac{W_{\text{微泡中 HK}}}{W_{\text{投入 HK 总量}}} \times 100\%$$

$$LE(\%) = \frac{W_{\text{微泡中 HK}}}{W_{\text{Lec}}} \times 100\%$$

2.4 星点设计-效应面法处方优化

2.4.1 因素水平及评价指标 选择 Lec(X_1)、Gly(X_2)作为考察对象, 每个因素均设 5 个水平, 3 个因素, 见表 1。选择 EE 为评价指标。

表 1 星点设计的因素和水平

Tab 1 Factor and level of the central composite design

因素	水平				
	- 1.414	- 1	0	1	1.414
X_1 (Lec/%)	3	3.59	5	6.41	7
X_2 (Gly/%)	40	45.86	60	74.14	80

2.4.2 实验设计及结果 实验方案由软件 Design Expert 11.0.3 生成^[10]。以表 1 中的 Lec 和 Gly 的水平制备 HKMB 并计算 EE。具体实验方案及结果见表 2。

2.4.3 模型拟合 采用 Design Expert 11.0.3 软件进行回归, 以拟合优度(r)和置信度(P)作

表 2 星点设计的实验与结果

Tab 2 Design and results of central composite design			
序号	X_1	X_2	EE/%
1	-1	-1	28.73
2	-1	1	33.56
3	1	-1	39.15
4	1	1	57.99
5	0	-1.414	23.77
6	0	1.414	50.34
7	-1.414	0	63.02
8	1.414	0	31.52
9	0	0	62.35
10	0	0	64.25
11	0	0	65.23
12	0	0	63.67
13	0	0	64.11

为模型判定标准。以 $EE(Y)$ 为评价指标对 Lec (X_1)、Gly (X_2) 进行拟合, 得到 $EE(Y)$ 的拟合方程 $Y = -65.30 + 4351.37X_1 + 75.38X_2 - 555.07X_1X_2 - 19965.5X_1^2 - 265.12X_2^2$ ($r = 0.9503$, $P < 0.05$), 其中 r 为 0.9699, P 值为 0.0001。通过软件分别绘制评价指标包封率随因素变化的效应面图, 见图 1。由图可知, 通过软件进行预测分析, 获得一组包封率最大的优化条件: X_1 为 5.65%, X_2 为 63.3%, 在此优化条件下, 因变量 EE 的预测值为 69.14%。从相关系数 r 可知, 采用二项式方程拟合本研究的效果良好, 且该模型具有显著性, 可在一定程度上正确反映 Y 与 X_1 、 X_2 之间的关系。结果表明 X_1 和 X_2 对 Y 的影响显著 ($P < 0.05$)。综合以上, 说明该模型选择合理, 可用二项式回归方程对 HKMB 的处方进行优化。

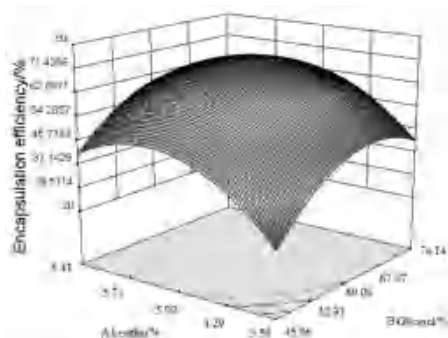


图 1 包封率的 3D 效应面图

Fig 1 3D surface of encapsulation efficiency

2.4.4 模型验证 使用模型预测的最优处方, Gly 浓度为 63.3%, Lec 浓度为 5.65%, 制备 3 批样品, 进行实验验证, 3 批样品的 EE 实测平均值 (74.02 ± 3.61)% 与预测值 (69.14%) 的偏差较小, 证明预测最佳处方条件在实际实验操作中稳定可行。而优化处方的 LE 为 (1.09 ± 0.40)%。

2.5 HKMB 粒径、微观结构的测定

使用 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 对 HKMB 进行稀释处理, 采用粒径分析仪测量 HKMB 的粒径 (见图 2)。HKMB 的粒径是 (308.6 ± 35.2) nm。将得到的 HKMB 混悬液滴加到一 200 目的铜网上, 用滤纸吸去多余液体, 放置风干 2 h 后, 于透射电镜观察其外观形态。如图 3 所示, 可见 HKMB 为分布较均匀的观圆球形颗粒。

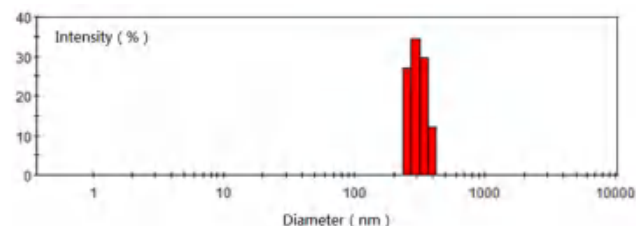


图 2 HKMB 的粒径分布

Fig 2 Diameter of honokiol ultrasound microbubbles



图 3 HKMB 的透射电镜扫描图片

Fig 3 Transmission electron micrograph image of honokiol ultrasound microbubbles

2.6 HKMB 稳定性研究

为考察 HKMB 的稳定性, 将微泡冷冻干燥后放置一周, 分别于第 1、3、5、7 日取样使用 PBS 缓冲液复溶后检测其粒径及 EE 。结果表明, 在第 1、3、5、7 日 HKMB 溶液的粒径和 EE 均未发现明显改变。在第 7 日观察, HKMB 溶液性状亦无明显改变, 无絮状物沉淀等。证明制备的 HKMB 具有良好的稳定性。

2.7 HKMB 体外释放度评价

使用透析袋建立体外药物释放评价体系, 考察超声处理后 HK 从 HKMB 中的释放行为。制备 HK 混悬液 (精密称量 5 mg 的 HK 原料药, 混悬于 0.5% 羧甲基纤维素钠水溶液中) 和 HKMB 混悬液 (按照实测 HK 的量计 5 mg), 分别设置超声处理组 (HK + US 组和 HKMB + US 组) 和无超声处理组 (HK 组、HKMB 组)。

分别将 HK + US 组、HKMB + US 组混悬液, 装入透析袋中, 再放置于含 0.5% 十二烷基硫酸钠的 25 mL PBS 缓冲液 (pH 7.4) 的具塞瓶

中, 给予超声处理, 将 LIFU 仪的探头浸入混悬液面下, 超声强度设为 $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$, 工作 30 s, 间歇 30 s, 工作持续 4 min。在超声作用结束后, 将具塞瓶置于恒温 37°C 水域振荡器中, 转速为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。在预定的时间点取样 5 mL, 同时补充等量 PBS 缓冲液 (pH 7.4), 将获得的释放液样品适当倍数的稀释后, 在 294 nm 处测定样品的吸光度值, 计算 HK 的累计释放情况。分别将 HK 组和 HKMB 组装入透析袋中, 操作步骤如超声处理组, 区别在于不给予超声处理, 计算无超声处理组制剂的药物释放情况。

如图 4 所示, HK 组和 HK + US 组的释放曲线没有显著差异, 即超声作用不会影响 HK 原料药的药物释放行为。与 HK 组相比, HKMB 组的药物释放显著减慢, 产生该现象的原因是将 HK 包裹于微泡中, 微泡膜的存在可以延迟 HK 从制剂中释放至介质, 从而显著减缓了 HK 的释放速度, 实现了药物的缓慢释放。与 HKMB 组的药物释放曲线相比, HKMB + US 组中制剂的药物释放速度明显更快。产生这种现象的原因是微泡在超声作用下被击破, 致使 HK 更快地从微泡中释放出来, 使药物的累计释放程度增加。体外释放的结果表明 HKMB 具有较好的超声响应击破特性, 可通过超声作用实现微泡中药物的控释, 满足实验设计的要求。并且在超声处理后, 在 24 h 时大多数的 HK 可以从 HKMB 制剂中释放入介质, 保证药物的治疗效用。

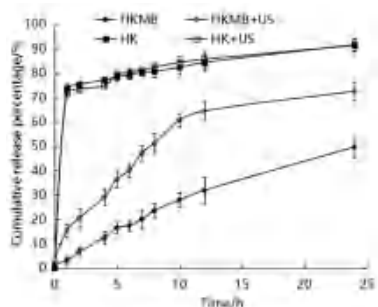


图 4 超声处理组和无超声处理组的 HK 及 HKMB 的释放曲线 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Fig 4 In vitro release curves of HK and honokiol ultrasound microbubbles with or without ultrasound ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

2.8 HKMB 的水囊显影

超声介导的显影特性是超声微泡的一项重要性质, 良好的显影性使微泡可以作为造影剂用于临床诊断。为了评价制得的空白微泡和 HKMB 的体外显影效果, 使用橡胶手套建立了 HK 组、MB 组和 HKMB 组的水囊模型, 用于评价 HK、MB 和 HKMB 的显影效果。将制备的各种制剂水囊模型置于超声显影诊断仪上, 探头覆盖于表

面, 超声强度设为 $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$, 工作 30 s, 间歇 30 s, 工作持续 4 min, 观察并记录结果。结果如图 5 所示, HK 几乎无超声散射的信号, 而 HKMB 和空白微泡具有较显著的超声散射信号, 表明空白微泡和 HKMB 具有良好的超声显影性, 而这种超声回声信号来自微泡自身的结构。同时, HKMB 和空白微泡的超声散射信号没有显著的差异, 表明将 HK 包裹于微泡中, 不会减弱微泡对超声作用的显影效果。

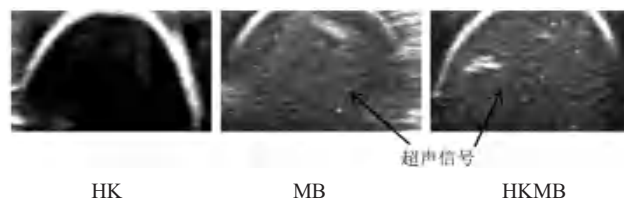


图 5 水囊显影图

Fig 5 Ultrasound images

2.9 HKMB 的小鼠体内抑瘤实验

将 H22 细胞调整细胞浓度至约 1×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 取 200 μL 接种到 KM 小鼠皮下, 待肿瘤长至 $0.5 \sim 1 \text{ cm}^3$ 左右则用于后续实验。将 20 只荷皮下移植瘤 KM 小鼠随机分为 4 组, 即 MB + US 组、HK 组、HKMB 组、HKMB + US 组, 每组 5 只, 经尾静脉隔日治疗 1 次, 每组的 HK 给药剂量为 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, MB + US 组与 HKMB + US 组分别注射 MB 混悬液 0.2 mL 和 HKMB 混悬液 0.2 mL, 且注射后立即超声辐照, 超声强度设为 $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$, 工作 30 s, 间歇 30 s, 工作持续 4 min。HK 组与 HKMB 组分别注射 HK 混悬液 0.2 mL 和 HKMB 混悬液 0.2 mL, 但不给予超声处理。每日用游标卡尺测量小鼠右背侧部的皮下瘤长直径 (D) 及垂直的短径 (M), 以下述公式计算皮下肿瘤的体积 (V): $V = (D \times M^2) / 2$, 并以天数为横坐标, 肿瘤体积为纵坐标制作肿瘤体积增长曲线。实验完毕后, 处死老鼠, 取肿瘤组织, 计算肿瘤生长抑制率 ($TGIR$), 公式计算如下:

$$TGIR(\%) = [(\text{MB} + \text{US 组的肿瘤质量}) - (\text{HKMB} + \text{US 组的肿瘤质量})] / (\text{MB} + \text{US 组的肿瘤质量}) \times 100\%$$

治疗期间, HKMB 组、MB + US 组、HK 组的肿瘤体积增长较快, 而 HKMB + US 组小鼠的肿瘤增长最为缓慢, 表明 HKMB + US 组具有明显的肿瘤抑制作用 (见图 6)。与 MB + US 组相比, HKMB + US 组的小鼠肿瘤体积和肿瘤生长抑制率显著更小 ($P < 0.05$) (见图 7 及表 4)。

3 讨论

与受体介导靶向载药体系相比, 具有超声响应破坏特性的微泡递药体系不会出现配体连接效

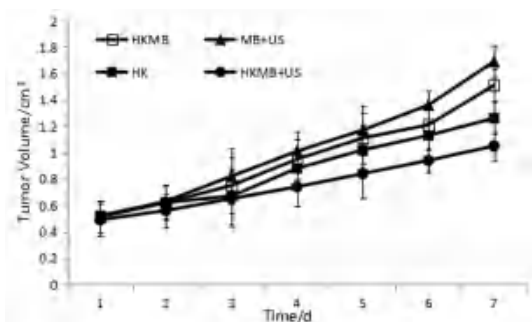
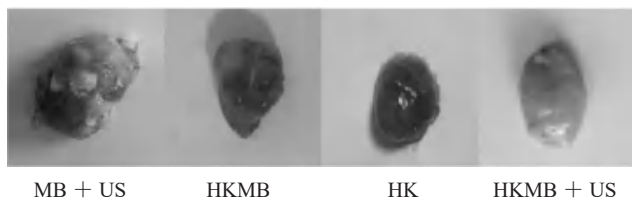
图 6 小鼠皮下移植肿瘤生长曲线 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)Fig 6 Growth curves of subcutaneous tumor in mice ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

图 7 剥离肿瘤图

Fig 7 Photographs of removed tumors from the mice

表 4 末次治疗 24 h 以后肿瘤质量和肿瘤生长抑制率 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)Tab 4 Tumor weight and inhibition growth rate per group 24 h after the last injection ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	肿瘤质量 /mg	肿瘤生长抑制率 /%
HKMB + US 组	701.4 ± 80.6*	32.21
HKMB 组	935.5 ± 77.1	/
HK 组	885.9 ± 96.0	/
MB + US 组	1034.1 ± 104.5	/

注 (Note): 与 MB + US 组对比, * $P < 0.05$ (Compared with the MB + US group, * $P < 0.05$).

率不高、或受体饱和等问题^[11-13]从而影响靶向递送效果,常被用来递送药物和基因。传统的超声微泡因为载体层无法携带大量药物导致载药量太低,只有少数药效较强,有效血药浓度较低的目标药物适用于该递送体系^[14]。本次实验中制备的 HKMB 载药量仅为 $(1.09 \pm 0.40) \%$ 。如果使用多层磷脂膜微泡可以提高载药能力,但是这类微泡的粒径和超声显影特性会发生显著改变^[15]。载药量过低可通过共同给予微泡和药物克服,但是这种方法仅仅只能短暂增加超声局部的渗透性,对增加药物在局部组织的浓度没有帮助^[16]。另外,将微泡中包裹的氟碳气体改为氟碳液体,也能够提升其载药能力,但载氟碳液体微泡稳定性不佳,在体内难以长循环递药^[17]。未来需要制备出一种新型的载药微泡,不仅能够携带大量药物,而且不会对其超声显影特性造成任何影响。

根据图 6,与 HK 相比, HKMB 组小鼠的肿瘤生长曲线并没有显著差异。该情况最可能的解释是 HKMB 载药量率较低,仅为 $(1.09 \pm 0.40) \%$,药物难以在肿瘤部位高浓度聚集,肿瘤生长未被

显著抑制。而将 HKMB 与低频聚焦超声联合应用后, HKMB + US 组小鼠的肿瘤体积相对最低,肿瘤生长抑制率相对最高,肿瘤增长速度最为缓慢,结果表明 HKMB 与超声技术联合对肿瘤的治疗效果较好。经尾静脉注射 HKMB,超声探头经皮给予肿瘤组织超声处理,当 HKMB 经血液循环转运至肿瘤组织,微泡遇到超声能量被击破,药物从微泡中释放出来,在肿瘤部位靶向聚集。同时,微泡被击破时会产生“空化效应”,会造成肿瘤组织的细胞膜和微血管通透性增加,更利于药物渗透进入肿瘤组织。而且,肿瘤组织的高通透性和滞留 (EPR) 效应增强了药物在肿瘤组织的滞留性,延长药物作用时间。基于上述原因,即使载药量不理想,超声微泡载药系统也能够提升药物的抗肿瘤作用效果^[17]。

参考文献

- [1] 张娜, 孙玉杰, 孙毅坤, 等. 超高效液相色谱法测定胃瘫外敷方中厚朴酚与和厚朴酚的含量的研究及其影响因素分析 [J]. 中南药学, 2020, 18 (2): 254-257.
- [2] Zheng Z, Zhang J, Jiang J, et al. Remodeling tumor immune microenvironment (TIME) for glioma therapy using multi-targeting liposomal codelivery [J]. J Immunother Cancer, 2020, 8 (2): 207-211.
- [3] 王建娜, 成日, 萨仁高娃, 等. 脂质体作为药物载体的研究进展 [J]. 中南药学, 2019, 17 (9): 1492-1498.
- [4] Chowdhury SM, Abou-Elkacem L, Lee T, et al. Ultrasound and microbubble mediated therapeutic delivery: underlying mechanisms and future outlook [J]. J Control Release, 2020, 10 (326): 75-90.
- [5] Helfield B. A review of phospholipid encapsulated ultrasound contrast agent microbubble physics [J]. Ultrasound Med Biol, 2019, 45 (2): 282-300.
- [6] Ho YJ, Li JP, Fan CH, et al. Ultrasound in tumor immunotherapy: current status and future developments [J]. J Control Release, 2020, 10 (323): 12-23.
- [7] Wang G, Wu B, Li Q, et al. Active transportation of liposome enhances tumor accumulation, penetration, and therapeutic efficacy [J]. Small, 2020, 16 (44): 4172-4178.
- [8] Panja S, Khatua DK, Halder M. Effect of casein on pure lecithin liposome: mixed biomacromolecular system for providing superior stabilization to hydrophobic molecules [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2019, 180: 298-305.
- [9] Upadhyay A, Dalvi SV. Microbubble formulations: synthesis, stability, modeling and biomedical applications [J]. Ultrasound Med Biol, 2019, 45 (2): 301-343.
- [10] 李红鑫, 吴非, 吴婧楠, 等. 基于星点设计-响应面法的红景天提取物冻干口崩片制备工艺研究 [J]. 中南药学, 2021, 19 (12): 2545-2548.
- [11] Lv Y, Li J, Chen H, et al. Glycyrrhetic acid-functionalized mesoporous silica nanoparticles as hepatocellular carcinoma-targeted drug carrier [J]. Int J Nanomedicine, 2017, 12: 4361-4370.

- [12] 陈凯云, 常佳丽, 陈卫东. 叶酸纳米给药系统抗肿瘤作用研究进展[J]. 中南药学, 2017, 15 (5): 626-630.
- [13] 王悦, 黄元政, 朱丹丹, 等. 基于聚酰胺类树形分子前药的纳米给药系统在恶性肿瘤治疗中的应用[J]. 中南药学, 2021, 19 (7): 1343-1352.
- [14] Gong Q, Gao X, Liu W, et al. Drug loaded microbubbles combined with ultrasound for thrombolysis and malignant tumor therapy[J]. Biomed Res Int, 2019, 1: 679-685.
- [15] Qu F, Wang P, Zhang K, et al. Manipulation of mitophagy by "All-in-One" nanosensitizer augments sono-dynamic glioma therapy[J]. Autophagy, 2020, 16 (8): 1413-1435.
- [16] Bourn MD, Batchelor DVB, Ingram N, et al. High-throughput microfluidics for evaluating microbubble enhanced delivery of cancer therapeutics in spheroid cultures[J]. J Control Release, 2020, 10 (326): 13-24.
- [17] Omata D, Maruyama T, Unga J, et al. Effects of encapsulated gas on stability of lipid-based microbubbles and ultrasound-triggered drug delivery[J]. J Control Release, 2019, 311 (312): 65-73.

(收稿日期: 2022-04-30; 修回日期: 2022-06-25)

复方硫酸新霉素温敏凝胶的制备及其对复发性口腔溃疡的作用

王欢, 李正伟, 杨盟, 刘振康*, 原永芳 (上海交通大学医学院附属第九人民医院药剂科, 上海 200011)

摘要: **目的** 制备复方硫酸新霉素温敏凝胶, 并对制备工艺、理化性质进行考察, 对凝胶剂中醋酸地塞米松的含量进行测定。**方法** 考察不同比例 P407 和 P188 的流变性能, 确定温敏凝胶最优处方。选取健康 SD 大鼠, 采用化学法诱导大鼠口腔黏膜溃疡, 完成复发性口腔溃疡 (ROU) 造模后, 将 SD 大鼠随机分为 4 组, 空白组 (不诱导 ROU, 涂抹生理盐水), 模型组 (诱导 ROU, 涂抹生理盐水), 实验组 (诱导 ROU, 涂抹复方硫酸新霉素温敏凝胶), 阳性对照组 (诱导 ROU, 涂抹复方硫酸新霉素液), 连续给药 20 d, 记录溃疡从发生至愈合的时间, 及溃疡发生的间歇时间, 测定大鼠组织或血清中的 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 表达。**结果** 确定最优处方 P407 : P188 为 18 : 2, 按照最优处方制备空白凝胶基质并与药液混合得复方硫酸新霉素温敏凝胶。复方硫酸新霉素温敏凝胶能够有效缩短 SD 大鼠口腔黏膜溃疡面积, 在给药 1 d 后溃疡面即有收缩趋势; 给药 3 d 后, 溃疡面积缩小; 给药 14 d 后, 溃疡面的假膜脱落, 溃疡愈合。复方硫酸新霉素温敏凝胶能够促进复发性口腔溃疡大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 比值升高, 修复口腔黏膜蛋白抗原诱导的损伤, 促进口腔黏膜愈合, 且较复方硫酸新霉素液有更好的治疗效果。**结论** 复方硫酸新霉素温敏凝胶可以为复发性阿弗他溃疡的临床治疗提供一种新的、有效的药物制剂。

关键词: 复方硫酸新霉素; 温敏凝胶; 复发性口腔溃疡; 醋酸地塞米松; 病理观察

中图分类号: R94, R96 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2022)12-2734-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.006

Preparation of compound neomycin sulfate thermosensitive gel and its treatment of recurrent oral ulcer

WANG Huan, LI Zheng-wei, YANG Meng, LIU Zhen-kang*, YUAN Yong-fang (*Department of Pharmacy, the Ninth People's Hospital Affiliated to the Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200011*)

Abstract: Objective To prepare compound neomycin sulfate thermosensitive gel, observe the prescription screening, preparation process, physical and chemical properties, and determine the content of dexamethasone acetate in the gel. **Methods** The rheological properties of P407 and P188 with different ratios were investigated to determine the optimal formulation of thermosensitive gel.

基金项目: 上海市科学技术委员会 (No.17401900800; No.19401900400); 上海交通大学医学院转化项目 (No.TM201714)。

作者简介: 王欢, 女, 主管药师, 主要从事药剂学和天然药物研究, email: 89297496@qq.com * **通信作者:** 刘振康, 男, 主管药师, 主要从事药事管理和药剂学研究, email: 13916861568@139.com

Oral mucosa ulcer was induced by chemical method in healthy SD rats. SD rats were randomly divided into four groups: blank group [without inducing recurrent oral ulcer (ROU), smearing normal saline], model group (inducing ROU, smearing normal saline), experimental group (inducing ROU, smearing compound neomycin sulfate thermosensitive gel), positive control group (inducing ROU, smearing compound neomycin sulfate solution). After the ROU modeling was completed, the drug was continuously administered for 20 days. The time from the occurrence to the healing and the interval between ulcers was recorded and the expression of $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ and $CD4^+/CD8^+$ in the tissues or the serum of rats were measured. **Results** The optimal prescription was determined $P407 : P188 = 18 : 2$. According to the optimal prescription, the blank gel matrix was prepared and mixed with the drug solution to obtain the compound neomycin sulfate thermosensitive gel. Compound neomycin sulfate thermosensitive gel effectively shortened the ulcer area of oral mucosa in SD rats, and the ulcer surface tended to shrink after 1 day of administration. After 3 days of administration, the ulcer area was reduced; after 14 days of administration, the pseudomembrane on the ulcer surface fell off and the ulcer healed. Compound neomycin sulfate thermosensitive gel increased the ratio of peripheral blood T lymphocyte subsets $CD3^+$, $CD4^+$ and $CD4^+/CD8^+$ in rats with ROU, repaired the injury induced by oral mucosal protein antigen, and promoted the healing of oral mucosa. Moreover, compound neomycin sulfate thermosensitive gel showed better therapeutic effect than its solution. **Conclusion** Compound neomycin sulfate thermosensitive gel can effectively promote oral mucosal exfoliation, promote the healing of erosion and ulcer and shorten the healing time, with a good therapeutic effect.

Key words: compound neomycin sulfate; temperature sensitive gel; recurrent oral ulcer; dexamethasone acetate; pathological observation

复发性口腔溃疡 (recurrent oral ulcer, ROU) 是临床上最常见的口腔黏膜疾病之一, 好发于青壮年, 患病率约为 20%^[1]。ROU 表现为反复发作的单个或多发圆形或椭圆形口腔黏膜溃疡, 发病时疼痛感明显, 严重时会影响患者进食、交流, 对患者身心造成伤害。但是目前 ROU 的具体发病机制研究还不明确, 有学者认为, ROU 的发作与人类免疫异常、病毒感染、胃肠功能障碍和遗传因素有关。另外, 有学者发现 ROU 患者外周血 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 表达水平均降低, 免疫失衡会通过细胞毒性作用导致溃疡形成^[2-3]。目前还未有能够根治 ROU 的办法, 临床上主要采用西药对症治疗, 用来消除治病诱因、缓解病情、延长间歇期、促进溃疡面的愈合来缓解局部症状。局部或全身治疗常用于减轻疼痛和促进溃疡愈合^[4]。全身治疗一般指采用中医治疗和口服免疫抑制剂来降低 ROU 的复发率, 但是中医治疗疗效不确切, 免疫抑制剂又容易诱发黏膜萎缩等一系列并发症, 在临床应用中受到较多限制。因此, 亟需找到一种新的治疗方法来有效缓解这一病症。

口腔具有特殊的生理环境, 多数研究药物如喷剂、含漱剂、含片、散剂等均在口腔内停留时间较短, 无法在口腔病变部位达到持续有效的药物临床治疗浓度, 疗效较差, 亟需开发一种符合口腔生理环

境且能够长时间持续稳定给药的剂型来治疗 ROU。本项目研发了一种温敏凝胶, 其具有温度相变性质, 在人口腔温度下即成为凝胶状态, 黏附在口腔溃疡面病变部位, 能够使药物浓度平稳且长时间持续释药, 更好地适应口腔特殊生理环境, 现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪 (包括 LC-10AT 泵、SPD-10A 紫外检测器、CTO-10A 柱温箱, CLASS vp 色谱工作站和 SCL-10Avp 系统控制器, 日本岛津制作所); 流变仪 (Bohlin Gemini, 型号 Gemini 2); FA-2004 电子天平 (精度: 0.0001 g, 上海精科天平仪器厂); 5804R 型高速冷冻离心机 (美国 Eppendorf)。

1.2 试药

复方硫酸新霉素液 [自制, 主要由硫酸新霉素 (主药含量 0.5%)、醋酸地塞米松、盐酸达克罗宁、维生素 E、冰片等药物组成, 批号: 20201209]; 泊洛沙姆 407 (P407, 德国 BASF 公司, 批号: WPCT509E); 泊洛沙姆 188 (P188, 德国 BASF 公司, 批号: WPOO565B); 乙腈、甲醇 (色谱纯, Fisher 公司); 弗氏免疫佐剂 (武汉谷歌生物科技有限公司); 盐酸氯胺酮注射液 (江苏恒瑞医药股份有限公司); 碘伏 (杭州朗索医用消毒剂有限公司); 1640 培养基 (武汉塞维尔生物科技有限公司)

公司);生理盐水(武汉滨湖双鹤药业有限责任公司);蒸馏水(自制)。

1.3 实验动物

32 只 SPF 级 SD 大鼠,雄性,体质量(200 ± 20) g [上海交通大学医学院附属第九人民医院实验动物中心,使用许可证号:SYXK(沪)2016-0016]。

2 方法与结果

2.1 复方硫酸新霉素温敏凝胶处方筛选

P407 和 P188 为凝胶剂常用辅料^[5],本研究选用 P407 和 P188 制备温敏凝胶。首先研究了不同比例的 P407 (18%~20%) 和 P188 (2%~6%) 在不同条件下制备的温敏凝胶的流变性能,并记录了相变温度 T 和口腔温度 37°C 所对应的黏度,绘制流变学曲线,确定最优比例。制备 3 批最优处方样品,测定样品的平均相变温度。

采用流变仪测定复方硫酸新霉素热敏凝胶样品的流变学参数。样品温度精确控制在 $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 内,应变幅度设定为 1.0%,4/20 mm 平板,Gap 0.5 mm。测定分析样品从 25°C 升温至 55°C 的流变学相关参数,震荡频率 0.5 Hz,升温速度 $5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

从表 1 可以看出,相变温度取决于 P407 的浓度,P407 浓度较高时,低温也会发生凝胶化,而 P407 浓度较低时,发生相变所需要的温度较高。固定 P407 的浓度,加入少量的 P188 即对相变温度产生较大影响,且 P188 含量越高,相变所需要的温度就越高。我们综合考虑人体口腔温度、相变温度及黏度,优选出的处方为 P407:P188 = 18:2。然后将优选出的凝胶包载复方硫酸新霉素药液,测得的流变曲线如图 1 所示。

表 1 不同含量的 P407、P188 对流变学参数的影响

Tab 1 Effect of different contents of P407 and P188 on rheological parameters

P407:P188	相变温度/ $^\circ\text{C}$	黏度/ ηPas
18:0	24.2	19.93
18:2	31.5	3.21
18:4	35.8	0.25
18:6	40.1	0.22
19:0	22.7	24.38
19:2	28.5	16.73
19:4	33.0	0.27
19:6	35.8	0.21
20:0	21.3	28.33
20:2	25.6	21.40
20:4	30.0	13.52
20:6	31.5	1.14

根据流变曲线,复方硫酸新霉素温敏凝胶在 33°C 时发生相变,黏度趋于稳定。最佳配方为 P407:P188 (18:2),平均相变温度为 33.1°C 。

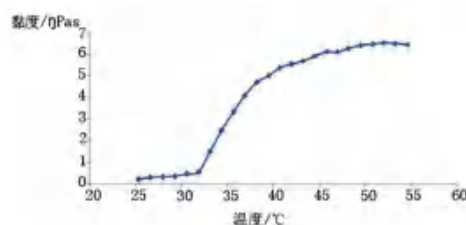


图 1 温敏凝胶流变学曲线

Fig 1 Rheological curve of the thermosensitive gel

2.2 复方硫酸新霉素温敏凝胶的制备

将处方量的 P407 和 P188 加入去离子水置于 4°C 冰箱溶胀过夜后得到空白凝胶基质 (95.4%)。将硫酸新霉素 (0.5%)、盐酸达克罗宁 (0.5%) 和醋酸地塞米松 (0.025%) 等药品加入已溶胀好的空白凝胶基质中。然后将水溶性差的药物成分冰片 (1.0%)、维生素 E (0.5%) 以及少量防腐剂 (0.05%) 加入乙醇 (2.0%) 溶液中。最后,将预制备的药物凝胶加入到混合乙醇溶液中,获得复方硫酸新霉素温敏凝胶。并进行含量测定,结果见表 2,样品含量均匀。

表 2 复方硫酸新霉素温敏凝胶中醋酸地塞米松的含量 ($n=6$)

Tab 2 Content of dexamethasone acetate in compound neomycin sulfate temperature-sensitive gel samples ($n=6$)

批号	醋酸地塞米松含量/%	RSD/%
1	0.025	2.1
2	0.025	1.8
3	0.025	0.98

2.3 复方硫酸新霉素凝胶中醋酸地塞米松含量测定方法的建立

2.3.1 色谱条件 色谱柱:Hypersil ODS-C18 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 甲醇-水 (70:30) 为流动相;检测波长 265 nm,柱温 25°C ,流速 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$,进样量 20 μL 。

2.3.2 溶液的配制

① 供试品溶液的配制:精密称取 1 g 复方硫酸新霉素温敏凝胶,用甲醇稀释至 100 mL 量瓶中,10 000 r $\cdot$ min $^{-1}$ 进样离心 5 min,取 1 mL 上清液于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶液稀释至刻度,得供试品溶液。

② 对照品溶液的配制:精密量取 5.0 mg 醋酸地塞米松对照品,用甲醇溶解并稀释至 50 mL 量瓶中,得 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.3.3 专属性验证 取对照品和供试品溶液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,进样检测,记录色谱图,见图 2。从图中可以看出醋酸地塞米松的峰形良好,供试品凝胶剂中的其他成分对醋酸地塞米松没有干扰,表明此分析方法专属性良好。

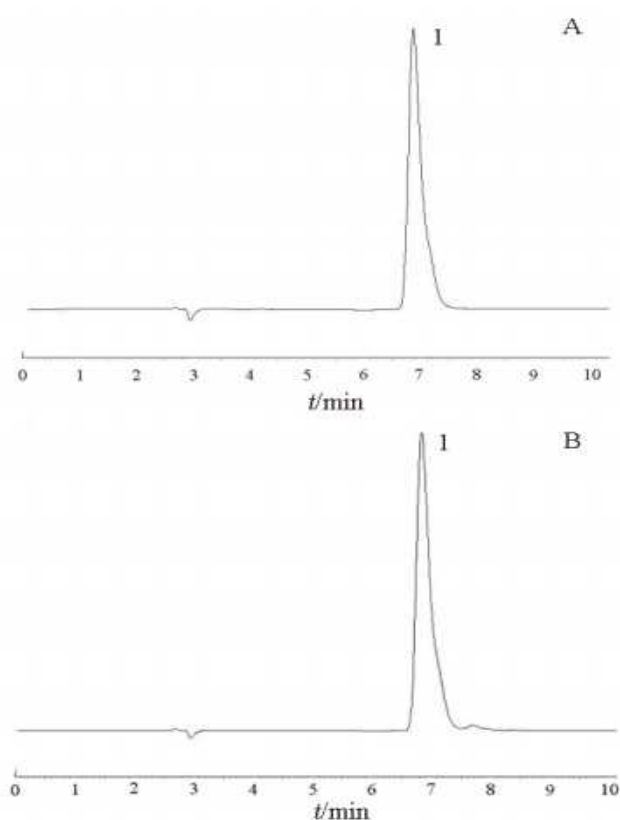


图2 醋酸地塞米松色谱图

Fig 2 Chromatogram of dexamethasone acetate

A. 对照品 (standard); B. 供试品 (sample); 1. 醋酸地塞米松 (dexamethasone acetate)

2.3.4 精密度 取“2.3.2”项下的对照品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件重复进样6次,并记录峰面积。结果峰面积 *RSD* 值为 1.4%,表明仪器精密度良好。

2.3.5 重复性 平行配制6份复方硫酸新霉素温敏凝胶的供试品溶液,进样测定。结果醋酸地塞米松含量 *RSD* 值为 1.8%,表明该方法重复性良好。

2.3.6 加样回收试验 精密量取低、中、高3个浓度的醋酸地塞米松对照品溶液加入到 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品溶液中,进样测定,计算回收率和 *RSD* 值,低、中、高3个浓度平均回收率分别为 $(101.9 \pm 2.6)\%$ 、 $(100.4 \pm 0.95)\%$ 、 $(101.5 \pm 1.3)\%$, *RSD* 分别为 2.1%、1.7%、2.3%,表明该方法稳定可靠。

2.4 药效学实验

2.4.1 动物实验模型的制备 使用 10% 的水合氯醛作为麻醉剂对大鼠进行麻醉 ($3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),再用 35% 的冰醋酸溶液对大鼠口腔内部黏膜进行刺激来建立口腔溃疡模型。取直径 1 cm 的塑料管,将其一端插入棉花中以防止溶液渗漏,另一端用冰醋酸溶液填满塑料管,然后将塑料管的一端放入大鼠的内唇黏膜,垂直握 1 min,48 h 后,观察到大鼠口腔黏膜内出现“黄、红、凹、痛”现象的临床溃疡特征为建模成功^[6],本研究的造模成功率为 100%。

2.4.2 分组情况 将 32 只 SD 大鼠随机分为 4 组:空白组 (不诱导 ROU, 涂抹生理盐水),模型组 (诱导 ROU, 涂抹生理盐水),实验组 (诱导 ROU, 应用复方硫酸新霉素温敏凝胶),阳性对照组 (诱导 ROU, 涂抹复方硫酸新霉素液)。完成造模后,连续涂药 20 d,最后 1 次涂药 30 min 后,处死大鼠。实验期间观察大鼠口腔黏膜,毛色,精神状态以及粪便的情况,每 2 日记录 1 次体质量并记录溃疡发生的第 1、3、7、14 日溃疡的面积,用游标卡尺测量溃疡的直径和数目以及溃疡从发生至愈合的时间。

2.4.3 大鼠的症状与体征变化 实验前,大鼠体毛鲜亮,性情温顺,食欲较好,排便正常,反应灵活,体质量增长。造模后大鼠体毛粗糙,性情暴躁,大便不成形,反应缓慢,食物和水摄入量减少,体质量减轻。造模 48 h 后,大鼠下唇黏膜均出现溃疡,直径 4~5 mm,呈圆形或椭圆形,中央凹陷,假膜覆盖,出现溃疡。溃疡边缘充血、肿胀、发炎。嘴唇肿胀。嘴唇湿润流口水,吸水性明显。

2.4.4 各组大鼠口腔溃疡的变化 模型组大鼠的下嘴唇内侧口腔黏膜局部出现红晕,溃疡形成后口腔表面呈灰白色,周围组织水肿充血,呈凹陷状,溃疡较为严重,在造模 1~3 d 后,溃疡面的直径扩大。不同药物处理组对口腔溃疡面积的影响结果见表 3。实验组给药 1 d 后,溃疡面有收缩趋势;给药 3 d 后,溃疡面开始出现假膜覆盖,直径缩小;给药 14 d 后,溃疡面的假膜脱落,溃疡面积明显缩小,溃疡持续愈合。与模型组相比,实验组给药第 1、3、7 和 14 日溃疡面积差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 3 不同处理方式对大鼠口腔溃疡面积的影响 (mm^2 , $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)Tab 3 Effect of different treatments on oral ulcer area in rats (mm^2 , $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	给药前	第 1 日	第 3 日	第 7 日	第 14 日
模型组	12.70 ± 2.12	13.48 ± 2.07	14.42 ± 1.95	10.78 ± 1.83	3.02 ± 0.59
实验组	12.72 ± 3.01	$10.73 \pm 1.98^*$	$7.03 \pm 1.83^*$	$5.93 \pm 1.56^*$	$0.33 \pm 0.15^{**}$
阳性对照组	12.71 ± 2.85	11.79 ± 2.05	$10.69 \pm 1.74^*$	$6.41 \pm 1.28^*$	$2.04 \pm 0.39^*$

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

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

2.4.5 组织病理学考察 给药 7 d 后每组抽取 2 只 SD 大鼠处死,取深达黏膜下层的大鼠下牙唇侧的口腔黏膜,然后用生理盐水进行冲洗,再用固定溶液固定和石蜡包埋后进行染色,最后在光学显微镜下观察黏膜组织的结构和炎性细胞的浸润情况。

给药 7 d 后,模型组溃疡部上皮溶解、破溃,对照组黏膜上皮内和细胞间水肿,基底膜清晰,溃疡内有大量炎性细胞浸润,细胞内和细胞间水肿,上皮组织下方形成空泡,细胞基底膜明显,而细胞具有固有层被中性粒细胞、浆细胞以及相关淋巴组织细胞浸润。溃疡组织损伤严重,组织坏死明显。空白组口腔黏膜上皮层、基底膜和固有层清晰,结构完整,阳性淋巴细胞和中性粒细胞占优势,口腔溃疡部位组织损伤较轻,无坏死。实验组口腔胶原纤维水肿变性上皮溶解形成溃疡,中性粒细胞浸润,口腔溃疡部位组织愈合,坏死程度较轻^[7],结果见图 3。

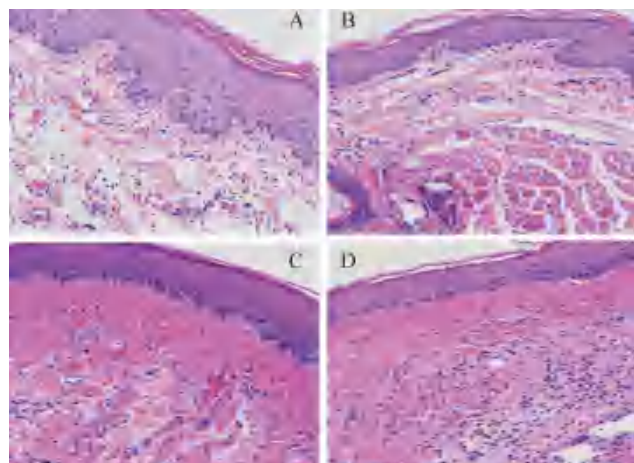


图 3 各组大鼠口腔病理组织图 (×200)

Fig 3 Oral pathology of rats in each group (×200)

A. 模型组 (model group); B. 空白组 (blank group); C. 阳性对照组 (positive control group); D. 实验组 (experimental group)

2.4.6 流式细胞分析 给药 7 d 后从各组实验大鼠眼眶取血,血液样本将被提取并在 1640 培养基中培养,加入溶血素,调整细胞浓度至 2×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,然后每份取 100 μL 样品加入 CD3^+ 、 CD4^+ 、 CD8^+ 等特异性表面抗体,在避光的环境下在冰上孵育 20 min,最后将样品置于流式细胞仪进行检测。

与空白组大鼠相比,模型组外周血 T 淋巴细胞亚群 CD3^+ 、 CD4^+ 和 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 比值在给药 7 d 后明显降低 ($P < 0.05$),ROU 大鼠体内免疫失衡,验证大鼠口腔溃疡模型构建成功。与模型组相比,实验组和阳性对照组外周血 CD3^+ 、 CD4^+ 、 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 比值均有不同程度升高

($P < 0.05$)。与阳性对照组相比,实验组外周血中 CD3^+ 、 CD4^+ 和 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 的比例显著增加 ($P < 0.05$) (见表 4)。实验结果表明,复方硫酸新霉素可以修复口腔黏膜蛋白抗原诱导的损伤,促进口腔黏膜愈合,治疗 ROU,且复方硫酸新霉素温敏凝胶较复方硫酸新霉素液有更好的治疗效果。

表 4 T 淋巴细胞亚群指标值分析 ($n = 8$, %, $\bar{x} \pm s$)

Tab 4 T lymphocyte subset index value analysis ($n = 8$, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	CD3^+	CD4^+	CD8^+	$\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$
空白组	60.6 ± 2.1	50.2 ± 2.3	21.4 ± 2.8	2.3 ± 1.8
模型组	52.8 ± 1.9^a	42.9 ± 3.0^a	19.7 ± 2.4	2.2 ± 1.3^a
实验组	$69.3 \pm 2.2^{a, b, c}$	$60.7 \pm 3.0^{a, b, c}$	22.5 ± 2.6	$2.7 \pm 1.2^{a, b, c}$
阳性对照组	$67.5 \pm 2.1^{a, b}$	$54.6 \pm 2.9^{a, b}$	22.1 ± 2.0	$2.5 \pm 1.5^{a, b}$

注:与空白组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$;与阳性对照组相比,^c $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the blank group, ^a $P < 0.05$; compared with the model group, ^b $P < 0.05$; compared with the positive control group, ^c $P < 0.05$.

2.4.7 统计学处理 用 SPSS Statistics 23.0 统计软件处理数据,数据以平均值 $\pm$ 标准差表示单变量方差分析 (ANOVA) 用于比较各组, Bonferroni 检验用于组间配对比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 讨论

复方硫酸新霉素液由硫酸新霉素、醋酸地塞米松、盐酸达克罗宁、维生素 E 等药物组成,用于治疗 ROU。硫酸新霉素是一种氨基糖苷类抗菌药物,具有良好的抗菌作用,但是其全身性药物治疗有明显的肾毒性和耳毒性,因此目前仅限于 ROU 局部应用,能有效促进溃疡愈合,减轻疼痛,具有良好的治疗效果^[8];盐酸达克罗宁为止痛类成品溃疡药物,多用于黏膜麻醉、局部止痛止痒以及溃疡的治疗^[9];醋酸地塞米松能够减少溃疡所造成的细胞急性损伤,促进溃疡愈合,同时抑制组氨等有毒物质的形成和释放^[10];维生素 E 能够使末梢血管进行扩张,改善患者血液系统循环,促进溃疡愈合^[11];冰片能够消除炎症,且具有良好的止疼作用,亦能促进口腔黏膜剥脱,使溃疡和糜烂面愈合^[12]。P407 和 P188 作为凝胶剂常用辅料,已经在食品和药品行业广泛应用。浓度较高的 P407 (15% ~ 30%) 具有良好的缓释作用且具有反向热凝胶性质,在低温条件下即可凝固为半固体状态,加入适量的 P188 调节相变温度, P407 和 P188 混合制备的凝胶剂具有安全性高的特点,能够有效降低给药次数,减少给药剂量,提高患者依从性^[5],所以本研究采用 P407 和 P188 作为凝胶基质来制备复方硫酸新霉素温敏凝胶。

本研究发现与模型组比较,阳性对照组及实验组的溃疡面积均显著减小,溃疡面愈合良好,表明各给药组对口腔溃疡的愈合有显著促进作用,且实验组优于阳性对照组。组织病理切片结果表明阳性对照组及实验组上皮组织愈合良好,周边黏膜上皮细胞内及细胞间水肿、毛细血管扩张充血、血管内皮肿胀等情况均有改善,炎症细胞浸润减少。ROU 大鼠体内免疫失衡,与模型组相比,实验组、阳性对照组外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比值均有不同程度升高,且实验组升高更显著。实验结果表明,制备的复方硫酸新霉素温敏凝胶能有效抑制大鼠口腔溃疡处的炎症发展,促进上皮组织生长,加速溃疡创面的愈合;能够修复口腔黏膜蛋白抗原诱导的损伤,促进口腔黏膜愈合,治疗 ROU,且复方硫酸新霉素温敏凝胶较复方硫酸新霉素液有更好的治疗效果。

对于大鼠 ROU 造模部位的选择,本研究选择了大鼠下唇内部黏膜。该部位为角化黏膜和非角化黏膜的交界处,在此处进行复方新霉素温敏凝胶的药效学实验更具有代表性。同时,该部位与人类频发的口腔溃疡部位颊、舌等非角化黏膜处外以及牙龈等角化黏膜处的病理特征和临床表现也极为类似。现有的治疗方法针对人类不同部位口腔溃疡的治疗并无较大差异,因此采用大鼠下唇内侧黏膜模型模拟人类口腔溃疡疾病研究更具有临床意义。除此之外,我们发现,对同一批大鼠进行二次造模时,会出现溃疡形成率较低、溃疡面不规则且面积缩小、愈合时间缩短等现象,推测出现原因可能是由于首次造模成功后,愈合后的组织对造模剂的耐受程度提高了,后续再进行 ROU 的研究时还可采用其他造模方法。

目前,临床剂型中使用的复方硫酸新霉素液主要为液体制剂,使用方法为将药液直接喷于溃疡处,给药不方便,药液容易迅速被清除,作用时间较短,无法持续稳定地使药物作用于溃疡面,对口腔深部的溃疡几乎无作用,这大大限制了其作用效果。为了克服其在临床使用中存在的缺点和不足,本课题组研发了复方硫酸新霉素温敏凝胶。温度敏感型凝胶给药时为溶液状态,配合特定的喷射装置,药液喷射至口腔溃疡处后,由于口腔的生理温度而发生胶凝,在给药部位立即转化为非化学交联的半固体凝胶^[13-14],可以有效地延长药物的作用时间,使药物持续稳定释

放,提高治疗效果。同时由于给药部位可以长时间稳定地维持有效药物浓度,还能减少给药次数,大大提高了患者对药物治疗的依从性^[15]。

参考文献

- [1] 孙璐,柴碧芳,贺启萌,等.基于文献数据挖掘中药治疗复发性口腔溃疡的用药规律[J].实用口腔医学杂志,2022,38(1):70-73.
- [2] Sánchez-Bernal J, Conejero C, Conejero R. Recurrent aphthous stomatitis [J]. Actas Dermosifiliogr (Engl Ed), 2020, 111(6): 471-480.
- [3] 王玉蓉,巨佳,王济,等.包载姜黄素的羧甲基化白及多糖-壳聚糖聚电解质复合膜对大鼠口腔溃疡的治疗作用研究[J].中南药学,2021,19(8):1532-1536.
- [4] Saikaly SK, Saikaly TS, Saikaly LE. Recurrent aphthous ulceration: a review of potential causes and novel treatments [J]. J Dermatolog Treat, 2018, 29(6): 542-552.
- [5] 高艳艳,秦铭,徐广,等.防风多糖温敏凝胶的制备及评价[J].环球中医药,2022,15(7):1139-1145.
- [6] 刘诗琦,王汉明,范志龙,等.免疫化学联合法建立 SD 大鼠复发性阿弗他溃疡动物模型的对比研究[J].临床口腔医学杂志,2020,36(11):646-649.
- [7] Kaliamoorthy S, Sathishmuthukumar R, Chidambaram K, et al. Assessment of oral mucosal integrity status in patients with recurrent aphthous stomatitis [J]. J Pharm Bioallied Sci, 2019, 11(2): 274-277.
- [8] 孙淑彦,顾永卫,杨盟,等.复方硫酸新霉素温敏凝胶的研制及其疗效观察[J].药学服务与研究,2019,19(3):196-200.
- [9] 曹健,王芳,张喆,等.双波长反相高效液相色谱法测定口腔溃疡油中 3 组分含量[J].中国药业,2011,20(17):38-39.
- [10] Jiang H, Yu X, Fang R, et al. 3D printed mold-based capsaicin candy for the treatment of oral ulcer [J]. Int J Pharm, 2019, 10(568): 118517.
- [11] 胡小梦.维生素 E 联合利多卡因治疗口腔溃疡患儿的临床疗效分析[J].中国现代药物应用,2021,15(2):223-224.
- [12] 吴芳,罗定强,樊宝娟,等.口腔溃疡系列制剂中冰片的定量检测和挥发性成分分析[J].中国药业,2018,27(9):9-12.
- [13] 丛志新,樊慧敏,吴春芝,等.原位凝胶剂的研究现状与应用前景[J].中南药学,2018,16(9):1185-1190.
- [14] 黄珍珍,曹晖.凝胶剂的研究及应用概况[J].中南药学,2019,17(2):210-215.
- [15] Guo Z, Bai Y, Zhang Z, et al. Thermosensitive polymer hydrogel as a physical shield on colonic mucosa for colitis treatment [J]. J Mater Chem B, 2021, 9(18): 3874-3884.

(收稿日期:2022-01-18;修回日期:2022-08-29)

鬼针草化学成分及 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究

姜李红¹, 张胜男¹, 龚桂芬¹, 柳彩萍¹, 方娟¹, 何东义¹, 潘争红², 谭钦刚^{1*} (1. 桂林医学院, 广西 桂林 541199; 2. 广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西植物功能物质研究与利用重点实验室, 广西 桂林 541006)

摘要: **目的** 研究鬼针草属植物鬼针草的化学成分及其抑制 α -葡萄糖苷酶的活性。**方法** 采用硅胶、Rp-18、Sephadex LH-20 等柱色谱方法对鬼针草乙醇提取物化学成分进行分离纯化, 根据理化性质及波谱数据鉴定化合物的结构, 并测定其对 α -葡萄糖苷酶抑制活性。**结果** 从鬼针草提取物中分离得到 15 个化合物, 分别鉴定为茛菪亭 (1)、6, 7, 3', 4'-四羟基橙酮 (2)、硫黄菊素 (3)、海生菊苷 (4)、紫钾因 (5)、4-甲氧基紫钾因 (6)、3, 2', 4'-三羟基-4-甲氧基查耳酮 (7)、8, 3'-dihydroxy-3, 7, 4'-trimethoxy-6-O- β -D-glucopyranosyl flavone (8)、8, 3', 4'-trihydroxyflavone-7-O- β -D-glucopyranoside (9)、7-O- β -D-glucopyranosyl-5, 3'-dihydroxy-3, 6, 4'-trimethoxyflavone (10)、(Z)-6-O-(6-O-p-coumaroyl- β -D-glucopyranosyl)-6, 7, 3', 4'-tetrahydroxyaurone (11)、cycloart-(23Z)-ene-3 β , 25-diol (12)、熊果酸 (13)、(22E)-ergosta-6, 22-diene-3 β , 5 β , 8 α -triol (14) 和 5 α , 8 α -epidioxyergosta-6, 22-dien-3 β -ol (15)。化合物 7, 8 和 11 对 α -葡萄糖苷酶的抑制率分别为 13.6%, 30.1% 和 38.6%。**结论** 化合物 6, 8 ~ 9, 12 ~ 15 为首次从该属植物中分离得到。化合物 7, 8 和 11 在酶标法实验中显示对 α -葡萄糖苷酶有较弱的抑制活性, 其他化合物无明显抑制活性。

关键词: 菊科; 鬼针草; 化学成分; α -葡萄糖苷酶

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2740-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.007

Chemical constituents of *Bidens pilosa* and their α -glucosidase inhibitory activity

JIANG Li-hong¹, ZHANG Sheng-nan¹, GONG Gui-fen¹, LIU Cai-ping¹, FANG Juan¹, HE Dong-yi¹, PAN Zheng-hong², TAN Qin-gang^{1*} (1. Guilin Medical University, Guilin Guangxi 541199; 2. Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin Guangxi 541006)

Abstract: **Objective** To determine the chemical constituents of *Bidens pilosa* and their inhibitory activities against α -glucosidase. **Methods** The chemical constituents of *Bidens pilosa* were isolated and purified by silica gel, Rp-18 and Sephadex LH-20 column chromatography. Their structures were identified by physicochemical properties and spectral data. The inhibition of those constituents on α -glucosidase was detected. **Results** These compounds were identified as scopoletin (1), 6, 7, 3', 4'-tetrahydroxyaurone (2), sulfuretin (3), maritimein (4), butein (5), butein-4-methyl ester (6), 3, 2', 4'-trihydroxy-4-methoxychalcone (7), 8, 3'-dihydroxy-3, 7, 4'-trimethoxy-6-O- β -D-glucopyranosyl flavone (8), 8, 3', 4'-trihydroxyflavone-7-O- β -D-glucopyranoside (9), 7-O- β -D-glucopyranosyl-5, 3'-dihydroxy-3, 6, 4'-trimethoxyflavone (10), (Z)-6-O-(6-O-p-coumaroyl- β -D-glucopyranosyl)-6, 7, 3', 4'-tetrahydroxyaurone (11), cycloart-(23Z)-ene-3 β , 25-diol (12), ursolic acid (13), (22E)-ergosta-6, 22-diene-3 β , 5 β , 8 α -triol (14), and 5 α , 8 α -epidioxyergosta-6, 22-dien-3 β -ol (15). The inhibition of

基金项目: 广西自然科学基金面上项目 (No.2020GXNSFAA259001); 广西植物功能物质研究与利用重点实验室开放课题 (No. FPRU2018-2); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (No. 201610601011)

作者简介: 姜李红, 女, 硕士研究生, 主要从事天然药物化学研究, email: 3524269159@qq.com * **通信作者:** 谭钦刚, 男, 博士, 教授, 主要从事天然药物化学研究, email: qgtan@glmc.edu.cn

compounds **7**, **8**, **11** against α -glucosidase was 13.6%, 30.1%, and 38.6%, respectively. **Conclusion** Compounds **6**, **8**~**9**, **12**~**15** have been obtained from *Bidens* genus for the first time. Compounds **7**, **8** and **11** show weak inhibition against α -glucosidase in the ELISA in vitro.

Key words: Asteraceae; *Bidens pilosa*; chemical constituent; α -glucosidase

鬼针草 (*Bidens pilosa*) 为菊科 (Asteraceae) 鬼针草属 (*Bidens* L.) 植物, 在我国各地区分布广泛, 多生长于荒地、湿地、路边、山坡以及田间等^[1]。鬼针草为我国常用民间药, 具有清热解毒、散瘀活血的功效, 临床主要用于治疗痢疾、腹泻、感冒、炎症等^[2], 也被众多少数民族如白族、苗族、壮族等用来治疗呼吸道感染、咽喉肿痛、风湿关节痛等疾病^[3], 现代研究表明, 该属植物主要含有黄酮类、苯丙素类、聚炔类以及萜类等多种成分, 其中黄酮类化合物是鬼针草属植物中的主要有效成分, 具有一定的降血压、降血糖、抗炎、保护肝脏等作用^[4]。为了从鬼针草中找寻具有良好生物活性的化学成分, 本实验对其乙醇提取物进行了研究, 从该植物地上部分共分离得到 15 个化合物, 分别鉴定为茛菪亭 (**1**)、6, 7, 3', 4'-四羟基橙酮 (**2**)、硫黄菊素 (**3**)、海生菊苷 (**4**)、紫柳因 (**5**)、4-甲氧基紫柳因 (**6**)、3, 2', 4'-三羟基-4-甲氧基查耳酮 (**7**)、8, 3'-dihydroxy-3, 7, 4'-trimethoxy-6-*O*- β -D-glucopyranosyl flavone (**8**)、8, 3', 4'-trihydroxyflavone-7-*O*- β -D-glucopyranoside (**9**)、7-*O*- β -D-glucopyranosyl-5, 3'-dihydroxy-3, 6, 4'-trimethoxyflavone (**10**)、(Z)-6-*O*-(6-*O*-*p*-coumaroyl- β -D-glucopyranosyl)-6, 7, 3', 4'-tetrahydroxyaurone (**11**)、cycloart-(23Z)-ene-3 β , 25-diol (**12**)、熊果酸 (**13**)、(22E)-ergosta-6, 22-diene-3 β , 5 β , 8 α -triol (**14**)、5 α , 8 α -epidioxyergosta-6, 22-dien-3 β -ol (**15**) (如图 1)。其中化合物 **6**、**8**~**9**、**12**~**15** 为首次从该植物中分离得到。酶标法^[5]实验表明, 化合物 **7**、**8** 和 **11** 对 α -葡萄糖苷酶有较弱的抑制活性, 其他化合物无明显抑制活性。

1 材料

Bruker DRX-500 (500 MHz) 核磁共振仪 (Bruker, 瑞士); UPLC-IT-TOF 色谱质谱联用仪 (日本岛津制作所); 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); 三用紫外仪 (ZF-2, 上海市安亭电子仪器厂); Tecan Infinite F200/M200 型多功能酶标仪 (上海宝特生命科学有限公司); 柱层析及薄层色谱所用硅胶 (200~300 目, 青岛海洋化工厂); 葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 (瑞典 Pharmacia 公司); Rp-18 (10~65 μ m, 德国 Merck 公司); 小孔树脂 (MCI) CHP20 (日本 Mitsubishi 公司);

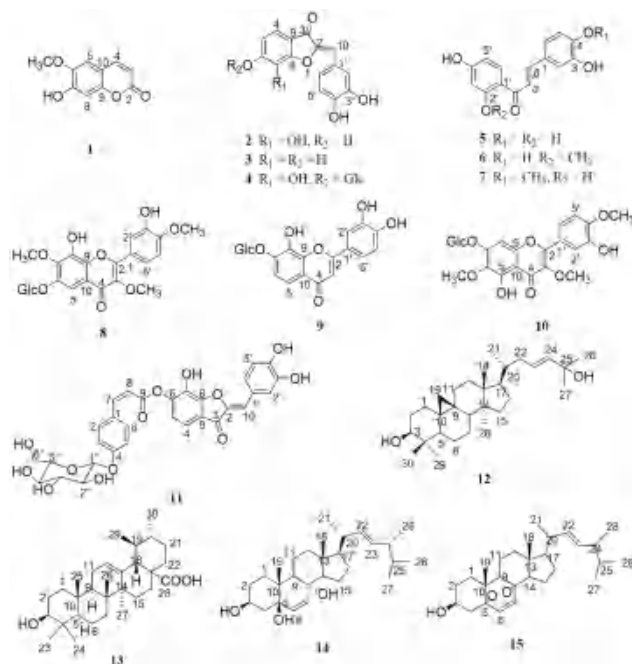


图 1 化合物 **1**~**15** 的结构

Fig 1 Chemical structures of compounds **1**~**15**

10% 的硫酸-乙醇显色剂、阿卡波糖、磷酸缓冲盐溶液 (北京索莱宝科技有限公司); α -葡萄糖苷酶 (美国 Sigma 公司); 4-硝基苯基 α -D-吡喃葡萄糖苷 (东京化成工业株式会社)。

鬼针草于 2018 年 10 月采自四川省邻水县, 由桂林医学院李云秋教授鉴定为菊科鬼针草属植物鬼针草 (*Bidens pilosa*) 的干燥地上部分。植物标本 (凭证编号 Tbp-18) 存放于桂林医学院药学院实验教学中心。

2 提取与分离

取干燥的鬼针草 10 kg, 粉碎后用 5 倍量 95% 乙醇在室温下提取 3 次, 每次 7 d, 合并提取液, 减压浓缩得浸膏 537 g。浸膏用蒸馏水分散, 依次用等体积石油醚萃取 4 次得到石油醚部位 290 g, 乙酸乙酯萃取 5 次, 回收溶剂得乙酸乙酯浸膏 117 g。

乙酸乙酯部位 117 g 经 MCI 柱层析 (甲醇, 75% $\rightarrow$ 90%), 得 6 个组分 I~VI。I 部分经硅胶柱 (二氯甲烷/甲醇, 30:1 $\rightarrow$ 4:1), 得到 15 个部分。I-1 和 I-5 经 Sephadex LH-20 (甲醇) 并重结晶 (乙酸乙酯) 分别得化合物 **1** (40 mg) 和 **5** (7.0 mg); I-7 经 Sephadex LH-20 (甲醇) 后得到 8 个组分 I-7-1~I-7-8。其中 I-7-4 经硅胶柱 (氯仿/

丙酮, 7:1, 2:1) 洗脱得化合物 **2** (3.2 mg); I-12 经硅胶柱层析 (氯仿/甲醇, 16:1, 10:1, 8:1, 5:1) 洗脱, 得到 12 个组分 I-12-1 ~ I-12-12。其中 I-12-5 经 Sephadex LH-20 (甲醇) 得化合物 **11** (13.7 mg); I-12-9 经硅胶柱 (氯仿/甲醇 8:1) 洗脱后经 Sephadex LH-20 (甲醇) 进一步纯化得化合物 **9** (5.1 mg); I-13 经正相硅胶柱 (氯仿/甲醇, 10:1) 洗脱分离后得到 5 个流份。其中 I-13-5 经 Sephadex LH-20 (甲醇) 并重结晶 (丙酮) 得化合物 **8** (7.4 mg) 和 **10** (4.3 mg); I-15 经正相 (氯仿/甲醇, 8:1, 7.2:1, 5:1) 洗脱, 得到 6 个部分。其中 I-15-2 经 Sephadex LH-20 (甲醇) 得化合物 **4** (4.4 mg); II 部分经硅胶柱 (氯仿/丙酮, 1:0 → 2:1) 梯度洗脱得到 10 个流份。II-1 经硅胶柱 (石油醚/丙酮, 5:1) 等度洗脱后再经 Sephadex LH-20 (甲醇) 得化合物 **7** (40 mg); II-6 经硅胶柱 (石油醚/丙酮, 5:1) 分离后再经 Sephadex LH-20 (甲醇) 得化合物 **3** (57.8 mg)。

石油醚部分 290 g, 经硅胶柱 (石油醚/丙酮, 1:0 → 1:1) 得 10 个流份 Fr-1 ~ Fr-10。Fr-5 组分经 MCI (90% 甲醇水) 洗脱, 得到 6 个部分 Fr-5-1 ~ Fr-5-6。Fr-5-2 经 Sephadex LH-20 (甲醇) 后再经硅胶柱 (石油醚/丙酮 8:1) 得化合物 **15** (7.1 mg); Fr-6 经 MCI (90% 甲醇) 洗脱后再经 Rp-18 柱 (80% → 90% 甲醇) 梯度洗脱、Sephadex LH-20 (甲醇) 得化合物 **12** (4.8 mg) 和 **13** (3.8 mg); Fr-7 ~ Fr-10 合并经 MCI (70% → 90% 甲醇)、硅胶柱 (石油醚/丙酮, 6:1, 4:1, 2:1) 和 Sephadex LH-20 (甲醇) 得化合物 **6** (49.4 mg); Fr-4 除去谷甾醇后余下母液经硅胶柱 (石油醚/乙酸乙酯, 6:1) 得化合物 **14** (9.0 mg)。

3 结构鉴定

化合物 **1**: 淡黄色簇状结晶 (乙酸乙酯), $C_{10}H_8O_4$, ESI-MS m/z 191 $[M - H]^-$ 。 1H -NMR [500 MHz, $(CD_3)_2CO$]: δ 3.90 (3H, s, OCH_3), 6.17 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 6.79 (1H, s, H-8), 7.19 (1H, s, H-5), 7.84 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-4); ^{13}C -NMR [125 MHz, $(CD_3)_2CO$]: δ 160.8 (C-2), 112.8 (C-3), 144.1 (C-4), 109.5 (C-5), 150.7 (C-6), 151.3 (C-7), 103.2 (C-8), 145.4 (C-9), 111.6 (C-10), 56.2 (OCH_3)。以上数据与文献^[5]的报道基本一致, 故鉴定化合物 **1** 为菝葜亭。

化合物 **2**: 橙红色粉末, $C_{15}H_{10}O_6$, ESI-MS m/z 285 $[M - H]^-$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 6.70 (1H, s, H-10), 6.72 (1H, s, H-4), 6.86 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 7.18 (1H, d, $J = 8.5$ Hz,

H-5), 7.39 (1H, dd, $J = 8.5, 1.5$ Hz, H-6'), 7.61 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2'); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 149.4 (C-2), 185.3 (C-3), 116.3 (C-4), 114.7 (C-5), 156.1 (C-6), 131.4 (C-7), 157.0 (C-8), 116.7 (C-9), 113.6 (C-10), 126.5 (C-1'), 119.4 (C-2'), 146.7 (C-3'), 148.0 (C-4'), 116.9 (C-5'), 125.7 (C-6')。以上数据与文献^[6]的报道基本一致, 故鉴定化合物 **2** 为 6, 7, 3', 4'-四羟基橙酮。

化合物 **3**: 黄绿色粉末, $C_{15}H_{10}O_5$, ESI-MS m/z 269 $[M - H]^-$ 。 1H -NMR [500 MHz, $(CD_3)_2CO$]: δ 6.62 (1H, s, H-10), 6.77 (1H, dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, H-6'), 6.81 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-7), 6.93 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-4), 7.33 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-5), 7.56 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.60 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'); ^{13}C -NMR [125 MHz, $(CD_3)_2CO$]: δ 148.2 (C-2), 182.4 (C-3), 126.4 (C-4), 112.2 (C-5), 166.5 (C-6), 99.4 (C-7), 168.9 (C-8), 115.1 (C-9), 113.4 (C-10), 125.6 (C-1'), 116.5 (C-2'), 146.1 (C-3'), 147.3 (C-4'), 118.7 (C-5'), 125.7 (C-6')。以上数据与文献^[7]的报道基本一致, 故鉴定化合物 **3** 为硫黄菊素。

化合物 **4**: 黄色粉末, $C_{21}H_{20}O_{11}$, ESI-MS m/z 447 $[M - H]^-$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 3.47 ~ 3.61 (4H, H-2', 3', 4', 5'), 3.76 (1H, dd, $J = 12.0, 5.5$ Hz, H-6b), 3.95 (1H, dd, $J = 12.0, 2.0$ Hz, H-6a), 5.03 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1''), 6.80 (1H, s, H-10), 6.89 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 7.17 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5), 7.29 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-4), 7.38 (1H, dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, H-6'), 7.58 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'); ^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 147.6 (C-2), 185.5 (C-3), 115.9 (C-4), 113.8 (C-5), 153.8 (C-6), 134.4 (C-7), 156.2 (C-8), 119.7 (C-9), 115.7 (C-10), 125.5 (C-1'), 119.3 (C-2'), 146.8 (C-3'), 149.7 (C-4'), 116.8 (C-5'), 126.8 (C-6'), 103.4 (C-1''), 74.8 (C-2''), 78.6 (C-3''), 71.2 (C-4''), 77.6 (C-5''), 62.4 (C-6'')。以上数据与文献^[6]报道的基本一致, 故鉴定化合物 **4** 为海生菊苷。

化合物 **5**: 黄色粉末, $C_{15}H_{12}O_5$, ESI-MS m/z 271 $[M - H]^-$ 。 1H -NMR (500 MHz, CD_3OD): δ 6.32 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-3'), 6.45 (1H, dd, $J = 8.5, 2.5$ Hz, H-5'), 6.85 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 7.14 (1H, dd, $J = 8.5, 2.5$ Hz, H-6), 7.21 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 7.57 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H- α), 7.75 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H- β), 7.98 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-6'); ^{13}C -NMR (125 MHz,

CD₃OD): δ 128.5 (C-1), 115.8 (C-2), 146.9 (C-3), 149.9 (C-4), 116.6 (C-5), 118.4 (C-6), 193.5 (C=O), 123.6 (C- α), 146.1 (C- β), 114.7 (C-1'), 166.4 (C-2'), 103.9 (C-3'), 167.5 (C-4'), 109.2 (C-5'), 133.3 (C-6')。以上数据与文献^[8]的报道基本一致, 故鉴定化合物 **5** 为紫铆因。

化合物 **6**: 黄色粉末, C₁₆H₁₄O₅, ESI-MS m/z 285 [M - H]⁻。 ¹H-NMR[500 MHz, (CD₃)₂CO]: δ 3.91 (3H, s, OCH₃), 6.37 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-3'), 6.48 (1H, dd, J = 9.0, 2.5 Hz, H-5'), 7.02 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5), 7.27 (1H, dd, J = 8.5, 2.0 Hz, H-6), 7.40 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-2), 7.75 (1H, d, J = 15.5 Hz, H- α), 7.79 (1H, d, J = 15.0 Hz, H- β), 8.15 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-6'); ¹³C-NMR[125 MHz, (CD₃)₂CO]: δ 128.3 (C-1), 114.0 (C-2), 146.9 (C-3), 150.2 (C-4), 111.4 (C-5), 122.6 (C-6), 191.9 (C=O), 118.4 (C- α), 144.3 (C- β), 113.6 (C-1'), 166.3 (C-2'), 102.8 (C-3'), 164.8 (C-4'), 107.8 (C-5'), 132.5 (C-6'), 55.5 (OCH₃)。以上数据与文献^[9]报道的基本一致, 故鉴定化合物 **6** 为 4-甲氧基紫铆因。

化合物 **7**: 黄色粉末, C₁₆H₁₄O₅, ESI-MS m/z 285 [M - H]⁻。 ¹H-NMR[500 MHz, (CD₃)₂CO]: δ 3.91 (3H, s, OCH₃), 6.36 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-3'), 6.47 (1H, dd, J = 9.0, 2.5 Hz, H-5'), 7.02 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5), 7.27 (1H, dd, J = 8.5, 2.0 Hz, H-6), 7.40 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2), 7.75 (1H, d, J = 15.5 Hz, H- α), 7.79 (1H, d, J = 15.5 Hz, H- β), 8.16 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-6'), 13.6 (1H, s, 2'-OH); ¹³C-NMR[125 MHz, (CD₃)₂CO]: δ 129.2 (C-1), 114.9 (C-2), 147.8 (C-3), 151.0 (C-4), 112.3 (C-5), 123.5 (C-6), 192.9 (C=O), 119.2 (C- α), 145.2 (C- β), 114.6 (C-1'), 167.6 (C-2'), 103.8 (C-3'), 165.6 (C-4'), 108.7 (C-5'), 133.4 (C-6'), 56.3 (OCH₃)。以上数据与文献^[10]报道的基本一致, 故鉴定化合物 **7** 为 3, 2', 4'-三羟基-4-甲氧基查耳酮。

化合物 **8**: 黄色粉末, C₂₄H₂₆O₁₃, ESI-MS m/z 567 [M+HCOO]⁻。 ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 3.44 (1H, m, H-4''), 3.54 (1H, t, H-5''), 3.59 (1H, m, H-2''), 3.74 (1H, dd, J = 12.0, 6.0 Hz, H-3''), 3.84 (3H, s, 7-OCH₃), 3.92 (3H, s, 3-OCH₃), 3.97 (3H, s, 4'-OCH₃), 4.60 (1H, s, H-6''), 5.14 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-1''), 6.94 (1H, s, H-5), 7.09 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5'), 7.65 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 7.70 (1H, dd,

J = 8.5, 2.0 Hz, H-6'); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 158.4 (C-2), 139.9 (C-3), 180.4 (C-4), 95.6 (C-5), 157.9 (C-6), 133.9 (C-7), 153.8 (C-8), 153.4 (C-9), 108.2 (C-10), 124.1 (C-1'), 116.3 (C-2'), 147.7 (C-3'), 151.9 (C-4'), 112.4 (C-5'), 122.4 (C-6'), 102.0 (C-1''), 74.8 (C-2''), 78.0 (C-3''), 71.3 (C-4''), 78.5 (C-5''), 62.6 (C-6''), 61.5 (7-OCH₃), 60.6 (3-OCH₃), 56.4 (4'-OCH₃)。以上数据与文献^[11]报道的基本一致, 故鉴定化合物 **8** 为 8, 3'-dihydroxy-3, 7, 4'-trimethoxy-6-*O*- β -D-glucopyranosyl flavone。

化合物 **9**: 黄色粉末, C₂₁H₂₀O₁₁, ESI-MS m/z 285 [M-Glc]。 ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 3.44 (1H, m, H-4''), 3.50 (1H, m, H-2''), 3.57 (1H, m, H-3''), 3.72 (1H, dd, J = 12.0, 5.5 Hz, H-5''), 3.92 (2H, m, H-6''), 4.99 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-1''), 6.76 (1H, s, H-3), 6.86 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 7.14 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-6), 7.25 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5), 7.35 (1H, dd, J = 8.5, 2.0 Hz, H-6'), 7.55 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2''); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 156.3 (C-2), 113.9 (C-3), 185.5 (C-4), 126.8 (C-5), 115.6 (C-6), 153.8 (C-7), 134.4 (C-8), 149.7 (C-9), 119.2 (C-10), 125.5 (C-1'), 115.9 (C-2'), 147.6 (C-3'), 146.8 (C-4'), 116.8 (C-5'), 119.4 (C-6'), 103.4 (C-1''), 74.8 (C-2''), 77.6 (C-3''), 71.3 (C-4''), 78.6 (C-5''), 62.4 (C-6'')。以上数据与文献^[12]报道的基本一致, 故鉴定化合物 **9** 为 8, 3', 4'-trihydroxyflavone-7-*O*- β -D-glucopyranoside。

化合物 **10**: 浅黄色粉末, C₂₄H₂₆O₁₃, ESI-MS m/z 557 [M+Cl]⁻。 ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 3.39 (2H, m, H-2'', 4''), 3.50 (1H, t, J = 8.5 Hz, H-3''), 3.56 (2H, m, H-6''), 3.70 (1H, dd, J = 12.0, 6.0 Hz, H-5''), 3.81 (3H, s, 6-OCH₃), 3.88 (3H, s, 3-OCH₃), 3.94 (3H, s, 4'-OCH₃), 5.11 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-1''), 6.92 (1H, s, H-8), 7.07 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-5'), 7.63 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 7.68 (1H, dd, J = 8.5, 2.0 Hz, H-6'); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 158.0 (C-2), 139.9 (C-3), 180.5 (C-4), 153.8 (C-5), 133.9 (C-6), 158.4 (C-7), 95.6 (C-8), 153.5 (C-9), 108.2 (C-10), 124.1 (C-1'), 116.3 (C-2'), 147.7 (C-3'), 151.9 (C-4'), 112.4 (C-5'), 122.4 (C-6'), 102.0 (C-1''), 74.8 (C-2''), 78.5 (C-3''), 71.3 (C-4''), 78.0 (C-5''), 62.6 (C-6''),

61.5 (4'-OCH₃), 60.6 (3-OCH₃), 56.4 (6-OCH₃)。以上数据与文献^[10]报道的基本一致, 故鉴定化合物 **10** 为 7-*O*-β-*D*-glucopyranosyl-5, 3'-dihydroxy-3, 6, 4'-trimethoxyflavone。

化合物 **11**: 红色粉末, C₃₀H₂₆O₁₃, ESI-MS *m/z* 285 [M-C₁₅H₁₇O₇]⁻。¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 橙酮部分 [6.74 (1H, s, H-10), 6.88 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 7.09 (2H, m, H-4, 5), 7.38 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, H-6'), 7.60 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-2')]; 葡萄糖部分 [3.49 (1H, dd, *J* = 10.0, 8.5 Hz, H-4), 3.57 ~ 3.65 (2H, m, H-2, 3), 3.81 (1H, m, H-5), 4.39 (1H, dd, *J* = 12.0, 7.0 Hz, H_b-6), 4.61 (1H, dd, *J* = 12.0, 2.0 Hz, H_a-6), 5.02 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1)]; 对-香豆酸部分 [6.37 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-8), 6.83 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-3, 5), 7.46 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2, 6), 7.65 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-7)]; ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 橙酮部分 [147.6 (C-2), 185.9 (C-3), 115.4 (C-4), 113.9 (C-5), 154.4 (C-6), 129.9 (C-7), 157.0 (C-8), 119.1 (C-9), 114.9 (C-10), 125.6 (C-1'), 119.2 (C-2'), 146.9 (C-3'), 149.7 (C-4'), 116.7 (C-5'), 127.1 (C-6')]; 葡萄糖部分 [103.3 (C-1''), 74.8 (C-2''), 77.5 (C-3''), 71.8 (C-4''), 75.9 (C-5''), 64.6 (C-6'')]; 酰基部分 [126.8 (C-1), 131.2 (C-2, 6), 116.9 (C-3, 5), 161.4 (C-4), 146.8 (C-7), 114.1 (C-8), 168.9 (C-9)]。以上数据与文献^[13]报道的基本一致, 故鉴定化合物 **11** 为 (Z)-6-*O*-(6-*O*-*p*-coumaryoyl-β-*D*-glucopyranosyl)-6, 7, 3', 4'-tetrahydroxyaurone。

化合物 **12**: 白色针状结晶 (甲醇), C₃₀H₅₀O₂, ESI-MS *m/z* 475 [M+Cl-2H]³⁻。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 0.33 (1H, d, *J* = 4.5 Hz, H-19), 0.56 (1H, d, *J* = 4.0 Hz, H-19), 0.77 (1H, m, H-6b), 0.81 (3H, s, H-29), 0.88 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-21), 0.89 (3H, s, H-30), 0.97 (3H, s, H-28), 0.98 (3H, s, H-18), 1.26 (3H, m, H-26), 1.31 (1H, m, H-1b), 1.32 (3H, m, H-27), 1.35 (1H, m, H-16b), 1.51 (5H, m, H-20, H-5, H-7a, H₂-15), 1.56 (2H, m, H-1a, H-8), 1.59 (2H, m, H-6a, H-2b), 1.62 (3H, m, H₂-12, H-17), 1.75 (2H, m, H-22b, H-2a), 1.96 (2H, m, H-11a, H-16a), 2.27 (1H, m, H-22a), 3.28 (1H, m, H-3), 5.64 (1H, m, H-23), 6.12 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-24); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 32.0 (C-1), 30.4 (C-2), 78.8 (C-3), 40.5 (C-4),

47.1 (C-5), 21.1 (C-6), 26.0 (C-7), 47.9 (C-8), 20.0 (C-9), 26.1 (C-10), 26.5 (C-11), 32.8 (C-12), 45.3 (C-13), 48.8 (C-14), 35.6 (C-15), 28.1 (C-16), 52.0 (C-17), 18.1 (C-18), 30.0 (C-19), 36.4 (C-20), 18.3 (C-21), 39.0 (C-22), 125.6 (C-23), 139.4 (C-24), 70.7 (C-25), 29.9 (C-26), 29.8 (C-27), 25.4 (C-28), 14.0 (C-29), 19.3 (C-30)。以上数据与文献^[14]报道的基本一致, 故鉴定化合物 **12** 为 cycloart-(23Z)-ene-3β, 25-diol。

化合物 **13**: 白色粉末, C₃₀H₄₈O₃, ESI-MS *m/z* 479 [M+Na]⁺。¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.68 (4H, s, H₃-24, H-5), 0.75 (3H, s, H-26), 0.81 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-29), 0.87 (3H, s, H-25), 0.90 (3H, s, H-23), 0.92 (3H, s, H-30), 1.04 (3H, s, H-27), 1.24 ~ 1.35 (6H, H₂-7, H₂-21, H-19, H-6b), 1.44 (2H, s, H-2), 1.46 (2H, d, *J* = 3.5 Hz, H-6a), 1.48 (2H, d, *J* = 5.0 Hz, H-22), 1.51 (2H, s, H-1), 1.54 (2H, m, H-16), 1.57 (1H, s, H-9), 1.82 (3H, m, H₂-11, H-18), 3.00 (1H, s, H-3), 4.31 (1H, s, 3-OH), 5.13 (1H, t, *J* = 7.0 Hz, H-12); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 36.5 (C-1), 27.0 (C-2), 76.9 (C-3), 38.3 (C-4), 54.8 (C-5), 18.0 (C-6), 30.2 (C-7), 38.5 (C-8), 47.0 (C-9), 36.3 (C-10), 23.8 (C-11), 124.6 (C-12), 138.2 (C-13), 41.7 (C-14), 30.7 (C-15), 22.9 (C-16), 46.9 (C-17), 52.4 (C-18), 38.3 (C-19), 38.4 (C-20), 27.6 (C-21), 32.7 (C-22), 28.3 (C-23), 16.9 (C-24), 16.1 (C-25), 15.2 (C-26), 23.3 (C-27), 178.3 (C-28), 17.0 (C-29), 21.1 (C-30)。以上数据与文献^[15]报道的基本一致, 故鉴定化合物 **13** 为熊果酸。

化合物 **14**: 白色羽状晶体 (丙酮), C₂₈H₄₆O₃, ESI-MS *m/z* 475 [M+HCOO]⁻。¹H-NMR [500 MHz, (CD₃)₂CO]: δ 0.79 (3H, m, H-26), 0.83 (3H, d, *J* = 1.5 Hz, H-21), 0.85 (3H, s, H-18), 0.88 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-27), 1.02 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-28), 1.25 (3H, m, H-12a, 2a, 16a), 1.38 ~ 1.44 (2H, m, H-25, 16b), 1.46 ~ 1.51 (3H, m, H₂-11, 14), 1.70 ~ 1.77 (2H, m, H-1b, 4b), 1.83 ~ 1.90 (3H, m, H-24, 20, 12b), 1.92 (1H, m, H-2b), 1.96 (1H, m, H-15b), 3.76 (1H, m, H-3), 5.20 (1H, dd, *J* = 16.5, 8.0 Hz, H-22), 5.26 (1H, dd, *J* = 16.5, 7.5 Hz, H-23), 6.22 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-6), 6.48 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-7); ¹³C-NMR [125 MHz, (CD₃)₂CO]:

δ 35.7 (C-1), 31.1 (C-2), 66.3 (C-3), 38.0 (C-4), 82.4 (C-5), 131.2 (C-6), 136.4 (C-7), 79.4 (C-8), 52.5 (C-9), 37.8 (C-10), 21.3 (C-11), 40.3 (C-12), 45.2 (C-13), 52.7 (C-14), 27.1 (C-15), 24.0 (C-16), 57.0 (C-17), 13.2 (C-18), 18.5 (C-19), 40.5 (C-20), 20.0 (C-21), 132.9 (C-22), 136.4 (C-23), 43.7 (C-24), 33.8 (C-25), 20.3 (C-26), 18.0 (C-27), 21.3 (C-28)。以上数据与文献^[16]报道的基本一致,故鉴定化合物 **14** 为 (22*E*)-ergosta-6, 22-diene-3 β , 5 β , 8 α -triol。

化合物 **15**: 白色晶体 (甲醇), C₂₈H₄₄O₃, ESI-MS m/z 475 [M+HCOOH+H]⁺。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 0.84 (3H, s, H-18), 0.85 (3H, d, J = 1.0 Hz, H-26), 0.86 (3H, s, H-27), 0.91 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-28), 1.02 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-21), 1.46 ~ 1.56 (5H, m, H-9, 11a, 15b, 16b, 25), 1.57 (1H, d, J = 7.0 Hz, H-2b), 1.63 ~ 1.66 (3H, m, H-1b, 15a, 14), 1.86 ~ 1.89 (2H, m, H-2a, 16a), 1.91 ~ 2.00 (4H, m, H-1a, 12a, 4b, 24), 2.13 (2H, m, H-20, 4a), 4.00 (1H, m, H-3), 5.17 (1H, dd, J = 15.5, 8.0 Hz, H-22), 5.25 (1H, dd, J = 15.5, 7.5 Hz, H-23), 6.27 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-6), 6.53 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-7); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 34.7 (C-1), 30.1 (C-2), 66.5 (C-3), 37.0 (C-4), 82.2 (C-5), 135.4 (C-6), 130.8 (C-7), 79.4 (C-8), 51.1 (C-9), 37.0 (C-10), 20.6 (C-11), 39.4 (C-12), 44.6 (C-13), 51.7 (C-14), 23.4 (C-15), 28.6 (C-16), 56.2 (C-17), 12.9 (C-18), 18.2 (C-19), 39.7 (C-20), 20.9 (C-21), 135.2 (C-22), 132.3 (C-23), 42.8 (C-24), 33.1 (C-25), 19.6 (C-26), 19.9 (C-27), 17.6 (C-28)。以上数据与文献^[17]报道的基本一致,故鉴定化合物 **15** 为 5 α , 8 α -epidioxyergosta-6, 22-dien-3 β -ol。

4 α -葡萄糖苷酶活性筛选

参照文献^[18]的方法,并适当修改。依次加入 50 μ L 0.5 mg $\cdot$ mL⁻¹ 样品 (化合物 **2** ~ **4**、**6** ~ **9**、**11** 和 **14**, 阳性对照阿卡波糖)、50 μ L 磷酸缓冲盐溶液 (0.1 mmol $\cdot$ L⁻¹、pH 6.8) 和 100 μ L α -葡萄糖苷酶 (0.2 U $\cdot$ mL⁻¹) 后于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中反应 10 ~ 15 min, 再加入 50 μ L 4-硝基苯基 α -D-吡喃葡萄糖苷 (2 mmol $\cdot$ L⁻¹) 在 405 nm 测定 OD 值, 每组设置 3 个复孔, 空白组和无底物对照组分别加入等量磷酸缓冲盐溶液。

抑制率 (%) = $[(OD_{\text{空白}} - OD_{\text{给药}} + OD_{\text{无底物}}) / OD_{\text{空白}}] \times 100\%$

结果化合物 **7**、**8** 和 **11** 对 α -葡萄糖苷酶的抑制率分别为 13.6%, 30.1% 和 38.6%, 其他化合物未见有抑制活性。

5 讨论

糖尿病是胰岛素分泌和利用缺陷所引起的以慢性高血糖为特征的代谢紊乱性临床综合征, 多年来一直是严重威胁人类健康的世界性公共卫生问题^[19]。本实验对分离得到的化合物进行了 α -葡萄糖苷酶抑制活性初筛, 除化合物 **10** 和 **12** 因分离纯化后的量较少及文献已报道化合物 **1**、**5**、**13** 和 **15** 具有良好的抑制 α -葡萄糖苷酶的活性^[20-23] 外, 采用酶标法测试了化合物 **2** ~ **4**、**6** ~ **9**、**11** 和 **14** 抑制 α -葡萄糖苷酶的活性, 阳性对照阿卡波糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制率为 76.3%, 化合物 **7**、**8** 和 **11** 分别为 13.6%, 30.1% 和 38.6%, 其他化合物未见有抑制活性。

鬼针草属药用植物所含化学成分类型多样, 本实验从鬼针草提取物中分离得到 15 个化合物, 其中 1 个香豆素, 2 个三萜类, 2 个甾体, 10 个黄酮类化学成分。黄酮类化合物在抗炎、抗肿瘤、抗氧化、神经保护及降压降糖等多方面具有潜在的疗效^[24], 具有很好的开发价值。作为治疗糖尿病的传统草药, 鬼针草在墨西哥、夏威夷等地应用广泛, 我国民间也有将该植物全草水煎、口服, 用于治疗糖尿病的历史^[25]。

鬼针草属在我国资源丰富, 具有一定的生物活性和临床疗效, 今后应加强对其有效成分及有效成分群的研究, 希望能在该属植物中发现活性更好的先导化合物, 为新药研究奠定理论基础。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 75 卷. 北京: 科学出版社, 1979: 377.
- [2] 陈川. 鬼针草的临床应用 [J]. 临床合理用药杂志, 2013, 6 (6): 28.
- [3] 贾敏如, 李星炜. 中国民族药志要 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005: 95.
- [4] 王碧晴, 赵俊男, 张颖, 等. 鬼针草的药理作用研究进展 [J]. 中医药导报, 2019, 25 (18): 100-103.
- [5] 冀保全, 冯宝民, 史丽颖, 等. 荨麻根中化学成分的研究 [J]. 中国药理学杂志, 2009, 44 (18): 1372-1374.
- [6] 赵爱华, 赵勤实, 彭丽艳, 等. 鬼针草中一个新的查耳酮甙 [J]. 云南植物研究, 2004, 26 (1): 121-126.
- [7] 李琳, 何红平, 郝小江. 蒙自木蓝中的化学成分研究 [J]. 中草药, 2006, 37 (5): 665-666.
- [8] 王春华, 王英, 王国才. 牛大力的化学成分研究 [J]. 中草药, 2008, 39 (7): 972-975.
- [9] 殷志琦, 巢剑非, 张雷红, 等. 构树化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18 (3): 420-422.
- [10] 田昕, 周思祥, 魏荷琳, 等. 三叶鬼针草中的黄酮类成

- 分[J]. 中国药学, 2011, 20(5): 518-522.
- [11] Xu RS, Zhang J, Yuan K. Two new flavones from *Tridax procumbens* Linn[J]. *Molecules*, 2010, 15(9): 6357-6364.
- [12] Yang XW, Huang MZ, Jin YS, et al. Phenolics from *Bidens bipinnata* and their amylase inhibitory properties[J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(7): 1169-1175.
- [13] Sashida Y, Ogawa K, Kitada M, et al. New aurone glucosides and new phenylpropanoid glucosides from *Bidens pilosa* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1991, 39(3): 709-711.
- [14] Martinez CE, Lozada MC, Ortega SH, et al. ^1H and ^{13}C NMR characterization of new cycloartane triterpenes from *Mangifera indica* [J]. *Magn Reson Chem*, 2012, 50(1): 52-57.
- [15] Silva MG, Vieira I, Menges F, et al. Variation of ursolic acid content in eight *Ocimum* species from northeastern Brazil[J]. *Molecules*, 2008, 13(10): 2482-2487.
- [16] Song L, Wang XF, Wu Y, et al. Chemical constituents from the linseed meal[J]. *Fitoterapia*, 2014, 97: 15-22.
- [17] 何萍, 李帅, 王素娟, 等. 半夏化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(9): 671-674.
- [18] 韦国兵, 熊巍. 金盏银盘提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用研究[J]. 山东化工, 2012, 41(9): 1-3.
- [19] 王中群. 重视糖尿病大血管并发症的发病、机制、评估与防治研究[J]. 中南医学科学杂志, 2022, 50(1): 1-6.
- [20] Jang JH, Park JE, Han JS. Scopoletin inhibits α -glucosidase in vitro and alleviates postprandial hyperglycemia in mice with diabetes[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 834: 152-156.
- [21] Rocha S, Sousa A, Ribeiro D, et al. A study towards drug discovery for the management of type 2 diabetes *mel-litus* through inhibition of the carbohydrate-hydrolyzing enzymes α -amylase and α -glucosidase by chalcone derivatives[J]. *Food Funct*, 2019, 10(9): 5510-5520.
- [22] Chao C, Chen Y, Lin LG, et al. Simultaneous determination of α -glucosidase inhibitory triterpenoids in *Psidium guajava* using HPLC-DAD-ELSD and pressurized liquid extraction[J]. *Molecules*, 2020, 25(6): 1278.
- [23] Chen SD, Yong TQ, Xiao C, et al. Pyrrole alkaloids and ergosterols from *Grifola frondosa* exert anti- α -glucosidase and anti-proliferative activities[J]. *J Funct Foods*, 2018, 43: 196-205.
- [24] 祁建宏, 董芳旭. 黄酮类化合物药理作用研究进展[J]. 北京联合大学学报, 2020, 34(3): 89-92.
- [25] 王玲, 崔东安, 周绪正, 等. 鬼针草的化学成分与药理作用[J]. 现代药物与临床, 2009, 24(3): 147-150.
- (收稿日期: 2022-04-28; 修回日期: 2022-07-06)

秦皮乙素纳米结晶的制备与抗炎活性评价

程雯, 朱洁, 张永帅, 王征, 梁艳妮* (陕西中医药大学 陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心/秦药特色资源研究开发国家重点实验室(培育)/陕西省创新药物研究中心, 陕西 咸阳 712083)

摘要: 目的 优化秦皮乙素纳米结晶的制备工艺并对所得纳米结晶进行初步评价。方法 将适量秦皮乙素溶于乙醇(良溶剂)并超声助溶, 均匀加入到搅拌条件下的水溶液(不良溶剂)中, 使之过饱和而析出结晶。考察良溶剂与不良溶剂比例、稳定剂种类、稳定剂浓度、药物浓度、冻干保护剂种类对纳米结晶粒径的影响; 比较秦皮乙素纳米结晶和秦皮乙素的体外溶出度; 利用小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 分析秦皮乙素纳米结晶的抗炎活性。结果 最优制备工艺为: 以 $4\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 聚乙烯吡咯烷酮作为单一稳定剂; 良溶剂与不良溶剂比例为 1:20, 药物质量浓度为 $7\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 超声 120 min, 得到的秦皮乙素纳米结晶粒径为 $(18.68 \pm 0.56)\text{ nm}$, 多分散系数为 (0.357 ± 0.008) 。冻干保护剂选择 D-山梨醇制得的 ES-NC 冻干粉效果好, 粒径为 $(30.74 \pm 3.00)\text{ nm}$ 。体外抗炎实验表明秦皮乙素纳米结晶可以抑制脂多糖诱导 M1 型巨噬细胞 RAW264.7 产生一氧化氮, 下调促炎性细胞因子肿瘤坏死因子- α 、白介素-8 水平, 上调抑炎性细胞因子白介素-4 水平。结论 秦皮乙素纳米结晶制备工艺简便, 可显著提高秦皮乙素的溶解度和体外溶出度, 并具有很好的体外抗炎活性, 为其新剂型开发提供理论依据。

关键词: 秦皮乙素; 纳米结晶; 反溶剂沉淀法; 体外溶出度; 粒径; 抗炎

中图分类号: R284, R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2022)12-2746-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.008

基金项目: 陕西省创新人才推进计划-青年科技新星项目(No.2019KJXX-025); 陕西省教育厅重点项目(No.20JY012); 陕西高校青年科技创新团队(No.陕教[2019]90号); 陕西省科技厅项目(No.2022SF-222); 陕西中医药大学研究生创新实践能力提升项目(No.ZG035)。

作者简介: 程雯, 女, 硕士, 主要从事药物作用及机制研究, email: wen390892120@qq.com *通信作者: 梁艳妮, 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药功效物质基础与作用机制研究, email: aiziji_2005@126.com

Preparation, characterization and anti-inflammatory of esculetin nanocrystals

CHENG Wen, ZHU Jie, ZHANG Yong-shuai, WANG Zheng, LIANG Yan-ni* (Co-Construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine Resources Industrialization by Shaanxi & Education Ministry/State Key Laboratory of Research & Development of Characteristic Qin Medicine Resources (Cultivation)/Shaanxi Innovative Drug Research Center, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang Shaanxi 712083)

Abstract: Objective To optimize the preparation of esculetin nanocrystals (ES-NC) and evaluate it preliminarily. **Methods** An appropriate amount of esculetin (ES) was dissolved in ethanol by ultrasonic method. It is uniformly added to the water under stirring conditions to make it supersaturate and crystallize. Several factors were optimized, including ratio of good solvent and poor solvent, types of stabilizer, concentrations of stabilizer, drug concentrations and types of lyoprotectant. Their effect on the nanocrystals was also observed. The dissolution rates in vitro of ES-NC and ES were determined. RAW264.7 cells were used to analyze the anti-inflammatory activity of ES-NC. **Results** The optimal conditions for the preparation of ES-NC included $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ polyvinylpyrrolidone as a single stabilizer; the ratio of good solvent and poor solvent was 1 : 20, the drug concentration was $7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and the ultrasonic time was 120 min. The obtained particle size of ES-NC was $(18.68 \pm 0.56) \text{ nm}$, and the polydispersity index was (0.357 ± 0.008) . D-sorbitol as the lyophilized protective agent for the preparation of lyophilized powder had good resolubility, and the particle size was $(30.74 \pm 3.00) \text{ nm}$. In vitro anti-inflammatory experiments showed that ES-NC reduced the production of nitric oxide, $\text{TNF-}\alpha$ and IL-8, and increased the levels of IL-4 in LPS-induced macrophage RAW264.7. **Conclusion** The preparation process of ES-NC is simple and convenient, which can significantly improve the solubility and dissolution in vitro of ES, with fairly good anti-inflammatory effect. This study provides a theoretical basis for the development of new dosage forms of ES.

Key words: esculetin; nanocrystal; anti-solvent precipitation; dissolution in vitro; particle size; anti-inflammation

秦皮是一种常用中药, 隶属于木犀科植物白蜡树 *Fraxinus chinensis* Roxb. 的干燥枝皮或干皮, 为“秦药”大宗道地中药材之一, 资源丰富。秦皮中的秦皮乙素是香豆素的衍生物, 为白色至浅黄色针状结晶, 化学名称为 6, 7-二羟基香豆素 (esculetin, ES, 见图 1)。秦皮乙素具有抗肿瘤、抗氧化、抗菌、抗炎、抗阿尔茨海默病等多种药理作用^[1], 其中抗炎作用研究广泛。秦皮乙素可以通过抑制白介素 (IL)-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等炎症因子的产生, 从而减轻肺损伤^[2]。但是其水溶性较差, 生物利用率低, 剂型研究和临床研究较少。目前关于秦皮乙素制剂的研究已有微乳、纳米粒等^[3-4], 在改善秦皮乙素的溶解性和生物利用度等方面取得一定进展^[5]。

纳米技术的发展愈加迅速, 其在医药领域的研究和应用也随之变得广泛。纳米技术主要包括两种: 一是将药物本身制成纳米粒, 二是将一定

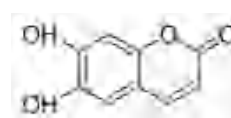


图 1 秦皮乙素的结构

Fig 1 Chemical structure of esculetin

形式的纳米载体与药物相结合, 如纳米结晶、纳米乳、脂质体等^[6]。纳米结晶制剂是一种新兴药物递送系统, 具有制备工艺简单、所用辅料少等优点^[7], 可以降低药物粒径, 增加难溶性药物的饱和溶解度和溶出速度, 进而提高其口服后吸收和生物利用度。制备方法分为“Top-down”和“Bottom-up”两种类型。“Bottom-up”技术是将含有药物的溶剂加入至另一种非溶剂中, 使药物浓度过饱和结晶, 包括沉淀法、乳化法等。“Bottom-up”制备技术的前提是所选良溶剂与不良溶剂对药物的溶解能力要有一定差距, 且良溶剂与不良溶剂互溶。“Top-down”技术是指将大的药物粒子分

散成小的药物粒子,包括介质研磨法、高压均质法,这两种方式方法是目前我国工业企业生产发展纳米材料结晶制剂的最主要制备方法^[8]。反溶剂沉淀法属于“Bottom-up”技术,是制备纳米结晶的常用方法,实验材料易得,具有工艺简单、易操作等优点^[9]。本文采用反溶剂沉淀法将秦皮乙素制备成纳米结晶,通过单因素实验优化秦皮乙素纳米结晶(esculletin nanocrystal, ES-NC)制备工艺,提高其溶解性和生物利用度并检测其对巨噬细胞抗炎活性的影响。

1 材料

秦皮乙素(ES,阿拉丁试剂上海有限公司,纯度:98%,批号:G1731067);聚乙二醇400(PEG400分析纯)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP K29/32)(天津市科密欧化学试剂有限公司);羟丙甲纤维素(HPMC,上海麦克林生化科技有限公司);十二烷基硫酸钠(SDS,安徽山河药用辅料有限公司);吐温-80、D-山梨醇、无水乙醇(天津市天力化学试剂有限公司);PBS(BI,批号:LOT.2138268);RPMI1640(BI,LOT.2049225);ELISA试剂盒(欣博盛生物公司,批号:M210622-102a);胎牛血清(AusGeneX,批号:FBSS00321-1);小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7(吉尼欧生物公司)。

EYEA N-1100 旋转蒸发器(东京理化器械株式会社);HJ-6B 六联双数显恒温磁力搅拌器(常州丹瑞实验设备有限公司);超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);FA21040 型电子天平(德国赛多利斯公司);Zetasizer nano zs 纳米粒度分析仪(英国马尔文仪器有限公司);JEM-2100 Plus 型透射电子显微镜[东京理化株式会社(日本)];UV-2600 型紫外可见分光光度计[岛津(日本)公司]。

2 方法与结果

2.1 纳米结晶的制备

将适量的秦皮乙素用无水乙醇(良溶剂)溶解,超声助溶,作为有机相;另取纯水(不良溶剂)加入适量稳定剂,作为水相。向搅拌状态下的水相中先加入适量稳定剂,再缓缓地注入有机相,继续搅拌,使两相反应析出纳米结晶,旋蒸除去乙醇,得到 ES-NC。

2.2 良溶剂与不良溶剂比例考察

称取 45 mg 秦皮乙素,溶于 9 mL 无水乙醇中,质量浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,作为良溶剂,以 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ SDS 作为稳定剂,其余条件不变,调整良溶剂(无水乙醇)和不良溶剂(水)的比例为 1:12、1:14、1:16、1:18、1:20、1:22,考

察其对 ES-NC 的粒径及多分散系数(PDI),结果见表 1。当良溶剂与不良溶剂的比例从 1:12 到 1:20,粒径减小;当比例到 1:22 时,粒径增大,故选择良溶剂与不良溶剂的比例为 1:20 进行后续实验。

表 1 不同比例良溶剂与不良溶剂对 ES-NC 的粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 1 Effect of different ratios of good solvent and poor solvent on particle size and PDI of ES-NC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

良溶剂 / 不良溶剂	粒径 / nm	PDI
1 : 12	267.2 ± 24.84	0.389 ± 0.069
1 : 14	190.8 ± 84.50	0.347 ± 0.075
1 : 16	192.6 ± 13.11	0.369 ± 0.135
1 : 18	221.8 ± 26.85	0.293 ± 0.054
1 : 20	134.3 ± 5.69	0.608 ± 0.154
1 : 22	302.4 ± 20.36	0.474 ± 0.060

2.3 稳定剂的筛选

选择良溶剂与不良溶剂的比例为 1:20,药物质量浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,稳定剂质量浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,分别考察单一稳定剂(SDS、F-68、HPMC、PVP)和混合稳定剂(以 SDS 作为主稳定剂,以 F-68、PVP、HPMC、吐温-80 作为助稳定剂,比例为 2:1)对 ES-NC 的粒径及 PDI 的影响,结果见表 2、3。使用单一稳定剂 PVP 时粒径为 $(29.4 \pm 3.86) \text{ nm}$,PDI 为 (0.318 ± 0.088) 。本研究首先选用了混合型稳定剂,但是通过考察其粒径和 PDI 发现存在稳定性不好,PDI 过大,分散不均匀等问题,使用单一稳定剂时粒径和 PDI 较混合稳定剂小,分散程度也比混合稳定剂好。可能是混合稳定剂提供的静电排斥和立体位阻作用对于该样品不够,导致在制备过程发生聚沉^[10-11],因此选用单一稳定剂 PVP 进行后续研究。

表 2 不同单一稳定剂对 ES-NC 粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 2 Effect of different single stabilizers on particle size and PDI of ES-NC ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

稳定剂	粒径 / nm	PDI
SDS	144.9 ± 5.87	0.607 ± 0.046
F-68	73.7 ± 11.58	0.305 ± 0.101
HPMC	139.0 ± 4.94	0.413 ± 0.007
PVP	29.4 ± 3.86	0.318 ± 0.088

2.4 稳定剂浓度的考察

以 PVP 为稳定剂,良溶剂与不良溶剂比例为 1:20,药物质量浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,调整稳定剂质量浓度为 2、3、4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,考察 ES-NC 的粒径、PDI 和 Zeta 电位,结果见表 4。当稳定剂质量浓度为 4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时溶液更为澄清、均一。为进一步探索其稳定性随时间周期的延长的变化,测定其粒径及 PDI 的变化(见图 2),结果

表 3 不同混合稳定剂对 ES-NC 粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Tab 3 Effect of different mixed stabilizers on particle size and PDI of ES-NC ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

助稳定剂	粒径 /nm	PDI
吐温 -80	54.9 ± 10.25	0.992 ± 0.014
F-68	54.8 ± 14.08	0.863 ± 0.123
PVP	93.2 ± 28.63	0.633 ± 0.282
HPMC	201.9 ± 18.5	0.758 ± 0.155

纳米粒子在 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 稳定剂下维持稳定。

表 4 不同质量浓度稳定剂对 ES-NC 的粒径、PDI 和 Zeta 电位的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Tab 4 Effect of different concentrations of stabilizer on particle size, PDI and Zeta potential of ES-NC ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

质量浓度 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	粒径 /nm	PDI	Zeta 电位 /mV
2	29.4 ± 3.86	0.318 ± 0.088	- 15.10 ± 2.30
3	26.0 ± 0.23	0.336 ± 0.0003	- 18.04 ± 1.99
4	26.0 ± 0.75	0.335 ± 0.012	- 27.90 ± 2.20

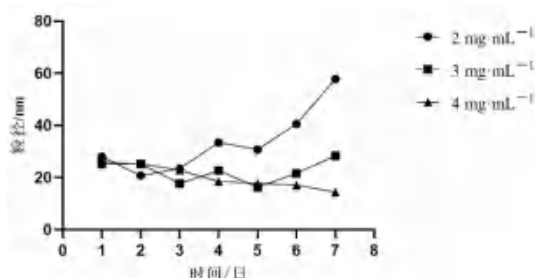


图 2 不同稳定剂浓度下的稳定性考察

Fig 2 Stability at different stabilizer concentrations

2.5 超声时间的考察结果

以 PVP 为稳定剂, 质量浓度为 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 良溶剂与不良溶剂的比例为 1 : 20, 药物质量浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 分别超声 30、60、90、120 min, 控制温度在 $25 \sim 30^\circ\text{C}$, 考察 ES-NC 的粒径、PDI, 结果见表 5, 超声 120 min 对其具有较好的助溶效果, 粒径为 $(15.42 \pm 0.59) \text{ nm}$, PDI 为 (0.245 ± 0.013) 。

表 5 不同超声时间下对 ES-NC 粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Tab 5 Effect of different times ultrasonic on particle size and PDI of ES-NC ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

时间 /min	粒径 /nm	PDI
0	28.67 ± 0.18	0.295 ± 0.004
30	27.65 ± 0.34	0.310 ± 0.019
60	28.00 ± 0.20	0.341 ± 0.006
90	16.62 ± 1.07	0.270 ± 0.053
120	15.42 ± 0.59	0.245 ± 0.013

2.6 药物质量浓度的筛选结果

药物质量浓度分别为 3、4、5、6、7 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 以 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ PVP 为稳定剂, 良溶剂与不良溶剂

的比例为 1 : 20, 考察 ES-NC 的粒径及 PDI。结果见表 6。当药物质量浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 纳米结晶粒径稳定, 粒径为 $(22.63 \pm 0.24) \text{ nm}$, PDI 为 (0.343 ± 0.010) 。稳定剂的浓度大小也与稳定性密切相关, 当稳定剂浓度较小时, 药物表面不能被稳定剂完全包裹, 导致粒子会出现聚沉的现象; 随着稳定剂浓度增大, 其稳定性也越好, 而当稳定剂浓度固定, 增大药物浓度时, 稳定剂不足以将混悬液中的所有粒子都包裹起来, 制备过程中就容易发生沉降、体系不稳定的问题, 所以药物最大质量浓度选用 $7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 如果还需要继续增大药物浓度, 需同时增大稳定剂的浓度。当有机相与水相的比例在一定的范围内, 随着不良溶剂比例增大, 其粒径会有所减小, 这是因为在使用反溶剂沉淀法制备秦皮乙素纳米结晶过程中, 有机相和水相发生沉淀时, 药物在单位体积的混悬液中含量较小, 在达到过饱和的情况下, 晶体增大的过程比较缓慢。反溶剂沉淀法制备 ES-NC 的关键是药物晶体的生长速度和晶体的成核速度需要在一定范围内保持平衡。

表 6 不同药物质量浓度对 ES-NC 粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Tab 6 Effect of different drug concentrations on particle size and PDI of ES-NC ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

药物质量浓度 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	粒径 /nm	PDI
3	16.57 ± 0.78	0.306 ± 0.045
4	19.26 ± 0.36	0.358 ± 0.011
5	22.63 ± 0.24	0.343 ± 0.010
6	32.07 ± 13.61	0.293 ± 0.116
7	18.68 ± 0.56	0.357 ± 0.008

2.7 冻干保护剂的选择

以 1% 质量浓度的 D-山梨醇、葡萄糖、蔗糖、乳糖分别作为冻干保护剂, 添加到 ES-NC 中, 充分混匀后于 -80°C 冰箱中预冻 24 h, 移至真空冷冻干燥机中干燥 72 h, 以冻干粉外观, 复溶后状态、粒径及 PDI 为指标筛选出合适的冻干保护剂。纳米结晶混悬液长期放置不是很稳定, 易出现聚沉, 粒径增大等现象, 为了使药物在长期储存过程中更加稳定, 选择将其通过真空冷冻干燥制备成冻干粉^[12]。其原理是通过升华的方式去除 ES-NC 的水分, 而且在低温的时候药物中的一些热敏物质也非常稳定, 真空下药物不易氧化, 所以将其制备成冻干粉也有利于储存和运输^[13]。在冻干过程中常需加入冻干保护剂, 从而使得纳米结晶冻干后复溶时能更好地重新分散。结果见表 7, 冻干后所得冻干粉如图 3 所示, 冻干粉使用超纯水复溶, 以 1% D-山梨醇作为冻干保护剂, 得到的冻干粉细腻光滑, 容易复溶, 粒径为

(30.74 ± 3.00) nm, 有利于长期密封储存。

表 7 不同冻干保护剂冻干粉的复溶状态和粒径 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Tab 7 Reconstituted state and particle size of lyophilized powder of different lyophilized protective agents ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

保护剂	复溶状态	粒径 /nm
蔗糖	容易复溶	42.60 ± 3.87
葡萄糖	复溶较慢且不完全	40.33 ± 2.01
乳糖	复溶缓慢	65.18 ± 15.53
D-山梨醇	容易复溶	30.74 ± 3.00



图 3 冻干粉外观

Fig 3 Freeze-dried powder appearance

注: 冻干粉所用冻干保护剂: 1. 乳糖; 2. D-山梨醇; 3. 蔗糖; 4. 葡萄糖。

Note: Lyophilized protective agents used in lyophilized powder: 1. lactose; 2. D-sorbitol; 3. sucrose; 4. glucose.

纳米结晶冻干粉的制备: 药物质量浓度为 $7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 良溶剂与不良溶剂比例为 1 : 20, 不良溶剂中加入 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ PVP, 向水相中加入有机相, 搅拌, 再加入 1% 质量浓度的各冻干剂, 搅拌充分, 冻干。得到的 ES-NC 冻干粉粒径为 (30.74 ± 3.00) nm。

2.8 ES-NC 的理化性质

2.8.1 药物的 pH 取 ES-NC 于离心管中, 用电子酸度计在 25°C 下测量样品 pH, 平行测量 3 次, 取平均值, 结果 pH 为 (6.16 ± 0.035)。

2.8.2 药物的体外释放度 根据《中国药典》2020 年版第四部关于释放度的测定^[14], 使用螺旋叶片浆法对 ES-NC 药物进行溶出度测定。控制搅拌器的转速一般保持在 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 温度控制在 (37 ± 0.5) $^\circ\text{C}$, 500 mL PBS 缓冲液作为释放介质, 在 1、2、4、6、8、10、12、24 h 对其分别取样 4 mL, 取样后同时向其中补充相同体积相同温度的 PBS 缓冲液, 控制溶出介质的总量保持不变。于 349 nm 处测定不同浓度样品的吸光度, 绘制标准曲线, 计算药物的吸光度和累计溶出程度, 并绘制溶出曲线, 累计释放度结果见图 4。秦皮乙素原药在 24 h 的释放率只有 41%, 而制备成纳米结晶在 24 h 的释放率为 85%, 释放率比原药的高 1 倍之多, 所以将其制备成纳米结晶可以提高秦皮乙素的释放率。

2.8.3 透射电镜观察 ES-NC 外观外貌 取少量样品置入离心管, 用超声波进行样品分散, 取样并滴加

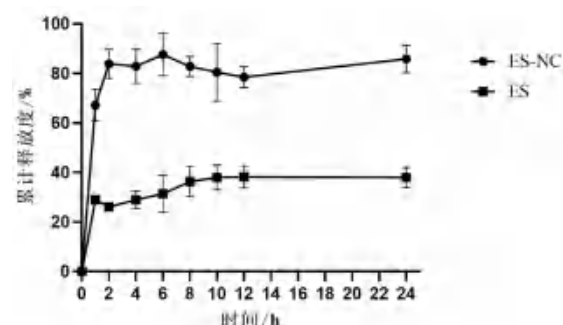


图 4 体外释放度实验结果 ($n = 3$)

Fig 4 In vitro release test ($n = 3$)

在载网支持膜上, 晾干, 放入透射电镜进行观察。结果见图 5, 纳米结晶的外观呈球形, 粒径在 25 nm 左右, 没有发生明显的聚集, 分散较为均匀。

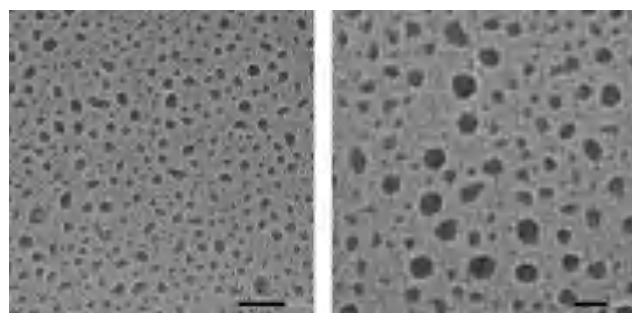


图 5 ES-NC 的透射电镜图

Fig 5 Transmission electron microscope (TEM) images of ES-NC

2.9 药物对 LPS 刺激的巨噬细胞抗炎活性影响

RAW264.7 细胞在 96 孔板中培养贴壁后, 采用 MTT 法检测细胞存活率, 筛选合适的药物浓度^[15]。用 PBS 溶解 ES-NC 及其冻干粉, 细胞在 96 孔板中培养贴壁后加入 ES-NC 药液, 1 h 后除空白组外加入 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS, 20 h 后取细胞上清液用 Griess 法测定一氧化氮 (NO) 的产生^[16], 其他细胞上清液用 ELISA 法检测促炎因子 TNF- α 、IL-8, 抑炎因子 IL-4 的水平。

当 ES-NC 药物质量浓度为 2.5、5、10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时细胞存活率分别为 (105 ± 0.04) %、(91 ± 0.04) %、(86 ± 0.02) %; ES-NC 冻干粉药物质量浓度为 250、500、1000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时细胞存活率分别为 (103 ± 0.04) %、(99 ± 0.02) %、(82 ± 0.04) %。ES-NC 可以有效抑制 NO 产生, 且呈剂量依赖性。ELISA 法结果显示 ES-NC 及其冻干粉可以抑制促炎因子 TNF- α 、IL-8 的产生, 促进抑炎因子 IL-4 的产生 (见图 6)。秦皮乙素可以通过降低促炎因子的水平抑制炎症损伤^[17], 本实验结果说明将秦皮乙素制成 ES-NC 冻干粉后增强其溶剂性的同时没有影响其抗炎活性。

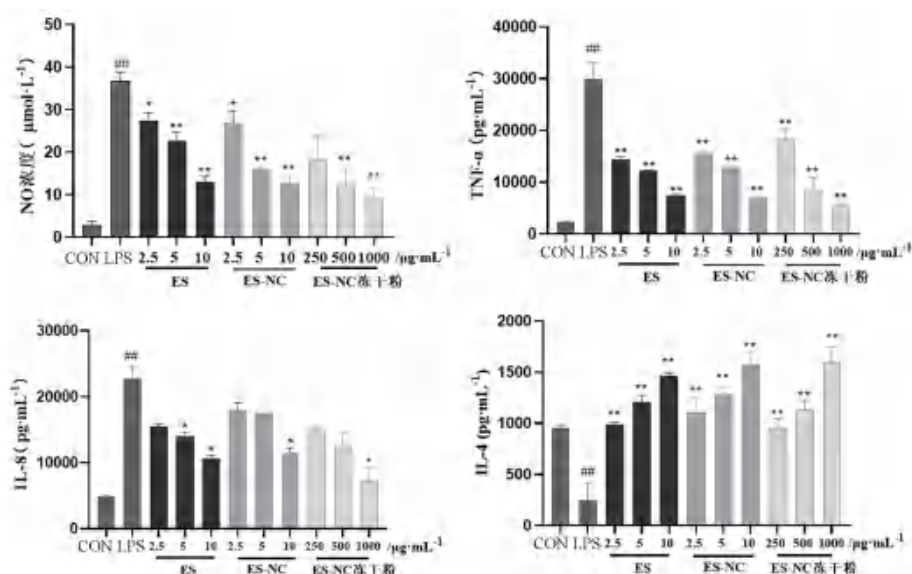


图 6 NO 和炎症因子含量的变化

Fig 6 Changes in NO and inflammatory factors

注：与 LPS 组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与 CON 组比较，^{###} $P < 0.01$ ，[#] $P < 0.05$ 。

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

3 结论

本文采用反溶剂沉淀法制备 ES-NC 解决其水溶性较差、生物利用度低的缺点，优化了制备工艺，初步评价结果显示 ES-NC 溶解度和溶出度有所提高，且能抑制 LPS 刺激的巨噬细胞 NO 产生和促炎因子水平，促进抑炎因子水平增加，未影响秦皮乙素的抗炎活性，为秦皮乙素新剂型的研发提供了理论依据。

参考文献

- [1] Liang CY, Ju WH, Tang SM, et al. Pharmacological activities and synthesis of esculetin and its derivatives: a mini-review [J]. *Molecules*, 2017, 22 (3): 387.
- [2] Cheng YJ, Tian XL, Zeng YZ, et al. Esculetin protects against early sepsis via attenuating inflammation by inhibiting NF- κ B and STAT1/STAT3 signaling [J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19 (6): 432-441.
- [3] Karatug KA, Bahadori F, Kepekci TSE, et al. Investigation of cell death mechanism and activity of esculetin-loaded PLGA nanoparticles on insulinoma cells in vitro [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2020, 72 (4): 592-606.
- [4] 王慧宁. 秦皮乙素微乳制备及理化性质研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2020.
- [5] Zhang L, Xie Q, Li X. Esculetin: a review of its pharmacology and pharmacokinetics [J]. *Phytother Res*, 2022, 36 (1): 279-298.
- [6] 高彩芳, 夏加璇, 朱颖, 等. 纳米技术在改善中药有效成分成药性中的应用 [J]. *中草药*, 2018, 49 (12): 2754-2762.
- [7] 张春娟, 丁彦戈, 杨阳, 等. 白藜芦醇纳米结晶的制备及体外抗氧化性的研究 [J]. *中国药理学杂志 (网络版)*, 2019, 17 (5): 157-168.
- [8] 曾泷彪, 廉云飞, 张军东, 等. 纳米结晶制剂产业化研究进展 [J]. *中国药科大学学报*, 2013, 44 (6): 504-510.
- [9] Du J, Li X, Zhao H, et al. Nanosuspensions of poorly water-soluble drugs prepared by bottom-up technologies [J]. *Int J Pharmaceut*, 2015, 495 (2): 738-749.
- [10] 方宇奇, 高崇凯, 易军, 等. 反溶剂沉淀法制备氟苯尼考纳米结晶 [J]. *畜牧与兽医*, 2020, 52 (1): 75-80.
- [11] 黄平, 毛坤军, 王雪婷, 等. 纳米混悬剂中稳定剂的研究进展 [J]. *广州化工*, 2016, 44 (20): 7-9, 32.
- [12] 刘扬扬. 可控式水飞蓟宾纳米结晶给药系统的研究 [D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2019.
- [13] Patil VV, Dandekar PP, Patravale VB, et al. Freeze drying: potential for powdered nanoparticulate product [J]. *Dry Technol*, 2010, 28 (5): 624-635.
- [14] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 132.
- [15] Cao Y, Chen J, Ren G, et al. Punicalagin prevents inflammation in LPS-induced RAW264.7 macrophages by inhibiting FoxO3a/autophagy signaling pathway [J]. *Nutrients*, 2019, 11 (11): 2794.
- [16] Han S, Gao H, Chen S, et al. Procyanidin A1 alleviates inflammatory response induced by LPS through NF- κ B, MAPK, and Nrf2/HO-1 pathways in RAW264.7 cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 15087.
- [17] 成涛, 王桂林, 张秀容, 等. 秦皮乙素调控 miR-486-5p 表达抑制高糖诱导的肾小管上皮细胞炎症损伤的机制研究 [J]. *实用临床医药杂志*, 2021, 25 (19): 83-87.

(收稿日期: 2022-01-05; 修回日期: 2022-03-08)

刘寄奴化学成分及其水煎液抗菌活性的研究

陈俊¹, 曹青青², 吕磊³, 梁李娟⁴, 周许薇⁵, 谭蔚锋^{6*} (1. 上海交通大学医学院附属仁济医院宝山分院药剂科, 上海 200444; 2. 上海市浦东新区人民医院药剂科, 上海 201299; 3. 海军军医大学东方肝胆外科医院药材料, 上海 200438; 4. 上海大学附属孟超肿瘤医院医教部, 上海 201823; 5. 复旦大学药学院, 上海 201203; 6. 同济大学附属同济医院肝胆外科中心, 上海 200065)

摘要: **目的** 研究刘寄奴的化学成分及其抗菌活性, 并探索刘寄奴水煎液对常见致病菌的抗菌作用。 **方法** 采用多种色谱技术分离纯化刘寄奴的化学成分, 根据理化常数和波谱数据鉴定化合物的结构, 并通过控制不同条件制备刘寄奴水煎液, 对分离得到的单体化合物和刘寄奴水煎液采用微孔板法进行体外抗菌活性筛选。 **结果** 从刘寄奴中共分离鉴定了 5 个化合物, 分别为 7-甲氧基香豆素 (1)、异泽兰黄素 (2)、奇蒿黄酮 (3)、芹菜素 (4) 和去氢母菊内酯酮 (5), 以上 5 个单体化合物对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、福氏志贺菌、痢疾志贺菌和无乳链球菌均有不同程度的抗菌活性, 同时比较了不同条件下制备的刘寄奴水煎液抗菌活性强弱。 **结论** 奇蒿黄酮和去氢母菊内酯酮对金黄色葡萄球菌抗菌作用均较为显著, 且不同条件制备刘寄奴水煎液的抗菌活性有所差异, 增加煎煮水量, 延长煎煮时间和增加煎煮次数得到的刘寄奴水煎液抗菌活性效果更显著。

关键词: 刘寄奴; 化学成分; 水煎液; 抗菌活性

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2752-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.009

Antimicrobial activity of chemical constituents and water decoction of *Artemisia anomala* S. Moore

CHEN Jun¹, CAO Qing-qing², LYU Lei³, LIANG Li-juan⁴, ZHOU Xu-wei⁵, TAN Wei-feng^{6*} (1. Department of Pharmacy, Baoshan Branch of Renji Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200444; 2. Department of Pharmacy, People's Hospital of Shanghai Pudong New Area, Shanghai 201299; 3. Department of Pharmacy, Dongfang Hepatobiliary Surgery Hospital, Naval Medical University, Shanghai 200438; 4. Department of Medical Education & Research, Mengchao Cancer Hospital of Shanghai University, Shanghai 201823; 5. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203; 6. Hepatobiliary Surgery Center, Tongji Hospital of Tongji University, Shanghai 200065)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents and antimicrobial activity of *Artemisia anomala* S. Moore, and to explore the antibacterial effect of its water decoction on the clinical common pathogens bacterium. **Methods** The chemical constituents of *Artemisia anomala* S. Moore were separated and purified by various chromatographic techniques. The structures of the compounds were identified according to the physical and chemical constants and spectral data. The *Artemisia anomala* S. Moore water decoction was prepared under different conditions. The isolated monomer compounds and the *Artemisia anomala* S. Moore decoction were detected for their antibacterial activities in vitro by microplate method. **Results** Totally 5 compounds were isolated and identified from *Artemisia anomala* S. Moore: 7-methoxycoumarin (1), eupatilin (2), arteanoflavone (3), apigenin (4) and dehydromatricarin (5). The above 5 monomers had antibacterial

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 81903843); 第二军医大学军事医学专项课题 (No. 2010JS16)。

作者简介: 陈俊, 女, 硕士, 副主任药师, 主要从事药物分析方面的工作, email: chenjuntcdj@126.com * **通信作者:** 谭蔚锋, 男, 博士, 主任医师, 主要从事肝胆外科及创面愈合方面的工作, email: twf1231@163.com

activities against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae* and *Streptococcus agalactis*. At the same time, the antibacterial activity of *Artemisia anomala* S. Moore water decoction prepared under different conditions was compared. **Conclusion** *Artemisia annua* flavone and dehydroethrione have significant bactericidal effect on *Staphylococcus aureus*, and the antibacterial activity of *Artemisia anomala* S. Moore water decoction prepared under different conditions is different, increasing the amount of water, prolonging the time and increasing the number of decoctions, its antibacterial effect becomes more obvious.

Key words: *Artemisia anomala* S. Moore; chemical compound; water decoction; antibacterial activity

刘寄奴 *Artemisia anomala* S. Moore, 又名阴性草、六月霜、苦连婆、野马头兰等, 为菊科蒿属植物奇蒿的地上部分, 广泛分布于我国华东、华南等地区^[1]。经植物草本考证, 分布在江苏、浙江、安徽、福建等地, 又俗称南刘寄奴^[2]。刘寄奴入药具有消肿止血、清热解毒、破血通经、消食化积之功效, 主要用于治疗跌打损伤、闭经痛经、产后淤滞腹痛、疮痈肿毒以及腹泻痢疾等^[3]。此前, 本课题组分别对刘寄奴 80% 乙醇、石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇提取部位进行了纸片扩散法和常量肉汤稀释法, 结果显示刘寄奴不同部位的提取物对临床常见致病菌均有良好的抗菌活性^[4], 进一步研究发现黄酮类化合物异泽兰黄素具有抗菌活性^[5]。目前学者对刘寄奴的化学成分研究较多, 主要报道的化合物有黄酮类、香豆素类和甾体等^[6-7], 但对其单体化合物的抗菌活性和刘寄奴药材的应用方法研究涉及甚少。

鉴于刘寄奴广阔的资源分布和明确的药效作用, 以及前期刘寄奴不同提取部位的抗菌活性, 本课题组进一步明确刘寄奴的抗菌活性成分, 对分离得到的单体化合物进行抗菌活性筛选, 预期得到类抗生素活性的单体化合物以满足需要, 并采用常规中药煎煮方法考察不同煎煮条件对刘寄奴抗菌药效的影响, 为刘寄奴药材的开发利用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

RE-52 型旋转蒸发仪 (上海申生科技有限公司); SHZ-III 型循环水真空泵 (上海华琦科学仪器有限公司); 玻璃中压柱色谱系统 (苏州汇通色谱分离纯化有限公司); Agilent1260 高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司); LC-20AP 制备液相色谱仪 (日本岛津公司); Kromasil C18 液相色谱柱 (日本大曹株式会社); 柱色谱用硅胶、硅胶 254 薄层板 (青岛海洋化工有限公司); 葡聚糖凝胶 LH-20 (上海国药集团化学试剂有限公司); HPLC-TOF-MS 高分辨质谱仪 (美国安捷

伦科技有限公司); X-4 数字显示显微熔点测定仪器 (上海隆拓仪器设备公司); Bruker AVANCE III 600 高分辨核磁共振波谱仪 (德国布鲁克科技有限公司); LDZX-50KB 立式压力蒸汽灭菌器 (上海申安医疗器械厂); SW-CJ-ID 型单人净化工作台 (苏州净化设备有限公司); Biotek 酶标仪 ELX800 (美国伯腾仪器有限公司); HZQ-X100 恒温振荡培养箱 (太仓华大实验仪器科技有限公司); DHP-022 电热恒温培养箱 (上海申贤恒温设备厂)。

1.2 试药

三氯化铁、铁氰化钾、镁粉 [中国医药 (集团) 上海化学试剂公司]; 盐酸 (江苏彤晟化学试剂有限公司)。青霉素 G 钠盐、氯霉素和丁胺卡那霉素无水 (上海生工生物工程有限公司); 改良肉汤培养基和血琼脂培养基 (青岛海博生物技术有限公司); 96 孔板和培养皿 (广州洁特生物过滤制品有限公司); 无水乙醇、乙酸乙酯、三氯甲烷、正丁醇、甲醇、无水乙醇、甲醇等均为分析纯试剂 (江苏强盛功能化学股份有限公司); 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA-CMCC26003)、大肠埃希菌 (*Escherichia coli*, EC-CMCC44102) (北京北纳创联生物技术研究院); 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA-ATCC6538)、福氏志贺菌 (*Shigella flexneri*, SF-CMCC51572)、痢疾志贺菌 [*Shigella dysenteriae*, SD-CMCC (B) 51252]、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*, SA-CICC10465)、鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella typhimurium*, ST-ATCC14028) (南京便诊生物科技有限公司)。刘寄奴道地药材采购 (采购时间: 20140813) 自浙江省临安市, 经海军军医大学张汉明教授鉴定为蒿属植物奇蒿 *Artemisia anomala* S. Moore 的干燥地上部分, 标本 (编号: 20140517) 保存于海军军医大学药学院药物化学教研室。

2 方法与结果

2.1 提取和分离

取刘寄奴药材 30 kg 粉碎后, 加入 70% 的乙

醇于 70 °C 回流提取 2 次, 合并 2 次提取液减压回流至无醇味, 得粗提物 5.3 kg; 将 5.3 kg 粗提物加水 10 L 混悬, 用石油醚、三氯甲烷、正丁醇分别萃取 3 次, 减压回收溶剂, 分别得到石油醚、三氯甲烷、正丁醇部位浸膏。石油醚部分采用正相硅胶柱色谱, 以石油醚-乙酸乙酯系统 15:1-0:1-5:1-1:1 进行梯度洗脱, 得流份 Fra1~Fra7, 对 Fra6 (0.8 g) 部分继续采用正相硅胶柱色谱, 以石油醚-乙酸乙酯 5:1 洗脱, 得到化合物 1 (约 47 mg); 三氯甲烷部分先经正相硅胶柱色谱, 以石油醚-二氯甲烷-甲醇-甲酸系统 8:2:1:0.1、6:2:1:0.1、4:2:1:0.1、2:2:1:0.1、1:1:1:0.1 进行梯度洗脱, 得到 Frb1~Frb7; Frb5 (63 g) 用 SephadexLH-20 凝胶柱色谱分离, 再采用 0.2% 甲酸水-乙腈 (45:55) 洗脱高压制备液相色谱分离, 分别得到化合物 2 (87 mg)、化合物 3 (60 mg) 和化合物 5 (52.5 mg); 将正丁醇部位经正相硅胶柱色谱, 用乙酸乙酯-甲醇系统以 8:1→6:1→4:1→2:1 进行梯度洗脱, 得到流份 Frc1~Frc8; Frc6 再经正相硅胶柱色谱, 以二氯甲烷-甲醇 6:1~4:1 进行梯度洗脱, 得到流份 Frc6a~Frc6h, Frc6h (15 g) 再过 SephadexLH-20 凝胶柱色谱分离, 用甲醇-水 (70:30) 等度洗脱, 再用 0.2% 甲酸水-乙腈 (62:38) 高压制备液相色谱分离, 获得化合物 4 (130 mg), 提取分离流程见图 1。

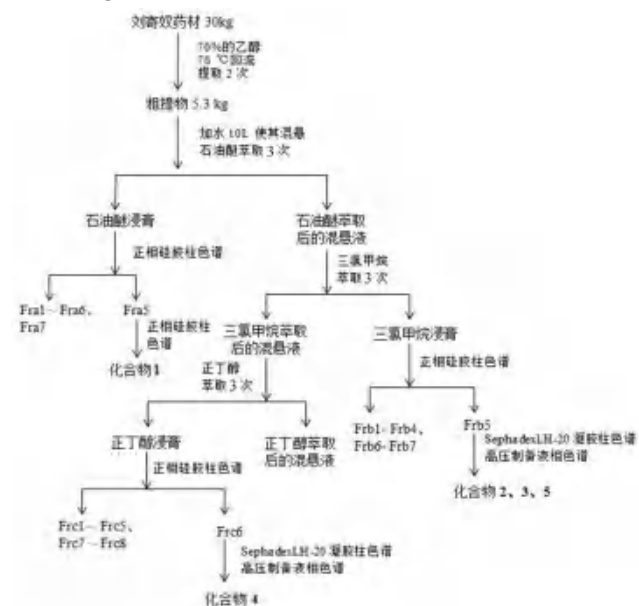


图 1 刘奇奴化学成分的提取流程

Fig 1 Extraction of chemical components from *Artemisia anomala* S. Moore

2.2 结构鉴定

化合物 1~5 的结构式见图 2。

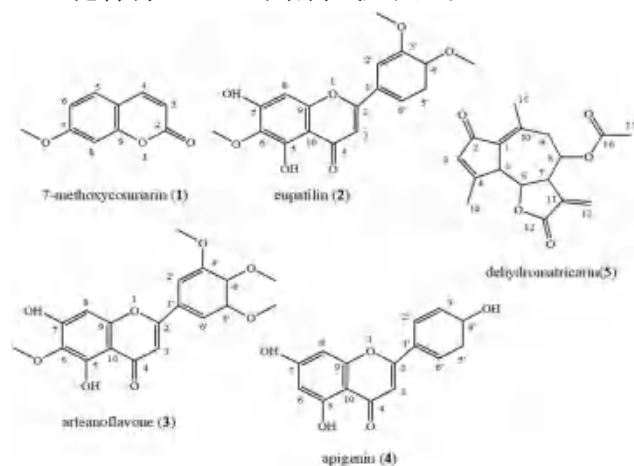


图 2 化合物 1~5 的结构式

Fig 2 Structure of compounds 1~5

化合物 1: 白色针晶, 在紫外灯 365 nm 下显紫色荧光, mp 117~118 °C。分子式 $C_{10}H_8O_3$, m/z 为 177.0532 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$, δ): 6.23 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-3), 7.61 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-4), 7.35 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, H-5), 6.80 (1H, dd, $J = 1.6, 5.6$ Hz, H-6), 6.79 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-8), 3.86 (3H, s, $-OCH_3$)。 ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$, δ): 162.8 (C-2), 112.5 (C-3), 143.3 (C-4), 128.6 (C-5), 100.8 (C-6), 161.1 (C-7), 112.4 (C-8), 155.8 (C-9), 113.0 (C-10), 55.7 (C-4'- OCH_3)。以上数据与文献报道^[8]的 7-甲氧基香豆素的数据基本一致, 推测化合物为 7-甲氧基香豆素 (7-methoxycoumarin)。

化合物 2: 黄色固体。三氯化铁-铁氰化钾反应阳性, 提示存在酚羟基。盐酸-镁粉反应阳性, 三氯化铝反应阳性, 提示该化合物为黄酮类化合物。化合物分子式 $C_{18}H_{16}O_7$, m/z : 345.0969 $[M+H]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$, δ): 7.34 (1H, s, H-3), 6.59 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-8), 7.26 (1H, s, H-2'), 6.97 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, H-5'), 7.51 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-6'), 4.05 (s, 6- OCH_3), 3.98 (s, 3'- OCH_3), 3.97 (s, 4'- OCH_3); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$, δ): 164.0 (C-2), 104.0 (C-3), 182.8 (C-4), 153.0 (C-5), 130.3 (C-6), 155.0 (C-7), 93.3 (C-8), 152.2 (C-9), 105.6 (C-10), 123.7 (C-1'), 108.8 (C-2'), 149.3 (C-3'), 152.0 (C-4'), 111.1 (C-5'), 120.0 (C-6'), 60.8 (C-6- OCH_3), 56.0 (C-3'- OCH_3), 56.0 (C-4'- OCH_3)。以上数据与文献^[9]报道的异泽兰黄素 (eupatilin) 基本一致, 故推测该化合物为 5, 7-二羟基-6, 3', 4'-三甲

氧基黄酮, 即异泽兰黄素。

化合物 **3**: 黄色颗粒状结晶, 分子式为 $C_{19}H_{18}O_8$, m/z : 375.1079 $[M + H]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, CD_3OD , δ): 6.72 (1H, s, H-3), 6.60 (1H, s, H-8), 7.24 (2H, s, H-2', H-6'), 3.88 (3H, s, C_6-OCH_3), 3.94 (6H, s, C_3' , $C_5'-OCH_3$), 3.84 (3H, s, $C_4'-OCH_3$)。 ^{13}C -NMR (150 MHz, CD_3OD , δ): 166.0 (C-2), 106.0 (C-3), 184.8 (C-4), 155.6 (C-5), 132.2 (C-6), 158.3 (C-7), 96.0 (C-8), 152.9 (C-9), 106.7 (C-10), 128.5 (C-1'), 105.8 (C-2'), 155.6 (C-3'), 142.1 (C-4'), 155.6 (C-5'), 105.8 (C-6'), 61.7 ($C_6'-OMe$), 61.4 ($C_4'-OMe$), 57.5 (each, $C_3'-OMe$, $C_5'-OMe$)。HMBC 表示, H-3 与 C-10, C-2 和 C-1' 相关, H-8 与 C-10, C-6 和 C-7 相关。NOESY 显示 H-3 和 H-8 相关, 以上数据与文献^[10]报道的奇蒿黄酮基本一致, 故鉴定化合物 **3** 为 5, 7-二羟基-6, 3', 4', 5'-四甲氧基黄酮, 即奇蒿黄酮 (arteanoflavone)。

化合物 **4**: 黄色针晶, 盐酸-镁粉反应呈阳性。分子式 $C_{15}H_{10}O_5$, m/z : 271.0600 $[M + H]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$, δ): 6.73 (1H, s, H-3), 6.14 (1H, m, $J = 0.8, 1.2$ Hz, H-6), 6.43 (1H, m, $J = 0.4, 1.2$ Hz, H-8), 7.90 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2'), 6.91 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-3'), 6.89 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-5'), 7.89 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-6')。 ^{13}C -NMR (150 MHz, $DMSO-d_6$, δ): 165.5 (C-2), 94.4 (C-3), 181.9 (C-4), 161.7 (C-5), 103.1 (C-6), 164.0 (C-7), 99.4 (C-8), 161.8 (C-9), 103.7 (C-10), 121.5 (C-1'), 128.8 (C-2'), 116.3 (C-3'), 157.7 (C-4'), 116.3 (C-5'), 128.8 (C-6')。以上数据与文献^[11]报道的芹菜素基本一致, 故鉴定该样品化合物为 4', 5, 7-三羟基黄酮, 即芹菜素 (apigenin)。

化合物 **5**: 白色粉末, 分子式 $C_{17}H_{18}O_5$, m/z : 303.0495 $[M + H]^+$ 。 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$, δ): 6.19 (1H, s, H-3), 3.50 (1H, d, $J = 11.6$ Hz, H-5), 3.71 (1H, t, $J = 10.2$ Hz, H-6), 3.25 (1H, dt, $J = 2.0, 10.2$ Hz, H-7), 4.91 (1H, dt, $J = 2.0, 10.4$ Hz, H-8), 2.46 (1H, t, $J = 1.2$ Hz, H-9), 6.23, 5.64 (2H, d, $J = 3.0$ Hz, H-13), 2.28 (3H, s, H-14), 2.44 (3H, s, H-15), 2.15 (3H, s, H-17); ^{13}C -NMR (150 MHz, $CDCl_3$, δ): 133.5 (C-1), 194.8 (C-2), 135.9 (C-3), 169.1 (C-4), 51.5 (C-5), 81.3 (C-6), 54.9 (C-7), 69.2 (C-8), 44.3 (C-9), 144.5 (C-10), 135.9

(C-11), 169.2 (C-12), 121.7 (C-13), 19.7 (C-14), 21.2 (C-15), 169.5 (C-16), 20.9 (C-17); 根据二维核磁谱图 HMBC 表示, C-10 与 H-15 相关, C-16 与 H-17 相关, C-4 与 H-14 相关, 由 COSY 谱图显示, H-5 与 H-6 相关, H-6 与 H-7 相关, H-7 与 H-8 相关, NOESY 谱图中 H-7 与 H-5 和 H-9 远程相关, 通过以上信息得到化合物 **5** 的结构, 该结构数据与文献^[12]报道的去氢母菊内酯酮基本一致, 故鉴定该化合物结构为去氢母菊内酯酮 (dehydromatricarin)。

2.3 水煎液的制备

方法一: 取刘寄奴药材 25 g, 加入温水 300 mL 浸泡 30 min, 武火加热煮沸 20 min (中间补加 50 mL 热水), 将药液倾出, 再加入 350 mL 水煮沸 10 min, 倾出药液。合并 2 次提取液浓缩得刘寄奴水煎液 1 浸膏 2.72 g, 标记为水煎液 1。

方法二: 取刘寄奴药材 25 g, 加入温水 300 mL 浸泡 30 min, 武火加热煮沸 30 min (中间补加水 100 mL), 倾出药液, 再加入 350 mL 水煮沸 20 min, 倾出药液, 继续加入 350 mL 水煮沸 10 min, 倾出药液, 合并 3 次水煎液浓缩得到刘寄奴水煎液 2 浸膏 3.55 g, 标记为水煎液 2。

2.4 抗菌试验

2.4.1 药液配制 化合物 7-甲氧基香豆素、异泽兰黄素、奇蒿黄酮、芹菜素和去氢母菊内酯酮, 以 50% 乙醇溶液为溶剂, 配成母液浓度分别为 56.82、29.07、26.74、37.04、33.11 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的溶液; 刘寄奴水煎液 1 和刘寄奴水煎液 2, 以超纯水为溶剂, 均配制成质量浓度为 500 mg $\cdot$ mL⁻¹ 的母液; 阳性药青霉素 G 钠盐、氯霉素、丁胺卡那霉素无水, 以蒸馏水为溶剂, 配制母液浓度分别为 0.28、0.31、0.13 mol $\cdot$ L⁻¹ 的溶液。以上药液均稀释到适当浓度供使用。

2.4.2 菌种活化和培养 称取 18 g 改良肉汤培养基于 300 mL 蒸馏水中, 于 121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min。无菌条件下, 将培养基分装至 15 mL 的离心管中, 每管 10 mL。取 1 mL 培养基至菌种冻干粉中, 吹打混匀后转移到 15 mL 离心管, 于 37 $^{\circ}$ C, 150 r $\cdot$ min⁻¹ 培养 24 h。取 100 μ L 菌悬液涂布于血琼脂培养基表面, 于 37 $^{\circ}$ C 电热恒温培养箱培养 24 h。挑取单克隆于肉汤培养基中培养 24 h 后备用。

2.4.3 最小杀菌浓度 (MBC) 和最小抑菌浓度 (MIC) 的测定 采用微孔板法测定化合物的抗菌活性, 参考文献^[13]中的方法, 取培养 24 h 后的细菌种 96 孔板, 每孔 100 μ L; 设置不加药孔, 加药孔和阳性对照药孔。单体化合物加药浓度分别为化合物 **1** 从 17.05 mmol $\cdot$ L⁻¹ 起、化合物 **2** 从

11.11 mmol·L⁻¹起, 化合物 **3** 从 8.02 mmol·L⁻¹ 起, 化合物 **4** 从 11.11 mmol·L⁻¹ 起, 化合物 **5** 从 9.93 mmol·L⁻¹ 起, 水煎液测试样品从 50 mg·mL⁻¹ 起, 用培养基 3 倍梯度稀释, 共 6 个梯度。阳性对照药孔青霉素 G 钠盐从 8.43 mmol·L⁻¹ 起, 氯霉素从 9.29 mmol·L⁻¹ 起, 无水丁胺卡那霉素从 3.94 mmol·L⁻¹ 起, 3 倍梯度稀释, 共 6 个梯度。加完药后于酶标仪上 490 nm 测定 0、2、4、8、24 h 的光密度 (OD) 值, 计算 MIC。取酶标板中有抑菌效果的菌液, 均匀涂抹于平板培养基上, 生化培养箱中继续培养 24 h, 无菌落形成的最小浓度即为 MBC。

结果显示化合物 7-甲氧基香豆素、异泽兰黄素、奇蒿黄酮、芹菜素、去氢母菊内酯酮以及刘寄奴水煎液 1 和刘寄奴水煎液 2 对金黄色葡萄球菌 (SA-CMCC26003) 和金黄色葡萄球菌 (SA-ATCC6538) 均具有不同程度的抗菌活性 (见表 1), 其中奇蒿黄酮对金黄色葡萄球菌抗菌效果最显著, 如图 3 所示, 奇蒿黄酮对金黄色葡萄球菌 SA-CMCC26003 的 MIC 为 0.03 mmol·L⁻¹, MBC 为 0.33 mmol·L⁻¹, 芹菜素的抗菌活性次之。奇蒿黄酮对痢疾志贺菌和无乳链球菌均具有明显的抗菌活性。7-甲氧基香豆素除了对金黄色葡萄球菌具有杀菌作用以外, 对大肠埃希菌、福氏志

贺菌和无乳链球菌也具有一定的杀菌效果, 其对无乳链球菌的抗菌作用较奇蒿黄酮弱。去氢母菊内酯酮对无乳链球菌的抗菌活性显著, 对大肠埃希菌也具有一定的抗菌能力, 对金黄色葡萄球菌的抗菌活性与奇蒿黄酮的抗菌活性相近。

根据表 1 和图 4, 刘寄奴水煎液 1 对大肠埃希菌 (EC-CMCC44102)、痢疾志贺菌 [SD-CMCC (B) 51252]、鼠伤寒沙门菌 (ST-ATCC14028) 和无乳链球菌 (SA = CICC10465) 的 MIC 均为 50 mg·mL⁻¹, 水煎液 2 对以上菌株的 MIC 为 16.67 mg·mL⁻¹, 即刘寄奴水煎液 1 对以上菌株的 MIC 均约为水煎液 2 的 3 倍; 刘寄奴水煎液 1 对金黄色葡萄球菌 SA-CMCC26003 的 MIC 为 5.56 mg·mL⁻¹, 对 SA-ATCC6538 的 MIC 为 16.67 mg·mL⁻¹, 水煎液 2 对以上 2 种金黄色葡萄球菌的 MIC 分别为 1.85 mg·mL⁻¹ 和 0.61 mg·mL⁻¹, 即刘寄奴水煎液 1 对金黄色葡萄球菌 SA-CMCC26003 抑菌浓度是水煎液 2 的 3.01 倍; 刘寄奴水煎液 1 对金黄色葡萄球菌 SA-ATCC6538 抑菌浓度是水煎液 2 的 27.33 倍。此外, 水煎液 2 制备方法得到的水煎液浸膏较水煎液 1 制备方法得到的浸膏多 0.83 g (30.52%), 推测, 水煎液 2 的制备方法得到有效成分的量多, 因此抑菌活性较水煎液 1 显著。

表 1 单体化合物 (mmol·L⁻¹) 和刘寄奴水煎液 (mg·mL⁻¹) 的 MIC 和 MBC

Tab 1 MIC and MBC of compounds (mmol·L⁻¹) and *Artemisia anomala* water decoction (mg·mL⁻¹)

样本	EC-CMCC44102		SF-CMCC51572		SA-CMCC26003		SA-ATCC6538		SD-CMCC (B) 51252		ST-ATCC14028		SA-CICC10465	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
化合物 1	5.68	5.68	5.68	5.68	0.06	1.71	1.71	17.05	—	—	—	—	17.05	17.05
化合物 2	—	—	—	—	0.87	2.91	0.87	—	—	—	—	—	—	—
化合物 3	—	—	—	—	0.03	0.33	0.80	2.67	0.27	8.02	—	—	2.67	8.02
化合物 4	—	—	—	—	0.04	3.70	0.37	3.70	—	—	—	—	—	—
化合物 5	3.31	9.93			0.99	3.31	0.33	3.31	0.33	9.93			0.33	0.99
水煎液 1	50	—	16.67	—	5.56	50	16.67	—	50	—	50	—	50	—
水煎液 2	16.67	50	16.67	—	1.85	50	0.61	5.56	16.67	—	16.67	—	16.67	—

注 (Note): “—” 表示没有抗菌活性 (“—” without antibacterial activity)。

综上所述, 采用增加煎煮次数、延长煎煮时间制备得到的刘寄奴水煎液 2 较水煎液 1 抗菌活性显著, 且对金黄色葡萄球菌的抗菌活性尤为明显。

3 讨论

3.1 单体化合物的制备和活性

本研究采用硅胶柱色谱法、凝胶柱色谱法和高效液相制备色谱法分离纯化得到 5 个单体化合物, 其中化合物 **5** (去氢母菊内酯酮) 为首次从刘寄奴药材中分离得到的倍半萜类化合物, 研究报道发现该化合物具有抗肿瘤活性^[12]。抗菌活性研究表明, 5 个化合物对临床常见致病菌均具

有一定抗菌活性。化合物 **1** (7-甲氧基香豆素) 为苯丙素类化合物, 其对大肠埃希菌、福氏志贺菌、金黄色葡萄球菌和无乳链球菌均具有抗菌作用; 异泽兰黄素、奇蒿黄酮和芹菜素均为黄酮类化合物, 主要对金黄色葡萄球菌发挥抗菌作用。根据抗菌数据可以发现其对金黄色葡萄球菌的抗菌强弱为: 奇蒿黄酮>芹菜素>异泽兰黄素, 可根据抗菌结果进一步探讨黄酮化合物中甲基的数量和羟基的数量多少对化合物抗菌活性影响。以上 5 个化合物中以单体化合物奇蒿黄酮的作用效果最显著, 对金黄色葡萄球菌的 MIC 达到 0.03 mmol·L⁻¹, MBC 为 0.33 mmol·L⁻¹, 该活性

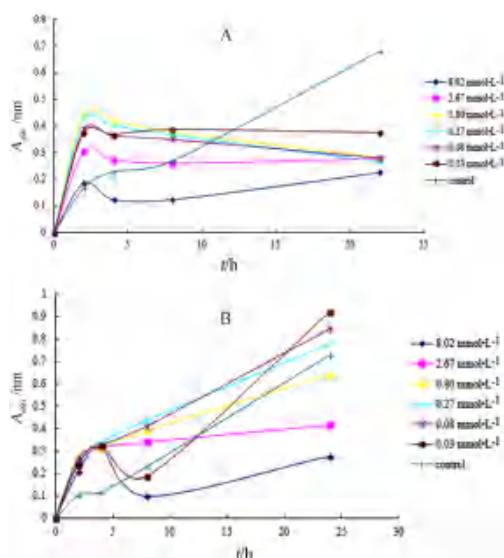


图 3 两种细菌在不同浓度的奇蒿黄酮中不同时间段的 OD_{490} 增加值
Fig 3 OD_{490} values of 2 bacteria at different concentrations of artemanoflavone at different time points

A. SA-CMCC26003; B. SA-ACTT6538

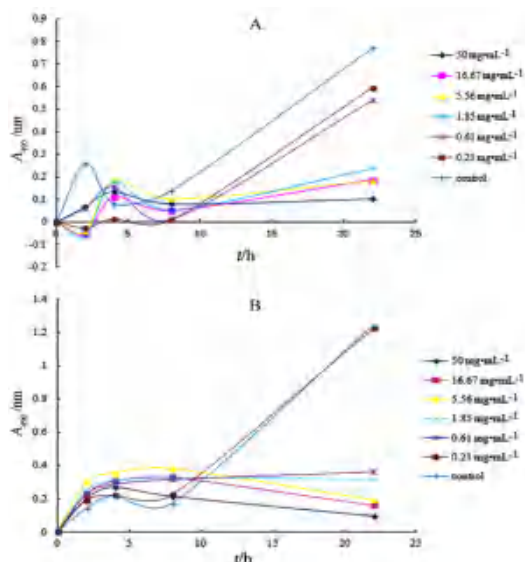


图 4 两种细菌在不同浓度刘寄奴水煎液不同时间段的 OD_{490} 增加值
Fig 4 OD_{490} values of 2 bacteria at different concentrations of *Artemisia anomala* water decoction at different time

A. SA-CMCC26003; B. SA-CICC10465

浓度与临床上使用的抗菌药物作用浓度相当,可研究开发为目前应用为抗金黄色葡萄球菌类抗菌药物的替代药物。单体奇蒿黄酮对痢疾志贺菌和无乳链球菌也表现出显著的抗菌活性,表示奇蒿黄酮具有一定的广谱抗菌作用。因此,可进一步研究对奇蒿黄酮进行药效学研究,以期临床开发质优廉价的天然抗菌药物提供物质基础。

3.2 刘寄奴水煎液的制备和活性

以常规中药煎煮法为基础,通过控制加水量、煎煮时间和煎煮次数得到两种刘寄奴水煎液。

抗菌活性研究发现,增加煎煮水量,延长煎煮时间和增加煎煮次数得到的刘寄奴水煎液抗菌活性较前者效果好,且表 1 数据显示,刘寄奴水煎液两对金黄色葡萄球菌的抗菌活性显著。该研究表明刘寄奴可以打破常规的解表药物煎煮法,延长煎煮时间,增加煎煮次数,有利于其抗菌成分溶解于水中而充分发挥抗菌活性,该研究为刘寄奴药材应用于抗菌治疗提供一定数据指导。

3.3 小结

本研究对刘寄奴单体化学成分和刘寄奴整体入药的抗菌活性均进行了探讨,结果表明,单体化合物和刘寄奴整体用药的水煎液对金黄色葡萄球菌均具有显著的功效。金黄色葡萄球菌是自然灾害中最常见且最易感染的细菌,从中药天然产物的探索发现有效的抗菌药物依然是当前抗菌药物研究的重要方向。因此,应结合刘寄奴的药理活性和资源分布,合理开发刘寄奴药材,为自然灾害发生引起细菌感染提供重要药物资源。

参考文献

- [1] 年华,郑汉臣,秦路平,等.奇蒿的研究进展[J].药学实践杂志,2002,20(5):305-309.
- [2] 陈晓春,柳贤福.白苞蒿和奇蒿的研究进展[J].广州化工,2020,48(20):1-3.
- [3] 李璐.药用植物奇蒿的化学成分研究[D].南昌:南昌大学,2017.
- [4] 谭蔚峰,王靖,邢新.中药奇蒿提取物体外抗菌活性的实验研究[J].药学实践杂志,2010,28(2):101-104.
- [5] 陈俊,徐雷,曹青青,等.中药奇蒿氯仿、乙酸乙酯提取物的抗菌化学组分研究[J].第二军医大学学报,2016,37(2):236-241.
- [6] 邱智泉,曹青青,谭蔚峰,等.应用高效液相色谱法测定中药奇蒿中异泽兰黄素和奇蒿黄酮的含量[J].药学实践杂志,2016,34(2):163-166.
- [7] 杜昕.奇蒿化学成分和药理作用的研究述要[J].世界最新医学信息文摘,2015,15(18):40.
- [8] 段和祥,罗文艳,杨毅生,等.菱蒿醋酸乙酯部位化学成分研究[J].中草药,2015,46(10):1441-1444.
- [9] 欧徐涵,况焱,吴学谦,等.青钱柳叶子化学成分的研究[J].中草药,2017,48(23):4840-4844.
- [10] 肖永庆,屠呦呦.蒿属中药南刘寄奴脂溶性成分的分离鉴定[J].药学学报,1984,19(12):909-912.
- [11] 冯薇,刘敏彦,李琛,等.淡豆豉化学成分及其体外促成骨细胞增殖活性研究[J].中国药理学杂志,2016,51(3):203-206.
- [12] Lee S, Kang H, Song H, et al. Sesquiterpene lactones, inhibitors of farnesyl protein transferase, isolated from the flower of *Artemisia sylvatica* [J]. Tetrahedron, 2000, 56(27):4711-4715.
- [13] 陈默,王志伟,胡长鹰,等.酶标仪法快速评价香兰素的抑菌活性[J].食品与发酵工业,2009,35(5):63-66.

(收稿日期:2022-05-07;修回日期:2022-07-06)

基于 UHPLC-Q-Exactive-Obitriap-MS 的 柴胡疏肝丸的化学成分解析

李宇¹, 张凯², 孙静¹, 朱博², 徐文娟^{2*}, 董玲^{2*} (1.北京中医药大学 中药学院, 北京 102488; 2.北京中医药大学 生命科学学院, 北京 102488)

摘要: **目的** 基于超高效液相色谱-四极杆-静电场离子阱技术 (UHPLC-Q-Exactive-Obitriap-MS) 对柴胡舒肝丸的化学成分进行快速解析。**方法** 参照药典方法制备柴胡舒肝丸供试品, 以 0.1% 甲酸水 (A) - 乙腈 (B) 为流动相进行梯度洗脱。采用热电喷雾离子源 (HESI), 正、负离子模式下分别进行一级和二级质谱数据采集, 结合文献报道对柴胡舒肝丸的化学成分进行表征。**结果** 共检测出 121 种化合物, 包括黄酮类、萜类、苯丙素类、蒽醌类、生物碱类等, 并系统总结了主要化学成分的质谱裂解规律。**结论** 本研究基于 UHPLC-Q-Exactive-Obitriap-MS 技术建立了中药成分准确快速的分析方法, 明确了柴胡舒肝丸的化学成分组成, 为进一步明确其药效物质基础及建立质量标准提供参考。

关键词: 柴胡舒肝丸; UHPLC-Q-Exactive-Obitriap-MS; 化学成分; 黄酮类; 萜类

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2758-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.010

Chemical compositions in Chaihu Shugan pills based on UHPLC-Q-Exactive-Obitriap-MS

LI Yu¹, ZHANG Kai², SUN Jing¹, ZHU Bo², XU Wen-juan^{2*}, DONG Ling^{2*} (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488; 2. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: **Objective** To determine and identify the chemical components in Chaihu Shugan pills based on UHPLC-Q-Exactive-Obitriap-MS. **Methods** The test samples of Chaihu Shugan pills were prepared according to the method in Pharmacopoeia, and the gradient elution was conducted with 0.1% formic acid (A) - acetonitrile (B) as the mobile phase. HESI was used to collect the primary and secondary mass spectrometry data in both positive and negative ion modes. Finally, the chemical components in Chaihu Shugan pills were characterized with the help of literature reports. **Results** Totally 121 components in Chaihu Shugan pills were detected, including flavonoids, terpenoids, phenylpropanoids, anthraquinones, and alkaloids, etc. The fragmentation behaviors of the main chemical components were systematically summarized. **Conclusion** An accurate and rapid analysis method of traditional Chinese medicine is established by UHPLC-Q-Exactive-Obitriap-MS. The chemical components in Chaihu Shugan pills have been determined for the first time, which provides a reference for further clarifying its pharmacodynamic material basis and establishing quality standards.

Key words: Chaihu Shugan pill; UHPLC-Q-Exactive-Obitriap-MS; chemical component; flavonoid; terpenoid

柴胡舒肝丸, 原方柴胡疏肝散出自明代张介宾的《景岳全书》, 经现代制剂工艺增加药味制备而得。多年临床应用表明, 柴胡舒肝丸对肝气不舒所致的失眠、抑郁等症均有较好的疗效^[1-6]。

作者简介: 李宇, 男, 硕士研究生, 主要从事中药化学成分分析及中药制剂新技术等研究, email: Halloween525@163.com

***通信作者:** 董玲, 女, 研究员, 主要从事中药标准化、中药制剂新技术、中药生物药剂学、中药药事管理等研究, email: elinadong@vip.163.com; 徐文娟, 女, 副研究员, 主要从事中药药效物质与作用机制研究, email: cathy xwj@126.com

方中柴胡、黄芩等药味已有明确的成分研究报道,然而对于柴胡舒肝丸全方的成分分析,目前仅韩晓妮等^[7]对柴胡舒肝丸进行了 HPLC 指纹图谱研究,2020 年版《中国药典》在柴胡舒肝丸的含量测定项下仅规定了黄芩苷、厚朴酚、和厚朴酚 3 种成分含量的最低限度^[8],而用于评判药味组成丰富的柴胡舒肝丸的质量显得不够充分。因此,系统分析柴胡舒肝丸的化学成分组成,对明确其药效物质基础、指导临床有效用药、控制产品质量等方面均具有重要的意义。

Q-Exactive-Obitriap 具备高分辨率、高灵敏度的特点,是复杂体系定性与定量分析的有力工具,目前已广泛应用于中药化学成分解析^[9-13],可为研究药味来源广泛、化学成分复杂的柴胡舒肝丸提供可靠的分析手段。本研究采用 UHPLC-Q-Exactive-Obitriap-MS 技术首次对柴胡舒肝丸化学成分进行系统分析,结合精准分子离子质量、质谱裂解规律、文献报道等对柴胡舒肝丸主要化学成分进行鉴定,初步构建柴胡舒肝丸化学成分库。该研究结果有效弥补了柴胡舒肝丸化学成分不清楚现状的短板,可为其药效物质及药理机制研究提供一定基础。

1 材料

1.1 仪器

Q-Exactive-Obitriap-MS 高分辨质谱仪配备 Vanquish 超高效液相色谱[配有热喷雾离子源(HESI),Xcalibur 4.2 化学工作站,美国 Thermo Scientific 公司];超声波清洗仪 SB25-12(宁波新芝生物科技股份有限公司);电子分析天平 BT-25S(北京赛多利斯仪器有限公司)。

1.2 试剂

柴胡舒肝丸(规格:10 g/丸,批号:20210605,北京御生堂集团石家庄制药有限公司)。质谱级乙腈、质谱级甲酸、色谱级甲醇(美国 Thermo Fishier 公司),蒸馏水(深圳屈臣氏蒸馏水有限公司)。

2 方法

2.1 样品制备

样品制备参照 2020 年版《中国药典》一部柴胡舒肝丸项下供试液制备方法^[8],取本品一丸剪碎并混匀,精密称取 2 g 置于具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 25 mL,密塞后称定,记录重量,浸泡过夜。再将其振摇溶散,超声处理(功率 180 W,频率 35 kHz) 50 min,放冷后称重,并以 70% 甲醇溶液补足减失的重量,摇匀过滤后取续滤液,过 0.22 μm 微孔滤膜即得。

2.2 仪器设置

2.2.1 色谱条件

色谱柱 BEH-C18 柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μm); 流动相 A 为 0.1% 甲酸水,流动相 B 为乙腈,梯度洗脱(0~15 min, 5%~40%B; 15~20 min, 40%~80%B; 20~24 min, 80%~100%B),流速 0.3 mL $\cdot$ min⁻¹,进样量 3 μL ;柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.2 质谱条件 采用 HESI 离子源,在正、负离子两种模式下进行扫描,扫描范围 m/z 100~1500 Da;离子源温度 350 $^{\circ}\text{C}$,电离源电压,毛细管电压,管透镜电压分别为 4 kV、35 V、110 V;辅助气流速 20 arb,鞘气流速 40 arb,两者均为氮气;一级质谱采用傅里叶变换高分辨全扫方式,数据扫描分辨率 30 000,二级质谱扫描分辨率 15 000,采用数据依赖性扫描方式获取, CID 碎裂方式。

2.3 数据处理分析

以“2.2”项下条件对柴胡舒肝丸样品溶液(80 mg $\cdot$ mL⁻¹) 在正、负离子模式下分别进行检测,并结合 Xcalibur 4.2 软件对检测结果进行分析,由得到的一级高分辨图谱可初步判断化合物可能的分子式,质谱偏差为 $\delta \leq 5 \times 10^{-6}$,并结合二级谱图裂解碎片及质荷比等信息,参考 PubChem 数据库及相关文献,对柴胡舒肝丸的化学成分进行解析。

3 结果与分析

得到正、负离子模式下的 TIC 总离子流图见图 1,结合文献^[14-44],共鉴定出柴胡舒肝丸 70% 甲醇提取液中的 121 个化学成分,包括黄酮类化合物 46 个,萜类化合物 31 个,氨基酸类化合物 3 个,苯丙素类化合物 2 个,苯酚类化合物 3 个,蒽醌类化合物 6 个,酚酸类化合物 4 个,生物碱类化合物 6 个,香豆素类化合物 3 个,其他类化合物 17 个,具体结果见表 1。

3.1 生物碱类化合物

柴胡舒肝丸中生物碱类化合物主要来源于厚朴、槟榔、半夏、乌药,如甜菜碱、乌药碱、Reticuline、去甲异波尔定碱、槟榔碱等。以化合物 1 为例,正离子模式下准分子离子 ($[M+H]^+$, m/z 118.09),推导其分子式为 $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$,在二级质谱中丰度最高离子为 m/z 59.07, m/z 58.07,为特征性碎片离子 $[M+H-C_2H_3O_2]^+$, $[M+H-C_2H_4O_2]^+$,结合参考文献^[14],推断此化合物为甜菜碱,来源于厚朴。化合物 29,正离子模式下准分子离子 ($[M+H]^+$, m/z 286.14),推导其分子式为 $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_3$,二级质谱基峰离子为 $[\text{C}_7\text{H}_7\text{O}]^+$, m/z 107.05,为化合物在 C-N 基团发生 α -裂解所产生,为异喹啉类生物碱的特征性碎片离子,结合文献^[15],推断此化合物为乌药碱,来源于乌药,裂解规律见图 2。

表 1 柴胡舒肝丸的化学成分鉴定结果

Tab 1 Identification of chemical components in Chaihu Shugan pills

No.	ESI	t_R / min	测定值	误差 / $\times 10^{-6}$	分子式	二级碎片	鉴定结果	来源
1	[M+H] ⁺	1.15	118.09	0.634	C ₅ H ₁₁ NO ₂	58.07, 59.07	甜菜碱 ^[14]	厚朴
2	[M+H] ⁺	1.20	136.06	-0.160	C ₅ H ₅ N ₅	119.04	腺嘌呤 ^[42]	半夏
3	[M+H] ⁺	1.23	182.08	0.221	C ₉ H ₁₁ NO ₃	87.04, 96.04, 111.04	酪氨酸 ^[26]	紫苏梗 / 三棱
4	[M+H] ⁺	1.24	156.10	0.159	C ₈ H ₁₃ NO ₂	113.06, 124.08	槟榔碱 ^[41]	槟榔
5	[M+H] ⁺	1.61	268.10	-0.337	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	70.07, 133.05, 136.06	腺苷 ^[26]	紫苏梗 / 半夏
6	[M-H] ⁻	1.75	331.07	0.474	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	125.02, 169.01	没食子酸-3-O-β-D-葡萄糖苷 ^[32]	大黄
7	[M+H] ⁺	1.79	132.10	-2.386	C ₆ H ₁₃ NO ₂	69.07, 72.94, 86.10	亮氨酸 ^[36]	三棱
8	[M+H] ⁺	1.90	199.06	-1.456	C ₉ H ₁₀ O ₅	154.99, 181.10	丹参素 ^[26]	紫苏梗
9	[M-H] ⁻	2.37	169.01	3.551	C ₇ H ₆ O ₅	125.02	没食子酸 ^[32]	大黄 / 白芍
10	[M+H] ⁺	2.93	127.04	-1.815	C ₆ H ₆ O ₃	81.03, 109.03	5-羟甲基糠醛 ^[21]	枳壳 / 青皮 / 陈皮
11	[M+H] ⁺	4.22	205.10	-2.897	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	121.03, 135.04, 149.06	色氨酸 ^[26]	紫苏梗
12	[M-H] ⁻	4.33	577.13	0.914	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	125.02, 289.07, 407.08	原花青素 B ^[32]	大黄
13	[M+H] ⁺	4.93	265.15	-3.805	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₃	145.03, 177.05	N-feruloylputrescine ^[39]	厚朴
14	[M-H] ⁻	4.96	495.15	3.731	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	61.99, 93.03, 137.02	氧化芍药苷 ^[29]	白芍
15	[M+H] ⁺	5.01	355.10	-2.671	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	136.02, 161.71, 163.04	绿原酸 ^[16]	柴胡 / 山楂
16	[M-H] ⁻	5.21	183.03	2.241	C ₈ H ₈ O ₅	61.99, 103.92, 154.91, 168.00	没食子酸甲酯 ^[29]	白芍
17	[M+H] ⁺	6.24	314.14	-4.312	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	205.06, 237.09, 265.08, 297.11	去甲异波尔定碱 ^[15]	乌药
18	[M-H] ⁻	6.29	289.07	3.962	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	109.03, 123.04, 203.07, 245.08	儿茶素 ^[32]	大黄 / 白芍
19	[M+H] ⁺	6.30	595.16	-3.539	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	295.06, 325.07, 337.07	木犀草素-7-O-芸香糖苷 ^[18]	黄芩
20	[M+H] ⁺	6.64	625.17	-3.969	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	317.07, 325.07, 355.08, 367.08, 409.09	水仙苷 ^[16]	柴胡
21	[M+H] ⁺	7.18	565.15	-2.870	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	271.05	夏佛塔苷 ^[40]	甘草
22	[M+H] ⁺	7.20	330.17	-3.255	C ₁₉ H ₂₃ NO ₄	137.06, 192.10, 299.13	Reticuline ^[39]	厚朴
23	[M-H] ⁻	7.43	479.15	-0.205	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	113.02, 479.15	芍药内酯苷 ^[29]	白芍
24	[M+H] ⁺	8.11	611.16	-2.325	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	71.05, 85.03, 303.05	芦丁 ^[16]	柴胡
25	[M-H] ⁻	8.18	431.10	-0.031	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	240.04, 269.04	芦荟大黄素-8-O-葡萄糖苷 ^[33]	大黄
26	[M+H] ⁺	8.36	195.06	-2.027	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	117.03, 145.01, 177.05	阿魏酸 ^[28]	当归
27	[M+H] ⁺	8.38	177.05	-2.376	C ₁₀ H ₈ O ₃	117.03, 145.01, 149.06	芸香苷 ^[20]	柴胡
28	[M+H] ⁺	8.39	286.14	-2.237	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	107.05, 143.05, 237.09, 269.12	乌药碱 ^[15]	乌药
29	[M+H] ⁺	8.44	465.10	-1.897	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	147.04, 169.1, 289.07, 303.05	2', 3, 5, 6', 7-四羟基黄酮-2'-O-葡萄糖苷 ^[18]	黄芩
30	[M+H] ⁺	8.48	257.08	-2.121	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	137.02, 147.04, 211.07	乔松素 ^[37]	豆蔻
31	[M+H] ⁺	8.54	463.09	-3.439	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	269.04, 287.05	黄芩素 ^[18]	黄芩
32	[M+H] ⁺	8.78	268.13	-1.474	C ₁₇ H ₁₇ NO ₂	191.09, 219.08, 251.11	asimilobine ^[39]	厚朴
33	[M+H] ⁺	9.02	307.12	-1.904	C ₁₆ H ₁₈ O ₆	235.06, 259.06, 274.08, 289.11	升麻素 ^[19]	防风
34	[M+H] ⁺	9.03	549.16	-0.978	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	279.06, 309.08, 363.09	8-阿拉伯糖基-6-葡萄糖基-5, 7-二羟基黄酮 ^[18]	黄芩
35	[M+H] ⁺	9.69	453.18	-0.515	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₀	231.06, 273.11, 291.12	5-O-甲基维斯阿米醇苷 ^[19]	防风
36	[M+H] ⁺	9.72	579.17	-1.039	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	85.03, 271.06, 272.06	山柰苷 ^[20]	柴胡
37	[M-H] ⁻	9.73	631.16	-1.801	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₅	102.06, 121.03, 151.00, 169.01	没食子酰芍药苷 ^[29]	白芍
38	[M+H] ⁺	9.78	273.08	-1.135	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	153.02, 147.04, 171.03, 119.05	柚皮素 ^[22]	枳壳 / 青皮 / 陈皮
39	[M+H] ⁺	9.79	581.19	-0.881	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	273.08, 195.03, 153.02	芸香柚皮苷 ^[21]	枳壳 / 青皮 / 陈皮
40	[M+H] ⁺	9.91	609.18	-0.093	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	301.07	香叶木苷 ^[43]	薄荷
41	[M+H] ⁺	10.05	611.20	-1.532	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	303.09, 177.059, 195.03	橙皮苷 ^[21]	枳壳 / 薄荷 / 青皮 / 陈皮
42	[M+H] ⁺	10.06	517.13	0.556	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	163.04, 135.04, 145.03, 129.01	异绿原酸 A / 异绿原酸 B ^[16]	柴胡
43	[M-H] ⁻	10.70	509.16	-1.753	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₂	121.03, 129.20, 174.95	牡丹皮苷 D ^[29]	白芍
44	[M+H] ⁺	10.77	551.17	-1.247	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	257.08	甘草素-4'-芹糖苷 ^[40]	甘草
45	[M+H] ⁺	11.06	255.06	-2.216	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	93.07, 121.10, 131.05, 137.02	白杨素 / 大豆素 ^[18]	黄芩
46	[M+H] ⁺	11.17	449.11	-2.823	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	169.01, 187.02, 273.07	槲皮苷 ^[24]	香附 / 六神曲
47	[M+H] ⁺	11.18	419.13	-1.572	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	137.02, 257.08	甘草苷 ^[40]	甘草
48	[M+H] ⁺	11.28	347.08	-2.547	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	314.04, 317.03, 332.05	4-羟基-2-甲氧基黄酮 ^[23]	枳壳 / 青皮 / 陈皮
49	[M+H] ⁺	11.29	507.11	-1.868	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	301.03, 316.06, 331.08	2, 5, 6'-三羟基-7, 8-二甲氧基黄酮-2'-O-葡萄糖醛酸 ^[18]	黄芩

续表 1

No.	ESI	t_R / min	测定值	误差 / $\times 10^{-6}$	分子式	二级碎片	鉴定结果	来源
50	[M+H] ⁺	11.30	261.11	- 2.166	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	131.05, 159.04, 189.05, 243.10	异米拉素 ^[23]	枳壳 / 青皮 / 陈皮
51	[M+H] ⁺	11.44	287.06	- 3.917	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	139.00, 153.07, 223.04, 241.05, 269.04	木犀草素 ^[24]	香附 / 桔梗 / 黄芩 / 六神曲
52	[M+H] ⁺	11.65	417.12	- 2.106	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	267.06, 297.07, 321.07	大豆苷 ^[20]	柴胡
53	[M+H] ⁺	12.17	449.11	- 2.823	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	169.01, 187.02, 273.07	木犀草苷 ^[18]	黄芩
54	[M+H] ⁺	12.41	303.05	- 2.736	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	161.06, 169.01, 187.02	槲皮素 ^[20]	柴胡 / 山楂 / 豆蔻 / 六神曲
55	[M+H] ⁺	12.47	593.18	- 3.021	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄	285.07	蒙花苷 ^[43]	薄荷
56	[M+H] ⁺	12.61	477.10	- 2.939	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	286.05, 301.07	粗毛豚草素 -7-O-β-D- 葡萄糖醛酸 苷 ^[18]	黄芩
57	[M+H] ⁺	12.81	595.20	- 3.364	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	287.09	香蜂草苷 ^[43]	薄荷
58	[M+H] ⁺	12.87	461.11	- 3.422	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	270.05, 285.07	汉黄芩苷 ^[18]	黄芩
59	[M-H] ⁻	13.08	415.10	1.015	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	253.05	大黄酚 -8-O- 葡萄糖苷 ^[32]	大黄
60	[M+H] ⁺	13.11	247.10	- 2.936	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	201.09, 214.06, 229.09, 247.10	异紫花前胡内酯 ^[21]	枳壳 / 青皮 / 陈皮
61	[M+H] ⁺	13.70	839.40	- 2.581	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	487.34	甘草皂苷 G ^[40]	甘草
62	[M+H] ⁺	13.93	187.04	- 3.532	C ₁₁ H ₆ O ₃	131.05, 143.05	补骨脂素 ^[19]	防风
63	[M+H] ⁺	14.19	445.15	- 3.524	C ₂₃ H ₂₄ O ₉	105.03, 407.22	1, 3-O-diferuloylglycerol ^[36]	三棱
64	[M+H] ⁺	14.51	725.23	- 4.096	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₈	361.09, 389.08, 404.11, 419.13	melitidin ^[23]	枳壳 / 青皮 / 陈皮
65	[M+H] ⁺	14.64	217.05	- 3.894	C ₁₂ H ₈ O ₄	161.06, 174.03, 202.02	花椒毒素 ^[19]	防风
66	[M-H] ⁻	15.02	445.11	2.442	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	240.04, 283.06	大黄素甲醚 -8-O- 葡萄糖苷 ^[33]	大黄
67	[M+H] ⁺	15.21	331.08	- 1.349	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	169.01, 183.03, 298.05, 316.06,	7, 3'-二甲氧基槲皮素 ^[16]	柴胡
68	[M+H] ⁺	15.56	271.06	- 4.316	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	123.01, 169.01, 253.05	芹菜素 ^[26]	紫苏梗 / 桔梗
69	[M+H] ⁺	16.40	269.08	- 3.848	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	213.09, 254.06	芒柄花素 ^[36]	三棱
70	[M+H] ⁺	17.26	823.41	- 2.808	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	453.33, 471.34	甘草酸 ^[40]	甘草
71	[M+H] ⁺	17.27	221.19	- 2.902	C ₁₃ H ₂₄ O	95.09, 119.09, 147.12, 203.18	氧化石竹烯 ^[24]	香附
72	[M+H] ⁺	17.30	343.12	- 2.666	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	135.04	甲基麦冬二氢高异黄酮 B ^[42]	半夏
73	[M+H] ⁺	17.47	471.20	- 1.134	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	95.01, 161.06, 425.19	柠檬苦素 ^[23]	枳壳 / 青皮 / 陈皮
74	[M+H] ⁺	17.80	533.24	- 0.270	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₀	95.01, 105.07, 161.06	诺米林酸 ^[23]	枳壳 / 青皮 / 陈皮
75	[M+H] ⁺	17.92	313.11	- 0.767	C ₁₈ H ₁₆ O ₅	255.06, 269.08, 270.09, 298.08	5, 7, 4'-三甲氧基黄酮 ^[23]	枳壳 / 青皮 / 陈皮
76	[M-H] ⁻	17.97	283.06	0.071	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	163.00, 239.03, 268.04	大黄素甲醚 ^[32]	大黄 / 香附
77	[M-H] ⁻	18.10	253.05	0.572	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	209.06, 225.05, 253.05	大黄酚 ^[32]	大黄
78	[M+H] ⁺	18.11	403.14	- 0.854	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	330.07, 355.08, 373.09, 388.11	川陈皮素 ^[23]	枳壳 / 青皮 / 陈皮
79	[M-H] ⁺	18.14	781.47	- 1.956	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	455.32, 471.35, 617.41, 779.46	柴胡皂苷 D/ 柴胡皂苷 A/ 柴胡 皂苷 B ₂ ^[16]	柴胡
80	[M+H] ⁺	18.17	315.09	- 1.379	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	282.05, 285.04, 300.06	3-O- 乙酰基短叶松素 ^[38]	豆蔻
81	[M+H] ⁺	18.24	277.11	- 3.717	C ₁₅ H ₁₆ O ₅	205.05, 259.10	亥茅酚 ^[19]	防风
82	[M+H] ⁺	18.29	375.11	- 0.544	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	327.05, 345.06, 360.08	迷迭香酸甲酯 ^[26]	紫苏梗
83	[M+H] ⁺	18.33	515.23	0.429	C ₂₈ H ₃₄ O ₉	133.06, 161.06, 205.05	诺米林 ^[23]	枳壳 / 青皮 / 陈皮
84	[M+H] ⁺	18.39	285.08	- 0.456	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	168.01, 186.02, 270.05	汉黄芩素 /7- 甲基芹菜定 ^[18]	黄芩
85	[M-H] ⁺	18.62	821.47	- 0.599	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	471.35, 617.16	2"- 乙酰基柴胡皂苷 A/3"- 乙酰基 柴胡皂苷 A/4"- 乙酰基柴胡皂苷 A/2"- 乙酰基柴胡皂苷 D/6"- 乙酰 基柴胡皂苷 A ^[16-20]	柴胡
86	[M+H] ⁺	18.63	433.15	- 0.182	C ₂₂ H ₂₄ O ₉	399.11, 403.10, 408.18, 418.13	3', 4', 3, 5, 6, 7, 8- 七甲氧基 黄酮 ^[23]	枳壳 / 青皮 / 陈皮
87	[M+H] ⁺	18.64	433.11	- 1.439	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	385.09, 403.10, 418.13	芹菜素 -7-O-β-D- 葡萄糖苷 ^[18]	黄芩
88	[M+H] ⁺	18.66	357.13	- 0.406	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	301.07	乌拉尔宁 ^[40]	甘草
89	[M+H] ⁺	18.71	245.12	- 0.575	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	171.12, 181.10, 245.12	乌药内酯 ^[15]	乌药
90	[M+H] ⁺	18.72	318.28	- 0.475	C ₂₁ H ₃₅ NO	256.26	丝胶树碱 ^[42]	半夏
91	[M+H] ⁺	18.77	359.11	- 0.193	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	298.08, 326.08, 344.09	5- 羟基 -6, 7, 3', 4'- 四甲氧基黄 酮 ^[23]	枳壳 / 青皮 / 陈皮
92	[M-H] ⁻	18.80	247.13	4.407	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	116.93, 203.14, 221.15, 247.13	木香内酯 ^[30]	木香

续表 1

No.	ESI	t_R / min	测定值	误差 / $\times 10^{-6}$	分子式	二级碎片	鉴定结果	来源
93	[M+H] ⁺	18.91	193.12	-0.188	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	57.07, 129.02, 137.06	洋川芎内酯 A ^[27]	当归
94	[M+H] ⁺	19.08	455.35	-0.773	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	95.01, 105.07, 161.06	白桦脂酮酸 ^[26]	紫苏梗 / 白芍
95	[M+H] ⁺	19.17	355.12	-0.520	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	299.05	甘草黄酮醇 ^[40]	甘草
96	[M+H] ⁺	19.21	249.15	0.156	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	152.92, 180.91, 203.14	莪术二醇 ^[35]	莪术
97	[M+H] ⁺	19.44	389.12	-1.835	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	316.06, 339.09, 341.06, 359.08	5-O-去甲基川陈皮素 ^[23]	枳壳 / 青皮 / 陈皮
98	[M-H] ⁻	19.75	269.05	2.565	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	197.06, 225.06, 241.05	大黄素 ^[31]	大黄
99	[M+H] ⁺	19.77	189.09	-2.360	C ₁₂ H ₁₂ O ₂	128.06, 143.09, 153.07, 189.09	丁烯基苯酚 ^[27]	当归
100	[M+H] ⁺	19.84	375.14	-1.785	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	247.10, 260.07, 275.09	ledebouriellol ^[19]	防风
101	[M+H] ⁺	19.98	191.11	-2.544	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	117.07, 145.10, 163.11, 173.10	藜本内酯 ^[27]	当归
102	[M+H] ⁺	20.39	221.19	-2.631	C ₁₅ H ₂₄ O	57.07, 147.04, 165.05	β -dictyoptero ^[25]	香附
103	[M+H] ⁺	20.45	213.13	-3.199	C ₁₅ H ₁₆ O	180.09, 195.12	benzeneethanol ^[28]	当归
104	[M+H] ⁺	20.45	231.14	-2.926	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	83.09, 143.09, 185.13, 213.13	银线草内酯 A ^[15]	乌药
105	[M+H] ⁺	20.77	219.17	-2.701	C ₁₅ H ₂₂ O	201.16, 163.11, 135.08, 121.06	(+)-诺卡酮 ^[25]	香附
106	[M-H] ⁻	20.80	483.31	-0.974	C ₃₀ H ₄₄ O ₅	409.27	茯苓新酸 B ^[44]	茯苓
107	[M+H] ⁺	20.84	329.10	-3.266	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	329.10, 314.08, 313.07, 299.05, 271.06	4'-羟基-5, 6, 7-三甲氧基黄酮 ^[23]	枳壳 / 青皮 / 陈皮
108	[M-H] ⁻	20.85	233.15	-2.687	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	215.14, 187.15, 145.10, 119.09	土木香内酯 ^[30]	木香
109	[M-H] ⁻	21.53	481.33	0.132	C ₃₁ H ₄₆ O ₄	421.31	猪苓酸 C ^[44]	茯苓
110	[M+H] ⁺	21.81	273.15	-4.104	C ₁₇ H ₂₀ O ₃	213.13, 171.08, 143.08, 105.07	乙酸乌药酯 ^[15]	乌药
111	[M+H] ⁺	21.83	149.02	-3.896	C ₈ H ₄ O ₃	121.03, 107.09, 93.07	邻苯二甲酸酐 ^[27]	当归 / 半夏
112	[M+H] ⁺	21.85	229.12	1.020	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	211.13, 167.14	莪术呋喃烯酮 ^[34]	莪术
113	[M+H] ⁺	21.87	205.19	-3.545	C ₁₅ H ₂₄	149.13, 121.10, 109.10, 95.09	α -芹子烯 ^[24]	香附
114	[M+H] ⁺	21.89	279.16	-4.247	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	149.02, 125.10	邻苯二甲酸二丁酯 ^[28]	当归
115	[M+H] ⁺	22.43	353.27	-3.952	C ₂₁ H ₃₆ O ₄	335.26, 261.22	甘油亚麻酸酯 ^[42]	半夏
116	[M-H] ⁻	22.84	527.37	0.244	C ₃₃ H ₅₂ O ₅	465.34	茯苓酸 ^[44]	茯苓
117	[M+H] ⁺	23.13	457.37	-4.421	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	203.18, 189.16, 163.15	齐墩果酸 ^[25]	香附
118	[M+H] ⁺	23.17	439.36	-4.250	C ₃₀ H ₄₆ O ₂	203.18, 189.16, 95.09	灵芝醇 A ^[26]	紫苏梗
119	[M-H] ⁻	24.04	467.35	1.729	C ₃₁ H ₄₈ O ₃	337.26	去氢齿孔酸 ^[44]	茯苓
120	[M+H] ⁺	26.15	473.36	-4.239	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	473.36, 299.93	朦朧木酸 ^[26]	紫苏梗
121	[M+H] ⁺	26.17	122.10	-0.458	C ₈ H ₁₁ N	107.54	N-乙基苯胺 ^[42]	半夏

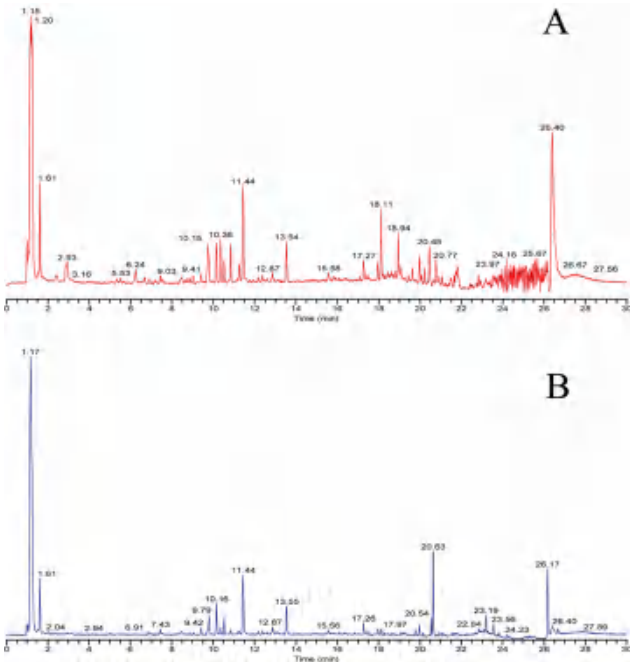


图 1 正离子 (A)、负离子 (B) 模式下柴胡舒肝丸提取液的总离子流图
Fig 1 Total ion chromatogram of Chaihu Shugan pills in both positive ion (A) and negative ion (B) modes

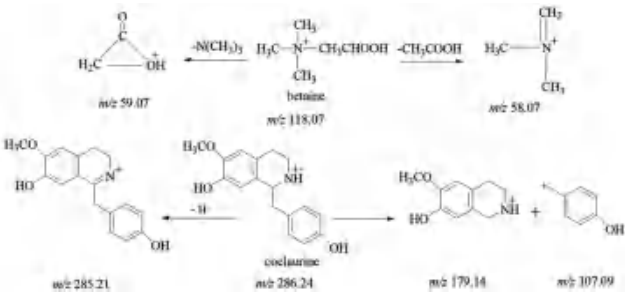


图 2 甜菜碱、乌药碱可能的裂解途径
Fig 2 Fragmentation pathways of coclaurine and betaine

3.2 酚酸类化合物

酚酸类化合物主要来源于柴胡、紫苏梗、大黄、白芍等。例如绿原酸、丹参素、没食子酸等，此类化合物在二级质谱图中，主要表现为失去水分子和羧基，或者是碳氧单键的断裂。以化合物 15 为例，其保留时间为 5.01 min，准分子离子 ([M + H]⁺, m/z 355.10)，推导其分子式为 C₁₆H₁₈O₉，在二级质谱图中显示较高丰度的 m/z 163.04 的碎片离子，为羧基上的碳氧单键断裂产生，结合相关文献^[16]，判断此碎片为咖啡酰基碎片峰，为母离子丢失一个奎宁酸片段获

得, 从而判断化合物 15 为绿原酸, 裂解规律见图 3。化合物 9 在二级质谱图中的高丰度离子碎片为 m/z 125.02, 负离子模式下的准分子离子为 m/z 169.01, 故丢失片段可能为羧基, 结合参考文献^[17], 推断化合物 9 为没食子酸。

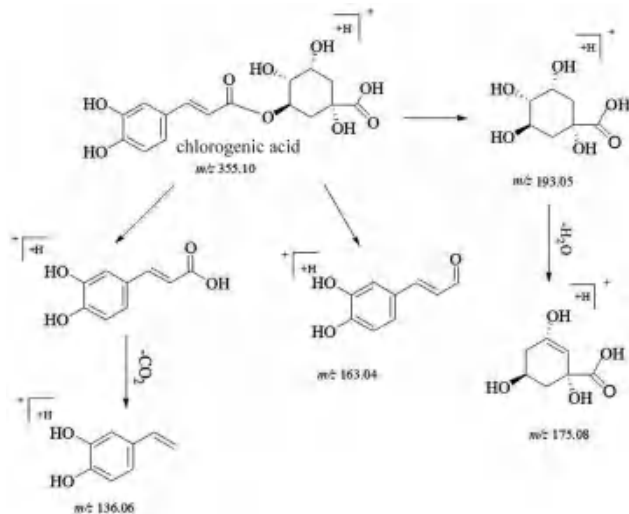


图 3 绿原酸可能的裂解途径

Fig 3 Fragmentation pathways of chlorogenic acid

3.3 黄酮类化合物

柴胡舒肝丸中黄酮类化合物主要来源于柴胡、枳壳、青皮、紫苏梗、黄芩、甘草。简单取代类黄酮如芦丁、山柰苷、芹菜素、黄芩素等, 其主要裂解形式见图 4, 表现为失去一分子二氧化碳, 或是发生 RDA 裂解^[17]。以化合物 51 为例, 其保留时间为 11.44 min, 一级高分辨质谱数据得到准分子离子 $([M + H]^+)$, m/z 287.06, 推导其化学式为 $C_{15}H_{10}O_6$, 碎片离子检测出 m/z 153.07, 此碎片为木犀草素经 RDA 裂解产生的碎片离子, 确定化合物 51 为木犀草素, 其裂解规律见图 5。

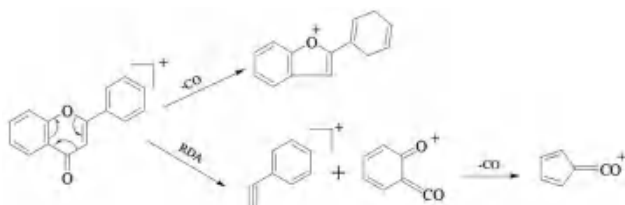


图 4 简单取代类黄酮化合物的可能裂解途径

Fig 4 Fragmentation pathways of simple substituted flavonoids

黄酮苷类化合物主要包括芦丁、山柰苷、大豆苷、芸香苷、香叶木苷等。以化合物 20 为例, 保留时间为 6.64 min, 一级高分辨质谱数据得到准分子离子 $([M + H]^+)$, m/z 625.17, 推导其化学式为 $C_{28}H_{32}O_{16}$, 二级碎片离子谱图上显示高丰度的碎片离子 m/z 317.07, 参考相关文献^[16], 此碎片离子为水仙苷失去鼠李糖与葡萄糖片段得

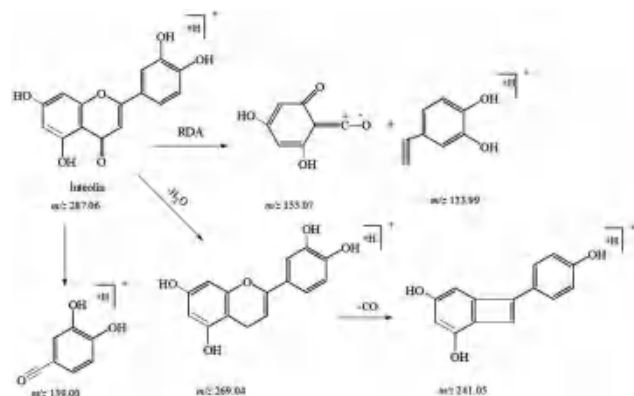


图 5 木犀草素可能的裂解途径

Fig 5 Fragmentation pathways of luteolin

到, 确定此化合物为水仙苷。化合物 25 保留时间为 8.11 min, 一级高分辨质谱数据得到准分子离子 $([M + H]^+)$, m/z 611.16, 推导其化学式为 $C_{27}H_{30}O_{16}$, 二级碎片离子为 m/z 303.05, 为苷发生水解, 丢失糖基所得, 结合参考文献^[16], 该裂解过程类似于水仙苷, 是芦丁失去鼠李糖与葡萄糖片段后得到的苷元离子 $([M + H - \text{Glu-Rha}]^+)$, m/z 303.05, 确定该化合物为芦丁, 裂解过程见图 6。

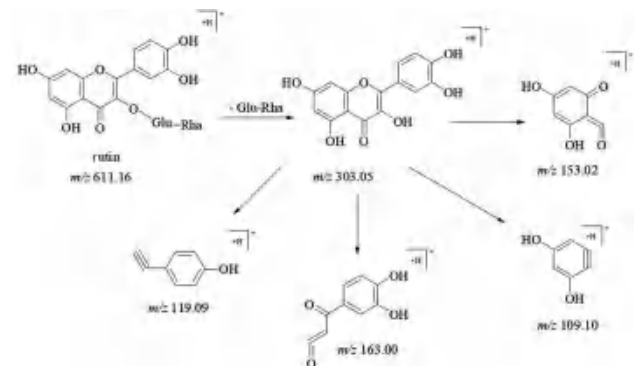


图 6 芦丁可能的裂解途径

Fig 6 Fragmentation pathways of rutin

C6 甲氧基取代的黄酮化合物, 如 4'-羟基-5, 6, 7-三甲氧基黄酮、5-羟基-6, 7, 3', 4'-四甲氧基黄酮、3', 4', 3, 5, 6, 7, 8-七甲氧基黄酮等, 裂解规律主要表现为失去甲基和一氧化碳基团^[17]。C8-甲氧基取代的黄酮类化合物, 较 C6 位取代更易丢失甲基^[17], 检测所得 3', 4', 3, 5, 6, 7, 8-七甲氧基黄酮、2, 5, 6'-三羟基-7, 8-二甲氧基黄酮-2'-O-葡萄糖醛酸, 汉黄芩素、汉黄芩苷等均属于此类黄酮化合物。例如化合物 58, 保留时间为 12.87 min, 一级高分辨质谱数据得到准分子离子 $([M + H]^+)$, m/z 461.11, 推导其化学式为 $C_{22}H_{20}O_{11}$, 二级碎片离子为 m/z 285.07、 m/z 270.05, 即失去一分子葡萄糖醛酸后再失去甲基所得, 结合相关参考文献^[18], 判定化

合物 58 为汉黄芩苷, 裂解规律见图 7。

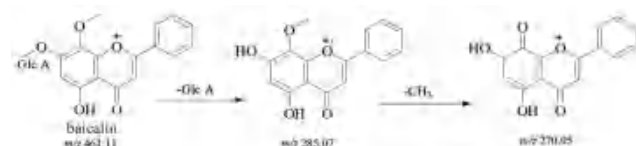


图 7 汉黄芩苷可能的裂解途径

Fig 7 Fragmentation pathways of baicalin

3.4 蒽醌类化合物

蒽醌类化合物主要来源于香附、大黄等药味, 如大黄素、大黄酚、大黄素甲醚及其取代基产物, 裂解规律主要包括甲基、亚甲基、一氧化碳、二氧化碳基团等常见裂解方式, 其中也伴随着双键的消失与新键的生成, 主要裂解规律见图 8。

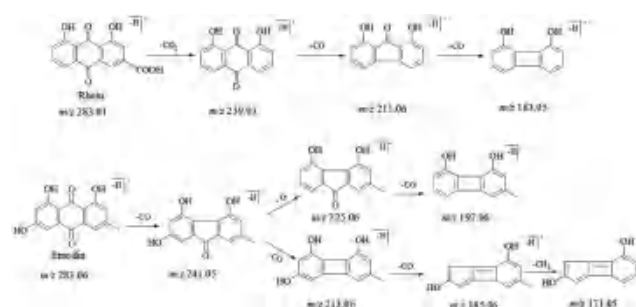


图 8 蒽醌类化合物可能的裂解途径

Fig 8 Fragmentation pathways of anthraquinones

3.5 香豆素类化合物

方中香豆素类化合物主要来源于防风、枳壳、青皮或陈皮, 一类以花椒毒素、补骨脂素为主的呋喃香豆素, 另一类以异紫花前胡内酯为主的异戊烯基香豆素。在裂解规律上表现为连续失去一氧化碳, 直至分子中的氧原子全部失去^[17]。以化合物 62 为例, 保留时间为 13.93 min, 一级高分辨质谱数据得到准分子离子为 $[M + H]^+$, m/z 187.04, 推导其化学式为 $C_{11}H_6O_3$, 二级碎片离子 m/z 143.05, m/z 131.05, 根据文献报道^[19], 此碎片离子为补骨脂素的特征性碎片离子 $[M + H - CO_2]^+$ 、 $[M + H - 2CO]^+$, 推断化合物 62 为补骨脂素, 裂解规律见图 9。

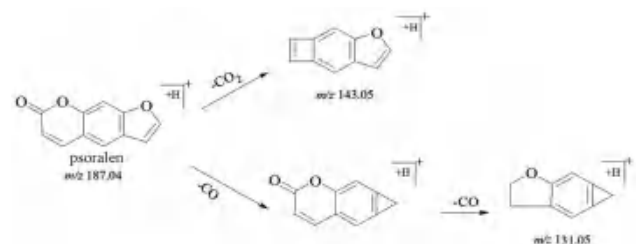


图 9 补骨脂素可能的裂解途径

Fig 9 Fragmentation pathways of psoralen

3.6 萜类化合物

方中萜类化合物主要来源于茯苓、防风、白

芍、木香、香附等, 单萜类、倍半萜类化合物, 大多具有挥发性, 组方中不易检测到。检测结果主要以三萜类化合物为主, 以齐墩果烷类三萜化合物为例, 其裂解规律主要表现为双键位置的 RDA 裂解及部分取代基的脱落。如化合物 117, 保留时间为 23.13 min, 正离子模式下的准分子离子为 $[M + H]^+$, m/z 457.37, 推导其化学式为 $C_{30}H_{48}O_3$, 二级碎片离子 m/z 203.18、 m/z 189.16, 结合分子量信息推断为齐墩果酸, m/z 203.18 为分子离子发生 RDA 裂解后丢失醋酸根离子所得, m/z 189.16 为发生 RDA 裂解再丢失氢原子和水分子所得^[17], 其裂解规律见图 10。

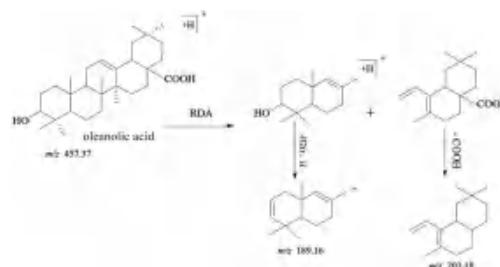


图 10 齐墩果酸可能的裂解途径

Fig 10 Fragmentation pathways of oleanolic acid

3.7 其他类化合物

其他类化合物包括有机酸类、色素类、酯类、酚类等。以化合物 33 为例, 其保留时间为 9.02 min, 一级高分辨质谱数据得到准分子离子为 $[M + H]^+$, m/z 307.12, 推导其化学式为 $C_{16}H_{18}O_6$, 二级碎片离子 m/z 289.11, m/z 259.06, 根据文献报道^[19], 此碎片离子为升麻素的特征性碎片离子 $[M + H - H_2O]^+$ 、 $[M + H - H_2O - 2CH_3]^+$, 裂解规律见图 11。再如酚类化合物 18, 其裂解规律主要为二氧化碳等基团的丢失、单键的断裂等, 裂解规律见图 12。

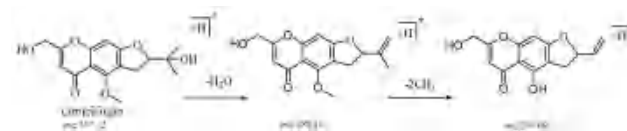


图 11 升麻素可能的裂解途径

Fig 11 Fragmentation pathways of cimicifugin

4 讨论

本研究首次采用 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap MS 技术, 结合文献报道, 对柴胡舒肝丸的化学成分进行系统分析, 共检测出 121 种化学成分。其中, 青皮、陈皮、枳壳各检测出 17 种化学成分; 黄芩检出 13 种; 柴胡检出 11 种; 大黄检出 10 种; 紫苏梗、半夏各检出 9 种; 香附、白芍各检出 8 种; 甘草、当归检出 7 种; 防风检出 6 种; 乌药、六神曲、桔梗各检出 5 种; 三棱、茯苓、厚朴、薄

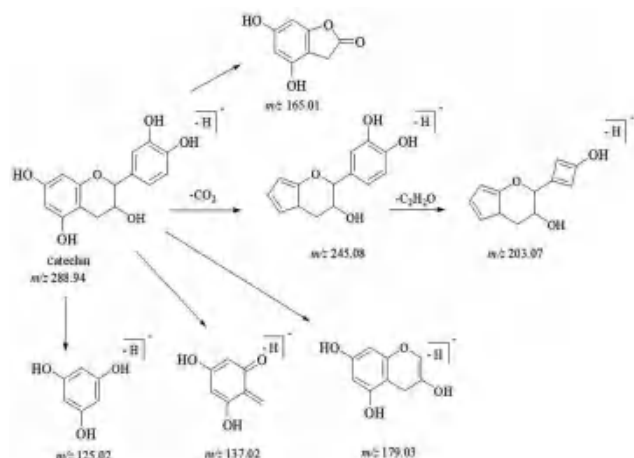


图 12 儿茶素可能的裂解途径

Fig 12 Fragmentation pathways of catechin

荷各检出 4 种；豆蔻检出 3 种；莪术、木香、山楂各检出 2 种；槟榔检出 1 种。此外，柴胡疏肝丸部分组方药材存在共同的化学成分，例如槲皮素为柴胡、山楂、豆蔻、六神曲共有成分，木犀草素为香附、桔梗、黄芩、六神曲共有成分。正、负离子模式下分别检测到 100 种、21 种化学成分，正离子模式下检测的化合物类型主要包括黄酮、酚酸、生物碱、萜类、香豆素等类化合物，负离子模式下主要有萜类、蒽醌等类化合物，正、负离子模式下均能检测到萜类化合物。

相关研究表明，方中君药柴胡所含柴胡皂苷类成分是发挥抗抑郁作用的主要物质基础，如柴胡皂苷 A 与柴胡皂苷 D 对于改善慢性不可预见性应激引起的大鼠抑郁状态有明显改善作用^[45-46]，柴胡或山楂的绿原酸类成分可通过小鼠海马星形胶质细胞中的单胺氧化酶 B-活性氧信号传导，从而防止应激激素诱导的抑郁行为^[47]。枳壳、青皮或陈皮中所含的柚皮苷类成分能够通过调控海马体神经营养因子、细胞生长因子，逆转小鼠认知及抑郁状态^[48]，通过抗炎及抗氧化作用调控抑郁小鼠体内色氨酸代谢^[49]，发挥抗抑郁作用。另据研究报道，没食子酸及其相关衍生物可明显改善小鼠氧化应激与抑郁状态^[50]。综上，该方药味所含药效成分抗抑郁症药理作用明确，但考虑到药物经口服到胃肠道消化吸收后，不排除发挥作用的为相关代谢产物，因此需要采用网络药理学及血清药物化学等手段对复方中的药效物质基础进一步筛选确认。

参考文献

[1] 金云隆. 针刺联合柴胡疏肝丸治疗肝胃不和型功能性消化不良临床研究[J]. 陕西中医, 2018, 39(3): 400-402.
[2] 郭庆飞. 浅谈用柴胡舒肝丸联合莫沙必利片治疗肝胃不和型

功能性消化不良的效果[J]. 当代医药论丛, 2017, 15(2): 96-98.
[3] 刘任程. 柴胡疏肝丸联合莫沙必利片治疗肝胃不和型功能性消化不良临床疗效评价[J]. 医疗装备, 2016, 29(2): 134-135.
[4] 谢佩贤. 柴胡疏肝丸联合莫沙必利片治疗肝胃不和型功能性消化不良临床效果观察[J]. 内蒙古中医药, 2017, 36(3): 87.
[5] 吴修敏. 督灸联合柴胡舒肝丸对气郁质失眠患者焦虑状态及血清多巴胺的影响[J]. 河南中医, 2021, 41(5): 766-769.
[6] 王庆军. 督灸联合柴胡舒肝丸治疗气郁质失眠临床观察[J]. 河南中医, 2021, 41(1): 120-123.
[7] 韩晓妮, 林丽峰, 曲艳国, 等. 柴胡舒肝丸 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药师, 2015, 18(4): 568-570.
[8] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 1456-1457.
[9] 肖治均, 杨欣欣, 梅矩铭, 等. 瓜拉那叶中化学成分的定性分析及咖啡因的含量测定[J]. 药物评价研究, 2022, 45(1): 60-70.
[10] 高旭华, 冯欣, 毕玥琳, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 的新癘片化学成分分析[J]. 中南药学, 2021, 19(9): 1792-1799.
[11] Liu M, Jiang Y, Rui L, et al. Structural features guided "fishing" strategy to identification of flavonoids from lotus plumule in a self-built data "pool" by ultra-high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry[J]. J Chromatogr B, 2019, 1124: 122-134.
[12] Jiang YP, Liu R, Liu M, et al. An integrated strategy to rapidly characterize non-targeted benzyloquinoline alkaloids from Plumbago nelumbinis ethanol extract using UHPLC/Q-orbitrap HRMS[J]. Inter J Mass Spectrom, 2018, 432: 26-35.
[13] Jiang YP, Liu R, Chen J, et al. Application of multifold characteristic ion filtering combined with statistical analysis for comprehensive profiling of chemical constituents in anti-renal interstitial fibrosis I decoction by ultra-high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2019, 1600: 197-208.
[14] 赵慧, 严颖, 邹立思, 等. 基于 UFLC-Triple TOF-MS/MS 技术分析厚朴化学成分[J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(20): 1824-1831.
[15] 洪浩, 杜伟峰, 康显杰, 等. 基于 UPLC-Triple-TOF/MS 定性比较乌药块根、直根化学成分[J]. 中药材, 2020, 43(3): 615-620.
[16] 郭敏娜, 刘素香, 赵艳敏, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术的柴胡化学成分分析[J]. 中草药, 2016, 47(12): 2044-2052.
[17] 丛浦珠, 李筍玉. 天然有机化合物质谱图集[M]. 北京: 化学工业出版社, 2011.
[18] 柴冲冲, 曹妍, 毛民, 等. 基于 HPLC 特征图谱, UPLC-Q-TOF/MS 定性及多成分定量的黄芩酒炙前后化学成分变化研究[J]. 中草药, 2020, 51(9): 2436-2447.
[19] 霍金海, 刘亚娟, 任晓蕾, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 的防风质量差异标志物初步研究[J]. 天津中医药大学学报, 2021, 40(1): 112-118.
[20] Zhu L, Liang ZT, Yi T, et al. Comparison of chemical profiles between the root and aerial parts from three Bupleurum species

- based on a UHPLC-QTOF-MS metabolomics approach [J]. *Bio Med Central*, 2017, 17 (1): 305.
- [21] 魏飞亭, 程昊, 乔日发, 等. UPLC-Q-TOF/MS 鉴定大鼠灌服枳壳提取物后的入血成分及其代谢产物 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26 (21): 161-172.
- [22] Chen HF, Zhang WG, Yuan JB, et al. Simultaneous quantification of polymethoxylated flavones and coumarins in *Fructus aurantii* and *Fructus aurantii immaturus* using HPLC-ESI-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 59: 90-95.
- [23] Zhou DY, Xu Q, Xue XY, et al. Identification of *O*-diglycosyl flavanones in *Fructus aurantii* by liquid chromatography with electrospray ionization and collision-induced dissociation mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 42 (4): 441-448.
- [24] 陈运, 赵韵宇, 王晓轶, 等. 鲜香附挥发油镇痛活性及其 GC-MS 分析 [J]. *中药材*, 2011, 34 (8): 1225-1229.
- [25] Jong PL, Young CS, Jin WK, et al. Free radical scavengers from the heartwood of *Juniperus chinensis* [J]. *Arch Pharm Res*, 2002, 25 (4): 449-452.
- [26] 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.
- [27] 魏文龙, 黄林芳. 市售不同加工方法当归的 GC-MS 分析 [J]. *中国现代中药*, 2015, 17 (7): 704-708.
- [28] Yi LZ, Liang YZ, Wu H, et al. The analysis of *Radix Angelicae Sinensis* (Danggui) [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1216 (11): 1991-2001.
- [29] 任娟, 刘晓, 李伟东, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 的白芍炒制前后化学成分研究 [J]. *世界中医药*, 2019, 14 (2): 268-273.
- [30] Shu MK, Chen F, Li SL, et al. Authentication of *Radix Aucklandiae* and its substitutes by GC-MS and hierarchical clustering analysis [J]. *J Sep Sci*, 2007, 30 (18): 3233-3239.
- [31] 李丹丹, 张慧, 李思雨, 等. 基于 HPLC 指纹图谱及 UPLC-Q-TOF-MS 法的 3 种不同来源大黄差异成分研究 [J]. *中国药房*, 2019, 30 (23): 3240-3245.
- [32] Wu L, Du SL, Yang FR, et al. Simultaneous determination of nineteen compounds of Dahuang Zhechong pill in rat plasma by UHPLC-MS/MS and its application in a pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B*, 2020, 1151: 122200.
- [33] Guo H, Li H, Liu X, et al. Development and validation of a HPLC-UV-ESI-MS method for the simultaneous quantitation of ten bioactive compounds in Dahuang Fuzi Tang [J]. *Chin J Nat Med*, 2014, 12 (12): 9.
- [34] 李军. 广西莪术化学成分及天然姜黄色素大鼠体内代谢研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2011.
- [35] Lv D Y, Cao Y, Dong X, et al. Analysis and pharmacokinetic study of curdione in *Rhizoma Curcumae* by UPLC/QTOF/MS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28 (6): 782-787.
- [36] 李景彪, 罗朵生, 李莎莎, 等. 基于 LC-MS 法对醋三棱成分快速鉴定研究 [J]. *中药材*, 2018, 41 (7): 1615-1621.
- [37] 卞梦芹, 王洪庆, 康洁, 等. 红豆蔻黄酮类化学成分研究 [J]. *药科学报*, 2014, 49 (3): 359-362.
- [38] Xin BR, Liu JF, Kang J, et al. (2*R*, 3*S*)-pinobanksin-3-cinnamate, a new flavonone from seeds of *Alpinia galanga* willd, presents in vitro neuroprotective effects [J]. *Mol Cell Toxicol*, 2014, 10 (2): 165-172.
- [39] Xu XN, Tang ZH, Liang YZ, et al. Comparison of the volatile constituents of different parts of *Cortex magnolia officinalis* by GC-MS combined with chemometric resolution method [J]. *J Sep Sci*, 2009, 32 (20): 3466-3472.
- [40] 赵艳敏, 刘素香, 张晨曦, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术的甘草化学成分分析 [J]. *中草药*, 2016, 47 (12): 2061-2068.
- [41] 郭志凯, 梅文莉, 曾艳波, 等. 槟榔果实脂溶性化学成分的 GC-MS 分析 [J]. *中国现代中药*, 2012, 14 (6): 1-3.
- [42] 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.
- [43] 钟昆芮, 徐晶晶, 徐超, 等. HPLC-MS/MS 法同时测定薄荷药材中 4 种黄酮苷的含量 [J]. *北京中医药大学学报*, 2014, 37 (12): 841-844, 857.
- [44] 赵秋龙, 张丽, 卞晓坤, 等. UPLC-QTRAP-MS 分析不同产地茯苓药材中 8 个三萜酸类成分 [J]. *药物分析杂志*, 2020, 40 (7): 1169-1177.
- [45] Chen XQ, Chen SJ, Liang WN, et al. Saikosaponin A attenuates perimenopausal depression-like symptoms by chronic unpredictable mild stress [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 662: 283-289.
- [46] Li HY, Zhao YH, Zeng MJ, et al. Saikosaponin D relieves unpredictable chronic mild stress induced depressive-like behavior in rats: involvement of HPA axis and hippocampal neurogenesis [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2017, 234 (22): 3385-3394.
- [47] 刘帆, 何琴, 王鸿利, 等. 绿原酸缓解 $A\beta$ 诱导的阿尔茨海默病小鼠神经损伤及 NLRP3 炎症小体活化 [J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37 (16): 1933-1937.
- [48] Bansal Y, Singh R, Saroj P, et al. Naringenin protects against oxido-inflammatory aberrations and altered tryptophan metabolism in olfactory bulbectomized-mice model of depression [J]. *Toxicol Appl Pharma*, 2018, 355: 257-268.
- [49] Mao QQ, Zhong XM, Li ZY, et al. Paeoniflorin protects against NMDA-induced neurotoxicity in PC12 cells via Ca^{2+} antagonism [J]. *Phytother Res*, 2011, 25 (5): 681-685.
- [50] Seyed N, Solomon H, Arianna DL, et al. Post-stroke depression modulation and in vivo antioxidant activity of gallic acid and its synthetic derivatives in a murine model system [J]. *Nutrients*, 2016, 8 (5): 248.
- [51] 卞振华, 张文明, 唐静月, 等. 基于血清代谢组学和网络药理学研究酸枣仁提取物治疗失眠的效应物质及作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47 (1): 188-202.
- [52] 曹陶涛, 杨畅, 孙佳, 等. 黑骨藤靶向 TNF- α 抗类风湿关节炎的药效物质基础研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28 (3): 187-195.
- [53] 王悦, 申洁, 何倩, 等. 基于网络药理学及分子对接技术探讨黄芩茶防治结直肠癌的药效物质基础及作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46 (23): 6251-6260.

(收稿日期: 2022-05-20; 修回日期: 2022-07-13)

大落新妇根、茎、叶挥发油成分的 GC-MS 分析及抗氧化能力测定

张露, 邹娟, 叶江海, 潘炉台, 何康* (贵州中医药大学, 贵阳 550025)

摘要: **目的** 对大落新妇根、茎、叶 3 个部位的挥发油进行成分分析, 并测定其抗氧化能力。**方法** 采用水蒸气蒸馏法提取挥发油, 用 GC-MS 技术与峰面积归一化法对提取的挥发油进行成分分析; 以 L-抗坏血酸为对照, 以 DPPH 清除率及羟基自由基清除率为评价指标, 测定 3 个部位挥发油的抗氧化能力。**结果** 从大落新妇 3 个部位共鉴定出 46 种挥发油成分, 分别是根 41 种、茎 45 种、叶 46 种, 各占挥发油总量的 87.88%、81.15% 和 74.74%; 3 个部位对 DPPH 清除能力的强弱为 L-抗坏血酸 > 茎 > 叶 > 根, 对羟基自由基清除能力的强弱为 L-抗坏血酸 > 茎 > 根, 而当大落新妇叶中挥发油的质量浓度低于 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 其羟基自由基清除率大于 L-抗坏血酸。**结论** 大落新妇根、茎、叶各部位挥发油存在成分种类差异小, 成分相对含量差异大的特点, 且均具有一定的抗氧化能力。

关键词: 大落新妇; 挥发油; GC-MS; 成分分析; 抗氧化

中图分类号: R284.1, R286 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2022)12-2767-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.011

GC-MS and antioxidant capacity of volatile oil from the roots, stems and leaves of *Astilbe grandis*

ZHANG Lu, ZOU Juan, YE Jiang-hai, PAN Lu-tai, HE Kang* (Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025)

Abstract: **Objective** To determine the constituents and antioxidant activity of volatile oil from the roots, stems and leaves of *Astilbe grandis*. **Methods** The essential oil was extracted by steam distillation and analyzed by GC-MS and peak area normalization method. With L-ascorbic acid as control, the antioxidant activity of volatile oil in the 3 parts was determined, with DPPH scavenging rate and hydroxyl radical scavenging rate as evaluation indicators. **Results** Totally 46 components were identified from the 3 parts of *Astilbe grandis*: 41, 45 and 46 components were identified from the roots, stems and leaves, accounting for 87.88%, 81.15% and 74.74% respectively of the total volatile oil. The scavenging rate of DPPH showed the order of L-ascorbic acid > stems > leaves > roots, and the scavenging rate of hydroxyl radicals showed the order of L-ascorbic acid > stems > roots. However, when the mass concentration of the leaves of *Astilbe grandis* was less than $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, the scavenging rate of hydroxyl radical was higher than that of L-ascorbic acid. **Conclusion** The volatile oil in the roots, stems and leaves of *Astilbe grandis* shows small difference in components and big difference in the relative content of components, but all with certain antioxidant activity.

Key words: *Astilbe grandis*; volatile oil; GC-MS; constituent analysis; antioxidant capacity

大落新妇 *Astilbe grandis* Stapf ex Wils. 是虎耳草科落新妇属的一种多年生草本植物, 生长于海拔 450 ~ 2000 m 的林下、灌木或山谷的阴凉

和潮湿地方, 分布于山西、山东、广西、四川、贵州等地^[1]。在贵州的少数民族地区, 大落新妇主要以根状茎入药, 常用于治疗外伤、关节痛、

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (No.81860694); 贵州省普通高等学校科技拔尖人才项目 (黔教合 KY 字 [2021]034)。

作者简介: 张露, 女, 硕士研究生, 主要从事中药民族药资源与化学研究, email: 728881987@qq.com *通信作者: 何康, 男, 博士, 教授, 主要从事中药民族药资源与化学研究, email: hekang0851@163.com

风湿、腰腿痛等^[2]。课题组前期从大落新妇中分离得到了羟基苯乙酸甲酯、黑曲霉糖、鼠李糖、果糖、邻羟基苯乙酸甲酯、胡萝卜苷、 β -谷甾醇棕榈酸酯、 β -谷甾醇、对香豆酸甲酯、丁香酸甲酯、邻苯二甲酸二-(2-乙基己基)酯、甲基- α -D-呋喃果糖苷、十二烷酸^[3]等化合物,并且发现其中大多数为亲脂性化合物;为进一步深入研究大落新妇化学成分及其活性,本课题在前期对同属植物落新妇挥发油研究的基础上^[4],采用 GC-MS 技术及峰面积归一化法对大落新妇根、茎、叶 3 个部位挥发油的成分和含量进行分析,并评价 3 个部位挥发油的体外抗氧化活性,以期为大落新妇的开发与利用提供参考依据。

1 材料

1.1 试药

大落新妇 *Astilbe grandis* Stapf ex Wils., 药材采自贵州省六盘水市梅花山,由贵州中医药大学王泽欢博士鉴定为正品。分别采摘收集大落新妇的根、茎、叶 3 个部位。*L*-抗坏血酸、硫酸亚铁七水合物、水杨酸、无水硫酸钠(分析纯,上海麦克林生化科技有限公司);1,1-二苯基-2-苦肟基自由基(DPPH,上海阿梅克生化有限公司);30%过氧化氢(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);无水乙醇、正己烷(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司)。

1.2 仪器

HP6890/5975C GC/MS 联用仪(美国安捷伦公司);移液枪(德国 Eppendorf 公司);UV-1800 岛津紫外可见分光光度计(岛津仪器苏州有限公司);JA2003 十万分之一电子天平(上海浦春计量仪器有限公司)。

2 方法

2.1 挥发油的提取

取大落新妇根、茎、叶干燥样品,粉碎过 2 号筛后,精密称取各部分样品 100 g 于 2000 mL 圆底烧瓶中,加入 1000 mL 蒸馏水及玻璃珠数粒,参照《中国药典》2020 年版四部通则 2204 挥发油测定法甲法^[5],提取 6 h,所得馏出液用正己烷萃取,正己烷层再用无水硫酸钠干燥,减压回收得到具有特殊气味的淡黄色、淡绿色的油状物。

2.2 GC-MS 分析条件

2.2.1 气相色谱条件 色谱柱:HP-5MS 弹性石英毛细管柱(60 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m),程序升温,起始温度 50 $^{\circ}$ C,保持 2 min,以 3.5 $^{\circ}$ C $\cdot$ min $^{-1}$ 升温至 208 $^{\circ}$ C,再以 12 $^{\circ}$ C $\cdot$ min $^{-1}$ 升温至 310 $^{\circ}$ C,运

行保持 55.64 min;载气:高纯 He(>99.999%);柱前压:16.66 psi,流速:1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$;分流比:20:1;溶剂延迟时间:6 min。

2.2.2 质谱条件 EI 源;离子源温度:230 $^{\circ}$ C;四极杆温度:150 $^{\circ}$ C;电子能:70 eV;发射电流:34.6 μ A;倍增器电压:1682 V;接口温度:280 $^{\circ}$ C;扫描范围:29~500 amu。

2.2.3 数据处理 采用质谱计算机数据系统对离子流图中的各峰进行检索;采用 Nist20 和 Wiley275 标准质谱图对离子流图中的各峰进行核对,并采用峰面积归一化法测定确定了 46 种挥发性化学成分的相对质量分数。

2.3 抗氧化能力测定

2.3.1 样品溶液配制 取大落新妇根、茎、叶挥发油于 50 mL 量瓶中,用无水乙醇配制成质量浓度为 0.031 25、0.062 50、0.125、0.25、0.5、1.0 mg $\cdot$ mL $^{-1}$ 的样品溶液,放于避光低温条件下,样品溶液需现配现用。

2.3.2 DPPH 自由基清除能力测定 参考文献^[6-8]的方法。各取 1 mL 上述不同质量浓度的样品溶液与 1 mL 0.2 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ 的 DPPH 乙醇溶液混合,避光静置 30 min 后,用紫外分光光度法于 517 nm 处重复 3 次(取平均值)测定其吸光度 A_1 ;在相同条件下,用同体积无水乙醇代替 DPPH 乙醇溶液测得吸光度 A_2 ,用同体积无水乙醇代替大落新妇挥发油样品溶液测得吸光度 A_0 。配制与样品相同质量浓度的 *L*-抗坏血酸溶液作为阳性对照。按公式计算自由基清除率,清除率(%)=[1-(A_1-A_2)/ A_0] $\times$ 100%。

2.3.3 羟基自由基清除能力测定 采用 Fenton 法,对文献^[9-11]中的方法稍作修改。取 6 根试管,依次加入 1 mL 6 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ FeSO₄ 溶液与 1 mL 6 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ H₂O₂ 溶液,然后再分别依次加入 1 mL “2.3.1”项下不同质量浓度的样品溶液,摇匀,静置 10 min,然后加入 1 mL 6 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ 水杨酸乙醇溶液,摇匀,静置 30 min,在 517 nm 处平行 3 次(取平均值)测量吸光度 A_a ;用相同体积的无水乙醇代替大落新妇挥发油样品溶液测定空白对照吸光度 A_0 ,并用同体积的无水乙醇代替不含显色剂 H₂O₂ 的大落新妇挥发油样品溶液,以测量底物吸光度 A_b 。使用与样品质量浓度相同的 *L*-抗坏血酸对照溶液作为阳性对照。按公式计算自由基清除率,清除率(%)=[1-(A_a-A_b)/ A_0] $\times$ 100%。

3 结果

3.1 挥发油收油率

用水蒸气蒸馏法从大落新妇根、茎、叶 3 个部位提取的挥发油中, 根的收油率最高, 为 0.31%; 其次是茎, 收油率为 0.26%; 叶的收油率最低, 为 0.06%。

3.2 挥发油成分分析

根据大落新妇根、茎、叶中挥发油的总离子流图鉴定出的 46 种化合物中, 大部分化合物是烷烃类成分, 还有少量烯、酮、醇等其他类型的化合物。其中 1-十八烯仅在叶中检出; 香叶基丙酮、异香树烯、十七烷和 9, 12, 15-十八碳三烯酸甲酯仅在茎和叶中检出。化合物详见表 1。大落新妇根、茎、叶中挥发油的总离子流图见图 1。

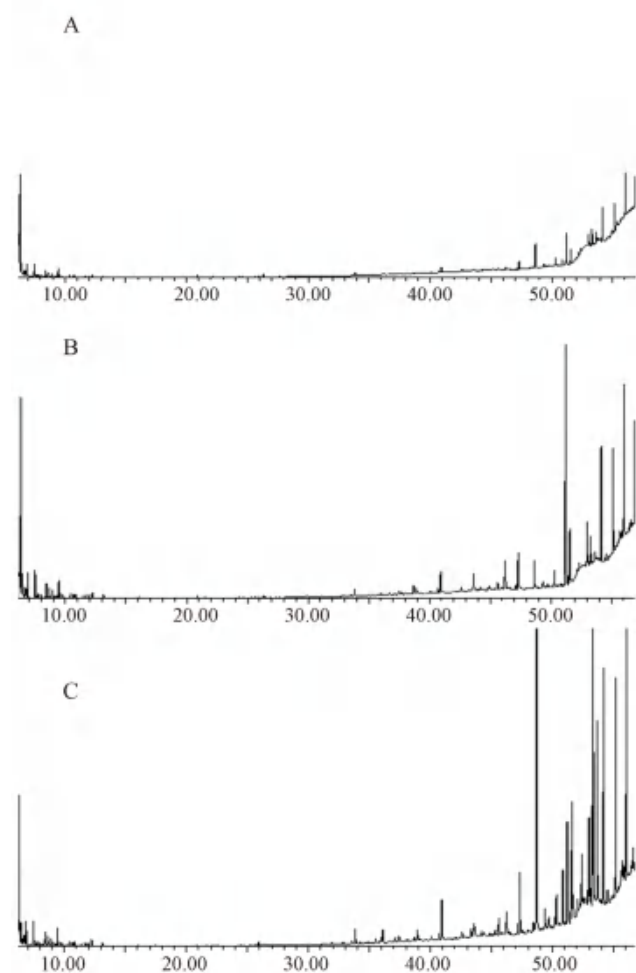


图 1 大落新妇根 (A)、茎 (B)、叶 (C) 中挥发油成分的总离子流图

Fig 1 Total ion current diagram of volatile oil components in the roots (A), stems (B) and leaves (C) of *Astilbe grandis*

经质谱计算机数据系统的检索以及 Nist20 和 Wiley275 标准质谱图的核对, 从大落新妇根中鉴定出 41 种化合物, 占根挥发油总量的 87.88%。其中主要成分含量由高到低分别是环己烷、二十四烷、6, 10, 14-三甲基-2-十五烷

酮、二十五烷、二十二烷、二十三烷等, 进一步分析化合物, 发现含量较高的还有甲基环戊烷、二十一烷、叶绿醇、二十烷、正十八烷、庚烷、棕榈酸甲酯、3-甲基己烷、辛烷、十六烷、2, 3-二甲基己烷、顺式, 1, 3-二甲基环己烷、 α -松油醇等, 而相对含量均小于 1% 的化合物有 22 种。

从大落新妇茎中鉴定出 45 种化合物, 占茎挥发油总量 81.15%。其中主要成分含量由高到低分别是环己烷、二十四烷、二十二烷、二十五烷、二十三烷、二十烷、正十八烷、二十一烷等, 进一步分析化合物, 发现含量较高的还有 6, 10, 14-三甲基-2-十五烷酮、十六烷、叶绿醇、甲基环戊烷、庚烷、辛烷、3-甲基己烷、棕榈酸甲酯, 而相对含量均小于 1% 的化合物有 29 种。

从大落新妇叶中鉴定出 46 种化合物, 占叶挥发油总量 74.74%。其中主要成分含量由高到低分别是 6, 10, 14-三甲基-2-十五烷酮、叶绿醇、二十四烷、二十二烷、二十三烷、二十五烷、环己烷等, 进一步分析化合物, 发现含量较高的还有正十八烷、二十一烷、十六烷, 而剩余相对含量均小于 1% 的化合物有 35 种。

总体来说, 大落新妇根、茎、叶各部位挥发油成分相类似, 主要都是含有烷烃类, 烷酮类, 酯类以及醇类化合物; 但各个不同部位的各成分相对含量有所差异, 根和茎中含量最高的成分均为环己烷, 其次为二十四烷; 而叶中含量最高的成分是 6, 10, 14-三甲基-2-十五烷酮, 其次是叶绿醇。各成分之间的含量差异见表 1。

3.3 DPPH 自由基清除能力

大落新妇根、茎、叶中挥发油和 *L*-抗坏血酸在不同质量浓度 (0.031 25、0.0625、0.125、0.25、0.5、1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的自由基清除率如图 2 所示。从图 2 可知, 3 个部位的挥发油对 DPPH 自由基的清除能力强弱为茎 > 叶 > 根。根中挥发油的 DPPH 清除率在质量浓度为 1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时最高, 为 22.75%; 茎中挥发油在质量浓度为 0.125 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时清除率最高 (66.19%); 叶中挥发油的 DPPH 清除率也随着质量浓度的增加而增大, 当质量浓度为 0.25 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 最大值为 37.32%。

3.4 羟基自由基清除能力

大落新妇根、茎、叶中挥发油和 *L*-抗坏血酸在不同质量浓度 (0.031 25、0.0625、0.125、0.25、0.5、1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 下对羟基自由基的清除率如图 3 所示。从图 3 可知, 大落新妇根和茎挥发油

表 1 大落新妇根、茎、叶中挥发油成分相对含量

Tab 1 Relative content of volatile oil components in the roots, stems and leaves of *Astilbe grandis*

编号	化合物名称	分子式	分子量	相对含量 /%		
				根	茎	叶
1	cyclohexane (环己烷)	C ₆ H ₁₂	84	21.296	13.451	4.018
2	cis-1, 3-dimethyl-cyclopentane (顺式, 1, 3-二甲基环戊烷)	C ₇ H ₁₄	98	0.944	0.573	0.221
3	trans-1, 3-dimethyl-cyclopentane (反式, 1, 3-二甲基环戊烷)	C ₇ H ₁₄	98	0.608	0.325	0.148
4	trans-1, 2-dimethyl-cyclopentane (反式, 1, 2-二甲基环戊烷)	C ₇ H ₁₄	98	0.907	0.545	0.213
5	methyl-cyclohexane (甲基环己烷)	C ₇ H ₁₄	98	2.940	1.947	0.716
6	ethyl-cyclohexane (乙基环己烷)	C ₈ H ₁₆	100	0.411	0.315	0.105
7	3-methyl-hexane ((3-甲基己烷)	C ₇ H ₁₆	100	2.131	1.330	0.522
8	heptane (庚烷)	C ₇ H ₁₆	100	2.281	1.572	0.566
9	ethylbenzene (乙苯)	C ₈ H ₁₀	106	0.133	0.147	0.051
10	o-xylene (邻二甲苯)	C ₈ H ₁₀	106	0.937	0.767	0.279
11	1, 2, 4-trimethyl-cyclopentane (1, 2, 4-三甲基环戊烷)	C ₈ H ₁₆	112	0.359	0.252	0.098
12	cis-1, 3-dimethyl-cyclohexane (顺式, 1, 3-二甲基环己烷)	C ₈ H ₁₆	112	1.246	0.629	0.315
13	trans-1-ethyl-3-methyl-cyclopentane (反式, 1-乙基-3-甲基环戊烷)	C ₈ H ₁₆	112	0.327	0.232	0.087
14	(cis/trans) 1, 2-dimethyl-cyclohexane (顺/反式, 1, 2-二甲基环己烷)	C ₈ H ₁₆	112	0.510	0.384	0.118
15	1, 4-dimethyl-cyclohexane (1, 4-二甲基环己烷)	C ₈ H ₁₆	112	0.327	0.248	0.089
16	ethyl-cyclohexane (乙基环己烷)	C ₈ H ₁₆	112	0.525	0.412	0.159
17	2, 3-dimethyl-hexane (2, 3-二甲基己烷)	C ₈ H ₁₈	114	1.327	0.983	0.345
18	2-methyl-heptane (2-甲基庚烷)	C ₈ H ₁₈	114	0.474	0.305	0.121
19	3-methyl-heptane (3-甲基庚烷)	C ₈ H ₁₈	114	0.949	0.745	0.275
20	octane (辛烷)	C ₈ H ₁₈	114	1.943	1.455	0.512
21	1-ethyl-3-methyl-benzene (1-乙基-3-甲基苯)	C ₉ H ₁₂	120	0.145	0.118	0.092
22	1, 2, 3-trimethyl-benzene (1, 2, 3-三甲基苯)	C ₉ H ₁₂	120	0.165	0.141	0.057
23	2, 6-dimethyl-heptane (2, 6-二甲基庚烷)	C ₉ H ₂₀	128	0.413	0.342	0.124
24	3-methyl-octane (3-甲基辛烷)	C ₉ H ₂₀	128	0.349	0.258	0.099
25	nonane (壬烷)	C ₉ H ₂₀	128	0.324	0.258	0.105
26	decane (癸烷)	C ₁₀ H ₂₂	142	0.041	0.019	0.021
27	alpha-terpineol (α -松油醇)	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1.071	0.300	0.025
28	5, 9-undecadien-2-one, 6, 10-dimethyl-, (E)-(香叶基丙酮)	C ₁₃ H ₂₂ O	194	—	0.278	0.193
29	tetradecane (十四烷)	C ₁₄ H ₃₀	198	0.805	0.639	0.559
30	2, 4-di-tert-butylphenol (2, 4-二叔丁基苯酚)	C ₁₄ H ₂₂ O	206	0.337	0.938	0.186
31	alloaromadendrene (异香树烯)	C ₁₅ H ₂₄	204	—	0.256	0.090
32	hexadecane (十六烷)	C ₁₆ H ₃₄	226	1.613	2.433	1.634
33	heptadecane (十七烷)	C ₁₇ H ₃₆	240	—	0.337	0.230
34	1-octadecene (1-十八烯)	C ₁₈ H ₃₆	252	—	—	0.442
35	octadecane (正十八烷)	C ₁₈ H ₃₈	254	2.455	4.027	2.487
36	6, 10, 14-trimethyl-2-pentadecanone (6, 10, 14-三甲基-2-十五烷酮)	C ₁₈ H ₃₆ O	268	6.222	2.511	14.005
37	hexadecanoic acid, methyl ester (棕榈酸甲酯)	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	2.243	1.275	0.903
38	cycloeicosane (环二十烷)	C ₂₀ H ₄₀	280	0.589	0.759	0.656
39	eicosane (二十烷)	C ₂₀ H ₄₂	282	2.695	4.276	3.640
40	heneicosane (二十一烷)	C ₂₁ H ₄₄	296	2.867	3.573	2.253
41	phytol (叶绿醇)	C ₂₀ H ₄₀ O	296	2.849	2.085	13.989
42	docosane (二十二烷)	C ₂₂ H ₄₆	310	5.257	7.084	5.766
43	tricosane (二十三烷)	C ₂₃ H ₄₈	324	4.295	5.956	5.007
44	tetracosane (二十四烷)	C ₂₄ H ₅₀	338	6.831	9.559	7.887
45	pentacosane (二十五烷)	C ₂₅ H ₅₂	352	5.739	6.528	5.002
46	9, 12, 15-octadecatrienoic acid, methyl ester (9, 12, 15-十八碳三烯酸甲酯)	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292	—	0.581	0.332

注: “—”表示未检测到或不存在。

Note: “—” means no detection or no presentation.

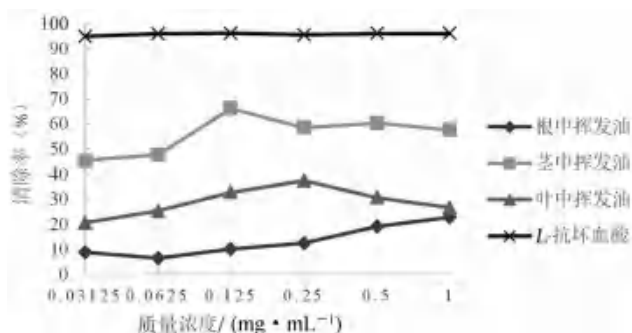


图2 大落新妇根、茎、叶中挥发油对 DPPH 自由基清除率的影响
Fig 2 Effect of volatile oil in the roots, stems and leaves of *Astilbe grandis* on DPPH free radical scavenging rate

的羟基自由基清除率均小于 *L*-抗坏血酸。当质量浓度小于 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,大落新妇叶中挥发油的羟基自由基清除率大于 *L*-抗坏血酸,且当质量浓度为 $0.125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,清除率最高 (67.66%)。

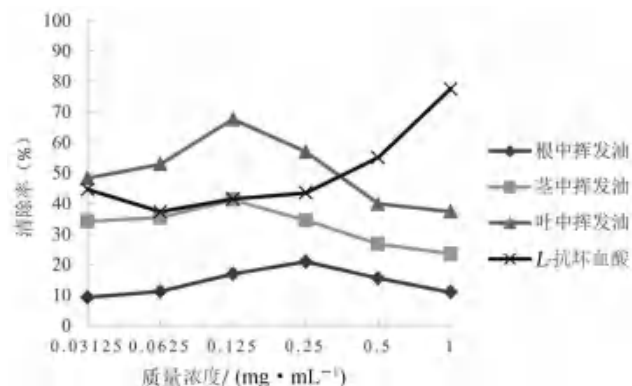


图3 大落新妇根、茎、叶中挥发油对羟基自由基清除率的影响
Fig 3 Effect of volatile oil in the roots, stems and leaves of *Astilbe grandis* on hydroxyl free radical scavenging rate

4 讨论

挥发油成分分析结果表明,大落新妇根、茎、叶中有相同成分 41 种,有 4 种成分仅在茎、叶中出现,有 1 种成分仅在叶中检测到。3 个不同部位的各成分相对含量有所差异,根和茎中含量最高的成分均为环己烷,相对含量分别为 21.296% 和 13.451%;其次为二十四烷,分别为 6.831% 和 9.559%;而叶中含量最高的成分是 6, 10, 14-三甲基-2-十五烷酮,为 14.005%,其次是叶绿醇,为 13.989%。研究结果显示,大落新妇根、茎、叶各部位挥发油存在成分差异小,成分相对含量差异大的特点。

在抗氧化活性测定中,采用 DPPH 清除率及羟基自由基清除率作为衡量大落新妇根、茎、叶中挥发油抗氧化活性的评价指标。结果大落新妇根、茎、叶中挥发油均有一定的抗氧化作用,但对羟基自由基的清除率随质量浓度的变化更明显一些。大落新妇根、茎、叶中挥发油及 *L*-抗坏血酸的 DPPH 清除率为 *L*-抗坏血酸 > 茎 > 叶 > 根;羟基自由基清除率为 *L*-抗坏血酸 > 茎 > 根,而当质量浓度 $< 0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,大落新妇叶羟基自由基清除率大于 *L*-抗坏血酸。表明大落新妇根、茎、叶中挥发油都具有一定的抗氧化活性。

本研究采用水蒸气蒸馏法对大落新妇根、茎、叶进行挥发油提取,结合 GC-MS 技术及峰面积归一化法对其成分和含量进行分析,并研究其抗氧化能力,为大落新妇的开发与利用提供了理论依据。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 第 34 卷. 北京: 科学出版社, 2004: 15-16.
- [2] 何康, 伍天苔, 范琳琳, 等. 大落新妇根中三萜类成分的研究 [J]. 中成药, 2020, 42 (7): 1791-1794.
- [3] 何康, 伍天苔, 范琳琳, 等. 大落新妇化学成分的研究 [J]. 中成药, 2021, 43 (1): 105-110.
- [4] 李广杰, 袁航, 叶江海, 等. 落新妇花、茎、叶挥发油成分的 GC-MS 分析及抗氧化能力测定 [J]. 中南药学, 2021, 19 (6): 1120-1125.
- [5] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 2182-2188.
- [6] 何月秋, 林立, 杜甜钿, 等. 紫娇花挥发油成分的 GC-MS 分析及抗氧化能力测定 [J]. 广西植物, 2017, 37 (5): 627-633.
- [7] 杜月, 朱贲贲, 杜佼. 基于 Box-Behnken 模型优化金锦香总黄酮闪式提取工艺及其抗氧化活性分析 [J]. 中南药学, 2019, 17 (4): 512-517.
- [8] 罗秋水, 谢升, 汤凯洁, 等. 鱼腥草挥发油抗氧化作用的研究 [J]. 中国粮油学报, 2020, 35 (2): 105-109.
- [9] 黄小凤, 刘泽干, 雷攀, 等. 柴胡不同极性部位的体外抗氧化活性研究 [J]. 中南药学, 2021, 19 (2): 203-208.
- [10] 赵海燕, 许钰, 班颖芳, 等. 广西莪术挥发油提取工艺优化及抗氧化活性研究 [J]. 山东化工, 2020, 49 (14): 7-14.
- [11] 马延红, 李赛男, 刘文华. 西江肉桂挥发油提取工艺优化及抗氧化研究 [J]. 中国调味品, 2019, 44 (12): 60-64.

(收稿日期: 2022-05-05; 修回日期: 2022-06-13)

基于网络药理学分析铁皮石斛花总黄酮抑制 结肠癌作用机制及体外实验验证

梁婉婷¹, 王新婷¹, 朱朋艳^{1, 2}, 张洲^{2, 3}, 马金蓉^{2, 3}, 任李玥⁴, 高文分⁴, 王宣军^{1, 2*}, 袁文娟^{1, 2*}
(1. 云南农业大学理学院, 昆明 650201; 2. 云南农业大学 普洱茶学教育部重点实验室, 昆明 650201; 3. 云南农业大学食品科学技术学院, 昆明 650201; 4. 云南省食品药品监督检验研究院, 昆明 650106)

摘要: **目的** 运用网络药理学和体外生物学实验对铁皮石斛花总黄酮治疗结肠癌的活性成分、潜在作用靶点和信号通路进行研究, 探索其治疗结肠癌的可能作用机制。 **方法** 利用 LC-MS/MS 对铁皮石斛花黄酮类代谢物进行成分分析。通过 TCMSP 筛选出铁皮石斛总黄酮的活性成分及靶点基因, GeneCards 数据库及 DisGeNET 数据库筛选出结肠癌的疾病靶点基因, 构建“药物-有效成分-靶基因-疾病”调控网络图, STRING 数据库构建蛋白互作网络图 (PPI), 对关键靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析。采用 MTT 法检测铁皮石斛花总黄酮对 HCT116 细胞的增殖抑制活性, 流式细胞术检测细胞凋亡情况, 细胞划痕实验观察铁皮石斛花总黄酮对 HCT116 细胞迁移能力的影响; Western blot 检测相关凋亡蛋白 (Bax、Bcl-2、caspase-3、cleaved-caspase-3) 和基质蛋白 (MMP-12、MMP-3) 的表达。 **结果** 代谢组分析获得 52 个黄酮类化合物, 经过筛选得到 27 个活性成分, 通过相关数据库平台预测得到作用靶点 178 个, PPI 网络核心蛋白为丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 1 (AKT1)、血管内皮细胞生长因子受体 2 (VEGFR2)、肿瘤蛋白 P53 (TP53)、转录因子 AP-1 (JUN)、肿瘤坏死因子 (TNF)、雷帕霉素靶蛋白 (MTOR) 等; GO 富集分析显示铁皮石斛花总黄酮会影响信号转导、细胞凋亡和增殖调控等; KEGG 通路富集分析显示铁皮石斛花总黄酮在细胞增殖、凋亡、PI3K-Akt 及肿瘤等信号通路中发挥作用。实验结果表明, 铁皮石斛花总黄酮能抑制 HCT116 细胞的增殖, 促进细胞的凋亡, 抑制细胞的迁移; 还能上调 Bax/Bcl-2、caspase-3、cleaved-caspase-3 蛋白的表达, 诱导细胞凋亡。 **结论** 铁皮石斛花总黄酮可通过多靶点、多途径发挥抗结肠癌的作用, 其作用机制可能与影响凋亡基因 Bax 及 Bcl-2 的表达有关。

关键词: 铁皮石斛花总黄酮; 结肠癌; 网络药理学; 靶点; 信号通路; 凋亡

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2772-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.012

Anti-colon cancer mechanism of total flavonoids of *Dendrobium candidum* flower based on network pharmacology and in vitro experimental verification

LIANG Wan-ting¹, WANG Xin-ting¹, ZHU Peng-yan^{1, 2}, ZHANG Zhou^{2, 3}, MA Jin-rong^{2, 3}, REN Li-yue⁴, GAO Wen-fen⁴, WANG Xuan-jun^{1, 2*}, YUAN Wen-juan^{1, 2*} (1. College of Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201; 2. Key Laboratory of Puer Tea Science, Ministry of Education, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201; 3. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201; 4. Yunnan Institute for Food and Drug Control, Kunming 650106)

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.32060084); 云南省科技厅应用基础面上项目 (No.2019FB119); 国家大学生创新创业训练计划支持项目 (No.202010676050)。

作者简介: 梁婉婷, 女, 主要从事化学生物学研究, email: tingwanliang@163.com * **通信作者:** 袁文娟, 女, 副主任药师, 主要从事药用植物化学及生物活性研究, email: 1435648569@qq.com; 王宣军, 男, 教授, 主要从事食品研究与开发研究, email: 7217778@qq.com

Abstract: Objective To determine the main active components, the potential targets and molecular pathways of total flavonoids in *Dendrobium candidum* flower (DOPTF) for colon cancer by network pharmacology-experimental verification in vitro, and to explore the mechanism of DOPTF treating on colon cancer. **Methods** The compositions of DOPTF were analyzed by HPLC-MS/MS. The main active components and the gene targets were screened with TCMSP. Colon cancer target genes were screened by the GeneCards database and DisGeNET database. Cytoscape software was used to construct regulatory network diagram of “Chinese herb-active ingredient-target gene-disease”. The STRING database was used to construct protein-protein interaction (PPI). GO enrichment and KEGG pathway analysis were conducted. MTT assay was used to detect the proliferation inhibition activity of total flavonoids in DOPTF on HCT116 cells, the flow cytometry was used to detect the cell apoptosis, and the cell scratch assay was used to observe the effect of DOPTF on migration of HCT116 cells. Western blot was used to detect the expression of related apoptotic proteins Bax, Bcl-2, caspase-3, cleaved-caspase-3, MMP-12 and MMP-3. **Results** Totally 52 DOPTF components were obtained by HPLC-MS/MS, and 27 active components were obtained after screening. Totally 178 DOPTF intervention colon cancer related targets were constructed through the relevant database platform. The core genes in PPI included AKT1, VEGFR2, TP53, JUN, TNF, MTOR and so on. GO analysis showed that flavonoid active ingredients affected the signal transduction, apoptosis and proliferation regulation of colon cancer cells. KEGG pathway analysis also showed that flavonoid active ingredients acted on the cell proliferation, apoptosis, PI3K-Akt, and tumor signaling pathways of colon cancer cells. DOPTF significantly inhibited the proliferation of HCT116 cells, promoted cell apoptosis, and inhibited cell migration. DOPTF also significantly up-regulated the expression of Bax/Bcl-2, caspase-3, cleaved-caspase-3, and induced cell apoptosis. **Conclusion** DOPTF can intervene colon cancer through multiple targets and multiple pathways, whose mechanism may be related to affecting the expression of apoptosis-related genes *Bax* and *Bcl-2*.

Key words: total flavonoid of *Dendrobium candidum* flower; colon cancer; network pharmacology; target; signaling pathway; apoptosis

结肠癌 (CRC) 是全球常见的第三大恶性肿瘤, 严重威胁人类健康^[1]。由于人们的生活方式和饮食结构发生了巨大变化, 结肠癌发病率和病死率呈逐年上升趋势, 加强对结肠癌防治研究是我国癌症控制工作的重要内容^[2-3]。从天然资源中寻找可以靶向清除结肠肿瘤、促进肿瘤细胞凋亡的先导化合物越来越被人们重视。铁皮石斛花中活性次生代谢产物主要为黄酮类化合物, 有抗氧化、抗肿瘤等药理活性^[4]。但其黄酮类成分较复杂、作用通路多, 作用机制尚不明确。

本文通过网络药理学结合体外细胞实验, 分析铁皮石斛花总黄酮抗结肠癌的有效成分及作用机制, 以期发现治疗结肠肿瘤的新型先导化合物, 为药物的开发提供思路。

1 材料

1.1 细胞

人结肠癌细胞 (HCT116) (云南农业大学普洱茶学教育部重点实验室细胞库)。

1.2 试剂

铁皮石斛花 (云南省普洱, 批号: 20210314); RPMI1640 液体培养基 (大连美仑生物技术有限公司); 胎牛血清 (上海道鹏生物科技有限公司); Annexin V-FITC/PI 试剂盒、TRIzol Reagent、MTT、RIPA 裂解液 (北京索莱宝科技有限公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (北京酷来搏科技有限公司); 兔单抗 Bax、兔单抗 Bcl-2、caspase-3、cleaved-caspase-3、MMP-12、MMP-3 (Abcam 公司, ab32503、ab32124、ab32351、ab32042、ab52897、ab53015); 小鼠单抗 GAPDH [艾比玛特医药科技 (上海) 有限公司, M20006]。

1.3 仪器

NovoCyt D2060R 流式细胞仪 (美国 BD 公司); MF53 倒置荧光显微镜 (德国莱卡公司)。

1.4 数据库

中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) (<http://tcmspw.com/tcmsp.php>, Version 2.3); Swiss

TargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstarget-prediction.ch/>); GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>); STRING 数据库 (<https://string-db.org/>, Version 11.0); David 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>, Version 6.8); PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); Cytoscape3.7.1 软件。

2 方法

2.1 铁皮石斛花总黄酮的提取及纯化

取铁皮石斛干花 1 kg, 粉碎过筛, 按照 1:30 的投料比, 加入 50% 甲醇浸泡超声提取 2 h, 共 3 次, 提取液 60℃ 以下蒸发浓缩得浸膏。将浸膏装入大孔树脂的玻璃层析柱中, 经 20% 甲醇洗脱, 收集洗脱液, 旋蒸后得总黄酮提取物 28.5 g。

2.2 铁皮石斛花总黄酮广靶代谢组分析

用 100 μL 乙腈水溶液 (乙腈:水 = 1:1) 复溶总黄酮提取物, 涡旋, 14 000 g、4℃ 离心 15 min, 取上清液进样分析。样品采用 Agilent 1290 Infinity LC 超高效液相色谱系统 (UHPLC), C_{18} 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 150 mm, 1.7 μm) 进行分离。柱温 40℃, 自动进样器 4℃, 流速 0.4 mL $\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量 2 μL , 流动相: 25 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵 (0.5% 甲酸)(A) - 甲醇 (B), 梯度洗脱 (0~0.5 min, 5%B; 0.5~10 min, 5%~100%B; 10.0~12.0 min, 100%B; 12.0~12.1 min, 100%~5%B; 12.1~16 min, 5%B)。采用 AB Triple TOF 6600 质谱仪进行一级、二级谱图的采集。

2.3 应用网络药理学进行靶点预测及网络构建

2.3.1 铁皮石斛花总黄酮靶点预测 基于非靶向代谢组分析获得铁皮石斛花总黄酮的组分, 在 TCMSP 平台对主要化合物分子进行吸收、分布、代谢、排泄和毒性 (ADME/T) 预测和评价。对符合药物口服生物利用度 (OB) 及类药性值 (DL) 的成分进行筛选, 获得总黄酮的有效活性成分, 再通过 TCMSP 平台预测有效活性成分的靶点。将所有靶点通过 STRING 数据库以 “Homo sapiens” (人属) 为关键词进行基因 - 蛋白名称转换。

2.3.2 PPI (Protein-protein interaction) 网络的构建 通过 STRING 数据库, 以 “Colorectal Carcinoma” “Colon Cancer” 为关键词, 物种设置为 “Homo sapiens”, 检索得到人结肠癌疾病靶点。将得到的结肠癌疾病靶点与铁皮石斛花总黄酮有效活性成分作用靶点取交集, 筛选总黄酮治疗结肠癌的共同靶点。之后通过 Cytoscape3.7.1 构建关键靶点得 PPI 网络。

2.3.3 关键靶点的 GO (Gene Ontology) 分析 将靶点列表导入 David 6.8 数据库进行 GO 分析,

从而得到靶点的功能水平分析结果, $P < 0.01$ 认为差异具有统计学意义, 筛选排名前 20 的结果进行可视化分析。

2.3.4 关键靶点的 KEGG 通路富集分析 为了说明靶点如何通过通路发挥作用, 进行 KEGG 分析。使用 Cytoscape3.7.1 的插件 Clue Go 对筛选出的铁皮石斛花总黄酮对应的靶点行 KEGG 通路分析, 设定阈值为 “Homo sapiens”, 限定分析类型为 “KEGG”, 限定只展示 $P < 0.01$ 的 KEGG 结果, 筛选排名前 20 的结果进行可视化分析。

2.3.5 铁皮石斛花总黄酮 - 靶点 - 通路网络构建 应用 Cytoscape3.7.1 软件绘制关键靶点 - 通路网络和铁皮石斛花总黄酮 - 关键靶点网络, 合并, 建立总黄酮 - 靶点 - 通路网络, 进行网络拓扑分析。

2.4 铁皮石斛花抑制结肠癌的作用机制

2.4.1 细胞培养 HCT116 细胞复苏后加入到 10% 的 RPMI1640 培养基中, 置入 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养, 待细胞进入快速生长期后传代培养。

2.4.2 MTT 实验检测细胞活性 取对数生长期 HCT116 细胞, 以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 用无菌水配制不同质量浓度铁皮石斛花总黄酮 (200、300、400、500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 孵育细胞; 处理 24 h 后, 每孔加入 20 μL MTT, 避光孵育 4 h; 除去培养液, 加入 150 μL 二甲基亚砜 (DMSO) 低速振动 10 min, 酶标仪检测 492 nm 波长处各孔的 OD 值。按照如下公式计算细胞抑制率, 半数抑制浓度 (IC_{50}) 值由 GraphPad Prism 8 软件求得, 实验重复 3 次。细胞抑制率 (%) = $[1 - OD_{\text{实验组}}/OD_{\text{对照组}}] \times 100\%$ 。

2.4.3 细胞划痕实验 取对数生长期 HCT116 细胞, 以 1.5×10^6 个/孔接种于 6 孔板, 用记号笔在板底划 “井” 字为标记。待细胞铺满底部后, 用 200 μL 无菌枪头在孔底垂直按照记号笔标记线划痕, PBS 清洗 3 次。给药剂量设置低于 IC_{50} , 约为 IC_{20} 和 IC_{40} , 用不同质量浓度 (150、300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的铁皮石斛花总黄酮干预细胞, 记录划痕初始状态 24 h; 培养 24 h 后拍照记录划痕愈合情况。以不加药作为对照。

2.4.4 流式细胞仪检测细胞凋亡情况 取对数期生长的 HCT116 细胞, 以 1×10^4 个/孔的细胞密度接种于 6 孔板, 贴壁过夜后, 用不同质量浓度 (200、300、400、500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的铁皮石斛花总黄酮孵育 24 h, 胰酶消化、收集细胞后, 用 100 μL 的 binding buffer 重悬, 先后加入 FITC-Annexin V 和 PI 各 5 μL , 室温避光孵育 15 min, 流式细胞仪分析凋亡率。细胞凋亡率 = 早期细胞凋亡率 + 晚期细

胞凋亡率。以不加药作为对照。

2.4.5 Western blot 检测 HCT116 细胞中关键靶点蛋白的表达 取对数生长期 HCT116 细胞, 接种于 60 mm 细胞培养皿中 (10^6 个/皿), 不同质量浓度 (200 、 300 、 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的铁皮石斛花总黄酮处理细胞 24 h 后, RAPI 液裂解后提取总蛋白, BCA 定量法测定蛋白浓度, 经 SDS-PAGE 电泳、转膜后, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 PVDF 膜 1 h。Caspase-3、cleaved-caspase-3、BAX、Bcl-2、MMP-12、MMP-3 一抗 ($1:1000$) 4°C 孵育过夜, 二抗 ($1:1500$) 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 5 min/次。曝光后, 软件统计

处理灰度值。以不加药作为对照。

2.5 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件对实验数据进行统计。数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析统计, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 铁皮石斛花总黄酮活性成分筛选

通过对铁皮石斛花总黄酮提取物进行广靶代谢组分析, 共得到黄酮化合物 52 个, 从 TCMSP 获得 27 个活性成分。铁皮石斛花总黄酮活性化合物的化学信息见表 1。

表 1 铁皮石斛花总黄酮中主要的活性化合物
Tab 1 Active ingredients of total flavonoids of *Dendrobium candidum*

分子编号	化合物中文名	化合物英文名	分子量	OB/%	DL
MOL003896	5-甲基-7-甲氧基异黄酮	5-methyl-7-methoxyisoflavone	266.31	42.56	0.20
MOL000561	黄芪素	astragalin	448.41	14.03	0.74
MOL011734	升麻素	cimifugin	306.34	13.49	0.29
MOL006599	异脱水淫羊藿素	isoanhydroicaritin	368.41	7.62	0.43
MOL000173	异绿合欢素	isolupalbigenin	406.47	30.68	0.23
MOL012040	凯林苷	khelloside	526.49	31.31	0.84
MOL013083	茵芋苷	skimmin	324.31	38.35	0.32
MOL004928	佛莱心苷	violanthin	578.57	4.17	0.81
MOL004947	异佛莱心苷	isoviolanthin	578.57	18.79	0.81
MOL001689	金合欢素	acacetin	284.28	34.97	0.24
MOL001950	补骨脂宁	corylin	320.34	33.06	0.1
MOL000390	大豆苷元	daidzein	254.25	19.44	0.19
MOL005734	异泽兰黄素	eupatilin	344.34	29.39	0.38
MOL000481	染料木素	genistein	270.25	17.93	0.21
MOL004368	金丝桃苷	hyperoside	464.41	6.94	0.77
MOL000354	异鼠李素	isorhamnetin	316.28	49.60	0.31
MOL012595	异鼠李素-3-O-葡萄糖苷	isorhamnetin-3-O-glucoside	478.44	1.17	0.80
MOL011111	异牡荆素	isovitexin	418.38	4.14	0.68
MOL000006	木犀草素	luteolin	286.25	36.16	0.25
MOL003686	水仙素	narcissin	624.60	5.09	0.65
MOL000771	柚皮素	naringenin	164.17	43.29	0.04
MOL002693	菸菲醇-3-O-芸香糖苷	nicotiflorin	594.57	3.64	0.73
MOL000098	槲皮素	quercetin	302.25	46.43	0.28
MOL000010	野漆树苷	rhoifolin	578.57	6.68	0.77
MOL000415	芸香叶苷	rutin	610.57	3.20	0.68
MOL011337	皂草苷	saponarin	594.57	3.04	0.77
MOL004925	牡荆素	vitexin	432.41	3.05	0.71

3.2 铁皮石斛花总黄酮抑制结肠癌潜在靶点预测

由上述得到的铁皮石斛花总黄酮 27 个活性成分从 TCMSP 数据库中获取预测靶点, 通过 STRING 数据库进行基因-蛋白名称转换并去除重复的靶基因, 共得到化合物靶点 178 个。使用 Cytoscape3.7.1 软件构建铁皮石斛花总黄酮-靶点网络图, 结果见图 1。

3.3 铁皮石斛花总黄酮-结肠癌-靶点网络构建

铁皮石斛花总黄酮与结肠癌相关靶点取交集共得到 24 个关键的靶点蛋白, 经 Cytoscape3.7.1 软件中整合铁皮石斛花总黄酮与结肠癌相关靶点 (见图 2), PPI 图中各节点对应靶点, 边对应靶点之间的相互作用关系。可看出 AKT1、VEGFR2、TP53、JUN、TNF、MTOR 等靶点的 Degree 值较高, 在该网络中可能起主要作用。

3.4 关键靶点的 GO 分析

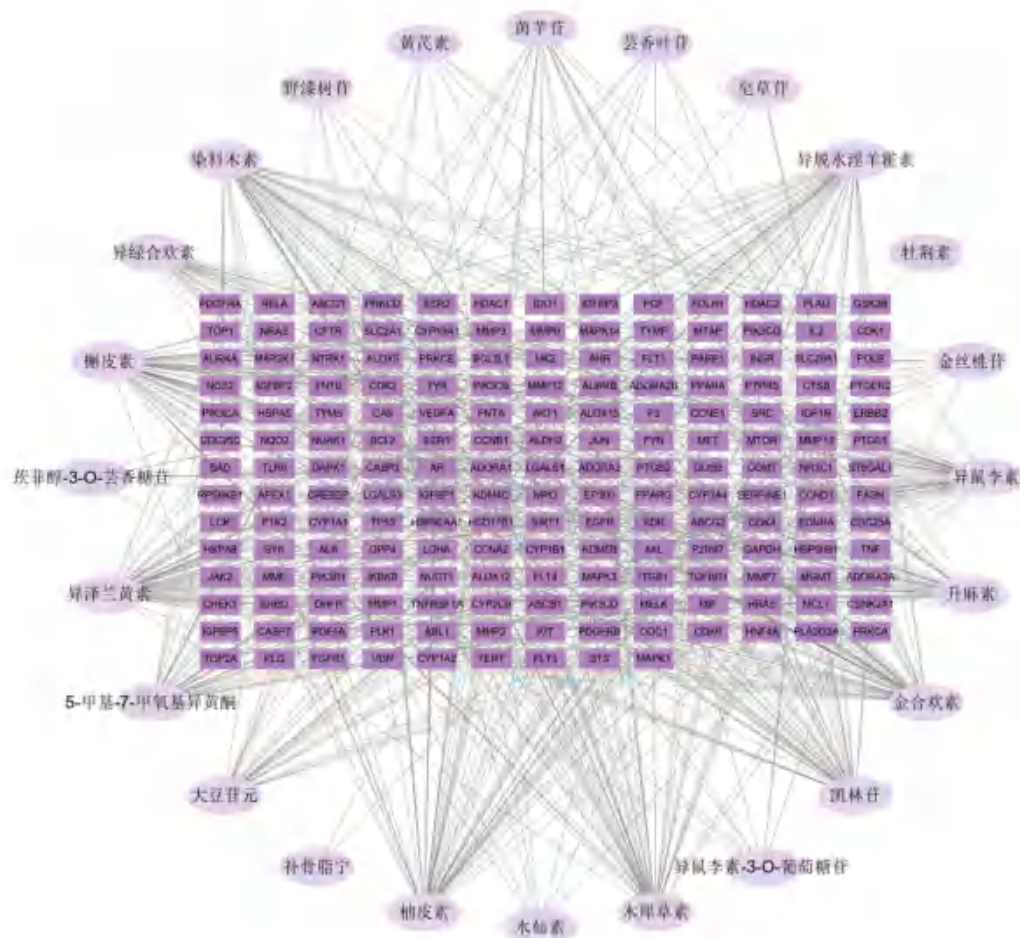


图 1 铁皮石斛花总黄酮-靶点网络图

Fig 1 Network diagram of total flavonoids of *Dendrobium candidum* and target

通过 David 数据库 GO 富集分析获得铁皮石斛总黄酮靶点的生物过程, 按照显著性程度 $P < 0.01$ 确定了 304 个 GO 条目, 按照显著性程度排列对 GO 分析结果进行部分展示。结果靶点涉及的生物过程的条目有 304 个, 主要富集在信号转导、药物反应、蛋白质磷酸化、细胞凋亡及细胞增殖调控、蛋白质自磷酸化、酪氨酸磷酸化、ERK1 和 ERK2 级联调控、血管内皮生长因子受体信号通路的调节等; 靶点涉及的分子功能相关的条目有 76 个, 主要富集在蛋白质结合、ATP 结合、蛋白激酶活性、酪氨酸激酶活性、酶结合、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性磷脂酰肌醇 3-激酶结合等; 靶点涉及的细胞成分相关的条目有 39 个, 主要在细胞质、细胞核、质膜、胞质、蛋白激酶等富集, 见图 3。

3.5 关键靶点的 KEGG 通路富集分析

KEGG 通路富集分析结果显示, 118 个通路被富集, $P < 0.01$ 的通路有 101 条, 依据 P 值大小, 选择 P 值最小即相关度最高的 20 位, 疾病类相关通路主要涉及肝癌 (hepatitis B)、前列腺癌

(prostate cancer)、胰腺癌(pancreatic cancer)、非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer)、急性白血病(acute myeloid leukemia, chronic myeloid leukemia)、膀胱癌(bladder cancer)等;包括由细菌、病毒引起的感染相关的通路,涉及黑色素瘤(melanoma)、局灶性粘连(focal adhesion);还富集于一些信号转导通路,PI3K-Akt 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、HIF-1 信号通路(HIF-1 signaling pathway)、ErbB 信号通路(ErbB signaling pathway)等,此外靶点还富集在与代谢相关信号通路,VEGFR 信号通路,见图 4。

3.6 铁皮石斛花总黄酮对 HCT116 细胞的生长抑制作用

MTT 的结果表明铁皮石斛花总黄酮对 HCT116 细胞的增殖有显著的抑制作用, 且浓度越高对细胞的增殖抑制作用越强 (见表 2); 由 GraphPad Prism 8 软件计算出 IC_{50} 值 ($357.9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

3.7 铁皮石斛花总黄酮对 HCT116 细胞迁移的影响

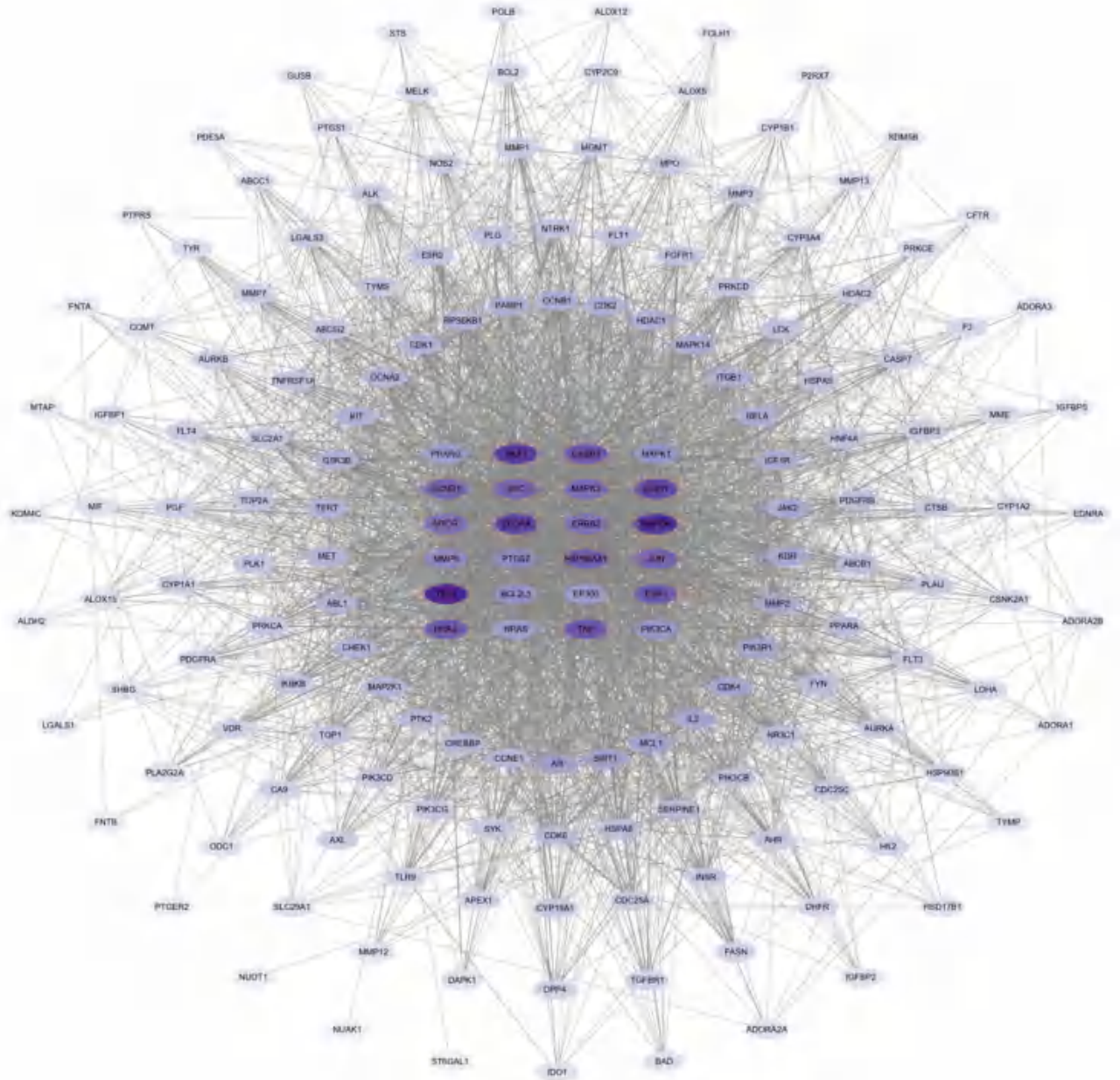


图 2 PPI 网络图
Fig 2 PPI network diagram

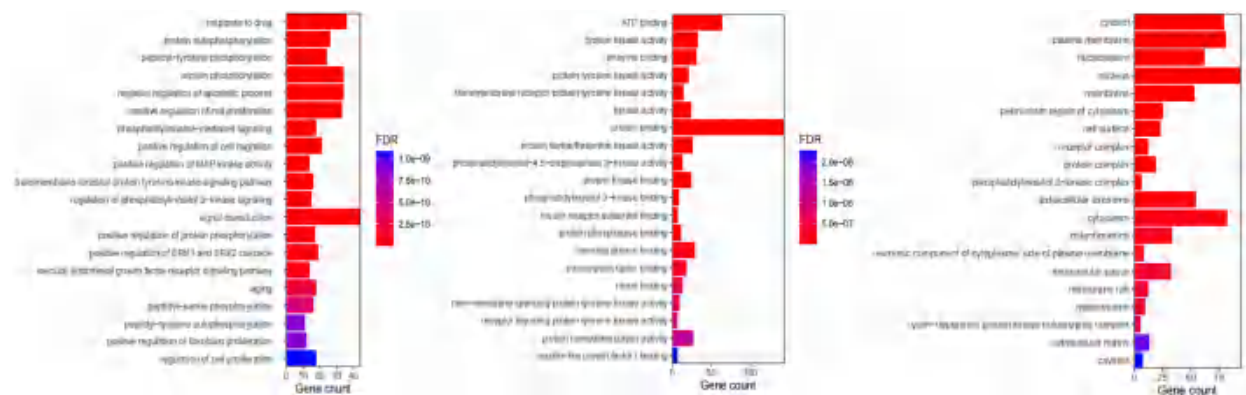


图 3 铁皮石斛总黄酮的 GO 分析
Fig 3 GO analysis of total flavonoids of *Dendrobium candidum*

表 2 总黄酮对 HCT116 细胞生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Tab 2 Inhibition of total flavonoids on HCT116 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	细胞抑制率 / %
总黄酮 0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组	0.05 $\pm$ 0.03
总黄酮 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组	40.20 $\pm$ 4.92 ^a
总黄酮 300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组	45.32 $\pm$ 2.76 ^{ab}
总黄酮 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组	67.84 $\pm$ 1.37 ^{abc}
总黄酮 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组	78.30 $\pm$ 0.69 ^{abcd}

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与总黄酮 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组比较, ^b $P < 0.05$; 与总黄酮 300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组, ^c $P < 0.05$; 与总黄酮 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组比较, ^d $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, ^a $P < 0.05$; compared with the total flavonoids 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group, ^b $P < 0.05$; compared with the total flavonoids 300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group, ^c $P < 0.05$; compared with the total flavonoids 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group, ^d $P < 0.05$.

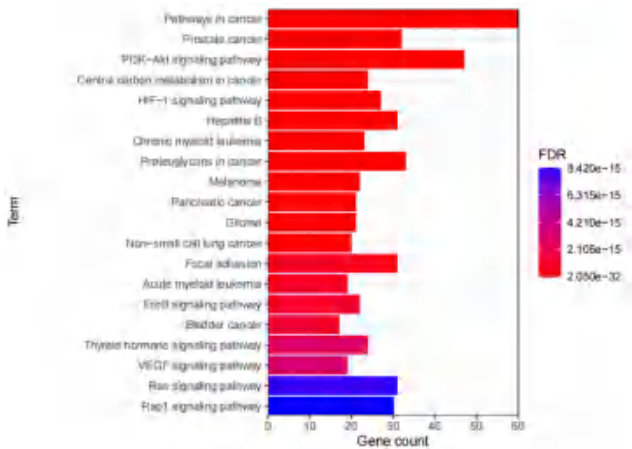


图 4 KEGG 通路分析
Fig 4 KEGG pathway analysis

划痕宽度愈合的情况, 与对照组划痕愈合程度相比, 铁皮石斛花总黄酮处理组划痕愈合明显被抑制, 表明铁皮石斛花总黄酮对 HCT116 细胞有抑制肿瘤细胞迁移的能力, 见图 5。

3.8 铁皮石斛花总黄酮对 HCT116 细胞凋亡的影响
流式的结果表明, 与对照组相比, 铁皮石斛花总黄酮处理组明显促进了细胞的凋亡, 见图 6。

3.9 铁皮石斛花总黄酮对 HCT116 细胞中关键靶点蛋白的表达水平的影响

与对照组相比, 铁皮石斛花总黄酮明显上调了 Bax/Bcl-2 的比值, caspase-3、cleaved-caspase-3, 随着总黄酮浓度的增大明显上调, MMP-12 和 MMP-3 明显下调, 结果见图 7。

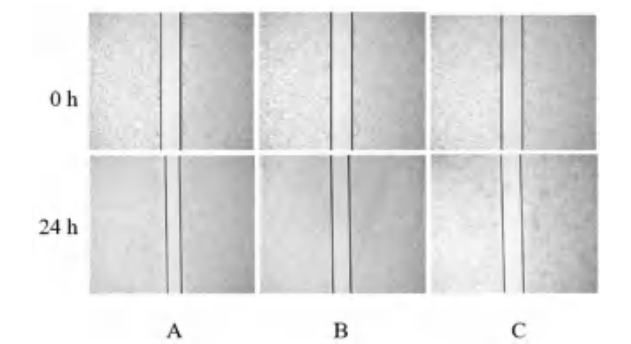


图 5 铁皮石斛花总黄酮对 HCT116 细胞迁移的影响
Fig 5 Effect of total flavonoids on HCT116 cell migration
A. 对照组 (control group); B. 总黄酮 150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组 (total flavonoids 150 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group); C. 总黄酮 300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组 (total flavonoids 300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group)

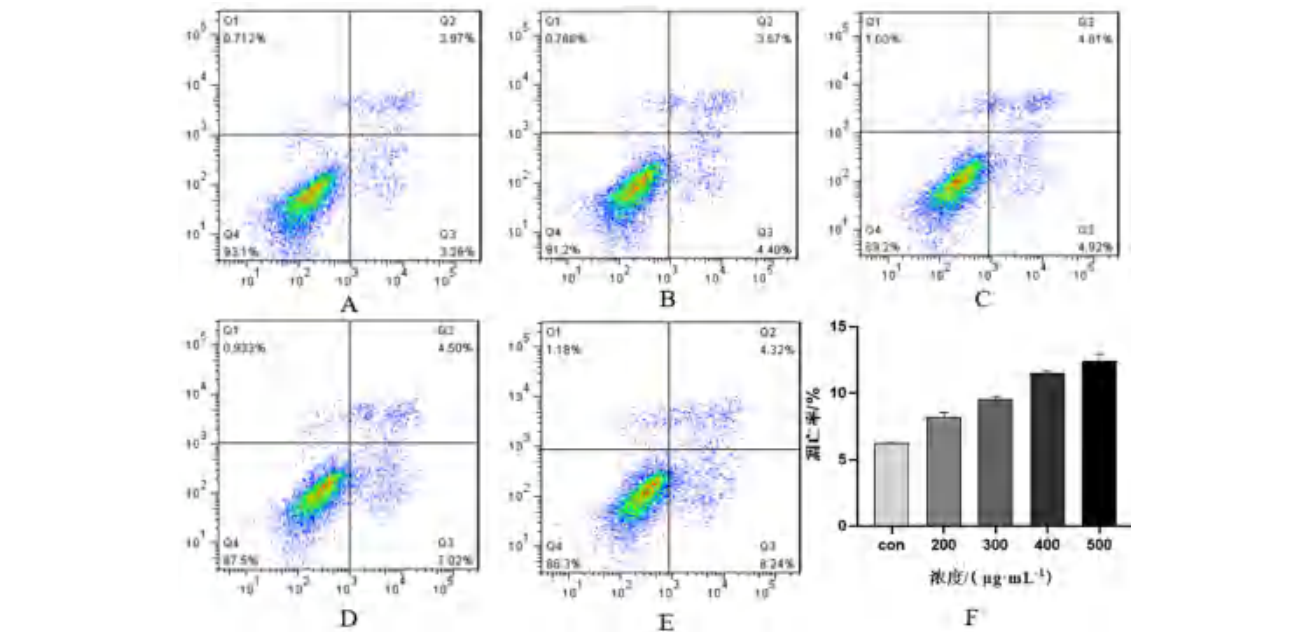


图 6 铁皮石斛花总黄酮对 HCT116 细胞凋亡的影响
Fig 6 Effect of total flavonoids on the apoptosis of HCT116 cells
A. 对照组 (control group); B ~ E. 分别为 200、300、400 和 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的总黄酮处理组 (200、300、400 and 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ total flavonoids treatment group, respectively); F. 凋亡率量化表达图 (quantitation of apoptosis rates)

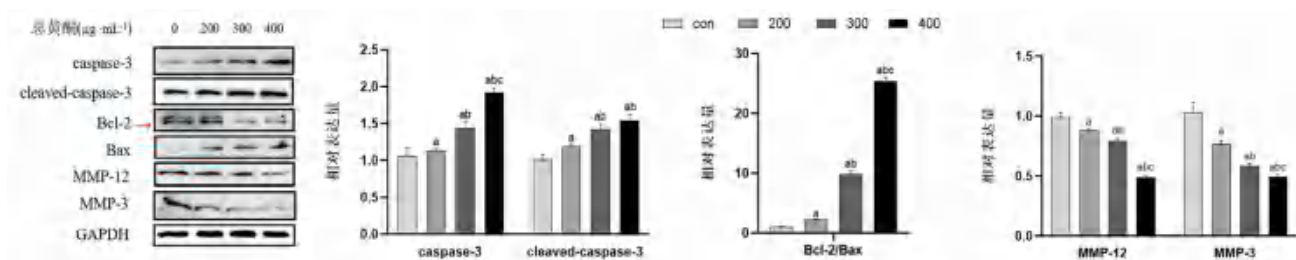


图 7 铁皮石斛花总黄酮对 HCT116 中关键靶点蛋白表达的影响

Fig 7 Effect of total flavonoids on the expression of key target proteins in HCT116 cells

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与总黄酮 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组比较, ^b $P < 0.05$; 与总黄酮 300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组比较, ^c $P < 0.05$; 与总黄酮 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组比较, ^d $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, ^a $P < 0.05$; compared with the total flavonoids 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group, ^b $P < 0.05$; compared with the total flavonoids 300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group, ^c $P < 0.05$; compared with the total flavonoids 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group, ^d $P < 0.05$ 。

4 讨论

近年来, 黄酮类物质被广泛用于肿瘤的治疗, 其存在于各种植物中, 对肺癌、乳腺癌、结肠癌、白血病、肝癌有良好的防治效果^[5-7], 而且主要通过抗氧化^[8]、诱导肿瘤细胞凋亡^[9]、影响细胞周期^[10]等发挥抗肿瘤作用。由于黄酮类化合物存在多个潜在的靶点, 故其作用机制非常复杂。网络药理学与生物信息学在系统阐明中药在分子水平上的作用机制以及活性化合物、潜在靶点和各种途径之间相互作用的表征等方面具有优势。本研究表明, 活性成分分析的潜在靶点显示染料木素、异绿合欢素、槲皮素、异泽兰黄素、异脱水淫羊藿素、升麻素、木犀草素、牡荆素和大豆苷元与网络中的多个靶点相互作用。有研究表明, 这几类黄酮物质可能在肿瘤的治疗中发挥重要作用。槲皮素是一种黄酮醇类物质, 在本研究中有最多潜在的治疗靶点, 可通过诱导细胞凋亡^[11]、抑制增殖和迁移^[12], 调节炎症过程^[13], 发挥抗肿瘤作用; 此外, 槲皮素可以通过 PI3K-Akt 信号通路影响人胶质瘤细胞^[14]; 从甘草中分离得到的异绿合欢素是一种有效的细胞分化刺激因子, 通过 Notch1 和 Akt 信号通路抑制增殖和阻断血管生成, 对治疗人脑瘤具有潜在的应用价值^[15-16]; 染料木素是豆科和一些天然植物中的异黄酮化合物, 抑制基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达, 发挥抗肿瘤作用^[17]; 木犀草素可以通过抑制 PI3K-Akt 信号通路中 MMP-2、MMP-9 的表达抑制人黑色素瘤细胞的增殖, 并诱导其凋亡, 发挥抗肿瘤活性^[18]; 牡荆素是黄酮苷类化合物, 可以促进非小细胞肺癌细胞凋亡, 伴有 Bcl-2/Bax 比值降低和 caspase-3 的表达增加, 还可以降低 p-PI3K、p-Akt 和 p-mTOR 的水平^[19]; 大豆苷元通过降低

MMP-2 的活性来抑制乳腺癌细胞侵袭^[20]。

免疫与肿瘤的发生发展密切相关。在 PPI 网络中, 大多数潜在的靶点与免疫密切相关, 包括 AKT1、TNF、EGFR、VEGFA、MAPK1、CASP3、MMP9、CCND1、ESR1、HSP90AA1 和 MTOR^[21-27]。这些蛋白是此次研究的核心蛋白, 可能在黄酮对结肠癌的治疗作用中发挥重要作用。最近的研究表明, 木犀草素降低了免疫相关基因包括 MMP9、MAPK1、HSP90AA1、CASP3、ALB、EGFR、SRC、HRAS 和 ESR1 的表达^[26]。

为了进一步揭示铁皮石斛花黄酮类药物对结肠癌的潜在机制, 对其进行 KEGG 分析, 发现 PI3K-Akt 是主要的信号通路。它是结肠癌中参与细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭和血管生成的经典信号转导途径, 在结肠癌的发生发展中起着重要作用。本研究表明, 铁皮石斛花总黄酮明显抑制 HCT116 细胞的增殖, 促进细胞的凋亡, 抑制细胞的迁移。当细胞内 Bax 高表达时, 细胞对死亡信号敏感, 促进细胞发生凋亡。当 Bcl-2 高表达时, Bcl-2 可以和 Bax 形成异源二聚体, 抑制细胞凋亡。所以胞内 Bax/Bcl-2 的比例对决定细胞凋亡的敏感性起到重要作用, 因此利用 Western blot 在细胞水平上进行验证, 结果表明铁皮石斛花总黄酮明显上调 Bax/Bcl-2 的比值, 促进了 HCT116 细胞的凋亡。结合网络药理学分析的结果, 铁皮石斛花总黄酮可通过多靶点、多途径发挥抗结肠癌的作用, 其抗肿瘤活性可能与影响凋亡基因 Bax 及 Bcl-2 的表达有关。

参考文献

- [1] Chen K, Wang H, Collins G, et al. Current perspectives on the importance of pathological features in prognostication and guidance of adjuvant chemotherapy in colon cancer [J]. Curr Oncol, 2022, 29 (3): 1370-1389.

- [2] 王露尧, 张鹭鹭. 中国结直肠癌发病和死亡情况及防控策略[J]. 解放军医院管理杂志, 2021, 28 (12): 1195-1197.
- [3] 魏文强, 沈洪兵. 中国癌症防控历史、现状与展望[J]. 中华疾病控制杂志, 2019, 23 (10): 1165-1168, 1180.
- [4] Ullah A, Munir S, Badshah SL, et al. Important flavonoids and their role as a therapeutic agent [J]. *Molecules*, 2020, 25 (22): 5243.
- [5] Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C, et al. Curcumin and health [J]. *Molecules*, 2016, 21 (3): Art. 234.
- [6] Ahmed S, Khan H, Fratantonio D, et al. Apoptosis induced by luteolin in breast cancer: mechanistic and therapeutic perspectives [J]. *Phytomedicine*, 2019, 59: 152883.
- [7] Zarmouh NO, Messeha SS, Mateeva N, et al. The anti-proliferative effects of flavonoid MAO inhibitors on prostate cancer cells [J]. *Molecules*, 2020, 25 (9): 2257.
- [8] Jakhar R, Paul S, Park YR, et al. 3, 5, 7, 3', 4' -pentamethoxyflavone, a quercetin derivative protects DNA from oxidative challenges: potential mechanism of action [J]. *J Photoch Photobiol B*, 2014, 131: 96-103.
- [9] Abotaleb M, Samuel S, Varghese E, et al. Cancers review flavonoids in cancer and apoptosis [J]. *Cancers*, 2018, 11 (1): 28.
- [10] Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, et al. Flavonoids as anticancer agents [J]. *Nutrients*, 2020, 12 (2): 457.
- [11] Taylor MA, Khathayer F, Ray SK. Quercetin and sodium butyrate synergistically increase apoptosis in rat C6 and human T98G glioblastoma cells through inhibition of autophagy [J]. *Neurochem Res*, 2019, 44 (7): 1715-1725.
- [12] Liu Y, Tang ZG, Lin Y, et al. Effects of quercetin on proliferation and migration of human glioblastoma U251 cells [J]. *Retour Au Numéro*, 2017, 92: 33-38.
- [13] Abds A, Plcc A, Mdno A, et al. The flavonoid rutin and its aglycone quercetin modulate the microglia inflammatory profile improving antiglioma activity [J]. *Brain Behav Immun*, 2020, 85: 170-185.
- [14] Pan HC, Jiang Q, Jiang Y, et al. Quercetin promotes cell apoptosis and inhibits the expression of MMP-9 and fibronectin via the AKT and ERK signalling pathways in human glioma cells [J]. *Neurochem Int*, 2015, 80: 66-71.
- [15] Lin Y, Sun H, Dang Y, et al. Isoliquiritigenin inhibits the proliferation and induces the differentiation of human glioma stem cells [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39 (2): 687-694.
- [16] Wang C, Chen Y, Wang Y, et al. Inhibition of COX-2, mPGES-1 and CYP4A by isoliquiritigenin blocks the angiogenic Akt signaling in glioma through ceRNA effect of miR-194-5p and lncRNA NEAT1 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38 (1): 371.
- [17] Yazdani Y, Rad M, Taghipour M, et al. Genistein suppression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in mesenchymal stem cell like cells isolated from high and low grade gliomas [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17 (12): 5303-5307.
- [18] Xin Y, Wei J, Yu D, et al. Luteolin inhibits proliferation and induces poptosis of human melanoma cells in vivo and in vitro by suppressing MMP-2 and MMP-9 through the PI3K/AKT pathway [J]. *Food Funct*, 2019, 10: 703-712.
- [19] Liu X, Jiang Q, Liu H, et al. Vitexin induces apoptosis through mitochondrial pathway and PI3K/Akt/mTOR signaling in human non-small cell lung cancer A549 cells [J]. *Biol Res*, 2019, 52 (1): 7.
- [20] Han BJ, Li W, Jiang GB, et al. Effects of daidzein in regards to cytotoxicity in vitro, apoptosis, reactive oxygen species level, cell cycle arrest and the expression of caspase and Bcl-2 family proteins [J]. *Oncol Rep*, 2015, 34 (3): 1115-1120.
- [21] Tao F, Zhu J, Duan L, et al. Anti-inflammatory effects of doxepin hydrochloride against LPS-induced C6-glioma cell inflammatory reaction by PI3K-mediated Akt signaling [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2019, 34 (2): e22424.
- [22] Madan E, Dikshit B, Gowda SH, et al. FAT1 is a novel upstream regulator of HIF1 α and invasion of high grade glioma [J]. *Int J Cancer*, 2016, 139 (11): 2570-2582.
- [23] Li T, Zhao J, Ge J, et al. Particulate matter facilitates C6 glioma cells activation and the release of inflammatory factors through MAPK and JAK2/STAT3 pathways [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41 (8): 1969-1981.
- [24] Xu D, Kong T, Shao Z, et al. Orexin-A alleviates astrocytic apoptosis and inflammation via inhibiting OX1R-mediated NF- κ B and MAPK signaling pathways in cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, 1867 (11): 166230.
- [25] Kar F, Kacar S, Hocolu C, et al. Concanavalin A induces apoptosis in a dose-dependent manner by modulating thiol/disulfide homeostasis in C6 glioblastoma cells [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2021 (6): 22742.
- [26] González-Morales A, Zabaleta A, García-Moure M, et al. Oncolytic adenovirus Delta-24-RGD induces a widespread glioma proteotype remodeling during autophagy [J]. *J Proteomics*, 2019, 194: 168-178.
- [27] Gao S, Sha Z, Zhou J, et al. BYSL contributes to tumor growth by cooperating with the mTORC2 complex in gliomas [J]. *Cancer Biol Med*, 2021, 18 (1): 88-104.

(收稿日期: 2022-04-22; 修回日期: 2022-06-27)

小柴胡颗粒抗人冠状病毒 229E 的活性研究及成分群筛选

余祥翠¹, 刘宏¹, 郑如文¹, 马蓉¹, 林爱华², 蒋研风^羊¹, 杜海泳¹, 刘奕明^{2*}, 毕聪^{1*} (1.广州白云山光华制药股份有限公司, 广州 510285; 2.广州中医药大学第二附属医院, 广州 510120)

摘要: **目的** 筛选小柴胡颗粒抗人冠状病毒 229E (HCoV-229E) 的活性成分群并验证。**方法** 构建体外 HCoV-229E 感染 Huh-7 细胞模型, 计算 TC_{50} 、 IC_{50} , 并采用 RT-qPCR 考察炎症因子 mRNA 表达水平。利用 Autodock 技术模拟小柴胡颗粒 66 个化学成分与 HCoV-229E 关键蛋白 S-protein、3CL 水解酶、NSP15、NSP3、NSP9 的分子结合能力。**结果** 小柴胡颗粒在 HCoV-229E 感染 Huh-7 细胞所致细胞病变具有抑制作用, 且可显著抑制炎症因子 IL-6、IL-8、MCP-1 和 TNF- α 的 mRNA 过表达; 小柴胡颗粒中的甘草黄酮类、甘草皂苷类、柴胡皂苷类、黄芩苷和汉黄芩苷等黄酮类成分等与 HCoV-229E 的关键蛋白有较好的结合能力, 小柴胡颗粒可能通过上述活性成分群抑制 HCoV-229E 的复制、入侵、转录等。**结论** 本研究初步揭示了小柴胡颗粒抗 HCoV-229E 的药效作用机制及潜在活性成分, 为其临床应用提供依据。

关键词: 小柴胡颗粒; 人冠状病毒 229E; 分子对接

中图分类号: R286 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2022)12-2781-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.013

Screening and validation of active components of Xiaochaihu granules against human coronavirus 229E

YU Xiang-cui¹, LIU Hong¹, ZHENG Ru-wen¹, MA Rong¹, LIN Ai-hua², JIANG Yan-feng-yang¹, DU Hai-yong¹, LIU Yi-ming^{2*}, BI Cong^{1*} (1. Guangzhou Baiyunshan Guanghua Pharmaceutical Co., Ltd, Guangzhou 510285; 2. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120)

Abstract: Objective To screen and verify the active components of Xiaochaihu granule (XCHG) against human coronavirus 229E (HCoV-229E). **Methods** HCoV-229E-infected Huh-7 cell model in vitro was constructed. The TC_{50} and IC_{50} were calculated, and the expression level of inflammatory factor mRNA was detected by RT-qPCR. The Autodock was used to simulate the molecular binding ability of 66 components in XCHG with S-protein, 3CL hydrolase, NSP15, NSP3 and NSP9, which were the key proteins of HCoV-229E. **Results** XCHG inhibited the cytopathy of Huh-7 cells caused by HCoV-229E in vitro, and significantly inhibited the mRNA over expression of inflammation factors IL-6, IL-8, MCP-1 and TNF- α . Licorice flavonoids, licorice saponins, saikosaponin, baicalin and wogonin in XCHG had good binding ability with the key proteins of HCoV-229E. XCHG inhibited the replication, invasion and transcription of HCoV-229E through the above active components. **Conclusion** This study preliminarily analyzes the pharmacodynamic mechanism and active components in XCHG against HCoV-229E, and provides data support for its clinical application.

Key words: Xiaochaihu granule; human coronavirus 229E; molecular docking

冠状病毒 (CoV) 是有包膜的正链单链 RNA 病毒, 迄今为止共发现了 7 种冠状病毒, 包括 α 群的人冠状病毒 229E (HCoV-229E) 和 HCoV-NL63, β 群的 HCoV-OC43、HCoV-HKU1、严重

基金项目: 广州市重点研发计划 (No. 202206010112)。

作者简介: 余祥翠, 女, 制药工程师, 主要从事中药新药制剂及机制研究, email: 496806245@qq.com *通信作者: 刘奕明, 女, 博士, 主要从事中药药代及机制研究, email: lyiming2000@163.com; 毕聪, 女, 硕士, 主要从事中药药效研究, email: bicong812@126.com

急性呼吸综合征冠状病毒 (SARS-CoV)、中东呼吸综合征冠状病毒 (MERS-CoV) 和新型冠状病毒 (SARS-CoV-2)^[1]。其中 HCoV-229E 是引起普通感冒的主要病原体之一, 大约 90% 的成年人体内可检测到该病毒抗体, 大多数感染者出现轻度呼吸道感染症状, 偶尔也会导致婴儿、老年人或免疫功能低下的个体出现下呼吸道感染^[2]。当前研究表明, HCoV-229E 与 SARS-CoV-2 结构相似, 且具有明显的进化性, 对其进行深入研究可加强我们对 SARS-CoV-2 的理解^[3]。

小柴胡颗粒是依据张仲景所著《伤寒杂病论》中的“小柴胡汤”研制而成的颗粒型中药制剂, 具有解表散热, 疏肝和胃的功效^[4]。作为抗疫经典名方, 小柴胡颗粒在抗击非典^[5-6]、甲型流感^[7]、登革热、新型冠状病毒肺炎^[8]中发挥了重要作用, 具有显著的抗病毒功效^[9]。但其对 HCoV-229E 的防治作用以及对冠状病毒的作用机制尚不清晰, 发挥关键作用的活性成分尚不明确。本研究基于此, 构建体外 HCoV-229E 感染 Huh-7 细胞模型, 考察小柴胡颗粒对病毒致细胞病变的抑制作用以及对细胞中炎症因子 mRNA 表达的影响, 同时结合分子对接技术筛选小柴胡颗粒防治 HCoV-229E 的活性成分, 为其临床应用及科学内涵的解析提供数据支撑。

1 材料

小柴胡颗粒 (广州白云山光华制药股份有限公司, 批号: K00078); Huh-7 细胞 (广州呼吸健康研究院呼吸疾病国家重点实验室病毒室保存); 人冠状病毒 HCoV-229E (滴度为 $TCID_{50} = 10^{-5}/100 \mu L$, 于广州呼吸健康研究院呼吸疾病国家重点实验室病毒室 $-80^{\circ}C$ 保存); 使用病毒滴度为 $100TCID_{50}$ 。二甲基亚砜 (DMSO, 天津市大茂化学试剂厂); PCR 试剂、逆转录试剂 (日本 Takara 公司); PBS、DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司)。

3-18K 冷冻离心机 (德国 Sigma 公司); 9700 PCR 扩增仪、Multiskan Spectrum 酶标仪、CO2 细胞培养箱 (美国 Thermo Fisher 公司); ABI PRISM 7500 Real-time PCR 检测系统 (美国 Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 细胞毒性实验 (MTT 法)

实验分为小柴胡颗粒组、空白对照组及细胞对照组。无菌 96 孔培养板, 每孔加入 $100 \mu L$ 浓度为 2×10^5 个 $\cdot mL^{-1}$ Huh-7 细胞, $37^{\circ}C$ 、5%CO₂ 培养 24 h; 96 孔板单层细胞用 PBS 洗涤 1 次, 每

孔加入 $100 \mu L$ 2 倍梯度稀释的药物 (小柴胡颗粒 5000、2500、1250、625、312.5、156.25、78.13 μg 生药 $\cdot mL^{-1}$)。空白对照组和正常细胞组每孔加入等体积培养液, $37^{\circ}C$ 培养 4 d; 每孔加入质量浓度为 $5 mg \cdot mL^{-1}$ 的 MTT 溶液 $20 \mu L$, 继续孵育 4 h。弃去上清液, 每孔加入 $100 \mu L$ 二甲基亚砜 (DMSO), 低速振荡 5 min, 使结晶物充分溶解; 在酶联免疫仪上 $490 nm$ 波长测定吸光度值, 计算抑制率。抑制率 (%) = (正常组平均 OD 值 - 药物组平均 OD 值) / (正常组平均 OD 值 - 空白对照组平均 OD 值) $\times 100\%$ 。Reed-Muench 法计算药物半数毒性浓度 (TC_{50})。以上实验操作均在 BSL-2 实验室内完成。

2.2 受试药物抗病毒实验

实验分为小柴胡颗粒组、229E 病毒对照组、细胞对照组及空白对照组。无菌 96 孔培养板, 每孔加入 $100 \mu L$ 浓度为 2×10^5 个 $\cdot mL^{-1}$ 的 Huh-7 细胞, $37^{\circ}C$ 、5%CO₂ 培养 24 h; 小柴胡颗粒实验组和病毒对照组加入 $100 TCID_{50}$ 病毒液 $100 \mu L$ /孔, $37^{\circ}C$ 、5%CO₂ 培养箱吸附 2 h; 2 h 后弃去细胞培养液。加入受试药物小柴胡颗粒 (1250、625、312.5、156.25 μg 生药 $\cdot mL^{-1}$), 每个质量浓度 3 个复孔, $100 \mu L$ /孔; 细胞对照、空白对照 (溶剂对照) 和病毒对照 (阴性对照) 组加入等体积培养液; 细胞 $37^{\circ}C$ 、5%CO₂ 孵育 3 ~ 4 d; 每孔加入质量浓度为 $5 mg \cdot mL^{-1}$ 的 MTT 溶液 $20 \mu L$, 继续孵育 4 h。弃上清液, 每孔加入 $100 \mu L$ DMSO, 低速振荡 5 min, 使结晶物充分溶解; 选择 $490 nm$ 波长, 在酶联免疫仪上测定吸光度值, 计算抑制率。抑制率 (%) = (药物组平均 OD 值 - 病毒组平均 OD 值) / (正常组平均 OD 值 - 病毒组平均 OD 值) $\times 100\%$ 。具有 50% 的抑制病毒致细胞病变效应 (CPE) 的浓度视为有效浓度, 采用 Reed-Muench 法或 GraphPad Prism8.0 计算半数抑制浓度 (IC_{50})。以上实验操作均在 BSL-2 实验室内完成。

2.3 抗病毒药效结果判定标准

以选择指数 SI ($SI = TC_{50}/IC_{50}$) 判定药效标准, $SI > 1$ 表示有效, SI 越大, 抗病毒效果越好。

2.4 RT-qPCR 检测炎症因子

Huh-7 细胞接种至 6 孔板中, 分为小柴胡颗粒组、229E 病毒对照组、瑞德西韦阳性药物对照组、细胞对照组。细胞长至单层后, 弃去培养液, 用 PBS 洗一次, 病毒对照组和小柴胡颗粒组接种 $1000 TCID_{50}$ 的人冠状病毒 (HCoV-229E), 正常组加入无血清培养基, $37^{\circ}C$ 吸附 1 h。弃去

病毒液, 小柴胡颗粒组加入不同质量浓度药物溶液 1 mL (1250、625、312.5 μg 生药 $\cdot \text{mL}^{-1}$), 阳性药物对照组加入 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 瑞德西韦溶液 1 mL。细胞对照组和病毒对照组加入等体积含 2% 血清培养基。37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 48 h 后, 弃上清液, PBS 洗细胞一次, 加入 TRIzol 试剂裂解细胞提取 RNA。RT-qPCR 检测细胞因子。以上实验操作均在 BSL-2 实验室内完成。

2.5 统计学分析

应用 SPSS 18.0 软件处理数据, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2.6 分子对接筛选活性成分

项目组前期基于 UHPLC-MS 技术分离鉴定得到小柴胡颗粒 66 个化学成分^[10], 通过 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载各成分的 mol2 格式分子结构。使用 Chem 3D 构建化合物 3D 结构并将其能量最小化。通过 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载 HCoV-229E 的刺突糖蛋白 (S-protein, PDB ID: 5ZHY)、3CL 水解酶 (PDB ID: 5ZHY)、非结构蛋白 15 (NSP15, PDB ID: 4RS4)、非结构蛋白 3 (NSP3, PDB ID: 3EJG) 以及非结构蛋白 9 (NSP9, PDB ID: 2J97) 蛋白的 pdb 格式。使用 PyMOL^[11] 提取各蛋白结构, 并进行去水、加氢等处理。使用 AutoDock^[12] 将化合物和蛋白转为 pdbqt 格式, 设置活性口袋位置, 运行 vina 进行分子对接, 计算结合能, 并使用 PyMOL 将分子对接结果可视化。使用 GraphPad Prism8.0 绘制各成分与蛋白的结合能热图。

3 结果

3.1 药物毒性

MTT 实验结果表明, 在 Huh-7 细胞中小柴胡颗粒半数毒性浓度 (TC_{50}) 为 3979 μg 生药 $\cdot \text{mL}^{-1}$ (见图 1), 小柴胡颗粒在 0 ~ 1250 μg 生药 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 对细胞无毒性。

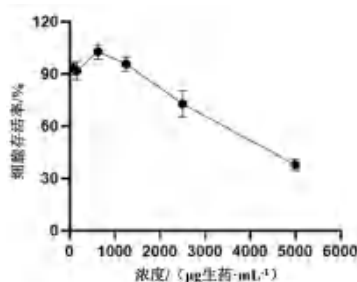


图 1 小柴胡颗粒细胞毒性检测结果

Fig 1 Cytotoxicity of XCHG

3.2 抗病毒药效

通过 MTT 法测试吸光度值并记录实验结果, 采用 Reed-Muench 法或 GraphPad Prism8.0 计算 IC_{50} , 小柴胡颗粒在此次实验的治疗模式中 IC_{50} 为 953 μg 生药 $\cdot \text{mL}^{-1}$ (见图 2)。

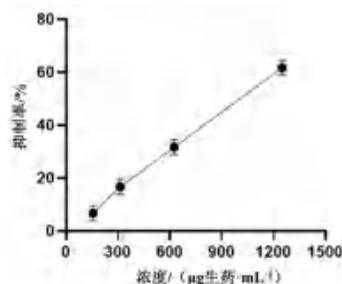


图 2 小柴胡颗粒对人冠状病毒 HCoV-229E 药效检测结果

Fig 2 Pharmacodynamic effect of XCHG on HCoV-229E

经计算, 选择指数 $SI = 4.17 > 1$, 表明小柴胡颗粒在体外可以有效抑制人冠状病毒 (HCoV-229E) 感染导致的 Huh-7 细胞病变, 且其安全范围较大。

3.3 炎症细胞因子的结果

通过 RT-qPCR 检测细胞因子 mRNA 的表达, 采用 GraphPad Prism8.0 分析计算结果见图 3。结果显示, 与病毒对照组比较, 阳性药瑞德西韦可以显著降低细胞中白介素 6 (IL-6)、IL-8、MCP-1 和肿瘤坏死因子 ($\text{TNF-}\alpha$) 的 mRNA 表达水平; 小柴胡颗粒低、中、高剂量组可抑制细胞中 IL-8、MCP-1 和 $\text{TNF-}\alpha$ 的 mRNA 表达水平, 小柴胡颗粒中、高剂量组可降低细胞中 IL-6 的 mRNA 表达水平, 该疗效作用与剂量成正相关。

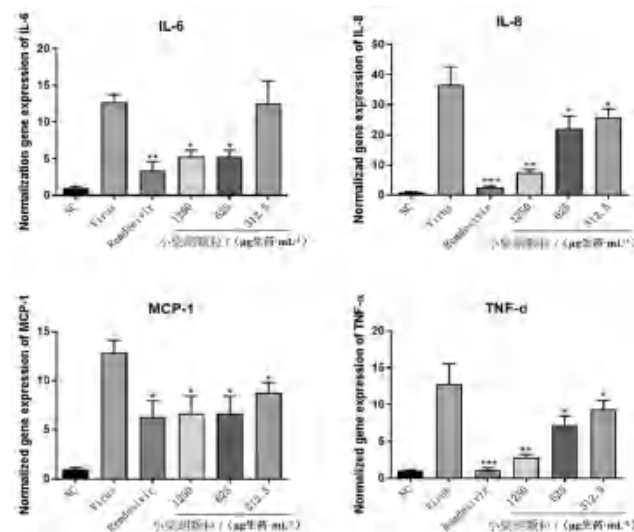


图 3 小柴胡颗粒对炎症因子表达的作用 ($n = 10$)

Fig 3 Effect of XCHG on the expression of inflammation factors ($n = 10$)

注: 与病毒对照组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ 。

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

3.4 基于分子对接的小柴胡颗粒抗 HCoV-229E 活性成分筛选

分别将小柴胡颗粒 66 个化学成分^[10]与 HCoV-229E 病毒的 S-protein、3CL 水解酶、NSP15、NSP3、NSP9 等关键蛋白进行分子对接, 结合能结果见图 4, 分子对接示意图见图 5。结合能越小, 配体与受体之间结合的构象越稳定, 认为两者发生作用的可能性越大。结果表明, 小柴胡颗粒中的化学成分与 HCoV-229E 病毒的关键蛋白均有较强的结合能力, 其中甘草黄酮醇、半甘草异黄酮 B、光甘草酮等与 S-protein 的结合能力较好; 柴胡皂苷 c、槲皮素-3-O-洋槐糖苷等与 3CL 水解酶的结合能力较好; 山柰酚-3, 7-二鼠李糖苷、水仙苷、甘草皂苷 B2 等与 NSP15 的结合能力较好; 新甘草酚、黄芩苷、汉黄芩苷等与 NSP3 的结合能力较好; 柴胡皂苷 f、甘草皂苷 A3 等与 NSP9 的结合能力较好。

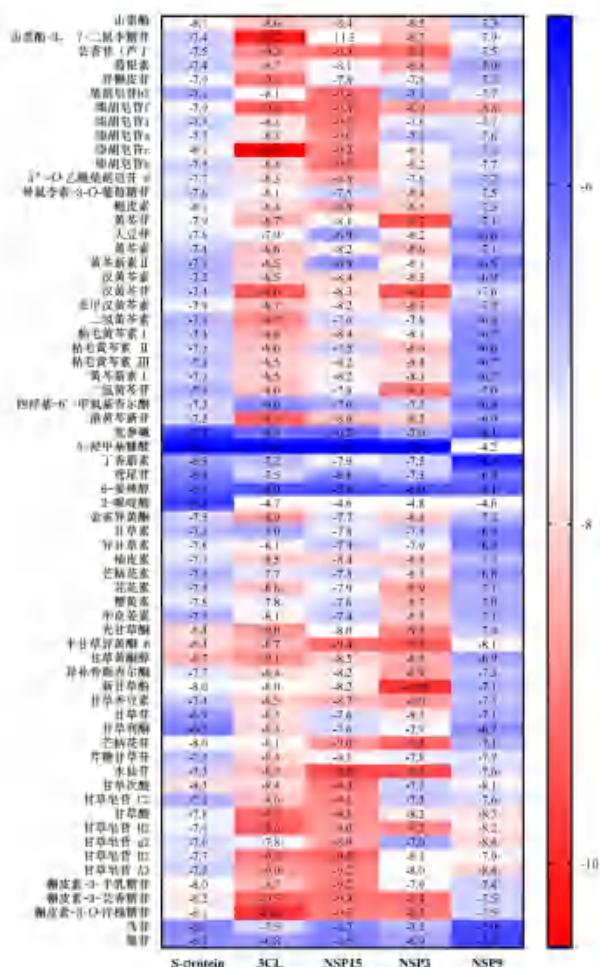


图4 小柴胡颗粒化学成分与 HCoV-229E 关键蛋白的分子对接结合能 ($\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)

Fig 4 Molecular docking binding energy between the chemical constituents of XCHG and key proteins of HCoV-229E (kcal • mol⁻¹)

4 讨论

当前 SARS-CoV-2 肆虐全球，给人们的生命

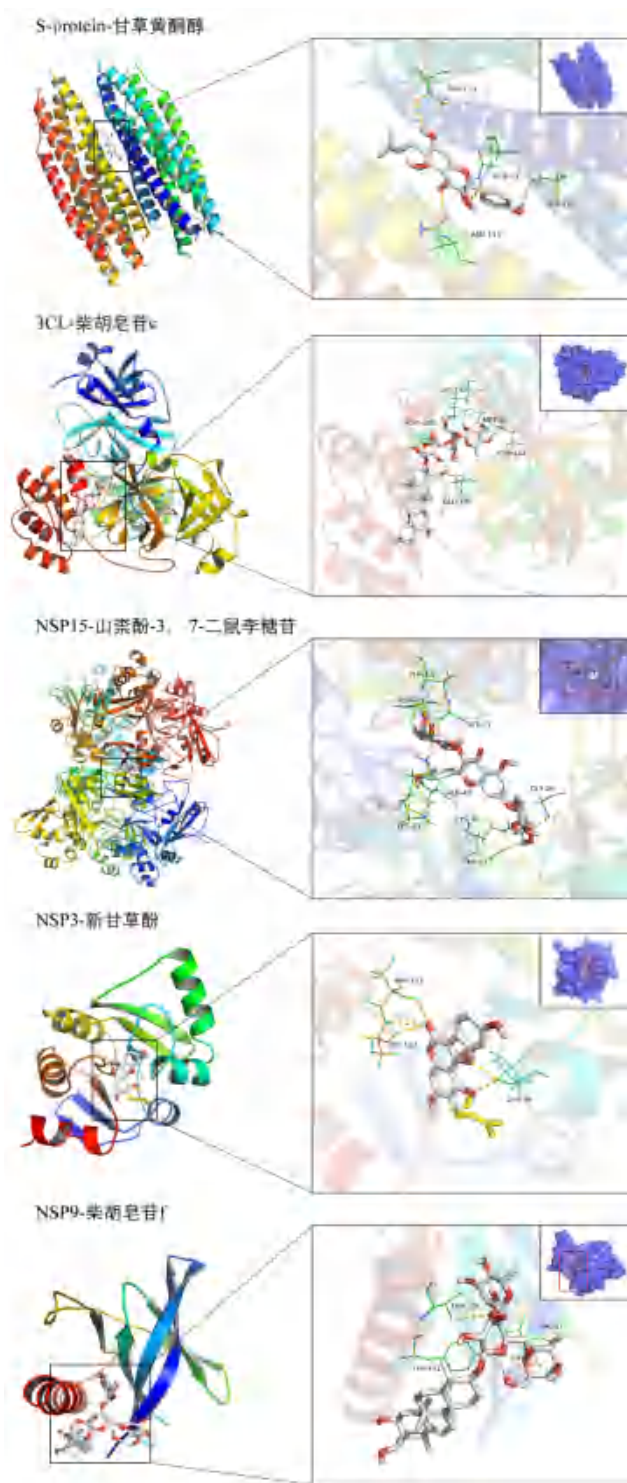


图 5 分子对接示意图

Fig 5 Molecular docking diagram

健康和世界经济带来了重大危害,同时其极强的传播性提高了基础研究的难度。与其结构相似、致病性低的 HCoV-229E 成为了一个较好的替代选择^[13]。研究小柴胡颗粒对 HCoV-229E 的作用机制、筛选活性成分不仅有助于其在临床治疗普通感冒时精准用药,还有助于理解其防治新型冠状病毒肺炎的作用机制。

本研究基于体外细胞实验,明确了小柴胡颗粒在体外对 HCoV-229E 感染 Huh-7 细胞所致细胞病变具有抑制作用,其机制可能与抑制炎症因子 IL-6、IL-8、MCP-1 和 TNF- α 的 mRNA 过度表达有关。Sun 等^[14]研究发现, HCoV-229E 可能是肺部炎症和广泛肺损伤的重要病原体,严重感染可能会引起全身炎症反应综合征。SARS-CoV-2 感染者血清中的炎症因子水平同样出现显著升高的现象,随着病程的进展,重症患者体内炎症因子水平出现急剧上升,引发“细胞因子风暴”^[15]。本研究结果表明小柴胡颗粒抑制 HCoV-229E 的机制可能与抑制炎症因子的表达有关。

为进一步探究小柴胡颗粒抗 HCoV-229E 的机制并筛选其发挥药效作用的主要活性成分,本研究通过分子对接技术将 66 个化学成分与 HCoV-229E 的 S-protein、3CL 水解酶、NSP15、NSP9、NSP3 等关键蛋白进行对接。其中 S-protein 可介导受体结合以及病毒和宿主细胞膜的融合,被视为中和抗体和疫苗开发的主要目标^[1]。3CL 水解酶是 RNA 病毒复制的核心蛋白酶,抑制其功能可大概率阻隔病毒复制^[16]。NSP3 对复制/转录复合体的形成至关重要,同时可作用于宿主蛋白的翻译后修饰,拮抗宿主的先天免疫反应^[17]。NSP9 是冠状病毒复制的必需 RNA 结合蛋白,是合成机制中重要的 RNA 结合亚基^[18]。NSP15 作为核糖核酸内切酶可介导病毒逃避宿主的 dsRNA 传感器,限制巨噬细胞凋亡^[19]。结果表明,小柴胡颗粒中的甘草黄酮类成分、甘草皂苷类成分、柴胡皂苷类成分、黄芩苷和汉黄芩苷等黄酮类成分以及槲皮素-3-O-洋槐糖苷、山柰酚-3,7-二鼠李糖苷等成分与上述关键蛋白有较好的结合能力,小柴胡颗粒可能通过上述主要活性成分抑制 HCoV-229E 的复制、入侵、转录等。

本研究基于体外细胞实验与分子对接技术,初步揭示了小柴胡颗粒抗 HCoV-229E 的药效作用机制及潜在活性成分,其抗病毒机制可能与抑制炎症因子过度表达、抑制病毒复制、入侵、转录有关。研究对于明确小柴胡颗粒对 HCoV-229E 的防治作用具有积极意义,可为深入了解其对其其他冠状病毒的机制提供参考。

参考文献

[1] Song X, Shi Y, Ding W, et al. Cryo-EM analysis of the HCoV-229E spike glycoprotein reveals dynamic prefusion conformational changes [J]. Nat Commun, 2021, 12: 141.
[2] Funk CJ, Wang JR, Ito Y, et al. Infection of human alveo-

lar macrophages by human coronavirus strain 229E [J]. J Gen Virol, 2012, 93 (3): 495-503.
[3] Diego F, Rachele C, Federica A, et al. Adaptation of the endemic coronaviruses HCoV-OC43 and HCoV-229E to the Human Host [J]. Virus Evol, 2021, 7 (2): 1-11.
[4] 毕聪, 郑如文, 黄海涛, 等. 小柴胡颗粒基于网络药理学的组方配伍规律解析 [J]. 药学研究, 2020, 39 (9): 504-513.
[5] 朱敏, 叶志中, 林新峰, 等. 中西医结合治疗传染性非典型肺炎 (SARS) 45 例临床分析 [J]. 中国医药学报, 2003, 18 (6): 328-330.
[6] 中华中医药学会. 传染性非典型肺炎 (SARS) 中医诊疗指南 [J]. 中医杂志, 2003, 44 (1): 865-872.
[7] 区海钧, 黎桂嫦. 小柴胡汤治疗甲型 H1N1 流感 25 例的效果观察 [J]. 中外健康文摘, 2011, 8 (30): 56-57.
[8] 林琳, 陈远彬, 谈馨媛, 等. 广东省新型冠状病毒肺炎中医药治疗方案 (试行第二版) [J]. 中医杂志, 2020, 61 (14): 1197-1199.
[9] 毕聪, 郑如文, 杜海泳, 等. 小柴胡颗粒生物靶标网络及潜在作用机制解析 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2021, 60 (3): 45-57.
[10] 马蓉, 刘宏, 郑如文, 等. 小柴胡颗粒退热作用机制的网络药理解析及确证 [J]. 药学研究, 2021, 40 (8): 497-503.
[11] Delano W L. The PyMol molecular graphics system [J]. Proteins, 2002, 30: 442-454.
[12] Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. J Comput Chem, 2009, 31 (2): 455-461.
[13] Meyers C, Robison R, Milici J, et al. Lowering the transmission and spread of human coronavirus [J]. J Med Virol, 2021, 93 (3): 1605-1612.
[14] Sun W, Liao JP, Yu KY, et al. A severe case of human coronavirus 229E pneumonia in an elderly man with diabetes mellitus: a case report [J]. BMC Infect Dis, 2021, 21 (1): 524.
[15] Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. The Lancet, 2020, 395 (10223): 497-506.
[16] Anand K, Ziebuhr J, Wadhwani P, et al. Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs [J]. Science, 2003, 300 (5626): 1763-1767.
[17] Lei J, Kusov Y, Hilgenfeld R. Nsp3 of coronaviruses: structures and functions of a large multi-domain protein [J]. Antivir Res, 2018, 149: 58-74.
[18] Zhe Z, Deng F, Shi K, et al. Dimerization of Coronavirus nsp9 with diverse modes enhances its nucleic acid binding affinity [J]. J Virol, 2018, 92 (17): e00692-18.
[19] Deng X, Hackbart M, Mettelman RC, et al. Coronavirus nonstructural protein 15 mediates evasion of dsRNA sensors and limits apoptosis in macrophages [J]. P Natl Acad Sci USA, 2017, 114 (21): E4251-E4260.
(收稿日期: 2022-05-11; 修回日期: 2022-07-10)

基于动物实验和网络药理学探讨子芪抑瘤饮治疗 卵巢癌的潜在机制

耿子翔¹, 刘莹², 聂小丽³, 井方圆³, 陈海阳³, 张开勇⁴, 刘鹏⁴, 袁龙⁴, 李冰融⁴, 刘特^{3*}, 张必萌^{4*} (1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 上海市松江区中心医院皮肤科, 上海 201699; 3. 上海市中医老年医学研究所, 上海 200030; 4. 上海交通大学医学院附属第一人民医院针灸科, 上海 200080)

摘要: **目的** 基于动物实验和网络药理学探讨子芪抑瘤饮治疗卵巢癌的潜在机制。**方法** 动物实验观察子芪抑瘤饮对皮下成瘤的影响, 利用 HE 染色观察瘤体的形态学改变; 通过生物信息学技术进行基因富集分析; 利用免疫组织化学染色检测 Ki67、TP53、ESR1、EGFR、VEGFA 的蛋白表达水平。**结果** 子芪抑瘤饮能显著减小卵巢癌瘤体的体积和质量 ($P < 0.05$), 上皮细胞异型性和病理性核分裂象减少。通过数据库共检索到子芪抑瘤饮的 154 个活性成分, 283 个潜在靶点, 药物与疾病交集靶点 38 个。PPI 网络分析以及 GO 和 KEGG 通路富集分析得到 TP53、ESR1、AKT1、EGFR 等 10 个核心靶点, 分子功能主要为分子结合、催化活性等, 生物学进程主要为分子代谢、刺激反应等。免疫组织化学染色显示子芪抑瘤饮显著降低了 Ki67、TP53、ESR1 的表达 ($P < 0.05$)。**结论** 子芪抑瘤饮可能通过槲皮素、木犀草素、山柰酚等关键成分作用于 TP53、ESR1 等靶点抑制卵巢癌细胞增殖和耐药, 促进凋亡等。

关键词: 子芪抑瘤饮; 卵巢癌; 网络药理学

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2786-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.014

Potential mechanism of Ziqi Yiliu decoction for ovarian cancer based on animal experiment and network pharmacology

GENG Zi-xiang¹, LIU Ying², NIE Xiao-li³, JING Fang-yuan³, CHEN Hai-yang³, ZHANG Kai-yong⁴, LIU Peng⁴, YUAN Long⁴, LI Bing-rong⁴, LIU Te^{3*}, ZHANG Bi-meng^{4*} (1. *Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203*; 2. *Department of Dermatology, Central Hospital of Songjiang District, Shanghai 201699*; 3. *Shanghai Institute of Chinese Medicine for Geriatric, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200030*; 4. *Department of Acupuncture, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080*)

Abstract: Objective To explore the potential mechanism of Ziqi Yiliu decoction for ovarian cancer based on animal experiments and network pharmacology. **Methods** Animal experiments were conducted to observe the effect of Ziqi Yiliu decoction on subcutaneous tumorigenesis. HE staining was used to observe the morphological changes of the tumor. Gene set enrichment analysis was performed with the bioinformatics analysis. Immunohistochemical staining was used to detect the expression level of Ki67, TP53, ESR1, EGFR, and VEGFA. **Results** Ziqi Yiliu decoction significantly decreased the volume and mass of the ovarian cancer ($P < 0.05$), and reduced nuclear atypia and pathological nuclear division. Totally 154 active components, 283 potential targets and 38 drug and disease intersection targets of Ziqi Yiliu decoction were retrieved through the database. PPI network analysis and GO and KEGG pathway enrichment analysis showed that 10 core targets such as TP53, ESR1, AKT1 and EGFR were enriched in the cancer signaling pathways. The molecular functions mainly included molecular binding and catalytic

基金项目: 上海市科委中医引导类项目 (No.18401903100)。

作者简介: 耿子翔, 男, 博士, 主要从事生殖系统疾病与表观遗传学, email: gengzx@foxmail.com *通信作者: 张必萌, 男, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事中医药现代化研究, email: pjzhtiger08@aliyun.com; 刘特, 男, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事表观遗传学研究, email: 0721160004@mail.tongji.edu.cn

activity, and the biological processes were mainly molecular metabolism and stimulation responses. Immunohistochemical staining showed that Ziqi Yiliu decoction significantly decreased the expression of Ki67, TP53, and ESR1 ($P < 0.05$). **Conclusion** Ziqi Yiliu decoction is effective for ovarian cancer, whose mechanism is through the action of key components such as quercetin, luteolin and kaempferol on TP53, ESR1 and other targets to inhibit the proliferation and drug resistance, thus promoting apoptosis.

Key words: Ziqi Yiliu decoction; ovarian cancer; network pharmacology

卵巢癌是女性生殖系统最常见的三大癌症之一,是妇科癌症死亡的主要原因^[1]。卵巢癌主要由上皮癌、恶性生殖细胞肿瘤和索间质肿瘤组成。其中上皮癌占绝大多数^[2]。临床表现为早期症状外阴及下肢水肿、性激素紊乱引起的性早熟,月经失调或绝经后阴道流血、腰腹部疼痛、胃肠道症状,如腹胀、食欲不振等。晚期卵巢癌表现为肿瘤生长迅速,长到一定大小,超出盆腔外,腹部可扪及,短期内可有腹胀、腹水或肿块^[3]。目前卵巢癌的治疗以手术为主,辅以放化疗,但部分患者易复发并且产生耐药性^[4]。

近年来,中药复方、单体等中药对卵巢癌的治疗越来越多,并且取得了良好的效果^[5-6]。中药复方药是中华传统医药学的瑰宝,具有作用多、靶点多、毒副作用小、经济有效等优势^[7],在卵巢癌治疗方面具有广阔的发展前景。卵巢癌在中医中可归为“癥瘕”“积聚”“肠覃”范畴。治疗多以“不外攻邪、扶正两端”为总治则,活血化瘀、软坚散结为主,佐以理气或清热,辨证施治。临床实践中发现以沙苑子、枸杞子、女贞子、黄芪、甘草、半夏、葛根、黄芩、夏枯草、藤梨根、蛇莓、重楼为配伍的子芪抑瘤饮针对湿热瘀阻、正气不足之证的卵巢癌具有较好的治疗效果。研究表明,沙苑子、蛇莓、半夏可抑制肿瘤的血管生成^[8-10],枸杞具有抗炎作用^[11],女贞子、黄芪、葛根、黄芩、藤梨根、重楼可抑制肿瘤细胞增殖,诱导凋亡和自噬^[12-16],甘草和夏枯草可抑制肿瘤的迁移和浸润^[17-18]。

中药复方成分之间相互作用机制复杂,可通过多靶点多通路发挥治疗作用^[19]。网络药理学具有系统性和整体性的特点,被广泛用于筛选中药有效成分、阐释作用机制等^[20-21],对临床用药具有较大的指导意义。因此,本文采用网络药理学结合动物实验验证的方法,分析和探究子芪抑瘤饮治疗卵巢癌的作用靶点和通路,评价其治疗效果,并对网络药理学筛选的得到作用靶点进行验证。

1 材料与方法

1.1 主要材料

4~5 周龄 SPF 级 BALB/C 裸鼠,体质量 18~22 g[上海中医药大学实验动物中心,SYXK

(沪)-2020-0009]; 卵巢癌细胞株(SKVO3);多聚甲醛、二甲苯、苏木精-伊红染料、中性树脂(Sigma Aldrich, USA);沙苑子(10 g)、枸杞子(10 g)、女贞子(10 g)、黄芪(10 g)、甘草(10 g)、半夏(10 g)、葛根(10 g)、黄芩(5 g)、夏枯草(10 g)、藤梨根(10 g)、蛇莓(10 g)、重楼(10 g)(江阴天江药业有限公司);柠檬酸钠抗原修复液(P0081)、免疫染色封闭液(P0260-QuickBlock)、DAPI 染色液(C1006)(碧云天);荧光显微镜(Axioskop 40, Zeiss, Germany)。

1.2 移植模型的建立及给药

将处于对数生长期的卵巢癌细胞消化并用 PBS 溶液配制成 1×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,然后将 0.2 mL 的细胞悬液注射在 BALB/C 裸鼠右前腋下,在 2 周时选择皮下有明显肿瘤突起的建模成功的小鼠 20 只,分为对照组(WT, $n = 10$)和子芪抑瘤饮治疗组(Treatment, $n = 10$)。治疗组小鼠接受子芪抑瘤饮灌胃,剂量为 0.2 mL/只,每日 1 次,连续 30 d。

1.3 瘤体的尺寸和重量

使用直尺测量瘤体的大小(cm^3),体重秤测量瘤体的质量(g)并统计。

1.4 HE 染色

取新鲜肿瘤组织浸泡于 10% 甲醛溶液,常规进行脱水、透明、石蜡包埋并切片。使用二甲苯对肿瘤的石蜡切片进行脱蜡,乙醇水化后流水冲洗。经过苏木素浸泡、盐酸乙醇分化、氨水返蓝,伊红染色后,将切片脱水,透明,封片。

1.5 免疫组织化学染色

使用二甲苯对石蜡切片进行脱蜡,乙醇水化,然后用柠檬酸钠抗原修复液进行抗原修复过程。随后取出切片自然冷却至室温,用 PBS 清洗 5 min $\times$ 3 次。用含有 5% 山羊血清的封闭液室温封闭 30 min,用一抗(Ki67: ab15580, EGFR: ab52894, ESR1: ab32063, TP53: 240362, VEGFA: ab52917, 1:200) 4℃ 孵育过夜。PBS 清洗 10 min $\times$ 3 次后用二抗(ab6721, 1:1000) 37℃ 室温孵育 1 h, PBS 清洗 10 min $\times$ 3 次。最后滴加 DAPI 染色液,盖玻片封片后用正置荧光显微镜观察染色情况。

1.6 获取与筛选子芪抑瘤饮的活性成分

将子芪抑瘤饮的成分即沙苑子、枸杞子、女贞子、黄芪、甘草、半夏、葛根、黄芩、夏枯草、藤梨根、蛇莓、重楼输入中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP), 按照生物利用度 $OB \geq 30\%$, 类药性 $DL \geq 0.18$ 筛选活性成分。由于甘草的活性成分较多, 为了最大程度避免干扰和有效成分遗漏, 甘草按照生物利用度 $OB \geq 60\%$ ^[22], 类药性 $DL \geq 0.18$ 筛选。对未检索到的成分在网络药理学在线数据库 (TCMID) 重新检索并进行文献补充。

1.7 子芪抑瘤饮与卵巢癌靶点筛选

使用 TCMSP 数据库对子芪抑瘤饮的靶点基因进行筛选, 使用 Therapeutic Target Database (<http://db.idrblab.net/ttd/>) 数据库和 DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) 数据库对卵巢癌靶点基因进行筛选。取子芪抑瘤饮和卵巢癌的靶点基因交集并使用 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 将获得的靶点进行基因标准化处理。

1.8 “药物 - 成分 - 靶点 - 疾病”网络构建

利用 Cytoscape 3.7.1 软件构建“子芪抑瘤饮 - 活性成分 - 靶点 - 卵巢癌”网络模型。

1.9 蛋白质 - 蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建

将得到的子芪抑瘤饮和卵巢癌的共同靶点上传至 STRING 数据库 (<http://string-db.org>), 物种定义为“Homo sapiens”, 以构建子芪抑瘤饮治疗卵巢癌的核心靶点 PPI 网络, 再将以上所得数据导入至 Cytoscape 3.7.2 中, 利用“Network Analyze”从而进行网络拓扑的参数分析。

1.10 基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析

使用 CTD (<http://ctdbase.org/>) 数据库导入核心靶点, 依次选择“Enriched GO functional annotations”和“Enriched pathways”进行 GO 生物过程的富集分析和 KEGG 通路分析, 设置筛选标准为 $P \leq 0.01$, 得到符合条件的前 10 条生物过程和 KEGG 通路。

1.11 统计方法

采用 SPSS 21.0 进行数据的统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验, $P < 0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 子芪抑瘤饮对卵巢癌小鼠的治疗作用

造模成功后, 移植瘤体外观呈乳白色, 表面可见部分血管, 质稍硬。子芪抑瘤饮灌胃治疗 30 d 后, 卵巢癌移植瘤体积和质量显著减小 (见图 1A、B、C, $P < 0.05$)。HE 染色可见对照组瘤体内腺体形态不规则, 上皮细胞异型性和病理性核分裂象易见 (黑色方框内), 而子芪抑瘤饮治疗后

上述表现明显减少 (见图 1D)。对瘤体切片进行免疫组织化学染色, 治疗组 Ki67 表达显著降低 (见图 1E, $P < 0.05$)。上述结果证明, 子芪抑瘤饮对卵巢癌具有良好的治疗作用。

2.2 子芪抑瘤饮治疗卵巢癌的网络药理学分析

网络药理学分析结果表明, 子芪抑瘤饮的有效活性成分共 154 个, 活性成分靶点共 283 个, 与卵巢癌靶点取交集并去重后得到 38 个靶点。“子芪抑瘤饮 - 成分 - 靶点 - 卵巢癌”网络图包括 143 个节点 (12 种中药, 91 种成分, 38 个靶点) 和 521 条边 (见图 2), 用度值的大小代表该节点在网络中的重要性, 接近中心度的大小表示节点在网络中的中心度。在互作网络中, 度值和接近中心度最大的中药是黄芪 (度值 = 29, 接近中心度 = 0.39) 和甘草 (度值 = 24, 接近中心度 = 0.36), 度值和接近中心度最大的成分和靶点参见表 1。

表 1 拓扑结构信息

Tab 1 Topology information

名称	接近中心度	度值
PTGS2	0.636 771	79
PTGS1	0.544 061	60
AR	0.512 635	52
ESR2	0.484 642	46
槲皮素	0.518 248	33
CHEK1	0.421 365	26
木犀草素	0.449 367	17
山柰酚	0.449 367	16
β -谷甾醇	0.455 128	16
KCNH2	0.404 558	15
异黄酮	0.440 994	11
汉黄芩素	0.432 927	10
黄芩素	0.432 927	10
shinpterocarpin	0.430 303	8
7-O-methylisomucronulatol	0.430 303	8
异鼠李素	0.430 303	8
MAP2	0.389 041	8
GSK3B	0.384 824	8
BCL2	0.384 824	8
TP53	0.380 697	7

2.3 靶点 PPI 网络构建与分析

将 38 个共有靶点上传至 STRING 在线数据库, 导出 TSV 文本, 利用 Cytoscape 3.7.2 软件构建可视化 PPI 网络, 共 38 个节点, 258 条边。网络拓扑学分析后, 将靶点以度值为条件排序, 排名前 10 的靶点为: TP53、ESR1、AKT1、EGFR、VEGFA、ERBB2、PTGS2、AR、MAPK8、ABCG2 (见图 3)。

2.4 GO 和 KEGG 富集分析结果

将上述共同靶点导入 CTD 数据库, 即可得到生物过程 (BP)、细胞成分 (CC)、分子功

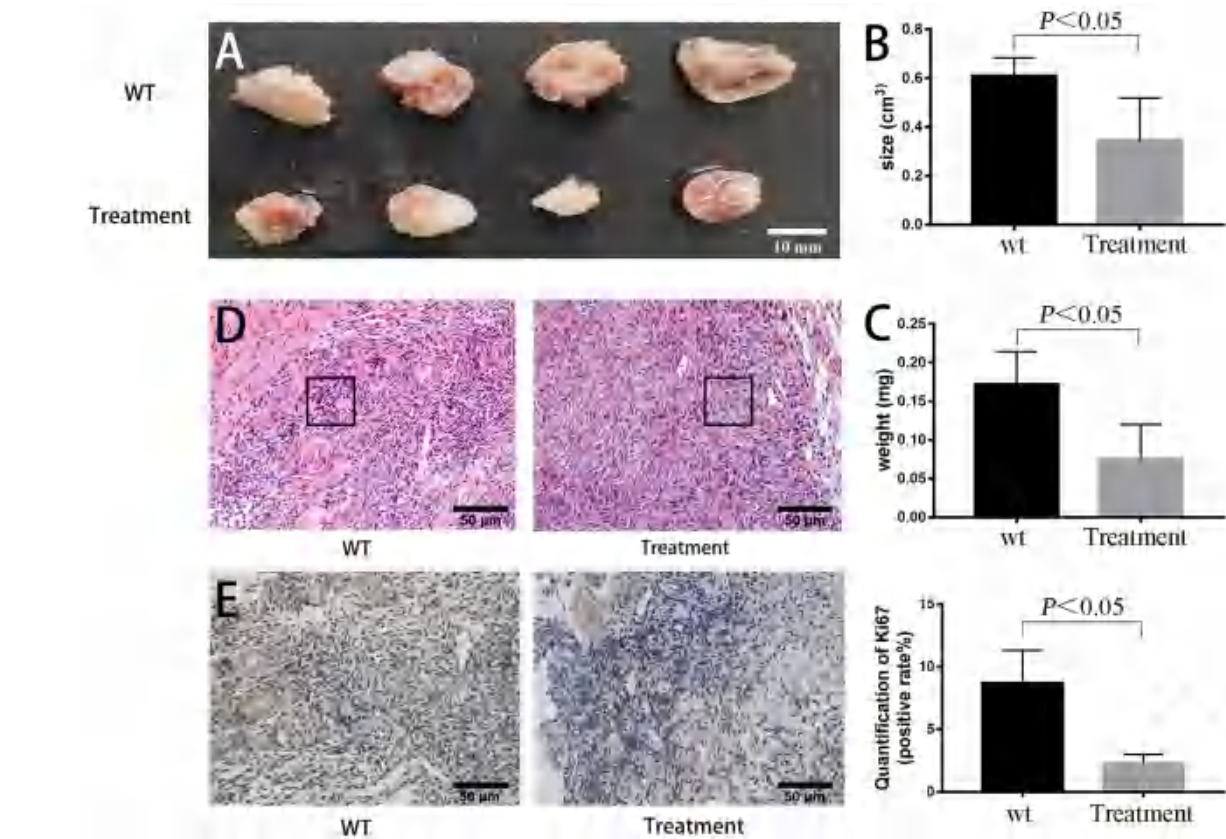


Fig 1 Effect of Ziqi Yiliu decoction on ovarian cancer

A、B. 肿瘤尺寸 (tumor size); C. 肿瘤质量 (tumor mass); D. HE 染色 (HE staining); E. Ki67 的蛋白表达水平 (expression level of Ki67 protein)

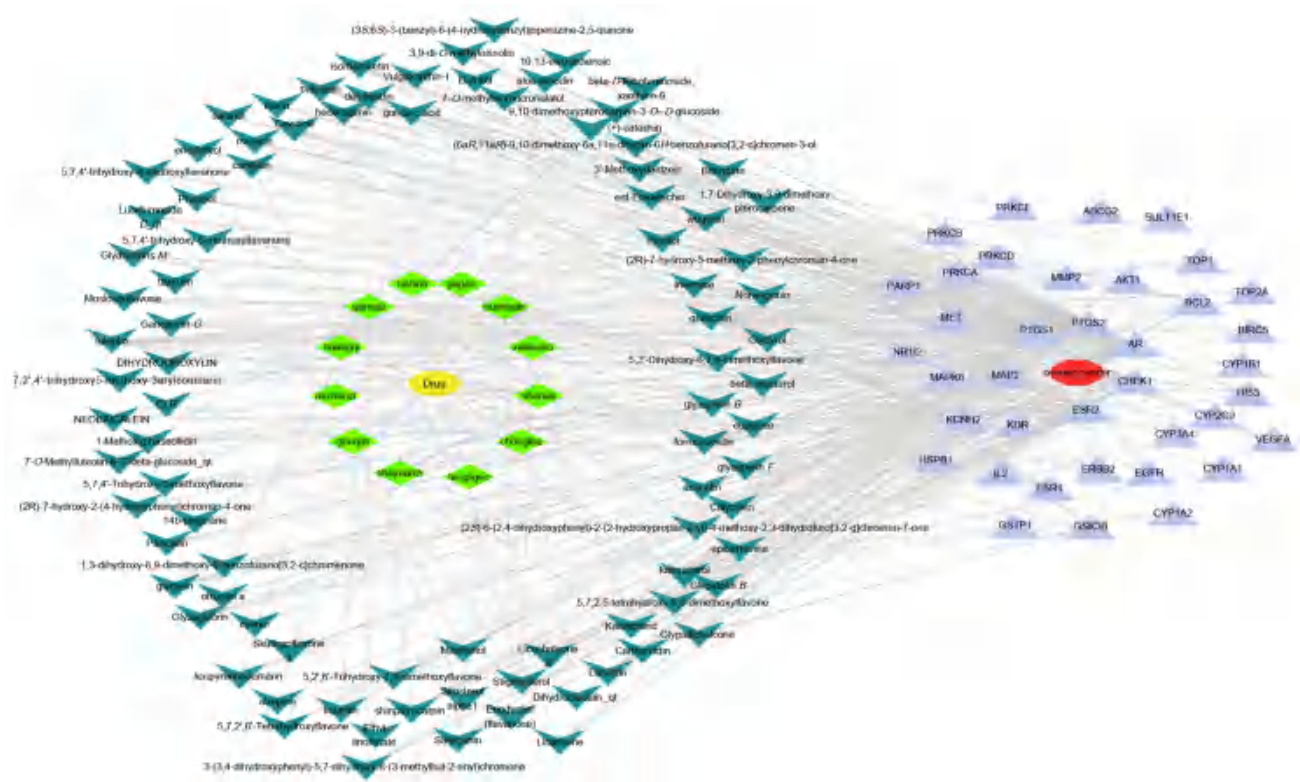


Fig 2 Network diagram of “Ziqi Yiliu decoction-ingredients-targets-ovarian cancer”

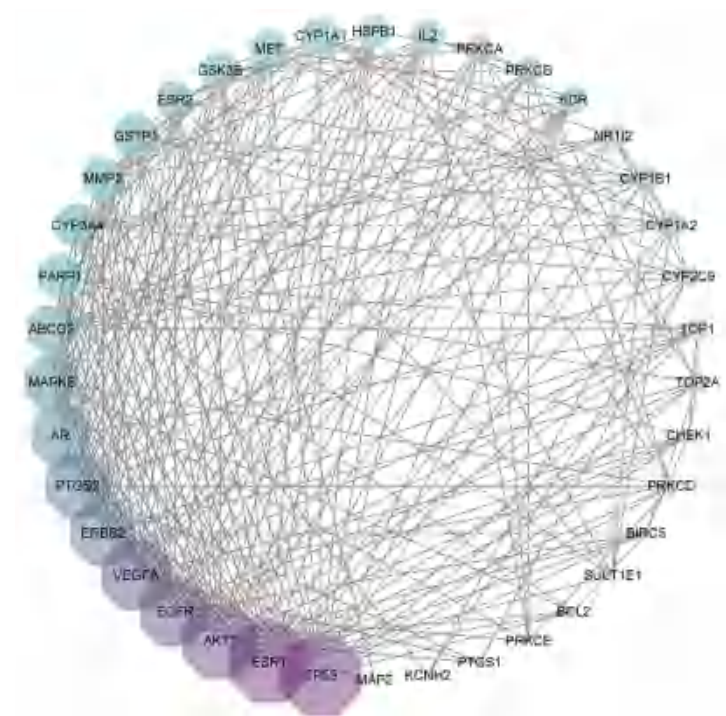


图3 共有靶点 PPI 网络图

Fig 3 PPI network diagram of common targets

能 (MF) 以及 KEGG 信号通路富集信息。设置 $P \leq 0.01$ 作为筛选条件, 取 P 值最小的前 10 个条目。结果发现子芪抑瘤饮治疗卵巢癌的潜在靶点可能跟分子结合、催化活性、蛋白激酶等分子功能和分子代谢、刺激反应、生物调控等生物过程存在密切联系 (见图 4A、B、C)。设置 $P \leq 0.01$ 作为筛选条件, 取 P 最小的前 20 个条目得到 KEGG 富集信息。结果发现子芪抑瘤饮治疗卵巢癌的潜在靶点可能跟癌症通路, miRNA、黏着斑、蛋白多糖、PI3K-Akt 信号通路, EGFR 酪氨酸激酶抑制反应等密切相关。其中癌症通路富集的靶点最多 (见图 4D)。

2.5 潜在靶点验证

免疫组织化学染色结果显示, 子芪抑瘤饮治疗后, EGFR 和 VEGFA 阳性率无明显差异 ($P > 0.05$), ESR1 和 TP53 阳性率明显下降 ($P < 0.05$) (见图 5)。

3 讨论

卵巢癌的中医病因病机为正气虚弱, 邪毒内侵, 或七情不遂、房事不慎、饮食内伤, 致脏腑功能失调, 气机阻滞, 血瘀、痰湿、热毒等有形之邪积聚于冲任胞宫而成^[23]。因此, 治疗时以“不外攻邪、扶正两端”为总治则, 根据患者体质强弱, 病程长短, 酌用攻补。子芪抑瘤饮组方遵循“七情配伍”原则, 方中沙苑子、枸杞子、女贞子补肝益肾, 益精血; 黄芪性味甘温, 补脾肺之气, 以实卫气, 固肌表; 黄芩性味苦寒, 常

与半夏配伍, 可清热燥湿, 化痰; 与葛根搭配, 可清湿热, 常用来治疗湿泻痢; 重楼、夏枯草性味苦寒, 可清热解毒, 消肿散结止痛; 蛇莓、藤梨根性味寒凉, 搭配使用以清热解毒, 凉血消肿; 甘草甘温益气, 配黄芪可加强益气补中之力, 又能调和诸药。现代研究中, 半夏、重楼、藤梨根和蛇莓均具有抗癌作用^[9, 24-26]。本方攻补兼施, 主治湿热瘀阻、正气不足之证, 治以清热解毒, 散结消肿, 扶正祛邪。

本研究首先对子芪抑瘤饮的治疗作用进行体内验证, 结果发现子芪抑瘤饮可以抑制卵巢癌瘤体的生长, 其体积和质量都明显减小; 且可显著降低 Ki67 的表达。Ki67 是肿瘤细胞增殖的活跃程度标志物, 其低表达表明子芪抑瘤饮可以抑制卵巢癌的增殖。虽然子芪抑瘤饮的治疗效果已得到充分证实, 但其发挥作用的活性成分及机制尚不清楚。因此我们利用网络药理学技术, 筛选鉴别出了子芪抑瘤饮的 154 个活性成分, 其中活性成分度值较高的是槲皮素、木犀草素、山柰酚、 β -谷甾醇、异黄酮等。最新研究表明, 槲皮素可以通过激活 JAK2/STAT3 信号传导通路明显抑制人卵巢癌细胞增殖, 促进其凋亡^[27]。木犀草素可能通过抑制 AKT/STAT3 通路, 进而抑制卵巢癌细胞增殖及侵袭、迁移能力^[28]。山柰酚可以通过促使肿瘤细胞内活性氧的生成, 干扰肿瘤细胞周期, 诱导细胞发生不同途径的凋亡; 山柰酚还可以抑制肿瘤细胞迁移侵袭以及血管生成, 协同提

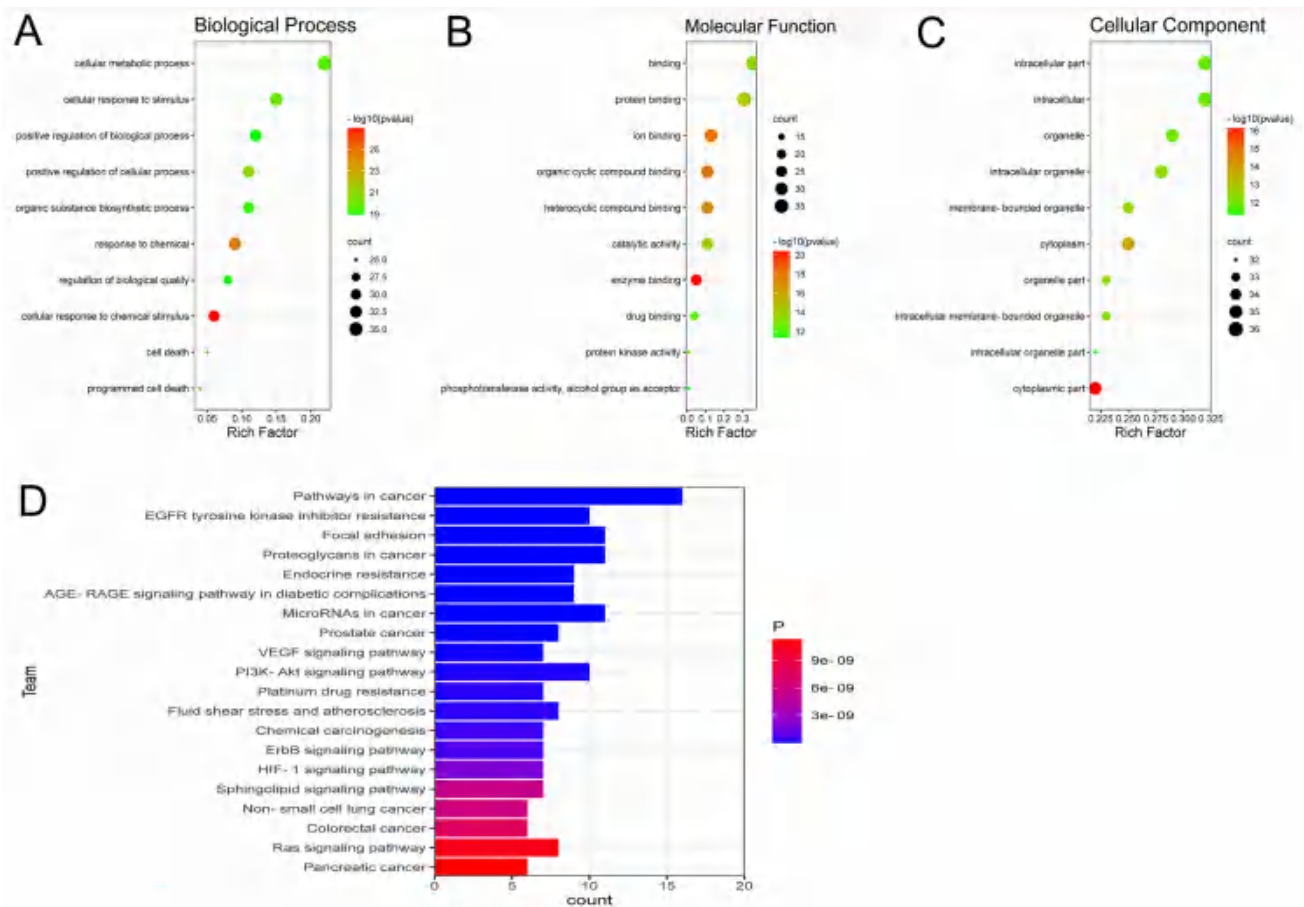


图 4 靶点的富集分析

Fig 4 Enrichment analysis of targets

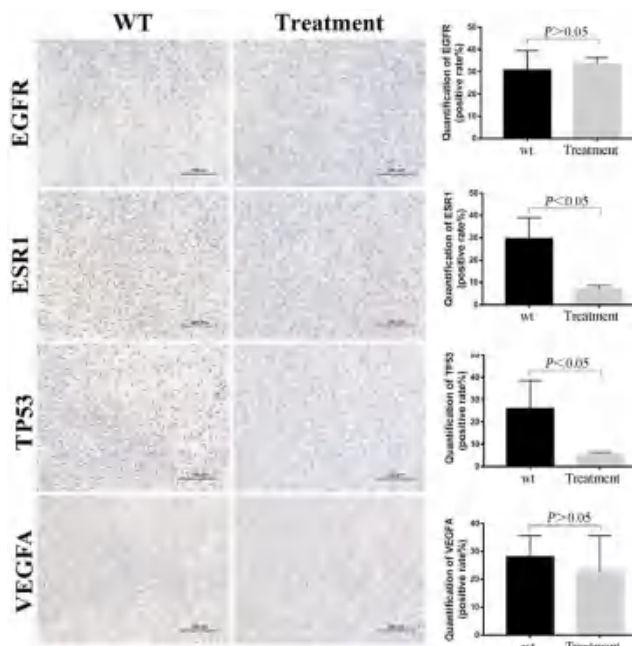


图 5 潜在靶点验证

Fig 5 Validation of potential targets

高化疗药物疗效、减少不良反应^[29]。由此可见，子芪抑瘤饮中具有多种抗肿瘤作用显著的活性成分，而这几种活性成分可能是子芪抑瘤饮发挥治

疗作用的主要药效成分。

PPI结果表明，经筛选得到的主要靶点有 TP53、ESR1、AKT1、VEGFA、EGFR 等，KEGG 和 GO 分析也证明这些靶点主要与癌症的多种通路相关。卵巢癌患者在治疗过程中往往出现耐药的情况，而促凋亡和抗凋亡途径的失调是导致化疗耐药的重要因素。在卵巢癌中，关键的凋亡调节因子包括 TP53、AKT 家族等，这些基因的失调在诱导卵巢癌产生耐药中具有关键作用^[30]。此外，雌激素受体也在耐药中发挥了重要作用^[31]。而 ESR1 作为雌激素受体家族的一员，其高表达大大促进了肿瘤细胞的增殖和耐药。免疫组织化学染色结果表明，子芪抑瘤饮可明显抑制突变型 TP53 和 ESR1 的表达，从而达到促凋亡和抗耐药效果。血管生成是卵巢癌生长的关键要求^[32]。一系列生长因子刺激和驱动“血管生成开关”，促进实体瘤内的血管发育^[33-34]。其中，血管内皮生长因子（VEGF）是最有效性的促血管生长因子^[35]。EGFR 和 VEGFA 是 VEGF 家族中最常见的类型，能够刺激内皮细胞增殖，并且具有很强的血管渗透性，可以通过增加小静脉血管的渗透性促使血管壁出现渗漏^[35-37]。但在本研

究的实验验证中, 子芪抑瘤饮并没有明显降低 EGFR 家族的表达。由此可见, 子芪抑瘤饮主要是在抗肿瘤耐药和促凋亡方面具有关键作用, 这为卵巢癌的治疗提供了新的方向。

综上, 本研究证明了子芪抑瘤饮对卵巢癌有良好的治疗作用, 通过网络药理学对子芪抑瘤饮的有效成分进行了分析并对其治疗机制进行了系统的研究, 为卵巢癌的治疗提供了新思路。但因网络药理学的局限性, 本研究不能完全阐述其详尽的机制, 还需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Kossai M, Leary A, Scoazec JY, et al. Ovarian cancer: a heterogeneous disease [J]. *Pathobiology*, 2018, 85 (1-2): 41-49.
- [2] Terraneo N, Jacob F, DubrovskAA, et al. Novel therapeutic strategies for ovarian cancer stem cells [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 319.
- [3] 江杨清. 中西医结合临床内科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 280-228.
- [4] Lheureux S, Gourley C, Vergote I, et al. Epithelial ovarian cancer [J]. *Lancet*, 2019, 393 (10177): 1240-1253.
- [5] 陈仔颖, 洪金妮, 陈捷. 活血化痰中药治疗血瘀证卵巢癌的研究进展 [J]. *中医药临床杂志*, 2021, 33 (7): 1394-1397.
- [6] 文敏, 周欣, 赵超, 等. 中药抗卵巢癌作用及机制研究新进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2021, 33 (3): 521-533.
- [7] 朱元章, 张贵彪, 朱国福. 中药复方抗肿瘤机制研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23 (16): 227-234.
- [8] 于猛, 热增才旦, 杨科, 等. 沙苑子苷 A 通过抑制血管生成抗肿瘤作用研究 [J]. *药物评价研究*, 2020, 43 (1): 21-26.
- [9] 李森, 安红梅, 沈克平, 等. 蛇莓抗肿瘤作用及临床应用 [J]. *世界中医药*, 2019, 14 (2): 505-509.
- [10] 王恒, 于森, 李伟楠, 等. 半夏化学成分及抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. *中医药导报*, 2021, 27 (8): 49-52.
- [11] 刘婷, 丁艳, 杨婷婷, 等. 鲜枸杞子提取物通过 p38 MAPK 信号通路抑制人肝癌细胞 HepG2 诱导小鼠恶病质的作用及机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25 (9): 89-94.
- [12] 陈晓霞, 路晓庆, 刘向荣, 等. 女贞子-黄芪抗胃癌研究及作用机制的探讨 [J]. *中国药物与临床*, 2021, 21 (23): 3801-3804.
- [13] 胡亚丽, 范玉宏, 杨杰, 等. 葛根素对肝癌细胞增殖、凋亡及对铂类敏感性的影响 [J]. *山东医药*, 2021, 61 (22): 27-31.
- [14] 曾小虎, 王莹莹, 李瑞琴. 黄芩苷抗肿瘤机制研究进展 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2021, 23 (12): 4699-4710.
- [15] 杨子华, 杨斐然, 张薇. 中药藤梨根有效成分及其抗肿瘤作用研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39 (6): 204-208.
- [16] 聂琴, 谭君, 陈乾, 等. 重楼皂苷化学成分及抗肿瘤作用研究进展 [J]. *肿瘤药学*, 2022, 12 (3): 337-343.
- [17] 连小龙, 令颖, 张尚龙, 等. 甘草有效成分抗肿瘤作用机制及联合抗肿瘤研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28 (11): 238-245.
- [18] 赵一丹, 杨静. 夏枯草主要化学成分抗肺癌作用机制研究进展 [J]. *医学信息*, 2022, 35 (9): 42-45.
- [19] 任艳, 邓燕君, 马焰彬, 等. 网络药理学在中药领域的研究进展及面临的挑战 [J]. *中草药*, 2020, 51 (18): 4789-4797.
- [20] Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4 (11): 682-690.
- [21] 孟凡翠, 汤立达. 中药网络药理学研究中存在的问题与发展展望 [J]. *中草药*, 2020, 51 (8): 2232-2237.
- [22] 潘国凤, 罗然, 吕文英, 等. 基于网络药理学养阴清肺口服液对肺损伤的保护作用及机制研究 [J]. *中药药理与临床*, 2018, 34 (1): 19-24.
- [23] 罗颂平. 中医妇科学 [J]. 北京: 高等教育出版社, 2008: 229-230.
- [24] 钱芳芳, 阙祖俊, 田建辉. 重楼皂苷的抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. *癌症进展*, 2018, 16 (14): 1709-1712.
- [25] 王银辉, 罗丽华, 冉瑞智, 等. 藤梨根制剂对卵巢癌细胞株 A2780 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 表达的影响 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2018, 17 (18): 1937-1941.
- [26] 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.
- [27] 周学敏. 槲皮素对人卵巢癌细胞 -3 增殖和凋亡的影响 [J]. *中医学报*, 2016, 31 (7): 931-936.
- [28] 惠雪莲, 舒瑾, 李俊玲, 等. 木犀草素对人卵巢癌 A2780 细胞增殖、迁移及 AKT/STAT3 通路的影响 [J]. *热带医学杂志*, 2020, 20 (10): 1292-1295.
- [29] 钟文良, 熊雨, 王贤文, 等. 山奈酚抗肿瘤效应与机制研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27 (20): 219-226.
- [30] Quintanal-Villalonga A, Chan JM, Yu HA, et al. Lineage plasticity in cancer: a shared pathway of therapeutic resistance [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17 (6): 360-371.
- [31] Andruska ND, Zheng X, Yang X, et al. Estrogen receptor alpha inhibitor activates the unfolded protein response, blocks protein synthesis, and induces tumor regression [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112 (15): 4737-4742.
- [32] Jayson GC, Kerbel R, Ellis LM, et al. Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions [J]. *Lancet*, 2016, 388 (10043): 518-529.
- [33] Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis [J]. *Semin Cancer Biol*, 2009, 19 (5): 329-337.
- [34] Burger RA. Overview of anti-angiogenic agents in development for ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2011, 121 (1): 230-238.
- [35] Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis [J]. *Nature*, 2011, 473 (7347): 298-307.
- [36] Kajal K, Panda AK, Bhat J, et al. Andrographolide binds to ATP-binding pocket of VEGFR2 to impede VEGFA-mediated tumor-angiogenesis [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 4073.
- [37] Bizzaro F, Nerini FI, Taylor MA, et al. VEGF pathway inhibition potentiates PARP inhibitor efficacy in ovarian cancer independent of BRCA status [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14 (1): 186.

(收稿日期: 2022-03-13; 修回日期: 2022-09-14)

黄芪甲苷纳米结构脂质载体的制备及其对肺癌作用的体内外研究

陈敏燕, 原永芳, 吴飞华, 王蓉, 杨刚* (上海交通大学医学院附属第九人民医院药剂科, 上海 200011)

摘要: **目的** 制备黄芪甲苷 (AST) 纳米结构脂质载体 (AST-NLCs), 探讨 AST 对髓源抑制性细胞 (MDSCs) 和 A549 肺癌细胞的生长抑制作用及对荷瘤鼠的抗肿瘤药效。**方法** 采用高压均质法, 以粒径和分散指数 (PDI) 为指标进行单因素实验, 考察分散功率、分散时间、均质压力以及均质次数对 AST-NLCs 粒径的影响从而筛选得到最佳工艺条件, 同时评价 AST-NLCs 的体外溶出行为。采用 CCK-8 法比较 AST 和 AST-NLCs 对 MDSCs 和 A549 细胞的抑制作用。建立 A549 BALB/c 荷瘤小鼠模型, 研究 AST-NLCs 对 A549 荷瘤小鼠的体内抗肿瘤作用。最后通过病理切片检查, 考察制剂的静脉刺激性。**结果** 优化所得 AST-NLCs 的粒径为 (136.7 ± 5.2) nm, PDI 为 (0.162 ± 0.009) , Zeta 电位为 (-21.2 ± 0.7) mV, 包封率和载药量分别达到 $(83.5 \pm 1.57)\%$ 和 $(12.8 \pm 0.89)\%$ 。同 AST 原药粉比较, AST-NLCs 的体外溶出明显提高。CCK-8 测定结果显示 AST-NLCs 对 MDSCs 和 A549 细胞生长具有显著地抑制作用, 在 A549 荷瘤鼠的体内实验中, AST-NLCs 的抑瘤效果也显著高于 AST 组。组织病理切片的观察结果显示, AST 组存在明显的静脉刺激性, NLCs 能够降低 AST 静脉刺激性。**结论** 高压均质法制备的 AST-NLCs 粒径大小分布均匀, 药物包封率高, 能显著提高药物的体外溶出度且具有明显的缓释效果, 在血浆中能稳定存在。AST-NLCs 能够通过抑制 MDSCs 和 A549 细胞达到抗肿瘤作用, 抑瘤效果优于 AST, 且降低了 AST 的静脉刺激性。

关键词: 黄芪甲苷; 纳米结构脂质载体; 体外溶出; 肿瘤抑制

中图分类号: R283, R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2022)12-2793-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.015

Preparation of astragaloside-loaded nanostructured lipid carriers and their effects on lung cancer in vitro and in vivo

CHEN Min-yan, YUAN Yong-fang, WU Fei-hua, WANG Rong, YANG Gang* (Department of Pharmacy, the Ninth People's Hospital Affiliated to Medical School of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200011)

Abstract: Objective To prepare astragaloside-loaded nanostructured lipid carriers (AST-NLCs) and investigate their inhibitory effect on the growth of myeloid derived suppressor cells (MDSCs) and lung cancer A549 cells and the anti-tumor effect on tumor-bearing mice. **Methods** The hot melting high-pressure homogenization method was used to conduct single-factor experiments with particle size and polydispersity index (PDI) as indicators to determine the effect of stirring power, stirring time, homogeneous pressure and cycle times on the particle size to screen the best process conditions. The dissolution behavior of AST-NLCs was evaluated in vitro. The effects of AST and AST-NLCs on MDSCs and A549 cells were compared by CCK-8 assay. A549 BALB/c tumor-bearing mice model was established and the anti-tumor effect of AST-NLCs on A549 tumor-bearing mice in vivo was determine. Finally, the venous irritation of the preparation was measured by pathological section examination. **Results** The optimized particle size of AST-NLCs was (136.7 ± 5.2) nm, the PDI was (0.162 ± 0.009) , the Zeta potential was (-21.2 ± 0.7) mV, and the entrapment efficiency and drug

基金项目: 上海市青年科技英才扬帆计划 (No.20YF1424000)。

作者简介: 陈敏燕, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事医院制剂研究, email: mychen1983@163.com *通信作者: 杨刚, 男, 博士, 主管药师, 主要从事新制剂和医院制剂研究, email: yanggangws@163.com

loading were $(83.5 \pm 1.57)\%$ and $(12.8 \pm 0.89)\%$, respectively. As compared with AST powder, AST-NLCs improved drug dissolution in vitro significantly. CCK-8 data showed that AST-NLCs significantly inhibited the growth of MDSCs and A549 cells. In the in vivo experiments on A549 tumor-bearing mice, the antitumor effect of AST-NLCs was also significantly higher than that of AST. Histopathological section showed that the AST group had obvious venous irritation, but NLCs reduced the AST venous irritation. **Conclusion** The particle size of GPS-NLCs prepared by high pressure homogenization is uniform, with high drug encapsulation efficiency. The in vitro dissolution rate of the drug is significantly improved with obvious sustained release effect. It is stable in the plasma. AST-NLCs achieve the anti-tumor effect via inhibiting MDSCs and A549 cells and the effect is better than that of AST. It also reduces the venous irritation of AST.

Key words: astragaloside; nanostructured lipid carrier; in vitro dissolution; tumor inhibition

肺癌是当今世界上发病率及病死率最高的恶性肿瘤之一,其中以非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)为多见^[1]。与其他恶性肿瘤相比,非小细胞肺癌的五年生存率较低。目前,非小细胞肺癌治疗手段包括手术、化疗、免疫治疗、放疗和靶向治疗等^[2]。虽然标准治疗方案在不断改进,但患者总体生存率较低,治疗效果仍不理想。其中,耐药性的产生成为导致治疗失败和患者死亡的主要原因^[3]。肿瘤微环境的动态变化、异质性等特点在药物治疗耐药中发挥着重要作用。肿瘤细胞可以募集大量免疫抑制性细胞形成免疫抑制微环境,削弱细胞毒性T细胞(cytotoxic T lymphocytes, CTLs)的细胞毒作用^[4]。其中,髓源抑制性细胞(myeloid derived suppressor cells, MDSCs)是造成机体免疫耐受的主要细胞之一,同时也是诱导肿瘤细胞耐药的重要因素^[5]。因此,探求新的更有效的治疗方法具有重要意义。

现代药理研究证实,扶正类中药黄芪可通过改善肿瘤微环境的免疫抑制状态,发挥抗肿瘤作用^[6-7]。黄芪甲苷(astragaloside, AST)是黄芪药效物质基础,是其免疫活性最强的一类物质。有研究表明^[8-9]:AST对肝癌细胞、胃癌细胞和肺癌细胞等均有明显的抑制作用,同时能通过抑制肿瘤浸润MDSCs,阻断免疫耐受通路,增强T淋巴细胞活性,发挥抗肿瘤作用。然而AST水溶性差、脂溶性低,而且作为皂苷类化合物在静脉注射时存在血管刺激性^[10]。

纳米结构脂质载体(nanostructured lipid carriers, NLCs)是第二代脂质纳米载体系统,在继承传统纳米粒能增加难溶性药物的溶解度、降低药物刺激性、延长药物在体内滞留时间等优点的同时,通过向固体脂质加入与其空间上不相容的液体脂质,使药物以结晶缺陷型或无定型结构存

在,增加了对药物分子的包容性,提高药物的载药量^[11]。

因此本研究制备了能够静脉给药的黄芪甲苷纳米结构脂质载体(astragaloside-loaded nanostructured lipid carriers, AST-NLCs),探讨AST-NLCs对肺癌A549荷瘤鼠的抑瘤效果,为AST的临床抗肿瘤应用提供参考。

1 仪器与试药

Agilent 1260 infinity 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);RC-806 溶出度仪(天津因赛科技发展有限公司);NS1001L 高压均质机(意大利GEA NiroSoavi公司);Nano ZS 90 激光粒度仪(英国Malvern公司);Synergy HT 酶标仪(美国Biotek公司);T25 高度分散仪(德国IKA公司);细胞恒温培养箱(美国Thermo Fisher公司)。

AST原料药(纯度 $\geq 99\%$,批号:170614,成都瑞芬思生物科技有限公司);单硬脂酸甘油酯(GMS,国药集团药业股份有限公司);Glycerylmonolinoleate (Maisine 35-1,法国Gattefossé公司);Oleoylmacroglycerides (Labrafil M1944 CS,法国Gattefossé公司);大豆磷脂(Lipoid S 100,德国Lipoid公司);吐温-80(Tween-80,美国Sigma公司);胎牛血清(美国Gibco公司);磷酸盐缓冲溶液(PBS,江苏凯基生物股份有限公司);乙腈(色谱级,德国Merck公司);其余试剂均为分析纯。

A549细胞(江苏凯基生物科技股份有限公司);SPF级BALB/c雌鼠, (18 ± 2) g;SPF级新西兰兔, (3 ± 0.3) kg[上海交通大学医学院附属第九人民医院实验动物中心,许可证编号:SYCK(沪)2015-0016],在实验动物中心标准条件下饲养,每日光照12h,温度 $(22 \pm 2)^{\circ}\text{C}$,湿度50%~60%,自由饮水和进食。

2 方法与结果

2.1 AST-NLCs 的制备

采用高压均质法制备 AST-NLCs。将处方量的混合脂质（固体脂质为 GMS、液态脂质为 Maisine 35-1 和 Labrafil M1944 CS）水浴加热至 68 ℃，搅拌条件下充分混合熔融得到油相；将处方量的 AST、乳化剂（大豆磷脂与 Tween-80 混合物）置于烧杯中混合后，加适量蒸馏水搅拌溶解，并加热至油相的温度得到水相。在 T25 高度分散仪高速分散下，将水相加入到油相中，持续搅拌一段时间，得到初分散体系，再经高压乳匀，即得 AST-NLCs。

以粒径和多分散系数（PDI）为指标，对 T25 高度分散仪的分散功率（W）、分散时间（min）、均质压力（bar）以及均质次数这 4 个参数进行筛选。

由图 1 可知，随着分散功率、分散时间、均质压力以及均质次数的增加，AST-NLCs 的粒径和 PDI 呈先减小后增大的趋势。增大的原因可能是由于随着分散功率、分散时间、均质压力以及均质次数的进一步增加，体系温度也在逐渐升高，从而导致 NLCs 的稳定性下降而发生了团聚^[12]。高压均质后采用冰浴冷却的方法能够大大减小所得 NLCs 的粒径及 PDI，增加样品放置的稳定性。故最终确定最佳工艺参数为：分散功率 6000 W；分散时间 6 min；均质压力 600 bar；循环次数 6 次，高压均质后冰浴骤冷处理。

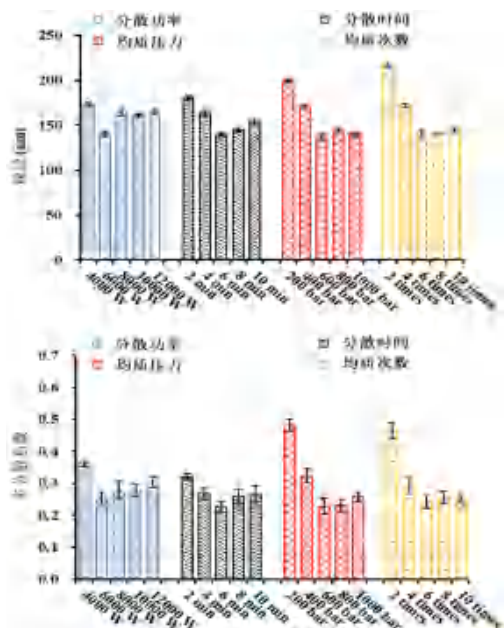


图 1 高压均质法制备工艺参数优化

Fig 1 Effect of optimization of the process parameters of high-pressure homogenization method

最终按照最佳工艺条件制备得到 AST-NLCs，采用动态光散射法测得平均粒径为 (136.7 ± 5.2)

nm，PDI 值为 (0.162 ± 0.009) （见图 2）。同时，测得其 Zeta 电位为 (-21.2 ± 0.7) mV。

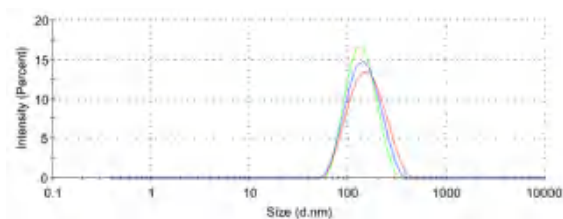


图 2 AST-NLCs 的粒径分布

Fig 2 Particle size distribution of AST-NLCs

2.2 透射电子显微镜（TEM）分析

取制备的 AST-NLCs 用蒸馏水稀释分散后，采用悬滴法滴加在 200 ~ 400 目铜网上，室温干燥后，透射电子显微镜观测其粒子形态，电压为 200 kV。AST-NLCs 的 TEM 观察结果见图 3。纳米粒近球形，分布较均匀，同时可见 NLCs 表面形成的乳化剂光圈。



图 3 AST-NLCs 透射电镜图

Fig 3 Transmission electron micrograph of AST-NLCs

2.3 包封率（EE）和载药量（DL）测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil Plus C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)；流动相乙腈 - 水 (35 : 65)；检测波长 203 nm，流速 1.0 mL · min⁻¹；柱温 30 ℃；进样量 20 μL。

2.3.2 标准曲线的建立 精密称取 AST 对照品 10 mg，甲醇溶解并定容到 50 mL 量瓶中，得到 200 μg · mL⁻¹ AST 母液，用甲醇稀释得到 150、90、60、30、10、12、2 μg · mL⁻¹ AST 对照品溶液，进样测定，记录峰面积。以 AST 峰面积 (*A*) 对质量浓度 (*C*) 进行线性拟合，得回归方程 $A = 2.58 \times 10^4 C + 4.09 \times 10^3$ ($r = 0.9999$)，表明 AST 在 2 ~ 150 μg · mL⁻¹ 与峰面积线性关系良好。

2.3.3 AST-NLCs 包封率和载药量测定 采用超滤法测定 AST-NLCs 的 EE 及 DL。精密移取 0.5 mL 制得的 AST-NLCs 混悬液，加入适量甲醇破乳，超声 30 min 后经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，HPLC 测定 AST 浓度，计算总药量 W_{total} 。另取 0.5 mL AST-NLCs 于超滤离心管中（截留分子量 10 kDa，Pall Corporation，美国），5000 r · min⁻¹ 离心 15 min，

取滤液,经 HPLC 测定,计算游离指标性成分的含量 W_{free} 。参照下列公式分别计算 EE 和 DL :

$$EE(\%) = (W_{\text{total}} - W_{\text{free}}) / W_{\text{total}} \times 100\%$$

$$DL(\%) = (W_{\text{total}} - W_{\text{free}}) / W_{\text{lipids}} \times 100\%$$

式中 W_{total} 为总药量; W_{free} 为游离药量; W_{lipids} 为制剂中加入的脂质材料总量。最终测得 AST-NLCs 包封率和载药量分别为 $(83.5 \pm 1.57)\%$ 和 $(12.8 \pm 0.89)\%$ ($n = 3$),表明 NLCs 对药物有较好的包裹和装载能力。

2.4 血浆稳定性考察

取新鲜抗凝大鼠血液 10 mL, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,得到的血浆储存在 -20°C 冰箱备用。实验前将血浆在室温下解冻,离心除去蛋白沉淀。取适量血浆,在 37°C 条件下水浴 10 min 来平衡介质温度,随后将 AST-NLCs 加到血浆中孵育 2、4、8、12 h,保持温度为 37°C ,振摇速度为 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。采用马尔文粒径仪测定粒径,比较放置前后 AST-NLCs 的粒径和 PDI 变化。

对于静脉注射用的纳米粒分散系统,控制粒子大小,避免纳米粒的聚集变大,保持其稳定性十分重要。结果如图 4 所示,与血浆孵育后,在 12 h 的考察时间内,AST-NLCs 粒径和 PDI 变化较小,稳定性良好。

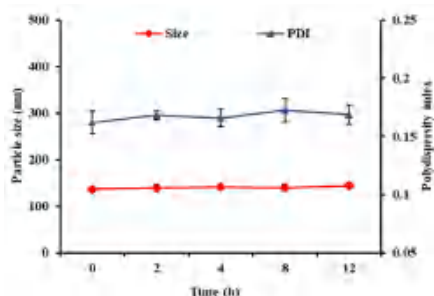


图 4 AST-NLCs 在血浆中孵育 (37°C) 后平均粒径和分散系数变化 ($n = 3$)

Fig 4 Change of mean particle size and PDI of AST-NLCs after incubation in the plasma at 37°C ($n = 3$)

2.5 体外溶出实验

本文采用透析袋法对 AST-NLCs 的体外溶出行为进行考察。将 AST 原药粉、AST-NLCs 加至处理好的透析袋内,透析袋两端用医用编织线扎紧,用橡皮筋固定在搅拌桨上,浸没在 100 mL 溶出介质 (20%PEG 400 的生理盐水溶液) 中,恒温 (37 ± 0.5) $^\circ\text{C}$,搅拌速度为 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,采用桨法。分别于特定时间点吸取溶液 1 mL,同时补充等体积等温度的空白溶出介质,样品经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后,经 HPLC 进样,测定 AST 浓度,每种制剂平行 3 份。

如图 5 所示,AST 原药粉的溶出速率要高于

AST-NLCs 组,在 3 h 内就达到了溶出平衡。而 AST-NLCs 组则在 36 h 后才达到溶出平衡。同时,AST-NLCs 组平衡时的累积释放率要显著高于原药粉组,原药粉组为 31.4%,而 AST-NLCs 达到了 72.8%。

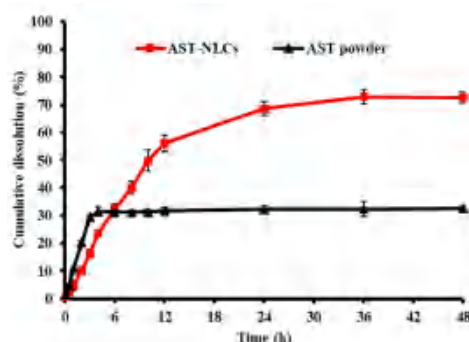


图 5 AST 的释药曲线 ($n = 3$)

Fig 5 Drug release profiles of AST ($n = 3$)

2.6 AST-NLCs 对 MDSCs 和 A549 细胞的增殖抑制实验

分别取对数生长期的 MDSCs 和 A549 细胞于离心管离心 ($1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min) 后弃去原培养基,再加入适量的新鲜培养基,混匀,计数后将细胞稀释为 4×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,接种于 96 孔板 (80 μL /孔)。弃去培养基,AST 组和 AST-NLCs 组均按照 200、100、50、10、1、0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 给药 100 μL ,平行实验 6 组,以空白培养基为对照。将 96 孔板放置在培养箱中培养 24 h。随后每孔加 10 μL (注意避光) CCK-8 溶液,充分振荡,再继续培养 4 h,于酶标仪中在 450 nm 处测定吸光度 (A),取平均值后根据公式计算药物对 MDSCs 和 A549 细胞的生长抑制率,采用 CompuSyn 软件计算半数抑制浓度 (IC_{50}) 值。

结果见表 1 和表 2,AST 和 AST-NLCs 对 MDSCs 和 A549 细胞增殖表现出明显的抑制活性,且在给药浓度范围内呈剂量依赖关系。其中,AST 和 AST-NLCs 对 MDSCs 增殖的 IC_{50} 分别为 $68.62 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $16.24 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,对 A549 细胞的 IC_{50} 分别为 $28.79 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10.18 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,表明 AST-NLCs 对 MDSCs 和 A549 细胞的抑制效果更加显著。

2.7 AST-NLCs 对 A549 荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制实验

2.7.1 A549 肺癌小鼠模型构建 将培养至对数期的 A549 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 培养基悬浮,调整 A549 细胞浓度至 2×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,于 BALB/c 小鼠右腋下接种 0.2 mL,注射的细胞数目为 4×10^6 个/只。在 SPF 级环境下饲养,并密切关注小鼠的体质量和肿瘤生长情况。

表 1 不同组别对 MDSCs 细胞的抑制率 ($n = 6$)Tab 1 Inhibition on MDSCs cells in different groups ($n = 6$)

组别	不同浓度下抑制率 /%				
	$0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
AST	11.9 ± 1.2	24.6 ± 5.3	33.2 ± 1.4	41.2 ± 0.7	53.9 ± 4.3
AST-NLCs	12.4 ± 1.8	28.1 ± 3.8	37.0 ± 3.6	54.3 ± 3.7	67.8 ± 1.6

表 2 不同组别对 A549 细胞的抑制率 ($n = 6$)Tab 2 Inhibition on A549 cells in different groups ($n = 6$)

组别	不同浓度下抑制率 /%					
	$0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
AST	10.5 ± 3.8	20.6 ± 2.9	34.9 ± 4.2	47.6 ± 6.8	65.7 ± 2.5	73.5 ± 6.0
AST-NLCs	15.5 ± 1.1	24.7 ± 3.8	41.6 ± 4.2	55.3 ± 2.4	76.2 ± 1.1	84.9 ± 0.2

2.7.2 模型动物的分组和处理 至小鼠肿瘤体积约为 50 mm^3 , 将所有小鼠随机分成生理盐水组、AST 组以及 AST-NLCs 组 3 组, 每组各 6 只。每组给药剂量以 AST 计算均为 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每只小鼠通过尾静脉注射 $100 \mu\text{L}$ 对应制剂, 每 3 日给药一次, 共给药 6 次。观察实验期间小鼠进食、排便、精神状态、活动情况。每次给药前称量小鼠体质量, 测量肿瘤长宽, 计算肿瘤体积, 绘制肿瘤生长曲线。结束给药后第 3 日, 采用颈椎脱臼法处死小鼠, 解剖取出瘤块, 并用生理盐水将取出的瘤块清洗干净, 用滤纸吸干表面水分, 称取其重量。

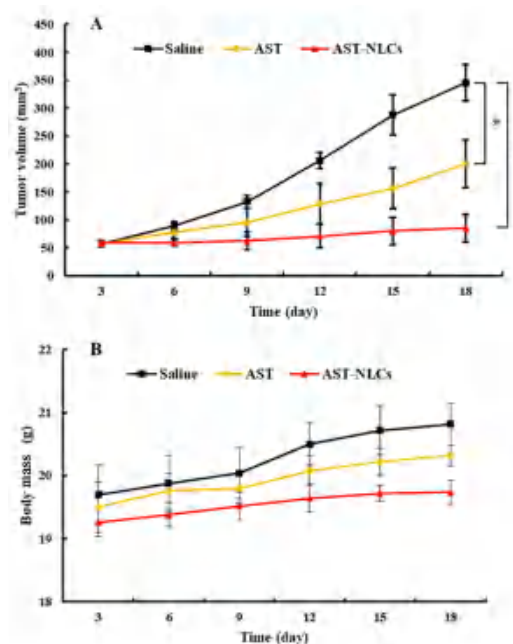
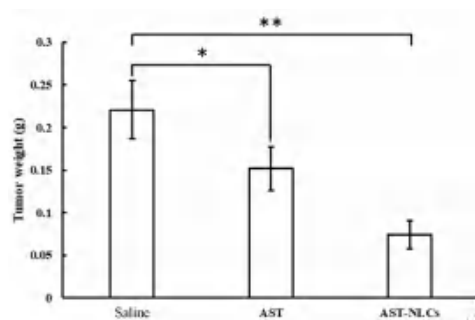
如图 6 所示, 在 18 d 的治疗周期内, 各组小鼠体内肿瘤体积均呈不同程度增大的趋势。其中生理盐水组肿瘤体积增加最明显, AST 组次之, 而 AST-NLCs 组肿瘤体积增加的趋势最为缓慢。说明 AST-NLCs 组对于小鼠体内肿瘤的抑制作用最为显著。从小鼠体质量变化曲线图看, 各组别小鼠体质量略有增加, 但无明显变化。

图 7 显示, AST 组和 AST-NLCs 组的肿瘤重量显著小于生理盐水组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 其中 AST-NLCs 组肿瘤重量最小, 说明其对 A549 荷瘤小鼠的治疗效果更佳。

2.8 静脉刺激性考察

对 AST-NLCs 的刺激性进行考察。将新西兰兔分为 3 组: AST 组、AST-NLCs 组、生理盐水组。连续给药一周后处死动物, 用 10% 甲醛固定血管组织, 然后对器官及组织进行石蜡包埋切片, 用苏木精-伊红对切片进行染色, 进行组织病理学检查。

组织病理切片结果如图 8 所示, AST-NLCs 组和生理盐水组相比无明显变化, 说明 AST-NLCs 并未造成静脉炎症, 而 AST 组出现了血管扩张以及炎性细胞浸润的现象, 说明 AST 产生了静脉刺激性。上述结果也表明 AST-NLCs 能够起到降低 AST 静脉刺激性的作用, 这可能是由于 AST-NLCs 具有较高的包封率, 可以避免大量游

图 6 小鼠肿瘤体积 (A) 和体质量 (B) 的变化曲线 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)Fig 6 Tumor volume (A) and body mass (B) of mice (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)图 7 给药治疗 18 d 后各组肿瘤重量 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)Fig 7 Tumor weight at the end of the 18-day treatment (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

离 AST 和血管直接接触, 从而降低了刺激性。

3 讨论

在体外溶出实验中, AST-NLCs 达到溶出平衡的时间要大于 AST 原药粉组, 在 36 h 后才达到溶

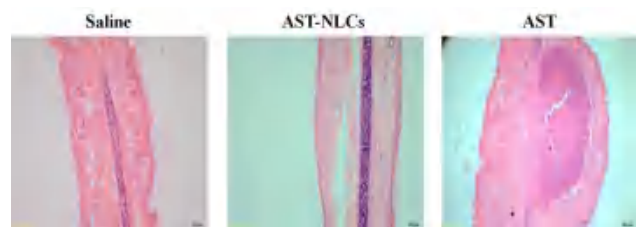


图 8 AST-NLCs 对新西兰兔血管刺激性影响

Fig 8 Effect of AST-NLCs on vascular irritation in New Zealand rabbits

出平衡, 具有明显的缓释效果。纳米粒中药物的释放一般有以下两种方式^[13]: ① 表面吸附的药物解吸; ② 药物从纳米基质中扩散; ③ 纳米胶囊中的药物从聚合物骨架扩散; ④ 纳米基质溶蚀; ⑤ 基质的溶蚀和药物扩散。由于 NLCs 对 AST 具有较好的包封效果, AST-NLCs 的释放是基于纳米基质的溶蚀和药物从基质中的扩散, 故导致释放速度缓慢持久。同时, NLCs 组的体外累积释放率均明显高于原药粉组。推测可能是因为经高压均质制成 NLCs 后, 药物以无定型状态存在于脂质纳米粒中, 因此具有更好的体外累积释放率^[14]。

AST 对肺癌细胞具有明显的抑制作用, 同时能通过抑制肿瘤浸润 MDSCs, 阻断免疫耐受通路, 增强 T 淋巴细胞活性, 发挥抗肿瘤作用。本研究发现 AST 对 MDSCs 和 A549 细胞均有显著的抑制作用, 将 AST 制备成 NLCs 后, 其抑制效果更加显著。在荷瘤鼠体内实验中亦是如此, 证明 AST-NLCs 作为抗肿瘤制剂具有广阔的临床应用前景。AST-NLCs 抗肿瘤疗效显著优于 AST, 其可能原因如下: ① 制备的 NLCs 粒径小, 仅为 (136.7 ± 5.2) nm, 可由于高通透性和滞留效应 (EPR) 而较易进入肿瘤组织, 提高了 AST 在肿瘤部位的滞留量^[15]; ② 脂质的包封改变了 AST 的体内代谢行为, 使其更利于抗肿瘤作用的发挥^[16]。

综上所述, 本研究制备的 AST-NLCs 具有较小的粒径、较高的包封率和载药量, 同时具有较好的血浆稳定性, NLCs 包封可显著提高 AST 抑瘤率, 降低 AST 的静脉刺激性。本研究结果为 AST-NLCs 对肺癌等肿瘤的治疗提供了参考, 在抗肿瘤研究方面具有良好的应用前景。

参考文献

[1] Milica M, Anthony J, Bailey ST, et al. In vivo imaging of mitochondrial membrane potential in non-small-cell lung

cancer [J]. *Nature*, 2020, 575 (7782): 380-384.

- [2] Schulze AB, Evers G, Kerkhoff A, et al. Future options of molecular-targeted therapy in small cell lung cancer [J]. *Cancer*, 2019, 11 (5): 690-723.
- [3] Zhu K, Zhu J, Geng J, et al. circSNX6 (hsa_circ_0031608) enhances drug resistance of non-small cell lung cancer (NSCLC) via miR-137 [J]. *BiochemBioph Res Co*, 2021, 567: 79-85.
- [4] You W, Li L, Sun D, et al. Farnesoid X receptor constructs an immunosuppressive microenvironment and sensitizes FXR high PD-L1 low NSCLC to anti-PD-1 immunotherapy [J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7 (6): 990-1000.
- [5] O' Donnell JS, Long GV, Scolyer RA, et al. Resistance to PD1/PDL1 check point inhibition [J]. *Cancer Treat Rev*, 2017, 52: 71-81.
- [6] 黄晓明, 孙建立, 侯爱画, 等. 金复康口服液对吉非替尼耐药人肺癌 PC9/R 的增敏作用和机制研究 [J]. *中草药*, 2020, 43 (4): 676-682.
- [7] 童克家, 汪志诚. 中西医结合治疗原发性支气管非小细胞肺癌 40 例 [J]. *湖南中医杂志*, 2011, 27 (3): 83-84.
- [8] 崔伟, 刘爱珍, 谢琼, 等. 黄芪多糖联合新辅助化疗 TP 方案对宫颈癌患者免疫抑制细胞 Treg 和 MDSC 的影响 [J]. *华南国防医学杂志*, 2018, 32 (4): 30-33.
- [9] Chang HL, Kuo YH, Wu LH, et al. The extracts of *Astragalus membranaceus* overcome tumor immune tolerance by inhibition of tumor programmed cell death protein ligand-1 expression [J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17 (7): 939-945.
- [10] 刘爱娜, 陈昊, 唐星. 黄芪甲苷脂质微球注射液的制备及其物理稳定性研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2009, 7 (4): 290-298.
- [11] Khosa A, Reddi S, Saha RN. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 598-613.
- [12] Siekmann B, Westesen K. Melt-homogenized solid lipid nanoparticles stabilized by the nonionic surfactant tyloxapol. I. Preparation and particle size determination [J]. *Pharm Pharmacol Lett*, 1994, 3: 194-197.
- [13] Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices [J]. *J Control Release*, 2001, 70 (1-2): 1-20.
- [14] Kazi M, Al-Qarni H, Alanazi FK. Development of oral solid self-emulsifying lipid formulations of risperidone with improved in vitro dissolution and digestion-science direct [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017, 114: 239-249.
- [15] Liu Y, Sun D, Fan Q, et al. The enhanced permeability and retention effect based nanomedicine at the site of injury [J]. *Nano Res*, 2020, 13 (2): 564-569.
- [16] 敖惠, 李好文, 王一帆, 等. 地塞米松脂质体的制备及其对乳腺癌作用的体内外研究 [J]. *现代药物与临床*, 2020, 35 (2): 222-228.

(收稿日期: 2022-06-10; 修回日期: 2022-07-20)

接骨木有效成分——莫诺昔对成骨细胞活性研究

袁旭², 董培良^{1*}, 韩华^{2*} (1. 黑龙江中医药大学中医药研究院, 哈尔滨 150000; 2. 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150000)

摘要: **目的** 探究莫诺昔在体外对 MC3T3-E1 成骨细胞增殖、分化、矿化、游离钙的影响。**方法** 分别用 MTT 比色法, 碱性磷酸酶 (ALP) 试剂盒, 骨钙素 (BGP) 试剂盒, 透射电镜进行观察, 采用 Flou-3 的负载检测不同浓度莫诺昔对成骨细胞增殖、分化、矿化、细胞内游离钙的影响。**结果** MTT 比色法结果表明, 2.5、12.5、62.5、125 mg · L⁻¹ 的莫诺昔对 MC3T3-E1 细胞增殖作用不显著 ($P > 0.05$); 与空白组比, 2.5、12.5 mg · L⁻¹ 的莫诺昔可明显提高 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性, 而 62.5 mg · L⁻¹ 的莫诺昔仅在作用 2 d 时明显提高 ALP 活性 ($P < 0.05$); 2.5 mg · L⁻¹ 的莫诺昔用药 5 d 可显著提高 MC3T3-E1 细胞 BGP 活性 ($P < 0.05$); 矿化结果显示培养 6 d 的给药组和空白组都没有出现直径大于 200 μm 的矿化结节, 培养 12 d 的给药组、空白组均出现直径大于 200 μm 的橘红色矿化结节, 给药组矿化结节数高于空白组 ($P < 0.05$); 电镜观察结果显示用药组细胞外可见密度较大的矿化物质; Flou-3 的负载实验结果显示 2.5 mg · L⁻¹ 的莫诺昔组使成骨细胞内平均荧光强度明显升高 ($P < 0.05$)。**结论** 莫诺昔能够促进 MC3T3-E1 成骨细胞分化、矿化以及内钙释放。

关键词: 莫诺昔; MC3T3-E1 成骨细胞; 增殖; 分化; 矿化; 内钙释放

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2799-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.016

Effect of monosine on the activity of osteoblasts grafting

YUAN Xu², DONG Pei-liang^{1*}, HAN Hua^{2*} (1. Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150000; 2. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150000)

Abstract: Objective To determine the effect of monosine on the proliferation, differentiation, mineralization and free calcium of MC3T3-E1 osteoblasts in vitro. **Methods** MTT colorimetric assay, alkaline phosphatase (ALP) kit, osteocalcin (BGP) kit, transmission electron microscopy, and Flou-3 loading were used to observe the effect of different concentrations of monosine on the proliferation, differentiation, mineralization, and intracellular free calcium of osteoblasts. **Results** MTT colorimetric assay showed monosine at 2.5, 12.5, 62.5, and 125 mg · L⁻¹ had no significant effect on the proliferation of MC3T3-E1 cells ($P > 0.05$). Compared with the blank group, monosine at 2.5 and 12.5 mg · L⁻¹ obviously increased the ALP activity of MC3T3-E1 cells, monosine at 62.5 mg · L⁻¹ increased the ALP activity only after 2 days of action ($P < 0.05$), monosine at 2.5 mg · L⁻¹ greatly increased the BGP activity of MC3T3-E1 cells after 5 days of cell administration ($P < 0.05$). The mineralization showed no mineralized nodules with diameter over 200 μm in both the administration group and the blank group after 6 days of culture. While orange mineralized nodules were found with diameter over 200 μm in both the administration group and the blank group after 12 days of culture, statistically different from the blank group ($P < 0.05$). The electron microscopy showed bigger extracellular density of mineralized substances in the drug group. The Flou-3 loading experiment

基金项目: 黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划项目 (No.1153G038); 黑龙江中医药大学博士创新基金项目 (No.B201003)。

作者简介: 袁旭, 男, 硕士, 主要从事药物化学与药理学研究, email: 2512323442@qq.com *通信作者: 董培良, 男, 博士, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事中药及复方药理作用及机制研究, email: tjaliang@163.com; 韩华, 女, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药及复方药效物质基础及作用机制研究, email: hh7551@163.com

showed that the average fluorescence intensity of osteoblasts in the $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ monosine group was significantly higher than that in the blank group ($P < 0.05$). **Conclusion** Monosine can promote the differentiation, mineralization and calcium release of MC3T3-E1 osteoblasts.

Key words: monosine; MC3T3-E1 osteoblast; proliferation; differentiation; mineralization; calcium release

接骨木 (*Sambucus williamsii* Hance) 为忍冬科 (Caprifoliaceae) 接骨木属 (*Sambucus linn*) 植物, 又名续骨木、铁骨散、舒筋树、大接骨丹等, 广泛分布于中国、韩国和日本的不同地区^[1]。接骨木用于治疗骨病在民间已经使用了几千年, 可见其药效稳定, 具有接骨续筋、活血止痛、祛风利湿之功效^[1]。现代药理研究发现接骨木具有抗病毒、抗炎、抗肿瘤、抗氧化等药理作用^[2], 临床主要用于治疗骨质疏松^[3]、骨折、跌打肿痛以及创伤出血等病症^[4-5]。接骨木中化学成分复杂, 经提取、分离、纯化发现莫诺苷为其主要成分, 本研究拟通过利用接骨木中主要成分莫诺苷进行体外实验, 从 MC3T3-E1 成骨细胞的增殖、分化、矿化以及对细胞内游离钙的影响等多方面考察其在促进骨折愈合^[6]、骨质疏松等骨病方面病症的活性, 从而确定莫诺苷为接骨木促进骨折愈合、治疗骨质疏松的活性成分。

1 材料

1.1 成骨细胞株

小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 (中科院上海细胞库)。

1.2 试剂

DMEM 培养基、胰蛋白酶 (美国 HyClone 公司); 10% 胎牛血清 (FBS)、MTT 溶液 (美国 Sigma 公司); 莫诺苷 (黑龙江中医药大学药学院中药化学教研室自行制备, HPLC 检测纯度达 95%); 氟化钠 (天津市天河化学试剂厂, 批号: 991218); 碱性磷酸酶 (ALP) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 地塞米松 (天津药业集团新郑股份有限公司); TritonX-100 (美国 Amresco 公司); 骨钙素 (BGP) 试剂盒 (原子高科股份有限公司, 批号: 200605); 茜素红 (天津市新精细化工开发中心, 批号: 20041201); Flou-3/AM (Molecular Probe Inc); 氯化钙 (郑州化学试剂一厂, 批号: 990506)。其余试剂均为分析纯。

1.3 仪器

HF90 二氧化碳细胞培养箱、BIOsafe12 生物安全柜 (上海力申科学仪器有限公司); TGL-20M 高速台式冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); BIO-RAD550 型酶标仪 (国产); BCD-202T 冰箱 (美菱公司); A-6 型半自动生化

分析测定仪 (北京松上技术有限公司); FJ2003PS 全自动 γ 免疫计数器 (国营二六二厂医用核仪器分厂); 荧光倒置显微镜、olympus Tokyo ck 透射电镜、LSM510 (美国蔡司公司)。

2 方法

2.1 药物制备

2.1.1 莫诺苷溶液的制备 精密称取莫诺苷, 加蒸馏水稀释至 $250.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 过 $0.2 \mu\text{m}$ 微孔滤膜除菌后作为母液, 给药时用无血清的 DMEM 培养液依次稀释至 125.0、62.5、12.5、2.5、0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 备用。取莫诺苷母液若干, 实验时用 D-Hanks 依次稀释成质量浓度为 12.5、2.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的工作液待用。

2.1.2 氟化钠溶液的制备 精密称取氟化钠, 加蒸馏水稀释至 $0.42 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 过 $0.2 \mu\text{m}$ 微孔滤膜除菌后待用。

2.1.3 地塞米松溶液的制备 精密称取地塞米松, 加蒸馏水稀释至 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 过 $0.2 \mu\text{m}$ 微孔滤膜除菌后待用。

2.1.4 氯化钙溶液的制备 精密称取氯化钙, 加蒸馏水稀释至 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 待用。

2.1.5 D-Hanks 液的配制 分别精密称取氯化钠两次共 8.0 g, 氯化钾 0.4 g, 磷酸二氢钾 0.06 g, 十二水合磷酸氢二钠 0.08 g, 碳酸氢钠 0.35 g, 置于 1000 mL 烧杯中, 加入 1000 mL 超纯水溶解, 用磁力搅拌器助溶, 使用前用蒸馏水和超纯水分别洗一次磁珠, 充分溶解后, 用 50 mL 离心管分装, 最后在超净台内用微孔滤膜进行过滤, 封口膜保存待用。

2.1.6 Flou-3/AM 的制备 Flou-3/AM 荧光探针加二甲基亚砜 (DMSO) 稀释至 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 待用, 实验时用 D-Hanks 液稀释成 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的工作液 (所有配制过程在避光条件下进行)。

2.2 对成骨细胞增殖的作用

2.2.1 细胞培养 取培养瓶中处于对数生长期的 MC3T3-E1 成骨细胞, 加入胰酶消化后, 离心, 弃去上清液, 加入 10%FBS 的 DMEM 细胞培养液, 将细胞密度调整为 2×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 每孔 100 μL 接种于 96 孔细胞培养板上。

2.2.2 增殖活性检测 培养 24 h 后取出 96 孔板, 更换不含血清的 DMEM 培养液继续培养, 第 2

日更换为经 DMEM 培养基稀释成的不同浓度的无血清含药培养液与细胞共培养 12、24、36、48 h, 每个浓度设 3 个平行孔。然后弃去含药培养液, 每个孔中加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液 $50 \mu\text{L}$, 在 37°C 培养箱中孵育 4 h, 有蓝紫色沉淀生成。吸去 MTT 溶液后, 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ DMSO, 待沉淀完全溶解后, 用酶标仪测定。设置不加药的细胞孔测得的吸光度值为空白, 在 490 nm 波长下测定吸光度值。以吸光度值考察药物对 MC3T3-E1 成骨细胞增殖作用的强弱。

2.3 对成骨细胞分化的作用

2.3.1 细胞培养 取处于对数生长期的 MC3T3-E1 成骨细胞, 经胰酶消化后, 加入含 10%FBS 的细胞完全培养液, 将细胞密度调整为 8×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 每孔 $100 \mu\text{L}$ 接种于 12 孔细胞培养板上。

2.3.2 ALP 活性测定 培养 24 h 后更换为不同浓度的无血清含药培养液与细胞共培养, 每日换液, 连续观察 1、2、3、5 d, 每个浓度设 3 个平行孔。弃去含药培养液, 每孔用 4°C 预冷的 PBS 洗涤 2 次后加入 $200 \mu\text{L}$ 裂解液, 反复冻融 3 次后于 -70°C 保存, 用于测定 ALP 的活性。

2.3.3 BGP 活性测定 培养 24 h 后更换为不同浓度的无血清含药培养液与细胞共培养, 每 2 日换液一次, 连续观察 3、5、7、9 d, 每个浓度设 3 个平行孔。收集每次更换的培养液, -70°C 保存, 用来测定 BGP。根据标准品绘制出标准曲线, 由标准曲线计算血清 BGP 浓度。

2.4 对成骨细胞矿化的作用

2.4.1 细胞培养 取处于对数生长期的 MC3T3-E1 成骨细胞, 经胰酶消化后, 加含 10%FBS 的细胞完全培养液, 将细胞密度调整为 8×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 每孔 $100 \mu\text{L}$ 接种于 12 孔细胞培养板上 (每孔培养板中预先放一块盖玻片), 放入 37°C 、5% CO_2 的细胞恒温培养箱中进行培养。

2.4.2 矿化功能的测定 培养 24 h 后更换为用不含血清的 DMEM 培养基稀释成的不同浓度的含药培养基与细胞共同培养, 每 2 日换液一次, 连续培养 6、12 d。并于第 6、12 日弃去培养液, 用 90% 多聚甲醛固定 10 min, 弃去多聚甲醛, 再用 0.1% 茜素红染色 30 min。当出现橘红色结节边界清晰、直径大于 $200 \mu\text{m}$ 时即为矿化结节的计数标准。在 40 倍光镜下, 记录每孔的矿化结节数。

2.5 透射电镜观察

2.5.1 细胞培养 用“2.1”项下稀释成的不同浓度含药培养基与 MC3T3-E1 成骨细胞共培养, 每 2 日换液一次, 连续培养 5 日。

2.5.2 电镜观察 经胰蛋白酶消化后, 收集细胞悬液, 以 $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度低速离心 5 min, 弃去上清液, 收集细胞, 3% 戊二醛固定, 用于电镜观察。

2.6 对成骨细胞内游离钙的影响

2.6.1 细胞培养 取处于对数生长期的 MC3T3-E1 成骨细胞, 经胰酶消化后, 加入含 10%FBS 的细胞完全培养液, 调整细胞密度为 1×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 接种到 96 孔板上, 每个孔加入 $100 \mu\text{L}$ 培养 24 h, 使细胞贴壁生长。

2.6.2 Flou-3 的负载 培养 24 h 后弃去培养液, 用 D-Hanks 液洗涤 3 次后, 于避光条件下加入 $100 \mu\text{L}$ Flou-3。在细胞培养箱中孵育 1 h, 弃去 Flou-3, 用 D-Hanks 液再洗涤 3 次, 洗去细胞外残余染料。加入 $150 \mu\text{L}$ 无血清培养液, 待测。加氯化钙观察细胞活性。加待测各药物, 迅速以间隔 6 s 的速度扫描, 共扫描 40 次, 每一浓度的药物重复以上操作 6 次。计算机记录储存扫描结果。

2.7 统计学分析

选用 SPSS 22.0 统计软件进行数据处理分析, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间采用单因素方差分析 (ANOVA), 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对成骨细胞增殖的作用

由图 1 可知, 与空白组比较, 2.5 、 12.5 、 62.5 、 $125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的莫诺昔组作用 24 h 和 36 h 时, 能够促进 MC3T3-E1 成骨细胞增殖, 作用 48 h 时抑制了成骨细胞的增殖, 但差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的莫诺昔组仅作用 24 h 时, 能够促进 MC3T3-E1 成骨细胞增殖, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。表明莫诺昔 2.5 、 12.5 、 62.5 、 $125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量组作用 24 h 和 36 h 时、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的莫诺昔组仅作用 24 h 时对成骨细胞有一定的增殖作用, 但增殖作用不显著 ($P > 0.05$), 作用 48 h 时抑制细胞增殖。

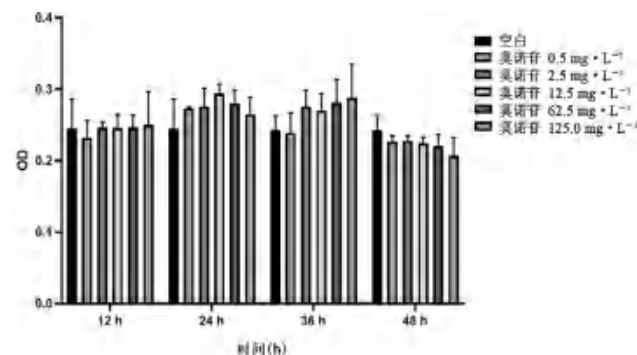


图 1 莫诺昔对成骨细胞增殖作用的影响

Fig 1 Effect of monosine on the proliferation of osteoblasts

3.2 对成骨细胞分化的作用

3.2.1 莫诺昔对 ALP 活性的影响 由图 2 可知,与空白组比较, $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的莫诺昔组作用 1 d 时能够显著增强 MC3T3-E1 成骨细胞 ALP 活性 ($P < 0.05$), 作用 2 d 时此效果达到高峰, 然后减弱, 但仍比空白组高。12.5、 $62.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的莫诺昔组作用 2 d 能够明显增强 MC3T3-E1 成骨细胞 ALP 活性, 与空白组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

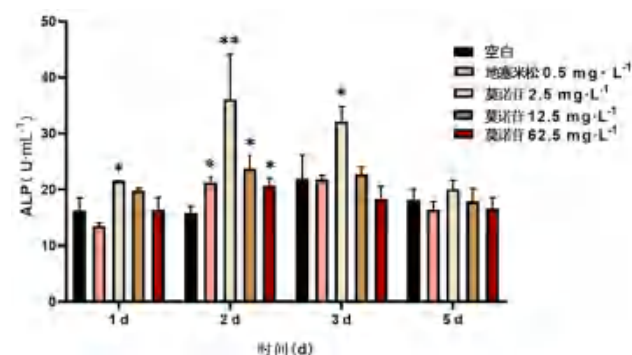


图 2 莫诺昔对成骨细胞 ALP 活性的影响

Fig 2 Effect of monosine on the ALP activity of osteoblasts

注 (Note): 与空白组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ (vs the blank group, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$)。

3.2.2 莫诺昔对 BGP 活性的影响 由图 3 可知, $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的莫诺昔组作用 5 d 可使 MC3T3-E1 细胞 BGP 活性明显增强, 与空白组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

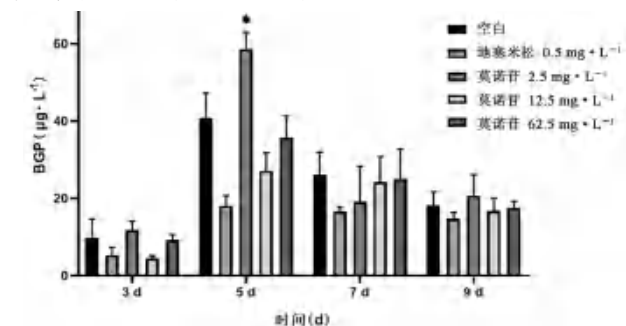


图 3 莫诺昔对成骨细胞 BGP 活性的影响

Fig 3 Effect of monosine on BGP activity of osteoblasts

注 (Note): 与空白组比较, $*P < 0.05$ (vs the blank group, $*P < 0.05$)。

3.3 对成骨细胞矿化的作用

经过 6 d 培养, 莫诺昔不同剂量组和空白组都没有出现直径大于 $200 \mu\text{m}$ 的矿化结节。观察 0.1% 茜素红染色结果, 发现在成骨细胞内或者细胞膜处都有橘红色颗粒出现, 即此时成骨细胞内含有细小的钙颗粒。且莫诺昔不同剂量组内的橘红色颗粒均比空白组多 (见图 4A、B)。

经过 12 d 的培养, 莫诺昔不同剂量组和空白组

都有直径大于 $200 \mu\text{m}$ 的橘红色矿化结节出现 (见图 4C、D)。且 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 莫诺昔组的矿化结节数与空白组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图 5)。

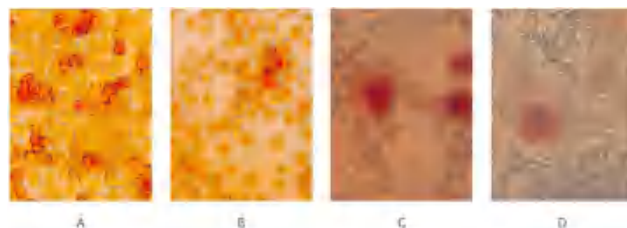


图 4 莫诺昔对成骨细胞矿化结节数的影响 (0.1% 茜素红染色, $\times 40$)

Fig 4 Effect of monosine on the number of mineralized nodules in osteoblasts (0.1% alizarin red staining, $\times 40$)

A. 6 d 莫诺昔组 (monosine group for 6 days); B. 6 d 空白组 (blank group for 6 days); C. 12 d 莫诺昔组 (monosine group for 12 days); D. 12 d 空白组 (blank group for 12 days)

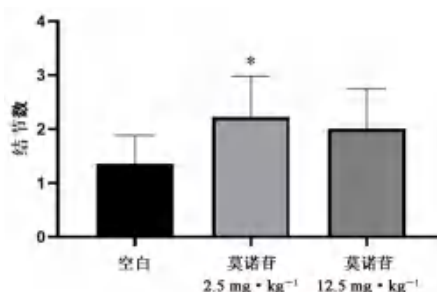


图 5 培养 12 d 后莫诺昔对成骨细胞矿化结节数的影响

Fig 5 Effect of monosine on the number of mineralized nodules in osteoblasts after 12 days of culture

注 (Note): 与空白组比较, $*P < 0.05$ (vs the blank group, $*P < 0.05$)。

3.4 透射电镜观察

给药组细胞核仁形态呈椭圆形 (见图 6A); 胞浆内富含线粒体、粗面内质网以及溶酶体, 状态活跃 (见图 6B、C); 细胞外有密度较深的矿化物质 (见图 6D)。

空白组细胞核仁形态呈椭圆形 (见图 6E); 胞浆内线粒体、粗面内质网不丰富, 存在大量空泡, 细胞不活跃 (见图 6F ~ H)。

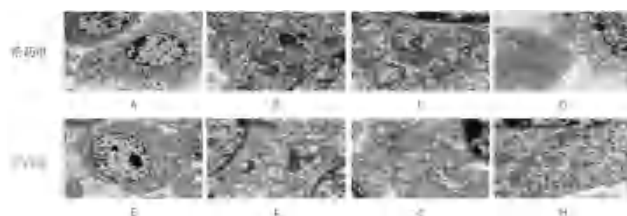


图 6 莫诺昔对成骨细胞内细胞器及矿化物质的影响 (透射电镜观察, A, E. $\times 4200$; B, C, F, H. $\times 20500$; D. $\times 9900$; G. $\times 16500$)

Fig 6 Effect of monosine on the organelles and mineralization in osteoblasts (observed by transmission electron microscope; A, E. $\times 4200$; B, C, F, H. $\times 20500$; D. $\times 9900$; G. $\times 16500$)

3.5 对成骨细胞内游离钙的影响

由图 7 可知, Flou-3/AM 与 MC3T3-E1 成骨细胞孵育后均能着染细胞。与空白组相比, $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的莫诺昔组能够明显增强成骨细胞内平均荧光强度 ($P < 0.05$)。但作用时间较短, 一般仅为几分钟。

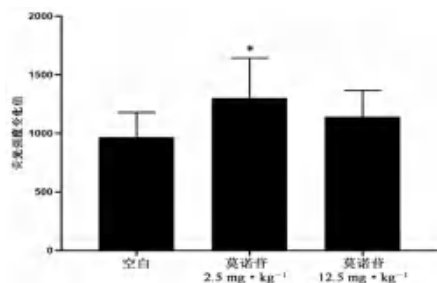


图 7 莫诺昔对荧光强度变化值的影响

Fig 7 Effect of monoside on change value of fluorescence intensity

注 (Note): 与空白组比较, * $P < 0.05$ (vs the blank group, * $P < 0.05$)。

4 讨论

随着老龄化人口越来越多, 人类步入老龄化社会, 骨质疏松疾病已经成为了常见病、多发病^[7]。常见的治疗方法大多是服用药物抑制骨吸收, 但此类药物长期大量使用会产生较多的不良反应, 使其在临床应用中受到限制, 因此发掘能够有效预防骨质疏松症的中草药及其活性成分已经引起了广泛关注^[8]。本实验在前期研究的基础上探究莫诺昔对成骨细胞增殖、分化、矿化、细胞内游离钙的影响。

莫诺昔是一种环烯醚萜类化合物, 是忍冬科接骨木属植物接骨木的有效成分, 经提取、分离、纯化后得到。具有促进骨折愈合、保护心肌细胞、抗血小板聚集、保护神经等药理作用^[9]。成骨细胞 MC3T3-E1 是由新生 C57BL/6 小鼠颅顶骨分离培养所建立的较为幼稚的一株成骨细胞株, 体积较大, 呈梭形、纺锤形等不规则形状^[10]。骨质疏松、骨折等骨疾病的发病与成骨细胞 MC3T3-E1 密切相关, 成骨细胞的骨形成量不足是引起骨质疏松症的主要因素^[11], 而成骨细胞的大量增殖能够促进骨折愈合^[12]。MTT 比色法实验结果表明, 2.5 、 12.5 、 62.5 、 $125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的莫诺昔对 MC3T3-E1 细胞具有增殖作用的趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

ALP 是成骨细胞标志性酶, 是成骨细胞早期分化的指标, 是骨形成的重要标志^[13]。参与成熟钙化过程的调节, 分解有机磷释放大量无机磷用于羟基磷灰石的形成, 促进钙沉积^[8]。实验结果表明, 2.5 、 $12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的莫诺昔可明显

提高 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性, 提示莫诺昔能够促进 MC3T3-E1 成骨细胞分化。BGP 是一种非胶原蛋白, 对骨质的钙化、矿化十分重要, 同时也是成骨细胞分化晚期的指标。本实验结果表明, $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的莫诺昔作用 5 d 可显著提高 MC3T3-E1 细胞 BGP 活性, 表明莫诺昔能够促进 MC3T3-E1 成骨细胞分化。

成骨细胞发生矿化, 出现矿化结节同样也是分化晚期的表现, 标志着成骨细胞分化成熟。矿化结果显示, 给药后培养 6 d 的成骨细胞没有矿化结节出现, 仅在细胞内出现了橘红色钙结晶; 给药培养 12 d 的成骨细胞出现了明显的矿化结节, 且空白组的结节数显著低于给药组的结节数, 表明莫诺昔能够促进成骨细胞的矿化, 推测可能与给药时间有一定关系。游离钙实验结果显示, 莫诺昔能够明显升高成骨细胞内的平均荧光强度, 表明莫诺昔能够增加细胞内钙的释放, 而细胞内钙离子的增加与成骨细胞的增殖密切相关, 一定程度能够促进成骨细胞的增殖。

综上, 莫诺昔能够促进成骨细胞的分化、矿化, 并且能够增加细胞内钙的释放, 对骨质疏松和骨折的治疗效果显著。但本实验仅以 MC3T3-E1 成骨细胞为研究对象进行了体外研究, 并不能真正模拟机体的骨质疏松和骨折等疾病, 并且对莫诺昔对成骨细胞的作用机制研究尚不清楚。因此后续需要进行动物实验补充体内实验, 并且进一步探究其作用机制。

参考文献

- [1] 申意伟, 李雪, 李毅, 等. 接骨木提取物对酒精性骨重构大鼠模型骨代谢、骨稳态及骨凋亡的实验研究[J]. 中医药学报, 2021, 49 (12): 41-47.
- [2] 师庆媛, 马鹏文, 朱昱澜, 等. 接骨木药材质量标准研究[J]. 西部中医药, 2021, 34 (5): 36-38.
- [3] Xie F, Wu CF, Zhang Y, et al. Increase in bone mass and bone strength by sambucus williamsii H ANCE in ovariectomized rats[J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28 (10): 1879-1885.
- [4] 郭宇兰, 刘克武, 宗宪春. 接骨木概况及遗传多样性研究进展[J]. 中国林副特产, 2019 (4): 82-86.
- [5] 余传隆, 黄泰康. 中药辞海[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1997: 10-12.
- [6] 韩华, 匡海学, 李振宇, 等. 正交实验优选莫诺昔的提取工艺[J]. 中医药信息, 2011, 28 (4): 33-35.
- [7] 杨森, 潘亚磊, 李引刚, 等. 飞天蜈蚣七提取物对大鼠成骨细胞的保护作用及对 Wnt/ β -catenin 信号通路的调节作用[J]. 中南药学, 2020, 18 (3): 435-439.
- [8] Borg S, Chopin F, Hoppé E, et al. Why and how should we investigate men for osteoporosis? [J]. Joint Bone Spine, 2011, (Suppl 2): S197-201.
- [9] 张丹丹, 闫雪生. 莫诺昔的药理药效作用研究进展[J]. 山

- 东中医药大学学报, 2015, 39 (1): 95-97.
- [10] 韩华. 接骨木根皮促进骨折愈合有效部位化学成分和药理作用研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2006.
- [11] 刘斌, 张琼. 6-姜酚对 MC3T3-E1 成骨细胞增殖及分化的影响 [J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36 (7): 25-27.
- [12] 许周媚, 张雪, 查旋, 等. 芹菜素对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 细胞增殖、分化和矿化的影响 [J]. 广东医学院学报, 2016, 34 (2): 109-112.
- [13] 潘亚磊, 谢培, 史鑫波, 等. 珠子参提取物促进大鼠成骨细胞增殖、分化、矿化及调节 OPG/RANKL 表达的作用 [J]. 中南药学, 2019, 17 (11): 1851-1855.
- (收稿日期: 2022-05-09; 修回日期: 2022-09-05)

聚烯丙基胺盐酸盐纳米粒制备工艺的研究与制剂学的初步评价

熊峰¹, 苏峰^{2, 3}, 鲁胜男², 曹俊如⁴, 储晓琴¹, 何广卫^{1, 2*} (1.安徽中医药大学, 合肥 230012; 2.合肥医工医药股份有限公司, 合肥 230088; 3.中国药科大学, 南京 211198; 4.安徽医科大学, 合肥 230032)

摘要: **目的** 以纳米粒粒径及粒度分布为主要考察指标研究聚烯丙基胺盐酸盐 (PAH) 纳米粒制备方法, 并对制剂学进行初步评价。 **方法** 分别采用涡旋振荡法、微流控技术制备纳米粒, 通过调节磷酸盐 (PBS) 的浓度、PBS 种类、微流控各通道的流速比等优化纳米粒制备方法; 马尔文粒度电位仪测定粒径、多分散系数 (PDI)、Zeta 电位, 以姜黄素作为模型药物制备载药纳米粒, 采用超速离心法分离载药纳米粒和游离药物, 以紫外分光光度法测定载药纳米粒的包封率。 **结果** 采用微流控技术在 PBS 浓度为 $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 流速比为 36:8:36 条件下可获得较优粒径, 其粒径为 $(127.7 \pm 1.92) \text{ nm}$, PDI 为 (0.126 ± 0.00) , Zeta 电位为 $(28.4 \pm 1.02) \text{ mV}$, 包封率为 $(85.1 \pm 0.09) \%$, 载药量为 $(30.3 \pm 3.9) \%$ 。此外, PAH 载药纳米粒具有缓释性能。 **结论** 微流控技术制备的 PAH 纳米粒工艺简便、参数可控, 制备出的载药纳米粒粒径较小, 粒度分布良好, 具有优良的载药与包封特性。

关键词: 聚烯丙基胺盐酸盐; 微流控; 纳米粒; 姜黄素; 包封率; 载药量

中图分类号: R943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2022)12-2804-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.017

Preparation of poly (allylamine) hydrochloride nanoparticles and preliminary evaluation of pharmaceuticals

XIONG Feng¹, SU Feng^{2, 3}, LU Sheng-nan², CAO Jun-ru⁴, CHU Xiao-qin¹, HE Guang-wei^{1, 2*} (1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Hefei Industrial Pharmaceutical Institute Co., Ltd., Hefei 230088; 3. China Pharmaceutical University, Nanjing 211198; 4. Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract: Objective To study the preparation of poly (allylamine) hydrochloride (PAH) nanoparticles with nanoparticle size and particle size distribution as the main indicators and to evaluate the pharmaceuticals. **Methods** The nanoparticles were prepared by vortex oscillation and microfluidics respectively. The nanoparticles were optimized by adjusting the concentration and type of phosphate and the flow rate ratio of each channel of microfluidics. The particle size, polydispersity coefficient (PDI) and Zeta potential were determined by Malvern particle size potentiometry. Curcumin was used as a model drug to prepare drug-loaded nanoparticles. Drug-loaded nanoparticles and free drugs were separated by ultracentrifugation, and the encapsulation efficiency of drug-loaded nanoparticles was determined by UV spectrophotometry. **Results** A superior particle size of $(127.7 \pm 1.92) \text{ nm}$, a PDI

作者简介: 熊峰, 男, 硕士, 主要从事新剂型与新技术研究, email: 2744959543@qq.com * **通信作者:** 何广卫, 男, 博士, 主任药师, 主要从事创新药物的研究与开发, email: hgwhipi@hotmail.com

of (0.126 ± 0.00) , a Zeta potential of (28.4 ± 1.02) mV, an encapsulation efficiency of $(85.1 \pm 0.09)\%$ and a drug loading capacity of $(30.3 \pm 3.9)\%$ were obtained with microfluidics at a PBS concentration of $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and a flow rate ratio of $36 : 8 : 36$. In addition, the PAH drug-loaded nanoparticles exhibited sustained release properties. **Conclusion** The PAH nanoparticles by microfluidics are simply prepared, with controllable parameters. The prepared drug-loaded nanoparticles have excellent drug loading, encapsulation properties, small particle size and good particle size distribution.

Key words: poly (allylamine) hydrochloride; microfluidic; nanoparticle; curcumin; encapsulation efficiency; drug loading capacity

聚烯丙基胺盐酸盐 [poly (allylamine) hydrochloride, PAH] 是一种被广泛使用的聚电解质, 曾用于构建不同类型的层层自组装膜^[1]。因其生物相容性^[2]、生物降解性^[3]、低细胞毒性^[4]等优势在生物医学领域应用广泛^[5]。PAH 分子带有大量的伯氨基, 其 pKa 约为 8.6, 在生理条件下带有正电荷, 可以通过静电作用与基因药物结合, 是良好的基因药物载体^[6]。同时该聚合物具有与疏水性药物通过络合作用形成纳米粒的能力, 从而增加药物的溶解度, 提高其生物利用度^[7]。

姜黄素 (curcumin, Cur) 是一种多酚类物质, 大多从姜科植物的根茎中提取, 也可通过化学合成, 来源广泛^[8]。姜黄素具有优秀的抗肿瘤、抗炎、抗氧化作用, 且能够与脑部神经元表面过表达的 β -淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β) 结合并将其清除, 具有强大的神经保护作用, 因此在结肠癌、脑胶质瘤、帕金森综合征、阿尔茨海默病、抑郁症领域有着广泛的研究和应用^[7, 9-15]。姜黄素溶解度低、生物利用度差、代谢较快、稳定性差等缺点, 限制了其在临床方面的应用^[16]。通过脂质体^[17]、白蛋白纳米粒^[18]、聚合物胶束^[19]、纳米乳^[20]、固体分散体^[21]等技术增加难溶性药物的溶解度和生物利用度的研究已经成为当今的研究热点。

传统制备纳米粒的方法有很多, 比如乙醇注入法^[22]、纳米共沉淀法^[23]、薄膜分散法^[24]、涡旋振荡法等。但是这些方法普遍存在粒径分布宽、分散性差、包封率低等缺点, 影响纳米粒的药物释放、胶体稳定性等物理化学特性^[25], 从而在工业化生产中出现了工艺可行性差、批次间质量差异大的现象^[26]。微流控技术是一种通过调节流速大小来控制流体在微米级别通道的混合时间, 来精确控制纳米颗粒尺寸的纳米粒制备技术^[27]。目前已被广泛应用于脂质纳米粒、聚合物胶束、聚合物纳米粒、无机纳米粒、杂化纳米粒等的制备^[28]。尽管微流控技术制备的纳米粒具有很大优势, 但非常消耗微流控芯片, 造成试验成

本的增加, 因此可以通过涡旋振荡法先进行条件的筛选, 选择最佳的制备工艺进行微流控技术的研究。

本试验以 PAH 作为药物载体, 系统探究影响 PAH 纳米粒粒径的因素, 并使用微流控技术首次制备 PAH 纳米粒。以姜黄素作为模型药物, 分别采用旋涡振荡法和微流控技术制备载药纳米粒, 并对粒径、Zeta 电位、包封率、载药量、释药性能进行初步评价。

1 仪器与试药

PAH (批号: J2119655, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4 , 批号: 20210409, 上海润捷化学试剂有限公司); 无水磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4 , 批号: 210513055C, 南京化学试剂股份有限公司); 氯化钠 (NaCl , 批号: P1403292, GENERAL-REAGENT); 姜黄素 (批号: DO517A, 美仑生物); NaOH (批号: 2011072, 西陇科学股份有限公司); 冰醋酸 (批号: 20210906)、吐温-80 (批号: 20201119, 国药集团化学试剂有限公司); 超纯水 (自制)。

DF101 集热式恒温磁力搅拌器 (巩义市高科仪器厂); 摩尔超纯水机 (上海摩勒科学仪器有限公司); KQ5200 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); AL104 电子天平 [梅特勒托利多仪器 (上海) 仪器有限公司]; UV-2700 型紫外分光光度计 [岛津仪器 (苏州) 有限公司]; Vortex-2 旋涡混匀仪 (上海沪忻实业有限公司); WH-SSP-08 分体式注射泵 / $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ 十字形标准 PDMS 芯片 (苏州汶颢微流控技术股份有限公司); RG-160AT 台式高速离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司); Zetasizer Nano ZS-90 纳米粒度电位仪 (英国 Malvern 公司); LYO-0.5 药用型真空冷冻干燥机 (上海东富龙科技股份有限公司)。

2 方法与结果

2.1 涡旋振荡法制备纳米粒及其稳定性研究

按文献方法, 采用涡旋振荡法制备纳米

粒^[29]。取 PAH (分子量为 15 kDa) 200 mg 溶于 20 mL 的超纯水中, 超声 2 min, 充分溶解, 配制成质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的聚合物溶液。取 Na_2HPO_4 0.9937 g、 KH_2PO_4 0.3811 g、 NaCl 0.5844 g 溶于 1000 mL 超纯水中, 超声 1 min, 充分溶解, 配制成 $7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 溶液。取 1 mL 的 PAH 聚合物溶液于 10 mL 离心管中, 加入 9 mL 的 $7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 溶液 ($V_{\text{PBS}} : V_{\text{PAH}} = 9 : 1$), 涡旋 15 s, 即得 PAH 纳米粒, 溶液呈蓝白色混悬液, 粒径重复测定 3 次, 结果粒径为 $(500.83 \pm 16.84) \text{ nm}$, PDI 为 (0.517 ± 0.01) , 粒径偏大, 呈明显双峰分布, 因此需要进一步优化粒径。

2.1.1 PBS 溶液对纳米粒粒径的影响 分别配制浓度为 4、5、6、7 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 溶液; PAH 浓度不变, 按照上述方法制备 PAH 纳米粒, 观察颜色变化, 粒径重复测定 3 次, 求均值, 结果见图 1。PBS 浓度从 4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 7 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 纳米粒溶液的颜色由泛蓝逐渐变至乳白。PBS 浓度在 4 ~ 6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 纳米粒的粒径从 $(70.36 \pm 0.52) \text{ nm}$ 缓慢增加至 $(118.33 \pm 0.81) \text{ nm}$, 这种缓慢增加的原因可能是 PAH 分子与更多的磷酸根离子发生静电结合所致^[6]; PBS 浓度为 7 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 粒径突然增加, 可能是小粒径通过磷酸根离子通过静电作用发生聚集。但仅有 6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 溶液与 PAH 形成纳米粒的 PDI 小于 0.2, 粒度分布均匀。

2.1.2 NaCl 溶液对纳米粒粒径的影响 分别配制浓度为 0、10、20、30、40、50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液; 其中 Na_2HPO_4 浓度为 6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 浓度为 2.4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, PAH 浓度不变, 按照上述方法制备 PAH 纳米粒, 观察颜色变化, 粒径重复测定 3 次, 求均值, 结果见图 2。NaCl 的浓度决定了溶液中的离子强度。离子强度增加时, PAH 分子链卷曲程度越严重; 离子强度降低时, 聚合物分子链越舒展。此外。离子强度的增加可以减少聚合物分子链之间的斥力, 促进纳米粒的生长^[30]。如图 2 所示, 当 NaCl 浓度从 0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加至 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 纳米粒溶液的颜色由浅蓝色逐步加深至乳白, 粒径由 $(104.87 \pm 0.65) \text{ nm}$ 增加至 $(249.57 \pm 6.66) \text{ nm}$, PDI 由 (0.172 ± 0.01) 逐渐降至 (0.064 ± 0.00) , 粒度分布逐步均一。PAH 在 0 ~ 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液中, 形成的纳米粒粒径小于 200 nm。

2.1.3 单组分磷酸盐溶液 (Na_2HPO_4) 对纳米粒粒径的影响 分别配制浓度为 3、4、5、6、7 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Na_2HPO_4 溶液; NaCl 为 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,

PAH 浓度不变, 并按照上述方法制备 PAH 纳米粒, 观察颜色变化, 粒径重复测定 3 次, 求均值, 结果见图 3。 Na_2HPO_4 浓度为 3 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 该溶液澄清透明, 说明该浓度下无纳米粒的形成。 Na_2HPO_4 浓度在 4 ~ 7 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内, 纳米粒溶液的颜色从浅蓝逐渐加深至乳白, 纳米粒粒径由 $(80.69 \pm 0.50) \text{ nm}$ 增至 $(431.23 \pm 18.19) \text{ nm}$ 。这种粒径变化的原因与“2.1.1”项下 PBS 溶液类似。4 ~ 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Na_2HPO_4 形成的纳米粒的粒径小于 200 nm, PDI 小于 0.2, 粒度分布均匀。

2.1.4 单组分磷酸盐溶液 (KH_2PO_4) 对纳米粒粒径的影响 分别配制浓度为 30、40、50、60、70 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KH_2PO_4 溶液; NaCl 浓度为 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, PAH 浓度不变, 按照上述方法制备 PAH 纳米粒将纳米粒溶液, 观察颜色变化, 粒径重复 3 次测定, 求均值, 结果见图 4。30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 与 PAH 的混合溶液澄清透明, 该浓度下无纳米粒形成。 KH_2PO_4 的浓度在 40 ~ 70 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内, 纳米粒溶液颜色由泛蓝加深至乳白, 纳米粒粒径由 $(71.50 \pm 2.22) \text{ nm}$ 增至 $(221.10 \pm 6.82) \text{ nm}$ 。由图 3 得到 Na_2HPO_4 与 PAH 形成纳米粒的最低浓度是 4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 按照 2 : 1 的电荷比, KH_2PO_4 与 PAH 形成纳米粒的最低浓度应该是 8 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 但试验结果表明 40 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KH_2PO_4 才是形成纳米粒的最低浓度。主要原因是 KH_2PO_4 与 PAH 未解离氨基发生氢键结合, KH_2PO_4 浓度越大, 与 PAH 结合的数目越多, 导致粒径增大。氢键作用力小于离子键, 也是导致 KH_2PO_4 形成纳米粒的浓度远大于 Na_2HPO_4 的原因^[30]。40 ~ 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KH_2PO_4 形成的纳米粒粒径均小于 200 nm, PDI 均小于 0.2, 粒度分布均匀。

采用涡旋振荡法筛选纳米粒的最佳粒径并测定 pH, 结果见表 1, 只有 6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PBS 溶液的 pH 值和人体接近, 且粒径较小。绘制 6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 与 PAH 形成纳米粒的粒径分布图, 结果见图 5, PAH 与 6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 形成纳米粒的粒径分布均匀, 且呈单峰分布, 因此接下来研究该纳米粒的稳定性。

2.1.5 纳米粒的稳定性研究 和 PAH 与 6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 形成的纳米粒, 在 $(25 \pm 5) ^\circ\text{C}$ 放置 48 h, 并在 0、1、2、3、4、5、6、24、48 h 取出样品, 测定粒径, 重复测定 3 次, 求均值, 结果见图 6、7。

如图 6 所示, 在 0 ~ 48 h 纳米粒粒径由 $(110.70 \pm 0.59) \text{ nm}$ 增至 $(175.17 \pm 0.37) \text{ nm}$, PDI 均小于 0.2, 并有降低趋势, 粒度分布均匀。0 ~ 6

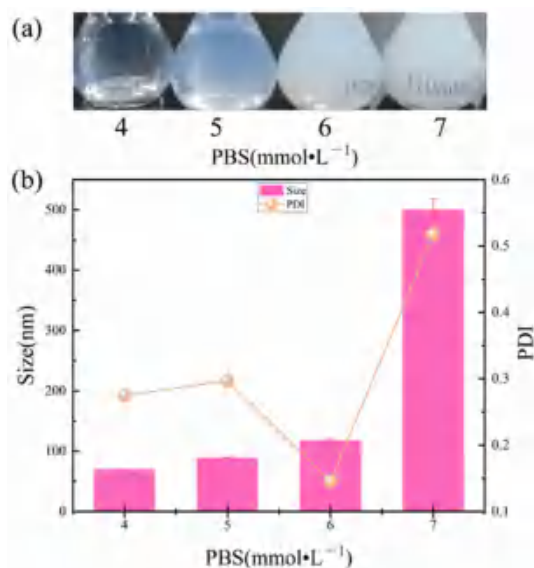


图 1 不同浓度的 PBS 与 PAH 形成纳米粒的颜色变化 (a) 及粒径分布 (b)

Fig 1 Colour change (a) and particle size distribution (b) of nanoparticles formed by different concentrations of PBS and PAH

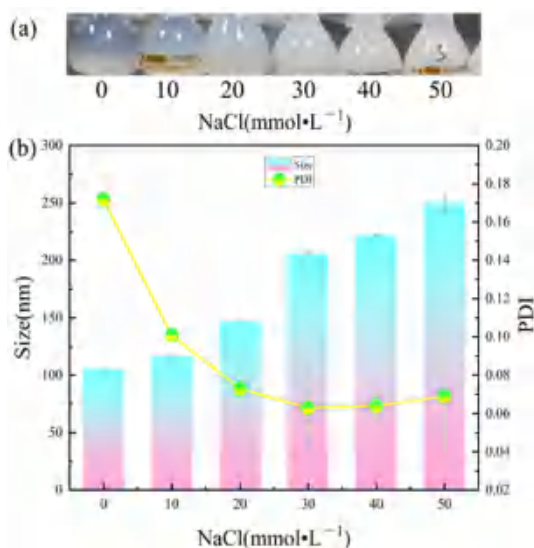


图 2 不同浓度的 NaCl 与 PAH 形成纳米粒的颜色变化 (a) 及粒径分布 (b)

Fig 2 Colour change (a) and particle size distribution (b) of nanoparticles formed by different concentrations of NaCl and PAH

表 1 采用漩涡振荡法筛选的最佳粒径
Tab 1 Optimal particle size screening by vortex oscillation

磷酸盐种类	浓度 / (mmol · L ⁻¹)	粒径 /nm	PDI	pH
PBS	6	118.33 ± 0.81	0.146 ± 0.00	7.40
单组分 Na ₂ HPO ₄	4	80.69 ± 0.50	0.179 ± 0.01	8.95
	5	139.03 ± 1.04	0.051 ± 0.02	9.01
单组分 KH ₂ PO ₄	40	71.50 ± 2.21	0.143 ± 0.02	4.45
	50	97.61 ± 1.40	0.078 ± 0.01	4.32
	60	148.10 ± 5.11	0.06 ± 0.00	4.39

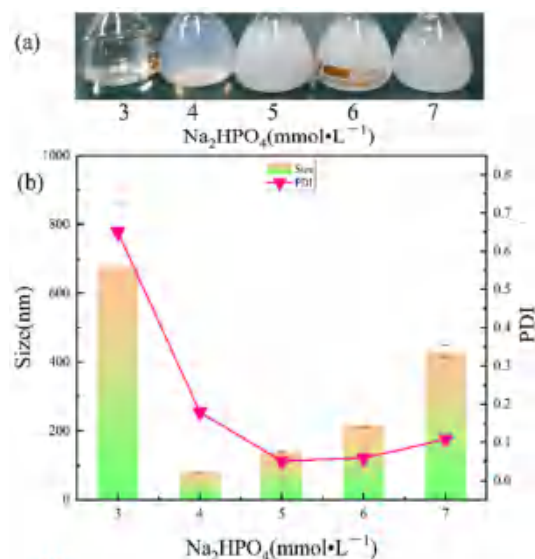


图 3 不同浓度单组分 Na₂HPO₄ 与 PAH 形成纳米粒的颜色变化 (a) 及粒径分布 (b)

Fig 3 Colour change (a) and particle size distribution (b) of nanoparticles formed by single-component Na₂HPO₄ and PAH at different concentrations

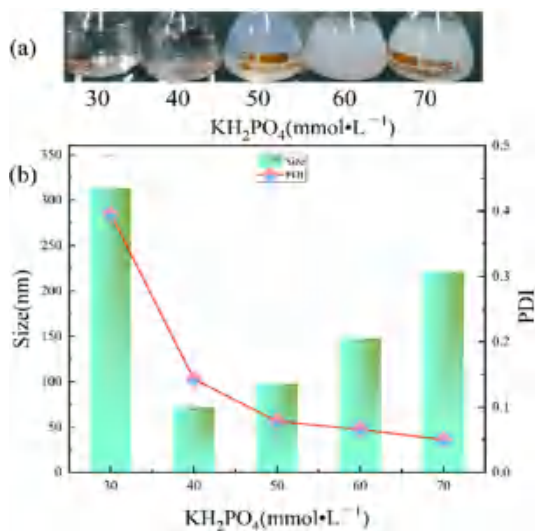


图 4 不同浓度单组分 KH₂PO₄ 与 PAH 形成纳米粒的颜色变化 (a) 及粒径分布 (b)

Fig 4 Colour change (a) and particle size distribution (b) of nanoparticles formed by single-component KH₂PO₄ and PAH at different concentrations

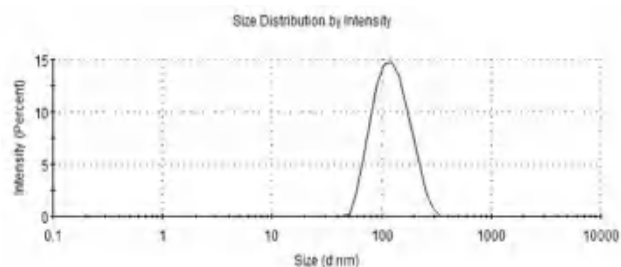


图 5 PAH 与 6 mmol · L⁻¹ PBS 形成纳米粒的粒径分布

Fig 5 Particle size distribution of nanoparticles formed by PAH and 6 mmol · L⁻¹ PBS

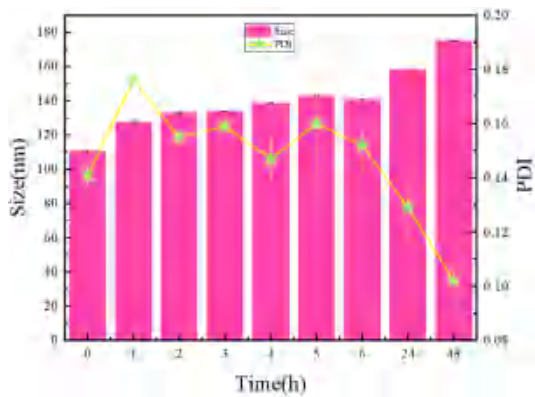


图 6 稳定性研究

Fig 6 Stability study

h 粒径几乎没有发生多大变化, 纳米粒相对稳定。从图 7 能更直观地发现, 虽然粒径在逐渐增大, 48 h 后仍然呈单峰分布, 且小于 200 nm, 因此 $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 溶液与 PAH 形成的纳米粒相对稳定。

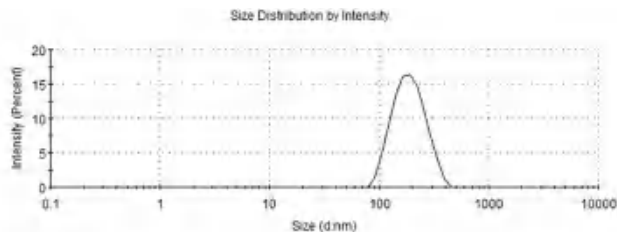


图 7 第 48 h 的粒径分布

Fig 7 Particle size distribution at 48 hours

如表 1 所示, 在单组分磷酸盐溶液中, 虽然可以通过调节其浓度大小来控制纳米粒的粒径, 但是不符合人体 pH 值, 若进入人体内, 会造成酸中毒或碱中毒。“2.1.3”和“2.1.4”项下结果显示 PAH 纳米粒的形成机制为: Na_2HPO_4 与 PAH 通过静电作用形成纳米粒, KH_2PO_4 与 PAH 通过氢键作用形成纳米粒。PBS 溶液具有缓冲作用以及与人体接近的 pH 值, 安全性高; 以氢键和静电双重作用与 PAH 结合, 稳定性好。此外, 由“2.1.2”项下的结果可知, NaCl 一方面可以通过调节溶液中的离子强度, 调节粒径大小; 另一方面可以维持人体渗透压, 含有 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl PBS 溶液可形成最佳的纳米粒。因此, $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS ($6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2HPO_4 、 $2.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl) 溶液是 PAH 纳米粒形成的最佳条件。

2.2 微流控技术制备纳米粒及其稳定性研究

2.2.1 微流控技术制备纳米粒 选择十字型 PDMS 标准芯片作为溶液混合通道。聚焦流为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PAH 溶液, 两端的鞘液流先后为 $7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 溶液, 并分别按照流速比 PBS : PAH : PBS 为 18 : 4 : 18、27 : 6 : 27、

36 : 8 : 36、45 : 10 : 45、54 : 12 : 54、90 : 20 : 90 制备纳米粒, 粒径重复 3 次测定, 求均值, 结果见图 8。

图 8a 中, 流速比为 36 : 8 : 36 粒径最小, 为 $(133.90 \pm 0.51) \text{ nm}$; 流速比为 54 : 12 : 54 粒径最大, 为 $(173.37 \pm 1.69) \text{ nm}$; PDI 均小于 0.2。与图 1 相比, 粒径得到很大改善。如图 8b 所示, PBS 溶液为 $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在流速比为 36 : 8 : 36 的条件下, 可将粒径进一步减小至 $(87.62 \pm 0.34) \text{ nm}$, 且粒度分布良好, 在后续的试验中, 以该流速进行载药纳米粒的制备。图 8 中的粒径均呈现先降低后增加的现象。可能由于流速慢, 导致混合时间延长, 纳米粒进一步生长; 流速增加时, 纳米粒生长时间短, 被快速收集; 当流速过快时, 单位时间内相当于增加了混合体积, 使得更多 PAH 与 PBS 结合, 导致粒径增加。这种粒径变化与微流控技术制备传统胶束的粒径变化不同^[31-32]。

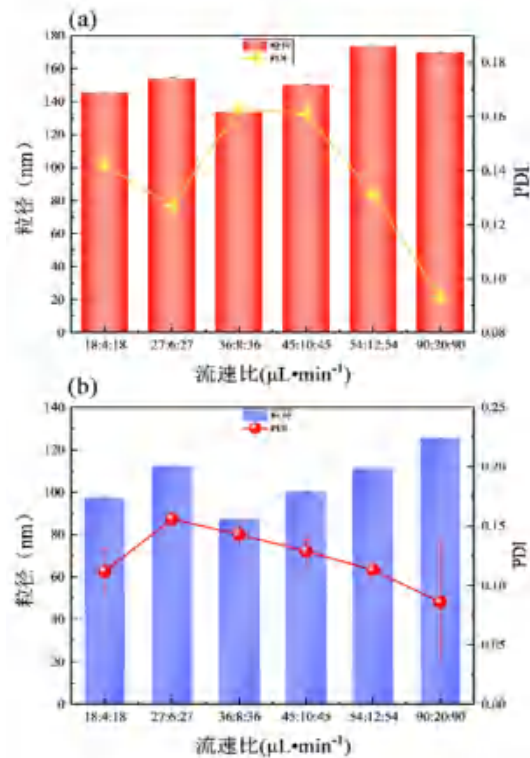


图 8 微流控技术制备纳米粒

Fig 8 Nanoparticle preparation by microfluidic

a. $7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS; b. $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS

2.2.2 微流控技术制备纳米粒的稳定性 根据“2.2.1”项下的研究结果, 对流速比为 36 : 8 : 36 形成的纳米粒进行稳定性研究, 其中聚焦流为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PAH 溶液, 鞘液流为 $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 溶液, 并且按“2.1.5”项下的时间点取样测定, 重复 3 次, 求均值, 结果见图 9 及图 10。

如图 9 所示, 48 h 内粒径由 (80.95 ± 2.39)

nm 不断增至 (143.90 ± 0.46) nm, PDI 均小于 0.14。如图 10 所示, 纳米粒在第 48 h 的粒度分布良好, 没有出现双峰分布的情况。因此, 微流控技术在流速比为 36 : 8 : 36 制备的空白纳米粒, 在 48 h 内具有较好的稳定性。

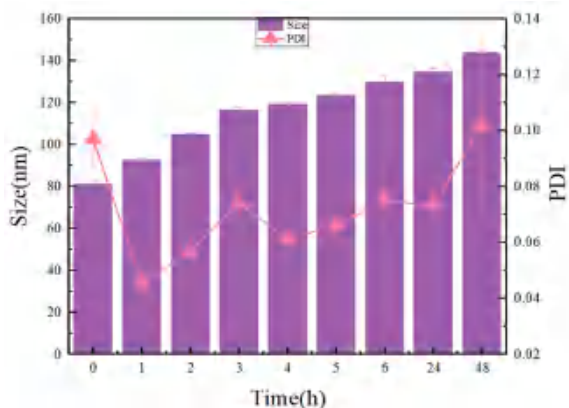


图 9 稳定性研究

Fig 9 Stability study

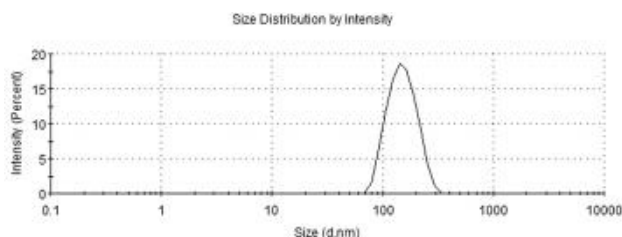


图 10 第 48 h 的粒径分布

Fig 10 Particle size distribution at 48 hours

流速是微流控技术制备纳米粒最为关键的因素^[31-32]。在预试验中我们发现, 当鞘液流的流速大于 $100 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, 芯片出现严重的漏液现象, 因此本次试验中鞘液流的流速最大设为 $90 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。除了流速外, 芯片形状、通道尺寸、溶剂种类等均是影响微流控制备纳米粒的重要因素^[28]。微流控芯片形状主要有 Y 型、T 型、十字型; Y 型和 T 型芯片只提供一个接触界面, 十字型芯片提供两个接触界面, 这使得各通道溶液在 Y 型和 T 型芯片的混合效率小于十字型芯片, 容易产生粒度不均匀等缺点。除此之外, 通道尺寸也是影响混合效率的关键, 小于 $100 \mu\text{m}$ 的通道, 会显著提高混合效率, 因此本次试验中选择了十字型、通道尺寸为 $50 \mu\text{m}$ 的微流控芯片。溶剂的种类是涡旋振荡法和微流控技术制备纳米粒的共同参数, 微流控的方法制备纳米粒虽然在粒径、稳定性、包封率、载药量都有很大优势, 但是非常消耗芯片, 造成试验成本的增加, 因此通过涡旋振荡法先进行条件的筛选, 选择最佳制备工艺进行微流控技术的研究。

2.3 姜黄素载药纳米粒的制备

2.3.1 姜黄素含量测定方法学考察 取 0.1 g 姜黄素粉末置 50 mL 量瓶中, 加入 30 mL 无水乙醇, 超声 3 min 使其充分溶解, 加入 20 mL 无水乙醇定容, 稀释 20 倍, 得质量浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 姜黄素储备液。取 1 mL 的储备液至 10 mL 的量瓶中, 用无水乙醇稀释定容, 得质量浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的稀释溶液, 并作为紫外波长扫描溶液。分别取储备液 700 、 600 、 500 、 400 、 300 、 200 、 $100 \mu\text{L}$ 置 10 mL 量瓶中, 并用无水乙醇定容, 最终得到质量浓度为 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 $7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准溶液, 依次测定, 结果姜黄素的紫外最大吸收波长为 427 nm , 线性回归方程为吸光度 $(A) = 0.1853C - 0.02414$, $R^2 = 0.9993$, 表明姜黄素溶液在 $1 \sim 7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与吸光度具有良好的线性关系。

配制 1 、 4 、 5 、 $7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 姜黄素溶液, 以 1 、 4 、 $7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为低、中、高 3 种浓度, 分别进行精密度和回收率试验; 分别在 0 、 3 、 6 、 12 、 24 h 测定溶液的吸光度, 进行稳定性试验; 取 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液 5 份测定吸光度, 进行重复性试验。结果精密度的 RSD 小于 1.3% , 回收率在 $97.58\% \sim 101.41\%$, 稳定性试验的吸光度 RSD 为 1.3% ($n = 5$); 重复性试验的吸光度 RSD 为 0.75% ($n = 5$), 方法学考察结果均符合要求。

2.3.2 PAH 载药纳米粒的制备

① 溶液的配制: 取 0.1 g 姜黄素粉末置于 50 mL 量瓶中, 用 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶解, 配制成质量浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 姜黄素溶液。取 0.1 g PAH 粉末置于 10 mL 量瓶中, 用 12% 冰醋酸溶液溶解, 配制成 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 聚合物溶液。

② 涡旋振荡法制备载药纳米粒: 改进文献的方法^[33]进行制备。将姜黄素溶液与 PAH 溶液按 $1 : 2$ 的体积比混合, 在 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下, 搅拌 2 min , 继续加入 8 mL $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 溶液, 涡旋 20 s , 充分混合。

③ 微流控技术制备载药纳米粒: 将 PAH 溶液与姜黄素混合, 并将混合溶液作为聚焦流, 磷酸盐溶液作为鞘液流, 并按照 $36 : 8 : 36$ 流速比混合, 收集纳米粒溶液。

④ 载药量与包封率的测定: 两种方法制备的纳米粒溶液均于 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min , 并取上清液, 在 427 nm 波长下测定吸光度, 同时将残留物用 5 mL 的超纯水重新分散, 冷冻干燥 10 h , 进行包封率 ($EE, \%$) 和载药量 ($DL, \%$) 的测定。 $EE(\%) = m_1/m_2 \times 100\%$, $DL(\%) = m_1/m_3 \times 100\%$ (m_1 为包封在 PAH 中的姜黄素质量, m_2 为包封在 PAH 中的姜黄素质量与游离姜黄素质量总重, m_3 为冷冻干燥的重量), 结果见表 2。

表 2 载药纳米粒制剂学评价 ($n = 3$)Tab 2 Pharmaceutical evaluation of drug-carrying nanoparticles ($n = 3$)

方法	粒径 /nm	PDI	Zeta/mV	EE/%	DL/%
涡旋振荡法	193.7±2.01	0.248±0.01	41.6±4.12	41.2±3.1	8.5±2.3
微流控技术	127.7±1.92	0.126±0.00	28.4±1.02	85.1±0.09	30.3±3.9

由表 2 的结果可知,在涡旋振荡法制备载药纳米粒的过程中,大批量的溶液混合不均匀,导致粒径大,分布不均匀,Zeta 电位偏大、包封率及载药量均偏低,由于游离的姜黄素存在,使得纳米粒溶液呈暗红色(见图 11a);在微流控制备载药纳米粒中,十字型芯片提供了微型混合通道,各组溶液充分混合,粒径偏小,分布均匀,Zeta 电位偏小,包封率和载药量得到明显改善,溶液呈橙黄色(见图 11b),说明有更多的药物被 PAH 包封。涡旋振荡法和微流控技术制备的空白纳米粒的 Zeta 电位分别为 (63.23 ± 0.53) mV、(48.2 ± 1.21) mV。与空白纳米粒相比,两种方法制备的载药纳米粒的粒径均有不同程度的增加,但 Zeta 电位均降低。原因可能是药物的加入,使得 PAH 与额外 Cur^+ 离子通过静电结合,使得粒径增加,电位降低。电位降低可能会影响纳米粒的稳定性,因此接下来对微流控技术制备载药的纳米粒进行稳定性研究。

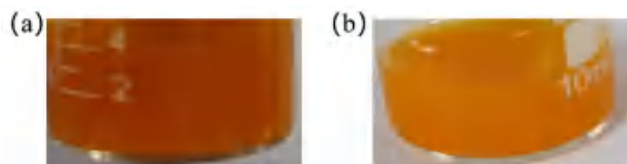


图 11 涡旋振荡法 (a) 及微流控技术 (b) 制备的载药纳米粒的颜色
Fig 11 Colour of drug-carrying nanoparticles by vortex oscillation method (a) and microfluidics (b)

2.3.3 微流控技术制备载药纳米粒的稳定性 按照“2.3.2”项下方法制备纳米粒,并且按“2.1.5”项下方法进行稳定性研究。粒径重复 3 次测定,求均值,结果见图 12、13。如图 12 所示,在 0~24 h 内粒径在 (118.67 ± 0.21) ~ (186.70 ± 1.48) nm, PDI 小于 0.1,粒径并无多大变化,呈单峰分布,分布均匀。但在第 48 h 时,粒径增加到 (1487 ± 5.60) nm, PDI 增加至 0.3,呈双峰分布(见图 13)。微流控方法制备的载药纳米粒在 24 h 内能够保持一定稳定性,但在 48 h 纳米粒发生聚集沉降,稳定性不如空白纳米粒。 Cur^+ 对纳米粒的粒径、电位、稳定性有一定的影响。

2.4 PAH 载药纳米粒的体外释放

采用动态透析法考察 PAH 载药纳米粒的体外释药性能^[34]。取 3 mL PAH 载药纳米粒溶液置于

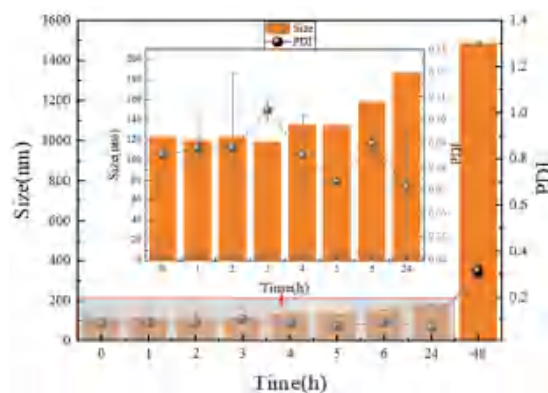


图 12 稳定性研究

Fig 12 Stability study

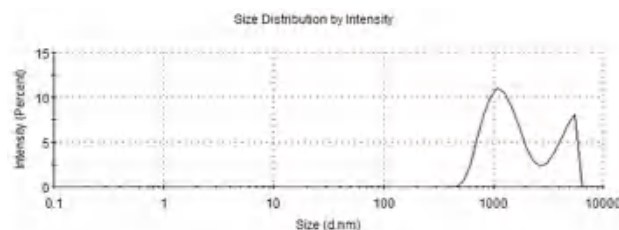


图 13 第 48 h 的粒径分布

Fig 13 Particle size distribution at 48 hours

1 kDa 的透析袋中,放入 100 mL 锥形瓶中,加入 80 mL 含有 1% Tween 80 的生理盐水 ($\text{pH} = 7.0$)。将锥形瓶置于水浴恒温振荡器中, 37°C 、 $105 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下释放,试验过程满足漏槽条件。分别在 0.5、1、2、3、4、5、6、8、12、24 h 时间点取样,并补充等体积的空白介质。以等质量的姜黄素溶液作为对照,结果见图 5。姜黄素溶液在前 4 h 的累计释放量为 70.3%,突释效应明显。微流控技术和涡旋振荡法制备的载药纳米粒 24 h 累计释放量分别为 56.5%、58.3%。与姜黄素溶液相比,PAH 载药纳米粒具有一定的缓释效应。

药物的释药速率可能与纳米粒的半径与致密性有关,相同致密性的纳米粒,粒径较大的纳米粒具有较长扩散距离,导致药物离开载体进入溶液的时间增加。如表 2 所示,采用旋涡振荡法制备的纳米粒的粒径大于微流控技术制备的纳米粒,应该可以获得更好的缓释效果,但如图 14 所示,旋涡振荡法的释药速率却大于微流控技术,缓释效果不如微流控技术,可能是因为微流控技术制备的纳米粒具有较好的致密性,因此释药速率更慢^[35]。

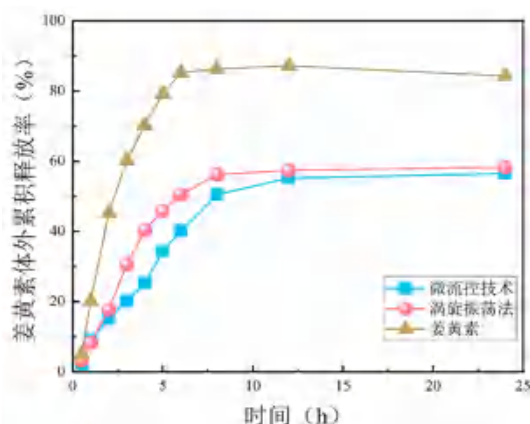


图 14 PAH 载药纳米粒的体外释放曲线

Fig 14 In vitro release profile of PAH drug-loaded nanoparticles

3 讨论

粒径大于 200 nm 的纳米载体可迅速被肝脏、脾脏等代谢器官清除, 小于 5 nm 的纳米载体又会被肾脏截留过滤^[36]。目前研究发现, 在中风、阿尔茨海默病、帕金森综合征、肿瘤等疾病的治疗中, 纳米载体通常采用 50 ~ 200 nm 粒径^[37]。因此, 寻求合适的纳米粒径十分重要。

PAH 与 PBS 能够形成纳米粒的原因是 PAH 与磷酸根离子之间的静电与氢键作用^[38]。姜黄素在 0.1 mol · L⁻¹ 的 KOH 溶液中形成 Cur³⁻, 使得姜黄素带有很强的负电荷, 会与 PAH 发生静电结合, 磷酸盐可以使形成的纳米粒更加稳定^[33]。试验证明, PAH 纳米粒确实可以通过调节 PBS 浓度、单组分 KH₂PO₄ 浓度、单组分 Na₂HPO₄、NaCl 浓度来控制纳米粒的粒径。

微流控技术可以通过控制流速大小进一步控制纳米粒的粒径, 使得粒度分布更加均一。同时增加了纳米载体的包封率与载药量, 从而提高了姜黄素的溶解度和生物利用度。除此之外, 微流控技术制备纳米粒的过程中, 消耗的耗材极少, 节省聚合物材料, 特别适用于新型纳米材料的研究。但是在纳米粒的制备中发现, 微流控技术制备的纳米粒容易因流速大、芯片堵塞等原因, 导致芯片受损, 因此一定要注意流速的控制以及及时清洗。

参考文献

[1] Zhao E, Zhao Z, Wang J, et al. Surface engineering of gold nanoparticles for in vitro siRNA delivery [J]. *Nanoscale*, 2012, 4 (16): 5102-5109.

[2] Janeesh PA, Sami H, Dhanya CR, et al. Biocompatibility and genotoxicity studies of polyallylamine hydrochloride nanocapsules in rats [J]. *RSC Adv*, 2014, 4 (47):

24484-24497.

[3] Varga N, Csapó E, Majláth Z, et al. Targeting of the kynurenic acid across the blood-brain barrier by core-shell nanoparticles [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2016, 86 (2): 67-74.

[4] Ruesing J, Rotan O, Gross-Heitfeld C, et al. Nanocapsules of a cationic polyelectrolyte and nucleic acid for efficient cellular uptake and gene transfer [J]. *J Mater Chem B*, 2014, 2 (29): 4625-4630.

[5] Alekseenko L, Shilina M, Kozhukharova I, et al. Impact of polyallylamine hydrochloride on gene expression and karyotypic stability of multidrug resistant transformed cells [J]. *Cells*, 2020, 9 (10): 2332.

[6] Di Silvio D, Martínez-Moro M, Salvador C, et al. Self-assembly of poly (allylamine) /siRNA nanoparticles, their intracellular fate and siRNA delivery [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2019, 557 (19): 757-766.

[7] Slika L, Moubarak A, Borjac J, et al. Preparation of curcumin-poly (allylamine) hydrochloride based nanocapsules: piperine in nanocapsules accelerates encapsulation and release of curcumin and effectiveness against colon cancer cells [J]. *Mater Sci Eng C*, 2020, 109: 110550.

[8] Mouslmani M, Rosenholm JM, Prabhakar N, et al. Curcumin associated poly (allylamine hydrochloride) -phosphate self-assembled hierarchically ordered nanocapsules: size dependent investigation on release and DPPH scavenging activity of curcumin [J]. *RSC Adv*, 2015, 5 (24): 18740-18750.

[9] Tiwari SK, Agarwal S, Seth B, et al. Curcumin-loaded nanoparticles potently induce adult neurogenesis and reverse cognitive deficits in Alzheimer's disease model via canonical Wnt/β-catenin pathway [J]. *ACS Nano*, 2014, 8 (1): 76-103.

[10] Voulgaropoulou SD, Van AT, Prickaerts J, et al. The effect of curcumin on cognition in Alzheimer's disease and healthy aging: a systematic review of pre-clinical and clinical studies [J]. *Brain Res*, 2019, 1725: 146476.

[11] Bhat A, Mahalakshmi AM, Ray B, et al. Benefits of curcumin in brain disorders [J]. *Biofactors*, 2019, 45 (5): 666-689.

[12] Askarizadeh A, Barreto GE, Henney NC, et al. Neuroprotection by curcumin: a review on brain delivery strategies [J]. *Int J Pharm*, 2020, 585 (6): 119476.

[13] Zou X, Himbert S, Dujardin A, et al. Curcumin and homotaurine suppress amyloid-β25-35 aggregation in synthetic brain membranes [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2021, 12 (8): 1395-1405.

[14] Benameur T, Soleti R, Panaro MA, et al. Curcumin as prospective anti-aging natural compound: focus on brain [J]. *Molecules*, 2021, 26 (16): 4794.

[15] 钟喆, 何正文, 杨杰, 等. 姜黄素对胶质瘤细胞 MMP2 mRNA 表达的影响 [J]. *中南药学*, 2017, 15 (11): 1546-1549.

[16] Cheow WS, Hadinoto K. Green amorphous nanoplex as

- a new supersaturating drug delivery system [J]. *Langmuir*, 2012, 28 (15): 6265-6275.
- [17] 韩阳, 付艳秋, 陈仁财, 等. 响应曲面法优化原花青素柔性纳米脂质体的制备 [J]. *中南药学*, 2015, 13 (9): 926-929.
- [18] 寇梦璇. 卵白蛋白-CMC 自组装纳米颗粒包埋姜黄素体系构建与表征 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2019.
- [19] 方俊, 柳威, 汤梦婕, 等. 丹参酮 II APEG-PE 纳米胶束的制备、体外释放及在急性心肌缺血模型大鼠体内的脏器靶向性 [J]. *中南药学*, 2018, 16 (7): 925-930.
- [20] 果秋婷, 李昱, 冯华, 等. 蛇床子素自乳化释药系统的制备与质量评价 [J]. *中南药学*, 2018, 16 (7): 958-962.
- [21] 童晓东, 范永春, 严玮. 姜黄素维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯-聚乙二醇硬脂酸酯 15 胶束对姜黄素溶解度和口服生物利用度的影响 [J]. *中草药*, 2017, 48 (5): 902-906.
- [22] 徐东伟, 刘同祥. 乙醇注入法制备柚皮素脂质体及其质量评价 [J]. *中南药学*, 2015, 13 (12): 1266-1269.
- [23] Yallapu MM, Khan S, Maher DM, et al. Anti-cancer activity of curcumin loaded nanoparticles in prostate cancer [J]. *Biomaterials*, 2014, 35 (30): 8635-8648.
- [24] 李映, 王莉芳, 王金铃, 等. 穿心莲内酯-甘草酸纳米胶束的制备工艺研究 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43 (1): 79-85.
- [25] Tran TT, Nguyen MH, Tan YZ, et al. Microfluidic synthesis of amorphous drug-polysaccharide nanoparticle complex with tunable size intended for supersaturating drug delivery applications [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017, 112 (17): 196-203.
- [26] Liu D, Zhang H, Fontana F, et al. Current developments and applications of microfluidic technology toward clinical translation of nanomedicines [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 128 (23): 54-83.
- [27] Tresset G, Marculescu C, Salonen A, et al. Fine control over the size of surfactant-polyelectrolyte nanoparticles by hydrodynamic flow focusing [J]. *Anal Chem*, 2013, 85 (12): 5850-5856.
- [28] 袁洲, 刘洁, 杨亚妮, 等. 微流控技术制备纳米制剂的研究与应用前景 [J]. *中国医药工业杂志*, 2021, 52 (4): 440-450.
- [29] 沈逸怀. 三级胺氮氧化物聚合物纳米递药体系与微流控分步可控制备纳米复合物的研究 [D]. 杭州: 浙江大学.
- [30] Andreozzi P, Ricci C, Porcel JEM, et al. Mechanistic study of the nucleation and conformational changes of polyamines in presence of phosphate ions [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2019, 543 (34): 335-342.
- [31] Karnik R, Gu F, Basto P, et al. Microfluidic platform for controlled synthesis of polymeric nanoparticles [J]. *Nano Lett*, 2008, 8 (9): 2906-2912.
- [32] Kimura N, Maeki M, Sato Y, et al. Development of a microfluidic-based post-treatment process for size-controlled lipid nanoparticles and application to siRNA delivery [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12 (30): 34011-34020.
- [33] Mouslmani M, Rosenholm JM, Prabhakar N, et al. Curcumin associated poly (allylamine hydrochloride) -phosphate self-assembled hierarchically ordered nanocapsules: size dependent investigation on release and DPPH scavenging activity of curcumin [J]. *RSC Adv*, 2015, 5 (24): 18740-18750.
- [34] 肖亚若. RDP 修饰的姜黄素长循环脂质体靶向脑胶质瘤递药系统的研究 [D]. 重庆: 重庆大学, 2017.
- [35] Majedi FS, Hasani-Sadabadi MM, VanDersarl JJ, et al. On-chip fabrication of paclitaxel-loaded chitosan nanoparticles for cancer therapeutics [J]. *Adv Funct Mater*, 2014, 24 (4): 432-441.
- [36] Zhou Z, Liu X, Zhu D, et al. Nonviral cancer gene therapy: delivery cascade and vector nanoproperty integration [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 115 (23): 115-154.
- [37] Chen Y, Liu L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64 (7): 640-665.
- [38] Andreozzi P, Diamanti E, Py-Daniel KR, et al. Exploring the pH sensitivity of poly (allylamine) phosphate supramolecular nanocarriers for intracellular siRNA delivery [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9 (44): 38242-38254.

(收稿日期: 2022-04-28; 修回日期: 2022-05-12)

紫花地丁提取物抗红色毛癣菌的作用研究

王桂荣, 程丽丽, 朱南南, 陈莹, 孙志蓉* (北京中医药大学 中药学院, 北京 102488)

摘要: **目的** 探究紫花地丁提取物抗红色毛癣菌的作用。**方法** 采用透射电镜观察紫花地丁提取物对红色毛癣菌细胞结构的影响, 利用高效液相色谱法测定麦角甾醇浓度, 利用酶联免疫法和荧光分光光度法考察角鲨烯环氧化酶、 β -1, 3-D-葡聚糖合成酶和琥珀酸脱氢酶的活性。**结果** 当质量浓度为 $0.781 \sim 12.500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 紫花地丁提取物对红色毛癣菌细胞结构具有破坏作用; 随着紫花地丁提取物浓度的增加, 红色毛癣菌中的麦角甾醇含量逐渐降低; 紫花地丁提取物以剂量依赖性的方式抑制角鲨烯环氧化酶、 β -1, 3-D-葡聚糖合酶和琥珀酸脱氢酶的活性, 在质量浓度为 $6.250 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时抑制作用最显著 ($P < 0.01$)。**结论** 紫花地丁提取物抗红色毛癣菌的作用可能通过降低角鲨烯环氧化酶、 β -1, 3-D-葡聚糖合成酶和琥珀酸脱氢酶的生物活性, 抑制细胞膜麦角甾醇的生物合成, 进而破坏细胞膜结构的完整性、影响红色毛癣菌的能量代谢, 最终导致红色毛癣菌细胞死亡, 达到杀菌目的。

关键词: 抗真菌作用; 麦角甾醇; 超微结构; 紫花地丁; 红色毛癣菌

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2813-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.018

Antifungal effect of *Viola yedoensis* Makino extract on *Trichophyton rubrum*

WANG Gui-rong, CHENG Li-li, ZHU Nan-nan, CHEN Ying, SUN Zhi-rong* (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: Objective To determine the antifungal effect of *Viola yedoensis* Makino extract on *Trichophyton rubrum*. **Methods** Transmission electron microscope was used to evaluate the ultrastructures of *Trichophyton rubrum* treated by *Viola yedoensis* Makino extract. The biosynthesis of ergosterol was analysed with HPLC, and the concentrations of squalene epoxidase, β -1, 3-D-glucan synthase, and succinic dehydrogenase were determined with enzyme-linked immunosorbent assay and fluorescence spectrophotometry. **Results** *Viola yedoensis* Makino extract showed antifungal effect on *Trichophyton rubrum* at $0.781 \sim 12.500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The synthesis of ergosterol in *Trichophyton rubrum* decreased with the content increase of *Viola yedoensis* Makino extract. The synthesis of squalene epoxidase, β -1, 3-D-glucan synthase, and succinic dehydrogenase were attenuated by *Viola yedoensis* Makino extract in a dose-dependent manner, especially at $6.250 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($P < 0.01$). **Conclusion** Antifungal effect of *Viola yedoensis* Makino extract on *Trichophyton rubrum* may act by decreasing the synthesis of squalene epoxidase, β -1, 3-D-glucan synthase, and succinic dehydrogenase to inhibit the synthesis of ergosterol, which further destroys the integrity of cell membrane structure, affects the energy metabolism of *Trichophyton rubrum* and eventually leads to cell death for sterilization.

Key words: antifungal effect; ergosterol; ultrastructure; *Viola yedoensis* Makino; *Trichophyton rubrum*

红色毛癣菌 *Trichophyton rubrum* 是导致慢性、广泛和浅部皮肤癣菌病的主要致病真菌, 发病率为 $20\% \sim 25\%$ ^[1-2], 常见的有足癣、体

癣、股癣等皮肤病, 特别是在高危人群中更易发, 包括糖尿病和获得性免疫缺陷综合征的相关人群^[3-4]。因真菌的耐药性不断增强^[3], 皮肤癣

基金项目: 国家现代农业产业技术体系资助 (No. CARS-21)。

作者简介: 王桂荣, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药资源质量研究, email: w15194181161@163.com *通信作者: 孙志蓉, 女, 教授, 主要从事中药资源质量与开发研究, email: zrs67@126.com

菌病发病率也在逐年上升。目前可用于治疗皮肤癣菌病的药物种类有限,传统的抗真菌药物包括唑类和多烯类,通常存在耐药性、活性谱窄等问题^[5-6]。皮肤癣菌的耐药性问题日益严重,已引起全球研究者的广泛关注^[7]。因此迫切需要寻找和开发新的有效的药物^[8]。中草药具有疗效好、来源广泛、不良反应少、耐药性低等优势。紫花地丁 *Viola yedoensis* Makino 为堇菜科堇菜属植物,主要分布在中国、日本和韩国^[9],以干燥全草入药,在民间被广泛用于治疗疔病、尿路感染和咽炎等症^[10]。贵州省东南部的侗医常用紫花地丁粉剂来治疗足癣和体癣,临床疗效显著^[11]。紫花地丁中含有黄酮类、黄酮苷类、香豆素类等化学成分,具有抗菌、抗炎、抗病毒等作用,开发前景广阔^[12-13]。研究表明,紫花地丁对红色毛癣菌具有抗真菌活性^[11],但其作用机制尚不明确。该文以红色毛癣菌为观测对象,考察紫花地丁提取物的抗真菌作用,并探讨其作用机制,为紫花地丁的开发利用提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 材料

紫花地丁植物取自贵州省东南地区黎平县山区,海拔 > 600 m,采集时间为 2014 年 11 月,经 DNA 条形码技术识别为紫花地丁 *Viola yedoensis* Makino^[11],用清水冲洗整株植物,干燥备用。红色毛癣菌 *Trichophyton rubrum* (编号 ATCC 4438) 由中国医学科学院(南京)皮肤病医院提供。沙氏培养基:蛋白胨 1%,葡萄糖 4%。皂化剂:氢氧化钾 25 g,加甲醇溶解,置于 250 mL 量瓶中,定容。

无水乙醇、无水丙酮(北京化工厂);25%戊二醛、1%钼酸、包埋剂环氧树脂、固化剂十二烷基琥珀酸(DDSA)、增塑剂邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、加速剂二乙基苯胺(DEA)(北京中兴百瑞技术有限公司);麦角甾醇对照品(成都普菲德生物技术有限公司,HPLC ≥ 98%,批号:141104);水为二次蒸馏水,吐温 20、无菌 NaCl 溶液、PBS 磷酸盐缓冲液(pH = 7.2)(北京索莱宝科技有限公司)。真菌酵母角鲨烯环氧化酶(squalene epoxidase)活性比色法定量检测试剂盒(美国 GENMED);真菌细胞 β-(1,3)-D-葡聚糖合成酶活性定量检测试剂盒(美国 GENMED);真菌/酵母细胞琥珀酸脱氢酶(SDH)活性比色法定量检测试剂盒(美国 GENMED);Pierce BCA Protein Assay Kit(美国 Thermo Fisher scientific 公司)。

1.2 仪器

OHAUS CP224C 型电子分析天平(奥豪斯仪器有限公司);XDTD-6000 型恒温水浴锅(上海仪器仪表有限公司);RE-52AA 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);GHP-9080 隔水式恒温培养箱(上海恒科学仪器有限公司);LT-CPS 立式压力蒸汽灭菌器[立德泰勃(上海)科学仪器有限公司];7800 制刀机(瑞典 LKB 公司);EMUC6 超薄切片机(德国 Leica 公司);H-7500 型透射电镜(日本日立公司);3K15 高速冷冻离心机(德国 SIGMA 公司);Waters 1525 型液相色谱仪(美国沃特世公司);BioTek Synergy2 多功能酶标仪(美国 BioTek 公司);Centrifuge 5920 R 低温台式离心机(德国 eppendorf);Beckman J-301 低温超速离心机(德国 Beckman)。

2 方法与结果

2.1 紫花地丁提取物制备

取紫花地丁药材粉末 50 g,每次加 50% 乙醇 750 mL,加热回流提取 2 次,每次 180 min,合并提取液,减压浓缩后干燥粉碎备用,干膏得率为 23.02%。干膏干燥粉碎,取 5 g,用水定容至 50 mL,制成提取液质量浓度为 0.1 g · mL⁻¹ 的紫花地丁提取液^[11]。置于冰箱,4℃ 备用。

2.2 菌接种液制备

制备 1% 吐温 20 溶液(0.4 mL 吐温 20 与 40 mL 0.9% 的氯化钠溶液混匀,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,备用)。将受试的红色毛癣菌接种于沙氏固体培养基上,于 30℃ 培养 7 d。吸取 5 mL 无菌 1% 吐温 20 溶液,冲洗菌落表面的菌丝和孢子,取冲洗液置于匀浆器中研磨均匀,冲洗液用血细胞计数板记载,将其浓度调制为 8 × 10⁵ cfu · mL⁻¹。根据前期研究,将其分为对照组和紫花地丁提取物处理组。

2.3 样品制备及电镜观察

2.3.1 对照组 135 μL 红色毛癣菌(红色毛癣菌孢子数为 1 × 10⁵ cfu)与 2 mL 沙氏培养基在 30℃ 下培养 7 d。

2.3.2 处理组 将紫花地丁提取物用沙氏培养基倍比稀释成不同质量浓度,分别为 12.500、6.250、3.125、1.563、0.781 mg · mL⁻¹。分别吸取上述不同质量浓度的提取液各 2 mL 置于试管,加入 135 μL 红色毛癣菌(即每管中红色毛癣菌孢子数为 1 × 10⁵ cfu)在 30℃ 下培养 7 d。

2.3.3 样品制备和观察 将菌丝转移到 1.5 mL 的离心管中,在 4℃ 下用戊二醛(3.5%)固定 2 h。将混合物浸入 4℃ 的 1% 钼酸溶液中 2 h,乙醇脱水。再将切片嵌入环氧树脂中,用醋酸铀酰和柠

檬酸铅染色, 置电子透射显微镜下观察。

在对照组中, 红色毛癣菌的细胞壁和细胞膜完整且无损伤 (见图 1a)。0.781 mg · mL⁻¹ 紫花地丁提取物处理的红色毛癣菌, 除细胞壁轻微增厚和玻璃化外, 细胞无明显变化 (见图 1b)。在质量浓度为 1.563 mg · mL⁻¹ 和 3.125 mg · mL⁻¹ 时, 细胞质基质随着空泡化的存在而明显减少, 形成高电子密度的颗粒结构, 尤其是在质量浓度为 3.125 mg · mL⁻¹ 时 (见图 1c 和图 1d)。当质量浓度为 6.250 mg · mL⁻¹ 时, 红色毛癣菌的细胞壁破裂, 细胞膜皱缩、破裂, 在细胞内可见较多的泡状结构, 几乎没有完整的细胞器结构。质量浓度为 12.500 mg · mL⁻¹ 时, 细胞壁破裂, 细胞膜皱缩、破裂, 细胞质基质几乎完全溶解、消失, 高电子密度凝集块遍布在细胞内外。在质量浓度为 0.781 ~ 12.500 mg · mL⁻¹ 时, 紫花地丁提取物抗红色毛癣菌的作用体现在破坏细胞结构, 造成细胞膜损伤、细胞质基质消除、空泡化等, 最终导致细胞坏死。

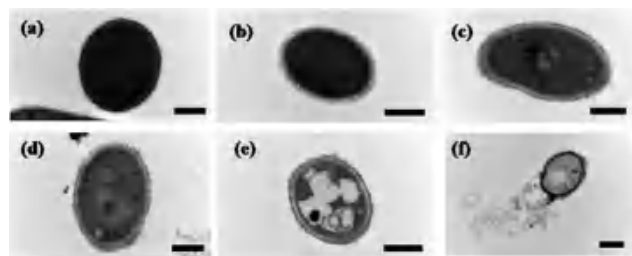


图 1 不同浓度的紫花地丁提取物处理后红色毛癣菌的形态

Fig 1 Morphology of *Trichophyton rubrum* treated with different concentrations of the extract of *Viola yedoensis* Makino

a. 对照组 (control group); b. 0.781 mg · mL⁻¹ 组 (0.781 mg · mL⁻¹ group); c. 1.563 mg · mL⁻¹ 组 (1.563 mg · mL⁻¹ group); d. 3.125 mg · mL⁻¹ 组 (3.125 mg · mL⁻¹ group); e. 6.250 mg · mL⁻¹ 组 (6.250 mg · mL⁻¹ group); f. 12.500 mg · mL⁻¹ 组 (12.500 mg · mL⁻¹ group); 比例尺: 1 μm (scale: 1 μm)。

2.4 统计分析

利用 GraphPad Prism 5.0 软件进行数据分析, 组间比较使用 Student *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.5 HPLC 测定麦角甾醇的浓度^[12-13]

2.5.1 色谱条件 DIAMONSIL-C18 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 甲醇等度洗脱, 流速: 1 mL · min⁻¹; 柱温: 30 °C; 检测波长: 282 nm; 分析时间: 24 min; 进样量: 20 μL。

2.5.2 样品制备 将对照组和紫花地丁提取物低、中、高浓度处理组 (1.563、3.125、6.250 mg · mL⁻¹) 的红色毛癣菌样品在 30 °C 下培养 2 h, 用 PBS 洗涤, 以 10 000 r · min⁻¹ 的速度将混合物离心 10

min, 去除上清液。精密称取湿菌 (0.1 g) 转移到圆底烧瓶中, 并在 80 °C 下与皂化剂混合 90 min, 再添加 15 mL 利格伦, 在 60 °C 水浴锅中孵育后获得脂质。将混合物过滤膜, 采用高效液相色谱法测定麦角甾醇的浓度。

2.5.3 方法学考察

① 线性关系: 精密称取麦角甾醇对照品 3.08 mg, 用甲醇定容至 100 mL 量瓶内, 得到 0.0308 mg · mL⁻¹ 的麦角甾醇对照品溶液。甲醇稀释得到质量浓度为 0.0154、0.0077、0.003 85、0.001 925 mg · mL⁻¹ 的溶液, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标制备标准曲线。得回归方程 $Y = 2 \times 10^7 X - 2.824 \times 10^4$, $R^2 = 0.9996$, 表明麦角甾醇在 0.001 925 ~ 0.0308 mg · mL⁻¹ 内与峰面积线性关系良好, 麦角甾醇的保留时间为 16.922 min。色谱图见图 2。

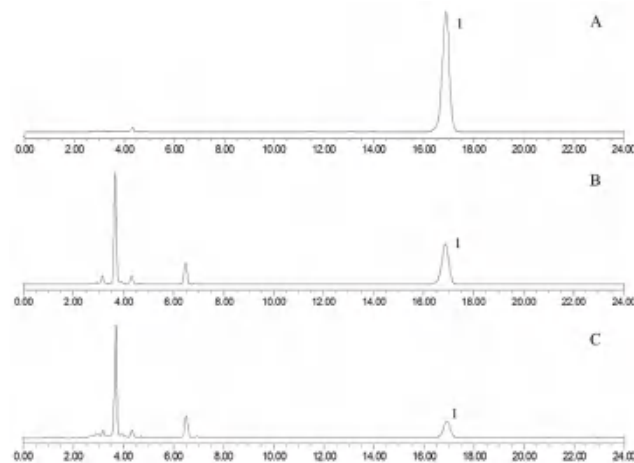


图 2 麦角甾醇 HPLC 图谱

Fig 2 HPLC chromatogram of ergosterol

A. 对照品 (control); B. 对照组 (control group); C. 紫花地丁提取物处理组 (extract group of *Viola yedoensis* Makino); 1. 麦角甾醇 (ergosterol)

② 稳定性: 精密吸取质量浓度为 3.125 mg · mL⁻¹ 的样品溶液, 在 0 ~ 12 h 内每隔 2 h 进样 20 μL, 记录峰面积, 计算得样品含量 *RSD* 值为 1.6%, 表明供试液在 12 h 内稳定性良好。

③ 精密度: 精密吸取 20 μL 麦角甾醇对照品溶液, 连续进样 5 次, 测得峰面积的 *RSD* 值为 1.0%, 表明仪器精密度良好。

④ 重复性: 制备 “2.5.2” 项下质量浓度为 3.125 mg · mL⁻¹ 样品共 5 份, 按 “2.5.1” 项下色谱条件进行测定, 得到峰面积的 *RSD* 值为 1.5%, 表明方法重现性良好。

⑤ 加样回收率: 精密称取 “2.5.2” 项下对照组菌丝 6 份, 每份 0.15 g, 另精密加入麦角甾醇对照品 0.18 μg, 加入称定的样品中, 进行样品制

备,按“2.5.1”项下色谱条件进行测定。结果麦角甾醇平均回收率为 96.64%,*RSD* 为 1.6%,表明该方法准确度良好。

2.5.4 紫花地丁提取物对红色毛癣菌中麦角甾醇合成的影响 与对照组相比,紫花地丁处理组红色毛癣菌中麦角甾醇的浓度显著降低 ($P < 0.05$)。在处理组中,高浓度组的麦角甾醇质量浓度显著低于低、中浓度组 ($P < 0.05$) (见表 1)。以往的研究发现,麦角甾醇合成减少与真菌细胞膜的异常变化密切相关,并最终导致细胞破裂^[14]。因此,抑制麦角甾醇的合成已被推荐为开发新的抗真菌药物的新途径^[15]。本研究结果表明,紫花地丁提取物能够抑制麦角甾醇的生物合成,并在 1.56 ~ 6.25 mg · mL⁻¹ 内以剂量依赖性的方式引发细胞损伤。

表 1 红色毛癣菌中麦角甾醇的含量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Tab 1 Ergosterol content in *Trichophyton rubrum* ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	结果 / ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)
对照组	$(0.0082 \pm 8.6352) \times 10^{-6}$
紫花地丁低浓度组	$(0.0038 \pm 5.3489) \times 10^{-6}^*$
紫花地丁中浓度组	$(0.0032 \pm 6.6806) \times 10^{-6}^{*#}$
紫花地丁高浓度组	$(0.0023 \pm 2.3845) \times 10^{-6}^{*#\Delta}$

注 (Note): 与对照组比较, $^*P < 0.05$; 与低浓度组比较, $^{\#}P < 0.05$; 与中浓度组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ (Compared with the control group, $^*P < 0.05$; compared with the low dose group, $^{\#}P < 0.05$; compared with the medium-dose group, $^{\Delta}P < 0.05$)。

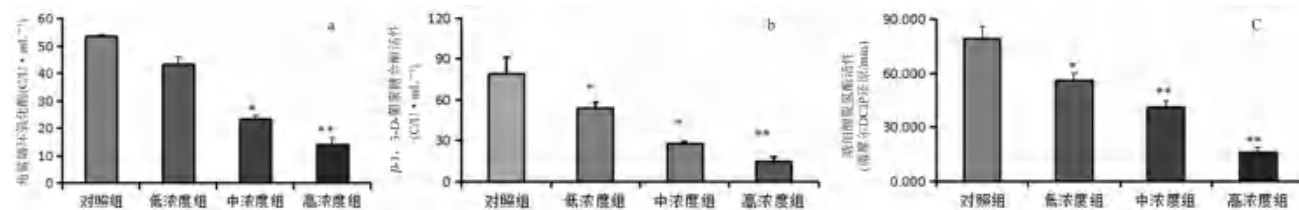


图 3 紫花地丁提取物对 3 种酶的活性的影响

Fig 3 Effect of extract of *Viola yedoensis* Makino on the activity of three enzymes

a. 角鲨烯环氧化酶 (squalene epoxidase); b. β -1, 3-D-葡聚糖合酶 (β -1, 3-D-glucan synthase); c. 琥珀酸脱氢酶的活性 (succinic dehydrogenase)

注 (Note): 与对照组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ (Compared with the control group, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$)。

观察表明,紫花地丁提取物可以首先穿透红色毛癣菌的细胞壁和细胞膜,导致细胞质和一些大分子的渗漏。同时,紫花地丁提取物可以抑制角鲨烯环氧化酶、 β -1, 3-D-葡聚糖合酶和琥珀酸脱氢酶的活性,从而导致红色毛癣菌细胞膜中麦角甾醇的合成减弱。越来越多的研究表明,抗真菌药物的有效性主要取决于抑制其细胞膜中参与麦角甾醇合成的酶活性,如氟康唑和特比萘芬^[16-17],而特比萘芬是通过阻断角鲨烯环氧化酶的环氧化反应,进而抑制麦角甾醇的合成^[18]。

麦角甾醇的合成涉及四个关键步骤,首先在

2.6 酶活性检测

在 30 °C 的沙氏培养基中培养 7 d 后,取对照组和紫花地丁提取液低 (1.563 mg · mL⁻¹)、中 (3.125 mg · mL⁻¹) 和高 (6.250 mg · mL⁻¹) 质量浓度组红色毛癣菌新鲜溶液 (10 mL),使用试剂盒测定角鲨烯环氧化酶、 β -1, 3-D-葡聚糖合成酶、琥珀酸脱氢酶的活性。按照说明书操作,重复 3 次。

与对照组相比,低浓度组的角鲨烯环氧化酶活性差异不显著 ($P > 0.05$, 见图 3a),但中、高剂量组的角鲨烯环氧化酶活性明显下降 ($P < 0.05$)。红色毛癣菌 β -1, 3-D-葡聚糖合酶的活性在紫花地丁提取物处理组中也显著降低,尤其是高剂量组 ($P < 0.01$, 见图 3b)。此外,与对照组相比,紫花地丁提取物处理组红色毛癣菌中琥珀酸脱氢酶的活性也显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, 见图 3c)。

3 讨论与结论

随着真菌感染发病率逐年上升,真菌病已严重影响到了人们的生活和健康,而真菌对抗某些抗菌药物的耐药性逐渐增强,人们已经开始从中草药中寻找高效、低毒、安全的抗真菌药物。紫花地丁作为少数民族使用的一种治疗脚气的常用药材,但其作用机制还不明确。本实验结果证明,紫花地丁提取物在 0.781 ~ 12.500 mg · mL⁻¹ 下对红色毛癣菌具有抑制、杀灭的作用。透射电镜

乙酰辅酶 A 的基础上合成 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (HMGCoA),脱去辅酶 A 形成甲羟戊酸。之后甲羟戊酸会传递给角鲨烯,进而形成羊毛甾醇,并最终转化为麦角甾醇^[19-20]。在这个过程中,角鲨烯环氧化酶是将角鲨烯转化为麦角甾醇的关键酶^[21]。烯丙胺和硫脲同系物通过抑制角鲨烯环氧化酶的活性显示出抗真菌作用^[22],阻断麦角甾醇的合成。此外, β -葡聚糖是细胞壁的主要成分之一,占细胞干重的 48% ~ 60%,对于维持渗透压、生长和细胞分化至关重要^[23]。通过抑制 β -(1, 3)-葡聚糖合成酶,影响 β -葡聚糖的合成,可导

致真菌细胞壁结构破坏。除此之外,琥珀酸脱氢酶是线粒体中线粒体内膜的结合酶,参与呼吸和脂肪酸降解^[24-25]。本研究结果证实了紫花地丁提取物通过抑制角鲨烯环氧化酶、 β -1, 3-D-葡聚糖合酶的活性诱导膜破裂,并通过抑制琥珀酸脱氢酶的活性干扰呼吸链电子传递系统。此外,紫花地丁提取物可引起细胞壁和细胞膜的破裂以及能量代谢中断,从而导致红色毛癣菌细胞坏死。紫花地丁提取物作用于红色毛癣菌细胞的多个位点,破坏并最终导致细胞裂解。紫花地丁抗红色毛癣菌的作用明显,且资源较丰富,具有开发治疗红色毛癣菌表面真菌感染药物的潜力。本文研究和阐述了紫花地丁的抗真菌作用,但其活性成分及其作用靶点还有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide [J]. *Mycoses*, 2008, 51 (4): 2-15.
- [2] Balci DD, Cetin M. Widespread, chronic, and fluconazole-resistant *Trichophyton rubrum* infection in an immunocompetent patient [J]. *Mycoses*, 2008, 51 (6): 546-548.
- [3] Guarner J, Brandt ME. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2011, 24 (2): 247-280.
- [4] Murata M, Yamada T, Muto M, et al. Subcutaneous trichophyton rubrum abscesses in an immunocompromised patient [J]. *Dermatol*, 2020, 47 (3): 95-96.
- [5] Revie NM, Lyer KR, Robbins N, et al. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2018, 45: 70-76.
- [6] 李福明, 汪洋, 汪少华. 黄芩苷对白色念珠菌生物膜形成的体外抑制作用 [J]. *海峡药学*, 2016, 28 (3): 224-226.
- [7] Monod M. Antifungal resistance in dermatophytes: emerging problem and challenge for the medical community [J]. *Mycol Med*, 2019, 29 (4): 283-284.
- [8] 杨龙飞. 抗白色念珠菌中药小分子的发现及相关机制研究 [D]. 吉林: 吉林大学, 2019.
- [9] Xie C, Veitch NC, Houghton PJ, et al. Flavone C-glycosides from *Viola yedoensis* Makino [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2003, 51 (10): 1204-1207.
- [10] 李雯. 紫花地丁和柴胡多糖的抗炎作用研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2013.
- [11] 程丽丽. 紫花地丁抗真菌作用研究及其酊剂的制备 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [12] 曹捷. 紫花地丁黄酮苷类成分的定性定量研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2013.
- [13] 周海艳, 秦民坚, 洪俊丽, 等. 紫花地丁的化学成分 (英文) [J]. *中国天然药物*, 2009, 7 (4): 290-292.
- [14] Plaine A, Walker L, Da Costa G, et al. Functional analysis of *Candida albicans* GPI-anchored proteins: roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity [J]. *Fungal Genet Biol*, 2008, 45 (10): 1404-1414.
- [15] Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. Current and emerging azole antifungal agents [J]. *Clin Microbiol Rev*, 1999, 12 (1): 40-79.
- [16] Ghannoum M, Isham N, Verma A, et al. In vitro antifungal activity of naftifine hydrochloride against dermatophytes [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57 (9): 4369-4372.
- [17] Gamarra S, Rocha EM, Zhang YQ, et al. Mechanism of the synergistic effect of amiodarone and fluconazole in *Candida albicans* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54 (5): 1753-1761.
- [18] Nowosieski M, Hoffmann M, Wyrwicz LS, et al. Detailed mechanism of squalene epoxidase inhibition by terbinafine [J]. *J Chem Inf Model*, 2011, 51 (2): 455-462.
- [19] Porter FD, Herman GE. Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis [J]. *J Lipid Res*, 2011, 52 (1): 6-34.
- [20] Ohto C, Muramatsu M, Obata S, et al. Prenyl alcohol production by expression of exogenous isopentenyl diphosphate isomerase and farnesyl diphosphate synthase genes in *Escherichia coli* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73 (1): 186-188.
- [21] Abe I, Seki T, Noguchi H, et al. Galloyl esters from rhubarb are potent inhibitors of squalene epoxidase, a key enzyme in cholesterol biosynthesis [J]. *Planta Med*, 2000, 66 (8): 753-756.
- [22] Ryder NS. Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition [J]. *Br J Dermatol*, 1992, 126 (Suppl 39): 2-7.
- [23] Liu X, Han Y, Peng K, et al. Effect of traditional Chinese medicinal herbs on *Candida* spp. from patients with HIV/AIDS [J]. *Adv Dent Res*, 2011, 23 (1): 56-60.
- [24] Miettinen M, Killian JK, Wang ZF, et al. Immunohistochemical loss of succinate 222 dehydrogenase subunit A (SDHA) in gastrointestinal stromal tumors (GISTs) signals SDHA germline mutation [J]. *Am J Surg Pathol*, 2013, 37 (2): 234-240.
- [25] Rossmanith W. Of P and Z: mitochondrial tRNA processing enzymes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1819 (9-10): 1017-1026.

(收稿日期: 2022-05-01; 修回日期: 2022-07-13)

天南星的化学成分研究

罗雨萌, 孙延平, 黎冠兰, 杨炳友, 匡海学* (黑龙江中医药大学省部共建教育部北药基础与应用研究重点实验室/黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室/黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040)

摘要: **目的** 研究天南星的化学成分。**方法** 采用硅胶、ODS、Sephadex LH-20 等柱色谱法以及制备型 HPLC 对天南星 70% 乙醇提取液进行分离纯化, 运用 HR-ESI-MS 和 NMR 等多种波谱学方法对化合物结构进行鉴定。**结果** 从天南星中分离并鉴定了 10 个化合物, 分别为 *cis*-coniferin (1), coniferin (2), methylconiferin (3), icarisides F2 (4), 3-methylbutan-1-ol β -D-glucopyranoside (5), *n*-hexyl *O*- β -D-glucopyranoside (6), apigenin-7-*O*-neohesperidoside (7), kaempferol 3-*O*-rutinoside (8), pinoresinol-4-*O*- β -D-glucoside (9), pinoresinol (10)。**结论** 化合物 1~8 为首次从天南星科植物中分离得到, 其中化合物 7、8 对脂多糖诱导的 BV-2 细胞的炎症反应具有抑制作用。

关键词: 天南星; 化学成分; 糖苷; 黄酮; 木脂素

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2818-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.019

Chemical constituents of *Arisaema erubescens* (Wall.) Schott

LUO Yu-meng, SUN Yan-ping, LI Guan-lan, YANG Bing-you, KUANG Hai-xue* (Key Laboratory of Basic Research and Application of Northern Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040)

Abstract: **Objective** To determine the chemical constituents from *Arisaema erubescens* (Wall.) Schott. **Methods** Silica gel, ODS, Sephadex LH-20 column chromatography and preparative HPLC were used to separate and purify the 70% ethanol extract of *Arisaema amurense* (Wall.) Schott. HR-ESI-MS, NMR and other spectroscopic methods were used to identify the structure of the compounds. **Results** Ten compounds were obtained from *Arisaema amurense* (Wall.) Schott and identified as *cis*-coniferin (1), coniferin (2), methylconiferin (3), icarisides F2 (4), 3-methylbutan-1-ol β -D-glucopyranoside (5), *n*-hexyl *O*- β -D-glucopyranoside (6), apigenin-7-*O*-neohesperidoside (7), kaempferol 3-*O*-rutinoside (8), pinoresinol-4-*O*- β -D-glucoside (9), and pinoresinol (10). **Conclusion** Compounds 1~8 have been isolated from Araceae for the first time. Compounds 7 and 8 can inhibit lipopolysaccharide induced inflammation in BV-2 microglial cells.

Key words: *Arisaema erubescens* (Wall.) Schott; chemical constituent; glycoside; flavonoid; lignan

中药天南星 *Arisaema Rhizoma* 为天南星科天南星属植物天南星 *Arisaema erubescens* (Wall.) Schott、异叶天南星 *A. heterophyllum* Bl. 或东北天南星 *A. amurense* Maxim. 的干燥块茎, 其味苦、辛, 性温, 是临床燥湿化痰、祛风止痉、散结消

肿的常用药^[1-3]。为寻找其活性成分, 本文对天南星 70% 乙醇提取物进行了系统研究, 从中共分离并鉴定了 10 个化合物 (结构见图 1), 包括 6 个糖苷类化合物, 2 个黄酮类化合物, 2 个木脂素类化合物, 分别为 *cis*-coniferin (1), coniferin (2),

基金项目: 国家中医药管理局中医药传承与创新“百千万”人才工程——岐黄工程首席科学家支持项目 (编号: 国中医药人教函〔2021〕7 号); 国家中医药管理局中医药传承与创新“百千万”人才工程 (岐黄工程) 岐黄学者支持项目 (编号: 国中医药人教函〔2018〕284 号); 2022 年全国名老中医药专家传承工作室建设项目 (编号: 国中医药人教函〔2022〕75 号); 第七批全国老中医药专家学术经验继承工作项目 (编号: 国中医药人教函〔2022〕76 号); 黑龙江省“头雁”团队支持项目 (编号: 黑龙江省头雁行动领导小组文件〔2019〕5 号)。

作者简介: 罗雨萌, 女, 博士研究生, 主要从事中药药效物质基础和中药药性理论研究, email: 909693919@qq.com *通信作者: 匡海学, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药药效物质基础和中药药性理论研究, email: hxkuang@hljucm.net

methylconiferin (3), icarisides F2 (4), 3-methylbutan-1-ol β -D-glucopyranoside (5), *n*-hexyl *O*- β -D-glucopyranoside (6), apigenin-7-*O*-neohesperidoside (7), kaempferol 3-*O*-rutinoside (8), pinoresinol-4-*O*- β -D-glucoside (9), pinoresinol (10), 其中化合物 1~8 为首次从天南星科植物中分离得到。现报道如下。

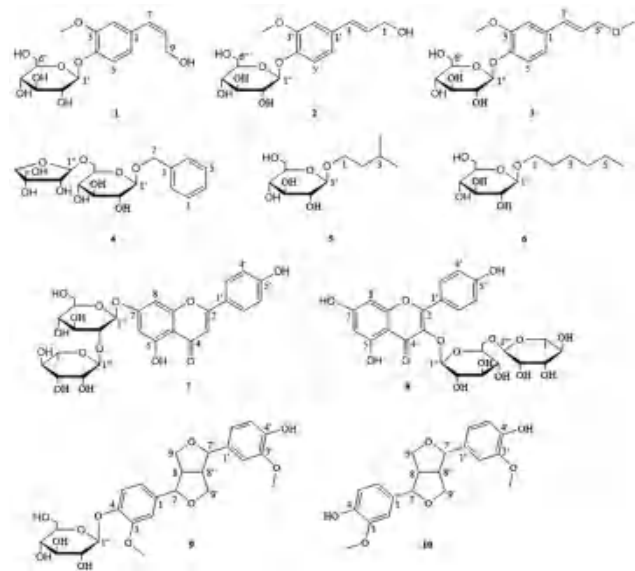


图 1 化合物 1~10 结构图

Fig 1 Structures of compounds 1~10

1 材料

旋转蒸发仪 (EYELA 公司); AV-600 型超导核磁共振仪 (Bruker 公司); Q-TOF (ESI) 高分辨质谱仪 (Waters 公司); 制备型高效液相色谱 (岛津公司); 分析型高效液相色谱 (Waters 公司); 恒温培养箱 (美国赛默飞公司); Sunfire 半制备色谱柱 (10 mm×250 mm, 5 μ m, Waters); Sephadex LH-20 (GE Healthcare 公司); 反相 ODS (YMC 公司); 柱色谱硅胶 (200~300 目, 80~100 目); 薄层色谱硅胶 (青岛海洋化工厂); 色谱甲醇 (默克公司); 胰酶细胞消化液 (碧云天公司); 脂多糖 (LPS, 美仑生物); BV-2 细胞及专用培养基 (普诺赛)。一氧化氮 (NO) 检测试剂盒 (碧云天公司)。其余试剂均为分析纯。

天南星药材于 2021 年 6 月采收于安徽省亳州, 经黑龙江中医药大学药学院苏连杰教授鉴定为天南星 *Arisaema erubescens* (Wall.) Schott。原植物标本 (20210821) 保存于黑龙江中医药大学中药化学实验室。

2 方法

2.1 提取与分离

天南星药材 20 kg (干燥), 以 70% 乙醇为溶

剂, 加热回流提取 3 次, 每次 2 h, 减压回收溶剂, 最终得到提取物 1.4 kg。将提取物与水均匀混悬, 采用乙酸乙酯及水饱和正丁醇依次进行萃取, 并将得到的萃取液分别浓缩至浸膏状, 最终得到正丁醇萃取部位浸膏 400 g。取 300 g 的正丁醇层浸膏经正相硅胶柱色谱进行分离, 以二氯甲烷-甲醇 (50:0 $\rightarrow$ 0:1) 系统为流动相进行梯度洗脱, 经硅胶薄层色谱检识, 合并相同斑点的流份, 最终得到 6 个组分即 Fr. A~Fr. F。Fr. B 经 ODS 柱色谱, 硅胶柱色谱以及制备型 HPLC 分离得化合物 1 (4.6 mg)、2 (3.0 mg)、4 (3.5 mg)、10 (3.8 mg)。Fr. E 经 ODS 柱色谱, 凝胶柱色谱以及制备型 HPLC 分离得化合物 3 (3.0 mg)、5 (5.5 mg)、6 (5.2 mg)。Fr. F 经硅胶柱色谱, 凝胶柱色谱以及制备型 HPLC 分离得化合物 7 (2.5 mg)、8 (5.6 mg)、9 (3.0 mg)。

2.2 化合物细胞毒性实验

用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解各化合物至 50 mmol·L⁻¹, 于 -20℃ 储存备用, 实验时用 DMEM 培养液稀释至 100 μ mol·L⁻¹。BV-2 细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化后, 重悬于完全培养基中, 以 1×10⁵ 个·mL⁻¹ 细胞 (每孔 100 μ L) 接种于 96 孔板, 置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱内培养 24 h 后换成无血清的新鲜培养液, 同时进行加药处理。设空白对照组, 在模型组及各给药组中加入 LPS (1 μ g·mL⁻¹), 每孔 10 μ L。继续培养 24 h 后, 每孔取 50 μ L 上清与 50 μ L Greiss 试剂, 室温反应 15 min。室温反应 15 min, 测定上清液中 NO 的含量。

3 结果

3.1 结构鉴定

化合物 1: 白色粉末, HR-ESI-MS m/z : 343.1386 [M+H]⁺ (计算值 343.1388), 分子式为 C₁₆H₂₂O₈。¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ : 7.13 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-2), 6.89 (1H, d, J = 1.7 Hz, H-5), 6.77 (1H, dd, J = 8.3, 1.7 Hz, H-6), 6.48 (1H, d, J = 12.0, 6.4 Hz, H-7), 5.77 (1H, dt, J = 12.0, 6.4 Hz, H-8), 4.33 (2H, dd, J = 6.4, 1.6 Hz, H-9), 4.90 (1H, J = 7.4 Hz, H-1'), 3.49 (1H, m, H-2'), 3.40 (1H, m, H-3'), 3.40 (1H, m, H-4'), 3.49 (1H, m, H-5'), 3.86 (1H, m, H-6'a), 3.68 (1H, m, H-6'b), 3.86 (3H, s, 3-OCH₃)。 ¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ : 133.2 (C-1), 117.6 (C-2), 150.5 (C-3), 147.3 (C-4), 114.4 (C-5), 122.9 (C-6), 131.1 (C-7), 131.9 (C-

8), 59.9 (C-9), 102.7 (C-1'), 74.9 (C-2'), 78.3 (C-3'), 71.4 (C-4'), 77.9 (C-5'), 62.5 (C-6'), 56.8 (3-OCH₃)。以上数据与文献报道^[4]基本一致, 故鉴定化合物 **1** 为 *cis-coniferin*。

化合物 **2**: 白色粉末, HR-ESI-MS m/z : 343.1386 [M + H]⁺ (计算值 343.1388), 分子式为 C₁₆H₂₂O₈。¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ : 4.23 (2H, d, $J = 5.6$ Hz, H-1), 6.27 (1H, td, $J = 6.0, 15.8$ Hz, H-2), 6.54 (1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-3), 7.09 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 7.10 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 6.94 (1H, dd, $J = 2.0, 8.3$ Hz, H-6'), 4.89 (1H, d, $J = 7.1$ Hz, H-1''), 3.50 (1H, m, H-2''), 3.48 (1H, m, H-3''), 3.40 (1H, m, H-4''), 3.45 (1H, m, H-5''), 3.86 (1H, m, H-6''a), 3.68 (1H, m, H-6''b), 3.87 (3H, s, H-OCH₃)。 ¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ : 63.7 (C-1), 128.9 (C-2), 131.3 (C-3), 133.7 (C-1'), 111.4 (C-2'), 150.9 (C-3'), 147.7 (C-4'), 118.0 (C-5'), 120.8 (C-6'), 102.8 (C-1''), 74.9 (C-2''), 77.9 (C-3''), 71.4 (C-4''), 78.2 (C-5''), 62.5 (C-6''), 56.7 (3-OCH₃)。以上数据与文献报道^[5]基本一致, 故鉴定化合物 **2** 为 *coniferin*。

化合物 **3**: 白色粉末, HR-ESI-MS m/z : 357.1546 [M + H]⁺ (计算值 357.1544), 分子式为 C₁₇H₂₄O₈。¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ : 7.10 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-2), 7.08 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-5), 6.97 (1H, dd, $J = 8.3, 1.8$ Hz, H-6), 6.58 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-1'), 6.22 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-2'), 4.06 (1H, dd, $J = 6.2, 1.3$ Hz, H-3'), 4.89 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1''), 3.48 (1H, m, H-2''), 3.45 (1H, m, H-3''), 3.35 (1H, m, H-4''), 3.35 (1H, m, H-5''), 3.86 (1H, m, H-6''a), 3.68 (1H, m, H-6''b), 3.88 (3H, s, 2-OCH₃), 3.37 (3H, s, 3'-OCH₃)。 ¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ : 133.3 (C-1), 111.4 (C-2), 150.9 (C-3), 147.8 (C-4), 117.9 (C-5), 120.9 (C-6), 133.6 (C-1'), 125.6 (C-2'), 74.9 (C-3'), 102.7 (C-1''), 74.9 (C-2''), 77.9 (C-3''), 71.3 (C-4''), 78.2 (C-5''), 62.5 (C-6''), 56.7 (2-OCH₃), 58.1 (3'-OCH₃)。以上数据与文献报道^[6]基本一致, 故鉴定化合物 **3** 为 *methylconiferin*。

化合物 **4**: 白色粉末, HR-ESI-MS m/z : 403.1596 [M + H]⁺ (计算值 403.1599), 分子式

为 C₁₈H₂₆O₁₀。 ¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ : 7.24 ~ 7.43 (5H, m, H-2 ~ H-6), 4.89 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-7a), 4.65 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-7b), 4.32 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 3.49 (1H, m, H-2'), 3.40 (1H, m, H-3'), 3.40 (1H, m, H-4'), 3.49 (1H, m, H-5'), 3.86 (1H, m, H-6'a), 3.68 (1H, m, H-6'b), 5.04 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-1''), 4.81 (1H, m, H-2''), 4.33 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-4'a), 4.65 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-4'b), 4.20 (2H, s, H-5'')。 ¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ : 139.0 (C-1), 129.3 (C-2), 128.7 (C-3), 128.2 (C-4), 128.7 (C-5), 129.3 (C-6), 71.2 (C-7), 103.2 (C-1'), 75.0 (C-2'), 78.1 (C-3'), 71.8 (C-4'), 77.0 (C-5'), 68.7 (C-6'), 111.1 (C-1''), 78.1 (C-2''), 80.6 (C-3''), 75.0 (C-4''), 65.6 (C-5'')。以上数据与文献报道^[7]基本一致, 故鉴定化合物 **4** 为 *icarisides F2*。

化合物 **5**: 白色粉末, HR-ESI-MS m/z : 251.1488 [M + H]⁺ (计算值 251.1490), 分子式为 C₁₁H₂₂O₆。 ¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ : 3.66 (1H, m, H-1a), 3.94 (1H, m, H-1b), 1.51 (2H, dd, $J = 7.0, 7.0$ Hz, H-2), 1.74 (1H, m, H-3), 0.92 (6H, s, CH₃), 4.24 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-1'), 3.15 (1H, m, H-2'), 3.33 (1H, m, H-3'), 3.33 (1H, m, H-4'), 3.55 (1H, m, H-5'), 3.86 (1H, m, H-6'a), 3.68 (1H, m, H-6'b)。 ¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ : 69.3 (C-1), 39.7 (C-2), 26.1 (C-3), 23.0 (C-4), 23.1 (C-5), 104.4 (C-1''), 75.2 (C-2''), 78.2 (C-3''), 71.7 (C-4''), 78.0 (C-5''), 62.8 (C-6'')。以上数据与文献报道^[8]基本一致, 故鉴定化合物 **5** 为 3-methylbutan-1-ol- β -D-glucopyranoside。

化合物 **6**: 白色粉末, HR-ESI-MS m/z : 265.1648 [M + H]⁺ (计算值 265.1646), 分子式为 C₁₂H₂₄O₆。 ¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ : 3.53 (1H, dt, $J = 8.8, 6.8$ Hz, H-1a), 3.88 (1H, dt, $J = 8.8, 6.8$ Hz, H-1b), 1.61 (2H, m, H-2), 1.38 (2H, m, H-3), 1.33 (2H, m, H-4), 1.34 (2H, m, H-5), 0.90 (3H, t, $J = 6.7$ Hz, H-6), 4.23 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'), 3.15 (1H, m, H-2'), 3.25 (1H, m, H-3'), 3.33 (1H, m, H-4'), 3.52 (1H, m, H-5'), 3.87 (1H, m, H-6'a), 3.65 (1H, m, H-6'b)。 ¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ : 70.9 (C-1), 30.8 (C-2), 26.8 (C-3), 32.9 (C-4), 23.7

(C-5), 14.4 (C-6), 104.4 (C-1'), 75.1 (C-2'), 78.1 (C-3'), 71.7 (C-4'), 77.9 (C-5'), 62.8 (C-6')。以上数据与文献报道^[9]基本一致, 故鉴定化合物 **6** 为 *n*-hexyl *O*- β -D-glucopyranoside。

化合物 **7**: 白色粉末, HR-ESI-MS m/z : 579.1700 $[M + H]^+$ (计算值 579.1709), 分子式为 $C_{27}H_{30}O_{14}$ 。 1H -NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ : 6.67 (1H, s, H-3), 6.45 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-6), 6.78 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-8), 7.88 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2', 6'), 6.92 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 5'), 5.19 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 3.48 (1H, m, H-2''), 3.45 (1H, m, H-3''), 3.35 (1H, m, H-4''), 3.35 (1H, m, H-5''), 3.86 (1H, m, H-6''a), 3.68 (1H, m, H-6''b), 5.28 (1H, brs, H-1'''), 3.34-3.94 (5H, m, H-2''' ~ H-6'''), 1.32 (2H, d, $J = 6.2$ Hz, H-6''')。 ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ : 164.3 (C-2), 102.6 (C-3), 184.1 (C-4), 161.4 (C-5), 99.8 (C-6), 163.0 (C-7), 96.0 (C-8), 159.0 (C-9), 104.2 (C-10), 123.1 (C-1'), 129.7 (C-2'), 117.1 (C-3'), 161.4 (C-4'), 117.1 (C-5'), 129.7 (C-6'), 101.0 (C-1''), 79.1 (C-2''), 79.0 (C-3''), 71.4 (C-4''), 78.3 (C-5''), 62.4 (C-6''), 102.6 (C-1'''), 72.2 (C-2'''), 72.1 (C-3'''), 74.0 (C-4'''), 70.0 (C-5'''), 18.3 (C-6''')。以上数据与文献报道^[10]基本一致, 故鉴定化合物 **7** 为 apigenin-7-*O*-neohesperidoside。

化合物 **8**: 白色粉末, HR-ESI-MS m/z : 595.1659 $[M + H]^+$ (计算值 595.1658), 分子式为 $C_{27}H_{30}O_{14}$ 。 1H -NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ : 6.21 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-6), 6.41 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-8), 8.05 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', 6'), 6.88 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'), 5.12 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1''), 3.51 (1H, m, H-2''), 3.45 (1H, m, H-3''), 3.35 (1H, m, H-4''), 3.35 (1H, m, H-5''), 3.79 (1H, m, H-6''a), 3.62 (1H, m, H-6''b), 4.50 (1H, brs, H-1'''), 3.34-3.94 (5H, m, H-2''' ~ H-6'''), 1.11 (2H, d, $J = 6.2$ Hz, H-6''')。 ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ : 159.5 (C-2), 135.5 (C-3), 179.5 (C-4), 163.1 (C-5), 100.0 (C-6), 166.1 (C-7), 94.9 (C-8), 158.6 (C-9), 105.7 (C-10), 122.8 (C-1'), 132.4 (C-2'), 116.2 (C-3'), 161.5 (C-4'), 116.2 (C-5'), 132.4 (C-6'), 104.6 (C-1''), 75.8 (C-2''), 78.2 (C-3''), 72.3

(C-4''), 77.3 (C-5''), 68.6 (C-6''), 102.5 (C-1'''), 71.5 (C-2'''), 72.1 (C-3'''), 73.9 (C-4'''), 69.8 (C-5'''), 17.9 (C-6''')。以上数据与文献报道^[11]基本一致, 故鉴定化合物 **8** 为 kaempferol 3-*O*-rutinoside。

化合物 **9**: 白色粉末, HR-ESI-MS m/z : 521.2022 $[M + H]^+$ (计算值 521.2018), 分子式为 $C_{26}H_{32}O_{11}$ 。 1H -NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ : 6.97 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2), 7.13 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.91 (1H, dd, $J = 8.4$, 1.6 Hz, H-6), 4.68 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-7), 3.03 (1H, m, H-8), 4.16 (1H, m, H-9a), 3.78 (1H, m, H-9b), 6.92 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2'), 6.76 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.78 (1H, dd, $J = 8.4$, 1.6 Hz, H-6'), 4.64 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-7'), 3.03 (1H, m, H-8'), 4.16 (1H, m, H-9'a), 3.78 (1H, m, H-9'b), 3.87 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''), 3.15 (1H, m, H-2''), 3.25 (1H, m, H-3''), 3.33 (1H, m, H-4''), 3.52 (1H, m, H-5''), 3.85 (1H, m, H-6''a), 3.65 (1H, m, H-6''b), 3.80 (6H, s, 3, 3'-OCH₃)。 ^{13}C -NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ : 137.5 (C-1), 111.7 (C-2), 147.3 (C-3), 149.2 (C-4), 117.9 (C-5), 119.9 (C-6), 87.1 (C-7), 55.4 (C-8), 72.8 (C-9), 133.9 (C-1'), 111.2 (C-2'), 147.5 (C-3'), 150.9 (C-4'), 116.3 (C-5'), 120.2 (C-6'), 87.4 (C-7'), 55.5 (C-8'), 72.8 (C-9'), 102.8 (C-1''), 75.0 (C-2''), 77.9 (C-3''), 71.4 (C-4''), 78.2 (C-5''), 62.7 (C-6''), 57.0 (3-OCH₃), 56.7 (3'-OCH₃)。以上数据与文献报道^[12]基本一致, 故鉴定化合物 **9** 为 pinoresinol-4-*O*- β -D-glucoside。

化合物 **10**: 白色粉末, HR-ESI-MS m/z : 359.1486 $[M + H]^+$ (计算值 359.1490), 分子式为 $C_{20}H_{22}O_6$ 。 1H -NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ : 6.97 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2), 6.78 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5), 6.83 (1H, dd, $J = 8.1$, 1.8 Hz, H-6), 4.73 (1H, d, $J = 4.4$ Hz, H-7), 3.11 (1H, m, H-8), 4.25 (1H, dd, $J = 9.0$, 6.8 Hz, H-9a), 3.81 (1H, dd, $J = 9.0$, 3.6 Hz, H-9b), 6.97 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2'), 6.78 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6.83 (1H, dd, $J = 8.1$, 1.8 Hz, H-6'), 4.73 (1H, d, $J = 4.4$ Hz, H-7'), 3.11 (1H, m, H-8'), 4.25 (1H, dd, $J = 9.0$, 6.8 Hz, H-9'a), 3.81 (1H, dd, $J = 9.0$, 3.6 Hz,

H-9'b), 3.88 (6H, s, 3, 3'-OCH₃)。¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ : 133.8 (C-1), 111.0 (C-2), 149.1 (C-3), 147.3 (C-4), 116.1 (C-5), 120.1 (C-6), 87.5 (C-7), 55.4 (C-8), 72.6 (C-9), 133.8 (C-1'), 111.0 (C-2'), 149.1 (C-3'), 147.3 (C-4'), 116.1 (C-5'), 120.1 (C-6'), 87.5 (C-7'), 55.4 (C-8'), 72.6 (C-9'), 56.4 (3-OCH₃), 56.4 (3'-OCH₃)。以上数据与文献报道^[13]基本一致, 故鉴定化合物 **10** 为 pinoresinol。

3.2 化合物生物活性测试结果

采用 LPS 诱导 BV-2 小胶质细胞炎症模型, 通过 Griess 试剂法检测细胞上清液炎症因子 NO 的含量, 判断单体化合物对 LPS 诱导 BV-2 细胞炎症的拮抗作用。10 个化合物在终浓度为 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对 LPS 诱导的 BV-2 细胞的炎症反应进行测试, 结果如图 2 所示, 发现化合物 **7**、**8** 可抑制 LPS 诱导的 BV-2 细胞产生的 NO 的生成率分别为 (76.5 $\pm$ 2.93)%、(72.33 $\pm$ 2.73)% ($P < 0.01$), 提示化合物 **7**、**8** 具有一定的抗炎活性。

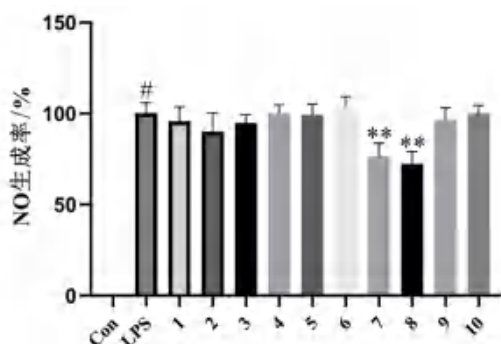


图 2 化合物对 LPS 诱导的 BV-2 细胞过量生成 NO 的影响

Fig 2 Effect of compounds on No induced by LPS in BV-2 microglial cells

注: 与空白对照组比较, # $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, # $P < 0.05$; compared with the LPS group, ** $P < 0.01$.

4 讨论

本研究对天南星 70% 乙醇提取物的正丁醇层进行系统的化学成分分离, 共得到 10 个化合物, 包括 6 个糖苷类化合物 *cis*-coniferin (**1**)、coniferin (**2**)、methylconiferin (**3**)、icarisides F2 (**4**)、3-methylbutan-1-ol- β -D-glucopyranoside (**5**)、

n-hexyl *O*- β -D-glucopyranoside (**6**), 2 个黄酮类化合物 apigenin-7-*O*-neohesperidoside (**7**)、kaempferol 3-*O*-rutinoside (**8**), 2 个木脂素类化合物 pinoresinol-4-*O*- β -D-glucoside (**9**)、pinoresinol (**10**)。其中化合物 **1**~**8** 为首次从天南星科植物中分离得到。化合物 **7**、**8** 能够抑制 LPS 诱导的 BV-2 细胞产生的 NO 的生成。本文进一步丰富了天南星植物的化学成分, 为深入挖掘天南星的药效物质基础, 合理利用药用资源提供了依据。

参考文献

- [1] 孙娜, 刘佳艺, 于婉莹, 等. 天南星化学成分及生物活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (20): 5194-5200.
- [2] 郑琇梅, 潘多, 曹杰, 等. 东北天南星化学成分的研究[J]. 中成药, 2020, 42 (1): 112-115.
- [3] 付鸣, 潘多, 许桢, 等. 东北天南星的化学成分研究[J]. 中药材, 2019, 42 (8): 1793-1795.
- [4] Dübeler A, Voltmer G, Gora V, et al. Phenols from *Fagus sylvatica* and their role in defence against *Cryptococcus fagisuga* [J]. *Phytochemistry*, 1997, 45 (1): 51-57.
- [5] Anh NQ, Yen TT, Hang NT, et al. Phenolic and lignan compounds from *Stixis suaveolens* [J]. *Vietnam J Chem*, 2019, 57 (3): 311-317.
- [6] Ping H, Gloria K, Pepter GW. Phenylpropanoid glycosides from *Typhonium flagelliforme* (Araceae) [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2004, 16 (5): 403-405.
- [7] Miyase T, Ueno A, Takizawa N, et al. Studies on the glycosides of *Epimedium grandiflorum* Morr. var. *thunbergianum* (Miq.) Nakai. III [J]. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36 (7): 2475-2484.
- [8] 黄金, 刘艳, 潘娟, 等. 北柴胡地上部分正丁醇层的化学成分研究[J]. 中医药学报, 2020, 48 (1): 38-41.
- [9] 李帅, 匡海学, 冈田嘉仁, 等. 鬼针草有效成分的研究 (II) [J]. 中草药, 2004, 35 (9): 972-975.
- [10] Feng W, Li K, Zheng X. A new norlignan lignanoid from *Selaginella moellendorffii* Hieron [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2011, 1 (1): 36-39.
- [11] 冯卫生, 郝志友, 郑晓珂, 等. 哥兰叶化学成分的研究[J]. 药学学报, 2007, 42 (6): 625-630.
- [12] Kim DK, Lim JP, Kim JW, et al. Antitumor and anti-inflammatory constituents from *Celtis sinensis* [J]. *Arch Pharm Res*, 2005, 28 (1): 39-43.
- [13] Xu W, Jin H, Zhang W, et al. Studies on the chemical constituents of *Daphne pedunculata* [J]. *Chem Nat Compd*, 2008, 44 (6): 771-772.

(收稿日期: 2022-07-08; 修回日期: 2022-10-20)

基于肠屏障功能探讨血府逐瘀胶囊防治卒中后抑郁作用研究

郑舒¹, 金博文¹, 李东娜¹, 田悦冬¹, 王跃飞¹, 宋纹³, 庄朋伟¹, 韩娟^{1*}, 石江伟^{2*} (1.天津中医药大学, 天津 301617; 2.天津中医药大学第一附属医院, 天津 301617; 3.天津宏仁堂药业有限公司, 天津 300385)

摘要: **目的** 明确血府逐瘀胶囊对卒中后抑郁 (PSD) 的治疗效果, 并基于网络药理学线索利用实验验证其关键作用途径。**方法** 利用 tMCAO 复合慢性不可预知应激手段复制大鼠 PSD 模型, 实验设置假手术组 (SHAM 组), 模型组 (PSD 组), 血府逐瘀胶囊高 (XFH, 2.16 g · kg⁻¹)、低 (XFL, 0.43 g · kg⁻¹) 剂量组, 氟西汀 (FLU, 0.0018 g · kg⁻¹) 组。除 SHAM 组和 PSD 组外其余各组每日灌胃给药, 连续 28 d。利用神经行为学评分、糖水偏好实验、旷场实验、强迫游泳实验、HE 染色技术考察血府逐瘀胶囊防治 PSD 的药效作用, 利用网络药理学技术初步探讨其关键作用环节; 基于肠屏障功能, 利用 FITC 标记的葡聚糖肠道渗透性、HE 染色技术验证血府逐瘀胶囊对肠屏障功能的影响; 利用 Western blot 技术考察血府逐瘀胶囊对大鼠结肠组织胞质紧密连接蛋白 1 (ZO-1), 紧密连接蛋白 (Occludin), 紧密连接蛋白 1 (claudin-1) 表达的影响。**结果** 药效学结果显示, 与 SHAM 组相比, PSD 组大鼠神经行为学评分显著升高, 糖水偏好率、自主活动显著降低, 不动时间显著延长, 神经元细胞数目减少、胞核固缩。与 PSD 组相比, XFL 组相关症状逐步改善, 神经行为学评分显著降低, 糖水偏好率、自主活动明显增加, 强迫游泳的不动时间显著减少, 神经元细胞数目增多, 核固缩减少。网络药理学结果显示, 血府逐瘀胶囊可调节炎症, 抑制 MAPK 信号通路的激活, 继而上调紧密连接蛋白的表达来修复肠屏障, 提示其防治 PSD 作用可能与改善肠屏障功能有关。利用整体动物实验对肠屏障功能进行验证, 结果表明与 SHAM 组相比, PSD 组肠道渗透性显著增加, 肠黏膜病理损伤, 病理评分明显升高, 肠组织 ZO-1、Occludin 与 claudin-1 表达水平显著下降; 与 PSD 组相比, XFL 组的结肠通透性显著降低, 肠黏膜病理损伤减轻, 肠组织 ZO-1、Occludin 和 claudin-1 的蛋白表达水平显著升高。**结论** 血府逐瘀胶囊可通过上调肠组织紧密连接蛋白表达改善脑缺血导致的肠屏障功能, 进而发挥防治 PSD 作用。

关键词: 血府逐瘀胶囊; 卒中后抑郁; 肠屏障功能; 网络药理学; 作用机制

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2823-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.020

Effect of Xuefu Zhuyu capsules on poststroke depression based on intestinal barrier function and related mechanism

ZHENG Shu¹, JIN Bo-wen¹, LI Dong-na¹, TIAN Yue-dong¹, WANG Yue-fei¹, SONG Wen³, ZHUANG Peng-wei¹, HAN Juan^{1*}, SHI Jiang-wei^{2*} (1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617; 2. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617; 3. Tianjin Hongrentang Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300385)

Abstract: **Objective** To evaluate the effect of Xuefu Zhuyu capsules on poststroke depression (PSD), and to verify its key pathway by experiments based on network pharmacological clues. **Methods** The PSD model of rats was established by tMCAO combined with chronic unpredictable mild stress. The present experiment included a sham group (SHAM), a model group (PSD), a Xuefu Zhuyu capsule high-dose group (XFH, 2.16 g · kg⁻¹), an XFH low-dose group (XFL, 0.43 g · kg⁻¹), and a fluoxetine (FLU, 0.0018 g · kg⁻¹) group. All rats were given alcohol intragastrically for 28 days except for the SHAM

基金项目: 天津市教委科研计划项目 (No.2019KJ060)。

作者简介: 郑舒, 女, 在读硕士, 主要从事方剂学研究, email: zhengshu23@126.com *通信作者: 石江伟, 男, 副主任医师, 博士, 主要从事中医药脑病康复相关基础与临床研究, email: rushk@163.com; 韩娟, 女, 教授, 博士, 主要从事方剂学研究, email: fangji05@126.com

group and the PSD group. The effect of Xuefu Zhuyu capsules on PSD was determined by neurobehavioral tests, sugar water preference experiment, open field experiment, forced swimming experiment and HE staining. Network pharmacology was used to explore the key element of Xuefu Zhuyu capsules in the prevention and treatment of PSD. FITC dextran gut permeability and HE staining were used to verify the effect of Xuefu Zhuyu capsules on the intestine barrier function. Western blot was used to verify the effect of Xuefu Zhuyu capsules on the expression of ZO-1, Occludin and claudin-1 in the rat colon.

Results Pharmacodynamic findings showed that as compared with the SHAM group, the PSD group's neurobehavioral scores increased, the sugar water preference rate, the autonomous activities were much decreased obviously, and the immobility time of forced swimming was significantly prolonged. The number of neuron cells was reduced, while nuclear pyknosis appeared. Compared with the PSD group, related symptoms gradually improved in the XFL group, sugar water preference rate, autonomous activities and the number of neuron cells significantly increased, while the immobility time of forced swimming experiment reduced. The network pharmacology showed that Xuefu Zhuyu capsule regulated inflammation, inhibited the activation of MAPK pathways, and up-regulated the expression of intestinal tight junction protein to repair the intestinal barrier, suggesting that the effect of Xuefu Zhuyu capsules on PSD might be related to the improvement in the intestinal barrier function. The animal experiment was used to verify the intestinal barrier function. Compared with the SHAM group, the PSD group significantly increased the intestinal permeability, pathological score, intestinal mucosa damage, and decreased the expression levels of ZO-1, Occludin and claudin-1 in the intestinal tissue. Compared with the PSD group, the colonic permeability and intestine damage were reduced in the XFL group, and the expression of ZO-1, Occludin and claudin-1 in the intestinal tissue was significantly increased. **Conclusion** Xuefu Zhuyu capsules may up-regulate the expression of the intestinal tight junction protein to improve the gut barrier dysfunction caused by cerebral ischemia, which further prevents PSD.

Key words: Xuefu Zhuyu capsule; poststroke depression; intestinal barrier function; network pharmacology; mechanism

卒中后抑郁 (PSD) 是脑中风恢复期常见的并发症。随着卒中患者数量增加, PSD 患者也随之增多, 有研究报道大约三分之一的中风患者罹患 PSD, 抑郁症状与功能结果成正相关, 与中风后长期病死率上升也密切相关^[1-2]。目前, PSD 一线治疗是基于单胺递质学说的抗抑郁药, 如 5-羟色胺再摄取抑制药 (SSRIs) 等, 但仍存在缓解率低等问题^[3]。传统中医药对脑损伤相关疾病具有丰富的临床经验与理论基础, PSD 属于中医郁证范畴, 脑卒中患者情绪低落, 肝气失调, 导致气滞血瘀, 治疗应以活血化瘀, 行气止痛为原则。血府逐瘀方由桃仁、红花、枳壳、赤芍等组成, 是行气活血的代表方。有多项研究表明, 血府逐瘀汤能够减轻 PSD 患者的抑郁症状, 改善卒中患者的神经功能, 提高其生存质量^[4-5], 然而目前关于血府逐瘀胶囊防治 PSD 的作用机制尚不深入。

PSD 发病机制较为复杂, 近年越来越多的研究表明 PSD 病理状态下肠组织促炎细胞因子分泌增加, 肠道通透性增加, 肠屏障功能损伤^[6]。提示卒中后肠屏障完整性对神经功能的恢复具有重要影响, 药物通过改善肠屏障功能可能是防

治 PSD 的重要作用机制。如有研究报道, 逍遥散不仅可以减轻实验动物的抑郁样症状, 还可影响结肠通透性, 上调结肠组织的紧密连接蛋白的表达, 基于肠脑轴改善肠屏障功能而发挥防治 PSD 的作用^[7]。鉴于此, 本文通过建立 PSD 模型, 拟首先明确血府逐瘀胶囊对 PSD 的防治作用, 在此基础上利用网络药理学技术初步探讨血府逐瘀胶囊防治 PSD 的关键作用环节, 并利用整体动物实验进行验证, 为血府逐瘀胶囊抗抑郁药效作用的开发提供了一定实验基础。

1 材料

Wistar 大鼠 50 只, 雄性, 8 周龄, 体质量为 260 ~ 280 g [北京维通利华生物技术有限责任公司, 许可证编号: Scxk (北京) 2016-0006], 动物实验由天津中医药大学实验动物伦理委员会批准。

血府逐瘀胶囊 (每粒 0.4 g, 天津宏仁堂药业股份有限公司, 批号: Z12020223), 根据文献选用临床等效剂量 ($0.43 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和 5 倍临床等效剂量 ($2.16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 为给药剂量^[8]。氟西汀 ($1.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 山西仟源医药集团股份有限公司, 批号: H20073985); 4% 组织细胞固定液 (P1110)、

RIPA 裂解液 (R0020)、PMSF (P0100)、BCA 蛋白测定试剂盒、HE 染色试剂盒 (北京 Solarbio 公司); Occludin (33-1500, 美国 Invitrogen 公司); ZO-1 (ab276131)、GAPDH (ab18162)、Claudin1 (ab242370)(英国 Abcam 公司)。

2 方法与结果

2.1 PSD 模型的复制

采用大脑中动脉梗死 (tMCAO) + 慢性不可预见温和应激法 (CUMS) 造模^[9-13]。tMCAO 手术结束, 于动物清醒 2 h 后进行神经功能评分^[14]。初步确定术后第 8 日应激开始, 随机接受 7 种不同方式的应激: ① 大鼠禁食 24 h; ② 大鼠禁水 24 h; ③ 光照时间 17 h; ④ 潮湿垫料; ⑤ 5 min 水平摇晃; ⑥ 45° 斜笼 24 h; ⑦ 4℃ 冰水游泳。

2.2 动物分组和给药

术后随机分成 5 组: 假手术组 (SHAM 组)、卒中后抑郁组 (PSD 组)、血府逐瘀低剂量组 (XFL 组, 0.43 g·kg⁻¹)、血府逐瘀高剂量组 (XFH 组, 2.16 g·kg⁻¹)、氟西汀组 (FLU 组 0.0018 g·kg⁻¹), 每组 10 只。术后第 8 日开始应激并灌胃药物, 连续 4 周。

2.3 血府逐瘀胶囊对实验性大鼠 PSD 的药效作用

2.3.1 改善 PSD 大鼠的神经行为学评分 分别在大鼠脑缺血后 24 h 和应激 28 d 后, 采用 Longa 神经病学评分^[15] 评定大鼠神经功能缺损。结果如表 1 所示, 在给药前, 与 SHAM 组相比, PSD 组、XFL 组、XFH 组以及 FLU 组的神经行为学评分显著升高 ($P < 0.001$), 表明术后大鼠的神经功能有损伤; 在给药后, 与 SHAM 组相比, PSD 组大鼠的评分显著升高 ($P < 0.001$), 而与 PSD 组相比, XFL 组、FLU 组的神经行为学评分均明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), XFH 组有下降的趋势。

表 1 血府逐瘀胶囊对卒中后 PSD 神经行为学的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab 1 Effect of Xuefu Zhuyu capsule on neuroethology in rats with PSD ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	给药前 / 分	给药 28 d / 分
SHAM 组	0	0
PSD 组	1.67 ± 0.5***	1.7 ± 0.48***
XFL 组	1.63 ± 0.52***	0.9 ± 0.25 [#]
XFH 组	1.69 ± 0.46***	1.25 ± 0.46
FLU 组	1.67 ± 0.43***	1.1 ± 0.22 [#]

注: 与 SHAM 组相比, *** $P < 0.001$; 与 PSD 组相比, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the SHAM group, *** $P < 0.001$; compared with the PSD group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$.

2.3.2 改善 PSD 大鼠糖水偏好率 各组大鼠在开始造 tMCAO 模型前 4 d 与 CUMS 后的第 29 日进行糖水偏好实验^[16]。结果显示, 与 SHAM 相比,

PSD 组糖水偏好率显著下降 ($P < 0.01$), 提示 PSD 组大鼠存在一定抑郁样症状。与 PSD 组相比, XFL 组、XFH 组、FLU 组的糖水偏好显著升高 ($P < 0.01$)(见表 2)。

2.3.3 改善 PSD 大鼠自主活动的作用 在结束 CUMS 后进行旷场实验, 采用开口的观察箱, 将大鼠放入箱底中央区域适应周围环境 60 s, 适应后进行测试, 记录 5 min 内直立次数、活动的总距离等。旷场实验开始之前 1 h 将大鼠放入测试房间内适应。结果显示, 与 SHAM 组相比, PSD 组活动的总距离与直立次数明显减少 ($P < 0.01$); 与 PSD 组相比, XFL 组活动的总距离与直立次数明显增加 ($P < 0.01$), XFH 组和 FLU 组活动的总距离与直立次数增加 ($P < 0.05$)(见表 2)。

表 2 血府逐瘀胶囊对卒中后 PSD 行为学的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab 2 Effect of Xuefu Zhuyu capsule on behaviors in rats with PSD ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	糖水偏好率 / %	旷场实验		强迫游泳不动时间 / s
		活动的总距离 / cm	直立次数	
SHAM 组	78 ± 8	73.35 ± 12.10	20.75 ± 4.50	122.50 ± 22.75
PSD 组	50 ± 12**	42.36 ± 19.63**	12.50 ± 3.67**	191.90 ± 10.10**
XFL 组	76 ± 7 ^{##}	69.00 ± 15.93 ^{##}	21.67 ± 3.39 ^{##}	145.17 ± 19.91 [#]
XFH 组	68 ± 12 ^{##}	65.00 ± 14.38 [#]	17.57 ± 4.83 [#]	139.43 ± 13.44 ^{##}
FLU 组	72 ± 8 ^{##}	67.14 ± 8.62 [#]	19.00 ± 4.16 [#]	137.43 ± 19.32 ^{##}

注: 与 SHAM 组相比, ** $P < 0.01$; 与 PSD 组相比, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the SHAM group, ** $P < 0.01$; compared with the PSD group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$.

2.3.4 减少 PSD 大鼠强迫游泳的不动时间 在开始 CUMS 后第 29 日进行强迫游泳实验^[17], 记录 6 min 内大鼠在水中静止不动的时间以评估大鼠是否处于绝望状态。结果如表 2 所示, 与 SHAM 相比, PSD 组的不动时间明显延长 ($P < 0.01$); 与 PSD 组相比, XFL 组、XFH 组以及 FLU 组的不动时间明显缩短 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.3.5 改善 PSD 大鼠脑组织病理形态 在各组大鼠结束行为学测试后, 经麻醉后 PBS 心脏灌注, 接着灌注 4% 多聚甲醛固定, 开颅取脑, 固定切片后进行苏木素-伊红染色, 脱水, 封片, 光镜下观察大脑的形态结构。结果如图 1 及表 3 显示, SHAM 组大鼠脑皮层未见病理改变, 神经元形态正常, 结构完整; PSD 组大鼠脑皮层可见明显的病理损伤, 常见细胞坏死, 神经元细胞数目明显减少 ($P < 0.001$), 胞核固缩, 颜色加深; XFL 组与 FLU 组的病变情况明显减轻, 脑皮层神经元数量显著增多 ($P < 0.01$), 细胞核固缩程度减轻, XFH 组病变情况有所好转, 神经元数量有增加的趋势。



图 1 血府逐瘀胶囊对 PSD 大鼠脑组织形态的影响 (HE, $\times 200$)

Fig 1 Effect of Xuefu Zhuyu capsule on brain histopathology in PSD rats (HE, $\times 200$)

表 3 血府逐瘀胶囊对卒中后 PSD 皮层存活神经元细胞的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)
Tab 3 Effect of Xuefu Zhuyu capsule on survival neurons of PSD rats cortex ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	神经元细胞数 / 个
SHAM 组	57.67 $\pm$ 10.07
PSD 组	19.67 $\pm$ 5.03***
XFL 组	45.67 $\pm$ 8.96##
XFH 组	37 $\pm$ 2.65
FLU 组	51 $\pm$ 3.61##

注: 与 SHAM 组相比, *** $P < 0.001$; 与 PSD 组相比, ## $P < 0.01$ 。
Note: Compared with the SHAM group, *** $P < 0.001$; compared with the PSD group, ## $P < 0.01$.

本研究通过整体动物行为学实验考察了血府逐瘀胶囊对 PSD 大鼠的治疗效果, 结果提示血府逐瘀胶囊具有明确的改善卒中后抑郁样行为的效果, 低剂量组效果更优, 因此选择 XFL 组进行后续实验。

2.4 血府逐瘀胶囊防治 PSD 的作用机制分析

在明确血府逐瘀胶囊防治 PSD 药效作用的基础上, 利用网络药理学对其作用机制进行初步研究, 以明确其潜在的作用环节, 并利用整体动物实验进行验证。

2.4.1 PSD 疾病相关靶点的搜集 在 GeneCards (<https://www.genecards.org>), OMIM (<https://omim.org>) 数据库搜索 PSD 的相关靶点, 关键词设置为“poststroke depression”, 筛选不同数据库的靶点, 去重取交集, 得到 170 个靶点。

2.4.2 血府逐瘀胶囊相关靶点的收集 利用 TCMS (www.tcmspw.com/tcmsp.php) 和 TCMID (47.100.169.139/tcmid) 数据库检索血府逐瘀胶囊化学成分的作用靶点。分别以“桃仁”“桔梗”“红花”“当归”“川芎”“赤芍”“生地黄”“枳壳”“柴胡”“甘草”“牛膝”为关键词进行搜索 [筛选条件为类药性 (DL) ≥ 0.18 , 口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$], 得到相应靶点, 去重后整理获得血府逐瘀胶囊所有药物的活性成分及靶点信息, 得到 244 个活性成分, 共获得有效靶点 606 个。接着将“2.4.1”与“2.4.2”项下得到的靶点取交集得到 47 个共同靶点, 对应 131 个有效成分。

2.4.3 药物 - 成分 - 疾病靶点 - 网络构建和分析 将交集靶点输入 Cytoscape 3.8.0 软件搭建药物 -

成分 - 疾病靶点图。如图 2 所示, 有 189 个节点, 485 条边。

2.4.4 构建蛋白质 - 蛋白质相互作用 (PPI) 的构建与分析 将交集靶点输入 STRING 网站 (<https://cn.string-db.org>) PPI 网络。利用 Cytoscape 软件中的 cytoNCA 插件中的度值 (DC)、介数中心性 (BC)、接近中心性 (CC) 3 个参数对得到的血府逐瘀胶囊治疗 PSD 的网络进行拓扑特征分析 [18]。以 DC、BC、CC 均大于 1 倍中位数为筛选标准, 得到网络的关键节点。

结果见图 3, 最小的互作分数值为 0.4, 共 47 个节点, 279 条边, 平均节点度是 11.9, 平均聚类系数是 0.711, $P < 1.0 \times 10^{-16}$, 以上结果表明交互作用极具显著性。进行网络拓扑分析得到核心靶点共有 5 个, 主要包括 TNF、IL-1 β 等。研究表明, 促炎细胞因子如 IL-1 β 、TNF- α 可引起肠屏障功能损伤, 导致肠道通透性的增加 [19]。

2.4.5 主要通路及 GO 功能富集分析结果 利用 R 4.1.2 软件, 结合 Bioconductor 软件, 将血府逐瘀胶囊治疗 PSD 的潜在作用靶点转化为基因 ID 后输入 David 数据库进行在线 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 将结果按校正后的 P 值升序排列, 取排名前 30 的 GO 功能条目以及 KEGG 通路分别绘制条形图 (见图 4、5), 综合预测血府逐瘀胶囊防治 PSD 的作用机制及关键病理环节。

结果显示, 其信号通路主要有 NF- κ B 通路, MAPK 通路以及 IL-17 信号通路等。GO 过程共得到 1660 个条目, 其中 BP 1561 个, CC 37 个, MF 61 个; 对血府逐瘀胶囊改善 PSD 具有显著影响的通路共 119 条; 根据其显著性程度分别列举了排名靠前的富集分析结果, 见图 5。生物过程富集结果主要涉及氧化应激反应、MAPK 的正向调节以及 ERK1 和 ERK2 的级联反应等。上皮细胞 NF- κ B 的激活可导致炎症因子如 TNF- α 、IL-1 β 的产生, 增加肠上皮通透性, 从而降低肠上皮紧密连接蛋白水平 [20]; 氧化应激可激活 MAPK 信号通路, 主要激活 MAPK 激酶, 继而激活细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 等蛋白, 共同参与肠上皮屏障功能的调控; IL-17 通过上调紧密连接相关基因的水平, 保护肠上皮屏障功

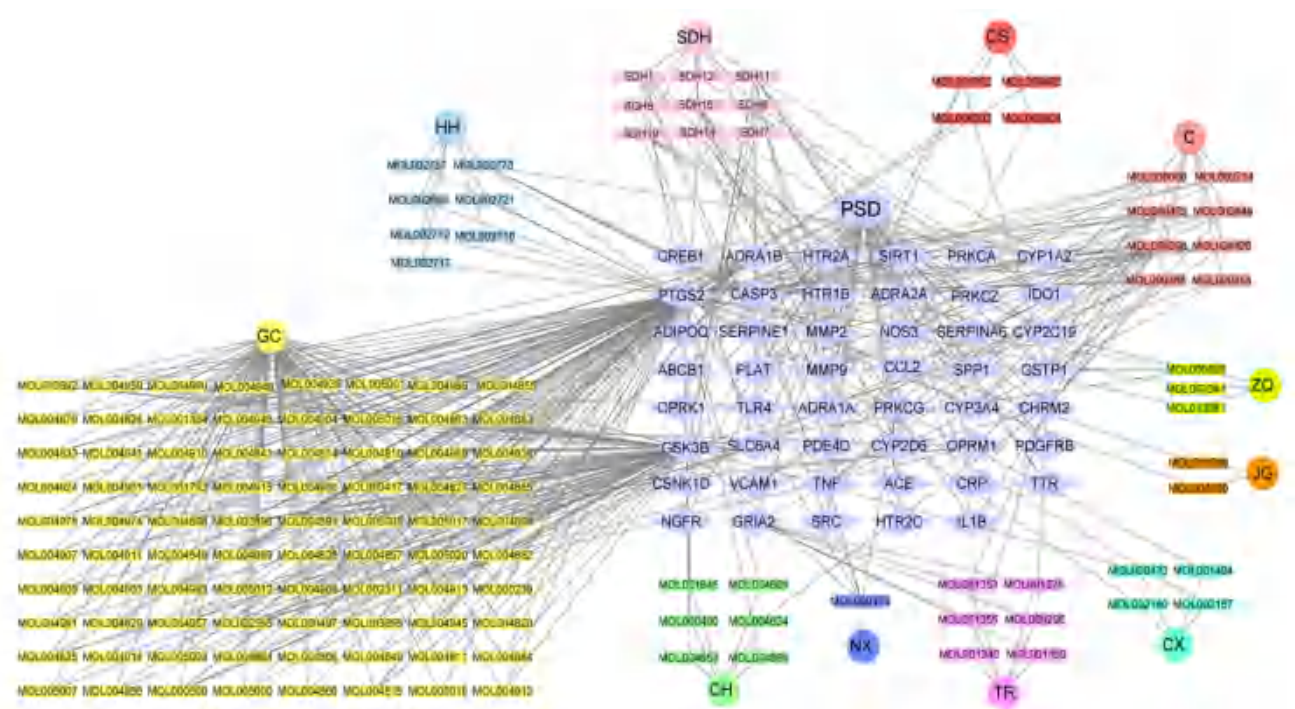


图 2 血府逐瘀胶囊药物-成分-疾病靶点图

Fig 2 Drug-compound-target network of Xuefu Zhuyu capsule

注：圆形节点为药物，长方形节点为成分，菱形节点为靶点，八边形节点为疾病名。

Note: Circular nodes are drugs, rectangular nodes are components, diamond nodes are targets, and octagonal nodes are disease names.

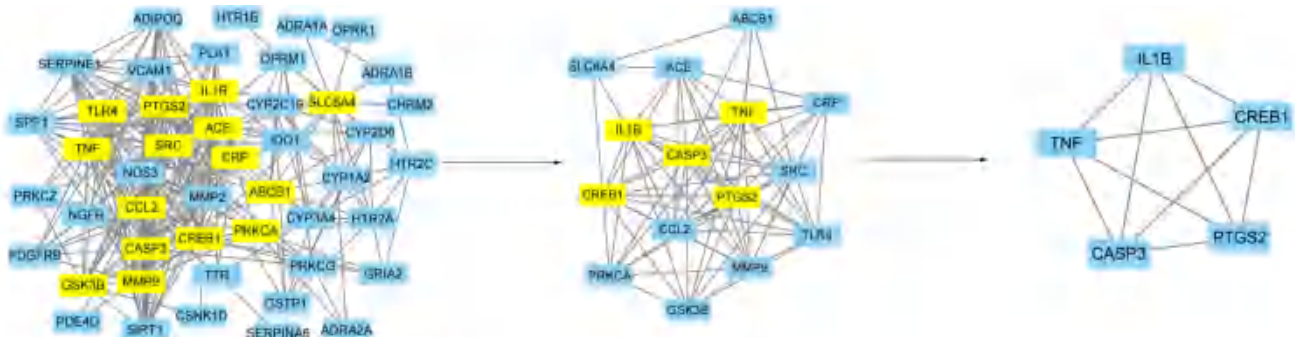


图 3 血府逐瘀胶囊防治卒中后抑郁潜在靶点的 PPI 网络

Fig 3 Protein-protein interaction network of Xuefu Zhuyu capsule anti-PSD target

能^[21]。这些信号通路共同调节肠上皮细胞紧密连接蛋白的表达，对紧密连接蛋白的分布、分解、磷酸化等进行调控，从而对紧密连接的结构及功能产生重要的作用。

利用网络药理学对血府逐瘀胶囊防治 PSD 的作用机制及关键作用环节进行了初步探讨，结果显示血府逐瘀胶囊可以影响 IL-1 β 、TNF- α 表达，从而下调 NF- κ B，抑制 MAPK 信号通路的激活，继而增加紧密连接蛋白的表达来修复肠上皮屏障功能，结果提示其防治 PSD 的作用可能与改善肠屏障功能有关。

2.5 血府逐瘀胶囊改善 PSD 肠屏障功能的实验验证

2.5.1 对 PSD 大鼠肠道渗透性的影响 将各组大

鼠禁食 12 h 后，进行腹腔麻醉，打开腹腔，在近盲端 5 cm 与 15 cm 处结扎，向回肠里注射 4 kDa-FITC 溶液 (40 mg·kg⁻¹) 0.2 mL，30 min 后取血，避光静置 2 h，4℃离心 10 min (3000 r·min⁻¹) 后取血清，测定其吸光度值，计算大鼠血清中所含 4-kDa FITC 的浓度并以此判断大鼠的肠道渗透性^[22]。结果如表 4 所示，与 SHAM 组相比，PSD 组的渗透性显著升高 ($P < 0.05$)；与 PSD 组相比，XFL 组的渗透性则显著降低 ($P < 0.05$)。

2.5.2 对 PSD 大鼠结肠形态的影响 各组大鼠行为学实验结束后，经麻醉后 PBS 心脏灌流，接着灌注 4% 多聚甲醛固定，取近盲端结肠，固定切片后进行苏木素-伊红染色，脱水，封片，光镜下观察结肠组织的形态结构，并根据病理组

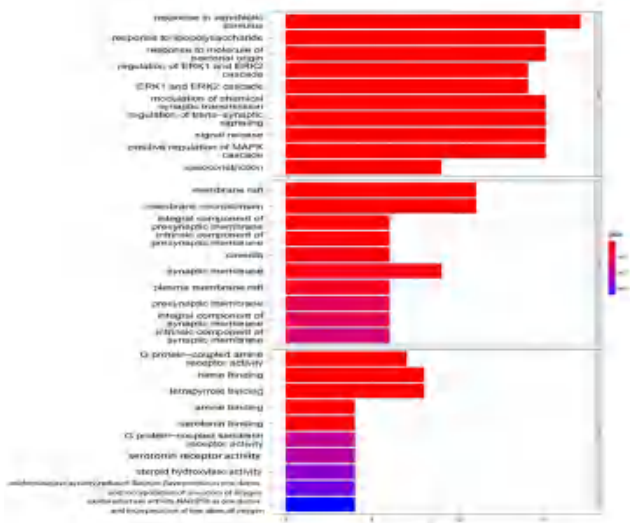


图 4 血府逐瘀胶囊防治卒中后抑郁的 GO 分析
Fig 4 GO terms of the anti-PSD targets of Xuefu Zhuyu capsule

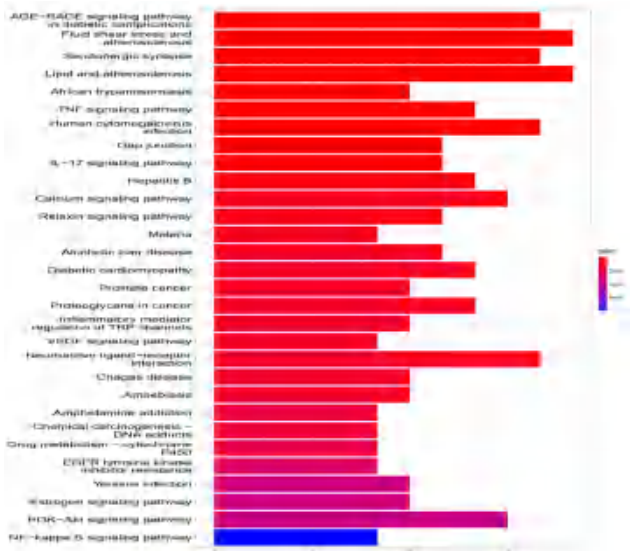


图 5 血府逐瘀胶囊防治卒中后抑郁的 KEGG 通路分析
Fig 5 KEGG pathways of the anti-PSD targets of Xuefu Zhuyu capsule

表 4 血府逐瘀胶囊对 PSD 大鼠肠道渗透性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)
Tab 4 Effect of Xuefu Zhuyu capsule on intestinal permeability in PSD rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	大鼠血清中所含 4-kDa FITC 的浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
SHAM 组	95.50 ± 24.62
PSD 组	190.70 ± 63.29*
XFL 组	98.91 ± 42.44#

注：与 SHAM 组相比，* $P < 0.05$ ；与 PSD 组相比，# $P < 0.05$ 。
Note: Compared with the SHAM group, * $P < 0.05$; compared with the PSD group, # $P < 0.05$.

织学^[23]对结肠进行病理评分。结果如图 6 所示，SHAM 组大鼠结肠肠腺排列良好，结构较为完整；与 SHAM 组相比，PSD 组大鼠的固有层黏膜有炎性细胞浸润，上皮结构与大肠腺被破坏；与

PSD 组相比，XFL 组大鼠减轻了炎性细胞的浸润程度，改善了腺体的损伤。病理评分见表 5。



图 6 血府逐瘀胶囊对 PSD 大鼠结肠组织病理学的影响 (HE, $\times 400$)
Fig 6 Effect of Xuefu Zhuyu capsule on colonic histopathology in PSD rats (HE, $\times 400$)

表 5 HE 染色结肠组织病理评分 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)
Tab 5 Colonic pathological score of HE staining images ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	上皮细胞 / 分	炎性细胞浸润 / 分	HS 评分 / 分
SHAM 组	0.63 ± 0.25	0.88 ± 0.25	1.5 ± 0.41
PSD 组	2.5 ± 0.71**	2.63 ± 0.75**	5.13 ± 1.38**
XFL 组	1 ± 0.41###	1.25 ± 0.29###	2.25 ± 0.65###

注：与 SHAM 组相比，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ；与 PSD 组相比，### $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the SHAM group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; compared with the PSD group, ### $P < 0.01$.

2.5.3 对 PSD 大鼠结肠 ZO-1, Occludin 和 claudin-1 表达的影响 各组大鼠结束行为学实验后麻醉，用 PBS 心脏灌注，取近盲端结肠组织，制备组织匀浆液，以 4℃、15 000 r · min⁻¹ 离心，收集上清液，测定其蛋白浓度，配成每 10 μL 中含 30 μg 蛋白的样品并煮沸变性，-20℃ 保存，备用。准备预制胶，进行加样，转膜，封闭，转膜，封闭，加入 ZO-1、Occludin 与 claudin-1 抗体，于 4℃ 冰箱孵育；次日加入二抗孵育 2 h，配置发光液，显影。标定 Marker，用 Image J 软件进行分析，对各组的蛋白进行相对表达量比较。结果显示，与 SHAM 组相比，PSD 组结肠组织 claudin-1、Occludin、ZO-1 的表达明显下调 ($P < 0.001$, $P < 0.01$)；与 PSD 组相比，XFL 组 claudin-1、Occludin, ZO-1 表达显著上调 ($P < 0.001$) (见表 6 及图 7)。

表 6 血府逐瘀胶囊对 PSD 大鼠结肠 ZO-1、Occludin、claudin-1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)
Tab 6 Effect of Xuefu Zhuyu capsule on the expression of ZO-1, Occludin and claudin-1 in colon of PSD rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	蛋白相对表达量		
	ZO-1	Occludin	claudin-1
SHAM 组	2.32 ± 0.93	2.42 ± 0.48	2.14 ± 0.44
PSD 组	1.12 ± 0.11**	1.52 ± 0.51***	1.28 ± 0.43***
XFL 组	2.31 ± 0.81###	2.24 ± 0.57###	2.12 ± 0.52###

注：与 SHAM 组相比，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ；与 PSD 组相比，### $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the SHAM group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; compared with the PSD group, ### $P < 0.001$.



图 7 血府逐瘀胶囊对 PSD 大鼠结肠组织紧密连接蛋白的影响

Fig 7 Effect of Xuefu Zhuyu on the intestinal tight junction protein in PSD rats

3 讨论

中医认为卒中后抑郁为“郁证”与“中风”并病，“郁证”发生于“中风”之后，属“因病致郁”。缺血性卒中的病机是以气虚血瘀为主，而郁证的病机则以气机郁滞为主，因此，PSD 以素体不足，气滞血瘀病机为主，活血理气是其基本治疗原则。血府逐瘀方是活血理气的代表方药，其中血府逐瘀胶囊是经过现代制剂及加工工艺制成的中成药，制剂工艺和药效物质相对明确。课题研究首先利用糖水偏好实验^[16]、旷场实验^[24]与强迫游泳实验^[17]对其防治 PSD 的药效学进行了考察，以反映药物改善实验动物快感缺失、对新环境的好奇度降低以及绝望心理状态等抑郁样症状，结果发现与 SHAM 组相比，PSD 组自主活动，糖水偏好以及强迫游泳不动时间评分显著降低，提示大鼠处于抑郁状态，血府逐瘀胶囊可改善 PSD 大鼠自主活动，糖水偏好与强迫游泳不动时间评分，表明血府逐瘀胶囊对 PSD 有较为显著的防治作用。其中，低剂量组效果更优。

在明确药效的基础上，课题组再利用网络药理学技术^[25]，围绕血府逐瘀胶囊方药主要化学成分及 PSD 的关键病理环节进行了初步探讨。在药物-成分-疾病靶点网络中，共收集血府逐瘀胶囊的相关靶点共有 606 个，治疗 PSD 的相关靶点有 47 个，包括 TNF、IL-1 β 等核心靶点。GO 分析和 KEGG 分析富集结果发现血府逐瘀胶囊治疗 PSD 的潜在靶点涉及氧化应激反应、MAPK 的正向调节、调节 ERK1 和 ERK2 的级联等多种生物学过程，涉及 MAPK 通路、NF- κ B 通路等多条信号通路。有研究报道 IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子可激活肠上皮 NF- κ B 通路，肠上皮紧密连接被破坏，造成肠屏障功能损伤，而抑制促炎因子则可降低肠道通透性，保护肠屏障功能^[26-27]。鉴于肠屏障功能在 PSD 发生发展过程中扮演的重要角色，以上结果提示血府逐瘀胶囊改善肠屏障功能可能是其防治 PSD 的关键药效环节。

基于网络药理学线索，课题组进一步对 PSD 动物模型肠屏障功能进行了验证，首先利用 FITC 标记的葡聚糖考察了实验动物肠道通透性的变化，

结果发现 PSD 组的肠道通透性显著增加，并且组织病理学结果发现 PSD 大鼠结肠组织炎症浸润严重，而在血府逐瘀胶囊的干预下，结肠组织的肠道通透性显著降低，炎症反应明显缓解。此外，紧密连接蛋白的表达变化在一定程度上可以反映肠道通透性的改变^[6]，实验研究利用 Western blot 检测紧密连接蛋白的表达，进一步验证了 PSD 模型动物结肠组织中 ZO-1、Occludin 和 claudin-1 表达显著减少的现象。血府逐瘀胶囊干预可在一定程度增加紧密连接蛋白的表达，结果进一步验证了血府逐瘀胶囊具有改善 PSD 大鼠肠屏障功能的作用。

对肠道菌群-肠道-脑轴的广泛研究发现，肠道菌群失调可影响中枢神经系统疾病的预后^[28-29]，而在一些精神疾病中，如焦虑、抑郁症，肠道屏障完整性可能被破坏。短链脂肪酸作为肠道菌群主要的代谢产物，被认为可能是参与脑肠轴的交流的介质，可通过免疫系统，与肠上皮细胞和免疫细胞进行局部相互作用，这些作用影响肠道黏膜免疫和屏障功能^[30]。有研究表明，逍遥散能够调节实验动物的菌群丰度从而改善其抑郁症状^[31]。本研究结果表明血府逐瘀胶囊能够缓解 PSD 大鼠的抑郁样行为以及改善肠屏障功能可能与调节肠道菌群及其代谢产物从而降低炎症反应有关。因此，我们提出一个假设：血府逐瘀胶囊可能通过调节肠道菌群及其代谢产物从而改善 PSD 的神经和肠道症状，接着代谢产物在参与肠脑信号通路的过程可以直接或间接地调节情绪、认知、神经系统等大脑功能。

综上，本研究利用 PSD 大鼠模型证实了血府逐瘀胶囊具有明确的改善 PSD 行为学症状的作用，并且其作用机制与改善 PSD 肠屏障功能密切相关。本研究对丰富血府逐瘀胶囊的现代研究和指导其临床合理用药具有一定参考价值，并且可为进一步探索血府逐瘀胶囊防治 PSD 的作用机制提供线索。

参考文献

- [1] Guo J, Wang J, Sun W, et al. The advances of post-stroke depression: 2021 update [J]. J Neurol, 2022, 269 (3): 1236-1249.
- [2] Das J, Rajanikant GK. Post stroke depression: the sequelae of cerebral stroke [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2018, 90: 104-114.
- [3] 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.
- [4] 吴清珍, 罗东辉, 史文莉. 血府逐瘀汤加减方对脑卒中后抑郁患者自主神经功能及生活质量的影响 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2020, 20 (9): 1056-1059.

- [5] 杨华. 血府逐瘀汤加味方对脑卒中后抑郁患者神经评分及睡眠质量的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(28): 3159-3162.
- [6] Luca M, Di Mauro M, Di Mauro M, et al. Gut microbiota in Alzheimer's disease, depression, and type 2 diabetes mellitus: the role of oxidative stress[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 4730539.
- [7] Ding F, Wu J, Liu C, et al. Effect of Xiaoyaosan on colon morphology and intestinal permeability in rats with chronic unpredictable mild stress[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1069.
- [8] 付衍. 血府逐瘀汤大鼠含药血清主要成分的初步研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2013.
- [9] Sicard KM, Fisher M. Animal models of focal brain ischemia[J]. *Exp Transl Stroke Med*, 2009, 1(1): 7.
- [10] 蔡华. 畅郁逍遥散对脑卒中后抑郁(PSD)小鼠作用机理的实验研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2010.
- [11] 赵爱梅. 解毒通络颗粒干预卒中后抑郁气虚血瘀证作用机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [12] McBride DW, Zhang JH. Precision stroke animal models: the permanent MCAO model should be the primary model, not transient MCAO[J]. *Transl Stroke Res*, 2017, 8(5): 397-404.
- [13] 展淑琴, 高亚亚, 张凌峰, 等. 大鼠大脑中动脉永久性缺血和缺血再灌注模型的比较[J]. 陕西医学杂志, 2013, 42(6): 643-646.
- [14] Lai Y, Lin P, Chen M, et al. Restoration of L-OPA1 alleviates acute ischemic stroke injury in rats via inhibiting neuronal apoptosis and preserving mitochondrial function[J]. *Redox Biol*, 2020, 34: 101503.
- [15] 罗琳. 从 MAPK/ERK 信号通路探讨补阳还五汤对卒中后抑郁大鼠海马神经再生的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2015.
- [16] Bogdanova OV, Kanekar S, D' Anci KE, et al. Factors influencing behavior in the forced swim test[J]. *Physiol Behav*, 2013, 118: 227-239.
- [17] Davey CG, Yücel M, Allen NB. The emergence of depression in adolescence: development of the prefrontal cortex and the representation of reward[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2008, 32(1): 1-19.
- [18] 苏晓乾, 夏长波, 严福林, 等. 基于网络药理学和分子对接研究淫羊藿治疗抑郁症的抗炎作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(17): 162-169.
- [19] Al-Sadi R, Boivin M, Ma T. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier[J]. *Front Biosci* (Landmark Ed), 2009, 14(7): 2765-2778.
- [20] 闫炎, 孟凡茹, 魏语泽, 等. 肠道紧密连接及调控通路研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2022, 58(1): 44-49.
- [21] 赵骏, 周贤, 王辉, 等. 人参皂苷对老龄大鼠结肠上皮紧密连接的调节作用及机制研究[J]. 中药材, 2021, 44(10): 2429-2433.
- [22] Aherne CM, Collins CB, Masterson JC, et al. Neuronal guidance molecule netrin-1 attenuates inflammatory cell trafficking during acute experimental colitis[J]. *Gut*, 2012, 61(5): 695-705.
- [23] Lenoir L, Rossary A, Joubert-Zakeyh J, et al. Lemon verbena infusion consumption attenuates oxidative stress in dextran sulfate sodium-induced colitis in the rat[J]. *Dig Dis Sci*, 2011, 56(12): 3534-3545.
- [24] Hamon M, Blier P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2013, 45: 54-63.
- [25] Zhang D, Liu B, Jie X, et al. Uncovering Bupi Yishen formula pharmacological mechanisms against chronic kidney disease by network pharmacology and experimental validation[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 761572.
- [26] Al-Sadi R, Ye D, Said HM, et al. IL-1 β -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by MEKK-1 activation of canonical NF- κ B pathway[J]. *The Am J Pathol*, 2010, 177(5): 2310-2322.
- [27] Liu Y, Mu S, Li X, et al. Unfractionated heparin alleviates sepsis-induced acute lung injury by protecting tight junctions[J]. *J Surg Res*, 2019, 238: 175-185.
- [28] Sampson T, Debelius J, Thron T, et al. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of parkinson's disease[J]. *Cell*, 2016, 167(6): 1469-1480. e12.
- [29] Jiang H, Ling Z, Zhang Y, et al. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder[J]. *Brain Behav Immun*, 2015, 48: 186-194.
- [30] Simpson CA, Mu A, Haslam N, et al. Feeling down? A systematic review of the gut microbiota in anxiety/depression and irritable bowel syndrome[J]. *J Affect Disord*, 2020, 266: 429-446.
- [31] Zhu HZ, Liang YD, Ma QY, et al. Xiaoyaosan improves depressive-like behavior in rats with chronic immobilization stress through modulation of the gut microbiota[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108621.

(收稿日期: 2022-08-10; 修回日期: 2022-09-20)

基于 AHP-熵权法结合指纹图谱优选独活药渣的醇提工艺

陈仕妍^{1,2}, 林伟雄^{1,2}, 罗毓^{1,2}, 李美洲^{1,2}, 吴晓英^{1,2}, 杨赞^{1,2}, 魏梅^{1,2}, 刘燎原^{1,2*} (1. 广东一方制药有限公司, 广东 佛山 528244; 2. 中药配方颗粒企业重点实验室, 广东 佛山 528244)

摘要: **目的** 以 AHP-熵权法评价独活药渣醇提物, 探究独活药渣利用价值。**方法** 采用正交试验, 结合 UPLC 指纹图谱, 应用 AHP-熵权法确定各项指标权重系数, 对蛇床子素含量、二氢欧山芹醇当归酸酯含量以及指纹图谱总峰面积进行综合评价, 优选独活药渣的醇提工艺。**结果** 确定最适工艺为: 加入 8 倍量的 60% 乙醇, 提取一次, 时间 1.5 h。**结论** 建立的方法可兼顾不同的质量评价指标, 且评价方法客观可靠, 可为独活药渣的资源开发提供基本思路。

关键词: 独活; 药渣; UPLC 指纹图谱; AHP-熵权法; 正交试验

中图分类号: R283.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2022)12-2831-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.021

Optimization for ethanol extraction of *Angelica Pubescens Radix* based on AHP-entropy and fingerprint chromatogram

CHEN Shi-yan^{1,2}, LIN Wei-xiong^{1,2}, LUO Yu^{1,2}, LI Mei-zhou^{1,2}, WU Xiao-ying^{1,2}, YANG Zan^{1,2}, WEI Mei^{1,2}, LIU Liao-yuan^{1,2*} (1. Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd, Foshan Guangdong 528244; 2. Guangdong Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granule, Foshan Guangdong 528244)

Abstract: **Objective** To determine the utility value of *Angelica Pubescens* residue, and to test its ethanol extract based on the AHP-entropy coefficient method. **Methods** Orthogonal experiment design was used, coupled with the founded UPLC fingerprint chromatography to optimize the ethanol-extraction configuration. Furthermore, AHP-entropy weight was used to determine the weighting coefficient for the evaluation indicators, in which the content of osthole and dihydrooxanol angelica acid ester, and the total peak areas from fingerprint chromatogram were selected for evaluation. **Results** The optimal ethanol extraction was to add 8 times of 60% ethanol, and extract for 1.5 h. **Conclusion** The method takes account of varied quality evaluation indexes, which is reliable and objective providing scientific evidence for the resource exploitation of *Angelica Pubescens* residue.

Key words: *Angelica Pubescens Radix*; residue; UPLC fingerprint chromatogram; AHP-entropy weight; orthogonal experiment

独活 (*Angelica pubescens* Maxim. f. biserrata Shan et Yuan) 为伞形科植物重齿毛当归的干燥根, 是一味常用的祛风除湿中药, 主治风寒湿邪所致腰膝疼痛、风湿头痛、足跖肿胀等^[1]。研究指出独活含有的主要化学成分为香豆素类、挥发油、甾醇以及多糖等^[2], 其中香豆素类以蛇床子素和二氢欧山芹醇当归酸酯等成分为主。现代药理研究表明, 独活中蛇床子素具有抗炎、保肝、

保护心血管和中枢神经系统的作用, 二氢欧山芹醇当归酸酯与独活提取物的抗炎、修复角质细胞的紫外损伤等功能有关^[3-4]。

近年来, 中药废弃物对环境的影响越来越严重, 对药渣的处理和利用逐渐成为包括中药、农业、环境和能源等领域的热点研究对象^[5-6]。独活配方颗粒是基于中药配方颗粒的制法, 以水为提取溶媒, 对独活饮片经提取、减压浓缩、喷雾干燥、

基金项目: 广东省科学技术厅广东省重点领域研发计划项目 (No. 2019B110209005); 佛山市科技创新项目 (No. 2120001002309)。

作者简介: 陈仕妍, 女, 硕士, 主要从事中药饮片及配方颗粒工艺、质量标准研究, email: 1476619732@qq.com *通信作者: 刘燎原, 男, 副主任药师, 主要从事中药饮片及配方颗粒质量标准研究, email: 99263@163.com

制粒等工序制得的颗粒^[7-9]。鉴于有效成分香豆素类成分如蛇床子素等基本集中在独活脂溶性部位,经由配方颗粒生产过程而得到的独活水提药渣中存有一定量的脂溶性成分,应考虑再次利用^[10-11]。

本试验利用正交试验优化独活醇提工艺,以蛇床子素和二氢欧山芹醇当归酸酯含量、UPLC 指纹图谱总峰面积为考察指标,采用 AHP-熵权结合法优化指标权重系数,根据指标的综合评分选择合适的提取参数,为独活水提药渣的质量研究提供新的思路。

1 材料

1.1 仪器

Waters H-Class 型超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); ME204E 型万分之一天平、XP26 百万分之一天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); KQ-500DE 型数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司); MiliQ Direct 8 型超纯水机(德国 Merck 有限公司); TC-15 型套式恒温器(海宁市新华医疗器械厂); DLSB-5L/20 型低温冷却液循环泵(巩义市予华仪器有限责任公司)。

1.2 试药

独活药渣(广东一方制药有限公司); 对照品蛇床子素(批号: 110822-201710, 纯度: 99.5%)、二氢欧山芹醇当归酸酯(批号: 111583-201605, 纯度: 98.6%)(中国食品药品检定研究院); 乙腈为色谱级, 其余试剂为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Waters CORTECS T3 柱(150 mm×2.1 mm, 1.6 μm); 流动相: 乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱(0~2 min, 5%~30%A; 2~4 min, 30%~31%A; 4~5 min, 31%~32%A; 5~11 min, 32%~37%A; 11~12 min, 37%~38%A; 12~13 min, 38%~53%A; 13~24 min, 53%~54%A; 24~25 min, 54%~5%A; 25~30 min, 5%A); 检测波长: 325 nm; 流速: 0.3 mL·min⁻¹; 柱温: 30℃; 进样量: 1 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 取蛇床子素和二氢欧山芹醇当归酸酯对照品适量, 精密称定, 加 50% 乙醇制成蛇床子素和二氢欧山芹醇当归酸酯质量浓度分别为 137 μg·mL⁻¹ 和 43 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 按表 1 设计正交试验,

制备不同水平的药渣提取物并浓缩至约 100 mL, 取正交和验证试验下的浓缩液 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 乙醇 20 mL, 称定重量, 超声(功率 300 W, 频率 40 Hz) 处理 20 min, 取出, 放冷, 再称重, 以 50% 乙醇补足减失重量, 摇匀, 用 0.22 μm 滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

表 1 因素水平表
Tab 1 Factor and level

水平	因素			
	乙醇浓度/%	加液量/倍	提取时间/h	提取次数/次
1	40	8	0.5	1
2	60	10	1.0	2
3	80	12	1.5	3

2.1.4 方法学考察

① 稳定性试验: 取正交试验编号 4 号(以下简称 H₄) 样品 1 份, 按“2.1.3”项下方法制备, 分别于室温放置 0、2、4、8、12、24 h 时, 进样测定, 记录色谱图。以峰 10(蛇床子素)为参照峰(S), 计算得各峰相对峰面积的 RSD 均小于 2.7%, 相对保留时间的 RSD 均小于 0.27%, 表明供试液在室温下 24 h 内稳定。

② 精密度试验: 取 H₄ 样品 1 份, 按“2.1.3”项下方法制备, 重复进样 6 次, 记录色谱图。以峰 10(蛇床子素)为参照峰(S), 得到各峰相对峰面积的 RSD 均小于 2.1%, 相对保留时间的 RSD 均小于 0.060%, 表明方法精密度良好。

③ 重复性试验: 取 H₄ 样品 6 份, 按“2.1.3”项下方法制备, 进样测定, 记录色谱图。以峰 10(蛇床子素)为参照峰(S), 计算得各共有峰相对峰面积的 RSD 均小于 2.8%, 相对保留时间的 RSD 均小于 1.4%, 表明该方法重复性良好。

2.1.5 UPLC 指纹图谱的建立 取供试品溶液, 进样测定, 记录色谱图。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》分析图谱, 共指认 12 个共有峰, 见图 1A, 独活药渣中所含成分的色谱峰均在 30 min 内洗脱完全, 通过与混合对照品(见图 1B)进行对比指认, 共指认两种成分, 10 号峰为蛇床子素, 11 号峰为二氢欧山芹醇当归酸酯, 蛇床子素的峰检测响应最高, 且分离度好, 选择该峰作为参照峰(S)。

2.2 含量测定方法的建立

2.2.1 线性关系考察 精密称取蛇床子素对照品 11.620 mg 置于 5 mL 量瓶中, 加 50% 乙醇溶解并稀释至刻度, 得质量浓度为 2.324 mg·mL⁻¹ 的

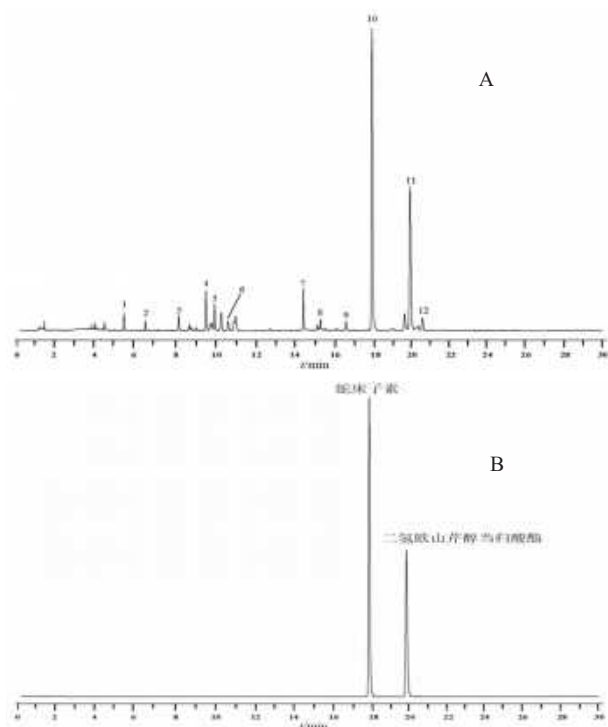


图1 独活药渣醇提物样品(A)及混合对照品(B)UPLC图谱
Fig 1 UPLC chromatogram of ethanol extract from *Angelica Pubescens* residues (A) and mixture reference (B)

蛇床子素储备液;精密称取二氢欧山芹醇当归酸酯对照品 20.412 mg 置于 10 mL 量瓶中,加 50% 乙醇溶解并稀释至刻度,得质量浓度为 $2.0412 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的二氢欧山芹醇当归酸酯储备液,分别精密吸取上述储备液 2.0、1.0、0.5、0.2、0.1 mL 置于 5 mL 量瓶中,加 50% 乙醇定容至刻度,摇匀,连同储备液,进样测定,以对照品质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,结果蛇床子素、二氢欧山芹醇当归酸酯分别在 $46.48 \sim 2324.00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $40.82 \sim 2041.20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好,回归方程分别为 $Y = 7.693 \times 10^3 X + 2.671 \times 10^5$ ($R^2 = 0.9999$), $Y = 7.916 \times 10^3 X - 4.226 \times 10^4$ ($R^2 = 0.9998$)。

2.2.2 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于室温放置 0、2、4、8、12、24 h 时,进样测定,计算得到蛇床子素和二氢欧山芹醇当归酸酯峰面积的 *RSD* 分别为 0.99%、0.76%,表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

2.2.3 精密度试验 取同一供试品溶液,重复进样 6 次,计算得到蛇床子素和二氢欧山芹醇当归酸酯峰面积的 *RSD* 分别为 0.14%、0.15%,表明该方法精密度良好。

2.2.4 重复性试验 取同一供试品 6 份,按“2.1.3”项下方法制备,进样测定,计算得到蛇

床子素和二氢欧山芹醇当归酸酯峰面积的 *RSD* 分别为 1.3%、1.3%,表明该方法重复性良好。

2.2.5 加样回收试验 精密称取已知质量分数的独活药渣浓缩清膏 (H_4) 6 份,每份 0.1 g,分别按照 0.5 : 1、1 : 1、1.5 : 1 比例加入对照品(羌活醇/二氢欧山芹醇当归酸酯: 2.94 mg/2.22 mg、5.86 mg/4.44 mg、8.81 mg/6.68 mg),按“2.1.3”项下方法制备,进样测定,测定得到蛇床子素和二氢欧山芹醇当归酸酯高、中、低水平的平均加样回收率在 99.56% ~ 104.14%、95.98% ~ 96.28%,*RSD* 在 0.88% ~ 2.8%、2.0% ~ 3.0%。

2.2.6 总固形物质量测定 精密吸取“2.1.3”项下浓缩液 3 g,置于已恒重的蒸发皿,水浴蒸干溶液,105 °C 干燥 3 h,取出迅速置于干燥器中冷却 30 min,照 2020 年版《中国药典》四部通则 0831 的干燥失重测定法,计算固形物总质量。

2.2.7 样品含量测定 取 9 个独活药渣样品,按“2.1.3”项下方法制备,进样测定,记录共有峰的峰面积,结果见表 2;按照“2.2.6”项下的固形物总量折算蛇床子素含量、二氢欧山芹醇当归酸酯含量,结果见表 3。

2.3 综合权重计算

2.3.1 AHP 判断矩阵构建 以蛇床子素含量、二氢欧山芹醇当归酸酯含量以及图谱峰总峰面积 3 个指标作为独活药渣工艺提取结果的衡量指标,为评价两两指标之间的优先顺序,需对权重进行量化,对 3 个指标的成对比较采用优先级矩阵的方式进行判断,结果如表 4 所示。

2.3.2 权重系数计算和一致性检验 初始权重系数 (w_j) 和归一化权重系数 (w'_j) 分别按照公式 (1) 和公式 (2) 进行计算,其中, j 和 m 均表示 3 个指标数 (j 和 m 为表 4 中的行数和列数,即为指标序号 1 ~ 3) [12-13]。

$$w_j = \sqrt{x_{j1} \times x_{j2} \cdots x_{jm}} \quad (1)$$

$$w'_j = w_j / \sum_{j=1}^m w_j \quad (2)$$

通过计算可得蛇床子素含量、二氢欧山芹醇当归酸酯含量以及总峰面积的指标权重分别为: 0.5396、0.2907、0.1634; 对权重系数 w'_j 的逻辑合理性采用一致性检验,根据公式 (3) 和 (4) 计算最大特征根 δ_m 以及一致性指标 *CI*,可得 $CI = 0.0046 < 0.1$,说明权重符合逻辑一致性要求。

$$\delta_m = \sum_{i=1}^m (\sum_{j=1}^m x_{ij} \times w'_j / w'_i) / 3 \quad (3)$$

$$CI = (\delta_m - m) / (m - 1) \quad (4)$$

2.3.3 AHP 结合熵权的综合权重确定 对于多

表 2 正交试验供试品共有峰峰面积统计
Tab 2 Common peak areas of samples for orthogonal experiment

共有峰	正交试验供试品峰面积								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
峰 1	6188	9826	10 838	6647	9108	9123	8844	7030	6153
峰 2	4383	7088	7960	5553	6775	6372	6204	5024	5029
峰 3	4565	7330	11 514	6106	8601	8359	7669	6580	5004
峰 4	28 430	45 396	56 430	32 988	48 383	45 570	42 440	34 796	27 937
峰 5	17 088	28 424	36 980	19 597	28 561	27 472	26 157	20 733	17 094
峰 6	3223	5054	5884	4124	5808	5948	5916	4920	4085
峰 7	17 465	29 267	36 947	22 163	32 869	31 292	31 510	25 621	21 167
峰 8	3719	6254	7859	4959	6966	6604	6410	5155	3982
峰 9	5083	9323	11 933	7363	11 468	11 458	11 740	8646	6974
峰 10	120 922	215 967	269 362	178 899	267 215	264 354	264 754	213 400	172 181
峰 11	91 135	162 952	205 317	132 244	200 182	199 263	196 066	153 248	123 153
峰 12	7209	12 786	15 695	10 083	14 813	14 341	13 810	10 477	8117
总和	309 408	539 668	676 718	430 726	640 749	630 157	621 519	495 631	400 877

表 3 指标成分测定结果
Tab 3 Content of indicator components

试验号	蛇床子素含量 / (mg · g ⁻¹)	二氢欧山芹醇当归 酸酯含量 / (mg · g ⁻¹)	总峰面积
1	45.51	35.04	309 408
2	44.74	34.51	539 668
3	42.58	33.18	676 718
4	58.70	44.54	430 726
5	55.20	42.29	640 749
6	49.94	38.44	630 157
7	62.85	47.45	621 519
8	61.68	45.08	495 631
9	69.28	50.22	400 877

表 4 指标成对比较的判断优先矩阵
Tab 4 Decision priority matrix for pairwise indicators

指标	蛇床子素	二氢欧山芹醇当归酸酯	总峰面积
蛇床子素	1	2	3
二氢欧山芹醇当归酸酯	2/1	1	2
总峰面积	1/3	1/2	1

指标的评价体系,需要突出数值变化对系统性质影响较大的指标项,针对不同数量级和量纲的数据,可以采用信息熵的概念对指标的影响程度进行度量,熵越小,则指标的差异贡献度越大,熵权重的计算步骤如下:①建立由 x_{ij} 组成的 n 行 m 列的原始数据矩阵($n=9, m=3, x_{ij}$ 表示第 i 次实验下的第 j 项指标结果);②将矩阵标准化为概率矩阵 P_{ij} ($0 \leq P_{ij} \leq 1$);③计算信息熵 H_j 和熵权重 W_j ;④将AHP法的主观权重 w'_j ,对客观熵权重 W_j 进行综合运算,可得综合权重系数 Ω_j ,各特征值依据公式(5)~(8)进行求解。

$$P_{ij} = x_{ij} / \sum_{i=1}^n x_{ij} \quad (5)$$

$$H_j = -1/\ln n (\sum_{i=1}^n P_{ij} \times \ln P_{ij}) \quad (6)$$

$$W_j = H_j / \sum_{j=1}^m (1 - H_j) \quad (7)$$

$$\Omega_j = (w'_j \times W_j) / (\sum_{j=1}^m w'_j \times W_j) \quad (8)$$

根据熵权结合的计算公式,可得蛇床子素含量、二氢欧山芹醇当归酸酯含量以及总峰面积的 Ω_j 为0.366、0.442、0.192,综合评分=蛇床子素/MAX(蛇床子素)×0.366+二氢欧山芹醇当归酸酯/MAX(二氢欧山芹醇当归酸酯)×0.442+总峰面积/MAX(总峰面积)×0.192。

2.4 正交试验

以蛇床子素含量、二氢欧山芹醇当归酸酯含量以及图谱峰总峰面积所得综合评分作为考察指标,按照正交试验设计表进行提取,筛选合适的提取工艺参数:乙醇浓度(A)、加液量(B)、提取时间(C)、提取次数(D),各因素结果和综合评分如表5,方差分析结果如表6。通过分析正交试验结果的极差和方差,可以发现四因素的作用主次关系分别为A>C>B>D,其中因素A和C对结果均具有显著性差异,综合确定最佳组合为A₃B₁C₃D₁;考虑到生产中采用高比例乙醇提取导致的潜在安全隐患以及较大的生产成本,实际生产中基本使用60%乙醇进行提取,结合实际生产条件,可见60%和80%比例的乙醇均可作为乙醇浓度的参数选项,现对两种较优组合A₂B₁C₃D₁和A₃B₁C₃D₁进行验证和对比讨论,具体醇提条件为:乙醇浓度分别为60%和80%,加液量为8倍,提取时间为1.5 h,提取次数为1次。

2.5 验证试验

表 5 正交试验结果

Tab 5 Orthogonal experiment

试验号	A/%	B/倍	C/h	D	蛇床子素 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	二氢欧山芹醇当归酸酯 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	总峰面积	综合评分
1	40	8	0.5	1	45.51	35.04	309 408	63.66
2	40	10	1.0	2	44.74	34.51	539 668	69.32
3	40	12	1.5	3	42.58	33.18	676 718	70.89
4	60	8	1.0	3	58.70	44.54	430 726	82.43
5	60	10	1.5	1	55.20	42.29	640 749	84.56
6	60	12	0.5	2	49.94	38.44	630 157	78.09
7	80	8	1.5	2	62.85	47.45	621 519	92.59
8	80	10	0.5	3	61.68	45.08	495 631	86.32
9	80	12	1.0	1	69.28	50.22	400 877	92.17
K_1	67.957	79.560	76.023	80.130				
K_2	81.693	80.067	81.307	80.000				
K_3	90.360	80.383	82.680	79.880				
R	22.403	0.823	6.6570	0.716				

表 6 综合评分方差分析结果

Tab 6 Square deviation for global scoring points

方差来源	偏差平方和	自由度	F 比	显著性
A	765.716	2	739.822	*
B (误差)	1.035	2	1.000	
C	74.111	2	71.605	*
D	0.094	2	0.091	

注 (Note): $F_{0.05}(2,2) = 19$, $*P < 0.05$ 。

分别按工艺 $A_2B_1C_3D_1$ 和 $A_3B_1C_3D_1$ 提取验证, 测定 3 种测定指标和综合评分, 由表 7 可知, 两者 3 项指标的 RSD 均 $< 3\%$, 综合评分均值分别为 84.64 和 91.22, $RSD < 1\%$, 表明工艺试验结果稳定、重复性良好。综合评分差异印证了 A 因

素 (乙醇浓度) 的显著性, 但两者相差不大, 均大于 80 分; 同时, 造成验证工艺 $A_2B_1C_3D_1$ 稍低于正交 7 和 9 的结果主要在于乙醇浓度, 加之加液量和提取时间的部分影响和提取次数的误差因素, 但较之正交 4~6 的结果仍具优势。综上, 只考虑提取结果, 可采取工艺 $A_3B_1C_3D_1$; 考虑实际成本, 80% 乙醇提取的综合评分接近 60% 乙醇, 且进行大规模提取时采用 60% 乙醇的低成本, 可一定程度上弥补两者的提取效益差异, 并降低生产设备中高比例乙醇受热引发的安全隐患, 因此建议考虑工艺 $A_2B_1C_3D_1$ 。

表 7 独活药渣醇提工艺验证

Tab 7 Verification of ethanol extraction of *Angelica Pubescens* residues

验证	60% 醇提				80% 醇提			
	蛇床子素 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	二氢欧山芹醇当归酸酯 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	总峰面积	综合评分	蛇床子素 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	二氢欧山芹醇当归酸酯 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	总峰面积	综合评分
1	57.63	46.41	512 382	84.52	60.43	48.50	789 894	91.35
2	56.67	47.44	519 251	84.32	59.90	48.68	768 092	90.60
3	58.49	45.49	524 478	85.06	61.72	47.03	788 238	91.70
均值	57.60	46.45	518 704	84.64	60.68	48.07	782 075	91.22
$RSD/\%$	1.6	2.1	1.2	0.45	1.5	1.9	1.6	0.61

3 讨论

本试验利用正交试验设计对影响独活药渣醇提工艺的关键参数进行优化, 得到合理的工艺条件组合, 并通过验证试验进行结果预期, 结果显示各项评价指标和综合评分的偏差值均 $< 3\%$, 说明所优化的醇提工艺条件可靠稳定。通过提取发现, 各正交表下的醇提物中蛇床子素含量为 $4.258\% \sim 6.928\%$, 二氢欧山芹醇当归酸酯含量为 $3.318\% \sim 5.022\%$, 可见独活药渣中仍含有一定残存量的香豆素类等生理活性成分, 对其进行有效的开发利用是有必要的。

本研究通过对独活药渣剩余价值的初步探究, 以蛇床子素含量、二氢欧山芹醇当归酸酯的含量以及指纹图谱峰面积为指标, 借助兼具主观量化和逻辑数维的 AHP-熵权模型, 对多指标进行综合评价, 通过挖掘潜在的有效物质的利用价值, 可为后续中药药渣的质量评价开拓思路 and 方向。

据不完全统计, 目前全国范围内针对国家和各省药监部门标准生产的中药配方颗粒品种 400 余个, 大多数饮片均含有脂溶性成分, 且配方颗粒按照水提工序进行提取利用, 所得药渣目前尚未得到有效处理, 同时对环境造成潜在污染。本

文主要意在通过正交试验考察醇提工艺,进而对水提药渣的二次利用的价值进行探究,同时通过建立含量测定及图谱测定方法对其醇提二次利用价值进行精准评价,以阐明独活配方颗粒水提药渣价值及其二次利用提供参考,为资源的可持续发展和减少资源浪费贡献一份力量。

参考文献

- [1] 周璐丽,曾建国.独活化学成分及药理活性研究进展[J].中国现代中药,2019,21(12):1739-1748.
- [2] 韩凤,林茂祥,罗川,等.不同产地独活及其混伪品的质量差异性分析[J].西南师范大学学报(自然科学版),2019,44(10):34-39.
- [3] 姚丽,冯红玄,霍红,等.独活活性成分蛇床子素的药理学研究进展[J].中华中医药学刊,2012,30(10):2221-2225.
- [4] 王计瑞,谭均,李隆云,等.独活的质量评价[J].中成药,2019,41(7):1623-1630.
- [5] 郑艳萍,袁琪,李伟东,等.丹参药渣的功能组分及体外抗氧化活性[J].生物加工过程,2021,19(3):263-267,273.
- [6] 周永康,史新元,张志强,等.厚朴配方颗粒药渣中厚朴酚及和厚朴酚的提取纯化研究[J].环球中医药,2021,14(8):1395-1400.
- [7] 国家药典委员会.中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求(征求意见稿)[EB/OL].(2016-08-15)[2020-01-12].<https://www.chp.org.cn/gjydw/xwzx/3095.jhtml>.
- [8] 郭东晓,于姗姗,郭衍珩,等.中药配方颗粒标准制定技术问题和对策分析[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(17):188-194.
- [9] 李军山,周明霞,张肖建,等.独活水煎剂和配方颗粒 HPLC 指纹图谱的相关性[J].中成药,2017,39(1):218-221.
- [10] 王春鹏,罗倩,李晋,等.正交试验优化独活总香豆素的渗漉提取工艺[J].天津中医药,2015,32(2):113-116.
- [11] 丁希飞,冯煦,董云发,等.独活香豆素类成分的研究[J].中成药,2009,31(7):1102-1104.
- [12] 任爱农,卢爱玲,田耀洲,等.层次分析法用于中药复方提取工艺的多指标权重研究[J].中国中药杂志,2008,33(4):372-374.
- [13] 孙宇靖,王耀鹏,马智勇,等当归烟熏工艺的正交设计结合加权综合评分法优选[J].时珍国医国药,2019,30(2):354-356.

(收稿日期:2022-04-25;修回日期:2022-08-29)

《中南药学》2023 年“毕业季”论文征稿

为了促进药学学术交流,我刊现在开始启动 2023 年“毕业季”论文征稿。凡在校全日制药理学硕、博毕业研究生的研究论文、综述,一经录用,即可在我刊 2023 年 1—6 月刊刊出。

《中南药学》杂志是中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊,被美国 CA 和波兰 IC 等国外知名数据库收录,被中国核心期刊(遴选)数据库、中国学术期刊光盘版、万方数据库和解放军医学图书馆数据库等收录。内容涵盖药剂、药理、药物分析、药物化学、医院药学、生化药物、中药与天然药物等各个方向。

具体要求及处理如下:

1. 与药学相关的研究论文或综述;
2. 在论文正文标题前及注册投稿时标题前标注“毕业季”;
3. 全日制硕士、博士毕业研究生;
4. 文章将快速处理、优先刊登、按时出版;
5. 投稿时间:即日起至 2023 年 2 月底;
6. 出刊时间:2023 年 1 月 20 日、2 月 20 日、3 月 20 日、4 月 20 日、5 月 20 日和 6 月 20 日,共 6 期,请至少提前 3 个月投稿,带基金项目文章优先刊登;
7. 投稿网址: <http://znyx.cbpt.cnki.net>, 请注册投稿。

如有任何疑问可联系我们:

Tel: 0731-82258487, 0731-84895602

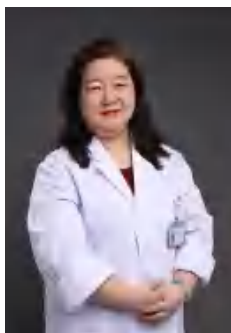
E-mail: znyxzz2003@vip.163.com

含碘中药及方剂在甲状腺疾病中的研究进展专题

【编者按】

含碘中药治疗甲状腺疾病的历史已久,沿用至今的海藻玉壶汤、四海舒郁丸、消瘰丸等治瘰名方中均使用含碘中药。随着我国人群碘状态的改变、甲状腺疾病谱的变化以及人们对病理机制的深入认识,含碘中药在甲状腺疾病中的应用逐渐引起争议,如何合理使用含碘中药是亟待解决的临床问题。“传承精华,守正创新”,我们认为在传承中医经典理论认识和临床实践经验的同时,应该结合现代药理学研究结果,应用含碘中药治疗甲状腺疾病同样如此。本专题系统梳理临床常用含碘中药、经典方剂在甲状腺疾病中的药理机制研究进展,旨在为相关领域临床工作者提供“辨证-辨病”结合用药参考,为基础研究工作者提供新的科研思路。

【特邀专家简介】



姜敏,首都医科大学附属北京世纪坛医院中医科主任,主任医师、教授、博士研究生导师,从事中医临床医、教、研工作 33 年。全国优秀中医临床人才、全国名老中医学术继承人、北京优秀名中医、北京市第六批名老中医师承指导老师、中华中医药学会亚健康分会副主任委员、中国中医药促进会疑难杂症分会副主任委员、中国中医药信息学会中医临床药学会分会副会长兼秘书长、北京中医药学会糖尿病专业委员会副主任委员、北京市科学技术奖评审专家、北京市自然科学基金评审专家。北京世纪坛医院国家临床重点专科(中医内分泌)负责人及学科带头人。承担或参加国家级项目及北京市科研课题 10 余项,发表学术论文 30 余篇,主编中医著作 4 部。

含碘中药治疗甲状腺疾病的作用机制探讨

杨涛,马思懿,姜敏^{*}(首都医科大学附属北京世纪坛医院中医科,北京 100038)

摘要:含碘中药治疗甲状腺疾病的历史已久,《肘后备急方》就有海藻、昆布治疗瘰病的记载,海藻玉壶汤、四海舒郁丸、消瘰丸等沿用至今的经典方剂均使用含碘中药。随着人们对疾病病理机制的深入认识,含碘中药应用于甲状腺疾病的治疗引起一定争议,如何合理使用含碘中药是亟待解决的问题。在“辨证论治”的指导下,结合现代药理学机制研究结果,可能是较为合理的途径。本文旨在梳理含碘中药在甲状腺疾病中的机制研究进展,为其进一步研究和临床应用提供参考。

关键词:含碘中药;甲状腺疾病;瘰病;机制

中图分类号: R259

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2837-06

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.022

Mechanism of iodine-containing traditional Chinese medicine for thyroid diseases

YANG Tao, MA Si-yi, JIANG Min^{*} (Department of Traditional Chinese Medicine, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038)

基金项目:国家中医药管理局基本中医药循证能力建设项目(No.2019XZZX-JB004)(National Administration of Traditional Chinese Medicine);国家中医药管理局、国家卫生健康委、中央军委后勤保障部卫生局“重大疑难疾病中西医临床协作能力建设项目”(No.国中医药医政发[2018]3号);北京市中医药科技发展资金项目(No. JJ-2020-57)。

作者简介:杨涛,男,博士研究生,主要从事中医药防治内分泌、肿瘤疾病研究, email: yangtao@bjsjth.cn ^{*}通信作者:姜敏,女,主任医师,教授,博士研究生导师,主要从事中医内分泌、中医体质学研究, email: jiangm1965@sina.com

Abstract: Iodine-containing traditional Chinese medicines have long been used for thyroid diseases. In the “Handbook of Prescriptions for Emergencies”, there are records of seaweed and kombu for goiter diseases, and classical prescriptions such as Seaweed Yuhu decoction, Sihai Shuyu pills and Xiaoluo pills all use iodine-containing traditional Chinese medicine till today. With deeper understanding of the pathological mechanism of the disease, the application of iodine-containing traditional Chinese medicines for thyroid diseases has caused some controversy, and the rational use of iodine-containing traditional Chinese medicine is also a problem. It may be a more reasonable way to combine the results of modern pharmacological study. This review aims to sort out the progress in the mechanism of iodine-containing traditional Chinese medicine for thyroid diseases and provide reference for further research and clinical application.

Key words: iodine-containing traditional Chinese medicine; thyroid disease; goiter disease; mechanism

甲状腺疾病属于中医学“瘰癧”范畴，早在战国时代《吕氏春秋·尽数篇》中就有相关记载：“轻水所，多秃与瘰人”，隋代巢元方在《诸病源候论》中引言“诸山水黑土中，出泉流者，不可久居，常食令人作瘰病，动气增患”，清代《杂病源流犀烛》中也有“西北方依山聚涧之民，食溪谷之水，受冷毒之气，其间妇女往往生节如瘰”的论述，均提示瘰病的发生与水土因素密切相关。关于瘰病的治疗，自《肘后备急方》首次提出使用海藻、昆布治疗以来，含碘中药的应用备受推崇，如昆布、羊靛、鹿靛治疗瘰病可见于《千金翼方》《外台秘要》等书中，《外科正宗》《疡科大全》《医学心悟》所载海藻玉壶汤、四海舒郁丸、消瘰丸等方剂均使用了含碘中药，这些方剂大多沿用至今，且临床疗效确切。

20 世纪 80 年代以前，中医治疗瘰病几乎都会使用含碘中药。后随着我国食盐碘化政策的实施、强化，在改善群众碘缺乏状态的同时，碘摄入过量引发的甲状腺疾病也开始逐渐增多，含碘中药在甲状腺疾病中的应用也逐渐受到争议。有研究者通过梳理含碘中药治疗甲状腺疾病的文献，认为应根据不同甲状腺疾病的生理病理情况，结合现代研究结果，合理使用含碘中药^[1]。本文系统梳理常用含碘中药在甲状腺疾病中的应用及作用机制，旨在为含碘中药在相关疾病领域的深入机制研究及临床合理用药提供参考。

1 碘与甲状腺的关系

碘是合成甲状腺激素的必要原料，机体内的碘含量与甲状腺疾病关系密切。碘的摄入量与甲状腺疾病的关系呈 U 型曲线，世界卫生组织推荐成人每日摄碘量为 150 μg ，碘缺乏或者碘过量都会影响甲状腺的形态结构和生理功能，导致甲状腺疾病的发生^[2]。碘摄入不足导致甲状腺激素合成减少，激活下丘脑-垂体-甲状腺的负反馈机

制，垂体大量分泌促甲状腺激素，过量的促甲状腺激素可刺激甲状腺组织增生肥大，引起单纯性甲状腺肿；碘摄入过多同样会引起甲状腺功能亢进症、甲状腺炎、甲状腺结节、甲状腺癌等疾病，而且长期碘摄入过量还能导致甲状腺功能减退^[3]。

2 治疗甲状腺疾病的常用含碘中药

含碘中药治疗甲状腺疾病的历史已久，有研究者整理历代医家治疗瘰病的 100 余首方剂发现，使用频率最高前 8 味中药是昆布、海藻、夏枯草、牡蛎、当归、浙贝母、生地黄和黄药子^[4]，采用砷铈催化分光光度法测定这些中药中碘的含量，结果显示昆布 ($794.69 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和海藻 ($682.46 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 饮片的碘含量丰富，属于富碘中药，夏枯草 ($38.43 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的碘含量居于两者之后，牡蛎 ($8.28 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、黄药子 ($4.69 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、浙贝母 ($2.09 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、当归 ($1.58 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的碘含量相对较少，生地黄 ($0.10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的碘含量最少^[5]。另有研究根据文献及临床经验筛选 6 种常用消瘰中药，包括昆布、海藻、牡蛎、香附、夏枯草及玄参，采用氧化还原滴定法进行碘含量测定，结果同样显示昆布和海藻的碘含量丰富，牡蛎、香附次之，夏枯草和玄参碘含量较低^[6]。

由此可见，碘含量最为丰富的是藻类药物昆布和海藻，也被称为“富碘中药”，介类中药牡蛎在不同研究中的碘含量均相对较高，而植物类中药的碘含量相对较低，其中夏枯草在不同研究中的碘含量差异较大，这可能与检测方法的差异相关。含碘中药临床主要用于单纯性甲状腺肿、甲状腺功能异常、甲状腺结节、甲状腺炎和甲状腺癌的治疗，如田甜等^[7]研究发现海藻玉壶汤能显著改善单纯甲状腺肿患者的甲状腺激素水平，保护患者甲状腺功能；张华军等^[8]应用海藻牡蛎消瘰汤联合西药治疗甲状腺功能亢进症，可明显缓解患者症状，调节甲状腺激素水平，降低复发

率；董玉娟等^[9]的 meta 分析显示，联合富碘中药复方应用于甲状腺功能亢进症的治疗，在总有效率、甲状腺功能、复发率等方面的改善均优于单纯应用西药治疗，且并未引起病情加重；贾蔓箐等^[10]联合使用夏枯草胶囊与甲巯咪唑片治疗甲状腺功能亢进症患者，与单纯西药比较，可提高临床疗效，改善甲状腺功能与骨代谢功能；张微等^[11]研究发现夏枯草胶囊联合小金丸能够缩小桥本甲状腺炎伴结节患者的甲状腺体积及结节大小，改善甲状腺抗体水平，提高甲状腺功能，抑制炎症反应。

参照《中国药典》对治疗甲状腺疾病常用含碘中药（海藻、昆布、夏枯草、牡蛎、当归、浙贝母、黄药子、生地黄、玄参和香附）的描述，药性以寒为主，药味以苦、咸和甘为主，归肝经和肾经者居多（见图 1）。中医认为瘰癧的发生与肝脾密切相关，肝郁气滞、化火，脾虚痰生，痰气（火）交阻，血行瘀滞，最终气滞、痰凝、血瘀相互为患而发为本病^[12-13]。常用含碘中药苦寒以清热泻火、咸以软坚散结，且主要入肝经，可谓正中病机。

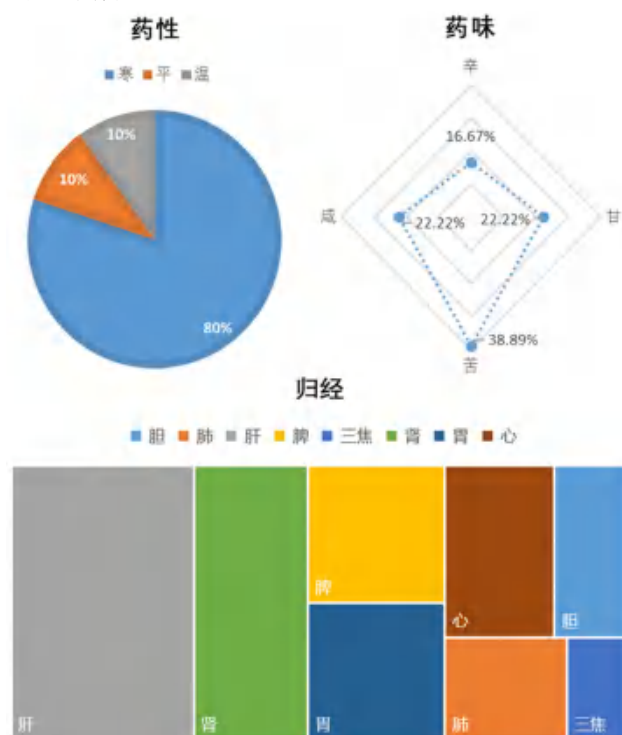


图 1 常用含碘中药性味、归经分布

Fig 1 Nature, flavor and meridian distribution of commonly used iodine-containing traditional Chinese medicines

3 常用含碘中药在甲状腺疾病中的作用机制

含碘中药及复方在甲状腺疾病领域的临床研究颇多，而相关机制研究则较为缺乏，现有研究以海藻、昆布、夏枯草和玄参为主，其余常用含

碘中药干预甲状腺疾病的研究较少，故本文主要对上述 4 种含碘中药的相关机制研究进行综述。

3.1 海藻

海藻主要包含酮类、萜烯类、多肽、生物碱、莽草酸类和多糖类褐等活性成分，海藻多糖是研究最为广泛的活性物质，研究表明海藻多糖具有抗肿瘤、抗氧化、抗菌、调节免疫和抗炎等药理作用^[14]。海藻干预甲状腺疾病的研究主要集中于治瘰名方海藻玉壶汤上，疾病类型以甲状腺肿大为主。综合目前研究结果，海藻玉壶汤主要通过影响甲状腺细胞凋亡与增殖来发挥作用。张晨等^[15]采用两种不同品种海藻（羊栖菜、海蒿子）的海藻玉壶汤干预甲状腺肿大鼠模型，结果发现高剂量海藻玉壶汤对大鼠甲状腺系数及甲状腺组织形态有纠正作用，其作用机制可能与升高 Bax/Bcl-2 从而促进甲状腺细胞凋亡相关；葛超冉等^[16]的研究同样显示，海藻玉壶汤及其拆方对甲状腺肿大模型大鼠的甲状腺系数及甲状腺组织病理形态有纠正作用，其作用机制可能是通过 mTOR-p70S6K/4E-BP1 信号通路抑制细胞增殖有关。此外，海藻玉壶汤中虽然包含海藻和甘草的反药组合，但并未发现明显的毒副作用。李怡文等^[17]研究发现，海藻玉壶汤用于甲状腺肿病理模型，在肝脏系统未发现明显的毒副作用，且不同比例配伍的复方对大鼠模型的心、肾功能无影响^[18]。还有研究显示海藻玉壶汤中不同品种海藻与甘草配伍可诱导肝脏 CYP3A1 mRNA、CYP2E1 蛋白的表达，进而影响 CYP450 酶系统促进甲状腺肿动物模型肝脏蛋白合成功能的恢复^[19-20]。

3.2 昆布

昆布中主要成分为多糖脂肪、天然蛋白质、纤维素、矿物质、核酸等，昆布多糖类物质是其重要的药理活性成分，已证明昆布多糖具有降血糖、抗肿瘤、抗氧化、肾脏保护和免疫调节等作用^[21]。昆布干预甲状腺疾病的机制研究也是以复方为主，除海藻玉壶汤外，昆布散同样是治疗瘰癧的经典名方，昆布散出自《圣济总录》，由昆布、海藻、松萝、海蛤、木通、白蔹、桂枝组成，主要用于甲状腺肿疾病的治疗。赵慎非等^[22]通过实验研究发现，昆布散可显著改善甲状腺肿大鼠模型甲状腺激素分泌水平，抑制氧化应激损伤，其作用机制可能与调控 Keap1/HO-1/NQO-1 通路有关。昆布、海藻等富碘中药的抗氧化应激作用，在自身免疫性甲状腺炎（AIT）动物模型中也得到了证明。Gao 等^[23]通过动物实验发现，富碘中药昆布、海藻和海带能明显提高 AIT 动物模型的抗氧化能力，抑制甲状腺中 Th17 细胞的高分化。此外，昆布提取液也体现出对甲状腺的保护作

用,付彦君等^[24]利用甲硫氧嘧啶构建甲状腺肿瘤模型,给予昆布提取液干预,结果发现高、中剂量组的甲状腺滤泡增大、胶质形成均有改善,其中高剂量组的改善更为明显,提示昆布提取液对甲硫氧嘧啶引起的大鼠甲状腺肿有保护作用。

3.3 夏枯草

夏枯草干预甲状腺疾病的机制研究较为丰富,疾病类型主要包括 AIT 和甲状腺癌。AIT 主要包括桥本甲状腺炎、萎缩性甲状腺炎、甲状腺功能正常的甲状腺炎、无痛性甲状腺炎和桥本甲亢 5 种类型。现代药理学研究显示,夏枯草中含有三萜类、黄酮类、甾体类、多糖类等药理成分^[25],夏枯草可通过影响免疫相关细胞、因子和通路来调节 AIT 的免疫反应状态。有研究证明夏枯草可促进脾脏 T 调节细胞和细胞因子白介素(IL)-10、肿瘤坏死因子 β (TGF- β)的表达,从而降低实验性自身免疫性甲状腺炎(EAT)模型的甲状腺球蛋白抗体(TgAb)水平,减小甲状腺体积。有研究显示,夏枯草能缩小 EAT 大鼠的甲状腺体积,降低甲状腺炎症评分和血清 TgAb 水平,并能减弱 Th1、Th2 和 Th17 细胞的表达,这与夏枯草通过高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)降低 TLR9/MyD88 通路和促炎细胞因子活性的机制相关^[26]。NF- κ B 信号通路与炎症和自身免疫性疾病密切相关,Chen 等^[27]对桥本甲状腺炎模型研究发现夏枯草可抑制 NF- κ B 和 IRF3 的激活,并抑制相应的启动子激活,进而抑制先天性、适应性免疫反应和细胞死亡对甲状腺细胞发挥保护作用,同时还能保护细胞免受碘相关氧化损伤。李嫚等^[28]同样发现夏枯草胶囊对 EAT 大鼠具有抑制 NF- κ B 信号通路活化的作用。除免疫调节作用外,夏枯草还能通过抑制细胞凋亡以保护甲状腺滤泡上皮,余欣然等^[29]研究发现,夏枯草胶囊可能通过减少 Fas、FasL 的表达,抑制甲状腺滤泡细胞凋亡,从而减轻 EAT 大鼠模型甲状腺滤泡上皮的破坏。

恶性肿瘤细胞的主要特征是具有无限增殖的能力,夏枯草干预甲状腺癌主要是以影响细胞增殖与凋亡为主。Song 等^[30]通过体内外研究发现,夏枯草水提液可通过 AMPK/mTOR/ULK1 通路诱导细胞自噬,从而抑制甲状腺癌细胞的增殖。体外研究显示,夏枯草可显著提高人类高分化甲状腺癌细胞系 TPC-1 和 FTC-133 中 Bcl-2 相关蛋白和 caspase-3 的表达,进而诱导细胞凋亡的发生^[31]。殷德涛等^[32]研究发现,夏枯草对甲状腺癌细胞 TPC-1 的增殖具有显著抑制作用,这可能与上调抑癌基因 *CCDC67* 的表达相关。还有研

究发现夏枯草的提取物熊果酸能抑制 TPC-1 细胞的增殖,具体机制涉及促进细胞凋亡、阻滞细胞周期、激活 p53 信号通路和抑制 MAPK 信号通路^[33]。夏枯草亦可通过降低 microRNA-146b-3p 的表达水平抑制甲状腺乳头状癌细胞 B-CPAP 的增殖、侵袭及迁移^[34]。

3.4 玄参

玄参主要成分为苯丙素苷类、环烯醚萜苷类和有机酸类等,其中研究较多的主要是环烯醚萜苷类成分,如哈巴苷、哈巴俄苷、桃叶珊瑚苷等,这些物质具有抗炎、免疫调节、抗氧化的等多种药理作用^[35-36]。中医学认为玄参具有凉血滋阴、泻火解毒的作用,临床常用于甲状腺功能亢进类疾病。利用组学技术探索中药对微观代谢产物的研究逐渐增多,张宁等^[37]通过 iTRAQ 技术的蛋白质组学分析玄参对阴虚火旺甲状腺功能亢进症大鼠的影响,结果显示经玄参干预后,纠正了 78 种异常表达蛋白质的趋势,涉及碳代谢、氨基酸的生物合成、淀粉和蔗糖代谢等代谢途径,与 ErbB 信号通路相关。还通过尿液代谢组学研究发现,玄参可调节 6 个代谢物包括脯氨酸二甲内盐、雌酮、胸苷、5-羟吡啶乙酸、环磷酸腺和左旋多巴水平,涉及相关性最强的通路有色氨酸代谢、嘧啶代谢、酪氨酸代谢、嘌呤代谢和甾体激素类生物合成等^[38]。肝脏代谢组学方面的研究则提示玄参提取物可显著回调 14 个甲状腺功能亢进症大鼠模型的肝脏代谢物,涉及糖基磷脂酰肌醇锚生物合成、花生四烯酸代谢、嘌呤代谢、 α -亚麻酸代谢等通路^[39]。此外,还有研究显示玄参可抑制甲状腺癌 SW579 细胞增殖,这与玄参可下调 Bcl-2 与 C-myc 的表达相关,且不同浓度的玄参与凋亡相关基因 *Bcl-2* 与 *C-myc* 表达有量效关系^[40]。

4 讨论

根据不同甲状腺疾病的生理病理情况,结合现代药理学研究,指导含碘中药在甲状腺疾病中的应用是较为合理的方式。如单纯性甲状腺肿的主要病理表现为细胞增生和血管新生,碘摄入不足或过量均可导致本病发生,对于因碘缺乏引起的甲状腺肿可予含碘中药治疗,尤其富碘中药海藻和昆布可通过促进甲状腺细胞凋亡、抗氧化等机制有效缓解甲状腺肿大。AIT 的发病机制与遗传因素、免疫失调、细胞凋亡等相关,同时碘摄入过量也是 AIT 发病的重要因素^[41],故富碘中药应谨慎用于 AIT 的治疗,夏枯草是临床治疗 AIT 的主要含碘中药,其能通过调节免疫、抑制凋亡来改善 AIT 的病理状态。甲状腺癌与碘摄入的关

系尚存在争议,但国内一项流行病学研究提示高碘地区甲状腺癌的发病率高于低碘地区和适碘地区^[42],谨慎起见,临床治疗甲状腺癌应当避免使用富碘中药,而适碘中药夏枯草、玄参等则无明显使用禁忌,相关机制研究还证明这些中药能通过抑制增殖、促进凋亡等途径干预甲状腺癌。此外,甲状腺功能亢进症是甲状腺激素合成过多而引起的甲状腺毒症,其主要原因是弥漫性毒性甲状腺肿(Graves病,约占85%)。尽管含碘中药治疗 Graves 病的机制研究较为缺乏,但随着近年来高剂量碘剂治疗 Graves 病的循证证据不断丰富,并写入 2016 版美国甲状腺协会的指南中^[43],国内相关指南也推荐可将海藻、昆布等富碘中药用于不耐受抗甲状腺药物(antithyroid drug, ATD)且拒绝接受¹³¹I或手术治疗的 Graves 病患者,需要注意的是要定期监测甲状腺功能,及时调整用量和疗程^[44-45]。

中药中的碘与碘化物中的碘是同种元素,但中药的成分更为复杂,中药还含有蛋白、无机盐、糖类等成分,而且中药复方通过不同药物配伍综合发挥作用,这也体现了中药多成分、多靶点的优势。总体而言,临床应用含碘药物治疗甲状腺疾病应以辨证论治为主,同时注意结合“辨病论治”,辨病主要体现在甲状腺功能状态和病理机制方面,对于碘摄入过多引起的甲状腺肿、甲状腺炎、甲状腺功能亢进症等疾病,应当慎用昆布、海藻等富碘中药,必须使用时应当注意剂量、疗程,并需定期监测甲状腺功能,谨防碘过敏样反应和碘逃逸现象。而适碘中药治疗甲状腺疾病未发现明显禁忌,可在“辨证论治”的基础上,结合现代药理学研究结果合理用药。

越来越多的临床研究表明,含碘中药在缓解症状、提高疗效、降低西药不良反应等方面具有独特优势^[46],同时相关机制研究显示含碘中药海藻、昆布、夏枯草和玄参能通过多种通路和机制干预甲状腺疾病,这些研究结果为含碘中药在临床的应用提供了有力参考。中药的特点是以“人用经验”为主,要实现现代化、全球化,明确中药的药理及毒理机制是关键。综合当前研究来看,对含碘中药的机制研究和挖掘仍然不足,缺乏牡蛎、浙贝母、当归等常用含碘中药的机制研究,而且多数研究以中药复方、单药为主,中药单体、有效成分的研究仍不足。在未来的研究中,我们需进一步探索含碘中药在甲状腺疾病中的作用,结合新兴的生物信息学、网络药理学等技术对常用含碘中药及复方进行深入研究,为临床应用及推广提供支持。

参考文献

- [1] 何莉莎,逢冰,赵林华,等.含碘中药在甲状腺疾病中的应用概况[J].中医杂志,2015,56(9):801-806.
- [2] Ruggert RM, Trimarchi F. Iodine nutrition optimization: are there risks for thyroid autoimmunity? [J]. J Endocrinol Invest, 2021, 44(9): 1827-1835.
- [3] 张倩为,綦一澄,汤明明,等.碘与甲状腺疾病的研究进展[J].医学综述,2021,27(7):1373-1379.
- [4] 崔鹏.不同碘含量复方治疗瘰癧的实验研究及临床经验总结[D].大连:辽宁中医药大学,2007.
- [5] 崔鹏,高天舒.常用软坚散结中药及复方碘含量的测定[J].中华中医药学刊,2007,25(7):1396-1398.
- [6] 王旭,尤爱琴,李伟,等.临床常用消瘰中药含碘量测定研究[J].南京中医药大学学报,2007,23(6):387-388.
- [7] 田甜,莫淑婵,吴钟彪,等.逍遥散合海藻玉壶汤对单纯性甲状腺肿甲状腺激素水平及预后的影响[J].中华中医药学刊,2022,40(3):48-50.
- [8] 张华军,左艳敏,周露鲁,等.海藻牡蛎消瘰汤联合西药治疗甲状腺功能亢进症临床观察[J].上海中医药杂志,2015,49(8):44-46,52.
- [9] 董玉娟,林俊红,刘宴伟,等.含富碘中药复方治疗甲亢有效性及安全性的 Meta 分析[J].江西中医药,2021,52(4):37-42.
- [10] 贾蔓菁,魏巍.夏枯草胶囊联合甲巯咪唑片治疗甲状腺功能亢进症的疗效观察[J].现代医学与健康研究(电子版),2022,6(9):1-4.
- [11] 张微,张明海,胡君.小金丸联合夏枯草胶囊治疗桥本甲状腺炎伴结节的效果及对炎症因子的影响[J].中国当代医药,2022,29(7):78-81.
- [12] 张仕衡,杨宇峰,石岩.瘰癧之病因病机理论框架研究[J].辽宁中医药大学学报,2020,22(10):120-122.
- [13] 黄学阳,刘大晟,林鸿国,等.从病因病机探析瘰癧的中医防治[J].中国中医基础医学杂志,2020,26(4):460-462.
- [14] Rengasamy KR, Mahomodally MF, Aumeeruddy MZ, et al. Bioactive compounds in seaweeds: an overview of their biological properties and safety [J]. Food Chem Toxicol, 2020, 135: 111013.
- [15] 张晨,钟赣生,李娜,等.海藻玉壶汤中海藻不同品种与甘草加减应用对甲状腺肿大模型大鼠甲状腺 Bax、Bcl-2mRNA 表达的影响[J].北京中医药大学学报,2019,42(4):304-311.
- [16] 葛超冉,王鑫,钟赣生,等.海藻玉壶汤及拆方对甲状腺肿大模型大鼠 mTOR-p70S6K/4E-BP1 信号通路的影响[J].北京中医药大学学报,2021,44(5):436-443.
- [17] 李怡文,钟赣生,柳海艳,等.基于均匀设计的海藻玉壶汤中海藻与甘草不同比例配伍对甲状腺肿大模型大鼠肝脏功能及病理形态的影响[J].中华中医药杂志,2013,28(5):1295-1300.
- [18] 李怡文,钟赣生,柳海艳,等.基于均匀设计的海藻玉壶汤中海藻、甘草不同比例配伍对甲状腺肿大模型大鼠心、肾功能影响的实验研究[J].中华中医药学刊,2014,

- 32 (5): 1011-1015.
- [19] 刘殿娜, 陈丰, 于雪, 等. 含反药组合的海藻玉壶汤中不同品种海藻与甘草配伍应用对甲状腺肿大模型大鼠肝脏的影响[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33 (5): 1788-1793.
- [20] 修琳琳, 于雪, 刘殿娜, 等. 含反药组合的海藻玉壶汤中海藻不同品种与甘草加减应用对甲状腺肿大模型大鼠肝脏 CYP450 酶基因与蛋白表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32 (5): 2020-2025.
- [21] Luan F, Zou J, Rao Z, et al. Polysaccharides from *Laminaria japonica*: an insight into the current research on structural features and biological properties [J]. Food Funct, 2021, 12 (10): 4254-4283.
- [22] 赵慎非, 黄莉莉, 黄鸣清, 等. 昆布散对甲状腺肿大模型大鼠甲状腺功能及氧化应激的影响[J]. 药学研究, 2021, 40 (6): 359-362.
- [23] Gao CH, Qu JQ, Zhou XY, et al. Iodine-rich herbs and potassium iodate have different effects on the oxidative stress and differentiation of TH17 cells in iodine-deficient NOD.H-2 (h4) mice [J]. Biol Trace Elem Res, 2018, 183 (1): 114-122.
- [24] 付彦君, 王卉, 韩兆丰, 等. 昆布提取液对实验性大鼠甲状腺肿的影响[J]. 新中医, 2013, 45 (8): 190-191.
- [25] 李思思, 华川, 杨金月, 等. 夏枯草治疗自身免疫性甲状腺炎的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30 (9): 1018-1022.
- [26] Guo Q, Qu H, Zhang H, et al. *Prunella vulgaris* L. Attenuates experimental autoimmune thyroiditis by inhibiting HMGB1/TLR9 signaling [J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 4559-4574.
- [27] Chen F, Kawashima A, Luo Y, et al. Innate immune-Modulatory activity of *Prunella vulgaris* in thyrocytes functions as a potential mechanism for treating Hashimoto's thyroiditis [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2020, 11: 579648.
- [28] 李嫚, 涂瑞沙, 余书勇, 等. 夏枯草胶囊对自身免疫性甲状腺炎大鼠 NF- κ B 通路及免疫指标的影响[J]. 解放军医药杂志, 2020, 32 (4): 88-92, 96.
- [29] 余欣然, 向楠, 曾明星, 等. 夏枯草胶囊对自身免疫性甲状腺炎大鼠甲状腺组织及 Fas、FasL 表达的影响[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18 (7): 1239-1242, 1271.
- [30] Song J, Zhang Z, Hu Y, et al. An aqueous extract of *Prunella vulgaris* L. inhibits the growth of papillary thyroid carcinoma by inducing autophagy in vivo and in vitro [J]. Phytother Res, 2021, 35 (5): 2691-2702.
- [31] Yin DT, Lei M, Xu J, et al. The Chinese herb *Prunella vulgaris* promotes apoptosis in human well-differentiated thyroid carcinoma cells via the B-cell lymphoma-2/Bcl-2-associated X protein/caspase-3 signaling pathway [J]. Oncol Lett, 2017, 14 (2): 1309-1314.
- [32] 殷德涛, 雷梦园, 许建辉, 等. 夏枯草对甲状腺乳头状癌细胞抑制作用及卷曲螺旋结构域蛋白 67 基因的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32 (3): 492-494.
- [33] 向润清. 夏枯草提取物中熊果酸抑制甲状腺乳头状癌细胞 TPC-1 增殖的实验研究[D]. 昆明: 云南中医药大学, 2020.
- [34] 武红园. 夏枯草通过调控 MicroRNA-146 对甲状腺乳头状癌细胞增殖、侵袭的影响[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2021.
- [35] 袁培培, 赵真真, 周文杰, 等. 不同产地玄参饮片高效液相色谱指纹图谱及 6 种化学成分含量测定[J]. 中南药学, 2019, 17 (5): 641-646.
- [36] Ren D, Shen ZY, Qin LP, et al. Pharmacology, phytochemistry, and traditional uses of *Scrophularia ningpoensis* Hemsl [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 269: 113688.
- [37] 张宁, 李自辉, 赵洪伟, 等. 基于 iTRAQ 技术的玄参对阴虚火旺甲状腺功能亢进大鼠蛋白质组学研究[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36 (7): 4207-4211.
- [38] 张宁, 李自辉, 赵洪伟, 等. 基于尿液代谢组学研究玄参对阴虚火旺甲亢大鼠的滋阴降火作用机制[J]. 药学报, 2018, 53 (11): 1843-1851.
- [39] 张宁, 李自辉, 赵洪伟, 等. 玄参提取物对甲亢模型大鼠肝脏代谢组学的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2019, 42 (1): 21-29.
- [40] 伍庆华, 李龙雪, 宋渺渺, 等. 中药玄参对甲状腺癌 SW579 细胞增殖及 BCL-2 和 C-myc 表达的影响[J]. 江西中医药, 2018, 49 (10): 67-69.
- [41] Ragusa F, Fallahi P, Elia G, et al. Hashimotos' thyroiditis: epidemiology, pathogenesis, clinic and therapy [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2019, 33 (6): 101367.
- [42] 关海霞, 滕卫平, 单忠艳, 等. 不同碘摄入量地区甲状腺癌的流行病学研究[J]. 中华医学杂志, 2001, 81 (8): 457-458.
- [43] Ross DS, Burch HB, Cooper DS, et al. 2016 American Thyroid Association Guidelines for Diagnosis and Management of Hyperthyroidism and Other Causes of Thyrotoxicosis [J]. Thyroid, 2016, 26 (10): 1343-1421.
- [44] 中国中西医结合学会内分泌专业委员会. 富碘中药治疗 Graves 病专家共识[J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41 (6): 663-667.
- [45] 中国医师协会中西医结合医师分会内分泌与代谢病专业委员会. 甲状腺功能亢进症中西医结合诊疗指南 (2021-01-20) [J]. 世界中医药, 2021, 16 (2): 193-196.
- [46] 罗夏敏, 唐冠兰, 滕晓洁, 等. 含碘中药治疗甲状腺疾病研究进展[J]. 陕西中医, 2022, 43 (5): 677-680.

(收稿日期: 2022-05-02; 修回日期: 2022-06-17)

海藻玉壶汤治疗甲状腺疾病的临床应用与药理作用研究进展

马思懿, 杨涛, 姜敏* (首都医科大学附属北京世纪坛医院中医科, 北京 100038)

摘要: 海藻玉壶汤为著名治瘰名方, 是治疗诸多甲状腺疾病的重要方剂。在临床应用方面, 海藻玉壶汤及其加减方可治疗甲状腺肿、甲状腺功能亢进症、桥本甲状腺炎和甲状腺癌等甲状腺疾病。现代药理研究表明海藻玉壶汤具有抗氧化应激、调节甲状腺细胞的增殖与凋亡和调节细胞因子等作用。本文旨在梳理海藻玉壶汤的临床应用进展及其药理作用研究, 探讨海藻甘草反药组合的研究进展, 为海藻玉壶汤的临床应用及其作用机制的深入研究提供参考。

关键词: 海藻玉壶汤; 甲状腺疾病; 瘰病; 反药组合; 药理作用; 临床应用

中图分类号: R285, R273 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2022)12-2843-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.023

Clinical application and pharmacological effect of Haizao Yuhu decoction for thyroid diseases

MA Si-yi, YANG Tao, JIANG Min* (Department of Traditional Chinese Medicine, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038)

Abstract: Haizao Yuhu decoction is a popular prescriptions for treating gall disease, and it is an important prescription for many thyroid diseases. Modified Haizao Yuhu decoction can treat thyroid diseases such as goiter, hyperthyroidism, Hashimoto's thyroiditis and thyroid tumor. Modern pharmacological studies have shown that Haizao Yuhu decoction has pharmacological effect such as anti-oxidation, regulation of proliferation and apoptosis of thyroid cells and cytokines. This review aimed to sort out the clinical application and pharmacological progress of Haizao Yuhu decoction, and discuss the research progress in the sargassum and glycyrrhiza antagonistic medicinal combination, providing reference for further research and application of Haizao Yuhu decoction.

Key words: Haizao Yuhu decoction; thyroid disease; gall disease; antagonistic medicinal combination; pharmacological effect; clinical application

甲状腺疾病是常见的内分泌疾病之一, 由于环境、遗传易感性、肠道菌群等因素导致甲状腺形态及功能异常。随着人们生活节奏的加快, 生活压力的增大, 甲状腺疾病发病率逐年攀升。甲状腺疾病主要包括甲状腺功能减退症、甲状腺功能亢进症、甲状腺结节、甲状腺炎、甲状腺癌等疾病。甲状腺疾病属于中医学“瘰病”范畴。《医学入门》说瘰“原因忧恚所生, 故又曰瘰气, 今之所谓瘰囊者是也”^[1]。在《诸病源候总论》中记载:“诸山水黑土中出泉流者, 不可久居, 常食令

人作瘰病”^[2]。可见, 中医学认为甲状腺疾病与体质、情志郁结、水土失宜等因素相关。对于瘰病的治疗, 自葛洪的《肘后方》中首次提出应用含碘中药海藻和昆布以来, 诸多治瘰方中多含有海藻和昆布等药, 其中以海藻玉壶汤较为经典, 疗效显著, 广为流传。

海藻玉壶汤首见于陈实功的《外科正宗》, 主要由海藻、昆布、海带、法半夏、浙贝母、青皮、陈皮、连翘、当归、独活、川芎、甘草组成, 方中海藻味苦咸、性寒, 昆布味咸、性寒, 共奏

基金项目: 国家中医药管理局基本中医药循证能力建设项目 (No.2019XZZX-JB004)(National Administration of Traditional Chinese Medicine); 国家中医药管理局、国家卫生计生委、中央军委后勤保障部卫生局“重大疑难疾病中西医临床协作能力建设项目”(No. 国中医药医政发【2018】3号); 北京市中医药科技发展资金项目 (No. JJ-2020-57)。

作者简介: 马思懿, 女, 硕士研究生, 主要从事中医内分泌研究, email: collet@139.com *通信作者: 姜敏, 女, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中医内分泌、中医体质学研究, email: jiangm1965@sina.com

化痰消肿、软坚散结之功；半夏味辛、性温，浙贝味苦、性寒，共奏化痰散结之功；青皮、陈皮可行气化痰；连翘解毒消肿；当归、川芎养血活血；独活祛风除湿、引药力上行；甘草调和诸药。诸药共奏化痰软坚、消癭散结、行气活血之功。《外科正宗》中记载海藻玉壶汤治疗“癭瘤初起，或肿或硬，或赤不赤，但未破者。”近现代医家多用海藻玉壶汤作为基础方，结合辨证论治，治疗以肿块、结节或者肿大为主要临床表现的疾病，例如癭病、瘰疬和乳癖等。

近年来，诸多学者对海藻玉壶汤进行了更深入的研究，其治疗机制及药理作用也日趋明晰，本文通过对海藻玉壶汤的临床应用、药理作用和海藻甘草反药组合进行梳理总结，旨在为今后海藻玉壶汤的深入研究提供参考。

1 海藻玉壶汤治疗甲状腺疾病的临床应用研究

1.1 治疗单纯性甲状腺肿

单纯性甲状腺肿亦称非毒性甲状腺肿，主要病因是由于缺碘、环境中接触致甲状腺肿物质或相关酶缺陷等原因导致的甲状腺代偿性肿大，女性患病率高于男性。目前临床上西医多采用左旋甲状腺素治疗，但是有复发、长期应用过量及发生不良反应等风险^[3]。中医学将单纯性甲状腺肿归为“癭病”的范畴。海藻玉壶汤可以通过改善甲状腺激素水平，缩小甲状腺肿体积，降低中医证候评分满足对单纯性甲状腺肿的治疗要求。

田甜等^[4]将单纯性甲状腺肿患者随机分为对照组和治疗组，各 68 例，对照组予左甲状腺素钠片，治疗组在予左甲状腺素钠片的基础上给予海藻玉壶汤联合逍遥散治疗，治疗时间为 2 个月。结果治疗组总有效率为 94.12%，高于对照组的 80.88%；治疗组患者甲状腺激素水平有明显的改善，且不良反应发生率较低。许华欣^[5]运用加减海藻玉壶汤治疗 50 例单纯性甲状腺肿患者，发现治疗组总有效率为 94.00%，显著高于对照组（口服西药碘化钾，总有效率 77.78%），加减海藻玉壶汤在海藻玉壶汤原方的基础上增加了炮山甲、夏枯草、皂刺、牡蛎、三棱、莪术、苦参等药，能够更有针对性地治疗单纯性甲状腺肿，临床疗效较好。

1.2 治疗结节性甲状腺肿

单纯性甲状腺肿进展形成结节以后，则为结节性甲状腺肿。以甲状腺肿和结节为主要表现。病理上表现为甲状腺上皮细胞通过复制而形成的新形态及功能各异的滤泡组织。目前临床上西医

多采用手术治疗结节性甲状腺肿，术后复发率为 2.5% ~ 4.5%^[6]。

陈杨荣^[7]运用加减海藻玉壶汤治疗结节性甲状腺肿，与应用左旋甲状腺素片的对照组相比，两组甲状腺结节均有不同程度缩小，但治疗组缩小明显，少数病例结节消失，总有效率为 93.9%，高于对照组的 69.4%。

1.3 治疗甲状腺功能亢进症

甲状腺功能亢进症是由多种原因引起的甲状腺激素分泌过多所致的一组内分泌疾病。临床表现主要包括甲状腺弥漫性肿、多汗、食欲亢进、心悸、烦躁、消瘦、易激动等。临床目前多采用抗甲状腺药物、放射碘治疗或手术治疗，治疗过程中常伴有粒细胞缺乏、肝功能异常、诱发甲状腺危象等不良反应且复发率高^[8]。甲状腺功能亢进症的中医病因多为先天不足、体质虚弱、忧思多虑、脏腑失濡、感受外邪等^[9]。海藻玉壶汤可以改善甲状腺功能亢进症患者的临床症状，协同改善甲状腺激素水平，具有一定的特色及优势。

凌珑等^[10]将 82 例痰结血瘀证癭病（甲状腺功能亢进症）患者随机分为治疗组和对照组，对照组采用甲巯咪唑治疗，治疗组在此基础上加用海藻玉壶汤治疗，研究表明：治疗组总有效率为 90.47%，显著高于对照组的 70.20%，治疗组在改善患者临床症状、体征方面优于对照组。黎敏姬等^[11]采用海藻玉壶汤联合柴胡疏肝散加西药甲巯咪唑片治疗 41 例育龄期甲状腺功能亢进症女性患者，对照组采用甲巯咪唑片治疗，观察组总有效率为 92.68%，对照组总有效率为 70.73%，且观察组甲状腺激素等指标改善明显。张立清^[12]认为气滞、痰结、血瘀为甲状腺功能亢进症三大基本病机，应采用海藻玉壶汤疏肝理气、活血化瘀，予治疗组 46 例患者海藻玉壶汤联合他巴唑 10 mg 治疗 2 周，总有效率显著高于对照组（口服西药他巴唑）（82.61% vs 78.72%），且三碘甲状腺原氨酸（FT3）、游离甲状腺素（FT4）恢复程度明显优于对照组。

甲状腺功能亢进症的发生是由于甲状腺激素合成和分泌增加，碘是合成甲状腺激素的原料之一，海藻玉壶汤中的海藻、昆布、海带均属于富碘中药^[13]，尽管有部分医家对应用富碘中药治疗甲状腺功能亢进症存在疑议，但多数医家认为可应用且疗效颇佳。近年来运用富碘中药复方治疗甲状腺功能亢进症的研究不少，富碘中药复方能显著降低甲状腺功能亢进症大鼠血清总三碘

甲状腺原氨酸 (TT3)、血清总甲状腺素 (TT4) 水平^[14]。且富碘中药复方对于特殊人群如妊娠期、老年人等的甲状腺功能亢进症均具有治疗作用^[15]。因此富碘药物治疗甲状腺功能亢进症需合理应用但不是绝对禁忌。复方中各药物之间相互作用, 治疗甲状腺功能亢进症能否运用富碘中药不能仅从单味药的含碘量考虑, 应发挥中药复方多途径、多靶点治疗疾病的优势, 根据不同病情、不同阶段区别对待, 不可一概而论。

1.4 治疗桥本甲状腺炎 (HT)

HT 为自身免疫甲状腺炎的经典类型, 最为多见。主要表现为甲状腺球蛋白抗体 (TGAb) 和甲状腺过氧化物酶抗体 (TPOAb) 的过度表达从而引起甲状腺组织的慢性炎症和损伤^[16]。西医治疗缺乏有效干预手段, 以定期复查甲状腺功能为主。魏军平教授认为 HT 的病因主要有情志内伤、饮食及水土失宜, 体质因素和外感六淫之邪^[17]。海藻玉壶汤治疗 HT 可通过调节 T 细胞亚群以及体内细胞因子比例, 降低甲状腺自身抗体水平, 减轻甲状腺组织损伤, 保护机体甲状腺细胞, 减少炎症细胞浸润, 从而改善 HT 临床症状。

王喆等^[18]将 90 例 HT 合并甲状腺功能减退症患者随机分为观察组和对照组, 各 45 例, 对照组予左甲状腺素钠片和硒酵母片治疗, 观察组在对照组的基础上予加减海藻玉壶汤治疗, 其方剂组成为在原方的基础上加柴胡、夏枯草, 减独活、海带。干预 3 个月后发现观察组治疗总有效率为 93.33%, 显著高于对照组的 75.56%, 且观察组 TGAb 和 TPOAb 低于对照组, 由此可见海藻玉壶汤可降低甲状腺自身抗体水平。舒阳妹^[19]采用硒酵母片联合海藻玉壶汤加减 (治疗组) 治疗 25 例 HT 患者, 总有效率为 88%; 对照组为单纯服用硒酵母片, 总有效率为 68%; 治疗组降低甲状腺自身抗体的效果显著优于对照组, 且甲状腺峡部厚度变化更加明显。另有动物实验发现自身免疫性甲状腺炎大鼠在应用海藻玉壶汤治疗后, 血清 TGAb、TPOAb、三碘甲状腺原氨酸 (T3) 和甲状腺素 (T4) 水平均显著下降, 并且海藻玉壶汤可显著降低甲状腺组织学损伤评分^[20]。

1.5 治疗甲状腺癌

甲状腺癌是常见的内分泌肿瘤, 近年来发病率明显增高, 具有生长速度快的特点^[21]。良性甲状腺癌可表现为甲状腺结节, 多数患者无明显症状, 有些可出现吞咽困难、声音嘶哑等表现以及类似甲状腺功能亢进症的症状如烦躁、多汗、激

动、失眠等。甲状腺癌可有疼痛、恶心呕吐、呼吸困难、失眠、便秘、腹泻等症状。外科手术切除是临床治疗甲状腺癌患者的主要手段。阙华发认为先天肝肾不足, 或久病未复, 气血虚弱导致气血运行失常, 气滞痰凝血瘀而形成甲状腺癌^[22]。海藻玉壶汤可改善甲状腺癌术后症状, 促进术后恢复, 提高患者生活质量。

甲状腺癌患者多于甲状腺癌切除术后予海藻玉壶汤治疗。刘海舟^[23]将 72 例甲状腺癌术后患者随机分为试验组和对照组各 36 例, 对照组予左甲状腺素钠片, 试验组予海藻玉壶汤治疗 2 个月, 试验组总有效率为 91.67%, 高于对照组的 66.67%, 且不良反应发生率较对照组低。白龙^[24]收集了 100 例甲状腺癌切除术后气滞脾虚痰浊证患者, 随机分为治疗组和对照组各 50 例, 对比治疗组逍遥散合海藻玉壶汤加减治疗和对照组常规左甲状腺素钠片治疗临床疗效的区别, 治疗 8 周后治疗组总有效率 (92.0%) 明显高于对照组 (72.0%)。疗效确切且安全性较高。对于甲状腺良性肿瘤如甲状腺腺瘤可以采用西药联合海藻玉壶汤治疗。戴卓依等^[25]针对 50 例甲状腺腺瘤患者采用左甲状腺素钠片联合海藻玉壶汤治疗, 治疗 1 个月后治疗组患者 TSH、T3、T4 水平显著低于对照组, 甲状腺指标水平波动变化减小。海藻玉壶汤治疗甲状腺疾病的临床应用情况见图 1。

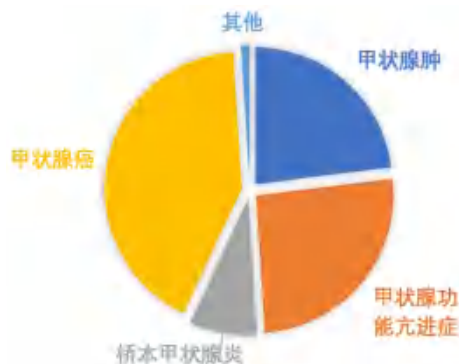


图 1 海藻玉壶汤治疗甲状腺疾病种类

Fig 1 Types of thyroid diseases that can be treated with Haizao Yuhu decoction

2 海藻玉壶汤的药理作用研究

海藻玉壶汤治疗甲状腺疾病的药理作用主要体现在抗氧化应激、调节甲状腺细胞的增殖与凋亡、调节细胞因子等方面。

2.1 抗氧化应激

氧化应激损伤机制被认为是甲状腺损伤的机制之一, 海藻玉壶汤具有抗氧化能力, 可促进甲状腺疾病恢复。甲状腺中 4-羟基壬烯酸

(4-HNE) 是氧化应激的标志物, 高天舒等^[26]从抗氧化应激角度探讨海藻玉壶汤对碘缺乏甲状腺肿模型大鼠的干预机制, 发现海藻玉壶汤治疗组 4-HNE 明显降低, 氧化还原酶 5 表达明显增高。李娜等^[27]研究发现海藻玉壶汤通过激活 Nrf2/HO-1 通路提高肝细胞的抗氧化能力。

2.2 调节甲状腺细胞的增殖与凋亡

广泛的甲状腺上皮细胞凋亡造成的组织损伤是 HT 发病的重要机制之一, Fas 可以诱导甲状腺细胞凋亡^[28]。谢东浩等^[29]研究海藻、甘草不同比例配伍对甲状腺相关调控因子的影响, 发现海藻比例增加时甲状腺相关调控因子 Fas 的表达减少, Bcl-2 的表达增加。贾燕丽等^[30]研究发现, 海藻玉壶汤治疗 HT 可能是通过抑制甲状腺 Fas/FasL 凋亡蛋白的表达, 从而避免细胞凋亡过度导致的甲状腺组织破坏。张晨等^[31]应用海藻玉壶汤治疗甲状腺肿模型大鼠, 发现该方可降低甲状腺 Bax mRNA 表达, 增强 Bax 蛋白与 Bcl-2 蛋白结合, 升高 Bax/Bcl-2, 从而降低 Bcl-2 蛋白对凋亡的抑制作用, 促进甲状腺细胞凋亡。

2.3 调节细胞因子

肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-4 (IL-4)、白细胞介素-6 (IL-6) 等细胞因子在甲状腺疾病的发生过程中发挥重要作用。张兰等^[32]研究发现海藻、昆布可通过降低血清自身抗体, TNF- α 、IL-1、IL-4、IL-6 水平有效治疗自身免疫性甲状腺炎, 且剂量在 20 ~ 30 g 疗效最佳。趋化因子 CXCR4 趋化因子受体 4 (CXCR4) 的表达与多种恶性肿瘤相关, 特别是在甲状腺癌中有很高的强阳性表达率^[33]。张勤良等^[34]发现海藻玉壶汤可使甲状腺癌荷瘤小鼠实体瘤上的趋化因子 CXCR4 表达降低, 从而减缓小鼠肿瘤生长。王业生等^[35]对胸腺淋巴瘤移植小鼠进行海藻玉壶汤灌胃治疗, 发现其能够通过调控转化生长因子 β 1 (TGF- β 1)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9)、基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 等细胞因子, 达到阻止新生血管在肿瘤内形成、降低肿瘤血流速度和瘤组织黏度的效果。

3 海藻甘草反药组合的研究

海藻玉壶汤中的“反药组合”海藻与甘草配伍属于中药配伍禁忌“十八反”中药物组合之一, 历来争议颇多。有医家认为会产生毒副作用, 有些则认为海藻与甘草同用后不仅没有产生大的毒性反而能够达到治疗疾病的目的, 甚至运用得当可获得特殊疗效。有研究报道甘草与海藻、大戟、

甘遂、芫花同用后有一定毒副反应, 可导致谷丙转氨酶 (ALT)、磷酸肌酸激酶 (CPK)、乳酸脱氢酶 (LDH) 等指标升高^[36], 但大多研究证实海藻与甘草配伍的“反药组合”未发现明显的毒副作用。不同配伍比例及不同品种的海藻和甘草疗效存在差异。

3.1 海藻甘草配伍相关急性毒性实验

修琳琳等^[37]研究比较两种不同品种海藻单煎和与生甘草合煎对小鼠急性毒性的影响, 结果显示海蒿子单煎液毒性大于海蒿子生甘草合煎液毒性, 均属于小毒范畴, 余下各组未表现出明显毒性。曹琰等^[38]研究发现海蒿子和羊栖菜在药典高剂量 (6 ~ 12 g) 的 19 倍时对小鼠灌胃给药, 均表现出急性毒性, 而甘草无明显毒性。

3.2 不同比例海藻和甘草配伍的毒副作用研究

赵晶等^[39]研究发现, 甘草与海藻 1 : 1 配伍致使钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白 (Ntcp) 的表达量较正常组下降, 同样可观察到肝细胞出现核固缩、嗜酸粒细胞和脂肪变性; 而甘草与海藻 1 : 3 配伍对大鼠肝脏 Ntcp 的表达影响不明显且对肝组织结构和细胞形态均无明显影响。刘云翔等^[40]运用累计半数致死量的方法来进行海藻玉壶汤的毒性评价, 用生甘草或炙甘草、去海藻或去甘草的不同配伍组合, 研究各给药组小鼠的肝、肾功能指标的变化和差异, 结果表明各给药组对小鼠的肝、肾功能均无明显影响, 且 ALT、谷草转氨酶 (AST) 活性反而低于空白组。李怡文等^[41-42]观察海藻玉壶汤加减海藻甘草反药组合对甲状腺肿大鼠的影响, 结果发现在心、肝、肾脏系统均未发现明显的毒副作用, 且海藻玉壶汤具有促进甲状腺球蛋白和甲状腺过氧化物酶转录的作用, 利于甲状腺激素达到正常水平, 抑制甲状腺肿^[43]。宋霄宏^[44]研究发现海藻玉壶汤加减海藻甘草组合对 HT 大鼠的肝肾功能未见明显影响。因此海藻玉壶汤对于生理状态下和甲状腺疾病病理状态下的模型动物均未有明显毒副作用, 但应用时应注意甘草与海藻的比例。

3.3 不同品种海藻和甘草的研究

海藻的品种包括海蒿子与羊栖菜^[37], 《本草图经》中记载: “今谓海藻者乃是海中所生, 根着水底石上, 黑色, 如乱发而粗大少许, 叶类水藻而大, 谓之大叶藻……又有一种马尾藻生浅水中, 状如短马尾, 细, 黑色”。可见古代药用海藻就有两种之分, 前者为海蒿子, 后者为羊栖菜。此两者均具有抗甲状腺肿作用, 但是两者之

间的作用存在差异,只有含有羊栖菜的海藻玉壶汤能够增强 NIS mRNA 表达,提高甲状腺肿大鼠血清谷胱甘肽过氧化物酶和血清超氧化物歧化酶的水平^[45],且羊栖菜的毒性低于海藻子^[37]。

2020 年版《中国药典》记载了甘草的三个品种:乌拉尔甘草、胀果甘草和光果甘草。三种甘草均含有多糖类、香豆素类、黄酮类、生物碱类化学成分,均具有抗肿瘤、降血糖、调血脂、抗菌、抗炎等作用^[46]。有研究比较了不同品种甘草的海藻玉壶汤对于甲状腺肿大鼠治疗效果的差别,不同品种的甘草均具有突出的抗甲状腺肿作用,且对肝肾功能具有保护作用^[47-48]。

综上所述,海藻玉壶汤虽然含有“反药组合”海藻与甘草,但合理应用对于甲状腺疾病的治疗具有一定作用。在临床应用中,海藻不宜单煎,应与甘草配伍使用,且注意两者的应用比例。海藻品种的选择中,羊栖菜优于海藻子。

4 总结与展望

甲状腺疾病作为内分泌领域第二大疾病,在人群中的患病率呈明显上升趋势,特别是甲状腺肿、甲状腺癌等严重影响患者日常生活,因此有效的治疗手段临床意义重大。

海藻玉壶汤具有化痰软坚、消瘿散结、行气活血之功,在古今瘰病、瘰疬和乳癖等以肿块、结节为主要临床表现的疾病治疗过程中具有重要作用。诸多临床研究表明海藻玉壶汤治疗甲状腺肿、甲状腺功能亢进症、HT 和甲状腺癌等甲状腺疾病疗效明确,可对患者自身的机体状态起到积极作用,复发率较低且不良反应少。若病情较重的甲状腺疾病,单独应用海藻玉壶汤疗效欠佳时,可考虑柴胡疏肝散等方联合运用。在海藻玉壶汤的药理作用主要体现在抗氧化应激、调节甲状腺细胞的增殖与凋亡和调节细胞因子等方面。海藻玉壶汤含有“反药组合”海藻与甘草,在临床应用中与甘草配伍使用时海藻品种宜选用羊栖菜。

目前对于海藻玉壶汤的研究多局限于临床应用方面,作用机制研究和药效学研究相对较少,以研究海藻与甘草的反药配伍毒副作用较多,复方研究活性成分较少,希望未来可以结合复方海藻玉壶汤的化学成分,阐明海藻玉壶汤多途径、多靶点治疗甲状腺疾病的作用机制。

参考文献

[1] 李槌. 医学入门[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1999: 1105.

[2] 曹炳章. 中国医学大成·诸病源候总论(四十一)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990: 453.

[3] 蒋金兰, 杨慧婷, 鲁商波, 等. 基于数据挖掘技术探析针灸治疗单纯性甲状腺肿的选穴规律[J]. 浙江中医药大学学报, 2019, 43(12): 1389-1394.

[4] 田甜, 莫淑婵, 吴钟彪, 等. 逍遥散合海藻玉壶汤对单纯性甲状腺肿甲状腺激素水平及预后的影响[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(3): 48-50.

[5] 许华欣. 加减海藻玉壶汤治疗单纯性甲状腺肿 50 例[J]. 中国医药指南, 2012, 10(23): 438-439.

[6] 刘明阳. 海藻玉壶汤对实验性甲状腺肿大鼠的影响[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2011.

[7] 陈杨荣. 加减海藻玉壶汤治疗结节性甲状腺肿 49 例[J]. 浙江中医杂志, 2013, 48(6): 419.

[8] 赵进东, 李艳, 方朝晖. 中医药治疗甲状腺功能亢进症的临床研究进展[J]. 天津中医药大学学报, 2022, 41(3): 390-396.

[9] 王秋虹. 林兰教授治疗甲亢经验及甲亢宁胶囊调控 FRTL-5 细胞 ERK 通路的机制研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2016.

[10] 凌珑, 陈永华. 海藻玉壶汤联合甲巯咪唑治疗瘰病(痰结血瘀证型) 42 例临床观察[J]. 黔南民族医专学报, 2015, 28(1): 34-35.

[11] 黎敏姬, 张绍芬, 梁积杰. 海藻玉壶汤合柴胡疏肝散联合甲巯咪唑片治疗育龄期妇女甲状腺功能亢进 82 例临床分析[J]. 黑龙江中医药, 2018, 47(3): 50-51.

[12] 张立清. 海藻玉壶汤加减治疗甲亢的临床疗效观察[J]. 内蒙古医科大学学报, 2014, 36(S1): 59-60.

[13] 王涵, 王丽, 唐程, 等. 甲状腺功能亢进的中药治疗进展[J]. 北京中医药, 2018, 37(8): 759-763.

[14] 时杨, 高天舒, 杨柳. 富碘中药复方对甲亢大鼠甲状腺功能和形态的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(9): 186-188.

[15] 刘晓炜, 赖倚文, 陈雪莹, 等. 富碘中药复方对甲状腺功能亢进症特殊人群的治疗作用研究现状[J]. 世界中西医结合杂志, 2022, 17(2): 420-424.

[16] Zeng B, Min Y, Feng Y, et al. Hashimoto's thyroiditis is associated with central lymph node metastasis in classical papillary thyroid cancer: analysis from a high-volume single-center experience[J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 868606.

[17] 陈银. 魏军平教授治疗桥本氏甲状腺炎经验总结[D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.

[18] 王喆, 张兰. 左甲状腺素钠片、硒酵母片联合海藻玉壶汤加减治疗桥本氏甲状腺炎合并甲状腺功能减退症的效果探究[J]. 中国医药指南, 2021, 19(16): 7-9.

[19] 舒阳妹. 海藻玉壶汤加减治疗桥本氏甲状腺炎的临床疗效研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.

[20] Song X, Zan R, Yu C, et al. Effects of modified Haizao Yuhu Decoction in experimental autoimmune thyroiditis rats[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 135(2): 321-324.

[21] 林茂生. 甲状腺乳头状癌患者中医体质及其与颈部淋巴结转移相关性的初步研究[D]. 广州: 广州中医药大学,

- 2017.
- [22] 仇莲胤, 阙华发. 阙华发治疗甲状腺癌的经验 [J]. 上海中医药杂志, 2020, 54 (6): 75-78.
- [23] 刘海舟. 海藻玉壶汤加减治疗甲状腺癌术后临床研究 [J]. 新中医, 2021, 53 (3): 115-117.
- [24] 白龙, 王歌, 杨宇峰. 逍遥散合海藻玉壶汤加减治疗甲状腺癌术后的临床研究 [J]. 中医药导报, 2019, 25 (22): 66-69.
- [25] 戴卓依, 尹晖明. 海藻玉壶汤用于甲状腺腺瘤患者临床治疗中的价值 [J]. 实用中医内科杂志, 2021, 35 (10): 116-118.
- [26] 高天舒, 齐腾澈. 海藻玉壶汤及其拆方对大鼠碘缺乏致甲状腺肿的干预作用 [J]. 中医杂志, 2012, 53 (19): 1671-1676.
- [27] 李娜, 钟赣生, 张晨, 等. 海藻玉壶汤中海藻不同品种与甘草加减应用对甲状腺肿大鼠氧化应激及肝脏 Nrf2/HO-1 通路的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2019, 42 (3): 190-197.
- [28] Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N, et al. Modulation of Fas-mediated apoptosis of human thyroid epithelial cells by IgG from patients with Graves' disease (GD) and idiopathic myxoedema [J]. Clin Exp Immunol, 1997, 110 (3): 434-439.
- [29] 谢东浩, 马利华, 徐卫东, 等. 海藻、甘草不同比例配伍对甲状腺相关调控因子 Fas 和 Bcl-2 的表达研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2010, 26 (6): 450-452.
- [30] 贾燕丽, 田港, 唐晓霞, 等. 海藻玉壶汤加减方对实验性自身免疫性甲状腺炎凋亡蛋白 Fas/FasL 表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 32 (10): 2456-2458.
- [31] 张晨, 钟赣生, 李娜, 等. 海藻玉壶汤中海藻不同品种与甘草加减应用对甲状腺肿大模型大鼠甲状腺 Bax、Bcl-2 mRNA 表达的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2019, 42 (4): 304-311.
- [32] 张兰, 邹晓宁, 姜维娜, 等. 不同含碘剂量中药复方对 AIT 大鼠 IL-1, 4, 6 及 TNF- α 影响的研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39 (3): 391-393.
- [33] Cao X, Zhu J, Li X, et al. Expression of CXCR4 and CXCR7 in papillary thyroid carcinoma and adjacent tissues and their relationship with pathologic indicators of tumor aggressiveness [J]. Endocr J, 2022, 69 (2): 189-197.
- [34] 张勤良, 关琪. 海藻玉壶汤对甲状腺癌荷瘤小鼠趋化因子受体 CXCR4 的影响研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2014, 34 (2): 42-44.
- [35] 王业生, 杜钢军, 孙玲, 等. 海藻玉壶汤对小鼠胸腺淋巴瘤生长抑制的机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (2): 191-195.
- [36] 黄文权, 程相岭, 肖鸿, 等. 中药十八反中部分禁忌中药的毒理实验研究 [J]. 成都中医药大学学报, 2001, 24 (1): 45-47.
- [37] 修琳琳, 王思睿, 钟赣生, 等. 海蒿子、羊栖菜、生甘草配伍及海藻玉壶汤中海藻不同品种与生甘草加减配伍的急性毒性实验研究 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31 (5): 1933-1936.
- [38] 曹琰. 基于“十八反”的中药配伍禁忌理论基础研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [39] 赵晶, 周利婷, 魏玉辉, 等. 海藻甘草配伍后水提取物对大鼠肝细胞膜 Ntcp 的影响 [J]. 中南药学, 2014, 12 (7): 619-622.
- [40] 刘云翔, 柳海艳, 钟赣生, 等. 海藻玉壶汤中海藻-甘草反药组合加减应用的急性毒性实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (22): 240-245.
- [41] 李怡文, 钟赣生, 柳海艳, 等. 基于均匀设计的海藻玉壶汤中海藻与甘草不同比例配伍对甲状腺肿大鼠模型肝脏功能及病理形态的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28 (5): 1295-1300.
- [42] 李怡文, 钟赣生, 柳海艳, 等. 基于均匀设计的海藻玉壶汤中海藻、甘草不同比例配伍对甲状腺肿大鼠模型心、肾功能影响的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 32 (5): 1011-1015.
- [43] 李怡文, 于雪, 钟赣生, 等. 海藻玉壶汤中海藻与甘草不同比例配伍对甲状腺肿大模型大鼠药效及其机制探讨 [J]. 中草药, 2014, 45 (21): 3124-3130.
- [44] 宋霄宏, 咎日增, 王芳. 海藻玉壶汤加减方中不同比例海藻甘草配伍对桥本氏甲状腺炎大鼠肝肾功能及病理形态的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26 (4): 801-803.
- [45] Liu D, Chen F, Yu X, et al. Do different species of sargassum in Haizao Yuhu decoction cause different effects in a rat goiter model? [J]. Evid-based Compl Alt, 2019, 2019: 1-13.
- [46] 李娜, 张晨, 钟赣生, 等. 不同品种甘草化学成分、药理作用的研究进展及质量标志物 (Q-Marker) 预测分析 [J]. 中草药, 2021, 52 (24): 7680-7692.
- [47] Chen F, Li N, Xiu L, et al. Comparative efficacy of Haizao Yuhu decoction composed of different varieties of glycyrrhiza in goiter rats [J]. Evid-based Compl Alt, 2021, 2021: 1-14.
- [48] Li N, Li M, Xiu L, et al. Haizao Yuhu decoctions including three species of glycyrrhiza protected against propylthiouracil-induced goiter with hypothyroidism in rats via the AMPK/mTOR pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 296: 115443.

(收稿日期: 2022-06-21; 修回日期: 2022-10-07)

综述

扫描电子显微镜在药品质量控制中的应用

徐昕怡, 洪小桐* (国家药典委员会, 北京 100061)

摘要: 扫描电子显微镜 (scanning electron microscopy, SEM) 是采用高聚焦的高能电子束扫描样品, 利用样品表面的二次电子、背散射电子、特征 X 射线进行成像和元素分析, 从而获得形貌、结构、成分和结晶学等信息的一种仪器分析方法。本文介绍了 SEM 的原理、特点、主要类型和各国药典标准, 综述了国内外 SEM 在药品质量控制中的应用, 为 SEM 在制药领域中的进一步应用和《中国药典》SEM 标准的制订提供参考。

关键词: 扫描电子显微镜; 药典; 药品质量控制; 应用

中图分类号: TQ460.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2849-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.024

Application of scanning electron microscopy in drug quality control

XU Xin-yi, HONG Xiao-xu* (Chinese Pharmacopoeia Commission, Beijing 100061)

Abstract: Scanning electron microscopy (SEM) scans a sample with a highly focused and high-energy electron beam. It uses secondary electrons, backscattered electrons, and characteristic X-rays on the surface of the sample for imaging and elemental analysis to obtain morphology, structure, composition, and crystallography, etc. This paper introduces the principle, characteristics, main types and pharmacopoeia standards of SEM, and summarized the application of SEM in drug quality control at home and abroad. It is hoped that it can provide a reference for the further application of SEM in the pharmaceutical field and for the development of SEM standard in Chinese Pharmacopoeia.

Key words: scanning electron microscopy; pharmacopoeia; drug quality control; application

扫描电子显微镜 (scanning electron microscopy, SEM) 是一种用于高分辨率微区形貌分析的大型精密仪器, 采用高聚焦的高能电子束扫描样品, 利用样品表面的二次电子、背散射电子、特征 X 射线进行成像和元素分析, 从而获得形貌、结构、成分和结晶学等信息。它具有景深大、分辨率高、成像立体感强、放大倍数宽、无损伤等特点, 已成为生命科学、材料科学、环境科学等领域研究中不可缺少的检测手段。近年来, 随着纳米药物的研发兴起以及对中药微观鉴定技术要求的提高, SEM 在药学领域也得到了广泛的应用。SEM 结合其他现代仪器技术, 可揭示药物的物理化学特性, 为纯度、质量标准化、安全性以及毒理和药理学研究提供重

要信息^[1]。本文介绍了 SEM 的原理、特点、主要类型和各国药典标准, 综述了国内外 SEM 在药品质量控制中的应用, 为 SEM 在制药领域中的进一步应用和《中国药典》SEM 标准的制订提供参考。

1 SEM 简介

1935 年德国科学家 Knoll M 首次提出了 SEM 的设计理念, 并于 1942 年成功研制出第一台 SEM, 之后 SEM 向实用化和商品化发展。1965 年后, SEM 进入精细化发展阶段, 主要包括提高分辨率、真空度, 以及防干扰等方面的改进。20 世纪 70 年代我国第一台 SEM 诞生^[2]。SEM 的工作原理: 首先是电子枪发射电子, 再经二级聚光镜和物镜的进一步缩小成细微电子束, 经过扫描线圈驱

基金项目: 科技部国家科技基础资源调查专项“中草药毒性药材鉴定标准及共享服务系统建设”(No.2018FY00803); 国家药典委员会国家药品标准制订研究课题“扫描电子显微镜法的制定”(No.2021Y05)。

作者简介: 徐昕怡, 女, 博士, 副主任药师, 主要从事药品标准研究, email: xuxinyi@chp.org.cn *通信作者: 洪小桐, 男, 博士, 主任药师, 主要从事药品标准研究, email: hongxiaoxu@chp.org.cn

动对试样表面进行扫描，电子束和试样表面进行相互作用产生二次电子、背散射电子、X 射线等信息，经过探测器的收集后转化为视频信号，经过显像管调制后呈现出需要的试样表面微观图像并提供样品的元素信息^[2-3]。与光学显微镜技术相比，SEM 分辨率高，物像表面细节丰富，三维立体效果好，使用简单，无需复杂制样过程，综合分析能力强，适用于亚微米及以下的微观样品的尺寸和形态的表征。SEM 可以在不受导电涂层干扰的情况下观察非导电材料，低电压操作能增强近表面信息，宽视场图像可以对较大区域进行快

速检查^[4]。但 SEM 也有其局限性，例如表征缺乏内部细节、分辨率仍然有限以及引起电子束损伤的风险^[5]。在药品质量控制中，常用的有扫描电子显微镜结合 X 射线能谱仪 /X 射线波谱仪（scanning electron microscopy-energy dispersive X-ray spectroscopy/wavelength dispersive X-ray spectroscopy, SEM-EDS/WDS）、环境扫描电子显微镜（environmental scanning electron microscopy, ESEM）、冷冻扫描电子显微镜（cryo-scanning electron microscopy, cryo-SEM）和场发射扫描电子显微镜（field emission scanning electron microscopy, FESEM）等（见表 1）。

表 1 不同类型 SEM 的比较
Tab 1 Different types of SEM

SEM	原理	应用	优点	缺点
SEM-EDS/ WDS	SEM 结合功能性配件 EDS 或 WDS 等元素 X 射线微分析系统	获得样品的形貌信息，并对元素组成进行定性和定量分析，探测元素范围 Be4 ~ U92 ^[6]	纳米分析中极少数能够分辨单个纳米粒子形态、尺寸和化学成分的表征技术 ^[7] ；目前先进的 EDS 探测器系统，如硅漂移检测器可提高纳米颗粒表征所需的灵敏度	WDS 对样品特征 X 射线波长进行测定，一次只能测定一种元素，需要操作者对样品有一定的了解，不常用于药物表征 ^[6]
ESEM	基于多孔径和分级真空系统，使腔室压力保持在 5000 Pa 左右，可在水蒸气或其他辅助气体下观察样品；使用抽空程序和珀耳帖阶段控制温度，可部分抑制水合样品的脱水 ^[5]	研究潮湿条件下药物活性成分（active pharmaceutical ingredient, API）的微观行为，识别不稳定的晶体化合物，用于水合纳米载体动态实验，研究药用辅料的水合作用，在水合过程中持续观察产品，以确定溶解模式和溶解时间 ^[4, 6, 8]	无需导电涂层，可在自然状态下对湿样品进行直接成像 ^[9]	分辨率相对较低，且不能显示样品的顶层信息 ^[10]
cryo-SEM	制备冷冻样品，然后立即转移到显微镜内的低温阶段并直接观察，用金属涂层增强电子的导电率	分析某些类型的胶体纳米乳液系统以及高黏度、具有强烈聚集倾向或含有大量油的样品	样品制备简便快速 ^[10] ；获得更具代表性和无伪影的基本结构特性的精确信息图像	在样品转移过程中可能会形成冰，冰晶的形态可能与观测样品的形态相似，从而发生误判
FESEM	使用场发射电子枪，电子束斑直径小于 1 nm	良好的低压高空间分析性能和低压下扫描电子像相互结合使用，使其应用范围得到扩展；可以观察和检测生物样品、非均相有机和无机材料在纳米尺度的表面特征	分辨率高，可进行各种固态样品表面形貌的二次电子像、反射电子像及图像处理	试样必须浸没于物镜的强磁场中以减少球差的影响，所以样品的尺寸受到限制 ^[11]

2 各国药典中的 SEM 标准

我国国家标准中已有 17 项 SEM 相关标准，以材料、环境领域的分析方法标准为主（见表 2），但 2020 年版《中国药典》中还尚未收载 SEM 技术标准。美国药典（United States Pharmacopoeia, USP）45 版通则 < 1181 >、欧洲药典（European Pharmacopoeia, EP）10.0 版通则 2.9.52 均收载了 SEM 方法标准。USP 和 EP 的框架稍有不同，但内容类似，USP 相比 EP 更加详细。USP 介绍了 SEM 的定义、技术功能、原子束产生、样品制备、X 射线生成与元素组成分析、图像优化方法、粒子法证分析；EP 介绍了 SEM 的定义、原理、与样品的相互作用（发射信号类型）、应用、技术特

点、装置、实验步骤、SEM 与 X 射线微分析的联合应用、性能要求^[3, 12]。此外，在 USP 其他章节中也提到使用 SEM 对药品进行鉴定和分析，包括 < 563 > 鉴定植物来源的药品、< 1059 > 辅料功能性、< 1153 > 含有纳米材料的药品、< 1787 > 治疗性蛋白质注射液中亚颗粒物的测量、< 1430.6 > 基于散射现象的分析方法——通过光散射进行粒子计数（见表 3）。我国 SEM 技术的研究起步较晚，与国外相比有一定差距。近年来，随着我国推动重大科学仪器国产替代的各项政策相继出台，我国 SEM 技术的研发水平正在不断提高^[13]，研究制订《中国药典》SEM 标准，将有助于推动国产 SEM 在我国药学领域的应用。

表 2 我国国家标准中的 SEM 标准

Tab 2 SEM standard in national standards of the People's Republic of China

标准号	标准名称
GB/T 14593-2008	山羊绒、绵羊毛及其混合纤维定量分析方法 扫描电镜法
GB/T 16594-2008	微米级长度的扫描电镜测量方法通则
GB/T 17722-1999	金覆盖层厚度的扫描电镜测量方法
GB/T 17361-2013	微束分析 沉积岩中自生粘土矿物鉴定 扫描电子显微镜及能谱仪方法
GB/T 17362-2008	黄金制品的扫描电镜 X 射线能谱分析方法
GB/T 18295-2001	油气储层砂岩样品 扫描电子显微镜分析方法
GB/T 20307-2006	纳米级长度的扫描电镜测量方法通则
GB/T 25189-2010	微束分析 扫描电镜能谱仪定量分析参数的测定方法
GB/T 27788-2020	微束分析 扫描电镜 图像放大倍率校准导则
GB/T 28873-2012	纳米颗粒生物形貌效应的环境扫描电子显微镜检测方法通则
GB/T 30834-2014	钢中非金属夹杂物的评定和统计 扫描电镜法
GB/T 31563-2015	金属覆盖层 厚度测量 扫描电镜法
GB/T 33834-2017	微束分析 扫描电子显微术 生物试样扫描电子显微镜分析方法
GB/T 35097-2018	微束分析 扫描电镜 - 能谱法 环境空气中石棉等无机纤维状颗粒计数浓度的测定
GB/T 35099-2018	微束分析 扫描电镜 - 能谱法 大气细粒子单颗粒形貌与元素分析
GB/T 36422-2018	化学纤维 微观形貌及直径的测定 扫描电镜法
GB/T 38783-2020	贵金属复合材料薄层厚度的扫描电镜测定方法

表 3 USP 和 EP 有关 SEM 的标准

Tab 3 SEM standard in USP and EP

方法标准	其他标准
USP 45 < 1181 > 扫描电子显微镜 简介、技术功能 [技术的一般描述、传统 SEM、可变压力或 ESEM、扫描透射电子显微镜]、电子束产生 (电子束 - 样品相互作用)、样品制备 (样品涂层、样品制备决策树)、X 射线生成与元素组成分析、图像优化方法、粒子法证分析 (形貌分析)	< 563 > 鉴定植物来源的药品 SEM 用于观察和识别表皮中毛状体结构和特殊元素的差异特征, 以及含有特定化合物的表面颗粒, 用于鉴定特定物种; SEM 广泛用于研究各种植物材料的表面拓扑结构, 在鉴定整个植物、粉末形式的植物、区分密切相关的物种方面发挥重要作用, 并可用于检查粉末混合物 < 1059 > 辅料功能性 SEM 有助于确保所选用的成膜剂、释放调节剂和增溶剂功能的一致性 < 1153 > 含有纳米材料的药品 SEM 是测量单个纳米粒子粒径的工具, 也可用于形态分析 < 1430.6 > 基于散射现象的分析方法——通过光散射进行粒子计数 在某些影响因素存在的情况下, 通过光散射法从样品中观察到的粒子计数和大小可能需要额外检查, 包括使用适当的过滤技术进行分离, 并通过 SEM 等正交技术进一步表征, 以确认光散射粒子计数器报告的值 < 1787 > 治疗性蛋白质注射液中亚可见颗粒物的检测 SEM 用来检测治疗性蛋白质注射液中亚可见颗粒物的尺寸和形态
EP 10.0 2.9.52 扫描电子显微镜 介绍、原理、与样品的相互作用: 发射信号类型 (二级电子检测器、反向散射电子检测器、阴极射线发光检测器、元素 X 射线微分析检测器)、应用、技术特点、装置 (样品室真空、电子发射体、检测器)、实验步骤 (样品制备、样品包衣、仪器操作)、SEM 与 X 射线微分析的联合应用、性能要求	/

3 SEM 在药品质量控制中的应用

3.1 植物药的形态学鉴定

SEM 可获得植物样本的结构细节, 帮助解决植物学中的分类问题, 避免过度简化的描述误导植物鉴定特征^[14]。冯毓秀等^[15]研究表明 SEM 能

够使物体立体感增强, 应用于中药材鉴定上是有益的。Zafar 等^[16]采用 SEM 对南亚次大陆使用的草药 Jadwar (*Delphinium denudatum* Wall. ex Hook. f. & Thomson) 进行了花粉微观形态特征研究, 为该物种的真伪鉴别奠定了基础。Yoganandam 等^[14]

采用 SEM 观察落叶乔木 *Ailanthus excelsa* Roxb. (Simaroubaceae) 茎皮的结构细节, 研究数据可用于制订该植物药的印度药典标准。Serrano 等^[17]应用 SEM 表征 *Hypericum foliosum* Aiton (Clusiaceae/Guttiferae) 干燥的开花地上部分, 建立了鉴定该植物的植物学标准, 可收载在 EP 该药用植物各论标准的鉴定部分中。与传统 SEM 制备方法相比, cryo-SEM 不会对样品造成破坏, 更适合研究接近天然状态的湿润和水合生物材料样品的表面形态。Choi 等^[18]观察了 *Aloe vera* 内叶中的凝胶在传统和 cryo-SEM 下的形态, 结果表明由于 cryo-SEM 无需去除样品中的水分, 是观察高度水合生物材料最合适的方法。

3.2 样品的物理和化学分析

Gnanasundari 等^[1]利用 SEM-EDS 定性、定量分析了矿物药 *Panchalavana thiraavagam* 样品中颗粒的大小、形状以及 Mg、Ca、Na 和 K 等主要元素的含量。Anuradha 等^[19]采用 SEM-EDS 定量修正方法 (ZAF) 研究了 *Eclipta alba* (L) Hussk. (Fam. Asteraceae) 整株汁液提取物——阿育吠陀药物 *Swarasa churna* 中微量元素 C、O、Na、Mg、Al、Si、P、S、Cl、K 和 Ca 的含量, 为墨旱莲的质量控制和标准化提供了参考信息。Silva 等^[20]研究发现, 在 $\times 45$ 或 $\times 300$ 放大倍率的 SEM 下, 噻苯达唑、非班太尔、托曲珠利和氟唑隆原料药表面呈现出不同的形态, 表明 SEM 可用于 API 的固态分析, 可作为评估抗寄生虫原料药质量的有用工具。Rades 等^[7]研究表明, SEM-EDS 是对药用辅料二氧化硅和二氧化钛纳米颗粒进行全面形态和化学表征的强大工具, 有助于分析具有复杂几何结构的多元素纳米系统。原子发射光谱 (atomic emission spectrometry, AES) 作为一种补充技术, 可用于在通过 EDS 批量检测后分析纳米颗粒的表面。AES 和 SEM-EDS 方法相互补充, 能够根据颗粒大小, 区分存在于最上表面和深度至整个纳米颗粒中的元素。

在分析制剂产品时, 通常需要评估和控制各种材料特性, 对表面形态和结构进行准确、清晰的观察。研究制剂各成分在生产过程各个阶段的混合情况, 分析终产品中辅料基质中活性成分的分布是必要的^[4]。Mura 等^[21]利用 SEM 研究了异丁普生与药用辅料的相容性。研究表明, 药物和辅料颗粒均保持其各自形态, 且药物晶体均匀且精细地分散在辅料颗粒表面。SEM 图像反映了聚合物颗粒的大小、形状和粗糙度在药物-聚合物

物理相互作用中所起的重要作用, 应用 SEM 有助于解释利用差示扫描量热法得出的相容性试验结果并排除药物不相容的假设。Hübner 等^[22]和 Yu 等^[23]分别利用 SEM 和 FESEM 分析了纳米颗粒形式的药物复合物呋塞米和聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinyl pyrrolidone, PVP)、酮洛芬和 PVP 的形态和尺寸。Totea 等^[24]采用 SEM-EDS 研究了盐酸普萘洛尔 (propranolol, PPN) 吸附到硅酸铝镁 (magnesium aluminometasilicate, MAS) 上的过程, 并表征了在络合时形成的 MAS-PPN 颗粒, 解释了 MAS-PPN 在药物控制释放方面的潜力。Bawankar 等^[25]利用 SEM 辅助核磁共振波谱, 证实了醋氯芬酸和牛酥油 (Go-Ghrita, GG) 中脂肪酸之间可能的相互作用, 阐明了离散和不规则形状的醋氯芬酸晶体包埋在开放晶格基质或笼状球形晶体的 GG 中, 形成包合型复合物, 提高了口服生物利用度。通过多变量分析, SEM-EDS 和共聚焦拉曼显微镜联合使用可作为表征固态药物制剂的补充方法, 用于片剂的准确定性和定量分析。EDS 可检测低浓度的片剂成分, 可用于提供快速的定量结果。Scoutaris 等^[26]采用 SEM-EDS 和共聚焦拉曼光谱表征了使用热熔挤出、预混热熔挤出和直接压片三种不同方法生产的片剂中扑热息痛和药用辅料 Compritol (C-888) 的分布, 由预混挤出制成的片剂中扑热息痛的均匀性和分布更好。利用 EDS 和共聚焦拉曼光谱对片剂表面药物成分定量分析的结果与理论预期值非常吻合。

SEM 在包括纳米乳液在内的各种水合材料超微结构研究方面应用广泛^[5]。Hatziantoniou 等^[27]的研究表明, SEM 适用于纳米乳液的研究, 与冷冻蚀刻透射电镜 (freeze fracture-transmission electron microscopy, FF-TEM) 相比, 检测成本更低, 并可以在短时间内检查大面积的分散颗粒。基于聚合物的纳米药物递送系统可保护药物免于降解、调节药物释放曲线并减少毒性或副作用^[23]。SEM 卓越的分辨率和方法上的多功能性使其成为分析粒径在亚微米内的脂质药物递送系统不可或缺的工具^[5]。Bibi 等^[28]用 ESEM 对脂质囊泡进行可视化, 监测压力变化对囊泡的影响以及囊泡坍塌的方式。Donald 等^[29]研究了 ESEM 在三种聚合胶乳中的应用, 表明 ESEM 是胶体分散体和聚集体分析的理想选择。Rizwan 等^[30]利用冷冻场发射扫描电子显微镜 (cryo-FESEM) 表征了由植烷三醇和水形成的一种新型脂质颗粒递送系统——双连续立方液晶系统。Krauel 等^[31]

利用 cryo-FESEM 表征液滴、双连续和溶液三种类型微乳液,研究表明,由于可以观察到接近自然状态的样品, cryo-FESEM 是胶体可视化中最有价值的技术。对控释固体制剂的表征通常发生在其制备过程中的不同阶段,以及药物测试期间的体外体内释放,这意味着制剂的成像需要在湿和/或水合的状态下进行。ESEM 可在自然状态下对湿样品直接成像。Roberts 等^[8]利用 ESEM 表征了传统 SEM 难以观察的水溶性亲水溶胀聚合物 Polyox 的颗粒形态差异和水合模式,颗粒在 ESEM 中溶解的速率与由 USP 溶出方法确定的药物溶出时间之间具有相关性。

3.3 不同来源原材料的比较

SEM 是表征不同来源原材料的可靠方法。SEM 提供的表面细节可以识别材料的差异^[6]。Peng 等^[32]采用 SEM 对市场上各品牌的三黄泻心汤配方颗粒外观和粗纤维进行了检测,发现不同厂家的药品呈现不同的颗粒状或棒状,该项研究为中草药制剂的理化检验质量控制提供了参考。温瑾等^[33]利用 SEM 观察了用海带渣制备的药用辅料微晶纤维素的形貌,发现其与市售微晶纤维素有所差异,形态不同的原因可能是制备原料和工艺不同。Gámiz 等^[34]使用 SEM 研究了工业和药物用途的粉状滑石粉和滑石粉形式的商业制剂(由滑石和各种添加剂制成)的形态和超微结构,如层流形态、伪球形层压板、解理面、孔隙度等,这些特征解释了其具有良好的润滑和吸收能力,并且对皮肤无刺激性,可用作药品制剂和化妆品中的辅料。

3.4 支持粒度测定方法的开发

除了定性分析外, SEM 在定量分析表征纳米和亚微米级颗粒系统的尺寸、形状和分布方面发挥着重要作用,可作为药品质量控制中测定粒度分布的标准技术^[4, 8]。SEM 分析关注纳米粒子整体形态,即单个颗粒的形状、潜在的其他结构和尺寸分布,适合作为基于群体的粒度测定方法的补充,例如动态光散射(dynamic light scattering, DLS)。DLS 技术不适合分析单个纳米粒子的状态和纳米粒子-蛋白质的相互作用,因此 SEM 与 DLS 结合使用,可获得准确的颗粒形状^[11]。Masaki 等^[35]采用 SEM 戊二醛-孔雀石绿和四氧化钨组合的固定技术,分析了添加利多卡因后乳液液滴与丙泊酚的聚结过程。研究发现最大液滴尺寸与由 DLS 测定的尺寸存在一定的差异,这可能是由于 DLS 仅确定所有液滴的平均直径,无法

确定大量小液滴中存在的少数大液滴,但大液滴的存在不利于纳米乳液的长期稳定性且不适合静脉应用。该项研究强调了 SEM 在纳米乳液粒度测定方法开发中的应用需求。药物混悬剂的粒度分布是一个重要的物理稳定性参数,可以使用激光光散射法测定。Neuberger 等^[36]对利用场发射低压扫描电子显微镜(field emission-low voltage scanning electron microscopy, FE-LVSEM)获得的数字显微照片进行图像分析,确定伊曲康唑混悬剂中大颗粒的大小和体积,结合激光光散射法准确报告了混悬剂的粒度分布。

3.5 片剂包衣的表征

片剂包衣是影响制剂行为的重要因素,检查包衣表面可以揭示片剂包衣机性能的细节。Neilly 等^[6]研究表明 SEM 可以显示涂层的应用情况。表面光滑说明包衣在片剂上干燥之前有足够的水分铺展,具有球形特征的粗糙涂层则是由于水分较低且在干燥前无法铺展产生的。当片剂上使用多个包衣时, SEM 可以揭示各包衣之间的边界,并显示每层包衣的平均厚度和总包衣厚度。此外,横截面可以显示气体是否被包裹在涂层中,涂层是否具有层状结构或颗粒状结构,以及核心是否与涂层发生反应,这些精细特征是光学显微镜无法辨别的。Seitavuopio 等^[37]用 SEM-EDS 观察了包衣过程中片剂表面粗糙度以及硬脂酸镁和二氧化钛的变化。结果表明,镁信号在 15 ~ 30 min 内消失,说明片剂在包衣过程中被均匀覆盖,该方法可对片剂表面薄膜包衣引起的变化进行可视化分析。Liu 等^[38]使用 SEM-EDS 观察了涂层之间水溶性成分的迁移,钠是涂有新型双涂层系统 EUDRAGIT L 30 D-55 的泼尼松龙微丸中的代表离子,首先集中在内涂层中,溶解时迁移到外层,这种迁移有助于双涂层系统的快速溶解。杜超等^[39]为筛选包衣材料的种类,观察了四种不同包衣材料非洛地平缓释片的 SEM 图像,不同包衣材料的表面呈现不同状态,表面的结合紧密程度及空隙会对包衣片的释放产生影响。

3.6 解决生产制造过程中的问题

在制药行业, SEM 对材料形状和表面结构的分析能力对于开发和维护满足 GMP 要求的制造工艺至关重要。SEM 的高分辨率成像和分析能力可以提供在工艺开发期间的初始验证和生产测量异常结果的解释^[4]。SEM 提供的颗粒表面细节,如细微的裂缝、气孔、圆角和其他特征可揭示颗粒的历史,纹理信息可用于监测和改进结晶过

程。高质量的 SEM-EDS 数据可提供带入产品和生产过程（如混合、研磨和制粒）的详细信息^[6]。cryo-SEM 可以观察液态胶体系统在压裂和铂涂层后的自然状态，由于脂质结构的形状和大小都能被可视化，因此可以通过这种技术检测在生产过程中可能出现的偏离纳米级的结构^[5]。

3.7 分析和识别颗粒物质污染

SEM-EDS 是制药行业中用于识别污染颗粒及其溯源的有力工具。医药产品的污染颗粒通常来源于制造领域广泛使用的不锈钢合金等材料，钢颗粒产生较大的反向散射对比度，使其易于定位，并且它们的元素组成独特，利用 SEM-EDS 可进行明确的识别^[6]。I 型硼硅酸盐玻璃瓶中产生的冷凝物可与 API 发生反应，扰乱玻璃网络并产生微粒。因此，药用玻璃瓶内部的冷凝物可以作为药品包装敏感性的关键指标。Ma 等^[40]采用 SEM-EDS 评估了 I 型药用玻璃瓶的注射剂颗粒风险。EDS 分析证实了从背散射图像获得的定性观察，硼硅酸盐玻璃小瓶的冷凝物在冷凝物位置显示出 Si、B、Na 急剧下降，而对照纯石英玻璃小瓶则显示均匀表面。

4 小结

SEM 具有观察小颗粒所需的分辨率，以及观察大颗粒所需的动态范围和聚焦深度，不但能观察样品表面形貌，还能进行成分和元素的分析以及结晶学分析，在植物药的形态学鉴定、样品的物理和化学分析、不同来源原材料的比较、支持粒度测定方法的开发、片剂包衣的表征、解决生产制造过程中的问题、分析和识别颗粒物质污染等药品质量控制领域中具有广阔的应用前景。EDS 可补充通过 SEM 获得的基本形态信息，是准确表征样品元素组成的重要技术，目前还没有其他技术可以为从整个到亚微米级颗粒大小的样品提供元素分析数据的成像分辨率。cryo-SEM 可用于表征如脂质纳米颗粒、微乳液、脂质体或纳米乳液等的水合胶体药物递送系统。考虑到时间和统计的限制，使用 SEM 表征时通常仅能表征单颗或几颗颗粒，因此，使用图像处理软件将能够使颗粒分析的数量扩展到百颗量级，使载体颗粒的分析结果更有统计学意义。应用 ESEM 能够缩短新工艺的开发和验证周期，加快新产品的上市时间，还可以快速和直观的监测批次间的变化，快速纠正生产中的问题，提高工艺产量。SEM 与共聚焦拉曼显微镜、远近场拉曼显微镜等图像分析相结合，可作为片剂表征的补充工具以

及研究亚微米药物复合粒子的形成机制。目前，我国尚缺乏适用于药学领域的 SEM 标准，而 USP、EP 均已收载 SEM 作为法定的方法。在国际合作与交流日益加强的今天，建议我国将 SEM 收载入《中国药典》，建立相应的方法标准，将有利于规范和指导 SEM 在药品质量控制中的应用，促进相关药品的微观机理分析和质量标准的制订。

参考文献

- [1] Gnanasundari M, Sathiyathilaga B, Velpandian V, et al. Standardization and quality control parameters of siddha poly-mineral formulation panchalavana thiravagam [J]. Indo Am J Pharm Res, 2014, 4 (9): 3697-3072.
- [2] 罗晓晶. 扫描电镜的发展及其在医药领域的应用 [J]. 山东工业技术, 2018 (4): 22.
- [3] United States Pharmacopoeia (45) Vol I [S]. 2022: 1641-1651.
- [4] Lich BH, Desrosiers L, Elands J, et al. Sub micron particle size and shape characterization by SEM [C]. Electron Microscopy, 2007.
- [5] Klang V, Matsko NB, Valenta C, et al. Electron microscopy of nanoemulsions: an essential tool for characterisation and stability assessment [J]. Micron, 2012, 43: 85-103.
- [6] Neilly JP, Vogt AD. Pharmaceutical compliance applications of scanning electron microscopy and energy dispersive X-Ray spectroscopy [J]. J GXP Compliance, 2009, 13 (3): 38-49.
- [7] Rades S, Hodoroba VD, Salge T, et al. High-resolution imaging with SEM/T-SEM, EDX and SAM as a combined methodical approach for morphological and elemental analyses of single engineered nanoparticles [J]. RSC Adv, 2014, 4 (91): 49577-49587.
- [8] Roberts RA, Shukla AJ, Rice T. Characterization of Polyox[®] granules using environmental scanning electron microscopy [J]. Scanning, 1997, 19 (2): 104-108.
- [9] Emanuele AD, Gilpin C. Applications of the environmental scanning electron microscope to the analysis of pharmaceutical formulations [J]. Scanning, 2010, 18 (7): 522-527.
- [10] Klang V, Matsko NB. Chapter three-electron microscopy of pharmaceutical systems [J]. Elsevier, 2014: 138, 143-144, 158.
- [11] 场发射扫描电镜的分类及应用 [EB/OL]. https://www.yiqi.com/daogou/detail_2656.html, 2022-05-03.
- [12] European Pharmacopoeia (10.0) Vol I [S]. 2021: 414-418.
- [13] 吴昊昊. 2021 年下半年国内扫描电镜中标盘点 [EB/OL]. <https://www.chem17.com/news/detail/137074.html>, 2022-05-03.
- [14] Yoganandam GP, Periyannayagam K, Ilango K. Pharmacognostical and phytochemical studies on stem bark of

- Ailanthus excelsa roxb.* (Simaroubaceae) [J]. Int J Pharma Bio Sci, 2010, 1 (2): 1-8.
- [15] 冯毓秀, 宋万志, 陈红. 12 种香茶菜叶的扫描电镜观察与鉴别 [J]. 中国药学杂志, 1991, 26 (3): 147-151, 188.
- [16] Zafar M, Ahmad M, Sultana S, et al. Micro-morphological, environmental and phytochemical investigation of herbal medicines by using LM and SEM: a quality control tool [J]. Microsc Res Tech, 2019; 82 (5): 550-557.
- [17] Serrano R, Ferreira P, Gomes ET, et al. The use of SEM and light microscopy for the characterization of hypericum foliosum aerial part as a medicinal plant [J]. Microsc Microanal, 2008, 14 (S3): 107-108.
- [18] Choi YM, Shin DH, Kim CH. An optimized methodology to observe internal microstructures of aloe vera by cryo-scanning electron microscope [J]. Appl Microsc, 2016, 46 (2): 76-82.
- [19] Anuradha D, Ramadevi, Anish N. Elemental analysis of swarasa churna by SEM-ZAF method [J]. Uni V J Ayurvedic Herb Med, 2013, 1 (1): 23-30.
- [20] Silva M, Gonring K, Silva R, et al. Fourier transform infrared spectroscopy, thermogravimetric analysis, scanning electron microscopy as supporting tools in quality control of antiparasitics [J]. Quim Nova, 2010, 41 (3): 258-267.
- [21] Mura P, Faucci MT, Manderioli A, et al. Compatibility study between ibuprofen and pharmaceutical excipients using differential scanning calorimetry, hot-stage microscopy and scanning electron microscopy [J]. J Pharm Biomed Anal, 1998, 18 (1-2): 151-163.
- [22] Hübner J, Coty JB, Busby Y, et al. Formation mechanisms of sub-micron pharmaceutical composite particles derived from far-and near-field Raman microscopy [J]. J Pharm Anal, 2021, 11 (4): 480-489.
- [23] Yu DG, Williams GR, Wang X, et al. Polymer-based nanoparticulate solid dispersions prepared by a modified electrospraying process [J]. J Biomed Sci Eng, 2011, 4 (12): 741-749.
- [24] Totea AM, Dorin I, Gavrilov G, et al. Real time calorimetric characterisation of clay-drug complex dispersions and particles [J]. Int J Pharm, 2019, 1: 100003.
- [25] Bawankar RD, Sakarkar DM, Dorle AK. Evidence for complex formation of aceclofenac with Go-Ghrita by FT-IR, in-vitro release, DSC, X-RD, NMR and SEM [J]. Res Rev: J Pharm Pharm Sci, 2014, 3 (4): 6-15.
- [26] Scoutaris N, Vithani K, Slipper I, et al. SEM/EDX and confocal Raman microscopy as complementary tools for the characterization of pharmaceutical tablets [J]. Int J Pharmaceut, 2014, 470 (1-2): 88-98.
- [27] Hatziantoniou S, Deli G, Nikas Y, et al. Scanning electron microscopy study on nanoemulsions and solid lipid nanoparticles containing high amounts of ceramides [J]. Micron, 2007, 38 (8): 819-823.
- [28] Bibi S, Kaur R, Henriksen-Lacey M, et al. Microscopy imaging of liposomes: from coverslips to environmental SEM [J]. Int J Pharm, 2011, 417 (1-2): 138-150.
- [29] Donald AM, He C, Royall CP, et al. Applications of environmental scanning electron microscopy to colloidal aggregation and film formation [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects, 2000, 174 (1-2): 37-53.
- [30] Rizwan SB, Dong YD, Boyd BJ, et al. Characterisation of bicontinuous cubic liquid crystalline systems of phytantriol and water using cryo field emission scanning electron microscopy (cryo FESEM) [J]. Micron, 2007, 38 (5): 478-485.
- [31] Krauel K, Girvan L, Hook S, et al. Characterisation of colloidal drug delivery systems from the naked eye to cryo-FESEM [J]. Micron, 2007, 38 (8): 796-803.
- [32] Peng WY, Tsai TH. Scanning electron microscopy and liquid chromatography for physical and chemical inspection of industrial pharmaceutical traditional Chinese herbal medicine [J]. ACS Omega, 2020, 5: 11563-11569.
- [33] 温瑾, 郑洲, 缪锦来, 等. 利用海带渣制备药用辅料微晶纤维素的研究 [J]. 中国海洋药物, 2012, 31 (1): 15-19.
- [34] Gámiz E, Soriano M, Delgado G, et al. A morphological study of talcs with scanning electron microscopy (sem). Pharmaceutical applications [J]. Ars Pharm, 2002, 43 (1-2): 173-185.
- [35] Masaki Y, Tanaka M, Nishikawa T. Physicochemical compatibility of propofol-lidocaine mixture [J]. Anesth Analg, 2003, 97 (6): 1646-1651.
- [36] Neuberger D, Wong J. Suspension for intravenous injection: Image analysis of scanning electron micrographs of particles to determine size and volume [J]. Pda J Pharm Sci Technol, 2005, 59 (3): 187-199.
- [37] Seitavuopio P, Heinämäki J, Rantanen J, et al. Monitoring tablet surface roughness during the film coating process [J]. AAPS PharmSciTech, 2006, 7 (2): E1-E6.
- [38] Liu F, Lizio R, Schneider UJ, et al. SEM/EDX and confocal microscopy analysis of novel and conventional enteric-coated systems [J]. Int J Pharm, 2009, 369: 72-78.
- [39] 杜超, 王阳, 杨彬, 等. 4 种不同的包衣材料对非洛地平释药性能的影响 [J]. 天津中医药大学学报, 2013, 32 (3): 176-180.
- [40] Ma Y, Srinivasan C, Lee S. Visualization and microanalysis of susceptible regions in tubular pharmaceutical glass vials using scanning electron microscopy [J]. Microsc Microanal, 2020, 26 (S2): 1-4.

(收稿日期: 2022-05-17; 修回日期: 2022-06-05)

头孢他啶阿维巴坦在儿童感染中的应用及研究进展

周成玥¹, 王卓芸¹, 姚奇¹, 蔡和平^{1*}, 方辉² (1. 安徽省儿童医院临床药学部, 合肥 232000; 2. 安徽省儿科医学研究所, 合肥 232000)

摘要: 多重耐药菌感染的发生逐年增加, 已经成为医疗卫生重大问题。其中影响儿童的主要是多重耐药革兰氏阴性菌感染, 尤其是铜绿假单胞菌、肠杆菌科和不动杆菌。头孢他啶阿维巴坦是一种新型抗菌药物, 被美国食品药品监督管理局批准用于治疗复杂的腹腔内感染和复杂的尿路感染。但目前儿童感染患者中使用该药的数据极为有限, 其安全性和有效性尚未确定。本文综述了该药的应用特点及其在儿童感染患者中的潜在用途, 为临床应用提供参考。

关键词: 头孢他啶阿维巴坦; 儿童; 多重耐药菌感染

中图分类号: R969.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2022)12-2856-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.025

Application and research progress of ceftazidime-avibactam for children's infection

ZHOU Cheng-yue¹, WANG Zhuo-yun¹, YAO Qi¹, CAI He-ping^{1*}, FANG Hui² (1. Department of Clinical Pharmacy, Anhui Children's Hospital, Hefei 232000; 2. Anhui Institute of Pediatric Research, Hefei 232000)

Abstract: The incidence of multidrug-resistant bacteria infection is increasing year by year, which has become a major health care problem. Among them, the main infections affecting children are multi-drug resistant Gram-negative bacteria, especially pseudomonas aeruginosa, enterobacteriaceae and acinetobacter. Ceftazidime-avibactam is a novel antibiotic approved by the FDA for complex intra-abdominal infections and complex urinary tract infections. However, there are very limited data on its use in infected child patients, and its safety and efficacy remain unclear. This article reviewed the application characteristics and potential use of ceftazidime-avibactam in infected child patients, providing reference for its clinical application.

Key words: ceftazidime-avibactam; child; multidrug-resistant bacteria infection

随着抗菌药物的不合理应用增多, 细菌的耐药情况越来越严重。儿童多重耐药菌 (multidrug-resistant, MDR) 感染的发病率和病死率逐年上升, 对公共安全造成了严重威胁。儿童多重耐药菌感染会延长住院时间, 增加医疗费用, 使治疗变得更加困难, 病死率上升。Meropol 等^[1]报道美国患儿中 MDR 肠杆菌感染率在 2007—2015 年间从 0.2% 增加到了 1.5%。景春梅等^[2]研究发现 2016—2018 年儿童血培养中耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌 (carbapenem-resistant enterobacteriaceae, CRE) 也逐年增加。全国细菌耐药监测网 (CARSS) 2018—2020 年数据示全国儿童医院 (含妇幼保健院) 耐头

孢噻肟或耐头孢曲松肺炎克雷伯菌 (CTX/CRO-R-KPN)、耐碳青霉烯类大肠埃希菌 (CR-ECO)、耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌 (CR-KPN)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA)、耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌 (MRCNS) 和耐青霉素肺炎链球菌 (ERSP) 检出率高于三级及二级综合医院, 新生儿和儿童 CTX/CRO-R-KPN 检出率高于成人及老年人群, 其中新生儿 CR-KPN 检出率较高, 并呈逐年上升趋势, 可能与治疗儿童及新生儿感染性疾病时抗菌药物种类选择有限, 头孢菌素、碳青霉素及大环内脂类广泛应用有关^[3-5]。中国儿童细菌耐药监测组 (ISPED) 2020 年 CRE 总检出率

基金项目: 安徽省自然科学基金面上项目 (No.2108085MH276); 安徽医科大学基金项目 (No.2019xkj182)。

作者简介: 周成玥, 女, 硕士, 副主任药师, 主要从事临床药学研究, email: kitty_zcy@163.com *通信作者: 蔡和平, 女, 硕士, 副主任药师, 主要从事药事管理和临床药学研究, email: greenhpui@163.com

为 4.9%，比 2019 年（8.2%）略低，其中新生儿组与非新生儿组 CRE 检出率接近，CR-KPN 在 CRE 中构成比最高（占 47.9%），肺炎克雷伯菌（KP）对亚胺培南和美罗培南的耐药率分别为 11.3% 和 13.4%，相比 2019 年检出率下降趋势较为明显^[6]。虽然 MDROs 在儿童患者中的总检出率较 2019 年降低，对多种抗菌药物的耐药率也有所降低，但 CRE 在儿科仍较为普遍，且临床预后较差。因此，遏制细菌耐药、切实降低患儿感染死亡风险已经成为全球关注的重要问题。

头孢他啶阿维巴坦（CZA）是一种新型 β -内酰胺酶/ β -内酰胺酶抑制剂复合制剂，由第三代头孢菌素头孢他啶与 β -内酰胺酶抑制剂阿维巴坦组成，2015 年 2 月获 FDA 批准用于治疗革兰氏阴性菌感染，对多重耐药菌引起的严重感染也有效果，适用于 18 岁及以上患者的复杂腹腔内感染（complicated intra-abdominal infection, cIAI）（联合甲硝唑）、复杂尿路感染（complicated urinary tract infection, cUTI）、医院获得性肺炎（hospital acquired pneumonia, HAP）及呼吸机相关性肺炎（ventilator associated pneumonia, VAP）^[7]。儿童正处于生长发育的重要时期，许多器官的生理功能尚未发育成熟全，不同发育阶段的解剖、生理、生化特点不同，药物在体内的药动学有其独特的规律，CZA 目前正开发用于儿童患者，但其安全性和有效性尚未确定，有研究指出 CZA 对从患儿标本中分离的革兰氏阴性杆菌非常有效，包括铜绿假单胞菌（PA）和肠杆菌科菌^[8]；至 2020 年 3 月，CZA 已获批用于治疗 3 个月大儿童的 cIAI 和 cUTI，目前临床正研究其用于治疗 HAP/VAP 患儿和 < 3 个月患儿的安全性及有效性^[9-10]。本文对该药特性及在儿童感染患者中的应用研究综述如下。

1 作用机制及抗菌活性

产 β -内酰胺酶的革兰氏阴性菌会降低头孢他啶抗菌作用，阿维巴坦是一种新型 β -内酰胺酶抑制剂，其本身不具抗菌活性，但可恢复或增强头孢他啶对产 β -内酰胺酶菌的抗菌活性，并扩大抗菌谱，如对产超广谱 β -内酰胺酶（ESBL）、 β -内酰胺酶（AmpC 酶）、丝氨酸碳青霉烯酶（KPC）和 OXA-48（oxacillinase-48-type carbapenemases）的大肠埃希菌、PA、KPN、肠杆菌等均有效，但对 IMP、NDM、VIM 或 OXA 等亚型无活性^[11-13]。

多项体外研究评估了 CZA 对 PA 等分离株及其他耐药菌的活性。Huband 等^[14]发现 CZA 对 PA 显示出最高抗菌敏感率（96%），而其他 β -内酰胺药物如头孢吡肟、美罗培南和哌拉西林他唑巴坦对 PA 的敏感率分别为 86.5%、83.0%、83.0%，

头孢他啶单药对 PA 的敏感率仅有 84%，说明在头孢他啶中添加阿维巴坦可增加其抗菌活性。Sader 等^[15]研究示 CZA 对分离的肠杆菌和 PA 有高度活性（含 MDR 和 XDR），对肠杆菌敏感率接近 100%，对 CRE（MIC 8 mg · L⁻¹）敏感率为 97.5%，对 MDR 和 XDR 肠杆菌的敏感率分别为 99.3% 和 97.6%；对 PA（MIC 4 mg · L⁻¹）的敏感率在 97.0%（肺炎）~ 99.4%（尿路感染），对 MDR 的敏感率为 89.3%（易感）、XDR 的敏感率为 80.4%（易感），但 β -内酰胺耐药（BLM-NS）分离株敏感率降至 76.0%。同时他还研究了 2014—2018 年从 33 家美国医疗中心的血流感染患儿（≤ 17 岁）分离的肠杆菌和 PA 菌株对 CZA 的敏感性均达到 100.0%^[16]。

Lin 等^[17]研究了 2016—2019 年从美国患儿中分离的 UTI 和 IAI 病原菌，发现 CZA 对肠杆菌及 ESBL 肠杆菌分离株均敏感，其中有 6 种耐美罗培南肠杆菌（美罗培南 MIC > 1 μ g · mL⁻¹）对 CZA 敏感（MIC 0.12 ~ 4 μ g · mL⁻¹），但在尿中分离的 3 个 PA 菌株对 CZA 耐药（MIC 均 ≥ 32 μ g · mL⁻¹）。张敬霞等^[18]发现 CZA 对 CRE 表现出明显优于头孢他啶和其他药物的抗菌活性，但弱于多黏菌素 B 和替加环素；CZA 对 CR-KP 的体外抑菌活性明显，尤其对携带 *bla_{KPC-2}* 基因型的 CRE。王李等^[19]研究示 CZA 对 CRE 和 CRPA 的敏感率分别为 74.5% 和 62.4%。林琳等^[20]研究显示阿维巴坦提高了头孢他啶对产 KPC 酶肠杆菌科菌的抗菌活性，CZA 对产 KPC 酶的 CRE 菌株有较强的抗菌效果，对产 NDM 金属酶的 CRE 菌株无抑制作用；在分离的 143 株 CRE 中，CZA 体外抗菌活性达 54.5%。de Jonge 等^[21]回顾性分析示 99.5% 肠杆菌对 CZA（MIC ≤ 8 g · mL⁻¹）敏感，CZA 对 83.5% 美罗培南耐药株敏感。CZA 对 MBL、OXA-48、GES、KPC、ESBL 和 AmpC 酶的耐碳青霉烯类分离株活性均超 98%。Zalas-Więcek 等^[22]研究了 2015—2019 年的相关数据，结果显示在儿童中 CZA 对肠杆菌的敏感性最高（98.9%），对 MDR 的敏感率为 97.5%、ESBL 为 96.3%，同时对 PA 敏感性也较高（93.3%），尤其在 PICU 可达 94.2%，对 CRPA 的敏感率达 69.2%。

2 PK/PD 及有效性

CZA 药代动力学在成人中进行了多项研究，但在儿童中研究不多。研究者采用蒙特卡罗模拟法（MCS）对 CZA 不同的给药方案进行研究并评估其治疗效果，结果示细菌 MIC 值越大，治疗效果越差^[19-23]。当感染菌 MIC ≤ 8 mg · L⁻¹ 予 CZA 2.0 g q8 h 达标概率（PTA）> 90%；若肌酐清除

率 (CrCl) 在 $51 \sim 120 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 标准剂量治疗方案 (2.5 g iv q8 h) PTA 可达 90%; 当 CrCl 在 $121 \sim 190 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, 仅高剂量给药方案 (3.75 g iv q8 h) PTA 达 90%; CrCl 在 $51 \sim 89 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, 低剂量给药 (1.25 g iv q8 h) 也有效; 当 $\text{CrCl} < 60 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 建议 CZA 1.0 g q8 h 。高剂量给药方案 (3.75 g iv q8 h) 对所有菌株累积反应分数 (CFR) 值均超过 90%。当 MIC 为 $16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 且 $\text{CrCl} > 120 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 予 CZA 2.0 g q8 h , PTA 为 38.6%, 而 CZA 增加到 3.0 g q8 h 时 PTA 可达 84.1%; 当 $\text{CrCl} \leq 120 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 在常规剂量时已达最佳给药方案, 但因大剂量安全性未得到验证, 不推荐实际应用。对于 $\text{MIC} \leq 8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PA 和肠杆菌科菌某些种的血流感染者, CrCl 为 $121 \sim 190 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 标准剂量治疗 (2.5 g iv q8 h) 下 CFR 均小于 90%。Deshpande 等^[24]研究 CZA 对高耐药结核菌的作用, 10 000 例儿童予标准 CZA 剂量 $50/12.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 后又分别每 8 h 予 50、100、150 及 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 输注 2 h, 并监测暴露目标 $\%T_{\text{MIC}}$, 其中 90% 儿童予 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ CZA 具有与一线抗结核药物相同的杀菌率, 且在 60% 儿童中 CZA 具有更高的杀菌率, 建议结核病儿童剂量为 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

一项 II 期试验^[9]评估了 CZA 在 3 个月至 18 岁的 cUTI (含急性肾盂肾炎) 患儿中的药代动力学, 微型 ITT 分析仪示 72 h 内评估临床反应达 90.7%, 治疗随访有效率达 88.9%, 生物学有效率 79.6%, 建议在肾功能不全的患儿中要调整 CZA 剂量。另一项多中心 II 期试验^[25]评估了 CZA 在 cIAI 患儿中的 PK, 头孢他啶和阿维巴坦的平均血药浓度在 1~3 岁队列中相似, 显示 CZA 具有良好的耐受性且对由革兰氏阴性病原体 (包括头孢他啶不敏感菌株) 感染导致的 cIAI 儿童患者有效。Iosifidis 等^[10]回顾分析了单中心 2013—2018 年 5 岁以下 XDR-KP 或 PDR-KP 感染者使用 CZA 情况, 其中 8 位患儿为重症, 接受了 9 个疗程 CZA 静脉滴注 [予 $62.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ q8 h}$, 除 1 例肾功能不全行连续性静脉-静脉血液滤过 (CVVH), 次剂量减半], 所有患者都具有良好的疗效。

3 在感染儿童中应用的案例报道

重症感染患儿使用 CZA 的个案报道越来越多, 目前从早产儿到 16 岁的儿童都有涉及, 多用于治疗尿路感染、复杂腹腔内感染、血液感染、脑膜炎、败血症、骨髓炎等, 见表 1。

Iosifidis 等^[10]报道 8 例疑似或确诊为 XDR-KP 或 PDR-KP 感染者 (13 d 至 4.5 岁, 平均年龄 53 d) 接受 9 个疗程静脉注射 CZA, 并首次用于

1 名在儿童重症监护室 (PICU) 的 2.5 岁女孩。Tamma 等^[26]首次报道使用 CZA 成功治疗 1 例 2 个月先天性膈疝女婴持续洋葱伯克霍尔德菌复合体 (Bcc) 菌血症, CZA 可被视为 Bcc 感染的潜在挽救性治疗。Hobson 等^[27]首次报道使用 CZA 联合氨曲南 (ATM) 成功治疗携带有 NDM-1 和头孢菌素酶的摩氏摩根菌感染。Esposito 等^[28]报道 1 例 CZA 治疗耐药肺炎克雷伯菌 (KPC-KP) 感染败血症的极低出生体质量儿, 说明 CZA 在儿童中使用可能是安全且有效的。Vargas 等^[29]报道 1 例 14 岁男孩 (体质量 50 kg) 在 ICU 使用 CZA 成功治疗由 KP 引起的感染性休克, 在治疗期间, 未发生肾损伤或其他不良事件。Yasmin 等^[30]报道 1 例 4 岁患急性 B 淋巴细胞白血病男孩, 用 CZA + ATM 成功治疗肠道细菌分离株 (携带 *blaKPC* 和 *blaNDM*) 感染, 并借助 TDM 调整方案实现 $100\% f_T > \text{MIC}$ 的 PK/PD 目标, 治疗 2 周后, 疾病治愈且未复发。Cowart 等^[31]报道 1 例患有囊性纤维化 (CF) 及肝病史的 11 岁女孩, 使用 CZA 联合 ATM 及米诺环素治疗嗜麦芽单胞菌肺炎, 并借助了 TDM 优化个体化用药方案。但该治疗方案未考虑到患者肺泡上皮衬液药物浓度, 未达到治疗预期目标。Coskun 等^[32]报道 1 例早产 (孕 27 周)、低出生体质量 (1000 g) 婴儿使用 CZA 成功治疗 PDR-KP 引起的尿路感染。Nguyen 等^[33]报道了 1 例 16 岁女性使用 CZA + 美罗培南 + 妥布霉素成功治疗多耐药洋葱伯克霍氏菌复合体感染的囊性纤维化患者, 但治疗 14 d 后, 洋葱伯克霍氏菌对其 MIC 升高, 引起对该类人群使用 CZA 产生耐药性风险的担忧。

Ji 等^[34]报道了 1 例 45 d 的男婴在进行了心脏手术后 1 个月继发 CRKP 骨髓炎, 使用 CZA 治疗 2 周后骨髓炎治愈, 用药有效且安全。Tootla 等^[35]报道 1 例 17 个月基础状况良好的儿童因大面积热水烧伤 (46% 全身表面积), 继发持续性耐碳青霉烯类黏质沙雷氏菌菌血症, 使用 CZA + 甲氧苄啶-磺胺甲噁唑 + 阿米卡星, 经治疗后病情稳定, 临床反应良好。Almangour 等^[36]报道了 1 例早产男婴 (孕 26 周), 予 CZA 静脉滴注, 联合脑室内注射多黏菌素, 成功治疗多重耐药铜绿假单胞菌中枢神经系统感染, 且治疗期间无任何神经功能缺损, 同时随访 2 年, 患者病情无复发。Asfour 等^[37]报道了 2 例极早产婴儿使用 CZA 治疗, 其中 1 例孕 27 周出生 (920 g), 诊断为脑膜炎和菌血症, 脑脊液培养出多重耐药肺炎克雷伯菌, 予静脉滴注 CZA + 多黏菌素成功治疗感染, 未发现肾损伤等不良反应; 另 1 例孕 28 周出生

表 1 CZA 在儿童感染性疾病中使用的安全性和有效性

Tab 1 Safety and efficacy of CZA for children with infectious diseases

国家	年龄	感染性疾病	病原学检查	患儿情况	联合用药	使用剂量 / (mg·kg ⁻¹)	用法 / 疗程	不良 反应	是否 进行 TDM	转归
希腊 ^[10]	13 d 至 4.5 岁	血液感染 (8), 中枢神经系统感染 (2) 和尿路感染 (1)	XDR/PDR-KP	危重, 挽救性治疗	—	7 例 62.5, 1 例因 CVVH 予 31.25	q8h ivgtt/ 4 ~ 38 d	2 例低钠血症, 1 例高胆红素血症, 未发生显著反应	否	微生物和临床反应良好
美国 ^[26]	2 个月	洋葱伯克霍尔德菌复合体 (Bcc) 菌血症	洋葱伯克霍尔德菌	危重, 挽救性治疗	—	50	q8h 持续滴注 8 h/6 周	—	否	治愈
法国 ^[27]	3 岁	淋巴母细胞急性白血病伴菌血症	NDM-1/ 头孢菌素酶的摩氏摩根菌	危重	氨曲南	150/d	ivgtt, 10 d	—	否	治愈
意大利 ^[28]	20 d (极低出生体重儿)	脓毒症	产 KPC-KP	危重	磷霉素、美罗培南	75/20 及 25/6.5	tid ivgtt/22 d	中度血小板减少	否	临床情况良好
意大利 ^[29]	14 岁	感染性休克	KP	危重	—	2500	q8h ivgtt/	未发生	否	良好
美国 ^[30]	4 岁	急性 B 淋巴细胞白血病的继发感染	携带 blaKPC 和 blaNDM 霍氏肠杆菌 Eh1 菌株	重症	氨曲南	50	q8h 持续滴注 3 h/14 d	—	是	治愈
美国 ^[31]	11 岁	肺炎	嗜麦芽单胞菌	危重	氨曲南、米诺环素	150	q8h 持续滴注 3 h/11 d	—	是	无明显效果
土耳其 ^[32]	早产儿 (孕 27 周)	尿路感染	耐碳青霉烯肺炎克雷伯氏菌	危重, 抢救治疗	—	50	q8h ivgtt/10 d	短暂时性糖尿	否	良好
美国 ^[33]	16 岁	囊性纤维化肺炎	多耐药洋葱伯克霍氏菌	危重	美罗培南、妥布霉素	2500	q8h ivgtt/14 d	—	否	良好
中国 ^[34]	45 d	原发性骨髓炎	CR-KP	正常	—	50	q8h ivgtt/14 d	未发生	否	治愈
南非 ^[35]	17 个月	大面积热水烧伤 (46% 全身表面积) 继发菌血症	耐碳青霉烯类黏质沙门氏菌	危重	甲氧苄啶 - 磺胺甲噁唑、阿米卡星	50	q8h ivgtt/28 d	—	否	良好
沙特 ^[36]	早产儿 (孕 26 周)	中枢神经系统感染	多重耐药铜绿假单胞菌	危重	脑室内注射多黏菌素	62.5	q8h ivgtt/21 d	未发生	否	随访 2 年, 无复发
沙特 ^[37]	极早产儿 (孕 27 周)	败血症和脑膜炎	CR-KP	危重	多黏菌素	62.5	q8h ivgtt/21 d	未发生	否	治愈
	极早产儿 (孕 28 周)	败血症	CR-KP	危重	阿米卡星	62.5	q8h ivgtt/4 d	肌酐升高	否	血培养无菌
中国 ^[38]	1 岁	肺部感染, 腹腔感染	CR-KP	危重	—	300	q8h ivgtt/3 d	无	否	死亡
	2 岁	腹腔感染	CR-KP	—	氨曲南	—	ivgtt/18 d	无	否	好转
	12 岁	腹腔感染	CR-KP	—	甲硝唑	—	ivgtt/14 d	无	否	好转
	0.5 岁	腹腔感染	CR-KP	—	—	—	ivgtt/7 d	无	否	好转
中国 ^[39]	7 岁	医院获得性肺炎	CR-KP + MDR-AB	危重	舒巴坦	1500	tid ivgtt/15 d	无	否	好转
	3 岁	皮肤软组织感染	CR-KP	危重	—	400	q8h ivgtt/8 d	无	否	好转
	15 岁	泌尿系感染	CR-KP + CRPA	正常	阿米卡星	2500	tid ivgtt/9 d	心率增加	否	好转
	12 岁	肺部感染	CR-KP + MDR-AB	危重	替加环素	2500	tid ivgtt/11 d	腹泻	否	好转

(925 g), 诊断为菌血症, 血培养出 KPC-KP, 予 CZA + 阿米卡星, 经治疗后培养阴性, 但患者基础状况较差最终死亡。Chen 等^[38]报道 4 名肝移植患儿 (0.5 岁、1 岁、2 岁、12 岁) 接受 CZA 治疗 CRKP 腹部感染, 3 例治疗成功, 1 例因多器官衰竭死亡, 说明 CZA 可作为肝移植患者 CRKP 感染的一种抢救性治疗。葛洁等^[39]报道 4 名患儿使用 CZA 对神经、心脏、肾脏系统疾病合并 CRKP 感染的肺部及泌尿系感染具有良好的临床

效果, 说明 CZA 推荐参考剂量用于我国 CRKP 患儿疗效好, 安全性高。

4 耐药研究

CZA 对耐药革兰氏阴性菌有效, 尽管被批准上市才几年, 但一些国家已报告了 CZA 耐药菌, 详见表 2。国际耐药监测 (International Network For Optimal Resistance Monitoring, INFORM) 全球监测计划, 2012—2015 年亚太地区对 CZA 耐药率较低, 肠杆菌为 1.0%, PA 为 7.4%, 其中在菲律宾肠杆菌

耐药率最高达 3%，泰国 PA 耐药率最高为 16.9%，携带金属 β 内酰胺酶 (MBLs) 菌株对 CZA 耐药率较高为 98.6%^[40]。2015—2017 年对碳青霉烯类耐药的肠杆菌中，CZA 对美罗培南耐药菌耐药率为 27%，对 MBL 阳性菌株无效。碳青霉烯酶阳性但 MBL 阴性菌株对 CZA 耐药率从 2015 年 0% 上升到 2017 年 0.6%，碳青霉烯酶阴性且 MBL 阴性菌株 2017 年对 CZA 耐药率为 6.3%，碳青霉烯酶阳性且 MBL 阳性菌株 2016 年和 2017 年对 CZA 耐药率为 100%^[41]。我国 2018 年 CHINET 数据示 CZA 耐药率不高，CZA 在 $MIC\ 8\ mg \cdot L^{-1}$ 时对 ECO 耐药率为 4.5%、KP 耐药率为 5.3%、阴沟肠杆菌耐

药率为 85.0%、PA 耐药率为 11.5%、CRE 耐药率为 30.3%，产 *blaKPC* 分离株对 CZA 耐药率也较低 ($< 10\%$)，但大多 *blaNDM* 分离株对 CZA 耐药率达 98.2%，CRECO 耐药率为 90.0%，CRPA 耐药率为 35.7%，鲍曼不动杆菌耐药率为 84.9%，CRAB 耐药率为 98.8%^[42]；2021 年 CHINET 数据^[43] 显示 CZA 对儿童及成人中分离的 KP 耐药率分别为 22.5% 及 6.7%；对 CRKP 的耐药率为 11.1%，对产 KPC 或 *OXA-48* 菌株 100% 敏感，产 NDM 菌株耐药率 100%，对变形杆菌属的耐药率为 1.7%，沙雷菌属 3.8%，儿童及成人分离的 PA 耐药率分别为 5.7% 及 5.5%，CRPA 耐药率为 13.9%。

表 2 CZA 对各种细菌的敏感性 (%)

Tab 2 Antimicrobial susceptibility to CZA (%)

研究者	地区	各检出细菌名称及敏感率													
		耐药肠杆菌*										肠杆菌			
		肠杆菌	肠杆菌 (MBL-)	肠杆菌 (MBL+)	肠杆菌 (含 OSBL+/ESBL+/AmpC+)	MDR/XDR/CRE	肠杆菌 (碳青霉烯酶 +MBL-)	肠杆菌 (耐美罗培南 +)	ECO	ECO (MBL-)	CRECO	变形杆菌	变形杆菌 MBL-	所有 CRE	产酸克雷伯菌
^[42] CHINET (2018)	中国	95.5	—	—	—	—	—	—	—	—	9.1	—	—	69.7	—
^[43] CHINET (2021)	中国	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
^[40] INFORM 全球监测计划 (2012-2015)	亚太	99.0	99.8	—	97.9/99.6/98.9	—	—	—	99.9	> 99.9	—	99.5	99.8	—	98.9
^[15] INFORM 全球监测计划 (2015-2016)	美国	99.9	—	—	—	99.3/97.6/97.5	—	—	> 99.9	—	—	—	—	—	—
^[41] INFORM 全球监测计划 (2015-2017)	全球	—	95.9	1.1	—	—	99.8	73	—	—	—	—	—	—	—

研究者	地区	各检出细菌名称及敏感率													
		耐药 PA* (含 OSBL+/ESBL+/GSE+/MBL+/KPC+)										肠杆菌			
		产酸克雷伯菌 MBL-	枸橼酸杆菌	枸橼酸杆菌 MBL-	阴沟肠杆菌	KP	CRKP	KP-MBL-	AB	CR-AB	PA	CR-PA	其他肠杆菌属	其他肠杆菌属 MBL-	其他肠杆菌属 MBL-
^[42] CHINET (2018)	中国	—	—	—	85.0	94.7	84.6	—	15.1	1.2	86.9	—	64.3	—	—
^[43] CHINET (2021)	中国	—	—	—	—	22.5	11.1	—	—	—	5.7	—	23.5	—	—
^[40] INFORM 全球监测计划 (2012-2015)	亚太	99.8	98.4	99.5	—	98.3	—	99.7	—	—	92.6	96.1/66.7/21.1/100/1.4/100	—	98.1	99.7
^[15] INFORM 全球监测计划 (2015-2016)	美国	—	—	—	99.8	99.9	—	—	—	—	97.6	89.3/80.4	76.0	—	—
^[41] INFORM 全球监测计划 (2015-2017)	全球	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Dai 等^[23] 报道从血培养中分离出肠杆菌科细菌和 PA，CZA 总耐药率为 2.31%，其中肠杆菌科

细菌和 PA 耐药率分别为 1.57% 和 14.29%。Zhou 等^[44] 对 2017 年 7 月—2018 年 6 月的 NICU 进行

研究,首次报道在 CZA 获批之前,中国新生儿患者中 CRKP 对 CZA 的耐药情况,超过 23.3%CRKP 对 CZA 耐药,除多黏菌素 B 和替加环素外,对大多数受测抗菌药物有高度耐药性,常见于新生儿肺炎和败血症,大多数检出新生儿与剖宫产、早产、低出生体质量和曾接受过碳青霉烯类 β -内酰胺类治疗有关。耐 CZA 的 CRKP 组对阿米卡星、呋喃妥因、左氧氟沙星和环丙沙星的耐药率低于对 CZA 敏感的 CRKP 组。所有耐 CZA 的 CRKP 分离株均带有耐碳青霉烯酶基因,其中以 *blaKPC-2* 为主,其次是 *blaNDM-1* 和 *blaNDM-5*。同时采用多位点序列分型技术 (mLST) 对所有菌株进行分子遗传学分析,共鉴定出 8 个不同的 STs, KPC-2 阳性的 CRKP 属于 ST241、ST37 和 ST11,而 NDM-1 有 ST784、ST1710、ST37 和 ST324, NDM-5 阳性有 ST1419。同时还发现了其他 β -内酰胺酶基因,包括 *blaSHV* 和 *blaCTX-M*^[44]。但 CZA 在 2019 年 5 月才在中国被批准用于临床抗感染治疗,之前无新生儿接受过 CZA 治疗,因此出现的耐药性不能归因于 CZA 药物使用,患者之间的传播可能是本研究中其他 CZA 耐药 CRKP 分离株的一个重要因素,有效的感染控制措施和流行病学监测的重要性,以防止从新生儿中分离出对 CZA 耐药的 CRKP 继续传播。

5 安全性研究

CZA 在儿童中临床研究较少,对于儿童不良事件 (AE) 报道不多,常见胃肠道不良反应,如腹泻、恶心和呕吐。一项 II 期随机对照研究^[25], CZA 与甲硝唑联用不良反应发生率为 52.5%, 常见呕吐 (14.8%)、输液部位静脉炎 (6.6%)、血清肿 (4.9%); 与美罗培南联用不良反应发生率为 59.1%, 常见呕吐、咳嗽、腹痛;多数不良反应较轻,但联合甲硝唑中有 4/61 例 (6.6%), 美罗培南组 1/22 例 (4.5%) 发生严重不良反应,但没有因不良反应导致研究药物死亡或停药。另一项 II 期临床随机对照试验^[9]中不良反应发生率 53.7%, 其中严重不良事件 (SAE) 发生率 9%, 如腹部疼痛、便秘、肾结石、神经系统疾病、心动过速和病毒感染各 1 例,急性肾盂肾炎 2 例。Iosifidis 等^[10]报道 CZA 总体耐受性良好,未发现 SAE,有 2 例新生儿在使用 CZA 48 h 内发现有低镁血症发生,予对症治疗后改善。Esposito 等^[28]报道 CZA 治疗 8 d 出现中度血小板减少,降低剂量后未加重。Coskun 等^[32]报道 CZA 治疗 3 d 后出现尿糖,但血糖水平正常,未发现其他可引起尿糖的相关疾病,停用 CZA 5 d 内尿糖逐渐消失。姜婷等^[45]报道 CZA 治疗中相关的不良反应发生率较低,见肾损伤、胃肠道反应、肝功能异常。CZA 引起的 AE 病例中,多经减量、

停药或停药后等对症治疗后得到有效缓解。

6 小结与展望

新型的非 β -内酰胺酶抑制剂阿维巴坦,与头孢他啶组合可对包括 ESBL、KPC、AmpC、OXA-48 在内许多产 β -内酰胺酶的革兰氏阴性菌产生活性,但 CZA 对 IMP、NDM、VIM 或其他 OXA 碳青霉烯酶无活性。

目前在 3 个月以下的患者中未被批准使用 CZA,但相关数据表明 CZA 可成功治疗早产儿因 PDR-KP 引起的 cUTI。此外, CZA 可与氨基糖苷联合使用,治疗由产 MBL 耐药菌引起的感染。CZA 在成人和儿童人群中的安全性、临床反应和生存率等方面都令人满意。基于以往观察性研究中关于 CRE 感染的证据,对 CZA 进行 PK/PD 优化,可采用延长输注和联合治疗 (使用氨基糖苷、TMP/SMX、磷霉素、替加环素、多黏菌素),可被认为是一种潜在的选择,以避免耐药性的出现。我们可根据药敏试验和感染部位选择 CZA 及联用药物。因其广泛抗菌谱涵盖了产 ESBL 肠杆菌和 PA,对于 MDR 革兰氏阴性菌感染危险因素的患者使用 CZA 可成为经验疗法,并且也可作为一种减少碳青霉烯使用量的目标策略,但还需前瞻性临床试验尤其是随机对照试验^[27]以评估 CZA 的安全性、有效性,以确定在 MDR-GN 感染儿科人群中选择 CZA 治疗是否是最佳经验治疗和靶向治疗方法,是否可作为儿童 PDR 细菌感染的治疗选择。

参考文献

- [1] Meropol SB, Haupt AA, Debanne SM. Incidence and outcomes of infections caused by multidrug-resistant enterobacteriaceae in children, 2007—2015 [J]. J Pediatric Infect Dis Soc, 2018, 7 (1): 36-45.
- [2] 景春梅,许红梅,赵瑞秋,等. 2016—2018 年 11 所医院儿童血培养分离菌的耐药性分析 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2021, 21 (1): 78-87.
- [3] 国家卫生计生委合理用药专家委员会,全国细菌耐药监测网. 2018 年全国细菌耐药监测报告 [J]. 中国合理用药探索, 2020, 17 (1): 1-10.
- [4] 国家卫生健康委合理用药专家委员会,全国细菌耐药监测网. 2019 年全国细菌耐药监测报告 [J]. 中国合理用药探索, 2021, 18 (3): 1-11.
- [5] 全国细菌耐药监测网. 2020 年全国细菌耐药监测报告 [J]. 中华检验医学杂志, 2022, 45 (2): 122-136.
- [6] 何磊燕,付盼,吴霞,等. 中国儿童细菌耐药监测组 2020 年儿童细菌耐药监测 [J]. 中国循证儿科杂志, 2021, 16 (6): 414-420.
- [7] 赵锦锦,张菁. 头孢他啶-阿维巴坦药品说明书 [J]. 国外医药 (抗生素分册), 2019, 40 (2): 115-127.
- [8] Sader HS, Huband MD, Duncan LR, et al. Ceftazidime-avibactam antimicrobial activity and spectrum when tested against gram-negative organisms from pediatric pa-

- tients: results from the INFORM surveillance program (United States, 2011—2015) [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2018, 37 (6): 549-554.
- [9] Bradley JS, Roilides E, Broadhurst H, et al. Safety and efficacy of ceftazidime-avibactam in the treatment of children ≥ 3 months to < 18 years with complicated urinary tract infection: results from a phase 2 randomized, controlled trial [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2019, 38 (9): 920-928.
- [10] Iosifidis E, Chorafa E, Agakidou E, et al. Use of ceftazidime-avibactam for the treatment of extensively drug-resistant or pan drug-resistant *klebsiella pneumoniae* in neonates and children < 5 years of age [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2019, 38 (8): 812-815.
- [11] Pitart C, Marco F, Keating TA, et al. Activity of ceftazidime-avibactam against fluoroquinolone-resistant enterobacteriaceae and *pseudomonas aeruginosa* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59 (6): 3059-3065.
- [12] Castanheira M, Mills JC, Costello SE, et al. Ceftazidime-avibactam activity tested against enterobacteriaceae isolates from U.S. hospitals (2011 to 2013) and characterization of β -lactamase-producing strains [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59 (6): 3509-3517.
- [13] Aktaş Z, Kayacan C, Oncul O. In vitro activity of avibactam (NXL104) in combination with β -lactams against gram-negative bacteria, including OXA-48 β -lactamase-producing *klebsiella pneumoniae* [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2012, 39 (1): 86-89.
- [14] Huband MD, Castanheira M, Flamm RK, et al. In vitro activity of ceftazidime-avibactam against contemporary *pseudomonas aeruginosa* isolates from U.S. medical centers by census region, 2014 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60 (4): 2537-2541.
- [15] Sader HS, Castanheira M, Duncan LR, et al. Antimicrobial susceptibility of enterobacteriaceae and *pseudomonas aeruginosa* isolates from United States Medical Centers stratified by infection type: results from the International Network for Optimal Resistance Monitoring (INFORM) surveillance program, 2015—2016 [J]. *Diagn microbiol Infect Dis*, 2018, 92 (1): 69-74.
- [16] Sader HS, Castanheira M, Streit JM, et al. Frequency and antimicrobial susceptibility of bacteria causing bloodstream infections in pediatric patients from United States (US) medical centers (2014—2018): therapeutic options for multidrug-resistant bacteria [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2020, 98 (2): 115108.
- [17] Lin LY, Riccobene T, Debabov D. Antimicrobial activity of ceftazidime-avibactam against contemporary pathogens from urinary tract infections and intra-abdominal infections collected from US children during the 2016—2019 INFORM surveillance program [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2021, 40 (4): 338-343.
- [18] 张敬霞, 贾天野, 张树永, 等. 头孢他啶/阿维巴坦对耐碳青霉烯肠杆菌科细菌的体外抗菌活性研究 [J]. *中国抗菌药物杂志*, 2018, 43 (9): 1109-1116.
- [19] 王李, 房晓伟, 耿士窠, 等. 蒙特卡洛模拟在碳青霉烯类耐药菌感染头孢他啶-阿维巴坦给药方案评价中的应用 [J]. *东南大学学报 (医学版)*, 2020, 39 (3): 281-286.
- [20] 林琳, 肖晓光, 王楠, 等. 阿维巴坦联合头孢他啶或氨曲南对耐碳青霉烯肠杆菌科细菌体外抗菌活性研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30 (1): 15-19.
- [21] de Jonge BL, Karlowsky JA, Kazmierczak KM, et al. In vitro susceptibility to ceftazidime-avibactam of carbapenem-nonsusceptible enterobacteriaceae isolates collected during the INFORM global surveillance study (2012 to 2014) [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60 (5): 3163-3169.
- [22] Zalas-Więcek P, Prażyńska M, Pojnar Ł, et al. Ceftazidime/Avibactam and other commonly used antibiotics activity against enterobacterales and *pseudomonas aeruginosa* isolated in Poland in 2015—2019 [J]. *Infect Drug Resist*, 2022, 15: 1289-1304.
- [23] Dai YY, Chang WJ, Zhou X, et al. Evaluation of ceftazidime/avibactam administration in enterobacteriaceae and *pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections by monte carlo simulation [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 2899-2905.
- [24] Deshpande D, Srivastava S, Chapagain M, et al. Ceftazidime-avibactam has potent sterilizing activity against highly drug-resistant tuberculosis [J]. *Sci Adv*, 2017, 3 (8): e1701102.
- [25] Bradley JS, Broadhurst H, Cheng K, et al. Safety and efficacy of ceftazidime-avibactam plus metronidazole in the treatment of children ≥ 3 months to < 18 years with complicated intra-abdominal infection: results from a phase 2, randomized, controlled trial [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2019, 38 (8): 816-824.
- [26] Tamma PD, Fan Y, Bergman Y, et al. Successful treatment of persistent *burkholderia cepacia* complex bacteremia with ceftazidime-avibactam [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62 (4): e02213-17.
- [27] Hobson CA, Bonacorsi S, Fahd M, et al. Successful treatment of bacteremia due to NDM-1-producing *morganella morganii* with aztreonam and ceftazidime-avibactam combination in a pediatric patient with hematologic malignancy [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63 (2): e02463-18.
- [28] Esposito P, Sbrana F, Di Toro A, et al. Ceftazidime-avibactam salvage therapy in newborn with KPC-producing *klebsiella pneumoniae* invasive infections [J]. *Minerva Anestesiol*, 2019, 85 (7): 804-805.
- [29] Vargas M, Buonomo AR, Buonanno P, et al. Successful treatment of KPC-MDR septic shock with ceftazidime-avibactam in a pediatric critically ill patient [J]. *IDCases*, 2019, 18: e00634.
- [30] Yasmin M, Fouts DE, Jacobs MR, et al. Monitoring ceftazidime-avibactam and aztreonam concentrations in the treatment of a bloodstream infection caused by a multidrug-resistant *Enterobacter* sp. carrying both *klebsiella pneumoniae* carbapenemase-4 and new delhi metallo- β -lactamase-1 [J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71 (4): 1095-1098.
- [31] Cowart MC, Ferguson CL. Optimization of aztreonam in combination with ceftazidime/avibactam in a cystic fibrosis patient with chronic *stentrophomonas maltophilia* pneumonia using therapeutic drug monitoring: a case study [J]. *Ther Drug Monit*, 2021, 43 (2): 146-149.

- [32] Coskun Y, Atici S. Successful treatment of pandrug-resistant klebsiella pneumoniae infection with ceftazidime-avibactam in a preterm infant: a case report [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2020, 39 (9): 854-856.
- [33] Nguyen TT, Condren M, Walter J. Ceftazidime-avibactam for the treatment of multidrug resistant burkholderia cepacia complex in a pediatric cystic fibrosis patient [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2020, 55 (2): 283-284.
- [34] Ji Z, Sun K, Li Z, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella Pneumoniae* osteomyelitis treated with ceftazidime-avibactam in an infant: a case report [J]. *Infect Drug Resist*, 2021, 14: 3109-3113.
- [35] Tootla HD, Copelyn J, Botha A, et al. Using ceftazidime-avibactam for persistent carbapenem-resistant *Serratia Marcescens* infection highlights antimicrobial stewardship challenges with new beta-lactam-inhibitor combination antibiotics [J]. *S Afr Med J*, 2021, 111 (8): 729-731.
- [36] Almangour TA, Alsubaie S, Ghonem L, et al. Ceftazidime-avibactam for the treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* central nervous system infection in pediatric patient: a case report [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2022, 41 (5): 436-438.
- [37] Asfour SS, Alaklobi FA, Abdelrahim A, et al. Intravenous ceftazidime-avibactam in extremely premature neonates with carbapenem-resistant enterobacteriaceae: two case reports [J]. *J Pediatr Pharmacol Ther*, 2022, 27 (2): 192-197.
- [38] Chen F, Zhong H, Yang T, et al. Ceftazidime-avibactam as salvage treatment for infections due to carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in liver transplantation recipients [J]. *Infect Drug Resist*, 2021, 14: 5603-5612.
- [39] 葛洁, 关月, 张筱芳, 等. 头孢他啶阿维巴坦在儿童碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌感染患者中的案例分析 [J]. *实用药物与临床*, 2021, 24 (12): 1114-1117.
- [40] Karlowsky JA, Kazmierczak KM, Bouchillon SK, et al. In vitro activity of ceftazidime-avibactam against clinical Isolates of enterobacteriaceae and pseudomonas aeruginosa collected in Latin American Countries: results from the INFORM global surveillance program, 2012 to 2015 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63 (4): e01814-18.
- [41] Spiliopoulou I, Kazmierczak K, Stone GG. In vitro activity of ceftazidime/avibactam against isolates of carbapenem-non-susceptible enterobacteriaceae collected during the INFORM global surveillance programme (2015-17) [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2020, 75 (2): 384-391.
- [42] Yang Y, Guo Y, Yin D, et al. In vitro activity of cefepime-zidebactam, ceftazidime-avibactam, and other comparators against clinical isolates of enterobacterales, pseudomonas aeruginosa, and acinetobacter baumannii: results from China Antimicrobial Surveillance Network (CHINET) in 2018 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020, 65 (1): e01726-20.
- [43] CHINET 中国细菌耐药监测网. CHINET 2021 年中国细菌耐药监测网 [EB/OL]. (2022/02/11) [2022-07-11]. <https://www.chinets.com/Data/AntibioticDrugFast>.
- [44] Zhou JJ, Yang JW, Hu FP, et al. Clinical and molecular epidemiologic characteristics of ceftazidime/avibactam-resistant carbapenem-resistant klebsiella pneumoniae in a neonatal intensive care unit in China [J]. *Infect Drug Resist*, 2020, 13: 2571-2578.
- [45] 姜婷, 邓飞, 恽波. 头孢他啶-阿维巴坦治疗耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌肺部感染的疗效 [J]. *江苏医药*, 2020, 46 (12): 1286-1288.

(收稿日期: 2022-05-16; 修回日期: 2022-07-26)

布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂个体化给药前景研究

安姝润¹, 罗雪梅², 杨晓璇¹, 胡美玲¹, 周玉皆^{3*} (1. 中国药科大学南京鼓楼医院, 南京 210008; 2. 南京大学医学院附属鼓楼医院药学部, 南京 210008; 3. 南京大学医学院附属鼓楼医院呼吸与危重症医学科, 南京 210008)

摘要: 布鲁顿酪氨酸激酶 (Bruton's tyrosine kinase, BTK) 抑制剂是治疗 B 细胞肿瘤的新药, 其疗效好、不良反应少, 近年来在临床中的使用逐渐增加。然而患者对于药物毒性的不耐受仍严重影响 BTK 抑制剂在临床中的使用, 如何给药并做好全程监护仍是临床中应不断思考的问题。个体化给药方案的制订依据主要包括治疗药物监测以及基因测定等结果。本文拟对 BTK 抑制剂的药动学、剂量调整、血药浓度和基因多态性与疗效及不良反应进行综述, 以期对 BTK 抑制剂的个体化给药方案的建立提供参考。

关键词: BTK 抑制剂; 泽布替尼; 伊布替尼; 阿卡替尼; 奥布替尼; 个体化给药

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2863-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.026

基金项目: 江苏省药学会-奥赛康临床药学基金科研项目 (No.A202007)。

作者简介: 安姝润, 女, 在读硕士研究生, 主要从事临床药理学研究, email: 3320092178@stu.cpu.edu.cn * **通信作者:** 周玉皆, 男, 博士, 主任医师, 主要从事呼吸与危重症医学研究, email: yujiezhou@163.com

Prospect of individualized administration of Bruton's tyrosine kinase inhibitors

AN Shu-run¹, LUO Xue-mei², YANG Xiao-xuan¹, HU Mei-ling¹, ZHOU Yu-jie^{3*} (1. Nanjing Drum Tower Hospital of China Pharmaceutical University, Nanjing 210008; 2. Department of Pharmacy, Nanjing Drum Tower Hospital Affiliated to Nanjing University Medical School, Nanjing 210008; 3. Department of Respiratory Medicine, Nanjing Drum Tower Hospital Affiliated to Nanjing University Medical School, Nanjing 210008)

Abstract: Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitors are new drugs for the treatment of B-cell tumors, with good efficacy, few adverse reactions, and increased use in recent years. However, patient intolerance to drug toxicity still seriously affects the use of BTK inhibitors in clinical practice, and how to administer and monitor the whole process remains constant concern in clinical practice. The development of individualized dosing regimens is based on the therapeutic drug monitoring and genetic assays. This paper reviewed the pharmacokinetics, dose adjustment, blood concentration, gene polymorphism and adverse effect of BTK inhibitors to provide reference for the establishment of individualized dosing regimens.

Key words: BTK inhibitor; zanubrutinib; ibrutinib; acalabrutinib; orelabrutinib; individualized administration

布鲁顿酪氨酸激酶 (Bruton's tyrosine kinase, BTK) 是 B 细胞受体信号通路中重要的信号分子, 参与调控 B 细胞生存、分化、增殖、黏附、迁移和凋亡, 其异常激活与多种 B 细胞肿瘤发生有关。BTK 抑制剂通过与 BTK 共价/非共价结合阻止 BTK 的激活, 阻断下游信号, 抑制肿瘤细胞生长。BTK 抑制剂作为新兴的临床治疗药物, 改变了传统对于 B 细胞肿瘤的治疗, 但是其在治疗时产生的毒性也不可忽视, 且出现不能耐受毒性是患者停药的原因之一。

结合每位患者不同情况后综合考虑, 制订安全、有效、合理、经济的药物治疗方案, 可提高药物的疗效。目前, 个体化给药方案的制订主要依据治疗药物监测 (therapeutic drug monitoring, TDM) 以及基因测定结果等。如今临床开始对越来越多的靶向药物开展个体化给药, 并且取得了良好的效果。本文拟从 BTK 抑制剂的药动学研究和剂量调整、血药浓度与疗效和不良反应之间的关系、BTK 目前基于基因的研究进行综述, 以期对 BTK 抑制剂个体化给药方案的制订提供启示。

1 BTK 抑制剂的概述

BTK 是一种细胞质非受体的无球蛋白血症酪氨酸激酶, 在除 T 细胞外的造血细胞中广泛表达^[1]。BTK 抑制剂根据其作用机制可以分为两类: ①不可逆抑制剂: 能够与 BTK 的 ATP 结合位点中的 Cys481 残基形成共价键, 抑制 BTK 活性; ②可逆抑制剂: 通过弱可逆相互作用结合到 SH3 结构域

的特定口袋中, 阻止 BTK 的完全激活^[2]。目前上市的 BTK 抑制剂均为不可逆的 BTK 抑制剂。BTK 抑制剂也能够抑制其他具有 Cys481 样残基的激酶和缺乏活性半胱氨酸的激酶, 这种脱靶效应是 BTK 抑制剂不良反应产生的原因^[3]。2013 年美国食品药品监督管理局批准了第一代 BTK 抑制剂伊布替尼作为套细胞淋巴瘤 (mantle cell lymphoma, MCL)、慢性淋巴细胞白血病 (chronic lymphocytic leukemia, CLL) / 小淋巴细胞淋巴瘤 (small lymphocytic lymphoma, SLL) 以及瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症 (Waldenström macroglobulinemia, WM) 的治疗药物, 随后出现的第二代 BTK 抑制剂阿卡替尼、泽布替尼和奥布替尼旨在提高药物选择性, 减少脱靶效应以减少不良反应, 提高药物疗效。BTK 抑制剂的出现, 改变了 B 细胞淋巴瘤以化学免疫法为主的传统治疗方案。目前, 伊布替尼、泽布替尼和奥布替尼已被批准用于治疗 MCL、CLL/SLL, 伊布替尼与泽布替尼还可用于治疗 WM, 阿卡替尼未在中国上市^[4]。

2 BTK 抑制剂的药动学和剂量调整

2.1 BTK 抑制剂的药动学

BTK 抑制剂口服给药后迅速吸收, 血浆蛋白结合率均在 90% 以上, 达峰时间在 0.5 ~ 2 h, 半衰期在 1 ~ 6 h, 其中伊布替尼的半衰期较长, 在 4 ~ 6 h, 受试者服用单剂量 (推荐剂量) 的 BTK 抑制剂后, 随胆汁通过粪便排泄 (大于 80%)。奥布替尼不同于其他 BTK 抑制剂, 其代谢产物主要经粪便

(49.4%) 与尿液 (34.3%) 共同排泄^[5-8]。因奥布替尼可用数据有限, 因此本文仅对其进行简略介绍。

伊布替尼、阿卡替尼和泽布替尼在健康受试者中的药动学均能用二室模型进行良好的描述。BTK 抑制剂的药动学几乎不受性别、年龄、体质量的影响^[6-8]。有研究表明, 进食会使伊布替尼的药动学发生改变, 与禁食后服药相比, 高脂饮食合并服用伊布替尼可使峰浓度 (peak concentration, C_{max}) 提高 2 ~ 4 倍, 血药浓度 - 时间曲线下面积 (area under the concentration time curve, AUC) 增加 2 倍, 第二代 BTK 抑制剂的暴露量不会因进食而改变^[4-6]。肝脏代谢是 BTK 抑制剂的主要代谢途

径, BTK 抑制剂在肝功能不全患者体内的暴露量增加, 因此在进行剂量调整的同时需要对此类患者进行不良反应监测^[9-11]。对于泽布替尼, 健康状态是影响其药动学的因素之一, 健康受试者的 C_{max} 和 AUC 分别比 B 细胞恶性肿瘤患者高约 26.8% 和 43.7%^[12]。这个现象并不能用药物的代谢进行解释, 因为泽布替尼的主要代谢酶 (CYP3A4) 的丰度会在癌症患者中显著降低, 具体原因还有待研究^[13]。另外, 生活习惯、合用药物等也可能会对 BTK 抑制剂的药动学产生影响, 使血药浓度发生改变。更高的体内未结合浓度可能与更长时间的 BTK 抑制有关^[14-15]。影响 BTK 抑制剂药动学的因素见表 1。

表 1 BTK 抑制剂药动学影响因素

Tab 1 Influence factors for pharmacokinetics of BTK inhibitors

药动学过程	影响因素	BTK 抑制剂	药动学可能 / 已经发生的变化	参考文献
吸收	饮食	伊布替尼、阿卡替尼	空腹情况下的伊布替尼血浆暴露量约为进食状态的 60%; 进食后阿卡替尼的 C_{max} 比禁食状态降低 73%	[5-6]
	胃酸还原剂	阿卡替尼	与抗酸剂 (碳酸钙) 合用时 AUC 降低 53%; 与质子泵抑制剂 (奥美拉唑) 合用时 AUC 降低 43%	[4]
分布	血浆蛋白结合	/	与其他药物联用时可能会对暴露量产生影响; 低蛋白血症会对药物的暴露量产生影响	[16]
代谢	肝功能不全	伊布替尼、阿卡替尼、泽布替尼	轻、中和重度肝功能不全会增加药物在患者体内的暴露量	[9-11]
	CYP3A	伊布替尼、阿卡替尼、泽布替尼	与 CYP3A 抑制剂 (伏立康唑、伊曲康唑等) 合用时 C_{max} 、 AUC 升高; 与 CYP3A 诱导剂 (利福平等) 合用时 C_{max} 、 AUC 降低	[5-7, 17]
		伊布替尼	吸烟可以诱导 CYP3A4 酶的代谢, 使伊布替尼清除率提高约 60%	[18]
排泄	胆汁排泄受损	/	胆汁排泄受损减少了药物从体内的清除, 增加了药物的吸收	[19]

2.2 肝损伤人群的药动学与剂量调整

BTK 抑制剂主要是在肝脏中由细胞色素 P450 (主要是 CYP3A) 进行代谢^[14]。因此, 根据患者肝功能进行个体化剂量调整尤为重要。

de Jong 等^[9]将受试者按照肝功能 (Child-Pugh A、B 和 C 级) 分为 3 个治疗组, 在禁食 10 h 后单次口服 140 mg 伊布替尼, 结果显示伊布替尼在轻度、中度和重度肝损伤受试者中的平均暴露量分别比健康受试者高约 4.10、9.80 和 13.40 倍。根据伊布替尼说明书, 其对于轻度肝损伤患者的推荐剂量为 140 mg · d⁻¹, 中度肝损伤患者的推荐剂量为 70 mg · d⁻¹, 而对于重度肝损伤患者则不建议使用伊布替尼^[7]。Xu 等^[10]对肝损伤人群进行阿卡替尼药动学研究发现, 轻、中和重度肝损伤的阿卡替尼暴露量分别为健康受试者的 1.90、1.48 和 5.0 倍, 阿卡替尼的暴露量并未因轻、中度肝损伤发生较大的改变, 因此在轻、中度肝损伤患者中的剂量无需调整, 在重度肝损伤患者中暴露量变化较大, 故不建议使用阿卡替尼。Ou 等^[11]的研究表明, 轻、中和重度肝损伤受试者泽布替尼的平均总暴露量是健康受试者的 1.10、1.2 和 1.60 倍, 因此, 在轻、中度

肝损伤的患者中可以维持 160 mg bid 的给药方式, 而重度肝损伤患者建议以 80 mg bid 的方式进行给药^[6]。目前尚无奥布替尼在肝损伤受试者中的药动学研究。因 BTK 抑制剂主要通过肝脏代谢, 在肝功能不全的患者中应用 BTK 抑制剂时均需要进行 TDM 及不良反应的监测。

2.3 肾损伤人群的药动学和用药调整

BTK 抑制剂主要通过肝脏进行代谢, 因此肾功能的改变对于 BTK 抑制剂的药动学影响较小。

轻、中度肾损伤基本不会改变伊布替尼和阿卡替尼在体内的暴露量, 但目前尚未评估重度肾损伤和血液透析对于伊布替尼和阿卡替尼药动学的影响^[5, 7]。对于泽布替尼, 轻、中和重度肾损伤均不会改变其药动学, 但尚无在血液透析受试者中的药动学数据^[6]。奥布替尼是最新上市的 BTK 抑制剂, 相比于其他已上市的 BTK 抑制剂, 其经肾脏排泄的比例最大, 约有 34.3% 的代谢产物经过尿液代谢, 但是尚未开展其在肾损伤患者中的药动学研究^[8]。伊布替尼、阿卡替尼和泽布替尼在肾损伤患者中不需要进行剂量调整, 但是仍需要进行 TDM 及不良反应的监测。

2.4 合并 CYP3A 抑制剂 / 诱导剂的药动学和用药调整

BTK 抑制剂主要由 CYP3A 酶代谢, 因此合用 CYP3A 抑制 / 诱导药物会改变 BTK 抑制剂在患者体内的药动学, 在使用 CYP3A 抑制剂 / 诱导剂时需格外注意。

de Zwart 等^[20]发现当合用强 CYP3A 抑制剂酮康唑时, 会使健康受试者伊布替尼的 AUC 增加 24 倍, 并将这个数据用于预测其他 CYP3A 诱导 / 抑制剂对于伊布替尼的影响, 结果发现, 当与强 CYP3A 诱导剂 (利福平) 合用时, 伊布替尼的暴露量下降了约 90%, 与中效 CYP3A 诱导剂 (依法韦仑) 合用时 $C_{\max}$ 与 AUC 分别下降了约 58% 和 60%, 与轻效 CYP3A 抑制剂 (氟伏沙明) 合用时, $C_{\max}$ 与 AUC 分别增加了 2.0 倍和 1.9 倍^[20]。因此, 合用轻效 CYP3A 抑制剂时, 不需要对伊布替尼的剂量进行调整, 而对于中效 CYP3A 抑制剂, 伊布替尼的推荐剂量为 $280 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$, 并避免强效 CYP3A 抑制剂合并用药^[7]。Zhou 等^[21]开发的模型预测显示, 阿卡替尼与中效 CYP3A 抑制剂合用时, 阿卡替尼的 AUC 增加 2 ~ 3 倍, 与强 CYP3A 抑制剂 (伊曲康唑) 合用时, 阿卡替尼的 $C_{\max}$ 与 AUC 分别增加了 3.9 和 5.1 倍, 而与利福平合用时, 阿卡替尼的 $C_{\max}$ 与 AUC 分别降低了 68% 和 77%。因此, 当阿卡替尼与中效 CYP3A 抑制剂合用时, 需要减量使用 (100 mg qd), 且应避免与强效 CYP3A 抑制剂合用^[5]。在 Mu 等^[22]的研究中, 利福平可使泽布替尼的 $C_{\max}$ 与 AUC 分别降低 92% 和 93%, 伊曲康唑则可使泽布替尼的 $C_{\max}$ 与 AUC 分别增加 2.6 和 3.8 倍。在与中效 CYP3A 抑制剂合用时, 泽布替尼的暴露量增加约 1.5 倍^[14]。因此, 在与中效 CYP3A 抑制剂合用时, 泽布替尼需减量使用 (80 mg bid), 与强效 CYP3A 抑制剂联用时, 泽布替尼的推荐剂量为 80 mg qd ^[6]。奥布替尼尚未开展药物相互作用的临床研究。所有 BTK 抑制剂都应避免与强效 CYP3A 诱导剂合用并且在与 CYP3A 抑制剂 / 诱导剂合用时都应进行 TDM 及不良反应的监测。

3 BTK 抑制剂血药浓度与疗效和不良反应

BTK 抑制剂与以往治疗相比显著提高了患者的客观缓解率、延长了患者的无进展生存期, 尤其是对于不能耐受化疗的老年人群, BTK 抑制剂的出现为其治疗提供了新的可能^[23]。通常认为, 血药浓度与疗效和不良反应息息相关, 大部分药物在调整治疗方案时常常以血药浓度作为参考指标之一。

在治疗 CLL/SLL 患者时, 更高剂量的伊布替

尼与更高的无进展生存率相关^[24]。在 Gallais 等^[25]的研究中, MCL 患者与较低的伊布替尼的暴露量有着明显相关的趋势。通常认为更高的药物浓度与不良反应的发生相关, BTK 抑制剂也不例外, 因不良反应而中断治疗与较高的药物暴露浓度仍呈现出显著的相关性^[25]。因不良反应停药是患者中断伊布替尼治疗的主要原因 (50.1%)^[26]。在治疗的第一年停止伊布替尼治疗会降低患者总体生存率和无进展生存率, 因此, 减少不良反应的发生成为影响患者获益的重要因素^[27]。

相比于第一代 BTK 抑制剂, 以推荐剂量服用第二代 BTK 抑制剂时, 疗效和不良反应与血药浓度之间的关系并不显著。在一项针对阿卡替尼的 I、II 和 III 期临床试验发现, 血药浓度和疗效、不良反应并未显示出显著的相关性^[28]。Ou 等^[29]对泽布替尼暴露 - 疗效的研究 (纳入一项 I 期和一项 II 期临床研究) 表明, 在以推荐剂量给药时, 暴露量与疗效并未呈现显著的相关性, 但无应答患者的中位药物暴露量低于有应答者。

在对第一代 BTK 抑制剂的研究中, 血药浓度与疗效和不良反应均显示出了相关的趋势或者相关性, 保证较高的 BTK 抑制剂的血药浓度可能更有利于疾病的治疗, 但也增加了不良反应发生的风险。在目前的研究中, BTK 抑制剂的耐受剂量尚不明确, 对患者进行 TDM 能够建立更为完整的量效关系, 可能有助于指导临床给药。

4 BTK 抑制剂与基因多态性

BTK 抑制剂主要由 CYP3A 酶进行代谢, 因此 CYP3A 的基因型会对 BTK 抑制剂的药动学产生影响。研究发现, 携带 CYP3A4*22 患者的伊布替尼的血药浓度显著高于其他携带基因型的患者 ($P < 0.05$)^[25]。体外实验显示, CYP3A4 的不同变异株会影响阿卡替尼的药动学, CYP3A4.11 的清除率是 CYP3A4.1 的 5.95 倍, 而 CYP3A4.9、14、16、19、23、24、28、32 变异株会使阿卡替尼的清除率明显降低^[17]。

在近几年围绕 WM 进行的研究中发现, MYD88、CXCR4 的基因型与 BTK 抑制剂的疗效呈现出明显的相关性。伊布替尼在治疗携带 MYD88WT 或 MYD88L265P 基因型的患者时, 无进展生存期短, 携带 MYD88WT 的患者的无进展生存期仅为 0.4 年, 因此伊布替尼一般不作为治疗携带此基因型患者的首选药物, 建议使用其他 BTK 抑制剂进行治疗^[30]。BTK 抑制剂与基因多态性之间的关系见表 2。

患者的基因型可能会对药物的代谢等产生影响, 且与临床疗效息息相关。在制订给药方案时

表 2 BTK 抑制剂与基因多态性之间的关系

Tab 2 Genes associated with the BTK inhibitors

BTK 抑制剂	相关基因	相关疾病	结论	文献
伊布替尼	<i>CYP3A4</i>	CLL	携带 <i>CYP3A4*22</i> 基因型患者的血药浓度较高	[25]
	<i>CXCR4</i> 、 <i>MYD88</i>	WM	对携带 <i>CXCR4WHIM</i> 和 <i>MYD88L265P</i> 或 <i>MYD88WT</i> 的患者疗效较差	[31]
	<i>CXCR4</i>	WM	无义突变的患者具有更低的主要反应率和更短的无进展生存期	[32]
	<i>CYP2D6</i>	CLL	<i>CYP2D6</i> 的基因多态性可能与不良反应的发生有关	[12]
阿卡替尼	<i>CYP3A4</i>	/	<i>CYP3A4.11</i> 的清除率是 <i>CYP3A4.1</i> 的 5.95 倍, 而 <i>CYP3A4.9</i> 、 <i>14</i> 、 <i>16</i> 、 <i>19</i> 、 <i>23</i> 、 <i>24</i> 、 <i>28</i> 、 <i>32</i> 变异株会使对阿卡替尼的清除率明显降低	[17]
	<i>CYP3A5</i>	CLL	<i>CYP3A5</i> 代谢不良型的血浆药物水平较高	[33]
泽布替尼	<i>CXCR4</i> 、 <i>MYD88</i>	WM	对携带 <i>MYD88L265P</i> 或有或无 <i>CXCR4WHIM</i> 突变的患者的主要缓解率更高, 对携带 <i>MYD88WT</i> 的患者有更加深层的应答	[34]

可以根据患者基因型对治疗药物进行初步的判断和选择, 在获得良好治疗结果的同时尽量降低不良反应发生的风险, 提高患者的用药依从性。

5 展望

随着医学的不断进步, 抗肿瘤治疗逐渐由化学免疫疗法向靶向治疗转变, 高效的靶向药物的出现给患者带来了新的希望。如何个体化用药是药学研究者在临床中需要不断研究的课题, 大部分的靶向药物的个体化给药仅限于通过基因型的检测指导药物的选择, 而尚未对患者实施 TDM。目前越来越多的研究表明, 开展靶向药物的 TDM, 不仅有助于准确调整给药剂量, 提高治疗的有效率、减轻严重不良反应的发生率, 还能够提高患者的依从性。

以往研究表明, 第一代 BTK 抑制剂伊布替尼的不良反应与药物浓度显著相关, 这提示或许可以借助血药浓度监测不良反应, 以减少因不良反应而停药事件的发生。研究显示第二代 BTK 抑制剂的疗效和不良反应与暴露量无明显相关性, 但有应答的人群中位暴露量仍明显高于无应答人群^[29]。同时 BTK 抑制剂的疗效和不良反应与患者的基因型也存在一定的关联, 因此对患者进行基因检测或许有助于临床治疗药物的选择。根据报道, 老年人为 MCL、CLL/SLL 和 WM 的好发人群, 且老年人群属于发生不良反应 (主要是出血事件) 的高风险人群, 具有较高的个体间变异性, 因此对此类人群进行 TDM 可能更有助于临床获益^[7, 35-37]。虽然目前批准的第二代 BTK 抑制剂具有较高的选择性, 显著延长了患者的生存期、减少了不良反应的发生, 但是目前的研究尚不完善, 仍存在许多问题, 如治疗窗尚不明确、疗效与毒性的影响因素未知等。因此, 在临床应用中对于 BTK 抑制剂仍需谨慎使用, 还需要更多的研究对影响 BTK 抑制剂疗效与不良反应的相关因素进行探索, 从而制订更加合理的给药方案, 以保证用药的有效性、安全性和经济性。

参考文献

- [1] Crawford JJ, Johnson AR, Misner DL, et al. Discovery of GDC-0853: a potent, selective, and noncovalent Bruton's tyrosine kinase inhibitor in early clinical development [J]. *J Med Chem*, 2018, 61 (6): 2227-2245.
- [2] Brullo C, Villa C, Tasso B, et al. BTK inhibitors: a medicinal chemistry and drug delivery perspective [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (14): 7641.
- [3] Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107 (29): 13075-13080.
- [4] 中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会, 中华医学会血液学分会, 中国慢性淋巴细胞白血病工作组. 中国慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤的诊断与治疗指南 (2022 年版) [J]. *中华血液学杂志*, 2022, 43 (5): 353-358.
- [5] Astrazeneca. Calquence® (Acalabrutinib) capsules, for oral use. [DB/OL]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/210259s006s0071b1.pdf. 2019-11/2022-06-26.
- [6] Beigene. Brukinsa® (Zanubrutinib) capsules, for oral use. [DB/OL]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/213217s0051b1.pdf. 2021-09/2022-06-26.
- [7] Pharmacoclytics Inc. Imbruvica® (Ibrutinib) capsules, for oral use. [DB/OL]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/205552s033210563s0101b1.pdf. 2020-12/2022-06-26.
- [8] 中国临床肿瘤学会 (CSCO) 淋巴瘤专家委员会. 奥布替尼治疗 B 细胞淋巴瘤中国专家推荐临床应用指导原则 (2021 年版) [J]. *白血病·淋巴瘤*, 2021, 30 (8): 455-460.
- [9] de Jong J, Skee D, Hellemans P, et al. Single-dose pharmacokinetics of ibrutinib in subjects with varying degrees of hepatic impairment [J]. *Leuk Lymphoma*, 2017, 58 (1): 185-194.
- [10] Xu Y, Izumi R, Nguyen H, et al. Evaluation of the pharmacokinetics and safety of a single dose of acalabrutinib in subjects with hepatic impairment [J]. *J Clin Pharmacol*, 2022, 62 (6): 812-822.

- [11] Ou YC, Preston RA, Marbury TC, et al. A phase 1, open-label, single-dose study of the pharmacokinetics of zanubrutinib in subjects with varying degrees of hepatic impairment [J]. *Leuk Lymphoma*, 2020, 61 (6): 1355-1363.
- [12] Ou YC, Liu L, Tariq B, et al. Population pharmacokinetic analysis of the BTK inhibitor zanubrutinib in healthy volunteers and patients with B-cell malignancies [J]. *Clin Transl Sci*, 2021, 14 (2): 764-772.
- [13] Schwenger E, Reddy VP, Moorthy G, et al. Harnessing meta-analysis to refine an oncology patient population for physiology-based pharmacokinetic modeling of drugs [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2018, 103 (2): 271-820.
- [14] Tam CS, Ou YC, Trotman J, et al. Clinical pharmacology and PK/PD translation of the second-generation Bruton's tyrosine kinase inhibitor, zanubrutinib [J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2021, 14 (11): 1329-1344.
- [15] Tam CS, Trotman J, Opat S, et al. Phase 1 study of the selective BTK inhibitor zanubrutinib in B-cell malignancies and safety and efficacy evaluation in CLL [J]. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 2019, 134 (11): 851-859.
- [16] Lindup W, Orme M. Clinical pharmacology: plasma protein binding of drugs [J]. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1981, 282 (6259): 212.
- [17] Han M, Qian J, Ye Z, et al. Functional assessment of the effects of CYP3A4 variants on acalabrutinib metabolism in vitro [J]. *Chem Biol Interact*, 2021, 345: 109559.
- [18] Al Ghazawi M, Saleh MI, Najib O, et al. Population pharmacokinetics of ibrutinib in healthy adults [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2021, 46 (3): 405-413.
- [19] Harrison LI, Gibaldi M. Influence of cholestasis on drug elimination: pharmacokinetics [J]. *J Pharm Sci*, 1976, 65 (9): 1346-1348.
- [20] de Zwart L, Snoeys J, de Jong J, et al. Ibrutinib dosing strategies based on interaction potential of CYP3A4 perpetrators using physiologically based pharmacokinetic modeling [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2016, 100 (5): 548-557.
- [21] Zhou D, Podoll T, Xu Y, et al. Evaluation of the drug-drug interaction potential of acalabrutinib and its active metabolite, ACP-5862, using a physiologically-based pharmacokinetic modeling approach [J]. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, 2019, 8 (7): 489-499.
- [22] Mu S, Tang Z, Novotny W, et al. Effect of rifampin and itraconazole on the pharmacokinetics of zanubrutinib (a Bruton's tyrosine kinase inhibitor) in Asian and non-Asian healthy subjects [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2020, 85 (2): 391-399.
- [23] Stauder R, Eichhorst B, Hamaker ME, et al. Management of chronic lymphocytic leukemia (CLL) in the elderly: a position paper from an international society of geriatric oncology (SIOG) task force [J]. *Ann Oncol*, 2017, 28 (2): 218-227.
- [24] Barr PM, Brown JR, Hillmen P, et al. Impact of ibrutinib dose adherence on therapeutic efficacy in patients with previously treated CLL/SLL [J]. *Blood*, 2017, 129 (19): 2612-2615.
- [25] Gallais F, Ysebaert L, Despas F, et al. Population pharmacokinetics of ibrutinib and its dihydrodiol metabolite in patients with lymphoid malignancies [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2020, 59 (9): 1171-1183.
- [26] Mato AR, Nabhan C, Thompson MC, et al. Toxicities and outcomes of 616 ibrutinib-treated patients in the United States: a real-world analysis [J]. *Haematologica*, 2018, 103 (5): 874-879.
- [27] Hardy AC, Pinotti R, Gabrilove J. Ibrutinib dose modifications in the management of CLL [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13 (1): 66.
- [28] Edlund H, Buil BN, Vishwanathan K, et al. Exposure-response analysis of acalabrutinib and its active metabolite, ACP-5862, in patients with B-cell malignancies [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2022, 88 (5): 2284-2296.
- [29] Ou Y, Wang K, Liu L, et al. Exposure-Response relationship of the Bruton's tyrosine kinase inhibitor, zanubrutinib (BGB-3111) in patients with hematologic malignancies [J]. *Blood*, 2019, 134 (Supplement_1): 5063.
- [30] Treon SP, Meid K, Gustine J, et al. Long-term follow-up of ibrutinib monotherapy in symptomatic, previously treated patients with Waldenström macroglobulinemia [J]. *J Clin Oncol*, 2021, 39 (6): 565-575.
- [31] Treon SP, Gustine J, Xu L, et al. MYD88 wild-type waldenstrom macroglobulinaemia: differential diagnosis, risk of histological transformation, and overall survival [J]. *Br J Haematol*, 2018, 180 (3): 374-380.
- [32] Castillo JJ, Xu L, Gustine JN, et al. CXCR4 mutation subtypes impact response and survival outcomes in patients with Waldenstrom macroglobulinaemia treated with ibrutinib [J]. *Br J Haematol*, 2019, 187 (3): 356-363.
- [33] Mato AR, Ghosh N, Schuster SJ, et al. Phase 2 study of the safety and efficacy of umbralisib in patients with CLL who are intolerant to BTK or PI3K δ inhibitor therapy [J]. *Blood*, 2021, 137 (20): 2817-2826.
- [34] Trotman J, Opat S, Gottlieb D, et al. Zanubrutinib for the treatment of patients with Waldenström macroglobulinemia: 3 years of follow-up-ScienceDirect [J]. *Blood*, 2020, 136 (18): 2027-2037.
- [35] Berti S, de Caterina AR, Berger RD. Left atrial appendage occlusion as an alternative to anticoagulants in ibrutinib-induced hemorrhagic pericardial effusion [J]. *JACC Case Rep*, 2022, 4 (12): 755-757.
- [36] 易树华, 李剑. 淋巴浆细胞淋巴瘤/华氏巨球蛋白血症诊断与治疗中国专家共识 (2016 年版) [J]. *中华血液学杂志*, 2016, 37 (9): 729-734.
- [37] 易树华, 徐卫. 套细胞淋巴瘤诊断与治疗中国专家共识 (2016 年版) [J]. *中华血液学杂志*, 2016, 37 (9): 735-741.

(收稿日期: 2022-07-02; 修回日期: 2022-09-02)

电化学分析法检测抗坏血酸、多巴胺和尿酸研究进展

夏用恢^{1, 2}, 李广利³, 胡长平^{1*} (1.中南大学湘雅药学院药理学系, 长沙 410078; 2.株洲市食品药品检验所, 湖南 株洲 421011; 3.湖南工业大学生命科学与化学学院, 湖南 株洲 412007)

摘要: 抗坏血酸 (ascorbic acid, AA)、多巴胺 (dopamine, DA) 和尿酸 (uric acid, UA) 分别作为抗氧化剂、神经递质和蛋白质代谢物共存于人体内。体内 AA、DA 和 UA 水平异常可引发多种疾病, 定量检测其水平对相关疾病的预防和诊断具有重要意义。电化学分析法具有成本低、响应快速、使用方便、灵敏度高、选择性好等突出优点, 广泛用于生物活性分子的检测。AA、DA 和 UA 具有高电化学活性, 适合采用电化学分析法进行测定。然而, 它们的氧化峰电位非常相近, 在电化学检测中容易产生重叠峰, 从而干扰检测结果。针对这一问题, 国内外学者通过发展不同的电极材料以提升检测的选择性和灵敏度。本综述总结了近年来电化学单独或同时检测 UA、DA 和 AA 的研究进展。

关键词: 电化学检测; 抗坏血酸; 多巴胺; 尿酸

中图分类号: R446.112, O657.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2022)12-2869-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.027

Research progress in electrochemical detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid

XIA Yong-hui^{1, 2}, LI Guang-li³, HU Chang-ping^{1*} (1. Department of Pharmacology, Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410078; 2. Zhuzhou Institute for Food and Drug Control, Zhuzhou Hunan 412011; 3. College of Life Sciences and Chemistry, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007)

Abstract: Ascorbic acid (AA), dopamine (DA) and uric acid (UA) coexist in the human body as antioxidants, neurotransmitters and protein metabolites, respectively. Abnormal levels of AA, DA and UA may cause many diseases. Quantitative detection of their levels is important in the prevention and diagnosis of related diseases. Electrochemical detection has low cost, fast response, convenient use, good sensitivity and selectivity, which is widely used in the detection of bioactive molecules. AA, DA and UA have high electrochemical activity, and are suitable for electrochemical analysis. However, their oxidation peak potentials are very similar, so overlapping peaks are easily generated in the electrochemical detection, thus interfering the detection results. To solve this problem, domestic and foreign scholars have developed different electrode materials to improve the selectivity and sensitivity. This review summarized recent advances in the individual or simultaneous determination of UA, DA and AA by electrochemistry.

Key words: electrochemical detection; ascorbic acid; dopamine; uric acid

电化学传感器具有成本低、响应快速、使用方便、灵敏度高、选择性好等突出优点^[1], 广泛用于生物活性分子、食品添加剂、环境污染物等的检测。不同的电活性生物分子氧化电位或还原

电位不同, 因此, 电化学传感器能用于这些分子氧化还原反应的电位测定。而且, 由于电化学传感器具有较低的检测限 (limit of detection, LOD), 电化学分析法被广泛用于生理液体中微

基金项目: 湖南省自然科学基金科药联合项目 (No. 2022JJ80123)。

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

量分析物的检测。

人体内抗坏血酸 (ascorbic acid, AA)、多巴胺 (dopamine, DA) 和尿酸 (uric acid, UA) 水平异常可能引发肾损伤、坏血病、失眠等疾病。AA、DA 和 UA 均具有高的电化学活性 (见图 1), 非常适合电化学检测, 研究人员成功开发了各种各样的电化学传感器对它们进行定量分析。然而它们的电化学性质非常相似, 电化学检测过程中可能形成多个异构体产物, 而且它们的氧化峰电位经常重叠^[2], 单独识别并准确测定它们的水平变得非常复杂。本综述系统总结近年来电化学单独或同时检测 AA、DA 与 UA 的研究进展, 重点分析了碳纳米材料、金属纳米材料、导电聚合物等电极修饰材料对 AA、DA 与 UA 的检测性能。

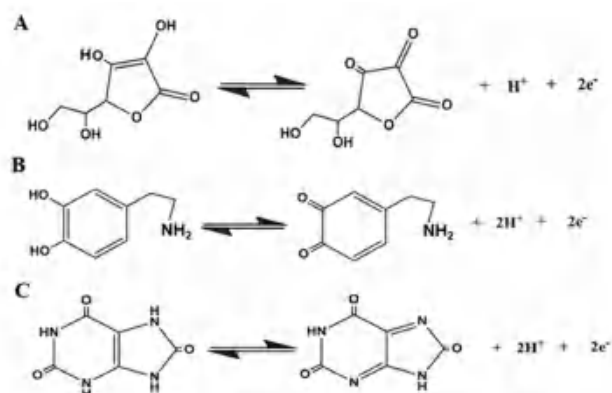


图 1 AA (A)、DA (B) 和 UA (C) 的氧化还原反应

Fig 1 Redox reaction of AA (A), DA (B) and UA (C)

1 电化学单独检测 AA、DA 和 UA

1.1 单独检测 AA

人体中高水平的氧化性分子可能损害人体细胞, 进而引发癌症、心脏病、肌肉退化等严重疾病^[3]。此外, 在阳光下过度暴露也会导致人体皮肤细胞氧化并产生自由基。故人体需要抗氧化剂中和自由基阻止细胞氧化链反应。AA 是一种常见的抗氧化剂, 天然存在于蔬菜产品中, 也存在于橙子、柠檬、葡萄柚、酸橙等柑橘类水果中, 因此检测 AA 水平对于控制体内 AA 水平至关重要。

Song 等^[5]构建了金纳米离子/氧化石墨烯复合物 (AuNP/GO) 的电化学传感平台用于临床维生素 C 片和血清中 AA 的检测。AA 的 LOD 和灵敏度分别为 $0.11 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $101.86 \mu\text{A} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-2}$, 灵敏度高。

Puangjan 等^[6]成功开发了对 AA 氧化具有高电催化活性聚苯胺 / MnO_2 - Sb_2O_3 修饰氟掺杂氧化锡 (PANI/ MnO_2 - Sb_2O_3 /FTO) 电极。由于 PANI/ MnO_2 - Sb_2O_3 具有优异的导电性能和更高的表面积, PANI/ MnO_2 - Sb_2O_3 /FTO 具有更高的氧化峰电流, LOD 低

至 $0.062 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。基于硼化镁 / 多壁碳纳米管复合材料 (MgB_2 -MWCNT) 的电化学传感器也能用于 AA 检测^[7], LOD 为 $1.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 灵敏度为 $76.6 \text{ mA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 。Banan 等^[7]发现随着 pH 持续升高, 裸玻碳电极 (GCE) 和修饰电极峰电流均会降低, 这主要是由于 AA 在高 pH 或碱性溶液中不稳定所致^[8]。

1.2 单独检测 DA

DA 是一种重要的神经递质, 在人类的中枢神经系统、情绪控制和激素平衡的功能调节中发挥重要作用^[9]。体内 DA 水平低会导致帕金森病、精神分裂症等神经类系统疾病^[10]。因此, DA 检测对体内激素平衡控制和预防神经类疾病至关重要。

电化学检测 DA 的关键是发展高灵敏、高选择性的材料修饰电极。导电聚合物具有高导电性、低成本、高比表面积等特性, 且氧化态导电聚合物对分析物具有高选择性, 非常适合传感器的构建。聚 3, 4- 乙烯二氧噻吩 (PEDOT)、聚吡咯 (PPy)、聚苯胺 (PANI) 等导电聚合物广泛用于构筑 DA 电化学传感器^[11-13]。Yan 等^[14]报道 Nafion- AgCl @PANI/GCE 修饰电极在 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ AA 共存下测得 DA 的阳极峰电流与 DA 的浓度成正比, 其灵敏度为 $0.49 \mu\text{A} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 。由于氧化石墨烯 (GO) 的基面和边缘上存在大量带负电荷的含氧基团, GO 可以用于电化学聚合或化学聚合导电聚合物的掺杂剂。然而, GO 存在导电性差的缺陷^[15]。将 GO 还原成还原氧化石墨烯 (rGO), 可以获得高电导率、快速电子转移和优异的电化学活性等特性, 从而克服 GO 导电性差的缺陷^[16]。Wang 等^[17]采用 PEDOT 掺杂的 GO 和 PEDOT 掺杂的 rGO 检测 DA。PEDOT/rGO 比 PEDOT/GO 具有更大的表面积和更高的电催化性能。与 PEDOT/GO 相比, PEDOT/rGO 可以提供更高的催化活性并增加 DA 氧化峰电流。近年来, 电化学还原氧化石墨烯 (ErGO) 常与 MnO_2 ^[18]、 Fe_2O_3 ^[19-20]、 ZnO ^[21] 等过渡金属纳米材料复合, 用于电化学测定 DA。此外, 过渡金属氧化物 (如 MnO_2 ^[22]、 Fe_2O_3 ^[23] 等) 与 N-掺杂石墨烯复合材料也可用于电化学检测 DA。

1.3 单独检测 UA

UA 存在于人体尿液、血液等生物体液中。UA 是一种蛋白质代谢物, 大量存在于某些食物中, 由于人体没有任何酶分解 UA, UA 富集会给人健康造成危害, 关节中形成 UA 结晶会引起疼痛的炎症反应, 进而引发痛风^[24]。总之, 体内 UA 水平异常会引发高血压、代谢综合征、肾损伤等疾病^[25]。因此, 检测体内 UA 水平对预防这

些疾病具有重要意义。

石墨烯是一种新型二维碳材料,具有机械强度高、表面积大、导电性能优异和原料低廉等优势^[26-27]。Du等^[28]利用石墨烯修饰碳纤维电极(GE/CFE)开发了一种简便、低成本的UA电化学传感器。他们发现石墨烯修饰检测UA性能优异,具有选择性好、灵敏度高、线性范围宽、制造成本低、简单易用等优点^[28],线性范围为 $0.194 \sim 49.68 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, LOD为 $0.132 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Wu等^[29]发展了树突状 CeO_2/rGO 复合修饰玻碳电极,成功实现了血清样品中UA的检测,灵敏度高,线性范围为 $0.1 \sim 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,

LOD为 $13.2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Batumalay等^[30]成功构建了基于塑料光纤(POF)的UA电化学传感器平台。 ZnO 修饰锥形POF检测UA的灵敏度和LOD分别为 $0.0025 \text{ mV} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 和 $5.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。未修饰 ZnO 的POF检测UA的灵敏度和LOD则分别为 $0.0009 \text{ mV} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 和 $18.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2 电化学同时检测 AA、DA 和 UA

AA、DA和UA通常共存于人体内,它们具有非常相近的氧化还原电位($0.2 \sim 0.4 \text{ V}$)。近年来,国内外研究者开发了多种电极修饰材料实现了AA、DA与UA的同时检测,本文对其进行汇总,详见表1。

表1 电化学传感器同时检测 UA、DA 和 AA 同时检测性能对比

Tab 1 Performance of electrochemical sensors for simultaneous detection of UA, DA, and AA

修饰电极	LOD/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)			线性范围/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)			文献
	AA	DA	UA	AA	DA	UA	
Pt/GE	0.15	0.03	0.05	$0.15 \sim 34.4$	$0.03 \sim 8.1$	$0.05 \sim 11$	[31]
MNC	0.01	0.001	0.01	$1 \sim 700$	$0.001 \sim 30$	$0.01 \sim 80$	[32]
NrGO/GCE	9.6	0.1	0.2	$100 \sim 4000$	$1 \sim 60$	$1 \sim 30$	[33]
3D-KSC/CCSBP	660	4.6	150	$1980 \sim 6000$	$14.1 \sim 100$	$450 \sim 1200$	[34]
MWCNT/Poly-VA	3.5	4.5	1.5	$5 \sim 120$	$5 \sim 120$	$5 \sim 120$	[35]
SPGNE	0.95	0.12	0.20	$4.0 \sim 4500$	$0.5 \sim 2000$	$0.8 \sim 2500$	[36]
PCF	2.90	0.04	0.03	$10 \sim 570$	$0.1 \sim 9.8$	$0.1 \sim 9.8$	[37]
PANI/rGO	20	0.5	0.2	$25 \sim 200$	$2 \sim 18$	$2 \sim 18$	[38]
Au@Pd-rGO	0.28	0.02	0.02	$1 \sim 800$	$0.1 \sim 100$	$0.1 \sim 350$	[39]
rGO	0.7	0.1	1.0	$0.7 \sim 100$	$0.1 \sim 400$	$2 \sim 600$	[40]
rGO/ZnO	3.71	1.08	0.33	$50 \sim 2350$	$3 \sim 330$	$1 \sim 70$	[41]
Pd/CNFs	15	0.2	0.7	$0.05 \sim 4$	$0.5 \sim 160$	$2 \sim 200$	[42]
CTAB/rGO/ZnS	30	0.5	0.4	$50 \sim 1000$	$1.0 \sim 500$	$1.0 \sim 500$	[43]
NG	2.2	0.25	0.04	$5 \sim 1300$	$0.5 \sim 170$	$0.1 \sim 20$	[44]
MWCNT-FeNAZ-CH	1.11	1.05	0.03	$7.77 \sim 833$	$7.35 \sim 833$	$0.2 \sim 83.3$	[45]
GO-PAN	50	0.5	1	$150 \sim 1050$	$1 \sim 14$	$3 \sim 26$	[46]
HCNTs	0.92	0.8	1.5	$7.5 \sim 180$	$2.5 \sim 105$	$6.7 \sim 65$	[47]
PSFM	0.006	0.08	0.1	$0.5 \sim 1300$	$0.05 \sim 470$	$0.2 \sim 100$	[48]
Ag-PLV	3.0	0.08	0.08	$10 \sim 1000$	$0.5 \sim 10$	$0.3 \sim 10$	[49]
AuNPs- β -CD-GR	10	0.15	0.21	$30 \sim 2000$	$0.5 \sim 150$	$0.5 \sim 60$	[50]
CNT NiNC	2.0	0.1	0.4	$1 \sim 45$	$0.3 \sim 7.0$	$1 \sim 45$	[51]
NiHCF/PDAN	0.04	0.03	0.04	$600 \sim 1000$	$600 \sim 1000$	$600 \sim 1000$	[52]
Au/rGO	53	1.4	1.8	$240 \sim 1500$	$6.8 \sim 41$	$8.8 \sim 53$	[53]
rGO-Ag/PANI	0.5	0.2	0.2	$20 \sim 50$	$5 \sim 200$	$20 \sim 350$	[54]
LaCoO ₃	—	3.53	—	$0.5 \sim 5$	$5 \sim 50$	$0.5 \sim 5$	[55]
CNF-CPE	2.0	0.04	0.2	$2 \sim 64$	$0.04 \sim 5.6$	$0.8 \sim 16.8$	[56]
CDDA	1.43	0.29	0.02	$5 \sim 240$	$5 \sim 280$	$0.1 \sim 18$	[57]
Nafion/AuNPs/AzA/MWCNTs	6.0	0.01	0.03	$300 \sim 10000$	$0.5 \sim 50$	$0.5 \sim 50$	[58]
Fe ₃ O ₄ /rGO	20	0.08	0.5	$160 \sim 7227$	$0.4 \sim 160$	$20 \sim 212$	[59]
rGO/AuNPs	5.7	0.69	2.2	$0.01 \sim 1$	$0.1 \sim 100$	$0.1 \sim 100$	[60]
Poly-DY/GCE	0.02	0.004	0.05	$15 \sim 80$	$0.035 \sim 2.5$	$0.2 \sim 2.7$	[61]
HNP-PtTi	17.5	2.8	5.7	$200 \sim 1000$	$4 \sim 500$	$100 \sim 1000$	[62]
AuNPs/P(PDA)-GO	1.76	0.02	0.16	$6 \sim 2400$	$0.05 \sim 100$	$0.5 \sim 150$	[63]
PdAu/rGO	12.5	2.5	0.75	$12.5 \sim 700$	$2.5 \sim 66.3$	$1.25 \sim 73.8$	[64]
MoS ₂ /PEDOT	5.83	0.52	0.95	$20 \sim 140$	$1 \sim 80$	$2 \sim 25$	[65]

2.1 碳纳米材料

Joshi 等^[32]制备了富氮介孔碳材料 (MNC), 在 pH 6 条件下成功实现了 DA、AA 和 UA 的同时检测 (见图 2)。MNC 修饰电极对 DA、AA 和 UA 的氧化表现出出色的催化活性, 它们的氧化峰电流相对于未修饰电极显著增大。DA、AA 与 UA 分别在 276、47 和 395 mV 处出现明显的氧化峰。MNC 具有石墨特性和介孔结构, N 附着在其边缘基面上^[66]。MNC 主要用作 DA、AA 和 UA 氧化的电活性表面, 其高表面积增加了电子转移速率, 并显著降低了传感性能^[32]。MNC 对 DA、AA 和 UA 氧化具有高的灵敏度, LOD 分别为 0.001、0.01 和 0.01 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 回收率为 98% ~ 105%。Zhang 等^[33]通过热解聚 (对苯二胺) 和 rGO 复合物制得氮掺杂石墨烯 (NrGO), NrGO 在同时检测 DA、AA 和 UA 时表现出优异的传感性能, LOD 分别为 0.1、9.6 和 0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Peng 等^[34]发展了一种基于垂直碳纳米片/三维多孔碳复合材料的电化学传感器, 同时检测 DA、AA 和 UA 的 LOD 分别为 4.6、660、150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Stankovich 等^[26]以原位产生的香草酸高分子功能化多壁碳纳米管为传感材料, 成功实现了 AA、DA 和 UA 的同时检测 (在 5 ~ 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内), 且它们的 LOD 分别为 3.5、4.5 和 1.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

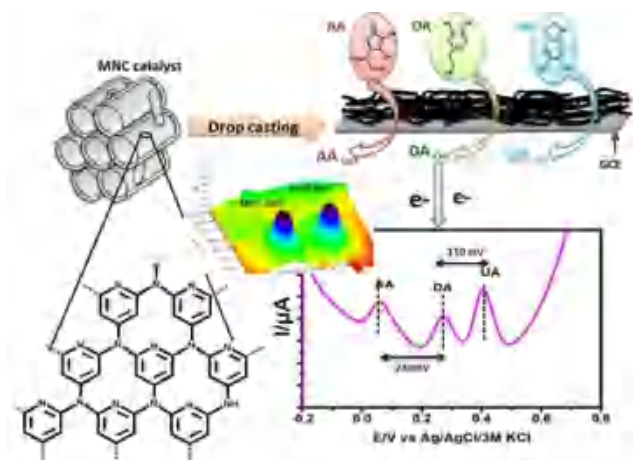


图 2 MNC 复合修饰电极同时检测 AA、DA 和 UA

Fig 2 Schematic representation of MNC sensor for simultaneous detection of AA, DA and UA

石墨烯及其衍生物如 GO、rGO 作为传感材料广泛用于电化学同时检测 AA、DA 和 UA 研究。特别是 rGO, 它能够和各种材料复合, 显著提高电化学检测 AA、DA 和 UA 的分析性能。清华大学李景虹课题组在构建基于 rGO 的电化学传感器方面做出了开创性工作, 并对电化学检测 AA 和 DA 的机制给出了可能的解释。他们利用

Hummers 和 Offeman 法制备了 GO, 然后通过水合肼还原得到 rGO, 成功用于选择性测定 DA^[67], 即在过量 AA 存在下, 修饰电极仍然能选择性检测 DA, 而不受 AA 的干扰。他们认为石墨烯对 DA 和 AA 的区分效应可能原因是 DA 的芳香结构和石墨烯的二维平面六角碳结构之间的 π - π 相互作用促进了电子迁移, 而 AA 和石墨烯的作用弱, 其氧化受到抑制。董绍俊等^[68]制备了化学还原氧化石墨烯 (CR-GO), 构建了检测多种目标物分子的多功能电化学传感平台。其中, 与裸电极相比, CR-GO 修饰电极能够明显降低 AA、DA 和 UA 的电化学氧化过电位, 显著提高法拉第电流, 表明 CR-GO 有利于促进电子在传感界面的转移。

2.2 金属纳米材料

金属纳米粒子 (MNPs) 具有优异的理化性质, 在电分析领域引起了研究人员的广泛兴趣。MNPs 通常对电极表面惰性化合物或缓慢的电化学还原过程具有良好的电催化活性, 其快速的氧化还原活性、相互之间干扰小, 已成为同时检测 AA、DA 和 UA 的理想材料之一。有研究者基于负载钯的碳纤维 (Pd/CNFs)^[42]、多级纳孔 PtTi 合金 (HNP-PtTi)^[62]、铂/石墨烯 (Pt/GE)^[31] 等金属基电化学传感器平台, 在 pH 7 (0.1 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ PBS) 中同时检测了 AA、DA 与 UA。DPV 结果表明, AA、DA、UA 在 Pd/CNFs 上响应峰电流较高, 且它们之间的氧化峰相互分离, UA-DA 峰间距 ($\Delta E_{\text{UA-DA}}$) 和 DA-AA 峰间距 ($\Delta E_{\text{DA-AA}}$) 为 148 和 244 mV^[42]。AA、DA 和 UA 的线性响应范围分别为 0.05 ~ 4、0.5 ~ 160 和 2 ~ 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 相应的 LOD 分别为 15、0.2 和 0.7 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Zhao 等^[62]将 HNP-PtTi 对 AA、DA 与 UA 高的电化学活性归结为多级纳孔结构 Ti 和 Pt 间的协同作用, 从而有效活化了这些分子的羟基基团并加速这些分子在 HNP-PtTi 表面的电荷转移速率。HNP-PtTi 的协同效应使得 AA、DA 和 UA 的 LOD 相对较低, 分别为 17.5、2.8 和 5.7 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Sun 等^[31]发现 Pt/GE 复合修饰电极对 AA、DA 和 UA 的 LOD 更低, 分别为 0.15、0.03 和 0.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 它们的灵敏度高达 0.3457、0.9695 和 0.4119 $\mu\text{A} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 。实验结果表明, 与 Pd/CNFs 和 HNP-PtTi 相比, 均匀分散的 Pt/GE 是一种更具应用前景的传感材料。

石墨烯/ZnO 和石墨烯/ZnS 复合修饰电极能在 0.1 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ PBS 中同时检测 AA、DA 和 UA。Zhang 等^[41]发现 rGO/ZnO 复合电极同时检测 AA、DA 和 UA, 且它们的氧化峰清晰可辨,

ΔE_{DA-AA} 、 ΔE_{UA-DA} 和 ΔE_{UA-AA} 分别为 236、132 和 368 mV。AA、DA 和 UA 在 1 ~ 70、3 ~ 330 和 50 ~ 2350 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内氧化峰电流随浓度呈线性增加趋势, AA、DA 和 UA 的 LOD 分别为 3.71、1.08 和 0.33 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。rGO/ZnO 的响应峰电流高于单独的 rGO, 这主要是由于 ZnO 增大了 rGO 的比表面积, 加速了这些电活性分子的电子转移速率。Yang 等^[43]发现 CTAB/rGO/ZnS 对 AA、DA 和 UA 具有良好的催化性能, 能有效区分三者的氧化峰, 分别在 0.06、0.21 和 0.30 V 处出现明显的响应峰。AA、DA 和 UA 的 LOD 分别为 30、0.5 和 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

镍基复合物修饰电极也可用于 AA、DA 和 UA 的同时检测。Deng 等^[51]在碳纳米管 (CNT) 中引入耐腐蚀性的镍化合物, 加速了 AA、DA 和 UA 在 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH 6.5) 中的电子转移速率, 它们的 LOD 分别为 2.0、0.1 和 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Hathoot 等^[52]调查了六氰基铁酸镍 / 聚 1, 5-二氨基萘 (NiHCF/PDAN) 在 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 中对 AA、DA 和 UA 的氧化性能, 其复合修饰电极的电化学活性面积约为裸电极的 10.98 倍。嵌入铁氰根配离子离子可以有效增加聚合物的电导率, 进而增强通过薄膜的电荷转移速率。

近年来, 基于金或石墨烯的材料同时检测 AA、DA 与 UA 吸引了国内外学者的兴趣。例如, 基于 Au/rGO 和金纳米粒子 / 聚多巴胺 - 氧化石墨烯 [AuNPs/P (PDA) -GO] 的电化学传感器^[55, 63], 并成功用于 AA、DA 与 UA 的同时检测。Wang 等^[53]认为 Au 纳米结构和 rGO 之间的协同效应可以从两个因素加以解释: rGO 纳米片的收缩促进在 GCE 表面形成一层薄而均匀的薄膜, 为 AuNPs 的成核和生长提供特定的活性位点^[69], 这有利于在 rGO 纳米片表面形成分布均匀的针状金纳米片; 针状 Au 纳米片能显著增大 Au/rGO 比表面积和活性位点, 从而增强对 AA、DA 和 UA 氧化的催化性能; Au/rGO 复合修饰电极同时检测 AA、DA 和 UA 的 LOD 分别为 0.51、1.4 和 1.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[53]。Wang 等^[63]研究表明, 与裸 GCE 相比, AA、DA 和 UA 在 AuNPs/P (PDA) -GO 复合修饰电极上均表现出更高的氧化峰电流和更低的氧化峰电位。此外, 尖锐的响应峰和过电位降低表明 AuNPs/P (PDA) -GO 复合材料增强了 AA、DA 和 UA 的电化学氧化反应。AA、DA 和 UA 的氧化峰电流分别在 6.0 ~ 2400、0.05 ~ 100 和 0.5 ~ 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内随浓度呈线性增加趋势, 其 LOD 分别为 1.764、0.017 和 0.160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。尽管 Au、Pt 等贵金属纳米材料对 AA、DA 和

UA 具有优异的电催化活性, 但传感器制造成本高严重限制了实际应用。

2.3 导电聚合物

导电聚合物具有类似于金属的电学性质, 广泛用于构建 AA、DA 和 UA 电化学传感器。Manivel 等^[38]和 Guo 等^[54]分别合成了聚苯胺 / 氧化石墨烯 (PANI/GO) 和聚苯胺 / Ag / 还原氧化石墨烯 (rGO-Ag/PANI) 复合材料, 并将它们成功用于 AA、DA 和 UA 的同时检测。Manivel 等^[38]研究发现, 在中性溶液中 (pH 7), AA、DA 和 UA 在 PANI/GO 修饰电极的响应峰电流比裸电极高很多。PANI/GO 具有相当高的比表面积, 能有效加速电子传输速率并增强分析物的响应信号。PANI 和 GO 间的强的 π - π 相互作用显著改善了 PANI/GO 纤维的电催化活性^[70]。该电极上, AA、DA 和 UA 分别在 25 ~ 200、2 ~ 18 和 2 ~ 18 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内具有良好的线性响应, LOD 分别为 20、0.5 和 0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Guo 等^[54]研究 rGO-Ag/PANI 对 AA、DA 与 UA 的传感性能。AgNPs 具有优异的催化能力和独特的性能, 在传感领域受到广泛的关注。据报道, 载银碳纳米材料具有协同效应能显著增强电催化性能^[71-72]。AA、DA 与 UA 在 rGO-Ag/PANI 修饰电极上可观察到响应峰电流显著增加, 证实了 rGO、Ag 和 PANI 的协同作用。Zhang 等^[41]发现 ZnO 和 rGO 复合能显著增大电化学活性表面积, 进而提升 AA、DA、UA 的检测灵敏度。AA、DA、UA 在 rGO/ZnO 修饰电极的响应主要是由于 AA 氧化呋喃环上的羟基、DA 中儿茶酚氧化成与邻醌基团, 以及 UA 通过桥接双键产生羟基然后脱水所致。采用类似方法分别制备了 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{rGO}$ ^[59]、PdAu/rGO^[67] 和 rGO/AuNP^[60]。因此, 结合导电聚合物和 rGO 有望实现 AA、DA 与 UA 的氧化峰的有效分离, 获得低的 LOD 和宽的线性范围。此外, $\text{MoS}_2/\text{PEDOT}$ 修饰电极也能很好地分辨这 3 种分析物的氧化峰, AA、DA 和 UA 的 LOD 分别为 5.83、0.52 和 0.95 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[68]。

2.4 稀土材料

近年来, 研究人员发现稀土元素也可作为传感材料实现 AA、DA 和 UA 的同时检测。例如, Priyatharshni 等^[73]利用 ABO₃ 型 LaCoO₃ 钙钛矿材料在 pH 4 中同时测定了 AA、DA 和 UA, LaCoO₃ 修饰电极能有效分离 AA、DA 和 UA 的氧化峰, 对 3 种物质均具有较高的灵敏度, 线性响应范围分别为 0.5 ~ 5、5 ~ 50 和 0.5 ~ 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3 结论与展望

近年来, 电化学测定 AA、DA 和 UA 已经取得了一定的研究进展, 已经开发各种不同的电化

学传感器用于单独或同时检测 AA、DA 和 UA。电极的修饰对改善 AA、DA 和 UA 检测的灵敏度、选择性、长期稳定性、电位分离和 LOD 具有重要作用。在电极表面修饰不同的纳米材料加速电极表面的电子转移,可以增强传感性能。将石墨烯、碳纳米材料、金属纳米材料、导电聚合物等材料复合,利用不同材料的协同效应可以增强传感性能。早期监测和控制体内的 AA、DA 和 UA 的水平进行,对许多疾病的预防和诊断具有重要意义。

单独或同时测定痕量的生物分子(特别是生物标志物)的电化学传感器应具有成本低、使用简便、灵敏度高、选择性好等特点。其中,电化学传感器的选择性是走向实际应用的关键。目前提升同时检测 AA、DA 和 UA 的选择性主要方法是在电极表面修饰能同时与 AA、DA 和 UA 选择性结合的官能团或者离子。

尽管电化学同时检测 AA、DA 和 UA 已取得可喜的研究进展,但目前仍处于实验研究阶段,高通量、高灵敏度、高选择性的在线分析方法仍然尚缺。目前市场上还没有商用的 AA、DA 和 UA 同时检测的电化学传感器产品。患者在家、医师在诊所都能方便使用的 AA、DA 和 UA 同时检测商用电化学传感器对疾病的预防和诊断非常重要。未来将结合低成本、一次性丝网印刷电极技术、便携式电化学设备以及智能终端,开发移动智能、使用友好、性能优异的 AA、DA 和 UA 的电化学传感器,实现居家就能准确监测体内的 AA、DA 和 UA 水平。

参考文献

- [1] Li Q, Wu JT, Liu Y, et al. Recent advances in black phosphorus-based electrochemical sensors: a review [J]. *Anal Chim Acta*, 2021, 1170: 338480.
- [2] Fang A, Ng HT, Li SFH. A high-performance glucose biosensor based on monomolecular layer of glucose oxidase covalently immobilised on indium-tin oxide surface [J]. *Biosens Bioelectron*, 2003, 19 (1): 43-49.
- [3] Jones DP. Redefining oxidative stress [J]. *Antioxid Redox Sign*, 2006, 8 (9-10): 1865-1879.
- [4] Du J, Yue RR, Ren FF, et al. Novel graphene flowers modified carbon fibers for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 53: 220-224.
- [5] Song J, Xu L, Xing RQ, et al. Synthesis of Au/graphene oxide composites for selective and sensitive electrochemical detection of ascorbic acid [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 7515.
- [6] Puangjan A, Chaiyaisith S, Wichitpanya S, et al. Electrochemical sensor based on Pani/MnO₂-Sb₂O₃ nanocomposite for selective simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid and acetylsalicylic acid [J]. *J Electroanal Chem*, 2016, 782: 192-201.
- [7] Banan D, Tan W, Sulaiman Y, et al. Electrochemical oxidation of ascorbic acid using MgB₂-MWCNT modified glassy carbon electrode [J]. *Int J Electrochem Sci*, 2013, 8: 12519-12530.
- [8] Zhang L, Lian JY. Electrochemical synthesis of copolymer of aniline and o-aminophenol and its use to the electrocatalytic oxidation of ascorbic acid [J]. *J Electroanal Chem*, 2007, 611: 51-59.
- [9] Thomas MD. Textbook of biochemistry with clinical correlations [M]. New York: Wiley, 1997.
- [10] Sansuk S, Bitziou E, Joseph MB, et al. Ultrasensitive detection of dopamine using a carbon nanotube network microfluidic flow electrode [J]. *Anal Chem*, 2013, 85 (1): 163-169.
- [11] Zhou X, Ma PP, Wang AQ, et al. Dopamine fluorescent sensors based on polypyrrole/graphene quantum dots core/shell hybrids [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 64: 404-410.
- [12] Hui N, Wang WT, Xu GY, et al. Graphene oxide doped poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) modified with copper nanoparticles for high performance nonenzymatic sensing of glucose [J]. *J Mater Chem B*, 2015, 3 (4): 556-561.
- [13] Manurung RV, Kurniawan ED, Risdian C. The electropolymerization of conductive polymer PPy-PANi on gold electrodes for uric acid biosensor [J]. *Int J Eng Sci*, 2012, 12: 91-94.
- [14] Yan W, Feng XM, Chen XJ, et al. A selective dopamine biosensor based on AgCl@polyaniline core-shell nanocomposites [J]. *Bioelectrochemistry*, 2008, 72 (1): 21-27.
- [15] Choi HJ, Jung SM, Seo JM, et al. Graphene for energy conversion and storage in fuel cells and supercapacitors [J]. *Nano Energy*, 2012, 1: 534-551.
- [16] Compton OC, Nguyen ST. Graphene oxide, highly reduced graphene oxide, and graphene: versatile building blocks for carbon-based materials [J]. *Small*, 2010, 6 (6): 711-723.
- [17] Wang WT, Xu GY, Cui XY, et al. Enhanced catalytic and dopamine sensing properties of electrochemically reduced conducting polymer nanocomposite doped with pure graphene oxide [J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 58: 153-156.
- [18] He QG, Liu J, Liu XP, et al. A promising sensing platform toward dopamine using MnO₂ nanowires/electro-reduced graphene oxide composites [J]. *Electrochim Acta*, 2019, 296: 683-692.
- [19] Liu J, Sun LL, Li GL, et al. Ultrasensitive detection of dopamine via electrochemical route on spindle-like α -Fe₂O₃ mesocrystals/rGO modified GCE [J]. *Mater Res Bull*, 2021, 133: 111050.
- [20] Li GL, Zhong P, Ye YB, et al. A highly sensitive and stable dopamine sensor using shuttle-like α -Fe₂O₃ nanoparticles/electro-reduced graphene oxide composites [J]. *J Electrochem Soc*, 2019, 166 (15): B1552-B1561.
- [21] Li FZ, Ni BB, Zheng YR, et al. A simple and efficient voltammetric sensor for dopamine determination based on ZnO nanorods/electro-reduced graphene oxide composite [J]. *Surf Interfaces*, 2021, 26: 101375.

- [22] Li Q, Xia YH, Wan X, et al. Morphology-dependent MnO₂/nitrogen-doped graphene nanocomposites for simultaneous detection of trace dopamine and uric acid [J]. Mater Sci Eng C, 2020, 109: 110615.
- [23] Liu HM, Xiong RJ, Zhong P, et al. Nanohybrids of shuttle-like α -Fe₂O₃ nanoparticles and nitrogen-doped graphene for simultaneous voltammetric detection of dopamine and uric acid [J]. New J Chem, 2020, 44: 20797-20805.
- [24] Rock KL, Kataoka H, Lai JJ. Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities [J]. Nat Rev Rheumatol, 2013, 9: 13-23.
- [25] Soltani Z, Rasheed K, Kapusta D, et al. Potential role of uric acid in metabolic syndrome, hypertension, kidney injury, and cardiovascular diseases: is it time for reappraisal [J]. Curr Hypertens Rep, 2013, 15 (3): 175-181.
- [26] Stankovich S, Dikin DA, Dommett GHB, et al. Graphene-based composite materials [J]. Nature, 2006, 442 (7100): 282-286.
- [27] Schedin F, Geim AK, Morozov SV, et al. Detection of individual gas molecules adsorbed on graphene [J]. Nat Mater, 2007, 6 (9): 652-655.
- [28] Du J, Yue RR, Yao ZQ, et al. Nonenzymatic uric acid electrochemical sensor based on graphene-modified carbon fiber electrode [J]. Colloid Surf A, 2013, 419: 94-99.
- [29] Wu BW, Xiao LX, Zhang MJ, et al. Facile synthesis of dendritic-like CeO₂/rGO composite and application for detection of uric acid and tryptophan simultaneously [J]. J Solid State Chem, 2021, 296: 122023.
- [30] Batumalay M, Harith Z, Rafaie Ha, et al. Tapered plastic optical fiber coated with ZnO nanostructures for the measurement of uric acid concentrations and changes in relative humidity [J]. Sens Actuators A: Phys, 2014, 210: 190-196.
- [31] Sun CL, Lee HH, Yang JM, et al. The simultaneous electrochemical detection of ascorbic acid, dopamine, and uric acid using graphene/size-selected Pt nanocomposites [J]. Biosens Bioelectron, 2011, 26 (8): 3450-3455.
- [32] Joshi A, Schuhmann WC, Nagaiah T. Mesoporous nitrogen containing carbon materials for the simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid [J]. Sens Actuators B: Chem, 2016, 230 (3): 544-555.
- [33] Zhang HY, Liu S. Electrochemical sensors based on nitrogen-doped reduced graphene oxide for the simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid [J]. J Alloys Compd, 2020, 842: 155873.
- [34] Peng X, Xie Y, Du Y, et al. Simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid based on vertical N-doped carbon nanosheets/three-dimensional porous carbon [J]. J Electroanal Chem, 2022, 904: 115850.
- [35] Da Silva LV, Silva FAS, Kubota LT, et al. Amperometric sensor based on carbon nanotubes and electropolymerized vanillic acid for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid [J]. J Solid State Electrochem, 2016, 20: 2389-2393.
- [36] Ping JF, Wu J, Wang YX, et al. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using high-performance screen-printed graphene electrode [J]. Biosens Bioelectron, 2012, 34 (1): 70-76.
- [37] Hadi M, Rouhollahi A. Simultaneous electrochemical sensing of ascorbic acid, dopamine and uric acid at anodized nanocrystalline graphite-like pyrolytic carbon film electrode [J]. Anal Chim Acta, 2012, 721: 55-60.
- [38] Manivel P, Dhakshnamoorthy M, Balamurugan A, et al. Conducting polyaniline-graphene oxide fibrous nanocomposites: preparation, characterization and simultaneous electrochemical detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid [J]. RSC Adv, 2013, 3: 14428-14437.
- [39] Jiang JJ, Du XZ. Sensitive electrochemical sensors for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid based on Au@Pd-reduced graphene oxide nanocomposites [J]. Nanoscale, 2014, 6 (19): 11303-11309.
- [40] Wang HW, Ren FF, Wang CQ, et al. Simultaneous determination of dopamine, uric acid and ascorbic acid using a glassy carbon electrode modified with reduced graphene oxide [J]. RSC Adv, 2014, 4: 26895-26901.
- [41] Zhang X, Zhang YC, Ma LX. One-pot facile fabrication of graphene-zinc oxide composite and its enhanced sensitivity for simultaneous electrochemical detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid [J]. Sens Actuators B: Chem, 2016, 227: 488-496.
- [42] Huang JS, Liu Y, Hou HQ, et al. Simultaneous electrochemical determination of dopamine, uric acid and ascorbic acid using palladium nanoparticle-loaded carbon nanofibers modified electrode [J]. Biosens Bioelectron, 2008, 24 (4): 632-637.
- [43] Yang YJ. One-pot synthesis of reduced graphene oxide/zinc sulfide nanocomposite at room temperature for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid [J]. Sens Actuators B: Chem, 2015, 221: 750-759.
- [44] Sheng ZH, Zheng XQ, Xu JY, et al. Electrochemical sensor based on nitrogen doped graphene: simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid [J]. Biosens Bioelectron, 2012, 34 (1): 125-131.
- [45] Noroozifar M, Khorasani-Motlagh M, Akbari R, et al. Simultaneous and sensitive determination of a quaternary mixture of AA, DA, UA and Trp using a modified GCE by iron ion-doped natrolite zeolite-multiwall carbon nanotube [J]. Biosens Bioelectron, 2011, 28 (1): 56-63.
- [46] Bao Y, Song JX, Mao Y, et al. Graphene oxide-templated polyaniline microspheres toward simultaneous electrochemical determination of AA/DA/UA [J]. Electroanalysis, 2011, 23: 878-884.
- [47] Cui RJ, Wang XY, Zhang GH, et al. Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid, and uric acid using helical carbon nanotubes modified electrode [J]. Sens Actuators B: Chem, 2012, 161: 1139-1143.
- [48] Ensafi AA, Taei M, Khayamian T, et al. Highly selective determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid by differential pulse voltammetry using poly (Sulfonazo III) modified glassy carbon electrode [J]. Sens Actuators B: Chem, 2010, 147: 213-221.
- [49] Hu W, Sun D, Ma W. Silver doped poly (L-valine) modified glassy carbon electrode for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid [J]. Biosens Bioelectron, 2012, 34 (1): 70-76.

- tion of uric acid, ascorbic acid and dopamine [J]. *Electroanalysis*, 2010, 22: 584-589.
- [50] Tian XQ, Cheng CM, Yuan HY, et al. Simultaneous determination of *L*-ascorbic acid, dopamine and uric acid with gold nanoparticles- β -cyclodextrin-graphene-modified electrode by square wave voltammetry [J]. *Talanta*, 2012, 93: 79-85.
- [51] Deng KQ, Li XF, Huang HW. A glassy carbon electrode modified with a nickel (II) norcorrole complex and carbon nanotubes for simultaneous or individual determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid [J]. *Microchim Acta*, 2016, 183: 2139-2145.
- [52] Hathoot AA, Hassan KM, Essa WA, et al. Simultaneous determination of ascorbic acid, uric acid and dopamine at modified electrode based on hybrid nickel hexacyanoferrate/poly (1, 5-diaminonaphthalene) [J]. *J Iran Chem Soc*, 2017, 14: 1789-1799.
- [53] Wang CQ, Du J, Wang HW, et al. A facile electrochemical sensor based on reduced graphene oxide and Au nanoplates modified glassy carbon electrode for Simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid [J]. *Sens Actuators B: Chem*, 2014, 204: 302-309.
- [54] Guo Z, Luo XK, Li YH, et al. Simultaneous electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid based on reduced graphene oxide-Ag/PANI modified glassy carbon electrode [J]. *Chem Res Chin Univer*, 2017, 33: 507-512.
- [55] Priyatharshni S, Tamilselvan A, Viswanathan C, et al. LaCoO₃ nanostructures modified glassy carbon electrode for simultaneous electrochemical detection of dopamine, ascorbic acid and uric acid [J]. *J Electrochem Soc*, 2017, 164: B152-B158.
- [56] Liu Y, Huang JS, Hou HQ, et al. Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid with electrospun carbon nanofibers modified electrode [J]. *Electrochem Commun*, 2008, 10: 1431-1434.
- [57] Ensafi AA, Taei M, Khayamian T. A differential pulse voltammetric method for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid using poly (3- (5-chloro-2-hydroxyphenylazo) -4, 5-dihydroxynaphthalene-2, 7-disulfonic acid) film modified glassy carbon electrode [J]. *J Electroanal Chem*, 2009, 633: 212-220.
- [58] Filik H, Avan AA, Aydar S. Simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine, uric acid and tryptophan with azure A-interlinked multi-walled carbon nanotube/gold nanoparticles composite modified electrode [J]. *Arab J Chem*, 2016, 9: 471-480.
- [59] Teymourian H, Salimi A, Khezrian S. Fe₃O₄ magnetic nanoparticles/reduced graphene oxide nanosheets as a novel electrochemical and bioelectrochemical sensing platform [J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 49: 1-8.
- [60] Lee CS, Yu SH, Kim TH. One-step electrochemical fabrication of reduced graphene oxide/gold nanoparticles nanocomposite-modified electrode for simultaneous detection of dopamine, ascorbic acid, and uric acid [J]. *Nanomaterials*, 2018, 8 (1): 17.
- [61] Karimi MA, Hatefi-Mehrjardi A, Soleymanzadeh M, et al. Sensitive electrochemical detection of dopamine, uric and ascorbic acids based on poly- (Dianix yellow) film modified electrode [J]. *Int J Electrochem Sci*, 2017, 12: 7089-7102.
- [62] Zhao DY, Yu GL, Tian KL, et al. A highly sensitive and stable electrochemical sensor for simultaneous detection towards ascorbic acid, dopamine, and uric acid based on the hierarchical nanoporous PtTi alloy [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 82: 119-126.
- [63] Aydoğdu Tığ G, Günendi G, Pekyardımcı Ş. A selective sensor based on Au nanoparticles-graphene oxide-poly (2, 6-pyridinedicarboxylic acid) composite for simultaneous electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid [J]. *J Appl Electrochem*, 2017, 47: 607-618.
- [64] Hu YJ, Jin J, Wu P, et al. Graphene-gold nanostructure composites fabricated by electrodeposition and their electrocatalytic activity toward the oxygen reduction and glucose oxidation [J]. *Electrochim Acta*, 2010, 56: 491-500.
- [65] Bai H, Xu YX, Zhao L, et al. Non-covalent functionalization of graphene sheets by sulfonated polyaniline [J]. *Chem Commun*, 2009, doi: 10.1039/b821805f.
- [66] Roy SS, Papakonstantinou P, Okpalugo TIT, et al. Temperature dependent evolution of the local electronic structure of atmospheric plasma treated carbon nanotubes: near edge X-ray absorption fine structure study [J]. *J Appl Phys*, 2006, 100: 053703.
- [67] Wang Y, Li YM, Tang LH, et al. Application of graphene-modified electrode for selective detection of dopamine [J]. *Electrochem Commun*, 2009, 11: 889-892.
- [68] Zhou M, Zhai YM, Dong SJ. Electrochemical sensing and biosensing platform based on chemically reduced graphene oxide [J]. *Anal Chem*, 2009, 81: 5603-5613.
- [69] Wang Y, Zhang S, Chen H, et al. One-pot facile decoration of graphene nanosheets with Ag nanoparticles for electrochemical oxidation of methanol in alkaline solution [J]. *Electrochem Commun*, 2012, 17: 63-66.
- [70] Shanmugharaj AM, Ryu SH. Excellent electrochemical performance of graphene-silver nanoparticle hybrids prepared using a microwave spark assistance process [J]. *Electrochim Acta*, 2012, 74: 207-214.
- [71] Zou CE, Zhong JT, Li SM, et al. Fabrication of reduced graphene oxide-bimetallic PdAu nanocomposites for the electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and rutin [J]. *J Electroanal Chem*, 2017, 805: 110-119.
- [72] Li Y, Lin HC, Peng H, et al. A glassy carbon electrode modified with MoS₂ nanosheets and poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) for simultaneous electrochemical detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid [J]. *Microchim Acta*, 2016, 183: 2517-2523.
- [73] Priyatharshni S, Tamilselvan A, Viawanathan C, et al. LaCoO₃ nanostructures modified glassy carbon electrode for simultaneous electrochemical detection of dopamine, ascorbic acid and uric acid [J]. *J Electrochem Soc*, 2017, 164 (4): B152-B158.

(收稿日期: 2022-06-14; 修回日期: 2022-08-19)

药物分析与检验

HS-GC-MS 结合保留指数法探讨白术麸炒过程中挥发性化学成分的变化规律

王凡一, 高如汐, 郑威, 刘想, 袁楚, 单国顺*, 贾天柱 (辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

摘要: **目的** 对白术和麦麸在麸炒前后的挥发性成分进行分析比较, 解析辅料麦麸对麸炒白术化学成分的影响, 并探讨白术麸炒过程中挥发性化学成分的变化规律。**方法** 采用静态顶空进样-气质联用 (HS-GC-MS) 结合保留指数法对白术和麦麸在麸炒前后的挥发性成分进行定性分析, 再结合主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA), 发现白术和麦麸在炮制前后差异性化学成分。**结果** 从生白术、清炒白术、麸炒白术、生麦麸、清炒麦麸和麸炒白术后的麦麸中分别鉴定出 37、43、37、49、16、44 种, 共 116 种挥发性化学成分, 涵盖烷烃类、烯烃类、醇类、醛酮类、酯类、含杂原子类、酸类以及其他类成分。麸炒后麦麸与麸炒白术共有成分 12 种; 麸炒白术后麦麸的成分有 8 种源自白术, 共新增 32 种成分。**结论** 麦麸可通过吸附作用降低白术的挥发油含量, 从而降低其燥性。麦麸与白术间可发生美拉德反应, 其产物可能增强麸炒白术的健脾作用。

关键词: 白术; 麸炒; 麦麸; 挥发性成分; HS-GC-MS; 保留指数

中图分类号: R283, R284.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2022)12-2877-10
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.028

HS-GC-MS combined with the retention index method in determining the change of volatile components in Rhizoma Atractylodis Macrocephalae stir-fried with bran

WANG Fan-yi, GAO Ru-xi, ZHENG Wei, LIU Xiang, YUAN Chu, SHAN Guo-shun*, JIA Tian-zhu
(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian Liaoning 116600)

Abstract: **Objective** To analyze and compare the volatile components in Rhizoma Atractylodis Macrocephalae and wheat bran before and after the bran frying, and to determine the effect of wheat bran on the chemical components of Rhizoma Atractylodis Macrocephalae stir-fried with bran, and the changes of volatile chemical components in Rhizoma Atractylodis Macrocephalae bran frying. **Methods** The static headspace sampling gas chromatography-mass spectrometry (HS-GC-MS) combined with the retention index method was used for the qualitative analysis of volatile components in Rhizoma Atractylodis Macrocephalae and wheat bran before and after the processing. The differentiation chemical constituents of Rhizoma Atractylodis Macrocephalae and wheat bran before and after the processing were found by principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). **Results** Totally 37, 43, 37, 49, 16, and 44 species of volatile components were identified from the raw Rhizoma Atractylodis Macrocephalae

基金项目: 辽宁省教育厅基本科研项目 (No. LJKMZ20222205, No. LJKMZ20221308); 国家自然科学基金青年基金项目 (No. 81803726); 辽宁省自然科学基金 (No. 20170540596, No. 20180540012); 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室开放基金 (No. zyzx2010); 辽宁中医药大学 2021 年校级课题 (自然科学类)。

作者简介: 王凡一, 女, 硕士, 主要从事中药炮制工艺及质量标准研究, email: 1178501303@qq.com * **通信作者:** 单国顺, 男, 副教授, 主要从事中药炮制工艺及质量标准研究, email: shanguoshun@126.com

(AMR), stir-fried *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae* (FAMR), Stir-fried *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae* with bran (WAMR), wheat bran (WB), fried wheat bran (FWB) and the wheat bran used to stir-fry *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae* (AWB). Totally 116 species of volatile chemical components, including alkanes, alkenes, alcohols, aldehydes, ketones, esters, heteroatomic, aromatic, acid, and others were identified. There were 12 common components in AWB and WAMR. 8 components of AWB were derived from AMR. There were 32 new ingredients in AWB. **Conclusion** Wheat bran can reduce the content of volatile oil in AMR by adsorption and reduce the attribute of dryness. Furthermore, Maillard reaction may occur between wheat bran and *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae*, which products may enhance the spleen function of WAMR.

Key words: *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae*; stir-fry with bran; wheat bran; volatile component; HS-GC-MS; retention index

白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎, 始载于《神农本草经》, 被列为上品, 具有健脾益气、燥湿利水、止汗、安胎等功效^[1]。白术作为中医临床常用的大宗中药, 历代炮制方法众多^[2-3]。但是, 目前仅有麸炒法被 2020 年版《中国药典》收载。然而, 有关白术麸炒前后药效物质基础变化规律的研究尚不深入, 这也使得白术生品、制品的质量控制及临床疗效受到较大影响。因此, 有必要对白术炮制前后的化学成分变化情况进行深入的研究。

事实上, 明代陈嘉谟在《本草蒙筌》中提出“麦麸皮制抑酷性勿伤上膈”的理论。中医传统观点认为, 中药经麸炒能够缓和燥性, 还能借麸入中, 增强和中健脾的作用。现代研究表明, 白术富含挥发油类成分, 倍半萜类成分苍术酮和白术内酯 I、II、III 是其发挥健脾作用的主要成分^[4]。麦麸作为炮制辅料, 能够吸附饮片的挥发油, 令其药性缓和, 降低对胃肠道的刺激性^[5]。因此, 为了探讨麸炒对白术化学成分的影响, 本研究拟采用静态顶空进样-气质联用 (HS-GC-MS) 结合保留指数法对白术和麦麸在麸炒前后的挥发性成分进行分析, 并结合多元统计分析的方法, 确定白术和麦麸在炮制前后的差异性化学成分, 以解析辅料麦麸对麸炒白术化学成分的影响, 并探讨白术麸炒过程中挥发性化学成分的变化规律。

1 材料

7890B 型 GC 气相色谱仪, 5977B 型 MSD 质谱仪和 7697A 型顶空进样器 (美国 Agilent 公司); FA1004B 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司)。

C7 ~ C30 饱和烷烃 (美国 Sigma 公司, 批号: 49451-U)。白术 (四川新荷花中药饮片有限公司、安徽惠丰国药有限公司、亳州市大西北药业有限责任公司、湖北圣草堂中药材有限公

司、湖北天济中药饮片有限公司、陕西中天中药材科技有限公司、西安盛兴中药饮片公司、四川同创康能药业有限公司、北京康美制药有限公司和安国市康德瑞琪商贸有限公司, 批号分别为 2021023、21090101、20210223、20210923、20211514、21080106、20211019、20210702、210360701、20211012) 和麦麸 (河北石家庄绿湾农副产品有限公司、石家庄龙运农业科技有限公司、临朐县永多饲料厂、山东宏远生物科技有限公司和郑州牧之森商贸有限公司), 经辽宁中医药大学许亮教授鉴定其分别为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎以及禾本科植物小麦 *Triticum aestivum* L. 的干燥种皮。

2 方法

2.1 样品制备^[6-7]

麸炒白术: 称取大小均等的白术饮片 100 g, 将锅预热至撒入麦麸即刻烟起, 均匀撒入麦麸, “顶烟上”投入白术饮片, 迅速拌炒至饮片表面黄棕色, 有焦香气逸出时, 取出, 分离麸皮及饮片, 放凉。每 100 kg 白术片, 用麦麸皮 10 kg。

清炒白术: 称取大小均等的白术饮片 100 g, 将锅加热至所需温度 (约 180 °C), 投入白术饮片, 快速翻动, 炒至饮片表面淡黄, 有香气逸出, 取出, 放凉。

清炒麦麸: 取麦麸 5 g, 将炒锅加热至撒入麦麸即刻烟起时, 投入麦麸, 快速翻动, 炒至麦麸焦黑色时, 取出, 放凉。

2.2 HS-GC-MS 法测定白术和麦麸麸炒前后的挥发性成分^[8-11]

2.2.1 顶空进样条件 分别精密称取不同批次白术、麸炒白术、清炒白术、生麦麸、清炒麦麸和麸炒白术后麦麸 (过 5 号筛) 各 0.5 g, 放入 20 mL 顶空样品瓶中, 密封, 置顶空进样器中进样, 样品瓶加热时间: 120 °C; 定量环温度: 140 °C; 传

输线温度: 160 °C; GC 循环时间: 45 min; 平衡时间: 30 min; 加压时间: 0.15 min; 进样时间: 0.5 min。

2.2.2 气相色谱和质谱条件 色谱柱为 DB-WAX 石英毛细管柱 (0.25 mm×30 m, 0.25 μm; 美国 Agilent 公司); 进样模式: 分流模式, 分流比: 10:1; 接口温度: 260 °C; 程序升温: 40 °C 保持 5 min, 以 20 °C·min⁻¹ 升至 140 °C, 保持 5 min, 再以 10 °C·min⁻¹ 升至 240 °C, 后运行 240 °C 保持 10 min; 载气为氦气, 流量为 1 mL·min⁻¹。

采用电子轰击型离子源 (EI); 离子源温度为 230 °C; 四级杆温度为 150 °C; 电子能量 70 eV; 扫描方式为全扫描 (SCAN) 模式, 扫描范围 m/z 20 ~ 550; 溶剂延迟 1.8 min。

2.2.3 数据处理 GC-MS 采集得到的数据经 MassHunter 定性分析软件 (Version B.07.00) 对总离子流图 (TIC) 进行自动解卷积处理, 解卷积条件经正构烷烃混合对照品进行参数优化。最终确定解卷积条件如下: 保留时间窗口比例系数为 195; 信噪比阈值为 2.0; 剔除 m/z 为 28, 32, 44。然后, 对解卷积得到的化合物进行定性分析, 先通过 NIST14 质谱数据库比对, 选择质谱匹配得分 ≥ 70 的化合物, 再将待鉴定化合物的计算保留指数 (RI) 与 NIST 质谱数据库中文献报道的 RI* 进行对比。最终, 结合相似度分析确定化合物种类。保留指数的计算: 精密吸取正构烷烃混合对照品 5 μL, 进样分析, 记录各正构烷烃的保留时间, 并采用线性升温公式计算待鉴定化合物的保留指数, $RI = 100n + 100(t_x - t_n) / (t_{n+1} - t_n)^{[12]}$ 。式中, t_x 、 t_n 、 t_{n+1} 分别为被分析组分、含 n 个碳原子、 $n+1$ 个碳原子数正构烷烃的保留时间。

同时, 制作 Venn 图并将定性后化合物的保留时间及峰面积结果导入 SIMCA-P (Version 14.1.0) 软件进行主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 分析, 发现白术和麦麸在炮制前后的差异性化学成分, 解析辅料麦麸对麸炒白术化学成分的影响, 并探讨白术麸炒过程中挥发性化学成分的变化规律。

3 结果与分析

3.1 白术、麦麸炮制前后挥发性成分鉴定

采用 HS-GC-MS 法对生白术、清炒白术、麸炒白术、生麦麸、清炒麦麸和麸炒白术后麦麸的挥发性成分进行分析, 得到的 TIC 图, 见图 1。应用 AMDIS 纯化色谱峰, 并通过质谱匹配度结合保留指数法进行定性分析, 使用峰面积归一化法计算各化合物的相对含量, 化合物相关信息见表 1。结果显示, 白术炮制前后共有 49 种成分, 并分别从生白术、清炒白术、麸炒白术中鉴定出 37、43、37

种成分, 各占挥发性成分总量的 62.70%、62.70% 和 43.46%。上述化合物涵盖烷烃、烯烃、醇、醛酮、酯、含杂原子以及其他类成分。其中, 烯烃类成分 (4aR, 8aS) -4a-methyl-1-methylene-7-(propan-2-ylidene) decahydronaphthalene 和 naphthalene, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 8a-octahydro-1, 8a-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1S-(1α, 7α, 8α)]- 在白术中含量较高, 在生白术中分别占 12.62% 和 6.64%, 在清炒白术中分别占 14.42% 和 7.24%, 在麸炒白术中分别占 7.26% 和 4.64%。麦麸炮制前后共有 82 种成分, 生麦麸、清炒麦麸、麸炒白术后麦麸中鉴定出 49、16、44 种成分, 分别占挥发性成分总量的 37.13%、10.93% 和 88.95%。上述化合物主要包括烷烃、烯烃、醇、醛酮、酯、含杂原子、芳香族、酸类成分。其中, 杂原子类成分 allophanic acid、phenyl ester 在生麦麸中含量最高, 约占 3.38%; 酯类 oxalic acid、diallyl ester 在清炒麦麸中含量最高, 约占 3.00%; 酯类成分 linalyl acetate 以及其他类成分 (4aS, 8aR) -3, 8a-dimethyl-5-methylene-4, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a, 9-octa-hydronaphtho[2, 3-b]furan 在麸炒白术后麦麸中含量最高, 约为 8.22% 和 8.02%。

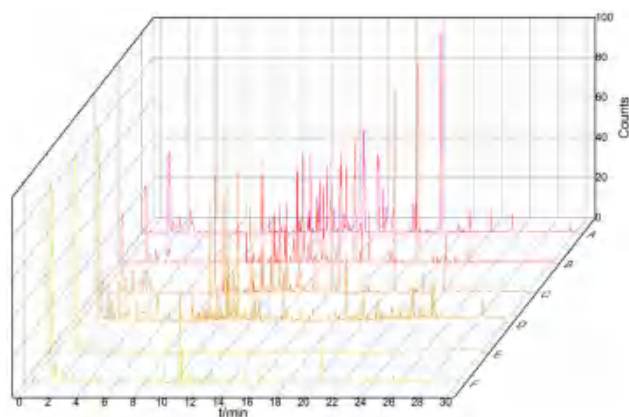


图 1 生白术 (A)、清炒白术 (B)、麸炒白术 (C)、生麦麸 (D)、清炒麦麸 (E) 和麸炒白术后麦麸 (F) 的 HS-GC-MS 总离子流图

Fig 1 TIC of AMR (A), FAMR (B), WAMR (C), WB (D), FWB (E) and AWB (F) by HS-GC-MS

3.2 白术、麦麸炮制前后化学成分比较分析

基于表 1 所鉴定化合物的名称及峰面积等结果, 采用 Venn 图、PCA 和 OPLS-DA 的方法, 分析白术和麦麸在炮制前后挥发性成分的差异, 并对其差异性成分的变化规律进行归纳和总结。

3.2.1 主成分分析^[13-14] 为了初步了解炮制前后白术及麦麸样本的挥发性成分差异, 采用 PCA 对其进行多元统计分析。PCA 得分图 (见图 2) 显示, 第一主成分 $t[1]$ 贡献率为 66.2%, 第二主成分 $t[2]$ 贡献率为 8.06%, 第三主成分 $t[3]$ 贡献率为 7.23%, 说明模型建立良好, 且所有样本均落在 95% 置信

表 1 白术和麦麸的挥发性化学成分相关信息

Tab 1 Information of the volatile chemical composition of Rhizoma Atractylodis Macrocephalae and wheat bran

分类	序号	化合物名称	t_R/min	CAS 号	RI	RI*	鉴定方法	相对百分含量 /% ($n = 10$)					
								AMR	WA MR	FA MR	WB	FWB	AWB
烷烃类	1	1-methyltricyclo[2.2.1.0 (2, 6)]heptane	6.30	4601-85-8	1312	—	MS	0.39	0.23	0.49	—	—	—
	2	pentane, 2, 3, 4-trimethyl-	7.97	565-75-3	1513	—	MS	—	—	—	—	0.16	0.05
	3	hexane, 3, 3-dimethyl-	9.13	563-16-6	1759	—	MS	—	—	—	—	0.14	—
	4	cyclopentane, 1-ethyl-2-methyl-, <i>cis</i> -	9.46	930-89-2	1692	—	MS	—	—	—	0.55	—	—
	5	<i>cis-anti-cis</i> -tricyclo[7.3.0.0 (2, 6)]dodecane	16.49	30159-15-0	2018	—	MS	2.67	0.12	—	—	—	—
烯烃类	6	bi-2-cyclohexen-1-yl	7.36	1541-20-4	1115	—	MS	—	—	—	0.35	—	—
	7	limonene	7.95	138-86-3	1151	1200±7	MS	4.37	3.02	4.82	—	—	1.71
							RI						
	8	γ -terpinene	8.54	99-85-4	1179	1246±9	MS	1.66	1.19	0.67	—	—	—
							RI						
	9	α -phellandrene	8.58	13466-78-9	1180	1167±9	MS	—	—	—	—	—	1.43
	10	bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 3, 6, 6-trimethyl-	8.62	4889-83-2	1182	—	MS	—	0.08	0.08	—	—	—
	11	1, 3-cyclohexadiene, 1-methyl-4- (1-methylethyl) -	8.92	99-86-5	1196	1180±8	MS	0.06	—	—	—	—	—
							RI						
	12	silphiperfol-5-ene	10.24	138752-24-6	1437	—	MS	—	0.09	0.17	—	—	—
	13	cyclohexene, 4-ethenyl-4-methyl-3- (1-methylethenyl) -1- (1-methylethyl) -, (3 <i>R-trans</i>) -	10.63	20307-84-0	1478	1470±9	MS	—	—	—	—	—	0.83
							RI						
	14	cyclopentane, 2-methyl-1-methylene-3- (1-methylethenyl) -	10.64	56710-83-9	1276	—	MS	—	—	0.13	—	—	—
	15	ylangene	10.89	14912-44-8	1499	1491±3	MS	—	—	—	—	—	0.14
							RI						
	16	modephene	11.21	68269-87-4	1530	1522±11	MS	1.12	0.94	1.12	—	—	0.55
							RI						
	17	(1 <i>R</i> , 3 <i>aS</i> , 5 <i>aS</i> , 8 <i>aR</i>)-1, 3 <i>a</i> , 4, 5 <i>a</i> -tetramethyl-1, 2, 3, 3 <i>a</i> , 5 <i>a</i> , 6, 7, 8-octahydrocyclopenta[<i>c</i>]pentalene	11.34	65372-78-3	1543	1533±13	MS	1.23	1.30	1.75	—	—	—
							RI						
	18	α -guaiene	11.65	3691-12-1	1594	1598±6	MS	0.23	0.17	0.43	—	—	—
							RI						
	19	azulene, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 8 <i>a</i> -octahydro-1, 4-dimethyl-7- (1-methylethenyl) -, [1 <i>S</i> - (1 <i>α</i> , 7 <i>α</i> , 8 <i>$\alpha\beta$</i>)]-	11.87	3691-11-0	1593	1624±11	MS	—	1.03	0.99	—	—	—
							RI						
	20	cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2, 4-bis (1-methylethenyl) -, [1 <i>S</i> - (1 <i>α</i> , 2 <i>β</i> , 4 <i>β</i>)]-	11.90	515-13-9	1598	1591±9	MS	1.13	0.79	0.39	—	—	4.21
							RI						
	21	caryophyllene	12.07	87-44-5	1613	1595±16	MS	3.93	3.05	3.84	—	—	4.65
							RI						
	22	γ -elemene	12.54	29873-99-2	1657	1642±9	MS	5.14	4.45	5.44	—	—	5.20
							RI						
	23	naphthalene, decahydro-4 <i>a</i> -methyl-1-methylene-7- (1-methylethenyl) -, [4 <i>aR</i> - (4 <i>$\alpha\alpha$</i> , 7 <i>α</i> , 8 <i>$\alpha\beta$</i>)]-	12.94	17066-67-0	1699	1717±13	MS	—	0.22	0.28	—	—	—
							RI						
	24	cyclohexene, 4-[(1 <i>E</i>)-1, 5-dimethyl-1, 4-hexadien-1-yl]-1-methyl-	13.07	25532-79-0	1711	1741±21	MS	1.92	1.61	1.93	—	—	—
							RI						
	25	humulene	13.08	6753-98-6	1711	1667±14	MS	—	—	—	—	—	2.69
	26	(<i>R</i>)-1-methyl-4- (6-methylhept-5-en-2-yl) cyclohexa-1, 4-diene	13.28	28976-67-2	1733	1738±7	MS	0.25	0.21	0.29	—	—	—
							RI						
	27	1, 4-methano-1 <i>H</i> -indene, octahydro-4-methyl-8-methylene-7- (1-methylethyl) -, [1 <i>S</i> - (1 <i>α</i> , 3 <i>$\alpha\beta$</i> , 4 <i>α</i> , 7 <i>α</i> , 7 <i>$\alpha\beta$</i>)]-	13.60	3650-28-0	1484	—	MS	—	—	—	—	—	0.33
	28	germacrene D	13.7	23986-74-5	1774	1710±14	MS	0.49	—	—	—	—	3.52
							RI						

续表 1

分类	序号	化合物名称	t_R/min	CAS 号	RI	RI*	鉴定方法	相对百分含量 /% ($n = 10$)					
								AMR	WA MR	FA MR	WB	FWB	AWB
醇类	29	1, 3-cyclohexadiene, 5- (1, 5-dimethyl-4-hexenyl) -2-methyl-, [<i>S</i> - (<i>R</i> [*] , <i>S</i> [*])]-	13.78	495-60-3	1782	1724±9	MS RI	0.14	0.35	0.35	—	—	—
	30	naphthalene, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 8a-octahydro-1, 8a-dimethyl-7- (1-methylethenyl) -, [<i>1S</i> - (<i>1α</i> , <i>7α</i> , <i>8α</i>)]-	13.93	10219-75-7	1797	1743±1	MS RI	6.64	4.64	7.24	—	—	7.95
	31	valerena-4, 7 (11) -diene	14.14	351222-66-7	1817	—	MS	—	—	0.83	—	—	—
	32	10 <i>S</i> , 11 <i>S</i> -himachala-3 (12), 4-diene	14.15	60909-28-6	1818	—	MS	0.73	0.03	—	—	—	—
	33	naphthalene, 1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1- (1-methylethyl) -, (<i>1α</i> , <i>4aβ</i> , <i>8α</i>) -	14.20	39029-41-9	1824	1765±11	MS RI	—	0.08	0.31	—	—	—
	34	α -farnesene	14.21	502-61-4	1823	1746±9	MS	—	—	—	—	—	0.40
	35	(1 <i>R</i> , 5 <i>R</i>) -4-methylene-1- (<i>R</i>) -6-methylhept-5-en-2-yl) bicyclo[3.1.0]hexane, (relative configuration)	14.83	1000408-90-5	1885	—	MS	0.98	0.61	0.72	—	—	—
	36	(4 <i>aR</i> , 8 <i>aS</i>) -4a-methyl-1-methylene-7- (propan-2-ylidene) decahydronaphthalene	15.14	58893-88-2	1913	—	MS	12.62	7.26	14.42	—	—	7.85
	37	1, 5-cyclodecadiene, 1, 5-dimethyl-8- (1-methylethenyl) -, [<i>S</i> - (<i>Z</i> , <i>E</i>)]-	16.12	75023-40-4	2011	—	MS	0.08	—	1.83	—	—	—
	38	(1 <i>R</i> , 4 <i>R</i> , 5 <i>S</i>) -1, 8-dimethyl-4- (prop-1-en-2-yl) spiro[4.5]dec-7-ene	16.15	729602-94-2	2007	—	MS	—	—	—	—	—	7.63
	39	3-heptene, 4-ethyl-	17.23	33933-74-3	1693	—	MS	—	—	—	0.42	—	—
	40	2-nonen-1-ol, (<i>Z</i>) -	10.04	41453-56-9	1296	—	MS	—	—	—	0.32	—	—
	41	linalool	11.37	78-70-6	1511	1547±7	MS RI	1.61	0.02	0.15	—	—	—
	42	4a, 5-dimethyl-3- (prop-1-en-2-yl) -1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 7-octahydronaphthalen-1-ol	17.17	61847-19-6	2144	—	MS	2.08	1.29	2.21	—	—	—
	43	1, 2-propanediol, 1-phenyl-	19.92	1855-09-0	1841	—	MS	—	—	—	0.45	—	—
	44	2- (4a, 8-dimethyl-2, 3, 4, 5, 6, 8a-hexahydro-1 <i>H</i> -naphthalen-2-yl) propan-2-ol	21.93	1000411-50-1	2580	—	MS	0.29	0.22	0.24	—	—	—
	45	(—) -spathulenol	23.18	77171-55-2	2702	—	MS	0.46	0.38	0.37	—	—	—
	46	(1 <i>R</i> , 7 <i>S</i> , <i>E</i>) -7-isopropyl-4, 10-dimethylenecyclodec-5-enol	24.25	81968-62-9	2808	—	MS	0.08	—	0.20	—	—	—
醛酮类	47	3, 4-hexanediol, 2, 5-dimethyl-	28.14	22607-11-0	3943	—	MS	—	—	—	1.23	—	0.12
	48	2-hexanone, 3, 4-dimethyl-	2.89	19550-10-8	901	—	MS	—	—	—	0.16	0.71	0.64
	49	1-pentanone, 1- (4-methylphenyl) -	8.84	1671-77-8	1261	—	MS	—	—	—	0.23	2.13	—
	50	phenylglyoxal	11.23	1074-12-0	1906	—	MS	—	—	—	2.68	0.54	0.47
	51	2 (1 <i>H</i>) -azulenone, 4, 5, 6, 7, 8, 8a-hexahydro-8a-methyl-, (<i>S</i>) -	16.46	55103-73-6	2016	—	MS	—	—	—	—	—	1.12
	52	bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1-ethenyl-7, 7-dimethyl-	16.5	1782-96-3	1800	—	MS	—	2.28	3.05	—	—	—
	53	2 (1 <i>H</i>) -naphthalenone, 7-ethynyl-4a, 5, 6, 7, 8, 8a-hexahydro-1, 4a-dimethyl-, (<i>1α</i> , <i>4aβ</i> , <i>7β</i> , <i>8α</i>) -	17.10	55220-87-6	2108	—	MS	—	—	—	—	—	1.22
	54	3, 5, 7-nonatrien-2-one, 8-methyl-7- (1-methylethyl) -, (<i>E</i> , <i>E</i>) -	18.62	70372-94-0	2431	—	MS	1.68	1.21	1.57	—	—	—
	55	bicyclo[4.3.0]nonan-2-one, 8-isopropylidene-	19.06	1000159-42-7	2272	—	MS	0.28	—	0.39	—	—	—
	56	cyclopentanecetaldehyde, 2-formyl-3-methyl- α -methylene-	19.51	5951-57-5	1688	—	MS	0.06	—	0.10	—	—	—
	57	4-hydroxy-2-methylacetophenone	21.27	875-59-2	1916	—	MS	—	—	—	1.58	—	2.25
	58	ethanone, 1- (2, 4-dihydroxyphenyl) -	21.60	89-84-9	3158	—	MS	—	—	—	0.68	—	—

续表 1

分类	序号	化合物名称	t_R /min	CAS 号	RI	RI*	鉴定方法	相对百分含量 /% ($n = 10$)					
								AMR	WA MR	FA MR	WB	FWB	AWB
酯类	59	(3aR, 4R, 7R)-1, 4, 9, 9-tetramethyl-3, 4, 5, 6, 7, 8-hexahydro-2H-3a, 7-methanoazulen-2-one	22.58	3466-15-7	2644	—	MS	1.04	0.76	0.69	—	—	0.17
	60	4-hexen-3-one, 4, 5-dimethyl-	24.30	17325-90-5	3481	—	MS	—	—	—	2.50	—	—
	61	benzaldehyde, 3-hydroxy-4-methoxy-	24.86	621-59-0	3548	—	MS	—	—	—	1.72	—	—
	62	3', 5'-dimethoxyacetophenone	24.92	39151-19-4	1941	—	MS	—	—	—	0.23	—	—
	63	ethanone, 1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-	25.54	6100-74-9	2151	—	MS	—	—	—	0.15	—	—
	64	cycloprop[e]indene-1a, 2(1H)-dicarboxaldehyde, 3a, 4, 5, 6, 6a, 6b-hexahydro-5, 5, 6b-trimethyl-, (1a α , 3a β , 6a β , 6b α)-(+) -	25.61	37841-91-1	2942	—	MS	1.86	—	1.96	—	—	—
	65	tricyclo[7.2.1.0(3, 8)]dodeca-3(8), 4, 6-triene-2, 12-dione, 6-methoxy-9-methyl-	29.64	1000319-33-6	3732	—	MS	0.43	0.34	0.29	—	—	—
	66	oxalic acid, diallyl ester	4.67	1000309-22-9	1116	—	MS	—	—	—	—	3.00	0.44
	67	methoxyacetic acid, hexyl ester	9.13	145747-16-6	1245	—	MS	—	—	—	0.37	—	—
	68	di-tert-butyl decarbonate	9.93	24424-99-5	1244	—	MS	—	—	—	0.68	0.64	0.30
	69	2-furancarboxylic acid, cyclobutyl ester	11.02	1000282-75-9	1350	—	MS	—	—	—	0.62	—	0.05
	70	5-azulenemethanol, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8-oc-tahydro- α , α , 3, 8-tetramethyl-, acetate, [3S-(3 α , 5 α , 8 α)]-	11.27	134-28-1	1598	—	MS RI	1.52	1.23	1.68	—	—	1.71
	71	linalyl acetate	11.35	115-95-7	1510	1555 $\pm$ 10	MS RI	—	—	—	—	—	8.22
	72	α -terpinyl acetate	13.42	80-26-2	1715	1692 $\pm$ 10	MS RI	—	—	—	—	—	0.17
	73	methacrylic anhydride	13.82	760-93-0	2218	—	MS	—	—	—	0.21	—	—
	74	formic acid, 2-methoxyphenyl ester	16.54	1000368-70-7	2546	—	MS	—	—	—	1.76	—	—
	75	aristol-1(10)-en-9-yl isovalerate	16.67	1000414-30-6	1837	—	MS	2.20	1.21	2.65	—	—	1.25
	76	3-acetoxy-2-methyl-pyran-4-one	18.34	1000373-04-9	2763	—	MS	—	—	—	1.21	—	—
	77	tetrahydrofuran-5-on-2-methanol, α -[α -methoxy-(tetrahydrofuran-5-on-2-ylmethoxy)]-	19.48	1000192-28-3	2016	—	MS	—	—	—	0.71	—	—
	78	(E)-2-[(8R, 8aS)-8, 8a-dimethyl-3, 4, 6, 7, 8, 8a-hexahydronaphthalen-2(1H)-ylidene]propyl formate	21.72	352457-47-7	2560	—	MS	0.02	0.16	0.11	—	—	—
	79	(E)-valerenyl isovalerate	22.03	101527-75-7	2133	—	MS	—	—	0.12	—	—	—
	80	formic acid, 2, 6-dimethoxyphenyl ester	22.04	1000368-91-0	1959	—	MS	—	—	—	0.64	—	0.31
	81	2-t-butyl-5-propyl-[1, 3]dioxolan-4-one	23.33	157733-17-0	3364	—	MS	—	—	—	0.18	—	—
	82	hexadecanoic acid, 2-methylpropyl ester	23.71	110-34-9	2367	2367 $\pm$ N/A	MS	—	—	—	0.26	0.17	0.39
	83	(E)-2-[(8R, 8aS)-8, 8a-dimethyl-3, 4, 6, 7, 8, 8a-hexahydronaphthalen-2(1H)-ylidene]propyl formate	24.04	352457-47-7	2560	—	MS	—	—	—	—	—	0.20
	84	trans-valerenyl acetate	24.06	101527-74-6	2234	—	MS	1.10	0.76	0.87	—	—	—
	85	octadecanoic acid, butyl ester	25.5	123-95-5	2598	—	MS	—	—	—	0.29	0.57	—
	86	octadecanoic acid, 2-methylpropyl ester	25.51	646-13-9	2598	—	MS	—	—	—	—	—	0.83
	87	2H-1-benzopyran-2-one, 3, 4-dihydro-6-hydroxy-	28.33	2669-94-5	2306	—	MS	—	—	—	0.52	—	—
	88	3, 5-dimethoxy-4-(acetyl)oxybenzaldehyde	29.09	1000395-81-2	2712	—	MS	—	—	—	0.18	—	—
含杂原子类	89	ethylamine, 2-[(p-bromo- α -methyl- α -phenylbenzyl)oxy]-N, N-dimethyl-	2.19	3565-72-8	1123	—	MS	0.15	—	0.09	—	—	0.51
	90	diazene, bis(1, 1-dimethylethyl)-	3.08	927-83-3	3.08	—	MS	—	—	—	—	0.73	0.92
	91	4-isobutylpyrimidine	8.99	98489-37-3	1636	—	MS	—	0.06	—	—	—	—
	92	3-buten-1-amine, N, N-diethyl-	9.04	15431-05-7	1642	—	MS	—	—	—	0.52	—	—
	93	hydroxylamine, O-decyl-	10.01	124-19-6	1330	—	MS	—	—	—	—	0.11	0.14

续表 1

分类	序号	化合物名称	t_R/min	CAS 号	RI	RI*	鉴定方法	相对百分含量 /% ($n = 10$)					
								AMR	WA MR	FA MR	WB	FWB	AWB
酸类	94	2-pyrrolidinone, 5-(cyclohexylmethyl)-	10.68	14293-08-4	1378	—	MS	—	—	—	1.14	—	—
	95	1, 4-methanocycloocta[d]pyridazine, 1, 4, 4a, 5, 6, 9, 10, 10a-octahydro-11, 11-dimethyl-, (1 α , 4 α , 4a α , 10a α)-	11.75	3650-28-0	1603	—	MS	—	—	0.11	—	—	0.10
	96	2, 3-diazabicyclo [2.2.1] hept-2-ene, 4-methyl-1-(pent-4-en-1-yl)-	11.92	150667-99-5	1468	—	MS	—	0.11	0.38	—	—	—
	97	benzene, 1-isocyano-3-methyl-	17.69	20600-54-8	2684	—	MS	—	—	—	0.22	—	—
	98	2-pyrrolidinecarboxylic acid, 1, 2-dimethyl-5-oxo-, methyl ester	18.13	56145-23-4	2737	—	MS	—	—	—	1.01	—	0.04
	99	allophanic acid, phenyl ester	18.88	49615-54-5	2828	—	MS	—	—	—	3.38	—	—
	100	sulfurous acid, isohexyl hexyl ester	19.67	1000309-12-8	2334	—	MS	—	—	—	0.31	—	—
	101	sulfurous acid, 2-propyl undecyl ester	22.08	1000309-12-2	2831	—	MS	—	—	—	0.51	—	—
	102	2-butanone, (2-ethoxyethyl) methylhydrazone	22.7	75268-06-3	1995	—	MS	—	—	—	0.19	—	—
	103	cyclobutane-1, 1-dicarboxamide, N, N'-di-benzoyloxy-	23.61	1000253-25-3	2359	—	MS	—	—	—	0.85	0.03	—
	104	n-heptyl methylphosphonofluoridate	24.05	162085-82-7	3450	—	MS	—	—	—	0.66	—	—
其他类	105	3-oxo-4-phenylbutyronitrile	24.75	19212-27-2	1933	—	MS	—	—	—	0.46	—	—
	106	conhydrin	25.27	63401-12-7	3598	—	MS	—	—	—	0.65	—	—
	107	propanoic acid, 3-chloro-, 4-formylphenyl ester	26.94	1000142-41-5	2035	—	MS	—	—	—	0.29	—	—
	108	butanedioic acid, phenyl-	8.79	635-51-8	1191	—	MS	—	—	—	0.48	—	—
	109	2-methylbutanoic anhydride	24.17	1468-39-9	1906	—	MS	—	—	—	0.83	—	—
	110	valeric anhydride	25.56	2082-59-9	1970	—	MS	—	—	—	0.34	—	—
	111	hexanedioic acid, mono (2-ethylhexyl) ester	27.54	4337-65-9	3481	—	MS	—	—	—	0.85	—	0.23
其他类	112	furan, 2-pentyl-	8.52	3777-69-3	1212	1231 $\pm$ 9	MS RI	—	—	—	0.40	0.21	0.05
	113	benzene, (2-methylpropyl)-	9.34	538-93-2	1216	1238 $\pm$ 21	MS RI	—	—	—	0.19	0.05	—
	114	phenol, 4-methoxy-3-methyl-	18.16	14786-82-4	2741	—	MS	—	—	—	0.21	—	—
	115	benzene, 1, 4-dimethoxy-2-methyl-	19.24	24599-58-4	1803	1795 $\pm$ 5	MS RI	—	—	—	0.34	—	—
	116	(4aS, 8aR)-3, 8a-dimethyl-5-methylene-4, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a, 9-octahydronaphtho[2, 3-b]furan	20.62	6989-21-5	2448	—	MS	2.06	1.96	—	—	1.93	8.02

注 (Note): AMR. 生白术 (raw Rhizoma Atractylodis Macrocephalae); FAMR. 清炒白术 (stir-fried Rhizoma Atractylodis Macrocephalae); WAMR. 麸炒白术 (stir-fried Rhizoma Atractylodis Macrocephalae with bran); WB. 生麦麸 (wheat bran); FWB. 清炒麦麸 (fried wheat bran); AWB. 麸炒白术后麦麸 [wheat bran used to stir-fry Rhizoma Atractylodis Macrocephalae (Same as below)]。

区间的椭圆形内, 各组间也可以明显分开, 说明白术和麦麸炮制前后的挥发性成分均存在一定的差异。除此之外, 图中可见麸炒白术后麦麸 (AWB) 和麸炒白术 (WAMR) 最为接近, 且 Venn 图中显示其有 12 种共同成分, 说明两者挥发性成分组成较为相似, 说明麸炒过程中麦麸与白术之间发生了化学成分的迁移, 使得两者在成分上具有相似性。

3.2.2 正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 和差异性成分分析 分别对生白术 - 清炒白术、生白术 - 麸炒白术、麸炒白术 - 清炒白术和生麦麸 - 清炒麦麸、生麦麸 - 麸炒白术后麦麸、清炒麦麸 - 麸炒

白术后麦麸间进行了 OPLS-DA 分析。由图 3 可知, 生白术 - 清炒白术 ($R^2Y = 0.994$, $Q^2 = 0.973$)、生白术 - 麸炒白术 ($R^2Y = 0.996$, $Q^2 = 0.969$)、麸炒白术 - 清炒白术 ($R^2Y = 0.993$, $Q^2 = 0.975$) 和生麦麸 - 清炒麦麸 ($R^2Y = 0.982$, $Q^2 = 0.943$)、生麦麸 - 麸炒白术后麦麸 ($R^2Y = 0.998$, $Q^2 = 0.993$)、清炒麦麸 - 麸炒白术后麦麸 ($R^2Y = 0.995$, $Q^2 = 0.996$), 表明模型具有良好的可解释度和预测能力。此外, 为了避免 OPLS-DA 模型出现无法有效预测新样本数据集时的过拟合现象^[15-16], 采用 SIMCA 14.1 中置换检验和交叉验证分析 (CV-ANOVA) 功能来验证模

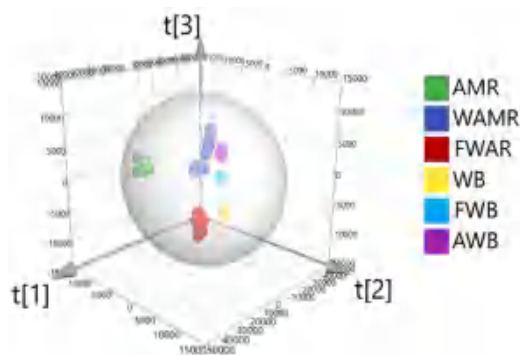


图2 PCA得分图

Fig 2 PCA score plot

型的可靠性。采用置换检验对模型进行 200 次排列检验, 结果如图 3 所示, 模型 Q^2 回归线与横坐标交叉, 且与纵坐标交叉的截距小于 0, 说明模型没有过拟合。同时, 交叉验证分析结果中各组的显著性概率值 P 均小于 0.05, 说明本研究建立的 OPLS-DA 模型稳定可靠, 具有统计学意义。同时, 这也证明了白术、麦麸在炮制前后化学成分发生了明显变化。

为进一步筛选白术及麦麸炮制前后的差异性成分, 应用 OPLS-DA 模型中 VIP 值筛选差异化合物^[17-18] (见图 4), 选择 $VIP > 1$ 作为差异性化合物的筛选条件。结果分种有 15 种、11 种、11 种、26 种、23 种、23 种挥发性成分在区分生白术和清炒白术、生白术和麸炒白术、麸炒白术和清炒白术、生麦麸和麸炒白术后麦麸以及清炒麦麸和麸炒白术后麦麸中起到重要作用。

通过比较白术和麦麸炮制前后差异性挥发性成分的种类和相对含量发现, 麸白术相比于清炒白术除了减少 10 种挥发性成分之外, 还有 24 种成分的含量降低, 其中 8 种成分为麦麸经麸炒后新增或含量显著升高的成分, 推测其为麸炒过程中麦麸吸附白术的化学成分, 这 8 种成分分别为 limonene、5-azulenemethanol, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8-octahydro- α , α , 3, 8-tetramethyl-, acetate, [3*S*-(3 α , 5 α , 8 α)]-, aristol-1 (10)-en-9-yl isovalerate、 γ -elemene、(4*aR*, 8*aS*)-4*a*-methyl-1-methylene-7-(propan-2-ylidene) decahydronaphthalene、modephene、naphthalene, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 8*a*-octahydro-1, 8*a*-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1*S*-(1 α , 7 α , 8 α)]-和 caryophyllene, 主要以烯烃为主, 其余为酯、醛酮类。

经过麸炒后的白术及麦麸中共有的新增成分有 4 种, 分别为 cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2, 4-bis(1-methylethenyl)-, [1*S*-(1 α , 2 β , 4 β)]-, (*E*)-2-[(8*R*, 8*aS*)-8, 8*a*-dimethyl-3, 4, 6, 7, 8, 8*a*-hexahydronaphthalen-2(1*H*)-ylidene]propyformate、(3*aR*, 4*R*, 7*R*)-1, 4, 9, 9-tetramethyl-3,

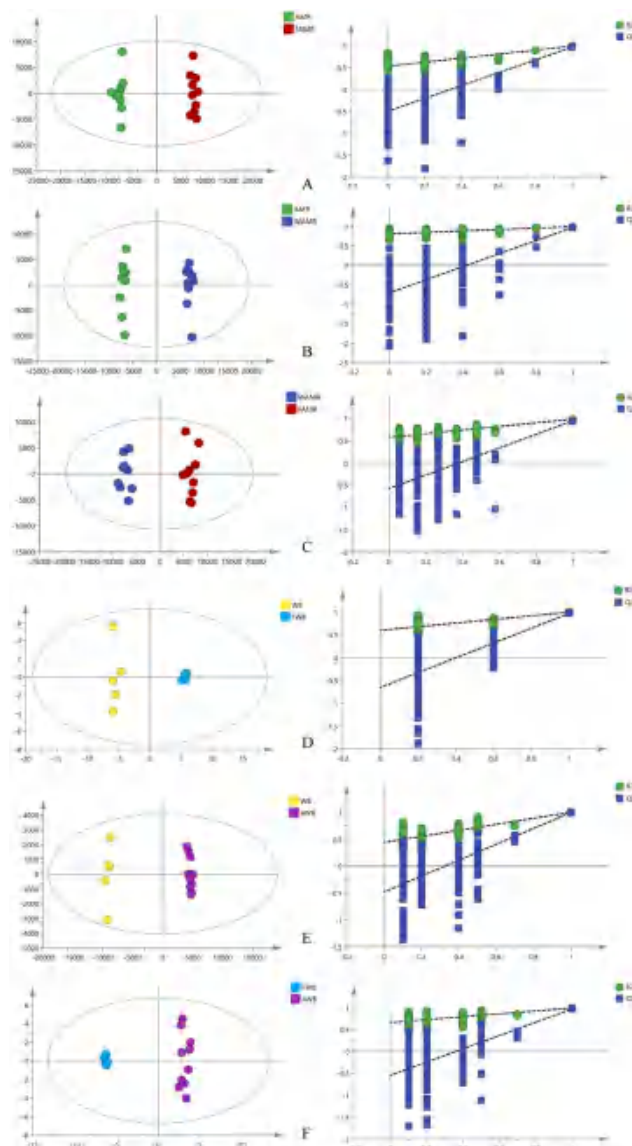


图3 生白术-清炒白术(A)、生白术-麸炒白术(B)、麸炒白术-清炒白术(C)和生麦麸-清炒麦麸(D)、生麦麸-麸炒白术后麦麸(E)、清炒麦麸-麸炒白术后麦麸(F)的 OPLS-DA 得分图(左)和置换检验(右)

Fig 3 OPLS-DA score plot (left) and permutation test (right) of AMR-FAMR (A), AMR-WAMR (B), WAMR-FAMR (C), WB-FWB (D), WB-AWB (E), and FWB-AWB (F)

4, 5, 6, 7, 8-hexahydro-2*H*-3*a*, 7-methanoazulen-2-one 和 (4*aS*, 8*aR*)-3, 8*a*-dimethyl-5-methylene-4, 4*a*, 5, 6, 7, 8, 8*a*, 9-octahydronaphtho[2, 3-*b*]furan。说明麸炒过程中辅料麦麸和饮片白术发生了化学反应, 并有烯烃类等物质生成。

白术麸炒后麦麸独有的新增成分有 28 种, 包括 α -phellandrene、cyclohexene、4-ethenyl-4-methyl-3-(1-methylethenyl)-1-(1-methylethyl)-, (3*R-trans*)-和 modephene 等, 其中大部分为含杂原子和烯烃类, 其余包括酮、酯以及烷烃类。

此外, 白术清炒后失去 8 种烷烃、其他类成

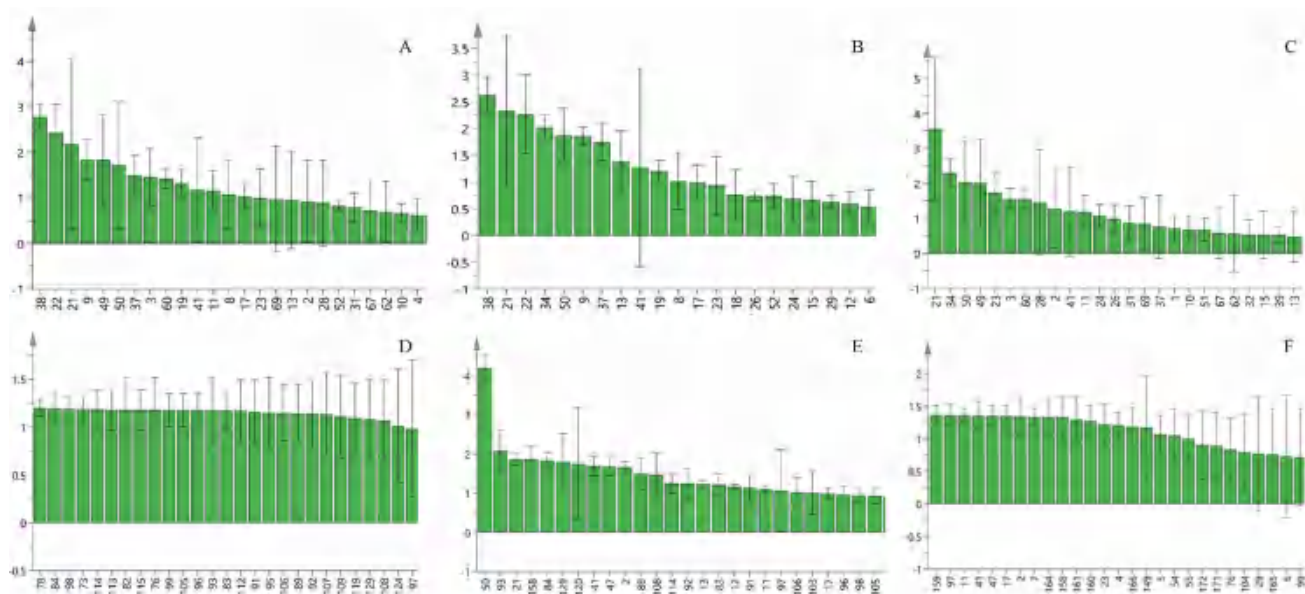


图4 生白术-清炒白术(A)、生白术-麸炒白术(B)、麸炒白术-清炒白术(C)和生麦麸-清炒麦麸(D)、生麦麸-麸炒麦麸(E)、清炒麦麸-麸炒麦麸(F)的VIP图

Fig 4 VIP of AMR-FAMR (A), AMR-WAMR (B), WAMR-FAMR (C) and WB-FWB (D), WB-AWB (E), and FWB-AWB (F)

分, 新增了8种烯烃、醛酮以及酯类等成分; 白术麸炒后失去5种烯烃、醛酮以及醇类等成分, 新增11种烯烃、醛酮以及含杂原子类成分。麦麸清炒后失去41种含杂原子、醛酮以及酯类等成分, 新增8种烷烃、含杂原子以及醛酮类等成分; 麦麸经过与白术拌炒后失去37种含杂原子、醛酮以及酯类等成分, 新增32种烯烃、含杂原子以及醛酮类成分。综上, 白术麸炒过程中, 白术饮片和辅料麦麸的挥发性成分均发生了显著的变化, 且两者间的化学成分存在相互转移的情况。

4 讨论

目前, 关于中药麸炒的研究大多集中在工艺优化、炮制前后饮片化学成分以及药理作用的变化等方面^[19-21]。然而, 关于麸炒的炮制机制, 尤其是关于辅料麦麸的作用研究相对较少。因此, 为了深入解析麸炒白术的炮制机制, 本文将对麦麸在炮制前后的成分变化与白术麸炒前后差异性物质的分析相结合, 探究麦麸在麸炒过程中发挥的作用。同时, 也可作为麸炒白术健脾作用、增强药效物质基础研究提供参考。

事实上, 中药经过麸炒后, 会产生独特的焦香气味。中医认为“脾为土脏, 与胃相表里, 脾胃健运, 自能消化饮食水谷”“土爱暖而喜芳香”, 且“脾常为湿困”, 芳香药性偏温燥, 善入脾、胃经, 有增强运化、悦脾开胃的功效^[22-24]。对于麸炒后焦香气味的来源, 崔小兵等^[25-26]提出中药麸炒炮制中产生的焦香味物质是基于美拉德反应形成。美拉德反应是含游离氨基的化合物和还原糖或羰基化

合物在常温或加热时发生的聚合、缩合等反应, 其产物除了棕黑色的大分子物质类黑精之外, 还有还原酮、醛和杂环化合物等, 这些物质是食品色泽和风味的主要来源^[27]。事实上, 相比于清炒白术和清炒麦麸, 白术、麦麸麸炒后新增的化学成分, 如 linalyl acetate (乙酸芳樟酯) 和 α -terpinyl acetate (α -乙酸松油酯), 两者都具有清香带甜、类似铃兰以及薰衣草等精油的幽雅香气, 结合文献^[28]报道对比确定其为美拉德反应产物。而其余新增成分如 (3aR, 4R, 7R)-1, 4, 9, 9-tetramethyl-3, 4, 5, 6, 7, 8-hexahydro-2H-3a, 7-methanoazulen-2-one, 2 (1H)-azulenone, 4, 5, 6, 7, 8, 8a-hexahydro-8a-methyl-, (S)-和 2 (1H)-naphthalenone, 7-ethynyl-4a, 5, 6, 7, 8, 8a-hexahydro-1, 4a-dimethyl-, (1 α , 4 α , 7 β , 8 α)-等酮、杂环类化合物也可能是美拉德反应生成的中间体还原酮及挥发性杂环化合物, 其反应机制有待进一步研究。

本研究采用 HS-GC-MS 对麦麸及白术麸炒前后的化学成分进行比较分析。与经典的水蒸气蒸馏法提取挥发油进样 GC-MS 系统进行分析相比, HS-GC-MS 的样本准备简单方便, 不需复杂的前处理, 尤其是对于一些含量较低或低挥发性的组分来说, 能起到富集作用, 且测定结果稳定可靠, 在挥发性物质分析中具有独特的优势^[29-30]。此外, 由于部分挥发性成分较为复杂, 且色谱分离能力有限, 一些色谱峰会出现部分或完全重叠, 使谱库检索结果的准确性降低。自动质谱解卷积和鉴定 (AMDIS) 技术可以有效去除干扰峰, 形成相

对纯净的质谱图。保留指数法作为气相色谱中常用的定性方法,具有重现性好、标准统一以及温度系数小等优点^[31-34]。因此,本研究采用 AMDIS 和保留指数法可有效提高 GC-MS 定性的准确性。

同时,本文还采用 PCA 和 OPLS-DA 法比较生白术、清炒白术、麸炒白术以及生麦麸、清炒麦麸、麸炒白术后麦麸之间挥发性成分的差异以及麸炒后白术与麦麸之间的成分异同,探讨辅料麦麸对麸炒白术挥发性化学成分的影响,并总结白术麸炒过程中挥发性成分的变化规律,从而为解析麸炒白术的炮制原理提供数据支持。结果发现,麦麸除可通过吸附作用降低白术的挥发油含量,从而降低麸炒白术饮片的燥性,麦麸与白术间还可发生美拉德反应,其产物可能是麸炒白术健脾作用增强的药效物质基础。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版.一部[S]. 2020: 107.
- [2] 李雪莲. 白术麸炒过程中颜色与物质基础变化相关性研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2015.
- [3] 孙冬梅. 不同炮制方法对中药饮片白术应用效果的影响[J]. 实用中医药杂志, 2021, 37(9): 1486-1487.
- [4] 黄小千, 牟洁, 朱莹, 等. 白术挥发油提取工艺的优化及其化学成分研究[J]. 山东中医药大学学报, 2013, 37(4): 339-342.
- [5] 刘江亭, 林永强, 张学兰, 等. 白术炮制研究进展[J]. 山东中医杂志, 2016, 35(11): 1005-1008.
- [6] 贾天柱. 中药炮制学(第二版)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2013: 105, 202.
- [7] 刘艳菊, 曾敏, 陈雯雯, 等. 气-质联用法分析苍术、麸炒苍术及其辅料麦麸的挥发性成分[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(11): 847-849.
- [8] 陈鸿平, 潘欢欢, 刘友平, 等. GC-MS 结合 AMDIS 和保留指数研究不同炮制火候麸炒白术挥发性成分动态变化规律[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(14): 2646-2651.
- [9] 顿珠次仁, 朱根华, 蔡瑛, 等. 顶空-气质联用测定藏药裂叶独活挥发性成分[J]. 中草药, 2017, 48(11): 2182-2188.
- [10] 郭慧玲, 罗江南, 熊耀坤, 等. 顶空-气质联用比较不同产地金银花与山银花挥发性成分差异[J]. 中南药学, 2021, 19(6): 1182-1189.
- [11] 于海英, 丁鹏霞, 李美萍, 等. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱分析细叶韭花水提液易挥发成分[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(14): 169-176.
- [12] 张胜强, 安登魁. Kovats 保留指数与药物分析[J]. 国外医学药学分册, 1981(2): 104-109.
- [13] 滕中秋, 郝庆秀, 金艳, 等. 基于 HS-SPME-GC-MS 的不同产地彝药满山香挥发性成分比较研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(15): 3216-3222.
- [14] 宋琬, 常叶, 金小丹, 等. HS-GC-MS 结合化学计量学方法快速鉴别木香及其纸煨品的实验研究[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(5): 916-926.
- [15] 欧阳红军, 刘义军, 袁源, 等. HS-SPME-GC-MS 结合 OPLS-DA 分析提取方法对牛油果油挥发性香气化合物的影响[J]. 南方农业学报, 2021, 52(3): 779-788.
- [16] 李伟, 刘亚丽, 宋永贵, 等. UPLC-Q-TOF-MS^E 结合 OPLS-DA 模式快速鉴定南、北五味子化学成分与识别差异标志物[J]. 中草药, 2015, 46(15): 2212-2218.
- [17] 荣晓惠, 刘艳, 王秋茹, 等. 不同产区掌叶大黄酒蒸前后指纹图谱的建立及 3 种差异性成分的含量测定[J]. 中国药房, 2022, 33(3): 280-286.
- [18] 崔园园, 周永峰, 马艳芹, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 法分析生、炙甘草中化学成分的差异性[J]. 中国药房, 2020, 31(9): 1049-1053.
- [19] 赵雪岑, 柏阳, 才谦, 等. 麸炒苍术粗多糖对脾虚模型大鼠的影响[J]. 上海中医药杂志, 2021, 55(11): 85-90.
- [20] 谭洪泉, 马彧, 赵磊. 麸炒木香炮制标准研究[J]. 中国医药导刊, 2022, 24(2): 179-183.
- [21] 彭艳, 张丽颖, 金阳, 等. 山药及麸炒山药拉曼指纹图谱分析[J]. 中成药, 2021, 43(12): 3403-3408.
- [22] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京: 中国中医古籍出版社, 1994: 373-374.
- [23] 蒋文杰, 陈江. 象思维在中医脾胃病治法用药中应用探析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(12): 129-132.
- [24] 张燕娜, 左明焕, 刘传波, 等. 基于“土爰暖而喜芳香”探讨肿瘤患者食欲减退中医辨治策略[J]. 吉林中医药, 2021, 41(9): 1125-1128.
- [25] 崔小兵. 基于 Maillard 反应研究麸炒增加“焦香健脾”作用的共性物质[D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.
- [26] 李雪莲. 白术麸炒过程中颜色与物质基础变化相关性研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2015.
- [27] 马传江, 王信, 辛义周, 等. 中药传统炮制理论的现代研究概述[J]. 中草药, 2018, 49(3): 512-520.
- [28] 邓波, 王维维, 张小涛, 等. 顶空固相微萃取-气相色谱/质谱联用法结合化学计量学分析白肋烟烘焙前后挥发性、半挥发性成分[J]. 色谱, 2019, 37(12): 1373-1382.
- [29] Escriche I, Kadar M, Juan-Borras M, et al. Using flavonoids, phenolic compounds and headspace volatile profile for botanical authentication of lemon and orange honeys[J]. Food Res Int, 2011, 44(5): 1504-1513.
- [30] Gonzalez-Mas MC, Garcia-Riano LM, Alfaro C, et al. Headspace-based techniques to identify the principal volatile compounds in red grape cultivars[J]. Int J Food Sci Technol, 2009, 44(3): 510-518.
- [31] 潘欢欢. 白术麸炒过程中物质基础、健脾作用和燥性变化研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.
- [32] 雷春妮, 王波, 孙苗苗, 等. GC-MS-AMDIS 结合保留指数在玫瑰花露香气成分准确定性分析中的应用[J]. 质谱学报, 2022, 43(1): 109-120.
- [33] 赵梦瑶, 李鹏冲, 张立攀, 等. HS-SPME-GC/MS 结合自动解卷积技术分析山茱萸果实挥发性成分[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(1): 128-134.
- [34] 吴婷婷, 朱冬青, 林崇良, 等. GC-MS 结合保留指数分析紫花香薷不同部位挥发油的化学成分[J]. 中国药师, 2021, 24(7): 365-368.

(收稿日期: 2022-05-11; 修回日期: 2022-06-02)

苦皮藤高效液相色谱指纹图谱及多指标成分含量测定

胡家震, 赵婷婷, 何席呈, 唐娟, 陈桃香, 胡成刚* (贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025)

摘要:目的 建立苦皮藤高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并对其中儿茶素、表儿茶素和 3, 4, 5-trimethoxyphenyl- β -D-glucopyranoside 进行含量测定,为苦皮藤的质量控制提供参考。方法 运用 HPLC 法构建苦皮藤药材的指纹图谱,并进行相似度评价,确认共有峰,与对照品比对指认共有峰,结合化学计量学方法对不同产地苦皮藤质量及其控制方法进行分析。采用 HPLC 法同时测定苦皮藤药材中儿茶素、表儿茶素和 3, 4, 5-trimethoxyphenyl- β -D-glucopyranoside 的含量。结果 建立了 12 批苦皮藤的指纹图谱,标定了 22 个共有峰,并指认出 3 个共有峰,12 批药材的相似度在 0.856 ~ 0.969;聚类分析和主成分分析将 12 批药材聚为 3 类,主成分分析得到 3 个主成分的累计方差贡献率为 91.009%;正交偏最小二乘法-判别分析筛选得到 10 个差异标志物,其中 2 个 VIP 较大的差异成分为儿茶素和表儿茶素。儿茶素、表儿茶素和 3, 4, 5-trimethoxyphenyl- β -D-glucopyranoside 的平均回收率分别为 97.97%、98.18%、95.72%,含量分别为 1.076 ~ 2.289、0.835 ~ 2.105、0.337 ~ 0.765 mg · g⁻¹。结论 建立了苦皮藤的 HPLC 指纹图谱及 3 个有效成分含量的测定方法,可为初步评价苦皮藤药材的质量提供依据。

关键词: 苦皮藤; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析; 含量测定

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2887-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.029

HPLC fingerprint and multi-component determination of *Celastrus angulatus* Maxim.

HU Jia-zhen, ZHAO Ting-ting, HE Xi-cheng, TANG Juan, CHEN Tao-xiang, HU Cheng-gang* (School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025)

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprint of *Celastrus angulatus* Maxim., and to determine catechin, epicatechin and 3, 4, 5-trimethoxyphenyl- β -D-glucopyranoside for the quality control of *Celastrus angulatus* Maxim.. **Methods** HPLC fingerprint of *Celastrus angulatus* Maxim. was established for similarity evaluation on the basis of common peaks through chemical pattern recognition. Catechin, epicatechin and 3, 4, 5-trimethoxyphenyl- β -D-glucopyranoside were simultaneously determined. **Results** In the HPLC fingerprint, 22 common peaks were marked, and 3 peaks were accurately identified. The similarity of the 12 batches of sample ranged from 0.856 to 0.969, which were clustered into 3 groups by cluster analysis and principal component analysis. The cumulative variance contribution rate of the three principal components was 91.009%. Ten differential markers were screened by orthogonal partial least squares-discriminant analysis. Among them, two VIP differential components were catechin and epicatechin. The average recoveries of catechin, epicatechin and 3, 4, 5-trimethoxyphenyl- β -D-glucopyranoside were 97.97%, 98.18% and 95.72%; the content of them was 1.076 ~ 2.289, 0.835 ~ 2.105, and 0.337 ~ 0.765 mg · g⁻¹, respectively. **Conclusion** The HPLC fingerprint and the determination of 3 effective components are established, providing a scientific basis for the quality evaluation of *Celastrus angulatus* Maxim..

Key words: *Celastrus angulatus* Maxim.; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis; content determination

基金项目:国家中医药管理局项目“中药资源普查”(No.040180043);2021年国家自然科学基金后补助资金科研创新探索专项(No.04021016107)。

作者简介: 胡家震,男,硕士研究生,主要从事中药及民族药资源分类鉴定与质量控制, email: 419339189@qq.com *通信作者: 胡成刚,男,教授,硕士研究生导师,主要从事中药及民族药资源分类鉴定与质量控制, email: 2274547063@qq.com

苦皮藤 (*Celastrus angulatus* Maxim.) 又名有吊干麻、苦树皮等, 是一种多年生藤状灌木, 为卫矛科南蛇藤属植物^[1], 为贵州省苗药, 收载于《贵州省中药材、民族药材质量标准》(2003 版)^[2], 分布广泛, 资源量大, 药用时常选择根或根皮。苦皮藤具有祛风除湿、活血通经、解毒杀虫的功效, 可用于治疗风湿痹痛、骨折伤痛、闭经、疮疡溃烂等疾病^[3]。在民间, 苦皮藤单用或配方, 可改善类风湿关节炎的症状体征, 具有一定的研究价值。《贵州草药》中记载, 用苦皮藤、藤萝根、白金条各一两, 泡酒服用可以治疗风湿、劳伤、关节疼痛^[4]。现代研究表明苦皮藤主要含有倍半萜类、生物碱类、三萜类、二萜类和黄酮类等化学成分^[5-7], 具有杀虫、抑制巨噬细胞活化、抗肿瘤、对肿瘤细胞多药抗性有修复作用、抗人类免疫缺陷病毒、抗氧化活性以及抗生育活性等作用^[8-10]。文献报道, 苦皮藤中黄酮类成分儿茶素、表儿茶素及槲皮素有一定的抗炎作用^[11-13], 儿茶素可改善佐剂性关节炎大鼠关节损伤病理变化, 并能降低细胞中环磷酸腺苷 (cAMP), 升高胃黏膜前列腺素 E₂ (PGE₂)^[14-15]。表儿茶素可以降低脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞释放炎症因子一氧化氮 (NO)、炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-1 和 IL-6^[16]。槲皮素对类风湿关节炎患者的晨僵、疼痛症状有良好的缓解作用, 且可有效抑制 TNF- α 诱导类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞 (MH7A) 分泌的血清 IL-1 β 、IL-6、IL-8、基质金属蛋白酶 (MMPs) 的表达和磷酸化 NF- κ B p65 (p-NF- κ B p65)^[17-18]。这与民间常用苦皮藤来改善类风湿关节炎症状的用途相符, 本课题组前期对苦皮藤进行了化学成分分离, 并对其化合物进行了体外抗炎活性研究, 得到儿茶素、表儿茶素、3, 4, 5-trimethoxyphenyl- β -D-glucopyranoside 的含量相对

较高且具有抗炎活性^[19-20]。

到目前为止, 在苦皮藤药材的质量控制方面, 尚未有完善可行的质量控制体系, 且 2020 年版《中国药典》中也未收载其质量标准, 这阻碍了苦皮藤的用药安全和资源开发利用的发展。近年来的研究, 很少有文献报道苦皮藤中儿茶素的含量测定方法^[21], 未见有苦皮藤的指纹图谱和其他指标成分的含量测定研究, 难以科学、全面地对该药的质量进行控制。因此, 本文运用高效液相色谱 (HPLC) 技术对不同产地苦皮藤指纹图谱进行研究, 指认指纹图谱中部分化学成分, 为苦皮藤药材的鉴定及质量控制提供参考, 同时利用 HPLC 测定苦皮藤中儿茶素、表儿茶素和 3, 4, 5-trimethoxyphenyl- β -D-glucopyranoside 的含量, 为其质量评价和深入研究开发提供依据。

1 材料

1.1 仪器

FW135 型中草药粉碎机 (天津市泰斯特仪器有限公司), HWS-24 型电热恒温水浴锅 (上海一恒科学仪器有限公司), KQ-5200DA 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), 配有四元泵、自动进样器、柱温箱和 DAD 检测器的 DLSB-10L/25 型高效液相色谱仪 (日本岛津)。

1.2 试剂

儿茶素 (批号: 110877-202005)、表儿茶素 (批号: 110878-201703) (纯度均为 98%, 中国食品药品检定研究院); 3, 4, 5-trimethoxyphenyl- β -D-glucopyranoside (自制, 纯度 98%)。乙腈 (色谱纯, TEDIA COMPANY0); 磷酸 (优级纯)、甲酸 (色谱纯) (天津市科密欧化学试剂有限公司); 怡宝纯净水; 12 批苦皮藤药材为课题组采收, 信息见表 1, 经贵州中医药大学胡成刚教授鉴定为苦皮藤 (*Celastrus angulatus* Maxim.) 的根或根皮药用部位。

表 1 12 批苦皮藤药材来源信息

Tab 1 Origin information of 12 batches of *Celastrus angulatus* Maxim.

编号	产地	采集日期	编号	产地	采集日期
S1	贵州省贵阳市乌当区航天路	2020.11	S7	贵州省贵阳市龙里县流阴洞	2020.11
S2	贵州省贵阳市白云区下水村	2020.11	S8	贵州省清镇市百花湖镇	2020.11
S3	贵州省贵阳市乌当区	2020.11	S9	贵州省贵阳市修文县乌栗乡	2020.11
S4	贵州省安顺市下羊场村	2020.08	S10	贵州省黔西县中山村	2020.11
S5	贵州省贵阳市观山湖区龙井村	2020.11	S11	贵州省贵阳市修文县六厂镇	2017.06
S6	贵州省织金县以那	2020.11	S12	贵州省贵阳市龙里羊场	2017.06

2 方法与结果

2.1 苦皮藤药材的 HPLC 指纹图谱建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 ChromCore 120 C18 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m), 流速 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹; 检测波长 230 nm; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样量 15 μ L, 以乙腈 (A) -0.1% 磷酸水溶液 (B) 为流动相, 梯

度洗脱 (0 ~ 10 min, 2% ~ 3%A; 10 ~ 20 min, 3% ~ 5%A; 20 ~ 90 min, 5% ~ 8%A; 90 ~ 105 min, 8% ~ 10%A)。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取对照品儿茶素、表儿茶素、3, 4, 5-trimethoxyphenyl- β -D-glucopyranoside 适量, 加 75% 甲醇制成

0.133、0.121、0.141 mg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取苦皮藤粉末(过 20 目筛),置具塞锥形瓶中,加入 75% 甲醇 20 mL,超声(功率 200 W,频率 50 kHz)提取 30 min,滤过,取滤液过 0.45 μm 微孔滤膜滤,备用。

2.1.4 精密度试验 取苦皮藤(编号 S4)粉末 1.0 g,精密称定,按“2.1.3”项下方法制备成供试品溶液,连续进样测定 6 次,以表儿茶素为参照进行计算,结果各峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 值均小于 3.0%,说明精密度良好。

2.1.5 重复性试验 按“2.1.3”项下方法制备 6 份苦皮藤供试品溶液,进样分析,以表儿茶素为参照进行计算,结果各峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 值均小于 3.0%,说明方法重复性良好。

2.1.6 稳定性试验 取苦皮藤(编号 S4)粉末 1.0 g,按“2.1.3”项下方法制备成供试品溶液,分别放置于 0、4、8、12、24、36 h 进样测定,以表儿茶素为参照进行计算,结果各峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 值均小于 3.0%,说明样品在 24 h 内稳定。

2.1.7 指纹图谱的建立^[22-23] 取 12 批苦皮藤药材,按“2.1.3”项下方法制备成供试品溶液,进样测定,运用《中药指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》,以样品 S4 色谱图为参照图谱,以 21 号为参照峰,采用中位数法(时间窗口宽度为 0.1),进行自动匹配,建立共有模式,12 批药材的 HPLC 指纹图谱和对照图谱,见图 1。选择了 22 个共有峰,与对照品图谱比较,通过保留时间指认其中 14 号峰为儿茶素,保留时间为 49.541 min;15 号峰为 3,4,5-trimethoxyphenyl-β-D-glucopyranoside,保留时间为 51.925 min;21 号峰为表儿茶素,保留时间为 87.042 min,见图 2。

2.1.8 相似度评价 如表 2 所示,12 批苦皮藤样品与对照指纹图谱的相似度在 0.856 ~ 0.969,表明各产地苦皮藤的指纹图谱具有较好的一致性。

2.2 聚类分析

采用 SPSS 21.0 对 12 批样品的共有峰峰面积进行聚类分析,使用组间联接聚类方法,以余弦离作为样品间的距离公式,聚类结果见图 3。从图中可以看出,当类间距离为 15 时,12 批苦皮藤样品被分为 3 类:1 类包括 S1、S2、S3、S4;2 类 S6、S8、S9、S10、S11、S12;3 类包括 S5、S7。

2.3 主成分分析

采用 SPSS 21.0 对共有峰的峰面积进行主成分分析,设置特征值大于 1,提取得到 3 个主成分,其累计贡献率达到 91.009%,结果见表 3 及图 4,第 1 主成分特征值为 10.336,累计贡献率为 46.983%,其对应载荷量较大的峰为峰 5、峰 4、

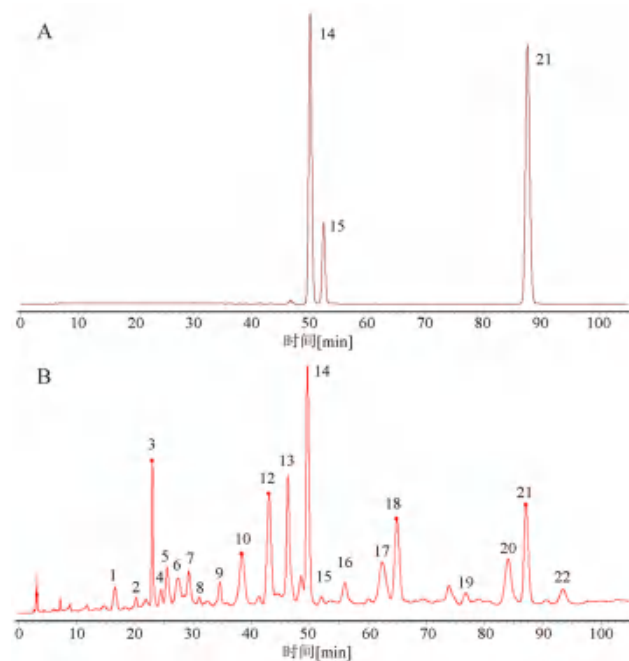


图 1 混合对照品溶液(A)和供试品溶液(B)的 HPLC 图谱

Fig 1 HPLC chromatogram of reference solution (A) and sample solution (B)

14. 儿茶素 (catechin); 15. 3, 4, 5-trimethoxyphenyl-β-D-glucopyranoside; 21. 表儿茶素 (epicatechin)

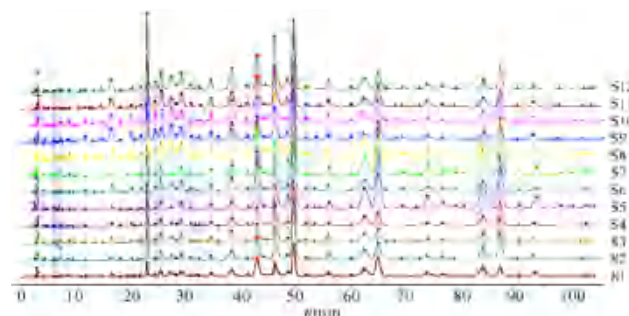


图 2 12 批苦皮藤药材 HPLC 指纹图谱

Fig 2 HPLC fingerprint of 12 batches of *Celastrus angulatus* Maxim.

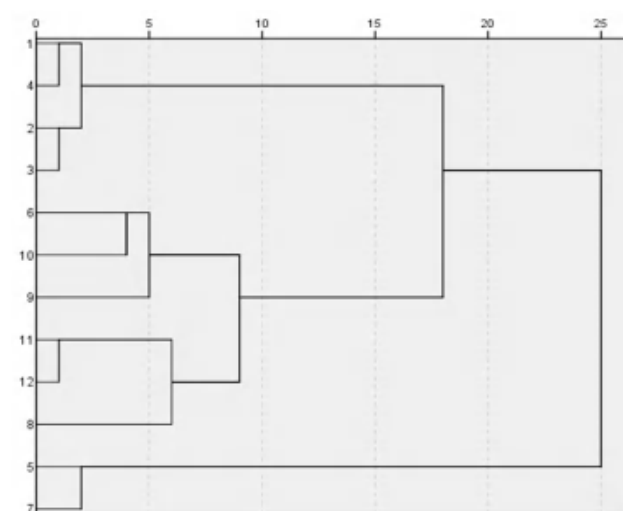


图 3 12 批苦皮藤药材聚类分析图

Fig 3 Cluster analysis of 12 batches of *Celastrus angulatus* Maxim.

表 2 12 批苦皮藤药材 HPLC 指纹图谱与对照指纹图谱的相似度

Tab 2 Similarity of HPLC fingerprint of 12 batches samples to the reference

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	R
S1	1												
S2	0.929	1											
S3	0.885	0.968	1										
S4	0.923	0.984	0.963	1									
S5	0.642	0.579	0.516	0.584	1								
S6	0.939	0.966	0.969	0.960	0.593	1							
S7	0.629	0.601	0.551	0.608	0.992	0.616	1						
S8	0.888	0.945	0.961	0.941	0.578	0.984	0.615	1					
S9	0.894	0.918	0.931	0.894	0.513	0.952	0.531	0.933	1				
S10	0.885	0.938	0.960	0.919	0.540	0.965	0.572	0.969	0.975	1			
S11	0.908	0.942	0.965	0.925	0.515	0.961	0.533	0.926	0.968	0.952	1		
S12	0.894	0.944	0.972	0.928	0.526	0.974	0.554	0.960	0.972	0.968	0.989	1	
R	0.930	0.951	0.940	0.944	0.856	0.969	0.876	0.956	0.926	0.945	0.934	0.946	1

表 3 12 批苦皮藤的主成分特征值及方差贡献率结果

Tab 3 Principal component eigenvalue and variance contribution rate of 12 batches of *Celastrus angulatus* Maxim.

主成分	特征值	方差贡献率 /%	累计方差贡献率 /%
1	10.336	46.983	46.983
2	8.014	36.428	83.411
3	1.672	7.598	91.009

峰 6、峰 1、峰 10、峰 7、峰 13，表明其对第 1 主成分的影响较大，可为苦皮藤的质量评价提供参考依据。第 2 主成分特征值为 8.014，累计贡献率为 36.428%，对应载荷量较大的峰为峰 12、峰 14（儿茶素），表明其对第 2 主成分存在一定程度的影响。第 3 主成分的特征值为 1.672，累计贡献率为 7.598%。分析结果表明，苦皮藤的前 3 个主成分可概括原有数据的绝大部分信息。

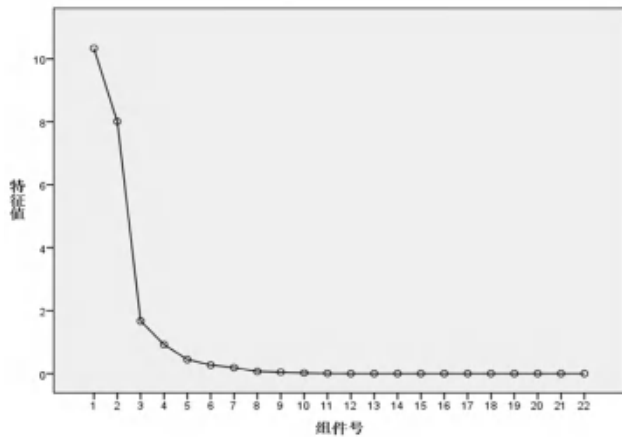


图 4 12 批苦皮藤主成分分析碎石图

Fig 4 Gravel maps of 12 batches of *Celastrus angulatus* Maxim.

2.4 正交偏最小二乘 - 判别分析 (OPLS-DA)

利用 SIMCA 13.0 软件，OPLS-DA 对 22 个共有峰的峰面积进行分析，结果见图 5，样品可聚为 3 类，其结果与聚类分析结果一致。提取 OPLS-DA 模型中 22 个变量的 VIP 值并从小

排序，结果见图 6。VIP 值大于 1 的分别为峰 14（儿茶素）、峰 21（表儿茶素）、峰 12、峰 18、峰 13、峰 20、峰 17、峰 3、峰 10、峰 6，以上成分可能导致苦皮藤质量产生差异的因素，能够为含量测定指标的选择提供参考。

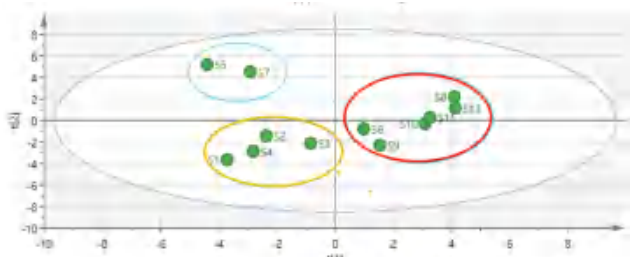


图 5 12 批苦皮藤 OPLS-DA 得分图

Fig 5 OPLS-DA score of 12 batches of *Celastrus angulatus* Maxim.

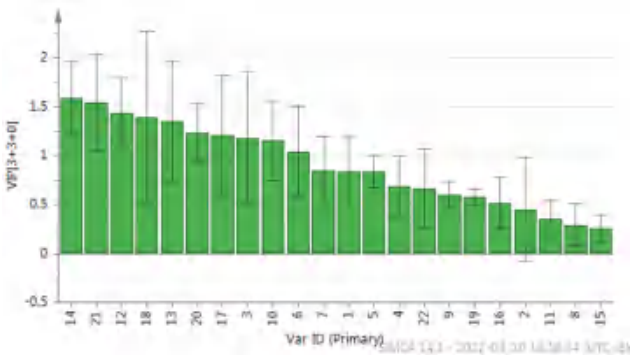


图 6 12 批苦皮藤 VIP 图

Fig 6 VIP plot of 22 common peaks of 12 batches of *Celastrus angulatus* Maxim.

2.5 苦皮藤药材中 3 个有效成分的含量测定

2.5.1 色谱条件 以 ChromCore 120 C18 (5 μ m, 4.6 mm $\times$ 250 mm) 为色谱柱，以乙腈 (A) -0.1% 甲酸水 (B) 为流动相进行梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 7.5% ~ 9.5%A; 10 ~ 40 min, 9.5% ~ 10%A)，进样量 10 μ L，流速 0.8 mL $\cdot$ min $^{-1}$ ，柱温 35 $^{\circ}$ C，检测波长 270 nm。

2.5.2 供试品溶液的制备 精密称取苦皮藤粉末 1.0 g, 加入 75% 甲醇 30 mL, 超声 40 min, 滤液过 0.22 μm 微孔滤膜, 得到供试品溶液。

2.5.3 专属性试验 取空白对照 (75% 甲醇), 混合对照品溶液及供试品溶液, 按“2.5.1”项下色谱条件进样。记录色谱图, 见图 7。结果表明该检测方法, 空白溶剂在对照品及供试品所需检测峰保留时间处无干扰, 具有较好的专属性。

2.5.4 线性关系考察 按“2.5.2”项下方法将儿

茶素、表儿茶素、3, 4, 5-trimethoxyphenyl- β -D-glucopyranosid 制成 1.463 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、1.320 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、1.551 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液, 精密吸取 0.9、2.7、4.5、6.3、8.1、9.9 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释并定容至刻度, 摇匀, 制成不同质量浓度的系列混合对照品溶液, 进样测定, 记录色谱图。以对照品质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为 X 轴, 峰面积为 Y 轴绘制标准曲线, 结果见表 4。

表 4 3 个成分的线性回归分析结果

Tab 4 Linear regression of 3 components

成分	回归方程	r^2	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
儿茶素	$Y = 5.516 \times 10^5 X - 2.081 \times 10^3$	0.9998	0.133 ~ 1.463
表儿茶素	$Y = 6.263 \times 10^5 X - 1.114 \times 10^4$	0.9998	0.120 ~ 1.320
3, 4, 5-trimethoxyphenyl- β -D-glucopyranoside	$Y = 1.621 \times 10^5 X - 3.291 \times 10^3$	0.9999	0.141 ~ 1.551

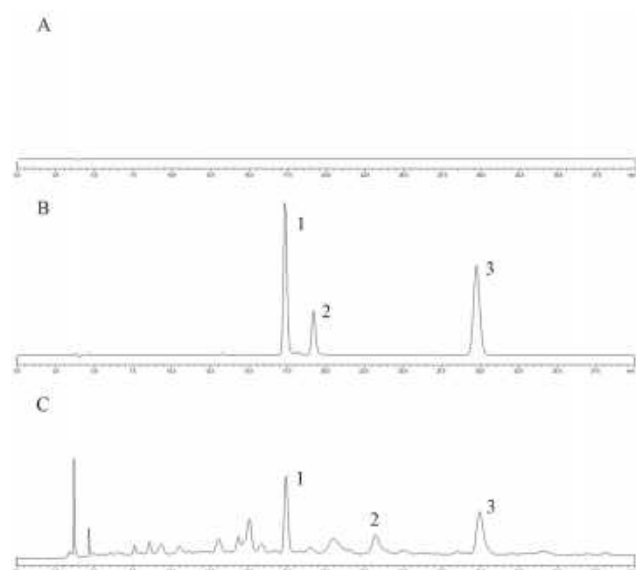


图 7 混合对照品溶液 HPLC 图谱

Fig 7 HPLC chromatograms of reference solution

A. 空白对照 (blank control); B. 混合对照品 (reference solution); C. 供试品 (sample); 1. 儿茶素 (catechin); 2. 3, 4, 5-trimethoxyphenyl- β -D-glucopyranoside; 3. 表儿茶素 (epicatechin)

2.5.5 精密度试验 精密吸取“2.5.2”项下供试品溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 测得峰面积。计算得 3 个成分的峰面积 RSD 值均小于 1.0%, 表明仪器精密度良好。

2.5.6 重复性试验 取苦皮藤粉末 (S4) 6 份, 按“2.5.2”项下方法制备供试品溶液, 分别进样测定, 记录各成分的峰面积, 测得苦皮藤药材中 3 个成分的峰面积 RSD 值均小于 2.0%, 表明本方法重现性良好。

2.5.7 稳定性试验 取苦皮藤粉末 (S4) 6 份, 按“2.5.2”项下方法制备, 分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样, 记录各成分的峰面积, 测得苦皮

藤药材中 3 个成分的峰面积 RSD 值均小于 1.0%, 表明供试品溶液 24 h 内稳定。

2.5.8 加样回收试验 精密称定 6 份已知含量的苦皮藤药材粉末 (S4) 1.0 g, 分别加入混合对照品溶液 1 mL, 按“2.5.2”项下方法制备, 进样测定, 计算回收率和 RSD 值。结果儿茶素、表儿茶素和的 3, 4, 5-trimethoxyphenyl- β -D-glucopyranoside 平均回收率分别为 97.97%、98.18%、95.72%, RSD 值分别为 1.6%、0.85%、0.59%。

2.5.9 样品含量测定 精密称取 12 个产地苦皮藤药材粉末各 1 份, 每份约 1.0 g, 按“2.5.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 记录各色谱峰面积, 计算含量, 结果见表 5。

表 5 12 批不同产地苦皮藤药材 3 个成分含量测定 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tab 5 Content of 3 components of 12 batches of *Celastrus angulatus* Maxim. ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

样品	儿茶素	表儿茶素	3, 4, 5-trimethoxyphenyl- β -D-glucopyranoside
S1	1.089	0.835	0.381
S2	1.076	0.952	0.337
S3	1.820	1.298	0.662
S4	1.872	1.687	0.592
S5	1.977	1.573	0.528
S6	1.532	1.291	0.567
S7	1.880	1.774	0.665
S8	2.069	2.105	0.765
S9	1.450	0.706	0.522
S10	1.471	1.229	0.505
S11	2.117	0.937	0.541
S12	2.289	1.223	0.743
平均含量	1.720	1.301	0.570
SD/%	0.39	0.42	0.13

3 讨论

3.1 指纹图谱的建立及相似度评价

苦皮藤 HPLC 指纹图谱与对照图谱相似度为 0.856 ~ 0.969, 标定了 22 个共有峰。通过与分离得到的化合物保留时间对比, 指认了 3 个共有峰。12 批样品共有峰的保留时间基本一致, 表明所建立的指纹图谱相似度和稳定性较好, 但是共有峰的相对面积差异较大, 可能与产地的气候、土壤等有关。

3.2 化学计量学分析

聚类分析显示 12 批苦皮藤样品可聚为 3 大类, S1、S2、S3、S4 为第 1 类; S6、S8、S9、S10、S11、S12 为第 2 类; S5、S7 为第 3 类, 贵州贵阳乌当区、白云区、安顺市的苦皮藤成分较为接近, 贵阳市观山湖区和龙里县的苦皮藤成分较为接近, 贵州织金、清镇、修文、黔西的苦皮藤成分较为接近, 说明药材成分会随着产地和气候而发生变化。根据 OPLS-DA 中, 影响较大的色谱峰有 14、21、12、18、13、20、17、3、10、6 号峰, 其中 14 号峰为儿茶素、21 号峰为表儿茶素, 其他峰暂不明确。

3.3 含量测定结果分析

含量测定结果显示, 12 个产地苦皮藤药材中儿茶素和表儿茶素的含量均高于 3, 4, 5-trimethoxyphenyl- β -D-glucopyranoside。儿茶素的含量以贵阳市龙里羊场所产苦皮藤最高, 表儿茶素和 3, 4, 5-trimethoxyphenyl- β -D-glucopyranoside 的含量以贵州省清镇市百花湖镇所产苦皮藤最高, 说明产地不同, 化学成分也不同。

3.4 小结

综上所述, 本研究建立的 HPLC 指纹图谱和含量测定方法准确性好, 同时结合化学模式识别分析, 筛选出了不同产地苦皮藤差异性的标志性成分, 结果可为苦皮藤质量控制和评价提供参考。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 45 卷第 3 分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1990: 97-129.
- [2] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003: 274.
- [3] 南京中医药大学. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 1217.
- [4] 贵州省中医研究所. 贵州草药 [M]. 贵阳: 贵州人民出版社, 1970.
- [5] Yin WP, Zhao TZ, Fu JG. Chinese bittersweet alkaloid III, a new compound *Celastrus angulatus* [J]. Asian Nat Prod Res, 2001, 3 (3): 183-189.
- [6] 吴文君, 胡兆农, 刘惠霞, 等. 苦皮藤主要杀虫有效成分的杀虫作用机理及其应用 [J]. 昆虫学报, 2005 (5): 770-777.
- [7] Zhang HY, Zhao TZ, Dong JJ, et al. Four new sesquiterpene polyolesters from *Celastrus angulatus* [J]. Phytochem Lett, 2014, 7: 101-106.
- [8] Bruwning R, Wagner H. Übersicht über die celastraceen-in-

- haltsstoffe: chemie, chemotaxonomie biosynthese pharmakologie [J]. Phytochemistry, 1978, 17 (11): 1821-1858.
- [9] Su XH, Zhang ML, Zhan WH, et al. Chemical and pharmacological studies of the plants from genus *Celastrus* [J]. Chem Biodivers, 2009, 6 (2): 146-161.
- [10] 张兴. 植物农药与药剂毒理学研究进展 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002: 40-44.
- [11] 童观珍, 付晓萍, 杨艳, 等. 表儿茶素的分布及药理活性研究进展 [J]. 云南农业大学学报, 2018, 33 (2): 343-349.
- [12] 周露露, 高原, 牛智慧, 等. 茶叶中儿茶素的药理作用及其研究进展 [J]. 辽宁化工, 2018, 47 (4): 316-318, 363.
- [13] 杨颖, 王芸芸, 蒋琦辰. 槲皮素药理作用的研究进展 [J]. 特种经济动植物, 2020, 23 (5): 24-28.
- [14] Tang LQ, Wei W, Wang XY. Effects and mechanisms of catechin on adjuvant arthritis in rats [J]. Adv Ther, 2007, 24 (3): 679-690.
- [15] 唐丽琴, 魏伟, 刘圣, 等. 儿茶素对 IL-1 α 诱导佐剂性关节炎大鼠成纤维样滑膜细胞功能的影响 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19 (3): 217-220.
- [16] 阮洪生, 牟晋珠. 表儿茶素对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞分泌炎症因子的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (4): 159.
- [17] Fatemeh J, Arman A, Shahryar E, et al. The effect of quercetin on inflammatory factors and clinical symptoms in women with rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized controlled trial [J]. J Am Coll Nutr, 2017, 36 (1): 9-15.
- [18] 贾庆运, 王拥军, 梁倩倩, 等. 槲皮素对人类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞炎症因子和基质金属蛋白酶的表达的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25 (6): 738-741.
- [19] 赵婷婷, 陈彦伶, 胡成刚, 等. 苦皮藤提取物对佐剂性关节炎大鼠的治疗作用 [J]. 亚太传统医药, 2022, 18 (4): 21-26.
- [20] 陈彦伶, 何金英, 胡成刚, 等. 苦皮藤对类风湿性关节炎成纤维滑膜细胞增殖和相关细胞因子表达的影响 [J]. 中国民族民间医药, 2020, 29 (4): 14-20.
- [21] 徐艳, 成运, 何应超, 等. 贵州民族药苦皮藤药材质量标准研究 [J]. 贵州科学, 2019, 37 (1): 5-9.
- [22] 南俊伶, 王超众, 闫广利, 等. 山豆根药材 UPLC-UV 指纹图谱及 3 种成分含量测定研究 [J]. 中南药学, 2022, 195 (4): 910-915.
- [23] 李鹤, 陈伟东. 不同产地三叶青 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中药材, 2021, 44 (12): 2910-2913.
- [24] 常红, 袁腾腾, 吕淑婕, 等. 骨疏灵的 UPLC 指纹图谱的建立及 8 种成分的含量测定 [J]. 中南药学, 2022, 192 (1): 159-164.
- [25] 王兆华, 张大军, 黄凤辉. 基于 HPLC 指纹图谱及聚类分析评价不同产地黄芪的质量 [J]. 山东化工, 2021, 50 (19): 132-135.
- [26] 刘妍妍, 张慧文, 白云霞, 等. 蒙药三子散 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别研究 [J]. 中国药房, 2022, 33 (3): 319-325.
- [27] 杨敏娟, 杨小龙, 黄银平, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和主成分分析方法评价不同产地延胡索的质量 [J]. 亚太传统医药, 2021, 17 (10): 46-50.
- [28] 汤晓, 焦泽武, 龚淑珍, 等. 黄酮混合物体外抗氧化活性的相互作用 [J]. 食品科技, 2013, 38 (2): 198-206.

(收稿日期: 2022-05-12; 修回日期: 2022-06-17)

高效液相色谱法测定曲咪新乳膏中硝酸咪康唑有关物质

周天天, 张营, 谈仲川, 张雁森, 胡春玲* (湖北中医药大学药学院, 武汉 430065)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法测定曲咪新乳膏中硝酸咪康唑有关物质。**方法** 使用 YMC-Triart C18 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 以甲醇-0.05% 醋酸铵溶液为流动相, 梯度洗脱; 柱温 30 °C、检测波长 230 nm、流速 1.0 mL·min⁻¹。对硝酸咪康唑杂质 A (降解杂质) 进行定量分析, 其他杂质作限度检查。**结果** 系统适用性试验中, 硝酸咪康唑 6 个杂质峰均完全分离, 制剂中的主成分和辅料对有关物质测定无干扰。杂质 A 的平均回收率在 89.99%~100.19% (RSD < 4.1%), 硝酸咪康唑的平均回收率在 91.50%~103.02% (RSD < 6.9%)。**结论** 所建立的方法重复性好、专属性强, 可用于曲咪新乳膏中硝酸咪康唑有关物质的检查。

关键词: 曲咪新乳膏; 有关物质; 硝酸咪康唑; HPLC

中图分类号: R917, R927 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2022)12-2893-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.030

Determination of related substances of miconazole nitrate in triamcinolone acetonide acetate and miconazole nitrate neomycin sulfate cream by HPLC

ZHOU Tian-tian, ZHANG Ying, TAN Zhong-chuan, ZHANG Yan-miao, HU Chun-ling* (Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065)

Abstract: **Objective** To determine the related substances of miconazole nitrate in triamcinolone acetonide acetate and miconazole nitrate neomycin sulfate cream by HPLC. **Methods** YMC-Triart C18 column (150 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. Gradient elution was conducted with methanol-0.05% ammonium acetate solution as the mobile phase. The column temperature was 30 °C, the detection wavelength was 230 nm, and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. Miconazole nitrate impurity A (degradation impurity) was quantitatively controlled and other impurities were checked for limits. **Results** In the system applicability test, six impurity peaks of miconazole nitrate were well separated, and the main components and excipients in the preparation did not interfere with the determination of related substances. The average recovery of impurity A was 89.99%~100.19% (RSD < 4.1%), and the average recovery of miconazole nitrate was 91.50%~103.02% (RSD < 6.9%). **Conclusion** The method has good repeatability and strong specificity, and it is suitable for the determination of related substances of miconazole nitrate in triamcinolone acetonide acetate and miconazole nitrate neomycin sulfate cream.

Key words: triamcinolone acetonide acetate and miconazole nitrate neomycin sulfate cream; relevant substance; miconazole nitrate; HPLC

对化学药原料及制剂中的杂质特别是毒性杂质的控制是药物质量控制的难点^[1-3]。曲咪新乳膏是由硝酸咪康唑 (miconazole nitrate)、硫酸新霉素 (neomycin sulfate) 和醋酸曲安奈德 (triamcinolone acetonide acetate) 三种原料及相应辅料制成的一种外用复方制剂, 用于皮肤湿疹、湿疹相关性皮炎、体癣等皮肤病, 疗效显著, 目

前在临床上已被广泛使用^[4-6]。有文献指出硝酸咪康唑原料药中可能存在的 6 种毒性杂质 (杂质 A~F)^[7-8]。由于曲咪新乳膏处方中原料药含量低, 制剂中的杂质分析难度大, 现有的曲咪新乳膏质量标准 [WS-10001-(HD-0155)-2002] 中尚无有关物质检查项。曲咪新乳膏有关物质研究已有文献报道, 王叶子等^[9]采用 HPLC 法建立了曲

作者简介: 周天天, 女, 硕士研究生, 主要从事药物化学研究, email: 2446871810@qq.com * 通信作者: 胡春玲, 女, 副教授, 主要从事天然产物的化学合成及结构修饰研究, email: 1054681196@qq.com

咪新乳膏中醋酸曲安奈德有关物质检查方法; 古丽霞等^[10]采用 UHPLC 法检测了曲咪新乳膏中硝酸咪康唑和醋酸曲安奈德的有关物质, 但目前 UHPLC 仪器在我国药品生产企业普及率低; 梁秋霞等^[11]简述了曲咪新乳膏中 3 种原料及其有关物质的检测方法, 重点分析了国内多个生产厂家的产品总体质量评估情况。鉴于我国制药企业分析仪器的普及性, 本研究通过杂质谱分析和强制降解试验优化了色谱条件, 采用 HPLC 法建立曲咪新乳膏中硝酸咪康唑有关物质检查方法, 将 6 种毒性杂质与硝酸咪康唑、醋酸曲安奈德及其他辅料完全分离, 可用于曲咪新乳膏中硝酸咪康唑有关物质的检测, 有利于提高药品的质量和安全性。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT HPLC 仪 (Shimadzu); 1260-HPLC 仪 (Agilent); AB135-S 型天平 (感量: 0.01 mg, Mettler Toledo); TG16-II 型医用离心机 (长沙平凡仪器仪表有限公司); BCD202 冰箱 (广东 TCL 集团); 超纯水制备仪 (成都优越科技有限公司)。

1.2 试药

硝酸咪康唑 (纯度: 99.6%, 批号: 100213-201706)、杂质 B (硝酸益康唑, 纯度: 99.6%, 批号: 10214-201704)、曲安奈德 (批号: 100055-201103, 纯度: 98.8%)(中国食品药品检定研究院); 杂质 A[(1*RS*) -1- (2, 4-dichlorophenyl) -2- (1*H*-imidazol-1-yl) ethan-1-ol, 纯度: 98.0%, 批号: 14691-1508]、杂质 C[(2*RS*) -2- (2, 4-dichlorophenyl) -2[[(2, 4-dichlorophenyl) methyl]oxy]ethan-1-amine, 纯度: 97.0%, 批号: 180211-1806]、杂质 D[1- [(2*RS*) -2- (2, 4-dichlorophenyl) -2[[(2, 6-dichlorophenyl) methyl]oxy]ethyl]-1*H*-imidazole, 纯度: 98.0%, 批号: 18024-1901]、杂质 E[2-[1- [(2*RS*) -2- (2, 4-dichlorophenyl) -2[[(2, 4-dichlorophenyl) methyl]oxy]ethyl]-1*H*-imidazol-3-ium-3-yl]-2-methylpropanoate, 纯度: 97.0%, 批号: 18025-1811]、杂质 F[1- [(2*RS*) -2- (2, 4-dichlorophenyl) -2[[(3, 4-dichlorophenyl) methyl]oxy]ethyl]-1*H*-imidazole, 纯度: 98.0%, 批号: 180212-1806)(CATO Research Chemicals Inc); 羟苯乙酯 (药用辅料, 批号: 20182012, 广州市汉普医药有限公司)。硝酸咪康唑原料 (批号: 20171202, 江苏恩华药业, 药用级); 曲咪新乳膏 (规格: 10 g/支, 批号: 20170302、20170701、20180501、20190301)、硝酸咪康唑阴性样品 (湖北人福成田药业); 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: YMC-Triart C18 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 0.05% 醋酸铵溶液为流动相 A, 甲醇为流动相 B, 梯度洗脱 (0~5 min, 30%A; 5~6 min, 30%→24%A; 6~24 min, 24%A; 24~25 min, 24%→30%A); 检测波长 230 nm; 柱温 30℃; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 进样量 20 μL。

2.2 溶液的制备

空白溶剂: 甲醇-0.05% 醋酸铵溶液 (70:30), 亦用作稀释剂。

硝酸咪康唑原料溶液: 取硝酸咪康唑原料适量, 加稀释剂溶解并制成 1 mg·mL⁻¹ 的溶液。

供试品溶液: 称取本品 2.5 g (相当于硝酸咪康唑 25 mg), 精密称定, 置小烧杯中, 分次加入稀释剂 15 mL, 置 60℃ 水浴加热溶解, 放冷, 溶液全部移入 25 mL 量瓶中, 用稀释剂润洗烧杯, 洗液并入同一量瓶, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀。置冰浴中冷却 2 h 后立即离心 5 min (5000 r·min⁻¹), 取上清液, 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 放至室温, 即得。

阴性样品溶液: 称取不含硝酸咪康唑的阴性样品 2.5 g, 精密称定, 照供试品溶液制备方法同法制备。

混合对照品溶液: 取杂质 A 对照品、硝酸咪康唑对照品各适量, 用甲醇溶解制成各含 10 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

加标供试品溶液: 称取本品 2.5 g, 置 25 mL 量瓶中, 加入杂质 A~F 对照品各适量, 用稀释剂稀释至刻度, 摇匀。按供试品溶液制备方法制成杂质 A~F 各含 2.5 μg·mL⁻¹ 的混合溶液。

系统适用性溶液: 精密称取硝酸咪康唑对照品、羟苯乙酯、杂质 A 对照品、杂质 B 对照品各适量, 加甲醇制成各含 10 μg·mL⁻¹ 的溶液。

2.3 系统适用性与专属性试验

精密量取“2.2”项下空白溶剂、阴性样品溶液、硝酸咪康唑原料溶液、系统适用性溶液、供试品溶液、加标供试品溶液各 20 μL, 进样分析, 结果见图 1。在系统适用性溶液色谱中, 杂质 A 峰与羟苯乙酯峰的分离度>2.5; 杂质 B 峰与硝酸咪康唑峰的分离度>10。在加标供试品溶液色谱中, 杂质 A~F 峰与制剂中其他成分峰均完全分离 [*t_R* 分别为: 2.82 min (杂质 A 峰)、3.44 min (羟苯乙酯峰)、7.67 min (醋酸曲安奈德峰)、9.37 min (杂质 C 峰)、12.01 min (杂质 E 峰)、13.31 min (杂质 B 峰)、15.58 min (杂质 D 峰)、17.47 min (杂质 F 峰)、20.78 min (硝酸咪康唑峰)], 表明空白溶剂、其他原料和辅料不干扰硝酸咪康唑有关物质的测定。

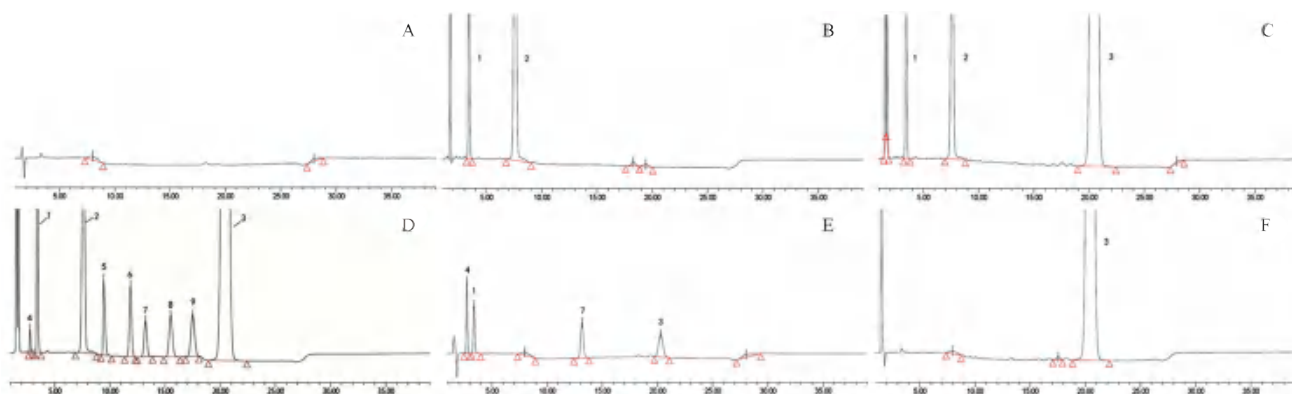


图1 系统适用性与专属性试验色谱图

Fig 1 Chromatograms of the system applicability and specificity validation test

A. 空白溶剂 (blank solvent); B. 阴性样品溶液 (negative sample solution); C. 供试品溶液 (test sample solution); D. 加标供试品溶液 (standard test sample solution); E. 系统适用性溶液 (system applicability solution); F. 硝酸咪康唑原料溶液 (raw materials solution); 1. 羟苯乙酯 (ethylparaben); 2. 醋酸曲安奈德 (triamcinolone acetonide acetate); 3. 硝酸咪康唑 (miconazole nitrate); 4. 杂质 A (impurity A); 5. 杂质 C (impurity C); 6. 杂质 E (impurity E); 7. 杂质 B (impurity B); 8. 杂质 D (impurity D); 9. 杂质 F (impurity F)

2.4 强制降解试验

取本品 2.5 g, 分别置烧杯中, 进行如下处理: ①加 2 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液, 摇匀, 避光放置 2 h 后, 加 2 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液; ②加 2 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液, 摇匀, 避光放置 2 h 后, 加 2 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液; ③光照 (4500 ± 500) lx 12 h; ④加 2 mL 10% H_2O_2 溶液, 摇匀, 避光放置 2 h; ⑤避光, 60°C 放置 12 h。即分别得到碱、酸、光照、氧化和高温破坏的样品, 再按“2.2”项下供试品溶液制备方法制成各条件破坏的样品溶液。另取硝酸咪康唑原料 25 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 同上述方法制成各条件破坏的原料溶液。

吸取各破坏试验溶液进样分析。结果硝酸咪康唑原料及制剂在各种破坏条件下均未检出硝酸咪康唑降解杂质, 经 DAD 检测器及 Empower 工作站分析检测, 各破坏条件下的试验溶液色谱中主成分峰纯度符合要求, 物料守恒 (见图 2)。

2.5 耐用性考察

考察色谱条件的变化对测定结果的影响, 即取同一供试品溶液、同一对照溶液和阴性样品溶液考察不同波长 (229、230、231 nm)、流速 (0.9 、 1.0 、 $1.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$)、柱温 (25 、 30 、 35°C) 及相同品牌不同批号色谱柱对测定结果的影响。结果显示, 波长、流速、柱温在上述范围内发生较小变动; 采用同品牌不同批号色谱柱的试验时, 主成分与杂质、杂质与杂质之间的分离度均符合要求, 空白辅料溶液不干扰供试品中杂质的测定, 且各杂质含量变化的绝对值均 $< 0.03\%$ 。表明本试验色谱条件的耐用性好。

2.6 线性关系考察

精密称取杂质 A 对照品、硝酸咪康唑对照品适量, 用甲醇溶解并逐级稀释成一系列浓度的混合溶液, 取 $20 \mu\text{L}$ 进样分析。以峰面积 (y) 为纵坐标, 溶液质量浓度 (x) 为横坐标进行线性回归, 定量限、检测限分别以信噪比 $S/N = 10$ 、3 计算, 结果见表 1。

表 1 线性考察结果

Tab 1 Linearity

成分	回归方程	相关系数	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	定量限 / ng	检测限 / ng
杂质 A	$y = 8.259 \times 10^4 x - 4.526 \times 10^3$	0.9985	1.085 ~ 4.746	12.79	3.80
硝酸咪康唑	$y = 1.432 \times 10^5 x - 4.901 \times 10^4$	0.9979	1.264 ~ 4.424	15.44	4.37

2.7 精密度试验

2.7.1 重复性 精密称取曲咪新乳膏约 2.5 g, 置小烧杯中, 加稀释剂 15 mL, 置 60°C 水浴加热溶解, 全部移入 25 mL 量瓶中, 用稀释剂润洗烧杯, 洗液并入同一量瓶, 再加入杂质 A 储备液 ($67.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1.0 mL, 置于 60°C 水浴 5 min、

振摇溶解, 放冷, 加稀释剂稀释至刻度、摇匀。再在冰水浴中冷却 2 h, 立即离心 5 min ($5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 取上清液滤过, 续滤液放至室温, 即为供试品溶液。平行制备 6 份, 进样分析。结果 6 份加标样品中杂质 A 含量的 RSD 值为 2.3%。

2.7.2 中间精密度考察 由不同分析人员在不同

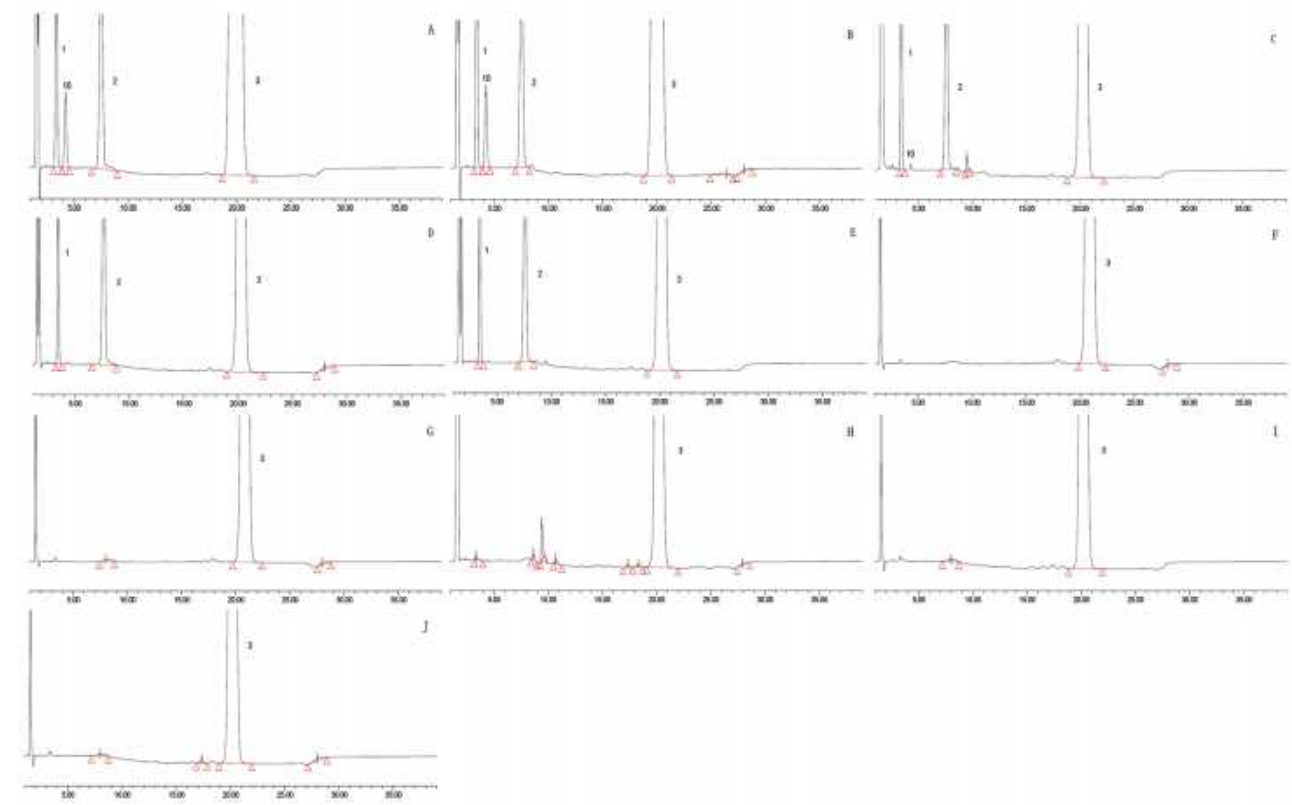


图 2 强制降解试验色谱图

Fig 2 Chromatograms of the forced degradation test

A. 酸破坏样品 (destroyed by acid for sample); B. 碱破坏样品 (destroyed by alkali for sample); C. 氧化破坏样品 (destroyed by 10% H_2O_2 for sample); D. 高温破坏样品 (destroyed by high temperature for sample); E. 光照破坏样品 (destroyed by high irradiation for sample); F. 酸破坏原料 (destroyed by acid for raw materials); G. 碱破坏原料 (destroyed by alkali for raw materials); H. 氧化破坏原料 (destroyed by 10% H_2O_2 for raw materials); I. 高温破坏原料 (destroyed by high temperature for raw materials); J. 光照破坏原料 (destroyed by high irradiation for raw materials); 1. 羟苯乙酯 (ethylparaben); 2. 醋酸曲安奈德 (triamcinolone acetonide acetate); 3. 硝酸咪康唑 (miconazole nitrate); 10. 曲安奈德 (triamcinolone acetonide)

时间和不同仪器,按重复性项下方法操作,测得 6 份加标样品中杂质 A 含量 RSD 值为 1.3%,表明中间精密度良好。

2.8 溶液稳定性试验

取室温放置的对照品混合溶液、供试品溶液,分别于 0、3、6、9、12、18、24 h 进样分析。结果供试品溶液色谱中和对照品混合溶液色谱中,主成分峰和杂质 A 峰的面积 RSD 值均 $< 2.0\%$ ($n = 7$)。表明在室温条件下,对照品混合溶液和供试品溶液在 24 h 内均稳定。

2.9 回收试验

精密称取硝酸咪康唑阴性样品约 2.5 g,置小烧杯中,加稀释剂 15 mL,置 60 $^{\circ}C$ 水浴加热溶解,移入 25 mL 量瓶中,分别精密加入杂质 A 和硝酸咪康唑的对照品储备液各适量,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成定量限、80%、100% 和 120% 等 4 个不同浓度水平的准确度溶液,计算杂质 A 和硝酸咪康唑的回收率。结果杂质 A 和硝

咪康唑的平均回收率分别在 89.99% ~ 100.19%, 91.50% ~ 103.02%, RSD 分别在 0.5% ~ 4.1%, 1.3% ~ 6.9%,表明方法准确可靠。

2.10 样品中硝酸咪康唑有关物质的测定

对 4 批样品 (批号分别为 20170302、20170701、20180501、20190301) 中有关物质进行检测。杂质 A 含量以外标法按峰面积计算,其他杂质含量采用主成分自身对照法计算,结果见表 2。

表 2 曲咪新乳膏中硝酸咪康唑有关物质测定结果 (%)
Tab 2 Determination of related substances in triamcinolone acetonide acetate and miconazole nitrate neomycin sulfate cream (%)

批号	杂质 A 含量	其他最大单杂含量	其他杂质总量
20190301	未检出	0.06	0.11
20180501	未检出	0.08	0.15
20170701	未检出	0.04	0.08
20170302	0.03	0.05	0.16

3 讨论

曲咪新乳膏处方组成复杂,主成分含量低。

本试验建立的曲咪新乳膏中硝酸咪康唑有关物质测定方法,经方法学验证结果显示,该方法不仅能使硝酸咪康唑 6 个已知杂质之间完全分离,且可与制剂中其他原料药、辅料完全分离,表明方法专属性强;波长、流速、柱温发生较小改变时不影响测定结果,表明耐用性好,且流动相组成采用低浓度的醋酸铵溶液,有利于色谱仪器和色谱柱的保护;重复性、中间精密度和准确度试验结果表明方法的精密度好,准确可靠。

本试验对硝酸咪康唑原料药进行了杂质谱分析,结果未检测出杂质 A,但在近效期的制剂中可检出杂质 A,而其他杂质未检出或未增加。表明杂质 A 为降解杂质,有文献报道在自由基引发剂存在下硝酸咪康唑被氧化可产生杂质 A^[12]。因此,可将杂质 A 作为已知杂质进行定量控制,其他杂质只作限度检查。根据样品测定结果,参照《中国药典》2020 年版二部^[13]中收载的硝酸咪康唑原料药标准,暂拟订本品中硝酸咪康唑有关物质的限度为:杂质 A ≤ 0.25%,其他单个杂质 ≤ 0.25%,杂质总量 ≤ 1.0%。含量小于 0.1% 的色谱峰及硝酸根离子峰忽略不计。

参考文献

- [1] 石小娜,张志英,王立爽,等. LC-MS/MS 法测定盐酸法舒地尔中 2 种基因毒性杂质的含量[J]. 中国新药杂志, 2021, 30 (13): 1236-1241.
- [2] Tamás K, Wachter-Kiss E, Kormány R. Hydrazine determination in allopurinol using derivatization and SPE for sample preparation [J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 152: 25-30.
- [3] 孙琳,马平平,牛妍妍,等. 气相-质谱联用法测定甲磺酸伊马替尼中的甲磺酸烷酯类[J]. 中南药学, 2017, 15 (9): 1293-1295.
- [4] 秦小金,宋美利,王丽娟,等. 曲咪新乳膏用于失禁相关性皮炎合并真菌感染的疗效观察[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2019, 33 (10): 1225-1228.
- [5] 高明. 曲咪新乳膏治疗外耳道湿疹合并感染 31 例[J]. 中国新药与临床杂志, 2007, 26 (6): 452-453.
- [6] 何善亮,赵广臣,陶文君. 曲咪新乳膏联合改性樟脑治疗湿疹临床疗效观察[J]. 海军医学杂志, 2017, 38 (6): 573-574.
- [7] 英国药典委员会. 英国药典 2021 年版[S]. 2021: 1042.
- [8] 欧洲药典委员会. 欧洲药典 10.5 版[S]. 2019: 3836.
- [9] 王叶子,张营,周琪,等. 曲咪新乳膏中醋酸曲安奈德有关物质检查方法研究[J]. 军事医学, 2021, 45 (4): 278-282.
- [10] 古丽霞,廖志刚,邓红,等. 曲咪新乳膏的有关物质研究[J]. 广东药科大学学报, 2021, 37 (2): 52-58.
- [11] 梁秋霞,刘庄蔚,邓鸣,等. 曲咪新乳膏质量分析[J]. 中国抗生素杂志, 2020, 45 (7): 672-678.
- [12] Oyler AR, Naldi RE, Facchine KL, et al. Characterization of autoxidation products of the antifungal compounds econazole nitrate and miconazole nitrate [J]. Tetrahedron Lett, 1991, 47 (33): 6549-6560.
- [13] 中国药典 2020 年版. 二部[S]. 2020: 1813.

(收稿日期: 2022-04-22; 修回日期: 2022-07-01)

离子色谱法测定枸橼酸钾缓释片中枸橼酸的含量

王森^{1, 2}, 顾小燕^{1, 2}, 李耕^{1*}, 严菲^{1*}, 陈民辉¹, 柯学² (1. 江苏省食品药品监督检验研究院, 南京 210019; 2. 中国药科大学, 南京 211198)

摘要: 目的 建立离子色谱法测定枸橼酸钾缓释片中枸橼酸的含量。方法 采用 Thermo Dionex IonPac AS11-HC (4 mm×250 mm, 3 μm) 色谱柱, 以 35 mmol·L⁻¹ KOH 作为淋洗液, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 进样量为 10 μL; 采用抑制电导检测方式, 抑制电流: 87 mA, 电导池温度: 35℃。结果 枸橼酸在 5~40 μg·min⁻¹ 内线性关系良好 ($r = 0.9998$), 低、中、高水平的枸橼酸平均回收率分别为 101.3%、101.0% 和 100.4%, RSD 分别为 0.68%、0.60% 和 1.5%。结论 本方法专属性强, 准确可靠, 精密度良好, 可用于测定枸橼酸钾缓释片中枸橼酸的含量。

关键词: 离子色谱法; 抑制电导检测器; 枸橼酸钾缓释片; 含量测定

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2897-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.031

作者简介: 王森, 女, 在读硕士研究生, 主要从事化学药物分析, email: 1339560613@qq.com *通信作者: 李耕, 男, 主管药师, 主要从事化学药品质量研究, email: 527643836@qq.com; 严菲, 女, 副主任药师, 主要从事化学药品质量标准研究, email: 37931658@qq.com

Determination of potassium citrate sustained-release tablets by ion chromatography

WANG Miao^{1,2}, GU Xiao-yan^{1,2}, LI Geng^{1*}, YAN Fei^{1*}, CHEN Min-hui¹, KE Xue² (1. *Jiangsu Institute of Food and Drug Control, Nanjing 210019*; 2. *China Pharmaceutical University, Nanjing 211198*)

Abstract: Objective To determine the content of potassium citrate sustained-release tablets by ion chromatography. **Methods** Thermo Dionex IonPac AS11-HC (4 mm×250 mm, 3 μm) column was used with the mobile phase consisting 35 mmol·L⁻¹ KOH at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and the injection volume at 10 μL. Suppressed conductivity detector with 87 mA suppression current and 35 °C conductivity cell temperature. **Results** Citrate had a good linearity at 5 ~ 40 μg·min⁻¹ ($r = 0.9998$). The average recovery of low, middle, and high level of citrate was 101.3%, 101.0% and 100.4% with *RSD* of 0.68%, 0.60% and 1.5%, respectively. **Conclusion** The method is highly specific and accurate, which is suitable to determine the content of citrate in potassium citrate sustained-release tablets.

Key words: ion chromatography; suppressed conductivity detector; potassium citrate sustained-release tablet; content determination

枸橼酸钾是一种碱化剂和钾补充剂,其速释制剂(如枸橼酸钾颗粒、枸橼酸钾口服溶液)难以确保尿液全天候的持续碱化,因此仅用于防治各种原因引起的低钾血症,而枸橼酸钾缓释片能全天碱化尿液达到治疗草酸钙和尿酸性结石的良好效果^[1-4]。枸橼酸钾缓释片执行标准为国家药监局标准^[5],其含量测定方法为紫外-可见分光光度法,此法需经显色处理后测定,操作烦琐,耐用性差。现有文献对枸橼酸钾溶液和枸橼酸钾缓释片中枸橼酸含量采用反相色谱法测定,均遇到枸橼酸在一般反相色谱柱上难以保留及紫外响应呈末端吸收的问题^[6-7]。离子色谱法作为常规反相色谱法的补充,能够解决离子性物质的反相色谱保留差及紫外响应末端吸收的问题,已成为分析水溶液中离子性物质的首选方法^[8-10]。目前未见有离子色谱法测定枸橼酸缓释片中枸橼酸含量的报道。因此,本文拟采用离子色谱法测定枸橼酸钾缓释片中枸橼酸的含量,旨在为其质量控制提供更科学的手段。

1 仪器与试药

Dionex ICS-6000型离子色谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);XS205 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);Milli-Q Integral 型超纯水器(德国 Merck Millipore 公司);枸橼酸钾缓释片(企业 A,批号:200927501、200927502、200927503,规格:1.08 g);枸橼酸对照品(中

国食品药品检定研究院,批号:100396-201603,纯度:100.0%);试验所用试剂均为色谱纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Thermo Dionex IonPac AS11-HC (4 mm×250 mm, 3 μm);保护柱:Dionex IonPac AG11 柱(4 mm×50 mm, 13 μm);抑制器:ADRS600 型抑制器(4 mm);检测器为电导检测器;淋洗液发生器:Dionex EGC 500 MSARFIC;淋洗液:35 mmol·L⁻¹ KOH;流速:1.0 mL·min⁻¹;柱温:30 °C;抑制电流:87 mA;分析时间:15 min;进样量:10 μL。

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品溶液 取枸橼酸对照品 50 mg,精密称定,置于 50 mL 量瓶中,加水溶解并定容至刻度,摇匀,即得对照品储备液;精密量取上述对照品储备液适量,置于 50 mL 量瓶中,制成每 1 mL 约含枸橼酸 20 μg 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取枸橼酸缓释片 20 片,精密称定,研细,取细粉(约相当于枸橼酸 20 mg),精密称定,置于 100 mL 量瓶中,加热水 30 mL,振摇使完全溶解,放冷,用水稀释至刻度,摇匀,滤过;精密量取续滤液适量,置于 20 mL 量瓶中,制成每 1 mL 约含枸橼酸 20 μg 的供试品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液 称取处方量的空白辅料,

按照供试品制备方法制备阴性样品溶液。

2.3 专属性试验

精密量取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各 10 μL ，进样测定，记录色谱图，详见图 1。结果表明，在该色谱条件下，理论板数按枸橼酸峰计为 52 547，保留时间为 11.4 min；且其他成分在枸橼酸峰的保留时间处无色谱峰出现，目标峰与相邻峰能达到基线分离，分离度大于 2.0，本方法可满足检测的需要。

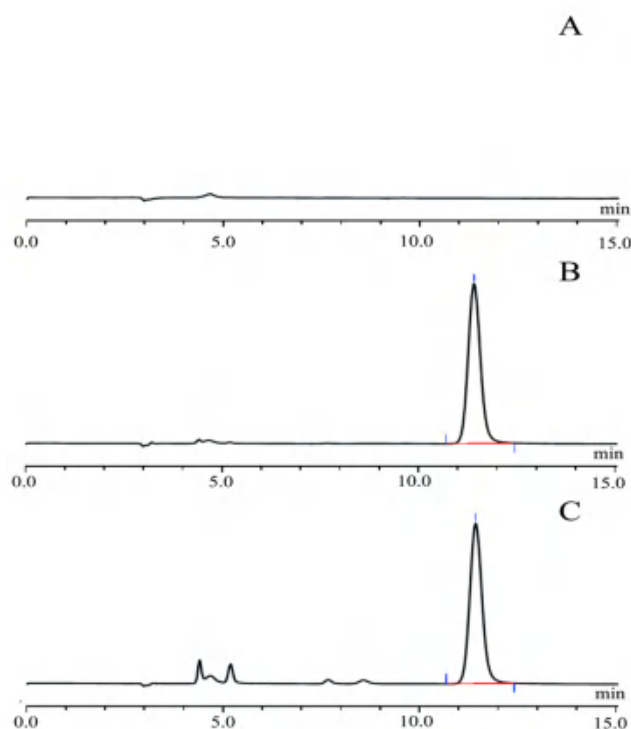


图 1 枸橼酸离子色谱图

Fig 1 Ion chromatograms of citrate

A. 阴性样品溶液 (negative sample solution); B. 对照品溶液 (reference solution); C. 供试品溶液 (sample solution); 1. 枸橼酸 (citrate)

2.4 线性范围

取“2.2.1”项下对照品储备液适量，用水定量稀释制成质量浓度分别为 5、10、20、30 和 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液。取上述系列对照品溶液适量，进样测定，记录峰面积。以枸橼酸质量浓度 (x , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标，峰面积 (y) 为纵坐标进行线性回归，得枸橼酸回归方程为 $y = 0.0319x - 0.0076$ ($r = 0.9998$)。结果表明，枸橼酸检测质量浓度线性范围为 5 ~ 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.5 定量限与检测限

取“2.2.1”项下对照品溶液适量，倍比稀释，连续进样测定 6 次，记录峰面积。当信噪比为 10 : 1 时，得定量限为 0.25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ；当信噪

比为 3 : 1 时，得检测限为 0.10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.6 进样精密度和重复性试验

取“2.2.1”项下对照品溶液 10 μL ，连续进样 6 次，记录峰面积。结果枸橼酸峰面积的 $RSD = 0.14\%$ ($n = 6$)，表明仪器进样精密度良好。取“2.7”项下低、中、高三个浓度水平的回收率结果，计算三个浓度水平的 RSD ($n = 3$)，结果如表 1 所示，表明本方法重复性良好。

2.7 回收试验

取处方量的空白辅料和对照品适量，按“2.2.2”项下方法操作，制成含限度浓度 80%、100%、120% 的加标供试品溶液，平行制备 3 份。取上述系列待测溶液适量，进样测定，记录峰面积并计算回收率，结果如表 1 所示。

表 1 回收率和重复性试验结果

Tab 1 Recovery and repeatability

浓度水平 / %	加入量 / mg	测得量 / mg	回收率 / %	平均回收率 / %	重复性 RSD / %
80	17.19	17.29	100.58	101.3	0.68
	16.88	17.14	101.54		
	16.74	17.06	101.91		
100	20.40	20.49	100.44	101.0	0.60
	20.90	21.24	101.63		
	21.19	21.37	100.85		
120	24.92	25.33	101.65	100.4	1.5
	25.34	25.54	100.79		
	26.44	26.09	98.68		

2.8 稳定性试验

取“2.2”项下的对照品溶液和供试品溶液，分别于室温下放置 0、3、6、12、24 h 时，进样测定，记录峰面积。结果对照品溶液和供试品溶液的枸橼酸峰面积的 RSD 分别为 1.2% 和 1.4% ($n = 5$)，表明对照品溶液和供试品溶液在室温下放置 24 h 均稳定。

2.9 样品含量测定

取 3 批枸橼酸钾缓释片，分别采用本法和药监局标准项下含量测定方法紫外 - 可见分光光度法，测定枸橼酸的含量，每批制备 3 份，每份测定两次，取平均值，计算枸橼酸的含量，结果见表 2。

表 2 3 批样品含量测定结果

Tab 2 Content of 3 batches of sample

批号	紫外 - 可见分光光度法 / %	离子色谱法 / %
200927501	100.2	102.1
200927502	99.6	101.4
200927503	99.0	100.9

3 讨论

3.1 紫外-可见分光光度法与离子色谱法的比较

原国家食品药品监督管理局标准^[5]中含量测定方法为紫外-可见分光光度法,为了解决枸橼酸的紫外响应差和缓释制剂的辅料干扰问题,此法需经显色处理后(在 31℃ 水浴温度中反应 33 min)测定,过程烦琐、自动化程度低,反应条件苛刻、耐用性差,需使用多种有机试剂,且灵敏度低。而本方法采用的离子色谱法操作便捷,选择性好,所用试剂温和,对人体与环境危害小。两种方法含量测定结果比对发现,紫外-可见分光光度法测定的结果较离子色谱法测得的结果稍低,可能是因为紫外-可见分光光度法需要严格遵守反应条件的温度和时间,对人为操作要求比较严格。

3.2 反相色谱法与离子色谱法的比较

已有文献^[6-7]采用反相色谱法对枸橼酸钾溶液和枸橼酸钾缓释片中枸橼酸进行含量测定,为了解决枸橼酸在一般反相色谱柱上保留差以及紫外响应呈末端吸收这两个问题,文献采用流动相中添加离子对试剂增加保留和采用紫外检测器末端吸收(215 nm)检测^[6],或是采用极性端基封尾的色谱柱、高比例水相的流动相和蒸发光散射检测器检测^[7]。但离子对试剂会对色谱柱造成损害;末端吸收会造成背景基线高,从而导致信噪比下降,灵敏度降低;蒸发光散射检测器的响应值与样品浓度呈指数关系,测定时需要平行制备标准曲线,无法通过单一浓度级别的对照计算样品浓度。而本方法采用的离子色谱法,从色谱分离原理上解决了枸橼酸难以保留的问题,方法专属性高,更适合辅料复杂的缓释片中枸橼酸的分离;方法使用电导检测器,提高了离子性物质的检测灵敏度。

3.3 离子色谱条件的选择

枸橼酸为三元有机酸,三级 pK_a 均小于 7,在电导检测器中响应高且稳定^[10],因此本法选用电导检测器。本研究选择 KOH 作为淋洗液^[11],考察了 KOH 浓度为 25 ~ 40 mmol · L⁻¹ 对色谱分离的影响,结果发现用 35 mmol · L⁻¹ 的 KOH 淋洗液,枸橼酸峰形良好且能与辅料峰有效分

离。抑制器能够降低高浓度淋洗液背景电导,增加被测离子的电导值从而提高电导检测器的灵敏度和稳定性^[12-13]。由于本研究选择了较高浓度的 KOH 作为淋洗液,在优化时发现不采用抑制器时枸橼酸响应不佳。因此,试验采用了 ADRS600 型抑制器(4 mm)降低背景电导,以获得较好的色谱响应。

本法相较于现行法定标准操作简便,专属性强,灵敏度高,重复性好,结果准确可靠,可为枸橼酸钾缓释片质量标准中枸橼酸的含量测定提供参考。

参考文献

- [1] 易延华,白先忠,莫曾男,等.枸橼酸钾防治泌尿系结石的研究新进展[J].广西医学,2007,29(9):1379-1381.
- [2] 孟静,蒋琳兰.枸橼酸钾的临床应用及其制剂研究进展[J].中国药房,2011,22(2):179-180.
- [3] 闫明,邹梅娟,齐翔,等.极易溶药物枸橼酸钾缓释片的研制[J].中国医药导报,2011,8(1):66-68.
- [4] Cao QR, Kim TW, Lee BJ. Photoimages and the release characteristics of lipophilic matrix tablets containing highly water-soluble potassium citrate with high drug loadings[J]. Int J Pharma, 2007, 339(1): 19-24.
- [5] 国家食品药品监督管理局标准[S]. YBH04562011.
- [6] 谢向阳,韩亮,陈晨,等.反相离子对色谱法测定枸橼酸钾溶液中枸橼酸钾的含量[J].中国药师,2014,17(8):1322-1324.
- [7] 钱晓萍,刘文英.枸橼酸钾及其缓释片中枸橼酸和钾的同时定量分析法[J].中国药科大学学报,2006,37(4):330-332.
- [8] 马雪芳.离子色谱在药品检测中的应用[J].化工设计通讯,2018,44(10):193.
- [9] 彭俊文,陈建平,布仁,等.离子色谱在药物分析中的应用进展[J].中南药学,2016,14(3):290-294.
- [10] 牟世芬,刘克纳,朱岩.离子色谱方法及应用[M].3版.北京:化学工业出版社,2018:57-60.
- [11] 陶云亭.离子色谱检测方法的应用进展[J].云南化工,2020,47(2):9-10.
- [12] 陈霞,张洁,董瑞.离子抑制色谱法测定伊班膦酸钠原料药中的有关物质[J].中南药学,2021,19(9):1934-1938.
- [13] 宋玉琴,赵昌军.离子色谱法测定丙戊酸钠片的含量[J].中国药房,2014,25(25):2383-2385.

(收稿日期:2022-05-26;修回日期:2022-08-03)

高效液相色谱法同时测定甲苯磺酸妥舒沙星中 4 种遗传毒性杂质的含量

陈鸿玉¹, 程雪清^{2*}, 廖漾³, 周碧红³, 刘栋华³, 刘雁鸣¹, 李昌亮¹ (1. 湖南省药品检验检测研究院, 湖南省药品质量评价工程技术研究中心, 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; 2. 天地恒一制药股份有限公司, 湖南省骨关节疾病药物工程技术研究中心, 湖南省药品质量评价工程技术研究中心, 长沙 410331; 3. 天地恒一制药股份有限公司, 长沙 410331)

摘要: **目的** 采用高效液相色谱 (HPLC) 法同时测定甲苯磺酸妥舒沙星中 4 种遗传毒性杂质 (2, 4-二氟苯胺、2, 6-二氟苯胺、对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯) 的含量。 **方法** 采用 CAPCELL PAK C₁₈ 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱; 柱温为 35℃; 流速为 0.8 mL·min⁻¹; 检测波长为 225 nm。 **结果** 2, 4-二氟苯胺、2, 6-二氟苯胺、对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯质量浓度分别在 0.0404 ~ 0.6064 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9997$)、0.0282 ~ 0.6055 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9998$)、0.0403 ~ 0.6045 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9997$)、0.0401 ~ 0.6019 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9999$) 与峰面积呈良好的线性关系, 平均加样回收率在 95.9% ~ 101.3%, RSD 在 0.40% ~ 7.3%。 **结论** 该方法专属性强, 重复性好, 准确度高, 可为甲苯磺酸妥舒沙星的质量控制及标准研究提供参考。

关键词: 高效液相色谱法; 甲苯磺酸妥舒沙星; 遗传毒性杂质

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2901-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.032

Simultaneous determination of 4 genotoxic impurities in tosylloxacin tosylate hydrate by HPLC

CHEN Hong-yu¹, CHENG Xue-qing^{2*}, LIAO Yang³, ZHOU Bi-hong³, LIU Dong-hua³, LIU Yan-ming¹, LI Chang-liang¹ (1. Hunan Institute for Drug Control, Hunan Engineering & Technology Research Center for Pharmaceutical Quality Evaluation, Key Laboratory of Pharmaceutical Excipients Engineering Technology of State Drug Administration, Changsha 410001; 2. Hinye Pharmaceutical Co., Ltd., Hunan Osteoarthritis Drug Engineering Technology Research Center, Hunan Engineering & Technology Research Center for Pharmaceutical Quality Evaluation, Changsha 410331; 3. Hinye Pharmaceutical Co., Ltd., Changsha 410331)

Abstract: Objective To simultaneously determine 4 genotoxic impurities (2, 4-difluoroaniline, 2, 6-difluoroaniline, methyl *p*-toluenesulfonate and ethyl *p*-toluenesulfonate) in tosylloxacin tosylate hydrate by HPLC. **Methods** The determination was performed on a CAPCELL PAK C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column, and the mobile phase was acetonitrile-water with gradient elution at 0.8 mL·min⁻¹. The column temperature was 35℃. The detection wavelength was 225 nm. **Results** The concentration of 2, 4-difluoroaniline, 2, 6-difluoroaniline, methyl *p*-toluenesulfonate and ethyl *p*-toluenesulfonate was 0.0404 ~ 0.6064 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9997$), 0.0282 ~ 0.6055 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9998$), 0.0403 ~ 0.6045 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9997$), and 0.0401 ~ 0.6019 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9999$), with a good linearity in the peak area. The average recovery was at 95.9% ~ 101.3% with RSD at 0.40% ~ 7.3%, respectively. **Conclusion** The method is validated, with strong specificity,

基金项目: 湖南科药联合基金项目 (No.2021JJ80003)。

作者简介: 陈鸿玉, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事药物分析与质量标准研究, email: 649409690@qq.com *通信作者: 程雪清, 男, 硕士, 高级工程师, 主要从事药物研究与质量标准研究, email: 251400253@qq.com

good repeatability and high accuracy, which can provide reference for the quality control and standard research of tosufloracin tosylate hydrate.

Key words: HPLC; tosufloracin tosylate hydrate; genotoxic impurity

遗传毒性杂质是能直接或间接损害 DNA, 导致基因突变或癌变的物质。从罗氏制药公司奈非那韦原料药存储罐中残留乙醇与甲磺酸反应形成一种有遗传毒性的物质甲磺酸乙酯的事件, 到缬沙坦、尼扎替丁、盐酸雷尼替丁、盐酸二甲双胍和利福平等原料和制剂中产生遗传毒性物质 *N*-亚硝基二甲胺事件后, 磺酸烷基酯类和亚硝胺类遗传毒性杂质倍受关注^[1-4]。

甲苯磺酸妥舒沙星为氟喹诺酮类抗菌药物, 对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌和厌氧菌均具有良好的抗菌效果, 临床上用于呼吸道感染、尿路感染和五官科感染等治疗^[5-6]。磺酸盐类药物在合成过程中, 甲磺酸、对甲苯磺酸、苯磺酸等磺酸类物质作为成盐试剂, 醇类物质作为溶剂, 两者会发生副反应产生磺酸烷基酯类遗传毒性杂质。甲苯磺酸妥舒沙星合成工艺过程中使用了溶剂乙醇, 而乙醇可能含有少量甲醇, 存在可能产生对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯的风险, 目前磺酸烷基酯类遗传毒性的分析方法主要有 HPLC、GC、HPLC-MS 和 GC-MS 等^[7-13]。2, 4-二氟苯胺为合成甲苯磺酸妥舒沙星原料, 2, 6-二氟苯胺为副产物, 均为遗传毒性杂质。甲苯磺酸妥舒沙星现行质量标准中没有检测 2, 4-二氟苯胺、2, 6-二氟苯胺、对甲苯磺酸甲酯、对甲苯磺酸乙酯的项目, 本课题组采用 HPLC 法同时测定甲苯磺酸妥舒沙星中 4 种遗传毒性杂质, 为甲苯磺酸妥舒沙星合理设计生产工艺、贮存环境、运输条件和包装等提供参考, 为保障甲苯磺酸妥舒沙星质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Waters ARC-2489 型超高效液相色谱仪 (UV 检测器, Waters 公司); MSA3.6P-OCE-DM 电子分析天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司, 百万分之一); LabonQ-120CGS 药品稳定性试验箱 (北京兰贝石恒温技术有限公司)。

1.2 试药

甲磺酸妥舒沙星 (天地恒一制药股份有限公司, 批号: 19121301-T、201102、201103、201201, 含量均大于 98%)。

2, 4-二氟苯胺 (新疆宝隆化工新材料有限公

司, 批号: 170622, HPLC 法测定纯度为 99.0%), 2, 6-二氟苯胺 (阿拉丁, 批号: E1818099, GC 法测定纯度为 99.0%), 对甲苯磺酸甲酯 (北京百灵威科技有限公司, 批号: LJ90R59, HPLC 法测定纯度为 98.0%), 对甲苯磺酸乙酯 (阿拉丁, 批号: K1206017, HPLC 法测定纯度为 98.0%); 乙腈为色谱级; 水为超纯水; 其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 CAPCELL PAK C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温为 35℃, 流动相为水 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~5 min, 65%A; 5~40 min, 65%→40%A; 40~41 min, 40%→65%A; 41~50 min, 65%A), 检测波长为 225 nm, 流速为 0.8 mL·min⁻¹, 柱温为 35℃, 进样量为 20 μL。

2.2 溶液的配制

2.2.1 空白溶液的制备 空白溶液为乙腈 - 水 (80 : 20)。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称定对照品 2, 4-二氟苯胺、2, 6-二氟苯胺、对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯各约 50 mg, 分别置于 50 mL 量瓶中, 加乙腈 - 水 (80 : 20) 稀释至刻度, 摇匀, 得各对照品储备液。分别精密量取上述 4 种对照品储备液各 1 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加乙腈 - 水 (80 : 20) 稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品储备液①; 精密量取混合对照品储备液① 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加乙腈 - 水 (80 : 20) 稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品储备液②; 精密量取混合对照品储备液① 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加乙腈 - 水 (80 : 20) 稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品溶液, 2, 4-二氟苯胺、2, 6-二氟苯胺、对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯均为 0.2 μg·mL⁻¹。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品约 25 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 用乙腈 - 水 (80 : 20) 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 取“2.2”项下的空白溶液、混合对照品溶液、供试品溶液各 20 μL, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 结果见图

1. 2, 4-二氟苯胺、2, 6-二氟苯胺、对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯保留时间分别为 13.04、14.11、20.87、25.12 min, 各色谱峰的分度度均大于 1.5, 空白溶液无干扰, 表明该方法专属性较好。

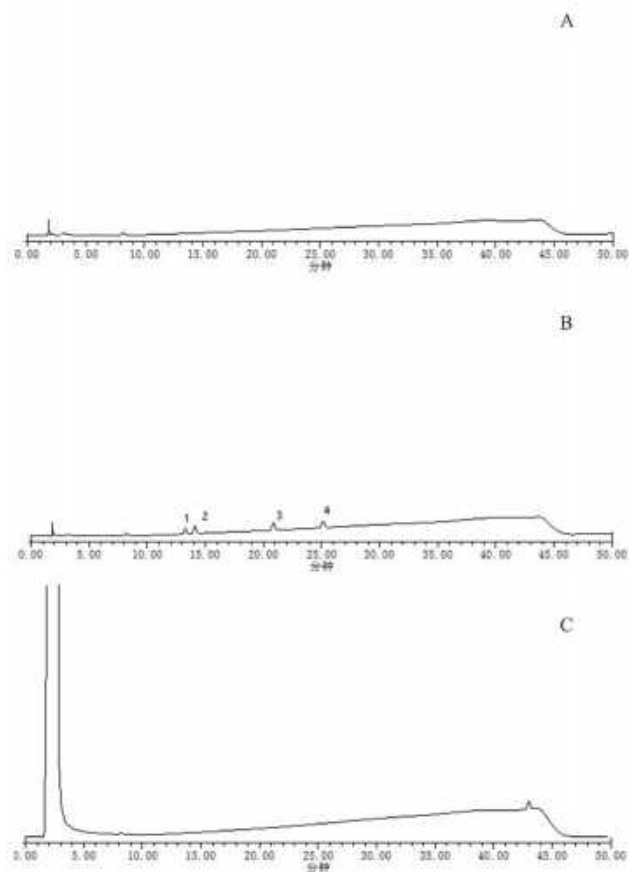


图 1 空白溶液 (A)、混合对照品溶液 (B) 和供试品溶液 (C) HPLC 图

Fig 1 HPLC chromatogram of blank solution (A), reference substance solution (B) and sample solution (C)

1. 2, 4-二氟苯胺 (2, 4-difluoroaniline); 2. 2, 6-二氟苯胺 (2, 6-difluoroaniline); 3. 对甲苯磺酸甲酯 (methyl *p*-toluenesulfonate); 4. 对甲苯磺酸乙酯 (ethyl *p*-toluenesulfonate)

2.3.2 线性关系的考察 分别取“2.2.2”项下 4 种对照品储备液适量, 用乙腈-水 (80 : 20) 稀释后得到不同浓度的线性溶液, 进样测定, 记录色谱图, 以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 结果见表 1。

2.3.3 精密度试验 取“2.2.2”项下混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 结果 2, 4-二氟苯胺、2, 6-二氟苯胺、对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯的保留时间 RSD 分别为 0.27%、0.27%、0.26%、0.24%; 峰面积 RSD 分别为 1.4%、0.99%、2.0%、1.6%, 表明仪器精密度良好。

2.3.4 定量限和检测限 分别取“2.2.2”项下各对照品储备液适量, 加乙腈-水 (80 : 20) 稀释, 进样测定, 当信噪比 (S/N) 约为 10 时的浓度为定量限, S/N 约为 3 时的浓度为检测限, 结果见表 1。

2.3.5 重复性试验 取本品 (批号: 19121301-T) 6 份, 每份约 25 mg, 精密称定, 用“2.2.2”项下混合对照品溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制备供试品溶液, 进样测定, 记录色谱图, 计算各成分含量的 RSD , 分别为 2.5%、1.9%、0.8%、1.3%, 结果表明方法重复性较好。

2.3.6 加样回收试验 取本品 (批号: 19121301-T) 约 25 mg, 精密称定, 分别用“2.3.4”项下定量限溶液、混合对照品溶液、混合对照品储备液②适量使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为低、中、高浓度供试品溶液, 每个浓度平行制备 3 份, 进样测定, 记录色谱图, 结果 2, 4-二氟苯胺低、中、高浓度平均回收率分别为 98.5%、101.3%、104.1%, RSD 分别为 7.3%、2.2%、0.40%。2, 6-二氟苯胺低、中、高浓度平均回收率分别为 99.8%、100.8%、101.6%, RSD 分别为 6.1%、1.1%、2.2%。对甲苯磺酸甲酯

表 1 化合物的回归方程、相关系数、线性方法、定量限及检测限

Tab 1 Regression equation, correlation coefficient, linearity, limit of quantitation and limit of detection of compounds

化合物	线性方程	相关系数	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	定量限 / ng	检测限 / ng
2, 4-二氟苯胺	$Y = 6.656 \times 10^4 X - 23.42$	0.9998	0.0404 ~ 0.6064	0.8	0.27
2, 6-二氟苯胺	$Y = 1.005 \times 10^6 X - 116.9$	0.9999	0.0283 ~ 0.6055	0.6	0.19
对甲苯磺酸甲酯	$Y = 9.028 \times 10^4 X - 224.1$	0.9998	0.0403 ~ 0.6044	0.8	0.27
对甲苯磺酸乙酯	$Y = 9.248 \times 10^4 X - 696.8$	0.9999	0.0401 ~ 0.6019	0.8	0.27

低、中、高浓度平均回收率分别为 98.6%、96.4%、97.7%, RSD 分别为 4.1%、2.7%、0.94%。对甲苯磺酸乙酯低、中、高浓度平均回收率分别为 100.9%、95.9%、98.1%, RSD 分别为 4.1%、2.2%、2.1%。

2.3.7 稳定性试验 取混合对照品溶液分别于室

温放置 0、2、4、7、12、36、43、49、125 h 后进样测定, 结果 2, 4-二氟苯胺、2, 6-二氟苯胺、对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯的峰面积 RSD 分别为 2.0%、1.4%、2.2%、1.6%, 表明混合对照品溶液在 125 h 内稳定。供试品溶液分别

于室温放置 0、2、4、6、17、51、80 h 后进样测定, 结果 2, 4-二氟苯胺、2, 6-二氟苯胺、对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯峰均未检出, 表明供试品溶液在 80 h 内稳定。

2.3.8 样品测定 取甲磺酸妥舒沙星 3 批次(批号分别为 201102、201103、201201)样品, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 结果样品中均未检出 2, 4-二氟苯胺、2, 6-二氟苯胺、对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯。

2.3.9 强制降解试验

① 酸破坏供试品溶液: 精密称取本品约 25 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液 1 mL, 放置 24 h, 加 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液 1 mL 中和, 用乙腈-水 (80 : 20) 使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为酸破坏供试品溶液。

② 碱破坏供试品溶液: 精密称取本品约 25 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液 1 mL, 放置 24 h, 加 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液 1 mL 中和, 用乙腈-水 (80 : 20) 使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为碱破坏供试品溶液。

③ 氧化破坏供试品溶液: 精密称取本品约 25 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 30% 的过氧化氢溶液 1 mL, 放置 24 h, 用乙腈-水 (80 : 20) 使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为氧化破坏供试品溶液。

④ 高温破坏供试品溶液: 取本品适量, 在 105°C 破坏 24 h, 精密称取约 10 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 12 mL 乙腈溶解后, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为高温破坏供试品溶液。

⑤ 光照破坏供试品溶液: 取本品适量, 在光照 (4500 ± 500) lx 放置 5 d, 精密称取约 25 mg, 置 25 mL 量瓶中, 用乙腈-水 (80 : 20) 使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为光照破坏供试品溶液。

取酸破坏供试品溶液、碱破坏供试品溶液、氧化破坏供试品溶液、高温破坏供试品溶液和光照破坏供试品溶液按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 见图 2。结果供试品在酸、碱、氧化、高温和光照条件下均未检测到遗传毒性杂质 2, 4-二氟苯胺、2, 6-二氟苯胺、对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯。

3 讨论

3.1 波长选择

采用二极管阵列检测器在全波长下 (200 ~ 400 nm) 进行扫描, 2, 4-二氟苯胺、2, 6-二氟苯胺、对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯在

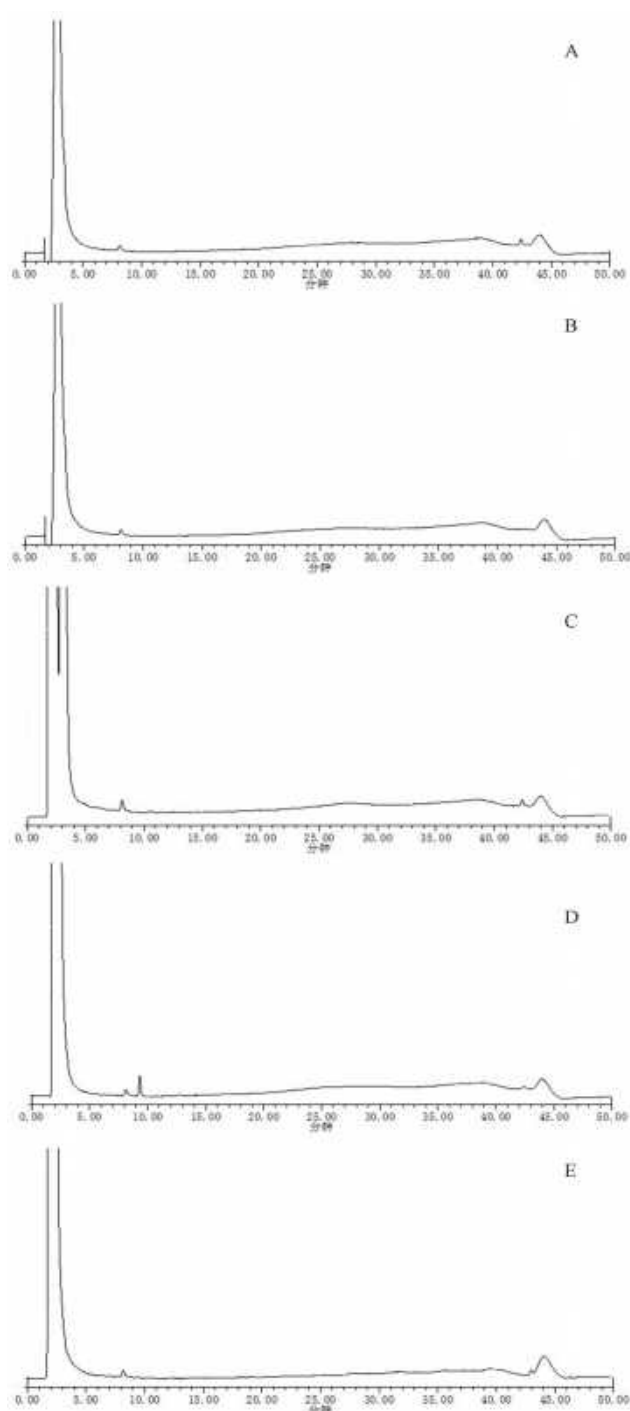


图 2 酸破坏溶液 (A)、碱破坏溶液 (B)、氧化破坏溶液 (C)、高温破坏溶液 (D)、光照破坏溶液 (E) HPLC 图

Fig 2 HPLC chromatogram of acid hydrolytic solution (A), base hydrolytic solution (B), oxidative degradation solution (C), heat degradation solution (D), and photolytic degradation solution (E)

(225 ± 2) nm 处均有最大吸收, 峰形较好, 灵敏度高, 分离度好, 故选择 225 nm 为检测波长。

3.2 色谱条件选择

在柱温方面, 考察了柱温 33、35 和 37°C 对色谱分离效果的影响, 结果表明柱温对分离效果和峰形影响不大, 本试验选择柱温为 35°C 。在流

速方面,考察了流速 0.7、0.8、0.9 mL·min⁻¹,结果表明流速对分离效果和峰形影响不大,本试验选择流速为 0.8 mL·min⁻¹。在色谱柱方面,考察了型号为 CAPCELL PAK C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 共两根不同序列号的色谱柱,色谱柱分离效果均较好。

3.3 遗传毒性杂质限度

人用药品注册技术要求国际协调会 (ICH) 制定了评估和控制药物中 DNA 反应性 (致突变) 杂质以限制潜在的致癌风险指导原则 ICH M7 (R1), 主要用于致突变杂质的鉴别、分类、界定和控制,以限制潜在的致癌风险。ICH M7 (R1) 中将遗传毒性杂质分为 5 类,计算可摄入量的方法有 3 种:第 1 种根据毒理学关注阈值 (TTC) 计算的可接受摄入量;第 2 种根据化学物特异性风险评估计算可接受摄入量;第 3 种根据给药周期调整计算可接受摄入量。甲苯磺酸妥舒沙星的最大日服用剂量 (MDD) 为 0.6 g·d⁻¹,用药周期小于 1 个月,单个基因毒性杂质每日最大耐受量 (TTC) 为 120 μg·d⁻¹,单个基因毒性杂质限度按照以下公式计算:限度 = TTC/MDD,根据公式可计算出甲苯磺酸妥舒沙星中含有 2, 4-二氟苯胺、2, 6-二氟苯胺、对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯的可接受的限度为 0.02%。

3.4 小结

本研究建立了 HPLC 法同时测定甲苯磺酸妥舒沙星中 4 种遗传毒性杂质含量的方法,专属性强,灵敏度高,准确度高,能够满足限度要求,适用于甲苯磺酸妥舒沙星原料药中 2, 4-二氟苯胺、2, 6-二氟苯胺、对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯含量的同时测定。

参考文献

- [1] 季雪飞. 奈非那韦中致癌物甲磺酸乙酯含量超标 [J]. 国际药学研究杂志, 2008, 35 (1): 45.
- [2] 吴兆伟, 杜凯, 王琳, 等. GC-MS 法测定缙沙坦中的 *N*-亚硝基二甲胺 [J]. 中国新药杂志, 2019, 28 (20): 2478-2481.
- [3] 冯雨薇, 袁军, 刘峰, 等. LC-MS/MS 法测定尼扎替丁原料药中的 *N*-亚硝基二甲胺和 *N*-亚硝基二乙胺 [J]. 华西药学杂志, 2021, 36 (2): 202-205.
- [4] 魏志雄, 刘丹丹, 蓝明雄, 等. 液相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱法测定雷尼替丁及其制剂中的痕量 *N*-亚硝基二甲胺 [J]. 华西药学杂志, 2022, 29 (7): 15-19.
- [5] 欧年春, 胡慧冰, 彭艳梅. 甲苯磺酸妥舒沙星分散片含量与溶出度的研究 [J]. 中南药学, 2012, 10 (1): 23-25.
- [6] 严家文, 朱琼. 甲苯磺酸妥舒沙星滴眼液内包装材料稳定性研究 [J]. 中国药业, 2022, 31 (8): 68-71.
- [7] 于瑞董, 俞海荣, 杨杰, 等. 药物中基因毒性杂质磺酰烷基酯类分析方法的研究近况 [J]. 海峡药学, 2019, 31 (8): 122-124.
- [8] 李炎, 马旻新, 曾实, 等. HS-GC-MS 同时测定沙芬酰胺中磺酰烷基酯类基因毒性杂质 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36 (19): 2431-2435.
- [9] 张勉, 李超, 梁静, 等. GC-MS 法测定克林霉素磷酸酯中的对甲苯磺酸甲酯和对甲苯磺酸乙酯 [J]. 华西药学杂志, 2019, 34 (5): 490-493.
- [10] 牛慧敏, 李运莉, 王辰, 等. 苯磺酸氨氯地平原料中基因毒性杂质苯磺酸甲酯与苯磺酸乙酯的含量测定 [J]. 抗感染药学, 2019, 16 (7): 1110-1114.
- [11] 王淋, 李雪, 朴惠顺, 等. GC-MS 法检测左卡尼汀中遗传毒性物质 *S*-环氧氯丙烷 [J]. 中南药学, 2021, 19 (4): 727-729.
- [12] 章为, 李文波, 李晓燕, 等. 顶空气相色谱法同时测定甲苯磺酸妥舒沙星原料药中 6 种有机溶剂的残留量 [J]. 中南药学, 2017, 28 (6): 847-850.
- [13] 王慧, 辛爱玲, 冯璐杰, 等. 高效液相色谱法同时测定红旱莲中 5 个黄酮类成分的含量 [J]. 中南药学, 2021, 19 (9): 1911-1914.

(收稿日期: 2022-06-05; 修回日期: 2022-07-10)

伏立康唑致肝损伤风险预测模型的构建与验证

刘丽春, 杨万枝, 彭杰成, 胡章海* (安徽医科大学附属安庆第一人民医院, 安徽 安庆 246003)

摘要: **目的** 分析伏立康唑致肝损伤的危险因素并建立预测模型, 同时验证该模型的准确率。**方法** 回顾分析 2018 年 1 月—2022 年 6 月本院使用伏立康唑治疗的 161 例住院患者信息, 按照 3:1 的比例随机分配 120 例作为训练集, 41 例作为验证集。利用训练集患者临床信息筛选出伏立康唑致肝损伤的独立危险因素, 建立预测模型并利用 ROC 曲线对模型进行评价, 再利用验证集患者信息验证该模型的准确率。**结果** 120 例训练集患者中共有 17 例 (14.17%) 发生了药物性肝损伤。多因素 Logistic 回归分析显示用药前血浆白蛋白浓度 (ALB) 和估算的肾小球滤过率 (eGFR) 是伏立康唑致肝损伤的独立危险因素, 利用 ALB 和 eGFR 构建联合预测因子 ($Y_{\text{联合}}$) 计算公式, $Y_{\text{联合}} = X_{\text{eGFR}} + 14.574X_{\text{ALB}}$, 计算 120 例患者的 $Y_{\text{联合}}$ 值, 绘制 ROC 曲线, 其中联合预测因子 ROC 曲线下面积最大 (0.848), Youden 指数最大时 (0.717), ROC 曲线最佳临界值为 540.21。利用 41 例验证集患者信息验证该模型准确率为 85.37%。**结论** ALB 和 eGFR 是伏立康唑致肝损伤的独立危险因素, 临床用药过程中可以通过上述公式计算 $Y_{\text{联合}}$ 值, 当其小于 540.21 时, 要加强用药期间肝肾功能指标监测, 及时优化用药。

关键词: 伏立康唑; 肝损伤; 危险因素; Logistic 回归; 预测模型

中图分类号: R969.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2906-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.033

Construction and verification of risk prediction model of liver injury induced by voriconazole

LIU Li-chun, YANG Wan-zhi, PENG Jie-cheng, HU Zhang-hai* (Anqing First People's Hospital of Anhui Medical University, Anqing Anhui 246003)

Abstract: Objective To determine the risk factors of voriconazole-induced liver injury, establish a prediction model, and verify the accuracy of the model. **Methods** The information of 161 inpatients treated with voriconazole in our hospital from January 2018 to June 2022 were retrospectively analyzed. At the 3:1 ratio, 120 patients were randomly assigned as the training set and the other 41 as the validation set. The independent risk factors of voriconazole-induced liver injury were screened out with the clinical information of the patients in the training set. A prediction model was established and evaluated with ROC curves. The information of validation set was used to verify the accuracy of this model. **Results** Totally 17 (14.17%) of 120 patients in the training set developed drug-induced liver injury. Multivariate Logistic regression analysis showed that pre-drug plasma albumin concentration (ALB) and estimated glomerular filtration rate (eGFR) were independent risk factors for voriconazole-induced liver injury. ALB and eGFR were used to construct the joint predictor ($Y_{\text{combination}}$) calculation formula, $Y_{\text{combination}} = X_{\text{eGFR}} + 14.574X_{\text{ALB}}$. This formula was used to calculate the $Y_{\text{combination}}$ value of the 120 patients and obtain the ROC curves, in which the area of the joint predictors under the ROC curves was the largest (0.848). When the Youden index was the largest (0.717), the best critical value of the ROC curve was 540.21. The accuracy of the model was 85.37% with the

基金项目: 安徽省卫生健康委科研项目立项项目 (No.AHWJ2021b103); 安庆市第一人民医院 2021 年“三新”立项项目 (No.Y2021030)。**作者简介:** 刘丽春, 女, 主管药师, 主要从事医院药学工作, email: 1171962563@qq.com ***通信作者:** 胡章海, 男, 副主任药师, 主要从事药事管理与医院药学工作, email: ahaqzh@sina.com

information of the 41 patients in the validation set. **Conclusion** ALB and eGFR are independent risk factors for voriconazole-induced liver injury. The above formula can be used to calculate $Y_{\text{combination}}$ in clinical medication. When less than 540.21, it is necessary to strengthen the monitoring of liver and kidney function indicators, and optimize medication scheme in time.

Key words: voriconazole; liver injury; risk factor; Logistic regression; prediction model

近年来侵袭性真菌感染呈现逐渐增多趋势,尤其是侵袭性曲霉病,已成为免疫力低下人群危及生命的主要并发症之一。伏立康唑作为一种新型三唑类抗真菌药物,其抗菌谱非常广泛而且抗菌活性很强,目前已成为侵袭性曲霉感染的首选治疗药物^[1]。随着伏立康唑使用量的增加,其不良反应也越来越受到关注。国内外已有文献报道了伏立康唑可引起幻觉、肝毒性、视力模糊等^[2-3]。肝损伤作为伏立康唑的主要不良反应,目前少有风险预测模型的构建。本研究采用二元 Logistic 回归和 ROC 曲线来建立伏立康唑致肝损伤的风险预测模型,同时验证该模型的准确率,为伏立康唑临床治疗的安全性提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象

通过医院 HIS 系统收集 2018 年 1 月—2022 年 6 月在安徽医科大学附属安庆第一人民医院使用伏立康唑注射液治疗的住院患者信息。纳入标准:①年龄 ≥ 18 岁;②微生物培养结果显示真菌感染或者经验性的使用伏立康唑治疗;③用药时间 ≥ 3 d。排除标准:①使用伏立康唑前总胆红素(TBIL)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)大于正常值上限;②入院诊断或影像学检查已有肝损伤的相关诊断;③使用伏立康唑前后相关检查指标不全者。

1.2 方法

1.2.1 收集资料 收集患者的一般资料信息(性别、年龄)、伏立康唑的用药天数、用法用量、合并用药情况(与伏立康唑联用 ≥ 3 d 的药物)、用药前的化验基线指标[如血浆总蛋白浓度(TP)、血浆白蛋白浓度(ALB)、ALT、AST、TBIL、ALP、凝血酶原时间(PT)、血红蛋白(HGB)、降钙素原(PCT)、纤维蛋白原(FIB)、血清肌酐(Scr)、国际标准化比值(INR)等]、腹部影像学检查、微生物培养结果、肝炎病史、临床诊断等基本信息资料。通过简化 MDRD 公式计算估算的肾小球滤过率(eGFR), $eGFR < 90 \text{ mL}/(\text{min} \cdot 1.73 \text{ m}^2)$ 为肾功能不全^[4-5]。

1.2.2 药物性肝损伤的判定标准 按照 2017 年我国《药物性肝损伤诊治指南》,用药后出现下列

任一情况即可判定为药物性肝损伤:① $ALT \geq 3$ 倍正常上限(ULN);② $ALP \geq 2 \text{ ULN}$ ^[6]。

1.2.3 肝损伤因果关系综合评估 根据上述指南推荐的 Roussel Uclaf 因果关系评估(RUCAM)量表,对伏立康唑与肝损伤的因果关系进行评分, > 8 分为极可能;6~8分为很可能;3~5分为可能。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 23.0 软件统计分析,对符合正态性分布的计量资料,组间比较采用 t 检验且以平均值 $\pm$ 标准差表示,不符合正态性分布的计量资料,采用中位数(四分位数间距)表示,组间比较采用 Man-Whitney U 检验;二分类变量采用 χ^2 检验。使用单因素方差分析和二元 Logistic 回归分析来确定伏立康唑致肝损伤的 OR 值和置信区间(95%CI),单因素分析中 $P < 0.05$ 的变量,用二元 Logistic 回归分析来确定伏立康唑致肝损伤的危险因素,建立预测模型,利用 ROC 曲线评价预测模型效力,并通过验证集对预测模型进行外部验证。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本情况

共纳入 2018 年 1 月—2022 年 6 月 359 例在本院使用伏立康唑进行治疗的患者,将符合标准的 161 例作为研究对象,按照 3:1 的比例随机分配 120 例作为训练集,41 例作为验证集。对于 120 例训练集患者信息进行单因素分析,其中正常组 103 例(男 67 例,女 36 例),年龄中位数为 73.00 (62.50~80.00) 岁,肝损伤发生组 17 例(男 12 例,女 5 例),年龄中位数 77.00 (70.00~82.50) 岁,见表 1。

2.2 肝损伤的发生与转归

本研究的 120 例训练集患者中,17 例发生了肝损伤。按照 RUCAM 量表评分,极可能 5 例,很可能 7 例,可能 5 例。肝损伤发生后 12 例在继续使用伏立康唑的同时加用保肝药(还原型谷胱甘肽或者异甘草酸镁),有 10 例恢复正常,1 例较前好转,1 例无效;4 例伏立康唑停药后加用保肝药,3 例恢复正常,1 例较前好转;1 例换用卡泊芬净注射液后,肝功能较前有所改善。

2.3 单因素分析

通过比较分析肝损伤发生组和正常组的基本信息、用药天数、血常规、生化指标、合并疾病以及联合用药等情况,发现用药前 FIB、TP、

ALB、PT、INR、PCT、eGFR、合用碳青霉烯类药物共 8 个指标差异有统计学意义 ($P < 0.05$),另外 19 个指标差异无统计学意义,见表 1。

表 1 伏立康唑致肝损伤发生组与正常组的病例数据比较
Tab 1 Data of voriconazole induced liver injury group and normal group

项目	肝损伤		$\chi^2/t/z$	P
	否 ($n = 103$)	是 ($n = 17$)		
性别 (男) [n (%)]	67 (65.05)	12 (70.59)	0.199	0.655
年龄 / 岁	73.00 (62.50, 80.00)	77.00 (70.00, 82.50)	- 1.310	0.190
用药天数 /d	10.00 (7.00, 14.00)	11.00 (6.50, 15.00)	- 0.423	0.673
用量 /g	0.20 (0.20, 0.20)	0.20 (0.20, 0.20)	- 0.744	0.457
首剂加量 [n (%)]	33 (32.04)	7 (41.18)	0.548	0.459
FIB/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	3.80 ± 1.49	4.80 ± 1.81	- 2.482	0.014
HGB/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	107.65 ± 24.10	101.29 ± 21.12	1.024	0.308
TP/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	63.05 ± 8.40	56.94 ± 7.19	2.829	0.005
ALB/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	35.00 (31.00, 37.80)	27.90 (25.15, 31.25)	- 4.369	< 0.001
ALT/ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	16.00 (11.00, 26.00)	18.00 (11.00, 22.50)	- 0.105	0.916
AST/ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	21.00 (16.00, 31.00)	22.00 (17.00, 28.50)	- 0.128	0.898
ALP/ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	84.00 (72.00, 104.00)	91.00 (72.50, 112.50)	- 0.719	0.472
PT/s	11.90 (10.75, 13.35)	12.80 (11.75, 15.40)	- 2.224	0.026
INR	1.02 (0.91, 1.13)	1.07 (1.00, 1.32)	- 2.304	0.021
PCT/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.10 (0.02, 0.47)	0.56 (0.13, 2.06)	- 2.666	0.008
eGFR/ [$\text{mL}/(\text{min} \cdot 1.73 \text{ m}^2)$]	108.88 (75.32, 136.84)	70.73 (54.01, 95.14)	- 2.728	0.006
真菌培养结果阳性 [n (%)]	55 (53.40)	11 (64.71)	0.754	0.385
合并疾病 [n (%)]				
高血压	34 (33.01)	8 (47.06)	1.266	0.261
糖尿病	17 (16.50)	4 (23.53)	0.131	0.718
心功能不全	21 (20.39)	7 (41.18)	2.459	0.117
合用药物 [n (%)]				
碳青霉烯类	38 (36.89)	12 (70.59)	6.816	0.009
β - 内酰胺类	43 (41.75)	8 (47.06)	0.168	0.682
喹诺酮类	19 (18.45)	6 (35.29)	1.594	0.207
糖肽类	10 (9.71)	2 (11.76)	0.000	1.000
他汀类	8 (7.77)	4 (23.53)	2.467	0.116
糖皮质激素	41 (39.81)	8 (47.06)	0.318	0.573
质子泵抑制剂	44 (42.72)	4 (23.53)	2.239	0.135

2.4 建立 Logistic 回归模型

以 FIB、TP、ALB、PT、INR、PCT、eGFR、合用碳青霉烯类药物共 8 个指标 ($P < 0.05$) 作为自变量,采用二元 Logistic 回归分析,结果显示 ALB 和 eGFR 是伏立康唑导致肝损伤的独立危险因素,见表 2。以 ALB、eGFR 两个独立危险因素建立 Logistic 模型方程, $\text{Logit}(P) = -0.016X_{\text{eGFR}} - 0.228X_{\text{ALB}} + 4.800$ 。Hosmer-Lemeshow test 检验结果显示该模型的拟合度较好 ($\chi^2 = 6.973$, $df = 8$, $P = 0.539$),模型准确度高达 87.5%。

2.5 ROC 曲线的预测分析

通过上述回归方程转换得出联合预测因子 ($Y_{\text{联合}}$) 的计算公式, $Y_{\text{联合}} = X_{\text{eGFR}} + 14.574X_{\text{ALB}}$,计算 120 例患者的 $Y_{\text{联合}}$ 值,绘制 ROC 曲线,见图 1。采用 ROC 曲线计算 ALB、eGFR 和联合预测因子曲线下面积 (AUC),其中联合预测

表 2 伏立康唑致肝损伤分析结果

项目	B	$S.E$	$Wald$	DF	P	OR	95%CI	
							下限	上限
ALB	- 0.228	0.079	8.452	1	0.004	0.796	0.682	0.928
eGFR	- 0.016	0.008	4.253	1	0.039	0.984	0.970	0.999
常量	4.800	3.683	1.698	1	0.193	121.515		

因子 AUC 最大,预测效果较其他指标高,最大 Youden 指数 0.717,最佳临界值 540.21,敏感度 0.835,特异性 0.882,见表 3。

2.6 预测模型验证

依据《个体预后或诊断的多变量预测模型透明报告》(TRIPOD) [7],对预测模型进行外部验证。将 41 例验证集患者的 ALB、eGFR 代入 $Y_{\text{联合}} = X_{\text{eGFR}} + 14.574X_{\text{ALB}}$,计算 $Y_{\text{联合}}$ 值,当 $Y_{\text{联合}}$ 值小于 540.21 时,发生肝损伤的风险较高。结果发现 35

表 3 各危险因素对肝损伤的预测价值

Tab 3 Predictive value of various risk factors for liver injury

危险因素	最佳临界值	敏感度	特异性	Youden 指数	AUC (95%CI)	P
ALB	32.75	0.650	0.941	0.592	0.832 (0.714 ~ 0.949)	< 0.001
eGFR	88.49	0.641	0.765	0.405	0.707 (0.578 ~ 0.836)	0.006
联合预测因子	540.21	0.835	0.882	0.717	0.848 (0.739 ~ 0.956)	< 0.001

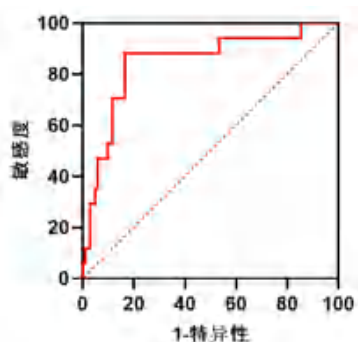


图 1 联合预测因子的 ROC 曲线

Fig 1 ROC curves of joint predictors

例预测正确, 6 例预测错误 (2 例假阴性, 4 例假阳性), 准确率为 85.37%。

3 讨论

3.1 肝损伤的发生率与原因

赵全凤等^[8]研究表明伏立康唑致肝损伤的发生率为 12.35%, 魏栋等^[9]研究显示其发生率为 13.5%。本研究分析结果表明, 伏立康唑致肝损伤的发生率为 14.17%, 与文献研究结果比较接近。向丽萍等^[10]研究表明, 伏立康唑致肝毒性主要与氧化应激和脂质代谢异常有关。Wu 等^[11]应用靶向代谢组学的研究方法, 发现在伏立康唑致肝毒性组中与氧化应激相关的代谢物发生了改变, 谷氨酰胺/谷氨酸的比值显著降低, 谷氨酰胺可能转化成谷氨酸用于谷胱甘肽的生物合成, 提示氧化应激增强, 最终导致肝细胞功能障碍。

3.2 肝损伤的影响因素分析

本研究单因素分析提示 FIB、TP、ALB、PT、INR、PCT、eGFR、合用碳青霉烯类药物共 8 个指标在伏立康唑致肝损伤的发生组和正常组之间差异有统计学意义, 但多因素 Logistic 回归分析表明, 只有 ALB 和 eGFR 是独立危险因素。ALB 作为伏立康唑致肝损伤的独立危险因素, ROC 曲线分析显示, ALB 等于 $32.75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 是伏立康唑引起肝损伤的临界值。如果患者 ALB 基线值小于 $32.75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 发生肝损伤的风险增加。Vanstraelen 等^[12]研究表明伏立康唑的血浆蛋白结合率随着 ALB 的降低而降低, ALB 每降低 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 伏立康唑的血浆蛋白结合率就降低 0.67%。因此当患者发生低蛋白血症时, 游离的伏立康唑浓度升高, 药物组织分布增加, 肝损伤

发生的风险亦增加。徐丙发等^[13]研究证明当患者 ALB 小于 $35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 伏立康唑血药谷浓度增加, 不良反应发生率升高。冯婷婷等^[14]研究了 1 例非霍奇金淋巴瘤行异基因造血干细胞移植后发生低蛋白血症的患者, 在使用伏立康唑治疗第 4 日发生了肝损伤, 分析伏立康唑致肝损伤的可能原因之一为低蛋白血症。

本研究采用简化 MDRD 公式计算 eGFR, 能较准确地反映患者的肾功能。分析结果表明 eGFR 是伏立康唑致肝损伤的独立危险因素, ROC 曲线分析表明 eGFR 等于 $88.49 \text{ mL}/(\text{min} \cdot 1.73 \text{ m}^2)$ 是伏立康唑引起肝损伤的临界值。当患者的 eGFR 小于 $88.49 \text{ mL}/(\text{min} \cdot 1.73 \text{ m}^2)$ 时, 发生肝损伤的风险增加, 这可能与伏立康唑注射液的增溶剂磺丁基- β -环糊精钠 (SBECD) 在体内累积有关。研究表明 SBECD 的清除率由 eGFR 决定, 两者成正相关。当 eGFR 低时, 由于 SBECD 蓄积, 引起肾小管空泡形成并激活肺以及肝脏内巨噬细胞, 导致肝毒性^[15-16]。唐嘉曦等^[17]研究分析表明由于 SBECD 在肾功能不全的患者中会有不同程度蓄积, 故在此类患者中使用伏立康唑注射液时应当权衡利弊。

3.3 Logistic 模型联合 ROC 曲线对伏立康唑致肝损伤的预测与评价

目前, 少有文献报道构建伏立康唑致肝损伤的风险预测模型, 本研究以 ALB 和 eGFR 构建 Logistic 模型方程, 绘制 ROC 曲线, 计算出联合预测因子 ROC 曲线最佳临界值为 540.21, 当 $Y_{\text{联合}}$ 值小于 540.21 时, 提示发生肝损伤的风险较大。通过验证集验证模型准确率为 85.37%, 证明该模型对伏立康唑致肝损伤有较好的预测价值。对 $Y_{\text{联合}}$ 值小于 540.21 的患者, 要加强用药期间肝肾功能监测, 及时发现风险优化用药。

本研究的不足之处在于使用伏立康唑治疗时, 很多患者未在用药前后做好相关生化监测, 导致纳入样本量有限, 另外未对患者进行 CYP2C19 基因型及血药浓度检测。今后需增加样本量, 检测患者 CYP2C19 基因型及血药浓度, 优化预测模型, 进一步提高预测模型的准确度, 降低肝损伤的发生风险, 确保患者用药安全。

参考文献

- [1] Park SY, Yoon JA, Kim SH. Voriconazole-refractory invasive aspergillosis [J]. Korean J Intern Med, 2017, 32 (5): 805-812.
- [2] 任晓蕾, 张晓, 詹秋秋, 等. 伏立康唑临床应用安全性研究: 基于北京市近 10 年药品不良反应监测数据 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42 (4): 439-442.
- [3] Maertens JA, Rahav G, Lee DG, et al. Posaconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive aspergillosis: a phase 3, randomised, controlled, non-inferiority trial [J]. Lancet, 2021, 397 (10273): 499-509.
- [4] 李飞, 邓庆梅, 黄山, 等. 核素肾动态显像评估 12 种肾小球滤过率计算公式在肾脏疾病中应用 [J]. 生物医学工程与临床, 2021, 25 (2): 170-178.
- [5] 张璐, 张玉娇, 王谦, 等. 急性冠状动脉综合征合并肾功能不全患者抗血小板治疗致出血危险因素分析 [J]. 中南药学, 2021, 19 (4): 746-750.
- [6] 于乐成, 茅益民, 陈成伟. 药物性肝损伤诊治指南 [J]. 实用肝脏病杂志, 2017, 20 (2): 257-274.
- [7] Collins GS, Reitsma JB, Altman DG, et al. Transparent reporting of a multivariable prediction model for individual prognosis or diagnosis (TRIPOD): the TRIPOD statement [J]. Br J Surg, 2015, 102 (3): 148-158.
- [8] 赵全凤, 符佩姝, 马欢, 等. 伏立康唑所致肝功能损害的主动监测研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2019, 24 (1): 43-48.
- [9] 魏栋, 张耀文, 陆文岐, 等. 伏立康唑用药安全性的评价 [J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33 (20): 2077-2080.
- [10] 向丽萍, 龚卫静, 刘婉玉, 等. 三唑类抗真菌药物致肝损伤的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41 (14): 1475-1480.
- [11] Wu SL, Wei TY, Lin SW, et al. Metabolomics investigation of voriconazole-induced hepatotoxicity in mice [J]. Chem Res Toxicol, 2019, 32 (9): 1840-1849.
- [12] Vanstraelen K, Wauters J, Vercammen I, et al. Impact of hypoalbuminemia on voriconazole pharmacokinetics in critically ill adult patients [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58 (11): 6782-6789.
- [13] 徐丙发, 陈思远, 昂韦, 等. 低蛋白血症对危重症患者伏立康唑血药谷浓度的影响 [J]. 中国新药杂志, 2019, 28 (3): 308-313.
- [14] 冯婷婷, 胡梦笛, 李琴, 等. 治疗药物监测在低蛋白血症患者应用伏立康唑致肝损伤病例分析中的作用 [J]. 中南药学, 2018, 16 (12): 1674-1676.
- [15] Luke DR, Tomaszewski K, Damle B, et al. Review of the basic and clinical pharmacology of sulfobutylether-beta-cyclodextrin (SBECD) [J]. J Pharm Sci, 2010, 99 (8): 3291-3301.
- [16] 宋文彬, 李兴德, 张阳, 等. 基于 CYP3A4 和 CYP2C19 酶活性探究伏立康唑与 COVID-19 潜在抗病毒药物间的相互作用 [J]. 中南药学, 2021, 19 (8): 1733-1737.
- [17] 唐嘉曦, 胡巧织, 徐珽. 伏立康唑临床常见不良反应的危险因素 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 29 (6): 469-473.

(收稿日期: 2022-04-26; 修回日期: 2022-06-30)

利伐沙班在老年非瓣膜性房颤患者体内的群体药动学

张瑜¹, 王鲁君², 朱少静^{2*}, 鲁燕侠^{2*} (1. 首都医科大学附属北京友谊医院 西药剂科, 北京 100050; 2. 解放军总医院医疗保障中心 药剂科, 北京 100039)

摘要: **目的** 建立利伐沙班在老年非瓣膜性房颤患者体内的群体药动学模型, 探索影响药物体内行为的因素, 促进患者的安全用药。 **方法** 回顾性收集某三甲医院长期服用利伐沙班的老年非瓣膜性房颤患者的血药浓度数据、人口统计学信息 (年龄、性别、体质量、体质量指数) 和生化指标 (血浆白蛋白、血肌酐、谷丙转氨酶、谷草转氨酶)。采用非线性混合效应模型化方法, 构建利伐沙班在非瓣膜性房颤患者体内的群体模型, 采用拟合优度检验 (GOF) 考察模型的拟合优劣, Bootstrap 和可视化预测检测 (VPC) 对模型进行验证。 **结果** 利伐沙班在老年非瓣膜性房颤患者的体内行为符合一级吸收的单室模型, 性别与血清肌酐可显著影响其清除率。纳入协变量后模型的拟合优度有显著提升, Bootstrap 和 VPC 结果表明最终模型预测准确、结果稳健。 **结论** 临床用药前应综合考虑患者的性别与血清肌酐水平, 选择合理的用药方案。

关键词: 利伐沙班; 群体药动学; 性别; 肌酐

中图分类号: R969.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2910-05

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.034

作者简介: 张瑜, 女, 主管药师, 主要从事医院药学工作, email: zhangyu_7302@sohu.com *通信作者: 朱少静, 女, 主要从事医院药学研究, email: zhushaojing1986@126.com; 鲁燕侠, 女, 主任药师, 主要从事群体药动学与个体化用药研究, email: lyx_67386@sina.com

Population pharmacokinetics of rivaroxaban in elderly patients with non-valvular atrial fibrillation

ZHANG Yu¹, WANG Lu-jun², ZHU Shao-jing^{2*}, LU Yan-xia^{2*} (1. Department of Pharmacy, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050; 2. Department of Pharmacy, Center of Medical Supplies, Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100039)

Abstract: Objective To determine the impact factors influencing the in vivo behaviors of rivaroxaban, and to promote rational drug use, with population pharmacokinetic model in patients with non-valvular atrial fibrillation. **Methods** The blood drug concentration data were retrospectively collected from elderly patients with non-valvular atrial fibrillation who took rivaroxaban. Patients' demographic information (age, sex, body mass, and body mass index), and biochemical indexes (plasma albumin, serum creatinine, glutamic-pyruvic transaminase and glutamic oxalacetic transaminase) were also collected. Nonlinear Mixed-Effects Modeling was used to construct rivaroxaban population pharmacokinetic model in elderly patients. Goodness-of-fit (GOF) plots were used to assess the base and final population pharmacokinetic model, and Bootstrap and Visual Predictive Check (VPC) were used to validate the final model. **Results** The in vivo behaviors of were described by one-compartment model with first-order absorption. The drug clearance was obviously affected by sex and serum creatinine. The GOF indicated that the final model was obviously improved after the incorporation of covariates (sex and serum creatinine). Bootstrap and VPC showed that the final model prediction was accurate and stable. **Conclusion** Before the clinical administration, it is recommended to consider the sex and serum creatinine level, and choose a reasonable medication regimen.

Key words: rivaroxaban; population pharmacokinetics; sex; serum creatinine

利伐沙班是一种口服的Xa因子抑制剂,可选择性地阻断Xa因子的活性位点,减少凝血酶(凝血因子IIa)生成从而发挥抗凝作用,不影响已生成的凝血酶活性,对生理性止血功能影响小。其可用于具有一种或多种危险因素(例如充血性心力衰竭、高血压、年龄≥75岁、糖尿病、卒中或短暂性脑缺血发作病史)的非瓣膜性房颤成年患者,以降低卒中和全身性栓塞的风险^[1-3]。

与其他抗凝药物一样,利伐沙班剂量不足会导致血栓事件,药物剂量过大容易发生出血事件。目前,利伐沙班有10 mg、15 mg和20 mg三种规格可供临床进行剂量调整。基于临床的有效性和安全性事件进行剂量调整属于事后调整,用药不当对患者的损伤已经产生。如何基于患者不同的个体情况,预测患者用药剂量,实施个体化的用药方案,成为亟待解决的临床问题^[4]。

本文采用群体药动学手段,对药动学和患者的生病理指标数据进行模型化,旨在探索并定量评估不同的协变量因素对利伐沙班体内行为的影响,为临床实施个体化的用药提供参考。

1 资料与方法

1.1 信息采集

回顾性收集就诊于某三甲医院长期服用利伐沙班进行抗凝治疗的老年非瓣膜性房颤患者,同时收集患者的人口统计学资料(年龄、性别、体质量、体质量指数)和生化指标(血浆白蛋白、血肌酐、谷丙转氨酶、谷草转氨酶等)。纳入标准:①确诊为非瓣膜性房颤,使用利伐沙班作为唯一的抗凝药物进行抗凝治疗,且连续服用药物至少3 d;②服用利伐沙班抗凝治疗期间,未发生过血栓或出血的不良事件;③人口统计学信息和生化指标数据完整;④接受大于1次的利伐沙班血药浓度测定。排除标准:①服用利伐沙班抗凝治疗的依从性不佳;②患者在抗凝期间换用了不同品牌的利伐沙班;③临床检验指标不全或信息丢失。

利伐沙班的给药方式均为每日1次,最小日剂量为15 mg,最大日剂量为20 mg。服药后择机采集患者的外周血,最大限度地使采血点均匀分布于整个给药周期内。采用文献报道的HPLC-MS/MS方法测定患者的血药浓度^[5]。

1.2 群体模型的构建

群体模型的构建采用Phoenix软件的NLME

模块 (Certara, Inc., Princeton), 利用 FOCE-ELS 方法构建基础和最终模型, 分别考察单室、二室和三室模型拟合药动学数据, 基于目标函数值 (objective function value, OFV) 和诊断图, 选择最适当的模型来描述药物的体内行为。采用指数模型描述了总体参数的个体间变异性:

$$P_i = P \times e^{\eta_i} \quad \text{Eq. 1}$$

P_i 和 P 分别表示参数的个体值和典型值, η_i 用于表征 P_i 和 P 之间的关系, η_i 符合均值为 0 方差为 ω^2 的正态分布。加和型误差模型描述残差:

$$C_i = C + \varepsilon_i \quad \text{Eq. 2}$$

其中 C_i 和 C 分别为观察值和预测值。 ε_i 表示残留误差, 该误差符合均值为 0 方差为 σ^2 的正态分布。

采用正向加入-逆向剔除的方法考察协变量对模型的影响, 正向加入时 $P < 0.05$, 逆向剔除时 $P < 0.01$ 。

1.3 模型评价

采用拟合优度 (goodness-of-fit, GOF) 图评价最终模型的优劣。GOF 包括了观测值与预测值的散点图、条件加权残差 (CWRES) 与预测散点图、CWRES 与时间之间的散点图, quantile-quantile (QQ) 图用于评估 CWRES 的分布与标准正态分布的匹配情况。

1.4 模型验证

采用可视化预测检验 (visual predictive check, VPC) 和 Bootstrap (1000 次) 方法检验最终模型的准确性。VPC 基于 1000 次的蒙特卡洛模拟, 计算模拟数据的 90% 预测区间 (90% prediction interval, 90%PI), 与观测数据直接比较, 考核模型预测的准确性。Bootstrap 基于有放回的重采样技术, 生成 1000 套重新组合的数据, 对参数进行拟合, 将参与的 95% 置信区间 (95% confidence interval, 95%CI) 与最终模型的参数进行比对。

2 结果

2.1 患者信息

共纳入 20 例患者的 76 个血药浓度数据, 纳入患者的平均年龄为 80.95 岁, 其中男性 6 例, 女性 14 例, 详细信息见表 1。

2.2 群体药动学

一级吸收的单室开放模型可以较好地描述利伐沙班的体内药动学行为, 选其作为基础模型; 在协变量选择之后, 发现药物的清除率 (CL) 受性别 (SEX) 和血清肌酐 (CR) 的影响显著, 最终模型如下:

$$K_a = 0.52 \times e^{\eta} \quad (\text{L} \cdot \text{h}^{-1}) \quad \text{Eq. 3}$$

$$V = 40.49 \times e^{\eta} \quad (\text{L}) \quad \text{Eq. 4}$$

表 1 纳入患者的基本信息 ($n = 20$)

Tab 1 Demographic information of the included patients ($n = 20$)

患者信息	均值 $\pm$ 标准差 (范围)
性别 (男/女)	6/14
年龄 / 岁	80.95 $\pm$ 3.43 (75 ~ 87)
体质量 / kg	58.82 $\pm$ 17.26 (48 ~ 85)
体质量指数 / ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$)	24.00 $\pm$ 3.75 (21.33 ~ 27.44)
白蛋白 / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	40.37 $\pm$ 12.32 (34.7 ~ 90.8)
肌酐 / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	70.60 $\pm$ 12.97 (45.8 ~ 97.9)
谷草转氨酶 / ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	31.75 $\pm$ 18.77 (14 ~ 82)
谷丙转氨酶 / ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	31.10 $\pm$ 30.78 (9 ~ 139)

$$CL = 9.36 \times (\text{CR}/69.9)^{-1.89} \times e^{-0.8\text{SEX}} \times e^{\eta} \quad (\text{L} \cdot \text{h}^{-1}) \quad \text{Eq. 5}$$

$0.52 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ 是吸收速率常数 (K_a) 的群体典型值, 表观分布容积 (V) 的典型值等于 40.49 L。清除率 CL 的群体典型值为 $9.36 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, 受血清肌酐 CR 和性别 SEX 影响, 其中 69.9 为 CR 的中位数, 当性别为男性时 $\text{SEX} = 0$, 当性别为女性时 $\text{SEX} = 1$, 根据患者的 CR 和 SEX, 可计算对应的 CL 。

最终的群体药动学的参数、95%CI、个体间变异和残留误差见表 2。表征参数预测精度的指标相对标准误 (relative standard error, $RSE\%$) 均小于 40%, 所有参数的 95%CI 均未出现跨零的情况, 说明参数的拟合可靠。

2.3 拟合优度检验

基础和最终模型的清除率个体间变异与性别和血清肌酐的相关性关系图见图 1。在基础模型中, 清除率的个体间变异与性别有相关性, 即女性的清除率低于男性, 同时, 清除率会随着血清肌酐的增加而变小。最终模型中, 表明模型中纳入的协变量的方式是可靠的。

基础模型 (上) 和最终模型 (下) 的拟合优度图见图 2, 图中显示模型预测不存在系统偏差。与基础模型相比, 最终模型中的 CWRES 更接近零线, CWRES 均匀地分布在零线周围, 更趋于正态分布。将性别和血清肌酐纳入模型后, 预测结果更加接近观测结果, 诊断图均有显著改善。

2.4 模型验证

Bootstrap 过程中, 模型成功收敛 986 次 (成功率 98.6%), 最终药动学参数的典型值接近 Bootstrap 拟合结果, 且均包含在其 95%CI 中, 表明了最终模型的稳健性 (见表 2)。VPC 图显示了 1000 次模拟药动学数据的中位数和 90%PI 的分布情况, 并将其与观测值进行比较 (见图 3)。大多数观测值位于 90%PI 中, 表明模型的预测性很好。

3 讨论

本研究采用非线性混合效应模型化的方法, 构建了利伐沙班在非瓣膜性房颤患者体内的群体

表 2 最终群体模型的拟合参数与 Bootstrap 结果

Tab 2 Fitting parameters of final population pharmacokinetics model and Bootstrap results

参数	参数拟合				Bootstrap	
	拟合值	RSE%	95%CI	个体间变异 (CV%)	中位值	95%CI
V/L	40.49	28.30	17.62 ~ 63.36	40.12	40.81	7.00 ~ 69.81
CL/(L·h ⁻¹)	9.36	9.24	7.64 ~ 11.09	30.73	8.90	7.31 ~ 11.67
K _a /(L·h ⁻¹)	0.52	36.67	0.14 ~ 0.91	0.59	0.49	0.12 ~ 113.60
f _{CL-SEX}	-0.80	-18.24	-1.10 ~ -0.51	—	-0.77	-1.12 ~ -0.49
f _{CL-CR}	-1.89	-26.65	-2.89 ~ -0.88	—	-1.81	-2.86 ~ -0.81
残留误差 (加和型, SD)						
σ/(mg·L ⁻¹)	70.50	9.21	57.54 ~ 83.46	—	68.72	57.55 ~ 81.22

注: f_{CL-SEX} 为性别和清除率的相关系数; f_{CL-CR} 为肌酐和清除率的相关系数。

Note: f_{CL-SEX} is coefficient of sex and clearance; f_{CL-CR} is coefficient of creatinine and clearance.

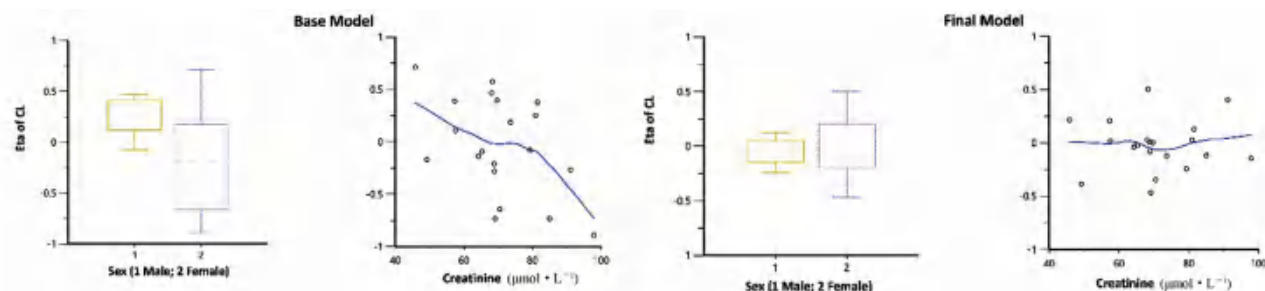


图 1 基础和最终模型的清除率个体间变异与性别和血清肌酐的相关性

Fig 1 Relationship between CL and sex/creatinine in the base and final model

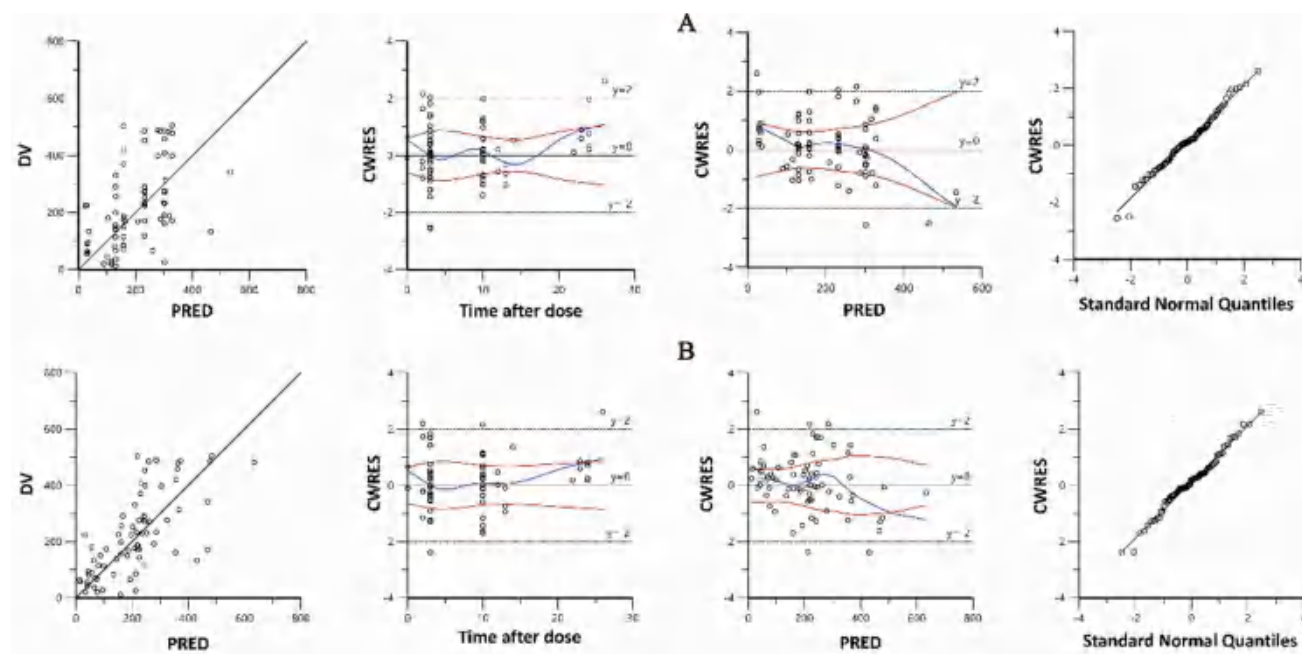


图 2 利伐沙班的基础模型 (A) 和最终模型 (B) 的拟合优度图

Fig 2 GOF plots of base (A) and final (B) population pharmacokinetics model

注 (Note): DV. 观测值 (dependents value); PRED. 预测值 (prediction value); CWRES. 条件加权残差 (conditional weighted residuals)。

药动学模型。在选择基础模型时,二室模型的目标函数值(918.266)与单室模型(919.788)无显著差异;此外,本研究的稀疏采样不能支持复杂的药动学模型,因此最终选择了一室模型对研究数据进行药动学拟合。从目前的文献报道来看^[6-11],基础模型均为口服一室模型。

利伐沙班主要经过肝脏代谢,肾脏排泄,肾功能可影响利伐沙班的体内过程。从目前发表的利伐沙班群体药动学模型来看^[6-11],患者的肾功能(肌酐清除率、肾小球滤过率或血清肌酐)是利伐沙班体内清除率的影响因素,本研究也证实药物的清除率会随着血清肌酐的升高而下降,成明

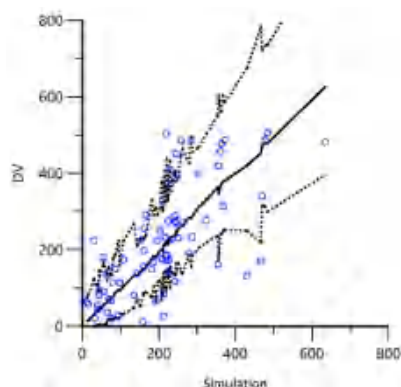


图3 利伐沙班最终群体药动力学模型的可视化预测检验图

Fig 3 VPC plots of final population pharmacokinetics model

注：圆圈为观测值；实线为 50% 预测线，虚线分别为 5% 和 95% 预测线，虚线间的面积为 90%PI。

Note: Circles are observation; solid line is 50% predictive line, dotted line are 5% and 95% predictive lines, the area between them is 90% prediction interval.

显负相关。此外，年龄也是多篇文献共同报道的影响药物清除率的主要指标^[7-11]，但本研究中患者人群为老年患者（均大于 75 岁），年龄分布较窄（75 ~ 87 岁），在模型化的过程中，没有发现年龄对药物清除率的相关影响。一篇以深静脉血栓患者为研究对象的群体药动力学模型发现，性别对药物的清除率亦有显著影响，即男性对药物的清除率要高于女性^[8]，本研究入组的患者虽为老年的房颤患者，但模型筛选出的协变量是一致的。

利伐沙班药品说明书中表述：在中度肝损害（Child Pugh B 类）的肝硬化患者中，利伐沙班血药浓度可能显著升高，进而导致出血风险升高。利伐沙班禁用于伴有凝血异常和临床相关出血风险的肝病患者。对于中度肝损害的肝硬化患者，如果不伴有凝血异常，可以谨慎使用利伐沙班。这表明肝功能受损也是影响利伐沙班体内行为的重要影响因素，本研究中仅有 3 例患者的谷丙转氨酶和谷草转氨酶升高（ $> 40 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ），且肝损伤程度较低，在模型化过程中未能发现上述两个指标对药物体内行为的影响。

本研究的不足之处在于：仅纳入了 20 位老年房颤患者，样本量有限，研究结果有待更大的样本量进行确证；利伐沙班的药效学指标缺失，如目前国内外研究较多的凝血酶原时间、活化部分凝血活酶时间、肝素定量和 Xa 因子活性等。

4 小结

本研究构建了利伐沙班在老年非瓣膜性房颤患者体内的群体药动力学模型，结果发现性别与血清肌酐可显著影响药物的清除率，提示临床在用药前应综合考虑患者的性别与血清肌酐水平，选择合理的用药方案，以确保抗凝治疗的安全性和有效性。

参考文献

- [1] 彭飞飞, 陶晓晓, 章熠, 等. 不同剂量利伐沙班预防老年非瓣膜性房颤患者脑卒中临床对比[J]. 中国现代医生, 2022, 60 (10): 28-31.
- [2] 王会程, 於绍龙, 张光宇. 利伐沙班预防髋部骨折术后静脉血栓栓塞发生的效果[J]. 临床合理用药杂志, 2022, 15 (8): 108-111.
- [3] 李伟雄, 林世磅, 黄海舟, 等. 利伐沙班对骨折术后静脉血栓的疗效及对凝血功能的影响[J]. 临床医学工程, 2022, 29 (3): 345-346.
- [4] 李晓林. 个体化剂量利伐沙班预防髋关节置换术后血栓的临床效果[J]. 临床合理用药杂志, 2021, 14 (13): 72-73.
- [5] Zhang YF, Liu XQ, Wang Y, et al. Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of direct oral anticoagulants in human plasma [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2021, 1182: 122952.
- [6] Speed V, Green B, Roberts LN, et al. Fixed dose rivaroxaban can be used in extremes of bodyweight: a population pharmacokinetic analysis [J]. J Thromb Haemost, 2020, 18 (9): 2296-2307.
- [7] Xu XS, Moore K, Burton P, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban in patients with acute coronary syndromes [J]. Br J Clin Pharmacol, 2012, 74 (1): 86-97.
- [8] Mueck W, Eriksson BI, Bauer KA, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban—an oral, direct factor Xa inhibitor—in patients undergoing major orthopaedicsurgery [J]. Clin Pharmacokinet, 2008, 47 (3): 203-216.
- [9] 陈敏, 陈慧, 林玮玮, 等. 非瓣膜性心房颤动患者利伐沙班群体药动力学研究[J]. 临床心血管病杂志, 2020, 36 (8): 724-730.
- [10] 张丹, 陈文倩, 秦伟, 等. 利伐沙班导致出血事件的群体药动力学模型建立及影响因素分析[J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41 (14): 1446-1449.
- [11] Girgis IG, Patel MR, Peters GR, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban in patients with non-valvular atrial fibrillation: results from ROCKET AF [J]. J Clin Pharmacol, 2014, 54 (8): 917-927.

(收稿日期: 2022-05-31; 修回日期: 2022-07-13)

发热门诊自助云药房建设与实践

田京辉, 张慧丽, 陈静静, 曹凯, 赵亮*, 田英娜 (许昌市中心医院药学部, 河南 许昌 461000)

摘要: **目的** 评价自助云药房在医院发热门诊的应用效果, 为医疗机构发热门诊自助药房的建设和优化提供参考。**方法** 通过对自助云药房药品目录制订、药品槽位优化和监控系统建设的不断探索, 使自助云药房得到最大化的应用。**结果** 经过 6 个月 (2021 年 1 月—6 月) 的持续优化, 日加药次数由优化前的 1.93 次降低到 0.93 次, 每次加药后可调剂处方人次由 (98.58 ± 18.38) 人增加到 (112.68 ± 11.87) 人, 患者取药等候时间由 (94.56 ± 6.53) s 下降为 (29.44 ± 5.38) s, 患者总体满意度 (70.0%) 高于门诊药房 (67.5%), 优化前后数值变化均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 发热门诊自助云药房减少了污染区人员管理成本, 提高了医院感染防控水平, 同时为探索构建医院规范化、精细化和现代化的智慧药房提供新思路。

关键词: 自助云药房; 发热门诊; 疫情防控

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2915-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.035

Construction of self-service cloud pharmacy in fever clinics

TIAN Jing-hui, ZHANG Hui-li, CHEN Jing-jing, CAO Kai, ZHAO Liang*, TIAN Ying-na
(Department of Pharmacy, Xuchang Central Hospital, Xuchang Henan 461000)

Abstract: **Objective** To determine the application of self-service cloud pharmacy in hospital fever clinics. **Methods** Through the continuous optimization (January 2021 to June 2021) and exploration of the mode of self-service cloud pharmacy, the application of self-service cloud pharmacy was maximized. **Results** The number of daily dosing was reduced from 1.93 before the optimization to 0.93. After each dosing, the number of adjustable prescriptions increased from (98.58 ± 18.38) to (112.68 ± 11.87) , patients waiting time for prescription filling decreased from (94.56 ± 6.53) s to (29.44 ± 5.38) s, and the overall patient satisfaction (70.0%) was higher than that of outpatient pharmacy (67.5%). The changes before and after the optimization were significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Self-service cloud pharmacy in the fever clinics may reduce the cost of personnel management in the polluted area, improve the prevention and control of nosocomial infection prevention and control. It also provides new ideas for the construction of standardized, refined and modern pharmacies in hospitals.

Key words: self-service cloud pharmacy; fever clinic; prevention and control of pandemic

新型冠状病毒肺炎发生以来, 发热门诊成为医疗机构防疫抗疫的“前哨阵地”。发热门诊药房的设置, 一方面避免了医疗机构在用药环节产生交叉感染, 同时为发热门诊患者在诊疗过程中提供专业药事服务^[1-2]。为优化发热门诊取药流程、减少患者取药环节交叉感染风险、提高了医院感染防控水平, 我院于 2020 年 12 月建立以自助云药房为载体的发热门诊自助取药模式。

自助云药房由储药单元、出药单元、视觉核对系统、网络通信和电脑端控制系统等模块构成。

① 储药单元: 具有 79 个槽位, 每个槽位能储存 15 ~ 35 盒药品, 总储药量为 1185 ~ 2765 盒; ② 出药单元: 借助拨药电机和传输皮带的出药方式; ③ 视觉核对系统: 采用视觉图像识别核对出药药品的正确性, 错误的或不确定的药品自动落到回收站; ④ 网络通信: 连接医院 HIS 系统, 接收医师

基金项目: 许昌市重点研发与推广专项 (No.20220213037)。

作者简介: 田京辉, 男, 硕士, 副主任药师, 主要从事智慧化药房及信息化技术应用方面的研究, email: tianjinghui65@163.com

* **通信作者:** 赵亮, 男, 硕士, 主任药师, 主要从事医院药事管理与临床药学方面的研究, email: 545765537@qq.com

开出的医嘱信息,自动解析处方数据,按照处方内容发药;⑤ 电脑端控制系统:可控制发药机的数字化模块核心系统,后台实时监控出药情况、库存数量以及药品效期等。现就我院发热门诊自助云药房使用过程中存在的问题和经验进行总结和探讨,为医疗机构发热门诊自助云药房的建设提供参考。

1 自助云药房的取药流程及双审核制度的建立

自助云药房作为新兴的医疗药事服务自动化设备,已在多家医院运行使用^[3]。医师开具处方后,HIS 以诊间结算方式完成处方的推送工作,缴费成功后生成取药码。设备可以通过读取取药码,识别患者处方信息,通过出药视觉核对功能对药品的图像进行识别,核对完成后发放药品,并留存图像以供溯源,随后自动打印药品用法用量指导单,辅助患者用药。药品用法用量指导单中包含药品用法用量、服药时间、注意事项等信息,帮助患者正确使用药物,提高用药依从性,是一个符合规定且人性化的创新应用^[4],其具体流程详见图 1。

处方合理性方面,通过在前置审方系统对发热门诊药品设置全面而细致的规则,对医师开具的不合理处方进行不同信号灯的拦截,并由门、急诊审方中心进行双重审核,保证患者合理用药。

2 自助云药房应用模式的优化探索

2.1 自助云药房药品目录的制订

若药品品种数量配备不合理,就会出现门、急诊兼职药师频繁进出发热门诊补充药品的情况。不但占用了人力资源,同时造成防护服等医用耗材的浪费,还增加了交叉感染的风险,与云



图 1 自助云药房的取药流程

Fig 1 Drug collection from self-service cloud pharmacy

药房“自助化”和“无人化”的使用理念相违背。

为避免频繁出现缺货、减少药师发热门诊药品配送次数,药学部组织召开专题研讨会,根据发热门诊开具的处方药品种类,以及与发热门诊医师协商的结果,决议暂定 47 种符合要求的常用药品中 37 种由自助取药机进行存发,其余 10 种注射剂由兼职药师进行配送,目录见表 1。并将此目录通过 OA 系统共享给发热门诊医师,避免医师开具的药品超出自助云药房药品目录的范围。

表 1 我院发热门诊药品目录

Tab 1 Medicine catalogues for fever clinics in our hospital

药品类别	药品名称
解热镇痛抗炎药物	右旋布洛芬混悬液 (2 g×100 mL)、对乙酰氨基酚混悬剂 (4.22 g×1.25 g×1 瓶)、小儿布洛芬栓 (50 mg×6 粒)、复方锌布颗粒
抗感染药物	头孢克洛咀嚼片 (0.125 g×24 片)、头孢地尼胶囊 (0.1 g×20 粒)、阿莫西林克拉维酸钾片 (0.457 g×12 片)、阿奇霉素干混悬剂 (0.1 g×6 袋)、阿奇霉素胶囊 (0.25 g×6 粒)、罗红霉素胶囊 (0.15 g×12 粒)、左氧氟沙星片 (0.5 g×10 片)、头孢丙烯分散片 (0.25 g×10 片)
抗病毒药物	磷酸奥司他韦胶囊 (75 mg×10 粒)、磷酸奥司他韦颗粒 (15 mg×10 袋)、盐酸阿比洛尔片 (0.1 g×6 片)
消化系统药物	复方消化酶胶囊、蒙脱石散 (3 g×12 袋)、凝结芽孢杆菌 (350 mg×30 粒)、酪酸梭菌活菌片 (0.35 g×24 片)、奥美拉唑胶囊 (20 mg×28 粒)
呼吸系统药物	肺力咳合剂、氨溴特罗口服液 (100 mL)、丙卡特罗 (80 mL)、复方福尔可定 (150 mL)、小儿肺热咳嗽颗粒 (4 g×16 袋)、孟鲁司特咀嚼片 (5 g×10 片)、黄龙止咳颗粒 (3 g×12 袋)
清热解毒药物	连花清瘟胶囊 (0.35 g×24 粒)、连花清瘟颗粒 (6 g×10 袋)、去感热口服液 (10 mL)、四季抗病毒合剂 (10 mL)、小儿豉翘颗粒 (2 g×9 袋)、胆木浸膏口服液 (10 mL)、开喉剑喷雾剂 (30 mL)、小儿青翘颗粒 (7.5 g×8 袋)、三拗片 (0.5 g×42 片)、双黄连颗粒 (5 g×6 袋)
其他 (兼职药师配送)	醋酸地塞米松磷酸钠注射液 (5 mg)、复方氨基比林巴比妥注射液 (2 mL)、地西洋注射液 (10 mg)、注射用苯巴比妥 (0.1 g)、盐酸曲马多注射液 (100 mg)、0.9% 氯化钠注射液 (500 mL、250 mL)、5% 葡萄糖注射液、水合氯醛灌肠剂 (250 mL)、0.9% 氯化钠注射液 (10 mL)

2.2 自助云药房槽位的优化

优化自助云药房的槽位,充分利用机内空间,保证发热门诊药品供给是一项非常重要的工作。本文参考沈颖燕等^[5]报道的方法,对自助云药房的轨道利用率进行计算,得出自助云药房内药品每日的最佳存储量,通过调节槽位宽度尽量满足所有药品的存放,保证每日只需 1 次加药即能满足发热门诊高峰期用药的需求,从而降低补药次数,提高工作效率,避免交叉感染风险。优化后,槽位数增加 4 个,总储药量增加 113 盒,很大程度上提高了自助云药房的空间利用率,具体见表 2。

表 2 优化前后机内槽位及药品的变化

Tab 2 Changes in the slots and medicines in the machine before and after the optimization

阶段	槽位数/个	药品品种/种	总储药量/盒
优化前	79	37	1915
优化后	83	37	2028

2.3 自助云药房监控系统的建设

2.3.1 自助云药房系统端的共享 为加强自助云药房药品的管理,不但在发热门诊设立独立的二级库,还将自助云药房的系统端与门、急诊电脑共享,药师可以在门、急诊药房监控发热自助云药房,实时查看药品的数量和出药状态。同时完成库存的查询及补药数量的添加,具体监控内容见图 2。另外设置有库存及近效期预警机制(见图 3、4),库存预警是机内药品库存低于警戒线时就会通过显示不同的颜色提醒上药(红色提示库存为 0;黄色提示库存低于警戒数量);近效期预警是系统通过对药品效期的自动跟踪,对不同近效期药品显示不同的颜色(红色、橙色、黄色分别表示失效期为 1、3、6 个月)。

2.3.2 自助云药房设备故障的监控 共享的系统端可显示自助云药房的出药状态,当提示出药失败时,由门、急诊药师根据相应处方信息进行调配工作,将药品打包并放在外包装袋上贴上患者信息,送至发热门诊污染区外,通过专门窗口放置污染区内部的桌面上,由护理人员进行核对发放给患者,全过程形成信息化闭环管理,流程可追溯。

3 自助云药房应用模式实施效果

自 2020 年 12 月我院发热自助云药房正式投入使用后,经过 6 个月对其应用模式不断的优化探索,自助云药房做到了 24 h 无人值守地为患者进行出药服务,2021 年 7 月使用效果已达预期:高峰期平均每日处方量可达 300 张,非高峰期平均每日处方量 86 张。其中自助云药房完成的发药

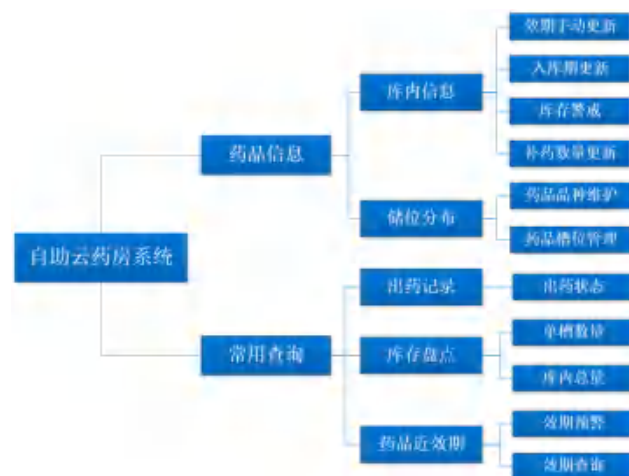


图 2 自助云药房系统端的监控内容

Fig 2 Monitoring of the mobile terminal of self-service cloud pharmacy

处方占 99.7%, 急诊药房监控发药占 0.3%。

3.1 优化人力资源配置, 节约防疫物资

在发热门诊建立自助云药房,可以撤去 24 h 值班的药房工作人员,由原来的 3 名专职药师变为由 1 名门、急诊药师兼职。将人力资源从发热门诊处方调剂工作中解放出来,增加药师开展药学技术服务的时间,提高药学服务质量和可及性。同时降低医院防疫物资的消耗,为医院节约人员管理成本和物资耗材成本。

3.2 减少自助云药房的补药次数, 提高发药效率

自助云药房根据发热门诊需求制订药品目录,并对槽位进行优化,增加机内药品的储放量,使自动化设备得到充分利用,减少疫情期间药师的补药频次,保障药品高效、安全供应,降低交叉感染风险^[6]。通过对 2021 年 1 月与 2021 年 7 月前后 1 个月数据的对比发现:日加药次数较优化前降低 [1.93 (2.20, 2.70) vs 0.93 (1.19, 1.35), $Z = -6.696$, $P < 0.001$], 每次加药后可调剂处方人次数较优化前显著增加 [(98.58 ± 18.38) vs (112.68 ± 11.87), $t = -3.587$, $P = 0.001$]。

3.3 减少药品调配时间

应用模式的持续优化,减少了药师去发热门诊配送药品的次数,自助云药房的运行只需通过程序控制完成自动批量快速调配发药,患者在 20 ~ 40 s 内即能取到药品和用药指导单,配药过程精准、高效,可显著减少处方调配时间,降低药师工作量。不仅大大缩短患者等候取药的时间,减少人员聚集交叉感染的风险,还可避免在取药高峰期药师受外界及人为因素影响而出现的调剂差错^[7-8]。通过自助云药房应用模式优化前后 1 个月数据(2021 年 1 月与 2021 年

药品位置	药品名称	规格	库存数量	药品编码	药品批号	药品效期	药品批号	生产日期	生产厂家	供应商	备注
010015	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010016	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010017	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010018	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010019	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010020	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010021	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010022	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010023	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010024	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010025	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010026	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010027	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010028	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010029	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010030	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010031	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010032	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010033	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010034	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010035	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010036	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010037	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010038	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010039	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20
010040	阿莫西林胶囊(0.5g)	0.5g*12粒	100	1001	1001	2024-04-30	2024-04-30	2024-04-30	阿莫西林胶囊(0.5g)	ATMOKIWE	20

图 3 库存预警系统

Fig 3 Early warning system for the inventory

位置	药品名称	规格	库存	厂家	唯一编码	药品有效期	天数
010021	聚桂石胆(中法D)(基)	3g*12袋	15	哈药集团中法二厂	3228	2022-09-30 15:00:09	174
010003	醋酸钠注射液	0.35g*124片	12	青岛东海药业有限...	2749	2022-08-31 12:30:43	144
010033	右旋布洛芬口服混...	2g*100ml*1瓶	6	湖北唯嘉制药有限公司	2660	2022-07-31 17:07:15	113

图 4 药品近效期预警系统

Fig 4 Early warning system for near-expiration drugs

7月)对比发现:患者取药等候时间较优化前显著降低 $[(29.44 \pm 5.38) \text{ s vs } (94.56 \pm 6.53) \text{ s}, t = 42.798, P < 0.001]$ 。

3.4 实现全程信息化管理

自助云药房系统不仅储存了医师的处方信息,还能存储药品自动调配过程中取药码扫描出的药品和患者相关信息,实现药品从自助药房到患者使用全过程可追溯的管理目标。此外,该自助云药房能智能管理药品效期以及库存数量,使药品品质管理更自动化、精细化。

3.5 提高患者就诊满意度

患者在医院就诊结束后手机会自动生成一份满意度调查表,由患者或家属自愿填写。调查内容包括就诊、缴费、取药等所有环节,其中非常满意8~10分,满意5~7分,一般1~4分,不满意0分。2021年7月,门诊药品调剂室随机抽取发热门诊患者和门诊患者填写满意度调查表各200份,对取药环节的满意度结果见表3。自助云药房的总体满意度(非常满意+满意,70.0%)高于门诊药房的总体满意度(67.5%),秩和检验显示自助云药房与门诊药房的总体满意度差异有统计学意义($Z = -5.766, P < 0.001$)。

表 3 自助云药房与门诊药房满意度调查情况表比较 [n(%)]

Tab 3 Satisfaction between self-service cloud pharmacy and outpatient pharmacy [n(%)]

药房	非常满意	满意	一般	不满意
自助云药房	45 (22.5)	95 (47.5)	60 (30.0)	0 (0.0)
门诊药房	55 (27.5)	80 (40.0)	57 (28.5)	8 (4.0)

4 讨论

4.1 自助云药房对疫情防控的重要性

国内新型冠状病毒肺炎疫情防控进入持续常态化防控阶段,发热门诊要充分发挥“哨点”作用,作为疫情筛查、防治的重要一站,也是感染风险性最大的部门。到此就诊的患者中,可能携带或感染新冠肺炎病毒的概率也是最高的,患者在取药环节滞留时间的长短、所经的区域范围,以及与药师接触的次數,都有可能造成潜在的交叉感染^[9]。因此,通过建设自助云药房及优化其取药流程,患者可在无人药房自助取药,全过程为单向、无接触式操作,能提升医院感染控制方面的管理水平,为我院的疫情防控工作起到了积极作用,对未来将要面对的传染病防疫,值得推广应用^[10]。

4.2 门、急诊药师监控自助云药房的优势

通过自助云药房系统端的共享,门、急诊药师可及时查看机器内药品的库存情况,做到提前对发热门诊药品进行补充,避免因缺药而出现患者聚集现象的发生。另外,可对机器内药品效期进行监控预警,保证了患者用药安全。

在自助取药机无法正常发药时,门、急诊药师能快速介入,及时为患者发放所需药品,不但避免患者在发热门诊的滞留时间,还减少了发热门诊护士、医师打电话至急诊药房的沟通时间,提高工作效率。

4.3 自助云药房存在的一些问题

关于发热门诊药品的配送问题,我院严格按照防疫要求由门诊兼职人员完成此项工作,但配送模式存在耗时长、效率低等弊端,已经无法满

足当前信息化时代的发展需求。如果云药房能采取新配送服务模式,如传送带物流配送方式或智能机器人^[11-12],将有助于提高发热自助云药房疫情防控时期药品供应的效率,并且形成药品流通全过程闭环管理。

参考文献

- [1] 胡立强,熊青云,李燕,等.新型冠状病毒肺炎定点医院发热门诊规范化管理探索[J].中国医院管理,2020,40(4):47-50.
- [2] 王晨,夏鹏辉,葛覃.急诊药房监控的发热急诊自助取药系统应用[J].中国数字医学,2021,16(10):26-30.
- [3] 刘彤,王可,管钰,等.PDCA循环用于发热门诊自助云药房管理效果分析[J].中国药业,2022,31(6):35-37.
- [4] 刘晴,李婧,沈素,等.疫情期间自助取药在发热门诊的应用[J].中国数字医学,2020,15(5):116-118.
- [5] 沈颖燕,陈秀兰,李桃.采用轨道利用率算法持续优化自动发药机内药品储位管理[J].中国药房,2017,28(28):4029-4032.
- [6] 中国智慧药学联盟专家组.新型冠状病毒肺炎疫情下加快开展智慧药学服务的专家共识(第一版)[J].临床药物治疗杂志,2020,18(2):4-9.
- [7] 吴剑虹,曹惠民,李源,等.无人自助云药房在医院门诊药房第二类精神药品管理中的应用[J].中国医学装备,2021,18(2):115-118.
- [8] 黄锦康.论医院自动化设备对药房的影响[J].世界最新医学信息文摘,2020,20(55):19-20.
- [9] 高贵德,李婕,刘可可,等.公立医院发热门诊在新型冠状病毒肺炎疫情防控中的作用、不足及改进措施[J].山东医药,2021,61(9):89-92.
- [10] 张兰,张堃,褚燕琦,等.新型冠状病毒肺炎疫情下加快开展智慧药学服务的专家共识(第二版)[J].临床药物治疗杂志,2020,18(6):11-24.
- [11] 潘善伟,汪建军,金雨松.轨道式小车物流传输系统设施安全和运行管理要点探析[J].医疗卫生装备,2020,41(1):66-69.
- [12] 叶华,张志尧,陈晓怡,等.物流机器人在医院静脉配置药品配送中的应用[J].中华医院管理杂志,2019,35(7):610-613.

(收稿日期:2022-05-16;修回日期:2022-07-08)

国家集采背景下的南京某院心血管药物应用情况

张宁, 马红, 钱巧, 王淼晶, 张凤怡* (南京医科大学第四附属医院药剂科, 南京 210031)

摘要: **目的** 分析国家集采试点扩围背景下南京某院心血管药品使用情况, 为医院药事管理与临床应用提供参考。**方法** 通过医院信息系统收集全院执行国家集采前后一年的心血管药品销售金额、数量, 利用药物经济学方法统计药品总消耗量、用药频度 (DDD_s)、药物利用指数 (DUI)、销售金额、日均费用 (DDC) 并对比前后差异。**结果** 执行集采后心血管药品大部分品种总消耗量及 DDD_s 有所增加, 幅度分别为 -25.67% ~ 51.97% 和 -34.54% ~ 34.20%; DUI 集采前后区间分别为 0.16 ~ 1.62 和 0.75 ~ 2.09; 销售金额均有明显下降, 降幅区间为 21.18% ~ 205.65%; 心血管药物的日均费用显著下降, 费用节省率为 57.59% ~ 185.14%。**结论** 某院执行国家集采后心血管药品费用下降, 切实降低部分心血管病患者经济负担, 对医改有积极促进作用。

关键词: 国家集采; 心血管药物; 用药频度; 药物利用指数; 日均费用

中图分类号: R95

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2920-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.036

Use of cardiovascular drugs in a hospital in Nanjing under national centralized purchase

ZHANG Ning, MA Hong, QIAN Qiao, WANG Miao-jing, ZHANG Feng-yi* (Department of Pharmacy, The Fourth Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210031)

Abstract: **Objective** To analyze the use of cardiovascular drugs under expansion of national centralized purchase pilot project, and to provide reference for hospital pharmacy management. **Methods** Through the hospital information system, the sales data of cardiovascular drugs in the hospital before and after the implementation of the national centralized purchase were compared. The total drug consumption, defined daily doses (DDD_s), drug utilization index (DUI), sales amount and daily average cost (DDC) were compared by pharmacoeconomic methods. **Results** After the implementation of centralized purchase, the total consumption and DDD_s of most cardiovascular drugs increased by -25.67% ~ 51.97% and -34.54% ~ 34.20% respectively; The interval before and after the DUI centralized purchase was 0.16 ~ 1.62 and 0.75 ~ 2.09. The sales amount decreased with a decrease range of 21.18% ~ 205.65%; The average daily cost of cardiovascular drugs decreased obviously, and the cost saving rate was 57.59% ~ 185.14%. **Conclusion** After the implementation of national centralized procurement, the cost of cardiovascular drugs in this hospital is decreased, which effectively reduces the economic burden of patients with cardiovascular diseases. **Key words:** national centralized purchase; cardiovascular drug; defined daily dose; drug utilization index; sales amount and daily average cost

随着我国经济高速发展, 社会城镇化及人口老龄化的加速, 心血管疾病发病率持续上升, 居我国城乡居民死因首位, 卫生经济负担日渐加重^[1]。为减少药费开支, 推动医药卫生体制改革, 2018 年 11 月, 中央全面深化改革委员会通过《国

家组织药品集中采购试点方案》, 试点范围为 4 个直辖市和 7 个较大的城市 (简称“4 + 7”试点工作); “4 + 7”试点工作开展以来, 25 种集中采购药品价格大幅降低, 社会舆论良好, 进展顺利。2019 年 8 月, 国务院常务会议专门提出“要加快

基金项目: 南京药学会 - 常州四药医院药学科研基金 (No.2021YX027)。

作者简介: 张宁, 女, 主管药师, 主要从事药事管理工作, email: 492953508@qq.com *通信作者: 张凤怡, 女, 硕士, 副主任药师, 主要从事临床药理学和药理学方面的研究, email: elsasweet@qq.com

推进国家组织药品集中采购和使用试点扩大区域范围工作”。2019 年 9 月, 国家医疗保障局等 9 部门联合印发《关于国家组织药品集中采购和使用试点扩大区域范围实施意见》(简称“国家集采试点扩围”)。2019 年 11 月, 江苏省医疗保障局等 9 部门联合印发《江苏省推进落实国家组织药品集中采购和使用试点扩大区域范围工作实施方案》(苏医保发〔2019〕95 号), 南京地区于 2019 年 12 月 23 日执行首批国家集采 25 种药品。为充分了解国家集采品种中治疗心血管疾病的药品使用情况及实施现状, 探讨国家集采对心血管慢病患者用药影响, 利用南京医科大学第四附属医院(简称“某院”)医药信息系统采集数据予以回顾性分析。

1 资料与方法

1.1 资料来源

2019 年 12 月 23 日零时起南京地区首批国家集采药品 25 个品种落地, 某院执行心血管药物 8 个品种, 10 个品规, 分别为阿托伐他汀钙片、苯磺酸氨氯地平片、厄贝沙坦片、厄贝沙坦氢氯噻嗪片、福辛普利钠片、硫酸氢氯吡格雷片、氯沙坦钾片、瑞舒伐他汀钙片。

利用医院药品信息系统统计执行国家集采前一年(2018 年 12 月 23 日—2019 年 12 月 22 日)及国家集采后一年(2019 年 12 月 23 日—2020 年 12 月 22 日)的同品种心血管药物使用情况, 包括药品规格、生产厂家、使用数量、销售金额等。

1.2 方法

统计执行国家集采前后某院 8 个心血管药物品种中原研药品及国家集采中选药品的药品总消耗量、用药频度(DDDs)、药物利用指数

(DUI)、销售金额、日均费用(DDC)并对比前后差异。通过世界卫生组织(WHO)提供的限定日剂量(DDD), 参照《新编药理学》^[2](第 18 版)及药品说明书, 来制订该药的 DDD 值。DDD 值为治疗目的成人平均日剂量, $DDDs = \text{该药品消耗总剂量} / \text{该药 DDD 值}$, $DDC = \text{该药品销售金额} / \text{该药 DDDs}$ 。原研药或者国家集采中标药品的 DDDs、金额占比为同组内对应原研药或者国家集采药品的 DDDs、金额分别比上同组内该品种所有药品的总 DDDs 和总金额。金额、DDDs、DDC 变化幅度等于国家集采前后的两组药品的金额、DDDs、DDC 比值。 $DUI = DDDs / \text{实际用药总天数}$, DUI 值越接近 1 表示表明处方日剂量未超过正常用量范围, 用药越合理; > 1 提示用药剂量高于常用量, DUI 越高用药越不合理。实际节省费用 = (国家集采前 DDC - 国家集采后 DDC) $\times$ 国家集采后 DDDs, 费用节省率(%) = 实际费用节省 / 总使用金额 $\times 100\%$ 。

2 结果

2.1 执行国家集采心血管药物品种明细及集采前后原研药品价格变化情况

某院执行国家集采前同品种心血管药物共 16 个品规, 其中福辛普利钠片仅一种规格, 中标药品为中美上海施贵宝生产原研药, 集采前同品种为浙江华海药业仿制药。执行国家集采后同品种原研药价格均有所下降(见表 1), 降幅区间为 15.91% ~ 77.10%, 其中氯吡格雷原研药(商品名: 波立维)降价幅度最大(77.10%), 由 108.29 元/盒降为 24.8 元/盒, 同规格价格接近国家集采中标品种(商品名: 帅信, 20.85 元/盒)。

表 1 国家集采中标心血管药品品种明细及集采前后原研药品价格变化

Tab 1 Details of the bid winning cardiovascular drugs and the price changes in the original drugs before and after national centralized purchase

类别	通用名	国家集采药品			某院在用原研药品				
		规格	中标企业	价格 / (元 / 盒)	规格	厂家	集采前价格 / (元 / 盒)	集采后价格 / (元 / 盒)	降价 幅度 /%
调脂药	阿托伐他汀钙片	10 mg*14	乐普制药	4.41	10 mg*7	辉瑞	55.5	25.16	54.67
	阿托伐他汀钙片	20 mg*7	乐普制药	3.83					
	瑞舒伐他汀钙片	10 mg*14	南京正大天晴	4.18	10 mg*7	阿斯利康	46.56	38.8	16.67
抗血小板药	硫酸氢氯吡格雷片	25 mg*20	乐普药业	24.72	75 mg*7	赛诺菲	108.29	24.8	77.10
	硫酸氢氯吡格雷片	75 mg*7	乐普药业	20.85					
抗高血压药	厄贝沙坦片	75 mg*28	浙江华海药业	5.46	150 mg*7	赛诺菲	28.58	22.24	22.18
	苯磺酸氨氯地平片	5 mg*14	国药集团容生制药	0.84	5 mg*7	辉瑞	29.58	24.01	18.83
	厄贝沙坦氢氯噻嗪片	150 mg:	浙江华海药业	14.67	150 mg:	赛诺菲	29.22	9.8	66.46
		12.5 mg*14			12.5 mg*7				
	福辛普利钠片	10 mg*14	中美上海施贵宝	11.8	10 mg*21	浙江华海	40.21	/	/
	氯沙坦钾片	50 mg*14	浙江华海药业	14.7	50 mg*7	默沙东	37.46	31.5	15.91

2.2 国家集采前后心血管药物消耗总量变化与目标药物占比

集采后药品总消耗量变化幅度为 -25.67% ~

51.97%, 除福辛普利片外均大幅度提升, 总消耗增加前三的品种为阿托伐他汀钙片、厄贝沙坦氢氯噻嗪片、厄贝沙坦片。原研药品消耗的变化幅

度为-60.41%~24.77%，消耗量较集采前降低的消耗量集采后降低60.41%（见表2）。均为抗高血压药品种，其中厄贝沙坦氢氯噻嗪片

表2 国家集采前后心血管药物总消耗量变化情况

Tab 2 Total consumption of cardiovascular drugs before and after the national centralized purchase

分类	通用名	国家集采前		国家集采后		总消耗量变化幅度/%	原研药品消耗量变化幅度/%
		总消耗量/kg	原研药品消耗量/kg	总消耗量/kg	中标药品消耗量/kg		
调脂药	阿托伐他汀钙片	4833.38	1558.13	7345.10	4909.80	51.97	24.77
	瑞舒伐他汀钙片	6023.57	2074.26	6669.11	3522.78	10.72	5.98
抗血小板药	硫酸氢氯吡格雷片	14 504.88	6097.73	16 288.25	9355.25	12.30	13.70
抗高血压药	厄贝沙坦片	17 425.20	17 425.20	23 187.15	10 728.45	33.07	-28.50
	苯磺酸氨氯地平片	2423.36	854.76	2581.01	1419.88	6.51	-9.97
	厄贝沙坦氢氯噻嗪片	49 337.11	1031.39	65 939.09	31 518.50	33.65	-60.41
	福辛普利钠片	22.75	/	16.91	16.91	-25.67	/
	氯沙坦钾片	6384.85	1997.15	8303.25	5999.85	30.05	15.33

2.3 国家集采前后心血管药物 DDDs 变化与目标药物占比

从集采前后心血管药物 DDDs 变化幅度来看，执行集采后大部分品种 DDDs 有所增加，变化幅度为-34.54%~34.20%，福辛普利钠片集采后

DDD 下降 34.54%。集采前后原研药品 DDDs 占比变化不大，集采后中标药品 DDDs 占比最高前三的品种为福辛普利钠片、氯沙坦钾片、阿托伐他汀钙片，原研药品 DDDs 占比较集采前增加的品种为硫酸氢氯吡格雷片、福辛普利钠片，详见表 3。

表3 国家集采前后心血管药物 DDDs 变化及中标品种、原研药品占比

Tab 3 DDDs of cardiovascular drugs, bid winning varieties and proportion of original drugs before and after the national centralized purchase

分类	通用名	DDD/mg	国家集采前		国家集采后			DDD 变化幅度/%
			DDD	原研药品占比/%	DDD	中标品种占比/%	原研药品占比/%	
调脂药	阿托伐他汀钙片	20	241 669.00	32.24	367 255.00	66.84	26.47	34.20
	瑞舒伐他汀钙片	10	602 356.50	34.44	666 911.00	52.82	32.96	9.68
抗血小板药	硫酸氢氯吡格雷片	75	193 398.33	42.04	217 176.67	57.44	42.56	10.95
抗高血压药	厄贝沙坦片	150	116 168.00	100.00	154 581.00	46.27	53.73	24.85
	苯磺酸氨氯地平片	5	484 672.00	35.27	516 201.00	55.01	29.81	6.11
	厄贝沙坦氢氯噻嗪片	162.5	303 613.00	2.09	405 779.00	47.80	0.62	25.18
	福辛普利钠片	10	2275.00	/	1691.00	100.00	100.00	-34.54
	氯沙坦钾片	50	127 697.00	31.28	166 065.00	72.26	27.74	23.10

2.4 国家集采前后心血管药物品种 DUI 变化

集采前药品 DUI 区间为 0.16~1.62，集采后为 0.75~2.09。原研药品集采前后 DUI 值较为接近，仅阿托伐他汀片原研集采前后 DUI 差值较大。集采后中标品种 DUI 大部分高于原研药品，厄贝沙坦片和硫酸氢氯吡格雷片集采后中标品种略低于原研药品。DUI 最高品种为福辛普利集采前为 1.62，集采后为 2.09（见表 4）。

2.5 国家集采前后心血管药物金额变化与目标药物占比

执行国家集采后所有品种销售金额均有明显下降，降幅区间为 21.18%~205.65%。集采后销售金额降幅前三品种为：福辛普利钠片、硫酸氢氯吡格雷片、苯磺酸氨氯地平片，原研药品销售金额占比变化不大，集采中标品种金额占比前三的为福辛普利钠片、硫酸氢氯吡格雷片、苯磺酸氨氯地平片，详见表 5。

表4 国家集采前后心血管药物品种 DUI 变化情况

Tab 4 DUI of cardiovascular drugs before and after national centralized purchase

分类	通用名	国家集采前		国家集采后		
		DUI	原研药品 DUI	DUI	中标品种 DUI	原研药品 DUI
调脂药	阿托伐他汀钙片	0.16	0.06	0.75	1.01	0.57
	瑞舒伐他汀钙片	1.43	1.44	1.29	1.44	1.26
抗血小板药	硫酸氢氯吡格雷片	1.07	1.09	1.04	1.01	1.13
抗高血压药	厄贝沙坦片	1.18	1.18	1.16	1.10	1.22
	苯磺酸氨氯地平片	1.62	1.28	1.43	1.42	1.30
	厄贝沙坦氢氯噻嗪片	1.51	1.09	1.58	1.62	1.30
	福辛普利钠片	1.62	/	2.09	2.09	2.09
	氯沙坦钾片	1.46	1.31	1.61	1.78	1.28

2.6 国家集采前后心血管药物 DDC 变化与费用节省情况

国家集采带来的药品降价显著，因此心血管药物的日均费用明显下滑，DDC 降幅前三品种：硫酸氢氯吡格雷片、阿托伐他汀钙片、福辛普利

表 5 国家集采前后心血管药销售金额变化幅度及中标品种、原研药占比

Tab 5 Changes in sales amount of cardiovascular drugs, bid winning varieties and proportion of original drugs before and after the national centralized purchase

分类	通用名	国家集采前		国家集采后			销售金额变化幅 度 / %
		销售总	原研药品销售	销售总	中标品种销售	原研药品销售	
		金额 / 万元	金额占比 / %	金额 / 万元	金额占比 / %	金额占比 / %	
调脂药	阿托伐他汀钙片	259.23	46.53	155.98	7.56	57.88	— 66.19
	瑞舒伐他汀钙片	274.36	45.15	178.30	7.59	67.85	— 53.87
抗血小板药	硫酸氢氯吡格雷片	199.76	66.01	78.67	56.87	43.13	— 153.92
抗高血压药	厄贝沙坦片	47.43	100.00	29.46	2.94	97.06	— 61.02
	苯磺酸氨氯地平片	112.68	64.47	65.14	29.51	43.87	— 72.97
	厄贝沙坦氢氯噻嗪片	78.33	3.11	56.74	13.66	0.66	— 38.04
	福辛普利钠片	0.44	/	0.14	100.00	100.00	— 205.65
	氯沙坦钾片	40.12	56.70	33.11	35.14	64.86	— 21.18

钠片, 集采前后原研药品 DDC 均有所下降。除硫酸氢氯吡格雷片外, 中标品种与原研药品 DDC 差值明显, 差值最大排名前三品种为阿托伐他汀钙片、瑞舒伐他汀钙片、苯磺酸氨氯地平片。费用

节省率为 57.59% ~ 185.14%, 其中阿托伐他汀钙片节省费用 237.96 万元, 福辛普利节省费用 0.18 万元, 详见表 6。

表 6 国家集采前后心血管药物品种 DDC 及费用节省情况

Tab 6 Changes in DDC of cardiovascular drugs and bid winning varieties before and after the national centralized purchase

分类	通用名	国家集采前 / 元		国家集采后 / 元		节省费用 / 万元	节省费用率 / %
		DDC	原研药品 DDC	DDC	中标品种 DDC	原研药品 DDC	
调脂药	阿托伐他汀钙片	10.73	15.86	4.05	0.59	7.19	237.96
	瑞舒伐他汀钙片	4.52	6.65	2.33	0.30	5.54	125.46
抗血小板药	硫酸氢氯吡格雷片	10.62	15.47	3.49	3.45	3.54	145.65
抗高血压药	厄贝沙坦片	4.08	4.08	2.63	0.39	3.18	33.66
	苯磺酸氨氯地平片	2.34	4.23	1.87	0.06	3.43	54.87
	厄贝沙坦氢氯噻嗪片	2.58	4.17	2.11	0.49	1.40	47.94
	福辛普利钠片	1.91	/	0.84	0.84	0.84	0.18
	氯沙坦钾片	3.24	5.35	2.05	1.02	4.50	19.07

3 讨论

3.1 执行国家集采后心血管药物用量差异性分析

国家集采后某院心血管药物大部分品种总消耗量有所增加, 原研药品消耗量降低的均为抗高血压药品种。厄贝沙坦是一种长效血管紧张素 II 受体拮抗剂, 其复方制剂厄贝沙坦氢氯噻嗪用于原发性高血压, 改善血流动力学及肾功能水平, 能够治疗高血压合并 2 型糖尿病肾病^[3]。集采后厄贝沙坦片总消耗量从 17 425.20 kg 增长至 23 187.15 kg, 增幅 33.07%。其原研药品消耗量从 17 425.20 kg 下降为 10 728.45 kg, 降幅 28.50%。总用药频度增幅 24.85%, 但原研药品 DDDs 占比降至 53.73%, 带量采购的“以量换价”得以体现, 侧面反映患者在使用高血压药物时, 对于药品厂家调整接受程度较高。中标品种的用量受政策影响, 执行带量采购临床每月必须要完成医院制订的中标品种任务量, 医保部门定期统计医院集采药品完成量, 未达标则相应扣减下一年度医保费用额度^[4]。福辛普利是血管紧张素转化酶抑制剂, 具有降压和逆转心肌重构作用^[5]。集采后福辛普利片 DUI 为 2.09, 在后续处方点评中发现因患者大

部分使用剂量为 20 ~ 40 mg, 其说明书指出常用初始剂量为 10 mg。他汀类药物是降低动脉粥样硬化性心血管事件主要治疗药物, 其中阿托伐他汀降低低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 效果最为显著, 临床应用广泛^[6]。阿托伐他汀钙片集采后总消耗量增加 51.97%, DDDs 增加 34.20%, DUI 从 0.16 提升至 0.75, 原研药品 DUI 从 0.06 增长为 0.57, 中标品种 DUI 为 1.01, 与研究报道一致^[7], 表明受价格因素影响, 集采降价后他汀类药物利用提升, 中标药品使用趋于合理, 在使用过程中安全性与原研药品无显著差异^[8]。硫酸氢氯吡格雷片其原研药品 DUI 在集采前后无明显变化, 与中标品种 DUI 也无太大差异, 考虑因集采后中标与原研药品的价格并无太大优势。也有调查表明, 在药品降价幅度太大而宣传力度不够情况下, 患者容易对药品的质量产生怀疑, 对政策有抵触情绪; 部分患者认为国产药品的疗效不及原研药品^[9]。虽中标药品均通过一致性评价, 但仅有少量的真实世界关于疗效、安全性评价研究, 在临床使用过程中医师与患者同样存在顾虑。建议相关部门鼓励开展基于真实世界仿制药与原研药一

致性研究,医院制订更完善的奖励机制和具体的临床应用指南,激励医师优先使用价格便宜的中标药品^[10]。

3.2 国家集中采购对患者使用心血管药物的药品费用影响

因集采带来降价效应使原研药品价格有不同程度的下降,这使得原本使用如硫酸氢氯吡格雷片(波立维)、厄贝沙坦氢氯噻嗪片(安博诺)等原研药的患者直观感受到国家集采政策带来的药费降低。数据显示大部分心血管药品 DDC 与 DDDs 之间存在“价降量升”的线性关系。硫酸氢氯吡格雷片、阿托伐他汀钙片集采前 DDC 为 10.62 元、10.73 元,集采后降为 3.49 元和 4.05 元,如患者使用集采中标品种,则 DDC 仅为 3.45 元和 0.59 元。实施集采后,阿托伐他汀钙片实际节省费用 237.96 万元,心血管药品费用节省率为 57.59%~185.14%,其中患者使用降压药中标品种苯磺酸氨氯地平片,DDC 0.06 元,一年药费仅不到百元,极大减轻了患者的药费负担。本研究中厄贝沙坦氢氯噻嗪片的中标及原研品种使用金额占比之和未达到 15%,表明医师在使用该品种降压治疗时,大多数未选择中标药品或者原研药品。这种做法并不可取,既不能完成医院约定的数量,也不利患者血压控制。集采政策实施后药品利用的经济性方面影响较为积极,患者治疗心血管疾病的药品费用减低,但选用中标药品替代原研药品仍然存在较大的费用节省空间,需要配套政策进一步完善和宣传^[11]。

3.3 国家集中采购政策对公立医院带来的机遇与挑战

药品集中带量采购政策作为促进医药服务供给侧改革的重要组成部分,具有招采合一、以量换价的特点和优势^[12]。有研究预测带量采购在公立医院的实施效果,表明带量采购可以有效降低药占比,影响医院医疗收入结构变化。但目前国家集采还存在覆盖药品品种范围窄、市场份额难以长期有效保障等潜在问题,需要不断的探索和完善^[13]。医院对于临床科室是否优先使用中标药品缺乏有效的评价手段,对临床科室优先使用中标药品的考核流于形式。医师在使用中标药品的同时更多地考虑用药安全因素,以保证药品疗效。药师应积极为患者提供专业药学服务,通过宣传教育和耐心讲解使患者认识到集采中标药品的确切疗效,定期开展专项处方点评,及时制订相应干预措施^[14]。医疗机构加强医务人员培训,在保障中标药品用量的前提下,对不肯接受中标药

品的患者可适量采购价格适宜的非中选药品。同时,还应通过信息系统,对集采药品及同类品种使用情况开展监测和分析评价,提升精细化管理水平^[15]。

参考文献

- [1] 李镒冲,刘世伟,曾新颖,等.1990~2016 年中国及省级行政区心血管病疾病负担报告[J].中国循环杂志,2019,34(8):729-740.
- [2] 陈新谦,金有豫,汤光,等.新编药理学(第 18 版)[M].北京:人民卫生出版社,2018:44-73.
- [3] 刘必铿,庄伟,林金秀.厄贝沙坦氢氯噻嗪对高血压患者的作用机制研究及其对肾功能的影响[J].中国临床药理学杂志,2015,31(21):2089-2092.
- [4] 江苏省医疗保障局.省医疗保障局等 9 部门关于印发江苏省推进落实国家组织药品集中采购和使用试点扩大区域范围工作实施方案的通知:苏医保发〔2019〕95 号[EB/OL].(2019-11-07)[2022-06-24].http://ybj.jiangsu.gov.cn/art/2019/11/18/art_74038_8818040.html.
- [5] 张祖峰,王晓红,郝晓慧,等.3 种血管紧张素转换酶抑制剂对急性心肌梗死患者心室重构的改善作用[J].中国药房,2018,29(4):526-530.
- [6] 冯英娜,邸钰蓉,贾玉娟,等.不同他汀类药物对心脑血管疾病病人低密度脂蛋白胆固醇影响的网状 Meta 分析[J].中西医结合心脑血管病杂志,2022,20(3):413-419.
- [7] 刘佳玲,王建,邱彦,等.“4+7”带量采购背景下上海市浦东新区人民医院他汀类药物使用情况分析[J].药学服务与研究,2021,21(1):68-71.
- [8] 孙哲,杨文娟,王瑞麟,等.基于回顾性队列的阿托伐他汀钙仿制药与原研药安全性和经济性评价及危险因素评估[J/OL].中国医院药学杂志.<https://kns.cnki.net/kcms/detail/42.1204.r.20220513.1048.004.html>.
- [9] 杨琦,顾洪安.上海市社区卫生服务中心国家药品集中采购实施情况调查[J].上海医药,2020,41(4):11-14.
- [10] 王辉,李歆,陈敬.试点城市带量采购政策对某三级综合医院门诊心血管类原研药和仿制药利用状况的影响[J].药学实践杂志,2020,38(4):373-377.
- [11] 倪寂,范贇婷,陆卿,等.某院执行药品带量采购的情况分析[J].中国药师,2020,23(4):719-722.
- [12] 崔兆涵,吕兰婷.国家药物政策框架构建下的我国药物政策改革逻辑分析与研究-基于 2009-2019 年的药物政策文本分析[J].中国药房,2019,30(14):1873-1880.
- [13] 朱佳英,任晋文,华特彬.“4+7”城市药品带量采购在公立医院的实施效果预测与探讨[J].浙江医学,2019,41(10):1103-1107.
- [14] 王辉,李歆,陈敬.试点城市带量采购政策对某三级综合医院门诊心血管类原研药和仿制药利用状况的影响[J].药学实践杂志,2020,38(4):373-378.
- [15] 郑解元,杨嘉永,朱王晓嘉,等.同品类集采药品使用监测和精细化管理[J].中国医院药学杂志,2022,42(11):1160-1163.

(收稿日期:2022-02-05;修回日期:2022-05-03)

利巴韦林用于慢性丙型肝炎病毒感染者的 群体药动学文献分析

李国兴^{1,2}, 舒家华^{1,2}, 陈松^{1,2}, 向秋林^{1,2}, 余娴^{2*} (1. 重庆医科大学药学院, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学
附属第二医院 I 期临床试验中心, 重庆 400010)

摘要: **目的** 为利巴韦林用于慢性丙型肝炎病毒感染治疗的临床合理用药及个体化治疗提供参考。**方法** 检索 PubMed、Embase、CNKI、万方等数据库中发表的利巴韦林的群体药动学相关文献, 总结其研究特征、模型特征, 分析协变量对利巴韦林 CL/F 的影响。**结果** 共纳入 9 篇文献, 研究人群为 18 ~ 81 岁的慢性丙型肝炎病毒感染者; 利巴韦林药动学特征符合二室或三室模型; CL/F 典型值范围为 $13.1 \sim 21.5 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; 显著影响利巴韦林 CL/F 的协变量有: 性别、体质量、肾功能以及 *ITPA* 基因多态性。女性患者相较于男性患者 CL/F 较低; 体质量越大的患者表现出更高的 CL/F ; 肾功能受损的患者 CL/F 降低; 与野生型患者相比 *ITPA* 基因变异型患者的 CL/F 较低。**结论** 利巴韦林用于慢性丙型肝炎病毒感染的临床用药方案需要考虑的因素包括性别、体质量、肾功能以及 *ITPA* 基因多态性, 仍需更多研究来考察这些因素对利巴韦林药动学参数的影响。**关键词:** 利巴韦林; 慢性丙型肝炎病毒感染; 群体药动学; 表观清除率; 影响因素

中图分类号: R969.3 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2022)12-2925-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.037

Population pharmacokinetics literature analysis of ribavirin in patients with chronic hepatitis C virus infection

LI Guo-xing^{1,2}, SHU Jia-hua^{1,2}, CHEN Song^{1,2}, XIANG Qiu-lin^{1,2}, YU Xian^{2*} (1. College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; 2. Department of Phase I Clinical Trial Center, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010)

Abstract: **Objective** To provide reference for the rational administration and individualized therapy of ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. **Methods** Literatures related to population pharmacokinetics of ribavirin in PubMed, Embase, CNKI and WanFang Data were searched. The study characteristics and model characteristics were summarized, and the influence of covariates on ribavirin CL/F was analyzed. **Results** Totally 9 literatures were included. The study population was 18 to 81 years old patients with chronic hepatitis C virus infection. The pharmacokinetic characteristics of ribavirin fit the two-compartment or three-compartment model. The typical values of CL/F range from 13.1 to 21.5 $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$. The covariates that greatly affected ribavirin CL/F included gender, body mass, renal function and *ITPA* gene polymorphism. Female patients had lower CL/F than male patients; heavier patients showed higher CL/F ; patients with impaired renal function had lower CL/F , while patients with *ITPA* genotype variants had lower CL/F than patients with wild-type. **Conclusion** Factors to be considered in the clinical dosing regimen of ribavirin for patients with chronic hepatitis C virus infection include gender, body mass, renal function, and *ITPA* gene polymorphism. More studies are needed to determine the effect of population factors on the pharmacokinetic parameters of ribavirin.

Key words: ribavirin; chronic hepatitis C virus infection; population pharmacokinetics; apparent clearance; influence factor

基金项目: 重庆医科大学附属第二医院“宽仁英才”项目基金 (No.kryc-gg-2209)。

作者简介: 李国兴, 男, 硕士, 主要从事临床药学工作, email: 2315714374@qq.com * 通信作者: 余娴, 女, 教授, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事临床药学及药物早期临床研究, email: 303671@cqmu.edu.cn

利巴韦林 (ribavirin, RBV) 作为广谱抗病毒的核苷类药物, 其主要代谢物三磷酸利巴韦林 (RTP) 通过结合病毒 mRNA 聚合酶的核苷酸结合位点进而抑制该酶的活性, 从而减少病毒的复制和蛋白质的合成^[1]。临床上利巴韦林常与直接抗病毒药物 (direct antiviral agents, DAAs) 联合用于丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 感染者的治疗^[2], 也可用于呼吸道病毒引起的病毒性肺炎与支气管炎、皮肤疱疹感染以及儿童手足口病的治疗^[3-5]。

利巴韦林的口服生物利用度为 52% ~ 64%^[6], 经胃肠道吸收后, 通过核苷转运体广泛分布于体内的各种细胞。利巴韦林在体内有两种代谢途径: 一种为在有核细胞中可逆性磷酸化, 经腺苷激酶或 5'-核苷酸酶磷酸化成一磷酸利巴韦林 (ribavirin monophosphate, RMP), 再由其他细胞激酶进一步磷酸化为二磷酸利巴韦林 (ribavirin diphosphate, RDP) 和三磷酸利巴韦林 (ribavirin triphosphate, RTP)^[7]; 另一种途径包括脱核糖基化和胺水解产生一种三吡咯羧酸代谢物^[8]。利巴韦林及其代谢产物主要经肾脏和消化道排泄, 口服利巴韦林后 72 ~ 80 h 尿排泄率为 30% ~ 55%, 72 h 粪便排泄率约为 15%^[8]。由于其具有较长的生物半衰期, 达到稳态浓度需较长时间, 且其药动学受多种因素影响, 存在较大个体差异, 导致其安全性和有效性差异较大。

以定量药理学为基础的群体药动学 (population pharmacokinetics, PPK) 现已被国内外广泛应用于新药的研发和临床给药方案设计与调整^[9-10]。PPK 研究运用经典的药动学原理结合统计学方法, 探究群体中药动学 (PK) 参数的典型值特征以及影响 PK 参数的协变量; 并根据建立的模型结合患者自身因素, 预测给药后的血药浓度, 可定量考察给药方案的安全性和有效性, 从而为患者制订合理的给药方案^[11-12]。

本研究通过检索利巴韦林用于慢性 HCV 感染者的 PPK 文献, 总结其研究特征、模型特征, 并对纳入模型的协变量进行分析, 期望为临床合理用药和个体化治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 检索策略

通过检索 Embase、PubMed、CNKI、万方数据库中建库以来至 2022 年 3 月 31 日公开发表有关利巴韦林 PPK 研究的相关文献。

英文主要检索词: (“ribavirin” OR “tribavirin” OR “virazole” OR “ribasphere”) AND (“population pharmacokinetics” OR “pharmacokinetics model”

OR “pop PK” OR “PPK” OR “nonlinear mixed effect model” OR “NONMEM” OR “WINNONMIX”), 在 “Title” “Title/Abstract” 中进行检索。

中文主要检索词: “利巴韦林” 和 (“群体药物代谢动力学” 或 “群体药动学” 或 “群体药动学” 或 “非线性混合效应模型” 或 “PPK” 或 “NONMEM”), 在 “标题” “摘要” “关键词” 中进行检索。

1.2 排除标准

① 非群体药动学研究的文献; ② 利巴韦林用于非慢性 HCV 感染的文献; ③ 重复文献; ④ 会议记录、综述类文献。

1.3 数据分析

运用 Microsoft Excel 2019 工具, 以表格形式总结了每项研究的研究特征、模型特征、模型参数和协变量等信息。每项研究中以表观清除率 (apparent clearance, CL/F) 的典型值作为参考, 根据每项研究中确定的协变量范围计算人群 CL/F 的范围, 连续协变量使用最大值和最小值计算, 对于分类协变量使用 0 或 1 计算。使用 Graphpad Prism 8.0.2 工具绘制森林图描述协变量对利巴韦林 CL/F 的影响。协变量对 CL/F 的影响按以下公式计算:

协变量 j 对 CL/F 的影响 = (计算出的 CL/F 范围) / (CL/F_i 典型值) $\times 100\%$

其中, i 表示第 i 个研究, 协变量 j 表示在第 i 个研究中确定的第 j 个协变量。

2 结果

2.1 文献检索

共检索到相关文章 62 篇, 其中 PubMed 数据库检索到 24 篇, Embase 数据库检索到 38 篇, 中文数据库未检索到相关文献。根据排除标准进行筛选, 最后共纳入 9 篇文献^[13-21]。

2.2 研究特征

利巴韦林 PPK 研究的基本情况见表 1。9 项针对慢性 HCV 感染患者的研究中, 患者年龄为 18 ~ 81 岁, 体质量为 31.3 ~ 181 kg。研究类型包括 PPK、PPK/PPD 研究, 给药剂量为 200 ~ 1200 $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$, 样本采集方式以稀疏采样为主, 部分研究采用稀疏采样与密集采样相结合。1 篇文献^[16]未记录样本检测方法, 其余研究的样本检测分析方法包括 HPLC (LC) -MS 法、HPLC-UV 法, 检测下限最低为 0.05 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。1 篇文献^[13]未记录研究数据分析的软件信息, Wu 等^[19]的研究采用 ADAPT 软件对数据进行拟合分析, 其余研究团队均采用 NONMEM 软件进行数据分析。

表 1 利巴韦林群体药动学研究的基本情况

Tab 1 Population pharmacokinetics research situation of ribavirin

研究者	研究类型	例数	年龄 / 岁	体质量 / kg	给药剂量 / ($\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$)	样本采集	分析方法	分析软件
Jen ^[13]	PPK/PPD	1105	42 (19 ~ 76)	78 (38 ~ 172)	1000、1200	稀疏采样	HPLC-MS 法, 检测下限 $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	未记录
Jen ^[14]	PPK/PPD	1367	44 (21 ~ 68)	81 (38 ~ 181)	800、1000、1200	稀疏采样	LC-MS 法, 检测下限 $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	NONMEM
Bruchfeld ^[15]	PPK	63	48.6 (20 ~ 71)	77 (46 ~ 125)	200 ~ 1200	密集采样 + 稀疏采样	HPLC-UV 法	NONMEM IV
Wade ^[16]	PPK	380	44 (18 ~ 71)	80 (44 ~ 155)	600、800、1000、1200	密集采样 + 稀疏采样	未记录	NONMEM 5.1
Jin ^[17]	PPK/PPD	144	48 (41 ~ 55)	黑人: 93 (74 ~ 112) 白人: 89 (72 ~ 106)	1000、1200	稀疏采样	HPLC-MS 法	NONMEM 6.1
Rower ^[18]	PPK/PPD	52	54 (25 ~ 78)	85.6 (45 ~ 153.4)	1000、1200	稀疏采样	HPLC-MS 法, 检测下限 $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	NONMEM 7.2
Wu ^[19]	PPK	36	52 (27 ~ 61)	79 (56 ~ 128)	1000、1200	密集采样 + 稀疏采样	HPLC-UV 法, 检测下限 $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	ADAPT V
Mensing ^[20]	PPK	1841	54 (18 ~ 71)	77 (42 ~ 129)	1000、1200	稀疏采样	LC-MS 法, 检测下限 $0.098 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	NONMEM 7.3
Gopalakrishnan ^[21]	PPK	1405	53.6 (18 ~ 81)	76.8 (31.3 ~ 139)	400 ~ 1200	稀疏采样	LC-MS 法	NONMEM 7.3

注 (Note): PPD. 群体药效学研究 (Population pharmacodynamics)。

2.3 模型特征

有 2 篇文献未记录建立的房室模型, 1 篇文献未记录研究模型的公式。6 项研究表明利巴韦林的药动学特征符合二室模型, 而 Wade 等^[16]的研究则为三室模型。利巴韦林的 CL/F 典型值范围为 $13.1 \sim 21.5 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; 中央室分布体积 (V_c/F) 典型值范围为 $472 \sim 5130 \text{ L}$; 外周室分布体积 (V_p/F) 典型值范围为 $756 \sim 5400 \text{ L}$ 。模型中 CL/F 个体间变异类型包括比例型、指数型, 估算值为 $6.2\% \sim 40\%$; 残差变异包括结合型、比例型、对数型, 估算值为 $1.6\% \sim 27\%$ 。模型协变量的选取主要是经过嵌套模型中的“前向纳入”和“逆向剔除”准则来筛选。最终模型的评价方法包括诊断图、可视化预测检验、预测误差检验、自举法、jack-knife 法、杠杆分析。利巴韦林的群体药动学的模型特征和参数如表 2 所示。

2.4 协变量对利巴韦林 CL/F 的影响

这些研究从人口统计学、病理生理学、基因多态性、药物相互作用等多方面综合考察了影响利巴韦林 PK 参数的协变量。纳入模型的协变量包括性别、年龄、体质量、肾功能、种族、肌苷三磷酸酶 (inosine triphosphatase, *ITPA*) 基因多态性、联合特拉匹韦、肝硬化。

根据研究中可用的模型数据评价协变量对利巴韦林 CL/F 的影响, 结果如图 1 所示。协变量对利巴韦林 CL/F 群体典型值的改变值超过 20% (低于 80% 或高于 125%) 被认为显著影响, 包

括性别、体质量、肾功能、*ITPA* 基因多态性。

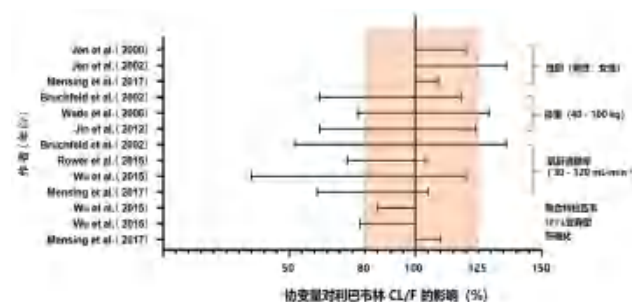


图 1 协变量对利巴韦林 CL/F 的影响

Fig 1 Effect of covariates on ribavirin CL/F

注: 横条表示计算出协变量对应的清除率与群体典型清除率的比值范围 (每个研究中 CL/F 的典型值为 100%); 体质量以 $40 \sim 100 \text{ kg}$ 计算; 肾功能指标以 CrCL 值 $30 \sim 120 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 计算; 阴影部分在 $80\% \sim 125\%$ 。

Note: The horizontal bar represents the ratio range of the calculated covariate clearance rate to the population typical clearance rate (the typical value of CL/F in each study is considered to be 100%); body mass is calculated as $40 \sim 100 \text{ kg}$; the renal function index is calculated by CrCL value $30 \sim 120 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; the shaded area ranges from $80\% \sim 125\%$.

在 Jen 等^[14]的研究中, 男女性别分别的典型值差异最为明显, 女性和男性典型 CL/F 分别为 $13.5 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ 和 $18.3 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, 男性群体 CL/F 约为女性的 140%。Mensing 等^[20]的研究中男性群体 CL/F 约为女性群体的 109%。根据 Bruchfeld 等^[15]、Wade 等^[16]和 Jin 等^[17]的研究模型, 患者在 $40 \sim 100 \text{ kg}$ 的体质量范围对应的 CL/F 与典型值相比较, 分别

表 2 利巴韦林的群体药动学模型特征及参数

Tab 2 Characteristics and parameters of population pharmacokinetics model of ribavirin

研究者	房室模型	模型公式	群体典型值
Jen ^[13]	NR	女<40岁: $\log CL/F = 2.846 + 0.467 \log (WT/72) - 0.478 \log (Scr)$; 女>40岁: $\log CL/F = 2.846 + 0.467 \log (WT/72) - 0.478 \log (Scr) - 0.620 \log (age/40)$; 男<40岁: $\log CL/F = 3.027 + 0.540 \log (WT/72) - 0.363 \log (Scr)$; 男>40岁: $\log CL/F = 3.027 + 0.540 \log (WT/72) - 0.363 \log (Scr) - 0.444 \log (age/40)$	男 $CL/F = 21.5 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; 女 $CL/F = 17.9 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$
Jen ^[14]	NR	女: $\log CL/F = \log 12.1 + 0.441 \times \log (WT/72) - 0.444 \times \log (Scr) - 0.252 \times \log (age/40)$; 男: $\log CL/F = \log 15.4 + 0.514 \times \log (WT/72) - 0.428 \times \log (Scr) - 0.229 \times \log (age/40)$	女 $CL/F = 13.5 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; 男 $CL/F = 18.3 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$
Bruchfeld ^[15]	二室模型	$CL/F = 0.122 \text{CrCL} + 0.0414 \text{WT}$; $\text{Dose} = 0.244 \cdot C_{\text{target}} \cdot \text{dose interval} \cdot CL/F$	$CL/F = 13.1 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; $V/F = 690 \text{ L}$
Wade ^[16]	三室模型	$CL/F = 19.8 \times [1 + 0.00869 \times (LBW - 67)]$; $V/F = 4910 \times [10.011 \times (LBW - 67)]$	$CL = 19.8 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; $V_c/F = 472 \text{ L}$; $V_{p2}/F = 4910 \text{ L}$; $V_{p3}/F = 871 \text{ L}$
Jin ^[17]	二室模型	$TV \text{ CL/F} = CL/F_{\text{pop}} \times (WT/75)^{0.75}$; $TV \text{ Vp/F} = V_{p/F} \text{ pop} \times (WT/75)^{1.0} \times \text{Race}$	$CL/F = 19 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; $V_c/F = 1130 \text{ L}$; $V_{p/F} = 4020 \text{ L}$
Rower ^[18]	二室模型	$CL/F = 12.2 + 7.11 (\text{MDRD}/104.7)$	$CL/F = 19.3 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; $V_c/F = 2960 \text{ L}$ (女); $V_c/F = 5130 \text{ L}$ (男); $V_{p/F} = 2680 \text{ L}$
Wu ^[19]	二室模型	$CL/F = 17.0 \cdot (\text{CrCL}/98)^{0.885} \cdot 0.853^T \cdot 0.779^{ITPA}$; $V_c/F = 756 \cdot (WT/79)^{1.29}$; $V_{p/F} = 3460 \cdot (WT/79)^{0.725} \cdot 0.732^{\text{SEX}} \cdot 1.52^{ITPA}$;	$CL/F = 17.0 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; $V_c/F = 756 \text{ L}$; $V_{p/F} = 3460 \text{ L}$
Mensing ^[20]	二室模型	$CL/F = 427 (\text{CrCL}/105)^{0.40} \cdot 1.10^{\text{CRHS}} \cdot 1.09^{\text{Male}}$; $V_c/F = 1100 \cdot 1.66^{\text{Male}}$; $V_{p/F} = 3230 \cdot 1.66^{\text{Male}}$	$CL/F = 17.8 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; $V_c/F = 1100 \text{ L}$; $V_{p/F} = 3230 \text{ L}$
Gopalakrishnan ^[21]	二室模型	NR	$CL/F = 18.0 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; $V_c/F = 1500 \text{ L}$; $V_{p/F} = 5400 \text{ L}$

研究者	模型随机效应	模型纳入的协变量	协变量纳入准则	最终模型评价
Jen ^[13]	NR	CL/F : 体质量、性别、年龄、Scr	NR	诊断图
Jen ^[14]	CL/F 个体间变异: 24%; 残差变异: 17%	CL/F : 体质量、性别、年龄、Scr	ΔObj 改变服从 χ^2 分布 ($\alpha = 0.005$)	预测误差检验, 可视化预测检验
Bruchfeld ^[15]	CL/F 个体间变异: 40%; 残差变异: 27%	CL/F : CrCL、体质量	OFV 下降 ≥ 6.6 ($d_f = 1$, $P \leq 0.01$)	NR
Wade ^[16]	CL/F 个体间变异: 16%; 残差变异: 17%	CL/F : 去脂体质量; V/F : 去脂体质量	逆向剔除协变量, 使得参数值变化 20% 的临床显著性水平	Jack-knife 法
Jin ^[17]	CL/F 个体间变异: 指数型, 37%; 残差变异: 对数型, 3%	CL/F : 体质量; $V_{p/F}$: 体质量、种族	前向纳入: OFV 下降 ≥ 3.84 ($d_f = 1$, $P < 0.05$); 逆向剔除: OFV 下降 ≥ 10 ($d_f = 1$, $P < 0.001$)	杠杆分析, 诊断图, 自举法
Rower ^[18]	CL/F 个体间变异: 比例型, 35.1%	CL/F : MDRD; V/F : 性别	正向纳入: OFV 下降 ≥ 3.84 ($P \leq 0.05$); 逆向剔除: ($P < 0.05$)	诊断图, 预测误差检验
Wu ^[19]	CL/F 个体间变异: 比例型, 22.9%; 残差变异: 比例型, 16%	CL/F : CrCL、特拉匹韦、 $ITPA$; V/F : WT、性别、 $ITPA$	Akaike 信息准则 (AIC), 逆向剔除: ($P < 0.01$)	诊断图, 可视化预测检验
Mensing ^[20]	CL/F 个体间变异: 指数型, 6.2%; 残差变异: 结合型, 1.7%	CL/F : 肝硬化、性别、CrCL; V_c/F 和 $V_{p/F}$: 性别	前向纳入: OFV 下降 > 6.63 ($d_f = 1$, $P < 0.01$); 逆向剔除: OFV 下降 > 10.83 ($d_f = 1$, $P < 0.001$)	诊断图, 可视化预测检验, 自举法
Gopalakrishnan ^[21]	CL/F 个体间变异: 指数型, 6.6%; 残差变异: 结合型, 1.6%	CL/F : 肝硬化、CrCL、种族; V/F : 性别、体质量、种族	前向纳入: $P < 0.01$; 逆向剔除: $P < 0.001$	诊断图, 可视化预测检验, 自举法

注 (Note): NR: 未记录; V/F : 表观分布体积; TV: 群体典型值; CL/F_{pop} : 群体表观清除率平均值; C_{target} : 目标药物浓度; WT: 体质量; LBW: 去脂体质量; Scr: 血清肌酐; MDRD: eGFR 肾小球滤过率 (2006 年改良的 IMDS-MDRD); CrCL: 肌酐清除率; $ITPA$: 肌苷三磷酸酶基因多态性; OFV : 模型目标函数值; Race: 黑人 = 1.0, 白人 = 1.5; T: 不联合特拉匹韦 = 0, 联合特拉匹韦 = 1; $ITPA$: 野生型 = 0, 变异型 = 1; SEX: 男 = 0, 女 = 1; Male: 男 = 1, 女 = 0; CRHS: 代偿性肝硬化患者 = 1, 失代偿性肝硬化患者 = 0 (NR: not recorded; V/F : apparent volume of distribution; TV: population typical value; CL/F_{pop} : mean population apparent clearance; C_{target} : target drug concentration; WT: body mass; LBW: lean body mass; Scr: serum creatinine; MDRD: eGFR glomerular filtration rate (2006 modified IMDS-MDRD); CrCL: creatinine clearance rate; OFV : model objective function value; Race: black = 1.0, white = 1.5; T: without telaprevir = 0, with telaprevir = 1; $ITPA$: wild = 0, variant = 1; Male: male = 1, female = 0; CRHS: patients with compensated cirrhosis = 1, patients with decompensated cirrhosis = 0]。

为 77% ~ 129%、62% ~ 124% 和 73% ~ 104%。在 Bruchfeld 等^[15]、Rower 等^[18]、Wu 等^[19] 和 Mensing 等^[20] 的模型中, CrCL 在 30 ~ 120 mL · min⁻¹ 的范围内对应的 CL/F 与典型值相比较, 分别为 52% ~ 136%、73% ~ 104%、35% ~ 120% 和 61% ~ 105%, 均达到显著水平。在 Wu 等^[19] 的研究模型中, 相比于野生型的患者, *ITPA* 变异型患者 CL/F 约降低 25%。

3 讨论

临床上利巴韦林治疗慢性 HCV 感染的过程中常发生贫血, 且有显著的剂量依赖性; 但剂量不足也会减弱持续病毒应答, 甚至后期复发^[22]。Rower 等^[18] 的群体 PK/PD 研究表明, 利巴韦林给药 14 d 后稳态药物浓度维持在 4.4 ~ 6.1 pmol/10⁶ 细胞的治疗范围, 既能带来较好的持续病毒应答, 同时也能减少患者发生溶血性贫血的风险。本研究根据已发表的利巴韦林用于慢性 HCV 的 PPK 文献, 分析了各研究中协变量对利巴韦林 CL/F 的影响。协变量对利巴韦林 CL/F 的改变值超过 20% (低于 80% 或高于 120%) 被认为对临床用药剂量调整具有实际意义^[22]。

性别对利巴韦林 PK 参数的固有差异可能是由于激素和其他生理因素对体内代谢转运体途径的影响所致^[20]。3 项研究^[13, 14, 20] 中男性的 CL/F 均高于女性群体典型值, 其中 Jen 等^[14] 的研究结果显示性别影响显著。此外, Shan 等^[23] 基于 FAERS 数据库挖掘利巴韦林联合干扰素治疗新型冠状病毒相关的不良事件信号的研究中发现: 相比男性患者, 女性患者更容易发生贫血、呕吐等不良事件。这表明在同等的治疗剂量下, 女性患者体内药物暴露量更高, 发生不良事件的风险也相对更大。

利巴韦林给药剂量是基于体质量来推荐的, 常见给药剂量包括 600、800、1000、1200 mg · d⁻¹^[24]。5 项研究^[13-17] 表明体质量较大的患者具有更高的 CL/F, 其临床给药方案设计往往需要更大的剂量。体质量还对利巴韦林的 V/F 有较大的影响, Gopalakrishnan 等^[21] 的研究中显示体质量每变化 10 kg, 相应的 Vc/F 和 Vp/F 也随之改变约 6%。因此基于患者的体质量来选择给药剂量依然是合理的。

由于利巴韦林主要经肾脏排泄, 患者的肾功能状态也很大程度地影响利巴韦林 CL/F^[25]。Bruchfeld 等^[15] 的研究发现, eGFR 的差异会导致利巴韦林半衰期的差异较大 (100 ~ 500 h), 达到稳态血药浓度的时间差异亦较大。Rower 等^[18] 的

PPD 研究表明 CrCL 越低的患者, 体内利巴韦林的暴露量更高, 发生贫血的风险更大。肾功能受损的患者以及老年患者, 其较低的 CL/F 更容易导致体内药物的蓄积, 针对此类人群需要适当减少剂量, 并加强对患者血常规的监护, 以减少贫血的发生。

ITPA 基因编码的蛋白可将三磷酸肌苷和脱氧三磷酸肌苷水解为单磷酸核苷酸和二磷酸, 其变异体会导致人体内的三磷酸肌苷水平升高^[26]。有研究表明 *ITPA* 基因的变异可在 HCV 联合治疗的早期阶段预防贫血, 但也与血小板计数降低有关^[27]。Wu 等^[19] 的研究表明, *ITPA* 变异型的患者群体具有较低的 CL/F, 可能与利巴韦林代谢过程中 RDP 逆转化为 RMP 系数升高有关。因此, *ITPA* 变异型可能不会加重利巴韦林诱导的贫血, 但仍需要考虑 CL/F 降低导致的其他潜在的影响, 如血小板计数降低。

本研究具有一定的局限性: 首先, 本研究纳入的均为国外发表的文献, 研究的人群特征亦为国外人群特征, 得到的结果可能不完全符合于国内的人群特征; 其次, 由于部分文献的数据存在缺失或未详细记录, 无法对研究的每一项协变量进行分析比较; 再次, 本研究主要分析了协变量对利巴韦林 CL/F 的影响, 未进一步深入探究协变量对服药后稳态血药浓度、AUC 以及疗效的影响。目前我国还尚未开展利巴韦林在国内人群的相关 PPK 研究, 因此仍需更多研究来考察这些人群因素对利巴韦林 PK 参数的影响, 以期临床为利巴韦林的个体化治疗提供理论依据。

参考文献

- [1] Te HS, Randall G, Jensen DM. Mechanism of action of ribavirin in the treatment of chronic hepatitis C [J]. Gastroenterol Hepatol (NY), 2007, 3 (3): 218-225.
- [2] 魏来, 段钟平, 王贵强. 丙型肝炎防治指南 (2019 年版) [J]. 实用肝脏病杂志, 2020, 23 (1): 33-52.
- [3] Burrows FS, Carlos LM, Benzimra M, et al. Oral ribavirin for respiratory syncytial virus infection after lung transplantation: efficacy and cost-efficiency [J]. J Heart Lung Transplant, 2015, 34 (7): 958-962.
- [4] 张会平, 王丽, 钱继红, 等. 利巴韦林气雾剂治疗小儿手足口病的有效性和安全性研究 [J]. 中国当代儿科杂志, 2014, 16 (3): 272-276.
- [5] Debing Y, Jochmans D, Neyts J. Intervention strategies for emerging viruses: use of antivirals [J]. Curr Opin Virol, 2013, 3 (2): 217-224.
- [6] Preston SL, Drusano GL, Glue P, et al. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of ribavirin in healthy volunteers as determined by stable-isotope methodology [J]. Antimicrob

- Agents Chemother, 1999, 43 (10): 2451-2456.
- [7] Wu JZ, Larson G, Walker H, et al. Phosphorylation of ribavirin and viramidine by adenosine kinase and cytosolic 5'-nucleotidase II: implications for ribavirin metabolism in erythrocytes [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49 (6): 2164-2171.
- [8] Dixit NM, Perelson AS. The metabolism, pharmacokinetics and mechanisms of antiviral activity of ribavirin against hepatitis C virus [J]. Cell Mol Life Sci, 2006, 63 (7-8): 832-842.
- [9] Li SC, Ye Q, Xu H, et al. Population pharmacokinetics and dosing optimization of linezolid in pediatric patients [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63 (4): e02387-18.
- [10] Whiting B, Kelman AW, Grevel J. Population pharmacokinetics. Theory and clinical application [J]. Clin Pharmacokinet, 1986, 11 (5): 387-401.
- [11] 林艳. 群体药动学应用于个体化给药的研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2015, 33 (4): 293-297.
- [12] 马广立, 许羚, 陈锐, 等. 新药研发中群体药动学/药效学研究的一般考虑 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2019, 24 (11): 1201-1220.
- [13] Jen JF, Glue P, Gupta S, et al. Population pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of ribavirin in patients with chronic hepatitis C [J]. Ther Drug Monit, 2000, 22 (5): 555-565.
- [14] Jen J, Laughlin M, Chung C, et al. Ribavirin dosing in chronic hepatitis C: application of population pharmacokinetic-pharmacodynamic models [J]. Clin Pharmacol Ther, 2002, 72 (4): 349-361.
- [15] Bruchfeld A, Lindahl K, Schvarcz R, et al. Dosage of ribavirin in patients with hepatitis C should be based on renal function: a population pharmacokinetic analysis [J]. Ther Drug Monit, 2002, 24 (6): 701-708.
- [16] Wade JR, Snoeck E, Duff F, et al. Pharmacokinetics of ribavirin in patients with hepatitis C virus [J]. Br J Clin Pharmacol, 2006, 62 (6): 710-714.
- [17] Jin R, Fossler MJ, McHutchison JG, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of ribavirin in patients with chronic hepatitis C genotype 1 infection [J]. AAPS J, 2012, 14 (3): 571-580.
- [18] Rower JE, Meissner EG, Jimmerson LC, et al. Serum and cellular ribavirin pharmacokinetic and concentration-effect analysis in HCV patients receiving sofosbuvir plus ribavirin [J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70 (8): 2322-2329.
- [19] Wu LS, Rower JE, Burton JJ, et al. Population pharmacokinetic modeling of plasma and intracellular ribavirin concentrations in patients with chronic hepatitis C virus infection [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59 (4): 2179-2188.
- [20] Mensing S, Eckert D, Sharma S, et al. Population pharmacokinetics of paritaprevir, ombitasvir, dasabuvir, ritonavir and ribavirin in hepatitis C virus genotype 1 infection: analysis of six phase III trials [J]. Br J Clin Pharmacol, 2017, 83 (3): 527-539.
- [21] Gopalakrishnan S, Mensing S, Menon RM, et al. Population pharmacokinetics of paritaprevir, ombitasvir, dasabuvir, ritonavir, and ribavirin in hepatitis C virus-infected cirrhotic and non-cirrhotic patients: analyses across nine phase III studies [J]. Clin Pharmacokinet, 2018, 57 (11): 1407-1419.
- [22] Li ZR, Wang CY, Zhu X, et al. Population pharmacokinetics of levetiracetam: a systematic review [J]. Clin Pharmacokinet, 2021, 60 (3): 305-318.
- [23] Shan W, Hong D, Zhu J, et al. Assessment of the potential adverse events related to ribavirin-interferon combination for novel coronavirus therapy [J]. Comput Math Methods Med, 2020, 2020: 1391583.
- [24] Reddy KR, Nelson DR, Zeuzem S. Ribavirin: current role in the optimal clinical management of chronic hepatitis C [J]. J Hepatol, 2009, 50 (2): 402-411.
- [25] Shuster DL, Menon R, Cohen DE, et al. Effect of chronic kidney disease on the pharmacokinetics of ombitasvir, paritaprevir, ritonavir and dasabuvir in subjects with HCV genotype 1 infection [J]. Hepatology, 2015, 62: 744A-745A.
- [26] Lin S, McLennan AG, Ying K, et al. Cloning, expression, and characterization of a human inosine triphosphate pyrophosphatase encoded by the *ITPA* gene [J]. J Biol Chem, 2001, 276 (22): 18695-18701.
- [27] Hwang JJ, Lo CC, Lin CH, et al. Association between *ITPA* gene polymorphisms and hematological abnormalities in hepatitis C virus-infected patients receiving combination therapy [J]. Gut Liver, 2015, 9 (2): 214-223.

(收稿日期: 2022-05-02; 修回日期: 2022-07-03)

药物与临床

支气管哮喘患者 *STIP1* 基因 rs4980524 位点多态性与吸入性糖皮质激素疗效关系的研究

冯文玲^{1,2}, 李静², 蒲文², 吴洁茹^{1,2}, 赵军^{2*} (1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆医科大学第一附属医院药学部, 乌鲁木齐 830011)

摘要: **目的** 探究支气管哮喘患者 *STIP1* 基因 rs4980524 位点多态性与吸入性糖皮质激素 (ICS) 疗效的关系。**方法** 选取 2021 年 1 月~2022 年 3 月就诊于本院呼吸科的 163 名哮喘患者作为研究对象, 常规给予 ICS 治疗 12 周。采用 KASP 法检测 *STIP1* rs4980524 基因多态性。比较不同基因型患者肺功能和临床疗效。**结果** *STIP1* 基因 rs4980524 位点在本地区存在基因多态性, 包括 TT、TG 和 GG 三种基因型。治疗前三种基因型患者之间 FEV1、FEV1/Pred%、FVC、FEV1/FVC、PEF 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。ICS 治疗后 *STIP1* 基因 rs4980524 位点 TT 型和 TG 型患者 FEV1、FEV1/Pred%、FVC、PEF 较治疗前显著升高 ($P < 0.05$); ICS 治疗后, GG 型患者 Δ FEV1 显著低于 TT 型、TG 型 ($P < 0.05$)。163 例患者接受 ICS 治疗后, 疗效良好的患者 110 例 (67.5%), 疗效不良的患者 53 例 (32.5%), *STIP1* rs4980524 位点 GG 型在疗效不良组的比例高于疗效良好组。**结论** 哮喘患者 rs4980524 位点多态性与 ICS 疗效相关, 携带变异性等位基因 G 型会降低 ICS 疗效。

关键词: 支气管哮喘; 吸入性糖皮质激素; *STIP1*; 多态性; 疗效

中图分类号: R562.25

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2931-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.038

Association between rs4980524 locus polymorphism of *STIP1* gene and effectivity of inhaled glucocorticoids in patients with asthma

FENG Wen-ling^{1,2}, LI Jing², PU Wen², WU Jie-ru^{1,2}, ZHAO Jun^{2*} (1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054; 2. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011)

Abstract: Objective To determine the association between rs4980524 locus polymorphism of the stress induced phosphoprotein 1 (*STIP1*) gene and the efficacy of inhaled glucocorticoids (ICS) in patients with asthma. **Methods** From January 2021 to March 2022, 163 asthma patients in the Respiratory Department of our hospital were selected as study subjects and were routinely given ICS treatment for 12 weeks. The Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) was used to detect the *STIP1* rs4980524 gene polymorphism. The lung function and clinical outcomes of patients with different genotypes were compared. **Results** The *STIP1* gene rs4980524 locus has genetic polymorphism in the region, including TT, TG and GG genotypes. The differences in FEV1, FEV1/Pred%, FVC, FEV1/FVC, and PEF among patients with the three genotypes before the ICS treatment were not significant ($P > 0.05$), but after the treatment, FEV1, FEV1/Pred%, FVC and PEF were higher in patients with TT and TG types than those before the treatment ($P < 0.05$). After the ICS treatment, Δ FEV1 was lower in patients with GG-type

基金项目: 省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室精准医学研究专项 (No.SK-L-HIDCA-2020-JZ3)。

作者简介: 冯文玲, 女, 在读硕士研究生, 主要从事临床药理学研究, email: 1923423148@qq.com *通信作者: 赵军, 女, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事临床药理学和药剂学研究, email: zhaojun700326@163.com

than those with TT-type and TG-type ($P < 0.05$). After the treatment prognosis of 110 patients (67.5%) was good, and that of 53 (32.5%) was poor. In the poor efficacy group, the GG-type distribution at *STIP1* rs4950928 locus was more frequent than in the good efficacy group. **Conclusion** The rs4980524 locus polymorphism is associated with ICS efficacy in asthmatic patients. The variant allele G-type may reduce ICS efficacy.

Key words: asthma; inhaled glucocorticoid; *STIP1*; polymorphism; efficacy

支气管哮喘(简称哮喘)是呼吸系统中常见的慢性疾病,是以慢性气道炎症和气道高反应为主要特征的异质性疾病^[1]。吸入性糖皮质激素(inhaled glucocorticoids, ICS)是临床上治疗哮喘的一线药物^[2],可有效缓解患者的临床症状并改善肺功能。然而,哮喘患者对 ICS 的反应存在明显的个体差异^[3-4],约 5%~10% 的患者经药物治疗后症状并未缓解或控制^[5],患者对 ICS 治疗效果的差异除了与药物依从性或疾病严重程度有关外,还可能与自身的基因差异相关。研究发现,糖皮质激素(glucocorticoid, GC)通路中的相关基因与 ICS 的疗效高度相关^[6],因此探讨 GC 通路基因多态性与 ICS 的关系对指导哮喘用药具有重要意义。

应激诱导的磷酸化蛋白 1(stress induced phosphoprotein 1, *STIP1*),又称为协调糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)的伴侣蛋白,其通过编码参与 GR 激活的热休克组织蛋白,影响 GC 和 GR 的结合过程,从而影响 GC 的疗效^[7]。研究发现,*STIP1* 基因多态性与 ICS 治疗哮喘患者的肺功能改善有关^[8-10]。但相关研究结论存在争议,且国内尚未见 *STIP1* 基因相关的研究报道。因此,本研究以中国新疆地区成人哮喘患者为研究对象,探究 *STIP1* 基因 rs4980524 位点多态性与 ICS 治疗哮喘之间的关系,为哮喘临床用药方案提供依据。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取 2021 年 1 月—2022 年 3 月就诊于新疆医科大学第一附属医院呼吸科的 163 名哮喘患者作为研究对象。其中男性 66 例,女性 97 例,年龄 18~75 岁,平均年龄(50.44 ± 13.78)岁,身高(163.11 ± 8.01)cm,体质量(67.29 ± 13.90)kg。

纳入标准:①符合《支气管哮喘防治指南(2020 年版)》中关于哮喘的诊断标准,均为初诊病例或既往诊断为哮喘但未进行规范治疗;②近 4 周内无全身性糖皮质激素用药史。

排除标准:①合并感染性疾病、免疫系统疾病、恶性肿瘤的患者;②妊娠期、哺乳期患者;③对糖皮质激素禁忌者。本研究已获得本院伦理

委员会批准(伦理批号:K202103-24),所有患者均签署了知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法 入组患者均根据《支气管哮喘防治指南(2020 年版)》中关于 GC 的用药标准,在常规对症治疗基础上,给予布地奈德福莫特罗吸入粉剂(AstraZeneca,1 次 1 吸,每日早晚各一次,规格:每吸 160 μg /4.5 μg ,120 吸/支,批号:H20140457);连续使用 12 周,在此期间,可根据病情按需使用硫酸沙丁胺醇吸入气雾剂(Glaxo Wellcome,规格:100 μg /揿,200 揿/支,批号:H20150673),以缓解哮喘急性发作期的症状。

1.2.2 基因多态性检测 血液 DNA 提取:采集患者外周静脉血 2 mL,以 EDTA 抗凝的无菌真空采集管采集。使用上海百敖科技公司血液 DNA 提取试剂盒(吸附柱法)提取 DNA,取 2 μL DNA 样本经 NaNo Drop 2000 进行浓度及纯度检测,随后将 DNA 原液稀释至 10 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。*STIP1* 基因 rs4980524 位点上游引物:5'-GAAGGTGACC AAGTTCATGCTCAAGTTTGCATTTTCCACATTAAAT-3',下游引物:5'-GAAGGTCGGAGTCAACG GATTAAGTTTGCATTTTCCACATTAAAG-3'。

委托浙江欣瑞达康生物医学技术公司采用竞争性等位基因特异性 PCR(Kompetitive Allele Specific PCR, KASP)方法对基因型进行检测。KASP 反应体系包含 2.5 μL Master Mix、0.07 μL Assay mix、2.5 μL DNA 模板。反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 复性 60 s,延伸 60 s,循环 48 次。PCR 反应程序结束后将样本置于测序仪中检测 FAM 及 VIC 荧光信号,检测程序反应温度 30 $^{\circ}\text{C}$,时间 1 min,收集荧光信号,仪器根据荧光信号值自动分型。

1.2.3 观察指标 观察患者基因型分布,进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验,比较不同基因型患者肺功能、临床疗效。

肺功能:治疗前和治疗 12 周后进行肺功能检测,记录患者第一秒呼气容积(FEV1)、第一秒用力呼气容积占预计值的百分比(FEV1/Pred%)、用

力肺活量 (FVC)、第一秒呼气容积占用力肺活量的百分比 (FEV1/FVC%)、呼气流量峰值 (PEF), 并计算各指标的改变量。

临床疗效: 通过电话随访的形式, 采用《支气管哮喘防治指南 (2020 年版)》中推荐的哮喘控制测试表 (asthma control test, ACT) 评估哮喘治疗后临床症状改善情况^[11], 该量表包含 5 个条目, 包括活动受限、呼吸困难频率、夜间觉醒、使用急救药物次数和患者对哮喘控制情况的自我评估五项内容, 分值范围 5 ~ 25 分, 25 分为完全控制, 20 ~ 24 分为部分控制, ≤ 19 分为未控制。本研究将未控制定义为疗效不良, 将完全控制和部分控制定义为疗效良好。

1.2.4 统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计学软件对所有数据进行分析。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 非正态分布资料以中位数和四分位间距表示。多组间比较用方差分析, 两组间比较用 t 检验。相同基因型比较, 资

料若符合正态分布采用配对样本 t 检验, 否则选用配对秩和检验; 不同基因型野生纯合型 (TT)、突变杂合型 (TG)、突变纯合型 (GG) 三组间比较资料符合正态分布和方差齐性, 则采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD- t 分析, 否则选用成组设计多样本秩和检验; 计数资料以构成比 [n (%)] 表示, 比较用 χ^2 检验。同时采用 χ^2 检验判断基因型频率是否符合 Hardy-Weinberg 平衡定律, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 STIPI 不同基因型哮喘患者基线资料比较

纳入患者 STIPI 基因 rs4980524 位点在新疆地区哮喘患者中存在基因多态性, 包括 TT 型 59 例 (占 36.2%)、TG 型 79 例 (占 48.5%)、GG 型 25 例 (占 15.3%), 基因型分布符合遗传平衡定律, 表明该样本具有群体代表性。三种基因型患者年龄、体质量指数 (BMI)、性别、民族比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 结果见表 1。

表 1 不同基因型哮喘患者基线资料

Tab 1 Baseline characteristics of patients with different genotypes of asthma

基因型	例数	年龄 / 岁	BMI / ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$)	性别 [n (%)]		民族 [n (%)]		
				男	女	汉族	维族	其他
TT	59	37.56 $\pm$ 21.88	22.37 $\pm$ 5.60	28 (47.5)	31 (52.5)	33 (55.9)	16 (27.1)	10 (17.0)
TG	79	41.29 $\pm$ 20.16	23.37 $\pm$ 5.72	30 (38.0)	49 (62.0)	48 (60.8)	19 (24.0)	12 (15.2)
GG	25	46.96 $\pm$ 20.79	23.87 $\pm$ 4.32	10 (40.0)	15 (60.0)	19 (76.0)	6 (24.0)	0 (0)
$F\chi^2$ 值		1.818	0.857	1.285		5.366		
P 值		0.166	0.426	0.526		0.252		

2.2 STIPI 不同基因型治疗前后肺功能指标比较

治疗前三种基因型 FEV1、FEV1/Pred%、FVC、FEV1/FVC%、PEF 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。治疗后 TT 型、TG 型 FEV1、FEV1/Pred%、FVC、PEF 较治疗前明显升高 ($P < 0.05$), 而 GG 型肺功能各项指标较治疗前无明显升高; 治疗后三种基因型 FEV1、FEV1/Pred、FVC、PEF 组间比较无差异, 而 FEV1/FVC% 存在差异, TG 型显著高于 TT 型和 GG 型 ($P < 0.05$), 结果见表 2。

2.3 STIPI 不同基因型患者肺功能改变量的比较

GG 型 FEV1 改变量显著小于 TT 型和 TG 型 ($P < 0.05$), FEV1/Pred%、FVC、FEV1/FVC、PEF 改变量比较无明显差异 ($P > 0.05$), 结果见表 3。

2.4 STIPI 基因多态性与哮喘患者 ICS 疗效的相关性

163 名患者经 ICS 规律治疗后 110 例 (67.5%) 患者 ACT 得分 ≥ 20 分, 哮喘获得良好控制, 作为疗效良好组; 53 例 (32.5%) 患者 ACT 得分 ≤ 19

分, 作为疗效不良组。STIPI rs4980524 位点 GG 型在疗效不良组的比例高于疗效良好 ($P < 0.05$), 结果见表 4。以哮喘患者临床疗效为因变量 (疗效不良组 = 0, 疗效良好组 = 1), 校正两组研究对象的性别、年龄、民族等因素进行 Logistic 回归分析, 发现 GG 型是影响 ICS 疗效良好的危险因素, 结果见表 5。

3 讨论

随着对哮喘发病机制的不断研究和认识, 大量研究表明哮喘是由遗传因素和环境相互作用引起的复杂性疾病。ICS 是临床上控制和治疗哮喘的主要抗炎药物, 但部分患者即使规律用药, 症状并未改善。已有研究表明 GC 通路中的部分基因多态性对 ICS 疗效发挥重要作用^[12-13]。因此, 探究 GC 通路基因多态性与 ICS 疗效之间的关系, 对哮喘临床用药具有重要的指导意义。

STIPI 基因, 定位于染色体 11q13.1 上, 包含 14 个外显子, 编码促进内源性糖皮质激素合成的伴侣蛋白, 是 GC 通路中的重要基因之一^[14]。Hawkins 等^[8]首次在成年白人中发现 STIPI 基因 rs4980524、

表 2 *STIPI* 不同基因型治疗前后肺功能指标比较

Tab 2 Lung function indicators before and after the treatment with different *STIPI* genotypes

基因型	FVC/L		<i>P</i> 值	FEV1/FVC/%		<i>P</i> 值	PEF/(L·S ⁻¹)		<i>P</i> 值
	治疗前	治疗后		治疗前	治疗后		治疗前	治疗后	
TT	2.96±1.03	3.15±0.98 ^a	0.001	68.70±14.71	70.33±14.10	0.168	5.25±2.27	5.68±2.15 ^a	< 0.001
TG	3.12±0.96	3.24±0.94 ^a	0.002	71.96±11.85	75.30±10.34 ^{ab}	< 0.001	5.62±1.90	6.15±1.86 ^a	< 0.001
GG	3.43±1.17	3.48±1.26	0.701	66.66±14.79	69.36±14.10 ^c	0.056	5.99±2.33	6.42±2.38	0.085
<i>F</i> 值	1.840	0.889		1.895	3.698		1.151	1.256	
<i>P</i> 值	0.162	0.413		0.154	0.027		0.319	0.288	

基因型	FEV1/L		<i>P</i> 值	FEV1/Pred/%		<i>P</i> 值
	治疗前	治疗后		治疗前	治疗后	
TT	2.05±0.85	2.22±0.82 ^a	< 0.001	81.04±25.72	87.22±22.62 ^a	< 0.001
TG	2.25±0.80	2.44±0.78 ^a	< 0.001	87.79±20.14	92.45±18.11 ^a	0.003
GG	2.39±0.90	2.42±0.90	0.581	86.08±26.56	86.63±26.71	0.903
<i>F</i> 值	1.670	1.309		1.439	1.321	
<i>P</i> 值	0.192	0.273		0.240	0.270	

注：与同基因型治疗前比较，^a*P* < 0.05；与 TT 型相比，^b*P* < 0.05；与 TG 型相比，^c*P* < 0.05。

Note: Compared with the same genotype before the treatment, ^a*P* < 0.05; compared with the TT-type, ^b*P* < 0.05; compared with the TG-type, ^c*P* < 0.05.

表 3 *STIPI* 不同基因型肺功能指标改变量比较

Tab 3 Change in lung function indicators with different *STIPI* genotypes

基因型	ΔFEV1/L	ΔFEV1/Pred/%	ΔFVC/L	ΔFEV1/FVC/%	ΔPEF/(L·S ⁻¹)
TT	0.16±0.28	6.17±12.78	0.19±0.42	1.62±8.95	0.42±0.86
TG	0.19±0.29	4.66±13.53	0.11±0.32	3.20±5.87	0.53±1.11
GG	-0.01±0.17 ^{ab}	0.54±22.15	0.04±0.56	3.50±7.31	0.43±1.20
<i>F</i> 值	5.105	1.256	1.240	0.968	0.221
<i>P</i> 值	0.007	0.288	0.292	0.382	0.802

注：与 TT 型比较，^a*P* < 0.05；与 TG 型比较，^b*P* < 0.05。

Note: Compared with the TT-type, ^a*P* < 0.05; compared with the TG-type, ^b*P* < 0.05.

表 4 不同疗效患者 *STIPI* 基因型频率比较 [n(%)]

Tab 4 *STIPI* genotype frequencies of patients with different treatment outcomes [n(%)]

组别	例数	基因型		
		TT	TG	GG
疗效不良组	53	17 (32.1)	21 (39.6)	15 (28.3)
疗效良好组	110	42 (38.2)	58 (52.7)	10 (9.1)
χ ²		10.242		
<i>P</i>		0.006		

表 5 ICS 疗效的 Logistic 回归分析

Tab 5 Logistic regression analysis of ICS efficacy

因素	β	Wald	<i>P</i> 值	OR	95%CI
TG 型	0.055	0.020	0.888	1.056	0.493 ~ 2.262
GG 型	-1.438	7.612	0.006	0.237	0.086 ~ 0.659
常量	0.712	1.519	0.218	2.039	

注：以 TT 基因型为参照。

Note: TT genotype as a reference.

rs1011219、rs2236647 和 rs6591838 位点的基因多态性与 ICS 反应有关，提示 *STIPI* 基因多态性可能是调节哮喘患者 ICS 反应的关键因素。此外，有研究报道在中国儿童、突尼斯人以及阿拉伯人群中发现 *STIPI* 基因 rs2236647 位点基因多态性与哮喘发生风险相关^[7, 9, 15]。rs4980524 位于 *STIPI* 基因的第一

个内含子中，被认为是在转录和蛋白质水平上调节 *STIPI* 表达的增强子^[16]。全基因组关联研究中发现 rs4980524 基因多态性与 ICS 治疗后肺功能改善相关，突变型患者肺功能改善显著高于野生型^[9]。上述研究结果表明 *STIPI* 基因多态性与哮喘的发生和 ICS 疗效有关，但 *STIPI* 基因 rs4980524 位点与 ICS 疗效的关系在中国人群中未见报道。因此，本研究借助 KASP 法，通过比较三种不同基因型患者经 ICS 治疗后肺功能指标及临床疗效，发现该位点的基因多态性与中国成年哮喘患者对 ICS 反应有关。

肺功能指标能够反映哮喘患者的气道阻塞程度和疾病严重程度，是用于判断哮喘发病及预后的客观指标^[17]。本研究比较了哮喘患者经 ICS 治疗前后肺功能指标 FEV1、FEV1/Pred%、FVC、FEV1/FVC、PEF 及各指标的改变量，经 ICS 治疗 12 周后，TT 型、TG 型患者肺功能指标较治疗前明显升高，GG 型肺功能各项指标较治疗前无明显改变。此外，三种基因型 ΔFEV1 存在差异，GG 型 ΔFEV1 低于 TT 型和 TG 型。Hawkins 等^[8]发现 *STIPI* 基因 rs4980524 位点 GG 型 ICS 治疗后 ΔFEV1 显著高于 TT 型，与本研究结果不一致，产生这种差异的原因可能与纳

入人群的种族、样本量、患病程度以及 ICS 治疗时间有关。提示 rs4980524 基因型与 ICS 治疗后患者肺功能变化存在相关性, TT 型与 TG 型患者的肺功能改善情况高于 GG 型。哮喘控制水平在一定程度上能够反映药物的治疗反应^[18-19]。为进一步评估 *STIP1* 基因 rs4980524 位点多态性对 ICS 疗效的影响, 本研究根据患者控制水平将患者分为疗效良好组和疗效不良组, 比较不同基因型在 ICS 疗效良好组和疗效不良组基因型分布频率, 结果显示 rs4980524 位点 GG 型在疗效不良组的比例高于疗效良好组。此外, 在 rs4980524 位点基因型与 ICS 疗效的 Logistic 回归分析中显示 GG 型是影响 ICS 疗效的危险因素, 提示 rs4980524 位点基因型与 ICS 疗效存在相关性, 但产生这种差异的潜在机制目前还不清楚, 基于 *STIP1* 基因的功能及其编码蛋白在糖皮质激素复合物中发挥的作用, 推测 rs4980524 位点突变可能影响 GC 与 GR 的结合过程, 从而导致 ICS 疗效差异。

本研究仍存在一定的局限性, 首先, 该研究患者的治疗药物布地奈德福莫特罗是 ICS 与长效 β 受体激动剂 (long acting inhale bete2 agonist, LABA) 的复合制剂, 两种药物共同作用降低气道炎症水平、舒张气管平滑肌, 从而提高肺功能、缓解临床症状^[20]。而 LABA 在哮喘患者中可能存在疗效差异^[21], 但这种差异是否对研究结果产生影响暂且未知。其次, 本研究的样本量较少, 并且未考虑哮喘其他基因-基因相互作用和非遗传因素对 ICS 反应产生的影响, 可能导致结论存在一定的偏倚。因此在今后的研究中应继续扩大样本量, 同时更加全面地探讨 ICS 疗效产生差异的原因, 为哮喘临床用药提供新思路和方法。

综上, 本研究结果显示 *STIP1* 基因 rs4980524 位点基因多态性与 ICS 疗效有关, GG 型患者经 ICS 治疗后临床症状和肺功能改善比 TT 型和 TG 型基因型差。提示 GG 型患者对 ICS 不敏感, 可能需要加大用药剂量或调整用药。

参考文献

- [1] Jonakowski M, Ziolo J, Koćwin M, et al. Role of *IL-15* in the modulation of *TGF- β 1*-mediated inflammation in asthma [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14 (5): 4533-4540.
- [2] Barnes PJ. Efficacy of inhaled corticosteroids in asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1998, 102 (4 Pt 1): 531-538.
- [3] Drazen JM, Silverman EK, Lee TH. Heterogeneity of therapeutic responses in asthma [J]. *Br Med Bull*, 2000, 56 (4): 1054-1070.
- [4] Szeffler SJ, Martin RJ, King TS, et al. Significant variability in response to inhaled corticosteroids for persistent asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2002, 109 (3): 410-418.
- [5] Maio S, Baldacci S, Bresciani M, et al. RItA: the Italian severe/uncontrolled asthma registry [J]. *Allergy*, 201, 73 (3): 683-695.
- [6] Keskin O, Farzan N, Birben E, et al. Genetic associations of the response to inhaled corticosteroids in asthma: a systematic review [J]. *Clin Transl Allergy*, 2019, 9: 2.
- [7] Huang J, Hu X, Zheng X, et al. Effects of *STIP1* and *GLCCII* polymorphisms on the risk of childhood asthma and inhaled corticosteroid response in Chinese asthmatic children [J]. *BMC Pulm Med*, 2020, 20 (1): 303.
- [8] Hawkins GA, Lazarus R, Smith RS, et al. The glucocorticoid receptor heterocomplex gene *STIP1* is associated with improved lung function in asthmatic subjects treated with inhaled corticosteroids [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 123 (6): 1376-1383.
- [9] Salhi M, Lahmar O, Salah MO, et al. *GLCCII* and *STIP1* variants are associated with asthma susceptibility and inhaled corticosteroid response in a Tunisian population [J]. *J Asthma*, 2021, 58 (2): 197-206.
- [10] Izuahara Y, Matsumoto H, Kanemitsu Y, et al. *GLCCII* variant accelerates pulmonary function decline in patients with asthma receiving inhaled corticosteroids [J]. *Allergy*, 2014, 69 (5): 668-673.
- [11] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南 (2020 年版) [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2020, 43 (12): 1023-1048.
- [12] Li J, Qiu C. Recent advances in pharmacogenomics research of anti-asthmatic drugs: a narrative review [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10 (6): 369.
- [13] 郝珉, 路零, 李媛媛. *GLCCII* 和 *CRHRI* 基因单核苷酸多态性对支气管哮喘患儿吸入糖皮质激素后肺功能的影响 [J]. *当代医学*, 2020, 26 (35): 120-122.
- [14] Meyers DA, Bleecker ER, Holloway JW, et al. Asthma genetics and personalised medicine [J]. *Lancet Respir Med*, 2014, 2 (5): 405-415.
- [15] Almomani BA, Al-Eitan LN, Samrah SM, et al. Candidate gene analysis of asthma in a population of Arab descent: a case-control study in Jordan [J]. *Per Med*, 2017, 14 (1): 51-61.
- [16] Tsai CL, Lee YS, Chao A, et al. Associations between a single nucleotide polymorphism of stress-induced phosphoprotein 1 and endometriosis/adenomyosis [J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2018, 57 (2): 270-275.
- [17] Dostaler SM, Olajos-Clow JG, Sands TW, et al. Comparison of asthma control criteria: importance of spirometry [J]. *J Asthma*, 2011, 48 (10): 1069-1075.
- [18] Almomani BA, Al-Eitan LN, Al-Sawalha NA, et al. Association of genetic variants with level of asthma control in the Arab population [J]. *J Asthma Allergy*, 2019, 12: 35-42.
- [20] 韩淑丽. 福莫特罗联合布地奈德治疗支气管哮喘的疗效观察 [J]. *中国冶金工业医学杂志*, 2022, 39 (1): 66.
- [21] 玛迪娜, 白玲. 哮喘患儿 β 2-AR 基因多态性与其肺功能改善效果的关系研究 [J]. *现代医药卫生*, 2021, 37 (3): 361-364.

(收稿日期: 2022-08-27; 修回日期: 2022-09-13)

基于蒙特卡洛模拟探讨两性霉素 B 在真菌感染患者中的给药方案

马欢, 马攀, 陈勇川* (陆军军医大学第一附属医院药学部, 重庆 400038)

摘要: **目的** 应用蒙特卡洛模拟探讨两性霉素 B 在真菌感染患者中的给药方案, 以最大限度地提高其疗效, 降低毒性, 促进临床用药。 **方法** 结合成人患者的药动学参数和 9 种真菌的最低抑菌浓度 (MIC) 分布, 以 $C_{\max}/MIC$ 为 PK/PD 模型应用 Oracle Crystal Ball (v11.1) 软件进行蒙特卡洛模拟, 得到两性霉素 B 1.0 mg/(kg·d) 和 0.6 mg/(kg·d) 两种剂量给药方案对念珠菌属、曲霉菌属、新型隐球菌感染的达标概率 (PTA) 及累积反应分数 (CFR)。 **结果** 当 $MIC \leq 0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 两种治疗方案的 PTA 均 $> 90\%$; 当 $MIC \geq 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 两种治疗方案的 PTA 均 $< 90\%$ 。1.0 mg/(kg·d) 的两性霉素 B 仅对白假丝酵母菌、新型隐球菌的 CFR $> 90\%$, 对其余菌株的 CFR 均 $< 90\%$; 0.6 mg/(kg·d) 的两性霉素 B 对所有菌种 CFR 均未达到 90%, 对新型隐球菌、白假丝酵母菌 CFR 较高, 分别为 84.12%、80.55%, 对黄曲霉菌的 CFR 较低, 为 3.05%; 两种剂量用药方案对不同菌种的 CFR 相差较大, 对念珠菌属、新型隐球菌的抗菌活性明显优于曲霉菌属。 **结论** 两性霉素 B 用药方案的选择在平衡疗效与毒性的同时, 需充分结合当地病原菌 MIC 分布情况及两性霉素 B 对不同菌种的活性差异。

关键词: 两性霉素 B; 毒性; 真菌感染; 蒙特卡洛模拟; 药动学/药效学

中图分类号: R969.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2936-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.039

Amphotericin B dosage regimen for patients with fungal infection by Monte Carlo simulation

MA Huan, MA Pan, CHEN Yong-chuan* (Department of Pharmacy, The First Hospital Affiliated to Army Medical University, Chongqing 400038)

Abstract: Objective To discuss into the administration regimen of amphotericin B in patients with fungal infection based on Monte Carlo simulation, to maximize its efficacy, reduce the toxicity and promote individualized administration. **Methods** Based on the pharmacokinetic parameters of adult patients and the minimal inhibitory concentration (MIC) distribution of 9 fungi, Monte Carlo simulation was conducted with Oracle Crystal Ball (v11.1) with $C_{\max}/MIC$ as the PK/PD model. The probability of target attainment (PTA) and cumulative fraction of response (CFR) of 1.0 mg/(kg·d) and 0.6 mg/(kg·d) against *Candida*, *Aspergillus* and *Cryptococcus neoformans* infection were obtained. **Results** When the $MIC \leq 0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the PTA of both regimens was $> 90\%$. When the $MIC \geq 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the PTA of both regimens was $< 90\%$. The CFR of amphotericin B at 1.0 mg/(kg·d) against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* was greater than 90%, and against other strains was less than 90%. The CFR of amphotericin B at 0.6 mg/(kg·d) for all strains did not reach 90%, and the CFR *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* was higher (84.12% and 80.55%), the CFR against *Aspergillus flavus* was the lowest at 3.05%. The CFR of amphotericin B at the same dose varied greatly for different strains, and the antibacterial activity against *Candida* and *Cryptococcus neoformans* was much better than *Aspergillus*. **Conclusion** In the selection of amphotericin B regimen, MIC distribution

资助项目: 重庆市临床药学重点专科建设项目。

作者简介: 马欢, 女, 硕士研究生, 主管药师, 主要从事临床药学研究, email: makunta@163.com *通信作者: 陈勇川, 男, 硕士研究生导师, 副主任药师, 主要从事临床药理、体内药物分析, email: zwmcyc@163.com

of local pathogenic bacteria and the activity differences of amphotericin B against different strains should be fully considered while balancing the efficacy and the toxicity.

Key words: amphotericin B; toxicity; fungal infection; Monte Carlo simulation; PK/PD

由于广谱抗菌药物和免疫抑制剂的广泛使用,侵袭性真菌感染(invasive fungal infections, IFIs)的发病率及病死率在世界范围内持续增加^[1]。根据 2018 年我国真菌病学流行数据^[2],在过去的 20 年中,我国念珠菌血症的发病率呈翻倍趋势,曲霉菌病的发病率有所增加且出现了唑类耐药的烟曲霉,IFIs 已经成为危及生命的公共卫生问题。两性霉素 B(amphotericin B, AMB)为多烯类抗真菌药物,应用于临床已超过 60 年^[3],至今为止仍然是治疗真菌疾病的重要选择^[4]。参考目前指南^[5-6],AMB 是中枢神经系统真菌感染、念珠菌心内膜炎和尿路感染的首选药物。

AMB 的使用会导致剂量依赖的输液反应和肾毒性^[7],促进了两性霉素 B 脂质体等新制剂的研发应用。多数情况下,脂质体制剂仅能在降低毒性方面发挥优势,在微生物学疗效方面可能与 AMB 相当^[8-9]。更有研究显示,在相同剂量下 AMB 的抗菌活性是脂质体制剂的 4~8 倍^[10]。虽棘白菌素类、唑类等新药的上市为真菌感染的治疗提供了新药物,但这些新药成本高,给患者造成极大的经济负担。基于药物经济学考虑,AMB 仍然是发展中国家抗真菌治疗的基础药物。

AMB 为浓度依赖型抗真菌药物,显示出相关的抗真菌后效应(post antifungal effect, PAFE),其峰浓度(maximum plasma concentration, C_{max})与真菌的最低抑菌浓度(minimal inhibition concentration, MIC)之比(C_{max}/MIC)是药动学(pharmacokinetics, PK)/药效学(pharmacodynamics, PD)的最佳预测参数^[11]。蒙特卡洛模拟(Monte Carlo simulation, MCS)是基于“随机数”的计算法,既考虑了体内药物处置过程的差异,又考虑到不同菌株敏感性的差异,广泛应用于抗菌药物 PK/PD 领域^[12]。本研究结合 PK/PD 理论,应用 MCS 算法,比较了 AMB 基于指南推荐^[13]及临床实践中常用的两种剂量方案对真菌感染的达标概率(probability of target attainment, PTA)和累积反应分数(cumulative fraction of response, CFR),以确定可以最大程度提高抗真菌疗效的同时降低毒性风险的给药策略。

1 材料与方法

1.1 给药方案

根据目前指南^[13],AMB 的推荐剂量范围多为 0.6~1.0 mg/(kg·d),故本研究分别纳入了药品说明书中的较高剂量 1.0 mg/(kg·d)及一般治疗量 0.6 mg/(kg·d)以评估其临床疗效。

1.2 PK/PD 参数

目前文献报道 AMB 在人体内的药动学研究较少,结合 AMB 的给药方案,AMB 在较高剂量 1.0 mg/(kg·d)及一般治疗量 0.6 mg/(kg·d)下的 PK 参数分别来源于确诊或疑似真菌感染伴中性粒细胞减少患者的临床研究^[14]、健康人类志愿者的 IV 期临床研究^[15](见表 1)。AMB 对临床常见 5 种念珠菌、3 种曲霉菌及新型隐球菌的 MIC 分布情况来源于欧洲药敏试验委员会(European committee on antimicrobial susceptibility testing, EUCAST)数据库(www.eucast.org),MIC 分布频率见表 2。

表 1 两性霉素 B 不同给药剂量的 PK 参数

Tab 1 PK parameter of different doses of amphotericin B

给药剂量 / [mg/(kg·d)]	$C_{max}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$AUC_{0\sim 24}/(\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1})$
0.6	1.43±0.20	13.9±2.0
1.0	2.83±1.17	28.98±15.46

1.3 MCS

根据 AMB 的药动学特征^[16], $C_{max}/MIC \geq 4 \sim 10$ 时疗效最佳,故以 $C_{max}/MIC \geq 4$ 作为考察 9 种真菌活性的靶标靶值。当 MIC 为某一特定值时,可获得靶指数的 PTA;当 MIC 为菌株群体的分布值时,可计算 PK/PD 指数对于目标的 CFR。本研究应用 Oracle Crystal Ball(v11.1)软件对 AMB 的两种剂量给药方案进行 MCS。设定 10 000 次模拟 AMB 在不同剂量给药方案下的 C_{max}/MIC 估值。在模拟过程中,假定 PK 参数 C_{max} 遵循正态分布,PD 参数 MIC 遵循自定义离散分布。根据 MIC 模拟计算出 PTA,采用菌株 MIC 分布值获得目标菌株的 CFR。PTA 或 CFR $\geq 90\%$,提示为最优选择。

2 结果

2.1 PTA 值

当真菌的 $MIC \leq 0.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,两种治

表 2 两性霉素 B 对不同真菌 MIC 的分布 (%)
Tab 2 MIC distribution of amphotericin B to different fungi (%)

菌株	MIC/ (μg · mL ⁻¹)												
	0.008	0.016	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
白假丝酵母菌	0.07	0.15	0.97	4.40	38.60	37.70	16.62	1.42	0.07	/	/	/	/
光滑念珠菌	/	/	0.99	1.43	23.70	45.98	25.36	2.43	0.11	/	/	/	/
热带念珠菌	/	/	/	1.56	12.06	52.14	31.52	2.72	/	/	/	/	/
近平滑念珠菌	/	/	1.59	2.55	8.28	36.94	44.90	5.41	/	/	/	/	0.32
克柔念珠菌	/	/	/	/	2.29	13.36	63.74	20.23	0.38	/	/	/	/
烟曲霉	/	0.04	0.04	0.45	15.72	24.28	49.80	9.13	0.49	0.04	/	/	/
黄曲霉	/	/	/	/	/	2.90	20.29	40.10	28.50	7.25	0.48	0.48	/
黑曲霉	/	/	/	1.65	3.31	6.61	30.58	31.40	16.53	3.31	2.48	4.13	/
新型隐球菌	/	0.10	1.17	8.02	36.30	39.73	12.04	2.45	0.20	/	/	/	/

注：“/”表明该 MIC 值的菌株比例为 0。
Note: “/” indicates that the proportion of strains with MIC value is 0.

疗方案的 PTA > 90%; 当 MIC ≥ 0.5 μg · mL⁻¹ 时, 两种剂量给药方案的 PTA 均未达标, AMB 在较高剂量 [1.0 mg/ (kg · d)] 下的 PTA 为 76.44%, 在一般治疗量 [0.6 mg/ (kg · d)] 下的 PTA 仅为 0.18%。AMB 的两种剂量给药方案对不同 MIC 在目标靶值下的 PTA 值见图 1。

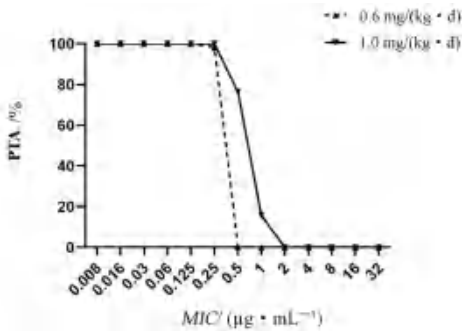


图 1 两性霉素 B 两种剂量给药方案对 9 种真菌的 PTA 值
Fig 1 PTA of 2 amphotericin B dosage against 9 fungi

表 3 两性霉素 B 两种给药方案对不同真菌的 CFR (%)
Tab 3 CFR of two dosage of amphotericin B against different fungi (%)

剂量/[mg/ (kg · d)]	CFR								
	白假丝酵母菌	光滑念珠菌	热带念珠菌	近平滑念珠菌	克柔念珠菌	烟曲霉	黄曲霉	黑曲霉菌	新型隐球菌
0.6	80.55	71.31	65.54	48.94	14.80	40.10	3.05	11.72	84.12
1.0	91.45	88.76	87.28	81.98	66.89	78.31	24.63	38.94	91.46

效的最佳指标 PTA 及 CFR, 可从 PK/PD 方面优化用药方案, 为临床提供借鉴参考。

本研究显示当 MIC ≤ 0.25 μg · mL⁻¹, 0.6 mg/ (kg · d) 的 AMB 可满足 PTA > 90%; 1 mg/ (kg · d) AMB 的 PTA 达 100%。因 0.6 mg/ (kg · d) 的 AMB 与 30% 的肾毒性相关, 而 1 mg/ (kg · d) 的 AMB 与大于 50% 的肾毒性显著相关^[20-21], 故 MIC ≤ 0.25 μg · mL⁻¹ 时, 0.6 mg/ (kg · d) 与 1 mg/ (kg · d) 的疗效相当但出现毒性的风险更低, 因此可选择一般治疗量 [0.6 mg/ (kg · d)]。当

2.2 CFR 值

1.0 mg/ (kg · d) 的 AMB 对白假丝酵母菌的 CFR > 90%, 对光滑念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌、克柔念珠菌的 CFR 值由高到低分别为 88.76%、87.28%、81.98%、66.89%; 0.6 mg/ (kg · d) 的 AMB 仅对白假丝酵母菌的 CFR > 80%, 对其余念珠菌 CFR 均 < 80%。AMB 两种给药方案对曲霉菌属的 CFR 均 < 80%, 且对不同曲霉菌差异较大, 对烟曲霉活性最高, 但 CFR 仅为 78.31%、40.10%; 对于新型隐球菌 CFR 整体较高 (见表 3)。

3 讨论

AMB 是已知抗真菌药物中作用范围最广、耐药率及耐药风险最低的药物^[17]。因 AMB 治疗窗相对狭窄, 不少学者建议以连续输注或改变制剂工艺来提高耐受性和降低病死率^[18-19]。通过 MCS 建立 AMB 的 PK/PD 模型, 预测出评价其临床疗

MIC = 0.5 μg · mL⁻¹ 时, AMB 在较高剂量下的 PTA 仅为 76.44%, 增加剂量可提高疗效。但因考虑毒性发生的风险, 建议有必要行治疗药物监测 (therapeutic drug monitoring, TDM) 以达到 PK/PD 目标。

AMB 对各种真菌的敏感性不一, 对白假丝酵母菌、烟曲霉及新型隐球菌较敏感。结合念珠菌属的 MIC 分布, AMB 对白假丝酵母菌、光滑念珠菌、热带念珠菌的敏感性较高, 大部分菌株分布在 MIC ≤ 0.25 μg · mL⁻¹; 其次对近平

滑念珠菌较敏感,但有少部分菌株 MIC 值达 $32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,此时需结合病原学结果谨慎用药。AMB 对克柔念珠菌的敏感性欠佳,大于 80% 的菌株分布在 $MIC \geq 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,建议可选用更优方案。较高剂量的 AMB 对白假丝酵母菌的 $\text{CFR} > 90\%$,对光滑念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌的 CFR 值为 88.76%、87.28%、81.98%,临床上大多数侵袭性真菌感染病例 (87.5%) 为侵袭性念珠菌病^[22],白假丝酵母菌最常见,其次是光滑念珠菌或近平滑念珠菌^[23],且国外多中心的流行病学数据显示出所有临床念珠菌分离株对 AMB 的易感性^[24]。故较高剂量的 AMB 达到的峰浓度可能足以满足临床常见念珠菌的需求。

AMB 对 3 种曲霉菌的 CFR 均未达标。较高剂量下 AMB 对烟曲霉的 CFR 接近 80%,但对黄曲霉、黑曲霉的 CFR 仅为 24.63%、38.94%。一方面,因曲霉菌属独特的生物学特性^[25],可能需要更高的药物浓度才能获得足够的杀真菌活性,故 ABX 指南推荐 AMB 用于治疗侵袭性曲霉菌病的剂量可增加至 $1.5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ^[13];另一方面,根据 AMB 的 MIC 分布,AMB 对曲霉菌属的耐药性较高,约 90% 的烟曲霉 MIC 均 $\leq 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,但超过 90% 的黄曲霉及将近 90% 的黑曲霉的 MIC 均 $\geq 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,且这两类菌株在 $MIC \geq 4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时仍存在一定比例的分布。AMB 对烟曲霉的快速抑制作用和增加的杀菌效率、对黄曲霉的较慢抑制作用和降低的杀菌效率导致 AMB 对烟曲霉的抗菌活性最高^[26],本研究结果与其一致。与之类似,伏立康唑的体外 PK/PD 模型对 3 种具有相同 MIC 的曲霉具有不同的抗真菌活性^[27]。烟曲霉为曲霉菌属中最常见病原体,约占病例数的 59.3%,其次是黄曲霉、土曲霉和黑曲霉^[28],AMB 仍可作为治疗疑似或确诊侵袭性曲霉病的重要药物。文献报道 AMB 的杀菌作用通常是在真菌暴露于恒定药物浓度后确定的^[29],当药物在体内经历代谢、分布和排泄时,真菌会暴露于非恒定浓度的 AMB,这将导致抗菌活性的变化而引起疗效的差异。

美国传染病学会推荐 AMB 治疗隐球菌性脑膜炎的最佳剂量为 $0.7 \sim 1.0 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ^[30],一般治疗量的 AMB 对新型隐球菌 CFR 可达 84.12%,较高剂量的 AMB 对新型隐球菌 $\text{CFR} > 90\%$ 。本研究证实了指南推荐剂量的科学性。国外一项荟萃分析显示,AMB 对隐球菌脑膜炎最大抗真菌作用是在大约 $0.7 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 或稍高的剂量下实现的,

超过该剂量在疗效获益的同时毒性风险增加^[31]。AMB 具有高相对分子量 (924) 和复杂的结合特性,广泛分布于组织中,难以透过血脑屏障,而氟胞嘧啶容易渗透到中枢神经系统,两药通常联合用于隐球菌脑膜炎。且两种药物对抗真菌作用不同,AMB 与真菌细胞膜麦角甾醇相结合,导致细胞膜通透性增加并致细胞死亡,氟胞嘧啶影响真菌核酸和蛋白质的合成,通过攻击真菌细胞的不同靶点,协同效应使抗真菌作用最大化,同时减少剂量以降低毒性。

本研究亦存在局限性:首先,因 AMB 在人体内缺乏研究数据,目前的 PK 数据来源于国外研究,故其预测结果可能未完全真实地反映 AMB 在我国人群中的疗效;其次,因各种真菌的生物学特性的差异,AMB 对不同菌种 C_{max}/MIC 的目标靶值不尽相同,仍需进一步明确具体菌种的 PK/PD 靶值;最后,潜在疾病、免疫状态等因素影响侵袭性真菌感染的治疗,本研究未充分考虑患者病理生理状态,其结果仅供临床参考。

本研究应用 MCS 初步讨论了两种方案下 AMB 对真菌感染患者的疗效,其研究结果在结合当地病原菌 MIC 分布的情况下,一定程度上可指导临床真菌感染经验治疗。为了进一步探索 AMB 的临床疗效,未来的研究应侧重于 AMB 对不同分离菌株的活性及体外敏感折点,并考虑 AMB 在人体内的分布,以获得当前模型无法获得的临床相关药物暴露,优化临床给药。

参考文献

- [1] Enoch DA, Yang H, Aliyu SH, et al. The changing epidemiology of invasive fungal infections [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1508: 17-65.
- [2] Chen M, Xu Y, Hong N, et al. Epidemiology of fungal infections in China [J]. *Front Med*, 2018, 12 (1): 58-75.
- [3] Cavassin FB, Baú-Carneiro JL, Vilas-Boas RR, et al. Sixty years of amphotericin B: an overview of the main antifungal agent used to treat invasive fungal infections [J]. *Infect Dis Ther*, 2021, 10 (1): 115-147.
- [4] Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America [J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 63 (4): e1-e60.
- [5] Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, et al. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: non-neutropenic adult patients [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2012, 18 (Suppl 7): 19-37.
- [6] Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis:

- 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America [J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 62 (4): e1-50.
- [7] Spellberg B, Witt MD, Beck CK. Amphotericin B: is a lipid-formulation gold standard feasible [J]. *Clin Infect Dis*, 2004, 38 (2): 304-305.
- [8] Kleinberg M. What is the current and future status of conventional amphotericin B? [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2006, 27 (Suppl 1): 12-16.
- [9] Walsh TJ, Finberg RW, Arndt C, et al. Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. National institute of allergy and infectious diseases mycoses study group [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340 (10): 764-771.
- [10] Andes D, Safdar D, Marchillo K, et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic comparison of amphotericin B (AMB) and two lipid-associated AMB preparations, liposomal AMB and AMB lipid complex, in murine candidiasis models [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50 (2): 674-684.
- [11] 张菁, 吕媛, 于凯江, 等. 抗菌药物药代动力学/药效学理论临床应用专家共识 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2018, 41 (6): 409-446.
- [12] Papich MG. Pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modeling and the rational selection of dosage regimes for the prudent use of antimicrobial drugs [J]. *Vet Microbiol*, 2014, 171 (3-4): 480-486.
- [13] Bartlett JG, Auwaerter PG, Pham PA. ABX 指南-感染性疾病的诊断与治疗 [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2012: 433-434.
- [14] Bekersky I, Fielding RM, Dressler DE, et al. Pharmacokinetics, excretion, and mass balance of liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycholate in humans [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46 (3): 828-833.
- [15] Ayestarán A, López RM, Montoro JB, et al. Pharmacokinetics of conventional formulation versus fat emulsion formulation of amphotericin B in a group of patients with neutropenia [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40 (3): 609-612.
- [16] Lewis RE. Current concepts in antifungal pharmacology [J]. *Mayo Clin Proc*, 2011, 86 (8): 805-817.
- [17] Chang YL, Yu SJ, Heitman J, et al. New facets of antifungal therapy [J]. *Virulence*, 2017, 8 (2): 222-236.
- [18] Falci DR, Lunardi LW, Ramos CG, et al. Continuous infusion of amphotericin B deoxycholate in the treatment of cryptococcal meningoencephalitis: analysis of safety and fungicidal activity [J]. *Clin Infect Dis*, 2010, 50 (5): e26-29.
- [19] Stone NR, Bicanic T, Salim R, et al. Liposomal amphotericin B (AmBisome®): a review of the pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical experience and future directions [J]. *Drugs*, 2016, 76 (4): 485-500.
- [20] Bowden R, Chandrasekar P, White MH, et al. A double-blind, randomized, controlled trial of amphotericin B colloidal dispersion versus amphotericin B for treatment of invasive aspergillosis in immunocompromised patients [J]. *Clin Infect Dis*, 2002, 35 (4): 359-366.
- [21] Subira M, Martino R, Gomez L, et al. Low dose amphotericin b lipid complex vs. conventional amphotericin B for empirical antifungal therapy of neutropenic fever in patients with hematologic malignancies-a randomized, controlled trial [J]. *Eur J Haematol*, 2004, 72 (5): 342-347.
- [22] Vincent JL, Rello J, Marshall J, et al. EPIC II Group of Investigators. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units [J]. *JAMA*, 2009, 302 (201): 2323-2329.
- [23] 徐灵玲, 曾章锐, 丁银环. 川南地区侵袭性念珠菌感染流行病学及耐药性分析 [J]. *中国真菌学杂志*, 2021, 16 (5): 319-325.
- [24] Prigitano A, Cavanna C, Passera M, et al. CAND-LO 2014-15 study: changing epidemiology of candidemia in Lombardy (Italy) [J]. *Infection*, 2016, 44 (6): 765-780.
- [25] Elefanti A, Mouton JW, Verweij PE, et al. Susceptibility breakpoints for amphotericin B and *Aspergillus* species in an in vitro pharmacokinetic-pharmacodynamic model simulating free-drug concentrations in human serum [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58 (4): 2356-2362.
- [26] Al-Saigh R, Siopi M, Siafakas N, et al. Single-dose pharmacodynamics of amphotericin B against *Aspergillus* species in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57 (8): 3713-3718.
- [27] Meletiadis J, Al-Saigh R, Velegraki A, et al. Pharmacodynamic effects of simulated standard doses of antifungal drugs against *Aspergillus* species in a new in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56 (1): 403-410.
- [28] 高露娟, 余进, 李若瑜. 中国大陆地区曲霉病流行现状分析 [J]. *中国真菌学杂志*, 2010, 5 (4): 247-251.
- [29] Moore CB, Sayers N, Mosquera J, et al. Antifungal drug resistance in *Aspergillus* [J]. *J Infect*, 2000, 41 (3): 203-220.
- [30] Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america [J]. *Clin Infect Dis*, 2010, 50 (3): 291-322.
- [31] Stott KE, Beardsley J, Whalley S, et al. Population pharmacokinetic model and meta-analysis of outcomes of amphotericin B deoxycholate use in adults with cryptococcal meningitis [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62 (7): e02526-17.

(收稿日期: 2022-05-06; 修回日期: 2022-07-02)

艾司氯胺酮复合丙泊酚抑制人工流产术体动反应的有效剂量研究

李双凤¹, 黄婷婉¹, 陈帅¹, 吴多志², 李娜^{2*} (1. 海口市妇幼保健院, 海口市妇女儿童医院, 海口 570102; 2. 海南省人民医院, 海南医学院附属海南医院, 海口 570311)

摘要: **目的** 探讨艾司氯胺酮复合丙泊酚 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 抑制人工流产术体动反应的半数有效剂量 (ED_{50}) 和 95% 有效剂量 (ED_{95})。 **方法** 选择自愿接受无痛人流人工流产术的孕早期患者, 所有患者静脉注射艾司氯胺酮, 艾司氯胺酮初始剂量为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 注射 30 s 后, 给予丙泊酚 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。采用序贯法进行试验, 相邻患者艾司氯胺酮剂量公比为 0.9, 若患者出现体动反应 ≥ 2 级, 则下一例患者的剂量升高一个梯度, 反之则降低一个梯度, 出现 9 个交叉拐点则终止该研究。采用 Probit 概率法计算艾司氯胺酮的 ED_{50} 、 ED_{95} 及相应 95% 可信区间 (CI)。记录生命体征平均动脉压 (MAP)、心率 (HR) 和血氧饱和度 (SpO_2)、体动反应级别、手术时间、苏醒时间、苏醒后 10 min 的 VAS 疼痛评分; 记录低血压、呼吸抑制 ($\text{SpO}_2 < 90\%$)、恶心呕吐、苏醒期躁动、头晕和噩梦等不良反应。 **结果** 艾司氯胺酮复合丙泊酚 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时抑制患者人工流产术体动反应的 ED_{50} 为 $0.095 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (95%CI $0.088 \sim 0.101 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), ED_{95} 为 $0.11 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (95%CI $0.103 \sim 0.142 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 手术时间为 $(5.45 \pm 1.18) \text{ min}$, 苏醒时间为 $(6.39 \pm 1.25) \text{ min}$, 苏醒后 10 min 的 VAS 疼痛评分为 (1.58 ± 0.79) 分。所有患者未发生低血压、呼吸抑制、苏醒期躁动, 5 例出现头晕, 1 例出现呕吐, 1 例出现噩梦。 **结论** 艾司氯胺酮复合丙泊酚 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时抑制患者人工流产术中体动反应的 ED_{50} 及 ED_{95} 分别为 $0.095 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $0.11 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

关键词: 艾司氯胺酮; 丙泊酚; 人工流产; 半数有效剂量; 剂量效应关系; 序贯法

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2941-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.040

丙泊酚是临床无痛人流人工流产术中普遍使用的静脉麻醉药物, 在单独使用时不能获得良好的麻醉效果, 并显著抑制呼吸循环系统, 易诱发低血压、呼吸抑制等不良反应^[1]。因此, 丙泊酚需与镇痛药物合用来减少药物用量、提高麻醉效果和降低不良反应发生率。艾司氯胺酮是氯胺酮的右旋体结构, 其镇痛作用是氯胺酮的两倍^[2]。丙泊酚联合氯胺酮麻醉不仅可为患者提供有效的镇静和镇痛作用, 还可降低呼吸循环系统不良事件的发生率^[3-4]。因此, 本试验将探究在人工流产术中艾司氯胺酮复合丙泊酚 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 麻醉时抑制患者体动反应的半数有效剂量 (median effective dose, ED_{50}) 及 95% 有效剂量 (95% effective dose, ED_{95}), 为指导临床用药提供参考。

1 材料和方法

1.1 一般资料

选取 2021 年 12 月 ~ 2022 年 1 月我院自愿选择行无痛人流人工流产术的患者, 所有患者均获得书面知情同意。本试验经我院医学伦理委员会审核通过 (审查批号: 院伦理 [2021]03003)。患者纳入标准: ASA 分级 I ~ II, 18 ~ 45 岁, 拟行门诊人工流产术, 需全麻, 胎儿年龄 < 10 周, 初产妇或无经阴道分娩史, 手术时间在 10 min 内。排除标准: 严重心肺肝肾功能异常, 镇静或镇痛药物的长期使用史, 精神疾病史以及对艾司氯胺酮或丙泊酚有使用禁忌证。

1.2 麻醉方法

患者术前常规禁食禁饮, 入室后常规心电图监测, 鼻导管吸氧 $5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。手术开始前 3 min, 静脉给予艾司氯胺酮 (批号: 210827BL, 江苏恒瑞医药股份有限公司) $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 30 s 后, 给予丙泊酚 (批号: 10PK7760, 北京费森尤斯卡比制

基金项目: 海南省临床医学中心建设项目资助; 海南省自然科学基金委员会青年基金项目 (No.820QN393); 海南省卫生健康委员会科研项目 (No. 20A200083)。

作者简介: 李双凤, 女, 博士, 副主任医师, 主要从事围术期心肌保护和麻醉药物的有效剂量研究, email: lishuangfeng1984@126.com * **通信作者:** 李娜, 女, 博士, 主任医师, 主要从事围术期肺保护和麻醉药物的有效剂量研究, email: tangxin1981@foxmail.com

药有限公司) $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 待患者睫毛反射消失时开始手术, 密切关注生命体征、体动反应(体动反应分为 3 级: 1 级, 患者轻微不自主地肢体运动, 不影响操作, 无需追加丙泊酚; 2 级, 患者不自主地肢体运动, 影响操作, 需追加麻醉药物抑制; 3 级, 患者躁动, 完全不能配合, 需终止操作, 加深麻醉后继续操作), 术中若患者发生体动反应 ≥ 2 级, 影响手术操作, 则追加丙泊酚 $0.5 \sim 1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 一次静脉推注。采用序贯法进行试验, 艾司氯胺酮初始剂量为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 相邻患者艾司氯胺酮剂量公比为 0.9, 如患者出现阳性反应(体动反应 ≥ 2 级), 则下一例患者剂量升高一个梯度, 反之则降低一个梯度, 出现 9 个交叉拐点则终止该研究。所有人工流产术患者由经验高于 5 年的妇科医师完成, 麻醉操作由同一位麻醉医师进行。若术中出现低血压, 静脉注射麻黄碱 6 mg ; 若出现心动过缓, 静脉注射阿托品 0.5 mg ; 若出现呼吸抑制, 使用面罩正压或置入喉罩维持通气; 若出现恶心呕吐, 静脉注射盐酸托烷司琼 2 mg 。

1.3 观察指标

记录麻醉诱导前 (T_1)、睫毛发射消失时

(T_2)、扩张宫颈时 (T_3)、术毕时 (T_4)、苏醒时 (T_5) 的平均动脉压 (MAP)、心率 (HR) 和血氧饱和度 (SpO_2); 记录体动反应级别、手术时间、苏醒时间、苏醒后 10 min 的 VAS 疼痛评分; 记录低血压、呼吸抑制 ($\text{SpO}_2 < 90\%$)、恶心呕吐、苏醒期躁动、头晕和噩梦等不良反应。

1.4 统计分析

使用 IBM SPSS Statistics 23.0 进行数据处理, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差分析, 不同时间点数据比较采用重复测量方差分析。采用 Probit 概率法计算艾司氯胺酮 ED_{50} 和 ED_{95} , 以及相应的 95% 可信区间 (confidence interval, CI)。采用 Microsoft Excel 软件绘制序贯图和剂量-效应曲线图。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料 and 生命体征变化

本研究共纳入女性患者 33 例, ASA I 级 28 例, ASA II 级 5 例, 年龄 (29.41 ± 5.25) 岁, 体质指数 (BMI) (22.59 ± 3.11) $\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$ 。患者在 5 个时间点 $T_1 \sim T_5$ 的 MAP、HR 和 SpO_2 无显著性变化 (见表 1)。

表 1 患者在不同时间点的生命体征比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 33$)

指标	T_1	T_2	T_3	T_4	T_5
MAP/mmHg	89.85 ± 7.15	86.58 ± 10.15	90.06 ± 10.57	88.42 ± 8.72	88.39 ± 7.01
HR/(次 $\cdot \text{min}^{-1}$)	80.06 ± 10.23	82.18 ± 10.15	80.64 ± 8.82	79.45 ± 8.92	79.67 ± 9.31
$\text{SpO}_2/\%$	98.30 ± 5.64	99.12 ± 0.42	98.94 ± 0.61	98.94 ± 0.56	99.00 ± 0.43

2.2 艾司氯胺酮的 ED_{50} 和 ED_{95}

艾司氯胺酮的初始剂量采用 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 第 8 例患者出现阳性反应, 则以第 7 例患者使用的艾司氯胺酮剂量作为初始剂量纳入研究, 其剂量为 $0.105 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 纳入第 33 例时出现第 9 个转折点, 即终止试验。

16 例患者出现“阳性反应”, 17 例患者出现“阴性反应” (见图 1)。联合丙泊酚 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 行人工流产术麻醉时, 艾司氯胺酮的 ED_{50} 为 $0.095 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (95%CI $0.088 \sim 0.101 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), ED_{95} 为 $0.11 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (95%CI $0.103 \sim 0.142 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 艾司氯胺酮抑制人工流产术体动反应的剂量-效应曲线见图 2。

2.3 手术时间、苏醒时间、苏醒后疼痛评分和不良反应

33 例患者手术时间为 (5.52 ± 1.25) min, 苏醒时间为 (6.42 ± 1.28) min, 苏醒后 10 min 的 VAS 疼痛评分为 (1.58 ± 0.83) 分。所有患者未发生低血压、呼吸抑制和苏醒期躁动, 5 例出现头晕, 1 例出现呕吐, 1 例出现噩梦。

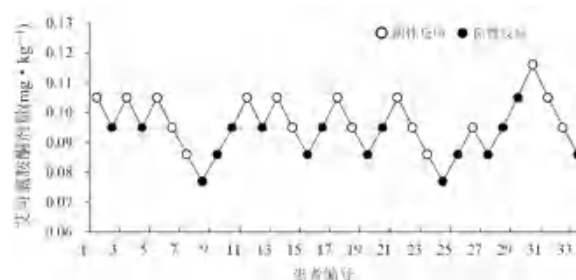


图 1 艾司氯胺酮复合丙泊酚抑制人工流产术体动反应的序贯图

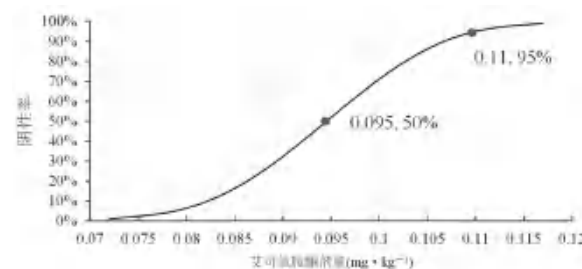


图 2 艾司氯胺酮复合丙泊酚抑制人工流产术体动反应的剂量-效应曲线图

3 讨论

人工流产术是妇科常见的日间短小手术, 无痛人流手术时要求安全、舒适和高效, 即应用的麻醉

药物诱导快,术中镇静镇痛充分,术毕苏醒迅速,不良反应少。临床上常规采用阿片类镇痛药物与镇静药物丙泊酚配伍,以提高麻醉效果。阿片类药物在有效镇痛的同时,也会带来不良反应,如呼吸循环抑制、恶心呕吐、皮肤瘙痒、痛觉过敏等^[5]。低剂量氯胺酮联合丙泊酚可很好地稳定心血管张力,减少使用血管活性药物,且不影响呼吸,比联合阿片类药物更加安全^[6]。在门诊和急诊接受镇静镇痛的患者中,氯胺酮联合丙泊酚可以减少呼吸的不良事件发生率,比单独使用丙泊酚更安全^[7-8]。

艾司氯胺酮是氯胺酮的右旋异构体,作用位点与氯胺酮相似,主要是 *N*-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体,但亲和力是氯胺酮的两倍,具有拟交感活性,呈现剂量相关性,小剂量就能发挥一定的镇静镇痛作用,静脉注射 30 s 起效,清除半衰期短,苏醒迅速,不抑制呼吸且轻度兴奋循环^[2]。艾司氯胺酮与丙泊酚联合使用,可减少丙泊酚的用量,患者血流动力学平稳且呼吸抑制发生率低,可产生更好的麻醉效果^[9-12]。张忠其等^[9]将艾司氯胺酮 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 联合丙泊酚应用于胃镜检查,苏醒质量高,且无明显不良反应。万幸等^[10]将艾司氯胺酮 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 联合丙泊酚应用于胃镜检查,可以维持稳定的血流动力学、减少丙泊酚的用量、降低不良反应的发生率,并提供有效的镇静镇痛麻醉作用。

目前,艾司氯胺酮作为一种新型的镇静镇痛麻醉药物,在无痛人流手术中的临床研究非常有限。因此,本试验采用小剂量艾司氯胺酮联合丙泊酚 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 行无痛人流手术,艾司氯胺酮的初始剂量为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,采用序贯法^[13]和 Probit 概率法,测定艾司氯胺酮的 ED_{50} 为 $0.095 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($95\%CI 0.088 \sim 0.101 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), ED_{95} 为 $0.11 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($95\%CI 0.103 \sim 0.142 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),无明显不良反应,在临床上可参考应用。高长胜等^[14]采用静脉注射艾司氯胺酮 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 联合丙泊酚用于无痛人流手术,术中麻醉效果优于舒芬太尼联合丙泊酚,并且有助于减轻患者术后短期内的抑郁情绪,提高患者术后恢复质量。

本研究中,33 例患者均未发生低血压和呼吸抑制,这与艾司氯胺酮的拟交感活性相关,拮抗了丙泊酚的呼吸循环抑制作用^[12, 15-16]。艾司氯胺酮联合丙泊酚并不增加恶心呕吐等不良反应的发生率,术后头晕患者较多,程度较轻,于术后 2 h 左右可自行缓解。头晕原因可能是艾司氯胺酮

激活了丘脑和边缘系统,呈现剂量依赖性,可用茶苯海明缓解^[17]。有 1 例患者术中出现噩梦,可能由于艾司氯胺酮兴奋边缘系统,诱发噩梦、幻觉等精神症状^[18],其具体机制还需要进一步研究,虽然发生率低,但在临床上仍需引起重视。

本研究仅限于初产妇或无阴道分娩史,扩展宫颈时的刺激强度大于有阴道分娩史的患者,因此,有阴道分娩史的患者行人工流产术时,可能需要艾司氯胺酮的剂量更小,更小剂量的艾司氯胺酮可进一步降低不良反应的发生率,具体有效剂量尚待进一步研究。

因此,在无痛人流手术中,联合丙泊酚 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,艾司氯胺酮抑制体动反应的 ED_{50} 、 ED_{95} 分别为 $0.095 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $0.11 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,无明显不良反应,值得临床推广应用。

参考文献

- [1] Jorge DOR. Metabolic profiles of propofol and fospropofol: clinical and forensic interpretative aspects [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 6852857.
- [2] 刘丝濛, 岳云. 右氯胺酮的药理学特点和临床应用 [J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2016, 37 (1): 62-66, 71.
- [3] Nazemroaya B, Maedi MA, Shetabi H, et al. Comparison of propofol and ketamine combination (ketofol) and propofol and fentanyl combination (fenofol) on quality of sedation and analgesia in the lumpectomy: a randomized-clinical trial [J]. Adv Biomed Res, 2018, 7: 134.
- [4] Shah A, Mosdosy G, McLeod S, et al. A blinded, randomized controlled trial to evaluate ketamine/propofol versus ketamine alone for procedural sedation in children [J]. Ann Emerg Med, 2011, 57 (5): 425-433.
- [5] 夏明, 徐建国. 去阿片化麻醉与镇痛的研究进展 [J]. 临床麻醉学杂志, 2020, 36 (9): 920-922.
- [6] Herzer G, Mirth C, Illievich UM, et al. Analgosedation of adult patients with elevated intracranial pressure: survey of current clinical practice in Austria [J]. Wien Klin Wochenschr, 2018, 130 (1-2): 45-53.
- [7] Yan JW, McLeod SL, Iansavitchene A. Ketamine-propofol versus propofol alone for procedural sedation in the emergency department: a systematic review and meta-analysis [J]. Acad Emerg Med, 2015, 22 (9): 1003-1013.
- [8] 钱夏丽, 夏凡, 沈晓凤, 等. 艾司氯胺酮复合丙泊酚在宫腔镜检查术中的应用 [J]. 临床麻醉学杂志, 2021, 37 (7): 706-708.
- [9] 张忠其, 许亚菲, 张艳静, 等. 丙泊酚复合小剂量艾司氯胺酮抑制胃镜置入反应的有效剂量 [J]. 临床麻醉学杂志, 2021, 37 (9): 949-952.
- [10] 万幸, 杨青青, 樊迪, 等. 亚麻醉剂量艾司氯胺酮复合丙泊酚应用于无痛胃肠镜检查的效果 [J]. 临床麻醉学杂志, 2022, 38 (2): 144-148.
- [11] Eberl S, Koers L, van Hooft JE, et al. Sedation with propofol during ERCP: is the combination with esketamine more

- effective and safer than with alfentanil? Study protocol for a randomized controlled trial [J]. *Trials*, 2017, 18 (1): 472.
- [12] Ebru TK, Resul K. Comparison of ketamine-propofol mixture (ketofol) and midazolam-meperidine in endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) for oldest patient [J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2019, 15: 755-763.
- [13] 陈南瑾, 梁文华, 应婷婷, 等. 序贯法测定阿芬太尼复合丙泊酚时抑制双腔支气管插管反应的半数有效剂量 [J]. *实用医学杂志*, 2022, 38 (7): 889-892.
- [14] 高长胜, 黄符香, 李永乐. 艾司氯胺酮静注在人工流产术中的应用效果观察 [J]. *山东医药*, 2022, 62 (11): 56-58.
- [15] Jonkman K, van Rijnssoever E, Olofsen E, et al. Esketamine counters opioid-induced respiratory depression [J]. *Br J Anaesth*, 2018, 120 (5): 1117-1127.
- [16] Trimmel H, Helbok R, Staudinger T, et al. S (+) -ketamine: current trends in emergency and intensive care medicine [J]. *Wien Klin Wochenschr*, 2018, 130 (9-10): 356-366.
- [17] Trujillo KA, Heller CY. Ketamine sensitization: influence of dose, environment, social isolation and treatment interval [J]. *Behav Brain Res*, 2020, 378: 112271.
- [18] 任芹, 朱莉敏, 许华, 等. 单次亚麻醉剂量氯胺酮对结肠肿瘤患者术后早期情绪反应的影响 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32 (4): 317-320.
- (收稿日期: 2022-05-21; 修回日期: 2022-07-09)

甲苯磺酸瑞马唑仑在子宫病损电切术麻醉中的应用研究

张璇¹, 李亭仪¹, 郭志佳², 王春燕^{2*} (1.山西医科大学, 太原 030001; 2.山西医科大学第一医院, 太原 030001)

摘要: **目的** 观察甲苯磺酸瑞马唑仑在宫腔镜下子宫病损电切术去阿片化麻醉中的应用。**方法** 对拟行全麻下宫腔镜病损电切术的患者 60 例, 按随机数字表法分为瑞马唑仑组 (R 组) 和丙泊酚对照组 (P 组)。所有患者给予氟比洛芬酯 50 mg 作为镇痛预处理。R 组静脉注射甲苯磺酸瑞马唑仑注射液 5 mg, 追加 2.5 mg/次; P 组静脉注射丙泊酚中/长链脂肪乳注射液 1.5 mg·kg⁻¹, 每次追加 0.5 mg·kg⁻¹。记录患者基本生命体征: 包括入室后 (T0), 麻醉诱导后 (T1), 手术开始 (T2), 放置扩阴器 (T3), 手术结束时 (T4), 手术结束后 1 min (T5)、3 min (T6)、5 min (T7) 的 HR、MAP、SpO₂、BIS 值、MOAA/S 评分; 主要观察指标: 累计使用药物剂量, 术中体动发生次数; 次要观察指标: 诱导时间, 术中知晓发生率, 术中镇静深度, 离室时间, 自制满意度调查问卷, 术前及术后 1 日焦虑评分, 不良事件发生率。**结果** 与 T0 相比, R 组 T2 时 HR、T1 ~ T5 时 BIS, P 组 T2 ~ T4 时 HR、T1 ~ T5 时 MAP、T1 ~ T5 时 BIS 均显著下降 ($P < 0.05$); R 组 T1 ~ T6 时 SpO₂, P 组 T1 ~ T5 时 SpO₂ 均显著上升 ($P < 0.05$)。与 R 组相比, P 组 T3 ~ T5 时 MAP, T4 时 SpO₂, T1 ~ T7 时 BIS, 累计追加次数 ≥ 6 次, 术中体动发生 ≥ 3 次, 诱导时间, BIS 50 ~ 60 例数, T5 ~ T7 时 MOAA/S 评分, 患者满意度 3 分均显著下降 ($P < 0.05$); P 组离室时间、不良事件总发生率显著高于 R 组 ($P < 0.05$)。两组术前焦虑评分差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 术后焦虑评分均显著下降 ($P < 0.05$), 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 在宫腔镜下子宫病损电切术的去阿片化麻醉方案中, 与丙泊酚相比, 甲苯磺酸瑞马唑仑可提供安全有效的镇静效果。瑞马唑仑剂量 0.3 mg·kg⁻¹ 优于单次注射 5 mg。

关键词: 瑞马唑仑; 去阿片化麻醉; 丙泊酚; 子宫病损电切术

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2022)12-2944-06

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.041

Application of remazolam and propofol in electrotomy of uterine lesions

ZHANG Xuan¹, LI Ting-yi¹, GUO Zhi-jia², WANG Chun-yan^{2*} (1. Shanxi Medical University, Taiyuan 030001; 2. First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001)

基金项目: 中关村精准医学基金会 (No. Z-2021-006); 北京医学奖励基金会 (No. YXJL-2021-0499-0408)。

作者简介: 张璇, 女, 硕士, 主要从事临床技能与研究, email: zhangx199627@163.com *通信作者: 王春燕, 女, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事临床技能与研究, email: wangchunyan19@163.com

Abstract: Objective To observe the use of rimazolam mesylate in opioid-free anesthesia for hysteroscopic electrosurgery of uterine lesions. **Methods** Sixty patients proposed for hysteroscopic lesion electrosurgery under general anesthesia were divided into a rimazolam group (group R) and a propofol group (group P) according to the random number table method. All patients were given flurbiprofen ester 50 mg as analgesic pretreatment. 5 mg of intravenous rimazolam mesylate injection with an additional 2.5 mg/dose was administered to group R; 1.5 mg · kg⁻¹ of intravenous propofol medium/long chain fatty milk injection with an additional 0.5 mg/ (sub · kg⁻¹) was administered to group P. Record the patient's basic vital signs: HR, MAP, SpO₂, BIS values, MOAA/S scores after entering the room (T0), after induction of anaesthesia (T1), at the start of surgery (T2), at the placement of the dilator (T3), at the end of surgery (T4), and 1 min (T5), 3 min (T6) and 5 min (T7) after the end of surgery; primary observations: cumulative dose of drug used, number of intraoperative somatic movements occurred; secondary observations: induction time, incidence of intraoperative knowledge, depth of intraoperative sedation, time to leave the room, self-administered satisfaction questionnaire, preoperative and 1 day postoperative anxiety scores, incidence of adverse events. **Results** Compared with T0, HR at T2, BIS at T1 to T5 in group R, HR at T2 to T4, MAP and BIS at T1 to T5 in group P were significantly lower ($P < 0.05$); SpO₂ at T1 to T6 in group R, SpO₂ at T1 to T5 in group P were significantly higher ($P < 0.05$). Compared with the group R, MAP at T3 to T5, SpO₂ at T4, BIS at T1 to T7, cumulative number of appendages ≥ 6 , intraoperative body movements occurring ≥ 3 , induction time, number of BIS 50 ~ 60 cases, MOAA/S score at T5 to T7, and patient satisfaction score of 3 were significantly lower in the group P than in the group R ($P < 0.05$); time to leave the room and total incidence of adverse events were significantly higher in the group P than in the group R ($P < 0.05$). The difference between the preoperative anxiety scores of the two groups was not statistically significant ($P > 0.05$). Postoperative anxiety scores were all significantly lower ($P < 0.05$) and the difference between the groups was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** In opioid-free anaesthetic regimen for hysteroscopic electrosurgery of uterine lesions, rimazolam mesylate provides safe and effective sedation compared to propofol. The dose of 0.3 mg · kg⁻¹ of rimazolam is superior to 5 mg as a single injection.

Key words: remazolam; opioid-free anesthesia; propofol; electrotomy of uterine lesion

甲苯磺酸瑞马唑仑是我国自主研发的一种新上市的超短效苯二氮草类药物,具有起效快、恢复快、血流动力学稳定的优点,低血压、呼吸抑制等不良反应少,且无注射痛^[1-2],可被氟马西尼拮抗^[3]。Ⅱ、Ⅲ期临床试验已经证实其可安全有效的应用于胃镜检查^[4]、结肠镜检查^[5]、支气管镜检查^[6]。在前期临床观察中发现,甲苯磺酸瑞马唑仑说明书的推荐剂量初始剂量 5 mg,追加剂量 2.5 mg,在无痛胃镜术中患者体动发生次数较多^[7]。但随着进一步扩展说明书用药适应证的Ⅳ期临床试验开展,广大临床医师开始关注瑞马唑仑对其他刺激较强的手术麻醉中的使用的安全性、有效性及最佳应用剂量。

目前我国关于宫腔镜手术麻醉的唯一一份指南共识《宫腔镜诊疗麻醉管理的专家共识》(中国心胸血管麻醉学会日间手术麻醉分会)中虽然推

荐使用瑞马唑仑,但没有列出文献证据支持。之后,有研究报道联合阿片类镇痛药物后,瑞马唑仑显示出比丙泊酚更大的安全性^[3, 8]。但是阿片类药物因其特有的胸壁强直、呼吸抑制以及增加恶心呕吐、认知功能障碍风险等不良反应,在门诊手术麻醉中已经逐渐被去阿片化麻醉(opioid-free anesthesia, OFA)镇痛技术取代。但在 OFA 模式中,无镇痛作用的瑞马唑仑是否仍然表现出安全性,以及在减少丙泊酚用量方面是否仍然具有优势,目前尚无文献报道。本研究旨在观察单独使用甲苯磺酸瑞马唑仑在子宫病损电切术麻醉中的效果并探索最优剂量,以期甲苯磺酸瑞马唑仑超说明书应用提供一定的临床证据。

1 资料和方法

1.1 研究对象和分组

本研究经山西医科大学第一医院伦理委员会

批准 ([2021] 伦理字 (K097) 号), 选取 2021 年 11 月至 12 月在山西医科大学第一医院日间手术中心拟施宫腔镜下子宫病损电切术的患者 60 例, 在签署知情同意后, 采用随机数字表法将患者分为瑞马唑仑组 (R 组) 和丙泊酚对照组 (P 组)。纳入标准: ASA 分级为 I ~ II 级; 年龄 18 ~ 60 周岁。排除标准: 急性心力衰竭、不稳定型心绞痛、术前 6 个月内发生心肌梗死、静息心电图心率 $< 50 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$ 、三度房室传导阻滞、严重心律失常等心脏疾患; 对苯二氮草类及其成分、丙泊酚、氟马西尼、大豆、牛奶过敏者; 长期服用麻醉性镇痛镇静药物者; 呼吸道管理困难者, 如张口受限、Mallampati 分级 ≥ 3 级、颈椎病患者、呼吸功能不全、睡眠呼吸暂停综合征患者; 合并精神障碍者; 未经控制的高血压、甲状腺功能亢进症、哮喘、慢性阻塞性肺疾病等患者, 或麻醉医师认为不宜静脉麻醉的情形; 肿瘤疾病、神经系统疾病、凝血障碍及免疫缺陷者。

1.2 试验方法

所有患者术前常规禁饮、禁食, 监测基本生命体征 [心电图 (ECG)、心率 (HR)、平均动脉压 (MAP)、血氧饱和度 (SpO_2)], BIS 值 (bispectral index, 脑电双频指数, 型号: 186-0106, 柯惠医疗), 以汉密尔顿焦虑评定量表 (HAM-A) 评估患者术前焦虑评分。

OFA 麻醉方案: 入室后面罩吸氧 ($2 \sim 4 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$), 建立静脉通道输注复方氯化钠注射液。所有患者常规给予氟比洛芬酯 (北京泰德) 50 mg 镇痛预处理, R 组静脉推注注射用甲苯磺酸瑞马唑仑 (江苏恒瑞) 5 mg , P 组静脉推注丙泊酚中 / 长链脂肪乳注射液 (北京费森尤斯卡比) $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 待患者 BIS 值 < 60 、睫毛反射消失、MOAA/S 评分 < 1 分后进行手术, 并记录患者诱导时间 (从静脉推注镇静药物到手术开始)。术中若发生体动, 影响术者操作, 可依据实际情况 R 组追加甲苯磺酸瑞马唑仑 2.5 mg /次, P 组追加丙泊酚中 / 长链脂肪乳注射液每次 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 并记录患者体动发生次数及累计追加药物次数, 若 3 min 内追加超过 3 次, 则记录为镇静失败, 退出 OFA 研究方案, 按照临床常规改用其他麻醉方案。手术结束前所有患者给予盐酸托烷司琼注射液 (齐鲁制药) 5 mg 预防术后恶心呕吐。若呼吸抑制, 则托下颌面罩加压给氧气辅助通气; 若低血压 (下降超过入室 20% 或收缩压 $\leq 90 \text{ mmHg}$), 给予麻黄碱 (东北制药) 6 mg 静脉注射; 若心率减慢 ($\text{HR} < 50 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$), 给予阿托品 (天津金耀)

0.25 mg 静脉注射, 并记录相应的不良事件。

术后观察患者生命体征、MOAA/S 评分, 待患者清醒后入 PACU, 以改良 Brice 调查问卷判断患者是否发生术中知晓, 并让患者填写自制满意度调查问卷 (包括术中感觉睡眠质量好不好、有无眩晕等不良体验、之后是否期待再次体验此药物达到睡眠), 记录患者离室时间, 术后 1 日再次评估患者焦虑评分。

1.3 观察指标

1.3.1 一般资料 包括年龄、体质指数 (BMI)、文化程度、ASA 分级、手术类型、手术时间、术中失血量、术中入液量。

1.3.2 基本生命体征指标 分别记录患者入室后 (T0)、麻醉诱导后 (T1)、手术开始 (T2)、放置扩阴器 (T3)、手术结束时 (T4)、术后 1 min (T5)、3 min (T6)、5 min (T7) 的 HR、MAP、 SpO_2 、BIS 值、MOAA/S 评分。

1.3.3 主要观察指标 术中体动发生次数, 累计使用药物剂量; 次要观察指标: 诱导时间、术中知晓发生率、术中镇静深度、离室时间、满意度调查问卷、术前及术后 1 日焦虑评分、不良事件发生率 (呼吸抑制、低血压、心动过缓、术后恶心呕吐、注射痛等)。

MOAA/S 评分: 5 分, 完全清醒, 对正常呼名的反应正常; 4 分, 对正常呼名的反应迟钝; 3 分, 仅对大声和 / 或反复呼名有反应; 2 分, 仅对轻微推动或轻微晃动身体有反应; 1 分, 仅对疼痛刺激 (挤压斜方肌) 有反应; 0 分, 对疼痛刺激 (挤压斜方肌) 无反应^[9]。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件对数据进行统计分析。计数资料采用中位数 $\pm$ 四分位距进行样本描述, 组间比较用秩和检验。计量资料用均数 $\pm$ 标准差进行统计描述, 用卡方检验进行正态性检验。对于符合正态分布的样本, 组间比较采用 t 检验, 生命体征的组内比较采用重复测量的方差分析; 对于不符合正态分布的样本, 采用非参数检验方法——Wilcoxon Signed-Rank Test (Wilcoxon 有符号秩和检验)。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

R 组 29 例, 有 1 例患者镇静失败退出 OFA 方案; P 组 30 例。两组患者年龄、BMI、文化程度、ASA 分级、手术类型、手术时间、术中失血量、术中入液量差异均无统计学意义 ($P > 0.05$, 见表 1)。

表 1 患者一般资料及观察指标比较

Tab 1 General data and observation indicator of patients

项目	R 组 (n = 29)	P 组 (n = 30)	项目	R 组 (n = 29)	P 组 (n = 30)
一般资料			麻醉深度		
年龄 / 岁	42.90 ± 10.90	43.60 ± 7.90	BIS 值 [n (%)]		
BMI / (kg · m ⁻²)	23.80 ± 2.60	24.00 ± 2.70	50 ~ 60	21 (72.41)	2 (6.67)*
文化程度			40 ~ 50	6 (20.69)	19 (63.33)*
大专及以上	10 (34.48)	12 (40.00)	30 ~ 40	1 (3.45)	3 (10.00)
中学到中专	15 (51.72)	16 (63.33)	< 30	1 (3.45)	6 (20.00)*
小学及以下	4 (13.79)	2 (6.67)	苏醒质量		
ASA 分级			MOAA/S 评分		
I 级	12 (41.38)	10 (33.33)	T5	3.10 ± 0.49	2.47 ± 0.51*
II 级	17 (58.62)	20 (66.67)	T6	3.90 ± 0.56	3.20 ± 0.41*
手术类型			T7	4.52 ± 0.51	4.17 ± 0.38*
子宫内息肉切除术	10 (34.48)	9 (30.00)	离室时间 /min	7.66 ± 1.59	16.23 ± 2.50*
子宫黏膜下肌瘤切除术	8 (27.59)	9 (30.00)	满意度调查问卷 [n (%)]		
子宫内诊断性刮宫术	11 (37.93)	12 (40.00)	术中感觉睡眠质量		
手术时间 /min	24.30 ± 10.50	23.70 ± 7.70	1 (好)	25 (82.21)	23 (76.67)
术中失血量 /mL	13.45 ± 5.10	14.33 ± 6.16	0 (不好)	4 (13.79)	7 (23.33)
术中入液量 /mL	520.00 ± 89.60	511.67 ± 86.60	眩晕等不良体验		
主要观察指标			1 (无)	22 (75.86)	11 (36.67)*
累计追加次数 [(R.2.5 mg/次, P.0.5 mg/			0 (有)	7 (24.14)	19 (63.33)*
(次 · kg ⁻¹)] [n (%)]			之后是否期待再次体		
10	7 (24.14)	0 (0.00)*	验此药物达到睡眠		
9	4 (13.79)	0 (0.00)*	1 (是)	20 (68.97)	10 (33.33)*
8	6 (20.69)	0 (0.00)*	0 (否)	9 (31.03)	20 (66.67)*
7	4 (13.79)	0 (0.00)*	总分		
6	4 (13.79)	0 (0.00)*	3	17 (58.62)	8 (26.67)*
5	0 (0.00)	0 (0.00)	2	6 (20.69)	3 (10.00)
4	2 (6.90)	0 (0.00)	1	4 (13.79)	14 (46.67)*
3	0 (0.00)	2 (6.67)*	0	2 (6.90)	5 (16.67)*
2	0 (0.00)	2 (6.67)*	焦虑评分 / 分		
1	1 (3.45)	9 (30.00)*	术前焦虑评分	20.62 ± 4.44	20.23 ± 4.46
0	1 (3.45)	17 (56.67)*	术后 1 日焦虑评分	9.86 ± 3.29 [#]	10.83 ± 2.83 [#]
瑞马唑仑 / 丙泊酚总量 /mg	22.50 ± 5.89	111.28 ± 31.81	不良事件发生率 [n (%)]		
瑞马唑仑 / 丙泊酚累计剂量 / (mg · kg ⁻¹)	0.39 ± 0.12	1.82 ± 0.44	注射痛	0 (0.00)	20 (66.70)*
术中体动发生次数 [n (%)]			呼吸抑制	0 (0.00)	16 (53.33)*
≥ 3	20 (68.97)	0 (0.00)*	低血压	1 (3, 45)	5 (16.67)*
2	7 (24.14)	1 (3.33)*	心动过缓	0 (0.00)	2 (6.67)
1	1 (3.45)	12 (40.00)*	术后恶心呕吐	3 (10.34)	10 (33.33)*
0	1 (3.45)	17 (56.67)*	总计	4 (2.75)	53 (35.33)*
麻醉诱导					
诱导时间 /s	30.10 ± 5.44	21.23 ± 3.63*			
术中知晓发生率 [n (%)]	0 (0.00)	0 (0.00)			

注: 与 R 组相比, *P < 0.05; 与术前相比, [#]P < 0.05。Note: Compared with the group R, *P < 0.05; compared with before the operative, [#]P < 0.05.

2.2 基本生命体征

如表 2 所示, 与 T0 相比, R 组 T2 时 HR、T1 ~ T5 时 BIS 及 P 组 T2 ~ T4 HR、T1 ~ T5 时 MAP、T1 ~ T5 时 BIS 显著下降 ($P < 0.05$), P 组下降更明显 ($P < 0.05$)。两组 T1 ~ T5 SpO₂ 均显著上升 ($P < 0.05$); 与 R 组相比, P 组 T3 ~ T5 MAP 及 T4 时 SpO₂ 显著下降 ($P < 0.05$)。

2.3 观察指标

2.3.1 主要观察指标 如表 1 所示, 累计追加次数 ≥ 6 次, R 组显著高于 P 组 ($P < 0.05$), 累计追加次数 ≤ 3 次, R 组显著低于 P 组 ($P < 0.05$); R 组的术中体动发生 ≥ 3 次、发生 2 次明显高于 P 组 ($P < 0.05$), R 组的术中体动发生 1 次、发生 0 次明显低于 P 组 ($P < 0.05$)。

2.3.2 诱导时间 如表 1 所示, R 组的诱导时间显著长于 P 组 ($P < 0.05$), 两组均无术中知晓发生。

2.3.3 麻醉深度 如表 2 所示, 与 T0 相比, 两组 T1 ~ T3 时刻 BIS 均显著下降 ($P < 0.05$); 与

R 组相比, P 组 T1 ~ T7 时刻 BIS 显著低于 R 组 ($P < 0.05$), 如表 1 示, R 组 BIS 50 ~ 60 例数显著高于 P 组 ($P < 0.05$), BIS 40 ~ 50、BIS < 30 例数显著低于 P 组 ($P < 0.05$)。

表 2 患者基本生命体征比较
Tab 2 Basic vital signs of patients

项目	组别	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
HR/min	R	78.10±11.15	71.59±9.62	70.38±8.44*	73.24±8.03	75.07±9.01	77.52±9.40	78.17±8.62	78.28±9.31
	P	80.97±14.34	72.63±12.68	69.67±11.33*	70.63±11.14*	71.40±11.59*	73.90±11.86	76.47±12.39	78.40±12.72
MAP/mmHg	R	90.13±8.85	80.18±7.44	77.32±7.13	80.95±5.82	83.23±6.34	85.25±8.22	85.57±6.45	86.20±6.39
	P	88.20±9.74	75.17±11.42*	73.00±8.17*	74.67±9.25**	77.17±8.25**	77.67±9.17**	82.67±8.42	85.00±7.83
SpO ₂	R	97.55±1.77	100.00±1.00*	100.00±1.00*	99.00±1.00*	99.00±1.00*	99.00±2.00*	98.00±2.00*	97.00±2.00
	P	96.47±2.25	100.00±1.00*	99.00±1.00*	99.00±2.75*	98.00±2.75**	98.00±2.00*	98.00±2.00	97.00±1.00
BIS	R	93.86±4.60	65.00±3.00*	58.00±5.00*	53.00±4.00*	63.00±4.00*	75.00±4.00*	86.00±6.00	95.00±4.00
	P	94.17±1.77	56.50±3.25**	44.00±5.00**	43.50±3.00**	55.50±4.75**	63.50±5.00**	70.00±3.00*	88.00±6.00*

注: 与 T0 相比, * $P < 0.05$, 与 R 组相比, ** $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the T0, * $P < 0.05$, compared with the group R, ** $P < 0.05$.

2.3.4 苏醒质量 如表 1 所示, R 组术后 T5 ~ T7 时刻 MOAA/S 评分显著高于 P 组 ($P < 0.05$), 离室时间显著低于 P 组 ($P < 0.05$), 患者满意度 3 分显著高于 P 组 ($P < 0.05$), 患者满意度 1 分、0 分显著低于 P 组 ($P < 0.05$)。两组术前焦虑评分的比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 术后焦虑评分均显著下降 ($P < 0.05$), 组间差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3.5 不良事件发生率 如表 1 所示, R 组的不良事件总发生率、注射痛、呼吸抑制、低血压术后恶心呕吐发生均显著低于 P 组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

静脉麻醉下的宫腔镜检查治疗越来越多, 目前几乎 90% 的宫腔镜手术都在日间手术中心进行, 以求快速周转、降低医疗成本及提供安全舒适的服务体验^[10]。目前宫腔镜手术麻醉多选用丙泊酚复合非甾体抗炎药物的 OFA 方案。丙泊酚可广泛抑制中枢神经系统, 减少患者的痛苦和焦虑, 增加舒适度, 同时起效快、半衰期短, 使患者快速入睡和恢复^[11]。然而丙泊酚的不良反应不可避免, 因其对循环系统的抑制, 会引起心肌耗量和血液灌注的下降, 导致低血压、心律失常等; 对呼吸系统的抑制, 会发生低氧血症等^[12], 不但增加了日间麻醉风险, 也极大限制了患者麻醉适应证, 增加相关辅助检查医疗成本。丙泊酚还具有注射痛^[13], 会造成不良记忆; 且无拮抗药会导致个别患者术后滞留时间过长; 术后头晕、恶心等症状致使恢复室周转慢。

瑞马唑仑作为一种新型苯二氮草类药物, 作用于 γ -氨基丁酸受体亚基 ($GABA_A$), 可引起细

胞膜通透性增加, 细胞内氯离子浓度增加, 膜超极化, 从而使兴奋性降低, 抑制神经元电活动, 产生抗焦虑、镇静、催眠等作用。瑞马唑仑通过一级药代动力学消除, 长期或大剂量输注, 不发生药物积聚, 其不依赖器官代谢, 而是被血液中的非特异性组织酶代谢为无活性的羧酸, 即使长时间输注也能快速消除, 并且没有药物蓄积^[14], 分布容积小、半衰期短、清除率高且与体积无明显关系, 代谢产物无活性, 因此起效快、苏醒快、无药物蓄积、可控性强^[15], 且术后精神意识恢复快, 现已被批准用于全身麻醉和程序性镇静。在前期 II、III 期临床试验中, 无痛胃、肠镜, 支气管镜检查方面证明有优势, 瑞马唑仑有望成为门诊短小手术中的新型短效镇静药物, 已被《宫腔镜诊疗麻醉管理的专家共识》列入推荐药物。但该共识并未给出推荐用药的证据及证据级别, 同时建议使用阿片类药物麻醉。事实上, 在临床中, 阿片类药物因其严重呼吸抑制并发症已经不被门诊及日间手术加速康复外科 (ERAS) 流程中常规使用。随着舒适化医疗的提出, OFA 模式是更适合宫腔镜麻醉的方案。有研究指出 OFA 模式术中呼吸抑制发生少, 术后恶心呕吐的发生率低, 周转快且预后好, 同时可减轻患者负担及降低医疗成本^[16]。因此, 本研究首次观察了在 OFA 模式中, 完全没有镇痛作用的瑞马唑仑在宫腔镜下子宫病损电切术中应该如何更好地应用。

本研究结果表明瑞马唑仑在维持镇静深度上个体差异大, 效果劣于丙泊酚, 且无镇痛作用。若按照说明书静脉推注甲苯磺酸瑞马唑仑负荷剂量 5 mg, 不仅诱导时间较丙泊酚长, 术中 BIS

值较高,且术中体动发生率高,需要多次追加药物,且按说明书每次追加 2.5 mg 后不能满足手术需求,或仅 30 ~ 40 s 就需要再次追加,因此对于刺激较强的手术而言,在 OFA 麻醉方案中,仅靠说明书单次剂量基本不能满足手术要求。本研究发现,瑞马唑仑追加 2 ~ 3 次,即每次累计追加 5 ~ 7.5 mg,可延长追加药物间隔;累计剂量达 $(0.39 \pm 0.12) \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,则基本可满足手术需求。因此我们认为,诱导负荷剂量为 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,可达到较深的镇静深度,满足手术需求,并可将术中追加次数降至 1 ~ 2 次,与丙泊酚使用方案接近。该剂量远大于说明书推荐剂量,与最新公布的 IV 期临床研究^[17-18]结论相似,但最优剂量的确定仍需要进一步增加样本量进行多中心研究来验证。

与 P 组相比, R 组的患者血流动力学更平稳,麻醉深度低,苏醒快且苏醒质量好,在术后 5 min 内即可完成相关的量表及问卷,而 P 组因为术后头晕、恶心等不适,多在 15 ~ 18 min 时完成量表及问卷,患者满意度高,不良事件发生率低,与现有研究^[3, 7]结论一致。因此,掌握合适的麻醉方案,瑞马唑仑不但可以满足宫腔镜手术需求,而且表现出比丙泊酚更大优势,舒适性、安全性提高,满意度高。

综上,本研究发现在宫腔镜下子宫病损电切术的 OFA 麻醉方案中,与丙泊酚相比,甲苯磺酸瑞马唑仑可提供安全有效的镇静效果,循环稳定,苏醒快,苏醒质量好,离室时间短,患者满意度高,不良事件发生率低。负荷剂量为 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 效果优于单次注射 5 mg。

参考文献

- [1] Oka S, Satomi H, Sekino R, et al. Sedation outcomes for remimazolam, a new benzodiazepine [J]. J Oral Sci, 2021, 63 (3): 209-211.
- [2] Masui K. Remimazolam besilate, a benzodiazepine, has been approved for general anesthesia [J]. J Anesth, 2020, 34 (4): 479-482.
- [3] Zhang S, Wang J, Ran R, et al. Efficacy and safety of remimazolam tosylate in hysteroscopy: a randomized, single-blind, parallel controlled trial [J]. J Clin Pharm Ther, 2022, 47 (1): 55-60.
- [4] Borkett KM, Riff DS, Schwartz HI, et al. A phase II a, randomized, double-blind study of remimazolam (CNS 7056) versus midazolam for sedation in upper gastrointestinal endoscopy [J]. Anesth Analg, 2015, 120 (4): 771-780.
- [5] Pambianco DJ, Borkett KM, Riff DS, et al. A phase IIb study comparing the safety and efficacy of remimazolam and midazolam in patients undergoing colonoscopy [J]. Gastrointest Endosc, 2016, 83 (5): 984-992.
- [6] Gerard S, Nicholas P, Alexander C, et al. Results of a phase 3, multicenter, randomized, placebo-controlled trial of remimazolam: a new ultra short acting benzodiazepine for bronchoscopy [J]. Chest, 2017: A739.
- [7] 朱越, 王倩, 杨天爽, 等. 瑞马唑仑复合瑞芬太尼在无痛胃镜检查中的临床应用 [J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2021, 42 (12): 1265-1271.
- [8] Zhang X, Li S, Liu J. Efficacy and safety of remimazolam besilate versus propofol during hysteroscopy: single-centre randomized controlled trial [J]. BMC Anesthesiol, 2021, 21 (1): 156.
- [9] Bagchi D, Mandal MC, Das S, et al. Bispectral index score and observer's assessment of awareness/sedation score may manifest divergence during onset of sedation: study with midazolam and propofol [J]. Indian J Anaesth, 2013, 57 (4): 351-357.
- [10] Mak JN, Imran A, Burnet S. Office hysteroscopy: back to the future [J]. Climacteric, 2020, 23 (4): 350-354.
- [11] Baker MT, Naguib M. Propofol: the challenges of formulation [J]. Anesthesiology, 2005, 103 (4): 860-876.
- [12] Park S, Choi SL, Nahm FS, et al. Dexmedetomidine-remifentanyl vs propofol-remifentanyl for monitored anesthesia care during hysteroscopy: randomized, single-blind, controlled trial [J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99 (43): e22712.
- [13] Bingol TT, Koceroglu I, Devrim S, et al. Comparison of sedation with dexmedetomidine vs propofol during hysteroscopic surgery: single-centre randomized controlled trial [J]. J Clin Pharm Ther, 2019, 44 (2): 312-317.
- [14] Cornett EM, Novitch MB, Brunk AJ, et al. New benzodiazepines for sedation [J]. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2018, 32 (2): 149-164.
- [15] Kim KM. Remimazolam: pharmacological characteristics and clinical applications in anesthesiology [J]. Anesth PBISn Med (Seoul), 2022, 17 (1): 1-11.
- [16] 夏明, 徐建国. 去阿片化麻醉与镇痛的研究进展 [J]. 临床麻醉学杂志, 2020, 36 (9): 920-922.
- [17] Lu Z, Zhou N, Li Y, et al. Up-down determination of the 90% effective dose (ED_{90}) of remimazolam besilate for anesthesia induction [J]. Ann Palliat Med, 2022, 11 (2): 568-573.
- [18] Jia Z, Ren LX, Fan YT, et al. Observation of effective dosage of remimazolam tosylate used for moderate-to-deep sedation in fiberoptic bronchoscopy [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2021, 101 (11): 813-816.

(收稿日期: 2022-04-28; 修回日期: 2022-06-22)

药品不良反应

复方磺胺甲噁唑片致 DRESS 综合征 1 例及文献复习

谢小云¹, 竺嘉幸^{1, 2*}, 邹淑梅¹, 黄爱文¹, 林庆安¹, 连霞¹, 陈清¹, 宋颖芳^{1*} (1. 联勤保障部队第九〇〇医院, 福州 350025; 2. 联勤保障部队三亚康复疗养中心, 海南 三亚 572000)

关键词: 复方磺胺甲噁唑; DRESS 综合征; 不良反应

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2022)12-2950-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.042

1 临床资料

患者男性, 74 岁, 体质量 52 kg, 因全身红色皮疹伴瘙痒 10 余日, 反复发热 2 d, 于 2022 年 6 月 20 日收入我院呼吸内科。患者 6 周前因肺部感染就诊当地医院 (具体用药不详), 出院带药复方磺胺甲噁唑片 0.96 g po tid, 出院时肝肾功能正常。服药 1 周后患者出现发热, 体温最高达 39.8℃, 伴全身弥漫分布红色粟米状斑丘疹, 停用复方磺胺甲噁唑片, 再次于外院就诊, 考虑过敏性皮炎, 予地塞米松等抗过敏治疗后, 皮肤瘙痒有所缓解, 但皮疹无明显消退。患者既往无肝炎、疟疾等传染病史, 否认食物及药物过敏史。

入院查体: 体温 39.3℃, 脉搏 70 次·min⁻¹, 呼吸 17 次·min⁻¹, 血压 140/70 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)。全身多形性红斑, 双上肢可见散在红色丘疹, 双下肢可见红色粟米状斑丘疹, 听诊双肺呼吸音粗, 心脏和腹部查体无异常。实验室检查: 白细胞计数 (WBC) 24.43×10⁹·L⁻¹, 嗜酸性粒细胞计数 (EOS) 12.56×10⁹·L⁻¹, 肌酐 (Cr) 98.1 μmol·L⁻¹, 谷丙转氨酶 (ALT) 65.6 U·L⁻¹, 碱性磷酸酶 (ALP) 193.1 U·L⁻¹, 谷氨酰转氨酶 (GGT) 169.1 U·L⁻¹, 谷草转氨酶 (AST) 116.4 U·L⁻¹, 直接胆红素 (DBIL) 3.3 μmol·L⁻¹, 肌酐清除率 42.76 mL·min⁻¹。胸部 CT 提示: 纵隔内多发肿大淋巴结, 较大者约为 2.0 cm。入院诊断: ① 过敏性皮炎; ② 肺气肿。入院后给予注射用甲泼尼龙琥珀酸钠 (MPSS) 40 mg ivgtt qd, 氯雷他定片 10 mg po qd, 盐酸西替利嗪片 10 mg po qn。6 月 24 日实验室检查: WBC 25.96×10⁹·L⁻¹, EOS 16.09×10⁹·L⁻¹, 血小板计数 (PLT) 58.0×10⁹·L⁻¹, 肝肾功能仍异常, 尿常规: 尿白

细胞 (±), 尿蛋白 (+), 尿胆原 (+), 肺炎支原体阴性, 肺炎衣原体阴性, 红色粟米状斑丘疹未见明显好转, 考虑为复方磺胺甲噁唑片引起的药物反应伴嗜酸性粒细胞增多和全身性症状 (DRESS) 综合征。将注射用甲泼尼龙琥珀酸钠增加至 80 mg ivgtt qd, 6 月 26 日全身皮疹较入院时减少、躯干皮疹大部分消退, 四肢皮疹多发暗红斑, 颜色较前变淡, 部分见脱屑; 6 月 29 日开始激素逐渐减量; 7 月 6 日停用注射用甲泼尼龙琥珀酸钠, 改甲泼尼龙片 20 mg po qd (出院前用量降至 12 mg po qd, 期间同时给予盐酸奥洛他定片、复方甘草酸苷片, 外用地奈德乳膏, 7 月 9 日皮疹逐渐消退, 红斑均消失, 没有过度残留的色素沉着和脱屑。7 月 11 日复查实验室指标基本恢复正常, 于当日出院。出院 7 周未复发, 预后良好。患者住院期间治疗药物变化及重要实验室指标监测如表 1 所示, 皮疹情况如图 1 所示。

2 讨论

2.1 不良反应关联性评价

根据欧洲药物不良反应登记 (RegiSCAR) 诊断 DRESS 综合征评分系统^[1], 患者服用复方磺胺甲噁唑片前肝肾功能正常, 服用后: 淋巴结肿大 (1 分); 嗜酸性粒细胞增高 (2 分); 伴全身弥漫分布斑丘疹, 且皮疹范围 > 50% 体表面积 (2 分); ALT、AST 升高, ALP 升高且伴胆红素增高, 判定是肝损伤 (1 分); 肌酐清除率下降、尿常规提示尿白细胞 (±)、尿蛋白 (+)、尿胆原 (+), 判定肾功能不全 (1 分)。评分 7 分, 患者 DRESS 综合征诊断明确, 考虑致敏药物为复方磺胺甲噁唑片。根据国家药品不良反应监测中心推荐的因果关系评价法^[2]: ① 患者在使用复方磺胺甲噁唑片 1 周后出现 DRESS 综合征, 存在合理

作者简介: 谢小云, 女, 主管药师, 主要从事呼吸内科临床药学工作, email: bluesky95952002@163.com *通信作者: 宋颖芳, 女, 硕士研究生导师, 主要从事呼吸内科工作, email: 15005081418@163.com; 竺嘉幸, 女, 主管药师, 主要从事呼吸内科临床药学工作, email: 1500557607@qq.com

表 1 患者住院期间治疗药物及重要实验室指标值变化

药物或指标	6 月 21 日	6 月 24 日	6 月 28 日	7 月 3 日	7 月 7 日	7 月 11 日
治疗药物	MPSS 40 mg ivgtt qd, 氯雷他定片 10 mg po qd, 盐酸西替利嗪片 10 mg po qn	MPSS 80 mg ivgtt qd	注射用甲泼尼龙琥珀酸钠 80 mg ivgtt qd	MPSS 20 mg ivgtt qd, 甲泼尼龙片 12 mg po qn, 地奈德乳膏 20 g 外用, 盐酸奥洛他定片 5 mg po q12h, 复方甘草酸苷片 225 mg po q8h	甲泼尼龙片 20 mg po qn, 地奈德乳膏 20 g 外用, 盐酸奥洛他定片 5 mg po q12h, 复方甘草酸苷片 225 mg po q8h	甲泼尼龙片 16 mg po qn, 地奈德乳膏 20 g 外用, 盐酸奥洛他定片 5 mg po q12h, 复方甘草酸苷片 225 mg po q8h
WBC/ ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	24.43	25.96	8.5	5.55	9	9.24
EOS/ ($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	12.54	16.09	0.01	0.01	0.01	0.02
Cr/ ($\mu mol \cdot L^{-1}$)	98.1	86.7	65.7	67.7	63.1	59.4
CCr/ ($mL \cdot min^{-1}$)	42.76	48.39	63.85	61.97	66.49	70.63
ALT/ ($U \cdot L^{-1}$)	65.6	224.3	280.8	163.5	138.9	98.8
GGT/ ($U \cdot L^{-1}$)	169.1	120.8	108.5	86	82.3	73.2
AST/ ($U \cdot L^{-1}$)	116.4	323.5	150.9	53.4	51	38.5
ALP/ ($U \cdot L^{-1}$)	193.1	174	184.9	140.6	162.9	160.2
DBIL/ ($mol \cdot L^{-1}$)	3.3	8.1	10.8	7.8	6.1	5



图 1 患者住院期间皮疹情况

注: A ~ B. 6 月 20 日; C ~ D. 6 月 26 日; E ~ F. 7 月 9 日。

的时间关系; ② 患者出现全身多形性红斑、胆红素增高、血小板增高符合说明书中记载的不良反应; ③ 本患者停用复方磺胺甲噁唑片后症状未明显减轻, 其抗 EB 病毒 (EBV) 衣壳抗原 IgG 抗体 7.46、EBV DNA 测定 $6.32 \times 10^3 IU \cdot mL^{-1}$, 符合 DRESS 综合征伴有 EBV 等病毒再激活导致临床症状延长和恶化的特点^[3]; ④ 患者未再次用药; ⑤ 患者出现皮疹的症状不能用基础疾病肺

水肿或其他短暂使用的合并药品按柠檬溶软胶囊、多索茶碱片解释 (通过检索中国知网、万方、维普和 PubMed 等数据库, 结合药品说明书未有相关不良反应的报道)。判定患者服用复方磺胺甲噁唑与 DRESS 综合征关联为很可能。

2.2 复方磺胺甲噁唑致 DRESS 综合征的相关文献复习

通过检索 PubMed、中国知网、万方医学、维普等数据库, 共得到复方磺胺甲噁唑致 DRESS 综合征的个案报道文献 15 篇 (见表 2), 涉及 15 例患者, 其中男性 9 例, 女性 6 例; 年龄 3 ~ 74 岁, 年龄未知 1 例, 其余 14 例的年龄中位数是 19.5 岁; 潜伏期在 1d ~ 8 周, 潜伏期中位数是 21 d, 低于 2 周的 3 例, 其余都是 3 周以上。出现发热症状 14 例; 嗜酸性粒细胞增多 11 例; 表现出红斑、皮疹等症状 14 例, 其中伴有面部水肿 7 例; 表现出颈部或腹股沟淋巴结肿大等症状 7 例; 伴有非典型淋巴细胞增多 4 例; 病毒再激活 4 例; 15 例患者中肺部受累 1 例, 眼部受累 1 例, 肝脏受累 6 例, 肾脏受累 1 例, 肝肾两个器官受累 6 例; 在采取停用复方磺胺甲噁唑、口服或静脉注射皮质类固醇、口服抗过敏药等治疗手段后, 好转 12 例, 发生自身免疫性疾病 2 例, 死亡 1 例。

2.3 药物相关性 DRESS 综合征现状

DRESS 综合征发病机制尚未完全清楚, 可能与抗原呈递、特定的人类白细胞抗原 HLA 等位基因、疱疹病毒再激活、效应 T 细胞激活等相关^[3]。Sharifzadeh 等^[19]认为 DRESS 综合征是一种延迟的、罕见的、可能危及生命的特异性药物反应。DRESS 综合征通常在暴露于药物后 2 ~ 6 周发生, 并出现高热、广泛的皮疹、面部水肿、淋巴结病、内脏器官受累和血液学异常^[20-21]。药物是

表 2 复方磺胺甲噁唑致 DRESS 综合征病例资料

文献	性别	年龄 / 岁	基础疾病	合并用药	发生时间	临床表现	累及器官	处理措施	转归
[4]	女	15	痤疮	无	8 w	发热、斑丘疹、面部水肿、外周血嗜酸性粒细胞增多	肝	停药, 静脉注射地塞米松、口服泼尼松龙	好转
[5]	男	15	左拇指周围脓肿	头孢曲松	13 d	发热、弥漫性瘀点和紫癜性皮疹、面部水肿、颈部和腹股沟淋巴结肿大、外周血嗜酸性粒细胞增多	肝、肾	停药, 静脉注射皮质类固醇	好转
[6]	男	74	急性细菌性前列腺炎	无	3 w	发热、面部和颈部出现斑丘疹、非典型淋巴细胞增多、外周血嗜酸性粒细胞增多、人类疱疹病毒 6 再激活	肝、肾	停药, 静脉注射皮质类固醇	好转
[7]	男	4	造血干细胞移植后感染	万古霉素、哌拉西林-他唑巴坦	11 d	发热、红斑和丘疹、面部水肿、下颌淋巴结肿大和脾肿大、外周血嗜酸性粒细胞增多	肝	停药, 静脉注射皮质类固醇、口服右氯苯那敏	好转
[8]	女	8	先天性膀胱输尿管反流	无	3 w	发热、麻疹样斑块、面部水肿、颈后和耳后淋巴结肿大、非典型淋巴细胞增多、外周血嗜酸性粒细胞增多	肝、肾	停药, 静脉注射皮质类固醇	好转
[9]	男	64	干细胞移植后感染	无	3 w	发热、皮疹、红斑伴有脱屑、面部水肿、巨细胞病毒再激活	肾	停药, 口服和外用皮质类固醇	好转
[10]	男	59	肺炎	无	5 w	发热、弥漫性斑丘疹, 面部水肿、人类疱疹病毒 6 再激活	肝	停药, 口服更昔洛韦、发生自身免疫性静脉注射泼尼龙	好转
[11]	男	6	骨髓炎	无	45 d	发热、躯干和四肢出现红斑、颈部淋巴结肿大、非典型淋巴细胞增多	肝	停药, 口服泼尼松龙、发生自身免疫性静脉注射免疫球蛋白	好转
[12]	女	51	克罗恩病	美沙拉嗪	6 w	发热、面部、胸部和腹部广泛出现融合红斑丘疹、外周血嗜酸性粒细胞增多、人类疱疹病毒 6 再激活	肺	停药, 静脉注射泼尼松龙	好转
[13]	女	3	未知	头孢克肟	3 w	发热、外周血嗜酸性粒细胞增多、单核细胞增多	肝、肾	停药	好转
[14]	男	17	结节性囊性寻常痤疮	异维 A 酸	4 w	发热、躯干、面部、手臂和腿部出现融合的红斑斑丘疹、双侧颈部和腹股沟淋巴结肿大、外周血嗜酸性粒细胞增多	肝	停药, 体外肝透析	好转
[15]	女	未成年	单纯性尿路感染	无	6 d	发热、麻疹样皮疹、面部水肿、颈部淋巴结肿大、非典型淋巴细胞增多	肝肾	停药, 静脉注射泼尼松龙	好转
[16]	女	22	尿路感染	无	1 d	皮肤红疹和黏膜病变以及玻璃体视网膜受累、外周血嗜酸性粒细胞增多	眼部	停药	好转
[17]	男	62	难治性髂腰肌脓肿	无	28 d	发热、面部有鳞屑、眼周苍白、弥漫性红斑、外周血嗜酸性粒细胞增多	肝、肾	口服皮质类固醇	死亡
[18]	男	24	哮喘、焦虑和慢性前列腺炎	孟鲁司特、吸入沙美特罗 / 替卡松和溴西泮	30 d	发热、斑丘疹、颈部两侧淋巴结肿大、外周血嗜酸性粒细胞增多	肝	口服强的松	好转

引起 DRESS 综合征的主要因素, 其确切发生率尚不清楚, 但估计在 1/1000 ~ 1/10 000, DRESS 综合征常涉及的药物包括芳香族抗惊厥药、抗抑郁药、非甾体抗炎药、磺胺类和砒类、抗菌药物、别嘌醇, 芳香类抗惊厥药和别嘌呤醇^[19, 22]。Sharifzadeh 等^[19]收集了 254 例抗菌药物引起的 DRESS 综合征, 其中大多数分别与抗结核药物、万古霉素和磺胺类药物有关, 磺胺类抗菌药物中, 复方磺胺甲噁唑与 DRESS 综合征密切相关。

目前, 复方磺胺甲噁唑片导致的 DRESS 综合征在国内未见报道, 国外文献报道的主要临床表现为发热, 全身出现斑丘疹、轻度面部水肿、淋巴结肿大、器官损伤、非典型淋巴细胞和嗜酸性粒细胞增多等^[4-18]。本例患者服用复方磺胺甲噁唑片 1 周后出现发热、皮肤瘙痒、全身弥漫分布红色粟米状丘疹、嗜酸性细胞粒细胞明显增多、纵隔内多发肿大淋巴结、肝肾损伤等, 且病程大于 15 d, 符合 DRESS 综合征的临床表现。

DRESS 综合征治疗的重点是停用可疑药物、对症支持治疗、使用类固醇或其他免疫抑制剂以及根据情况使用抗病毒治疗。使用全身性皮质类固醇是改善 DRESS 综合征临床症状的标准治疗^[23]。Isaacs 等^[20]报告了系统性使用全身性皮质类固醇是 DRESS 综合征的一线疗法,通常每日使用 $1 \sim 2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的泼尼松,一次或分成两次使用。但全身性皮质类固醇不是控制 DRESS 综合征的唯一治疗方法,当其治疗失败时,免疫球蛋白^[24-25]、环孢素^[26]、环磷酰胺^[27]、吗替麦考酚酯^[28]和血浆置换^[29]通常作为二线治疗。对于确认病毒激活的严重患者,一些专家还提出抗病毒治疗,如使用更昔洛韦^[30]。本例患者体质量 52 kg,根据文献^[20]推荐的泼尼松剂量,换算成甲泼尼龙为 $0.8 \sim 1.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,入院初给予注射用甲泼尼龙琥珀酸钠 40 mg ivgttt qd 治疗,相关指标和红色粟米状斑丘疹未见明显好转,后将注射用甲泼尼龙琥珀酸钠调整为 80 mg ivgtt qd,红色粟米状斑丘疹较入院减少、躯干皮疹大部分消退,症状及指标明显好转。出院 7 周末复发,预后良好。

该病例提示,DRESS 综合征早期诊断、停药和足量类固醇治疗可以挽救患者的生命,因此对 DRESS 综合征的总体认识非常重要。临床医师和临床药师应该加强对复方磺胺甲噁唑可能导致 DRESS 综合征的认识,了解其临床表现、致病特点和治疗方案。早期识别和治疗这种情况可以改变疾病的进展并挽救患者生命。

参考文献

- [1] Kardaun SH, Sidoroff A, Valeyrie-Allanore L, et al. Variability in the clinical pattern of cutaneous side-effects of drugs with systemic symptoms: does a DRESS syndrome really exist? [J]. *Br J Dermatol*, 2007, 156 (3): 609-611.
- [2] 李涛, 鲁喆. 新药 I 期临床试验中不良事件关联性评价存在的问题与对策 [J]. *中国新药杂志*, 2011, 20 (2): 101-105.
- [3] Miyagawa F, Asada H. Current perspective regarding the immunopathogenesis of drug-induced hypersensitivity syndrome/drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DIHS/DRESS) [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (4): 2147.
- [4] Paitorn L. Co-trimoxazole-induced DRESS syndrome: a case report [J]. *J Med Assoc Thai*, 2016, 99 (2): S227-S230.
- [5] Cohen A, Morrow A, McClure M. Full-body rash and fever in a 15-year-old male [J]. *Clin Pediatr (Phila)*, 2020, 59 (9-10): 933-937.
- [6] Hagiya H, Iwamuro M, Tanaka T, et al. Reactivation of human herpes virus-6 in the renal tissue of a patient with drug-induced hypersensitivity syndrome/drug rash with eosinophilia and systemic symptoms (DIHS/DRESS) [J]. *Intern Med*, 2016, 55 (13): 1769-1774.
- [7] Rueda-Valencia ML, Infante S, Campos M, et al. Trimethoprim-sulfamethoxazole-induced DRESS syndrome in a 4-year-old child [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2016, 116 (4): 366-367.
- [8] Maarouf M, Wickenheiser M, Krase JM, et al. Trimethoprim-sulfamethoxazole-induced drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms in a child with congenital renal disease [J]. *Pediatr Dermatol*, 2018, 35 (6): e391-e392.
- [9] Holbrook MB, Glick J. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS syndrome) [J]. *J Emerg Med*, 2019, 56 (5): 562-563.
- [10] Iinuma S, Kanno K, Honma M, et al. Drug-induced hypersensitivity syndrome followed by chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy [J]. *J Dermatol*, 2018, 45 (11): e310-e311.
- [11] Morita C, Yanase T, Shiohara T, et al. Aggressive treatment in paediatric or young patients with drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS) /drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) is associated with future development of type III polyglandular autoimmune syndrome [J]. *BMJ Case Rep*, 2018. <https://doi.org/10.1136/bcr-2018-225528>.
- [12] Sawata T, Bando M, Kogawara H, et al. Drug-induced hypersensitivity syndrome accompanied by pulmonary lesions exhibiting centrilobular nodular shadows [J]. *Intern Med*, 2016, 55 (9): 1159-1163.
- [13] Garnier A, El Marabetel H, Kwon T, et al. Acute renal failure in a 3-year-old child as part of the drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) syndrome following hepatitis A [J]. *Pediatr Nephrol*, 2008, 23 (4): 667-669.
- [14] Ng CT, Tan CK, Oh CC, et al. Successful extracorporeal liver dialysis for the treatment of trimethoprim-sulfamethoxazole-induced fulminant hepatic failure [J]. *Singapore Med J*, 2013, 54 (5): e113-116.
- [15] Ahluwalia J, Arkin L, Boos M, et al. Peripheral bands in the setting of drug hypersensitivity syndrome [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2014, 71 (4): e153-154.
- [16] Colon B, Horta JM, Casillas S, et al. Retinal hemorrhages and intermediate uveitis in a patient with drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms syndrome: a case report [J]. *Retin Cases Brief Rep*, 2014, 8 (2): 150-152.
- [17] Miyashita K, Shobatake C, Miyagawa F, et al. Involvement of human herpesvirus 6 infection in renal dysfunction associated with DIHS/DRESS [J]. *Acta Derm Venereol*, 2016, 96 (1): 114-115.
- [18] Córdoba S, Navarro-Vidal B, Martínez-Morán C, et al. Reactivation of skin lesions after patch testing to investigate drug rash with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) syndrome [J]. *Actas Dermosifiliogr*, 2016, 107 (9): 781-783.

- [19] Sharifzadeh S, Mohammadpour AH, Tavanaee A, et al. Antibacterial antibiotic-induced drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) syndrome: a literature review [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2021, 77 (3): 275-289.
- [20] Isaacs M, Cardones AR, Rahnema-Moghadam S. DRESS syndrome: clinical myths and pearls [J]. Cutis, 2018, 102 (5): 322-326.
- [21] Kardaun SH, Sekula P, Valeyrie-Allanore L, et al. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS): an original multisystem adverse drug reaction. Results from the prospective RegiSCAR study [J]. Br J Dermatol, 2013, 169 (5): 1071-1080.
- [22] Heymann WR. The diagnostic criteria of DRESS syndrome must be addressed [J]. J Am Acad Dermatol, 2020, 82 (3): 573-574.
- [23] Shiohara T, Kano Y. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS): incidence, pathogenesis and management [J]. Expert Opin Drug Saf, 2017, 16 (2): 139-147.
- [24] Fields KS, Petersen MJ, Chiao E, et al. Case reports: treatment of nevirapine-associated dress syndrome with intravenous immune globulin (IVIG) [J]. J Drugs Dermatol, 2005, 4 (4): 510-513.
- [25] Scheuerman O, Nofech-Moses Y, Rachmel A, et al. Successful treatment of antiepileptic drug hypersensitivity syndrome with intravenous immune globulin [J]. Pediatrics, 2001, 107 (1): E14.
- [26] Su HJ, Chen CB, Yeh TY, et al. Successful treatment of corticosteroid-dependent drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms with cyclosporine [J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2021, 127 (6): 674-681.
- [27] Esposito AJ, Murphy RC, Toukatly MN, et al. Acute kidney injury in allopurinol-induced DRESS syndrome: a case report of concurrent tubulointerstitial nephritis and kidney-limited necrotizing vasculitis [J]. Clin Nephrol, 2017, 87 (6): 316-319.
- [28] Hagiwara H, Fukushima A, Iwano H, et al. Refractory cardiac myocarditis associated with drug rash with eosinophilia and systemic symptoms syndrome due to anti-bipolar disorder drugs: a case report [J]. Eur Heart J Case Rep, 2018, 2 (4): yty100.
- [29] Waldman RA, Grant-Kels JM. Thinking outside the box: Is there a role for extracorporeal blood purification in DRESS syndrome complicated by acute kidney injury? [J]. Clin Dermatol, 2020, 38 (5): 580-583.
- [30] Kühl U, Lassner D, Wallaschek N, et al. Chromosomally integrated human herpesvirus 6 in heart failure: prevalence and treatment [J]. Eur J Heart Fail, 2015, 17 (1): 9-19.

(收稿日期: 2022-09-05; 修回日期: 2022-10-14)

硫唑嘌呤致重症肌无力患者肺部感染 1 例

王麦利¹, 刘新红^{2*}, 刘丁萍³, 王静⁴ (1. 浙江领创优品药业有限公司, 浙江 金华 321017; 2. 浙江华海药业股份有限公司, 浙江 临海 317000; 3. 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040; 4. 金华市药品不良反应监测中心, 浙江 金华 321000)

关键词: 硫唑嘌呤; 重症肌无力; 血细胞减少; 感染

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2022)12-2954-03

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.043

1 病例资料

患者女, 47 岁, 既往有下肢酸痛无力 5 年, 用药史不详。3 个月前, 自感下肢酸痛无力加重并吞咽困难、复视, 于 2020 年 1 月 7 日入某医院神经内科住院治疗, 肌电图: 神经肌肉接头突触后膜病变, 诊断“重症肌无力 (MG)”。住院治疗期间给予溴吡斯的明片 (60 mg tid) 和注射用甲泼尼龙琥珀酸钠 (80 mg, 9 d 后减至 40 mg qd ivgtt) 治疗, 1 月 16 日起加用硫唑嘌呤片 (浙江

奥托康制药有限公司, 批号: H33020153) 25 mg bid 治疗, 病情好转后于 1 月 21 日出院, 出院时血常规检查: 白细胞 (WBC) $15.9 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ↑、中性粒细胞 (NEUT) $11.0 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ ↑、血小板 (PLT) $216 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 红细胞计数 (RBC) $4.73 \times 10^{12} \cdot L^{-1}$ 。出院后, 继续用溴吡斯的明片、硫唑嘌呤片, 并予醋酸泼尼松片 (30 mg qd) 治疗, 其中硫唑嘌呤片于 2 月 19 日增加至 50 mg bid。2 月 23 日因发热 3 d, 舌体溃疡, 血常规检

作者简介: 王麦利, 女, 主要从事药物警戒工作, email: 1636831022@qq.com * **通信作者:** 刘新红, 男, 高级工程师, 主要从事药物制剂开发, email: lxh76125@sina.com

查: WBC $0.5 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$ 、NEUT $0 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$ 、PLT $21 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$ 、RBC $3.78 \times 10^{12} \cdot L^{-1} \downarrow$;
胸部 CT: 右肺下叶背段磨玻璃影, 收住某市级
医院血液科, 停用硫唑嘌呤片, 溴吡斯的明、醋
酸泼尼松继续使用, 同时用重组人粒细胞刺激因
子注射液、重组人血小板生成素注射液及注射用
美罗培南治疗, 患者自觉反复发热, 血常规未见
明显好转, 于 3 月 2 日要求出院转上级医院治疗。

2020 年 3 月 3 日患者以“肺部感染、全血细

胞减少、口腔溃疡并伴反复发热半月余”转入省
级某医院。入院体检: 患者发热最高 $39.0^\circ C$, 心
率 $110 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$, 呼吸 $24 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$, 血压
 $115/83 \text{ mmHg}$ ($1 \text{ mmHg} = 133.2 \text{ Pa}$), 神志清。
口腔多处溃疡疼痛明显, 影响进食; 双肺叩诊清
音, 未闻及啰音。入院后硫唑嘌呤片持续停用,
住院期间采用输血、抗感染、升血细胞等对症治
疗, 住院期间重要的药物治疗及临床信息见表 1。

表 1 患者住院期间重要的药物治疗及临床信息

住院时间	临床检查检验结果	治疗药物调整情况
2020-03-03 (d1)	WBC $0.6 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$ 、NEUT $0 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$ 、PLT $26 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$ 、RBC $2.89 \times 10^{12} \cdot L^{-1} \downarrow$; 血钾 $3.95 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$, 血钠 $135.3 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$, 肝、肾功 能和凝血功能正常, 超敏 C 反应蛋白 (hs-CRP) $190.56 \text{ mg} \cdot L^{-1} \uparrow$; 网织红细 胞 $0.16\% \downarrow$; 骨髓检查: 无骨髓小粒和巨核细胞; 有核细胞增生极度减低; 粒 系增生减低占 8% ; 红系增生减低占 3.5% , 以中晚幼红细胞为主, 粒红比为 $2.29:1$; 淋巴细胞相对增多; PLT 少见; 胸部 CT 检查: 两肺多发炎症	停用硫唑嘌呤片, 醋酸泼尼松片继续使用, 同 时予重组人粒细胞刺激因子注射液 (吉粒 芬) $150 \mu\text{g qd iv}$; 注射用重组人白介素 -11 1200 万 U qd ih ; 卡泊芬净 50 mg qd ivgtt ; 美罗培南 1.0 g tid ivgtt ; 替考拉宁 400 mg qd ivgtt; 伏立康唑 200 mg bid ivgtt ; 单采血小 板 1 U qd ivgtt
d3	降钙素原 $0.057 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \uparrow$; WBC $0.7 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$ 、NEUT $0 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$ 、PLT $40 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$ 、RBC $2.92 \times 10^{12} \cdot L^{-1} \downarrow$; 血钾 $4.03 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$, 血钠 138.5 $\text{mmol} \cdot L^{-1}$, 肝、肾功能和凝血功能正常, hs-CRP $185.32 \text{ mg} \cdot L^{-1} \uparrow$	停用注射用重组人白介素 -11
d9	B 型利钠肽 $29.0 \text{ ng} \cdot L^{-1}$; WBC $0.9 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$ 、NEUT $0.1 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$ 、PLT $45 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$ 、RBC $2.95 \times 10^{12} \cdot L^{-1} \downarrow$; 肝、肾功能正常; hs-CRP 154.35 $\text{mg} \cdot L^{-1} \uparrow$	停用吉粒芬、注射用伏立康唑; 改用重组人 粒细胞刺激因子注射液 (瑞白) $100 \mu\text{g qd}$ iv; 伏立康唑片 200 mg po bid
d16	真菌涂片检查有真菌孢子; WBC $1.4 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$ 、NEUT $0.2 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$ 、PLT $59 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$ 、RBC $2.95 \times 10^{12} \cdot L^{-1} \downarrow$	停用卡泊芬净、单采血小板; 停用伏立康唑 片, 改用氟康唑胶囊 100 mg po qd
d22	1, 3- β -D 葡聚糖 $294.80 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \uparrow$	停用替考拉宁
d26	CT 检查: 两肺多发炎症, 伴部分纤维灶, 两侧少量胸腔积液, 心包少量积液	停用美罗培南, 加用替加环素 50 mg bid ivgtt
d32	心包少量积液, 双侧胸膜局部增厚, WBC $2.7 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$ 、NEUT $1.0 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$ 、PLT $92 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$	停用瑞白
d36	WBC $2.5 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$ 、NEUT $0.8 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$ 、PLT $87 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$ 、RBC $3.13 \times 10^{12} \cdot L^{-1} \downarrow$, hs-CRP $< 1.36 \text{ mg} \cdot L^{-1}$	停用替加环素
d42	WBC $2.9 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$ 、NEUT $0.9 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$ 、PLT $86 \times 10^9 \cdot L^{-1} \downarrow$ 、RBC $3.15 \times 10^{12} \cdot L^{-1} \downarrow$, hs-CRP $< 1.00 \text{ mg} \cdot L^{-1}$, 病情稳定, 准予出院	出院带药, 参血胶囊 0.7 g bid

2 讨论

2.1 关联性评价

本例患者同时使用硫唑嘌呤片、溴吡斯的明片、醋酸泼尼松片 3 种药物治疗重症肌无力, 出现肺部感染症状后, 住院对症治疗期间, 停用硫唑嘌呤, 醋酸泼尼松片继续使用, 感染症状未见加重趋势, 说明肺部感染与醋酸泼尼松不相关, 查阅溴吡斯的明片说明书及相关文献, 未见其致肺部感染报道, 因此考虑不良反应 (adverse reaction, ADR) 与硫唑嘌呤有关。依据诺氏不良反应评估量表进行关联性分析, 结果见表 2。硫唑嘌呤与此不良反应评分为 7 分, 判定本例患者肺部感染与硫唑嘌呤片“很可能”有关。

2.2 硫唑嘌呤致感染风险分析

硫唑嘌呤是较早上市的嘌呤拮抗类免疫抑制剂, 可抑制核酸生物合成, 从而抑制免疫细胞及

其他类型细胞增生, 临床单独使用或联用皮质类固醇减量使用防止器官移植患者排斥反应及治疗重症肌无力等^[1-2]。硫唑嘌呤片不良反应信号前 3 位为血液系统损害、感染及浸染类疾病、胃肠道反应等^[3]。

硫唑嘌呤片致除器官移植外患者感染率在 12% 左右^[4-5]。结合本例患者进行硫唑嘌呤片致感染风险因素分析:

其一, 免疫抑制使患者易感染风险增加, 接受硫唑嘌呤片单独治疗或与其他免疫抑制剂 (如激素) 联合用药时, 会使患者位于较高的免疫抑制状态, 导致免疫力下降, 易感染性增加^[6-7], 本例患者服用硫唑嘌呤片使其处于较高的免疫抑制状态。其二, 骨髓抑制是致感染的另一主要因素, 患者化疗致骨髓抑制时, 白细胞、粒细胞数值呈进行性下降, 伴随白细胞、粒细胞严重减少, 机

表 2 诺氏药物不良反应评估量表

指标	问题分值			该病例得分情况分析
	是	否	未知	
1. 该 ADR 先前是否有结论性报告?	+ 1	0	0	+ 1
2. 该 ADR 是否在使用可疑药物后发生的?	+ 2	- 1	0	+ 2
3. 该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂后得到缓解?	+ 1	0	0	+ 1
4. 该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现?	+ 2	- 1	0	+ 0
5. 是否存在其他原因能单独引起该 ADR?	- 1	+ 2	0	+ 2
6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现?	- 1	+ 1	0	+ 0
7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度?	+ 1	0	0	+ 0
8. 该 ADR 是否随剂量增加而加重, 或随剂量减少而缓解?	+ 1	0	0	+ 0
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现过类似反应?	+ 1	0	0	+ 0
10. 是否存在任何客观证据证实该反应?	+ 1	0	0	+ 1
总分值				7 分

体防御能力降低, 极易发生不同部位感染^[8], 回顾 A 类文献 13 例死亡病例中, 血液系统损害致感染引发死亡 7 例^[9]。本例患者硫唑嘌呤片使用 38 d 后血细胞下降至 $WBC\ 0.5 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 、 $NEUT\ 0 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 机体防御能力下降, 引发肺部感染。其三, 患者本身潜在感染因子(如细菌、真菌、病毒、肝炎等)再激活使患者易感性增加, 国家药品监督管理局在《药物警戒快讯》(总第 135 期)发布: 硫唑嘌呤片巨细胞病毒再激活风险, 巨细胞病毒血症可致患者出现严重肺炎和嗜血细胞综合征; Pan 等^[10]曾发现入院前获得潜伏性肺隐球菌感染患者使用硫唑嘌呤 3 个月后胸部 CT 发现孤立性肺结节, 组织病理学检查结果及血清隐球菌抗原滴度阳性(1:8), 提示肺隐球菌病。

感染与严重骨髓抑制是硫唑嘌呤片相关死亡报告事件中主要相关因素^[11], 为降低用药风险, 根据上述致感染因素可采取: 硫唑嘌呤片使用前, 用巴氏涂片法筛查人乳头瘤病毒, 用血清学方法筛查肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒等, 根据情况进行疫苗接种或抗病毒治疗等, 使患者尽可能避免潜在感染因子^[12]; 定期血常规检测, 根据各血细胞变化趋势及时调整硫唑嘌呤片剂量, 当 WBC 低于 $3.0 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 应立即停用^[2], 必要时用重组人粒细胞刺激因子注射液、注射用重组人白介素-11 升血细胞。

综上, 通过本例硫唑嘌呤致肺部感染的不良反应的案例分析, 建议硫唑嘌呤临床使用时应筛查潜在感染因子; 低剂量开始逐渐调整至维持剂量或根据血药浓度监测调整给药剂量^[13]; 用药过程中定期进行血常规检查; 密切关注身体变化情况, 发现头晕、发热、出血、感染等应及时停药并告知医师, 以便医师采取必要的纠正措施或对症治疗, 如感染时应暂停使用, 通过细菌培养、毒素检测等手段确定感染类别, 并用敏感抗菌药物或抗真菌药物治疗^[14], 保障患者用药安全。

参考文献

- [1] 田普训, 敖建华, 李宁, 等. 器官移植免疫抑制剂临床应用技术规范(2019 版)[J]. 器官移植, 2019, 10(3): 213-226.
- [2] 常婷. 中国重症肌无力诊断和治疗指南(2020 版)[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2021, 28(1): 1-12.
- [3] 杨霞, 吴斌, 吴逢波. 基于 FAERS 挖掘硫唑嘌呤相关不良反应信号[J]. 中国药业, 2021, 30(10): 84-88.
- [4] Rossides M, Kullberg S, Di GD, et al. Infection risk in sarcoidosis patients treated with methotrexate compared to azathioprine: a retrospective "target trial" emulated with Swedish real-world data[J]. Respiriology, 2021, 26(5): 452-460.
- [5] Feldman CH, Marty FM, Winkelmayer WC, et al. Comparative rates of serious infections among patients with systemic lupus erythematosus receiving immunosuppressive medications[J]. Arthritis Rheumatol, 2017, 69(2): 387-397.
- [6] 朱有华, 闵志廉, 姚亚成, 等. 肾移植患者重症肺部感染的诊断与救治[J]. 中华器官移植杂志, 2001, 22(1): 14-16.
- [7] 周兴丽, 詹同英, 李薇. 硫唑嘌呤在皮肤科的应用[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2021, 37(11): 739-743.
- [8] 田劭丹, 董青, 祁烁, 等. 化疗后白细胞减少症中医药防治与评估专家共识[J]. 现代中医临床, 2018, 25(3): 1-6.
- [9] 杨霞, 肖敏, 吴斌, 等. 硫唑嘌呤不良反应文献分析[J]. 中国药业, 2020, 29(7): 134-137.
- [10] Pan WG, Chen BC, Li YF, et al. An unusual case of reactivated latent pulmonary cryptococcal infection in a patient after short-term steroid and azathioprine therapy: a case report[J]. BMC Pulmonary Med, 2021, 21(1): 76-76.
- [11] 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.
- [12] Kucharzik T, Ellul P, Greuter T, et al. ECCO guidelines on the prevention, diagnosis, and management of infections in inflammatory bowel disease[J]. Crohn's Disease and Colitis, 2021, 15(6): 879-913.
- [13] 郭玲, 罗雪梅. 硫唑嘌呤治疗炎症性肠病的疗效及骨髓抑制相关不良反应分析研究[J]. 中南药学, 2021, 19(1): 137-142.
- [14] 杨红, 冉志华, 刘玉兰, 等. 炎症性肠病合并机会性感染专家共识意见[J]. 中国实用内科杂志, 2017, 37(4): 303-316.

(收稿日期: 2022-07-06; 修回日期: 2022-09-06)

注射用己酮可可碱致过敏性休克 1 例并文献复习

宋菁菁, 周海英 (联勤保障部队第904医院苏州医疗区神经内科, 江苏 苏州 215007)

关键词: 注射用己酮可可碱; 过敏性休克; 不良反应

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2022)12-2957-02

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2022.12.044

1 病例介绍

患者, 女, 83 岁, 2022 年 1 月 15 日因“头晕、双下肢乏力 3 年余”入院。患者 3 年前无明显诱因出现头晕、四肢乏力, 此过程中无昏迷、恶心、呕吐等症状, 其他医院头颅 MRI 检查显示腔隙性脑梗死, 当时治疗后好转。现四肢乏力, 不能独立走路, 来我院继续治疗。入院时患者精神、睡眠佳, 饮食可, 大小便正常。既往无高血压、糖尿病和肝炎等病史、无药物过敏史但有海鲜过敏史。查体: 体温 (T) 36.4℃, 脉搏 (P) 83 次·min⁻¹, 呼吸频率 (R) 24 次·min⁻¹, 血压 (BP) 136/72 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa); 双肺未闻及明显干湿啰音, 心脏各瓣膜未闻及明显杂音, 无胸闷、气促等症。辅助检查: 头颅 MRI 显示两侧大脑对称, 中线结构居中; 大脑灰白质边界欠清, 双侧基底节区、放射冠区及半卵圆区可见斑点状低密度影, 双侧侧脑室周边见片状低密度影, 各脑室扩大, 脑沟及脑裂增宽, 局部脑回变小, 诊断为脑梗死后遗症。入院次日给予乳果糖口服溶液治疗便秘, 血府逐瘀口服液和注射用血栓通对症治疗。1 月 19 号 10:15 左右给予注射用己酮可可碱 (酒泉大得利制药股份有限公司, 批号: 01-210913) 100 mg + 0.9% 氯化钠注射液 250 mL ivgtt qd, 要求滴速不超过 2 mL·min⁻¹, 2~3 h 输完, 改善微循环。约 5 min 后, 患者出现气短、呼吸困难、胸闷、脸色发白等症状, 考虑为药物引起的过敏性休克, 立即停用注射用己酮可可碱。使用异丙嗪 25 mg 肌肉注射, 地塞米松 5 mg 静脉推注, 吸氧, 心电图监护: BP 86/57 mmHg, P 124 次·min⁻¹, R 31 次·min⁻¹, 心率 139 次·min⁻¹, 血氧饱和度下降至 89%。让患者平躺保持呼吸道畅通, 高流量面罩吸氧, 加快补液, 继续呋塞米注射液 20 mg 静脉推注, 肾上腺素 2 mg 静脉推注, 25 min 后,

患者的各项指标逐步恢复, BP 132/68 mmHg, P 93 次·min⁻¹, R 27 次·min⁻¹, 血氧饱和度维持在 94%~97%, 心电图正常。

2 讨论

2.1 注射用己酮可可碱与过敏性休克的关联性评价

患者入院后加用注射用己酮可可碱出现过敏性休克, 过敏性休克与注射用己酮可可碱的使用有明确的时间关联性。采用 Naranjo 药物不良反应评估量表^[1-2]对本例进行评估, 注射用己酮可可碱引起的过敏性休克得分 8 分, 结论为“很可能”(见表 1)。

2.2 文献检索资料及结果

中文检索 2002 年 1 月 1 日至 2022 年 1 月 1 日期间中国知网、万方医学和维普等数据库收录的文献, 以 (“注射用己酮可可碱”或“己酮可可碱”) 和 (“过敏性休克”或“过敏”或“休克”) 和/或 (“例”或“致”) 等为检索词。仅检索到 1 篇使用注射用己酮可可碱出现过敏性休克的报道^[3], 该文中患者为 55 岁男性, 给药途径与使用剂量与本文患者相同, 不良反应症状有面色发白、呼吸急促和血压下降等, 与本病例相似。英文检索 2002 年 1 月 1 日至 2022 年 1 月 1 日期间 PubMed 数据库收录的文献, 以 [(pentoxifylline) OR (PTX)] AND [(anaphylaxis) OR (shock) OR (allergy)] 等为检索词, 检索到 Carballada 等^[4]报道了一名 53 岁男性患者, 在使用注射用己酮可可碱 400 mg 后立即出现口咽瘙痒、打喷嚏和咳嗽异物感, 15~20 min 后, 头部和四肢出现严重血管水肿和红斑, 伴有呼吸窘迫、咳嗽和呼吸困难, 使用激素和抗组胺药治疗后症状缓解。

2.3 过敏性休克的防治原则

过敏性休克可导致喉头或气道痉挛、水肿, 造成机体严重缺氧, 严重者可因呼吸循环衰竭而死亡^[5]。应对措施如下:

作者简介: 宋菁菁, 女, 主管护师, 主要从事老年患者的护理工作, email: 3475512187@qq.com * **通信作者:** 周海英, 女, 主管护师, 主要从事老年患者的护理工作及实习生的带教工作, email: 2992899646@qq.com

表 1 Naranjo 药物不良反应评估量表评分结果

相关问题	是	否	未知	评分依据
1. 该不良反应发生前是否有结论性报告	1			说明书提示偶然情况下有发生过过敏性休克报道
2. 本不良反应是否发生于可疑药物使用后	2			过敏性休克不良反应是在使用注射用己酮可可碱之后
3. 停用该药物或应用拮抗药后不良反应是否改善	1			停药并对症治疗不良反应消失
4. 重新用药后该不良反应是否重新出现			0	没有再次使用注射用己酮可可碱
5. 是否存在其他原因引起不良反应		2		患者入院无此类不良反应, 且使用注射用己酮可可碱之前使用了 3 种药物达 3 d, 未出现任何异常
6. 应用安慰剂后该不良反应是否再次出现		1		停药后患者继续使用其他所有药物未出现类似症状
7. 血药浓度是否达到中毒浓度		0		注射用己酮可可碱使用常规剂量, 未达到中毒浓度
8. 增加或减少药物剂量不良反应是否随之增强或减弱			0	药物剂量未发生变化
9. 患者既往应用同样或类似药物是否出现过类似反应			0	患者既往未应用同样或类似药物
10. 不良反应是否有客观依据证实	1			不良反应有相关客观检查指标予以确认
得分	8 分			

① 源头上减少过敏性休克的发生, 询问过敏史, 避免使用有过敏史的同类药品; 严格按照说明书选择合适的溶媒、浓度和输液速度; 认真阅读说明书注意事项和不良反应。

② 及时发现, 预先告知患者可能发生不良反应的症状, 如有异常及时告知医务人员; 护士加强巡视、观察和询问, 在输液、巡床的过程中如发现患者异常情况应立即通知医师鉴别诊断。在不能肯定的时候, 可用肾上腺素 0.3 mg (安全剂量) 皮下注射, 如果患者症状迅速缓解, 就证实为药物引起的变态反应^[6]。

③ 积极抢救, 一旦发生过敏性休克, 应立即停止可疑药物, 采用扩容、吸氧、心电监护, 使用地塞米松、肾上腺素等药品, 必要时行气管插管、电除颤等治疗手段。

3 小结

己酮可可碱是一种磷酸二酯酶抑制剂, 具有抗炎和抗氧化、抑制炎症递质产生、改善微循环、阻止血小板聚集、提升记忆等功能, 主要用于改善脑梗死后脑循环及治疗周围血管病^[7-9]。常见的不良反应有恶心、头晕、消化不良等, 较少见的不良反应表现在心血管系统如血压下降、水肿, 神经系统如焦虑、抑郁等。

己酮可可碱发生过敏性休克机制暂不清楚, 临床也不常见, 相关报道也极少, 但却可能危及生命, 需要足够重视。使用之前需认真查阅说明书: 用药时要求患者平卧位, 最大滴速不可超过 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 最大剂量每日不得超过 400 mg 等。为了应对突发状况, 有必要准备好抢救药品和急救器械。临床药师要定期给医师和护士宣讲药品

知识, 帮助其提高鉴别不良反应的能力; 医师和护士要注重演练与考核相结合, 强化抢救药物的合理使用和设备操作流程规范。

参考文献

- [1] 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]. 中国药理学杂志, 2012, 47(8): 650-652.
- [2] 陈静静, 钱佩佩, 曹凯, 等. 我国药品不良反应关联性评价方法与诺氏评估量表法的对比与分析[J]. 中国药事, 2020, 34(8): 988-992.
- [3] 钟淑娟. 静脉滴注己酮可可碱致过敏性休克 1 例[J]. 中国现代应用药学, 2004, 21(3): 229-229.
- [4] Carballada F, Guitian L, Nunez R, et al. Due to pentoxifylline[J]. J Invest Allerg Clin, 2014, 24(6): 457-458.
- [5] 华素, 庞立峰, 李灵红, 等. 1 例异甘草酸镁注射液致过敏性休克的病例报道与分析[J]. 中南药学, 2019, 17(6): 968-970.
- [6] 靳会欣, 王冕, 赵雪平, 等. 静脉滴注盐酸赖氨酸致过敏性休克 1 例[J]. 中南药学, 2021, 19(4): 786-788.
- [7] El-Sadek HM, Al-Shorbagy MY, Awny MM, et al. Pentoxifylline treatment alleviates kidney ischemia/reperfusion injury: novel involvement of galectin-3 and ASK-1/JNK&ERK1/2/NF-kB/HMGB1 trajectories[J]. J Pharmacol Sci, 2021, 7(9): 520-522.
- [8] Sma B, Kp A, Scbg C. Quantitative simultaneous determination of pentoxifylline and paracetamol in drug and biological samples at graphene nanoflakes modified electrode[J]. J Taiwan Inst Chem Eng, 2020, 107(7): 15-23.
- [9] 王少颖, 王莉迪, 李净兵, 等. 基于脑血流量探讨己酮可可碱对非痴呆型血管性认知功能障碍患者认知功能障碍的改善作用[J]. 中国医院用药评价与分析, 2021, 21(12): 1453-1455, 1463.

(收稿日期: 2022-02-05; 修回日期: 2022-05-08)