



中南药 学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊 2003年4月创刊 第21卷 第2期(总第205期) 2023年2月20日出版

目 次

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>

email: 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

2023 年版权 归《中南药 学》

编辑部所有

研究论文

- (279) 重楼皂苷 II 诱导黑色素瘤细胞 B16F10 铁死亡的作用研究
..... 陈馨, 刘霞霞, 王文君, 等
- (285) 沙蟾毒精通过 Nrf2-HO-1/SLC7A11 途径诱导人胃癌 SGC-7901 细胞铁死亡
..... 王文君, 刘霞霞, 陈馨, 等
- (291) 芦荟大黄素通过激活 Caspase-3/GSDME 焦亡通路发挥抗胶质瘤作用
..... 方兴刚, 汪嫄, 陈卓, 等
- (298) 基于 UPLC-QTOF/MS 的关黄母颗粒主要化学成分及脑组织移行成分研究
..... 彭秘, 张增珠, 李刚, 等
- (306) 甘草次酸介导的马钱子碱自组装纳米粒的体内药动力学研究
..... 管庆霞, 周小影, 刘宇萌, 等
- (312) 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的不同产地肺形草化学成分的研究
..... 张忠立, 石文康, 左月明, 等
- (320) 裂叶独活精油成分分析及其对 HaCat 细胞辐射损伤的保护作用
..... 向汝群, 朱根华, 严志宏, 等
- (328) 一种植物酵素 / 蜂王浆混合物的抗氧化及免疫调节活性研究
..... 杨翠婷, 周晴, 屈青松, 等
- (334) 基于 miRNA 高通量测序探讨芪玄抑甲宁改善格雷夫斯病小鼠甲状腺功能亢进的作用机制
..... 高长久, 卢芳, 柳长凤, 等
- (342) 基于网络药理学和 UPLC-Q-TOF/MS 结合动物实验探究薯蓣预防急性肝损伤的作用机制
..... 王超, 付瑞嘉, 左倩, 等
- (351) 酒黄精总黄酮提取工艺及其抗氧化作用研究
..... 薛妙, 郭凯丽, 袁盼盼, 等
- (357) Box-Behnken 设计 - 响应面法优化经典名方散偏汤的提取工艺
..... 孙萌, 刘雪纯, 赵玥瑛, 等
- (363) 益气活血通便颗粒成型工艺研究
..... 权起元, 陈飞, 王本欢, 等
- (369) 基于 Box-Behnken 响应面法优化紫苏叶挥发油提取工艺的研究
..... 陶晓倩, 张强, 付慧敏, 等
- (375) 磷霉素氨基葡萄糖盐 β -CD 包合物的制备与研究
..... 张尹萌, 马强, 金学平, 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

- (380) 载体-抑晶剂多元体系过饱和环孢素固体分散体的制备及体外溶出研究 程伟康, 郑华, 郝贵周, 等
- (386) 芹菜素纳米胶束的制备工艺优化及质量评价 刘雄英, 于恩江, 典成阳, 等
- (392) 克班宁对肝癌细胞增殖和凋亡的影响 谭佳杰, 向玉玲, 熊远果, 等
- (398) 基于加权基因共表达网络分析建立结肠腺癌预后风险模型以及关键基因药物敏感性分析 黎蕴琪, 蒋利和, 陈闯
- (407) 半边旗二萜化合物 5F 对人结直肠癌细胞增殖、凋亡和自噬的影响 罗梦花, 陈佩文, 陈志红, 等
- (413) 新型 4-三氟甲基-6-甲氧基喹啉-2-胺衍生物的合成及抗肿瘤活性研究 李成, 吕梦凡, 余佳, 等
- (421) 醋酸亮丙瑞林聚乳酸-羟基乙酸共聚物微球的处方优化及评价 郭玉贤, 刘磊, 郑明秀, 等
- (427) 通俗环毛蚓、参环毛蚓、赤子爱胜蚓的分子鉴定及纤溶、抗凝活性对比 杨麒麟, 马楹楠, 杨万青, 等
- (432) LC-MS/MS 法测定人血浆中比阿培南浓度 钱亚芳, 杨旭萍, 蒋艳, 等
- (437) 藏药石榴健胃丸(片、散)质量标准提升研究 拜礼文, 焦兴苹, 谭金华, 等
- (442) 基于 UPLC-Q-Exactive-MS 技术鉴定蒙药葶苈的化学成分 张弘, 张慧文, 张晨, 等
- (449) 共载姜黄素与阿霉素胶束的制备工艺优化及体外抗肿瘤评价 李芳婵, 韦志英, 罗小莉, 等
- ## 综述
- (456) 黄芩素对糖尿病心肌病保护作用的机制研究及临床应用进展 孙玉凤, 葛卓琦, 白雪, 等
- (462) 五味子防治阿尔茨海默病的作用机制研究进展 沈昆双, 孔玲, 闫广利, 等
- (470) 帕金森病分期治疗的中西医研究进展 李智智, 姜媛, 路小伟, 等
- (477) 多准则决策分析在药品管理领域中的应用研究进展 潘欢妍, 蔡俊, 王倩, 等
- (481) III 型代谢型谷氨酸受体在痛觉调控中的作用 王静, 高进贤, 高珩, 等
- (488) 纳美芬辅助治疗颅脑损伤意识障碍的研究进展 吴光铭, 许德荣, 黄艳, 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 倩
陈 璐 陈国宁 陈富超 罗 聪
金 锐 周志旭 赵 亮 赵 娣
胡 楠 姜 雷 贾王平 徐 硕
徐文峰 郭海彪 黄 芳 梅升辉
龚力民 梁光平 寇龙发 蒋跃平
蒋德旗 韩立峰 韩晓芳 韩晓鹏
程汝滨 舒 畅 曾贵荣 蒙光义
廖德华 潘 昊 魏 博

编辑: 邬志娟 彭金飞 李 科
陆窈窈

本刊声明:

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

除非特别声明,本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点。

(493) 经典名方黄连膏的古今文献研究 朱艳华, 王玮莹, 高曦

药物分析与检验

- (497) 一测多评法同时测定艾叶配方颗粒中 6 个酚酸类成分
..... 王瑜婷, 邝敏, 何荣荣, 等
- (503) 基于高效液相色谱法测定不同产地、不同抽芯程度远志药材中 4 种成分的含量 洪占梅, 熊晓莉, 肖俊萍, 等
- (508) 人参鲜品中农药残留评价研究 谭乐俊, 林林, 梅桂雪, 等
- (515) 青皮的高效液相特征图谱和 5 个黄酮类成分含量测定
..... 肖小春, 何小芳, 张英, 等
- (520) 桑菊感冒颗粒质量标准完善研究
..... 董秋香, 张月寒, 刘翀, 等

医院药学

- (526) 基于数据挖掘探讨胆南星成药的配伍规律及应用特点
..... 武旭, 王晶, 邹婷, 等
- (531) 口服剂型中成药治疗小儿消化系统疾病的核心处方挖掘
..... 师玥, 吴力群, 张韵清
- (537) 华法林 - 胺碘酮药物相互作用与肾功能关系的研究
..... 杨华蓉, 周伯庭
- (543) 吸气峰流速仪在干粉吸入剂使用方法宣教中的应用
..... 蔡永桥, 李静婷, 强音, 等

药品不良反应

- (547) 信迪利单抗致甲状腺功能减退和糖尿病酮症酸中毒 1 例
..... 刘维峰, 白笑梅, 杨晓宇, 等
- (551) 超说明书使用氟尿嘧啶致严重口腔溃疡、IV 度骨髓抑制 1 例
..... 高羽, 张睿, 陈旭, 等
- (554) 卡瑞利珠单抗引起肾上腺皮质功能减退 1 例
..... 郭紫云, 陈子颖, 陈立伟

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*278*zh*P*25.0*46*2023-2

本期责任编辑: 陆窈窈, 彭金飞, 邬志娟, 李科

英文编辑: 周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 21, Number 2 February 20 2023

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

- (279) Ferroptosis in melanoma cells B16F10 induced by polyphyllin II
..... CHEN Xin, LIU Xia-xia, WANG Wen-jun, et al
- (285) Arenobufagin induces the ferroptosis in human gastric cancer cell line
SGC-7901 through Nrf2-HO-1/SLC7A11 pathway
..... WANG Wen-jun, LIU Xia-xia, CHEN Xin, et al
- (291) Aloe-emodin suppresses glioblastoma by activating Caspase-3/GSDME
pyroptosis pathway
..... FANG Xing-gang, WANG Man, CHEN Zhuo, et al
- (298) Main chemical constituents and brain tissue migration components of
Guanhuangmu granules based on UPLC-QTOF/MS
..... PENG Mi, ZHANG Zeng-zhu, LI Gang, et al
- (306) In vivo pharmacokinetics of brucine self-assembled nanoparticles mediated
by glycyrrhetic acid
..... GUAN Qing-xia, ZHOU Xiao-ying, LIU Yu-meng, et al
- (312) Chemical constituents in *Tripterospermum chinense* from different regions
based on UPLC-Q-TOF-MS
..... ZHANG Zhong-li, SHI Wen-kang, ZUO Yue-ming, et al
- (320) Component analysis of essential oil of *Heracleum millefolium* and its
protective effect on radiation damage in HaCaT cells
..... XIANG Ru-qun, ZHU Gen-hua, YAN Zhi-hong, et al
- (328) Antioxidant and immunomodulatory activity of a plant enzyme/royal jelly
mixture YANG Cui-ting, ZHOU Qing, QU Qing-song, et al
- (334) Mechanism of action of Qixuan Yijianing in improving hyperthyroidism
in mice with Graves disease based on miRNA high-throughput sequencing
..... GAO Chang-jiu, LU Fang, LIU Chang-feng, et al
- (342) Mechanism of action of *Achillea alpina* L. in the prevention of acute liver
injury based on UPLC-Q-TOF/MS combined with network pharmacolo-
gy and animal experiments
..... WANG Chao, FU Rui-jia, ZUO Qian, et al
- (351) Extraction optimization and antioxidant activities of total flavonoid from
alcoholic polygonatum
..... XUE Miao, GUO Kai-li, YUAN Pan-pan, et al
- (357) Optimization of extraction of Sanpian decoction by Box-Behnken design-re-
sponse surface methodology
..... SUN Meng, LIU Xue-chun, ZHAO Yue-ying, et al
- (363) Optimization of the molding process of Yiqi Huoxue Tongbian granules
..... QUAN Qi-yuan, CHEN Fei, WANG Ben-huan, 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 2023 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.

- (369) **Optimization of extraction of volatile oil from perillae folium based on Box-Behnken response surface methodology**
..... TAO Xiao-qian, ZHANG Qiang, FU Hui-min, et al
- (375) **Preparation and study of fosfomycin glucosamine salt β -CD inclusion complex**
..... ZHANG Yin-meng, MA Qiang, JIN Xue-ping, et al
- (380) **Preparation and in vitro dissolution of supersaturated CsA solid dispersion of carrier-crystal inhibitor multi-component system**
..... CHENG Wei-kang, ZHENG Hua, HAO Gui-zhou, et al
- (386) **Preparation optimization and quality evaluation of apigenin-loaded soluplus nanomicelles**
..... LIU Xiong-ying, YU En-jiang, DIAN Cheng-yang, et al
- (392) **Effect of crebanine on the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells**
..... TAN Jia-jie, XIANG Yu-ling, XIONG Yuan-guo, et al
- (398) **Establishment of colon adenocarcinoma prognostic risk model and key genes drug sensitivity analysis based on weighted gene co-expression network** LI Yun-qi, JIANG Li-he, CHEN Chuang
- (407) **Effect of 5F on the proliferation, apoptosis and autophagy of colorectal cancer cells**
..... LUO Meng-hua, CHEN Pei-wen, CHEN Zhi-hong, et al
- (413) **Synthesis and anti tumor activity of novel 6-methoxy-4-trifluoromethyl-quinolin-2-amine derivatives**
..... LI Cheng, LV Meng-fan, YU Jia, et al
- (421) **Prescription optimization and evaluation of leuprolide acetate PLGA microspheres**..... GUO Yu-xian, LIU Lei, ZHENG Ming-xiu, et al
- (427) **Molecular identification and comparison of anticoagulant activity and fibrinolytic activity of *Pheretima vulgaris*, *Pheretima aspergillum* and *Eisenia foetida*** YANG Qi-lin, MA Yun-nan, YANG Wan-qing, et al
- (432) **Determination of concentration of biapenem in human plasma by LC-MS/MS** QIAN Ya-fang, YANG Xu-ping, JIANG Yan, et al
- (437) **Quality standard improvement of Tibetan Shiliu Jianwei pills (tablets or powder)** BAI Li-wen, JIAO Xing-ping, TAN Jin-hua, et al
- (442) **Identification of chemical components in *Piperlongum* L. by UPLC-Q-Ex-active-MS**
..... ZHANG Hong, ZHANG Hui-wen, ZHANG Chen, et al
- (449) **Optimization of preparation and in vitro anti-tumor evaluation of CUR/DOX micelles** LI Fang-chan, WEI Zhi-ying, LUO Xiao-li, et al
- (456) **Protective mechanism of baicalein on diabetic cardiomyopathy and prospective clinical application**
..... SUN Yu-feng, GE Zhuo-qi, BAI Xue, et al
- (462) **Research progress in the mechanism of Schisandra chinensis in preventing and treating Alzheimer's disease**
..... SHEN Kun-shuang, KONG Ling, YAN Guang-li, et al
- (471) **Research progress in traditional Chinese medicine and western medicine for Parkinson's disease in various stages**
..... LI Zhi-zhi, JIANG Yuan, LU Xiao-wei, et al
- (477) **Research progress in application of multi-criteria decision analysis in drug management** PAN Huan-yan, CAI Jun, WANG Qian, et al

- (481) **Role of group III metabotropic glutamate receptors in pain modulation**
..... *WANG Jing, GAO Jin-xian, GAO Bei, et al*
- (488) **Advances in nalmefene assisted treatment of disorders of consciousness due to craniocerebral injury**
..... *WU Guang-ming, XU De-rong, HUANG Yan, et al*
- (497) **Simultaneous determination of 6 phenolic acids in Artemisiae Argyi Folium formula granules by QAMS**
..... *WANG Yu-ting, KUANG Min, HE Rong-rong, et al*
- (503) **HPLC determination of 4 components in *Polygala tenuifolia* from different habitats with different core pulling degrees**
..... *HONG Zhan-mei, XIONG Xiao-li, XIAO Jun-ping, et al*
- (508) **Evaluation of pesticide residues in fresh ginseng**
..... *TAN Le-jun, LIN Lin, MEI Gui-xue, et al*
- (515) **HPLC specific chromatogram and quantitation of 5 components in *Citri reticulatae pericarpium viride***
..... *XIAO Xiao-chun, HE Xiao-fang, ZHANG Ying, et al*
- (520) **Quality standard of Sangju Ganmao granules**
..... *DONG Qiu-xiang, ZHANG Yue-han, LIU Chong, et al*
- (531) **Core prescriptions of Chinese patent medicines in oral dosages for digestive diseases in children via data mining**
..... *SHI Yue, WU Li-qun, ZHANG Yun-qing*
- (537) **Warfarin-amiodarone drug interaction and renal function**
..... *YANG Hua-rong, ZHOU Bo-ting*
- (543) **Application of In-check DIAL G16 in dry powder inhaler**
..... *CAI Yong-qiao, LI Jing-ting, QIANG Yin, et al*

研究论文

重楼皂苷 II 诱导黑色素瘤细胞 B16F10 铁死亡的作用研究

陈馨^{1, 2}, 刘霞霞^{1, 2}, 王文君^{1, 2}, 王萌^{1, 2}, 程卉^{1, 2*} (1.安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2.安徽中医药大学科研技术中心, 合肥 230038)

摘要: **目的** 探讨重楼皂苷 II 对黑色素瘤细胞 B16F10 的抑制作用及可能的作用机制。**方法** 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法检测不同浓度的重楼皂苷 II 对黑色素瘤细胞 B16F10 的抑制作用; 透射电镜 (TEM) 观察细胞线粒体结构的变化; 流式细胞仪检测活性氧 (ROS) 的变化; 试剂盒检测铁死亡相关指标丙二醛 (MDA) 的含量、超氧化物歧化酶 (SOD) 的含量、铁 (Fe) 的含量及谷胱甘肽 (GSH) 的水平; Western blot 法检测铁死亡相关蛋白的表达变化。**结果** 与空白组相比, 重楼皂苷 II 处理后 B16F10 细胞的活性显著降低, 具有剂量和时间依赖性。TEM 可以观察到重楼皂苷 II 处理后 B16F10 细胞中线粒体结构发生皱缩变小以及膜密度增加的变化。重楼皂苷 II 作用后 ROS 的水平、MDA 和 Fe 的含量提高, SOD 的含量和 GSH 的水平降低。除此之外, 重楼皂苷 II 可以抑制黑色素瘤细胞 B16F10 中 GPX4、FTH-1、SLC7A11 蛋白的表达水平而促进 P53、ACSL4 蛋白的表达水平。**结论** 重楼皂苷 II 可以抑制黑色素瘤细胞 B16F10 增殖, 其可能与诱导细胞发生铁死亡有关。

关键词: 黑色素瘤; 重楼皂苷 II; 铁死亡

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0279-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.001

Ferroptosis in melanoma cells B16F10 induced by polyphyllin II

CHEN Xin^{1, 2}, LIU Xia-xia^{1, 2}, WANG Wen-jun^{1, 2}, WANG Meng^{1, 2}, CHENG Hui^{1, 2*} (1.School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Research and Technology Center, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038)

Abstract: Objective To determine the inhibitory effect of polyphyllin II (PP II) on melanoma B16F10 cells and possible mechanism. **Methods** MTT assay was used to detect the inhibitory effect of different concentrations of polyphyllin II on melanoma cells B16F10. Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the changes of cell mitochondrial structure. Flow cytometry was used to detect the changes of reactive oxygen species (ROS). The ferroptosis-related indicators, including malondialdehyde (MDA) content, superoxide dismutase (SOD) content, iron (Fe) level and glutathione (GSH) level were detected by kits. Western blot was used to detect the changes of ferroptosis-related protein expression. **Results** Compared with the control group, the viability of B16F10 cells was significantly reduced after the polyphyllin II treatment in a dose- and time-dependent manner. Under the transmission electron microscope, it can be observed that the mitochondrial structure shrank and the cell membrane density increased in B16F10 cells after the polyphyllin II treatment. The ROS level and the content of MDA and Fe were increased, while the content of SOD and GSH was decreased after the polyphyllin II treatment. Polyphyllin II inhibited the expression levels of GPX4, FTH-1 and SLC7A11 proteins and promoted the expression level

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.81903859)。

作者简介: 陈馨, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药药理研究, email: 2020205225002@stu.ahtcm.edu.cn * **通信作者:** 程卉, 女, 副研究员, 主要从事中药药理研究, email: chenghuikyzyx@ahtcm.edu.cn

of P53 and ACSL4 protein in melanoma cells B16F10. **Conclusion** Polyphyllin II can inhibit the proliferation of melanoma cells B16F10 in mice, which may be related to the induction of ferroptosis.

Key words: malignant melanoma; polyphyllin II; ferroptosis

恶性黑色素瘤是由黑色素细胞恶性转化后形成的恶性肿瘤,其发病位置大多集中在皮肤表面,但有时也会在黏膜组织如眼脉络膜等其他身体部位发现^[1]。黑色素瘤的发展是一个动态的过程,容易发生转移形成血管瘤,具有高侵袭性,是皮肤病变中病死率最高的一种疾病,目前其发病率在全球范围内呈上升趋势^[2-5]。目前研究发现与铁死亡相关的细胞死亡途径对于黑色素瘤的调节具有关键作用,与未处理的细胞相比,铁死亡抑制剂预处理细胞后会导致黑色素瘤细胞发生更多转移^[6]。这表明新的黑色素瘤的治疗方法的开发可以从参与铁死亡调节的靶点入手。

铁死亡是最近发现的一种调控细胞死亡形式。其形态学特征是存在比正常线粒体更小的线粒体,线粒体膜密度浓缩,线粒体嵴减少或消失,外线粒体膜破裂。而影响铁死亡的因素有亚铁、活性氧(ROS)和谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)^[7]。在形态学、生化和遗传水平上,铁死亡与其他调控细胞死亡的形式不同。研究表明,人类和动物的多种生理条件和病理应激均可引发铁死亡^[8]。

重楼为合科植物云南重楼 *Paris polyphylla* Smithvar. *Yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz. 或七叶一枝花 *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara 的干燥根茎^[9],是一种常用中药,至今有两千多年的用药历史,性苦,微寒,具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊的功效。其化学成分主要有甾体皂苷类、胡萝卜苷、氨基酸类的有效成分等,其中重楼皂苷II是重楼主要有效成分之一。据报道,重楼皂苷II在肺癌、膀胱癌、卵巢癌、黑色素瘤等癌症中均表现出较好的抗肿瘤特性^[10-14]。本实验旨在研究重楼皂苷II抑制黑色素瘤的增殖,并探讨其抑制黑色素瘤 B16F10 细胞增殖是否通过诱导肿瘤细胞铁死亡来介导。

1 材料

1.1 细胞株

黑色素瘤细胞 B16F10 (中国科学院细胞库)。

1.2 试剂

重楼皂苷II (纯度 91.4%, 中国食品药品检定研究院)。胎牛血清 (上海道鹏生物科技有限公司); Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-

1640) 培养基 (武汉塞维尔生物科技有限公司); 青霉素-链霉素溶液、ROS 试剂盒、BCA 蛋白浓度试剂盒、一抗稀释液 (碧云天生物技术有限公司); 丙二醛 (MDA) 试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒、谷胱甘肽 (GSH) 试剂盒、Fe 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); β -肌动蛋白 (β -actin, 成都正能生物技术有限责任公司); 谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4, 美国 Cell Signaling Technology 公司); 溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11) 重组蛋白、重组人铁蛋白重链 1 (FTH-1) (江苏亲科生物研究中心有限公司); 酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (ACSL4) 重组蛋白 (美国 abcam 公司); 肿瘤蛋白 53 (P53)、山羊抗兔的 IgG-HRP 标记 (成都正能生物技术有限责任公司); ECL 化学发光底物试剂盒 (北京 biosharp 公司)。

1.3 仪器

CO₂ 培养箱 (美墨尔特贸易有限公司); 全波段多功能酶标仪 iD3 (美国 MD 公司); 流式细胞仪 FC500 (美国 BECKMAN 公司); 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); 透射电子显微镜 HITACHI-600 (日本日立公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

细胞在含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 RPMI-1640 培养基中培养,并且置于 37 °C, 5%CO₂ 的培养箱中培养。每日更换培养基,取对数生长细胞,用于后续实验。

2.2 MTT 法检测细胞活力

将黑色素瘤细胞 B16F10 以每孔 5×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔板,待细胞汇合度达到 70% ~ 80% 后分别用 0、1、2、4、8、16、32 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的重楼皂苷II 处理后培养 24 h 和 48 h,采用 MTT 法检测细胞存活率,在每孔中加入 MTT (终质量浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 后将细胞放置于 37 °C 恒温培养箱中孵育 4 h。吸弃旧培养基后加入二甲基亚砷溶解细胞中的甲瓩,并在摇床上震荡 10 min。最后,在 570 nm 处检测 OD 值。

2.3 透射电镜 (TEM) 观察线粒体结构

取对数生长期的 B16F10 细胞,将细胞以 2×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度接种于 100 mm 培养皿中

培养,待细胞汇合度达到 70%~80%后,分别用 0、2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的重楼皂苷 II 处理后培养 24 h 后,收集细胞,离心去上清液 (4500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min);用电镜固定液 (2.5%戊二醛)于 4℃固定 24 h,四氧化钨固定细胞 25 min 以上,然后不同浓度的乙醇溶液将细胞团块梯度脱水并包埋于环氧树脂中,使用电镜专用切片机制成电镜切片;醋酸双氧铀染色后再用醋酸铅染色,于透射电子显微镜下观察细胞并摄片。

2.4 流式细胞仪检测 ROS 含量

取对数生长期的 B16F10 细胞,将细胞以 2×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的密度接种于 6 孔板,待细胞汇合度达到 70%~80%后,分别用 0、1、2、4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的重楼皂苷 II 处理后培养 24 h。弃去旧培养基,加入用无血清培养液稀释的 DCFH-DA 探针,于 37℃细胞培养箱中孵育 20 min 后消化收集细胞于流式细胞仪上机检测。实验数据通过 FlowJo_V10 软件进行分析。

2.5 MDA 含量的检测

取对数生长期的 B16F10 细胞,将细胞以 2×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的密度接种于 6 孔板,待细胞汇合度达到 70%~80%后,分别用 0、1、2、4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的重楼皂苷 II 处理后培养 24 h。在冰上消化收集细胞,超声破碎细胞后,根据 MDA 试剂盒说明书进行操作。每组设 3 个复孔,使用酶标仪在 532 nm 处测量吸光度 A 。

2.6 SOD 含量的检测

取对数生长期的 B16F10 细胞,将细胞以 2×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的密度接种于 6 孔板,待细胞汇合度达到 70%~80%后,分别用 0、1、2、4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的重楼皂苷 II 处理后培养 24 h。在冰上消化收集细胞,超声破碎细胞后,根据 SOD 试剂盒说明书进行操作。每组设 3 个复孔,使用酶标仪在 450 nm 处测量吸光度 A 。

2.7 GSH 含量的检测

取对数生长期的 B16F10 细胞,将细胞以 2×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的密度接种于 6 孔板,待细胞汇合度达到 70%~80%后,分别用 0、1、2、4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的重楼皂苷 II 处理后培养 24 h。在冰上消化收集细胞,超声破碎细胞后离心取上清液 (3500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min),根据 GSH 试剂盒说明书进行操作。每组设 3 个复孔,使用酶标仪在 405 nm 处测量 OD 值。

2.8 Fe 含量的检测

取对数生长期的 B16F10 细胞,将细胞以 2×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的密度接种于 6 孔板,待细胞汇合度达到 70%~80%后,分别用 0、1、2、4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的重楼皂苷 II 处理后培养 24 h。在冰上消化收集细胞,超声破碎细胞后离心取上清液 (2500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min),根据 Fe 试剂盒说明书进行操作。每组设 3 个复孔,使用酶标仪在 520 nm 处测量吸光度 A 。

2.9 Western blot 检测相关蛋白表达

取对数生长期的 B16F10 细胞,将细胞以 2×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的密度接种于 100 mm 培养皿中培养,待细胞汇合度达到 70%~80%后,用 0、1、2、4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的重楼皂苷 II 处理后培养 24 h。在冰上消化收集细胞,用含有磷酸酶抑制剂的蛋白裂解液超声提取蛋白。采用 BCA 蛋白测定法测定蛋白含量。加入 10% SDS-PAGE 处理蛋白质,加热变性后,得到蛋白质样品。根据蛋白质的分子量的不同使用特定的电压来分离蛋白质,分离的蛋白质转移到硝化纤维素滤膜上,在 5% 的脱脂牛奶中封膜,然后一抗 4℃孵育过夜。主要抗体及稀释比: β -actin (1:1000); GPX4 (1:1000); SLC7A11 (1:1000); FTH-1 (1:1000); P53 (1:1000); ACSL4 (1:1000)。最后,用含有 1% Tween-20 的 Tris 缓冲盐溶液冲洗 3 遍膜,在二抗 (1:10 000) 中室温孵育 2 h。使用 ECL 试剂盒显色在凝胶分析系统进行检测,使用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值,计算目的蛋白相对表达量。

2.10 统计学分析

所有数据均采用 GraphPad Prism 7 软件进行处理,数据以平均值 \pm 标准差表示,多组均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 重楼皂苷 II 对黑色素瘤 B16F10 细胞的抑制作用

MTT 结果表明,与空白组比较, B16F10 细胞存活率随着重楼皂苷 II 作用剂量的增大和时间的延长而降低 ($P < 0.01$, 见图 1)。重楼皂苷 II 作用于黑色素瘤细胞 B16F10 24 h 和 48 h 后的 IC_{50} 值分别为 (1.568 \pm 0.219)、(1.293 \pm 0.199) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 综合考虑以 1、2、4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为后续实验重楼皂苷 II 的低、中、高剂量。

3.2 重楼皂苷 II 对黑色素瘤 B16F10 细胞中线粒体结构的影响

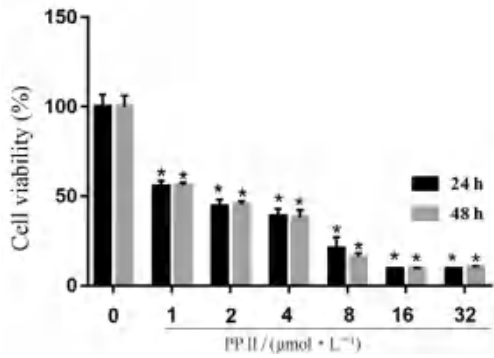


图1 重楼皂苷 II 对 B16F10 细胞活力的影响
Fig 1 Effect of polyphyllin II on the viability of B16F10 cells
注: 与同时间段的空白组相比, **P* < 0.01。

Note: Compared with the blank group in the same time period, **P* < 0.01.

透射电镜观察 B16F10 细胞线粒体的形态和微观结构发现, 空白组细胞的细胞核形态完整, 细胞核膜明显, 线粒体结构清晰; 重楼皂苷 II (2 μmol · L⁻¹) 作用细胞后, 细胞核形态不完整, 细胞核的核膜破裂, 线粒体明显皱缩变小, 线粒体的膜密度明显增加 (见图 2), 这些都是细胞发生铁死亡的重要特征。

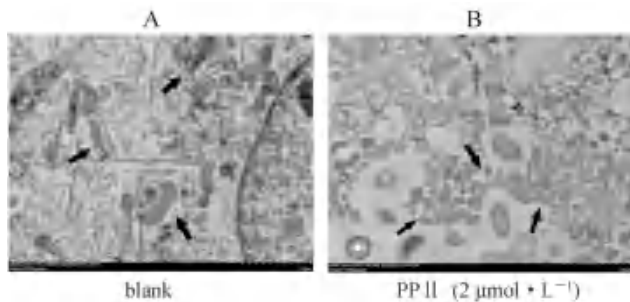


图2 透射电镜下 B16F10 细胞线粒体的结构 (×4000)
Fig 2 Structure of mitochondria in B16F10 cells observed under transmission electron microscope (×4000)

3.3 重楼皂苷 II 对黑色素瘤 B16F10 细胞 ROS 的影响

结果显示, ROS 随着重楼皂苷 II 给药浓度的增加在 B16F10 细胞中不断积累, 与空白组相比, ROS 的含量显著上升, 且具有剂量依赖性 (见图 3)。

3.4 重楼皂苷 II 对黑色素瘤 B16F10 细胞 MDA、SOD、GSH 和 Fe 含量的影响

结果显示 MDA 和 Fe 的含量随着重楼皂苷 II 给药浓度的增大而升高, 与空白组比较, 中、高剂量组差异均具有统计学意义 (*P* < 0.05, *P* < 0.01); SOD 和 GSH 的含量随着重楼皂苷 II 给药浓度的增大而显著降低, 与空白组比较, 中、高剂量组差异均具有统计学意义 (*P* < 0.05, *P* < 0.01) (见图 4)。

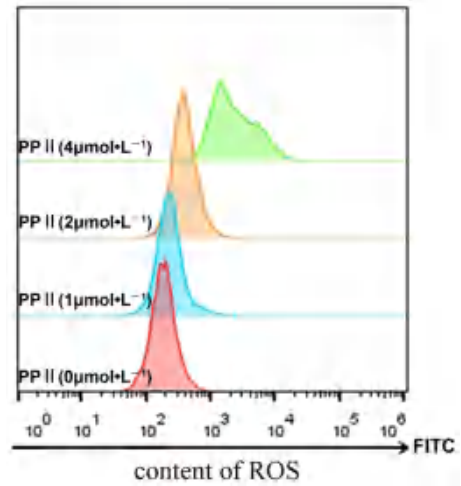


图3 重楼皂苷 II 对 B16F10 细胞 ROS 含量的影响
Fig 3 Effect of polyphyllin II on the ROS content of B16F10 cells

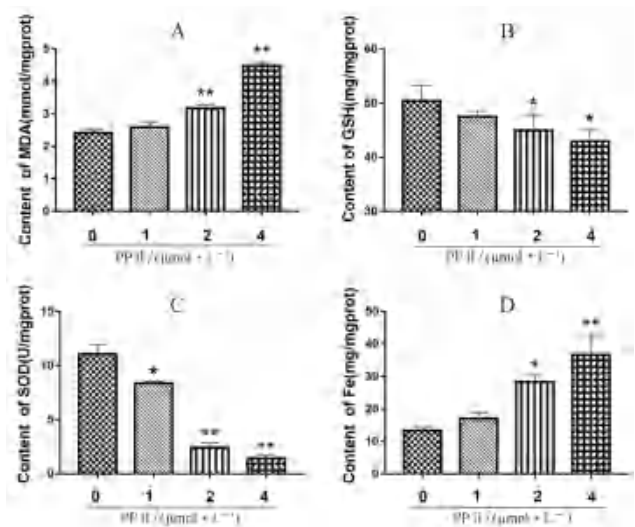


图4 重楼皂苷 II 对 B16F10 细胞中 MDA、SOD、GSH 和 Fe 含量的影响
Fig 4 Effect of polyphyllin II on the content of MDA, SOD, GSH and Fe in B16F10 cells

注: 与空白组相比, **P* < 0.05, ***P* < 0.01。
Note: Compared with the blank group, **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

3.5 重楼皂苷 II 对黑色素瘤 B16F10 细胞铁死亡相关蛋白的影响

与空白组比较, 铁死亡标志性蛋白 GPX4、FTH-1、SLC7A11 在重楼皂苷 II 作用于 B16F10 细胞后的表达水平呈下降趋势 (*P* < 0.05, *P* < 0.01), 且呈现剂量依赖性; 而 P53 和 ACSL4 在中、高剂量重楼皂苷 II 作用于 B16F10 细胞后的表达水平呈上升趋势 (*P* < 0.01) (见图 5)。

4 讨论

黑色素瘤是一种来源于皮肤表皮层中黑色素细胞的皮肤恶性肿瘤^[15], 作为一种侵袭性皮肤病, 皮肤恶性黑色素瘤导致的相关死亡在所有

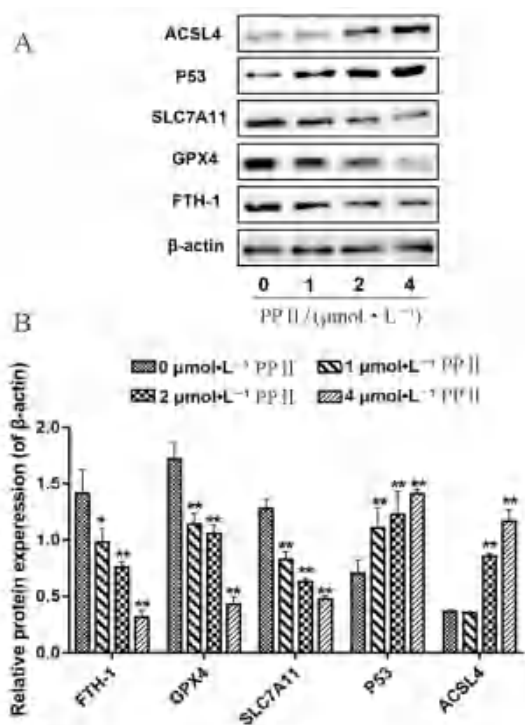


图 5 重楼皂苷 II 对 B16F10 细胞中铁死亡相关蛋白表达的影响
Fig 5 Effect of polyphyllin II on the expression of ferroptosis-related proteins in B16F10 cells

注：与空白组相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

皮肤癌中占 75% [3]，目前治疗黑色素瘤主要以手术切除为主，辅助放疗和免疫治疗，但治疗效果有限，亟待开发新的有效治疗手段 [16]。铁死亡是 Dixon 在 2012 年首次提出的一种新的细胞死亡方式 [17]。研究表明，铁死亡可能是由人类和动物的多种生理条件和病理应激引起的 [18]。目前铁死亡已经逐渐成为消除恶性细胞的关键特征之一，它通过去除环境中缺乏关键营养素或因感染或环境应激而受损的细胞，在抑制肿瘤发生中发挥着关键作用 [19]。重楼皂苷 II 是中药重楼的有效成分之一，具有抑制多种肿瘤的作用 [20-22]。本实验通过重楼皂苷 II 作用于黑色素瘤细胞 B16F10，从体外研究发现重楼皂苷 II 可以通过诱导 B16F10 细胞发生铁死亡从而抑制细胞增殖生长。

铁死亡是一种由 GPX4 活性丧失和随后产生的 ROS 积累引起细胞死亡的调节形式，主要依赖铁和 ROS 的调控 [23]。SOD 和 GSH 是维持细胞内氧化还原稳态的重要核心组成部分，任何使 GSH 和 SOD 减少的因素都会引起细胞内 ROS 水平的升高。MDA 可能由于脂质氧化而受到大量自由基

的影响而增加，是一种脂质过氧化的标志物，可以直接反映细胞氧化应激水平 [24]。此外，铁作为一种催化剂，将过氧化物转化为自由基，发生芬顿反应，这可能是铁死亡诱导细胞死亡所起到的作用 [23]。重楼皂苷 II 可以在 B16F10 细胞内增加 MDA 含量，降低 SOD 和 GSH 的含量从而引起的大量 ROS 积累。表明重楼皂苷 II 可以引起 B16F10 细胞中 ROS 和铁的积累从而诱导细胞发生铁死亡。

抑癌蛋白 P53 可以引起肿瘤细胞的细胞周期阻滞、衰老、凋亡等，在肿瘤的发生发展过程中具有重要的作用。P53 还可调节大量不同的细胞功能，如代谢调节、ROS 应激反应和铁死亡，这些新出现的功能在 P53 介导的肿瘤抑制中发挥关键作用 [25]。P53 由于其可以诱导肿瘤细胞发生铁死亡，所以仍然发挥抑制肿瘤增殖的能力 [19]。研究表明 SLC7A11 基因是 P53 介导的转录抑制的一个靶点 [26]，SLC7A11 是胱氨酸 / 谷氨酸逆向转运体的一个组成部分，通过介导胱氨酸转运促进 GSH 的合成，而 GSH 是主要的细胞抗氧化剂，可以抑制 ROS 的累积，对 ROS 诱导的铁死亡至关重要 [7]。P53 的激活可以抑制 SLC7A11 的转录，进而减少了胱氨酸的摄取，这反过来又限制了细胞内 GSH 的产生。因此，ROS 诱导的铁死亡在 P53 激活的细胞中明显增加 [27]。实验结果表明重楼皂苷 II 可以通过促进 P53 的表达、抑制 SLC7A11 的表达，从而促进细胞铁死亡的发生。

GPX4 可以作为判断细胞铁死亡的指标之一，GPX4 将 GSH 转化为氧化型谷胱甘肽 (GSSG)，同时将脂质氢过氧化物转化为相应的醇或游离过氧化氢转化为水 [7]。FTH-1 是铁蛋白重链 1，在铁蛋白结构中起到关键作用，也是铁死亡发生的标志性蛋白。ACSL4 可以通过参与易被氧化的膜磷脂合成过程而成为铁死亡发生的必需分子 [28]。GPX4、FTH-1 蛋白的表达随着重楼皂苷 II 的浓度的增加而下降，而 ACSL4 蛋白的表达呈现上升趋势。这些重要蛋白分子表达水平的变化显示重楼皂苷 II 对 B16F10 细胞的抑制作用可能与铁死亡相关。

综上所述，本研究初步证明了铁死亡是重楼皂苷 II 诱导黑色素细胞 B16F10 细胞发生死亡的重要途径，但是发生铁死亡的具体机制还有待进一步实验研究验证。

参考文献

- [1] Rodríguez-Cerdeira C, Carnero Gregorio M, López-Barcenas A, et al. Advances in immunotherapy for melanoma: a comprehensive review [J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017: 3264217.
- [2] Lucci A, Hall CS, Patel SP, et al. Circulating tumor cells and early relapse in node-positive melanoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26 (8): 1886-1895.
- [3] Burns D, George J, Aucoin D, et al. The pathogenesis and clinical management of cutaneous melanoma: an evidence-based review [J]. *J Med Imaging Radiat Sci*, 2019, 50 (3): 460-469.
- [4] Cannavò SP, Tonacci A, Bertino L, et al. The role of oxidative stress in the biology of melanoma: a systematic review [J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215 (1): 21-28.
- [5] Rodríguez-Cerdeira C, Carnero Gregorio M, López-Barcenas A, et al. Advances in immunotherapy for melanoma: a comprehensive review [J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017: 3264217.
- [6] Liao Y, Jia X, Ren Y, et al. Suppressive role of microRNA-130b-3p in ferroptosis in melanoma cells correlates with DKK1 inhibition and Nrf2-HO-1 pathway activation [J]. *Hum Cell*, 2021, 34 (5): 1532-1544.
- [7] Xie Y, Hou W, Song X, et al. Ferroptosis: process and function [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23 (3): 369-379.
- [8] Epelak I, Dodig S, Dodig DE. Ferroptosis: regulated cell death [J]. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2020, 71 (2): 99-109.
- [9] 中国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 271.
- [10] 游丽娇, 孙芳园, 杨小芳, 等. 重楼皂苷 II 对人非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2021, 28 (10): 81-85.
- [11] Man S, Zhang L, Cui J, et al. Curcumin enhances the anti-cancer effects of Paris Saponin II in lung cancer cells [J]. *Cell Prolif*, 2018, 51 (4): e12458.
- [12] 姜福琼, 王剑松, 邓丹琪, 等. 重楼皂苷 II 对人膀胱癌裸鼠移植瘤的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29 (10): 3208-3211.
- [13] Yang M, Zou J, Zhu H, et al. Paris saponin II inhibits human ovarian cancer cell-induced angiogenesis by modulating NF- κ B signaling [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33 (5): 2190-2198.
- [14] 程卉, 苏婧婧, 王训翠, 等. 重楼皂苷 II 诱导黑色素瘤 B16 细胞凋亡的机制研究 [J]. *中药材*, 2016, 39 (11): 2594-2597.
- [15] 高悦, 王晓萍, 李敏, 等. 天然产物在黑色素瘤防治中的研究进展 [J]. *药学学报*, 2021, 56 (1): 92-101.
- [16] 黄一睿, 何卫, 李锐, 等. 5-AZA 抑制人葡萄膜黑色素瘤细胞增殖的研究 [J]. *中华全科医学*, 2019, 17 (6): 969-973.
- [17] Dixon SJ. Ferroptosis: bug or feature? [J]. *Immunol Rev*, 2017, 277 (1): 150.
- [18] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149 (5): 1060-1072.
- [19] Mou YH, Wang J, Wu JC, et al. Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12 (1): 34.
- [20] Niu W, Xu L, Li J, et al. Polyphyllin II inhibits human bladder cancer migration and invasion by regulating EMT-associated factors and MMPs [J]. *Oncol Lett*, 2020, 20 (3): 2928-2936.
- [21] 赵亚鹏, 段文超, 王艳敏, 等. 重楼皂苷 II 对胶质瘤增殖、侵袭和替莫唑胺化疗敏感性的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2020, 100 (35): 2774-2778.
- [22] 王林娜. 重楼皂苷 II 体外抗肺癌活性、分子机制及其制剂处方前研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2019.
- [23] Wan SY, Stockwell BR. Ferroptosis: death by lipid peroxidation [J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 26 (3): 165-176.
- [24] Sri Iswari R, Dafip M, Purwantoyo E. Malondialdehyde (MDA) production in atherosclerosis supplemented with steamed tomato [J]. *Pak J Biol Sci*, 2021, 24 (3): 319-325.
- [25] Berkers CR, Maddocks OD, Cheung EC, et al. Metabolic regulation by p53 family members [J]. *Cell Metab*, 2013, 18 (5): 617-633.
- [26] Mou Y, Wang J, Wu J, et al. Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12 (1): 34.
- [27] Jiang L, Kon N, Li T, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression [J]. *Nature*, 2015, 520 (7545): 57-62.
- [28] Yuan H, Li X, Zhang X, et al. Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478 (3): 1338-1343.

(收稿日期: 2022-09-23; 修回日期: 2022-11-17)

沙蟾毒精通过 Nrf2-HO-1/SLC7A11 途径诱导人胃癌 SGC-7901 细胞铁死亡

王文君¹, 刘霞霞^{2, 3}, 陈馨^{2, 3}, 程卉^{2, 3*}, 王国凯^{1*} (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 新安医学教育部重点实验室, 合肥 230038; 3. 安徽中医药大学科研技术中心, 合肥 230038)

摘要: **目的** 探讨沙蟾毒精 (ArBu) 诱导人胃癌 SGC-7901 细胞发生铁死亡的机制。**方法** 采用 CCK-8 法检测不同浓度 ArBu 对 SGC-7901 细胞存活率的影响, 显微镜和透射电镜分别观察细胞及线粒体形态变化。将 SGC-7901 细胞分为对照组, ArBu 低、中、高浓度组 (0.2、0.4、0.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 以及 ArBu (0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 联合 Ferrostatin-1 (Fer-1, 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组干预 24 h, 用试剂盒检测还原性谷胱甘肽 (GSH)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、总 Fe 和脂质活性氧 (ROS) 的水平。Western blot 分别检测 Nrf2、HO-1、SLC7A11、FTH1、GPX4 的蛋白表达情况。**结果** ArBu 处理细胞 24 h 和 48 h 后, 细胞存活率明显下降, 且呈浓度依赖性。与对照组相比, ArBu 处理细胞 24 h 后, 细胞和线粒体皱缩死亡, 线粒体嵴消失, GSH 和 SOD 水平明显下降, MDA、总 Fe 和 ROS 水平明显上升。与 ArBu 中浓度组处理细胞 24 h 相比, 联合 Fer-1 处理后, 明显逆转了 GSH、SOD、MDA、总 Fe 和脂质 ROS 水平, 细胞形态与对照组无明显差异, 线粒体并未皱缩变小。此外, ArBu 明显降低 Nrf2、HO-1、SLC7A11、FTH1、GPX4 的蛋白表达水平。**结论** ArBu 能诱导人胃癌 SGC-7901 细胞铁死亡, 其机制可能是通过 Nrf2-HO-1/SLC7A11 途径。

关键词: 沙蟾毒精; 胃癌; 铁死亡; Nrf2-HO-1/SLC7A11

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0285-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.002

Arenobufagin induces the ferroptosis in human gastric cancer cell line SGC-7901 through Nrf2-HO-1/SLC7A11 pathway

WANG Wen-jun¹, LIU Xia-xia^{2, 3}, CHEN Xin^{2, 3}, CHENG Hui^{2, 3*}, WANG Guo-kai^{1*} (1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012; 2. Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Hefei 230038; 3. Research Technology Center of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038)

Abstract: Objective To determine the mechanism of ferroptosis induced by arenobufagin (ArBu) in human gastric cancer cell line SGC-7901. **Methods** The effect of different concentrations of ArBu on the survival rate of SGC-7901 cells was detected by CCK-8 method. Cellular and mitochondrial morphological changes were observed with microscope and transmission electron microscope, respectively. SGC-7901 cells were divided into a control group, ArBu low, medium, high concentration groups (0.2, 0.4 and 0.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), and an ArBu (0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) combined with Ferrostatin-1 (Fer-1, 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) group. The intervention lasted 24 h. The levels of glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), total iron (Fe) and lipid reactive oxygen species (ROS) were measured by kits. Western blot was used to detect the protein expression of Nrf2, HO-1, SLC7A11, FTH1 and GPX4. **Results** The cell viability decreased significantly after 24 h and 48 h of ArBu-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81903859, No. 81673650); 安徽省高校自然科学研究重点项目 (No. KJ2021A0591)。

作者简介: 王文君, 男, 在读硕士研究生, 主要从事天然药物活性成分研究, email: wenjunwang1998@163.com * **通信作者:** 程卉, 女, 硕士, 副研究员, 主要从事中药药理研究, email: chenghuiyzyx@ahtcm.edu.cn; 王国凯, 男, 博士, 教授, 主要从事天然药物化学成分研究, email: wanggk@ahtcm.edu.cn

treatment cells in a concentration-dependent manner. Compared with the control group, cells and mitochondria crumpled and died after 24 h of ArBu treatment, and mitochondrial cristae disappeared with a significant decrease in GSH and SOD levels, and a significant increase in MDA, total Fe and ROS levels. The levels of GSH, SOD, MDA, total Fe and lipid ROS were significantly reversed after Fer-1 combination treatment, as compared with ArBu medium concentration treatment for 24 h. The cell morphology was not significantly different from that of the control group, and the mitochondria did not crumple and shrink. In addition, ArBu significantly decreased the protein expression levels of Nrf2, HO-1, SLC7A11, FTH1, and GPX4. **Conclusion** ArBu can induce ferroptosis in human gastric cancer cell line SGC-7901 and the mechanism may be related to Nrf2-HO-1/SLC7A11 pathway.

Key words: arenobufagin; gastric cancer; ferroptosis; Nrf2-HO-1/SLC7A11

胃癌 (gastric cancer, GC) 是全球最常见的恶性肿瘤之一, 在消化道恶性肿瘤中排第二位, 2020 年新增 100 多万病例, 有 76.9 万人死亡, 发病率、病死率均较高^[1]。多数患者确诊时已经处于 GC 中晚期, 术后易复发转移^[2], 化疗有助于延长患者的生存时间, 提高患者的生活质量。然而, 目前的化疗药物对 GC 的治疗效果十分有限^[3-4], 因此亟待发掘新的化疗药物。

天然化合物沙蟾毒精 (ArBu) 是从中华大蟾蜍的蟾酥和蟾皮提取得到的一种新的潜在抗肿瘤成分^[5], 分子式为 $C_{24}H_{32}O_6$, 分子量为 416.5, 目前已有诸多研究发现 ArBu 具有广谱抗肿瘤活性, 主要通过诱导细胞凋亡、抑制血管生成以及肿瘤细胞的黏附、迁移和侵袭发挥作用^[6-8]。

铁死亡 (ferroptosis) 是一种依赖于铁代谢的新的程序性细胞死亡方式, 即在二价铁或脂氧合酶的作用下, 催化细胞膜上高表达的不饱和脂肪酸, 使活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 积聚导致脂质过氧化, 从而诱导细胞死亡^[9-11]。越来越多的天然化合物被发现能通过铁死亡途径发挥抗肿瘤作用^[12], 但未见研究报道 ArBu 诱导 GC 细胞铁死亡。核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 是控制细胞氧化还原、动态平衡和炎症的关键转录因子, 与铁死亡氧化应激通路密切相关, Nrf2 可以通过调控血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 和溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 诱导铁死亡^[13-14]。因此, 本研究旨在观察 ArBu 是否能诱导人胃癌细胞系 SGC-7901 细胞发生铁死亡, 并探讨其机制。

1 材料

1.1 肿瘤细胞

人胃癌细胞 SGC-7901 (中国科学院上海细胞库), 在含 10% 胎牛血清, 1% 青霉素链霉素混合液的 RPMI-1640 培养基中于 37℃, 5%CO₂ 的条

件下培养。

1.2 仪器

酶标仪 (美国 MD 公司, iD3); 细胞培养箱 (美国 Thermo Fisher 公司, BB150); 生物安全柜 (浙江苏净净化公司, BSC-1000 II A2); 离心机 (德国 Eppendorf 公司, 5418R); 显微镜 (德国徕卡公司, DMI6000B); 透射电镜 (日本日立公司, Hitachi-600); 蛋白电泳及转印系统 (美国伯乐公司, Mini-PROTEAN); 流式细胞仪 (美国 Beckman 公司, FC500); 凝胶成像仪 (广州博鹭腾生物科技有限公司, GelView6000Plus)。

1.3 试剂

ArBu [安徽华润金蟾药业股份有限公司提供, 纯度为 94.1%, CAS: 464-74-4, 用二甲基亚砜 (DMSO) (终浓度 < 0.1%) 助溶后加入 RPMI-1640 培养液配制]; Fer-1 (批号: #28329, 规格: 10 mmol · L⁻¹ × 1 mL, MedChemExpress 公司), CCK-8 试剂盒 (批号: 2J226, 麦客生物有限公司), 谷胱甘肽 (GSH) 检测试剂盒 (批号: 20220513)、超氧化物歧化酶 (SOD) 检测试剂盒 (批号: 20211124)、丙二醛 (MDA) 检测试剂盒 (批号: 20210923) (南京建成科技有限公司), 脂质 ROS 检测试剂盒 (批号: 2011556, Thermo Fisher Scientific 公司), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号: 092721220221, 碧云天生物技术有限公司), 细胞 Fe 含量检测试剂盒 (批号: BC5310, 北京索莱宝公司), Nrf2 抗体、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 抗体 (Cell Signaling Technology 公司), SLC7A11 抗体、铁蛋白重链 1 (FTH1) 抗体 (Affinity Biosciences 公司), HO-1 抗体、β-actin 抗体、二抗 (正能生物技术有限责任公司), ECL 显影发光液 (批号: 22182599, 兰杰柯科技有限公司)。

2 方法

2.1 CCK-8 法检测细胞增殖

将 SGC-7901 细胞接种到 96 孔板中培养过夜, 每孔 100 μL (5×10^3 个), 每组 6 个复孔, 第 2 日将原培养基吸出, 加入不同浓度的药物培养基 (0、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ArBu, 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fer-1, 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ArBu + 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fer-1) 的培养基 100 μL 继续培养 24 h 和 48 h。每孔加入 CCK-8 试剂 10 μL , 继续在培养箱里避光培养 2 h。用酶标仪在 450 nm 波长处测定每孔的吸光度值 A , 用不含细胞的培养基来校正。将细胞存活率输入 GraphPad 6.0 Prism 8.0.2 计算 IC_{50} 。细胞存活率 (%) = $[(A_{\text{药物}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})] \times 100\%$ 。

2.2 显微镜和透射电镜观察细胞及线粒体形态变化

将细胞分为对照组 (含同浓度 DMSO)、ArBu 中浓度组 (0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 ArBu 联合 Fer-1 组 (0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。细胞处理 24 h 后, 分别用显微镜 ($\times 200$) 和透射电镜 ($\times 7000$) 观察细胞及线粒体形态变化。

2.3 GSH、SOD、MDA 和总 Fe 水平的测量

将细胞分为对照组 (含同浓度 DMSO), ArBu 低、中、高浓度组 (0.2、0.4、0.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 ArBu (0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 联合 Fer-1 (5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组。细胞处理 24 h 后, 将 SGC-7901 细胞用胰酶消化收集于 PBS 中, 并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下超声破碎成细胞匀浆, 按照试剂盒说明书操作, 检测 GSH、SOD、MDA 和总 Fe 水平。用 BCA 法对细胞的蛋白水平进行定量。

2.4 脂质 ROS 水平的测量

细胞分组同“2.3”项下。细胞处理 24 h 后, 弃去含药培养基, 加入含有 C11-BODIPY581/591 荧光探针的培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 弃去培养基, 用无血清培养基洗涤 3 次, 收集细胞后用流式细胞仪检测荧光强度。

2.5 Western blot 检测蛋白表达

将细胞分为对照组 (含同浓度 DMSO)、ArBu 低、中、高浓度组 (0.2、0.4、0.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 细胞处理 24 h 后收集细胞, 提取总蛋白, BCA 法进行蛋白定量, 加入 5 \times loading buffer, 100 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴煮沸 10 min 使蛋白变性。采用 SDS 凝胶电泳将蛋白质分离, 上样 10 μL 蛋白样品, 电泳转移至硝酸纤维素膜上。5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 孵育相对应的一抗 (1 : 1000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 二抗 (1 : 10 000) 室温孵育 2 h。ECL 显影发光液显色, 凝胶成像仪拍照, Image J 6.0 软件分析条带灰度值, 计算相对表达量 (%) = (目标蛋白 \div 参比蛋白 β -actin 的灰度值) $\times 100\%$ 。

2.6 统计学处理

定量研究结果采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行分析并作图。所有实验都至少重复了 3 次。数据比较采用单因素方差分析 (One-way, ANOVA) 和 Dunnett's 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 ArBu 抑制 SGC-7901 细胞增殖

ArBu 处理 SGC-7901 细胞 24 h 和 48 h 的细胞存活率结果见图 1。与对照组相比, SGC-7901 细胞的存活率随着 ArBu 的浓度增大和处理时间的延长逐渐降低, 24 h 和 48 h 的 IC_{50} 值分别为 0.46 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 0.26 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因此, 选择 0.2、0.4、0.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为 ArBu 低、中、高浓度进行后续实验。此外, 与 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ArBu 处理组相比, ArBu 联合 Fer-1 组 (0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 细胞存活率明显升高 ($P < 0.01$), 说明 ArBu 抑制 SGC-7901 细胞增殖确实有铁死亡参与, 且 Fer-1 能部分逆转铁死亡所导致的细胞增殖的抑制。

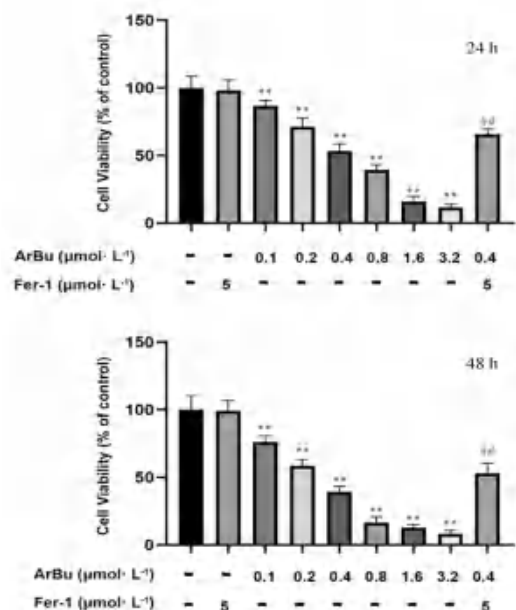


图 1 ArBu 对 SGC-7901 细胞存活率的影响

Fig 1 Effect of ArBu on cell viability of SGC-7901 cells

注: 与对照组相比, $**P < 0.01$; 与 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ArBu 处理组相比, $^{##}P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, $**P < 0.01$; compared with the 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ArBu-treated group, $^{##}P < 0.01$.

3.2 细胞形态变化

ArBu 处理 SGC-7901 细胞 24 h 后, 与对照组相比, ArBu 中浓度组 (0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的细胞和线粒体失去正常形态, 明显变形皱缩, 线粒体嵴消失, 线粒体和部分细胞死亡; 与 0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ArBu 处理组相比, ArBu 联合 Fer-1 组 (0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与对照组细胞形态无明显差异, 线粒体并未皱缩变小 (见图 2)。

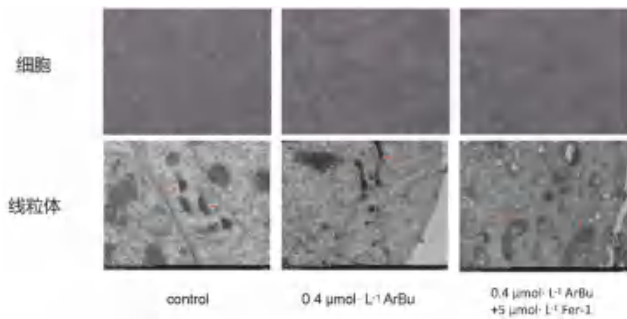


图 2 显微镜(×200)和透射电镜(×7000)下 0.4 μmol·L⁻¹ ArBu 以及联合 5 μmol·L⁻¹ Fer-1 处理 SGC-7901 细胞 24 h 后的细胞和线粒体形态图

Fig 2 Morphology of cells and mitochondria of SGC-7901 cells treated with 0.4 μmol·L⁻¹ ArBu or combined with 5 μmol·L⁻¹ Fer-1 for 24 h under microscope (×200) and transmission electron microscope (×7000)

注: 细胞形态图比例尺为 300 μm, 线粒体形态图比例尺为 1 μm。

Note: Scale bar for cell morphology map was 300 μm, scale bar for mitochondrial morphology map was 1 μm.

3.3 ArBu 对 SGC-7901 细胞 GSH、SOD、MDA 和总 Fe 水平的影响

ArBu 处理 SGC-7901 细胞 24 h 后, 与对照组相比, 细胞内 GSH 和 SOD 水平明显降低 ($P < 0.01$), MDA 和总 Fe 水平明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且都呈现出浓度依赖性; 与 0.4 μmol·L⁻¹ ArBu 组相比, ArBu 联合 Fer-1 组 (0.4 μmol·L⁻¹ + 5 μmol·L⁻¹) 细胞内 GSH 和 SOD 水平显著升高 ($P < 0.05$), MDA 和总 Fe 水平显著降低 ($P < 0.01$) (见图 3)。

3.4 ArBu 对 SGC-7901 细胞脂质 ROS 水平的影响

ArBu 处理 SGC-7901 细胞 24 h 后, 与对照组相比, 峰显著右移, 荧光更强, 且呈浓度依赖性, 与 0.4 μmol·L⁻¹ ArBu 组相比, ArBu 联合 Fer-1 组 (0.4 μmol·L⁻¹ + 5 μmol·L⁻¹) 峰明显左移, 荧光较弱 (见图 4A)。细胞内脂质 ROS 水平变化见图 4B, 与对照组相比, ArBu 处理组细胞内脂质 ROS 水平明显升高 ($P < 0.01$), 且呈浓度依赖性。与 0.4 μmol·L⁻¹ ArBu 组相比, 0.4 μmol·L⁻¹ ArBu 联合 Fer-1 (5 μmol·L⁻¹) 组细胞内脂质 ROS 水平显著降低 ($P < 0.05$)。

3.5 ArBu 对 SGC-7901 细胞 Nrf2-HO-1/SLC7A11 途径相关蛋白表达的影响

与对照组相比, ArBu 处理 SGC-7901 细胞 24 h 后, Nrf2、HO-1、SLC7A11、FTH1 和 GPX4 的表达水平均降低 ($P < 0.05$), 且呈浓度依赖性 (见图 5)。说明 ArBu 能通过 Nrf2-HO-1/SLC7A11 途径诱导 SGC-7901 细胞铁死亡。

4 讨论

GC 占全球新发肿瘤病例的 6%, 我国是 GC 患者最多的国家, 在 2020 年有 47.85 万新发病例,

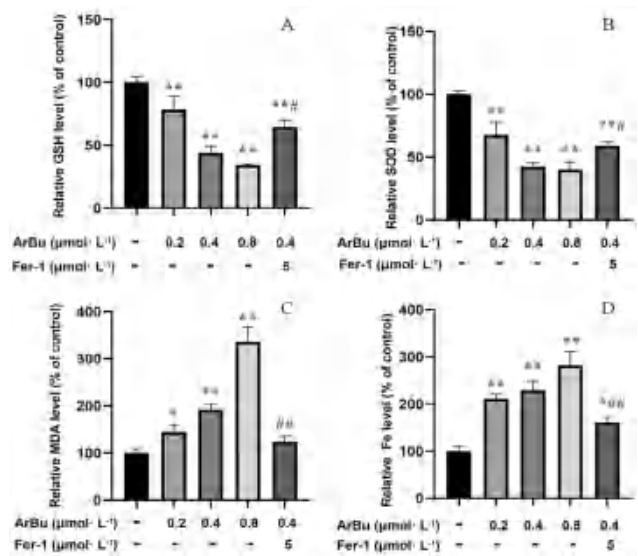


图 3 ArBu 对 SGC-7901 细胞 GSH、SOD、MDA 和总 Fe 水平的影响
Fig 3 Effect of ArBu on GSH, SOD, MDA and total Fe levels in SGC-7901 cells

注: 与对照组相比, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; 与 0.4 μmol·L⁻¹ ArBu 处理组相比, $#P < 0.05$, $##P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; compared with the 0.4 μmol·L⁻¹ ArBu-treated group, $#P < 0.05$, $##P < 0.01$.

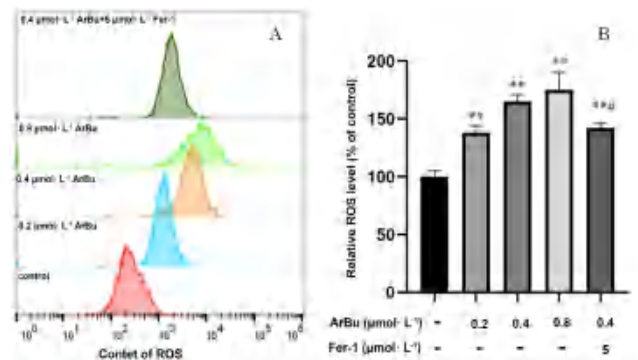


图 4 ArBu 对 SGC-7901 细胞脂质 ROS 水平的影响

Fig 4 Effect of ArBu on lipid ROS levels in SGC-7901 cells

注: 与对照组相比, $**P < 0.01$; 与 0.4 μmol·L⁻¹ ArBu 处理组相比, $#P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, $**P < 0.01$; compared with the 0.4 μmol·L⁻¹ ArBu-treated group, $#P < 0.05$.

37.38 万死亡病例, 占全球 GC 新发病例和死亡病例的 44.0% 和 48.6%^[1]。寻找有效、安全、低毒的抗 GC 药物已成为应对这一威胁的主要策略。

近年来越来越多的天然药物单体被发现具有治疗 GC 的潜力。蟾蜍毒的主要活性成分 ArBu 是一种天然甾体化合物, 已被证明能在体内外抑制多种细胞和肿瘤增殖, 显示出了良好的广谱抗肿瘤活性。ArBu 可作用于非小细胞肺癌 (NSCLC) PC-9 细胞和 A549 细胞, 可引起染色质固缩、核碎裂和凋亡小体的形成^[15-16]。ArBu 还可通过干扰

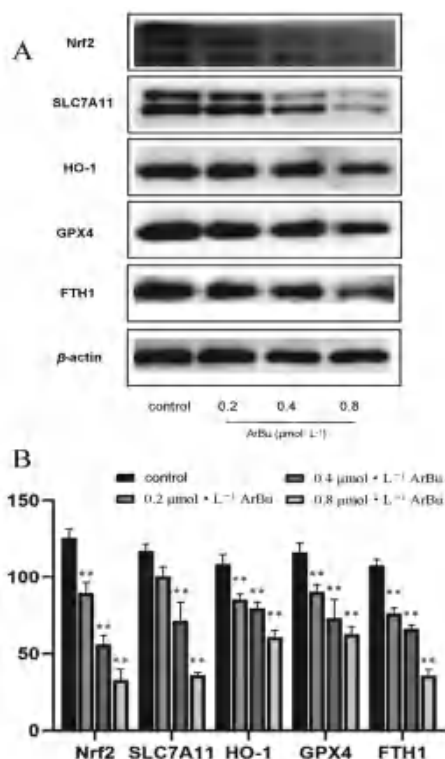


图 5 ArBu 对 SGC-7901 细胞 Nrf2-HO-1/SLC7A11 途径相关蛋白表达的影响

Fig 5 Effect of ArBu on the expression of Nrf2-HO-1/SLC7A11 pathway-related proteins in SGC-7901 cells

注：与对照组相比，***P* < 0.01。

Note: Compared with the control group, ***P* < 0.01.

信号通路诱导细胞凋亡和抑制血管生成, Zhang 等^[17]发现 ArBu 能通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡, Li 等^[18]发现通过 VEGFR-2 信号通路, ArBu 可以抑制 VEGF 介导的血管生成, 抑制血管内细胞迁移和侵袭以及人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 的形成。本研究通过 CCK-8 法发现, ArBu 能显著降低 SGC-7901 细胞的存活率且具有时间和浓度依赖性, 24 h 和 48 h 的 *IC*₅₀ 值仅为 0.46 μmol · L⁻¹ 和 0.26 μmol · L⁻¹, 显示 ArBu 具有良好的抗肿瘤细胞活性。

铁死亡领域自从被发现以来就被联想到与肿瘤相关, 铁死亡的化学诱导剂也是在寻找新的抗肿瘤化合物过程中发现的^[19-20]。铁死亡的起始和执行与氨基酸、脂质和铁代谢调节都有联系, 受到多种分子机制的调控。

当 0.4 μmol · L⁻¹ ArBu 与 5 μmol · L⁻¹ 铁死亡特异性抑制剂 Fer-1 联用时, 24 h 和 48 h 的细胞存活率明显升高 (*P* < 0.01), 说明 ArBu 抑制 SGC-7901 细胞增殖可能与铁死亡相关。用显微镜和透射电镜观察细胞和线粒体的形态变化时发现, 与对照组相比, ArBu 处理 SGC-7901 细胞

24 h 后, 细胞和线粒体明显变形皱缩, 部分细胞死亡, 线粒体嵴消失; 但当 Fer-1 联合 ArBu 处理 SGC-7901 细胞 24 h, 细胞形态与对照组无明显差异, 线粒体并未皱缩变小; 并且氧化应激相关指标 GSH、SOD、MDA、总 Fe 和脂质 ROS 的水平变化, 也证实了 ArBu 能诱导 SGC-7901 细胞发生铁死亡。

Nrf2 是控制细胞氧化还原、动态平衡和炎症的关键转录因子, 同时与铁死亡氧化应激通路密切相关, Nrf2 作为转录因子促进 SLC7A11 和 GPX4 的表达, 还调控下游的靶基因 HO-1 和 FTH1^[14, 21-22]。GPX4 对铁死亡起到至关重要的调控作用, GPX4 和细胞膜上的胱氨酸/谷氨酸转运受体 (System Xc-) 以及各种铁死亡相关蛋白是通过影响 ROS 代谢发挥其功能的, GSH 是 GPX4 催化脂质过氧化物还原过程的主要辅助因子^[23]。System Xc- 由 SLC7A11 和 SLC3A2 组成, 能够使细胞内谷氨酸和细胞外胱氨酸进行 1:1 交换^[24], 进入细胞内的胱氨酸可被还原成半胱氨酸, 参与 GSH 的合成。抑制 System Xc- 会导致 GSH 耗竭并间接诱导 GPX4 失活, 最终导致 ROS 聚集, 诱发铁死亡^[9]。Western blot 结果显示, ArBu 处理细胞 24 h 后, Nrf2、SLC7A11 和 GPX4 的表达水平明显下降, 可能是 ArBu 抑制了 Nrf2 的表达, Nrf2 又下调了 SLC7A11 和 GPX4 的表达, 而下调 SLC7A11 的表达会耗竭 GSH, 进一步抑制 GPX4, GSH 的试剂盒检测结果也显示 ArBu 能显著降低 GSH 水平。

HO-1 是一种重要的抗氧化酶, 主要催化血红素分解代谢成亚铁、一氧化碳和胆绿素: 一方面, 血红素基团的降解有利于阻止其促氧化作用; 另一方面, 副产物胆绿素及其还原型胆红素具有有效 ROS 清除活性^[25-27]。HO-1 是细胞铁离子的重要来源, 在铁死亡诱导剂 erastin 诱导的细胞死亡中, 可以使膜脂质过氧化诱导细胞发生铁死亡^[28]。铁蛋白轻链 (FTL) 和 FTH1 可以将细胞中多余的铁储存在胞质中^[29], FTL 和 FTH1 的失活会导致细胞内铁离子浓度因代谢失衡而升高。本研究结果显示 ArBu 处理细胞 24 h 后, HO-1 和 FTH1 的表达水平显著降低, Nrf2 表达的抑制可能下调了下游 HO-1 和 FTH1 的表达, 从而导致铁稳态失衡, 细胞内亚铁离子浓度升高发生芬顿反应。

GPX4 的抑制和芬顿反应都会产生大量 ROS, HO-1 的抑制导致无法有效清除 ROS, 进一步加剧了 ROS 的大量蓄积, 流式细胞术也证实了 ArBu 处理 SGC-7901 细胞 24 h 后, 脂质 ROS 水平显著

升高, 而 ROS 的蓄积最终诱发细胞铁死亡。

综上, ArBu 能抑制 Nrf2-HO-1/SLC7A11 途径, 破坏 SGC-7901 细胞的抗氧化应激系统, 使细胞内铁代谢和 GSH 代谢失衡, 亚铁的大量存在导致芬顿反应发生, GSH 的耗竭使 GPX4 失活, HO-1 的抑制使 ROS 无法有效清除, 最终导致 ROS 蓄积, 诱发铁死亡, 抑制 SGC-7901 细胞增殖。本研究表明 ArBu 对 SGC-7901 细胞具有良好的抗肿瘤活性, 为 ArBu 治疗 GC 提供了实验依据。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71 (3): 209-249.
- [2] Li Z, Gao X, Peng X, et al. Multi-omics characterization of molecular features of gastric cancer correlated with response to neoadjuvant chemotherapy [J]. *Sci Adv*, 2020, 6 (9): eaay4211.
- [3] Choi AH, Kim J, Chao J. Perioperative chemotherapy for resectable gastric cancer: magic and beyond [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21 (24): 7343-7348.
- [4] Reddavid R, Sofia S, Chiaro P, et al. Neoadjuvant chemotherapy for gastric cancer. Is it a must or a fake? [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24 (2): 274-289.
- [5] 阚钧, 周瑞生, 侯雪楠, 等. 沙蟾毒精抗肿瘤作用研究进展 [J]. *山东医药*, 2019, 59 (24): 98-101.
- [6] Ma L, Zhu Y, Fang S, et al. Arenobufagin induces apoptotic cell death in human non-small-cell lung cancer cells via the noxa-related pathway [J]. *Molecules*, 2017, 22 (9): 1525.
- [7] 刘俊珊, 张冬梅, 陈敏锋, 等. 沙蟾毒精抑制血管生成的作用 [J]. *药学报*, 2011, 46 (5): 527-533.
- [8] Chen L, Mai W, Chen M, et al. Arenobufagin inhibits prostate cancer epithelial-mesenchymal transition and metastasis by down-regulating β -catenin [J]. *Pharmacol Res*, 2017, 123: 130-142.
- [9] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149 (5): 1060-1072.
- [10] Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease [J]. *Cell*, 2017, 171 (2): 273-285.
- [11] Yang WS, Kim KJ, Gaschler MM, et al. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113 (34): E4966-4975.
- [12] 曾耀莹, 吴建春, 骆莹滨, 等. 天然化合物通过铁死亡途径抗肿瘤作用的研究进展 [J]. *中国肿瘤*, 2021, 30 (11): 867-874.
- [13] Yang J, Mo J, Dai J, et al. Cetuximab promotes RSL3-induced ferroptosis by suppressing the Nrf2/HO-1 signalling pathway in KRAS mutant colorectal cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12 (11): 1079.
- [14] Yuan Y, Zhai Y, Chen J, et al. Kaempferol ameliorates oxygen-Glucose deprivation/reoxygenation-induced neuronal ferroptosis by activating Nrf2/SLC7A11/GPX4 axis [J]. *Biomolecules*, 2021, 11 (7): 923.
- [15] 李国林. 沙蟾毒精及其代谢物对人肺癌细胞的促凋亡作用及其药代动力学研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2015.
- [16] 刘倩, 胡春萍, 曹鹏, 等. 沙蟾毒精诱导肺癌 PC-9 细胞的凋亡效应及其作用机制初探 [J]. *天然产物研究与开发*, 2017, 29 (12): 2030-2035.
- [17] Zhang DM, Liu JS, Deng LJ, et al. Arenobufagin, a natural bufadienolide from toad venom, induces apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34 (6): 1331-1342.
- [18] Li M, Wu S, Liu Z, et al. Arenobufagin, a bufadienolide compound from toad venom, inhibits VEGF-mediated angiogenesis through suppression of VEGFR-2 signaling pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83 (9): 1251-1260.
- [19] Dolma S, Lessnick SL, Hahn WC, et al. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells [J]. *Cancer Cell*, 2003, 3 (3): 285-296.
- [20] Yagoda N, von Rechenberg M, Zaganjor E, et al. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels [J]. *Nature*, 2007, 447 (7146): 864-869.
- [21] Gong P, Zhang W, Zou C, et al. Andrographolide attenuates blood-brain barrier disruption, neuronal apoptosis, and oxidative stress through activation of Nrf2/HO-1 signaling pathway in subarachnoid hemorrhage [J]. *Neurotox Res*, 2022, 40 (2): 508-519.
- [22] Ramos S, Carlos AR, Sundaram B, et al. Renal control of disease tolerance to malaria [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116 (12): 5681-5686.
- [23] Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4 [J]. *Cell*, 2014, 156 (1-2): 317-331.
- [24] Ji X, Qian J, Rahman SMJ, et al. xCT (SLC7A11)-mediated metabolic reprogramming promotes non-small cell lung cancer progression [J]. *Oncogene*, 2018, 37 (36): 5007-5019.
- [25] Yang S, Ouyang J, Lu Y, et al. A dual role of heme oxygenase-1 in tuberculosis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 842858.
- [26] Zhu H, Jia Z, Misra BR, et al. Nuclear factor E2-related factor 2-dependent myocardial cytoprotection against oxidative and electrophilic stress [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2008, 8 (2): 71-85.
- [27] González-Burgos E, Carretero ME, Gómez-Serranillos MP. Diterpenoids isolated from *Sideritis* species protect astrocytes against oxidative stress via Nrf2 [J]. *J Nat Prod*, 75 (10): 1750-1758.
- [28] Kwon MY, Park E, Lee SJ, et al. Heme oxygenase-1 accelerates erastin-induced ferroptotic cell death [J]. *Oncotarget*, 2015, 6 (27): 24393-24403.
- [29] Torti SV, Torti FM. Iron and cancer: more ore to be mined [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13 (5): 342-355.

(收稿日期: 2022-09-29; 修回日期: 2022-11-29)

芦荟大黄素通过激活 Caspase-3/GSDME 焦亡通路 发挥抗胶质瘤作用

方兴刚^{1,2}, 汪嫆², 陈卓¹, 张思思³, 罗杰^{1,2*} (1. 湖北中医药大学中医临床学院, 武汉 430065; 2. 胚胎干细胞研究湖北省重点实验室, 湖北医药学附属太和医院, 湖北 十堰 442000; 3. 湖北医药学院药护学院, 湖北 十堰 442000)

摘要: **目的** 探讨芦荟大黄素(AE)抗脑胶质母细胞瘤(GBM)的作用及机制。**方法** 梯度浓度 AE 处理体外培养的 GBM 细胞, MTT 实验检查 GBM 细胞活力, 倒置显微镜及 LDH 释放实验检测 AE 对 GBM 细胞的焦亡诱导作用; Western blot 实验检测 AE 对 Caspase-3、GSDME 蛋白的活化作用, qPCR 检测 AE 对 GBM 细胞 GSDME 在 mRNA 水平的调控作用; DCFH-DA 标识 GBM 细胞活性氧, 荧光显微镜及流式细胞术检测 AE 处理的 GBM 细胞活性氧产生水平, JC-1 试剂盒检测线粒体膜电位。**结果** 与对照组相比, AE 能显著降低 GBM 细胞活性 ($P < 0.05$), 诱导 GBM 细胞出现焦亡特异性外观和 LDH 释放, 剪切活化 Caspase-3 和 GSDME 蛋白, 在 mRNA 水平升高 GSDME 的表达, 诱导 GBM 细胞活性氧产生及线粒体膜电位降低。**结论** 芦荟大黄素通过激活 Caspase-3/GSDME 焦亡通路诱导 GBM 焦亡发挥抗胶质瘤作用。

关键词: 芦荟大黄素; 胶质母细胞瘤; Caspase-3; GSDME; 焦亡

中图分类号: R730.5, R285.5, R2-031 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)02-0291-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.003

Aloe-emodin suppresses glioblastoma by activating Caspase-3/GSDME pyroptosis pathway

FANG Xing-gang^{1,2}, WANG Man², CHEN Zhuo¹, ZHANG Si-si³, LUO Jie^{1,2*} (1. *Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065*; 2. *Hubei Key Laboratory of Embryonic Stem Cells, Taihe Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan Hubei 442000*; 3. *Pharmacy and Nursing Institute, Hubei University of Medicine, Shiyan Hubei 442000*)

Abstract: Objective To determine the anti-glioblastoma (GBM) effect and mechanism of aloe-emodin (AE). **Methods** GBM cells were treated with different concentrations of AE; the cell viability was tested by MTT assay; the pyroptosis-inducing effect was detected by inverted microscopy and lactic acid dehydrogenase (LDH) release assay; the activation of Caspase-3 and GSDME proteins was detected by Western blot; the effect of AE on the regulation of GSDME at mRNA level was detected by qPCR; the level of reactive oxygen species (ROS) in AE treated GBM cells was detected by fluorescence microscopy and flow cytometry by the DCFH-DA markers; and the mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 kit. **Results** Compared with the control group, AE significantly reduced the viability of GBM cells ($P < 0.05$), induced pyroptosis-specific appearance and lactic acid dehydrogenase release, activated Caspase-3 and GSDME protein, elevated GSDME expression at mRNA levels, increased cellular reactive oxygen species, and decreased mitochondrial membrane potential. **Conclusion** AE suppresses glioblastoma by activating Caspase-3/GSDME pyroptosis pathway.

Key words: aloe-emodin; glioblastoma; Caspase-3; GSDME; pyroptosis

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.81671831); 湖北省 2020 年引进国外人才和智力项目 (No.Yz2020015); 2022 年度湖北省教育厅科学研究计划指导性项目 (No. B2022131)。

作者简介: 方兴刚, 男, 博士研究生, 副主任医师, 主要从事中西医结合防治脑血管及脑肿瘤疾病, email: 404180068@qq.com

***通信作者:** 罗杰, 男, 博士研究生导师, 教授, 主要从事中西医结合防治脑血管及脑肿瘤疾病, email: luojie2022tougao@163.com

神经胶质细胞瘤, 简称胶质瘤, 是颅内最常见的恶性肿瘤, 约占全部颅内恶性肿瘤的 80%^[1]。其中胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 为第 IV 级胶质瘤, 约占胶质瘤总数的 54%, 具有高发病率、高复发率、高病死率和低治愈率的特点^[1]。GBM 的浸润性生长方式决定其恶性生物学行为, 手术难以完全切除。由于血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 以及脑-肿瘤细胞屏障 (brain tumor cell barrier, BTB) 的存在以及化疗抗性, 化疗的疗效也不尽理想^[2-5], 且因 GBM 免疫抑制的微环境, 目前蓬勃发展的 PD-1 等免疫检查点抑制剂效果欠佳^[6-8]。因此, 从治疗的角度来看, 需要其他治疗途径和治疗靶点来改善预后。

焦亡是由 GSDM 家族 (GSDMs) 介导的具有免疫原性的程序性的细胞死亡, 在活化的 Caspase 家族及颗粒酶 B 的作用下, GSDMs 被活化, 释放具有细胞膜成孔功能的 N 端结构域, 诱导细胞内外渗透压失衡, 导致细胞肿胀、死亡^[9]。由于 GSDME 途径的焦亡会诱导乳酸脱氢酶 (LDH) 和 HMGB1 细胞外释放而和适应性免疫相联系, 在抗肿瘤治疗中日益受到重视。GSDME 途径的焦亡依赖于 GSDME 在组织中的表达水平, TCGA 数据库 (<http://ualcan.path.uab.edu/analysis.html>) 显示, GBM 特异性高表达 GSDME, 故我们认为 GSDME 是抗 GBM 治疗的良好靶点。而激活 GBM 高表达的 GSDME, 促进 GSDME 途径的焦亡进而激活适应性免疫, 可能为 GBM 治疗提供新的策略。

芦荟大黄素 (aloe-emodin, AE) 是一种蒽醌衍生物, 是从大黄、虎杖、何首乌、芦荟、决明子等传统中药中提取的有效成分, 具有较好的血脑屏障通透性。近年来, AE 已被证明具有广泛的药理作用, 如抗病毒、抗菌、抗过敏、抗骨质疏松、抗糖尿病、免疫抑制、神经保护和肝保护活性以及抗肿瘤作用^[10]。既往研究显示 AE 通过多种机制作用于肿瘤细胞, 如诱导 DNA 损伤^[11], 阻滞细胞周期^[12-14], 抑制肿瘤细胞迁徙^[15]。AE 可以通过诱导线粒体功能障碍及激活 Caspase-9/3/GSDME 轴诱导 Hela 细胞焦亡, 显示 AE 具有诱导肿瘤细胞焦亡的潜力^[16]。本研究以 AE 作为候选药物, 应用于 GSDME 特异性高表达的 GBM 细胞 (U87MG、GL261), 以明确 AE 对 GBM 细胞的抑制作用及焦亡诱导作用。目前, AE 通过激活 CASP3/GSDME 通路促进 GBM 细胞焦亡发挥抗胶质瘤作用的研究尚未见任何报道。本研究可能为临床胶质瘤的治疗提供一种新的选择。

1 材料和方法

1.1 细胞株与试剂

U87MG、GL261 细胞均来源于本实验室 (胚胎干细胞湖北省重点实验室, 冻存细胞); 芦荟大黄素 (规格: 100 mg, 纯度: 98%, 成都埃法生物科技有限公司, 结构式见图 1); 重组 Anti-Cleaved Caspase-3 抗体、重组 Anti-DFNA5/GSDME 抗体 [EPR19859]-N-terminal、重组 Anti-cleaved N-terminal GSDMD 抗体 (Abcam 公司); ABScript II Reverse Transcriptase (ABclonal); 蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合液、高敏 ECL 化学发光试剂盒 (新赛美); MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒、2×PCR Master Mix、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、LDH 释放检测试剂盒、 β -Tubulin Rabbit Monoclonal Antibody、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H+L)、FITC 标记山羊抗兔 IgG (H+L)、顺铂 (Cisplatin)、NAC、Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK (碧云天); PageRuler 预染蛋白 Marker (赛默飞); DCFH-DA 活性氧 (ROS) 荧光探针细胞检测试剂盒 (索莱宝); Taq-HS Probe qPCR Premix、线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1) (兰博利德)。

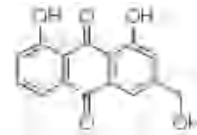


图 1 芦荟大黄素分子结构式

Fig 1 Molecular formula of aloe-emodin

1.2 仪器

生物安全柜、CO₂ 恒温培养箱、多功能酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司); 倒置显微镜 (德国 Leica 公司); 超速低温离心机 (德国 Eppendorf 公司); 荧光定量 PCR 仪 (美国 BIO-RAD 公司); 流式细胞分析仪 (美国 Beckman 公司)。

2 方法和结果

2.1 AE 对 GBM 细胞活力的影响

选择 GBM 细胞系 U87MG (人)、GL261 (鼠) 作为实验对象, 以浓度梯度的 AE 作用于胶质瘤细胞系 48 h, MTT 实验检测细胞存活率: 复苏 U87MG、GL261 细胞, 传代至 96 孔板中, 预设每个梯度浓度 5 孔重复, 每孔 4000 个/100 μ L, 12 h 后给予包含梯度浓度 (6.25、12.5、25、50、75、100 μ mol \cdot L⁻¹) AE 的培养基共培养, 其中 0.2% DMSO 作为对照组 (Con), 48 h 后每孔加入 10 μ L MTT 液 (5 mg \cdot mL⁻¹) 避光孵育 4 h, 离心, 弃上清液, 每孔加入 100 μ L Formazan (甲瓩) 溶解液, 适当混匀, 在细胞培养箱内再继续孵育 3

h. 光学显微镜下观察发现甲瓚全部溶解。用酶标仪于 490 nm 波长处测量各孔的光密度 (OD) 并计算细胞增殖抑制率, 使用 Graphpad 软件统计细胞存活率。结果显示: AE 以浓度依赖的方式抑制 U87MG (见图 2A) 及 GL261 (见图 2B) 的活性, 其对 U87MG 细胞的半抑制浓度 (IC_{50}) 为 $24.76 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 对 GL261 细胞的 IC_{50} 为 $43.38 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 提示 AE 对胶质瘤细胞有明确的抑制作用。

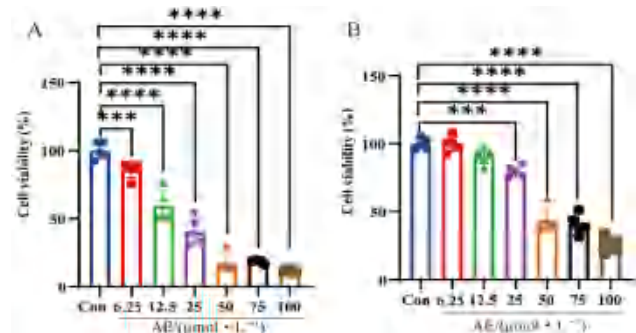


图 2 AE 对 U87MG 细胞 (A) 和 GL261 细胞 (B) 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig 2 Effect of AE on the viability of U87MG cell (A) and GL261 cell (B) detected ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

注: 与对照组相比, $***P < 0.001, ****P < 0.0001$ 。

Note: Compared with the control group, $***P < 0.001, ****P < 0.0001$.

2.2 AE 对 GBM 细胞焦亡的影响

为明确 AE 对 GBM 细胞的作用方式, 对 AE 处理的 U87MG、GL261 细胞在倒置显微镜下进行形态学动态观察: U87MG、GL261 细胞铺至 24 孔板中, 每孔 4000 个 /100 μL , 细胞贴壁后给予 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AE 共孵育, 分别于 2、6、12、24、36、48、60 h 时间点进行细胞拍照, 记录细胞形态。60 h 后 AE 处理的 U87MG 及 GL261 (见图 3) 细胞出现细胞肿胀、吐泡等焦亡特异性细胞外观 (蓝色箭头标识), 提示 AE 可以促进胶质瘤细胞焦亡。

焦亡的另一特征是细胞膜成孔, 细胞内容物如 LDH 从细胞内释放, 为此我们开展了 LDH 释放实验。U87MG 细胞铺至 96 孔板中, 每孔 4000 个 /100 μL , 待其密度生长至 90% 左右, 加入梯度浓度 AE 共孵育 24 h, 收集各孔上清至新的 96 孔板中, 采用通过乳酸脱氢酶释放检测试剂盒 (LDH Release Assay Kit, 碧云天) 对 LDH 含量进行检测, 采用 SpectraMax 190 酶标仪检测上清液在 490 nm 的吸光度进而计算 LDH 释放水平。结果显示, LDH 以浓度依赖的方式实现细胞外释放 (见图 4)。结果显示 AE 对胶质瘤细胞具有明确的抑制作用, 这种抑制作用是通过介导胶质瘤细胞焦亡实现的。

2.3 AE 对 CASP3/GSDME 焦亡通路活化的影响

焦亡的发生主要是通过经典的 CASP1/GSDMD

通路及非经典的 CASP3/GSDME 通路, 为了明确 AE 通过哪种通路介导 GBM 细胞焦亡, 我们开展了 Western blot 实验检验了这两条通路的关键蛋白 GSDME-N 和 GSDMD-N: U87MG 细胞在 6 孔板中与浓度梯度 AE (按实验需求合用或单用 caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK, CASP3 途径焦亡阳性对照药物顺铂, 抗氧化剂 NAC) 共孵育 48 h, 以包含 1%PMSF 的 RIPA 裂解液裂解后提取蛋白, BCA 法分析蛋白浓度, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜至 PVDF 膜上, 以 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 裁膜后分别给予 CASP3、GSDMD-N、GSDME-N、 β -tubulin 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入对应二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, ECL 显影液显影, 运用 Image J 软件对条带进行灰度分析。结果显示: AE 处理的 U87MG 细胞出现了 CASP3、GSDME 蛋白活化 (C-CASP3、GSDME-N) 表达水平上升, 而 GSDMD 蛋白未受影响 (未见 GSDMD-N 表达) (见图 5A), 这提示 AE 活化了 CASP3/GSDME 焦亡通路而非 GSDMD 通路。为进一步验证这一结果, 我们给予 CASP3/GSDME 焦亡通路阳性对照药顺铂和 caspase 阻断剂 (Z-VAD-FMK) 进行处理, 结果显示, AE 处理组出现和顺铂组类似的 GSDME-N 的表达, 而 AE 处理组 (100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AE) 给予 Z-VAD-FMK 共处理, GSDME-N 的表达明显减少 (见图 5B), 这进一步证明 AE 可以引起焦亡关键蛋白 GSDME 的活化, 且这种活化依赖于 caspase 的表达。

蛋白免疫荧光是检测蛋白表达水平的另一种手段, 为了进一步证实 AE 对 GSDME 活化的影响, 我们开展了 GSDME-N 免疫荧光实验: 细胞铺至 12 孔板中, 梯度浓度 AE 共孵育 48 h, 去上清, PBS 清洗后加入免疫荧光固定液, 室温固定 30 min, 去固定液, PBS 清洗三次, 每次 5 min, 加入免疫荧光封闭液, 室温封闭 30 min, 清洗三次。加入 1:200 GSDME-N 一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜, 回收一抗, 清洗三次; 加入 FITC 标记山羊抗兔 IgG (H+L) 二抗, 室温避光孵育 2 h, 回收二抗, 清洗 3 遍; 加入 DAPI 染色液, 室温孵育 10 min, 去染色液, PBS 清洗三次, 于荧光显微镜下检测 GSDME-N 的表达。结果显示, AE 增强了 GSDME-N 在 U87MG 细胞的荧光强度 (见图 6), 这进一步证明 AE 能增强 GSDME 蛋白的活化。

2.4 AE 对 GSDME 在胶质瘤细胞 mRNA 水平的影响

为明确 AE 对 GSDME mRNA 表达水平的影响, 我们进行了 qPCR 实验: 梯度浓度 AE 处理 U87MG、GL261 细胞 48 h, Trizol 提取总 RNA, 测定总 RNA

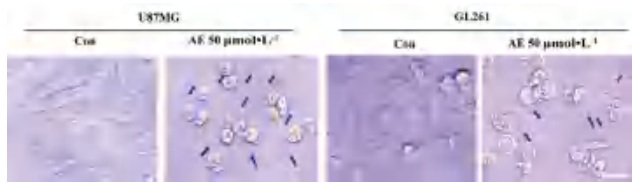


图 3 AE 处理的 U87MG 和 GL261 细胞外观 (蓝色箭头指向焦亡细胞, 比例尺: ×200)
 Fig 3 Appearance of U87MG and GL261 cells treat with AE (The blue arrows pointed to pyroptosis cells, scale bar: ×200)

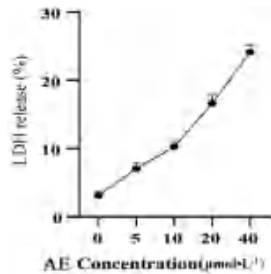


图 4 AE 对 U87MG 细胞中 LDH 释放的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Fig 4 Effect of AE on the LDH release of U87MG cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

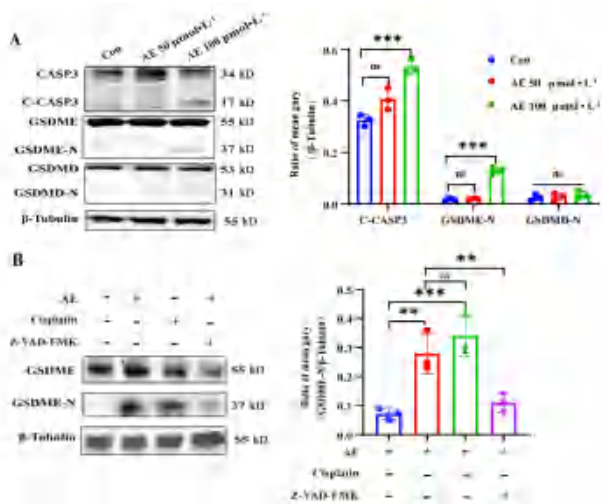


图 5 AE 激活 U87MG 细胞 CASP3/GSDME 焦亡通路 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Fig 5 AE activate CASP3/GSDME pyroptosis pathway on U87MG cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A. AE 对 GSDME 和 GSDMD 活化的影响 (effect of AE on GSDME and GSDMD activation); B. GSDME 途径焦亡阳性对照药 Cisplatin ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和 Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK ($40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对 GSDNE 活化的影响 [effect of positive control drug Cisplatin ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) and caspase inhibitor Z-VAD-FMK ($40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) on GSDNE activation]

注: 与对照组相比, $**P < 0.01, ***P < 0.001$ 。

Note: Compared with the control group, $**P < 0.01, ***P < 0.001$.

浓度及纯度, 使用 ABScript II Reverse Transcriptase (RK21400) 试剂盒反转录合成 cDNA, 使用 Taq-HS Probe qPCR Premix 预混液进行 qPCR 实验。条件如下: $95^\circ\text{C}: 2 \text{ min}, 94^\circ\text{C}: 20 \text{ s}, 58^\circ\text{C}: 20 \text{ s}, 72^\circ\text{C}: 20 \text{ s}, 40$ 个循环, 最后在 72°C 下延伸 4 min。以 β -actin 作为内参计算 GSDME 的相对表达水平, 实验相关引

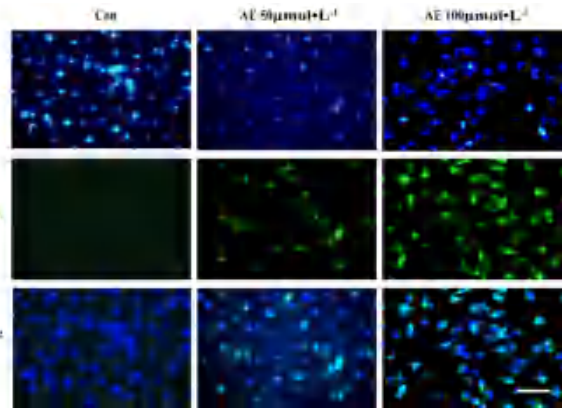


图 6 AE 对 U87MG 细胞 GSDME-N 蛋白表达的影响 (比例尺: ×200)
 Fig 6 Effect of AE on the expression of GSDME-N in U87MG cells (scale bar: ×200)

物列表如表 1, 结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行统计分析。

表 1 引物序列

Tab 1 Primers used in the experiment		
基因	引物	序列
<i>H-GSDME</i>	正向引物	CCCAGGATGGACCATTAAGTGT
	反向引物	GGTTCAGGACCATGAGTAGTT
<i>M-GSDME</i>	正向引物	TGCAACTTCTAAGTCTGGTGACC
	反向引物	CTCCACAACCACTGGACTGAG
<i>H-β-actin</i>	正向引物	CATGTACGTTGCTATCCAGGC
	反向引物	CTCCTTAATGTCACGCACGAT
<i>M-β-actin</i>	正向引物	AACAGTCCGCCTAGAAC
	反向引物	CGTTGACATCCGTAAAGACC

结果显示, 无论是在 U87MG 细胞, 还是在 GL261 细胞中, AE 均可促进 GSDME 在 mRNA 水平的表达, 在 U87MG 细胞中其差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图 7)。

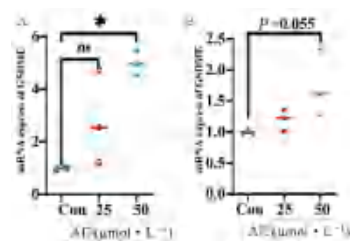


图 7 AE 对 U87MG (A)、GL261 (B) 细胞 GSDME 在 mRNA 水平的表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig 7 Effect of AE on the expression of GSDME in U87MG (A) and GL261 (B) cells at the mRNA level ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注: 与对照组相比, $*P < 0.05$ 。

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

2.5 AE 对胶质瘤细胞线粒体功能及 ROS 的影响

有研究显示线粒体功能障碍及 ROS 和 CASP3/GSDME 途径的焦亡密切相关^[17-18], 为了明确 AE 介导 GBM 过程中是否发生线粒体功能障碍, 我们对 AE 处理的 U87 细胞线粒体膜电位和 ROS 水平进行检测。U87 细胞铺入 6 孔板中, 细胞生长至

70% ~ 80% 分别给予含 0.2%DMSO, 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AE 的培养液共孵育 24 h, 除去培养液, PBS 洗涤细胞一次, 加入 1 mL 含血清细胞培养液。再加入 1 mL JC-1 染色工作液, 充分混匀, 细胞培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min。在孵育期间, 按照每 1 mL JC-1 染色缓冲液 (5 \times) 加入 4 mL 蒸馏水的比例, 配制适量的 JC-1 染色缓冲液 (1 \times), 并放置于冰浴。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育结束后, 吸除上清, 用 JC-1 染色缓冲液 (1 \times) 洗涤 2 次。再加入 2 mL 含血清细胞培养液, 用荧光显微镜进行观察。结果显示 (见图 8): 未经 AE 处理的 U87MG 细胞线粒体膜电位处于正常高电位 (红色荧光标识), 而经 AE 处理的线粒体膜电位降低 (绿色荧光标识)。荧光显微镜活性氧检测显示 (见图 9A): 经 AE 处理后 U87MG 细胞 ROS 荧光明显增强; 应用 DCFH-DA 活性氧 ROS 荧

光针对细胞 ROS 标记, 通过荧光显微镜及流式细胞术检测 ROS 水平。U87 细胞铺入 6 孔板中, 细胞生长至 70% 分别给予含 0.2%DMSO, 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基共孵育 24 h, 除去培养基, 加入 DCFH-DA 浓度为 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基 1 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 30 min, 除去含探针培养基, PBS 清洗三次, 分别进行荧光拍照及流式细胞分析。结果显示 (见图 9B), DCFH-DA 标识的阳性细胞数量明显增多, 这说明 AE 可提高 U87 细胞 ROS 水平。为进一步明确 ROS 的表达是否会影响 GSDME 的活化, AE 处理的 U87MG 细胞与抗氧化剂 NAC 共孵育, 显示 NAC 可以显著减轻 AE (100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 所诱导的 GSDME 的活化 ($P < 0.0001$) (见图 9C), 这提示 AE 诱导 ROS 介导了 GSDME 的活化及细胞焦亡。

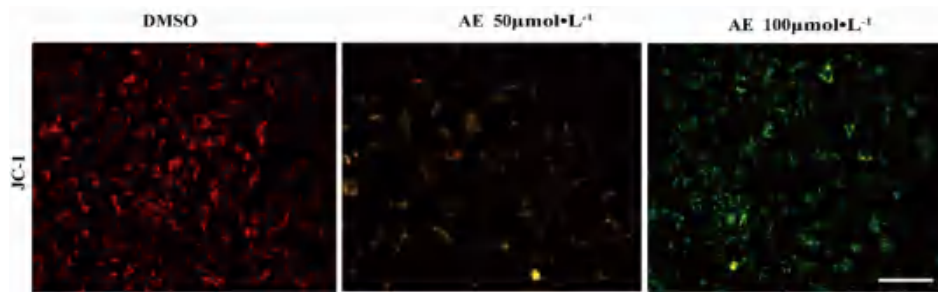


图 8 线粒体膜电位检测 (比例尺: $\times 200$)

Fig 8 Detection of mitochondrial membrane potential (scale bar: $\times 200$)

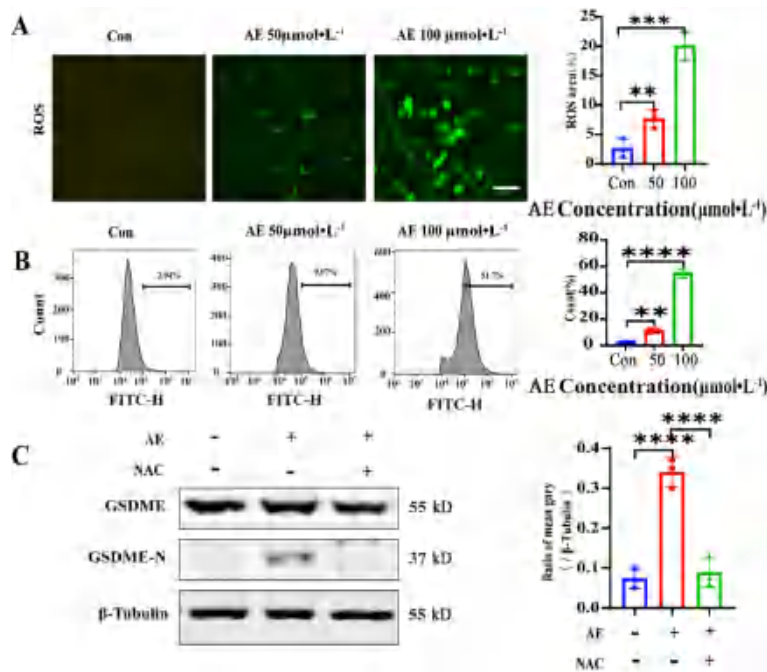


图 9 AE 诱导 U87MG 细胞 ROS 产生及抗氧化剂 NAC 对 GSDME 活化的影响

Fig 9 AE induced ROS production in GBM cells and the effect of antioxidants NAC on GSDME activation

A. DCFH-DA 标记的 ROS 荧光及表达量 (比例尺: $\times 200$) (expression of DCFH-DA-labeled ROS, scale bar: $\times 200$); B. ROS 标记的阳性细胞量 (expression of ROS-labeled positive cells); C. 抗氧化剂 NAC 对 GSDME 活化的影响 (effect of antioxidant NAC on GSDME activation)

注: 与对照组相比, $**P < 0.05$, $***P < 0.01$, $****P < 0.0001$ 。

Note: Compared with the control group, $**P < 0.05$, $***P < 0.01$, $****P < 0.0001$ 。

2.6 统计学方法

所有定量数据均以算术平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用双尾独立样本 *t* 检验比较两组平均值, 使用单因素方差分析与 Bonferroni 的事后分析比较两组以上的平均值。其余数据均采用非参数单向 Kruskal-Wallis 检验, 再进行 Dunnett 多重比较。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 讨论

胶质瘤是中枢神经系统最常见、恶性程度最高、预后最差的恶性肿瘤^[2]。Westphal 等^[19]认为, 癌症相关凋亡诱导和执行缺陷是治疗失败的重要原因^[20-21]。AE 作为一种从天然中草药中提取的单体化合物, 可通过多种途径发挥抗肿瘤作用, 而 AE 应用于抗 GBM 的治疗尚不多见。我们的研究首次发现 AE 通过激活 CASP3/GSDME 通路诱导 GBM 焦亡发挥抗胶质瘤作用, 可能为胶质瘤的治疗提供新的策略。

焦亡是新发现的程序性细胞死亡方式, 而 GSDME 途径的焦亡被认为具有良好的抗肿瘤应用前景, 是 GBM 的一个重要的预后预测因子^[22]。化疗药物被认为是诱导焦亡发生的重要途径之一, 其诱发焦亡是通过激活凋亡关键蛋白 CASP3 来实现的^[23-24]。CASP3 是天冬氨酸特异酶切的半胱氨酸蛋白酶, 正常状况下以无活性的酶原形式存在于细胞质中, 既往研究认为 CASP3 是凋亡相关关键蛋白, CASP3 激活后, 细胞进入凋亡途径, 近年研究表明 CASP3 的剪切和活化, 可进一步剪切和活化焦亡关键蛋白 GSDME, 释放的 GSDME-N 端片段具有细胞膜及线粒体成孔功能, 细胞膜的成孔会导致细胞内容物如 LDH、HMGB1 的释放, 细胞内外渗透压失衡, 诱导细胞焦亡^[25-27]。而 HMGB1 等抗原物质的释放能激活抗原递呈细胞, 进而激活杀伤性 T 细胞, 同时引起肿瘤相关巨噬细胞的活化及浸润, 起到免疫放大作用, 扩大抗肿瘤效应^[28-29]。故 GSDME 途径的焦亡发挥抗肿瘤效应受到直接的细胞成孔及间接的免疫激活双重作用。目前的研究显示乳腺癌、黑色素瘤、胃癌细胞的焦亡有明显的肿瘤抑制作用^[30-31]。

GSDME 的表达可促使细胞从凋亡向焦亡转变^[23], GSDME 在 GBM 中高表达, 使其成为诱导焦亡抗 GBM 治疗的天然靶点, 故筛选合适的焦亡激活药物尤为重要。目前的研究显示多种化学药物如顺铂、阿霉素等具有 GSDME 途径焦亡诱导作用^[29], 但血脑屏障的存在及其毒副作用限制了其颅内应用。AE 具有血脑屏障能力^[32], 本研究显示 AE 具有确切的 CASP3、GSDME 活化作用及 GBM 细胞抑制作用, 故 AE 可以作为

诱导 GBM 焦亡抗肿瘤的良好候选药物。中等浓度的 AE 可明显抑制 GBM 活性, 但未见明显的 CASP3 与 GSDME 的活化, 这提示诱导焦亡是 AE 抑制 GBM 细胞的途径之一, 目前有文献显示 AE 可抑制 DNA 合成、阻滞细胞周期^[11-12], 故认为 AE 抗 GBM 的机制为包括诱导焦亡在内的多种途径渗入, 其焦亡诱导作用也是有限的。GSDME 在正常脑组织及机体器官有表达, GSDME 的完全激活会引起正常组织损伤, 这也被认为与多种化疗药物的毒副反应相关^[26], 而 AE 有限的焦亡诱导作用既有利于其发挥对肿瘤的抑制作用, 又可避免焦亡过度激活所引起的正常组织损伤, 是一种适合临床应用的理想的焦亡诱导药物, 当然其更明确的抗 GBM 作用及安全性有待体内实验进一步明确。

焦亡的发生与线粒体的功能障碍以及 ROS 产生密切相关^[17], Yang 等^[33]研究显示: ROS 产生可激活 JNK/Cytochrome C/CASP9/CASP3 通路, 而诱导高表达 GSDME 的细胞出现焦亡; An 等^[18]研究显示: 线粒体 ROS 的产生可激活 CASP3/GSDME, 进而诱导乳腺癌细胞焦亡。以上研究显示, 线粒体功能障碍和 ROS 产生是 CASP3/GSDME 途径焦亡的启动因素之一, 我们的研究也显示 AE 处理的 GBM 细胞在晚期 (60 h) 出现细胞焦亡, 而在早期 (24 h) 检测 ROS 水平, 显示 ROS 表达水平明显升高, 而用抗氧化剂阻断 ROS 可抑制 AE 所诱导的 GSDME 的活化, 说明 AE 介导 GBM 细胞焦亡和诱发线粒体功能障碍和 ROS 产生相关。

综上, 本文以胶质瘤细胞为研究对象, 通过体外实验证明 AE 以浓度依赖的方式抑制 GBM 细胞活性, 诱导 GBM 细胞出现焦亡特异性外观及 LDH 释放, 介导 CASP3、GSDME 蛋白水平的剪切活化, 上调 GSDME 在 mRNA 的表达, 诱导线粒体功能障碍和 ROS 的产生。证实激活 CASP3/GSDME 通路是 AE 抗 GBM 的机制之一, 可为胶质瘤的治疗提供一种新的选择。

参考文献

- [1] Goodenberger ML, Jenkins RB. Genetics of adult glioma [J]. *Cancer Genet*, 2012, 205 (12): 613-621.
- [2] Sathornsumetee S, Rich JN, Reardon DA. Diagnosis and treatment of high-grade astrocytoma [J]. *Neurol Clin*, 2007, 25 (4): 1111-1139.
- [3] Ferguson SD. Malignant gliomas: diagnosis and treatment [J]. *Dis Mon*, 2011, 57 (10): 558-569.
- [4] 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 (5): 973-978.
- [5] Namba H, Kawaji H, Yamasaki T. Use of genetically engi-

- neered stem cells for glioma therapy [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11 (1): 9-15.
- [6] Brown NF, Carter TJ, Ottaviani D, et al. Harnessing the immune system in glioblastoma [J]. *Br J Cancer*, 2018, 119 (10): 1171-1181.
- [7] Garcia-Fabiani MB, Ventosa M, Comba A, et al. Immunotherapy for gliomas: shedding light on progress in preclinical and clinical development [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2020, 29 (7): 659-684.
- [8] Wang EJ, Chen JS, Jain S, et al. Immunotherapy resistance in glioblastoma [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 750675.
- [9] Xia S, Hollingsworth LT, Wu H. Mechanism and regulation of gasdermin-mediated cell death [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2020, 12 (3). doi: 10.1101/hperspect.a036400.
- [10] Dong X, Zeng Y, Liu Y, et al. Aloe-emodin: a review of its pharmacology, toxicity, and pharmacokinetics [J]. *Phytother Res*, 2020, 34 (2): 270-281.
- [11] Lee HZ, Lin CJ, Yang WH, et al. Aloe-emodin induced DNA damage through generation of reactive oxygen species in human lung carcinoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2006, 239 (1): 55-63.
- [12] Chen R, Zhang J, Hu Y, et al. Potential antineoplastic effects of Aloe-emodin: a comprehensive review [J]. *Am J Chin Med*, 2014, 42 (2): 275-288.
- [13] 孙玮. 芦荟大黄素与顺铂对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 Bcl-2 及 Bcl-xL 表达水平的影响 [J]. *中国实用医刊*, 2018, 45 (21): 112-115.
- [14] 肖丙秀, 郭俊明, 刘东海, 等. 芦荟大黄素抑制胃癌细胞生长与细胞周期阻滞的关系 [J]. *中草药*, 2008, 39 (5): 729-732.
- [15] 谭章斌, 徐由财, 丁文俊, 等. 芦荟大黄素抑制肝癌细胞增殖与迁移的机制 [J]. *中成药*, 2021, 43 (10): 2653-2658.
- [16] Li T, Shi L, Liu W, et al. Aloe-emodin induces mitochondrial dysfunction and pyroptosis by activation of the Caspase-9/3/Gasdermin E axis in HeLa cells [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 854526.
- [17] Bernard NJ. Mitochondria control pyroptosis [J]. *Nat Immunol*, 2021, 22 (9): 1071.
- [18] An H, Heo JS, Kim P, et al. Tetraarsenic hexoxide enhances generation of mitochondrial ROS to promote pyroptosis by inducing the activation of caspase-3/GSDME in triple-negative breast cancer cells [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12 (2): 159.
- [19] Westphal M, Lamszus K. The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2011, 12 (9): 495-508.
- [20] Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13 (10): 714-726.
- [21] Ng KP, Hillmer AM, Chuah CT, et al. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer [J]. *Nat Med*, 2012, 18 (4): 521-528.
- [22] Lin J, Lai X, Liu X, et al. Pyroptosis in glioblastoma: a crucial regulator of the tumour immune microenvironment and a predictor of prognosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26 (5): 1579-1593.
- [23] Jiang M, Qi L, Li L, et al. The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer [J]. *Cell Death Discov*, 2020, 6: 112.
- [24] Shen X, Wang H, Weng C, et al. Caspase 3/GSDME-dependent pyroptosis contributes to chemotherapy drug-induced nephrotoxicity [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12 (2): 186.
- [25] Rogers C, Fernandes-Alnemri T, Mayes L, et al. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14128.
- [26] Wang Y, Gao W, Shi X, et al. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin [J]. *Nature*, 2017, 547 (7661): 99-103.
- [27] Jiang M, Qi L, Li L, et al. The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer [J]. *Cell Death Discov*, 2020, 6: 112.
- [28] Xiao Y, Zhang T, Ma X, et al. Microenvironment-responsive prodrug-induced pyroptosis boosts cancer immunotherapy [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8 (24): e2101840.
- [29] Zhang Z, Zhang Y, Xia S, et al. Gasdermin E suppresses tumour growth by activating anti-tumour immunity [J]. *Nature*, 2020, 579 (7799): 415-420.
- [30] Fang Y, Tian S, Pan Y, et al. Pyroptosis: a new frontier in cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109595.
- [31] Loveless R, Bloomquist R, Teng Y. Pyroptosis at the forefront of anticancer immunity [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40 (1): 264.
- [32] Monn JA, Valli MJ, Massey SM, et al. Synthesis, pharmacological characterization, and molecular modeling of heterobicyclic amino acids related to (+)-2-aminobicyclo [3.1.0] hexane-2, 6-dicarboxylic acid (LY354740): identification of two new potent, selective, and systemically active agonists for group II metabotropic glutamate receptors [J]. *J Med Chem*, 1999, 42 (6): 1027-1040.
- [33] Yang XR, Chen GD, Yu KN, et al. Cold atmospheric plasma induces GSDME-dependent pyroptotic signaling pathway via ROS generation in tumor cells [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11 (4): 295.

(收稿日期: 2022-09-18; 修回日期: 2022-11-16)

基于 UPLC-QTOF/MS 的关黄母颗粒主要化学成分及 脑组织移行成分研究

彭秘¹, 张增珠¹, 李刚¹, 苏丹², 熊国营³, 刘匡一^{3*} (1. 中国人民解放军联勤保障部队第908医院, 南昌 330000; 2. 江西中医药大学抑郁症中医证候动物模型江西省中医药管理局重点研究室, 南昌 330000; 3. 南昌市第一医院, 南昌 330000)

摘要: **目的** 运用 UPLC-QTOF/MS 法对关黄母颗粒中化学成分及脑组织移行成分进行分析和鉴定。**方法** 基于 UPLC-QTOF/MS, 在 0.1% 甲酸水 - 乙腈流动相体系下, Acquity UPLC HSS T3 色谱柱色谱分离后进行正负离子扫描, 结合文献、数据库检索等方式, 对制剂主要化学成分及入脑成分进行分析。**结果** 共分离鉴定出 159 种化学成分, 包括生物碱类、萜类、黄酮类、皂苷类等多种化合物, 并成功鉴定出 15 种脑组织移行成分, 结果显示其主要入脑成分为生物碱及萜类物质。**结论** 该方法准确稳定, 适用于关黄母颗粒中化学成分分析, 也可为寻找出该类物质质量标志物及抗抑郁作用物质基础提供数据支撑。

关键词: 关黄母颗粒; UPLC-QTOF/MS; 脑组织移行成分

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)02-0298-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.004

Main chemical constituents and brain tissue migration components of Guanhuangmu granules based on UPLC-QTOF/MS

PENG Mi¹, ZHANG Zeng-zhu¹, LI Gang¹, SU Dan², XIONG Guo-ying³, LIU Kuang-yi^{3*} (1. *The 908th Hospital of the Joint Logistics Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Nanchang 330000*; 2. *Key Laboratory of Animal Model of TCM Syndrome of Depression, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi Administration Bureau of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330000*; 3. *The First Hospital of Nanchang, Nanchang 330000*)

Abstract: Objective To identify the chemical components and brain tissue transition components in Guanhuangmu granules with a UPLC-QTOF/MS method. **Methods** Based on UPLC-QTOF/MS equipment, and 0.1% formic acid water-acetonitrile mobile phase system, after chromatographic separation on Acquity UPLC HSS T3 column, both positive and negative ion scanings were performed. The main chemical components and brain tissue migration components of the preparation were identified by literature, database retrieval and other methods. **Results** Totally 159 chemical components were isolated, including alkaloids, terpenoids, flavonoids, saponins and other compounds, and 15 brain tissue transition components were successfully identified. The main components entering the brain were alkaloids and terpenoids. **Conclusion** The method is accurate and stable, suitable for the analysis of chemical components in Guanhuangmu granules, which provides data support for determining out the quality markers of this kind of drugs and the material basis of antidepressant effect.

Key words: Guanhuangmu granule; UPLC-QTOF/MS; migrating component of the brain tissue

女性更年期综合征(绝经前后诸证)中医辨证属肝肾阴虚证, 症见烘热汗出、头晕、耳鸣、腰膝酸软或足跟痛、少寐多梦、急躁易怒等, 关黄母颗粒在临床上常应用于妇女更年期后抑郁症类疾病的治疗, 其主要成分包括熟地黄、龟甲胶、盐关黄柏、盐知母以及白芍。目前临床对抑郁治

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.82074014); 江西省中医药管理局科技计划项目(No.2022B1067)。

作者简介: 彭秘, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事药物分析学研究, email: pmi1993@163.com *通信作者: 刘匡一, 男, 主管药师, 主要从事药物分析学研究, email: narutokuang@163.com

疗的药物多为化学类精神药品,普遍存在副作用大,成瘾性隐患等问题。近年来,愈来愈多的药学科人员将目光转移至传统中药上来,以五味子、白芍、关黄柏等药材为主要代表。相对于关黄柏等单味药材,已有文献表明知母与关黄柏配伍联用可显著提高其小檗碱等生物碱的含量^[1],而关黄母颗粒作为临床疗效确切的中药复方制剂,其具体联合用药抗抑郁作用机制尚不清晰,药物主要化学成分能否跨过血脑屏障直接调控神经系统成为传统中药治疗抑郁疾病的重要环节之一^[2-3],因此,对其主要化学成分的分析及脑组织移行成分的研究显得极为重要。

本实验利用超高效液相色谱-质谱联用技术(UPLC-QTOF/MS)中的IDA采集技术^[4-7],结合数据库及文献资料,解析药物中可能存在的主要化学成分,并鉴定大鼠灌胃给药后药物的入脑成分,为进一步明晰该药物抗抑郁作用物质基础提供实验依据^[8],也为下一步的药物质量控制研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

ExionLC AD超高效液相色谱系统、SCIEX X500R四极杆飞行时间质谱仪(美国SCIEX);高速离心机(上海安亭科学仪器厂);涡旋混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);恒温氮气吹干仪(青岛海科仪器有限公司)。

1.2 试药

红景天苷(批号:B1619137,纯度 $\geq 97.5\%$,上海阿拉丁生化科技股份有限公司),槲皮苷(批号:111538-200301,纯度 $\geq 94.5\%$,中国食品药品检定研究院),益母草苷(批号:YA220607,纯度 $\geq 98\%$,合肥博美生物科技有限责任公司)。甲醇、乙腈(色谱级,Thermo Fisher公司),甲酸(质谱级,美国Sigma公司)。蒸馏水采用屈臣氏蒸馏水。关黄母颗粒(批号:04210503,通化万通药业股份有限公司,每袋装9g,相当于饮片4.8g)。

2 方法

2.1 药液样品的制备

取1袋药品(相当于饮片4.8g),移至100 mL烧杯中,加入80%乙腈水溶液50 mL,超声30 min,取适量超声提取液,16 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液进样分析。

灌胃药液:取1袋药品,用25 mL蒸馏水溶解完全,现配现用。

2.2 对照品溶液的制备

取红景天苷、槲皮苷及益母草苷对照品溶液

适量,乙腈溶解稀释,混合配制成为终质量浓度为1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,4℃冷藏保存。

2.3 动物实验

SPF级雄性SD大鼠4只,体质量(180 \pm 20)g[江西中医药大学实验动物中心,动物生产许可证号SCXK(赣)2018-003]。正常喂养1周后开始实验,给药前禁食12 h,自由饮水,空白组灌胃2.5 mL蒸馏水,实验组灌胃2.5 mL灌胃药液,3只大鼠分别于灌胃后1、2、4 h剥离大鼠脑组织,生理盐水冲洗,洗净后加入2倍于组织重量的生理盐水溶液于匀浆机上处理,匀浆后样本4000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,取上清液至-20℃保存。

2.4 血浆及组织样品前处理

取各时间点大鼠脑匀浆后上清组织液200 μL ,600 μL 乙腈沉淀蛋白,涡旋震荡2 min,16 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液,室温下氮气恒流吹干,200 μL 乙腈复溶,进样分析。

2.5 色谱条件

采用Acquity UPLC HSS T3色谱柱(100 mm \times 2.1 mm,1.8 μm ,Waters公司);流动相:正离子模式下0.1%甲酸水(A)-乙腈(B),负离子模式下水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~1 min,5%B;1~10 min,5%~15%B;10~35 min,15%~65%B;35~38 min,65%~95%B;38~41 min,95%B;41~41.1 min,95%~5%B,41.1~45 min,5%B);流速:0.3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温:40℃;进样体积:2 μL 。

2.6 质谱条件

ESI正负离子扫描,喷雾电压+5500 V/-4500 V。Gas 1/Gas 2 55 psi;Cur Gas 35 psi;一级TOF MS扫描范围100~1500 Da,DP 65 V。IDA扫描模式下对碎片进行数据采集,CE \pm 35 V,MS/MS扫描范围50~1500 Da。采样全程DBS(动态背景扣除)模式下运行。

2.7 数据处理

使用SCIEX OS 2.0对数据进行处理,在Mass Error $< 5 \times 10^{-6}$ 内,鉴定药物中主要化学成分。

3 结果

3.1 药液化合物分析结果

药液的总离子流图见图1。通过Sciex OS 2.0数据处理软件,结合数据库、对照品、部分文献^[9-16]以及天然产物裂解规律,共鉴定出159个化学成分,包括萜类27个,生物碱22个,黄酮类20个,醇苷类11个,皂苷类13个,有机酸类12个,氨基酸类12个,木脂素类3个,其他类39个。具体结果见表1。

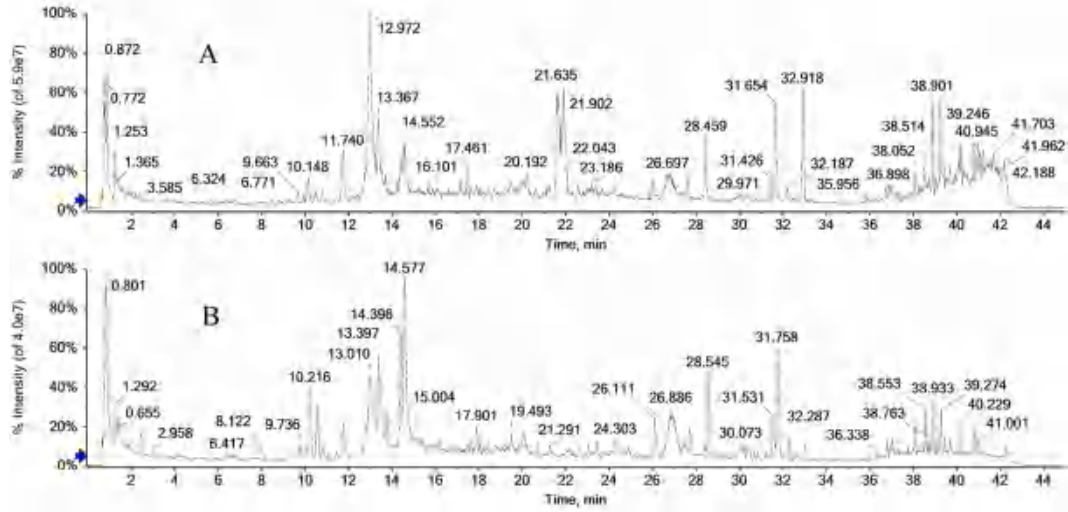


图 1 正 (A)、负 (B) 离子模式下样品的总离子流图
 Fig 1 Chromatogram of samples in positive (A) and negative (B) ion modes

表 1 正、负离子模式下样品的主要化学成分
 Tab 1 Main chemical compositions in samples in the positive and negative ion modes

峰号	t_R/min	化合物	分类	分子式	离子形式	母离子 (m/z)	碎片离子 (m/z)	偏差 / ($\times 10^{-6}$)	归属
1	0.74	L-精氨酸	氨基酸类	$C_6H_{14}N_4O_2$	$[M+H]^+$	175.1191	130.0972, 116.0706, 70.0649	0.6	-
2	0.79	2-甲基丙氨酸	氨基酸类	$C_4H_9NO_2$	$[M+H]^+$	104.0708	60.0806, 58.0651	1.7	-
3	0.79	棉子糖	三糖类	$C_{18}H_{32}O_{16}$	$[M+H]^+$	505.1774	325.1139, 163.0600, 145.0499	2.1	熟地黄
4	0.84	L-脯氨酸	氨基酸类	$C_5H_9NO_2$	$[M+H]^+$	116.0705	70.0653, 68.0495	-1.0	-
5	0.85	D-无水葡萄糖	单糖类	$C_6H_{12}O_6$	$[M-H]^-$	179.0562	161.0469, 89.0244, 71.0142, 59.0141	0.7	-
6	0.85	蔗糖	双糖类	$C_{12}H_{22}O_{11}$	$[M-H]^-$	341.1093	179.0564, 101.0244, 89.0247, 59.0139	1.3	白芍/熟地黄
7	0.89	胞苷	嘧啶类	$C_9H_{13}N_3O_5$	$[M+H]^+$	244.0934	226.1162, 112.0511, 70.0651	2.5	-
8	0.95	L-苹果酸	氨基酸类	$C_4H_6O_5$	$[M-H]^-$	133.0143	115.0042, 72.9933, 71.0141	0.1	-
9	1.11	鸟嘌呤	嘌呤类	$C_5H_5N_5O$	$[M+H]^+$	152.0571	135.0311, 110.0346, 106.0648, 93.0583	2.2	-
10	1.26	烟酰胺	酰胺类	$C_6H_6N_2O$	$[M+H]^+$	123.0553	80.0498, 78.0337, 53.0386	0.5	盐知母
11	1.32	次黄嘌呤	嘌呤类	$C_5H_4N_4O$	$[M+H]^+$	137.0459	119.0353, 110.0350, 94.0411, 82.0403	0.5	-
12	1.35	柠檬酸	有机酸类	$C_6H_8O_7$	$[M-H]^-$	191.0196	111.0091, 87.0090, 67.0191, 57.0348	-0.8	熟地黄
13	1.39	环磷酸腺苷	嘌呤类	$C_{10}H_{12}N_5O_6P$	$[M+H]^+$	330.0599	136.0620, 130.0503, 98.9850	0.3	-
14	1.42	L-焦谷氨酸	氨基酸类	$C_5H_7NO_3$	$[M-H]^-$	128.0354	82.0298, 52.0198	0.5	-
15	1.47	L-谷氨酸	氨基酸类	$C_5H_9NO_4$	$[M+H]^+$	148.0605	84.0449, 56.0487	0.5	-
16	1.47	尿苷	嘧啶类	$C_4H_4N_2O_2$	$[M+H]^+$	113.0345	96.0079, 70.0286	-0.4	-
17	1.53	N-乙酰-L-谷氨酸	氨基酸类	$C_7H_{11}NO_5$	$[M-H]^-$	188.0563	170.0472, 128.0358, 102.0561	-0.8	-
18	1.54	阿糖尿苷	嘧啶类	$C_9H_{12}N_2O_6$	$[M-H]^-$	243.0622	200.0586, 152.0371, 82.0302	-0.1	-
19	1.58	L-酪氨酸	氨基酸类	$C_9H_{11}NO_3$	$[M+H]^+$	182.0813	147.0449, 136.0758, 91.0543	0.8	-
20	1.62	梓醇	萜类	$C_{13}H_{22}O_{10}$	$[M+NH_4]^+$	380.1555	270.0968, 165.0546, 123.0442	1.1	熟地黄
21	1.72	L-异亮氨酸	氨基酸类	$C_6H_{13}NO_2$	$[M+H]^+$	132.1019	86.0963, 69.0700, 56.0496	0.1	-
22	1.76	对羟基苯乙胺	添加剂类	$C_8H_{11}NO$	$[M+H]^+$	138.0915	121.0646, 103.0544, 91.0541, 77.0385	1.1	添加剂
23	1.83	腺苷	嘌呤类	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	$[M+H]^+$	268.1039	136.0616, 119.0353	-0.6	-
24	1.84	腺嘌呤	嘌呤类	$C_5H_5N_5$	$[M+H]^+$	136.0619	119.0361, 92.0329, 65.0134	0.6	-
25	1.89	L-亮氨酸	氨基酸类	$C_6H_{13}NO_2$	$[M+H]^+$	132.1021	86.0963, 69.0700, 56.0496	0.8	-
26	2.14	鸟苷	嘌呤类	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	$[M-H]^-$	282.0842	150.0462, 133.0157, 108.0208	-0.7	-
27	2.14	肌苷	嘌呤类	$C_{10}H_{12}N_4O_5$	$[M-H]^-$	267.0733	135.0312, 108.0211	-0.7	-
28	2.40	去苯甲酰基芍药苷	萜类	$C_{16}H_{24}O_{10}$	$[M+FA-H]^-$	421.1354	375.1303, 345.1192, 195.0667, 183.0662, 151.0766	0.7	白芍
29	2.46	没食子酸	酚酸类	$C_7H_6O_5$	$[M-H]^-$	169.0143	125.0250, 81.0350, 79.0194, 69.0349	0.5	白芍

续表 1

峰号	t_R /min	化合物	分类	分子式	离子形式	母离子 (m/z)	碎片离子 (m/z)	偏差 / ($\times 10^{-6}$)	归属
30	3.00	牡丹酮 -1- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	黄酮类	C ₁₆ H ₂₄ O ₉	[M+FA-H] ⁻	405.1406	359.1355, 197.0820, 179.0717, 122.0377	0.8	白芍
31	3.06	黄嘌呤核苷	嘌呤类	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₆	[M-H] ⁻	283.0683	151.0269, 108.0199	-0.5	-
32	3.48	L-苯丙氨酸	氨基酸类	C ₉ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺	166.0863	120.0808, 103.0543, 77.0385	0.2	-
33	4.18	地黄苷 D	醇苷类	C ₂₇ H ₄₂ O ₂₀	[M+FA-H] ⁻	731.2251	685.2220, 505.1558, 323.0996, 263.0778, 179.0561	-0.2	熟地黄
34	4.68	泛酸	有机酸类	C ₉ H ₁₇ NO ₅	[M-H] ⁻	218.1032	146.0822, 116.0722, 88.0401	-0.8	盐知母
35	4.76	原儿茶酸	酚酸类	C ₇ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	153.0194	109.0301, 108.0218, 91.0187, 65.0025	0.1	白芍 / 熟地黄
36	5.73	京尼平苷酸	萜类	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	[M-H] ⁻	373.1143	211.0576, 149.0604, 123.0461	0.7	熟地黄
37	6.34	L-色氨酸	氨基酸类	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	205.0973	188.0704, 146.0605, 118.0653, 91.0544	0.8	盐知母
38	6.55	柯里拉京	鞣质	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	[M-H] ⁻	633.0733	300.9992, 275.0239	0.8	白芍
39	6.57	没食子酸甲酯	酚类	C ₈ H ₈ O ₅	[M-H] ⁻	183.0301	168.0059, 124.0164, 95.0137	0.9	白芍
40	6.61	6- <i>O</i> - β -D-吡喃葡萄糖基-白芍醇内酯	萜类	C ₁₆ H ₂₆ O ₉	[M+FA-H] ⁻	407.1555	361.1507, 199.0984, 161.0473	-0.9	白芍
41	6.81	原儿茶醛	酚酸类	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	137.0243	108.0211, 92.0266, 81.0344	-1.1	白芍
42	7.32	2, 5-二羟基苯甲酸	酚酸类	C ₇ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	153.0192	125.0236, 108.0215, 95.0131	-1.3	白芍
43	7.40	去乙酰车叶草酸	萜类	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	389.1092	345.1161, 183.0669, 139.0407	0.8	白芍
44	7.43	益母草苷 [#]	萜类	C ₁₅ H ₂₄ O ₉	[M-H] ⁻	347.1345	167.0734, 123.0812	-0.8	熟地黄
45	7.49	色胺	生物碱类	C ₁₀ H ₁₂ N ₂	[M+H] ⁺	161.1073	144.0809, 127.0544, 115.0540	-0.2	盐关黄柏
46	7.53	牡丹皮苷 F	萜类	C ₁₆ H ₂₄ O ₈	[M+FA-H] ⁻	389.1456	343.1387, 181.0872, 163.0766, 151.0768	0.8	白芍
47	7.55	对羟基苯甲酸	酚酸类	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	137.0243	93.0348, 65.0397	-0.7	熟地黄
48	7.72	脱咖啡酸毛蕊花糖苷	醇苷类	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	[M-H] ⁻	461.1662	315.1678, 161.0449, 135.0449, 113.0248	-0.5	熟地黄
49	7.79	儿茶素	酚类	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	[M+H] ⁺	291.0866	147.0437, 139.0391, 123.0429	0.9	白芍
50	7.86	红景天苷 [#]	醇苷类	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	[M-H] ⁻	299.1133	119.0495, 89.0228, 71.0141, 59.0139	-1.5	熟地黄
51	8.01	去甲乌药碱	生物碱类	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	[M+H] ⁺	272.1284	255.1023, 237.0904, 161.0601, 143.0949, 107.0491	0.9	盐关黄柏
52	8.06	秦皮甲素	香豆素类	C ₁₅ H ₁₆ O ₉	[M-H] ⁻	339.0719	177.0197	-0.6	熟地黄
53	8.15	马钱苷酸	萜类	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	[M-H] ⁻	375.1297	213.0769, 169.0873, 151.0760,	0.1	白芍
54	8.26	芍药苷亚硫酸酯	萜类	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₃ S	[M-H] ⁻	543.1181	421.0817, 259.0275, 121.0305	0.5	白芍
55	8.47	肉苁蓉苷 F	醇苷类	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	487.1462	179.0347, 161.0244, 135.0455	0.9	熟地黄
56	9.95	(-)-oblongine	生物碱类	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃	[M+H] ⁺	314.1748	269.1169, 237.0911, 175.0754, 107.0491	-1.2	盐关黄柏
57	10.06	香草酸	酚酸类	C ₈ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	167.0349	152.0139, 108.0215, 68.9960	-0.7	熟地黄
58	10.10	秦皮乙素	香豆素类	C ₉ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	177.0194	133.0295, 105.0355, 89.0395	0.2	熟地黄 / 盐关黄柏
59	10.31	氧化芍药苷	萜类	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	[M-H] ⁻	495.1505	465.0387, 281.0674, 137.0245, 93.0349	-0.6	白芍
60	10.47	去甲异波尔多定	生物碱类	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	[M-H] ⁻	312.1239	297.1013, 282.0767, 254.0821	-0.9	盐关黄柏
61	10.52	咖啡酸	有机酸类	C ₉ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	179.0350	135.0451, 134.0374	0.2	熟地黄
62	10.82	丁香苷	醇苷类	C ₁₇ H ₂₄ O ₉	[M+FA-H] ⁻	417.1399	209.0820, 164.0604, 161.0234	-0.9	盐关黄柏
63	10.86	新绿原酸	有机酸类	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	353.0875	191.0561, 179.0349, 173.0457, 135.0450	-1.0	熟地黄
64	11.10	新芒果苷	黄酮类	C ₂₅ H ₂₈ O ₁₆	[M-H] ⁻	583.1310	463.0890, 421.0788, 403.0663, 331.0464, 301.0363	1.0	盐知母
65	11.79	黄柏碱	生物碱类	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	[M] ⁺	342.1697	192.1042, 177.0780, 148.0758	-0.9	盐关黄柏
66	13.04	阿斯巴甜	添加剂类	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅	[M-H] ⁻	293.1142	261.0886, 217.0988, 200.0719, 146.0612, 97.0407	-0.2	添加剂
67	13.13	木兰花碱	生物碱类	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	[M+H] ⁺	342.1697	297.1118, 282.0882, 265.0852, 237.0906	-1.0	盐关黄柏
68	13.43	芍药内酯苷	萜类	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	[M+H] ⁺	481.1703	319.1167, 197.0801, 179.0700, 151.0750, 133.0644, 105.0330	-0.3	白芍
69	13.73	槲皮素	黄酮类	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M+H] ⁺	303.0499	285.0411, 273.0399, 257.0452	0.8	盐关黄柏
70	13.78	芒果苷	黄酮类	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₁	[M-H] ⁻	421.0775	331.0462, 301.0357, 259.0250	-0.2	盐知母

续表 1

峰号	t_R /min	化合物	分类	分子式	离子形式	母离子 (m/z)	碎片离子 (m/z)	偏差 / ($\times 10^{-6}$)	归属
71	13.97	没食子酸乙酯	鞣质	C ₉ H ₁₀ O ₅	[M-H]	197.0454	169.0142, 124.0157, 78.0121	-0.8	白芍
72	14.02	异芒果苷	黄酮类	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₁	[M-H]	421.0773	343.0459, 331.0461, 313.0360, 301.0354, 258.0173	-0.9	盐知母
73	14.08	马钱苷	萜类	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	[M+FA-H]	435.1504	227.0945, 101.0234	-0.8	白芍
74	14.40	右旋奎宁酸	有机酸类	C ₇ H ₁₂ O ₆	[M-H]	191.0559	93.0334, 85.0293	-1.3	熟地黄
75	14.44	3-O-阿魏酰奎尼酸	有机酸类	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	[M-H]	367.1031	191.0561, 134.0374, 93.0347	-0.9	熟地黄
76	14.52	莲心季铵碱	生物碱类	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃	[M] ⁺	314.1748	269.1170, 237.0912, 209.0964, 143.0494	-1.0	盐关黄柏
77	14.58	桂皮醛	醛酸类	C ₉ H ₈ O	[M+H] ⁺	133.0647	105.0699, 77.0388	-0.4	熟地黄
78	14.64	牡丹皮苷 E	萜类	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₃	[M-H]	525.1610	479.1568, 449.1453, 327.1085, 165.0560, 121.0300	-0.6	白芍
79	14.64	牡丹皮苷 I	萜类	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	[M-H]	479.1555	327.1072, 165.0560, 121.0294	-0.8	白芍
80	14.64	芍药苷	萜类	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	[M-H]	479.1564	449.1449, 327.1078, 165.0560, 121.0300	-0.6	白芍
81	14.66	N-甲基四氢罂粟碱	生物碱类	C ₂₁ H ₂₇ NO ₄	[M+H] ⁺	358.2013	313.1432, 189.0911, 151.0756, 137.0598	0.1	盐关黄柏
82	15.20	紫苏酸	有机酸类	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	[M+H] ⁺	167.1069	149.0960, 121.1016, 105.0700, 91.0543	1.4	熟地黄
83	15.44	松果菊苷	醇苷类	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀	[M-H]	785.2511	623.2201, 161.0242	0.2	熟地黄
84	15.71	蝙蝠葛任碱	生物碱类	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	[M] ⁺	356.1853	311.1275, 279.1012, 248.0834, 236.0834	-0.9	盐关黄柏
85	15.76	辛二酸	有机酸类	C ₈ H ₁₄ O ₄	[M-H]	173.0816	111.0814, 83.0500	-1.8	盐关黄柏
86	15.88	反式阿魏酸	有机酸类	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H]	193.0504	178.0258, 134.0376	-1.3	熟地黄
87	16.05	儿茶素没食子酸酯	酚类	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	[M+H] ⁺	443.0975	291.0873, 273.0787, 153.0187, 139.0384	0.5	白芍
88	16.14	亚美罂粟碱	生物碱类	C ₂₀ H ₂₅ NO ₃	[M+H] ⁺	328.1905	283.1328, 251.1069, 175.0753, 121.0648	-0.8	盐关黄柏
89	16.82	(-)-南烛木树脂酚	酚酸类	C ₂₂ H ₂₈ O ₈	[M-H]	419.1707	373.1302, 359.1144, 343.0830	-1.0	熟地黄
90	16.94	焦地黄苯乙醇苷 A ₁	醇苷类	C ₃₆ H ₄₈ O ₂₀	[M-H]	799.2668	623.2187, 461.1661, 175.0401	0.3	熟地黄
91	17.18	7-甲氧基-芒果苷	黄酮类	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₁	[M-H]	435.0923	315.0536, 272.0313, 175.0393, 160.0109	-2.2	盐知母
92	17.38	牡荆苷	黄酮类	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M+H] ⁺	433.1135	397.0916, 367.0808, 337.0706, 313.0708, 283.0607	1.2	盐知母
93	17.51	金丝桃苷	黄酮类	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	[M+H] ⁺	465.1030	421.1479, 303.0499, 85.0284	0.5	盐关黄柏
94	17.88	异牡荆苷	黄酮类	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M+H] ⁺	433.1134	397.0947, 337.0710, 313.0711, 283.0620	1.1	盐知母
95	17.91	山柰酚-3-O-芸香糖苷	黄酮类	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M+H] ⁺	595.1660	433.1135, 287.0554	0.3	白芍
96	17.93	没食子酰芍药苷	萜类	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₅	[M-H]	631.1667	613.1568, 491.1197, 399.0931271.0459, 169.0141, 121.0293	-0.3	白芍
97	18.04	鞣花酸	有机酸类	C ₁₄ H ₆ O ₈	[M-H]	300.9982	229.0179, 145.0294, 129.0327	-2.6	白芍
98	18.08	五没食子酰葡萄糖	鞣质	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	[M-H]	939.1106	769.0872, 617.1044,	-0.3	白芍
99	18.08	去亚甲基小檗碱	生物碱类	C ₁₉ H ₁₇ NO ₄	[M] ⁺	324.1230	308.0913, 294.0765, 280.0965, 266.0812	0.2	盐关黄柏
100	18.82	黄柏苷	黄酮类	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₁	[M+H] ⁺	519.1865	369.0824, 357.1341, 311.1272, 255.0656, 221.0807	0.8	盐关黄柏
101	19.10	焦地黄苯乙醇苷 B ₁	醇苷类	C ₃₇ H ₅₀ O ₂₀	[M-H]	813.2821	637.2385, 491.1714, 175.0401	-0.2	熟地黄
102	19.31	人血草碱	生物碱类	C ₁₉ H ₁₇ NO ₄	[M+H] ⁺	324.1232	176.0716, 149.0601	0.5	盐关黄柏
103	19.47	延胡索乙素	生物碱类	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	[M+H] ⁺	356.1858	340.1557, 192.1023, 176.0704, 165.0914	0.5	盐关黄柏
104	19.55	(+)-丁香脂素	木脂素类	C ₂₂ H ₂₆ O ₈	[M-H]	417.1557	402.1273, 387.1096, 181.0507	0.4	盐关黄柏
105	19.62	木犀草苷	黄酮类	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M+H] ⁺	449.1082	287.0552, 259.0607, 165.0171	0.9	熟地黄
106	19.79	异丁香酚	添加剂类	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	[M+H] ⁺	165.0910	137.0605, 105.0715, 77.0390	0.2	添加剂
107	19.90	小檗红碱	生物碱类	C ₁₉ H ₁₅ NO ₄	[M] ⁺	322.1072	307.0839, 279.0894, 250.0875	-0.5	盐关黄柏
108	19.97	非洲防己碱	生物碱类	C ₂₀ H ₁₉ NO ₄	[M] ⁺	338.1384	322.1070, 294.1125, 279.0891, 265.0738	-0.9	盐关黄柏
109	20.13	地黄苦苷	醇苷类	C ₁₆ H ₂₆ O ₈	[M-H]	345.1550	165.0917, 119.0347, 89.0238, 59.0137	-1.3	熟地黄
110	20.23	药根碱	生物碱类	C ₂₀ H ₁₉ NO ₄	[M] ⁺	338.1379	323.1145, 308.0915, 294.1120, 279.0888	-0.6	盐关黄柏
111	20.26	牡丹皮苷 D	萜类	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₂	[M-H]	509.1661	463.1622, 341.1229, 112.0295	-0.6	白芍
112	20.62	延胡索甲素	生物碱类	C ₂₂ H ₂₇ NO ₄	[M+H] ⁺	370.2016	352.1185, 206.1173, 192.1020, 165.0912	0.8	盐关黄柏
113	21.07	异肉苁蓉苷	醇苷类	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₅	[M-H]	637.2134	475.1806, 161.0246, 133.0289	-0.7	熟地黄
114	21.49	3', 6'-di-O-galloylpae-oniflorin	萜类	C ₃₇ H ₃₆ O ₁₉	[M-H]	783.1776	631.1726, 465.1400, 347.0759	-0.3	白芍

续表 1

峰号	t_R/min	化合物	分类	分子式	离子形式	母离子 (m/z)	碎片离子 (m/z)	偏差 / ($\times 10^{-6}$)	归属
115	21.76	小檗碱	生物碱类	$C_{20}H_{17}NO_4$	$[M]^+$	336.1225	320.0927, 292.0968, 278.0808	-1.5	盐关黄柏
116	21.83	芹菜素 -7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷	黄酮类	$C_{21}H_{18}O_{11}$	$[M+H]^+$	447.0924	353.2151, 271.0605, 149.0229	0.4	熟地黄
117	21.93	巴马汀	生物碱类	$C_21H_{21}NO_4$	$[M]^+$	352.1540	337.1304, 336.1229, 308.1275, 294.1120	-0.9	盐关黄柏
118	21.97	牡丹皮苷 H	萜类	$C_{30}H_{32}O_{14}$	$[M-H]^-$	615.1716	493.1310, 131.0567, 169.0141	-0.5	白芍
119	22.35	芦丁	黄酮类	$C_{27}H_{30}O_{16}$	$[M-H]^-$	609.1460	445.0974, 303.0499, 283.0463, 85.0284	-0.2	盐关黄柏
120	22.61	槲皮苷 [#]	黄酮类	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M+H]^+$	449.1083	303.0524, 287.1305	1.0	盐关黄柏
121	23.07	地黄苷	醇苷类	$C_{31}H_{40}O_{15}$	$[M-H]^-$	651.2291	475.1821, 193.0506, 175.0401, 160.0160	-0.5	熟地黄
122	23.11	脱氢紫堇碱	生物碱类	$C_{22}H_{23}NO_4$	$[M+H]^+$	366.1696	350.1380, 336.1229, 322.1438, 308.1282	-0.9	盐关黄柏
123	23.27	苯甲酰氧化芍药苷	萜类	$C_{30}H_{32}O_{13}$	$[M-H]^-$	599.1762	477.1396, 137.0247	-1.3	白芍
124	23.32	知母皂苷 E ₁	皂苷类	$C_{43}H_{76}O_{20}$	$[M-H]^-$	935.4849	773.4464, 661.2898	-0.8	盐知母
125	23.77	木犀草素	黄酮类	$C_{15}H_{10}O_6$	$[M-H]^-$	285.0404	237.0397, 175.0421, 133.0310	-0.4	熟地黄
126	23.79	癸二酸	有机酸类	$C_{10}H_{18}O_4$	$[M-H]^-$	201.1129	183.1019, 139.1124	-1.5	熟地黄
127	24.79	罗汉松脂素	木脂素类	$C_{20}H_{22}O_6$	$[M-H]^-$	357.1338	342.1082, 221.0824, 147.0444, 83.0135	-1.7	盐关黄柏
128	24.81	汉黄芩苷	黄酮类	$C_{22}H_{20}O_{11}$	$[M+H]^+$	461.1084	301.0363, 285.0774, 270.0522	1.2	盐关黄柏
129	24.82	异莲心碱	生物碱类	$C_{37}H_{42}N_2O_6$	$[M+H]^+$	611.3089	567.3186, 523.3281, 425.1715	-4.4	盐关黄柏
130	24.83	苯甲酰芍药内酯苷	萜类	$C_{30}H_{32}O_{12}$	$[M+FA-H]^-$	629.1870	553.1717, 461.1404, 165.0521, 121.0294	-0.9	白芍
131	25.99	肉豆蔻素 A ₂	木脂素类	$C_{20}H_{24}O_5$	$[M+H]^+$	345.1699	313.0335, 221.1181, 165.0914, 137.0603	0.9	熟地黄
132	26.02	苯甲酰芍药苷	萜类	$C_{30}H_{32}O_{12}$	$[M+NH_4]^+$	602.2232	585.1981, 427.1378, 319.1174, 267.0866, 249.0761	0.1	白芍
133	26.11	牡丹皮苷 B	萜类	$C_{31}H_{34}O_{14}$	$[M-H]^-$	629.1870	553.1704, 431.1344, 165.0558, 121.0295	-0.9	白芍
134	26.79	淫羊藿苷	黄酮类	$C_{33}H_{40}O_{15}$	$[M+H]^+$	677.2451	531.1876, 369.1340, 313.0702	1.7	盐知母
135	26.81	白鲜碱	生物碱类	$C_{12}H_9NO_2$	$[M+H]^+$	200.0707	185.0479, 129.0577	0.7	熟地黄
136	26.88	知母皂苷 B II	皂苷类	$C_{43}H_{76}O_{19}$	$[M-H]^-$	919.4895	757.4353, 595.3787, 433.3311	-1.2	盐知母
137	27.71	知母皂苷 D	皂苷类	$C_{43}H_{74}O_{19}$	$[M-H]^-$	917.4748	755.4231, 623.9350	-0.4	盐知母
138	28.37	吴茱萸苦素	萜类	$C_{26}H_{30}O_9$	$[M-H]^-$	485.1812	397.2032, 259.0974, 231.1022	-1.0	盐关黄柏
139	28.46	柠檬苦素	萜类	$C_{26}H_{30}O_8$	$[M+H]^+$	471.2010	425.1952, 367.1906, 161.0596	-0.8	盐关黄柏
140	30.73	汉黄芩素	黄酮类	$C_{16}H_{12}O_5$	$[M-H]^-$	283.0605	268.0364, 93.0342	-2.6	盐关黄柏
141	31.11	黄柏酮酸	酮酸类	$C_{26}H_{32}O_8$	$[M+H]^+$	473.2169	427.2124, 341.2116, 161.0600	-0.1	盐关黄柏
142	31.53	知母皂苷 C	皂苷类	$C_{43}H_{74}O_{18}$	$[M-H]^-$	901.4793	739.4284, 577.3643, 161.0430	-1.0	盐知母
143	31.60	尼艾酚	酚酸类	$C_{17}H_{16}O_2$	$[M-H]^-$	251.1076	235.0763, 222.0685, 157.0656, 93.0345	-0.7	盐知母
144	31.76	知母皂苷 B	皂苷类	$C_{43}H_{74}O_{18}$	$[M-H]^-$	901.4798	739.4258	-0.5	盐知母
145	31.83	原薯蓣皂苷	皂苷类	$C_{51}H_{84}O_{22}$	$[M+FA-H]^-$	1093.5439	901.4812, 739.4341, 603.4258	0.3	盐知母
146	32.69	知母皂苷 F	皂苷类	$C_{39}H_{64}O_{15}$	$[M-H]^-$	771.4166	609.3964	-0.8	盐知母
147	32.92	黄柏酮	萜类	$C_{26}H_{30}O_7$	$[M+H]^+$	455.2061	437.1960, 409.2004, 315.1375, 161.0598	-0.7	盐关黄柏
148	33.95	乌药醚内酯	内酯类	$C_{15}H_{16}O_4$	$[M+H]^+$	261.1124	215.1067, 187.1119, 128.0617	1.0	盐关黄柏
149	35.54	宝藿苷 I	黄酮类	$C_{27}H_{30}O_{10}$	$[M-H]^-$	513.1756	366.1097, 351.0891, 323.0915	-2.0	盐知母
150	36.06	大黄素	蒽醌类	$C_{15}H_{10}O_5$	$[M-H]^-$	269.0452	225.0549, 210.0324, 181.0663	-1.5	盐知母
151	36.34	25 (27) -ene-anemarthenasaponin I	皂苷类	$C_{39}H_{64}O_{14}$	$[M-H]^-$	755.4217	593.3722, 521.4002	-0.8	盐知母
152	36.56	知母皂苷 III	皂苷类	$C_{39}H_{64}O_{14}$	$[M-H]^-$	755.4216	593.3650, 537.1203	-0.9	盐知母
153	37.00	薯蓣皂苷元	皂苷类	$C_{27}H_{42}O_3$	$[M+H]^+$	415.3211	271.2062, 253.1948, 147.1180	0.9	盐知母
154	37.05	知母皂苷 A ₂	皂苷类	$C_{39}H_{64}O_{14}$	$[M-H]^-$	755.4219	593.3715, 456.7391	-0.6	盐知母
155	38.52	剑麻皂苷元	皂苷类	$C_{27}H_{44}O_3$	$[[M+H]^+$	417.3365	273.2212, 255.2108, 199.1480	0.4	盐知母
156	38.55	知母皂苷 A III	皂苷类	$C_{39}H_{64}O_{13}$	$[M-H]^-$	739.4266	577.3721, 265.1465,	-1.0	盐知母
157	38.75	2, 3- 羟基白桦酸	萜类	$C_{30}H_{48}O_4$	$[M-H]^-$	471.3475	305.0210, 128.9595	-1.1	白芍
158	40.81	棕榈酸	有机酸类	$C_{16}H_{32}O_2$	$[M-H]^-$	255.2320	219.8413, 166.8659	-3.7	熟地黄
159	41.24	胆甾醇硫酸盐	甾醇类	$C_{27}H_{46}O_4S$	$[M-H]^-$	465.3040	397.2249, 325.1856, 116.9281	-0.9	盐关黄柏

注: [#] 对照品验证; - : 归属可能为多种药材共有或暂不确定。

Note: [#] Standard reference substance verification; - : attribution may be common or uncertain for many herbs.

3.2 醇苷类化合物结构解析鉴定

样品中存在较多醇苷类化合物，以地黄苷为例，负离子模式下，保留时间 23.07 min 存在加和离子 m/z 651.2291 $[M-H]^-$ 的信号强度，对应的 IDA MS/MS 碎片离子中存在 m/z 475.1821 以及 m/z 193.0506 和 m/z 175.0401 特征峰，结合天然产物质谱裂解规律，推测 m/z 475.1821 以及 m/z 193.0506 可能为苷键断裂后产生的 $[M-C_{10}H_8O_3-H]^-$ 及 $[M-C_{21}H_{30}O_{11}-H]^-$ 的碎片离子， m/z 175.0401 为 m/z 193.0506 脱去一分子水所得。

3.3 萜类化合物结构解析鉴定

在整个色谱结构解析过程中鉴定出大量的萜类化合物，实验通过 m/z 165.0557 以及 m/z 121.0298 特征碎片离子的方式来寻找化合物，结果主要以芍药苷、牡丹皮苷 D、牡丹皮苷 B、芍药苷亚硫酸酯、氧化芍药苷为主。以芍药苷为例，保留时间 14.64 min 存在加和离子 m/z 479.1564 $[M-H]^-$ 的信号强度，同时产生 m/z 449.1449 $[M-CH_2O-H]^-$ 的碎片离子，并再次碎裂分解为 m/z 327.1078 的一分子苯甲酸结构及脱去一分子苯甲酸的 m/z 327.1078 的碎片离子^[9]。

3.4 生物碱类化合物结构解析鉴定

共鉴定出 22 种含生物碱类结构的化合物。从峰面积响应强度上来看，含量较多的为黄柏碱、木兰花碱、药根碱、小檗碱以及巴马汀。该类化合物大多都含有 m/z 308.1275 以及 m/z 294.1120 特征碎片离子。以药根碱为例， t_R 20.23 min 出现 m/z 338.1379 以 $[M]^+$ 的一级信号，二级质谱图中 m/z 323.1145 为 $[M-CH_3]^+$ 所致碎片离子， m/z 322.1068 则为 m/z 323.1145 结构中含氮的闭合环上发生电子重排反应再次失去 H 分子产生双键所得， m/z 308.0915 $[M-CH_3-CH_3]^+$ 则可能是 m/z 338.1379 母离子失去两分子甲基后的电子重排的双键产物^[14]， m/z 294.1120 则是 m/z 322.1068 裂解失去 CO 所得。具体二级质谱图及裂解方式见图 2。

3.5 黄酮类化合物结构解析鉴定

通过文献检索、数据库以及天然产物裂解规律，结合数据处理软件中 Formula Finder 确证方式，正离子扫描模式下共鉴定出以 $[M+H]^+$ 加和方式存在的槲皮素、芒果苷、新芒果苷以及牡荆苷等 20 种黄酮类化合物。在天然产物裂解规律中，黄酮类物质一般带有糖基类基团，失去糖基后结构易再次发生 RDA 裂解反应。以 t_R 17.51 min 金丝桃苷为例，二级碎片离子包括失去一分子葡萄糖基的 m/z 303.0499 以及经 RDA 等裂解反应终得的 m/z 85.0284 碎片离子。其中 m/z 303.0499、 m/z 85.0284 的碎片离子是芦丁、金丝桃苷的共有特征碎片离子， m/z 301.0363 是汉黄芩苷黄酮化合物的特有碎片离子^[16]。

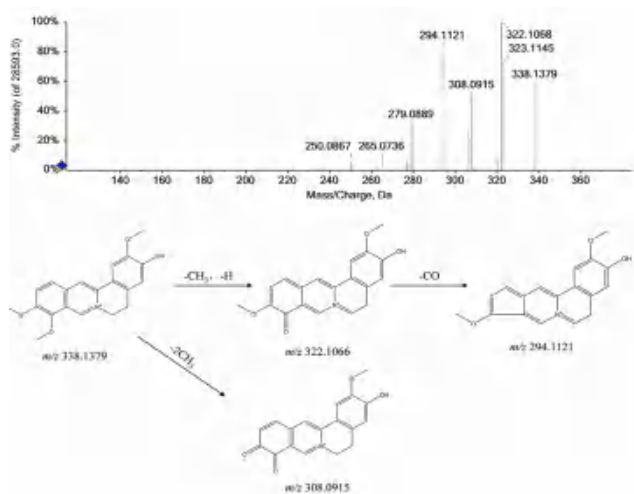


图 2 药根碱二级质谱图及可能存在的裂解途径
Fig 2 MS spectrogram of jatrorrhizine and possible cracking pathways

整合裂解规律，黄酮类化合物在整体二级质谱裂解过程中 C 环 1 位和 4 位上的 CO 键易脱去，产生新的碎片离子。以 t_R 13.73 min 槲皮素为例， m/z 303.0499 是槲皮素的 $[M+H]^+$ 一级信号，失去一分子水得二级碎片信息中 m/z 285.0411，再次发生缩合反应失去一分子 CO 得到 m/z 257.0452 碎片离子^[16]。

3.6 皂苷类化合物鉴定

共鉴定出 13 种皂苷类成分，主要以知母皂苷 A₂、知母皂苷 A III 及知母皂苷 B II 为主。以 t_R 26.88 min 知母皂苷 B II 为例， m/z 919.4873 的 $[M-H]^-$ 离子为其一级加和方式， m/z 757.4353 为 $[M-C_6H_{10}O_5-H]^-$ 碎片离子， m/z 595.3787 为 $[M-C_{12}H_{20}O_{10}-H]^-$ 碎片离子，具体二级质谱图及可能裂解途径见图 3。

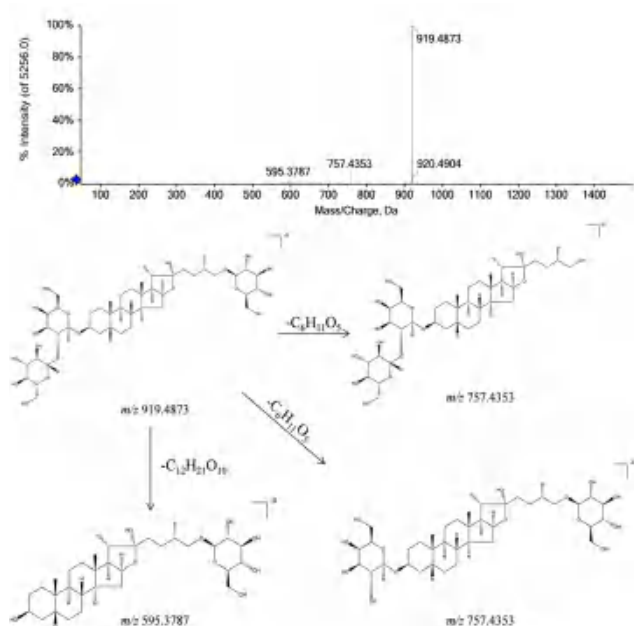


图 3 知母皂苷 B II 二级质谱图及可能存在的裂解途径
Fig 3 MS spectrogram of timosaponin and possible cracking pathways

3.7 脑组织样本分析结果

根据以上鉴定结果,对大鼠灌胃给药后 1、2、4 h 脑组织样本进行 UPLC-QTOF/MS 鉴定分析,通过色谱图和碎片离子信息共推测出 15 种入脑成分,并结合 Sciex QTOF 中的 Swath 非数据依赖型采集技术,选择目标化合物中 MS/MS 响应强度大的二级碎片离子形成 MRMHR (High Resolution) 通道

进行定量研究。结果显示,组织样品中含量较高的部分主要为关黄柏中生物碱类成分,以小檗碱、巴马汀、小檗红碱为代表,其次是芍药苷类化合物,例如芍药苷、芍药内酯苷等。在其中 4 h 脑组织样本中检测出京尼平苷酸类熟地黄化合物,含量较小。生物样品移行成分峰面积分布见图 4。

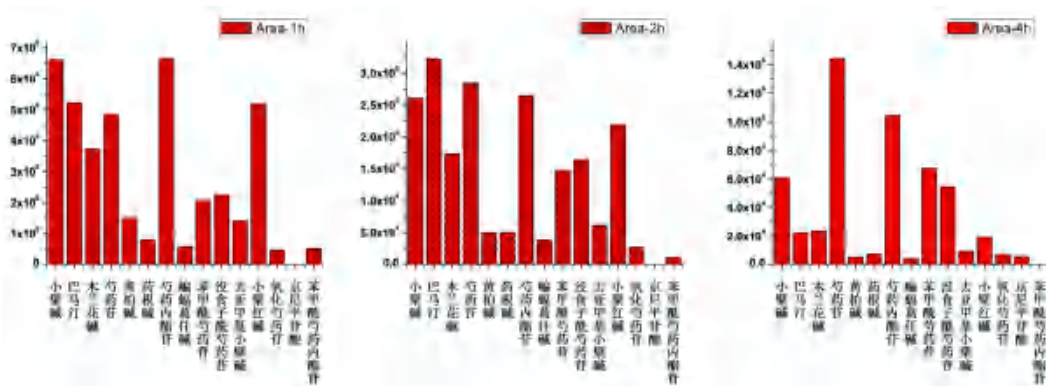


图 4 不同大鼠 1 h、2 h 及 4 h 脑组织移行成分峰面积

Fig 4 Peak area content of migrating components in different brain tissues at 1 h, 2 h and 4 h

4 讨论

本实验基于 UPLC-QTOF/MS 分析方法对关黄母颗粒中主要化学成分进行了分析研究,推测出可能存在的 159 种主要化学成分。其中共鉴定出关黄柏类化合物 39 种,熟地黄类 36 种,盐知母类化合物 26 种以及白芍类化合物 35 种,其中以盐关黄柏中生物碱及白芍中萜类成分最多,并通过动物实验成功鉴定出 15 种入脑成分。

在色谱柱选择方面,本实验着重比较了 C18 与 T3 两种色谱柱的分离情况,颗粒中主要成分为水溶性,C18 色谱柱得到的色谱图大部分色谱峰聚集在保留时间前三分之一段,造成了 IDA 二级扫描模式下部分化合物二级碎片的缺失,因此,通过最终实践比较,选择了 T3 色谱柱进行分离实验。

从鉴定结果表 1 中可见,鉴定出大量的氨基酸类、腺苷类及嘌呤类物质,其在种类及含量上远超过于知母、关黄柏、白芍及熟地黄等单味药材,考虑是颗粒剂中含有龟甲胶成分所致。通过脑组织样品化合物成分鉴定,发现以小檗碱、巴马汀、药根碱、小檗红碱、芍药苷、芍药内酯苷等化合物入脑含量较多。有文献表明,关黄柏类生物碱化合物能通过调节花生四烯酸、甘油磷脂等代谢通路达到消炎镇痛的效果,同时巴马汀成分具有抑制单胺氧化酶 A,调节脑去甲肾上腺素、血清素、多巴胺水平的能力^[13]。而白芍中大量的萜类成分,则具有神经系统调节的功效,芍药苷、芍药内酯苷等易透过

血脑屏障的特点可能是关黄母颗粒剂中治疗抑郁样情绪障碍的有效成分^[8]。与之相同的是,知母皂苷 B II 作为样品鉴定中成分最多的皂苷类物质,在针对女性更年期抗抑郁方面也有一定的药理作用^[17]。而熟地黄中黄酮类化合物则可以显著提高血清雌激素浓度、脾细胞雌激素受体含量水平^[18]。

综上所述,本实验通过运用 UPLC-QTOF/MS 技术对关黄母颗粒主要化学成分及大鼠入脑成分进行了分离和鉴定,后续将对入脑成分在大鼠各脑组织(海马、下丘脑、大脑皮层、脑垂体、脑干等)中的分布进行研究,进一步分析 15 种入脑成分在各区域靶器官的含量,为明晰该制剂改善更年期综合征及抗抑郁等作用的物质基础提供参考。

参考文献

- [1] 邱全玉, 邱昆成, 孙振刚, 等. LC-MS/MS 同时测定配伍知母对黄柏中 5 种成分含量的影响 [J]. 中药材, 2017, 40 (12): 2884-2887.
- [2] 王敏, 胡冰莹, 孙莹莹, 等. 血脑屏障上有机阴离子转运多肽的表达、分子调控及其介导的药物转运 [J]. 中中药学, 2021, 19 (10): 2087-2094.
- [3] 吴莉峰, 石镇港, 曾贵荣, 等. 两种慢性应激对 ICR 小鼠抑郁样行为表现及海马中 FGF2/FGF9 含量的影响 [J]. 中中药学, 2019, 17 (3): 394-398.
- [4] 秦伟瀚, 刘飞, 刘翔, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 法分析江西虫草化学成分 [J]. 中药材, 2017, 40 (6): 1339-1344.
- [5] 秦伟瀚, 刘翔, 阳勇, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 法分析凉山虫草化学成分 [J]. 分析测试学报, 2017, 36 (3):

- 312-318.
- [6] 陈一龙, 励娜, 姚媛媛, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术快速分析铁苋菜的化学成分 [J]. 中药材, 2018, 41 (6): 1352-1358.
- [7] 韩鑫龙, 成欣, 孙颖超, 等. 基于 UHPLC-Orbitrap-MS/MS 法分析青蒿鳖甲汤化学成分 [J]. 中成药, 2021, 43 (12): 3531-3535.
- [8] 李芳, 朱付全, 宋春红, 等. HPLC-ESI-MSⁿ 法鉴定大鼠口服白芍提取物后血清及脑内的化学成分 [J]. 中草药, 2016, 47 (14): 2475-2481.
- [9] 贺晶, 高晓霞, 田俊生, 等. UPLC-MS 分析柴胡、白芍水煎液的化学成分及其对逍遥散的贡献 [J]. 山西医科大学学报, 2018, 49 (4): 375-382.
- [10] 周海玲, 许舜军, 周若龙, 等. 白芍、赤芍化学成分的高效液相色谱-飞行时间串联质谱分析 [J]. 中药材, 2018, 41 (7): 1637-1640.
- [11] 陈琪, 何祥玉, 周曼佳, 等. 白芍的化学成分, 药理作用和临床应用研究进展 [J]. 临床医学研究与实践, 2021, 6 (11): 187-189.
- [12] 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.
- [13] 冯媛, 牛敏格, 张清清. 关黄柏化学成分与药理活性研究进展 [J]. 中国现代中药, 2021, 23 (8): 1486-1498.
- [14] Liao CP, Liu XC, Dong SQ, et al. Investigation of the metabolites of five major constituents from *Berberis amurensis* in normal and pseudo germ-free rats [J]. Chin J Nat Medicines, 2021, 19 (10): 758-771.
- [15] 张波泳, 江振作, 王跃飞, 等. UPLC/ESI-Q-TOF MS 法分析鲜地黄, 生地黄, 熟地黄的化学成分 [J]. 中成药, 2016, 38 (5): 1104-1108.
- [16] 刘匡一, 熊国营, 苏丹. 小绿叶止咳糖浆主要化合物鉴定及药物移行成分分析 [J]. 中成药, 2022, 44 (5): 1385-1392.
- [17] 刘艳平. 知母皂苷成分的药理活性及作用机制研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2018, 36 (1): 24-29.
- [18] 严斐霞, 谢永艳, 陈畅, 等. 熟地黄炮制过程中的化学成分变化和药理作用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32 (10): 2493-2495.

(收稿日期: 2022-07-19; 修回日期: 2022-08-17)

甘草次酸介导的马钱子碱自组装纳米粒的体内药动学研究

管庆霞¹, 周小影¹, 刘宇萌¹, 于欣¹, 赵芳园^{2*} (1.黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2.黑龙江中医药大学附属第一医院, 哈尔滨 150040)

摘要: 目的 对甘草次酸(GA)介导的马钱子碱自组装纳米粒甘草次酸-聚乙二醇-二硫代二丙酸-单硬脂酸甘油酯(B-GPSG-NPs)、马钱子碱(B)、马钱子碱自组装纳米粒聚乙二醇-二硫代二丙酸-单硬脂酸甘油酯(B-PSG-NPs)进行药动学比较研究。方法 采用HPLC法测定马钱子碱在血浆中的含量。18只健康大鼠,雌雄各半,随机分成马钱子溶液组,B-GPSG-NPs溶液组以及B-PSG-NPs溶液组,经尾静脉注射后在不同时间点大鼠眼眶取血,分别于给药后的不用时间点(10、30、60、90、120、150、180、210、240、300、420、600 min)进行眼底静脉丛毛细血管取血,HPLC含量测定后采用DAS 2.0软件对药时数据进行方程拟合,得出药动学参数,进行药动学评价。结果 B-GPSG-NPs溶液组中药物的 $t_{1/2\alpha}$ 、 $t_{1/2\beta}$ 分别是马钱子碱溶液组中药物的3.11、2.18倍,AUC值是马钱子碱溶液组中药物的3.7倍,血浆清除率是马钱子碱溶液组的0.31倍;B-PSG溶液组中药物的 $t_{1/2\alpha}$ 、 $t_{1/2\beta}$ 分别是马钱子碱溶液组中药物的1.5、1.7倍,AUC值是马钱子碱溶液组中药物的3.2倍,血浆清除率是马钱子碱溶液组的0.36倍。结论 B-GPSG-NPs和B-PSG-NPs均改变了马钱子碱的药动学参数,且B-GPSG-NPs组效果更好,延长了药物在大鼠体内的半衰期和体内滞留时间,更有助于提高马钱子碱的生物利用度,发挥长效且高效的作用。

关键词: 甘草次酸; 马钱子碱; 自组装; 纳米粒; 体内药动学

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0306-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.005

基金项目: 黑龙江自然科学基金面上项目(No.H2016076); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(No.12531624); 哈尔滨市应用技术与开发项目(青年后备人才A类)(No.2017RAQXJ090)。

作者简介: 管庆霞,女,博士,副教授,主要从事中药纳米递药系统及中药新药开发研究, email: gqxwyb@163.com *通信作者: 赵芳园,女,硕士,主治医师,主要从事超声影像与中医药及辨证分型相关性研究, email: zfy19820101@163.com

In vivo pharmacokinetics of brucine self-assembled nanoparticles mediated by glycyrrhetic acid

GUAN Qing-xia¹, ZHOU Xiao-ying¹, LIU Yu-meng¹, YU Xin¹, ZHAO Yuan-fang^{2*} (1. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040)

Abstract: Objective To compare the pharmacokinetics of glycyrrhetic acid (GA)-mediated brucine self-assembled nanoparticles glycyrrhetic acid-polyethylene glycol-dithiodipropionic acid-monostearate (B-GPSG-NPs), brucine and brucine self-assembled nanoparticles polyethylene glycol-dithiodipropionic acid-monostearate (B-PSG-NPs). **Methods** An in vivo analytical method for the determination of brucine in the plasma was established by HPLC. Eighteen healthy rats, 9 males and 9 females, were randomly divided into a nux vomica solution group, a B-GPSG-NPs solution group and a B-PSG-NPs solution group. The orbital blood was taken at different time points after tail vein injection, and the blood was collected at different time points after the administration. The fundus venous plexus capillary blood was taken at 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 420, and 600 min. After the content determination by HPLC, the drug time data fitting was conducted by DAS 2.0 software. The pharmacokinetic parameters were obtained, and the pharmacokinetics evaluated. **Results** The $t_{1/2\alpha}$ and $t_{1/2\beta}$ in the B-GPSG-NPs solution group were 3.11, and 2.18 times higher than those in the brucine solution group, the *AUC* was 3.7 times higher than that in the brucine solution group, and the plasma clearance rate was 0.31 times higher than that in the brucine solution group. The $t_{1/2\alpha}$ and $t_{1/2\beta}$ of the drugs in the B-PSG-NPs solution group were 1.5, and 1.7 times higher than that in the brucine solution group, the *AUC* was 3.2 times higher than that in the brucine solution group, and the plasma clearance rate was 0.36 times higher than that in the brucine solution group. **Conclusion** Both the B-GPSG-NPs and the B-PSG-NPs can change the metabolic kinetic parameters of brucine, and the effect of B-GPSG-NPs is better. Compared with the other two groups, B-GPSG-NPs prolongs the half-life and retention time of brucine in rats, and helps improve the bioavailability of brucine.

Key words: glycyrrhetic acid; brucine; self-assembling; nanoparticle; pharmacokinetics in vivo

甘草次酸 (GA) 及其衍生物的抗肿瘤作用已被广泛研究。GA 可通过诱导细胞周期阻滞和激活半胱天冬酶依赖途径来诱导肝癌细胞凋亡, 还通过下调血管内皮生长因子 (VEGF)、淋巴管内皮透明质酸受体 1 (LYVE-1) 和基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 蛋白的表达来抑制肝癌的血管化和淋巴转移^[1-2]。聚乙二醇 (PEG) 修饰的纳米给药系统可延长纳米粒在体内的循环时间, 且透过细胞膜的能力增强。细胞内外存在氧化还原电位, 而二硫键能够在细胞外环境中稳定存在, 在还原性的细胞内环境中被谷胱甘肽 (GSH) 还原, 肿瘤细胞中 GSH 的浓度比细胞外及正常细胞均较高, 能够提供还原环境, 使得二硫键发生断裂, 实现高效释药的目的^[3-4]。

马钱子碱具有抗炎、抗肿瘤及增强机体免疫力等作用, 是一种高效的抗肿瘤单体, 但水溶性差、具有毒性等缺点制约了其在临床上的应

用^[5-6]。如何将药物靶向于肝, 使其更好地发挥疗效, 已成为目前亟需攻克的难题。

本试验基于 GA 的肝靶向性及抗肿瘤的药理作用, PEG 长循环特性及二硫键细胞内可断裂特点, 将 GA、PEG 以及二硫键进行制备, 构建 GA 介导的马钱子碱自组装纳米粒, 以期提高马钱子碱生物利用度, 发挥长效作用。采用 HPLC 法建立马钱子碱在血浆中含量测定的体内分析方法, 经尾静脉注射后在不同时间点大鼠眼眶取血, HPLC 含量测定后 DAS 2.0 软件对药时数据进行方程拟合, 得出药动学参数, 从而分析体内药动学差异。

1 仪器与试药

DF-101Z 恒温磁力搅拌器 (郑州长城科工贸有限公司); 氮气吹干仪 (BFC 八方世纪); 微型涡旋混合器 (上海沪西分析仪器厂有限公司); e2695-2698 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); 离心机 (上海安亭科学仪器厂); 超声波清洗机 (宁波新芝生物科

技股份有限公司); 十万分之一分析电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); 微量移液器(大龙合资)。

肝素钠注射液(江苏万邦生化医药股份有限公司, 批号: 1209124, 规格: 2 mL: 12 500 U); B-GPSG-NPs 冻干品、B-PSG-NPs 冻干品(自制, 载药量约 2.58%); 羟基酪醇(HT)对照品(批号: 20130301, 苏州皓翔化学科技有限公司)、马钱子碱对照品(批号: 110706-200505, 纯度均 > 98%, 中国食品药品检定研究院)。

SPF 级 SD 大鼠, 雌雄各半(200 ± 20) g (批准文号 2016101601, 黑龙江中医药大学试验动物中心)。

2 方法与结果

2.1 GA 介导的马钱子碱自组装纳米粒的制备及表征

2.1.1 GA 介导的马钱子碱自组装纳米粒的制备 课题组前期通过酰胺、酯化等方法将 GA、PEG 以及二硫键进行制备, 构建出 GA 介导的马钱子碱自组装纳米粒载体; 溶剂乳化超声法制备 GA 介导的马钱子碱自组装纳米粒; 制备成 B-GPSG-NPs 冻干粉^[7], GA 介导的马钱子碱自组装纳米粒结构如图 1 所示。

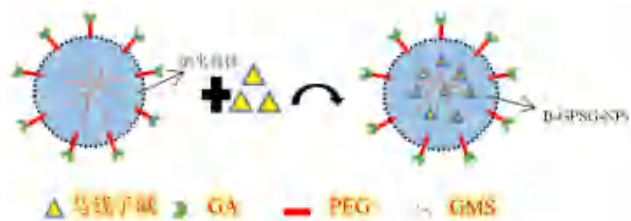


图 1 GA 介导的马钱子碱自组装纳米粒结构图

Fig 1 Structure of GA-mediated brucine self-assembled nanoparticles

2.1.2 GA 介导的马钱子碱自组装纳米粒的表征

① 外观: B-GPSG-NPs 冻干粉, 外观均为白色疏松的固体粉末, 色泽均匀, 外观饱满且光洁细腻, 轻轻振摇后能成块脱落, 见图 2。



图 2 纳米冻干粉

Fig 2 Freeze-drying powder of B-GPSG-NPs

② 形态观察: 将 B-GPSG-NPs 冻干粉复溶后, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 滴入覆有支持膜的铜网上, 吸去过量液体, 自然干燥, 随后滴加浓度为 2% 的磷钨酸溶液, 染色 2 ~ 3 min, 自然干燥, 置于透

射电子显微镜(TEM)下观察并拍照。结果见图 3。冻干后粒径和形态基本没有变化, 为分散均匀的圆球形纳米粒。

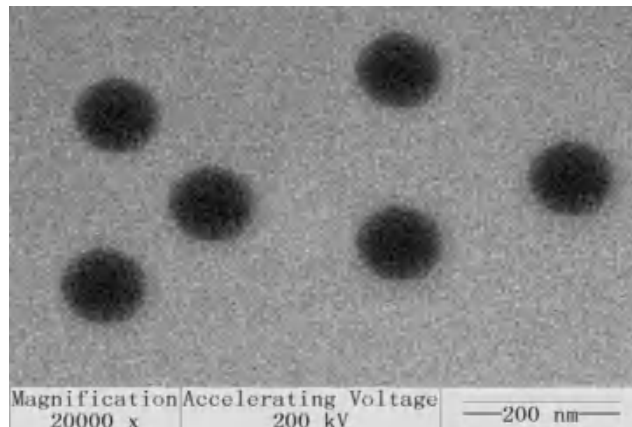


图 3 B-GPSG-NPs 透射电镜照片

Fig 3 B-GPSG-NPs by TEM

③ 再分散性: 取适量 B-GPSG-NPs 冻干粉样品 3 批, 加入适量注射用水进行复溶, 经数次轻轻振摇后, 很快分散成均匀淡蓝色的纳米粒溶液, 说明 B-GPSG-NPs 冻干粉再分散性良好(见图 4)。



图 4 B-GPSG-NPs 冻干品复溶后的外观图

Fig 4 B-GPSG-NPs after re-dissolving

④ 粒径及 Zeta 电位: 取 B-GPSG-NPs 冻干粉用注射用水复溶后, 得到纳米溶液, 测定粒径及 Zeta 电位。结果其粒径为 (108.91 ± 8.62) nm, Zeta 电位为 (-19.63 ± 3.40) mV, PDI 为 (0.187 ± 0.005), 粒径分布及电位见图 5。

⑤ 包封率及载药量的测定

采用低温超速离心法: 量取 3 批 B-GPSG-NPs 溶液置于离心管中, 超速离心 (15 000 r · min⁻¹, 30 min), 将沉淀的纳米粒收集, 再用蒸馏水超声使其分散, 继续离心, 重复 3 次, 取沉淀部分。精密量取 B-GPSG-NPs 混悬液, 加色谱甲醇超声 20 min (频率: 40 kHz, 功率: 200 W), 使纳米粒破乳, 将包载的药物充分释放, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得 B-GPSG-NPs 供试品溶液。同法制备不加药物的 GPSG 空白纳米粒溶液。过 0.22 μm 微孔滤膜, 在流动相为甲醇 - (水 - 乙酸 - 三乙胺 = 230 : 2.4 : 0.3)(30 : 70); 色谱柱为

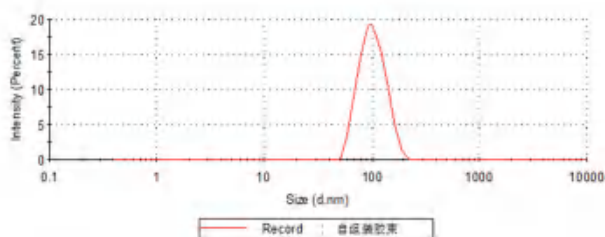


图 5 粒径分布图及电位图

Fig 5 Particle size distribution and Zeta potential

Dikma C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 检测波长 265 nm; 流速 1 mL·min⁻¹; 进样量 20 μL; 柱温 30 °C 条件下进样测定, 计算包封率以及载药量。结果包封率及载药量分别为 (68.37±1.83)% 和 (1.86±0.05)%, 均略有增加, RSD 均小于 5%, 与前期相比, 重现性良好, 工艺可行。

⑥ 稳定性评价: 配制 0.0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mol·L⁻¹ 的 Na₂SO₄ 溶液, 制备 GPSG 空白纳米粒, 取 0.5 mL 的 GPSG 空白纳米粒溶液加入至 2.5 mL 不同浓度的 Na₂SO₄ 溶液中, 37 °C 静置 10 min, 560 nm 波长处紫外检测各个样品的吸光度值, 进行浓度-吸光度曲线的绘制, 用于纳米粒的稳定性评价。

GPSG 纳米粒与一系列浓度的 Na₂SO₄ 溶液作用后的吸光度变化曲线见图 6。由图 6 可知, 当 Na₂SO₄ 浓度低于 0.7 mol·L⁻¹ 时, 体系的吸光度几乎没有变化, 而当电解质浓度继续增加后, 体系的吸光度突然增大, 这可能由于随着电解质浓度的进一步增加, 纳米粒子稳定性降低, 体系吸光度发生突变。其临界絮凝浓度为 0.7 mol·L⁻¹, 远远大于人体血液中的电解质浓度 (主要成分为 0.14 mol·L⁻¹ 的钠离子和 0.10 mol·L⁻¹ 的氯离子), 表明纳米粒子在电解质水溶液中具有高度的稳定性。

2.2 体内药动学分析方法的建立

2.2.1 色谱条件 流动相为甲醇-(水-乙酸-三乙胺=230:2.4:0.3)(30:70); 色谱柱为 Dikma C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 检测波长: 265 nm; 流速: 1 mL·min⁻¹; 进样量: 20 μL; 柱温: 30 °C。

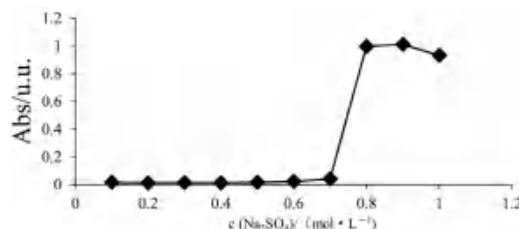


图 6 纳米粒稳定性

Fig 6 Stability of nanoparticles

2.2.2 血浆样品的处理 取大鼠血浆 250 μL, 加入内标 (20 μg·mL⁻¹ 羟基酪醇甲醇溶液) 20 μL, 加入 100 μL 的 NaOH 溶液 (1 mol·L⁻¹), 涡旋 1 min, 超声 20 min, 放入 2 mL 萃取剂 (二氯甲烷: 甲醇=9:1), 涡旋 5 min, 超声溶解 20 min, 离心 5 min (转速 5000 r·min⁻¹), 收集下层液, 上层血浆继续加 2 mL 萃取剂, 重复上述操作, 合并下层液, 置于 37 °C 水浴氮气吹干, 用 200 μL 色谱甲醇复溶, 涡旋 2 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液进样测定。

2.2.3 专属性考察 取空白血浆、含马钱子碱对照品和内标物羟基酪醇对照品的血浆、尾静脉注射马钱子碱后的血浆样品, 按“2.2.2”项下方法进行处理, 结果见图 7, 血浆样品处理的过程中未引入干扰物质, 马钱子碱与内标羟基酪醇的分离度良好, 血浆的内源性物质对测定无干扰。

2.2.4 线性关系的考察

① 马钱子碱溶液的配制: 称取马钱子碱对照品 2.60 mg 置于 25 mL 量瓶中, 用适量甲醇定容, 即得质量浓度为 104 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液, 备用。

② 标准曲线的绘制: 将马钱子对照品溶液, 用空白大鼠血浆逐级稀释得到 0.65、3.25、6.50、13.00、26.00、52.00 μg·mL⁻¹ 系列质量浓度的对照品溶液, 按“2.2.2”项下方法处理, 横坐标 (X) 为血浆中马钱子碱质量浓度, 纵坐标 (Y) 为对照品与内标物峰高之比, 用加权最小二乘法进行回归运算, 得标准曲线方程为 $Y = 0.038X + 0.082$, $R^2 = 0.9986$, 马钱子碱在 0.65 ~ 52.00 μg·mL⁻¹ 内与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度考察 精密量取马钱子碱供试品溶液 200 μL (40.00、20.00、4.00 μg·mL⁻¹), 挥干有机溶剂加入等量空白血浆, 按“2.2.2”项下方法处理后进样分析, 记录峰面积, 在日内、日间分别测定 6 次, 考察其精密度。结果表明, 日内与日间精密度 RSD 均小于 10%, 符合方法学要求。

2.2.6 稳定性考察 精密量取等量马钱子碱供

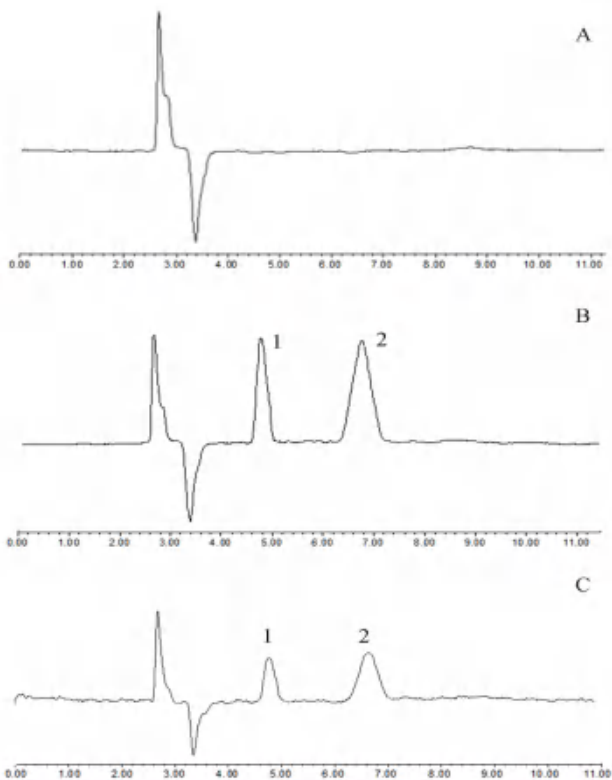


图 7 高效液相色谱图
Fig 7 HPLC chromatogram

A. 空白血浆 (blank plasma); B. 空白血浆+马钱子碱+内标物羟基酪醇 (containing B and hydroxytyrosol substance plasma); C. 血浆样品 (plasma sample); 1. 羟基酪醇 (hydroxytyrosol); 2. 马钱子碱 (brucine)

试品溶液, 分为高、中、低 3 个浓度 (40.00 、 20.00 、 $4.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) ($n = 6$), 氮气挥干, 将适量的空白血浆加入其中, 室温静置 6、12、24 h, 分别取样并冷冻; 间隔 1、2、3 周后取样, 按血浆样品的处理和进样分析, 记录峰面积, 结果 *RSD* 均小于 5%, 符合方法要求。

2.2.7 检测限及定量限 将马钱子碱对照品溶液不断稀释后进行分析, 测得马钱子碱对照品溶液测定的检测限为 $0.428 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 定量限为 $0.650 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。由此可见, 该方法的灵敏度较高, 能满足马钱子碱含量测定的要求。

2.2.8 回收率考察 精密量取 52、13、0.65 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的马钱子碱供试品溶液 200 μL , 各 3 份挥干有机溶剂, 加入等量空白血浆, 按“2.2.2”项下方法处理, 进样分析, 记录峰面积。马钱子碱峰高与未经提取的相同量对照品 (甲醇液) 的峰高比较, 得马钱子碱的绝对回收率; 另将马钱子碱与羟基酪醇峰高之比代入标准曲线方法, 计算测得药物浓度, 与加入量比较, 考察样品的方法回收率, 结果见表 1, 符合生物样品的测定要求。

表 1 回收试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

马钱子碱 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	提取回收率 / %	方法回收率 / %
52.00	92.41 ± 1.54	89.11 ± 4.83
13.00	89.76 ± 3.91	93.34 ± 6.54
0.65	86.17 ± 4.38	94.23 ± 4.12

2.2.9 体内药动学研究

① 动物分组及给药: 取 18 只健康大鼠, 雌雄各半, 随机分成 3 组, 分别为原料药马钱子碱溶液组, B-GPSG-NPs 溶液组以及 B-PSG-NPs 溶液组, 于给药前的 12 h 进行禁食不禁水, 采用尾静脉推注给药的方式, 每组注射马钱子碱的剂量均为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。分别于给药后的不同时间点进行取血 (眼底静脉丛毛细血管取血), 取血时间点为 10、30、60、90、120、150、180、210、240、300、420、600 min, 取血量约为 0.5 mL, 随后置于涂有肝素钠的尖底离心管 (规格: 1.5 mL) 中, $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上层血浆, 按“2.2.2”项下方法处理, 进样分析, 计算血药浓度。

② 血药浓度 - 时间: 分别在给药后各时间点取血, 进样测定后计算血药浓度。马钱子碱溶液组, B-PSG-NPs 溶液组以及 B-GPSG-NPs 溶液组各时间点的马钱子的血药浓度值绘制三组的平均血药浓度 - 时间曲线, 见图 8。

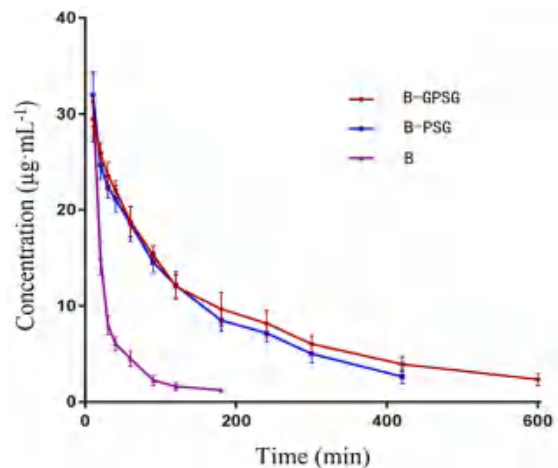


图 8 马钱子碱溶液组, B-PSG-NPs 溶液组, B-GPSG-NPs 溶液组中马钱子碱的血药浓度 - 时间曲线

Fig 8 Plasma concentration-time curves of brucine in the brucine group, the B-PSG-NPs group and the B-GPSG-NPs group

由图 8 可知, B-GPSG-NPs 溶液组与 B-PSG-NPs 溶液组显著提高马钱子碱在体内的血药浓度; 显著延长了马钱子碱在体内的时间。B-GPSG-NPs 经 GA 介导, 较未介导的 B-PSG-NPs 不仅提高了血药浓度还延长了作用时间。

③ 药动学参数: 通过运用 DAS 2.0 软件对所

得进行血药浓度-时间曲线拟合, 结合 F 检验, 根据 AIC 值最小和拟合优度最优原则, 可判定大鼠尾静脉注射马钱子碱溶液组、B-GPSG-NPs 溶

液组以及 B-PSG-NPs 溶液组后的血药浓度-时间曲线均符合权重因子为 $1/C^2$ 的二室模型, 药动学参数见表 2。

表 2 不同给药组的大鼠药动学参数 ($n = 6$)

Tab 2 Pharmacokinetic parameters of different series of rats ($n = 6$)

组别	$t_{1/2\alpha}/h$	$t_{1/2\beta}/h$	$CL/[L/(h \cdot kg)]$	$AUC_{0 \sim t}/[(mg)/(L \cdot h)]$	$AUC_{0 \sim \infty}/[(mg)/(L \cdot h)]$	K_{10}/h^{-1}	K_{12}/h^{-1}	K_{21}/h^{-1}
马钱子碱溶液组	0.141±0.04	1.369±0.42	0.314±0.07	22.831±3.79	31.878±4.83	1.94±0.09	2.603±0.18	0.865±0.07
B-PSG-NPs 溶液组	0.212±0.06 [*]	2.253±0.58 [*]	0.113±0.05 [*]	74.046±4.89 [*]	88.687±5.61 [*]	0.436±0.08 [*]	1.075±0.12 [*]	2.071±0.09 [*]
B-GPSG-NPs 溶液组	0.439±0.09 [*]	2.978±0.48 [*]	0.099±0.11 [*]	85.414±5.26 [*]	100.861±6.12 [*]	0.333±0.98 [*]	0.465±0.08 [*]	1.016±0.07 [*]

注: 与马钱子碱溶液组相比, ^{*} $P < 0.05$, ^{*} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the brucine solution group, ^{*} $P < 0.05$, ^{*} $P < 0.01$ 。

由表 2 可知, 与马钱子碱溶液组相比, B-GPSG-NPs 溶液组和 B-PSG-NPs 溶液组 AUC 、 $t_{1/2\alpha}$ 和 $t_{1/2\beta}$ 均显著增加, CL 大大降低。B-GPSG-NPs 溶液组中药物的 $t_{1/2\alpha}$ 、 $t_{1/2\beta}$ 分别是马钱子碱溶液组中药物的 3.11、2.18 倍, AUC 值是溶液组中药物的 3.7 倍, 血浆清除率是溶液组的 0.31 倍。B-PSG-NPs 溶液组中药物的 $t_{1/2\alpha}$ 、 $t_{1/2\beta}$ 分别是马钱子碱溶液组中药物的 1.5、1.7 倍, AUC 值是溶液组中药物的 3.2 倍, 血浆清除率是溶液组的 0.36 倍。

B-GPSG-NPs 溶液组和 B-PSG-NPs 溶液组均改变了马钱子碱的药动学参数, B-GPSG-NPs 溶液组效果更好, 药物在大鼠体内的半衰期和体内滞留时间更长, 更有助于提高药物的生物利用度, 发挥长效作用。

3 小结

GA 介导的马钱子碱自组装纳米粒的体内药动学研究结果表明, B-GPSG-NPs 溶液组、B-PSG-NPs 溶液组与马钱子碱原料药组相比, 马钱子碱溶液组在 180 h, 基本已代谢完全, 而 B-PSG-NPs 溶液组以及 B-GPSG-NPs 溶液组药物在体内的作用时间延长, 分别为 420 h 和 600 h, 达到长效缓释的效果, 但 B-GPSG-NPs 溶液组更为长效, 原因可能是 GPSG 载体有效地保护了药物, 避免被酶类分解, 有助于药物生物利用度的提高, 从而达到长效的作用; 也有可能是 GA 水解后可生成 18 β -甘草次酸 (β -GA), 具有较大的位阻效应, 对代谢具有一定影响, 从而使其半衰

期延长^[8]。综上, 若进一步优化及研究, GA 介导的马钱子碱自组装纳米粒将有成为临床抗肿瘤治疗新剂型的潜力, 对临床治疗有巨大的研究意义。

参考文献

- [1] Kuang P, Zhao W, Su W, et al. 18 β -glycyrrhetic acid inhibits hepatocellular carcinoma development by reversing hepatic stellate cell-mediated immunosuppression in mice [J]. Int J Cancer, 2013, 132 (8): 1831-1841.
- [2] Satomi Y, Nishino H, Shibata S. Glycyrrhetic acid and related compounds induce G1 arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 [J]. Anticancer Res, 2005, 25 (6B): 4043-4047.
- [3] Luo K, Guo W, Yu Y, et al. Reduction-sensitive platinum (IV)-prodrug nano-sensitizer with an ultra-high drug loading for efficient chemo-radiotherapy of Pt-resistant cervical cancer in vivo [J]. J Control Release, 2020, 326: 25-37.
- [4] Zhang X, Liu K, Huang Y, et al. Reduction-sensitive dual functional nanomicelles for improved delivery of paclitaxel [J]. Bioconjug Chem, 2014, 25 (9): 1689-1696.
- [5] 王晓慧, 孙双姣, 张运良, 等. 马钱子总碱脂质体纳米粒镇痛凝胶的研制 [J]. 邵阳学院学报 (自然科学版), 2022, 19 (1): 97-104.
- [6] 刘丹, 于佳. 马钱子碱 mPEG-PLGA 纳米粒的构建与体外抗肿瘤细胞活性研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2021, 38 (11): 1133-1138.
- [7] 管庆霞, 夏昭睿, 王艳宏, 等. 包载马钱子碱聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒处方工艺优化及其特性研究 [J]. 中草药, 2021, 52 (4): 951-961.
- [8] 颜苗, 李兰芳, 李焕德. 甘草酸、甘草次酸 18 位差向异构体比较研究的进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21 (5): 562-566.

(收稿日期: 2022-06-24; 修回日期: 2022-07-12)

基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的不同产地肺形草化学成分的研究

张忠立, 石文康, 左月明, 吴华强* (江西中医药大学药学院, 南昌 330004)

摘要: **目的** 分析不同产地肺形草中化学成分的差异。**方法** 采用超高效液相-四极杆-飞行时间串联质谱法 (UPLC-Q-TOF-MS) 技术, 色谱条件为 Welchrom HPLC C18 色谱柱 (2.1 mm×150 mm, 3 μm), 乙腈 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0~2 min, 5%A; 2~20 min, 5%~12%A; 20~35 min, 12%~40%A; 35~38 min, 40%A; 38~48 min, 40%~80%A; 48~50 min, 80%A), 流速为 0.3 mL·min⁻¹, 进样室温度为 15℃, 柱温为 35℃, 进样量为 2 μL。电喷雾离子源 (ESI), 在负离子模式下扫描, 扫描范围 *m/z* 100~1250。采用自建数据库匹配、文献参照对不同产地肺形草化学成分进行鉴定, 对所得质谱数据经 MarkView 1.2.1 处理, 使用 SIMCA 14.1 进行主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA), 得到变量重要性投影 (VIP) 值 > 1 的化合物信息, 综合筛选分析不同产地肺形草的分组趋势、相关性和含量差异性化学成分。**结果** 在负离子模式下共鉴别出 51 个化合物, 其中黄酮 8 个、咕吨酮 10 个、环烯醚萜 6 个、生物碱 3 个、醌类 4 个、三萜 3 个、苯丙素 2 个、酚酸 7 个、酯类 3 个、脂肪酸 2 个、其他类 3 个。PCA 及 OPLS-DA 分析结果显示, 不同产地肺形草清晰地聚成 3 类, *t* 检验发现 *P* < 0.05 且 VIP > 1 的化合物有 11 个。**结论** 本法可以系统、精准地鉴定肺形草中含有的化学成分。不同产地肺形草成分差异明显, 同一成分含量也不相同, 以此可作为区分不同产地肺形草的重要依据之一。

关键词: 肺形草; 化学成分; 主成分分析; 正交偏最小二乘判别分析; UPLC-Q-TOF-MS

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0312-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.006

Chemical constituents in *Tripterospermum chinense* from different regions based on UPLC-Q-TOF-MS

ZHANG Zhong-li, SHI Wen-kang, ZUO Yue-ming, WU Hua-qiang* (School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004)

Abstract: Objective To compare the chemical composition in *Tripterospermum chinense* from different regions. **Methods** Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight-tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) technique was used. The chromatographic conditions were Welchrom HPLC C18 column (2.1 mm×150 mm, 3 μm), with acetonitrile (A)-0.1% formic acid aqueous solution (B) as the mobile phase, gradient elution (0~2 min, 5%A; 2~20 min, 5%~12%A; 20~35 min, 12%~40%A; 35~38 min, 40%A; 38~48 min, 40%~80%A; 48~50 min, 80%A). The flow rate was 0.3 mL·min⁻¹, the injection volume was 2 μL, the injection chamber temperature was 15℃, and the column temperature was 35℃. Electrospray ion source (ESI) was used. Samples were scanned in the negative ion mode, and the scanning ranged *m/z* 100~1250. The chemical constituents in *Tripterospermum chinense* from different regions were identified by self-built database matching and literature reference, and the obtained mass spectrum data were processed by MarkView 1.2.1. SIMCA 14.1 was used for principal component analysis (PCA) and orthogonal

基金项目: 江西省教育厅科学技术研究项目资助 (No.GJJ201225)。

作者简介: 张忠立, 男, 副教授, 主要从事天然药物的药效物质基础研究, email: zzl51518@163.com *通信作者: 吴华强, 男, 实验师, 主要从事中药药效物质基础研究, email: 125742454@qq.com

partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) to obtain the information of compounds with variable importance projection (VIP) value > 1. The grouping trends, correlations and differential chemical constituents of *Tripterospermum chinense* from different regions were comprehensively screened and analyzed. **Results** Totally 51 chemical components were identified in the negative ion mode, including 8 flavones, 10 xanthenes, 6 iridoids, 3 alkaloids, 4 quinones, 3 triterpenes, 2 phenylpropionins, 7 phenolic acids, 3 esters, 2 fatty acids, and 3 others. PCA and OPLS-DA showed that *Tripterospermum chinense* from different regions were clearly clustered into 3 categories. Eleven compounds with $P < 0.05$ and $VIP > 1$ by t -test. **Conclusion** This method can comprehensively and accurately identify the chemical components in *Tripterospermum chinense* from different origins. The difference in the compounds of *Tripterospermum chinense* is obvious, and the content of the same chemical component is also different, which can be used as an important criterion for distinguishing *Tripterospermum chinense* from different origins.

Key words: *Tripterospermum chinense*; chemical constituents; principal component analysis; orthogonal partial least squares discriminant analysis; UPLC-Q-TOF-MS

《中华本草》记载了龙胆科双蝴蝶属植物肺形草、青鱼胆草、黄金线、台湾肺形草、小筋骨藤 5 种中草药^[1], 其中肺形草来源于龙胆科植物双蝴蝶 [*Tripterospermum chinense* (Migo) H. Smith] 的幼嫩全草, 主要分布于江西、福建、湖北等地, 味甘、性寒, 归肺、肾经, 具有清肺止咳、凉血止血、利尿解毒等功效^[2]。国内外研究主要集中在玉山双蝴蝶、日本双蝴蝶、双蝴蝶和台湾双蝴蝶等几种植物, 目前已从双蝴蝶属植物中分离得到 100 多个化合物, 主要含有环烯醚萜类和黄酮类(咕吨酮)等成分^[2-4], 现代药理学研究证明其具有抗炎、抗氧化、抗高血压、抗禽流感病毒、抑菌等作用^[4-6]。本课题组前期依据“肺脾两虚, 痰瘀内阻”的中医病机, 建立肺脾两虚型慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 病理模型, 利用此模型研究发现肺形草提取物具有治疗 COPD 的生物活性, 故本实验以不同产地的肺形草为研究对象, 采用超高效液相-四极杆-飞行时间串联质谱法 (UPLC-Q-TOF-MS) 测定不同产地样本, 运用多种统计方法分析不同产地肺形草所含化学成分的差异性, 以提供较全面的肺形草技术资料, 促进肺形草资源的合理利用和开发。

1 材料

1.1 仪器

Nexera X2 LC-30A 型超高效液相色谱仪 (日本岛津公司), Triple TOF 5600+ 型高分辨质谱 (美国 AB SCIEX 公司, 配备 Analyst 1.6 数据处理软件), BT255 十万分之一电子分析天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司), KQ3200B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), GZX-9070ME 数显鼓风干燥箱 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

1.2 试药

不同产地的肺形草药材样品 F1 ~ F8 (见表 1) 均采自于 7 ~ 8 月份, 经江西中医药大学中药鉴定教研室左月明教授鉴定为龙胆科双蝴蝶属植物 *Tripterospermum chinense* (Migo) H. Smith. 的干燥全草。水为屈臣氏蒸馏水, 甲酸、乙腈为色谱纯 (德国 Merck 公司), 其他试剂均为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司)。

表 1 不同产地肺形草药材样品信息

Tab 1 Sample sources of the herba of *Tripterospermum chinense* in different areas

序号	产地	序号	产地
F1	江西省九江市修水县	F5	江西省九江市德安县花桥镇
F2	四川省甘孜州泸定县	F6	云南省安宁市
F3	湖北省十堰市房县	F7	浙江省温州市永丰地区
F4	福建省三明市建宁县	F8	江西省宜春市靖安县中源乡

2 方法与结果

2.1 液相检测条件

Welchrom HPLC C18 色谱柱 (2.1 mm × 150 mm, 3 μm), 流动相乙腈 (A) -0.1% 甲酸水溶液 (B) 梯度洗脱, 洗脱条件: 0 ~ 2 min, 5%A; 2 ~ 20 min, 5% ~ 12%A; 20 ~ 35 min, 12% ~ 40%A; 35 ~ 38 min, 40%A; 38 ~ 48 min, 40% ~ 80%A; 48 ~ 50 min, 80%A。流速为 0.3 mL · min⁻¹, 进样室温度为 15 °C, 柱温为 35 °C, 进样量为 2 μL。

2.2 质谱条件

电喷雾离子源 (ESI), 负离子模式检测, 扫描范围 m/z 100 ~ 1250, 喷雾电压 5.5 kV, 离子源 500 °C, 去簇电压 100 V, 碰撞能量 35 eV, 数据采集时间 50 min。

2.3 供试品溶液的制备

续表 2

No.	t_R /min	化合物名称	分子式	实测分子 量 [M-H] ⁻ ($\times 10^{-6}$)	误差 /	二级碎片	不同产地样品							
							F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
38	34.23	去甲基雏菊叶龙胆酮 ^[9]	C ₁₃ H ₈ O ₆	259.0249	0.7	243.0581, 199.0852, 133.0125	√	√	√	√	√	√	√	√
39	34.77	当药黄素 ^[29]	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	445.1132	-1.8	385.0103, 325.0921, 281.0364	×	√	√	√	×	√	√	×
40	36.44	1-羟基-2,3,4,7-四甲 氧基咕吨酮 ^[28]	C ₁₇ H ₁₆ O ₇	331.3041	-1.2	301.0635, 241.0509	√	×	×	√	×	√	√	√
41	36.49	千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄 糖醛酸苷 ^[30]	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	459.0923	-2.1	313.0714, 265.0808, 235.0242	√	√	√	√	√	√	√	√
42	36.90	1,7-二羟基-3,8-二甲氧 基咕吨酮 ^[28]	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	287.0562	0.4	257.0105, 229.0139, 187.0052	√	√	√	√	√	√	√	√
43	39.31	1,2,8-三羟基-5,6-二 甲氧基咕吨酮 ^[28]	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	303.0361	-0.8	272.0532, 257.0095, 229.0124	√	√	√	√	√	√	√	√
44	39.65	3,6,8-三羟基-1-甲基咕 吨酮 ^[28]	C ₁₄ H ₁₀ O ₅	257.0455	-0.1	243.0230, 215.0279	√	√	√	√	√	√	√	√
45	41.49	2α,3α,19α,23-四羟 基-12-烯-28 乌苏酸 ^[11]	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	503.3375	-0.5	485.0129, 459.0352	√	√	×	√	√	√	×	×
46	42.61	大黄素 ^[13]	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.0455	-0.4	241.0515, 225.0565, 213.0562, 197.0606, 185.0585, 171.0458	√	×	√	√	√	√	√	√
47	44.44	山楂酸 ^[31]	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	471.3475	-0.9	454.3364, 417.0321, 393.0163	√	√	√	×	√	√	√	√
48	44.75	邻苯二甲酸二丁酯 ^[27]	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	277.1444	-0.2	220.0269, 163.1577	√	√	√	√	√	√	√	√
49	46.81	熊果酸 ^[31]	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	455.3534	-1.5	437.0692, 409.0132, 391.0258, 350.0721, 247.0261, 207.2688, 189.0126	√	√	√	√	√	√	√	√
50	47.38	亚油酸 ^[27]	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	279.2331	0.7	261.2197, 251.2327	√	√	√	√	√	√	√	√
51	48.12	油酸 ^[27]	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	281.2488	0.8	267.0595, 263.1488	√	√	√	√	√	√	√	√

注：“√”表示样本存在该成分，“×”表示样本不存在该成分。

Note: “√” Indicates that the component exist in the sample, “×” indicates that the component does not exist in the sample.

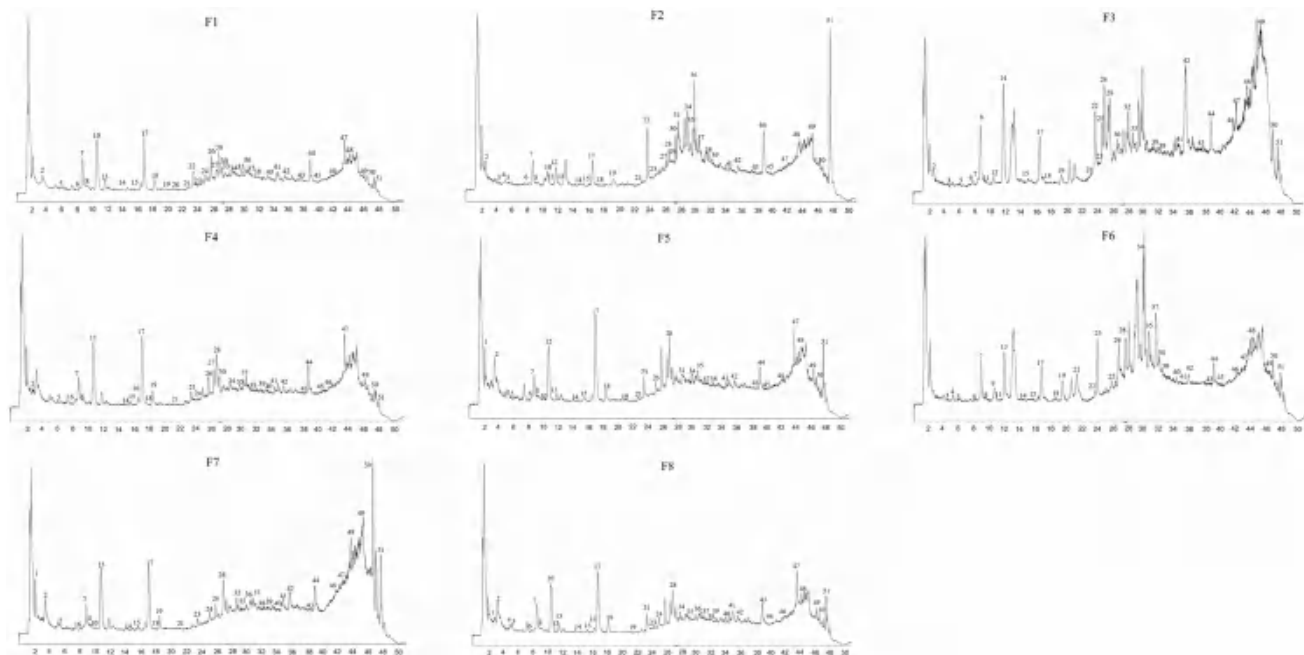


图 1 不同产地肺形草基峰色谱图 (BPI)

Fig 1 Chromatogram of the base peaks of *Tripterospermum chinense* in different areas

2.4.1 环烯醚萜类成分鉴定 峰 3 在负离子峰模式下 m/z 355.1035, 分子式为 C₁₆H₂₀O₉, 在丢失中性碎片 -C₆H₁₀O₅-CO₂ 得到 m/z 149.0178, 再继续丢失 -C₂H₄O₂ 得到 m/z 89.0351, 与参考文献^[9] 比对得知, 此化合物为龙胆苦苷。峰 8 在负离子峰模式下

m/z 375.1296, 分子式为 C₁₆H₂₄O₁₀, 丢失 -C₆H₁₀O₅ 得到碎片离子 m/z 213.0769, 再失去一分子 -CO₂ 得到碎片离子 m/z 169.0873, 丢失一分子 -H₂O 得到碎片 m/z 151.0766, 见图 2。根据二级碎片离子结合参考文献^[9] 推测出此化合物为马钱苷酸。

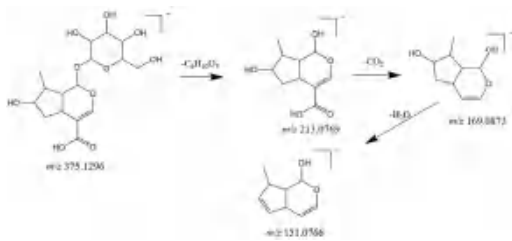


图 2 马钱苷酸的裂解方式

Fig 2 Proposed fragmentation pathways of loganic acid

2.4.2 咕吨酮类成分鉴定 峰 18 在负离子峰模式下 m/z 421.0769, 分子式为 $C_{19}H_{18}O_{11}$, 继而丢失中性碎片 $-H_2O$, $-C_3H_6O_3$, $-C_4H_8O_4$, $-C_6H_{10}O_5$, 生成 m/z 403.0129, 331.0470, 301.0364 和 259.0259 碎片离子, 碎片离子 m/z 331.0470 丢失 $-CO-H_2O$ 得到离子 m/z 285.0411, 碎片离子 m/z 301.0364 丢失 $-CH_2O$ 得到碎片离子 m/z 271.0254, 见图 3。与参考文献^[21] 比对得知, 此化合物为芒果苷。峰 35 在负离子峰模式下 m/z 273.0406, 分子式为 $C_{14}H_{10}O_6$, 丢失一分子 $-CH_3$ 得到碎片离子 m/z 258.0171, 或者丢失一分子 $-CO_2$ 得到碎片离子 m/z 229.0229。与参考文献^[9] 对比得知, 此化合物为雏菊叶龙胆酮。峰 38 在负离子峰模式下 m/z 259.0249, 分子式为 $C_{13}H_8O_6$, 一个羟基键断裂, 得到 m/z 243.0581, 在双苯基 γ -吡喃酮的母核上发生杂环的碳氧化学键断裂, 得到碎片离子 m/z 199.0852。结合文献^[9] 推测出此化合物为去甲基雏菊叶龙胆酮。

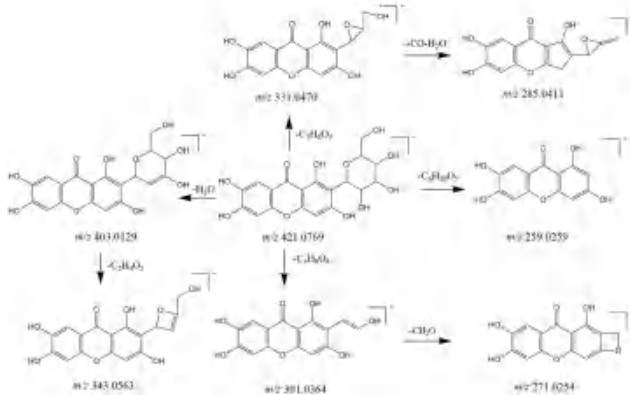


图 3 芒果苷的裂解方式

Fig 3 Proposed fragmentation pathways of mangiferin

2.4.3 黄酮类成分鉴定 峰 22 在负离子峰模式下 m/z 461.1103, 分子式为 $C_{22}H_{22}O_{11}$, 母离子发生 RDA 反应, 丢失 $-C_4H_8O_4$ 生成了 m/z 341.0368 的碎片, 随后又丢失 $-CO$ 及 CH_3 得到碎片 m/z 313.0258 和 m/z 298.0402。通过参考文献^[18] 比对, 得出此化合物为日当药黄素。

峰 23 在负离子峰模式下 m/z 447.0924, 分子式为 $C_{21}H_{20}O_{11}$, 丢失碎片 $-C_6H_{10}O_5$, $-C_4H_8O_4$, $-C_3H_6O_3$, 生成 m/z 285.0681, 327.0522 和 357.0621 碎片离

子, m/z 357.0621 离子碎片再丢失一分子水得 m/z 339.0582, m/z 327.0522 离子碎片再丢失一分子水得 m/z 309.0692, 见图 4。通过参考文献^[22] 比对, 得出此化合物为异荛草苷。

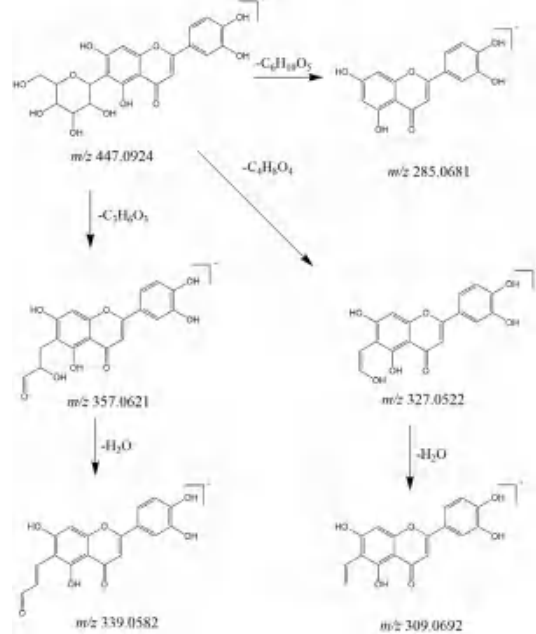


图 4 异荛草苷的裂解方式

Fig 4 Proposed fragmentation pathways of isoorientin

2.4.4 生物碱类成分鉴定 峰 20 在负离子峰模式下 m/z 174.0563, 分子式为 $C_{10}H_9NO_2$, 丢失一分子 $-HCHO$ 得到碎片离子 m/z 144.0621, 再丢失一分子 $-CO$ 得碎片离子 m/z 116.0662, 见图 5。通过参考文献^[9] 比对, 得出此化合物为龙胆碱。

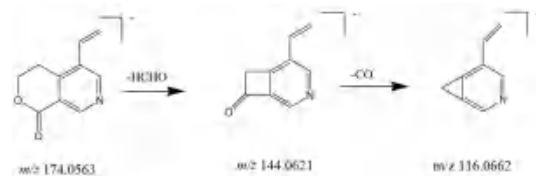


图 5 龙胆碱的裂解方式

Fig 5 Proposed fragmentation pathways of gentianine

2.4.5 三萜类成分鉴定 峰 49 在负离子峰模式下 m/z 455.3534, 分子式为 $C_{30}H_{48}O_3$, 丢失一分子 $-HCOOH$ 得到碎片离子 m/z 409.0132, 再丢失一个 $-H_2O$ 和 RDA 裂解后得到碎片离子 m/z 350.0721, 或者原分子丢失一个 $-H_2O$ 得到碎片离子 m/z 437.0692, 或者原分子发生 RDA 裂解后得到碎片离子 m/z 207.2688, 再丢失一分子 $-H_2O$ 得到碎片离子 m/z 189.0126, 见图 6。通过与参考文献^[31] 进行对比, 得出此化合物为熊果酸。

2.4.6 蒽醌类成分鉴定 峰 46 在负离子峰模式下 m/z 269.0455, 分子式为 $C_{15}H_{10}O_5$, 丢失一分子 $-CO$ 得到碎片离子 m/z 241.0515, 进一步丢失一

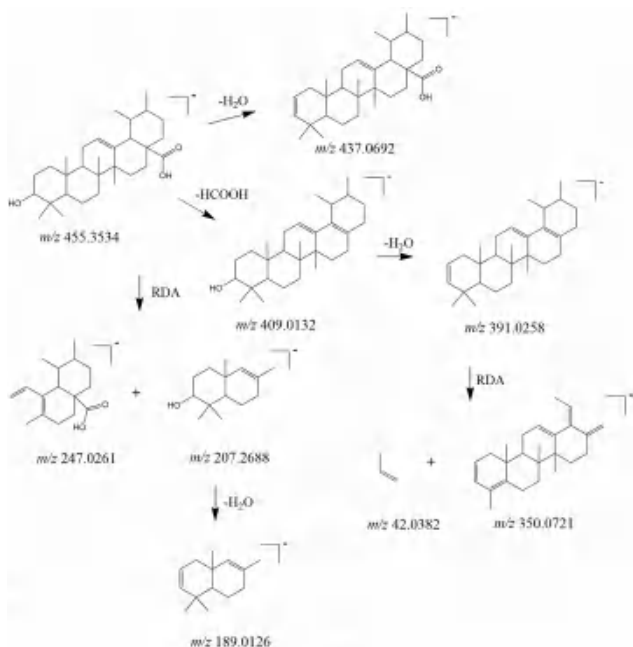


图 6 熊果酸的裂解方式

Fig 6 Proposed fragmentation pathways of ursolic acid

个 -O 得到碎片离子 m/z 225.0565, 而后丢失一分子 -CO 得到 m/z 197.0606; 或者 m/z 241.0515 碎片丢失一分子 -CO 得到 m/z 213.0562, 再丢失一分子 CO 得到 m/z 185.0585, 继续丢失一分子 CH_2 得到 m/z 171.0458, 见图 7。通过与参考文献^[13] 比对, 得出此化合物为大黄素。

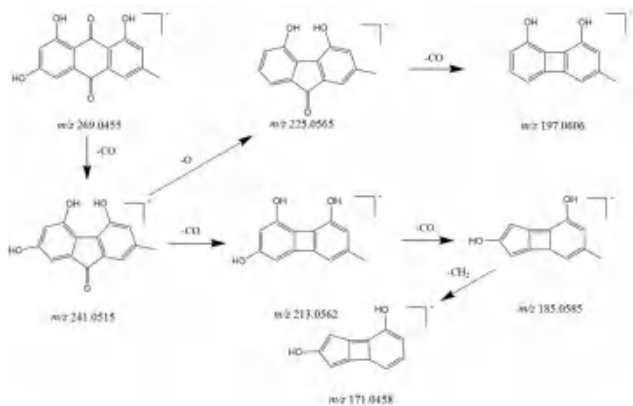


图 7 大黄素的裂解方式

Fig 7 Proposed fragmentation pathways of emodin

2.4.7 有机酸类成分鉴定 峰 21 在负离子峰模式下 m/z 179.0348, 分子式为 $C_9H_8O_4$, 丢失一分子 $-CO_2$ 得到 m/z 135.0459。通过与参考文献^[19] 比对, 得出此化合物为咖啡酸。

2.5 主成分分析

将不同产地的肺形草化学成分存在差异, 主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法 - 判别分析 (OPLS-DA) 将不同产地的肺形草 MS 数据导入 MarkView 1.2.1 并设置参数, 去除同位素离子

峰, 归一化处理得到数据。将得到的数据导入 SIMCA 14.1 进行 PCA 和 OPLS-DA 分析。数据在软件中经过处理可以得到 PCA 图。结果发现不同产地的样本被明显分为三类, 说明样本之间的化学成分有明显的差异, F3 样本为一组, F2 和 F6 样本为一组, F1、F4、F5、F7 和 F8 样本为一组, 每组组内样本之间离散较小, 表示组内均一性良好。PCA 虽然可以将样本进行分类, 但是组内差异并不明显, 所以在 PCA 的基础上进行 OPLS-DA 分析, 结果发现组间差距依旧明显, 组内也存在差异 (见图 8)。聚类分析结果显示: 如果将样本分为两类, F2、F3、F6 为一类, F1、F4、F5、F7、F8 为一类; 如果将样本分为 4 类, 则 F3 为一类, F2、F6 为一类, F5、F8 为一类, F1、F4、F7 为一类, 见图 9。

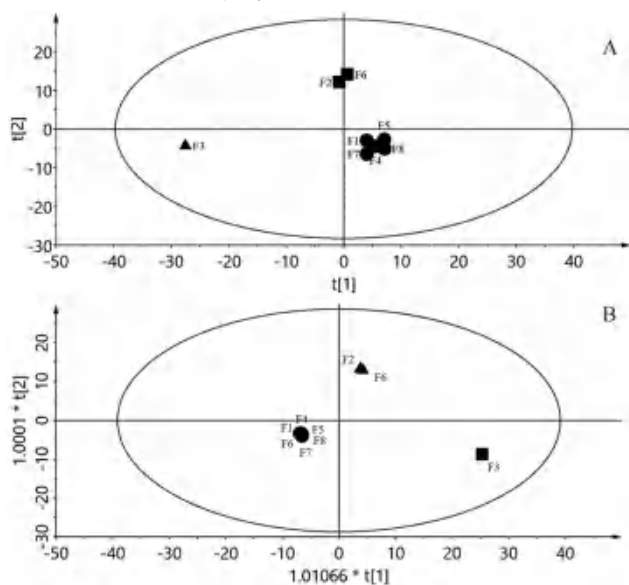


图 8 不同产地肺形草的 PCA 得分 (A) 和 OPLS-DA 得分 (B)

Fig 8 PCA scores (A) and OPLS-DA scores (B) of *Tripterospermum chinense* in different areas

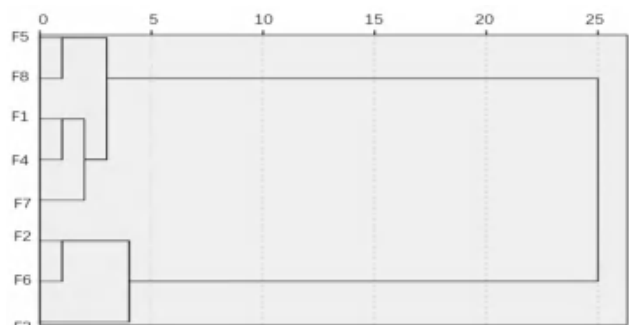


图 9 不同产地肺形草的聚类分析

Fig 9 Cluster analysis of *Tripterospermum chinense* in different areas

2.6 差异性成分的筛选与分析

将不同产地肺形草数据导入 MarkView 1.2.1 中设置参数, 去掉同位素离子峰后再进行 t 检

验, 导出数据保留 Use 一列中的 Ture 数据; 结合 OPLS-DA 中 VIP > 1 的值与 *t* 检验中 $P < 0.05$ 的值取交集, 对照所有的数据共得到 11 个差异性指标成分, 将每个产地的峰面积进行对比, 结果见表 3。

表 3 不同产地肺形草存在差异的化合物信息

Tab 3 Compound information of differences of *Tripterospermum chinense* in different areas

序号	化合物名称	VIP	含量最高产地
8	马钱苷酸	1.0349	F3
10	莫诺昔	1.1513	F8
17	8-表-金银花苷	1.1215	F3
18	芒果苷	1.1416	F5
37	1, 3, 8-三羟基咕吨酮	1.1364	F6
39	当药黄素	1.1552	F3
41	千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷	1.1535	F3
44	3, 6, 8-三羟基-1-甲基咕吨酮	1.1639	F6
46	大黄素	1.1525	F8
47	山楂酸	1.1536	F3
49	熊果酸	1.0903	F3

不同产地的肺形草药材中, 化学成分种类差别不大, 均以黄酮和环烯醚萜类成分为其主要成分类型, 而有 11 个差异性成分的相对含量不同, 马钱苷酸、8-表-金银花苷、莫诺昔和芒果苷在肺形草药材中相对含量较高。1, 3, 8-三羟基咕吨酮和 3, 6, 8-三羟基-1-甲基咕吨酮在 F6 样本中含量较高, 大黄素和莫诺昔在 F8 样本中含量较高, 芒果苷在 F5 样本中含量较高, 马钱苷酸、8-表-金银花苷、当药黄素、熊果酸、山楂酸和千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷在 F3 样本中含量较高。

3 讨论

本实验采用 UPLC-Q-TOF-MS 对不同产地肺形草的化学成分进行辨识, 前期正、负离子模式比较发现, 黄酮类和环烯醚萜类成分在负离子模式下所显示的成分信息更多。同时, 我们对色谱条件进行优化, 对提取方法、提取时间以及流动相等进行了考察, 最终确定以 70% 甲醇为提取溶剂, 回流提取 2 h, 流动相采用乙腈-0.1% 甲酸水进行负离子模式下梯度洗脱测试, 共鉴别出 51 个化合物, 其中以黄酮、咕吨酮和环烯醚萜类成分为主, 最终筛选出大黄素、芒果苷、莫诺昔等 11 个差异性成分, 这些差异性成分相对含量的不同直接反映不同产地肺形草药材质量的差异性, 产于江西、浙江、福建的肺形草药材成分相近, 产于四川和云南的肺形草药材成分相近, 而产于湖北的肺形草单独为一组。由于目前化学成分数据

库尚不完善和相关领域研究报道较少, 导致部分成分没有最终鉴定, 有待后续进一步深入研究。

国内外对双蝴蝶属植物的化学成分和药理活性的研究显示, 双蝴蝶属植物中的化学成分多属于环烯醚萜类和咕吨酮类成分, 大多具有非常广泛的药理活性, 其中马钱苷酸和 8-表-金银花苷具有抗炎作用^[4], 莫诺昔具有保护神经元延缓衰老、保肝作用^[32], 芒果苷具有抗炎、抗心力衰竭作用^[33], 当药黄素具有抗炎、抗氧化和抗抑郁作用^[34], 研究表明肺形草具有抗炎、抗氧化、抗高血压、抗病毒、抑菌等作用。本课题组前期研究发现肺形草提取物具有治疗 COPD 的生物活性, 但其药效物质基础不清晰, 有待进一步深入探讨。此外, 肺形草不同产地药材中环烯醚萜类和咕吨酮类差异性成分相对含量的不同, 导致药材质量的不稳定, 需要以此类差异性成分为定量指标建立和完善肺形草药材的质量标准, 故通过本文研究, 可为后续药材质量标准的制定提供科学依据和理论支撑, 以促进其资源的合理利用和深度开发。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 6266-6267.
- [2] 张涛. 肺形草抗 H5N1 禽流感活性成分研究 [D]. 北京: 北京工业大学, 2013.
- [3] 左月明, 刘电航, 张忠立, 等. 肺形草化学成分研究 [J]. 中药材, 2014, 37 (11): 2002-2004.
- [4] 韩海燕. 双蝴蝶的化学成分及抗炎作用研究 [D]. 武汉: 中南民族大学, 2019.
- [5] Hou CY. Theoretical study of antioxidative ability and antioxidative mechanism of norathyriol in solution [J]. Comput Theor Chem, 2014, 1028: 87-91.
- [6] 周罗琴, 田宏现. 峨嵋双蝴蝶提取物抑菌作用研究 [J]. 中国农学通报, 2015, 31 (7): 154-158.
- [7] 赵亮, 田文君, 吕磊, 等. HPLC-TOF/MS 对中药复方扶正平消胶囊化学成分的鉴别 [J]. 第二军医大学学报, 2012, 33 (7): 770-779.
- [8] 艾则孜·穆合买提, 贺玖明, 孙江浩, 等. 中药注射液液中 5-羟甲基糠醛含量测定的 LC-MS/MS 分析方法研究 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30 (7): 1195-1198.
- [9] 段吉平, 段琼, 王铁战, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的当药化学成分分析 [J]. 中国现代中药, 2021, 23 (7): 1182-1189.
- [10] 涂海声, 邱嘉琦, 徐雅, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive-MS 技术的短序蒲桃叶白素新衍生物的快速发现 [J]. 分析测试学报, 2022, 41 (7): 988-997.
- [11] 陈金梅, 廖锦红, 高金薇, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 研究胆木药材水提物的化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24 (18): 49-56.

- [12] 秦伟瀚, 阳勇, 郭延垒, 等. 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱定性分析油炸马钱子中化学成分[J]. 中国药理学杂志, 2019, 54(2): 123-131.
- [13] Jiang YP, Liu R, Chen JJ, 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] 樊晓荃, 付娟, 胡军华, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 快速分析六味地黄苷片化学成分[J]. 中草药, 2021, 52(21): 6473-6484.
- [15] 程斌, 李文兰, 周爱珍. HPLC-ESI/MSⁿ 联用技术对桂附地黄丸体内代谢化学成分的研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(2): 388-392.
- [16] 刘佳星, 魏洁, 武锦春, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的酸枣仁汤颗粒化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(12): 1-12.
- [17] 张程瑞. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的喜树花果茎叶的靶向代谢组学分析[D]. 成都: 四川农业大学, 2020.
- [18] 梁向平, 戢爽, 杜少波, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的麻花秦艽不同部位化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(8): 139-148.
- [19] 李晓娜. HPLC-Q-Exactive-MS/MS 法快速分析四味土木香散血中移行成分及其代谢物[D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2019.
- [20] 肖雪, 许思敏, 高映敏, 等. 盐制女贞子化学成分的 UPLC-Q/TOF MS 鉴定研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(10): 253-260.
- [21] Ji D, Huang ZY, Fei CH, et al. Comprehensive profiling and characterization of chemical constituents of rhizome of *Anemarrhena asphodeloides* Bge. [J]. J Chromatogr B, 2017, 1060: 355-366.
- [22] Liu M, Jiang YP, Liu R, 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.
- [23] 吕渭升, 位翠杰, 潘晓君, 等. UPLC-MS/MS 法分析旋覆花蜜炙后化学成分的变化[J]. 中国药房, 2021, 32(20): 2478-2484.
- [24] Xu SY, Xu XF, Yuan SX, et al. Identification and analysis of amygdalin, neoamygdalin and amygdalin amide in different processed bitter almonds by HPLC-ESI-MS/MS and HPLC-DAD [J]. Molecules, 2017, 22(1425): 1-10.
- [25] 王维皓, 严平贞, 杨滨. 羌活中香豆素类化合物 UPLC-Q-TOF 质谱裂解规律研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(5): 1179-1190.
- [26] 陈雷. 龙胆苦苷衍生物合成及药理作用研究[D]. 西安: 西北大学, 2008.
- [27] 梁泽华, 潘颖洁, 邱丽媛, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析黄精九蒸九晒炮制过程中化学成分的变化[J]. 中草药, 2022, 53(16): 4948-4957.
- [28] 董惠敏, 许如玲, 陈晓青, 等. 印度獐牙菜中吡啶类成分的 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 分析[J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(5): 744-749.
- [29] 王晓玫, 刘洁, 丁永胜, 等. 基于 HPLC-LTQ-Orbitraps-MSⁿ 分析比较酸枣仁-五味子药对单煎液和合煎液化学成分[J]. 中国现代中药, 2021, 23(11): 1949-1966.
- [30] 庞溢媛, 薛立英, 郑艳红, 等. 基于 UHPLC-MS/MS 代谢组学技术的不同采收期黄芩质量比较研究[J]. 药理学学报, 2017, 52(12): 1903-1909.
- [31] 陈方超, 高守红, 王志鹏, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术鉴定藤梨根的化学成分[J]. 中国药房, 2020, 31(14): 1725-1731.
- [32] 雷小小, 苏艳莹, 李美云, 等. 山茱萸环烯醚萜苷中马钱苷和莫诺苷的研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(1): 104-108.
- [33] 杨海光, 方莲花, 杜冠华. 芒果苷的药理作用研究进展[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(1): 5-8.
- [34] 江南, 许晓燕, 余梦瑶, 等. 当药黄素抗抑郁作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31: 129-134, 162.

(收稿日期: 2022-09-10; 修回日期: 2022-11-05)

裂叶独活精油成分分析及其对 HaCaT 细胞 辐射损伤的保护作用

向汝群¹, 朱根华¹, 严志宏¹, 董德刚¹, 张云², 蔡瑛¹, 彭苏芹¹, 熊庆¹, 姚雪莲^{1*}, 潘纯国^{2*}
(1.江西中医药大学, 南昌 330004; 2.江西省肿瘤医院, 南昌 330029)

摘要: **目的** 采用 GC/Q-TOF MS 对裂叶独活精油进行成分定性分析并研究其对 X 射线照射的 HaCaT 细胞的损伤保护作用。**方法** 应用水蒸气蒸馏法提取裂叶独活精油, 采用 GC/Q-TOF MS 对其成分进行解析; 采用 CCK-8 法检测细胞增殖活性探索裂叶独活精油的照射剂量、作用浓度和时间; 细胞划痕实验检测细胞迁移; Real-time PCR 法检测 Notch1 受体和 Jagged1 配体 mRNA 表达。**结果** 共得到裂叶独活精油 118 个化学成分, 其中含量较高的有 3-苯基丙基环丁烷羧酸酯 (9.06%)、十六烷酸 (8.62%)、匙羹藤醇 (7.76%)、氧化石竹烯 (4.05%)、反式-橙花叔醇 (3.99%)、2-(4-甲基苯基) 2-丙醇 (3.92%), 主要为单萜、倍半萜、脂肪族和芳香族类化合物; 裂叶独活精油能有效促进 HaCaT 细胞增殖、迁移, 并上调 Notch1 受体和 Jagged1 配体 mRNA 表达。**结论** 裂叶独活精油成分对辐射损伤的 HaCaT 细胞有防护作用, 可能是通过激活 Notch 信号通路, 上调 HaCaT 细胞相关受体与配体的表达, 发挥其促增殖和迁移作用。

关键词: 裂叶独活; 成分分析; 放射性皮肤损伤; HaCaT 细胞; Notch 信号通路

中图分类号: R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)02-0320-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.007

Component analysis of essential oil of *Heracleum millefolium* and its protective effect on radiation damage in HaCaT cells

XIANG Ru-qun¹, ZHU Gen-hua¹, YAN Zhi-hong¹, DONG De-gang¹, ZHANG Yun², CAI Ying¹, PENG Su-qin¹, XIONG Qing¹, YAO Xue-lian^{1*}, PAN Chun-guo^{2*} (1. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004; 2. Jiangxi Cancer Hospital, Nanchang 330029)

Abstract: Objective To qualitatively analyze the components of essential oil of *Heracleum millefolium* by GC/Q-TOF MS and determine its protective effect on X-ray irradiated HaCaT cells. **Methods** The essential oil of *Heracleum millefolium* was extracted by steam distillation and analyzed by GC/Q-TOF MS. CCK-8 method was used to detect the cell proliferation to explore the irradiation dose, concentration and time of use of the essential oil of *Heracleum millefolium*. Cell scratch test was used to detect the cell migration, and real-time PCR was used to detect the mRNA expression of Notch1 and Jagged1. **Results** Totally 118 essential oil components in *Heracleum millefolium* were detected, among which those with higher included were 3-phenylpropyl cyclobutanecarboxylate (9.06%), hexadecanoic acid (8.62%), gymnosinol (7.76%), caryophyllene oxide (4.05%), trans nerol (3.99%), and 2-(4-methylphenyl) 2-propanol (3.92%), mainly monoterpenes, sesquiterpenes, aliphatic and aromatic compounds. Furthermore, the essential oil of *Heracleum millefolium* effectively promoted the proliferation and migration of HaCaT cells, upregulated the mRNA expression of Notch1 and Jagged1, and protected against the cellular radiation. **Conclusion** The essential oil of *Heracleum millefolium* can effectively protect HaCaT cells from radiation damage, and its mechanism may be to activate Notch signaling pathway, and upregulate the expression of HaCaT cell related

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.82160827); 江西省自然科学基金青年项目 (No.20192BAB215067)。

作者简介: 向汝群, 女, 硕士研究生, 主要从事中药分析方面的研究, email: 1336415094@qq.com ***通信作者:** 姚雪莲, 女, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药分析方面的研究, email: 854587682@qq.com; 潘纯国, 男, 副主任医师, 主要从事胸部肿瘤放射治疗方面的研究, email: 35124895@qq.com

receptors and ligands, thus promoting the proliferation and migration.

Key words: *Heracleum millefolium*; component analysis; radiation-induced skin injury; HaCaT cell; Notch signal pathway

放射性皮肤损伤 (radiation-induced skin injury, RSI) 是指放射线对皮肤照射所引起的急慢性皮肤损伤, 引发 RSI 的原因包括肿瘤放疗、核辐射事故和职业暴露等。临床中超过 50% 的癌症患者采用放疗手段, 约 90% 接受过放疗的患者出现中度至重度皮肤反应, 迫使放疗中断或终止, 严重影响患者生活质量, 降低其放疗效果^[1-2]。RSI 临床表现涵盖红斑、皮肤坏死、溃疡、脱屑及出血等, 统称为放射性皮炎^[3]。患者受损皮肤缠延不愈, 并表现出易感染性、复发率高, 最终发展为皮肤组织纤维化, 甚至癌变^[4]。

针对 RSI 的治疗, 主要运用治疗热烧伤的方法, 包括局部护理、伤口敷料以及细胞疗法等, 然而, 放射引起的皮肤创伤的性质与热烧伤等其他伤口有很大不同, 尤其是对皮肤深层细胞的改善作用有限, 使 RSI 的治疗效果不理想, 即目前尚无治疗 RSI 的有效手段^[5]。探索 RSI 新的治疗策略对患者放疗及其预后具有重要社会意义及学术价值。现有的研究显示皮肤内各驻留细胞对放射的敏感性有所差异, 其中毛囊干细胞、黑素细胞以及位于基底角质形成细胞对放射高度敏感, 这也是放射能导致更严重的深层真皮损伤的主要原因^[6-7]。角质形成细胞 (keratinocytes, KCs) 是表皮主要细胞类型, 是皮肤抵御辐射或病原体等外界损伤的核心屏障, 在维持皮肤稳态方面发挥关键作用^[8]。重塑 KCs 功能与稳态可能是一种有潜力的防治 RSI 的策略。

中医认为 RSI 火热毒邪、阻滞气血、损伤肌表、影响体内气血津液布散、损伤脏腑机能, 许多中药具有清热解毒凉血、活血化瘀生肌、扶正益气养阴之功效, 具有促进创面血液循环、抑菌抗菌、控制创面感染、将坏死组织溶解液化、改善局部血液循环、促进肉芽生成的作用, 动物及临床临床实践证明中医药防治 RSI 疗效确切^[9-10]。但其详细作用机制有待阐明。

裂叶独活 (*Heracleum millefolium*) 为伞形科独活属植物, 又名藏当归 (青海) 或千叶独活 (秦岭植物志), 藏名巴木保。产于我国西藏、青海 (日曲) 等海拔较高地区的山顶或沙砾沟谷草甸^[11]。裂叶独活是一味药食两用的藏药, 具有消散肿胀、祛除痞块的功效, 藏民多用来治疗风湿、关节疼痛、跌打损伤等^[12]。据《中国民族药辞典》记

载, 裂叶独活全草治创伤、肿胀和麻风病^[13]。目前独活属植物的主要研究集中在香豆素及精油类化合物, 具有抗炎、抗菌、抗肿瘤等药理作用。裂叶独活含有丰富的精油类成分, 但其相关研究较少。

藏药裂叶独活广泛用于创伤治疗, 但其药效缺乏现代药理学验证。故本文采用气质高分辨飞行时间质谱 (GC/Q-TOF MS) 对裂叶独活精油成分进行分析鉴定, 通过建立放射性损伤 HaCaT 细胞模型, 探讨裂叶独活精油的促细胞增殖和促迁移作用, 并从 Notch 信号角度初步探究其可能的作用机制。

1 仪器与试药

1.1 试药

裂叶独活全草 (采自西藏山南地区贡嘎县岗堆镇, 由江西中医药大学药学院龚千锋教授鉴定为伞形科独活属植物裂叶独活的干燥全草)。正己烷 (分析纯, 阿达玛斯公司); HaCaT 细胞 (BNCC339817, 商城北纳创联生物科技有限公司); 高糖 DMEM 完全培养基 (KGM12800S, 江苏凯基生物技术股份有限公司); 胰蛋白酶-EDTA 消化液 (T1300, 索莱宝生物科技有限公司); 1×PBS (0.01 mol·L⁻¹, pH 7.4, 江西凯基生物技术股份有限公司); CCK-8 法细胞增殖检测试剂盒 (KGA317, 江苏凯基生物技术股份有限公司)。

1.2 仪器

Precise 高能直线加速器 (瑞典医科达公司); 7250 GC/Q-TOF MS (美国 Agilent 公司); CO₂ 培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司); 倒置荧光显微镜 (广州市明美光电有限公司); 医用离心机 (长沙英泰仪器有限公司); 多功能酶标分析仪 (上海闪谱生物科技有限公司); 普通 PCR 扩增仪 (杭州博日科技有限公司); 荧光 PCR 仪、超高灵敏度化学发光成像系统仪 [伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司]。

2 方法

2.1 试药配制

2.1.1 裂叶独活精油的配制 将裂叶独活全草打碎成粉末, 按照裂叶独活粉末 100 g 加双蒸水 1200 mL 的比例采用水蒸气蒸馏法蒸馏 5 h, 将得到的裂叶独活精油静置过夜后用无水硫酸钠脱水, 密封保存备用。精油与正己烷按 1:1000 比例稀释, 过 0.22 μm 微孔滤膜装入气相小瓶, 待测。

2.1.2 不同浓度精油的配制 称取裂叶独活精油 100 mg, 加入 2 mL 的 DMSO 溶解得到 50 mg · mL⁻¹ 的母液。将 0.04、0.2、0.5、1 μL 母液加入至 1 mL 完全培养基中, 制成实验所需 2、10、25、50 mg · L⁻¹ 质量浓度的精油, 待用。

2.2 GC/Q-TOF MS 条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent HP-5MS 石英毛细管柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm); 升温程序 40 °C 保持 2 min, 以 10 °C · min⁻¹ 升至 250 °C, 保持 5 min, 以 20 °C · min⁻¹ 升到 280 °C, 保持 1 min; 载气: 氦气 (99.999%), 流速 1.0 mL · min⁻¹; 进样口温度 280 °C; 进样量 1 μL, 分流比 40 : 1, 溶剂延迟 3 min。

2.2.2 质谱条件 离子源: EI 电子轰击源 (70 eV); 离子源温为 280 °C; 传输线温度为 280 °C; 检测方式: 全扫描, 扫描范围 50 ~ 550 *m/z*。

2.3 细胞来源与培养

HaCaT 细胞采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 (含青霉素 100 U · mL⁻¹ 和链霉素 100 μg · mL⁻¹) 在 37 °C、含 5%CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养 HaCaT 细胞。

2.4 细胞分组与给药

按照照射与给药方式分为对照组、精油组、单纯照射组以及照射 + 精油组。对照组不进行任何处理 (假照射), 精油组为 0、2、10、25、50 mg · L⁻¹ 精油处理组, 单纯照射组指接受不同剂量 (5、10、15 Gy) 的 X 射线照射, 照射 + 精油组是指在接受一定剂量的 X 射线照射前 24 h、48 h 用一定质量浓度的精油 (0、2、10、25、50 mg · L⁻¹) 处理。

2.5 照射条件

采用生物辐照仪进行照射, X 射线最高能量为 225 kV, 源靶距 50 cm, 剂量率 2.0 Gy · min⁻¹。以不同剂量 (5、10、15 Gy) 的 X 射线单次照射。

2.6 CCK-8 法检测细胞增殖

选择对数生长期的 HaCaT 细胞, 调整其浓度为 5 × 10⁴ 个 · mL⁻¹, 以 200 μL/孔接种于 96 孔板中, 然后将培养板置于培养箱中。孵育 24 h 后的 X 射线照射, 分别在 48 h 后每孔加入 20 μL 的 CCK-8 溶液, 将培养板在培养箱中孵育 2 h 后, 用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度, 并计算细胞的相对存活率:

$$\text{相对存活率}(\%) = (A_{\text{加药孔}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{空白孔}}) \times 100\%$$

2.7 细胞划痕实验检测迁移情况

将培养至良好状态的 HaCaT 细胞分为空白对照组、单纯照射组、单纯精油组以及照射 + 精油组。空白对照组不做任何处理, 给予其余三组 10

Gy 的 X 射线照射, 单纯精油组与照射 + 精油组于照射前 24 h 加入精油预处理, 照射后 48 h 将处理后的细胞进行划线, 使用 200 μL 枪头在每孔进行划痕, 弃去培养基, 用 PBS 清洗 3 次, 换成无血清培养基后给每孔划痕拍照, 48 h 后再次给每孔的划痕拍照。使用 Image J 计算划痕区域的面积, 从而计算愈合度:

$$\text{愈合度}(\%) = [(S_{0h} - S_{48h}) / S_{0h}] \times 100\%$$

2.8 RT-PCR 法检测 Notch1 及其配体 Jagged1 的 mRNA 表达水平

照射后继续培养 6 h, 收集细胞, 采用 TRIzol 法提取 RNA, 分光光度计检测 RNA 含量和纯度, 取 1 μg 总 RNA, 反转录 cDNA。将反转录得到的产物加入 GoTaq qPCR 反应液中进行 Real-time PCR 扩增, 以 β-actin 为内参, 使用 2^{-ΔΔCt} 法对扩增结果进行相对定量分析。每个样本重复 3 次实验。引物由通用生物系统 (安徽) 有限公司合成。引物序列、产物长度见表 1。

表 1 mRNA 扩增的基因引物序列

Tab 1 Gene primer sequences for mRNA amplification		
名称	引物序列 (5'-3')	产物长度 /bp
β-actin	F: TGGCACCAGCACAATGAA	186
	R: CTAAGTCATAGTCCGCTAGAAGCA	
Notch1	F: GCACAAGGTGTCTTCCAGATCCT	145
	R: CGTCGGCGTGTGAGTTGAT	
Jagged1	F: GACGGATCGCTGCTCAA	275
	R: AATGTGCTCCGTAGTAAGACCTG	

2.9 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计软件对数据进行分析, 两组之间定量数值比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 计数资料采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。作图采用 Graphpad 8.0 软件。

3 结果与分析

3.1 裂叶独活精油成分分析

使用 GC/Q-TOF MS 对裂叶独活精油成分进行分析, 采用计算机 NIST.17 标准谱库检索, 通过每个成分的峰面积相对于所有成分的峰总面积计算各组分的相对含量。经鉴定的裂叶独活精油化合物和相对含量结果见表 2, 总离子流图见图 1。

由表 2 可知: 从裂叶独活精油中共分离鉴定出 118 种化合物, 主要为萜类、脂肪族类和芳香族类化合物。其中萜类化合物 51 个, 占精油含量的 42.73%; 脂肪族化合物 42 个, 占精油含量的 31.48%; 芳香族化合物 25 个, 占精油含量的 25.79%。萜类化合物分为单萜、倍半萜、半萜和二萜, 含量较高的有匙羹藤醇 (7.76%)、氧化

表 2 裂叶独活精油化学组分及其相对含量

Tab 2 Chemical components and relative content of essential oil in *Heracleum millefolium*

No.	保留时间 /min	类别	中文名称	分子式	相对含量 /%
1	22.50	单萜	蛇床子素	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	0.16
2	11.46	单萜	α- 松油醇	C ₁₀ H ₁₈ O	1.23
3	12.08	单萜	1, 4- 二甲基 -4- 乙酰环己烯	C ₁₀ H ₁₆ O	0.58
4	9.99	单萜	芳樟醇	C ₁₀ H ₁₈ O	0.51
5	11.09	单萜	2- (4- 甲基 -2, 4- 环己二烯基) -2- 丙醇	C ₁₀ H ₁₆ O	0.36
6	12.32	单萜	橙花醇	C ₁₀ H ₁₈ O	0.34
7	9.34	单萜	γ- 萜品烯	C ₁₀ H ₁₆	0.33
8	17.39	单萜	(Z)-3, 7- 二甲基 -2, 6- 辛二烯基 2- 甲基巴豆酸酯	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	0.29
9	11.10	单萜	冰片	C ₁₀ H ₁₈ O	0.26
10	9.83	单萜	γ- 松油醇	C ₁₀ H ₁₈ O	0.26
11	11.59	单萜	α- 环香叶醇醋酸酯	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0.20
12	12.25	单萜	(-)- 香芹酮	C ₁₀ H ₁₄ O	0.19
13	7.18	单萜	3, 6, 6- 三甲基 -双环 [3.1.1] 庚 -2- 烯	C ₁₀ H ₁₆	0.12
14	10.61	单萜	1, 5, 8- <i>p</i> - 薄荷三烯	C ₁₀ H ₁₄	0.12
15	7.96	单萜	桉烯	C ₁₀ H ₁₆	0.10
16	10.22	单萜	1, 3, 8- <i>p</i> - 薄荷三烯	C ₁₀ H ₁₄	0.10
17	8.34	单萜	2, 6- 二甲基 -2, 6- 辛二烯	C ₁₀ H ₁₈	0.09
18	9.57	单萜	(<i>E</i>)- 氧化芳樟醇	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	0.09
19	8.20	单萜	顺式 -2- 乙烯基四氢 -2- 甲基 -5- (1- 甲基乙炔基) - 咪喃	C ₁₀ H ₁₆ O	0.08
20	8.84	单萜	(+)- 柠檬烯	C ₁₀ H ₁₆	0.07
21	8.63	单萜	α- 萜品烯 / 松油烯	C ₁₀ H ₁₆	0.07
22	8.50	单萜	顺式二氢香芹酮	C ₁₀ H ₁₆ O	0.07
23	9.14	单萜	(<i>E</i>)-β- 罗勒烯	C ₁₀ H ₁₆	0.06
24	16.74	倍半萜	匙羹藤醇	C ₁₅ H ₂₄ O	7.76
25	16.82	倍半萜	氧化石竹烯	C ₁₅ H ₂₄ O	4.05
26	16.41	倍半萜	反式 - 橙花叔醇	C ₁₅ H ₂₆ O	3.99
27	16.49	倍半萜	(<i>E, E</i>)-1, 5- 二甲基 -8- (1- 甲基亚乙基) -1, 5- 环癸二烯	C ₁₅ H ₂₄	2.55
28	14.75	倍半萜	β- 石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	2.24
29	17.99	倍半萜	[5- 甲基 -8- 异丙基 -2- (3, 4, 4α, 7, 8, 8α- 六氢萘基)] 甲醇	C ₁₅ H ₂₄ O	1.66
30	17.80	倍半萜	(-)- 匙羹藤醇	C ₁₅ H ₂₄ O	1.48
31	15.53	倍半萜	β- 可帕烯	C ₁₅ H ₂₄	0.84
32	17.90	倍半萜	α- 红没药醇	C ₁₅ H ₂₆ O	0.81
33	18.22	倍半萜	反式 - 戊烯基乙酸酯	C ₁₇ H ₂₆ O ₂	0.78
34	17.62	倍半萜	(3 <i>R</i> , 8 <i>αR</i>)-1, 2, 3, 7, 8, 8 <i>α</i> - 六氢 -5, 8 <i>α</i> - 二甲基 -3- (1- 甲基乙炔基) - 萘	C ₁₅ H ₂₂	0.77
35	17.60	倍半萜	β- 桉叶醇	C ₁₅ H ₂₆ O	0.65
36	15.71	倍半萜	α- 布藜烯	C ₁₅ H ₂₄	0.53
37	16.01	倍半萜	Δ- 杜松烯	C ₁₅ H ₂₄	0.51
38	14.33	倍半萜	β- 榄香烯	C ₁₅ H ₂₄	0.48
39	15.06	倍半萜	(<i>E</i>)-β- 法尼烯	C ₁₅ H ₂₄	0.47
40	15.62	倍半萜	β- 硒烯	C ₁₅ H ₂₄	0.42
41	15.44	倍半萜	β- <i>gurjunene</i>	C ₁₅ H ₂₄	0.31
42	16.21	倍半萜	愈创木烯	C ₁₅ H ₂₄	0.22
43	14.28	倍半萜	β- 波旁烯	C ₁₅ H ₂₄	0.19
44	15.92	倍半萜	γ- 卡地烯	C ₁₅ H ₂₄	0.18
45	18.12	倍半萜	1, 4 <i>a</i> - 二甲基 -7- (1- 甲基亚乙基) -1- 十氢萘酚	C ₁₅ H ₂₆ O	0.15
46	14.94	倍半萜	α- 愈创烯	C ₁₅ H ₂₄	0.12
47	14.14	倍半萜	α- 蒎烯	C ₁₅ H ₂₄	0.08
48	13.74	倍半萜	(-)-α- 葑烯油烯	C ₁₅ H ₂₄	0.03
49	19.43	二萜	新植二烯	C ₂₀ H ₃₈	3.67
50	22.13	二萜	植物醇	C ₂₀ H ₄₀ O	2.08
51	21.77	二萜	贝壳杉烯	C ₂₀ H ₃₂	0.03
52	20.64	脂肪族	十六烷酸 / 棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	8.62
53	22.57	脂肪族	亚油酸乙酯	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	2.58
54	22.63	脂肪族	亚麻酸乙酯	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	2.13
55	22.30	脂肪族 (酸)	亚油酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	2.05

续表 2

No.	保留时间 /min	类别	中文名称	分子式	相对含量 /%
56	21.42	脂肪族(醇)	人参炔醇	C ₁₇ H ₂₄ O	1.91
57	21.95	脂肪族	亚油酸甲酯	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	1.73
58	22.02	脂肪族	亚麻酸甲酯	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	1.68
59	19.50	脂肪族(酮)	植酮	C ₁₈ H ₃₆ O	1.63
60	20.30	脂肪族(酯)	棕榈酸甲酯	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	1.63
61	20.97	脂肪族(酯)	棕榈酸乙酯	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	1.29
62	20.74	脂肪族(酯)	Ω-3 花生四烯酸甲酯	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	0.81
63	18.56	脂肪族(酸)	肉豆蔻酸	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	0.71
64	29.29	脂肪族	正三十一烷	C ₃₁ H ₆₄	0.60
65	20.45	脂肪族(酸)	(Z, Z, Z)-7, 10, 13 顺-十六碳三烯酸	C ₁₆ H ₂₆ O ₂	0.59
66	18.52	脂肪族(酯)	(E)-川芎内酯	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	0.57
67	26.20	脂肪族	正二十七烷	C ₂₇ H ₅₆	0.49
68	20.07	脂肪族(酯)	7, 10, 13-十六碳三烯酸甲酯	C ₁₇ H ₂₈ O ₂	0.44
69	16.57	脂肪族(酯)	己酸辛酯	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	0.18
70	8.18	脂肪族(醚)	2-正戊基呋喃	C ₉ H ₁₄ O	0.15
71	15.32	脂肪族	5-甲氧基-6, 7-二甲基-苯并呋喃	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	0.15
72	14.69	脂肪族(烯)	1, 3-二甲基环己烯	C ₈ H ₁₄	0.14
73	4.58	脂肪族(酮)	2-己酮	C ₆ H ₁₂ O	0.14
74	13.80	脂肪族(酸)	正癸酸	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	0.13
75	4.68	脂肪族(醇)	3-己醇	C ₆ H ₁₄ O	0.12
76	11.76	脂肪族(酯)	10-羟基三环烯	C ₁₀ H ₁₆ O	0.11
77	10.06	脂肪族	(E)-3-己烯基丁酸酯	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	0.11
78	20.03	脂肪族(酯)	异丁酸烯丙酯	C ₇ H ₁₂ O ₂	0.08
79	11.80	脂肪族(烯)	2, 7-二甲基-1, 7-辛二烯	C ₁₀ H ₁₈	0.08
80	9.49	脂肪族	1, 1-二甲基环戊烷	C ₇ H ₁₄	0.07
81	12.84	脂肪族(酮)	3, 5-庚二烯酮	C ₇ H ₁₀ O	0.07
82	20.91	脂肪族(酯)	9-十六碳烯酸乙酯	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	0.07
83	14.67	脂肪族(酮)	6-甲基-6-(5-甲基-2-呋喃基)-2-庚酮	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	0.07
84	12.67	脂肪族	正十六烷	C ₁₆ H ₃₄	0.06
85	7.41	脂肪族	1-乙基丁基氢过氧化物	C ₆ H ₁₄ O ₂	0.05
86	14.06	脂肪族(酯)	6-甲基-4-庚烯-1-基-2-甲基丁酸乙酯	C ₁₃ H ₂₄ O ₂	0.05
87	22.09	脂肪族(酮)	2-乙酰基-2-甲基四氢呋喃	C ₇ H ₁₂ O ₂	0.04
88	8.37	脂肪族(醛)	正辛醛	C ₈ H ₁₆ O	0.03
89	9.28	脂肪族	3, 3-二甲基己烷	C ₈ H ₁₈	0.03
90	7.79	脂肪族(醚)	3, 3-二乙氧基-1-丙炔	C ₇ H ₁₂ O ₂	0.03
91	10.04	脂肪族(醛)	壬醛	C ₉ H ₁₈ O	0.03
92	7.57	脂肪族	1-甲基戊基氢过氧化物	C ₆ H ₁₄ O ₂	0.03
93	8.81	脂肪族(烯)	4, 4-二甲基-1-戊烯	C ₇ H ₁₄	0.02
94	17.52	芳香族	3-苯基丙基环丁烷羧酸酯	C ₁₄ H ₁₈ O ₂	9.06
95	11.37	芳香族	2-(4-甲基苯基)2-丙醇	C ₁₀ H ₁₄ O	3.92
96	18.30	芳香族	异辣椒烯醇	C ₁₅ H ₂₄ O	2.12
97	16.65	芳香族	异丁酸肉桂酯	C ₁₃ H ₁₆ O ₂	2.08
98	16.93	芳香族	3-苯基丙基异丁酸酯	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	1.04
99	9.85	芳香族	1-异丙烯基-3-甲基苯	C ₁₀ H ₁₂	0.84
100	13.23	芳香族	4-乙烯基愈创木酚	C ₉ H ₁₀ O ₂	0.80
101	20.25	芳香族	茴香脑	C ₁₀ H ₁₂ O	0.80
102	20.75	芳香族	邻苯二甲酸二丁酯	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	0.75
103	19.02	芳香族	E-肉桂酯	C ₁₄ H ₁₆ O ₂	0.74
104	19.80	芳香族	邻苯二甲酸二异丁酯	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	0.66
105	8.77	芳香族	2-异丙基甲苯	C ₁₀ H ₁₄	0.59
106	14.40	芳香族	甲基丁香酚	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	0.50
107	13.03	芳香族	3-甲基-4-异丙基苯酚	C ₁₀ H ₁₄ O	0.44
108	15.78	芳香族	2, 4-二叔丁基苯酚	C ₁₄ H ₂₂ O	0.44
109	15.79	芳香族	3-苯丙乙酸酯	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	0.22
110	19.92	芳香族	水杨酸苄酯	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	0.22
111	12.76	芳香族	2-羟基-5-甲基苯乙酮	C ₉ H ₁₀ O ₂	0.14

续表 2

No.	保留时间 /min	类别	中文名称	分子式	相对含量 /%
112	11.25	芳香族	2- 甲基苯并呋喃	C ₉ H ₈ O	0.13
113	14.64	芳香族	1, 4- 二甲氧基 -2- 甲基 -5- (1- 甲基乙基) - 苯	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	0.08
114	13.91	芳香族	3, 4- 二甲氧基苯乙炔	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	0.06
115	11.84	芳香族	2, 5- 二甲基苯乙酮	C ₁₀ H ₁₂ O	0.06
116	19.21	芳香族	6- 甲氧基百里香酯	C ₁₆ H ₂₂ O ₃	0.04
117	18.18	芳香族	4', 6' - 二羟基 -2', 3' - 二甲基苯乙酮	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	0.02
118	13.12	芳香族	肉桂醇	C ₉ H ₁₀ O	0.02

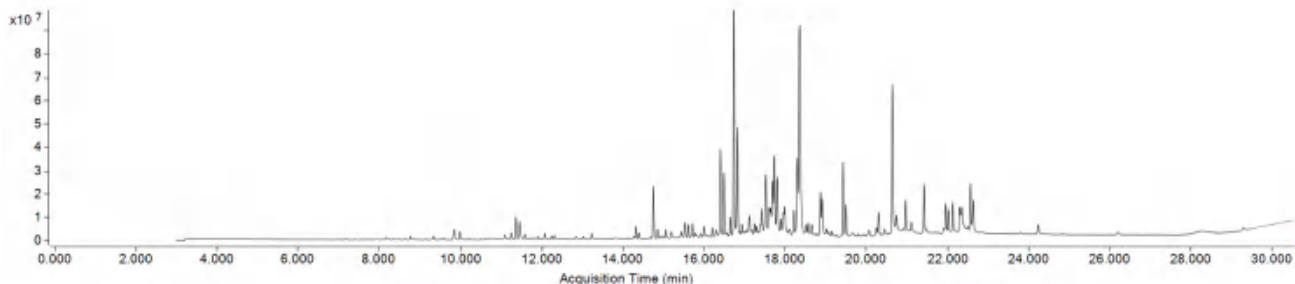


图 1 裂叶独活精油总离子流图

Fig 1 Total ion flow diagram of essential oil of *Heracleum millefolium*

石竹烯 (4.05%)、反式 - 橙花叔醇 (3.99%)、新植二烯 (3.67%)、植物醇 (2.08%)、(E, E) - 1, 5- 二甲基 -8- (1- 甲基亚乙基) -1, 5- 环癸二烯 (2.55%)、β- 石竹烯 (2.24%) 等；脂肪族化合物含量较高的有十六烷酸 (8.62%)、亚油酸乙酯 (2.58%)、亚麻酸乙酯 (2.13%)、亚油酸 (2.05%) 等；芳香族含量较高的有 3- 苯基丙基环丁烷羧酸酯 (9.06%)、2- (4- 甲基苯基) 2- 丙醇 (3.92%)、异辣椒烯醇 (2.12%)、异丁酸肉桂酯 (2.08%)。

3.2 HaCat 细胞增殖情况

与正常对照组相比，HaCaT 细胞在射线照射后出现明显的细胞增殖抑制，当照射剂量为 5 Gy 时，前 24 h 未出现细胞增殖抑制现象，而当照射剂量为 10 Gy 时，细胞在 24 h 及 48 h 后均出现细胞增殖抑制现象，即 10 Gy 为出现细胞增殖现象的最小照射剂量。具体见图 2。

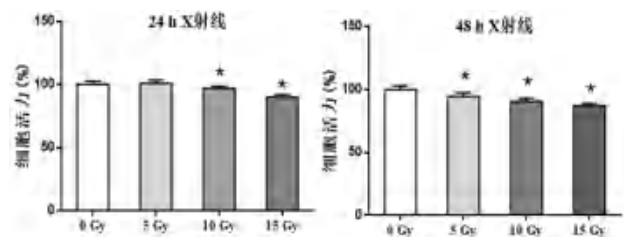


图 2 不同照射剂量对细胞增殖的影响

Fig 2 Effect of different irradiation doses on cell proliferation

注 (Note)：与正常对照组相比，**P* < 0.05 (vs the normal control group, **P* < 0.05)。

采用 CCK-8 法检测辐射后 24 h 和 48 h 加入不同浓度精油后各组细胞活力变化的情况。结果显示，在加入裂叶独活精油干预后，10 ~ 50

mg · L⁻¹ 质量组均对照射后的 HaCaT 细胞显示出一定的促增殖作用 (*P* < 0.05)，且效果随质量浓度升高及时间延长而提高，50 mg · L⁻¹ 作用 48 h 精油的促 HaCaT 细胞增殖作用最佳，见图 3。

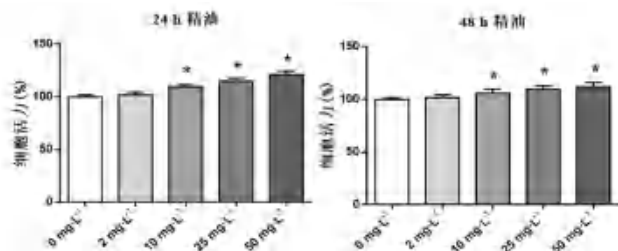


图 3 不同浓度精油对细胞增殖的影响

Fig 3 Effect of different concentrations of essential oil on cell proliferation

注 (Note)：与空白对照组相比，**P* < 0.05 (vs the blank control group, **P* < 0.05)。

通过 CCK-8 实验，确定裂叶独活的浓度、射线的剂量以及作用的时间。考虑到精油浓度太大细胞形态、行为会发生变化。综合细胞形态、行为、存活等情况，确定裂叶独活精油的质量浓度为 25 mg · L⁻¹、射线剂量为 10 Gy，作用时间为 48 h，进行细胞划痕实验。

3.3 细胞划痕实验结果

与空白对照组相比，裂叶独活精油 (LYDH) 处理后，HaCaT 细胞迁移能力显著增强 (*P* < 0.05)。而 HaCaT 细胞经辐射后，其迁移能力显著下降 (*P* < 0.05)，但细胞经精油处理后照射，损伤细胞迁移能力增强，且与空白对照组无显著差异 (*P* > 0.05)。具体见图 4。

3.4 Notch1 与 Jagged1 的 mRNA 的表达情况

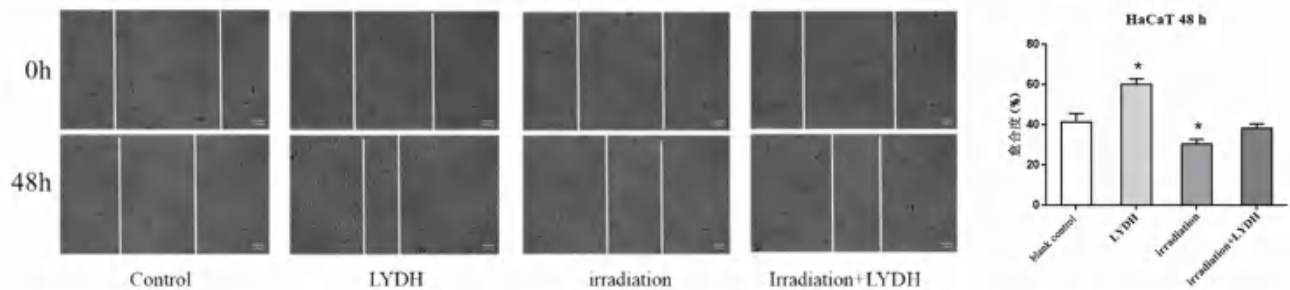


图 4 裂叶独活精油对辐射损伤细胞迁移的影响

Fig 4 Effect of essential oil of *Heracleum millefolium* on the cell migration after radiation injury

注 (Note): 与空白对照组相比, * $P < 0.05$ (vs the blank control group, * $P < 0.05$)。

图 5 结果显示, 裂叶独活能上调正常 HaCaT 细胞中 Notch1 受体及其配体 Jagged1 的 mRNA 的表达。HaCaT 细胞经辐射后, 细胞中 Notch1 受体及其配体 Jagged1 的 mRNA 的表达下降 ($P < 0.05$), 裂叶独活促进照射损伤 HaCaT 细胞中 Notch1 与 Jagged1 的 mRNA 的表达。

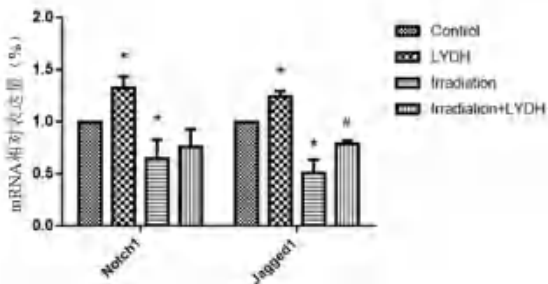


图 5 裂叶独活对损伤细胞 Notch1 及其配体 Jagged1 mRNA 表达的影响

Fig 5 Effect of *Heracleum millefolium* on the mRNA expression of Notch1 and its ligand Jagged1 in injured cells

注 (Note): 与对照组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, # $P < 0.05$ (vs the control group, * $P < 0.05$; vs the model group, # $P < 0.05$)。

4 讨论

GC/Q-TOF MS 分析结果显示裂叶独活精油化学成分主要为萜类 (42.73%)、脂肪族类 (31.48%) 及芳香族类 (25.79%) 三大类。萜类化合物中含量较高的为倍半萜类化合物。顿珠次仁等^[14]采用顶空气质色谱法对裂叶独活根茎花叶各部位的挥发性成分进行分析, 发现全草茎花叶部位含量较多的成分为芳香族类和萜类化合物, 其中单萜化合物 γ -松油烯和异松油烯在叶和花中的含量较高。以上分析结果与本文结果存在一定差异, 其中主要原因可能为 GC/Q-TOF MS 在成分解析上定性功能强大, 具有高通量、高精度、高可靠性的特点^[15], 能比顶空气质分析得到更多裂叶独活精油成分, 也可能与药材的产地选择、样品制备方式及程序升温方法不一样有关。

中药复方及单体在辐射损伤治疗中发挥着重

要作用^[16]。廖子玲等^[17]研究加味四妙勇安油在治疗放疗导致的急性 RSI 时能有效减轻炎症反应, 保护胶原纤维, 促进血管及成纤维细胞生成, 加快损伤的愈合。许文婧等^[18]研究发现复方苦参注射液能防治大鼠 RSI, 其机制可能与保护线粒体的结构和酶的功能相关。王程等^[19]研究发现淫羊藿素对 HaCat 细胞存在明显的放射保护作用, 具有促进增殖、抑制凋亡、抗氧化和抗炎的能力, 有望成为防护 RSI 的中药防护剂。

Notch 信号决定多数细胞命运, 调节细胞增殖、分化、凋亡及存活等细胞行为, 是维持细胞稳态的关键信号^[20]。在哺乳动物中, 含有四种 Notch 受体 (Notch 1 ~ 4) 与五种不同的配体 (Jagged1、Jagged2、Delta1、Delta3、Delta4)^[21]。皮肤损伤后, 局部会发生血小板聚集, 随后聚集的血小板和受损的角质形成细胞释放表皮生长因子, 促进角质形成细胞的增殖、分化和成熟。研究发现烫伤小鼠经治疗后其 Notch 信号通路中 Notch1 受体、Jagged1 配体及下游靶基因 Hes1 蛋白表达水平上调^[22]。激活 Notch 信号通路刺激骨髓来源内皮细胞表达 Delta4 和 Notch1, 使下游靶基因 Hes1 和 Hey1 的表达增加, 内皮细胞的迁移能力提高^[23]。Notch 信号通过靶向 *c-Myc* 和 *Hes1* 等基因参与 KCs 的分化、迁移以及毛囊再生, 调节血管生成, 影响伤口愈合增强或延迟^[24-26]。可见, Notch 信号作为一个分子开关发挥作用, 在表皮分化过程中控制皮肤层之间的细胞转换。激活 Notch 信号可有效调节皮肤中损伤的细胞角质形成细胞、内皮细胞等局部细胞增殖、迁移与分化, 进而促进皮肤伤口愈合。

本研究以 Notch 信号为靶点, 以永生化角质形成细胞 (HaCaT 细胞) 为研究对象, 以体外实验初步探讨裂叶独活精油的抗 KCs 作用。结果显示, HaCaT 细胞经辐射后, 其增殖与迁移能力显著降低, 且损伤细胞中 Notch1 受体和其配体 Jagged1 的 mRNA 低表达。进一步实验证实, 裂

叶独活精油不仅能够促进辐射损伤 HaCaT 细胞增殖与迁移,且可有效上调辐射损伤 HaCaT 细胞中的 Notch1 受体和其配体 Jagged1 的 mRNA 表达水平。基于此,推测裂叶独活精油可能通过激活 Notch 信号通路调节辐射损伤 KCs 增殖与迁移,从而起到保护细胞辐射损伤作用,而 KCs 是 RSI 疾病发生与进展中的主要靶细胞。此外,研究表明,Notch1 基因的 KCs 特异性缺失导致表皮增生和多种分化标志物的表达失调,导致 KCs 生长停滞和分化^[27]。因此,综合认为裂叶独活可能通过调控 KCs 稳态,从而促进 RSI 创面愈合。

综上,裂叶独活精油成分丰富且有多样性的生物活性,对射线辐射后的 HaCaT 细胞具有促增殖和迁移作用,有望成为抗 RSI 新的天然药物,Notch 信号是重要靶点。课题组下一步拟从整体动物、细胞水平系统探讨其抗 RSI 作用与详细的生物机制,以期作为 RSI 的临床治疗提供新思路与新靶标。

参考文献

- [1] Thariat J, Hannoun-Levi JM, Sun Myint A, et al. Past, present, and future of radiotherapy for the benefit of patients [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10 (1): 52-60.
- [2] Yang X, Ren H, Guo X, et al. Radiation-induced skin injury: pathogenesis, treatment, and management [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12 (22): 23379-23393.
- [3] Hymes SR, Strom EA, Fife C. Radiation dermatitis: clinical presentation, pathophysiology, and treatment [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2006, 54 (1): 28-46.
- [4] Burnett LR, Hughes RT, Rejeski AF, et al. Review of the terminology describing ionizing radiation-induced skin injury: a case for standardization [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2021, 20 (12): 315-344.
- [5] Jia H, Mo W, Hong M, et al. Interferon- α inducible protein 6 (IFI6) confers protection against ionizing radiation in skin cells [J]. *J Dermatol Sci*, 2020, 100 (2): 139-147.
- [6] Isoir M, Buard V, Gasser P, et al. Human keratinocyte radiosensitivity is linked to redox modulation [J]. *J Dermatol Sci*, 2006, 41 (1): 55-65.
- [7] Iddins CJ, DiCarlo AL, Ervin MD, et al. Cutaneous and local radiation injuries [J]. *J Radiol Prot*, 2022, 42 (1). doi: 10.1088/1361-6498/ac1241a.
- [8] Li F, Adase CA, Zhang LJ. Isolation and culture of primary mouse keratinocytes from neonatal and adult mouse skin [J]. *J Vis Exp*, 2017, 125: 56027.
- [9] 王玉华, 林岫, 付丽佳, 等. 中药防治放射性皮肤损伤的研究进展 [J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2014, 34 (4): 314-317.
- [10] 黄从书, 朱贵花, 谢光辉, 等. 中医药防治放射性皮肤损伤的研究进展 [J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2021, 41 (3): 229-233.
- [11] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1992: 209.
- [12] 顿珠次仁, 邓敏芝, 朱根华, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术快速分析裂叶独活中香豆素类成分 [J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33 (1): 105-114.
- [13] 贾敏如, 张艺. 中国民族药辞典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2016: 415.
- [14] 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.
- [15] He SY, Gong FJ, Lian R, et al. Identification of tiletamine, zolazepam and their metabolites in drug facilitated sexual assault by GC-QTOF-MS [J]. *Fa Yi Xue Za Zhi*, 2019, 35 (5): 581-585.
- [16] Wang J, Cai Y, Sheng Z. Experimental studies on the protective effects of the overexpression of lentivirus-mediated sirtuin 6 on radiation-induced lung injury [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2020, 29 (7): 873-877.
- [17] 廖子玲, 康宁, 李全, 等. 加味四妙勇安油治疗大鼠急性放射性皮肤损伤机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36 (2): 748-752.
- [18] 许文婧, 马玥诗, 王佩, 等. 复方苦参注射液通过保护线粒体防治大鼠急性放射性皮炎的研究 [J]. *中医药信息*, 2022, 39 (6): 6-11.
- [19] 王程, 洪金省, 陈金梅, 等. 淫羊藿素对人角质形成细胞 HaCat 辐射损伤的保护作用 [J]. *辐射防护*, 2019, 39 (4): 338-344.
- [20] Pagie S, Gérard N, Charreau B. Notch signaling triggered via the ligand DLL4 impedes M2 macrophage differentiation and promotes their apoptosis [J]. *Cell Commun Signal*, 2018, 16 (1): 4.
- [21] Hori K, Sen A, Artavanis-Tsakonas S. Notch signaling at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126 (10): 2135-2140.
- [22] Zhao X, Li S, Ding J, et al. Combination of an engineered *Lactococcus lactis* expressing CXCL12 with light-emitting diode yellow light as a treatment for scalded skin in mice [J]. *Microb Biotechnol*, 2021, 14 (5): 2090-2100.
- [23] Qin H, Weng J, Zhou B, et al. Magnesium ions promote in vitro rat bone marrow stromal cell angiogenesis through Notch signaling [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2022. doi: 10.1007/s12011-022-03364-7.
- [24] Saleh S, Ullah M, Naveed H. Cell fate determination is influenced by Notch heterogeneity [C]// Proceedings of 2021 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC), 2021: 4143-4146.
- [25] Yang L, Wang X, Sun J, et al. Neuritin promotes angiogenesis through inhibition of DLL4/Notch signaling pathway [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2021, 53 (6): 663-672.
- [26] Shi Y, Shu B, Yang R, et al. Wnt and Notch signaling pathway involved in wound healing by targeting c-Myc and Hes1 separately [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6 (1): 120.
- [27] Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, et al. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation [J]. *EMBO J*, 2001, 20 (13): 3427-3436.

(收稿日期: 2022-07-14; 修回日期: 2022-08-29)

一种植物酵素 / 蜂王浆混合物的抗氧化及免疫调节活性研究

杨翠婷¹, 周晴¹, 屈青松², 李智勋¹, 宗浩³, 史新元^{2*} (1.北京中医药大学生命科学院, 北京 100102; 2.北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 3.颍川堂健康科技有限公司, 北京 100027)

摘要: **目的** 通过有效成分测定、自由基清除和免疫调节实验研究植物酵素 / 蜂王浆混合物的生物活性。**方法** 采用 HPLC 法、BCA 法及亚硝酸钠 - 硝酸铝比色法分别测定 10-羟基-2-萜烯酸和没食子酸、蛋白质及黄酮类化合物的含量; 通过测定植物酵素 / 蜂王浆混合物对自由基的清除率及免疫低下小鼠免疫指标的影响考察其抗氧化及免疫调节活性。**结果** 植物酵素 / 蜂王浆混合物中 10-羟基-2-萜烯酸、蛋白质含量分别为 $3.30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $145.90 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 酵素原浆中没食子酸、黄酮类化合物分别为 $0.35 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.16 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。植物酵素 / 蜂王浆混合物对 DPPH·、超氧阴离子自由基及羟自由基的清除率分别为 85.11%、72.20% 及 44.51%。中、高剂量组的植物酵素 / 蜂王浆混合物均能显著提高模型组小鼠的免疫脏器指数 ($P < 0.05$), 高剂量组在一定程度上能修复免疫低下小鼠免疫器官的形态结构, 植物酵素 / 蜂王浆混合物各剂量组均可显著提高小鼠血清中 IgM、IL-1 β 和 TNF- α 细胞因子的含量 ($P < 0.01$), 具有免疫增强作用。**结论** 植物酵素 / 蜂王浆混合物具有较好的抗氧化性能及增强免疫低下小鼠免疫功能的作用。

关键词: 药食同源; 酵素; 蜂王浆; 抗氧化; 免疫调节

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0328-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.008

Antioxidant and immunomodulatory activity of a plant enzyme/royal jelly mixture

YANG Cui-ting¹, ZHOU Qing¹, QU Qing-song², LI Zhi-xun¹, ZONG Hao³, SHI Xin-yuan^{2*} (1. College of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102; 2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102; 3. Inchant Health Technology Co., Ltd., Beijing 100027)

Abstract: Objective To determine the biological activity of a plant enzyme/royal jelly mixture through active ingredient measurement, free radical scavenging and immunomodulation experiments. **Methods** The content of 10-hydroxydec-2-enoic acid and gallic acid, protein and flavonoids was determined by HPLC, BCA and sodium nitrite-aluminium nitrate colorimetric methods, respectively. The antioxidant and immunomodulatory activities of the plant enzyme/royal jelly mixture were determined by measuring the scavenging rate of free radicals and the immune indexes in immunocompromised mice. **Results** The content of 10-hydroxydec-2-enoic acid and protein in the plant enzyme/royal jelly mixture was $3.30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $145.90 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, and the content of gallic acid and flavonoids in the plant enzyme original syrup was $0.35 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $0.16 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The scavenging rates of DPPH·, superoxide anion radicals and hydroxyl radicals by the plant enzyme/royal jelly mixture was 85.11%, 72.20% and 44.51%, respectively. The plant enzyme/royal jelly mixture in the medium and high dose significantly improved the immune organ indexes of mice in the model group ($P < 0.05$), and the high dose group repaired the morphological structure of immune organs in immunocompromised mice to a certain extent. In addition, all dose groups of the plant enzyme/royal jelly mixture increased the levels of IgM,

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.82174093)。

作者简介: 杨翠婷, 女, 硕士, 主要从事中药发酵与肠道菌群方面的研究, email: 1980858911@qq.com *通信作者: 史新元, 女, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药生物技术方面的研究, email: xys_2019@126.com

IL-1 β and TNF- α cytokines in the mice serum ($P < 0.01$), displaying an immune-enhancing effect.

Conclusion Plant enzyme/royal jelly mixture has good antioxidant properties and may enhance immune the function in immunocompromised mice.

Key words: herb-food homology; plant enzyme; royal jelly; antioxidant; immunomodulation

“药食同源”酵素是采用药食同源的原料、水果、蔬菜、菌类等经益生菌发酵后产生的含有特定生物学功能的食品,其中既含有能调节机体生理功能的益生菌,又含有大量的活性成分,从而具有丰富的营养保健功能^[1]。酵素可产生大量的植物综合酶,这些酶对人体的代谢和机能调整起着重要作用,同时还含有维生素、氨基酸、有机酸、低聚糖等营养成分,进而具有活化细胞、改善体质、提高免疫、调整肠道菌群等作用^[2]。

植物酵素/蜂王浆混合物(下称酵素/蜂王浆混合物)是采用传统发酵工艺,选用新鲜的余甘子、牛蒡根两种“药食同源”原料及青梅、奇异果、柠檬,经益生菌自然发酵成酵素原浆,再与特定比例的蜂王浆混合后制成的酵素饮品^[3]。其中,余甘子营养成分丰富,含黄酮和多酚化合物,如没食子酸、没食子鞣质、焦性没食子酸等^[4]。黄酮类化合物具有较强的抗氧化活性,没食子酸具有提高免疫力、辅助保护肝损伤等作用^[5]。蜂王浆营养成分丰富,其含有的特殊化合物 10-羟基-2-癸烯酸(10-hydroxydec-2-enoic acid, 10-HDA)在蜂王浆的各种活性功能和药理活性中起着关键作用,具体表现为抗菌、抗氧化、免疫调节及抗肿瘤等方面^[6-8]。

本文以酵素/蜂王浆混合物为研究对象,对其活性成分进行含量测定;同时以 DPPH· 等三种自由基的清除力以及免疫低下小鼠的脏器指数和形态、细胞因子水平等为指标,分析酵素/蜂王浆混合物的抗氧化活性及免疫调节活性,以期“药食同源”型植物酵素的综合性开发和功能性研究提供数据支持。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LHS-80HC-II 恒温恒湿培养箱(上海一恒科技);PB303-S 电子天平(波兰 RADWAG);KQ-250E 超声波清洗器(昆山市超声仪器);Synergy-2 多功能酶标仪(美国安捷伦);LC-20Ai 高效液相色谱仪(日本 Shimadzu);Sorvall ST 8R 高速冷冻离心机、CryoStar NX50 冷冻切片机(赛默飞世尔科技);TS-2 荧光倒置生物显微镜(尼康仪器)。

1.2 试剂

酵素/蜂王浆混合物(10-HDA 不低于 3

mg·mL⁻¹,批号:20211121,为颍川堂健康科技有限公司提供的颍川堂秘性皇浆);BCA 试剂盒、芦丁(YZ-100060, HPLC > 98%)、没食子酸对照品(CAS: 139-91-6, HPLC > 99%)(上海沪震实业有限公司);没食子酸对照品(批号: B20103)、左旋咪唑(批号: S30366)(上海源叶生物科技有限公司);磷酸(CAS: 1122-001)、亚硝酸钠(CAS: Q/12GF 04-2017)、硝酸铝(CAS: 13473-90-0)、硫酸亚铁(CAS: 7782-63-0)(罗恩化学试剂公司);DPPH 试剂(CAS: 1898-66-4)、水杨酸(批号: 20210531)、邻苯三酚(批号: 20201014)(上海化成工业发展有限公司);Tris(CAS: 77-86-1, 合肥志宏生物技术有限公司);甲醇(色谱纯, Lot: 207801)、乙醇(分析纯,批号: 2021619)、氢氧化钠(批号: 20200709A)、盐酸(批号: 20190802A)、30%过氧化氢(CAS: 7722-84-1)(北京化工厂);SPF 级 ICR 雄鼠(批准号: BUCM-4-2021091306-2125, 斯贝福生物技术有限公司);环磷酸胺(CTX,批号: 04092113, 海正辉瑞制药有限公司);ELISA 试剂盒(批号: 20210816-0021, 爱博泰克生物技术公司)。

2 方法与结果

2.1 10-HDA 含量测定

采用十八烷基硅烷键合硅胶柱;流动相为 0.03 mol·L⁻¹ HCl-甲醇-水(10:55:35);检测波长为 210 nm;流速 1.0 mL·min⁻¹;柱温 35℃;进样量 4 μ L。具体方法参考 GB 9697-2008^[9],委托谱尼测试机构测定。测试结果显示酵素/蜂王浆混合物中 10-HDA 含量为 3.30 mg·mL⁻¹。

2.2 没食子酸含量测定

2.2.1 溶液的配制 对照品溶液:精密称取没食子酸对照品 2.00 mg 置 5 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,即得 0.40 mg·mL⁻¹ 的没食子酸对照品溶液,经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

供试品溶液:按大力子发酵液:青梅发酵液:奇异果发酵液:柠檬发酵液:余甘子发酵液为 10:5:5:3:2 制备酵素原浆^[3],备用。取 10 mL 酵素原浆冻干,分别超声处理 3 次(功率 250 W,频率 45 kHz),每次处理 1 h,使其完全溶于

5 mL 甲醇。离心取上清液, 合并 3 次滤液, 置于通风橱中挥干, 加 15 mL 甲醇复溶, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.2.2 色谱条件 采用十八烷基硅烷键合硅胶柱; 流动相为 0.10% 磷酸溶液 - 甲醇 (93 : 7); 检测波长为 271 nm; 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 10 μL 。该方法经方法学考察符合要求, 将对照品溶液进样, 以没食子酸质量浓度 (Y , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 对峰面积 (X) 进行线性回归, 得没食子酸的标准曲线方程为: $Y = 3.381 \times 10^4 X - 248.62$, $R^2 = 0.999$ 。

2.2.3 样品测定 取供试品溶液 1 mL 测定, 将测定的峰面积代入回归方程计算酵素原浆中的没食子酸含量, 每个样品平行 3 次。

由于酵素 / 蜂王浆混合物中的黄酮类化合物来源于多种“药食同源”原料, 为提高检测结果的准确度, 采用酵素原浆进行没食子酸的测定。计算得供试品溶液中没食子酸质量浓度为 (0.23 \pm 0.001) $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 换算出酵素原浆中没食子酸含量为 0.35 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3 蛋白质含量测定

2.3.1 样品制备 随机选取 3 份酵素 / 蜂王浆混合物, 分别精密称量并采用去离子水配制成 5.01、5.05 和 4.96 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 置于 5 mL 离心管中, 即得供试品溶液。

2.3.2 样品测定 依照 BCA 试剂盒操作说明书进行, 以吸光度值 (Y) 对蛋白含量 (X , μg) 进行线性回归。结果蛋白质含量标准曲线方程为 $Y = 0.0292X + 0.1191$, $R^2 = 0.992$ 。在标准曲线中代入样品测得的吸光度值, 计算出酵素 / 蜂王浆混合物中蛋白含量为 (145.90 \pm 5.53) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.4 黄酮类化合物含量测定

2.4.1 溶液的配制 对照品溶液制备: 精确称取芦丁对照品 0.020 g, 置于 5 mL 烧杯中, 加入 5 mL 无水乙醇溶解, 30% 乙醇定容至 100 mL 量瓶中, 摇匀, 即得对照品溶液。

样品溶液制备: 酵素原浆制备方法同“2.2.1”项下。

2.4.2 标准曲线制作 分别依次取芦丁对照品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1 mL 分别置于 25 mL 量瓶中, 加入 30% 乙醇稀释至 10 mL, 依次加入 0.12 mL 的 6% NaNO_2 溶液和 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液, 分别混匀, 室温放置 6 min, 再加入 1.6 mL 的 4% NaOH 溶液, 最后用 30% 乙醇定容, 混匀后放置 15 min, 于 510 nm 波长处测定吸光度值。以吸光

度值 (Y) 对芦丁质量浓度 (X , $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行线性回归, 得黄酮类化合物标准曲线方程为: $Y = 5.3X + 0.0354$, $R^2 = 0.9992$ 。

2.4.3 样品测定 取酵素原浆溶液 1 mL 测定, 将测得的吸光度值代入回归方程计算酵素原浆中黄酮类化合物含量, 每个样品平行 3 次。

计算得酵素原浆中黄酮类化合物含量为 (0.16 \pm 0.002) $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.5 DPPH \cdot 自由基清除能力测定

采用 DPPH \cdot 氧化法^[10]测定酵素 / 蜂王浆混合物对 DPPH \cdot 的清除能力。用去离子水对酵素 / 蜂王浆混合物进行适当稀释, 每个样品平行 3 次, 计算公式如下:

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率} (\%) = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$$

式中: A_0 为 70% 乙醇的吸光度, A_i 为样品溶液与 DPPH \cdot 溶液反应后的吸光度, A_j 为不加 DPPH \cdot 溶液的吸光度。

由于酵素 / 蜂王浆混合物颜色较深, 在测定其对不同自由基的清除能力时根据采用试剂体系大小将其稀释至合适倍数, 经测定发现稀释至 50% 后的酵素 / 蜂王浆混合物对 DPPH \cdot 的清除率可达 85.11%。

2.6 超氧阴离子自由基清除能力测定

采用 NBT 显色法^[11]测定, PMS/NADH 体系会产生超氧自由基。用去离子水对酵素 / 蜂王浆混合物进行适当稀释, 每个样品平行 3 次, 计算公式如下:

$$\text{超氧阴离子自由基清除率} (\%) = [1 - A_x / A_0] \times 100\%$$

式中: A_x 为样品与混合反应溶液的吸光度, A_0 为水代替样品的混合反应溶液的吸光度。

经测定发现稀释至 50% 后的酵素 / 蜂王浆混合物对超氧阴离子自由基的清除率可达 72.20%。

2.7 羟自由基清除能力测定

采用水杨酸法^[12]测定酵素 / 蜂王浆混合物对羟自由基的清除能力。用去离子水对酵素 / 蜂王浆混合物进行适当稀释, 每个样品平行 3 次, 计算公式如下:

$$\text{羟自由基清除率} (\%) = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$$

式中: A_0 为水溶液的吸光度, A_i 为样品溶液与混合反应溶液的吸光度, A_j 为不加水杨酸混合反应溶液的吸光度。

稀释至 2% 后的酵素 / 蜂王浆混合物对羟自

由基的清除率仍可达 44.51%。

2.8 免疫功能测定

2.8.1 剂量设计 人体推荐摄入量为 $30.0 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ ，根据《中国药理研究方法学》人鼠剂量换算方法换算的小鼠体重与 60 kg 成人的等效剂量，其相对剂量设计为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，根据该推荐量设置低、中、高 3 个剂量组，分别为 5 倍的低剂量组 $2.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、10 倍的中剂量组 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、20 倍的高剂量组 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，按 $0.1 \text{ mL}/10 \text{ g}$ 体积给小鼠灌胃。

2.8.2 实验分组及给药 将 48 只雄性 ICR 小鼠，体质量 $(21 \pm 6) \text{ g}$ ，置于 $(25 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ 、12 h/12 h 光暗循环、60% 相对湿度的条件下，自由饮食饮水 7 d 使其适应环境，记录体重。将小鼠随机分为 6 组 ($n = 8$)，空白组、模型组、左旋咪唑阳性药组、混合物低剂量组、混合物中剂量组、混合物高剂量组^[13]。各组小鼠每日定时灌胃，空白组和模型组灌胃生理盐水 ($0.2 \text{ mL}/20 \text{ g}$)，其余各组小鼠灌胃等量对应混合物样品，每日 1 次。连续灌胃 30 d^[14]，每日观察小鼠状态、记录体重。同时，自第 24 日起，空白组小鼠腹腔注射生理盐水 ($0.2 \text{ mL}/20 \text{ g}$)，其余各组小鼠腹腔注射等量的环磷酰胺，每日 1 次，连续注射 3 d。最后一日灌胃后将各组小鼠禁食 24 h，摘眼球取血，快速解剖脾脏和胸腺。所有实验用鼠均按照北京中医药大学动物护理和使用委员会批准的程序进行。

2.8.3 体重变化 适应性喂养 7 d 后，称重记录初始体重，并且在处死前再次称量体重，记为终末体重。

由表 1 可知，灌胃期结束后，与空白组相比，模型组小鼠的体重增长量显著降低；与模型组相比，阳性药组和混合物样品各剂量组小鼠的体重增长量均有所提高，但差异无统计学意义。

表 1 酵素 / 蜂王浆混合物对免疫低下小鼠体重的影响 (g)

Tab 1 Effect of plant enzyme/royal jelly mixture on the body weight of immunocompromised mice (g)

组别	初始体重	终末体重	增重
空白组	21.49 ± 0.67	36.01 ± 3.97	15.53 ± 4.51
模型组	27.87 ± 1.28	36.83 ± 2.36	$8.95 \pm 1.81^{###}$
阳性药组	26.24 ± 1.02	36.47 ± 2.23	10.23 ± 1.87
混合物低剂量组	24.84 ± 0.41	34.62 ± 1.80	9.78 ± 1.62
混合物中剂量组	27.23 ± 1.03	40.19 ± 3.78	12.95 ± 3.48
混合物高剂量组	26.61 ± 0.96	37.70 ± 3.00	11.09 ± 2.83

注 (Note): 与空白组比较, $^{###}P < 0.01$ (Compared with the blank group, $^{###}P < 0.01$)。

2.8.4 免疫脏器指数 解剖摘取各组小鼠的脾脏

和胸腺，去除周围结缔组织，用吸水纸吸除多余水分并称重，脏器质量 (mg) / 终末体重 (g) 即得免疫脏器指数^[15]。

如图 1 所示，空白组、阳性药组小鼠的胸腺指数和脾脏指数均明显高于模型组，说明 CTX 可以抑制小鼠免疫器官的生长发育；与模型组相比，混合物样品中、高剂量组小鼠的胸腺指数和脾脏指数均有明显提高。说明酵素 / 蜂王浆混合物具有对抗环磷酰胺、促进免疫器官发育、提高非特异性免疫的效果。

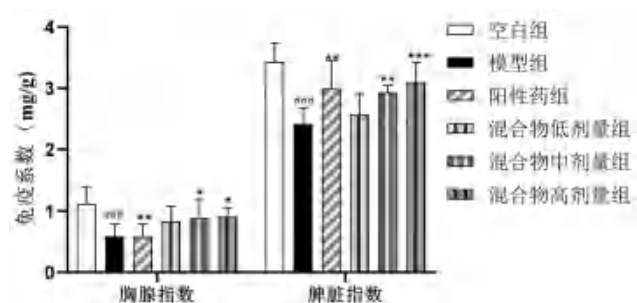


图 1 酵素 / 蜂王浆混合物对小鼠脾脏指数、胸腺指数的影响
Fig 1 Effect of plant enzyme/royal jelly mixture on the spleen index and thymus index of mice

注: 与空白组比较, $^{###}P < 0.001$; 与模型组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ 。

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

2.8.5 脾脏形态学观察 将称量后的小鼠脾脏浸泡在 10% 甲醛溶液中 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 储存, 24 h 后转移至 20% 蔗糖溶液中浸泡过夜使其沉底, 再转移至 30% 蔗糖溶液中浸泡过夜使其沉底。取出脾脏样品, 用冷冻切片机切成 $5 \mu\text{m}$ 的薄片, 通过 HE 染色进行处理后置于光学显微镜下观察并拍照。

结果如图 2 所示，空白组淋巴细胞分布集中，小梁结构清晰，红髓、白髓清楚可辨，边缘区界限清晰；模型组淋巴细胞分布稀疏，红髓与白髓界限模糊，脾组织存在破损现象。与模型组相比，阳性药组小鼠脾脏白髓中淋巴小结的数目多且相互连结，淋巴细胞密集；混合物样品低、中剂量组的修复作用不明显，高剂量组脾脏结构恢复较为明显，淋巴细胞相对密集，白髓中淋巴小结数目多、体积大、相互连结，红髓、白髓边缘区界限逐渐清晰。结果显示，酵素 / 蜂王浆混合物在一定程度上可以促进小鼠脾脏生长发育，起到修复免疫脏器组织的作用。

2.8.6 细胞因子的测定 于第 30 日给药后，取血，分离血清，用灭菌后的生理盐水将血清稀释至 10%，参考 ELISA 试剂盒操作说明书进行检

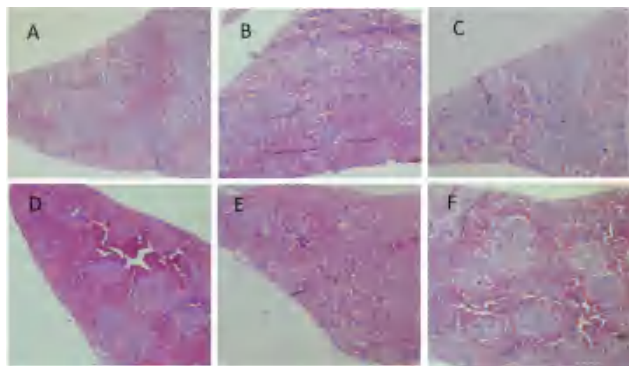


图 2 酵素 / 蜂王浆混合物对免疫低下小鼠脾脏组织形态学变化的影响 (×10)

Fig 2 Effect of plant enzyme/royal jelly mixture on the histomorphological changes of the spleen in immunocompromised mice (×10)

A. 空白组 (blank group); B. 模型组 (model group); C. 阳性药组 (positive drug group); D. 混合物低剂量组 (plant enzyme/royal jelly mixture low dose group); E. 混合物中剂量组 (plant enzyme/royal jelly mixture middle dose group); F. 混合物高剂量组 (plant enzyme/royal jelly mixture high dose group)

测。根据浓度标准曲线分别计算 IgM、IL-1β 和 TNF-α 的相应含量。

各组小鼠血清中细胞因子的含量如图 3 所示。空白组、阳性药组小鼠血清中 IgM、IL-1β 和 TNF-α 的水平明显高于模型组, 说明 CTX 可以抑制小鼠的体液和细胞免疫功能。与模型组相比, 低、中、高剂量的混合物样品干预组小鼠血清中三种细胞因子的含量均有显著提高, 说明酵素 / 蜂王浆混合物具有对抗环磷酰胺、促进机体体液免疫和细胞免疫的效果。结果提示, 酵素 / 蜂王浆混合物可能通过影响细胞因子的分泌, 从而起到改善机体免疫功能的作用, 并在一定范围内具有量效关系。

2.9 数据处理

实验数据采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析, 符合正态分布的计量资料以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 利用单因素方差分析进行组间比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 讨论

10-HDA 是蜂王浆重要成分之一, 性质稳定, 具有优良的杀菌、抗肿瘤和提高免疫的功能^[4]。没食子酸提高免疫力的功效已被证实。在犊牛饲料中添加没食子酸可以显著提高 IgG、TNF-α 等细胞因子的水平^[16]。蛋白质是人体免疫防御能力的物质基础, 人体各种免疫细胞和抗体的生成都需要蛋白质的参与。黄酮是优良的抗氧化剂。在探究沙苑子、柴胡等中药不同部位抗氧化性能时发现, 黄酮含量越高其抗氧化能力越高^[17-18]。本

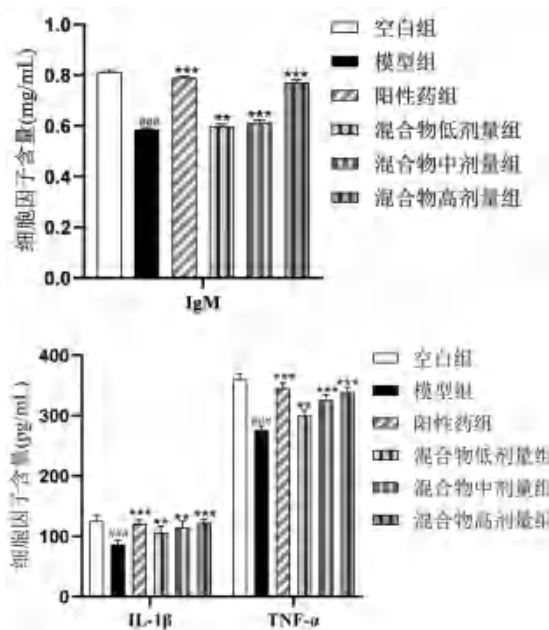


图 3 血清中细胞因子含量

Fig 3 Cytokine content in serum

注: 与空白组比较, $^{###}P < 0.001$; 与模型组比较, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ 。

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

文检测出混合物样品中 10-HDA、蛋白质含量分别为 $3.30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $145.90 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 酵素原浆中没食子酸、黄酮类化合物含量分别为 $0.35 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.16 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 提示酵素 / 蜂王浆混合物可能具有抗氧化及提高免疫力的潜能。

抗氧化即为清除相关自由基, 在人体美白祛斑、抗衰老等方面具有积极意义^[19]。抗氧化实验结果表明, 稀释至 50% 的混合物样品对 DPPH· (85.11%) 和超氧阴离子自由基 (72.2%) 均具有较好的清除效果, 稀释至 2% 后对羟自由基仍具有一定清除能力 (44.51%), 结果表明酵素 / 蜂王浆混合物具有较强的抗氧化性能。

免疫是人体的一种生理功能, 增强机体免疫力, 对于疾病的防御和治疗十分关键。胸腺和脾脏是机体重要的免疫器官, 其指数一定程度上可以反映机体的免疫水平^[20]。脾脏是机体内最核心的免疫器官, 其形态结构是反映机体非特异性免疫的重要指标^[21]。免疫球蛋白是体液免疫应答中最主要的细胞因子, 在抗原刺激机体免疫系统时, IgM、IL-1β 和 TNF-α 等细胞因子能够产生极强的抗感染能力、激活免疫系统等一系列生物学反应^[22-24]。本文研究结果表明, 混合物样品可以提高小鼠的免疫脏器指数, 促进脾脏细胞生长发育, 增加小鼠血清中 IgM、IL-1β 和 TNF-α 细胞

因子的含量, 具有提高机体非特异性免疫、体液免疫及细胞免疫的作用, 其作用可能与提高免疫脏器指数, 减少免疫器官损伤, 以及提高血液中一些细胞因子 (IgM、IL-1 β 和 TNF- α) 含量等因素有关, 并在一定范围内具有量效关系。

4 结论

“药食同源”植物酵素结合了药食两用原料的药效作用和酵素的营养保健功能, 成为近年来酵素产品研究的热点。本研究中, 以“药食同源”原料与蜂王浆混合制备后, 发现其具有良好的抗氧化和免疫调节能力, 在抗氧化和调节免疫功能的食物及药物开发方面具有极大的应用前景, 可为今后“药食同源”植物酵素的综合性开发和进一步应用提供实验基础。

参考文献

[1] 杨权, 杨成玮, 袁斌, 等. “药食同源”型诺丽果酵素对小鼠胃肠动力作用的探究 [J]. 现代食品科技, 2019, 12 (7): 143-148.

[2] 高庆超, 常应九, 马蓉. 微生物酵素的研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2020, 41 (2): 190-195.

[3] 宗浩, 陈平华. 一种植物发酵皇浆饮品及其制备方法 [P]. 浙江省: CN113040301A, 2021.06.29.

[4] 兰杨, 姜红, 张仕瑾, 等. 余甘子化学成分、药理活性及质量控制提升的研究进展 [J]. 中国药业, 2020, 29 (7): 156-159.

[5] 裴河欢, 张美凤, 李琦. 余甘子药理作用的研究与开发进展 [J]. 当代医药论丛, 2020, 18 (12): 11-13.

[6] Yang YC, Chou WM, Widowati DA, et al. 10-hydroxy-2-decenoic acid of royal jelly exhibits bactericide and anti-inflammatory activity in human colon cancer cells [J]. BMC Complement Altern Med, 2018, 18 (1): 202-213.

[7] Fan P, Han B, Hu H, et al. Proteome of thymus and spleen reveals that 10-hydroxydec-2-enoic acid could enhance immunity in mice [J]. Expert Opin Ther Targets, 2020, 24 (3): 267-279.

[8] Honda Y, Araki Y, Hata T, et al. 10-hydroxy-2-decenoic acid, the major lipid component of royal jelly, extends the lifespan of caenorhabditis elegans through dietary restriction and target of rapamycin signaling [J]. J Aging Res, 2015, 20 (12): 425-461.

[9] GB 9697-2008. 蜂王浆 [S]. 2008: 3-4.

[10] 聂少平, 谢明勇, 罗珍. 用清除有机自由基 DPPH 法评价茶叶多糖的抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2006, 24 (3):

34-36.

[11] 宋坤, 刘琴, 殷振雄, 等. 籽瓜多糖的超声波辅助提取工艺、分子量和抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技, 2014, 35 (10): 269-274.

[12] 吴兰芳, 景永帅, 张振东, 等. 吊灯花提取物体外抗氧化活性评价 [J]. 食品工业科技, 2010, 31 (11): 78-80.

[13] Wang Z, Li Y, Wang C, et al. Oral administration of *Urtica macrorrhiza* Hand. -Mazz. polysaccharides to protect against cyclophosphamide-induced intestinal immunosuppression [J]. Exp Ther Med, 2019, 18 (3): 2178-2186.

[14] Meng M, Guo M, Feng C, et al. Water-soluble polysaccharides from *Grifola Frondosa* fruiting bodies protect against immunosuppression in cyclophosphamide-induced mice via JAK2/STAT3/SOCS signal transduction pathways [J]. Food Funct, 2019, 10 (8): 4998-5007.

[15] 邓旭坤, 段欢, 刘钊, 等. 黄精多糖对环磷酰胺诱导小鼠免疫抑制的影响 [J]. 中南民族大学学报 (自然科学版), 2018, 37 (2): 49-53.

[16] 张全宇, 徐宏建, 王丽华, 等. 没食子酸对断奶前犊牛生长性能及血浆生化、抗氧化和免疫指标的影响 [J]. 动物营养学报, 2022, 34 (4): 2496-2503.

[17] 莫小春, 胡德辉, 张强, 等. 沙苑子黄酮类化合物的提取工艺及其抗氧化活性研究 [J]. 广州化工, 2022, 50 (7): 45-49.

[18] 李慧敏, 高月, 邵雪飞, 等. 柴胡不同部位黄酮类化合物含量及抗氧化活性比较研究 [J]. 中国食品添加剂, 2022, 33 (4): 211-217.

[19] 高秀蕊, 石双群, 宋秀芹, 等. 谷胱甘肽、甘露醇对酪氨酸酶的抑制和对 O₂⁻· 自由基的清除作用 [J]. 河北师范大学学报, 1990, 23 (2): 4-8.

[20] Qi Q, Dong Z, Sun Y, et al. Protective effect of bergenin against cyclophosphamide induced immunosuppression by immunomodulatory effect and antioxidation in Balb/c mice [J]. Molecules, 2018, 23 (10): 2668-2687.

[21] Yasunaga M. Antibody therapeutics and immunoregulation in cancer and autoimmune disease [J]. Semin Cancer Biol, 2020, 64 (6): 1-12.

[22] 刘畅, 李志满, 吴修利, 等. 鹿血改善环磷酰胺致小鼠血虚证的作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32 (9): 2102-2104.

[23] Song Y, Kim YR, Kim SM, et al. RNAi mediated silencing of TNF- α converting enzyme to down regulate soluble TNF- α production for treatment of acute and chronic colitis [J]. J Control Release, 2016, 239 (3): 231-241.

[24] 邹静, 郑作文. 壮药复方铁草胶囊 (ZT) 对肝癌小鼠扶正作用的研究 [J]. 海峡药学, 2019, 31 (3): 16-18.

(收稿日期: 2022-07-08; 修回日期: 2022-08-18)

基于 miRNA 高通量测序探讨芪玄抑甲宁改善格雷夫斯病小鼠甲状腺功能亢进的作用机制

高长久¹, 卢芳², 柳长风², 于栋华², 丁焱¹, 刘树民^{2*} (1. 黑龙江中医药大学研究生院, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学中医药研究院, 哈尔滨 150040)

摘要: **目的** 基于微小 RNA (miRNA) 高通量测序技术, 探讨芪玄抑甲宁通过调控 miRNA 改善格雷夫斯病 (GD) 甲状腺功能亢进的作用机制。 **方法** 将雌性 BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组、甲巯咪唑组和芪玄抑甲宁组, 前期应用重组腺病毒 (Ad-TSHR289) 免疫造模成功后, 芪玄抑甲宁组灌胃芪玄抑甲宁 50 g/(kg·d) 进行干预, 观察各组小鼠血清中三碘甲状腺原氨酸 (T₃)、甲状腺素 (T₄)、促甲状腺激素 (TSH) 水平及甲状腺组织病理形态, 并对对照组、模型组和芪玄抑甲宁组小鼠甲状腺组织进行 miRNA 测序。 **结果** 与模型组比较, 芪玄抑甲宁干预 4 周后, 小鼠血清 T₃、T₄ 显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), TSH 升高 ($P < 0.05$); 小鼠甲状腺滤泡大小形状比较均一, 排列疏松, 胶质含量相对丰富。与对照组比较, 模型组共筛选出 171 个差异表达 miRNA, 其中 99 个 miRNA 下调、72 个 miRNA 上调; 与模型组比较, 芪玄抑甲宁组共筛选出 127 个差异表达 miRNA, 其中 61 个 miRNA 下调、66 个 miRNA 上调。差异表达 miRNA 的 qRT-PCR 验证结果显示, 三组小鼠甲状腺组织 miR-128-3p、miR-144-3p、miR-363-3p、miR-215-5p 和 miR-30a-5p 表达与 miRNA 测序结果基本一致。差异表达 miRNA 靶基因的富集结果显示, 基因本体 (GO) 功能主要富集于对生长因子的反应、神经元细胞体、染色质结合、DNA 转录因子结合、RNA 聚合酶 II 结合等方面; 京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路主要富集于丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt)、转化生长因子 β (TGF- β)、血管内皮生长因子 (VEGF)、甲状腺激素信号通路等途径。 **结论** miR-128-3p、miR-144-3p 和 miR-363-3p 可能是芪玄抑甲宁治疗格雷夫斯病甲状腺功能亢进的作用靶点。 **关键词:** 芪玄抑甲宁; 格雷夫斯病 (GD); 甲状腺功能亢进; miRNA 测序; 生物信息学分析 **中图分类号:** R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)02-0334-08 **doi:**10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.009

Mechanism of action of Qixuan Yijianing in improving hyperthyroidism in mice with Graves disease based on miRNA high-throughput sequencing

GAO Chang-jiu¹, LU Fang², LIU Chang-feng², YU Dong-hua², DING Song¹, LIU Shu-min^{2*} (1. School of Graduate, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040)

Abstract: Objective To determine the mechanism of Qixuan Yijianing in improving hyperthyroidism in mice with Graves disease (GD) by regulating microRNA (miRNA), based on miRNA high-throughput sequencing. **Methods** Female BALB/c mice were randomly divided into a control group, a model group, a methimazole group and a Qixuan Yijianing group. After successful immunization with recombinant adenovirus (Ad-TSHR289) in the early stage, Qixuan Yijianing group was treated with Qixuan Yijianing 50 g/(kg·d). The levels of triiodothyronine (T₃), thyroxine (T₄), thyroid stimulating hormone (TSH) in the serum and the pathological morphology of the thyroid tissues were observed. miRNA sequencing was performed on the thyroid tissues of mice in the control group, the model group and the Qixuan Yijianing group. **Results** After 4 weeks of intervention, compared with

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (No. 81302898); 国家自然科学基金面上项目 (No. 82074149)。

作者简介: 高长久, 男, 博士研究生, 主要从事中药药性理论及药效物质基础研究, email: gaochangjiu0202@163.com *通信作者: 刘树民, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药药性理论及药效物质基础研究, email: keji-liu@163.com

the model group, the levels of T_3 and T_4 in the serum of the mice were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the TSH was increased ($P < 0.05$). The size and shape of the thyroid follicles of the mice were relatively uniform, with loose arrangement, and relatively rich colloid content. Compared with the control group, a total of 171 differentially expressed miRNAs were screened in the model group, 99 of which were down-regulated and 72 up-regulated. Compared with the model group, 127 differentially expressed miRNAs were screened in the Qixuan Yijianing group, 61 of which were down-regulated, 66 were up-regulated. The qRT-PCR validation of differentially expressed miRNAs showed that the expression of miR-128-3p, miR-144-3p, miR-363-3p, miR-215-5p and miR-30a-5p in the thyroid tissue of the mice in the three groups was consistent with the miRNA sequencing. The enrichment of differentially expressed miRNA target genes showed that the function of gene ontology (GO) mainly responded to the growth factors, neuron cell body, chromatin binding, DNA transcription factor binding, RNA polymerase II binding, etc.. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways were predominantly in the mitogen-activated protein kinases (MAPK), phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt), transforming growth factor- β (TGF- β), vascular endothelial growth factor (VEGF), thyroid hormone signaling pathways and other pathways.

Conclusion Possibly miR-128-3p, miR-144-3p and miR-363-3p are the targets of Qixuan Yijianing in the treatment of hyperthyroidism in Graves disease.

Key words: Qixuan Yijianing; Graves disease; hyperthyroidism; microRNA sequencing; bioinformatics analysis

格雷夫斯病 (Graves disease, GD) 是一种发生于甲状腺的自身免疫性疾病, 以促甲状腺激素 (TSH) 受体刺激抗体 (TRAb) 的发现为特征, 主要表现为弥漫性甲状腺肿、甲状腺毒症和眼病。在所有甲状腺功能亢进 (以下简称甲亢) 患者中, 有 80% 左右的病例被诊断出患有 GD。当前, 治疗 GD 主要有放射性碘、抗甲状腺药物和甲状腺切除术三种方式^[1-2], 但这些方式存在复发率高、易伴发甲状腺功能减退等问题^[3]。

MicroRNA (miRNA) 是内源性、单链的非编码微小 RNA, 长度一般为 19 ~ 25 个核苷酸。miRNA 可以通过抑制 mRNA 翻译或促进靶 RNA 降解来下调编码蛋白基因的表达^[4], 广泛参与炎症介质的释放、免疫反应的调控、血管的形成等诸多重要生物学事件^[5]。近年来, 越来越多的研究表明 miRNA 在 GD 的发生发展中起着重要作用^[6-8]。

GD 属于中医“瘰疬”范畴, 初期多为气机郁滞, 继而津凝痰聚, 痰气搏结颈前; 进而肝气郁结, 日久化火, 火热内盛, 耗气伤阴, 导致气阴两虚之候^[9]。基于上述认识, 刘树民教授通过多年临床经验总结并创建了补气滋阴、清肝降火、化痰散结之验方——芪玄抑甲宁, 广泛应用于临床, 并取得了良好的疗效。前期药效学研究已证实芪玄抑甲宁对 GD 有显著改善作用, 本研究旨在通过 miRNA 测序技术, 从表观遗传学角度探索其在 GD 模型小鼠甲状腺组织中的作用靶点及改善 GD 甲亢的作用机制。

1 材料

1.1 试药

芪玄抑甲宁组方五味中药黄芪 - 玄参 - 牡蛎 - 浙贝母 - 夏枯草配伍比例为 3 : 2 : 2 : 2 : 1 (黑龙江修生堂药业有限公司, 批号分别为 20190401、20190401、20200601、20191101、20190701), 经黑龙江中医药大学药学院中药资源与开发教研室王振月教授鉴定为正品饮片, 符合 2020 年版《中国药典》饮片性状规定, 按照最优工艺进行提取^[10], 制备成冻干粉; 甲巯咪唑片 (Merck KGaA, 批号: C10002097)。

Ad-TSHR289 重组腺病毒 (赛业生物科技有限公司, 滴度 3.13×10^{11} PFU \cdot mL⁻¹); 小鼠三碘甲腺原氨酸 (T_3)、甲状腺素 (T_4)、促甲状腺激素 (TSH) ELISA 试剂盒 (江苏晶美生物科技有限公司, 批号分别为 202112、202112、202201); VAHTSTM Small RNA Library Prep Kit for Illumina、VAHTSTM DNA Clean Beads 试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 批号分别为 NR801-02、N411-03); TransScript II All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for Qpcr/One-Step gDNA Removal、TransStart Top Green qPCR SuperMix 试剂盒 (北京全式金生物技术股份有限公司, 批号分别为 AH341、AQ131)。

1.2 仪器

Eclipse E100 正置光学显微镜 (日本 Nikon 公

司); M200pro 型酶标仪、Nanodrop 2000 超微量紫外分光光度计(美国 Thermo 公司); NovaSeq 6000 测序仪(美国 Illumina 公司); LabChip GX 大分子分析仪(美国 PerkinElmer 公司); CFX96 qRT-PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 动物

6 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠, 体质量 18 ~ 22 g [北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK(京)2021-0006]。小鼠在温度 20 ~ 24 °C、湿度 40% ~ 50% 条件下适应性饲养 1 周, 自由进食饮水。动物实验在黑龙江中医药大学中医药研究院完成, 动物使用许可证号: SYXK(黑)2018-007。本研究经黑龙江中医药大学实验动物福利与伦理委员会批准(批准文号: 2021030605)。

2 方法

2.1 动物模型的制备与分组给药

促甲状腺激素受体(TSHR)是具有 7 个跨膜结构的 G 蛋白偶联受体, 包括 A(细胞表面)、B(跨膜)两个亚单位, A 亚单位主要参与促甲状腺激素(TSH)受体特异性刺激性自身抗体(TRAAb)结合。通过构建 TSHR-A 亚单位的腺病毒(Ad-TSHR289)可成功诱导 GD 动物模型。在众多造模方法中, 雌性 BALB/c 小鼠通过 Ad-TSHR289 重组腺病毒免疫诱导所建立的 GD 模型, 与人 GD 的发生机制类似, 成模率最高(可达 86%), 且具有高度可重复性, 此动物模型现被广泛应用^[11]。前期实验结果表明, 芪玄抑甲宁各剂量组对 GD 模型小鼠的外观行为、甲状腺组织病理形态具有改善作用, 并对血清中 T₄、TRAAb 有回调作用, 且高剂量组最显著^[12], 故本研究以前期实验的高剂量组作为给药组。

取雌性 BALB/c 小鼠 50 只, 随机分为对照组(10 只)、造模组(40 只)。造模组应用经 PBS 稀释的重组腺病毒(Ad-TSHR289)于小鼠胫前肌内注射免疫造模, 每次免疫剂量为 1.878×10^9 PFU/60 μ L, 对照组给予等剂量的 PBS, 于第 1、4、7 周共免疫 3 次。第 10 周将检测造模成功的小鼠分为模型组、甲巯咪唑组、芪玄抑甲宁组, 每组 8 只。芪玄抑甲宁组灌胃芪玄抑甲宁 50 g 生药/(kg·d)(质量浓度 2.5 g 生药·mL⁻¹, 20 mL·kg⁻¹), 甲巯咪唑组灌胃甲巯咪唑片 3.75 mg/(kg·d), 对照组、模型组灌胃给予 20 mL/(kg·d)的饮用水, 连续 4 周。

2.2 芪玄抑甲宁对 GD 小鼠甲状腺功能的影响

给药前和给药 4 周后, 将各组小鼠腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠(40 mg·kg⁻¹)麻醉, 于小鼠颌

下静脉丛采静脉血, 离心取上清, ELISA 法检测小鼠血清中 T₃、T₄ 和 TSH 水平, 具体操作按试剂盒说明书进行, 并经酶标仪检测 450 nm 波长时的光密度值, 比较各组间的差异并分析。

2.3 芪玄抑甲宁对 GD 小鼠甲状腺组织病理形态的影响

给药结束后, 颈椎脱位法处死小鼠, 取甲状腺组织, 用 4% 多聚甲醛固定, 经石蜡包埋切片, 脱蜡至水, 苏木素和伊红染色, 脱水, 中性树脂封片后, 在正置光学显微镜下观察和拍照。

2.4 各组小鼠甲状腺组织差异表达 miRNA 的分析

2.4.1 甲状腺组织 RNA 的提取与检测 从对照组、模型组和芪玄抑甲宁组每组随机选取 6 只小鼠的甲状腺组织, 使用 TRIzol 法提取组织样本的总 RNA, 使用生物大分子分析仪 LabChip GX 对 RNA 的完整性进行检测, 使用超微量紫外分光光度计 Nanodrop2000 对 RNA 进行浓度检测。

2.4.2 文库构建与高通量测序 使用 VAHTSTM Small RNA Library Prep Kit for Illumina 构建单端测序文库, 通过 VAHTSTM DNA Clean Beads 纯化产物合成 cDNA 文库, 生成的文库通过 Qsep400 方法进行质检, 在 NovaSeq 6000 平台上进行测序。

2.4.3 基因鉴定与表达分析 将每个具有 miRNA 序列的样品读长与已有 miRNA 数据库和新 miRNA 的预测结果进行比较, 对各样本中 miRNA 进行表达量分析, 并使用 TPM 算法对表达量进行归一化。以差异倍数(Fold Change, FC) > 1.5 或 < 0.67, P < 0.05 作为筛选标准, 使用 edgeR 软件进行差异表达分析, 获得两组样本之间的差异表达 miRNA。

2.5 差异表达 miRNA 的 qRT-PCR 验证

选择 miR-128-3p、miR-144-3p、miR-363-3p、miR-215-5p、miR-30a-5p 这 5 个差异表达 miRNA 进行 qRT-PCR 验证。取各组小鼠甲状腺组织 miRNA, 使用 TransScript II All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (One-Step gDNA Removal) 反转录试剂盒反转录成 cDNA。根据 TransStart Top Green qPCR SuperMix 试剂盒说明书进行 qRT-PCR 分析。结果以差异倍数(FC) 进行表示并绘制柱状图。引物序列见表 1。

2.6 差异表达 miRNA 靶基因的预测与网络的构建

将差异表达的 miRNA 通过 miRDB (<http://mirdb.org>)、TargetScan (<https://www.targetscan.org>)、Starbase (<https://starbase.sysu.edu.cn>) 3 个数据库预测靶基因并取交集, 获得差异表达 miRNA 的靶基因。运用 Cytoscape 3.8.2 软件构建“差异表达 miRNA-靶基因”网络图。

表 1 miRNA 引物序列

Tab 1 miRNA primer sequences

miRNA 名称	正向引物序列 (5'-3')	反向引物序列 (5'-3')
miR-128-3p	CGCGTCACAGTGAACCGGT	GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-144-3p	TCATGTAGTAGATATGACAT	GGCAGGGTCCGAGGTATTC
miR-363-3p	GCGAATTGCACGGTATCCA	AATTGCACGGTATCCA
miR-215-5p	ATGACCTATGATTTGACAGAC	GCAGGGTCCGAGGTATTC
miR-30a-5p	CGCGTGTAACATCCTCGAC	GTGCAGGGTCCGAGGT
U6 (内参)	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT

2.7 miRNA 靶基因的 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

通过 Metascape 数据库 (<https://metascape.org>) 对差异表达 miRNA 的靶基因进行富集分析, 包括基因本体 (GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。

2.8 统计学分析

甲功三项 (TSH、T₃、T₄) 结果采用 IBM SPSS Statistics 24 软件进行数据分析, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组内治疗前后比较采用配对样本 *t* 检验; 差异表达 miRNA 的 qRT-PCR 和 miRNA 测序结果数据比较分析采用独立样本 *t* 检验, 应用 GraphPad Prism 7 软件进行分组柱状图的绘制。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 芪玄抑甲宁对 GD 小鼠甲状腺功能的影响

给药前与对照组比较, 模型组小鼠 T₃、T₄ 显著升高 ($P < 0.01$), TSH 显著降低 ($P < 0.01$)。给药 4 周后, 与模型组比较, 芪玄抑甲宁组小鼠 T₃、T₄ 降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), TSH 升高 ($P < 0.05$); 与给药前比较, 芪玄抑甲宁组 T₃、T₄ 降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), TSH 升高 ($P < 0.01$) (见表 2)。

3.2 芪玄抑甲宁对 GD 小鼠甲状腺组织病理形态的影响

对照组甲状腺组织中的滤泡大小形状相对比较均一, 滤泡细胞排列较为疏松, 甲状腺上皮细胞呈椭圆状、无增生, 滤泡中胶质含量较丰富。模型组甲状腺组织中的滤泡细胞大小不一, 增生肥大, 呈立方状或高柱状, 部分滤泡腔中胶质缺失, 存在空泡情况等病理特征。与模型组相比, 芪玄抑甲宁组甲状腺组织病理形态有一定的恢复, 与对照组较为接近 (见图 1)。

3.3 三组小鼠甲状腺组织差异表达 miRNA

与对照组比较, 模型组共筛选出 171 个差异表达的 miRNA, 其中 99 个 miRNA 下调、72 个 miRNA 上调, 差异最大的 miRNA 为 miR-18b-5p; 与模型组比较, 芪玄抑甲宁组共筛选出 127 个差异表达的 miRNA, 其中 61 个 miRNA 下调、66 个 miRNA 上调,

表 2 芪玄抑甲宁对 GD 小鼠甲状腺功能的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Tab 2 Effect of Qixuan Yijianing on the thyroid function in GD mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	甲功三项	给药前	给药后
对照组	TSH/ (mU · L ⁻¹)	12.93 ± 1.24	12.62 ± 1.25
	T ₃ / (ng · mL ⁻¹)	2.79 ± 0.31	2.81 ± 0.20
	T ₄ / (ng · mL ⁻¹)	61.64 ± 5.46	60.21 ± 5.67
模型组	TSH/ (mU · L ⁻¹)	10.58 ± 0.75 ^{##}	10.99 ± 0.78 ^{##}
	T ₃ / (ng · mL ⁻¹)	3.91 ± 0.39 ^{##}	4.06 ± 0.38 ^{##}
	T ₄ / (ng · mL ⁻¹)	87.04 ± 9.38 ^{##}	85.42 ± 10.29 ^{##}
甲巯咪唑组	TSH/ (mU · L ⁻¹)	10.59 ± 0.95 ^{##}	12.57 ± 1.00 ^{**△△}
	T ₃ / (ng · mL ⁻¹)	4.03 ± 0.38 ^{##}	3.05 ± 0.37 ^{**△△}
	T ₄ / (ng · mL ⁻¹)	90.34 ± 7.63 ^{##}	64.70 ± 5.20 ^{**△△}
芪玄抑甲宁组	TSH/ (mU · L ⁻¹)	10.79 ± 0.95 ^{##}	12.38 ± 1.13 ^{**△}
	T ₃ / (ng · mL ⁻¹)	4.06 ± 0.17 ^{##}	3.63 ± 0.39 [△]
	T ₄ / (ng · mL ⁻¹)	91.20 ± 5.01 ^{##}	67.14 ± 5.08 ^{**△△}

注: 与同组给药前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与同时时间对照组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与同时时间模型组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the same group before the administration, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with the control group at the same time, ^{##} $P < 0.01$; compared with the model group at the same time, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ 。

差异最大的 miRNA 为 miR-1197-3p。其中 miR-128-3p、miR-144-3p 和 miR-363-3p 在模型组表达下调, 而在芪玄抑甲宁组表达上调 (见图 2 和表 3)。

表 3 各组小鼠甲状腺组织差异表达的 miRNA

Tab 3 Differentially expressed miRNAs in the thyroid tissue of mice in each group

差异 miRNA	模型组与对照组比较		差异 miRNA	芪玄抑甲宁组与模型组比较	
	<i>P</i> 值	差异倍数 (FC)		<i>P</i> 值	差异倍数 (FC)
miR-215-5p	1.350 × 10 ⁻²⁷	3.623	miR-295-3p	6.554 × 10 ⁻³	5.311
miR-147-3p	5.720 × 10 ⁻⁵	2.318	miR-20b-5p	1.210 × 10 ⁻²²	2.698
miR-499-5p	2.610 × 10 ⁻⁹	1.886	miR-363-3p	1.870 × 10 ⁻²⁵	2.592
miR-21a-5p	9.460 × 10 ⁻¹⁶	1.860	miR-128-3p	3.190 × 10 ⁻³³	1.799
miR-134-5p	1.020 × 10 ⁻⁹	1.719	miR-144-3p	1.670 × 10 ⁻²⁸	1.700
miR-128-3p	2.570 × 10 ⁻⁸	0.655	miR-542-3p	7.560 × 10 ⁻³²	0.504
miR-144-3p	1.520 × 10 ⁻⁸	0.538	miR-30a-5p	5.510 × 10 ⁻³⁵	0.482
miR-363-3p	4.000 × 10 ⁻¹⁰	0.464	miR-490-3p	1.670 × 10 ⁻¹⁹	0.324
miR-196b-5p	3.348 × 10 ⁻⁴	0.369	miR-883b-3p	1.155 × 10 ⁻²	0.254
miR-18b-5p	5.690 × 10 ⁻⁶	0.217	miR-1197-3p	5.647 × 10 ⁻³	0.0882

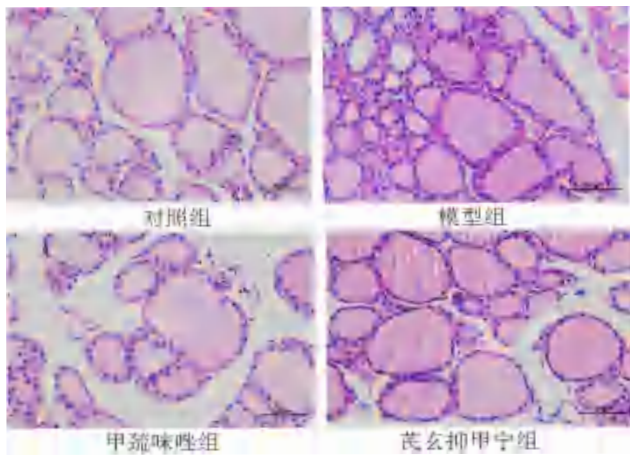


图 1 芪玄抑甲宁对 GD 小鼠甲状腺组织病理形态的影响 (HE 染色, $\times 400$)

Fig 1 Effect of Qixuan Yijianing on the pathological morphology of thyroid in GD mice (HE staining, $\times 400$)

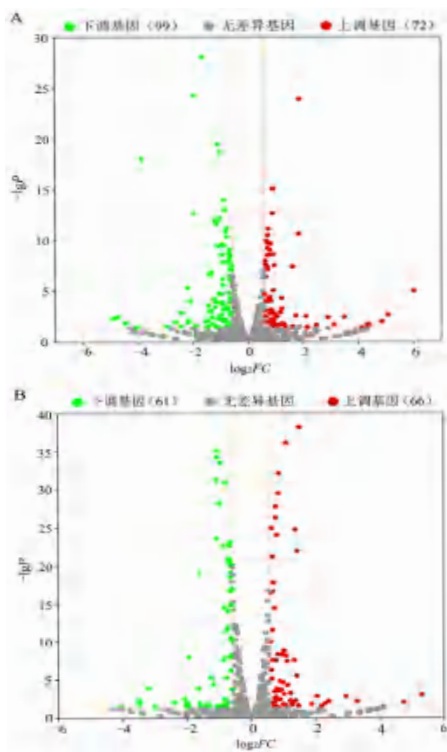


图 2 甲状腺组织差异表达 miRNA 的火山图

Fig 2 Volcano plot of differentially expressed miRNAs in the thyroid tissue

A. 模型组与对照组比较 (comparison between the model group and the control group); B. 芪玄抑甲宁组与模型组比较 (comparison between the Qixuan Yijianing group and the model group)

3.4 差异表达 miRNA 的 qRT-PCR 验证

三组小鼠甲状腺组织 miR-128-3p、miR-144-3p、miR-363-3p、miR-215-5p 和 miR-30a-5p mRNA 相对表达量与 miRNA 测序结果基本一致 (见图 3)。

3.5 差异表达 miRNA 与靶基因网络图

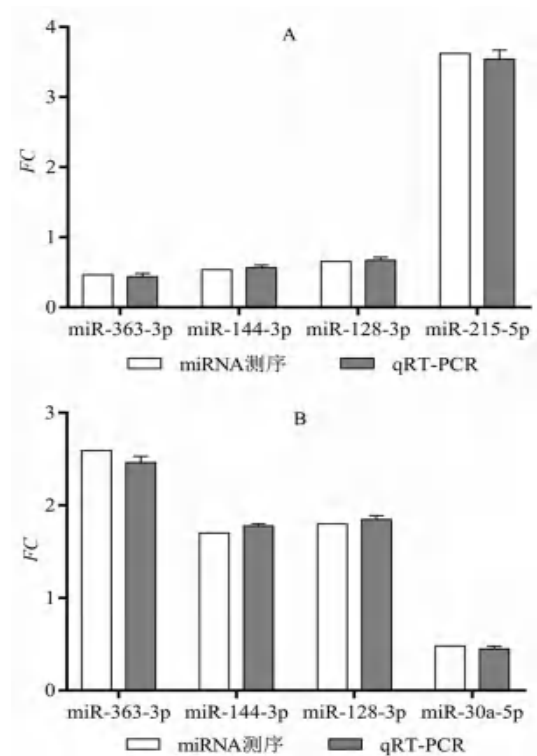


图 3 差异表达 miRNA 的 qRT-PCR 验证

Fig 3 qRT-PCR validation of differentially expressed miRNAs

A. 模型组与对照组比较 (comparison between the model group and the control group); B. 芪玄抑甲宁组与模型组比较 (comparison between the Qixuan Yijianing group and the model group)

构建了模型组与对照组、芪玄抑甲宁组与模型组“差异表达 miRNA 与靶基因”的网络图 (见图 4), 以确定 miRNA-mRNA 间的功能性相互作用, 为探讨芪玄抑甲宁改善 GD 甲亢的作用机制提供依据。

3.6 差异表达 miRNA 靶基因的功能分析

GO 功能分析包括生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 3 个部分。模型组与对照组比较, 差异表达 miRNA 的靶基因主要富集在管形态发生、激酶活性的调节、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性的调节、脉管系统发育、染色质、转录调节复合物、mRNA 结合、染色质结合、DNA 转录因子结合等条目。芪玄抑甲宁组与模型组相比, 差异表达 miRNA 的靶基因主要富集在对生长因子的反应、细胞对生长因子刺激的反应、染色质、神经元细胞体、轴突、突触后膜的内在成分、转录因子结合、染色质结合、DNA 转录因子结合等条目 (见图 5)。

KEGG 富集分析结果显示, 模型组与对照组比较, 差异表达 miRNA 的靶基因主要富集在丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、人叉头框蛋白 O (FoxO)、磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/

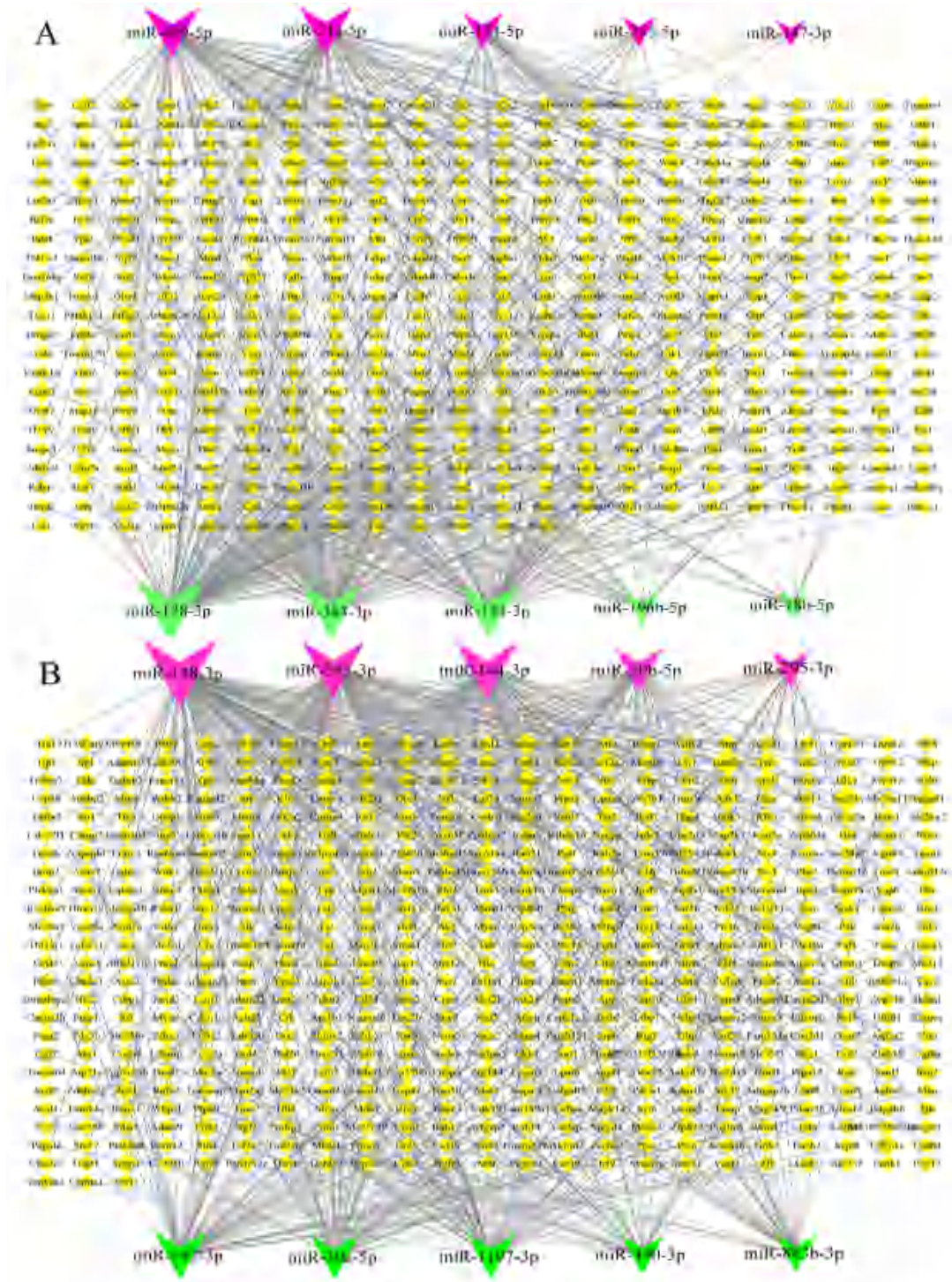


图 4 差异表达 miRNA-靶基因网络图

Fig 4 Differentially expressed miRNA-target genes network diagram

A. 模型组与对照组比较 (comparison between the model group and the control group); B. 芪玄抑甲宁组与模型组比较 (comparison between the Qixuan Yijianing group and the model group)

Akt)、神经营养因子、T 细胞受体、血管内皮生长因子 (VEGF) 等信号通路。芪玄抑甲宁组与模型组比较, 差异表达 miRNA 的靶基因主要富集在 FoxO、MAPK、转化生长因子 β (TGF- β)、Notch、生长激素的合成、分泌和作用、T 细胞受体等信号通路 (见图 6)。

4 讨论

GD 由于 TRAb 过度刺激甲状腺细胞而导致甲亢, 出现心悸、出汗、进食和便次增多及体重减轻等症^[13]。本课题组前期研究结果表明, 芪玄抑甲宁各剂量组能显著降低尾静脉注射小肠结肠炎耶尔森氏菌免疫甲亢大鼠模型血清中 T₃、T₄

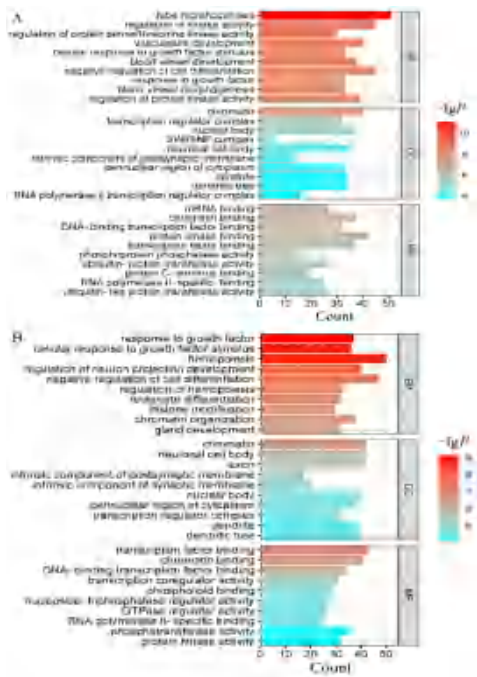


图 5 差异表达 miRNA 靶基因的 GO 功能富集分析 (前 10)
Fig 5 GO functional enrichment analysis of differentially expressed miRNA target genes (top 10)
A. 模型组与对照组比较 (comparison between the model group and the control group); B. 芪玄抑甲宁组与模型组比较 (comparison between the Qixuan Yijianing group and the model group)

的水平并提高 TSH 的水平, 可明显改善甲亢大鼠的外观行为、体质量、甲状腺组织病理样变化, 可显著降低血清中白细胞介素 -17 (IL-17)、白细胞介素 -6 (IL-6) 和 TGF- β 的水平, 回调甲亢大鼠甲状腺组织中 IL-17、IL-17R 的 mRNA 和蛋白表达水平^[14-15]; 对胫前肌内注射重组腺病毒 (Ad-TSHR289) 免疫的 GD 小鼠模型的外观行为、甲状腺组织病理形态具有改善作用, 并对血清中对 T₄、TRAb 有回调作用^[12]。GD 患者的甲状腺组织中有 miRNA 异常表达的现象, 本研究利用 miRNA 高通量测序技术, 从表观遗传学角度探讨 GD 的可能发病机制及芪玄抑甲宁治疗 GD 的作用机制。

miRNA 测序结果发现, 模型组与对照组比较, 171 个 miRNA 存在差异表达情况, 其中 99 个表达下调、72 个表达上调, 并且 miR-363-3p、miR-128-3p 和 miR-144-3p 表达在 miRNA 测序和 qRT-PCR 验证中均下调。T 辅助细胞 17 (Th17) 介导的炎症与多种自身免疫性疾病相关, miR-363-3p 可以结合到活化 T 细胞核因子 5 (*Nfat5*) 和维 A 酸相关核受体 a (*Rora*) 的 3' -UTR 上; 使体外小鼠原代 CD4⁺ 淋巴细胞中 miR-363-3p 下调, 能提高 *Rora*、IL-17a 和 IL-17f 的表达, 并增加 Th17 的分化和 IL-17 的分泌^[16]。miR-128-3p

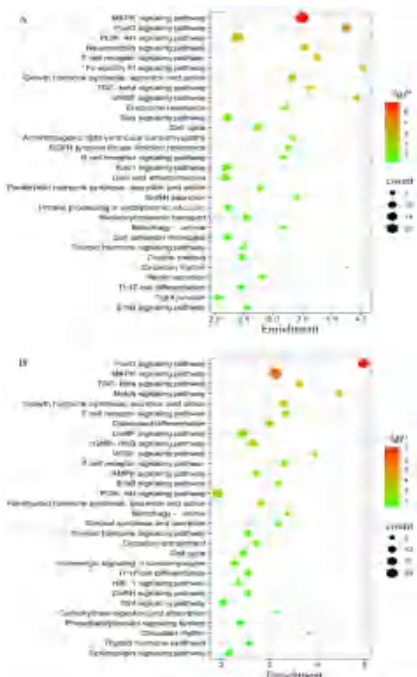


图 6 差异表达 miRNA 靶基因的 KEGG 通路富集分析 (前 30)
Fig 6 KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed miRNA target genes (top 30)
A. 模型组与对照组比较 (comparison between the model group and the control group); B. 芪玄抑甲宁组与模型组比较 (comparison between the Qixuan Yijianing group and the model group)

的表达下调, 其靶基因 *Wnt1* 诱导信号通路蛋白 1 (*WISPI*) 上调, 可激活 PI3K/Akt 信号通路, 抑制软骨细胞的增殖, 诱导细胞凋亡、软骨细胞基质降解和促炎细胞因子的产生^[17]; GD 甲状腺新血管生的增加, 可使甲状腺体积增大, 甲状腺激素合成和释放增多, miR-128-3p 的表达下调, 其靶基因 *VEGFC* 上调, 从而促进血管生成^[18]。GD 患者血浆中循环 miR-144-3p 的表达显著降低, 可作为 GD 的潜在生物标志物, 但其在 GD 中的作用机制尚不明确^[7]; 有研究表明 miR-144-3p 在多种肿瘤组织中下调, 与血管生成密切相关^[19]。本研究发现, 经芪玄抑甲宁干预后, GD 模型小鼠 miR-363-3p、miR-128-3p 和 miR-144-3p 表达水平均显著上调, 提示其可能为芪玄抑甲宁改善 GD 甲亢症状的作用靶点。

GO 富集分析结果显示, 与 GD 甲亢相关条目主要集中在对生长因子的反应、细胞对生长因子刺激的反应、染色质、神经元细胞体、细胞质核周区、转录调节复合物、转录因子结合、染色质结合、DNA 转录因子结合、RNA 聚合酶 II 结合等方面, 提示由于 GD 引起甲状腺激素合成和释放的增加, 使染色质、细胞质和神经元细胞等成分变化, 影响机体 DNA、转录因子、RNA 聚合酶 II 结合等转录过程, 导致机体生长发育和神经系统异常。

KEGG 通路分析显示, 模型组差异表达 miRNA 的靶基因主要富集于 MAPK、FoxO、PI3K/Akt、T 细胞受体、TGF- β 、VEGF、甲状腺激素信号通路等。甲状腺是高度血管化的内分泌器官, 在 GD 的发病过程中血管过度生成, 使甲状腺血流增加, 导致甲状腺体积增大、甲状腺激素水平增高^[20]。VEGFA 是血管生成的关键调节因子, 它通过与包括血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR2) 在内的受体结合发挥作用, 并且 VEGF 和 VEGFR2 多态性与 GD 难治性相关, VEGFA 在 GD 伴格雷夫斯眼病 (GO) 患者的甲状腺和眼眶脂肪组织中显著上调, 并能观察到血管过度生成^[21], 较高的 VEGFA 水平可能会增加 GD 患者甲状腺血管生成并导致甲状腺肿大^[22]。FOXO1 主要与调节 VEGFA 表达并促进血管生成有关^[23]。综合芪玄抑甲宁组差异表达 miRNA 靶基因的 KEGG 通路富集分析结果^[24], 推测芪玄抑甲宁可能通过调节差异 miRNA 的表达, 调控上述相关信号通路, 从而发挥减轻 GD 甲亢和眼病症状的作用。

综上所述, 本研究通过对对照组、模型组和芪玄抑甲宁组小鼠甲状腺组织进行 miRNA 测序, 构建“模型组与对照组”“芪玄抑甲宁组与模型组”差异 miRNA 的表达谱, 应用生物信息学技术预测差异 miRNA 的靶基因并进行靶基因的富集分析, 筛选出与芪玄抑甲宁干预 GD 甲亢密切相关的 miRNA 靶点及调控通路。基于本研究, 将选取相关 miRNA、靶基因和信号通路进行细胞和动物实验验证, 以期从表观遗传学角度阐明芪玄抑甲宁治疗 GD 甲亢的作用机制。

参考文献

- [1] Subekti I, Pramono LA. Current diagnosis and management of Graves disease [J]. Acta Med Indones, 2018, 50 (2): 177-182.
- [2] Barczyński M. Current approach to surgical management of hyperthyroidism [J]. Q J Nucl Med Mol Im, 2021, 65 (2): 124-131.
- [3] 王祺, 朱鹏里, 肖淳纯, 等. 1 例甲硫咪唑致胰岛素自身免疫综合症的病例分析 [J]. 中中药学, 2020, 18 (6): 1081-1083.
- [4] 陈双华, 李荣, 周玉生. miR-145 通过靶向 ABCE1 发挥抗乳腺癌作用 [J]. 中中药学, 2022, 20 (5): 1017-1022.
- [5] 王辰. miR-412-5p 靶向 xpo1 调控痔核组织血管增生以及痔血宁合剂干预的机制研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.
- [6] Tatulashvili S, Baudry C, Sadoul JL, et al. Nouvelles perspectives pour le diagnostic et pronostic de la maladie de Basedow [J]. Ann Endocrinol Paris, 2018, 79 (1): S31-S39.
- [7] Yao Q, Wang X, He W, et al. Circulating microRNA-144-3p and miR-762 are novel biomarkers of Graves disease [J]. Endocrine, 2019, 65 (1): 102-109.
- [8] Yin X, Ge J, Ge X, et al. MiR-363-5p modulates regulatory T cells through STAT4-HSPB1-Notch1 axis and is associated with the immunological abnormality in Graves disease [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25 (19): 9364-9377.
- [9] 岳仁宋. 甲状腺疾病病证结合治疗学 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2015: 170.
- [10] 柳长风, 苗晶囡, 邱军强, 等. 星点设计-响应面法优选芪玄抑甲宁的提取工艺 [J]. 中中药学, 2013, 41 (3): 43-47.
- [11] Eckstein A, Philipp S, Goertz G, et al. Lessons from mouse models of Graves disease [J]. Endocrine, 2020, 68 (2): 265-270.
- [12] 刘树民, 甄喆, 王可心, 等. 芪玄抑甲宁对格雷夫斯病模型药效学研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20 (6): 5-7.
- [13] Krause G, Eckstein A, Schüle R. Modulating TSH receptor signaling for therapeutic benefit [J]. Eur Thyroid J, 2020, 9 (1): 66-77.
- [14] 刘树民, 甄喆, 王可心, 等. 芪玄抑甲宁治疗甲亢的主要药效学研究 [J]. 中中药学, 2017, 45 (5): 48-51.
- [15] 刘树民, 甄喆, 李健英, 等. 芪玄抑甲宁对甲亢大鼠的 Th17 细胞相关因子的调控影响 [J]. 中药药理与临床, 2017, 33 (1): 144-148.
- [16] Kästle M, Bartel S, Geillinger-Kästle K, et al. microRNA cluster 106a ~ 363 is involved in T helper 17 cell differentiation [J]. Immunology, 2017, 152 (3): 402-413.
- [17] Yang P, Han J, Li S, et al. miR-128-3p inhibits apoptosis and inflammation in LPS-induced sepsis by targeting TGF- β 2 [J]. Open Med-Warsaw, 2021, 16 (1): 274-283.
- [18] Chang L, Yang P, Zhang C, et al. Long intergenic non-protein-coding RNA 467 promotes tumor progression and angiogenesis via the microRNA-128-3p/vascular endothelial growth factor C axis in colorectal cancer [J]. Bioengineered, 2022, 13 (5): 12392-12408.
- [19] Tian F, Wang H, Ma H, et al. miR-144-3p inhibits the proliferation, migration and angiogenesis of multiple myeloma cells by targeting myocyte enhancer factor 2A [J]. Int J Mol Med, 2020, 46 (3): 1155-1165.
- [20] 马文欣, 刘金民, 汤阳, 等. 从抑制血管新生探讨中医治疗格雷夫斯病的调血脉之法 [J]. 中医杂志, 2021, 62 (14): 1224-1227.
- [21] Craps J, Joris V, Baldeschi L, et al. miR-199a downregulation as a driver of the NOX4/HIF-1 α /VEGF-A pathway in thyroid and orbital adipose tissues from Graves' patients [J]. Int J Mol Sci, 2021, 23 (1): 153-171.
- [22] Okamoto M, Watanabe M, Inoue N, et al. Gene polymorphisms of VEGF and VEGFR2 are associated with the severity of Hashimoto's disease and the intractability of Graves disease, respectively [J]. Endocr J, 2020, 67 (5): 545-559.
- [23] Jeon HH, Yu Q, Lu Y, et al. FOXO1 regulates VEGFA expression and promotes angiogenesis in healing wounds [J]. J Pathol, 2018, 245 (3): 258-264.
- [24] 刘瑶, 李伟. 基于 miRNA 测序技术探讨黄芪-丹参药对干预自发性高血压大鼠肾损害的机制研究 [J]. 中草药, 2021, 52 (18): 5599-5607.

(收稿日期: 2022-07-02; 修回日期: 2022-08-20)

基于网络药理学和 UPLC-Q-TOF/MS 结合动物实验探究 苍草预防急性肝损伤的作用机制

王超, 付瑞嘉*, 左倩, 徐顶巧, 乐世俊, 唐于平* (陕西中医药大学 陕西省中医药管理局中药配伍重点研究室, 西安 712046)

摘要: **目的** 通过 UPLC-Q-TOF/MS 定性分析和网络药理学预测并结合动物实验验证初步探究苍草保护急性肝损伤 (ALI) 大鼠肝脏的作用机制。**方法** 采用 UPLC-Q-TOF/MS 法鉴定苍草中的化学成分, 利用 TCMSP、CTD 和 Similarity Ensemble Approach 等数据库筛选这些成分的作用靶点, 同时在 GeneCards、OMIM 和 NCBI 数据库筛选 ALI 相关靶点, 将成分作用靶点与疾病靶点的交集靶点导入 STRING 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 并使用 Cytoscape 3.8.2 软件进行网络拓扑分析筛选核心靶点, 通过 DAVID 数据库对关键靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。通过肝组织 HE 染色, 大鼠血清中肝功能指标、炎症因子水平以及肝组织中氧化应激水平的测定对苍草防治 ALI 的药效进行评价, 并利用免疫组化的方法对预测的核心靶点及 KEGG 富集通路结果进行验证。**结果** 经 UPLC-Q-TOF/MS 法鉴定出 20 个成分, 网络药理学方法筛选得到上述成分预防治疗 ALI 的核心靶点 104 个, GO 功能主要与炎症反应、氧化还原酶活性和蛋白酶结合等生物过程相关, KEGG 结果主要涉及 IL-17、TNF 及 Toll 样受体等信号通路; 动物实验结果显示, 苍草预防性给药后能够缓解大鼠肝脏的损伤, 显著降低模型组大鼠血清中 ALT、AST、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平和肝组织中 MDA 的含量, 且 SOD 和 CAT 在肝组织中的活性显著增强; 此外还发现苍草给药后可上调大鼠肝脏组织中 Nrf2 蛋白的表达, 下调 TLR-4、NF- κ Bp65、keap1 和 HO-1 蛋白的表达。**结论** 苍草对四氯化碳诱导的 ALI 大鼠肝脏具有保护作用, 该作用可能与其调节 keap1/Nrf2/HO-1 和 Toll 样受体信号通路有关。

关键词: 苍草; 急性肝损伤; 网络药理学; keap1/Nrf2/HO-1 信号通路; Toll 样受体信号通路
中图分类号: R286 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)02-0342-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.010

Mechanism of action of *Achillea alpina* L. in the prevention of acute liver injury based on UPLC-Q-TOF/MS combined with network pharmacology and animal experiments

WANG Chao, FU Rui-jia*, ZUO Qian, XU Ding-qiao, YUE Shi-jun, TANG Yu-ping* (Key Laboratory of TCM Compatibility Shaanxi Administration of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046)

Abstract: Objective To determine the mechanism of action of *Achillea alpina* L. in protecting against acute liver injury (ALI) in rats by UPLC-Q-TOF/MS qualitative analysis and network pharmacological prediction combined with animal experimental validation. **Methods** Firstly, the chemical components in *Achillea alpina* L. were identified by UPLC-Q-TOF/MS, and the targets of these components were screened with TCMSP, CTD and Similarity Ensemble Approach databases, while the targets related to ALI were screened in GeneCards, OMIM and NCBI databases. The intersecting targets of the components and the disease targets were imported into STRING to construct

基金项目: 国家重点研发计划项目 (No. 2019YFC1711000); 陕西中医药大学学科创新团队项目 (No. 2019-YL10)。

作者简介: 王超, 男, 在读硕士研究生, 主要从事中药配伍关系研究, email: fz2664957796@126.com ***通信作者:** 付瑞嘉, 女, 助理实验师, 主要从事中药配伍关系研究, email: frjde@sina.com; 唐于平, 男, 教授, 主要从事中药配伍效应与物质基础研究, email: yupingtang@sntcm.edu.cn

protein-protein interaction (PPI) network. The core targets were screened by network topology analysis with Cytoscape 3.8.2 software, and the key targets were enriched by GO and KEGG analysis through DAVID database. The efficacy of *Achillea alpina* L. in preventing against ALI was further determined by HE staining of the liver tissues, liver function parameters, inflammatory factors and oxidative stress levels in the liver tissues of rats. **Results** Twenty components were identified by UPLC-Q-TOF/MS, and 104 core targets of the above components for the prophylactic treatment of ALI were obtained by screening with network pharmacology. GO functions were mainly related to the biological processes such as inflammatory response, oxidoreductase activity and protease binding, and KEGG results mainly involved IL-17, TNF and Toll-like receptors signaling pathways. The animal experiments showed that *Achillea alpina* L. alleviated the liver injury in rats, and significantly reduced the serum levels of ALT, AST, TNF- α , IL-6, IL-1 β and the content of MDA in the liver tissues of rats in the model group, and the activities of SOD and CAT in the liver tissues were enhanced. *Achillea alpina* L. upregulated the expression of Nfr2 protein in rat liver tissues, and downregulated TLR-4, NF- κ Bp65, keap1 and HO-1 protein expression. **Conclusion** *Achillea alpina* L. has a protective effect on rats with ALI induced by carbon tetrachloride, and this effect may be related to the regulation of keap1/Nrf2/HO-1 and Toll-like receptor signaling pathways.

Key words: *Achillea alpina* L.; acute liver injury; network pharmacology; keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathway; Toll-like receptor signaling pathway

急性肝脏损伤 (acute liver injury, ALI) 可由多种因素诱发, 包括酒精、药物滥用、病毒感染、代谢和自身免疫攻击^[1-2]。ALI 发展末期会演变成肝纤维化或肝硬化, 治疗难度高, 治疗费用昂贵, 故对肝脏疾病的早期防治十分重要。研究表明, 肝损伤的病理过程中伴随着大量的炎症和氧化应激反应, 抑制炎症以及缓解氧化应激反应对于治疗肝损伤具有重要意义^[3]。因此, 具有抗炎和抗氧化活性的药物可用于治疗肝损伤。蓍草来源于菊科植物蓍 *Achillea alpina* L. 的干燥地上部分, 具有解毒利湿、活血化瘀的功效^[4]。现代研究表明, 蓍草具有抗炎^[5]、抗氧化、抗菌^[6]的作用, 能够显著改善高血压^[7]、肝损伤^[8]等疾病。蓍草治疗肝损伤的药效确切^[9-10], 但是缺乏药效物质基础和作用机制的研究。网络药理学是基于系统生物学和药理学的综合性学科, 通过分析生物网络和生物功能, 从而系统化阐明药物分子作用机制。故本研究基于 UPLC-Q-TOF/MS 分析鉴定蓍草中含有的成分, 然后利用网络药理学筛选预测这些成分作用的靶点并结合动物实验对网络药理学分析结果进行验证, 进而初步探究蓍草防治 ALI 的药效及作用机制, 以期临床治疗 ALI 提供指导。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 24 只, 体质量 (200±20)

g [成都达硕实验动物有限公司, 合格证号 SCXK (川) 2020-030], 动物实验经陕西中医药大学伦理委员会批准, 动物饲养和实验操作均符合实验管理条例要求。

1.2 试药

蓍草购自铜陵禾田中药饮片股份有限公司, 药材经陕西中医药大学颜永刚教授鉴定为菊科植物蓍 *Achillea alpina* L. 的干燥地上部分; 联苯双酯滴丸 (万邦德制药集团有限公司, 规格: 1.5 mg, 批号: 19J210318)。四氯化碳 (CCl₄, 天津市天力化学试剂有限公司, 批号: 20210902), 橄榄油 (上海源叶生物科技有限公司, 批号: H29O11P129145), LC-MS 级 甲醇 (Honeywell Burdick & Jackson 公司), LC-MS 级 甲酸 (德国 Darmstadt 默克公司), 分析纯 甲醇 (天津天利化学试剂有限公司), 二甲苯、正丁醇、无水乙醇 (国药集团化学试剂有限公司), 柠檬酸抗原修复液、环保型脱蜡透明液、PBS 缓冲液 (武汉赛维尔科技有限公司); 谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、丙二醛 (MDA)、过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 大鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素 6 (IL-6)、IL-1 β 酶联免疫试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司); 一抗 TLR-4、NF- κ Bp65、Nfr2、

keap1、HO-1 以及二抗辣根 HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体 (武汉赛维尔科技有限公司)。

1.3 仪器

Waters ACQUITY I-Class UPLC、Waters SYNAPT G2-Si Q-TOF 高分辨率飞行时间质谱仪 (美国 Waters 公司), Milli-Q 超纯水系统 (美国 Millipore 公司), RE-52AA 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂), KQ-500DE 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), 多功能酶标仪 (美国基因生物科技有限公司), Centrifuge 5418R 台式离心机、恒温板式混匀仪 (德国 Eppendorf 公司), Donatello 脱水机 (米兰 DIAPATH 公司), JB-P5 包埋机 (武汉俊杰电子有限公司), RM2016 病理切片机 (上海徠卡仪器有限公司), DHG-9140A 烤箱 (上海慧泰仪器制造有限公司)。

2 方法

2.1 UPLC-Q-TOF/MS 检测薯蓣的成分

2.1.1 样品制备 取薯蓣药材 (过 2 号筛) 约 2 g, 置于具塞锥形瓶中, 加入 70% 甲醇 40 mL, 密塞, 称重, 40 °C 水浴, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 45 min, 放冷, 再次称重, 用 70% 甲醇补足损失量, 摇匀, 抽滤, 取续滤液, 即得薯蓣提取液。取薯蓣提取液以适量甲醇稀释, 5000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 取上清过 0.22 μm 微孔滤膜得供试品溶液。

2.1.2 色谱条件 Waters Acquity BEH C18 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 柱温 35 °C; 流动相为 0.1% 甲酸水 (A) - 纯甲醇 (B), 梯度洗脱: 0 ~ 1 min, 90%A; 1 ~ 5 min, 90% → 65%A; 5 ~ 7 min, 65% → 60%A; 7 ~ 10 min, 60% → 30%A; 10 ~ 11 min, 30% → 15%A; 11 ~ 11.5 min, 15% → 5%A; 11.5 ~ 12 min, 5%A。流速 0.3 mL · min⁻¹, 检测波长 290 nm, 进样量 5 μL。

2.1.3 质谱条件 ESI 源条件: 负离子模式, 毛细管电压 2.5 kV, 样品锥孔温度 55 °C, 源温度 120 °C, 脱溶剂气温度 280 °C, 锥孔气体流量 50 L · h⁻¹, 氮气作为雾化气 (600 L · h⁻¹), 扫描模式为全扫描, 扫描范围 *m/z* 100 ~ 1200 Da。采用 MassLynx v4.2 软件处理数据。

2.2 网络药理学

2.2.1 关键靶点的筛选 将 UPLC-Q-TOF/MS 检测到的成分英文名输入 TCMSP 数据库 (<http://tcmsp.com/tcmsp.php>) 和 CTD 数据库 (<http://ctdbase.org/>) 获取作用靶点。对于靶点较少或检索不到作用靶点的成分, 使用 PubChem 数据库查询获取成分的 Canonical SMILES 号, 将

SMILES 号上传至 Similarity Ensemble Approach 数据库 (<http://sea.bkslab.org/>) 和 Swiss Target Prediction 平台 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), 预测这些成分可能作用的靶点。以 “acute liver injury” 或 “acute hepatic damage” 为关键词, 在 OMIM (<https://www.omim.org/>), GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 和 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中检索, 合并并去掉重复靶点, 得到 ALI 疾病相关作用靶点。最后, 使用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 将所有靶点名称标准化。将薯蓣成分的作用靶点与疾病靶点取交集并将交集靶点导入 Venn 平台绘图, 获得薯蓣防治 ALI 的关键靶点。将薯蓣成分与关键靶点导入 Cytoscape 3.8.2 软件构建薯蓣 “成分 - 靶点 - 疾病” 网络关系图并分析。

2.2.2 靶点蛋白互作 (PPI) 网络分析 将交集靶点导入 STRING (<https://string-db.org/>) 数据库, 构建 PPI 网络, 限定物种为 “Homo sapiens”, 蛋白互作评分设定为最低不小于 0.4, 删除与其他蛋白无相互作用的蛋白, 将结果保存为 “TSV” 格式文件并导入 Cytoscape 3.8.2 软件进行网络拓扑分析, 以各个节点的连接度 (Degree), 介度 (Betweenness) 及紧密度 (Closeness) 均大于其中位数为筛选条件筛选核心靶点。

2.2.3 GO 功能及 KEGG 通路富集分析 将交集靶点输入 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) 数据库中, 设置物种为 “Homo sapiens”, 进行 GO 功能富集分析及 KEGG 通路分析。

2.3 动物实验

2.3.1 薯蓣提取液的制备 薯蓣经打粉机粉碎后过 2 号筛, 称取 150 g 薯蓣粉末置于 2 L 圆底烧瓶中, 加入 6 倍量 50% 乙醇, 40 °C 水浴 250 W 超声提取 45 min, 抽滤, 药渣置于 1 L 圆底烧瓶中, 加入 3 倍量 50% 乙醇, 40 °C 水浴 250 W 超声提取 45 min, 合并 2 次滤液, 使用旋转蒸发器回收乙醇, 浓缩药液。本次实验共提取薯蓣 600 g, 按上述提取方法, 分 4 次提取, 最终合并 4 次浓缩药液, 超纯水定容至 400 mL, 制备得到 1.5 g · mL⁻¹ 的薯蓣提取液。

2.3.2 阳性药配制方法 取联苯双酯滴丸 10 粒于研钵中碾碎成粉末, 于 40 mL 纯水中超声溶解, 得 0.375 mg · mL⁻¹ 的阳性药溶液。

2.3.3 动物分组及给药 24 只大鼠适应性饲养一周后, 按照正常组、模型组、薯蓣组、阳性药组随机分为 4 组, 每组 6 只, 适应性饲养一周后, 开始给药。薯蓣组按薯蓣生药量 15 g · kg⁻¹

的剂量灌胃给药，一日一次，连续两周。阳性药组使用 $3.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 联苯双酯滴丸溶液灌胃给药，一日一次，连续两周。正常组和模型组给予纯水同体积灌胃。末次给药 4 h 后，除正常组外，其余各组均腹腔注射 $50\% \text{CCl}_4$ 橄榄油溶液 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，正常组腹腔注射同体积橄榄油溶液，大鼠禁食不禁水 12 h，乌拉坦麻醉后，腹主动脉采血，摘取肝脏。

2.3.4 脏器指数及生化指标的测定 取肝脏用冷生理盐水冲洗干净，用滤纸擦干，称重并计算肝指数。肝指数 (%) = (肝重 / 体重) × 100%。血液静置 0.5 h 后，以 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min，取上清液，按照试剂盒说明书，检测分组大鼠血清中 ALT 和 AST 水平。精密称取肝脏组织，加入适量生理盐水， 4°C 研磨成 10% 肝匀浆，以 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min，取上清液检测 MDA、CAT 和 SOD 活性水平；按照 ELISA 试剂盒操作检测大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平。

2.3.5 肝脏组织病理学形态变化 剪取各组大鼠肝脏同一部位组织于 10% 多聚甲醛中固定，常规石蜡包埋切片，进行 HE 染色后 200 倍物镜下观察病理状态。

2.3.6 肝脏中 TLR-4、NF- κ Bp65、Nfr2、keap1、HO-1 蛋白表达的检测 肝脏组织切片，常规脱蜡至水，使用柠檬酸缓冲液进行抗原修复，双氧水灭活，BSA 室温封闭；加一抗 [TLR-4 (1 : 400)、NF- κ Bp65 (1 : 600)、Nfr2 (1 : 600)、keap1 (1 : 800)、HO-1 (1 : 800)] 4°C 过夜；PBS 冲洗，二抗孵育，DAB 显色后苏木素复染，自来水冲洗，苏木素返蓝，流水冲洗，脱水封片后镜检，阳性为棕黄色。

2.3.7 统计学分析 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 GraPhpad Prime 8 进行统计学分析。各组间的比较均采用 *t* 检验， $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 蓍草 UPLC-Q-TOF-MS 检测结果

运用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 得到的蓍草鉴定图谱，见图 1。使用 UNIFI 数据处理系统、Masslynx v4.2 软件和查阅文献比对，共鉴定出 20 种化合物，见表 1。

3.2 网络药理学结果

3.2.1 蓍草防治 ALI 的“成分-靶点-疾病”网络 通过数据库检索得到 20 个成分作用的潜在靶点共 316 个。从 OMIM、GeneCards 和 NCBI 数据库中共检索到 ALI 相关靶点共 19 033 个。将

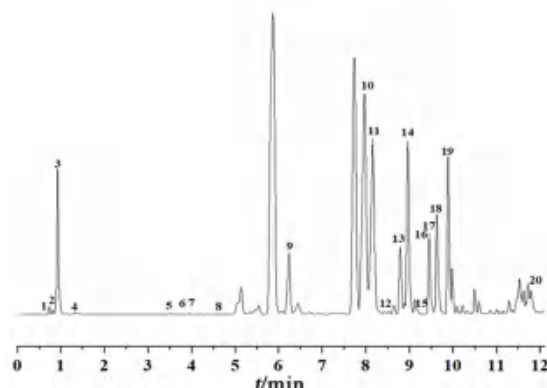


图 1 蓍草提取液负离子 BPI 模式图

Fig 1 BPI pattern of negative ions of *Achillea alpina* L. extract

蓍草成分的作用靶点与疾病靶点取交集共得到 291 个关键靶点。将蓍草的成分和关键靶点导入 Cytoscape 3.8.2 软件构建蓍草“成分-靶点”网络关系图并进行拓扑分析，见图 2。根据度值进行筛选，排名前十的成分分别为异栎素、蓍素、绿原酸、芒柄花素、双酚 A、百蕊草素 II、3, 4, 5-tetracaffeoylquinic acid、kaempferol 3-O-(6"-caffeoyl)- β -D-glucopyranoside、quercetin 3-O-(6"-caffeoyl)- β -D-glucopyranoside、艾黄素，这些成分可能是蓍草预防治疗 ALI 的活性成分。

3.2.2 核心靶点 PPI 网络 共得到 104 个核心靶点，见图 3。可以认为是蓍草防治 ALI 的核心靶点，其中节点越大，颜色越深，表明度值越大。

3.2.3 生物信息学分析 选取 $P < 0.05$ ，GO 功能排名前十，KEGG 通路排名前二十的结果进行可视化，见图 4。GO 生物富集结果中，生物过程 (biological process, BP) 主要涉及炎症反应、凋亡及缺氧反应等；细胞组分 (cellular component, CC) 主要涉及质膜、浆膜及细胞外区等；分子功能 (molecular function, MF) 主要涉及氧化还原酶活性以及蛋白激酶活性等。KEGG 通路富集分析显示，主要涉及 IL-17 信号通路、TNF 信号通路及 Toll 样受体信号通路等。综上 Toll 样信号通路与 ALI 关系紧密，故选择通过动物实验对该通路进行验证。

3.3 动物实验研究

3.3.1 蓍草提取液对 ALI 大鼠的肝指数的影响 与正常组 (N 组) 对比，模型组 (M 组) 肝指数增大，血清 ALT、AST 水平显著上升。与模型组相比，阳性药组 (P 组) 肝指数显著降低，血清中 ALT、AST 水平显著下降；蓍草给药组 (S 组) 肝指数显著降低，血清中 ALT、AST 水平显著下降，结果见图 5。

3.3.2 蓍草对大鼠肝脏氧化应激指标的影响 与正常组比较，模型组 MDA 含量增加，SOD 和 CAT

表 1 蒿草 UPLC-Q-TOF/MS 鉴定成分

Tab 1 Components identified by UPLC-Q-TOF/MS of *Achillea alpina* L.

No.	t_R /min	名称	分子式	离子模式	准分子离子峰 m/z	碎片离子
1	0.95	艾黄素	$C_{20}H_{20}O_8$	$[M - H]^-$	387.1138	341.1116, 195.0482
2	0.96	芒柄花素	$C_{16}H_{12}O_4$	$[M - H]^-$	267.0714	223.0417
3	1.05	乌头酸	$C_6H_6O_6$	$[M - H]^-$	173.0089	129.0170
4	1.23	糠酸	$C_5H_4O_3$	$[M - H]^-$	111.0080	101.9389
5	3.77	异牡荆素	$C_{21}H_{20}O_{10}$	$[M - H]^-$	431.0973	413.0848, 341.0650, 311.0508
6	3.90	异荭草素	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M - H]^-$	447.0925	285.0398, 133.0287
7	3.95	绿原酸	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M - H]^-$	353.0870	191.0552, 179.0340, 161.0232
8	4.39	甲氧基万寿菊素	$C_{17}H_{14}O_8$	$[M - H]^-$	345.0605	315.1096, 191.0536
9	6.44	黄酮素	$C_{15}H_{18}O_3$	$[M + HCOO]^-$	291.1264	193.0518
10	7.96	异绿原酸 B	$C_{25}H_{24}O_{12}$	$[M - H]^-$	515.1187	353.1030, 173.0525, 191.0635
11	8.15	异绿原酸 A	$C_{25}H_{24}O_{12}$	$[M - H]^-$	515.1186	353.0908, 191.0570, 179.0360
12	8.42	双酚 A	$C_{15}H_{16}O_2$	$[M + HCOO]^-$	273.1159	191.0536
13	8.79	异枞素	$C_{21}H_{20}O_{12}$	$[M - H]^-$	463.0859	301.0378, 193.0518
14	8.97	异绿原酸 C	$C_{25}H_{24}O_{12}$	$[M - H]^-$	515.1195	161.0301, 133.0355, 132.0269
15	9.38	绿原酸甲酯	$C_{17}H_{20}O_9$	$[M - H]^-$	367.1024	191.0561, 173.0454, 134.0373
16	9.45	百蕊草素 II	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M - H]^-$	447.0916	285.0405, 255.0325
17	9.48	quercetin 3-O- (6"-caffeoyl) - β -D-glucopyranoside	$C_{30}H_{26}O_{15}$	$[M - H]^-$	625.1220	529.1396, 447.0916
18	9.88	3, 4, 5-tricaffeoylquinic acid	$C_{34}H_{30}O_{15}$	$[M - H]^-$	677.1570	609.1232, 515.1224, 161.0226
19	9.98	kaempferol 3-O- (6"-caffeoyl) - β -D-glucopyranoside	$C_{30}H_{26}O_{14}$	$[M - H]^-$	609.1232	515.1224, 161.0226
20	11.55	灰毡毛忍冬素 G	$C_{26}H_{26}O_{12}$	$[M - H]^-$	529.1342	367.1026, 353.0876, 191.0195



图 2 “成分-靶点”网络图

Fig 2 “Component-target” network diagram

活力明显降低。与模型组比较, 阳性药组 MDA 含量显著降低, SOD 和 CAT 活力明显增加; 蒿草给药组 MDA 含量显著降低, SOD 和 CAT 活力明显增加, 结果见图 6。

3.3.3 蒿草对大鼠血清炎症因子的影响 与正常组比较, 模型组 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平显著升高。与模型组比较, 阳性药组 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平显著降低; 蒿草给药组 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平显著降低, 结果见图 7。

3.3.4 蒿草对大鼠肝组织形态的影响 正常大鼠

肝脏颜色红润, 表面光滑有光泽, 质地柔软; 四氯化碳诱导损伤的大鼠肝脏颜色暗红, 大叶与小叶间有白色粘连, 光泽度下降, 被膜下游黄白色颗粒; 联苯双酯组与蒿草给药组的病理变化相对较轻。

正常大鼠肝脏组织结构正常, 肝细胞呈索状排列, 各肝细胞间界限清晰。四氯化碳诱导损伤的大鼠肝脏细胞水肿严重, 细胞排列紊乱, 界限模糊, 存在较多坏死细胞, 炎症浸润明显。联苯双酯组和蒿草给药组大鼠肝细胞损伤程度较轻,

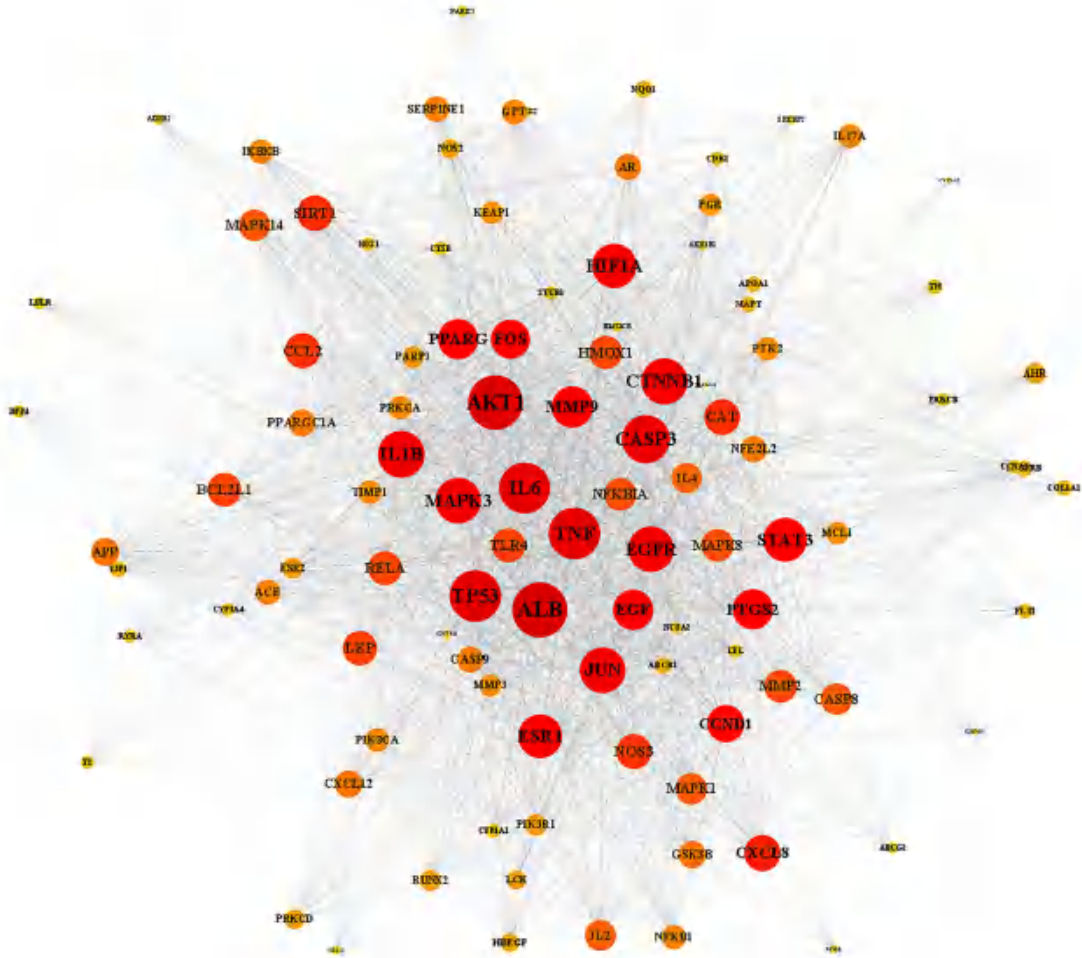


图 3 核心靶点 PPI 网络图
Fig 3 Core target PPI network diagram

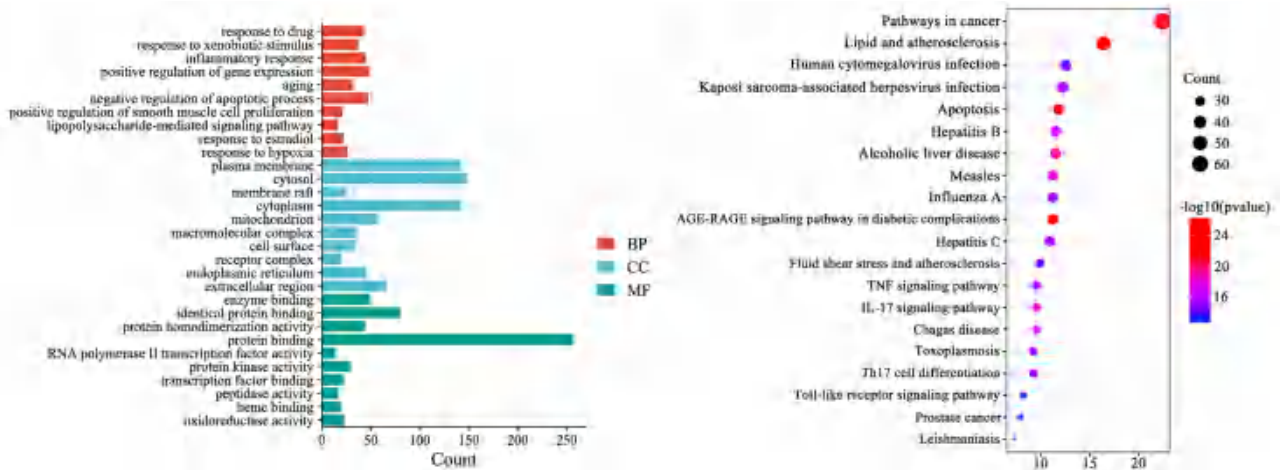


图 4 生物信息富集图
Fig 4 Bioinformation enrichment map

存在有少量肝细胞水肿、坏死及炎症浸润。结果见图 8。

3.3.5 相关蛋白免疫组化染色结果 蓍草对四氯化碳诱导的 ALI 大鼠肝组织相关蛋白的影响如图 9 所示，各蛋白在细胞质中阳性表达，棕黄色

的深浅代表蛋白表达量的多少。结果表明，TLR-4、NF- κ Bp65、HO-1 和 keap1 在正常大鼠肝组织中仅少量表达，模型组中四者表达量上升。相较于模型组，在使用蓍草和联苯双酯给药后，TLR-4、NF- κ Bp65 和 keap1 表达量降低，HO-1 在蓍草

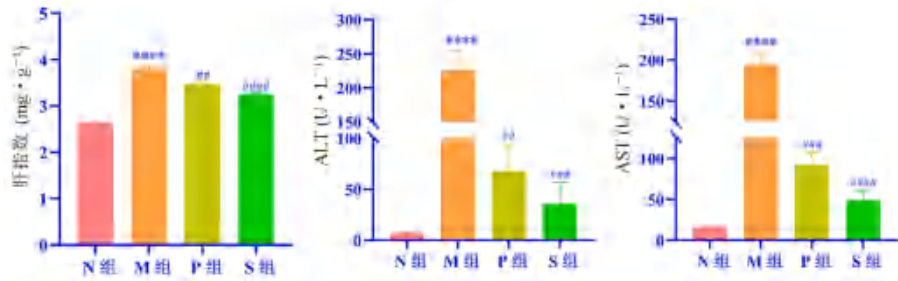


图5 薯蓣草提取液对四氯化碳诱导的急性肝损伤大鼠肝指数及肝功能影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig 5 Effect of *Achillea alpina* L. extract on liver index and liver function in rats with acute liver injury induced by Carbon tetrachloride ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注: 与正常组比较, **** $P < 0.0001$; 与模型组比较, # $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ 。

Note: Compared with the normal group, **** $P < 0.0001$; compared with the model group, # $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$.

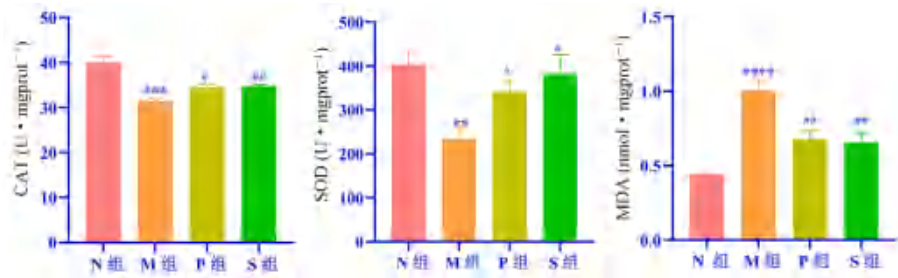


图6 薯蓣草提取液对四氯化碳诱导的急性肝损伤大鼠抗氧化能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig 6 Effect of *Achillea alpina* L. extract on the antioxidant capacity of rats with acute liver injury induced by Carbon tetrachloride ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the normal group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

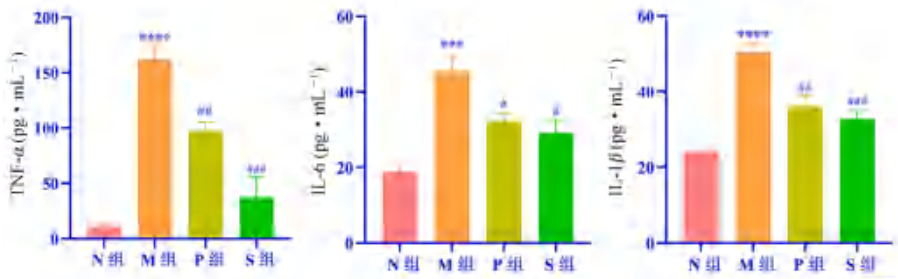


图7 薯蓣草提取液对四氯化碳诱导的急性肝损伤大鼠抗炎能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig 7 Effect of *Achillea alpina* L. extract on anti-inflammatory ability of rats with acute liver injury induced by Carbon tetrachloride ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

注: 与正常组比较, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the normal group, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$; compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$.

组中表达量降低, 在阳性药组表达上升。Nfr2 在正常大鼠肝组织中表达量较高, 在模型组中表达降低, 经薯蓣草和联苯双酯给药后的大鼠肝组织中 Nfr2 表达上升。

4 讨论

ALI 是指由多种原因引起的肝脏损伤的疾病总称, 具有发病急、易复发、风险大等特点。肝脏作为体内最大的代谢器官, 药物的代谢多在肝脏中完成, 而目前临床保肝药物需要长时间服药且伴有许多不良反应, 这无疑加大了肝损伤的风险^[11]。故寻找安全有效的治疗方法是当前肝损伤

临床研究的重点问题。目前, 中医药防治肝损伤被认为是较好的方法, 但中医药防治肝损伤的作用机制研究尚不明朗。

本研究通过 UPLC-Q-TOF/MS 检测薯蓣草中的主要化学成分, 共鉴定出 20 种成分。通过网络数据库筛选, 最终选出 104 个核心靶点, 包括 TNF、IL-6、ALB、TLR4、NFKBIA 等。然后, 进一步构建“成分-靶点-疾病”网络, 根据度值筛选出异槲素、薯蓣素和绿原酸等 10 个成分。有研究表明异槲素具有保肝退黄的作用^[12], 能够激活 p38 蛋白, 促进 Nrf2 的上调, TLR、NF-κB 和 HO-1 的下

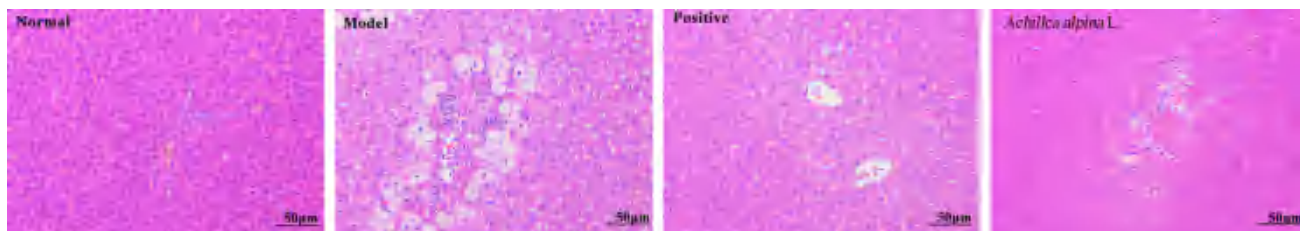


图 8 蓍草对急性肝损伤大鼠肝脏组织病理变化的影响

Fig 8 Effect of *Achillea alpina* L. on histopathological changes in the liver of rats with acute liver injury

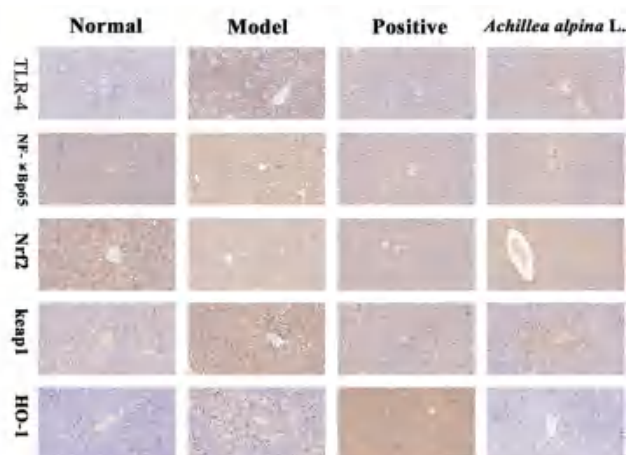


图 9 各蛋白免疫组化结果 (×200)

Fig 9 Immunohistochemical results for each protein (×200)

调, 从而减少炎症反应, 增强抗氧化效果^[13]。绿原酸具有良好的抗炎和抗氧化活性^[14], 研究表明其可以通过调节 Toll 样受体信号通路缓解 ALI^[15]。TNF、IL-6 和 ALB 等均为体内炎症信号传导因子, 在体内炎症反应中大量存在, 研究表明三者均参与 ALI 的发病过程^[16]。由此表明蓍草可能通过异栎素、绿原酸等活性成分通过作用于 TNF、TLR4 等核心靶点发挥预防治疗 ALI 的作用。

GO 功能富集分析表明, 蓍草中活性成分可能通过质体膜、细胞膜和细胞质等细胞组分参与炎症反应的正向调节、对缺氧的反应和凋亡过程的负调控等生物学过程, 发挥酶结合、血红素结合和蛋白磷酸酶结合等分子功能达到治疗 ALI 的目的。KEGG 富集分析发现, 蓍草治疗 ALI 的 104 个核心靶点主要参与 Toll 样受体、IL-17、TNF 等信号通路。有文献报道, 肝损伤中肝细胞死亡受体和识别受体受到刺激, Toll 样受体会被识别激活, 诱导 NLRP3 炎症小体生成, 从而导致肝细胞焦亡, 可见 Toll 样信号通路与 ALI 关系紧密^[17], 故本研究选择对该通路进行验证。

使用四氯化碳诱导 ALI 是一种经典的 ALI 模型, 常被用于筛选治疗肝损伤的药物中^[18]。在本研究中, 模型组大鼠 AST、ALT 以及肝指数水平显著上升, 肝细胞水肿严重, 且存在肝细胞坏

死, 表明 ALI 模型造模成功。在给予蓍草提取液的大鼠中, ALT、AST 以及肝指数水平显著降低, 肝细胞损伤程度有所缓解, 表明蓍草对 ALI 大鼠的肝脏具有一定的保护作用。

研究表明, 肝损伤的病理过程中伴随着严重的氧化应激和炎症反应^[19]。四氯化碳引起肝细胞损伤后, 肝脏内会产生脂质过氧化反应, 产生大量过氧化物损伤肝细胞, 如 MDA^[20]。为了防御这些物质带来的损伤, 肝脏内会产生 SOD 和 CAT 发挥抗氧化作用^[21]。本研究发现, 相较于模型组, 蓍草给药组可以降低肝脏组织中 MDA 的含量和血清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平, 提高 SOD 和 CAT 的活性。结果表明蓍草可以通过降低肝脏的氧化应激和炎症反应保护 ALI 大鼠的肝脏。研究表明, 细胞可以通过转录因子上调特定抗氧化剂以及抗氧化酶的合成, 而主要被调节的转录因子为 Nrf2^[22-23]。keap1/Nrf2 轴是细胞内氧化还原平衡的主要调节因子, 而 keap1/Nrf2/HO-1 信号通路是体内维持细胞氧化还原稳态, 调节炎症和解除细胞毒性的重要途径。当体内产生氧化应激反应时, Nrf2 会从 keap1 中解离, 转入细胞核, 并与转录因子结合产生复合物, 复合物会与抗氧化反应元件结合, 促进 HO-1 抗氧化基因的转录^[24-25]。Toll 样受体信号通路与炎症因子的调控和释放密切相关, 其激活后会合成大量 TNF 家族的炎症因子。研究表明, TLR4 属于 Toll 样信号通路上游信号分子, 在肝细胞中广泛存在, 通过与各种病原微生物分子结合后激活, 传递信号促使下游信号分子 MyD88 磷酸化, MyD88 磷酸化激活后可以激活下游 NF- κ B 分子的磷酸化, 从而控制促炎因子和一些免疫相关基因的表达^[26]。故本研究选择采用免疫组化检测 Nrf2、keap1、HO-1、TLR4 和 NFKBIA 蛋白的表达, 验证 keap1/Nrf2/HO-1 和 Toll 样受体信号通路, 探究蓍草预防治疗 ALI 的作用机制。研究结果显示, 蓍草可以提高 Nrf2 蛋白的表达, 降低 keap1、HO-1、TLR4 和 NF- κ Bp65 蛋白的表达, 表明蓍草预保护治疗 ALI 的机制可能与调控 keap1/Nrf2/HO-1 和 Toll 样受体信

号通路有关。

综上所述,本研究通过 UPLC-Q-TOF/MS 联合网络药理学的方法,阐明了蓄草中的活性成分、靶点、通路之间的相互作用关系,并通过动物实验对网络药理学的分析结果进一步验证,发现蓄草治疗 ALI 的作用与调节 keap1/Nrf2/HO-1 和 Toll 样受体信号通路密切相关,这可为后续临床中治疗 ALI 提供指导。

参考文献

- [1] Xiao J, Wang F, Wong NK, et al. Global liver disease burdens and research trends: analysis from a Chinese perspective [J]. *J Hepatol*, 2019, 71 (1): 212-221.
- [2] 谭琴,李鹏,丁选胜.胡黄连苷 II 对 CCl₄ 致大鼠急性肝损伤的保肝利胆作用研究 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45 (7): 1343-1349.
- [3] Wang Q, Wei S, Zhou HM, et al. Hyperglycemia exacerbates acetaminophen-induced acute liver injury by promoting liver-resident macrophage proinflammatory response via AMPK/PI3K/AKT-mediated oxidative stress [J]. *Cell Death Discovery*, 2019, 5 (1): 119-131.
- [4] 中国药典 2020 年版.一部 [S]. 2020: 365.
- [5] 王建,邱彦,李克冉,等.蓄草总倍半萜内酯对类风湿性关节炎模型大鼠保护作用的实验研究 [J]. *药学实践杂志*, 2018, 36 (6): 529-532.
- [6] Cho HW, Lee HJ, Sim MO, et al. Antioxidant and ant melanogenic activities of compounds isolated from the aerial parts of *Achillea alpina* L [J]. *Chem Biodiversity*, 2019(16): 1-12.
- [7] 闫昕雨,宗蓉,赵蓉,等.菊科薯蓣植物生物活性的研究进展 [J]. *现代医药卫生*, 2019, 35 (23): 3634-3637.
- [8] 洪振丰,陈艳华,周建衡,等.蓄草提取物预防慢性肝损伤、肝纤维化的实验研究 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2007 (1): 16-18.
- [9] Al-Ezzy RM, Al Anee RSA, Kathum OA. Hepatoprotective effects of achillea millefolium methanolic extract on carbon tetrachloride induced [J]. *Int J Adv Res Biol Sci*, 2017, 8 (4): 98-109.
- [10] Dadkhah A, Fatemi F, Alipour M, et al. Protective effects of iranian achillea wilhelmsii essential oil on acetaminophen-induced oxidative stress in rat liver [J]. *Pharm Biol*, 2015, 53 (2): 220-227.
- [11] Gu XS, Manautou JE. Molecular mechanisms underlying chemical liver injury [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2012, 14: e4.
- [12] 李沛波,王永刚,吴钉红,等.田基黄中三个黄酮类化合物保肝退黄作用的实验研究 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2007, 28 (1): 40-43.
- [13] Jayachandran M, Wu Z, Ganesan K, et al. Isoquercetin up-regulates antioxidant genes, suppresses inflammatory cyto-
- kines and regulates AMPK pathway in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 303: 62-69.
- [14] Shi H, Shi A, Dong L, et al. Chlorogenic acid protects against liver fibrosis in vivo and in vitro through inhibition of oxidative stress [J]. *Clin Nutr*, 2016, 35 (6): 1366-1373.
- [15] Shi H, Dong L, Jiang J, et al. Chlorogenic acid reduces liver inflammation and fibrosis through inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathway [J]. *Toxicology*, 2013, 303: 107-114.
- [16] He Y, Li S, Tang D, et al. Circulating Peroxiredoxin-1 is a novel damage-associated molecular pattern and aggravates acute liver injury via promoting inflammation [J]. *Free Radical Biol Med*, 2019, 137: 24-36.
- [17] Miyuki B, Tatsuya A, Yumi Y, et al. The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway mediates induction of the tissue factor gene in monocytes stimulated with human monoclonal anti-beta2Glycoprotein I antibodies [J]. *Int Immunol*, 2004, 16 (11): 1633-1641.
- [18] Kosinska AD, Liu J, Lu M, et al. Therapeutic vaccination and immunomodulation in the treatment of chronic hepatitis B: preclinical studies in the woodchuck [J]. *Med Microbiol Immunol*, 2015, 204 (1): 103-114.
- [19] Shan Z, Ju C. Hepatic macrophages in liver injury [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 322.
- [20] Zhang X, Kuang G, Wan JY, et al. Salidroside protects mice against CCl₄-induced acute liver injury via down-regulating CYP2E1 expression and inhibiting NLRP3 inflammasome activation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 85 (6): 106662.
- [21] Wang ML, Niu JL, Ou LN, et al. Zerumbone protects against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced acute liver injury in mice via inhibiting oxidative stress and the inflammatory response: Involving the TLR4/NF- κ B/COX-2 pathway [J]. *Molecules*, 2019, 24 (10): 1964.
- [22] Louvet A, Mathurin P. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 12 (4): 231-242.
- [23] Magdaleno, Fernando, Blajszczak, et al. Key events participating in the pathogenesis of alcoholic liver disease [J]. *Biomolecules*, 2017, 7 (1): 9.
- [24] Rosa PL, Bertini ES, Piemonte F. The NRF2 signaling network defines clinical biomarkers and therapeutic opportunity in friedreich's ataxia [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (3): 916.
- [25] Mohs A, Otto T, Schneider KM, et al. Hepatocyte-specific NRF2 activation controls fibrogenesis and carcinogenesis in steatohepatitis [J]. *J Hepatol*, 2021, 74 (3): 638-648.
- [26] 周兴华,龚道银,钟森,加味茵陈蒿汤通过抑制 TLR4 信号通路对大鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. *山西医科大学学报*, 2021, 52 (9): 1143-1148.

(收稿日期: 2022-10-10; 修回日期: 2022-12-07)

酒黄精总黄酮提取工艺及其抗氧化作用研究

薛妙¹, 郭凯丽², 袁盼盼¹, 刘继平³, 史永恒³, 过晓芳⁴, 王斌³, 朱星枚^{1, 2, 3*} (1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 咸阳 712046; 3. 陕西省中医药管理局中药药效机制与物质基础重点研究室, 陕西 咸阳 712046; 4. 西安工业大学数理系, 西安 710021)

摘要: **目的** 优化酒黄精总黄酮提取工艺, 并探讨其抗氧化活性及对顺铂诱导的小鼠急性肾损伤的保护作用。**方法** 以总黄酮提取率为指标, 以纤维素酶用量、乙醇浓度、提取时间及料液比为自变量, 应用 Box-Behnken 响应面法优化酒黄精总黄酮提取工艺, 考察酒黄精总黄酮的抗氧化活性及其对顺铂诱导的小鼠急性肾损伤的保护作用。**结果** 酒黄精中总黄酮最佳提取条件为: 纤维素酶用量 1.5%, 乙醇浓度 45%, 提取时间 16 min, 料液比 1 : 21 (g/mL), 总黄酮提取率为 0.119%。酒黄精总黄酮有明显的清除自由基活性, 其 IC_{50} 值分别为 (19.43±0.96) (DPPH)、(4.46±0.14)(羟自由基) 和 (31.57±0.14)(ABTS) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 酒黄精总黄酮提取物能减弱顺铂诱导的小鼠肾小管氧化损伤, 表现为血清 MDA 含量显著降低 ($P < 0.01$); 血清 SOD 含量显著升高 ($P < 0.01$); 肾组织 MDA 含量显著下降 ($P < 0.05$); 肾组织 SOD 和 GSH-Px 含量显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** 酒黄精总黄酮的提取工艺简便、可行; 酒黄精总黄酮具有强抗氧化作用, 并对顺铂引起的小鼠急性肾损伤具有防治作用。

关键词: 酒黄精; 响应面法; 总黄酮; 抗氧化; 急性肾损伤保护

中图分类号: R284, R285 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)02-0351-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.011

Extraction optimization and antioxidant activities of total flavonoid from alcoholic polygonatum

XUE Miao¹, GUO Kai-li², YUAN Pan-pan¹, LIU Ji-ping³, SHI Yong-heng³, GUO Xiao-fang⁴, WANG Bin³, ZHU Xing-mei^{1, 2, 3*} (1. Department of Pharmacology, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an Shaanxi 712046; 2. Shaanxi Key Laboratory of Traditional Medicine Foundation and New Drug Research, Xi'an Shaanxi 712046; 3. Key Laboratory of Pharmacodynamics and Material Basis of Chinese Medicine of Shaanxi Administration of Traditional Chinese Medicine, Xi'an Shaanxi 712046; 4. School of Sciences, Xi'an University of Technology, Xi'an 710021)

Abstract: Objective To optimize the extraction of total flavonoid from alcoholic polygonatum, and determine its anti-oxidation activities and its protective effect on cisplatin-induced acute renal injury. **Methods** Box-Behnken experimental was used to optimize the extraction of total flavonoid from alcoholic polygonatum with the amount of cellulase, ethanol concentration, extraction time and the ratio of solid to liquid as the variables. The antioxidation activity of total flavones and protective effect on cisplatin-induced acute renal injury was determined. **Results** The optimization conditions included cellulase amount at 1.5%, ethanol concentration at 45%, ultrasonic extraction for 16 min, and the ratio of solid to liquid at 1 : 21 (g/mL). The extraction yield of total flavonoid reached 0.119%. DPPH, OH and ABTS free radicals were scavenged by the total flavonoid of alcoholic polygonatum with the IC_{50} values of (19.43±0.96) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, (4.46±0.14) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 62102304); 陕西省科技厅社会发展项目 (No. 2023-YBSF-294); 陕西省教育厅重点实验室项目 (No. 21JS015); 陕西中医药大学创新团队项目 (No. 2019-YL13)。

作者简介: 薛妙, 女, 在读硕士研究生, 主要从事药理学研究, email: 3477114970@qq.com * **通信作者:** 朱星枚, 女, 博士, 副教授, 主要从事抗肿瘤药物物质基础与机制研究, email: zhuzhu_sky8169@163.com

and $(31.57 \pm 0.14) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. Meanwhile, serious damage of the tubular structure in mice with acute kidney injury was relieved by total flavonoid of alcoholic polygonatum, shown as a significant decrease in the serum MDA ($P < 0.01$) and increase in the serum SOD ($P < 0.01$); a significant decrease in the content of MDA ($P < 0.05$) and increase in the content of SOD and GSH-Px in the kidney tissue ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion** The extraction is simple and feasible. The total flavonoid of alcoholic polygonatum has a strong anti-oxidation ability, and can protect against cisplatin-induced acute renal injury.

Key words: alcoholic polygonatum; response surface methodology; total flavonoid; anti-oxidation; acute renal injury protection

酒黄精收录于 2020 年版《中国药典》黄精 (Polygonati Rhizoma) 项下, 由净黄精经酒炖或酒蒸制得, 主补气养阴, 健脾, 润肺, 益肾^[1]。现代药理学研究表明黄精具有调节血脂血糖、增强免疫、抗氧化、抗衰老等多种药理活性^[2-4], 而酒黄精在滋阴养肾、抗氧化、提高免疫等方面较黄精生品作用更强^[5-7], 因此酒黄精具备更广阔的自然产物开发市场, 但是目前对酒黄精化学成分研究偏少, 功效物质及机制尚不清楚。本研究拟通过响应面法优化酒黄精总黄酮的提取工艺, 并探讨其抗氧化作用及对顺铂诱导的急性肾损伤的保护作用。

1 材料

1.1 试药

酒黄精购自陕西西安万寿路中药材市场, 由陕西中医药大学颜永刚教授鉴定为酒黄精。芦丁对照品 (纯度 $\geq 97\%$, 批号: C06M11Y112461)、维生素 C (VC, 纯度 $\geq 99\%$, 批号: S19J6G1)、2, 6-二叔丁基-4-甲基苯酚 (BHT, 纯度 $\geq 99\%$, 批号: Y17A9Y307695)(上海源叶); 纤维素酶 (批号: 191125)(上海蓝季生物); 1, 1-二苯基-2-苦肟基 (DPPH)、羟基自由基、总还原能力 (ABTS +)、MDA、GSH-Px、SOD 检测试剂盒 (南京建成); 其他试剂 (分析纯, 天津科密欧)。

1.2 仪器

KS-500DV 液晶超声波清洗器 (昆山洁力美); BSA224S 分析天平 (精度: 0.0001 g)、pH 酸度计 (北京赛多利斯); TDZ5-WS 低速离心机 (湖南湘仪); TY2021000834 全波长酶标仪 (美国伯腾)。

1.3 细胞及动物

KM 小鼠 40 只, 体质量 25 ~ 35 g, 雄性 [成都达硕, 动物合格证号 SCXK (川) 2020-030]。动物实验经陕西中医药大学实验动物伦理委员会批准 (SUCMDC 20210310009)。

2 方法与结果

2.1 总黄酮提取液的制备

酒黄精经干燥粉碎后过 6 号筛备用。精密称

取酒黄精粉末 2.00 g, 加入 10 mL 乙醇溶液至锥形瓶中, 充分溶解, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液调节 pH 为 4.8。称取适量纤维素酶, 40°C 水浴中活化 30 min。 50°C 超声提取结束后沸水浴灭活 10 min, 趁热过滤, 上清液用乙醇溶液定容至 10 mL, 备用。

2.2 总黄酮的含量测定

2.2.1 标准曲线的绘制 采用 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$ 比色法^[8]测定总黄酮含量。用色谱甲醇溶解芦丁对照品制成 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。精密吸取芦丁对照品储备液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL, 置 25 mL 量瓶中, 依据文献^[9]以芦丁质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线 $y = 10.24x + 0.0272$ ($R^2 = 0.9976$), 线性范围为 $0.0080 \sim 0.0480 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2.2 样品中总黄酮含量的测定 精密吸取“2.1”项下提取液 1.0 mL, 依“2.2.1”项下方法测定黄精总黄酮提取液的吸光度, 代入标准曲线后, 计算总黄酮提取率。

总黄酮提取率 (%) = (总黄酮质量浓度 \times 药液体积) / 药材质量 $\times 100\%$ 。

2.3 统计分析

采用 GraphPad Prism 7.0 进行数据分析, One-way Analysis of Variance (ANOVA) 比较多组间差异, t 检验比较两组间差异, $P < 0.05$ 时差异具有统计学意义。

2.4 响应面法优化提取黄精总黄酮的最佳工艺

2.4.1 单因素实验 依“2.1”项下方法, 超声提取, 分别考查纤维素酶用量 (1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%), 乙醇浓度 (45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%), 料液比 (1:5、1:10、1:15、1:20、1:25, g/mL), 提取时间 (5、10、15、20、25、30、35、40、45 min) 对总黄酮提取率的影响。各单因素结果见图 1。初步确定最佳条件分别为纤维素酶用量为 2.5%, 乙醇浓度为 55%, 提取时间为 15 min, 料液比为 1:15 (g/mL)。

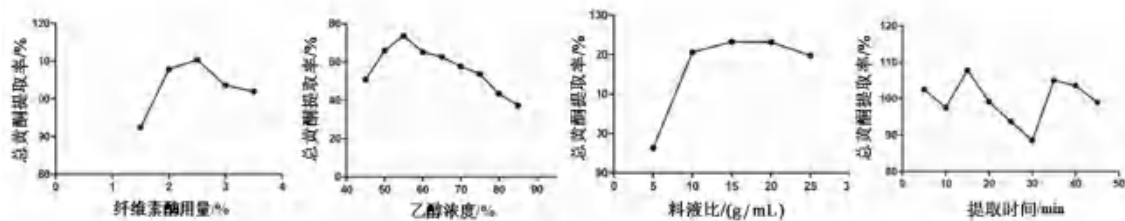


图 1 单因素对酒黄精总黄酮提取率的影响

Fig 1 Influence of single factors on the yield of total flavonoids of alcoholic polygonatum

2.4.2 响应面法优化实验设计及结果 依据 Box-Behnken 中心组合的实验设计原理, 针对“2.4.1”单因素实验结果, 选取纤维素酶用量 (A)、乙醇浓度 (B)、料液比 (C)、提取时间 (D) 为变量因素, 以总黄酮提取率 (Y) 为响应值, 采用四因素三水平的响应面分析法进行测试, 各因素水平见表 1, 实验结果见表 2。利用 Design Expert 10.6.4 软件对数据进行回归拟合, 得到总黄酮提取率 Y 对以上 4 个因素的二次多项回归模型: $Y = 116 - 0.36A - 6.63B + 31.08C + 2.6D + 2.01AB - 2.51AC + 2.23AD + 3.73BC - 1.89BD - 2.99CD - 0.12A^2 - 2.47B^2 - 24.33C^2 - 1.31D^2$ 。方差分析见表 3。

表 1 响应面实验因素及水平

水平	因素			
	A. 纤维素酶用量 / %	B. 乙醇浓度 / %	C. 料液比 / (g/mL)	D. 提取时间 / min
- 1	1.5	45	5	10
0	2.5	55	15	15
1	3.5	65	25	20

从表 3 中可看到, 回归模拟方程中, 一次项乙醇浓度 (B), 料液比 (C), 二次项料液比 (C²) 对总黄酮提取率具有显著影响。各因素之间的互作关系通过响应面曲面分析图展示 (见图 2), 曲面越陡, 其对提取率影响越显著。由此可见料液比是酒黄精总黄酮提取率的决定因素。

2.4.3 最佳工艺确定及验证 经 Design Expert 10.6.4 软件分析, 最优工艺为纤维素酶用量 1.5%, 乙醇浓度 45%, 提取时间 15.879 min, 料液比 1 : 21.028 (g/mL), 根据实际情况校正酒黄精总黄酮最佳提取工艺为: 纤维素酶用量 1.5%, 乙醇浓度 45%, 提取时间 16 min, 料液比 1 : 21 (g/mL)。并进行 3 次平行实验验证, 结果最优工艺下酒黄精总黄酮提取率为 0.119%, RSD = 0.58%。表明该工艺简便可行, 重复性好。

2.5 体外抗氧化作用研究

2.5.1 溶液配制与分组 ABTS 工作液的配制: 将 7 mmol · L⁻¹ ABTS 溶液和 140 mmol · L⁻¹ 过

表 2 响应面实验设计及结果

序列	A. 纤维素酶用量 / %	B. 乙醇浓度 / %	C. 料液比 / (g/mL)	D. 提取时间 / min	Y. 总黄酮提取率 / %
1	1.5	55	25	15	0.104
2	2.5	55	25	10	0.105
3	2.5	55	25	20	0.104
4	3.5	55	25	15	0.103
5	2.5	65	15	20	0.102
6	3.5	55	15	10	0.106
7	1.5	65	15	15	0.091
8	2.5	55	15	15	0.123
9	2.5	55	5	20	0.095
10	2.5	45	15	10	0.102
11	2.5	45	25	15	0.104
12	2.5	55	15	15	0.121
13	1.5	55	15	10	0.107
14	2.5	65	15	10	0.101
15	1.5	55	15	20	0.106
16	3.5	55	15	20	0.109
17	2.5	45	15	20	0.105
18	3.5	45	15	15	0.106
19	2.5	65	25	15	0.107
20	1.5	55	5	15	0.096
21	2.5	55	15	15	0.116
22	3.5	65	15	15	0.104
23	2.5	55	15	15	0.122
24	2.5	55	5	10	0.080
25	3.5	55	5	15	0.098
26	1.5	45	15	15	0.090
27	2.5	65	5	15	0.100
28	2.5	55	15	15	0.123
29	2.5	45	5	15	0.097

硫酸钾水溶液按 50 : 1 混合, 避光反应 16 h, 用乙醇稀释到 A_{732 nm} 约 0.7 备用。

各实验设置样品组 (A_s, 加入样品的 DPPH 无水乙醇溶液), 样品对照组 [A_{bs}, 加入乙醇 (蒸馏水) 的提取液], 空白对照组 (A_{bc}, 等体积无水乙醇 (蒸馏水) 代替样品的 DPPH (羟自由基工作液, ABST 溶液), 阳性对照组 (VC 或 BHT)。每组实验重复 3 次。

2.5.2 DPPH 自由基清除能力的测定 精密吸取不同浓度酒黄精总黄酮溶液 100 μL, 加 0.1 mmol · L⁻¹ DPPH 无水乙醇溶液 100 μL, 混匀,

表 3 方差分析结果

Tab 3 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	16 409.06	14	1172.08	37.38	< 0.0001
A	1.58	1	1.58	0.05	0.8256
B	527.44	1	527.44	16.82	0.0011
C	11 590.16	1	11 590.16	369.64	< 0.0001
D	80.97	1	80.97	2.58	0.1304
AB	16.23	1	16.23	0.52	0.4837
AC	25.26	1	25.26	0.81	0.3846
AD	19.86	1	19.86	0.63	0.4395
BC	55.76	1	55.76	1.78	0.2036
BD	14.32	1	14.32	0.46	0.5101
CD	35.78	1	35.78	1.14	0.3035
A ²	0.089	1	0.09	2850.00	0.9582
B ²	39.47	1	39.47	1.26	0.2808
C ²	3839.55	1	3839.55	122.45	< 0.0001
D ²	11.08	1	11.08	0.35	0.5617
残差	438.98	14	31.36		
失拟项	354.99	10	35.50	1.69	0.3233
净失误	83.99	4	21.00		
总和	16 848.04	28			

室温避光 30 min, 517 nm 测定 A 值, 计算 DPPH 自由基清除率。DPPH 自由基清除率 (%) = [1 - (A_s - A_{bs}) / A_{bc}] × 100%。

2.5.3 羟基自由基清除能力的测定 精密吸取不同浓度酒黄精总黄酮溶液 50 μL, 依次加入 50 μL 6 mmol · L⁻¹ FeSO₄、100 μL 6 mmol · L⁻¹ H₂O₂, 充分摇匀后室温放置 10 min; 再加入 50 μL 6 mmol · L⁻¹ 水杨酸, 充分摇匀后室温放置 30 min, 510 nm 测定 A 值, 计算羟自由基清除率。羟自由基清除率 (%) = (A_{bs} - A_s) / A_{bs} × 100%。

2.5.4 ABTS 总抗氧化能力的测定 精密吸取不同浓度酒黄精总黄酮溶液 50 μL, 加入 100 μLABTS, 避光 10 min, 734 nm 测定 A 值, 计算总抗氧化能力。总抗氧化能力 (%) = [1 - (A_s - A_{bs}) / A_{bc}] × 100%。

结果如图 3 所示, 酒黄精总黄酮具有较强的抗氧化能力, 可以剂量依赖性地清除 DPPH、羟自由基和 ABTS 自由基, 其 IC₅₀ 分别是 (19.43 ± 0.96)

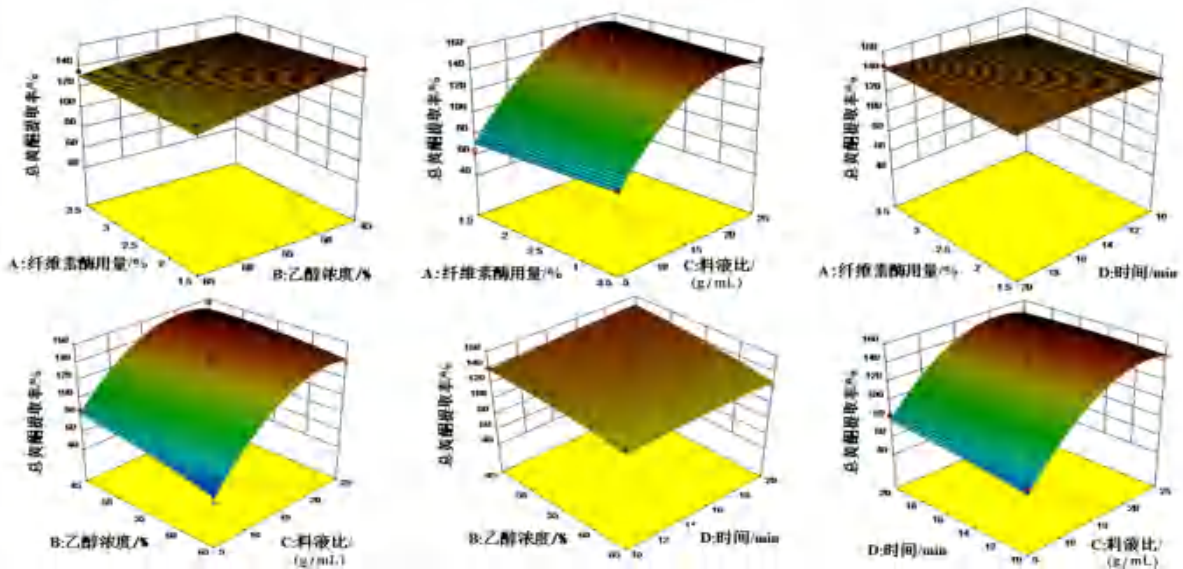


图 2 酒黄精总黄酮提取工艺各影响因素交互图

Fig 2 Influence of different factors on the yield of total flavonoids of alcoholic *polygonatum*

μg · mL⁻¹、(4.46 ± 0.14) μg · mL⁻¹ 和 (31.57 ± 0.14) μg · mL⁻¹, 尤其是对羟自由基具有较 VC [IC₅₀ = (22.23 ± 0.99) μg · mL⁻¹] 和 BHT [IC₅₀ = (54.83 ± 0.95) μg · mL⁻¹] 更强的清除能力。其对 ABTS 的清除能力在低浓度时较 VC 低, 但当浓度达到 100 μg · mL⁻¹ 时, 作用比 BHT 强, 与 VC 相当。

2.6 酒黄精提取物对顺铂诱导小鼠急性肾损伤的保护作用

2.6.1 顺铂诱导小鼠急性肾损伤模型制备 依文献方法^[9] 单日腹腔注射顺铂 (20 mg · kg⁻¹) 建立小鼠急性肾损伤模型。

2.6.2 分组及给药 将 40 只雄性 KM 小鼠随机

分为空白组, 模型组, 酒黄精低、中、高剂量组 (3.08、9.25、27.74 mg · kg⁻¹), 每组 8 只。空白组、模型组连续灌胃 7 d 生理盐水, 酒黄精组 (参照 2020 年版《中国药典》方法换算小鼠等效剂量 3.08 mg · kg⁻¹) 连续灌胃 7 d 提取物。除空白组外, 每组小鼠按 0.02 mL · g⁻¹ 腹腔注射顺铂。空白组腹腔注射等量生理盐水。

2.6.3 血清和肾组织中丙二醛 (MDA)、过氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的检测 对实验后的小鼠进行眼球取血, 3000 r · min⁻¹ 离心 20 min 获得血清。取肾组织和生理盐水按 1 : 9 制备成 10% 的肾组织匀

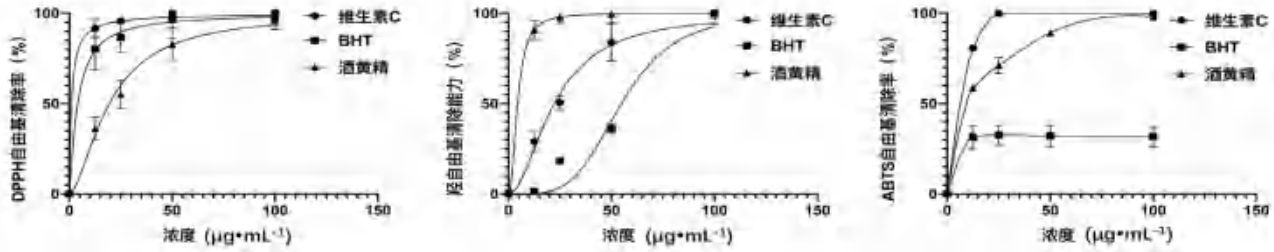


图3 酒黄精总黄酮体外抗氧化能力

Fig 3 In vitro antioxidant capacity of total flavonoids from alcoholic polygonatum

浆，匀浆于离心机 $12\ 000\ r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min，取上层清液，BCA 蛋白浓度试剂盒测定肾脏组织蛋白浓度。依次对血清、肾组织按试剂盒说明书步骤，通过比色法在酶标仪上 532 nm (450 nm、412 nm) 处检测并计算 MDA (SOD、GSH-Px) 含量。与空白组比较，模型组小鼠氧化应激与抗氧化失衡，表现为血清和肾组织 MDA 显

著升高 ($P < 0.01$)，SOD 和 GSH-Px 显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较，酒黄精组血清和肾组织 MDA 含量降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)，SOD 和 GSH-Px 含量升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。表明不同剂量酒黄精总黄酮提取物能减轻顺铂诱导小鼠急性肾损伤氧化应激水平 (见图 4)。

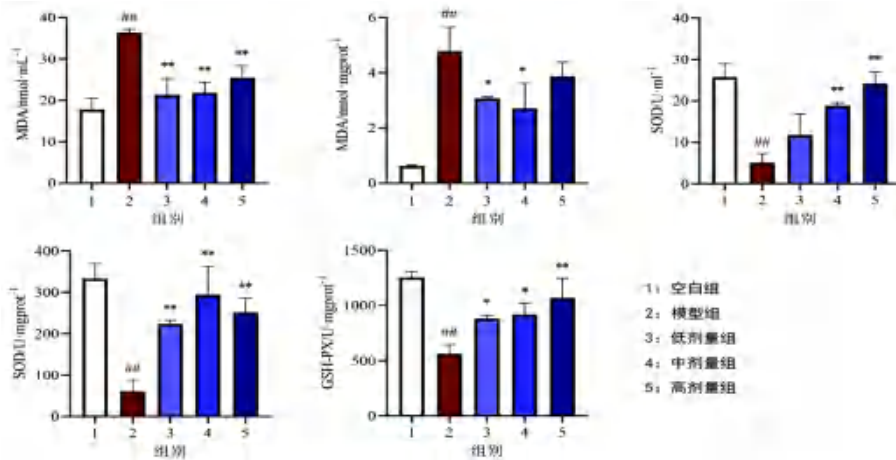


图4 不同剂量酒黄精总黄酮对顺铂诱导急性肾损伤小鼠血清、肾组织中MDA、SOD、GSH-Px的影响

Fig 4 Effect of different dosages of total flavonoids of alcohol from alcoholic polygonatum on MDA, SOD, GSH-Px in the serum and renal tissue of mice with acute renal injury induced by cisplatin

注 (Note): 与空白组比较, $^{###}P < 0.01$; 与模型组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ (Compare with the blank group, $^{###}P < 0.01$; compared with the model group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$)。

2.6.4 病理学检测 取实验后的小鼠肾脏，经过 4% 多聚甲醛固定，脱水透明后石蜡包埋，取肾脏切片进行 HE 染色，在显微镜下观察肾小管及周围细胞变化。

模型组中观察到急性肾损伤组织肾小管上皮细胞颗粒或空泡样变形，官腔扩张，刷状缘脱落，可看到基底膜断裂，官腔内可见透明、颗粒或细胞管型，有上皮细胞凋亡现象。而酒黄精提取物组肾小管空泡样变形，上皮细胞颗粒均较模型组缓解，肾小管上皮脱落减轻，管腔内脱落的细胞核固缩上皮细胞明显减少 (见图 5)。

3 讨论与结论

课题组前期实验表明，黄精总黄酮具有抗氧化、抗非小细胞肺癌增殖活性^[10]。黄精含有多

糖、皂苷、黄酮、蒽醌及氨基酸等活性成分，酒制后多糖和总酚含量降低，皂苷、黄酮和蒽醌含量升高^[11]。故本研究首次利用响应面法优化酒黄精总黄酮的提取工艺，使总黄酮提取率为 0.119%，显著高于基于黄精原药材 (0.01%) 的黄酮得率^[10]。验证实验表明该工艺方法可靠，重复性高 ($RSD = 0.58\%$)。黄精具有益肾健脾、补气养阴等功效，而肝肾阴虚则是衰老的病机。衰老是一个复杂的生命过程，其与机体抗氧化与氧化系统失衡导致体内过量自由基、炎症因子堆积相关。现代药理学研究表明黄精多糖体外具备和 VC 相当的清除自由基能力，具有较好的抗氧化作用^[12]。本研究进一步通过体外抗氧化实验发现提取的黄精总黄酮可清除 DPPH、羟自由基和

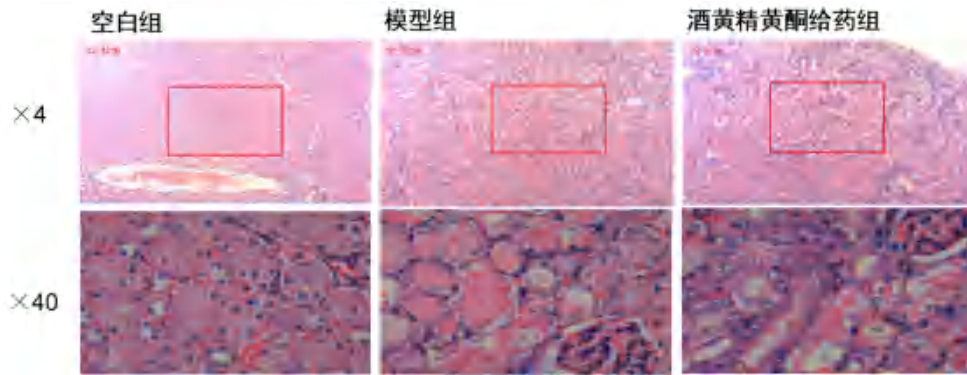


图 5 酒黄精总黄酮对顺铂诱导急性肾损伤的影响

Fig 5 Effect of total flavonoids from alcoholic polygonatum on acute renal injury induced by cisplatin in mice

ABTS, 具备显著的抗氧化能力, 尤其是其对羟自由基的 IC_{50} 几乎是水溶性抗氧化剂 VC 的 5 倍、脂溶性抗氧化剂 BHT 的 11 倍。因此, 本研究获得的酒黄精总黄酮是一种潜在的天然自由基强清除剂, 为黄精抗氧化应用提供了理论依据。顺铂是临床治疗非小细胞肺癌的一线药物^[13], 但有 25% ~ 30% 的患者出现肾毒性, 如急性肾损伤、尿毒症等^[14-15]。本研究病理结果显示顺铂主要损伤肾小管, 使上皮细胞水肿变性、基底增厚、肾间质轻度纤维化, 最终诱导肾小管上皮细胞发生凋亡、坏死, 出现透明管型。其机制可能包括: 氧化应激、炎症反应、DNA 损伤、线粒体功能障碍、内质网应激及细胞凋亡等^[16-17]。孙桃桃^[18]研究表明黄精多糖对庆大霉素诱导大鼠肾损伤可通过抗氧化、抗炎、调节 p38 MAPK/ATF2 信号通路发挥保护作用。彭静等^[19]研究表明黄精皂苷可通过降低糖尿病肾损伤模型大鼠的肾脏指数来改善相关病理变化, 本研究首次发现酒黄精黄酮提取物通过阻断脂质过氧化连锁反应, 降低顺铂对肾组织的氧化损伤, 可能与其强大的清除自由基能力相关。本研究表明酒黄精总黄酮可缓解顺铂所致的小鼠急性肾损伤, 为协同顺铂治疗非小细胞肺癌提供新的思路。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 319.
 [2] 刘爽, 胡舒婷, 贾巧君, 等. 黄精的化学组成及药理作用的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33 (10): 1783-1796.
 [3] 陈宇, 周芸涓, 李丹, 等. 黄精的现代药理作用研究进展[J]. 中药材, 2021, 44 (1): 240-244.
 [4] 陶爱恩, 赵飞亚, 钱金楸, 等. 黄精属植物治疗肾精亏虚相关疾病的本草学和药理作用与药效物质研究进展[J]. 中草药, 2021, 52 (5): 1536-1548.
 [5] 任洪民, 邓亚玲, 张金莲, 等. 药用黄精炮制的历史沿革、化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020,

45 (17): 4163-4182.
 [6] 刘艳艳, 蒋琳, 杨婷宇, 等. 酒黄精现代研究进展[J]. 广东药科大学学报, 2022, 38 (4): 130-134.
 [7] 肖晓燕, 苏联麟, 陈鹏, 等. 基于正交试验及 AHP-综合评分法优选酒黄精炮制工艺及调节免疫作用研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 22 (4): 1-10.
 [8] 马雪洁, 程路峰, 杨淑梅, 等. 异叶青兰总黄酮的含量测定及体外抗氧化活性研究[J]. 中南药学, 2021, 19 (6): 1130-1133.
 [9] 郭凯丽, 刘继平, 赵重博, 等. 酶辅助超声法提取陕产黄精总黄酮及其抗氧化、抗 A549 细胞增殖活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34 (4): 630-638.
 [10] 潘笑悦. 不同剂量顺铂诱导小鼠急性肾损伤模型观察及生物学指标检测[D]. 新乡: 新乡医学院, 2015.
 [11] 郭信东, 袁小凤, 杨昌贵, 等. 黄精酒制后活性成分的变化研究[J]. 时珍国医国药, 2022, 33 (6): 1366-1368.
 [12] 钱红月, 肖移生. 黄精防治神经系统类疾病的研究进展[J]. 中药药理与临床, 2021, 37 (6): 236-240.
 [13] Griesinger F, Korol EE, Kayaniyil S, et al. Efficacy and safety of first-line carboplatin-versus cisplatin-based chemotherapy for non-small cell lung cancer: a meta-analysis[J]. Lung Cancer, 2019, 135 (9): 196-204.
 [14] Holditch SJ, Brown CN, Lombardi AM, et al. Recent advances in models, mechanisms, biomarkers, and interventions in cisplatin-induced acute kidney injury[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20 (12): 3011-3036.
 [15] Manohar S, Leung N. Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature[J]. J Nephrol, 2018, 31 (1): 15-25.
 [16] McSweeney KR, Gadanec LK, Qaradakh T, et al. Mechanisms of cisplatin-induced acute kidney injury: pathological mechanisms, pharmacological interventions, and genetic mitigations[J]. Cancers (Basel), 2021, 13 (7): 1572-1598.
 [17] Mapuskar KA, Steinbach EJ, Zaher A, et al. Mitochondrial superoxide dismutase in cisplatin-induced kidney injury[J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10 (9): 1329-1345.
 [18] 孙桃桃. 黄精多糖对庆大霉素诱导大鼠肾损伤的保护作用研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2019.
 [19] 彭静. 黄精皂苷对糖尿病肾损伤大鼠肾损伤的保护作用及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响[J]. 中成药, 2019, 41 (10): 2518-2521.

(收稿日期: 2022-10-22; 修回日期: 2022-12-07)

Box-Behnken 设计 - 响应面法优化经典名方散偏汤的提取工艺

孙萌, 刘雪纯, 赵玥瑛, 张晴, 席铖, 董爽, 张馨雨, 杜守颖, 白洁*, 陆洋* (北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

摘要: 目的 优选与基准样品指标性成分含量、出膏率和指纹图谱相似度均接近的散偏汤提取工艺。方法 以阿魏酸、芥子碱硫氰酸盐、甘草苷及甘草酸的含量和出膏率作为综合评分的指标, 在单因素试验结果的基础上采用 Box-Behnken 设计 - 响应面法优化提取工艺。结果 优化后的散偏汤提取工艺为加水 20 倍量、提取 60 min、提取 1 次, 全方在此提取工艺条件下所得阿魏酸、芥子碱硫氰酸盐、甘草苷和甘草酸含量分别为 40.54 mg、70.87 mg、22.30 mg、40.63 mg, 出膏率为 23.83%, 与基准样品的质控标准最为接近。结论 散偏汤提取工艺经 Box-Behnken 设计 - 响应面法优化后更加可靠, 且符合基准样品质量标准范围, 可为后续剂型开发提供参考。

关键词: 散偏汤; 提取工艺; 响应面法; 基准样品

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0357-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.012

Optimization of extraction of Sanpian decoction by Box-Behnken design-response surface methodology

SUN Meng, LIU Xue-chun, ZHAO Yue-ying, ZHANG Qing, XI Cheng, DONG Shuang, ZHANG Xin-yu, DU Shou-ying, BAI Jie*, LU Yang* (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488)

Abstract: Objective To optimize the extraction process of Sanpian decoction, which is similar to the benchmark sample in indicative component content, extract yield and fingerprint similarity. **Methods** The content and extract yields of ferulic acid, sinapine thiocyanate, liquiritin and glycyrrhizic acid were taken as the comprehensive scoring indicators. Based on the single factor test, the extraction was optimized by Box-Behnken design-response surface methodology. **Results** The optimized extraction process of Sanpian decoction included 20 times of water, 60 min of extraction, and extraction once. The content of ferulic acid, sinapine thiocyanate, liquiritin, and glycyrrhizic acid in the whole prescription was 40.54 mg, 70.87 mg, 22.30 mg, and 40.63 mg, respectively. The extract yield was 23.83%, which was closest to the quality control standards of the benchmark sample. **Conclusion** The extraction process of Sanpian decoction is more reliable after optimization by Box-Behnken design-response surface methodology, and meets the quality standards of the benchmark sample, which can provide reference for the development of subsequent dosage forms.

Key words: Sanpian decoction; extraction technology; response surface methodology; benchmark sample

散偏汤为国家中医药管理局发布的《古代经典名方目录(第一批)》中的第 98 方, 为治头痛要方, 出自清代陈士铎所著的《辨证录》^[1] 头痛门卷之二, 由川芎、白芍、白芥子、甘草、郁李仁、

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 82173989)。

作者简介: 孙萌, 女, 硕士研究生, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: sunmeng0906@qq.com *通信作者: 陆洋, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: landocean28@163.com; 白洁, 女, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药新剂型与新技术研究, email: baijie22811@163.com

白芷、香附、柴胡 8 味药组成, 功效为疏肝解郁、祛风止痛, 用于治疗郁气不宣, 风邪袭于少阳经之半边头风。方中川芎为君药, 外散风邪, 入肝胆经, 善治头痛; 白芍和甘草合用酸甘化阴、缓急止痛, 柴胡和香附合用疏利肝胆、和解少阳, 白芷解表散寒、祛风止痛, 白芥子温肺化痰、通络止痛, 以上 6 味共为臣药; 郁李仁药性主降, 助川芎散之太过, 为佐药; 甘草为使药, 可调和诸药。现代临床报道散偏汤可用于治疗血管神经型偏头痛、急性缺血性中风偏瘫、抑郁症、多囊卵巢综合征等疾病^[2-5]。散偏汤传统剂型为汤剂, 需要临时煎煮, 费时费力, 且不易保存^[6], 将其开发成颗粒剂能够克服以上缺点, 同时亦能保证其药性、药效, 在临床应用上具有重要意义。

根据经典名方颗粒剂开发研究的相关文件, 颗粒剂的关键质量属性 (critical quality attributes, CQAs) 应与基准样品保持一致, CQAs 包括指纹图谱相似度、指标性成分含量以及出膏率。经典名方颗粒剂的工艺研究并非以 CQAs 最高为目的, 而是要保证颗粒剂的 CQAs 与基准样品的质量标准范围具有较好的一致性, 这就给经典名方颗粒剂的工艺研究带来了挑战。Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 采用多元回归方程来拟合因素和效应值之间的函数关系, 针对目标工艺水平进行工艺参数的预测和优化^[7-10], 该方法能够有效解决经典名方颗粒剂工艺研究面临的困难。为保证提取液的 CQAs 能够达到散偏汤基准样品的质量标准范围, 本研究依据前期确定的基准样品标准^[11]选取阿魏酸、芥子碱硫氰酸盐、甘草苷和甘草酸含量以及出膏率为综合评分的指标, 采取 Box-Behnken 设计-响应面法优化提取工艺参数。

1 仪器与试药

1.1 仪器

JM-B10002 电子天平 (余姚市纪铭称重校验设备有限公司); 赛多利斯 BSA224S 电子分析天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司]; HH-6 型电热恒温水浴锅 (北京科伟永兴仪器有限公司); DZF-6051 型真空干燥器 (北京利康达圣科技有限公司); DZ47SD20 型真空冷冻干燥机 (北京博医康实验仪器有限公司); RE-52AA 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); G20 型医用离心机 (北京白洋医疗器械有限公司); LC-20A 高效液相色谱仪 (DAD 检测器, 四元低压梯度泵, 柱温箱, 自动进样器, LC Solution 色谱工作站) [岛津 (中国) 有限公司]; Thermo Ultimate3000 高效液相色谱

仪 (DAD 检测器, CM7.2 色谱工作站) [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]。

1.2 试药

阿魏酸 (批号: 110773-201915, 含量: 99.0%)、芥子碱硫氰酸盐 (批号: 111702-202006, 含量: 98.3%)、甘草苷 (批号: 111610-201908, 含量: 93.1%)、甘草酸铵 (批号: 110731-202021, 含量: 97.7%) (中国食品药品检定研究院); 乙腈、甲醇、磷酸 (Fisher 公司, 色谱纯); 乙醇 (分析纯); 娃哈哈纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司)。

川芎饮片 (批号: 2009072, 产地四川眉山)、白芍饮片 (批号: 200623, 产地安徽亳州)、白芥子饮片 (批号: 200213, 产地四川南充)、甘草饮片 (批号: 201804-3, 产地甘肃武威)、柴胡饮片 (批号: TS-4, 产地甘肃康乐)、郁李仁饮片 (批号: 160944, 产地甘肃天水)、白芷饮片 (批号: 201801-4, 产地四川遂宁)、香附饮片 (批号: 2009080, 产地河南开封) (亿帆医药股份有限公司提供, 经北京中医药大学刘春生教授鉴定)。

2 方法与结果

2.1 散偏汤基准样品的制备

取处方量饮片 (川芎 38 g, 白芍 19 g, 白芥子 11 g, 甘草 4 g, 柴胡 4 g, 郁李仁 4 g, 白芷 2 g, 香附 8 g) 于陶瓷锅中, 加水 630 mL, 放置浸泡 30 min, 武火 (1500 W) 煎沸后文火 (300 W) 煎煮 45 min, 趁热用 1 层 300 目尼龙布过滤; 滤渣加水 540 mL, 武火 (1500 W) 煎沸后文火 (300 W) 煎煮 35 min, 趁热过滤, 合并两次滤液, 冷却, 调整体积至 600 mL, 即得散偏汤水煎液。精密移取散偏汤水煎液 10 mL 于 30 mL 西林瓶中, 冰箱 -20 °C 预冷冻 12 h 左右, 转移至 -80 °C 的真空冻干机 (真空度为 < 10 Pa) 冻干 72 h, 取出后压盖密塞, 即得散偏汤基准样品。

2.2 指标性成分含量测定方法

2.2.1 色谱条件

① 色谱条件 1: 色谱柱: Waters Xselect HSS T3 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-0.05% 磷酸水, 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 2% 乙腈; 10 ~ 18 min, 2% ~ 6% 乙腈; 18 ~ 45 min, 6% ~ 10% 乙腈; 45 ~ 90 min, 10% ~ 15% 乙腈; 90 ~ 110 min, 15% ~ 95% 乙腈); 柱温: 30 °C; 流速: 1 mL · min⁻¹; 进样量: 10 μL; 波长: 321 nm, 用于阿魏酸和芥子碱硫氰酸盐的含量测定。

② 色谱条件 2: 色谱柱: 资生堂 CAPCELL-PAK C18MGS5 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-0.05% 磷酸水, 梯度洗脱 (0 ~ 8 min, 19% ~ 20% 乙腈; 8 ~ 20 min, 20% ~ 33% 乙腈);

20 ~ 40 min, 33% ~ 50% 乙腈; 40 ~ 45 min, 50% ~ 100% 乙腈; 45 ~ 49 min, 100% ~ 19% 乙腈); 柱温: 30 ℃; 流速: 1 mL · min⁻¹; 进样量: 10 μL; 波长: 237 nm, 用于甘草苷和甘草酸的含量测定。

2.2.2 方法学考察^[11] 根据《中国药典》2020 年版方法^[12], 按照“2.2.1”项下色谱条件对含量测定方法进行方法学考察, 结果见表 1, 各考察指标均符合要求。

表 1 散偏汤中指标性成分含量测定的方法学考察

Tab 1 Methodological investigation on the content determination of index component in the Sanpian decoction

指标性成分	线性关系	RSD/%			加样回收率 (RSD) /%
		精密度	重复性	稳定性	
阿魏酸	$Y = 5.472 \times 10^4 X + 3.155 \times 10^4 (R^2 = 1.000)$	1.2	2.0	0.40	97.16 (2.5)
芥子碱硫氰酸盐	$Y = 2.914 \times 10^4 X + 12.78 \times 10^4 (R^2 = 0.9996)$	1.4	2.4	1.3	98.17 (2.2)
甘草苷	$Y = 0.3057X - 0.2120 (R^2 = 0.9993)$	0.51	2.9	1.5	104.70 (4.1)
甘草酸	$Y = 0.0973X + 0.1860 (R^2 = 0.9996)$	0.86	1.6	0.31	100.40 (2.6)

2.2.3 供试品溶液的制备

① 基准样品: 取散偏汤基准样品 2 份, 于西林瓶中加适量水超声 (250 W, 40 kHz) 溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 定容至刻度, 混匀后取 5 mL 于离心管, 10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得基准样品供试品溶液。

② 提取液: 称取处方量饮片于圆底烧瓶中, 加适量水, 放置浸泡 30 min, 回流一段时间, 用 1 层 300 目的尼龙布趁热过滤, 冷却; 调整滤液体积一致, 取 5 mL 于离心管中, 10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得提取液供试品溶液。

2.2.4 对照品溶液的制备 精密称取阿魏酸对照品 9.50 mg 于 10 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇至刻度, 摇匀, 得到 940.50 μg · mL⁻¹ 的阿魏酸对照品母液, 用 70% 甲醇稀释成 47.03 μg · mL⁻¹ 的阿魏酸对照品溶液。精密称取芥子碱硫氰酸盐对照品 9.85 mg 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 得到 968.26 μg · mL⁻¹ 的芥子碱硫氰酸盐对照品母液, 用甲醇稀释成 96.83 μg · mL⁻¹ 的芥子碱硫氰酸盐对照品溶液。

分别精密称取甘草苷对照品 9.69 mg、甘草酸对照品 10.05 mg 于 10 mL 量瓶中, 加 70% 乙醇至刻度, 摇匀, 分别得到 902.14 μg · mL⁻¹、1002.21 μg · mL⁻¹ 的甘草苷、甘草酸对照品母液, 用 70% 乙醇稀释, 分别得到 90.21 μg · mL⁻¹、96.20 μg · mL⁻¹ 的甘草苷、甘草酸对照品溶液。

2.3 出膏率测定

2.3.1 基准样品出膏率的测定 按“2.1”项下方法制备基准样品, 移取水煎液 200 mL 至蒸发皿中, 置于水浴锅上浓缩至稠膏状, 60 ℃ 真空干燥 72 h, 即得散偏汤基准样品干膏, 按照公式 (1) 计算出膏率; 出膏率 (%) = (所得干膏重 × 水煎液总

体积) / (药味称样量 × 取样体积) × 100% (1)

2.3.2 提取液出膏率的测定 将供试品制备后剩余的药液转移至蒸发皿中, 浓缩至适当体积后, 置于水浴锅上浓缩至稠膏状, 60 ℃ 真空干燥 72 h, 按照公式 (1) 计算得出膏率。

2.4 单因素试验

2.4.1 加水倍量的考察 称取处方量饮片于圆底烧瓶中, 分别加入散偏汤处方量饮片 5 倍 (450 mL)、10 倍 (900 mL)、15 倍 (1350 mL)、20 倍 (1800 mL) 水, 放置浸泡 30 min, 回流提取 80 min, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 平行两份, 测定并取平均值。

结果见图 1, 由图 1 可知, 4 种指标性成分的含量及出膏率均随加水倍量的增加而增加, 在 5 倍量时最低, 20 倍量时最高, 15 倍到 20 倍变化不明显, 总体呈现一个向上的趋势。高于 20 倍的加水量对指标性成分含量及出膏率提高作用不明显, 为避免资源浪费, 不再选择更高的加水量, 选择 5 倍加水量为低水平, 20 倍加水量为高水平。

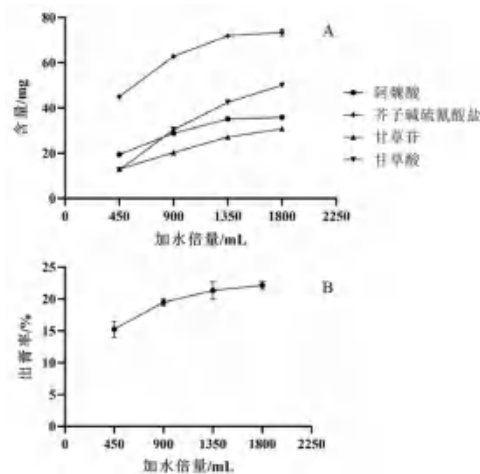


图 1 不同加水倍量下各指标性成分含量 (A) 及出膏率 (B) (n = 2)
Fig 1 Content of each index component (A) and extract yield (B) at different water times (n = 2)

2.4.2 提取时间的考察 称取处方量散偏汤饮片于圆底烧瓶中, 加入处方量 13 倍量 (1170 mL) 水浸泡 30 min, 分别回流提取时 60、90、120、150 min, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 平行两份, 测定并取平均值。

结果见图 2, 由图 2 可知, 出膏率在 60 min 时最低, 150 min 时最高, 总体呈现一个向上的趋势。4 个指标性成分含量特别是芥子碱硫氰酸盐和甘草苷的含量, 随着提取时间总体上变化不大, 除阿魏酸外, 其他 3 种指标性成分含量均在 90 min 时有最高值, 而阿魏酸含量则与提取时间成正相关。阿魏酸不稳定, 浓缩、干燥过程中损失率最大, 甘草酸损失率最小, 所以虽然甘草酸在 150 min 含量最低, 但为最大程度保证提取液中指标性成分的含量, 故选择 60 min 为低水平, 150 min 为高水平。

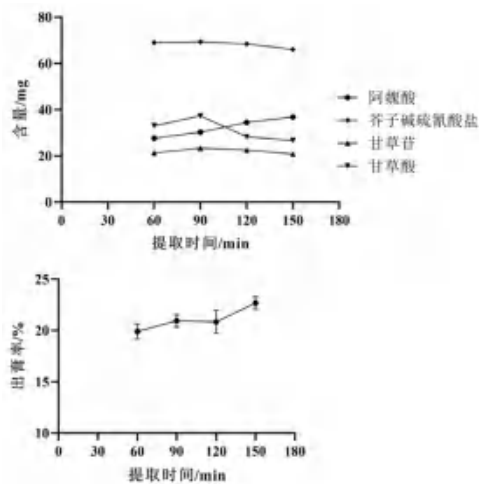


图 2 不同提取时间下各指标性成分含量 (A) 及出膏率 (B) (n = 2)
Fig 2 Contents of each index components (A) and extract yield (B) at different extraction time (n = 2)

2.5 Box-Behnken 设计 - 响应面法优化散偏汤提取工艺

2.5.1 因素水平设计 选取提取时间 A (60 min、105 min、150 min), 加水倍量 B (5 倍、12.5 倍、20 倍), 提取次数 C (1 次、2 次、3 次) 三因素进行响应面设计。以 4 个指标性成分含量 (Y₁: 阿魏酸含量; Y₂: 芥子碱硫氰酸盐含量; Y₃: 甘草苷含量; Y₄: 甘草酸含量) 和出膏率 (Y₅) 为评价指标, 采用 Design Expert 10.0 软件进行响应面设计和数据分析, 筛选出最佳提取工艺。

前期试验中发现, 在“提取-浓缩-干燥”过程中, 4 个指标性成分均有一定损失, 阿魏酸损失率约为 40%, 芥子碱硫氰酸盐损失率约为 25%, 甘草苷损失率约为 20%, 甘草酸损失率约为 5%。因此, 选取各指标性成分含量及出膏率作为评价指标进行综合加权评分, 设置权重系数

均为 0.2, 同时将各成分损失率折算, 进行综合评分, 综合评分值越接近 0 则越接近基准样品要求。综合评分公式如下:

$$\text{综合评分} = 0.2 \times (\text{提取液中阿魏酸含量} - 1.40 \times \text{基准样品中阿魏酸含量}) + 0.2 \times (\text{提取液中芥子碱硫氰酸盐含量} - 1.25 \times \text{基准样品中芥子碱硫氰酸盐含量}) + 0.2 \times (\text{提取液中甘草苷含量} - 1.20 \times \text{基准样品中甘草苷含量}) + 0.2 \times (\text{提取液中甘草酸含量} - 1.05 \times \text{基准样品中甘草酸含量}) + 0.2 \times (\text{提取液出膏率} - \text{基准样品出膏率}) \quad (2)$$

根据 Design Expert 10.0 软件进行三因素三水平的 17 次试验, 其中 12 个析因点, 5 个中心点, 因素水平表见表 2, 试验设计见表 3, 结果见表 4。

表 2 响应面设计因素水平表
Tab 2 Factor and level of response surface methodology

水平	因素		
	A 提取时间 /min	B 加水倍量 / 倍	C 提取次数 / 次
-1	60	5	1
0	105	12.5	2
1	150	20	3

表 3 Box-Behnken 设计 - 响应面法试验设计

Tab 3 Box-Behnken design-response surface methodology

编号	因素		
	A 提取时间 /min	B 加水倍量 / 倍	C 提取次数 / 次
1	105	5	1
2	105	20	3
3	60	12.5	1
4	105	5	3
5	60	20	2
6	150	20	2
7	105	20	1
8	150	5	2
9	60	12.5	3
10	150	12.5	1
11	60	5	2
12	150	12.5	3
13	105	12.5	2
14	105	12.5	2
15	105	12.5	2
16	105	12.5	2
17	105	12.5	2

2.5.2 模型建立与评价 根据 17 组试验结果, 采用二项式回归对综合评分及对应的因素 (提取时间、加水倍量、提取次数) 进行拟合, 得到的回归方程: 综合评分 = 9.19 + 1.12A + 7.99B + 11.56C + 3.84AB - 0.25AC - 1.95BC + 0.53A² - 2.04B² - 2.88C²。

对拟合模型进行 ANOVA 方差分析, 结果见表 5。该模型的方差 P = 0.0001, 显著; 模型的

表 4 响应面试验结果

Tab 4 Response surface methodology

编号	含量/mg				出膏率/%	综合评分/分
	阿魏酸	芥子碱硫酸盐	甘草苷	甘草酸		
1	26.11	46.22	15.29	15.75	22.25	-18.4755
2	68.32	81.55	59.58	89.50	34.49	23.0885
3	42.10	74.72	23.95	36.81	25.68	-2.9475
4	52.89	82.48	46.03	68.16	28.34	11.9805
5	51.65	89.19	38.90	57.47	29.59	9.7605
6	62.59	91.54	60.18	84.03	32.38	22.5445
7	55.92	82.01	23.10	33.49	25.74	0.4525
8	43.06	75.20	26.53	34.94	27.85	-2.0835
9	66.10	97.52	36.12	72.90	31.65	17.2585
10	44.72	73.58	29.09	30.69	24.56	-3.0715
11	48.12	78.35	32.93	35.56	25.49	0.4905
12	57.62	92.95	21.19	92.91	33.90	16.1145
13	60.19	84.43	33.86	58.02	26.55	9.0105
14	61.00	84.86	35.86	60.41	29.19	10.6645
15	58.80	91.96	24.17	52.42	29.07	7.6845
16	58.16	92.11	20.58	56.29	29.51	7.7305
17	59.56	82.81	36.02	60.82	33.05	10.8525

失拟项 P 值为 $0.0589 > 0.05$, 不显著, 方差显著而失拟项不显著, 表明该模型有统计学意义, 且模型与实际值能较好地拟合。模型的相关系数 $R^2 = 0.9711$, 调整决定系数 $R^2_{adj} = 0.9340$, 说明该模型能解释 93.40% 响应值的变化, 可信度较好, 可以运用该模型分析。

表 5 方差分析结果

Tab 5 Analysis of variance

误差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1720.26	9	191.14	26.15	0.0001
A	9.99	1	9.99	1.37	0.2805
B	510.94	1	510.94	69.91	< 0.0001
C	1069.16	1	1069.16	146.29	< 0.0001
AB	58.97	1	58.97	8.07	0.0250
AC	0.26	1	0.26	0.036	0.8557
BC	15.29	1	15.29	2.09	0.1913
A^2	1.20	1	1.20	0.16	0.6977
B^2	17.59	1	17.59	2.41	0.1648
C^2	35.00	1	35.00	4.79	0.0648
残差	51.16	7	7.31		
失拟项	41.79	3	13.93	5.95	0.0589
纯误差	9.37	4	2.34		
总和	1771.42	16			

该模型中, 因素 B、C 的 P 值均 < 0.0001 , 表明加水倍量、提取次数对综合评分的影响较显著, 3 个因素对综合评分的影响顺序为提取次数 $>$ 加水倍量 $>$ 提取时间。此外, 根据等高线图和 3D 图可知, 因素 A、B、C 之间还存在交互作用, 具体的响应面分析见图 3。3 个交互作用中, 图 3C 的响应面图坡度最陡, 图 3B 的次之, 图 3A 的响应面

图坡度最平缓, 表明加水倍量与提取次数的交互作用最强, 对综合评分的影响最大, 提取时间与加水倍量的交互作用较弱, 对综合评分的影响最小。

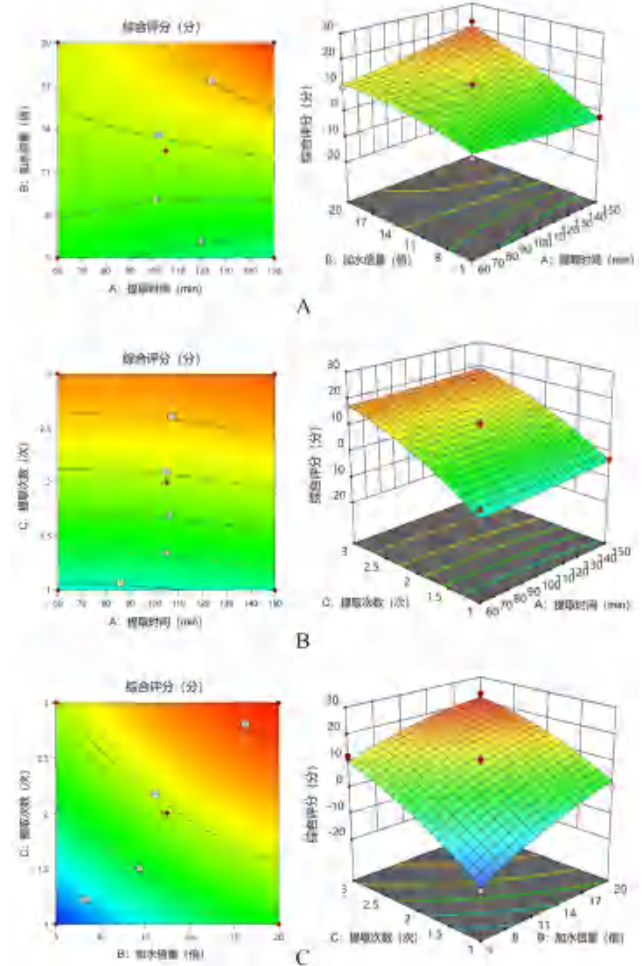


图 3 各因素交互作用对综合评分影响的响应面图及等高线图
Fig 3 Response surface and contour plot of interactive effect on the comprehensive score

A. 提取时间与加水倍量 (extraction time and water addition times);
B. 提取时间与提取次数 (extraction time and extraction times); C. 加水倍量与提取次数 (water addition times and extraction times)

2.5.3 预测最优工艺参数 采用 Design Expert 10.0 软件预测的提取工艺参数为提取时间 60.0 min, 加水倍量 20.0 倍, 提取次数 1.1 次, 此时的综合评分预测值为 0.0。根据实际情况对提取工艺参数进行调整, 即加水 20 倍量 (1800 mL)、提取 60 min、提取 1 次。

2.5.4 验证试验 按照调整后的预测工艺参数进行响应面验证试验, 结果见表 6。

3 讨论

经典名方是历代医家临床实践经验的总结, 对经典名方的研究和开发既能实现中药剂型现代化创新, 也能够推动中医药产业高速发展。经典名方作为体现中药复方配伍理论的重要载体, 往往是由多

表 6 响应面验证试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Tab 6 Verification test of response surface ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

编号	含量/mg				出膏率/%
	阿魏酸	芥子碱硫氰酸盐	甘草苷	甘草酸	
1	42.31±1.71	70.74±0.79	24.18±0.51	38.54±1.84	23.26
2	38.38±0.26	71.32±0.22	18.75±0.11	40.59±0.17	24.48
3	40.93±4.04	70.56±0.50	23.96±0.29	42.77±0.46	23.76

种成分共同作用而起效的,不同的制备工艺参数往往会导致其成分组成和相对含量的变化,因此制备工艺研究是经典名方开发的关键环节。

本研究以单因素试验确定了加水倍量和提取时间的上下限,在单因素试验基础上设计了 Box-Behnken 设计-响应面法试验,以提取液中 4 个指标性成分含量及出膏率为指标,通过试验设计及综合加权评分对不同提取条件的结果进行直观分析,优选散偏汤提取工艺,并通过试验验证了优选工艺的可行性。试验发现,不同提取条件下的水煎液的指纹图谱相似度与基准样品标准比均大于 0.9,相似度良好,说明不同提取条件下指纹图谱相似度差异不大,故虽然指纹图谱相似度属于 CQAs,但在考察提取工艺时未将指纹图谱相似度纳入评分标准。

本研究在散偏汤饮片回流提取之前采取先将饮片浸泡 30 min 的方法,其原因在于前期研究发现浸泡后 4 个指标性成分含量相较于不浸泡组均有升高,且前期基准样品的制备也采用了饮片浸泡 30 min 的方法,基准样品是制剂工艺筛选及制剂标准制订的依据和准绳^[13],为了保持一致性,故在提取工艺的考察部分试验仍继续采用饮片浸泡 30 min 的方法。

前期考察发现在提取-浓缩-干燥过程中,阿魏酸的损失率高达 40%,其原因为阿魏酸以溶液状态存在时不稳定,易受外界和溶液环境等因素的影响,在高温及光照情况下易发生结构变化^[14-15],因此在考察提取时间时充分考虑了阿魏酸损失率高的实际情况,选取阿魏酸含量较高的 150 min 为高水平。

根据前期试验结果,15 批基准样品中,4 个指标性成分含量已确定的范围为:每个处方含阿魏酸 19.08~35.43 mg,芥子碱硫氰酸盐 38.02~70.60 mg,甘草苷 14.65~27.21 mg,甘草酸 21.17~39.31 mg。试验最终优选散偏汤提取工艺为加水 20 倍(1800 mL),浸泡 30 min,提取 60 min,提取 1 次,根据 3 组验证试验结果,

得到每个处方中阿魏酸含量均值为 40.54 mg、芥子碱硫氰酸盐含量均值为 70.87 mg、甘草苷含量均值为 22.30 mg、甘草酸含量均值为 40.63 mg,出膏率均值为 23.83%,综合评分为-3.9655,验证试验结果减去“提取-浓缩-干燥”过程的损失,均满足前期建立的质量标准,且与响应面法预测值接近,表明该提取工艺可以用于后续的试验。

参考文献

- [1] 陈士铎. 辨证录[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989: 108-109.
- [2] 刘燕. 中医药治疗偏头痛用药规律及散偏汤对偏头痛模型大鼠 CGRP、PENK 的实验研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [3] 邢筱华. 刘亚娟教授应用散偏汤治疗多囊卵巢综合征经验[J]. 陕西中医, 2011, 32(5): 585-586.
- [4] 王钊, 王慧莉. 陈士铎散偏汤联合氟桂利嗪治疗前庭性偏头痛的疗效及对焦虑抑郁状态的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(18): 2003-2006.
- [5] 刘文瑜, 易志红, 陈利江, 等. 针刺联合散偏汤对偏头痛患者血清 CGRP、5-HT 及 NOS 水平的影响[J]. 上海针灸杂志, 2020, 39(1): 15-19.
- [6] 张星, 张臻, 林夏, 等. 经典名方制剂开发的主要环节关键技术问题探析[J]. 中草药, 2021, 52(21): 6724-6731.
- [7] 赵国栋, 洪璐, 王倪, 等. 基于 Box-Behnken 设计-响应面设计法结合熵权法优选脑络欣通方提取工艺[J]. 中南药学, 2021, 19(9): 1848-1853.
- [8] 何瑶, 江华娟, 成颜芬, 等. 基于 Box-Behnken 设计-响应面法与质量综合评价优化经典名方桃红四物汤煎煮工艺[J]. 中草药, 2021, 52(22): 6845-6855.
- [9] 李越, 吴中宝, 杨艳玲, 等. Box-Behnken 设计-响应面法优选红景天苷乳剂凝胶处方工艺并研究其对烫伤的治疗作用[J]. 中国现代中药, 2020, 22(4): 609-614.
- [10] 曾海蓉, 李婷娜, 冉倩, 等. 基于熵权法结合 Box-Behnken 设计-响应面法优化桂枝芍药知母颗粒复方提取工艺[J]. 中草药, 2020, 51(1): 84-90.
- [11] 刘雪纯, 莫雨佳, 张晴, 等. 经典名方散偏汤的物质基准量值传递分析[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(8): 2099-2108.
- [12] 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 480-483.
- [13] 杨洪军, 黄璐琦. 经典名方的研发——中医药传承发展的突破口之一[J]. 中国现代中药, 2018, 20(7): 775-779.
- [14] 任淑萌. 阿魏酸的降解作用规律和机理研究及其在药物质量控制中的应用[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2009.
- [15] 王莹, 孙嘉辰, 李霞, 等. 基于建立成分活性权重函数的当归酒炙工艺评价研究[J]. 中草药, 2022, 53(10): 3014-3021.

(收稿日期: 2022-10-05; 修回日期: 2022-11-25)

益气活血通便颗粒成型工艺研究

权起元¹, 陈飞¹, 王本欢¹, 杨晓玲¹, 杨秀娟¹, 王智勇⁴, 李硕^{1, 2, 3*} (1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室, 兰州 730000; 3. 甘肃省中药质量与标准研究重点实验室培育基地, 兰州 730000; 4. 甘肃省中药现代制药工程研究院有限公司, 兰州 730000)

摘要: **目的** 优化益气活血通便颗粒的成型工艺。**方法** 在单因素试验的基础上, 以乙醇体积分数、辅料配比(糊精:可溶性淀粉)、辅料与浸膏用量比例为考察对象, 以吸湿率、成型率、溶化时间、休止角作为考察指标, 运用星点设计-响应面法结合 CRITIC 法计算综合评分, 优选益气活血通便颗粒的成型工艺。**结果** 益气活血通便颗粒最优成型工艺为: 乙醇体积分数 50.74%、辅料配比(糊精:可溶性淀粉=5.21:1)、辅料与浸膏用量比例(辅料:浸膏=3.07:1), 综合评分为 77.56。**结论** 本法所建模型预测准确, 且重复性较好, 所制颗粒质量稳定可靠, 可为益气活血通便颗粒生产制备提供参考。

关键词: 益气活血通便颗粒; 响应面法; 辅料; 成型工艺

中图分类号: R283.6 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)02-0363-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.013

Optimization of the molding process of Yiqi Huoxue Tongbian granules

QUAN Qi-yuan¹, CHEN Fei¹, WANG Ben-huan¹, YANG Xiao-lin¹, YANG Xiu-juan¹, WANG Zhi-yong⁴, LI Shuo^{1, 2, 3*} (1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000; 2. Key Laboratory of Chemistry and Quality of Traditional Chinese Tibetan Medicine of Colleges of Gansu Province, Lanzhou 730000; 3. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality and Standard, Lanzhou 730000; 4. Gansu Traditional Chinese Medicine Modern Pharmaceutical Engineering Research Institute, Lanzhou 730000)

Abstract: Objective To optimize the molding process of Yiqi Huoxue Tongbian granules. **Methods** On the basis of the one-factor experiment, the ethanol volume fraction, excipient ratio (dextrin: soluble starch) and the ratio of excipients and extract dosage of Yiqi Huoxue Tongbian granules were measured. The moisture absorption rate, molding rate, dissolution time, and rest angle were used as the indicators. The comprehensive score was calculated by combining the star-response surface method with the CRITIC method to optimize the molding process of Yiqi Huoxue Tongbian granules. **Results** The optimal molding process of Yiqi Huoxue Tongbian granules was as follows: ethanol volume fraction 50.74%, excipient ratio (dextrin : soluble starch = 5.21 : 1), excipient and extract dosage ratio (excipient : extract = 3.07 : 1), and the comprehensive score was 77.56. **Conclusion** The method has accurate prediction, good reproducibility. The particles are stable and reliable, which can provide a reference for the production and preparation of Yiqi Huoxue Tongbian granules.

Key words: Yiqi Huoxue Tongbian granule; response surface method; excipient; molding process

便秘是临床上常见的胃肠道功能紊乱性疾病, 我国成人慢传输型便秘 (slow transit constipation, STC) 占整个便秘患者的 15% ~ 42%^[1-5]。全小林

院士基于“态靶同调”辨理念^[6-9], 认为 STC 的主要病因病机是气血津液亏虚、肠燥失运, 结合临床实践总结出由黄芪、当归、肉苁蓉、火麻仁组

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 81960713, No. 82160750, No. 82160755); 甘肃省高等学校创新基金项目 (No. 2021A-079); 甘肃省科技厅项目 (自然科学基金 No. 18JR3RA201, 基础研究创新群体 No. 21JR7RA569, 青年科技基金 No. 20JR10RA331)。

作者简介: 权起元, 男, 在读硕士研究生, 主要从事中药品质评价及产品开发研究, email: 82384757@qq.com *通信作者: 李硕, 女, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药品质评价及产品开发研究, email: 290608323@qq.com

成的益气活血通便方, 针对年老体弱、产后、久病引起的气血亏虚, 肠道濡润失司的 STC 人群, 有明显的补气养血、润肠通便作用, 临床治疗效果显著。

益气活血通便组方临床剂型为汤剂, 存在服用口感差, 服用量大, 难以保存、运输等问题。为了更好地服务于患者, 本课题组运用传统煎药方法, 结合现代中药颗粒剂制备技术对该组方进行颗粒剂制备, 以期获得一种服用、携带方便的中药颗粒。本试验以辅料配比、干燥温度、乙醇体积分数、乙醇用量、辅料与浸膏用量比例进行单因素考察, 在单因素试验的基础上, 选择乙醇体积分数、辅料配比(糊精:可溶性淀粉)、辅料与浸膏用量比例为考察对象, 以吸湿率、成型率、溶化时间、休止角作为考察指标, 结合星点设计-响应面法和 CRITIC 法, 研究益气活血通便颗粒的最佳成型工艺, 为其临床应用及制剂生产提供技术支撑。

1 材料

1.1 仪器

EX224ZH 型电子分析天平、EX2202ZE 电子天平(奥豪斯仪器常州有限公司); DHG-9123A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司); HH-4 型数显恒温水浴锅(江苏金坛市环宇科学仪器厂); 16 目尼龙筛(孔径 1.25 mm)、1 号及 5 号药典标准筛(上海宝蓝试验仪器制造有限公司)。

1.2 试药

黄芪(批号: 20220402)、当归(批号: 20220203)、肉苁蓉(批号: 21080601)、火麻仁(批号: 22032802)饮片由甘肃中医药大学附属医院提供, 经甘肃中医药大学王明伟副教授鉴定分别来源于豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的根、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根、列当科植物肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y.C.Ma 的干燥带鳞叶的肉质茎、桑科植物大麻 *Cannabis sativa* L. 的干燥成熟果实。

糊精(批号: 20191101B, 曲阜市药用辅料有限公司); 可溶性淀粉(批号: 20201115)、无水乙醇(批号: 20210301)、硫酸铵(批号: 20180623)(天津市大茂化学试剂厂); 益气活血通便处方浸膏(自制)。

2 方法与结果

2.1 益气活血通便处方稠浸膏的制备

依据处方配伍, 分别精密称取黄芪 15 g、当归 15 g、肉苁蓉 18 g、火麻仁 30 g, 加适量蒸馏水浸泡后, 热回流装置密闭提取, 将提取液趁热用纱布滤过, 即得煎煮液。合并煎煮液, 65 °C 减压浓缩至相对密度在 1.21 左右的浸膏, 即得。

2.2 颗粒的制备工艺

采用湿法制粒的方法, 精密称取益气活血通便处方浸膏和辅料, 辅料按“等量递增法”充分混匀, 再逐次适量加入浸膏, 并加入适量乙醇, 制软材, 过 16 目筛制粒, 60 °C 常压干燥 1 h, 整粒, 即得。

2.3 成型率的测定

采用双筛分法测定^[10]。取所制的益气活血通便颗粒, 质量记为 M , 依次通过一号和五号筛, 收集通过一号筛但未通过五号筛的颗粒, 质量记为 M_1 , 按照公式(1)计算成型率。

$$\text{成型率}(\%) = M_1/M \times 100\% \quad (1)$$

2.4 吸湿性的测定

参照《中国药典》2020 年版(四部)通则(9103)“药物引湿性试验指导原则”^[10], 取恒重干燥后的称量瓶(外径为 50 mm, 高为 15 mm), 于试验前 24 h 置于(25±1) °C 的恒温干燥器内, 底部放置硫酸铵饱和溶液, 称重记为 M_1 。取益气活血通便颗粒适量, 平铺于称量瓶底部, 颗粒厚度约 1 mm, 称重记为 M_2 。打开瓶塞, 将称量瓶置于上述恒温恒湿条件下 24 h。盖好瓶塞, 称重记为 M_3 。按照公式(2)计算吸湿率。

$$\text{吸湿率}(\%) = (M_3 - M_2) / (M_2 - M_1) \times 100\% \quad (2)$$

2.5 流动性的测定

采用固定漏斗法测定^[11]。将漏斗固定于水平放置的白纸上方, 使漏斗下口与白纸的距离为 H , 将益气活血通便颗粒缓慢地沿漏斗壁倒入, 直至漏斗下方形成的圆锥体接触到漏斗下口时停止, 测量圆锥体底部的直径 R 。则 $\tan \alpha = 2H/R$, α 即为休止角。重复测定 3 次, 求平均值。

2.6 溶化性的测定

参照《中国药典》2020 年版(四部)颗粒剂(0104)中可溶颗粒溶化性检查^[10]。称取益气活血通便颗粒约 10 g, 加入 80 °C 热水 200 mL, 搅拌, 直至颗粒全部溶化, 记录溶化时间。

2.7 CRITIC 法确定各指标权重系数

对各指标试验数据进行线性插值处理, 对于越大越好的指标(如成型率)采用公式^[12]: 标准化数据(%) = (实测值 - 最小值) / (最大值 - 最

小值) × 100%。

对于越小越好的指标(如吸湿率、溶化时间、休止角)采用公式: 标准化数据(%) = (最大值 - 实测值) / (最大值 - 最小值) × 100%。

数据标准化处理后, 将数据转换为 SPSS 数据格式, 通过数据分析平台 SPSSAU 输入数据, 选择功能栏“综合评价”, 选用方法“CRITIC 权重”, 即可获得各项考察指标的权重系数。

2.8 综合评分的计算

根据“2.7”项下获得的标准化数据和权重系数, 综合评分等于对应的指标权重系数乘以各考察指标标准化数据, 总和相加即得^[13]。

2.9 单因素试验

2.9.1 辅料比对益气活血通便颗粒影响 称取约 10 g 益气活血通便处方浸膏, 选择辅料为糊精与可溶性淀粉, 比例为 1 : 1、3 : 1、5 : 1、7 : 1、9 : 1 进行考察, 设定辅料与浸膏比例为 2.5 : 1, 乙醇体积分数为 60%, 乙醇用量为浸膏与辅料的比重为 10%, 干燥温度为 60 °C, 干燥时间为 1 h。分别以吸湿率、成型率、休止角、溶化时间作为评价指标, 计算综合评分作为最终评价指标。将数据标准化处理后, 得到成型率、休止角、吸湿率、溶化时间的权重分别为 20.83%、24.07%、32.63%、22.47%。当糊精与可溶性淀粉比例为 5 : 1 时, 所制颗粒成型率为 93.24%, 休止角为 41.98 °, 吸湿率为 14.58%, 溶化时间为 24 s, 综合评分为 58.87 (见表 1)。因此选择糊精与可溶性淀粉的比例为 5 : 1。

表 1 辅料比对益气活血通便颗粒影响

Tab 1 Effect of excipients ratio on Yiqi Huoxue Tongbian granules

辅料(糊精:可溶性淀粉)	成型率/%	休止角/°	吸湿率/%	溶化时间/s	综合评分
1 : 1	92.12	38.17	14.82	28	53.73
3 : 1	89.76	43.17	15.18	31	0
5 : 1	93.24	41.98	14.58	24	58.87
7 : 1	91.06	40.69	13.19	30	55.56
9 : 1	92.71	41.16	15.08	29	35.39

2.9.2 辅料与浸膏用量比例对益气活血通便颗粒影响 称取约 10 g 益气活血通便处方浸膏, 选择辅料与浸膏比例为 2 : 1、2.5 : 1、3 : 1、3.5 : 1、4 : 1, 糊精与可溶性淀粉比例为 5 : 1, 其他条件不变。以所制颗粒的吸湿率、成型率、溶化时间、休止角作为评价指标。将数据标准化处理后, 得到成型率、休止角、吸湿率、溶化时间的权重为 39.61%、20.57%、23.78%、16.04%。当浸膏与

辅料比例为 1 : 3 时, 所制颗粒成型率为 94.45%, 休止角为 41.02 °, 吸湿率为 13.25%, 溶化时间为 22 s, 综合评分为 71.85 (见表 2)。故选取浸膏与辅料比 1 : 3 为最佳比例。

表 2 辅料与浸膏用量比例对益气活血通便颗粒影响

Tab 2 Effect of the ratio of extract to excipients on Yiqi Huoxue

Tongbian granules					
辅料与浸膏比例	成型率/%	休止角/°	吸湿率/%	溶化时间/s	综合评分
2 : 1	92.03	42.98	13.03	38	25.45
2.5 : 1	94.21	44.39	13.08	27	52.15
3 : 1	94.45	41.02	13.25	22	71.85
3.5 : 1	91.87	42.24	12.94	20	45.04
4 : 1	91.53	41.04	12.73	16	60.27

2.9.3 乙醇体积分数对益气活血通便颗粒影响

由于药材浸膏含糖类成分较多, 黏性较大, 用水作为润湿剂制粒成型率低、质硬, 故不选用水作为润湿剂, 在查阅文献的基础上, 确定以乙醇作为润湿剂。称取约 10 g 益气活血通便处方浸膏, 辅料与浸膏比例为 3 : 1, 糊精与可溶性淀粉比例为 5 : 1, 选用体积分数 10%、30%、50%、70%、90% 的乙醇作为润湿剂, 其余条件不变。以颗粒的吸湿率、成型率、溶化时间作为考察指标, 计算综合评分作为最终评价指标。将数据标准化处理后, 得到成型率、吸湿率、溶化时间的权重为 25.58%、38.11%、36.31%。当乙醇体积分数为 50% 时, 所制颗粒成型率为 93.71%, 吸湿率为 14.04%, 溶化时间为 45 s, 综合评分为 58.14 (见表 3)。因此制备益气活血通便颗粒的润湿剂最佳体积分数为 50%。

表 3 乙醇体积分数对益气活血通便颗粒影响

Tab 3 Effect of ethanol volume fraction on Yiqi Huoxue Tongbian granules

乙醇体积分数/%	成型率/%	吸湿率/%	溶化时间/s	综合评分
10	91.92	13.18	48	42.29
30	91.85	13.41	47	40.87
50	93.71	14.04	45	58.14
70	92.31	14.59	44	33.69
90	91.57	14.89	40	36.31

2.9.4 乙醇用量对益气活血通便颗粒影响 称取约 10 g 益气活血通便处方浸膏, 辅料与浸膏比例为 3 : 1, 糊精与可溶性淀粉比例为 5 : 1, 乙醇体积分数为 50%, 加入占浸膏与辅料比重 5%、10%、15%、20%、25% 的乙醇, 其他条件不变。以所制颗粒的吸湿率、成型率、溶化时间进行测定作为评价指标, 计算综合评分作为最终评价指

标。将数据标准化处理后,得到成型率、吸湿率、溶化时间的权重为 50.68%、24.37%、24.96%。当乙醇用量为浸膏与辅料比重的 15% 时,所制颗粒成型率为 94.83%,吸湿率为 12.35%,溶化时间为 51 s,综合评分为 54.63 (见表 4)。选取用量为浸膏与辅料比重的 15% 的乙醇作为最佳润湿剂用量。

表 4 乙醇用量对益气活血通便颗粒影响

Tab 4 Effect of ethanol consumption on Yiqi Huoxue Tongbian granules

乙醇用量 (占原辅料比重) %	成型率 /%	吸湿率 /%	溶化时间 /s	综合评分
5	94.02	11.36	44	52.78
10	94.24	12.02	48	46.31
15	94.83	12.35	51	54.63
20	93.89	12.71	60	14.87
25	95.80	13.49	65	50.68

2.9.5 干燥温度对益气活血通便颗粒影响 称取约 10 g 益气活血通便处方稠浸膏,辅料与浸膏比例为 3 : 1,辅料配比糊精与可溶性淀粉比例为 5 : 1,乙醇体积分数为 50%,乙醇用量为浸膏与辅料比重的 15%,干燥温度分别为 60、80、100、120、140 °C,干燥时间为 1 h。以所制得颗粒的吸湿率、成型率、溶化时间进行测定作为评价指标,计算综合评分作为最终评价指标。将数据标准化处理后,得到成型率、吸湿率、溶化时间的权重为 38.53%、35.29%、26.18%。当干燥温度为 60 °C 时,所制颗粒成型率为 93.07%,吸湿率为 12.96%,溶化时间为 70 s,综合评分为 66.09 (见表 5)。所以选取 60 °C 作为益气活血通便颗粒成型工艺的最佳干燥温度。

表 5 干燥温度对益气活血通便颗粒影响

Tab 5 Effect of drying temperature survey on Yiqi Huoxue Tongbian granules

干燥温度 /°C	成型率 /%	吸湿率 /%	溶化时间 /s	综合评分
60	93.07	12.96	70	66.09
80	93.42	15.10	77	36.48
100	92.15	11.84	69	61.47
120	92.51	14.17	74	37.48
140	94.64	18.07	70	61.44

2.10 星点设计 - 响应面法优选益气活血通便颗粒的成型工艺

在单因素试验的基础上,选择乙醇体积分数、辅料配比 (糊精:可溶性淀粉)、辅料与浸膏用量比例作为影响益气活血通便颗粒质量的主要因素,以吸湿率、成型率、溶化时间、休止角作为考察指标,运用 CRITIC 法确定各指标权

重系数,计算综合评分作为最终评价指标。运用 Design Expert 8.0.6 软件进行三因素五水平的星点设计,因素水平见表 6,试验设计及各指标测量结果见表 7。按照“2.7”项下计算方法对考察指标吸湿率、成型率、溶化时间、休止角的数据进行线性插值处理,获得各考察指标的标准化数据。通过 SPSSAU 数据分析平台运用 CRITIC 法处理获得各指标权重系数,结果得到成型率、休止角、吸湿率、溶化时间的权重为 19.80%、26.54%、33.10%、20.55%。最后通过“2.8”项下方法计算综合评分。

表 6 因素水平

Tab 6 Factor and level

水平	A. 辅料与浸膏比例 / (g/g)	B. 辅料配比 (糊精:可溶性淀粉) / (g/g)	C. 乙醇体积分分数 /%
- 1.6	2.2	3.4	34
- 1	2.5	4	40
0	3	5	50
1	3.5	6	60
1.6	3.8	6.6	66

2.10.1 模型拟合 运用 Design-Expert 8.0.6 软件进行多元线性回归,得到回归方程:综合评分 = $76.94 + 3.29A + 3.56B + 2.47C - 0.79AB - 0.61AC - 5.64BC - 11.47A^2 - 7.18B^2 - 8.04C^2$ 。通过方差分析 (见表 8) 显示,失拟项 $P > 0.05$,说明方程拟合度较好^[14],无失拟因素存在,所选的二次回归模型适当;同时,回归方程的显著性检验 $P < 0.0001$,表明模型预测情况良好,与实际情况十分吻合^[15]。A、B、C 三因素对综合评分的影响程度依次为 $B > A > C$ ^[16]。表明辅料与浸膏用量比例、辅料配比和乙醇体积分数均能显著影响益气活血通便颗粒的成型工艺,并且辅料配比、辅料与浸膏用量比例影响较大。

2.10.2 响应面分析 运用 Design-Expert 8.0.6 软件,绘制综合评分与辅料与浸膏用量比例、辅料配比 (糊精:可溶性淀粉)、乙醇体积分相交的三维效应面曲线图 (见图 1 ~ 3),由图可知各因素对益气活血通便颗粒的成型的影响都比较明显,辅料配比 (糊精:可溶性淀粉) 与乙醇体积分数的重合面积最小,其交互作用最为显著。通过叠加各个效应面的较优区域,筛选较优取值范围^[17]。得到益气活血通便颗粒成型工艺的最佳条件为:乙醇体积分数为 50.74%;辅料配比 (糊精:可溶性淀粉) 为 5.21 : 1;辅料与浸膏用量比例为 3.07 : 1,预测综合评分为 77.56。

2.10.3 最佳成型工艺验证试验 由于考虑到实

表 7 星点设计及各指标检测结果

Tab 7 Design of star points and test results of various indicators

编号	A. 辅料与浸膏用量比例 (g/g)	B. 辅料配比 (g/g)	C. 乙醇体积分数 /%	成型率 /%	休止角 /°	吸湿率 /%	溶化时间 /s	综合评分
1	2.5	4.0	40	93.36	41.23	13.43	56	34.02
2	3.5	4.0	40	95.06	40.98	13.84	51	45.00
3	2.5	6.0	40	93.62	40.53	13.23	54	53.91
4	3.5	6.0	40	95.39	41.37	13.22	49	60.55
5	2.5	4.0	60	95.45	40.41	13.91	53	50.92
6	3.5	4.0	60	95.79	41.44	13.59	45	58.29
7	2.5	6.0	60	95.91	41.47	13.47	55	47.07
8	3.5	6.0	60	95.73	41.17	13.78	48	52.46
9	2.2	5.0	50	94.98	41.29	13.31	58	43.57
10	3.8	5.0	50	95.43	40.05	14.25	50	51.53
11	3.0	3.4	50	95.07	40.96	13.98	44	51.98
12	3.0	6.6	50	96.18	40.18	14.01	47	65.05
13	3.0	5.0	34	96.5	40.53	14.04	54	50.96
14	3.0	5.0	66	96.42	39.65	14.49	47	61.69
15	3.0	5.0	50	95.47	39.95	13.34	48	79.88
16	3.0	5.0	50	95.34	39.76	13.49	51	73.49
17	3.0	5.0	50	96.05	40.42	13.23	52	73.75
18	3.0	5.0	50	96.48	39.63	13.66	48	82.52
19	3.0	5.0	50	95.31	40.19	13.57	47	70.88
20	3.0	5.0	50	95.53	39.74	13.31	50	81.13

表 8 响应面二次模型方差分析

Tab 8 ANOVA of the secondary model of the effect surface

来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	3463.927	9	384.880	29.355	< 0.0001
A	141.777	1	141.777	10.813	0.0082
B	165.813	1	165.813	12.647	0.0052
C	80.147	1	80.147	6.113	0.0330
AB	4.987	1	4.987	0.380	0.5512
AC	2.960	1	2.960	0.225	0.6449
BC	254.601	1	254.601	19.418	0.0013
A ²	1635.034	1	1635.034	124.707	< 0.0001
B ²	641.645	1	641.645	48.939	< 0.0001
C ²	803.405	1	803.405	61.277	< 0.0001
残差	131.109	10	13.111		
失拟项	14.934	5	2.986	0.128	0.979
纯误差	116.175	5	23.235		
总和	3595.037	19			

际生产过程的合理性和操作的可行性, 确定益气活血通便颗粒的最佳成型工艺为: 乙醇体积分数为 50%; 辅料配比 (糊精:可溶性淀粉) 为 5 : 1; 辅料与浸膏用量比例为 3 : 1。为验证模型可靠性, 按上述最佳成型工艺进行验证试验, 共进行 3 组平行试验, 结果见表 9。结果显示, 3 组平行试验的平均综合评分为 76.28, 与模型预测的综合评分 77.56 相比, 相对误差 1.65%, 表明模型预测性良好, 可靠稳定。

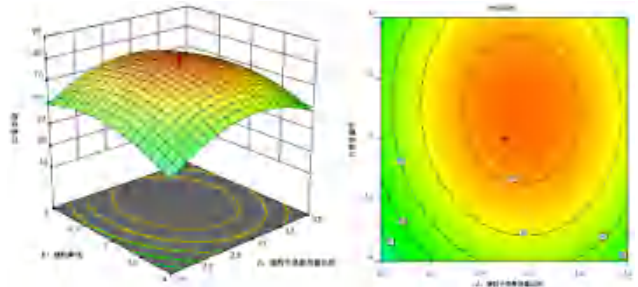


图 1 辅料与浸膏用量比例和辅料比对综合评分影响的交互作用
Fig 1 Interaction between the proportion of excipients and extract dosage and the ratio of excipients on the comprehensive score

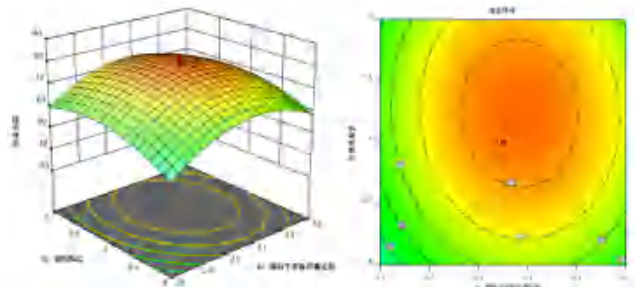


图 2 辅料与浸膏用量比例和乙醇体积分数对综合评分影响的交互作用
Fig 2 Interaction of excipients with extract dosage ratio and ethanol volume fraction on the effect of comprehensive score

3 讨论

本研究中运用传统煎药方法进行益气活血通便组方合煎, 制得浸膏, 结合现代中药颗粒剂制

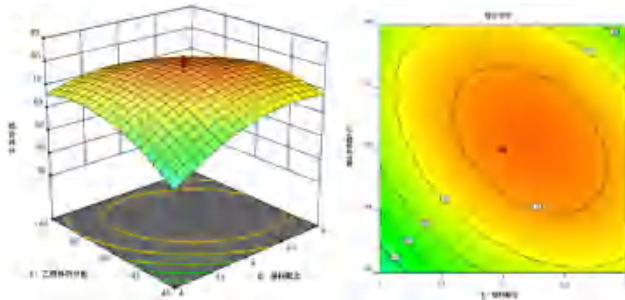


图 3 辅料配比和乙醇体积分数对综合评分影响的交互作用
Fig 3 Interaction of excipient ratio and ethanol volume fraction on the effect of comprehensive score

表 9 验证试验结果
Tab 9 Verification tests

编号	成型率 /%	休止角 /°	吸湿率 /%	溶化性 /s	综合评分
1	96.17	40.11	13.52	49	75.83
2	95.88	39.82	13.58	50	75.15
3	95.79	40.05	13.44	48	77.85
均值	95.95	39.99	13.51	49.00	76.28

备方法，采用湿法制粒制备颗粒，研究稳定可行的益气活血通便颗粒最佳成型工艺。

由于组方中含黄芪、当归两味中药，制备过程中发现水煎液中含多糖类成分较多，浓缩制备浸膏甜度适宜，无需再添加矫味剂，所制得的颗粒口感适宜，气味易于接受。益气活血通便组方浸膏黏性较强，故用乙醇作润湿剂。糊精和淀粉价格低廉，是常用的辅料。可溶性淀粉与浸膏混合，黏连情况较严重，无法达到制粒要求；而糊精具有稳定性好、溶解性好、黏性低、吸湿性低等优点，故将两种辅料混合使用。

星点设计-效应面法在中药制剂工艺优化过程中运用广泛，客观赋值的 CRITIC 权重法适用于计算成型工艺中的吸湿率、成型率、溶化时间、休止角的权重赋值，可作为益气活血通便颗粒的评价标准。本研究通过星点设计-响应面法结合 CRITIC 权重法，优选益气活血通便颗粒的最佳成型工艺，结果所建模型预测准确，并且重复性较好，所制颗粒质量稳定，可用于益气活血通便颗粒的生产。

参考文献

[1] 刘田田, 周国华, 陈叶青, 等. 生物反馈联合抗焦虑抑

郁药物治疗慢性功能性便秘合并焦虑抑郁的临床疗效研究 [J]. 中国全科医学, 2017, 20 (S2): 254-256.

[2] 刘启鸿, 柯晓, 胡露楠, 等. 基于网络药理学探讨理气通便方治疗慢传输型便秘的作用机制 [J]. 福建中医药, 2022, 53 (1): 50-54.

[3] Sun YH, Yan CQ, Jin SF, et al. Curative effect and mechanism of guiren runchang granules on morphine-induced slow transit constipation in mice [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 5493192.

[4] Bharucha AE, Lacy BE. Mechanisms, evaluation, and management of chronic constipation [J]. Gastroenterology, 2020, 158 (5): 1232-1249.

[5] 刘芳, 魏先鹏, 唐学贵. 枳实导滞丸加减治疗慢传输型便秘热积秘证的临床观察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26 (2): 92-97.

[6] 张莉莉, 仝小林, 赵林华, 等. 态靶结合辨治多囊卵巢综合征高雄激素血症 [J]. 世界中医药, 2021, 16 (22): 3372-3375.

[7] 李烁, 李敏, 安心怡, 等. 仝小林“态靶结合”辨治糖尿病视网膜病变经验 [J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48 (1): 24-26.

[8] 杨映映, 魏秀秀, 王天铭, 等. 仝小林“三期六态”高血压病辨治经验 [J]. 中华中医药志, 2020, 35 (6): 2949-2953.

[9] 何莉莎, 顾成娟, 王涵, 等. 态靶结合辨治代谢性高血压病 [J]. 中医杂志, 2019, 60 (16): 1423-1424, 1427.

[10] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 6, 145, 485.

[11] 程艳飞, 国大亮, 刘岩, 等. 星点设计-效应面法优化黄芩桑菊抗病毒颗粒的成型工艺 [J]. 中医药导报, 2017, 23 (11): 41-44.

[12] 陈娇, 余姣, 江敏瑜, 等. 基于多指标权重分析和正交设计法对三七跌打损伤膏提取工艺的探究 [J]. 中药材, 2017, 40 (2): 412-415.

[13] 兰太进, 常明, 李巧凤, 等. 基于 CRITIC 法计算权重系数的星点设计-效应面法优化雷公降压颗粒成型工艺的研究 [J]. 中药材, 2019, 42 (6): 1356-1359.

[14] 李晶晶, 吴亚超, 侯健, 等. 星点设计-效应面法优选参麦胶囊成型工艺 [J]. 现代中药研究与实践, 2019, 33 (2): 54-57, 66.

[15] 刘雅婷, 李会耘, 李明慧, 等. 星点设计-效应面试验优化复方竹茹植物固体饮料的处方 [J]. 湖北农业科学, 2021, 60 (1): 108-113.

[16] 王满, 汪露露, 陈雪晴, 等. 星点设计-效应面法优化复方肠泰颗粒成型工艺 [J]. 中成药, 2017, 39 (2): 420-423.

[17] 杜庆伟, 袁敏, 梁瑞雪. 星点设计-效应面法优选淋必通颗粒的成型工艺 [J]. 山东科学, 2020, 33 (4): 7-12.

(收稿日期: 2022-09-20; 修回日期: 2022-11-09)

基于 Box-Behnken 响应面法优化紫苏叶 挥发油提取工艺的研究

陶晓倩¹, 张强¹, 付慧敏¹, 张纯刚^{1, 2, 3*}, 程岚^{1*} (1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116620; 2. 长治医学院药学院, 山西 长治 046000; 3. 祈蒙股份有限公司, 内蒙古 赤峰 024330)

摘要: 目的 优化紫苏叶挥发油的提取工艺。方法 以料液比、浸泡时间、加热时间为考察因素, 紫苏叶挥发油提取率和紫苏醛含量为评价指标, 利用单因素试验及 Box-Behnken 响应面法优化紫苏叶挥发油的提取工艺。结果 优选的紫苏叶挥发油提取工艺: 前处理方法为剪碎, 料液比 1:17, 浸泡时间 0.70 h, 加热时间 2 h。该条件下得到紫苏叶挥发油提取率与紫苏醛含量均较高。结论 本研究通过响应面分析法将紫苏叶挥发油提取率与紫苏醛含量结合起来, 分析两个评价指标与多个考察因素间的回归关系, 选择出最优提取工艺, 为紫苏叶挥发油的进一步开发提供参考。

关键词: 响应面法; 水蒸气蒸馏; 紫苏叶; 挥发油; 紫苏醛; 提取工艺

中图分类号: R283 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)02-0369-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.014

Optimization of extraction of volatile oil from perillae folium based on Box-Behnken response surface methodology

TAO Xiao-qian¹, ZHANG Qiang¹, FU Hui-min¹, ZHANG Chun-gang^{1, 2, 3*}, CHENG Lan^{1*} (1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian Liaoning 116620; 2. Department of Pharmacy, Changzhi Medical College, Changzhi Shanxi 046000; 3. Qimeng Co., LTD, Chifeng Inner Mongolia 024330)

Abstract: Objective To optimize the extraction of volatile oil from perillae folium. **Methods** The solid-liquid ratio, soaking time and heating time were taken as factors, the extraction rate of volatile oil from perillae folium and perillaldehyde content as the evaluation indexes. The single factor experiment and Box-Behnken response surface methodology were used to optimize the extraction of volatile oil from perillae folium. **Results** The optimal extraction of volatile oil from perillae folium was as follows: the pre-treatment included cutting into pieces, with solid-liquid ratio at 1: 17, soaking time at 0.70 h, and the heating for 2 h. Under these conditions, the extraction rate of volatile oil and the content of perillaldehyde were higher. **Conclusion** The extraction rate of volatile oil and perillaldehyde content are combined by response surface analysis, and the regression between evaluation indexes and multiple factors is analyzed. The response surface and contour lines are studied to select the optimal extraction process, providing a reference for further development of volatile oil from perillae folium.

Key words: response surface methodology; steam distillation; perillae folium; volatile oil; perillaldehyde; extraction process

基金项目: 国家重点研发计划 (No.2018YFC1706903); 内蒙古自治区科技重大专项 (No.2021ZD0017); 辽宁省自然科学基金指导计划项目 (No.2019-ZD-0968); 中医脏象理论及应用国家教育部重点实验室一般项目 (No.zyx1809); 沈阳市中青年科技创新人才项目 (No.RC200204)。

作者简介: 陶晓倩, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药新剂型、新技术研究, email: taoxiaoqian1997@163.com ***通信作者:** 程岚, 女, 博士研究生导师, 教授, 主要从事中药新剂型、新技术及体内药物分析研究, email: sychenglan@163.com; 张纯刚, 男, 硕士研究生导师, 副教授, 主要从事中药新剂型、新技术及体内药物分析研究和保健食品开发研究, email: gaogaonii123@163.com

紫苏叶为唇形科植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 的干燥叶(或带嫩枝)^[1], 是我国的传统中药材, 是卫生部颁布的首批既是食品又是药品的 60 种中药之一^[2]。紫苏叶中含有丰富的挥发油, 主要包括紫苏酮、紫苏醛、紫苏烯、石竹烯、 α -法尼烯等 31 种成分, 可分为紫苏酮(PK)型、紫苏醛(PA)型、芳香族化合物(PP)型、香薷酮(EK)型、紫苏烯(PL)型五个化学型^[3], 其中以紫苏酮含量较多的 PK 型和以紫苏醛及柠檬烯含量较多的 PA 型为主流化学型^[4]。紫苏叶挥发油(以下简称紫苏叶油)具有多种生物活性, 包括抗氧化、抗菌、抗过敏、抗抑郁、抗炎、抗肿瘤、神经保护等^[5]。研究表明, 紫苏叶油中的紫苏醛是重要的活性成分, 具有治疗口咽念珠菌病的抗真菌作用^[6]; 治疗结肠炎小鼠模型的抗炎活性^[7]; 治疗与氧化应激有关疾病的潜在抗氧化作用^[8]等。

水蒸气蒸馏法是最经典、最常用的挥发油提取方法, 具有操作简单、设备要求不高、成本低廉、适合工业化生产等特点^[9], 多年来仍为挥发油提取的国标方法^[10]。紫苏醛作为紫苏叶油中重要的有效成分, 以其为评价指标优化紫苏叶油的提取工艺尚未见报道。本研究在单因素试验的基础上, 以紫苏叶油提取率与紫苏醛含量为评价指标, 以料液比、浸泡时间、加热时间为考察因素, 利用 Box-Behnken 响应面法优化紫苏叶油的提取工艺, 以期对紫苏叶的开发利用及深入研究提供参考。

1 材料

1.1 试药

紫苏叶购自安徽亳州药材市场, 经辽宁中医药大学许亮教授鉴定为唇形科紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 的干燥叶(或带嫩枝)。紫苏醛对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 111806-201806, 纯度: 95.7%), 甲醇(瑞典欧森巴克化学公司, 色谱纯), 甲醇(天津市科密欧化学试剂有限公司, 分析纯), 纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

1.2 仪器

LC-1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司, 包括四元泵, VWD 可变波长扫描紫外检测器, Chemstations 化学工作站), CP225D 十万分之一电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司], SG3300H 超声波清洗器(上海冠特超声仪器有限公司), TGL-16G 高速离心机(上海安亭科学仪器厂), DZTW 调温电热套(北京市永光明医疗仪器有限公

司), 高速多功能粉碎机(永康市铂欧五金制品有限公司), 挥发油提取器(太原三益生物有限公司)。

2 方法与结果

2.1 紫苏叶油提取

参考《中国药典》2020 年版(四部)通则 2204 挥发油测定法^[11], 取剪碎的紫苏叶适量, 置于烧瓶中, 加水适量, 摇匀混合后, 浸泡一定时间, 连接挥发油测定器与回流冷凝管。自冷凝管上端加水, 使充满挥发油测定器的刻度部分并溢流入烧瓶时为止。置电热套中缓缓加热至沸, 从冷凝管中回流下第一滴水水混合物时开始计时, 保持微沸, 一定时间后停止加热, 放置 1 h, 吸取油层, $12\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 吸取油层, 减重法得紫苏叶油质量($m_{\text{油}}$), 其与紫苏叶的质量($m_{\text{叶}}$)百分比即为紫苏叶油提取率($m_{\text{紫苏叶油}}$)。

$$m_{\text{紫苏叶油}}(\%) = m_{\text{油}}/m_{\text{叶}} \times 100\%$$

2.2 紫苏醛含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: ChromCore AR C18 (4.6 mm×150 mm, 5 μm); 预柱: Phenomenex C18 (2.0 mm×4.0 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(75:25, V/V); 流速: $1\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测器: 紫外检测器; 检测波长: 230 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL 。

2.2.2 对照品溶液制备 精密称量 4.70 mg 紫苏醛对照品于 10 mL 量瓶中, 加适量甲醇, 超声 10 min, 放至室温, 定容后摇匀, 得 $450\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的紫苏醛对照品储备液。准确移取 0.2 mL 紫苏醛对照品储备液于 100 mL 量瓶中, 甲醇定容, 即得 $0.90\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 紫苏醛对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液制备 精密称量 5.00 mg 紫苏叶油于 10 mL 量瓶中, 加适量甲醇, 超声 10 min, 放至室温, 定容后摇匀。准确移取 1 mL 至 10 mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 过 0.2 μm 有机滤膜, 供高效液相色谱分析用。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取 1 mL 紫苏醛对照品储备液于 10 mL 量瓶中, 甲醇定容, 得 $45\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的紫苏醛对照品溶液。采用逐级稀释的方法, 将上述紫苏醛对照品溶液稀释成各质量浓度为 0.11、0.23、0.45、0.90、2.25、4.50、11.25、22.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准系列溶液。进样测定紫苏醛含量, 以对照品紫苏醛的质量浓度 X ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和峰面积 Y 绘制回归曲线, 得回归方程 $Y = 86.62X - 6.437$ ($R^2 = 0.9999$), 表明紫苏醛在 0.11 ~ 22.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好。

2.2.5 专属性试验 分别取甲醇(阴性样品)、紫

苏醛对照品溶液及紫苏叶油供试品溶液，进样测定，色谱图见图 1。紫苏醛色谱峰与其他组分峰可达基线分离，紫苏叶油供试品与紫苏醛对照品

在相同时间点出现同一色谱峰，阴性对照品无干扰，紫苏醛保留时间为 5.241min。

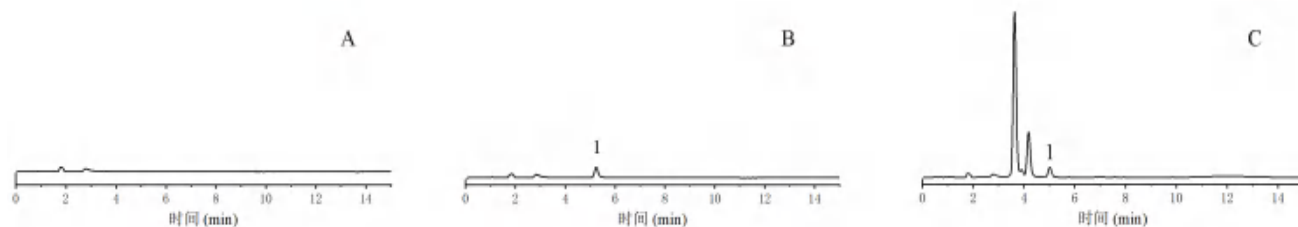


图 1 阴性样品 (A)、紫苏醛对照品 (B) 及紫苏叶油供试品 (C) 的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of negative sample (A), perillaldehyde control substance (B) and volatile oil from perillae folium test sample (C)

1. 紫苏醛 (perillaldehyde)

2.2.6 精密度试验 取同一紫苏叶油供试品溶液，连续进样测定 6 次，记录紫苏醛峰面积，计算紫苏醛含量分别为 1.9%、1.6%、1.6%、1.6%、1.6%、1.6%， $RSD < 2\%$ ($n = 6$)，表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验 取同一批号的紫苏叶，按“2.1”项下紫苏叶油提取方法提取紫苏叶油样品 6 份，按“2.2.3”项下方法制备紫苏油供试品溶液，进样测定，记录紫苏醛峰面积，计算紫苏醛含量分别为 1.6%、1.6%、1.6%、1.6%、1.6%、1.6%， $RSD < 1\%$ ($n = 6$)，表明方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 同一紫苏叶油供试品溶液，在 0、2、4、6、8、12、24 h 按“2.2.1”项下色谱方法进样测定，记录紫苏醛峰面积，计算紫苏油中紫苏醛的含量分别为 1.7%、1.6%、1.6%、1.7%、1.7%、1.6%、1.7%， $RSD < 2\%$ ，表明紫苏油供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.9 加样回收试验 向 6 份 1 mL 已知浓度的紫苏叶油样品溶液中分别加入 1 mL 相同浓度的紫苏醛对照品溶液，进样测定，计算加样回收率，测得平均加样回收率为 99.42%， $RSD < 2\%$ 。表明测定方法符合要求。

2.2.10 紫苏叶油中紫苏醛含量测定 精密称量紫苏叶油适量，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，采用外标一点法计算紫苏醛含量。

$$m_{\text{紫苏醛}} (\%) = A_2 C_1 / A_1 C_2 \times 100\%$$

其中， $m_{\text{紫苏醛}}$ 为紫苏叶油中紫苏醛的含量， A_1 为紫苏醛对照品的峰面积， A_2 为紫苏叶油供试品的峰面积， C_1 为紫苏醛对照品浓度， C_2 为紫苏叶油浓度。

2.3 数据处理

采用 Origin 2019b 作图，Design-Expert 8.0.6 进行响应面分析，GraphPad Prism 9 进行统计学

分析， $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2.4 单因素试验

2.4.1 紫苏叶前处理方式 以紫苏叶粉碎与剪碎两种前处理方式处理紫苏叶。取适量紫苏叶，分别粉碎过 60 目筛、剪碎，以料液比 (g/mL) 为 1 : 20 加水，浸泡 0.75 h，加热 3 h，进样测定，比较紫苏叶油提取率及紫苏醛含量。

由图 2 可知，当其他试验条件相同时，紫苏叶经粉碎后挥发油含量明显降低，可能是由于粉碎过程中粉碎机运作时的产热作用，导致紫苏叶油的挥发，使紫苏叶油的含量明显降低；而剪碎与粉碎得到的紫苏醛含量相差不大，故选择前处理方式为剪碎。

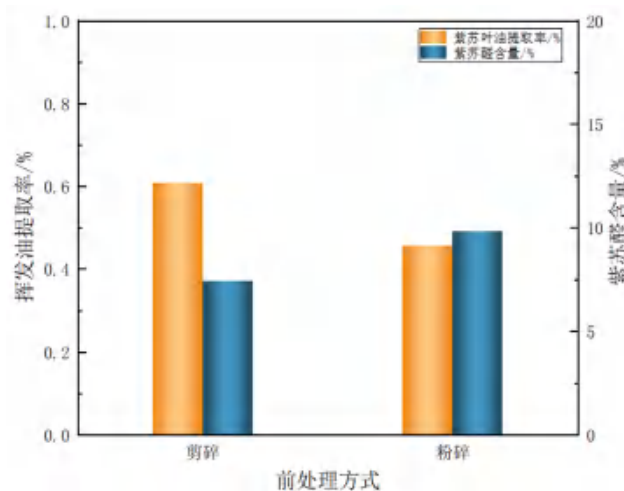


图 2 前处理方式对紫苏叶油提取率及紫苏醛含量的影响

Fig 2 Effect of pretreatment on the extraction yield of volatile oil from perillae folium and perillaldehyde content

2.4.2 料液比 取适量紫苏叶，剪碎，分别以料液比 1 : 10、1 : 12、1 : 15、1 : 20、1 : 25 加水，浸泡 0.75 h，加热 3 h，进样测定，比较紫苏叶油提取率及紫苏醛含量。

随着加水量的增加，紫苏叶油提取率与紫苏醛含量均显著增加，当料液比为 1 : 20 时，紫苏叶油

提取率达到最高 (0.607%)，而当料液比为 1 : 12 时紫苏醛含量达到最大 (10.332%)，之后紫苏叶油提取率与紫苏醛含量均随加水量的增加而显著降低。当加水量增大时，有利于紫苏叶油及紫苏醛在水蒸气中的扩散和溶解；但是当加水量过大时，加热时间相对延长，相同加热时间内生成的紫苏叶油及紫苏醛含量减少，且易造成资源浪费。因此选择料液比 1 : 12、1 : 16、1 : 20 三个水平进行响应面优化。

2.4.3 浸泡时间 取适量紫苏叶，剪碎，以料液比 1 : 20 加水，分别浸泡 0、0.5、0.75、1、2 h，加热 3 h，进样测定，比较紫苏叶油提取率及紫苏醛含量。

随着浸泡时间的增加紫苏叶油提取率显著升高，当浸泡时间达到 0.75 h 时，紫苏叶油提取率达到最大值 (0.607%)。而紫苏醛含量随浸泡时间的增加呈显著下降趋势，综合选择 0.5、0.75、1 h 进行响应面优化。

2.4.4 加热时间 取适量紫苏叶，剪碎，以料液比 1 : 20 加水，浸泡 0.75 h，加热 1、1.5、2、3、4 h，进样测定，比较紫苏叶油提取率及紫苏醛含量。

随着加热时间的增加紫苏叶油提取率显著升高，当加热时间达到 3 h 时，紫苏叶油提取率达到最大值。随着加热时间的增加紫苏醛含量下降，综合考虑选择加热 2、3、4 h 进行响应面试验考察。

2.5 响应面优化试验设计

2.5.1 响应面试验设计及结果 根据 Design-Expert 8.0.6 软件的 Box-Behnken 试验设计原理，综合单因素影响试验结果，以料液比 (A)、浸泡时间 (B)、加热时间 (C) 为考察因素，进行三因素三水平试验，因素与水平设计见表 1。

表 1 Box-Behnken 设计因素与水平表
Tab 1 Factor and level of Box-Behnken design

水平	因素		
	A. 料液比 / (g/mL)	B. 浸泡时间 /h	C. 加热时间 /h
- 1	1 : 12	0.5	2
0	1 : 16	0.75	3
1	1 : 20	1	4

根据 Design-Expert 8.0.6 软件设计条件进行试验，测定不同条件下紫苏叶油的提取率及紫苏醛含量，试验设计及结果见表 2。

2.5.2 回归模型的建立和方差分析 以紫苏叶油提取率为响应值，利用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 2 中的试验结果进行分析，得到紫苏叶油提取率的多元二次回归方程为 $R = 0.51 + 0.048A + 0.033B + 0.038C - 6.725 \times 10^{-3}AB -$

表 2 响应面试验设计及结果

Tab 2 Response surface test design and results

序号	A. 料液比 / (g/mL)	B. 浸泡时间 /h	C. 加热时间 /h	紫苏叶油提取率 /%	紫苏醛含量 /%
1	1 : 12	0.5	3	0.339	8.486
2	1 : 20	0.5	3	0.473	8.799
3	1 : 12	1	3	0.416	8.154
4	1 : 20	1	3	0.524	7.319
5	1 : 12	0.75	2	0.365	9.388
6	1 : 20	0.75	2	0.485	9.370
7	1 : 12	0.75	4	0.482	7.500
8	1 : 20	0.75	4	0.506	7.326
9	1 : 16	0.5	2	0.398	11.817
10	1 : 16	1	2	0.471	10.370
11	1 : 16	0.5	4	0.487	9.358
12	1 : 16	1	4	0.553	8.842
13	1 : 16	0.75	3	0.491	9.193
14	1 : 16	0.75	3	0.502	9.407
15	1 : 16	0.75	3	0.531	10.112
16	1 : 16	0.75	3	0.512	9.633
17	1 : 16	0.75	3	0.524	9.365

$0.0244C - 1.750 \times 10^{-3}BC - 0.046A^2 - 0.028B^2 - 6.902 \times 10^{-3}C^2$ 。由表 3 回归模型方差分析表可知，一次项 A、B、C 和二次项 A^2 对提取得到的紫苏叶油提取率影响极显著，交互项 AC 和二次项 B^2 对提取得到的紫苏叶油提取率影响显著，其他因素影响不显著。影响紫苏叶油提取率的因素顺序为：A > C > B，即料液比 > 加热时间 > 浸泡时间。此模型的 $P = 0.0005$ ，响应面回归模型达到了显著水平 ($P < 0.01$)，失拟项 ($P = 0.2985 > 0.05$) 不显著，变异系数 3.93% ($< 10%$)，说明非试验因素对结果影响不大，模型具有较好的试验稳定性。模型相关系数 R^2 为 0.9578，说明实际试验中约 95.78% 的结果可以通过拟合模型进行解释，拟合效果较好，试验误差较小。校正后的决定系数 R^2_{Adj} 为 0.9035，说明该模型能解释响应值变化的 90.35%，因此该方程能很好地预测和解释紫苏叶油提取率随各个影响因素变化的规律。

以紫苏醛含量为响应值，利用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 2 中的试验结果进行分析，得到紫苏醛含量的多元二次回归方程为 $R = 9.54 - 0.089A - 0.47B - 0.99C - 0.29AB - 0.039AC + 0.23BC - 1.53A^2 + 0.17B^2 + 0.38C^2$ 。由表 4 回归模型方差分析表可知，一次项 B、C 和二次项 A^2 对提取得到的紫苏醛含量影响极显著，二次项 C^2 对提取得到的紫苏醛含量影响显著，其他因素影响不显著。影响紫苏醛含量的因素顺序为：C > B > A，即加热时

表 3 回归模型方差分析

Tab 3 Variance analysis for the regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.055	9	6.13E-03	17.65	0.0005
A	0.019	1	0.019	53.54	0.0002
B	8.93×10^3	1	8.93×10^3	25.71	0.0014
C	0.012	1	0.012	34.1	0.0006
AB	1.81×10^4	1	1.81×10^4	0.52	0.4939
AC	2.28×10^3	1	2.28×10^3	6.55	0.0376
BC	1.23×10^5	1	1.23×10^5	0.035	0.8564
A ²	8.88×10^3	1	8.88×10^3	25.57	0.0015
B ²	3.34×10^3	1	3.34×10^3	9.62	0.0173
C ²	2.01×10^4	1	2.01×10^4	0.58	0.4721
残差	2.43×10^3	7	3.47×10^4		
失拟项	1.37×10^3	3	4.58×10^4	1.73	0.2985
纯误差	1.06×10^3	4	2.65×10^4		
总和	0.058	16			

间>浸泡时间>料液比。此模型的 $P < 0.0001$ ，响应面回归模型达到了极显著水平 ($P < 0.01$)，失拟项 ($P = 0.9858 > 0.05$) 不显著，变异系数 3.01% ($< 10\%$)，说明非试验因素对结果影响不大，模型具有较好的试验稳定性。模型相关系数 R^2 为 0.9751，说明实际试验中约 97.51% 的结果可以通过拟合模型进行解释，拟合效果较好，试验误差较小。校正后的决定系数 R^2_{Adj} 为 0.9432，说明该模型能解释响应值变化的 94.32%，因此该方程能很好地预测和解释紫苏醛含量随各个影响因素变化的规律。

2.5.3 Box-Behnken 响应面分析交互作用 在回归模型方差分析结果的基础上，采用 Design-Expert 8.0.6 软件依据回归方程绘制等高线图及响应面图，分析料液比、浸泡时间、加热时间对紫苏叶油提取率的影响，结果见图 3。等高线图与响应面图能直观反应交互作用对响应值的影响程度，曲面越陡，等高线越密集，表示影响越显著^[12-15]。由图 3 可知，紫苏叶油提取率随料液比、浸泡时间和加热时间的升高变化幅度不同，但均呈现先增大后降低的变化趋势。料液比与加热时间的响应面曲线较弯曲且等高线呈椭圆形，表明料液比与加热时间的交互作用对紫苏叶油提取率的影响显著 ($P > 0.05$)，料液比与浸泡时间的交互作用对紫苏叶油提取率的影响次之，浸泡时间与加热时间等高线趋于圆形，表明两者的交互作用对紫苏叶油的提取率影响最小。

根据表 4，在回归模型方差分析结果的基础上，固定料液比、浸泡时间、提取时间 3 个因素中的其中一个因素，其他两个因素间的交互作用对紫苏醛含量的影响可通过绘制等高线图与响应面图来

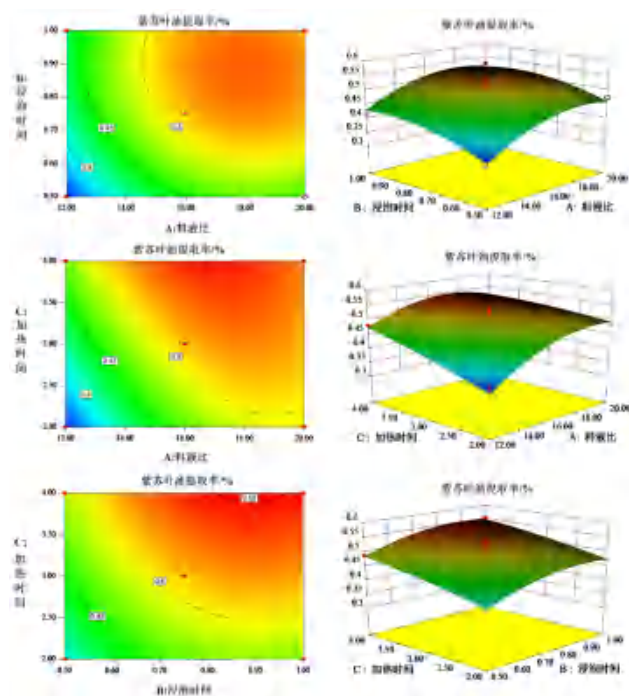


图 3 各因素交互作用对紫苏叶油提取率的影响

Fig 3 Effect of interaction of various factors on extraction yield of volatile oil from perillae folium

表示，结果见图 4。料液比与浸泡时间的交互作用对紫苏醛含量的影响最大，浸泡时间与加热时间的交互作用对紫苏醛含量的影响次之，料液比与加热时间的交互作用对紫苏醛含量的影响最小，但其交互作用对紫苏醛含量的影响均不显著。

表 4 回归模型方差分析

Tab 4 Variance analysis for the regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	20.48	9	2.28	30.51	< 0.0001
A	0.064	1	0.064	0.85	0.386
B	1.78	1	1.78	23.89	0.0018
C	7.84	1	7.84	105.11	< 0.0001
AB	0.33	1	0.33	4.41	0.0738
AC	6.11×10^3	1	6.11×10^3	0.082	0.7831
BC	0.22	1	0.22	2.9	0.1325
A ²	9.81	1	9.81	131.55	< 0.0001
B ²	0.13	1	0.13	1.71	0.2323
C ²	0.61	1	0.61	8.17	0.0244
残差	0.52	7	0.075		
失拟项	0.017	3	5.60×10^3	0.044	0.9858
纯误差	0.51	4	0.13		
总和	21	16			

2.6 优化工艺及验证试验

根据响应面分析软件得到紫苏叶油提取的理论最佳工艺条件为：料液比 1 : 17.12，浸泡时间 0.68 h，加热时间 2 h。且在此条件下预测的紫苏叶油提

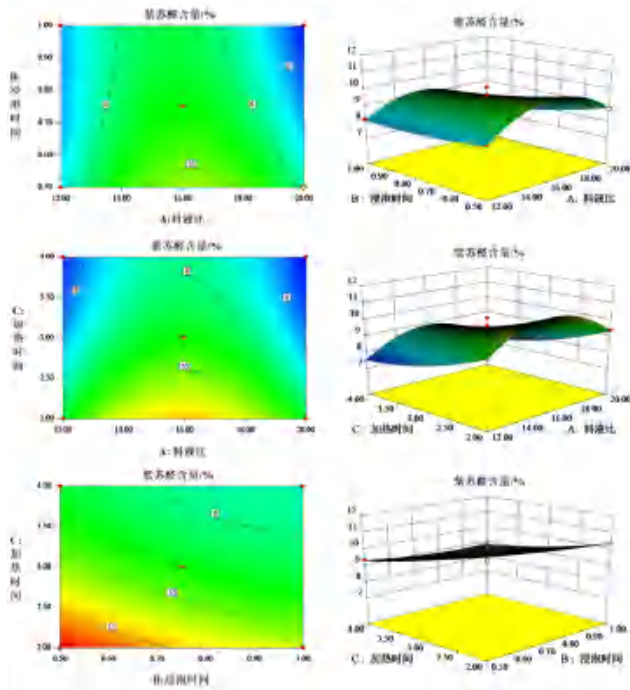


图 4 各因素交互作用对紫苏醛含量的影响
Fig 4 Effects of interaction of various factors on perillaldehyde content

取率为 0.473%，紫苏醛含量为 11%。结合试验条件及实际操作的可能性，确定最佳工艺条件为：料液比 1 : 17，浸泡时间 0.70 h，加热时间 2 h。在此条件下重复 3 次试验，得到紫苏叶油平均提取率为 0.468%，紫苏醛平均含量为 10.65%。与预测值基本一致，表明该提取条件可靠，能较好地预测与分析紫苏叶油的提取工艺，具有实际应用价值。

3 结论

紫苏叶油的市场潜力巨大，可作为应用于香水中的天然香料，作为芳香疗法中的芳香药物，作为食物中的调味剂和防腐剂，作为调理人体机能的保健品，作为治疗人类疾病的新型消炎抗菌药物、抗肿瘤药物、抗抑郁药物等^[10]。本研究建立了有效测定紫苏叶油中紫苏醛含量的高效液相色谱方法，并在单因素试验的基础上利用 Box-Behnken 响应面法对紫苏叶油的提取工艺进行了优化，得到了紫苏叶油提取率与紫苏醛含量的两个多元二次回归模型，回归模型拟合好，能很好地预测与分析紫苏叶油的提取工艺。

本研究采用紫苏叶油提取率与紫苏醛含量两个指标优化紫苏叶油的提取工艺，相较于单一地使用其中任意一个指标具有显著优势，为获得较

高的紫苏叶油与紫苏醛的工业化生产提供理论与技术支持，为紫苏叶油的深入研究提供较优的工艺参数，为紫苏叶的质量控制标准提供参考。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020: 354.
- [2] 金建忠 . 超临界 CO₂ 萃取紫苏叶挥发油的工艺优化 [J]. 食品科学, 2011, 32 (6): 124-126.
- [3] 魏长玲, 郭宝林, 张琛武, 等 . 中国紫苏资源调查和紫苏叶油化学型研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41 (10): 1823-1834.
- [4] 魏长玲, 郭宝林 . 紫苏叶挥发油的不同化学型及研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40 (15): 2937-2944.
- [5] Ahmed HM. Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological investigations of *Perilla frutescens* (L.) Britt [J]. Molecules, 2018, 24 (1): 102.
- [6] Chen L, Qu S, Yang K, et al. Perillaldehyde: a promising antifungal agent to treat oropharyngeal candidiasis [J]. Biochem Pharmacol, 2020, 180: 114201.
- [7] Uemura T, Yashiro T, Oda R, et al. Intestinal anti-inflammatory activity of perillaldehyde [J]. J Agric Food Chem, 2018, 66 (13): 3443-3448.
- [8] Fuyuno Y, Uchi H, Yasumatsu M, et al. Perillaldehyde inhibits AHR Signaling and activates NRF2 antioxidant pathway in human keratinocytes [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 9524657.
- [9] 郑红富, 廖圣良, 范国荣, 等 . 水蒸气蒸馏提取芳樟精油及其抑菌活性研究 [J]. 林产化学与工业, 2019, 39 (3): 108-114.
- [10] 钟萍, 汪镇朝, 刘英孟, 等 . 紫苏叶挥发油化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27 (13): 215-225.
- [11] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020: 233.
- [12] Zhang RB, Liu T, Zhang YM, et al. Preparation of spent fluid catalytic cracking catalyst-metakaolin based geopolymers and its process optimization through response surface method [J]. Constr Build Mater, 2020, 264: 120727.
- [13] Omranian SR, Hamzahm O, Yee TS, et al. Effects of short-term ageing scenarios on asphalt mixtures' fracture properties using imaging technique and response surface method [J]. Int J Pavement Eng, 2020, 21 (11): 1374-1392.
- [14] 付慧敏, 乔子桐, 张纯刚, 等 . 响应面法优化改性明胶软胶囊囊壳制备工艺 [J]. 中南药学, 2022, 20 (4): 793-799.
- [15] 李琪, 张慧, 安超, 等 . 响应面法优化苦瓜甙的提取工艺及其 HPLC 测定 [J]. 安徽农业大学学报, 2022, 49 (1): 175-180.

(收稿日期: 2022-03-04; 修回日期: 2022-05-06)

磷霉素氨基葡萄糖盐 β -CD 包合物的制备与研究

张尹萌¹, 马强¹, 金学平^{2, 3}, 祝宏^{1*} (1. 武汉工程大学化工与制药学院 新型反应器与绿色化学工艺湖北省重点实验室, 武汉 430205; 2. 武汉软件工程职业学院, 武汉 430205; 3. 武汉市药物增溶工程技术研究中心, 武汉 430205)

摘要: 目的 制备磷霉素氨基葡萄糖盐 (FA)- β -环糊精 (β -CD) 包合物, 解决磷霉素氨基葡萄糖盐高温不稳定、引湿性强的问题。方法 采用冷冻干燥法制备 FA- β -CD 包合物, 以包合率和收率为评价指标, 单因素考察投料质量比、包合时间、包合温度对包合效果的影响; 通过红外光谱分析、X-射线衍射法对 FA- β -CD 包合物进行鉴定; 对 FA、FA- β -CD 包合物以及 β -CD 进行抗菌活性测试; 对 FA 和 FA- β -CD 包合物及其溶液在不同温度下进行稳定性考察。结果 冷冻干燥法制备 FA- β -CD 包合物的最佳工艺为 $m(\beta\text{-CD}) : m(\text{FA}) = 1.25 : 1$, 包合时间为 2 h, 包合温度为 20 °C; 抗菌活性测试和稳定性考察结果均表明 β -CD 能够较好的保护 FA。结论 冷冻干燥法可以成功制备 FA- β -CD 包合物, 并能提高 FA 的稳定性。

关键词: β -CD; 磷霉素氨基葡萄糖盐; 包合物; 工艺优化

中图分类号: R944

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0375-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.015

Preparation and study of fosfomycin glucosamine salt β -CD inclusion complex

ZHANG Yin-meng¹, MA Qiang¹, JIN Xue-ping^{2, 3}, ZHU Hong^{1*} (1. School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Hubei Key Laboratory of Novel Reactor and Green Chemical Technology, Wuhan 430205; 2. Wuhan Vocational College of Software and Engineering, Wuhan 430205; 3. Wuhan Research Center for Drug Solubilization and Delivery Technology, Wuhan 430205)

Abstract: Objective To prepare fosfomycin glucosamine salt (FA)- β -cyclodextrin (β -CD) inclusion complex, and to solve the problems of instability in high temperature and strong hygroscopicity of fosfomycin glucosamine salt. **Methods** The FA- β -CD inclusion complex was prepared by freeze-drying method, and the inclusion rate and yield were used as evaluation indicators. The inclusion complex was identified by infrared spectroscopy and X-ray diffraction; the antibacterial activity of FA, FA- β -CD inclusion complex and β -CD were tested; the stability of FA and FA- β -CD inclusion complexes was tested at different temperatures, and the changes in the antibacterial activity of the inclusion complex solutions were also measured. **Results** The optimal process for preparing FA- β -CD inclusion complex by freeze-drying method was $m(\beta\text{-CD}) : m(\text{FA}) = 1.25 : 1$, the inclusion time was 2 h, and the inclusion temperature was 20 °C. The stability test showed that β -CD protected FA well. **Conclusion** Freeze-drying method can successfully prepare FA- β -CD inclusion complex, and improve the stability of FA.

Key words: β -CD; fosfomycin glucosamine salt; inclusion complex; process optimization

1969 年, 磷霉素从链霉菌中分离得到, 在临床上应用广泛, 其作用机制是通过干扰细菌细胞壁的合成, 从而达到抑菌效果, 对多数革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌至今仍保持着较高的抗菌活

性^[1-2]。但磷霉素中的环氧基团在强酸、高温等条件下容易开环, 结构不稳定, 通常以盐的形式存在, 从而获得较高的稳定性^[3], 如磷霉素钙及磷霉素钠。因此, 本课题组选用天然的 D-氨基葡

作者简介: 张尹萌, 女, 硕士研究生, 主要从事药物制剂研究, email: 402406495@qq.com *通信作者: 祝宏, 男, 教授, 主要从事新药研究与开发, email: 1147421599@qq.com

葡萄糖, 利用拼合原理与磷霉素拼合在一起得到了磷霉素氨基葡萄糖盐 (FA), 并在先前研究中对进行了结构鉴定和初步活性测试^[4]。

目前, 市面上常用的磷霉素钙和磷霉素钠分别以口服和注射方式给药, 会不可避免地出现首过效应和不良反应, 而在治疗呼吸道感染时若直接选用安全性高的抗菌药物经肺给药则能更好避免以上问题^[5]。 β -环糊精 (β -cyclodextrins, β -CD) 是一种对人体无害, 性质稳定且常用的药用辅料。其内部的疏水性结构使其具有使包含的各种各样的化合物进入空腔内的能力, 通过主客体相互作用与药物形成包合物, 用以增加药物溶解度和稳定性, 控制药物的释放^[6-7]。为更好地解决 FA 中的环氧键在高温下易发生开环反应和引湿性强等问题, 本研究采用冷冻干燥法制备 FA- β -CD 包合物, 并对所制备的包合物进行表征, 探究最佳包合工艺, 同时对其进行抗菌活性及稳定性考察, 为后续磷霉素类药物肺部给药制剂研究做准备。

1 材料

1.1 仪器

MS105DU 电子分析天平 [梅特勒-托利多国际贸易 (上海) 有限公司]; DZG-303A 超纯水机 (上海富诗特仪器设备有限公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 (上海越众仪器股份有限公司); PHS-25 pH 计 (上海仪电科学仪器股份有限公司); ZLGJ-10 冷冻干燥机 (河北盈盛仪器有限公司); WQF-510A 傅里叶红外光谱仪 (安捷伦科技股份有限公司); BrukerAXS D8 Advance X 射线光电子能谱仪 (德国布鲁克公司); SDH-150 型恒温恒湿箱 (上海佐诚实验仪器有限公司)。

1.2 试药

FA (实验室自制); β -CD、盐酸、氢氧化钠 (国药集团化学试剂有限公司, 分析纯); 磷霉素钙 (武汉五景药业有限公司, 批号: 20180715, 纯度 $\geq 98\%$); 其余试剂均为分析纯, 水为实验室自制纯化水。

2 方法与结果

2.1 药物含量的测定

现行的药物质量标准采用微生物检定法测定磷霉素含量, 操作复杂, 结果易受操作者主观影响^[8]。磷霉素在大于 220 nm 处无紫外吸收, 无法利用紫外分光光度计直接测定 FA 含量; HPLC-ELSD 法能同时测定磷霉素及相关杂质含量, 但耐用性差, 结果难以重现。因此, 本研究参考《中国药典》方法, 通过电位滴定测定样品

溶液中磷酸基团的含量进而换算出药物中磷霉素的含量^[9]。

2.1.1 电位滴定测定 FA 含量 取一定量的 FA, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶解, 加入搅拌磁子进行电磁搅拌, 用标定过的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液缓慢滴定, 记录待测液 pH 和电位的变化, 直至出现第二次突跃, pH 约为 11.5 时可停止滴定。另取空烧杯, 加入 10 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸进行空白对照滴定实验。通过二阶微商计算突跃时消耗 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液体积, 并根据以下公式计算 FA 含药量。

$$W = (V - V_1) \times C \times M \times 10^{-3} / 2m \times 100\%$$

式中, V 为滴定 FA 时消耗氢氧化钠溶液的体积 (mL), V_1 为空白试验中消耗氢氧化钠溶液的体积 (mL), C 为氢氧化钠标定后的浓度 ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), m 为称取 FA 的量 (g), M 为磷霉素的相对分子质量 $138.06 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

2.1.2 包合物包合率和收率测定 取包合物 0.1 g, 按“2.1.1”项下方法进行电位滴定计算包合率, 另采用称重法计算收率, 计算公式如下所示。

收率 (%) = (所得的包合物的质量) / (FA 和 β -CD 总质量) $\times 100\%$

包合率 (%) = (包合物中的含药量) / (FA 中的含药量) $\times 100\%$

2.2 FA- β -CD 包合物的制备

经过预实验, 选用 β -CD 作为 FA 的包合材料, 采用冷冻干燥法制备包合物。取 β -CD 1 g, 溶解于适量纯化水中, 在 30°C 下恒温搅拌 2 h, 配制成 β -CD 饱和溶液。待溶液澄清后加入 1 g FA, 继续在该温度下搅拌包合 1 h, 待冷却至室温后, 放入冰箱预冻 24 h, 再进行冷冻干燥脱水, 得 FA- β -CD 包合物。另外, 按照质量比 1:1, 分别称取适量的 β -CD 和 FA, 置于研钵中研磨混匀, 制备 FA 和 β -CD 物理混合物。

2.3 包合物制备的工艺优化

2.3.1 质量比对包合率和收率的影响 一般来说, 在包合物制备过程中, 主客体分子比例越高, β -CD 所提供的分子腔数量也就越多, 药物分子也更容易进入空腔被包合^[10]。根据“2.2”项下方法制备, 保持水浴温度为 30°C 、包合时间为 1 h 不变, 考察 $m(\beta\text{-CD}) : m(\text{FA}) = 0.75 : 1$ 、 $1 : 1$ 、 $1.25 : 1$ 、 $1.5 : 1$ 、 $1.75 : 1$ 对 FA 的包合率和收率的影响。结果如图 1 所示, 以冷冻干燥法制备 FA- β -CD 包合物时, 包合率随着主客体质量比的增加呈现先升后降的趋势。当主客体质量比

为 0.75 : 1 时, 主分子 β -CD 提供的空腔不足以让客分子 FA 充分进入; 当 $m(\beta\text{-CD}) : m(\text{FA})$ 为 1.25 : 1 时, 包合率最高, 达到 89.44%; 此后继续增加 β -CD 的用量也无法提高 FA 的包合率。由图 1 还可得知, FA- β -CD 包合物的收率受主客比影响不大, 但随着主客比的增大, β -CD 用量增加, 在影响包合率的同时, 成本也增加。因此, $m(\beta\text{-CD}) : m(\text{FA}) = 1.25 : 1$ 为最佳质量比。

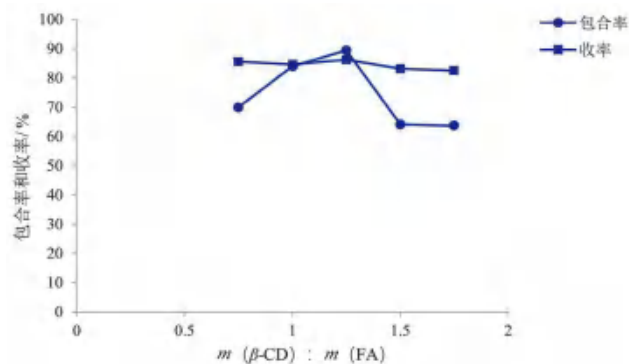


图 1 $m(\beta\text{-CD}) : m(\text{FA})$ 对包合率和收率的影响
Fig 1 Influence of $m(\beta\text{-CD}) : m(\text{FA})$ on the inclusion rate and yield

2.3.2 包合时间对包合率和收率的影响 在 $m(\beta\text{-CD}) : m(\text{FA})$ 为 1.25 : 1, 包合温度为 30 °C 的条件下, 考察包合时间 1、2、3、4、5 h 时对 FA 的包合率和收率的影响。结果如图 2 所示。随着包合时间的延长, FA 的包合率和收率均呈现先升后降的趋势, 当包合时间为 2 h 时, β -CD 对 FA 的包合率和收率达到最高, 分别为 92.30% 和 89.34%; 继续增加包合时间, 包合率和收率不增反降, 这可能是因为当包合时间达到 2 h, FA 进入 β -CD 空腔的速度与从空腔中脱离的速度达到平衡, 因此, 继续增加包合时间, 包合率也无法上升。而且, 随着包合时间的延长, 研究的时间成本增加, 最后选择 2 h 为最佳包合时间。

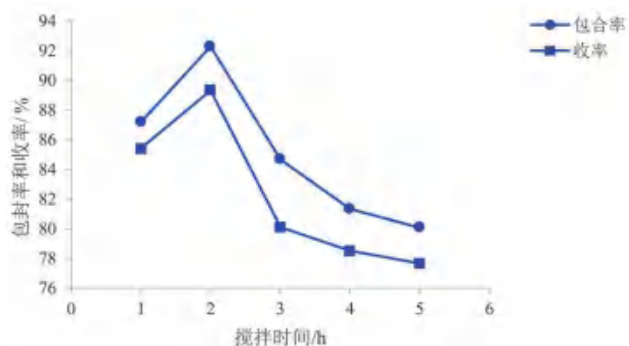


图 2 包合时间对包合率和收率的影响
Fig 2 Influence of inclusion time on the inclusion rate and yield

2.3.3 包合温度对包合率和收率的影响 温度也影响着包合效果, 在 $m(\beta\text{-CD}) : m(\text{FA})$ 为

1.25 : 1, 包合时间为 2 h 时, 考察包合温度在 20、25、30、35、40 °C 时对 FA 的包合率及收率的影响。由图 3 可知, 随着包合温度升高, FA 的包合率逐渐降低, 当包合温度为 20 °C 时包合率最大, 为 90.35%。

因此, FA- β -CD 包合物的最佳制备工艺为 $m(\beta\text{-CD}) : m(\text{FA}) = 1.25 : 1$, 包合时间为 2 h, 包合温度为 20 °C。

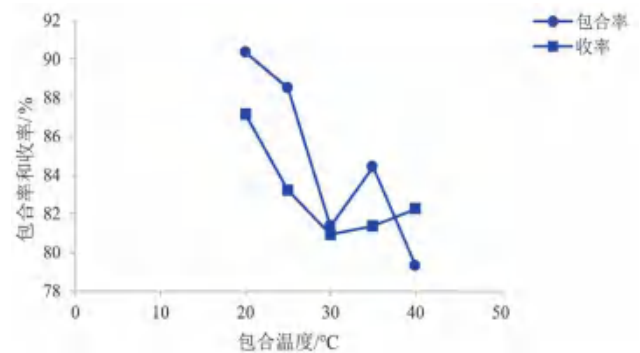


图 3 包合温度对包合率和收率的影响
Fig 3 Influence of inclusion temperature on the inclusion rate and yield

2.4 包合物的鉴定

FA 经过 β -CD 包合后, 需要对得到的包合物进行鉴定, 常用的鉴定方法有以下几种: 电镜法、红外光谱法 (IR)、X 射线衍射法 (XRD) 以及薄层色谱法 (TLC) 等^[11]。本实验运用 IR 和 XRD 两种方法对 FA- β -CD 包合物进行鉴定。

2.4.1 IR 本研究使用傅里叶变换红外光谱仪, 采用溴化钾压片制样, 分别测定 β -CD、FA、FA- β -CD 包合物及 FA 和 β -CD 的 1 : 1 物理混合物的红外光谱。结果见图 4, FA 的红外光谱在 3300 cm^{-1} 左右出现分子间氢键 O-H 伸缩振动, 属于氨基葡萄糖分子上的羟基缔合形成的宽吸收峰, 在与磷霉素反应生成 FA 后, 在 1600 cm^{-1} 到 1750 cm^{-1} 处出现多个 N-H 的特征吸收峰。FA- β -CD 包合物的红外图谱与 β -CD 的红外图谱相似, 在 1600 ~ 1750 cm^{-1} 是一个宽峰, 这是与 FA 及两者的物理混合物是明显能区别开的, 初步说明 FA 成功包合进入 β -CD 的空腔内。

2.4.2 粉末 XRD 分别将 FA、 β -CD、FA 和 β -CD 的 1 : 1 物理混合物以及 FA- β -CD 包合物这 4 种样品进行粉末 XRD 分析, 扫描速度为 2θ , 角度为 5° 到 50°。从图 5 扫描结果可以发现, FA 的粉末衍射图有清晰且尖锐的晶体衍射峰, 说明其具有明显的晶体结构。而 β -CD 几乎没有峰, 说明其为无定型粉末。两者的物理混合物中几乎所有的特征峰都存在, 而 FA- β -CD 包合物的晶体

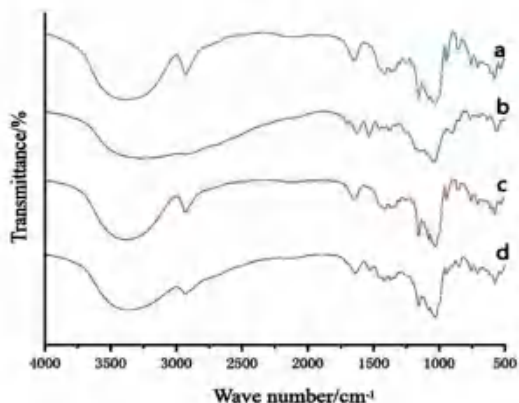


图 4 样品的 IR 图谱

Fig 4 Infrared spectroscopy pattern of the samples

a. β -CD; b. FA; c. FA- β -CD 包合物 (FA- β -CD inclusion complex); d. FA 和 β -CD 的物理混合物 (physical mixture of FA and β -CD)

衍射峰明显减弱, 表明粉末失去晶体结构转变为无定型状态, 证明 FA- β -CD 包合物包合成功。

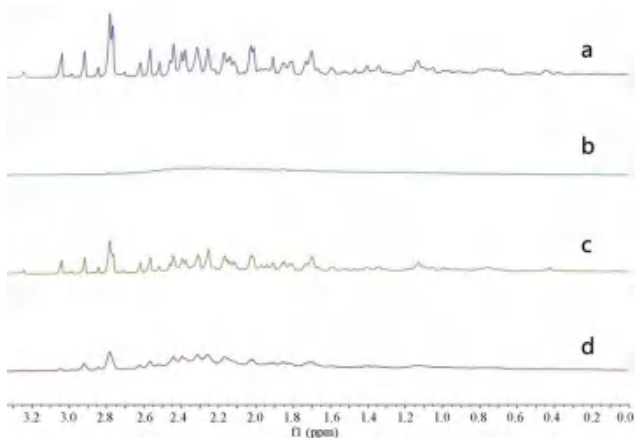


图 5 样品的粉末 XRD 图谱

Fig 5 X-ray powder diffraction pattern of the samples

a. FA; b. β -CD; c. FA 和 β -CD 的物理混合物 (physical mixture of FA and β -CD); d. FA- β -CD 包合物 (FA- β -CD inclusion complex)

2.5 抑菌活性实验

2.5.1 主要试剂配制 分别称取适量磷霉素钙、FA、FA- β -CD 包合物, 加纯化水溶解配成实际含磷霉素 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液; 另配制相同浓度不含药的 β -CD 溶液。

2.5.2 菌悬液的制备 用接种环分别从耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA)、铜绿假单胞菌 (Pae)、鲍曼不动杆菌 (Ab) 中挑取菌落, 接种于 200 mL 液体培养基中, 将培养基置于恒温振荡器中, 在 37°C 、 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件下培养 18 ~ 20 h, 备用。

2.5.3 微量肉汤稀释法测定 MIC 取各溶液和液体培养基各 100 μL 混匀, 依次倍比稀释置于 96 孔板中, 在每个孔加入 80 μL 液体培养基及 20 μL 菌悬液, 使待测液质量浓度梯度依次为 500、

250、125、62.5、31.3、15.6、7.8、3.9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 在其后一孔加入共 180 μL 液体培养基和 20 μL 菌液, 最后一孔加入 200 μL 液体培养基作为对照, 在 37°C 恒温箱培养 24 h, 测量药品对 3 种细菌 (MRSA、Pae、Ab) 的 MIC 值。平行重复实验 3 次, 结果如表 1 所示, β -CD 完全没有抗菌活性, 对测试结果不会产生干扰。相比于 MRSA 和 Pae, Ab 具有更强的耐药性。各样品对 MRSA、Ab 的作用效果表现一致, 对 Pae 的抗菌活性表现为 FA- β -CD 包合物弱于 FA, FA 弱于磷霉素钙, 推测 β -CD 包合 FA 后可能对药物释放有所影响, 另外可能需要进一步优化 FA 的拼合工艺使其药效发挥更加稳定。但从整体上来看, FA 及其包合物的抗菌活性与磷霉素钙相比并无太大差异, 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都能展示出较好的抑菌效果。

表 1 抗菌活性测试结果 (MIC, $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Tab 1 Antibacterial activity test (MIC, $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

样品	MRSA	Pae	Ab
磷霉素钙	62.5	15.6	500
FA	62.5	125	500
FA- β -CD 包合物	62.5	250	500
β -CD	—	—	—

2.6 稳定性实验

FA 容易吸潮, 不易储存, 以表 2 中所列指标考察样品稳定性。分别将 FA 和 FA- β -CD 包合物用生理盐水配制成磷霉素浓度相同的溶液, 再与 FA 和 FA- β -CD 包合物固体样品一起放置于 40°C 恒温恒湿箱中, 做遮光处理。于第 5 日检查溶液的颜色、气味、pH 值变化以及固体样品的增重情况。结果如表 2 所示, 在 40°C 避光的条件下, FA 增重明显, 其溶液的颜色、气味以及 pH 变化也较大; 而 FA- β -CD 的重量及其溶液的颜色和气味变化均较小。因此, 经过 β -CD 包合后的 FA 更加稳定, 尤其是其强引湿性得到了很好的改善。另外, 按“2.5.3”项下方法, 利用 Pae 对 FA- β -CD 包合物溶液进行活性测试, 在 8 h 内其抗菌效果未减弱, 这对于现配现用的溶液来说, 可满足稳定性要求。

3 讨论

3.1 FA- β -CD 包合物制备工艺优化

本实验以 β -CD 作为载体, 采用冷冻干燥法制备了 FA- β -CD 包合物。包合物的形成需要一定的时间, 主客体质量比和包合温度会影响最终包合效果。在包合过程中, FA 借助外力逐渐进入

表 2 FA 及 FA-β-CD 包合物的稳定性

Tab 2 Stability of FA and FA-β-CD inclusion complex

样品	时间	固体增重 /%	颜色、气味	pH 值
FA	第 0 日	0	无色, 无味	5.30
	第 5 日	6.61	黄色, 刺激性气味	4.33
FA-β-CD 包合物	第 0 日	0	无色, 无味	5.18
	第 5 日	0.13	几乎无刺激性气味	4.40

到 β-CD 空腔中, 两者分子间相互作用, β-CD 的量不足时会导致 FA 包合不全, 过多时又会因其浓度过高反而阻碍 FA 进入空腔。只有在合适温度下, 主客比适量, 包合达平衡时才能取得最佳包合效果。因此, 本研究以包合率和收率为指标, 通过单因素实验筛选出了最佳的制备工艺, 即 $m(\beta\text{-CD}) : m(\text{FA})$ 为 1.25 : 1, 包合时间为 2 h, 包合温度为 20 °C。

3.2 FA-β-CD 包合物的鉴定

药物的分子结构决定着其红外区的吸收特征, 采用 β-CD 对 FA 包合后, 可根据 FA 红外吸收峰的位移以及吸收峰的减弱或消失来判断包合效果^[12]。另外, X-射线衍射性质也会随着结晶性药物被包合后的结晶度的改变而发生一些变化, 结晶度高的药物通常会有较强的衍射特征峰, 而经过 β-CD 包合后, 样品结晶程度会下降或者消失, 在 X-射线衍射图谱上则表现为原有的特征吸收峰消失或减弱。因此, 本文通过红外光谱分析和 X-射线衍射对样品进行表征, 证实了 FA-β-CD 包合物的形成。

3.3 FA-β-CD 包合物的抗菌活性和稳定性

经抗菌活性测试发现, FA 及 FA-β-CD 包合物对 Pae 的抗菌效果弱于对照品磷霉素钙。可能是 β-CD 包合 FA 后会对药物释放产生影响, 另外, 也需要进一步优化 FA 的拼合工艺使其药效发挥更加稳定。但从整体结果来看, FA 及 FA-β-CD 包合物均能有效对抗革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌。而且, 经过稳定性观察发现, FA-β-CD 包合物几乎不吸潮。因此, 本次研究证明了 β-CD

是合适 FA 的包封材料, 采用冷冻干燥法制备 FA-β-CD 包合物时不会明显影响 FA 的抗菌活性, 且能明显改善 FA 的强引湿性, 有利于药品的储存和应用。这也为后续进一步的制剂研究提供了一定参考。

参考文献

- [1] Falagas ME, Athanasiaki F, Voulgaris GL, et al. Resistance to fosfomycin: mechanisms, frequency and clinical consequences [J]. Int J Antimicrob Agents, 2019, 53 (1): 22-28.
- [2] 向婷, 陈卓. 磷霉素的临床应用新进展 [J]. 华西药理学杂志, 2021, 36 (4): 485-488.
- [3] Torralba MP, Sanz D, Claramunt RM, et al. The structure of fosfomycin salts in solution and in the solid state by nuclear magnetic resonance spectroscopy and DFT calculations [J]. Tetrahedron, 2018, 74 (29): 3937-3942.
- [4] 李爽, 李丽, 姜志炜, 等. 磷霉素壳寡糖盐的合成与抗菌活性测试 [J]. 武汉工程大学学报, 2021, 43 (4): 372-375.
- [5] 万妮, 陈斌, 李合, 等. 肺部吸入给药系统的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2021, 30 (15): 1386-1395.
- [6] Sheng TM, Kumar PV. A new approach for beta-cyclodextrin conjugated drug delivery system in cancer therapy [J]. Curr Drug Deliv, 2022, 19 (3): 266-300.
- [7] 马宏瑞, 吴茜, 李聘, 等. 和降颗粒中挥发油的包合工艺研究及 GC-MS 成分分析 [J]. 中南药学, 2020, 18 (3): 396-402.
- [8] 梅芊, 郜继东, 刘英. 影响管碟法测定磷霉素效价中抑菌圈质量的因素分析 [J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46 (9): 868-872.
- [9] 中国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 93.
- [10] 赵宁, 李伟泽, 付丽娜, 等. 阿司匹林羟丙基-β-环糊精包合物的制备 [J]. 化工科技, 2021, 29 (6): 11-15.
- [11] 郭琳, 王美玲, 张森, 等. 胃康宁颗粒中混合挥发油包合物制备工艺的优化及其稳定性研究 [J]. 中南药学, 2018, 16 (12): 1688-1692.
- [12] 廖朗坤, 陈志伟, 胡巧红, 等. 吡啶美辛包合物可溶性微针的制备及体内外特性研究 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37 (22): 2689-2696.

(收稿日期: 2022-06-02; 修回日期: 2022-08-05)

载体 - 抑晶剂多元体系过饱和环孢素固体分散体的制备及体外溶出研究

程伟康¹, 郑华², 郝贵周^{2*}, 翟立海², 孙勇¹ (1. 青岛大学药学院, 山东 青岛 266071; 2. 山东新时代药业有限公司, 山东 临沂 273400)

摘要: **目的** 制备载体 - 抑晶剂多元体系过饱和环孢素固体分散体, 并对其体外溶出研究。**方法** 采用热熔挤出技术, 分别以 HME 专用辅料 AFFINISOL HPMC 15LV、HPMC 100LV、聚乙烯吡咯烷酮 VA64 为载体, 泊洛沙姆 188、羟丙甲纤维素 (HPMC E5)、聚乙烯己内酰胺 - 聚乙酸乙烯酯 - 聚乙二醇接枝共聚物 (Soluplus) 为抑晶辅料, 制备单元及多元体系固体分散体。利用粉末 X 射线衍射法 (PXRD) 与差示扫描量热法 (DSC) 对其进行物相表征, 并通过体外模拟过饱和溶出试验对聚合物的过饱和增溶能力、抑晶剂的抑晶效果进行考察。**结果** 结果表明, HPMC 100LV 型号聚合物在过饱和和增溶上具有较强优势。析晶抑制能力表现为泊洛沙姆 188 > HPMC E5 > Soluplus, 且抑晶剂联合用量在药物的 0.5 倍时抑晶效果最优。**结论** 本研究构建了载体 - 抑晶剂多元体系固体分散体, 可为进一步解决难溶性药物在胃肠道析出及过饱和释药系统的开发提供理论指导。

关键词: 过饱和释药系统; 固体分散体; 多元体系; 抑晶; 热熔挤出

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0380-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.016

Preparation and in vitro dissolution of supersaturated CsA solid dispersion of carrier-crystal inhibitor multi-component system

CHENG Wei-kang¹, ZHENG Hua², HAO Gui-zhou^{2*}, ZHAI Li-hai², SUN Yong¹ (1. School of Pharmacy, Qingdao University, Qingdao Shandong 266071; 2. Shandong New Times Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi Shandong 273400)

Abstract: Objective To prepare and determine the supersaturated CsA solid dispersion of carrier-crystal inhibitor multi-component system in vitro dissolution. **Methods** Hot melt extrusion technology was used to prepare unit and multi-system solid dispersion with HME special auxiliary materials AFFINISOL HPMC 15LV, HPMC 100LV and polyvinylpyrrolidone VA64 as carriers; and poloxamer 188, hydroxypropyl methylcellulose (HPMC E5), and polyvinyl caprolactam-polyvinyl acetate-polyethylene glycol graft copolymer (Soluplus) as crystal-inhibiting auxiliary materials. PXRD and DSC were used to characterize the phase of the polymer, and the supersaturation solubilization ability of the polymer and the crystal inhibition effect of crystal inhibitor were investigated by in vitro simulated supersaturation dissolution test. **Results** HPMC 100LV polymer had obvious advantage in supersaturation solubilization. The crystallization inhibition ability was shown as follows: poloxamer 188 > HPMC E5 > Soluplus, and when the combined dosage of crystal inhibitor was 0.5 times of the drug, the crystal inhibition effect was the best. **Conclusion** The solid dispersion of carrier-crystal inhibitor multicomponent system constructed in this study provides theoretical guidance for gastrointestinal crystallization of insoluble drugs and the development of supersaturated drug delivery system.

Key words: supersaturated drug delivery system; solid dispersion; pluralistic system; crystal inhibition; hot melt extrusion

基金项目: 青岛市关键技术攻关及产业化示范项目 (No.22-3-3-hygg-25-hy)。

作者简介: 程伟康, 男, 硕士, 主要从事增加难溶性药物口服生物利用度研究, email: Chengweikangxr@163.com *通信作者: 郝贵周, 男, 高级工程师, 主要从事药物新剂型研究与开发, email: haoguizhouhg@163.com

近年来过饱和释药系统 (supersaturated drug delivery system, SDDS) 作为一种新型药物传递系统在制剂领域受到广泛关注^[1]。利用成盐、共晶、纳米粒及固体分散体技术等, 有效提高难溶性药物溶解度及生物利用度的方法可统称为过饱和释药系统。“过饱和”是指药物以分子、无定型等形式在溶液中快速溶解, 从出现到表观溶解度远远高于其平衡溶解度的现象^[2-4]。

固体制剂口服给药进入胃消化道溶解, 经小肠上皮细胞吸收后才能进入体循环, 从而发挥作用^[5]。而目前许多新筛选出来的具有药理活性的化合物溶解性差、在胃消化道中不易溶出, 生物利用度低下。固体分散体技术作为一种能有效提升难溶性药物溶解度的制剂策略, 随着科学研究的深入愈发受到关注^[6-7]。无定形固体分散体 (amorphous solid dispersion, ASD) 能将难溶性药物以分子、无定型等状态高度分散在适宜的载体基质中, 溶解时药物随着载体迅速溶出形成过饱和溶液, 从而达到促进吸收、提高生物利用度的目的^[8]。但药物的这种过饱和态属于高能态体系, 热力学上不稳定, 药物分子有从溶液中析晶的趋势, 使其浓度转向稳定平衡溶解度。因此, 如何有效抑制过饱和和固体分散体中的药物析晶问题, 使得药物在胃肠道中有较长时间的吸收是提高生物利用度的关键^[9-11]。

目前, 许多研究利用辅料的抑晶作用与载体联合使用, 以期抑制或减缓药物在过饱和溶解过程中的重结晶现象^[12]。在此基础上, 本研究以环孢素 A (CsA) 为模型药物, 采用热熔挤出技术制备不同固体分散体处方, 通过体外过饱和溶出试验探究不同载体及比例对药物的增溶能力, 同时对添加不同抑晶剂以后的多元体系固体分散体的析晶抑制能力也进行了考察。

由于 CsA 在水中平衡溶解度为 ($7.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 37°C)^[13]。本实验所使用载体均为水溶性聚合物, 且为模拟胃液中酸性环境, 体外模拟过饱和溶出介质使用 pH 1.0 盐酸溶液 900 mL (非漏槽条件下), 以考察在此条件下不同载体的迅速增溶作用及抑晶辅料的析晶抑制能力。

1 材料

PROCESS 11 HYGIENIC TSE 型双螺杆热熔挤出仪 (德国 Thermo Fisher 公司); UltiMate SR-3000 高效液相色谱仪 (美国 Thermo Scientific 公司); EMPYREAN 型 X 射线粉末衍射仪 (荷兰 PANalytical 公司); 200F3 型差示扫描量热

(DSC) 仪 (德国 Netzsch 公司); UDT-812A 型溶出仪 (美国 Logan 公司); 高速粉碎机 (天津泰斯特仪器有限公司); 实验室 pH 计 (梅特勒-托利多公司)。

CsA 原料药 (含量: 99.5%, 广东态森德制药有限公司, 批号: H10940111); 羟丙甲纤维素 HME (AFFINISOL, HPMC 15LV、100LV HME); 聚乙烯吡咯烷酮 VA64 (批号: 25963109T0)、聚乙烯己内酰胺-聚乙酸乙烯酯-聚乙二醇接枝共聚物 (Soluplus, 批号: 30724424U0) (德国 BASF 公司); 羟丙甲纤维素 E5 (陶氏化学, 批号: D011I93L02); 泊洛沙姆 188 (BASF 公司, 批号: GND10023B); 磷酸 (国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20211011); 盐酸 (西陇科学, 批号: 2112237); 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他化学试剂均为分析纯。环孢素软胶囊 (诺华制药, 批号: KF8462)。

2 方法与结果

2.1 聚合物载体和抑晶剂的热稳定性考察

采用热分析法考察 CsA 原料药 (API)、聚合物载体及抑晶剂的热稳定性^[14]。分别取适量的样品置于铝坩埚中, 在流速为 $40 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的氮气中, 以 $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的升温速率, 在 $30 \sim 300^\circ\text{C}$ 内扫描, 并以空白的铝坩埚为参比, 记录样品质量的变化规律, 结果见图 1。

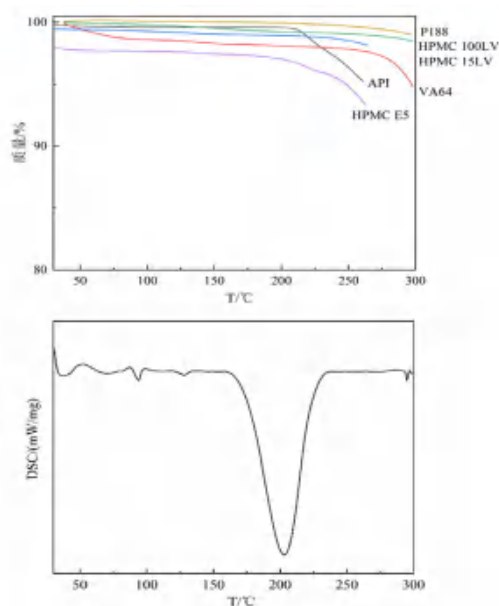


图 1 CsA 与不同聚合物的 TGA 与 DSC 曲线

Fig 1 TGA and DSC curves of CsA and different polymers

2.2 单一载体固体分散体的制备

采用双螺杆热熔挤出机, 将预混好的 CsA (5 g) 与不同载体 HPMC 100LV、HPMC 15LV、VA64 分别按 1:1、1:3、1:5 的质量比投料。设置热

熔挤出机温度 170 °C，螺杆转速 100 r · min⁻¹，待稳定后将物理混合物投入挤出机。物料收集，待冷却后，粉碎机粉碎，过 80 目筛，避光保存备用。

2.3 含量测定方法学

2.3.1 色谱条件 色谱柱：Ultimate AQ-C18 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)；流动相：乙腈 -pH 2.8 磷酸水溶液 (60 : 40)；检测波长：226 nm；柱温：70 °C；流速：1.5 mL · min⁻¹；进样量：20 μL。

2.3.2 标准曲线的绘制 精密称取 CsA 25 mg，置于 100 mL 量瓶中，用流动相溶解并定容。配制成 250 μg · mL⁻¹ 的母液，再精密量取母液稀释至 2.5、5、7.5、12.5、20、30 μg · mL⁻¹ 质量浓度梯度，进样分析，记录谱图，以峰面积 (*A*) 对质量浓度 (*C*) 进行线性回归，得到标准曲线方程 $A = 0.1208C - 0.1279$ ($r = 0.9997$)，表明 CsA 在 2.5 ~ 30 μg · mL⁻¹ 与峰面积线性关系良好。为验证方法的准确性，配制了低、中、高质量浓度分别为 5、12.5、30 μg · mL⁻¹ 的标准溶液进行精密密度与回收率考察。结果低、中、高质量浓度标准溶液日内 RSD 分别为 2.0%、3.6%、1.6% ($n = 3$)，平均回收率为 (98.75 ± 0.56)%、(99.56 ± 0.34)% 及 (100.15 ± 0.74)% ($n = 3$)。

2.3.3 固体分散体中药物的含量 精密称取“2.2”项下制备的不同固体分散体粉末适量 (约相当于 CsA 25 mg)，置 25 mL 量瓶中，加入甲醇溶解并定容，照“2.3.2”项下色谱条件进样分析，记录峰面积。每个处方重复测定 3 次。结果 3 种载体 (1 : 3) 处方中药物含量分别为 100.51%、99.82%、100.01%，RSD 分别为 1.8%、1.2%、0.80% ($n = 3$)。表明药物含量与理论值无显著差异。

2.4 物相表征

2.4.1 DSC 物相分析 称取样品 5 ~ 10 mg，置于坩埚铝盘中，氮气流速 40 mL · min⁻¹；升温速度 10 °C · min⁻¹；温度范围 30 ~ 300 °C。记录随温度变化样品的吸热变化情况。结果见图 2。

2.4.2 PXRD 分析 取适量原料药、固体分散体、药物-载体物理混合物分别进行 PXRD 分析。工作条件：Cu 靶；石墨单色器；电压 40 kV；电流 40 mA；扫描角度 (2θ) 3° ~ 50°；扫描速度 18.870° · s⁻¹；扫描步长 0.013°。结果见图 3。

2.5 单一载体固体分散体体外过饱和和溶出试验

精密称取单一载体固体分散体适量 (相当于 CsA 25 mg)。采用浆法，溶出仪转速 75 r · min⁻¹，温度设定在 (37 ± 0.5) °C，溶出介质选择 pH 1.0 盐酸溶液 900 mL (非漏槽条件下)。分别于 5、

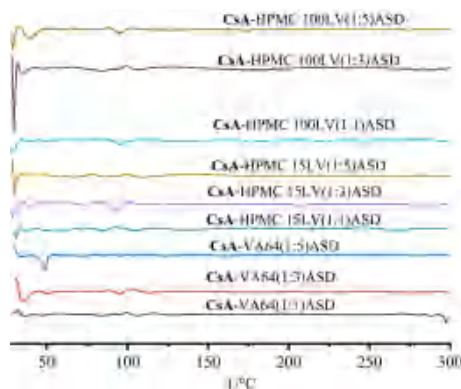


图 2 单一载体固体分散体的 DSC 图谱

Fig 2 DSC patterns of single carrier solid dispersion

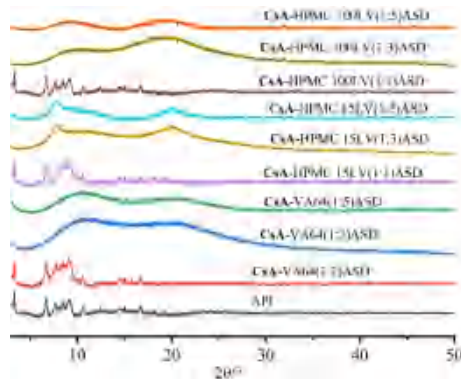


图 3 单一载体固体分散体的 PXRD 图谱

Fig 3 PXRD patterns of single carrier solid dispersion

10、15、20、30、45、60、90 min 取样 5 mL，用 0.45 μm 滤膜过滤，弃去初滤液 3 mL，取续滤液 1.5 mL。按“2.3.1”项下条件进样检测不同点药物过饱和浓度。结果见图 4。

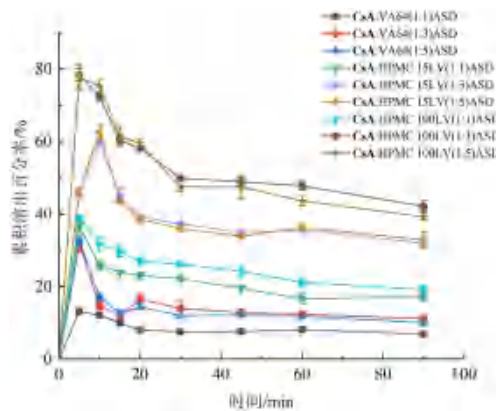


图 4 单一载体固体分散体过饱和和溶出曲线 ($n = 3$)

Fig 4 Dissolution curves of single carrier solid dispersion under supersaturated condition ($n = 3$)

在 PXRD 的检测图谱中可以看出，单一载体 (1 : 1) 处方中均出现了与药物相似的衍射峰，表明固体分散体出现了析晶或相分离的情况。但在 DSC 分析中，却未见固体分散体的晶型吸热峰，表明 PXRD 的检测灵敏度高于 DSC，故后续处方均

采用 PXRD 进行表征。由于本研究中选用的 HPMC 15LV、HPMC 100LV、VA64 均为水溶性辅料，在 pH 1.0 盐酸介质中，随着载体材料的溶解，CsA 快速释放后形成过饱和溶液。从图 4 的溶出曲线中可以看出，不同比例载体 ASD 的增溶能力各有差异。

当 CsA :载体为 1 : 1 时 3 种载体的瞬时过饱和和增溶能力较差，从 PXRD 中分析可能与药物 - 载体出现相分离相关。而在 CsA :载体为 1 : 3 和 1 : 5 ASD 处方中，药物增溶迅速，过饱和溶出接近 80%，过饱和度近数十倍。然而在高过饱和状态下，CsA 出现从溶液中析出的现象，导致其溶解度不断下降，表明单纯使用聚合物载体有快速增溶的作用，但并不能很好地维持这种过饱和和溶出的优势。

同时，从 CsA :载体为 1 : 3 和 1 : 5 ASD 处方的溶出结果来看，两种比例载体处方的过饱和和增溶能力并无显著差异，考虑到载药量应越高越好，因此接下来选择药物 - 载体 (1 : 3) 进行下一步的抑晶实验。

2.6 载体 - 抑晶剂多元体系固体分散体的制备及表征

2.6.1 多元体系固体分散体的制备 为了维持药物的过饱和浓度，有效抑制药物的析晶过程，提升药物在胃肠道内的吸收，从而提高药物的生物利用度，本研究以水溶性聚合物为主要载体，与其他具有抑晶作用的辅料联合使用。制备了不同

比例药物 - 载体 - 抑晶剂多元体系的固体分散体，处方组成见表 1。并进一步对其稳定性及过饱和和抑晶效果进行了研究。

表 1 聚合物 - 抑晶剂多元体系固体分散体处方

Tab 1 Solid dispersion prescription of polymer crystal inhibitor multi-component system

聚合物载体 (w/w)	泊洛沙姆 188	HPMC E5	Soluplus
API : 载体 (1 : 3)	1 : 3 : 0.1		
	1 : 3 : 0.3		
	1 : 3 : 0.5		
API : 载体 (1 : 3)		1 : 3 : 0.1	
		1 : 3 : 0.3	
		1 : 3 : 0.5	
API : 载体 (1 : 3)			1 : 3 : 0.1
			1 : 3 : 0.3
			1 : 3 : 0.5

2.6.2 多元体系固体分散体的物相表征 按照表 1 所设计的处方，称取 CsA (5 g)、聚合物载体及抑晶辅料充分混合后通过热熔挤出技术 (挤出温度 170 °C，螺杆转速 100 r · min⁻¹) 制备多元固体分散体。PXRD 分析结果显示 (见图 5)，1-VA64-P188 (0.5) 多元载体固体分散体出现了少量 CsA 的结晶衍射峰，分析原因可能是 VA64 与泊洛沙姆 188 的相溶性较差，导致 CsA 无法完全熔融分散在体系中。而其他多元体系固体分散体中均未出现 CsA 的晶型，验证了热熔挤出技术制备固体分散体具有良好的物理稳定性及可行性。

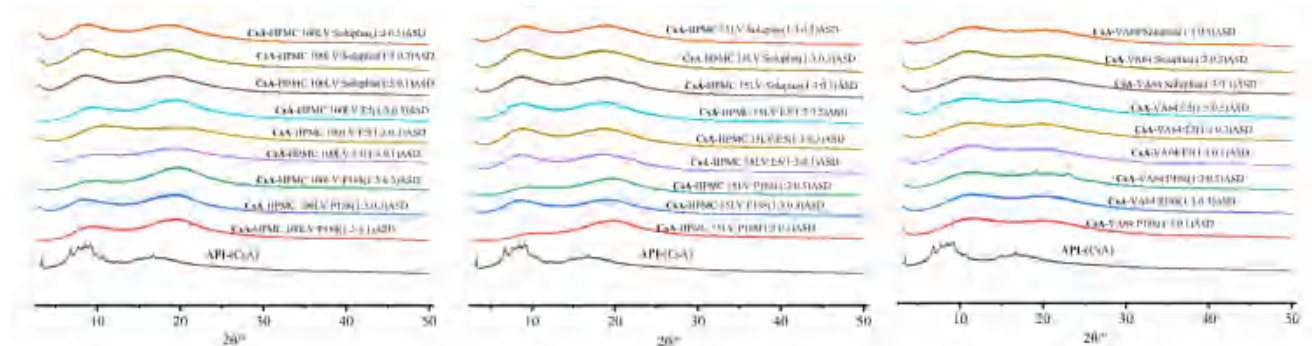


图 5 载体 - 抑晶剂多元体系固体分散体 PXRD 图谱
Fig 5 PXRD patterns of solid dispersion of crystal inhibitor multi-component system

2.6.3 多元体系固体分散体的体外过饱和和试验 抑晶辅料可以通过与载体或药物发生某些分子水平的作用力，例如形成氢键，疏水相互作用、及空间位阻效应等，来减缓药物在胃液中的聚集重结晶，从而使 CsA 在到达小肠部位还具有较高过饱和浓度被吸收进入体循环。本研究以多种水溶性聚合物为载体，通过添加不同比例抑晶剂组合，系统研究了多元体系固体分散体对过饱和溶液的析晶抑制效果。

如图 6 所示，添加不同抑晶辅料对维持过饱和和溶出的能力各有差异。总体来看，添加泊洛沙姆 188 的固体分散体系对维持 CsA 过饱和和溶解效果较好，添加 HPMC E5 作为抑晶剂体系也能有效减缓析晶过程，但优势略小于泊洛沙姆 188 体系。与单一载体 HPMC 100LV 固体分散体相比，添加 Soluplus 体系固体分散体对维持 CsA 过饱和状态效果不显著。HPMC 100LV、HPMC 15LV、VA64

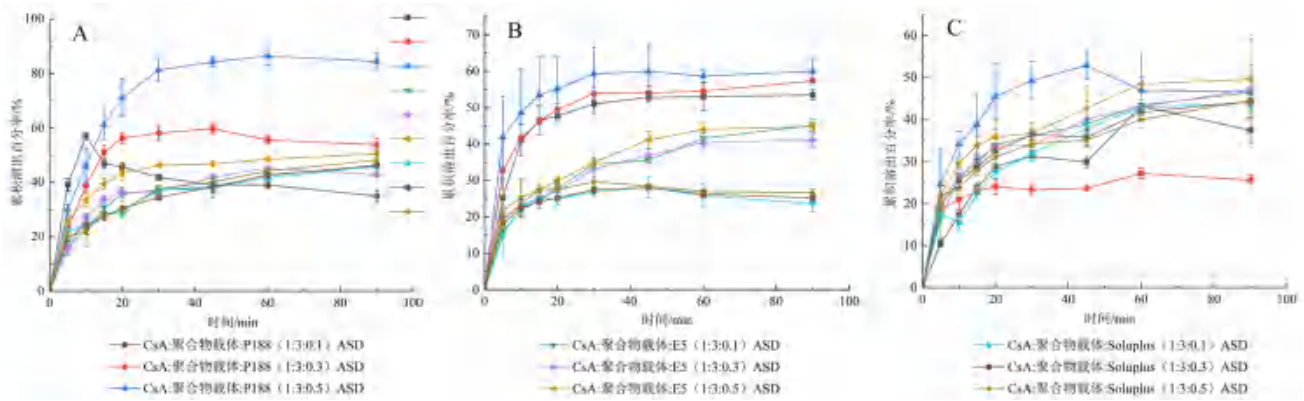


图 6 载体-抑晶剂多元体系 ASDs 过饱和和溶出曲线 ($n = 3$)

Fig 6 ASDs supersaturated dissolution curves of carrier crystal inhibitor multi-component system ($n = 3$)

A. HPMC 100LV; B. HPMC 15LV; C. VA64

这 3 种多元固体分散体体系中，添加不同抑晶辅料后的析晶抑制效果呈相同趋势：泊洛沙姆 188 > HPMC E5 > Soluplus。同时，对 HPMC 15LV、100LV-P188 系列载体来看，抑晶剂比例为 CsA 的 0.1 倍与 0.3 倍相比，0.1 倍抑晶剂的瞬时增溶优势可以延续，但维持过饱和优势能力较差。0.3 倍抑晶剂的瞬时增溶有所减缓，但维持溶出过饱和优势有提升。当抑晶剂比例为 0.5 倍时，既能保持过饱

和增溶优势，又大大延缓了 CsA 结晶析出。

对过饱和溶出浓度-时间曲线下面积 (AUC_{ss}) 进一步进行计算。如图 7 所示，CsA-载体-P188 系列 ASD 具有更高的 AUC_{ss} 值。 AUC_{ss} 值随着抑晶剂比例的增加而逐渐增大。其中以 CsA-HPMC 100LV-P188 体系具有最高的 AUC_{ss} 值，表明该体系的抑晶能力更强，且图 8 加速试验显示该体系具有较强物理稳定性。

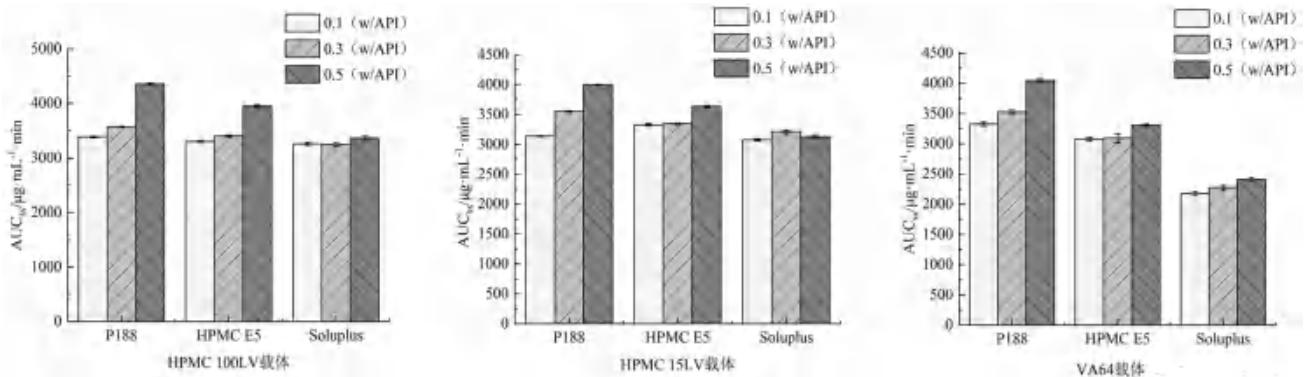


图 7 不同体系固体分散体的 AUC_{ss} 结果 ($n = 3$)

Fig 7 AUC_{ss} values of solid dispersion with different formulations ($n = 3$)

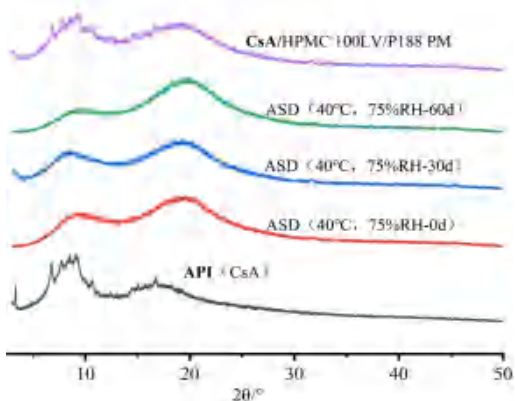


图 8 1-HPMC 100LV-P188 (1:3:0.5) ASD (40°C, 75%RH) 加速试验结果

Fig 8 Stability accelerated test for 1-HPMC 100LV-P188 (1:3:0.5) ASD (40°C, 75%RH)

3 讨论

本试验首先通过热熔挤出技术制备了 CsA 的单元载体固体分散体，分别以 3 种聚合物 HPMC 100LV、HPMC 15LV、VA64 不同比例 1:1、1:3、1:5 为载体制备固体分散体系。过饱和溶出度差异的考察结果显示，单一载体虽然具有快速增溶的优势，但维持过饱和浓度的能力有限。在此基础上，添加了第三元抑晶辅料与载体联合使用，制备多元体系固体分散体，并进一步探究其析晶抑制效果。

不同聚合物维持 CsA 的这种过饱和态能力各有不同，同一载体不同比例瞬时过饱和增溶也有差异，结果表明当 CsA-载体 (1:1) 时的增溶能力最弱，PXRD 显示载体比例越少体系越不稳

定。而 CsA-载体 (1:3、1:5) 体系增溶趋势相当,且稳定性更好。考虑到载药量因素,(1:3) 体系优势更大。不同聚合物的增溶趋势表现为: HPMC 100LV > HPMC 15LV > VA64。

本研究中选择的 3 种具有抑晶作用的辅料,泊洛沙姆 188 组具有更好的析晶抑制能力。这主要是由于泊洛沙姆 188 属于非离子型表面活性剂,溶解时泊洛沙姆 188 分子能够吸附在药物分子周围,为 CsA 提供了一定的空间位阻,从而抑制了晶格的形成及晶体生长两个阶段。此外,高浓度的表面活性剂溶出也具有一定的增溶作用。近年来有将 HPMC E5 作为抑晶辅料的研究报道,因为 HPMC E5 聚合物分子链上含有羟基,可与药物分子中的羰基形成氢键。而从本实验结果来看,HPMC E5 作为抑晶剂联用维持过饱和的优势一般,可能是 CsA 分子中羰基数量较少,分子间相互作用力较小。作为一种新型 HME 的辅料,Soluplus 是三嵌段共聚物,同时也是一种两亲性非离子型表面活性剂。其对 CsA 的过饱和态维持效果与泊洛沙姆 188、HPMC E5 相比较差,推测主要原因是 Soluplus 与载体聚合物发生某些相互作用,导致 CsA 分子过多暴露于溶液中而加速了结晶过程。

抑晶辅料的用量与维持 CsA 过饱和时间也并非完全成正相关。少量抑晶剂联用时(0.1 倍)瞬时增溶快,但维持效果不佳;抑晶剂用量(0.3 倍)时抑晶作用增强,但增溶优势有所下降。当抑晶剂用量适当时(0.5 倍)既保证了瞬时增溶快,又能有效抑制 CsA 结晶析出。对较优体系 CsA:HPMC 100LV:泊洛沙姆 188(1:3:0.5)粉末进行初步压片制备,与原研参比制剂的体外过饱和溶出对比试验验证了自制片剂处方在维持过饱和溶出上具有优势性。

综上所述,本实验利用热熔挤出技术制备载体-抑晶剂多元体系固体分散体,通过系列实验探究了不同聚合物载体及抑晶辅料对维持难溶性药物 CsA 过饱和溶出的影响,为过饱和释药系统的开发提供了一定理论基础,并为热熔挤出制备固体分散体的产业化提供试验依据。

参考文献

[1] Wang W, Li M, Yang Q, et al. The opposed effects of

- polyvinylpyrrolidone K30 on dissolution and precipitation for indomethacin supersaturating drug delivery systems [J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2020, 21 (3): 107-116.
- [2] Sunnam S, Sodhi I, Joshi P, et al. Correlating precipitation inhibition efficacy of EUD EPO and PVP K30 on supersaturated solution of atorvastatin calcium with Caco-2 permeability enhancement [J]. J Drug Deliv Sci Tec, 2020, 57: 101692.
- [3] Wilson VR, Lou X, Osterling DJ, et al. Amorphous solid dispersions of enzalutamide and novel polysaccharide derivatives: investigation of relationships between polymer structure and performance [J]. Scientific Reports, 2020, 10: 18535.
- [4] Suzuki H, 王盈. 用于肺部给药的环孢素 A 自胶束化固体分散体的研制 [J]. 中国医药工业杂志, 2017, 48 (1): 77.
- [5] 刘雯君, 费焯婷, 胡巧红, 等. Soluplus[®]、PVP VA64 为载体的氟苯尼考固体分散体的制备及体外评价 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38 (9): 1031-1037.
- [6] 陈幽攸, 张淑芸, 陶义华, 等. 热熔挤出技术制备难溶性药物固体分散体的研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2015, 42 (5): 593-600.
- [7] 李荣敏, 何鸿玲, 马志敏, 等. 热熔挤出制备恩杂鲁胺三元固体分散体 [J]. 今日药学, 2021, 31 (4): 290-294.
- [8] Price DJ, Nair A, Becker-baldus J, et al. Incorporation of HPMC-AS during loading of glibenclamide onto mesoporous silica improves dissolution and inhibits precipitation [J]. Eur J Pharm Sci, 2020, 141: 105113.
- [9] Saboo S, Moseson DE, Kestur US, et al. Patterns of drug release as a function of drug loading from amorphous solid dispersions: a comparison of five different polymers [J]. Eur J Pharm Sci, 2020, 155: 105514.
- [10] Sarode AL, Sandhu H, Shan N, et al. Hot melt extrusion (HME) for amorphous solid dispersions: predictive tools for processing and impact of drug-polymer interactions on supersaturation [J]. Eur J Pharm Sci, 2013, 48 (3): 371-384.
- [11] Rahman M, Arevalo F, Coelho A, et al. Hybrid nanocrystal-amorphous solid dispersions (HyNASDs) as alternative to ASDs for enhanced release of BCS class II drugs [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2019, 145: 12-26.
- [12] 谭佳威, 孙如煜, 曾滢棱, 等. 固体分散技术在制剂领域的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2017, 40 (8): 1182-1188.
- [13] 斯陆勤, 孙明辉, 何雪心, 等. 环孢素 A 固体分散体的制备及体外研究 [J]. 中国药学杂志, 2005, 40 (10): 760-762.
- [14] 杨蓓蓓, 冯地桑, 潘昕, 等. 聚合物-表面活性剂二元体系抑制难溶性药物固体分散体的胃肠道析晶 [J]. 中国医药工业杂志, 2019, 50 (9): 993-1004.

(收稿日期: 2022-09-05; 修回日期: 2022-11-08)

芹菜素纳米胶束的制备工艺优化及质量评价

刘雄英, 周韵秋, 于恩江, 典成阳, 冉梦楠, 典灵辉* (广东医科大学药学院, 广东 东莞 523808)

摘要: 目的 优化芹菜素的 Soluplus 纳米胶束的制备工艺, 并对其进行质量评价。方法 采用薄膜分散法制备芹菜素纳米胶束, 以粒径、包封率和载药量为评价指标, 在单因素试验基础上, 采用 Box-Behnken 设计-响应面法优化芹菜素纳米胶束的制备工艺, 并对其质量进行评价。结果 优化后的芹菜素纳米胶束包封率为 $(93.49 \pm 1.28)\%$, 载药量为 $(4.45 \pm 0.06)\%$, 粒径为 (62.8 ± 1.1) nm, 且至少在 28 d 内稳定。傅里叶变换红外光谱显示芹菜素与载体材料之间形成了氢键, 提高了纳米胶束的稳定性。体外释放结果表明芹菜素纳米胶束有缓释作用。结论 优化后的制备工艺稳定可行, 所制得的纳米胶束粒径均一, 包封率和载药量较高, 并具有一定的缓释作用。

关键词: 芹菜素; Box-Behnken 设计-响应面法; 体外释放

中图分类号: R94

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0386-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.017

Preparation optimization and quality evaluation of apigenin-loaded soluplus nanomicelles

LIU Xiong-ying, ZHOU Yun-qiu, YU En-jiang, DIAN Cheng-yang, RAN Meng-nan, DIAN Ling-hui* (School of Pharmaceutical Sciences, Guangdong Medical University, Dongguan Guangdong 523808)

Abstract: Objective To optimize the preparation of apigenin-loaded soluplus nanomicelles (API-PMs) and evaluate its quality. **Methods** API-PMs were prepared by film dispersion method. The particle size, encapsulation efficiency and drug loading were used as the evaluation indexes. On the basis of single factor experiment, the preparation process of API-PMs was optimized by Box-Behnken design-response surface method, and its quality was evaluated. **Results** The encapsulation efficiency of the optimized API-PMs was $(93.49 \pm 1.28)\%$, the drug loading was $(4.45 \pm 0.06)\%$, and the particle size was (62.8 ± 1.1) nm. The preparation was stable for at least 28 days. Fourier transform infrared spectroscopy showed that hydrogen bonds were formed between apigenin and the carrier material, which improved the stability of the API-PMs. The in vitro release showed that API-PMs had sustained release effect. **Conclusion** The optimized preparation is stable and feasible, with uniform particle size, high encapsulation efficiency, high drug loading, and sustained release.

Key words: apigenin; Box-Behnken design-response surface method; in vitro release

芹菜素 (apigenin, API, 4', 5, 7-三羟基黄酮) 是一种天然存在的黄酮类化合物, 无毒, 具有抗氧化、抗炎、神经保护、抗肿瘤等药理作用^[1-2], 能抑制乳腺癌、肺癌、肝癌等多种类型肿瘤细胞的增殖, 促进细胞凋亡, 发挥抗肿瘤作用^[3-4]。然而

芹菜素属于生物药剂学分类系统 II 类药物 (即低溶解性和高渗透性), 它在 pH 1.0、6.8 和 7.5 下的溶解度分别为 1.43、1.56 和 2.16 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其水溶性较差、肠道吸收少, 生物利用度较低^[5], 这影响了其在体内发挥活性, 限制了临床应用。

基金项目: 广东省教育厅自然科学青年创新人才类项目 (No. 2019KQNCX038); 国家级大学生创新创业项目 (No. 202110571024); 广东省大学生创新创业项目 (No. 202210571071)。

作者简介: 刘雄英, 女, 在读硕士研究生, 主要从事药物缓控释制剂研究, email: 774476586@qq.com *通信作者: 典灵辉, 女, 教授, 博士, 主要从事药物缓控释制剂研究, email: dianlh@163.com

提高芹菜素的溶解度和口服生物利用度的方法有很多,比如制备成纳米颗粒、脂质体、纳米乳剂等,但作用效果不显著^[6]。而纳米胶束作为一种新型的纳米药物递送系统,具有载药范围广、组织渗透性好等优点,且能提高难溶性药物的溶解度和控制药物释放,具有更好的应用前景^[7-9]。聚乙烯己内酰胺-聚乙酸乙烯酯-聚乙二醇接枝共聚物(Soluplus)是一种两亲性非离子型共聚物,其两亲性结构可在溶液中自组装形成纳米胶束,可以将难溶性药物溶于疏水核心,提高难溶性药物的溶解度^[10-11],具有较低的临界胶束浓度($6.44 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),在水中易形成稳定的胶束。Soluplus的疏水结构具有羰基,能与具有羟基的化合物形成氢键,增强纳米胶束的稳定性^[12]。*D*- α 生育酚聚乙二醇 1000 琥珀酸酯(TPGS)是一种非离子表面活性剂、增溶剂、吸收促进剂,能显著促进难溶性药物的溶解度及其在体内的吸收^[13]。TPGS常与其他材料制备混合胶束或纳米粒,增强单一胶束的稳定性,并能形成功能化纳米胶束,促进药物的吸收,增强药物治疗效果^[14]。

因此,本试验以Soluplus为纳米载体材料,采用薄膜分散法制备芹菜素纳米胶束(apigenin-loaded soluplus nanomicelles, API-PMs),用响应面法对其制备工艺进行优化,并考察其体外释放特性,为进一步开发利用芹菜素奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

UM-4T 磁力搅拌器(北京忧晟联合科技有限公司),KQ5200DB 型数控超声波清洗器(昆明市超声仪器有限公司),SZ-100 纳米粒度分析仪(日本 HORIBA 公司),UV-650 型紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司),WQF-510A 型傅里叶变换红外光谱仪(北京瑞利分析仪器有限公司),RE52CS 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 试药

芹菜素(批号: CAS 520-36-5, 质量分数 $\geq 98\%$)、*D*- α 生育酚聚乙二醇 1000 琥珀酸酯(TPGS, 批号: CAS 9002-96-4)(美国 Sigma 公司),聚乙烯己内酰胺-聚乙酸乙烯酯-聚乙二醇接枝共聚物(Soluplus, 批号: 84414368E0, 德国 BASF 公司),Tween80(化学纯,天津市富宇精细化工有限公司),甲醇、无水乙醇(分析纯,天津市大茂化学试剂厂)水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 芹菜素含量测定

2.1.1 芹菜素紫外检测波长的确定 取适量芹菜素配制芹菜素乙醇溶液,用紫外分光光度计在 200 ~ 600 nm 内扫描,确定芹菜素的检测波长为 336 nm,且各辅料对芹菜素的测定无干扰。

2.1.2 线性关系和方法学考察 分别配制质量浓度为 1、2、5、10、20、30、40、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芹菜素乙醇溶液,测定吸光度(*A*),以芹菜素质量浓度(*C*, $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,*A*为纵坐标进行线性回归,得标准曲线 $A = 0.0766C + 0.0102$, $r = 0.9999$,线性范围为 1 ~ 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。低、中、高浓度(5、20、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的芹菜素乙醇溶液日内精密度的 *RSD* 分别为 1.1%、0.79%、1.6% ($n = 3$),日间精密度的 *RSD* 分别为 1.8%、0.56%、1.5% ($n = 3$),平均回收率分别为 105.2%、103.4%、100.8%,*RSD* 分别为 1.8%、0.40%、1.5% ($n = 3$),表明本方法的仪器精密度和回收率良好。

2.2 API-PMs 的制备及处方工艺的优化

2.2.1 API-PMs 的制备 采用薄膜分散法制备,称取适量芹菜素和 Soluplus 于茄形瓶中,加适量无水乙醇完全溶解,于 50 °C 减压旋转蒸发挥去有机溶剂,使其在瓶壁上形成一层均匀的含药薄膜;再将一定量的 TPGS 水溶液加入茄形瓶中,涡旋,磁力搅拌一定时间,经过 0.22 μm 微孔滤膜,得淡黄色透明乳光的 API-PMs 溶液。

2.2.2 单因素试验 其他条件不变,分别对芹菜素投药量(1.0、1.5、2.0、2.5、3 mg)、TPGS 浓度(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、磁力搅拌时间(1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h)、磁力搅拌速度(400、500、600、700、800 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$)进行单因素试验,采用紫外分光光度计和纳米粒度分析仪测定胶束的包封率和粒径的变化。

结果如图 1 所示,芹菜素投药量对纳米胶束粒径影响较大,随着投药量的增加,粒径逐渐增大,而包封率缓慢减小;当投药量在 1.5 mg 时具有最大包封率。随着 TPGS 浓度的增加,粒径无明显变化,包封率则缓慢增大;当 TPGS 浓度为 0.4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,包封率最大。随着磁力搅拌时间的增加,粒径无明显变化,包封率在搅拌时间为 3 h 时最大。随着磁力搅拌速度的增大,粒径无明显变化,当磁力搅拌速度为 700 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时,包封率最大。

2.2.3 Box-Behnken 设计(BBD)-响应面试验优化纳米胶束的制备工艺

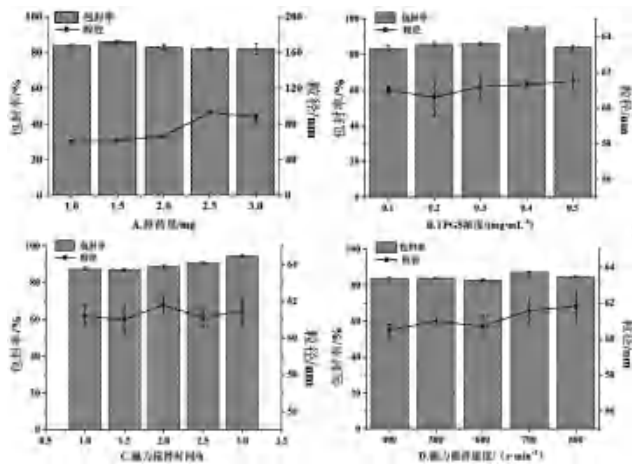


图 1 单因素对纳米胶束包封率和粒径的影响
Fig 1 Effect of single factor on the encapsulation efficiency and particle size of API-PMs

① BBD 试验设计与结果：根据单因素试验结果，采用 BBD 响应面法来进行制备工艺优化，以投药量 (A)、TPGS 浓度 (B)、磁力搅拌速度 (C) 和磁力搅拌时间 (D) 为因素，并以包封率、载药量和粒径为响应值进行试验，试验数据运用软件 Design-Expert 8.0.6 分析处理，因素与水平见表 1。

表 1 因素与水平
Tab 1 Factor and level

水平	因素			
	A. 投药量 / mg	B. TPGS 浓度 / (mg · mL ⁻¹)	C. 磁力搅拌速度 / (r · min ⁻¹)	D. 磁力搅拌时间 / h
- 1	1	0.1	400	1
0	2	0.3	600	2
1	3	0.5	800	3

由于试验设计包括包封率、载药量和粒径三个指标评价，因此可采用多指标数据总评归一值 (overall desirability, OD) 法，对取值越小越好的指标 (粒径) 和取值越大越好的指标 (包封率和载药量)，采用 Hassan 方法，通过计算各个实验指标“归一值”的几何平均值，得到综合评价的“归一值”^[15]。故以 OD 为响应变量 (Y)，结果见表 2。

② 模型拟合及方差分析：以 OD 值为响应值，利用 Design Expert 8.0.6 软件分别对各因素多元线性回归和二项式拟合，得到 OD 值对 A、B、C、D 四个因素的二项式回归方程：

$$OD = 0.92 - 0.31A + 0.035B - 1.944 \times 10^{-3}C + 0.018D + 0.11AB - 0.016AC + 0.022AD + 7.34110^{-3}BC + 0.018BD - 1.657 \times 10^{-3}CD - 0.5A^2 + 0.063B^2 - 0.019C^2 - 8.526 \times 10^{-3}D^2$$

表 2 BBD 响应面实验设计与结果

Tab 2 BBD response surface experiment design and results

编号	变量编码				包封率 / %	载药量 / %	粒径 / nm	OD
	A	B	C	D				
1	- 1	- 1	0	0	94.36	2.30	57.9	0.77
2	+ 1	- 1	0	0	4.36	0.30	209.8	0.08
3	- 1	+ 1	0	0	90.00	2.20	58.9	0.75
4	+ 1	+ 1	0	0	49.23	3.43	203.5	0.48
5	0	0	- 1	- 1	85.90	4.09	62.1	0.91
6	0	0	+ 1	- 1	89.87	4.28	64.9	0.93
7	0	0	- 1	+ 1	89.87	4.28	63.7	0.93
8	0	0	+ 1	+ 1	92.30	4.40	63.5	0.95
9	- 1	0	0	- 1	91.80	2.24	60.6	0.76
10	+ 1	0	0	- 1	4.27	0.30	268.5	0.00
11	- 1	0	0	+ 1	92.05	2.25	57.4	0.76
12	+ 1	0	0	+ 1	6.15	0.43	225.4	0.09
13	0	- 1	- 1	0	91.79	4.37	64.5	0.94
14	0	+ 1	- 1	0	91.03	4.33	63.9	0.94
15	0	- 1	+ 1	0	93.85	4.47	64.9	0.96
16	0	+ 1	+ 1	0	97.31	4.63	64.2	0.98
17	- 1	0	- 1	0	84.87	2.07	60	0.72
18	+ 1	0	- 1	0	3.76	0.26	200.8	0.07
19	- 1	0	+ 1	0	83.85	2.05	59.6	0.71
20	+ 1	0	+ 1	0	1.20	0.08	193.7	0.00
21	0	- 1	0	- 1	92.05	4.38	64.6	0.95
22	0	+ 1	0	- 1	88.08	4.19	65.2	0.92
23	0	- 1	0	+ 1	91.67	4.36	62.2	0.95
24	0	+ 1	0	+ 1	98.21	4.68	63.3	0.99
25	0	0	0	0	88.33	4.21	62.9	0.92
26	0	0	0	0	87.69	4.18	63.1	0.92
27	0	0	0	0	87.18	4.15	63.3	0.91
28	0	0	0	0	87.95	4.19	63.5	0.92
29	0	0	0	0	90.26	4.29	63.0	0.94

响应面模型对 OD 值的方差分析结果如表 3 所示，模型 P 值小于 0.0001，表明该模型是显著的；失拟项 P 值大于 0.05，不显著，说明模型方程拟合程度好，可以用此模型对制备工艺进行分析和预测；并且模型中参数 A、AB、A² 和 B² 都是显著的，对比所有因素的 F 值大小，得出影响制备工艺的因素强弱排序为投药量 > TPGS 浓度 > 磁力搅拌时间 > 磁力搅拌速度。

③ 响应面交互作用结果分析与预测：为了进一步研究不同因素之间交互作用以及确定最优工艺处方参数，通过 Design-Expert 8.0.6 软件绘制出 OD 值随着不同因素交互作用变化的三维响应面图。结果见图 2，可知，OD 存在最大值，经软件分析筛选，得到最优工艺处方参数为投药量 1.89 mg，TPGS 浓度为 0.49 mg · mL⁻¹，磁力搅拌速度

表 3 响应面模型对 OD 值的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	3.08	14	0.22	42.41	< 0.0001
A	1.17	1	1.17	225.79	< 0.0001
B	0.014	1	0.014	2.76	0.1188
C	4.54×10^{-3}	1	4.54×10^{-3}	8.75×10^{-3}	0.9268
D	3.92×10^{-3}	1	3.92×10^{-3}	0.76	0.3993
AB	0.046	1	0.046	8.96	0.0097
AC	1.01×10^{-3}	1	1.01×10^{-3}	0.20	0.6654
AD	1.89×10^{-3}	1	1.89×10^{-3}	0.36	0.5556
BC	2.16×10^{-4}	1	2.16×10^{-4}	0.042	0.8414
BD	1.31×10^{-3}	1	1.31×10^{-3}	0.25	0.6236
CD	1.09×10^{-5}	1	1.09×10^{-5}	2.12×10^{-3}	0.9639
A ²	1.63	1	1.63	314.78	< 0.0001
B ²	0.026	1	0.026	5.03	0.0415
C ²	2.44×10^{-3}	1	2.44×10^{-3}	0.47	0.5034
D ²	4.72×10^{-4}	1	4.72×10^{-4}	0.091	0.7674
残差	0.073	14	5.19×10^{-3}		
失拟项	0.072	10	7.23×10^{-3}	18.64	0.0612
纯误差	2.93×10^{-4}	4	7.33×10^{-5}		
总变异	3.15	28			

为 $662.97 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ，磁力搅拌时间为 2.26 h，预测粒径为 57.1 nm，包封率为 99.35%，OD 为 1.04。

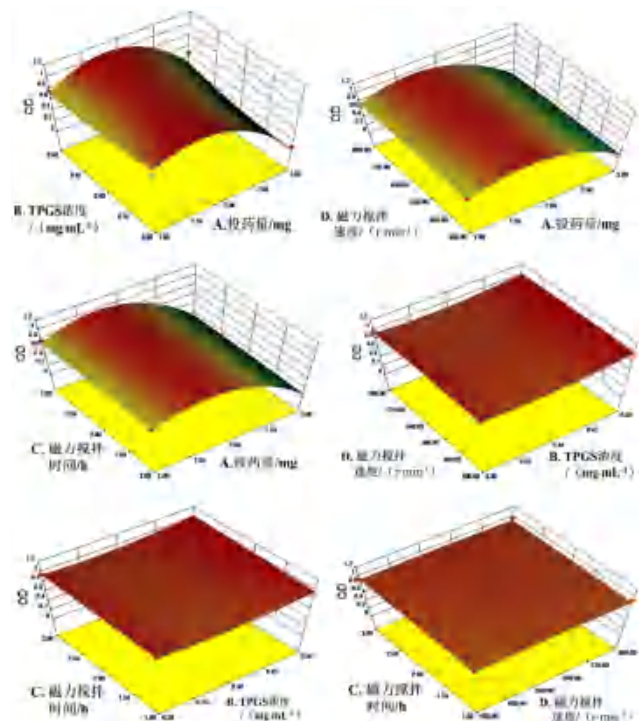


图 2 四个因素相互作用的三维响应面图
Fig 2 Three-dimensional response surface of interaction of 4 factors

④ 最优制备工艺处方的验证: 综合实际情况, 确定芹菜素投药量 2 mg, TPGS 质量浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 磁力搅拌速度为 $700 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 磁力搅拌时间为 2.5 h, 平行 3 次试验, 测定包封率、

载药量和粒径。结果见表 4, 实际测得 OD 值与预测 OD 值基本接近, RSD 为 1.0%, 表明该方法预测的最优工艺处方参数可靠, 可用于该制备处方工艺优化。

表 4 制备工艺验证结果

编号	评价指标			RSD/%
	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	
1	97.37	4.42	62.2	1.0
2	95.79	4.34	61.5	
3	94.74	4.30	63.1	

2.3 API-PMs 的质量评价

2.3.1 包封率和载药量测定 精密吸取 50 μL 纳米胶束溶液, 加无水乙醇破乳并稀释至 5 mL, 按“2.1”项下方法测定药物的含量, 平行测定 3 次。计算包封率和载药量: 包封率 (%) = (包封的药物质量 / 加入的药物质量) \times 100%, 载药量 (%) = (包封的药物质量 / 胶束和药物总质量) \times 100%。计算得出胶束中芹菜素的包封率和载药量分别为 $(93.49 \pm 1.28) \%$ 和 $(4.45 \pm 0.06) \%$ 。

2.3.2 粒径测定 取 API-PMs 溶液适量, 加水稀释后用纳米粒度分析仪测量粒径大小, 平行测定 3 组, 结果如图 3 所示, 测得的 API-PMs 粒径为 $(62.8 \pm 1.1) \text{ nm}$, 表明制备的纳米胶束粒径小且分布均匀。

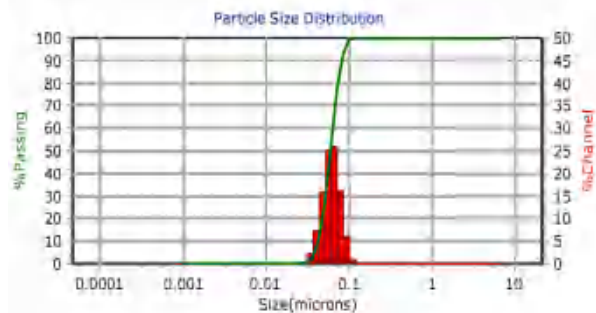


图 3 API-PMs 的粒径分布图
Fig 3 Particle size distribution of API-PMs

2.3.3 稳定性试验 将 API-PMs 溶液置于室温, 分别在第 0、7、14、21、28 日测定胶束的包封率和粒径, 结果包封率和粒径 RSD 分别为 1.5% 和 1.8%, 表明纳米胶束在室温条件下 28 d 内是比较稳定的。

2.3.4 傅里叶变换红外光谱法 (FTIR) 将芹菜素原料药 (API)、空白纳米胶束冻干样品 (PMs)、芹菜素原料药与空白纳米胶束的物理混合物冻干样品、芹菜素纳米胶束 (API-PMs) 冻干样品, 分别与一定量的溴化钾混合均匀, 压片, 测定

400 ~ 4000 cm^{-1} 内样品的红外光谱图, 如图 4 所示, 芹菜素原料药的 O-H 特征吸收峰 (3278 cm^{-1}) 和 C = O 特征吸收峰 (1654 cm^{-1} , 1608 cm^{-1}), 芹菜素原料药与空白纳米胶束的物理混合物的红外光谱中, 既有空白纳米胶束的特征吸收峰, 也有芹菜素原料药的 O-H 特征吸收峰; 芹菜素纳米胶束出现的 C = O 特征吸收峰 (1735 cm^{-1} , 1631 cm^{-1}) 相比空白纳米胶束出现 C = O 的特征吸收峰 (1737 cm^{-1} , 1639 cm^{-1}), 位移发生了改变, 这表明在芹菜素纳米胶束中, 芹菜素分子中的羟基与纳米胶束疏水结构中的羰基之间形成了氢键。

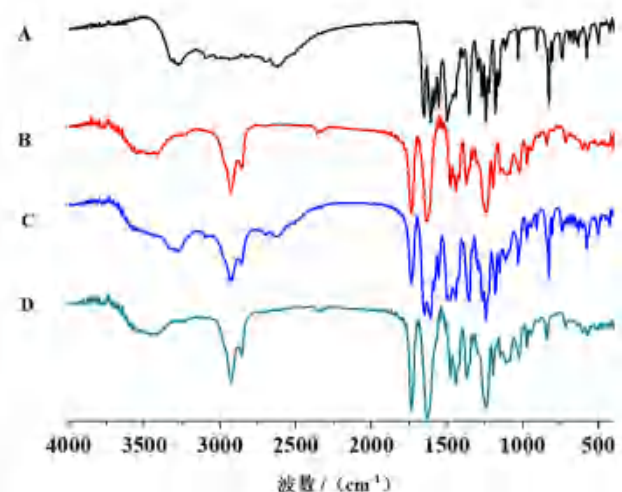


图 4 纳米胶束的红外光谱图

Fig 4 Infrared spectra of nanomicelles

A. 芹菜素原料药 (apigenin); B. 空白纳米胶束 (PMs); C. 芹菜素原料药与空白纳米胶束的物理混合物 (physical mixture of PMs and apigenin); D. 芹菜素纳米胶束 (API-PMs)

2.3.5 体外释放试验 在参考文献^[16]和预试验的基础上, 采用动态透析袋法考察 API-PMs 中芹菜素的释放行为。分别取 1 mL API 溶液和 1 mL API-PMs 溶液, 置透析袋 (截留分子量为 10000 Da), 两端扎紧, 在满足漏槽条件的前提下, 放入磷酸盐缓冲液 (pH 7.4, 0.5% Tween 80) 20 mL 释放介质中。在 37°C 、 $100 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下振摇, 分别于 0.5、1、2、3、4、5、6、8、10、12、24、36、48、72 h 时取出全部释放介质 (同时补入同温等量的新鲜释放介质), 平行 3 组。按“2.1”项下方法测定释放介质中芹菜素的含量, 计算累积释放率 (Q), 绘制释放曲线。结果如图 5 所示, API 在 72 h 内仅释放出 30.04%, API-PMs 在 72 h 内持续缓慢释放出 43.63%, 具有明显的缓释作用。采用 Higuchi 方程对胶束的体外释放数据进行拟合, 显示其体外释放符合 Higuchi 方程, 所

得回归方程 $Q = 5.326t^{1/2}$, $r = 0.9991$, 表明其体外释放以扩散为主, 药物从胶束的疏水内核中慢慢扩散到释放介质中。

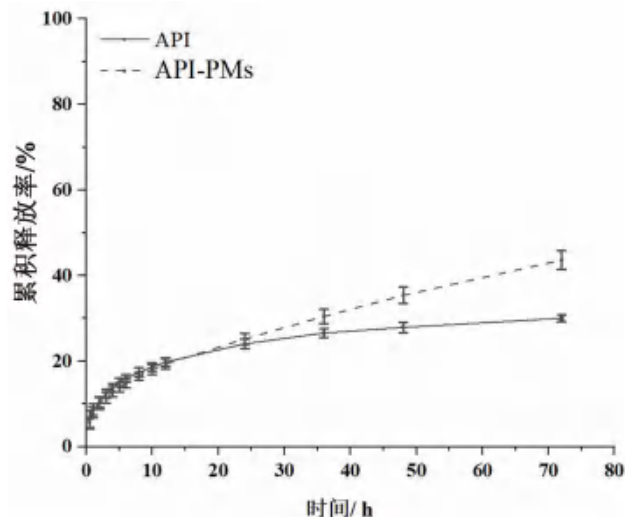


图 5 API 和 API-PMs 的累积释放曲线 ($n = 3$)

Fig 5 Cumulative release profile of API and API-PMs ($n = 3$)

3 讨论

本试验通过单因素试验和 Box-Behnken 设计-响应面法, 优化 API-PMs 的制备工艺, 验证试验显示实测值与预测值偏差较小, 表明 Box-Behnken 设计-响应面法具有较好的预测性, 可用于 API-PMs 的制备工艺的优化设计。

对于纳米胶束输送系统, 更高的包封率和载药量意味着同等给药剂量下进入患者体内的载体材料和辅料更少, 毒性和免疫原性风险更低。本试验中的 API-PMs 具有较高的包封率和载药量, 表明药物包封与载体载药性能良好。其粒径约 62 nm, 小于 100 nm, 符合口服吸收的粒径范围^[17]。稳定性试验结果显示, API-PMs 在常温条件下贮存 28 d 后, 其包封率和粒径没有显著变化, 表明纳米胶束性质稳定, 药物不易析出且贮存方便。从 FTIR 分析可以得出, 芹菜素与载体之间形成的氢键提高了纳米胶束的稳定性, 使得载药量和包封率增加, 减少药物泄漏^[18]。

体外释放试验中, 在满足漏槽条件的前提下, 选择磷酸盐缓冲液 (pH 7.4, 0.5% Tween 80) 为其释放介质, 结果显示, 芹菜素原料药水溶性差, 快速在透析袋中沉淀, 不再释放, 而 API-PMs 具有明显的缓慢扩散作用, 达到了缓释、长循环的目的。本试验制备的 API-PMs 中加入 TPGS 吸收促进剂, 有利于胃肠道对纳米胶束的吸收, 而纳米胶束能否促进芹菜素吸收, 有待进一步研究。

参考文献

- [1] Ginwala R, Mctish E, Raman C, et al. Apigenin, a natural flavonoid, attenuates eae severity through the modulation of dendritic cell and other immune cell functions [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2016, 11 (1): 36-47.
- [2] Shankar E, Goel A, Gupta K, et al. Plant flavone apigenin: an emerging anticancer agent [J]. *Curr Pharmacol Rep*, 2017, 3 (6): 423-446.
- [3] Imran M, Aslam GT, Atif M, et al. Apigenin as an anticancer agent [J]. *Phytother Res*, 2020, 34 (8): 1812-1828.
- [4] Papachristou F, Anninou N, Koukoulis G, et al. Differential effects of cisplatin combined with the flavonoid apigenin on HepG2, Hep3B, and Huh7 liver cancer cell lines [J]. *Mutat Res*, 2021, 866: 503352.
- [5] Zhang J, Liu D, Huang Y, et al. Biopharmaceutics classification and intestinal absorption study of apigenin [J]. *Int J Pharm*, 2012, 436 (1-2): 311-317.
- [6] Strickley RG. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations [J]. *Pharm Res*, 2004, 21 (2): 201-230.
- [7] Maeda H, Bharate GY, Daruwalla J. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009, 71 (3): 409-419.
- [8] Hou J, Sun E, Sun CY, et al. Improved oral bioavailability and anticancer efficacy on breast cancer of paclitaxel via Novel Soluplus®-Solutol® HS15 binary mixed micelles system [J]. *Int J Pharmaceut*, 2016, 512 (1): 186-193.
- [9] Alsalhi A, Ayon NJ, Sikder S, et al. Self-assembled nanomicelles to enhance solubility and anticancer activity of etoposide [J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2021, 19 (8): 526-538.
- [10] Alvarez-Rivera F, Fernández-Villanueva D, Concheiro A, et al. α -Lipoic acid in Soluplus® polymeric nanomicelles for ocular treatment of diabetes-associated corneal diseases [J]. *J Pharm Sci*, 2016, 105 (9): 2855-2863.
- [11] Obata T, Suzuki Y, Ogawa N, et al. Improvement of the antitumor activity of poorly soluble sapacitabine (CS-682) by using Soluplus as a surfactant [J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37 (5): 802-807.
- [12] Jin IS, Jo MJ, Park CW, et al. Physicochemical, pharmacokinetic, and toxicity evaluation of soluplus® polymeric micelles encapsulating fenbendazole [J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12 (10): 1000.
- [13] Yang C, Wu T, Qi Y, et al. Recent advances in the application of vitamin E TPGS for drug delivery [J]. *Theranostics*, 2018, 8 (2): 464-485.
- [14] Moretton MA, Bernabeu E, Grotz E, et al. A glucose-targeted mixed micellar formulation outperforms Genexol in breast cancer cells [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017, 114: 305-316.
- [15] Zoran Z, Muammer K, Branimir P, et al. Chemical characterization of polyphenols and volatile fraction of coriander (*Coriandrum sativum* L.) extracts obtained by subcritical water extraction [J]. *Ind Crop Prod*, 2016, 87: 54-63.
- [16] 周韵秋, 冀素平, 刘聪, 等. 白藜芦醇聚合物胶束的制备及质量评价 [J]. *中国医药生物技术*, 2020, 15 (1): 25-31.
- [17] Feng SS, Mei L, Anitha P, et al. Poly (lactide) -vitamin E derivative montmorillonite nanoparticle formulations for the oral delivery of docetaxel [J]. *Biomaterials*, 2009, 30 (19): 3297-3306.
- [18] Dian LH, Hu YJ, Lin JY, et al. Fabrication of paclitaxel hybrid nanomicelles to treat resistant breast cancer via oral administration [J]. *Int J Nanomed*, 2018, 2 (13): 719-731.

(收稿日期: 2022-07-06; 修回日期: 2022-10-11)

克班宁对肝癌细胞增殖和凋亡的影响

谭佳杰, 向玉玲, 熊远果, 张洪* (武汉大学人民医院药学部, 武汉 430060)

摘要: **目的** 研究异喹啉生物碱克班宁对肝癌细胞株 Huh7 的生长抑制作用及促凋亡作用。**方法** 用不同浓度的克班宁作用于 Huh7 细胞后, 按照 CCK-8 法检测克班宁对肝癌细胞增殖的影响, 并据此将后面的实验分为对照组和给药组 (36、48、60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); 利用形态学实验观察克班宁对肝癌细胞生长和状态的影响, 平板克隆实验观察细胞克隆形成能力; Hoechst 33258 实验和流式细胞术检测细胞凋亡状态和水平; Western blot 检测细胞中 BAX、Bcl-2、PARP 凋亡相关蛋白及 AKT、p-AKT、FoxO3a、p-FoxO3a 的表达情况。**结果** 与对照组相比, 克班宁可明显抑制 Huh7 细胞的增殖能力, 抑制作用呈剂量和时间依赖性; 且可诱导 Huh7 细胞出现明显的形态学变化; 并在长时间内影响其克隆形成能力; 同时还显著促进细胞凋亡, 上调 PARP、BAX 蛋白的表达, 下调 Bcl-2、p-AKT、p-FoxO3a 蛋白的表达。**结论** 克班宁不仅能抑制肝癌细胞株 Huh7 的增殖, 还能促进细胞凋亡, 且其促凋亡作用有可能是通过抑制 AKT/FoxO3a 信号通路产生的。

关键词: 克班宁; 肝细胞癌; Huh7 细胞; 增殖; 凋亡; AKT/FoxO3a

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0392-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.018

Effect of crebanine on the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells

TAN Jia-jie, XIANG Yu-ling, XIONG Yuan-guo, ZHANG Hong* (Department of Pharmacy, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060)

Abstract: Objective To determine the inhibitory effect of isoquinoline alkaloid crebanine on the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma cell line Huh7. **Methods** After different concentrations of crebanine acting on Huh7 cells, the effect of crebanine on the proliferation of Huh7 cells was detected according to CCK-8 method. The following experiments were divided into a control group and 3 dosing groups (36, 48 and 60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); subsequent morphological experiment was conducted to determine the effect of crebanine on the growth and status of Huh7 cells. The ability of cell clone formation was observed in plate cloning assays. Then, Hoechst 33258 assay and flow cytometry were used to detect the apoptosis status and level. The expression of apoptosis-related proteins BAX, Bcl-2, PARP, AKT, p-AKT, FoxO3a, and p-FoxO3a in the cells were recognized by Western blot. **Results** Compared with the control group, crebanine significantly inhibited the proliferation of Huh7 cells with dose and time dependence. It evidently altered the morphology of Huh7 cells and affected their reproduction over an extended period of time. Crebanine also promoted the apoptosis significantly, up-regulated PARP and BAX protein expression, and down-regulated Bcl-2, p-AKT, and p-FoxO3a protein expression. **Conclusion** Crebanine not only inhibits the proliferation of hepatocellular carcinoma cell line Huh7, but also promotes the apoptosis by inhibiting AKT/FoxO3a signal pathway.

Key words: crebanine; hepatocellular carcinoma; Huh7 cell; proliferation; apoptosis; AKT/FoxO3a

基金项目: 湖北省自然科学基金项目 (No. 2012FKB04439)。

作者简介: 谭佳杰, 女, 在读硕士研究生, 主要从事消化系统疾病进行治疗药物的药剂学与药理学研究, email: jiajietan0814@163.com

*通信作者: 张洪, 男, 主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事消化系统疾病进行治疗药物的药剂学与药理学研究, email: 1324409465@qq.com

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 作为世界上最常见的癌症之一, 常由包括慢性乙型和丙型肝炎病毒感染、过量饮酒、非酒精性脂肪肝在内的各种风险因素导致^[1-2]。其常见的治疗方法包括手术切除、肝移植、局部消融和经导管动脉化疗栓塞术, 其中晚期肝癌患者的临床疗效和预后非常差, 迫切需要更有效的治疗药物^[3-4]。

克班宁 (crebanine) 作为一种阿朴啡类异喹啉生物碱, 存在于防己科千金藤属 (*Stephania Lour*) 植物中, 多来自其中的千金藤亚属 (*Subgen. Stephania*) 和山乌龟亚属 (*Subgen. Tuberiphania*)^[5]。研究发现, 在云南地不容中, 阿朴啡型和原小檗碱型生物碱最多, 其中克班宁是含量最高的阿朴啡型化合物之一^[6]。迄今为止, 对于克班宁的性质结构已有了一定的探索结果^[7-9], 且发现它具有抗心律失常等多种药理活性^[10-13]。同时, 已有多个研究证明克班宁能有效抑制白血病、纤维肉瘤、宫颈癌、乳腺癌、肺癌和卵巢癌等肿瘤细胞的活性^[14-17]。Yodkeeree 等^[18]发现克班宁能通过下调侵袭迁移相关因子的表达来抑制肺癌的迁移和侵袭, 另外 Wongsirisin 等^[19]还发现克班宁作用于 HL-60 细胞后, 能通过调控凋亡相关蛋白来介导细胞凋亡。

但关于克班宁对肝癌的生物学影响, 目前还未见更深入报道, 因此, 本研究的目的在于探索克班宁对肝癌生物学方面的影响, 从而为未来开发克班宁在肝癌方向的治疗作用提供一定的参考, 并奠定相应的研究基础。

1 材料

1.1 试药

克班宁 (分子式: $C_{20}H_{21}NO_4$, 纯度 $\geq 98\%$, 规格: 20 mg, 批号: RFS-K02811812016, 成都瑞芬思生物科技有限公司, 化学结构如图 1); DMEM 高糖培养基 (批号: 8120360)、胎牛血清 (批号: 20012050)(美国 Gibco 公司); CCK-8 试剂盒 (批号: C0038, 上海碧云天生物技术有限公司); Hoechst 33258 染色试剂盒 (批号: G1011)、PBS (批号: G4202)(武汉赛维尔生物科技有限公司); Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒 (批号: 8086787, 美国 BD 公司); FoxO3a 抗体 (批号: 10849-1-AP)、p-AKT 抗体 (批号: 28731-1-AP)、p-FoxO3a 抗体 (批号: 28755-1-AP)(武汉三鹰生物技术有限公司); BAX 抗体 (批号: 5023S)、Bcl-2 抗体 (批号: 3498S)、PARP 抗体 (批号: 9532S)、AKT 抗体 (批号: 9272S)、 β -actin 抗体 (批号: 4970S)、二抗 anti-rabbit IgG (H + L)(批号: 5151S)(美国 CST 公司)。

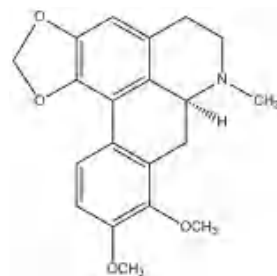


图 1 克班宁的化学结构

Fig 1 Chemical structure of crebanine

1.2 仪器

HERAcell 160i 二氧化碳培养箱 (美国 Thermo); TC20 细胞计数仪 (美国 BIO-RAD); EnSight 酶标仪 (美国 Perkin Elmer); CytoFlex 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter); IX73 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus); DYY-7C 蛋白电泳仪 (北京六一生物科技有限公司); Odyssey 双色红外激光成像系统 (美国 Li-COR)。

1.3 细胞和培养

人肝癌细胞系 Huh7 (中国科学院上海细胞生物研究所), 采用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素 - 链霉素双抗的完全 DMEM 培养基, 在 37 °C、5% CO_2 条件下的细胞培养箱中培养, 每 2 ~ 3 d 换液传代。

2 方法

2.1 CCK-8 法检测细胞存活率

将 Huh7 细胞以每孔 1×10^4 个接种至 96 孔板中, 培养 24 h 后, 按照 0 (对照组)、12、36、48、60、96 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的分组分别给予克班宁, 每个质量浓度 6 个复孔, 然后继续在相同条件下培养, 待 24、48 和 72 h 后, 在每孔中加入 10 μL CCK-8 工作液, 在 450 nm 波长下测定各孔的吸光度值。细胞存活率 (%) = (给药组吸光度 - 空白组吸光度) / (对照组吸光度 - 空白组吸光度) $\times 100\%$ 。

2.2 细胞形态学观察

取对数生长期的 Huh7 细胞, 以每孔 4×10^6 个接种于 6 孔板中, 待培养 24 h 后给予不同质量浓度的克班宁 [0 (对照组)、36、48、60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$], 继续培养 24 h 后弃去培养基, 用 PBS 清洗 2 次, 加入 1 mL DMEM 后在倒置显微镜下观察肝癌细胞的生长状态和形态变化, 并拍照记录。

2.3 克隆形成实验

将 Huh7 细胞以每孔 4×10^3 个接种到 6 孔板中, 放入培养箱培养 24 h, 给予克班宁, 在 24 h 后弃去培养基, 重新加入新鲜培养基, 待 14 d 后用 PBS 清洗 2 次, 并以 4% 多聚甲醛固定 20 min, 之后用 0.5% 结晶紫染色, 30 min 后清洗并晾干, 同时拍

照记录。细胞数 > 30 个为一个集落，克隆形成率 (%) = 每组的克隆形成数 / 接种细胞数 × 100%。

2.4 Hoechst 33258 实验

细胞收集、种板、给药方法同“2.2”项下，给药 24 h 后用 PBS 清洗 2 次，再用 4% 多聚甲醛固定 20 min，加入 Hoechst 33258 工作液避光孵育 30 min，用荧光倒置显微镜观察拍照。

2.5 流式细胞术检测细胞凋亡

细胞收集、种板、给药方法同“2.2”项下，给药 24 h 后，收集培养基，PBS 清洗 2 次，用无 EDTA 胰酶消化，1000 × g 离心 5 min，再次用 PBS 清洗 2 次，每组加入 100 μL 缓冲液、5 μL Annexin V-FITC 及 5 μL PI，避光孵育 25 min 后用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.6 Western blot 实验

将对数生长期的 Huh7 细胞以每孔 7 × 10⁶ 个接种于 100 mm 的培养皿中，培养 24 h 后给予克班宁，再孵育 24 h 后，提取蛋白，以 BCA 法测定蛋白浓度。将蛋白上样后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，2 h 后恒流进行电转，之后用 5% 的 BSA 封闭 1.5 h，加 TBST 清洗，然后用相应一抗在 4 °C 条件下孵育过夜；再次用 TBST 清洗，之后加入 HRP 标记的二抗 (1 : 10 000) 孵育 2 h，同样用 TBST 清洗，最后用 Odyssey 双色红外激光成像系统扫描目的条带。扫描结果用 Image J 软件测定灰度值，最后目的蛋白的相对表达量 = 目的蛋白的灰度值 / 内参的灰度值。

2.7 统计学处理

采用 GraphPad Prism 软件进行统计分析和图片制作，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，3 组及以上数据组间差异评估采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。各实验至少重复 3 次。

3 结果

3.1 克班宁对肝癌 Huh7 细胞增殖能力的影响

CCK-8 实验结果见图 2，与对照组相比，随着给药浓度增加 (0、12、36、48、60、96 μg · mL⁻¹) Huh7 细胞的增殖活性逐渐降低，且细胞的存活率随着时间的增长 (24、48、72 h) 也显著降低 ($P < 0.01$)，总体呈现出良好的剂量和时间依赖性；根据 GraphPad 软件计算得出 IC₅₀ 值：24 h 为 (45.05 ± 1.48) μg · mL⁻¹，48 h 为 (24.47 ± 0.52) μg · mL⁻¹，72 h 为 (15.90 ± 0.40) μg · mL⁻¹。克隆形成实验结果见图 3，给药剂量越大，克隆形成的数量越少，密度越小，克班宁的质量浓度对肝癌细胞长期增殖能力的影响较大，具有浓度依赖性 ($P < 0.01$)。

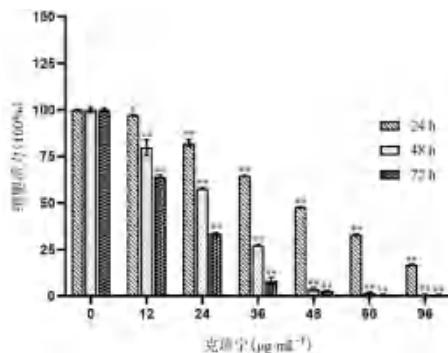


图 2 不同浓度克班宁作用不同时间对肝癌 Huh7 细胞活力的影响 (n = 6)

Fig 2 Effect of different concentrations of crebanine on the viability of Huh7 cells at different time (n = 6)

注：与对照组 (0 μg · mL⁻¹) 比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.2 克班宁对肝癌 Huh7 细胞形态学的影响

从图 4 可观察到克班宁对 Huh7 肝癌细胞形态上的影响较为明显，对照组肝癌细胞生长状态良好，Huh7 细胞紧密贴壁，且细胞形状多保持完整，呈现不规则多边形，多为梭形；而随着克班宁给药剂量的增加，细胞生长状态不断下降的同时密度也降低，且逐渐出现大量的空泡，当给药剂量达到 60 μg · mL⁻¹ 时，大量肝癌细胞缩小变圆，无法保持基本的癌细胞形态。这表明克班宁有较好的抑制肝癌 Huh7 细胞的作用。

3.3 克班宁对肝癌 Huh7 细胞的促凋亡作用

从图 5A 可以看出，相比于对照组在荧光倒置显微镜下呈现出的均匀染色，细胞核形状完整的状态，给予了一定剂量的克班宁的肝癌细胞则逐渐皱缩，破碎，细胞核也大多形态异常，并且这种状况随着剂量的加大而变得更加严重；由流式细胞术的检测结果可知 (见图 5B)，克班宁作用于 Huh7 细胞 24 h 后，细胞凋亡率随着浓度的升高而增加，晚期凋亡细胞数量从对照组的 5.87% 上升至 37.5%，可见克班宁对肝癌 Huh7 细胞的促凋亡作用有剂量依赖性。

3.4 克班宁对肝癌 Huh7 细胞凋亡相关蛋白的表达影响

Western blot 检测凋亡相关蛋白的检测结果如图 6A 所示，与对照组相比，克班宁给药组肝癌细胞中 BAX、Cleaved-PARP 蛋白表达均显著增加，Bcl-2 蛋白表达则显著降低；各个凋亡蛋白的相对表达量见图 6B，克班宁的浓度越高，BAX 蛋白表达水平越高，相对的 Bcl-2 蛋白表达越低。为了研究克班宁对 Huh7 细胞凋亡和增殖的影响是否与 Akt/FoxO3a 信号通路有关，本研究采用 Western

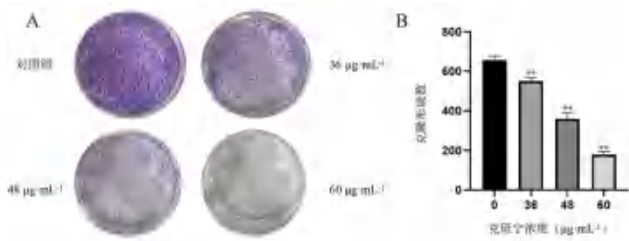


图 3 不同浓度克班宁对肝癌 Huh7 细胞活力的影响
Fig 3 Effect of different concentrations of crebanine on the viability of Huh7 cells

注：与对照组 (0 μg · mL⁻¹) 比较，***P* < 0.01。
Note: Compared with the control group, ***P* < 0.01.



图 4 不同浓度克班宁对肝癌 Huh7 细胞形态的影响
Fig 4 Effect of different concentrations of crebanine on the morphology of Huh7 cells

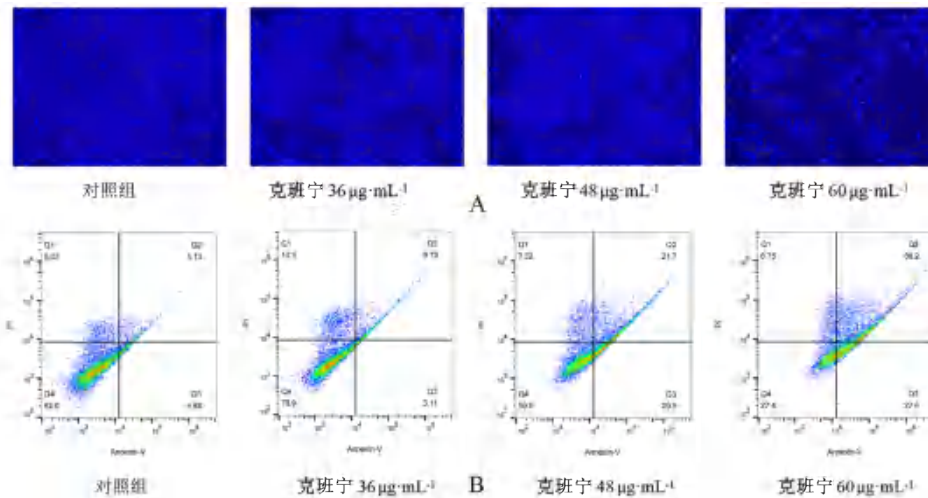


图 5 不同浓度克班宁对肝癌 Huh7 细胞凋亡的影响
Fig 5 Effect of different concentrations of crebanine on the apoptosis of Huh7 cells

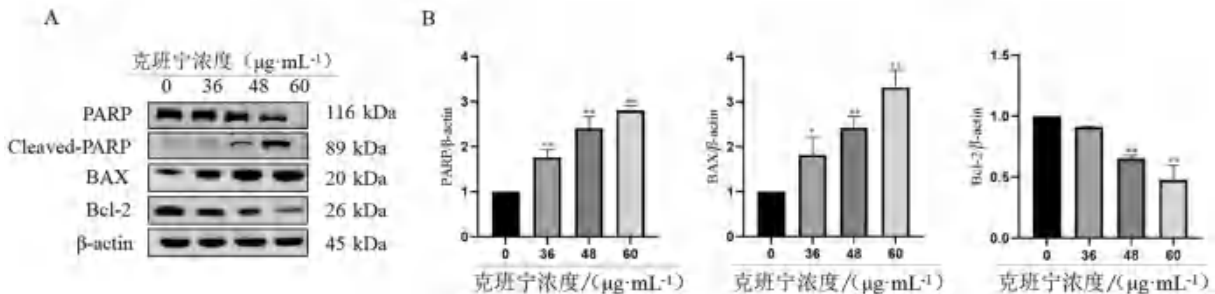


图 6 不同浓度克班宁对肝癌 Huh7 细胞凋亡蛋白表达的影响
Fig 6 Effect of different concentrations of crebanine on the expression of apoptosis protein in Huh7 cells

注：与对照组 (0 μg · mL⁻¹) 比较，**P* < 0.05，***P* < 0.01。
Note: Compared with the control group, **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

blot 检测不同浓度克班宁处理的 Huh7 细胞中相关蛋白 (AKT、p-AKT、FoxO3a 和 p-FoxO3a) 的表达水平。根据图 7A 结果所示, AKT 和 FoxO3a 的表达水平几乎保持不变, 而 p-AKT 和 p-FoxO3a 的表达水平随着克班宁浓度的增加而下降。综合图 7B 的结果来看, 中、高浓度克班宁显著抑制 AKT/FoxO3a 信号通路蛋白的表达 (*P* < 0.01)。

4 讨论

HCC 有着起病隐匿, 恶性程度高, 早期诊断困难, 预后差等特点; 且研究发现 HCC 患者的平

均年生存率低于 10%^[20], 在晚期肝癌患者全身治疗药物有限, 对传统化疗药物极为不敏感的情况

下^[21], 即使有类似索拉非尼、乐伐替尼、纳武单抗等靶点药物的出现, 也仍有大部分患者因为价

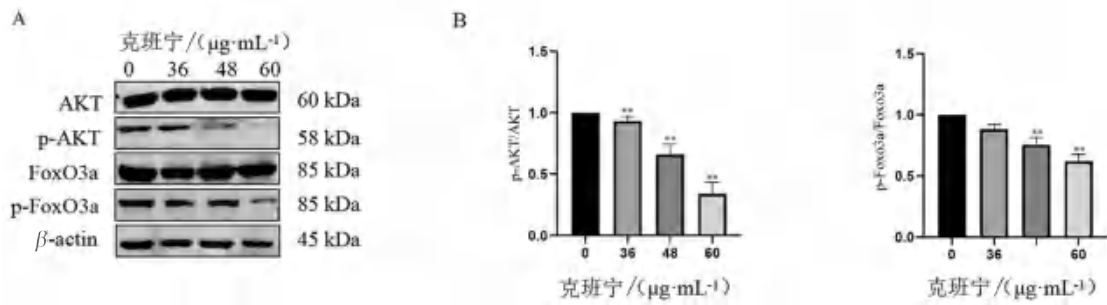


图 7 不同浓度克班宁对肝癌 Huh7 细胞不同蛋白表达的影响

Fig 7 Effect of different concentrations of crebanine on the expression of different proteins in Huh7 cells

注：与对照组 ($0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 比较，** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the control group, ** $P < 0.01$.

格昂贵或者不良反应的原因而无法长期使用^[22]，而现在，从天然化合物中提取出有效成分，研究其抑制癌症的功能并开发成抗肿瘤药物，已经逐渐成为热点^[23-24]。越来越多的证据表明，天然化合物可以通过抑制 HCC 的增殖、迁移、侵袭、凋亡、自噬等功能来发挥抗肿瘤作用^[25]。

本研究在 CCK-8 法和克隆形成实验中观察到，克班宁在体外显著抑制肝癌 Huh7 细胞系的生长，这种抑制能力长期存在；且通过显微镜发现肝癌细胞形态异常，随着药物剂量增大出现空泡化和皱缩，表明其有可能被诱导凋亡，而 Hoechst 33258 和流式细胞实验结果则同时证明了克班宁有促进肝癌凋亡的能力，Western blot 检测到凋亡相关蛋白 BAX 和 Cleaved-PARP 的过表达，Bcl-2 的低表达，再次证实了这一猜想。

另外，本实验还初步探索了克班宁对 PI3K/AKT 信号通路的影响，过去的研究发现 PI3K/AKT 信号通路在多种人类癌症中异常激活，如肝癌、胰腺癌、结肠癌、乳腺癌、卵巢癌等^[26]。研究表明激活的 PI3K 可以磷酸化并激活 AKT，而 AKT 是 PI3K/AKT 信号通路中的关键调节因子，被激活的 AKT 调节多种效应分子促进肿瘤的发展，其中 FoxO3a 是 AKT 的重要靶点之一^[27]。在 PI3K/AKT 信号通路被异常激活后，AKT 对 FoxO3a 的磷酸化触发了 FoxO3a 蛋白，使其从细胞核到细胞质的快速重新定位，激活或抑制 FoxO3a 相关信号分子；其中，受 FoxO3a 调控的 Bim、PUMA、14-3-3、FasL 和 TRAIL 都是与凋亡相关的蛋白^[28-29]。而 Hagenbuchner 等^[30]在研究中证明了 FoxO3a 不仅影响线粒体功能及相关凋亡因子的表达，还通过诱导线粒体活性氧 (ROS) 的积累和 Bcl-2 蛋白家族的表达来控制细胞凋亡的进程。另外，Yan 等^[31]的研究结果也表明了库潘尼西 (copanlisib) 通过 AKT/FoxO3a/PUMA 轴对结直肠癌有细胞毒性和促

凋亡作用。还有研究表明，扁蒴藤素 (pristimerin) 可以直接调控 PI3K/AKT/FoxO3a 途径引发葡萄糖膜黑色素瘤的细胞死亡^[32]。而在本实验中发现克班宁可显著抑制 AKT 磷酸化，同时减少 FoxO3a 的磷酸化，证明克班宁可以干扰 AKT/FoxO3a 信号的表达，从而对肝癌产生细胞毒性，致使细胞死亡。

综上所述，克班宁对肝癌 Huh7 细胞增殖有明显的抑制作用，同时促进了肝癌细胞的凋亡，能显著促进或抑制凋亡相关蛋白的表达，而早在之前的研究中就已经证实 AKT/FoxO3a 是调节细胞凋亡的关键通路之一^[33-34]；因此，初步推测克班宁的促凋亡作用可能是通过抑制 AKT/FoxO3a 信号通路产生的。当然，两者之间的关系需要进一步的实验验证，而本课题组也只是对克班宁抗肝癌作用进行了初步研究，其对肝癌迁移、侵袭和其他功能的影响未来仍需更为深入的探讨。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 7 (3): 209-249.
- [2] Kudo M. Recent advances in systemic therapy for hepatocellular carcinoma in an aging society: 2020 update [J]. Liver Cancer, 2020, 9 (6): 640-662.
- [3] Craig AJ, Von Felden J, Garcia-Lezana T, et al. Tumour evolution in hepatocellular carcinoma [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 17 (3): 139-152.
- [4] Armengol C, Sarrias MR, Sala M. Hepatocellular carcinoma: present and future [J]. Med Clin (Barc), 2018, 150 (10): 390-397.
- [5] Xiao J, Song N, Lu T, et al. Rapid characterization of TCM qianjinteng by UPLC-QTOF-MS and its application in the evaluation of three species of stephania [J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 156: 284-296.
- [6] 马云淑, 方波, 张壮丽. 云南含克班宁的千金藤属植物资源调查研究 [J]. 云南中医学院学报, 2005, 28 (1): 18-21.

- [7] 马云淑, 周发平, 张壮丽. 克班宁对照品的研究[J]. 中医药学刊, 2006, 46(6): 1038-1039.
- [8] 于蕾, 姜春艳, 宋冬雪, 等. 海南地不容生物碱抑制肿瘤细胞增殖及构效关系解析[J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(2): 145-154.
- [9] Da DB, Silva EC, Tulli GC, et al. The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *duguetia furfuracea* [J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(11): 1059-1063.
- [10] 陈玲玲, 马云淑, 晏菲, 等. 克班宁脂质体抗心律失常作用的研究[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(11): 1359-1361.
- [11] Xs L, Ma Q, Yu YS, et al. Crebanine inhibits voltage-dependent Na^+ current in guinea-pig ventricular myocytes [J]. *Chin J Nat Med*, 2014, 12(1): 20-23.
- [12] Deng Y, Yu Y, Luo H, et al. Antimicrobial activity of extract and two alkaloids from traditional Chinese medicinal plant *stephania dielsiana* [J]. *Food Chem*, 2011, 124(4): 1556-1560.
- [13] Kongkiatpaiboon S, Duangdee N, Prateeptongkum S, et al. Acetylcholinesterase inhibitor activity of alkaloids isolated from *stephania venosa* [J]. *Nat Prod Commun*, 2016, 11(2): 1805-1806.
- [14] 杨德兰, 梅文莉, 戴好富. 小叶地不容块根中的细胞毒活性生物碱[J]. 中国药物化学杂志, 2010, 20(3): 206-210.
- [15] Nantapap. Antiproliferative effects of alkaloids isolated from the tuber of *stephania venosa* via the induction of cell cycle arrest in mammalian cancer cell lines [J]. *American J Appl Sci*, 2010, 7(8): 1057-1065.
- [16] Makarasin A, Sirithana W, Mogkhuntod S, et al. Cytotoxic and antimicrobial activities of aporphine alkaloids isolated from *stephania venosa* (Blume) spreng [J]. *Planta Med*, 2011, 77(13): 1519-1524.
- [17] Le PM, Srivastava V, Nguyen TT, et al. Stephanine from *stephania venosa* (Blume) spreng showed effective antiparasitic and anticancer activities, the latter by inducing apoptosis through the reverse of mitotic exit [J]. *Phytother Res*, 2017, 31(9): 1357-1368.
- [18] Yodkeeree S, Pompimon W, Limtrakul P. Crebanine, an aporphine alkaloid, sensitizes TNF- α -induced apoptosis and suppressed invasion of human lung adenocarcinoma cells A549 by blocking NF- κ B-regulated gene products [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(9): 8615-8624.
- [19] Wongsirisin P, Yodkeeree S, Pompimon W, et al. Induction of G1 arrest and apoptosis in human cancer cells by crebanine, an alkaloid from *stephania venosa* [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2012, 60(10): 1283-1289.
- [20] Wang H, Lu Z, Zhao X. Tumorigenesis, diagnosis, and therapeutic potential of exosomes in liver cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12: 133.
- [21] Zhao WT, Han LX, Liu L, et al. The Yunnan national medicine maytenus compound inhibits the proliferation of hepatocellular carcinoma by suppressing the activation of the EGFR-PI3K-AKT signaling pathway [J]. *J Cancer*, 2021, 12(11): 3325-3334.
- [22] Chen Z, Xie H, Hu M, et al. Recent progress in treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(9): 2993-3036.
- [23] Xiang Y, Guo Z, Zhu P, et al. Traditional Chinese medicine as a cancer treatment: modern perspectives of ancient but advanced science [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(5): 1958-1975.
- [24] Luo H, Vong CT, Chen H, et al. Naturally occurring anti-cancer compounds: shining from Chinese herbal medicine [J]. *Chin Med*, 2019, 14: 48.
- [25] Alqahtani A, Khan Z, Alloghbi A, et al. Hepatocellular carcinoma: molecular mechanisms and targeted therapies [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2019, 55(9): 526.
- [26] Kapoor I, Li Y, Sharma A, et al. Resistance to BTK inhibition by ibrutinib can be overcome by preventing FOXO3a nuclear export and PI3K/AKT activation in B-cell lymphoid malignancies [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(12): 924.
- [27] Zhu Y, Rao Q, Zhang X, et al. Galangin induced antitumor effects in human kidney tumor cells mediated via mitochondrial mediated apoptosis, inhibition of cell migration and invasion and targeting PI3K/AKT/mTOR signalling pathway [J]. *J BUON*, 2018, 23(3): 795-799.
- [28] Mu D, Miao C, Cheng Y, et al. The on-off action of forkhead protein O3a in endotoxin tolerance of kupffer cells depends on the PI3K/AKT pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 82: 106342.
- [29] Huang H, Tindall DJ. Dynamic FoxO transcription factors [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 15): 2479-2487.
- [30] Hagenbuchner J, Ausserlechner MJ. Mitochondria and FoxO3: breath or die [J]. *Front Physiol*, 2013, 4: 147.
- [31] Yan J, Yang S, Tian H, et al. Copanlisib promotes growth inhibition and apoptosis by modulating the AKT/FoxO3a/PUMA axis in colorectal cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(11): 943.
- [32] Yan F, Liao R, Silva M, et al. Pristimerin-induced uveal melanoma cell death via inhibiting PI3K/Akt/FoxO3a signalling pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(11): 6208-6219.
- [33] Holm K, Isacson O. Factors intrinsic to the neuron can induce and maintain its ability to promote axonal outgrowth: a role for BCL2? [J]. *Trends Neurosci*, 1999, 22(6): 269-273.
- [34] Dong P, Zhang X, Zhao J, et al. Anti-miR-132 causes sevoflurane-induced neuronal apoptosis via the PI3K/AKT/FOXO3a pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(6): 3238-3246.

(收稿日期: 2022-07-19; 修回日期: 2022-08-30)

基于加权基因共表达网络分析建立结肠腺癌预后风险模型 以及关键基因药物敏感性分析

黎蕴琪¹, 蒋利和^{2,3}, 陈闯^{1*} (1. 广西医科大学附属肿瘤医院, 南宁 530021; 2. 右江民族医学院, 广西 百色 533000; 3. 广西大学, 南宁 530004)

摘要: 目的 筛选与结肠腺癌 (COAD) 发展相关的枢纽基因, 构建 COAD 预后模型。方法 通过下载两个 GEO 数据集进行加权基因共表达网络分析 (WGCNA) 和差异表达分析, 将获得的差异表达基因 (DEGs) 和重要模块基因取交集得到共同基因用于进一步分析。将癌症样本随机分为训练集 (70%) 和测试集 (30%), 利用训练集进行预后模型的构建, 利用测试集和 TCGA 数据对模型进行内外部验证。通过时间依赖性 ROC 曲线和列线图评估模型的预测能力; 对高、低风险组进行 GSEA 富集分析探索潜在功能; 最后通过 CellMiner 和 GEO 数据库探究关键基因的表达与药物敏感性之间的关系。结果 筛选出 5 个关键基因构建 COAD 预后模型并成功验证, 风险评分可以作为独立的预后因子 ($HR = 1.581, P < 0.001$)。ROC 曲线分析显示, 在 1 年、2 年和 3 年的随访中, 训练集的 AUC 分别为 0.690、0.709、0.699。生存分析显示, 与高风险组相比, 低风险组总体生存率更高 ($P < 0.001$)。此外, 模型中的 HSD17B2 基因与多种 COAD 化疗药物的耐药性相关。结论 筛选并验证了 5 个枢纽基因 (GZMB、HSD17B2、PDK4、PIGR 和 PXMP2) 可能为 COAD 的潜在预后标志物, 其中 HSD17B2 可能与结肠腺癌的耐药性有关。

关键词: 结肠腺癌; 加权基因共表达网络分析; 预后模型; 药物敏感性

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0398-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.019

Establishment of colon adenocarcinoma prognostic risk model and key genes drug sensitivity analysis based on weighted gene co-expression network

LI Yun-qi¹, JIANG Li-he^{2,3}, CHEN Chuang^{1*} (1. Cancer Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021; 2. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise Guangxi 533000; 3. Guangxi University, Nanning 530004)

Abstract: Objective To screen the hub genes related to the development of colorectal adenocarcinoma (COAD), and construct a prognostic COAD model. **Methods** Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) and differential expression analysis were performed by downloading two datasets from the GEO database. The hub genes of COAD were obtained by intersection of DEGs and WGCNA, and used for further analysis. The cancer samples were randomly divided into a training set (70%) and a test set (30%). The training set was used to construct a prognostic model, and the test set and TCGA data were used to validate the model internally and externally. The time-dependent receiver operating characteristic (ROC) curve and nomogram were used to evaluate the model. Gene set enrichment analysis (GSEA) was performed on high- and low-risk groups to determine potential functions. CellMiner database and GEO database were used to analyze the relationship between the expression of hub genes and drug sensitivity. **Results** Totally 5 key genes were screened to construct a colon adenocarcinoma prognostic model and successfully verified. The risk score could be used as an

基金项目: 广西中医药重点学科建设 (No. GZXK-Z-20-18); 右江民族医学院高层次人才引进科研启动项目 (No. YY2021SK02)。

作者简介: 黎蕴琪, 女, 在读硕士研究生, 主要从事恶性肿瘤的机制研究, email: 545857569@qq.com *通信作者: 陈闯, 男, 主任医师, 主要从事中西医结合防治肝癌的研究, email: chlch2@163.com

independent prognostic factor ($HR = 1.581, P < 0.001$). The ROC area under the curve of the training set of the 1-year, 2-year and 3-year follow-up was 0.690, 0.709 and 0.699. The Kaplan-Meier curve showed that compared with the high-risk group, the overall survival rate was higher than in the low-risk group ($P < 0.001$). Furthermore, *HSD17B2* in the model was associated with resistance to multiple COAD chemotherapeutics. **Conclusion** Five hub genes (*GZMB, HSD17B2, PDK4, PIGR* and *PXMP2*) have been screened and verified as potential prognostic markers for COAD, and *HSD17B2* may be associated with drug resistance in colon adenocarcinoma.

Key words: colon adenocarcinoma; weighted gene co-expression network analysis; prognostic model; drug sensitivity

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是世界上最常见的消化系统恶性肿瘤之一。据统计, 在全球范围内, CRC 发病率排第三, 病死率排第二^[1]。结肠腺癌 (colorectal adenocarcinoma, COAD) 是 CRC 中最常见的病理分型。目前, 根治性手术治疗是早期 COAD 最主要的治疗方法, 而对中晚期患者来说, 化疗是最常用且有效的选择, 可限制肿瘤细胞的扩散和转移, 进而控制病情。但化疗药物耐药性的产生和肿瘤的高复发率仍是 COAD 临床实践中的主要问题^[2-3]。

近年来, 生物信息学在挖掘癌症生物标志物^[4]和抗肿瘤药物分子靶点^[5]等研究方面发挥重要作用。加权基因共表达网络分析 (WGCNA) 主要运用于分析大样本基因表达数据, 将基因根据表达模式相似性分为不同模块^[6], 这种方法跟普通聚类方法的不同在于其将基因表达值的相关系数取了 N 次幂, 从而使得相关系数分布更加符合无尺度网络分析, 这更符合生物学规律^[7]。相比于只关注差异表达的基因, WGCNA 充分利用信息, 把基因与表型的关联转换为基因集与表型的关联, 免去了多重假设检验校正的问题。本研究基于 WGCNA 结合差异表达基因 (DEGs) 的方法, 构建高性能的预后预测模型, 同时对这些靶点进行化疗药物敏感性分析, 旨在筛选出高风险肿瘤患者并对其进行精准的靶向治疗, 以达到个体 COAD 治疗疗效最大化。

1 材料和方法

1.1 数据采集

微阵列数据集 GSE39582 和 GSE41258 以及这些数据集的相应临床数据从 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) 中下载, 通过 R 软件进行数据归一化处理, 利用 limma 包去除批次效应, 通过 ggord 包绘制 PCA 图。GEO 数据用于筛选 DEGs, 构建预后模型。从癌症基因组图谱 (TCGA) 数据库 (<http://cancergenome.nih.gov/>)

下载 COAD 的 RNA-seq 数据和相应临床信息。该数据集包括 424 个 COAD 样本, 用于验证预后模型和生存分析。

1.2 差异表达基因分析

采用 limma 软件包寻找 mRNA 的差异表达, 并通过 pheatmap 包绘制热图, “Adjusted $P < 0.05$ 且 $|\log_2FC| > 1$ ” 被定义为阈值, 得到的 DEGs 被用于后续分析。

1.3 WGCNA

在评估 GSE39582 和 GSE41258 的基因表达谱后, 使用 WGCNA 包构建无标度的共表达网络, 计算基因的皮尔逊相关系数以获得相关矩阵, 选择适当的软阈值来测量基因之间的连接性, 将邻接矩阵转换为拓扑重叠矩阵 (TOM), 并计算相应的差异 (1-TOM)。具有相似表达模式的基因被分为同一个共表达模块。此外, 我们计算了模块特征基因的差异性, 对模块进行了层次聚类, 并合并了相似的模块 ($abline = 0.25$)。

1.4 预后风险模型的构建

将 DEGs 和关键模块基因取交集, 得到共同基因用于进一步分析。将这些基因的表达谱和临床信息合并, 再随机分为训练集 (70%) 和测试集 (30%), 使用训练集建立模型并在测试集进行验证。在训练集中, 通过单变量 Cox 比例风险回归分析筛选与预后相关的基因, 纳入 Lasso 回归分析, 防止模型过度拟合, 然后纳入多因素 Cox 回归分析, 得出 COAD 预后风险模型, 计算每个患者的风险评分, 依据训练集风险评分的中位值, 分别将训练集和测试集分为高风险组和低风险组。运用 Kaplan-Meier 生存分析和 ROC 曲线评估该预后风险模型的准确性。利用生存时间和基因风险模型分别绘制散点图和高低风险热图, 利用风险评分结合临床信息绘制列线图。

1.5 基因集富集分析 (GSEA)

为了进一步确认预后关键基因的潜在功能和

识别高、低风险组的相关通路，使用 GSEA 软件 (4.0.1) 进行基因组富集分析，以 $P < 0.05$ 为阈值，展示 KEGG 相关通路的富集结果。

1.6 药物敏感相关性分析

CellMiner 是以美国国家癌症研究所癌症研究中心 (NCI) 所列出的 60 种癌细胞为基础建立的数据库^[8]。从 CellMiner 数据库下载 NCI-60 中基因 mRNA 表达数据和药物活性相关数据，探究 5 个关键基因的表达与药物敏感性之间的关系。此外，通过数据库 GSE81005 分析 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 耐药的结直肠癌细胞系和野生型结直肠癌细胞系中 *HSD17B2* mRNA 的表达高低。

1.7 统计学分析

使用 Wilcoxon 检验分析连续变量。使用 Kaplan-Meier 生存分析和 Cox 单因素分析进行预后分析。Pearson 相关性分析用于评估 5 个关键基因的表达与药物敏感性之间的相关性。使用 R 软件 (3.6.3 版本) 进行统计分析， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 数据处理

GSE39582 和 GSE41258 数据集共包含 73 个正常样本和 752 个 COAD 组织样本。从这些样本中鉴定出 490 个 DEGs，其中上调基因 313 个，下调基因 177 个 (见图 1A、B)。数据批次效应情况通过批次去除前后的 PCA 图进行评估 (见图 1C、D)。

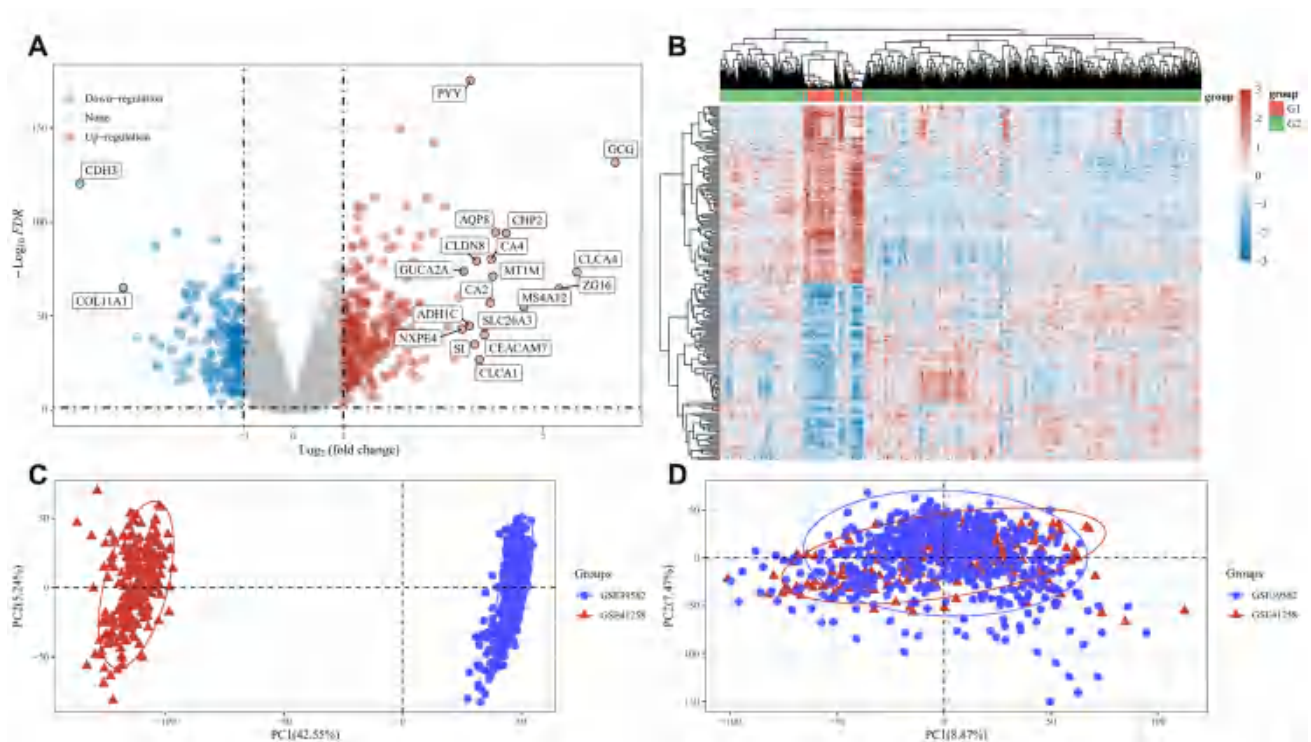


图 1 基因表达差异分析结果

Fig 1 Gene expression differential analysis

A. 火山图 (volcano map); B. 热图 (heat map); C. 两个数据集去除批次效应前的 PCA 结果图 (PCA of both datasets before removing the batch effect); D. 去除批次效应后的 PCA 结果图 (PCA result chart after removing the batch effect)

2.2 WGCNA 和关键模块的识别

为了找出与 COAD 相关的关键基因，笔者使用正常样本和 COAD 样本的基因表达矩阵进行了 WGCNA 分析。将软阈值 β 设置为 5，平均连通性接近 0 (见图 2C、D)。将具有相似表达模式的 DEGs 聚集到相同的模块中，最终得到 11 个共表达模块 (见图 2B)，灰色模块被认为是无法被分配给任何模块的基因集合。绿松石色模块与正常样本表型相关系数为 0.64，绿色模块与肿瘤样本表型相关系数为 0.53，通过分析基因与模块的相

关性 (MM) 和基因与临床特征 (正常和肿瘤) 的相关性 (GS) 之间的关联，发现绿色和绿松石色模块中 MM 和 GS 成正相关 (见图 2E、F)，说明这些与性状高度相关的基因，在关键模块中也扮演着举足轻重的角色。因此选择绿色和绿松石色为目的模块，并将 DEGs 和目的模块基因取交集筛选出 247 个基因用于进一步分析。

2.3 预后模型的构建

将表达和生存数据合并后的 740 个 GEO 数据集样本分为训练集 (70%) 和测试集 (30%)。首

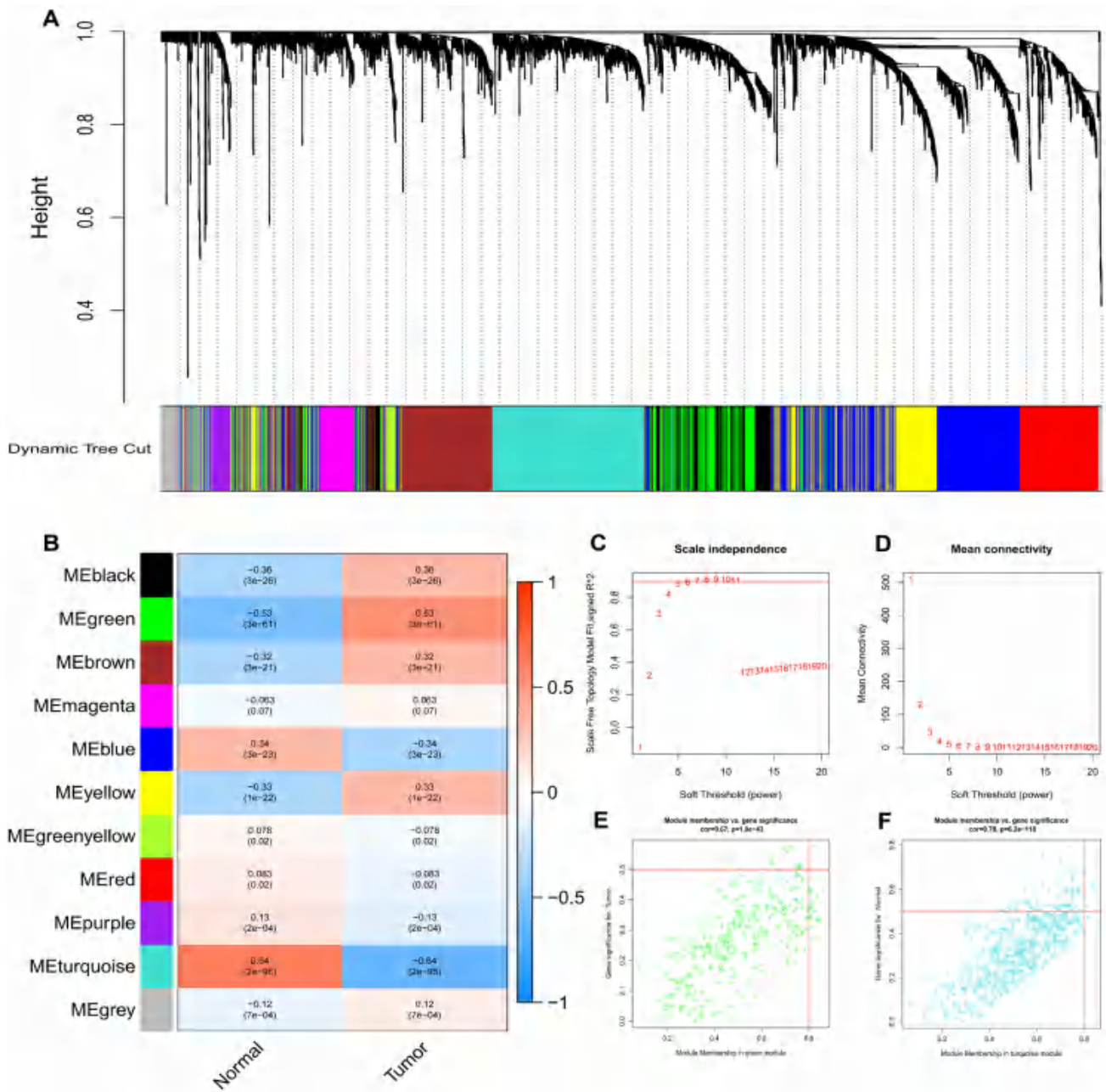


图 2 WGCNA 分析

Fig 2 WGCNA analysis

A. 聚类树状图 (cluster dendrogram); B. 模块和临床特征相关性分析 (correlation analysis of the modules and clinical traits); C、D. 软阈值 (soft threshold); E、F. 绿色和绿松石色模块中基因的 GS 评分和 MM 的散点图 (scatter plots of GS score and MM for genes in the green and turquoise modules)

先使用训练集的生存数据对 247 个 DEGs 进行单因素 Cox 比例风险回归分析, 鉴定出 7 个对预后具有显著影响的基因 ($P < 0.01$), 分别为 *GZMB*、*HSD17B2*、*PDK4*、*PIGR*、*PXMP2*、*GINS1*、*EMPI*。将上述基因纳入 Lasso 回归分析降维 (见图 3A、B), 进一步使用多变量 Cox 比例风险回归分析, 最终得到 5 个与 COAD 预后相关的风险基因 (见图 3C)。基于这 5 个关键基因进行风险预后模型的构建: $\text{Risk score} = -0.162GZMB +$

$0.210HSD17B2 + 0.184PDK4 - 0.141PIGR - 0.516PXMP2$ 。生存分析结果均显示低风险组的患者生存状况明显优于高风险组 ($P < 0.001$, 见图 4A、B)。训练集 1 年、2 年和 3 年的随访预测 AUC 分别为 0.690、0.709、0.699 (见图 4C), 测试集的随访预测 AUC, 见图 4D。从生存时间和风险评分绘制的热图和散点图中看出, 随着风险得分的增加, 死亡的患者也增加, 存活时间相对减少, 由此可见模型有相对较好的预测能力 (见图 5)。

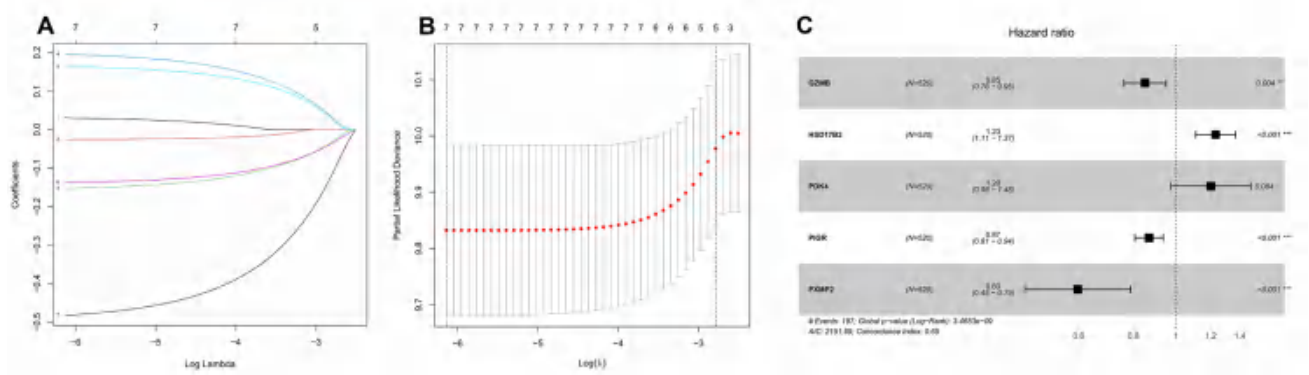


图 3 LASSO 及多变量 Cox 回归分析进一步筛选预后基因

Fig 3 Further screening of prognostic genes by the LASSO and multivariate Cox regression analysis

A. LASSO 回归系数分布图 (LASSO regression coefficient distribution map); B. LASSO 回归交叉验证图 (LASSO regression cross validation chart); C. 多因素 Cox 回归分析结果森林图 (Forest plot of multivariate Cox regression analysis)

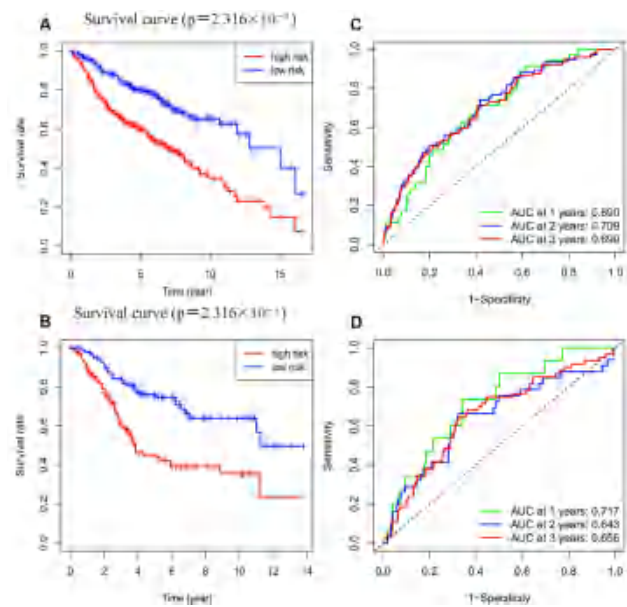


图 4 训练集 (A、C)、测试集 (B、D) Kaplan-Meier 曲线和时间依赖性 ROC 曲线

Fig 4 Distribution of time-dependent ROC curves and Kaplan-Meier curves of the training set (A and C) and the test set (B and D)

2.4 预后风险模型的临床应用

进一步通过单因素和多因素 Cox 回归分析评估 COAD 患者风险评分和临床病理信息与总生存期的关系。训练集和测试集的结果均显示风险评分可以作为独立危险因素来预测 COAD 患者的生存预后 ($P < 0.01$), 多因素 Cox 回归分析结果显示, 风险评分在训练集 (见图 6B) 和测试集 (见图 6D) 中的 HR 分别为 1.581 和 1.616。

2.5 模型验证

接下来, 在 TCGA 验证集 (424 例样本) 中使用上述模型公式计算每位患者的风险评分, 将患者分为高风险和低风险组, 并通过 KM 曲线比较预后。结果表明, 该模型可以区分患者的预后 ($P = 0.013$, 见图 7)。

2.6 预后列线图的建立

笔者使用临床病理特征 (年龄、性别、肿瘤分级、T 分期、N 分期) 和 5 个基因的表达在 GEO 测试集具有完整临床资料的 503 例样本中建立了建立列线图来预测患者的生存率。结果显示列线图可以预测 1 年、2 年和 3 年的生存率, 接近理想模型 (见图 8A)。校准图显示出最佳的预测准确性 (见图 8B), 并且预测的生存率与实际生存率基本重合。

2.7 高风险和低风险组的 DEGs 功能富集分析

为了探索 5 个关键基因与 COAD 的潜在生物学机制, 笔者使用 GSEA 在训练集和测试集中对高、低风险组之间的 DEGs 进行了功能富集分析。训练集和测试集结果均显示低风险组的基因集在代谢以及细胞周期等相关途径有明显的富集作用 (见图 9), 提示低风险组可能通过细胞周期通路影响肿瘤细胞凋亡进而影响患者生存。

2.8 药物敏感性分析

最后, 笔者研究了 5 个关键基因在 60 种人类癌细胞系 (NCI-60) 中的表达水平及其与化疗药物之间的相关性。这些基因和多种肿瘤的化疗药物的耐药性增加有关 ($P < 0.05$), 其中 *HSD17B2* mRNA 的表达增加与多种治疗 COAD 的化疗药物的耐药性增加有关 (见图 10A ~ E), 包括伊立替康 ($cor = -0.262, P = 0.043$, 中晚期 CRC 的一线用药^[9])、5-氟脱氧尿苷 ($cor = -0.318, P = 0.013$)、氟尿苷 ($cor = -0.334, P = 0.009$, 治疗结肠癌的肝转移^[10])、依托泊苷 ($cor = -0.308, P = 0.017$)、雷替曲塞 ($cor = -0.298, P = 0.021$)。另外, 通过数据库 GSE81005 对 5-FU 耐药的 CRC 细胞系和野生型 CRC 细胞系进行分析, 发现 5-FU 耐药的 CRC 细胞系中 *HSD17B2* mRNA 的表达明显高于野生型 CRC 细胞系 ($P < 0.001$, 见图 10F)。这些结果表明 *HSD17B2* 在 CRC 的发生发展和耐药

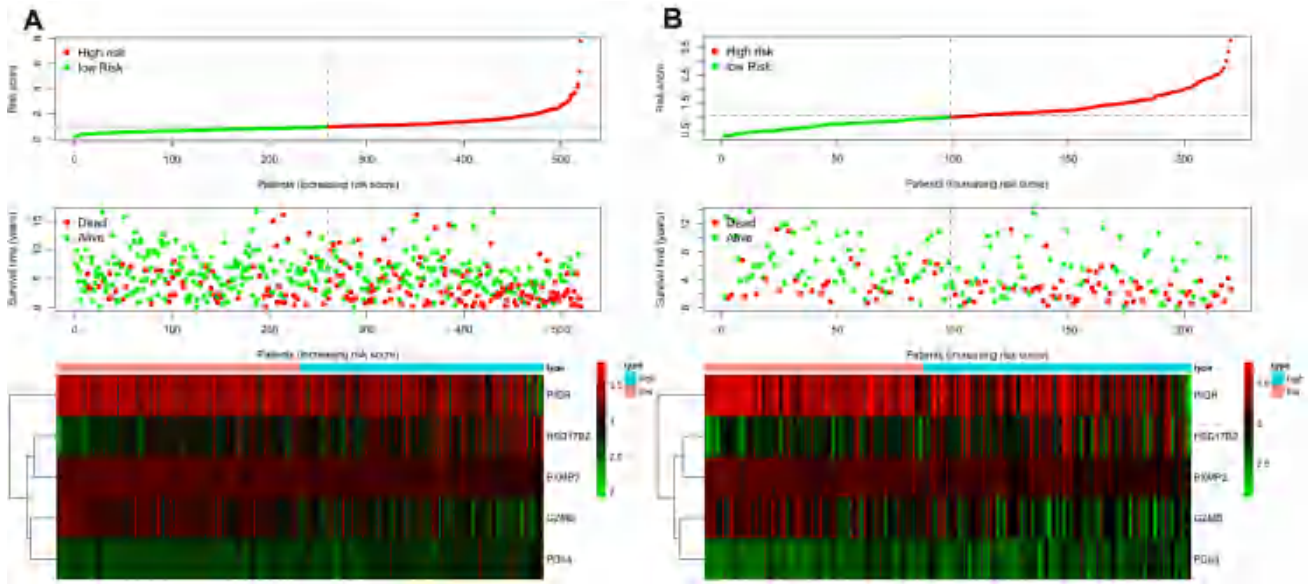


图 5 训练集 (A)、测试集 (B) 风险评分的分布、患者的生存状态和 5 个基因的表达热图
 Fig 5 Distribution of risk scores, patient survival status, and the five-gene expression heat map of the training set (A) and the test set (B)

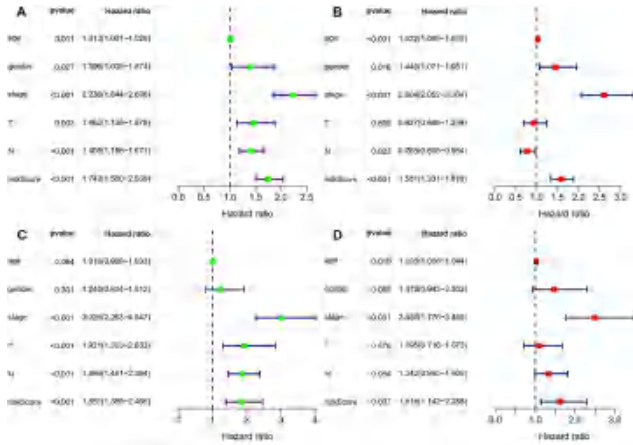


图 6 训练集 (A、B)、测试集 (C、D) 关于临床特征因素和风险评分的独立预后分析
 Fig 6 Independent prognostic analysis of clinical characteristics and risk score of both the training set (A and B) and the test set (C and D)

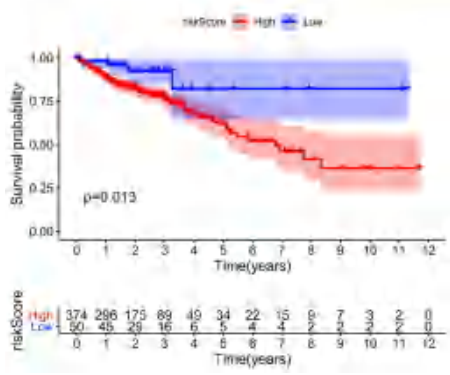


图 7 TCGA 验证集的生存分析
 Fig 7 Survival on TCGA validation set

性中发挥着重要生物学作用。
3 讨论

COAD 是全球范围内最常见的癌症类型之

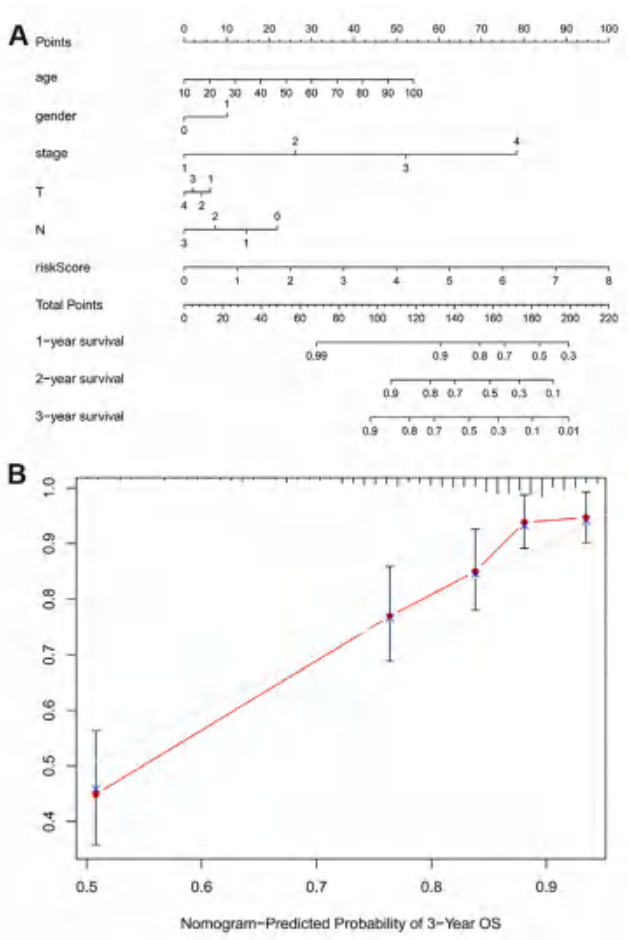


图 8 预后风险模型列线图 (A) 及校准曲线图 (B)
 Fig 8 Nomogram (A) and calibration (B) curve of the prognostic risk model

一，恶性程度和病死率较高^[1, 11]。目前 COAD 的治疗主要采取手术切除及化疗等传统治疗方法，对于早期肿瘤效果较好，但对于中、晚期肿瘤只

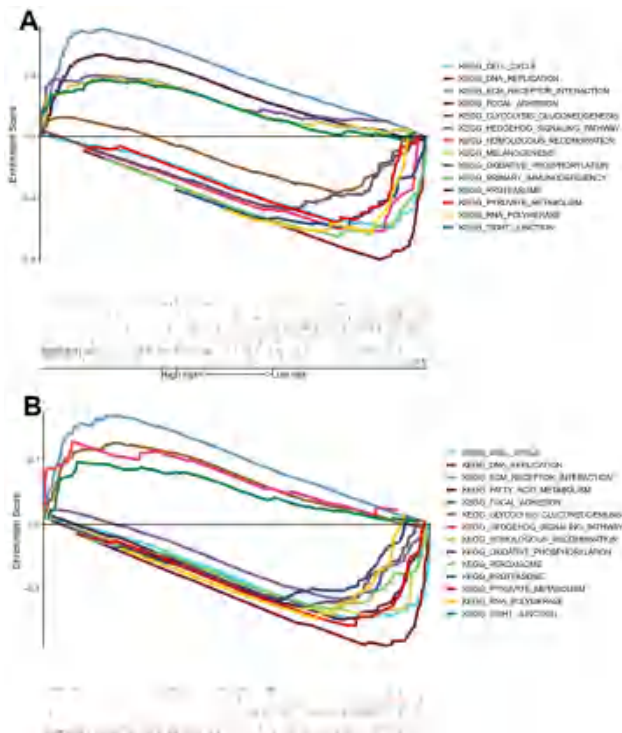


图 9 训练集 (A)、测试集 (B) GSEA 富集分析
Fig 9 GSEA enrichment analysis of the training set (A) and the test set (B)

能延长患者生命，缓解临床症状，不能从根本上提高患者的生活质量，患者预后仍较差。因此，寻找 COAD 中用于生存评估和靶向治疗的生物标志物仍至关重要。

本研究通过分析两个 GEO 数据集来鉴定 DEGs，构建了 WGCNA 共表达网络，从中找出 5 个预后关键基因 (*GZMB*、*HSD17B2*、*PDK4*、*PIGR* 和 *PXMP2*)，构建 COAD 预后预测模型，并对其进行了验证，列线图图和 ROC 曲线显示该模型具有较好的临床实用潜力。药物敏感性的分析显示，这些关键基因与多种化疗药物的耐药性相关。先前的研究表明，颗粒酶 (GZMs) 是细胞毒性 T 淋巴细胞和自然杀伤细胞的关键效应分子，在控制细胞内病原体和癌症方面发挥着关键作用^[12-13]。颗粒酶 B (GZMB) 作为抗肿瘤和抗感染因子，在多种肿瘤中显著表达并与良好预后相关，如非小细胞肺癌、CRC、骨肉瘤等^[14-16]。17- β 羟基类固醇脱氢酶 2 型 (HSD17B2) 是一种参与雌激素和雄激素调节的酶^[17]，其可催化睾酮和雌二醇 (E2) 分别转化为雄烯二酮和雌酮 (E1)^[18]。而雌二醇被报道可减少 CRC 细胞的增殖和促进凋亡^[19]。本研究

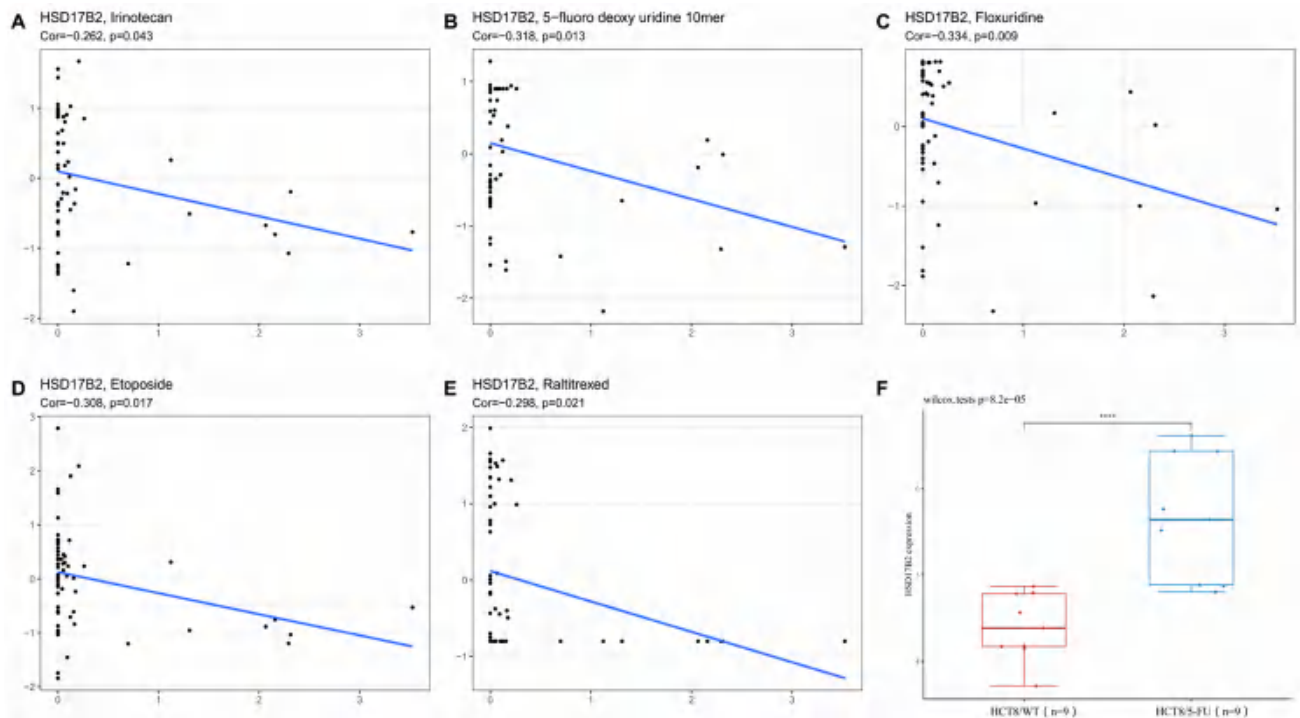


图 10 HSD17B2 的表达与伊立替康 (A)、5-氟脱氧尿苷 (B)、氟尿苷 (C)、依托泊苷 (D) 和雷替曲塞 (E) 的药物敏感性的相关性分析以及 HSD17B2 在 CRC 野生型细胞及其 5-FU 诱导耐药细胞系中的表达 (F)
Fig 10 Correlation between HSD17B2 expression and drug sensitivity of irinotecan (A), 5-fluorodeoxyuridine (B), fluorouridine (C), etoposide (D) and raltitrexed (E); expression of HSD17B2 in CRC wild type cells and its 5-FU-induced resistant cell lines (F)

构建的风险模型也提示，随着 *HSD17B2* 的表达增加，COAD 患者的预后更差，这可能与雌二醇的失活相关。Lee 等^[20]发现 *HSD17B2* 可以作为独立预

测因子，其过表达与直肠癌患者的不良预后相关。丙酮酸脱氢酶 4 (PDK4) 是细胞能量代谢的关键调节剂，可以参与 *m6A* 调节的糖酵解和 ATP 生

成^[21]。研究表明 PDK4 的高表达可以促进肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭,例如 CRC、宫颈癌、肝癌、膀胱癌细胞等^[21-23]。Woolbright 等^[23]发现,抑制 PDK4 表达可能会加剧顺铂诱导的细胞死亡。聚合免疫球蛋白受体 (PIGR) 是黏膜免疫系统的关键组成部分,在非小细胞肺癌、鼻咽癌、上皮性卵巢癌等的表达降低^[24-27]。PIGR 被证实了和消化道肿瘤密切相关。研究发现,PIGR 可以启动 *Yes-Dap12-Syk-Rac1/CDC42-MEK/ERK* 信号级联以促进肿瘤细胞的增殖和转化^[28],富含 PIGR 的细胞外囊泡可以促进肝癌细胞的侵袭性^[29]。Ohkuma 等^[30]发现,PIGR 的 mRNA 和蛋白水平是胰腺癌的独立预后因素,其高表达与患者预后不良有关。PXMP2 是高等真核生物中最丰富的一种同源三聚体过氧化物酶体膜蛋白 (PMP),具有通道形成活性^[31-32],参与广泛的代谢途径,包括脂质、氨基酸和羧基酸、嘌呤和活性氧物质的转化^[33]。但 *PXMP2* 基因与人类疾病的关系尚未被充分了解。

对高风险组和低风险组进行 GSEA 功能富集分析,发现低风险组在细胞周期、DNA 复制、RNA 聚合酶和代谢相关通路显著富集。细胞周期失调和细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 激活导致的持续细胞增殖是癌症的标志^[34]。目前,已经有 3 种选择性 CDK4/6 抑制剂获得美国食品药品监督管理局的批准^[35],多种 CDK4/6 抑制剂正处于治疗癌症的临床试验中^[36]。此外,通过药物敏感性分析发现这 5 个关键基因与多种化疗药物相关,特别是 *HSD17B2* 与结肠癌化疗药物 (伊立替康、5-氟脱氧尿苷、依托泊苷、雷替曲塞等) 存在显著负相关。此外,5-FU 耐药的细胞系中的 *HSD17B2* 表达显著高于野生组。5-FU 是 CRC 治疗中使用最广泛的化疗药物之一。尽管近年越来越多的化疗药物出现,但以 5-FU 为基础的化疗 (如 XELOX 和 FOLFOX) 仍然是目前中晚期 CRC 的一线化疗药物。但由于化疗耐药性,其总体反应率仅为 10% ~ 15%^[37],化疗耐药和严重的不良反应已成为影响化疗治疗效果的主要因素^[38]。为了克服化学耐药性和减少不良反应,许多药物在临床试验中进行了测试,但迄今为止尚未取得重大进展,需要更多努力寻找能够克服 5-FU 耐药性且毒性较小的新药以改善 CRC 患者。本研究提示 *HSD17B2* 可能是 5-FU 化疗耐药的潜在生物标志物,针对 *HSD17B2* 的靶向治疗或许能在提高化疗敏感性的同时改善患者的预后。总之,预后模型中的 5 个靶基因可能通过影响细胞周期和细胞对化疗药物的敏感性,进而影

响 COAD 的进展和预后。

综上,本研究筛选的 5 个靶基因是潜在 COAD 的预后生物标志物, *HSD17B2* 更是有望作为降低 COAD 化疗药物耐药性的靶点。然而,本研究是基于多个公共数据库的数据分析,具有局限性,这些关键基因在结肠腺癌预后以及化疗耐药中的分子机制仍需要进一步的基础实验来证实。

4 结论

本研究筛选了 5 个枢纽基因可能为 COAD 的潜在预后标志物,并发现 *HSD17B2* 可能是化疗耐药的潜在生物标志物,为进一步研究 COAD 的发病机制和治疗提供潜在靶点。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71 (3): 209-249.
- [2] Chen MC, Nhan DC, Hsu CH, et al. SENP1 participates in Irinotecan resistance in human colon cancer cells [J]. *J Cell Biochem*, 2021, 122 (10): 1277-1294.
- [3] Guraya SY. Pattern, stage, and time of recurrent colorectal cancer after curative surgery [J]. *Clin Colorectal Cancer*, 2019, 18 (2): e223-e228.
- [4] Phan JH, Yin-Goen Q, Young AN, et al. Emerging translational bioinformatics: knowledge-guided biomarker identification for cancer diagnostics [J]. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*, 2009, 2009: 4162-4165.
- [5] Li K, Du Y, Li L, et al. Bioinformatics approaches for anti-cancer drug discovery [J]. *Curr Drug Targets*, 2020, 21 (1): 3-17.
- [6] Langfelder P, Horvath S. Fast R functions for robust correlations and hierarchical clustering [J]. *J Stat Softw*, 2012, 46 (11): 1-17.
- [7] Mumford JA, Horvath S, Oldham MC, et al. Detecting network modules in fMRI time series: a weighted network analysis approach [J]. *Neuroimage*, 2010, 52 (4): 1465-1476.
- [8] Reinhold WC, Sunshine M, Liu H, et al. CellMiner: a web-based suite of genomic and pharmacologic tools to explore transcript and drug patterns in the NCI-60 cell line set [J]. *Cancer Res*, 2012, 72 (14): 3499-3511.
- [9] Fujita K, Kubota Y, Ishida H, et al. Irinotecan, a key chemotherapeutic drug for metastatic colorectal cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21 (43): 12234-12248.
- [10] Li Y. Analysis of hepatic artery infusion (HAI) chemotherapy using randomized trials of floxuridine (FUDR) for colon cancer patients with multiple liver metastases [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2022, 2022: 3546455.
- [11] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2021 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71 (1): 7-33.
- [12] Arias M, Martinez-Lostao L, Santiago L, et al. The untold story of granzymes in oncoimmunology: novel opportunities

- with old acquaintances [J]. *Trends Cancer*, 2017, 3 (6): 407-422.
- [13] Martin P, Pardo J, Schill N, et al. Granzyme B-induced and caspase 3-dependent cleavage of gelsolin by mouse cytotoxic T cells modifies cytoskeleton dynamics [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (24): 18918-18927.
- [14] Hurkmans DP, Basak EA, Schepers N, et al. Granzyme B is correlated with clinical outcome after PD-1 blockade in patients with stage IV non-small-cell lung cancer [J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8 (1): e000586.
- [15] Prizment AE, Vierkant RA, Smyrk TC, et al. Cytotoxic T cells and granzyme B associated with improved colorectal cancer survival in a prospective cohort of older women [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2017, 26 (4): 622-631.
- [16] Yoshida K, Okamoto M, Sasaki J, et al. Clinical outcome of osteosarcoma and its correlation with programmed death-ligand 1 and T cell activation markers [J]. *Oncotargets Ther*, 2019, 12: 2513-2518.
- [17] Hilborn E, Stal O, Jansson A. Estrogen and androgen-converting enzymes 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase and their involvement in cancer: with a special focus on 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, 2, and breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (18): 30552-30562.
- [18] Engeli RT, Rohrer SR, Vuorinen A, et al. Interference of paraben compounds with estrogen metabolism by inhibition of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (9): 2007.
- [19] Sasso CV, Santiano FE, Campo VAF, et al. Estradiol and progesterone regulate proliferation and apoptosis in colon cancer [J]. *Endocr Connect*, 2019, 8 (3): 217-229.
- [20] Lee YE, He HL, Shiue YL, et al. The prognostic impact of lipid biosynthesis-associated markers, HSD17B2 and HMGCS2, in rectal cancer treated with neoadjuvant concurrent chemoradiotherapy [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36 (10): 7675-7683.
- [21] Li Z, Peng Y, Li J, et al. N (6)-methyladenosine regulates glycolysis of cancer cells through PDK4 [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 2578.
- [22] Leclerc D, Pham DN, Levesque N, et al. Oncogenic role of PDK4 in human colon cancer cells [J]. *Br J Cancer*, 2017, 116 (7): 930-936.
- [23] Woolbright BL, Choudhary D, Mikhalyuk A, et al. The role of pyruvate dehydrogenase kinase-4 (PDK4) in bladder cancer and chemoresistance [J]. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17 (9): 2004-2012.
- [24] Kaetzel CS. The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces [J]. *Immunol Rev*, 2005, 206: 83-99.
- [25] Khattar NH, Lele SM, Kaetzel CS. Down-regulation of the polymeric immunoglobulin receptor in non-small cell lung carcinoma: correlation with dysregulated expression of the transcription factors USF and AP2 [J]. *J Biomed Sci*, 2005, 12 (1): 65-77.
- [26] Qi X, Li X, Sun X. Reduced expression of polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) in nasopharyngeal carcinoma and its correlation with prognosis [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37 (8): 11099-11104.
- [27] Berntsson J, Lundgren S, Nodin B, et al. Expression and prognostic significance of the polymeric immunoglobulin receptor in epithelial ovarian cancer [J]. *J Ovarian Res*, 2014, 7: 26.
- [28] Yue X, Ai J, Xu Y, et al. Polymeric immunoglobulin receptor promotes tumor growth in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2017, 65 (6): 1948-1962.
- [29] Tey SK, Wong SWK, Chan JYT, et al. Patient pIgR-enriched extracellular vesicles drive cancer stemness, tumorigenesis and metastasis in hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2022, 76 (4): 883-895.
- [30] Ohkuma R, Yada E, Ishikawa S, et al. High expression levels of polymeric immunoglobulin receptor are correlated with chemoresistance and poor prognosis in pancreatic cancer [J]. *Oncol Rep*, 2020, 44 (1): 252-262.
- [31] Rokka A, Antonenkov VD, Soininen R, et al. Pxmp2 is a channel-forming protein in Mammalian peroxisomal membrane [J]. *PLoS One*, 2009, 4 (4): e5090.
- [32] Otte DM, Schwaab U, Lüers G. The Pxmp2 and PoleI genes are linked by a bidirectional promoter in an evolutionary conserved fashion [J]. *Gene*, 2003, 313 (1): 119-126.
- [33] Rokka A. Solute traffic across the mammalian peroxisomal membrane—the role of Pxmp2 [J]. University of Oulu, 2008, <http://urn.fi/urn:isbn:9789514289729>.
- [34] Yuan K, Wang X, Dong H, et al. Selective inhibition of CDK4/6: a safe and effective strategy for developing anticancer drugs [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11 (1): 30-54.
- [35] Murphy CG. The role of CDK4/6 inhibitors in breast cancer [J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2019, 20 (6): 52.
- [36] Bai J, Li Y, Zhang G. Cell cycle regulation and anticancer drug discovery [J]. *Cancer Biol Med*, 2017, 14 (4): 348-362.
- [37] Pardini B, Kumar R, Naccarati A, et al. 5-fluorouracil-based chemotherapy for colorectal cancer and MTHFR/MTRR genotypes [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2011, 72 (1): 162-163.
- [38] Wilhelm M, Mueller L, Miller MC, et al. Prospective, multicenter study of 5-fluorouracil therapeutic drug monitoring in metastatic colorectal cancer treated in routine clinical practice [J]. *Clin Colorectal Cancer*, 2016, 15 (4): 381-388.

(收稿日期: 2022-07-16; 修回日期: 2022-09-26)

半边旗二萜化合物 5F 对人结直肠癌细胞增殖、 凋亡和自噬的影响

罗梦花¹, 陈佩文¹, 陈志红¹, 吴民华², 龚先玲^{1*} (1. 广东医科大学药学院, 广东 东莞 523808; 2. 广东医科大学基础医学院, 广东 东莞 523808)

摘要: **目的** 探讨半边旗二萜化合物 5F 对人结直肠癌细胞增殖、凋亡和自噬的影响及其作用机制。**方法** 采用 MTT 法检测 6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5F 对结直肠癌细胞 SW480、HCT116 的增殖抑制作用。Hoechst 33342 染色观察 5F 作用结直肠癌细胞后细胞形态学的变化。吖啶橙染色观察 5F 对结直肠癌细胞酸性小泡细胞器的影响。Western blot 分析 5F 对结直肠癌细胞相关凋亡、自噬蛋白的影响。另外, 用 5F 单独给药以及与自噬抑制剂氯喹联合用药检测其对自噬标志蛋白 LC3、凋亡相关蛋白表达和细胞存活情况的影响。**结果** 与空白组相比, 5F 处理的 SW480、HCT116 细胞活力均显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。Hoechst 33342 染色显示 5F 处理 SW480、HCT116 后细胞核固缩, 表现为明显的亮蓝色, 呈凋亡特征。随着 5F 浓度的增加, Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP、Bax 蛋白表达显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), Bcl-2 蛋白表达显著减少 ($P < 0.01$); Caspase 广谱抑制剂 z-VAD-fmk 与 5F 联用可削弱 Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP 蛋白表达 ($P < 0.01$)。25、50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5F 分别处理结直肠癌细胞后, 细胞内被吖啶橙染成红色的酸性小泡有增加趋势; 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5F 处理结直肠癌细胞后, 代表酸性小泡的红色荧光反而减少。低浓度的 5F 处理结直肠癌细胞后 LC3-II 蛋白表达增加 ($P < 0.01$), 而 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5F 组表达反而减少 ($P < 0.01$)。与 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5F 组相比, 同浓度的 5F 联合氯喹处理组, LC3-II 蛋白表达增加 ($P < 0.01$); Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP 表达明显减少 ($P < 0.01$)。与 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5F 组比, 同浓度的 5F 联合氯喹处理结直肠癌细胞后细胞存活率增加 ($P < 0.01$); 与 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5F 组比, 同浓度的 5F 联合氯喹处理结直肠癌细胞后细胞存活率几乎不变。**结论** 5F 可通过增加 Bax 蛋白, 降低 Bcl-2 蛋白, 促进结直肠癌细胞凋亡。低浓度的 5F 还可诱导结直肠癌细胞发生自噬, 发挥促凋亡作用; 高浓度的 5F 主要诱导结直肠癌细胞凋亡。

关键词: 5F; 结直肠癌; SW480 细胞; HCT116 细胞; 凋亡; 自噬

中图分类号: R273

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0407-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.020

Effect of 5F on the proliferation, apoptosis and autophagy of colorectal cancer cells

LUO Meng-hua¹, CHEN Pei-wen¹, CHEN Zhi-hong¹, WU Min-hua², GONG Xian-ling^{1*} (1. School of Pharmacy, Guangdong Medical University, Dongguan Guangdong 523808; 2. School of Basic Medical Sciences, Guangdong Medical University, Dongguan Guangdong 523808)

Abstract: Objective To determine the effect of 5F on the proliferation, apoptosis and autophagy of colorectal cancer (CRC) cells, SW480 and HCT116, and its primary mechanism. **Methods** The proliferation inhibition effect of 5F on SW480 and HCT116 was detected by MTT assay. After the cells were treated with the indicated concentrations of 5F, Hoechst 33342 staining was used to observe the changes in the cell morphology. Acridine orange staining was used to observe the effect of 5F on acidic vesicle organelles in CRC cells. Apoptosis and autophagy-related proteins of CRC cells

基金项目: 广东省自然科学基金 (No. 2018A030310116); 广东省中医药局项目 (No. 20201182); 广东医科大学强校基金 (No. 4SG2209G)。

作者简介: 罗梦花, 女, 硕士, 主要从事结直肠癌的防治及机制研究, email: 930068126@qq.com * **通信作者:** 龚先玲, 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事结直肠癌的防治及机制研究, email: xlgong@163.com

treated with 5F were analyzed by Western blot. In addition, cells were pretreated with chloroquine, an autophagic inhibitor, for 1 h and further treated with 5F. Next, the expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) and apoptosis-related proteins was detected with Western blot and the cell viability was measured by MTT. **Results** Compared with the blank group, the viability of SW480 and HCT116 cells in the 5F treatment group was significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). CRC cells treated with 5F showed nuclear shrinkage, chromatin condensation and apoptotic characteristics by Hoechst 33342 staining. With the increase of 5F concentration, the protein levels of Cleaved Caspase-3, Cleaved PARP, Bax ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in CRC cells were elevated, but those Bcl-2 were down-regulated ($P < 0.01$). The protein expression of Cleaved Caspase-3 and Cleaved PARP was weakened accordingly by z-VAD-fmk pretreatment ($P < 0.01$). The red fluorescence representing acid vesicles increased in both 25 and 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ groups, but decreased in the 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group by acridine orange staining. Similarly, the expression level of LC3- II also increased significantly ($P < 0.01$) in both 25 and 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ groups, but decreased in the 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group ($P < 0.01$) by Western blot. The cell viability was restored by chloroquine pretreatment and Cleaved Caspase-3 and PARP decreased accordingly, but LC3- II increased in CRC cells after the treatment with 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 5F. Compared with the 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 5F group, the cell viability was not affected in 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 5F combined chloroquine group. **Conclusion** 5F can induce the apoptosis of CRC cells, and its mechanism may be related to the increase of Bax protein and decrease of Bcl-2 protein. Low concentration 5F can induce the autophagy of CRC cells, playing a role in promoting apoptosis, while high concentration 5F mainly induces the apoptosis of CRC cells.

Key words: 5F; colorectal cancer; SW480 cell; HCT116 cell; apoptosis; autophagy

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是常见的消化道恶性肿瘤之一。化疗是肿瘤的治疗方式之一, 虽然在临床上出现了许多抗肿瘤的化疗药物, 并且配合放疗可以使患者的病情有所好转, 延长了寿命, 但这些化疗药物常常会导致人体出现各种不良反应和毒副作用, 从而使肿瘤患者在治疗过程中产生其他疾病或损伤。中草药具有使用历史悠久, 毒副作用相对较小, 效果较好等优势, 因此从中草药中开发新的防治肿瘤的天然药物是研究方向之一。5F 是岭南草药半边旗中的一种二萜类成分, 全称为 11 β -hydroxy-15-oxo-16-ent-kaur-16-en-19-oic acid 或 ent-11 α -hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic-acid^[1], 具有抗炎、抑制多种肿瘤细胞增殖等作用^[2-5]。但关于 5F 对结直肠癌的影响报道很少。本研究探讨二萜化合物 5F 对结直肠癌细胞凋亡及自噬的影响, 并初步探究其抗肿瘤作用的机制。

1 材料

1.1 试药

5F (HPLC 纯度 $\geq 98\%$; 广东医科大学天然药物研究与开发重点实验室自制)^[4]。二甲基亚砜 (DMSO)、MTT (法国 MP 公司); Hoechst 33342 (Beyotime 公司); z-VAD-fmk (R&D systems 公司); 吖啶橙 (AO)、氯喹 (CQ) (美国 Sigma 公司)。人结直肠癌细胞 SW480、HCT116 (中国科学院上海细

胞库)。RPMI 1640 培养液、胎牛血清 (美国 Gibco 公司); 青-链霉素混合液 (北京 Solarbio 科技有限公司); 蛋白定量试剂盒 (美国 Thermo 公司); Anti-Pro-Caspase-3、Cleaved Caspase-3、PARP、Bax、Bcl-2、LC3A/B 抗体 (美国 Cell Signalling Technology 公司); β -actin (北京中杉金桥公司); 辣根过氧化物 (HRP) 标记山羊抗兔、HRP 标记山羊抗鼠二抗 (武汉 Boster 公司); ECL 化学发光试剂盒 (美国 Millipore 公司)。

1.2 仪器

Nikon Ti-S 型倒置荧光显微镜 (日本 Nikon 公司), Thermo Scientific Multiskan Sky 全波长酶标仪 (美国 Thermo 公司), 化学发光成像仪 MiniChemi II (北京赛智创业科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

人结直肠癌细胞 SW480、HCT116 生长在含 1% 青-链霉素、10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养。在倒置显微镜下观察, 细胞呈单层贴壁状态生长, 细胞生长状态良好。每 2 日细胞传代一次。

2.2 MTT 法测定 5F 对结直肠癌细胞生长活力的影响

分别取对数生长期的 SW480、HCT116 细胞,

弃上清液, PBS 漂洗 2 次, 用 0.25% 的胰酶消化, 完全培养液中和胰酶, 离心, 弃上清液, 将细胞密度调整成 8×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。并以每孔 $100 \mu\text{L}$ 接种在 96 孔板中, 培养过夜, 待细胞贴壁后, 每孔加 $100 \mu\text{L}$ 5F 溶液, 使药物的终浓度分别为 0 (空白组)、6.25、12.5、25、50、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 每个处理设 5 个重复。培养 24、48 h 后每孔加 $5 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT $20 \mu\text{L}$, 反应 4 h, 吸出上清液, 加 $200 \mu\text{L}$ DMSO, 振荡溶解甲瓩结晶, 用酶标仪在 490 nm 处测 OD 值。

2.3 Hoechst 33342 染色

将细胞密度为 8×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的 SW480、HCT116 细胞分别接种于 6 孔板中, 培养过夜待细胞贴壁后, 加入 0 (空白组)、25、50、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5F 溶液, 培养 48 h, 吸出旧培养液, PBS 洗 2 次, 加 Hoechst 33342 后于 37°C 孵育 15 min, PBS 漂洗 2 次, 然后用倒置荧光显微镜观察细胞形态。

2.4 Western blot 检测相关蛋白的表达水平

5F 分别处理 SW480、HCT116 细胞相应时间后, 弃去旧液, 收集细胞, 加 RIPA 裂解液裂解, 并于 4°C 、 $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 25 min, 取上清液, 得总蛋白。采用 BCA 法检测各组总蛋白含量。每组蛋白分别加一定量的上样缓冲液并混合均匀, 在沸水浴中变性 5 min。各组取等量蛋白经 SDS-PAGE 电泳, 分离结束后, 用转膜仪转移至 PVDF 膜上, 然后将 PVDF 膜放入 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h。加一抗 Anti-Pro-Caspase-3、Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP、Bax、Bcl-2、LC3A/B (1 : 1000), 4°C 孵育过夜。用稀释 10 000 倍的 HRP 酶标记的二抗, 室温孵育 60 min, 吸出二抗, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。在避光条件下, 混合化学发光液 A 和 B, 再在膜上滴加混合均匀的化学发光试剂, 然后将膜置于化学发光成像仪的暗室中曝光, 拍照并分析相关蛋白表达的变化。

2.5 AO 染色检测细胞内酸性细胞器

将细胞密度为 8×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的 SW480、HCT116 细胞分别接种于 12 孔板中, 培养过夜, 待细胞贴壁后, 加入不同浓度的 5F 溶液, 培养 24 h, 吸出旧液, PBS 洗 1 遍, 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 每孔加入 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 AO 工作液, 室温避光孵育 15 min, 去除 AO 工作液, PBS 洗 2 次, 于倒置荧光显微镜下观察并拍照。

2.6 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件统计分析数据, 实验数据用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析; 两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 二萜化合物 5F 对结直肠癌细胞生长的影响

图 1 为 MTT 法检测不同浓度 5F 对 SW480、HCT116 细胞活力的影响。5F 分别作用结直肠癌细胞 24 h、48 h 后, 随着药物浓度增加, 细胞存活率均显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。同一浓度下, 随着 5F 作用时间增加, 细胞活力也降低。

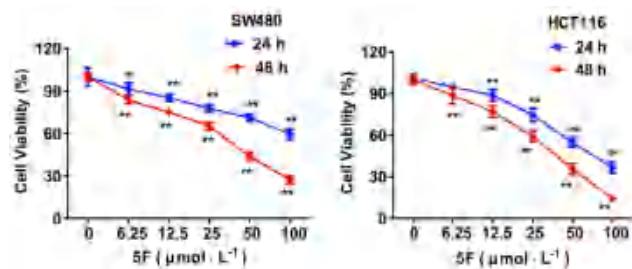


图 1 5F 对人结直肠癌 SW480、HCT116 细胞活力的影响

Fig 1 Effect of 5F on cell viability of SW480 and HCT116 cells

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.2 倒置荧光显微镜观察 5F 对结直肠癌细胞形态的影响

图 2 为倒置荧光显微镜观察 5F 对结直肠癌细胞 SW480、HCT116 形态的影响。倒置显微镜下, 空白组细胞贴壁正常生长; 不同浓度 5F 分别处理结直肠癌细胞 48 h, 随着 5F 浓度增加, SW480 和 HCT116 细胞的形态变圆, 密度变小。Hoechst 33342 染色, 空白组细胞的细胞核呈正常均匀的蓝色荧光; 5F 作用 SW480 和 HCT116 细胞后出现细胞核固缩现象, 细胞核呈现明显的亮蓝色荧光, 且随着 5F 浓度的增加, 呈现明显亮蓝色荧光的细胞核数目也增加。

3.3 5F 处理结直肠癌细胞后凋亡相关蛋白的表达

Hoechst 33342 染色显示 5F 处理结直肠癌细胞后表现出凋亡的特征, 细胞死亡是否由凋亡引起, 还需进一步证明。因此本研究用 Western blot 检测了与凋亡相关的蛋白表达, 结果见图 3。不同浓度的 5F 分别处理 SW480、HCT116 细胞 24 h, 随着 5F 浓度的增大, Pro-Caspase-3 蛋白的表达呈下调趋势, 而 Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP 蛋白的表达逐渐增加; 与空白组比较, Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP 表达显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。说明 5F 有诱导 SW480、HCT116 细胞凋亡的作用。

3.4 5F 诱导结直肠癌细胞凋亡与 Caspase 的相关性

为了进一步明确 5F 诱导的凋亡是否与 Caspase 依赖的机制有关, 本实验使用了 Caspase 广谱抑制剂 z-VAD-fmk。分别将 SW480、HCT116 细胞在加或不加 z-VAD-fmk ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 培养 1 h 后, 再加或者不加 5F ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用 24 h。如

图 4 所示, Western blot 检测结果显示, 与 5F 单独处理的结直肠癌细胞 Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP 蛋白表达明显相比; 5F 和 z-VAD-fmk 共同作用的结直肠癌细胞 Cleaved Caspase-3 ($P < 0.01$)、Cleaved PARP ($P < 0.01$) 蛋白表达显著下调, 表明 z-VAD-fmk 可阻断 caspase 激活。说明 5F 诱导的凋亡与 Caspase 依赖的机制有关。

3.5 5F 诱导结直肠癌细胞凋亡与 Bax 和 Bcl-2 的相关性

如图 5 所示, 不同浓度的 5F 分别处理 SW480、HCT116 细胞 24 h, 随着 5F 浓度的增大, Bax 蛋白表达升高, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平下降。表明 5F 可通过改变 Bax、Bcl-2 蛋白的表达促进细胞凋亡。

3.6 AO 染色观察 5F 对结直肠癌细胞酸性小泡细胞器的影响

AO 染色可使细胞核和细胞质染成绿色, 酸性囊泡被染成红色^[6]。图 6 所示, AO 染色法观察不同浓度的 5F 对 SW480、HCT116 细胞酸性小泡细胞器的影响。结果显示, 25、50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5F 分别处理结直肠癌细胞 24 h 后, 细胞内被 AO 染成红色的酸性小泡有增加趋势; 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5F 处理结直肠癌细胞 24 h 后, 代表酸性小泡的红色荧光反而减少。

3.7 5F 对结直肠癌细胞 LC3 蛋白表达的影响

LC3 在自噬的发生中扮演着重要的角色。LC3- II 是自噬体形成的特异性蛋白标志物, LC3- II 的量及 LC3- II /LC3- I 比率可能与细胞内自噬囊泡的量成正相关。图 7 所示, Western blot 显示, SW480、HCT116 细胞经 5F 处理 24 h 后, 在 0~50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内, 随着 5F 浓度的增加, LC3- II 的蛋白条带逐渐变深; 而 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5F 处理组, LC3- II 的蛋白表达明显减少。提示一定浓度的 5F 有诱导 SW480、HCT116 细胞自噬的作用, 而 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5F 处理结直肠癌细胞主要引起细胞凋亡。

3.8 5F 处理结直肠癌细胞自噬与凋亡的关系

为探讨 5F 诱导的结直肠癌细胞自噬与凋亡相互关系以及对细胞存活率的影响, 本实验用 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5F 联合 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氯喹处理结直肠癌细胞, 检测其对自噬标志蛋白 LC3、凋亡相关蛋白表达和细胞存活情况的影响。结果如图 8 所示, 与 5F 组相比, 5F 联合氯喹处理组 LC3- II 蛋白表达增加, Cleaved Caspase-3、Cleaved PARP 表达明显减少 ($P < 0.01$)。说明自噬受到抑制, 凋亡也下降。图 9 所示, 与 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5F 组比, 同浓度的 5F 联合氯喹处理结直肠癌细胞后细胞存

活率增加 ($P < 0.01$); 与 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5F 组比, 同浓度的 5F 联合氯喹处理结直肠癌细胞后细胞存活率几乎不变。

4 讨论

细胞凋亡是机体细胞在发育过程中或一定条件下, 受内在基因调控的细胞自主有序死亡, 其在生理及病理性死亡、机体的生长发育以及细胞分化等方面发挥重要作用^[7]。肿瘤细胞过度增殖, 凋亡通路受阻可导致肿瘤的发生和发展。很多中药有效成分通过诱导细胞凋亡从而发挥抗肿瘤活性。本研究发现半边旗二萜化合物 5F 能显著抑制结直肠癌细胞增殖, 浓度越高抑制作用越强; Hoechst 33342 染色表明 5F 处理结直肠癌细胞出现凋亡特征。依赖胱天蛋白酶 (Caspase) 的信号传导途径是细胞凋亡的途径之一^[7-9], z-VAD-fmk 是应用非常广泛的 Caspase 广谱性蛋白抑制剂^[10-11]。研究发现 z-VAD-fmk 可减弱 5F 诱导的结直肠癌细胞凋亡, 说明 5F 诱导的结直肠癌细胞凋亡是 Caspase 依赖的凋亡。Caspase 家族中最重要的凋亡执行者 Caspase-3 更被称为“死亡执行蛋白酶”, 是多种凋亡途径的共同下游效应部分, 是死亡受体通路和线粒体通路执行细胞凋亡的关键执行子^[12]。PARP[poly (ADP-ribose) polymerase] 是一种蛋白翻译后修饰酶, 在细胞修复与凋亡的调控中起重要作用, 是 Caspase-3 的底物之一, 可被活化的 Caspase-3 切割分解而失活, 从而导致细胞凋亡^[13]。本课题的研究表明 5F 可诱导结直肠癌细胞中 Pro-Caspase-3 转化为 Cleaved Caspase-3 蛋白, 效应性的 Caspase 可裂解下游的 PARP, 出现 Cleaved PARP, 而 PARP 的降解失活使染色质 DNA 遭到破坏, 使结直肠癌细胞失去保持稳态的能力从而发生凋亡。Bcl-2 家族蛋白对细胞的凋亡起调节作用, Bcl-2 是抗凋亡的负调节因子之一, 当细胞受到外界刺激时能保护细胞免于凋亡; Bax 是促凋亡的正调节因子之一, 能促进细胞凋亡; Bax/Bcl-2 比值可作为判断细胞是否凋亡的参考^[14-16]。5F 可通过上调 Bax, 下调 Bcl-2 蛋白的表达促进细胞凋亡。

自噬和凋亡是细胞命运调节的两种基本病理生理机制^[17]。自噬和凋亡之间的相互作用非常复杂, 然而, 这些相互作用可分为三类: ① 自噬与凋亡, 两者均以同步方式诱导细胞死亡, 或在促进细胞死亡中起主导作用 (协同作用); ② 自噬通过诱导凋亡促进细胞死亡; ③ 自噬抑制凋亡诱导的细胞死亡^[18]。姜黄素类似物 EF24 对 A549 细胞处理中自噬促进细胞凋亡, 而 EF24 浓度为

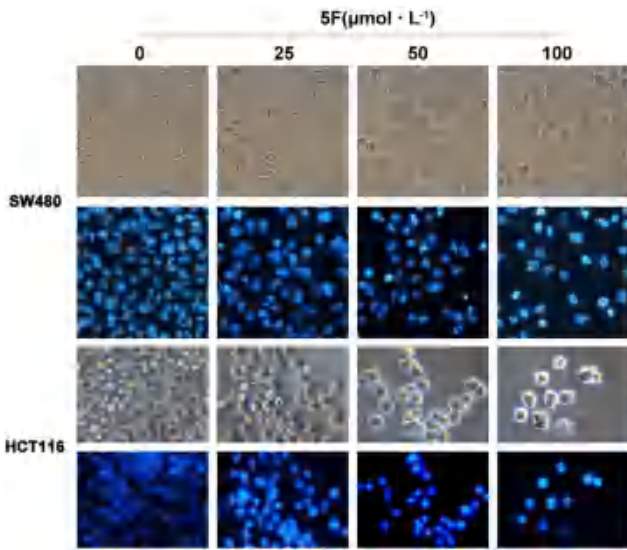


图 2 5F 对 SW480、HCT116 细胞形态学的影响 (×200)
Fig 2 Effect of 5F on morphology of SW480 and HCT116 cells (×200)

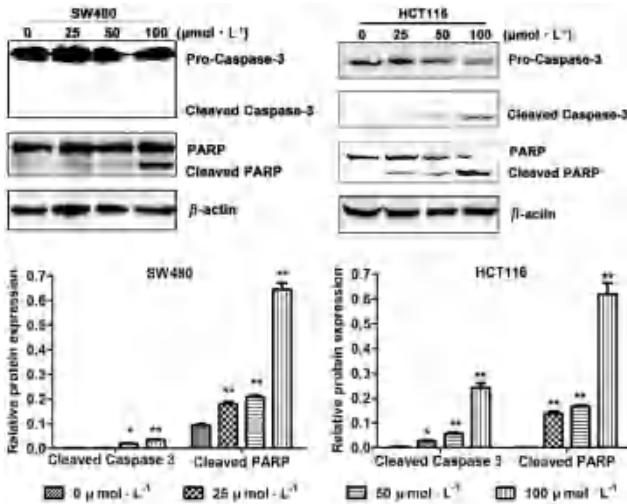


图 3 5F 对 SW480、HCT116 细胞相关凋亡蛋白的影响
Fig 3 Effect of 5F on apoptosis-related proteins in SW480 and HCT116 cells

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note: Compared with the blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

16 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, A549 细胞以凋亡为主^[19]。本研究发现, AO 染色表明 5F 处理结直肠癌细胞出现自噬特征, 但 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5F 诱导的细胞自噬明显减少。与此结果一致, 低浓度 5F 处理结直肠癌细胞时, 自噬标志蛋白 LC3-II 表达增加, 而 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5F 处理的结直肠癌细胞 LC3-II 蛋白表达明显降低。5F 与自噬抑制剂联用, 削弱了低浓度 5F 对结直肠癌细胞的抑制作用, 表明 5F 通过自噬从而抑制结直肠癌细胞的生长。但当 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5F 与自噬抑制剂联用时, 并没改变结直肠癌细胞的存活率, 表明 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5F 处理结直肠癌细胞主要

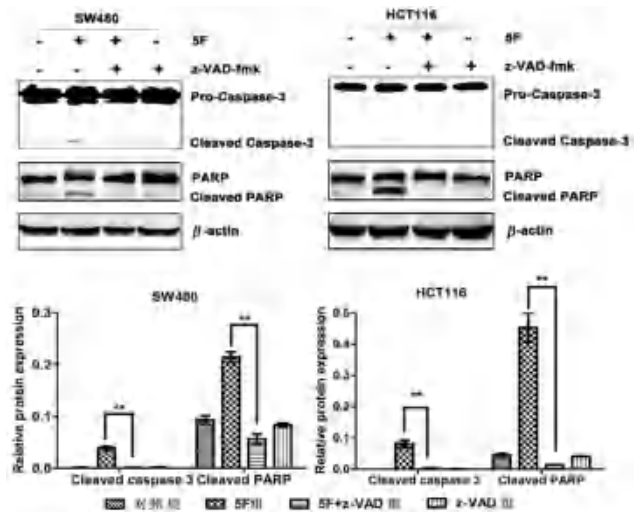


图 4 5F 联合 z-VAD-fmk 处理对 SW480、HCT116 细胞 Caspase-3 及 PARP 蛋白的影响
Fig 4 Effect of 5F combined with z-VAD-fmk on Caspase-3 and PARP proteins in SW480 and HCT116 cells

注: 与 5F 组比较, ** $P < 0.01$ 。
Note: Compared with the 5F group, ** $P < 0.01$.

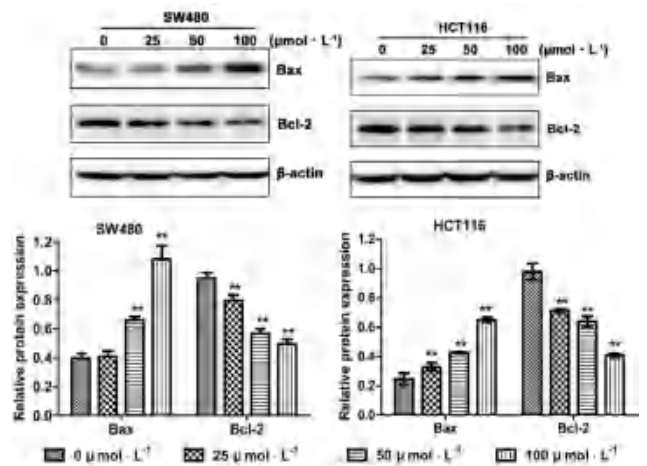


图 5 5F 对 SW480、HCT116 细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白的影响
Fig 5 Effect of 5F on the expression of Bax and Bcl-2 proteins in SW480 and HCT116

注: 与空白组比较, ** $P < 0.01$ 。
Note: Compared with the blank group, ** $P < 0.01$.

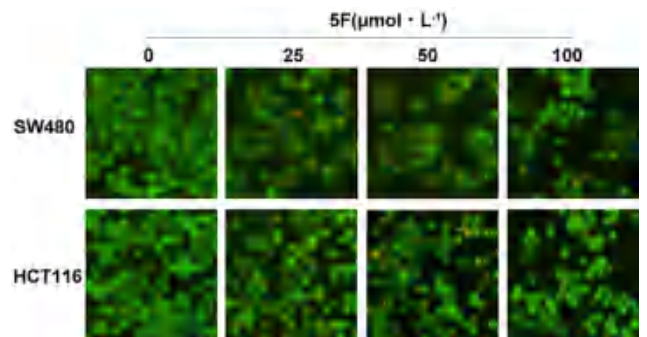


图 6 AO 染色观察 5F 对结直肠癌细胞酸性小泡细胞器的影响 (×200)
Fig 6 Effect of 5F on acidic vesicular organelles in CRC cells by acridine orange staining (×200)

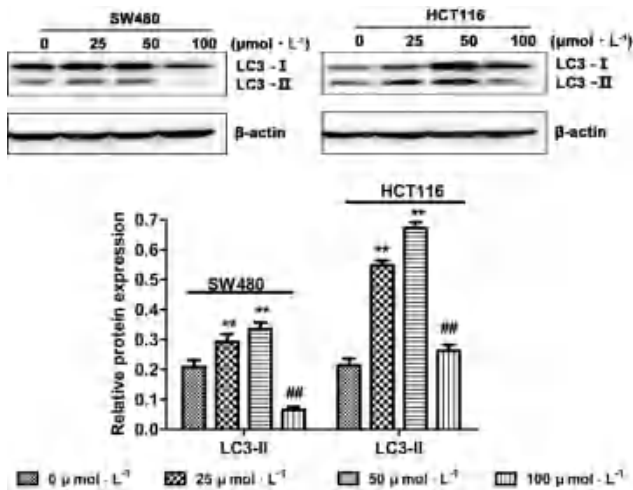


图 7 5F 对 SW480、HCT116 细胞 LC3 蛋白的影响
Fig 7 Effect of 5F on LC3 proteins in SW480 and HCT116 cells
注：与空白组比较，** $P < 0.01$ ；与 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 5F 组相比，## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the blank group, ** $P < 0.01$; compared with the $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 5F group, ## $P < 0.01$.

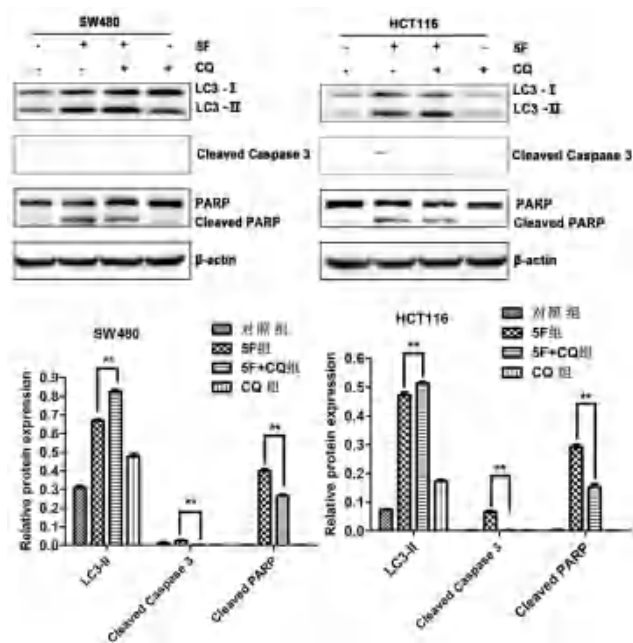


图 8 5F 与氯喹联用对 SW480、HCT116 细胞自噬标志蛋白 LC3 以及凋亡相关蛋白的影响
Fig 8 Effect of 5F combined with chloroquine on LC-3 and apoptosis-related proteins in SW480 and HCT116 cells

注：与 5F 和氯喹 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 联合用药组比较，** $P < 0.01$ 。
Note: Combined with the chloroquine ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) group, ** $P < 0.01$.

引起细胞凋亡。

综上所述，5F 可通过增加 Bax 蛋白，降低 Bcl-2 蛋白，影响下游成员 Cleaved Caspase-3 以及 Cleaved PARP 等蛋白表达，从而促进结直肠癌细胞凋亡；低浓度的 5F 还可诱导结直肠癌细胞发生自噬，自噬对凋亡起促进作用；高浓度的 5F

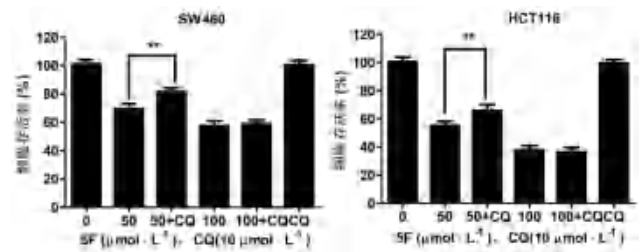


图 9 5F 联合氯喹对 SW480、HCT116 细胞存活率影响 ($n = 5$)
Fig 9 Effect of 5F combined with chloroquine on cell viability of SW480 and HCT116 cells ($n = 5$)

注：5F 组与 5F 和氯喹联合用药组比较，** $P < 0.01$ 。
Note: Compared with 5F combined with chloroquine group, ** $P < 0.01$.

主要诱导结直肠癌细胞凋亡。本研究为 5F 防治结直肠癌奠定了实验基础，为将来进一步利用自噬促进剂从而达到细胞死亡的目的以及选择最优的药物浓度防治结直肠癌提供研究方向。

参考文献

- [1] 龚先玲, 陈志红, 吕应年, 等. 半边旗抗肿瘤有效成分 5F 的纯化工艺研究 [J]. 中成药, 2008, 30 (9): 1286-1289.
- [2] 张晓, 崔燎, 田中信寿, 等. 半边旗有效成分及抗肿瘤活性研究 [J]. 中国药学杂志, 1997, 32 (1): 39-40.
- [3] 张晓, 李金华, 何承伟, 等. 半边旗中二萜类化合物的植化及抗肿瘤活性初步研究 [J]. 中国药学杂志, 1999, 34 (8): 512-514.
- [4] 吕应年, 龚先玲, Chen GG, 等. 半边旗抗肿瘤活性成分 5F 对照品的制备和鉴定 [J]. 化学与生物工程, 2009, 26 (5): 72-74, 78.
- [5] 杨斌, 刘序森, 袁泉恒. 半边旗中二萜类化合物 5F 诱导人胰腺癌细胞凋亡机制的探讨 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25 (3): 355-358.
- [6] Thomé M, Filippi-Chiela EC, Villodre ES, et al. Ratiometric analysis of acridine orange staining in the study of acidic organelles and autophagy [J]. J Cell Sci, 2016, 129 (24): 4622-4632.
- [7] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death [J]. Toxicol Pathol, 2007, 35 (4): 495-516.
- [8] Wu H, Che X, Zheng Q, et al. Caspases: a molecular switch node in the crosstalk between autophagy and apoptosis [J]. Int J Biol Sci, 2014, 10 (9): 1072-1083.
- [9] Pistrutto G, Trisciuglio D, Ceci C, et al. Apoptosis as anti-cancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies [J]. Aging (Albany NY), 2016, 8 (4): 603-619.
- [10] Werthmüller N, Frey B, Wunderlich R, et al. Modulation of radiochemo-immunotherapy-induced B16 melanoma cell death by the pan-caspase inhibitor zVAD-fmk induces anti-tumor immunity in a HMGB1-, nucleotide- and T-cell-dependent manner [J]. Cell Death Dis, 2015, 6 (5): e1761.
- [11] Rathore S, Datta G, Kaur I, et al. Disruption of cellular homeostasis induces organelle stress and triggers apoptosis like cell-death pathways in malaria parasite [J]. Cell Death Dis,

- 2015, 6 (7): e1803.
- [12] Asadi M, Taghizadeh S, Kaviani E, et al. Caspase-3: structure, function, and biotechnological aspects [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2022, 69 (4): 1633-1645.
- [13] 周柔丽. 医学细胞生物学 (第二版) [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2008: 114-123.
- [14] Lin KN, Zhao W, Huang SY, et al. Grape seed proanthocyanidin extract induces apoptosis of HL-60/ADR cells via the Bax/Bcl-2 caspase-3/9 signaling pathway [J]. *Transl Cancer Res*, 2021, 10 (9): 3939-3947.
- [15] Wang T, Zhang J, Cui L, et al. Apatinib inhibits gastric carcinoma development by regulating the expression levels of IL-17 via the Bax/Bcl-2 signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21 (6): 654-663.
- [16] Alam M, Alam S, Shamsi A, et al. Bax/Bcl-2 cascade is regulated by the EGFR pathway: therapeutic targeting of non-small cell lung cancer [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 869672.
- [17] Sorice M. Crosstalk of autophagy and apoptosis [J]. *Cells*, 2022, 11 (9): 1479-1482.
- [18] Das S, Shukla N, Singh SS, et al. Mechanism of interaction between autophagy and apoptosis in cancer [J]. *Apoptosis*, 2021, 26 (9-10): 512-533.
- [19] 汪宇, 周桃, 孙韩艳, 等. 姜黄素类似物 EF24 诱导 A549 细胞自噬及凋亡关系的研究 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2012, 34 (6): 590-596.
- (收稿日期: 2022-09-01; 修回日期: 2022-11-02)

新型 4- 三氟甲基 -6- 甲氧基喹啉 -2- 胺衍生物的合成及抗肿瘤活性研究

李成^{1, 2, 3}, 吕梦凡^{1, 2, 3}, 余佳^{2, 3}, 徐必学^{2, 3*}, 徐广灿^{2, 3*} (1. 贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550014; 3. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550014)

摘要: 目的 发现高效、低毒的新型抗肿瘤目标化合物。方法 以 4- 甲氧基苯胺为原料, 通过氨解、环化、氯代、偶联、烷基化等反应, 设计并合成一系列新型 4- 三氟甲基 -6- 甲氧基喹啉 -2- 胺衍生物, 并通过 ¹H NMR、¹³C NMR、¹⁹F NMR 进行结构确证。采用 MTT 法评价目标化合物对 K562 细胞 (人慢性髓系白血病细胞)、LNCaP 细胞 (前列腺癌细胞)、PC3 细胞 (前列腺癌细胞)、HeLa 细胞 (人宫颈癌细胞) 和 A549 细胞 (人肺癌细胞) 5 种肿瘤细胞株的生长抑制活性。结果 共合成了 4- 三氟甲基 -6- 甲氧基喹啉 -2- 胺衍生物 17 个。其中, 在 5 μmol · L⁻¹ 浓度下, 化合物 **5b** 对 LNCaP 细胞抑制率为 42.61%, 化合物 **5e** 对 K562 细胞抑制率为 41.29%。结论 建立了一种新型 4- 三氟甲基 -6- 甲氧基喹啉 -2- 胺衍生物的快速合成方法, 部分化合物对肿瘤细胞的增殖具有一定的抑制活性, 可为该类化合物的深入研究提供参考。

关键词: 喹啉衍生物; 三氟甲基; 癌症; 抗肿瘤活性

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0413-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.021

Synthesis and antitumor activity of novel 6-methoxy-4-trifluoromethyl-quinolin-2-amine derivatives

LI Cheng^{1, 2, 3}, LV Meng-fan^{1, 2, 3}, YU Jia^{2, 3}, XU Bi-xue^{2, 3*}, XU Guang-can^{2, 3*} (1. College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025; 2. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550014; 3. Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014)

基金项目: 贵州省高层次创新型人才项目 (黔科合平台人才 [2016]5678); 贵州省科技计划项目 (黔科合基础 -ZK[2022]一般 298); 贵州省科技计划项目 (黔科中引地 [2022]4015)。

作者简介: 李成, 男, 硕士研究生, 主要从事中药化学研究, email: licheng1999@qq.com *通信作者: 徐必学, 男, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事药物化学研究, email: bixue_xu@126.com; 徐广灿, 男, 助理研究员, 主要从事药物化学研究, email: xgc0707@163.com

Abstract: Objective To discover new antitumor target compounds with high efficiency and low toxicity. **Methods** A series of novel 6-methoxy-4-trifluoromethyl-quinolin-2-amine derivatives were designed and synthesized starting with 4-methoxyaniline through amination, cyclization, chlorination, coupling, and alkylation reactions. The structures of all target compounds were characterized by ^1H NMR, ^{13}C NMR, and ^{19}F NMR. The antiproliferation activities of the target compounds on tumor cell lines (such as K562, LNCaP, PC3, HeLa, and A549) in vitro were evaluated by MTT assay. **Results** Totally 17 6-methoxy-4-trifluoromethyl-quinolin-2-amine derivatives were synthesized. At a concentration of $5\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, the inhibitory rate of compound **5b** on LNCaP cells was 42.61%, and the inhibitory rate of compound **5e** on K562 cells was 41.29%. **Conclusion** The method for novel 6-methoxy-4-trifluoromethyl-quinolin-2-amine derivatives has been established, and some of the target compounds exhibit certain inhibition on the proliferation of tumor cells. This study provides a basis for further research on the derivatives of 6-methoxy-4-trifluoromethyl-quinolin-2-amine.

Key words: quinoline derivative; trifluoromethyl group; cancer; antitumor activity

近年来, 癌症(亦称恶性肿瘤)的发病率和病死率呈逐年上升趋势^[1], 我国癌症患者病死率居世界首位。2021年, 全球新增癌症患者数量约为1930万, 因患癌死亡人数达1000万人; 预计到2040年全球将会有超过2840万新增癌症患者, 相较于2020年, 增幅达47%^[2]。由此可见, 癌症已成为威胁人类生命健康的主要疾病之一。目前, 抗肿瘤的治疗方法主要有手术治疗、化学药物治疗和免疫治疗等^[3]。其中, 化学药物治疗是目前针对恶性肿瘤的主要治疗方法, 但在临床应用中, 现有抗肿瘤药物往往表现出毒副作用大和易产生耐药性等缺点^[4]。因此, 寻找和开发新型

高效低毒的抗肿瘤药物具有重要的科学意义。

喹啉(quinoline)及其衍生物是一类重要的、具有多种生物活性(如抗疟疾^[5]、抗菌^[6]、抗肿瘤^[7-9]、调节免疫^[10]、抗炎症^[11]和抗结核^[12]等)的氮杂环类化合物, 广泛存在于许多天然产物和合成药物中^[13]: 如抗疟疾药^[14](奎宁、奎尼丁、氯喹等)、抗真菌药(氯碘羟喹)和平喘药(孟鲁司特)等已上市销售药物^[15]。同时, 喹啉作为抗肿瘤药物研发中的优势骨架结构受到了高度的关注, 已有多种含喹啉骨架的抗肿瘤药物上市销售, 例如伯舒替尼(bosutinib)、乐伐替尼(lenvatinib)、吡咯替尼(pyrotinib)等^[16](见图1)。

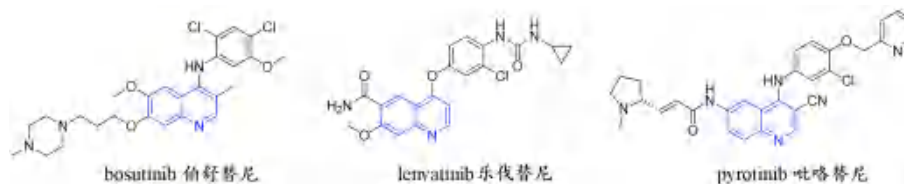


图1 伯舒替尼、乐伐替尼和吡咯替尼结构式

Fig 1 Structures of bosutinib, lenvatinib, and pyrotinib

氟原子因具有与氢原子相近的原子半径以及高电负性的特性, 使得含氟基团在许多研究领域, 尤其是医药领域得到了广泛的应用^[17-19]。三氟甲基(-CF₃)是一类常见的含氟基团, 多项研究表明, 三氟甲基的引入能够显著改善原化合物的化学稳定性、亲脂亲油性、生物膜通透性、体内代谢稳定性和生物利用度等^[20]。基于喹啉骨架结构和三氟甲基在抗肿瘤药物研发应用中的优势, 本课题组前期设计并合成了系列2-三氟甲基-喹啉-4-胺衍生物, 并发现部分化合物具有较好的抗肿瘤活性^[21-23]。在药物设计开发过程中, 药物分子母核结构上取代基的位置变化往往对其药效及生物活性具有较大的影响。因此, 探

索喹啉类化合物母核上三氟甲基取代位置的变化对其生物活性的影响, 本文在前期研究基础上设计并合成了一系列4-三氟甲基-6-甲氧基喹啉-2-胺衍生物(见图2), 并通过 ^1H NMR、 ^{13}C NMR和 ^{19}F NMR进行了结构确证。采用MTT法测定目标化合物对K562细胞(人慢性髓系白血病细胞)、LNCaP细胞(前列腺癌细胞)、PC3细胞(前列腺癌细胞)、HeLa细胞(人宫颈癌细胞)、A549细胞(人肺癌细胞)5种肿瘤细胞株的体外生长抑制活性, 为进一步探讨该类化合物的抗肿瘤生物活性提供了研究基础。

1 仪器与试药

GB3002型电子天平(METTLER TOLEDO);

MYP19-2 型磁力搅拌器(上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司); Rotavaper R-114 型旋转蒸发器(BUCHI); XT-4 型熔点仪(上海华岩仪器设备有限公司); Bruker Avance NEO 600 MHz 型核磁共振仪 [DMSO- d_6 或 $CDCl_3$ 为溶剂, 四甲基硅烷(TMS)为内标, 瑞士 Bruker 公司]; 恒温培养箱(美国 Grant 公司); 超低温冰箱(美国 Beckman 公司); 显微镜(Olympus Corporation); 多功能酶标仪(美国 Biotek 公司)。柱层析硅胶(200~300 目)和薄层层析硅胶板(烟台江友硅胶开发有限公司); 四氮唑蓝(MTT, Sigma 公司); 所用试剂均为市售分析纯或化学纯; A549 细胞(湖南丰晖生物科技有限公司); PC3 细胞、LNCaP 细胞、K562 细胞、HeLa 细胞(贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室)。

2 方法

2.1 目标化合物合成路线

如图 2 所示合成路线, 将 4-甲氧基苯胺与三氟乙酰乙酸乙酯在 130 °C 下回流反应得化合物 2, 化合物 2 经多聚磷酸催化环合反应得化合物 3, 化合物 3 经氯代反应得关键中间体 4; 在酸性条件下, 将中间体 4 与适宜的苯胺类化合物偶联得化合物 5a~5f; 化合物 5a~5d 经 *N*-甲基化得化合物 6a~6d; 5e~5f 经钯碳催化氢化还原得化合物 7a~7b, 化合物 7a~7b 与不同的酸酐(乙酸酐、丙酸酐和戊酸酐)或丙烯酰氯反应得化合物 8a~8e(见图 2)。

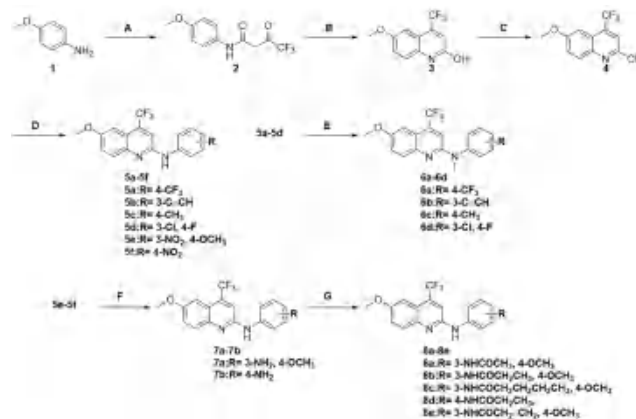


图 2 目标化合物的合成路线图

Fig 2 Synthesis route of target compounds

A. 三氟乙酰乙酸乙酯, 水, 130 °C, 回流 (ethyltrifluoroacetate, H₂O, 130 °C, reflux); B. 多聚磷酸, 100 °C (polyphosphoric acid, 100 °C); C. 三氯氧磷, *N,N*-二甲基甲酰胺, 100 °C (POCl₃, DMF, 100 °C); D. 苯胺类化合物, 盐酸, 异丙醇, 80 °C (aniline derivatives, HCl, IPA, 80 °C); E. 碘甲烷, 氢氧化钠, DMF (CH₃I, NaH, DMF); F. 钯碳(10%, 加约 55% 水湿润), 氢气, 甲醇, 室温 (Pd/C, H₂, MeOH, rt); G. 8a~8d: 酸酐化合物, 碳酸钾, 二氯甲烷, 室温 (anhydride compound, K₂CO₃, DCM, rt); 8e: 丙烯酰氯, 碳酸钾, 二氯甲烷, 0 °C (acryloyl chloride, K₂CO₃, DCM, 0 °C)

2.2 化学合成

2.2.1 *N*-(4-甲氧基苯基)-三氟乙酰乙酰胺(化合物 2^[24])的合成 取对甲氧基苯胺(10 g, 81.2 mmol)、三氟乙酰乙酸乙酯(23.75 mL, 162.4 mmol)于 100 mL 反应瓶中, 130 °C 搅拌回流, 每隔 30 min 加水 0.36 mL, 6 h 反应完毕^[25]。待反应液冷却至室温后, 将反应液分散至 200 mL 正己烷和 200 mL 冰水混合液中并且迅速搅拌, 可见大量固体析出, 过滤, 滤饼以正己烷少量多次洗涤后于 60 °C 减压烘干, 得 16.58 g 白色固体化合物 2, 收率为 78.2%。所得样品未经进一步纯化直接用于下一步反应。

2.2.2 4-三氟甲基-2-羟基-6-甲氧基-喹啉(化合物 3^[24])的合成 取多聚磷酸(85.8 g, 253.9 mmol)置于 250 mL 反应瓶中, 氩气置换, 于 100 °C 搅拌 0.5 h, 加入化合物 2(16.58 g, 63.48 mmol)后继续搅拌 1 h 至反应完全。将反应液分散至 400 mL 冰水中, 搅拌下加入 NaOH 调节 pH 至弱碱性, 可见大量固体析出, 过滤, 滤饼于 80 °C 减压烘干, 得 12.47 g 白色固体化合物 3, 收率为 80.8%。所得样品未经进一步纯化直接用于下一步反应。¹H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.25 (s, 1H), 7.41 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.35 (dd, $J = 9.1, 2.7$ Hz, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 3.80 (s, 3H)。

2.2.3 4-三氟甲基-6-甲氧基-2-氯-喹啉(化合物 4^[26])的合成 取化合物 3(12.47 g, 5.62 mmol)放于 500 mL 反应瓶中, 加入 DMF 150 mL 溶解完全, 氩气置换, 于 100 °C 搅拌下缓慢注入三氯氧磷(9.56 mL, 102 mmol), 继续搅拌 4.5 h 至反应完全。将反应液分散至水中, 有固体析出, 过滤, 滤饼于 80 °C 减压烘干, 得 11.46 g 白色固体化合物 4, 收率为 85.4%。所得样品直接用于下一步反应。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ : 8.00 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.46 (dd, $J = 9.3, 2.7$ Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 3.95 (s, 3H)。

2.2.4 化合物 5 的合成(以化合物 5a 为例) 取化合物 4(200 mg, 0.76 mmol)、对三氟甲基苯胺(148 mg, 0.92 mmol)置于 10 mL 反应瓶中, 加入异丙醇 3 mL 将其溶解, 氩气置换后加入 HCl(36%) 200 μ L, 于 80 °C 搅拌反应 41 h。将反应液分散于乙酸乙酯与水中, 萃取, 有机相依次以饱和 NaCl 洗涤, 无水 MgSO₄ 干燥, 减压蒸干, 所得浓缩物经硅胶柱层析纯化, 得 252 mg 白色固体化合物 5a, 收率为 90.9%。

N-(4-三氟甲基苯基)-4-三氟甲基-6-甲氧基喹啉-2-胺(化合物 5a): 收率为 90.9%。白

色固体, m.p. 157 ~ 162 °C, ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.84 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.80 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.61 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.37 (dd, $J = 9.2, 2.7$ Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 3.93 (s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ : 156.95, 150.50, 144.13, 143.29, 135.25 (q, $J = 31.5$ Hz), 129.53, 126.60 (q, $J = 3.8$ Hz), 124.51 (q, $J = 271.1$ Hz), 124.26 (q, $J = 32.9$ Hz), 123.40 (q, $J = 274.3$ Hz), 122.81, 119.90, 118.41, 110.79 (q, $J = 5.5$ Hz), 103.12 (q, $J = 2.4$ Hz), 55.71; ^{19}F NMR (565 MHz, CDCl_3) δ : -61.8, -62.7.

参考上述方法合成化合物 **5b** ~ **5f**。N-(3-乙炔基苯基)-4-三氟甲基-6-甲氧基喹啉-2-胺 (化合物 **5b**): 收率为 90.9%。白色固体, m.p. 147 ~ 156 °C, ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.81 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.77 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.65 ~ 7.62 (m, 1H), 7.34 (dd, $J = 9.2, 2.8$ Hz, 1H), 7.32 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.22 (dt, $J = 7.6, 1.3$ Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.10 (s, 1H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ : 156.62, 151.18, 144.29, 140.14, 135.08 (q, $J = 31.4$ Hz), 129.39, 129.35, 126.86, 123.46 (q, $J = 274.6$ Hz), 123.15, 123.10, 122.60, 120.27, 119.62, 110.33 (q, $J = 5.6$ Hz), 103.14 (q, $J = 2.6$ Hz), 83.62, 77.47, 55.67; ^{19}F NMR (565 MHz, CDCl_3) δ : -62.7.

N-(4-甲基苯基)-4-三氟甲基-6-甲氧基喹啉-2-胺 (化合物 **5c**): 收率为 84.6%。白色固体, m.p. 155 ~ 159 °C, ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.75 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.32 (dd, $J = 9.2, 2.8$ Hz, 1H), 7.25 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.19 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 6.83 (s, 1H), 3.91 (s, 3H), 2.36 (s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ : 156.25, 152.31, 144.58, 137.24, 134.95 (q, $J = 31.1$ Hz), 133.48, 130.06, 128.99, 123.56 (q, $J = 274.4$ Hz), 122.45, 121.04, 119.38, 109.64 (q, $J = 5.7$ Hz), 103.22 (q, $J = 2.3$ Hz), 55.65, 21.00; ^{19}F NMR (565 MHz, CDCl_3) δ : -62.7.

N-(3-氟-4-氯苯基)-4-三氟甲基-6-甲氧基喹啉-2-胺 (化合物 **5d**): 收率为 93.2%。白色固体, m.p. 120 ~ 123 °C, ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 7.90 (dd, $J = 6.5, 2.7$ Hz, 1H), 7.80

(d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.43 ~ 7.39 (m, 1H), 7.35 (dd, $J = 9.2, 2.7$ Hz, 1H), 7.26 ~ 7.24 (m, 1H), 7.14 ~ 7.10 (m, 2H), 6.64 (s, 1H), 3.92 (s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ : 156.71, 154.15 (d, $J = 244.5$ Hz), 150.98, 144.11, 136.79 (d, $J = 3.0$ Hz), 135.22 (q, $J = 31.2$ Hz), 129.33, 123.40 (q, $J = 274.4$ Hz), 122.69, 121.83, 121.31 (d, $J = 18.4$ Hz), 119.39 (d, $J = 6.7$ Hz), 116.89 (d, $J = 22.2$ Hz), 110.29 (q, $J = 5.6$ Hz), 103.18 (q, $J = 2.5$ Hz), 55.69; ^{19}F NMR (565 MHz, CDCl_3) δ : -62.7, -122.6.

N-(3-硝基-4-甲氧基苯基)-4-三氟甲基-6-甲氧基喹啉-2-胺 (化合物 **5e**): 收率为 99.0%。黄色固体, m.p. 224 ~ 235 °C, ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 9.85 (s, 1H), 8.70 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 7.90 (dd, $J = 9.1, 2.8$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.38 ~ 7.33 (m, 2H), 7.29 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.06 (s, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.79 (s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 155.81, 151.20, 146.78, 143.09, 138.62, 134.13, 132.64 (q, $J = 30.9$ Hz), 128.94, 124.36, 123.34 (q, $J = 273.9$ Hz), 121.73, 118.01, 115.01, 114.09, 112.49 (q, $J = 5.8$ Hz), 102.98, 56.79, 55.45; ^{19}F NMR (565 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : -61.9.

N-(4-硝基苯基)-4-三氟甲基-6-甲氧基喹啉-2-胺 (化合物 **5f**): 收率为 68.7%。黄色固体, m.p. 270 ~ 274 °C, ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.35 (s, 1H), 8.18 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 8.10 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 7.85 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.44 (dd, $J = 9.1, 2.7$ Hz, 1H), 7.12 (s, 1H), 3.85 (s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 156.49, 150.50, 147.22, 142.88, 140.20, 132.86 (q, $J = 30.8$ Hz), 129.51, 125.21, 123.27 (q, $J = 274.0$ Hz), 122.06, 118.71, 117.29, 112.83 (q, $J = 5.8$ Hz), 102.72, 55.49; ^{19}F NMR (565 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : -61.9.

2.2.5 化合物 6 的合成 (以化合物 6a 为例) 取化合物 **5a** (80 mg, 0.21 mmol) 于 10 mL 反应管中, 加入 DMF 5 mL 使其完全溶解, 加入 NaH (10 mg, 0.42 mmol), 氩气置换, 搅拌下缓慢注入碘甲烷 (26 μL , 0.42 mmol), 室温反应 1 h 至反应完毕。将反应液分散于乙酸乙酯与水中, 萃取, 有机相依次以饱和 NaCl 洗涤, 无水 MgSO_4 干燥, 减压蒸干, 所得残留物经硅胶柱层析纯

化, 得 80.0 mg 黄色固体化合物 **6a**, 收率 96.5%。

N-甲基-*N*-(4-三氟甲基苯基)-4-三氟甲基-6-甲氧基喹啉-2-胺(化合物 **6a**): 收率为 96.5%。黄色固体, m.p. 104 ~ 115 °C, ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.82 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.37 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.35 (dd, *J* = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 7.26 ~ 7.22 (m, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.66 (s, 3H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ: 156.59, 153.93, 149.40, 144.58, 134.32 (q, *J* = 31.0 Hz), 129.43, 127.14 (q, *J* = 3.8 Hz), 126.93 (q, *J* = 32.7 Hz), 124.51, 124.19 (q, *J* = 271.5 Hz), 123.54 (q, *J* = 274.6 Hz), 122.48, 119.28, 110.59 (q, *J* = 5.8 Hz), 103.08 (q, *J* = 2.6 Hz), 55.68, 38.67; ¹⁹F NMR (565 MHz, CDCl₃) δ: -62.18, -62.64。

参考上述方法合成化合物 **6b** ~ **6e**。*N*-甲基-*N*-(3-乙炔基苯基)-4-三氟甲基-6-甲氧基喹啉-2-胺(化合物 **6b**): 收率为 99.7%。黄色固体, m.p. 102 ~ 110 °C, ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.79 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.44 ~ 7.40 (m, 1H), 7.43 ~ 7.36 (m, 2H), 7.32 (dd, *J* = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 7.27 (dt, *J* = 6.9, 2.4 Hz, 1H), 7.23 ~ 7.19 (m, 1H), 7.07 (s, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.13 (s, 1H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ: 156.09, 154.39, 146.26, 144.64, 134.09 (q, *J* = 31.0 Hz), 130.17, 129.89, 129.76, 129.17, 126.87, 124.17, 123.59 (q, *J* = 274.5 Hz), 122.19, 118.69, 109.98 (q, *J* = 6.0 Hz), 103.19 (q, *J* = 2.3 Hz), 82.90, 78.31, 55.65, 38.86; ¹⁹F NMR (565 MHz, CDCl₃) δ: -62.7。

N-甲基-*N*-(4-甲基苯基)-4-三氟甲基-6-甲氧基喹啉-2-胺(化合物 **6c**): 收率为 96.5%。黄色固体, m.p. 79 ~ 84 °C, ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.78 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.31 (dd, *J* = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.20 (s, 1H), 7.16 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.04 (s, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.58 (s, 3H), 2.40 (s, 3H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ: 155.73, 154.90, 144.73, 143.44, 136.34, 133.78 (q, *J* = 30.9 Hz), 130.84, 128.95, 126.45, 123.68 (q, *J* = 274.7 Hz), 121.90, 118.29, 110.02 (q, *J* = 5.8 Hz), 103.32 (q, *J* = 2.5 Hz), 55.62, 38.96, 21.2; ¹⁹F NMR (565 MHz, CDCl₃) δ: -62.7。

N-甲基-*N*-(3-氟-4-氯苯基)-4-三氟甲基-6-

甲氧基喹啉-2-胺(化合物 **6d**): 收率为 96.4%。黄色固体, m.p. 108 ~ 110 °C, ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.78 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.35 (dd, *J* = 6.5, 2.6 Hz, 1H), 7.33 (dd, *J* = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 7.24 ~ 7.20 (m, 2H), 7.18 ~ 7.14 (m, 1H), 7.01 (s, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.56 (s, 3H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ: 156.39 (d, *J* = 248.8 Hz), 156.21, 154.27, 144.56, 142.89 (d, *J* = 3.7 Hz), 134.33 (d, *J* = 31.0 Hz), 129.23, 128.84, 126.38 (d, *J* = 7.3 Hz), 123.55 (q, *J* = 274.6 Hz), 122.39, 122.27, 118.73, 117.87 (d, *J* = 22.0 Hz), 109.46 (d, *J* = 5.8 Hz), 103.11 (d, *J* = 2.4 Hz), 55.66, 39.14; ¹⁹F NMR (565 MHz, CDCl₃) δ: -62.7, -117.7。

2.2.6 化合物 **7** 的合成(以化合物 **7a** 为例) 取化合物 **5e** (50 mg, 127 μmol) 于 10 mL 反应瓶中, 加入 3 mL 甲醇使其溶解, 加入钯碳 (5 mg), 氢气置换, 室温搅拌 12 h 至反应完全。反应液经 300 ~ 400 目硅胶垫滤除钯碳, 并以甲醇少量多次洗涤, 浓缩滤液, 残留物经柱层析纯化, 得白色固体化合物 **7a**, 收率为 82.6%。

N-(3-氨基-4-甲氧基苯基)-4-三氟甲基-6-甲氧基喹啉-2-胺(化合物 **7a**): 收率为 82.6%。白色固体, m.p. 176 ~ 212 °C, ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7.71 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.31 (dd, *J* = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 7.24 ~ 7.22 (m, 1H), 7.20 (s, 1H), 6.85 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.78 ~ 6.77 (m, 2H), 6.73 (s, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.87 (s, 3H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ: 156.04, 153.23, 144.65, 144.63, 137.22, 134.89 (q, *J* = 31.2 Hz), 133.08, 128.71, 123.59 (q, *J* = 274.5 Hz), 122.39, 119.20, 112.28, 111.22, 109.73, 109.26 (q, *J* = 5.8 Hz), 103.29 (q, *J* = 2.4 Hz), 55.95, 55.65。

参考上述方法合成。*N*-(4-氨基苯基)-4-三氟甲基-6-甲氧基喹啉-2-胺(化合物 **7b**): 收率为 90.7%。黄色固体, m.p. 273 ~ 286 °C, ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ: 7.94 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.64 (s, 1H), 7.62 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.56 (dd, *J* = 9.1, 2.5 Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 3.96 (s, 3H); ¹³C NMR (151 MHz, CD₃OD) δ: 159.18, 151.99, 138.42, 136.38 (q, *J* = 31.6 Hz), 130.20, 126.02, 125.99, 124.58, 123.92 (q, *J* = 274.7 Hz), 122.81, 119.67, 114.89, 109.11 (q, *J* = 5.8 Hz), 106.03 (q, *J* = 2.5 Hz), 56.41; ¹⁹F NMR (565 MHz, CD₃OD) δ: -64.7。

2.2.7 化合物 8a ~ 8d 的合成 (以化合物 8a 为例) 取化合物 **7a** (80 mg, 0.20 mmol) 于 10 mL 反应瓶中, 加入 DCM 3 mL 使其完全溶解, 加入 K_2CO_3 (138 mg, 1.00 mmol), 氩气置换, 缓慢注入乙酸酐 (38 μ L, 0.40 mmol), 室温继续搅拌 1 h 至反应完毕。将反应液分散于乙酸乙酯与水中, 萃取, 有机相依次以饱和 NaCl 洗涤, 无水 $MgSO_4$ 干燥, 减压蒸干, 所得残留物经硅胶柱层析纯化, 得 81.1 mg 黄色固体化合物 **8a**, 收率为 42.7%。

N-(3-乙酰氨基-4-甲氧基苯基)-4-三氟甲基-6-甲氧基喹啉-2-胺 (化合物 **8a**): 收率为 42.7%。黄色固体, m.p. 220 ~ 230 $^{\circ}C$, 1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 9.51 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 8.48 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.85 (dd, $J = 8.8, 2.6$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.38 (dd, $J = 9.1, 2.8$ Hz, 1H), 7.11 (s, 1H), 7.00 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 2.11 (s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 168.49, 155.36, 151.77, 144.21, 143.55, 133.94, 132.23 (q, $J = 30.2$ Hz), 128.78, 127.56, 123.43 (q, $J = 274.0$ Hz), 121.40, 117.56, 113.82, 112.61, 111.16, 103.01, 79.19, 55.94, 55.40, 24.06; ^{19}F NMR (565 MHz, $DMSO-d_6$) δ : -61.9。

参考上述方法合成化合物 **8b ~ 8d** (化合物 **8a ~ 8c** 以 **7a** 为原料, 化合物 **8d** 以 **7b** 为原料)。*N*-(3-丙酰氨基-4-甲氧基苯基)-4-三氟甲基-6-甲氧基喹啉-2-胺 (化合物 **8b**): 收率为 56.0%。黄色固体, m.p. 194 ~ 205 $^{\circ}C$, 1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 9.51 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 7.88 (dd, $J = 9.0, 2.5$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.38 (dd, $J = 9.3, 2.7$ Hz, 1H), 7.11 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 7.00 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 2.41 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.08 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 172.14, 155.35, 151.78, 144.28, 143.56, 133.96, 132.24 (q, $J = 30.4$ Hz), 128.76, 127.55, 123.44 (q, $J = 274.2$ Hz), 121.38, 117.57, 113.79, 112.69, 112.61 (q, $J = 5.7$ Hz), 111.14, 103.02, 79.19, 55.95, 29.46, 9.88; ^{19}F NMR (565 MHz, $DMSO-d_6$) δ : -61.9。

N-(3-戊酰氨基-4-甲氧基苯基)-4-三氟甲基-6-甲氧基喹啉-2-胺 (化合物 **8c**): 收率为 27.6%。黄色固体, m.p. 167 ~ 171 $^{\circ}C$, 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.48 (d, $J = 2.7$ Hz,

1H), 7.80 (s, 1H), 7.75 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.58 (dd, $J = 8.8, 2.7$ Hz, 1H), 7.28 (dd, $J = 9.2, 2.7$ Hz, 1H), 7.23 ~ 7.19 (m, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.85 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 2.41 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 1.72 (p, $J = 7.7$ Hz, 2H), 1.41 (h, $J = 7.4$ Hz, 2H), 0.94 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ : 171.66, 156.02, 152.37, 144.45, 144.17, 134.55 (q, $J = 31.0$ Hz), 133.53, 129.01, 128.19, 123.57 (q, $J = 274.3$ Hz), 122.08, 119.11, 115.76, 113.24, 110.41, 110.31 (q, $J = 5.6$ Hz), 103.24 (q, $J = 2.5$ Hz), 56.08, 55.60, 38.02, 27.87, 22.49, 13.91; ^{19}F NMR (565 MHz, $CDCl_3$) δ : -62.6。

N-(4-丙酰氨基苯基)-4-三氟甲基-6-甲氧基喹啉-2-胺 (化合物 **8d**): 收率为 50.0%。黄色固体, m.p. 243 ~ 270 $^{\circ}C$, 1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 9.74 (s, 1H), 9.52 (s, 1H), 7.81 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.72 (dd, $J = 9.1, 1.9$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.41 (s, 1H), 7.35 ~ 7.30 (m, 1H), 7.08 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 2.27 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.05 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 171.54, 155.45, 151.61, 143.51, 136.26, 133.50, 132.34 (q, $J = 30.6$ Hz), 128.90, 123.43 (q, $J = 274.1$ Hz), 121.38, 119.68, 118.62, 117.69, 112.64 (q, $J = 6.0$ Hz), 103.01, 55.38, 29.47, 9.80; ^{19}F NMR (565 MHz, $DMSO-d_6$) δ : -61.9。

2.2.8 *N*-(3-丙烯酰氨基-4-甲氧基苯基)-4-三氟甲基-6-甲氧基喹啉-2-胺 (化合物 8e) 的合成

取化合物 **7a** (160 mg, 0.40 mmol) 于 10 mL 反应瓶中, 加入 DCM 3 mL 使其完全溶解, 加入 K_2CO_3 (276 mg, 2.00 mmol), 氩气置换, 0 $^{\circ}C$ 下搅拌 5 min 后缓慢注入丙烯酰氯 (65 μ L, 0.80 mmol), 继续搅拌 1 h 至反应完毕。将反应液分散于乙酸乙酯与水中, 萃取, 有机相依次以饱和 NaCl 洗涤, 无水 $MgSO_4$ 干燥, 减压蒸干, 所得残留物经硅胶柱层析纯化, 得 65.6 mg 黄色固体化合物 **8e**, 收率为 39.3%。黄色固体, m.p. 180 ~ 191 $^{\circ}C$, 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.56 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.76 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.61 (dd, $J = 8.8, 2.6$ Hz, 1H), 7.30 (dd, $J = 9.2, 2.8$ Hz, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.14 (s, 1H), 6.88 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.42 (dd, $J = 16.9, 1.3$ Hz, 1H), 6.31 (dd, $J = 16.9, 10.2$ Hz, 1H), 5.77 (dd, $J = 10.2, 1.3$

Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.89 (s, 3H); ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ: 163.58, 156.09, 152.36, 144.42, 144.33, 134.72 (q, J = 31.2 Hz), 133.51, 131.60, 128.90, 128.03, 127.77, 123.54 (q, J = 274.3 Hz), 122.19, 119.16, 116.30, 113.43, 110.51, 110.28 (q, J = 5.7 Hz), 103.28 (q, J = 2.5 Hz), 56.15, 55.63; ¹⁹F NMR (565 MHz, CDCl₃) δ: - 62.7.

2.3 抗肿瘤活性测试

以紫杉醇为阳性对照, 目标化合物和阳性对照药物用 DMSO 完全溶解后以无血清的培养基稀释至浓度为 5 μmol · L⁻¹。采用 MTT 法测试目标

化合物对 K562、LNCaP、PC3、HeLa 和 A5495 种肿瘤细胞株的体外生长抑制活性, 以评估该类化合物的抗肿瘤活性。分别取上述处于对数生长期的肿瘤细胞株, 接种于 96 孔板中, 培养 24 h, 随后每孔加入目标化合物或阳性对照药物 100 μL, 每组设 3 个平行孔, 在孵箱中继续培养 48 h。再加入 20 μL 质量浓度为 5 mg · mL⁻¹ 的 MTT 溶液继续培养 4 h。离心, 弃去上清液, 加入 150 μL DMSO, 避光、低速振荡至完全溶解。在 570 nm 波长处用酶标仪测量吸光度 (OD) 值, 计算抑制率, 结果见表 1。

表 1 目标化合物的体外抗肿瘤活性
Tab 1 Antitumor activities of the target compounds in vitro

化合物	抑制率/%				
	K562	LNCaP	PC3	HeLa	A549
5a	- 3.76±5.64	1.07±1.90	5.27±3.58	28.42±1.07	1.69±2.15
5b	6.45±4.43	42.61±0.41	- 1.86±6.12	34.92±3.02	- 1.40±2.91
5c	10.31±1.60	3.27±3.85	9.74±5.81	1.70±4.05	8.37±1.21
5d	11.71±5.52	20.37±3.27	- 10.68±3.52	17.63±6.50	3.37±5.76
5e	41.29±5.61	- 11.43±1.20	17.35±3.97	16.31±2.92	10.34±2.56
5f	29.66±4.72	6.42±3.71	24.21±5.05	13.61±2.77	22.28±5.57
6a	3.59±2.09	7.68±3.40	7.42±3.37	19.26±6.39	4.08±2.68
6b	5.61±2.53	0.47±2.98	7.79±4.79	9.71±4.18	- 1.58±2.53
6c	4.32±4.14	13.78±1.70	- 9.24±3.39	7.09±5.70	8.91±4.74
6d	12.37±4.26	6.91±2.82	1.28±5.81	4.49±5.04	6.54±3.28
7a	22.08±5.28	- 17.01±6.70	10.72±2.51	20.43±2.10	0.89±4.09
7b	15.65±4.41	4.41±2.71	13.94±1.59	19.55±2.38	0.70±2.43
8a	27.15±4.16	3.53±7.40	0.38±4.53	1.21±3.91	5.60±5.22
8b	- 3.67±3.56	11.56±2.70	1.30±0.78	7.20±2.67	36.18±2.66
8c	0.95±3.54	3.41±2.08	0.51±0.90	5.19±3.57	2.29±3.47
8d	15.13±1.84	5.10±1.78	19.14±2.84	4.13±6.53	- 4.12±2.05
8e	13.77±4.38	16.31±4.51	7.23±1.75	18.88±4.78	10.81±5.68
紫杉醇	58.06±1.74	72.04±0.90	74.43±0.24	58.81±1.41	55.14±1.08

3 结果

本文通过以 4-甲氧基苯胺为起始原料, 通过氨解、环化、氯代、偶联、烷基化等反应, 设计合成新型 4-三氟甲基-6-甲氧基喹啉-2-胺衍生物 17 个。以 MTT 法对合成所得目标化合物进行了体外抗肿瘤活性测试, 发现部分化合物对肿瘤细胞的增殖具有一定的抑制活性。其中, 在 5 μmol · L⁻¹ 浓度下, 化合物 5b 对 LNCaP 细胞的增殖抑制率为 42.61%, 化合物 5e 对 K562 细胞的增殖抑制率为 41.29%。

4 讨论

4.1 合成部分

在本文采用的 4-三氟甲基-6-甲氧基喹啉-2-胺衍生物合成路线中, 部分中间体的制备仅需简单的后处理, 未经柱层析纯化即可直接用于下一

步反应, 操作简便, 收率较高。在喹啉环 2-位引入不同取代芳胺的偶联反应中, 参照文献^[23], 曾尝试过碱性条件 (K₂CO₃ 或 NaH) 和中性条件下反应, 但均未取得较好的结果, 最终发现在酸性条件下^[21, 23], 本文涉及的偶联反应较好, 收率均在 68% 以上。

4.2 活性测试结果分析

化合物 5b 的 2-位 N 原子上烷基化后的化合物 6b 对 K562 细胞、LNCaP 细胞和 HeLa 细胞的增殖抑制活性均有所降低; 化合物 5e 和 5f 的硝基还原为氨基后的化合物 7a 和 7b 对肿瘤细胞的增殖抑制活性均有所降低。该研究结果可为喹啉类衍生物抗肿瘤作用进一步的结构优化提供参考。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2021 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71 (1): 7-33.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71 (3): 209-249.
- [3] 魏秋红, 刘晓月, 王盼, 等. 抗肿瘤药物的分类和药效学研究进展 [J]. *医学综述*, 2020, 26 (18): 3707-3716.
- [4] Miao L, Guo S, Lin CM, et al. Nanoformulations for combination or cascade anticancer therapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 115: 3-22.
- [5] Persoons L, Vanderlinden E, Vangeel L, et al. Broad spectrum anti-coronavirus activity of a series of anti-malaria quinoline analogues [J]. *Antiviral Res*, 2021, 193: 105127.
- [6] Patel KB, Kumari P. A review: structure-activity relationship and antibacterial activities of quinoline based hybrids [J]. *J Mol Struct*, 2022, 1268: 133634.
- [7] Soliman MHA, Ali I, El-Sakka S, et al. Novel quinoline derivatives as antitumor agents against HepG2 cells: synthesis, characterization, in silico, in vitro and docking studies [J]. *J Mol Struct*, 2022, 1254: 132325.
- [8] Ilakiyalakshmi M, Napoleon AA. Review on recent development of quinoline for anticancer activities [J]. *Arab J Chem*, 2022, 15 (11): 104168.
- [9] Li XP, Chen Q, Ao JS, et al. Synthesis of novel 4, 7-disubstituted quinoline derivatives as autophagy inducing agents via targeting stabilization of ATG5 [J]. *Bioorg Chem*, 2022, 127: 105998.
- [10] Tazi J, Begon-Pescia C, Campos N, et al. Specific and selective induction of miR-124 in immune cells by the quinoline ABX464: a transformative therapy for inflammatory diseases [J]. *Drug Discov Today*, 2021, 26 (4): 1030-1039.
- [11] Mohassab AM, Hassan HA, Abdelhamid D, et al. New quinoline/1, 2, 4-triazole hybrids as dual inhibitors of COX-2/5-LOX and inflammatory cytokines: design, synthesis, and docking study [J]. *J Mol Struct*, 2021, 1244: 130948.
- [12] Adeniji SE, Adamu SG, Ebuka AD, et al. Quantum modeling and molecular docking evaluation of some selected quinoline derivatives as anti-tubercular agents [J]. *Heliyon*, 2020, 6 (3): e03639.
- [13] Afzal O, Kumar S, Haider MR, et al. A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline [J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 97: 871-910.
- [14] Kucharski DJ, Jaszczak MK, Boratynski PJ. A review of modifications of quinoline antimalarials: mefloquine and (hydroxy) chloroquine [J]. *Molecules*, 2022, 27: 1003.
- [15] Matada BS, Pattanashettar R, Yernale NG. A comprehensive review on the biological interest of quinoline and its derivatives [J]. *Bioorg Med Chem*, 2021, 32: 115973.
- [16] Ayala-Aguilera CC, Valero T, Lorente-Macias Á, et al. Small molecule kinase inhibitor drugs (1995-2021): medical indication, pharmacology, and synthesis [J]. *J Med Chem*, 2021, 65 (2): 1047-1131.
- [17] Richardson P. Applications of fluorine to the construction of bioisosteric elements for novel drug discovery [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2021, 16 (11): 1261-1286.
- [18] Hunter L. The C-F bond as a conformational tool in organic and biological chemistry [J]. *Beilstein J Org Chem*, 2010, 6: 38.
- [19] Müller K, Faeh C, Diederich F. Fluorine in pharmaceuticals: looking beyond intuition [J]. *Science*, 2007, 317 (5846): 1881-1886.
- [20] Meanwell NA. Fluorine and fluorinated motifs in the design and application of bioisosteres for drug design [J]. *J Med Chem*, 2018, 61 (14): 5822-5880.
- [21] 张偲偲, 余佳, 曾晓萍, 等. 2-三氟甲基-3-硝基-喹啉-4-胺衍生物的合成及其抗肿瘤活性研究 [J]. *中南药学*, 2021, 19 (10): 2018-2023.
- [22] 张偲偲, 余佳, 曾晓萍, 等. 新型含三氟甲基取代喹啉衍生物的合成及其抗肿瘤活性 [J]. *合成化学*, 2021, 29 (7): 584-592.
- [23] 吕梦凡, 余佳, 曾晓萍, 等. 新型 2-三氟甲基-4-氨基喹啉衍生物的合成及抗肿瘤活性研究 [J]. *合成化学*, 2022, 30 (3): 153-160.
- [24] Kathuria A, Priya N, Chand K, et al. Substrate specificity of acetoxy derivatives of coumarins and quinolones towards Calreticulin mediated transacetylation: investigations on antiplatelet function [J]. *Bioorg Med Chem*, 2012, 20 (4): 1624-1638.
- [25] Marull M, Lefebvre O, Schlosser M. An improved access to 4-trifluoromethyl-2 (1H)-quinolinones: the "watering protocol" [J]. *Eur J Org Chem*, 2004, 54: 63.
- [26] Li XL, Luo Z, Yang YX, et al. Quinoline-based derivatives as VAP-1 inhibitors: EP. WO2020063854 [P]. 2020-04-02.

(收稿日期: 2022-09-08; 修回日期: 2022-11-02)

醋酸亮丙瑞林聚乳酸-羟基乙酸共聚物微球的处方优化及评价

郭玉贤¹, 刘磊¹, 郑明秀¹, 郭作娟¹, 梁荣财^{1, 2*} (1.烟台大学药学院, 烟台大学新型制剂与生物技术药物研究山东省高校协同创新中心, 分子药理和药物评价教育部重点实验室(烟台大学), 山东 烟台 264005; 2.山东绿叶制药有限公司长效和靶向制剂国家重点实验室, 山东 烟台 264003)

摘要: **目的** 对醋酸亮丙瑞林聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)微球处方进行优化, 以制备粒径较小, 包封率较高的微球, 并对其评价。**方法** 采用 $W_1/O/W_2$ 乳化溶剂挥发法制备醋酸亮丙瑞林 PLGA 微球, 以理论载药量、PVA 体积分数、水油相比比例为自变量, 以粒径、包封率为响应指标, 通过 Box-Behnken 响应面法优化处方, 并对最优处方进行粒径、载药量、包封率、表面形态、药物稳定性、体外加速释放、生物相容性等评价。**结果** 微球最优处方参数为: 理论载药量为 7.59%, PVA 体积分数为 2%, 水油比为 200:1。最优处方下得到的微球粒径为 $(20.81 \pm 1.34) \mu\text{m}$, 包封率为 $(95.88 \pm 1.56)\%$ 。扫描电镜显示微球呈球形, 表面圆整, 且孔道较多; 高效液相色谱图和圆二色谱图显示微球具有良好的药物稳定性; 体外加速释放结果显示药物以一级释药模型释放; HE 染色结果显示微球具有良好的生物相容性。**结论** 通过 Box-Behnken 响应面法优化微球处方合理可行, 所制备出的微球粒径较小, 包封率较高, 并具有良好的药物稳定性及生物相容性。

关键词: 醋酸亮丙瑞林; 聚乳酸-羟基乙酸共聚物微球; Box-Behnken 响应面法; 药物稳定性; 体外加速释放; 生物相容性

中图分类号: R944.9, R977 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)02-0421-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.022

Prescription optimization and evaluation of leuprolide acetate PLGA microspheres

GUO Yu-xian¹, LIU Lei¹, ZHENG Ming-xiu¹, GUO Zuo-juan¹, LIANG Rong-cai^{1, 2*} (1. School of Pharmacy, Collaborative Innovation Center of Advanced Drug Delivery System and Biotech Drugs in Universities of Shandong, Key Laboratory of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation (Yantai University), Ministry of Education, Yantai University, Yantai Shandong 264005; 2. State Key Laboratory of Long-acting and Targeting Drug Delivery System, Shandong Luye Pharmaceutical Co., Ltd, Yantai Shandong 264003)

Abstract: Objective To optimize and evaluate the formulation of leuprolide acetate PLGA microspheres, and prepare microspheres with smaller particle size and higher encapsulation efficiency. **Methods** Leuprolide acetate PLGA microspheres were prepared by $W_1/O/W_2$ emulsification solvent evaporation. The formulation was optimized by Box-Behnken response surface method with theoretical drug loading, PVA volume fraction, water-oil ratio as the independent variables, particle size and encapsulation efficiency as the response indicators, and characterized by particle size, drug loading, entrapment efficiency, surface morphology, drug stability, in vitro accelerated release and biocompatibility. **Results** The optimal formulation parameters of microspheres were as follows: theoretical drug loading at 7.59%, PVA volume fraction at 2%, and water-oil ratio at 200:1. The particle size of the microspheres obtained under the optimal prescription was $(20.81 \pm 1.34) \mu\text{m}$, and the encapsulation efficiency was $(95.88 \pm 1.56)\%$. The scanning electron microscopy showed that

作者简介: 郭玉贤, 女, 硕士, 主要从事长效缓控释制剂研究, email: 15735012792@163.com * 通信作者: 梁荣财, 男, 博士, 副教授, 主要从事长效缓控释制剂研究, email: liangrongcai@luye.com

the microspheres had round surface and dense pore. HPLC and CD showed that the microspheres had good drug stability. In vitro accelerated release results showed that the drug was released with first-order drug release model. HE staining showed that the microspheres had good biocompatibility.

Conclusion It is reasonable and feasible to optimize the formulation of microspheres by Box-Behnken response surface method, and the microspheres have small particle size, high encapsulation efficiency, good drug stability and biocompatibility.

Key words: leuprolide acetate; PLGA microsphere; Box-Behnken response surface; drug stability; in vitro accelerated release; biocompatibility

微球作为一类长效注射剂, 通过将药物分散或包裹在生物可降解材料中, 保护药物不被酶降解, 实现缓释和控释给药, 提高药物在体内的耐受性和患者的依从性, 以获得良好的治疗效果^[1-2]。生物可降解高分子材料因其疗效好、毒性低而被用于微球的制备^[3]。其中聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)可以通过改变其组成、相对分子质量和化学结构来调节药物的释放, 是目前应用最广泛的缓释微球骨架材料^[4]。

醋酸亮丙瑞林是一种促黄体生成激素释放激素类似物, 为水溶性九肽, 具有高效的垂体-性腺系统抑制作用, 可用于治疗激素敏感型前列腺癌、乳腺癌、子宫内膜异位症等疾病^[5]。醋酸亮丙瑞林具有亲水性、易被酶降解、pH 敏感的物理化学性质, 因此存在生物利用度低、生物半衰期短等缺点, 需频繁、长期给药^[6-7], 将其开发成长效注射剂非常必要^[8-9]。自美国食品药品监督管理局(FDA)于 1989 年批准以来, 醋酸亮丙瑞林 PLGA 微球已成为现代长效释放基准产品, 是国内外研究的热点^[10]。

本研究采用 $W_1/O/W_2$ 乳化溶剂挥发法制备醋酸亮丙瑞林 PLGA 微球, 通过 Box-Behnken 响应面法优化处方, 以制备粒径较小, 包封率较高的微球, 并对其粒径、载药量、包封率、表面形态、药物稳定性、体外加速释放行为等进行表征, 为醋酸亮丙瑞林 PLGA 微球工业化大规模生产的处方设计提供参考。

1 材料

IKA 高速均质机(德国 IKA 公司); 高速剪切分散乳化机(上海依卡机电制造有限公司); 高效液相色谱仪 LC25 (Agilent 公司); 马尔文 3000 粒度仪(Malvern Instruments 公司); EM-30 型扫描电镜(韩国 Coxem 公司); GL21M 高速冷冻离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司); 电动搅拌器(德国 IKA 公司); pH 计(上海梅特勒-托利多仪器有限公司); 冷冻干燥机(宁波新芝冻干设备股份有限公司); SHZ-88 水浴恒温振荡器(江苏金怡仪器科技有限公司); 圆二色谱仪

(Applied Photophysics Ltd 公司)。

醋酸亮丙瑞林(中肽生化有限公司); 二氯甲烷(南京化学试剂股份有限公司, 分析纯); PLGA (7525 2A, 山东绿叶制药有限公司); 聚乙烯醇(PVA, 德国 Merck 公司); 吐温 20 (国药集团化学试剂有限公司); 其余试剂均为色谱纯。

SD 大鼠, 雄性, 体质量(200±20) g [济南朋悦实验动物繁育有限公司, 实验动物许可证号: SCXK(鲁) 20190003]。将大鼠圈养在(22±1) °C 且 12 h 光照/黑暗循环的标准环境中饲养, 并提供标准的饮食和水。所有动物实验均在烟台大学动物实验伦理委员会的指导原则下进行, 符合欧盟指令 2010/63/EU 和国际实验动物评估和认可委员会的要求。

2 方法

2.1 高效液相色谱条件

色谱柱: Agilent C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-三乙胺/磷酸盐缓冲溶液(15.2 g 三乙胺溶于 800 mL 超纯水中, 用磷酸调节 pH 3.0, 然后稀释至 1000 mL) = 24 : 76; 柱温: 30 °C; 流速: 1 mL·min⁻¹; 检测波长: 220 nm; 进样量: 20 μL^[11]。醋酸亮丙瑞林的保留时间为 8.79 min。

2.2 醋酸亮丙瑞林 PLGA 微球的制备

采用 $W_1/O/W_2$ 乳化溶剂挥发法制备醋酸亮丙瑞林 PLGA 微球。将 PLGA 溶于二氯甲烷中形成油相(O), 醋酸亮丙瑞林溶于水中, 形成内水相(W_1)。将油相加入内水相中, 在冰水浴条件下 21 600 r·min⁻¹ 均质 3 min 50 s, 形成初乳(W_1/O)。将初乳缓慢加入到 1% PVA (W_2), 在高速剪切分散机的作用下, 剪切 2 min, 形成复乳($W_1/O/W_2$)。转移至恒温搅拌器中固化 3 h, 以除去大部分二氯甲烷。将所得溶液过 180 目筛网, 离心水洗 3 次, 冷冻干燥后收球。

2.3 Box-Behnken 响应面法优化微球处方

通过前期单因素实验的考察, 采取三因素三水平 Box-Behnken 响应面设计对微球粒径、包封率影响较为显著的三个因素进行处方优化。以理论载药

量、PVA 体积分数 [φ (PVA)]、水油相比比例 (水油比) 为自变量, 以粒径 (Y_1)、包封率 (Y_2) 为响应指标。每个自变量选择三个水平, 如表 1 所示。

表 1 Box-Behnken 响应面设计因素及水平

Tab 1 Factor and level of Box-Behnken response surface

自变量	水平		
	- 1	0	+ 1
A. 理论载药量 /%	3	9	15
B. φ (PVA) /%	0.5	1.25	2
C. 水油比	100	150	200

按照 Box-Behnken 响应面法设计原理, 17 次实验设计方案及数据处理结果如表 2 所示, 使用 Design-Expert 软件对各项实验数据拟合分析, 得到的多项式模型如下:

$$\textcircled{1} Y_1: Y_1 = 44.18 + 11.56A - 12.11B - 5.78C - 2.32AB - 4.00AC + 1.50BC - 3.29A^2 - 3.84B^2 - 2.51C^2 (R^2 = 0.9922)。$$

$$\textcircled{2} Y_2: Y_2 = 93.79 + 4.50A + 1.64B + 4.71C + 0.40AB - 3.91AC - 0.91BC - 10.79A^2 - 1.55B^2 + 0.30C^2 (R^2 = 0.9911)。$$

表 2 Box-Behnken 响应面设计及其结果

Tab 2 Design and response value of Box-Behnken response surface

No.	A 理论载药量 /%	B φ (PVA) /%	C 水油比	粒径 / μm	包封率 /%
1	3	2.0	150	14.5	78.69
2	9	0.5	200	41.2	95.71
3	3	1.25	200	25.6	87.64
4	3	0.5	150	35.9	76.18
5	15	1.25	200	40.7	90.01
6	9	1.25	150	44.5	94.62
7	9	1.25	150	42.8	94.32
8	15	0.5	150	64.8	83.63
9	15	2.0	150	34.1	87.72
10	9	1.25	150	45.1	93.86
11	15	1.25	150	50.2	86.63
12	3	1.25	100	28.6	68.98
13	9	2.0	200	21.8	97.16
14	9	1.25	150	43.9	93.43
15	9	0.5	100	56.3	85.88
16	9	2.0	100	30.9	90.97
17	9	1.25	150	45.7	93.18

对模型进行显著性检验及方差分析, 结果如表 3、4 所示。 Y_1 、 Y_2 模型的 F 均较大 (分别为 98.88、86.97), P 均小于 0.0001, 表明模型回归性显著; 模型失拟项的 P 均大于 0.05, 表明失拟项不显著, 模型拟合度较高, 可用于描述各因素与响应指标之间的关系。 Y_1 、 Y_2 模型的 R^2 均大于 0.9000 (分别为 0.9922、0.9911), 表明模型相关性良好, 可有效预测实验结果。

表 3 粒径的响应面方差分析结果

Tab 3 Variance analysis of particle size

方差来源	离差平方和	自由度	均方差	F	P
Model	2511.42	9	279.05	98.88	< 0.0001
A	898.23	1	898.23	318.28	< 0.0001
B	1173.70	1	1173.70	415.89	< 0.0001
C	187.64	1	187.64	66.49	< 0.0001
AB	21.62	1	21.62	7.66	0.0278
AC	34.73	1	34.73	12.31	0.0099
BC	9.00	1	9.00	3.19	0.1173
A^2	42.18	1	42.18	14.95	0.0062
B^2	55.54	1	55.54	19.68	0.0030
C^2	20.99	1	20.99	7.44	0.0294
残差	19.75	7	2.82		
失拟项	14.75	3	4.92	3.93	0.1094
净误差	5.00	4	1.25		
总离差	2531.18	16			

表 4 包封率的响应面方差分析结果

Tab 4 Variance analysis of encapsulation efficiency

方差来源	离差平方和	自由度	均方差	F	P
Model	935.69	9	103.97	86.97	< 0.0001
A	136.14	1	136.14	113.88	< 0.0001
B	21.58	1	21.58	18.05	0.0038
C	124.83	1	124.83	104.42	< 0.0001
AB	0.62	1	0.62	0.52	0.4934
AC	33.19	1	33.19	27.76	0.0012
BC	3.31	1	3.31	2.77	0.1399
A^2	452.92	1	452.92	378.86	< 0.0001
B^2	9.12	1	9.12	7.63	0.0280
C^2	0.30	1	0.30	0.25	0.6388
残差	8.37	7	1.20		
失拟项	6.93	3	2.31	6.45	0.0518
净误差	1.43	4	0.36		
总离差	944.06	16			

根据拟合方程绘制三维响应曲面图, 进一步分析各因素与响应指标之间的相互作用, 响应曲面越陡峭, 表明该因素影响越显著。图 1 为粒径的响应面图, 可以看出微球粒径随着 φ (PVA) 和水油比的增加呈现逐渐减小的趋势, 随着理论载药量的增加呈现逐渐增大的趋势。结合表 3 可知, 各因素对粒径响应值的影响依次为 $B > A > C$ 。

图 2 为包封率的响应面曲面图。可以看出微球包封率随理论载药量的增加先增大后减小, 随水油比的增加而增大, 随 φ (PVA) 的增加而减小。结合表 4 可知, 各因素对包封率响应值的影响依次为 $A > C > B$ 。

2.4 最佳工艺的验证

得到软件模拟出的制备微球的最优处方为: 理论载药量为 7.59%, φ (PVA) 为 2%, 水油比为 200:1。预测响应值: 粒径为 20.04 μm , 包封率为 97.16%。按最优处方制备的 3 批微球平均粒径为 $(20.81 \pm 1.34) \mu\text{m}$, 包封率为 $(95.88 \pm 1.56) \%$,

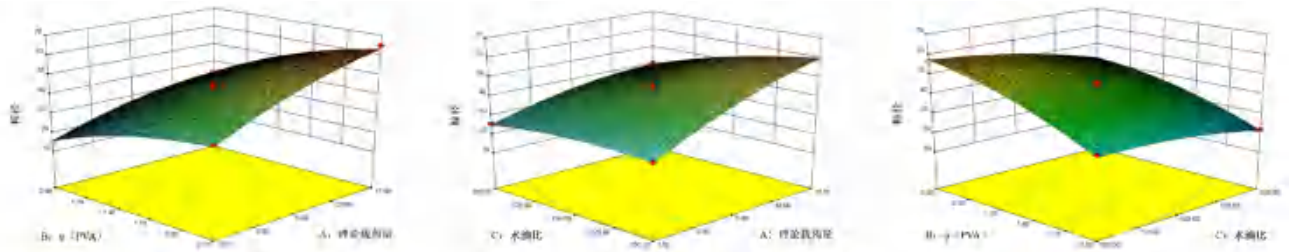


图 1 各因素对粒径影响的响应面图
Fig 1 Response surface of the effect of various factors on the particle size

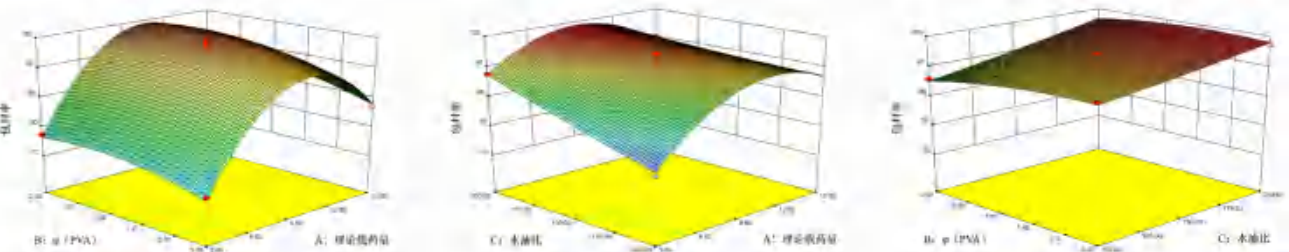


图 2 各因素对包封率影响的响应面图
Fig 2 Response surface of the effect of various factors on the encapsulation efficiency

预测值与实际值较为接近，说明该模型可有效预测实验结果。

2.5 微球的评价

2.5.1 粒径的测定 称取适量制备的微球，以

超纯水为分散介质，超声 1 min，使其分散均匀，测定其粒径。3 批微球的粒径分别为 20.89、20.54、21.01 μm，PDI 分别为 2.00、2.11、2.63，粒径分布图见图 3。

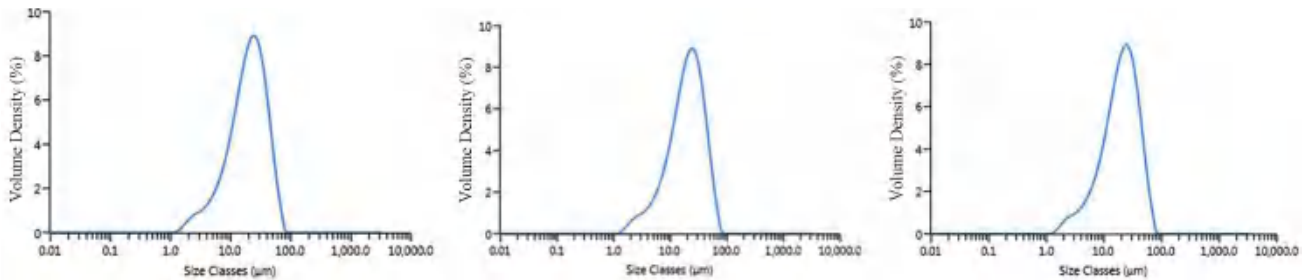


图 3 3 批醋酸亮丙瑞林 PLGA 微球的粒径分布图
Fig 3 Particle size distribution of 3 batches of leuprolide acetate PLGA microspheres

2.5.2 载药量和包封率的测定 精密称取 10 mg 微球，溶于少量乙腈中，超声使其溶解，用水稀释定容至 10 mL，离心收集上清液，按“2.1”项下色谱条件测定醋酸亮丙瑞林的含量。分别以下式计算其载药量和包封率：

$$\text{载药量}(\%) = \frac{\text{微球中醋酸亮丙瑞林的重量}}{\text{微球总重量}} \times 100\%$$

$$\text{包封率}(\%) = \frac{\text{实际载药量}}{\text{理论载药量}} \times 100\%$$

按最优处方制得的 3 批微球的平均载药量为 (7.28±0.27) %，包封率为 (95.88±1.56) %。

2.5.3 表面形态 将适量微球粉末分散固定于导电胶上，真空状态下喷金后放置于扫描电镜中观察微球的表面形态，结果如图 4 所示。醋酸亮丙瑞林 PLGA 微球呈球形，表面圆整，且孔道较多。

2.5.4 药物的稳定性 精密称取适量醋酸亮丙瑞

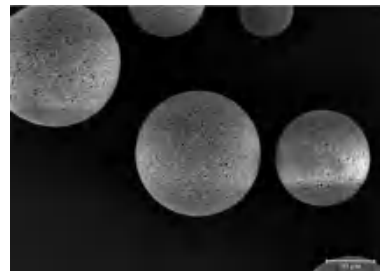


图 4 醋酸亮丙瑞林 PLGA 微球的表面形态
Fig 4 Surface morphology of leuprolide acetate PLGA microspheres

林原料药及 PLGA 微球，以乙腈-水为溶剂，配制成一定浓度的溶液，比较其高效液相色谱图和圆二色谱图。前者可以提供不同衍生物的定性信息，后者可以显示二级结构的变化^[12]。由图 5 可知，提取出的药物与原料药的色谱图没有显著差别，表明微球制备过程不影响药物的化学完整性，不存在衍生化产物。圆二色谱图也没有明显的区

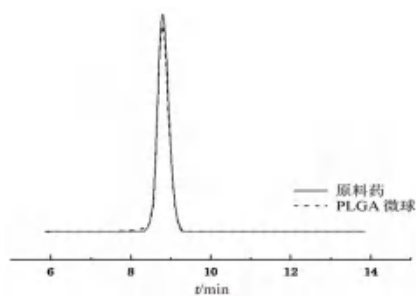


图 5 原料药与醋酸亮丙瑞林 PLGA 微球的高效液相色谱图
Fig 5 HPLC of API and leuprolide acetate PLGA microspheres

别, 199 nm 和 228 nm 附近分别有一个负峰和一个正峰, 其二级结构不受影响 (见图 6)。因此, 醋酸亮丙瑞林的生物稳定性得到了较好的保留。

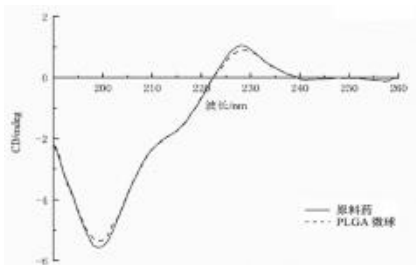


图 6 原料药与醋酸亮丙瑞林 PLGA 微球的圆二色谱图
Fig 6 CD spectra of API and leuprolide acetate PLGA microspheres

2.5.5 体外加速释放 精密称取 20 mg 微球置于 25 mL 离心管中, 加入 5 mL 5% (V/V) 甲醇水溶液, 在 45 °C、50 r·min⁻¹ 条件下振荡释放。分别在 2 h、8 h、24 h、2 d、3 d、5 d、6 d、7 d、8 d、9 d、11 d、13 d 取样, 离心, 取出 4 mL 上清液, 同时补加相同体积的释放介质。按“2.1”项下条件测定醋酸亮丙瑞林含量, 计算其累计释放量, 以时间为横坐标, 累计释放度为纵坐标, 绘制其累计释放曲线, 结果见图 7。醋酸亮丙瑞林 PLGA 微球在 5% 甲醇水中的释放呈双相特征。

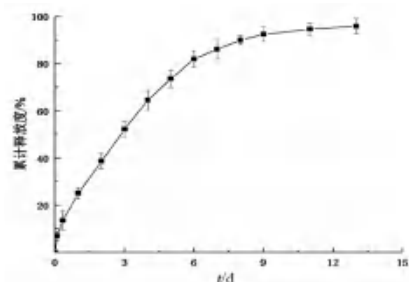


图 7 醋酸亮丙瑞林 PLGA 微球的体外累计释放曲线
Fig 7 In vitro cumulative release profiles of leuprolide acetate PLGA microspheres

以零级释药模型、一级释药模型、Higuchi 模型和 Korsmeyer-Peppas 模型分别对制备的醋酸亮丙瑞林 PLGA 微球体外累计释放曲线进行拟合, 探究其释药机制, 结果见表 5。各拟合方程的

相关性依次为: 一级释药模型 ($R^2 = 0.9946$) > Korsmeyer-Peppas 模型 ($R^2 = 0.9716$) > Higuchi 模型 ($R^2 = 0.9706$) > 零级释药模型 ($R^2 = 0.8418$), 因此药物在微球中的释放行为可用一级释药模型评价, 表明微球呈浓度依赖性^[13]。

表 5 醋酸亮丙瑞林 PLGA 微球释药行为拟合方程
Tab 5 Fitting equation of drug release behavior of leuprolide acetate PLGA microspheres

释药模型	拟合方程	R^2
零级模型	$Q_t = 7.711t + 20.06$	0.8418
一级模型	$Q_t = 101.14(1 - e^{-0.26t})$	0.9946
Higuchi 模型	$Q_t = 30.34t^{1/2} - 0.40$	0.9706
Korsmeyer-Peppas 模型	$Q_t = 31.71t^{0.48}$	0.9716

2.5.6 生物相容性 将 8 只 SD 大鼠随机分为 4 组, 对背部进行脱毛处理, 范围为 2 cm×2 cm。A、B 两组作为对照组, 皮下注射生理盐水; C、D 两组作为实验组, 皮下注射醋酸亮丙瑞林 PLGA 微球。在注射后的 4 d 和 25 d 分别处死大鼠, 取出注射部位的组织, 制备成石蜡切片, 并用苏木精-伊红 (HE) 染色, 观察大鼠的皮肤在注射部位上的差异。结果对照组和实验组注射部位外观无明显变化, 皮肤组织无明显炎症反应, 表明所制备的微球具有良好的生物相容性 (见图 8)。

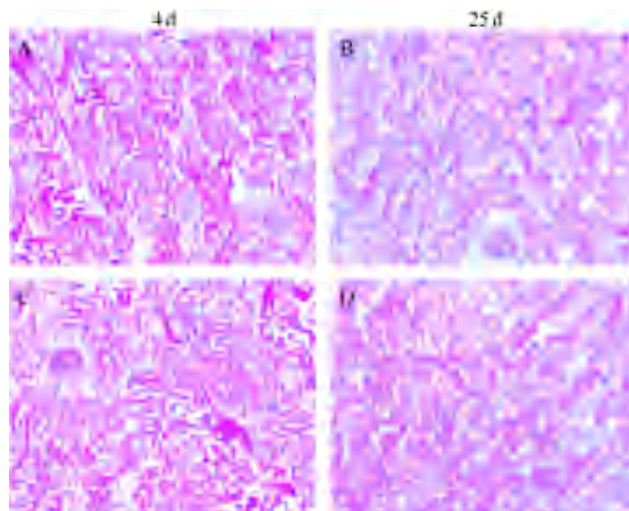


图 8 SD 大鼠皮下注射生理盐水 (A 和 B)、微球 (C 和 D) 后注射部位 HE 染色结果 (×40)

Fig 8 HE staining at the injection site after subcutaneous injection of normal saline (A and B) and microspheres (C and D) (×40)

3 讨论

微球因其巨大的工业价值和广阔的应用前景, 已成为药剂学研究热点之一, 但我国鲜有相关产品上市, 醋酸亮丙瑞林微球作为国内首个上市微球产品, 其工业化规模尚有待扩大^[14-15]。本研究采用 Box-Behnken 响应面法对醋酸亮丙瑞林 PLGA 微球处方进行优化, 通过多元二次回归

方程来拟合相关因素与响应值之间的函数关系, 得到最优处方的实测值与预测值较为接近, 说明响应面法优化微球处方合理可行, 准确度高, 重现性良好。

本研究选用粒径和包封率作为响应值能直观反映微球制备工艺。三个因素中, ϕ (PVA) 和理论载药量对粒径的影响更大, 这是由于 ϕ (PVA) 的增加使得外水相黏度增加, 液滴聚结减少, 形成更小的液滴; 另一方面理论载药量增加, 引起内水相黏度增加, 乳滴变大, 微球粒径随之增大^[16]。理论载药量和水油比对包封率的影响更大, 这是由于理论载药量增加, 药物被包封的概率也随之增加, 但同时初乳浓度梯度逐渐增大, 促使药物流失到外水相中; 另一方面, 随着外水相体积的增加, 有机溶剂接触到的水体积增加, 从而使聚合物聚结速度更快, 限制了药物的外溢, 使更多药物保留在微球中^[9]。

体外释放行为是评价微球性质的关键性参数。注射用双羟萘酸曲普瑞林使用的释放介质为 5% 甲醇水溶液。由于亮丙瑞林和曲普瑞林同为促性腺激素释放激素类似物, 其释放行为可能具有相似性^[17]。因此, 本研究选择 5% 甲醇水作为释放介质。醋酸亮丙瑞林 PLGA 微球的释放可分为两个阶段, 前期快速释放阶段可能是因为微球表面药物的快速溶解, 此时微球的释放机制为扩散作用^[18]; 后期药物的释放可能是由于 PLGA 的降解, 微球骨架结构被逐渐破坏, 药物通过孔道和骨架的溶蚀逐渐从微球内部扩散到介质中^[19]。

本研究所制备出的醋酸亮丙瑞林 PLGA 微球包封率高, 药物稳定性和生物相容性良好, 可为其工业化生产的处方设计提供参考, 但其生物有效性有待进一步研究。

参考文献

- [1] Shi NQ, Zhou J, Walker J, et al. Microencapsulation of luteinizing hormone-releasing hormone agonist in poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres by spray-drying [J]. *J Control Release*, 2020, 321: 756-772.
- [2] Park H, Otte A, Park K. Evolution of drug delivery systems: from 1950 to 2020 and beyond [J]. *J Control Release*, 2022, 342: 53-65.
- [3] Park K, Otte A, Sharifi F, et al. Formulation composition, manufacturing process, and characterization of poly (lactide-co-glycolide) microparticles [J]. *J Control Release*, 2021, 329: 1150-1161.
- [4] Kim M, Kim JH, Kim S, et al. New long-acting injectable microspheres prepared by IVL-DrugFluidic™ system: 1-month and 3-month in vivo drug delivery of leuprolide [J]. *Int J Pharm*, 2022, 622: 121875.
- [5] Shore ND, George DJ, Saad F, et al. HERO phase III trial: results comparing relugolix, an oral GnRH receptor antagonist, versus leuprolide acetate for advanced prostate cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38: 5602-5602.
- [6] Ma G. Microencapsulation of protein drugs for drug delivery: strategy, preparation, and applications [J]. *J Control Release*, 2014, 193: 324-340.
- [7] Asfour MH. Advanced trends in protein and peptide drug delivery: a special emphasis on aquasomes and microneedles techniques [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2021, 11 (1): 1-23.
- [8] Kim GY, Kim JH, Lee T, et al. In vitro and in vivo evaluations of a 3-month sustained-release microsphere depot formulation of leuprolide acetate [J]. *J Pharm Investig*, 2022, 52 (1): 129-138.
- [9] Bee SL, Hamid ZAA, Mariatti M, et al. Approaches to improve therapeutic efficacy of biodegradable PLA/PLGA microspheres: a review [J]. *Polym Rev*, 2018, 58 (3): 495-536.
- [10] Zhou J, Walker J, Ackermann R, et al. Effect of manufacturing variables and raw materials on the composition-equivalent PLGA microspheres for 1-month controlled release of leuprolide [J]. *Mol Pharm*, 2020, 17 (5): 1502-1515.
- [11] Guo N, Zhang Q, Sun Y, et al. Separation and identification of acylated leuprorelin inside PLGA microspheres [J]. *Int J Pharm*, 2019, 560: 273-281.
- [12] Qi P, Bu R, Zhang H, et al. Goserelin acetate loaded poloxamer hydrogel in PLGA microspheres: core-shell Di-depot intramuscular sustained release delivery system [J]. *Mol Pharm*, 2019, 16 (8): 3502-3513.
- [13] 钟薇, 苏颖, 李志明, 等. 响应面法优化恩替卡韦微球的制备及体外释药 [J]. *烟台大学学报 (自然科学与工程版)*, 2021, 34 (2): 171-177.
- [14] 顾玲玲, 吴忠虹, 尹霞, 等. 多肽类药物长效微球制剂仿制药研发要点浅析 [J]. *中国医药工业杂志*, 2021, 52 (11): 1436-1443.
- [15] 魏颖, 尹焱, 张宇, 等. 缓释微球仿制药一致性评价过程中质量管理策略 [J]. *医药导报*, 2022, 41 (3): 412-416.
- [16] 刘娜. 托特罗定 PLGA 微球的制备及治疗膀胱过度活动症的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [17] 王梦迪, 薛英, 冷广意, 等. 醋酸戈舍瑞林微球的体内外相关性研究 [J]. *药学学报*, 2019, 54 (1): 159-165.
- [18] Andhariya JV, Jog R, Shen J, et al. Development of leval A in vitro-in vivo correlations for peptide loaded PLGA microspheres [J]. *J Control Release*, 2019, 308: 1-13.
- [19] Wan B, Bao Q, Wang R, et al. Polymer source affects in vitro-in vivo correlation of leuprolide acetate PLGA microspheres [J]. *Int J Pharm*, 2022, 625: 122032.

(收稿日期: 2022-09-19; 修回日期: 2022-10-25)

通俗环毛蚓、参环毛蚓、赤子爱胜蚓的分子鉴定及纤溶、抗凝活性对比

杨麒麟, 马韞楠, 杨万青, 汪文杰, 钟宛凌, 樊箫雨, 杨天姿, 杜守颖*, 李鹏跃* (北京中医药大学中药学院, 北京 100029)

摘要: **目的** 鉴定参环毛蚓、通俗环毛蚓以及药典外研究较多的赤子爱胜蚓, 再比较 3 种鲜体蚯蚓在两种不同提取方法下的纤溶和抗凝活性, 并检测乙醇沉淀物的分子量。**方法** 采用 DNA 分子鉴定法鉴别 3 种蚯蚓。采用水提法提取鲜体蚯蚓蛋白, 进一步采用乙醇沉淀法对水提物中的蛋白进行富集, 利用纤维蛋白平板法和纤维蛋白原-凝血酶时间法 (Fibg-TT 法) 测定纤溶活性和抗凝活性, 利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 3 种蚯蚓乙醇沉淀物的分子量。**结果** 以线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I (COI) 基因片段为识别片段准确鉴定出了 3 种蚯蚓。比较 3 种蚯蚓水提液的抗血栓活性: 参环毛蚓水提液的抗凝活性和纤溶活性最强, 而赤子爱胜蚓水提液活性最弱; 比较 3 种蚯蚓乙醇沉淀物的抗血栓活性: 参环毛蚓乙醇沉淀物的纤溶活性最强, 而通俗环毛蚓乙醇沉淀物的抗凝活性最强; 赤子爱胜蚓的乙醇沉淀物纤溶和抗凝活性均最弱。参环毛蚓和通俗环毛蚓乙醇沉淀物的蛋白分子量主要分布在 25 ~ 70 kDa, 赤子爱胜蚓乙醇沉淀物的蛋白分子量主要分布在 25 ~ 40 kDa。**结论** 药典地龙品种通俗环毛蚓和参环毛蚓的纤溶、抗凝活性远大于药典外的常用品种赤子爱胜蚓, 3 种蚯蚓中抗血栓活性蛋白有明显差异; 乙醇沉淀法可有效富集抗血栓蛋白。

关键词: 通俗环毛蚓; 参环毛蚓; 赤子爱胜蚓; 分子鉴定; 抗凝活性; 纤溶活性

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0427-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.023

Molecular identification and comparison of anticoagulant activity and fibrinolytic activity of *Pheretima vulgaris*, *Pheretima aspergillum* and *Eisenia foetida*

YANG Qi-lin, MA Yun-nan, YANG Wan-qing, WANG Wen-jie, ZHONG Wan-ling, FAN Xiao-yu, YANG Tian-zi, DU Shou-ying*, LI Peng-yue* (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029)

Abstract: Objective To identify *Pheretima aspergillum*, *Pheretima vulgaris* and *Eisenia foetida*, compare the fibrinolytic and anticoagulant activities of 3 fresh earthworms by two extraction methods, and measure the molecular weights of ethanol precipitates. **Methods** DNA molecules were used to the 3 earthworms. Earthworm protein was extracted by water, and enriched by ethanol precipitation method. Fibrinolytic activity and anticoagulant activity were measured by fibrin plate method and fibrinogen thrombin time method. The molecular weights of ethanol precipitates from the earthworms were determined by SDS-PAGE. **Results** Mitochondrial COI gene fragment was used for the recognition, 3 earthworms were accurately identified by molecular method. The antithrombotic activities of the 3 earthworm extracts were compared: the anticoagulant and fibrinolytic activities of *Pheretima aspergillum* were the strongest, while those of *Eisenia foetida* were the weakest; the antithrombotic activities of the 3 earthworm ethanol precipitates were compared. The fibrinolytic activity of *Pheretima aspergillum* was the strongest, the anticoagulant activity of *Pheretima vulgaris* was the strongest, and the fibrinolytic and

基金项目: 基于转录组学-蛋白组学-活性评价整合模式的地龙抗血栓有效部位研究 (No.2020-JYB-ZDGG-032)。

作者简介: 杨麒麟, 女, 硕士, 主要从事中药动物药研究, email: kirinyang170@163.com ***通信作者:** 杜守颖, 女, 教授, 主要从事中药新剂型研究, email: dushouying@263.net; 李鹏跃, 男, 副教授, 主要从事中药新剂型研究, email: pengyuelee@126.com

anticoagulant activities of *Eisenia foetida* were the weakest. The protein molecular weight of ethanol precipitates of *Pheretima aspergillum* and *Pheretima vulgaris* was mainly 25 ~ 70 kDa, and that of ethanol precipitates of *Eisenia foetida* was mainly 25 ~ 40 kDa. **Conclusion** The fibrinolytic and anticoagulant effects of *Pheretima aspergillum* and *Pheretima vulgaris* in Chinese Pharmacopoeia are more active than *Eisenia foetida* outside Chinese Pharmacopoeia. The antithrombotic protein in the 3 earthworms is greatly different. The antithrombotic protein can be effectively enriched by ethanol precipitation.

Key words: *Pheretima vulgaris*; *Pheretima aspergillum*; *Eisenia foetida*; molecular identification; anticoagulant activity; fibrinolytic activity

2020 年版《中国药典》收录的地龙为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier)、通俗环毛蚓 *Pheretima vulgaris* Chen (P. vulgaris)、威廉环毛蚓 *Pheretima guillelmi* (Michaelsen) 或栉盲环毛蚓 *Pheretima pectinifera* Michaelsen 的干燥体^[1]。前一种习称“广地龙”，主产地为广东、广西、海南等；后 3 种习称“沪地龙”，主产地为上海、江苏、浙江等^[2]。我国地龙药材的基原动物主要有 14 个品种，分别属于钜蚓科 (*Megascolecidae*)、正蚓科 (*Lumbricidae*) 和链胃蚓科 (*Moniligastridae*) 5 个属^[3]。赤子爱胜蚓 *Eisenia foetida* (Savigny) 为正蚓科爱胜蚓属，俗称红蚯蚓，其繁殖率高，适宜人工养殖，是目前世界上养殖最普遍的蚯蚓品种^[4]。地龙及混淆品的基原动物种类繁多，且形态极其相似，容易造成品种混杂和掺假的现象^[5]。通过 DNA 分子水平进行物种的鉴别是近年来兴起的物种鉴定新方法，在中药材鉴定领域中发挥重要作用。格小光等^[6]采集全国多个药材市场的地龙，进行 DNA 分子鉴定，与数据库比对，发现 55% 的市售地龙均非药典规定的基原。因此采用 DNA 分子鉴定地龙是有效的手段。

现代研究表明，地龙中含有的化学成分主要有蛋白质、多肽、氨基酸、核苷、有机酸、脂质等^[7]，其中地龙内含有的蛋白多肽类成分高达 55% ~ 68%^[8]。目前有关赤子爱胜蚓的研究大多集中在其对环境污染物的富集、生物降解等方面^[9]。而赤子爱胜蚓不仅在环境保护方面发挥功能，同时也是一种有效的抗血栓药材。赤子爱胜蚓是药典地龙品种之外研究抗血栓活性较多的蚯蚓品种。20 世纪 80 年代日本学家 Mihara^[10]首次从赤子爱胜蚓中分离得到具有纤溶酶活性的蛋白酶，后来研究者们开始研究蚯蚓具有抗血栓功效的蛋白多肽类成分，发现地龙蛋白中的纤维蛋白溶解酶、蚓激酶、蚓胶原酶对体内凝血系统具有显著的影响，是抗凝血活性物质的主要成分^[11]。乙醇沉淀法是纯化蛋白常用方法，是利用蛋白的

溶解度进行分离纯化，彭洪兵等^[12]对比盐析法和水提醇沉法对地龙蛋白活性的影响，结果表明水提醇沉法的蛋白提取率及纤溶活性均高于盐析法。因此本实验选择药典内的沪地龙品种之一通俗环毛蚓和广地龙的品种参环毛蚓与药典外的赤子爱胜蚓，对比这 3 种蚯蚓水提液以及乙醇沉淀物的抗血栓活性大小，为今后地龙抗血栓类产品的开发选择蚯蚓品种提供参考。

1 材料

电热恒温鼓风干燥箱 (PHGT-9140A)，台式高速离心机 (5418 R, Eppendorf)，超微量分光光度计 (NanoDrop 2000, Thermo)，PCR 仪 (C1000, Bio-Rad)、电泳仪 (PowerPac, Bio-Rad)，凝胶成像仪 (UVP, Upland)，微量移液器 (Eppendorf)，Milli Q 超纯水机 (Millipore)，pH 计 (FE20, Mettler Toledo)，恒温空气浴摇床 (INNOVA 40R, New Brunswick)，匀浆机 (QSJ1 型, OI-DIRE)，电动搅拌器 (OES20 型, BNCH)，台式离心机 (TDL80-2B 型, 上海安亭科学仪器厂)，Multiscan Go 全波长酶标仪 (Thermo Scientific)，电子天平 (BS224S 型, Sartorius)，Sysmex CA500 全自动血凝分析仪 (Sysmex)。

鲜体通俗环毛蚓 (上海市地龙养殖基地)，鲜体赤子爱胜蚓 (天津市蚯蚓培养基地)，鲜体参环毛蚓 (广西蚯蚓养殖基地)，基因组提取试剂盒 Mollusc DNA Kit D3373 (OMEGA Bio-tek, America)，Fast Pure Gel DNA Extraction Mini Kit、5minTM TA /Blunt-Zero Cloning Kit、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase、Fast-T1 化学感受态细胞 C505-02/03 (Vazyme, 南京诺唯赞生物科技有限公司)，无水乙醇 (Fisher)，氯仿 (北京科华经纬科技有限公司)，异戊醇 (X1, 西陇化工股份有限公司)，氯化钠、氢氧化钠 (国药集团化学试剂有限公司)，Tris、EDTA (Bioruler, America)，冰醋酸 (北京化工股份有限公司)，Tryptone、Yeast Extract (OXOID)，琼脂糖 (Biowest Agarose, 北京拜尔迪生物有限公司)，6x SuperStain Loading

Buffer (北京康为试剂生物科技有限公司), Agar 粉 (北京索莱宝科技有限公司), 氨苄青霉素钠 (北京百瑞极生物科技有限公司), *COI* 通用引物 (*COI-F*: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3', *COI-R*: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3', T_m 值为 54), 纤维蛋白原 (牛血) (批号: 140607-202042)、凝血酶 (牛血) (批号: 140606-201826)、蚓激酶 (批号: 140650-201703) (中国食品药品检定研究院), 生理盐水 (山东华鲁制药有限公司, 批号: SD21061115), 琼脂糖 (上海贝晶), 药用级 95% 乙醇。

2 方法

2.1 3 种蚯蚓的分子鉴定

2.1.1 蚯蚓 DNA 的提取 在研钵中放入活体蚯蚓 2 cm 的肌肉组织, 加入液氮冷冻, 快速研磨成粉, 按照软体动物基因组提取试剂盒 (Mollusc DNA Kit D3373) 说明书提取蚯蚓基因组 DNA, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 并通过 NanoDrop 2000 进行浓度及纯度检测。

2.1.2 PCR 扩增及产物检测 根据 PCR 扩增试剂盒 (Fast Pure Gel DNA Extraction Mini Kit) 说明书加入通用引物、DNA 和试剂, PCR 的反应程序以 50 μ L 反应体系建立, 具体程序见表 1。1% 琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测, 将扩增产物连接至质粒, 转化至大肠埃希菌, 将菌液送华大基因进行测序。测序完成后, 将克隆的基因片段在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 中进行 BLAST 搜索比对。

表 1 PCR 反应程序

Tab 1 PCR reaction procedure

循环步骤	温度 / $^{\circ}$ C	时间 /s	循环数
预变性	95	180	
变性	95	15	35
退火	50	15	
延伸	72	30	
彻底延伸	72	300	

2.2 3 种蚯蚓水提液及乙醇沉淀物的纤溶、抗凝活性对比

2.2.1 3 种蚯蚓水提液的制备 将鲜体蚯蚓切碎, 用打浆机制成蚯蚓泥, 加 4 倍量纯水, 匀浆处理, 离心 ($4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min), 收集上清液, 稀释适当倍数至检测范围内作为测试样品。

2.2.2 3 种蚯蚓乙醇沉淀物的制备 取鲜体蚯蚓制备的水提液, 加定量 95% 乙醇, 调至乙醇浓度为 80%, 静置后收集沉淀, 冻干。称取 10 mg 乙醇沉淀物加 10 mL 生理盐水溶解, 稀释适当倍数至检测范围内作为测试样品。

2.2.3 纤维蛋白平板法评价纤溶活性 参考刘涛等^[13]利用纤维蛋白平板法, 以尿激酶为标准品测定地龙中蛋白酶的活性, 本实验采用蚓激酶作为标准品。取一次性平皿, 加入 0.5 mL 凝血酶 ($40 \text{ BP} \cdot \text{mL}^{-1}$)。将 8 mL 纤维蛋白原 ($2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 与 10 mL 的琼脂糖溶液 ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 迅速混合后加入皿中, 轻轻摇匀, 室温水平放置 1 h 后打孔, 分别吸取 10 μ L 浓度为 4000、6000、8000、10 000、12 000、16 000 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准品蚓激酶以及“2.2.1”项下制得的测试样品进行点样加盖, 置 37°C 恒温箱中孵育 18 h, 取出, 测量溶圈垂直两直径, 以标准品蚓激酶单位数的对数为横坐标, 垂直两直径乘积的对数为纵坐标, 绘制回归方程, 计算样品效价单位数作为纤溶活性, 利用公式 1 计算纤溶比活 ($\text{U} \cdot \mu\text{g}^{-1}$)。

公式 1: 纤溶比活 ($\text{U} \cdot \mu\text{g}^{-1}$) = 纤溶活性 ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) / 蛋白浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

2.2.4 Fibg-TT 法评价抗凝活性 参考吴娅丽等^[14]利用全自动血凝分析仪测定纤维蛋白原-凝血酶时间 (Fibg-TT) 来评价地龙及其相关制剂的体外抗凝活性。以生理盐水为空白对照, 测定系列浓度的标准品蚓激酶液 (250、500、1000、1500、2000 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和测试样品, 以标准品蚓激酶的单位数为横坐标, 以系列浓度标准品蚓激酶 Fibg-TT 的对数与空白组 Fibg-TT 的对数的差值为纵坐标, 绘制标准曲线, 得样品效价单位数作为抗凝活性, 利用公式 2 计算抗凝比活 ($\text{U} \cdot \mu\text{g}^{-1}$)。

公式 2: 抗凝比活 ($\text{U} \cdot \mu\text{g}^{-1}$) = 抗凝活性 ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) / 蛋白浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

2.3 蛋白含量测定

采用 BCA 法测定蚯蚓蛋白含量, 测试样品用酶标仪进行测定, 以系列浓度 BSA 蛋白标准溶液作标准曲线计算蛋白含量。

2.4 SDS-PAGE 凝胶电泳

采用 SDS-PAGE 检测 3 种蚯蚓乙醇沉淀物的分子量, 每个样品上样 10 μ L。采用 12% 电泳预制胶, 电压为 150 V, 电泳结束后用考马斯亮蓝蛋白胶快速染色液染色, 最后用纯水脱色至背景清晰, 重复 2 次。

2.5 数据处理

每种蚯蚓从提取到测试重复 3 次, 结果用平均值 \pm 标准差表示, 采用 SPSS 20.0 软件对数据进行单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 3 种蚯蚓的分子鉴定结果

3.1.1 蚯蚓 DNA 的提取、PCR 扩增 对 3 种蚯蚓提取的 DNA 进行琼脂糖电泳检测, DNA 条带均清晰明亮, 无弥散情况, 如图 1。3 种蚯蚓提取的 DNA 的 $A_{260/280}$ 均在 1.8 ~ 2.0, 表明提取的 DNA 纯度较高, 无蛋白质污染。利用通用引物 *COI* 对 3 种蚯蚓提取的 DNA 片段进行 PCR 扩增, 扩增产物的条带均呈现整齐、单一明亮的条带, 如图 2。

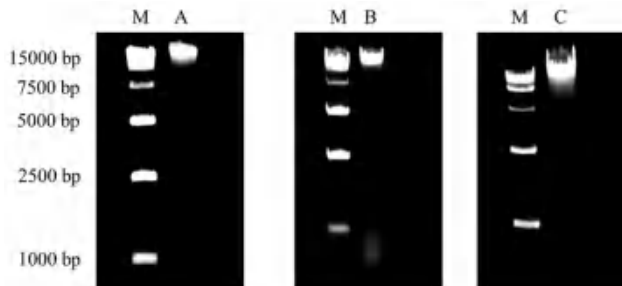


图 1 3 种蚯蚓提取的 DNA 的琼脂糖电泳
Fig 1 Agarose electrophoresis of DNA of the three earthworms
A. 参环毛蚓 (*Pheretima aspergillum*); B. 赤子爱胜蚓 (*Eisenia foetida*); C. 通俗环毛蚓 (*Pheretima vulgaris*); M. DNA 标记 (DNA marker)

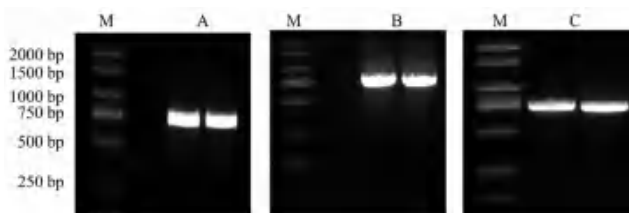


图 2 3 种蚯蚓 PCR 产物的琼脂糖电泳
Fig 2 Agarose electrophoresis of PCR products of the three earthworms
A. 参环毛蚓 (*Pheretima aspergillum*); B. 赤子爱胜蚓 (*Eisenia foetida*); C. 通俗环毛蚓 (*Pheretima vulgaris*); M. DNA 标记 (DNA marker)

3.1.2 PCR 产物测序分析 去除载体 TOPO 序列及引物端可知扩增的 *COI* 基因片段大小分别是: 参环毛蚓为 709 bp、赤子爱胜蚓为 768 bp、通俗环毛蚓为 765 bp。BLAST 相似性比对结果显示本实验 3 种蚯蚓都能成功匹配上对应物种。其中本实验样品通俗环毛蚓与 NCBI 基因库中报道的所有已知基原的蚯蚓序列相似度最高的为通俗腔蚓 (*Metaphire Vulgaris*) 线粒体基因 *COI* KF205980.1, 相似度为 99.27%。通俗腔蚓与通俗环毛蚓为同名异物现象, 该现象是由于蚯蚓分类系统的改进而出现的结果^[15]。本实验样品赤子爱胜蚓与 NCBI 基因库中报道的所有已知基原的蚯蚓序列相似度最高的为赤子爱胜蚓 (*Eisenia foetida*) 线粒体基因 *COI* LC006114.1, 相似度为 98.87%。本实验样品参环毛蚓与 NCBI 基因库中报道的所有已知基原的蚯蚓序列相似度最高的

为参环毛蚓 (*Pheretima aspergillum*) 线粒体基因 *COI* MN729554.1, 相似度为 99.85%。

3.2 3 种蚯蚓水提液的纤溶、抗凝活性对比

计算 3 批参环毛蚓、通俗环毛蚓、赤子爱胜蚓水提液的纤溶比活、抗凝比活和蛋白含量百分比, 具体结果如表 2 所示。3 种蚯蚓的水提液纤溶比活用单因素方差分析检验, LSD 法进行两两比较, $F = 1753.750$, $P < 0.05$; 3 种蚯蚓的水提液抗凝比活用单因素方差分析检验, LSD 法进行两两比较, $F = 274.35$, $P < 0.05$ 。因此 3 种蚯蚓水提液的纤溶比活之间与抗凝比活之间的差异有统计学意义。结果显示参环毛蚓水提液的纤溶比活和抗凝比活最强, 通俗环毛蚓次之, 赤子爱胜蚓水提液的纤溶比活和抗凝比活远远小于参环毛蚓和通俗环毛蚓, 而赤子爱胜蚓水提液的蛋白含量最高。

表 2 参环毛蚓、通俗环毛蚓、赤子爱胜蚓水提液的纤溶比活、抗凝比活与蛋白含量 ($n = 3$)

Tab 2 Specific activity of fibrinolysis, specific activity of anticoagulation and protein content of water extracts from *Pheretima aspergillum*, *Pheretima vulgaris* and *Eisenia foetida* ($n = 3$)

样品	纤溶比活 / ($U \cdot \mu g^{-1}$)	抗凝比活 / ($U \cdot \mu g^{-1}$)	蛋白含量 / %
参环毛蚓水提液	56.14 ± 1.42	13.15 ± 0.58	1.09 ± 0.21
通俗环毛蚓水提液	48.45 ± 0.80**	8.50 ± 0.47**	1.27 ± 0.06
赤子爱胜蚓水提液	12.42 ± 0.37***	4.76 ± 0.15***	2.59 ± 0.32

注: 与参环毛蚓水提液比较, ** $P < 0.01$; 与通俗环毛蚓水提液比较, *** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the *Pheretima aspergillum* water extract, ** $P < 0.01$; compared with the *Pheretima vulgaris* water extract, *** $P < 0.01$ 。

3.3 3 种蚯蚓乙醇沉淀物的纤溶、抗凝活性对比

3 批参环毛蚓、通俗环毛蚓、赤子爱胜蚓乙醇沉淀物的纤溶比活、抗凝比活和蛋白含量百分比结果见表 3。3 种蚯蚓的乙醇沉淀物纤溶比活用单因素方差分析检验, LSD 法进行两两比较, $F = 1053.967$, $P < 0.05$; 3 种蚯蚓的乙醇沉淀物抗凝比活用单因素方差分析检验, LSD 法进行两两比较, $F = 127.904$, $P < 0.05$ 。因此 3 种蚯蚓乙醇沉淀物的纤溶比活之间和抗凝比活之间的差异有统计学意义。结果参环毛蚓乙醇沉淀物的纤溶比活最强, 通俗环毛蚓乙醇沉淀物的抗凝比活最强, 赤子爱胜蚓的纤溶比活、抗凝比活、蛋白含量均小于参环毛蚓和通俗环毛蚓。

3.4 SDS-PAGE 结果分析

重复 2 次结果一致性较好, 典型图谱见图 3, 通俗环毛蚓与参环毛蚓乙醇沉淀物的条带集中在 25 ~ 70 kDa, 但条带分布有所差异, 而赤子爱

表 3 参环毛蚓、通俗环毛蚓、赤子爱胜蚓乙醇沉淀物的纤溶比活、抗凝比活与蛋白含量 (n = 3)

Tab 3 Specific activity of fibrinolysis, specific activity of anticoagulation and protein content of ethanol precipitates from *Pheretima aspergillum*, *Pheretima vulgaris* and *Eisenia fetida* (n = 3)

样品	纤溶比活 / (U · μg ⁻¹)	抗凝比活 / (U · μg ⁻¹)	蛋白含 量 /%
参环毛蚓乙醇沉淀物	234.97 ± 2.84 ^{###}	78.44 ± 4.00 ^{###}	11.46 ± 0.80
通俗环毛蚓乙醇沉淀物	199.79 ± 2.46 ^{**}	105.46 ± 4.22 ^{**}	11.06 ± 0.43
赤子爱胜蚓乙醇沉淀物	146.38 ± 1.69 ^{###}	64.97 ± 1.56 ^{###}	8.91 ± 0.87

注：与参环毛蚓乙醇沉淀物比较，**P < 0.01；与通俗环毛蚓乙醇沉淀物比较，^{###}P < 0.01。

Note: Compared with the *Pheretima aspergillum* ethanol precipitates, **P < 0.01; compared with the *Pheretima vulgaris* ethanol precipitates, ^{###}P < 0.01.

胜蚓乙醇沉淀物的条带集中在 25 ~ 40 kDa，条带数量较前两种蚯蚓少。其中参环毛蚓乙醇分级沉淀物在 55 ~ 70 kDa 分布一个较为清晰的条带，通俗环毛蚓乙醇分级沉淀物在 25 ~ 35 kDa 分布一个较为清晰的条带。3 种蚯蚓的乙醇分级沉淀物均在 10 ~ 15 kDa 有一条较宽的条带。

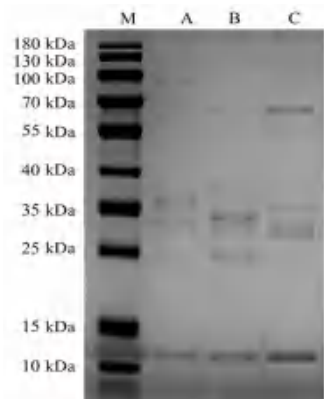


图 3 3 种蚯蚓乙醇沉淀物的 SDS-PAGE 图

Fig 3 SDS-PAGE of ethanol precipitates from three earthworms A. 赤子爱胜蚓 (*Eisenia fetida*); B. 通俗环毛蚓 (*Pheretima vulgaris*); C. 参环毛蚓 (*Pheretima aspergillum*); M. 蛋白 Marker (protein marker)

4 讨论

虽然形态鉴定是传统鉴定方法，但地龙的外表形态特征相似，仅通过形态鉴定无法确定品种，容易受主观因素影响，且混杂品种较多，采用 DNA 分子鉴定可以更准确、高效地鉴定地龙品种。本实验运用基于 *COI* 基因对鲜体地龙进行 DNA 分子鉴定，序列结果与 NCBI 中的基因库对比，与已知地龙品种的序列相似度均在 98% 以上，以此相似度可确定品种，有效鉴定出参环毛蚓、通俗环毛蚓和赤子爱胜蚓。

不同地龙含有的抗血栓活性蛋白有所区别，抗血栓的能力也有差别。本研究结果表明，参环

毛蚓的水提液抗凝比活和纤溶比活最强；参环毛蚓乙醇沉淀物的纤溶比活最强，而通俗环毛蚓乙醇沉淀物的抗凝比活最强；赤子爱胜蚓的水提液和乙醇沉淀物的抗凝比活和纤溶比活都远小于前两者。赤子爱胜蚓中发挥抗血栓作用的主要是蚓激酶，这说明药典内的两种地龙体内含有除蚓激酶之外独特的蛋白，其具有较高的抗血栓活性。通过纵向对比，蚯蚓乙醇沉淀物的抗凝比活与纤溶比活均强于蚯蚓的水提液，可知通过乙醇沉淀法可以有效纯化富集抗血栓地龙蛋白。

参环毛蚓的水提液抗凝活性更强，而通俗环毛蚓的乙醇沉淀物抗凝活性更强，可能因为通俗环毛蚓水提液中含有非抗凝血蛋白和非蛋白质含量较高，且杂蛋白中可能有促凝血的蛋白，用乙醇纯化后，去除了部分杂质，使得通俗环毛蚓中抗凝蛋白能更充分地发挥其作用。同时也说明地龙蛋白是主要具有抗凝活性的物质，且纯度越高作用越明显。赤子爱胜蚓用水提取后的蛋白含量在三者间最高，再用乙醇纯化后蛋白含量反而最低，推测赤子爱胜蚓体内含有大量非抗血栓活性蛋白和非蛋白质，或者用乙醇纯化赤子爱胜蚓蛋白效率较低，应该另寻找更适合的纯化方法。

3 种蚯蚓乙醇沉淀物在 25 ~ 40 kDa 均有较明显的条带，说明地龙具有抗血栓活性的独特蛋白分子量分布于此，但条带分布有明显差异，说明 3 种蚯蚓中具有抗血栓活性蛋白有所差异。

从本研究结果可看出，药典内的两种蚯蚓的水提液和乙醇沉淀物的抗凝活性和纤溶活性都远强于赤子爱胜蚓，而目前研究较多的是药典以外的蚯蚓品种（赤子爱胜蚓、粉正蚓）等，关于药典内的地龙研究较少，且通俗环毛蚓和参环毛蚓分布广，数量多，因此深入研究药典内地龙的基原蚯蚓的抗血栓活性蛋白具有重大意义。本实验仅研究了 3 种蚯蚓水提液和乙醇沉淀物的纤溶和抗凝活性，后续可进一步纯化参环毛蚓和通俗环毛蚓蛋白的抗血栓活性部位，研究其体内外的活性及物质基础。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020: 127.
- [2] 王玲, 张筱杉, 张长林. 地龙及其基原相近蚯蚓的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (13): 3298-3302.
- [3] 韦健红, 李薇, 吴文如, 等. 基于 *COI* 与 *16S rRNA* 基因对广地龙的 DNA 分子鉴定研究 [J]. 中国药房, 2012, 23 (35): 3274-3278.
- [4] 张彬, 成晓英. 人工养殖赤子爱胜蚓中重金属及有害元素的测定 [J]. 中国现代应用药学, 2017, 34 (9): 1248-1251.

- [5] 高晓悦, 赵邕, 郭颖, 等. 地龙及其混淆品原动物的形态及 DNA 双重条形码鉴定 [J]. 中草药, 2020, 51 (9): 2530-2537.
- [6] 格小光, 蒋超, 田娜, 等. 基于 DNA 测序技术的市售地龙类药材基原调查与考证研究 [J]. 中国现代中药, 2019, 21 (9): 1206.
- [7] 张玉, 董文婷, 霍金海, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的广地龙化学成分分析 [J]. 中草药, 2017, 48 (2): 252-262.
- [8] 刘巧, 毕启瑞, 谭宁华. 地龙蛋白多肽类成分的研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50 (1): 252-261.
- [9] Miao J, Chen X, Xu T, et al. Bioaccumulation, distribution and elimination of lindane in *Eisenia foetida*: the aging effect [J]. Chemosphere, 2018, 190: 350-357.
- [10] Mihara H, Sumi H, Yoneta T, et al. A novel fibrinolytic enzyme ex-tracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus* [J]. Jpn Physiol, 1991, 41 (3): 461.
- [11] 杨新, 刘欣, 万明, 等. 地龙抗凝血活性物质研究进展 [J]. 江汉大学学报 (自然科学版), 2017, 45 (1): 83-88.
- [12] 彭洪兵, 袁仕君, 尹聪, 等. 地龙蛋白两种提取方法的活性比较 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32 (8): 1860-1862.
- [13] 刘涛, 谭清红, 王晓霞, 等. 基于酶活性的地龙质量标准再评价研究 [J]. 中药材, 2014, 37 (9): 1535-1537.
- [14] 吴娅丽, 马韞楠, 张琦, 等. 地龙抗凝血活性体外评价方法的建立 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36 (20): 2527-2530.
- [15] 蒋际宝, 邱江平. 中国巨蚓科蚯蚓的起源与演化 [J]. 生物多样性, 2018, 26 (10): 1074-1082.

(收稿日期: 2022-09-06; 修回日期: 2022-10-25)

LC-MS/MS 法测定人血浆中比阿培南浓度

钱亚芳, 杨旭萍, 蒋艳, 胡楠* (常州市第一人民医院药学部, 江苏 常州 213003)

摘要: 目的 建立 LC-MS/MS 法测定人血浆中比阿培南的浓度。方法 以法罗培南为内标、乙腈溶液沉淀蛋白并稀释后进样分析。色谱柱为 Kinetex HILIC (2.1 mm×50 mm, 2.6 μm), 流动相为 0.1% 甲酸-水 (含 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵) 和 95% 乙腈-水 (含 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵), 梯度洗脱, 进样量为 5 μL, 流速为 0.4 mL·min⁻¹, 分析时间为 5 min。采用电喷雾离子源 (ESI), 正离子多反应监测 (MRM) 模式扫描, 用于定量分析的离子对分别为 *m/z* 351.0→110.0 (比阿培南)、*m/z* 308.0→178.0 (内标法罗培南)。结果 比阿培南在 0.20~50.00 μg·mL⁻¹ 与峰面积线性关系良好 ($r \geq 0.9950$), 准确度为 97.80%~111.25%, 批内和批间精密度 *RSD* 均 < 15%。提取回收率为 80.25%~84.11%, 基质效应为 109.19%~117.91%。血浆样品室温放置 1 h, 4℃ 冰箱放置 6 h, -80℃ 冰箱放置 14 d, 经过 3 次冻融循环及处理好的样本于自动进样器 (15℃) 中放置 6 h 后, 均符合生物样本分析的要求。应用本研究方法测定 15 例发生感染并使用比阿培南患者的血浆谷浓度, 测得比阿培南谷浓度为 0.30~11.82 μg·mL⁻¹。结论 该法专属性强, 准确度和重现性好, 分析效率高, 适用于比阿培南的临床治疗药物监测。

关键词: LC-MS/MS; 比阿培南; 血药浓度; 治疗药物监测

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0432-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.024

Determination of concentration of biapenem in human plasma by LC-MS/MS

QIAN Ya-fang, YANG Xu-ping, JIANG Yan, HU Nan* (Department of Pharmacy, The First People's Hospital of Changzhou, Changzhou Jiangsu 213003)

基金项目: 常州市“十四五”卫生健康高层次人才培养工程 (No. KY20221389); 常州市科技基础设施建设计划-常州市临床药学重点实验室 (No. CM20223005)。

作者简介: 钱亚芳, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事临床药学研究, email: qianyafang1989@126.com *通信作者: 胡楠, 女, 博士, 副主任药师, 主要从事药物代谢动力学和临床药学研究, email: hn_324@163.com

Abstract: Objective To establish an LC-MS/MS method to determine the concentration of biapenem in human plasma. **Methods** Faropenem was used as the internal standard and the protein was precipitated with acetonitrile. The chromatographic column was Kinetex HILIC (2.1 mm×50 mm, 2.6 μm, Phenomenex, USA) with mobile phases consisting of 0.1% formic acid-water (containing 10 mmol·L⁻¹ ammonium acetate) and 95% acetonitrile-water (containing 10 mmol·L⁻¹ ammonium acetate). Gradient elution was performed. The flow rate was 0.4 mL·min⁻¹ and the injection volume was 5 μL. The analysis time was 5 min. The ion pairs were *m/z* 351.0 → 110.0 (biapenem) and *m/z* 308.0 → 178.0 (faropenem), respectively. **Results** The linearity of biapenem was 0.20 ~ 50.00 μg·mL⁻¹ (*r* ≥ 0.9950). The intra-day and inter-day precision were both lower than 15%. The stability of biapenem, including plasma samples placed at room temperature for 1 h, in the refrigerator at 4 °C for 6 h, in the refrigerator at -80 °C for 14 d and after three freeze-thaw cycles and the treated samples placed in the automatic samplers (15 °C) for 6 h, were all met the methodological requirements. The trough concentration of biapenem was measured in 15 patients and the result was 0.30 ~ 11.82 μg·mL⁻¹. **Conclusion** This method is specific, accurate, and repeatable, which is suitable for clinical monitoring of biapenem.

Key words: LC-MS/MS; biapenem; blood concentration; therapeutic drug monitoring

碳青霉烯类药物在重症感染治疗中有举足轻重的地位,是革兰氏阴性杆菌治疗的最后一道防线^[1]。比阿培南属于碳青霉烯类抗菌药物,相较于其他品种,具有稳定性更好、耐药性更小的优势^[2],其抗菌活性和美罗培南相当,神经毒性和肾毒性小,更加安全有效^[3],临床上常作为治疗重症感染的杀手锏^[2]。比阿培南的血药浓度及维持时间是保证其临床效果的关键^[2]。比阿培南血药浓度测定已报道的方法多为 HPLC 法^[4-9],分析效率较低,易受干扰。本研究使用 LC-MS/MS 技术,建立一种快速、准确地测定比阿培南血药浓度的方法,为其临床合理使用提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Jasper HPLC 液相色谱仪、Triple Quad 4500MD 三重四极杆串联质谱仪(美国 AB SCIEX), Direct-Q 纯水仪(美国 Millipore), BT25S 电子分析天平(德国 Sartorius), 5417R 低温高速离心机(德国 Eppendorf), Vortex-Genie 2 涡旋混合器(美国 Scientific industries)。

1.2 待测药品

对照品比阿培南(批号:130578-201602,纯度:99.0%)、法罗培南(内标,批号:130532-201301,纯度:80.3%)(中国食品药品检定研究院)。乙腈(色谱纯,Merck 公司),水由 Milli-Q 超纯水系统制得。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kinetex HILIC 柱(2.1 mm×50 mm, 2.6 μm, Phenomenex, USA);柱温:40 °C;流动相:0.1%甲酸-水(含 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵)(A)和 95%乙腈-水(含 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵)(B),梯度洗脱(0.01 ~ 0.70 min: 95%B, 0.70 ~ 1.00 min: 95% ~ 40%B, 1.00 ~ 2.50 min: 40%B, 2.50 ~ 2.70 min: 40% ~ 95%B, 2.70 ~ 5.00 min: 95%B);流速:0.4 mL·min⁻¹;进样量:5 μL;分析时间:5 min。

2.2 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI),正离子多反应监测(MRM)模式扫描,毛细管电压(IS)为 5500 V,离子源温度(TEM)为 550 °C,气帘气(CUR)为 30 psi,碰撞气(CAD)为 8 psi,雾化气(GS1)为 50 psi,辅助气(GS2)为 50 psi。比阿培南和内标(法罗培南)的 MS-scan 图见图 1,各自的监测离子对、去簇电压(DP)、碰撞电压(CE)等质谱参数见表 1。

2.3 溶液配制

精密称取比阿培南对照品适量,用甲醇定量化制成 15.00 mg·mL⁻¹ 的对照品储备液,置于 -20 °C 冰箱中保存,使用前用甲醇稀释成 2.00、5.00、10.00、20.00、50.00、100.00、200.00、400.00、500.00 μg·mL⁻¹ 的系列对照品工作液。

精密称取法罗培南对照品适量,用甲醇-水溶液(4:1)配制成 5.00 mg·mL⁻¹ 的内标储备液,

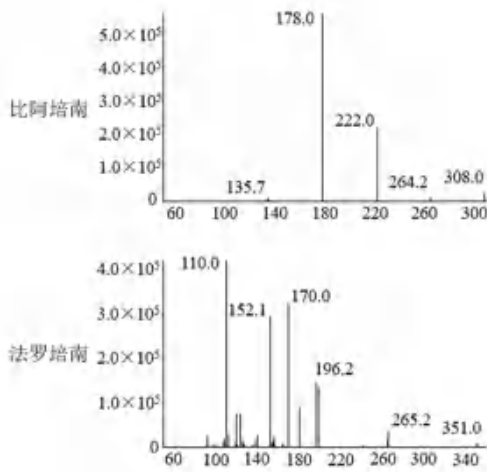


图 1 比阿培南和内标(法罗培南)的 MS-scan 图
Fig 1 MS-scan image of biapenem and internal standard (faropenem)

表 1 比阿培南和内标 LC-MS/MS 测定参数
Tab 1 LC-MS/MS measurement parameters of the biapenem and internal standard

化合物	母离子 质量/Da	子离子 质量/Da	碰撞 电压/V	去簇 电压/V
比阿培南	351.0	110.0	24	48
内标(法罗培南)	308.0	178.0	24	40

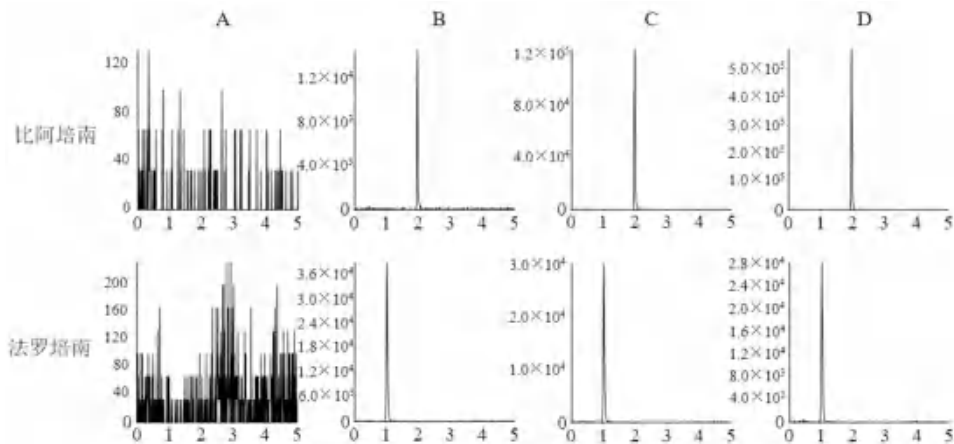


图 2 血浆中比阿培南和法罗培南的 LC-MS/MS 色谱图
Fig 2 LC-MS/MS chromatogram of biapenem and faropenem in the plasma

A. 空白血浆 (blank plasma); B. 空白血浆添加对照品 ($0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) [blank plasma spiked with control ($0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)]; C. 空白血浆添加对照品 ($2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) [blank plasma spiked with control ($2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)]; D. 临床样品 (clinical sample)

以比阿培南的浓度 (X) 为横坐标, 比阿培南与内标的峰面积比值 (Y) 为纵坐标, 进行回归分析 ($W = 1/X^2$), 得到标准曲线回归方程: $Y = 1.460X - 0.0177$ ($r = 0.9959$), $r \geq 0.9950$, 结果说明在本研究条件下血浆中比阿培南在 $0.20 \sim 50.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好。

2.5.3 精密度与准确度 向空白血浆中分别加入“2.3”项下质量浓度为 5.00 、 50.00 、 $400.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品工作液, 配制成低、中、高 3 个浓度水平 (0.50 、 5.00 、 $40.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的

置于 -20°C 冰箱中保存, 临用前用甲醇-水溶液 ($4:1$) 稀释成 $10.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标工作液。

2.4 血浆样品的处理

精密移取血浆样品 $50 \mu\text{L}$ (含 $5 \mu\text{L}$ 标准工作液和 $45 \mu\text{L}$ 空白血浆) 于离心管中, 加入内标工作液 ($10.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) $5 \mu\text{L}$, 加入乙腈 $150 \mu\text{L}$ 沉淀蛋白, 涡旋 3 min , 于 $16400 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min , 精密移取上清液 $20 \mu\text{L}$ 至另一离心管中, 加入 $180 \mu\text{L}$ 乙腈-水溶液 ($95:5$) 稀释, 置于进样小瓶中, 按“2.1”和“2.2”项下方法进样测定。

2.5 方法学验证

2.5.1 专属性 取 6 份不同来源的人空白血浆、加入对照品的血浆样品 (质量浓度为 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、使用比阿培南的患者血浆样品按“2.4”项下方法处理分析。结果比阿培南和法罗培南的保留时间分别为 1.94 min 和 0.98 min , 见图 2。

2.5.2 标准曲线 向空白血浆中分别加入“2.3”项下的系列对照品工作液, 配制成 0.20 、 0.50 、 1.00 、 2.00 、 5.00 、 10.00 、 20.00 、 $50.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品血浆样本, 按“2.4”项下方法处理后进样分析。

质控样本, 每 6 份为 1 个分析批, 按“2.4”项下方法处理后进样分析, 根据随行标准曲线, 计算质控样本的准确度和批内精密度。在 2 周内对 3 个分析批质控样本进行检测分析, 计算质控样本的准确度和批间精密度, 结果见表 2。

本研究方法下, 比阿培南血药浓度测定的准确度为 $97.80\% \sim 111.25\%$, 低、中、高 3 个浓度水平质控样本的精密度 $RSD < 15\%$, 均符合生物样本定量分析的要求。

表 2 比阿培南血药浓度测定的准确度和精密度结果

理论值 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	批内 ($n = 6$)		批间 ($n = 18$)	
	准确度 /%	精密度 RSD /%	准确度 /%	精密度 RSD /%
0.50	108.68	3.78	111.25	5.03
5.00	105.95	2.21	110.45	7.99
40.00	97.80	0.67	104.41	9.92

2.5.4 提取回收率和基质效应 取“2.5.3”项下低、中、高 3 个质量浓度水平 (0.50、5.00、40.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的质控样本, 每个浓度水平 6 份, 按“2.4”项下方法处理后进行分析, 得到比阿培南的峰面积 A_1 ; 另取人空白血浆, 乙腈沉淀蛋白后取得上清液, 向上清液中加入分别加入“2.3”项下质量浓度为 5.00、50.00、400.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品工作液, 配制成低、中、高 3 个质量浓度水平 (0.50、5.00、40.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的样本, 每个浓度水平 6 份, 分析后得到比阿培南的峰面积 A_2 , 峰面积比 A_1/A_2 即为比阿培南的提取回收率。结果见表 3, 本研究方法下, 比阿培南的提取回收率为 80.25% ~ 84.11% ($RSD < 15\%$), 说明本样品前处理方法适用于比阿培南的提取分析。

以纯水作为基质, 配制低、中、高 3 个质量浓度水平 (0.50、5.00、40.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的样本, 每个浓度水平 6 份, 进样分析得到比阿培南的峰面积 A_3 。根据峰面积比 A_2/A_3 求算比阿培南的基

质效应。结果见表 3, 比阿培南的基质效应结果为 109.19% ~ 117.91% ($RSD < 15\%$), 表明基质中内源性物质对比阿培南的影响较小。

表 3 人血浆样本中比阿培南提取回收率和基质效应结果
Tab 3 Extraction recovery and matrix effect of biapenem

理论值 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	提取回收率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$) /%	基质效应 ($\bar{x} \pm s, n = 6$) /%
0.50	80.76 \pm 8.54	109.19 \pm 12.55
5.00	80.25 \pm 6.42	115.88 \pm 9.56
40.00	84.11 \pm 10.31	117.91 \pm 10.25

2.5.5 稳定性考察 取低、中、高 3 个质量浓度水平 (0.50、5.00、40.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的质控样本, 分别于室温放置 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 6 h, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 14 d 以及经过 3 次冻融循环后, 按“2.4”项下方法处理后进样分析, 考察样本在上述 4 种条件下的稳定性。

另取低、中、高 3 个质量浓度水平 (0.50、5.00、40.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的质控样本, 按“2.4”项下方法处理, 将处理好的样本于自动进样器 (15 $^{\circ}\text{C}$) 中放置 6 h 后分析, 考察处理后样本在自动进样器中的稳定性。

稳定性考察结果见表 4, 在上述 5 种不同条件下, 低、中、高 3 个浓度水平的测定值与理论值的平均偏差均在 $\pm 15\%$ 范围内, 表明人血浆中比阿培南在本实验条件下稳定。

表 4 人血浆样本中比阿培南测定的稳定性结果

理论值 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	准确度 /% ($n = 6$)				
	室温 1 h	4 $^{\circ}\text{C}$ 6 h	-80 $^{\circ}\text{C}$ 14 d	冻融循环 3 次	自动进样器 6 h
0.50	100.30 \pm 1.22	101.62 \pm 11.36	95.64 \pm 6.74	108.97 \pm 7.79	104.85 \pm 7.31
5.00	94.77 \pm 2.04	93.45 \pm 1.45	99.62 \pm 2.20	108.34 \pm 2.21	94.56 \pm 4.58
40.00	92.89 \pm 3.76	89.07 \pm 2.78	97.34 \pm 6.98	94.58 \pm 3.67	99.40 \pm 6.79

2.6 临床应用

应用本方法对 15 例发生感染并使用比阿培南的患者进行血药浓度测定, 其中男性 11 例, 女性 4 例, 年龄 47 ~ 92 岁。具体用药方案为比阿培南 0.3 g ivgtt q8h 或 0.3 g ivgtt q6h, 连续给药 3 ~ 4 次, 于第 4 次给药前抽取患者静脉血, 离心后得到患者血浆, 按“2.4”项下方法处理后进样分析得到患者谷浓度, 结果见表 5, 测得比阿培南谷浓度为 0.30 ~ 11.82 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 可为临床合理化用药提供重要依据。

3 讨论

在临床实际的抗感染治疗中, 使用碳青霉烯类药物的患者病情多较为严重, 且联用药物较

多。不同品种的碳青霉烯类药物药效学和药动学方面均存在一定差异, 不同病理生理状态也会影响其药动学^[10]。碳青霉烯类血药谷浓度是否达到目标范围, 可用于优化给药方案, 提高抗感染治疗的有效性和安全性^[10]。比阿培南具有抗菌谱广、抗菌活性强、临床效果好等特点, 其对耐药的铜绿假单胞菌及鲍曼不动杆菌有一定优势, 且无中枢神经系统毒性, 不会诱发癫痫发作^[11]。

比阿培南是新一代碳青霉烯类抗菌药物^[1], 检索现有文献, 已报道的比阿培南血药浓度测定方法多为 HPLC 法^[4-9], 分析效率低, 易受干扰。本研究建立的 LC-MS/MS 分析方法, 相较于已报道的 HPLC 法^[4-9], 专属性更强, 分析效率得到显

表 5 患者感染灶、用药方案和谷浓度检测结果

Tab 5 Infection condition, therapeutic regimen and results of trough concentration determination of patients

No.	性别	年龄 / 肌酐清除率 / 岁 (mL·min ⁻¹)	感染灶	用药方案	谷浓度 / (μg·mL ⁻¹)	
1	男	83	18.61	肺部	0.3 g ivgtt q6h	11.82
2	女	60	94.19	胰腺	0.3 g ivgtt q6h	0.85
3	男	62	99.11	肺部	0.3 g ivgtt q6h	1.50
4	男	69	103.42	肺部	0.3 g ivgtt q6h	0.83
5	男	80	39.14	肺部	0.3 g ivgtt q6h	1.61
6	男	72	70.33	泌尿系统	0.3 g ivgtt q8h	1.75
7	女	47	110.70	颅内	0.3 g ivgtt q8h	0.30
8	男	89	22.85	肺部	0.3 g ivgtt q8h	2.92
9	女	59	142.89	肺部、胃 肠道	0.3 g ivgtt q8h	0.50
10	男	72	64.38	肺部	0.3 g ivgtt q8h	1.87
11	女	88	34.35	肺部	0.3 g ivgtt q8h	2.03
12	男	73	46.13	肺部	0.3 g ivgtt q8h	3.87
13	男	92	57.94	肺部	0.3 g ivgtt q8h	1.54
14	男	56	89.65	胃肠道	0.3 g ivgtt q8h	1.07
15	男	69	44.04	颅内	0.3 g ivgtt q8h	3.11

著提高,能满足大批量样本分析的要求。本研究考察了 C18 柱以及 HILIC 柱,在研究初期尝试使用 C18 柱对比阿培南进行分离,发现比阿培南在 C18 柱上保留不佳,与比阿培南极性较大、亲水性较好有关。HILIC 柱采用两性离子修饰的固定相,相较于 C18 柱,更适用于极性和亲水性化合物的分析^[12]。本研究最终使用了 HILIC 柱对比阿培南和内标(法罗培南)进行了分离和测定,两种物质得到了很好的保留和分离。通过调整流动相比比例以及梯度洗脱程序改善峰形,降低了干扰。

比阿培南的国内药品说明书中适应证描述简单,用法用量保守,限制了其临床应用^[11]。比阿培南的主要排泄途径为肾脏排泄,患者肾脏功能、血流动力学、液体复苏、CRRT 等体外循环支持等因素均会影响比阿培南的血药浓度^[10]。重症患者联合用药较多,发生药物相互作用的机会增加,也会对比阿培南的血药浓度产生影响。监测比阿培南的谷浓度可以比较直接地验证是否在目标范围内,实现个体化给药,提高治疗的有效性和安全性^[10]。有文献报道,1~5 μg·mL⁻¹为比阿培南的谷浓度目标范围^[8]。在本研究中,

有 4 例患者谷浓度低于 1 μg·mL⁻¹,将此结果反馈至临床,临床考虑此 4 例患者抗感染效果不佳,换用亚胺培南西司他丁或美罗培南;1 例患者谷浓度高于 5 μg·mL⁻¹,将此情况反馈至临床,建议将比阿培南给药剂量调整为 0.3 g ivgtt q12 h;10 例患者的比阿培南谷浓度在 1~5 μg·mL⁻¹,临床治疗有效,病程中患者未出现不良反应。

本研究建立的 LC-MS/MS 分析方法,专属性强,准确度和重现性好,分析效率高,适用于比阿培南的临床治疗药物监测。

参考文献

- [1] 薛晓燕,王大明,孙梦茹,等.比阿培南用于重症感染患者的给药方案优化研究[J].中国医院用药评价与分析,2018,18(7):876-879.
- [2] 陈一平,马海英.比阿培南给药方案优化的研究进展[J].中华医院感染学杂志,2019,29(7):1117-1120.
- [3] 李浩,刘浚.新型 1-甲基碳青霉烯类抗生素比阿培南[J].国外医药:抗生素分册,2003,24(6):261-264.
- [4] 王宝龙,兰婷,李明华,等.HPLC 法测定人血浆中比阿培南的浓度及其药动学研究[J].中国药房,2012,23(26):2436-2438.
- [5] 罗芳梅,何建群,罗丽娜,等.HPLC-UV 法测定人血浆及尿液中比阿培南的浓度[J].中南药学,2011,9(6):423-427.
- [6] 郭玲,罗雪梅,梁培,等.高效液相色谱法测定重症患者亚胺培南血药浓度及 PK/PD 达标率研究[J].中国医院药学杂志,2017,37(16):1598-1601.
- [7] 侯智韬,戴婷,孙志霞.HPLC 法测定人尿液中比阿培南的浓度[J].解放军药学报,2017,33(6):554-556.
- [8] Veiga RP, Paiva JA. Pharmacokinetics-pharmacodynamics issues relevant for the clinical use of beta-lactam antibiotics in critically ill patients[J]. Crit Care, 2018, 22(1): 233.
- [9] 李博涵,彭秘,封传华,等.HPLC 法测定人血清中游离比阿培南浓度及其在重症感染中的临床应用[J].药品评价,2022,19(14):861-864.
- [10] 徐银丽,郭晓芳,江翊国,等.重症患者碳青霉烯类药物血药浓度监测分析[J].中国药物应用与监测,2019,16(6):335-338,342.
- [11] 李明艳,吴洪文.比阿培南研究进展[J].医药导报,2014,33(3):352-354.
- [12] 俞平,文诗雨,赵杨,等.HILIC-MS/MS 法测定早产儿血浆中咖啡因的浓度[J].药学与临床研究,2022,30(2):127-130.

(收稿日期:2022-10-13;修回日期:2022-11-16)

藏药石榴健胃丸(片、散)质量标准提升研究

拜礼文^{1,2}, 焦兴苹², 谭金华^{1,2}, 肖华^{1,2}, 海平^{2*}, 张炜^{2*} (1. 青海大学医学院, 西宁 810016; 2. 青海省药品检验检测院/青海省中藏药现代化研究重点实验室/国家药品监督管理局中药(藏药)质量控制重点实验室, 西宁 810016)

摘要:目的 提高石榴健胃丸(片、散)的质量标准。方法 建立石榴健胃丸(片、散)中豆蔻、肉桂、荜茇的 TLC 法, 建立同时测定桉油精、桂皮醛、胡椒碱 3 种成分含量的 GC 法并确立其限度。结果 石榴健胃丸(片、散) TLC 图中, 各组分与相应对照品、对照药材相同位置上, 均显相同颜色的斑点, 且阴性样品无干扰; 桉油精、桂皮醛、胡椒碱分别在 23.63 ~ 236.28、91.12 ~ 638.26、154.98 ~ 929.86 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与峰面积线性关系良好 (r 均 > 0.9983), 平均加样回收率分别为 99.42%、100.03%、99.79%, RSD 分别为 1.4%、0.82%、0.30% ($n = 6$)。石榴健胃丸(片、散)样品中桉油精、桂皮醛、胡椒碱的含量分别为 0.03 ~ 0.24、0.03 ~ 1.15、0.80 ~ 2.53 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结论 该方法可以用于石榴健胃丸(片、散)中桉油精、桂皮醛、胡椒碱含量的同时测定, 可作为石榴健胃丸(片、散)的质量控制方法。

关键词: 石榴健胃丸(片、散); 含量测定; 质量标准提升; 桉油精; 桂皮醛; 胡椒碱

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0437-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.025

Quality standard improvement of Tibetan Shiliu Jianwei pills (tablets or powder)

BAI Li-wen^{1,2}, JIAO Xing-ping², TAN Jin-hua^{1,2}, XIAO Hua^{1,2}, HAI Ping^{2*}, ZHANG Wei^{2*} (1. School of Medicine, Qinghai University, Xining 810016; 2. Qinghai Institute for Drug Control, Qinghai Key Laboratory of Modernization of Chinese and Tibetan Medicine, Key Laboratory of Chinese and Tibetan Medicine Quality Control of National Medical Products Administration, Xining 810016)

Abstract: Objective To improve the quality standard of Shiliu Jianwei pills (tablets or powder). **Methods** TLC method was established to identify Cardamom, Cinnamon and Cubeb longum in Shiliu Jianwei pills (tablets or powder). GC method for the simultaneous determination of eucalyptol, cinnamaldehyde, piperine and their respective limits was established. **Results** The TLC of Shiliu Jianwei pills (tablets or powder) showed spots of the same color at the same position with the reference substance and reference medicinal materials, and the negative control had no interference. The linearity of eucalyptol, cinnamaldehyde and piperine was 23.63 ~ 236.28, 91.12 ~ 638.26 and 154.98 ~ 929.86 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively ($r > 0.9983$). The average recovery was 99.42%, 100.03%, and 99.79%, and RSD was 1.4%, 0.82%, and 0.30% ($n = 6$). The content of eucalyptol, cinnamaldehyde and piperine in Shiliu Jianwei pills (tablets and powder) ranged 0.03 ~ 0.24, 0.03 ~ 1.15 and 0.80 ~ 2.53 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively. **Conclusion** The method can be used to simultaneous determine the content of eucalyptol, cinnamaldehyde and piperine. It can also be used for the quality control of Shiliu Jianwei pills (tablets or powder).

Key words: Shiliu Jianwei pill (tablet or powder); content determination; quality standard improvement; eucalyptol; cinnamaldehyde; piperine

基金项目: 青海省中藏药现代化研究重点实验室 (No.2022-ZJ-Y22); 藏药经典名方整体质量控制创新基地建设 (No.2023ZY004)。

作者简介: 拜礼文, 女, 硕士研究生, 主要从事药物分析及民族药质量控制, email: 2298996610@qq.com *通信作者: 海平, 男, 研究员, 主要从事中藏药质量标准研究, email: 352786498@qq.com; 张炜, 男, 副主任药师, 主要从事民族药药物分析及质量控制, email: 32682484@qq.com

石榴健胃制剂(包括石榴健胃丸、石榴健胃散、石榴健胃片,下同)由石榴子、肉桂、豆蔻、荜茇及红花组成,处方源自《四部医典》^[1],对于治疗肠易激综合征^[2]、功能性消化不良^[3]、炎症性肠病^[4]及小儿再发性腹痛^[5]等疾病有较好的疗效。处方中豆蔻、肉桂、荜茇均含有挥发性成分^[6-14],其中桉油精具有抗炎、抗氧化、镇痛、神经保护作用^[15];桂皮醛具有抗炎、抗肿瘤、抗菌等作用^[16];胡椒碱具有镇痛、抗炎、解痉等作用^[17]。

目前,全国生产石榴健胃丸(片、散)的藏药生产厂家有 8 家,对于石榴健胃制剂的定性和定量分析,各现行标准参差不齐,难以全面评价该制剂的质量。本文将采用薄层色谱鉴别法(TLC)和气相色谱法(GC)对方中豆蔻、肉桂、荜茇进行定性鉴别和定量研究,建立石榴健胃制剂的定性定量方法,以期完善和提升石榴健胃制剂标准,全面控制制剂质量。

1 材料

1.1 仪器

薄层点样和成像系统(瑞士 CAMAG 公司);7890B 型气相色谱仪(Agilent 科技有限公司);AR5120 型百分之一电子天平(上海 OHAUS 公司);SQP 型万分之一电子天平、MSA225-ICE-DI 型十万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司);DT1028CH 型超声波提取器(德国 BANDELIN 公司);Milli-Q advantage A10 超纯水系统(Merck millipore);硅胶板(青岛海洋化工厂/默克公司)。

1.2 试药

对照药材肉桂(批号:121363-201703)、荜茇(批号:121023-201103);对照品桉油精(批号:110788-201105,纯度:99.9%)、桂皮醛(批号:110710-202022,纯度:99.5%)、胡椒碱(批号:110775-201706,纯度:98.9%)(中国食品药品检定研究院)。石榴健胃制剂中石榴子(安石榴科植物石榴 *Punica granatum* L.)、红花(菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L.)、肉桂(樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl)、荜茇(胡椒科植物荜茇 *Piper longum* L.)、豆蔻(姜科植物白豆蔻 *Amomum kravanh* Pierre ex Gagnep.)等药材饮片(四川荷花池药材市场,经青海省药品检验检测院藏药检测中心杨凤梅主任药师鉴定)。石榴健胃制剂共 26 个批次,来自青海、甘肃、西藏自治区的 5 家生产企业,均为市售药品(见表 1)。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱对肉桂、荜茇的鉴别

2.1.1 豆蔻鉴别 取石榴健胃丸、片适量,研细,称取 5 g;石榴健胃散称取 5 g,加入 300 mL 的水,

表 1 石榴健胃制剂样品信息

序号	样品	批号	生产企业	规格
S ₁	石榴健胃丸	180810	A 企业	0.6 g/丸
S ₂	石榴健胃丸	181014	A 企业	0.6 g/丸
S ₃	石榴健胃丸	190302	A 企业	0.6 g/丸
S ₄	石榴健胃丸	190504	A 企业	0.6 g/丸
S ₅	石榴健胃丸	190505	A 企业	0.6 g/丸
S ₆	石榴健胃丸	190608	A 企业	0.6 g/丸
S ₇	石榴健胃丸	190609	A 企业	0.6 g/丸
S ₈	石榴健胃丸	190610	A 企业	0.6 g/丸
S ₉	石榴健胃丸	190712	A 企业	0.6 g/丸
S ₁₀	石榴健胃丸	2020090102	B 企业	0.6 g/丸
S ₁₁	石榴健胃丸	2020090201	B 企业	0.6 g/丸
S ₁₂	石榴健胃丸	2020090202	B 企业	0.6 g/丸
S ₁₃	石榴健胃丸	2020120102	B 企业	0.6 g/丸
S ₁₄	石榴健胃丸	2020120202	B 企业	0.6 g/丸
S ₁₅	石榴健胃丸	2021010101	B 企业	0.6 g/丸
S ₁₆	石榴健胃散	190101	C 企业	1.2 g/袋
S ₁₇	石榴健胃散	191202	C 企业	1.2 g/袋
S ₁₈	石榴健胃散	201203	C 企业	1.2 g/袋
S ₁₉	石榴健胃散	200204901	D 企业	1.2 g/袋
S ₂₀	石榴健胃散	200304902	D 企业	1.2 g/袋
S ₂₁	石榴健胃散	201104903	D 企业	1.2 g/袋
S ₂₂	石榴健胃片	200608	E 企业	0.6 g/片
S ₂₃	石榴健胃片	200807	E 企业	0.6 g/片
S ₂₄	石榴健胃片	201009	E 企业	0.6 g/片
S ₂₅	石榴健胃片	201117	E 企业	0.6 g/片
S ₂₆	石榴健胃片	201118	E 企业	0.6 g/片

挥发油提取器加水至 3 mL,加入 2 mL 正己烷,连接回流冷凝管,加热至微沸继续加热 3 h,放冷,取正己烷液,通过铺有无水硫酸钠约 1 g 的漏斗过滤,收集滤液,挥发油测定器内壁用 2 mL 正己烷洗涤,洗液合并滤液,摇匀,滤过,滤液作为供试品溶液;取豆蔻对照药材 5 g,同法制成对照药材溶液。取桉油精对照品,加正己烷制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液;按石榴健胃丸的处方和工艺制备缺豆蔻的阴性样品 5 g,并按供试品溶液方法制成阴性样品溶液。按 2020 年版《中国药典》四部 TLC 法,吸取供试品溶液 10 μL,对照药材溶液、对照品溶液各 1 μL,阴性样品溶液 10 μL,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以环己烷-二氯甲烷-乙酸乙酯(15:5:0.5)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 5% 香草醛硫酸溶液,在 105 °C 加热至斑点显色清晰,日光下立即检视。供试品色谱中,在与豆蔻对照药材、桉油精对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性样品无干扰,结果见图 1。

2.1.2 肉桂鉴别 取石榴健胃丸、片适量,研细,称取 3 g;石榴健胃散称取 3 g,加甲醇 10 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液作为供试品溶液;取肉桂对照药材 1 g,同法制成对照药材溶液。取桂皮醛对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的对照品溶

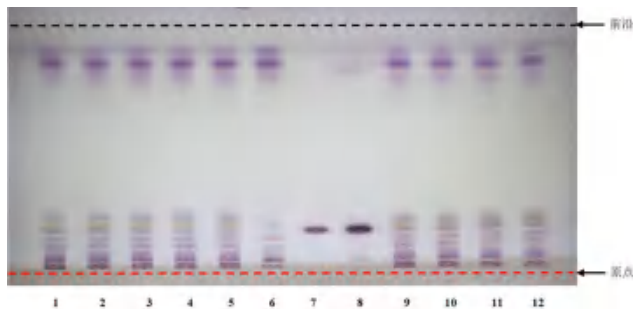


图 1 豆蔻薄层色谱图

Fig 1 TLC chromatogram of Cardamom

1、2. C 企业石榴健胃散 (C enterprise Shiliu Jianwei powder); 3、4. B 企业石榴健胃丸 (B enterprise Shiliu Jianwei pills); 5. A 企业石榴健胃丸 (A enterprise Shiliu Jianwei pills); 6. 阴性样品 (negative sample); 7. 桉油精对照品 (eucalyptol reference substance); 8. 豆蔻对照药材 (Cardamom control herbs); 9~11. D 企业石榴健胃散 (D enterprise Shiliu Jianwei powder); 12. E 企业石榴健胃片 (E enterprises Shiliu Jianwei tablets)

液; 按石榴健胃丸的处方和工艺制备缺肉桂的阴性样品 3 g, 并按供试品溶液方法制成阴性样品溶液。按 2020 年版《中国药典》四部 TLC 法, 吸取供试品溶液 10 μL , 对照药材溶液、对照品溶液各 2 μL , 阴性样品溶液 10 μL , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚 (60~90 $^{\circ}\text{C}$) - 乙酸乙酯 (17:3) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷二硝基苯肼乙醇试液, 置日光下检视。供试品色谱中, 在与肉桂对照药材、桂皮醛对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 阴性样品无干扰, 结果见图 2。

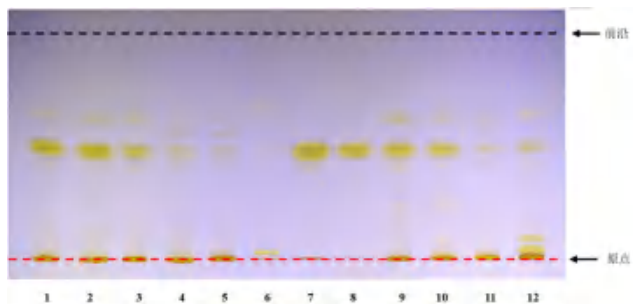


图 2 肉桂薄层色谱图

Fig 2 TLC chromatogram of Cinnamon

1~3. C 企业石榴健胃散 (C enterprises Shiliu Jianwei powder); 4、5. B 企业石榴健胃丸 (B enterprise Shiliu Jianwei pills); 6. 阴性样品 (negative sample); 7. 肉桂对照药材 (Cinnamon control herbs); 8. 桂皮醛对照品 (cinnamaldehyde reference substance); 9、10. E 企业石榴健胃片 (E enterprises Shiliu Jianwei tablets); 11. D 企业石榴健胃散 (D enterprise Shiliu Jianwei powder); 12. A 企业石榴健胃丸 (A enterprise Shiliu Jianwei pills)

2.1.3 萹苳鉴别 取石榴健胃丸、片适量, 研细, 称取 3 g; 石榴健胃散称取 3 g, 加甲醇 20 mL, 超声处理 30 min, 滤液浓缩至 2 mL, 作为供试品溶液; 取萹苳对照药材 1 g, 同法制成对照药材溶液。取胡椒碱对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含

1 mg 的溶液, 作为对照品溶液; 按石榴健胃丸的处方和工艺制备缺萹苳的阴性样品 3 g, 并按供试品溶液方法制成阴性样品溶液。按 2020 年版《中国药典》四部 TLC 法, 吸取上述 4 种溶液 10 μL , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以环己烷 - 乙酸乙酯 (3:2) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 置紫外灯 (365 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与萹苳对照药材、胡椒碱对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 阴性样品无干扰, 结果见图 3。

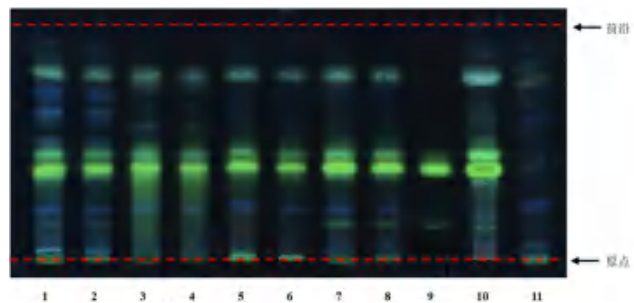


图 3 萹苳薄层色谱图

Fig 3 TLC chromatogram of Cubeb longum

1、2. B 企业石榴健胃丸 (B enterprise Shiliu Jianwei pills); 3、4. A 企业石榴健胃丸 (A enterprise Shiliu Jianwei pills); 5. C 企业石榴健胃散 (C enterprise Shiliu Jianwei powder); 6. D 企业石榴健胃散 (D enterprise Shiliu Jianwei powder); 7、8. E 企业石榴健胃片 (E enterprises Shiliu Jianwei tablets); 9. 胡椒碱对照品 (piperine reference substance); 10. 萹苳对照药材 (Cubeba longum control herbs); 11. 阴性样品 (negative sample)

2.2 制剂中桉油精、桂皮醛、胡椒碱的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent DB-5 毛细管柱 (30 $\text{m} \times 0.250 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$); 进样口温度: 230 $^{\circ}\text{C}$; 分流比 20:1; 检测器 (FID) 温度: 250 $^{\circ}\text{C}$; 流量控制模式: 恒流模式; 载气 (氮气): 40 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 氢气: 40 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 空气: 400 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 流量: 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温为程序升温, 初始温度: 50 $^{\circ}\text{C}$, 保持 10 min; 以 5 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升温至 180 $^{\circ}\text{C}$, 保持 30 min; 再以 5 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升温至 240 $^{\circ}\text{C}$, 保持 30 min。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取桉油精 59.13 mg、桂皮醛 458.19 mg、胡椒碱 31.34 mg 分别置于 25、50、10 mL 棕色量瓶中, 用无水乙醇溶解并定容至刻度, 即得约含桉油精 2.36 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、桂皮醛 9.12 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和胡椒碱 3.10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。分别精密吸取上述各对照品储备液 0.5、0.3、2.0 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用无水乙醇稀释至刻度, 即得混合对照品溶液 (含桉油精 0.12 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 桂皮醛 0.27 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 胡椒碱 0.62 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.2.3 供试品溶液的制备 取石榴健胃丸适量, 研

细,称取 5.0 g;石榴健胃片 20 片,研细,称取 5.0 g;石榴健胃散称取 5.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入无水乙醇 20 mL,称定重量,超声处理 30 min,放冷,再称定重量,用无水乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 阴性样品溶液的制备 按石榴健胃制剂处方比,分别取缺豆蔻、缺肉桂、缺荜茇阴性样品,依照“2.2.3”项下方法,分别制备得缺豆蔻、缺肉桂、缺荜茇的阴性样品溶液,备用。

2.2.5 专属性试验 分别精密吸取“2.2.2”项下混合对照品、供试品及阴性样品溶液进样测定,记录色谱图。供试品溶液色谱中,在桉油精、桂皮醛、胡椒碱混合对照品色谱峰相应位置上有相同保留时间色谱峰,且阴性样品无干扰,见图 4。

2.2.6 线性关系考察 分别精密吸取不同量的桉油精 ($2.36 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、桂皮醛 ($9.12 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、胡椒碱 ($3.10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 对照品储备液置 10 mL 棕色量瓶中,加无水乙醇定容至刻度,摇匀,即得各系列浓度的混合对照品溶液,进样分析,记录对应的峰面积。待测成分质量浓度为横坐标 (X)、峰面积为纵坐标 (Y),得到 3 种成分的线性关系,结果见表 2。

2.2.7 检测限与定量限 取混合对照溶液,按逐步稀释法,按信噪比 3:1、10:1 分别测得各成分的检测限和定量限,见表 2。

表 2 桉油精、桂皮醛和胡椒碱线性关系考察结果

Tab 2 Linearity of eucalyptol, cinnamaldehyde and piperine

化合物	回归方程	r	范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	检测限 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	定量限 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
桉油精	$Y = 0.8560X + 2.732$	0.9983	23.63 ~ 236.28	0.002	0.009
桂皮醛	$Y = 0.6082X - 41.62$	0.9996	91.12 ~ 638.26	0.086	0.290
胡椒碱	$Y = 0.4759X - 6.435$	0.9999	154.98 ~ 929.86	0.020	0.060

2.2.8 稳定性试验 取供试品溶液 (S_{17}),分别在 0、2、4、10、18 及 24 h 进样测定,结果表明供试品中桉油精、胡椒碱在 24 h 内均稳定性良好,其峰面积 RSD 值分别为 0.67%、0.95%;桂皮醛在 10 h 内稳定性良好,峰面积 RSD 为 0.62%。

2.2.9 精密度试验 精密吸取含桉油精 ($0.12 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、桂皮醛 ($0.27 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、胡椒碱 ($0.62 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的混合对照品溶液,连续进样 5 次,计算桉油精、桂皮醛、胡椒碱峰面积的 RSD 值分别为 1.4%、0.84% 及 0.61%。结果表明仪器精密度良好。

2.2.10 重复性试验 取供试品 (S_{17}),精密称取 6 份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,测定桉油精、桂皮醛、胡椒碱的含量的平均值分别为 0.24、0.39、 $1.51 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 值分别为 1.4%、0.89%、0.20%,表明方法重现性良好。

2.2.11 回收试验 取已知含量样品 (S_{17}) 6

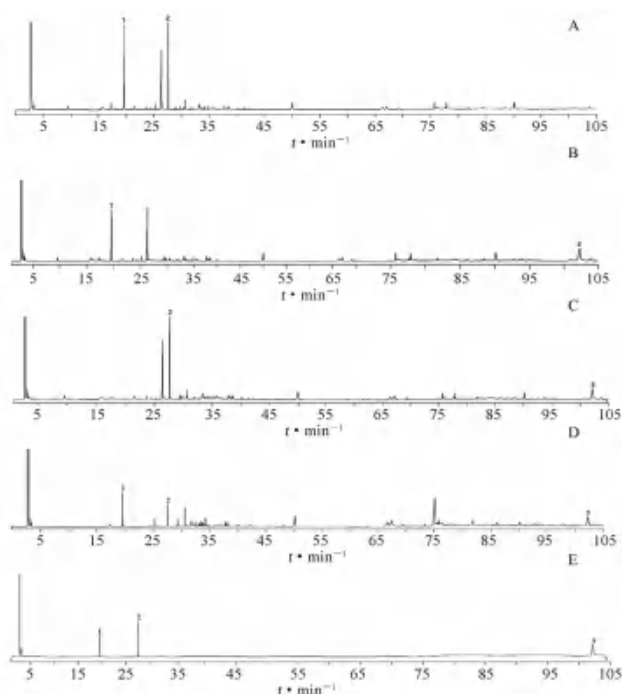


图 4 石榴健胃制剂的气相色谱图

Fig 4 Gas chromatogram of Shiliu Jianwei preparation

A. 缺荜茇阴性样品 (negative sample without Cubeb longum); B. 缺肉桂阴性样品 (negative sample without Cinnamon); C. 缺豆蔻阴性样品 (negative sample without Cardamom); D. 石榴健胃散 (S_{17}) (Shiliu Jianwei powder); E. 混合对照品 (mixed reference substance); 1. 桉油精 (eucalyptol); 2. 桂皮醛 (cinnamaldehyde); 3. 胡椒碱 (piperine)

份,精密加入无水乙醇配制的桉油精 ($120.126 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、桂皮醛 ($195.09 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、胡椒碱 ($740.07 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的混合对照品溶液 5 mL,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定,计算平均回收率分别为 99.42%、100.03%、99.79%, RSD 值分别为 1.4%、0.82%、0.30%。

2.2.12 样品含量测定 将 26 批样品按照“2.2.2”方法制成供试品溶液,进样测定,分别计算桉油精、桂皮醛、胡椒碱的含量,结果见表 3。

2.3 限度确定

依据表 3 测定结果并参照《中国药典》2020 年版一部对豆蔻、肉桂、荜茇中桉油精、桂皮醛、胡椒碱含量限度要求 [规定桉油精 (豆蔻) 不得低于 3.0%;桂皮醛 (肉桂) 不得低于 1.5%;胡椒碱 (荜茇) 不得低于 2.5%],同时考虑到 3 种成分均为挥发性成分,生产工艺中对温度较为敏感。将桉油精的转化率 10%、桂皮醛的转化率 20%、胡椒碱的

表 3 石榴健胃制剂中桉油精、桂皮醛、胡椒碱含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tab 3 Determination of eucalyptol, cinnamaldehyde and piperine in Shiliu Jianwei preparation ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

编号	桉油精	桂皮醛	胡椒碱	编号	桉油精	桂皮醛	胡椒碱
S ₁	/	0.03	0.82	S ₁₄	0.07	0.11	1.05
S ₂	/	0.07	0.80	S ₁₅	0.04	0.07	1.02
S ₃	/	0.07	1.03	S ₁₆	0.11	0.09	1.49
S ₄	/	0.07	1.69	S ₁₇	0.24	0.39	1.48
S ₅	/	0.06	1.56	S ₁₈	0.20	0.20	1.70
S ₆	/	0.05	1.33	S ₁₉	0.14	1.06	1.83
S ₇	/	0.04	1.47	S ₂₀	0.14	0.60	2.06
S ₈	/	0.04	1.29	S ₂₁	0.16	1.15	1.02
S ₉	/	0.05	1.45	S ₂₂	/	0.25	2.53
S ₁₀	0.03	0.03	1.25	S ₂₃	/	0.20	1.37
S ₁₁	0.04	0.03	0.89	S ₂₄	/	0.35	2.25
S ₁₂	0.05	0.08	0.93	S ₂₅	/	0.27	2.19
S ₁₃	0.06	0.14	1.02	S ₂₆	/	0.42	2.11

注 (Note): “/” 为未检出或检出量低于定量限 (“/” Indicates that it is not detected or below the quantitative limit)。

转化率 75% 计算, 则石榴健胃制剂中桉油精含量不得少于 $0.11 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 桂皮醛含量不得少于 $0.20 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 胡椒碱含量不得少于 $0.85 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

3 讨论

3.1 定性鉴别方法的选择

曾对各现行标准薄层鉴别方法结果进行了对比, 发现各现行标准存在着斑点 R_f 值过高、不清晰、专属性不强等问题。为此课题组对展开剂、提取方法等进行了考察, 对肉桂、萆薢分别选用了无水乙醇、乙醇及甲醇作为提取溶剂, 选用超声 30 min、20 min, 振摇 20 min、30 min 的提取方法进行综合交叉考察; 豆蔻展开剂采用石油醚-乙酸乙酯 (4:1)、甲苯-乙酸乙酯 (9:1) 等, 肉桂展开剂采用石油醚 (60~90℃)-乙酸乙酯 (17:3) 及乙酸乙酯-甲酸-水-甲醇 (7:2:3:0.4) 进行了考察; 结果发现采用本文方法可得到斑点清晰、分离度较好、专属性较强的结果。

3.2 供试品溶液提取条件选择

考察了超声、加热回流等不同提取方法进行提取, 结果超声提取效果最好。同时对提取溶剂 (正己烷、无水乙醇)、超声时间 (20、30、40 min)、取样量 (2、3、5 g) 进行考察, 结果显示, 取 5 g 样品加无水乙醇超声 30 min 效果最好。

3.3 样品质量评价

根据化学成分限度、检测结果及前期对企业问卷调查和实地调研, 对比各企业生产参数, 发现 E 企业产品干燥温度为 80°C , 而其他企业产品干燥温度均 $\leq 60^\circ\text{C}$, 这表明部分生产企业在质量控制方面存在一定差异。造成这种差异的原因是原药材质量参差不齐或生产工艺不稳定。为了加强石榴健胃制剂的质量标准, 需加强对其中豆蔻、

肉桂、萆薢等药材的质量控制; 还需考察生产工艺的稳定性, 设置合理生产工艺参数。

3.4 小结

综上, 本研究在现行标准基础上, 对豆蔻、肉桂、萆薢的 TLC 鉴定方法进行了提升, 建立了可同时测定石榴健胃制剂中桉油精、桂皮醛、胡椒碱含量的新方法, 以便提高对豆蔻、肉桂、萆薢等挥发性药味在制剂中的质量均一性。本方法具有较好的精密度和准确度, 可以为藏成药石榴健胃制剂的质量评价及标准制订提供依据。

参考文献

- [1] 宇妥·元丹贡布等著, 马世林等译注. 四部医典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987.
- [2] 皮林君, 马春林, 孙浩哲, 等. 石榴健胃片对 D-IBS 模型大鼠 5-HT、SP、VIP 的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13 (5): 630-633, 637.
- [3] 董光新, 龚立, 孟宪丽. 石榴健胃片药效学研究 [J]. 成都中医药大学学报, 2004, 27 (3): 40-43.
- [4] 申香群, 仁增多杰, 马倩倩, 等. 石榴健胃散干预对实验性结肠炎小鼠肠道免疫功能的影响 [J]. 中国高原医学与生物学杂志, 2021, 42 (2): 126-132.
- [5] 徐流国. 石榴健胃散治疗小儿再发性腹痛的疗效观察 [J]. 中国民族医药杂志, 2007 (9): 22-22.
- [6] 刘金敏, 江汉美, 田宇. HS-SPME-GC-MS 分析五种姜科香辛料的挥发性成分 [J]. 中国调味品, 2021, 46 (4): 141-147.
- [7] 容蓉, 邱丽丽, 张莹, 等. 水蒸气蒸馏与顶空进样 GC-MS 法分析萆薢挥发性成分 [J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41 (10): 740-742, 747.
- [8] 郭胜男, 卢金清, 蔡君龙, 等. HS-SPME-GC-MS 联用分析不同产地肉桂挥发性成分 [J]. 中国调味品, 2014, 39 (12): 113-117, 128.
- [9] 王波, 龚伟, 陈国宝, 等. 肉桂挥发性成分的气相色谱/质谱分析 [J]. 世界中西医结合杂志, 2014, 9 (9): 941-943.
- [10] 田宇, 江汉美, 邱江雪, 等. HS-SPME-GC-MS 联用分析丁香、肉桂及其药对挥发性成分变化 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41 (9): 912-916.
- [11] 顾崇梅, 何元. GC 和 RP-HPLC 测定藏药石榴健胃片中桂皮醛含量的方法比较 [J]. 中兽医医药杂志, 2018, 37 (3): 32-35.
- [12] 魏国寿. HPLC 法测定石榴健胃胶囊中胡椒碱的含量 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18 (47): 115.
- [13] 万雪荷, 王芳, 王进权. HPLC 测定石榴健胃胶囊中的胡椒碱 [J]. 华西药学杂志, 2011, 26 (1): 75-76.
- [14] 何元. HPLC-PDA 同时测定石榴健胃片中 4 种活性成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36 (12): 2209-2214.
- [15] 何元, 顾崇梅. 气相色谱法测定石榴健胃片中桉油精的含量 [J]. 甘肃中医药大学学报, 2018, 35 (4): 36-39.
- [16] 张利青, 张占刚, 付岩, 等. 桂皮醛药理作用的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40 (23): 4568-4572.
- [17] 王如梦, 杨宏新. 萆薢及其有效成分胡椒碱的研究进展 [J]. 中国药事, 2021, 35 (3): 350-356.

(收稿日期: 2022-09-03; 修回日期: 2022-11-04)

基于 UPLC-Q-Exactive-MS 技术鉴定蒙药葶苈的化学成分

张弘, 张慧文, 张晨, 刘宏, 许佳琦, 王焕芸* (内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110)

摘要: **目的** 建立一种快速分析葶苈化学成分的方法, 初步揭示葶苈的药效物质基础, 为该药后续研究提供参考。**方法** 采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Exactive-MS)对葶苈提取物进行分析。色谱条件: 色谱柱为 Welch Ultimate C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇(A)-0.1%甲酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~5 min, 55%A, 5~25 min, 55%~90%A, 25~50 min, 90%~100%A); 流速 1 mL·min⁻¹; 检测波长 272 nm; 柱温 30℃; 进样量 20 μL。质谱条件: 离子源为 HESI 源; 正、负离子模式同时检测; 检测方式均为 Full-MS/dd-MS²; 扫描范围 *m/z* 110~1000。使用 Compound Discoverer 3.0 软件对质谱数据进行初步筛查, 获得化合物的保留时间、准分子离子峰的精确质量数及二级碎片等信息, 再查阅相关数据库和文献与之比对分析, 以此推断化合物结构。**结果** 根据保留时间和多级质谱碎片比对, 初步鉴定出葶苈中的 57 个化学成分, 包括 16 个 A 型酰胺类生物碱、13 个 B 型酰胺类生物碱、9 个 C 型酰胺类生物碱、10 个 D 型酰胺类生物碱、3 个 E 型酰胺类生物碱、6 个 O 型化合物。**结论** 该方法有助于揭示葶苈的药效物质基础, 可为进一步的药理学和活性机制研究提供参考。

关键词: 葶苈; 生物碱; 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱; 化学成分; 分析鉴定

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)02-0442-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.026

Identification of chemical components in *Piperlongum* L. by UPLC-Q-Exactive-MS

ZHANG Hong, ZHANG Hui-wen, ZHANG Chen, LIU Hong, XU Jia-qi, WANG Huan-yun* (Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110)

Abstract: Objective To develop a rapid method to identify the chemical components in *Piperlongum* L., and to provide reference for subsequent development of this drug. **Methods** The extract was analyzed by UPLC-Q-Exactive-MS. Welch Ultimate C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) chromatographic column was used. The mobile phase was methanol (A)-0.1% aqueous formic acid solution (B) with gradient elution (0~5 min, 55%A; 5~25 min, 55%~90%A; 25~50 min, 90%~100%A). The flow rate was 1 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 272 nm. The column temperature was 30℃, and the injection volume was 20 μL. The ion source was HESI source. The positive and negative ion modes were detected simultaneously. Detection methods were Full-MS/dd-MS². The scanning range was *m/z* 110~1000. The mass spectrometry data were screened with Compound Discoverer 3.0 software to obtain information on retention time, precise mass numbers of excimer ion peaks and secondary fragments of the compounds. Then relevant databases and literatures were compared to deduce the structures of the compounds. **Results** Based on the retention time and multilevel mass spectrometry fragmentation, 57 components of *Piperlongum* L. were primarily identified, including 16 A-type amide alkaloids, 13 B-type amide alkaloids, 9 C-type amide alkaloids,

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目 (No.2022MS08023); 内蒙古自治区蒙医药协同创新中心科学研究项目 (No.MYYXTYB202108); 内蒙古自治区教育科学“十三五”规划课题 (No.NGJGH2020277); 内蒙古医科大学校级创新训练项目 (No.202210132062)。

作者简介: 张弘, 男, 在读硕士研究生, 主要从事中蒙药药效物质基础研究, email: 969498738@qq.com *通信作者: 王焕芸, 女, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事中蒙药质量控制与药效物质基础研究, email: whuanyun999@163.com

10 D-type amide alkaloids, 3 E-type amide alkaloids, and 6 O-type compounds. **Conclusion** This method can help reveal pharmacological basis of *Piperlongum* L. and provide a reference for further pharmacological and activity mechanism study.

Key words: *Piperlongum* L.; alkaloid; UPLC-Q-Exactive-MS; chemical composition; analysis and identification

荜茇又名荜拔、毕勃、荜拔梨，为胡椒科植物荜茇 *Piperlongum* L. 的干燥近成熟或成熟果穗，收载于历版《中国药典》。国内主产于云南、两广地区，国外主产于印度尼西亚、菲律宾、越南。荜茇是药食两用中药^[1]，蒙医体系中也常见它的身影，但中药学和蒙药学对荜茇的药性认识和临床应用不尽相同，范围亦有差异^[2]。目前临床上主要用于脘腹冷痛，呕吐，泄泻，寒凝气滞，胸痹心痛，头痛，牙痛。现代植物化学研究表明，荜茇中含有的化学成分以生物碱类和挥发油类成分为主^[3]，同时含有少量黄酮类、有机酸类、萜类和甾醇类、氨基酸类以及微量无机元素等成分，其中酰胺类化合物为荜茇的主要特征成分。荜茇的药理活性报道较多，但最新的研究侧重于抗肿瘤、降脂、抗菌抗炎、抗抑郁和抗氧化等方面的作用^[4]。

荜茇的化学成分复杂，阐述其化学成分的文献很少，且研究方法相对单一。因此，全面且快速鉴定荜茇的化学成分很有必要。近年来，液质联用技术因其简便、快捷与准确等特点常应用于中药化学成分的分鉴定中。因此本试验采用 UPLC-Q-Exactive-MS 技术对荜茇化学成分进行分析，旨在探求其发挥药效的物质基础，为其进一步研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

Q-Exactive 高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱高分辨质谱仪、UltiMate 3000 超高效液相色谱仪（美国 Thermo 公司）；AB 135-S 型十万分之一分析天平（瑞士 Metter Toledo 公司）；CF1524R 高速冷冻型微量离心机（美国 SCILOGEX）；KQ-250 DA 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；WH-1 微型涡旋混合仪（上海沪西分析仪器厂）；FDU2110 型冷冻干燥机（东京理化器械株式会社）。

1.2 试药

甲醇（色谱纯，Thermo 公司）；水为超纯水。荜茇（内蒙古腾翔中药饮片有限公司，批号：

170701，产地内蒙古，经内蒙古医科大学药学院生药学教研室张慧文博士鉴定，均符合 2020 年版《中国药典》一部规定）。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

取荜茇药材，粉碎过 40 目筛，称取 200 g 荜茇粉末，甲醇超声提取 3 次，每次 1 h，合并提取液，减压浓缩后，冷冻干燥制成荜茇冻干粉。精密称取荜茇冻干粉 1 g，精密称定，置于 50 mL 具塞锥形瓶中，加入 25 mL 甲醇，称定重量，超声（功率 100 W）处理 20 min，放冷后补重，12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min，取上清液即得荜茇供试品溶液。

2.2 分析条件

2.2.1 色谱条件 Welch Ultimate C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱；流动相：甲醇 (A) -0.1% 甲酸水溶液 (B)，梯度洗脱 (0~5 min, 55%A, 5~25 min, 55%~90%A, 25~50 min, 90%~100%A)；流速 1 mL·min⁻¹；检测波长 272 nm；柱温 30℃；进样量 20 μL。

2.2.2 质谱条件 质谱条件：离子源为 HESI 源；正、负离子模式同时检测；正离子检测模式下，辅助气体辅助气体体积流量 30 L·min⁻¹，喷雾电压 4.00 kV，离子传输管温度 300℃，辅助气温度 100℃，碰撞能量 (CE) 45 eV；负离子模式下，辅助气体体积流量 30 L·min⁻¹，喷雾电压 3.5 kV，离子传输管温度 300℃，辅助气温度 100℃，CE 为 30 eV，检测方式均为 Full-MS/dd-MS²；Full MS 分辨率 70 000，dd-MS² 分辨率 17 500，扫描范围 *m/z* 110~1000。

2.3 荜茇数据库的建立与分析鉴定

通过 Compound Discoverer 3.0 软件对所检测样本的质谱数据进行自动初步筛查，再查阅 Chemspider 数据库和荜茇化学成分的相关中英文文献，收集整理荜茇中已报道的化合物，将各化学成分进行汇总，包括分子式、分子结构式、相对分子质量、分子离子、药材来源、中英文名称等，采用 Xcalibur3.0 软件进行峰提取、峰匹配等质谱数据处

理方法, 质谱偏差范围 $\delta \leq 5 \times 10^{-6}$, 对目标化合物进行准确鉴定, 结合已有文献信息^[3, 5-13] 推测可能的化合物的裂解规律并进行初步分析鉴定。

3 结果与讨论

3.1 荜茇药材的 UPLC-Q-Exactive-MS/MS 鉴定

正、负离子模式下荜茇的总离子流图如图 1 所示。通过参考相关文献、对比保留时间、精确质谱信息等, 对荜茇的化学成分进行确认, 鉴定出 57 个可能的化学成分, 包括 16 个 A 型酰胺类生物碱、13 个 B 型酰胺类生物碱、9 个 C 型酰胺类生物碱、10 个 D 型酰胺类生物碱、3 个 E 型酰胺类生物碱、6 个 O 型化合物 (4 个酰胺化合物、1 个羧酸、1 个酯类化合物)。UPLC-Q-Exactive-MS/MS 数据见表 1。

3.2 成分鉴定过程

荜茇中的生物碱由不同的脂肪酸和胺部分组成, 其中脂肪酸部分的差异集中在末端结构 (亚甲二氧基苯基和正戊基); 胺部分由哌啶、异丁胺或吡咯组成。根据构成生物碱的两部分之间的差

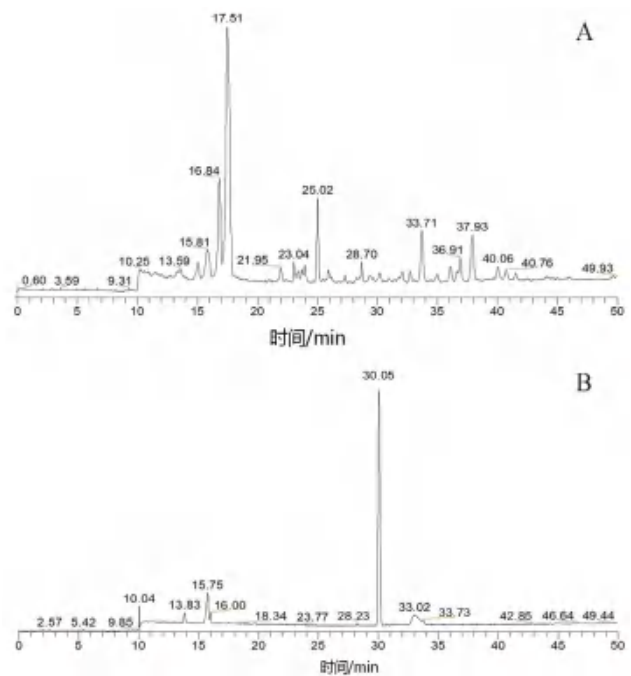


图 1 正离子模式 (A) 和负离子模式 (B) 下荜茇的总离子流图
Fig 1 Total ion flow chromatogram of *Piperlongum* L. in the positive (A) and negative ion mode (B)

表 1 荜茇化学成分结构鉴定

Tab 1 Structure identification of chemical components in *Piperlongum* L.

No.	化合物	保留时间 /min	分子式	离子模式	预测值	实测值	碎片离子 (m/z)	误差 / mmu	分类文献
1	去氢阿魏波因	10.26	C ₁₇ H ₂₃ NO ₃	[M + H] ⁺	290.1750	290.1763	205.0862, 177.0921, 166.1230, 137.0603, 112.0764	1.290	O ^[5]
2	香豆酰哌啶	11.49	C ₁₆ H ₁₉ NO ₂	[M + H] ⁺	258.1488	258.1501	173.0604, 152.1074, 145.0653	1.265	O ^[3]
3	threo-1-[1-oxo-9(3, 4-methylenedioxyphenyl)-8, 9-dihydroxy-2E-non-enyl]-piperidine	11.65	C ₂₁ H ₂₉ NO ₅	[M + H] ⁺	376.2118	376.2135	358.2026, 340.1923, 255.1026, 227.1076, 187.0759, 135.0447	1.741	A ^[5]
4	fagaramide	11.92	C ₁₄ H ₁₇ NO ₃	[M + H] ⁺	248.1281	248.1293	192.0611, 175.0397, 145.0289	1.210	B ^[6]
5	胡椒酸	12.07	C ₁₂ H ₁₀ O ₄	[M + H] ⁺	219.0651	219.0661	201.0554, 173.0815, 135.0446	0.915	O ^[7]
6	piperodione	12.76	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	[M + H] ⁺	318.1335	318.1351	233.0450, 205.0504, 196.0976, 177.0552, 168.1024, 149.0238	1.531	O ^[6]
7	erythro-1-[1-oxo-9(3, 4-methylenedioxyphenyl)-8, 9-dihydroxy-2E-non-enyl]-piperidine	13.28	C ₂₁ H ₂₉ NO ₅	[M + H] ⁺	376.2118	376.2135	358.2026, 340.1923, 255.1026, 227.1076, 187.0759, 135.0447	1.651	A ^[5]
8	胡椒林碱	14.83	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	[M + H] ⁺	272.1281	272.1294	201.0554, 173.0604, 135.0447	1.270	E ^[8]
9	二氢荜茇宁碱	15.03	C ₁₆ H ₂₁ NO ₃	[M + H] ⁺	276.1594	276.1606	203.0712, 175.0760, 161.0602, 135.0447	1.260	B ^[9]
10	荜茇宁	15.82	C ₁₆ H ₁₉ NO ₃	[M + H] ⁺	274.1437	274.1449	201.0554, 173.0604, 135.0447	1.220	B ^[3]
11	胡椒内酰胺 B	16.38	C ₁₇ H ₁₃ NO ₄	[M + H] ⁺	296.0917	296.0931	279.2309, 266.8930, 238.8978	1.376	O ^[3]
12	胡椒新碱	16.84	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	[M + H] ⁺	288.1594	288.1605	203.0711, 161.0603, 135.0447	1.100	A ^[8]
13	胡椒酸甲酯	17.33	C ₁₃ H ₁₂ O ₄	[M + H] ⁺	233.0808	233.0817	217.1079, 201.0554, 173.0815, 135.0446	0.895	O ^[10]
14	胡椒碱	17.51	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	[M + H] ⁺	286.1437	286.1449	201.0554, 173.0603, 161.0604, 135.0446	1.160	A ^[8]
15	胡椒亭碱 I	20.75	C ₁₉ H ₂₁ NO ₃	[M + H] ⁺	312.1594	312.1609	227.0711, 199.8788, 169.0654, 161.0602, 135.0445, 131.0499	1.500	A ^[8]

续表 1

No.	化合物	保留时间 /min	分子式	离子模式	预测值	实测值	碎片离子 (<i>m/z</i>)	误差 /mmu	分类文献
16	piperdardine	20.89	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃	[M + H] ⁺	314.1750	314.1765	229.0875, 201.0921, 179.1311, 161.0603, 135.0447	1.440	A [8]
17	胡椒亭碱 II	20.98	C ₁₉ H ₂₁ NO ₃	[M + H] ⁺	312.1594	312.1608	227.0711, 199.0763, 169.0655, 161.0603, 135.0448	1.470	A [8]
18	胡椒亭碱 III	21.34	C ₁₉ H ₂₁ NO ₃	[M + H] ⁺	312.1594	312.1609	227.0710, 199.0261, 169.0654, 161.0602, 135.1171	1.500	A [8]
19	胡椒亭碱 IV	21.65	C ₁₉ H ₂₁ NO ₃	[M + H] ⁺	312.1594	312.1609	227.0710, 199.0761, 169.0653, 135.1175	1.500	A [8]
20	墙草碱	21.95	C ₁₄ H ₂₅ NO	[M + H] ⁺	224.2018	224.2018	182.1548, 168.1389, 151.1123, 133.1017, 123.1175	0.999	C [8]
21	假葎萘酰胺 A	22.46	C ₂₀ H ₂₅ NO ₃	[M + H] ⁺	328.1907	328.1922	255.1024, 227.1073, 166.1202, 161.0602, 135.0447	1.540	B [9]
22	pipgularine	22.85	C ₂₃ H ₃₃ NO ₃	[M + H] ⁺	372.2533	372.2549	298.8431, 161.0609, 135.0447	1.650	B [8]
23	pipercollosine	23.40	C ₂₀ H ₂₇ NO ₃	[M + H] ⁺	330.2063	330.2079	257.1178, 229.1232, 161.0682, 135.0447	1.001	B [8]
24	brachyamide B	23.45	C ₂₀ H ₂₅ NO ₃	[M + H] ⁺	328.1907	328.1923	257.1178, 229.1231, 189.0616, 161.0602, 135.0446	1.630	E [3]
25	<i>N</i> -isobutyl-2 <i>E</i> , 4 <i>E</i> -undecadienamide	23.70	C ₁₅ H ₂₇ NO	[M + H] ⁺	238.2165	238.2176	193.2141, 168.1390, 151.1123, 137.0151	1.109	C [3]
26	piptigrine	23.72	C ₂₁ H ₂₅ NO ₃	[M + H] ⁺	340.1907	340.1923	255.1026, 227.1074, 213.0922	1.630	A [11]
27	neopellitorine B	23.88	C ₁₅ H ₂₅ NO	[M + H] ⁺	236.2008	236.2020	151.1122, 123.0810, 109.0654	1.179	D [11]
28	葎萘壬三烯哌啶	23.97	C ₂₁ H ₂₅ NO ₃	[M + H] ⁺	340.1907	340.1923	255.1026, 227.1074, 179.1318, 161.0602, 135.0446, 131.0497	1.630	A [8]
29	dehydroretrofractamide C	24.31	C ₂₀ H ₂₉ NO ₃	[M + H] ⁺	332.2220	332.2237	286.1448, 259.1317, 161.0603, 135.0447	1.730	B [12]
30	葎萘壬二烯哌啶	25.02	C ₂₁ H ₂₇ NO ₃	[M + H] ⁺	342.2063	342.2077	257.1180, 229.1232, 189.0921, 161.0603, 135.0446	1.390	A [8]
31	假葎萘酰胺 B	25.92	C ₂₂ H ₂₉ NO ₃	[M + H] ⁺	356.2220	356.2234	283.1343, 255.1390, 189.0921, 161.0603, 135.0447	1.460	B [8]
32	<i>N</i> -isobutyl-(2 <i>E</i> , 4 <i>E</i>)-dodecadienamide	26.14	C ₁₆ H ₂₉ NO	[M + H] ⁺	252.2321	252.2334	196.1706, 179.1439, 168.1386	1.249	C [8]
33	胡椒油碱 B	26.15	C ₂₁ H ₂₉ NO ₃	[M + H] ⁺	344.2220	344.2236	259.1336, 161.0605, 135.0447	1.670	A [8]
34	piperchabamide D	26.76	C ₂₂ H ₃₁ NO ₃	[M + H] ⁺	358.2376	358.2392	285.1497, 257.1555, 161.0603, 135.0447	1.590	B [9]
35	葎萘十一碳三烯哌啶	27.25	C ₂₃ H ₂₉ NO ₃	[M + H] ⁺	368.2220	368.2238	283.1348, 255.1390, 189.0918, 161.0601, 135.0447	1.860	A [8]
36	(2 <i>E</i> , 4 <i>E</i>)- <i>N</i> -dodecadienoylpiperidine	27.66	C ₁₇ H ₂₉ NO	[M + H] ⁺	264.2321	264.2334	196.8789, 179.1437, 164.9309	1.299	D [13]
37	piperchabamide B	28.21	C ₂₃ H ₃₁ NO ₃	[M + H] ⁺	370.2376	370.2394	285.1496, 257.1547, 161.0602, 135.0447	1.770	A [8]
38	几内亚胡椒酰胺	28.70	C ₂₄ H ₃₃ NO ₃	[M + H] ⁺	384.2533	384.2549	311.1658, 283.1705, 217.1231, 161.0603, 135.0446	1.590	B [8]
39	piperlongumamide C	28.79	C ₁₉ H ₃₁ NO	[M + H] ⁺	290.2478	290.2490	205.1593, 192.1391, 177.1645	1.209	D [13]
40	(2 <i>E</i> , 4 <i>E</i> , 13 <i>E</i>)-14-(benzo[d][1,3]dioxol-6-yl)- <i>N</i> -isobutyltrideca-2, 4, 13-trienamide	29.65	C ₂₅ H ₃₅ NO ₃	[M + H] ⁺	398.2689	398.2709	325.9065, 296.2959, 161.0602, 147.1171, 135.0446, 121.1017	1.970	B [11]
41	(2 <i>E</i> , 4 <i>E</i> , 12 <i>E</i>)-13-(Benzo[d][1,3]dioxol-6-yl)-1-(piperidin-1-yl)trideca-2, 4, 12-trien-1-one	30.14	C ₂₅ H ₃₃ NO ₃	[M + H] ⁺	396.2533	396.2550	311.1659, 283.1706, 161.0604, 135.0447	1.750	A [11]

续表 1

No.	化合物	保留时间 /min	分子式	离子模式	预测值	实测值	碎片离子 (m/z)	误差 /mmu	分类文献
42	(2E, 8E)-1-(1-piperidinyl)-2,8-tetradecadien-1-one	30.58	C ₁₉ H ₃₃ NO	[M + H] ⁺	292.2634	292.2648	207.1749, 180.1392, 179.0711	1.279	D [8]
43	N-[(2E, 4E)-tetradecadienoyl]piperidine	30.97	C ₁₉ H ₃₃ NO	[M + H] ⁺	292.2634	292.2647	207.1750, 179.0698, 112.0763	1.279	D [11]
44	brachystamide B	31.66	C ₂₆ H ₃₇ NO ₃	[M + H] ⁺	412.2846	412.2865	339.1965, 311.2014, 161.0602, 135.0447	1.969	B [8]
45	1-(piperidinyl)-2-tetradecen-1-one	32.28	C ₁₉ H ₃₃ NO	[M + H] ⁺	294.2791	294.2805	209.1904, 180.9047	1.439	D [8]
46	N-isobutyl-2E, 4E-hexadecadienamide	32.72	C ₂₀ H ₃₇ NO	[M + H] ⁺	308.2947	308.2961	252.2330, 235.2063, 168.1389	1.349	C [11]
47	brachystamide D	32.80	C ₂₇ H ₃₉ NO ₃	[M + H] ⁺	426.3002	426.3019	324.3275, 161.0603, 135.0446	1.669	B [3]
48	(2E, 4E, 12Z)-N-isobutyl-ocatadeca-2, 4, 12-trienamide	33.71	C ₂₂ H ₃₉ NO	[M + H] ⁺	334.3104	334.3117	261.2220, 233.2260, 219.2117, 166.1231	1.329	C [8]
49	1-(piperidinyl)-2, 4-octadecadien-1-one/isomer	35.04	C ₂₃ H ₄₁ NO	[M + H] ⁺	348.3260	348.3278	278.2489, 261.2226	1.729	E [8]
50	1-(2E, 4E, 12E)-octadecatrienylpiperidine	36.11	C ₂₃ H ₃₉ NO	[M + H] ⁺	346.3104	346.3117	261.2218, 233.2272, 178.1227	1.329	D [8]
51	N-isobutyl-(2E, 4E)-octadecadienamide	36.91	C ₂₂ H ₄₁ NO	[M + H] ⁺	336.3260	336.3272	280.2647, 263.2376, 168.1394	1.179	C [8]
52	1-(piperidinyl)-2, 4-octadecadien-1-one/isomer	37.73	C ₂₃ H ₄₁ NO	[M + H] ⁺	348.3260	348.3277	263.2374, 234.8346	1.639	D [8]
53	(2E, 4E, 15Z)-N-isobutyl-eicosa-2, 4, 15-trienamide	37.93	C ₂₄ H ₄₃ NO	[M + H] ⁺	362.3417	362.3432	316.8295, 289.2567, 196.8787	1.458	C [6]
54	1-(piperidinyl)-2, 4-octadecadien-1-one	39.69	C ₂₃ H ₄₁ NO	[M + H] ⁺	348.3260	348.3278	263.2377, 234.8346	1.789	D [8]
55	1-[(2E, 4E, 14Z)-1-oxo-2, 4, 14-eicosatrienyl]-piperidine	40.76	C ₂₅ H ₄₃ NO	[M + H] ⁺	374.3417	374.3434	289.2540, 261.2587, 209.1343	1.738	D [8]
56	N-isobutyl-2E, 4E-decyldeca-dienamide	41.55	C ₂₄ H ₄₅ NO	[M + H] ⁺	364.3573	364.3589	291.2692, 196.8786	1.588	C [8]
57	(2E, 4E, 16Z)-N-isobutyl-docosa-2, 4, 16-trienamide	42.44	C ₂₆ H ₄₇ NO	[M + H] ⁺	390.3730	390.3748	317.2847, 304.8351, 288.8610, 237.0493	1.808	C [11]

异可以将生物碱分为 6 类, 分别为 Type A、Type B、Type C、Type D、Type E、Type O 型, Type A ~ E 型结构见图 2。其中, Type O 型为其他化合物。鉴于相似结构具有相同的裂解规律, 选择 Type A 型和 Type C 型两类成分进行详细说明。

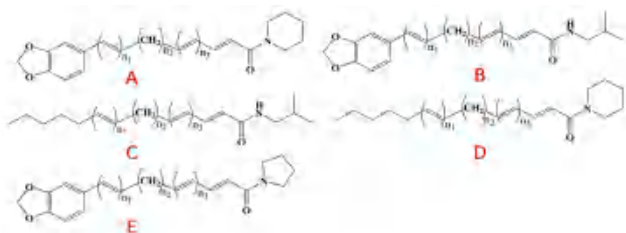


图 2 Type A ~ E 型结构

Fig 2 Structure of type A ~ E

3.2.1 Type A 型 Type A 型结构为吡啶结合末端带有亚甲二氧基苯的不饱和脂肪酸, 其质谱裂解特点

为胺部分容易失去一个中性哌啶 (C₅H₁₁N, 85.0886 Da) 或甲酰基哌啶 (C₆H₁₁NO, 113.0835 Da), 其末端结构易产生 m/z 161.0597[C₁₀H₈O₂ + H]⁺ 的丙烯基亚甲二氧基苯和 m/z 135.0440[C₈H₆O₂ + H]⁺ 的甲基亚甲二氧基苯, 共发现 16 个 A 型酰胺类生物碱。以胡椒碱为例来说明鉴别过程。胡椒碱可能的裂解规律见图 3, 二级质谱图见图 4。在正离子模式下检测到 m/z 286.1449[M + H]⁺ 的分子离子峰, 丢失 C₅H₁₁N 形成 m/z 201.0554 的碎片离子, 再丢失 CO 形成 m/z 173.0603 的离子碎片, 以及脂肪酸末端产生的 m/z 161.0604[C₁₀H₈O₂ + H]⁺ 的丙烯基亚甲二氧基苯和 m/z 135.0446[C₈H₆O₂ + H]⁺ 的甲基亚甲二氧基苯。结合化合物的分子式、裂解规律、碎片信息及比对结果, 确认化合物为胡椒碱 [8]。

3.2.2 Type B 型 Type B 型结构为异丁胺结合末端

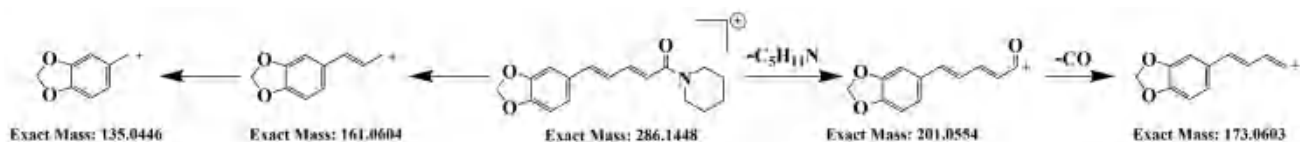


图 3 胡椒碱的质谱裂解途径

Fig 3 Fragmentation pathway of piperine

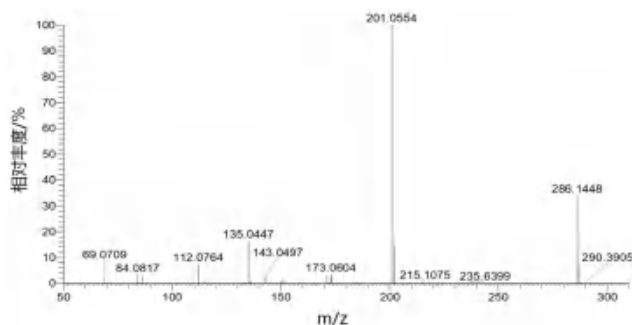


图 4 胡椒碱的二级质谱图

Fig 4 MS/MS spectrum of piperine

带有亚甲二氧基苯的不饱和脂肪酸，与 Type A 型结构相比，其质谱裂解特点为胺部分容易失去 1 个中性异丁胺 ($C_4H_{11}N$, 73.0886 Da) 或甲酰基异丁胺 ($C_5H_{11}NO$, 101.0835 Da)，其末端结构的裂解模式与 Type A 型相同，共发现 13 个 B 型酰胺类生物碱。

3.2.3 Type C 型 Type C 型结构为异丁胺结合末端

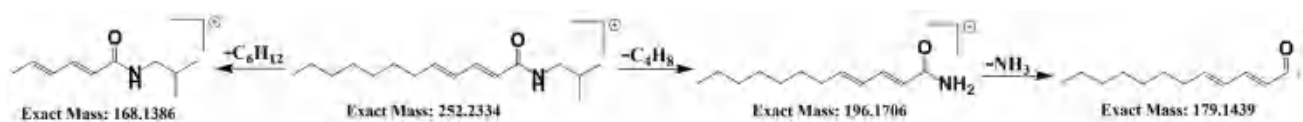


图 5 *N*-isobutyl-(2*E*, 4*E*)-dodecadienamide 的质谱裂解途径

Fig 5 Fragmentation pathway of *N*-isobutyl-(2*E*, 4*E*)-dodecadienamide

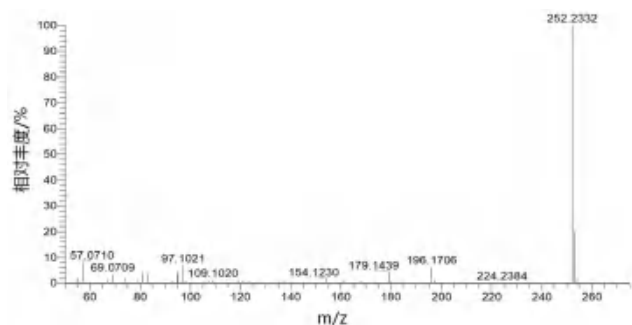


图 6 *N*-isobutyl-(2*E*, 4*E*)-dodecadienamide 的二级质谱图

Fig 6 MS/MS spectrum of *N*-isobutyl-(2*E*, 4*E*)-dodecadienamide

3.2.4 Type D 型 Type D 型结构为哌啶结合末端结构为正戊基的不饱和脂肪酸，与 Type C 型结构相比，其质谱裂解特点为胺部分容易失去 1 个中性哌啶 ($C_5H_{11}N$, 85.0886 Da)，有时会伴随脱羰基 (CO , 27.9943 Da)，结构中有共轭双键，则易发生 α 裂解脱烷基，共发现 10 个 D 型酰胺类生物碱。

3.2.5 Type E 型 Type E 型结构为吡咯烷结合末

端为正戊基的不饱和脂肪酸，其质谱裂解特点为胺部分容易失去 1 个中性异丁胺 ($C_4H_{11}N$, 73.0886 Da)，有时会伴随脱羰基 (CO , 27.9943 Da)，也会产生一系列烷基碎片 (并不是特征碎片)，结构中有共轭双键，易发生 α 裂解脱烷基，共发现 9 个 C 型酰胺类生物碱。以 *N*-isobutyl-(2*E*, 4*E*)-dodecadienamide 为例来说明鉴别过程。*N*-isobutyl-(2*E*, 4*E*)-dodecadienamide 可能的裂解规律见图 5，二级质谱图见图 6。在正离子模式下检测到 m/z 252.2334 [$M + H$]⁺ 的分子离子峰，丢失 C_4H_8 形成 m/z 196.1706 的碎片离子，再丢失 NH_3 形成 m/z 179.1439 的离子碎片，脂肪酸部分经过 α 裂解丢失 C_6H_{12} 后产生 m/z 168.1386 [$C_{10}H_{17}NO + H$]⁺ 的碎片离子。结合化合物的分子式、裂解规律、碎片信息及比对结果，确认化合物为 *N*-isobutyl-(2*E*, 4*E*)-dodecadienamide^[8]。

端带有苯并二氧杂环的不饱和脂肪酸，与 Type A 型结构相比，此类结构中胺部分容易失去 1 个中性吡咯 (C_4H_9N , 71.0729 Da) 或甲酰基吡咯 (C_5H_9NO , 99.0678 Da)，其末端结构的裂解模式与 Type A 型相同，共发现 3 个 E 型酰胺类生物碱。

3.2.6 Type O 型 除 Type A ~ E 外的结构统称为 O 型结构，共发现 6 个 O 型化合物 (4 个酰胺化合物、1 个羧酸、1 个酯类化合物)。O 型化合物的裂解规律基本相似，易在碳碳单键与碳碳双键间裂解，区别主要在官能团上。酰胺类化合物易失去哌啶，后继续丢失一分子 CO ；而环内酰胺则易失去 CO ；羧酸易先失去一分子羟基，进一步失去 CO ；酯类化合物先失去烷氧基后，又失去 CO 。此外，甲氧基也容易离去。O 型化合物可能的质谱裂解途径见图 7。

4 结论

本试验以甲醇为提取溶剂，分别考察了茱萸回流和超声两种提取方式对提取的影响，结果发

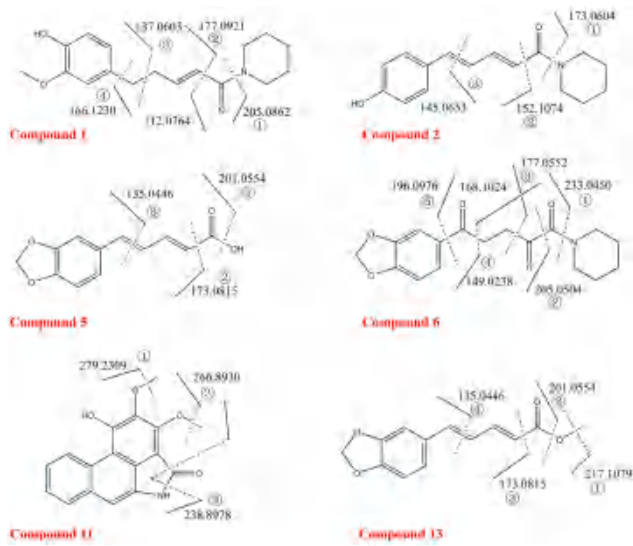


图 7 O 型化合物的质谱裂解途径

Fig 7 Fragmentation pathway of type O compounds

现超声提取的峰容量更大，提取更完全；本试验还考察了流动相中甲酸的含量对提取的影响，当不加入甲酸时，以胡椒碱为代表的生物碱类成分出现峰分离度低及拖尾等现象，为避免此类现象发生，选用了甲醇 -0.1% 甲酸水为流动相。

本文建立了一种基于 UPLC-Q-Exactive-MS 技术的快速、灵敏、可靠的鉴定荜茇化学成分的方法，目的是探求该中药发挥药效的物质基础，为后续课题组进行药物代谢动力学和药效学研究提供参考，从而更好地研究其作用机制。

参考文献

[1] 王睿, 曲惠翀, 李丹, 等. 药食两用中药荜茇研究进展 [J]. 食品与药品, 2020, 22 (5): 442-446.
 [2] 包·照日格图, 李翀, 海银梅. 中医和蒙医临床应用荜茇异同浅析 [J]. 上海中医药杂志, 2006, 40 (2): 59-61.
 [3] 廖翠平, 葛莎莎, 阿拉坦朝鲁门, 等. 荜茇的研究进展及质量标志物的预测 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47

(19): 5182-5192.
 [4] 李丹, 杨异卉, 赖睿智, 等. 荜茇化学成分和药理活性研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33 (6): 565-569.
 [5] Jiang ZY, Liu WF, Zhang XM, et al. Anti-HBV active constituents from *Piper longum* [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2013, 23 (7): 2123-2127.
 [6] Abdubakiev S, Li H, Lu X, et al. N-alkylamides from *piper longum* L. and their stimulative effects on the melanin content and tyrosinase activity in B16 melanoma cells [J]. Nat Prod Res, 2020, 34 (17): 2510-2513.
 [7] 刘文峰, 江志勇, 陈纪军, 等. 荜茇三氯甲烷部位化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34 (9): 1101-1103.
 [8] Luca SV, Minceva M, Gertsch J, et al. LC-HRMS/MS-based phytochemical profiling of Piper spices: global association of piperamides with endocannabinoid system modulation [J]. Food Res Int, 2021, 141: 110-123.
 [9] Li K, Fan Y, Wang H, et al. Qualitative and quantitative analysis of an alkaloid fraction from *Piper longum* L. using ultra-high performance liquid chromatography-diode array detector-electrospray ionization mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 109: 28-35.
 [10] Lee SA, Hwang JS, Han XH, et al. Methylpiperate derivatives from *Piper longum* and their inhibition of monoamine oxidase [J]. Arch Pharm Res, 2008, 31 (6): 679-683.
 [11] Li KY, Zhu WY, Fu Q, et al. Purification of amide alkaloids from *Piper longum* L. using preparative two-dimensional normal-phase liquid chromatography × reversed-phase liquid chromatography [J]. Analyst, 2013, 138 (11): 3313-3320.
 [12] Lee SW, Kim MS, Park MH, et al. Alkamides from *Piper longum* and *Piper nigrum* as inhibitors of IL-6 action [J]. B Korean Chem Soc, 2010, 31 (4): 921-924.
 [13] Jiang ZY, Liu WF, Huang CG, et al. New amide alkaloids from *Piper longum* [J]. Fitoterapia, 2013, 84: 222-226.

(收稿日期: 2022-10-01; 修回日期: 2022-11-17)

共载姜黄素与阿霉素胶束的制备工艺优化及体外抗肿瘤评价

李芳婵^{1,2}, 韦志英^{1,2}, 罗小莉^{1,2}, 潘翠柳^{2,3}, 吴秀彩^{2,3}, 梁方耀³, 潘真真^{1,2*}, 李耀华^{1,2*} (1. 广西中医药大学教学实验实训中心, 南宁 530200; 2. 广西高校中药提取纯化与质量分析重点实验室, 南宁 530200; 3. 广西中医药大学药学院, 南宁 530200)

摘要: **目的** 制备共载姜黄素/阿霉素聚己内酯-聚乙二醇-聚己内酯胶束 (CUR/DOX micelle), 优化其制备工艺, 并进行体外抗肿瘤评价。**方法** 采用薄膜-水化-超声法制备 CUR/DOX micelle, 以粒径、包封率和载药量为评价指标, 采用正交设计优化纳米粒处方; 对胶束进行表征, 透射电镜观察胶束的外观形态, 测定其粒径大小及分布, 并测定包封率及载药量; 考察其稳定性和体外释药特性; 体外抗肿瘤评价中, 流式细胞仪考察 CUR/DOX micelle 的细胞摄取率, MTT 法考察其对肿瘤细胞的抑制作用。**结果** CUR/DOX micelle 的最佳制备工艺为: 药物和聚己内酯-聚乙二醇-聚己内酯 (PCL-PEG-PCL) 比例为 1:10, 水化温度为 65℃, 超声时间为 6 min; 制得的胶束平均粒径为 150 nm, TEM 结果显示胶束呈球形; 姜黄素的包封率为 85.21%, 载药量为 6.80%, 阿霉素的包封率为 82.92%, 载药量为 1.28%; CUR/DOX micelle 具有良好的稳定性和缓释能力; 体外细胞实验结果显示, CUR/DOX micelle 细胞摄取率升高, 能有效抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖。**结论** CUR/DOX micelle 制备工艺简单且稳定性好, 能有效增强药物的体外抗肿瘤活性。

关键词: 姜黄素; 阿霉素; 胶束; 抗肿瘤活性

中图分类号: R283.6, R944 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)02-0449-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.027

Optimization of preparation and in vitro anti-tumor evaluation of CUR/DOX micelles

LI Fang-chan^{1,2}, WEI Zhi-ying^{1,2}, LUO Xiao-li^{1,2}, PAN Cui-liu^{2,3}, WU Xiu-cai^{2,3}, LIANG Fang-yao³, PAN Zhen-zhen^{1,2*}, LI Yao-hua^{1,2*} (1. Guangxi University of Chinese Medicine, Experimental Teaching Center, Nanning 530200; 2. Key Laboratory of TCM Extraction and Purification and Quality Analysis (Guangxi University of Chinese Medicine), Education Department of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530200; 3. Guangxi University of Chinese Medicine, College of Pharmacy, Nanning 530200)

Abstract: Objective To prepare curcumin and doxorubicin loaded PCL-PEG-PCL micelle (CUR/DOX micelles), optimize the preparation, and evaluate the anti-tumor activity of CUR/DOX micelles in vitro. **Methods** The CUR/DOX micelles were prepared by thin film-hydration-ultrasound method. The preparation technology was optimized by orthogonal test with the particle size, encapsulation efficiency and drug loading as the evaluation parameters. The morphology imaging of CUR/DOX micelles was observed by transmission electron microscopy. The particle size was conducted by a nanoparticle analyzer. The drug-loading rate and encapsulation efficiency of micelle were determined. The stability and release profile in vitro were determined. The cellular uptake of CUR/DOX micelles was measured by flow cytometry and the cytotoxicity was determined by MTT in vitro. **Results** The

基金项目: 广西高校中青年骨干教师科研基础能力提升项目 (No.2019KY0333); 广西高校中青年骨干教师科研基础能力提升项目 (No.2020KY07037); 广西中医药大学校级课题 (No.2019QN006)。

作者简介: 李芳婵, 女, 硕士, 实验师, 主要从事中药、食品研究与开发, email: 1936490308@qq.com *通信作者: 潘真真, 女, 硕士, 实验师, 主要从事中药民族药的质量控制、新剂型研发及抗肿瘤作用研究, email: zhenzhenpan1991@163.com; 李耀华, 男, 硕士, 高级实验师, 主要从事中药民族药的质量控制及医院制剂开发研究, email: yaohuali@163.com

optimal preparation of CUR/DOX micelles was as follows: the drug and PCL-PEG-PCL ratio was 1 : 10, the hydration temperature was 65 °C , and the ultrasound use for 6 min. The optimal mean diameter of micelles was around 150 nm at size and the TEM showed spherical morphology. The encapsulation efficiency and drug loading of curcumin were 85.21% and 6.80%; those of doxorubicin were 82.92% and 1.28%, respectively. The CUR/DOX micelles exhibited good stability and sustained release. In vitro experiments showed CUR/DOX micelles increased the cellular uptake efficiency and enhanced the cytotoxicity in MCF-7 cells effectively. **Conclusion** The preparation method is simple and stable, and CUR/DOX micelles can enhance the anti-tumor activity significantly.

Key words: curcumin; doxorubicin; micelle; anti-tumor activity

目前, 乳腺癌约占女性癌症病例的 24.5%, 占癌症死亡的 15.5%, 发病率和病死率均居首位, 已经成为严重威胁女性健康的恶性肿瘤^[1], 随着生活水平日益提高、环境污染和人口老龄化的加剧, 预计 2070 年新发乳腺癌病例将达到 440 万^[2]。在我国乳腺癌每年新发病例约 27.9 万, 并以每年 2% 的速度递增^[3]。乳腺癌的主流治疗方案一般以化学治疗为主, 配合手术切除和放射治疗的综合治疗, 化疗药物大多是小分子细胞毒性药物, 虽然能杀伤肿瘤细胞, 但选择性和靶向性差, 会对人体正常的组织细胞实行“无差别攻击”, 使患者出现严重的毒副作用, 化疗后期患者的生存质量差, 以至于化疗难以持续, 在临床中的应用有很多局限性^[4-5]。因此, 探索更好的化学治疗方案, 提高乳腺癌治疗水平具有深远的理论和现实意义。

姜黄素 (curcumin, CUR) 是从姜黄根茎中提取的一种脂溶性多酚, 具有抗肿瘤、抗菌、抗抑郁、抗炎、抗氧化等多种药理活性^[6-9]。CUR 的抗肿瘤作用, 在近几年受到国内外的广泛关注, 文献报道其通过调节如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、核转录因子- κ B (nuclear transcription factor, NF- κ B) 及环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 等促炎因子和细胞因子的表达水平而抑制肿瘤细胞的增殖^[10-12]。但因 CUR 为脂溶性多酚, 难溶于水, 口服给药吸收差, 在普通给药方式下 CUR 的生物利用率很低, 限制其临床应用。阿霉素 (doxorubicin, DOX) 是临床一线广谱抗肿瘤药物, 通过激发拓扑异构酶 II 裂解 DNA 从而破坏 DNA 的三级结构, 并触发细胞凋亡途径, 是临床治疗乳腺癌的化疗药物之一^[13-14]。但是, DOX 选择性较差, 临床应用时出现明显的毒副作用, 对心、肝、肾等正常组织和器官造成损伤, 长期使用会引起患者强烈的过

敏反应、心脏毒性和肝脏损伤^[15-17]。联合用药是肿瘤治疗的新方向之一, 将不同作用机制的抗肿瘤药物联合起来, 降低肿瘤对化疗药物的耐药性, 增强化疗药物对肿瘤的杀伤作用^[18-20]。多项研究表明, CUR 与 DOX 联用, 增强了 DOX 的抗肿瘤作用, 降低了 DOX 的给药剂量, 从而降低 DOX 的毒副作用^[21]。体外研究发现 CUR 和 DOX 联合给药, 能够有效提高乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-231 对 DOX 的敏感性, 降低 DOX 的半数抑制浓度 (IC_{50})^[22]。另一研究发现, 在 DOX 耐药细胞中, CUR 和 DOX 联合给药能有效抑制 ABC (ATP-binding cassette) 转运蛋白家族中的外排蛋白 ABCB4 的活性, 从而逆转乳腺癌细胞的 DOX 耐药^[23]。此外, 多项研究发现 CUR 能降低 DOX 诱导的心脏毒性。有研究揭示 CUR 可能是通过消除大鼠的炎症、凋亡、改善 DNA 氧化损伤和调节蛋白质氧化水平来改善 DOX 诱导的心脏毒性^[24]。另有研究发现, 与单用 DOX 给药的小鼠组相比, DOX 和 CUR 联合给药组的小鼠血清心肌酶显著降低, 抗氧化能力提高; 进一步研究发现 CUR 通过 PI3K/Akt/mTOR 通路抑制 DOX 诱导的心肌细胞焦亡^[25]。因此, 研究 DOX 和 CUR 联合用药具有理论和现实意义。

本研究以三嵌段共聚物聚己内酯-聚乙二醇-聚己内酯 (PCL-PEG-PCL) 为载体, 采用薄膜-水化-超声法制备共载姜黄素/阿霉素胶束 (CUR/DOX micelle)。以粒径、包封率和载药量为考察指标, 单因素结合正交实验对 CUR/DOX micelle 制备工艺进行优化, 确定其最优制备工艺条件。对 CUR/DOX micelle 进行表征, 并考察其体外细胞摄取率和抗肿瘤活性。本研究通过制备胶束实现共载姜黄素与阿霉素, 采用联合给药模式发挥协同抗肿瘤作用, 为肿瘤治疗提供新的思路。

1 材料

1.1 仪器

旋转蒸发器 (上海爱朗仪器有限公司); JY92-2D 超声波细胞粉碎仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司); LC2030 高效液相色谱仪、RF-6000 荧光分光光度计 (日本岛津仪器有限公司); EM10 透射电子显微镜 (德国蔡司公司); 纳米粒度分析仪 (美国麦奇克有限公司); FreeZone 2.5 冷冻干燥机 (美国 Labconco 公司); CT 15RE 冷冻离心机 (日本日立公司); Multiskan Sky 型酶标仪 (赛默飞世尔科技公司); LSR Fortessa 流式细胞仪 (BD 公司)。

1.2 试剂

姜黄素原料药 (北京百灵威科技有限公司, 批号: 921105); 姜黄素对照品 (纯度: 99.50%, 成都曼斯特生物科技股份有限公司, 批号: MUST-21022710); 阿霉素 (大连美仑生物技术有限公司, 对其进行脱盐处理); PCL₈₀₀₀-PEG₆₀₀₀-PCL₈₀₀₀ (山东岱罡生物科技股份有限公司); 甲基偶氮唑盐 (MTT, 北京索莱宝科技有限公司, 批号: 829Z0513); 人乳腺癌细胞 MCF-7 (中国科学院上海细胞生物学研究所); 胎牛血清 (美国 Gemini, 批号: A87F82H); 1640 培养基 (赛默飞世尔科技有限公司, 批号: 8120133); 磷酸缓冲盐 (江苏凯基生物技术股份有限公司, 批号: 20211210); 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 CUR/DOX micelle 的制备

采用薄膜-水化-超声法制备 CUR/DOX micelle。称取处方量的 CUR、脱盐 DOX (CUR : DOX = 5 : 1) 和 PCL-PEG-PCL, 加入适量的二氯甲烷-丙酮混合溶液 (1 : 1) 使其溶解后, 减压旋转蒸发除去有机溶剂, 直至在瓶底形成一层橘红色的薄膜。加入适量去离子水, 水浴加热水化。水化后于冰浴中探头超声处理 (250 W), 过 0.22 μm 微孔滤膜除去游离 CUR 和 DOX, 即得。同法制备不含药的空白胶束、单载 CUR 胶束和单载 DOX 胶束。

2.2 CUR 和 DOX 的含量测定

采用高效液相色谱法对 CUR 进行含量测定。色谱条件: 流动相为甲醇-4% 冰醋酸 (48 : 52), 色谱柱为 Hypersil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 检测波长为 430 nm, 柱温 30 °C; 流速 1 mL · min⁻¹; 进样量 10 μL。经方法学验证表明方法的专属性良好; 回归方程为 $Y = 7.79 \times 10^4 X - 5.95 \times 10^3$, $r = 0.9999$ ($n = 5$), CUR 在 21.30 ~ 106.50 μg · mL⁻¹ 内与峰面积线性关系良好。精密度和重复性 RSD 分别为 1.8%、2.1% ($n = 6$); 平均加样

回收率为 99.17%, RSD 为 1.4%。

采用荧光分光光度法对 DOX 含量进行测定 (避光操作), 激发波长为 485 nm, 发射波长为 590 nm, 测定其荧光强度。回归方程为 $Y = 0.2203X + 32.13$, $r = 0.9999$ ($n = 5$), 结果表明 DOX 在 400 ~ 6400 ng · mL⁻¹ 内与峰面积线性关系良好。精密度和重复性 RSD 分别为 1.4%、1.0% ($n = 6$); 平均加样回收率为 99.33%, RSD 为 2.5%。

2.3 包封率和载药量的测定

按“2.1”项下方法制备 CUR/DOX micelle, 并且取出部分进行冷冻干燥。采用高速离心法测定其载药量及包封率, 称取一定量 CUR/DOX micelle, 计为 W_M , 加入一定量甲醇超声 10 min, 超高速离心 10 min (35 000 r · min⁻¹), 取上清液按“2.2”项下方法分别测定 CUR 和 DOX 的含量, 计为 W_S , 投药量记为 $W_{总}$ 。按载药量及包封率的计算公式, 分别计算 CUR 和 DOX 的包封率和载药量。

$$\text{载药量} (\%) = W_S / W_M \times 100\%;$$

$$\text{包封率} (\%) = W_S / W_{总} \times 100\%。$$

2.4 粒径测定

按“2.1”项下方法制备 CUR/DOX micelle, 分散在一定量的去离子水中, 通过纳米粒粒度仪测定其粒径和多分散系数 (PDI), 平行测定 3 次, 取其平均值。

2.5 CUR/DOX micelle 处方工艺优化

2.5.1 正交实验因素和水平 在前期单因素实验基础上, 选取对胶束制备影响较大的因素药物与 PCL-PEG-PCL 的比例 (A)、水化温度 (B)、超声时间 (C) 为考察因素, 每个因素设定 3 个水平, 以粒径、CUR 和 DOX 的平均包封率和平均载药量为评价指标。按照正交实验设计表 L₉ (3⁴) 设计实验, 因素水平表见表 1。

表 1 因素水平表
Tab 1 Factor and level

水平	因素		
	A (CUR + DOX) : PCL-PEG-PCL	B 水化温度 / °C	C 超声时间 / min
1	1 : 5	50	4
2	1 : 10	65	6
3	1 : 15	80	8

2.5.2 正交实验优选制备工艺 按照表 1 的因素和水平进行实验, 考察胶束制备过程中药物与 PCL-PEG-PCL 的比例 (A)、水化温度 (B)、超声时间 (C) 对 CUR/DOX micelle 制备工艺的影响, 最终测定各实验样品胶束的粒径、包封率和载药量。采用加权评分法分析实验结果, 设定胶束粒径的加权

系数为 0.5, 包封率为 0.25, 载药量的加权系数为 0.25, 综合评分值 = (粒径最小值 / 粒径 × 0.5 + 平均包封率 / 平均包封率最大值 × 0.25 + 平均载药量 / 平均载药量最大值 × 0.25) × 100%。

正交实验结果见表 2, 方差分析结果见表 3, 最终优选的条件为 A₂B₂C₂, 即药物与 PCL-PEG-PCL 投料比为 1 : 10, 水化温度为 65 °C, 超声时间为 6 min。因此, CUR/DOX micelle 的制备工艺为: 称取处方量的 CUR、DOX (CUR : DOX = 5 : 1) 和 PCL-PEG-PCL (药物与 PCL-PEG-PCL 投料比为 1 : 10), 加入适量的二氯甲烷 - 丙酮混合溶液 (1 : 1) 使其溶解后, 减压旋转蒸发除去有机溶剂, 直至在瓶底形成一层橘红色的薄膜。加入适量去离子水, 65 °C 水浴加热水化。水化后于冰浴中探头超声处理 6 min (250 W), 过 0.22 μm 微孔滤膜除去游离 CUR 和 DOX, 即得。

2.5.3 处方工艺验证 按照优选工艺制备条件进行 3 批验证实验, 结果图 1A 显示 CUR/DOX micelle 的粒径为 150.0 nm, PDI 为 0.0573 ± 0.02, CUR 载药量为 6.80%, 包封率为 85.21%, DOX 载药量为 1.28%, 包封率为 82.92%。透射电镜 (TEM) 观察 CUR/DOX micelle 的形态特征, 取少量 CUR/DOX micelle 滴至水化后的铜网上, 静置后滤纸吸干, 2% 的磷钨酸负染, 自然挥干, 测定。TEM 结果显示 CUR/DOX micelle 为球形, 大小均一, 结果见图 1B。

2.6 CUR/DOX micelle 稳定性考察

将 CUR/DOX micelle 按体积比 1 : 1 分别分散在去离子水和含 10% 胎牛血清的水溶液中, 于 0、2、4、6、8、12、24、36、48、72 h 分别测定

表 2 正交实验设计及结果 (n = 3)
Tab 2 Orthogonal test design and results (n = 3)

No.	因素				粒径 / nm	包封率 / %	载药量 / %	综合评分
	A	B	C	D				
1	1	1	1	1	154.3	72.11	3.47	91.32
2	1	2	2	2	150.7	80.30	4.06	98.52
3	1	3	3	3	164.7	76.31	3.76	91.25
4	2	1	2	3	156.4	72.36	4.00	94.00
5	2	2	3	1	153.4	85.35	3.71	96.96
6	2	3	1	2	163.8	81.20	3.47	91.15
7	3	1	3	2	162.9	60.91	3.35	84.72
8	3	2	1	3	165.7	78.33	3.53	90.15
9	3	3	2	1	164.2	73.42	3.06	86.24
K ₁	93.72	90.04	90.89	91.39				
K ₂	93.93	95.09	92.93	91.49				
K ₃	87.05	89.57	90.88	91.82				
R	6.87	5.52	2.04	0.43				

表 3 方差分析结果
Tab 3 Variance analysis

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	91.77	2	297.00	19	< 0.05
B	56.26	2	182.06	19	< 0.05
C	8.31	2	26.89	19	< 0.05
D (误差)	0.31	2			

其粒径, 考察其稳定性, 见图 1C。结果显示在水溶液中纳米粒的粒径稳定在 (151.19 ± 1.23) nm, 72 h 内粒径 RSD 为 0.81%; 在含 10% 胎牛血清的水溶液中, 纳米粒的粒径稳定在 (151.47 ± 1.73) nm, 72 h 内粒径 RSD 为 1.1%, 表明在水溶液及含 10% 胎牛血清的水溶液中 CUR/DOX micelle 均具有较好的稳定性。

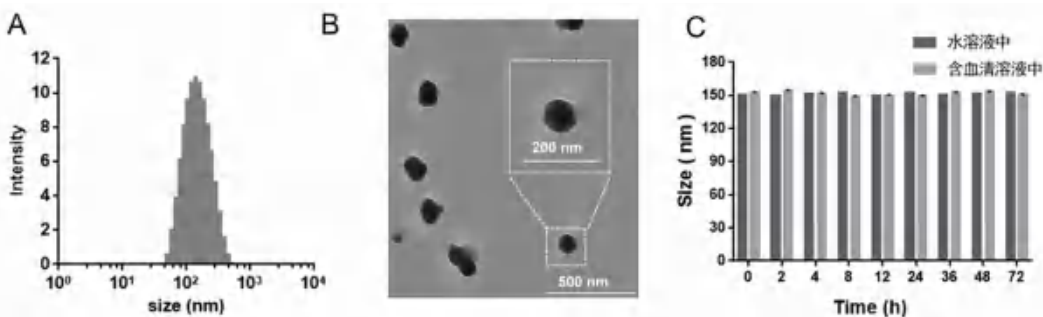


图 1 CUR/DOX micelle 的粒径分布 (A)、TEM (B) 及稳定性 (C)
 Fig 1 Particle size (A), TEM photograph (B) and stability (C) of CUR/DOX micelle

2.7 CUR/DOX micelle 的体外释药行为考察

采用透析法考察胶束的体外释药行为, 为模拟正常体液环境和肿瘤细胞内环境, 选择 pH 7.4 和 pH 5.0 的磷酸缓冲液 (PBS) 作为释放介质, 为保障疏水药物 CUR 和 DOX 的释放介质加入 0.1% 的吐温 80 作为表面活性剂。分别取一定量 CUR/

DOX micelle 置于预处理的透析袋中, 两端封口, 浸于装有释放介质的装置中, 释放温度为 37 °C, 摇床转速为 120 r · min⁻¹。定时取样 (1、2、4、8、10、12、24、36、48、72、96 h), 取样量为 1 mL, 取样后补加相应的 PBS 1 mL。样品按 “2.2” 项下方法分别测定, 计算累积释放率 (n = 3)。

以时间为横坐标, 累积释放率为纵坐标绘制体外释药曲线, 结果见图 2。由体外释药曲线可知, CUR/DOX micelle 表现出较好的缓释作用, 在 pH 7.4 的释放介质中, CUR/DOX micelle 中的 CUR 和 DOX 释放速率比较慢, 24 h 时胶束的 CUR 的累积释放率为 49.38%, DOX 的累积释放率为 40.09%, 96 h 时 CUR 的累积释放率为 64.08%, DOX 的累积释放率为 60.13%, 而在 pH 5.0 的释放介质中, 释放速度明显加快, 96 h 时 CUR 的累积释放率为 84.60%, DOX 的累积释放率为 85.59%, 上述结果表明, 释放介质的 pH 值对 CUR/DOX micelle 影响较大, 这有可能是低 pH 条件下胶束中脂溶性脱盐 DOX 和 CUR, 尤其是脱盐 DOX 在酸性条件下质子化, 溶解度升高, 释放加快。CUR/DOX micelle 的这种 pH 敏感释药行为可以减少 DOX 在体液循环中的释放, 增加其在酸性环境如肿瘤细胞内的释放。

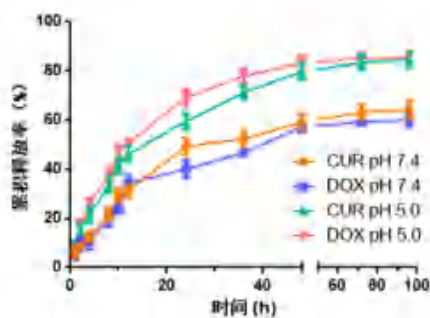


图 2 CUR/DOX micelle 的体外释药曲线
Fig 2 Release profile of CUR/DOX micelle in vitro

2.8 细胞摄取考察

取对数生长期的 MCF-7 细胞, 进行细胞计数并调整细胞密度, 以 5×10^4 /孔的密度接种于 24 孔板中, 进行摄取实验。实验设置分别设置 CUR/DOX micelle 组, 游离脱盐 DOX 组, 并设空白对照组。给药时弃去原培养基, 加入含不同样品及 10% 胎牛血清的细胞培养基, 每孔 0.5 mL, 确保 DOX 质量浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。共孵育 4 h, 吸弃培养基, 胰酶消化并离心收集细胞, 冷 PBS 充分清洗 3 次, 全程避光操作。最后加入 PBS 0.5 mL 重悬细胞, 于流式细胞仪上检测, 测定细胞内的荧光强度, 并计算细胞摄取率, 结果见图 3。可以看出, 与空白对照组相比, 游离脱盐 DOX 组和 CUR/DOX micelle 组中的 DOX 均能进入细胞, 游离 DOX 的摄取效率为 73.9%, 而 CUR/DOX micelle 组的摄取效率为 82.1%, 与游离脱盐 DOX 组相比, CUR/DOX micelle 组的摄取效率明显提高, 表明胶束包

裹 DOX 后能显著提高肿瘤细胞的摄取效果。

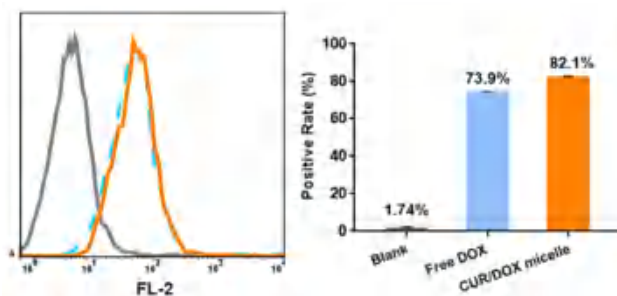


图 3 CUR/DOX micelle 的细胞摄取
Fig 3 Cellular uptake of CUR/DOX micelle

2.9 体外抗肿瘤活性评价

取对数生长期的 MCF-7 细胞, 消化收集并调整密度, 接种于 96 孔板中, 密度为 5×10^3 /孔, 继续培养 24 h 后进行实验。实验设置空白对照组、空白纳米粒组、游离 CUR 组、游离 DOX 组、单载 CUR micelle 组、单载 DOX micelle 组和 CUR/DOX micelle 组, CUR 最终质量浓度为: 0、0.52、1.04、2.08、3.12、4.16、5.20、6.24、8.32、10.40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, DOX 最终质量浓度为: 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.6、2.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 空白纳米粒组采用培养基按给药组相同体积比例进行稀释 ($n = 6$)。继续培养 48 h 后, 加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液 20 μL 继续孵育 4 h, 弃去培养液, 每孔加 0.2 mL 二甲基亚砜, 震荡仪震荡 1 min 后, 酶标仪 490 nm 下测定吸光度值 (OD), 按以下公式计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率}(\%) = (\text{实验组平均 OD 值} - \text{空白纳米粒组平均 OD 值}) / (\text{空白对照组平均 OD 值} - \text{空白纳米粒组平均 OD 值}) \times 100\%$$

实验结果见图 4, 空白纳米粒组在相应的浓度下对 MCF-7 细胞的生长无明显毒性及抑制作用, 可见载体 PCL-PEG-PCL 生物相容性较好。游离 CUR 组、游离 DOX 组、单载 CUR micelle 组、单载 DOX micelle 组和 CUR/DOX micelle 组均有不同程度的抑制肿瘤细胞生长作用, 相较于游离 DOX 组、单载 DOX micelle 组和 CUR/DOX micelle 组, 游离 CUR 组和单载 CUR micelle 组在相应的给药质量浓度下 ($0.52 \sim 10.40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 肿瘤细胞生长抑制作用较弱。通过拟合计算可知, 游离 DOX 组的 IC_{50} 为 $1.24 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 单载 DOX micelle 组的 IC_{50} 为 $1.02 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, CUR/DOX micelle 的 IC_{50} 为 $0.79 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (以 DOX 给药量浓度进行拟合计算), 这表明联合应用 CUR 和 DOX 增强了药物的抗肿瘤作用。

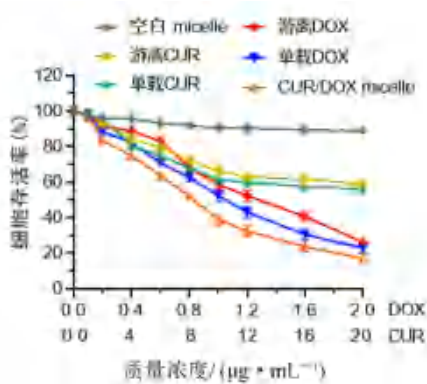


图 4 CUR/DOX micelle 的细胞毒性

Fig 4 Cytotoxicity test of CUR/DOX micelle

根据人乳腺癌 MCF-7 细胞在不同浓度的游离 CUR、游离 DOX 和 CUR/DOX micelle 条件下的存活率, 采用 CompuSyn 软件分析联合药物指数 (CI), 结果见表 4。从 CompuSyn 结果可知, 抑制作用 (F_a) 为 50% 时 CI 值、75% CI 值、90% CI 值及 95% CI 值均小于 1, 表明 CUR 和 DOX 联用具有协同作用。当 CUR 质量浓度大于 $5.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, DOX 质量浓度大于 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 随着药物浓度和抑制率的增加, CI 值逐渐降低, 这表明 CUR 和 DOX 协同作用逐渐增强。

表 4 姜黄素和阿霉素的联合药物指数

Tab 4 Combination index of curcumin and doxorubicin

CUR 质量浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	DOX 质量浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	F_a	CI 值
2.08	0.40	0.25	1.15
3.12	0.60	0.36	1.16
4.16	0.80	0.48	1.08
5.20	1.00	0.61	0.91
6.24	1.20	0.67	0.89
8.32	1.60	0.76	0.87
10.40	2.00	0.83	0.80

2.10 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9 统计软件进行分析, 计量数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 讨论

联合用药是目前肿瘤治疗的新方向, 中药活性成分与化疗药物的作用靶点不同, 两者联用, 从机制的互补、作用的协同、不良反应的减轻等方面发挥协同效应, 提高治疗效果。纳米制剂的主要优势在于其能够包裹溶解性差、稳定性差的药物并将药物传输至体内不同部位, 降低药物的毒副作用。采用纳米技术共载化疗药物和中药活性成分, 能为中药联合化疗药物治疗肿瘤提供新的思路。

本研究以 PCL-PEG-PCL 为载体, 通过薄膜-水化-超声法成功制备了 CUR/DOX micelle, 提高了 CUR 和 DOX 的有效利用度; 有文献报道, 以 PCL-PEG-PCL 制备胶束时, PEG 的分子量大小对纳米胶束的载药量、包封率和稳定性影响比较大, 相较于其他分子量的 PEG (如 PEG₄₀₀₀、PEG₂₀₀₀ 和 PEG₁₀₀₀), PEG₆₀₀₀ 可以提供更加适宜的亲水疏水比例, 制备的胶束载药量、包封率较高且稳定性好^[26-28], 故本研究选择 PEG₆₀₀₀ 作为亲水端。在前期研究中, 采用单因素实验对 PCL-PEG-PCL 分子量、药物与 PCL-PEG-PCL 的比例、有机溶剂的比例、水化温度、超声功率、超声时间等因素进行考察。在对 PCL-PEG-PCL 分子量的单因素实验中分别考察了 PCL₄₅₀₀-PEG₆₀₀₀-PCL₄₅₀₀、PCL₁₀₀₀₀-PEG₆₀₀₀-PCL₁₀₀₀₀ 和 PCL₈₀₀₀-PEG₆₀₀₀-PCL₈₀₀₀, 发现 PCL₈₀₀₀-PEG₆₀₀₀-PCL₈₀₀₀ 制备的胶束最为合适; 在正交实验中, 选择对胶束制备影响较大的因素: 药物与 PCL-PEG-PCL 的比例、水化温度和超声时间作为考察因素进行优化, 得到粒径合适, 分布均匀, 载药量和包封率均较为理想的胶束; 本文采用最优制备工艺制得的 CUR/DOX micelle 的粒径为 (150.0 ± 0.6) nm, 大小均一; 稳定性考察结果表明, 72 h 内胶束在去离子水和含 10% 胎牛血清的水溶液中稳定性良好; 体外释放考察表明 CUR/DOX micelle 具有缓释作用; 细胞摄取结果表明, 在相同浓度下相较于游离 DOX, CUR/DOX micelle 的入胞能力更强, 这有利于更好地发挥抗肿瘤作用; 体外实验结果显示, 对于人乳腺癌 MCF-7 细胞, 载体 PCL-PEG-PCL 无明显的生长抑制作用, CUR/DOX micelle 组的抑制作用强于游离 CUR 组、游离 DOX 组、单载 CUR 组和单载 DOX 组, 这可能是 CUR 和 DOX 联用共同发挥了抗肿瘤作用, 并且制成胶束后有效地提高了药物的入胞能力。采用 CompuSyn 软件分析联合药物指数, 当 CUR 质量浓度大于 $5.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, DOX 质量浓度大于 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, CUR 和 DOX 联用具有协同作用。在后续的工作中, 将进一步研究 CUR/DOX micelle 的活性及抗肿瘤作用机制, 为后续研究奠定基础。

参考文献

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71 (3): 209-249.
 [2] Soerjomataram I, Bray F. Planning for tomorrow: global

- cancer incidence and the role of prevention 2020 — 2070 [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18 (10): 663-672.
- [3] Lei SY, Zheng RS, Zhang SW, et al. Breast cancer incidence and mortality in women in China: temporal trends and projections to 2030 [J]. *Cancer Biol Med*, 2021, 18 (3): 900-909.
- [4] Mitry MA, Edwards JG. Doxorubicin induced heart failure: phenotype and molecular mechanisms [J]. *Int J Cardiol*, 2016, 10: 17-24.
- [5] Florea AM, Busselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects [J]. *Cancers*, 2011, 3: 1351-1371.
- [6] Prajapati J, Rao P, Poojara L, et al. Unravelling the anti-fungal mode of action of curcumin by potential inhibition of CYP51B: a computational study validated in vitro on mucormycosis agent, *Rhizopus oryzae* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2021, 712: 109048-109048.
- [7] Shehzad A, Lee YS. Molecular mechanisms of curcumin action: signal transduction [J]. *BioFactors*, 2013, 39 (1): 27-36.
- [8] 汪燕, 王金梦, 马浩, 等. 姜黄素抗抑郁作用的研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38 (13): 1461-1465.
- [9] Aneva N, Savova G, Ivanova I, et al. Anti-inflammatory effect of curcumin in peripheral blood mononuclear cells pretreated with LPS [J]. *Gen Med*, 2021, 23 (1): 15-21.
- [10] Liu GP, Wang YF, Li MJ. Curcumin sensitized the antitumor effects of irradiation in promoting apoptosis of oesophageal squamous-cell carcinoma through NF- κ B signalling pathway [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2018, 70 (10): 1340-1348.
- [11] Shrestha S, Zhu JB, Wang Q, et al. Melatonin potentiates the antitumor effect of curcumin by inhibiting IKK β /NF- κ B/COX-2 signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2017, 51 (4): 1249-1260.
- [12] Zhang J, Du Y, Wu C, et al. Curcumin promotes apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through miR-186 signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2010, 24 (5): 1217-1223.
- [13] Baselga J, Manikhas A, Cortés J, et al. Phase III trial of nonpegylated liposomal doxorubicin in combination with trastuzumab and paclitaxel in HER2-positive metastatic breast cancer [J]. *Ann Oncol*, 2014, 25 (3): 592-598.
- [14] Liu HN, Guo NN, Guo WW, et al. Delivery of mitochondriotropic doxorubicin derivatives using self-assembling hyaluronic acid nanocarriers in doxorubicin-resistant breast cancer [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39 (10): 1681-1692.
- [15] Mitry MA, Edwards JG. Doxorubicin induced heart failure: phenotype and molecular mechanisms [J]. *Int J Cardiol*, 2016, 10: 17-24.
- [16] Gianni L, Salvatorelli E, Minotti G. Anthracycline cardiotoxicity in breast cancer patients: synergism with trastuzumab and taxanes [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2007, 7 (2): 67-71.
- [17] Fogli S, Nieri P, Breschi MC. The role of nitric oxide in anthracycline toxicity and prospects for pharmacologic prevention of cardiac damage [J]. *Faseb J*, 2004, 18: 664-675.
- [18] Cheng X, Li DP, Sun M, et al. Co-delivery of DOX and PDTTC by pH-sensitive nanoparticles to overcome multidrug resistance in breast cancer [J]. *Colloid Surface B*, 2019, 181: 185-197.
- [19] Zhao MD, Li JQ, Chen FY, et al. Co-delivery of curcumin and paclitaxel by “Core-Shell” targeting amphiphilic copolymer to reverse resistance in the treatment of ovarian cancer [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 9453-9467.
- [20] Astani S, Salehi R, Massoumi B, et al. Co-delivery of cisplatin and doxorubicin by carboxylic acid functionalized poly (hydroxyethyl methacrylate) /reduced graphene nanocomposite for combination chemotherapy of breast cancer cells [J]. *Biomater Sci Polym Ed*, 2020, 32 (5): 657-677.
- [21] Deng SL, Yang XH, Li X, et al. Co-delivery of doxorubicin and curcumin by polymeric micelles for improving antitumor efficacy on breast carcinoma [J]. *RSC Adv*, 2014, 4 (87): 46737-46750.
- [22] Sadzuka Y, Nagamine M, Toyooka T, et al. Beneficial effects of curcumin on antitumor activity and adverse reactions of doxorubicin [J]. *Int J Pharm*, 2012, 432 (1-2): 42-49.
- [23] Wen C, Fu L, Huang J, et al. Curcumin reverses doxorubicin resistance via inhibition the efflux function of ABCB4 in doxorubicin-resistant breast cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19 (6): 5162-5168.
- [24] Benzer F, Kandemir FM, Ozkaraca M, et al. Curcumin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by abrogation of inflammation, apoptosis, oxidative DNA damage, and protein oxidation in rats [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2018, 32 (2): 22030-22037.
- [25] Yu W, Qin X, Zhang Y, et al. Curcumin suppresses doxorubicin-induced cardiomyocyte pyroptosis via a PI3K/Akt/mTOR-dependent manner [J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2020, 10 (4): 752-769.
- [26] 孙敏捷, 张乐洋, 平其能. 长春碱 PCL-PEG-PCL 纳米粒的制备及质量评价 [J]. *中国药科大学学报*, 2010, 41 (1): 29-34.
- [27] Kheiri Manjili H, Sharafi A, Attari E, et al. Pharmacokinetics and in vitro and in vivo delivery of sulforaphane by PCL-PEG-PCL copolymeric-based micelles [J]. *Artif Cell Nanomed B*, 2017, 45 (8): 1728-1739.
- [28] Ramazani A, Keramati M, Malvandi H, et al. Preparation and in vivo evaluation of anti-plasmodial properties of artemisinin-loaded PCL-PEG-PCL nanoparticles [J]. *Pharm Dev Technol*, 2018, 23 (9): 911-920.

(收稿日期: 2022-10-26; 修回日期: 2022-11-28)

综述

黄芩素对糖尿病心肌病保护作用的机制研究及临床应用进展

孙玉凤¹, 葛卓琦³, 白雪^{1, 2, 3}, 陈琦^{1, 2, 3*} (1. 贵州中医药大学, 贵阳 550025; 2. 贵州省人民医院, 贵阳 550002; 3. 贵州医科大学, 贵阳 550025)

摘要: 糖尿病心肌病 (DCM) 是 2 型糖尿病最常见的并发症之一, 其发病机制较为复杂。目前临床上的治疗手段包括生活方式的干预和降糖药物的使用, 但仍然缺乏长期有效的治疗药物。黄芩素是天然的黄酮类成分, 具有抗氧化、抗炎、降血糖、调节免疫、防治心血管疾病等作用, 对糖尿病相关并发症也有治疗作用。本文结合国内外最新文献重点论述黄芩素对 DCM 潜在的保护机制与黄芩及含有黄芩方剂在此病中的临床应用, 揭示黄芩素在 DCM 治疗方面的开发潜力, 为后续的深入研究和开发利用提供科学依据。

关键词: 糖尿病心肌病; 黄芩素; 黄芩方剂; 作用机制; 临床应用

中图分类号: R28

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0456-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.028

Protective mechanism of baicalein on diabetic cardiomyopathy and prospective clinical application

SUN Yu-feng¹, GE Zhuo-qi³, BAI Xue^{1, 2, 3}, CHEN Qi^{1, 2, 3*} (1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025; 2. People's Hospital of Guizhou, Guiyang 550002; 3. Guizhou Medical University, Guiyang 550025)

Abstract: Diabetic cardiomyopathy (DCM) is a common complication of type 2 diabetes mellitus, with complex pathogenesis. The current clinical treatments include lifestyle intervention and hypoglycemic drugs, lacking in long-term effective drugs. Baicalein is a natural flavonoid, which has antioxidant, anti-inflammatory, hypoglycemic function, and immune regulation, prevention and treatment of cardiovascular diseases and diabetes-related complications. This paper discussed the latest literatures at home and abroad, the potential protective mechanism of baicalin to diabetic cardiomyopathy and clinical application of *Scutellaria baicalensis* Georgi and its compound preparation on diabetic cardiomyopathy. The potential of baicalein in the treatment of diabetic cardiomyopathy is revealed, which provides scientific basis for further research and development.

Key words: diabetic cardiomyopathy; baicalein; formula of *Scutellaria baicalensis* Georgi; mechanism of action; clinical treatment

糖尿病心肌病 (diabetic cardiomyopathy, DCM) 是指发生于糖尿病患者, 但是不能用高血压性心脏病、冠状动脉粥样硬化性心脏病、心脏瓣膜病及其他心脏病变来解释的心肌疾病^[1], 其病理表现为心脏肥大、心肌细胞凋亡和纤维化、心脏功能障碍等^[2-3]。DCM 在糖尿病的心血管并

发症中具有较高的发病率和严重的不良预后, 且其病理机制十分复杂, 至今还未完全阐明, 已引起国内外学者的广泛关注^[4]。当前研究结果显示, DCM 发病原因主要与氧化应激、炎症反应、亚硝化/硝化应激、线粒体功能损伤、内质网应激、自噬损伤、心肌细胞凋亡和死亡以及糖尿病微血

基金项目: 贵州省卫生健康委员会科学技术基金项目 (No.gzwbkj2021-461); 贵州省人民医院青年基金项目 (No.GZSYQN[2016]17 号)。

作者简介: 孙玉凤, 女, 硕士研究生, 主要从事中药药理学基础研究, email: 2498205310@qq.com *通信作者: 陈琦, 女, 副主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事临床药学和中药药理学基础研究, email: 241081573@qq.com

管病有关^[3, 5-6]。此外,有研究表明,胰岛素信号与心脏能量被破坏、肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)激活血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)的形成增多及心脏自主神经病变等密切相关;一氧化氮(NO)生物利用度降低、晚期糖基化终末产物(AGEs)升高及心肌细胞钙处理失调等对DCM亦有重要意义^[7-9],DCM的病理生理机制见图1。



图1 糖尿病心肌病的病理生理机制^[7]
Fig 1 Pathophysiology of diabetic cardiomyopathy^[7]

目前针对DCM的治疗方法主要包括两种:一种是生活方式干预和药物治疗联合;另一种为降糖药物治疗^[10],如二甲双胍、胰岛素等,但此类药物的使用并不能有效控制高血糖引起的心肌病变,相反,长期使用降糖药物会产生胰岛素抵抗,最终导致控制条件恶化^[11]。此外,临床上治疗DCM的一些新药,如钠-葡萄糖协同转运蛋白-2抑制剂(sodium-dependent glucose transporter-2, SGLT-2)、二肽基肽酶-4(dipeptidyl peptidase-4, DPP-4)和胰高血糖素样肽-1激动剂(glucagon-like peptide-1, GLP-1)等也可以控制糖尿病患者的血糖,并具有改善心力衰竭的作用^[12-13]。但这些药物存在严重的不良反应,例如,SGLT-2抑制剂具有高度生殖系统损害和酮症酸中毒反应等特点^[13],DPP-4和GLP-1激动剂则会出现低血糖、恶心呕吐及腹泻等不良反应^[14]。鉴于此,很有必要研究治疗和控制DCM发生发展的替代疗法。

类黄酮是最常见的植物酚类化合物,它们在医学和其他生物活性方面表现出不同的治疗潜力^[15-18]。黄酮类化合物在缓解DCM或其他糖尿病心血管并发症方面的潜力通常与其抗高血糖、高血脂、抗氧化、抗炎和抗凋亡的活性有关^[19-22]。近年来,有报道研究并评估了几种黄酮类化合物对阿霉素诱导的大鼠心肌保护作用,发现黄芩素在心肌细胞损伤中具有较强的保护作用^[23]。黄芩素是黄芩

(*Scutellaria baicalensis* Georgi)根部提取物,其化学名称为5,6,7-三羟基黄酮(5,6,7-trihydroxyflavone,见图2)^[24],是天然黄酮类化合物。黄芩素具有抗氧化、抗炎、清除自由基、调节免疫、防治心血管疾病等药理活性^[25-26],对于糖尿病并发症也有一定的治疗作用。因此,本文基于黄芩素的药理作用,归纳并总结出黄芩素对DCM潜在的保护机制,并且介绍黄芩及含有黄芩方剂在治疗该病中的临床应用,揭示了黄芩素治疗DCM的发展潜能,为其今后进一步研究与开发应用提供了科学依据。

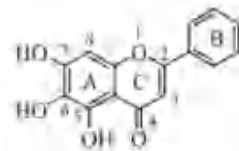


图2 黄芩素结构
Fig 2 Structure of baicalin

1 黄芩素对DCM潜在的保护机制

1.1 降低血糖

糖尿病患者体内持续的高血糖可导致心肌细胞凋亡,左心室收缩、舒张功能障碍,进而诱发DCM,最终导致心肌组织广泛灶性坏死,增加心率失常、心力衰竭、心源性休克,从而增加糖尿病患者的猝死风险^[27]。

据报道,类黄酮类和其他多酚可有效抑制 α 淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶活性,并改善糖尿病动物模型和人们体内的餐后血糖^[28],其作用和阿卡波糖功能相似^[29]。研究显示,黄芩水提物单独使用或与其他药物联合使用时能降低大鼠血糖,其机制可能与肝脏中胰岛素信号通路PI3K/Akt有关,激活该通路可使胰岛素受体(insulin receptor, InsR)、IRS-1、PI3K、Akt和GLUT-2的蛋白表达显著升高,影响2型糖尿病大鼠葡萄糖吸收;还能通过抑制糖异生、糖原分解,促进糖酵解及糖原生成来抑制肝葡萄糖输出^[30]。Zhao等^[31]研究发现黄芩水提物可通过调整回肠法尼酯X受体(farnesoid X receptor, FXR)介导的肠道微生物群与胆汁酸(BA)代谢之间的相互作用来发挥降血糖作用。Xi等^[32]表明黄芩素能增加肝糖原含量,降低血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平,起到降血糖的作用。此外,Yang等^[33]研究发现低浓度黄芩素($1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)能明显增加胰岛素抵抗HepG2细胞的葡萄糖消耗量,其机制可能是通过调节InsR/IRS-1/PI3K/Akt信号通路,抑制糖异生,提高丙酮酸激酶(PK)和葡萄糖激酶(GCK)活性从而促进糖酵解。Dong等^[34]采用高糖诱导刺激人肝细胞HL-7702,使用 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芩素处理高

糖刺激 HL-7702 细胞, 发现 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的黄芩素能提高核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nrf2) 蛋白水平和骨骼肌中能量消耗相关基因的表达, 降低肝脏中糖异生相关基因的表达^[35], 并通过减少葡萄糖或糖原的生成起到降血糖的作用。除此之外, 黄芩素还可以利用肠道微生物抑制淀粉水解来调节短链脂肪, 从而降低血糖^[36]。由此可知, 黄芩素可通过抑制血糖的生成和机体对血糖的吸收、影响肠道菌群和代谢产物来调节血糖浓度。

1.2 调节脂代谢

心肌细胞中异常的脂质代谢在 DCM 相关的病理性结构和功能变化的发生和发展中起着关键的作用^[37]。脂质以脂滴的形式积累, 作为进一步代谢需求的能量沉积物^[38]。脂质积累导致细胞内稳态失调被称为脂毒性, 可通过激活代谢、炎症和氧化途径引发细胞死亡^[39]。Yan 等^[40]研究表明, 黄芩总黄酮可抑制胆固醇 7α -羟化酶 (CYP7A1) 的表达来减少肝脏和 BA 脂质的积累; 黄芩水提物则通过降低肝脏中总胆固醇 (TG) 和低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平及增加高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 水平来调节肝脏脂代谢。Sun 等^[41]发现, 黄芩素通过活化 AMP 活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 和抑制固醇 [激素] 调节元件结合蛋白 (sterol regulatory element-binding protein, SREBP) 的裂解使肝脏脂肪积累减少。在糖尿病前期, 黄芩素及其代谢物可抑制新生脂肪生成, 减少肝细胞因子分泌及脂质的积累, 起到降血脂的作用^[42]。此外, AMPK 作为调节脂肪酸、胆固醇的合成及三酰甘油分解的重要因子^[43], 激活 AMPK 通路可影响心肌细胞的生理病理过程^[44]。有研究表明, 黄芩素可活化 AMPK, 抑制下游 MAPK/NF- κ B 途径减少活性氧 (ROS) 的产生、钙离子的过载和细胞凋亡, 对心肌细胞起到保护作用^[45]。

综上所述, 黄芩素及黄芩提取物对糖尿病脂代谢有良好的调节作用, 但黄芩素能否通过影响脂质代谢和合成对心肌起到保护作用, 及其治疗 DCM 的作用机制尚需进一步研究。

1.3 抗炎

心脏炎症是 DCM 发展的原因之一^[46]。炎症被认为是在对细胞受到应激时恢复细胞稳态的适应反应^[47]。然而, 当糖尿病患者受到持续的应激时, 这种适应性反应会产生破坏影响。有研究表明, TNF- α 、白细胞介素- 1β (IL- 1β) 和白细胞介素-6 (IL-6) 均在心肌细胞肥大中起到主要作用^[48]。持续的高血糖可以激活 MAPK 通路 (JNK 和 p38MAPK) 诱导炎症因子在心脏中的表达, 引

起心脏损伤^[49]。此外, 升高血液中的脂质水平能激活 Toll 样受体-4 (TLR4) / 核因子- κ B (NF- κ B) 途径, 增强心脏炎症反应^[50]。

研究表明, 黄芩素可以显著抑制 MAPK 和 NF- κ B 及其下游的 TLR4, 减少炎症因子的产生^[51-52]。黄芩素除了能抑制 MAPKs 途径外还可激活 IRS-1/PI3K/Akt 途径, 减少炎症因子的生成。同样在链脲佐菌素 (STZ) 诱导的 DCM 大鼠中, 与对照组相比, 黄芩素组以剂量依赖性的方式增强超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性, 降低 NADPH 氧化酶 (NADPH oxidase, NOX) 表达和丙二醛 (MDA) 含量, 使炎症产生减少, 其作用机制与 PI3K/Akt 信号通路有关^[53]。另有研究发现, 黄芩素可降低促炎因子 IL-6 和白细胞介素-8 (IL-8) 水平, 且能通过调节 NO、抑制内皮炎症和氧化应激来减少心肌细胞凋亡^[54]。由此可知, 黄芩素对 DCM 的保护作用与抑制炎症、氧化应激和多种信号传导途径有关^[55]。

1.4 抗氧化

ROS 是糖尿病并发症的一个重要因素。在心肌细胞中, ROS 可能通过单胺氧化酶 (MAO) 或者钙蛋白酶在电子传递链 (ETC) 的线粒体中产生^[56]。此外, 还有特定的酶如黄嘌呤氧化酶、脂氧合酶和 NOX 等均可以产生 ROS^[57]。然而, 当 ROS 过多或降解不足时可能会引起 DNA、蛋白质和脂质的损伤, 进而使细胞产生不可逆的损伤和死亡, 引起心脏功能障碍, 此反应过程被定义为氧化应激。氧化应激会对蛋白质、核酸和脂质产生损伤, 导致细胞结构、生理和代谢机制破坏及调节异常, 促使 DCM 快速发展^[58]。

有研究表明, 黄芩素可以抑制 ROS 生成, 可能是与黄芩素属于酚类抗氧化剂, 能够通过自由基捐赠氢原子来转移电子自由基有关^[59]。此外, 黄芩素可以激活 SOD、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的活性, 抑制脂质过氧化从而减少 ROS 的生成, 起到抗氧化作用^[60]。在 2 型糖尿病小鼠中, 黄芩素抗氧化活性与下调蛋白激酶 R 样 ER 激酶 (PERK)、上调 Nrf2 途径以缓解氧化应激和细胞凋亡有关^[34]。而在一些体外研究中, 黄芩素对氧化应激损伤同样显示出保护作用^[61]。在经 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞中, 黄芩素以剂量依赖性的方式抑制 ROS 生成和脂质过氧化, 下调 RIPK1/RIPK3 蛋白的表达, 提高细胞存活率^[62]。此外, 黄芩素还可以通过稳定 Hsc70 相互作用蛋白 (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein, CHIP) 来抑制心肌细胞的坏死, 促进心肌细胞中 RIPK1/RIPK3 的泛素化和降解, 从而产生心脏保护作用^[63]。

1.5 改善胰岛素抵抗

Min 等^[64]将饮食诱导的肥胖小鼠腹腔注射给予 20 mg · kg⁻¹ 黄芩素，每日一次，持续 21 d，发现黄芩素可以减少空腹血糖 (FBG)、胰腺 β 细胞凋亡和功能障碍，还可以促进 GLUT4 易位，以防止胰岛素抵抗和 2 型糖尿病的发生。其主要作用机制与 PGC-1α 和 pAKT 的上调以及脂肪细胞中 pP38MAPK 和 pERK 的下调有关。另有研究发现，黄芩素还可以抑制 α-葡萄糖苷酶，并下调下游炎症因子的表达，其改善胰岛素抵抗的作用机制与抑制炎症信号通路密切相关^[65]。黄芩素对营养肥胖的大鼠模型具有良好的减肥效果，可通过改善饮食诱导的瘦素抵抗作用、增加靶器官对胰岛素的敏感性，使胰岛素抵抗作用得到改善^[66]；另外，黄芩素还能增加 IRS-1 和 AKT1 的磷酸化水平，降低细胞因子信号传导 3 (SOCS3) 的表达，使 GSK3β 的磷酸化减少，并增加肝糖原水平来改善胰岛素抵抗；动物实验表明，黄芩素可以通过调节 MAPK/PI3K/Akt 信号通路来改善 2 型糖尿病大鼠的葡萄糖和脂肪代谢，从而改善胰岛素抵抗^[30]。

总之，黄芩素可以通过降低血糖和脂质、保护胰腺 β 细胞以及增加靶器官对胰岛素的敏感性来改善胰岛素抵抗。黄芩素还可以通过其抗炎和抗氧化特性降低胰岛素的抵抗指数，主要是通过调节 MAPK/PI3K/Akt 信号通路。黄芩素对 DCM 的潜在保护作用机制见图 3。

2 临床应用

DCM 在中医学中归属于“消渴病”“心悸”“胸痹”等范畴^[67]。糖尿病阴虚燥热经久不愈，逐渐涉及于心，影响心神、心脉、心体，因此可选用苦寒清热的药物来治疗。

2.1 黄芩的临床应用

邢颖等^[68]统计中国中医科学院中医药中心临床数据库，收集到 2843 例 2 型糖尿病患者门诊中药处方的用药规律，发现清热药居首位，单味药黄芩使用频次仅次于黄连。根据《糖尿病心肌病证结合诊疗指南》(2021 年版)，黄芩具有泻火燥湿、解毒宁心的功效，可用于治疗中度阴虚火旺型的 DCM 及热毒炽盛引起的心律失常^[67]。

2.2 含黄芩方剂的临床应用

全小林教授^[69-70]临床上善用不同剂量的葛根芩连汤来治疗糖尿病湿热蕴脾证，且具有较好的治疗效果。黄煌教授^[71]则以该方作为治疗糖尿病的基本方，应用于心悸、胸闷、失眠多梦等症状的糖尿病患者。临床数据统计，全小林教授^[72]运用干姜黄芩黄连人参汤治疗 80 例 2 型糖尿病患者，发现其有效率达到 71%，治疗前后实验室指标水

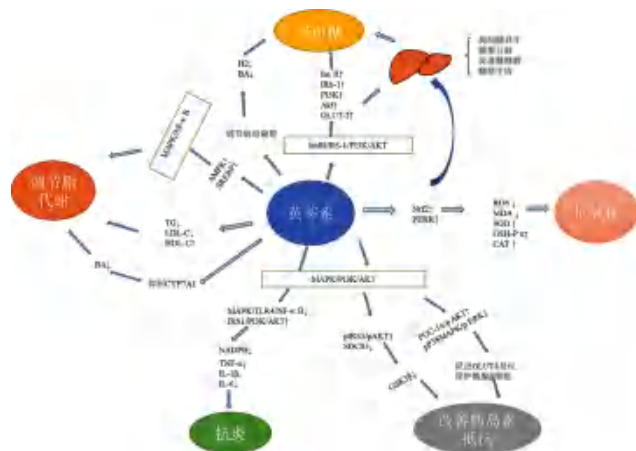


图3 黄芩素对 DCM 潜在的保护机制

Fig 3 Potential protective mechanism of baicalein on diabetic myocardium

平得到改善，其中黄芩和干姜常作药对使用，治疗口干、乏力伴有心悸、心慌的糖尿病患者。卜献春教授^[73]采用当归六黄汤加减方，治疗 DCM 早期患者，从而改善由气阴两虚、火毒伤络导致的该类患者心慌、心悸、胸闷等症状。

3 展望

随着糖尿病发病率的逐年升高，由其引发的心血管疾病也明显增多。目前，临床上尚无确切的预防和治疗方案，导致部分患者最后发展为 DCM，增加了糖尿病患者的死亡风险。因此，研发新的 DCM 针对性药物迫在眉睫，本文主要从黄芩素对 DCM 潜在药理作用、黄芩及含黄芩的方剂在糖尿病及其并发症的临床应用角度出发，揭示黄芩素在 DCM 治疗方面的开发潜力。DCM 发病机制较为复杂，而黄芩素作为传统的中药提取物，对多种原因导致的心肌细胞均具有保护作用，体现了良好的开发利用价值，但黄芩素对 DCM 的保护机制尚需进一步研究阐明，相信在不久的将来，黄芩素能作为一种新型的药物治疗 DCM 的治疗。

参考文献

- [1] Stefania P, Fabio M, Maria P, et al. Diabetic cardiomyopathy: definition, diagnosis, and therapeutic implications [J]. Heart Fail Clin, 2019, 15 (3): 341-347.
- [2] Ernande L, Bergerot C, Rietzschel ER, et al. Diastolic dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus: is it really the first marker of diabetic cardiomyopathy? [J]. J Am Soc Echocardiogr, 2011, 24 (11): 1268-1275.
- [3] Zhang JR, Sun HJ. Roles of circular RNAs in diabetic complications: from molecular mechanisms to therapeutic potential [J]. Gene, 2020, 763 (5): 145066.
- [4] Pikkemaat M, Melander O, Hjerpe P, et al. Prediction of treatment response in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: the skaraborg diabetes register [J]. J Diabetes Com-

- plications, 2017, 31 (5): 854-858.
- [5] Bugger H, Abel ED. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy [J]. *Diabetologia*, 2014, 57 (4): 660-671.
 - [6] Varga ZV, Giricz Z, Liaudet L, et al. Interplay of oxidative, nitrosative/nitrative stress, inflammation, cell death and autophagy in diabetic cardiomyopathy [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2015, 1852 (2): 232-242.
 - [7] Jia G, Hill MA, Sowers JR. Diabetic Cardiomyopathy: an update of mechanisms contributing to this clinical entity [J]. *Circ Res*, 2018, 122 (4): 624-638.
 - [8] Jia G, Whaley-Connell A, Sowers JR. Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia-and insulin-resistance-induced heart disease [J]. *Diabetologia*, 2018, 61 (1): 21-28.
 - [9] Shah AK, Dhalla NS, Tappia PS. Role of oxidative stress in metabolic and subcellular abnormalities in diabetic cardiomyopathy [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (7): 2413.
 - [10] Pharmacologic approaches to glycemic treatment: standards of medical care in diabetes-2021 [J]. *Diabetes Care*, 2021, 44 (Suppl 1): S111-S124.
 - [11] 周国坚, 谌剑飞. 胰岛素治疗糖尿病不良反应的临床分析 [J]. *中国医药导报*, 2011, 8 (28): 64-66.
 - [12] 王维波, 陈华, 孙建华, 等. 2017~2019 年山东省降糖药致严重不良反应回顾性分析 [J]. *中国合理用药探索*, 2022, 19 (5): 35-41.
 - [13] 洪庆霞, 梅文柳, 刘文雅, 等. 钠-葡萄糖协同转运蛋白功能与作用研究进展 [J]. *中南药学*, 2021, 19 (9): 1757-1765.
 - [14] 张恩景, 李玉萍. 长效胰高血糖素样肽-1 受体激动剂索马鲁肽 [J]. *中南药学*, 2018, 16 (6): 817-820.
 - [15] Xiao J. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: which show better biological significance? [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017, 57 (9): 1874-1905.
 - [16] Ycl A, Syc A, Wan Y, et al. New flavonoid-based compound synthesis strategy for antihypertensive drug development [J]. *Life Sci*, 2020, 249: 117512.
 - [17] Bailly C. Molecular and cellular basis of the anticancer activity of the prenylated flavonoid icaritin in hepatocellular carcinoma [J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 325: 109124.
 - [18] Qiu ZP, Lin L, Dai N, et al. Flavonoid extract of hawthorn (*Crataegus oxyacantha* L.) fruit alleviates oxidative stress, inflammation and vascular dysfunction in L-NAME-induced hypertensive rats [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2020, 34 (6): 2271-2276.
 - [19] Ghorbani A. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 96: 305-312.
 - [20] Musolino V, Gliozzi M, Scarano F, et al. Bergamot polyphenols improve dyslipidemia and pathophysiological features in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1): 2565.
 - [21] Garcia JP, Santana A, Baruqui DL, et al. The cardiovascular effects of chocolate [J]. *Rev Cardiovasc Med*, 2018, 19 (4): 123-127.
 - [22] Maleki SJ, Crespo JF, Cabanillas B. Anti-inflammatory effects of flavonoids [J]. *Food Chem*, 2019, 299: 125124.
 - [23] Psotová J, Chlopciková S, Miketová P, et al. Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes. Part II. caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids [J]. *Phytother Res*, 2010, 18 (7): 516-521.
 - [24] 邱爽, 牟佳佳, 邓雁如. 黄芩素的结构修饰及其药理活性研究进展 [J]. *中国药物化学杂志*, 2021, 31 (5): 390-399.
 - [25] 雷奇林, 黄雅兰, 钟茜, 等. 基于网络药理学的黄芩抗炎作用机制研究 [J]. *中草药*, 2018, 49 (15): 3523-3530.
 - [26] 王雅芳, 李婷, 唐正海, 等. 中药黄芩的化学成分及药理研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33 (1): 206-211.
 - [27] 闫毅凤, 谭志鹏, 刘海琼, 等. 葡萄糖预处理对大鼠心肌细胞糖毒性损伤的保护作用 [J]. *解放军医学杂志*, 2018, 43 (9): 746-751.
 - [28] Kumar S, Mittal A, Babu D, et al. Herbal medicines for diabetes management and its secondary complications [J]. *Curr Diabetes Rev*, 2021, 17 (4): 437-456.
 - [29] Barber E, Houghton MJ, Williamson G. Flavonoids as human intestinal α -glucosidase inhibitors [J]. *Foods*, 2021, 10 (8): 1939.
 - [30] Cui X, Qian DW, Jiang S, et al. Scutellariae radix and coptidis rhizoma improve glucose and lipid metabolism in Mrats via regulation of the metabolic profiling and mapk/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Mol Sci*, 2019, 19 (11): 3634.
 - [31] Zhao L, Ma P, Peng Y, et al. Amelioration of hyperglycaemia and hyperlipidaemia by adjusting the interplay between gut microbiota and bile acid metabolism: radix Scutellariae as a case [J]. *Phytomedicine*, 2021, 83: 153477.
 - [32] Xi YL, Li HX, Chen C, et al. Baicalin attenuates high fat diet-induced insulin resistance and ectopic fat storage in skeletal muscle, through modulating the protein kinase B/Glycogen synthase kinase 3 beta pathway [J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14 (1): 48-55.
 - [33] Yang Z, Huang W, Zhang J, et al. Baicalein improves glucose metabolism in insulin resistant HepG2 cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 854: 187-193.
 - [34] Dong YS, Xing Y, Sun J, et al. Baicalein alleviates liver oxidative stress and apoptosis induced by high-level glucose through the activation of the PERK/Nrf2 signaling pathway [J]. *Molecules*, 2020, 25 (3): 599.
 - [35] Uruno A, Furusawa Y, Yagishita Y, et al. The Keap1-Nrf2 system prevents onset of diabetes mellitus [J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33 (15): 2996-3010.
 - [36] 杨帆. 黄芩素和阿卡波糖体外调控糖尿病鼠肠道菌群 [D]. 大连: 大连理工大学, 2020.
 - [37] Sun X, Pan H, Tan H, et al. High free fatty acids level related with cardiac dysfunction in obese rats [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2012, 95 (2): 251-259.
 - [38] Wilfling F, Haas JT, Walther TC, et al. Lipid droplet biogenesis [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2014, 29: 39-45.
 - [39] Bobulescu I A. Renal lipid metabolism and lipotoxicity [J]. *Curr Opin Nephrol Hy*, 2010, 19 (4): 393-402.
 - [40] Yan X, Zhang Y, Peng Y, et al. The water extract of radix scutellariae, its total flavonoids and baicalin inhibited CYP7A1 expression, improved bile acid, and glycolipid metabolism in T2DM mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 293: 115238.
 - [41] Sun W, Liu P, Wang T, et al. Baicalein reduces hepatic

- fat accumulation by activating AMPK in oleic acid-induced HepG2 cells and high-fat diet-induced non-insulin-resistant mice [J]. *Food Funct*, 2020, 11 (1): 711-721.
- [42] Xing Y, Ren X, Li X, et al. Baicalein enhances the effect of acarbose on the improvement of nonalcoholic fatty liver disease associated with prediabetes via the inhibition of De Novo Lipogenesis [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69 (34): 9822-9836.
- [43] Cokorinos EC, Delmore J, Reyes AR, et al. Activation of skeletal muscle AMPK promotes glucose disposal and glucose lowering in non-human primates and mice [J]. *Cell Metab*, 2017, 25 (5): 1147-1159.
- [44] 周凡, 方伟, 祝光礼. 参附强心合剂对心衰大鼠心肌能量代谢 AMPK-PGC-1 α 通路的影响 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 2018, 28 (10): 834-837.
- [45] Chen HM, Hsu JH, Liou SF, et al. Baicalein, an active component of *Scutellaria baicalensis* Georgi, prevents lysophosphatidylcholine-induced cardiac injury by reducing reactive oxygen species production, calcium overload and apoptosis via MAPK pathways [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 9 (14): 233.
- [46] Reis F, Nunes, Soares, et al. The role of inflammation in diabetic cardiomyopathy [J]. *J Interf Cytok Res*, 2012, 4 (1): 59-73.
- [47] Al-Rasheed NM, Al-Rasheed NM, Hasan IH, et al. Simvastatin ameliorates diabetic cardiomyopathy by attenuating oxidative stress and inflammation in rats [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 1092015.
- [48] Prabhu SD, Frangogiannis NG. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: from inflammation to fibrosis [J]. *Circ Res*, 2016, 119 (1): 91-112.
- [49] Tourki B, Halade G. Leukocyte diversity in resolving and nonresolving mechanisms of cardiac remodeling [J]. *Faseb J*, 2017, 31 (10): 4226-4239.
- [50] 杨晶, 姜德建, 张一帅, 等. Toll 样受体与心脏疾病 [J]. *中国药理学通报*, 2008, 24 (9): 1121-1123.
- [51] Wu Y, Wang F, Fan L, et al. Baicalin alleviates atherosclerosis by relieving oxidative stress and inflammatory responses via inactivating the NF-kappa B and p38 MAPK signaling pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 1673-1679.
- [52] 陈美珍, 陈简庆, 吴红莲. 黄芩素对肥胖小鼠体脂及胰岛素抵抗的作用研究 [J]. *泸州医学院学报*, 2019, 42 (6): 527-532.
- [53] Ma L, Li XP, Ji HS, et al. Baicalein protects rats with diabetic cardiomyopathy against oxidative stress and inflammation injury via phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 5368-5375.
- [54] Chi DS, Lin TC, Hall K, et al. Enhanced effects of cigarette smoke extract on inflammatory cytokine expression in IL-1 β -activated human mast cells were inhibited by baicalein via regulation of the NF- κ B pathway [J]. *Allergy*, 2012, 10:3.
- [55] Wang AW, Song L, Miao J, et al. Baicalein attenuates angiotensin II-induced cardiac remodeling via inhibition of AKT/mTOR, ERK1/2, NF- κ B, and calcineurin signaling pathways in mice [J]. *Am J Hypertens*, 2015, 28 (4): 518-526.
- [56] Pu P, Wang XA, Salim M, et al. Baicalein, a natural product, selectively activating AMPK α (2) and ameliorates metabolic disorder in diet-induced mice [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 362 (1-2): 128-138.
- [57] Pickering RJ, Rosado CJ, Sharma A, et al. Recent novel approaches to limit oxidative stress and inflammation in diabetic complications [J]. *Clin Transl Immunol*, 2018, 7 (4): e1016.
- [58] Huynh K, Bernardo BC, McMullen JR, et al. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms and new treatment strategies targeting antioxidant signaling pathways [J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 142 (3): 375-415.
- [59] Chan SH, Hung CH, Shih JY, et al. Baicalein is an available anti-atherosclerotic compound through modulation of nitric oxide-related mechanism under oxLDL exposure [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (28): 42881-42891.
- [60] Alsaad AM, Mohany M, Almalki MS, et al. Baicalein neutralizes hypercholesterolemia-induced aggravation of oxidative injury in rats [J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17 (9): 1156-1166.
- [61] Li Y, Zhao J, Hölscher C. Therapeutic potential of baicalein in Alzheimer's disease and Parkinson's disease [J]. *CNS Drugs*, 2017, 31 (8): 639-652.
- [62] 高新富, 边瑞民, 王滨, 等. 黄芩素对缺氧/复氧诱导的心肌损伤保护作用以及 RIPK1/RIPK3 信号通路的影响 [J]. *中国药理学杂志*, 2021, 56 (8): 654-661.
- [63] 王语. 黄芩素抑制心肌细胞程序性坏死及心肌梗死的分子机制研究 [D]. 青岛: 青岛大学, 2019.
- [64] Min W, Wu MJ, Fang PH, et al. Effect of baicalein on GLUT4 translocation in adipocytes of diet-induced obese mice [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50 (2): 426-436.
- [65] 周鹏, 华芳, 王茜. 黄芩-黄连药对有效成分防治 2 型糖尿病的实验研究进展 [J]. *广东化工*, 2019, 46 (13): 75-76.
- [66] 李恒华, 黄崇刚, 罗金萍, 等. 黄芩素对肥胖模型大鼠减肥作用及机制的研究 [J]. *中药药理与临床*, 2015, 31 (4): 42-46.
- [67] 钱秋海, 倪青, 杨文军. 糖尿病心病病证结合诊疗指南 (2021-12-31) [J]. *世界中医药*, 2022, 17 (12): 1641-1653.
- [68] 邢颖, 何雄, 张润顺, 等. 基于 2843 例 2 型糖尿病患者中医门诊处方的核心方药规律分析 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2020, 22 (9): 3241-3248.
- [69] 赵林华, 连凤梅, 姬航宇, 等. 仝小林教授运用不同剂量葛根芩连汤治疗 2 型糖尿病验案 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17 (4): 249-251.
- [70] 万方. 仝小林教授辛开苦降法治疗糖尿病临床用药规律分析 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2011.
- [71] 李佳音. 基于黄煌经验的葛根芩连汤方证研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
- [72] 陈欣燕, 金末淑, 姬航宇, 等. 仝小林教授运用干姜黄芩黄连人参汤治疗 2 型糖尿病 80 例临床观察 [J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28 (2): 463-465.
- [73] 李汶珊, 卜献春. 卜献春治疗糖尿病心病经验 [J]. *湖南中医杂志*, 2022, 38 (1): 44-46.

(收稿日期: 2022-10-10; 修回日期: 2022-11-21)

五味子防治阿尔茨海默病的作用机制研究进展

沈昆双^{1,2}, 孔玲^{1,2}, 闫广利^{1,2}, 王喜军^{1,2*} (1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 2. 中医方证代谢组学研究中心, 哈尔滨 150040)

摘要: 阿尔茨海默病 (AD) 患病率逐年升高, 但目前仍无有效治疗药物, 因此对其早期干预和新药研发尤为重要。中医认为 AD 为肾虚所致, 在防治 AD 的补益方剂中, 常用的中药五味子, 具有补肾宁心之效, 现代研究表明五味子可以显著提高 AD 模型的学习记忆能力, 活性成分主要为木脂素类。本文通过查阅有关五味子及其活性成分防治 AD 的国内外文献, 从减少 A β 蛋白沉积、抑制 Tau 蛋白磷酸化、调节神经递质紊乱、清除自由基及提高抗氧化能力、减少炎症因子产生等方面对五味子提取物及活性成分防治 AD 的有效性及作用机制进行综述, 挖掘其潜在的关键作用靶点和药效成分, 为下一步五味子作用机制研究和 AD 药物开发提供参考, 为进一步完善五味子质量评价系统提供依据。

关键词: 五味子; 阿尔茨海默病; 活性成分; 作用机制

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0462-09

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.029

Research progress in the mechanism of Schisandra chinensis in preventing and treating Alzheimer's disease

SHEN Kun-shuang^{1,2}, KONG Ling^{1,2}, YAN Guang-li^{1,2}, WANG Xi-jun^{1,2*} (1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040; 2. Chinmedomics Research Center of National Administration of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040)

Abstract: The prevalence of Alzheimer's disease (AD) is increasing year by year, but there is still no effective medicine. Therefore, early intervention and new drug development are important. The theoretical system of traditional Chinese medicine believes that AD is mostly caused by kidney deficiency. Schisandra chinensis is commonly used in the tonic prescriptions for the prevention and treatment of AD, which can tonify the kidney and calm the heart. Modern research shows that Schisandra chinensis can greatly improve the learning and memory ability in AD models, and its active ingredients are mainly lignans. This paper reviewed relevant domestic and foreign literatures, the mechanism and effective components of Schisandra chinensis extract in preventing and treating AD from reducing A β protein deposition, inhibiting Tau protein phosphorylation, regulating neurotransmitter disorder, scavenging free radicals, improving antioxidant capacity, and reducing the production of inflammatory factors, and explored potential key targets and effective components. This can provide reference for the mechanism study of Schisandra chinensis and the development of AD drugs, and improving the quality evaluation system of Schisandra chinensis.

Key words: Schisandra chinensis; Alzheimer's disease; active component; mechanism

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD), 又称老年性痴呆, 是神经系统发生进行性病变, 且不可逆转的脑部疾病, 临床表现为学习记忆力减退等认知功能损伤, 并伴有相关人格变化, 最终多因并发症死亡。AD 的病因病机复杂, 受 A β 毒性、Tau 蛋白异常磷酸化、氧化应激损伤、神经

基金项目: 黑龙江省自然科学基金联合引导项目 (No.LH2020H095)。

作者简介: 沈昆双, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药血清药物化学及中医方证代谢组学研究, email: 18800462824@163.com

*通信作者: 王喜军, 男, 博士研究生导师, 教授, 主要从事中药血清药物化学及中医方证代谢组学研究, email: xijunw@sina.com

细胞损伤^[18]。五味子醇甲还可以调节转 *Tau* 基因果蝇中 *dTOR* mRNA 表达水平, 改善海马体神经细胞活动, 提高果蝇嗅觉学习记忆能力^[19]。在脑室内注射 $A\beta_{1-42}$ 的 AD 小鼠模型中, 五味子酯甲通过调节 *GSK-3 β* 活性, 减少海马区 *Tau* 蛋白过度磷酸化, 改善 AD 小鼠的学习和记忆能力^[20]。

1.3 调节神经递质紊乱

神经递质对大脑功能有着至关重要的作用, 通过调节突触可塑性, 参与调节神经元信息传递、营养发育和学习记忆等过程。AD 患者脑内神经递质代谢紊乱, 突触间信号传递受损, 导致学习记忆能力下降^[21]。五味子木脂素^[22]和五味子多糖^[23]可以控制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 AD 大鼠脑内 γ -氨基丁酸 (GABA)、5-羟色胺 (5-HT)、乙酰胆碱 (Ach)、多巴胺 (DA)、去甲肾上腺素 (NE) 和甘氨酸 (Gly) 含量下降, 抑制兴奋性神经递质谷氨酸 (Glu) 和天冬氨酸 (Asp) 含量升高。五味子醇甲可以恢复 *APP/PS1* 转基因小鼠脑中 Glu、Ach、5-HT、NE、GABA 等神经递质异常变化^[24]。其中 Glu 是一种兴奋性氨基酸神经递质, 谷氨酸能神经元在突触前神经元中通过谷氨酸转运蛋白 1 (GLUT1) 和谷氨酸转运蛋白 2 (GLUT2) 维持囊泡中的 Glu 水平, 从而调节突触传递和可塑性影响 AD 的病理过程^[25]。左侧脑室注射 $A\beta_{1-42}$ 的小鼠经灌胃五味子酯乙后, 体内 GLUT1 和 *GSK-3 β* 活性恢复, *Tau* 蛋白磷酸化受到抑制, 小鼠的学习记忆功能得到显著提高^[26]。五味子甲素可通过促进 $A\beta_{1-42}$ 损伤小鼠的海马区 and 大脑皮层 AMPA 受体中 GluR1 和 GluR2 的表达, 减轻 Glu 和突触功能障碍的毒性, 改善其认知功能损伤^[27]。

Ach 是脑内与学习记忆功能密切相关的一种胆碱类神经递质。AchE 可以迅速酶解突触间隙中 Ach 进而影响信号传递, 影响学习记忆能力^[28]。AchE 抑制剂多奈哌齐、加兰他敏、卡巴拉汀等可通过抑制 AchE 活性, 减少 Ach 分解, 从而改善 AD 患者脑功能障碍。五味子水提取物和醇提取物均具有显著抗 AchE 活性和较低的细胞毒性, 并在东莨菪碱诱导的 AD 小鼠模型中可显著抑制小鼠脑组织中 AchE 活性, 进而改善认知障碍^[29]。五味子木脂素提取物可以减少东莨菪碱诱导记忆障碍小鼠脑组织中自由基、AchE 水平, 提高乙酰胆碱转移酶 (ChAT) 含量, 缩短小鼠的逃避潜伏期, 提高其学习记忆能力^[30]。从五味子中提取的倍半萜类成分 α -异毕澄茄油烯醇通过抑制 AchE 活性, 促进 Ach 作用, 进而改善东莨菪碱造成的小鼠认知障碍^[31]。

1.4 清除自由基, 提高抗氧化能力

在应激状态下, 耗氧量较大的中枢神经易产生大量自由基, 不能被抗氧化系统及时清除, 从而侵

害脂质、蛋白质、核酸等大分子物质^[32], 造成神经元氧化损伤, 促进 AD 的老年斑和神经纤维缠结等病理进程^[33]。五味子可以通过清除自由基, 减少过氧化物生成, 提高超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、过氧化氢酶 (CAT) 等抗氧化酶的活性, 保护神经细胞免受氧自由基损害, 发挥抗 AD 作用。五味子 90% 乙醇提取物可以分别从记忆获得、巩固、再生三个方面改善记忆障碍, 其机制与提高机体抗氧化能力有关^[34]。五味子总木脂素可恢复 $A\beta_{1-42}$ 诱导的 AD 小鼠海马和大脑皮层中总抗氧化能力 (T-AOC) 以及丙二醛 (MDA) 水平, 这与抑制丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路中应激活蛋白激酶 (JNK) 和 p38 的磷酸化表达有关^[35]。五味子木脂素可以提高 SOD、CAT、GSH 活性, 降低 MDA 和一氧化氮 (NO) 水平, 其中石油醚萃取部分的抗氧化活性显著^[36]。在 $A\beta_{25-35}$ 诱导 AD 大鼠模型中, 给予五味子木脂素提取物后, 大鼠体内 SOD、CAT 含量显著提高, 降低 NO、一氧化氮合酶 (NOS) 含量, 提高抗氧化能力, 保护损伤神经细胞^[37]。五味子水提液可通过提高 *APP/PS1* 小鼠大脑皮层神经细胞的 SOD 活性, 清除自由基, 降低 MDA 含量, 从而保护神经组织免受氧化损伤^[38]。五味子挥发油提取物可以提高 SOD、GSH-Px 活性, 抑制 MDA 含量增加, 从而减少氧自由基对神经细胞的伤害^[39]。

五味子醇甲还可以通过下调 RAGE 蛋白^[40]和 NF- κ B 表达^[41], 减少氧化应激产生的活性氧 (ROS), 进而减少神经元氧化损伤。五味子甲素^[42]和五味子丙素^[43]可以提高 $A\beta_{1-42}$ 诱导 AD 小鼠的大脑皮层和海马区中 SOD、GSH-Px、GSH 活性, 调节其抗氧化系统, 保护神经细胞免受氧化损伤。五味子乙素预防东莨菪碱诱导 AD 小鼠神经损伤与其抗氧化活性有关, 可以提高脑内 SOD、GSH-Px、GSH 活性, 从而发挥抗 AD 作用^[44]。五味子酯甲主要通过提高体内 SOD 含量, 降低 MDA 水平, 调节氧化应激反应, 进而改善 $A\beta_{1-42}$ 诱导 AD 小鼠学习记忆能力^[45]。五味子酯甲还可以通过提高 *D*-半乳糖诱导的 AD 小鼠的抗氧化能力来降低海马组织中 *p19*、*p53*、*p21* 基因表达, 提高神经细胞功能, 还可以上调细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1) 蛋白表达, 提高 DNA 的自我修复能力^[46]。五味子酚不仅可以提高抗氧化酶活性^[47], 还可以通过上调烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖性酶 (SIRT1), 提高抗氧化能力, 保护 SH-SY5Y 细胞免受过氧化氢损伤^[48]。 α -异毕澄茄油烯醇可以通过蛋白激酶 A/环腺苷酸应答原件结合蛋白/核因子 E2-相关因子 2 (PKA/CREB/Nrf2) 通路诱导血红素氧合酶 1 (HO-

1) 和醌氧化还原酶 (NQO-1) 表达, 从而减少谷氨酸盐诱导的 HT22 细胞氧化损伤^[49]。

1.5 减少炎症因子产生

在炎症反应中, 白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-6、IL-18 和肿瘤坏死因子 (TNF- α) 等多种促炎细胞因子代谢紊乱, 导致突触功能障碍、神经元生成异常和神经元缺失, 加剧 AD 的发生发展^[50]。五味子的木脂素类^[51]、多糖类^[52] 和挥发油类^[53] 提取物均对 AD 的神经炎症具有调节作用, 其机制是通过下调 NF- κ B/MAPK 炎症信号通路, 尤其是 p38, 进而抑制 TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子释放, 缓解炎症造成的神经损伤。

五味子醇甲可以通过上调 SIRT1 表达, 抑制 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 生成, 调节炎症反应与内质网应激, 改善链脲佐菌素诱导的神经炎症和认知障碍^[54]。APP/SP1 双转基因小鼠经灌胃五味子醇甲后, 体内 NLRP1 炎性小体受到抑制, IL-1 β 和 IL-18 等相关凋亡因子水平得到恢复, 从而提高空间学习记忆能力^[55]。在中枢神经中, 激活的胶质细胞可促进炎症反应, 加剧 AD 的蛋白沉淀和神经缺失等病理进程^[56]。五味子甲素可抑制体内 M1 型小胶质细胞, 同时促进 M2 型小胶质细胞极化, 从而抑制 TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子分泌, 并促进代谢产物清除, 保护神经组织^[57]。五味子乙素抑制 AD 大鼠脑组织中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 表达与调节 RAGE/NF- κ B/MAPK 轴有关^[58]。五味子乙素提高 AD 小鼠学习认知能力还与其抑制脑组织内 p53、Bax、细胞色素 C (Cyto C)、半胱氨酰天冬氨酸酶 (Caspase)-9、Caspase-3 等凋亡因子的表达有关^[59]。华中五味子酮可以抑制 AD 大鼠海马区 NF- κ B 和 iNOS 表达, 缓解炎症反应^[60]。 α -异毕澄茄油烯通过介导 NF- κ B、JNK 和 p38 信号通路, 抑制前列腺素 E₂、NO、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症因子产生, 改善了 A β ₁₋₄₂ 导致的小胶质细胞损伤^[61]。

1.6 其他方面

五味子还可以通过改善线粒体功能、调节肠道菌群、线粒体功能障碍、影响基因表达等, 提高学习认知障碍。五味子超临界萃取物可以提高细胞中琥珀酸脱氢酶 (SDH) 的活性, 降低乳酸脱氢酶 (LDH) 含量, 减少细胞损伤, 并存在一定的剂量依赖性^[62]。五味子醇甲可以从线粒体的功能、生物合成、能量代谢、动力学四个方面整体恢复 A β ₁₋₄₁ 诱导 AD 大鼠的线粒体系统损害^[63]。五味子乙醇提取物还可降低 A β ₁₋₄₂ 诱导的 AD 大鼠血清中肠道菌群代谢产物短链脂肪酸丁酸、3-甲基戊酸和己酸浓度并使之趋于正常水平, 进而减少 A β 的聚积^[64]。五味子木脂素提取物可以通过调节 TrkB/CREB/

ERK 通路, 增加脑源性神经营养因子 (BDNF), 从而缓解抑郁小鼠的认知功能减退^[65]。随着年龄增长, DNA 甲基化的水平降低, 而神经元细胞 DNA 甲基化与 AD 的发病机制密切相关。五味子乙素可以通过调节 PI3K/Akt 信号通路, 促进 A β ₁₋₄₂ 损伤的 SH-SY5Y 细胞模型中 DNMT3A 和 DNMT1 的 mRNA 及蛋白表达, 影响 DNA 甲基化状态, 进而起到防治 AD 的作用^[66-67]。五味子乙素可能通过提高海马组织和大脑皮层中突触素 (SYN)、突触后致密蛋白 -95 (PSD-95) 水平, 提高突触可塑性, 进而改善铝中毒大鼠的学习认知障碍^[68]。

五味子提取物及活性成分防治 AD 及其作用机制汇总见表 1 及表 2。

2 五味子配伍使用在防治 AD 中的应用

在临床应用中, 中药多与其他药物配伍组成方剂使用, 从而更好地发挥疗效。在治疗 AD 的方剂中, 五味子常与益智仁、熟地黄、人参、石菖蒲等中药配伍使用, 协同发挥提高认知功能障碍的作用。在益智五味丸中五味子和益智仁配伍, 可增强其补肾固精之功, 研究发现两者合用可以通过激活 PI3K/Akt/GSK-3 β /CREB 途径, 显著改善 A β ₁₋₄₂ 诱导 AD 小鼠的认知功能障碍^[69]。地黄饮子中五味子补肾益气, 加以熟地黄滋阴填髓, 两药配伍可以明显抑制 A β ₁₋₄₂ 联合半乳糖诱导 AD 大鼠脑中 A β 和 Tau 蛋白生成, 其机制与可抑制脑内的 AchE 含量, 并促进 CREB 等学习相关蛋白表达有关^[70]。生脉散以人参为君药, 佐以五味子, 可增强益气养阴之效, 两药合用可以显著改善 A β ₂₅₋₃₅ 诱导的 AD 大鼠的认知障碍, 其机制与改善机体的炎症反应、肠道菌群、神经递质和能量代谢等方面密切相关^[71]。五味子补肾益气, 配以石菖蒲祛痰开窍, 可用于治疗“肾虚痰淤”型痴呆, 两者合用的作用机制与调节 AD 大鼠的花生四烯酸代谢、鞘脂代谢、神经递质代谢有关^[72]。

3 讨论与展望

本文通过梳理五味子防治 AD 的作用机制研究, 理清其作用途径: 主要涉及减少老年斑和神经纤维形成、提高突触可塑性、缓解氧化应激、减轻神经炎症反应等, 主要涉及的靶点有: β -secretase、Glu、AchE、GSK-3 β 、PI3K、Akt、GLUT、CREB、Nrf2、JNK、p38、ERK1/2、SIRT1、NF- κ B、NLRP1 等。本文将基于文献得到的五味子改善 AD 作用的相关靶点和通路进行整合、关联, 发现其主要通过上调 PI3K/Akt, 下调 MAPKs 通路, 再激活 CREB 蛋白, 进而触发其他下游分子表达, 调节各作用途径, 从而发挥治疗 AD 效果, 如图 2 所示。

五味子通过 PI3K/Akt 和 MAPKs 信号通路激

表 1 五味子提取物防治 AD 及其作用机制研究

Tab 1 Schisandra chinensis extract in preventing and treating AD and their mechanism

提取物	作用途径	模型	作用机制	文献
五味子木脂素组分	Aβ 蛋白、神经递质	Aβ ₁₋₄₂ 诱导 AD 小鼠	β-secretase↓、AChE↓、GSH↑	[14]
	氧化应激	东莨菪碱诱导 AD 小鼠	AChE↓、MDA↓	[29]
	神经递质	东莨菪碱诱导记忆障碍小鼠	SOD↑、MDA↓、AChE↓、ChAT↑	[30]
	氧化应激	D-半乳糖诱导衰老小鼠	SOD↑、T-AOC↑	[34]
	氧化应激	Aβ ₁₋₄₂ 诱导 AD 小鼠模型; Aβ ₁₋₄₂ 诱导原代小鼠神经细胞	SOD↑、T-AOC↑、MDA↓; β-secretase↓、JNK↓、p38↓	[35]
	氧化应激	D-半乳糖诱导的脑氧化损伤大鼠	SOD↑、CAT↑、GSH↑、MDA↓、NO↓	[36]
	氧化应激、炎症反应	Aβ ₂₅₋₃₅ 诱导 AD 大鼠	TNF-α↓、GSH↑、SOD↑、NOS↓、NO↓、MDA↓、CAT↑	[37]
五味子多糖组分	肠道菌群	Aβ ₁₋₄₂ 诱导 AD 大鼠	丁酸↓、3-甲基戊酸↓、己酸↓	[64]
	Aβ 蛋白	脂多糖诱导 AD 小鼠	TNF-α↓、IL-1β↓、IL-6↓、NLRP3↓、M-caspase-1↓、p-p38↓	[13]
	Tau 蛋白	Aβ ₂₅₋₃₅ 诱导 AD 小鼠	Tau Ser199↓、Tau Ser396↓、Tau Ser404↓、GSK-3β Tyr216↓、GSK-3β Ser9↑	[17]
	神经递质	Aβ ₂₅₋₃₅ 诱导 AD 大鼠	Glu↓、Asp↓、5-HT↑、NE↑、DA↑、ACh↑、taurine↓、GABA↑、Gly↑、NOS↓、SOD↑、AChE↓、GSK-3β	[23]
五味子挥发油组分	炎症反应	Aβ ₁₋₄₂ 诱导 AD 大鼠	MDA↓、SOD↑、GSH-Px↑、TNF-α↓、IL-1β↓、BDNF↑	[39]
	炎症反应	脂多糖刺激的 BV-2 小胶质细胞	p-p38/p38↓、NF-κB↓、IL-1β↓、IL-6↓、TNF-α↓	[53]
五味子 CO ₂ 超临界萃取物	线粒体功能	Aβ ₁₋₄₂ 或脂多糖诱导 AD 小鼠	SDH↑、LDH↓	[62]

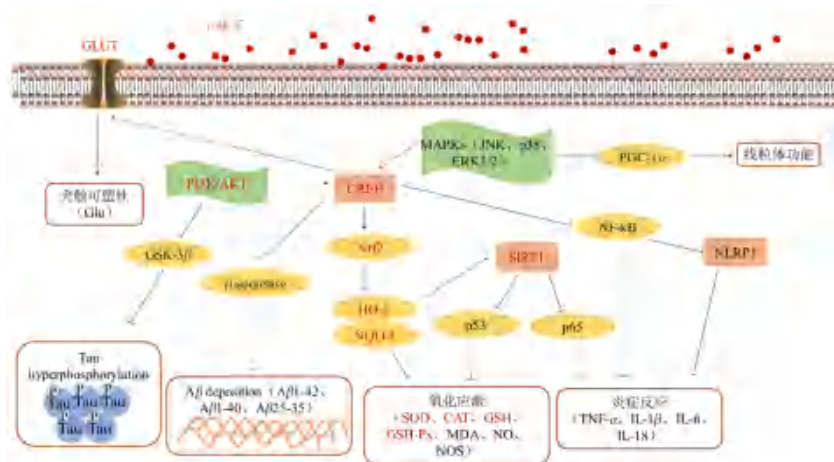


图 2 五味子防治 AD 的作用机制

Fig 2 Prevention mechanism of Schisandra chinensis on AD

注 (Note): 普通箭头表示激活, 平箭头表示抑制; 红字表示促进表达, 黑字表示抑制表达; 五味子可以通过激活 CREB, 促进 GLUT 表达, 减少 Glu 分泌, 提高神经元突触可塑性; 抑制 GSK-3β 表达, 减少 Tau 磷酸化聚积; 降低 β-secretase 的活性, 减少 Aβ 蛋白生成、聚积; 激活 Nrf2 表达, 提高 HO-1、NQO-1 含量及抗氧化能力; 激活 SIRT1 受体, 抑制 p53 和 p65 表达, 从而缓解氧化应激和炎症反应; 抑制 NF-κB 表达, 下调 NLRP1 炎性小体, 减少炎症因子生成, 减轻炎症反应; 抑制 PGC-1α 表达, 改善线粒体功能 (Ordinary arrows indicate activation, flat arrows indicate inhibition; red letters indicate promoting expression, and black letters indicate inhibiting expression; Schisandra chinensis can activate CREB, promote GLUT expression, reduce Glu secretion, and improve neuronal synaptic plasticity; inhibit GSK-3β expression, reduce Tau phosphorylation and accumulation; reduce β-secretase activity, to reduce Aβ protein production and accumulation; activate Nrf2 expression, increase the content of HO-1, NQO-1, to improve antioxidant capacity; activate SIRT1 receptor, inhibit p53 and p65 expression, thereby alleviating oxidative stress and inflammatory response; inhibit NF-κB expression, down-regulate NLRP1 inflammasome, to reduce the production of inflammatory factors and reduce the inflammatory reaction; inhibit the expression of PGC-1α and improve mitochondrial function)。

活 CREB 后: 可以促进 GLUT 表达, 减少 Glu 分泌, 提高神经元突触可塑性; 降低 β-secretase 活性, 进而抑制 Aβ₁₋₄₂、Aβ₁₋₄₀、Aβ₂₅₋₃₅ 毒性蛋白生成、

聚积; 通过促进 Nrf2 表达, 提高 HO-1、NQO-1 含量, 提高 SOD、CAT、GSH、GSH-Px 等抗氧化酶活性, 降低 MDA、NO、NOS 含量, 改善

表 2 五味子活性成分防治 AD 及其作用机制研究

Tab 2 Active components in Schisandra chinensis in treating AD and their mechanism

成分	作用途径	模型	作用机制	参考文献
五味子醇甲	Tau 蛋白	$A\beta_{1-42}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞	p-Akt \uparrow 、p-GSK-3 β \downarrow 、p-Tau \downarrow	[18]
	神经递质	APP/PS1 转基因小鼠	Glu \downarrow 、ACh \uparrow 、5-HT \uparrow 、NE \uparrow 、GABA \uparrow 、DA \uparrow	[24]
	氧化应激	$A\beta_{1-42}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞	ROS \downarrow 、RAGE \downarrow	[40]
	氧化应激	APP/PS1 转基因小鼠	ROS \downarrow 、p65	[41]
	炎症反应	链脲佐菌素诱导 AD 大鼠	TNF- α \downarrow 、IL-1 β \downarrow 、IL-6 \downarrow 、NF- κ B \downarrow 、SIRT1 \uparrow	[54]
	炎症反应、 凋亡	APP/PS1 双转基因小鼠、 $A\beta_{1-42}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞	IL-1 β \downarrow 、IL-18 \downarrow 、NLRP1 \downarrow 、Caspase-3 \downarrow 、Bax \downarrow	[55]
	线粒体功能	$A\beta_{1-41}$ 诱导 AD 大鼠、 $A\beta_{1-41}$ 诱导 AD 细胞	线粒体膜电位 \uparrow 、ATP \uparrow 、柠檬酸合酶 \uparrow 、PGC-1 α \uparrow	[63]
五味子甲素	A β 蛋白	$A\beta_{1-42}$ 诱导 AD 小鼠	β -secretase \downarrow 、GluR1 \uparrow 、GluR2 \uparrow	[27]
	氧化应激	$A\beta_{1-42}$ 诱导 AD 小鼠	MDA \downarrow 、GSH \uparrow 、SOD \uparrow 、GSH-Px \uparrow 、氧化型谷胱甘肽 \downarrow	[42]
	炎症反应	APP/PS1 转基因小鼠、脂多糖处理 BV2 胶质细胞	IL-6 \downarrow 、IL-10 \downarrow 、iNOS \downarrow	[57]
五味子乙素	氧化应激、 神经递质	东莨菪碱诱导 AD 小鼠	MDA \downarrow 、GSH \uparrow 、SOD \uparrow 、AChE \downarrow 、ACh \uparrow	[44]
	氧化应激、 炎症反应	$A\beta_{1-40}$ 灌注诱导 AD 大鼠	AChE \downarrow 、ACh \uparrow 、SOD \uparrow 、MDA \downarrow 、p-p53/p53 \downarrow 、TNF- α \downarrow 、 IL-1 β \downarrow 、IL-6 \downarrow 、DNA 氧化损伤 \downarrow 、NF- κ B \downarrow 、RAGE \downarrow 、 iNOS \downarrow 、诱导型环氧合酶 \downarrow	[58]
	凋亡	D-半乳糖联合氢溴酸东莨菪碱诱导 AD 小鼠	p53 \downarrow 、Bax \downarrow 、Caspase-9 \downarrow 、Caspase-3 \downarrow	[59]
	DNA 甲基化	$A\beta_{1-42}$ 损伤的 SH-SY5Y 细胞	DNMT1 \uparrow 、DNMT3A \uparrow	[66]
五味子丙素	氧化应激、 神经递质	$A\beta_{1-42}$ 诱导 AD 小鼠	SYN \uparrow 、PSD-95 \uparrow	[68]
	氧化应激、 神经递质	$A\beta_{1-42}$ 诱导 AD 小鼠	SOD \uparrow 、GSH-Px \uparrow 、GSH \uparrow	[43]
五味子酯甲	Tau 蛋白	$A\beta_{1-42}$ 诱导 AD 小鼠	GSK-3 β \downarrow 、p-Tau \downarrow	[20]
	氧化应激	$A\beta_{1-42}$ 诱导 AD 小鼠	SOD \uparrow 、GSH-Px \uparrow 、MDA \downarrow 、GSH \uparrow	[45]
	氧化应激	$A\beta_{1-42}$ 诱导 AD 小鼠	SOD \uparrow 、MDA \downarrow 、p19 \downarrow 、p53 \downarrow 、p21 \downarrow 、cyclin D1 \uparrow	[46]
五味子酯乙	神经递质	$A\beta_{1-42}$ 诱导 AD 小鼠	GLT-1 \uparrow 、GSK-3 β \downarrow 、p-GSK-3 β \uparrow 、p-Tau \uparrow	[26]
五味子酚	氧化应激	东莨菪碱诱导痴呆小鼠	SOD \uparrow 、MDA \downarrow 、GSH-Px \uparrow 、AChE \downarrow	[47]
	氧化应激	痴呆小鼠、H ₂ O ₂ 诱导 SH-SY5Y 细胞	SIRT1 \uparrow 、PGC-1 α \uparrow	[48]
五味子酮	炎症反应	$A\beta_{25-35}$ 诱导 AD 大鼠	NF- κ B \downarrow 、iNOS \downarrow	[60]
α -异毕澄茄 油烯	氧化应激	Glu 诱导 HT22 海马神经元细胞	ROS \downarrow 、ERK \downarrow 、PKA \uparrow 、CREB \uparrow 、Nrf2 \uparrow 、HO-1 \uparrow 、NQO1 \uparrow	[49]
	炎症反应	$A\beta_{1-42}$ 诱导小鼠 BV2 小胶质细胞	NO \downarrow 、TNF- α \downarrow 、IL-1 β \downarrow 、IL-6 \downarrow 、iNOS \downarrow 、诱导型环氧合酶 \downarrow	[61]
α -异毕澄茄 油烯醇	神经递质、 凋亡	莨菪碱诱导 AD 小鼠	AChE \downarrow 、Bcl-2/Bax \uparrow 、p-ERK \uparrow	[31]

氧化损伤；可以激活 SIRT1 受体，减少 p53 和 p65 表达，从而缓解氧化应激和炎症反应；还能抑制 NF- κ B 表达，下调 NLRP1 炎性小体，减少 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18 等炎症因子生成，减轻炎症反应。

CREB 是神经元中一种普遍存在的选择性结合核蛋白，可以调节神经元生长、突触可塑性、神经保护、基因转录等过程，是短期记忆转化为长期记忆所必需的核心靶点。AD 患者脑中 CREB 含量显著降低，是导致认知障碍的重要原因。五味子可以提高 CREB 表达，调节多个下游靶点，进而通过各途径改善 AD 的病理变化，提高学习记忆能力，发挥防治 AD 的作用。因此，CREB 可能是五味子防治 AD 作用机制的关键靶点，这为五味子防治 AD 的作用机制研究提供了依据和参考。

五味子中五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素、五味子酯甲、五味子酯乙、五味子酚、五味子酮、 α -异毕澄茄油烯均具有改善认知功能障碍的活性，其中对五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素的研究较成熟，抗 AD 活性较强；五味子中的五味子醇甲和五味子乙素含量高于近缘药材南五味子，为五味子的典型成分，可考虑作为五味子防治 AD 的潜在质量标志物，为进一步完善五味子的质量分析评价体系提供参考。

参考文献

[1] Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, et al. Alzheimer's disease [J]. Lancet, 2021, 397 (10284): 1577-1590.
 [2] 任汝静, 殷鹏, 王志会, 等. 中国阿尔茨海默病报告 2021 [J]. 诊断学理论与实践, 2021, 20 (4): 317-337.
 [3] Jia L, Du Y, Chu L, et al. Prevalence, risk factors, and management of dementia and mild cognitive impairment

- in adults aged 60 years or older in China: a cross-sectional study [J]. *Lancet Public Health*, 2020, 5 (12): e661-e671.
- [4] Ong WY, Wu YJ, Farooqui T, et al. Qi Fu Yin-a ming dynasty prescription for the treatment of dementia [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55 (9): 7389-7400.
- [5] Han GH, Zhen WZ, Dai Y, et al. Dihuang-Yinzi alleviates cognition deficits via targeting energy-related metabolism in an Alzheimer mouse model as demonstrated by integration of metabolomics and network pharmacology [J]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 873929.
- [6] Lu SW, Han Y, Chu H, et al. Characterizing serum metabolic alterations of Alzheimer's disease and intervention of Shengmai-San by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadruple time-of-flight mass spectrometry [J]. *Food Funct*, 2017, 8 (4): 1660-1671.
- [7] 王方, 陈彦红, 王春波. 安神补心丸对小鼠学习记忆功能的影响 [J]. 菏泽医学专科学校学报, 2018, 30 (3): 51-55.
- [8] Yu Q, Song FJ, Chen JF, et al. Antineuroinflammatory effects of modified Wu-Zi-Yan-Zong prescription in beta-amyloid-stimulated BV2 microglia via the NF-kappaB and ERK/p38 MAPK signaling pathways [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017: 8470381.
- [9] 郑远武, 朴钟源, 宋琳, 等. 地黄饮子及其有效成分五味子醇甲对 A β 诱导 SH-SY5Y 细胞 CCK-8 的影响 [J]. 实用中医内科杂志, 2022, 36 (8): 15-18.
- [10] 卢盛文, 孔玲, 初航, 等. 基于中医方证代谢组学的生脉散干预老年痴呆症大鼠的药效物质基础研究 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2016, 18 (10): 1720-1729.
- [11] Zhang AH, Yu JB, Sun H, et al. Identifying quality-markers from Shengmai San protects against transgenic mouse model of Alzheimer's disease using chinmedomics approach [J]. *Phytomedicine*, 2018, 45: 84-92.
- [12] Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis [J]. *Science*, 1992, 256 (5054): 184-185.
- [13] Xu M, Yan T, Gong G, et al. Purification, structural characterization, and cognitive improvement activity of a polysaccharides from Schisandra chinensis [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 163: 497-507.
- [14] Jeong EJ, Lee HK, Lee KY, et al. The effects of lignan-riched extract of Shisandra chinensis on amyloid-beta-induced cognitive impairment and neurotoxicity in the cortex and hippocampus of mouse [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 146 (1): 347-354.
- [15] 杨擎, 李娜, 隋欣, 等. 五味子乙素靶向调节 A β 及下游 NF- κ B/TNF- α 信号通路保护受损神经元的分子机制 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32 (5): 2064-2069.
- [16] Renaud LJ, Visani AV, Baker SL, et al. Prospective longitudinal atrophy in Alzheimer's disease correlates with the intensity and topography of baseline tau-PET [J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12 (524): eaau5732.
- [17] 李贺, 刘聪, 李宁, 等. 北五味子酸性多糖对阿尔茨海默病模型小鼠学习记忆能力的改善作用 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2017, 43 (6): 1115-1120.
- [18] Zhao ZY, Zhang YQ, Zhang YH, et al. The protective underlying mechanisms of Schisandrin on SH-SY5Y cell model of Alzheimer's disease [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2019, 82 (19): 1019-1026.
- [19] 李全, 关慧波, 胡红, 等. 五味子醇甲对转 tau 基因果蝇阿尔兹海默病模型 dTORmRNA 表达的影响 [J]. 现代中药研究与实践, 2020, 34 (6): 25-27.
- [20] Jing S, Liu C, Lin H, et al. Schisantherin a improves the learning and memory by reducing the phosphorylation of Tau protein of the hippocampus in AD mice [J]. *Nat Prod Commun*, 2020, 15 (3): 1-9.
- [21] Sun Z, Li Q, Bi K. Rapid HPLC-ESI-MS/MS analysis of neurotransmitters in the brain tissue of Alzheimer's disease rats before and after oral administration of Xanthoceras sorbifolia Bunge [J]. *Molecules*, 2018, 23 (12): 3111.
- [22] Wei M, Liu Z, Liu Y, et al. Urinary and plasmatic metabolomics strategy to explore the holistic mechanism of lignans in *S. chinensis* in treating Alzheimer's disease using UPLC-Q-TOF-MS [J]. *Food Funct*, 2019, 10 (9): 5656-5668.
- [23] Liu Y, Liu Z, Wei M, et al. Pharmacodynamic and urinary metabolomics studies on the mechanism of Schisandra polysaccharide in the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Food Funct*, 2019, 10 (1): 432-447.
- [24] Wei BB, Liu MY, Chen ZX, et al. Schisandrin ameliorates cognitive impairment and attenuates Abeta deposition in APP/PS1 transgenic mice: involvement of adjusting neurotransmitters and their metabolite changes in the brain [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39 (4): 616-625.
- [25] Abd-Elrahman KS, Ferguson SSG. Noncanonical metabotropic glutamate receptor 5 signaling in Alzheimer's disease [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2022, 62: 235-254.
- [26] Xu M, Dong Y, Wan S, et al. Schisantherin B ameliorates Abeta₁₋₄₂-induced cognitive decline via restoration of GLT-1 in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Physiol Behav*, 2016, 167: 265-273.
- [27] Yan TX, Xu MJ, Wan ST, et al. Deoxyschizandrin attenuates A β ₁₋₄₂-induced cognitive impairments through up-regulation of AMPA receptors in mice [J]. *Phytochem Lett*, 2018, 28: 24-31.
- [28] Shin J, Kong C, Lee J, et al. Focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening improves adult hippocampal neurogenesis and cognitive function in a cholinergic degeneration dementia rat model [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2019, 11 (1): 110.
- [29] Song X, Wang T, Guo L, et al. In vitro and in vivo anti-AchE and antioxidative effects of schisandra chinensis extract: a potential candidate for Alzheimer's disease [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020:

- 2804849.
- [30] 谢云亮, 张博, 李世英, 等. 五味子木脂素对记忆障碍模型小鼠自由基及胆碱能、单胺类神经递质的影响[J]. 中成药, 2018, 40 (7): 1589-1591.
- [31] Song SH, Choi SM, Kim JE, et al. Alpha-Isocubebenol alleviates scopolamine-induced cognitive impairment by repressing acetylcholinesterase activity [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 638: 121-128.
- [32] Gao HL, Zhang AH, Yu JB, et al. High-throughput lipidomics characterize key lipid molecules as potential therapeutic targets of Kaixinsan protects against Alzheimer's disease in *APP/PS1* transgenic mice [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1092: 286-295.
- [33] Abolhassani N, Leon J, Sheng Z, et al. Molecular pathophysiology of impaired glucose metabolism, mitochondrial dysfunction, and oxidative DNA damage in Alzheimer's disease brain [J]. *Mech Ageing Dev*, 2017, 161 (Pt A): 95-104.
- [34] Zhao LL, Tang J, Chen Y, et al. Effects of Schisandra chinensis extract on the learning and memory ability of mice with learning and memory disorders [J]. *Nat Prod Commun*, 2020, 15 (12): 1-6.
- [35] Zhao X, Liu C, Xu M, et al. Total lignans of Schisandra chinensis ameliorates Abeta1-42-Induced neurodegeneration with cognitive impairment in mice and primary mouse neuronal cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (4): e0152772.
- [36] Yan T, Shang L, Wang M, et al. Lignans from Schisandra chinensis ameliorate cognition deficits and attenuate brain oxidative damage induced by *D*-galactose in rats [J]. *Metab Brain Dis*, 2016, 31 (3): 653-661.
- [37] Wei M, Liu Y, Pi Z, et al. Systematically characterize the anti-Alzheimer's disease mechanism of lignans from *S. chinensis* based on in-vivo ingredient analysis and target-network pharmacology strategy by UHPLC-Q-TOF-MS [J]. *Molecules*, 2019, 24 (7): 1203.
- [38] 靳艳君. 五味子水提取液对 *APP/PS1* 小鼠大脑皮层神经细胞保护作用研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19 (4): 30-33.
- [39] Yang B, Liu B, Liu Y, et al. Cognitive enhancement of volatile oil from the stems of Schisandra chinensis Baill. in Alzheimer's disease rats [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2018, 96 (6): 550-555.
- [40] 宋琳, 朴钟源, 郑倩, 等. 五味子醇甲对 $A\beta_{1-42}$ 诱导 SH-SY5Y 细胞的 RAGE-ROS- 凋亡通路的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38 (3): 36-39, 259.
- [41] 宋琳, 朴钟源, 张丽梅, 等. 五味子醇甲对 *APP/PS1* 小鼠学习记忆和 NF- κ B p65 的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38 (2): 180-183, 287.
- [42] Hu D, Li C, Han N, et al. Deoxyschizandrin isolated from the fruits of Schisandra chinensis ameliorates $A\beta_{1-42}$ -induced memory impairment in mice [J]. *Planta Med*, 2012, 78 (12): 1332-1336.
- [43] Mao X, Liao Z, Guo L, et al. Schisandrin C ameliorates learning and memory deficits by Abeta1-42-induced oxidative stress and neurotoxicity in mice [J]. *Phytother Res*, 2015, 29 (9): 1373-1380.
- [44] Giridharan VV, Thandavarayan RA, Sato S, et al. Prevention of scopolamine-induced memory deficits by schisandrin B, an antioxidant lignan from Schisandra chinensis in mice [J]. *Free Radic Res*, 2011, 45 (8): 950-958.
- [45] Li X, Zhao X, Xu X, et al. Schisantherin A recovers Abeta-induced neurodegeneration with cognitive decline in mice [J]. *Physiol Behav*, 2014, 132: 10-16.
- [46] 刘聪. 五味子酯甲对 *D*-半乳糖诱导小鼠学习记忆障碍的改善作用及机制研究 [D]. 吉林: 北华大学, 2018.
- [47] 周世月, 邓之荣, 谭琳, 等. 五味子酚对东莨菪碱诱导的痴呆小鼠学习记忆损伤的保护作用 [J]. 中国药理学杂志, 2014, 49 (23): 2088-2091.
- [48] 杨宏艳. 五味子酚调控 SIRT1-PGC1 α 信号通路抗痴呆作用研究 [D]. 齐齐哈尔: 齐齐哈尔医学院, 2018.
- [49] Park SY, Jung WJ, Kang JS, et al. Neuroprotective effects of alpha-iso-cubebene against glutamate-induced damage in the HT22 hippocampal neuronal cell line [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35 (2): 525-532.
- [50] Lopez-Rodriguez AB, Hennessy E, Murray CL, et al. Acute systemic inflammation exacerbates neuroinflammation in Alzheimer's disease: IL-1beta drives amplified responses in primed astrocytes and neuronal network dysfunction [J]. *Alzheimers Dement*, 2021, 17 (10): 1735-1755.
- [51] Yang B, Han W, Han H, et al. Lignans from Schisandra chinensis rattan stems suppresses primary Abeta1-42-induced microglia activation via NF-kappaB/MAPK signaling pathway [J]. *Nat Prod Res*, 2019, 33 (18): 2726-2729.
- [52] Xu M, Yan T, Fan K, et al. Polysaccharide of Schisandra Chinensis fructus ameliorates cognitive decline in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 237: 354-365.
- [53] Xu M, Zhang X, Ren F, et al. Essential oil of Schisandra chinensis ameliorates cognitive decline in mice by alleviating inflammation [J]. *Food Funct*, 2019, 10 (9): 5827-5842.
- [54] Song L, Piao Z, Yao L, et al. Schisandrin ameliorates cognitive deficits, endoplasmic reticulum stress and neuroinflammation in streptozotocin (STZ)-induced Alzheimer's disease rats [J]. *Exp Anim*, 2020, 69 (3): 363-373.
- [55] Li Q, Wang Q, Guan H, et al. Schisandrin inhibits NLRP1 inflammasome-mediated neuronal pyroptosis in mouse models of Alzheimer's disease [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2021, 17: 261-268.
- [56] Hansen DV, Hanson JE, Sheng M. Microglia in Alzheimer's disease [J]. *J Cell Biol*, 2018, 217 (2): 459-472.
- [57] Wang Q, Liu L, Guan H, et al. Schizandrin A ameliorates cognitive functions via modulating microglial polarization in Alzheimer's disease mice [J]. *Pharm Biol*, 2021,

- 59 (1): 860-867.
- [58] Giridharan VV, Thandavarayan RA, Arumugam S, et al. Schisandrin B ameliorates ICV-infused amyloid beta induced oxidative stress and neuronal dysfunction through Inhibiting RAGE/NF-kappaB/MAPK and up-regulating HSP/Becl in expression [J]. PLoS One, 2015, 10 (11): e0142483.
- [59] 李佳芮, 聂文博, 张佳悦, 等. 五味子乙素对阿尔茨海默病小鼠学习记忆能力及神经细胞凋亡的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37 (14): 3390-3394.
- [60] 于方, 拓西平, 吕建勇, 等. 华中五味子酮对阿尔茨海默病样大鼠学习记忆功能及海马区核因子 κ B、诱导型一氧化氮合酶表达的影响 [J]. 第二军医大学学报, 2007, 28 (12): 1351-1355.
- [61] Park SY, Park SJ, Park NJ, et al. α -iso-cubebene exerts neuroprotective effects in amyloid beta stimulated microglia activation [J]. Neurosci Lett, 2013, 555: 143-148.
- [62] 谢宁, 姜媛媛, 于森, 等. 五味子超临界萃取物对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞损伤后生存状态和活力的保护作用 [J]. 中医学报, 2012, 40 (5): 27-29.
- [63] Piao Z, Song L, Yao L, et al. Schisandrin restores the amyloid beta-induced impairments on mitochondrial function, energy metabolism, biogenesis, and dynamics in rat primary hippocampal neurons [J]. Pharmacology, 2021, 106 (5-6): 254-264.
- [64] Guo L X, Tong Y, Wang J, et al. Determination and comparison of short-chain fatty acids in serum and colon content samples: Alzheimer's disease rat as a case study [J]. Molecules, 2020, 25 (23): 5739.
- [65] Yan T, He B, Wan S, et al. Antidepressant-like effects and cognitive enhancement of Schisandra chinensis in chronic unpredictable mild stress mice and its related mechanism [J]. Sci Rep, 2017, 7 (1): 6903.
- [66] 高洋洋, 刘景平, 张明, 等. 五味子乙素对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的阿尔茨海默病细胞 DNA 甲基化的影响 [J]. 中医临床研究, 2018, 10 (10): 1-4.
- [67] 高洋洋. DNA 甲基化和 PI3K/Akt 信号通路在五味子乙素抗阿尔茨海默病中作用及其机制 [D]. 包头: 内蒙古科技大学包头医学院, 2018.
- [68] 程厚之, 张丽凤, 梁祚仁, 等. 五味子乙素对铝中毒大鼠学习记忆及突触相关蛋白表达影响的研究 [J]. 右江民族医学院学报, 2021, 43 (6): 714-718.
- [69] Qi Y, Jing HT, Cheng XH, et al. Alpinia oxyphylla-Schisandra chinensis herb pair alleviates Amyloid-beta induced cognitive deficits via PI3K/Akt/Gsk-3beta/CREB pathway [J]. Neuromolecular Med, 2020, 22 (3): 370-383.
- [70] 陈玉宝. 五味子-熟地黄配伍改善 AD 模型大鼠学习记忆及机制研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2018.
- [71] Wang A, Pi Z, Liu S, et al. Mass spectrometry-based urinary metabolomics for exploring the treatment effects of Radix ginseng-Schisandra chinensis herb pair on Alzheimer's disease in rats [J]. J Sep Sci, 2021, 44 (16): 3158-3166.
- [72] 陈健. 基于网络药理学-代谢组学技术的五味子-石菖蒲醇提取物抗阿尔茨海默病作用机制初探 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2021.

(收稿日期: 2022-10-17; 修回日期: 2022-11-20)

帕金森病分期治疗的中西医研究进展

李智智¹, 姜媛¹, 路小伟¹, 白呦呦¹, 郭婕², 李华¹, 王强^{1, 2, 3*} (1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西省针灸结合重点实验室, 陕西 咸阳 712046; 3. 咸阳市神经生物学(针灸)重点实验室, 陕西 咸阳 712046)

摘要: 中西医结合治疗帕金森病 (PD) 是目前该领域研究的热点和重点, 而分期治疗是中西医结合治疗的唯一切入点, 也是指导临床中西医结合治疗 PD 的突破点, 其研究意义的重要性尤为突出。文章对 PD 分期治疗进行归纳, 建议早期 PD 单纯使用中医药治疗, 到疾病中晚期后可采取中西医结合治疗。不仅解决了长期以来困扰着人们过早使用西医抗 PD 药物带来的各种不良反应, 而且很大程度的提高了临床治疗有效率。

关键词: 帕金森病; 分期治疗; 中西医; 药物

中图分类号: R742.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0470-07

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.030

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81674086); 陕西省自然科学基金研究计划 (No.2020JM-594); 陕西中医药大学经脉-脏腑相关研究创新团队 (No.YL-09)。

作者简介: 李智智, 男, 硕士研究生, 主要从事针灸治疗对神经退行性疾病干预效应的研究, email: 874509262@qq.com

***通信作者:** 王强, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事针灸治疗对神经退行性疾病干预效应的研究, email: 1107683030@qq.com

Research progress in traditional Chinese medicine and western medicine for Parkinson's disease in various stages

LI Zhi-zhi¹, JIANG Yuan¹, LU Xiao-wei¹, BAI You-you¹, GUO Jie², LI Hua¹, WANG Qiang^{1,2,3*} (1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xiayang Shaanxi 712046; 2. Shaanxi Key Laboratory of Acupuncture & Medicine, Xiayang Shaanxi 712046; 3. Xiayang Key Laboratory of Neurobiology (Acupuncture), Xiayang Shaanxi 712046)

Abstract: Treatment of Parkinson's disease (PD) with integrated traditional Chinese and western medicine is the hot spot and focus of current research. Staged treatment seems to be the only entry point for integrated traditional Chinese and western medicine treatment, and also a breakthrough point to guide clinical treatment of PD with great importance. This article summarized the treatment of Parkinson's disease by stages: early PD could be treated with traditional Chinese medicine alone, while in the middle and late stages of the disease, integrated traditional Chinese and western medicine was preferred. It not only reduced various adverse reactions in the premature use of anti-PD drugs of western medicine, but also improved the efficacy of clinical treatment.

Key words: Parkinson's disease; staged treatment; traditional Chinese and western medicine; medicine

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种慢性神经退行性疾病, 临床中以运动迟缓、肌强直、静息性震颤和步态姿势不稳为主要表现。据报道全世界的 PD 患者已经超 600 万例, 预计到 2030 年我国的 PD 患者将占全球的一半^[1], 且该病越来越趋于年轻化^[2]。据调查显示 PD 患者从确诊到生命结束可长达 10 余年, 可见其长期治疗的必要性^[3]。在运动症状出现前, PD 的退行性病变过程就已经开始了, 在此期间, 及早地对临床症状进行干预和治疗, 可以有效保护多巴胺能神经元, 而达到预防和延缓 PD 进展的作用^[4-6]。对于 PD 呈现长期性且退行性加重的性质, 临床分期的管理治疗显得尤为必要。根据最新中医临床诊疗专家共识^[7] 建议, PD 可分早、中、晚三期治疗, 参考 Hoehn-Yahr 分级和患者生活自理能力将早期 PD 定义为 Hoehn-Yahr 分级 1~2 级, 中期为 Hoehn-Yahr 分级 3~4 级, 晚期为 Hoehn-Yahr 分级 5 级, 并建议在疾病早期以单纯中医药治疗为主, 到疾病中晚期时中西医结合治疗。

1 中医各家分期治疗 PD 经验

中医药在临床中分期治疗 PD 的优势早已凸显。早期或超早期的 PD 患者临床症状较轻, 且主要以非运动症状为主, 而中医药在改善早期 PD 非运动症状有显著的优势^[8], 能弥补西医抗 PD 药物只能控制运动症状不能改善非运动症状的缺陷^[9], 因此中医药的重要性在早期 PD 的治疗中

意义重大。随着疾病进展, 患者的各项临床症状加重, 运动症状也逐渐显现, 此时则需要中西医结合治疗达到增效减毒、保护神经的目的^[10]。因此, 中医药需全程参与 PD 的治疗。现将各大医家分期治疗 PD 经验及用药特点总结如下。

1.1 赵国华教授治疗 PD 经验

根据改良后 Hoehn-Yahr 分期, PD 治疗可分早、中、晚三期治疗^[11-12]。赵国华教授认为早期 PD 患者各项临床症状轻、患病时间短, 尚可正常生活工作, 临床多以肝郁脾滞、筋脉失养多见, 方选逍遥散疏肝柔筋以治标, 归脾汤健脾益气以治本。中期 PD 患者症状加重, 临床以本虚标实多见, 本虚为肝脾肾三脏亏虚, 标实为痰瘀阻络, 方首选柴胡舒肝散合温胆汤加减健脾豁痰、活血化瘀, 后以通窍活血汤合左归饮加减活血通窍、滋补肝肾; 又因中期 PD 患者已经出现了明显的运动障碍, 中医药在改善运动障碍方面起效慢、针对性差, 因此需介入起效快、针对性强的西医抗 PD 药物控制患者的运动症状。常用的西医抗 PD 药物有左旋多巴、多巴胺受体激动剂、抗胆碱能。晚期 PD 患者已经丧失自主生活能力, 患者精血、阴阳虚损至极, 又因久病折磨产生一系列的心理障碍以及耐药性等问题, 错综复杂, 因此治疗需从多途径综合考虑, 以中医药大补阴丸、虎潜丸、海马补肾丸等补益精血的同时配以西医抗 PD 药物控释剂等增加患者血药浓

度, 治疗的同时还需考虑对患者的心理辅导, 对于提高临床疗效以及患者生存质量非常重要。

1.2 何建成教授治疗 PD 经验

根据改良 Hoehn-Yahr 分级量表结合临床经验对 PD 进行分期^[13-14]。何建成教授认为早期患者多以虚、瘀为见, 临床症状较轻以非运动症状为主, 治疗首当补虚养阴、活血化瘀, 药选党参、黄芪、山药、熟地等补虚养阴, 同时辅以当归、丹参、赤芍等活血化瘀。中期患者虚实夹杂, 虚为气阴两虚, 实为血瘀、痰热, 且临床各种症状逐渐加重, 治疗当以中西结合, 在左旋多巴控制运动症状的同时配以中药减轻毒性, 药用阿胶、龟板、党参、黄芪、西洋参等补气养阴, 并辅以全蝎、蜈蚣、鳖甲、水蛭等解毒散结、活血通瘀。晚期患者气血阴阳俱虚, 且久病入络, 加左旋多巴类制剂的毒副作用开始显现, 病情进一步加重, 治疗应补虚养阴、减毒祛瘀。针对“虚损”可选党参、黄芪、西洋参、阿胶、熟地等, 针对“瘀毒”则用全蝎、水蛭、穿山甲、川芎等。且治疗时注重调肝的同时当不忘健脾理气, 再综合考虑患者的心理障碍多途径治疗, 临床疗效显著。

1.3 丁氏学派治疗 PD 经验

丁氏学派结合改良 Hoehn-Yahr 分级量表从脾分期论治 PD 在临床中取得了较好疗效^[15], 认为早期患者各种临床症状不明显, 中医辨证为脾虚夹瘀, 治疗可以健脾除湿理气通窍之法, 可用 PD I 期方加减; 中期一些运动症状开始凸显, 辨证为脾肾阳虚、湿阻中焦、肝郁气滞、治疗以健脾升阳、平肝止颤、行气通便为主, 以 II 期方加减治疗; 晚期患者各项临床症状加重, 舌像多见胖大或有瘀斑, 脉沉涩或沉弦, 以健脾除湿、补肾温阳为法, 使用 III 期方加减治疗。丁氏学派认为不论是在 PD 的哪个阶段, 对患者的肠道菌群进行调节, 都可能给 PD 的治疗带来新的契机。

1.4 鲍远程教授治疗 PD 经验

鲍远程教授认为 PD 病机为本虚标实, 治疗时应各有侧重, 应当分期与分型相结合治疗^[16]。早期患者的临床症状较轻, 病程为 1 年以内, 此期患者临床以痰热动风和血瘀动风常见, 治疗应化痰、祛瘀、熄风, 在祛邪的同时当不忘固本, 自创抗震止痉胶囊用于早期的治疗。中期 PD 患者一般病程在 3 年以上, 此期患者临床多以脾气亏虚、肝肾不足, 治疗应阴阳并补、肝肾同治, 以定振丸、大定风珠、二仙汤为基础组方补益气血, 调和肝肾, 其又针对不同病机加行气、敛汗、

通下、化痰、行瘀之品佐以治疗, 大大降低了西药抗 PD 药物产生的不良反应。晚期患者病程多在 7 年以上, 自主生活困难, 各项临床症状严重, 此期患者多为脾肾阴阳两虚, 兼以痰浊、血瘀阻滞窍脉, 治疗以地黄饮子为基础方阴阳双补, 并佐以水蛭、全蝎、钩藤、白豆蔻等破血逐瘀、搜风通络。此外, 在临证用药的同时兼以砂仁、白术、鸡内金等顾护脾胃, 使气血生化有源而延缓五脏衰退。最后考虑 PD 病程日久、病机复杂, 治疗需循序渐进, 可以将汤剂改为丸剂便于长期服用。

1.5 马云枝教授治疗 PD 经验

马云枝教授其主张在疾病发展的不同时期, 治疗当审证求因, 权衡主次, 处方用药需以平和为贵^[17]。早期患者病情较轻, 以肝肾亏虚或肝阳上亢多见, 治疗应滋水涵木, 自制熄风定颤丸来补益肝肾、平肝熄风。中期患者病情加重, 临床常见患者肌肤甲错、唇甲舌质紫暗, 脉沉细涩, 辨为瘀阻脉络, 治以活血通络、逐瘀为法, 方用血府逐瘀汤为主加减治疗, 又因中药在运动障碍方面起效慢, 需配合西药普拉克索、金刚烷胺、多巴丝肼片等对症治疗。晚期病情加重, 临床表现复杂多变, 此时应多途径治疗, 方用归脾汤或八珍汤加减治疗。马云枝教授认为运用中医药分期辨证治疗不仅可以延缓疾病进展, 减少西药不良反应, 一些患者在停用西药的情况下甚至可以继续保持良好的生活质量。

1.6 最新 PD 中医临床诊疗专家共识

PD 中医临床诊疗专家共识将 PD 命名为颤拘病^[7], 并确定了 5 个基本证型: 阴血亏虚, 筋失濡养证; 阴血亏虚, 肝风内动证; 少阳气郁, 痰火内扰证; 中气亏虚, 肝风内动证; 阴损及阳, 阴阳两虚证。且认为早期治疗主要以滋阴养血或滋阴养血熄风为主, 针对阴血亏虚, 筋失濡养, 强推荐连梅四物汤加减治疗 (I b 级); 针对阴血亏虚, 肝风内动, 强推荐滋阴熄风汤加减治疗 (I b 级)。中期则以补养气血, 活血熄风为主, 针对中气亏虚, 肝风内动, 推荐补中益气汤加减治疗 (V 级)。到了晚期需阴阳双补, 活血熄风, 强推荐地黄饮子加减治疗 (I a 级)。并建议早期单纯使用中医药治疗, 等到疾病中晚期则采用中西医结合治疗, 为后续指导临床分期治疗和诊断 PD 奠定了客观基础。

2 西药抗 PD 药物分期治疗

启动症状治疗药物, 提高脑内多巴胺浓度或

刺激多巴胺受体，仍然是治疗运动症状的主要方法。针对早期 PD 患者出现的运动症状可用西医抗 PD 药物对症治疗，但由于这些药物均未被证明具有神经保护或调节疾病的作用，因此无需在所有患者确诊时开始治疗^[18]。随着疾病的发展及运动症状的出现，此时则可在“剂量滴定”的原则下缓缓加入西医抗 PD 药物，力求用最小的剂量达到满意的临床治疗效果。

2.1 早期 PD 治疗

2.1.1 左旋多巴 此药在开始使用的 3~5 年内有较好的治疗效果，长期服用会出现“开关现象”和“左旋多巴恐惧症”等不良反应。根据文献^[19]报道，服用左旋多巴的 PD 患者在 4~6 年后发生运动并发症的风险为 40%，平均发病时间估计为 6.5 年^[19]。年轻患者应尽量推迟使用，老年患者可早期从小剂量开始，推荐初始剂量小于 400 mg，有助于减少运动并发症的发生^[20]。

2.1.2 多巴胺受体激动剂 DAs 包括麦角和非麦角衍生激动剂。普拉克索、罗匹尼罗和透皮罗替戈汀是常用于 PD 的 3 种非麦角衍生激动剂，并已被证明对疾病早期患者作为单一疗法有效，但常常会引起日间嗜睡、直立性低血压、神经精神疾病等不良反应^[21]。麦角衍生的 DAs，如溴隐亭、卡麦角林、培高利特等，由于其可以导致纤维化以及瓣膜性心脏病，大多地区已经减少了使用^[22]。有研究表明 DAs 与冲动控制障碍（ICDs）相关，如病理性赌博、强迫性性行为或强迫性购买，这也是与左旋多巴相比最显著的不良反应^[23]。70 岁以上的患者因耐受性差应避免使用 DAs，又因 DAs 可导致催乳素浓度降低，所以哺乳期的妇女也禁用这些药物。年龄较小的 PD 患者对 DAs 有更好的耐受性，因此可替代左旋多巴成为一线药物，但其改善运动症状的效果不如左旋多巴。

2.1.3 单胺氧化酶（MAO-B）抑制剂 包括司来吉兰、雷沙吉兰两种，两者都被临床验证有效。在日本一项为期 12 周的 III 期对照试验研究表明，司来吉兰用于早期 PD 患者单独给药能明显降低统一帕金森病评定量表（UPDRS）的第 I、II、III 部分评分，且患者耐受性良好临床疗效可靠，推荐每日剂量 2.5~5 mg，为防止引起失眠需早晨或中午服用^[24]。中国一项为期 26 周的随机、双盲临床试验研究表明雷沙吉兰单药治疗中国早期 PD 患者可显著降低 UPDRS 第 I 部评分，且对 UPDRS II、III 部分以及反映参与者自身健

康状况感知的 EQ-5D 视觉模拟量表（VAS）评分也有所改善，一日只需 1 mg，安全且耐受性良好^[25]。有研究表明在 PD 早期使用 MAO-B 抑制剂还可以保护神经，延缓疾病进展^[26]。

2.1.4 抗胆碱能药物 研究表明抗胆碱能药物可能对伴震颤和僵硬的 PD 患者有一定的治疗作用，其可能机制是通过抑制纹状体对多巴胺的重吸收和储存^[27]。常用的药物有苯海索、苯扎托品，推荐剂量为 1~2 mg tid，狭角型青光眼或前列腺肥大的患者禁用，由于其可以导致记忆和认知功能减退，故仅限于认知完整的年轻患者使用。

2.1.5 金刚烷胺 金刚烷胺可能的药理机制是促进神经末梢释放多巴胺且减少多巴胺的再摄取，对伴有强直、少动、震颤的 PD 患者疗效明显，尤其是处于早期阶段的患者^[28]。最新研究表明通过对 PD 患者的静脉重复给药，能快速缓解运动症状并有效控制非自主运动的发生^[29]。推荐剂量为 100 mg bid，16:00 前给药以免引起失眠。不良反应可能会引起视觉幻觉、足踝水肿和网状青斑。

2.1.6 腺苷 其主要在基底神经节中发挥作用，作为治疗 PD 的新手段，腺苷 A2A 拮抗剂药物也是美国 FDA 在过去 20 年中批准的第一种用于 PD 治疗的非多巴胺能药物^[30]。其早已在日本被临床上验证作为单药治疗早期 PD 安全有效且耐受性良好，但却不能改善运动症状^[31]，目前主要用来辅助左旋多巴和脱羧酶抑制剂减短“关”期^[32]。

2.2 中晚期 PD 治疗

运动波动和异动症是中晚期 PD 患者经常出现的运动症状，都是因为疾病进展发展而来或是因为长期服用西医抗 PD 药物产生的不良反应。此期常常需要三四个药联合使用进行治疗，或者选择免疫疗法、基因疗法、手术治疗等多途径综合治疗。

2.2.1 运动波动的治疗 运动波动主要包括剂末恶化、“开关现象”、冻结步态。剂末恶化是指在下次服药之前 PD 的运动症状会恶化，针对剂末现象，可通过缩短左旋多巴的用药间隔进行多次给药解决，改变左旋多巴释放形式来延长药效。临床中可通过添加儿茶酚氧位甲基转移酶（COMT）抑制剂延长左旋多巴的半衰期是一种有效解决剂末现象的方法^[33]，或者通过增加多巴胺受体激动剂及用量、加用 MAO-B 抑制剂、金刚烷胺等辅助药物来减少左旋多巴高峰血药浓度。“开关现象”是指随着疾病的进展产生的急剧的不规则运动症状的改善（开）或加剧（关），目

前没有很好的治疗方法。美国一项研究表明一种注射用的 DR 激动剂阿朴吗啡能够显著改善“关”的症状，在短时间内就可以改善运动症状，但是肾功能不全的患者应小剂量使用^[34]。冻结步态分为“开期”和“关期”冻结，表现为患者在启动行走时突然出现下肢的运动阻滞。开期冻结可通过减少左旋多巴的用量，增加 MAO-B 抑制剂、多巴胺受体激动剂治疗。关期冻结治疗则与之相反，需增加左旋多巴的剂量或其他多巴胺能药物^[35]。

2.2.2 异动症的治疗 异动症主要包括剂峰异动症、双相异动症和“关”期肌张力障碍^[36]。剂峰异动症的出现主要是由于左旋多巴血药浓度高峰期间继续给患者用药而引起，一般在用药后 2 h 内出现。较轻的异动症不需要特殊治疗，对于严重的异动症可选择多次左旋多巴给药，对于不能接受降低药物剂量治疗的患者，可选择辅助抗异动症的药物控制减少剂量而带来的其他运动症状。普拉克索在一项临床试验研究被证明可减轻异动症^[37]。多项研究表明金刚烷胺也可以减少剂峰异动产生的运动障碍，已经作为美国抗异动症的基础用药^[38-39]。双向异动症的出现是由于患者脑内的左旋多巴血药浓度不稳定一般发生在上升或下降时，这种情况比较少见。治疗可通过多次给予左旋多巴治疗，或可用半衰期较长的缓释剂型的抗 PD 药物。“关”期肌张力障碍是指左旋多巴血药浓度下降至低谷而导致机体出现一系列的问题。临床治疗可通过睡前服用左旋多巴控释剂或者长效多巴胺受体激动剂治疗，亦可晨起嚼服左旋多巴。而对于由左旋多巴水平上升或下降引起的肌张力障碍，可通过较高剂量的左旋多巴或经皮注射阿朴吗啡治疗，可能取得疗效^[40]。

3 中西医药物结合分期治疗

3.1 早期 PD 治疗

中西医药物结合治疗在临床中早已运用于 PD 的各个阶段且证实疗效显著。王开达^[41]在升阳益胃冲剂治疗早期 PD 患者的临床试验观察中，将符合纳入标准的 60 例早期 PD 患者随机分为美多芭（多巴丝肼片）、吡贝地尔缓释片、盐酸普拉克索片等基础西药联合升阳益胃冲剂对照治疗，分别于治疗开始前及治疗 14 d 后、28 d 后观察 UPDRS (I & II & III)、帕金森病非运动症状评价量表 (NMSS)、疲劳严重度量表 (FSS)，结果发现中西结合治疗组在改善 PD 早期患者的某些非运动症状（疲劳、认知、睡眠、抑郁、焦虑、便秘等）都显著优于单纯西药组。升阳益胃

冲剂通过发挥其多靶点、多通路的协同作用而达到综合的治疗效果，临床疗效十分显著。高甜^[42]在治疗早中期气血亏虚型 PD 患者中，采用多巴丝肼片联合八珍汤治疗，3 个月后观察发现中西医联合用药组的 UPDRS (II、III) 量表评分、帕金森病生活质量量表 (PDQ-39) 评分都明显低于单纯西药组，且治疗的总有效率明显高于西药组 (90.00% vs 66.67%)。八珍汤加减治疗 PD 气血亏虚型患者，不仅可明显改善 PD 患者的运动症状和非运动症状，提高患者生活质量，而且还可以减少多巴丝肼片的用量，从而最大程度地降低毒副作用。

3.2 中晚期 PD 治疗

张朝贵等^[43]在治疗 43 例有“开”“关”现象的晚期 PD 患者中，采用多巴丝肼片联合补肾通络胶囊治疗，观察治疗后的 4、8、12 周患者的开关期时间、Webster 评分、治疗的总有效率，各项结果显示中西医结合治疗都优于单纯西医治疗。郑太昌等^[44]在治疗 70 例肝肾阴虚型异动症的 PD 患者中，采用多巴丝肼片、吡贝地尔联合熄风定颤汤治疗，治疗 28 d 后，中西医结合治疗在日常活动积分、异动症积分、运动功能积分都优于单纯西药组，且以 77.14% 的治疗有效率明显高于单纯西药组的 34.28%。中西医结合治疗 PD 较单纯的西药治疗对各期的 PD 患者更具有优势，在改善运动症状、非运动症状及各种并发症等方面都明显优于单纯西药治疗，且通过中药的配合使用大大地降低了西医抗 PD 药物的用量，不同程度地减少了毒副作用。

4 针药结合治疗

针灸作为治疗 PD 的辅助疗法在临床中也被广泛应用。兰思杨等^[45]运用金针王乐亭经验方配合火针治疗符合纳入标准的 17 例 PD 患者，在继续服用之前的西药配合针刺连续治疗 12 周，观察 UPDRS 评分和 PDQ-39 评分，发现配合针刺治疗的患者明显低于单纯西药治疗的患者，且治疗的总有效率为 94.1%。董勤建等^[46]运用头电针联合多巴丝肼片治疗 PD 患者睡眠障碍，将符合纳入标准的 72 例患者随机分为单纯多巴丝肼片治疗的对照组和多巴丝肼片配合头电针的治疗组，在治疗 30 d 后观察患者 Webster 运动症状评分和帕金森病睡眠量表 (PDSS) 睡眠评分，结果显示两组的 Webster 评分和 PDSS 评分均明显改善且治疗组优于对照组。邱丽蓉等^[47]对患有 PD 异动症的患者用西药联合针刺治疗取得了较好疗效，治

疗首先停用金刚烷胺，其他服用的抗 PD 药物均适当减量，配合固本通督针刺法，取 T₁ ~ L₅ 夹脊穴、肝俞、肾俞为一组；百会、前神聪、印堂、关元、气海、后溪、足三里、三阴交、合谷、太冲为另一组，两组交替隔日针刺，连续治疗 6 周。患者治疗后震颤频率、幅度、睡眠质量、四肢强直症状较前明显改善；UPDRS-III、UPDRS-IV 评分较前明显下降，3 个月后对患者进行随访，患者各项临床症状缓解，病情稳定。

5 总结

何时开始西医药物治疗 PD 的问题长期存在争议，有两种不同的观点：一种是经典的“观察与等待”，意味着推迟治疗^[48]；另一种是基于起始治疗，一旦确诊就马上给予对症治疗，可以有效地控制运动症状，提高 PD 患者的生活质量^[49]。两种治疗方法各有利弊，延迟治疗可能会造成疾病后期更严重的残疾和患者更高的生产力丧失，但是相比于早期治疗，减少了更早使用抗 PD 药物产生的不良反应和巨额治疗成本，直到祖国医学的加入才弥补了早期 PD 治疗的这一尴尬期。中医药不仅仅可以用于早期 PD 非运动症状的治疗，在 PD 的全程治疗中都可以使用，既可以减少西医抗 PD 药物的用量，降低毒性，还可以协助西医抗 PD 药物控制运动症状，提高患者的生活质量。大量研究已经证实中西医结合治疗 PD 较单纯的西医抗 PD 药物确有优势，在未来将会是治疗 PD 的重点，临床中选准用药时机，把握好西医抗 PD 药物的介入时机是中西医分期治疗的关键，对于改善患者临床症状、提高生活质量及提高临床治疗有效率意义重大，因此，未来亟需探索出一套科学规范的中西医结合治疗方案。

参考文献

[1] Li G, Ma J, Cui S, et al. Parkinson's disease in China: a forty-year growing track of bedside work [J]. *Transl Neurodegener*, 2019, 8 (1): 1-9.

[2] Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030 [J]. *Neurology*, 2007, 68 (5): 384-386.

[3] Schapira AHV. Treatment options in the modern management of Parkinson disease [J]. *Arch Neurol*, 2007, 64 (8): 1083-1088.

[4] Jagadeesan AJ, Murugesan R, Devi SV, et al. Current trends in etiology, prognosis and therapeutic aspects of Parkinson's disease: a review [J]. *Acta Biomed*, 2017, 88 (3): 249-262.

[5] Armstrong MJ, Okun MS. Time for a new image of Parkinson's disease [J]. *JAMA Neurol*, 2020, 77 (11): 1345-1346.

[6] Siderowf A, Stern MB. Preclinical diagnosis of Parkinson's disease: are we there yet? [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2006, 6 (4): 295-301.

[7] 雒晓东, 李哲, 朱美玲, 等. 帕金森病(颤拘病)中医临床诊疗专家共识 [J]. *中医杂志*, 2021, 62 (23): 2109-2116.

[8] 雒晓东, 郑春叶, 苏巧珍. 帕金森病中医认识与诊疗策略 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2018.

[9] Armstrong MJ, Okun MS. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: a review [J]. *JAMA*, 2020, 323 (6): 548-560.

[10] 袁灿兴, 刘振国. 中西医结合治疗早期帕金森病专家共识(2021) [J]. *上海中医药杂志*, 2022, 56 (1): 1-6.

[11] 赵国华. 再论帕金森病的分期治疗 3 法 [J]. *中医杂志*, 2005, 46 (7): 541-543.

[12] 赵国华. 老年颤证分期治疗 3 法 [J]. *中医杂志*, 1997, 38 (5): 294-295.

[13] 徐鹏恒, 夏菁, 王利. 何建成分阶段治疗帕金森病的思路与方法 [J]. *中医文献杂志*, 2018, 36 (5): 39-42.

[14] 王利, 张建英, 徐鹏恒, 等. 何建成教授治疗帕金森病睡眠障碍经验 [J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36 (8): 1960-1962.

[15] 潘卫东, 朱旭莹, 蔡滢. 从脾分期辨证论治帕金森病: 丁氏内科程门雪流派学术思想的应用 [J]. *神经病学与神经康复学杂志*, 2021, 17 (1): 1-5.

[16] 方向, 金珊, 鲍远程. 鲍远程教授分期论治帕金森病经验 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2018, 42 (5): 367-369.

[17] 娄爱琴, 沈晓明, 马云枝. 马云枝分期治疗帕金森病经验 [J]. *中医杂志*, 2018, 59 (7): 558-560.

[18] Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease [J]. *Lancet*, 2015, 386 (9996): 896-912.

[19] Tran TN, Vo T, Karen F, et al. Levodopa-induced dyskinesia: clinical features, incidence, and risk factors [J]. *J Neural Transm*, 2018, 125: 1109-1117.

[20] Stalevo reduction in dyskinesia evaluation in Parkinson's disease, factors predictive of the development of levodopa-induced dyskinesia and wearing-off in Parkinson's disease [J]. *Mov Disord*, 2013, 28: 1064-1071.

[21] Binde CD, Tvete IF, Gåsemyr JI, et al. Comparative effectiveness of dopamine agonists and monoamine oxidase type-B inhibitors for Parkinson's disease: a multiple treatment comparison meta-analysis [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2020, 76 (12): 1731-1743.

[22] Fox SH, Katzenschlager R, Lim SY, et al. International Parkinson and movement disorder society evidence-based medicine review: update on treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease [J]. *Mov Disord*, 2018, 33 (8): 1248-1266.

[23] Bhattacharjee S. Impulse control disorders in Parkinson's disease: review of pathophysiology, epidemiology, clin-

- ical features, management, and future challenges [J]. *Neurol India*, 2018, 66 (4): 967.
- [24] Mizuno Y, Hattori N, Kondo T, et al. A randomized double-blind placebo-controlled phase III trial of selegiline monotherapy for early Parkinson disease [J]. *Clin Neuropharmacol*, 2017, 40 (5): 201.
- [25] Zhang Z, Wang J, Chen S, et al. Efficacy and safety of rasagiline in Chinese patients with early Parkinson's disease: a randomized, double-blind, parallel, placebo-controlled, fixed-dose study [J]. *Transl Neurodegener*, 2018, 7 (1): 1-9.
- [26] McCormack PL. Rasagiline: a review of its use in the treatment of idiopathic Parkinson's disease [J]. *CNS Drugs*, 2014, 28 (11): 1083-1097.
- [27] Müller B, Assmus J, Larsen JP, et al. Autonomic symptoms and dopaminergic treatment in de novo Parkinson's disease [J]. *Acta Neurol Scand*, 2013, 127 (4): 290-294.
- [28] 赵桂宏, 白向荣, 李晓玲, 等. 金刚烷胺治疗帕金森病的有效性和安全性评价 [J]. *中国药理学杂志*, 2011, 46 (23): 1847-1850.
- [29] Khlebtovsky A, Steiner I, Treves T, et al. Effect of repeated intravenous amantadine infusions in patients with Parkinson's disease: an open-label pilot study [J]. *Clin Transl Sci*, 2019, 12 (6): 586-590.
- [30] Chen JF, Cunha RA. The belated US FDA approval of the adenosine A2A receptor antagonist istradefylline for treatment of Parkinson's disease [J]. *Purinerg Signal*, 2020, 16 (2): 167-174.
- [31] Fernandez HH, Greeley DR, Zweig RM, et al. Istradefylline as monotherapy for Parkinson disease: results of the 6002-US-051 trial [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2010, 16 (1): 16-20.
- [32] Mori A, Chen JF, Uchida S, et al. The pharmacological potential of adenosine A2A receptor antagonists for treating Parkinson's disease [J]. *Molecules*, 2022, 27 (7): 2366.
- [33] Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease [J]. *Lancet*, 2004, 363 (9423): 1783-1793.
- [34] Drapier S, Eusebio A, Degos B, et al. Quality of life in Parkinson's disease improved by apomorphine pump: the OPTIPUMP cohort study [J]. *J Neurol*, 2016, 263 (6): 1111-1119.
- [35] 刘振国, 李文涛. 帕金森病运动并发症中西医结合诊治专家共识 (2020) [J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2020, 27 (4): 247-252.
- [36] 王丽娟, 陈海波, 张玉虎. 中国中晚期帕金森病运动症状治疗的循证医学指南 [J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2021, 28 (5): 347-360.
- [37] Utsumi H, Okuma Y, Kano O, et al. Evaluation of the efficacy of pramipexole for treating levodopa-induced dyskinesia in patients with Parkinson's disease [J]. *Internal Med*, 2013, 52 (3): 325-332.
- [38] Ory-Magne F, Corvol JC, Azulay JP, et al. Withdrawing amantadine in dyskinetic patients with Parkinson disease: the AMANDYSK trial [J]. *Neurology*, 2014, 82 (4): 300-307.
- [39] Oertel W, Eggert K, Pahwa R, et al. Randomized, placebo-controlled trial of ADS-5102 (amantadine) extended-release capsules for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease (EASE LID 3) [J]. *Mov Disord*, 2017, 32 (12): 1701-1709.
- [40] Davie CA. A review of Parkinson's disease [J]. *Br Med Bull*, 2008, 86 (1): 109-127.
- [41] 王开达. 升阳益胃冲剂治疗早期帕金森病的临床与实验研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2021.
- [42] 高甜. 八珍汤联合多巴丝肼片治疗帕金森病气血亏虚型的临床观察 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2021.
- [43] 张朝贵, 张红, 瞿昌华, 等. 补肾通络胶囊联合美多巴治疗晚期帕金森病的临床研究 [J]. *中成药*, 2014, 36 (2): 263-265.
- [44] 郑太昌, 郑莹. 熄风定颤汤对肝肾阴虚型帕金森病异动症患者 UA、SOD 水平的影响 [J]. *河南中医*, 2020, 40 (3): 419-422.
- [45] 兰思杨, 王春琛, 刘慧琳, 等. 金针王乐亭经验方配合火针治疗原发帕金森病 17 例 [J]. *中国针灸*, 2019, 39 (5): 487-488, 494.
- [46] 董勤建, 李晓艳, 唐明群, 等. 头电针治疗帕金森病睡眠障碍的随机对照研究 [J]. *实用医院临床杂志*, 2018, 15 (5): 214-216.
- [47] 邱丽蓉, 王盛春. 帕金森病异动症案 [J]. *中国针灸*, 2021, 41 (3): 342.
- [48] Aminoff MJ. Treatment should not be initiated too soon in Parkinson's disease [J]. *Ann Neurol*, 2006, 59 (3): 562-564.
- [49] Gonera EG, Hof MV, Berger H, et al. Symptoms and duration of the "premotor" phase in Parkinson's disease [J]. *Mov Disord*, 1997, 12 (6): 871-876.

(收稿日期: 2022-07-07; 修回日期: 2022-09-15)

多准则决策分析在药品管理领域中的应用研究进展

潘欢妍^{1,2}, 蔡俊³, 王倩^{1,2}, 盛梦迪^{1,2}, 李俐^{3*} (1. 中国药科大学南京鼓楼医院, 南京 210009; 2. 中国药科大学基础医学与临床药学院, 南京 210009; 3. 南京大学医学院附属鼓楼医院药学部, 南京 210008)

摘要: 多准则决策分析 (MCDA) 是一种系统的决策方法和思维, 是运筹学的一个分支学科, 其应用范围非常广泛。近几年, MCDA 在药品评估、遴选和定价等药品管理领域的应用迅速增加。本文通过检索相关文献, 对 MCDA 的方法学及其在国内外药品管理领域的应用进行综述, 以期在药品管理领域的决策行为提供参考依据。

关键词: 多准则决策分析; 卫生技术评估; 药品遴选; 效益风险评价

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)02-0477-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.031

Research progress in application of multi-criteria decision analysis in drug management

PAN Huan-yan^{1,2}, CAI Jun³, WANG Qian^{1,2}, SHENG Meng-di^{1,2}, LI Li^{3*} (1. Nanjing Drum Tower Hospital, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; 2. School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; 3. Department of Pharmacy, Nanjing Drum Tower Hospital, the Affiliated Hospital of Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008)

Abstract: Multi-criteria decision analysis (MCDA) is a method of systematic decision and thinking, and is a branch of operation research, with wide application. In recent years, MCDA is used in drug management, such as drug evaluation, selection and pricing. By searching related literatures, the methodology of MCDA and its application in drug management field at home and abroad were reviewed, hoping to provide reference for decision behaviors in drug management.

Key words: multi-criteria decision analysis; health technology assessment; drug selection; benefit risk assessment

随着医药行业的不断发展, 新兴卫生技术不断涌现, 决策者往往需要从多维度评估和衡量卫生技术的价值^[1], 在不同的价值组合中进行权衡取舍, 从而做出最优选择。而医药卫生决策中涉及的许多问题往往都受到不同利益相关者价值取向的影响, 具有不确定性, 单纯靠经验法则进行决策, 结果多由于过程中存在的主观性和不透明性而不尽如人意。多准则决策分析 (MCDA) 是一种能够帮助决策者系统地考虑各种影响因素, 指导决策者和相关利益主体之间进行商议和沟通, 并产生最终决策的辅助工具^[2]。由于 MCDA 方法和应用的多样性及灵活性, 现已经被应用于各行业的决策过程中, 但其在我国药品管理领域的应用价值未得到充分认识。本文以“多准则决策分析”“卫生技术评估”“效

益风险评估”“药品遴选”“MCDA”“multiple criteria decision”“HTA”“BRA”“benefit risk assessment”“risk benefit assessment”等为关键词在“中国知网”“维普网”和“PubMed”中进行文献检索并学习, 介绍 MCDA 的基本理论及其在药品管理领域中的应用现状并提出发展建议, 以促进 MCDA 在我国药品管理领域中的应用。

1 MCDA 的基本理论

1.1 MCDA 的概念

Howardr 和 Ralphk 在 1976 年首次引入了 MCDA 这一概念, 并将其描述为决策理论的延伸, 涵盖了具有多个属性和目标的任何决策^[3]。从实践角度来看 MCDA 就是当决策者在面对需要考虑多因素、多标准、多利益相关者的复杂问题时, 制订多个准则

作者简介: 潘欢妍, 女, 硕士研究生, 主要从事临床药学和医院药学研究, email: 1033620695@qq.com * 通信作者: 李俐, 女, 主任药师, 主要从事临床药学和管理药学研究, email: njgllily@163.com

并设置相对权重，通过评分系统将价值量化从而进行决策的一种工具。

1.2 MCDA 实施的基本步骤

一个公平和明确的决策过程应该满足两个要求：支持需要考虑多个因素的复杂审议过程和有助于决策结果的合法性。而 MCDA 可通过建模，设置价值矩阵，将不同层级的利益相关者都纳入决策过程中来满足这两个功能。为防止 MCDA 在医疗保健领域被滥用，误导决策者，2014 年，国际药物经济学和产出研究协会

(International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research, ISPOR) 成立工作组，研究并制订 MCDA 模型在卫生决策中的实施步骤。2016 年，ISPOR 工作组提出了一个包含 8 个步骤的框架^[4-5]，这一框架是目前最为全面的 MCDA 评价实施框架(见表 1)。决策者首先要分析决策问题，识别考量影响决策的所有因素，制订一个系统化的评价标准体系，并为每个评价标准设置权重，通过正式的流程来评估备选方案和确定优先顺序，决策者和利益相关者合作，为决策过程提供支持。

表 1 MCDA 模型在卫生决策中的实施步骤描述

Tab 1 Implementation of multi-criteria decision analysis model in health decision making

步骤	描述
定义决策问题	明确决策目标；咨询决策者、专家和利益相关者的意见；充分理解、描述决策问题；明确备选方案、利益相关者以及决策可能面临的问题
选择和构建评价标准	从以前决策的文件、支持相关决策的评估、对利益相关者和优先事项的研究以及临床治疗指南等确定评价标准，可构建“价值树”将整个标准体系分为标准和子标准
衡量绩效	在绩效矩阵中，展示针对每个标准的每个替代方案的绩效评估结果
评分	在标准内捕获利益相关者对绩效变化的偏好强度，将不同单位的绩效衡量转化为一个共同的尺度
确定权重	获取利益相关者在各标准之间的偏好，确定准则的权重
计算总分值	将分数乘以该标准的相对权重，以求取加权分数的总和，得出备选方案的总评分
进行不确定性分析	对决策过程中的不确定因素进行分析，以了解决策结果的稳健性 ^[6]
解读评价结果和撰写评价报告	对 MCDA 得到的结果进行解释，综合考量做出最优选择

2 MCDA 在医药卫生领域的应用

2.1 卫生技术评估 (health technology assessment, HTA)

HTA 是指运用循证医学和经济学的对某项卫生技术进行综合评价^[7]。传统的 HTA 提供的证据通常是分散的、非系统的，而 MCDA 可以系统地考虑多个标准，将其与 HTA 结合可以有效建立证据和决策间的联系，加强利益相关者之间的交流与协作，使决策者同时考虑多重因素。有研究建立了 HTA 和 MCDA 联合的决策方法学框架 (The Evidence and Value: Impact On Decision Making, EVIDEM)，EVIDEM 是一个开源的、可共享的决策框架，该框架建立了一套非常全面的标准体系，以促进对决策的所有方面进行系统和明确的审议，可用于医药卫生领域的决策分析^[8]。近几年，MCDA 在国内外的 HTA 领域都有广泛应用^[9-10]。印度尼西亚开展了一项 MCDA 为西爪哇省的艾滋病毒/艾滋病五年战略计划提供评估信息，并被收录于战略文件中^[11]。中国儿童中心借鉴英国国家卫生及医疗优化研究院 (National Institute for Health and Care Excellence, NICE) HTA 的经验，提出 HTA 联合 MCDA 建立儿童用药临床评价体系的方法学框架，并以哮喘控制类用药评价为例初步验证其可行性^[12]。廖星等^[13]也

尝试使用 EVIDEM 证据决策框架构建中成药临床评估方法学体系，创新了我国中成药评价方法。

MCDA 具有很大的潜力支持和改进 HTA，但是在 HTA 中应用 MCDA 仍属于探索性研究，HTA 部门还需要制订明确的方法学和实用准则来协助研究者进行实践，例如，如何选择最合适的 MCDA 类型？如何在权力关系不平衡的情况下兼顾各方的利益？如何保证价值衡量模型和决策规则的合理性与合法性？

2.2 药品遴选

药品遴选是医疗机构制订处方集，是保障临床用药需求的基础，也是药事管理中的重点与难点。其本质就是一个优先确定的过程，即在多个备选方案中根据既定的遴选条件，选择最符合要求的方案。而 MCDA 可以提供兼具科学性和操作性的遴选框架，将药物遴选的原则转化为具体的量化指标，并按指标的重要性赋予一定的比重，指导开展遴选工作，MCDA 让医药人员、专家学者、患者都参与到药品遴选过程中，帮助决策者在决策过程中考虑到多个准则，满足公开透明、多维判断、多方参与以及循证决策的遴选要求。Badia 等^[14]开发了一个反思性 MCDA 框架，通过在肿瘤药物的遴选过程中纳入患者的观点，加强患者与医疗保健系统的联系。Gilbert

等^[15]利用 EVIDEM 建立孤儿药的遴选循证决策框架,在适应加泰罗尼亚本土情况的同时又能完善现有的评估方法,帮助决策者解决面临的伦理困境。胡善联等^[16]运用 MCDA 研究孤儿药的遴选条件,得出造成孤儿药价格高的主要原因,并对波兰、希腊和匈牙利等国的遴选标准,提出我国医管理者对患者的偏好重视程度有待提高这一问题。李正翔等^[17]基于德尔菲法构建《医疗机构药品遴选指南》研究问题及药品遴选指标体系,为日后指南的制订提供基础依据。邱英鹏等^[18]运用 MCDA 方法提出了儿童药品遴选的路径和方法,通过探索和试点验证显示该方案具有较好的可行性,可为后续国家出台药品遴选技术指南提供参考。MCDA 为药品遴选决策提供了一个规范化和科学化的过程,并且已经有了初步探索和经验。我国目前仍缺乏可用于医疗机构遴选药品的指南性文件,MCDA 的应用可为将来指南的制订提供一定的方法学基础和依据。但在实际应用中,要注意不同药品类型(孤儿药、专利药和儿童药等)具有不同价值偏向,应该设置相应的绩效矩阵,灵活应用,避免机械化操作。

2.3 药物效益风险评价 (benefit and risk assessment, BRA)

BRA 是卫生保健专业人员的日常工作,贯穿于药品的全生命周期管理^[19]。传统的效益风险评价可以从定量和定性两个方面进行,但仅定性评价容易受主观影响、透明性差,一些以定性评价为基础的定量评估数值模型已被开发出来^[20],MCDA 就是其中之一。欧洲药品管理局 (European Medicines Agency, EMA) 下属人用药品委员会经评估认为,在现有的各种药品获益风险评价方法中,MCDA 评价的实用性高,具备推广潜力^[21]。Marcelon 等^[22]使用 MCDA 量化男性的四价人乳头瘤病毒重组疫苗的效益风险平衡,结果发现疫苗对预防肛门癌和生殖器疣同样具有有益效果,拓展了疫苗的适应症。FDA 在最近一项关于替格瑞洛的决策中,首次应用 MCDA 作为决策模型进行效益与风险分析,分析结果显示替格瑞洛可用于心血管事件高危患者的一级预防,随后获批^[23]。卢颖等^[24]以双黄连注射剂治疗急性上呼吸道感染为例,建立了基于 MCDA 模型的中药注射剂效益风险评价体系,为比较多种中药注射剂治疗某一疾病的综合价值提供参考。王琳等^[25]通过建立不同剂量沃替西汀治疗重度抑郁症的效益和风险的 MCDA 模型,得出最佳剂量为 $20 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$,为临床上药品剂量选择提供一种新的决策思路。对于单一疗效标准和单一风险

标准,效益/风险被认为是 BRA 衡量的标准,但是药物的 BRA 通常包括多种风险和效益标准,并且在时间的推移中,风险和效益之间的平衡也会随之产生变化,这种情况下,建立基于 MCDA 理论的 BRA 模型可成为 BRA 的新思路,为涉及价值权衡的复杂决策问题提供了一个系统化、可复制、可反复调整的分析框架。尤其对于效益/风险决策来说,纳入患者对效益和不利影响的观点同样重要,显然 MCDA 可以很好地解决这一问题,并且具有显著优势。

2.4 其他

近年来 MCDA 被越来越多地应用到药品临床综合评价,例如北京协和医院联合中国罕见病联盟,组织制订的《多准则决策分析应用于罕见病药品临床综合评价的专家共识 (2022)》^[26],就是应用 MCDA 为评价体系建设提供规范性方法学指导。在 2021 年发布的《儿童药品临床综合评价指南》的制订过程中也强调了以 MCDA 为基本框架是进行综合评价的基本原则和方法^[27]。此外,MCDA 工具还被应用于支持药品采购、定价和医保报销决策^[28-31],评价药物治疗方案^[32]等,逐渐成为医疗保健领域的重要决策工具。

3 讨论与总结

MCDA 在我国药品管理领域的应用仍属于初步探索,还未完全被推广应用,缺乏指导性的参考资料和指南,仍需进一步的研究和实践,验证 MCDA 在我国药品管理决策领域的价值。目前,将 MCDA 应用于药品管理领域仍有一些问题值得注意:为了使 MCDA 得出的决策结果更加公正客观,设计 MCDA 的人员、决策者以及利益相关者必须熟悉决策问题和决策流程,参与到方法设计过程中;利益相关者的类型和数量也可能会影响决策结果,在方案设计时要注意将每一位利益相关者的利益最小化;MCDA 中使用的一些标准,非专业人员可能很难理解,需要提前进行解释,决策设计的许多标准可能无法打分,需要进行专家审议来决定;权重的设置是一项专业活动,容易产生偏差,需要一定的技术水平,决策者需要做好充分的准备工作以提供准确的权重来描述不同标准的相对重要性;还要强化 MCDA 过程中的问责制度,避免个人主观影响和权力压制。

MCDA 作为一个决策工具,可作为将不同观点纳入决策过程的平台,通过共享决策提高决策的透明度和决策者的责任感。需要强调的是,MCDA 并不能够取代价值判断,它只是通过系统化的组织信息来帮助决策者更好地分析评价,以支持他们的决策过程。药品价值评估框架的构建

作为药物政策研究的一个新兴领域得到了广泛的关注,借助 MCDA 建立一个基于证据的价值评估框架,进行规范、透明、科学的药品价值评估,可为新药的审批、临床用药指南制订、药品定价、医保补偿甚至患者的临床用药的选择提供方法学支撑,值得进一步研究和验证。

参考文献

- [1] 耿劲松, 鲍海妮, 余小兰. “证据与价值对决策的影响” 框架在知证决策中应用的方法学 [J]. 中国卫生资源, 2020, 23 (4): 342-347.
- [2] 胡善联. 多准则决策分析在卫生决策领域中的应用价值 [J]. 中国卫生资源, 2020, 23 (4): 325.
- [3] Keeney RL, Raiffa H, Rajala DW. Decisions with multiple objectives: preferences and value trade-offs [J]. *Ieee T Syst Man*, 1979, 9 (7): 403-403.
- [4] Praveen, Thokala, Nancy, et al. Multiple criteria decision analysis for health care decision making—an introduction: report 1 of the ISPOR MCDA emerging good practices task force [J]. *Value Health*, 2016, 19 (1): 1-13.
- [5] Marsh K, Ijzerman M, Thokala P, et al. Multiple criteria decision analysis for health care decision making—emerging good practices: report 2 of the ISPOR MCDA emerging good practices task force [J]. *Value Health*, 2016, 19 (2): 125-137.
- [6] 邢庆华. 基于多准则决策的多源不确定性处理框架及算法的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2020.
- [7] Chen Y, He Y, Chi X, et al. Development of health technology assessment in China: new challenges [J]. *Biosci Trends*, 2018, 12 (2): 102-108.
- [8] Moreno-Calderón A, Tong TS, Thokala P. Multi-criteria decision analysis software in healthcare priority setting: a systematic review [J]. *Pharmacoeconomics*, 2020, 38 (3): 269-283.
- [9] Moreno-Calderón A, Tong TS, Thokala P. Multi-criteria decision analysis software in healthcare priority setting: a systematic review [J]. *Pharmacoeconomics*, 2019, 38 (3): 1-15.
- [10] Baran Kooiker A, Czech M, Kooiker C, et al. Multi-criteria decision analysis (MCDA) models in health technology assessment of orphan drugs—a systematic literature review. next steps in methodology development? [J]. *Frontiers in Public Health*, 2018, 6: 287.
- [11] Marsh K, Thokala P, Youngkong S, et al. Incorporating MCDA into HTA: challenges and potential solution, with a focus on lower income settings [J]. *Cost Eff Resour Alloc*, 2018, 16 (S1): 43.
- [12] 宋子扬, 尉耘翠, 聂晓璐, 等. 基于卫生技术评估联合多准则决策分析建立我国儿童用药临床综合评价方法 [J]. *药物流行病学杂志*, 2019, 28 (10): 681-686.
- [13] 廖星, 郭武栋, 曹庄, 等. 应用卫生技术评估开展中成药临床综合评价 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45 (16): 3749-3758.
- [14] Badia X, Aguarón A, Fernández A, et al. Patient involvement in reflective multicriteria decision analysis to assist decision making in oncology [J]. *Int J Technol Assess Health Care*, 2019, 35 (1): 56-63.
- [15] Gilabert PA, Torrent FJ, Catalan A, et al. Drug evaluation and decision making in catalonia: development and validation of a methodological framework based on multi-criteria decision analysis (MCDA) for orphan drugs [J]. *Int J Technol Assess*, 2017, 33 (1): 111-120.
- [16] 胡善联, 杨燕, 何江江, 等. 罕见病孤儿药遴选标准的多维决策分析 [J]. *中国卫生经济*, 2018, 37 (3): 67-70.
- [17] 李正翔, 段蓉. 基于德尔非法构建《医疗机构药品遴选指南》研究问题及药品遴选指标体系 [J]. *中国医院药学杂志*, 2020, 40 (22): 2372-2376.
- [18] 邱英鹏, 赵琨, 王晓玲, 等. 儿童药品临床综合评价主题的遴选方法初探 [J]. *中国药物评价*, 2021, 38 (3): 177-182.
- [19] 党海霞, 张力, 刘骏, 等. 基于风险-效益的美国 FDA 药品价值评估框架分析与启示 [J]. *药物评价研究*, 2020, 43 (4): 665-669.
- [20] 熊玮仪, 董铎. 基于多准则决策分析模型的药品获益风险评估方法 [J]. *中国药物警戒*, 2017, 12 (132): 54-56.
- [21] European Medicines Agency. Benefit-risk methodology project. Work package 2 report: applicability of current tools and processes for regulatory benefit-risk assessment [EB/OL]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2010/10/WC500097750.pdf [Accessed 2011 Aug 28].
- [22] Marcelon L, Verstraeten T, Dominiak FG, et al. Quantitative benefit-risk assessment by MCDA of the quadrivalent HPV vaccine for preventing anal cancer in males [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2016, 15 (1): 139-148.
- [23] Lackey LG, Garnett CE, Senatore F. Applying decision analysis to inform the US Food and Drug Administration's Benefit-Risk Assessment of Ticagrelor for primary prevention of myocardial infarction or stroke based on THEMIS [J]. *Circulation*, 2021, 144 (8): 655-658.
- [24] 卢颖, 王斯玥, 刘畅, 等. 基于 MCDA 模型构建中药注射剂效益风险评价体系——以双黄连注射剂治疗急性上呼吸道感染为例 [J]. *药物流行病学杂志*, 2017, 26 (7): 499-501, 510.
- [25] 王琳, 李青. 采用多准则决策分析模型评价不同剂量沃替西汀治疗重度抑郁症的效益与风险 [J]. *药物流行病学杂志*, 2020, 29 (2): 77-83.
- [26] 北京协和医院罕见病多学科协作组, 中国罕见病联盟, 张波, 等. 多准则决策分析应用于罕见病药品临床综合评价的专家共识 (2022) [J]. *协和医学杂志*, 2022, 13 (2): 235-254.
- [27] 肖月, 倪鑫, 王天有, 等. 儿童药品临床综合评价技术指南的研究与应用 [J]. *中国药物评价*, 2021, 38 (6): 479-483.
- [28] Elezbawy B, Fasseeh AN, Sedrak A, et al. A multi-criteria decision analysis (MCDA) tool for purchasing off-patent oncology medicines in Egypt [J]. *J Pharm Policy Pract*, 2022, 15 (1): 10.
- [29] Jakab I, Németh B, Elezbawy B, et al. Potential criteria for frameworks to support the evaluation of innovative medicines in upper middle-income countries—a systematic literature

- review on value frameworks and multi-criteria decision analyses [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1203.
- [30] Kolasa K, Zah V, Kowalczyk M. How can multi criteria decision analysis support value assessment of pharmaceuticals? Findings from a systematic literature review [J]. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*, 2018, 18 (4): 379-391.
- [31] Holtorf AP, Kristin E, Assamawakin A, et al. Case studies for implementing MCDA for tender and purchasing decisions in hospitals in Indonesia and Thailand [J]. *J Pharm Policy Pract*, 2021, 14 (1): 52.
- [32] 吕健, 王志飞, 谢雁鸣, 等. 热炎宁合剂治疗急性上呼吸道感染(热毒袭肺证)的临床综合评价 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47 (6): 1476-1483.
- (收稿日期: 2022-07-08; 修回日期: 2022-09-05)

III 型代谢型谷氨酸受体在痛觉调控中的作用

王静^{1, 2}, 高进贤², 高琲², 葛斌², 吴树金^{2, 3*} (1. 宁夏医科大学药学院, 银川 750004; 2. 甘肃省人民医院药剂科, 兰州 730000; 3. 兰州大学药学院, 兰州 730000)

摘要: 代谢型谷氨酸受体 (mGluR) 是 G 蛋白偶联受体, 通过与谷氨酸这一主要中枢神经递质结合后而激活。目前已有 8 种不同的 mGluR 亚型被鉴定出来, 并根据其分子结构、药理学特性和信号转导机制分为 I、II 及 III 型。mGluR 介导了多种生理功能, 如神经元兴奋性和突触可塑性, 但它们同时也参与了如疼痛等多种病理条件下的调控。mGluR 广泛表达于外周及中枢痛觉调控通路中, 近些年来, 随着 III 型 mGluR 新的选择性配体及正性变构调节剂的开发, 使得 III 型 mGluR 在痛觉中的生理及病理性调控作用及机制逐渐明确, 提示 III 型 mGluR 可能是治疗病理性疼痛的潜在靶点。本文就 III 型 mGluR 在痛觉调控中的作用进行综述。

关键词: 代谢型谷氨酸受体; 突触可塑性; 疼痛; 痛觉过敏; 痛觉超敏

中图分类号: R96 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)02-0481-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.032

Role of group III metabotropic glutamate receptors in pain modulation

WANG Jing^{1, 2}, GAO Jin-xian², GAO Bei², GE Bin², WU Shu-jin^{2, 3*} (1. *College of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004*; 2. *Department of Pharmacy, Gansu People's Hospital, Lanzhou 730000*; 3. *College of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000*)

Abstract: Metabotropic glutamate receptors (mGluR) are G-protein coupled receptors activated by the binding of glutamate, the main classical neurotransmitter of the nervous system. Eight mGluR subtypes have been cloned and classified as group I, II, and III based on their molecular, pharmacological and signaling properties. Several physiological functions are mediated such as neuronal excitability and synaptic plasticity by mGluR, which also involve in numerous pathological conditions including pain. Besides mGluR are widely expressed in the peripheral and central pain pathway. The availability of new and more selective allosteric modulators has led to significant advances in our knowledge about the role of the group III mGluR in the pathophysiological mechanism of pain, indicating group III mGluR may be a potential target in the treatment of pathological pain. This paper reviewed the role of group III mGluR in pain regulation.

Key words: metabotropic glutamate receptor; synaptic plasticity; pain; hyperalgesia; allodynia

基金项目: 甘肃省自然科学基金项目 (No.20JR10RA383); 兰州大学中央高校优秀研究生创新项目 (No.lzujbky-2021-it37)。

作者简介: 王静, 女, 硕士研究生, 主要从事疼痛基础与临床研究, email: huhuwon@163.com *通信作者: 吴树金, 女, 副主任药师, 硕士研究生导师, 主要从事疼痛基础与临床研究, email: drug73@163.com

谷氨酸 (glutamate, Glu) 是哺乳动物中枢神经系统中主要的兴奋性神经递质, 存在于整个大脑、脊髓和外周, 并在伤害性刺激和组织、神经损伤时释放增多, 参与痛觉的传递及慢性疼痛相关的中枢敏化。谷氨酸通过激活两类受体来介导其作用, 分别是离子型谷氨酸受体 (ionic glutamate receptor, iGluR) 和代谢型谷氨酸受体 (metabotropic glutamate receptor, mGluR) [1]。

关于 iGluR 类的药物因为不良反应多, 研究受到限制。如氯胺酮具有强大的镇痛特性, 然而, 由于其潜在的拟精神作用, 对氯胺酮这类 iGluR 药物的使用仅限于可以进行临床监测的环境 [2]。近年来对 mGluR 在疼痛中作用的研究日益深入。mGluR 是 C 家族 G 蛋白偶联受体, 参与调节整个中枢神经系统的突触传递和神经元兴奋性, 在整个神经系统的突触前膜和突触后膜表达。根据氨基酸序列同源性、胞内 G 蛋白偶联信号转导机制及配体选择等药理学特性 (见图 1), 将 mGluR 分为 I 型、II 型和 III 型共计 8 种 (见表 1), 其中 III 型包括 mGluR₄、mGluR₆、mGluR₇ 和 mGluR₈。除 mGluR₆ 仅在视网膜内存在外 (与疼痛无明显相关性), 其他 III 型 mGluR 都在外周和中枢神经系统中广泛表达, 在不同的解剖区域具有一定的亚型特异性 [3]。本文就近年 III 型 mGluR 在不同脑区的分布、突触的定位及可能的突触前受体调节模式在痛觉调控中的作用进行综述, 以期 III 型 mGluR 痛觉调控的相关研究提供参考。

表 1 代谢型谷氨酸受体分型
Tab 1 Classification of mGluR

亚型	跨膜信号转导机制	激动剂	拮抗剂	
I 型	mGluR ₁	PLC↑	DHPG	CPCCOEt
	mGluR ₅	PLC↑	DHPG	MPEP
II 型	mGluR ₂	cAMP↓	LY354740	EGLU
	mGluR ₃	cAMP↓	LY379268	LY341495
III 型	mGluR ₄	cAMP↓	L-AP4	CPPG
	mGluR ₆	cAMP↓	L-SOP	MAP4
	mGluR ₇	cAMP↓	PPG	MMPIP
	mGluR ₈	cAMP↓	(S)-3, 4-DCPG	—

1 III 型 mGluR 的结构和生理功能

1.1 mGluR 的结构

mGluR 由 1 个大的细胞外亲水性 N 端 (N-terminal) 结构域、7 个跨膜结构域 (hepatahelical domain, HD) 和 1 个大的细胞内 C 端 (C-terminus) 组成。N 端包含 1 个配体结合区域, 并包含 1 个高度保守的富半胱氨酸区域 (cysteine-rich domain, CRD)。N 端配体结合域类似于金星捕蝇器的嘴, 称为金星捕蝇器结构域 (venus flytrap

domain, VFD), 它包含谷氨酸结合位点。VFD 通过 CRD 与 HD 相连。这 7 个跨膜结构域由胞内和胞外环连接, 随后是 1 个可变长度的细胞内 C 端 (见图 2) [4-5]。

1.2 III 型 mGluR 的生理功能

一般情况下, III 型 mGluR 定位于突触前。在突触前位置, mGluR₄ 和 mGluR₈ 通常位于突触外位置, 而 mGluR₇ 则高度定位于活性区。III 型 mGluR 活化后, 通过抑制突触前钙离子内流来抑制谷氨酸或 γ -氨基丁酸 (gamma-aminobutyric acid, GABA) 的释放。在突触后末端, 谷氨酸与谷氨酸门控离子通道 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA)、 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸 (α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-isoxazole-4-prorionate, AMPA) 和红藻酸盐 (kainate, KA) 结合后, 使细胞内钠离子或钙离子增加, 促进细胞兴奋性 (见图 3) [5]。

2 III 型 mGluR 在中枢及外周神经系统中的表达

III 型 mGluR 在整个痛觉上行及下行调控神经轴中都有表达。在中枢神经系统中表达情况如下: 在丘脑、杏仁核、前额叶皮层中有 mGluR₄、mGluR₇ 和 mGluR₈ 表达; 在导水管周围灰质中有 mGluR₇ 和 mGluR₈ 表达; 在脊髓中有 mGluR₄ 和 mGluR₇ 表达。除此之外, 在外周痛觉感受器中, mGluR₄、mGluR₇ 和 mGluR₈ 都有表达 [6]。近期研究表明, mGluR₈ 在脊髓中也有表达 (见图 4) [7]。

3 中枢神经系统 III 型 mGluR 在痛觉调控中的作用

3.1 杏仁核中 III 型 mGluR 调节疼痛的作用

中央杏仁核 (central amygdala, CeA) 是情绪认知活动的整合中心, CeA 突触前 III 型 mGluR 可能是缓解深层组织炎症病变引起疼痛的潜在治疗靶点。

有研究将 mGluR₇ 激动剂 AMN082 注射到正常大鼠 CeA 中, 结果大鼠的后肢屈肌反射阈值显著降低了, 增加了对无害和有害刺激的超声波发声时间, 并增加了焦虑样行为, 提示 mGluR₇ 激动剂在正常大鼠中具有促伤害性作用和焦虑样作用; 但在关节炎大鼠中则无以上改变, 这表明关节炎相关的变化可能阻断了 mGluR₇ 介导的作用 [8]。给予 mGluR₈ 选择性激动剂 DCPG 则显示, 在关节炎大鼠中, 显著提高了大鼠的脊髓后肢屈肌反射阈值, 部分逆转了机械超敏反应, 显著降低了对无害和有害刺激的超声波发声时间, 逆转了关节炎的影响, 同时显示出一定的抗焦虑作用, 但对正常大鼠则无上述影响, 提示 mGluR₈ 选择性激动剂在疼痛模型中具有抗伤害性和抗

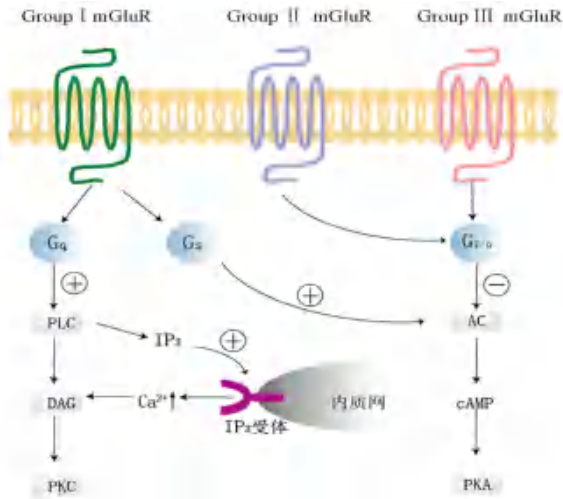


图 1 mGluR 介导的化学和分子信号通路示意图

Fig 1 Signaling downstream pathways of mGluR

注：I 型 mGluR 与 G_q 蛋白偶联， G_q 蛋白激活磷脂酶 C (PLC)，PLC 水解膜中的磷脂酰肌醇 4, 5-二磷酸 (PIP₂) 产生第二信使肌醇 (1, 4, 5)-三磷酸 (IP₃) 和二酰基甘油 (DAG)；IP₃ 扩散到内质网，激活 IP₃ 受体释放 Ca^{2+} 到细胞质中，动员细胞内 Ca^{2+} 存储，调节下游信号通路。II 型 mGluR 和 III 型 mGluR 通常与 $G_{i/o}$ 蛋白偶联，抑制腺苷酸环化酶 (AC)，减少环磷酸腺苷 (cAMP) 的形成，来调节下游信号通路的活性。

Note: Group I mGluR is coupled to G_q protein, which further stimulates phospholipase C (PLC). PIP₂ hydrolysis in the PLC gives rise to inositol (1, 4, 5)-triphosphate (IP₃) and diacylglycerol (DAG). The IP₃ diffuses to the endoplasmic reticulum and activates the IP₃ receptors to release Ca^{2+} to the cytosol, mobilizes intracellular Ca^{2+} storage, and regulates the downstream signaling pathways. While group II and III mGluR classically are coupled to $G_{i/o}$ proteins and inhibit adenylyl cyclase, which decrease the formation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), thus affecting downstream signaling pathways.

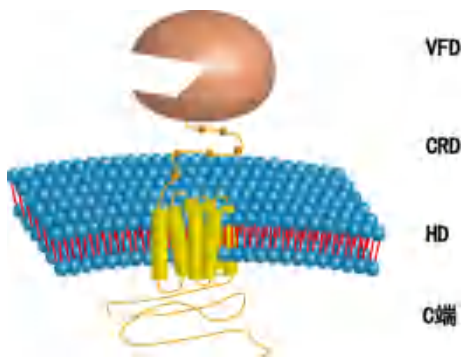


图 2 mGluR 的结构

Fig 2 Structure of mGluR

焦虑样作用。综上所述，CeA 中的 mGluR₇ 和 mGluR₈ 在痛觉调控中发挥着相反的作用^[8]。

上述情况产生的机制可能是 AMN082 增加了正常大鼠脑切片中的单突触兴奋性突触后电流 (excitatory postsynaptic currents, EPSCs) 和动作电位，但对疼痛模型无此作用；此外，还

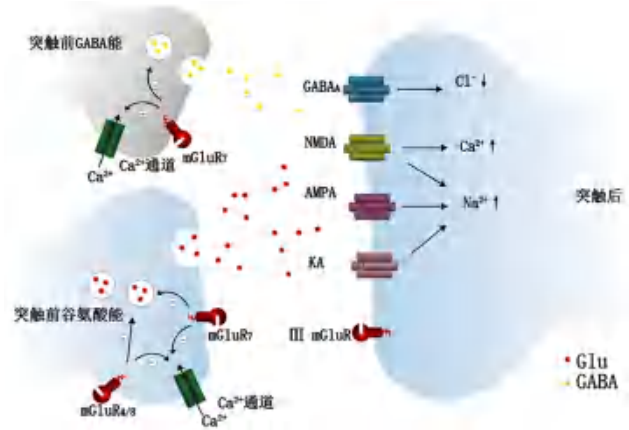


图 3 III 型 mGluR 细胞定位和细胞功能

Fig 3 Cell localization and function of group III mGluR

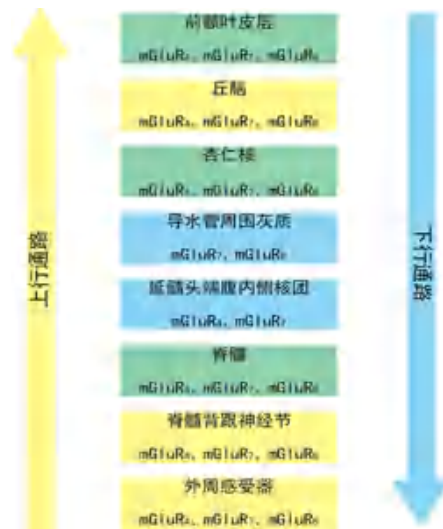


图 4 III 型 mGluR 在疼痛通路中的表达示意图

Fig 4 Schematic representation of the expression of group III mGluR within the pain pathways

注：III 型 mGluR 在上升 (黄色) 和下降 (蓝色) 疼痛路径中表达，共有的区域用绿色表示。除了 mGluR₆ 外，所有的 III 型 mGluR 均在痛觉相关中枢及外周神经系统中表达，进而参与疼痛的调节。

Note: Group III mGluR are expressed in the ascending (yellow) and descending (blue) pain pathways. Areas common to the two pathways are marked in green. Besides mGluR₆, all group III mGluR are expressed along the pain neuraxis where they modulate the pain.

与 AMN082 降低了正常大鼠单突触和多突触抑制性突触后电流 (inhibitory postsynaptic currents, IPSCs) 有关。因此，在正常大鼠中，激动突触前 mGluR₇，抑制了 CeA 中抑制性突触传递，促进兴奋性传递，增加了谷氨酸能在 CeA 脑区的投射，从而产生促伤害性作用，但在疼痛时对突触传递没有影响。与之相反，DCPG 在关节炎大鼠脑切片中比在正常大鼠脑切片中更有效的抑制 EPSCs 的峰值，而对抑制性突触的传递无影响。因此，激动疼痛模型突触前 mGluR₈ 产生的抗伤害性作用是通过抑制 CeA 中疼痛相关的兴奋性突

触传递发挥的^[9]。

3.2 导水管周围灰质中 III 型 mGluR 调节疼痛的作用

导水管周围灰质 (periaqueductal grey, PAG) 是痛觉下行调控的重要处理中心, 谷氨酸和 GABA 在 PAG 水平上的痛觉处理中发挥着至关重要的作用^[10]。

有研究表明, 在福尔马林炎症性疼痛大鼠模型中, 全身给药或腹外侧导水管周围灰质 (ventrolateral periaqueductal grey, VL PAG) 内局部注射 mGluR₈ 选择性激动剂 (S)-3, 4-DCPG, 能显著减少福尔马林诱导的双相伤害性行为; mGluR₇ 拮抗剂 MMPIP 进行 VL PAG 内局部注射, 也能产生与 (S)-3, 4-DCPG 相同的镇痛效应, 但全身给药无效。在角叉菜胶炎症性疼痛大鼠模型中, 全身给药或 VL PAG 内局部给药 (S)-3, 4-DCPG 均显著增加了热刺激诱发的缩足潜伏期和机械刺激诱发的缩足阈值 (paw-withdrawal mechanical threshold, PWMT)。将 III 型 mGluR 拮抗剂 MSOP 注射入 VL PAG 时, 则可以抑制上述镇痛效应^[10-11]。在坐骨神经结扎 (spare nerve injury, SNI) 神经病理性疼痛大鼠模型中, 注射 MMPIP 到 VL PAG 中相比假手术组显著增加了 SNI 组的甩尾潜伏期。而当全身给药时, 未显示出镇痛作用^[10]。在另一项研究中, SNI 损伤 3 d 后腹腔内注射 (S)-3, 4-DCPG 显著增加了热刺激诱发的缩足潜伏期和机械刺激诱发的缩足阈值, 7 d 后注射 (S)-3, 4-DCPG 则没有改变^[11]。以上结果表明, 激动 mGluR₈ 受体可缓解炎症及早期神经病理性疼痛大鼠的痛觉过敏, 而对于持续性神经病理性疼痛, 其效果较差。在正常小鼠中, VL PAG 内注射 (S)-3, 4-DCPG 增加了其甩尾潜伏期, 注射 AMN082 则降低了其甩尾潜伏期^[12]。以上研究结果提示在 PAG 中激动 mGluR₇ 和 mGluR₈ 起着相反的作用。

近期有研究显示, 在糖尿病神经病变小鼠模型中, 潜在的 mGluR₈ 激动剂 Homo-AMPA 注射入 VL PAG 增加了小鼠的甩尾潜伏期和缩足阈值; 降低了延髓头端腹内侧核团 (rostromedial medulla, RVM) ON 细胞的持续活性、爆发的频率和爆发的持续时间。在对照组中, Homo-AMPA 增加了其甩尾潜伏期, 降低了 ON 细胞的持续活性、爆发的频率和爆发的持续时间; 还增加了 RVM OFF 细胞持续活性, 减少并延迟了 OFF 细胞的暂停^[13]。以上研究表明, PAG 的镇痛作用主要是通过调节 RVM 内的神经元产生的, 其对脊

髓背角的投射抑制了伤害性神经元的活动和疼痛反应^[13]。

3.3 脊髓中 III 型 mGluR 调节疼痛的作用

3.3.1 III 型 mGluR 选择性激动剂 L-AP4

在脊髓神经损伤大鼠模型中, 鞘内注射 III 型 mGluR 选择性激动剂 L-AP4 可以显著提高机械刺激诱导的缩足阈值, 降低了大鼠的机械痛觉敏化; 而鞘内注射 III 型 mGluR 的选择性拮抗剂 MAP4 则可以抵消这个作用, 双向证实了在脊髓水平激动 III 型 mGluR 受体后对病理性神经痛发挥着镇痛的作用。然而鞘内注射 L-AP4 并不能改变正常大鼠的痛阈值, 但是鞘内注射 MAP4 却可以诱发正常大鼠出现痛觉过敏和痛觉超敏, 降低伤害性刺激痛觉阈值, 相关机制尚不十分清楚, 或许与正常情况下谷氨酸释放的基础水平相关, 从而限制了 III 型 mGluR 的作用^[14]。其他研究也证实, 鞘内给予 III 型 mGluR 激动剂 ACPT- I 或 mGluR₄ 激动剂 PHCCC 对正常大鼠机械或热刺激后的伤害性感受阈值没有影响, 但显著降低了炎症性疼痛和神经性疼痛大鼠的机械痛觉过敏, 使用 MAP4 消除了 ACPT- I 对以上两个模型的抗痛觉过敏作用。此外, ACPT- I 和 mGluR₄ 选择性激动剂 PHCCC 仅逆转了炎症和神经性疼痛动物模型的痛觉过敏, 并未起到完全镇痛的作用。ACPT- I 的抗痛觉过敏作用可能是通过激活 mGluR₄ 来发挥的^[15]。

在坐骨神经慢性压迫性神经损伤 (chronic constriction injury, CCI) 大鼠模型中, L-AP4 鞘内注射既降低了假手术组的痛觉伤害性反应, 也降低了 CCI 组大鼠福尔马林诱导的痛觉伤害性反应。在完全弗氏制剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 炎症大鼠模型中, L-AP4 鞘内注射不影响辣椒素诱导的伤害性反应, 但降低了正常大鼠对辣椒素诱导的伤害性反应。这些结果与 L-AP4 降低了福尔马林诱导的 CCI 大鼠脊髓谷氨酸释放的增加, 但不影响辣椒素诱导的 CFA 大鼠谷氨酸释放的增加相类似。因此 L-AP4 可缓解神经病理性或福尔马林诱导的炎症性大鼠的痛觉过敏, 但不影响 CFA 炎症性大鼠的伤害性反应^[16]。使用 L-AP4 对福尔马林炎症性疼痛绵羊模型机械痛觉过敏没有影响, 这与在大鼠中使用 L-AP4 的结果不同, 其原因尚不清楚, 可能与剂量或物种相关^[17]。

在一项对脊髓损伤的大鼠电生理研究中, 由初级传入神经诱发的谷氨酸能 EPSCs 的基线振幅显著大于对照组, 但神经损伤大鼠的 GABA 能和甘氨酸能 IPSCs 基线频率远低于对照组大鼠。注射 L-AP4 后对神经损伤大鼠 EPSCs 振幅的抑制

作用大于对照组,然而,L-AP4对GABA能和甘氨酸能IPSCs的抑制作用并无显著差异。该研究表明,神经损伤增加了来自初级传入神经的谷氨酸能输入,但减少了脊髓背角神经元的GABA能和甘氨酸能输入。Ⅲ型mGluR激动剂对神经病理性疼痛发挥抗伤害性作用的原因可能是激活Ⅲ型mGluR会减弱神经损伤大鼠初级传入的谷氨酸能输入^[18]。

L-AP4可以激活mGluR₄和mGluR₇,抑制伤害性刺激诱发的浅背角神经元的动作电位,从而抑制炎性和神经病理性疼痛,但是L-AP4不改变正常动物的痛阈^[14]。Wang等^[19]研究了mGluR₄选择性激动剂VU0155041和mGluR₇激动剂AMN082,发现鞘内注射VU0155041减弱了神经病理性疼痛模型大鼠的机械痛觉过敏和热痛觉过敏,而鞘内注射AMN082并没有该作用。此外,与L-AP4的作用相似,VU0155041和AMN082均未能在正常大鼠中诱导任何抗伤害性感觉。这些观察结果表明,体内脊髓mGluR₄(而非mGluR₇)可能与神经性痛觉过敏相关。mGluR₄的mRNA表达在脊髓背角呈现弥散性分布,包括灰质和白质,主要在非伤害神经元和背角中间神经元,但在I、II板层表达很少。因此它可能参与非伤害性信息在脊髓传递过程中递质释放的调控。

3.3.2 mGluR₇激动剂AMN082 虽然AMN082并没有抑制神经病理性疼痛模型大鼠的痛觉过敏,但在另一项研究中,鞘内注射AMN082可以抑制福尔马林炎症性疼痛绵羊模型患肢机械痛觉过敏,对健侧肢没有影响。这是因为使用AMN082增强了脊髓内源性mGluR₇受体活性,抑制炎症性绵羊的急性伤害性感受处理和痛觉过敏^[17]。还有研究表明,鞘内注射AMN082对角叉菜胶和爪切口诱发的炎症大鼠的热痛觉过敏有显著的抑制作用,且在诱发炎症前后均能抑制热痛觉过敏,但对机械痛觉超敏没有影响^[20]。

上述对神经病理性疼痛研究结果表明,脊髓mGluR可能在调节脊神经结扎所致神经病理性疼痛中发挥重要作用。然而,另一项研究结果显示,I型mGluR拮抗剂、II型或III型mGluR激动剂在脊髓神经结扎大鼠中均未表现出任何抗神经性疼痛的活性,表明脊髓mGluR并没有直接参与脊髓神经结扎后神经性疼痛的发展。脊髓损伤后,周围神经表现出自发的和持续的传入放电,导致脊髓的敏化,从而驱动神经性疼痛的发展。在此研究中虽然单独使用III型mGluR激动剂ACPT-III没有抗神经病理性疼痛的活性,但是增加了吗啡的

镇痛作用,使吗啡的用量大幅下降,其具体机制尚不明确^[21]。

3.3.3 III型mGluR拮抗剂CPPG 近期有研究显示^[7],在福尔马林炎症性大鼠模型中,III型mGluR拮抗剂CPPG减弱了大鼠炎症性阶段的伤害感受行为和脊髓背角I-II板层兴奋性神经元中fos细胞的表达^[7]。而L-AP4对福尔马林炎症性大鼠模型则无作用,这与之前的III型mGluRs激动剂具有镇痛作用的研究结果不一致^[14-20]。该研究发现,mGluR₄和mGluR₈mRNA优先表达于pax2阳性抑制性神经元,而非lhx1b阳性兴奋性神经元。鉴于这些结果和正常条件下这些受体的细胞内信号(Gi/o),mGluR₄和mGluR₈的作用可能为抑制抑制性神经元,导致兴奋性神经元的反应性增加。这些结果表明,III型mGluR的拮抗剂有可能是抑制了mGluR₄和mGluR₈,触发了抑制性神经元的去抑制,抑制了脊髓背角I-II板层兴奋性神经元的兴奋性,从而产生了抗伤害性行为的作用^[7]。

综上,多数研究表明,III型mGluR激动剂具有一定的镇痛作用。但仍有相反的研究结果,即III型mGluR激动剂单独使用无镇痛作用,还有研究表明是III型mGluR拮抗剂而非激动剂有镇痛作用,因此需要进一步的研究。

3.4 背侧纹状体中III型mGluR调节疼痛的作用

背侧纹状体(dorsal striatum,DS)作为基底神经节的一部分可能在痛觉处理过程中发挥作用。向假手术大鼠DS微量注射AMN082,促进了机械痛觉超敏和热感受反应,增加了RVM ON细胞的活性,抑制了RVM OFF细胞的活性;增加了DS网状核中总伤害性OFF神经元的活性。相反,AMN082则抑制SNI大鼠的痛觉超敏和甩尾潜伏期,抑制了RVM ON细胞的活性,增加了RVM OFF细胞的活性;抑制了DS网状核中总伤害性OFF神经元的活性。但AMN082既降低了假手术组大鼠的谷氨酸水平也降低了SNI组谷氨酸水平。此外,在DS外1mm处微注射AMN082未能改变假手术和SNI大鼠的机械刺激诱发的缩足阈值。AMN082对机械痛觉超敏和谷氨酸释放的作用均可以被mGluR₇选择性拮抗剂ADX71743阻断。通过向丘脑下核显微注射利多卡因来阻断间接通路(苍白球外段-丘脑下核-苍白球内段-黑质网状部)后,利多卡因消除了AMN082对假手术大鼠总伤害性OFF神经元的影响,而对SNI大鼠则没有影响^[22]。因此,激活mGluR₇在生理条件下促进疼痛的作用可能是由

基底神经节的间接途径介导的,在病理条件下抑制疼痛的作用可能是由基底神经节的直接途径介导的^[22]。

DS 内微注射选择性 mGluR₈ 激动剂 (S)-3, 4-DCPG, 没有改变假手术大鼠的甩尾潜伏期和机械刺激诱发的缩足阈值,也对其 ON 和 OFF 细胞的活性没有影响;但 (S)-3, 4-DCPG 增加了 SNI 大鼠的甩尾潜伏期和机械刺激诱发的缩足阈值,抑制了 ON 细胞活性,同时增加了 OFF 细胞的活性。而 DS 内注射选择性 mGluR₄ 激动剂 VU0155041, 则对正常生理状态和 SNI 大鼠的热痛敏和 ON、OFF 细胞活性方面均无效^[23]。这些结果表明,在神经病理性疼痛模型中刺激 mGluR₈ 可抑制热感受反应和机械性痛敏,该作用与抑制 RVM 内的 ON 细胞和刺激 OFF 细胞有关,但在正常大鼠中激动 mGluR₈ 没有改变疼痛反应的作用^[23]。

4 外周系统中 III 型 mGluR 调节疼痛的作用

外周神经元是感觉传感器和传递器,在各种生理和病理条件下通过释放谷氨酸与外周环境相互作用。强烈的有害刺激或炎症条件导致初级传入神经终末释放谷氨酸到外周组织。动物研究的结果显示,通过调节外周谷氨酸能系统,可以起到镇痛作用^[24]。

有研究显示,在蜂毒诱发的大鼠足底炎症性疼痛模型中,足底注射选择性 III 型 mGluR 激动剂 L-AP4 具有镇痛作用,与对照组相比,对炎症性疼痛模型大鼠的撤足次数产生了剂量相关的抑制作用,而选择性 III 型 mGluR 拮抗剂 MSOP 预处理则消除了这种抑制效应。但 L-AP4 对蜂毒诱导的机械性痛觉过敏没有抑制作用,不能抑制缩足阈值的降低^[25]。在角叉菜胶关节炎疼痛大鼠模型中,诱发疼痛期间和疼痛维持期间,用 L-AP4 治疗,增加了大鼠的缩足阈值和负重值,表明 L-AP4 激活 III 型 mGluR 对角叉菜胶诱导的关节炎疼痛具有抗痛觉过敏作用^[26]。在 CFA 关节炎疼痛模型中,大鼠膝关节注射高剂量 L-AP4 也能使负重值增加,还能抑制因为膝关节上的机械压力造成的外周感觉神经末梢的神经元兴奋性。但是,在非炎症状态下没有显著的抑制作用。因此,激活外周 III 型 mGluR 可以抑制 CFA 炎症大鼠神经末梢的神经元放电速率,从而在负性调节伤害性行为和疼痛传递中发挥重要作用^[27]。近期有研究显示,在福尔马林炎症疼痛大鼠模型中,足底注射 III 型 mGluR 激动剂减弱了炎症性阶段的伤害感受行为和脊髓背角 fos 蛋白的水平,降低了脊髓中促炎因子肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor- α , TNF- α)

和白细胞介素- 1β (interleukine- 1β , IL- 1β) 的水平。该研究表明,外周 III 型 mGluR 通过减少外周感觉输入和中枢敏化参与痛觉的传递^[28]。

5 结论

mGluR 在中枢、脊髓、外周痛觉感受器中广泛表达,使得 mGluR 调节疼痛的机制和作用位点尚不清楚。目前的研究表明,在 CeA、PAG 中选择性 mGluR₇ 拮抗剂和 mGluR₈ 激动剂均可发挥镇痛效应;而应用 AMN082 激活 mGluR₇ 对正常动物则产生了促伤害反应。在 DS 中 mGluR₇ 和 mGluR₈ 激动剂在神经病理性疼痛模型中产生了相同的镇痛效应,但是应用 AMN082 激活 mGluR₇ 对正常动物则产生了促伤害反应,这提示在生理病理条件下 mGluR₇ 是通过不同机制、途径参与痛觉的调控。脊髓上的 mGluR₄ 与神经病理性痛觉过敏有关,这表明 mGluR₄ 在疼痛处理中的作用也很重要。综上,关于 III 型 mGluR 在痛觉调控中的作用尚不完全明确,目前的相关研究结果也存在一定的争议,尚需要在生理和各种不同的病理情况下,在不同的痛觉调控水平上,进行深入的研究。

参考文献

- [1] Raja SN, Carr DB, Cohen M, et al. The revised international association for the study of pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises [J]. Pain, 2020, 161 (9): 1976-1982.
- [2] Montana MC, Gereau RW. Metabotropic glutamate receptors as targets for analgesia: antagonism, activation, and allosteric modulation [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2011, 12 (10): 1681-1688.
- [3] Chiechio S. Modulation of chronic pain by metabotropic glutamate receptors [J]. Adv Pharmacol, 2016, 75: 63-89.
- [4] Coutinho V. Book review: metabotropic glutamate receptors: electrical and chemical signaling properties [J]. Neuroscientist, 2002, 8 (6): 551-561.
- [5] Niswender CM, Conn PJ. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2010, 50 (1): 295-322.
- [6] Kolber BJ. mGluR head to toe in pain [J]. Prog Mol Biol Transl, 2015, 131: 281-324.
- [7] Okubo M, Yamanaka H, Kobayashi K, et al. Differential expression of mGluR in rat spinal dorsal horns and their modulatory effects on nociceptive behaviors [J]. Mol Pain, 2019, 15: 1744806919875026.
- [8] Palazzo E, Fu Y, Ji G, et al. Group III mGluR7 and mGluR8 in the amygdala differentially modulate nociceptive and affective pain behaviors [J]. Neuropharmacology, 2008, 55 (4): 537-545.
- [9] Ren W, Palazzo E, Maione S, et al. Differential effects of mGluR7 and mGluR8 activation on pain-related synaptic

- activity in the amygdala [J]. *Neuropharmacology*, 2011, 61 (8): 1334-1344.
- [10] Palazzo E, Marabese I, Luongo L, et al. Effects of a metabotropic glutamate receptor subtype 7 negative allosteric modulator in the periaqueductal grey on pain responses and rostral ventromedial medulla cell activity in rat [J]. *Mol Pain*, 2013, 9: 44.
- [11] Marabese I, De NV, Palazzo E, et al. Effects of (S)-3,4-DCPG, an mGlu8 receptor agonist, on inflammatory and neuropathic pain in mice [J]. *Neuropharmacology*, 2007, 52 (2): 253-262.
- [12] Ida M, Francesca R, Enza P, et al. Periaqueductal gray metabotropic glutamate receptor subtype 7 and 8 mediate opposite effects on amino acid release, rostral ventromedial medulla cell activities, and thermal nociception [J]. *J Neurophysiol*, 2007, 98 (1): 43-53.
- [13] Palazzo E, Boccella S, Marabese I, et al. Homo-AMPA in the periaqueductal grey modulates pain and rostral ventromedial medulla activity in diabetic neuropathic mice [J]. *Neuropharmacology*, 2022, 212: 109047.
- [14] Chen SR. Distinct roles of group III metabotropic glutamate receptors in control of nociception and dorsal horn neurons in normal and nerve-injured rats [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 312 (1): 120-126.
- [15] Goudet C, Chapuy E, Alloui A, et al. Group III metabotropic glutamate receptors inhibit hyperalgesia in animal models of inflammation and neuropathic pain [J]. *Pain*, 2008, 137: 112-124.
- [16] Kumar N, Laferriere A, Yu JS, et al. Metabotropic glutamate receptors (mGluR) regulate noxious stimulus-induced glutamate release in the spinal cord dorsal horn of rats with neuropathic and inflammatory pain [J]. *J Neurochem*, 2010, 114 (1): 281-290.
- [17] Dolan S, Gunn MD, Crossan C, et al. Activation of metabotropic glutamate receptor 7 in spinal cord inhibits pain and hyperalgesia in a novel formalin model in sheep [J]. *Behav Pharmacol*, 2011, 22 (5-6): 582-588.
- [18] Zhang HM, Chen SR, Pan HL. Effects of activation of group III metabotropic glutamate receptors on spinal synaptic transmission in a rat model of neuropathic pain [J]. *Neuroscience*, 2009, 158 (2): 875-884.
- [19] Wang H, Jiang W, Yang R, et al. Spinal metabotropic glutamate receptor 4 is involved in neuropathic pain [J]. *Neuroreport*, 2011, 22 (5): 244-248.
- [20] Dolan S, MD Gunn, Biddlestone L, et al. The selective metabotropic glutamate receptor 7 allosteric agonist AMN082 inhibits inflammatory pain-induced and incision-induced hypersensitivity in rat [J]. *Behav Pharmacol*, 2009, 20 (7): 596-604.
- [21] Lee HG, Park SK, Yoon MH. Potentiation of morphine antiallodynic efficacy by ACPT-III, a group III metabotropic glutamate receptor agonist, in rat spinal nerve ligation-induced neuropathic pain [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2010, 96 (1): 108-113.
- [22] Marabese I, Boccella S, Iannotta M, et al. Metabotropic glutamate receptor subtype 7 in the dorsal striatum oppositely modulates pain in sham and neuropathic rats [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 135: 86-99.
- [23] Rossi F, Marabese I, de Chiaro M, et al. Dorsal striatum metabotropic glutamate receptor 8 affects nociceptive responses and rostral ventromedial medulla cell activity in neuropathic pain conditions [J]. *J Neurophysiol*, 2014, 111 (11): 2196-2209.
- [24] Miller KE, Hoffman EM, Sutharshan M, et al. Glutamate pharmacology and metabolism in peripheral primary afferents: physiological and pathophysiological mechanisms [J]. *Pharmacol Ther*, 2011, 130 (3): 283-309.
- [25] Chen HS, Fang Q, Xiang H, et al. Differential roles of peripheral metabotropic glutamate receptors in bee venom-induced nociception and inflammation in conscious rats [J]. *J Pain*, 2010, 11 (4): 321-329.
- [26] Lee KS, Park EH, Cho HY, et al. Peripheral group II and III metabotropic glutamate receptors in the knee joint attenuate carrageenan-induced nociceptive behavior in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2013, 542: 21-25.
- [27] Ho E, Park, Won S, et al. Activation of peripheral group III metabotropic glutamate receptors inhibits pain transmission by decreasing neuronal excitability in the CFA-inflamed knee joint [J]. *Neurosci Lett*, 2019, 694: 111-115.
- [28] Li YL, Chang XR, Ma JT, et al. Activation of peripheral group III metabotropic glutamate receptors suppressed formalin-induced nociception [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2022, 49 (2): 319-326.

(收稿日期: 2022-07-18; 修回日期: 2022-10-08)

纳美芬辅助治疗颅脑损伤意识障碍的研究进展

吴光铭¹, 许德荣^{2*}, 黄艳¹, 何海梅¹, 冯敏¹, 姚洁文¹ (1.广西医科大学第七附属医院/梧州市工人医院药剂科, 广西 梧州 543001; 2.广西医科大学第七附属医院/梧州市工人医院神经外科, 广西 梧州 543001)

摘要: 创伤性颅脑损伤 (TBI) 即颅脑创伤, 是指因外力直接或间接作用于头颅所造成的脑部损伤, 是神经创伤中的常见病, 具有病情急、发病率高、致残率高及病死率高等特点。随着现代急诊处理及重症医学水平的进步, TBI 救治后的存活率明显上升, 但救治后常遗留不同程度的意识障碍, 如最小意识状态、持续性植物状态、昏迷等。意识障碍患者不能进行功能性交流和意向性运动, 只能长期卧床, 依赖于他人的护理, 给个人、家庭和社会经济带来了沉重的压力。因此, 对 TBI 意识障碍患者进行促醒治疗具有重要意义。近十年来, 纳美芬被广泛应用于治疗 TBI 等疾病引起的意识障碍, 并取得了良好的临床效果。本文就纳美芬辅助治疗 TBI 意识障碍的有效性、安全性、可能作用机制及存在的一些问题进行综述, 旨在促进纳美芬促醒治疗的规范化。

关键词: 纳美芬; 颅脑损伤; 颅脑创伤; 意识障碍; 昏迷; 促醒

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0488-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.033

Advances in nalmefene assisted treatment of disorders of consciousness due to craniocerebral injury

WU Guang-ming¹, XU De-rong^{2*}, HUANG Yan¹, HE Hai-mei¹, FENG Min¹, YAO Jie-wen¹ (1. Department of Pharmacy, The Seventh Affiliated Hospital of Guangxi Medical University/Wuzhou Workers' Hospital, Wuzhou Guangxi 543001; 2. Department of Neurosurgery, The Seventh Affiliated Hospital of Guangxi Medical University/Wuzhou Workers' Hospital, Wuzhou Guangxi 543001)

Abstract: Traumatic brain injury (TBI) is a type of brain injury caused by external forces acting directly or indirectly on the skull, and it is a common neurotrauma, with acute condition, morbidity, disability and mortality. With the progress of modern emergency management and critical care medicine, the survival rate of TBI after the treatment has increased significantly, but different degrees of consciousness impairment are often found after the treatment, such as minimal consciousness, persistent vegetative state, coma and so on. Patients with impaired consciousness cannot functionally communicate and intentionally move. They are bedridden and have to rely on the care givers, which puts pressure on individuals, families and the society. It is important to practice wakefulness-promoting for patients with consciousness disorders after TBI. In the past decade, nalmefene has been widely used in patients with disorders of consciousness caused by TBI and other diseases, and good clinical results have been achieved. This paper reviewed the effectiveness, safety and possible mechanism of nalmefene in the assisted treatment of consciousness disorders after TBI, and analyzed some problems in clinical application, aiming to promote the standardization of nalmefene wakefulness-promoting treatment.

Key words: nalmefene; brain injury; brain trauma; consciousness disorder; coma; wakefulness-promoting

基金项目: 梧州市科学研究与技术开发计划项目 (No.202102185)。

作者简介: 吴光铭, 男, 副主任药师, 主要从事医院药学工作, email: 772168201@qq.com *通信作者: 许德荣, 男, 副主任医师, 主要从事特重型颅脑创伤及显微内镜神经系统肿瘤手术治疗相关研究, email: xuderong2003@126.com

1 创伤性颅脑损伤 (TBI) 意识障碍的康复治疗概述

颅脑受到严重创伤常造成脑缺氧、脑水肿、大脑皮层之间功能的连接中断^[1]；对脑干网状结构及其广泛投射的损害，导致网状激活系统受损，影响皮质功能传递与整合，致使患者陷入意识障碍状态^[2]，包括昏迷、持续性植物状态、最小意识状态。意识障碍患者的中枢神经系统在早期受损阶段，其结构与功能有较大的可塑性，部分细胞功能经过及时治疗可得到一定的恢复。

目前，针对意识障碍患者的主要手段是神经康复综合治疗，其常用方法包括康复训练、高压氧、针灸治疗、经颅磁刺激、神经电刺激、音乐刺激及药物治疗等^[3-5]，其中药物治疗在临床上的运用主要是促进中枢神经代谢、促进脑循环代谢、营养神经等，常用的药物有金刚烷胺、溴隐亭、巴氯芬、唑吡坦、纳洛酮、纳美芬 (nalmefene, Revex)、神经节苷脂、胞磷胆碱、脑蛋白水解物等；有研究表明，部分患者在使用上述药物后，意识在一定程度上有所恢复或改善^[6-8]。但是，目前尚无足够的证据支持使用药物能提高患者意识水平的观点；迄今为止，仅有金刚烷胺获得美国意识障碍实践指南的推荐用于 TBI 意识障碍患者^[9-10]；我国的慢性意识障碍诊断与治疗专家共识^[11]提及以上部分药物对意识障碍具有较好的改善作用，但未就应用方法展开详细讨论。

2 纳美芬的药理学特性

纳美芬是新一代高选择性阿片受体拮抗剂，为 6 位亚甲基的纳曲酮类似物，于 1975 年合成，1995 年上市，分子式为 $C_{21}H_{25}NO_3$ ，化学名称为 (5 α)-17-(环丙基甲基)-4, 5-环氧-6-亚甲基吗啡喃-3, 14-二醇。

纳美芬起效快，能够快速突破血脑屏障，在体内迅速分布。静脉给药后 2 min 即产生阿片受体拮抗作用，5 min 内达血药浓度高峰，可阻断 80% 以上的大脑阿片受体^[12]。作为阿片受体调节剂，纳美芬竞争性拮抗 μ 受体和 δ 受体，因其对 μ 受体的强大亲和力及拮抗作用，被用作替代解毒剂用于逆转与急性阿片类药物过量相关的呼吸抑制。对 κ 受体具有部分激动亲和力，因占据 κ 受体拮抗激动药的部分生理效应反而导致净拮抗作用^[12]。 κ 受体也是参与神经损伤的主要受体系统^[13]。在中枢神经系统中，纳美芬与 μ 受体的结合力是纳洛酮的 4 倍，与 κ 受体的结合力是纳洛

酮的 28 倍^[14]，能够产生强效的阻断内阿片肽的病理效应，在神经保护方面可能存在更大优势。纳美芬相较纳洛酮消除半衰期更长 (8 ~ 11 h vs 30 ~ 120 min^[12])，多次给药后不需要进行用药监测。纳美芬的安全性与纳洛酮基本相同，对 μ 受体无激动活性，不产生依赖性、耐受性。综合上述，纳美芬具有速效、强效、长效、安全的特性，能够更方便地应用于临床。

3 纳美芬在 TBI 意识障碍治疗中的有效性研究

一项旨在评价纳美芬治疗急性重度颅脑损伤疗效和安全性的 Meta 分析研究中共纳入 8 项研究，共计 879 例患者，其结果显示，纳美芬能明显改善重度颅脑损伤患者的格拉斯哥昏迷 (GCS) 评分和格拉斯哥预后 (GOS) 评分；然而该项研究纳入的文献较少，可能存在一定的发表偏倚，笔者也承认其纳入的文献质量较低，因此，其评价结果存在一些局限性^[15]。在既有的纳美芬辅助治疗 TBI 意识障碍的临床研究中，仍然缺乏大样本、多中心的研究资料。

近年来，大量的小样本研究表明，纳美芬应用于 TBI 意识障碍患者有着积极的辅助治疗作用。季骋远等^[16]的研究表明，纳美芬注射液可改善颅脑损伤患者意识状态，对神经系统有较好的保护作用；其结果来源于临床的回顾性分析，可能存在证据等级不足。张艳玲等^[17-18]的多项前瞻性研究表明，纳美芬能够保护重度颅脑损伤患者的脑功能，逆转患者的意识障碍状态，该研究纳入了 2012—2014 年收治的 204 例重度颅脑损伤患者，将患者随机分为对照组 (个性化循证护理辅助神经节苷脂治疗 14 d) 与研究组 (个性化循证护理辅助神经节苷脂联合纳美芬治疗 14 d)，治疗后研究组患者昏迷发生率低于对照组 (20.59% vs 37.25%, $P < 0.05$)，研究组患者昏迷时间短于对照组 [(11.22 ± 6.31) d vs (23.51 ± 7.33) d, $P < 0.05$]^[17]；2015 年，该研究再次纳入 90 例重度颅脑损伤患者，随机分为对照组 (个性化康复训练联合神经节苷脂治疗 14 d) 和研究组 (个性化康复训练联合神经节苷脂 + 纳美芬治疗 14 d)，结果研究组患者的平均昏迷时间显著短于对照组患者 [(11.20 ± 6.28) d vs (23.52 ± 7.14) d, $P < 0.05$]^[18]。

在实际临床中，对颅脑损伤意识障碍患者的治疗，单一促醒方法往往达不到理想的效果，需要采取多种治疗方法相结合的综合措施^[3]。一项探讨针灸疗法联合盐酸纳美芬药物疗法在颅

脑损伤昏迷患者促醒治疗的应用效果研究显示, 将 94 例患者随机分为对照组(醒脑开窍针法治疗 7 d)和观察组(醒脑开窍针法联合盐酸纳美芬治疗 7 d), 观察组一个疗程后 GCS 评分高于对照组 [(12.31±0.87) vs (8.53±0.68), $P < 0.05$]; 神经功能障碍(DRS)评分低于对照组 [(4.21±0.49) vs (10.49±0.98), $P < 0.05$], 说明盐酸纳美芬辅助治疗颅脑损伤能改善患者昏迷状态, 减少神经损伤^[19]。另一项旨在观察纳美芬联合高压氧治疗急性重型颅脑损伤临床疗效的随机研究显示, 将 92 例急性重型颅脑损伤患者分为对照组(常规治疗联合高压氧疗法治疗 4 周)和观察组(常规治疗联合高压氧疗法+纳美芬治疗 4 周), 结果两组存活者的 GCS 评分较治疗前显著升高, 且观察组高于同期对照组 [(12.72±1.61) vs (10.41±2.31), $P < 0.05$]; 表明纳美芬联合高压氧疗法疗效比单一高压氧疗法更好, GCS 评分改善情况更优, 说明在综合疗法下, 纳美芬能充分发挥其辅助治疗作用, 促使患者自我意识的恢复, 改善 GCS 评分^[20]。

与同类药物纳洛酮相比, 纳美芬在改善颅脑损伤昏迷患者意识状态方面略有优势。一项旨在对比纳洛酮、纳美芬在重型颅脑损伤后迁延性昏迷患者疗效的临床观察中, 纳入 126 例重型颅脑损伤患者随机分为对照组(盐酸纳洛酮治疗 2 周)和观察组(盐酸纳美芬治疗 2 周), 观察组患者治疗后生命体征较快恢复稳定, GCS 评分和 GOS 评分均明显优于对照组, 患者清醒率较高 (50.79% vs 30.16%, $P < 0.05$), 表明纳美芬对颅脑损伤后意识状态有积极的治疗作用, 能改善患者创伤后的昏迷状态, 对患者的预后起到促进作用^[21]。

4 纳美芬在 TBI 意识障碍治疗中的安全性研究

目前, 纳美芬在 TBI 意识障碍治疗中的安全性资料仍然有限。根据一项纳美芬治疗急性重度颅脑损伤疗效和安全性的系统评价, 纳入的 8 项研究结果表明, 使用纳美芬未见明显的药品不良反应^[15]。根据国家药品监督管理局(NMPA)批准的纳美芬药品说明书, 纳美芬用药有较好的安全性。纳美芬治疗剂量无明显毒副作用, 对健康用药者, 即使盐酸纳美芬剂量达到推荐剂量的 15 倍或 15 倍以上, 纳美芬的耐受性都很好, 没有出现严重的不良反应。对少数患者, 当盐酸纳美芬的剂量超过推荐剂量时, 纳美芬产生的症状可能显示出对内源性阿片类物质作用的逆转, 表现为恶心、寒战、肌痛、烦躁不安、腹部痉挛和关

节痛等, 常为一过性的且发生率低。

随着纳美芬的广泛应用, 除用于 TBI 患者, 也应用于脑血管病、中毒性疾病患者, 未出现严重的不良反应^[22-24]。截至目前, 并未发现纳美芬导致死亡的报道。但仍需警惕其罕见的过敏反应^[25-26], 包括荨麻疹、突发性严重胸闷、呼吸困难急促、皮肤苍白、体温下降等综合症状。

5 纳美芬治疗 TBI 意识障碍的可能作用机制

根据颅脑损伤发生的时间及病理改变, 分为原发性损伤和继发性损伤两个阶段。原发性损伤是颅脑受到外力创伤性打击时出现的组织损伤导致脑组织和细胞功能障碍, 其病理基础为急性神经元变性凋亡。继发性损伤是在原发性损伤后出现的神经化学、代谢与细胞、分子等病理生理改变引起的相关级联反应损伤, 其损伤机制复杂, 可能与细胞凋亡、脑血管损伤和血脑屏障破坏、脑水肿形成、离子稳态失衡(主要是钙超载)、兴奋性氨基酸毒性、自由基生成和脂质过氧化、炎症介质大量释放、线粒体功能障碍、凝血功能障碍等有关^[27-30], 这些均可导致神经死亡。

发生上述现象的一个重要因素便是内源性阿片肽^[31]。内源性阿片肽主要存在于中枢, 是体内广泛分布的具有阿片样活性的一类物质。颅脑受到创伤性打击时, 内源性阿片肽会大量合成和释放。大量内源性阿片肽结合阿片受体, 通过影响 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、细胞膜上离子通道性、促进血管内皮细胞生成大量自由基、影响心血管系统的自主调节功能等多种途径导致继发性颅脑组织损伤, 成为自损因子。纳美芬穿透血脑屏障后, 与大脑、中脑和脑干的 κ 、 δ 、 μ 等受体有效结合, 加速了外周 β -内啡肽(β -EP)的分解, 从而降低血清 β -EP 水平^[32-34]; 并与 κ 、 δ 、 μ 等阿片受体特异性结合, 使 β -EP 失活, 阻断应激状态下内源性阿片肽继发性病理反应, 降低细胞内氧自由基水平、抑制炎症介质的释放、调节氧化应激水平, 从而改善神经细胞的能量代谢、逆转钙离子及兴奋性氨基酸对神经系统的损害进而起到脑保护作用^[35-36]。

炎症反应可引起或加重颅脑损伤患者的继发性损伤^[37]。常见的炎症反应因子如白细胞介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等表达水平超出正常范围, 星形细胞活化、增殖, 产生大量 S100 β 蛋白, 造成 S100 β 蛋白在局部或全身有明显升高。动物实验表明, 纳美芬可显著逆转颅脑损伤后 TNF- α 和 NF- κ B(核因子 κ B, 炎症应答中的关键转录因子)的增加, 减轻 TBI 后炎症反应,

促进损伤后恢复^[38]；临床研究表明，纳美芬可能通过降低急性重型颅脑损伤患者的 IL-8、S100 β 蛋白的免疫指标水平，减轻脑外伤后脑组织的早期炎症反应，改善患者自身应激反应所致的各种病理反应，保护神经元细胞，从而降低患者外伤后继发脑损伤的风险，发挥神经保护作用^[39]。

TBI 患者常伴随脑循环障碍，从而引起脑组织的缺血缺氧，影响颅脑神经的修复^[40]。内皮缩血管肽 1 (ET-1) 是体内强烈的血管收缩物质；一氧化氮 (NO) 可抑制缩血管物质的活性，抑制血管收缩；两者均参与维持脑血管张力与心血管系统稳态，ET-1 的升高及 NO 水平的下降均提示内皮细胞损伤。已有研究发现纳美芬降低重型颅脑损伤患者脑脊液 ET-1 水平，提高 NO 水平，降低脑血管痉挛的发生，促进患者意识的恢复，从而发挥脑保护作用^[41]。

6 纳美芬治疗 TBI 意识障碍的临床用药说明书 / 指南 / 共识

目前，纳美芬治疗 TBI 意识障碍的用法用量没有明确标准，国内指南共识将其作为促醒的重要治疗方法之一，但并未详细讨论其应用方法；此外，NMPA 批准盐酸纳美芬注射液的临床适应证用于完全或部分逆转阿片类药物的作用，包括由天然或合成阿片类药物引起的呼吸抑制；用于已知或疑似阿片类药物过量的治疗，包括呼吸抑制、意识障碍等；缺乏治疗 TBI 等病因引起的意识障碍相应适应证及应用指导。纳美芬作为一种临床应用于 TBI 意识障碍患者的促醒治疗药物，虽获得了较多的宝贵经验及研究成果的证据支持，但其用药证据仍然存在不足，临床超说明书使用的问题，仍是医药工作者关心的问题。

现有证据表明，纳美芬已被广泛应用于临床，用于缓解颅脑损伤、出血性脑血管病、缺血性脑血管病等引起的意识障碍^[22-24]。这一治疗方式的应用主要来源于现有指南的推荐^[11]，其用法用量可能来自临床经验实践，或参照既有的研究文献。然而，现有的临床研究，其干预措施又不尽相同，存在着临床异质性，如杜小静等^[42]探讨纳美芬对重型颅脑损伤患者脑电双频指数及预后的影响，采用纳美芬 0.4 ~ 0.6 mg 静脉滴注，1 次 · d⁻¹，疗程 14 d；陈霞等^[43]探讨纳美芬对急性颅脑损伤患者的脑保护作用，使用纳美芬每次 0.2 mg，2 次 · d⁻¹，静脉滴注，间隔时间为 12 h，疗程为 14 d。因此，如果参照临床研究，其用药方案可能存在一定程度的差异，提示后期还应致

力于开展大样本临床双盲随机对照研究，进一步寻找循证医学证据，构建临床用药标准，以指导临床医师合理用药。

7 总结与展望

综上所述，通过总结纳美芬用于辅助治疗 TBI 意识障碍的作用机制和临床疗效的研究，可以明确的是其具有良好的神经保护作用，且安全性较高。然而，纳美芬用于辅助治疗 TBI 意识障碍的临床研究仍处于探索阶段，国内外依然缺乏大样本系统评价以及明确的用药指导，目前虽获得了较多的宝贵经验及小样本研究成果的证据支持，后期还应着力于开展临床双盲随机对照研究，构建临床用药标准，规范临床用药，提升临床的用药合理性。

参考文献

- [1] Stevens RD, Hannawi Y, Puybasset L. MRI for coma emergence and recovery [J]. *Curr Opin Crit Care*, 2014, 20 (2): 168-173.
- [2] Bagnato S. The role of plasticity in the recovery of consciousness [J]. *Handb Clin Neurol*, 2022, 184: 375-395.
- [3] Wu XL, Liu LX, Yang LY, et al. Comprehensive rehabilitation in a patient with corpus callosum syndrome after traumatic brain injury: case report [J]. *Medicine*, 2020, 99 (28): e21218.
- [4] 何超, 吴海涛. 重型颅脑创伤后慢性意识障碍促醒治疗研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2021, 18 (27): 47-50.
- [5] 刘岩松, 李红玲. 音乐疗法治疗意识障碍的研究进展 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2021, 43 (1): 78-81.
- [6] Clauss R. Disorders of consciousness and pharmaceuticals that act on oxygen based amino acid and monoamine neurotransmitter pathways of the brain [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20 (26): 4140-4153.
- [7] 莫贤伦, 魏风, 胡北泉, 等. 脑损伤昏迷患者促醒治疗的进展 [J]. *中国现代医生*, 2019, 57 (29): 165-168.
- [8] 周卫, 刘克洪, 胡晓华, 等. 意识障碍患者中西药物治疗的作用机制和临床疗效 [J]. *中国现代医生*, 2021, 59 (5): 185-188.
- [9] Giacino JT, Katz DI, Schiff ND, et al. Practice guideline update recommendations summary: disorders of consciousness: report of the guideline development, dissemination, and implementation subcommittee of the American academy of neurology; the American congress of rehabilitation medicine; and the national institute on disability, independent living, and rehabilitation research [J]. *Neurology*, 2018, 91 (10): 450-460.
- [10] 何江弘, 杨艺, 夏小雨, 等. 《2018 年版美国意识障碍实践指南》解读 [J]. *临床神经外科杂志*, 2020, 17 (1): 4-7.
- [11] 中国医师协会神经修复专业委员会意识障碍与促醒学组. 慢性意识障碍诊断与治疗中国专家共识 [J]. *中华神经医学杂志*, 2020, 19 (10): 977-982.

- [12] Edinoff AN, Nix CA, Reed TD, et al. Pharmacologic and clinical considerations of nalmefene, a long duration opioid antagonist, in opioid overdose [J]. *Psychiatry International*, 2021, 2 (4): 365-378.
- [13] Vink R, Portoghese PS, Faden AI. kappa-Opioid antagonist improves cellular bioenergetics and recovery after traumatic brain injury [J]. *Am J Physiol*, 1991, 261 (6 Pt 2): R1527-1532.
- [14] 谢晓雨. 酮咯酸联合小剂量纳美芬预防瑞芬太尼术后痛觉过敏的效果观察 [D]. 大连: 大连医科大学, 2021.
- [15] 徐锦龙, 马卫成, 陈武, 等. 纳美芬治疗急性重度颅脑损伤疗效和安全性的系统评价 [J]. *中国药物应用与监测*, 2016, 13 (1): 7-10.
- [16] 季骋远, 王中, 孙晓欧, 等. 盐酸纳美芬注射液用于治疗创伤性颅脑损伤的临床疗效观察 [J]. *神经损伤与功能重建*, 2022, 17 (2): 113-114.
- [17] 张艳玲, 靳立新, 秦玲, 等. 个性化循证护理辅助神经节苷脂联合纳美芬治疗重症颅脑损伤的临床分析 [J]. *临床合理用药杂志*, 2015, 8 (12A): 47-48.
- [18] 张艳玲, 郭艳红, 秦玲, 等. 个性化康复训练护理辅助神经节苷脂联合纳美芬治疗对重症颅脑损伤患者肢体功能恢复的影响 [J]. *中国妇幼健康研究*, 2017, 28 (S4): 257.
- [19] 黄昊, 孟琼, 滕蕾, 等. 醒脑开窍针法联合纳美芬治疗颅脑损伤昏迷患者效果观察 [J]. *海南医学*, 2019, 30 (20): 2619-2621.
- [20] 宋丹. 纳美芬联合高压氧对急性重型颅脑损伤血清 S100 β 蛋白、缺氧诱导因子-1 α 、丙二醛及乳酸水平的影响 [J]. *安徽医药*, 2020, 24 (1): 47-50.
- [21] 陆少锋, 沈春莲, 张凌云, 等. 盐酸纳洛酮与盐酸纳美芬在重型颅脑损伤后迁延性昏迷治疗中的疗效对比 [J]. *国际医药卫生导报*, 2013, 19 (16): 2568-2571.
- [22] 黄琳琅, 彭海莹, 万春燕, 等. 我院 MICU 病区盐酸纳美芬注射液用药情况分析 [J]. *实用药物与临床*, 2015, 18 (4): 492-495.
- [23] 安胜男, 任文静, 付桂英. 279 例盐酸纳美芬注射液临床使用分析 [J]. *中国药物应用与监测*, 2021, 18 (1): 45-48.
- [24] 王光勇. 某院基于合理用药监测系统对临床盐酸纳美芬注射液使用现状及其安全性的分析 [J]. *抗感染药学*, 2022, 19 (1): 66-70.
- [25] 杨晓萍, 张丽萍. 静滴盐酸纳美芬注射液致大面积荨麻疹 1 例 [J]. *中国医药导刊*, 2011, 13 (3): 494.
- [26] 武弋, 雷鹏, 曹富裕, 等. 罕见 1 例盐酸纳美芬用药不良反应的分析报告 [J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2015, 14 (2): 181-182.
- [27] Cash A, Theus MH. Mechanisms of blood-brain barrier dysfunction in traumatic brain injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (9): 3344.
- [28] Khatri N, Thakur M, Pareek V, et al. Oxidative stress: major threat in traumatic brain injury [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2018, 17 (9): 689-695.
- [29] Killen MJ, Giorgi-Coll S, Helmy A, et al. Metabolism and inflammation: implications for traumatic brain injury therapeutics [J]. *Expert Rev Neurother*, 2019, 19 (3): 227-242.
- [30] Nakae R, Murai Y, Morita A, et al. Coagulopathy and traumatic brain injury: overview of new diagnostic and therapeutic strategies [J]. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2022, 62 (6): 261-269.
- [31] Hussain ZM, Fitting S, Watanabe H, et al. Lateralized response of dynorphin a peptide levels after traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2012, 29 (9): 1785-1793.
- [32] 贺波. 纳美芬对急性重症颅脑损伤患者血清 β -EP 和 NSE 水平的影响 [J]. *西南国防医药*, 2016, 26 (9): 991-993.
- [33] 冷成林. 盐酸纳美芬联合神经节苷脂钠对急性重症颅脑损伤患者血清 β -EP NSE 水平及凝血功能的影响 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2017, 20 (12): 57-59.
- [34] 黄钢, 杨双武, 董冀晨. 纳美芬联合亚低温治疗重型颅脑损伤疗效及对患者血清 β -内啡肽、可溶性细胞间黏附分子-1 及髓鞘碱性蛋白水平的影响 [J]. *陕西医学杂志*, 2020, 49 (12): 1642-1644.
- [35] Faden AI, Sacksen I, Noble LJ. Opiate-receptor antagonist nalmefene improves neurological recovery after traumatic spinal cord injury in rats through a central mechanism [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1988, 245 (2): 742-748.
- [36] Vink R, McIntosh TK, Rhomhanyi R, et al. Opiate antagonist nalmefene improves intracellular free Mg^{2+} , bioenergetic state, and neurologic outcome following traumatic brain injury in rats [J]. *J Neurosci*, 1990, 10 (11): 3524-3530.
- [37] Kalra S, Malik R, Singh G, et al. Pathogenesis and management of traumatic brain injury (TBI): role of neuroinflammation and anti-inflammatory drugs [J]. *Inflammopharmacology*, 2022, 30 (4): 1153-1166.
- [38] 张永, 高培龙, 褚沛, 等. 盐酸纳美芬对大鼠创伤性脑损伤后炎症反应的影响 [J]. *中华创伤杂志*, 2013, 29 (10): 991-995.
- [39] 刘兴华, 陈春有, 郑璘, 等. 盐酸纳美芬对急性颅脑损伤患者的效果及血清 IL-8、NSE 及 S100 β 水平的影响 [J]. *中国生化药物杂志*, 2016, 36 (7): 97-99.
- [40] Launey Y, Fryer TD, Hong YT, et al. Spatial and temporal pattern of ischemia and abnormal vascular function following traumatic brain injury [J]. *JAMA Neurol*, 2020, 77 (3): 339-349.
- [41] 魏晋琪, 夏晓萍, 路楷, 等. 康复训练联合纳美芬对重型颅脑损伤急性期脑血管痉挛的治疗及对内皮素-1 和 NO 的影响 [J]. *临床输血与检验*, 2020, 22 (4): 408-412.
- [42] 杜小静, 李晓慧, 岳胜, 等. 盐酸纳美芬对重型颅脑损伤患者脑电双频指数及预后的影响 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2022, 36 (2): 200-202.
- [43] 陈霞, 陈琳, 张胜武. 盐酸纳美芬对急性颅脑损伤患者脑保护作用分析 [J]. *实用药物与临床*, 2016, 19 (11): 1369-1372.

(收稿日期: 2022-06-02; 修回日期: 2022-08-05)

经典名方黄连膏的古今文献研究

朱艳华¹, 王玮莹¹, 高曦^{2*} (1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 150000; 2. 黑龙江中医药大学附属第一医院, 黑龙江 150000)

摘要: 黄连膏作为经典名方之一记载于《医宗金鉴》上, 由黄连、黄柏、生地黄、当归尾、姜黄五味药组成, 主治脏器湿热引起的鼻疮湿疹等, 临床应用广泛。本研究收集相关药方古籍记载, 对黄连膏处方来源、处方组成、功能主治等历史沿革进行归纳总结, 按经典名方研究要求对黄连膏处方用量、辅料作用、制备工艺等进行考证分析, 明确黄连膏药方演变过程, 确定了现代药物剂量, 阐述方中辅料麻油、黄蜡的作用, 结合现代手段初步确定其制备工艺, 为后续现代制剂开发提供参考。

关键词: 黄连膏; 经典名方; 文献研究; 古籍

中图分类号: R286

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0493-04

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.034

清代《医宗金鉴》所记载的黄连膏被收录于《古代经典名方目录(第一批)》^[1]中。原文记载“此证生于鼻窍内……内宜黄芩汤清之, 外用油纸捻粘辰砂定痛散, 送入鼻孔内。若干燥者, 黄连膏抹之立效”^[2]。

近些年许多学者正在研究开发古代经典名方, 需要在保证其古方特色的基础上, 采用现代手段优化其制备工艺, 因此要考证大量文献。本文主要通过归纳总结古今黄连膏处方变化, 对经典名方黄连膏的处方来源、制备工艺进行考证, 为其研究开发提供参考。

1 黄连膏的文献收集与统计

1.1 数据来源

古代文献基于中医古籍全文数据库《国医典藏》、相关古籍原版等, 现代文献基于 CNKI 公开发表的研究文献, 以“黄连膏”为关键词进行检索。

1.2 数据统计

以“黄连膏”为关键词进行中医古籍文献全文检索, 筛选后共得到数据 122 条, 涉及古籍 34 本。以“黄连膏”为关键词进行 CNKI 全文检索, 筛选后得到数据 265 条, 其中前三个主要分类为: 黄连膏 112 条, 临床观察 37 条, 复方黄连膏 25 条。

2 黄连膏的历史沿革

2.1 古代文献记载

从南北朝开始, 古籍中以黄连膏为名就记载有多个方剂, 均以黄连为君药, 但配伍药味略有不同, 通过归纳总结各个朝代的黄连膏, 可明确

形成经典名方的过程。现对相关古籍文献记载整理见表 1。黄连膏在《刘涓子鬼遗方》中主要治疗湿热诸疮;《圣济总录》中主要治疗小儿癣疥赤肿。随着历史演变, 通过加减药味, 至清朝《医宗金鉴》中所收录的黄连膏方, 由黄连、黄柏、生地黄、当归、姜黄等五味药组成, 主治鼻疮。鼻疮多因风热蕴结于肺所致, 治以清肺泄热。方中黄连、黄柏清热燥湿解毒, 姜黄破血行气, 生地凉血养阴润燥, 当归活血养血。诸药合用, 共奏清热解毒, 疏通经络之功效^[12]。《医宗金鉴》中所收录的黄连膏方由于组方合理严谨, 在后世成为临床外科发展的基础方, 多以此方进行加减药味, 例如《外科传薪集》方加白芷、牡丹皮、赤芍、合欢皮、大黄、黄芩、秦艽、紫草、白鲜皮等九味药, 增强了清热解毒燥湿的功效;《疡科捷径》卷下方是减去姜黄, 加元参、生龟板两味药, 增加了去腐生新的药效。

2.2 现代文献记载

现代各种皮肤疾病频发, 涌现了一批治疗的药物, 其中黄连膏的研究也越来越多, 所治的疾病范围也越来越广。黄连膏临床使用多为加减方或联合临床常用药, 在外科、妇科、儿科等方面应用广泛, 对湿疹、皮肤烫伤、过敏性皮炎、创面愈合等疾病疗效显著。例如,《全国中药成药处方集》(上海方)^[13]增加了大黄和黄芩, 使清热燥湿解毒的功效提升, 主治湿疮诸证;武汉市各医院自制的黄连膏是减姜黄加黄芩, 使其清热消肿

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (No.LH2021H092)。

作者简介: 朱艳华, 女, 教授, 主要从事缓控释制剂及经皮给药制剂研究, email: yhz8709@163.com *通信作者: 高曦, 男, 主任医师, 主要从事中西医结合骨与关节疾病研究, email: 13845082037@139.com

表 1 黄连膏历史典籍记载

典籍及朝代	处方	主治
《刘涓子鬼遗方》 ^[3] (南北朝·龚庆宣)	黄连、白蔹、白芷、生胡粉	湿热诸疮
《圣济总录》 ^[4] 卷一一三 (宋·太医院编)	黄连、蕤仁、干姜、膩粉	目多眵 (目蔑)
《圣济总录》 ^[4] 卷一八二 (宋·太医院编)	黄连、黄柏、蛇床子、藜茹、礞石、水银	小儿癬疥赤肿, 及湿癬久不愈
《圣济总录》 ^[4] 卷一三四 (宋·太医院编)	黄连、黄柏、杏仁、蔓菁子、胡粉、水银、猪脂、豉心	湿疮
《宣明论方》 ^[5] (金·刘完素)	黄连、朴消、白丁香	一切眼目疼痛, 瘀肉攀睛, 风痒泪落不已
《瑞竹堂经验方》 ^[6] (元·萨迁)	黄连、蕤仁、杏仁、木贼、草龙胆	一切眼疾
《活幼心书》 ^[7] (元·曾世荣)	净黄连	痘疮余毒攻眼, 眵多有热
《普济方》 ^[8] 卷二八 (明·朱橚)	黄连、白矾、硫黄、雌黄、蛇床子	诸疥干痒
《医宗金鉴》 ^[2] (清·吴谦)	黄连、当归尾、生地、黄柏、姜黄	肺经壅热, 致生鼻疮, 干燥肿疼, 皮肤湿疹, 红肿热疮, 水火烫伤, 乳头碎痛
《华氏医方汇编》 ^[9] (清·华岳)	川连、川柏、大黄、当归	湿毒脚癬溃烂
《外科传薪集》 ^[10] (清·马文植)	黄连、黄柏、姜黄、当归尾、白芷、牡丹皮、赤芍、生地、合欢皮、大黄、黄芩、秦艽、紫草、白鲜皮	多年臃疮湿毒, 鼻疮结毒
《疡科捷径》 ^[11] (清·时世瑞)	川古勇连、川柏皮、元参、大生地、生龟版、当归 (全)	眼癬, 漏眼疮, 鼻 (匿虫), 唇疔, 乳癬, 乳疔, 脐疮, 脐漏, 及肛疡诸痔, 茎疔阴蚀

能力得以增强;《河南省医院制剂规范》(1988 年版)^[14]方减姜黄加紫草, 不仅增强抗炎作用, 还具有抗菌抗病毒作用, 在河南省各级医院广泛应用。目前临床药味组成和功能主治见表 2。

表 2 黄连膏现代临床应用总结

年份	药味组成	功能主治
1990	黄连、黄柏、姜黄、当归尾、生地	鼻前庭炎 ^[16]
1999	黄连、黄柏、姜黄、当归、生地、紫草	肛周脓肿 ^[17]
2001	黄连、黄柏、姜黄、当归尾、生地、独角莲、山慈菇	血管瘤 ^[18]
2002	黄连、姜黄、当归、生地	肛窦炎 ^[19]
2008	黄连、当归、生黄芪、川芎、双花、公英	压疮 ^[20]
2009	黄连、当归、大黄、生地榆、三七、血竭	混合痔手术后促愈合 ^[21]
2011	黄连、黄柏、姜黄、当归尾、生地	甲沟炎 ^[22]
2012	黄连、黄柏、紫草、当归、地黄	静脉炎 ^[23]
2012	黄连、黄柏、当归	婴儿尿布皮炎 ^[24]
2012	黄连素、炉甘石、冰片、南通蛇药	隐肢虫皮炎 ^[25]
2012	黄连、黄柏、当归、生地、赤芍、白芷	腹泻导致肛周皮肤淹红 ^[26]
2013	黄连、黄柏、当归尾、羌活	口腔肿瘤术后 ^[27]
2014	黄连、黄柏、当归	带状疱疹 ^[28]
2015	黄连、黄柏、姜黄、当归、干生地	单纯性肛裂 ^[29]
2017	黄连、黄柏、姜黄、当归、生地、大黄、黄蜡	多巴胺外渗 ^[30]
2018	黄连、黄柏、姜黄、当归、生地、黄芪	老年慢性心力衰竭患者, 便秘 ^[31]
2019	黄连、黄柏、姜黄、当归尾、生地、乳香、没药、冰片	肛窦炎 ^[32]
2020	姜黄、黄柏、当归、生地黄、冰片	湿疹 ^[33]
2021	黄连、黄柏、姜黄、当归、生地黄	银屑病 ^[15]

黄连膏历史悠久, 但对此方的系统研究较少。桂俊芳等^[15]研究了黄连膏对银屑病患者白细胞介素水平的影响, 并通过实验证明了其临床疗效显著。于倩等^[34]通过用高效液相色谱法测定小檗碱、芝麻素等的含量, 并验证了黄连膏的体外透皮吸收功能及抗炎活性。王远茜等^[35]优化了提取工艺, 评价指标为姜黄素含量, 影响因素为药材粒度、煎炸时间、煎炸温度、浸泡时间。由此可见, 这些研究均是从某一角度进行, 并没有

全面的进行黄连膏的制备工艺、质量标准等研究。故应按照国家颁布的经典名方研发要求对黄连膏开展包括制剂开发及质量标准的系统研究。

至今, 黄连膏常用药材依然是黄连、黄柏、当归、生地和姜黄, 除此之外大黄、黄芩也多为配伍用药, 所治疾病多为鼻和肛门部位的皮肤疾病, 多用于黏膜部位, 使用时均为涂患处。现代研究证明中药脂溶性成分抗炎抗氧化作用更强, 表 2 中黄连膏的制备方法多为油中煎炸法, 用油

炸或油拌炒药材,常用芝麻油、羊脂油,使药材炙后酥脆、易于粉碎,有效成分易煎出,并可降低毒副作用^[36]。

3 处方用量考证

依据相关史料记载,元、明、清三朝度量衡并没有改动,依然使用宋朝时期的“市制”方法,即:1两=1.194市两,1市两=31.25g,1两=10钱,1钱=3.73克^[37]。

通过考证可知,黄连膏出自清代,将经典古方各药味处方用量转化成现代数据,并通过取整转换为:黄连12g、黄柏12g、当归尾18g、生地黄36g、姜黄12g、麻油450g、黄蜡150g。

4 制备工艺考证

4.1 辅料考证

古代油膏常用辅料有松香、黄蜡、白蜡等,本方中辅料为黄蜡,黄蜡是一种取自蜂巢的粗制蜜蜡。《本草纲目》^[38]记载:“取蜜后炼过,滤入水中,候凝取之,色黄者,俗名黄蜡”。即取蜂巢,放入锅中加水使其熔化,趁热过滤,冷凝成块,取出,即为黄蜡。因黄蜡属于天然的可食用物质,所以黄蜡也可作为中药用于治疗 and 预防人体疾病,其含有许多活性成分和酸性物质,可用于清热解毒。

通过古籍考证可知,古代煎炸成膏多以麻油作为辅料,除此以外还有桐油、牛乳、猪脂、白蜜等^[39]。如《外科集腋》对膏剂记载“桐油1斤……搅匀”,《圣济总录》记载“除胡粉、水银、猪脂外锉碎,先熬脂令沸……以瓷盒盛”“以牛乳3合,渍之1宿,明旦于微火上煎取1合……入膩粉搅和”,《圣惠》记载“上锉细……入白蜜4两相和,煎令稠”。很早之前就有麻油作为油膏剂的辅料,主要都是从芝麻中提取,只是不同朝代的工艺不同,三国时期麻油制备是采用石臼法或木榨法。汉唐时期,孙思邈在《备急千金要方》^[40]中记载治疮用的是炒乌麻,并且当时更加推崇将乌麻用作药物的辅料。宋朝时期,庄绰在《鸡肋编》里记载当时主要用胡麻炒制芝麻油^[41]。元明清时期是“炒碾磨”法制麻油,工艺更加精进。到了现代,主要使用胡麻,经压榨、压滤、水代等一系列加工工艺制成。麻油除了具有止痛消肿的作用外,还具有外用润肤、抗衰老等作用。

4.2 容器考证

古代煎煮药物的容器很多是药罐,大部分是陶瓷,加热方式也很原始,多为柴火加热^[42]。到了现代,煎煮中药的容器常见的多为铝锅、陶瓷锅、不锈钢锅等。同时,加热方式也更加便捷,能

控制温度和时间。原方中并没有容器的规定,但考虑到清朝时期铜锅盛行,《圣济总录》中黄连膏制法记载“以水并白蜜各3合,用铜器盛,于火上炊1次,绵滤去滓,贮瓷盒内”,推测黄连膏制备时使用铜锅。考虑到铜元素也具有一定的抗炎作用,在确保处方质量一致性以及可追溯性的原则,在经典名方制备工艺的实验研究中,器皿可选择铜锅,加热方式选择可以控制的电磁炉加热,以考察方中有效成分的变化情况以及药效学的异同。

4.3 煎炸工艺的确定

在传统工艺的研究中,要以古籍中记载的为基础,进而结合现代实际操作水平和技术,进行制备工艺考察,使古籍记载文字更加具体化与数据化,确定准确操作规范。

考虑到黄连膏最早出现于《刘涓子鬼遗方》中,其工艺规定也可作为参考,如对油膏工艺曾有许多明确的规定^[43]:

①浸料:以苦酒浸之,夏浸一日,冬浸二夜或在油中直接浸半日。②火力:必须微火,后世称为文火。③火候:观察油成有两种方法,一是根据油的沸腾次数,如煎三上下、煎四上下等;二是根据“白芷黄膏成”。④不耐油煎药物采用分次后下和冷油中调入法。在以上诸规定中“白芷黄膏成”即白芷煎至变黄为度,是很好的质量控制方法。煎三上下指煎三次,煎至沸腾后端下重复三次,煎四上下就是煎四次。因此制备时需先在麻油中浸泡12h(半日),并使用文火煎炸,由于文火有一定的温度范围,可在工艺研究中进行优化考证。煎炸时间可采用“白芷黄膏成”的方法确定,同时,也可在此时间上下浮动进行工艺优化。

5 结论与讨论

黄连膏方从南北朝起就开始使用,以黄连为君药,加减药味,所治疾病众多,为现代研究肌肤疾病提供了参考。现代文献主要以经典名方名录所收录的黄连膏方为基础进行研究,采用现代手段,扩展了黄连膏的应用。古籍中原方记载略微简略,原方中并没有药材的相关粒度、煎炸温度、煎炸时间、使用容器材质的明确记载,只能参考同一时期的油膏工艺技术初步确定其制备工艺,经典名方的研究需要对其进行优化,使用现代手段进一步进行考察,黄连膏关键信息见表3。通过查阅古代现代黄连膏文献可证明,即使到了现代,黄连膏在临床上的应用也极其丰富,可治疗的疾病也越来越多,足以体现黄连膏作为经典名方所具有的价值,随着医学科技的进步,需进一步研究开发并探究黄连膏治疗疾病的范围及作用机制。

表 3 黄连膏关键信息

处方来源	处方组成及用量	制备工艺	功能主治
《医宗金鉴》	黄连 12 g、黄柏 12 g、当归尾 18 g、生地黄 36 g、姜黄 12 g、麻油 450 g、黄蜡 150 g	取药材放入铜锅中,加入麻油,浸泡 12 h,文火煎炸,以“白芷黄膏成”为度,捞去渣,趁热加入黄蜡,放入瓷碗内,搅拌直至凝固	清火解毒;治肺经壅热,上攻鼻窍,聚而不散,致生鼻疮,干燥肿疼,皮肤湿疹,红肿热疮,水火烫伤,乳头碎痛

参考文献

[1] 国家中医药管理局. 古代经典名方目录(第一批)[S]. 2018.

[2] 吴谦. 医宗金鉴[M]. 郑金生整理. 北京: 人民卫生出版社, 2006.

[3] 季光琼, 邓衍清, 谈发明, 等. 黄连软膏的研究进展[J]. 湖北中医杂志, 2018, 40(3): 55-57.

[4] 刘涓子. 刘涓子鬼遗方[M]. 龚庆宣编, 于文忠点校. 北京: 人民卫生出版社, 1986.

[5] 赵佶. 圣济总录[M]. 郑金生, 汪惟刚, 犬卷太一, 校. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 2339.

[6] 金·刘完素. 刘完素医学全书[M]. 宋乃光, 胡国臣主编. 北京: 中国中医药出版社, 2006: 1-109.

[7] 萨谦斋. 重订瑞竹堂经验方[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 1, 11, 61, 81.

[8] 曾世荣. 活幼心书[M]. 田代华整理. 北京: 人民卫生出版社, 2006.

[9] (清)华岳原纂. 华氏医方汇编[M]. 上海务本堂刻本, 1885.

[10] 清·马培之编. 外科传薪集[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1959: 12.

[11] (清)时世瑞集. 疡科捷径[M]. 上海古籍书店, 1980.

[12] 朱橚. 普济方·针灸门[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2013: 1-5.

[13] 冉小峰, 胡长鸿. 全国中药成药处方集(上海方)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1962.

[14] 河南省卫生厅药政处. 河南省医院制剂规范(1988年版)[S]. 郑州: 郑州人民印刷厂, 1988.

[15] 桂俊芳, 张怡, 李影, 等. 臭氧联合黄连膏封包外敷对银屑病患者的临床疗效及其对皮损处 IL-17、IL-22 水平的影响[J]. 川北医学院学报, 2021, 36(7): 902-905.

[16] 张小平. 复方黄连膏治疗鼻前庭炎 74 例[J]. 辽宁中医杂志, 1990(7): 36-37.

[17] 孙丙军. 仙方活命饮配合黄连膏外敷治疗肛周脓肿 80 例临床观察[J]. 中西医结合实用临床急救, 1999(6): 34.

[18] 姚敬生. 加味黄连膏外敷治疗血管瘤 500 例[J]. 陕西中医, 2001(9): 517.

[19] 王守岭. 黄连膏治疗肛窦炎 150 例[J]. 实用中医药杂志, 2002(7): 36.

[20] 袁英, 魏晓冬, 张淑香. 芪参黄连膏治疗重度压疮 30 例的临床研究[J]. 实用医技杂志, 2008(30): 4280-4281.

[21] 王振彪, 张志强, 焦霞. 复方黄连膏在混合痔手术后促愈合作用的临床研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2009, 15(6): 478.

[22] 张金花, 张合会. 黄连膏外敷治疗甲沟炎临床观察[J]. 湖北中医杂志, 2011, 33(3): 43-44.

[23] 汪成书, 姚琴. 黄连膏贴敷治疗静脉炎 64 例[J]. 陕西中医, 2012, 33(2): 186-187.

[24] 李琳. 黄连膏治疗婴儿尿布皮炎疗效观察[J]. 护理学杂志, 2012, 27(9): 50.

[25] 许百轩, 许佩玲. 复方黄连膏治疗隐肢虫皮炎[A]/ 中华中医药学会第八次外治学术会议论文集[C]. 2012: 274-275.

[26] 管颖. 黄连膏治疗腹泻导致肛周皮肤淹红的疗效观察[J]. 中国临床护理, 2012, 4(6): 478-479.

[27] 汪芳, 田祚鲜, 李璐, 等. 黄连膏纱条在口腔肿瘤术后的临床应用[J]. 当代医学, 2013, 19(15): 94-95.

[28] 李琳. 黄连膏治疗带状疱疹疗效观察[J]. 湖北中医杂志, 2014, 36(7): 40.

[29] 王彬彬. 黄连膏油膏肛门滴入治疗单纯性肛裂的临床观察[J]. 中西医结合研究, 2015, 7(5): 250-251.

[30] 柴士花, 王莉娟, 邱明月. 95% 酒精联合黄连膏湿敷治疗多巴胺外渗护理观察[J]. 中医临床研究, 2017, 9(17): 124-126.

[31] 王丽珍, 张鹏. 黄连膏直肠灌注治疗老年慢性心力衰竭患者便秘的疗效观察[J]. 西北国防医学杂志, 2018, 39(2): 91-94.

[32] 李乾元, 周秀扣, 方征宇. 加味黄连膏联合肛管直肠微波仪治疗肛窦炎的疗效观察[J]. 中国现代医生, 2019, 57(12): 120-123.

[33] 张荣榕, 李宁, 邵帅, 等. 基于 P38MAPK 信号通路探讨加味黄连膏对小鼠湿疹模型的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(16): 1728-1732.

[34] 于倩, 张荣榕, 沈颖昕, 等. 黄连膏体外透皮吸收及抗炎活性研究[J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(16): 1625-1630.

[35] 王远茜, 韩冰, 王丹, 等. 黄连膏提取工艺优化及其体外抗炎活性[J]. 中成药, 2020, 42(8): 1977-1982.

[36] 曹乃馨, 解修超, 罗阳兰, 等. 夹竹桃花脂溶性成分提取工艺优化及其生物活性分析[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(14): 1841-1847.

[37] 宋佳, 谭曦然, 傅延龄. 宋代至清代经方本原剂量研究概述[J]. 中医杂志, 2013, 54(21): 1804-1807.

[38] 明·李时珍. 本草纲目[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975.

[39] 陈天朝, 瞿来超, 赵新红. 黄连膏的历史及临床应用考证[J]. 河南中医, 2010, 30(5): 514-516.

[40] 唐·孙思邈. 备急千金要方校释[M]. 李景荣, 等, 校释. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 23, 56, 239.

[41] 胡蝶. 宋代膏油研究[D]. 郑州: 河南大学, 2017.

[42] 蒋志, 蒋丽霞, 李智韬, 等. 中药汤剂煎煮方法及影响因素研究进展[J]. 广州中医药大学学报, 2022, 39(2): 45.

[43] 孙启明. 对中药油膏工艺合理性的初步探讨[J]. 中国药理学杂志, 1982(1): 46-48.

(收稿日期: 2022-08-06; 修回日期: 2022-10-02)

药物分析与检验

一测多评法同时测定艾叶配方颗粒中 6 个酚酸类成分

王瑜婷, 邝敏, 何荣荣, 潘玲, 黎桃敏, 钟志奎, 孙冬梅* (广东一方制药有限公司/广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 广东 佛山 528244)

摘要: **目的** 建立一测多评 (QAMS) 法测定艾叶配方颗粒中 6 个酚酸类成分的含量, 并验证其准确性及可行性。**方法** 采用 UPLC 法, 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为乙腈-0.1% 甲酸溶液, 梯度洗脱; 流速为 0.3 mL·min⁻¹; 检测波长为 325 nm。以绿原酸为内参物, 计算新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的相对校正因子 (f)。同时采用外标法和 QAMS 法测定艾叶配方颗粒中 6 个酚酸类成分的含量, 比较 2 种方法的测定结果是否存在差异。**结果** 新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 在各自质量浓度范围内与峰面积线性关系良好 ($r \geq 0.999$); f 分别为 1.00、0.94、1.20、1.25、1.16。QAMS 法与外标法测得 13 批样品中 6 个酚酸类成分的含量结果无显著差异, 相对误差均小于 1.2%。**结论** 建立的 QAMS 法测定结果准确, 可用于艾叶配方颗粒的定量分析及质量控制。

关键词: 一测多评法; 艾叶配方颗粒; 新绿原酸; 绿原酸; 隐绿原酸; 异绿原酸 B; 异绿原酸 A; 异绿原酸 C

中图分类号: R286

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0497-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.035

Simultaneous determination of 6 phenolic acids in Artemisiae Argyi Folium formula granules by QAMS

WANG Yu-ting, KUANG Min, HE Rong-rong, PAN Ling, LI Tao-min, ZHONG Zhi-kui, SUN Dong-mei* (Guangdong Efang Pharmaceutical Co., Ltd., Guangdong Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granules, Foshan Guangdong 528244)

Abstract: Objective To establish a quantitative method to analyze simultaneously 6 phenolic acids in Artemisiae Argyi Folium formula granules by quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS), and to verify its accuracy and feasibility. **Methods** The chromatographic column was Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% formic acid solution with gradient elution, the flow rate was 0.3 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was 325 nm. Chlorogenic acid was used as the internal reference material, and the relative correction factors of neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A and isochlorogenic acid C were calculated. The content of 6 phenolic acids was determined by the external standard method and QAMS respectively. The QAMS was validated through comparison of the results obtained by both methods. **Results** Neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A and isochlorogenic acid C all had good linearity in their respective ranges ($r \geq 0.999$), and their relative correction factors were 1.00, 0.94, 1.20, 1.25 and 1.16, respectively. The content of the 6 phenolic acids in 13 batches of samples by both method had no significant difference, with relative error was less than 1.2%. **Conclusion** The method is feasible and accurate, and can be used in the quantitative analysis and quality control.

基金项目: 国家工业和信息化部 2019 年产业技术基础公共服务平台项目 (No.2019-00902-1-2)。

作者简介: 王瑜婷, 女, 主要从事中药制剂工艺研究, email: 1262424257@qq.com ***通信作者:** 孙冬梅, 女, 硕士, 主任中药师, 主要从事中药新药工艺开发及质量研究, email: 1471237855@qq.com

Key words: QAMS; Artemisiae Argyi Folium formula granule; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; isochlorogenic acid B; isochlorogenic acid A; isochlorogenic acid C

艾叶为菊科植物艾 *Artemisia argyi* Levl. et Vant. 的干燥叶, 性温, 味辛、苦, 具有温经止血、散寒止痛的功效, 内服治疗吐血、衄血、崩漏、月经过多、胎漏下血、少腹冷痛、经寒不调、宫冷不孕等疾病, 外用可治疗皮肤痛痒^[1-3]。现代研究表明, 艾叶的主要化学成分为挥发油、酚酸类、黄酮类、萜类等, 具有抗菌、抗病毒、平喘镇咳祛痰、止血、抗凝血、抗过敏、镇静、护肝利胆及补体激活等作用^[4]。

酚酸类成分具有清除自由基、抗菌、消炎、抗病毒、保肝利胆、降血压、降血脂等作用, 是艾叶重要的药效物质。植物中广泛存在的绿原酸异构体有绿原酸(3-咖啡酰奎尼酸)、隐绿原酸(4-咖啡酰奎尼酸)、新绿原酸(5-咖啡酰奎尼酸)、异绿原酸 A(3, 5-二咖啡酰奎尼酸)、异绿原酸 B(3, 4-二咖啡酰奎尼酸)、异绿原酸 C(4, 5-二咖啡酰奎尼酸)等^[5]。一测多评(quantitative analysis of multi-components by single marker, QAMS)法是选定一个成分作内参物, 同时实现多个同类型化合物的含量测定方法, 回避了多对照品、高配置检测仪器的检测条件, 适合中药质量评价检测特点^[6]。因此, 本文以绿原酸作为内参物, 建立艾叶配方颗粒的 QAMS 法, 同时测定新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的含量, 不仅节约了检测成本, 同时为进一步提高艾叶配方颗粒整体质量控制水平提供了科学依据。

1 仪器与试药

Waters H-Class 型超高效液相色谱仪(Waters 公司); Agilent 1290 型超高效液相色谱仪(Agilent 公司); Shimadzu LC-40 型超高效液相色谱仪(岛津公司); XP26 型百万分之一天平、ME204E 型万分之一天平(METTLER TOLEDO 公司); Milli-Q Direct 型超纯水系统(Merck 公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

绿原酸(批号: 110753-202018, 纯度: 96.1%, 中国食品药品检定研究院); 新绿原酸(批号: DSTDX001503, 纯度: 99.58%)、隐绿原酸(批号: DST220104-035, 纯度: 99.3%)、异绿原酸 C(批号: DSTDY003802, 纯度: 99.58%)(德思特生物技术有限公司); 异绿原酸 B(批号: wkq210222206, 纯度: 99.85%)、异绿原酸 A(批号: wkq21020306, 纯度: 99.45%)(四川省维克奇生物科技有限公司); 甲醇、乙腈(色谱纯, Merck 股份有限公司), 甲酸

(色谱纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。13 批艾叶配方颗粒(编号: S1 ~ S13, 广东一方制药有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1% 甲酸溶液(B), 梯度洗脱(0~2 min, 8%A; 2~4 min, 8%~10%A; 4~8 min, 10%~15%A; 8~12 min, 15%~18%A; 12~18 min, 18%~19%A; 18~22 min, 19%~21%A; 22~25 min, 21%~37%A; 25~28 min, 37%~100%A; 28~32 min, 100%A; 32~35 min, 100%~8%A; 35~45 min, 8%A); 流速: 0.3 mL·min⁻¹; 柱温: 30℃; 检测波长: 325 nm; 进样量: 1 μL。

2.2 对照品溶液的制备

分别取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成质量浓度分别为 55.140、68.189、56.138、121.078、71.121、135.035 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取艾叶配方颗粒适量, 研细, 取约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇 25 mL, 称定重量, 超声处理(功率 300 W, 频率 40 kHz) 30 min, 取出, 放冷, 再称定重量, 用 80% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验 分别精密吸取空白溶剂、混合对照品溶液及供试品溶液(S12)进样测定, 结果见图 1。可见, 供试品溶液色谱在与对照品溶液色谱相应的保留时间处具有相同的色谱峰, 且空白溶剂无干扰, 表明该方法专属性良好。

2.4.2 线性关系考察 分别精密吸取“2.2”项下混合对照品储备液 0.5、1.0、3.0、5.0、8.0、10 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成系列质量浓度的混合对照溶液。按“2.1”项下色谱条件进样测定, 以对照品溶液质量浓度(μg·mL⁻¹)为横坐标(X), 以峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 结果见表 1。可知 6 个成分在相应质量浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.4.3 精密度考察 精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 计算得新绿原酸、绿

表 1 6 个成分的线性关系考察结果

Tab 1 Linearity of 6 components

成分	回归方程	<i>r</i>	范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
新绿原酸	$Y = 1.002 \times 10^4 X - 330.6$	1.000	2.757 ~ 55.140
绿原酸	$Y = 1.036 \times 10^4 X - 1.136 \times 10^3$	1.000	3.409 ~ 68.189
隐绿原酸	$Y = 9.654 \times 10^3 X - 969.9$	1.000	2.807 ~ 56.138
异绿原酸 B	$Y = 1.267 \times 10^4 X - 1.089 \times 10^4$	0.9993	6.054 ~ 121.078
异绿原酸 A	$Y = 1.340 \times 10^4 X - 6.265 \times 10^3$	0.9993	3.556 ~ 71.121
异绿原酸 C	$Y = 1.240 \times 10^4 X - 1.204 \times 10^4$	0.9995	6.752 ~ 135.035

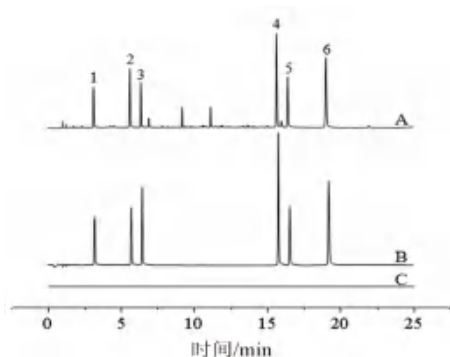


图 1 专属性试验 UPLC 色谱图

Fig 1 UPLC diagram of specific test

A. 供试品 (sample); B. 混合对照品 (mixed reference); C. 空白溶剂 (blank solvent); 1. 新绿原酸 (neochlorogenic acid); 2. 绿原酸 (chlorogenic acid); 3. 隐绿原酸 (cryptochlorogenic acid); 4. 异绿原酸 B (isochlorogenic acid B); 5. 异绿原酸 A (isochlorogenic acid A); 6. 异绿原酸 C (isochlorogenic acid C)

原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 峰面积的 *RSD* 均小于 2.0%，表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取艾叶配方颗粒 (S12)，精密称定，按“2.3”项下方法制备，分别在 0、4、8、12、24、48 h 进样测定，计算得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 峰面积的 *RSD* 均小于 2.0%，表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.4.5 重复性试验 取艾叶配方颗粒 (S12)，精密称定，平行称定 6 份，按“2.3”项下方法制备，进样测定。计算得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 含量的 *RSD* 均小于 2.0%，表明该方法重复性良好。

2.4.6 加样回收试验 取已知含量的艾叶配方颗粒 (S12)，精密称取 9 份，每份约 0.1 g，置具塞锥形瓶中，均分为 3 组，每组分别精密加入相当于含有量 50%、100%、150% 的混合对照品溶液，按“2.3”项下方法制备，进样测定，计算加样回收率及 *RSD*，结果见表 2。新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的平均加样回收率在 90.6% ~ 102.0%，*RSD* 均小于 5.0%，表明该方法准确性良好。

2.5 QAMS 法的建立

2.5.1 相对校正因子 (*f*) 的确定 取“2.2”项下混合对照品溶液，以绿原酸作为内参物，考察不同进样量 (0.2、0.5、0.8、1.0、1.5 μL) 下新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的 *f*。公式为 $f_{si} = f_i/f_s = (C_i/A_i)/(C_s/A_s) = (C_i \times A_s)/(C_s \times A_i)$ ，式中 A_s 为内参物峰面积， C_s 为内参物浓度， A_i 为某待测成分峰面积， C_i 为待测成分浓度^[7]。计算得 *f* 分别为 1.00、0.94、1.20、1.25、1.16，*RSD* 分别为 0.00%、0.48%、0.95%、1.0%、1.7%，结果见表 3。

2.5.2 色谱仪及色谱柱对 *f* 的影响 以绿原酸为内标物，考察其他成分在不同超高效液相色谱仪 Waters H-Class 型、Agilent 1290 型、Shimadzu LC-40 型，以及不同色谱柱 ZORBAX RRHD SB C18 (150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)、ACQUITY UPLC HSS T3 (150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)、CORTECS UPLC T3 (150 mm × 2.1 mm, 1.6 μm) 下的 *f*，结果见表 4，各成分的 *f* 的 *RSD* 均小于 2.0%，表明不同色谱系统和色谱柱对各成分的 *f* 无显著影响。

2.5.3 流速对 *f* 的影响 以绿原酸为内标物，考察不同流速 (0.20、0.25、0.30、0.35、0.40 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$) 下的 *f*，结果见表 5，各成分的 *f* 的 *RSD* 均小于 1.0%，表明不同流速对各成分的 *f* 无显著影响。

2.5.4 柱温对 *f* 的影响 以绿原酸为内标物，考察不同柱温 (25、28、30、35 $^{\circ}\text{C}$) 下的 *f*，结果见表 6，各成分的 *f* 的 *RSD* 均小于 1.0%，表明不同柱温对各成分的 *f* 无显著影响。

2.5.5 检测波长对 *f* 的影响 以绿原酸为内标物，考察不同检测波长 (320、323、325、327、330 nm) 下的 *f*，结果见表 7，各成分的 *f* 的 *RSD* 均小于 2.0%，表明不同检测波长对各成分的 *f* 无显著影响。

2.5.6 梯度程序对 *f* 的影响 以绿原酸为内标物，考察“2.1”项下梯度程序波动 (-5% ~ +5%) 下的 *f*，结果见表 8，各成分的 *f* 的 *RSD* 均小于 5.0%，表明不同梯度程序对 *f* 无显著影响。

2.6 待测成分色谱峰的定位

目前，常用的色谱峰定位方法有相对保留值法、保留时间差法、时间校正法、对照提取物法等。保

表 2 6 个成分的加样回收试验结果 (n = 3)

Tab 2 Recovery of the 6 components (n = 3)

成分	原有量 /	加入量 /	测得量 /	回收率 /	平均回收	RSD/%	成分	原有	加入	测得	回收	平均回收	RSD/%
	mg	mg	mg	%	率 /%			量 /mg	量 /mg	量 /mg	率 /%	率 /%	
新绿原酸	0.492	0.251	0.733	96.02	100.4	3.9	异绿原酸 B	0.957	0.481	1.391	90.23	94.3	3.8
	0.491	0.251	0.746	101.59				0.956	0.481	1.419	96.26		
	0.492	0.251	0.752	103.59				0.958	0.481	1.422	96.47		
	0.492	0.502	0.989	99.00	99.3			0.957	0.962	1.854	93.24	93.7	
	0.489	0.502	0.985	98.80				0.953	0.962	1.845	92.72		
	0.492	0.502	0.994	100.00				0.957	0.962	1.873	95.22		
	0.491	0.753	1.224	97.34	99.2			0.956	1.443	2.322	94.66	96.4	
	0.498	0.753	1.242	98.80				0.970	1.443	2.355	95.98		
	0.504	0.753	1.268	101.46				0.980	1.443	2.404	98.68		
	绿原酸	0.639	0.318	0.947	96.86			102.0	4.4	异绿原酸 A	0.555	0.273	
0.637		0.318	0.967	103.77		0.554	0.273	0.818			96.70		
0.639		0.318	0.974	105.35		0.556	0.273	0.817			95.60		
0.639		0.636	1.267	98.74	99.1	0.555	0.537	1.074			96.65	94.5	
0.635		0.636	1.260	98.27		0.553	0.537	1.047			91.99		
0.639		0.636	1.276	100.16		0.555	0.537	1.064			94.79		
0.638		0.953	1.572	98.01	100.0	0.555	0.806	1.332			96.40	98.0	
0.647		0.953	1.597	99.69		0.563	0.806	1.343			96.77		
0.654		0.953	1.630	102.41		0.569	0.806	1.381			100.74		
隐绿原酸		0.496	0.269	0.753	95.54	92.8	2.5	异绿原酸 C			1.036	0.535	1.542
	0.495	0.269	0.741	91.45		1.034			0.535	1.572	100.56		
	0.496	0.269	0.742	91.45		1.038			0.535	1.582	101.68		
	0.496	0.537	0.980	90.13	90.6	1.036			1.069	2.070	96.73	96.6	
	0.493	0.537	0.977	90.13		1.031			1.069	2.052	95.51		
	0.496	0.537	0.988	91.62		1.036			1.069	2.078	97.47		
	0.495	0.806	1.248	93.42	95.2	1.035			1.604	2.549	94.39	96.3	
	0.502	0.806	1.266	94.79		1.050			1.604	2.591	96.07		
	0.507	0.806	1.293	97.52		1.061			1.604	2.642	98.57		

表 3 5 个成分的相对校正因子 (n = 5)

Tab 3 Relative correction factors of 5 components (n = 5)

进样量 / μL	f (内参物绿原酸)				
	新绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C
0.2	1.00	0.93	1.18	1.23	1.13
0.5	1.00	0.94	1.19	1.24	1.16
0.8	1.00	0.94	1.20	1.25	1.17
1.0	1.00	0.94	1.20	1.26	1.17
1.5	1.00	0.94	1.21	1.26	1.18
平均值	1.00	0.94	1.20	1.25	1.16
RSD/%	0.00	0.48	0.95	1.0	1.7

留时间差法计算公式为 $\Delta t_{i/s} = t_i - t_s$; 相对保留值法计算公式为 $t_{i'} = t_i/t_s^{[8]}$ 。本文采用相对保留值法, 以绿原酸为内参物, 考察其他成分在不同超高效液相色谱仪以及色谱柱下的相对保留值, 结果见表 9, 各成分相对保留值的 RSD 均小于 2.0%, 表明不同色谱系统和色谱柱对各成分相对保留值无显著影响。

2.7 外标法 (ESM) 和 QAMS 法结果对比

取 13 批艾叶配方颗粒适量 (S1 ~ S13), 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 分别采用 ESM 和 QAMS 法测定各成分含量, 利用 SPSS 26.0 软件对结果进行 Pearson 相关系数 (r) 分析, 结果见表 10, 两种方法的 r 均为 1.000, 具有

高相关性 ($P > 0.05$)。验证 ESM 和 QAMS 法测定艾叶配方颗粒中新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 的含量, 计算 2 种测定方法下的相对误差, 相对误差 (%) = (QAMS 含量 - ESM 含量) / QAMS 含量 $\times 100\%^{[9]}$, 结果显示新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 的测定相对误差范围分别为 0.85% ~ 1.10%、0.00% ~ 0.24%、0.44% ~ 0.59%、0.14% ~ 0.39%、0.65% ~ 0.79%, 均小于 1.2%, 表明建立的艾叶配方颗粒 QAMS 法测定结果准确可靠。

3 讨论

3.1 待测组分的选择

艾叶配方颗粒为艾叶饮片经水提、分离、浓缩、干燥、制粒而成的颗粒, 在中医药理论指导下, 按照中医临床处方调配后, 冲服使用。目前有关艾叶药材或饮片的多指标含量测定报道较多^[10-13], 对相关制剂定量分析的报道较少。艾叶中含量较高的药效成分有酚酸类、挥发油等, 其中酚酸类成分为水溶性成分, 易于检测, 因此本研究将 6 个酚酸类成分作为艾叶配方颗粒质量控制的指标^[14-15], 其中, 绿原酸含量、保留时间适

表 4 不同色谱仪和色谱柱对相对校正因子的影响 (n = 3)

Tab 4 Effect of instrument and column on relative correction factor (n = 3)

仪器	色谱柱	f (内参物绿原酸)				
		新绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C
Shimadzu LC-40	ZORBAX RRHD SB C18	1.00	0.94	1.20	1.26	1.18
	ACQUITY UPLC HSS T3	1.00	0.92	1.20	1.28	1.19
	CORTECS UPLC T3	1.00	0.93	1.20	1.28	1.18
Agilent 1290	ZORBAX RRHD SB C18	1.00	0.94	1.19	1.27	1.17
	ACQUITY UPLC HSS T3	1.01	0.94	1.20	1.30	1.18
	CORTECS UPLC T3	1.00	0.94	1.18	1.24	1.16
Waters H-Class	ZORBAX RRHD SB C18	1.00	0.94	1.20	1.26	1.18
	ACQUITY UPLC HSS T3	0.99	0.93	1.18	1.24	1.16
	CORTECS UPLC T3	1.01	0.92	1.20	1.25	1.17
平均值		1.00	0.93	1.19	1.26	1.17
RSD/%		0.60	0.93	0.74	1.6	0.86

表 5 不同流速对相对校正因子的影响 (n = 3)

Tab 5 Effect of flow velocity on relative correction factor (n = 3)

流速 / (mL · min ⁻¹)	f (内参物绿原酸)				
	新绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C
0.20	1.01	0.94	1.21	1.26	1.18
0.25	1.01	0.94	1.20	1.25	1.17
0.30	1.00	0.94	1.20	1.25	1.17
0.35	1.00	0.94	1.20	1.25	1.17
0.40	1.00	0.94	1.22	1.27	1.19
平均值	1.00	0.94	1.21	1.26	1.18
RSD/%	0.55	0.00	0.74	0.71	0.76

表 6 不同柱温对相对校正因子的影响 (n = 3)

Tab 6 Effect of column temperature on relative correction factor (n = 3)

柱温 / °C	f (内参物绿原酸)				
	新绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C
25	1.00	0.94	1.20	1.25	1.17
28	1.00	0.94	1.20	1.25	1.17
30	1.01	0.94	1.20	1.26	1.17
35	1.01	0.94	1.21	1.26	1.18
平均值	1.01	0.94	1.20	1.26	1.17
RSD/%	0.57	0.00	0.42	0.46	0.43

表 9 不同色谱仪和色谱柱对相对保留值的影响 (n = 3)

Tab 9 Effect of instrument and column on relative retention time (n = 3)

仪器	色谱柱	相对保留值 (内参物绿原酸)				
		新绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C
Shimadzu LC-40	ZORBAX RRHD SB C18	0.54	1.09	2.55	2.61	3.12
	ACQUITY UPLC HSS T3	0.56	1.13	2.51	2.66	3.19
	CORTECS UPLC T3	0.56	1.09	2.51	2.62	3.17
Agilent 1290	ZORBAX RRHD SB C18	0.55	1.10	2.51	2.63	3.14
	ACQUITY UPLC HSS T3	0.57	1.12	2.52	2.61	3.15
	CORTECS UPLC T3	0.56	1.11	2.58	2.63	3.18
Waters H-Class	ZORBAX RRHD SB C18	0.56	1.10	2.52	2.68	3.14
	ACQUITY UPLC HSS T3	0.57	1.08	2.54	2.62	3.18
	CORTECS UPLC T3	0.56	1.13	2.55	2.69	3.15
平均值		0.56	1.11	2.53	2.64	3.16
RSD/%		1.7	1.6	0.96	1.1	0.75

表 7 不同检测波长对相对校正因子的影响 (n = 3)

Tab 7 Effect of detectionwavelength on relative correction factor (n = 3)

波长 / nm	f (内参物绿原酸)				
	新绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C
320	1.01	0.94	1.20	1.23	1.16
323	1.01	0.94	1.19	1.24	1.16
325	1.00	0.94	1.19	1.25	1.16
327	1.00	0.94	1.20	1.24	1.16
330	0.99	0.95	1.23	1.25	1.17
平均值	1.00	0.94	1.20	1.24	1.16
RSD/%	0.83	0.47	1.4	0.67	0.38

表 8 不同梯度程序对相对校正因子的影响 (n = 3)

Tab 8 Effect of gradient program on relative correction factor (n = 3)

梯度 程序	f (内参物绿原酸)				
	新绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C
- 5%	1.00	0.95	1.26	1.33	1.24
0	1.00	0.94	1.19	1.25	1.16
+ 5%	1.02	0.95	1.17	1.26	1.18
平均值	1.01	0.95	1.21	1.28	1.19
RSD/%	1.2	0.61	3.9	3.4	3.5

中, 易于对其他成分进行定位, 且绿原酸对照品来源充足, 化学性质较稳定, 选其作为内参物能够充分体现 QAMS 法低成本的优势。

3.2 提取方法及色谱条件的选择

本研究对供试品溶液的提取方式 (超声法、回流法), 提取溶剂 (50% 乙醇、80% 乙醇、无水乙醇、

表 10 6 个成分的含量测定结果 (n = 3, %)

Tab 10 Content determination of 6 components (n = 3, %)

编号	绿原酸	新绿原酸		隐绿原酸		异绿原酸 B		异绿原酸 A		异绿原酸 C	
		ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS
S1	0.623	0.476	0.472	0.470	0.470	1.227	1.233	0.716	0.717	1.370	1.380
S2	0.557	0.421	0.417	0.414	0.414	1.115	1.121	0.654	0.655	1.249	1.258
S3	0.570	0.431	0.427	0.424	0.423	1.143	1.149	0.670	0.671	1.286	1.295
S4	0.633	0.548	0.543	0.551	0.551	0.846	0.851	0.454	0.455	0.896	0.902
S5	0.635	0.553	0.547	0.554	0.553	0.845	0.850	0.453	0.454	0.891	0.897
S6	0.653	0.569	0.563	0.570	0.569	0.869	0.874	0.468	0.469	0.919	0.925
S7	0.567	0.469	0.465	0.471	0.471	0.919	0.924	0.507	0.509	1.006	1.013
S8	0.592	0.515	0.510	0.515	0.514	0.830	0.834	0.447	0.448	0.877	0.884
S9	0.559	0.485	0.480	0.489	0.489	0.861	0.865	0.460	0.461	0.907	0.913
S10	0.583	0.506	0.501	0.506	0.505	0.900	0.904	0.482	0.483	0.948	0.955
S11	0.693	0.544	0.539	0.549	0.549	1.031	1.037	0.578	0.579	1.135	1.143
S12	0.646	0.501	0.496	0.511	0.511	0.957	0.962	0.537	0.538	1.061	1.069
S13	0.588	0.487	0.482	0.488	0.488	0.951	0.956	0.529	0.531	1.048	1.055
r	/	/	1.000	/	1.000	/	1.000	/	1.000	/	1.000
P	/	/	> 0.05	/	> 0.05	/	> 0.05	/	> 0.05	/	> 0.05

50% 甲醇、80% 甲醇、甲醇), 提取时间 (30、45、60 min) 和稀释倍数 (25、50、100 倍) 进行考察。结果表明, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液时色谱峰分离度较好。采用 PDA 检测器在 210 ~ 400 nm 内对供试品溶液进行扫描, 发现在 325 nm 时色谱图基线平稳、噪声小, 各组分的响应值较高, 因此, 选择 325 nm 作为检测波长。

3.3 QAMS 法的建立

正确定位各待测成分的色谱峰是评价 QAMS 法可行性的重要步骤, 本研究应用不同高效液相色谱仪和品牌色谱柱, 分别考察保留时间差和相对保留时间的可靠性, 最终发现相对保留时间更能准确定位各待测成分色谱峰。常用来计算 *f* 的方法有多点校正法和斜率校正法, 而采用斜率校正法, 要求标准曲线线性关系较好, 斜率与截距之比大于 100, 计算得到的校正因子才具有较好的重复性和准确性^[16], 故本研究采用多点校正法计算 *f*, 方法学耐用性考察中 *RSD* 均小于 5.0%, 表明该方法稳定可行, 可为艾叶配方颗粒的质量控制提供参考。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 91.
 [2] 兰晓燕, 张元, 朱龙波, 等. 艾叶化学成分、药理作用及质量研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45 (17): 4017-4030.
 [3] 刘涛, 廖晓凤, 吴燕婷, 等. 艾叶有效成分抗炎作用及其机制的研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32 (3): 449-454.
 [4] 许兰杰, 梁慧珍, 余永亮, 等. 艾叶主要活性成分评价研究进展[J]. 安徽农业科学, 2022, 50 (2): 23-25.
 [5] 董珊, 肖伟敏, 彭祖茂, 等. HPLC 法同时测定金银花等样品中 6 种绿原酸异构体的含量[J]. 食品科技, 2020, 45

(3): 300-306.
 [6] 匡艳辉, 王德勤, 徐科一, 等. 一测多评法测定白芍中 7 种成分的含量[J]. 中药材, 2020, 43 (10): 2499-2503.
 [7] 刘艳芬, 段芳, 张翘, 等. 基于一测多评 (QAMS) 法联合化学计量学的参贝止咳颗粒综合质量评价[J]. 中草药, 2022, 53 (2): 413-423.
 [8] 刘晓霞, 丁青, 陈芳, 等. 基于高效液相色谱特征图谱和一测多评法的淫羊藿配方颗粒质量标准研究[J]. 中南药学, 2021, 19 (7): 1316-1320.
 [9] 万红才, 徐作刚, 段萍, 等. 一测多评法测定乌蕨中 5 个黄酮成分含量[J]. 药物分析杂志, 2021, 41 (12): 2211-2218.
 [10] 王丽霞, 刘聪, 杨晓芸, 等. 四制艾叶炮制前后的 UPLC 指纹图谱及主要成分含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27 (22): 147-154.
 [11] 于晓, 戴衍朋, 周倩, 等. 一测多评法测定艾叶中 6 个有机酸类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2016, 36 (12): 2131-2138.
 [12] 龚敏, 卢金清, 肖宇硕. 不同产地艾叶中总黄酮及其 3 种主要苷元的含量测定[J]. 中国药师, 2019, 22 (5): 966-968, 975.
 [13] 郭龙, 焦倩, 张丹, 等. 基于指纹图谱和多组分含量测定的艾叶药材质量控制研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43 (5): 977-984.
 [14] Xia JX, Zhao BB, Zan JF, et al. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Artemisiae Argyi Folium* by HPLC-MS/MS and discovery of antioxidant ingredients based on relevance analysis[J]. J Pharmaceut Biomed, 2019, 175: 112734.
 [15] 郑昆, 钟肖飞, 张华. 艾叶挥发油类成分及其药理作用的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26 (18): 224-234.
 [16] 刘紫璇, 吴祥明, 蒋鑫铨, 等. 基于指纹图谱及一测多评法的芍药甘草汤物质基准质量评价研究[J]. 中南药学, 2021, 19 (11): 2384-2389.

(收稿日期: 2022-07-15; 修回日期: 2022-09-06)

基于高效液相色谱法测定不同产地、不同抽芯程度远志药材中 4 种成分的含量

洪占梅¹, 熊晓莉², 肖俊萍², 高慧², 章芳琴³, 叶喜德^{1*} (1.中国人民解放军联勤保障部队第九〇一医院药剂科, 合肥 230031; 2.江西中医药大学药学院, 南昌 330004; 3.南昌大学第一附属医院药剂科, 南昌 330006)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法测定不同产地、不同抽芯程度远志药材的主要成分, 并比较其含量差异。 **方法** 采用 HPLC 法对远志药材中西伯利亚远志糖 A₅、西伯利亚远志糖 A₆、远志吡酮、3, 6'-二芥子酰基蔗糖 4 种化学成分的含量进行测定, 采用聚类分析法比较其含量差异。 **结果** 远志 4 种成分在 320 nm 下分离度良好, 西伯利亚远志糖 A₅、西伯利亚远志糖 A₆、远志吡酮、3, 6'-二芥子酰基蔗糖低、中、高浓度的平均回收率在 94.8% ~ 106.8%。成分含量分析结果表明, 不同产地的远志药材在不同抽芯程度下 4 种成分含量差异具统计学意义 ($P < 0.05$)。 **结论** 该方法科学、简便、准确, 可用于不同产地、不同抽芯程度远志药材成分含量测定。

关键词: 不同产地; 远志; 成分测定; 含量比较; 高效液相色谱法

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0503-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.036

HPLC determination of 4 components in *Polygala tenuifolia* from different habitats with different core pulling degrees

HONG Zhan-mei¹, XIONG Xiao-li², XIAO Jun-ping², GAO Hui², ZHANG Fang-qin³, YE Xi-de^{1*} (1. Department of Pharmacy, The 901st Hospital of the Logistics Support Section of Chinese People's Liberation Army, Hefei 230031; 2. Department of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004; 3. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006)

Abstract: Objective To establish an HPLC method to determine 4 main components of *Polygala tenuifolia* from different producing areas with different core pulling degrees, and to compare the content difference. **Methods** The content of sibiricose A₅, sibiricose A₆, *Polygala tenuifolia* ketone and 3, 6'-disinapoyl sucrose in *Polygala tenuifolia* was determined by HPLC. The content difference was analyzed by cluster analysis. **Results** The 4 components in *Polygala tenuifolia* were well separated at 320 nm. The average recoveries of low, medium and high concentrations of sibiricose A₅, sibiricose A₆, polygala tenuifolia ketone and 3, 6'-disinapoyl sucrose ranged from 94.8% to 106.8%. The content of the 4 components of *Polygala tenuifolia* from different areas was significantly different with different core pulling degrees ($P < 0.05$). **Conclusion** The method is scientific, simple and accurate. It can be used to determine of the content of *Polygala tenuifolia* medicinal materials from different habitats with different degrees of core extraction.

Key words: different habitats; *Polygala tenuifolia*; composition determination; content comparison; HPLC

基金项目: 江西省教育厅科学技术研究项目 (No.GJJ190637); 江西省中医药中青年骨干人才 (第一批) 培养计划【赣中医药科教学〔2020〕2号】。

作者简介: 洪占梅, 女, 主管药师, 主要从事中药研究, email: 741619304@qq.com *通信作者: 叶喜德, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药研究, email: 552376722@qq.com

远志为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 或卵叶远志 *Polygala sibirica* L. 的干燥根^[1], 主产于山西和陕西, 性温, 味苦。传统用药常以远志根皮入药, 具有镇静安神、祛痰消肿等功效, 多用于治疗失眠多梦、健忘等证。现代研究发现远志中寡糖酯、吡啶和皂苷类等成分对远志镇静安神及神经保护等药效产生影响^[2]。而不同产地远志药材所含化学成分的含量存在差异^[3-4], 其中山西产远志药材中寡糖酯和吡啶类成分含量高且品质优。而当前对不同产地远志成分的含量研究多集中于采用 HPLC 法测定寡糖酯、吡啶和皂苷类等成分的含量^[5]。2020 年版《中国药典》以远志吡啶Ⅲ、3, 6'-二芥子酰基蔗糖和细叶远志皂苷为目标成分, 应用反相色谱 ODS 柱及甲醇-0.05% 磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱, 并按照 HPLC 法进行含量测定。另一方面, 远志质量优劣, 常与抽芯程度有关。所谓抽芯程度是指同一批远志抽芯所占比率, 在一定程度上代表远志等级, 这与远志传统用药习惯“去芯”有关, 认为远志芯是远志的主要毒性部位。由于远志抽芯困难, 故远志的抽芯程度越高, 商品等级越高^[6]。但现代研究发现, 远志可不去芯, 远志芯中的化学成分与远志筒相近, 只是含量较低, 且去芯可能更易导致远志发霉, 从而导致黄曲霉毒

素超标^[7]。基于此, 本文研究远志不同产地、不同抽芯程度对其所含西伯利亚远志糖 A₅、西伯利亚远志糖 A₆、远志吡啶和 3, 6'-二芥子酰基蔗糖等 4 种成分含量的影响, 并比较它们之间的差异, 为深入研究远志提供数据支撑。

1 材料

1100 型高效液相色谱系统 (安捷伦公司), DFY-400 型 400 克摇摆式高速中药粉碎机 (温岭市林大机械有限公司), KQ-500E 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), TGL-16B 高速离心机 (上海安亭科学仪器厂), 十万分之一电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司), 娃哈哈纯净水。对照品西伯利亚远志糖 A₅ (批号: MUST-21052704)、西伯利亚远志糖 A₆ (批号: MUST-20082523)、远志吡啶 (批号: MUST-19092310) (纯度 > 94.0%) (成都曼斯特生物科技有限公司); 3, 6'-二芥子酰基蔗糖 (批号: wkq 21031112) (纯度 > 99.0%, 四川省维克奇生物科技有限公司); 除乙腈为色谱纯外, 其他试剂均为分析纯。

本研究所用远志药材来源于陕西和山西两地, 详见表 1, 经江西中医药大学药学院中药鉴定教研室刘应蛟副教授鉴定为远志 (*Polygala tenuifolia* Willd) 的干燥根。

表 1 12 批远志来源信息

Tab 1 12 batches of *Polygala tenuifolia* source information

样品编号	生产地	远志	抽芯程度	样品编号	生产地	远志	生产地与抽芯程度
S1	陕西	大筒远志	98% 抽芯	S7	山西	中筒远志	95% 抽芯
S2	陕西	小筒远志	95% 抽芯	S8	山西	中筒远志	98% 抽芯
S3	陕西	中筒远志	未抽芯	S9	山西	大筒远志	90% 抽芯
S4	陕西	小筒远志	未抽芯	S10	山西	大筒远志	98% 抽芯
S5	陕西	大筒远志	未抽芯	S11	山西	大筒远志	95% 抽芯
S6	陕西	中筒远志	98% 抽芯	S12	山西	大筒远志	未抽芯

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

取不同产地远志药材 20 g, 粉碎, 过 60 目筛, 各取 0.5 g 粉末, 精密称定, 置于锥形瓶中, 加入 60% 甲醇 25 mL, 称定重量, 超声 45 min。静置冷却后, 再称定重量, 用 60% 甲醇补足减失重量, 摇匀, 滤过, 取滤液, 置于 25 mL 量瓶中, 定容至刻度。转移至离心管内, 5000 r · min⁻¹ 下离心 5 min, 取上清液, 微孔滤膜过滤后, 得供试品溶液。

2.2 对照品溶液的制备

取西伯利亚远志糖 A₅、西伯利亚远志糖 A₆、

远志吡啶各 1 mg, 3, 6'-二芥子酰基蔗糖 2 mg, 于 5 mL 量瓶中用纯甲醇定容, 制成对照品储备液。分别从各对照品储备液中精密吸取适量配制成西伯利亚远志糖 A₅、西伯利亚远志糖 A₆、远志吡啶质量浓度均为 0.05 mg · mL⁻¹, 3, 6'-二芥子酰基蔗糖质量浓度为 0.2 mg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液, 逐级稀释, 得混合对照品系列溶液。

2.3 色谱条件^[8]

采用 Synchronis C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 柱温 35 °C, 流速 1 mL · min⁻¹, 进样量 10 μL, 检测波长 320 nm, 流动相为乙腈 (A) - 0.05% 磷酸溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 8 min,

8% ~ 15.5%A; 8 ~ 22 min, 15.5% ~ 18%A; 22 ~ 30 min, 18% ~ 20%A; 30 ~ 50 min, 20% ~ 24%A; 50 ~ 73 min, 24% ~ 33%A; 73 ~ 85 min, 33% ~ 42%A)。在上述色谱条件下, 各成分间分离度良好, 分离度均大于 1.5, 见图 1。

2.4 线性关系考察

取混合对照品系列溶液, 西伯利亚远志糖 A₅、西伯利亚远志糖 A₆、远志吡酮质量浓度分别为 5、10、15、25、40、50 μg · mL⁻¹, 3, 6'-二芥子酰基蔗糖质量浓度分别为 20、40、60、100、160、200 μg · mL⁻¹, 按“2.3”项下色谱条件进行测定, 记录各成分峰面积, 以峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 以信噪比 (S/N) 为 10 时计算定量限, 结果见表 2。

2.5 精密度试验

精密吸取远志混合对照品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进样 10 μL, 重复 6 次, 记录并计算对照品中西伯利亚远志糖 A₅、西伯利亚远志糖 A₆、远志吡酮、3, 6'-二芥子酰基蔗糖成分峰面积 RSD 值, 其结果分别为 1.9%、1.9%、1.1%、1.6%,

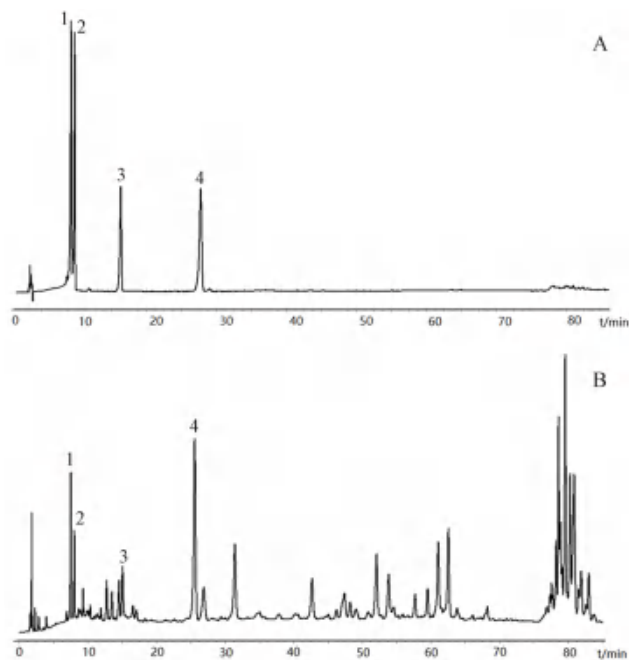


图 1 远志中 4 种成分 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of 4 components in *Polygala tenuifolia* A. 混合对照品 (mixed reference); B. 样品 (sample); 1. 西伯利亚远志糖 A₅ (sibiricose A₅); 2. 西伯利亚远志糖 A₆ (sibiricose A₆); 3. 远志吡酮 (polygala tenuifolia ketone); 4. 3, 6'-二芥子酰基蔗糖 (3, 6'-disinapoyl sucrose)

表 2 远志中 4 种成分的标准曲线和线性范围

Tab 2 Standard curve and linearity of 4 components in *Polygala tenuifolia*

成分	回归方程	线性范围 / (μg · mL ⁻¹)	R ²	定量限 / (μg · mL ⁻¹)
西伯利亚远志糖 A ₅	y = 40.487x + 15.950	5.0 ~ 50.0	0.9880	5.0
西伯利亚远志糖 A ₆	y = 36.745x + 23.135	5.0 ~ 50.0	0.9713	5.0
远志吡酮	y = 22.182x - 0.388	5.0 ~ 50.0	0.9997	5.0
3, 6'-二芥子酰基蔗糖	y = 33.935x - 2.714	20.0 ~ 200.0	0.9994	20.0

表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取同一批远志药材粉末 6 份, 精密称定, 按照“2.1”项方法制备, 按照“2.3”项下色谱条件进样测定, 计算西伯利亚远志糖 A₅、西伯利亚远志糖 A₆、远志吡酮、3, 6'-二芥子酰基蔗糖峰面积 RSD 值, 其结果分别为 2.1%、2.2%、2.3%、1.8%, 表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取同一批远志供试品溶液适量, 于室温下分别在 0、2、4、8、12 h, 按“2.3”项下色谱条件进样测定, 计算峰面积 RSD 值。结果西伯利亚远志糖 A₅、西伯利亚远志糖 A₆、远志吡酮、3, 6'-二芥子酰基蔗糖峰面积 RSD 分别为 1.1%、2.0%、1.7%、1.6%, 表明供试品在 12 h 内稳定。

2.8 加样回收试验

精密量取已知成分含量的远志供试品溶液

(批号: S1) 1 mL, 加入低、中、高浓度的混合对照品溶液 1 mL, 每个浓度取 3 份, 置于 5 mL 量瓶中, 定容, 在“2.3”项色谱条件下进样, 测定西伯利亚远志糖 A₅、西伯利亚远志糖 A₆、远志吡酮、3, 6'-二芥子酰基蔗糖的平均回收率。结果 4 种成分的低、中、高浓度的平均回收率在 94.8% ~ 106.8%, RSD 在 0.47% ~ 2.0%。

2.9 样品含量测定

取各批次样品, 按“2.1”项下方法进行制备, 按照“2.3”项下色谱条件进行检测, 记录峰面积, 计算供试品中各成分含量, 结果见表 3。

2.10 统计分析

采用 SPSS 23.0 软件分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验进行组间比较, 以 P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2.10.1 4 种不同成分含量聚类分析 将 12 份不同产地、不同抽芯程度远志药材中西伯利亚远

表 3 不同远志中 4 种成分含量测定结果 (mg · g⁻¹)
 Tab 3 Determination of 4 components in different *Polygala tenuifolia* (mg · g⁻¹)

样品编号	西伯利亚远志糖 A ₅	西伯利亚远志糖 A ₆	远志吡啶酮	3, 6'-二芥子酰基蔗糖
S1	1.077	0.779	1.849	4.884
S2	1.410	0.900	1.201	4.913
S3	1.269	1.010	0.858	3.896
S4	0.787	0.734	0.894	1.976
S5	2.129	1.574	1.429	8.465
S6	1.188	0.700	1.518	3.982
S7	1.256	0.851	0.999	4.451
S8	1.387	0.870	1.103	4.851
S9	1.387	0.969	1.186	5.669
S10	1.203	0.957	1.242	6.807
S11	0.885	0.627	0.700	3.554
S12	2.193	1.195	2.579	4.427

志糖 A₅、西伯利亚远志糖 A₆、远志吡啶酮和 3, 6'-二芥子酰基蔗糖 4 种成分含量数据输入 SPSS 23.0 统计软件中进行聚类分析。在分析过程中主要以远志药材中各成分含量的相似性进行分类。结果表明, 12 批远志样品首先可聚为两个大类, S5、S9、S10 聚为一大类, 其他可聚为另一大类, 见图 2。在第一大类中, S5 单独为一小类, S9、S10 聚为一小类; 在第二大类中, 可分为 4 个小类, S1、S2、S7、S8 聚为一小类, S3、S11、S6 聚为一小类, S12 与 S4 单独各为一小类。

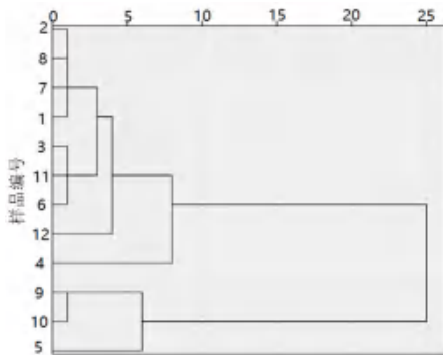


图 2 12 批远志的聚类分析树状图
 Fig 2 Cluster analysis of 12 batches *Polygala tenuifolia*

2.10.2 4 种成分含量差异分析 由表 3 可知, 不同产地、不同抽芯程度远志药材 4 种成分含量存在显著差异。西伯利亚远志糖 A₅ 含量为 0.787 ~ 2.193 mg · g⁻¹, 以山西未抽芯大筒远志含量最高, 为 2.193 mg · g⁻¹, 其次为陕西未抽芯大筒远志, 含量为 2.129 mg · g⁻¹, 与其他不同产地、不同抽芯程度远志药材存在显著性差异 (P < 0.05)。相同产地、不同抽芯程度远志中西伯利亚远志糖 A₅ 含量无显著差异, 以山西抽芯 98% 中筒远志与抽

芯 90% 大筒远志含量最为接近。

西伯利亚远志糖 A₆ 含量为 0.627 ~ 1.574 mg · g⁻¹, 以陕西未抽芯大筒远志含量最高, 为 1.574 mg · g⁻¹, 其次为山西未抽芯大筒远志, 含量为 1.195 mg · g⁻¹, 与其他不同产地、不同抽芯程度远志存在显著差异 (P < 0.05)。相同产地、不同抽芯程度远志中西伯利亚远志糖 A₆ 含量无显著差异, 以山西抽芯 95% 与抽芯 98% 中筒远志中西伯利亚远志糖 A₆ 含量最为接近。

远志吡啶酮含量为 0.700 ~ 2.579 mg · g⁻¹, 以未抽芯的山西大筒远志的含量最高, 为 2.579 mg · g⁻¹, 其次为陕西抽芯 98% 的大筒远志, 含量为 1.849 mg · g⁻¹, 与其他不同产地、不同抽芯程度的远志药材存在显著差异 (P < 0.05)。相同产地、不同抽芯程度远志中远志吡啶酮含量无显著差异, 以山西抽芯 90% 大筒远志与抽芯 98% 大筒远志含量最为接近。

3, 6'-二芥子酰基蔗糖含量为 1.976 ~ 8.465 mg · g⁻¹, 以陕西未抽芯大筒远志含量最高, 为 8.465 mg · g⁻¹, 其次为陕西抽芯 98% 大筒远志, 含量为 6.807 mg · g⁻¹, 与其他不同产地、不同抽芯程度的远志存在显著差异 (P < 0.05)。相同产地、不同抽芯程度远志中 3, 6'-二芥子酰基蔗糖含量无显著差异, 以陕西抽芯 98% 大筒远志与抽芯 95% 小筒远志含量最为接近。

3 总结与讨论

3.1 远志药材及测定指标的选择

目前, 我国的远志药材主要分布于山西、陕西、河北和山东等地, 以山西和陕西为主要产地。在远志多指标成分含量研究中, 对山西、内蒙、陕西等地的糖酯类指标成分进行研究, 结果表明山西远志药材成分含量较高, 整体品质较好^[9]。因此, 本研究选用山西和陕西两地不同抽芯程度的远志药材进行成分含量研究。在选择测定指标方面, 大量研究表明, 远志中寡糖酯类和吡啶酮类成分与远志药效相关, 因此对不同产地远志药材进行成分含量测定时, 常以远志吡啶酮、3, 6'-二芥子酰基蔗糖为测定指标。另外, 参考文献^[10]对远志药材中西伯利亚远志糖 A₅ 和西伯利亚远志糖 A₆ 进行含量测定, 分析远志药材成分含量的差异性。因此, 在本研究中选用西伯利亚远志糖 A₅、西伯利亚远志糖 A₆、远志吡啶酮和 3, 6'-二芥子酰基蔗糖 4 种成分进行研究。

由含量测定结果可知, 山西未抽芯大筒远志中西伯利亚远志糖 A₅ 含量比抽芯者高, 陕西抽

芯 98% 大筒远志中西伯利亚远志糖 A₆ 含量最高, 山西未抽芯大筒远志中远志吡啶含量最高, 陕西未抽芯远志中 3, 6'-二芥子酰基蔗糖含量最高, 表现为整体质量优、品质佳。

3.2 测定条件的筛选

2020 年版《中国药典》远志的含量测定中, 采用 70% 甲醇对远志粉末进行超声提取, 残渣加 10% 氢氧化钠加热回流, 盐酸调节 pH 值, 正丁醇振摇提取等方式制备供试品溶液。本研究在设计供试品的制备方法阶段对超声提取和回流提取方式进行了比较, 发现文献^[11-12]多采用超声提取进行供试品制备, 甲醇浓度在 50% ~ 70%, 此法提取效率高且用时少, 因此, 本研究中对远志药材采用超声法提取, 提取溶剂为 60% 的甲醇。对于流动相的选择, 文献^[13-15]对远志成分含量测定时多采用甲醇-0.05% 磷酸溶液 (70:30) 为流动相进行梯度洗脱, 而在远志指纹图谱研究以及远志质量评价研究中多采用乙腈-0.05% 磷酸溶液进行洗脱。本文参考文献并对混合对照品成分进行测定后, 采用乙腈-0.05% 磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱, 实现了对西伯利亚远志糖 A₅、西伯利亚远志糖 A₆、远志吡啶与 3, 6'-二芥子酰基蔗糖含量分析测定。

3.3 不同抽芯程度对远志药材的影响

根据远志传统药用经验^[16], 远志以根皮入药, 药效以“去净木心者”为佳, 其中大筒远志质量最优, 中筒其次, 小筒较次。而在本研究中, 对不同抽芯程度远志药材含量进行比较, 发现陕西、山西中未抽芯大筒远志西伯利亚远志糖 A₅ 成分含量较高, 西伯利亚远志糖 A₆ 则以陕西 98% 抽芯大筒远志最高, 远志吡啶以山西未抽芯大筒远志最高, 陕西未抽芯大筒远志中 3, 6'-二芥子酰基蔗糖成分含量最高。历代本草用药, 提倡远志去芯。但随着研究不断深入, 发现远志不去芯时, 毒性和溶血作用比取芯之后的根皮入药时更小^[17], 且祛痰作用相近。本研究结果表明, 不去芯远志中化学成分含量相对较高, 说明去芯会影响远志主要成分含量, 这为远志去芯是否影响其药效等方面的深入研究提供了基础。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 163.
- [2] 刘丽. 中药远志的研究进展概论[J]. 中医临床研究, 2017, 9 (34): 146-148.
- [3] 王海波, 刘勇, 矫承媛, 等. 不同产地远志中远志吡啶 III、3, 6'-二芥子酰基蔗糖、细叶远志皂苷 A 含量测定[J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19 (10): 39-41.
- [4] 张琳, 杨冰月, 王晶, 等. 不同产地野生远志中 5 种主要成分的含量测定及质量分析[J]. 中草药, 2020, 51 (6): 1609-1616.
- [5] 栾茹乔, 张学兰, 吴鹏, 等. HPLC 法测定远志及其 3 种炮制品中 3 种寡糖酯[J]. 中成药, 2017, 39 (8): 1666-1669.
- [6] 姜雨彤, 高照, 乐智勇, 等. 不同等级制远志饮片的质量分析[J]. 药学报, 2019, 54 (6): 1082-1087.
- [7] 张西梅, 毕艳孟, 张继培, 等. 远志加工过程中黄曲霉毒素和污染真菌的分析研究[J]. 中草药, 2020, 51 (10): 2851-2856.
- [8] 刘露, 冯伟红, 刘晓谦, 等. 中药远志的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (22): 5744-5759.
- [9] 邸学, 刘雅晴, 田盛, 等. 远志多指标成分活性效应质量评价研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24 (4): 37-41.
- [10] 王丹丹, 闫艳, 张福生, 等. 远志药材 UPLC 指纹图谱及多指标性成分测定方法的建立[J]. 中草药, 2018, 49 (5): 1150-1159.
- [11] 姜秋, 李慧芬, 梁晓, 等. HPLC 同时测定不同产地远志饮片中 6 种寡糖酯类成分[J]. 中成药, 2015, 37 (2): 360-364.
- [12] 刘庆华, 郭海利, 姚莹, 等. HPLC 法测定不同月份远志中远志皂苷的含量[J]. 山西农业科学, 2019, 47 (11): 1881-1883.
- [13] 王永艳. 冀产远志与卵叶远志的含量测定研究[J]. 中国医药导报, 2016, 13 (12): 132-134, 138.
- [14] 王晶, 彭亮, 王媛媛, 等. 基于 HPLC-PDA 检测系统的远志指纹图谱分析与研究[J]. 中南药学, 2017, 15 (5): 561-566.
- [15] 赵云生, 刘秀, 毛福英, 等. 基于 HPLC-DAD 指纹图谱的远志质量评价研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39 (20): 3991-4000.
- [16] 彭亮, 杨冰月, 程虎印, 等. 不同干燥方法对远志筒及根中主要化学成分的影响[J]. 中草药, 2018, 49 (21): 5010-5017.
- [17] 刘艳芳, 彭东艳, 杨晓娟, 等. 去心与不去心远志药材的化学成分和药效学比较研究[J]. 中国药学杂志, 2012, 47 (24): 1975-1979.

(收稿日期: 2022-10-01; 修回日期: 2022-12-20)

人参鲜品中农药残留评价研究

谭乐俊, 林林, 梅桂雪, 林永强* (山东省食品药品检验研究院 国家药监局胶类产品质量评价重点实验室 山东省中药标准创新与质量评价工程实验室, 中药配方颗粒共性技术山东省工程研究中心, 济南 250101)

摘要: **目的** 建立测定鲜人参中 63 种农药残留的分析方法, 检测 34 批鲜人参药材样品的农药残留量, 并对鲜人参的质量安全进行评价。 **方法** 采用 QuEChERS 法进行前处理, 结合气相色谱-三重四极杆质谱 (GC-MS/MS)、液相色谱-三重四极杆质谱 (LC-MS/MS), 于多反应检测模式下同时测定 34 批次鲜人参药材中 63 种农药的残留量。 **结果** 63 种农药在相应含量范围内呈现良好的线性关系, 相关系数 r 均 > 0.995 , 仪器精密度 RSD 在 $0.34\% \sim 2.9\%$, 加标回收率在 $81.2\% \sim 118.8\%$, 符合检测要求。34 批鲜人参药材中共检出 4 种禁用农药: 有 22 批样品检出五氯硝基苯 ($0.01 \sim 43.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 14 批样品检出六氯苯 ($0.01 \sim 1.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 2 批样品检出 α -六六六 ($0.012 \sim 0.016 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 2 批样品检出 β -六六六 ($0.010 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 检出率 64.7%, 不合格率 41.2%。不合格批次均来自 A 公司, 五氯硝基苯最高检出批次超出定量限的 432 倍。六氯苯最高检出批次超出定量限 18 倍。 **结论** 该方法简单、准确、灵敏度高, 适合鲜人参中多种农药残留的筛查测定, 可为鲜人参的农药残留监控提供参考。

关键词: 鲜人参; 农药残留; 气相色谱-三重四极杆质谱; 液相色谱-三重四极杆质谱

中图分类号: R927, R284 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)02-0508-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.037

Evaluation of pesticide residues in fresh ginseng

TAN Le-jun, LIN Lin, MEI Gui-xue, LIN Yong-qiang* (*Shandong Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Evaluation of Gelatin Products, Shandong Engineering Laboratory for Standard Innovation and Quality Evaluation of TCM, Shandong Engineering Research Center of Generic Technologies for Traditional Chinese Medicine Formula Granules, Jinan 250101*)

Abstract: Objective To determine 63 pesticides in 34 batches of fresh ginseng samples, and to evaluate its quality and safety. **Methods** QuEChERS method was used to pretreat fresh ginseng, and 63 pesticides were determined under multiple reaction monitoring mode (MRM) of gas chromatography-triple quadruple mass spectrometry (GC-MS/MS) and liquid chromatography-triple quadruple mass spectrometry (LC-MS/MS). **Results** The 63 pesticides showed a good linearity in the corresponding content range, with correlation coefficient $r > 0.995$, the instrument precision RSD ranged 0.34% to 2.9% , and the recovery ranged $81.2\% \sim 118.8\%$, all meeting the detection requirements. quitozen ($0.01 \sim 43.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) was detected in 22 batches of fresh ginseng; hexachlorobenzene ($0.01 \sim 1.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) were detected in 14 batches of sample; α -BHC ($0.012 \sim 0.016 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) was detected in 2 batches of sample, and β -BHC ($0.010 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) in 2 batches of sample. The detection rate of pesticide residues in fresh ginseng samples was 64.7% and the unqualified rate was 41.2%. The unqualified batches were all provided by A company. The highest residue of quitozen exceeded the quantitative limit by 432 times. The highest residue of hexachlorobenzene exceeded the quantification limit by 18 times. **Conclusion** The method is simple, accurate, sensitive, and suitable for the screening and determination of multiple

基金项目: 山东省重点研发计划重大科技创新工程项目 (No.2021CXGC010511); 山东省重点研发计划项目 (No.2020RKB24001); 山东省人文社会科学课题 (No.2021-YYGL-44)。

作者简介: 谭乐俊, 女, 主管药师, 主要从事药品质量评价和质量标准研究, email: lejuntan0212@163.com *通信作者: 林永强, 男, 主任药师, 主要从事药品质量评价和质量标准研究, email: 13864067104@163.com

pesticide residues in fresh ginseng. It can provide reference for monitoring of pesticide residues and ensuring safe use of fresh ginseng.

Key words: fresh ginseng; pesticide residue; gas chromatography-triple quadruple mass spectrometry; liquid chromatography-triple quadruple mass spectrometry

鲜人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的新鲜根和根茎, 多于秋季采挖, 洗净或经保鲜处理。栽培的俗称“园参”, 播种在山林野生状态下自然生长的为“林下山参”, 习称“籽参”^[1]。人参入药历史悠久, 始载于《神农本草经》, 列为上品^[2], 鲜人参性平, 主要具有补气强身、益智安神、延年益寿的功效^[3]。

2012 年, 人参被原卫生部列入新资源食品后, 市场需求激增。为了更好地保护人参资源以满足市场需求, 我国形成了以东北地区(主要为吉林长白山地区)为主的种植区^[4]。人参生长周期较长, 一般从播种至成熟收获需 6~8 年, 大面积的种植极易造成病虫害相互传染, 参农在缺乏专业技术指导的情况下, 为了确保人参的质量和产量, 一般多倾向于使用广谱、高毒、速效的杀虫杀菌剂。如此乱用药、高频率用药、过量用药和误用药的行为必然引起农药残留问题, 这个问题不仅成为我国人参走向国际市场的主要限制因素^[5-7], 也严重威胁到了人们的身体健康。

目前, 对人参中农药残留的检测常集中于用于食疗与美容的人参鲜品的农药残留^[8-9], 缺乏系统研究及安全评价。因此, 为了保障鲜人参及其产品的食用、美容和临床用药安全, 使我国人参尽快走向国际市场, 本研究选择 QuEChERS 样品前处理方法, 优化色谱质谱条件, 利用 GC-MS/MS 和 LC-MS/MS 的高选择性, 建立同时测定鲜人参中 63 种农药残留的方法, 并采用此方法对 34 批鲜人参样品进行测定, 对其农药残留情况进行系统评估, 以期对鲜人参药材的农残检测和质量控制提供参考。

1 仪器与试剂

GCMS-TQ8050NX 气相色谱质谱联用仪、LC8050-三重四极杆液相质谱联用仪(日本岛津公司); Sartorius CP225D 电子天平(德国 Sartorius)。

磷酸三苯酯(固标, 批号: G172525, 德国 Dr.E 公司, $0.102 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 禁用农药混合对照品(液标, 批号: 610020-202001, 中国食品药品检验研究院, 质量浓度见表 1), 硝基苯(批号: GSB05-1845-2008)、六氯苯(批号: GSB05-

1846-2008)、七氯(批号: GSB05-2316-2008)、反式-环氧七氯(批号: GSB05-2317-2008)、顺式-环氧七氯(批号: SB05-291-2015)、氧氯丹(批号: SB05-290-2015)、顺式氯丹(批号: SB05-064-2008)、反式氯丹(批号: SB05-065-2008)(农业部环境保护科研检测所, 质量浓度均为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。甲醇、乙腈为色谱纯, 水为 Millipore 制备的纯化水, 其他试剂均为分析纯。

34 批样品中 S1~S14 购买于生产厂家 A(简称 A), S15~S34 购买于生产厂家 B(简称 B), 经鉴定, 均为吉林产五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的新鲜根和根茎, 4~5 年生, -80°C 冰箱保存。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 GC-MS/MS 法 安捷伦 DB-17MS 毛细管柱 ($30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$), 进样口温度: 250°C ; 恒压模式, 柱前压力为 146 kPa; 程序升温: 初始温度 60°C , 保留 1 min, 以 $30^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 120°C , 再以 $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 160°C , 再以 $2^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 180°C , 再以 $0.5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 190°C , 再以 $2^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 230°C , 最后以 $15^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升温至 300°C , 保持 6 min。三重四极杆检测器; 离子源为电子轰击源(EI), 离子源温度: 250°C 。质谱传输接口温度 250°C 。质谱检测模式为多反应监测(MRM)。

2.1.2 LC-MS/MS 法 安捷伦 Poroshell 120 EC-C18 色谱柱 ($3.0 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}, 2.7 \mu\text{m}$), 流动相: 以 0.1% 甲酸溶液(含 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸铵)为流动相 A, 以乙腈-0.1% 甲酸溶液(含 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸铵)(95:5)为流动相 B, 梯度洗脱(0~3 min, 33%B; 3~15 min, 33%→100%B; 15~18 min, 100%B); 流速为 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温为 40°C 。以三重四极杆串联质谱仪检测; 离子源为电喷雾(ESI)离子源, 氟虫腈、氟甲腈、氟虫腈砷和氟虫腈亚砷采用电喷雾负离子模式(ESI^-), 其余化合物均采用电喷雾正离子模式(ESI^+)正离子扫描模式, 质谱检测模式为多反应监测(MRM)。63 种农药保留时间、MRM 条件具体参数见表 1。

表 1 63 种农药保留时间、MRM 条件参数

Tab 1 Retention time and mass parameters of 63 pesticides

化合物	名称	质量浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	保留时间 /min	定量离子对 (CE/V)	定性离子对 (CE/V)
1	甲拌磷	4.1	13.766	260.00 > 75.00/5	230.80 > 175.00/10
2	α -六六六	9.9	14.405	181.00 > 145.00/15	219.00 > 183.00/5
3	六氯苯	100.0	14.991	284.00 > 248.80/18	282.00 > 246.80/30
4	特丁硫磷	4.2	15.351	230.80 > 129.00/25	231.00 > 175.00/13
5	γ -六六六	9.4	16.952	181.00 > 145.00/15	219.00 > 183.00/5
6	地虫硫磷	4.1	17.132	246.00 > 137.00/18	246.00 > 109.00/23
7	五氯硝基苯	100.0	17.933	249.00 > 213.90/12	295.00 > 236.80/18
8	七氯	100.0	18.501	100.00 > 65.10/15	272.00 > 236.80/18
9	β -六六六	9.8	19.083	181.00 > 145.00/15	219.00 > 183.00/5
10	艾氏剂	9.5	21.394	262.70 > 193.00/30	255.00 > 220.00/20
11	δ -六六六	9.5	21.397	181.00 > 145.00/15	219.00 > 183.00/5
12	氧化氯丹	100.0	21.599	149.00 > 85.00/18	386.80 > 287.00/26
13	顺式环氧七氯	100.0	22.007	353.00 > 262.80/18	352.80 > 281.90/12
14	反式环氧七氯	100.0	22.994	183.00 > 154.80/15	183.00 > 119.00/27
15	甲基对硫磷	3.8	23.641	125.00 > 47.00/13	263.00 > 109.00/5
16	<i>o</i> 、 <i>p'</i> -三氯杀螨醇	10.1	24.876	250.00 > 139.00/15	250.00 > 215.00/5
17	对硫磷	4.0	27.155	291.00 > 109.00/25	291.00 > 81.00/30
18	<i>p</i> 、 <i>p'</i> -三氯杀螨醇	10.1	27.970	250.00 > 139.00/15	250.00 > 215.00/5
19	甲基异柳磷	4.2	29.751	241.00 > 121.00/20	241.00 > 199.00/5
20	甲拌磷砒	3.9	30.830	199.00 > 143.00/35	199.00 > 97.00/22
21	α -硫丹	10.4	32.877	240.80 > 205.60/15	241.00 > 170.00/25
22	反式氯丹	100.0	33.611	373.00 > 263.90/21	373.00 > 266.10/21
23	顺式氯丹	100.0	35.961	373.00 > 264.00/24	373.00 > 265.80/27
24	狄氏剂	10.3	37.839	263.00 > 193.00/35	277.00 > 241.00/10
25	4、4'-滴滴伊	9.4	38.443	246.00 > 176.00/30	316.00 > 246.00/25
26	2、4'-滴滴涕	10.2	45.646	235.00 > 165.00/25	235.00 > 199.00/15
27	除草醚	9.8	45.732	201.80 > 138.70/28	283.00 > 253.00/10
28	β -硫丹	9.8	46.958	206.80 > 171.80/15	195.00 > 125.00/30
29	4、4'-滴滴滴	9.5	47.350	235.00 > 165.00/25	237.00 > 165.00/25
30	4、4'-滴滴涕	9.5	50.554	235.00 > 165.00/25	235.00 > 199.00/15
31	硫丹硫酸酯	9.7	52.952	271.80 > 236.70/15	274.00 > 239.00/15
32	涕灭威亚砒	19.9	2.248	207.00 > 89.10/13	207.00 > 132.10/19
33	甲胺磷	10.2	2.208	142.05 > 94.00/15	142.05 > 124.95/18
34	久效磷	6	2.584	224.00 > 127.00/15	224.00 > 193.00/20
35	涕灭威砒	20.2	2.821	240.10 > 223.00/9	240.10 > 86.05/20
36	杀虫脒	4.2	3.139	197.10 > 117.00/26	197.10 > 46.00/20
37	甲基硫环磷	20.2	2.991	228.00 > 167.95/15	228.00 > 109.00/20
38	3-羟基克百威	10.4	3.846	238.10 > 163.10/16	238.10 > 181.00/30
39	硫环磷	10.1	4.998	256.00 > 140.00/23	256.00 > 168.00/25
40	苯线磷亚砒	4.1	5.643	320.10 > 233.00/26	320.10 > 291.95/15
41	磷胺	10.3	6.285	300.20 > 174.15/13	300.20 > 127.00/30
42	涕灭威	20.2	6.574	208.10 > 88.90/16	208.10 > 115.90/16
43	甲磺隆	9.7	7.592	382.30 > 167.20/18	382.20 > 199.00/16
44	苯线磷砒	4.0	7.595	336.30 > 265.90/21	336.30 > 188.10/17
45	克百威	10.1	8.144	222.10 > 123.10/21	222.10 > 165.10/12
46	氯磺隆	10.1	8.079	358.00 > 141.20/20	358.00 > 167.10/28
47	甲拌磷亚砒	4.1	8.421	276.90 > 96.90/35	276.90 > 198.85/20
48	胺苯磺隆	10.0	8.338	411.30 > 196.00/18	411.20 > 168.10/20
49	内吸磷-O	2.2	9.448	259.00 > 88.95/12	259.00 > 61.15/16
50	内吸磷-S	1.8	9.448	259.00 > 88.95/12	259.00 > 61.15/16
51	特丁硫磷亚砒	4.0	9.762	305.00 > 186.90/12	305.00 > 96.95/19
52	水胺硫磷	10.1	9.947	311.90 > 270.00/15	311.90 > 236.05/13
53	苯线磷	4.0	10.486	304.10 > 217.00/24	304.10 > 202.05/21
54	灭线磷	4.1	10.968	243.00 > 130.90/20	243.00 > 96.90/20

续表 1

化合物	名称	质量浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	保留时间 / min	定量离子对 (CE/V)	定性离子对 (CE/V)
55	特丁硫磷砒	4.2	10.915	320.90 > 96.95/43	320.90 > 171.10/19
56	氯唑磷	2.0	11.805	314.00 > 120.00/26	314.00 > 162.10/22
57	硫线磷	4.0	12.598	271.10 > 159.00/14	271.10 > 97.00/15
58	蝇毒磷	10.1	12.377	362.90 > 227.00/27	362.90 > 307.05/24
59	治螟磷	4.1	12.535	322.90 > 96.85/40	322.90 > 171.00/20
60	氟虫腈	4.2	11.694	434.90 > 329.90/16	434.90 > 250.00/10
61	氟甲腈	4.3	11.928	387.10 > 350.70/14	387.10 > 282.00/20
62	氟虫腈砒	3.9	12.241	451.00 > 282.00/26	451.00 > 243.90/12
63	氟虫腈亚砒	4.0	12.292	419.10 > 261.90/28	419.10 > 383.00/17

注：化合物 1 ~ 31 采用 GC-MS/MS 检测；化合物 32 ~ 63 采用 LC-MS/MS 检测。内吸磷 -O 和内吸磷 -S 为同分异构体，采用 LC-MS/MS 测定法时呈现为同一个色谱峰。

Note: Compound 1 ~ 31 were detected by GC-MS/MS. Compound 32 ~ 63 were detected by LC-MS/MS. Internal phospho-O and internal phospho-S were isomers, which showed the same chromatographic peak when measured by LC-MS/MS.

2.2 样品前处理 (QuEChERS 法)

取供试品匀浆 3 g，精密称定，置 50 mL 聚苯乙烯具塞离心管中，加入 1% 冰醋酸溶液 15 mL，涡旋使药粉充分浸润，放置 30 min，精密加入乙腈 15 mL，涡旋使混匀，置振荡器上剧烈振荡 ($500 \text{次} \cdot \text{min}^{-1}$) 5 min，加入无水硫酸镁与无水乙酸钠的混合粉末 (4 : 1) 7.5 g，立即摇散，再置振荡器上剧烈振荡 ($500 \text{次} \cdot \text{min}^{-1}$) 3 min，于冰浴中冷却 10 min，离心 ($4000 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$) 5 min，取上清液 9 mL，置预先装有 QuEChERS 净化材料的分散固相萃取净化管 [无水硫酸镁 600 mg, N-丙基乙二胺 200 mg] 中，涡旋使充分混匀，置振荡器上剧烈振荡 ($500 \text{次} \cdot \text{min}^{-1}$) 5 min 使净化完全，离心 ($4000 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$) 5 min 使净化完全，离心 ($4000 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$) 5 min，精密吸取上清液 5 mL，置氮吹仪上于 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴浓缩至约 0.4 mL，加乙腈稀释至 2.0 mL，涡旋混匀，滤过，取续滤液，即得。精密吸取上清液，滤过，取续滤液，即得供试品溶液。

2.3 溶液的制备

2.3.1 混合对照品溶液的制备 精密量取禁用农药混合对照品 1 mL，五氯硝基苯、六氯苯、七氯、反式环氧七氯、顺式环氧七氯、氧氯丹、顺式氯丹和反式氯丹各 100 μL ，置同一 20 mL 量瓶中，加乙腈稀释至刻度，摇匀，即得。

2.3.2 内标溶液的配制 精密称取磷酸三苯酯对照品适量，置 100 mL 量瓶中，用乙腈稀释至刻度，摇匀，得到质量浓度为 $0.102 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的磷酸三苯酯溶液。

2.3.3 空白基质溶液的制备 取未检出上述 63 种农药的鲜人参样品 (S21) 作为空白基质，同供试品溶液的制备方法制成空白基质溶液。

2.3.4 随行回收对照溶液的制备 取鲜人参空白基质匀浆 (S21) 3 g (6 份)，精密称定，精密加入对照品溶液 0.3 mL，挥至近干，同供试品溶液的制备方法制备随行回收对照品溶液。

2.3.5 基质混合对照品溶液的制备 分别精密量取空白基质溶液 1.0 mL (6 份)，置氮吹仪上， $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴浓缩至约 0.6 mL，分别加入 63 种农药混合对照品溶液 10、20、50、100、150、200 μL ，加乙腈稀释至 1.0 mL，涡旋混匀，即得系列 (C1 ~ C6) 基质混合对照品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性考察 分别精密吸取上述鲜人参空白基质溶液和基质混合对照品溶液 (C2) 各 1 mL，精密加入内标溶液 0.3 mL (LC-MS/MS 精密加入水 0.3 mL)，取续滤液，按“2.1”项下条件分别进样，结果表明空白基质溶液无干扰。

2.4.2 线性关系、检测限和定量限 为减少基质效应，试验时采用鲜人参空白样品作为基质，取“2.3.5”项下 63 种农药系列浓度的基质混合对照品溶液，按“2.1”项下条件进样，以相对响应值为纵坐标，相对质量浓度为横坐标，绘制标准曲线，计算得线性回归方程，结果显示 63 种农药在相应浓度范围内与峰面积呈现良好的线性关系，相关系数 r 均大于 0.995。取信噪比约为 10 的溶液浓度作为定量限，信噪比约为 3 的溶液浓度作为检测限，结果见表 2。

2.4.3 稳定性、回收率和精密度试验 按照“2.3.5”项下基质混合对照品溶液的制备方法，得到 63 种农药基质混合对照品溶液，分别在 0、2、4、8、12、24 h，按“2.1”项下条件测定 6 次，结果待测成分峰面积无显著变化，表明样品溶液在 24 h 内基本稳定。

按照“2.3.5”项下基质混合对照品溶液的制备方法，得到 63 种农药基质混合对照品溶液，按“2.1”项下条件连续进样 6 次。结果精密度的 RSD 值在 0.34% ~ 2.9%，仪器精密度满足试验要求，如图 1 为鲜人参空白基质中 63 种农药混合对照的 MRM 总离子流色谱图。具体结果见表 2。

按照“2.3.4”项下随行回收对照品溶液的制备方法，得到 63 种农药随行回收对照品溶液。按“2.1”项下条件进样，计算得加标回收率在 81.2% ~ 118.8%，说明采用 QuEChERS 前处理操作不仅简单快速，而且准确度好，符合检测要求。具体结果见表 2。

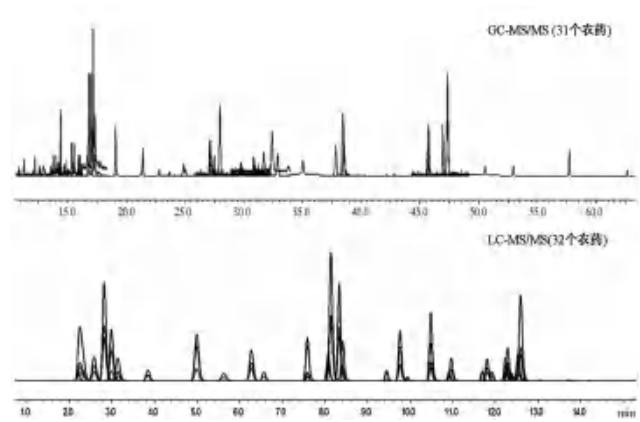


图 1 鲜人参空白基质中 63 种农药 MRM 总离子流色谱图
Fig 1 MRM total ions chromatogram of 63 pesticides in fresh ginseng

表 2 63 种农药残留的标准曲线、线性范围、检测限、回收率及精密度

Tab 2 Regression equation, linearity, limit of detection, recovery and instrument precision of the 63 pesticides

化合物	名称	线性范围 / (ng · mL ⁻¹)	回归方程	r	定量限 / (mg · kg ⁻¹)	检测限 / (mg · kg ⁻¹)	回收率 /%	精密度 RSD/%
1	甲拌磷	1.58 ~ 31.54	$y = 1.9150 \times 10^{-2}x + 5.0200 \times 10^{-2}$	0.999	0.0205	0.0015	109.1	1.3
2	α -六六六	3.81 ~ 76.15	$y = 1.0909 \times 10^{-2}x + 3.3200 \times 10^{-2}$	0.998	0.0495	0.0006	112.2	0.97
3	六氯苯	3.85 ~ 76.92	$y = 4.2380 \times 10^{-2}x + 4.1500 \times 10^{-2}$	0.999	0.0500	0.0005	81.2	1.7
4	特丁硫磷	3.62 ~ 72.31	$y = 9.5810 \times 10^{-2}x + 5.0000 \times 10^{-3}$	0.998	0.0210	0.0010	117.6	1.5
5	γ -六六六	1.58 ~ 31.54	$y = 6.9090 \times 10^{-2}x + 7.2800 \times 10^{-2}$	0.998	0.0470	0.0001	111.5	1.7
6	地虫硫磷	3.77 ~ 75.38	$y = 0.1001x + 1.2900 \times 10^{-2}$	0.999	0.0205	0.0003	106.9	0.61
7	五氯硝基苯	3.85 ~ 76.92	$y = 0.3622x - 0.1505$	0.999	0.0500	0.0002	99.5	0.97
8	七氯	3.85 ~ 76.92	$y = 0.3911x - 0.1796$	0.999	0.0500	0.0002	89.0	0.51
9	β -六六六	1.46 ~ 29.23	$y = 8.3420 \times 10^{-2}x + 2.0500 \times 10^{-2}$	0.998	0.0490	0.0001	111.0	0.36
10	艾氏剂	0.42 ~ 8.46	$y = 2.3550 \times 10^{-2}x + 2.1000 \times 10^{-3}$	0.998	0.0475	0.0005	116.7	0.47
11	δ -六六六	1.54 ~ 30.77	$y = 5.2100 \times 10^{-2}x - 2.7200 \times 10^{-2}$	0.995	0.0475	0.0001	111.4	1.6
12	氧化氯丹	3.85 ~ 76.92	$y = 0.3247x + 1.866$	0.999	0.0500	0.0013	101.5	1.8
13	顺式环氧七氯	3.85 ~ 76.92	$y = 0.3712x - 0.7820$	0.999	0.0500	0.0005	117.5	1.7
14	反式环氧七氯	3.85 ~ 76.92	$y = 0.4230x - 0.1141$	0.999	0.0500	0.0005	89.2	0.91
15	甲基对硫磷	4.00 ~ 80.00	$y = 2.1400 \times 10^{-2}x + 2.4700 \times 10^{-2}$	0.999	0.0190	0.0013	112.1	0.56
16	<i>o</i> , <i>p</i> '-三氯杀螨醇	3.96 ~ 79.23	$y = 8.8040 \times 10^{-2}x - 5.0000 \times 10^{-4}$	0.995	0.0505	0.0013	109.8	2.6
17	对硫磷	3.62 ~ 72.31	$y = 5.8500 \times 10^{-3}x - 2.1000 \times 10^{-3}$	0.998	0.0200	0.0015	107.6	0.59
18	<i>p</i> , <i>p</i> '-三氯杀螨醇	3.77 ~ 75.38	$y = 5.1740 \times 10^{-2}x + 1.7400 \times 10^{-2}$	0.998	0.0505	0.0012	104.7	1.0
19	甲基异柳磷	3.92 ~ 78.46	$y = 2.3060 \times 10^{-2}x + 2.8400 \times 10^{-2}$	0.999	0.0210	0.0013	107.5	0.51
20	甲拌磷砒	3.77 ~ 75.38	$y = 0.1419x + 1.8500 \times 10^{-2}$	0.999	0.0195	0.0012	106.2	1.6
21	α -硫丹	3.65 ~ 73.08	$y = 1.3810 \times 10^{-2}x - 2.6000 \times 10^{-3}$	0.999	0.0520	0.0008	116.4	0.49
22	反式氯丹	3.85 ~ 76.92	$y = 0.4252x - 2.3690 \times 10^{-1}$	0.999	0.0500	0.0012	104.4	0.4
23	顺式氯丹	3.85 ~ 76.92	$y = 0.4003x - 1.5950 \times 10^{-1}$	0.999	0.0500	0.0012	105.0	2.4
24	狄氏剂	7.65 ~ 153.08	$y = 1.0450 \times 10^{-2}x - 3.2000 \times 10^{-3}$	0.999	0.0515	0.0010	113.6	0.69
25	4, 4'-滴滴伊	3.92 ~ 78.46	$y = 0.1697x + 7.6200 \times 10^{-2}$	0.998	0.0470	0.0008	108.5	0.88
26	2, 4'-滴滴涕	2.31 ~ 46.15	$y = 0.1219x - 1.4100 \times 10^{-2}$	0.998	0.0510	0.0008	109.6	2.9
27	除草醚	7.77 ~ 155.38	$y = 1.9050 \times 10^{-2}x + 4.8000 \times 10^{-3}$	0.999	0.0490	0.0010	118.8	0.76
28	β -硫丹	1.62 ~ 32.31	$y = 9.3700 \times 10^{-3}x - 8.1000 \times 10^{-3}$	0.998	0.0490	0.0008	112.5	1.3
29	4, 4'-滴滴滴	2.42 ~ 48.46	$y = 0.2372x + 5.1400 \times 10^{-2}$	0.999	0.0475	0.0008	107.1	2.0
30	4, 4'-滴滴涕	4.00 ~ 80.00	$y = 8.6080 \times 10^{-2}x - 7.1200 \times 10^{-2}$	0.998	0.0475	0.0008	113.6	1.0
31	硫丹硫酸酯	2.38 ~ 47.69	$y = 2.2460 \times 10^{-2}x - 1.3400 \times 10^{-2}$	0.996	0.0485	0.0008	110.0	0.34
32	涕灭威亚砒	1.58 ~ 31.54	$y = 6.1363 \times 10^3x - 2.9916 \times 10^3$	0.999	0.0995	0.0005	108.4	0.66
33	甲胺磷	3.96 ~ 79.23	$y = 7.7687 \times 10^3x + 4.4071 \times 10^4$	0.998	0.0510	0.0013	116.2	0.57
34	久效磷	7.00 ~ 155.38	$y = 3.3577 \times 10^4x - 1.2855 \times 10^4$	0.997	0.0300	0.0005	116.8	1.9
35	涕灭威砒	7.77 ~ 74.62	$y = 3.8942 \times 10^4x + 3.0029 \times 10^5$	0.999	0.1010	0.0002	100.0	1.8
36	杀虫脒	1.54 ~ 30.77	$y = 2.2452 \times 10^4x - 3.7024 \times 10^3$	0.998	0.0210	0.0005	115.5	0.99

续表 2

化合物	名称	线性范围 / (ng · mL ⁻¹)	回归方程	r	定量限 / (mg · kg ⁻¹)	检测限 / (mg · kg ⁻¹)	回收率 /%	精密度 RSD/%
37	甲基硫环磷	3.88 ~ 77.69	$y = 1.0988 \times 10^4 x + 3.3190 \times 10^3$	0.998	0.1010	0.0013	116.6	1.4
38	3-羟基克百威	3.88 ~ 77.69	$y = 1.3078 \times 10^4 x - 3.6156 \times 10^3$	0.998	0.0520	0.0005	115.3	0.96
39	硫环磷	1.58 ~ 31.54	$y = 1.3479 \times 10^5 x - 3.7163 \times 10^3$	0.998	0.0505	0.0005	117.9	0.58
40	苯线磷亚砷	3.85 ~ 76.92	$y = 8.4042 \times 10^4 x + 5.9716 \times 10^3$	0.999	0.0205	0.0013	116.3	1.6
41	磷胺	1.62 ~ 32.31	$y = 7.9204 \times 10^4 x + 7.8785 \times 10^3$	0.999	0.0515	0.0005	113.3	2.0
42	涕灭威	1.54 ~ 30.77	$y = 4.9271 \times 10^3 x + 4.6989 \times 10^3$	0.998	0.1010	0.0005	95.6	1.4
43	甲磺隆	3.88 ~ 77.69	$y = 5.3197 \times 10^4 x + 2.5586 \times 10^4$	0.999	0.0485	0.0013	115.6	2.5
44	苯线磷砷	1.54 ~ 30.77	$y = 2.4478 \times 10^4 x + 3.4621 \times 10^3$	0.999	0.0200	0.0005	115.2	0.67
45	克百威	1.58 ~ 31.54	$y = 1.7299 \times 10^5 x - 5.1873 \times 10^3$	0.999	0.0505	0.0005	92.5	0.47
46	氯磺隆	1.62 ~ 32.31	$y = 3.1650 \times 10^4 x + 1.0670 \times 10^4$	0.999	0.0505	0.0005	116.1	0.62
47	甲拌磷亚砷	0.77 ~ 15.38	$y = 9.1140 \times 10^4 x + 4.4452 \times 10^4$	0.999	0.0205	0.0003	105.6	0.93
48	胺苯磺隆	1.54 ~ 30.77	$y = 8.7832 \times 10^4 x + 3.7377 \times 10^4$	0.999	0.0500	0.0005	116.4	0.45
49	内吸磷-O	3.88 ~ 77.69	$y = 3.6591 \times 10^4 x + 5.4044 \times 10^3$	0.998	0.0210	0.0013	103.2	2.0
50	内吸磷-S	3.88 ~ 77.69	$y = 3.6591 \times 10^4 x + 5.4044 \times 10^3$	0.998	0.0210	0.0013	103.2	2.0
51	特丁硫磷亚砷	1.58 ~ 31.54	$y = 1.0988 \times 10^4 x + 3.5719 \times 10^3$	0.998	0.0200	0.0005	110.2	2.1
52	水胺硫磷	1.62 ~ 32.31	$y = 2.7002 \times 10^3 x + 2.2160 \times 10^4$	0.997	0.0505	0.0005	115.9	2.1
53	苯线磷	1.65 ~ 33.08	$y = 1.9484 \times 10^5 x + 2.5259 \times 10^4$	0.998	0.0200	0.0005	113.3	1.1
54	灭线磷	1.50 ~ 30.00	$y = 6.3318 \times 10^4 x + 7.5384 \times 10^3$	0.999	0.0205	0.0005	116.1	0.57
55	特丁硫磷砷	1.54 ~ 30.77	$y = 2.7130 \times 10^4 x + 6.2072 \times 10^3$	0.999	0.0210	0.0005	114.8	1.1
56	氯唑磷	1.58 ~ 31.54	$y = 1.2350 \times 10^5 x + 9.8997 \times 10^3$	0.999	0.0100	0.0001	99.5	2.1
57	硫线磷	3.81 ~ 76.15	$y = 2.0019 \times 10^5 x + 9.2850 \times 10^2$	0.999	0.0200	0.0006	101.3	1.0
58	蝇毒磷	1.62 ~ 32.31	$y = 1.3925 \times 10^4 x + 4.0421 \times 10^3$	0.999	0.0505	0.0005	111.9	0.94
59	治螟磷	3.62 ~ 72.31	$y = 4.8340 \times 10^4 x + 8.7941 \times 10^3$	0.999	0.0205	0.0006	100.7	0.78
60	氟虫腈	1.58 ~ 31.54	$y = 6.6599 \times 10^4 x + 6.5371 \times 10^4$	0.999	0.0210	0.0001	103.6	1.2
61	氟甲腈	3.77 ~ 75.38	$y = 1.4457 \times 10^4 x + 1.1829 \times 10^4$	0.995	0.0215	0.0003	113.0	0.61
62	氟虫腈砷	3.65 ~ 73.08	$y = 7.5107 \times 10^4 x + 4.2198 \times 10^4$	0.999	0.0195	0.0002	114.8	1.4
63	氟虫腈亚砷	3.65 ~ 73.08	$y = 4.4919 \times 10^4 x + 4.7459 \times 10^3$	0.997	0.0200	0.0002	110.0	0.66

2.5 样品检测结果

根据以上建立的方法对 34 批鲜人参样品进行检测分析, 结果显示所检测 63 种农药中, 检出了 4 种, 分别为六氯苯、五氯硝基苯、 α -六六六和 β -六六六 (见表 3)。有 22 批样品检出五氯硝基苯, 测定结果在 0.01 ~ 43.3 mg · kg⁻¹, 检出率 64.7%, 14 批超过定量限 0.1 mg · kg⁻¹, 不合格率 41.2%。有 14 批检出六氯苯, 测定结果在 0.01 ~ 1.93 mg · kg⁻¹, 检出率 41.2%, 5 批超过定量限 0.1 mg · kg⁻¹, 不合格率 14.7%。有 3 批检出六六六, 2 批检出 α -六六六, 测定结果为 0.012 ~ 0.016 mg · kg⁻¹; 2 批检出 β -六六六, 测定结果均为 0.01 mg · kg⁻¹, 未超过定量限 0.1 mg · kg⁻¹, 六六六检出率 8.8%。综上, 34 批次鲜人参样品的总体检出率为 64.7%, 不合格率达到 41.2%。

3 讨论

3.1 目标化合物的选择

人参为多年生草本植物, 在生长过程中病虫害时有发生, 人参育苗及种植过程中常会使用有机氯类、有机磷类、拟除虫菊酯类等农药, 综合参考相关文献, 最终确定以鲜人参中 63 种农药残

表 3 鲜人参样品农药残留检出结果

Tab 3 Determination of pesticides residues in fresh ginseng samples

农药	测定值范围 / (mg · kg ⁻¹)	残留限值 / (mg · kg ⁻¹)	检出率 /%
六氯苯	0.01 ~ 1.93	0.1	41.2
五氯硝基苯	0.01 ~ 43.3	0.1	64.7
六六六	0.01 ~ 0.02 (α -六六六) 0.01 (β -六六六)	0.1 (六六六)	8.8

注: 六六六表示 α -六六六、 β -六六六、 γ -六六六和 δ -六六六之和; 残留限制参考 2020 年版《中国药典》。

Note: HCH means the sum of Alpha-HCH, Beta-HCH, Gamma-HCH and Delta-HCH. Residual limits refer to the 2020 edition of Chinese Pharmacopoeia.

留为目标分析化合物^[7-10]。

3.2 色谱质谱条件的优化

通过测定农药对照品溶液, 以全扫描的方式得到农药的一级质谱图, 得到每种农药的分子离子峰, 对每种农药的分子离子峰进行离子扫描, 得到碎片离子信息, 然后优化其碰撞电压等参数, 使每种农药的分子离子与特征碎片离子产生的离子对强度达到最大, 按照优化后的 GC-MS/MS 和 LC-MS/MS 质谱参数进样分析。

3.3 检测结果分析

随着鲜人参在临床入药、食疗和美容方面需求的日益增加,其安全性和质量问题越来越受到人们的关注。为了满足其日益增长的市场需求,种植户在人参种植过程中经常盲目滥用农药。农药喷洒后,约 80% 会进入环境中,进而在水、土壤等环境介质中传播,并随着食物链的传递在生物体内累积,从而使整个生态系统的结构和功能遭到破坏^[11]。有机氯类农药的降解半衰期长,理化性质稳定,能在土壤和生物体内贮存,再加上人参生长周期长,农药极易在其生长过程中富集,故经常检出此类农药,属高残留农药^[12-13]。

本文在 34 批次鲜人参样品中检出农药均为有机氯类。五氯硝基苯,不合格批次均为 A 公司提供,14 批次均被检出且均超限,其中 9 批超过定量限 10 倍以上,3 批超过定量限 100 倍以上,最高检出批次超出定量限 432 倍。购买于 B 公司的 S15 ~ S34,20 批次五氯硝基苯检出率为 40%,但不合格率为 0%。六氯苯 5 批超过定量限的批次均购买于 A 公司,且 3 批超过定量限 10 倍以上,最高检出批次超出定量限 18 倍。购买于 A 公司的 S15 ~ S34 中,20 批次六氯苯检出率为 5%,不合格率为 0%。检出农药六六六的 3 批次也均购买于 A 公司。分析结果可知,两种农药的残留除了直接来自不规范使用农药,还间接地来自土壤。34 批鲜人参购买于两个厂家,虽生长年限相近,产地均为吉林,但可能因其采收产区不同,产区的药农用药的规范性不同,土壤等环境介质不同,不同厂家人参的农药残留量存在一定差异。

3.4 检出农药分析

有机氯类农药有类雌激素和致癌、致畸、致诱变作用^[14],容易通过食物链传递到人体,大量堆积于肝、肾、脾等组织中,严重危害人体健康。我国政府于 1983 年已决定停产,并于 1984 年停止使用此类农药^[15]。人参中登记的农药主要包括恶霉灵、枯草芽孢杆菌丙环唑、嘧菌酯、异菌脲、苯醚甲环唑、代森锰锌、多抗霉素、王铜乙霉·多菌灵、嘧菌环胺、哈茨木霉菌、咯菌腈、枯草亚宝多菌灵、噻虫·咯·霜灵和霜脲·锰锌^[16]。五氯硝基苯和六氯苯虽不是禁用农药,但也不包括在登记使用农药范围内,两种农药的高残留不仅

影响其质量,威胁人的健康,也影响其在国际市场的竞争力。

本研究应用 QuEChERS 样品前处理方法,优化色谱和质谱条件,利用 MS/MS 的高选择性,建立了同时测定鲜人参中 63 种农药残留的方法。该方法简单、准确、灵敏度高,不仅对保障人们安全食用鲜人参具有积极意义,也为其农残的检测和防控措施提供参考。

参考文献

- [1] 山东省药品监督管理局.《山东省中药材标准》2012 版[S]. 2012: 352-355.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].第 15 卷.1999: 805-822.
- [3] 李曼微,陈雪,陈长宝.鲜参与生晒参药理活性差异的比较分析[J].时珍国医国药,2020,31(9): 3.
- [4] 赵国平,戴慎,陈仁寿,等.《中药大辞典》[M].上册.2006: 38-40.
- [5] 康传志,郭兰萍,周涛,等.中药材农残研究现状的探讨[J].中国中药杂志,2016,41(2): 155-159.
- [6] 陈士林,董林林,郭巧生,等.中药材无公害精细栽培体系研究[J].中国中药杂志,2018,43(8): 1517-1528.
- [7] 孙海,钱佳奇,张小波,等.人参农药残留研究进展[J].中国中药杂志,2022,47(6): 1427-1432.
- [8] 王震,邹兰,刘振鹏,等.3 个不同产地人参中 9 种农药残留量研究[J].辽宁中医药大学学报,2020,22(7): 63-67.
- [10] 任理雪,邓高琼,龙婉君,等.中药材中常见农药残留及其研究进展[J/OL].中国中药杂志,2022,47(1): 2899-2908.
- [11] 胡一晨,孔维军,魏建和,等.人参药材中农药使用及残留限量标准的现状和思考[J].中南药学,2013,11(9): 664-669.
- [12] 卜元卿,孔源,智勇,等.化学农药对环境的污染及其防控对策建议[J].中国农业科技导报,2014,16(2): 19-25.
- [13] Yang W, Ni W, Jin L, et al. Determination of organochlorine pesticides in human umbilical cord and association with orofacial clefts in offspring [J]. Chemosphere, 2021, 266: 129-138.
- [14] 李慧君,张文生,吴洁珊,等.中药材农药残留研究现状[J].中国中药杂志,2019,44(1): 48-52.
- [15] 伊雄海,陆贻通.我国中药材化学农药残留污染现状与防治方法[J].上海交通大学学报(农业科学版),2004,22(4): 423-427.
- [16] Geng LI, Yang HJ, Bian BL. Review on the current situation of study on pesticide residue in chinese herbal medicines [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2005, 11(4): 71-73.

(收稿日期: 2022-08-05; 修回日期: 2022-09-20)

青皮的高效液相特征图谱和 5 个黄酮类成分含量测定

肖小春¹, 何小芳^{2, 3}, 张英^{3, 4}, 吴孟华^{3, 4}, 曹晖^{3, 4}, 马志国^{3, 4*} (1. 无限极(中国)有限公司研发中心, 广州 510410; 2. 广东医科大学附属医院, 广东 湛江 524001; 3. 暨南大学岭南传统中药研究中心, 广州 511400; 4. 广东省中医药信息化重点实验室, 广州 511400)

摘要: 目的 采用高效液相色谱法建立青皮的特征图谱, 并测定其中芸香柚皮苷、橙皮苷、香蜂草苷、川陈皮素、橘皮素的含量。方法 采用 Agilent TC-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈为流动相 A, 0.1% 甲酸水溶液为流动相 B, 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 15%A; 10 ~ 15 min, 15% ~ 20%A; 15 ~ 20 min, 20% ~ 25%A; 20 ~ 30 min, 25% ~ 40%A); 流速 1.0 mL·min⁻¹, 特征图谱检测波长为 295 nm, 含量测定检测波长为 283 nm 和 330 nm, 柱温 30 °C。结果 建立了青皮特征图谱, 35 min 内青皮的主要色谱峰能够达到完全分离, 同时指认了 5 个特征峰, 均为黄酮类成分。5 个黄酮类成分芸香柚皮苷、橙皮苷、香蜂草苷、川陈皮素、橘皮素在 0.56 ~ 22.4、3.59 ~ 143.5、0.21 ~ 8.4、0.09 ~ 3.62、0.06 ~ 2.58 μg·mL⁻¹ 与峰面积线性关系良好, 平均回收率 (n = 6) 分别为 101.12% (RSD = 2.7%)、100.41% (RSD = 0.91%)、99.11% (RSD = 1.4%)、100.32% (RSD = 2.6%)、98.62% (RSD = 2.4%)。24 批青皮中 5 个成分含量分别为 0.162% ~ 2.44%、9.95% ~ 18.0%、0.130% ~ 0.507%、0.029% ~ 0.884%、0.016% ~ 0.529%。结论 该方法操作简单, 重复性好, 并能同时测定 5 个黄酮类成分含量, 可为青皮的质量标准研究提供参考。

关键词: 青皮; 高效液相色谱; 芸香柚皮苷; 橙皮苷; 香蜂草苷; 川陈皮素; 橘皮素; 特征图谱
中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)02-0515-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.038

HPLC specific chromatogram and quantitation of 5 components in citri reticulatae pericarpium viride

XIAO Xiao-chun¹, HE Xiao-fang^{2, 3}, ZHANG Ying^{3, 4}, WU Meng-hua^{3, 4}, CAO Hui^{3, 4}, MA Zhi-guo^{3, 4*} (1. R&D Center of Infinitus (China) Company Ltd., Guangzhou 510410; 2. Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang Guangdong 524001; 3. Research Center for TCM of Lingnan (Southern China), Jinan University, Guangzhou 511400; 4. Guangdong Key Lab of Traditional Chinese Medicine Information Technology, Guangzhou 511400)

Abstract: Objective To establish the HPLC specific chromatogram for citri reticulatae pericarpium viride (CRPV) and to determine the content of narirutin, hesperidin, didymin, nobiletin and tangeretin. **Methods** An Agilent TC-C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with mobile phase of acetonitrile (A)-0.1% formic acid solution (B) with gradient elution (0 ~ 10 min, 15%A; 10 ~ 15 min, 15% ~ 20%A; 15 ~ 20 min, 20% ~ 25%A; 20 ~ 30 min, 25% ~ 40%A). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength for specific chromatogram was 295 nm, the detection wavelength for quantitative analysis was 283 nm and 330 nm, and the column temperature was 30 °C. **Results** HPLC specific chromatogram of CRPV was established and 5 specific peaks were marked. The 5 constituents were simultaneously determined by HPLC within 35 min. The linear ranges of narirutin, hesperidin, didymin, nobiletin and tangeretin were 0.56 ~ 22.4, 3.59 ~ 143.5, 0.21 ~ 8.4, 0.09 ~ 3.62, and 0.06 ~ 2.58 μg·mL⁻¹, respectively. The average recovery (n = 6) was 101.12%

基金项目: 2020 年广东省重点领域研发计划 (第五批) (No. 2020B1111110005); 广东省中医药信息化重点实验室 (No. 2021B1212040007)。
作者简介: 肖小春, 男, 硕士, 主管药师, 主要从事药品及保健食品研发, email: xxiaochun@126.com * 通信作者: 马志国, 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药炮制与饮片质量研究, email: mzg79@hotmail.com

($RSD = 2.7\%$), 100.41% ($RSD = 0.91\%$), 99.11% ($RSD = 1.4\%$), 100.32% ($RSD = 2.6\%$), and 98.62% ($RSD = 2.4\%$), respectively. The content of the 5 constituents in 24 batches of CRPV was $0.162\% \sim 2.44\%$, $9.95\% \sim 18.0\%$, $0.130\% \sim 0.507\%$, $0.029\% \sim 0.884\%$, and $0.016\% \sim 0.529\%$, respectively. **Conclusion** The proposed specific chromatogram and quantitation method for CRPV is simple and repeatable, which can be used for the quality control of CRPV.

Key words: citri reticulatae pericarpium viride; HPLC; narirutin; hesperidin; didymin; nobiletin; tangeretin; specific chromatogram

青皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥幼果或未成熟果实的果皮; 5~6 月收集自落的幼果, 晒干, 习称“个青皮”; 7~8 月采收未成熟的果实, 在果皮上纵剖成四瓣至基部, 除尽瓢瓣, 晒干, 习称“四花青皮”。青皮具有疏肝破气, 消积化滞的功效; 用于胸胁胀痛, 疝气疼痛, 乳癖, 乳痈, 食积气滞, 脘腹胀痛^[1]。青皮中含有挥发油、黄酮类、氨基酸、胺类、生物碱、有机酸等成分^[2], 其中以橙皮苷、橘皮素、川陈皮素等为代表的黄酮类成分是青皮的主要药效物质基础^[3-4]。2020 年版《中国药典》一部中青皮以橙皮苷为含量测定指标^[1], 有研究采用 UPLC、HPLC 对青皮中的橙皮苷、柚皮素、橘皮素、川陈皮素等成分进行定量分析^[5-9]。关于青皮的 HPLC 特征图谱也有文献报道, 但分析时间过长, 且各峰分离度仍需改善^[10-12]。目前尚未见到同时测定芸香柚皮苷、橙皮苷、香蜂草苷、川陈皮素、橘皮素 5 个黄酮类成分的方法报道。本研究采用 HPLC 建立青皮的特征图谱, 并同时测定其中 5 个黄酮类成分的含量, 以期对青皮的质量控制提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

Thermo UlitMate 3000 型高效液相色谱仪, DAD 检测器, 在线真空脱气机, 自动进样器, 柱温箱(美国赛默飞公司); XSR105/A 十万分之一天平(瑞士梅特勒-托利多); FA 2204B 万分之一电子天平(上海佑科仪器仪表有限公司); KQ-300DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DK-98-II 单列两孔恒温水浴锅(TAISITE 仪器有限公司); YF-高速中药粉碎机(瑞安市永历制药机械有限公司); DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精其仪器有限公司)。

1.2 试药

对照品芸香柚皮苷(批号: X-080-181219)、橙皮苷(批号: Y-071-180917)、香蜂草苷(批号: X-010-171216)、川陈皮素(批号: Y-006-171216)、橘皮素(批号: G-019-171216)(成都瑞芬思生物

科技有限公司, 含量均大于 98.0%)。乙腈(上海麦克林生化科技有限公司)、甲酸(天津科密欧化学试剂有限公司)均为色谱纯, 水为纯净水, 其余试剂均为市售分析纯。

共收集 24 批四花青皮药材, 经暨南大学岭南传统中药研究中心马志国教授鉴定为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的未成熟果实的果皮。样品信息见表 1。

表 1 四花青皮样品信息
Tab 1 Sample information of Sihuaqingpi

编号	产地	编号	产地
SHQP-01	四川	SHQP-13	浙江金华
SHQP-02	江西	SHQP-14	浙江金华
SHQP-03	江西	SHQP-15	浙江衢州
SHQP-04	浙江衢州	SHQP-16	浙江衢州
SHQP-05	浙江衢州	SHQP-17	浙江衢州
SHQP-06	浙江衢州	SHQP-18	浙江衢州
SHQP-07	江西赣州	SHQP-19	浙江衢州
SHQP-08	浙江衢州	SHQP-20	浙江衢州
SHQP-09	浙江磐安	SHQP-21	浙江金华
SHQP-10	浙江衢州	SHQP-22	四川南充
SHQP-11	浙江衢州	SHQP-23	四川南充
SHQP-12	浙江衢州	SHQP-24	四川南充

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液的制备 精密称取芸香柚皮苷对照品 2.24 mg、香蜂草苷对照品 1.68 mg 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得对照品溶液 A、B; 分别精密称取川陈皮素对照品 1.81 mg、橘皮素对照品 1.29 mg 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得混合对照品溶液 C; 精密称取橙皮苷对照品 5.74 mg 置 20 mL 量瓶中, 精密加入对照品溶液 A 4 mL、B 2 mL、C 2 mL, 超声使溶解, 再加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配制成含芸香柚皮苷、川陈皮素、橘皮素、橙皮苷 5 个对照品成分质量浓度分别为 44.80 、 16.80 、 7.24 、 5.16 、 $287.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液, 即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 取干燥样品粉末 0.2 g (过 80 目筛), 精密称定, 置 150 mL 具塞锥形

瓶中，精密加入甲醇 50 mL，密塞，摇匀，称定重量，超声处理（功率 700 W，频率 40 kHz）30 min，放冷，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，过 0.45 μm 微孔滤膜，即得。

2.2 色谱条件

采用 Agilent TC-C18 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），以乙腈（A）-0.1% 甲酸水（B）为流动相，梯度洗脱（0～10 min，15%A；10～15 min，15%～20%A；15～20 min，20%～25%A；20～30 min，25%～40%A）；流速 1.0 mL·min⁻¹，特征图谱检测波长为 295 nm，含量测定检测波长为 283 nm 和 330 nm，柱温 30℃，进样量 10 μL。

2.3 特征图谱研究

2.3.1 精密度考察

取同一供试品溶液（SHQP-01），连续测定 6 次，记录色谱图。以川陈皮素（4 号峰）为参照峰，计算得各色谱峰的相对保留时间的 *RSD* 均 < 0.12%，相对峰面积 *RSD* 均 < 3.2%，表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性考察

取同一供试品溶液（SHQP-01），分别在 0、2、4、8、12、16、20、24 h 进样，分别记录色谱图。以川陈皮素（4 号峰）为参照峰，计算得各色谱峰的相对保留时间的 *RSD* 均 < 0.14%，相对峰面积 *RSD* 均 < 3.7%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性考察

取同一批四花青皮（SHQP-01）样品粉末（过 80 目筛），按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，分别进样，记录色谱图。以川陈皮素（4 号峰）为参照峰，计算得各色谱峰的相对保留时间 *RSD* 均 < 0.11%，相对峰面积 *RSD* 均 < 3.3%，表明该方法重复性良好。

2.3.4 四花青皮特征图谱的建立

取 24 批样品粉末，按“2.1.2”项下方法制备，进样检测，获得特征图谱，以 4 号峰为参照，共确定了 5 个特征峰，导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件（2012 版）”（见图 1），采用平均值法生成对照特征图谱（见图 2），计算得到 24 批样品与对照特征图谱的相似度均大于 0.95，表明各批次样品之间化学成分基本一致。

根据表 2 中 24 批四花青皮药材样品的特征图谱测定结果，峰 1～5 的相对保留时间范围均符合小于平均值 ±5% 的限度要求，且 *RSD* 均 < 1.00%，故以峰 1～5 作为青皮药材的特征峰。以 4 号峰为参照峰，分别计算各特征峰的相对保留时间，结果各特征峰的相对保留时间值分别为峰 1（0.410）、峰 2（0.437）、峰 3（0.554）、峰 4（1.000）、峰 5（1.202），其相对保留时间应

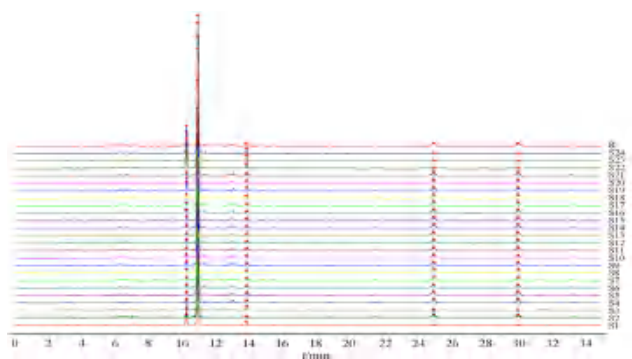


图 1 24 批四花青皮药材样品 HPLC 色谱图叠加图

Fig 1 HPLC chromatogram of 24 batches of Sihuaqingpi

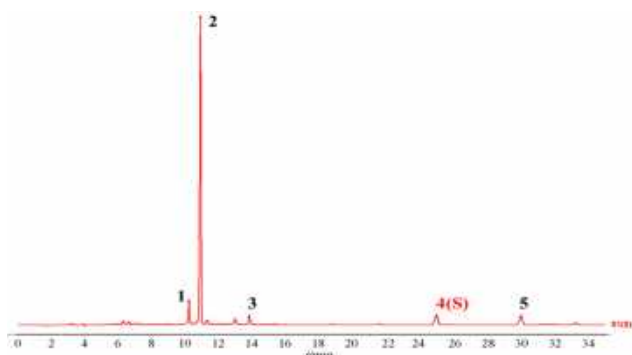


图 2 四花青皮 HPLC 特征图谱共有模式图

Fig 2 HPLC specific chromatogram of Sihuaqingpi

表 2 24 批四花青皮药材样品特征图谱中 5 个特征峰相对保留时间
Tab 2 Relative retention time of 5 peaks in 24 batches of Sihuaqingpi samples

编号	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5
SHQP-01	0.410	0.437	0.553	1.000	1.202
SHQP-02	0.410	0.437	0.554	1.000	1.202
SHQP-03	0.411	0.438	0.554	1.000	1.204
SHQP-04	0.410	0.437	0.554	1.000	1.203
SHQP-05	0.410	0.437	0.554	1.000	1.203
SHQP-06	0.410	0.437	0.554	1.000	1.203
SHQP-07	0.410	0.437	0.554	1.000	1.203
SHQP-08	0.410	0.437	0.554	1.000	1.203
SHQP-09	0.409	0.436	0.553	1.000	1.201
SHQP-10	0.409	0.436	0.553	1.000	1.201
SHQP-11	0.409	0.436	0.553	1.000	1.201
SHQP-12	0.409	0.436	0.553	1.000	1.201
SHQP-13	0.409	0.436	0.553	1.000	1.201
SHQP-14	0.409	0.436	0.553	1.000	1.201
SHQP-15	0.409	0.436	0.553	1.000	1.201
SHQP-16	0.409	0.437	0.553	1.000	1.202
SHQP-17	0.410	0.437	0.554	1.000	1.203
SHQP-18	0.409	0.436	0.553	1.000	1.202
SHQP-19	0.410	0.437	0.554	1.000	1.202
SHQP-20	0.410	0.437	0.554	1.000	1.203
SHQP-21	0.410	0.437	0.554	1.000	1.203
SHQP-22	0.410	0.437	0.554	1.000	1.203
SHQP-23	0.410	0.437	0.554	1.000	1.203
SHQP-24	0.410	0.437	0.554	1.000	1.204
平均值	0.410	0.437	0.554	1.000	1.202
<i>RSD</i> /%	0.145	0.116	0.099	< 0.000	0.074

在制订值的 ±5% 之内，积分参数斜率灵敏度为 10，峰宽为 0.1，最小峰面积为 2。

2.4 青皮中 5 个黄酮类成分的含量测定

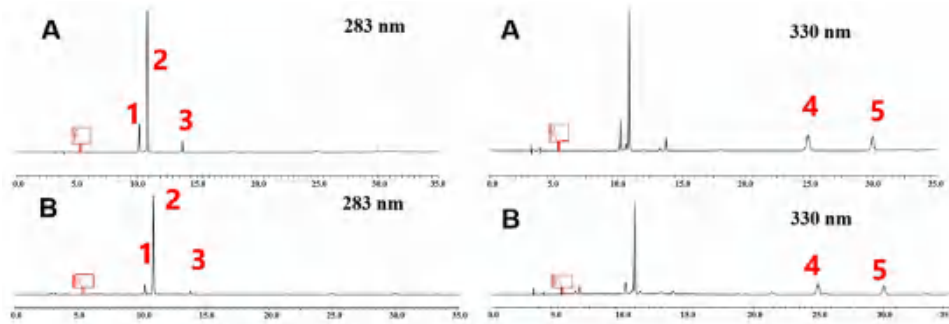


图 3 青皮药材的 HPLC 图谱

Fig 3 HPLC chromatogram of Sihuqingpi

A. 混合对照品 (mixed reference); B. 供试品 (sample); 1. 芸香柚皮苷 (naringin); 2. 橙皮苷 (hesperidin); 3. 香蜂草苷 (didymelin); 4. 川陈皮素 (nobiletin); 5. 橘皮素 (tangeretin)

2.4.2 线性关系考察 精密吸取“2.1.1”项下混合对照品溶液 10、5、2.5、0.5、0.25 mL，分别置 20 mL 量瓶中，加甲醇稀释并定容至刻度，摇匀，得不同质量浓度的对照品混合溶液，进样测定，以对照品质量浓度 (x , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标，峰面积 (y) 为纵坐标，绘制标准曲线，结果见表 3。

表 3 回归方程、相关系数和线性范围

Tab 3 Regressive equation, correlation coefficient and linearity

成分	回归方程	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	r
芸香柚皮苷	$y = 1.324x - 0.4159$	0.56 ~ 22.4	0.9996
橙皮苷	$y = 5.069x + 2.203$	3.59 ~ 143.5	0.9999
香蜂草苷	$y = 0.4566x + 0.0021$	0.21 ~ 8.4	0.9993
川陈皮素	$y = 0.3231x + 0.0230$	0.09 ~ 3.62	0.9999
橘皮素	$y = 0.2684x + 0.0126$	0.06 ~ 2.58	1.000

2.4.3 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液 (芸香柚皮苷、橙皮苷、香蜂草苷、川陈皮素、橘皮素，质量浓度分别为 44.80、287.00、16.80、7.24、5.16 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)，连续进样 6 次，计算得 5 个成分的峰面积 RSD 均 < 3.4%，表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 (SHQP-01)，分别于 0、2、4、8、12、16、20、24 h 进行测定，结果供试品溶液中 5 个成分的峰面积 RSD 均 < 2.6%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 重复性试验 取四花青皮样品 (SHQP-01) 粉末 (过 80 目筛) 6 份，精密称定，按“2.1.2”项下方法制备，进样测定，结果样品中芸香柚皮苷、橙皮苷、香蜂草苷、川陈皮素、橘皮素平均含量分别为 10.16、121.50、3.67、3.63、2.21 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ， RSD 均 < 2.9%，说明该方法重复性良好。

2.4.1 色谱测定 按“2.2”项下色谱条件进行检测，在该色谱条件下，5 个黄酮类成分分离度良好，混合对照品及样品色谱图见图 3。

2.4.6 加样回收试验 取已知含量的四花青皮 (SHQP-01) 粉末 (过 80 目筛) 约 0.1 g，共 6 份，精密称定，置 50 mL 量瓶中，每份分别精密加入橙皮苷对照品溶液 ($1.26 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 10 mL，芸香柚皮苷 ($0.492 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 对照品溶液 2 mL、香蜂草苷 ($0.356 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、川陈皮素 ($0.360 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、橘皮素 ($0.242 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 对照品溶液各 1 mL，再加甲醇稀释至刻度，按“2.1.2”项下方法制备，进样测定，计算平均回收率，结果芸香柚皮苷、橙皮苷、香蜂草苷、川陈皮素、橘皮素的平均加样回收率 ($n = 6$) 分别为 101.12% ($RSD = 2.7\%$)、100.41% ($RSD = 0.91\%$)、99.11% ($RSD = 1.4\%$)、100.32% ($RSD = 2.6\%$)、98.62% ($RSD = 2.4\%$)，表明方法回收率良好。

2.4.7 样品测定 分别取 24 批四花青皮药材粉末 (过 80 目筛) 各 2 份，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液。精密吸取各供试品溶液 10 μL ，按“2.2”项下色谱条件进行测定，用外标法计算含量，结果见表 4。5 个成分中，橙皮苷含量最高，为 12.7%，约占 5 个成分总量的 87.6%，且不同产地间的含量差异最小。香蜂草苷平均含量最低，为 0.285%，含量范围为 0.130% ~ 0.507%，其中四川南充产的 3 批样品 (SHQP-22、SHQP-23、SHQP-24) 含量明显高于平均值。芸香柚皮苷、川陈皮素、橘皮素 3 个成分的含量呈现明显的产地差异性，四川产的 4 批样品 (SHQP-1、SHQP-22、SHQP-23、SHQP-24) 中芸香柚皮苷显著高于其他省份，而川陈皮素和橘皮素显著低于其他省份。

3 讨论

3.1 黄酮类成分含量

由试验结果可知，不同批次的青皮样品中各

表 4 四花青皮中 5 个成分含量测定结果 (% , n = 2)

Tab 4 Contents of 5 components in Sihuaqingpi (% , n = 2)

编号	芸香柚皮苷	橙皮苷	香蜂草苷	川陈皮素	橘皮素	总量
SHQP-01	1.230	13.4	0.327	0.029	0.016	15.0
SHQP-02	0.263	12.5	0.130	0.723	0.409	14.0
SHQP-03	0.210	11.5	0.278	0.711	0.452	13.1
SHQP-04	0.227	11.4	0.258	0.685	0.421	13.0
SHQP-05	0.269	11.9	0.276	0.811	0.500	13.8
SHQP-06	0.255	12.2	0.274	0.844	0.529	14.1
SHQP-07	0.246	13.0	0.254	0.638	0.389	14.5
SHQP-08	0.273	12.3	0.275	0.837	0.496	14.2
SHQP-09	0.288	13.0	0.275	0.623	0.398	14.5
SHQP-10	0.292	13.4	0.294	0.666	0.374	15.1
SHQP-11	0.205	11.0	0.244	0.683	0.425	12.5
SHQP-12	0.243	10.8	0.246	0.739	0.491	12.5
SHQP-13	0.162	10.6	0.227	0.754	0.459	12.2
SHQP-14	0.224	11.1	0.239	0.771	0.483	12.9
SHQP-15	0.461	13.7	0.225	0.713	0.410	15.5
SHQP-16	0.230	12.4	0.259	0.813	0.519	14.2
SHQP-17	0.197	9.95	0.226	0.797	0.482	11.7
SHQP-18	0.271	12.0	0.278	0.771	0.495	13.8
SHQP-19	0.608	12.7	0.320	0.591	0.386	14.6
SHQP-20	0.423	13.0	0.293	0.736	0.457	14.9
SHQP-21	0.235	11.1	0.257	0.751	0.469	12.8
SHQP-22	2.210	16.7	0.433	0.083	0.040	19.5
SHQP-23	2.440	18.0	0.507	0.050	0.034	21.0
SHQP-24	2.310	16.2	0.454	0.064	0.038	19.0
平均值	0.574	12.7	0.285	0.620	0.382	14.5

测定成分含量均有不同程度的差异,但橙皮苷和香蜂草苷差异相对较小,而芸香柚皮苷、川陈皮素、橘皮素含量差异与产地密切相关,四川产的 4 批样品与浙江、江西产的样品差异显著,可能与不同省份栽培品种不同有关。此外,文献报道,青皮生长发育期间,其中物质形成不是简单地从少到多,而是随生长成熟,有的成分在减少,有的成分在增加,表明采收期不同会影响青皮中黄酮类成分的含量^[10],四花青皮中 5 种成分含量的差异可能与采收期不同有关^[3]。因此,加强青皮药材的规范化种植和产地加工的规范化、完善青皮药材的质量标准,对保证青皮药材质量具有重要意义。

3.2 提取方法的优选

本试验对供试品溶液制备的提取方法、提取溶剂、提取时间分别进行了优选。首先进行提取方法(超声、回流)考察,发现在相同的提取时间超声提取法提取率普遍高于回流法;对提取溶剂(50% 甲醇溶液、70% 甲醇溶液、甲醇)进行比较,发现甲醇的提取率最高;对比了不同超声时间(20、30、40 min)对提取率的影响,结果超

声 30 min 提取率最好。

3.3 检测波长的选择

采用 DAD 检测器观察 190 ~ 370 nm 下各特征峰的信号高低,最终选择 295 nm 作为特征图谱的测定波长,在此波长下各特征峰均有较好的信号强度。因 5 个成分的最大吸收波长不同,芸香柚皮苷、橙皮苷、香蜂草苷最佳测定波长为 283 nm,而川陈皮素、橘皮素最佳吸收波长为 330 nm,因此选择 283 nm 和 330 nm 两个测定波长。

3.4 小结

本试验建立了青皮饮片的特征图谱,并同时测定了不同批次青皮中芸香柚皮苷、橙皮苷、香蜂草苷、川陈皮素、橘皮素 5 个黄酮类成分的含量,该方法简便、准确,具备定性定量双重作用,为有效控制青皮饮片质量提供了研究基础。

参考文献

- [1] 中国药典 2020 年版.一部[S].2020: 205-206.
- [2] 陈红,刘传玉,李承晏.青皮的化学及药理作用研究进展[J].中草药,2001,32(11): 1050-1052.
- [3] 刘梦诗,杨得坡,杨婉玲,等.基于UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术分析四花青皮的成分[J].中国医院药学杂志,2021,41(23): 2395-2400,2427.
- [4] 吕小梨,林彦朝,陈红英.青皮配方颗粒质量标准研究[J].中国药业,2019,28(20): 40-43.
- [5] 李先端,顾雪竹,林生,等.HPLC 测定青皮生品及炮制品中橙皮苷的含量[J].中成药,2004,26(9): 724-726.
- [6] 盛钊君,葛思媛,张焜,等.新会柑胎仔与青皮、陈皮的黄酮含量分析与比较[J].食品研究与开发,2017,38(20): 135-139.
- [7] 李先端,马志静,毛淑杰,等.个青皮和四花青皮中四种成分的含量比较[J].中成药,2005,27(5): 611-612.
- [8] Tian F, He XF, Sun J, et al. Simultaneous quantitative analysis of nine constituents in six Chinese medicinal materials from Citrus genus by HPLC and high-resolution MS combined with chemometric methods[J]. J Sep Sci, 2020, 43(4): 736-747.
- [9] He XF, Huang SS, Wu MM, et al. Simultaneous quantitative analysis of ten bioactive flavonoids in Citri Reticulatae Pericarpium Viride (Qing Pi) by ultrahigh-performance liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry combined with chemometric methods[J]. Phytochem Analysis, 2021, 32: 1152-1161.
- [10] 邓芸,叶惠焯,谢安,等.高效液相色谱特征图谱结合化学计量学评价青皮饮片的质量[J].中南药学,2017,15(11): 1598-1601.
- [11] 李锦,赵晓莉.青皮饮片 HPLC 指纹图谱研究[J].中国中医药信息杂志,2014,21(12): 82-84.
- [12] 陈芳,梁月仪,童培珍,等.不同规格青皮饮片指纹图谱[J].中国现代中药,2021,23(1): 117-122.

(收稿日期: 2022-10-01; 修回日期: 2022-11-07)

桑菊感冒颗粒质量标准完善研究

董秋香¹, 张月寒¹, 刘翀¹, 王腾¹, 姚辉¹, 桑皖怡², 付萍萍^{1*} (1. 保定市食品药品检验所, 河北 保定 071000; 2. 中国医科大学中英联合学院, 沈阳 110000)

摘要: **目的** 完善桑菊感冒颗粒质量标准并考察市售样品的质量现状。**方法** 建立薄层色谱法鉴别菊花、连翘及甘草; 建立高效液相色谱法测定连翘酯苷 A、连翘苷和甘草酸的含量, 色谱柱为 Waters SunFire C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相: 0.1% 磷酸溶液 - 乙腈, 梯度洗脱, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 柱温: 30 °C; 检测波长: 237 nm; 进样量: 10 μL。**结果** 薄层色谱方法分离度好、斑点清晰且专属性强; 连翘酯苷 A、连翘苷、甘草酸的线性范围分别为 3.02 ~ 96.71 μg·mL⁻¹ ($r = 1.000$), 2.38 ~ 76.08 μg·mL⁻¹ ($r = 1.000$), 2.37 ~ 75.87 μg·mL⁻¹ ($r = 1.000$); 平均加样回收率在 97.57% ~ 103.06%, RSD 均小于 2.0%; 法定检验显示 23 批桑菊感冒颗粒合格率为 100%; 探索性研究结果表明, 样品质量差异较大。**结论** 桑菊感冒颗粒质量现状不容乐观, 质量标准亟待提高。该研究建立的方法操作简便、准确可靠, 可用于桑菊感冒颗粒的质量控制与分析。

关键词: 桑菊感冒颗粒; 质量标准; 质量分析; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-2981(2023)02-0520-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.039

Quality standard of Sangju Ganmao granules

DONG Qiu-xiang¹, ZHANG Yue-han¹, LIU Chong¹, WANG Teng¹, YAO Hui¹, SANG Wan-yi², FU Ping-ping^{1*} (1. *Baoding Institute for Food and Drug Control, Baoding Hebei 071000*; 2. *The Queen's University of Belfast Joint College, China Medical University, Shenyang 110000*)

Abstract: Objective To improve the current quality standard of Sangju Ganmao granules and determine the quality status of domestic samples. **Methods** A thin-layer chromatography (TLC) method was established to identify Chrysanthemi Flos, Forsythiae Fructus and Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma. HPLC method was established to determine the content of forsythoside A, forsythin and glycyrrhizic acid. The samples were analyzed on a Waters SunFire C₁₈ column with the mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the temperature was 30 °C, the detection wavelength was 237 nm, and the injection volume was 10 μL. **Results** The characteristic spots of Chrysanthemi Flos, Forsythiae Fructus and Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma were detected by TLC. The spots were clear and specific, with no interference in the negative reference solution. The linear ranges of forsythoside A, forsythin and glycyrrhizic acid were 3.02 ~ 96.71 μg·mL⁻¹ ($r = 1.000$), 2.38 ~ 76.08 μg·mL⁻¹ ($r = 1.000$), 2.37 ~ 75.87 μg·mL⁻¹ ($r = 1.000$). The average sampling recovery rates was 97.57% ~ 103.06%, with RSD all less than 2.0%. The legal qualification rate of 23 batches of the samples was 100%. There were obvious differences in the samples. **Conclusion** The overall quality of Sangju Ganmao granules is not satisfactory, and the quality standard should be improved urgently. This method is simple, accurate and reliable, it can be used for the quality control of Sangju Ganmao granules.

Key words: Sangju Ganmao granule; quality standard; quality analysis; TLC; HPLC

基金项目: 河北省市场监督管理局科研计划重点项目 (No.2020ZD37)。

作者简介: 董秋香, 女, 主管药师, 主要从事药品检验及质量标准研究工作, email: 739998331@qq.com *通信作者: 付萍萍, 女, 主任药师, 主要从事药品检验及质量标准研究工作, email: fupp2008@163.com

桑菊感冒颗粒源自清代医学家吴瑭所著《温病条辨》，收载于《卫生部药品标准·中药成方制剂（第二册）》，本方由桑叶、菊花、连翘、薄荷、苦杏仁、桔梗、甘草和芦根 8 味药材制成，方中桑叶、菊花为君药，薄荷、杏仁、桔梗为臣药，连翘、芦根为佐药，甘草为使药，调和诸药^[1]，共奏疏风清热、宣肺止咳之功效，传统用于风热感冒初起，头痛，咳嗽，2018 年流行性感冒诊疗方案的轻症辨证治疗方案亦新增了桑菊感冒颗粒。经国家药品监督管理局官网检索桑菊感冒颗粒目前共有 44 个批准文号，涉及 44 家生产企业，现行质量标准仅载了性状和颗粒剂通用检查项目^[2]，缺少专属性鉴别及量化指标，质量标准不完善，不能有效评价其内在质量，难以保证人们用药的安全有效。药品质量风险排查处置机制是我国首创的将抽检探索性研究结果与监督检查相结合的监管策略，是对药品监管科学理论的进一步丰富和发展^[3]。本课题参考相关文献^[4-6]开展探索性研究，建立薄层色谱（TLC）法鉴别菊花、连翘及甘草，建立高效液相色谱（HPLC）法同时测定连翘酯苷 A、连翘苷及甘草酸的含量，对市售 23 批次样品进行综合分析，考察市售桑菊感冒颗粒的质量现状，为其建立完善的质量标准和提升整体质量水平提供技术支撑。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20AB 型高效液相色谱仪（配备 PDA 检测器，LCMS solution Ver3 工作站，日本岛津公司）；BP211D（德国赛多利斯公司，十万分之一）；CAMAG 薄层色谱成像系统（瑞士 CAMAG 公司）；SK250HP 超声波清洗器（上海科导超声仪器有限公司）；WGL-45B 电热鼓风干燥箱（天津泰斯特仪器有限公司）。

1.2 试药

桑叶对照药材（批号：121123-200603）、菊花对照药材（批号：121384-201805）、连翘对照药材（批号：120908-201216）、薄荷对照药材（批号：120916-201812）、甘草对照药材（批号：120904-202021）、苦杏仁对照药材（批号：121554-201204）、桔梗对照药材（批号：121028-201612）、芦根对照药材（批号：121107-201706）、连翘酯苷 A 对照品（批号：111810-201707；纯度：97.2%）、连翘苷对照品（批号：110821-201816；纯度：95.1%）、甘草酸铵对照品（批号：110731-202021；纯度：96.2%）（中国食品药品检定研究院）；硅胶 G 板、乙腈、甲醇

为色谱纯（德国 Merck 公司），水为娃哈哈纯净水，其余试剂为分析纯；桑菊感冒颗粒（市售，A 企业，批号：04190108，编号：A1；B 企业，批号：180601、200506、210405，编号：B1~3；C 企业，批号：191004、201004、211001、210405，编号：C1~4；D 企业，批号：202011031、202101002、202012005、202011016，编号：D1~4；E 企业，批号：201101、210402，编号：E1~2；F 企业，批号：210103、201204、211204，编号：F1~3；G 企业，批号：2012001、2108002、2110002，编号：G1~3；H 企业，批号：21030002、21040005，编号：H1~2；I 企业，批号：210603，编号：I1）。

2 方法与结果

2.1 样品情况

本次共收集样品 23 批次，涉及生产企业 9 家，占生产桑菊感冒颗粒全部企业的 20%；均来自经营企业；规格均为 11 g；贮藏条件均为密封；不同企业生产的样品有效期不一致，企业 A、C、E、F 生产的 10 批样品为 24 个月，企业 B、D、G、H、I 生产的 13 批样品为 36 个月。

2.2 法定标准检验

本品现行质量标准为《卫生部药品标准·中药成方制剂（第二册）》，检验项目包括性状、粒度、水分、溶化性、装量差异、微生物限度，对 23 批样品依据现行标准进行全项检验，合格率为 100%。

2.3 TLC 鉴别

2.3.1 菊花 取本品 2 g，研细，加水 20 mL，振摇使溶解（必要时过滤），用水饱和的正丁醇振摇提取 2 次，每次 20 mL，合并正丁醇提取液，用正丁醇饱和的水 20 mL 洗涤，蒸干，残渣加甲醇 1 mL 使溶解，作为供试品溶液；取处方中各药味对照药材，以模拟处方比例及方法制备阳性样品，同法制成阳性样品溶液（编号：Y1）。取菊花对照药材 0.1 g，加水 20 mL 加热回流 1 h，滤过，同法制成对照药材溶液。以模拟处方方法制备缺菊花的阴性样品，同法制成阴性对照溶液。固定相为硅胶 G，展开剂为甲苯-乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水（1:15:1:1:2）的上层溶液；点样量为 5 μ L；展开，晾干，喷以 2% 三氯化铝乙醇溶液，加热至干，置紫外光灯（365 nm）下检视。结果供试品溶液色谱中，在与菊花对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点，且阴性样品无干扰。色谱图见图 1。

2.3.2 连翘 供试品溶液同“2.3.1”项下方法制

备。取连翘对照药材 0.2 g, 加水 20 mL 加热回流 1 h, 滤过, 同法制成对照药材溶液。取连翘苷对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 作为对照品溶液。以模拟处方方法制备缺连翘的阴性样品, 同法制成阴性样品溶液。固定相为硅胶 G, 展开剂为三氯甲烷-甲醇-甲酸 (9:2:0.1); 点样量为 10 μ L; 展开, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰, 日光下检视。结果供试品溶液色谱中, 在与连翘对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点, 且阴性样品无干扰。色谱图见图 2。

2.3.3 甘草 供试品溶液同“2.3.1”项下方法制备。取甘草对照药材 0.1 g, 加水 20 mL 加热回流 1 h, 滤过, 同法制成对照药材溶液。以模拟处方比例及方法制备缺少甘草的阴性样品, 同法制成阴性样品溶液。固定相为硅胶 G, 展开剂为三氯甲烷-甲醇-水 (13:6:2) 10 $^{\circ}$ C 以下放置的下层溶液; 点样量为 10 μ L; 展开, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰, 日光下检视。结果供试品溶液色谱中, 在与甘草对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点, 且阴性样品无干扰。色谱图见图 3。

2.4 多指标成分含量测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱: Waters SunFire C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 流动相: 0.1% 磷酸溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~40 min, 10%~18%B; 40~55 min, 18%~36%B; 55~65 min, 36%~60%B; 65~70 min, 60%~100%B; 70~71 min, 100%~10%B; 71~85 min, 10%B), 流速: 1.0 mL \cdot min⁻¹, 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 检测波长: 237 nm; 进样量: 10 μ L。

2.4.2 溶液的制备 取连翘酯苷 A、连翘苷、甘草酸铵对照品适量, 精密称定, 加 80% 甲醇制成质量浓度分别为 42.85、14.17、14.56 μ g \cdot mL⁻¹ 的混合溶液, 作为对照品溶液。取本品 10 袋, 内容物研细, 取细粉 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇 25 mL, 称定重量, 超声处理 (功率: 250 W, 频率: 53 kHz) 30 min, 放冷, 用 80% 甲醇补足缺失重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。分别取处方中各药味对照药材, 以模拟处方比例及方法制备缺少连翘、甘草的阴性样品, 照供试品溶液的制备方法, 同法制成缺连翘的阴性样品溶液、缺甘草的阴性样品溶液。

2.4.3 方法学考察

① 专属性试验: 取对照品溶液、供试品溶液、

阴性样品溶液及空白溶剂, 进样测定, 记录色谱图 (见图 4), 供试品溶液色谱图中峰 1 与相邻峰的分度度分别为 1.75、1.71, 峰 2 与相邻峰的分度度分别为 3.94、2.83, 峰 3 与相邻峰的分度度分别为 5.38、2.68, 均大于 1.5。同时采用 PDA 检测器在 190~800 nm 进行光谱扫描, 峰 1、2、3 的紫外光谱图分别与连翘酯苷 A、连翘苷、甘草酸对照品的紫外光谱图一致。峰 1、2、3 的峰纯度检测结果显示未检测到杂质, 依据工作站判定规则可判断为单一成分。结果表明, 此色谱条件下 3 种待测成分峰与相邻峰分离良好, 阴性样品无干扰。

② 线性关系考察: 取连翘酯苷 A、连翘苷、甘草酸铵对照品适量, 精密称定, 加 80% 甲醇定量稀释制成质量浓度分别为 96.71、76.08、75.87 μ g \cdot mL⁻¹ 的混合对照品储备液, 加 80% 甲醇等倍逐级稀释成系列浓度的对照品溶液, 进样测定, 记录峰面积。分别以 3 种待测成分的质量浓度 (X , μ g \cdot mL⁻¹) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归, 结果各待测成分在相应范围内线性关系良好, 回归方程及线性范围见表 1。

表 1 主成分回归方程、相关系数及线性范围
Tab 1 Regression equation, correlation coefficient and linear range of each component

成分	回归方程	相关系数	线性范围 / (μ g \cdot mL ⁻¹)
连翘酯苷 A	$Y = 1.353 \times 10^4 X - 319.9$	1.000	3.02 ~ 96.71
连翘苷	$Y = 9.682 \times 10^3 X + 991.3$	1.000	2.38 ~ 76.08
甘草酸	$Y = 6.258 \times 10^3 X + 181.7$	1.000	2.37 ~ 75.87

③ 定量限和检测限: 取“2.4.3”项下的对照品储备液适量, 等倍逐级稀释, 进样测定, 结果连翘酯苷 A、连翘苷及甘草酸的定量限 (LOQ) 分别为 0.47、0.23、0.45 μ g \cdot mL⁻¹ ($S/N = 10$); 检测限 (LOD) 分别为 0.14、0.07、0.14 μ g \cdot mL⁻¹ ($S/N = 3$)。

④ 精密度试验: 取“2.4.2”项下对照品溶液, 进样测定, 记录峰面积。结果连翘酯苷 A、连翘苷、甘草酸峰面积的 RSD 分别为 0.20%、0.40%、0.30% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

⑤ 重复性试验: 取同一批样品 (编号 B1), 按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液 6 份, 进样测定, 以外标法计算平均含量。结果样品中连翘酯苷 A、连翘苷及甘草酸的平均含量分别为 1.087、0.3827、0.4485 mg \cdot g⁻¹, RSD 分别为 0.60%、0.60%、0.70% ($n = 6$), 表明本方法重复性良好。

⑥ 稳定性试验: 取“2.4.2”项下供试品溶液 (编号: B1), 分别于室温下放置 0、1.5、3、4.5、

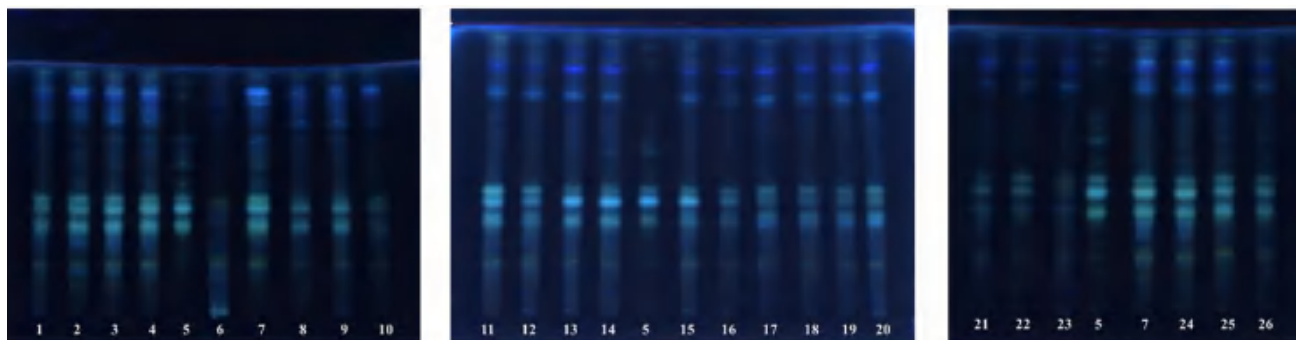


图 1 菊花薄层色谱图

Fig 1 TLC chromatogram of Chrysanthemi Flos

1~4. 供试品 (A1, B1~B3) [sample (A1, B1~B3)]; 5. 对照药材 (reference medicinal material); 6. 阴性样品照 (negative sample); 7~26. 供试品 (Y1, F1~F3, C1~C4, E1, E2, D1~D4, G1~G3, H1, H2, I1) [sample (Y1, F1-F3 C1-C4, E1, E2, D1-D4, G1-G3, H1, H2, I1)]

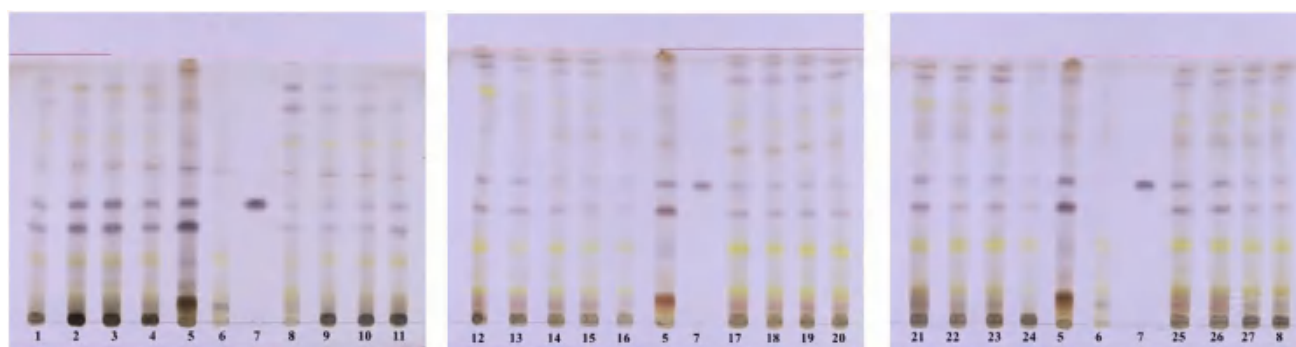


图 2 连翘薄层色谱图

Fig 2 TLC chromatogram of Forsythiae Fructus

1~4. 供试品 (A1, B1~B3) [sample (A1, B1~B3)]; 5. 对照药材 (reference medicinal material); 6. 阴性样品 (negative sample); 7. 连翘苷 (forsythin); 8~27. 供试品 (Y1, F1~F3, C1~C4, E1, D1~D4, G1~G3, E2, H1, H2, I1) [sample (Y1, F1~F3, C1~C4, E1, D1~D4, G1~G3, E2, H1, H2, I1)]

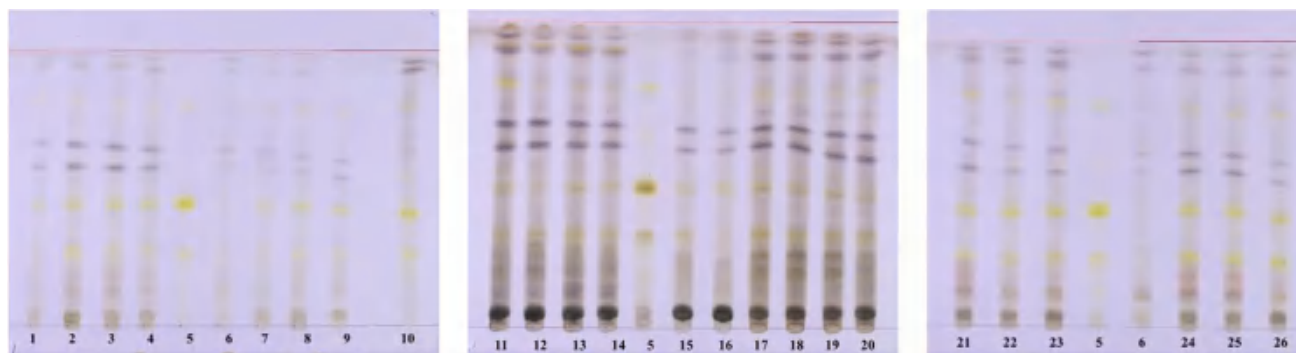


图 3 甘草薄层色谱图

Fig 3 TLC chromatogram of Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma

1~4. 供试品 (A1, B1~B3) [sample (A1, B1~B3)]; 5. 对照药材 (reference medicinal material); 6. 阴性样品 (negative sample); 7~26. 供试品 (F1~F3, Y1, C1~C4, E1, E2, D1~D4, G1~G3, H1, H2, I1) [sample (F1~F3, Y1, C1~C4, E1, E2, D1~D4, G1~G3, H1, H2, I1)]

6、7.5、9、12、18、24 h, 进样测定, 记录峰面积。结果连翘酯苷 A、连翘苷及甘草酸色谱峰面积的 *RSD* 分别为 0.20%、0.40%、0.40% ($n = 10$), 表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

⑦ 加样回收试验: 取已知含量的样品 (编号 B2) 0.5 g, 精密称定 (9 份), 置 100 mL 具塞锥

形瓶中, 分别精密加入连翘酯苷 A、连翘苷、甘草酸铵对照品适量, 依法制备高、中、低浓度的供试品溶液, 进样测定, 计算加样回收率。结果 3 种成分的回收率均在 97.57%~103.06%, *RSD* 均小于 2.0%。

2.4.4 含量测定 取 23 批样品, 按“2.4.2”项下

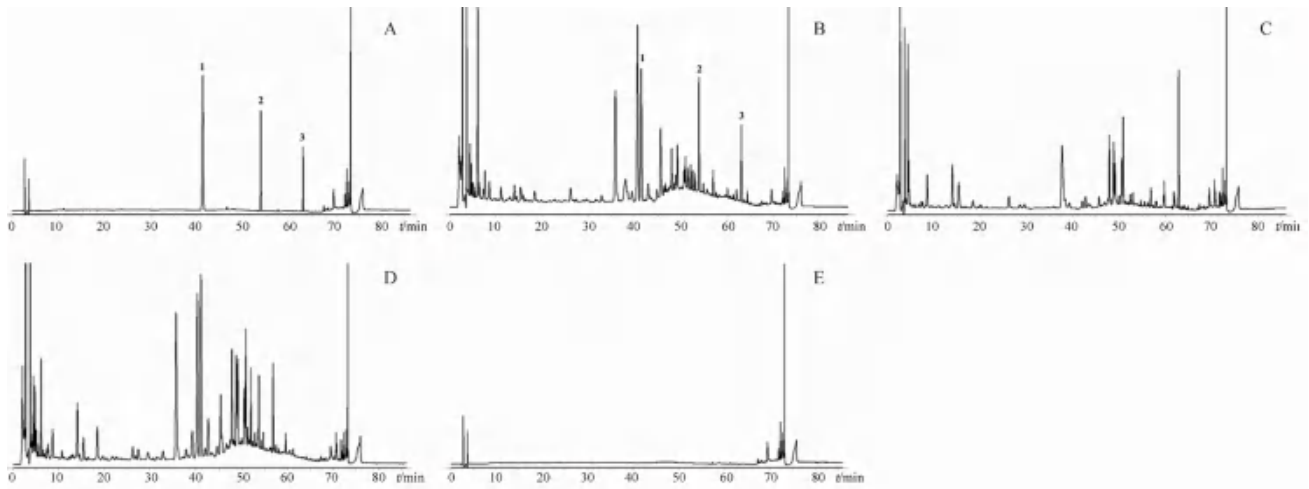


图 4 高效液相色谱图

Fig 4 HPLC chromatograms

A. 混合对照品 (mixed reference solution); B. 供试品 (B2)(test solution); C. 缺连翘的阴性样品 (negative sample lacking Forsythiae Fructus); D. 缺甘草的阴性样品 (negative sample lacking Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma); E. 空白溶剂 (blank solvent); 1. 连翘酯苷 A (forsythoside A); 2. 连翘苷 (forsythin); 3. 甘草酸 (glycyrrhizic acid)

方法制备供试品溶液, 进样测定, 记录峰面积, 以外标法计算 3 种成分的含量 (甘草酸的计算结果与 0.9797 相乘), 结果见表 2, 23 批样品连翘酯苷 A、连翘苷、甘草酸的平均含量为 4.68、1.86、3.60 mg/袋, RSD 值为 72.1%、58.7%、44.1%。

表 2 样品含量测定结果 (mg/袋)

Tab 2 Content determination in the samples (mg/袋)

编号	连翘酯苷 A	连翘苷	甘草酸	编号	连翘酯苷 A	连翘苷	甘草酸
A1	3.35	1.21	2.47	E1	1.86	1.07	1.13
B1	11.59	4.06	4.66	E2	0.43	0.29	0.45
B2	11.06	4.78	4.31	F1	0.70	0.63	1.42
B3	4.96	2.54	3.37	F2	1.05	0.72	2.26
C1	5.22	2.36	5.71	F3	2.37	0.78	1.66
C2	5.52	2.43	3.17	G1	11.11	2.17	5.52
C3	3.94	1.65	3.51	G2	2.28	1.24	5.03
C4	3.73	1.45	2.39	G3	3.41	1.68	5.20
D1	3.76	1.87	4.13	H1	8.84	3.48	5.98
D2	4.46	1.89	2.97	H2	8.84	2.04	4.65
D3	4.69	1.87	3.82	I1	2.19	1.28	6.01
D4	2.28	1.27	3.88				

3 讨论

3.1 指标成分的确立

本研究曾尝试开展处方中君药桑叶的 TLC 鉴别, 但选用多个展开系统展开后, 均未排除阴性样品干扰, 桑叶的鉴别有待进一步研究。本品由 8 味药材组方, 其中薄荷采用气相色谱法测定薄荷脑的含量, 桔梗采用蒸发光散射检测器测定桔梗皂苷 D 的含量, 芦根质量标准中未收载含量测定, 文献报道经碱性乙醇水溶液回流提取后测定芦根中对香豆酸和阿魏酸的含量^[7], 故未实现上

述 3 味药材的同时测定。王庆喜等^[8]用盐酸溶液回流提取后测定桑菊感冒颗粒中槲皮素的含量, 亦未实现槲皮素的同时测定。本品中绿原酸、芦丁、苦杏仁苷的含量较低, 且绿原酸为桑叶和菊花的共有成分, 芦丁为桑叶、菊花和连翘的共有成分, 均不适宜做含量测定的指标成分。本课题组前期进行了指纹图谱相关研究, 共标定 21 个共有峰, 属桑叶、菊花、连翘、甘草和薄荷, 运用 SPSS 18.0 统计分析软件进行主成分分析, 筛选出 8 个差异性指标成分, 结合色谱峰的保留时间及紫外光谱信息进行解析指出其中 3 个色谱峰, 分别为连翘酯苷 A、连翘苷和甘草酸, 其中连翘酯苷 A 和连翘苷属连翘, 甘草酸属甘草, 故本研究确立此 3 种成分为含量测定的指标成分。

3.2 提取溶剂及方式的选择

TLC 鉴别考察用水饱和的正丁醇、乙酸乙酯、三氯甲烷、乙醚提取样品, 按拟定色谱条件测定, 结果以水饱和的正丁醇为溶剂提取时, 样品信息更丰富, 斑点更清晰, 故选择以水饱和的正丁醇作为提取溶剂; HPLC 多指标成分含量测定考察提取溶剂 (甲醇、90% 甲醇、80% 甲醇、水) 和提取时间 (10、20、30、40 min) 对 3 种成分提取效率的影响, 结果显示以 80% 甲醇超声 30 min 时 3 种成分的含量较高, 故选择此方法制备供试品溶液。

3.3 色谱条件的优化

3.3.1 TLC 色谱条件 曾尝试用相同色谱系统同时分析连翘和甘草, 但在甘草的色谱系统下连翘

昔的 R_f 值偏低, 连翘的色谱系统下甘草主斑点的 R_f 值均偏高, 最终确定本文的色谱条件分别测定连翘和甘草。

3.3.2 HPLC 流动相 甲醇-水系统洗脱能力较差, 无法检测到甘草酸峰, 以乙腈-水为流动相时峰形较差, 采用乙腈-0.05% 磷酸溶液、乙腈-0.1% 磷酸溶液和乙腈-0.2% 磷酸溶液为流动相梯度洗脱, 乙腈-0.05% 磷酸溶液系统下色谱峰形较差, 后两者差异不大, 分离度符合要求且峰形较好, 故选择乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相。

3.4 含量测定限度制定

由于青翘与老翘中连翘酯苷 A 含量存在一定差异^[9], 而本品制法项下未明确青翘或老翘投料, 且不同厂家生产工艺与设备不同造成的转移率差异, 故未能采用样品的测定结果结合转移率确定含量限度。国家药品标准工作手册规定中药材和中药饮片原则上按照平均值的-20% 制定含量测定限度, 另 2017 年 3 月 18 日广东省药品检验所网站发布的关于“在广东省提高国家药品标准行动计划有关问题的解答”中提到, 中成药含量限度一般按平均值下浮 20% 较合适, 故以 23 批次样品含量测定结果的平均值下浮 20% 为标准, 将连翘酯苷 A、连翘苷、甘草酸的限度暂定为 3.74、1.49、2.88 mg/袋。针对青翘与老翘中连翘酯苷 A 含量的差异, 有必要对本品中连翘酯苷 A 的含量制订更加科学的限度, 此项工作有待进一步研究。

3.5 整体质量分析

23 批样品按现行标准进行法定检验全部合格, 但结合探索性研究结果深入分析, 仍可发现一些与药品质量相关的问题。TLC 鉴别结果分析 23 批样品均检出与菊花、甘草、连翘对照药材和连翘苷对照品相应的斑点, 但斑点深浅不一; 以本文制订的限度进行检验, 有 11 批样品不合格, 不合格率为 47.8%, 不合格样品涉及 7 家企业; 23 批样品的 3 种成分含量测定结果 RSD 值显示样品间质量存在显著差异, 特别是连翘酯苷 A 的 RSD 值超过 70%, 推测可能是连翘采收期及生产工艺不同导致连翘酯苷 A 含量差异尤为显著。本文运用 SPSS 18.0 统计学软件对含量测定与水分、

装量及粒度的相关性进行了分析, 结果显示样品中连翘酯苷 A 和连翘苷的含量与水分成显著正相关, 提示生产过程中干燥方式对含量测定结果有影响, 建议生产企业严格控制干燥温度及时间。

3.6 有效期的制订

现行质量标准在关键检验项目上的缺失, 致使有效期的制订不科学, 且不同企业产品的有效期不同, 建议生产企业对有效期重新考察, 且不能忽略包装材料对有效期的影响。

桑菊感冒颗粒现行质量标准在项目设置上未关注影响药品有效性和安全性的重要质量要素, 无法准确评价产品质量, 标准亟待完善; 法定标准检验合格率较高, 探索性研究结果显示市售桑菊感冒颗粒质量存在显著差异, 产品质量亟待提高。本文建立的 TLC 鉴别和 HPLC 含量测定方法填补了桑菊感冒颗粒关键质控项目的缺失, 为完善质量标准和评价产品质量现状提供了重要依据。

参考文献

- [1] 罗玲英, 赵珍东. 实用方剂与中成药[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2012: 46.
- [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第二册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1990: 227.
- [3] 刘文, 王翀, 冯磊, 等. 国家药品抽检质量风险排查处置机制关键控制点分析[J]. 中国药业, 2022, 31(6): 13-15.
- [4] 杨惠莲, 吴佳, 张毅. 高效液相色谱法测定桑菊感冒颗粒连翘苷含量[J]. 医药导报, 2009, 28(8): 1080-1081.
- [5] 崔佰吉, 张宏梅, 朱鹤云, 等. HPLC 法同时测定桑菊感冒颗粒中 5 种有效成分的含量[J]. 中国药房, 2018, 29(12): 1609-1612.
- [6] 吕艳妮, 李俊强. 高效液相色谱法测定桑菊感冒颗粒中连翘酯苷 A 的含量[J]. 天津药学, 2018, 30(2): 28-29.
- [7] 潘春燕, 陈静, 杭太俊, 等. HPLC 法同时测定芦根中对香豆酸和阿魏酸含量[J]. 中国药科大学学报, 2015, 46(2): 219-223.
- [8] 王庆喜, 李姝红, 程艳飞, 等. 高效液相色谱法测定桑菊感冒颗粒中槲皮素含量[J]. 中国药业, 2010, 19(12): 46.
- [9] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 177-178.
- [10] 国家药典委员会. 国家药品标准工作手册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2013: 13.

(收稿日期: 2022-06-02; 修回日期: 2022-07-20)

基于数据挖掘探讨胆南星成药的配伍规律及应用特点

武旭^{1, 2}, 王晶^{1, 2}, 邹婷^{1, 2}, 马晓蕾¹, 刘晔¹, 贺素容^{1, 4}, 张桥^{1, 2}, 赵重博^{1, 2, 3*} (1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西省中药饮片工程技术研究中心, 陕西 咸阳 712046; 3. 陕西省中药炮制技术传承基地, 陕西 咸阳 712046; 4. 西安大兴医院, 西安 710000)

摘要: **目的** 基于数据挖掘探讨含胆南星方剂的配伍规律及应用特点, 为胆南星的合理使用和中药新药研发提供数据支撑。**方法** 以药智网平台收录的含有胆南星的中成药处方作为研究对象, 以 Excel 2017、SPSS Modeler 14.1、SPSS Statistics 23.0 作为统计软件, 统计含胆南星中成药处方的中药频次、性味归经、主治疾病与证候分布, 并对高频药物进行关联规则分析和聚类分析。**结果** 本研究获得含胆南星的 143 种中成药处方, 共涉及 325 味中药, 常用于治疗小儿惊风、肺热咳嗽等。含胆南星中成药处方中累计出现频数最高的前 6 味中药分别是牛黄、僵蚕、朱砂、天麻、甘草、天竺黄; 药性主要为温、寒、平性; 药味主要集中在苦、甘、辛、咸; 归经以肺、肝、脾、心、膀胱经最为常见。主要治疗肺热咳嗽、小儿惊风、小儿急热惊风等中医临床常见疾病, 通过关联规则分析, 得到常用药对 25 对, 如“胆南星-冰片”“胆南星-牛黄”“天麻-全蝎-胆南星”“胆南星-牛黄-冰片”等。对高频药物进行聚类分析可将药物分为息风止痉药、温化寒痰药、清化热痰药、发散风寒药、开窍药等。**结论** 本文梳理了含胆南星的成药中胆南星在治疗不同疾病时的配伍组合, 主要与息风止痉药、清化热痰药、开窍药等药配伍。胆南星治疗肺热咳嗽时配伍半夏(法)、水牛角、麻黄、黄芩、陈皮等; 治疗小儿急热惊风、癫痫时配伍天竺黄、天麻、钩藤、朱砂、琥珀、僵蚕等; 治疗跌打损伤时配伍石菖蒲、狗脊、升麻、重楼、白芷等; 治疗支气管哮喘时配伍五味子、川贝母、洋金花、百部、甘草(蜜)等。本文可为胆南星的科学用药及其新药研发提供新思路。

关键词: 胆南星; 中成药; 数据挖掘; 配伍规律; 临床应用

中图分类号: R289.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0526-05

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.040

胆南星 (Rhizoma Arisaema Cum Bile), 是天南星的炮制品, 味苦, 微辛凉, 归肺、肝和脾经, 由主料和辅料组成, 主料为天南星系天南星科植物天南星 *Arisaema erubescens* (Wall.) Schott.、异叶天南星 *Arisaema heterophyllum* Blume. 或东北天南星 *Arisaema amurense* Maxim. 的干燥块根的细粉, 辅料为牛、羊或猪胆汁, 通过发酵或混合制得。胆南星擅于清化热痰、息风定惊, 临床多用于痰热咳喘、癫痫及急惊风等症。胆汁处理可以减低或者消除天南星的毒性和燥性, 古代医家认为“天南星为燥痰之品, 制以牛胆汁以杀其毒”^[1], “得牛胆则减燥性”^[2], “牛胆汁制去燥烈而清润”^[3]等记载。现代医家认为, 胆汁味苦性寒,

有清热解毒的功效, 可以使得天南星的性味变为苦凉, 故善于治疗痰热惊风、抽搐等疾病。

随着中医药知识的普及和中药产业现代化的发展, 中成药的临床使用日益广泛^[4]。采用数据挖掘探寻中药处方规律, 扩大其临床应用范围已成为探索中药配伍和中药新药研发的重要手段^[5-6]。胆南星的应用历史悠久, 目前临床上已经研制出含有胆南星的中成药, 包括丸剂、片剂、胶囊等多种剂型, 例如小儿镇惊丸、小儿牛黄清肺片、哮喘宁片、小儿抗痫胶囊、麝香抗栓胶囊等。本文应用数据挖掘的方法对含有胆南星的中成药进行处方分析, 梳理出药物存在的潜在网络关系和新的药对组合, 为胆南星现代临床科学合

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (No.81803732); 陕西省教育厅自然科学项目 (No.20JK0598); 陕西省创新人才推进计划-科技创新团队 (No.2018TD-005); 陕西省科技计划项目 (No.2021SF-385); 陕西省中药炮制技术传承基地建设项目 (No.138010015)。

作者简介: 武旭, 男, 硕士研究生, 主要从事中药炮制与饮片质量标准研究, email: wuxu_145185@126.com *通信作者: 赵重博, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事中药炮制与饮片质量标准研究, email: zhao_chongbo@126.com

理的应用和新药研究提供依据。

1 资料与方法

1.1 数据来源

基于药智网数据库 (<https://db.yaozh.com/>) 中的“中成药处方数据库”工具, 数据来源为 2020 年版《中国药典》。结合 2015 年版《中华人民共和国药典临床中药饮片(卷)》对胆南星的功效应用进行梳理。

1.2 纳入标准及排除标准

以“胆南星”为关键词, 筛选出所有含胆南星的中成药; 排除临床应用中与胆南星作对比, 但药物组成中不含胆南星的方剂。

1.3 数据处理

将纳入方剂中所有的中药录入 Excel 2017 软件中, 一个方剂录一行, 一人录一人审核。依照《中药学》和 2020 年版《中国药典》对录入的中药名称进行规范化处理, 如“麸炒僵蚕”统一为“僵蚕”, “酒炙大黄”统一为“大黄”, “炙附子”统一为“附子”, “醋炙乳香”统一为“乳香”, “酒炙威灵仙”统一为“威灵仙”, “麸炒白术”统一为“白术”, “炒杏仁”统一为“杏仁”, “炒酸枣仁”统一为“酸枣仁”, “炒牛蒡子”统一为“牛蒡子”, “炒紫苏子”统一为“紫苏子”, “炒莱菔子”统一为“莱菔子”, “烫水蛭”统一为“水蛭”, “煅龙骨”统一为“龙骨”, “炒牵牛子”统一为“牵牛子”, “麸炒枳壳”统一为“枳壳”, “水飞朱砂”统一为“朱砂”, “琥珀粉”统一为“琥珀”。若炮制前后功效或归经发生变化, 则应分别录入。在性味归经统计时, 若同一味中药有多种性味归经应分别录入。在成药剂型统计时如同一处方被研发成不同剂型, 应分别录入; 其他分析则视为一个处方。按照《中医临床诊疗术语》, 对方剂中所叙述的疾病进行统计归类。

1.4 统计分析

在 Excel 2017 软件中分析中药的性味归经, 使用频数。在 BM SPSS Modeler 18.0 软件中, 采用 Apriori 算法进行关联规则分析, 设置前项支持度阈值 ≥ 0.1 , 置信度阈值 ≥ 0.8 , 最大前项数为 5^[7]。在运用 IBM SPSS Statistics 23.0 软件中进行系统聚类分析, 并用皮尔森相关系数观察变量之间的相似性^[8]。

2 结果

2.1 含胆南星中成药处方中药材频次及药性分布

方剂中共涉及中药 325 味, 所有中药累计使用 2674 次, 其中高频(使用频次 ≥ 30) 中药有 20 味, 四气主要以寒、凉、微温类药物为主; 药味主要以苦、辛、甘类药物为主; 这些药物多入

肺、脾、肝、心、膀胱经, 见表 1。另外统计胆南星高频配伍中的功效使用情况。由表 2 可知胆南星常与息风止痉药、清热泻火药、发散风寒药、开窍药等进行联合使用, 见表 2。

表 1 含胆南星方剂中高频(频次 ≥ 30) 中药统计

序号	药名	频次/次	性味	归经
1	胆南星	143	苦、微辛、凉	肺、肝、脾
2	冰片	86	辛、苦、微寒	心、脾、肺
3	牛黄	72	甘、凉	心、肝
4	僵蚕	72	咸、辛、平	肝、肺、胃
5	朱砂	70	甘、微寒	心
6	天麻	67	甘、平	肝
7	甘草	67	甘、平	心、肺、脾、胃
8	天竺黄	65	甘、寒	心、肝
9	全蝎	64	辛、平; 有毒	肝
10	茯苓	57	甘、淡、平	心、肺、脾、肾
11	防风	48	辛、甘、微温	膀胱、肝、脾
12	琥珀	47	甘、平	心、肝、肺、脾、小肠、膀胱
13	钩藤	41	甘、凉	肝、心包经
14	麝香	39	辛、温	心、脾
15	羌活	38	辛、苦、温	膀胱、肾
16	当归	35	甘、辛、温	肝、心、脾
17	黄芩	32	苦、寒	肺、胆、脾、大肠、小肠
18	川芎	31	辛、温	肝、胆、心
19	黄连	30	苦、寒	心、脾、胃、肝、胆、大肠
20	珍珠	30	甘、咸、寒	心、肝

表 2 含胆南星方剂中药功效分类统计(频次 ≥ 40)

序号	功能分类	频次/次	序号	功能分类	频次/次
1	息风止痉药	389	10	补血药	70
2	清热泻火药	242	11	清热燥湿药	65
3	发散风寒药	179	12	清热凉血药	59
4	开窍药	166	13	祛风寒湿药	58
5	理气药	153	14	利水消肿药	49
6	补气药	152	15	化湿药	48
7	清化热痰药	133	16	活血调经药	48
8	重镇安神药	128	17	温化寒痰药	46
9	活血止痛药	86	18	止咳平喘药	40

2.2 含胆南星中药制剂归纳统计

含胆南星的中成药剂型类型多样, 主要包括传统的中成药剂型如丸剂, 散剂, 膏剂, 丹剂, 片剂, 胶囊剂, 颗粒剂等, 见表 3。其中, 多以丸剂、散剂为常见。中医认为“丸者, 缓也”, 临床上往往用于治疗慢性疾病或者虚弱病证的调理。部分有毒、芳香走窜的药物制成丸剂可用于治疗急症^[9]。散剂可内服和外用, 运用于众多病症, 急症实证多用之。

由含胆南星的中成药功效, 大致可将其分为 2~3 类, 息风止痉类, 例如痢愈胶囊、琥珀惊风散、广羚散、抗栓再造丸、清热镇惊散等。胆南星配伍黄芪、党参、天麻、酸枣仁, 安神定惊,

表 3 含胆南星的复方制剂

剂型	成方	数量
丸	小儿珍珠镇惊丸, 散风活络丸, 健脑丸, 小儿镇惊丸, 小儿琥珀丸, 至圣保元丸, 追风丸, 舒筋活络丸, 痢症镇心丸, 小儿太极丸, 太极升降丸, 牛黄安心丸, 育婴丸, 八宝镇惊丸, 龙脑安神丸, 抗栓再造丸, 小儿止嗽丸, 小儿奇应丸, 回天再造丸, 惊风丸, 醒脑再造丸, 蛇胆追风丸, 小儿清热止咳丸, 清气化痰丸(浓缩丸), 琥珀化痰镇惊丸, 疏风再造丸, 保童化痰丸, 顺气消食化痰丸, 补脑丸, 清金理嗽丸, 清胃丸, 麝香抗栓丸, 九龙化风丸, 小儿止嗽金丸, 解表清肺丸, 儿童七珍丸, 人参再造丸(浓缩丸, 蜜丸), 金黄抱龙丸, 清肺化痰丸, 众生丸, 参麝活络丸, 小儿七珍丸, 太极丸, 珍珠消积丸, 五粒回春丸(糊丸), 复方小活络丸, 散风活络丸(浓缩丸), 益通栓丸, 七珍丸, 大黄清胃丸, 小儿百寿丸, 小儿至宝丸, 小儿解热丸, 小活络丸, 牛黄抱龙丸, 牛黄镇惊丸, 平肝舒络丸, 金嗓利咽丸, 清气化痰丸, 琥珀抱龙丸, 豨莶通栓丸, 双黄祛风丸, 解热镇惊丸, 小儿回春丸(大蜜丸, 水丸), 保元丸, 乾元丸	73
散	回春散, 小儿牛黄清肺散, 小儿镇惊散, 琥珀惊风散, 小儿牛黄散, 小儿牛黄清心散, 小儿清肺散, 牛黄清肺散, 羚羚散, 小儿肺炎散, 保婴夺命散, 小儿珍珠散, 小儿清热镇惊散, 牛黄小儿散, 羚珠散, 保婴散, 婴宁散, 清热镇惊散, 千金散, 天黄喉散, 小儿惊风七厘散, 惊风七厘散, 镇惊散, 安宁保婴散, 八宝惊风散, 清热定惊散, 宝宝牛黄散, 广羚散, 天黄猴枣散, 琥珀保婴散	30
膏	熊胆跌打膏, 神农镇痛膏	2
丹	小儿止嗽金丹, 小儿金丹, 保幼化风丹, 琥珀保婴丹, 乾元丹, 保元丹, 金粟丹, 平肝舒络丹	8
胶囊	双红活血胶囊, 琥珀抱龙胶囊, 痫愈胶囊, 脑心安胶囊, 金嗓利咽胶囊, 复方天仙胶囊, 抑眩宁胶囊, 健脑胶囊, 醒脑再造胶囊, 解郁安神胶囊, 众生胶囊, 豨莶通栓胶囊, 芪蛭通络胶囊, 小儿抗痫胶囊, 癫痫康胶囊, 麝香抗栓胶囊	16
片	小儿牛黄清肺片, 哮喘宁片, 镇痫片, 防芷鼻炎片, 珍黄安宫片, 鼻舒适片, 小儿惊风片, 小活络片, 小儿抗惊片, 牛黄抱龙片, 追风片, 小儿七珍片, 小儿金丹片, 众生片, 金嗓利咽片	15
颗粒	小儿肺咳颗粒, 小儿牛黄颗粒, 解郁安神颗粒, 小儿清肺颗粒, 金嗓利咽颗粒	5

息风解痉; 配伍僵蚕、天竺黄、牛黄、琥珀, 镇静安神, 息风化痰; 配伍丹参、三七、红花, 活血化瘀, 舒经活络, 息风镇惊; 配伍黄连、栀子、钩藤, 清热解痉, 镇惊息风。清肺热化痰类, 例如小儿牛黄清肺片、小儿珍珠镇惊丸、乾元丸(酒炙胆南星)、五粒回春丸(酒炙胆南星)、保童化痰丸、小儿解热丸等。胆南星配伍半夏、茯苓、黄芩、白前, 清热化痰, 止咳; 配伍麻黄、羌活、防风, 解热化痰, 镇静; 配伍橘红、赤芍、黄芩、前胡、陈皮, 清热化痰, 定喘止咳; 配伍金银花、连翘、羌活, 宣肺透表, 清热解毒。开窍类, 例如豨莶通栓丸、九龙化风丸、脑心安胶囊等, 配伍麝香、冰片、豨莶草, 开窍醒脑、祛风舒筋; 配伍石菖蒲、柴胡、远志, 豁痰开窍、平肝息风; 配伍麝香、三七、西红花, 开窍通络、益气活血。

2.3 含胆南星中成药处方的主治疾病

初步检索含有胆南星的方剂 149 首, 经过筛选, 最终纳入研究的方剂共 143 首, 根据《中医临床诊疗术语》^[10] 中对疾病的分类标准, 记录方剂中的所有疾病共 11 种, 如肺热咳嗽、小儿热惊厥、小儿癫痫、小儿夜啼、中风、口眼歪斜、半身不遂、缺血性中风、跌打损伤、支气管哮喘、鼻炎等。用于治疗肺热咳嗽, 胆南星常配伍半夏(法)、水牛角、麻黄、黄芩、陈皮等, 用量为 25 ~ 250 g; 用于治疗小儿急热惊风、癫痫, 胆南星常配伍天竺黄、天麻、钩藤、朱砂、琥珀、僵蚕等, 用量为 40 ~ 500 g; 用于治疗中风、口眼歪斜、半身不遂、

缺血性中风, 胆南星常配伍防风、地黄、蕲蛇、人参、羌活、红花、川芎、白芍、当归、三七等, 用量为 15 ~ 160 g; 用于治疗跌打损伤, 胆南星常配伍狗脊、升麻、重楼、白芷等, 用量为 107 ~ 563 g; 用于治疗支气管哮喘, 胆南星常配伍五味子、川贝母、洋金花、半夏、百部、甘草(蜜)等, 用量为 8 ~ 45 g; 用于治疗慢性鼻炎引起的喷嚏、流涕、鼻塞、头痛、头昏, 伴有耳鸣、流泪等, 胆南星常配伍苍耳子、野菊花、鹅不食草等, 用量为 70 g。

2.4 含胆南星中药制剂中核心药物组合关联分析

通过关联分析, 得到中药组合 25 项, 其中 2 味中药组合 9 项, 3 味中药组合 16 项。在药对关联规则中, “胆南星-冰片” “胆南星-牛黄” “胆南星-朱砂” “胆南星-僵蚕” 和 “胆南星-天麻” 的支持度较高。三味药组合以 “天麻-全蝎-胆南星” 和 “胆南星-牛黄-冰片” 的支持度最高, 详见图 1、表 4 和表 5。

2.5 含胆南星中药制剂中高频药物聚类分析

聚类分析可以直观地筛选出核心药物组方, 被广泛应用于中药处方用药规律总结和中成药新方剂开发等^[11-12]。聚类分析采用皮尔逊相关性的组间连接, 结果见图 2。由聚类分析可知, 依据中医基础理论及方剂学知识, 发现可将基础方大概分为 4 类, 详见表 6。第 1 类: 当归, 川芎, 地龙等主要为补血活血, 可用于血虚血瘀。第 2 类: 防风, 羌活, 甘草等主要为通痹止痛, 可用于风毒湿痹。第 3 类: 天麻, 全蝎, 僵蚕等主要

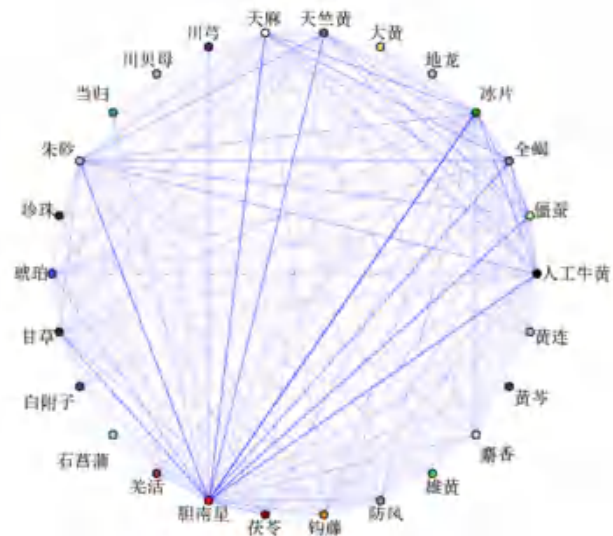


图 1 含胆南星高频中药关联网络 (配伍频次越多, 节点连线越粗)

表 4 胆南星高频中药药对关联规则分析 (2 味)

序号	后项	前项	支持度 /%	置信度 /%
1	胆南星	冰片	54.84	100.00
2	胆南星	牛黄	46.45	100.00
3	胆南星	朱砂	44.52	100.00
4	胆南星	僵蚕	44.52	100.00
5	胆南星	天麻	43.23	100.00
6	胆南星	甘草	41.94	100.00
7	胆南星	天竺黄	41.29	100.00
8	胆南星	全蝎	39.35	100.00
9	胆南星	茯苓	36.77	100.00

表 5 胆南星高频中药组合关联规则 (3 味)

序号	后项	前项	支持度 /%	置信度 /%
1	天麻	全蝎、胆南星	39.35	81.97
2	胆南星	牛黄、冰片	36.77	100.00
3	胆南星	天麻、冰片	33.55	100.00
4	胆南星	天竺黄、朱砂	32.90	100.00
5	冰片	全蝎、天麻	32.26	80.00
6	胆南星	全蝎、天麻	32.26	100.00
7	天竺黄	朱砂、僵蚕	30.97	81.25
8	胆南星	朱砂、僵蚕	30.97	100.00
9	胆南星	僵蚕、冰片	30.97	100.00
10	牛黄	朱砂、冰片	29.03	80.00
11	胆南星	朱砂、冰片	29.03	100.00
12	朱砂	天竺黄、僵蚕	28.39	88.64
13	胆南星	天竺黄、僵蚕	28.39	100.00
14	天麻	全蝎、冰片	28.39	90.91
15	朱砂	全蝎、僵蚕	28.39	81.82
16	胆南星	全蝎、僵蚕	28.39	100.00

为息风止痉, 可用于解痉止痛。第 4 类: 黄芩, 川贝母, 胆南星主要为清热、化痰、燥湿, 可用于清肺火, 散痈结。

3 讨论

胆南星首次记载于《小儿药证直诀》, 炮制

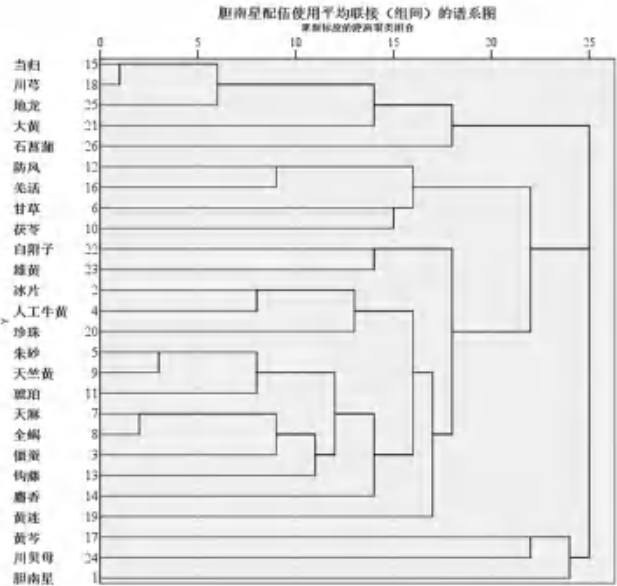


图 2 胆南星配伍使用聚类图

表 6 高频药物聚类分析表

序号	中药组成
1	当归, 川芎, 地龙, 大黄, 石菖蒲
2	防风, 羌活, 甘草, 茯苓
3	白附子, 雄黄, 冰片, 人工牛黄, 珍珠, 朱砂, 天竺黄, 琥珀, 天麻, 全蝎, 僵蚕, 钩藤, 麝香, 黄连
4	黄芩, 川贝母, 胆南星

方法为:“腊月酿牛胆中阴干百日”, 在《圣济总录》中记载了发酵法, 炮制方法为:“黄牛胆内浸三宿焙, 牛胆煮一伏时暴干”。发展至今, 胆南星的炮制方法主要分为发酵法和混合法两种。胆南星苦、微辛、凉; 归肺、肝、脾经。具有清热化痰、息风定惊的功效; 其临床使用近一千年, 用于治疗痰热咳喘、癫痫及急惊风等症^[13]。历代医家常用胆南星配伍不同类型中药治疗许多疾病, 配伍朱砂清心镇惊, 治疗痰痫; 配伍瓜蒌降肺火、化热痰; 配伍石菖蒲化痰开窍醒神, 治疗痰热痫证; 配伍琥珀、茯神安神定志, 治疗一切惊痫; 配伍附子温散风寒、消散瘀结; 配伍柴胡疏肝理气、化痰安神, 治疗少阳不和, 痰热阻窍型被迫害妄想症; 配伍全蝎祛痰通经, 活络止痛; 配伍大黄通腑泄热止惊, 治疗缓解期的婴儿痉挛性疾病; 配伍冰片化痰定惊、开窍醒神, 用于治疗痰瘀阻窍型癫痫、痰瘀互结, 脉络壅滞型血管神经性头痛^[14-18]。胆南星在应用中只有得到合理配伍才能发挥较好的药效。

通过频数分析, 关联规则分析, 聚类分析对现代含胆南星的中成药方剂的配伍规律及其应用特点进行探讨。结果显示, 关联度较高的药对组合有“胆南星 - 冰片”“胆南星 - 牛黄”“胆南星 - 朱砂”“胆南星 - 天麻”等, 3 味药度值最高的组合有

“胆南星-天麻-全蝎”“胆南星-牛黄-冰片”“胆南星-天麻-冰片”“胆南星-天竺黄-朱砂”等。《痧证汇要》中记载：“牛黄丸，胆星、天竺黄各三钱，朱砂五分，牛黄四分……共为末，甘草水为丸……于治疗痰涎喘急。”《圣济总录》有云：“胆星一两，丹砂一钱半……炼蜜和丸，治小儿风热壅毒，关膈滞塞，凉心压惊。”《直指小儿方》记载：“胆南星，僵蚕（炒），全蝎……末水煮半夏糊丸，主治慢性风阳气未甚脱者。”《痘疹传心录》记载：“胆南星天竺黄佐之……伍天麻息内风，主治小儿脾气虚有痰而多睡者。”2020年版《中国药典》收录的中成药牛黄千金散由胆南星、冰片、黄连等9味药组成，主要治疗小儿惊风高热，手足抽搐，痰涎壅盛，神昏谵语。

胆南星的现代药理研究表明，其具有良好的镇静、镇痛和抗炎的作用，能显著延长戊四氮惊厥模型小鼠的惊厥潜伏期和存活时间^[18]。临床上，胆南星、天麻、钩藤等配伍以息风涤痰开窍法专治兼有明显热证的癫痫，效果显著^[19]。胆南星、大黄、厚朴等组成的清热化痰通腑汤与神经内科常规疗法联合使用，可显著提高常规疗法对急性脑梗死患者的治疗效果^[20]。胆南星与瓜蒌仁共为君药制成清气化痰丸加减方，能显著改善慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者的临床症状和肺部功能，并且可以有效抑制炎症反应^[21]。胆南星在临床应用广泛，疗效显著，用药剂量在3~30g，且多以汤剂使用^[22]，但中成药中胆南星最大使用量可达到563g。随着我国中医药现代化政策的推进与落实以及中药制药技术的不断发展。中药药剂研发者在保证药效的基础上，将服用量大、患者不便居家煎煮的汤剂进行改良，现市场中含胆南星的中成药主要为丸剂、散剂、胶囊剂、片剂等，便于患者服用、携带和储存。综上，本文对市场上含有胆南星的中成药进行药物组成、性味归经；处方中的高频中药和关联规则等进行分析总结。归纳出含胆南星方剂的配伍特点和应用规律，为临床上科学和规范应用胆南星及其创新使用提供参考。

参考文献

[1] 吴仪洛. 成方切用[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1958.

- [2] 吴仪洛. 本草从新[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1958: 100.
- [3] 张仲岩. 修事指南[M]. 杭州: 杭州抱经堂书局. 1926.
- [4] 肖小河. “健康中国”战略下的中药安全性研究与思考[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(5): 857-860.
- [5] 连妍洁, 刘思娜, 刘红旭, 等. 基于数据挖掘分析含水蛭中成药的配伍规[J]. 世界中医药, 2022, 17(4): 505-511.
- [6] 吴春兴, 裴志斐, 白庆云, 等. 基于数据挖掘分析含天麻方剂的配伍规律及应用特点[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(10): 1562-1567.
- [7] 王琛, 陈鹏, 蔡云, 等. 基于数据挖掘的林培政治疗岭南地区头痛用药规律分析[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(8): 1002-1007.
- [8] 王燕, 周冰倩, 庞龙, 等. 基于数据挖掘探讨中医药治疗年龄相关性黄斑变性的用药规律[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(4): 579-584.
- [9] 禹海燕, 蔡成龙, 杜庆伟, 等. 中药丸剂研究进展[J]. 药学研究, 2019, 38(7): 424-426.
- [10] 国家技术监督局. 中医临床诊疗术语[S]. 北京: 中国标准出版社, 1997.
- [11] 林九国, 史梦瑶, 金磊, 等. 基于数据挖掘的中药治疗血液病的用药规律分析[J]. 中草药, 2021, 52(4): 1073-1082.
- [12] 吴瑞, 苗明三, 李秀敏. 基于数据挖掘的中药治疗神经性皮炎用药规律分析[J]. 中国药师, 2021, 24(2): 344-347.
- [13] 金贵诗, 许彤. 胆南星炮制方法研究进展[J]. 中医药临床杂志, 2021, 33(10): 2042-2045.
- [14] 潘丽, 卫若楠, 于同月, 等. 胆南星的临床应用及其用量探究[J]. 吉林中医药, 2021, 41(4): 532-535.
- [15] 何莉莎, 刘文科, 全小林. 论脏腑风湿理论在临床中的应用[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(5): 2087-2089.
- [16] 潘佳蕾, 李赛美. 李赛美教授治疗神志病经验拾零[J]. 浙江中医药大学学报, 2016, 40(2): 122-124.
- [17] 陈汉江, 张喜莲, 马融. 马融治疗婴儿痉挛症经验[J]. 中医杂志, 2013, 54(18): 1547-1549.
- [18] 李瑶. 胆南星炮制前后成分变化及质量标准研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.
- [19] 袁旭, 李政, 王晓天, 等. 中药及其有效成分在抗癫痫中的作用与机制[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(1): 9-18.
- [20] 崔春凤, 殷永刚, 朱青霞. 清热化痰通腑汤联合西药治疗急性缺血性脑梗死36例[J]. 中医研究, 2019, 32(12): 29-31.
- [21] 刘锐, 侯体保, 何嘉, 等. 清气化痰丸加减治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期痰热壅肺证的临床疗效及对血清TNF- α , IL-8, MMP-9的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(9): 31-37.
- [22] 潘丽, 卫若楠, 于同月, 等. 胆南星的临床应用及其用量探究[J]. 吉林中医药, 2021, 41(4): 532-535.

(收稿日期: 2022-07-17; 修回日期: 2022-08-02)

口服剂型中成药治疗小儿消化系统疾病的核心处方挖掘

师玥¹, 吴力群^{2*}, 张韵清¹ (1. 北京中医药大学 第二临床医学院, 北京 100078; 2. 北京中医药大学东方医院儿科, 北京 100078)

摘要: **目的** 分析治疗小儿消化系统疾病口服剂型中成药的用药特点与组方规律, 挖掘核心处方。 **方法** 收集中国药品注册数据库中所有治疗小儿消化系统疾病的口服剂型中成药, 建立规范化数据库, 进行证型、症状分类, 运用频数统计与 Apriori 关联规则分析主要证型及症状的用药特点与组方规律, 发现核心处方。 **结果** 共纳入 52 种中成药, 含单味药 136 味, 涉及 6 种证型、16 种症状, 其中脾失运化证、脾胃气虚证、寒湿证为主要证型, 食积、纳少、腹泻为主要症状, 明确了与 3 种证型、3 种症状相关的核心处方。 **结论** 频率统计与 Apriori 关联规则相结合的方法能够挖掘治疗小儿消化系统疾病口服剂型中成药的用药特点, 展现中医对证治疗与对症治疗的特色, 为临床治疗和新药开发提供参考。

关键词: 儿科; 中成药; 消化系统疾病; 核心处方

中图分类号: R283

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0531-06

doi: 10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.041

Core prescriptions of Chinese patent medicines in oral dosages for digestive diseases in children via data mining

SHI Yue¹, WU Li-qun^{2*}, ZHANG Yun-qing¹ (1. Second Clinical Medicine School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078; 2. Department of Pediatrics, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078)

Abstract: Objective To determine the components and principles of Chinese patent medicines for digestive diseases in children and the core prescriptions. **Methods** We searched Chinese patent drugs in oral dosage forms for digestive diseases in Chinese Pharmaceutical Registration database, and established a standardized database to classify the syndromes and symptoms. Descriptive analysis and association rule analysis based on Apriori algorithm were conducted with Microsoft Excel and SPSS Modeler respectively. Association rules and core prescriptions among Chinese patent drugs were determined. **Results** Totally 52 Chinese patent medicines and 136 single drugs were included, involving 6 syndrome types and 16 symptoms, in which failure of the spleen to transport pattern, spleen-stomach Qi deficiency pattern, and cold and dampness pattern were more common types, while food stagnation, less consuming and diarrhea were the main symptoms. Finally, 3 core prescriptions and 3 symptoms were clarified. **Conclusion** Descriptive analysis and association rule analysis can be used to determine the pharmaceutical characteristics of oral dosage forms of Chinese patent medicines for digestive diseases in children, indicating intervention of traditional Chinese medicine may the disease from both pattern and symptom respectively. This study may provide a reference for clinical treatment and new drug development.

Key words: pediatrics; Chinese patent medicine; digestive disease; core prescription

作者简介: 师玥, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中医儿科学方面的研究, email: shiyuesia@foxmail.com * 通信作者: 吴力群, 女, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事中医儿科学方面的研究, email: wulq1211@163.com

儿童消化系统疾病涉及的范围庞杂,包括功能性胃肠病、感染性肠病等^[1]。患儿通常表现为肠胃症状,如腹胀、腹痛、厌食、呕吐、便秘、腹泻等;重者影响其他系统功能,出现发热、少尿等;日久影响营养状况,则出现神疲乏力、面色少华等症状,影响生长发育。临床采用对症治疗及病因治疗,对症治疗为休息、镇痛、导泻、止泻等,病因治疗为抗菌及抗病毒治疗等。目前西医常用消化系统药品对儿童用法用量及儿童用药安全性标注不足^[2],益生菌制剂有待开展更多高质量、大型临床研究^[3],抗菌药物及抗病毒药物滥用造成了严重的耐药问题^[4]。中医治疗具有缩短病程、改善症状和体征的作用,临床使用有较高的安全性和有效性,对于儿童消化系统疾病用药问题,开发安全有效的口服中药复方在临床研究方面具有广阔的前景。因此,本研究拟搜集、整理口服剂型中成药治疗小儿消化系统疾病的处方,采用数据挖掘的方法针对具体证型及症状分析市场现有该类药物的配伍规律,挖掘核心处方,为小儿消化系统疾病中成药新药研发提供思路和方法。

1 材料和方法

1.1 资料收集

中国药品注册数据库(Chinese Marketed Drugs Database, <https://www.drugfuture.com>)涵盖了目前为止所有在国内批准注册上市的药品,可查询国家食品药品监督管理局批准的所有国产药品和进口药品数据。本研究通过整理和挖掘中国药品注册数据库建库至2022年3月1日的数据库中儿科消化系统疾病的口服剂型中成药信息,建立规范化数据库。以“小儿”“儿童”“脾”“胃”“肠”“吐”“泻”“积”“食”“痛”“和”“通”“健”为关键词进行检索,收集说明书中明确记载治疗儿童消化系统疾病的已上市口服中成药,收集信息包括中成药的名称、生产企业、批准时间、主治、功效、组成、剂型、注意事项等。

1.2 处方筛选标准

纳入标准:主治病症中含有小儿消化系统疾病相关中西医病名的所有口服中成药处方。

排除标准:①名称重复且药物组成相同的处方;②剂型不同但药物组成相同的处方,如小儿健胃糖浆与小儿健胃咀嚼片;③表述含消化系统症状,但首要治疗其他系统疾病的处方,包括小儿奇应丸、小儿百效片、小儿至宝丸、小儿百寿丸、小儿保安丸、小儿七珍丸、小儿葫芦散;④小儿肝炎颗粒因主治、成分等较特殊而排除;⑤注销或撤销批准文号的药品。

1.3 中成药信息规范化

对收集到的所有小儿消化系统疾病的口服中成药信息进行中药名称规范化处理,以《中药学》^[5]和《中国药典》^[6]为标准,如藿香统一为广藿香。删除炒、炙、蜜制等炮制方法,去除含有西药成分的中成药,如盐酸小檗碱。依据《中医临床诊疗术语》^[7]将主治中提及的证型、症状规范化处理,如脾胃不和证、脾失健运证统一为脾失健运证,除明确标示脾胃阴虚证之外的脾胃虚弱证、脾虚证、脾胃气虚证统一为脾胃气虚证,脾胃受寒证及除明确标示湿热之外的湿邪困脾证、湿困脾土证统一为寒湿证;饮食停滞、乳食积滞、伤食伤乳、宿食不消、食滞、积食饱胀、食积统一为食积,食欲不振、食欲减退、不思饮食、厌食、纳少统一为纳少,泄泻、久泻、水泻、大便稀薄、大便次数增多、腹泻统一为腹泻。

1.4 数据库建立及整理

中成药筛选、数据提取由3名研究者共同完成,对有疑问者讨论后决定。采用Excel 2003建立小儿消化系统疾病口服中成药数据库,收集中成药的药品名称、主治、功效、组成等信息。

1.5 数据挖掘

1.5.1 描述性分析 采用Excel 2003进行统计,分析治疗小儿消化系统疾病口服中成药的剂型、各药品包含的中药数量;计算口服中成药单味药使用频率,单味药用药次数占总用药次数的比例;提取药品说明书主治中记录的证型及症状,进行统计分析。

1.5.2 关联规则分析 采用IBM SPSS Modeler 18.0 Premium软件,以Apriori模块进行关联规则分析,挖掘小儿消化系统疾病主要证型及主要症状的复方药物配伍规律,设置最小支持度为15%,置信度为80%,最大前项数为5。

1.5.3 核心处方挖掘 筛选出主要证型、症状,对其处方进行药物频率统计,分别得出频率 $\geq 2\%$ 的高频药物,结合药物关联分析结果得出的置信度排名前10的药物配伍,取高频药物与置信度高的药物配伍交集作为核心处方。

2 结果与分析

2.1 描述性结果分析

共纳入52种中成药,含单味药136味。共涉及剂型种类13种,包括片剂、散剂、颗粒剂、糖浆剂、丸剂、合剂、煎膏剂,涉及2个品种剂型的药品有10种,如小儿健胃糖浆、小儿健胃咀嚼片;涉及3个品种剂型的药品有3种,如小儿健脾丸、小儿健脾散、小儿健脾口服液;涉及4个品种剂型的药品有1种,为小儿腹泻宁糖浆、小儿腹泻宁泡腾颗粒、小儿腹泻宁合剂、小儿腹泻宁袋泡茶。治疗小儿消化系统疾病中成药药物类别共有4种,以健脾和胃剂、止泻剂、消导剂为主,见表1。

表 1 治疗小儿消化系统疾病中成药类别分析

Tab 1 Category of Chinese patent drugs for pediatric digestive system diseases

药品类别	品种数	举例
健脾和胃剂	19	小儿健脾开胃合剂, 小儿启脾片, 小儿参苓健脾丸
止泻剂	15	小儿腹泻散, 小儿泄痢片, 小儿泻速停颗粒
消导剂	14	小儿复方鸡内金散, 小儿消积丸, 小儿磨积片
养阴清热剂	4	小儿喜食糖浆, 小儿健胃咀嚼片, 小儿六味增食膏

52 种中成药中最少含有 2 味药物, 最多含有 27 味药物, 78% 的中成药含有 4 ~ 14 味药物, 平均含有 9 味中药。治疗小儿消化系统疾病中成药单味药使用频次 ≥ 10 的中药有 9 味, 分别是山楂 27 次 (5.76%)、茯苓 23 次 (4.90%)、陈皮 20 次 (4.26%)、麦芽 19 次 (4.05%)、白术 19 次 (4.05%)、神曲 18 次 (3.84%)、甘草 18 次 (3.84%)、山药 17 次 (3.62%)、槟榔 13 次 (2.78%)。

2.2 主要证型、症状及高频药物分析

根据 52 种治疗小儿消化系统疾病中成药说明书内容, 提取主治中对证型及症状的描述, 共有 6 种证型 (见图 1), 包括脾失健运证、脾胃气虚证、寒湿证等, 其中出现脾失健运证 21 次、脾胃气虚证 12 次、寒湿证 9 次, 其余症状出现次数少于 4 次, 因数据量过少无法进行关联分析, 因此只对脾失健运证、脾胃气虚证、寒湿证进行处方挖掘。52 种中成药说明书中均对症状进行了描述, 共有 16 种症状 (见图 2), 包括食积、纳少、腹泻、腹胀、呕吐、面色少华、腹痛等, 其中食积、纳少、腹泻 3 个症状出现频次分别为 29、28、27, 故对以上 3 个症状进行处方挖掘。3 种证型、3 个症状对应频率 $\geq 2\%$ 的中药见表 2 ~ 3。

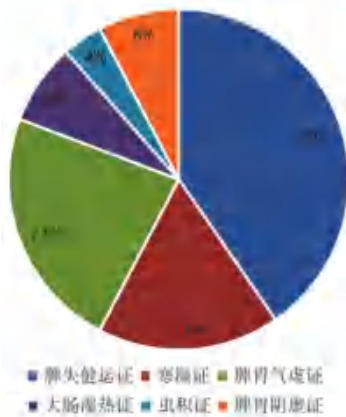


图 1 小儿消化系统疾病证型类别频率统计
Fig 1 Frequency statistics of syndrome types of pediatric digestive system diseases

2.3 药物之间的相关度分析

按照置信度降序排序, 置信度相同时, 按照支持度降序排序, 列举排名靠前的配伍组合 (见表 4 ~ 5)。结果显示治疗脾失健运证的核心药物为山

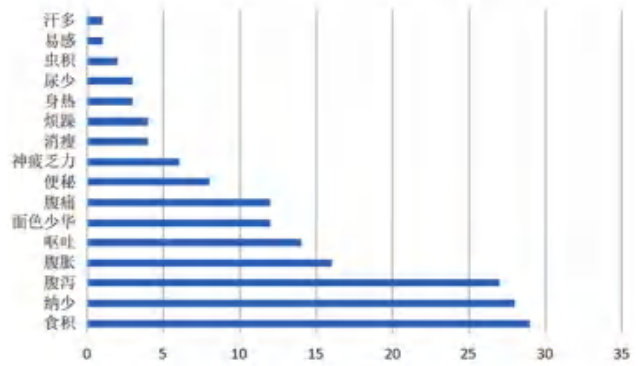


图 2 小儿消化系统疾病症状类别频数统计
Fig 2 Statistics of symptom categories and frequency of pediatric digestive system diseases

表 2 治疗小儿消化系统疾病主要证型的高频药物分析
Tab 2 High frequency drug of main pattern types of pediatric digestive system diseases

脾失健运证		脾胃气虚证		寒湿证	
药物	频数 / n (%)	药物	频数 / n (%)	药物	频数 / n (%)
山楂	15 (8.3)	白术	9 (8.8)	茯苓	5 (6.9)
麦芽	13 (7.2)	山药	8 (7.8)	肉豆蔻	4 (5.5)
神曲	13 (7.2)	茯苓	8 (7.8)	砂仁	4 (5.5)
槟榔	8 (4.4)	山楂	6 (5.9)	陈皮	3 (4.1)
陈皮	7 (3.9)	陈皮	6 (5.9)	白术	3 (4.1)
枳壳	6 (3.3)	莲子	5 (4.9)	厚朴	3 (4.1)
大黄	6 (3.3)	甘草	5 (4.9)	甘草	3 (4.1)
甘草	5 (2.8)	人参	4 (3.9)	苍术	3 (4.1)
鸡内金	5 (2.8)	神曲	4 (3.9)	丁香	2 (2.7)
山药	4 (2.2)	麦芽	4 (3.9)	赤石脂	2 (2.7)
白术	4 (2.2)	砂仁	3 (2.9)	石榴皮	2 (2.7)
		芡实	3 (2.9)	寒水石	2 (2.7)
		党参	3 (2.9)	广藿香	2 (2.7)
		黄芪	2 (2.0)	半夏	2 (2.7)
		白扁豆	2 (2.0)	神曲	2 (2.7)
		木香	2 (2.0)	车前子	2 (2.7)
		罂粟壳	2 (2.0)		

楂、麦芽、神曲、槟榔、鸡内金、白术、枳壳、山药、茯苓; 治疗脾胃气虚证的核心药物为人参、白术、茯苓、莲子、麦芽、山楂、甘草; 治疗寒湿证的核心药物为陈皮、茯苓、厚朴、肉豆蔻、半夏、白术、广藿香、神曲、石榴皮、赤石脂。治疗食积症状的核心药物为山楂、神曲、麦芽、槟榔、白术、甘草、陈皮、茯苓; 治疗纳少症状的核心药物为山楂、神曲、麦芽、白术、陈皮、茯苓; 治疗腹泻的核心药物为茯苓、甘草、白术、黄芩、陈皮、神曲。

2.4 小儿消化系统疾病主要证型 / 症状核心处方分析

根据治疗小儿消化系统疾病中成药中高频药物及药物配伍的相关程度, 挖掘脾失健运证、脾胃气虚证、寒湿证以及食积、纳少、腹泻处方, 并将结果可视化 (见图 3 ~ 4)。通过比较可知, 山楂、麦

表 3 治疗小儿消化系统疾病主要症状的高频药物分析

Tab 3 High frequency drug of main syndrome types of pediatric digestive system diseases

digestive system diseases					
食积		纳少		腹泻	
药物	频数 /n (%)	药物	频数 /n (%)	药物	频数 /n (%)
山楂	20 (7.49)	山楂	17 (6.69)	茯苓	17 (7.00)
麦芽	15 (5.62)	茯苓	13 (5.12)	白术	13 (5.35)
神曲	14 (5.24)	山药	13 (5.12)	黄芩	11 (4.53)
陈皮	14 (5.24)	麦芽	12 (4.72)	神曲	10 (4.12)
茯苓	12 (4.49)	陈皮	12 (4.72)	甘草	9 (3.70)
槟榔	10 (3.75)	枳壳	12 (4.72)	陈皮	9 (3.70)
甘草	10 (3.75)	白术	11 (4.33)	山楂	8 (3.29)
白术	10 (3.75)	神曲	10 (3.94)	山药	6 (2.47)
山药	10 (3.75)	槟榔	9 (3.54)	麦芽	6 (2.47)
鸡内金	7 (2.62)	鸡内金	5 (1.97)	肉豆蔻	5 (2.06)
		莲子	5 (1.97)	厚朴	5 (2.06)
				乌梅	5 (2.06)
				苍术	5 (2.06)

表 4 主要证型药物配伍关联分析

Tab 4 Correlation of drug compatibility of main pattern types

证型	药物	支持度 /%	置信度 /%	
脾失健运证	山楂→枳壳	63.16	100	
	山楂→槟榔	47.37	100	
	山楂→山药	31.58	100	
	神曲→茯苓、白术	26.32	100	
	茯苓→白术、神曲	26.32	100	
	白术→茯苓、神曲	26.32	100	
	槟榔→麦芽	26.32	100	
	枳壳→麦芽	21.05	100	
	槟榔→神曲	21.05	100	
	麦芽→槟榔	21.05	100	
	鸡内金→麦芽	21.05	100	
	脾胃气虚证	人参→白术	45.45	100
		白术→莲子	45.45	100
白术→麦芽		45.45	100	
山楂→茯苓、莲子		45.45	100	
茯苓→莲子、山楂		45.45	100	
莲子→山楂、茯苓		45.45	100	
茯苓→山楂、甘草		36.36	100	
山楂→甘草、茯苓		36.36	100	
甘草→茯苓、山楂		36.36	100	
寒湿证		白术→半夏、陈皮	33.33	100
		半夏→陈皮、白术	33.33	100
		陈皮→半夏、白术	33.33	100
		厚朴→神曲	33.33	100
		半夏→茯苓	33.33	100
		肉豆蔻→石榴皮	22.22	100
		赤石脂→肉豆蔻	22.22	100
		伏龙肝→肉豆蔻	22.22	100
	厚朴→广藿香	22.22	100	
茯苓→广藿香	22.22	100		

芽、神曲、槟榔、白术、茯苓同时在脾失健运证、食积处方中出现，山楂、麦芽、神曲、白术、茯苓

表 5 主要症状药物配伍关联分析

Tab 5 Correlation of drug compatibility of main syndrome types

证型	药物	支持度 /%	置信度 /%	
食积	山楂→茯苓	56	100	
	山楂→白术	44	100	
	山楂→甘草	36	100	
	山楂→槟榔	32	100	
	陈皮→麦芽、茯苓	32	100	
	茯苓→麦芽、陈皮	32	100	
	麦芽→茯苓、陈皮	32	100	
	陈皮→茯苓、神曲	28	100	
	神曲→茯苓、陈皮	28	100	
	茯苓→陈皮、神曲	28	100	
	纳少	山楂→麦芽、神曲	17.86	100
		麦芽→山楂、神曲	17.86	100
		神曲→麦芽、山楂	17.86	100
山楂→陈皮		42.86	91.67	
麦芽→神曲		35.71	90	
麦芽→陈皮		35.71	90	
陈皮→茯苓、神曲		32.14	88.89	
茯苓→甘草、山楂		32.14	88.89	
山楂→甘草、茯苓		32.14	88.89	
甘草→山楂、茯苓		32.14	88.89	
腹泻	白术→茯苓	25	85.71	
	白术→山楂	25	85.71	
	白术→黄芩	33.33	100	
	白术→茯苓	25.93	100	
	甘草→黄芩	25.93	100	
	甘草→茯苓	22.22	100	
	陈皮→黄芩	22.22	100	
	陈皮→茯苓	22.22	100	
	黄芩→神曲	22.22	100	

同时在脾失健运证、食积、纳少处方中出现，白术、茯苓同时在脾失健运证、脾胃气虚证、寒湿证、食积、纳少、腹泻处方中出现，白术、陈皮、茯苓、神曲同时在食积、纳少、腹泻处方中出现。鸡内金、枳壳是脾失健运证处方单独具有的药物，人参、莲子是脾胃气虚处方单独具有的药物，厚朴、肉豆蔻、半夏、广藿香、石榴皮是寒湿证处方单独具有的药物；黄芩是腹泻处方单独具有的药物。

3 讨论

3.1 小儿消化系统疾病证型 / 症状分析

小儿脾常不足，易因外感或内伤发病，核心病位在脾、胃、大肠，由于体质以及感邪的差异，出现的证型也不相同：小儿脾常不足，饮食不知自节，超过脾胃运化功能，则出现脾失健运证；脾胃运化失常，日久伤津耗气，则出现脾气虚弱证、脾胃阴虚证；脾病不能运化水湿，与食积化热相合，湿热郁阻中焦，若感外邪，湿热留滞肠腑，则出现大肠湿热证；嗜食生冷或过用寒凉药物，脾阳受损，或中脏虚寒，寒湿自生，则



图 3 主要证型核心处方网络展示

Fig 3 Network display of core prescriptions of main pattern types

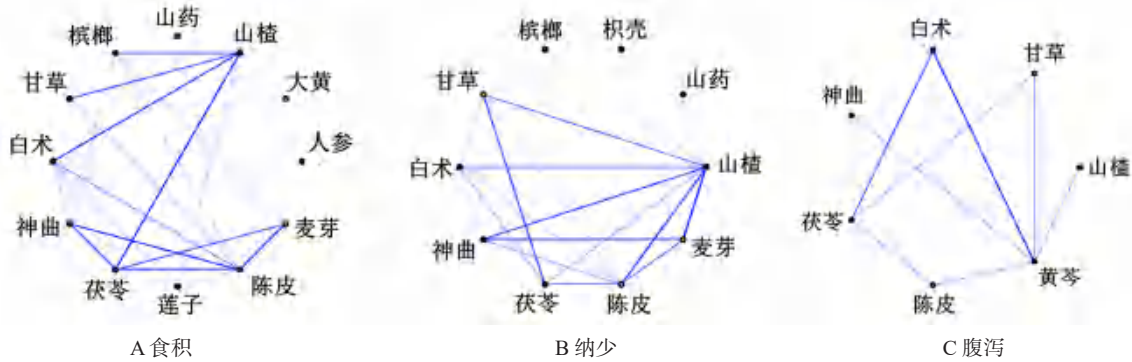


图 4 主要症状核心处方网络展示

Fig 4 Network display of core prescriptions of main syndrome types

出现寒湿证；饮食不洁，虫邪留稽，则出现虫积证。小儿消化系统疾病的临床治疗在辨证的基础上，常采取对症治疗的方法。小儿消化系统疾病症状多样，食积、纳少、腹泻是其主要症状。脾主运化，小儿脾常不足，饮食不节，消化不良，出现食积症状；胃主受纳，小儿胃气未充，或食积气滞，胃降受阻，出现纳少症状；脾虚不能运化水谷，或饮食寒凉，或感时令湿热，大肠传导失司，出现腹泻症状。

3.2 高频药物功效及配伍分析

从频数统计及关联分析发现治疗小儿消化系统疾病脾失健运证处方以消食药为主，兼以理气药、补虚药，药物配伍以山楂-枳壳，山楂-槟榔，山楂-山药，神曲-茯苓、白术等为主。脾胃气虚证处方以补虚药为主，兼以化湿药、消食药，药物配伍以人参-白术，白术-莲子，白术-麦芽，山楂-茯苓、莲子等为主。寒湿证处方以化湿药为主，兼以温里药、收涩药，药物配伍以白术-半夏、陈皮，厚朴-神曲伏龙肝半夏-茯苓伏龙肝肉豆蔻-石榴皮，伏龙肝-肉豆蔻、赤石脂-肉豆蔻等为主。食积处方以消食药为主，兼以理气药，药物配伍以山楂-茯苓，山楂-甘草，山楂-槟榔，陈皮-麦芽、茯苓，陈皮-茯苓、神曲等为主；纳少处方以消食药为主，兼以补虚药，

药物配伍以山楂-麦芽，神曲，山楂-陈皮，麦芽-陈皮，陈皮-茯苓，神曲，白术-茯苓，白术-山楂等配伍为主。腹泻处方以化湿药、理气药为主，药物配伍以白术-黄芩，白术-茯苓，甘草-黄芩，甘草-茯苓，陈皮-黄芩，陈皮-茯苓等为主。

高频药物中，山楂消食、健胃、行气，用于肉食积滞、胃脘胀满、腹痛泄泻等；麦芽行气消食、健脾开胃，用于食积不化、脘腹胀满、脾虚食少等；神曲消食和胃，用于面食积滞等；现代药理研究显示此三者可以刺激消化系统的分泌、促进代谢^[8]。槟榔消积、行气，用于食积虫积、腹胀腹痛等，可促进唾液分泌和胃肠道蠕动^[9]；茯苓利水、渗湿、健脾，用于脾虚食少，泄泻等，可干预肠道菌群，调节消化相关通路^[10]；陈皮理气、健脾、燥湿，用于脘腹胀满、食少吐泻等，可促进增加胃酸分泌，增强胃蛋白酶活性，从而增强消化功能^[11]；白术补脾、益胃、燥湿、和中，用于脾胃气弱、不思饮食、倦怠少气等，可调节胃泌素、血管活性肠肽等因子，进而改善肠道功能^[12]。

3.3 核心处方的分析 小儿消化系统疾病可因外感、内伤所致，治疗应在辨证的基础上结合患儿症状进行治疗，强调祛邪扶正并施。脾脏是小儿消化系统疾病病位的重中之重，故诸证治疗均从脾脏入

手；脾失健运，食积气滞，治疗当从运脾立法，核心处方以消食、除满、行气为主，脾胃气虚，食滞湿生，治疗当从健脾立法，核心处方以益气、化湿、消食为主；寒湿伤阳，困脾作泄，治疗当从醒脾立法，核心处方以温中、化湿、固涩为主。脾为气机升降之枢纽，脾病则气机不行，故诸症处方均含理气之品，如陈皮等。食积的核心处方以健脾消食为主，重用消食药，如槟榔等；纳少的核心处方以健脾消食为主，重用健脾药，如白术等；腹泻的核心处方在健脾消食的基础上，重用燥湿药，如黄芩等。在证-症关系方面，因脾胃运化失常易致食积不化，食滞胃肠又可进一步阻碍运化，故脾失健运证处方与食积证处方有较多相似之处；因脾胃气虚易致纳食不馨，纳少使充养无源又可进一步加重脾胃虚弱，故脾胃气虚证处方与纳少症处方有较多相似之处；无湿不作泄，故寒湿证处方与腹泻症处方有一定相似之处，其中寒湿证处方偏于温中收涩，腹泻症处方偏于燥湿理气，寒热泄泻均可考虑使用。提示在临床治疗过程中，应在辨证明确的基础上，结合症状选择合适的中成药。

在核心处方中，山楂、麦芽、神曲、槟榔炒用或焦用，为“焦四仙”的组成成分，功擅消食导滞，焦香气味作用于下丘脑摄食和能量代谢调节中枢，可调节食积动物体重，使其摄食和食物利用率恢复正常^[8]。人参、茯苓、陈皮、白术、山药、莲子、甘草是参苓白术散的组成成分，可益气健脾，渗湿止泻，通过调节炎症因子水平对胃肠道运动具有双向调节作用，可改善胃肠功能，纠正营养不良-微炎症状态^[13-14]。广藿香、茯苓、陈皮、甘草、厚朴、白术、半夏、神曲为藿香正气散的组成成分，可以化湿、理气、和中，可通过干预肠道黏膜稳态和菌群稳态减轻寒湿困脾型泄泻^[15-18]，通过参与多种生物过程治疗急性肠胃炎^[19]。此外，筛选出的核心处方多佐以甘草，考虑甘草具有调节胃肠道功能、提高机体机能的作用^[20]，由于筛选出的处方用于小儿，甘草还能缓和药性、调和苦味，因而使用频率较高。

4 总结

本研究通过数据挖掘的方法，筛选出口服中成药治疗小儿消化系统疾病主要证型及症状的高频药物和相关配伍，总结口服剂型中成药治疗小儿消化系统疾病的用药规律及特点，挖掘其核心处方，以期对儿科消化系统中成药的临床应用及新药研发提供参考。

参考文献

- [1] 郑伟, 黄子嫣, 江逊, 等. 第十一届全国儿童消化系统疾病学术会议会议纪要[J]. 中华儿科杂志, 2021, 59(2): 154-155.
- [2] 范倩倩, 宋红梅, 朱珠. 常用消化系统药品儿童适宜剂型和用药信息的调查与思考[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(14): 1231-1234, 1236.
- [3] 赵紫楠, 陈丽, 金鹏飞, 等. 益生菌的临床研究进展[J]. 中国药业, 2021, 30(8): 96-102.
- [4] 章德林, 汤丹丰, 郑琴, 等. 具有抗感染作用的中药分类研究[J]. 中草药, 2015, 46(24): 3771-3778.
- [5] 高学敏. 中药学[M]. 2版. 北京: 中国中医药出版社, 2007.
- [6] 中国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020.
- [7] 国家标准《中医临床诊疗术语》. 湖南中医药大学, 2009.
- [8] 徐瑶. “焦三仙”炒焦增强消食导滞的“焦香气味”物质及其协同增效作用机理研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2018.
- [9] 易攀, 汤嫣然, 周芳, 等. 槟榔的化学成分和药理活性研究进展[J]. 中草药, 2019, 50(10): 2498-2504.
- [10] 张丹丹, 叶晓川. 基于肠道菌群和代谢组学探讨茯苓水提物健脾的作用机制[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(7): 3994-4001.
- [11] 梅全喜, 林慧, 宋叶, 等. 广陈皮的药理作用与临床研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析, 2019, 19(8): 899-902.
- [12] 俞忠明, 郑纯威, 施佳君, 等. 白术药材-饮片-配方颗粒主要成分量值传递规律及对脾虚模型大鼠肠道调节作用的研究[J]. 浙江中医杂志, 2021, 56(11): 787-789.
- [13] 孙洋, 梅伦方. 山药药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2013, 9(3): 50-51.
- [14] 卢广英, 邢训颜, 王嘉昀, 等. 经典名方参苓白术散的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(19): 5171-5181.
- [15] 魏巍, 张明发, 沈雅琴. 厚朴酚及和厚朴酚的胃肠道药理作用及其机制的研究进展[J]. 药物评价研究, 2022, 45(9): 1914-1921.
- [16] 张明发, 沈雅琴. 半夏提取物对呼吸和消化系统药理作用的研究进展[J]. 抗感染药学, 2017, 14(8): 1457-1462.
- [17] 徐雯, 吴艳清, 丁浩然, 等. 广藿香的药理作用及机制研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(10): 103-106.
- [18] 张晨阳. 从肠黏膜菌群-氨基酸代谢研究藿香正气散干预寒湿困脾型泄泻的微生态机制[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2022.
- [19] 李慧. 藿香正气散证治规律及“异病同治”的网络药理学研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [20] 王波, 王丽, 刘晓峰, 等. 中药甘草成分和药理作用及其现代临床应用的研究进展[J]. 中国医药, 2022, 17(2): 316-320.

(收稿日期: 2022-10-17; 修回日期: 2022-11-17)

华法林 - 胺碘酮药物相互作用与肾功能关系的研究

杨华蓉, 周伯庭* (中南大学湘雅医院药学部, 长沙 410008)

摘要: **目的** 分析华法林与胺碘酮药物相互作用与肾功能的关系, 探索华法林与胺碘酮药物相互作用异质性的来源。 **方法** 回顾性收集华法林和胺碘酮合并用药的患者纳入试验组, 收集仅使用华法林未合并使用胺碘酮的患者纳入对照组。根据肾功能水平进行分层分析, 对抗凝情况及华法林敏感性指数 (WSI) 进行比较。 **结果** 抗凝情况的分析结果显示, 从第三日起试验组的凝血酶原时间国际标准化比值 (INR) 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。根据肾功能水平分层分析的结果显示, 除肌酐清除率为 $0 \sim 30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的亚组外, 其余亚组中试验组的 INR 在治疗范围内的时间百分比 (TTR) 平均水平及 $TTR > 0$ 的患者比例均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。对 WSI 进行分析, 整体研究结果显示, 试验组的 WSI 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。根据肾功能水平分层分析, 不同肌酐清除率水平之间 WSI 存在显著差异 ($P < 0.001$)。除肌酐清除率为 $0 \sim 30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 亚组外, 其余亚组中试验组的 WSI 显著高于对照组, 试验组 WSI 比对照组提高 $16\% \sim 31\%$ 。 **结论** 华法林与胺碘酮之间的药物相互作用与肾功能有关, 本研究为临床合理用药提供了可靠的依据。

关键词: 华法林; 胺碘酮; 药物相互作用; 肾功能; 华法林敏感性指数

中图分类号: R969.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981(2023)02-0537-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.042

Warfarin-amiodarone drug interaction and renal function

YANG Hua-rong, ZHOU Bo-ting* (*Department of Pharmacy, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008*)

Abstract: Objective To analyze the relationship between warfarin and amiodarone drug interactions and renal function and to determine the sources of heterogeneity in warfarin and amiodarone drug interaction. **Methods** Patients receiving a combination of warfarin and amiodarone were retrospectively studied and served as the test group, while patients receiving warfarin only (without combination of amiodarone) were taken as the control group. Stratified analysis was performed according to the level of renal function to compare the anticoagulation profile and warfarin sensitivity index (WSI). **Results** Analysis of anticoagulation showed that the international normalized ratio (INR) was significantly higher in the test group than that in the control group from the third day onwards ($P < 0.05$). The stratified analysis according to the level of renal function showed that the mean time in therapeutic range (TTR) and the proportion of patients with TTR greater than 0 was significantly higher in the test group than in the control group ($P < 0.05$), except for the subgroup with creatinine clearance rate of $0 \sim 30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The test group had a significantly higher WSI than that of the control group ($P < 0.05$). Stratified comparative analysis based on the level of renal function showed significant difference in WSI among different creatinine clearance rate levels ($P < 0.001$). Except for the subgroup with creatinine clearance rate of $0 \sim 30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, the WSI in the test group was significantly higher than that of the control group, $16\% \sim 31\%$ higher than that of the control group. **Conclusion** The drug interaction between warfarin and amiodarone is related to the renal function and this study provides a reliable basis for rational clinical drug use.

Key words: warfarin; amiodarone; drug interaction; renal function; warfarin sensitivity index

作者简介: 杨华蓉, 女, 硕士研究生, 主要从事临床药学研究, email: yanghuarong0408@163.com * 通信作者: 周伯庭, 男, 主任药师, 主要从事临床药学研究, email: botingzhou0918@126.com

华法林是一种香豆素类维生素 K 拮抗剂, 常用于预防和治疗血栓性疾病。胺碘酮是一种临床应用广泛的广谱抗心律失常药物, 常用于控制室性或室上性心律失常以及行射频消融术后患者的心律^[1-2]。胺碘酮是华法林代谢酶肝细胞色素 P450 2C9 的抑制剂, 以非立体选择的方式抑制华法林的羟化, 可增强华法林抗凝作用^[3-5]。两种药物常合并使用, 易导致严重的出血^[6]。

在接受抗凝治疗的患者中有 30% ~ 50% 的患者同时患有慢性肾脏疾病^[7-9]。慢性肾脏疾病不仅会影响经肾脏排泄的药物的清除, 还会改变肝细胞色素 P450 的活性、药物转运蛋白的表达以及药物的血浆蛋白结合率^[10-12]。这无疑增加了华法林和胺碘酮药物相互作用的不可预见性。近年来已经有不少根据临床特征、遗传因素和药物因素的模型来预测华法林的剂量^[13-15], 但是在胺碘酮与华法林合并使用初期, 尽管已经减少了华法林剂量且增加了国际标准化比值 (INR) 监测频率, 仍然有约 30% 的患者出现超过治疗范围的 INR^[16]。这提示临床需要进一步探索华法林和胺碘酮相互作用异质性的来源。虽然过往的研究已经表明肾功能会影响华法林的代谢, 但是目前很少有研究论证肾功能是否会影响华法林和胺碘酮药物相互作用。本研究的目的是考察肾功能对华法林和胺碘酮药物相互作用的影响, 并探索异质性的来源, 帮助临床更合理的用药。

1 方法

1.1 研究设计和研究对象

本研究为回顾性队列研究, 收集了 2017 年至 2020 年在中南大学湘雅医院行心脏瓣膜置换手术的患者。华法林合并使用胺碘酮的患者纳入试验组, 使用华法林但不合并使用胺碘酮的患者纳入对照组, 拟按照 1:5 的比例纳入试验组和对照组患者, 比较试验组和对照组之间抗凝情况和华法林敏感性指数 (warfarin sensitivity index, WSI) 的差异。WSI 是一个剂量化 INR 指标, 在各种研究中常被用来反映个体对华法林的总体敏感性^[17-20]。

1.2 用药情况

① 对于试验组的患者, 无论华法林与胺碘酮使用的先后顺序如何, 从华法林和胺碘酮开始合并用药之日起该患者即纳入研究; 对照组患者从服用华法林的第一日起即纳入研究。② 患者使用规格 2.5 mg/片或规格 3.0 mg/片的华法林钠片均可; 由于华法林的药效存在显著的个体差异, 因此无固定给药剂量, 且 WSI 已经能够反映剂量对 INR 的影响。③ 试验组患者使用盐酸胺碘酮注射

液或盐酸胺碘酮片均可, 无论使用何种剂量的胺碘酮都会对肝细胞色素 P450 2C9 产生一定程度的抑制, 因此本研究不规定胺碘酮的使用剂量。

1.3 研究纳入和排除标准

纳入标准: ① 患者年龄 ≥ 18 岁; ② 患者诊断为心脏瓣膜病且进行了心脏瓣膜置换手术, 术后服用华法林; ③ 合并使用胺碘酮的患者纳入试验组, 未合并使用胺碘酮的患者纳入对照组。

排除标准: ① 有严重凝血功能障碍疾病的患者; ② 有严重肝功能不全的患者; ③ 有恶性肿瘤或严重消耗性疾病的患者; ④ 伴有严重心力衰竭的患者; ⑤ 存在使用华法林相关禁忌的患者; ⑥ 使用了可能会影响 INR 的直接凝血酶抑制剂, 如阿加曲班、比伐卢定的患者。

1.4 数据收集

本研究经过中南大学湘雅医院伦理委员会批准 (伦理批号为: 202110193-2)。通过电子病历系统调取患者的信息, 包括: ① 基本人口学特征如年龄、性别、体质量、身高; ② 患者的血肌酐检测结果: 本研究中肾功能水平使用肌酐清除率表示, 根据肌酐清除率的计算公式使用血肌酐检测结果换算而得到, 然后根据计算所得结果进行肌酐清除率分层, 分为 $0 \sim 30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $31 \sim 60 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $61 \sim 90 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $> 90 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 四层; ③ 患者的凝血功能检测结果; ④ 患者服用的华法林剂量; ⑤ 合并疾病情况, 如冠心病、糖尿病和高血压等。

1.5 评价指标

1.5.1 抗凝情况分析 本研究对患者开始服用华法林后的前 7 d 抗凝情况进行分析。然后将所有患者根据肾功能水平进行分层, 评估两组之间的抗凝情况的差异。抗凝情况评价指标包括: ① INR 随时间的变化情况; ② 抗凝治疗达标率, 定义为 INR 在治疗范围内的时间百分比 (time in therapeutic range, TTR); ③ TTR > 0 的患者的比例。

1.5.2 WSI 分析 本研究对患者开始服用华法林后的前 7 d 的 WSI 进行分析比较。然后将所有患者根据肾功能水平进行分层, 评估两组之间 WSI 的差异。在本研究中, WSI 定义为 INR 测量时间的前 3 d 内的华法林剂量对 INR 的影响, 第 n 日的 WSI 的计算公式为: $WSI(n) = INR(n) / \text{华法林平均剂量}$, 华法林平均剂量定义为第 n 日的前 3 d 给予华法林剂量的平均值。本研究中 WSI 从患者被纳入研究的第 3 日开始计算, 第 3 日的 WSI 是前 2 d 给药剂量对 INR 的影响, 因此计算第 3 日的 WSI 时所使用的华法林平均剂量为前 2 d 给药剂量的平均值。

1.6 数据分析

统计分析采用 IBM SPSS 26.0 进行。对所有的变量进行描述性分析和正态性检验。符合正态分布的连续变量用平均值 (95%CI) 表示, 非正态分布的连续变量用中位数 (四分位数间距) 表示。分类变量采用频数 (百分比) 表示。两组连续变量的比较采用 *t* 检验或 *U* 检验, 多组连续变量的比较采用单因素方差分析。采用皮尔逊卡方检验或 Fisher 精确检验来比较分类变量。采用协变量方差分析方法比较不同肌酐清除率水平对 WSI 的影响。WSI 采用经对数转换后的值进行比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

通过电子病历系统提取了 2017 ~ 2020 年所有进行心脏瓣膜置换手术的患者, 并根据纳入和排除标准对所有患者进行筛选。本研究最终共纳入 1760 位患者, 其中试验组 300 位, 对照组 1460 位。两组患者的基本信息如表 1 所示, 两组患者之间的基本临床特征除性别比例外均无显著差异。

2.2 抗凝情况分析结果

试验组和对照组患者 7 d 内的 INR 及其变化趋势如图 1 所示。第 1 日和第 2 日两组的 INR 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。由于胺碘酮对华法林代谢的抑制, 从第 3 日开始试验组的 INR 均显著高于对照组。根据肌酐清除率水平进行分层, 比较了对照组和试验组 TTR 的差异如图 2 所示, 在肌酐清除率为 $0 \sim 30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 亚组中, 对照组和试验组 TTR > 0 的患者的比例没有显著差异 ($P = 0.513$)。在肌酐清除率为 $31 \sim 60 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $61 \sim 90 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $> 90 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 三个亚组中试验组 TTR > 0 的患者比例显著高于对照组。同时无论是对照组还是试验组, 随着肌酐清除率的升高, TTR > 0 的患者比例均呈下降的趋势。对两组 TTR 平均水平的比较结果如图 3 所示, 肌酐清除率 $0 \sim 30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 亚组中, 对照组和试验组之间的 TTR 没有显著差异 ($P = 0.992$), 在 $31 \sim 60 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $61 \sim 90 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $> 90 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 三个亚组中, 两组之间的 TTR 存在显著差异。

2.3 华法林敏感性指数分析结果

对试验组和对照组进行分析, 比较两组 WSI 随时间的变化趋势及其差异, 结果如图 4 所示。从第 3 日至第 7 日, 无论是对照组还是试验组, WSI 均呈上升趋势, 且试验组的 WSI 均显著高于对照组。不同肌酐清除率水平的 WSI 的趋势如

表 1 患者的基本临床特征

Tab 1 Basic clinical characteristics of the patient

临床特征	试验组 (<i>n</i> = 300)	对照组 (<i>n</i> = 1460)	<i>P</i> 值
年龄 / 岁 [中位数 (IQR)]	53.8 (52.7 ~ 54.9)	53.0 (52.4 ~ 53.5)	0.17
性别 [<i>n</i> (%)]			0.01
男	120 (40)	745 (51)	
女	180 (60)	715 (49)	
体质量 [中位数 (IQR)]/kg	58.2 (57.1 ~ 59.4)	58.3 (57.7 ~ 58.9)	0.92
体质量指数 [中位数 (IQR)]	22.9 (22.2 ~ 23.6)	22.4 (22.1 ~ 22.7)	0.13
冠心病 [<i>n</i> (%)]	54 (18)	218 (14.9)	0.18
糖尿病 [<i>n</i> (%)]	19 (6.3)	70 (4.8)	0.27
高血压 [<i>n</i> (%)]	44 (14.7)	271 (18.6)	0.11
高脂血症 [<i>n</i> (%)]	12 (4.0)	62 (4.2)	0.85
低蛋白血症 [<i>n</i> (%)]	9 (3.0)	71 (4.9)	0.16
血栓形成 [<i>n</i> (%)]	26 (8.7)	155 (10.6)	0.31
肝功能不全 [<i>n</i> (%)]	3 (1.0)	14 (1.0)	0.95
心功能分级 [<i>n</i> (%)]			0.12
I	0 (0.0)	19 (1.3)	
II	36 (12)	212 (14.5)	
III	185 (61.7)	827 (56.6)	
IV	10 (3.3)	61 (4.2)	
未知	69 (23)	341 (23.4)	
肌酐清除率分层 [<i>n</i> (%)]			0.14
$0 \sim 30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$	20 (6.7)	73 (5.0)	
$31 \sim 60 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$	112 (37.3)	486 (33.3)	
$61 \sim 90 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$	130 (43.3)	652 (44.7)	
$> 90 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$	38 (12.7)	249 (17.1)	

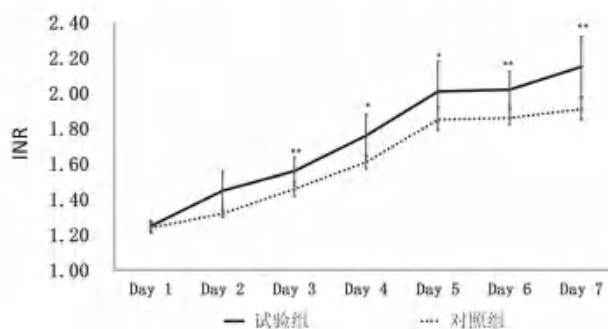


图 1 两组之间 INR 随时间变化情况 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$)
Fig 1 Change in INR over time between the two groups (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$)

图 5 所示。综上所述, 随着肌酐清除率的下降, WSI 呈升高的趋势, 不同肌酐清除率水平之间的 WSI 的差异具有统计学意义。

根据肌酐清除率的水平进行分层, 比较对照组和试验组第 3 日至第 7 日的 WSI 均值。如图 6A 所示, 肌酐清除率为 $0 \sim 30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的亚组中对照组和试验组的 WSI 未观察到明显的趋势且未发现明显差异 ($P = 0.38$)。如图 6B ~ 6D 所示,

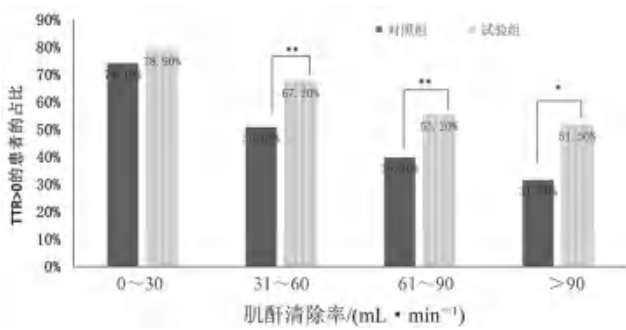


图 2 按肌酐清除率分层的 TTR > 0 的患者比例的比较 (*P < 0.05, **P < 0.001)

Fig 2 Proportion of patients with TTR > 0 between the two groups stratified by creatinine clearance rate (*P < 0.05, **P < 0.001)

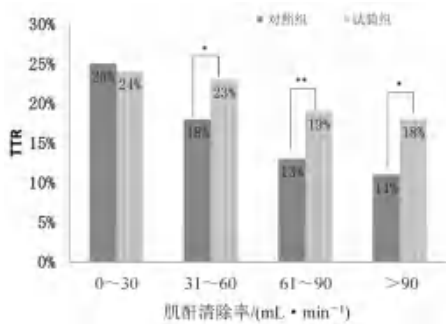


图 3 按肌酐清除率分层的两组 TTR 的比较 (*P < 0.05, **P < 0.001)

Fig 3 TTR between the two groups stratified by creatinine clearance rate (*P < 0.05, **P < 0.001)

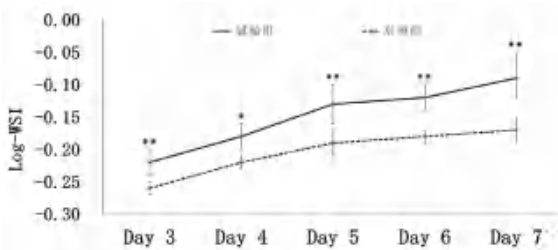


图 4 两组 WSI 的变化趋势 (*P < 0.05, **P < 0.001)

Fig 4 Trend of WSI between the two groups (*P < 0.05, **P < 0.001)

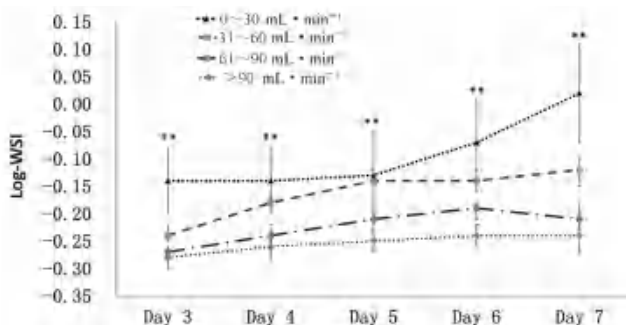


图 5 试验组根据肌酐清除率分层的 WSI 的变化趋势 (**P < 0.001)

Fig 5 Trend of WSI stratified by creatinine clearance (**P < 0.001)

在肌酐清除率为 31 ~ 60 mL · min⁻¹、61 ~ 90 mL · min⁻¹ 和 > 90 mL · min⁻¹ 三个亚组中，试验组的 WSI 均高于对照组。肌酐清除率为 31 ~ 60 mL · min⁻¹ 亚组中，试验组和对照组 WSI 的均值

分别为 - 0.11 和 - 0.16，试验组 WSI 比对照组升高了 31% (P < 0.001)。在肌酐清除率为 61 ~ 90 mL · min⁻¹ 亚组中，试验组和对照组 WSI 的均值分别为 - 0.16 和 - 0.22，试验组 WSI 比对照组升高了 27% (P < 0.001)。在肌酐清除率为 > 90 mL · min⁻¹ 亚组中，试验组和对照组 WSI 的均值分别为 - 0.21 和 - 0.25，试验组 WSI 比对照组升高了 16% (P < 0.05)。胺碘酮对华法林的影响在不同的肾功能水平之间相差较大。

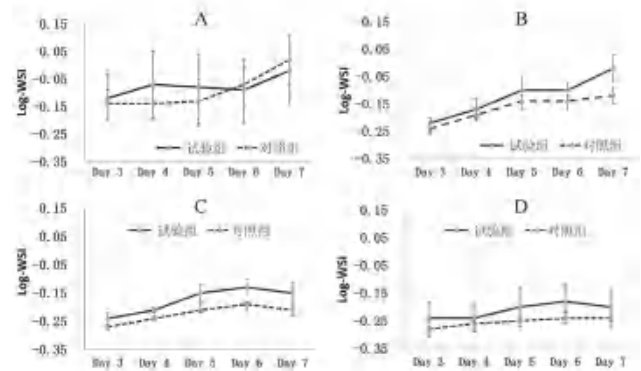


图 6 根据肌酐清除率分层的两组之间 WSI 的比较

Fig 6 WSI of the two groups stratified by creatinine clearance rate

A. Ccr 0 ~ 30 mL · min⁻¹; B. Ccr 31 ~ 60 mL · min⁻¹; C. Ccr 61 ~ 90 mL · min⁻¹; D. Ccr > 90 mL · min⁻¹

3 讨论

本研究的主要考察指标为 WSI，根据其计算公式可以看出，WSI 越高，则说明华法林的代谢越少。如图 4 所示，试验组的 WSI 显著高于对照组，由此可说明胺碘酮抑制了华法林的代谢消除，使华法林的药效升高，与华法林抗凝情况分析的结果一致，具体表现为：① 试验组的 INR 显著高于对照组；② 除肌酐清除率为 0 ~ 30 mL · min⁻¹ 的亚组外，试验组的平均 TTR 水平显著高于对照组且 TTR > 0 的比例也存在显著差异。肾功能障碍会影响到经肾清除的药物。而华法林几乎完全靠肝细胞色素 P450 酶代谢消除^[21]，很少以原形从尿液中排出，因此其代谢受肾功能影响的机制为非肾清除机制。肝细胞色素 P450 酶的活性受到遗传、年龄、疾病以及药物等因素的影响，现有大量证据表明，慢性肾脏疾病可以通过循环中的尿毒症毒素下调或直接抑制药物代谢酶和转运蛋白的活性^[22-25]。当华法林代谢酶的活性受到抑制时，华法林的代谢消除就会减少。之前的研究结果显示，中重度肾功能不全导致肝细胞色素 P450 2C9 的活性降低，因此在中重度肾功能不全的患者中使用华法林时，应当减少华法林的剂量^[26]。在本研究中，随着肌酐清除率水平的下降，WSI 随之升高，即华法林的代谢随之

减少。肌酐清除率处于 $0 \sim 30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 亚组的患者, WSI 以及抗凝情况之间无显著差异。这是因为此亚组中患者肾功能不全导致肝细胞色素 P450 2C9 酶活性降低, 使得胺碘酮对华法林代谢的抑制并不显著。而其他亚组患者的肾功能对肝细胞色素 P450 2C9 酶的活性无影响或者影响较小, 因此胺碘酮对华法林代谢的抑制较为显著。本研究结果发现, 在肌酐清除率 $\leq 30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的患者中, 试验组和对照组的 WSI 差异无统计学意义。在肌酐清除率 $> 30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的患者中, 试验组的 WSI 比对照组提高 $16\% \sim 31\%$ 。华法林与胺碘酮的合并用药常与出血等不良反应紧密相关, 因此掌握两者的药物相互作用对于抗凝管理极为重要。当华法林的代谢受到胺碘酮的显著抑制时, 如果没有合理降低华法林的剂量, 则会增加患者的出血风险; 相反, 当华法林的代谢不受胺碘酮的显著抑制时, 如果盲目的减少华法林的剂量, 则会导致抗凝不足从而增加患者血栓栓塞的风险。

本研究结果表明, 华法林和胺碘酮药物相互作用与肾功能存在相关关系, 因此在临床用药过程中根据患者的肾功能情况进行合理的合并用药, 能够提高抗凝管理的质量。本研究观察了华法林和胺碘酮合用后前 7 d 的抗凝情况和 WSI 之间的差异, 华法林的半衰期约为 36 h, 其达到稳态血药浓度的时间约为 7 d, 胺碘酮的半衰期长且个体差异大 ($20 \sim 100 \text{ d}$), 因此本研究的观察期实则为华法林的血药浓度达到稳态的过程。虽然在此期间胺碘酮的血药浓度仍未达到稳态, 但胺碘酮对华法林的代谢的影响是存在的, 本研究结果证实了在此期间胺碘酮对华法林代谢的影响具有统计学意义和临床意义。

华法林与多种药物合用时会发生药物相互作用^[27-29]。华法林的治疗窗窄, 无论药物使用过量还是剂量不足都可能会导致严重不良反应的发生。在临床实践过程中如果能提高对药物相互作用的预测能力, 将提高临床医师对华法林剂量的决策能力, 在提高了华法林疗效的同时也可以降低不良反应的发生。预测药物相互作用的关键是找到异质性的来源。目前很少有研究探索华法林和胺碘酮药物相互作用与肾功能的关系。一项在美国宾夕法尼亚进行的回顾性研究发现, 胺碘酮对华法林的影响在肾功能范围内变化 3 倍, 肾功能正常的患者 WSI 增加 36%, 但在严重肾功能不全患者中仅增加 12%^[17]。肾功能是一个可以解释华法林与胺碘酮药物相互作用异质性的新因素。但华法林的剂量具有显著的种族差异^[30-31], 本研

究首次在中国人群中探索华法林与胺碘酮相互作用与肾功能的关系。本研究的结果为华法林和胺碘酮药物相互作用发现了一个异质性的来源, 为华法林和胺碘酮合并用药时华法林的剂量调整提供了依据, 具有较高的临床价值。

但本研究仍有其局限性, 本研究为回顾性研究, 虽然代表了临床实践的真实情况, 但是能够收集到的患者信息有限, 未来需要前瞻性的研究来进一步验证此结果。本研究所纳入的患者均为住院患者, 对于门诊患者是否同样适用, 仍需要进一步的研究。虽然结果显示华法林与胺碘酮药物相互作用与肾功能有关, 但是本研究仅观察了前 7 d 的药物相互作用情况, 胺碘酮的半衰期长且个体差异大, 因此本研究的结果是否能外推至胺碘酮的血药浓度达到稳态还需要进一步的研究。

4 结论

本研究发现华法林与胺碘酮药物相互作用与患者的肾功能有关, 是华法林和胺碘酮药物相互作用的新的异质性来源。当华法林与胺碘酮合并使用时, 参考患者的肾功能水平进行华法林剂量调整可能更合理。

参考文献

- [1] Mason JW. Amiodarone [J]. *N Engl J Med*, 1987, 316 (8): 455-466.
- [2] Julian DG, Camm AJ, Frangin G, et al. Randomised trial of effect of amiodarone on mortality in patients with left-ventricular dysfunction after recent myocardial infarction: EMIAAT. *European Myocardial Infarct Amiodarone Trial Investigators [J]. Lancet*, 1997, 349 (9053): 667-674.
- [3] McDonald MG, Au NT, Wittkowsky AK, et al. Warfarin-amiodarone drug-drug interactions: determination of $[I(u)]/K(I, u)$ for amiodarone and its plasma metabolites [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2012, 91 (4): 709-717.
- [4] Heimark LD, Wienkers L, Kunze K, et al. The mechanism of the interaction between amiodarone and warfarin in humans [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1992, 51 (4): 398-407.
- [5] O'reilly RA, Trager WF, Rettie AE, et al. Interaction of amiodarone with racemic warfarin and its separated enantiomorphs in humans [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1987, 42 (3): 290-294.
- [6] Vitry AI, Roughead EE, Ramsay EN, et al. Major bleeding risk associated with warfarin and co-medications in the elderly population [J]. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2011, 20 (10): 1057-1063.
- [7] Ramagopalan SV, Stamp E, Sammon CJ, et al. Renal function and oral anticoagulant treatment of incident non-valvular atrial fibrillation: a retrospective study [J]. *Future Cardiol*, 2019, 15 (4): 301-309.

- [8] Carrero JJ, Evans M, Szummer K, et al. Warfarin, kidney dysfunction, and outcomes following acute myocardial infarction in patients with atrial fibrillation [J]. *JAMA*, 2014, 311 (9): 919-928.
- [9] Jun M, James MT, Manns BJ, et al. The association between kidney function and major bleeding in older adults with atrial fibrillation starting warfarin treatment: population based observational study [J]. *BMJ*, 2015, 350: h246.
- [10] Lea-Henry TN, Carland JE, Stocker SL, et al. Clinical pharmacokinetics in kidney disease: fundamental principles [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2018, 13 (7): 1085-1095.
- [11] Naud J, Nolin TD, Leblond FA, et al. Current understanding of drug disposition in kidney disease [J]. *J Clin Pharmacol*, 2012, 52 (1 Suppl): 10s-22s.
- [12] Yeung CK, Shen DD, Thummel KE, et al. Effects of chronic kidney disease and uremia on hepatic drug metabolism and transport [J]. *Kidney Int*, 2014, 85 (3): 522-528.
- [13] Huang Q, Cao L, Luo N, et al. Predicting range of initial warfarin dose based on pharmacometabolomic and genetic inputs [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2021, 110 (6): 1585-1594.
- [14] Klein TE, Altman RB, Eriksson N, et al. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360 (8): 753-764.
- [15] Li Q, Tao H, Wang J, et al. Warfarin maintenance dose Prediction for Patients undergoing heart valve replacement-a hybrid model with genetic algorithm and Back-Propagation neural network [J]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 9712.
- [16] Holm J, Lindh JD, Andersson ML, et al. The effect of amiodarone on warfarin anticoagulation: a register-based nationwide cohort study involving the Swedish population [J]. *J Thromb Haemost*, 2017, 15 (3): 446-453.
- [17] Miano TA, Yang W, Shashaty MGS, et al. The magnitude of the warfarin-amiodarone drug-drug interaction varies with renal function: a propensity-matched cohort study [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2020, 107 (6): 1446-1456.
- [18] Sridharan K, Al Banna R, Malalla Z, et al. Influence of CYP2C9, VKORC1, and CYP4F2 polymorphisms on the pharmacodynamic parameters of warfarin: a cross-sectional study [J]. *Pharmacol Rep*, 2021, 73 (5): 1405-1417.
- [19] Katada Y, Nakagawa S, Nishimura A, et al. Effects of fasting on warfarin sensitivity index in patients undergoing cardiovascular surgery [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2019, 75 (4): 561-568.
- [20] Tyson K, Hutchinson N, Williams S, et al. Identification of clinical factors predicting warfarin sensitivity after cardiac surgery [J]. *Ther Adv Drug Saf*, 2018, 9 (8): 415-424.
- [21] Holford NH. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin. Understanding the dose-effect relationship [J]. *Clin Pharmacokinet*, 1986, 11 (6): 483-504.
- [22] Sun H, Frassetto LA, Huang Y, et al. Hepatic clearance, but not gut availability, of erythromycin is altered in patients with end-stage renal disease [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2010, 87 (4): 465-472.
- [23] Lobo ED, Heathman M, Kuan HY, et al. Effects of varying degrees of renal impairment on the pharmacokinetics of duloxetine: analysis of a single-dose phase I study and pooled steady-state data from phase II/III trials [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2010, 49 (5): 311-321.
- [24] Smulders RA, Smith NN, Krauwinkel WJ, et al. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of solifenacin in patients with renal insufficiency [J]. *J Pharmacol Sci*, 2007, 103 (1): 67-74.
- [25] Liu B, Luo F, Luo X, et al. Metabolic enzyme system and transport pathways in chronic kidney diseases [J]. *Curr Drug Metab*, 2018, 19 (7): 568-576.
- [26] Limdi NA, Limdi MA, Cavallari L, et al. Warfarin dosing in patients with impaired kidney function [J]. *Am J Kidney Dis*, 2010, 56 (5): 823-831.
- [27] Tan CSS, Lee SWH. Warfarin and food, herbal or dietary supplement interactions: a systematic review [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2021, 87 (2): 352-374.
- [28] Wang M, Zeraatkar D, Obeda M, et al. Drug-drug interactions with warfarin: a systematic review and meta-analysis [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2021, 87 (11): 4051-4100.
- [29] Mar PL, Gopinathannair R, Gengler BE, et al. Drug interactions affecting oral anticoagulant use [J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2022, 15 (6): e007956.
- [30] Ohara M, Suzuki Y, Shinohara S, et al. Differences in warfarin pharmacodynamics and predictors of response among three racial populations [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2019, 58 (8): 1077-1089.
- [31] Kaye JB, Schultz LE, Steiner HE, et al. Warfarin pharmacogenomics in diverse populations [J]. *Pharmacotherapy*, 2017, 37 (9): 1150-1163.

(收稿日期: 2022-10-09; 修回日期: 2022-11-16)

吸气峰流速仪在干粉吸入剂使用方法宣教中的应用

蔡永桥, 李静婷, 强音, 李静, 刘香男, 杭晶卿, 王旋* (上海市普陀区人民医院, 上海 200060)

摘要: **目的** 通过吸气峰流速仪判断患者吸气峰流速是否在最佳吸气范围, 从而辅助患者调整吸气流速到最佳范围或更换治疗药物。**方法** 使用 In-check DIAL G16 吸气峰流速测试仪反复测试三次, 以评估长期使用干粉吸入剂患者的吸气峰流速, 并对吸气峰流速不佳的患者, 使用吸气峰流速仪进行纠正, 对纠正后仍不能达标的患者给予更换其他吸入给药装置。**结果** 首次评估有 25.00% 的患者吸气峰流速值不在最佳吸气流速范围, 其中吸气峰流速 $> 90 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的患者占 50.00%, $30 \sim 60 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的占 44.74%, $< 30 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的占 5.26%。第二次复诊时再次评估, 不在最佳吸气流速范围内的患者占 11.11%, 较第一次显著降低。第三次复诊时不在最佳吸气流速范围内的患者为 10.20%, 与第二次相比差异无统计学意义。**结论** 吸气峰流速对于干粉吸入剂中药物在肺部的有效沉积至关重要, 通过评估患者吸气峰流速值, 使患者充分掌握“用力且深长”的吸气方法, 可减少因吸气流速不达标而造成的临床疗效欠佳。

关键词: 吸气峰流速; 干粉吸入剂; 支气管哮喘; 慢性阻塞性肺疾病; 药物治疗管理

中图分类号: R969.3, R95 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2981(2023)02-0543-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.043

Application of In-check DIAL G16 in dry powder inhaler

CAI Yong-qiao, LI Jing-ting, QIANG Yin, LI Jing, LIU Xiang-nan, HANG Jing-qing, WANG Xuan* (People's Hospital of Putuo District, Shanghai 200060)

Abstract: Objective To determine whether the peak inspiratory flow rate falls in the appropriate range with In-check DIAL G16, and help patients to inhale at an optimal flow rate or change the therapeutic drug. **Methods** The In-check DIAL G16 device was used to assess the peak inspiratory flow rate for long-time users of dry powder inhalers. Meanwhile, patients who failed to inhale at the appropriate flow rate were corrected. For patients who still failed to meet the standard after the correction, the delivery device would be replaced. **Results** In the first evaluation, the peak inspiratory flow rate of 25% of patients failed to fall within the optimal inspiratory flow rate range, of which the inspiratory flow rate of 50% of the patients $> 90 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, that of 44.74% of the patients ranged $30 \sim 60 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, and that of 5.26% patients $< 30 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$. After following up the patients, 11.11% failed to fall within the optimal inspiratory flow rate range, much lower the second time. The third time, that number was 10.2% almost no difference between the second time and the third time. **Conclusion** Peak inspiratory flow rate is crucial for the dry powder to deposit effectively into the lungs. Patients may as well know the "forced and deep" inhaling method after evaluating the peak inspiratory flow rate, which would reduce the poor efficacy.

Key words: peak inspiratory flow rate; dry powder inhaler; bronchial asthma; chronic obstructive pulmonary disease; medication therapy management

我国以支气管哮喘和慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 为代表的慢气道疾病的发病率正逐年攀升^[1]。一项支气管哮喘的流行病学调查结果显

示, 我国 14 岁以上人群支气管哮喘的患病率为 1.24%^[2], 且发病率仍在逐年上升^[3]。

干粉吸入剂 (dry powder inhaler, DPI) 作为

作者简介: 蔡永桥, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事呼吸系统临床药学研究, email: yq_cai126@163.com * 通信作者: 王旋, 女, 硕士, 主任药师, 主要从事临床药理学研究, email: wxandld186@163.com

慢气道疾病长期控制的重要药物,具有安全、有效、方便携带的优势^[4]。DPI的使用需要一个初始的快速吸气峰流速(peak inspiratory flow, PIF)打破药物颗粒与其惰性载体之间的弱键,从而产生小于 $5\ \mu\text{m}$ 的药物颗粒,使药物有效地沉积在下呼吸道^[5]。根据干粉吸入剂使用说明,对于准纳器、易纳器及都保装置最佳吸气峰流速为 $60\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,最低吸气峰流速为 $30\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$;对于吸乐装置其最佳吸气峰流速为 $30\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,最低吸气峰流速为 $20\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ^[6]。只有掌握正确的吸入峰流速才能够使标准剂量的药物沉积在下气道,提高疗效,降低药物不良反应发生率。因此吸气峰流速在 DPI 的使用中起着至关重要的作用。根据干粉吸入剂使用七步法,医务工作者在对于干粉吸入剂使用患者进行教育时,应教导患者“用力且深长”地吸气^[7]。过去没有准确的测量工具,无法对患者的吸气峰流速进行评估。本研究通过对患者吸气峰流速的测量与评估,并给予正确的教育和指导,使患者吸气峰流速控制在其所使用的装置的最佳吸气峰流速范围内,提高装置使用的正确性,以期达到最佳的治疗效果,避免不良反应的发生。

1 材料

1.1 纳入及排除标准

收集 2021 年 4 月—2021 年 12 月上海某二级医院呼吸与危重症医学科长期规范使用干粉吸入剂并处于疾病临床缓解期的门诊患者,包括 COPD 和支气管哮喘患者。排除认知功能不全,合并有肺栓塞、充血性心力衰竭、间质性肺病、肺炎和气胸的患者。

1.2 仪器

采用 In-Check DIAL G16 (Clement Clarke International Ltd, Harlow, UK and Alliance Tech Medical) 吸气峰流速仪,测试流速 $20\sim 120\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。根据 In-Check DIAL 说明书,不同的干粉吸入剂装置具有不同的吸气阻力。准纳器、易纳器吸气阻力为中等偏低 (Med Low),都保装置吸气阻力为中等 (Medium),吸乐装置吸气阻力为高 (High)。

2 方法

2.1 测试方法

首先,患者按照其日常用药方式,采用中等偏低阻力对患者进行测试,测试结果取三次最佳值。测试结束后,对所有接受测试的患者进行宣教。告知患者首次测试结果是否在最佳吸气流速范围内及该患者所使用装置的最佳吸气流速范

围。理论知识宣教后,使用吸气峰流速仪对患者吸气流速进行纠正,通过患者自身反复多次的尝试,使其吸气峰流速控制在最佳吸气流速范围内。确认患者完全掌握后,对吸气峰流速仪阻力进行调整,以对应患者所使用的干粉吸入给药装置,并对患者的吸气峰流速进行复测。分别测试患者首次就诊时,第二次就诊时,第三次就诊时吸气峰流速的变化并记录结果。

三次宣教仍不能达到有效吸气流速范围($30\sim 90\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)内的患者,对于吸气峰流速 $> 90\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的患者,继续给予纠正;对于吸气峰流速 $< 30\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的患者,更换治疗药物,包括雾化吸入或使用气雾剂等对吸气流速要求低的药物。

2.2 判断标准

干粉吸入装置的吸气峰流速应保证在 $30\sim 90\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 才能够达到临床疗效^[8],其最佳吸气峰流速应为 $60\sim 90\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ^[9];吸气峰流速 $> 90\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 或 $< 60\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 为吸气峰流速欠佳,将欠佳的吸气峰流速分为三档: $> 90\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, $30\sim 60\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 及 $< 30\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.3 统计方法

采用 SPSS 20.0 进行统计,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,结果采用 t 检验;计数资料以例数 (n) 表示,结果采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 基本资料

本研究共纳入长期规范使用 DPI 的临床缓解期门诊患者 152 例,其中男性 86 例,女性 66 例;平均年龄(65.17 ± 13.02)岁;支气管哮喘患者 110 人,COPD 患者 42 人。

3.2 患者不佳吸气峰流速比例及疾病分布

在接受测试的 152 人中,首次测试时,其吸气峰流速不在最佳吸气范围内的患者占 25.00%。首次宣教后确保所有患者均已掌握最佳吸气方法,且达到最佳吸气峰流速。在患者第二次就诊时,再次测试其吸气峰流速,不在最佳吸气范围内占比 11.11%,经过培训患者的吸气峰流速合格率较第一次相比显著提升。第三次测试时不在最佳吸气范围内占比 10.20%,与第二次测试相比差异无统计学意义(见表 1)。

将每一次吸气峰流速不在最佳范围内患者的疾病分布进行统计,在三次统计中,首次吸气峰流速低于 $30\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 占 5.26%,经纠正后

均可达到有效吸气峰流速范围。三次测试大部分患者的吸气峰流速高于 90 L · min⁻¹, 分别占 50.00%、55.56%、80.00%, 且其中大部分为支气管哮喘患者。

表 1 不在最佳吸气峰流速范围内患者疾病占比

Tab 1 Proportion of disease and patients not within the range of optimal peak inspiratory flow

次数	吸气峰流速 欠佳人数比 例 [n (%)]	流速 > 90 L · min ⁻¹		流速 30 ~ 60 L · min ⁻¹		流速 < 30 L · min ⁻¹			
		比例 [n (%)]	疾病 [n (%)]	比例 [n (%)]	疾病 [n (%)]	比例 [n (%)]	疾病 [n (%)]		
第一次 (n = 152)	38 (25.00)	19 (50.00)	哮喘 COPD 4 (21.05)	15 (78.95)	17 (44.74)	哮喘 COPD 4 (23.53)	13 (76.47)	2 (5.26)	哮喘 COPD 1 (50.00)
第二次 (n = 81)	9 (11.11*)	5 (55.56)	哮喘 COPD 0 (0.00)	5 (100.00)	4 (44.44)	哮喘 COPD 3 (75.00)	1 (25.00)	0 (0.00)	哮喘 COPD 0 (0.00)
第三次 (n = 49)	5 (10.20*)	4 (80.00)	哮喘 COPD 1 (25.00)	3 (75.00)	1 (20.0)	哮喘 COPD 0 (0.00)	1 (100.00)	0 (0.00)	哮喘 COPD 0 (0.00)

注: 与第一次比较, *P < 0.05。

Note: vs the first visit, *P < 0.05.

3.3 三次宣教后使用不同给药装置患者吸气峰流速在每一次宣教后对患者长期使用的 DPI 吸气峰流速进行评价, 以确保患者达到最佳吸气峰流

速。如表 2 所示, 经过宣教后, 所有患者均可以掌握其所使用装置的正确吸气流速。

表 2 三次宣教后不同给药装置吸气峰流速

Tab 2 Peak inspiratory flow of different delivery devices after three sessions

装置	第一次		第二次		第三次	
	例数	吸气峰流速 / (L · min ⁻¹)	例数	吸气峰流速 / (L · min ⁻¹)	例数	吸气峰流速 / (L · min ⁻¹)
都保	79	72.21 ± 8.64	41	72.13 ± 9.20	23	67.39 ± 7.67
吸乐	7	51.00 ± 11.34	3	48.33 ± 5.77	1	70.00
准纳器	43	75.23 ± 9.57	25	72.17 ± 7.80	17	75.00 ± 7.50
易纳器	23	69.57 ± 8.11	14	71.43 ± 8.19	9	77.22 ± 9.39

4 讨论

近年来, 慢性呼吸系统疾病的发病率显著上升^[10]。吸入治疗作为治疗慢性气道疾病的基石, 广泛运用于 COPD、支气管哮喘等疾病的治疗。与口服和静脉给药方式相比, 吸入给药具有使用方便、起效迅速、生物利用度高、药物剂量低、全身不良反应少等特点。干粉吸入剂的作用原理为将吸附着药物微粉的载体分装于胶囊或给药装置中, 在吸气气流的作用下, 药物粉末以气溶胶的形式被患者吸入肺内。根据其储存方式的不同分为单剂量胶囊剂(如吸乐)、多剂量储库型给药装置(如都保)以及囊泡型给药装置(如准纳器、易纳器)。不同类型的装置因其内部结构不同, 使用时所需克服的阻力亦不同, 因此在装置的使用和选择时, 吸气峰流速值的评估就显得十分重要^[11]。

本课题组以往的研究主要关注吸入给药装置的七步使用法, 在吸入药物时强调“用力且深长”的吸气, 而如何才能做到“用力且深长”的吸气没有定量的评估方法^[12]。干粉吸入剂使用时的最佳吸气流速为 60 L · min⁻¹, 最低有效流速为

30 L · min⁻¹, 当吸气峰流速超过 60 L · min⁻¹ 甚至达到 96 L · min⁻¹ 后并不能增加药物的递送剂量^[13]。根据空气动力学原理, 吸入药物在气道内的运动方式包括湍流、层流和布朗运动。在药物使用过程中, 鼻咽喉等气道转弯位置最容易产生气体湍流。然而在湍流气体中, ≥ 5 μm 和 / 或流速大于 60 L · min⁻¹ 的药物颗粒产生的离心力较高, 容易发生撞击而停留于咽喉等上气道处^[11]。不佳的吸气峰流速使药物更多地停留在口咽部, 不仅会导致进入肺内有效的药物剂量减少, 且停留在咽喉及上气道的药物颗粒如果不能被冲洗干净, 易导致声音嘶哑、口咽部溃疡等不良反应的发生^[14]。

对于肺功能较差或处于疾病急性加重恢复期的患者, 其吸气峰流速可能会低于最佳吸气峰流速, 导致药物吸入不足^[15-16]。因此, 以往的研究更加关注通过吸气峰流速测试, 帮助吸气峰流速不佳的患者选择适当的给药装置。而本研究是利用其可视化的标尺, 帮助患者掌握吸入给药装置的正确使用方法, 尤其是帮助患者将吸气峰流速

控制在最佳流速范围内, 以达到最佳治疗效果。通过本研究结果可以看出, 在反复多次的测试和宣教过程中, 吸气峰流速不在最佳范围内的患者明显减少。

另外本研究发现, 在哮喘患者临床缓解期, 吸气峰流速值可能会大于 $90 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。在首次测试的患者中, 吸气峰流速 $> 90 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的患者有 19 名, 占吸气峰流速不在最佳范围内的患者的 50%。这与 Haughney 等^[17]的研究结论一致。日后的研究中应增加对吸气峰流速过高的人群及其可能增加的不良反应的关注。

本研究通过 In-Check DIAL G16 装置对患者吸气能力进行反复的训练, 使患者掌握“用力且深长”的吸气方法。通过反复训练及具象的感知, 可以使患者将吸气峰流速控制在最佳的范围内。但目前尚无可视化的方法测试患者口咽部药物的沉积率及肺部药物的沉积率, 故本研究希望通过将患者的吸气峰流速控制在干粉吸入剂的最佳吸气峰流速范围内, 以此来达到最佳的治疗效果, 尽可能减少不良反应的发生。

综上所述, 使用吸气峰流速仪对患者进行吸气峰流速的测试, 一方面, 可以帮助患者选择适宜的药物; 另一方面, 也可以通过对患者吸气能力的反复训练, 使患者掌握正确的药物吸入方法, 提高药物疗效。

参考文献

[1] 刘又宁. 间隔十年我国慢性阻塞性肺疾病的发病率真的升高了吗[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2019, 42(2): 81-82.

[2] 农英, 林江涛, 陈萍, 等. 我国 14 岁以上人群吸烟状况及其与支气管哮喘发病和控制的关系[J]. 中华内科杂志, 2017, 56(7): 485-489.

[3] 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.

[4] Newman SP. Inhaler treatment options in COPD[J]. Eur Respir Rev, 2005, 14(96): 102-108.

[5] Atkins PJ. Dry powder inhalers: an overview[J]. Resp Care, 2005, 50(10): 1304-1312.

[6] 文文, 谢宝松. 慢性阻塞性肺疾病管理中吸入装置的选择与应用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2020, 43(1): 75-79.

[7] 秦琼, 陈蓉, 雷伟, 等. 哮喘、慢性阻塞性肺病患者吸入给药装置依从性评价与分析[J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(5): 413-416.

[8] Jeremy SM. Guiding inspiratory flow: development of the In-Check DIAL G16, a tool for improving inhaler technique[J]. Pulm Med, 2017, 2017: 1-7.

[9] Ghosh S, Ohar JA, Drummond MB. Peak inspiratory flow rate in chronic obstructive pulmonary disease: implications for dry powder inhalers[J]. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv, 2017, 30(6): 381-387.

[10] 万欢英. 支气管哮喘和 COPD 前沿: 理论和实践[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.

[11] 中国医学装备协会呼吸病学专委会吸入治疗与呼吸康复学组, 中国慢性阻塞性肺疾病联盟. 稳定期慢性气道疾病吸入装置规范应用中国专家共识[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2019, 42(4): 241-253.

[12] 蔡永桥, 李静, 李静婷, 等. 基于药物治疗管理的支气管哮喘全程药学服务效果[J]. 医药导报, 2021, 40(7): 931-936.

[13] Emeryk A, Bartkowiak-Emeryk M, Czerwińska-Pawluk I, et al. Usefulness of peak expiratory flow measurement for selection of dry powder inhalers in asthmatic children[J]. Polski Merkuriusz Lekarski, 2000, 9(52): 667-670.

[14] Lavorini F, Magnan A, Dubus JC, et al. Effect of incorrect use of dry powder inhalers on management of patients with asthma and COPD[J]. Respir Med, 2008, 102(4): 593-604.

[15] Loh CH, Peters SP, Lovings TM, et al. Suboptimal inspiratory flow rates are associated with chronic obstructive pulmonary disease and all-cause readmissions[J]. Ann Am Thorac Soc, 2017, 14(8): 1305-1311.

[16] Broeders ME, Molema J, Hop WC, et al. The course of inhalation profiles during an exacerbation of obstructive lung disease[J]. Respir Med, 2004, 98(12): 1173-1179.

[17] Haughney J, Lee AJ, Mcknight E, et al. Peak inspiratory flow measured at different inhaler resistances in patients with asthma[J]. J Allergy Clin Immunol Pract, 2020, 9(6): 890-896.

(收稿日期: 2022-07-04; 修回日期: 2022-08-19)

药品不良反应

信迪利单抗致甲状腺功能减退和糖尿病酮症酸中毒 1 例

刘维峰¹, 白笑梅², 杨晓宇¹, 王天珩¹, 韩欢欢¹, 张易南¹ (1. 河北省邯郸市第一医院药学部, 河北 邯郸 056002; 2. 河北省邯郸邯钢医院内分泌科, 河北 邯郸 056002)

关键词: 信迪利单抗; 甲状腺功能减退; 糖尿病酮症酸中毒; 不良反应

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2023)02-0547-04

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.044

信迪利单抗是作用于程序性细胞死亡蛋白 1 (PD-1) 及其配体的一种 IgG4 单克隆抗体, 它能有效地与 PD-1 结合, 干扰 PD-1 与其配体 (PD-L1 和 PD-L2) 的相互作用, 从而激活和恢复 T 细胞的功能, 具有明显的抗肿瘤作用^[1]。信迪利单抗已于 2018 年 12 月获国家药品监督管理局批准用于治疗接受过二线或以上全身化疗的复发或难治性经典霍奇金淋巴瘤患者^[1-2], 并于 2021 年 6 月获批了肝癌、非小细胞肺癌适应证。信迪利单抗治疗的其他多项肿瘤类型如食管癌、胃癌等的临床试验也在进行中^[2]。

信迪利单抗不良反应包括肺炎、肝炎、腹泻、结肠炎、肾炎、皮肤、输液反应和免疫相关不良反应 (irAEs)。irAEs 主要与 T 细胞过度激活有关, 在抗肿瘤的同时, 正常组织中的 T 细胞过度激活后可能导致 irAEs^[3]。随着 PD-1 抑制剂在临床上的广泛使用, irAEs 逐年增加, 不仅会影响患者预后, 严重者还会导致生命危险。笔者报道了 1 例患者在使用信迪利单抗后不同阶段引起甲状腺功能减退和糖尿病酮症酸中毒 (DKA) 的不良反应, 以期为临床安全用药提供参考。

1 病例介绍

患者男, 82 岁, 75 kg, 既往体健, 否认高血压、心脏病史, 否认糖尿病、脑血管病、精神疾病史, 否认药物过敏史, 个人史、家庭史及婚育史无特殊。现病史: 2021 年 6 月查出贲门胃底癌 (印戒细胞癌), 未手术或化疗。2021 年 7 月患者胃痛症状加重, 再次住院治疗, 给予卡培他滨片及注射用奥沙利铂化疗, 因恶心、呕吐不良反应不能耐受停用。2021 年 8 月给予患者阿帕替尼片 (0.5 g qd) 联合注射用信迪利单抗 (200 mg ivgtt q21d, 信达生物制药有限公司, 商品名: 达伯舒, 批号: P2010029) 方案治疗。入院化疗前患者谷

丙转氨酶 $32 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, 谷草转氨酶 $24 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, 空腹血糖 (FBG) $5.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 肝功能、FBG 均正常。2021 年 10 月出现药物性肝损伤和骨髓抑制不良反应, 谷丙转氨酶 $405 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, 谷草转氨酶 $336 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, 给予保肝对症治疗好转, 由于患者为联合用药且阿帕替尼与信迪利单抗均可引起肝功能损伤^[4], 无法确定肝功能受损是否与应用信迪利单抗有关。基于免疫治疗中药物毒性可控, 考虑继续使用 PD-1 抑制剂方案治疗。

2021 年 11 月 17 日患者出现乏力、嗜睡等症状, 检查血清促甲状腺激素 $20.75 \mu\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1} \uparrow$, 诊断为甲状腺功能减退。考虑该患者年龄大, 引起症状较轻, 初始剂量为 $25 \mu\text{g}$, 4 ~ 6 周复查甲状腺功能, 医师采纳意见。患者在复查时检查血清促甲状腺激素 $15.77 \mu\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1} \uparrow$, 增加左甲状腺素钠片至 $50 \mu\text{g}$, 在 2022 年 4 月 4 日血清促甲状腺激素恢复正常, 该患者出现乏力、嗜睡等症状, 为 2 级内分泌 irAE, 经过服用左甲状腺素钠片后甲状腺功能恢复正常, 因症状较轻, 未终止 PD-1 抑制剂的治疗。

2022 年 4 月 4 日患者因多尿、口干、多饮 3 d, 意识丧失 8 h 再次入院。入院体格检查显示体温 $36.5 \text{ }^\circ\text{C}$, 心率 $112 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$, 血压 $138/84 \text{ mmHg}$, 氧饱和度 97%。入院后急查: 血糖 $45.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, 血酮体 $3.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, 血气分析 pH $7.22 \downarrow$, 血二氧化碳分压 (PCO_2) $30 \text{ mmHg} \downarrow$, 剩余碱 BE (B) $-14.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, 血乳酸 (Lac) $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 糖化血红蛋白 (HbA1c) $8.4\% \uparrow$, 血、尿淀粉酶未见异常。头颅 CT 未见出血。头颅磁共振扩散加权成像 (DWI): 未见明显异常。上腹部 CT: 符合贲门胃底癌表现, 腹腔内、腹膜后多发肿大淋巴结, 考虑转移, 脾大。结合腹部 CT 及血、尿、淀粉酶等指标, 暂可除外胰腺炎及胰腺占位性

基金项目: 河北省邯郸市科学技术研究与发展计划项目 (No.21422083073)。

作者简介: 刘维峰, 男, 主管药师, 主要从事临床药学工作, email: 123liuweifeng@163.com

病变所致胰岛功能受损。结合头颅 DWI, 暂可排除新发脑梗死所致昏迷。诊断: 高血糖高渗性昏迷, 酮症酸中毒, 胃癌。

该患者无糖尿病史, 治疗前血糖正常。第 7 个周期用药后, 患者出现口干、乏力, 3 d 后突然出现意识障碍, 浑身抽搐, 嘴眼歪斜等症状, 急查 FBG 为 $45.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, 血酮体: $3.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, 胰岛素 $5.23 \mu\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$, C 肽 $0.16 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \downarrow$, 患者开始接受普通胰岛素静脉泵入治疗, 维持电解质、水、酸碱平衡以纠正酮症酸中毒, 血糖相对稳定后, 调整为门冬胰岛素皮下泵入治疗。

2022 年 4 月 9 日查 FBG $8.55 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, 胰岛素 $< 0.2 \mu\text{U} \cdot \text{mL}^{-1} \downarrow$, C 肽 $< 0.01 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \downarrow$, 糖尿病抗体三项: 抗谷氨酸脱羧酶抗体阴性, 抗组织细胞抗体 (胰岛细胞) 测定阴性, 胰岛素自身

抗体阴性, 诊断为爆发性 1 型糖尿病。去泵后调整降糖方案为德谷胰岛素 22 U, 门冬胰岛素早 5 U、中午 3 U。由于患者血糖不稳定, 波动较大, 临床药师建议加服阿卡波糖胶囊 $100 \text{ mg tid}^{[5-6]}$ 。因 PD-1 抑制剂对胰岛功能损害不可逆转, 其胰岛素和 C 肽水平较低, 需长期给予胰岛素替代治疗。结合患者高龄, 病情严重影响患者生活质量, 未重启 PD-1 抑制剂治疗。1 个月后患者复查, FBG $4.68 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 胰岛素 $< 0.2 \mu\text{U} \cdot \text{mL}^{-1} \downarrow$, C 肽 $< 0.01 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \downarrow$, 血清促甲状腺激素 (TSH) $4.50 \mu\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1} \uparrow$, 游离三碘甲状腺原氨酸 (FT3) $1.60 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, 游离甲状腺素 (FT4) $15.36 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 患者情况稳定, 继续给予左甲状腺素片和胰岛素维持治疗, 定期复查。患者使用信迪利单抗后的检查结果见表 1。

表 1 患者使用信迪利单抗后检查结果

日期	FBG/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	C 肽/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TSH/ ($\mu\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$)	FT3/ ($\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	FT4/ ($\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	8 am 皮质醇/ ($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	8 am 促肾上腺皮质 激素/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
2021/9/2	4.78	—	7.33 \uparrow	2.75	18.05	—	—
2021/10/14	5.46	—	5.11 \uparrow	2.12	17.07	—	—
2021/11/17	5.34	—	20.75 \uparrow	1.53 \downarrow	11.59 \downarrow	—	—
2022/12/9	4.66	—	15.77 \uparrow	1.79 \downarrow	15.07	—	—
2022/2/7	5.48	—	11.63 \uparrow	1.8	16.93	—	—

2 分析讨论

2.1 不良反应关联性评价

2.1.1 甲状腺功能减退 ① 患者在 2021 年 11 月 17 日前甲状腺功能指标 TSH $5.11 \mu\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1} \uparrow$, FT3 $2.12 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$, FT4 $17.07 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在使用信迪利单抗第 3 个周期后出现甲状腺功能减退 (TSH $20.75 \mu\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1} \uparrow$); ② 信迪利单抗药品说明书及文献资料指出可能导致出现甲状腺功能异常相关自身免疫性疾病^[7], 属于已知的不良反应; ③ 应用左甲状腺素钠后甲状腺功能正常, 但这种损伤不可逆, 需长期服药; ④ 未见同期服用的药物卡培他滨及奥沙利铂等引起甲状腺功能减退的报道; ⑤ 有研究对不同免疫抑制剂诱发甲状腺功能异常的时间进行了统计, 甲状腺功能减退发生的时间为用药后 7 ~ 475 d^[8], 该患者发生甲状腺功能减退时间为 105 d, 在时间关联上相符。

2.1.2 糖尿病酮症酸中毒 ① 患者否认既往糖尿病, 在使用信迪利单抗前胰岛功能正常, FBG $4.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在使用信迪利单抗第 7 个周期后出现高血糖昏迷, 血糖 $45.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, C 肽 $< 0.01 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \downarrow$; ② 信迪利单抗药品说明书及文献资料指出其可能导致出现糖尿病, 属于已知的不良反应^[2]; ③ 经胰岛素治疗后血糖恢复正常; ④ 未

见同期服用的药物卡培他滨及奥沙利铂等引起患者血糖变化的报道; ⑤ 不同免疫抑制剂诱发糖尿病的时间为用药后 5 ~ 448 d^[9], 该患者发生 1 型糖尿病时间为 215 d, 有时间关联性。

因此, 根据《药品不良反应报告和监测办法》中的关联性评价标准, 使用诺氏评估量表对药物不良反应关联性进行评价^[10], 评分为 6 分, 判断信迪利单抗与甲状腺功能减退、1 型糖尿病因果关系关联性评价为“很可能”。具体评分见表 2。

2.2 不良反应原因分析

2.2.1 甲状腺功能减退 甲状腺是易受 PD-1 抑制剂影响的器官, Barroso-Sousa 等^[11]对 7551 名患者进行荟萃分析, 结果显示免疫检查点抑制剂导致甲状腺功能减退症的发生率约为 7.0%。除了肿瘤细胞, PD-1 也广泛表达于正常组织细胞, 包括甲状腺组织。多数研究认为由于 PD-1 在正常甲状腺组织的表达, 在接受免疫治疗后正常的甲状腺细胞受到细胞毒性 T 细胞的攻击^[12], 破坏甲状腺滤泡出现甲状腺炎症, 导致甲状腺炎、甲状腺功能亢进或减退, 其中甲状腺功能减退发生率最高。研究表明, 此类患者的抗甲状腺过氧化物酶 (TPO) 和抗甲状腺球蛋白 (TG) 抗体的值较

表 2 诺氏药物不良反应评估量表

相关问题	问题分值			评分
	是	否	未知	
1. 该 ADR 先前是否有结论性报告	+ 1	0	0	+ 1
2. 该 ADR 是否是在使用可疑药物后发生的	+ 2	- 1	0	+ 2
3. 该 ADR 是否在停药或应用拮抗剂后得到缓解	+ 1	0	0	0
4. 该 ADR 是否在再次使用可疑药物后重复出现	+ 2	- 1	0	0
5. 是否存在其他原因能单独引起该 ADR	- 1	+ 2	0	+ 2
6. 该 ADR 是否在应用安慰剂后重复出现	- 1	+ 1	0	0
7. 药物在血液或其他体液中是否达到毒性浓度	+ 1	0	0	0
8. 该 ADR 是否随着剂量的增加而加重, 或随剂量减少而缓解	+ 1	0	0	0
9. 患者是否曾暴露于同种或同类药物并出现类似反应	+ 1	0	0	0
10. 是否存在任何客观证据证实该反应	+ 1	0	0	+ 1

注: 总分 ≤ 0 为可疑; 1 ~ 4 分为可能有关; 5 ~ 8 分为很可能有关; ≥ 9 分为肯定。

高^[13]。PD-1 抑制剂导致的甲状腺功能损伤与患者基础甲状腺水平、基础免疫性疾病、循环细胞表型如 NK 细胞、T 细胞以及 *HLA-DQ* 和 *HLA-DR* 基因等有关^[14]。此损伤通常在 PD-1 抑制剂治疗完成后持续存在, 需长期用药。

2.2.2 1 型糖尿病 1 型糖尿病是 PD-1 抑制剂中的罕见 irAE, 不良反应发生率在 0.1%^[15]。PD-1 抑制剂导致相关糖尿病的确切发病频率和机制尚不清楚。PD-1 可以被 PD-L1 (B7-H1 或 CD274) 和 PD-L2 (B7-DC 或 CD273) 两种配体激活, 其不仅能在 T 细胞上表达, 也能在其他造血细胞以及血管内皮细胞以及胰岛细胞上表达^[16]。当 PD-1 与 PD-L1 结合时, 会产生一种抑制信号, 调节 T 细胞的活化、耐受性和细胞毒性, 这种结合会抑制免疫系统并诱导 T 细胞凋亡。相关动物实验表明, PD-1 和其配体结合, 可调节 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞, 大量研究也提示, 此过程与 P13K-AKT 信号通路有关^[17]。肿瘤细胞通过改善免疫抑制性肿瘤微环境和激活抑制肿瘤特异性 T 细胞反应的途径来逃避人类免疫系统。阻断 PD-1 通路, 可以恢复 T 细胞功能和抗肿瘤免疫反应, 靶向胰岛细胞的自身反应性 T 细胞也会存活, 最终导致 1 型糖尿病。而且, 在 PD-1 抑制剂诱导的 1 型糖尿病患者中, 高危 *HLA* 单倍型 (例如 *HLA-DR4*) 占优势, 存在遗传倾向^[18]。

2.3 患者自身因素

该患者 82 岁, 高龄是潜在药物在机体发生不良的高危因素, 研究显示信迪利单抗不良反应发生可能与癌症发病年龄有关^[19]。高龄患者各脏器功能较弱, 可能影响药物在机体内的代谢和排泄, 导致不良反应发生率升高。该老年患者胃癌、多发转移, 进食相对困难, 营养摄取不均衡, 既往多周期化疗后曾出现骨髓抑制、肝功能损伤等

不良反应。另外患者因多次住院, 情绪易激动造成心理压力及焦虑, 可能对甲状腺功能有影响, 进而促进糖尿病的发展。

2.4 药学监护

本例患者因胃癌给予信迪利单抗注射液 200 mg ivgtt q21d。结合《免疫检查点抑制剂引起的内分泌器官免疫相关不良事件的管理: 日本内分泌学会的临床指南》^[20], 当患者确定甲状腺功能减退和糖尿病酮症酸中毒时, 熟悉 irAE 的专科医师、临床药师和护士应尽早参与。

甲状腺功能减退是 PD-1 抑制剂治疗最常见的内分泌 irAEs。信迪利单抗引起甲状腺功能相关不良反应确诊时间跨度大, 多数患者无症状或症状较轻, 大多临床观察发现此损伤不可逆, 需要长期用药。在 PD-1 抑制剂治疗期间, 临床药师建议每 4 ~ 6 周复查甲状腺功能, 6 个月后, 检测间隔时间延长到每 6 ~ 8 周一次, 1 年后又延长到每 12 周一次。根据甲状腺自身抗体的浓度来判断是否发生不良反应以及其程度: 如果 TSH 高, 不定期查 TPOAb; 如果 TSH 低, 不定期查 TRAb。本例患者在信迪利单抗治疗后出现甲状腺功能减退, 给予左甲状腺素治疗后, 甲状腺功能指标恢复正常。临床药师对患者进行用药教育: 左甲状腺素钠片应于早餐前半小时服用; 奶制品、大豆制品可能影响药物的吸收, 合用时宜间隔 4 h; 如与钙剂、铁剂合用宜间隔 2 h。如患者近期发现甲状腺功能亢进的症状 (多汗、食欲亢进、怕热等), 或者甲状腺功能减退症状 (水肿、怕冷、嗜睡等), 应及时就医。

相对而言, PD-1 抑制剂致糖尿病较少见, 临床表现有较大个体差异, 严重者可导致糖尿病酮症甚至酮症酸中毒, 通常在使用药物后几周到 1 年发生。此类患者胰岛功能受损且不可逆转, 需

终身依赖胰岛素治疗。因此临床药师建议在 PD-1 抑制剂治疗过程中需要密切监测血糖、HbA1c 及胰岛素、C 肽水平, 尽早预防内分泌 irAEs 的发生, 并给予及时处理。

3 小结

随着 PD-1 抑制剂药物的不断发展和临床使用, irAEs 严重影响着患者的生活质量和治疗效果, 应引起重视。目前还没有关于 PD-1 抑制剂诱导的糖尿病和甲状腺功能的筛查和监测的临床指南。临床医护人员和临床药师都必须意识到 PD-1 抑制剂可能影响到患者甲状腺和胰岛功能, 建议告知患者这些不良反应的风险, 提高对不良反应的理解和认识。早期诊断、识别尤其重要, 应对高危患者制订筛查指南。临床药师应加强对采用免疫抑制剂治疗患者的药学监护, 对接受信迪利单抗治疗的患者进行常规甲状腺功能及甲状腺炎症的有效生物标志物 (FT4 和 TSH) 以及必要的血糖监测, 可以对肿瘤患者进行 *HLA-DQ* 和 *HLA-DR* 基因的基线筛查, 寻找出早期毒性标志物, 一旦出现 irAEs, 及时药学干预, 避免病情进一步发展, 再根据患者情况讨论是否重启免疫治疗, 使不良反应最小化。

参考文献

- [1] Nie C, Lv H, Liu Y, et al. Clinical study of sintilimab as second-line or above therapy in patients with advanced or metastatic gastric cancer: a retrospective study [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 741865.
- [2] Jiang H, Zheng Y, Qian J, et al. Safety and efficacy of sintilimab combined with oxaliplatin/capecitabine as first-line treatment in patients with locally advanced or metastatic gastric/gastroesophageal junction adenocarcinoma in a phase Ib clinical trial [J]. *BMC Cancer*, 2020, 20 (1): 760.
- [3] Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD. Immune-related adverse events associated with immune checkpoint blockade [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378 (2): 158-168.
- [4] 沈晓, 汪新茹, 陈明, 等. 免疫检查点抑制剂联合小分子靶向药物治疗晚期胃癌患者的药学监护分析 [J]. *中南药学*, 2020, 18 (7): 1215-1218.
- [5] 王毅, 邱俊霖. 暴发性 1 型糖尿病的诊治经验 [J]. *内科急危重症杂志*, 2019, 25 (4): 342-344.
- [6] 赵敏, 陈亚昆, 孙瑞芳. 阿卡波糖联合胰岛素治疗 1 型糖尿病的系统评价 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2016, 16 (7): 959-962.
- [7] 薛淑一, 张洁婷, 纪鹏, 等. 信迪利单抗致甲状腺功能减退及器官退化不良反应 1 例 [J]. *药物流行病学杂志*, 2022, 31 (3): 211-213.
- [8] Cugnet AC, Abeillon J, Maillat D, et al. Les dysthyroïdies sous immunothérapie anti-cancéreuse, thyroid dysfunctions secondary to cancer immunotherapy [J]. *Bull Cancer*, 2020, 107 (2): 262-271.
- [9] Akturk HK, Michels AW. Adverse events associated with immune checkpoint inhibitors: a new era in autoimmune diabetes [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2020, 27: 187-193.
- [10] 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.
- [11] Barroso-Sousa R, Barry WT, Garrido-Castro AC, et al. Incidence of endocrine dysfunction following the use of different immune checkpoint inhibitor regimens: a systematic review and meta-analysis [J]. *JAMA Oncol*, 2018, 4 (2): 173-182.
- [12] Percik R, Larkin J, Morganstein DL. Endocrinopathies induced by immune checkpoint inhibitors: the need for clear endocrine diagnosis [J]. *Lancet Oncol*, 2021, 22 (7): 905-907.
- [13] Puzanov I, Diab A, Abdallah K, et al. Managing toxicities associated with immune checkpoint inhibitors: consensus recommendations from the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) Toxicity Management Working Group [J]. *J Immunother Cancer*, 2017, 5 (1): 95.
- [14] Wright JJ, Powers AC, Johnson DB. Endocrine toxicities of immune checkpoint inhibitors [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2021, 17: 389-399.
- [15] 李哲, 孙一琦, 何超然, 等. 某院 PD-1 免疫检查点抑制剂致不良反应的发生情况及分析 [J]. *中南药学*, 2021, 19 (9): 1942-1946.
- [16] Clotman K, Janssens K, Specenier P, et al. Programmed cell death-1 inhibitor-induced type 1 diabetes mellitus [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018, 103 (9): 3144-3154.
- [17] Huang X, Yang M, Wang L, et al. Sintilimab induced diabetic ketoacidosis in a patient with small cell lung cancer: a case report and literature review [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2021, 100 (19): e25795.
- [18] Wen L, Zou X, Chen Y, et al. Sintilimab-induced autoimmune diabetes in a patient with the anti-tumor effect of partial regression [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 2076-2081.
- [19] Zhang L, Mai W, Jiang W, et al. Sintilimab: a promising anti-tumor PD-1 antibody [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 594558.
- [20] Arima H, Iwama S, Inaba H, et al. Management of immune-related adverse events in endocrine organs induced by immune checkpoint inhibitors: clinical guidelines of the Japan Endocrine Society [J]. *Endocr J*, 2019, 66 (7): 581-586.

(收稿日期: 2022-07-03; 修回日期: 2022-09-06)

超说明书使用氟尿嘧啶致严重口腔溃疡、IV度骨髓抑制 1 例

高羽, 张睿*, 陈旭, 张红曦, 梁华, 黄砚 (电子科技大学医学院附属妇女儿童医院·成都市妇女儿童中心医院, 成都 611731)

关键词: 氟尿嘧啶; 骨髓抑制; 口腔溃疡; 不良反应

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2023)02-0551-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.045

超说明书用药在国内外都已成为临床上相当普遍的现象, 超说明书用药是临床医学发展的客观需要, 但其导致的医疗纠纷主体责任常由临床医师承担, 超说明书用药所带来的潜在危害不容忽视。《妇产科学》第 9 版中滋养细胞肿瘤的化疗方案之一为氟尿嘧啶联用放线菌素 D, 其疗效显著且在临床使用多年, 但方案中氟尿嘧啶的推荐用量远超说明书中推荐用量。现介绍 1 例氟尿嘧啶超说明书用药引起的严重口腔溃疡、IV度骨髓抑制, 并进行药学分析, 提醒临床应重视化疗药物超说明书用药带来的安全性问题。

1 临床资料

患者, 女, 50 岁, 因“葡萄胎清宫术后 59 日, 发现血人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 升高 35 日”于 2021 年 4 月 7 日入院, 入院前 59 日外院诊断为葡萄胎。入院前 42 日、35 日、28 日、11 日显示血 HCG 分别为 513.95、799.94、1175.73、4947.00 mIU·mL⁻¹, 入院前 7 日, 彩超显示子宫前位, 子宫体大小 5.7 cm×4.7 cm×4.3 cm, 子宫内膜厚度 0.5 cm, 回声均匀, 子宫肌壁回声不均匀, 右前壁可见一弱回声团约 1.8 cm×1.5 cm, 未见明显血流信号, 后壁上段可见约 3.0 cm×1.9 cm 不均质回声, 内见多个片状无回声。全腹部增强 MRI 显示子宫右前壁不规则团块。入院后修正诊断为侵袭性葡萄胎 I 期。入院后患者白细胞总数、血红蛋白含量等略低 (见表 1), 给予重组人粒细胞刺激因子 150 μg 皮下注射, 2 d 后血常规显示患者白细胞总数、中性粒细胞绝对数升高 (见表 1), 符合化疗条件, 入院后第 3 日开始行氟尿嘧啶 (2.25 g) 联合放线菌素 D (0.48 g) 化疗 8 d, 化疗第 6 日出现恶心, 化疗第 7 日口腔出现散在溃疡, 化疗第 8 日, 开始出现发热, 体温 38.2℃, 嘴唇可见数个大小约 0.5 cm×0.5 cm 的溃疡, 颊黏膜可见 4 个大小约 0.5 cm×0.5 cm

的溃疡, 上腭部可见 2 个大小约 0.5 cm×0.5 cm 的溃疡, 咽喉部疼痛, 充血, 扁桃体 II 度肿大, 有恶心、反酸、烧心、呕吐等不适。血常规显示白细胞总数、中性粒细胞总数在正常范围 (见表 1), 化疗结束后第 1 日, 血常规显示白细胞总数、中性粒细胞总数等无明显变化, 但患者仍有发热, 伴腹泻, 解黄色稀大便 5 次, 最高体温 38.7℃, 予以左氧氟沙星 0.5 g po qd 抗感染治疗 2 d 后, 粪便常规显示白细胞: 0~2/HP, 隐血 (阳性), 血常规显示白细胞总数、中性粒细胞总数、血小板总数明显下降 (见表 1), 其中血小板总数 75×10⁹·L⁻¹, 口腔疼痛症状加重, 嘴唇肿胀, 进食困难, 最高体温 40.1℃, 于化疗结束后第 3 日更换抗菌药物为头孢哌酮舒巴坦钠抗感染, 重组人粒细胞刺激因子升白细胞、泮托拉唑抑酸护胃, 洛哌丁胺、蒙脱石散、双歧杆菌等对症治疗。化疗结束后第 4 日, HCG 345.6 mIU·mL⁻¹, 白细胞总数、中性粒细胞绝对数有明显升高, 但血小板进一步降低 (见表 1), 血小板降至 35×10⁹·L⁻¹, 血液科会诊后予以制霉菌素漱口, 氟康唑输注抗真菌, 白介素 II 3.5 mg ih qd, 促血小板生成素 1.5 万 IU ih qd 等治疗。化疗结束后第 5 日, 患者白细胞总数及中性粒细胞绝对数无明显变化 (见表 1), 但血小板进一步下降, 低至 17×10⁹·L⁻¹, C 反应蛋白 (CRP) 升高为 14 mg·L⁻¹, 予以输注血小板 1 个治疗量。患者发热、腹泻无明显缓解, 于化疗结束第 7 日改抗菌药物为亚胺培南西司他丁钠 1 g, q8h 及盐酸万古霉素 1 g, q12h 联合抗感染治疗, 患者仍发热、夜间体温最高 39.9℃, 口腔疼痛及溃疡无缓解, 腹泻有所好转, 骨髓抑制情况进一步加重 (见表 1), 白细胞总数 0.58×10⁹·L⁻¹、中性粒细胞绝对数 0.13×10⁹·L⁻¹、血小板总数 19×10⁹·L⁻¹, 曲霉菌免疫学试验 0.64, 1-3-B-D

作者简介: 高羽, 女, 硕士, 副主任药师, 主要从事临床药学工作, email: 724099739@qq.com *通信作者: 张睿, 女, 硕士, 主管药师, 主要从事医院药学工作, email: 392971662@qq.com

葡聚糖动态定量检测 $< 37.5 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，血培养结果为 5 d 无细菌生长。转 ICU 进一步治疗。结合临床表现、其他实验室检查结果等诊断为脓毒症，于 ICU 先后下病重、病危通知书，行特级护理，予以血小板 1 个治疗量，并继续予以亚胺培南+万古霉素抗感染，改用伏立康唑抗真菌，继续予以重组人血小板生成素，加大重组人粒细胞刺激因子用量对症支持等治疗措施。于化疗结束第 11 日患者白细胞逐渐上升，体温逐渐控制，消化道症状明显缓解，停升白细胞、促血小板生成治疗，逐渐降低抗菌药物用量及减少抗菌药种类至降阶梯使用头孢美唑抗感染，病情平稳后转入普通病房治疗。出院时（化疗结束第 22 日）患者骨髓抑制情况好转，血小板总数升到正常（见表 1），HCG 降低为 $16.9 \text{ mIU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

第 2 周期化疗前，患者体质量较上次化疗减轻 5 kg，白细胞总数 $4.21 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$ 、中性粒细胞绝对数 $1.85 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$ 、血红蛋白 $96 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、血小板总数 $500 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$ ，HCG: $9.6 \text{ mIU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。患者为低危，根据国外指南推荐^[1]可以选用放线

菌素 D 进行化疗，更改化疗方案为放线菌素 D 0.5 mg 每日，共计 5 d 单药化疗。化疗第 2 日患者出现轻微恶心，后逐渐出现呕吐、食欲下降、嘴唇稍肿胀，无口腔溃疡，无腹泻、发热等不适。化疗结束后血常规显示白细胞总数 $3.29 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$ 、中性粒细胞绝对数 $1.69 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$ 、血红蛋白 $98 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，余未见明显异常。以重组人粒细胞刺激因子等治疗后好转。

第 3 周期化疗沿用上一周期化疗方案放线菌素 D 0.5 mg qd，并予以昂丹司琼、苯海拉明、西咪替丁止吐治疗、华蟾素增强免疫力、补液等对症支持治疗，化疗过程中出现恶心、食欲下降，无呕吐、腹泻、口腔溃疡、手足疼痛等不适，化疗结束后血常规提示白细胞总数 $2.92 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$ 、血小板总数 $357 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$ 、中性粒细胞绝对数 $0.82 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$ ，予以重组人粒细胞刺激因子 $150 \text{ } \mu\text{g bid}$ 治疗，复查血常规显示患者白细胞总数、中性粒细胞绝对数升高，未出现严重骨髓抑制。HCG 降低至 $2.6 \text{ mIU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表 1 第一周期化疗后患者骨髓抑制情况

指标	正常范围	化疗前 3 日	化疗当日	化疗第 6 日	化疗结束第 1 日	化疗结束第 3 日	化疗结束第 4 日	化疗结束第 5 日	化疗结束第 7 日	化疗结束第 11 日	化疗结束第 22 日
白细胞总数 / ($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	4 ~ 10	3.39	15.19	5.76	5.99	3.37	6.65	5.87	0.58	2.31	5.06
中性粒细胞绝对数 / ($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	2.30 ~ 7.70	1.59	11.98	4.69	4.76	2.4	5.68	4.92	0.13	1.52	2.84
中性粒细胞百分率 / %	50.0 ~ 70.0	46.90	78.80	81.40	79.40	71.20	84.70	83.90	58.40	65	76.20
血红蛋白 / ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	110 ~ 155	108	108	118	—	124	119	113	105	99	89
血小板总数 / ($\times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$)	100 ~ 450	—	197	172	128	75	35	17	19	81	366

2 讨论

2.1 关联性评价

本例患者诊断为侵袭性葡萄胎，使用氟尿嘧啶和放线菌素 D 联合化疗第 7 日开始出现口腔溃疡，化疗结束后出现发热，粪便隐血并查见白细胞等感染指征，并迅速出现严重骨髓抑制、高热、严重口腔溃疡等一系列症状体征，用药与不良反应的出现有合理的时间关系。骨髓抑制、血小板降低、胃肠道反应及口腔溃疡是氟尿嘧啶和放线菌素 D 已知的不良反应。但是，放线菌素 D 骨髓抑制为剂量限制性毒性，尤其是胃肠道反应多见于每次剂量超过 500 μg 时，该患者放线菌素 D 含量未超过 500 μg ，且再次使用放线菌素 D，该患者未出现明显口腔溃疡、未出现严重骨髓抑制及明显血小板减少，而停用氟尿嘧啶后，第 2 周期、第 3 周期均未出现严重口腔溃疡和严重骨髓抑制，因此，氟尿嘧啶引起的不良反应可能性更大，根据国家药品不良反应因果关系评价，本例关联性

评价为“很可能”。

2.2 药学监护

对于氟尿嘧啶引起的严重口腔溃疡、IV 度骨髓抑制，临床药师主要对该患者的口腔溃疡用药、升白细胞用药进行药学监护。化疗引起的口腔黏膜炎，以黏膜保护剂、镇痛剂、中药等治疗措施为主。该患者口腔溃疡严重，口腔黏膜炎达到 4 级，以上措施起效慢，给予碳酸氢钠加利多卡因含漱剂，患者疼痛虽有减轻，但疼痛明显、张口困难持续时间较长，影响患者生活质量，目前严重口腔黏膜炎的诊治强调预防与治疗结合^[1-3]，预防为主。因此，对化疗药物引起的口腔黏膜炎应在早期进行药学监护。中性粒细胞减少症减少程度、持续时间与患者感染甚至死亡风险直接相关^[4]，需要对升白细胞用药进行药学监护^[5]，患者 50 岁，住院期间发热、中性粒细胞减少，具有使用粒细胞集落刺激因子治疗指征，在治疗效果不佳时，加大重组人粒细胞刺激因子用量后患者

白细胞及中性粒细胞逐渐恢复。

2.3 不良反应原因分析

我国是妊娠滋养细胞肿瘤的高发地区,侵袭性葡萄胎属于滋养细胞肿瘤中的一种,侵袭性葡萄胎病死率曾高达 25%。滋养细胞肿瘤的化疗方案有多种,国内国外推荐有所不同,国外指南中^[1]并没有推荐氟尿嘧啶为主的方案,以氟尿嘧啶+放线菌素 D 方案治疗侵袭性葡萄胎,因治愈率高且价格低廉成为中国使用多年的经典方案,《妇产科学》第 9 版中也推荐该方案^[6],是部分低危型或高危型滋养细胞肿瘤的一线治疗方案,也是低危型患者经单药化疗失败后的补救治疗措施。氟尿嘧啶引起的常见不良反应为恶心、食欲减退或呕吐,一般剂量时不良反应多不严重,仅少数为严重口腔溃疡^[7],周围血白细胞减少常见,但少数为重度骨髓抑制^[8],血小板减少罕见。但是该方案中氟尿嘧啶的用法用量属于超说明书用药,氟尿嘧啶说明书中的常见用法用量为缓慢静脉滴注,0.5~1 g·d⁻¹,连用 5 d,或者按体表面积一日 300~500 mg·m⁻²,连用 3~5 d。值得注意的是该方案中氟尿嘧啶的用量为每日 26~28 mg·kg⁻¹,每日用量远远超过说明书中的用药方案。另外国外指南^[9]及国内 2021 版中 FAV 方案对于氟尿嘧啶用量为每日 24~26 mg·kg⁻¹,连续使用 6 d 一个用药疗程^[10],而该方案为连续使用 8 d 一个疗程,用药疗程较长。大剂量、长时间超说明书使用氟尿嘧啶可能会让氟尿嘧啶及其代谢产物在人体蓄积,使不良反应严重程度增加。

临床考虑化疗方案有效性的同时,需重视其毒副作用的发生,氟尿嘧啶联合放线菌素 D 虽然是经典“中国方案”,特别是目前教科书中有推荐,在我国使用多年,文献证实该方案治愈率高^[11-12],但是其中氟尿嘧啶剂量远超说明书用量、连续用药疗程较长,治疗剂量与中毒剂量相似,个体差异大,氟尿嘧啶超说明书用药带来的安全性问题,需要引起关注,条件允许时,可优先选择其他国外推荐或国内最新指南推荐方案。如必须使用该方案时,应进行个体化治疗^[13-14],可进行血药浓度检测,氟尿嘧啶导致的不良反应与药时曲线下面积(AUC)之间具有相关性,AUC>30 mg·h·L⁻¹^[15]时,消化系统反应、骨髓抑制不良反应有增加,可根据 AUC 进行剂量调整,同时需关注该方案中氟尿嘧啶可能引起的骨髓抑制,

根据患者个体情况防治重度骨髓抑制的发生。

参考文献

- [1] 中国临床肿瘤学会抗肿瘤药物安全管理专家委员会,中国临床肿瘤学会肿瘤支持与康复治疗专家委员会. 抗肿瘤治疗引起急性口腔黏膜炎的诊断和防治专家共识[J]. 临床肿瘤学杂志, 2021, 26(5): 449-459.
- [2] 马婷婷, 吴琼, 欧阳静, 等. 中国癌症症状管理实践指南——口腔黏膜炎[J]. 护士进修杂志, 2020, 35(20): 1871-1878.
- [3] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会. 肿瘤放疗化疗相关中性粒细胞减少症规范化管理指南[J]. 中华肿瘤杂志, 2017, 39(11): 868-878.
- [4] 廖德华, 曹丽芝. 肿瘤化疗引起骨髓抑制的防治[J]. 中南药学(用药与健康), 2015, 12: 14-15.
- [5] NCCN Clinical Practice Guidelines in Gestational Trophoblastic Neoplasia [EB/OL]. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/gtn.pdf (accessed 30 September 2022).
- [6] 谢幸, 孔北华, 段涛. 妇产科学[M]. 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 330-331.
- [7] 邓杰, 殷家福, 杨柱梅, 等. 氟尿嘧啶致严重口腔黏膜炎 1 例[J]. 中国药物应用与监测, 2017, 14(6): 377-380.
- [8] 王宏强, 李佳, 夏延哲. 氟尿嘧啶致骨髓抑制、神经和视神经毒性不良反应 1 例[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(1): 106-107.
- [9] Horowitz NS, Eskander RN, Adelman MR, et al. Epidemiology, diagnosis, and treatment of gestational trophoblastic disease: a society of gynecologic oncology evidenced-based review and recommendation [J]. Gynecol Oncol, <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2021.10.003>.
- [10] 中国抗癌协会妇科肿瘤专业委员会. 妊娠滋养细胞病诊断与治疗指南(2021年版)[J]. 中国癌症杂志, 2021, 31(6): 520-532.
- [11] 王璟乐, 杨晓霞. 5-氟尿嘧啶联合更生霉素治疗恶性滋养细胞肿瘤的效果分析[J]. 当代医药论丛, 2020, 9: 35-36.
- [12] 靖爽, 和晓利, 王悦. 放线菌素-D 与氟尿嘧啶治疗低危型妊娠滋养细胞肿瘤的疗效评价[J]. 医药论坛杂志, 2017, 9: 46-48.
- [13] 李刚, 王继红, 王珊, 等. 氟尿嘧啶治疗妇科滋养细胞肿瘤剂量的个体化研究[J]. 河南大学学报(医学版), 2013, 4: 270-272.
- [14] 何光照, 刘茜, 李小倩, 等. 氟尿嘧啶类药物个体化用药研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 6: 679-683.
- [15] Beumer JH, Chu E, Paolo AD, et al. Highlights from: 5-fluorouracil drug management pharmacokinetics and pharmacogenomics Workshop; Orlando, Florida; January 2007 [J]. Clin Colorectal Cancer, 2007, 6(6): 407-422.

(收稿日期: 2022-06-08; 修回日期: 2022-08-02)

卡瑞利珠单抗引起肾上腺皮质功能减退 1 例

郭紫云, 陈子颖, 陈立伟* (天津中医药大学第一附属医院, 国家中医针灸临床医学研究中心, 天津 300380)

关键词: 卡瑞利珠单抗; 肾上腺皮质功能减退; 不良反应

中图分类号: R969.3

文献标识码: B

文章编号: 1672-2981(2023)02-0554-03

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.02.046

随着免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICPis) 临床疗效不断被肯定, 越来越多的 ICPis 被研发并应用于临床, 同时免疫相关不良反应 (immune-related adverse events, irAEs) 也被临床医师所关注。irAEs 涉及多个器官, 内分泌腺体常被累及, 如垂体、甲状腺、胰腺、肾上腺^[1], 国外文献中最常报道的是垂体炎及甲状腺功能障碍, 肾上腺及胰腺功能障碍罕见^[2-3]。目前, 国产 ICPis 相关内分泌毒性报道较少, 本文通过对 1 例卡瑞利珠单抗使用后出现的肾上腺皮质功能减退的病例进行分析讨论, 以供临床医师参考, 提高患者用药安全。

1 病例资料

患者, 女, 65 岁, 2021 年 10 月 6 日发现胆囊占位性病变, 10 月 11 日行腹腔镜下胆囊根治术, 行联合肝 S4b、S5 段胆囊癌根治切除 + 8、12、13 组淋巴结清扫, 术后病理回报示: 胆囊低分化腺癌, 癌侵袭囊壁全层, 淋巴结未见转移。10 月 21 日部分肝 + 淋巴结病理: ① 肝脏未见癌组织; ② 送检第 13 组淋巴结未见癌转移 (0/2); ③ 送检第 8 组、第 12 组淋巴结检材示纤维、血管及脂肪组织, 未见转移。2021 年 11 月 26 日、2021 年 12 月 17 日、2022 年 1 月 7 日、2022 年 1 月 27 日行卡培他滨 1.5 g + 奥沙利铂 180 mg + 卡瑞利珠单抗 (苏州盛迪亚生物医药有限公司) 200 mg 治疗 4 周期, 用药后出现上臂内侧、背部、眼睑皮肤毛细血管增生, 最大直径约 8 mm, 无破溃。2022 年 1 月 27 日查上腹 MRI + 强化示: 与 2021 年 11 月 26 日上腹 MRI 检查比较, 术区积液减少, 肝实质近术区边缘局限异常信号灶较前减小, 所示右侧前锯肌局部饱满; 右后腹壁皮下脂肪层局灶性异常强化, 建议随诊; 余无显著变化。2022 年 2 月 28 日主因“周身乏力甚”收入我院。患者既往高血压病史、陈旧性脑梗死。入院症见: 患者神清, 精神弱, 周身乏力, 纳差, 恶心呕吐, 呕吐物为白痰, 未见呕血及咖啡样物。

诊疗经过: 住院行常规扶正抗肿瘤及对症营养支持治疗, 病情一度稳定。2022 年 3 月 4 日患者清晨空腹抽血后突然出现嗜睡, 化验回报示: 血常规未见异常; 肝功能 + 急症七项示: 钠 $135.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, 二氧化碳结合力 $8.99 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, 血糖 $3.73 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, 总蛋白 $64.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, 白蛋白 $31.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, 阴离子间隙 $22.11 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \uparrow$, 血浆渗透压 $275.34 \text{ mOsm} \cdot \text{L}^{-1} \downarrow$, 肾小球滤过率 $55.12 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \downarrow$; 甲功全项: 未见异常; 尿常规示: 尿酮体 + + + + (同 2022 年 2 月 28 日)。结合化验回报, 并嘱其急查颅脑 MRI 以排除颅内占位、梗死、出血; 急查血气分析以明确诊断, 患者拒绝; 考虑患者卡瑞利珠单抗用药史, 不排除免疫治疗导致的免疫相关内分泌毒性, 故急查血清皮质醇。后复查随机血糖示: $4.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 静脉血糖示: $4.56 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。颅脑 MRI 示: 未见明显出血、梗死、占位性病变, 血清皮质醇 (11: 00): $0.30 \mu\text{g} \cdot \text{dL}^{-1} \downarrow$ 。患者血清皮质醇极低, 且伴有神志淡漠、乏力、嗜睡、恶心呕吐, 故怀疑 ICPis 导致肾上腺皮质功能减退可能性大, 遂请内分泌专科会诊。经内分泌专科医师会诊, 结合各项化验检查, 考虑肾上腺皮质功能减退可能性大, 嘱查促肾上腺皮质激素 (ACTH)、血清皮质醇、24 h 尿皮质醇明确诊断, 并可酌情予氢化可的松琥珀酸钠治疗。结合内分泌科医师会诊意见, 3 月 4 日予氢化可的松琥珀酸钠 150 mg ivdrip qd 治疗。3 月 5 日嗜睡较前有所好转, 继续激素、补液治疗。3 月 7 日嗜睡较前明显好转、纳食较前增加, 复查化验示: 血清皮质醇 (8: 00): $10.60 \mu\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$; 24 h 尿皮质醇定量 $2990.00 \mu\text{g} \cdot 24 \text{ h}^{-1} \uparrow$; ACTH (8: 00): $0.082 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1} \downarrow$; 血清皮质醇恢复正常, 考虑激素治疗有效, 24 h 尿皮质醇增多、ACTH 减少考虑与外源性激素补充及其引起的下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴负反馈发生有关。考虑大剂量激素治疗 3 d, 症状好转, 故继续减量使用, 改为氢化可的松琥珀酸钠

作者简介: 郭紫云, 女, 在读硕士研究生, 主要从事中西医结合肿瘤方面的研究, email: 2072922279@qq.com * 通信作者: 陈立伟, 男, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事中西医结合防治肿瘤相关疾病的研究, email: iron9999@126.com

100 mg ivdrip qd 治疗。3 月 9 日患者嗜睡明显好转，周身乏力好转，纳食增加，见颜面部、手背、下肢水肿，考虑为激素治疗不良反应，故将静脉激素补充治疗改为口服，药用醋酸泼尼松龙 15 mg (5 mg/片) qd 治疗。3 月 10 日患者嗜睡、乏力、纳食、水肿均较前好转，复查化验示：血清皮质醇 (8:00): 1.7 $\mu\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$ ↓, ACTH (8:00): 0.282 $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ↓。3 月 11 日患者症状好转后出院，嘱其激素长期替代治疗，门诊定期复查并调节激素用量。

2 讨论

2.1 不良反应相关性分析

根据国家药品不良反应关联性评价标准，对本例患者的肾上腺皮质功能减退症进行关联性评价：

① 患者肾上腺皮质功能减退是在使用卡瑞利珠单

抗 3 个月后突然出现，不良反应的发生与卡瑞利珠单抗的使用具有时间相关性；② 卡瑞利珠单抗说明书中关于“特定不良反应”的描述中提示，在接受该药治疗的患者中，0.4% 发生肾上腺功能不全，不良反应发生的时间为 2 ~ 14.9 个月，本例患者不良反应的发生符合卡瑞利珠单抗已知的不良反应类型；③ 查阅同期使用的奥沙利铂、卡培他滨药品说明书，未见有致肾上腺皮质功能减退的不良反应。结合辅助检查回报评估，患者在接受 4 个周期的化疗+免疫治疗后，疾病稳定，未见进展，故排除原患疾病和疾病进展的影响。结合以上评价该肾上腺皮质功能减退“可能”为卡瑞利珠单抗不良反应所致。而采用诺氏 (Naranjo) 评估量表法评分为 5 分 (见表 1)，考虑本例患者卡瑞利珠单抗与肾上腺皮质功能减退评价为“很可能”。

表 1 诺氏药品不良反应评估量表

序号	相关问题	问题分值			记分
		是	否	未知	
1	该 ADR 先前是否有结论性报告	+1	0	0	+1
2	该 ADR 是否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有缓解	+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	0
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

注：总分值 ≥ 9 分，表明药物与不良反应的因果关系为肯定；5 ~ 8 分为很可能有关；1 ~ 4 分为可能有关； ≤ 0 为可疑的。

2.2 PD-1 抑制剂相关原发性肾上腺皮质功能减退症 (primary adrenal insufficiency, PAI)

ICPis 导致 PAI 的发生率为 0.8% ~ 2.0%^[4], PAI 作为 ICPis 治疗相关的罕见内分泌毒性，有荟萃分析显示：在 5831 名患者中，只有 43 例所有等级 (1 ~ 4 级) 的 PAI 病例 (0.7%)，但联合治疗患者中报告 PAI 的发生率为 4.2%^[5]。PD-1 抑制剂单药引起的 PAI 发生率甚至更低，如纳武利尤单抗单药治疗发生 PAI 的概率为 1%^[6]，目前尚未有国产 PD-1 抑制剂致 PAI 的报道。其发生机制目前尚不明确，考虑与 ICPis 对自身组织产生免疫损伤有关^[7]，有文献报道 1 例帕博利珠单抗引起的 PAI 中存在 21-羟化酶和肾上腺皮质抗体阳性^[8]。并且有文献研究发现，与 CTLA-4 抑制剂相比，使用 PD-1/PD-L1 抑制剂治疗更常发生自身免疫性肾上腺炎，但发生率较低^[9]。

ICPis 导致的 PAI 临床表现缺乏特异性，可以表现为周身乏力、厌食、恶心呕吐、脱水、神志淡漠、皮肤色素沉着、体重下降、电解质代谢紊

乱、低血糖等。严重者可发生肾上腺危象，甚至危及生命，主要表现为低血压休克、疲乏、恶心、呕吐、嗜睡、意识模糊或昏迷等。其诊断主要依靠 ICPis 用药史、临床表现结合激素水平明确。本例患者在使用卡瑞利珠单抗治疗 3 个月后出现周身乏力、恶心呕吐、神志淡漠、嗜睡，甲功全项未见异常、皮质醇极低 (0.30 $\mu\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$)，经激素补充治疗后症状好转，且结合激素补充后血清皮质醇、ACTH 变化，考虑该患者为卡瑞利珠单抗导致的 PAI 可能性大。

ICPis 导致的 PAI 发病率低，起病隐匿，其相关症状容易被肿瘤本身疾病所掩盖，因此临床应仔细区别。

2.3 临床处理及启发

2021CSCO 免疫检查点抑制剂相关的毒性管理指南中指出^[10]：对于 ICPis 导致的 PAI 建议首先暂停 ICPis 治疗，其次根据不良反应的严重程度并结合内分泌专科医师会诊意见进行激素替代治疗，而且考虑到为避免肾上腺危象发生，建议

在其他激素补充替代治疗之前先给予类固醇口服进行激素替代治疗，同时应密切关注激素的不良反应，及时调整激素用量。若怀疑发生肾上腺危象，及时获取血清皮质醇和 ACTH，同时开始治疗，无需等待化验结果^[6]。美国肿瘤学会 (ASCO) 及中华内分泌学会提出了关于 ICPis 引

起 PAI 的一般分级及处理建议，其结果互参^[4, 11]，见表 2。本例患者突发嗜睡、神志淡漠，结合用药史及化验回报，严重怀疑肾上腺危象，故急于大剂量激素静脉补充治疗，状况明显好转。患者在激素使用过程中出现了明显不良反应：颜面部、手背、下肢水肿，减量后好转。

表 2 ICPis 相关 PAI 分级及处理建议

分级	是否暂停 ICPis	处理建议	
		糖皮质激素	盐皮质激素
1 级 (轻度: 无症状或轻度症状)	可考虑暂停, 直到激素代替使病情稳定	维持剂量口服: 泼尼松 5 ~ 10 mg · d ⁻¹ 或氢化可的松 10 ~ 20 mg am, 5 ~ 10 mg pm	根据病情需要补充盐皮质激素: 氟氢可的松 0.05 ~ 0.2 mg · d ⁻¹ , 根据血压、血钾、血浆肾素水平进行调整
2 级 (中度: 有症状, 但不影响日常活动)	病情稳定	出现 2 ~ 3 次症状时需控制急性症状: 泼尼松口服 20 mg · d ⁻¹ 或氢化可的松口服, 每日 20 ~ 30 mg am, 10 ~ 20 mg pm。症状控制后 5 ~ 10 d 内减量到维持剂量	
3 级 (重度: 日常活动严重受限)	暂停, 直到激素代替使病情稳定	考虑肾上腺危象时, 及时静脉补充: 氢化可的松 100 mg 或地塞米松 4 mg, 同时大量补液 (生理盐水 ≥ 2000 mL); 症状控制后 7 ~ 14 d 内逐渐减到维持剂量	
4 级 (危及生命)	定		

卡瑞利珠单抗虽极少报道 PAI 病例，但其说明书中有涉及，并且临床有病例报道，因此值得临床医师关注。首先，在进行 ICPis 治疗之前，基线内分泌功能检测很重要，若患者本身内分泌功能低下，则应考虑是否先行激素替代治疗稳定后再行 ICPis 治疗；其次，治疗期间内分泌功能的评估是必要的，每 2 ~ 3 周复查 8: 00 血清皮质醇、ACTH 及电解质，考虑 ICPis 相关肾上腺皮质功能不全有延迟发生的现象，故在 ICPis 治疗后应至少随访 1 年，密切关注患者激素及电解质水平^[4]。该病例充分证明了免疫治疗前及免疫治疗期间激素水平检测的重要性，如果定期监测皮质醇变化，在患者出现神志变化时便可以有的放矢，及时干预治疗，可以缩短病程。同时该病例也提示我们对于使用 ICPis 治疗的患者，如果出现周身乏力、恶心呕吐等症状时，要注意 ICPis 相关内分泌毒性可能，避免肾上腺危象发生。对于发生 ICPis 相关 PAI 的患者，由于 ICPis 引起的 PAI 较难恢复，需要长期激素补充替代治疗^[12]，因此激素治疗期间应重视患者宣教，明确激素治疗的不良反应。

参考文献

[1] 赖妍靓, 耿艳, 杨兵全. PD-1/PD-L1 抑制剂相关的内分泌紊乱及其治疗的研究进展 [J]. 肿瘤防治研究, 2021, 48 (11): 1035-1040.
 [2] Ruggeri RM, Campenni A, Giuffrida G, et al. Endocrine and metabolic adverse effects of immune checkpoint inhibitors: an overview (what endocrinologists should know) [J]. J Endocrinol Invest, 2019, 42 (7): 745-756.
 [3] Chang LS, Barroso-Sousa R, Tolaney SM, et al. Endo-

crine toxicity of cancer immunotherapy targeting immune checkpoints [J]. Endocr Rev, 2019, 40 (1): 17-65.
 [4] 中华医学会内分泌学分会免疫内分泌学组. 免疫检查点抑制剂引起的内分泌系统免疫相关不良反应专家共识 (2020) [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2021, 37 (1): 1-16.
 [5] Barroso-Sousa R, Barry WT, Garrido-Castro AC, et al. Incidence of endocrine dysfunction following the use of different immune checkpoint inhibitor regimens: a systematic review and meta-analysis [J]. JAMA Oncol, 2018, 4 (2): 173-182.
 [6] Cukier P, Santini FC, Scaranti M, et al. Endocrine side effects of cancer immunotherapy [J]. Endocr Relat Cancer, 2017, 24 (12): T331-T347.
 [7] 谈仪炯, 方芳, 刘芳, 等. 1 例 PD-1 抑制剂致多内分泌腺综合征的不良反应分析 [J]. 中南药学, 2021, 19 (11): 2470-2472.
 [8] Paepgeaey AC, Lheure C, Ratour C, et al. Polyendocrinopathy resulting from pembrolizumab in a patient with a malignant melanoma [J]. J Endocr Soc, 2017, 1 (6): 646-649.
 [9] González-Rodríguez E, Rodríguez-Abreu D. Immune checkpoint inhibitors: review and management of endocrine adverse events [J]. Oncologist, 2016, 21 (7): 804-816.
 [10] 郝捷, 李进, 程颖, 等. 中国临床肿瘤学会 CSCO 免疫检查点抑制剂相关的毒性管理指南 2021 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2021: 43-51.
 [11] Brahmer JR, Lacchetti C, Schneider BJ, et al. Management of immune-related adverse events in patients treated with immune checkpoint inhibitor therapy: american society of clinical oncology clinical practice guideline [J]. J Clin Oncol, 2018, 36 (17): 1714-1768.
 [12] 段炼, 王林杰, 斯晓燕, 等. 免疫检查点抑制剂相关内分泌不良反应的临床诊治建议 [J]. 中国肺癌杂志, 2019, 22 (10): 649-652.

(收稿日期: 2022-09-25; 修回日期: 2022-10-20)