中南药学

ZHONGNAN YAOXUE

月刊　2003 年 4 月创刊　第 21 卷　第 4 期（总第 207 期）　2023 年 4 月 20 日出版

顾问

周宏灏

主编

李焕德

社长

张毕奎

编辑部主任

邬志娟

主管单位

湖南省食品药品监督管理局

主办单位

湖南省药学会

编辑：中南药学编辑委员会

地址：长沙市人民中路 139 号中南大学湘雅二医院内

出版：中南药学杂志社

发行：湖南省报刊发行局

印刷：长沙建华印务有限公司

订阅：全国各地邮局

定价：每期 25.00 元，全年 300.00 元

邮编：410011

电话：（0731）82258487/84895602

传真：（0731）82258487

邮发代号：42-290

投稿网址：http://znyx.cbpt.cnki.net

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

目　次

研究论文

（839）外泌体负载甲氨蝶呤递药体系的构建及表征 …… 王强，鲍倩倩，陈卫东，等

（844）尖尾芋石油醚部位化学成分及抗乳腺癌作用研究 …… 陈娅，王鹏，彭兰淳，等

（850）小檗碱与维奈托克联用协同诱导获得性维奈托克耐药的人急性淋巴细胞白血病细胞凋亡 …… 黄侨宗，陈卫东，楼洋，等

（857）酮咯酸氨丁三醇鼻用温敏凝胶的制备及体外释放研究 …… 种思茹，彭汐涯，王欣茹，等

（863）天山花楸抗哮喘活性提取部位的筛选及其成分分析 …… 吴娜，屯妮萨古丽·艾买提江，常军民，等

（870）星点设计 - 效应面法优化盐酸多奈哌齐冻干型口崩片的制备工艺 …… 吴雪纯，邱旖，吴婧楠，等

（876）基于“药辅合一”的甘草次酸 - 蓖麻油亚微乳研究 …… 魏文静，朱梨梨，潘娇娇，等

（882）虫草素的合成及工艺优化 …… 娄绍岩，董慧玲，伊冰清，等

（888）白花败酱全草的化学成分研究 …… 万颖，吴娟，邓子怡，等

（894）基于 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术的赤芍化学成分分析及其抗银屑病活性研究 …… 金重先，于佳禾，刘金凤，等

（903）基于 3D 肿瘤模型和网络药理学的威灵仙粗提物体外抗肺癌药效及潜在作用机制研究 …… 刘诚毅，秦鑫鹏，包永睿，等

（911）姜黄素联合盐酸阿霉素的协同抗肿瘤效应及机制研究 …… 陆慧毓，王凤玲，陈云娜，等

（917）新型吖啶二酮类 GPR40 激动剂结构的优化和抗 2 型糖尿病的活性研究 …… 巨世杰，魏朝，郭凯蕾，等

（924）基于 UFLC-Triple TOF-MS/MS 的活心丸全成分分析 …… 郑苏楠，刘玉铃，吴灏，等

（933）五味子酮通过调节 AKT/GSK3 信号通路改善 2 型糖尿病大鼠血糖的研究 …… 胡益杏，李逃明，杨中保，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　娄月芬　宫　建　祝德秋
秦红岩　袁　成　袁　易　贾素洁
夏道宗　原永芳　徐　珽　徐　萍
徐必学　高利臣　郭　韧　郭怀忠
郭建军　唐　芳　曹　玲　常福厚
巢志茂　彭文兴　董亚琳　董得时
蒋孟良　傅　强　温金华　谢　诚
谢奕丹　睢大筼　肇丽梅　翟　青
黎　敏　颜　苗　潘卫三　魏高文

（940）坤宁颗粒治疗功能性子宫出血的实验研究
…… 解锦香，史斌琦，马世平，等

（945）基于“扶正培本”研究鼻咽解毒胶囊免疫调节作用
…… 伍梦玲，欧阳林旗，龙远雄，等

（953）菊花提取物对肝旺痰阻型高血压大鼠的降压作用研究
…… 汪诗沁，朱芊芊，尹宣，等

（959）甘草香豆素平衡溶解度和油水分配系数的测定
…… 汤玉梅，欧水平，叶林虎，等

（963）基于指纹图谱及多成分含量测定的泽泻汤单煎及共煎差异性研究
…… 赵美奇，武慧敏，徐丽芝，等

（968）注射用红花黄色素对大鼠颈总动脉血流动力学的影响及体外溶栓作用 …… 刘雅楠，牛芬溪，郑晓春，等

药品临床综合评价专题

（973）基于药品全周期管理的药品评价指标体系构建
…… 李芬，谢印，朱碧帆，等

（979）药品临床综合评价创新性指标的构建——以 PD-1/PD-L1 抑制剂为例 …… 朱碧帆，胡嘉浩，刘宇晗，等

综述

（984）2 型糖尿病脑内糖代谢改变与神经退行性变性疾病的关系
…… 莫子鑫，何玲，孙逸

（993）三伏贴临床应用及新剂型研究进展
…… 刘雨薇，姜海波，吕颖，等

（1000）肿瘤药敏实验模型研究进展…… 黄传玉，刘富垒，王晓丹，等

（1008）第三代新型抗癫痫药物布瓦西坦的研究进展
…… 李莹，王鸣璐，王成彬，等

医药知识产权

（1013）抗痛风中药新药品种的专利布局分析
…… 徐慧芳，刘盼，褚丹丹，等

药物分析与检验

（1020）氢定量核磁共振法测定光甘草定含量
…… 杨玉琴，海力马依·海米提，热依木古丽·阿布都拉，等

（1025）保元抗疲咀嚼片 HPLC-ELSD 特征图谱研究及 4 种功效成分的含量测定 …… 杨颖，刘陶世，刘漫，等

（1032）UPLC-MS/MS 测定补肾填精口服液中乌头碱类生物碱的含量
…… 汤逊尤，孙辉，叶惠煊，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
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

（1037）UPLC-MS/MS 法检测中药全蝎中 29 种抗感染药物的残留 …… 任晓娜，郑磊

（1042）基于 HPLC 指纹图谱及多指标成分分析的化学模式识别评价补阳还五汤质量 …… 崔亚玲，李爽，胡北，等

（1049）基于高效液相色谱的消痞和胃胶囊指纹图谱研究及多组分含量测定 …… 孙耕，徐浩然，于庚原，等

（1056）高效液相色谱法测定富马酸卢帕他定口崩片的有关物质 …… 王璟，刘伟，刘为中，等

医院药学

（1062）生物制剂治疗类风湿关节炎相关间质性肺病疗效与安全性的 meta 分析 …… 项惟真，董蓉蓉，李美琪，等

（1070）智能药柜在医疗机构病区用药安全的系统评价 …… 倪倩，方丽涌，齐伟，等

（1076）替加环素致凝血功能异常预测模型构建 …… 李亚，汪晓娟，武东，等

（1081）药物禁忌证规则在合理用药监测系统中的精细化设置 …… 秦小莉，徐敏，杨玉洁，等

（1087）信迪利单抗用药评价和分析 …… 隋月，李雨，刘广宣

（1093）基于 CNKI 文献计量分析的中药矫味与掩味研究现状 …… 赵佳柱，祝雨辰，邝柏宇，等

临床药师在临床

（1101）临床药师对腹膜透析患者实施肾性贫血药物治疗管理服务实践效果 …… 雷雯朴，白迎文，杨婷，等

药品不良事件信号监测专题

（1107）基于美国 FAERS 数据库的盐酸决奈达隆不良反应信号挖掘 …… 蒋罗兰，蒋新华

药品不良反应

（1112）1 例伏立康唑药物相互作用致横纹肌溶解的案例报道并文献分析 …… 胡功利，韩丽珠，雷洋，等

本刊声明：

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

除非特别声明，本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点。

[本刊基本参数] CN43-1408/R*2003*b*A4*278*zh*P*25.0*44*2023-4

本期责任编辑：李科，陆窈窈，彭金飞，邬志娟

英文编辑：周静

CENTRAL SOUTH PHARMACY

Monthly Founded in April 2003 Volume 21, Number 4 April 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

(839) **Construction and characterization of an exosome-loaded methotrexate drug delivery system** ····· *WANG Qiang, BAO Qian-qian, CHEN Wei-dong, et al*

(844) **Chemical compositions and mechanism of anti-breast cancer activity of petroleum ether site of *Alocasia cucullate* (Lour.) Schoot.** ····· *CHEN Ya, WANG Peng, PENG Lan-chun, et al*

(850) **Combination of berberine and venetoclax synergistically induces apoptosis in human acute lymphoblastic leukemia cells with acquired venetoclax resistance** ····· *HUANG Qiao-zong, CHEN Wei-dong, LOU Yang, et al*

(857) **Preparation and in vitro release of ketorolac tromethamine thermosensitive nasal gel** ····· *CHONG Si-ru, PENG Xi-ya, WANG Xin-ru, et al*

(863) **Screening of anti-asthmatic active extracts from *Sorbus tianschanica* Rupr. and component analysis** ····· *WU Na, Aimaitijiang • Tunnisaguli, CHANG Jun-min, et al*

(870) **Preparation of lyophilized orally disintegrating tablets of donepezil hydrochloride based on central composite design and response surface methodology** ····· *WU Xue-chun, QIU Yi, WU Jing-nan, et al*

(876) **Glycyrrhetinic acid-castor oil submicron emulsion based on combination medicine and adjuvant** ····· *WEI Wen-jing, ZHU Li-li, PAN Jiao-jiao, et al*

(882) **Synthesis and process optimization of cordycepin** ····· *LOU Shao-yan, DONG Hui-ling, YI Bing-qing, et al*

(888) **Chemical constituents in the whole herbs of *Patrinia villosa*** ····· *WAN Ying, WU Juan, DENG Zi-yi, et al*

(894) **Chemical constituents of Paeoniae Radix Rubra and their anti-psoriasis activity based on UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS** ····· *JIN Zhong-xian, YU Jia-he, LIU Jin-feng, et al*

(903) **In vitro anti-lung cancer efficacy and potential mechanism of crude extracts of Clematidis Radix et Rhizoma based on 3D tumor model and network pharmacology** ····· *LIU Cheng-yi, QIN Xin-peng, BAO Yong-rui, et al*

Postal code
42-290

Publish
Editorial Office of Central South Pharmacy

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

Price
￥ 25.00 an issue
￥ 300.00 a year

CSSN
ISSN 1672-2981
CN43-1408/R

Copyright 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.

(911) **Synergistic antitumor effect of curcumin combined with doxorubicin hydrochloride on breast cancer cells and related mechanism** ····· *LU Hui-yu, WANG Feng-ling, CHEN Yun-na, et al*

(918) **Structural optimization and anti-type 2 diabetes activity of novel acridinedione GPR40 agonists** ····· *JU Shi-jie, WEI Zhao, GUO Kai-lei, et al*

(924) **Full component analysis of Huoxin pills by UFLC-Triple TOF-MS/MS** ····· *ZHENG Su-nan, LIU Yu-ling, WU Hao, et al*

(933) **Schisandrone improves the blood glucose in rats with type 2 diabetes mellitus by regulating the AKT/GSK3 signal pathway** ····· *HU Yi-xing, LI Tao-ming, YANG Zhong-bao, et al*

(940) **Experimental study of Kunning granules for dysfunctional uterine bleeding** ····· *XIE Jin-xiang, SHI Bin-qi, MA Shi-ping, et al*

(945) **Mechanism of Biyan Jiedu capsules in immunoregulation based on "Fuzheng Peiben"** ····· *WU Meng-ling, OU YANG Lin-qi, LONG Yuan-xiong, et al*

(953) **Antihypertensive effect of *Chrysanthemum morifolium* extracts on hypertensive rats with liver prosperity and phlegm obstruction syndrome** ····· *WANG Shi-qin, ZHU Qian-qian, YIN Xuan, et al*

(959) **Determination of equilibrium solubility and oil-water partition coefficient of glycycoumarin** ····· *TANG Yu-mei, OU Shui-ping, YE Lin-hu, et al*

(963) **Difference between single decoction and total decoction of Zexie decoction based on fingerprint and multicomponent content determination** ····· *ZHAO Mei-qi, WU Hui-min, XU Li-zhi, et al*

(968) **Effect of safflor yellow injection on hemodynamics of common carotid artery in rats and thrombolysis in vitro** ····· *LIU Ya-nan, NIU Fen-xi, ZHENG Xiao-chun, et al*

(974) **Drug evaluation index framework based on drug lifecycle management** ····· *LI Fen, XIE Yin, ZHU Bi-fan, et al*

(979) **Construction of indicator system for innovation in clinical comprehensive evaluation: taking PD-1/PD-L1 inhibition as an example** ····· *ZHU Bi-fan, HU Jia-hao, LIU Yu-han, et al*

(984) **Relationship between altered cerebral glucose metabolism and neurodegenerative diseases in type 2 diabetes mellitus** ····· *MO Zi-xin, HE Ling, SUN Yi*

(993) **Research progress on the clinical application and new dosage forms of Sanfu plaster** ····· *LIU Yu-wei, JIANG Hai-bo, LYU Ying, et al*

(1000) **Research progress in experimental model of tumor drug sensitivity** ····· *HUANG Chuan-yu, LIU Fu-lei, WANG Xiao-dan, et al*

(1008) **Research progress in the third generation new antiepileptic drug brivaracetam** ····· *LI Ying, WANG Ming-lu, WANG Cheng-bin, et al*

(1013) **Patent portfolios of new anti-gout Chinese materia medica species** ····· *XU Hui-fang, LIU Pan, CHU Dan-dan, et al*

(1020) **Determination of the absolute content of glabridin by ^{1}H quantitative nuclear magnetic resonance**
…… *YANG Yu-qin, Helimay Himit, Rahima Abdulla, et al*

(1025) **Content determination of 4 effective ingredients in Baoyuan Kangpi chewable tablets by HPLC-ELSD** … *YANG Ying, LIU Tao-shi, LIU Man, et al*

(1032) **Determination of aconitine alkaloids in Bushen Tianjing oral liquid by UPLC-MS/MS**
……*TANG Xun-you, SUN Hui, YE Hui-xuan, et al*

(1037) **Determination of 29 anti-infection drugs in scorpions by UPLC-MS/MS**
…… *REN Xiao-na, ZHENG Lei*

(1042) **Quality evaluation of Buyang Huanwu decoction based on HPLC fingerprints and chemical pattern recognition with multi-component content analysis** …… *CUI Ya-ling, LI Shuang, HU Bei, et al*

(1049) **Fingerprint and multi-component determination of Xiaopi Hewei capsules based on high performance liquid chromatography**
…… *SUN Geng, XU Hao-ran, YU Geng-yuan, et al*

(1056) **HPLC determination of related substances in rupatadine fumarate orally disintegrating tablets** …… *WANG Jing, LIU Wei, LIU Wei-zhong, et al*

(1062) **Efficacy and safety of biological agents for rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: a meta-analysis**
…… *XIANG Wei-zhen, DONG Rong-rong, LI Mei-qi, et al*

(1070) **Systematic evaluation of medication safety of automated dispensing cabinet's in wards hospital**
…… *NI Qian, FANG Li-yong, QI Wei, et al*

(1076) **Establishment of a predictive model for coagulation disorders induced by tigecycline** …… *LI Ya, WANG Xiao-juan, WU Dong, et al*

(1081) **Fine setting of drug contraindication rules in prescription automatic screening system** …… *QIN Xiao-li, XU Min, YANG Yu-jie, et al*

(1087) **Evaluation and analysis of sintilimab medication**
…… *SUI Yue, LI Yu, LIU Guang-xuan*

(1093) **Research status of traditional Chinese medicine taste correction and masking based on CNKI bibliometric analysis**
…… *ZHAO Jia-zhu, ZHU Yu-chen, KUANG Bo-yu, et al*

(1101) **Effectiveness of clinical pharmacists implementing medication therapy management practices for peritoneal dialysis patients with renal anemia**
…… *LEI Wen-pu, BAI Ying-wen, YANG Ting, et al*

(1107) **Data mining for adverse drug reactions of dronedarone based on FAERS database** …… *JIANG Luo-lan, JIANG Xin-hua*

研究论文

外泌体负载甲氨蝶呤递药体系的构建及表征

王强[1]，鲍倩倩[1]，陈卫东[1, 2, 3, 4]，王雷[1, 2, 4, 5]，张雪[1]，吴成圆[1]，王思维[1]，唐丽琴[6]，吴培云[1*]
（1. 安徽中医药大学药学院，合肥　230012；2. 省部共建安徽道地中药材品质提升协同创新中心，合肥　230012；3. 中药资源保护与开发研究所，合肥　230012；4. 中药复方安徽省重点实验室，合肥　230012；5. 药物制剂技术与应用安徽省重点实验室，合肥　230012；6. 中国科学技术大学附属第一医院，合肥　230012）

摘要：目的　以巨噬细胞来源外泌体（exosomes，Exos）为载体，包载抗肿瘤药物甲氨蝶呤（methotrexate，MTX），构建一种纳米载药体系（MTX-Exos），并对其理化性质及在体外对肝细胞癌增殖的抑制作用进行研究。**方法**　通过超速离心从 RAW264.7 细胞中提取纯化 Exos，采用超声孵育法将 MTX 载入 Exos，利用动态光散射（dynamic light scattering，DLS）、透射电镜（transmission electron microscope，TEM）和 Western blot 对其进行表征，并通过 MTT 实验研究了该递药体系抑制肝细胞癌增殖的作用。**结果**　最优处方下的 MTX-Exos 的平均粒径为（174.3±3.2）nm，Zeta 电位为（－10.8±0.3）mV，载药量为（2.81±0.02）%，外观形态呈茶托状双层膜结构并表达外泌体特异性蛋白 Alix 和 TSG101。MTX-Exos 对肝癌细胞的毒性作用比游离 MTX 更强。**结论**　Exos 成功负载 MTX，制备方法简单可行，在体外试验中对肝细胞癌的增殖展示出良好的抑制作用。

关键词：肝细胞癌；甲氨蝶呤；外泌体；药物递送
中图分类号：R944.9　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0839-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.001

Construction and characterization of delivery system for exosome-loaded methotrexate

WANG Qiang[1], BAO Qian-qian[1], CHEN Wei-dong[1, 2, 3, 4], WANG Lei[1, 2, 4, 5], ZHANG Xue[1], WU Cheng-yuan[1], WANG Si-wei[1], TANG Li-qin[6], WU Pei-yun[1*] (1. *College of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *MOE-Anhui Joint Collaborative Innovation Center for Quality Improvement of Anhui Genuine Chinese Medicinal Materials*, *Hefei* 230012; 3. *Institute of Traditional Chinese Medicine Resources Protection and Development*, *Hefei* 230012; 4. *Anhui Key Laboratory of Chinese Medicinal Compound Formula*, *Hefei* 230012; 5. *Key Laboratory of Pharmaceutical Preparation Technology and Application*, *Hefei* 230012; 6. *The First Affiliated Hospital of University of University of Science and Technology of China*, *Hefei* 230012)

Abstract: Objective To construct a nano-drug delivery system with macrophage-derived exosomes (Exos) encapsulated with anticancer drug methotrexate (MTX), and to determine its physicochemical properties and inhibition of hepatocellular carcinoma proliferation in vitro. **Methods** Exos were purified from RAW264.7 cells by ultracentrifugation, and MTX was loaded into Exos by ultrasonic incubation, and characterized by dynamic light scattering, transmission electron microscope (TEM), and Western blot. The effect of this drug delivery system in inhibiting the proliferation of hepatocellular carcinoma was determined by MTT assay. **Results** The average particle size of MTX-Exos in the optimal prescription was (174.3±3.2) nm, the Zeta potential was (－10.8±0.3) mV, and the drug loading was (2.81±0.02)%.

基金项目：国家自然科学基金资助项目（No.82073923）。
作者简介：王强，男，在读硕士研究生，主要从事药物新剂型研究，email：wangqiangqy@163.com　*通信作者：吴培云，女，教授，硕士研究生导师，主要从事中药、天然产物的提取、分离、鉴定及药效研究，email：wupeiyun@ahtcm.edu.cn

These exosomes contained known markers Alix and TSG101 with the classic saucer-like bilayer structure of exosomes observed by TEM. The toxic effect of MTX-Exos on the hepatoma cells was stronger than that of free MTX. **Conclusion** MTX is successfully loaded by Exos with a simple and feasible method, and the in vitro experiment shows a good inhibition on the proliferation of hepatocellular carcinoma.

Key words: hepatocellular carcinoma; methotrexate; exosome; drug delivery

肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）是一种具有高度侵袭性的恶性肿瘤，其发病率高，预后不良，已成为全球癌症患者死亡的重要因素[1-2]。化疗是治疗 HCC 的主要策略之一，甲氨蝶呤（methotrexate，MTX）是一种抗叶酸类代谢药物，常用于治疗各种恶性肿瘤，但 MTX 体内清除快、毒副作用大等缺点严重限制了它的临床应用[3-4]。因此，设计一种新型的 MTX 给药系统对其临床应用至关重要。外泌体（exosomes，Exos）是一类可由多种细胞分泌的带膜囊泡，粒径在 40 ～ 160 nm[5]。作为内源性物质，Exos 具有较低的免疫原性和较高的生物相容性、能够跨越物理屏障并保护功能载体不被降解并且稳定性良好等优点，是一种理想的药物递送工具[6-8]。

巨噬细胞作为先天免疫细胞的主要组成部分，在炎症调节和肿瘤进展中发挥着重要作用[9-10]，巨噬细胞来源的外泌体不但可以携带来自母体细胞的信息，具有母体细胞的功能，而且其表面表达的淋巴细胞功能相关抗原 -1（lymphocyte function associated antigen-1，LFA-1）可以与 HCC 细胞表面过表达的细胞间黏附分子 -1（intercellular cell adhesion molecule-1，ICAM-A）结合从而靶向 HCC 细胞[11-14]。除此之外，相较于其他细胞来源的外泌体，巨噬细胞来源的外泌体含量更高，且具有良好的生物相容性，因此可被用作药物载体[15]。

本研究利用巨噬细胞 RAW264.7 来源的 Exos 作为药物载体负载抗肿瘤药物 MTX，构建了一种纳米载药体系（MTX-Exos），通过动态光散射（dynamic light scattering，DLS）、透射电镜（transmission electron microscopy，TEM）和 Western blot 对其进行表征，并研究了 MTX-Exos 在体外对 HCC 细胞增殖的抑制作用。

1　材料

1.1　仪器

L-90K 型超速离心机（美国 Beckman 公司）；Tecnai G2 SpirtBiotwin 型透射电子显微镜、ELX-800uv 酶标仪、UltiMate 3000 型高效液相色谱仪（美国 Thermo 公司）；Nano ZS90 马尔文粒度分析仪（英国 Malvern 公司）；JY92-Ⅱ DN 型超声波细胞粉碎机（宁波新芝生物科技有限公司）。

1.2　试药

DMEM 培养基、胎牛血清（FBS）（美国 Hyclone 公司）；BCA 蛋白浓度测定试剂盒（北京兰杰柯科技有限公司）；1% 醋酸铀染液（中镜科仪）；MTX（上海源叶生物科技有限公司）；Alix 抗体、TSG101 抗体（成都正能生物技术有限责任公司）；β-actin 抗体（北京中杉金桥生物技术有限公司）；辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG（美国 Abcam 公司）；PVDF 膜（美国 Millipore 公司）；增强型化学发光试剂盒（美国 Thermo 公司）；MTT（德国 Sigma Aldrich 公司）。

1.3　细胞系

小鼠肝癌细胞 Hepa 1-6 和人类肝癌细胞 HepG2 来自武汉普诺赛生命科技有限公司；RAW264.7 细胞来自中国科学院细胞库。

2　方法与结果

2.1　细胞培养

Hepa 1-6、HepG2 和 RAW264.7 细胞用含 10% FBS 和 1% 青霉素 - 链霉素的 DMEM 培养基，在 37 ℃、5%CO_2 恒温培养箱中培养。

2.2　巨噬细胞来源外泌体的提取

采用超速离心法提取外泌体，收集 RAW264.7 细胞的培养液，4 ℃ 下分别以 300 g（10 min）、2000 g（10 min）和 10 000 g（30 min）离心，取上清液，过 0.22 μm 的微孔滤膜以除去细胞碎片，然后以 100 000 g（70 min）离心两次，将沉淀重悬于 PBS 中，即得 Exos。

2.3　MTX-Exos 制备

采用超声孵育的方法制备 MTX-Exos。将 MTX 和 Exos（30 μg，以蛋白量计）混合，冰浴下超声（功率 20 W，每循环 5 s 开，5 s 关，超声 1 min，循环 6 次，循环间隔 2 min）后，混合物在 37 ℃下孵育 1 h 使 Exos 膜恢复。低速离心（10 000 g，10 min）除去未被包载的 MTX，超速离心（100 000 g，70 min）收集 MTX-Exos。

2.4　外泌体表征

2.4.1　粒径及 Zeta 电位　分别取 100 μL 的 Exos 和 MTX-Exos，用超纯水稀释 10 倍，室温平衡 2 min 后过 0.22 μm 微孔滤膜，用马尔文粒度分析仪进行检测。结果见图 1，Exos 的粒径为（128.8±1.5）nm，而 MTX-Exos 的粒径在药物加载后略有增加，粒径为（174.3±3.2）nm。尺寸的变化可能与 MTX 融入 Exos 的脂质双分子层有关，这可能是由于疏

水作用引起的表面吸附。Exos 和 MTX-Exos 的 Zeta 电位分别为（－14.3±0.8）mV 和（－10.8±0.3）mV，表明两者稳定性良好。

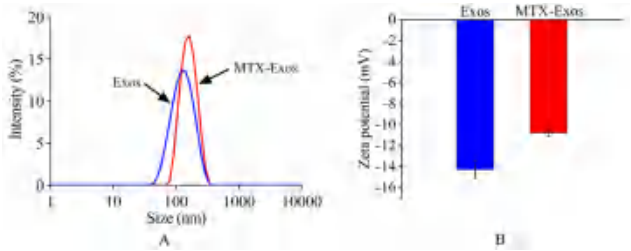


图 1　Exos 和 MTX-Exos 的粒径（A）和 Zeta 电位（B）

Fig 1　Particle size（A）and Zeta potential（B）of Exos and MTX-Exos

2.4.2　形态分析　分别取 10 μL 的 Exos 和 MTX-Exos 滴加在 200 目碳涂层的铜网上，静置 1 min，用滤纸吸去浮液，随后滴加 1% 的醋酸铀染液染色 1 min，吸去多余染液，晾干后于透射电子显微镜下观察样品形态并拍照，结果见图 2。相较于 Exos，MTX-Exos 直径略有增加，与 DLS 结果一致；两者包膜完整，呈经典的茶托状结构，颗粒分散良好，背景干净清晰。

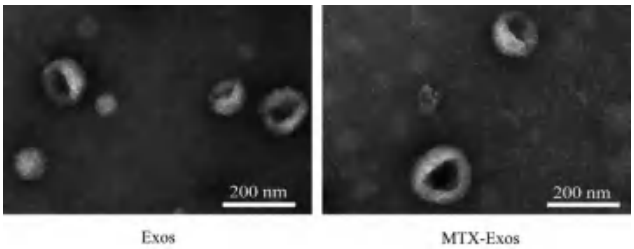


图 2　Exos 和 MTX-Exos 的形态图

Fig 2　Morphology of Exos and MTX-Exos

2.4.3　外泌体特异性蛋白的检测　分别提取 RAW264.7 细胞、Exos 及 MTX-Exos 总蛋白，BCA 定量蛋白质含量后，加入蛋白样品上样缓冲液，100 ℃煮沸 5 min，冷却至室温，取适量蛋白样品用 SDS-PAGE 凝胶分离并转移至 PVDF 膜上。再用 5% 的脱脂牛奶在室温下封闭膜 2 h，TBST 洗涤后分别于 TSG101 及 Alix 抗体溶液（1∶1000）中 4 ℃孵育过夜，TBST 洗涤，加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG（1∶12 000）室温下孵育 2 h，使用增强型化学发光试剂盒检测蛋白表达。结果见图 3，以 RAW264.7 细胞为阴性对照，载药前后 Exos 均表达蛋白 Alix 和 TSG101，结果表明负载 MTX 不会影响 Exos 特异性蛋白的表达。

2.5　MTX-Exos 中 MTX 含量测定

2.5.1　色谱条件　色谱柱：COSMOSIL C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相：乙腈 -7.0% 柠檬酸 -2.0% 无水磷酸氢二钠（10∶10∶80，*V*/*V*/*V*），流速：1 mL • min^{-1}，柱温：30 ℃；检测波长：302 nm；进样量：20 μL。

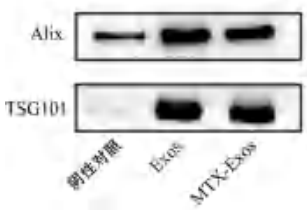


图 3　外泌体特异性蛋白 Alix 和 TSG101 的表达

Fig 3　Expression of Exos markers Alix and TSG101

2.5.2　溶液的制备

① 对照品溶液：精密称量 5.03 mg 的 MTX 对照品，流动相定容至 10 mL 得到 503 μg • mL^{-1} MTX 储备液，精密移取适量 MTX 储备液，流动相稀释后 12 000 r • min^{-1} 离心 10 min，即得。

② 供试品溶液：分别取空白 Exos 和 MTX-Exos 100 μL 于 1 mL 量瓶中，加入适量流动相，超声破乳，随后用流动相定容至刻度，12 000 r • min^{-1} 离心 10 min 后取上清，即得。

2.5.3　专属性考察　精密吸取对照品及供试品溶液 20 μL，按“2.5.1”项下色谱条件进样分析。MTX、Exos 及 MTX-Exos 的色谱图见图 4，MTX 的保留时间在 7.5 min，峰形良好，空白 Exos 在该保留时间没有响应，说明对 MTX 的含量测定没有影响。

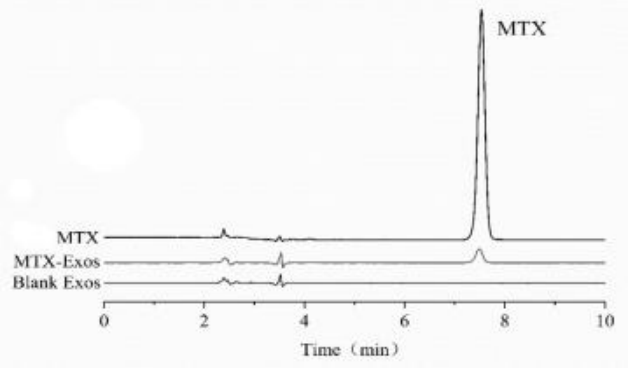


图 4　MTX、MTX-Exos 和空白 Exos 的色谱图

Fig 4　Chromatograms of MTX，MTX-Exos and blank Exos

2.5.4　线性关系考察　取 MTX 储备液适量，配制成 0.05、0.125、0.25、0.5、1、2、4 μg • mL^{-1} 的 MTX 工作液，进样测定，对其进行线性拟合，得到线性回归方程：$Y = 1.033X + 0.0259$（$R^2 = 0.9998$），可知 MTX 在 0.05 ～ 4 μg • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好。

2.5.5　MTX-Exos 载药量的测定　精密吸取 MTX-Exos 样品溶液 20 μL 按“2.5.1”项下色谱条件进样分析，计算载药量。载药量（*DL*，%）＝ $W_1/W_2 \times 100\%$，其中 W_1 为 MTX-Exos 包载的 MTX 量，W_2 为 Exos 的蛋白含量。

2.5.6　MTX-Exos 处方优化　将 Exos（30 μg，以蛋白含量计）和 MTX 按不同比例制备 MTX-Exos，以载药量作为考察指标，筛选出 MTX 与 Exos 的最

优比例。结果如表 1 所示，在一定量的外泌体中，MTX-Exos 的载药量随着药物剂量的增加而增加。在外泌体与 MTX 的比例为 1∶4 时，载药量最大，为（2.81±0.02）%。

表 1　MTX-Exos 制备工艺优化（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Tab 1　Optimization of MTX-Exos preparation process（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Exos∶MTX	载药量 /%
1∶1	0.50±0.01
1∶2	1.03±0.01
1∶3	1.35±0.01
1∶4	2.81±0.02

2.6　体外释放

本试验采用透析法（分子量 8000 ～ 14 000 Da，21 mm）对 MTX 溶液及 MTX-Exos 的体外释放性能进行考察。分别取等量的 MTX 溶液及 MTX-Exos 置于预先处理好的透析袋中，随后将透析袋浸入相同体积的释放介质中（PBS，pH 7.4），37 ℃、200 r • min^{-1} 条件下搅拌。在预定的时间点各取样 1 mL 并补充相同体积的释放介质，12 000 r • min^{-1} 离心 10 min 后取上清液进样分析，代入标准曲线计算相应浓度，计算累积释放百分率（Q）并绘制体外释放曲线，结果如图 5 所示，MTX 溶液释放迅速，2 h 内释放 80% 以上，8 h 基本释放完全，达到（92.10±1.81）%；MTX-Exos 前 12 h 释放迅速，12 h 后趋于平缓，MTX-Exos 36 h 的累积释放率为（89.00±1.91）%，由此可知，MTX-Exos 释放比 MTX 原料药更慢。

$$Q(\%)=\{C_i\times V_1+(C_1+C_2+\cdots+C_{i-1})\times V_2\}/M\times 100\%$$

其中，C_1、C_2、C_{i-1}、C_i 分别为第 1、2、$i-1$、i 时间点释放介质中 MTX 的浓度，V_1 代表释放介质的总体积，V_2 代表所取样品的体积。

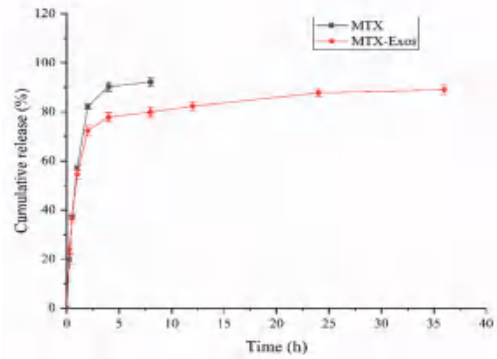


图 5　MTX 及 MTX-Exos 的体外释药曲线

Fig 5　In vitro drug release profiles of MTX and MTX-Exos

2.7　细胞相容性分析

将 Hepa l-6 和 HepG2 细胞分别按每孔 5×10^3 个的密度接种至 96 孔板中。37 ℃、5%CO_2 条件下培养 24 h 后每孔分别加入蛋白质量浓度为 25、50、100、150 μg • mL^{-1} 的 Exos，空白对照孔不作处理，培养 48 h 后，每孔加入 20 μL MTT 溶液（5 mg • mL^{-1}，PBS 配制），在 37 ℃下培养 4 h，然后加入 150 μL DMSO，在 490 nm 处测量吸光度（A）值并计算细胞存活率。细胞存活率（%）＝$A_{\text{Exos 处理孔}}/A_{\text{空白对照孔}}\times 100\%$。结果如图 6 所示，在测试的所有浓度中，Hepa1-6 细胞和 HepG2 细胞的存活率均在 95% 以上，两种细胞的增殖情况未受影响，表明 Exos 与 Hepa1-6 和 HepG2 细胞具有良好的相容性。

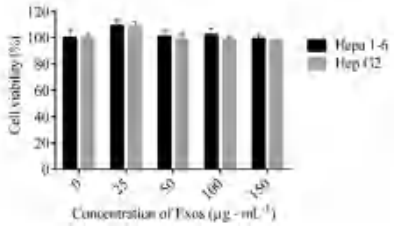


图 6　Exos 对 Hepa l-6、HepG2 细胞存活率的影响

Fig 6　Effect of Exos on the cell viability of Hepa l-6 and HepG2

2.8　细胞毒性试验

将 Hepa l-6 和 HepG2 细胞分别接种至 96 孔板中，每孔 5×10^3 个细胞。然后分别用 PBS、游离 MTX、MTX-Exos 处理细胞（MTX 浓度分别为 0、25、50、100 和 150 μmol • L^{-1}）。培养 48 h 后，每孔加入 20 μL 5 mg • mL^{-1} MTT 溶液（用 PBS 配制），在 37 ℃下培养 4 h，然后加入 150 μL DMSO，在 490 nm 处测量吸光度，计算细胞存活率，细胞存活率（%）＝$A_{\text{Exos 处理孔}}/A_{\text{空白对照孔}}\times 100\%$。结果见图 7，与游离 MTX 组（$IC_{50}$ ＝ 133.9 μmol • L^{-1}）相比，MTX-Exos（IC_{50} ＝ 108.4 μmol • L^{-1}）对 HepG2 细胞表现出更强的细胞毒性。在 Hepa1-6 细胞中也发现了类似的结果，游离 MTX 的 IC_{50} 值为 125.0 μmol • L^{-1}，而 MTX-Exos 则降至 99.9 μmol • L^{-1}。表明 MTX-Exos 相较于游离 MTX 在体外对肝癌细胞的增殖具有更强的抑制效果。

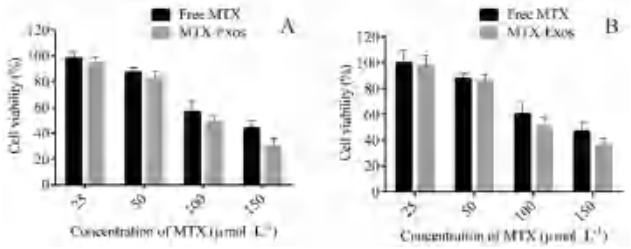


图 7　不同浓度 MTX、MTX-Exos 对 Hepa 1-6 细胞（A）及 HepG2 细胞（B）存活率的影响

Fig 7　Effect of different concentrations of MTX and MTX-Exos on the cell viability of Hepa 1-6 cells（A）and HepG2 cells（B）

3　讨论

现有的 Exos 载药方法可分为分泌前载药和分泌后载药两大类，分泌前载药是将药物与 Exos 亲本细胞共孵育让药物进入细胞质，进而在 Exos 分泌的过程中将药物包载进 Exos 内，该法能够较好地保留 Exos 结构的完整性，但是载药效率较低[16-18]。为提高载药效率，研究人员通常选择分泌后载药：先提取纯化 Exos，然后通过共孵育、超声、电穿孔、挤出等方式将药物包载进 Exos 内，其中超声法操作简便，具有良好的包载效率[19-23]，因此本研究采用超声孵育法制备 MTX-Exos 载药体系。结果显示载药前后 Exos 形态以及特异性蛋白没有较大变化，表明超声没有破坏 Exos 结构，可以利用超声法将 Exos 作为递送 MTX 的有效载体。

MTX 作为一种抗代谢药物，对 HCC 具有良好的治疗作用，细胞毒性试验结果显示 MTX-Exos 载药体系相较于游离 MTX，显著抑制了 HCC 细胞的增殖，在体外表现出更为优异的抗 HCC 活性。本研究构建了以巨噬细胞来源的 Exos 作为药物载体的 MTX-Exos 药物递送体系，表明以巨噬细胞来源的 Exos 作为递药载体的潜力巨大，同时也为 MTX 的临床应用提供了一种新的思路。

参考文献

[1] Tian Q，Zhang CN，Wang XH，et al. Glycyrrhetinic acid-modified chitosan/poly（ethylene glycol）nanoparticles for liver-targeted delivery [J]. Biomaterials，2010，31（17）：4748-4756.

[2] Abdelmoneem MA，Elnaggar MA，Hammady RS，et al. Dual-targeted lactoferrin shell-oily core nanocapsules for synergistic targeted/herbal therapy of hepatocellular carcinoma [J]. ACS Appl Mater Interfaces，2019，11（30）：26731-26744.

[3] Stapf M，Teichgraber U，Hilger I. Methotrexate-coupled nanoparticles and magnetic nanochemothermia for the relapse-free treatment of T24 bladder tumors [J]. Int J Nanomedicine，2017，12：2793-2811.

[4] 谢黎崖，李岩秀，曹伟，等 . 甲氨蝶呤磷脂复合物纳米粒的制备及表征 [J]. 药物生物技术，2018，25（6）：471-475.

[5] Thery C，Witwer KW，Aikawa E，et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018（MISEV2018）：a position statement of the International Society for extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines [J]. J Extracell Vesicles，2018，7（1）：1535750.

[6] De Jong OG，Van Balkom BW，Schiffelers RM，et al. Extracellular vesicles：potential roles in regenerative medicine [J]. Front Immunol，2014，5：608.

[7] Johnsen KB，Gudbergsson JM，Skov MN，et al. A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles-endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy [J]. Biochim Biophys Acta，2014，1846（1）：75-87.

[8] Munson P，Shukla A. Exosomes：potential in cancer diagnosis and therapy [J]. Medicines（Basel），2015，2（4）：310-327.

[9] Anderson NR，Minutolo NG，Gill S，et al. Macrophage-based approaches for cancer immunotherapy [J]. Cancer Res，2021，81（5）：1201-1208.

[10] Tsukamoto H，Komohara Y，Oshiumi H. The role of macrophages in anti-tumor immune responses：pathological significance and potential as therapeutic targets [J]. Hum Cell，2021，34（4）：1031-1039.

[11] Aucher A，Rudnicka D，Davis DM. MicroRNAs transfer from human macrophages to hepato-carcinoma cells and inhibit proliferation [J]. J Immunol，2013，191（12）：6250-6260.

[12] Haney MJ，Zhao Y，Jin YS，et al. Macrophage-derived extracellular vesicles as drug delivery systems for triple negative breast cancer（TNBC）therapy [J]. J Neuroimmune Pharmacol，2020，15（3）：487-500.

[13] 杨斌，张海泉，于鲜君，等 . 细胞间黏附分子 -1 在肝癌组织中表达及临床意义 [J]. 临床军医杂志，2019，47（9）：920-922.

[14] 孙帝力，陈婧，高金峰，等 . 基于巨噬细胞的药物递送系统在心血管疾病中的诊疗进展 [J]. 中国临床医学，2022，29（5）：857-863.

[15] Kim MS，Haney MJ，Zhao Y，et al. Engineering macrophage-derived exosomes for targeted paclitaxel delivery to pulmonary metastases：in vitro and in vivo evaluations [J]. Nanomedicine，2018，14（1）：195-204.

[16] 邢昊楠，陆梅，刘瑛琪，等 . 基于外泌体的抗肿瘤药物靶向递送的研究进展 [J]. 药学学报，2022，57（1）：150-158，277.

[17] 余亚辉，吕田田，薛丙权，等 . 外泌体装载连翘酯苷 A 递药系统的制备及体外评价 [J]. 中国中药杂志，2021，46（11）：2824-2829.

[18] 张靖悦，李云，杨翀 . 外泌体靶向给药系统的研究现状 [J]. 天津药学，2021，33（5）：68-73.

[19] Luo S，Sun X，Huang M，et al. Enhanced neuroprotective effects of epicatechin gallate encapsulated by bovine milk-derived exosomes against Parkinson’s disease through antiapoptosis and antimitophagy [J]. J Agric Food Chem，2021，69（17）：5134-5143.

[20] Hood JL，Scott MJ，Wickline SA. Maximizing exosome colloidal stability following electroporation [J]. Anal Biochem，2014，448：41-49.

[21] Tran PHL，Wang T，Yin W，et al. Aspirin-loaded nanoexosomes as cancer therapeutics [J]. Int J Pharm，2019，572：118786.

[22] Kim MS，Haney MJ，Zhao Y，et al. Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells [J]. Nanomedicine，2016，12（3）：655-664.

[23] 陈晓峰，王开元，梁芳铭，等 . 外泌体递药系统及其在肿瘤治疗中的应用 [J]. 化学进展，2022，34（4）：773-786.

（收稿日期：2022-12-07；修回日期：2022-12-30）

尖尾芋石油醚部位化学成分及抗乳腺癌作用研究

陈娅[1, 2]，王鹏[1, 2]，彭兰淳[1, 2]，郑青竹[1, 2]，陈厅[3]，彭江丽[1, 4]，彭求贤[1, 2*]（1. 湖南中医药大学药学院，长沙　410208；2. 湘产大宗药材品质评价湖南省重点实验室，湖南中医药大学，长沙　410208；3. 湖南中医药大学中西医结合学院，长沙　410208；4. 湖南省中药活性物质筛选工程技术研究中心，长沙　410208）

摘要：目的　探讨尖尾芋石油醚部位的化学成分及其抗乳腺癌作用。**方法**　采用 GC-MS 法分析尖尾芋石油醚部位（EAC）的化学成分，CCK-8 法检测 EAC 对 MDA-MB-231 细胞和 4T1 细胞活性的影响，显微镜观察 EAC 对 MDA-MB-231 形态的影响，Western blot 法检测 EAC 处理后，MAPKs 信号通路蛋白的表达情况。**结果**　共鉴定出 53 个化学成分，主要成分为脂肪酸类、甾醇类等。EAC 能抑制 MDA-MB-231 细胞和 4T1 细胞的活性，改变 MDA-MB-231 细胞的形态，能抑制 MAPKs 信号通路中 p-ERK/ERK 的表达。**结论**　EAC 可抑制 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的增殖，可能与下调 ERK 蛋白磷酸化有关。

关键词：尖尾芋；乳腺癌；MAPKs 信号通路；ERK 蛋白
中图分类号：R285.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0844-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.002

Chemical compositions and mechanism of anti-breast cancer activity of petroleum ether site of *Alocasia cucullate* (Lour.) Schoot.

CHEN Ya[1, 2], WANG Peng[1, 2], PENG Lan-chun[1, 2], ZHENG Qing-zhu[1, 2], CHEN Ting[3], PENG Jiang-li[1, 4], PENG Qiu-xian[1, 2*] (1. *School of Pharmacy*, *Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha* 410208; 2.*Key Laboratory for Quality Evaluation of Bulk Herbs of Hunan Province*, *Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha* 410208; 3. *College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, *Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha* 410208; 4. *Hunan Engineering Research Center of Bioactive Substance Discovery of Chinese Medicine*, *Changsha* 410208)

Abstract: Objective　To determine the chemical compositions and mechanism of anti-breast cancer activity of petroleum ether site of *Alocasia cucullate* (Lour.) Schoot. (EAC). **Methods**　The chemical compositions in EAC were analyzed by GC-MS, the effect of EAC on the activity of MDA-MB-231 cells and 4T1 cells was detected by CCK-8, the morphology of MDA-MB-231 cells was observed by microscopy, and the level of protein in MAPKs signaling pathway was detected by Western blot. **Results**　Totally 53 chemical components being identified, the major components were fatty acids and sterols. The activity of MDA-MB-231 cells and 4T1 cells and the expression of p-ERK/ERK protein in the MAPKs signaling pathway were inhibited by EAC. The morphology of MDA-MB-231 cells was changed by EAC. **Conclusion**　EAC can inhibit the proliferation of MDA-MB-231 cells, possibly by down-regulating the phosphorylation of ERK protein.

Key words: *Alocasia cucullate* (Lour.) Schoot.; breast cancer; MAPKs signaling pathway; ERK protein

近年来，乳腺癌已经成为我国女性最常见的健康杀手之一，严重威胁了女性的健康[1]。在世界范围内，乳腺癌占癌症发病率的 10%，占女性恶性肿瘤发病率的 25% ～ 30%，占女性肿瘤相关死亡率的 15%。世界卫生组织（WHO）发表的最新的《全球癌症报告 2020》显示乳腺癌在世界女

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81973593），湖南省研究生科研创新项目（No.CX20210715）；湖南省自然科学基金（No.2019JJ50429）。
作者简介：陈娅，女，在读硕士研究生，主要从事中药抗肿瘤的作用机制研究，email：1452656475@qq.com　*通信作者：彭求贤，男，硕士研究生导师，主要从事中药抗肿瘤的作用机制研究，email：cspqx@163.com

性中成为发病率最高的癌症，在 2018 年有 210 万乳腺癌新病例，有 2.7 万人死于乳腺癌 [2]。目前，西医治疗乳腺癌的方法主要是以手术为基础，同时配合放化疗、内分泌治疗、分子靶向治疗等手段 [3]。但手术引起的并发症多，且费用高昂，很多患者无法承担。中药及活性成分的干预作用具有多靶点、多途径、多环节等特点，对治疗乳腺癌有明显的疗效 [4]，例如淫羊藿素、淫羊藿苷等淫羊藿中的有效成分能通过多机制抑制乳腺癌细胞的增殖并诱导其凋亡发挥抗乳腺癌作用 [5]。

尖尾芋又名卜芥，是天南星科海芋属植物尖尾芋 [*Alocasia cucullata*（Lour.）Schott.] 的根茎。尖尾芋根茎是民间常用药，味辛、微苦，性寒，有毒，具有清热解毒，消肿镇痛的功效。用于治疗多种肿瘤、流感、高热不退、钩端螺旋体病、毒蛇咬伤、毒蜂螫伤、慢性支气管炎等 [6]，在中医临床中尖尾芋常被用于治疗乳腺癌 [7]。近年来，越来越多的研究表明尖尾芋对多种肿瘤细胞有较强的抑制作用 [8-11]，本课题组前期研究表明其水提物具有抑制乳腺癌生长的作用，与植物多糖增强免疫功能有关 [12-13]；其醇提物对黑色素瘤有抑制作用，与 PI3K/Akt 信号通路有关 [14]；其石油醚提取物对胃癌细胞有抑制作用，具体机制尚未明确。但有关尖尾芋石油醚部位的化学成分及其对人乳腺癌细胞活性的影响及其相关机制的研究尚未见报道。本研究通过初步检测尖尾芋石油醚部位化学成分，观察不同浓度尖尾芋石油醚部位对乳腺癌细胞活性的影响，并研究其对丝裂原活化蛋白激酶（mitogenactiveted protein kinase，MAPKs）信号通路的影响，为进一步开发尖尾芋作为防治乳腺癌药物提供实验依据。

1　材料

1.1　细胞株

MDA-MB-231 系人乳腺癌细胞株，4T1 系小鼠乳腺癌细胞株，均购自武汉普诺赛生命科技有限公司，由本实验室保存细胞。

1.2　试药

新鲜尖尾芋采集于广西省玉林市，经湖南中医药大学刘塔斯教授鉴定为天南星科海芋属植物尖尾芋 [*Alocasia cucullata*（Lour.）Schott.]。DMEM 高糖培养基、青霉素 - 链霉素溶液、PBS 缓冲液、0.25% 胰蛋白酶溶液（武汉普诺赛生命科技有限公司）；CCK-8 试剂盒（合肥兰杰柯科技有限公司）；RIPA 裂解液、磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂（江苏康为世纪生物科技股份有限公司）；BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、封闭液（上海碧云天生物技术有限公司）；凝胶试剂盒 [赛文创新（北京）生物技术有限公司]；甘氨酸、十二烷基硫酸钠、三羟甲基氨基甲烷（广州赛国生物科技有限公司）；甲醇（国药集团化学试剂有限公司）；PVDF 膜 [默克投资（中国）有限公司]；ERK1/2、JNK、P38、p-ERK1/2、p-JNK、p-P38（成都正能生物技术有限责任公司）。

1.3　仪器

QP2020 气质联用仪（岛津公司）；SW-CJ-1F 超净工作台（苏州安泰空气技术有限公司）；SQP 电子天平 [赛多利斯科学仪器（北京）有限公司，精度：0.0001 g]；二氧化碳培养箱 [赛默飞世尔科技（中国）有限公司]；TGL-16A 型医用离心机（长沙平凡仪器仪表有限公司）；TC-20 型全自动细胞计数仪（美国 BIORAD 公司）；S1LFA 多功能酶标仪（美国伯腾仪器有限公司）；ZWY-100H 型恒温培养振荡器（上海智城分析仪器制造有限公司）。

2　方法

2.1　药材提取

取新鲜尖尾芋根茎适量，切片，晒干，粉碎。取尖尾芋粉末 2 kg，以 10 倍量 70% 乙醇浸泡 24 h，回流提取 4 次（10、8、8、8 倍），每次 3 h，合并提取液，浓缩至浸膏，用 1000 mL 石油醚萃取至无色，萃取液合并浓缩得石油醚部位（8 g）。

2.2　GC-MS 法成分分析

取石油醚部位 50 mg 溶于 2 mL 1% 硫酸 - 甲醇溶液，70 ℃恒温加热 30 min，加 2 mL 正己烷，5 mL 蒸馏水，混匀，静置分层，取上清液，即得。

气相色谱条件：采用色谱 Rtx-5MS 柱（0.25 μm×30 m×0.25 m）；进样口温度 250 ℃；程序升温起始温度 100 ℃，保持 2 min，以 10 ℃ • min^{-1} 升至 300 ℃，保持 8 min；载气氦气，流速 1 mL • min^{-1}；分流比 50∶1，进样量 1 μL。

质谱条件：电离方式为电轰击电离（EI）；电离能量 70 eV；离子源温度 250 ℃，接口温度 250 ℃；*m/z* 扫描范围 41 ～ 450。

2.3　细胞培养

收集对数生长期的人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞和 4T1 小鼠乳腺癌细胞，接种在含 10% 胎牛血清（FBS）的高糖 DMEM 培养基中，于 37 ℃、5%CO_2 无菌细胞培养箱培养。待细胞长至培养瓶面积的 80% ～ 90% 时，用 0.25% 胰酶在培养箱中消化 2 min，按 1∶2 ～ 1∶4 的比例进行传代，取对数生长期细胞制成细胞悬液用于后续实验。

2.4　CCK-8 法检测尖尾芋石油醚部位对 MDA-MB-231 细胞、4T1 细胞活性的影响

收集对数期生长的 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞和 4T1 小鼠乳腺癌细胞。细胞悬液稀释至

1×10^5 个 • mL^{-1} 接种于 96 孔细胞培养板中，每孔 100 μL，37 ℃培养箱中过夜。待细胞充分贴壁后更换培养液，分别加入 0、25、50、100、150、200 μg • mL^{-1} 的尖尾芋以及 2 mmol • L^{-1} 的阳性药 5- 氟尿嘧啶（5-FU），其中 0 μg • mL^{-1} 为模型对照组（Ctrl），另设置不含细胞的空白对照组。每个给药浓度组均设 6 个以上复孔，药物干预 24 h 后终止，每孔加入 10 μL CCK-8 溶液，再放回培养箱 4 h 后测定各孔的吸光度（450 nm 波长）。计算不同浓度尖尾芋石油醚部位作用下 MDA-MB-231 细胞和 4T1 细胞的存活率，并计算尖尾芋石油醚部位的半数抑制浓度（IC_{50}）。

细胞存活率（%）＝[$OD_{给药}$ － $OD_{空白对照}$]/[$OD_{模型对照}$ － $OD_{空白对照}$]×100%。

2.5　细胞形态学观察

收集对数期生长的人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞。细胞悬液稀释至 1×10^5 个 • mL^{-1} 细胞密度接种于 96 孔细胞培养板中，37 ℃培养箱中过夜。待细胞充分贴壁后更换培养液，分别加入低、中、高质量浓度（50、100、150 μg • mL^{-1}）的尖尾芋石油醚部位以及 2 mmol • L^{-1} 的阳性药组 5-FU，其中 0 μg • mL^{-1} 为模型对照组（Ctrl）。每个给药浓度组均设 6 个复孔，药物干预 24 h 后于倒置显微镜下观察细胞生长情况及形态变化并采集图像。

2.6　免疫印迹分析检测 MDA-MB-231 细胞 MAPK 信号通路相关蛋白的表达情况

收集对数期生长的人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞，稀释至 5×10^5 个 • mL^{-1} 接种于 6 孔板中，待细胞贴壁后，分别以低、中、高质量浓度（50、100、150 μg • mL^{-1}）的尖尾芋以及 2 mmol • L^{-1} 的 5-FU 进行药物干预，其中 0 μg • mL^{-1} 为模型对照组（Ctrl），培养 24 h 后，按细胞总蛋白提取试剂盒说明书提取各组细胞总蛋白，用 BCA 试剂盒对各组所提蛋白进行定量。按每孔 20 μg 蛋白等量上样在 10% SDS-PAGE 进行电泳，然后转移至 PVDF 膜上，封闭液中封闭 15 min。随后加入稀释好的一抗，于 4 ℃摇床孵育过夜，用 TBST 洗涤 3 次，然后加入二抗于 37 ℃孵育 1 h。采用 Image J 进行电泳条带分析。以目的蛋白与 GAPDH 灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量，实验独立重复 3 次。

2.7　统计学分析

应用 SPSS 21.0 统计软件对数据进行统计学分析，计量结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 GraphPad Prism 9 软件绘制相关柱状图。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3　结果

3.1　尖尾芋石油醚部位的化学成分

尖尾芋石油醚部位挥发性成分的总离子流图（见图 1），采用归一化法计算各成分相对含量，采用 NIST 质谱图库检索，选择匹配度高于 80 的峰，鉴定出尖尾芋石油醚部位的 53 个化学成分，结果见表 1。含量占前四位的化学成分分别是亚油酸甲酯（21.12%）、棕榈酸甲酯（18.34%）、顺式 - 十八烷酸甲酯（11.72%）、γ- 谷甾醇（5.70%）。

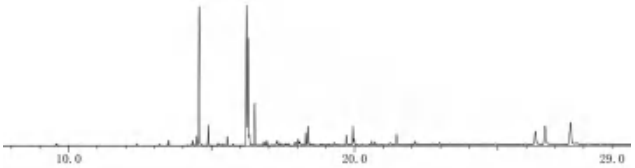


图 1　尖尾芋石油醚部位挥发性成分的总离子流图

Fig 1　Total ion flow diagram of volatile components at ether site of *Alocasia cucullate* (Lour.) Schoot.

3.2　尖尾芋石油醚部位对 MDA-MB-231 和 4T1 细胞活性的影响

将 MDA-MB-231 和 4T1 细胞用不同浓度的尖尾芋石油醚部位刺激 24 h 后，MDA-MB-231 细胞、4T1 细胞的活力均受到抑制，并且尖尾芋石油醚部位浓度越大，细胞存活率越小，见图 2。MDA-MB-231 细胞 IC_{50} 为 86.29 μg • mL^{-1}，4T1 细胞 IC_{50} 为 154.2 μg • mL^{-1}。MDA-MB-231 细胞活力受尖尾芋石油醚部位刺激后的影响更大。因此后续实验选择 MDA-MB-231 细胞，选择 50、100、150 μg • mL^{-1} 分别作为低剂量组（l-EAC）、中剂量组（m-EAC）、高剂量组（h-EAC）。

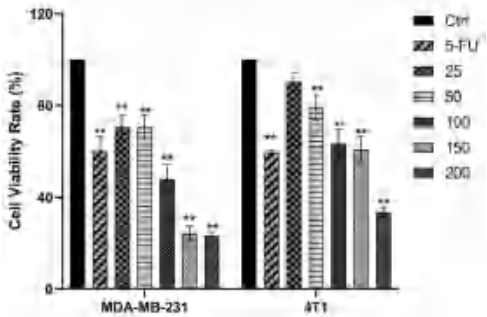


图 2　尖尾芋石油醚部位对 MDA-MB-231 和 4T1 细胞活力的影响（$\bar{x}\pm s$，$n = 6$）

Fig 2　Effect of ether site of *Alocasia cucullate* (Lour.) Schoot. on the cell viabitity of MDA-MB-231 and 4T1 cell（$\bar{x}\pm s$，$n = 6$）

注：与模型对照组比较，$^{**}P < 0.01$。

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

3.3　尖尾芋石油醚部位对 MDA-MB-231 形态的影响

由图 3 可知，模型对照组细胞形态规则呈梭形，边缘清晰。而经过不同浓度的尖尾芋处理后出现了形态变化，细胞边缘模糊，细胞数量也减少，并且随着浓度的增加，此现象更加明显，以高剂量组（h-EAC）150 μg • mL^{-1} 最明显。

表 1　尖尾芋石油醚部位挥发性成分分析结果

Tab 1　Volatile component of ether site of *Alocasia cucullate* (Lour.) Schoot.

编号	保留时间 /min	化合物	化学式	相对含量 /%	匹配度 /%
1	9.566	*β-D*- 阿洛糖	$C_6H_{12}O_6$	0.36	96
2	10.021	月桂酸甲酯	$C_{13}H_{26}O_2$	0.04	96
3	10.269	壬二酸二甲酯	$C_{11}H_{20}O_4$	0.08	95
4	10.765	*β-D*-glucofuranose，1，6-anhydro-	$C_6H_{10}O_5$	0.04	94
5	10.884	十二醛二甲缩醛	$C_{14}H_{30}O_2$	0.04	88
6	11.100	methyl（7Z）-7-hexadecenoate	$C_{17}H_{32}O_2$	0.02	89
7	11.984	12- 甲基十三烷酸甲酯	$C_{15}H_{30}O_2$	0.03	95
8	12.285	2-*O*-butyl-1-*O*-methyl benzene-1，2-dicarboxylate	$C_{13}H_{16}O_4$	0.01	92
9	12.329	十七碳醛	$C_{17}H_{34}O$	0.03	96
10	12.399	肉豆蔻酸甲酯	$C_{15}H_{30}O_2$	0.21	97
11	13.103	十五酸甲酯	$C_{16}H_{32}O_2$	0.03	95
12	13.452	2- 乙基己基己二酸氢酯	$C_{14}H_{26}O_4$	0.12	80
13	13.500	十五酸甲酯	$C_{16}H_{32}O_2$	0.54	97
14	14.220	亚油酸	$C_{18}H_{32}O_2$	0.02	84
15	14.339	棕榈油酸甲酯	$C_{17}H_{32}O_2$	1.92	96
16	14.566	棕榈酸甲酯	$C_{17}H_{34}O_2$	18.34	96
17	14.884	邻苯二甲酸二丁酯	$C_{16}H_{22}O_4$	2.15	97
18	15.229	十六酸乙酯	$C_{18}H_{36}O_2$	0.30	85
19	15.408	cyclopropaneoctanoicacid	$C_{18}H_{34}O_2$	0.22	95
20	15.547	十七烷酸甲酯	$C_{18}H_{36}O_2$	0.93	95
21	15.754	2- 羟基十六烷酸甲酯	$C_{17}H_{34}O_3$	0.18	93
22	16.227	亚油酸甲酯	$C_{19}H_{34}O_2$	21.12	95
23	16.278	顺式 - 十八烷酸甲酯	$C_{19}H_{36}O_2$	11.72	85
24	16.321	油酸甲酯	$C_{19}H_{36}O_2$	1.39	93
25	16.445	octadec-15-ensaeuremethylester	$C_{19}H_{36}O_2$	0.13	94
26	16.504	硬脂酸甲酯	$C_{19}H_{38}O_2$	4.98	97
27	16.585	9- 炔十八酸甲酯	$C_{19}H_{34}O_2$	0.01	91
28	16.821	亚油酸乙酯	$C_{20}H_{36}O_2$	0.36	94
29	17.303	芥酸甲酯	$C_{23}H_{44}O_2$	0.48	92
30	18.291	花生酸甲酯	$C_{21}H_{42}O_2$	1.34	94
31	18.366	methyl-13，14-epoxyinbricatolate	$C_{21}H_{34}O_4$	2.09	90
32	18.807	己二酸二（2- 乙基己）酯	$C_{22}H_{42}O_4$	0.09	90
33	19.130	二十一烷酸甲酯	$C_{22}H_{44}O_2$	0.14	95
34	19.712	13，16- 顺 - 二十二碳二烯酸甲酯	$C_{23}H_{42}O_2$	1.16	95
35	19.939	山嵛酸甲酯	$C_{23}H_{46}O_2$	2.16	93
36	19.983	邻苯二甲酸二辛酯	$C_{24}H_{38}O_4$	0.72	96
37	20.501	2-methylhexacosane	$C_{27}H_{56}$	0.04	93
38	20.715	二十三酸甲酯	$C_{24}H_{48}O_2$	0.30	95
39	21.249	triacontane-1，29-diol	$C_{30}H_{62}O_2$	0.41	94
40	21.464	木蜡酸甲酯	$C_{25}H_{50}O_2$	1.23	94
41	21.585	间苯二甲酸二辛酯	$C_{24}H_{38}O_4$	0.02	86
42	21.974	正二十一烷	$C_{21}H_{44}$	0.04	93
43	22.095	角鲨烯	$C_{30}H_{50}$	0.39	97
44	22.191	二十五烷酸甲酯	$C_{26}H_{52}O_2$	0.16	93
45	22.725	正四十烷	$C_{40}H_{82}$	0.14	96
46	22.974	蜡酸甲酯	$C_{27}H_{54}O_2$	0.25	93
47	24.890	甲基二十八酸酯	$C_{29}H_{58}O_2$	0.08	90
48	24.941	维生素 E	$C_{29}H_{50}O_2$	0.15	95
49	25.972	麦角甾醇	$C_{28}H_{44}O$	0.21	93
50	26.319	菜油甾醇	$C_{28}H_{48}O$	3.10	87
51	26.655	植物甾醇	$C_{29}H_{48}O$	4.22	91
52	27.547	*γ*- 谷甾醇	$C_{29}H_{50}O$	5.70	94
53	27.756	岩皂甾醇	$C_{29}H_{48}O$	0.34	89

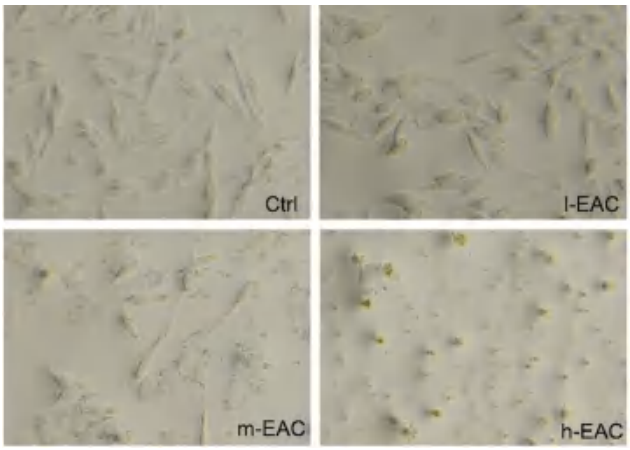


图 3　尖尾芋石油醚部位对 MDA-MB-231 细胞的形态学的影响（×10）

Fig 3　Effect of ether site of *Alocasia cucullate* (Lour.) Schoot. on MDA-MB-231 cells（×10）

3.4　尖尾芋石油醚部位对 MDA-MB-231 细胞 MAPK 信号通路的影响

与模型组比较，阳性药物组以及尖尾芋低剂量组、中剂量组、高剂量组均能下调 MDA-MB-231 细胞 MAPKs 信号通路中 ERK 的磷酸化蛋白 p-ERK 的表达（$P < 0.01$），而对其他 MAPKs 信号通路相关蛋白差异无统计学意义（见图 4）。

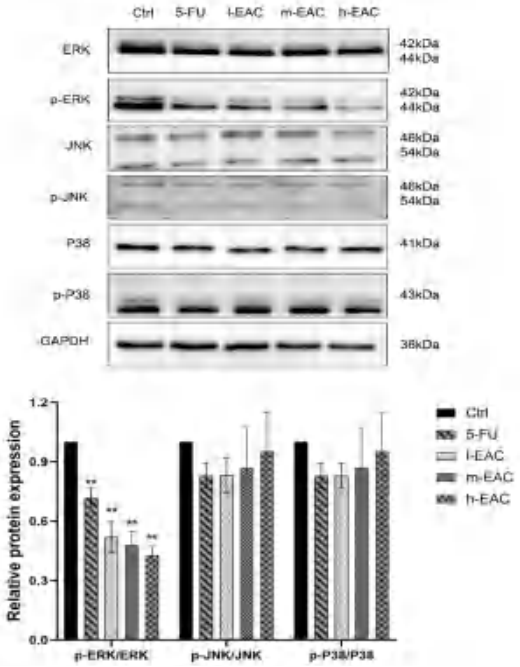


图 4　尖尾芋石油醚部位对 MDA-MB-231 细胞 MAPKs 信号通路的影响（$n = 3$）

Fig 4　Effect of ether site of *Alocasia cucullate* (Lour.) Schoot. on MAPKs pathway in MDA-MB-231 cells（$n = 3$）

注：与模型对照组比较，$^{**}P < 0.01$。

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

4　讨论

在预实验中，采用 GC-MS 检测未进行甲酯化的尖尾芋石油醚部位，结果样品的分离度和峰形较差，测出的主要成分为不饱和脂肪酸类和脂肪酸类，甲酯化处理后亚油酸甲酯化后为亚油酸甲酯，故样品中含有亚油酸。研究显示，尖尾芋石油醚部位中含有的不饱和脂肪酸类（如亚油酸、棕榈酸）、植物甾醇（如菜油甾醇、γ- 谷甾醇等）以及维生素 E 具有抗乳腺癌活性 [15-19]。油酸、亚油酸能通过早期下调 COX-2，降低 Bcl-2 的表达，诱导肿瘤细胞凋亡和细胞分化 [20-22]。植物甾醇能显著诱导 MCF-7 细胞的凋亡，增加 Bax/Bcl-2 水平，抑制 pro-caspase 9 和 pro-caspase 3 的表达 [23]。维生素 E 在小鼠乳腺癌模型中能促进细胞凋亡发挥抗肿瘤活性 [24]。由此推测，GC-MS 法鉴定出的亚油酸甲酯、棕榈酸甲酯、棕榈油酸甲酯、维生素 E、植物甾醇等成分可能为尖尾芋石油醚部位抗乳腺癌活性成分，且本课题组正在对尖尾芋石油醚部位化合物作纯化分离鉴定，验证推测预测出活性单体。本研究发现，尖尾芋作用于 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞后，对其细胞活性有显著抑制作用，并能明显改变 MDA-MB-231 细胞的形态，提示尖尾芋具有潜在的抗乳腺癌作用。

MAPK 信号通路在肿瘤细胞的增殖、凋亡等生命活动中具有重要作用 [25-26]，ERK、P38、JNK 是三条主要的信号转导通路，p38 和 JNK 功能类似，参与各种炎症、应激和化疗药物的信号转导，调控细胞的凋亡和生长；ERK 主要有 ERK1 和 ERK2 两种形式，其上游信号是著名的 Ras/Raf 蛋白，它们共同组成了经典的 Ras-Raf-MAPK 途径，参与各种生长因子、细胞因子、丝裂原以及激素受体活化后的信号转导，调节细胞的增殖、生长、分化、细胞迁移、代谢和转录 [27-29]。P38 信号通路被证实通过抑制间充质干细胞向原发性肿瘤的迁移发挥作用 [30]。JNK 信号通路能影响细胞周期调控发挥重要作用 [31]。大量研究表明调控 ERK 信号通路影响了乳腺癌的发生发展，如彭博等 [32] 在研究筋骨草总环烯醚萜对三阴性乳腺癌转移的抑制作用时发现其能显著降低 p-ERK1/2 蛋白的表达。Xing 等 [33] 发现乌司他丁抑制 ERK 信号通路能降低 ERK 和 FOXO3 的表达，从而抑制乳腺癌细胞的增殖促进其凋亡。在本研究中，笔者发现尖尾芋抑制了 p-ERK，而对 p-P38、p-JNK 无明显影响，提示尖尾芋可能通过抑制 MAPK 通路中 p-ERK/ERK 的表达来抑制 MDA-MB-231 细胞增殖。

但本研究仍存在不足，仅在 MDA-MB-231 细胞和 4T1 细胞中对尖尾芋的活性进行了研究，因此仍需对不同乳腺癌细胞系进行活性评价研

究。ERK 通路上游和下游仍有多个蛋白靶点，还需进一步的实验深入探究尖尾芋抗乳腺癌机制。

参考文献

[1] 商木岩，郭帅，张强，等 . 中国乳腺癌筛查现状 [J]. 实用癌症杂志，2020，35（11）：1911-1914.

[2] Torre LA，Islami F，Siegel RL，et al. Global cancer in women：burden and trends cancer [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev，2017，26（4）：444-457.

[3] 金明子，王丽祯，沈雪勇 . 中医外治法治疗乳腺癌相关上肢淋巴水肿的研究进展 [J]. 中国中医急症，2017，26（3）：464-466.

[4] 富琦，史琳，杨国旺，等 . 乳腺癌术后高危人群复发转移影响因素及中医治疗评价 [J]. 中国中医药信息杂志，2014，21（2）：27-31.

[5] 华辞怡，史有阳，谢颖，等 . 淫羊藿有效成分治疗乳腺癌作用机制的研究进展 [J]. 中草药，2022，53（20）：6593-6600.

[6] 李经纬，余欧，永欣，等 . 中医大辞典 [M]. 北京：人民卫生出版社，1995：30-31.

[7] 雷霄，徐朝晖，王源，等 . 海芋属植物化学成分及生物活性研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志，2013，32（3）：163-166.

[8] 雷霄，冯怡，梁爽，等 . 尖尾芋根茎石油醚部位抗肿瘤活性及化学成分研究 [J]. 中国医药工业杂志，2012，43（5）：340-343，380.

[9] Kaur A，Kamboj SS，Singh J，et al. Isolation of a novel *N*-acetyl-*D*-lactosamine specific lectin from *Alocasia cucullata*（Schott.）[J]. Biotechnol Lett，2005，27（22）：1815-1820.

[10] Dhuna V，Singh J，Saxena AK，et al. In vitro antiproliferative effect of *N*-acetyl-*D*-lactosamine specific lectin from alocasia indica on human cancer cell lines [J]. Eur Soc Med Oncol，2006，17（3）：37-41.

[11] Peng W，Chen ZY，Tang X，et al. Antitumor effect and apoptosis induction of *Alocasia cucullata*（Lour.）G. Don in human gastric cancer cells in vitro and in vivo [J]. BMC Complement Altern Med，2015，15（1）：33.

[12] Peng W，Liang S，Hu J，et al. The cytotoxic and tyrosine kinase inhibitory properties of C21 steroids and iridoids from the tubers of *Alocasia cucullata* [J]. J Nat Med，2016，70（3）：602-609.

[13] Peng QX，Cai HB，Sun XG，et al. *Alocasia cucullata* exhibits strong antitumor effect in vivo byactivating antitumor immunity [J]. PLoS One，2013，8（9）：e75328.

[14] Fang M，Zhu D，Luo C，et al. In vitro and in vivo anti-malignant melanoma activity of *Alocasia cucullata* via modulation of the phosphatase and tensin homolog/phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway [J]. J Ethnopharmacol，2018，213：359-365.

[15] 陆柏益，杨佳佳，熊丽娜 . 甾醇阿魏酸酯的功能、制备及检测方法研究进展 [J]. 现代食品科技，2013，29（12）：3063-3069.

[16] 周志远，卢群，刘洋，等 . 豆甾醇的研究及开发进展 [J]. 中国当代医药，2015，22（24）：15-17.

[17] Grattan BJ. Plant sterols as anticancer nutrients：evidence for their role in breast cancer [J]. Nutrients，2013，5（2）：359-387.

[18] Li JJ，Gu ZN，Pan Y，et al. Dietary supplementation of alpha-lino-lenic acid induced conversion of n-3 LCPUFAs and reduced prostatecancer growth in a mouse model [J]. Lipids Health Dis，2017，16（1）：136.

[19] Alqahtani S，Kaddoumi A. Vitamin E transporters in cancer therapy [J]. AAPS J，2015，17（2）：313-322.

[20] Ip C，Ip MM，Loftus T，et al. Induction of apoptosis by conjugated linoleic acid in cultured mammary tumor cells and premalignant lesions of the rat mammary gland [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev，2000，9（7），689-696.

[21] Kwong SC，Abd Jamil AH，Rhodes A，et al. Fatty acid binding protein 7 mediates linoleic acid-induced cell death in triple negative breast cancer cells by modulating 13-HODE [J]. Biochimie，2020，179：23-31.

[22] Llor X，Pons E，Roca A，et al. The effects of fish oil，olive oil，oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes [J]. Clin Nutr，2003，22：71-79.

[23] Xu H，Li Y，Han B，et al. Anti-breast-cancer activity exerted by β-Sitosterol-d-glucoside from sweet potato via upregulation of microRNA-10a and via the PI3K-Akt signaling pathway [J]. J Agric Food Chem，2018，66（37）：9704-9718.

[24] Lawson KA，Anderson K，Menchaca M，et al. Novel vitamin E analogue decreases syngeneic mouse mammary tumor burden and reduces lung metastasis [J]. Mol Cancer Ther，2003，2（5）：437-444.

[25] 马瑞莲，王毅 . MAPK 信号通路在乳腺癌中的研究进展 [J]. 内蒙古医科大学学报，2021，43（S1）：162-165.

[26] Yue J，López JM. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis [J]. Int J Mol Sci，2020，21（7）.

[27] Wen S，Hou Y，Fu L，et al. Cancer-associated fibroblast（CAF）-derived IL32 promotes breast cancer cell invasion and metastasis via integrin β3-p38 MAPK signalling [J]. Cancer Lett，2019，442：320-332.

[28] Guo YJ，Pan WW，Liu SB，et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis [J]. Exp Ther Med，2020，19（3）：1997-2007.

[29] Xie X，Deng T，Duan J，et al. Exposure to polystyrene microplastics causes reproductive toxicity through oxidative stress and activation of the p38 MAPK signaling pathway [J]. Ecotoxicol Environ Saf，2020，190：110-133.

[30] Hong B，Li H，Zhang M，et al. p38 MAPK inhibits breast cancer metastasis through regulation of stromal expansion [J]. Int J Cancer，2015，136（1）：34-43.

[31] Wu J，Sun J，Xue Y. Involvement of JNK and P53 activation in G_2/M cell cycle arrest and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in neuron cells [J]. Toxicol Lett，2010，199（3）：269-276.

[32] 彭博，杨依霏，王晶晶，等 . 筋骨草总环烯醚萜对三阴性乳腺癌转移的抑制作用及其机制研究 [J]. 中国药学杂志，2017，52（21）：1903-1908.

[33] Xing Z，Wang X，Liu J，et al. Effects of ulinastatin on proliferation and apoptosis of breast cancer cells by inhibiting the ERK signaling pathway [J]. Biomed Res Int，2021，2021：9999268.

（收稿日期：2022-11-07；修回日期：2022-12-13）

小檗碱与维奈托克联用协同诱导获得性维奈托克耐药的人急性淋巴细胞白血病细胞凋亡

黄侨宗[1, 2]，陈卫东[1]，楼洋[3]，杨灿[1, 2]，高安慧[2, 3*]（1. 安徽中医药大学药学院，合肥　230012；2. 长三角药物高等研究院，江苏　南通　226133；3. 百极弘烨（南通）医药科技有限公司，江苏　南通　226133）

摘要：目的　研究小檗碱（BBR）与维奈托克（VEN）联用诱导获得性 VEN 耐药的人急性淋巴细胞白血病 RS4；11 细胞（RS4；11-VENR）凋亡的作用及相关机制。**方法**　通过将人急性淋巴细胞白血病 RS4；11 细胞长期暴露在 VEN 中获得 RS4；11-VENR。基于 ZIP 模型评估 BBR 与 VEN 处理 RS4；11-VENR 的联用效果。通过流式细胞法检测两者联用对细胞凋亡率的影响。采用 qRT-PCR 法检测 BBR 与 VEN 处理后细胞抗凋亡蛋白基因表达水平的变化。Western blot 法检测细胞凋亡相关蛋白表达水平以及 Caspase-3 的剪切情况。**结果**　细胞凋亡诱导和增殖抑制实验证明 VEN 对 RS4；11-VENR 不敏感（IC_{50} ＞ 10 μmol • L^{-1}），Western blot 结果表明 RS4；11-VENR 对比野生型 RS4；11 细胞存在 MCL-1 上调；基于 ZIP 模型的联用评价表明 12 ～ 50 μmol • L^{-1} BBR 与 0.1 ～ 10 μmol • L^{-1} VEN 协同杀伤 RS4；11-VENR，流式结果显示 25 μmol • L^{-1} BBR 与 1 μmol • L^{-1} VEN 联用协同诱导细胞凋亡；qRT-PCR 实验结果显示 25 ～ 30 μmol • L^{-1} BBR 单独处理细胞致 *MCL-1*、*BCL-XL* 基因表达水平降低，Western blot 结果显示 BBR 单独处理降低细胞 MCL-1、BCL-XL 蛋白水平。**结论**　BBR 与 VEN 联用协同杀伤 RS4；11-VENR，BBR 可能通过降低 RS4；11-VENR 的 MCL-1、BCL-XL 蛋白水平，增加细胞对 VEN 敏感性从而诱导凋亡发生。

关键词：小檗碱；联合用药；抗凋亡蛋白；耐药；细胞凋亡
中图分类号：R733.71　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0850-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.003

Combination of berberine and venetoclax synergistically induces apoptosis in human acute lymphoblastic leukemia cells with acquired venetoclax resistance

HUANG Qiao-zong[1, 2], CHEN Wei-dong[1], LOU Yang[3], YANG Can[1, 2], GAO An-hui[2, 3*] (1. *School of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *Drug Research Institute of Yangtze Delta*, *Nantong Jiangsu* 226133; 3. *Biopolar Hongye* (*Nantong*) *Pharmaceutical Co*., *Ltd*., *Nantong Jiangsu* 226133)

Abstract: Objective To determine the effect and mechanism of berberine (BBR) combined with venetoclax (VEN) in inducing apoptosis in human acute lymphoblastic leukemia RS4 and 11 cells with acquired drug resistance to VEN (RS4; 11-VENR). **Methods** RS4; 11-VENR were obtained by long-term exposure to human acute lymphoblastic leukemia RS4; 11 cells to VEN. Evaluation of the effect of combination of BBR and VEN on RS4; 11-VENR based on ZIP model was evaluated. The effect of the combination on the apoptosis rate was detected by flow cytometry. qRT-PCR method was used to detect the changes of anti-apoptotic protein gene expression in cells treated with BBR and VEN combination. The expression of apoptosis-related proteins and the splicing of Caspase-3 were detected by Western blot. **Results** Apoptosis induction and proliferation inhibition showed that VEN

作者简介：黄侨宗，男，在读硕士研究生，主要从事药理学研究，email：1584031055@qq.com　*通信作者：高安慧，女，博士，研究员，硕士研究生导师，主要从事血液肿瘤药物研发，email：ahgao@bio-polar.com

was not sensitive to RS4; 11-VENR (IC_{50} ＞ 10 μmol • L $^{-1}$) and Western blot showed that MCL-1 was up-regulated by RS4; 11-VENR as compared with wild-type RS4; 11 cells. The combination evaluation based on ZIP model showed that 12 ～ 50 μmol • L $^{-1}$ BBR and 0.1 ～ 10 μmol • L $^{-1}$ VEN synergistically killed RS4; 11-VENR; the flow cytometry showed that 25 μmol • L $^{-1}$ BBR combined with 1 μmol • L $^{-1}$ VEN synergistically induced the apoptosis; the qRT-PCR assay showed that 25 ～ 30 μmol • L $^{-1}$ BBR alone decreased the expression of *MCL-1* and *BCL-XL* genes; and Western blot showed that BBR alone decreased the protein levels of MCL-1 and BCL-XL. **Conclusion** BBR combined with VEN synergistically kills RS4; 11-VENR. BBR may induce the apoptosis by reducing the levels of MCL-1 and BCL-XL proteins and increasing the sensitivity of RS4; 11-VENR to VEN.

Key words: berberine; drug combination; anti-apoptotic protein; drug resistance; apoptosis

白血病是一种常见的血液系统恶性肿瘤，发病时常伴随一系列并发症，严重影响患者生活质量，危害患者生命健康。据 2020 年全球癌症统计报告，白血病在全球范围发病率为 2.5%，致死率为 3.1%[1]。近年来，白血病的治疗方式逐渐从化疗过渡到靶向治疗，而血液肿瘤细胞大多存在 BCL-2 等抗凋亡蛋白高表达，因此 BCL-2 蛋白家族是治疗血液肿瘤的关键靶标之一。

BCL-2 家族蛋白根据功能可分为 BH3-only 促凋亡蛋白（BIM、BID、BAD 等），凋亡效应蛋白（BAX、BAK 等），抗凋亡蛋白（BCL-2、MCL-1、BCL-XL 等），BCL-2 家族蛋白成员之间通过相互作用调控细胞凋亡。维奈托克（venetoclax，VEN）是 BCL-2 高选择性抑制剂，作用机制是通过靶向结合 BCL-2 的释放促凋亡蛋白从而诱导肿瘤细胞凋亡，已被批准用于治疗慢性淋巴细胞白血病和急性髓系白血病，但对 MCL-1 和 BCL-XL 依赖的血液恶性肿瘤细胞的杀伤作用较弱 [2]。随着 VEN 的长期使用，白血病患者治疗过程中耐药现象频发，其中 MCL-1 等抗凋亡蛋白的代偿性上调是引发白血病患者 VEN 耐药的主要原因之一 [3-4]，为缓解抗凋亡蛋白上调引起的耐药现象，通常采用联合用药靶向多个抗凋亡蛋白的治疗策略 [5]。我国拥有丰富的中药资源，且中药抗肿瘤活性成分具有毒副作用低、资源易得的特点，因此从中药资源中寻找抗肿瘤有效成分与 VEN 联合应用抗 VEN 耐药白血病成为一种切实可行的开发策略。

黄连为常用中药，具有清热燥湿、泻火解毒的功效，临床用于湿热痞满，呕吐吞酸，泻痢，心火亢盛，痈肿疔疮等症 [6]。除了传统的中医药价值，现代药理研究表明黄连提取物具有广泛的药理作用，可用于多种疾病的治疗 [7-8]。小檗碱（berberine，BBR，结构式见图 1）是一种从黄连中提取的异喹啉类生物碱，具有广泛的药理活性，包括抗炎症反应、改善糖脂代谢疾病以及抗肿瘤作用等 [9-11]。近年来有许多文献报道了 BBR 在抗血液肿瘤方面同样具有积极意义与潜在治疗价值，BBR 主要通过抑制白血病细胞增殖、诱导细胞凋亡等发挥抗血液肿瘤作用 [12-13]。BBR 作用具有多靶点、多途径的特性，可以辅助多种一线抗肿瘤药物发挥作用 [14]。因此，本研究旨在通过构建白血病 VEN 耐药模型，探讨 BBR 与 VEN 联用对白血病耐药模型的体外活性以及作用机制，为缓解血液肿瘤 VEN 耐药现象提供新的思路。

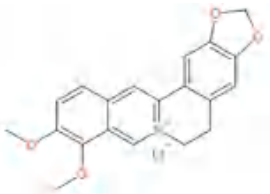


图 1　小檗碱的化学结构式

Fig 1　Chemical structure of berberine

1　材料

1.1　细胞株

人急性淋巴细胞白血病细胞株 RS4；11（ATCC）。使用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养细胞，置于 5%CO_2、37 ℃恒温恒湿的细胞培养箱中常规培养。

1.2　试药

BBR（纯度：99.66%，MCE 公司）；VEN（纯度＞99.00%，上海与昂化工有限公司）；RPMI-1640 培养基、胎牛血清（Thermo Fisher Scientific 公司）；MTS 细胞增殖检测试剂盒（Promega 公司）；BCL-2、BCL-XL、MCL-1、Caspase-3、Cleaved Caspase-3、*β*-actin 抗体、HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗（美国 CST 公司）；细胞色素 c 抗体（美国 BD 公司）；ECL 化学发光试剂盒（Thermo Fisher Scientif-

ic 公司）；Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒（上海翌圣生物有限公司）；Trizol 试剂盒、反转录试剂盒、SYBR qPCR 试剂盒（南京诺唯赞生物科技有限公司）。

1.3　仪器

细胞培养箱（Thermo Fisher Scientific 公司）；垂直高压电泳系统（美国 Bio-Rad 公司）；快速湿转仪（南京金斯瑞生物公司）；水平脱色摇床（其林贝尔仪器有限公司）；流式细胞仪（贝克曼公司）；多功能酶标仪（美国 PerkinElmer 公司）；高速冷冻微型离心机（美国 Scilogex 公司）；荧光定量 PCR 仪（美国 ABI 公司）。

2　方法

2.1　药物的配制

50 mmol • L^{-1} BBR 储备液：称取 20 mg BBR 粉末，将粉末溶于 1.08 mL 的 DMSO 中，0.22 μm 无菌滤器过滤除菌，分装于 EP 管，储存于－ 80 ℃冰箱。

10 mmol • L^{-1} VEN 储备液：称取 10 mg VEN 粉末，将粉末溶于 1.15 mL 的 DMSO 中，0.22 μm 无菌滤器过滤除菌，分装于 EP 管，储存于－ 80 ℃冰箱。

细胞色素 c 实验缓冲液 A：20 mmol • L^{-1} HEPES，4 mmol•L^{-1}氯化钾，5 mmol•L^{-1}氯化镁，1 mmol • L^{-1} 乙二胺四乙酸，1 mmol • L^{-1} 乙二醇双（2- 氨基乙基醚）四乙酸，250 mmol • L^{-1} 蔗糖，0. 135 mg • mL^{-1} 洋地黄皂苷。

细胞色素 c 实验缓冲液 B：20 mmol • L^{-1} Tris，135 mmol • L^{-1} 氯化钠，1.5 mmol • L^{-1} 氯化镁，1 mmol • L^{-1} 乙二醇双（2- 氨基乙基醚）四乙酸，10% 甘油，1%Triton X-100。

2.2　构建急性淋巴细胞白血病 VEN 耐药细胞模型

RS4；11 使用 4 nmol • L^{-1} VEN（RS4；11 细胞的 IC_{50}）处理 24 h，收集细胞并更换不含药物培养基，恢复生长后测试细胞的 IC_{50} 并逐渐增加 VEN 作用浓度，如此周期循环最终获得耐药细胞株，传代时加入 1 μmol • L^{-1} VEN 维持，即得 RS4；11-VENR。

2.3　MTS 法检测细胞增殖抑制活性

细胞接种密度为每孔 2×10^4 个，接种于 96 孔板中，BBR、VEN 梯度稀释至适宜浓度加入细胞。细胞在 37 ℃，5%CO_2 培养箱中培养 72 h 后，每孔加入 20 μL MTS 试剂，放入培养箱中孵育 2 h，酶标仪测定检测波长 490 nm 和参比波长 690 nm 处的光密度（optical density，*OD*）。$OD = OD_{490} - OD_{690}$，计算细胞存活率（%）＝（加药细胞组 *OD* －空白组 *OD*）/（对照细胞孔 *OD* －空白组 *OD*）×100%，使用 Graphpad Prism 8 软件拟合曲线并计算 IC_{50} 值。

2.4　qRT-PCR 检测抗凋亡蛋白基因表达水平

药物处理细胞 24 h，收集细胞，按照 Trizol 试剂盒说明书抽提总 RNA，逆转录合成 cDNA，使用 SYBR 试剂盒测定基因表达水平。PCR 反应条件：95 ℃预变性 10 min，随后 95 ℃变性 10 s，60 ℃延伸 30 s，融解曲线：95 ℃ 15 s，60 ℃ 60 s，95 ℃ 15 s，40 个循环，记录 CT 值，以 *GADPH* 作为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析基因相对表达水平。实验使用引物序列，*BCL-XL* 上游引物：GCCACTTACCTGAATGACCACC，*BCL-XL* 下游引物：AACCAGCGGTTGAAGCGTTCCT；*MCL-1* 上游引物：CCAAGAAAGCTGCATCGAACCAT，*MCL-1* 下游引物：CAGCACATTCCTGATGCCACCT；*GAPDH* 上游引物：GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG，*GAPDH* 下游引物：ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA。

2.5　Western blot 检测凋亡相关蛋白水平变化

收集细胞样品，加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液处理，冰上裂解 30 min，95 ℃煮样 15 min。上层 4% 浓缩胶使用 60 V 恒压电泳，溴酚蓝进入下层 10% 分离胶时使用 90 V 恒压电泳，待目的蛋白充分分离后停止电泳，将蛋白转移至硝酸纤维素膜，使用 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h，将膜放入一抗稀释液（BCL-2、BCL-XL、MCL-1 抗体稀释比例 1∶1000）于 4 ℃冰箱中孵育过夜。TBST 清洗 3 遍，加入二抗 IgG-HRP（稀释比例 1∶10 000）室温孵育 1 h。TBST 清洗 3 遍后，将膜浸泡在 ECL 化学发光试剂反应 2 min，于凝胶成像仪曝光并采集图片。

2.6　流式细胞术检测细胞凋亡率

细胞接种于 12 孔板中，每孔接种密度为 6×10^5 个细胞，经药物处理后置于培养箱中孵育 24 h。离心收集细胞，PBS 洗涤 2 次，随后加入 Annexin V-FITC 和 PI 染色液，室温避光孵育 15 min，通过流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.7　细胞色素 c 释放实验

按照“2.1”项下方法配制细胞色素 c 实验缓冲液。低速离心收集细胞，加入缓冲液 A，冰上静置 5 min，离心收集上清即为胞质蛋白，随后往沉淀加入缓冲液 B，离心收集上清即为线粒体蛋白。

2.8　统计学分析

采用 GraphPad Prism 8 等软件进行数据统计分析。实验重复 3 次，结果采用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）进行统计学描述，多组间均数比较采用单

因素方差分析，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　RS4；11-VENR 细胞株的建立

细胞增殖抑制实验结果显示 VEN 对野生型 RS4；11 细胞增殖体现出强效的抑制活性，其 IC_{50} 为（3.91±0.46）nmol • L^{-1}，而对 RS4；11-VENR 增殖基本无影响，其 IC_{50} > 10 μmol • L^{-1}，见图 2A。流式结果证明，与空白组对比，1 μmol • L^{-1} VEN 可显著诱导野生型 RS4；11 细胞的凋亡，3 次独立重复实验晚期凋亡细胞占比分别为 66.07%、69.28%、71.05%，均值为（68.80±2.52）%，而对 RS4；11-VENR 基本无诱导凋亡作用，见图 2B。Western blot 结果显示，相较于野生型 RS4；11 细胞，RS4；11-VENR 的 MCL-1 蛋白水平上调，并且加入 1 μmol • L^{-1} VEN 维持的 RS4；11-VENR 的 MCL-1 蛋白水平进一步上调，见图 2C。

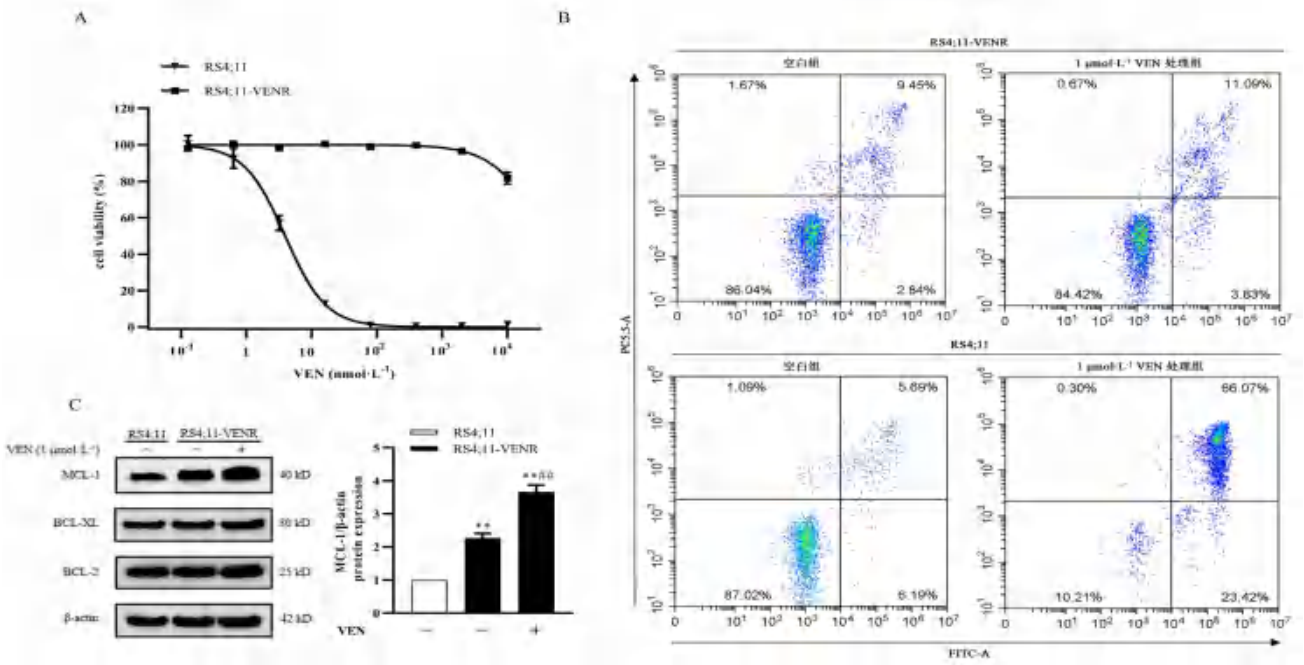


图 2　RS4；11-VENR 的验证

Fig 2　Validation of RS4；11-VENR

A. VEN 作用 72 h 对 RS4；11 和 RS4；11-VENR 增殖的影响（effect of VEN on the proliferation of RS4；11 and RS4；11-VENR treated for 72 h）；B. VEN 作用 4 h 对 RS4；11 和 RS4；11-VENR 凋亡率的影响（effect of VEN on apoptosis rate of RS4；11 and RS4；11-VENR treated for 4 h）；C. RS4；11-VENR 中凋亡相关蛋白的表达（apoptosis-related protein expression in RS4；11-VENR）

注（Note）：与空白组比较，$^{**}P < 0.01$；与不加入 VEN 的模型组比较，$^{\#\#}P < 0.01$（Compared with the blank group，$^{**}P < 0.01$；compared with the model group without VEN，$^{\#\#}P < 0.01$）。

3.2　BBR 与 VEN 联用对 RS4；11-VENR 凋亡的影响

通过 SynergyFinder 网络应用程序（https：//synergyfinder.fimm.fi/），基于 ZIP 模型分析药物联用效果[15]。白色区域表示叠加作用，红色区域表示协同作用，药物协同评分大于 10 表示两个药物存在协同作用。结果显示 ZIP 模型药物协同评分为 15.02，12 ～ 50 μmol•L^{-1} BBR 与 0.1 ～ 10 μmol•L^{-1} VEN 协同杀伤 RS4；11-VENR，见图 3。

联用流式结果证明，对比空白组，25 μmol • L^{-1} BBR、1 μmol • L^{-1} VEN 分别处理 RS4；11-VENR24 h 对凋亡率基本没有影响，而两者联用处理 RS4；11-VENR 的凋亡水平优于单独处理组，见图 4A。

细胞色素 c 释放实验表明，对比空白组，25、30 μmol • L^{-1} BBR，1 μmol • L^{-1} VEN 分别单独处理 RS4；11-VENR 24 h 基本没有检测到线粒体的细胞色素 c 释放到胞质中；当 BBR 与 1 μmol • L^{-1} VEN 联用时，可促使线粒体中细胞色素 c 释放至胞质，且随着 BBR 使用浓度提高，这一作用效果逐渐增强。BCL-2 和 β-actin 分别作为线粒体和胞质蛋白的对照，见图 4B。利用 Western blot 检测凋亡相关信号 Cleaved Caspase-3 发现，15 ～ 30 μmol • L^{-1} BBR 与 1 μmol • L^{-1} VEN 联合处理 RS4；11-VENR 可检测到 Cleaved Caspase-3 呈现剂量依赖性的增加，见图 4C。

3.3　BBR 与 VEN 处理 RS4；11-VENR 对抗凋亡蛋白水平的影响

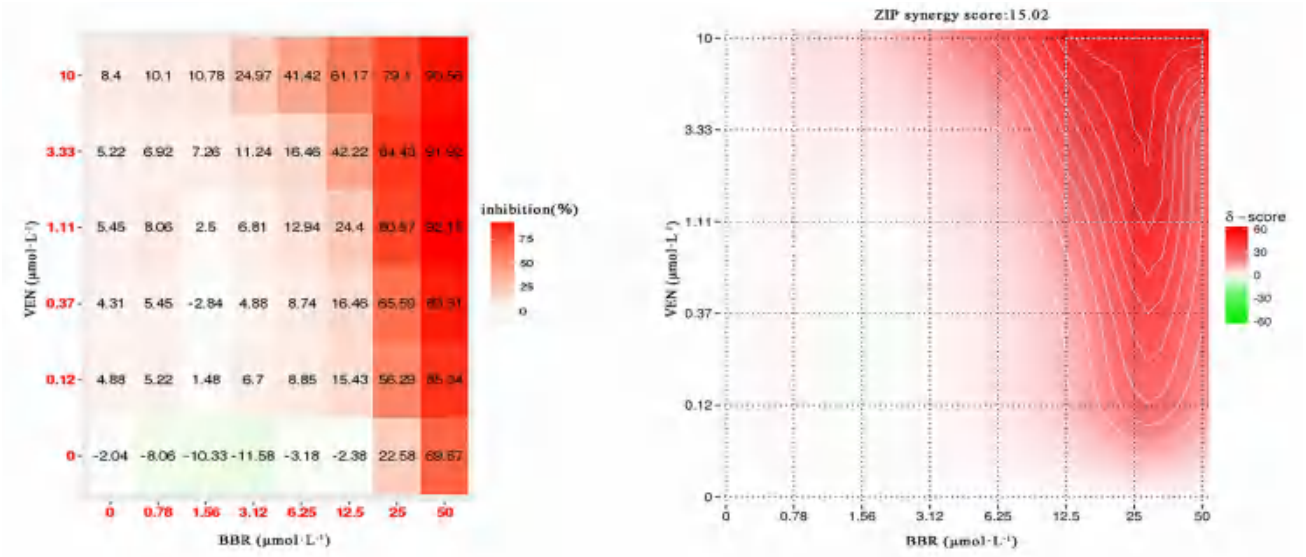


图 3　基于 ZIP 模型评价 BBR 与 VEN 联用在 RS4；11-VENR 中的作用

Fig 3　Effect of of BBR and VEN combination on RS4；11-VENR based on ZIP model

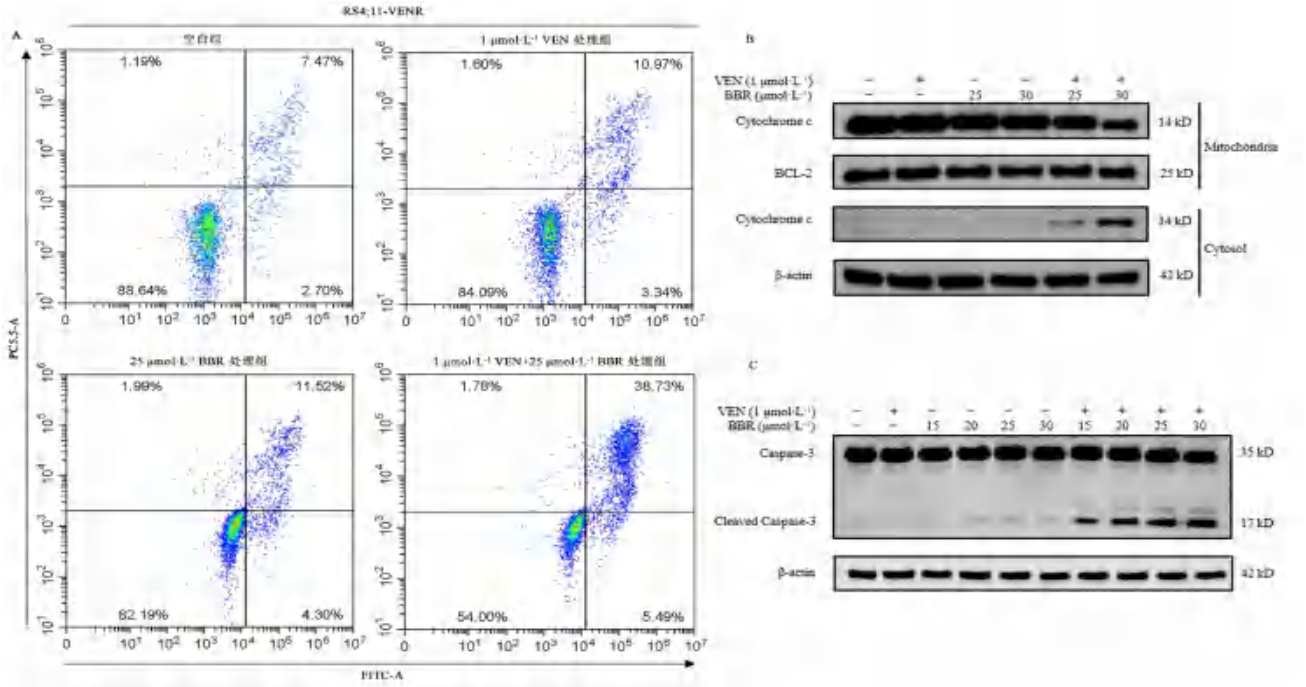


图 4　BBR 与 VEN 联用对 RS4；11-VENR 凋亡的影响

Fig 4　Effect of BBR combined with VEN on apoptosis of RS4；11-VENR

A. BBR 与 VEN 联用处理 RS4；11-VENR 24 h 凋亡率影响（effect of BBR combined with VEN on apoptosis rate of RS4；11-VENR treated for 24 h）；B. BBR 与 VEN 联用处理 RS4；11-VENR 24 h 细胞色素 c 释放影响（effect of BBR combined with VEN on Cytochrome c release of RS4；11-VENR treated for 24 h）；C. BBR 与 VEN 联用处理 RS4；11-VENR 24 h 凋亡信号 Caspase-3 的影响（effect of BBR combined with VEN on apoptosis signal Caspase-3 of RS4；11-VENR treated for 24 h）

qRT-PCR 结果显示，对比空白组，1 μmol • L^{-1} VEN 单独处理 RS4；11-VENR 后 *MCL-1* 和 *BCL-XL* 基因转录水平无明显变化，25、30 μmol • L^{-1} BBR 单独或与 VEN 联用处理 RS4；11-VENR，*MCL-1* 和 *BCL-XL* 基因转录水平下调，25、30 μmol • L^{-1} BBR 单独或联用处理组与空白组比较差异有统计学意义（见图 5A）。

通过 Western blot 方法检测 RS4；11-VENR 中蛋白表达水平。对比空白组，15 ～ 30 μmol • L^{-1} BBR 单独处理组、20 ～ 30 μmol • L^{-1} BBR 与 1 μmol • L^{-1} VEN 联用处理组使 RS4；11-VENR 的 MCL-1 蛋白水平下调，而 1 μmol • L^{-1} VEN 单独处理时 MCL-1 蛋白水平上调；25、30 μmol • L^{-1} BBR 单独处理细胞的 BCL-XL 蛋白水平下调，并

且 15 ～ 30 μmol • L^{-1} BBR 与 1 μmol • L^{-1} VEN 的联用进一步降低细胞 BCL-XL 蛋白水平，1 μmol • L^{-1} VEN、各浓度 BBR 单独或联用处理组与空白组比较蛋白表达水平差异有统计学意义；对比 BBR 单独处理组，20 ～ 30 μmol • L^{-1} BBR 与 VEN 联用组 MCL-1 蛋白水平上调，20 ～ 30 μmol • L^{-1} BBR 和 VEN 联用处理组与 BBR 单独处理组比较蛋白表达水平差异有统计学意义；对比 1 μmol • L^{-1} VEN 单独处理组，15 ～ 30 μmol • L^{-1} BBR 和 VEN 联用组 MCL-1 与 BCL-XL 水平均下调，15 ～ 30 μmol • L^{-1} BBR 和 VEN 联用组与 1 μmol • L^{-1} VEN 单独处理组比较蛋白表达水平差异有统计学意义（见图 5B）。

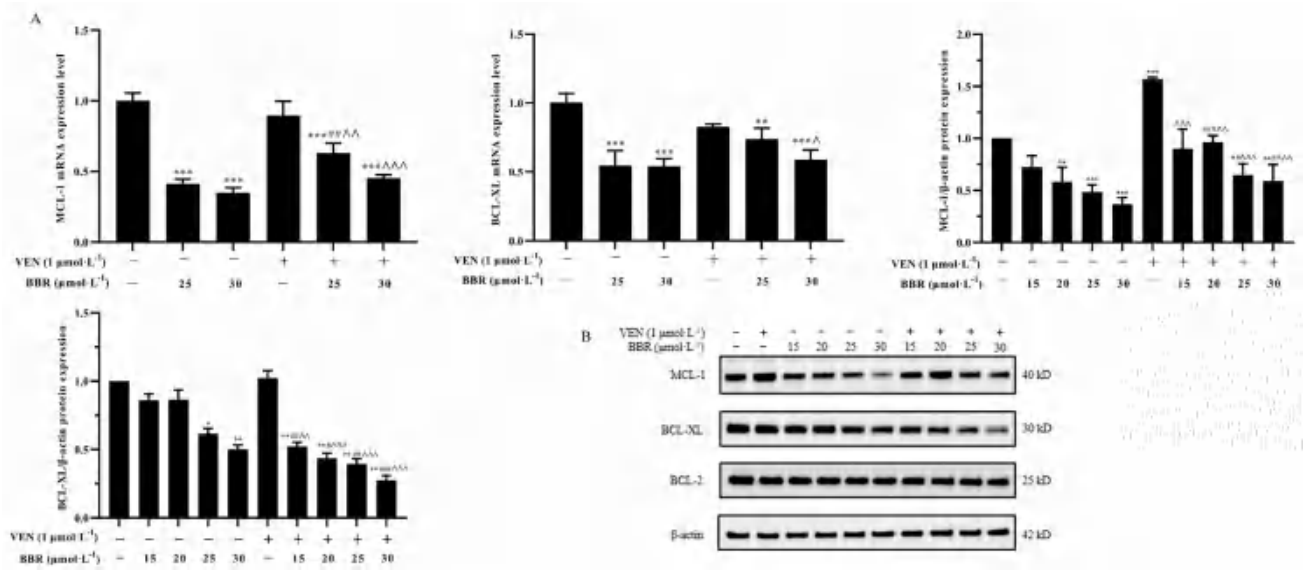


图 5　BBR 与 VEN 对 RS4；11-VENR 抗凋亡蛋白 mRNA 转录水平（A）及表达水平（B）的影响

Fig 5　Effect of BBR and VEN on the mRNA transcription level（A）and expression level（B）of anti-apoptotic proteins in RS4；11-VENR

注（Note）：与空白组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$；与 BBR 处理组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$；与 1 μmol • L^{-1} VEN 处理组比较，$^{\wedge}P < 0.05$，$^{\wedge\wedge}P < 0.01$，$^{\wedge\wedge\wedge}P < 0.001$（Compared with the blank group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$；compared with the BBR treatment group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$，$^{\#\#\#}P < 0.001$；compared with the 1 μmol • L^{-1} VEN treatment group，$^{\wedge}P < 0.05$，$^{\wedge\wedge}P < 0.01$，$^{\wedge\wedge\wedge}P < 0.001$）。

4　讨论

4.1　获得性 VEN 耐药 RS4；11 细胞株的分析

VEN 对 BCL-2 蛋白表现出高度的结合特异性，依赖 MCL-1 或 BCL-XL 生存的细胞往往会对 VEN 产生原发性耐药，而 VEN 治疗后复发的慢性淋巴细胞白血病患者的细胞样本中观察到 MCL-1 的表达水平明显升高，这也是继发性耐药的一种机制 [16]。因此，本研究基于构建 RS4；11-VENR 模型进行后续探讨，经验证，耐药株对比野生型细胞的 MCL-1 蛋白表达上调，这也是 BCL-2 选择性抑制剂 VEN 对 RS4；11-VENR 不敏感的关键原因，但本实验通过 qRT-PCR 法检测到耐药株 *MCL-1* 基因转录水平相较于 RS4；11 正常细胞无明显影响。Niu 等 [17] 使用 VEN 处理白血病患者细胞系出现 MCL-1 蛋白水平升高，*MCL-1* 基因转录水平不变或略微降低，其原因是 MCL-1 蛋白半衰期的增加。笔者实验的结果观察到类似现象，这一现象可能与 VEN 持续处理导致 RS4；11-VENR 中 MCL-1 蛋白半衰期延长有关。

4.2　BBR 与 VEN 联用处理 RS4；11-VENR 的机制

本研究采用 ZIP 模型评估 BBR 与 VEN 的联用效果，虽然 BBR 与 VEN 分别单独处理 RS4；11-VENR 基本没有杀伤作用，但两者联用能协同杀死耐药株，另外流式结果也表明两者联用有效促进 RS4；11-VENR 凋亡。因此，本研究的重点在于探究 BBR 与 VEN 联用如何诱导 RS4；11-VENR 发生凋亡。

Caspase 蛋白酶家族在细胞凋亡过程中发挥关键作用，当细胞接收到死亡信号激活线粒体凋亡途径时，线粒体通透性增加，细胞色素 c 等促凋亡因子从线粒体释放至胞质，间接激活 Caspase-9，继而剪切活化下游的凋亡关键酶 Caspase-3，启动后续 Caspase 级联反应导致凋亡发生 [18]。因此，细胞色素 c 的释放与 Caspase-3 的剪切都是反映细胞发生凋亡的关键信号。本研究通过 Western blot 法检测胞质蛋白与线粒体蛋白的细胞色素 c 含量变化与下游凋亡相关信号 Caspase-3，结果表明 BBR 与 VEN 联用是通过线

粒体凋亡途径诱导 RS4；11-VENR 凋亡。

此外，本研究还探讨了 BBR 与 VEN 的联用对 RS4；11-VENR 的基因转录水平和抗凋亡蛋白表达水平影响，qRT-PCR 实验证明 BBR 单独或联用 VEN 处 理 RS4；11-VENR 使 *BCL-XL* 与 *MCL-1* 基因转录水平下调；Western blot 实验结果显示 BBR 单独或联用 VEN 处理 RS4；11-VENR 时 MCL-1 蛋白水平下调，而 BBR 与 VEN 联用处理耐药株的 MCL-1 蛋白水平高于 BBR 单独处理组的原因是 VEN 刺激使耐药株的 MCL-1 蛋白水平进一步上调。另外 BBR 单独处理 RS4；11-VENR 使 BCL-XL 蛋白下调，而 BBR 与 VEN 联用使 BCL-XL 蛋白进一步下调。虽然 BBR 单独处理白血病的耐药细胞没有明显杀伤作用，但是 BBR 可以通过降低 RS4；11-VENR 的 MCL-1、BCL-XL 蛋白表达水平增强 VEN 对细胞的杀伤作用，这意味着可以在兼顾疗效的前提下降低 VEN 的使用剂量，从而降低药物的毒副作用，缓解细胞耐药问题。

4.3　总结与展望

本文阐述了体外 BBR 与 VEN 联用协同诱导 VEN 耐药白血病细胞凋亡的作用，同时也为中药成分联用化学药物发挥抗肿瘤活性提供思路。本研究不足的地方是未深入考察 VEN 处理 RS4；11-VENR 后 MCL-1 进一步上调的现象，其中可能涉及的机制有待进一步阐述与研究。此外，水溶性极低，口服生物利用度差是 BBR 临床应用的主要限制因素，而口服是 BBR 主要的给药途径，目前已经有研究开发了改善 BBR 向肿瘤传递的纳米技术策略 [19]，为了获得最佳的协同抗肿瘤作用，增加血药浓度也是 BBR 今后研究的重点方向之一。

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] Souers AJ，Leverson JD，Boghaert ER，et al. ABT-199，a potent and selective BCL-2 inhibitor，achieves antitumor activity while sparing platelets [J]. Nat Med，2013，19（2）：202-208.

[3] Blombery P，Anderson MA，Gong JN，et al. Acquisition of the recurrent Gly101Val mutation in BCL-2 confers resistance to venetoclax in patients with progressive chronic lymphocytic leukemia [J]. Cancer Discov，2019，9（3）：342-353.

[4] Zhang Q，Riley-Gillis B，Han L，et al. Activation of RAS/MAPK pathway confers MCL-1 mediated acquired resistance to BCL-2 inhibitor venetoclax in acute myeloid leukemia [J]. Signal Transduct Target Ther，2022，7（1）：51.

[5] Ramsey HE，Fischer MA，Lee T，et al. A novel MCL-1 inhibitor combined with venetoclax rescues venetoclax-resistant acute myelogenous leukemia [J]. Cancer Discov，2018，8（12）：1566-1581.

[6] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：316-318.

[7] 王晓，刘博，张译心，等 . 黄连总生物碱与三七皂苷组合物对大鼠糖尿病心肌缺血再灌注损伤的影响 [J]. 中南药学，2021，19（6）：1092-1097.

[8] 周红祖，陈永恒，邱裕豪，等 . 黄连与吴茱萸药对配方颗粒、单煎与共煎对幽门螺杆菌抑制作用的研究 [J]. 中南药学，2019，17（1）：48-53.

[9] 韩本丽 . 二甲双胍联合盐酸小檗碱治疗非酒精性脂肪肝疗效及对白细胞介素 -17 与转化生长因子 -β 水平影响 [J]. 现代中西医结合杂志，2017，26（5）：496-499.

[10] 魏敬，蒋建东，吴锦丹，等 . 盐酸小檗碱的调脂作用的研究 [J]. 中华糖尿病杂志，2005，13（1）：52-54.

[11] 杨先浩，张丽瑾，罗梦珺，等 . 小檗碱抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. 中国中药杂志，2021，46（10）：2449-2455.

[12] Mohammadlou M，Abdollahi M，Hemati M，et al. Apoptotic effect of berberine via BCL-2，ROR1，and mir-21 in patients with B-chronic lymphocytic leukemia [J]. Phytother Res，2021，35（4）：2025-2033.

[13] Zhang X，Gu L，Li J，et al. Degradation of MDM2 by the interaction between berberine and DAXX leads to potent apoptosis in MDM2-overexpressing cancer cells [J]. Cancer Res，2010，70（23）：9895-9904.

[14] Liu L，Fan J，Ai G，et al. Berberine in combination with cisplatin induces necroptosis and apoptosis in ovarian cancer cells [J]. Biol Res，2019，52（1）：37.

[15] Ianevski A，Giri AK，Aittokallio T. SynergyFinder 3.0：an interactive analysis and consensus interpretation of multi-drug synergies across multiple samples [J]. Nucleic Acids Res，2022，50（1）：739-743.

[16] Elias EE，Sarapura Martinez VJ，Amondarain M，et al. Venetoclax-resistant CLL cells show a highly activated and proliferative phenotype [J]. Cancer Immunol Immunother，2022，71（4）：979-987.

[17] Niu X，Zhao J，Ma J，et al. Binding of released Bim to MCL-1 is a mechanism of intrinsic resistance to ABT-199 which can be overcome by combination with daunorubicin or cytarabine in AML cells [J]. Clin Cancer Res，2016，22（17）：4440-4451.

[18] Kalkavan H，Green DR. MOMP，cell suicide as a BCL-2 family business [J]. Cell Death Differ，2018，25（1）：46-55.

[19] Sreeja S，Krishnan Nair CK. Tumor control by hypoxia-specific chemotargeting of iron-oxide nanoparticle-berberine complexes in a mouse model [J]. Life Sci，2018，195：71-80.

（收稿日期：2022-11-22；修回日期：2022-12-25）

酮咯酸氨丁三醇鼻用温敏凝胶的制备及体外释放研究

种思茹[1, 2, 5]，彭汐涯[2, 3, 5]，王欣茹[1, 2, 5]，王淑君[4*]，叶田田[1, 4*]，杨瑞[6]（1. 江西中医药大学 药学院，南昌　330004；2. 南通市海门长三角药物高等研究院，江苏　南通　226133；3. 安徽中医药大学 研究生院，合肥　230012；4. 沈阳药科大学 药学院，沈阳　110016；5. 江苏艾迪纳米生物医药有限公司，江苏　南通　226100；6. 辽宁中医药大学附属第二医院，沈阳　110034）

摘要：目的　优化酮咯酸氨丁三醇鼻用温敏凝胶（ketorolac tromethamine thermosensitive nasal gel，KT-Gel）处方，并对其体外释药机制进行研究。**方法**　采用 Box-Behnken 效应面法优化 KT-Gel 处方；以无膜溶出法考察 KT-Gel 的体外溶蚀行为；以扩散池法考察 KT-Gel 的体外释药行为。**结果**　KT-Gel 最佳处方为泊洛沙姆 407 22.59%，泊洛沙姆 188 2.44%，羟丙基甲基纤维素 0.31%，胶凝温度为（34.2±0.3）℃；凝胶的溶蚀符合一级动力学方程特征，体外释药遵从 Ritger-Peppas 动力学方程，为扩散与骨架溶蚀协同作用。**结论**　采用 Box-Behnken 效应面法优化 KT-Gel 处方，所建模型预测性良好。KT-Gel 释放受扩散和骨架溶蚀控制，可维持药物持续、稳定的释放。

关键词：酮咯酸氨丁三醇；鼻用温敏凝胶；Box-Behnken 效应面法；体外溶蚀；体外释药
中图分类号：R943　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0857-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.004

Preparation and in vitro release of ketorolac tromethamine thermosensitive nasal gel

CHONG Si-ru[1, 2, 5], PENG Xi-ya[2, 3, 5], WANG Xin-ru[1, 2, 5], WANG Shu-jun[4*], YE Tian-tian[1, 4*], YANG Rui[6]
(1. *College of Pharmacy*, *Jiangxi University of Chinese Medicine*, *Nanchang*　330004; 2. *Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute*, *Nantong*　*Jiangsu*　226133; 3. *College of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei*　230012; 4. *College of Pharmacy*, *Shenyang Pharmaceutical University*, *Shenyang*　110016; 5. *Jiangsu Aidi Nano Biomedical Co.*, *Ltd.*, *Nantong*　*Jiangsu*　226100; 6. *The Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, *Shenyang*　110034)

Abstract: Objective　To optimize the formulation of ketorolac tromethamine thermosensitive nasal gel (KT-Gel), and to determine the in vitro release mechanism. **Methods**　Box-Behnken response surface method was used to optimize the gel matrix prescription. Membrane-free dissolution method was used to determine the in vitro erosion behavior of KT-Gel. Diffusion pool method were used to investigate the in vitro drug release behavior of KT-Gel. **Results**　The best prescription of KT-Gel included 22.59% poloxamer 407, 2.44% poloxamer 188, 0.31% hydroxypropyl methyl cellulose, and the gelation temperature (34.2±0.3)℃ . The erosion pattern of the gel showed first-order kinetic characteristics and its drug release complied with Ritger-Peppas equation. KT release from the thermosensitive nasal gel showed the synergic action of diffusion and erosion. **Conclusion**　Box-Behnken response surface methodology can be used to optimize the formulation of KT-Gel, and the constructed models are predictive. KT-Gel release is controlled by diffusion and backbone erosion, which maintains a stable drug release.

Key words: ketorolac tromethamine; thermosensitive nasal gel; Box-Behnken response surface methodology; in vitro erosion; in vitro release

---

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81973494）。
作者简介：种思茹，女，硕士研究生，主要从事药剂学研究，email：chongsiru@163.com　*通信作者：王淑君，女，教授，博士研究生导师，主要从事药剂学与创新制剂研究，email：1252116911@qq.com；叶田田，女，博士，副教授，主要从事药剂学与工业药剂学研究，email：729587208@qq.com

酮咯酸氨丁三醇（ketorolac tromethamine，KT）是一种具有强力镇痛、中等抗炎解热作用的非甾体抗炎药，与阿片类药物相比，具有无成瘾性、非麻醉性的优点，通常用于急性较严重疼痛的短期治疗[1-3]。该药在临床上以注射给药、口服给药为主，虽然也有鼻腔用溶液制剂上市，但溶液通常从鼻腔中快速清除，不利于药物持续释放[4]。

与传统的喷雾剂相比，原位型温敏凝胶结合了液体与半固体鼻用制剂的优点，可轻松地以液体形式进入鼻腔并原位凝胶化，有利于鼻内长时间停留和药物持续释放[5-6]。故在本研究中使用泊洛沙姆 407（poloxamer 407，P407）和泊洛沙姆 188（poloxamer 188，P188）制备了温度诱导的原位凝胶系统，并添加羟丙基甲基纤维素（hydroxypropyl methyl cellulose，HPMC），降低鼻腔纤毛的清除作用[7]，延长药物与鼻黏膜的接触时间。在单因素考察的基础上应用 Box-Behnken 设计 - 效应面法优化处方，并对其释药机制进行探讨，为酮咯酸氨丁三醇鼻腔递送的开发提供参考。

1　材料

1.1　仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪（日本岛津公司）；PX85Z 型分析天平（奥豪斯仪器有限公司，精度：0.01 mg）；DF-101S 型集热式磁力搅拌器（巩义市予华仪器有限责任公司）；SHA-C 型数显水浴恒温振荡器（常州荣华仪器制造有限公司）。

1.2　试药

酮咯酸氨丁三醇对照品（批号：T1WG-6XQE，纯度：99.8%，中国食品药品检定研究院）；酮咯酸氨丁三醇原料药（浙江车头制药股份有限公司，批号：206781039）；泊洛沙姆 407（批号：GNE03821B）、泊洛沙姆 188（批号：GND1742213）（巴斯夫股份公司）；羧甲基纤维素钠（批号：20210107）、冰醋酸（批号：20210108）（国药集团化学试剂有限公司）；HPMC（批号：C375878）、壳聚糖（批号：C13856485）、卡波姆 934（批号：C12717413）、海藻酸钠（批号：C13600351）（上海麦克林生化科技有限公司）；甲醇（色谱级，安徽时联特种溶剂股份有限公司）。液相用试剂均为色谱纯，其他化学试剂为分析纯。

1.3　实验动物

普通级日本大耳白兔，体质量 1 ～ 2.5 kg，由辽宁长生生物技术股份有限公司提供，许可证号：SCXK（辽）2020-0001。

2　方法与结果

2.1　酮咯酸氨丁三醇含量测定方法的建立

2.1.1　色谱条件　色谱柱：Diamonsil C_{18}（4.6 mm×150 mm，5 μm）；流动相：甲醇 - 水 - 冰醋酸（55∶44∶1）；检测波长：254 nm；流速：1.0 mL • min^{-1}；进样体积：20 μL；柱温：30 ℃。

2.1.2　溶液的配制

① 对照品溶液：取酮咯酸氨丁三醇对照品适量，精密称定，加溶剂（甲醇 - 水＝55∶44）溶解并定量稀释制成质量浓度为 604.4 μg • mL^{-1} 的对照品储备液。精密移取对照品储备液适量，加溶剂依次稀释为 30.22、48.352、60.44、72.528、90.66 μg • mL^{-1} 的系列对照品溶液。

② 供试品溶液：取酮咯酸氨丁三醇鼻用温敏凝胶（KT-Gel）1.0 mL，加溶剂定容，超声，以 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得供试品溶液。

③ 空白辅料溶液：制备不含酮咯酸氨丁三醇的空白温敏凝胶，取其 1.0 mL，加溶剂定容，超声，以 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得空白辅料溶液。

2.1.3　专属性　取“2.1.2”项下的对照品储备液、供试品溶液、空白辅料溶液进样测定，记录色谱图，结果表明辅料不干扰检测（见图 1），说明该方法专属性良好。

2.1.4　线性关系考察　取“2.1.2”项下系列对照品溶液进样测定，以样品的质量浓度（C）为横坐标，色谱峰面积（A）为纵坐标作线性回归，得回归方程 $A = 2.766\times10^4C + 2.193\times10^4$（$r = 0.9999$），酮咯酸氨丁三醇在 30.22 ～ 90.66 μg • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好。

2.1.5　精密度　取 100% 限度浓度（60.44 μg•mL^{-1}）的对照品溶液连续测定 6 次，测得峰面积 *RSD* 为 0.15%，表明该仪器精密度良好。

2.1.6　稳定性　取供试品溶液、100% 限度浓度的对照品溶液在室温条件下于 0、4、8、12、16、24 h 进样检测。测得供试品溶液峰面积 *RSD* 为 1.1%，100% 限度浓度对照品溶液峰面积 *RSD* 为 0.90%，表明该方法稳定性良好。

2.1.7　加样回收试验　分别精密称取酮咯酸氨丁三醇原料药 8.0、10.0、12.0 mg，溶解定容至 50 mL，再精密称定辅料适量（辅料加入量均为 100% 处方比例的空白辅料），即得低、中、高浓度的样品，每组 3 份。稀释至标准曲线范围内，进样分析，结果低、中、高浓度平均加样回收率在 98.9% ～ 100.3%，*RSD* 均＜ 2.0%，表明该方法准确度良好。

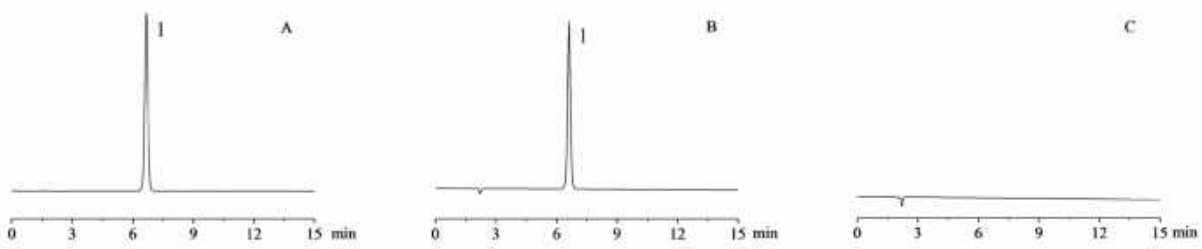


图 1　专属性试验色谱图

Fig 1　Chromatogram of specific test

A. 对照品储备液（reference stock solution）；B. 供试品溶液（test solution）；C. 空白辅料溶液（blank excipient solution）；1. 酮咯酸氨丁三醇（ketorolac tromethamine）

2.2　KT-Gel 制备工艺

采用冷溶法制备 KT-Gel[8]。称取一定量的 P407、P188、HPMC、酮咯酸氨丁三醇置于西林瓶中，加入一定量纯化水溶解，在冰浴条件下于磁力搅拌器上搅拌 30 min，然后将西林瓶在 4 ℃冰箱中放置 24 h，充分溶胀，即得 KT-Gel。

2.3　胶凝温度的测定

采用搅拌子法测定胶凝温度[9]。取 2 mL KT-Gel 溶液，置于西林瓶中，插入温度计（精度为 0.1 ℃），并加入转子，磁力搅拌器转速为 100 r • min^{-1}，升温速度约为 0.5 ℃ • min^{-1}，记录转子停止转动时的温度，即为胶凝温度（T_g）。

2.4　黏附力的测定

采用位移法测定黏附力[10]。制备猪黏蛋白（2%）- 琼脂（1%）凝胶均匀涂抹于玻璃板上，4 ～ 8 ℃放置 3 h 后，在 22 ℃、相对湿度 75% 的条件下平衡 1 h，用作黏膜黏附组织的模型，原位凝胶滴于玻璃板的一端，将玻璃板 90° 放置，测定 3 批鼻用原位凝胶在 1 h 内移动的距离，凝胶的黏附力和距离成反比。

2.5　单因素考察

以胶凝温度、黏附力为评价指标，对黏附聚合物种类（壳聚糖、卡波姆 934、羧甲基纤维素钠、海藻酸钠及 HPMC）进行考察，结果见表 1，除海藻酸钠、HPMC 外，加入其他黏附聚合物导致胶凝温度显著降低，含 HPMC 配方的黏膜黏附力高于含海藻酸钠的配方，综上选择 HPMC 作为黏膜黏附物。

表 1　黏膜黏附物筛选试验结果

Tab 1　Mucosal adhesion screening test

黏附聚合物	胶凝温度 /℃	位移 /cm
—	32.5	0.92
壳聚糖	26.8	0.43
卡波姆 934	27.6	0.88
羧甲基纤维素钠	28.3	0.67
海藻酸钠	31.7	0.54
HPMC	31.4	0.47

以胶凝温度为评价指标，采用单因素试验对 P407 用量（18%、20%、22%、24%、26%）、P188 用量（1%、2%、3%、4%、5%）、HPMC 用量（0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1%）进行考察，结果见图 2，在上述范围内 P407 用量越高，胶凝温度越低；P188 用量越高，胶凝温度越高；HPMC 用量对胶凝温度无显著影响。

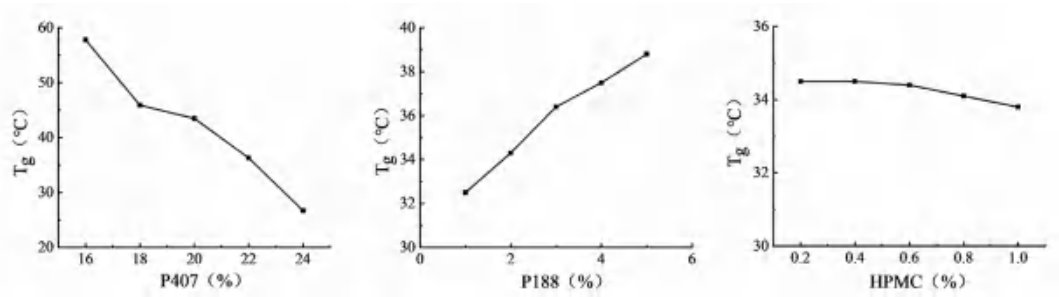


图 2　KT-Gel 单因素试验结果

Fig 2　Single factor test of KT-Gel

2.6　Box-Behnken 效应面法优化温敏凝胶基质处方

根据单因素试验的结果，选取 P407 用量（X_1）、P188 用量（X_2）、HPMC 用量（X_3）3 个因素进行考察，P407 的用量为 22% ～ 24%，P188 的用量为 1% ～ 3%，HPMC 的用量为 0.2% ～ 0.6%，以胶凝温度为评价指标，使用 Design-Expert 12.0 软件进行试验设计，3 因素 3 水平进行试验，试验因素水平见表 2，试验设计与结果见表 3。

表 2　Box-Behnken 效应面法试验因素水平

Tab 2　Factor and level of Box-Behnken response surface methodology

水平	因素		
	P407 用量 /%	P188 用量 /%	HPMC 用量 /%
－1	22	1	0.2
0	23	2	0.4
1	24	3	0.6

表 3　Box-Behnken 效应面法试验设计与结果

Tab 3　Design and results of Box-Behnken response surface methodology

试验号	P407 用量 /%	P188 用量 /%	HPMC 用量 /%	胶凝温度 /℃
1	22	1	0.4	33.4
2	24	1	0.4	26.2
3	22	3	0.4	38.5
4	24	3	0.4	29.1
5	22	2	0.2	36.3
6	24	2	0.2	28.4
7	22	2	0.6	34.5
8	24	2	0.6	27.3
9	23	1	0.2	29.3
10	23	3	0.2	34.2
11	23	1	0.6	27.9
12	23	3	0.6	32.1
13	23	2	0.4	30.5
14	23	2	0.4	30.7
15	23	2	0.4	30.5
16	23	2	0.4	30.8
17	23	2	0.4	31.1

2.6.1　模型拟合　应用 Design-Expert 12 软件对试验数据进行拟合，得到回归方程：$T_g = 585.888 - 45.303X_1 + 14.478X_2 - 22.175X_3 - 0.55X_1X_2 + 0.875X_1X_3 - 0.875X_2X_3 + 0.915X_1^2 + 0.165X_2^2 - 0.25X_3^2$。方差分析结果见表 4，该模型 $P < 0.0001$；失拟项 $P = 0.1923 > 0.05$，表明该模型拟合度和可信度良好，回归方程可以较好地描述各因素与响应值之间的关系。影响顺序：P407 用量＞ P188 用量＞ HPMC 用量。利用 Design-Expert 12 软件绘制效应面图和等高线图，见图 3。

表 4　方差分析

Tab 4　Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	
模型	172.47	9	19.16	184.89	＜ 0.0001	极显著
X_1	125.61	1	125.61	1211.96	＜ 0.0001	
X_2	36.55	1	36.55	352.67	＜ 0.0001	
X_3	5.12	1	5.12	49.40	0.0002	
X_1X_2	1.21	1	1.21	11.67	0.0112	
X_1X_3	0.1225	1	0.1225	1.18	0.3130	
X_2X_3	0.1225	1	0.1225	1.18	0.3130	
X_1^2	3.53	1	3.53	34.01	0.0006	
X_2^2	0.1146	1	0.1146	1.11	0.3279	
X_3^2	0.0004	1	0.0004	0.0041	0.9510	
残差	0.7255	7	0.1036			
失拟项	0.4775	3	0.1592	2.57	0.1923	不显著
净误差	0.2480	4	0.0620			
总误差	173.19	16				

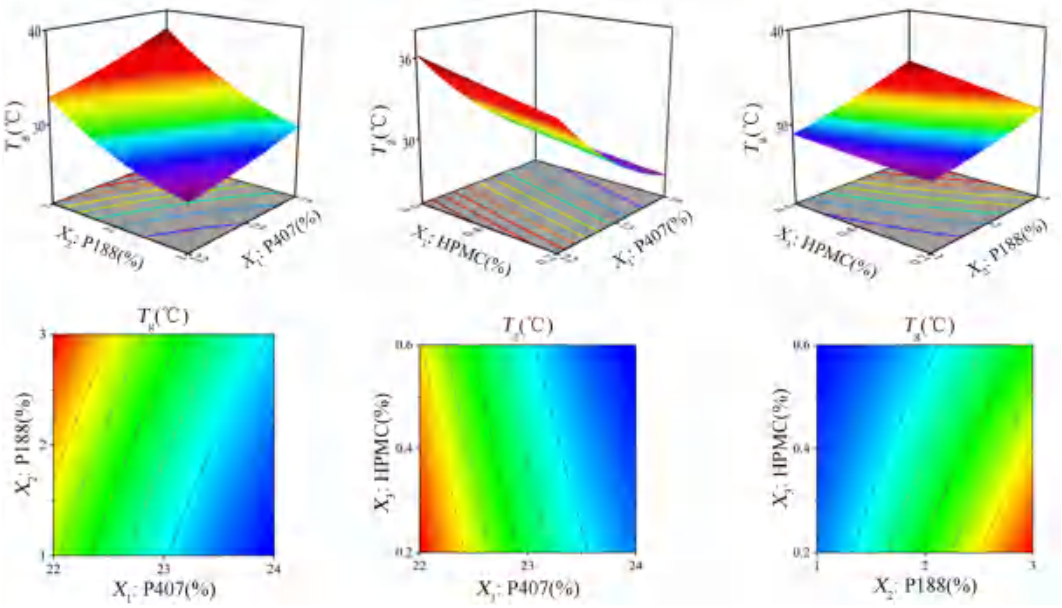


图 3　X_1、X_2、X_3 对 T_g 影响的效应面图与等高线图

Fig 3　Contour plot and response surface of effect of variables X_1，X_2，X_3 on T_g

2.6.2　优化工艺验证　应用 Design-Expert 12 软件进行响应面优化，将胶凝温度趋于 34 ℃，得到最佳处方：P407 用量为 22.59%，P188 用量为 2.44%，HPMC 用量为 0.31%。按优化工艺平行制备 3 组温敏凝胶，分别测定 T_g，结果见表 5，偏差结果显示，KT-Gel 模型可靠。

表 5　胶凝温度预测值与实测值比较

Tab 5　Comparison of predicted values with measured values

试验号	预测值 /℃	实测值 /℃	*RSD*/%
1	34.0	34.2	0.59
2	34.0	34.5	
3	34.0	33.9	
平均值	34.0	34.2	

2.7　溶蚀与释放行为研究

2.7.1　溶蚀行为　以无膜溶出法考察 KT-Gel 的释放机制与溶蚀是否有关[8]。称取 1 g KT-Gel，置于 10 mL 离心管中，放入 34 ℃恒温水浴锅中，使其转变为固态凝胶，精密称定质量后，缓慢加入 5 mL 已脱气处理的模拟鼻液（氯化钠：8.77 g•L^{-1}；氯化钾：2.98 g•L^{-1}；氯化钙：0.59 g•L^{-1}，使用 0.1 mol • L^{-1} 氢氧化钠调节至 pH 6.5）[11]，置于水浴恒温振荡器中（水浴温度为 34 ℃、振荡频率为 100 r • min^{-1}），每隔 30 min 倒出全部释放介质，擦干离心管内外壁水珠后，记录此时离心管质量，然后补加 5 mL 同温度释放介质，再次放入水浴恒温振荡器中，重复上述操作直至剩余凝胶量不足加入量的 10%。

计算各时间点累积溶蚀率（Q_e）、累积释放率（Q_n），并分别对时间绘制曲线，结果见图 4。为进一步考察凝胶溶蚀与药物释放的相关性，以 Q_n 对 Q_e 作图，得回归方程 $Q_n = 1.2034Q_e - 3.6995$（$r = 0.997$），证明药物释放与凝胶溶蚀相关。

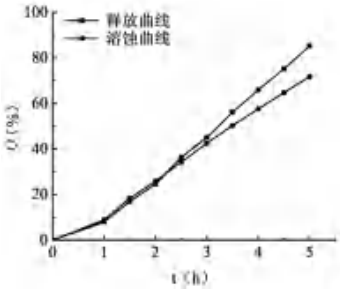


图 4　KT-Gel 溶蚀曲线与释放曲线

Fig 4　Dissolution curve and release curve of KT-Gel

2.7.2　释放行为　以扩散池法考察 KT-Gel 体外释药行为[12]。将半透膜固定于 Franz 扩散池上，扩散池的面积为 1.96 cm^2，释放介质作为接收液，接收池容量 16 mL，透皮扩散仪内置磁力搅拌子，转速为 100 r • min^{-1}，水浴温度为 34 ℃，于供给池加入鼻用原位凝胶 0.5 g 使其均匀分散在半透膜的表面，平行 3 份，室温下搅拌，分别于 0.5、1、2、3、5、7、9、11 和 24 h 从接收池取出全部接收液，并立即补加等体积同温度接收液。经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，用高效液相色谱法测定药物含量并计算药物累积释放率（Q_n），结果见表 6，各时间点的药物累积释放率 *RSD* 均＜ 5.0%，说明本制剂的批内均一性良好。

表 6　KT-Gel 体外释放试验结果

Tab 6　In vitro release results of KT-Gel

时间 /h	药物累积释放率 /%			均值 /%	*RSD*/%
	样品 1	样品 2	样品 3		
0.5	7.35	7.22	7.00	7.19	2.5
1	14.75	14.22	13.71	14.23	3.7
2	24.72	22.6	22.97	23.43	4.9
3	31.53	29.87	29.64	30.35	3.4
5	46.62	43.1	43.29	44.34	4.5
7	56.69	54.62	51.81	54.37	4.6
9	64.28	60.64	58.80	61.24	4.6
11	70.26	66.63	64.69	67.19	4.3
24	89.36	84.26	83.85	85.82	3.6

以时间为横坐标（*t*），累积释放率均值为纵坐标（Q_n）绘制累积释放曲线，结果见图 5，并将其分别按零级动力学、一级动力学、Higuchi 动力学、Ritger-Peppas 动力学方程进行拟合，初步研究 KT-Gel 的体外释放规律。Ritger-Peppas 模型中的 *n* 为释放指数，KT-Gel 的 *n* 值为 0.506 67，介于 0.45 ～ 0.89 之间，这表明 KT 从鼻用温敏凝胶中的释放是扩散与骨架溶蚀协同作用[13]。在所应用的模型中，一级释放模型的相关系数最高（见表 7），说明 KT-Gel 具有缓释特征。

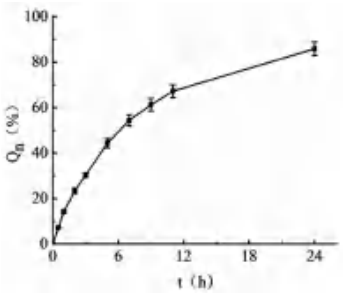


图 5　KT-Gel 体外释放曲线

Fig 5　In vitro release profiles of KT-Gel

表 7　KT-Gel 释药动力学模型拟合方程及相关系数

Tab 7　Fitting equation and correlation coefficients for the in vitro release of KT-Gel

动力学模型	方程	R^2
零级	$Q = 3.565t + 16.713$	0.8032
一级	$\ln(1 - Q/87.43) = -0.1404t$	0.9968
Higuchi	$Q = 19.44t^{1/2} - 1.923$	0.9727
Ritger-Peppas	$\ln Q = 0.5003\ln t + 2.933$	0.9710

2.8　家兔眼睛刺激性考察

采用同体左右侧自身对比法[14]。实验前 24 h 内对每只动物的双眼进行检查（包括使用荧光素钠检查）。将 0.1 mL KT-Gel 滴在左侧眼结膜上，另一侧滴入 0.1 mL 生理盐水作对照，涂药后使眼

被动闭合 10 s，在给药后 1、2、4、24、48 和 72 h 观察家兔左右眼情况，拍照，记录家兔左右眼刺激反应，参照《化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》眼刺激性试验项下方法评分，判断其刺激程度[15]。评分结果均为零，说明 KT-Gel 对家兔眼睛无刺激性。

3　讨论

3.1　KT-Gel 中酮咯酸氨丁三醇含量的确定

预试验显示 KT-Gel 的胶凝温度明显受药物含量影响，空白基质的胶凝温度最低，随着酮咯酸氨丁三醇含量的升高，胶凝温度也随之升高，因此酮咯酸氨丁三醇含量的确定在本试验中至关重要。2010 年，美国食品药品管理局批准酮咯酸氨丁三醇鼻喷雾剂 Sprix（15.75 mg/ 喷，每喷 100 μL）上市，Sprix 具有使用简便、止痛效力强且起效迅速等特点。Li 等[16]制备了酮咯酸氨丁三醇热敏和离子敏感性原位水凝胶（157.5 mg • mL^{-1}）用于酮咯酸氨丁三醇的鼻内递送，该制剂具有合适的胶凝温度，持续的药物释放与良好的镇痛效果。综合预试验与文献调研结果，确定 KT-Gel 中酮咯酸氨丁三醇含量为 157.5 mg • mL^{-1}。

3.2　KT-Gel 中 HPMC 的选择

原位凝胶与黏附聚合物联合使用能降低鼻腔纤毛的清除作用，延长药物与鼻黏膜的接触时间，改善药物的吸收，这一点已得到明确证明[17]。本研究筛选了几种黏附聚合物（壳聚糖、卡波姆 934、羧甲基纤维素钠、海藻酸钠及 HPMC），在鼻腔给药的可接受范围内没有明显改变凝胶温度的黏附聚合物是海藻酸钠和 HPMC，加入其他黏膜黏附聚合物均导致 KT-Gel 胶凝温度显著降低，这与 Fatouh 等[18]的研究一致。这一现象可能是由于黏膜黏附聚合物的水合作用消耗了配方中的部分水分，导致 P407 胶束水合度降低，因此胶束脱水和溶胶到凝胶的转变发生在较低的温度下。

凝胶与鼻黏膜的黏附对于增强用药部位的停留时间至关重要，因此以黏附力强度评估 KT-Gel 保留能力，黏附力强度越高，鼻黏膜中的保留就越多[11]。在黏附力测定试验中，含 HPMC 的黏附力高于含海藻酸钠的黏附力，综上初步确定 HPMC 作为黏附聚合物。

3.3　KT-Gel 体外释药机制分析

无膜法考察 KT-Gel 溶蚀行为试验，结果表明药物的释放与骨架的溶蚀以相同的速率进行，药物的释放受骨架的溶蚀速度控制。扩散池法考察 KT-Gel 体外释药行为结果显示，Q_n-t 模型拟合符合一级动力学方程特征，表明药物释放存在一定的缓释效果，且 Ritger-Peppas 方程的释放指数 n 介于 0.45 ～ 0.89 之间，综上，温敏凝胶剂中酮咯酸氨丁三醇的释放受扩散和骨架溶蚀控制，可避免突释现象，维持药物持续、稳定的释放。

3.4　不足之处

试验中采用扩散池法考察了 KT-Gel 体外释药行为，但仍存在一定的局限性，这种静态模型与鼻腔环境有所差距，在体内设置中会有很多影响药物吸收的因素，例如鼻腔黏液的分泌和纤毛的运动，KT-Gel 的体内吸收以及生物利用度情况是否理想，还有待于进行体内药动学试验来验证。另外，本研究中添加 HPMC 降低鼻腔纤毛的清除作用，如果黏度过高，会改变鼻黏膜的正常功能，对纤毛产生毒性，因此本研究还需开展 KT-Gel 对鼻纤毛毒副作用的研究。

3.5　展望

本研究以 P407、P188、HPMC 作为凝胶基质材料，以胶凝温度为评价指标，采用 Box-Behnken 效应面法优化 KT-Gel 处方，并对其体外释药机制进行研究。本研究制备的 KT-Gel，克服了传统喷雾剂的缺点，具有良好的黏膜黏附性和缓释效果，为酮咯酸氨丁三醇鼻腔递送的开发提供参考。

参考文献

[1] Suhail M，Hsieh YH，Shao YF，et al. Formulation and in-vitro characterization of pH-responsive semi-interpenetrating polymer network hydrogels for controlled release of ketorolac tromethamine [J]. Gels，2021，7（4）：167.

[2] 王奕皓，滕娜，刘娟，等 . 右美托咪定滴鼻联合酮咯酸氨丁三醇对小儿术后的镇痛作用 [J]. 中国疼痛医学杂志，2021，27（6）：469-473.

[3] 张莹，曾媛，刘辉，等 . 酮咯酸氨丁三醇控释片的制备工艺研究及处方优化 [J]. 中国医院药学杂志，2022，42（5）：485-490.

[4] Gu F，Fan H，Cong Z，et al. Preparation，characterization，and in vivo pharmacokinetics of thermosensitive in situ nasal gel of donepezil hydrochloride [J]. Acta Pharm，2020，70（3）：411-422.

[5] Agrawal M，Saraf S，Dubey SK，et al. Stimuli-responsive in situ gelling system for nose-to-brain drug delivery [J]. J Control Release，2020，327：235-265.

[6] Wang X，Liu G，Ma J，et al. In situ gel-forming system：an attractive alternative for nasal drug delivery [J]. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst，2013，30（5）：411-434.

[7] El Taweel MM，Aboul-Einien MH，Kassem MA，et al. Intranasal zolmitriptan-loaded bilosomes with extended na-

sal mucociliary transit time for direct nose to brain delivery [J]. Pharmaceutics，2021，13（11）：1828.
[8] 李晨曦 . 用于鼻腔给药的载酮咯酸氨丁三醇温敏即型凝胶的制备与评价 [D]. 哈尔滨：黑龙江中医药大学，2014.
[9] 范冉冉，王增明，张慧，等 . 紫杉醇温敏凝胶的制备、体外表征及其药代动力学研究 [J]. 药学学报，2022，57（7）：2197-2205.
[10] 董芙蓉，刘莉，陈志良，等 . 芷冰鼻腔原位凝胶剂的质量评价 [J]. 中国实验方剂学杂志，2011，17（4）：19-22.
[11] Nair AB，Chaudhary S，Shah H，et al. Intranasal delivery of darunavir-loaded mucoadhesive in situ gel：experimental design，in vitro evaluation，and pharmacokinetic studies [J]. Gels，2022，8（6）：342.
[12] 罗婷婷，庾莉菊，宁保明，等 . 外用半固体制剂质量研究与体外评价技术进展 [J]. 药物分析杂志，2022，42（5）：748-760.
[13] 杨佳佳，韦世权，李婉蓉，等 . 星点设计 - 效应面法优化丹皮酚脂微球处方工艺及其体外释药机制研究 [J]. 中草药，2020，51（15）：3901-3910.
[14] 盛平，张瑞涛，王晖，等 . 复方地西泮鼻腔给药的安全性评价 [J]. 中国临床药理学与治疗学，2013，18（5）：487-490.
[15] 国家食品药品监督管理局 . 药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则 [S]. 2014-05-13.
[16] Li X，Du L，Chen X，et al. Nasal delivery of analgesic ketorolac tromethamine thermo-and ion-sensitive in situ hydrogels [J]. Int J Pharm，2015，489（1-2）：252-260.
[17] Zahir-Jouzdani F，Wolf JD，Atyabi F，et al. In situ gelling and mucoadhesive polymers：why do they need each other [J]. Expert Opin Drug Deliv，2018，15（10）：1007-1019.
[18] Fatouh AM，Elshafeey AH，Abdelbary A. Agomelatine-based in situ gels for brain targeting via the nasal route：statistical optimization，in vitro，and in vivo evaluation [J]. Drug Deliv，2017，24（1）：1077-1085.

（收稿日期：2022-11-10；修回日期：2022-12-08）

天山花楸抗哮喘活性提取部位的筛选及其成分分析

吴娜，屯妮萨古丽·艾买提江，常军民，李改茹*（新疆医科大学药学院，乌鲁木齐　830017）

摘要：目的　基于 BEAS-2B 细胞筛选天山花楸抗哮喘活性提取部位，并对其化学成分进行分析。**方法**　采用系统溶剂提取法制备天山花楸不同溶剂提取物；采用脂多糖诱导 BEAS-2B 细胞构建体外炎症模型，ELISA 法检测细胞培养上清液中 IL-1β 和 IL-8 水平，筛选天山花楸抗哮喘的活性提取部位；基于 UPLC-QE-MS 技术对天山花楸抗哮喘活性提取部位进行成分分析。**结果**　ELISA 法检测结果表明天山花楸乙酸乙酯、正丁醇和水提取物均可以抑制脂多糖诱导的 BEAS-2B 细胞分泌 IL-1β 和 IL-8，乙酸乙酯部位抑制效果更为显著；利用 UPLC-QE-MS 技术对乙酸乙酯部位进行成分分析，通过分析各成分的质荷比及二级碎片离子信息，对其中 11 个化学成分的结构及其裂解途径进行了推导，包括黄酮类、苯丙素类、酚类及氯苷类化合物。**结论**　本研究对天山花楸乙酸乙酯提取物进行成分分析，为研究天山花楸抗哮喘活性的物质基础提供理论依据。

关键词：天山花楸；哮喘；活性提取部位；成分分析
中图分类号：R284　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0863-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.005

Screening of anti-asthmatic active extracts from *Sorbus tianschanica* Rupr. and component analysis

WU Na, Aimaitijiang·Tunnisaguli, CHANG Jun-min, LI Gai-ru* (*College of Pharmacy*, *Xinjiang Medical University*, *Urumqi* 830017)

基金项目：新疆维吾尔自治区自然科学基金（No. 2020D01C167）。
作者简介：吴娜，女，硕士研究生，主要从事新疆特色药用植物方面的研究，email：1393115481@qq.com　*通信作者：李改茹，女，副教授，硕士研究生导师，主要从事新疆特色药用植物方面的研究，email：gruli104@163.com

Abstract: Objective To screen the anti-asthma active extracts from *Sorbus tianschanica* Rupr. based on BEAS-2B cells and to analyze their chemical compositions. **Methods** Different solvent extracts from *Sorbus tianschanica* Rupr. were obtained by systematic solvent extraction method. LPS-induced BEAS-2B cells were used to construct an in vitro inflammation model, and the levels of IL-1*β* and IL-8 in the cell culture supernatant were detected by ELISA to screen the anti-asthma active extracts of *Sorbus tianschanica* Rupr.. The compositions of the anti-asthma active extracts of *Sorbus tianschanica* Rupr. were analyzed with UPLC-QE-MS. **Results** ELISA showed that ethyl acetate extract, *n*-butanol extract and water extract inhibited the secretion of IL-1*β* and IL-8 in LPS-induced BEAS-2B cells, and the inhibitory effect of ethyl acetate extract was more significant. The compositions of the ethyl acetate site were analyzed by UPLC-QE-MS, and the structures of the 11 chemical components and their cleavage pathways were deduced from the mass-to-charge ratio and secondary fragment ion information, including flavonoids, phenylpropanoids, phenols and cyanogenic glycosides. **Conclusion** The composition analysis of the ethyl acetate extract from *Sorbus tianschanica* Rupr. helps provide a theoretical basis for the material basis for the anti-asthmatic activity of *Sorbus tianschanica* Rupr..

Key words: *Sorbus tianschanica* Rupr.; asthma; active extract; component analysis

天山花楸（*Sorbus tianschanica* Rupr.）为蔷薇科花楸属植物，为新疆民间常用药材，常以嫩枝叶、果实和茎皮入药，具有清热利肺、补脾生津、止咳的功效，主要用于肺结核、哮喘咳嗽、胃炎及维生素 A、C 缺乏等症的治疗 [1]。目前，对于天山花楸的研究报道主要集中在化学成分的定性和定量分析，而其药理作用机制的研究较少，课题组前期通过动物实验发现天山花楸具有抗哮喘活性 [2]，但是其发挥抗哮喘活性的物质基础尚不明确。

哮喘是呼吸道最常见的疾病之一，是由多种细胞和细胞组分参与的以气道慢性炎症为特征的异质性疾病，哮喘的发病伴随着气道炎症、气道高反应性以及气道重塑。气道上皮细胞是气道与外界环境接触的第一道屏障，环境中的变应原与气道上皮细胞表面的膜受体如 Toll 样受体（TLR）s、NoD 样受体（NLR）等结合，进而激活气道上皮细胞分泌多种炎症介质，如白介素 -1*β*（IL-1*β*）、白介素 -8（IL-8）、白介素 -6（IL-6）、肿瘤坏死因子 -*α*（TNF-*α*）等，这些细胞因子可趋化体内多种炎性细胞和抗原呈递细胞在气道聚集，引起气道慢性炎症 [3]。人支气管上皮细胞 BEAS-2B 细胞是被普遍接受的用于研究呼吸道上皮细胞的理想模型，而脂多糖（LPS）能够刺激各种细胞启动信号级联反应，最终导致细胞激活并表达免疫调节或释放炎症因子 [4-5]。因此，本实验采用 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞模型筛选天山花楸抗哮喘活性提取部位，并通过液 - 质联用技术对其进行成分分析，为天山花楸抗哮喘活性物质基础的研究提供理论依据。

1　仪器与试药

MODULYOD 冷冻干燥机（美国 Thermo）；超净工作台（苏州万达净化科技有限公司）；CO_2 培养箱（美国 Thermo Scientific）；荧光倒置显微镜（日本 OLYMPUS，IX71）；xMark 全波长酶标仪（美国 BIO-RAD）；冷冻离心机（德国 Eppendorf）；1290UPLC 超高效液相色谱仪（Agilent）；Q Exactive Focus 高分辨质谱（Thermo Fisher Scientific）；BSA124S-CW 天　平（Sartorius）；YM-080S 超声仪（深圳市方奥微电子有限公司）；明澈 D24 UV 纯水仪（Merck Millipore）。

BEAS-2B 细胞购自丰晖生物科技有限公司。天山花楸采自新疆呼图壁林场，经新疆医科大学药学院生药学教研室帕丽达教授鉴定为天山花楸（*Sorbus tianschanica* Rupr.）的干燥枝叶。乙醇、石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇均为分析纯；RPMI-1640 培养基、青链霉素混合液、0.25% 胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液（Biological Industries）；胎牛血清（美国 Gibco 公司，批号：2138109RP）；LPS（Sigma 公司，批号：L2880）；地塞米松（Dex，北京索莱宝科技有限公司）；人 IL-1*β* ELISA 试剂盒（武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司，批号：U3EM3414UV）；人 IL-8 ELISA 试剂盒（武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司，批号：994M6FJHXY）；甲醇（批号：67-56-1）、乙腈（批号：75-05-8）（CNW Technologies）；甲酸（Sigma 公司，批号：64-18-6）。

2　方法

2.1　天山花楸各溶剂提取物的制备

称取天山花楸药材 5 kg，按料液比 1∶20（kg/L）加入 95% 乙醇，80 ℃提取 2 次，每次 1 h，合并 2 次滤液，减压浓缩得天山花楸醇提浸膏。将

醇提浸膏用水混悬后，依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取，将萃取液浓缩，经冷冻干燥得石油醚部位 62.0 g、氯仿部位 26.2 g、乙酸乙酯部位 68.5 g、正丁醇部位 134.6 g；将醇提后的药材凉晒干，称重，按料液比 1∶20（kg/L）加入水，沸水提取 2 次，每次 1 h，合并 2 次滤液，减压浓缩至干，得天山花楸水提取部位 904 g。

2.2　天山花楸提取物及阳性药物对 BEAS-2B 细胞的毒性作用

调整 BEAS-2B 细胞密度为 1×10^5 个•mL^{-1}，接种于 96 孔细胞培养板，每孔接种 100 μL。石油醚组给药梯度为 0、1、10、20、40、60、80 μg•mL^{-1}，氯仿组给药梯度为 0、1、10、50、100、150、200 μg•mL^{-1}，乙酸乙酯、正丁醇、水提取物组给药梯度为 0、1、10、100、200、300、400、500 μg•mL^{-1}，每孔给药 200 μL。给药完成后继续培养 24 h，再向每孔内加入 20 μL 的 5 mg•mL^{-1} 的 MTT，继续培养 4 h 后吸去上清液，向每孔内加入 150 μL DMSO，震荡 10 min 后于 490 nm 处测定各孔 *OD* 值。

2.3　天山花楸不同提取部位对 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞分泌 IL-1*β* 和 IL-8 的影响

BEAS-2B 细胞用 RPMI-1640 完全培养基（含 10%FBS，1% 双抗）于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养，当细胞生长至 80% ～ 90% 时，进行传代。

调整细胞密度为 1×10^5 个•mL^{-1}，接种于 24 孔细胞培养板（500 μL/孔），分组实验。空白对照组：正常培养的 BEAS-2B 细胞；模型组：采用 1 μg•mL^{-1} 的 LPS 处理 BEAS-2B 细胞 24 h；阳性药物地塞米松，石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、水提取物组：分别采用 1000 nmol•L^{-1} 的地塞米松、80 μg•mL^{-1} 的石油醚提取物、100 μg•mL^{-1} 的氯仿提取物、300 μg•mL^{-1} 的乙酸乙酯提取物、300 μg•mL^{-1} 的正丁醇提取物、400 μg•mL^{-1} 的水提取物作用 2 h 后，再给予 1 μg•mL^{-1} 的 LPS 刺激，继续培养 24 h。收集各组细胞培养液，于 2 ～ 8 ℃，1000 r•min^{-1} 离心 20 min，取上清液，按照 ELISA 试剂盒说明书进行检测。

2.4　天山花楸乙酸乙酯提取物的成分分析

2.4.1　色谱条件　色谱柱：UPLC BEH C18 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）；流速：0.4 mL•min^{-1}；进样量：5 μL；流动相：0.1% 甲酸水（A）- 乙腈（B），梯度洗脱（0 ～ 3.5 min，95% ～ 85%A；3.5 ～ 6 min，85% ～ 70%A；6 ～ 6.5 min，70%A；6.5 ～ 12 min，70% ～ 30%A；12 ～ 12.5 min，30%A；12.5 ～ 18 min，30% ～ 0%A；18 ～ 25 min，0%A；25 ～ 26 min，0% ～ 95%A；26 ～ 30 min，95%A）。

2.4.2　质谱条件　采用 ESI 离子源，在正、负离子两种模式下分别进行质谱检测分析。喷雾电压：4000 V 和－ 3600 V；鞘气流量：45 Arb，辅助气体流量：15 Arb；毛细管温度：400 ℃；扫描模式：分别设置 Full MS 和 DD-MS^2 两种扫描模式，分辨率 Full MS 模式为：70 000，DD-MS^2 模式为：17 500；扫描离子范围 *m/z* 100 ～ 1500；碰撞能量：15、30、45 V。

2.5　统计学处理

采用 Origin 2018 对数据进行处理，用 $\bar{x}\pm s$ 表示。用 SPSS 26.0 统计软件进行统计分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　天山花楸提取物及阳性药物对 BEAS-2B 细胞的毒性作用

结果表明，天山花楸石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇、水提取物组分别在质量浓度低于 80、100、300、300、400 μg•mL^{-1} 时对 BEAS-2B 细胞没有毒性。阳性药物地塞米松给药浓度在 62.5 ～ 2000 nmol•L^{-1} 未表现出对 BEAS-2B 细胞的毒性作用，见图 1。

3.2　天山花楸提取物对 LPS 诱导 BEAS-2B 细胞分泌炎性因子 IL-1*β* 和 IL-8 的影响

正常 BEAS-2B 细胞培养上清液中 IL-1*β* 和 IL-8 的含量均较低，给予 LPS 刺激 BEAS-2B 细胞作用 24 h 后，IL-1*β* 和 IL-8 的含量显著增加（$P<0.05$）。与模型组比较，石油醚、氯仿提取物组对 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞分泌 IL-1*β*、IL-8 无抑制作用；而乙酸乙酯、正丁醇和水提取物组的细胞培养上清液中 IL-1*β*、IL-8 的含量均明显降低（$P<0.05$），且乙酸乙酯提取物的作用相对较强，结果见图 2。

3.3　天山花楸乙酸乙酯提取物成分分析

天山花楸乙酸乙酯提取物正、负离子模式下的基峰离子流图见图 3。将质谱原始数据导入 XCMS 软件，进行保留时间矫正、峰识别、峰提取、峰积分、峰对齐等工作，基于自建 BIOTREE TCM 数据库及相应裂解规律匹配法对含有二级质谱数据的峰进行鉴定，保留打分值 0.6 以上定性到的物质。结果表明，天山花楸乙酸乙酯提取物中的化学成分主要为黄酮类、萜类、酚类、苯丙素类、生物碱类、氨基酸衍生物类等。通过 *m/z* 确定化合物的准分子离子峰，推断化合物的分子量及分子式，再结合其二级质谱碎片离子，推测化合物的裂解途径，进一步确证了没食子酸、瑞香素、秦皮甲素、绿原酸、丁香醛、苦杏仁苷、表儿茶素、芦丁、紫云英苷、金丝桃苷、柚皮素 11 个化合物的结构，结果见表 1。

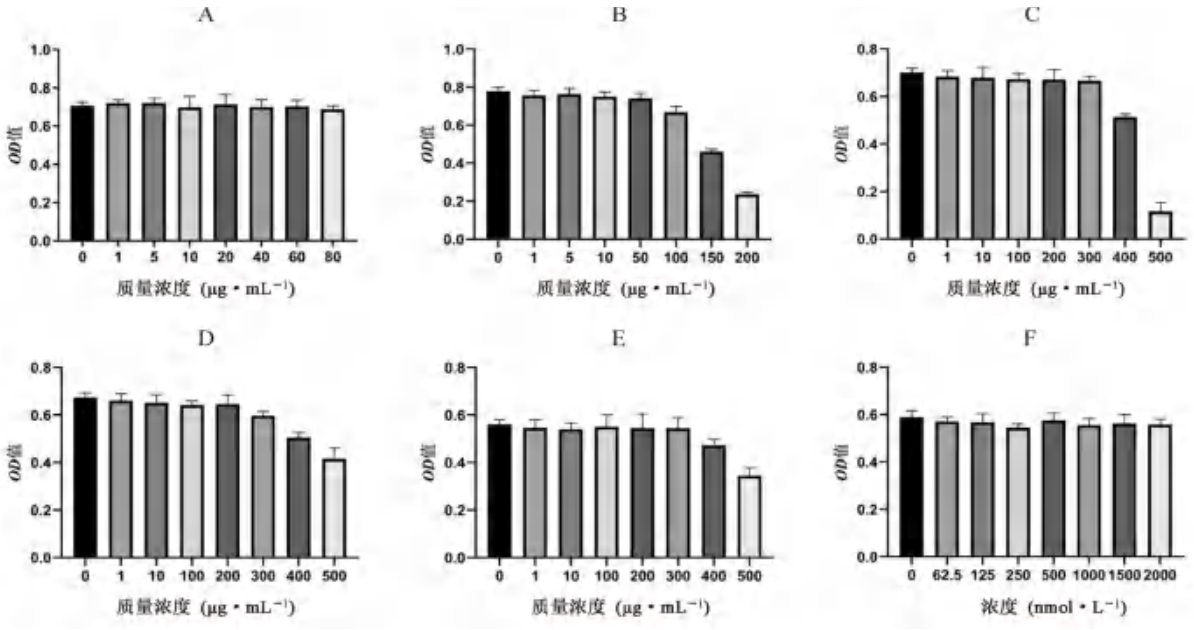


图 1　天山花楸提取物及地塞米松对细胞的毒性作用

Fig 1　Cytotoxic effect of *Sorbus tianschanica* Rupr. extract and dexamethasone

A. 石油醚提取物（petroleum ether extract）；B. 氯仿提取物（chloroform extract）；C. 乙酸乙酯提取物（ethyl acetate extract）；D. 正丁醇提取物（*n*-butanol extract）；E. 水提取物（water extract）；F. 地塞米松（dexamethasone）

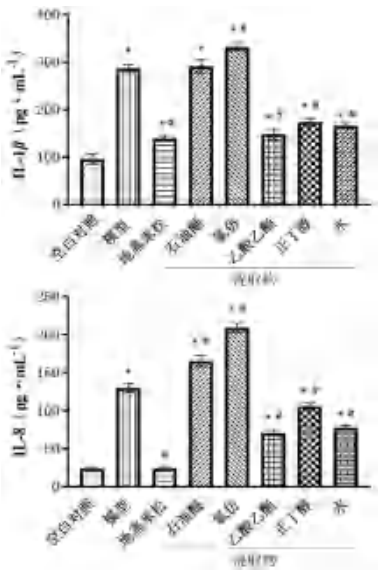


图 2　天山花楸提取物对 BEAS-2B 细胞分泌 IL-1*β* 和 IL-8 的影响

Fig 2　Effect of *Sorbus tianschanica* Rupr. extract on the secretion of IL-1*β* and IL-8 from BEAS-2B cells

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

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

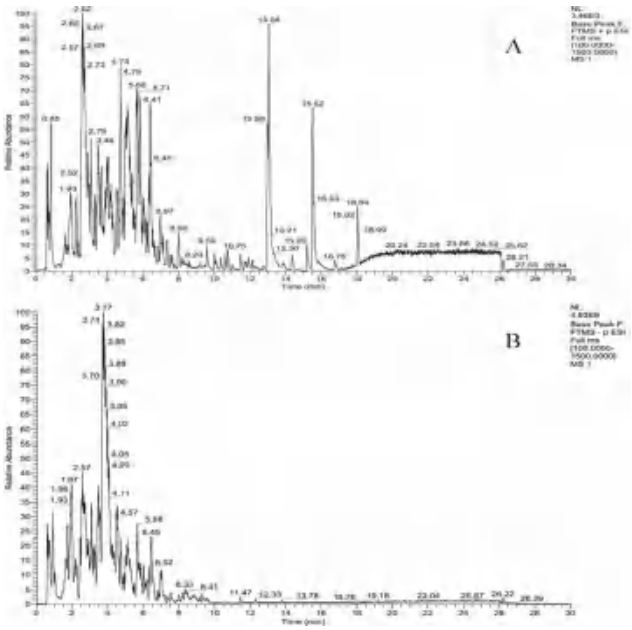


图 3　天山花楸乙酸乙酯提取物正（A）、负（B）离子模式下基峰离子流图

Fig 3　Ion flow diagram of ethyl acetate extract of *Sorbus tianschanica* Rupr. under positive（A）and negative（B）ion mode

正离子模式下保留时间为 2.25 min 的化合物 **1**，准分子离子峰 *m/z* 341.086，分子式为 $C_{15}H_{16}O_9$，其二级质谱可见 *m/z* 179.035 $[M + H\text{-}C_6H_{10}O_5]^+$，为脱去一分子葡萄糖产生的离子碎片，推断为秦皮甲素，其可能的裂解途径见图 4。

化合物 **2** 的保留时间为 2.61 min，正离子模式下可见准分子离子 *m/z* 355.102，分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$，二级质谱可见 *m/z* 163.039 $[M + H\text{-}C_7H_{12}O_6]^+$离子碎片，推断为绿原酸，其可能的裂解途径见图 5。

正离子模式下化合物 **3** 的保留时间为 2.89 min，准分子离子峰 *m/z* 183.065，分子式为 $C_9H_{10}O_4$，二级图谱可观察到依次丢失一分子 CO、一分子 CH_3 形成的 *m/z* 155.071 $[M + H\text{-}CO]^+$、*m/z* 140.047 $[M + H\text{-}CO\text{-}CH_3]^+$，碎片离子 *m/z* 155.071 失去一分子

表 1　天山花楸乙酸乙酯提取物的化学成分

Tab 1　Chemical constituents in ethyl acetate extract of *Sorbus tianschanica* Rupr.

No.	离子模式	t_R/min	*m/z*	碎片离子	$\delta/\times10^{-6}$	分子式	化合物
1	$[M+H]^+$	2.25	341.086	179.035	2.30	$C_{15}H_{16}O_9$	秦皮甲素
2	$[M+H]^+$	2.61	355.102	163.039	0.54	$C_{16}H_{18}O_9$	绿原酸
3	$[M+H]^+$	2.89	183.065	155.071、140.047、123.044、95.049	2.35	$C_9H_{10}O_4$	丁香醛
4	$[M+H]^+$	3.70	291.086	207.066、139.039、127.039	0.12	$C_{15}H_{14}O_6$	表儿茶素
5	$[M+H]^+$	4.97	611.161	302.978	1.42	$C_{27}H_{30}O_{16}$	芦丁
6	$[M+H]^+$	5.52	449.108	287.053	0.29	$C_{21}H_{20}O_{11}$	紫云英苷
7	$[M+H]^+$	5.87	465.104	303.048	1.14	$C_{21}H_{20}O_{12}$	金丝桃苷
8	$[M+H]^+$	7.84	273.076	153.018、147.044、119.049	0.16	$C_{15}H_{12}O_5$	柚皮素
9	$[M-H]^-$	1.05	169.014	125.024、97.030、69.035	2.53	$C_7H_6O_5$	没食子酸
10	$[M-H]^-$	2.24	177.019	149.043、134.312	1.51	$C_9H_6O_4$	瑞香素
11	$[M+HCOO]^-$	3.22	502.157	323.098、263.077、179.056、161.045、119.034、101.024	0.47	$C_{20}H_{27}NO_{11}$	苦杏仁苷

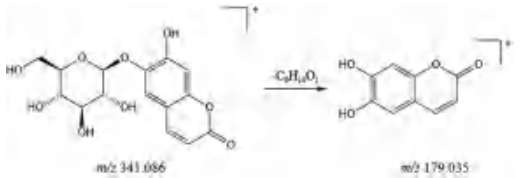


图 4　秦皮甲素裂解途径

Fig 4　Fragmentation pathway of esculin

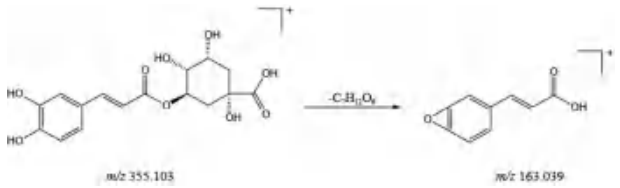


图 5　绿原酸裂解途径

Fig 5　Fragmentation pathway of chlorogenic acid

CH_3OH 形成的 *m/z* 123.044 $[M + H\text{-}CO\text{-}CH_3OH]^+$、丢失一分子 $C_2H_2O_2$ 形成的 *m/z* 95.049 $[M + H\text{-}CO\text{-}C_2H_2O_2]^+$，与丁香醛裂解碎片一致 [6]，其可能的裂解途径见图 6。

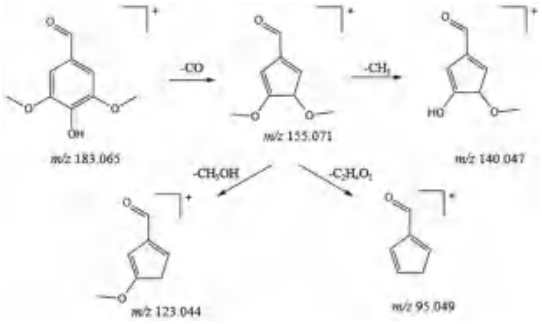


图 6　丁香醛裂解途径

Fig 6　Fragmentation pathway of syringaldehyde

正离子模式下化合物 **4** 的保留时间为 3.70 min，准分子离子 *m/z* 291.086，分子式为 $C_{15}H_{14}O_6$，二级图谱可观察到发生 RDA 裂解形成的 *m/z* 127.039 $[M + H\text{-}C_9H_8O_3]^+$、*m/z* 139.039 $[M + H\text{-}C_8H_8O_3]^+$，不发生 RDA 裂解直接形成的 *m/z* 207.066 $[M + H\text{-}2C_2H_2O]^+$，与文献数据基本一致 [7]，推断其为表儿茶素，可能的裂解途径见图 7。

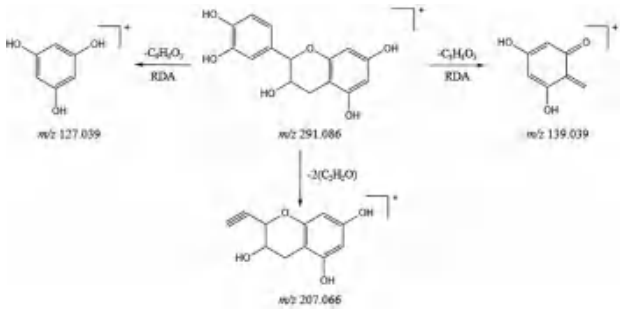


图 7　表儿茶素裂解途径

Fig 7　Fragmentation pathway of epicatechin

化合物 **5** 的保留时间为 4.97 min，在正离子模式下准分子离子为 *m/z* 611.161，分子式为 $C_{27}H_{30}O_{16}$，二级质谱可观察到脱去芸香糖的特征离子碎片峰 *m/z* 302.978 $[M + H\text{-}C_{12}H_{20}O_9]^+$，结合文献报道推测为芦丁 [8]，其可能的裂解途径见图 8。

正离子模式下化合物 **6** 的保留时间为 5.52 min，准分子离子峰 *m/z* 449.108，分子式为 $C_{21}H_{20}O_{11}$，二级质谱图可见脱去一分子葡萄糖的离子碎片 *m/z* 287.053 $[M + H\text{-}C_6H_{10}O_5]^+$，推断为紫云英苷，其可能的裂解途径见图 9。

正离子模式下化合物 **7** 的保留时间为 5.87 min，准分子离子峰 *m/z* 465.104，其分子式为 $C_{21}H_{20}O_{12}$，二级质谱可观察到 *m/z* 303.048 $[M + H\text{-}C_6H_{10}O_5]^+$离子碎片，推断化合物为金丝桃苷 [8]，其可能的裂解途径见图 10。

正离子模式下化合物 **8** 的保留时间为 7.84 min，准分子离子峰 *m/z* 273.076，分子式 $C_{15}H_{12}O_5$，二级质谱可观察到 *m/z* 153.018 $[M + H\text{-}C_8H_8O]^+$、*m/z* 147.044 $[M + H\text{-}C_6H_6O_3]^+$、*m/z* 119.049 $[M + H\text{-}C_7H_6O_4]^+$特征离子碎片，经查阅文献推断为柚皮素 [9]，其可能的裂解途径见图 11。

负离子模式下化合物 **9** 的保留时间为 1.05 min，准分子离子峰 *m/z* 169.014，分子式为 $C_7H_6O_5$，二

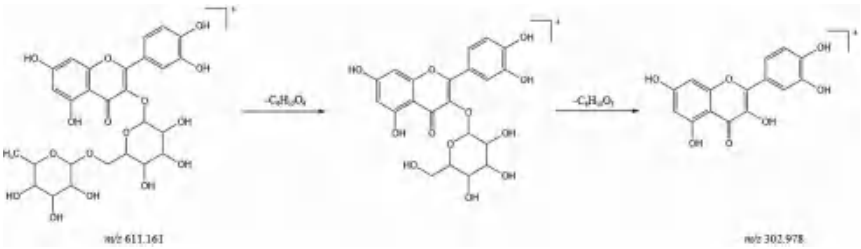


图 8　芦丁裂解途径

Fig 8　Fragmentation pathway of rutin

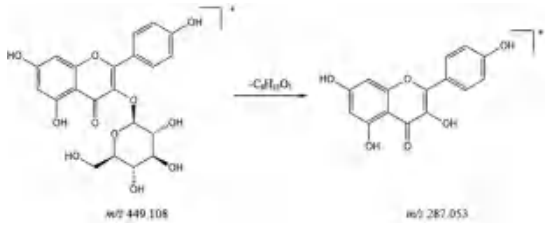


图 9　紫云英苷裂解途径

Fig 9　Fragmentation pathway of astragalin

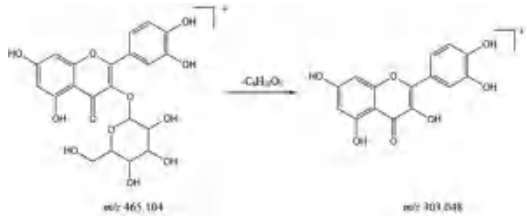


图 10　金丝桃苷裂解途径

Fig 10　Fragmentation pathway of hyperoside

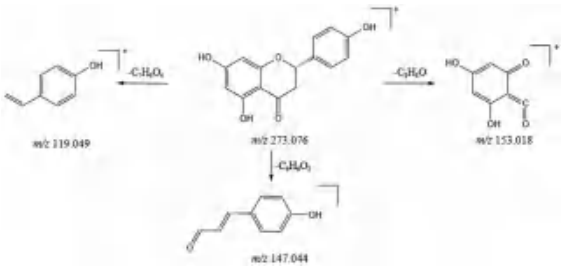


图 11　柚皮素裂解途径

Fig 11　Fragmentation pathway of naringenin

级质谱图中有脱去一分子 CO_2 生成的 *m/z* 125.024 $[M-H-CO_2]^-$ 碎片离子，同时还有 *m/z* 97.030 $[M-H-CO_2-CO]^-$、*m/z* 69.035 $[M-H-CO_2-CO-CO]^-$ 碎片离子 [10]，通过与文献信息比对推断化合物 **9** 为没食子酸，其可能的裂解途径见图 12。

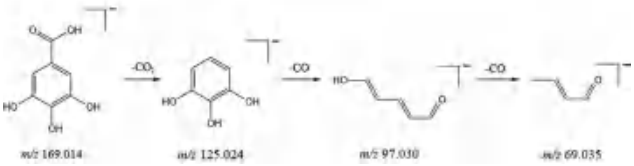


图 12　没食子酸裂解途径

Fig 12　Fragmentation pathway of gallic acid

负离子模式下化合物 **10** 的保留时间为 2.24 min，准分子离子峰 *m/z* 177.019，分子式为 $C_9H_6O_4$，二级质谱可见脱去 CO、CO_2 生成碎片离子 *m/z* 149.043 $[M-H-CO]^-$、*m/z* 134.312 $[M-H-CO_2]^-$，与瑞香素裂解规律相同 [11]，其可能的裂解途径见图 13。

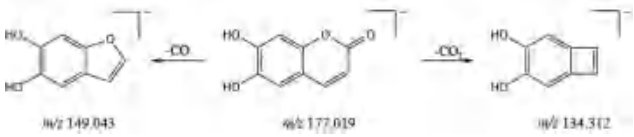


图 13　瑞香素裂解途径

Fig 13　Fragmentation pathway of daphnetin

化合物 **11** 的保留时间为 3.22 min，负离子模式下准分子离子 *m/z* 502.157，分子式为 $C_{20}H_{27}NO_{11}$，二级图谱可观察到丢失一分子葡萄糖形成的 *m/z* 323.098 $[M + HCOO-C_6H_{10}O_6]^-$，该碎片离子继续丢失一分子水后发生重排丢失一分子 C_2H_2O 形成 *m/z* 263.077 $[M + HCOO-C_6H_{10}O_6-H_2O-C_2H_2O]^-$；丢失一分子葡萄糖形成 *m/z* 179.056 $[M-H]^-$，继续丢失一分子水形成 *m/z* 161.045 $[M-H-H_2O]^-$、重排失去一分子 C_2H_2O 形成 *m/z* 119.034 $[M-H-H_2O-C_2H_2O]^-$、失去一分子水形成 *m/z* 101.024 $[M-H-H_2O-C_2H_2O-H_2O]^-$，与苦杏仁苷裂解规律一致 [12]，其可能的裂解途径见图 14。

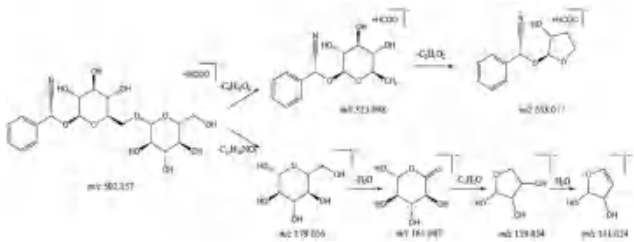


图 14　苦杏仁苷裂解途径

Fig 14　Fragmentation pathway of amygdalin

4　讨论

IL-1β 可促进嗜酸性粒细胞和肺部炎症的浸润，并促进肥大细胞和 T 细胞活化 [13]，可诱导 Th2 型哮喘炎症反应 [14]，同时 IL-1β 也与中性粒细胞炎症关系密切，是嗜中性粒细胞型哮喘的关键炎症因子 [15]，可激活 Th17 细胞分泌 IL-17 进

一步导致气道炎症加重[16]。IL-8 是一种 CXC 趋化因子，在气道炎症中同样发挥重要作用，IL-8 不但可以趋化中性粒细胞聚集，还与嗜酸性粒细胞（EOS）浸润关系密切[17]，在严重哮喘患者气道中 IL-8 的表达上调[18]。因此，本实验构建了 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞体外炎症模型，以细胞培养上清液中的 IL-1β 和 IL-8 为检测指标，筛选天山花楸抗哮喘的活性提取部位。

天山花楸乙酸乙酯提取物主要成分为黄酮类、苯丙素类、氰苷类和酚类物质，其中天山花楸中绿原酸、苦杏仁苷、表儿茶素、芦丁、紫云英苷、金丝桃苷的抗炎作用已有报道。黄酮类化合物抗炎机制涉及到多种信号通路，绿原酸可通过激活核因子 -κB（NF-κB）信号通路抑制 IL-8 的生成发挥抗炎作用[19]，没食子酸可以抑制炎症细胞因子 TNF、IL-6 和 IL-1 的分泌，间接抑制 LPS 诱发的炎性反应[20]，苦杏仁苷在体内能被微生物酶水解产生微量的苯甲醛和氢氰酸，对呼吸中枢有抑制作用，从而发挥镇咳平喘的作用。

综上所述，天山花楸乙酸乙酯提取物、正丁醇提取物以及水提取物均可以抑制 LPS 诱导的 BEAS-2B 细胞分泌 IL-1β 和 IL-8，且乙酸乙酯部位活性最强，但是本课题组目前只对活性最强的乙酸乙酯提取物进行了成分分析，后续会对 3 个提取部位的化学成分进行系统的分析，为进一步研究天山花楸抗哮喘活性的物质基础提供理论依据。

参考文献

[1] 国家医药管理局，中华本草编委会 . 中华本草（第 4 册 10 卷）[M]. 上海：上海科学技术出版社，1999：292.

[2] 马俊鹏 . 天山花楸平喘作用的实验研究 [D]. 乌鲁木齐：新疆医科大学，2007.

[3] 李莹 . 鸢尾素对屋尘螨诱导的气道上皮细胞炎症反应和凋亡的抑制作用及机制 [D]. 南昌：南昌大学，2020.

[4] 刘建洲，张立伟 . 基于人呼吸道上皮细胞炎症模型的连翘提取物抗炎活性实验研究 [J]. 天然产物研究与开发，2015，27（7）：1248-1253.

[5] 徐玲文，王华兵，揭凤英，等 . 麦冬皂苷 D 预处理对 LPS 介导的人肺上皮 Beas-2B 细胞炎性及氧化损伤的抑制作用 [J]. 沈阳药科大学学报，2021，38（12）：1302-1308.

[6] 郭文海，李跃，邹增城，等 . 阴阳攻积丸成分分析及其中肉桂醛、6- 姜酚、吴茱萸碱的含量测定 [J]. 光明中医，2021，36（17）：2885-2891.

[7] 王晴，卢志威，刘月红，等 . UPLC-Q-TOF/MS. E 结合诊断离子过滤方法快速分析大黄中酚类成分 [J]. 中国中药杂志，2017，42（10）：1922-1931.

[8] 熊莹姿，赵振，成婧，等 . 基于 UPLC-Orbitrap-HRMS 技术的苎麻籽乙醇提取物中主要化学成分分析与鉴定 [J]. 现代食品科技，2022，38（2）：245-255.

[9] 王改丽，程团，霍金海，等 . 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的北青龙衣大鼠肾组织化学成分分析 [J]. 中草药，2018，49（16）：3763-3769.

[10] 刘香易，曾锐，杨长传，等 . 基于 UPLC-ESI-HRMSn 技术的三草保肝汤化学成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（7）：141-147.

[11] 单进军，邓海山，文红梅，等 . 高效液相色谱 - 四级杆飞行时间串联质谱法分析瑞香素在大鼠肠壁的代谢产物 [J]. 药学学报，2011，46（11）：1366-1369.

[12] 张聪聪，王长虹，李兴佳，等 . 基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 分析桃仁化学成分及快速测定苦杏仁苷和野黑樱苷的含量 [J]. 中国医院药学杂志，2022，42（4）：347-355.

[13] Ritter M，Straubinger K，Schmidt S，et al. Functional relevance of NLRP3 inflammasome-mediated interleukin（IL）-1β during acute allergic airway inflammation [J]. Clin Exp Immunol，2014，178（2）：212-223.

[14] Besnard AG，Guillou N，Tschopp J，et al. NLRP3 inflammasome is required in murine asthma in the absence of aluminum adjuvant [J]. Allergy，2011，66（8）：1047-1057.

[15] Hoffman HM，Wanderer AA. Inflammasome and IL-1beta-mediated disorders [J]. Curr Allergy Asthma Rep，2010，10（4）：229-235.

[16] HS Chang. Neutrophilic inflammation in asthma：mechanisms and therapeutic considerations [J]. Expert Rev Respir Med，2017，11：29-40.

[17] Nakagome K，Nagata M. Involvement and possible role of eosinophils in asthma exacerbation [J]. Front Immunol，2018，9：2220.

[18] 王耀洁，李春花，刘红兵 . IL-8 在慢性鼻窦炎中的表达及作用 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志，2021，35（8）：765-768.

[19] 王庆华，杜婷婷，张智慧，等 . 绿原酸的药理作用及机制研究进展 [J]. 药学学报，2020，55（10）：2273-2280.

[20] 郑雪花，杨君，杨跃辉 . 没食子酸药理作用的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志，2017，37（1）：94-98.

（收稿日期：2022-08-18；修回日期：2022-10-27）

星点设计 - 效应面法优化盐酸多奈哌齐冻干型口崩片的制备工艺

吴雪纯[1]，邱旖[1]，吴婧楠[1]，孙常胜[1]，蒋巧萍[1]，宇泉霖[1]，宋嘉佳[1]，顾凯琳[2]，郭杏梅[2]，孙腾跃[2]，蔡程科[1*]，王洪飞[2*]（1. 北京中医药大学中药学院，北京　102488；2. 北京量子高科制药科技有限公司，北京　102200）

摘要：目的　优化盐酸多奈哌齐冻干型口崩片的制备工艺。**方法**　以口崩片外观性状、崩解时间、含水量为主要考察指标，对盐酸多奈哌齐冻干型口崩片的处方工艺进行单因素和星点设计 - 效应面法的考察。**结果**　盐酸多奈哌齐冻干型口崩片的最优处方工艺为：普鲁兰多糖 9.5 mg/ 片，甘露醇 4.9 mg/ 片，黄原胶 0.2 mg/ 片，制备的口崩片片型饱满、表面光洁、崩解迅速，且室温下放置 3 个月的稳定性良好。**结论**　优化得到的盐酸多奈哌齐冻干型口崩片制备工艺操作简便、稳定可行，该工艺适用于大规模工业化生产。

关键词：盐酸多奈哌齐；冻干型口崩片；星点设计 - 效应面法
中图分类号：R943　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0870-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.006

Preparation of lyophilized orally disintegrating tablets of donepezil hydrochloride based on central composite design and response surface methodology

WU Xue-chun[1], QIU Yi[1], WU Jing-nan[1], SUN Chang-sheng[1], JIANG Qiao-ping[1], YU Quan-lin[1], SONG Jia-jia[1], GU Kai-lin[2], GUO Xing-mei[2], SUN Teng-yue[2], CAI Cheng-ke[1*], WANG Hong-fei[2*] (1. *School of Chinese Meteria Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing*　102488; 2. *Beijing Quantum Hi-tech Pharmaceutical Co.*, *Ltd.*, *Beijing*　102200)

Abstract: Objective　To optimize the preparation of lyophilised orally disintegrating tablets of donepezil hydrochloride. **Methods**　The prescription process of lyophilised orally disintegrating tablets of donepezil hydrochloride was determined by single-factor and central composite design and response surface methodology, with appearance property, disintegration time and water content as the main indexes. **Results**　The optimal prescription for the lyophilized orally disintegrating tablets of donepezil hydrochloride included: prululan polysaccharide 9.5 mg/tablet, mannitol 4.9 mg/tablet, and xanthan gum 0.2 mg/tablet. The prepared orally disintegrating tablets showed full shaped, smooth surface with rapid disintegration, and good stability at room temperature for 3 months. **Conclusion** The optimized lyophilized orally disintegrating tablets preparation of donepezil hydrochloride is simple, stable and feasible, and suitable for large-scale industrial production.

Key words: donepezil hydrochloride; lyophilized orally disintegrating tablet; central composite design and response surface methodology

盐酸多奈哌齐于 1997 年在美国上市，由日本　卫材株式会社研制[1]，并于 1999 年以商品名“安

基金项目：国家科技重大专项研发项目（No.2011ZX09201-201-15）；北京市科技计划专项研发项目（No.Z16010101390）。
作者简介：吴雪纯，女，硕士研究生，主要从事中药新药研发及中药新剂型与新制剂研究，email：969331248@qq.com　*通信作者：蔡程科，男，教授，主要从事中药新剂型与新制剂研究，email：cck98@126.com；王洪飞，男，博士，主要从事药物速释制剂的研发和产业化研究，email：bjwhf@vip.sina.com

理申”进入中国市场[2]，作为唯一被美国食品药品监督管理局和英国药品管理局同时批准上市的阿尔茨海默病（Alzheimer’s disease，AD）治疗药物，具有较高的临床价值[3]。盐酸多奈哌齐属于第二代长效乙酰胆碱酯酶抑制剂，对中枢神经具有高度选择性[4]，具有半衰期长、肝毒性低、不良反应少等优点[5]，在临床治疗中对改善患者的精神状态和提高生活能力有重要价值[6]，常作为轻中度认知障碍患者的首选药物。

我国面临人口老龄化的重要社会趋势，由于老年人群的特殊性，在用药时需选择合适的药物剂型及给药方式[7]。目前盐酸多奈哌齐已上市的剂型均为口服制剂，其中包括片剂、胶囊剂、滴丸剂等[8]。传统的片剂和胶囊剂需用水送服，对患者的自主意识要求较高[9]。此外，药物的外形、口味等也容易引起患者吞咽困难，研究发现约有84%的AD患者存在吞咽障碍，这极大地降低了患者的依从性[10-11]。本研究采用Qsorb®冻干闪释技术将盐酸多奈哌齐制备成具有高孔隙率、崩解迅速、入口即化、口感良好的冻干型口崩片[12]，提高患者服药依从性，为工业化生产提供参考。

1　材料

1.1　试药

盐酸多奈哌齐（批号：5530-20-094M，浙江华海药业股份有限公司）；普鲁兰多糖（批号：1E2312，日本林原株式会社）；甘露醇（批号：2107062，石家庄华旭药业有限责任公司）；黄原胶、海藻糖（批号分别为F201C210201、X14M210601，湖北葛店人福药用辅料有限责任公司）；β-环糊精、麦芽糊精（批号分别为TF53220201、TF70220101，湖南九典制药股份有限公司）；三氯蔗糖、羟丙基甲基纤维素（批号分别为20210301、20210902，江西阿尔法高科药业有限公司）；右旋糖酐（批号：104210801，山东金洋药业有限公司）；海藻酸钠（批号：YP201207-2，青岛海之林生物科技开发有限公司）；壳聚糖（批号：21121804，湖南新绿方药业有限公司）；甘氨酸（批号：202103121，湖北省八峰药化股份有限公司）；山梨醇（批号：F782G，广西南宁化学制药有限公司）；乳糖（批号：200801，安徽山河药用辅料股份有限公司）；乙腈（Fisher公司，色谱级）；纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司）。

1.2　仪器

GLZ-0.4型冷冻真空干燥机（北京速原真空技术有限公司）；AL204型电子天平（上海梅特勒-托利多仪器有限公司）；BME100LX型高剪切混合乳化机（上海威宇机电制造有限公司）；BS2202S型电子天平、14022922型电子移液枪（北京赛多利斯科学仪器有限公司）；MA-1型卡尔费休水分测定仪（上海本昂科学仪器有限公司）。

2　方法与结果

2.1　盐酸多奈哌齐冻干型口崩片的制备方法

① 称量：按处方称量相应辅料于剪切杯中，干混后加入适量水搅拌溶解，随后加入原料药混合均匀，固定盐酸多奈哌齐5 mg/片。② 配液：制备100片的量，加水定容至40 g，用玻璃棒搅拌混匀。③ 剪切：采用高剪切乳化机进行药液剪切（转速2500 r·min^{-1}，时间5 min）使其混合均匀。④ 灌装：采用移液枪将溶液灌装至0.4 mL的铝材模具中，注样称重400 mg/片。⑤ 预冻：将灌装完的铝材模具放置－60 ℃的低温冰箱中预冻30 min。⑥ 冻干过程：将预冻完成的样品转至冻干机中进行冻干，采用电阻法测定药液的共晶点、共融点分别为－36.0 ℃和－32.8 ℃，由此设定冻干曲线如下：进箱温度－40 ℃，升至－25 ℃，维持120 min；－25 ℃升至－5 ℃，维持90 min；－5 ℃升至25 ℃，维持60 min，冻干曲线运行结束。进行压升试验，压升合格，样品出箱。

2.2　盐酸多奈哌齐冻干型口崩片的质量评价标准

冻干型口崩片质量评价的综合评分包括外观性状（包含指标有口崩片的饱满度、光洁度、芯融情况、颜色均匀度、成型情况、黏壁情况）、含水量、崩解时间3个部分，共8个指标，总分40分。每个指标分为5个等级，对应分数0～5分，评分可根据实际情况保留至小数点后一位，分数与口崩片质量成正比。由6名从事该制剂研究的试验人员对盐酸多奈哌齐冻干型口崩片进行评分，具体评分细则如下。

① 饱满度：从泡罩中取出片剂，在光线充足处观察表面饱满度，分为5个等级。片剂中心凸起，片型饱满，得5分；片剂比较平坦，片型较饱满，得4分；片型略有塌陷，中心凹陷，得3分；片型塌陷，片剂中心比边缘低，得2分；片剂表面凹凸不平，得1分。

② 光洁度：从泡罩中取出片剂，在光线充足处观察表面光洁度，分为5个等级。片型表面光滑平整，无裂纹、麻点，得5分；表面略有麻点，得4分；表面有麻点、裂纹，得3分；表面粗糙，得2分；表面粗糙且凹凸不平，得1分。

③ 芯融情况：从泡罩中取出片剂，在光线充足处观察断面芯融情况，分为5个等级。断面孔隙均匀，得5分；断面孔隙不均匀，数量占比整板的0～5%，得4分；断面孔隙不均匀，数量占比整板的5%～20%，得3分；断面孔隙不均匀，

数量占比整板的 20% ～ 40%，得 2 分；断面孔隙不均匀，数量占比整板超过 40%，得 1 分。

④ 颜色均匀度：从泡罩中取出片剂，在光线充足处观察表面颜色，分为 5 个等级。片剂颜色均匀一致，得 5 分；颜色不均，片面一种颜色占总面积 80% ～ 90%，得 4 分；颜色不均，片面一种颜色占总面积的 70% ～ 80%，得 3 分；颜色不均，片面一种颜色占总面积的 60% ～ 70%，得 2 分；颜色不均，片面一种颜色占总面积的 50% ～ 60%，得 1 分。

⑤ 成型情况：从泡罩中取出片剂，在光线充足处观察成型情况，分为 5 个等级。取出片型完整，断面平整，摔后不掉粉，得 5 分；取出片型完整，断面平整，摔后轻微掉粉，得 4 分；取出片型不完整，摔后掉粉，得 3 分；取出片型易碎，摔后裂开有碎渣，得 2 分；取出片型极易碎，摔后碎裂呈棉絮状，得 1 分。

⑥ 黏壁情况：从泡罩中取出片剂，在光线充足处观察铝窝黏壁情况，分为 5 个等级。无黏壁，黏壁面积占铝窝总面积不超过 10%，得 5 分；轻微黏壁，黏壁面积占铝窝总面积的 10% ～ 20%，得 4 分；中度黏壁，黏壁面积占铝窝总面积的 20% ～ 30%，得 3 分；较严重黏壁，黏壁面积占铝窝总面积的 30% ～ 60%，得 2 分；严重黏壁，黏壁面积占铝窝总面积超过 60%，得 1 分。

⑦ 含水量：从泡罩中取出片剂 1 片，充分研磨后快速放入卡尔费休水分测定仪进行含水量测定，记录测定结果，每批平行测定 3 次，分为 5 个等级。水分含量小于等于 5%，得 5 分；水分含量在 5% ～ 7%，得 4 分；水分含量在 7% ～ 9%，得 3 分；水分含量在 9% ～ 10%，得 2 分；水分含量超过 10%，得 1 分。

⑧ 崩解时间：从泡罩中取出片剂 6 片，于等高处置入体积 40 mL，温度（37±2）℃水溶液的培养皿中，直至口崩片完全崩散，记录崩解时间，分为 5 个等级。崩解时间 0 ～ 3 s，得 5 分；崩解时间 3 ～ 5 s，得 4 分；崩解时间 5 ～ 10 s，得 3 分；崩解时间 10 ～ 30 s，得 2 分；崩解时间＞30 s，得 1 分。

2.3　盐酸多奈哌齐冻干型口崩片的基质种类筛选

通过单因素考察盐酸多奈哌齐冻干型口崩片黏合剂和骨架剂的种类，以综合评分为考察指标，筛选出普鲁兰多糖作为黏合剂，甘露醇作为骨架剂，结果如表 1、2 所示。

表 1　黏合剂种类考察

Tab 1　Inspection of adhesive types

种类	外观性状	崩解时间	含水量 /%	综合评分 / 分
普鲁兰多糖	表面光洁、颜色均匀、片型饱满、崩解迅速	0.51 s	7.04	32.5
右旋糖酐	表面有裂纹，取出易碎不成型	0.58 s	8.52	27.2
羟丙基甲基纤维素	表面中心突起呈空壳状	20.12 s	6.23	29.9
明胶	表面较粗糙，颜色略有不均，剪切时易起泡	0.68 s	9.15	31.1
海藻酸钠	片型十分塌陷，中间体黏性极强，无法准确注样	＞ 1 min	9.67	21.5
壳聚糖	表面凹凸不平，取出松软易碎，黏壁严重	1.23 s	3.87	28.1

表 2　骨架剂种类的筛选

Tab 2　Screening of skeletal agent types

种类	外观性状	崩解时间 /s	含水量 /%	综合评分 / 分
甘氨酸	表面中心凸起呈空壳状，略显粗糙	0.54	7.42	32.5
甘露醇	片型饱满，表面光洁，几乎无黏壁	0.66	5.95	34.1
山梨醇	表面略有塌陷，取出黏手，极易吸湿	0.81	5.39	30.9
乳糖	表面中心凸起呈空壳状，略显粗糙	2.45	6.25	32.7
海藻糖	表面中心凸起呈空壳状	1.21	6.01	32.9
麦芽糊精	表面略显粗糙	0.51	7.93	33.0

2.4　星点设计 - 效应面法优化处方工艺

2.4.1　试验设计　根据课题组前期单因素试验确定处方基本基质用量范围，应用 Design Experts 13 软件，采用星点设计 - 效应面法，以综合评分（Y）为考察指标，对黏合剂普鲁兰多糖（A）、骨架剂甘露醇（B）、助悬剂黄原胶（C）的用量进行三因素五水平考察，星点设计因素及水平见表 3，星点设计结果见表 4，方差分析结果见表 5。

2.4.2　模型拟合与显著性分析　应用 Design Experts 13 软件对试验数据进行分析，由方差分析表可知普鲁兰多糖（A）、甘露醇（B）用量对综合评分（Y）影响显著（$P < 0.0001$），且因素影响程度普鲁兰多糖＞甘露醇＞黄原胶。以综合评分（Y）对普鲁兰多糖（A）、甘露醇（B）、黄原胶（C）进行方程拟合，得出二项式方程：$Y = 30.78 + 1.232A + 0.1145B - 10.16C + 0.040\,63AB + 1.175AC + 0.5938BC -$

表 3　星点设计因素及水平

Tab 3　Factor and level of central composite design

因素	水平				
	－1.682	－1	0	1	1.682
A	1.591 04	5	10	15	18.409
B	1.272 83	4	8	12	14.7272
C	0.031 821	0.1	0.2	0.3	0.368 179

$0.073\ 39A^2 - 0.061\ 63B^2 - 17.30C^2$。采用 ANOVA 分析回归参数，得出多元相关系数 $R^2 = 0.9896$，F 值为 106.24（$P < 0.0001$），且模型的失拟项不显著（$P = 0.2598 > 0.05$）。表明该模型效果良好，可用于对实际结果进行预测分析。根据回归方程，分别固定其中一因素为中值，得出因素对综合评分的三维效应面图，如图 1 所示。

表 4　星点设计实验结果

Tab 4　Experimental results of central composite design

编号	编码值			实际值			综合评分 / 分
	普鲁兰多糖 /（mg/ 片）	甘露醇 /（mg/ 片）	黄原胶 /（mg/ 片）	普鲁兰多糖 /（mg/ 片）	甘露醇 /（mg/ 片）	黄原胶 /（mg/ 片）	
1	－1	－1	－1	5	4	0.1	35.1
2	1	－1	－1	15	4	0.1	35.8
3	－1	1	－1	5	12	0.1	30.6
4	1	1	－1	15	12	0.1	34.0
5	－1	－1	1	5	4	0.3	33.4
6	1	－1	1	15	4	0.3	35.9
7	－1	1	1	5	12	0.3	29.3
8	1	1	1	15	12	0.3	35.6
9	－1.681 79	0	0	1.591 04	8	0.2	28.4
10	1.681 79	0	0	18.409	8	0.2	33.9
11	0	－1.681 79	0	10	1.272 83	0.2	35.8
12	0	1.681 79	0	10	14.7272	0.2	31.1
13	0	0	－1.681 79	10	8	0.031 821	35.7
14	0	0	1.681 79	10	8	0.368 179	36.0
15	0	0	0	10	8	0.2	36.6
16	0	0	0	10	8	0.2	36.9
17	0	0	0	10	8	0.2	36.1
18	0	0	0	10	8	0.2	36.9
19	0	0	0	10	8	0.2	36.5
20	0	0	0	10	8	0.2	36.4

表 5　方差分析结果

Tab 5　Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方值	F 值	P 值
模型	128.75	9	14.31	106.24	＜ 0.0001
A	35.92	1	35.92	266.78	＜ 0.0001
B	26.27	1	26.27	195.08	＜ 0.0001
C	0.0463	1	0.0463	0.3441	0.5705
AB	5.28	1	5.28	39.22	＜ 0.0001
AC	2.76	1	2.76	20.51	0.0011
BC	0.4513	1	0.4513	3.35	0.0971
A^2	48.51	1	48.51	360.25	＜ 0.0001
B^2	14.02	1	14.02	104.08	＜ 0.0001
C^2	0.4314	1	0.4314	3.20	0.1038
残差	1.35	10	0.1347		
失拟项	0.8732	5	0.1746	1.84	0.2589
误差	0.4733	5	0.0947		
总离差	130.10	19			

2.4.3　处方的优化与预测　试验发现，通过适当增加黏合剂普鲁兰多糖的用量，片型表面光洁度提高，裂纹逐渐减少，推测是由于黏合剂的黏合作用使得片剂表面更加光滑平整。当黏合剂用量适当时，增加骨架剂的用量，片型的成型性较好，硬度有所提高，推测是由于骨架剂具有支撑作用，维持片剂形成疏松多孔的孔隙结构，使得片剂更加坚固。应用 Design Experts 13 软件，选择综合评分（Y）最大值为最优工艺条件，即为普鲁兰多糖 9.520 mg/ 片，甘露醇 4.897 mg/ 片，黄原胶 0.203 mg/ 片。结合实际试验情况，确定工艺条件为普鲁兰多糖 9.5 mg/ 片，甘露醇 4.9 mg/ 片，黄原胶 0.2 mg/ 片。

2.4.4　工艺验证　根据星点设计选出的最优工艺条件，制备 3 批口崩片进行评分。结果 3 批评分分别为 36.7 分、36.8 分、36.3 分，平均综合评分为 36.6 分，与预测值 36.914 分接近，误差为 0.85%。制备出的盐酸多奈哌齐冻干型口崩片片型饱满、表面光洁、崩解迅速、成型性好、无融片现象，微观结构疏松多孔且排列有序（如图 2 所示），表明处方工艺稳定可行。

2.5　盐酸多奈哌齐冻干型口崩片含量测定方法

2.5.1　色谱条件　色谱柱为 Develosil ODS-HG-5（4.6 mm×150 mm，5 μm）；流动相为 2.5 g•L^{-1} 的 1-

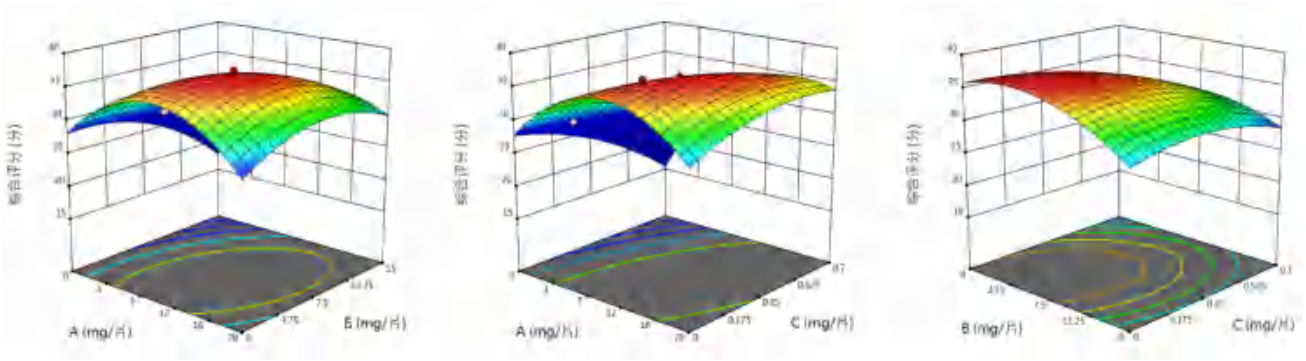


图 1　综合评分的三维效应面图

Fig 1　Three-dimensional effect surface diagram of the composite score

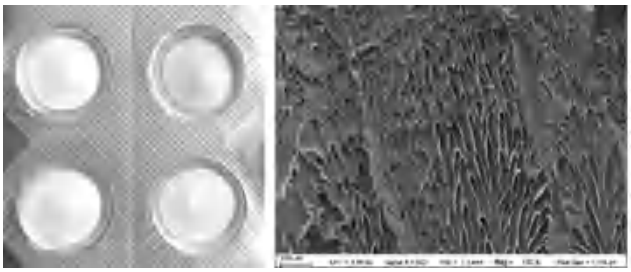


图 2　盐酸多奈哌齐冻干型口崩片的外观及切面 SEM 图（×100）

Fig 2　Appearance and SEM image of lyophilized orally disintegrating tablets of donepezil hydrochloride（×100）

癸烷磺酸钠水溶液 - 乙腈 - 高氯酸（650∶350∶1）；检测波长为 271 nm；进样量为 10 μL；流速为 1 mL • min^{-1}；柱温为 25 ℃。

2.5.2　对照品溶液的配制　精密称取盐酸多奈哌齐对照品 25.68 mg，置于 25 mL 量瓶中，加入适量流动相溶液溶解并稀释定容，作为对照品储备液备用。精密吸取 1 mL 对照品储备液，置于 10 mL 量瓶中，以流动相溶液稀释定容，摇匀即得，作为对照品溶液。

2.5.3　供试品溶液的配制　取盐酸多奈哌齐冻干型口崩片 1 片，置于 50 mL 量瓶中，加入适量流动相溶液超声 30 min 溶解，放冷至室温，加入流动相定容，摇匀即得。

2.5.4　专属性考察　取出盐酸多奈哌齐冻干型口崩片空白片 1 片，置于 50 mL 量瓶中，加入适量流动相溶液超声 30 min 溶解，放冷至室温，加入流动相定容，摇匀即得，作为辅料空白溶液。分别取上述盐酸多奈哌齐对照品溶液、供试品溶液、辅料空白溶液适量，经滤膜过滤后取续滤液进样，进行专属性考察。结果如图 3 所示，处方中辅料对盐酸多奈哌齐含量的测定并无影响。

2.5.5　线性关系考察　精密吸取“2.5.2”项下的对照品储备液，配制质量浓度分别为 2.054、51.35、102.7、154.05、205.4 μg • mL^{-1} 的对照品溶液，以盐酸多奈哌齐的质量浓度（X）对峰面积（Y）进行线性回归，得方程：$Y = 0.293X + 0.0134$，

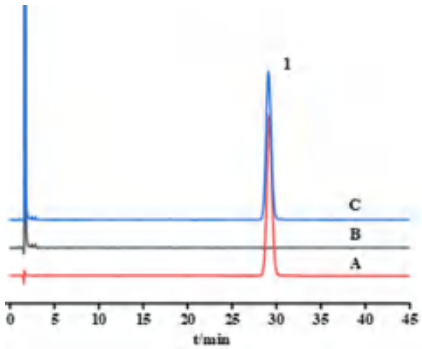


图 3　盐酸多奈哌齐冻干型口崩片的 HPLC 图

Fig 3　HPLC chromatogram of donepezil hydrochloride

A. 对照品溶液（control solution）；B. 辅料空白溶液（excipient blank solution）；C. 供试品溶液（test solution）；1. 盐酸多奈哌齐（donepezil hydrochloride）

$R^2 = 0.9999$，表明盐酸多奈哌齐在 2.054 ～ 205.4 μg • mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好。

2.5.6　精密度、稳定性、重复性考察　精密吸取“2.5.2”项下的对照品溶液，经滤膜过滤后取续滤液连续进样 6 次，考察方法精密度；精密吸取“2.5.3”项下的供试品溶液，经滤膜过滤后取续滤液，分别在制备后 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样，考察溶液稳定性；按照“2.5.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，经滤膜过滤后取续滤液分别进样，考察方法重复性。精密度、稳定性、重复性考察结果显示，峰面积的 *RSD* 及保留时间的 *RSD* 均小于 1%，表明方法学符合要求。

2.5.7　加样回收试验　取盐酸多奈哌齐冻干型口崩片 5 片，置于 50 mL 量瓶中，加入适量流动相溶液超声 30 min 溶解，放冷至室温，加入流动相定容，摇匀即得，作为供试品储备液备用。精密吸取供试品储备液 1 mL，置于 10 mL 量瓶中，分别加入“2.5.2”项下的对照品储备液 0.4、0.5、0.6 mL，并用流动相稀释定容，配制成浓度为 80%、100%、120% 的样品溶液。各浓度平行制备 3 份，结果低、中、高浓度的平均回收率分别为 98.79%、98.98%、

100.21%，*RSD* 分别为 0.16%、0.35%、0.82%。

2.6 盐酸多奈哌齐冻干型口崩片长期稳定性试验

将“2.4.4”项下最优处方工艺验证的 3 批盐酸多奈哌齐冻干型口崩片模拟市售包装，放置在温度（25±2）℃、相对湿度（60±10）% 的条件下，分别于 0、3、6 个月取样（由于试验时间有限，本阶段数据仅收集到前 3 个月），观察口崩片外观性状，并对崩解时限、药物含量进行测定。由表 6 可知，盐酸多奈哌齐冻干型口崩片在 3 个月内稳定。

表 6　长期稳定性试验结果

Tab 6　Long-term stability test results

批次	放置时间 / 月	外观性状	崩解时限	盐酸多奈哌齐含量 /（mg/ 片）
1	0	表面光洁饱满、颜色洁白均一	合格	5.04
	3	表面光洁饱满、颜色洁白均一	合格	5.06
2	0	表面光洁饱满、颜色洁白均一	合格	4.98
	3	表面光洁饱满、颜色洁白均一	合格	5.05
3	0	表面光洁饱满、颜色洁白均一	合格	5.07
	3	表面光洁饱满、颜色洁白均一	合格	4.95

3　讨论

常见的基质种类包括多元醇类、多糖类、氨基酸类、胶类、纤维素类等 [13]。本试验采用单因素对盐酸多奈哌齐冻干型口崩片处方中的基本基质进行考察。最终选用普鲁兰多糖作为黏合剂，甘露醇作为骨架剂，黄原胶作为助悬剂。由于单因素试验无法考察因素间的交互作用，后续试验可对不同基质种类间的交互作用进行深入考察，为其他类冻干型口崩片的基质搭配提供参考。

星点设计 - 效应面法具有试验次数少、精度高、可考察因素间的交互作用等优点 [14]。因此本试验采用星点设计 - 效应面法对盐酸多奈哌齐冻干型口崩片的处方组成进行工艺优化，得出的优化工艺为普鲁兰多糖 9.5 mg/ 片，甘露醇 4.9 mg/ 片，黄原胶 0.2 mg/ 片。经 3 批验证，制备出的口崩片片型饱满、崩解迅速，微观结构孔道均匀、排列有序，表明该处方工艺稳定可行。

运用冷冻干燥法制备出的口崩片同传统工艺直接压片法相比，具有崩解迅速、稳定性好、辅料用量少、口感好等优点 [12]。盐酸多奈哌齐冻干型口崩片可在口中快速崩散，无需用水服用，有效提高服药便携性。将盐酸多奈哌齐冻干型口崩片在长期稳定性试验条件下放置 3 个月，口崩片的外观性状、崩解性能以及药物含量均无明显变化，稳定性较好。由于试验时间有限，本研究目前已完成 3 个月的长期稳定性试验，后期为盐酸多奈哌齐冻干型口崩片有效期提供依据，将继续考察 6 个月的长期稳定性。

参考文献

[1] 童国宝，姬于婷 . 高效液相色谱法同时测定盐酸多奈哌齐原料的十种有关物质 [J]. 解放军医药杂志，2019，31（7）：109-112.

[2] 刘春风，曹勇军 . 阿尔茨海默病的乙酰胆碱酯酶抑制剂治疗 [J]. 老年医学与保健，2005（4）：211-214.

[3] 朱强，邓蓝进，陈永建，等 . 盐酸多奈哌齐口崩片的溶出曲线相似性研究 [J]. 中南药学，2015，13（5）：487-489.

[4] 李默 . 半夏白术天麻汤联合盐酸多奈哌齐对阿尔茨海默病患者 TESS 评分的影响 [J]. 新中医，2020，52（16）：34-37.

[5] 崔丽，刘茜，郑国艳，等 . LC-MS/MS 法同时测定大鼠血浆中多奈哌齐和美金刚的含量 [J]. 沈阳药科大学学报，2017，34（8）：654-659.

[6] 周莹，姜丽杰，侯宇 . 探讨盐酸多奈哌齐治疗老年痴呆的临床疗效 [J]. 中国医药指南，2018，16（3）：29-30.

[7] 初晓阳，高春红，葛成，等 . 以患者为中心的个体化制剂新技术研究进展 [J]. 中国新药杂志，2018，27（4）：409-416.

[8] 黄晶，李爽，樊慧敏，等 . 盐酸多奈哌齐鼻用温敏凝胶在大鼠脑组织内药动学与药效学相关性 [J]. 中南药学，2022，20（1）：104-108.

[9] 冯松浩，金云隆，白明学，等 . 基于星点设计 - 效应面法优化元胡止痛口腔崩解片处方的研究 [J]. 中草药，2018，49（23）：5568-5572.

[10] 李丹，胡艳宁 . 老年吞咽障碍患者风险管理研究进展 [J]. 中国老年学杂志，2021，41（6）：1340-1343.

[11] 何敏超 . 4 种常用阿尔茨海默病评测量表与提高后的服药依从性相关研究 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志，2021，48（1）：40-45.

[12] 李思潼，薛婉莹，李红鑫，等 . 冻干口崩片的质量评价研究 [J]. 中南药学，2022，20（6）：1274-1279.

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

[14] 方哲正，黄味子，戚建平，等 . 星点设计 - 效应面优化法在国内制剂处方优化中的应用进展 [J]. 药学学报，2021，56（1）：169-177.

（收稿日期：2022-11-23；修回日期：2022-12-30）

基于“药辅合一”的甘草次酸 - 蓖麻油亚微乳研究

魏文静[1, 3, 4]，朱梨梨[2]，潘娇娇[1, 3, 4]，郝自强[1, 3, 4]，陈卫东[1*]，杨瑞[5*]，王淑君[2*]（1. 安徽中医药大学药学院，合肥　230012；2. 沈阳药科大学药学院，沈阳　110016；3. 江苏艾迪纳米生物医药有限公司，江苏　南通　226100；4. 南通长三角药物高等研究院，江苏　南通　226133；5. 辽宁中医药大学附属第二医院，沈阳　110034）

摘要：目的　基于“药辅合一”的理念，优化甘草次酸 - 蓖麻油亚微乳的处方及制备工艺，并对其质量进行评价。**方法**　通过单因素实验筛选油相和乳化剂，以浊度和粒径为考察指标，采用响应面法优化甘草次酸 - 蓖麻油乳剂处方，并考察其制备工艺。通过测定粒径、稳定性、pH、体外释放等指标综合评价亚微乳质量。**结果**　优选的处方中，蓖麻油为 10%、聚山梨酯 -80 为 2.5%、三油酸山梨坦为 0.9%，磷酸盐为 0.24%，含药量为（2.94±0.02）mg • mL^{-1}，平均粒径为（197.3±2.5）nm，多分散指数（PDI）为（0.19±0.01），且离心稳定性良好。**结论**　此方法构建“药辅合一”的甘草次酸 - 蓖麻油亚微乳较稳定，有利于进一步开发。

关键词：甘草次酸；“药辅合一”；响应面法；蓖麻油；亚微乳
中图分类号：R944　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0876-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.007

Glycyrrhetinic acid-castor oil submicron emulsion based on combination medicine and adjuvant

WEI Wen-jing[1, 3, 4], ZHU Li-li[2], PAN Jiao-jiao[1, 3, 4], HAO Zi-qiang[1, 3, 4],CHEN Wei-dong[1*],YANG Rui[5*], WANG Shu-jun[2*] (1. *School of Pharmacy*, *Anhui University of Traditional Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *School of Pharmacy*, *Shenyang Pharmaceutical University*, *Shenyang* 110016; 3. *Jiangsu Aidi Nano Biomedical Co.*, *Ltd.*, *Nantong Jiangsu* 226100; 4. *Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute*, *Nantong Jiangsu* 226133; 5. *The Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, *Shenyang* 110034)

Abstract: Objective To optimize the formulation and preparation technology of glycyrrhetinic acid-castor oil submicron emulsion based on the concept of unification of medicine and adjuvant, and to evaluate its stability. **Methods** The oil phase and emulsifier were screened by single factor experiment. The formulation of glycyrrhetinic acid-castor oil emulsion was optimized by response surface method with the turbidity and particle size as indexes. Its particle size, stability and pH were determined. The in vitro drug release behavior was investigated, based on which the quality of the as-prepared submicron emulsion was evaluated comprehensively. **Results** The optimal formulation was composed of 10% castor oil, 2.5% polysorbide-80, 0.9% sorbitan trioleate, and 0.24% phosphate, which showed a concentration of (2.94±0.02) mg•mL^{-1}, mean particle size of (197.3±2.5) nm and PDI of (0.19±0.01), with good stability. **Conclusion** The method of combining a medicine and adjuvant submicron emulsion of glycyrrhetinic acid-castor oil is relatively stable, which is conducive to further development.

Key words: glycyrrhetinic acid; combining medicine and adjuvant; response surface method; castor oil; submicron emulsion

新型冠状病毒感染属中医学“疫病”范畴，表现为寒湿郁肺等[1]。抗疫中“三药三方”[2]极其重

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81973494）。
作者简介：魏文静，女，在读硕士研究生，主要从事中药创新制剂研究，email：wenjingwei2020@163.com　*通信作者：杨瑞，女，研究员，主要从事药剂学及药物动力学研究，email：yang_rui1983@163.com；王淑君，女，教授，博士研究生导师，主要从事药剂学、创新制剂研究，email：1252116911@qq.com

要，其中甘草使用频率最高，发挥着不可或缺的作用。甘草为豆科植物甘草（*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.）、胀果甘草（*Glycyrrhiza inflata* Bat.）或光果甘草（*Glycyrrhiza glabra* L.）的干燥根和根茎，性平，味甘，归心、肺、脾、胃经，用于补脾益气、清热解毒等[3]。研究表明，其中有效成分甘草次酸（glycyrrhetinic acid，GA）有良好的抗肿瘤[4-5]、抗病毒[6]和抗炎[7-8]作用，但由于 GA 高度疏水，水溶性差[9]，全身暴露量不理想，影响其发挥药效。

蓖麻子为大戟科植物蓖麻（*Ricinus communis* L.）的干燥成熟种子，味甘、辛，性平，归大肠、肺经，用于消肿、拔毒等[10]。蓖麻油（castor oil，CO）是从蓖麻子中提取的脂肪油，研究证明蓖麻油中脂溶性抗肿瘤成分蓖麻油酸（12- 羟基 -9- 十八碳烯酸）具有有效的抗炎、抗肿瘤作用[11]。

“药辅合一”即“药之为辅”，指部分中药可通过利用其形、色、气、味等理化特性和助悬、分散、增溶等功能特性来作为辅料以辅助制剂的成型与稳定[12]。本课题前期调研和实验发现，蓖麻油既有一定的药理作用，又能充当 GA 的优良载体，起到“药辅合一”的作用。鉴于此，本研究拟将 GA- 蓖麻油（GA-CO）设计成乳剂，增大 GA 的溶解度的同时还可以缓慢释放，为 GA 在临床上的合理应用提供参考。

1　材料

1.1　仪器

PX85Z 型分析天平（奥豪斯仪器有限公司，d ＝ 0.01 mg）；DF-101Ss 型集热式恒温加热磁力搅拌器（巩义市予华仪器有限责任公司）；FJ200-SH 型数显高速分散均质机（上海标本模型厂）；SCIENCETZ-E 型超声波细胞粉碎机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；TDZ4K 型离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；MALVERN ZS90 型马尔文粒度分析仪（英国马尔文仪器有限公司）；LC-20AT 高效液相色谱仪（日本岛津）。

1.2　试药

GA（陕西富捷药业有限公司，批号：202105012）；蓖麻油、三油酸山梨坦、丙二醇、冰醋酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、十二烷基磺酸钠、无水乙醇（国药集团化学试剂有限公司）；棉籽油（成都西亚化工股份有限公司）；玉米油、大豆油（上海阿拉丁试剂有限公司）；泊洛沙姆 188、聚氧乙烯 40 氢化蓖麻油（中国巴斯夫有限公司）；大豆磷脂（南京威尔药业集团股份有限公司）；聚山梨酯 -80、聚乙二醇单硬脂酸酯（上海麦克林生化科技有限公司）；单双硬脂酸甘油酯（嘉法狮上海贸易有限公司）；甲醇（色谱级，安徽时联特种溶剂股份有限公司）。液相用试剂均为色谱纯，其他化学试剂为分析纯。

2.1　GA-CO 亚微乳处方筛选与工艺考察

2.1.1　油相种类和用量的筛选　采用单因素考察法，称取相同质量的 GA，置于 1 mL 不同油相中，分别在室温、70 ℃条件下磁力搅拌 1 h，观察溶解情况；将载药油相放入 4 ℃下冷藏，观察 GA 是否析出。以室温、70 ℃下的溶解情况作为指标，筛选最优油相，结果见表 1，GA 在蓖麻油中溶解度最高，故选择蓖麻油为油相。甘草次酸溶解在蓖麻油中，油相用量越多，药物载药量就越大。分别采用 5%、10%、15% 油相制备亚微乳，结果见表 2，随着油相用量的增加，离心稳定常数变大，稳定性减弱，同时粒径变大，当油相用量达到 15% 时，制备的亚微乳出现挂壁现象。同时结合最大载药量原则，故优选 10% 的蓖麻油为油相。

表 1　GA 在不同油相中的溶解情况

Tab 1　Dissolution of GA in different oil phases

油相	室温溶解程度	70 ℃溶解程度	4 ℃放置是否析出
大豆油	部分溶解	部分溶解	冷藏后无析出
蓖麻油	部分溶解	完全溶解	冷藏后无析出
棉籽油	部分溶解	部分溶解	冷藏后无析出
玉米油	部分溶解	部分溶解	冷藏后无析出

表 2　油相用量对乳剂的影响

Tab 2　Effect of oil phase dosage on emulsion

油相用量 /%	能否过 0.22 μm 滤膜	离心稳定常数	乳剂外观
5	能	0.13	乳白，白色较浅
10	能	0.19	乳白，白色较深
15	否	0.36	乳白，白色较深，出现挂壁

2.1.2　蓖麻油最适 HLB 值测定　称取不同质量比的聚山梨酯 -80（HLB 值为 15.0）和三油酸山梨坦（HLB 值为 1.8）混合，分别制备成不同 HLB 值的混合乳化剂，取混合乳化剂和蓖麻油制备乳剂，4000 r • min^{-1} 离心 15 min，吸取少量底部样品，以蒸馏水 1∶100 稀释，600 nm 处测定吸光度 *A*。按下式计算混合 HLB 值和浊度：

$HLB_{混} = (HLB_1 \times W_1 + HLB_2 \times W_2) / (W_1 + W_2)$；浊度（%）＝$(100 - 10^{2-A}) \times 100\%$

浊度越高，乳剂稳定性越高。蓖麻油 HLB 值如图 1 所示，当乳化剂 HLB 值在 11 左右时，乳剂浊度最高，稳定性最好。

2.1.3　乳化剂的筛选　采用单因素考察法筛选乳化剂。固定相同质量的乳化剂，将蓖麻油 1 mL 与不同乳化剂混合，加热到 70 ℃观察是否溶解或分层。向纯水中逐滴加入混匀的油相和乳化剂，以粒径大小和在水中的扩散速度为评价指标，筛选最优乳化剂，结果见表 3 和表 4。表 3 显示所有乳化剂在油相中溶

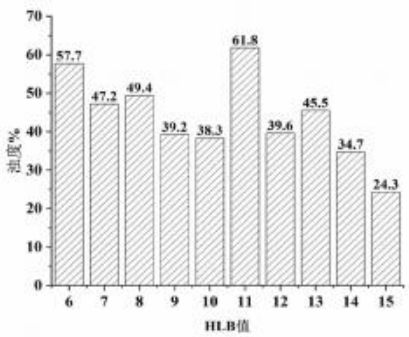


图 1　蓖麻油和不同混合 HLB 值乳化剂对应的浊度

Fig 1　Turbidity corresponding to castor oil and emulsifiers with mixed HLB values

解或无相分离，表 4 显示从粒径和扩散程度优选出聚山梨酯 -80 或聚山梨酯 -80 和三油酸山梨坦复合乳化剂，综合考虑蓖麻油最适 HLB 值为 11，因此选择聚山梨酯 -80 和三油酸山梨坦作为复合乳化剂。

表 3　蓖麻油在不同乳化剂中的溶解情况

Tab 3　Dissolution of castor oil in different emulsifiers

乳化剂	溶解或分层	颜色
聚山梨酯 -80	无相分离	浅黄色
泊洛沙姆 188	溶解	浅黄色
大豆磷脂	溶解	黄色
单双硬脂酸甘油酯	溶解	浅黄色
聚氧乙烯 40 氢化蓖麻油	溶解	浅黄色
聚乙二醇单硬脂酸酯	溶解	浅黄色
三油酸山梨坦	无相分离	浅黄色
丙二醇	溶解	浅黄色
聚山梨酯 -80- 三油酸山梨坦	无相分离	浅黄色
泊洛沙姆 188- 大豆磷脂	溶解	黄色

表 4　蓖麻油和不同乳化剂在水中的扩散情况

Tab 4　Diffusion of castor oil and different emulsifiers in water

乳化剂	粒径	扩散程度	状态
聚山梨酯 -80	小于 1 mm	缓慢均匀扩散	白色液滴
泊洛沙姆 188	小于 1 mm	扩散，沉降	白色液滴
大豆磷脂	大于 1 mm	不扩散	黄色油滴
单双硬脂酸甘油酯	大于 1 mm	不扩散	白色固体状
聚氧乙烯 40 氢化蓖麻油	大于 1 mm	不扩散	黄色油滴
聚乙二醇单硬脂酸酯	大于 1 mm	不扩散	黄色油滴
三油酸山梨坦	大于 1 mm	不扩散	黄色油滴
丙二醇	大于 1 mm	扩散，迅速沉降	白色液滴
聚山梨酯 -80- 三油酸山梨坦	小于 1 mm	缓慢均匀扩散	白色液滴
泊洛沙姆 188- 大豆磷脂	小于 1 mm	扩散，沉降	白色液滴

2.1.4　响应面法优化处方　以乳剂的外观、浊度、粒径为指标筛选处方，利用响应面法进一步优化 GA-CO 亚微乳，因素聚山梨酯 -80 用量（%）为 X_1、三油酸山梨坦用量（%）为 X_2、磷酸盐用量（%）为 X_3，因素水平表见表 5。实验中引入一个综合浊度与粒径的归一值（overall desirability，*OD*），来考察指标的综合效果。$OD = \sqrt{(Y_1 - 0)/(100 - 0) \times (250 - Y_2)/(250 - 150)}$，其中，$Y_1$ 为浊度，最大 100%，最小为 0%，Y_2 为粒径，设计粒径最大 250 nm，最小 150 nm。实验设计和响应值情况见表 6。

表 5　因素和水平

Tab 5　Factor and levels

因素 /%	水平				
	− 1.732	− 1	0	1	1.732
聚山梨酯 -80 用量	1	1.42	2	2.58	3
三油酸山梨坦用量	0	0.42	1	1.58	2
磷酸盐用量	0.2	0.242	0.3	0.358	0.4

表 6　实验设计和响应值

Tab 6　Experimental design and response value

No	X_1/%	X_2/%	X_3/%	Y_1/%	Y_2/nm	*OD*
1	1.42	0.42	0.242	29.9	228.2	0.26
2	2.58	0.42	0.242	46.7	178.6	0.58
3	1.42	1.58	0.242	46.7	218.2	0.39
4	2.58	1.58	0.242	39.1	202.3	0.43
5	1.42	0.42	0.358	12.8	228.5	0.17
6	2.58	0.42	0.358	15.9	204.6	0.27
7	1.42	1.58	0.358	27.6	230.2	0.23
8	2.58	1.58	0.358	48.3	200.5	0.49
9	1.00	1.00	0.300	31.0	218.1	0.31
10	3.00	1.00	0.300	55.3	200.6	0.52
11	2.00	0.00	0.300	35.1	205.3	0.40
12	2.00	2.00	0.300	51.3	218.9	0.40
13	2.00	1.00	0.200	51.2	198.2	0.51
14	2.00	1.00	0.400	16.1	199.9	0.28
15	2.00	1.00	0.300	51.4	208.2	0.46
16	2.00	1.00	0.300	60.0	211.5	0.48
17	2.00	1.00	0.300	55.5	212.8	0.45
18	2.00	1.00	0.300	53.7	205.4	0.49
19	2.00	1.00	0.300	50.7	203.6	0.49
20	2.00	1.00	0.300	52.4	209.2	0.46

模型拟合结果方程如下：$OD = -0.643 + 0.522X_1 - 0.014X_2 + 4.106X_3 - 0.045X_1X_2 + 0.001X_1X_3 + 1.125X_2X_3 - 0.086X_1^2 - 0.101X_2^2 + 10.571X_3^2$（$R^2 = 0.83$，$P < 0.01$），有显著性差异。根据上述所确立二次多项式模型，分别绘制因素 X_1、X_2 和 X_3 响应面图，见图 2。

根据响应面图，优选处方为：聚山梨酯 -80 用量 2.5%，三油酸山梨坦用量 0.9%，磷酸盐用量 0.24%。根据混合 HLB 值的计算方法，优选处方的复合乳化剂 HLB 值为 11.2，这与蓖麻油需乳化剂的 HLB 值基本吻合，该体系下乳剂稳定性良好。

2.1.5　优化处方验证　按照优选处方进行乳剂制备，平行制备 3 组，测定其粒径和浊度，取平均值，结果见表 7，偏差结果表明该模型可靠。

2.1.6　投药量的选择　在 10 mL 乳剂中，考察不同 GA 投药量对乳剂外观和粒径的影响。结果，提高投药量，粒径变化不明显。但投药量增至 3.5

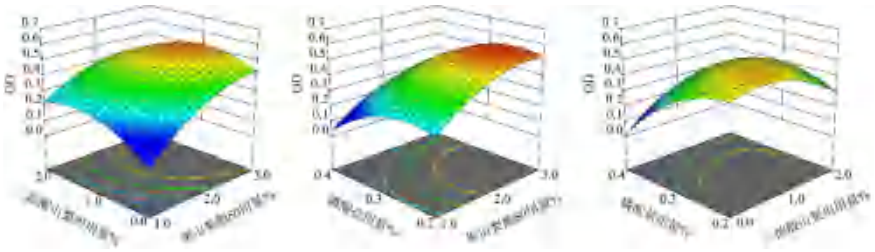


图 2　*OD* 与各因素响应面图

Fig 2　Predicted response surface of *OD* value and different factors

表 7　预测值与实测值比较 (n = 3)

Tab 7　Predicted values with measured values (n = 3)

试验号	预测 *OD*	实测粒径 /nm	实测浊度 /%	实测 *OD* 值	偏差 /%
1	0.553	193.5	49.3	0.550±0.022	0.40
2		188.9	52.8		
3		190.2	51.2		

mg • mL^{-1} 时，放置后有白色固体析出。以最大载药量为原则，选择投药量为 3.0 mg • mL^{-1} GA。投药量筛选结果见表 8。

表 8　投药量筛选结果

Tab 8　Amount of drugs

GA 投药量 /（mg • mL^{-1}）	粒径 /nm	放置外观
1.5	199.4	无白色固体析出
2.0	211.0	无白色固体析出
2.5	207.8	无白色固体析出
3.0	209.3	无白色固体析出
3.5	未测	白色固体析出

2.1.7　工艺考察　分别对加入顺序、乳化时间、乳化温度、超声时间、过膜次数进行考察，以离心外观、稳定性常数为考察指标，结果见表 9。优化制备工艺为 70 ℃乳化 20 min，超声 4 min，过 0.22 μm 滤膜可得。

2.2　GA-CO 亚微乳质量评价

2.2.1　GA-CO 亚微乳外观、粒径和 pH　按照优选处方和工艺制备 GA-CO 乳剂，外观呈白色、未分层、不挂壁，见图 3，表面无油滴，流动性较好，测其 pH 为 6.7。将乳剂稀释 100 倍测定粒径。该乳剂平均粒径为（197.3±2.5）nm，PDI 为（0.19±0.01），见图 4。

2.2.2　稳定性考察　取新制 5 mL GA-CO 亚微乳 4000 r • min^{-1} 离心 15 min，精密量取下层溶液 100 μL 稀释 1000 倍，采用紫外分光光度法，测定其在 500 nm 波长处的吸光度（A），同法测定未离心原乳剂稀释同样倍数后的吸光度（A_0）。按公式计算得离心稳定常数 Ke，$Ke = |A_0 - A| \cdot A_0^{-1}$，考察离心稳定性；将样品于 2 ～ 8 ℃放置 2 d，再在 40 ℃放置 2 d，循环 3 次，考察低温循环稳定性；将样品室温下放置 15 d，测其粒径变化并观察其外观，考察室温放置稳定性；将样品于－20 ～－10 ℃放置 2 d，再置 40 ℃恒温放置 2 d，平行 3 组，考察冻融稳定性。稳定性考察结果见表 10。

表 9　GA-CO 亚微乳工艺考察

Tab 9　GA-CO submicron emulsion technology

考察项目	梯度设置	评价指标		
		离心稳定性常数	粒径 /nm	离心乳剂外观
加入顺序	油→水	0.05	198.3	无分层，无漂油
	水→油	0.08	200.7	无分层，无漂油
乳化时间 /min	10	0.33	未测	分层严重，漂油
	20	0.27	205.4	无分层，无漂油
	30	0.20	195.9	无分层，无漂油
乳化温度 /℃	50	0.41	未测	分层，漂油
	70	0.10	199.6	无分层，无漂油
	100	0.10	200.7	轻微分层，无漂油
超声时间 /min	2	0.27	387.1	轻微分层，无漂油
	4	0.10	202.8	无分层，无漂油
	6	0.10	255.5	无分层，无漂油
过膜次数	1	0.27	219.4	无分层，无漂油
	2	0.12	222.0	无分层，无漂油
	3	0.21	207.9	无分层，无漂油

图 3　GA-CO 亚微乳外观

Fig 3　Appearance of GA-CO submicroemulsion

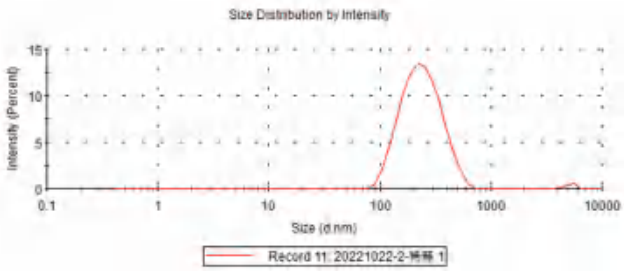


图 4　GA-CO 亚微乳的粒径分布图

Fig 4　Particle size distribution of GA-CO submicron emulsion

2.3　GA 含量的测定

2.3.1　色谱条件　色谱柱：Diamonsil-C_{18} 色谱柱（150 mm×4.6 mm，3.5 μm），流动相：甲醇 - 水 - 冰醋酸（89∶10∶1）；流速：1.0 mL • min^{-1}，检测波长：250 nm，柱温：30 ℃；进样量：20 μL。

表 10　GA-CO 亚微乳稳定性考察 (n = 6)

Tab 10　Stability of GA-CO submicron emulsion technology (n = 6)

考察项目	pH	平均粒径 /nm	外观
离心稳定性	6.5	198.5 → 218.6	未见明显分层
低温循环稳定性	6.8	206.4 → 212.8	未见明显分层
室温放置稳定性	6.5	195.3 → 210.7	未见明显分层
冻融稳定性	6.4	未测	漂油且无法重新分散

2.3.2　样品制备　取 GA 对照品适量，精密称定，加甲醇制成 10.5 μg • mL^{-1}，即得对照品溶液。精密量取 GA 亚微乳 100 μL 置 25 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，滤过即得供试品溶液。取甲醇适量置进样小瓶中，即得空白溶剂对照。空白亚微乳精密量取 100 μL 置 25 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，滤过即得空白制剂溶液。

2.3.3　专属性　取空白溶剂、空白制剂、对照品溶液、供试品溶液，进样测定，样品溶液与对照品溶液的 GA 出峰时间相同，峰形良好，且未见其他峰，结果表明该方法专属性良好，见图 5。

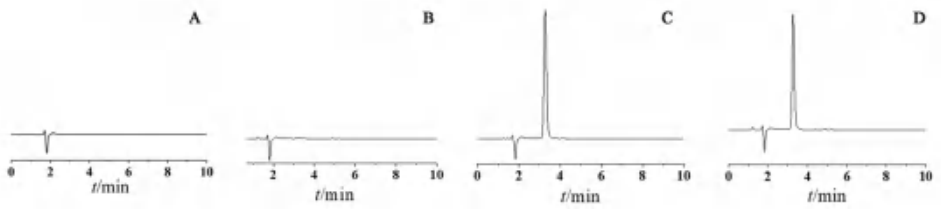


图 5　方法专属性试验

Fig 5　Specificity test

A. 空白溶剂（blank solvent）；B. 空白制剂（blank preparation）；C. GA 对照品（GA reference substance）；D. GA 供试品（GA test substance）

2.3.4　精密度　取 GA 对照品溶液，连续进样 6 针，记录 GA 峰面积，结果 GA 峰面积的 *RSD* 为 0.18%（n = 6），说明仪器精密度良好。

2.3.5　线性关系考察　精密称定 GA 对照品适量，加甲醇制成 105 μg • mL^{-1} 的对照品储备液。分别精密量取该储备液 0.5、0.8、1.0、1.2、1.5 mL，置 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，分别进样测定，记录峰面积，以质量浓度（X）为横坐标，峰面积（Y）为纵坐标，绘制标准曲线，其线性方程为：$Y = 3.38\times10^4X + 6.21\times10^3$，$r$ = 0.9992，结果表明 GA 在 5.25 ～ 15.75 μg • mL^{-1} 与峰面积线性关系良好。

2.3.6　加样回收试验　称取 GA 对照品 8.0、10.0、12.0 mg 置于 10 mL 量瓶中，再加入 100% 处方的空白辅料，用甲醇定容，得到低、中、高 3 组样品，每组平行 3 份，再分别量取 100 μL 置 10 mL 量瓶中，用甲醇定容至刻度，进样分析，计算加样回收率。结果低、中、高 3 组样品平均回收率均在 98% ～ 101%，且 *RSD* 均小于 2%，表明该法准确度良好。

2.3.7　GA-CO 亚微乳含量测定　取 100 μL GA-CO 亚微乳于 25 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，涡旋 5 min 破乳，0.45 μm 滤膜滤过，取续滤液，即用得 GA-CO 亚微乳破乳样品溶液。平行测定 3 次，测得 GA 含量为（2.94±0.02）mg • mL^{-1}。

2.4　体外释药评价

将半透膜固定于 Franz 扩散池上，于供给池加入 GA-CO 亚微乳和含 GA 同等质量浓度的混悬液，平行 3 份，室温下搅拌，释放外液加入 0.5% 的十二烷基硫酸钠和 30% 乙醇，并调至 pH 7.4，37 ℃恒温磁力搅拌，分别于 0.5、1、2、4、6、8、12、24 h 从扩散池内吸取 1 mL 释放介质（同时补加等量释放介质），HPLC 法测定 GA 的含量，计算不同时间点的累积释放率（Q_n）。以时间（t）为横坐标，Q_n 为纵坐标绘制累积释放曲线，结果见图 6，GA 混悬液在 12 h 内为主要释药阶段，随后趋于平稳；GA-CO 亚微乳在 24 h 依然未释放完全，初步预测 GA-CO 亚微乳具有缓释效果。并分别按 Zero-order、Linear、Higuchi 动力学方程进行拟合，初步研究 GA-CO 亚微乳的体外释放规律，结果 Linear 动力学相关系数最高（0.9700），结果见表 11。

表 11　GA-CO 释药动力学模型拟合方程及相关系数

Tab 11　Fitting equation and correlation coefficients for the in vitro release of GA-CO

动力学模型	方程	R^2
Zero-order 方程	$Q_n = 3.1069t + 12.4055$	0.7345
Linear 方程	$\mathrm{Ln}(100 - Q_n) = -0.1230t + 78.8618$	0.9700
Higuchi 方程	$Q = 19.0028t^{1/2} - 9.8497$	0.9054

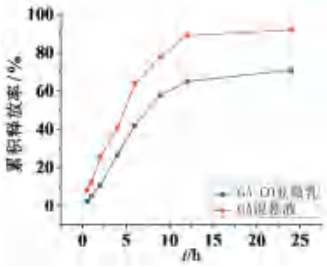


图 6　GA 混悬液和 GA-CO 亚微乳体外释放

Fig 6　In vitro release of free GA and GA-CO submicron emulsion

3　讨论

3.1　处方和工艺

本实验在筛选油相时发现，室温下 GA 在 4 种

油相中溶解度均较小，但是加热至 70 ℃时，GA 在蓖麻油中的溶解度显著增大，冷藏以后无药物析出，采用液相法对 GA 对照品溶液、GA 蓖麻油溶液、GA 蓖麻油冷藏溶液进行测定，发现其峰面积、保留时间几乎一致，但是还需进一步测定其结构来判定 GA 在蓖麻油中是否稳定，另外蓖麻油黏度较高，在溶解的过程中，温度是重要的条件，在加热到合适温度时，蓖麻油黏度降低，流动性增加，为形成稳定乳剂提供支持，故选用蓖麻油为油相。在预实验中采用了 5%、10%、15% 的蓖麻油进行制备，随着蓖麻油用量的增加，亚微乳的粒径越来越大，在 15% 时黏度很大，发生挂壁，不利于亚微乳的长期稳定性，但油相过少时含药量不够，因此在实验中选择 10% 的油相来制备。

在筛选乳化剂时，每种乳化剂都有固定的 HLB 值，一般 8 ～ 18 适合制备 *O*/*W* 型乳剂，3 ～ 8 适合制备 *W*/*O* 型乳剂 [13]。被乳化的油相所需 HLB 值与乳化剂的 HLB 值越接近，乳剂越稳定。聚山梨酯 -80 和三油酸山梨坦为常用的乳化剂，能在油水界面形成复合凝聚膜，增加界面膜的柔韧性，从而提高乳剂的稳定性。另外，实验中发现磷酸盐用量过少会产生絮凝现象，用量过多则会造成破乳，最终影响乳剂的稳定性。

工艺考察项下，两者加入顺序虽然没有对制剂的理化参数产生影响，但是通常选择水相加入到油相中来防止药物损失。另乳化温度对乳剂的稳定性也十分重要，当温度较低时，形成的乳滴粒度大，不利于乳剂的稳定性。

3.2　“药辅合一”的体现和优势

在此基础上，本研究以蓖麻油为油相，基于“药辅合一”理念制备了 GA-CO 亚微乳，并对其处方进行了优化。蓖麻油既可以充当载体，增大 GA 的溶解度，同时文献报道蓖麻油还具有一定的抗肿瘤、抗炎作用。与其他文献相比，安全性方面，GA 亚微乳与微乳 [14] 相比未用毒性较大的助乳化剂，这可能会提高其在临床使用的安全性。将 GA 制备成亚微乳可以提高其溶解度，能达到 2.94 mg • mL^{-1}，与在纯化水中溶解度 0.006 32 mg • mL^{-1} 比较显著提高，且 GA 亚微乳的含药量远大于脂质体 [15-16]。

3.3　结论

综上，本研究通过星点效应面法筛选了最优处方，制备了 GA-CO 亚微乳，不仅增大 GA 的溶解度，还可以缓慢释放，为 GA 在临床上的合理应用提供了参考。有研究表明，制剂粒径越小，比表面积越大，越利于细胞的摄取 [17-19]。因此，后续还需要更深入地开展粒径大小对细胞内吞、胞内运输方式和细胞因子分泌的影响。

参考文献

[1] 姚梦凡，王苏雷，赵杨 . 中医对新型冠状病毒肺炎神经系统表现认识及防治刍识 [J]. 辽宁中医药大学学报，2022，24（12）：175-179.

[2] 李鼎鹏，李建国，谢兴文，等 . 新型冠状病毒肺炎中医病因病机认识及“三药三方”防治进展 [J]. 医学理论与实践，2022，35（20）：3453-3455.

[3] 罗子宸，张雯，杨瑞，等 . 甘草“调和诸药”生物药剂学机制的研究进展 [J]. 中草药，2021，52（1）：267-277.

[4] 高丰，周菲，陈红珊，等 . 甘草次酸抗肿瘤衍生物的设计、合成及其活性评价 [J]. 西北药学杂志，2021，36（5）：789-796.

[5] 王若宁，柳雨影，陈健，等 . 甘草酸、甘草次酸的抗肿瘤机制及其作为药物递送载体的研究进展 [J]. 中草药，2019，50（23）：5876-5886.

[6] 李阳，高欢，朱庆均，等 . 甘草化学成分抗病毒活性研究进展 [J]. 山东中医杂志，2017，36（2）：167-171.

[7] Malik A，Manan A，Mirza MU. Molecular docking and in silico ADMET studies of silibinin and glycyrrhetic acid anti-inflammatory activity [J]. Trop J Pharm Res，2017，16（1）：67-74.

[8] 杨晓辉，刘利军，任彬彬，等 . 甘草次酸 3 位酯类衍生物的合成及其抗炎活性的研究 [J]. 华西药学杂志，2009，24（3）：221-223.

[9] Puglia C，Rizza L，Drechsler M，et al. Nanoemulsions as vehicles for topical administration of glycyrrhetic acid：characterization and in vitro and in vivo evaluation [J]. Drug Deliv，2010，17（3）：123-129.

[10] 杨光义，叶方，王刚，等 . 蓖麻子药效成分分离纯化和药理作用研究概述 [J]. 中国药师，2011，14（4）：552-554.

[11] 薛少安，吕登仕，李宝林，等 . 蓖麻油提取物的抗癌作用研究 [J]. 中国中药杂志，1992，17（9）：560-561.

[12] 张定堃，傅超美，林俊芝，等 . 中药制剂的“药辅合一”及其应用价值 [J]. 中草药，2017，48（10）：1921-1929.

[13] 秦云，涂家生，孙春萌 . 乳化剂乳化性能及其关键质量属性研究进展 [J]. 药学研究，2022，41（4）：236-241.

[14] 肖志偲，赵瑞芝，卢传坚 . 甘草次酸微乳的制备及质量评价 [J]. 中成药，2016，38（1）：187-190.

[15] 孙玉琦，尹美林，王硕，等 . 甘草次酸衍生物介导脂质体的物理稳定性评价 [J]. 中国药学杂志，2018，53（16）：1395-1400.

[16] 张素红，周敬，李阳杰，等 . 甘草次酸脂质体制备及其药剂学性质分析 [J]. 化工设计通讯，2022，48（2）：97-99.

[17] 刘晓琳，谢青昕，李漂，等 . 流感疫苗脂质体的制备方法及粒径对免疫原性的影响 [J]. 昆明医科大学学报，2022，43（5）：7-11.

[18] 李静雯，杜美红，杨寅，等 . 不同粒径的免疫磁珠对食源性致病菌捕获效率的影响 [J]. 食品与生物技术学报，2020，39（9）：46-52.

[19] 岳华，魏炜，岳占国，等 . 纳微球粒径大小对免疫学效应的影响 [A]// 生物颗粒与粉体制备、应用技术研讨会论文集 [C]. 2010.

（收稿日期：2022-11-07；修回日期：2022-12-21）

虫草素的合成及工艺优化

娄绍岩，董慧玲，伊冰清，苏进，孙宇菲，马涛*，赵国栋*，雷海民*（北京中医药大学中药学院，北京 102488）

摘要：目的　开发并优化一条经济、安全、高效的虫草素半合成工艺路线，深入分析反应机制。**方法**　以廉价的腺苷为起始原料，与 2- 乙酰氧基异丁酰溴反应生成溴代中间体 **3**，再经二氢双（2- 甲氧乙氧基）铝酸钠（Red-Al）还原脱卤得虫草素，利用 HRMS、^{1}H-NMR、^{13}C-NMR、HPLC、旋光和熔点进行结构确认及纯度鉴定，分析反应机制及生成的副产物。**结果**　通过两步反应实现了虫草素的合成，其中脱卤反应在常温常压下进行，避免了昂贵金属试剂（Pd/C）和危险源（高压氢气）的使用，极大降低了生产成本，提高了反应安全性。**结论**　本实验报道的两步法是目前虫草素最简洁高效的半合成路线，分离纯化简单，机制明确清晰，具有良好的市场化前景。

关键词：腺苷；虫草素；两步合成；反应机制

中图分类号：R284　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0882-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.008

Synthesis and process optimization of cordycepin

LOU Shao-yan, DONG Hui-ling, YI Bing-qing, SU Jin, SUN Yu-fei, MA Tao*, ZHAO Guo-dong*, LEI Hai-min* (*School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488)

Abstract: Objective　To develop and optimize a economic, safe, and efficient method to semi-synthesize cordycepin, and to define the reaction mechanism. **Methods**　Firstly, cheap adenosine was used to react with 2-acetoxyisobutyryl bromide to furnish the bromide intermediate **3**. Secondly, the bromide was reduced by sodium bis (2-methoxyethoxy) aluminium hydride (Red-Al) to get cordycepin. Finally, the product was determined and confirmed by HRMS, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, HPLC, optical rotation and melting point. The side-product and possible mechanism were also proposed. **Results**　Cordycepin was synthesized in two steps, for which the dehalogenation was conducted under ambient temperature and normal pressure without using expensive metal (Pd/C) and dangerous reagent (high-pressure hydrogen). Therefore, this protocol reduced the cost and improve the safety greatly. **Conclusion**　Two-step semi-synthesis of cordycepin is now the most efficient protocol with sample purification and clear mechanism, which facilitates the industrial production of cordycepin.

Key words: adenosine; cordycepin; two-step synthesis; reaction mechanism

虫草素（cordycepin），即 3'- 脱氧腺苷，化学式为 $C_{10}H_{13}N_5O_3$，是蛹虫草的主要生物活性成分之一 [1-3]，也是第一个从真菌中分离出来的核苷类抗生素 [4]。虫草素具有多种药理活性，如抗菌、抗病毒、抗炎、抗氧化、促凋亡、抗血栓和抗肿瘤等 [4-8]，尤其对多种肿瘤细胞有较强的抑制效

基金项目：“北京市科技新星”人才项目（No.Z211100002121128）。

作者简介：娄绍岩，女，在读硕士研究生，主要从事绿色化学与中药单体制备，email：18730289609@163.com　*通信作者：马涛，男，研究员，硕士研究生导师，主要从事中药先导化合物研究与开发，email：201701033@bucm.edu.cn；赵国栋，男，副教授，硕士研究生导师，主要从事绿色化学与中药单体制备，email：202001036@bucm.edu.cn；雷海民，男，研究员，博士研究生导师，主要从事中药先导化合物研究与开发，email：hm_lei@126.com

果，如肝癌、肺癌、乳腺癌、胃癌、结肠癌细胞等[9-11]。良好的药理活性及广阔的应用前景使虫草素一直处于供不应求的状态，其纯品价格在国际市场一度高达每克 2200 美元[12]。

最初虫草素主要是从蛹虫草中分离提取获得，但面临虫草子实体生长周期长，培养条件苛刻，不易控制[13-15]，虫草素生物转化率低（2 ～ 3 mg • kg^{-1}）[12] 等问题。

目前，人工合成已逐渐取代天然提取成为制备虫草素的重要方法。已报道的人工合成法大致可分为三类：全合成法[16-17]、半合成法[2-3，12，18-20]以及生物合成法[21-23]。其中以腺苷为起始原料的半合成法具有绿色、经济、易纯化等优势，极具产业开发价值。然而已报道的半合成法仍面临路线稍长[12，18-20]，贵重金属试剂参与（如 Pd/C）[12，19-20]，操作不安全（使用高压氢气）[12，19，20]等弊端。

本实验创新性地提出了两步制备虫草素的高效半合成法：以廉价腺苷为起始原料，先与 2- 乙酰氧基异丁酰溴反应生成关键溴代中间体 **3**，再经二氢双（2- 甲氧乙氧基）铝酸钠（Red-Al）还原脱卤制备虫草素。其中脱卤反应在常温常压下进行，避免使用昂贵金属试剂（如 Pd/C）和高压氢气，从而降低了生产成本，消除了安全隐患。针对前期虫草素合成文献缺少机制解析[12，20]，产生的关键中间体及构型机制不清晰的问题，本文在充分调研文献基础上[19，24-25]，提出了详细的机制解析，对中间体、副产物及构型进行了合理解释，使整条路线机制清晰、杂质可控。虫草素结构经 ^{1}H-NMR、^{13}C-NMR、HRMS、IR、熔点和旋光确认无误，经 HPLC 峰面积归一化法鉴定纯度为 99.7%。值得注意的是，该反应过程无需柱层析纯化，重结晶操作有利于反应规模扩大，使工艺路线具有更好的市场化前景。

1　仪器与试药

磁力搅拌器（德国 IKA 公司）；SARRORIUS-BS124S 型电子分析天平（德国赛多利斯股份有限公司）；N-1300D-W 型旋转蒸发仪（东京理化器械株式会社）；X-5 型显微熔点测定仪（北京泰克仪器有限公司）；Bruker Avance 400 型核磁共振仪（瑞士 Bruker 公司）；Agilent Q-TOF 质谱仪（美国安捷伦科技有限公司）；ALPHA FTIR 红外光谱仪（瑞士 Bruker 公司）；安捷伦 1260 高效液相色谱仪（美国安捷伦科技有限公司）；SGW-2 自动旋光仪（美国鲁道夫公司）。

2- 乙酰氧基异丁酰溴（上海麦克林生化科技有限公司）；腺苷、二氢双（2- 甲氧乙氧基）铝酸钠（3.5 mol•L^{-1} 甲苯溶液，Red-Al）、4Å 分子筛（安耐吉化学有限公司）；乙腈、乙酸乙酯、四氢呋喃（分析纯，天津市致远化学试剂有限公司），使用前需经 4Å 分子筛干燥除水；硅胶 GF254 薄层板（青岛海洋化工有限公司）。

2　方法与结果

2.1　第一步反应及机制解析

2.1.1　合成步骤　将腺苷（**2**，5.0 g，18.7 mmol）加入反应瓶中，同时加入乙腈（50 mL）和乙酸乙酯（50 mL）混合，搅拌均匀后缓慢加入 2- 乙酰氧基异丁酰溴（11.0 g，52.4 mmol），室温下继续搅拌反应 2 h，加入饱和 $NaHCO_3$ 水溶液（100 mL）淬灭反应。乙酸乙酯萃取 3 次（100 mL×3），合并有机相，无水硫酸钠干燥、过滤、减压浓缩得淡黄色固体，室温下加入 130 mL 溶剂（乙酸乙酯 - 石油醚＝10：1）溶解，再逐渐冷却至 0 ℃后抽滤，得到白色固体 5.7 g，产率约 61%。熔点为 172 ～ 173 ℃（文献值[19，26]：171 ℃）。$[\alpha]_D^{26}$＝－ 14°（*c* 0.1，dioxane）[文献值[19]：$[\alpha]_D^{23}$ ＝ － 11.5°（*c* 2.5，dioxane）]。^{1}H-NMR（400 MHz，$CDCl_3$），δ：8.34（s，1H），8.26（s，1H），6.24（d，J ＝ 2.4 Hz，1H），5.88（s，2H），5.74 ～ 5.75（m，1H），4.42 ～ 4.45（m，2H），3.95 ～ 3.96（m，2H），2.17（s，3H），1.77（s，3H），1.57（s，3H），1.51（s，3H）。^{13}C-NMR（100 MHz，$CDCl_3$）δ：174.6，169.3，155.5，153.3，149.9，138.8，120.3，119.7，87.7，83.0，79.2，79.0，63.3，49.9，25.6，25.2，25.0，20.8。HRMS（ESI $^{+}$）（*m/z*）calcd.for $C_{18}H_{23}BrN_5O_7$ $[M + H]^{+}$ 500.0775；found 500.0764；IR 3303.8，3151.8，1802.5，1754.0，1672.1，1605.2，1466.4，1424.4，1377.1，1299.6，1211.9，1177.4，1105.0，1049.9，987.5，909.3 cm^{-1}。

2.1.2　机制解析　腺苷与 2- 乙酰氧基异丁酰溴生成溴代中间体 **3** 虽已有报道[20]，但极少有文献阐述其具体反应机制。本文在查阅大量文献基础上[19，24-25]，提出了如图 1 所示的具体反应机制。首先，腺苷中的羟基亲核进攻 2- 乙酰氧基异丁酰溴中的缺电子酯羰基，经分子内电子转移脱去溴化氢生成二噁茂烷过渡态Ⅱ，再在质子酸催化下发生二噁茂烷环水解开环并脱去 2- 羟基 -2- 甲基丙酸生成乙酰氧鎓过渡态Ⅵ，最后被溴负离子亲核取代生成溴代中间体 **3** 和 **4**。其中，在产生过渡态Ⅱ的过程中，由于 2- 乙酰氧基异丁酰溴为

α，α-二取代酰卤，位阻较大，因此，醇羟基优先进攻位阻较小的酯羰基，再经分子内关环去卤化，最终生成五元二噁茂烷结构[24-25]。由于毗邻 C2 位的腺嘌呤位阻效应远大于毗邻 C3 位的亚甲基氧基团，溴负离子优先进攻 C3 位并生成主产物：溴代中间体 **3**，且 3-Br 与 2-OAc 一定为反式构型。溴代中间体 **3** 的核磁谱图见图 2。

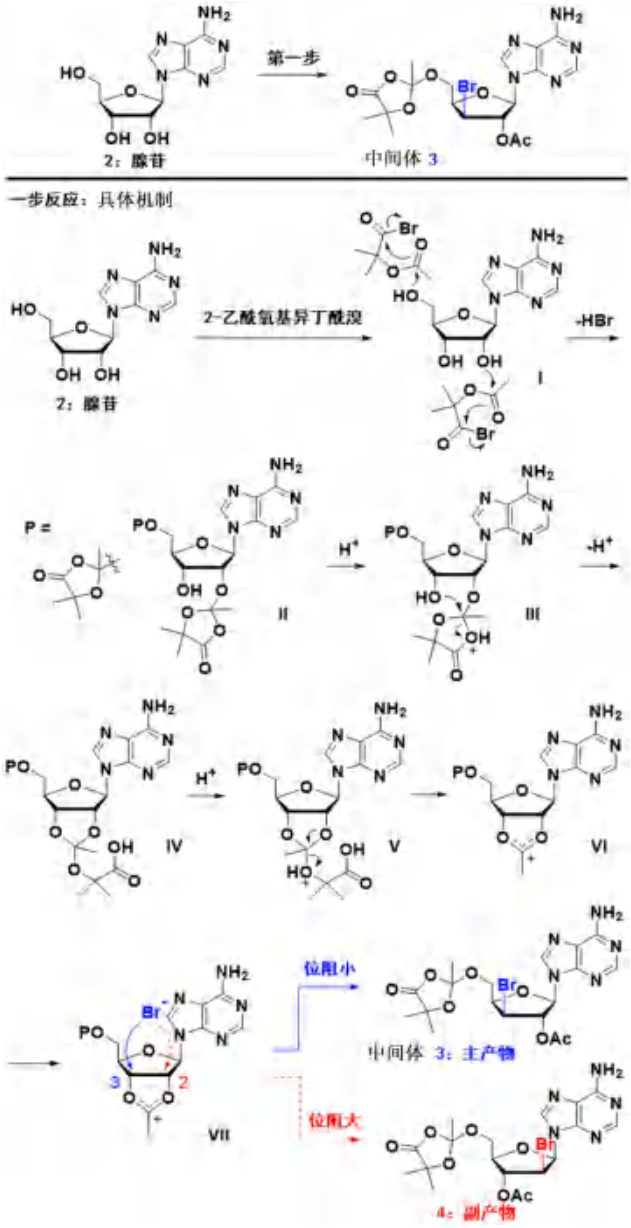


图 1　第一步反应及机制解析图

Fig 1　First synthesis step and its synthetic mechanism

值得注意的是，在 TLC 监测反应过程中，副产物 **4** 的位移值（R_f 值）与主产物 **3** 基本一致，无法通过柱层析去除，只能通过重结晶纯化。

2.2　第二步反应及机制解析

2.2.1　合成步骤　溴代中间体 **3**（5.7 g，11.4 mmol）用四氢呋喃（50 mL）溶解后加入反应瓶，N_2 保护下

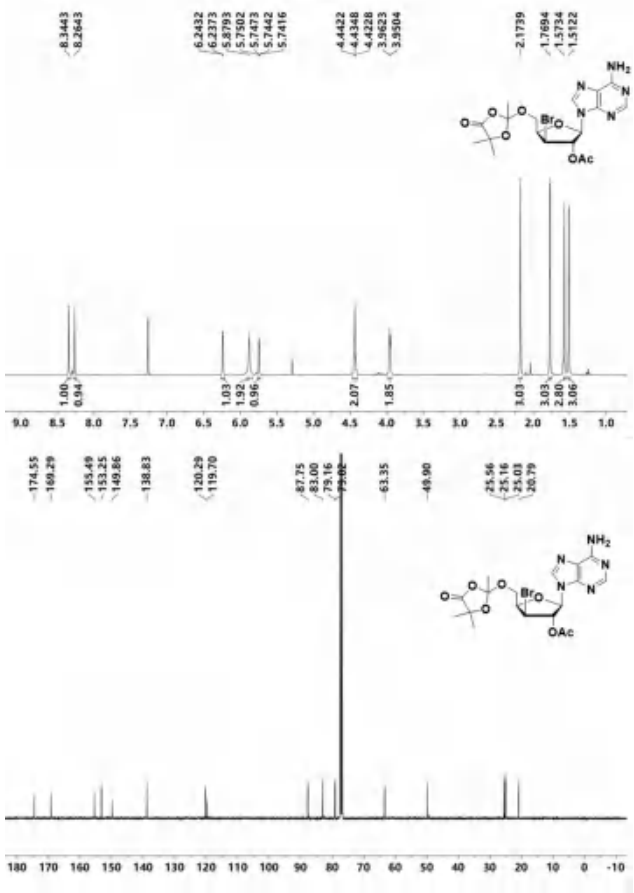


图 2　中间体 **3** 的 NMR 谱图

Fig 2　NMR spectra of intermediate **3**

加入红铝（38 mL，137 mmol），25 ℃搅拌反应 30 min。十水合硫酸钠（15 g）淬灭反应，充分搅拌后过滤、乙酸乙酯洗涤 3 次（100 mL×3）、浓缩，甲醇重结晶 2 次得白色固体 1.63 g，产率 57%。熔点为 230 ～ 231 ℃（文献值[26]：229 ～ 230 ℃）$[\alpha]_D^{26}$ = − 41°（*c* 0.1，H_2O）[文献值[19]：$[\alpha]_D^{23}$ = − 45.8°（*c* 0.6，H_2O）]。HPLC 纯度 99.7%（色谱条件见“2.2.4”项下）。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO）δ：8.36（s，1H），8.15（s，1H），7.29（brs，2H），5.87（d，*J* = 2.4 Hz，1H），5.66（d，*J* = 4.3 Hz，1H），5.16（t，*J* = 5.6 Hz，1H），4.60 ～ 4.56（m，1H），4.38 ～ 4.33（m，1H），3.72 ～ 3.67（ddd，*J* = 12.0，5.2，3.3 Hz，1H），3.52（ddd，*J* = 12.0，6.1，3.9 Hz，1H），2.30 ～ 2.22（m，1H），1.96 ～ 1.89（m，1H）。^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO）δ：156.0，152.3，148.8，139.0，119.0，90.7，80.6，74.5，62.5，34.0。HRMS（ESI$^+$）（*m/z*）calcd.for $C_{10}H_{14}N_5O_3$ $[M + H]^+$ 252.1091；found 252.1082；IR 3130.4，2910.5，2362.6，2131.2，1939.1，1664.6，1604.3，1476.8，1376.7，1306.0，1208.1，1069.5，1045.9，1005.9，957.4，821.3，793.0，725.7 cm^{-1}。

2.2.2　还原剂用量考察及副产物分析　还原剂 Red-Al 用量对虫草素收率影响较大，控制试验显示随 Red-Al 用量增加，虫草素产率先升高后维持恒定，具体结果见表 1。

表 1　还原剂用量对虫草素收率的影响

Tab 1　Effect of reductant dosage on the yield of cordycepin

Red-Al 用量 /eq	收率 /%
4	19
8	34
12	57
16	55

TLC 监测发现 Red-Al 用量少的情况下有极性小于虫草素的副产物生成。取部分重结晶滤液浓缩后经柱层析分离（CH_2Cl_2：MeOH ＝ 5：1）得主要副产物白色固体，经谱图表征和结构确认其为 2'，3'- 脱水腺苷（**5**）。熔点为 176 ～ 177 ℃（文献值[26]：180 ℃）。$[\alpha]_D^{26}$ ＝ －23.5°（*c* 0.1，H_2O）[文献值[19]：$[\alpha]_D^{23}$ ＝ －21.8°（*c* 0.2，H_2O）]。^{1}H-NMR（400 MHz，DMSO）δ：8.33（s，1H），8.16（s，1H），7.30（s，2H），6.20（s，1H），4.45（d，J ＝ 2.6 Hz，1H），4.22（d，J ＝ 2.7 Hz，1H），4.17（t，J ＝ 5.2 Hz，1H），3.59 ～ 3.54（dd，J ＝ 11.6，5.5 Hz，1H），3.52 ～ 3.47（m，1H）。^{13}C-NMR（100 MHz，DMSO）δ：156.5，153.2，149.6，140.1，119.2，82.5，81.6，61.3，59.2，58.2。HRMS（ESI）（*m/z*）calcd.for $C_{10}H_{12}N_5O_3$ $[M + H]^+$ 250.0935；found 250.0925；IR 3205.7，2922.9 1653.6，1602.3，1474.2，1415.9，1376.5，1335.8，1297.6，1219.0，1169.2，1050.0，968.1，906.8，845.4 cm^{-1}。

2.2.3　机制解析　通过文献调研[27]及上述控制实验，我们提出了如图 3 所示的脱卤反应机制。溴代中间体 **3** 中的酯羰基受到 Red-Al 中的氢负离子亲核进攻，经电子转移和二噁茂烷开环获得溴代氧负离子过渡态 X，再经氢负离子亲核进攻 C3 位脱去卤素Ⅺ获得终产物虫草素（**1**）。如反应中 Red-Al 用量过少、浓度过低，极易发生分子内亲核取代Ⅻ，产生环氧副产物 **5**（见图 4）。该机制可以很好地解释实验观测到的现象，同时也证明较高浓度的氢负离子（Red-Al）是反应成功的关键。

2.2.4　终产物虫草素（**1**）谱图表征　对终产物进行表征，色谱条件如下：色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C_{18}（4.6 mm×150 mm，5 μm）；流动相为甲醇 - 水（体积比 4：96）；进样量为 5 μL；流速为 1.0 mL • min^{-1}；检测波长为 260 nm；柱

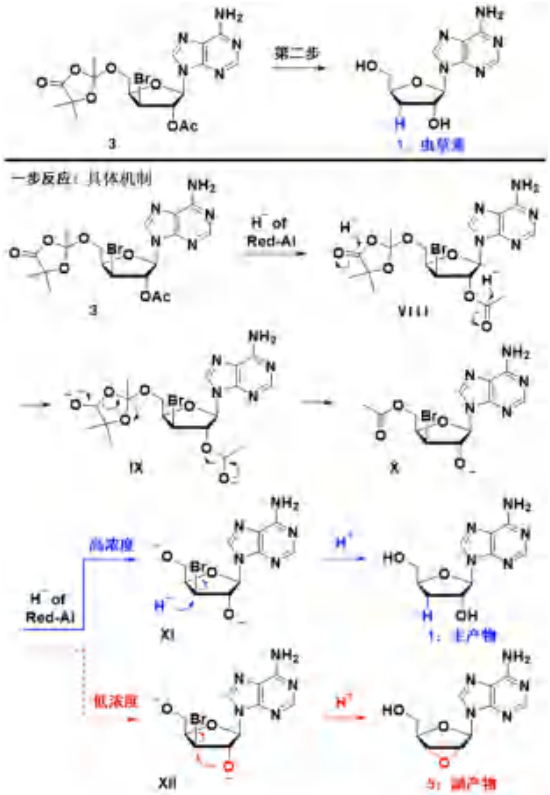


图 3　第二步反应及机制解析图

Fig 3　Second synthesis step and its synthetic mechanism

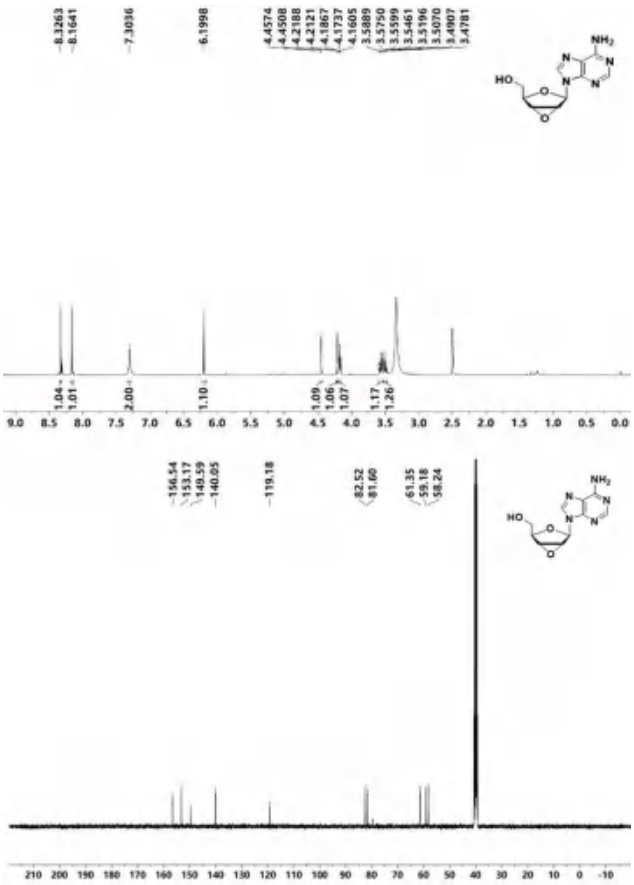


图 4　环氧副产物 **5** 的 NMR 谱图

Fig 4　NMR spectra of epoxide side-product **5**

温为 25 ℃。结果得色谱图和核磁谱图见图 5、6。

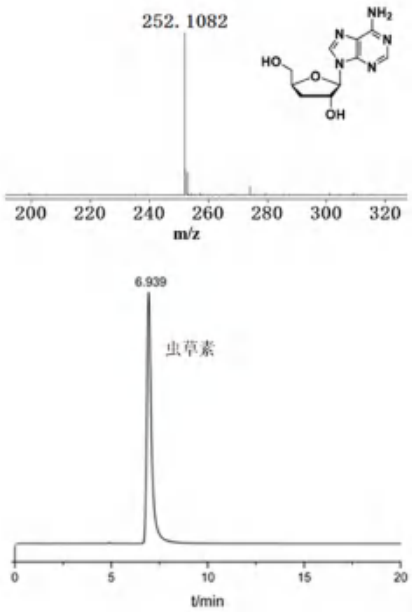


图 5　虫草素的 HPLC 谱图

Fig 5　HPLC spectra of cordycepin

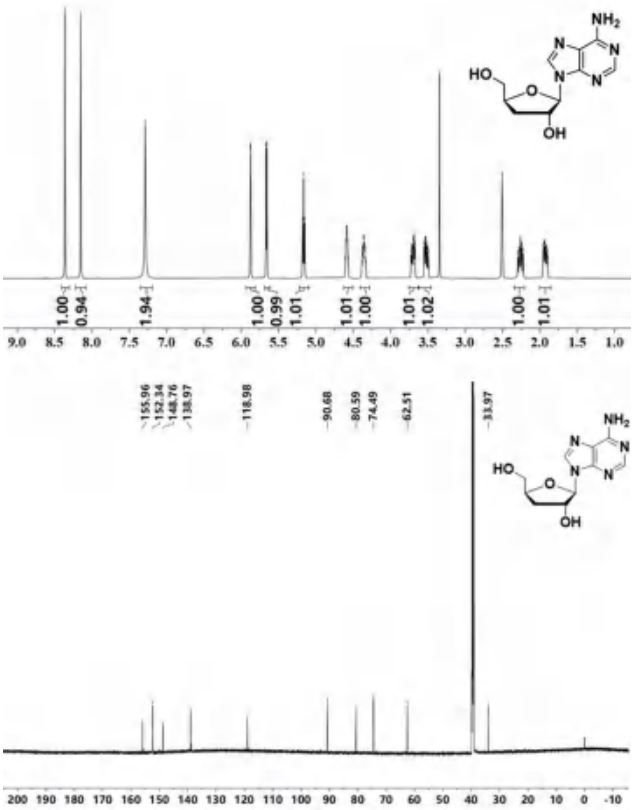


图 6　虫草素的 NMR 谱图

Fig 6　NMR spectra of cordycepin

3　讨论

虫草素具有广泛的药理活性和巨大的开发价值，在国际和国内市场上价格昂贵且供不应求，受到学术界和工业界的普遍关注。本实验以廉价腺苷为起始原料，仅通过两步反应实现了虫草素的高效制备，是目前最简洁的半合成工艺路线。与已有报道不同，本方法在常温常压下通过 Red-Al 实现关键脱卤反应，避免使用昂贵金属 Pd/C 和危险性极高的高压氢气脱卤。此外，本文在大量文献调研基础上，首次提出了详细的机制解析，使读者对反应过程和产物构型更加清晰。对于第一步溴代中间体 **3**，Br 与 OAc 一定是反式取代；对于第二步脱卤反应，高浓度 Red-Al 是反应成功的关键。本实验率先对脱卤反应中的杂质进行了分离和结构确认，并通过机制层面予以合理解析：低浓度 Red-Al 促进反式溴代中间体 **3** 分子内亲核取代反应，环氧杂质 **5** 的确认有助于后续工艺的质量控制。

本实验以腺苷为原料，与 2- 乙酰氧基异丁酰溴反应后，再经 Red-Al 还原即可得到目标产物虫草素，同时优化了第二步反应的 Red-Al 用量、反应温度以及反应时间，当 n（中间体Ⅰ）：n（Red-Al）＝1∶12，温度为 25 ℃，反应时间为 30 min 时，收率达到最佳，两步合成法总收率为 35%，重结晶两次后的终产物经 HPLC 法峰面积归一化法检测纯度为 99.7%，避免了复杂的柱层析纯化，后期预通过该方法实现更大规模虫草素的制备，探究该路线在工业放大中的应用。

参考文献

[1] Xia Y，Luo F，Shang Y，et al. Fungal cordycepin biosynthesis is coupled with the production of the safeguard molecule pentostatin [J]. Cell Chem Biol，2017，24（12）：1479-1489.

[2] Wang L，Yan H，Zeng B，et al. Research progress on cordycepin synthesis and methods for enhancement of cordycepin production in cordyceps militaris [J]. Bioeng，2022，9（2）：69.

[3] Yang L，Li G，Chai Z，et al. Synthesis of cordycepin：current scenario and future perspectives [J]. Fungal Genet Biol，2020，143：103431.

[4] 黄艳萍，杨莹，王宏娟，等 . 虫草素在护肤领域的作用机制及其应用研究 [J]. 中国美容医学，2019，28（1）：168-170.

[5] Khan MA，Tania M. Cordycepin in anticancer research：molecular mechanism of therapeutic effects [J]. Curr Med Chem，2020，27（6）：983-996.

[6] Jin Y，Meng X，Qiu Z，et al. Anti-tumor and anti-metastatic roles of cordycepin，one bioactive compound of Cordyceps militaris [J]. Saudi J Biol Sci，2018，25（5）：991-995.

[7] Chaicharoenaudomrung N，Jaroonwitchawan T，Noisa P. Cordycepin induces apoptotic cell death of human brain

cancer through the modulation of autophagy [J]. Toxicol In Vitro，2018，46：113-121.

[8] Lei J，Wei Y，Song P，et al. Cordycepin inhibits LPS-induced acute lung injury by inhibiting inflammation and oxidative stress [J]. Eur J Pharmacol，2018，818：110-114.

[9] Qing R，Huang Z，Tang Y，et al. Cordycepin negatively modulates lipopolysaccharide-induced cytokine production by up-regulation of heme oxygenase-1 [J]. Int Immunopharmacol，2017，47：20-27.

[10] 张安勇，熊秋萍，刘新平，等 . 虫草素的抗癌作用及其机制研究进展 [J]. 中国药学杂志，2021，56（20）：1664-1670.

[11] Yoon SY，Park SJ，Park YJ. The anticancer properties of cordycepin and their underlying mechanisms [J]. Int J Mol Sci，2018，19（10）：3027.

[12] Huang S，Liu H，Sun Y，et al. An effective and convenient synthesis of cordycepin from adenosine [J]. Chem Pap，2018，72（1）：149-160.

[13] 王长文，王忠，王锦锋，等 . 蛹虫草虫草素研究进展 [J]. 福建农业科技，2019（2）：66-70.

[14] 赵星月，李倩，刘文静，等 . 蛹虫草菌生物合成虫草素的研究进展 [J]. 生物工程学报，2020，36（7）：1293-1304.

[15] 唐成伦，王松涛，赵南，等 . 蛹虫草发酵产虫草素工艺优化 [J]. 食品与发酵工业，2022，48（5）：106-110.

[16] McDonald FE，Gleason MM. Asymmetric synthesis of nucleosides via molybdenum-catalyzed alkynol cycloisomerization coupled with stereoselective glycosylations of deoxyfuranose glycals and 3-amidofuranose glycals [J]. J Am Chem Soc，1996，118（28）：6648-6659.

[17] 李启欢，阳如春，阮志忠，等 . 虫草素的全合成研究 [J]. 有机化学，2013，33（6）：1340-1344.

[18] Meier C，Huynh-Dinh T. Improved conversion of adenosine to 3′-deoxyadenosine [J]. Synlett，1991（4）：227-228.

[19] Russell AF，Greenberg S，Moffatt JG. Reactions of 2-acyloxyisobutyryl halides with nucleosides. II. Reactions of adenosine [J]. J Am Chem Soc，1973，95（12）：4025-4030.

[20] Aman S，Anderson DJ，Connolly TJ，et al. From adenosine to 3′-deoxyadenosine：development and scale up [J]. Org Process Res Dev，2000，4（6）：601-605.

[21] Liu T，Liu Z，Yao X，et al. Identification of cordycepin biosynthesis-related genes through de novo transcriptome assembly and analysis in Cordyceps cicadae [J]. Roy Soc Open Sci，2018，5（12）：181247.

[22] Wongsa B，Raethong N，Chumnanpuen P，et al. Alternative metabolic routes in channeling xylose to cordycepin production of Cordyceps militaris identified by comparative transcriptome analysis [J]. Genomics，2020，112（1）：629-636.

[23] Zhao X，Zhang G，Li C，et al. Cordycepin and pentostatin biosynthesis gene identified through transcriptome and proteomics analysis of Cordyceps kyushuensis Kob [J]. Microbiol Res，2019，218：12-21.

[24] Greenberg S，Moffatt JG. Reactions of 2-acyloxyisobutyryl halides with nucleosides. I. Reactions of model diols and of uridine [J]. J Am Chem Soc，1973，95（12）：4016-4025.

[25] Mattocks AR. 371. Novel reactions of some α-acyloxy acid chlorides [J]. J Chem Soc，1964，DOI:10.1039/jr9640001918.

[26] Fonvielle M，Chemama M，Lecerf M，et al. Decoding the logic of the tRNA regiospecificity of nonribosomal $FemX_{Wv}$ aminoacyl transferase [J]. Angew Chem，2010，122（30）：5241-5245.

[27] Kraus M. Properties of sodium bis（2-methoxyethoxy）aluminium hydride. XIII. Dechlorination of substituted chlorobenzenes [J]. Collect Czech Chem C，1972，37（9）：3052-3053.

（收稿日期：2022-11-02；修回日期：2022-12-20）

白花败酱全草的化学成分研究

万颖[1]，吴娟[1]，邓子怡[1]，汪洋[1]，郁阳[1]，王国凯[1, 2]，刘劲松[1, 2*]（1. 安徽中医药大学药学院，合肥 230012；2. 中药饮片制造新技术安徽省重点实验室，合肥　230012）

摘要：目的　研究白花败酱全草的化学成分。**方法**　采用硅胶、葡聚糖凝胶、反相及制备液相等多种色谱技术进行分离纯化，所获得的单体化合物经核磁共振波谱和质谱数据鉴定。**结果**　从白花败酱药材中分离并鉴定了 14 个化合物，分别为白花败酱酸（**1**）、（*S*）-3- 羟基 -*β*- 紫罗兰酮（**2**）、芦丁（**3**）、5，7，4'- 三甲氧基黄酮（**4**）、3，5，7，4'- 四羟基黄酮（**5**）、3，5，3'- 三甲氧基槲皮素（**6**）、鼠李柠檬素（**7**）、（1*S*，3a*R*，4*S*，9a*R*）-1-ethoxy-4-（4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl）-7-methoxy-1，3，3a，4，9，9a-hexahydronaphtho[2，3-c]-furan-6-ol（**8**）、（＋）-isolariciresinol（**9**）、东莨菪内酯（**10**）、2'，3- 二羟基 -5- 甲氧基联苄（**11**）、对乙氧基苯甲醇（**12**）、反式对香豆酸乙酯（**13**）、2，5- 二羟基苯乙酸乙酯（**14**）。**结论**　本研究从白花败酱药材中分离鉴定了 14 个单体化合物，其中化合物 **1** 为新化合物，除化合物 **3**、**10**、**14** 外，其余化合物均为首次从该种植物中分离得到。

关键词：白花败酱；化学成分；结构鉴定；白花败酱酸
中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0888-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.009

Chemical constituents in the whole herbs of *Patrinia villosa*

WAN Ying[1], WU Juan[1], DENG Zi-yi[1], WANG Yang[1], YU Yang[1], WANG Guo-kai[1, 2], LIU Jin-song[1, 2*] (1. *School of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *Anhui Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces and New Manufacturing Technology*, *Hefei* 230012)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents in the whole herbs of *Patrinia villosa* (*P. villosa*). **Methods** The chemical components of *P. villosa* were separated and purified with various chromatographic techniques: silica gel, Sephadex LH-20, ODS, and preparative HPLC. Their structures were identified by NMR and MS spectroscope. **Results** Totally 14 compounds were identified as patrivicid (**1**), (*S*)-3-hydroxy-*β*-ionone (**2**), rutin (**3**), 5, 7, 4'-trimethoxyflavone (**4**), 3, 5, 7, 4'-tetrahydroxyflavone (**5**), 3, 5, 3'-trimethoxyquercetin (**6**), rhamnocitrin (**7**), (1*S*, 3a*R*, 4*S*, 9a*R*)-1-ethoxy-4-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-7-methoxy-1, 3, 3a, 4, 9, 9a-hexahydronaphtho[2, 3-c]-furan-6-ol (**8**), (＋)-isolariciresinol (**9**), scopoletin (**10**), 2', 3-dihydroxy-5-methoxydibenzyl (**11**), *p*-ethoxybenzyl alcohol (**12**), *trans-p*-coumaric acid ethylester (**13**), and 2, 5-dihydroxyphenylethyl acetate (**14**). **Conclusion** Totally 14 compounds are identified from *P. villosa.* Compound **1** is new. Except for compound **3**, **10**, and **14**, all the other compounds have been isolated from this plant for the first time.

Key words: *Patrinia villosa*; chemical constituent; structural identification; patrivicid

白花败酱草 *Patrinia villosa* Juss. 为败酱科败酱属植物白花败酱的干燥全草，其根茎以及全草均能入药，在我国广泛存在，具有清热解毒、排脓、活血化瘀、镇心安神的功效[1-2]。近年来对

基金项目：安徽中医药大学探索性科研项目（No.2020HXTS09）。
作者简介：万颖，女，硕士研究生，主要从事中药化学研究，email：wying419@163.com　*通信作者：刘劲松，男，教授，主要从事天然药物化学及中药药效物质基础研究，email：jinsongliu@ahtcm.edu.cn

白花败酱草化学成分的研究表明该类药材中主要含有黄酮类、苯丙素类、酚酸类、三萜类、甾醇类、环烯醚萜类及挥发油等化合物[3-5]，但研究并不充分。且其作为败酱草药用来源仅被收载于 1977 年版《中国药典》，药材标准仅含有显微鉴别和理化鉴别，质控手段不足，缺乏明确的质量标准[1，6]。基于此本课题组前期对白花败酱草 95% 乙醇提取物中的石油醚部分进行化学成分研究，发现了部分三萜、黄酮以及酚酸类化合物[7]，为了进一步系统地发掘该药材化学成分类型，本课题组继续对白花败酱草的化学成分进行了研究，并从中分离鉴定了 14 个化合物，分别为：白花败酱酸（**1**）、（*S*）-3- 羟基 -*β*- 紫罗兰酮（**2**）、芦丁（**3**）、5，7，4'- 三甲氧基黄酮（**4**）、3，5，7，4'- 四羟基黄酮（**5**）、3，5，3'- 三甲氧基槲皮素（**6**）、鼠李柠檬素（**7**）、（1*S*，3a*R*，4*S*，9a*R*）-1-ethoxy-4-（4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl）-7-methoxy-1，3，3a，4，9，9a-hexahydronaphtho[2，3-c]-furan-6-ol（**8**）、（＋）-isolariciresinol（**9**）、东莨菪内酯（**10**）、2'，3- 二羟基 -5- 甲氧基联苄（**11**）、对乙氧基苯甲醇（**12**）、反式对香豆酸乙酯（**13**）、2，5- 二羟基苯乙酸乙酯（**14**），其中化合物 **1** 为新的脂肪酸化合物，除化合物 **3**、**10**、**14** 外，其余均为首次从白花败酱草中分离得到。

1　材料

DRX-500 型核磁共振谱仪（Bruker 公司）；Shimadzu UPLC-IT-TOF 质谱仪（Shimadzu 公司）；Buchi 中压制备色谱（RP-C18，15 mm×230 mm 或 26 mm×460 mm）；Waters1525 型高效液相制备色谱仪（Waters 公司）。柱层析用硅胶（200 ～ 300 目）和薄层层析硅胶板（青岛海洋硅胶试剂厂）；反相填充材料（40 ～ 75 μm，Fuji Silysia Chemical Ltd，Japen）RP-18 硅胶；中压色谱分离凝胶材料（MCI，75 ～ 150 μm，日本三菱化学株式会）；Sephadex LH-20 凝胶材料（GE 公司）。

白花败酱药材于 2018 年 10 月采于安徽省六安市金寨县，经安徽中医药大学杨青山老师鉴定为败酱科败酱属植物白花败酱（*Patrinia villosa* Juss.）的干燥全草。鉴定标本（Liu20181001）存于安徽中医药大学中药与天然药物化学教研室。

2　提取与分离

取 36 kg 干燥的白花败酱，研至粗粉，用 95% 乙醇反复渗漉提取，将提取液减压浓缩，浸膏加水混悬，按照顺序用石油醚、乙酸乙酯及正丁醇进行萃取。乙酸乙酯部位（670 g）及石油醚（477 g）均采用硅胶柱色谱石油醚 - 丙酮（100：0 ～ 0：100，*V/V*）系统进行梯度洗脱（未从正丁醇部位分离出化合物），薄层色谱法（TLC）检识，合并，其中石油醚部位共得到 9 个组分（A1 ～ A9），乙酸乙酯部位共得到 9 个组分（B1 ～ B9）。

组分 A9 经 MCI 柱（甲醇 - 水，40：60 ～ 100：1）系统洗脱，得到 8 个亚组分，即 A9-1 ～ A9-8；A9-2 经反复硅胶正相柱洗脱及凝胶柱色谱（氯仿 - 甲醇，1：1），纯化得到化合物 **11**（4 mg）。

组分 B1 经 MCI 柱（甲醇 - 水，40：60 ～ 100：1）系统洗脱，得到 9 个亚组分，即 B1-1 ～ B1-9；B1-2 经 pre-HPLC（制备型高效液相色谱）（乙腈 - 水，37：63 ～ 55：45，27 min）纯化得到化合物 **12**（2 mg）。

组分 B2 经 MCI 柱（甲醇 - 水，40：60 ～ 100：1）系统洗脱，得到 5 个亚组分，即 B2-1 ～ B2-5；B-2-1 经反相 RP-18 中压柱色谱（甲醇 - 水，40：60 ～ 100：0）分离得到 6 个亚组分，即 B2-1-1 ～ B2-1-6；B2-1-1 经 pre-HPLC（乙腈 - 水，15：85 ～ 30：70，17 min）纯化得到化合物 **1**（3 mg）；B2-2 经凝胶柱（甲醇）得到 5 个组分，即 B2-2-1 ～ B2-2-5，B2-2-5 经 pre-HPLC（乙腈 - 水，58：42 ～ 70：30，13 min）纯化得到化合物 **13**（5 mg）。

组分 B3 经 MCI 柱（甲醇 - 水，30：70 ～ 100：1）系统洗脱，得到 6 个亚组分，即 B3-1 ～ B3-6；B3-3 经凝胶柱（甲醇）得到 4 个组分，即 B3-3-1 ～ B3-3-4，B3-3-1 经 pre-HPLC（乙腈 - 水，52：48 ～ 67：33，14 min）纯化得到化合物 **2**（4 mg）。

组分 B6 经 MCI 柱（甲醇 - 水，30：70 ～ 100：1）系统洗脱，得到 8 个亚组分，即 B6-1 ～ B6-8；B6-1 经反相 RP-18 中压柱色谱（甲醇 - 水，20：80 ～ 100：0，*V/V*）分离得到 4 个亚组分，即 B6-1-1 ～ B6-1-4，B6-1-1 经凝胶柱（甲醇）纯化得到化合物 **3**（11 mg），B6-3 经凝胶柱（甲醇）得到 3 个组分，即 B6-3-1 ～ B6-3-3，B6-3-2 经反相 RP-18 中压柱色谱（甲醇 - 水，43：57 ～ 100：0）分离得到 3 个亚组分，即 B6-3-2-1 ～ B6-3-2-3；B6-3-2-2 经 pre-HPLC（乙腈 - 水，43：57 ～ 58：42，14 min）纯化得到化合物 **14**（4 mg），B6-3-3 经 pre-HPLC（乙腈 - 水，38：62 ～ 53：47，11 min）纯化得到化合物 **9**（8 mg）；B6-4 经凝胶柱（甲醇）纯化得到化合物 **5**（8 mg），**6**（13 mg）；B6-7 经凝胶柱（甲醇）得 3 个组分，即 B6-7-1 ～ B6-7-3，B6-7-2

经 pre-HPLC（乙腈 - 水，67：33 ～ 80：20，15 min）纯化得到化合物 **8**（6 mg）；B6-8 经反相 RP-18 中压柱色谱（甲醇 - 水，30：70 ～ 100：0，*V/V*）分离得到 6 个亚组分，即 B6-8-1 ～ B6-8-6；B6-8-2 经 pre-HPLC（乙腈 - 水，40：60 ～ 55：45，30 min）纯化得到化合物 **4**（12 mg）；B6-8-3 经 pre-HPLC（乙腈 - 水，69：31 ～ 84：16，15 min）纯化得到化合物 **7**（25 mg）。

组分 B7 经 MCI 柱（甲醇 - 水，20：80 ～ 100：1）系统洗脱，得到 6 个亚组分，即 B7-1 ～ B7-6；B7-5 析出结晶，经反复重结晶得到化合物 **10**（2 mg）。

3　结构解析

化合物 **1**：淡黄色油状物；分子式为 $C_8H_{12}O_4$；HR-ESI-MS，*m/z* 171.0664 $[M-H]^-$（计算结果为 171.0663，$C_8H_{11}O_4$）；硫酸乙醇显淡灰色，HPLC 在末端吸收（UV ＝ 210 nm）；^{1}H NMR 和 ^{13}C NMR 数据见表 1。由高分辨（-）-HRESIMS 图谱可知其分子式为 $C_8H_{12}O_4$，不饱和度为 3。通过一维核磁图谱数据发现，该化合物包含两个酯（酸）羰基信号 δ_C 171.6 和 δ_C 172.9，一组烯质子氢信号 δ_H 5.84 和 δ_H 6.87，三个亚甲基信号（其中一个含氧亚甲基 δ_H 4.08/δ_C 64.9）以及一个单峰甲基信号（δ_H 2.03/δ_C 20.7）。随后通过二维核磁图谱，尤其是 ^{1}H-^{1}H COSY 谱发现上述一组烯质子氢相关，其中一个与一个亚甲基信号（δ_H 2.28）相关，同时该亚甲基又与 δ_H 1.80 信号的亚甲基相关，而 δ_H 1.80 又与含氧亚甲基信号相关，从而得出该分子中含有 -OCH_2-CH_2-CH_2-CH ＝ CH 的关键片段。此外，再借助 HMBC 谱上关键信号：含氧亚甲基氢信号（δ_H 4.08）和单峰甲基氢信号（δ_H 2.03）与 δ_C 172.9 信号相关、烯质子氢信号（δ_H 5.84 和 δ_H 6.87）与 δ_C 171.6 信号相关，得出一个甲酯基基团和一个羧基基团分别在上述关键片段的两端，确定了化合物 **1** 的平面结构。又因该化合物中双键偶合常数为 15.5 Hz，得出双键构型为反式。从而最终确定该化合物，并命名为白花败酱酸（见图 1）。

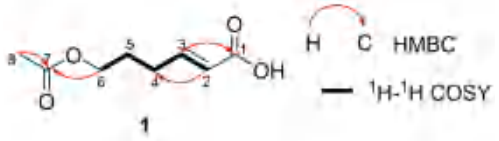


图 1　化合物 **1** 的结构和关键二维相关

Fig 1　Structure of **1** and its key 2D correlation

化合物 **2**：淡黄色油状物；分子式为 $C_{13}H_{20}O_2$；ESI-MS *m/z*：209 $[M + H]^+$；^{1}H-NMR（500 MHz，CD_3OD）δ：6.84（1H，m，H-7），6.15（1H，dd，J ＝ 15.8，1.5 Hz，H-8），3.99（1H，m，H-3），2.33（1H，dd，J ＝ 17.0，5.6 Hz，H-4b），2.00（1H，dd，J ＝ 17.0，8.8 Hz，H-4a），1.94（3H，dd，J ＝ 6.8，1.6 Hz，10-CH_3），1.72（1H，dd，J ＝ 12.2，2.0 Hz，H-2b），1.53（3H，s，13-CH_3），1.47（1H，m，H-2a），1.12（3H，s，H-11），0.95（3H，s，H-12）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：204.4（C-9），149.8（C-7），140.7（C-6），135.4（C-8），130.2（C-5），65.2（C-3），48.6（C-4），41.5（C-2），37.3（C-1），30.3（C-12），29.6（C-11），21.4（C-13），18.6（C-10）。化合物 **2** 的氢谱和碳谱数据与文献 [8] 中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为（*S*）-3- 羟基 -*β*- 紫罗兰酮。

表 1　化合物 1 的 ^{1}H NMR 和 ^{13}C NMR 数据（^{1}H 为 500 MHz，^{13}C NMR 为 125 MHz，均在氘代甲醇中测量）

Tab 1　^{1}H NMR and ^{13}C NMR data for compound 1 (500 MHz for ^{1}H and 125 MHz for ^{13}C NMR，measured in CD_3OD)

碳原子编号	δ_H（*J* in Hz）	δ_C，类型
1		171.6，C
2	5.84（d，15.5）	124.8，CH
3	6.87（dt，15.5，6.9）	148.0，CH
4	2.28（m）	29.6，CH_2
5	1.80（m）	28.3，CH_2
6	4.08（t，6.5）	64.9，CH_2
7		172.9，C
8	2.03（s）	20.7，CH_3

化合物 **3**：黄色粉末；分子式为 $C_{27}H_{30}O_6$；ESI-MS *m/z*：611 $[M + H]^+$；^{1}H-NMR（500 MHz，CD_3OD）δ：7.69（1H，d，J ＝ 1.9 Hz，H-2'），7.65（1H，dd，J ＝ 8.4，1.9 Hz，H-6'），6.88（1H，d，J ＝ 8.4 Hz，H-5'），6.41（1H，d，J ＝ 1.8 Hz，H-8），6.22（1H，d，J ＝ 1.8 Hz，H-6），5.14（1H，d，J ＝ 7.5 Hz，H-1''），4.54（2H，d，J ＝ 11.3 Hz，H-6''），3.82（1H，d，J ＝ 10.6 Hz，H-1'''），3.47 ～ 3.65（4H，m，H-2''，3''，4''，5''），3.33 ～ 3.46（4H，m，H-2'''，3'''，4'''，5'''），1.14（3H，d，J ＝ 6.2 Hz，H-6'''）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：179.5（C-4），166.1（C-7），163.0（C-5），159.4（C-9），158.6（C-2），149.9（C-3'），145.9（C-4'），135.7（C-3），123.6（C-6'），123.3（C-1'），117.6（C-5'），116.1（C-2'），105.7（C-1'''），104.8（C-10），102.5（C-1''），100.0（C-6），94.9（C-8），78.0（C-2'''），77.3（C-3''），75.8（C-5''），74.0（C-2''），72.3（C-4'''），72.1（C-3'''），71.4（C-4''），

69.8（C-6''），68.6（C-5'''），17.9（C-6'''）。化合物 **3** 的氢谱和碳谱数据与文献[9]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为芦丁。

化合物 **4**：淡黄色针状结晶；分子式为 $C_{18}H_{16}O_5$；ESI-MS *m/z*：313 $[M+H]^+$；^{1}H-NMR（500 MHz，$CDCl_3$）δ：7.92（2H，d，J = 8.7 Hz，H-2'，6'），7.51（2H，d，J = 8.6 Hz，H-3'，5'），6.69（1H，d，J = 2.0 Hz，H-8），6.64（1H，s，H-3），6.45（1H，d，J = 2.0 Hz，H-6），3.99（9H，s，5，7，4'-OCH_3）；^{13}C-NMR（125 MHz，$CDCl_3$）δ：177.9（C-4），160.7（C-7），156.7（C-5），156.4（C-9），156.4（C-4'），152.0（C-2），131.3（C-3），130.8（C-1'），126.0（C-2'，C-6'），109.1（C-10），108.4（C-3'，C-5'），92.6（C-6），92.6（C-8），61.6（7-OCH_3），56.5（5-OCH_3），56.3（4'-OCH_3）。化合物 **4** 的氢谱和碳谱数据与文献[10]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为 5，7，4'- 三甲氧基黄酮。

化合物 **5**：淡黄色粉末；分子式为 $C_{15}H_{10}O_6$；ESI-MS *m/z*：287 $[M+H]^+$；^{1}H-NMR（500 MHz，CD_3OD）δ：8.06（2H，d，J = 8.8 Hz，H-2'，6'），6.92（2H，d，J = 8.8 Hz，H-3'，5'），6.39（1H，d，J = 2.0 Hz，H-8），6.17（1H，d，J = 2.0 Hz，H-6）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：177.3（C-4），165.6（C-7），162.5（C-5），160.5（C-9），158.2（C-4'），148.1（C-2），137.1（C-3），130.6（C-2'，6'），123.7（C-1'），116.2（C-3'，5'），104.5（C-10），99.2（C-6），94.4（C-8）。化合物 **5** 的氢谱和碳谱数据与文献[11]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为 3，5，7，4'- 四羟基黄酮。

化合物 **6**：淡黄色针状结晶；分子式为 $C_{18}H_{16}O_7$；ESI-MS *m/z*：345 $[M+H]^+$；^{1}H-NMR（500 MHz，CD_3OD）δ：7.69（1H，d，J = 2.0 Hz，H-2'），7.62（1H，dd，J = 8.5，2.0 Hz，H-6'），6.95（1H，d，J = 8.5 Hz，H-5'），6.50（1H，d，J = 2.0 Hz，H-8）. 6.40（1H，d，J = 2.0 Hz，H-6），3.95（3H，s，3'-OCH_3），3.91（3H，s，5-OCH_3），3.76（3H，s，3-OCH_3）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：176.1（C-4），165.0（C-7），162.5（C-5），160.2（C-9），155.4（C-2），150.6（C-4'），148.9（C-3'），141.5（C-3），123.3（C-6'），123.0（C-1'），116.4（C-5'），112.7（C-2'），108.6（C-10），97.1（C-6），96.1（C-8），60.3（3-OCH_3），56.5（5-OCH_3），56.4（3'-OCH_3）。化合物 **6** 的氢谱和碳谱数据与文献[12]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为 3，5，3'- 三甲氧基槲皮素。

化合物 **7**：淡黄色粉末；分子式为 $C_{16}H_{12}O_6$；ESI-MS *m/z*：301 $[M+H]^+$；^{1}H-NMR（500 MHz，CD_3OD）δ：8.13（2H，d，J = 8.9 Hz，H-2'，6'），6.92（2H，d，J = 8.9 Hz，H-3'，5'），6.62（1H，d，J = 2.0 Hz，H-8），6.32（1H，d，J = 2.0 Hz，H-6），3.89（3H，s，7-OCH_3）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：177.5（C-4），167.0（C-7），162.2（C-9），160.7（C-4'），158.2（C-5），148.5（C-2），137.5（C-3），130.7（C-2'，6'），123.6（C-1'），116.3（C-3'，5'），105.4（C-10），98.6（C-6），92.7（C-8），56.41（7-OCH_3）。化合物 **7** 的氢谱和碳谱数据与文献[13]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为鼠李柠檬素。

化合物 **8**：无色油状物；分子式为 $C_{22}H_{26}O_6$；ESI-MS *m/z*：387 $[M+H]^+$；^{1}H-NMR（500 MHz，CD_3OD）δ：6.76（1H，d，J = 8.0 Hz，H-5'），6.74（1H，d，J = 1.7 Hz，H-2'），6.62（1H，dd，J = 8.0，1.7 Hz，H-6'），6.19（1H，s，H-5），6.21（1H，s，H-2），5.10（1H，d，J = 4.6 Hz，H-9），3.82（3H，s，3'-OCH_3），3.77（3H，s，3-OCH_3），3.59（2H，m，H-9'），3.49（2H，m，H-10），3.45（2H，m，H-7'），2.86（2H，m，H-7），2.45（1H，m，H-8），2.05（1H，m，H-8'），1.19（3H，t，J = 7.0 Hz，11-CH_3）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：149.2（C-4'），147.6（C-3'），146.3（C-4），145.5（C-3），137.9（C-1'），133.8（C-6），129.0（C-1），116.9（C-6'），116.2（C-5），113.2（C-5'），112.7（C-2），105.4（C-2'），73.2（C-10），64.1（C-9'），56.3（3'-OCH_3），56.0（3-OCH_3），51.8（C-9），48.8（C-8'），47.7（C-7'），47.2（C-8），29.9（C-7），15.5（C-11）。化合物 **8** 的氢谱和碳谱数据与文献[14]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为（1*S*，3a*R*，4*S*，9a*R*）-1-ethoxy-4-（4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl）-7-methoxy-1，3，3a，4，9，9a-hexahydronaphtho[2，3-c]furan-6-ol。

化合物 **9**：淡黄色油状物；分子式为 $C_{20}H_{24}O_6$；ESI-MS *m/z*：361 $[M+H]^+$；$[\alpha]_D^{20}$ = 101.1（*c* 1.0，CH_3OH）；^{1}H-NMR（500 MHz，CD_3OD）δ：6.74（1H，d，J = 1.8 Hz，H-2'），6.67（1H，d，J = 8.0 Hz，H-5'），6.65（1H，s，H-2），6.60（1H，dd，J = 8.0，1.8 Hz，H-6'），6.18（1H，s，H-5），3.80（3H，s，3-OCH_3），3.77（3H，s，3'-OCH_3），3.67（1H，d，J = 4.9 Hz，H-7'），3.62（2H，dd，J = 11.8，5.4 Hz，H-9），3.40（2H，dd，J = 11.2，3.9

Hz，H-9'），2.77（2H，d，J ＝ 7.7 Hz，H-7），2.0（1H，m，H-8'），1.76（1H，m，H-8）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：149.0（C-4'），147.2（C-3'），145.9（C-4），145.2（C-3），138.6（C-1'），134.2（C-6），128.9（C-1），123.2（C-6'），117.3（C-5'），116.0（C-5），113.8（C-2'），112.3（C-2），65.9（C-9），62.2（C-9'），56.4（3'-OCH_3），56.4（3-OCH_3），48.1（C-8'），48.0（C-7'），40.0（C-8），33.6（C-7）。化合物 **9** 的氢谱和碳谱数据与文献[15]中的波谱数据基本一致且旋光值为正，故鉴定该化合物为（＋）-isolariciresinol。

化合物 **10**：淡黄色针状结晶；分子式为 $C_{10}H_8O_4$；ESI-MS *m/z*：193 [M ＋ H]$^+$；^{1}H-NMR（500 MHz，CD_3OD）δ：7.86（1H，d，J ＝ 9.4 Hz，H-4），7.11（1H，s，H-5），6.77（1H，s，H-8），6.19（1H，d，J ＝ 9.4 Hz，H-3），3.90（3H，s，6-OCH_3）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：164.0（C-2），153.0（C-6），151.4（C-7），151.4（C-9），146.1（C-4），112.5（C-3），109.9（C-10），109.9（C-5），103.9（C-8），56.7（6-OCH_3）。化合物 **10** 的氢谱和碳谱数据与文献[16]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为东莨菪内酯。

化合物 **11**：淡黄色粉末状物质；分子式为 $C_{15}H_{16}O_3$；ESI-MS *m/z*：245 [M ＋ H]$^+$；^{1}H-NMR（500 MHz，CD_3OD）δ：6.99（2H，m，H-6'，H-4'），6.76（1H，m，H-3'），6.71（1H，m，H-5'），6.28（1H，d，J ＝ 1.7 Hz，H-2），6.19（1H，d，J ＝ 2.0 Hz，H-6），6.18（1H，d，J ＝ 2.3 Hz，H-4），3.70（3H，s，5-OCH_3），2.83（2H，m，H-a），2.75（2H，m，H-a'）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：162.2（C-5），159.1（C-3），156.3（C-2'），146.2（C-1），131.2（C-6'），129.4（C-1'），127.9（C-4'），120.4（C-5'），115.8（C-3'），109.1（C-2），106.4（C-6），99.8（C-4），55.5（5-OCH_3），37.5（C-a），33.6（C-a'）。化合物 **11** 的氢谱和碳谱数据与文献[17]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为 2'，3-二羟基 -5- 甲氧基联苄。

化合物 **12**：白色针状结晶；分子式为 $C_9H_{12}O_2$；ESI-MS *m/z*：153 [M ＋ H]$^+$；^{1}H-NMR（500 MHz，CD_3OD）δ：7.15（2H，d，J ＝ 8.4 Hz，H-2，6），6.75（2H，d，J ＝ 8.4 Hz，H-3，5），4.38（2H，s，H-7），3.51（2H，q，J ＝ 7.0 Hz，-OCH_2-），1.18（3H，t，J ＝ 7.0 Hz，-CH_3）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：158.3（C-4），130.7（C-2，6），130.4（C-1），116.1（C-3，5），73.6（C-7），66.3（-OCH_2-），15.4（-CH_3）。化合物 **12** 的氢谱和碳谱数据与文献[18]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为对乙氧基苯甲醇。

化合物 **13**：白色针状结晶；分子式为 $C_{11}H_{12}O_3$；ESI-MS *m/z*：193 [M ＋ H]$^+$；^{1}H-NMR（500 MHz，CD_3OD）δ：7.60（1H，d，J ＝ 16.0 Hz，H-2），7.44（2H，d，J ＝ 8.6 Hz，H-2'，6'），6.79（2H，d，J ＝ 8.6 Hz，H-3'，5'），6.31（1H，d，J ＝ 16.0 Hz，H-3），4.21（2H，q，J ＝ 7.1 Hz，-OCH_2-），1.30（3H，t，J ＝ 7.1 Hz，-CH_3）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：169.3（C-1），161.3（C-4'），146.4（C-3），130.1（C-2'，6'），127.1（C-1'），116.8（C-2），115.3（C-3'，5'），60.4（-OCH_2-），14.6（-CH_3）。化合物 **13** 的氢谱和碳谱数据与文献[19]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为反式对香豆酸乙酯。

化合物 **14**：无色无定形结晶；分子式为 $C_{10}H_{12}O_3$；ESI-MS *m/z*：181 [M ＋ H]$^+$；^{1}H-NMR（500 MHz，CD_3OD）δ：6.69（1H，d，J ＝ 8.5 Hz，H-3），6.67（1H，d，J ＝ 2.4 Hz，H-6），6.56（1H，dd，J ＝ 8.5，2.4 Hz，H-4），4.09（2H，q，J ＝ 7.1 Hz，-OCH_2-），3.43（2H，d，J ＝ 7.1 Hz，H-7），1.22（3H，t，J ＝ 7.1 Hz，10-CH_3）；^{13}C-NMR（125 MHz，CD_3OD）δ：174.2（C-8），146.3（C-5），145.4（C-2），127.0（C-1），121.6（C-6），117.3（C-3），116.3（C-4），61.8（-OCH_2-），41.5（C-7），14.5（10-CH_3）。化合物 **14** 的氢谱和碳谱数据与文献[20]中的波谱数据基本一致，故鉴定该化合物为 2，5- 二羟基苯乙酸乙酯。

4　讨论

本研究在课题组前期研究的基础上，进一步发掘了白花败酱草中化学成分，化合物类型涵盖脂肪酸（**1**）、倍半萜（**2**）、黄酮（**3** ～ **7**）、木脂素（**8** ～ **9**）、香豆素（**10**）以及酚酸类（**11** ～ **14**），其中化合物 **1** 为新发现的脂肪酸类化合物，在天然产物中亦比较少见。

本文虽未对所发现的化合物进行生物活性筛选，但已有文献报道部分化合物具有丰富的生物活性，如化合物 **2** 通过体外抑制脂多糖（LPS）诱导 RAW 264.7 巨噬细胞释放一氧化氮（NO）发挥抗炎作用[21]；化合物 **3** 能预防神经炎症、治疗糖尿病、高胆固醇血症，还可以作用于心血管系统从而治疗高血压、改善血液凝固；同时，还具有利尿、平喘、镇痛、抗肿瘤等广泛的药理作用[22]。化合物 **4** 对食管癌细胞具有较好的抑制效

果[23]；化合物 **5** 通过体外抑制黄嘌呤氧化酶活性发挥抗痛风作用[24]；化合物 **7** 具有抗炎作用[25]和抗肿瘤作用[26]；化合物 **9** 具有抗氧化活性[27]；化合物 **10** 具有抗肿瘤、抗炎、降血糖、降血压、抗神经退行性疾病等多种药理活性[28]；化合物 **14** 对人类免疫缺陷病毒（HIV）有抑制活性[29]。由此可见，所获得的单体化合物生物活性多样，具有抗炎、活血以及抗肿瘤活性的化合物极有可能是白花败酱草发挥清热解毒和活血化瘀的药效物质基础。

上述研究结果所发现的结构类型虽已包含在前期白花败酱草化学结构类型中[1]，但本研究中的化合物，除化合物 **3**、**10**、**14** 外均为首次从该种分离鉴定，进一步丰富了白花败酱草的化学成分种类；目前相关文献对白花败酱草质量控制研究主要集中在黄酮、苯丙素以及三萜（皂苷）成分类型中，而本研究从该种首次发现了 4 种黄酮类（化合物 **4** ～ **7**），可能为其质量标准的制订提供科学依据。

参考文献

[1] 范宇，沙冬梅，沙马里牛，等 . 白花败酱草的化学成分、药理活性及质量控制研究进展 [J]. 中国中药杂志，2022，47（22）：6005-6019.

[2] 朴成玉，吴修红，安柏松，等 . 白花败酱草研究进展 [J]. 中国民族民间医药，2010，19（3）：21.

[3] 阎新佳，郑威，温静，等 . 白花败酱草的化学成分研究 [J]. 中草药，2017，48（2）：247-251.

[4] 包永睿，阎新佳，杨欣欣，等 . 金白花败酱草的化学成分研究 [J]. 中药材，2017，40（2）：347-349.

[5] 王嘉琪，刘洋，杨永芬，等 . 白花败酱草抗氧化成分研究 [J]. 中草药，2019，50（21）：5206-5211.

[6] 郭富礼 . 败酱草的混乱状况剖析 [J]. 中国药事，2002，16（11）：668-669.

[7] 吴娟，王国凯，邬家成，等 . 白花败酱石油醚部位化学成分研究 [J]. 安徽中医药大学学报，2019，38（6）：76-78.

[8] 何江波，牛艳芬，李金仙，等 . 骆驼蹄瓣中萜类成分研究 [J]. 中国中药杂志，2015，40（23）：4634-4638.

[9] 张颖，李嘉，何飞，等 . 滇白珠止泻活性部位的化学成分研究 [J]. 中南药学，2020，18（11）：1800-1802.

[10] Sutthanut K，Sripanidkulchai B，Yenjai C，et al. Simultaneous identification and quantitation of 11 flavonoid constituents in *Kaempferia parviflora* by gas chromatography [J]. J Chromatogr A，2007，1143（1-2）：227-233.

[11] 蔡爱华，朴惠顺 . 关龙胆根的化学成分研究 [J]. 延边大学医学学报，2018，41（4）：258-261.

[12] Lin S，Chen T，Liu XH，et al. Iridoids and ligans from *valeriana jatamansi* [J]. J Nat Prod，2010，73（4）：632-638.

[13] 曹家庆，孙淑伟，陈欢 . 滇桂艾纳香黄酮类化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志，2008，33（7）：782-784.

[14] Richard C，Cambie，George R，et al. Chemistry of the podocarpaceae：LXIX. Further lignans from the Wood of *Dacrydium intermedium* [J]. J Nat Prod，1984，38（1）：1631-1645.

[15] Jutiviboonsuk A，Zhang HG，Ghee TT，et al. Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis* [J]. Phytochemistry，2005，66（23）：2745-2751.

[16] 郎天琼，罗国勇，王剑，等 . 苗药乌桕酚性成分研究 [J]. 亚太传统医药，2019，15（3）：71-72.

[17] 李来明，李国强，吴霞，等 . 黄药子芪类化学成分的研究 [J]. 中草药，2014，45（3）：328-332.

[18] 段洁，李巍，胡旭佳，等 . 九子参化学成分研究 [J]. 中国中草药杂志，2009，40（4）：528-530.

[19] 王刚，刘劲松，李红艳，等 . 檻木化学成分研究 [J]. 天然产物研究与开发，2011，23（2）：267-269.

[20] Dai JR，Kardono LB，Tsauri S，et al. Phenylacetic acid derivatives and a thioamide glycoside from Entada phaseol-oides [J]. Phytochemistry，1991，30（11）：3749-3752.

[21] 陈宜敏，许天启，范春林，等 . 胭脂树醇提物中乙酸乙酯部位的化学成分 [J]. 暨南大学学报（自然科学与医学版），2022，43（1）：73-81.

[22] 李珂，冯亚莉，曹瑞梅，等 . 芦丁的结构修饰及生物活性研究进展 [J]. 中草药，2021，52（20）：6413-6424.

[23] 董子钢，刘慧，牛沛佳 . 5，7，4'- 三甲氧基黄酮在制备预防和治疗抗肿瘤药物中的应用：CN11422- 4880A [P]. 2022-03-25.

[24] 孙杰，王聚乐，范东艳，等 . 藏药陆额化学成分的分离鉴定及其对黄嘌呤氧化酶活性的影响 [J]. 西藏医药，2018，39（5）：18-21.

[25] 古秋莉，黄聪琳，张丽，等 . 镰形棘豆中鼠李柠檬素抗炎作用研究 [J]. 中国中医药信息杂志，2014，21（12）：48-50.

[26] 甄汉深，周燕园，袁叶飞，等 . 青天葵中黄酮类化合物的体外抗肿瘤实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2008，14（3）：36-38.

[27] Huang SW，Qiao JW，Sun X，et al. Secoiridoids and lignansfrom the leaves of *Diospyros kaki* Thunb. with antioxidant andneuroprotective activities [J]. J Funct Foods，2016，24：183-195.

[28] 褚子璇，卢敏，熊山 . 东莨菪内酯的药理活性及药代动力学研究进展 [J]. 化学研究，2019，30（4）：434-440.

[29] 张勇 . 榼藤子种仁的化学成分研究 [D]. 北京：中国协和医科大学，2008.

（收稿日期：2022-12-05；修回日期：2023-01-06）

基于 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术的赤芍化学成分分析及其抗银屑病活性研究

金重先[1]，于佳禾[1]，刘金凤[1]，魏梅[2]，陈向东[2]，石晋丽[1*]，王春国[3*]（1. 北京中医药大学 中药学院，北京　102488；2. 广东一方制药有限公司，广东　佛山　528000；3. 北京中医药大学 中医药研究院，北京　102488）

摘要：目的　采用超高效液相色谱 - 四极杆 - 静电场轨道阱高分辨质谱法（UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS）分析赤芍中的化学成分并探讨其抗银屑病活性。**方法**　色谱条件：色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 液相色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm），以 0.1% 甲酸水（A）-0.1% 甲酸乙腈（B）为流动相进行梯度洗脱，质谱条件为热喷雾离子源（HESI），在负离子模式下对色谱流出物进行检测，检测范围 *m/z* 100 ～ 1200。利用肿瘤坏死因子（TNF）-*α* 诱导人永生化角质形成细胞（HaCaT 细胞）过度增殖建立银屑病细胞模型，采用 ELISA 法检测各组细胞培养上清液中白介素 -2（IL-2）、白介素 -6（IL-6）、*γ* 干扰素（IFN-*γ*）的水平，探讨赤芍乙醇提取物、赤芍总苷中的单体成分芍药苷和芍药内酯苷的抗银屑病活性。**结果**　共鉴定出 61 个化合物，其中单萜及其苷类 24 个，黄酮及其苷类 13 个，酚酸类 14 个，鞣质类 10 个。细胞实验中，与空白组相比，模型组 IL-2、IL-6、IFN-*γ* 水平显著升高（$P < 0.01$）；与模型组相比，赤芍乙醇提取物、芍药苷和芍药内酯苷组 IL-2、IL-6、IFN-*γ* 水平显著降低（$P < 0.01$）。**结论**　UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术能够简便、快速、准确地鉴别赤芍药材的化学成分，且赤芍乙醇提取物、芍药苷和芍药内酯苷可能通过降低 IL-2、IL-6、IFN-*γ* 银屑病相关炎性因子的水平而发挥抗银屑病活性，本研究可为赤芍的临床应用、药效物质基础研究及质量评价提供参考。

关键词：赤芍；液质联用；成分分析；银屑病；HaCaT 细胞
中图分类号：R284　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0894-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.010

Chemical constituents of Paeoniae Radix Rubra and their anti-psoriasis activity based on UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS

JIN Zhong-xian[1], YU Jia-he[1], LIU Jin-feng[1], WEI Mei[2], CHEN Xiang-dong[2], SHI Jin-li[1*], WANG Chun-guo[3*] (1. *School of Traditional Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488; 2. *Guangdong Yifang Pharmaceutical Co.*, *Ltd.*, *Foshan Guangdong* 528000; 3. *Research Institute of Chinese Medicine*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488)

Abstract: Objective To determine the chemical constituents of Paeoniae Radix Rubra and its anti-psoriasis activity by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-exactive orbitrap mass spectrometry (UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS). **Methods** Chromatographic conditions were as follows: an ACQUITY UPLC HSS T3 column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) was used for the gradient elution with 0.1% formic acid water (A)-0.1% formic acid acetonitrile (B) as the mobile phases. Mass spectrometry condition: thermal spray ion source (HESI) was applied, the chromatographic effluent was collected and detected under the negative ion mode with the detection range of *m/z* 100 ～ 1200. The over proliferation of human immortalized keratinocytes (HaCaT cells) was induced

基金项目：北京市技术服务类横向课题项目（No. BUCM-2021-JS-FW-133）。
作者简介：金重先，男，硕士研究生，主要从事中药药效物质基础研究，email：1395123472@ qq.com　*通信作者：石晋丽，女，博士研究生导师，教授，主要从事中药药效物质基础与作用机制研究，email：shijl@vip.sina.com；王春国，男，研究员，主要从事中药药效物质基础研究，email：wangcg1119@126.com

by tumor necrosis factor (TNF)-α to establish a psoriasis cell model. The levels of interleukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6) and interferon-γ (IFN-γ) in the supernatant of cell culture of each group were determined by ELISA. The effect of Paeoniae Radix Rubra ethanol extraction, paeoniflorin as well as albiflorin in total paeony glycoside (TPG) on psoriasis were determined. **Results** Totally 61 compounds were identified, including 24 monoterpenoids and their glycosides, 13 flavones and their glycosides, 14 phenolic acids, and 10 tannins. In the cell experiment, compared with the blank group, the levels of IL-2, IL-6 and IFN-γ in the model group were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the levels of IL-2, IL-6 and IFN-γ in the ethanol extract of Paeoniae Radix Rubra, paeoniflorin and albiflorin groups were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Paeoniae Radix Rubra can be identified in a easy, quick, and accurate way with UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS technology. The ethanol extract of Paeoniae Radix Rubra, paeoniflorin and albiflorin exerts its anti-psoriasis effect by reducing the levels of IL-2, IL-6, IFN-γ psoriasis related inflammatory factors. This study provides reference for the clinical application, pharmacodynamic substance base study and quality evaluation of Paeoniae Radix Rubra.

Key words: Paeoniae Radix Rubra; liquid chromatography-mass spectrometry; component analysis; psoriasis; HaCaT cell

赤芍为毛茛科植物芍药（*Paeonia lactiflora* Pall.）或川赤芍（*Paeonia veitchii* Lynch）的干燥根，具有清热凉血、散瘀止痛的功效[1]。现代研究表明赤芍主要含有单萜苷类、三萜类、黄酮类、鞣质类、糖类、甾体类、酚酸类、挥发油及其他化合物[2]，其中单萜苷类统称赤芍总苷[3]，是赤芍发挥药理作用的基础，主要分为两大类：一类为具蒎烷结构的单萜苷类；一类为具内酯结构的单萜苷类。目前运用液质联用技术对第一类化合物即具蒎烷结构的单萜苷类鉴定多集中在芍药苷、苯甲酰芍药苷等蒎烷骨架 C_9 位无取代基的成分上[4-7]，而对于芍药苷 D、芍药苷 E[2] 等蒎烷骨架 C_9 位具有取代基的成分鉴定尚未见报道。赤芍药材中的黄酮类，酚酸类等化合物同样具有药理活性，但是对这些成分的分析研究更少[4-8]，缺乏对赤芍药材成分特征的全面表征，无法反映中药材整体质量[9]。

银屑病又名牛皮癣，中医名白疕，影响全球约 2% 的人口，是一种常见的慢性炎症性皮肤病，本病发病率较高、易复发、病程长，尤以侵犯青壮年为多，对患者的身体健康和精神影响甚大，研究发现，银屑病患者血清中的白介素 -2（interleukin-2，IL-2）、白介素 -6（interleukin-6，IL-6）、γ 干扰素（interferon-γ，IFN-γ）等炎性因子相比较健康者组均呈现升高趋势[10]。近年来，中医治疗银屑病得到了越来越多的关注，中医认为银屑病内因主要在血分，其中血热、血燥、血虚、血瘀为内在发病基础[11]。而赤芍作为常用的清热凉血中药，具有抗炎、抗内毒素等药理作用，其在治疗银屑病的复方中出现频率极高[12]，但关于赤芍治疗银屑病的物质基础尚未明确，这阻碍了赤芍药材在临床上的应用。

超高效液相色谱 - 四极杆 - 静电场轨道阱质谱（UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS）技术结合了超高效液相色谱和高分辨质谱的优点[13]，可以快速实现赤芍中化学成分的鉴定。

因此本研究采用 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 对赤芍化学成分进行分析，建立一种能够简便、快速、准确表征赤芍化学成分的方法。同时采用肿瘤坏死因子（TNF）-α 诱导 HaCaT 细胞增殖[14-15]，模拟银屑病患者皮损处角质形成细胞异常增殖的病理特征，建立银屑病体外细胞模型，用赤芍的乙醇提取物以及赤芍总苷中相对含量较高的单体成分芍药苷和芍药内酯苷进行干预[4, 16-17]，分析其对细胞释放炎症因子 IL-2、IL-6、IFN-γ 的影响，探讨其抗银屑病活性，以期为今后赤芍的临床应用、药效物质基础研究及药材的质量评价提供依据。

1　材料

1.1　仪器

Q-Exactive-Orbitrap 四极杆 - 静电场轨道阱质谱仪：配有热喷雾离子源（HESI）、Xcalibur4.1 化学工作站（美国 ThermoScientific 公司）；Vanquish 超高效液相色谱系统：含二元梯度泵，自动进样器，柱温箱，DAD 检测器（美国 ThermoScientific 公司）。Millipore Synergy UV 型超纯水机（美国 Millipore 公司）；R200D 型电子分析天平（精度：十万分之一，德国 Sartorius 公司），CO_2 培养箱

（Thermo Electron Corpo-ration，Steri-cycle CO_2，Incubatot），倒置显微镜（日本 Olympus 公司）。

1.2　试药

赤芍由广东一方制药有限公司提供，经北京中医药大学中药鉴定教研室石晋丽教授鉴定为毛茛科植物芍药（*Paeonia lactiflora* Pall.）的干燥根。芍药苷（批号：23180-57-6）、芍药内酯苷（批号：39011-90-0）、苯甲酰芍药苷（批号：38642-49-8）、羟基芍药苷（批号：PCS0090）、苯甲酸（批号：65-85-0）、儿茶素（批号：154-23-4）、1，2，3，4，6-五没食子酰葡萄糖（批号：14937-32-7）、没食子酸乙酯（批号：831-61-8）、没食子酸（批号：149-91-7）、山柰酚（批号：220321）（成都植标化纯生物技术有限公司，纯度均≥98%）；阳性药阿维 A 酸（上海笛柏生物科技有限公司，批号：H573004，规格：100 mg/瓶）；甲醇、乙腈（赛默飞世尔科技有限公司，色谱纯），甲酸（北京正程生物科技有限公司，色谱纯），胎牛血清（FBS，浙江天杭生物科技股份有限公司），胰蛋白酶-EDTA 消化液、DMEM 培养基（美国 ThermoScientific 公司），人永生化角质形成细胞（HaCaT）受赠于北京中医药大学雷海民教授团队，CCK-8 试剂盒（北京拜尔迪生物技术有限公司），青链霉素混合液，TNF-*α*（Monmouth Junction，NJ，USA，批号：HY-P7058）。

2　方法

2.1　色谱条件

Waters ACQUITY UPLC HSS T3 液相色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm），以 0.1% 甲酸水（A）-0.1% 甲酸乙腈（B）为流动相进行梯度洗脱（0～2 min，2%～5%B；2～5 min，5%～12%B；5～10 min，12%～20%B；10～12 min，20%～30%B；12～13 min，30%～50%B；13～15 min，50%～100%B；15～16 min，100%B；16～18 min，100%～2%B；18～23 min，2%B），流速 0.3 mL·min^{-1}，进样量 2 μL，柱温 30 ℃。

2.2　质谱条件

在配有 HESI 的 Q-Exactive 四极杆静电场轨道阱质谱仪及 Vanquish 超高效液相色谱系统中进行上样分析。负离子检出模式，离子源温度 400 ℃，喷雾电压 3.0 kV，S-LensRF 电压 55 V，毛细管温度 320 ℃，鞘气和辅助气均为高纯氮气（纯度＞99.99%），鞘气流速：35 arb，辅助气流速：10 arb。数据采集采用一级全扫描（Full Scan，*m/z* 100～1200）与数据依赖性二级质谱扫描 ddMS^2；分辨率：70 000（Full Scan），17 500（MS/MS）；碰撞模式：高能量碰撞解离（HCD），碰撞能量：NCE 30，Stepped NCE 50%。

2.3　供试品溶液的制备

取赤芍适量，粉碎过 60 目筛，精密称取粉末 10.0 g 置于 250 mL 具塞锥形瓶中，加入 10 倍量 70% 乙醇，称定质量，40 ℃以下超声提取（频率 40 kHz，功率 300 W）2 次，每次 60 min，称重，70% 乙醇补足减少的重量，静置，过滤，残渣再用 10 倍量 70% 乙醇加热回流提取，每次 60 min，连续提取 2 次，过滤，合并滤液。减压回收乙醇，得赤芍 70% 乙醇超声联合回流提取物浸膏，于真空干燥机中干燥至恒重，得赤芍 70% 乙醇超声联合回流提取物干膏。计算出膏率为 29.7%，取相当于生药量 1 g 的提取物干膏粉末 0.297 g，置于 25 mL 量瓶中用甲醇溶解，高速离心 10 min（14 000 r·min^{-1}），取上清液，即得。

2.4　混合对照品溶液的制备

精密称取对照品芍药苷、芍药内酯苷、羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷、苯甲酸、没食子酸、儿茶素、没食子酸乙酯、1，2，3，4，6-五没食子酰葡萄糖、山柰酚适量，加甲醇定容至 10 mL，配制成各化合物终质量浓度为 10 mg·mL^{-1} 的混合对照品溶液，高速离心 10 min（14 000 r·min^{-1}），取上清液，即得。

2.5　细胞实验

2.5.1　HaCaT 细胞培养　在 37 ℃、5%CO_2 以及饱和湿度的培养箱中，使用含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 DMEM 培养基在 T25 培养瓶中常规培养 HaCaT 细胞株，常规换液、传代，待细胞培养至对数生长期进行实验。

2.5.2　CCK-8 法筛选阿维 A 酸与赤芍乙醇提取物的最佳作用浓度与时间　阿维 A 酸用二甲基亚砜（DMSO）配制成 5、10、20、40、80 mmol·L^{-1} 的溶液；赤芍乙醇提取物制备冻干粉后，用 DMEM 培养基配制成 50、100、150、200、250 mg·L^{-1} 的溶液。待 HaCaT 细胞达对数生长期时，消化、计数，以 3×10^4 个·mL^{-1} 接种于 96 孔板中，每孔 100 μL，置于 37 ℃、5%CO_2 条件下培养 24 h。待细胞贴壁后，弃去培养液，加入相应浓度的阿维 A 酸溶液和赤芍乙醇提取物，继续培养至所需时间，进行 CCK-8 检测。每孔加入 10 μL CCK-8 试剂，避光培养 2 h，在 450 nm 处测定各孔吸光度（*A*），计算细胞存活率。细胞存活率（%）＝（实验孔 *A* 值－空白孔 *A* 值）/（对照孔 *A* 值－空白孔 *A* 值）×100%。

2.5.3　TNF-*α* 诱导 HaCaT 细胞增殖能力的确定　采用 CCK-8 法检测不同浓度 TNF-*α* 对 HaCaT 细胞增殖能力的影响，分为空白组及 TNF-*α* 组（5、10、20、40、80 ng·mL^{-1}），每组 5 个复孔，加

入药物后置 CO_2 培养箱培养至所需时间，采用 CCK-8 法进行检测，计算细胞存活率。

2.5.4　芍药苷和芍药内酯苷对细胞增殖能力的影响　采用 CCK-8 法检测芍药苷和芍药内酯苷对 HaCaT 细胞增殖能力的影响，分为空白组、芍药苷和芍药内酯苷组（10、20、40、60、80 mmol•L^{-1}），空白组为 HaCaT 细胞株不加任何干预，每组 5 个复孔，加入药物后置 CO_2 培养箱培养至所需时间，采用 CCK-8 法进行检测，计算细胞存活率。

2.5.5　细胞造模及分组　取 50 μg TNF-*α* 蛋白粉末，13 000 r • min^{-1} 离心处理 20 ～ 30 s，收集附着于管壁或管底的蛋白粉末，用 500 μL 培养基溶解，混匀，配制成终质量浓度为 100 μg • mL^{-1} 的溶液，50 μL/ 管分装，－ 20 ℃冰箱保存备用。造模时将分装好的 TNF-*α* 溶液从冰箱取出后按照所需浓度进行稀释。取对数生长期的 HaCaT 细胞，消化、计数，以 3×10^4 个 • mL^{-1} 的密度接种于 96 孔板中，每孔 100 μL，培养 24 h，HaCaT 细胞贴壁后，通过检测细胞存活率的变化评价药物对 TNF-*α* 诱导的 HaCaT 细胞异常增殖的抑制作用。HaCaT 细胞贴壁后，空白组为 HaCaT 细胞株不加任何干预，模型组在 HaCaT 细胞株中加入 40 ng • mL^{-1} 的 TNF-*α* 培养 48 h，模拟银屑病患者角质形成细胞病理微环境造模（当模型组细胞存活率相比空白组显著升高时，代表造模成功），阳性药（阿维 A 酸）组在模型组基础上加入 20 mmol • L^{-1} 阿维 A 酸培养 48 h，赤芍醇提物组在模型组基础上加入 100 mg • L^{-1} 赤芍乙醇提取物培养 48 h，芍药苷组在模型组基础上加入 10 mmol • L^{-1} 芍药苷培养 48 h，芍药内酯苷组在模型组基础上加入 20 mmol • L^{-1} 芍药内酯苷培养 48 h，置 CO_2 培养箱中培养至所需时间，采用 CCK-8 法进行检测，计算各组细胞存活率。

2.5.6　ELISA 检测相关炎症因子　按照 ELISA 检测试剂盒说明书操作，以 630 nm 为校正波长，用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的吸光度（*A*）。加终止液后 5 min 内读数。

2.6　统计学方法

采用 GraphPad Prism 8 软件进行分析，数据采用平均值 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。组间比较采用独立样本 *t* 检验，正态分布性检验（$P > 0.05$），方差齐性检验（$P > 0.05$），多组间比较选用单因素方差分析（one-way ANOVA）进行统计分析，$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3　结果与分析

3.1　化学成分鉴定

取赤芍供试品溶液及混合对照品溶液按照色谱、质谱条件进行分析，得到负离子模式下总离子流图（TIC）和混合对照品质谱图，分别见图 1、2。

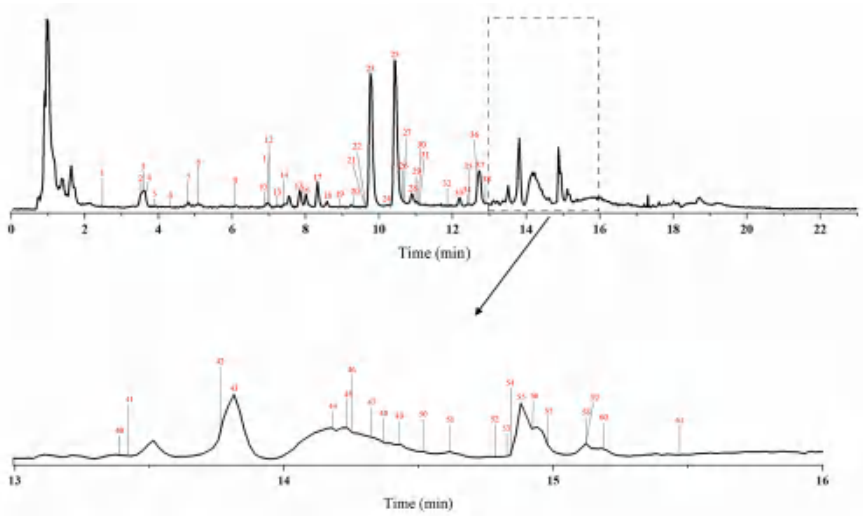


图 1　赤芍乙醇提取物的 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 总离子流图

Fig 1　Total ion flow diagram of UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS of ethanol extract of Paeoniae Radix Rubra

使用 Xcalibur 工作站计算出的高分辨精确质量数，推测各色谱峰对应化合物的分子式，根据二级质谱的碎片离子推测化合物的结构式，再根据部分对照品的质谱信息、裂解规律、相关文献进行鉴定；共鉴定出 61 个化合物，其中单萜及其苷类 24 个，黄酮及其苷类 13 个，酚酸类 14 个，鞣质类 10 个，其中 10 个化合物通过与对照品进行比对明确识别。实验表明，当单萜苷 C_9 位上具有含氧取代基时，在负离子电喷雾作用下并不稳定，容易发生取代基丢失产生 *m/z* 165 的离子峰，或者进一步丢失 1 个 O 形成新的离子峰。被推断化合物的相对保留时间、相对分子质量、理论分子质量、分子式、一级质谱数据及二级质谱碎片离子见表 1。

表 1　赤芍乙醇提取物化学成分的 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 快速鉴定分析

Tab 1　Rapid identification and analysis of chemical components of ethanol extract of Paeoniae Radix Rubra by UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS

化合物	t_R/min	名称	分子式	*m/z* 理论值	*m/z* 实测值	$\delta/\times10^{-6}$	碎片离子
1	2.44	2，3-（*S*）-六羟基二苯甲酰葡萄糖[18]	$C_{20}H_{18}O_{14}$	481.0624	481.0623[M-H]$^-$	−0.2	319.0099，300.9990，166.9984
2	3.56	1-*O*-没食子酰葡萄糖或异构体[18]	$C_{13}H_{16}O_{10}$	331.0671	331.0673[M-H]$^-$	0.4	313.0558，169.0141，151.0035
3	3.60	没食子酸*[4]	$C_7H_6O_5$	169.0143	169.0141[M-H]$^-$	−0.9	125.0243，107.0137
4	3.62	pyrogallol[8]	$C_6H_6O_3$	125.0244	125.0243[M-H]$^-$	−1.0	107.0142，81.0345
5	3.88	peony ketone-1-*O*-*β*-*D*-glucoside[8]	$C_{16}H_{24}O_9$	359.1348	359.1351[M-H]$^-$	1.0	197.0819，179.0713，153.0196
6	4.29	1-*O*-没食子酰葡萄糖或异构体[19]	$C_{13}H_{16}O_{10}$	331.0671	331.0672[M-H]$^-$	0.4	313.0573，169.0141，151.0035
7	4.81	没食子酰蔗糖或异构体[4]	$C_{19}H_{26}O_{15}$	493.1199	493.1200[M-H]$^-$	0.2	331.0675，313.0565，169.0141，125.0242
8	5.07	没食子酰蔗糖或异构体[4]	$C_{19}H_{26}O_{15}$	493.1199	493.1200[M-H]$^-$	0.2	331.0666，313.2258，169.0141，125.0242
9	6.08	龙胆酸-5-*O*-葡萄糖苷[20]	$C_{13}H_{16}O_9$	315.0722	315.0724[M-H]$^-$	0.8	153.0189，109.0294
10	6.89	6'-*O*-没食子酰-去苯甲酰基芍药苷[7]	$C_{23}H_{28}O_{14}$	527.1406	527.1407[M-H]$^-$	0.1	497.1303，479.1198，331.0566，165.0556
11	6.97	牡丹皮苷 F[7]	$C_{16}H_{24}O_8$	389.1453	389.1456[M+HCOO]$^-$	0.7	343.1398，181.0856
12	6.99	pterocaryanin B[18]	$C_{27}H_{22}O_{18}$	633.0733	633.0738[M-H]$^-$	0.7	481.0603，463.0478，300.9990，169.0141
13	7.24	catechin-5-*O*-glucoside[21]	$C_{21}H_{24}O_{11}$	451.1246	451.1235[M-H]$^-$	−2.4	289.0718，271.0614，245.0819，205.0503，179.0347，165.0190，137.0243，125.0244
14	7.44	没食子酸丙酯[22]	$C_{10}H_{12}O_5$	257.0667	257.0670[M+HCOO]$^-$	1.2	169.0869，125.0970，107.0861
15	7.84	4，5-dihydroxy-3-methoxybenzoic acid[23]	$C_8H_8O_5$	183.0299	183.0297[M-H]$^-$	−2.7	168.0062，151.0036，140.0114，124.0164，
16	8.03	羟基芍药苷*[4]	$C_{23}H_{28}O_{12}$	495.1506	495.1511[M-H]$^-$	0.6	465.1404，345.1190，333.0961，195.0661，165.0556，137.0242
17	8.33	儿茶素*[4]	$C_{15}H_{14}O_6$	289.0718	289.0718[M-H]$^-$	0.1	245.0819，179.0350，165.0193，151.0399，137.0240
18	8.53	三没食子酰葡萄糖[8]	$C_{27}H_{24}O_{18}$	635.0889	635.0881[M-H]$^-$	−1.4	465.0674，313.0566，169.0142，125.0243
19	8.92	原儿茶酸[22]	$C_7H_6O_4$	153.0193	153.0193[M-H]$^-$	−0.2	109.0295，91.0302，81.0457
20	9.34	山柰酚-3-7-二-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷[23]	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.1461	609.1453[M-H]$^-$	−1.3	447.0925，285.0406，121.0289，102.8055
21	9.75	异麦芽糖芍药苷[6]	$C_{29}H_{38}O_{16}$	641.2087	641.2047[M-H]$^-$	−6.3	611.1982，593.1876，323.0982，165.0555，121.0294
22	9.75	6'-*O*-*α*-glucopyran osylpaeoniflo[6]	$C_{29}H_{38}O_{16}$	641.2087	641.2047[M-H]$^-$	−6.3	611.1982，593.1876，489.1615，283.0818，165.0555
23	9.77	芍药内酯苷*[4]	$C_{23}H_{28}O_{11}$	525.1614	525.1613[M+HCOO]$^-$	−0.1	479.1558，357.1200，327.1093，121.0294，77.0396
24	10.33	9-乙基芍药新苷 A	$C_{25}H_{32}O_{11}$	507.1872	507.1866[M-H]$^-$	−1.1	477.1392，345.1182，165.0553，194.0453，149.0241，121.0293
25	10.45	芍药苷*[7]	$C_{23}H_{28}O_{11}$	479.1559	479.1553[M-H]$^-$	−1.2	449.1458，357.1190，327.1086，165.0555，121.0294
26	10.62	芍药内酯 B[24-26]	$C_{10}H_{12}O_4$	195.0663	195.0662[M-H]$^-$	−0.4	177.0557，149.0604，137.0246，123.0815，107.0502，87.0088，59.0138
27	10.66	芍药内酯 A[23，27-28]	$C_{10}H_{14}O_4$	197.0819	197.0808[M-H]$^-$	−5.7	169.0141，151.0609，137.0246
28	10.91	没食子酸乙酯*[4]	$C_9H_{10}O_5$	197.0456	197.0455[M-H]$^-$	−0.3	169.0142，125.0244，124.0162
29	10.95	4-甲基芍药苷	$C_{24}H_{30}O_{11}$	493.1715	493.1736[M-H]$^-$	4.2	463.1617，345.1193，179.0563，165.0556
30	11.05	香草酸[23]	$C_8H_8O_4$	167.0350	167.0348[M-H]$^-$	−1.1	152.0144，123.0086，108.0219
31	11.09	四没食子酰葡萄糖[4]	$C_{34}H_{27}O_{22}$	787.0955	787.1006[M-H]$^-$	6.5	635.0901，617.0780，483.0783，465.0681，313.0566，295.0457，169.0141
32	11.86	山柰酚葡萄糖鼠李糖苷[8]	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.1512	593.1516[M-H]$^-$	0.7	431.0983，285.0404
33	12.26	quercetin galloylglucoside[8]	$C_{28}H_{24}O_{16}$	615.0992	615.1000[M-H]$^-$	1.4	463.0884，301.0355，169.0144，151.0037，125.0243
34	12.38	四没食子酰葡萄糖[4]	$C_{34}H_{27}O_{22}$	787.0955	787.1003[M-H]$^-$	6.1	635.0891，617.0791，483.0770，465.0674，313.0571，295.0460，169.0142
35	12.44	catechin-7-*O*-gallate[29]	$C_{22}H_{18}O_{10}$	441.0827	441.0820[M-H]$^-$	−1.6	289.0717，271.0619，245.0818，205.0506，179.0345，165.0191，137.0242，125.0243
36	12.67	鞣花酸[23]	$C_{14}H_6O_8$	300.9990	300.9991[M-H]$^-$	0.4	257.0100，229.01449
37	12.72	没食子酰芍药苷[7]	$C_{30}H_{32}O_{15}$	631.1668	631.1674[M-H]$^-$	0.9	613.1555，509.1293，313.0568，169.0141，121.0294
38	12.89	二氢槲皮素[29]	$C_{15}H_{12}O_7$	303.0510	303.0512[M-H]$^-$	0.6	275.0559，231.0663，178.9985，151.0034

续表 1

化合物	t_R/min	名称	分子式	*m/z* 理论值	*m/z* 实测值	$\delta/\times10^{-6}$	碎片离子
39	13.09	苯甲酸*[4]	$C_7H_6O_2$	121.0295	121.0295[M-H]$^-$	0	93.0347
40	13.39	双没食子酸甲酯[28]	$C_{15}H_{12}O_9$	335.0409	335.0411[M-H]$^-$	0.7	183.0297，124.0164，78.1522
41	13.41	山柰酚没食子酸葡萄糖苷[8]	$C_{28}H_{24}O_{15}$	599.10424	599.1045[M-H]$^-$	0.4	447.0925，313.0567，285.0403，284.0322，169.0140，151.0035，125.0241
42	13.76	对羟基苯甲酸[23]	$C_7H_6O_3$	137.0244	137.0243[M-H]$^-$	−0.9	120.5833，93.0345
43	13.81	芍药苷 D	$C_{31}H_{34}O_{15}$	645.1825	645.1825[M-H]$^-$	0	627.1708，523.1455，493.1333，327.0723，183.0296，169.0142，121.0294
44	14.18	芍药新苷[25]	$C_{23}H_{26}O_{10}$	507.1508	507.1502[M+HCOO]$^-$	−1.2	461.1474，339.1084，283.0822，177.0554，121.0294
45	14.23	3'，6'-二-*O*-没食子酰芍药苷[6]	$C_{37}H_{36}O_{19}$	783.1778	783.1788[M-H]$^-$	1.3	661.1471，631.1666，613.1567，465.1396，313.0562，169.0141，121.0293
46	14.23	二氢山柰酚[21]	$C_{15}H_{12}O_6$	287.0561	287.0562[M-H]$^-$	0.3	269.0460，259.0611，201.0556，151.0034，125.0243，107.0137，83.0138，
47	14.32	五没食子酰葡萄糖*[4]	$C_{41}H_{32}O_{26}$	939.1109	939.1102[M-H]$^-$	−0.7	787.0976，769.0898，617.0786，465.0676，447.0564，295.0455，169.0141
48	14.37	牡丹皮苷 H[8]	$C_{30}H_{32}O_{14}$	615.1719	615.1691[M-H]$^-$	−4.6	493.1357，273.0401
49	14.43	(*Z*)-(1*S*，5*R*)-*β*-pinen-10-yl-*β*-v icianoside	$C_{21}H_{34}O_{10}$	491.2134	491.2159[M-H]$^-$	5.0	445.2078，293.0879，149.0454
50	14.52	oleuropeic acid[23]	$C_{10}H_{16}O_3$	183.1027	183.1024[M-H]$^-$	−1.5	137.0969，123.5164，83.0249
51	14.62	羟基苯甲酰芍药苷（1*S*，2*S*，4*R*）[4]	$C_{30}H_{32}O_{13}$	599.1770	599.1771[M-H]$^-$	0.2	477.1401，447.1284，283.0461，169.0141，137.0242，121.0294
52	14.78	圣草酚[21]	$C_{15}H_{12}O_6$	287.0561	287.0559[M-H]$^-$	−0.7	151.0036，135.0450
53	14.82	芍药内酯 C[27]	$C_{17}H_{18}O_6$	317.1031	317.1031[M-H]$^-$	0.1	212.9981，168.0062，140.0116，151.0036，136.9874
54	14.84	槲皮素[19]	$C_{15}H_{10}O_7$	301.0356	301.0351[M-H]$^-$	−1.6	273.0407，178.9985，151.0036，107.0137，83.0139
55	14.88	苯甲酰芍药苷*[7]	$C_{30}H_{32}O_{12}$	629.1876	629.1863[M-H]$^-$	−2.0	583.1815，553.1703，431.1345，121.0294
56	14.92	芍药苷 E	$C_{31}H_{34}O_{13}$	659.1981	659.1976[M-H]$^-$	−0.8	613.2019，583.178，431.1325，165.0553，151.0399，137.0240，121.0294
57	14.98	malyngic acid[20]	$C_{18}H_{32}O_5$	327.2177	327.2177[M-H]$^-$	0	309.2079，291.1966，229.1443，211.1340，171.0125
58	15.12	芍药苷 H	$C_{17}H_{24}O_6$	323.1500	323.1500[M-H]$^-$	0	282.9770，169.0128，154.9922，124.0172，108.9910
59	15.12	柚皮素[30]	$C_{15}H_{12}O_5$	271.0612	271.0612[M-H]$^-$	0	177.0196，151.0037，107.0136，83.0137
60	15.18	山柰酚*[30]	$C_{15}H_{10}O_6$	285.0405	285.0405[M-H]$^-$	0.1	266.9893，257.0455，178.9924，151.0037，107.0136，83.0138
61	15.46	3-3'-4-*O*-trimethylellagic acid[27]	$C_{27}H_{24}O_{18}$	635.0890	635.0881[M-H]$^-$	−1.4	465.0674，313.0566，169.0142，125.0243

注：*表示经与对照品比对确认。

Note：*Means confirmed by standard comparison.

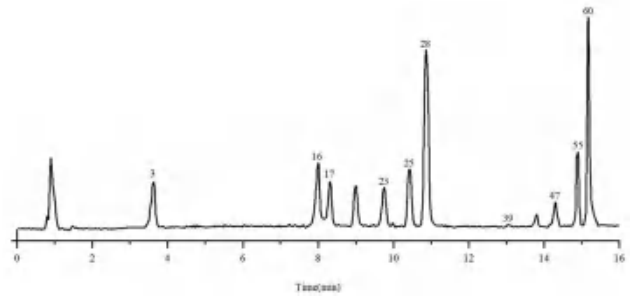


图 2　混合对照品的 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 总离子流图

Fig 2　Total ion flow diagram of UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS of mixed reference

3.2　细胞实验结果

3.2.1　阿维 A 酸和赤芍乙醇提取物对细胞存活率的影响　如图 3A 所示，阿维 A 酸浓度为 20 mmol·L^{-1}，作用时间 48 h，细胞无明显损伤；如图 3B 所示，赤芍乙醇提取物质量浓度为 100 mg·L^{-1}，作用时间 48 h，细胞无明显损伤。

因此选择 20 mmol·L^{-1} 的阿维 A 酸和 100 mg·L^{-1} 的赤芍乙醇提取物，作用时间 48 h，进行后续药效学验证。

3.2.2　TNF-*α* 诱导 HaCaT 细胞增殖模型最佳质量浓度确定　如图 4 所示，与空白组相比，TNF-*α* 10、40 ng·mL^{-1} 组的细胞存活率显著升高（$P<0.01$），其中 TNF-*α* 质量浓度 40 ng·mL^{-1} 时，细胞存活率

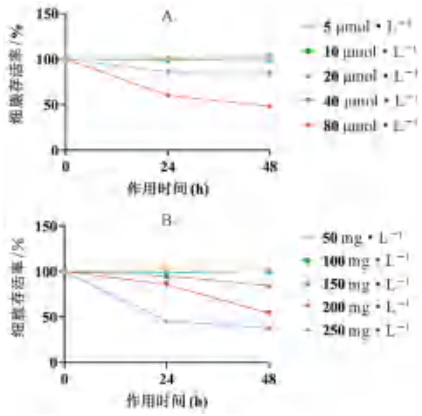


图 3　阿维 A 酸（A）和赤芍乙醇提取物（B）对细胞存活率的影响

Fig 3　Cell viability of actinic acid（A）and ethanol extract from Paeoniae Radix Rubra（B）

最高，因此，采用 40 ng • mL^{-1} TNF-α 诱导 HaCaT 建立银屑病细胞模型，作用时间 48 h。

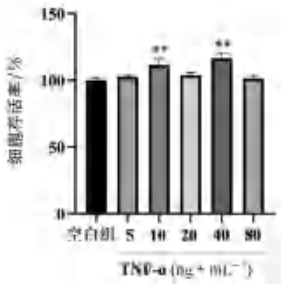


图 4　不同浓度 TNF-α 对 HaCaT 细胞增殖的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

Fig 4　Effect of different concentrations of TNF-α on HaCaT cell proliferation（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

注：与空白组比较，$^{**}P<0.01$。

Note：*vs* the blank group，$^{**}P<0.01$.

3.2.3　芍药苷和芍药内酯苷对细胞存活率影响　如图 5 所示，与空白组相比，20、40、60、80 mmol • L^{-1} 的芍药苷作用于 HaCaT 细胞存活率均明显降低（$P<0.05$，$P<0.01$），10 mmol • L^{-1} 的芍药苷对 HaCaT 细胞存活率无影响；与空白组相比，10 mmol • L^{-1} 的芍药内酯苷作用于 HaCaT 细胞，其存活率显著上升（$P<0.01$），40、60、80 mmol • L^{-1} 的芍药内酯苷作用于 HaCaT 细胞，其存活率显著降低（$P<0.01$），20 mmol • L^{-1} 的芍药内酯苷对 HaCaT 细胞存活率无影响，因此选用 10 mmol • L^{-1} 的芍药苷，20 mmol • L^{-1} 的芍药内酯苷，进行后续实验。

3.2.4　CCK-8 法检测各药物对 HaCaT 细胞增殖模型的影响　如图 6 所示，与空白组相比，模型组存活率显著升高（$P<0.01$），阳性药（阿维 A 酸）在 20 mmol • L^{-1}、赤芍醇提物在 100 mg • L^{-1}、芍药苷在 10 mmol • L^{-1}、芍药内酯苷在 20 mmol • L^{-1} 的浓度下，对于 TNF-α 诱导的 HaCaT 增殖细胞模型具有显著的抑制作用（$P<0.01$）。

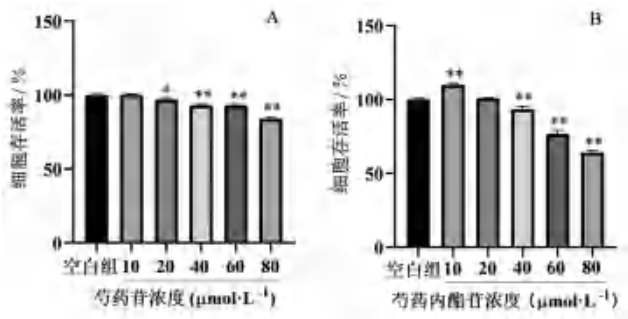


图 5　不同浓度芍药苷（A）、芍药内酯苷（B）对 HaCaT 细胞存活率的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

Fig 5　Effect of different concentrations of paeoniflorin（A）and albiflorin（B）on cell viability of HaCaT cells（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

注：与空白组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

Note：*vs* the blank group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$.

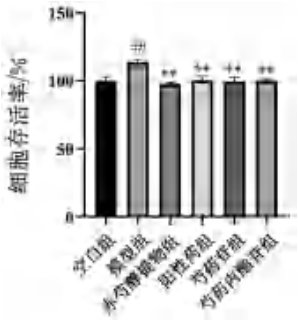


图 6　各药物组对 TNF-α 诱导 HaCaT 细胞增殖的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

Fig 6　Effect of different drug groups on proliferation of HaCaT cells induced by TNF-α（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

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

Note：*vs* the blank group，$^{\#\#}P<0.01$；*vs* the model group，$^{**}P<0.01$.

3.2.5　ELISA 检测各药物对炎症因子表达的影响　与空白组相比，模型组 IL-2、IL-6、IFN-γ 水平显著上升（$P<0.01$），阳性药（阿维 A 酸）在 20 mmol • L^{-1}、赤芍醇提物在 100 mg • L^{-1}、芍药苷在 10 mmol • L^{-1}、芍药内酯苷在 20 mmol • L^{-1} 的浓度下，对于 HaCaT 细胞模型 IL-2、IL-6、IFN-γ 炎症因子的水平具有显著的下调作用（$P<0.01$），其中赤芍醇提物组对 IL-2、IFN-γ 的下调作用弱于芍药苷组及芍药内酯苷组，而赤芍醇提物组对 IL-6 的下调作用强于芍药苷组及芍药内酯苷组，结果如图 7 所示。

4　讨论

本研究采用 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 分析方法实现了赤芍中 61 种化合物的快速鉴定，且本研究对赤芍中除单萜苷类成分外的黄酮类，酚酸类和鞣质类成分进行较为全面的鉴定，为全面评价赤芍的质量提供了参考。

赤芍作为常见的清热凉血中药，其在治疗血热引起的银屑病方面的应用较为广泛[31-34]，并且

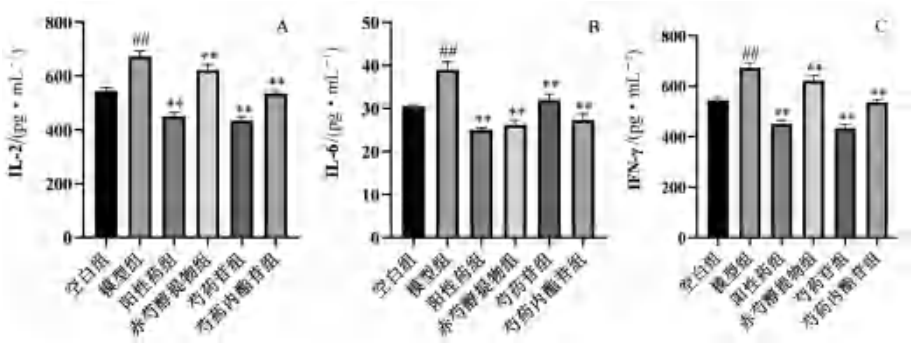


图 7　各药物组对 TNF-α 诱导 HaCaT 细胞 IL-2（A），IL-6（B），IFN-γ（C）表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

Fig 7　Effect of different drug groups on the expression of IL-2（A），IL-6（B），and IFN-γ（C）in HaCaT cells induced by TNF-α（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

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

Note：*vs* the blank group，$^{\#\#}P<0.01$；*vs* the model group，$^{**}P<0.01$.

赤芍总苷作为赤芍发挥主要药理作用的物质基础[2]，推测其同样具有清热凉血的功效，赤芍总苷是一类包含单萜苷类化合物的统称，因此选取其中含量较高，价廉易得的单体成分芍药苷和芍药内酯苷[4，16-17]验证体外抗银屑病活性。HaCaT 为人类永生化表皮细胞，其增殖特性与银屑病的病理特征相似[10]，因此本研究选取此细胞系进行实验。现代药理研究表明，银屑病是一种常见的慢性炎症性皮肤病，以表皮过度增生和免疫细胞浸润为特征，尽管疾病的机制尚未完全阐明，但仍然有证据表明 T 细胞参与银屑病的发病[35]，而 IL-2 被广泛认为是 T 细胞依赖性免疫应答中的关键细胞因子，其与 T 细胞的增殖及分化密切相关，并且还抑制角质形成细胞的凋亡，部分导致银屑病皮损中角质形成细胞的过度增殖，刺激表皮细胞增殖从而加重银屑病[36]。IL-6 是一种多功能细胞因子，在免疫反应、急性期反应及炎症中发挥重要作用，Goodman 等[37]研究显示，由树突状细胞及内皮细胞分泌的 IL-6 可导致具有免疫抑制作用的调节性 T 细胞的逃逸，并且 IL-6 可阻断 TNF-β 诱导的 Foxp3 表达，而 Foxp3 为调节性 T 细胞的标志分子。在银屑病皮损中，树突状细胞、内皮细胞、巨噬细胞及 IL-17 分泌细胞通常同时高表达 IL-6，因此 IL-6 可通过导致 Treg 细胞与 Th17 细胞之间的平衡紊乱，从而促进银屑病的发展[38]，且最新临床研究表明[39]，IL-6 可能是银屑病患者疾病活动性的潜在标志物。IFN-γ 为 Th1 型细胞因子，它能够通过诱导角质形成细胞表达角质蛋白 17，促使角质形成细胞过度增生，与银屑病的发生发展有着密切的关系[40]。在银屑病患者的血清、皮损及非皮损皮肤中均可检测到 IFN-γ 水平升高，且血清和皮损中的 IFN-γ 水平与银屑病的严重程度相关[41]。因此本研究选取 IL-2、IL-6、IFN-γ 这三个明确在银屑病患者血清中显著升高的炎症因子作为检测目标，采用 ELISA 法检测赤芍醇提物、芍药苷、芍药内酯苷对 TNF-α 诱导 HaCaT 银屑病细胞模型中 IL-2、IL-6、IFN-γ 的影响。实验结果显示赤芍醇提物、芍药苷及芍药内酯苷可能是通过降低 IL-2、IL-6、IFN-γ 细胞因子水平而发挥治疗银屑病的作用，本研究为赤芍抗银屑病的临床应用和药效物质基础研究提供了一定的参考。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：165.

[2] 吴玲芳，王子墨，赫柯芊，等 . 赤芍的化学成分和药理作用研究概况 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（18）：198-206.

[3] 董国菊 . 赤芍总苷药理作用的研究进展 [J]. 环球中医药，2017，10（9）：1157-1160.

[4] 刘杰，陈琳，范彩荣，等 . 基于 HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS 的白芍和赤芍主要成分定性定量研究 [J]. 中国中药杂志，2015，40（9）：1762-1770.

[5] 练杭芸，徐王彦君，梁乾德，等 . UPLC-QTOF MS 法比较赤芍、白芍煎液化学成分差异 [J]. 质谱学报，2014，35（3）：269-278.

[6] 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.

[7] Li SL，Song JZ，Choi FF，et al. Chemical profiling of Radix Paeoniae evaluated by ultra-performance liquid chromatography/photo-diode-array/quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal，2009，49（2）：253-266.

[8] Yang S，Zhang X，Dong Y，et al. Cleavage rules of mass spectrometry fragments and rapid identification of chemical components of *Radix Paeoniae* Alba using UHPLC-Q-TOF-MS [J]. Phytochem Anal，2021，32（5）：836-849.

[9] 车爽 . UPLC-Q-TOF-MS 联合 UNIFI 技术在中药分析领域的应用进展 [J]. 天津药学，2022，34（3）：67-74.

[10] 郑雯，李刚刚，刘清民，等 . 复方青黛胶囊对银屑病微环境下 HaCaT 细胞分泌细胞因子的影响 [J]. 中国皮肤性病学

杂志，2021，35（3）：261-265.
[11] 袁媛，高东文，邱霞 . 中医药治疗寻常型银屑病的研究进展 [J]. 转化医学杂志，2014，3（4）：236-238，254.
[12] 王世博，张晓艳 . 基于数据挖掘中医药治疗银屑病用药规律研究 [J]. 中华中医药学刊，2019，37（12）：2974-2978.
[13] 曾彬，刘红梅，刘晓梅，等 . UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术在中药分析中的应用 [J]. 中药材，2020，43（9）：2312-2318.
[14] 赵凯轩，孙丽蕴 . 龙胆苦苷对肿瘤坏死因子 -α 诱导的 HaCaT 细胞增殖的抑制作用 [J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志，2021，20（3）：246-250.
[15] Wang F，Wang J，Zhang Z，et al. Tetrandrine inhibits the proliferation and cytokine production induced by IL-22 in HaCaT cells [J]. J Int Med Res，2018，（12）：5210-5218.
[16] 余捷婧，吴金雄，梁亚凤，等 . HPLC 同时测定赤芍和白芍中没食子酸等 6 种成分的量 [J]. 中草药，2015，46（11）：1673-1677.
[17] 金林，赵万顺，郭巧生，等 . 白芍饮片的化学成分测定及质量评价 [J]. 中国中药杂志，2015，40（3）：484-489.
[18] Cao J，Qiao X，Ji S，et al. Insights into the neutral loss of 30 Da of Paeonia monoterpene glycosides in electrospray ionization tandem mass spectrometry and the rapid screening of monoterpene glycosides by LC/MS/MS [J]. J Pharm Sci，2016，25（1）：37-45.
[19] Piccolella S，Crescente G，Volpe MG，et al. UHPLC-HR-MS/MS-guided recovery of bioactive flavonol compounds from Greco di Tufo Vine leaves [J]. Molecules，2019，24（19）：3630.
[20] He J，Dong Y，Liu X，et al. Comparison of chemical compositions，antioxidant，and anti-photoaging activities of Paeonia suffruticosa flowers at different flowering stages [J]. Antioxidants（Basel），2019，8（9）：345.
[21] Wang X，Li C，Contreras MDM，et al. Integrated profiling of fatty acids，sterols and phenolic compounds in tree and herbaceous peony seed oils：marker screening for new resources of vegetable oil [J]. Foods，2020，9（6）：770.
[22] 梁静，徐风，尚明英，等 . 赤芍化学成分没食子酸丙酯在大鼠体内的代谢研究 [J]. 中国中药杂志，2013，38（22）：3970-3976.
[23] 王小萍，徐冠玲，闫昕，等 . “莪术 - 三棱” 药对及其单味药水煎液的酚类和有机酸类化学成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2020，26（23）：171-179.
[24] Wang Z，Tang S，Hattori M，et al. Simultaneous determination of paeonilactone A and paeonilactone B in rat plasma after oral administration of albiflorin by UPLC/TOF/MS following picolinoyl derivatization [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci，2017，1061-1062：327-333.
[25] Nie R，Zhang Y，Jin Q，et al. Identification and characterisation of bioactive compounds from the seed kernels and hulls of *Paeoniae Radix* Rubra Pall by UPLC-QTOF-MS [J]. Food Res Int，2021，139：109916.
[26] 马尚智，秦惠玉，龙飞，等 . 没食子多酚类化合物的鉴定及其在 UPLC-MS/MS 中的裂解规律研究 [J]. 中草药，2017，48（22）：4632-4638.
[27] 姚子蔚，边丽华，李秋雨，等 . 甘松新酮、去氢木香内酯和甘松香酮 H-3 个倍半萜类成分的电喷雾质谱裂解规律研究 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2021，23（7）：2353-2360.
[28] Ye M，Han J，Chen H，et al. Analysis of phenolic compounds in rhubarbs using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry [J]. J Am Soc Mass Spectrom，2007，18（1）：82-91.
[29] Fabre N，Rustan I，de Hoffmann E，et al. Determination of flavone，flavonol，and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry [J]. J Am Soc Mass Spectrom，2001，12（6）：707-715.
[30] Schmidt J. Negative ion electrospray high-resolution tandem mass spectrometry of polyphenols [J]. J Mass Spectrom，2016，51（1）：33-43.
[31] 陈艺苒，蒯仂，丁晓杰，等 . 秦万章血分论治寻常型银屑病组方规律分析 [J]. 上海医药，2022，43（7）：43-46，95.
[32] 王琦 . 张鸣鹤教授治疗银屑病关节炎综合诊疗方案传承研究 [D]. 济南：山东中医药大学，2021.
[33] 陈广山，李玲玲，白春晓 . 基于网络药理学分析牡丹皮 - 赤芍治疗银屑病的作用机制 [J]. 天津中医药，2021，38（5）：659-665.
[34] 曹艳红，朱珂，潘富强，等 . 中医治疗寻常型银屑病的证候分布及用药规律的文献分析 [J]. 广州中医药大学学报，2020，37（6）：1198-1201.
[35] Raeber ME，Zurbuchen Y，Impellizzieri D，et al. The role of cytokines in T-cell memory in health and disease [J]. Immunol Rev，2018，283（1）：176-193.
[36] Malek TR，Bayer AL. Tolerance，not immunity，crucially depends on IL-2 [J]. Nat Rev Immunol，2004，4（9）：665-674.
[37] Goodman WA，Levine AD，Massari JV，et al. IL-6 signaling in psoriasis prevents immune suppression by regulatory T cells [J]. J Immunol，2009，183（5）：3170-3176.
[38] 王文明，晋红中 . 白介素 -6 在银屑病中的研究进展 [J]. 中国医学科学院学报，2018，40（2）：284-288.
[39] Pietrzak A，Chabros P，Grywalska E，et al. Serum concentration of interleukin 6 is related to inflammation and dyslipidemia in patients with psoriasis [J]. Postepy Dermatol Alergol，2020，37（1）：41-45.
[40] Lowes MA，Suárez-Fariñas M，Krueger JG. Immunology of psoriasis [J]. Annu Rev Immunol，2014，（32）：227-55.
[41] Chiricozzi A，Romanelli P，Volpe E，et al. Scanning the immunopathogenesis of psoriasis [J]. Int J Mol Sci，2018，19（1）：179.

（收稿日期：2022-09-18；修回日期：2022-12-20）

基于 3D 肿瘤模型和网络药理学的威灵仙粗提物体外抗肺癌药效及潜在作用机制研究

刘诚毅[1]，秦鑫鹏[1]，包永睿[1, 2, 3]，王帅[1, 2, 3]，李天娇[1, 2, 3]，孟宪生[1, 2, 3*]，于睿[4]（1.辽宁中医药大学药学院，大连　116600；2.辽宁省中药多维分析专业技术创新中心，大连　116600；3.辽宁省现代中药研究工程实验室，大连　116600；4.辽宁中医药大学，沈阳　110847）

摘要：目的　基于 3D 肿瘤细胞模型和网络药理学方法，研究威灵仙体外抗肺癌的药效及潜在作用机制。**方法**　使用人肺癌细胞系 A549 建立体外 3D 肺癌模型，以依托泊苷作为阳性对照组，对水、30% 乙醇、60% 乙醇、70% 乙醇、90% 乙醇提取得到的威灵仙粗提物进行体外药效学研究。通过多种数据库筛选出药物和肺癌的核心靶点，并采用 ELISA 试剂盒检测信号通路中的关键因子。**结果**　挖掘出威灵仙活性成分 33 个，核心成分 3 种，为 Hederagenin、2-Deoxy-D-Ribono-1、beta-sitosterol，排名靠前的靶点为 CASP3、PTGS2、IL6、TNF，推测为核心靶点。GO 功能富集共筛选得到 171 个条目，KEGG 通路富集共筛选出 56 条通路。ATP 检测结果显示各 2D、3D 细胞模型处理组 IC_{50} 值分别为：依托泊苷（41.98±1.15），（118.63±3.93）μmol・L^{-1}；水提取物（0.89±0.04），（6.37±0.78）mg・mL^{-1}；30% 醇提物（0.64±0.02），（5.40±0.78）mg・mL^{-1}；60% 醇提物（0.45±0.01），（4.30±1.16）mg・mL^{-1}；70% 醇提物（0.37±0.02），（3.24±0.85）mg・mL^{-1}；90% 醇提物（0.60±0.03），（5.46±1.47）mg・mL^{-1}。HE 染色结果显示，肿瘤细胞核皱缩及胞质减少程度强弱顺序为 70% 醇提物＞依托泊苷处理组＞ 60% 醇提物＞ 90% 醇提物＞ 30% 醇提物＞水提物。免疫细胞结果显示，相比于对照组，各给药组均有肿瘤细胞核皱缩且 P53 表达量显著减少（$P < 0.05$）。ELISA 结果显示，威灵仙 70% 醇提物和 60% 醇提物均对 Bax-Bcl-2-Caspase-3 信号通路产生显著影响（$P < 0.05$）。**结论**　各组威灵仙粗提物均对人 A549 3D 模型有一定的活性抑制作用，其中 70% 醇提物效果最佳，60% 醇提物次之，这种抑制作用可能与其上调 Bax、Caspase-3 含量，下调 Bcl-2 含量相关，即威灵仙粗提物可能具有抑制肿瘤细胞增殖，促进肿瘤细胞凋亡的作用。

关键词：威灵仙；肺癌；3D 细胞模型；网络药理学
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0903-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.011

In vitro anti-lung cancer efficacy and potential mechanism of crude extract of Clematidis Radix et Rhizoma based on 3D tumor model and network pharmacology

LIU Cheng-yi[1], QIN Xin-peng[1], BAO Yong-rui[1, 2, 3], WANG Shuai[1, 2, 3], LI Tian-jiao[1, 2, 3], MENG Xian-sheng[1, 2, 3*], YU Rui[4] (1. *College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian Liaoning* 116600; 2. *Liaoning Multi-dimensional Analysis of Traditional Chinese Medicine Technical Innovation Center, Dalian Liaoning* 116600; 3. *Liaoning Modern Traditional Chinese Medicine Research Engineering Laboratory, Dalian Liaoning* 116600; 4. *Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang* 110847)

Abstract: Objective To determine the anti-lung cancer targets and mechanism of Clematidis Radix

基金项目：辽宁省科学技术计划项目 - 工业重大专项（No.2020JH1/10100022）。
作者简介：刘诚毅，男，硕士研究生，主要从事药物分析研究，email：943330705@qq.com　*通信作者：孟宪生，男，教授，博士研究生导师，主要从事中药药效物质组学及作用机制整合研究，email：mxsvvv@126. com

et Rhizoma, based on 3D tumor cell model combined with network pharmacology. **Methods** An in vitro 3D lung cancer model was established with human lung cancer cell line A549. The in vitro pharmacodynamic studies were conducted based on the crude extract of Clematidis Radix et Rhizoma obtained with water, 30% ethanol, 60% ethanol, 70% ethanol and 90% ethanol, respectively, and the etoposide was used as a positive control group. The core targets of the drug and lung cancer were screened by various databases, and the key factors in the signal pathway were detected with ELISA kit. **Results** Totally 33 active components of Clematidis Radix et Rhizoma were determined, with 3 core components, namely Hederagenin, 2-Deoxy-D-Ribono-1 and beta-sitosterol; the top targets included CASP3, PTGS2, IL6 and TNF, which were considered to be the core targets. Totally 171 items were screened by GO function enrichment, and 56 pathways were screened by KEGG pathway enrichment. The ATP assay showed that the IC_{50} values of the 2D and 3D cell model by different crude extract were (41.98±1.15) and (118.63±3.93) μmol • L^{-1} for etoposide; (0.89±0.04) and (6.37±0.78) mg • mL^{-1} for water extract; (0.64±0.02) and (5.40±0.78) mg • mL^{-1} for 30% ethanol extract; (0.45±0.01) and (4.30±1.16) mg • mL^{-1} for 60% ethanol extract; (0.37±0.02) and (3.24±0.85) mg • mL^{-1} for 70% ethanol extract; (0.60±0.03) and (5.46±1.47) mg • mL^{-1} for 90% ethanol extract, respectively. The HE staining showed that the order of nucleus shrinkage and cytoplasmic decrease was 70% ethanol extract > etoposide treatment > 60% ethanol extract > 90% ethanol extract > 30% ethanol extract > water extract. Immunohistochemical showed that tumor nucleus shrinkage and decreased P53 expression occurred in the experimental groups as compared with the control group ($P < 0.05$). ELISA showed that both 70% and 60% ethanol extract of Clematidis Radix et Rhizoma greatly affected the Bax-Bcl-2-Caspase-3 signal pathway ($P < 0.05$). **Conclusion** All groups of crude extract of Clematidis Radix et Rhizoma can inhibit the activity of human lung cancer cells by 3D model. The 70% ethanol extract has the best effect, followed by 60% ethanol extract. This inhibition may be related to up-regulating Bax and Caspase-3 content, and down-regulating Bcl-2 content, implying that the crude extract of Clematidis Radix et Rhizoma can inhibit tumor cell proliferation and promot tumor cell apoptosis.

Key words: Clematidis Radix et Rhizoma; lung cancer; 3D cell model; network pharmacology

在我国，肺癌是发病率和死亡率第一的恶性肿瘤[1]。肺癌目前的治疗手段中除手术外药物治疗是最佳的方案，如今新药数量繁多，缺乏有效的高通量体外药物筛选方法。大多数肺癌治疗相关的体外研究都是基于传统二维单层（2D）培养的肿瘤细胞进行，随后在小鼠、大鼠、家兔等动物模型中进行体内药效验证。但是，2D 培养的细胞与肿瘤在体状态差异极大，得到的药效数据可参考性和对临床的指导意义均比较小；而受限于基因和物种差异，各类动物模型也无法很好地模拟人体对药物的吸收、转化、代谢、排泄等特点，得到的药效会有所偏差或产生无法预知的毒副作用，并且其培养时间较长，需要花费更多的人力和物力。与传统 2D 细胞培养相比，三维条件（3D）培养的细胞行为和基因蛋白表达相对来说与细胞在体环境更加相似[2]。因此采用人来源细胞构建 3D 培养模型有助于解决传统 2D 细胞培养模型或基于模式动物开展的体内实验与实际的差异[3]，是更好的药物和器官毒性筛选方法。

威灵仙是一种广泛应用的传统中药材，具有解痉镇痛，抗炎抑菌，利胆利尿，降糖降压等作用。随着研究的深入，发现威灵仙还有潜在的抗肿瘤作用[4-5]，在本课题组的初期研究中，发现其在抗肺癌方面也有一定作用，但目前鲜有文献报道。综上，本文以网络药理学的靶点预测作为基础，结合 3D 肺癌细胞模型进行威灵仙不同醇浓度粗提物的体外药效学研究，评价其体外抗肺癌药效的强弱并初步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 仪器

CKX-350 显微镜（德国 Olympus 公司）；酶标仪（美国 Tecan 公司）；HistoCore Biocut 手动轮转式切片机（德国 Leica 公司）。

1.2 试药

威灵仙（辽宁上药好护士药业有限公司，批号：220711），由辽宁中医药大学许亮教授鉴定该

药材符合《中国药典》2020 年版规定。F12K 细胞培养基、胎牛血清（FBS）、磷酸盐缓冲液（PBS）（美国 Gibco 公司）；依托泊苷（货号：HY-13629，MCE 公司）；超低吸附 96 孔 U 型底板（浙江弘瑞医疗科技有限公司）；总蛋白提取裂解液 RIPA（美国 Abcam 公司）；二甲基亚砜（DMSO，碧云天公司）；10×TBST 缓冲液（北京索莱宝科技有限公司）；P53 单克隆抗体（武汉三鹰 Proteintech 公司）；BCL-2 关联 X 蛋白（Bax）检测试剂盒、B- 细胞淋巴瘤因子 2（Bcl-2）检测试剂盒、胱天蛋白酶（CASP3）检测试剂盒（武汉云克隆科技股份有限公司）；ATP 活力检测试剂 Glucose Uptake-Glo Assay（美国 Promega 公司）；人肺癌 A549 细胞系（中国武汉普诺赛生命科技有限公司）。

2 方法

2.1 威灵仙网络的构建

通过 TCMSP、ETCM 两个数据库，筛选出威灵仙成分及对应靶点，并结合 DisGeNet、OMIM、Uniprot 三个疾病数据库，以“lung cancer”为关键词，搜索肺癌的所有相关靶点，合并去重后，即得。将威灵仙的活性成分及其潜在靶点导入 Cytoscape 3.7.2 软件中绘制“威灵仙 - 靶点”网络图，结合 Network Analyzer 插件对网络图进行分析。

2.2 蛋白互作（PPI）网络构建与分析

将交集靶点输入 String 平台，设置物种为“Homo sapiens”，置信度为“≥ 0.4”，并将所得结果导入 Cytoscape 3.7.2 软件依据 Network Analyzer 插件进行分析。

2.3 KEGG 通路与 GO 功能分析

将交集靶点输入 DAVID 数据库，选择物种为“Homo sapiens”，按照 P 值由小到大排序，选择 $P \leqslant 0.05$ 的 KEGG 通路，筛选 KEGG 前 20 和 GO 分析前 10 的结果进行结果绘制。

2.4 威灵仙不同提取方法的提取物

用粉碎机将威灵仙药材打成粉末，称定约 30 g，置圆底烧瓶中，分别用 10 倍量新配制的水及 30%、60%、70% 以及 90% 乙醇浸泡并搅拌混匀，回流提取 1 h，抽滤，药渣加 8 倍量溶剂重复提取 2 次，合并滤液，旋转蒸发成稠膏后，于冷冻干燥机中冻干成粉末。

2.5 3D 细胞模型建立及 2D、3D 细胞模型体外药物敏感度测试

A549 肺腺癌细胞系以每孔 2.5×10^3 个细胞，分别均匀地接种于平底 96 孔板和低吸附 U 型底 96 孔板中。在 37 ℃、5%CO_2 培养 72 h 后显微镜下观察低吸附 U 型底 96 孔板中是否形成 3D 细胞模型（3D 细胞模型整体趋近于球形，因此后文统一称为 3D 细胞球）。对成功培养的 3D 细胞球进行给药。精密称取威灵仙的水提物及 30%、60%、70%、90% 醇提物各 200 mg。配制成 5 mg • mL^{-1} 的药物母液，稀释为 2.5、1.25、0.63、0.31、0.16、0.08、0.04 mg • mL^{-1}，对 A549 肺癌 2D 细胞模型处理 72 h；配制成 100 mg • mL^{-1} 的药物母液，稀释为 50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78 mg • mL^{-1}，对 A549 肺癌 3D 细胞球处理 72 h。精密称取依托泊苷 2 mg，配制 100 μmol • L^{-1} 的药物母液，稀释为 50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78 μmol • L^{-1}，对 A549 肺癌 2D 细胞模型处理 72 h；配制 200 μmol • L^{-1} 的药物母液，稀释为 100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56 μmol • L^{-1}，对 A549 肺癌 3D 细胞球处理 72 h。使用 Glucose Uptake-Glo Assay 检测各处理组的细胞 ATP 活力，不同给药浓度下的抑制率（%）=（对照组 *OD* 值－对应给药浓度下给药组 *OD* 值）/ 对照组 *OD* 值 ×100%。每组设 3 个复孔，实验重复 3 次。通过各给药组的抑制率 - 药物浓度的量效曲线，在 GraphPad prism 9.2 中计算出对应的 IC_{50} 值。

2.6 苏木精和伊红（HE）染色

将威灵仙的水提物及 30%、60%、70%、90% 醇提物用培养基统一配制成 5 mg • mL^{-1}，依托泊苷配制为 100 μmol • L^{-1}，药物处理 72 h。各组给药后的 3D 细胞球分别回收后在 4% 多聚甲醛中固定，然后脱水和石蜡包埋。使用切片机对包埋后的 3D 细胞球进行切片、脱蜡、复水、二甲苯浸泡 2 次，每次 5 min、梯度乙醇复水、自来水冲洗等操作后，进行 HE 染色。

2.7 免疫组化（IHC）方法

将玻片置于 65 ℃烘箱中烤片 30 min，随后用二甲苯及梯度乙醇脱蜡，并使用 Tris-EDTA（pH ＝ 9.0）进行抗原修复 20 min。使用 5% PBS-BSA 室温封闭 10 min 后切片添加 P53 蛋白抗体在 4 ℃下孵育过夜。随后添加 HRP 偶联二抗，室温孵育 30 min，孵育完成后添加 DAB 工作液显色 20 min 后使用苏木素对细胞核进行复染，并进行脱水封片。使用显微镜在 40 倍镜下观察结果并拍照。拍照后图片导入 QaPath-0.3.2 图像分析系统中，每例切片选 5 个 40 倍镜下视野，随即选测 3 ～ 4 个 3D 细胞球计算阳性表达的平均光密度值（MOD 值），同时对平均光密度值进行统计分析。

2.8 ELISA 法

将威灵仙的水提物及 30%、60%、70%、90% 醇提物用培养基统一配制成 3 mg • mL^{-1}，依托泊苷配制为 50 μmol • L^{-1} 的给药浓度给药 72 h。收集各给药组的 3D 细胞球，使用添加 PMSF 的 RIPA 裂解液，冰上裂解 20 min，再于 13 000 r • min^{-1} 离心 20 min，将样本按照 ELISA 试剂盒操作步骤进行检测。在酶标仪 450 nm 波长测定 *OD* 值，计算样品浓度。

2.9　统计分析

数据以均值 ± 标准差表示。首先用单因素方差分析组间差异，然后用 Student’s-test 对各组数据进行差异性分析，当 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　威灵仙网络图的构建和分析

将 TCMSP 以及 ETCM 数据库的成分合并去重后，共筛选出威灵仙活性成分 33 个，根据其序号和疾病交集核心靶点绘制威灵仙“成分 - 靶点”网络图，见图 1。根据该网络图拓扑分析可知，该网络的平均 BC 值为 0.0247，平均 CC 值为 0.4396，平均 DC 值为 6.8485。进一步分析该网络可知 wlx2（Hederagenin）、wlx9（2-Deoxy-D-Ribono-1）、wlx32（beta-sitosterol）这 3 个成分的 BC、CC、DC 的值均大于平均值，结果见表 1。

表 1　威灵仙核心成分拓扑参数

Tab 1　Topological parameters of core components of Clematidis Radix et Rhizoma

序号	核心成分名	BC	CC	DC
wlx2	Hederagenin	0.0656	0.4468	8.0000
wlx9	2-Deoxy-D-Ribono-1	0.2944	0.4667	11.0000
wlx32	beta-sitosterol	0.1751	0.4532	9.0000

3.2　威灵仙 PPI 网络的绘制

PPI 网络去除无关联靶点后，共包含 30 个节点和 171 条边，并依据 degree 值大小进行排序后绘图，见图 2。根据绘图结果可知 CASP3、PTGS2、IL6、TNF 排名最为靠前，基因靶点蛋白活性最强，推测可能是威灵仙抗肺炎的核心靶点。

3.3　KEGG 通路与 GO 功能分析结果

GO 功能富集共筛选得到 171 个条目，其中生物过程（BP）118 个，细胞组分（CC）21 个，分子功能（MF）32 个，每组选择 10 个靠前的条目展示，见图 3。KEGG 通路富集共筛选出 56 条通路，筛选排名靠前的 20 条通路展示，见图 4。

3.4　3D 肿瘤细胞模型的建立以及体外药物敏感度测试

在显微镜下观察不同接种时间下 3D 细胞球的生长状态，结果见图 5。当接种低吸附孔板 24 h，视野下多数为散在的单细胞，具有成球的趋势（见图 5A）。接种低吸附孔板 48 h 后（见图 5B），细胞呈聚拢状态。而接种 72 h 后，细胞完全聚拢成为细胞球，细胞高度融合，细胞球整体透亮，边缘清晰（见图 5C）。

2D、3D 细胞模型各处理组抑制率 - 药物浓度的量效曲线见图 6 及图 7。2D、3D 细胞模型处理组 IC_{50} 值分别为：依托泊苷（41.98±1.15）、（118.63±3.93）μmol•L^{-1}，水提取物（0.89±0.04）、（6.37±0.78）mg•mL^{-1}，30% 醇提物（0.64±0.02）、（5.40±0.78）mg•mL^{-1}，60% 醇提物（0.45±0.01）、（4.30±1.16）mg•mL^{-1}，70% 醇提物（0.37±0.02）、（3.24±0.85）mg•mL^{-1}，90% 醇提物（0.60±0.03）、（5.46±1.47）mg • mL^{-1}。

3.5　细胞形态观察以及 HE 染色结果评价

按“2.6”项下方法对各组 3D 肿瘤细胞模型的切片进行 HE 染色，结果见图 8。其中对照组细胞核染色较深，形状完整，边缘清晰可见，胞质分布均匀且致密，生长状况良好（见图 8A）。依托泊苷组经过 72 h 处理后细胞核呈收缩状态，且部分细胞核由于内部崩解导致有中空出现，此外细胞质减少，分布稀疏松散，整体结构呈崩解状态，凋亡程度较高（见图 8B）。水提取物组经过 72 h 处理后外围以及部分内部的细胞核呈收缩状态，胞质无明显变化，整体无明显的崩解趋势，凋亡程度较轻（见图 8C）。60%、70% 醇提物处理 72 h 后，可见细胞核收缩成圆形，胞质减少，分布稀疏松散，整体呈崩解状态，其中 70% 醇提物凋亡以及崩解程度略高于依托泊苷处理组（见图 8E 及 8F）。30%、90% 醇提物给药也可见一定程度的细胞核收缩，胞质减少，呈现崩解状态，凋亡情况弱于 60%、70% 醇提物以及依托泊苷处理组（见图 8D 及 8G）。各组细胞凋亡程度从高到低排序为：70% 醇提物处理组＞依托泊苷处理组＞ 60% 醇提物处理组＞ 90% 醇提物处理组＞ 30% 醇提物处理组＞水提取物处理组＞对照组。

3.6　细胞形态观察以及免疫组化结果

免疫组化结果如图 9 所示。未经给药的对照组可见 DAB 染色程度深，P53 蛋白表达量多，呈现出高表达状态，同时细胞核形状完整，边缘清晰可见，生长状况良好（见图 9A）。依托泊苷组经过 72 h 处理后 DAB 染色程度减弱更为明显，被染色的细胞核数量减少，P53 蛋白表达量减少，呈现出弱表

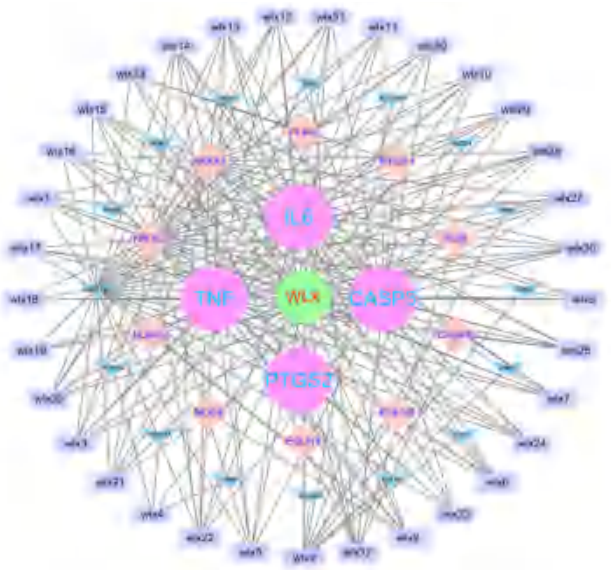


图 1　威灵仙“成分 - 靶点”网络图

Fig 1　“Composition-target” network diagram of Clematidis Radix et Rhizoma

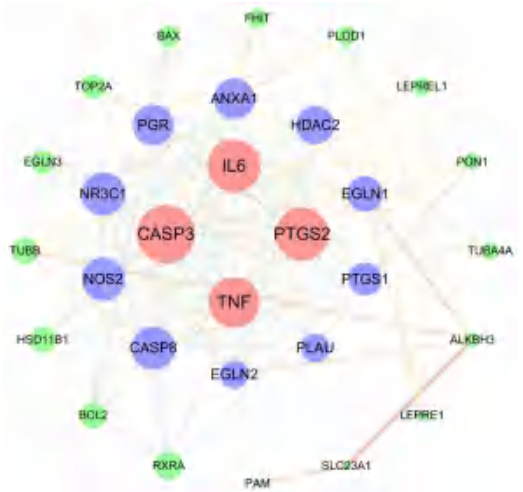


图 2　威灵仙 PPI 筛选核心靶点图

Fig 2　Core target map of Clematidis Radix et Rhizoma PPI screening

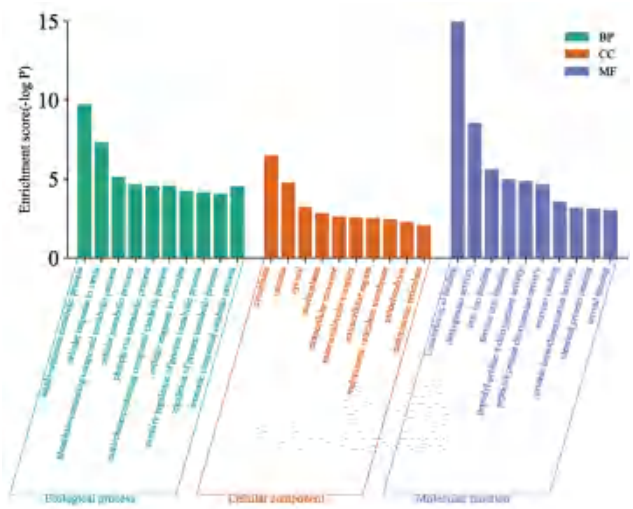


图 3　GO 功能富集分析图

Fig 3　GO function enrichment analysis

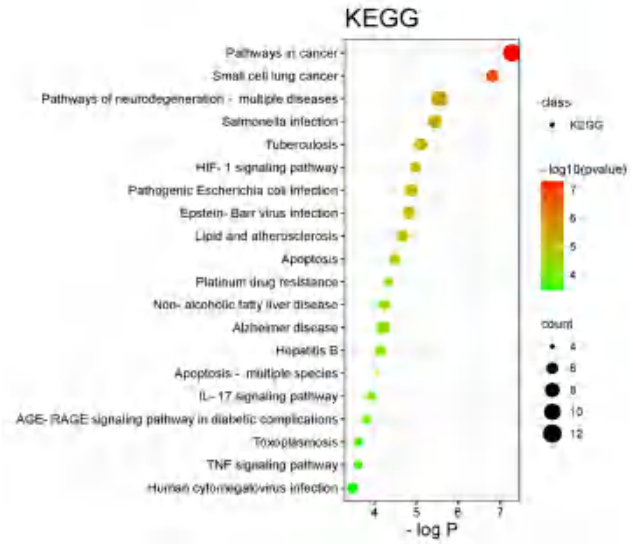


图 4　KEGG 通路富集分析图

Fig 4　Enrichment analysis of KEGG pathway

图 5　3D 细胞的生长状态观察

Fig 5　Observation on the growth state of 3D cell

达状态，且细胞核收缩呈圆形并且部分崩解，边缘较为模糊，呈现凋亡状态（见图 9B）。水提取物组经过 72 h 处理后 DAB 染色程度减弱，由棕褐色转为浅棕色，且被染色的细胞核数量减少，P53 蛋白表达量减少，呈现出弱表达状态，细胞核收缩呈圆形，边缘较为模糊（见图 9C）。其余各处理组相比起对照组，同样出现了 DAB 染色程度减弱，P53 蛋白低表达，细胞核皱缩崩解等凋亡情况的发生（见图 9D ～ G）。各处理组中阳性细胞的 DAB 平均光密度值：对照组为（0.175±0.03），依托泊苷处理组为（0.087±0.04），水提物处理组为（0.099±0.02），30% 醇提物处理组为（0.096±0.03），60% 醇提物处理组为（0.092±0.04），70% 醇提物处理组为（0.093±0.03），90% 醇提物处理组为（0.094±0.04）。各处理组平均光密度值均小于对照组（$P < 0.05$）。

3.7　ELISA 联免疫吸附试剂盒结果评价

肿瘤细胞的凋亡及坏死与 Bax、Caspase-3 的上调，Bcl-2 的表达下调以及 Bcl-2/Bax 的比值相关。Bax 表达量最高的为依托泊苷处理组，其次是 70%、60% 醇提物处理组（$P < 0.05$）（见图 10A）。Bcl-2 表达量最低的是依托泊苷处理组，其次是 70%、60% 醇提物处理组（$P < 0.05$）（见图 10B）。Caspase-3 表达量最高为依托泊苷处理组，其次是 70%、60%、90%、30% 醇提物处理组（$P < 0.05$）

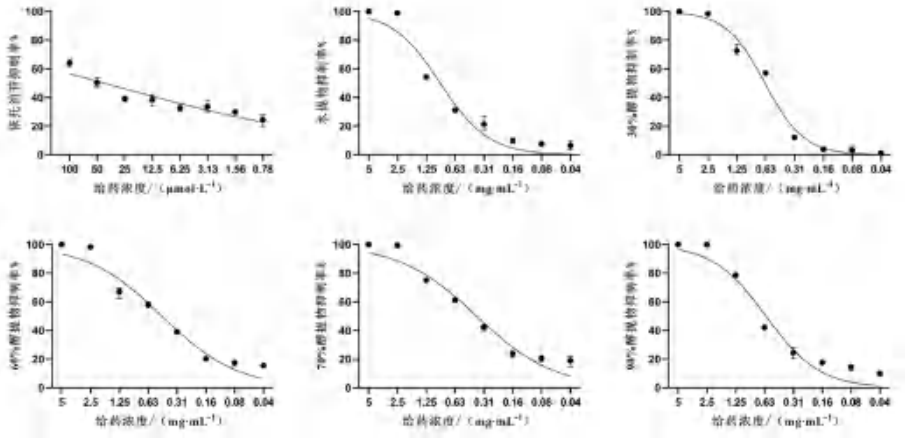


图 6　2D 细胞各组抑制率的量效曲线

Fig 6　Dose effect curve of inhibition rate of 2D cells in different groups

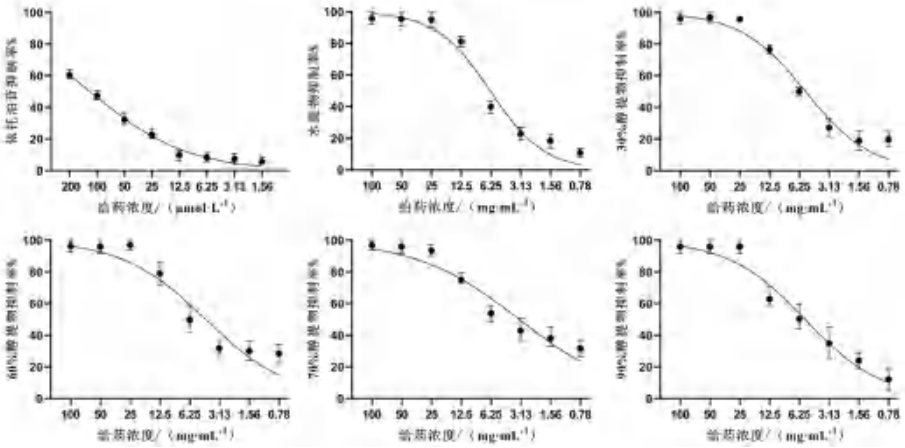


图 7　3D 细胞各组抑制率的量效曲线

Fig 7　Dose effect curve of 3D cells in different groups

（见图 10D）。说明通过 Bax-Bcl-2-Caspase-3 途径，抗凋亡作用最强的是依托泊苷，而 70%、60% 醇提物同样对此信号通路造成影响，70% 醇提物效果更明显。

4　讨论

现阶段的体外细胞培养大多基于 2D 的传统方式，虽然细胞能广泛均匀地分布并获取营养，但其生长环境与体内组织器官的立体结构有本质的区别，无法形成管腔结构、细胞间的信号传递和相互影响的作用也极其微弱，无法良好地模拟细胞在体内的真实情况 [6]。同时，在大量 2D 细胞模型中进行抗肿瘤药物筛选之后，绝大多数所获得的药物敏感度无法在体内实验中获得良好的重现，导致了较高的药物研发失败率 [7]，说明 2D 细胞模型并非可靠的用于预测体内药物疗效和毒性模型。而 3D 细胞的培养方式是一种更贴近人体内细胞生长方式的细胞模型，细胞可以成团簇状增殖，重建类似在体微环境，有实验证明 3D 细胞球在细胞数量监测、活力、形态、增殖、分化、对刺激的反应、肿瘤细胞向周围组织的迁移和侵袭、血管生成刺激和免疫系统逃避、药物代谢、基因表达和蛋白质合成、一般细胞功能等更接近体内真实环境 [8]。本实验发现 3D 细胞球处理组的 IC_{50} 值整体高于 2D 细胞模型处理组，其原因可能是因为 3D 的细胞球体致密生长，相对较小剂量的给药，会被外层细胞阻隔，而对内部细胞产生了保护作用，导致内外部细胞对药物的敏感性不同，这些是 2D 模型无法模拟的。

已有实验证明了威灵仙具有抗艾氏腹水癌、肉瘤 S180（腹水型）、肝癌腹水型（Hep A）[9-13] 等作用，且皂苷类成分是威灵仙的主要药效成分 [14-16]。但目前威灵仙是否具有抗肺癌作用、潜在靶点及机制鲜有报道。因此，本文通过网络药理学，对威灵仙内的化合物及肺癌相关作用靶点进行汇总，采用人源肺癌细胞系 A549 对构建 3D 肺癌模型，研究威灵仙各粗提物的体外药效。结果显示，70% 醇提物具有较高的抑制作用，促细胞凋亡以及崩解程度强于依托泊苷；60% 醇提物

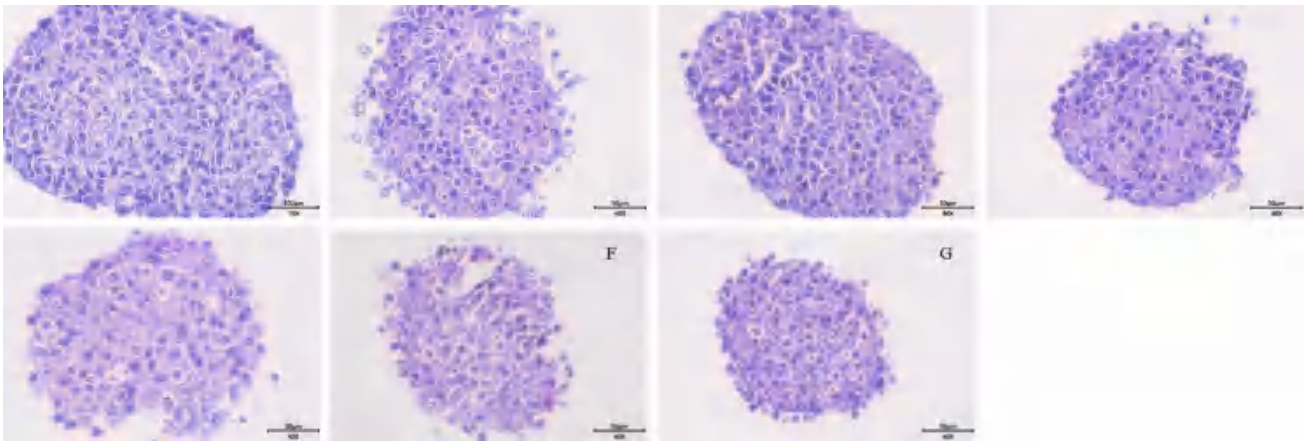


图 8　3D 细胞各组 HE 染色切片图

Fig 8　HE staining of 3D cells in different groups

A. 对照组（control）；B. 依托泊苷处理组（eoposide treated group）；C. 水提物处理组（aqueous extract treated group）；D. 30% 醇提物处理组（30% ethanol extract treated group）；E. 60% 醇提物处理组（60% ethanol extract treated group）；F.70% 醇提物处理组（70% ethanol extract treated group）；G.90% 醇提物处理组（90% ethanol extract treated group）

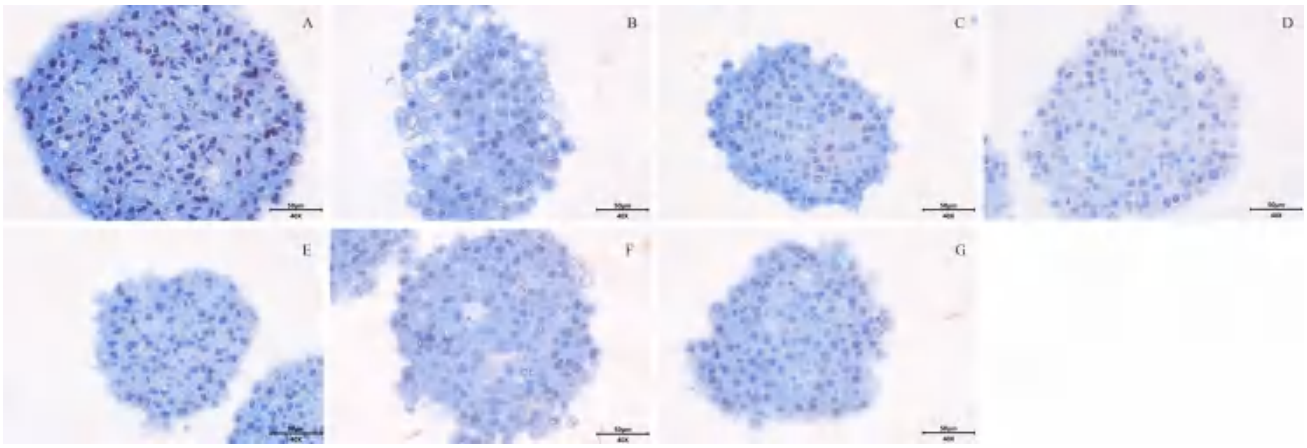


图 9　3D 细胞各组 P53 蛋白免疫组化染色结果

Fig 9　Immunohistochemical staining of P53 proteins in different groups of 3D cells

A. 对照组（control）；B. 依托泊苷处理组（eoposide treated group）；C. 水提物处理组（aqueous extract treated group）；D. 30% 醇提物处理组（30% ethanol extract treated group）；E. 60% 醇提物处理组（60% ethanol extract treated group）；F.70% 醇提物处理组（70% ethanol extract treated group）；G.90% 醇提物处理组（90% ethanol extract treated group）

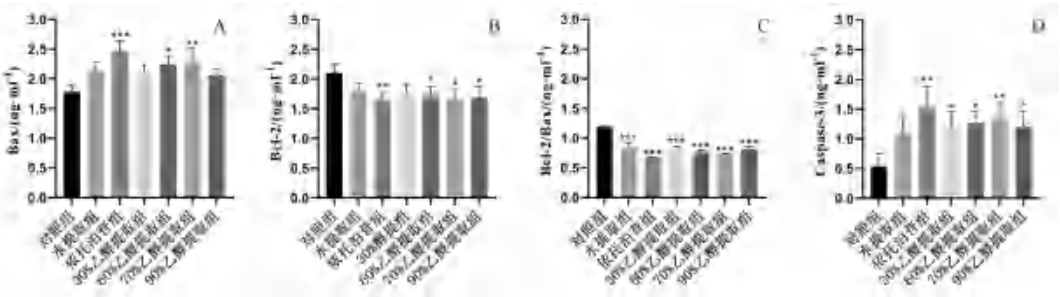


图 10　3D 细胞各组不同蛋白表达量

Fig 10　Protein expressions in different groups of 3D cells

有相近效果。免疫组化结果显示，各给药组都发生了细胞核皱缩以及 P53 蛋白表达降低的情况。在多篇文献报道中[17-22]，依托泊苷作为拓扑异构酶Ⅱ抑制剂，造成 DNA 损伤，进而激活野生型 *P53* 基因的促肿瘤细胞凋亡作用。但并没有明确的文献报道依托泊苷是否对突变型 *P53* 基因有抑制作用。推测 P53 蛋白表达量减少是由于依托泊苷的细胞毒性作用，干扰 DNA 拓扑异构酶Ⅱ的 DNA 断裂重新连接反应进而破坏肿瘤细胞整体结构，导致 P53 蛋白表达量减少。且在威灵仙各组

粗提物的处理下，各组 3D 模型均发生了与经过依托泊苷处理组类似的结果，推测威灵仙可能通过细胞毒性作用对肿瘤细胞造成杀伤。

根据 KEGG 通路富集结果，提示 Bax/Bcl-2/Caspase-3 信号通路与细胞凋亡过程密切相关，Bax 的表达上调会有效抑制 Bcl-2 表达，最后激活 Caspase-3，使染色质凝聚及核酸酶激活，进一步促进细胞凋亡。同时 Bcl-2 过表达时能有效抑制 Bax 和 Caspase-3 的表达，显著抑制细胞凋亡 [23]。ELISA 检测结果显示，70%、60% 醇提物均能引起 Bax 和 Caspase-3 的上调，Bcl-2 的下调，进而引起细胞的凋亡，且 70% 醇提物效果更明显。

综上所述，本研究通过构建人 A549 肺癌 3D 模型，研究了威灵仙不同组分的体外抗肺癌作用，发现其 70% 醇提物的效果最佳，其次为 60% 醇提物。结合网络药理学、免疫组化、ELISA 等方法，发现其抗肺癌的潜在作用机制与 Bax/Bcl-2/Caspase 3 通路相关，即与直接促进肺癌细胞凋亡有关。

参考文献

[1] Chen W，Zheng R，Baade PD，et al. Cancer statistics in China，2015 [J]. CA Cancer J Clin，2016，66（2）：115-132.

[2] Bissell MJ，Hines WC. Why don’t we get more cancer?A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression [J]. Nat Med，2011，17（3）：320-329.

[3] Chaicharoenaudomrung N，Kunhorm P，Noisa P. Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling [J]. World J Stem Cells，2019，11（12）：1065-1083.

[4] 刘包欣子，邹玺，周锦勇，等 . 威灵仙抗肿瘤研究 [J]. 长春中医药大学学报，2012，28（5）：917-919.

[5] Barabási AL，Gulbahce N，Loscalzo J. Network medicine：a network-based approach to human disease [J]. Nat Rev Genet，2011，12（1）：56-68.

[6] Antoni D，Burckel H，Josset E，et al. Three-dimensional cell culture：a breakthrough in vivo [J]. Int J Mol Sci，2015，16（3）：5517-5527.

[7] Hutchinson L，Kirk R. High drug attrition rates——where are we going wrong? [J]. Nat Rev Clin Oncol，2011，8（4）：189-190.

[8] Saleh FA，Genever PG. Turning round：multipotent stromal cells，a three-dimensional revolution? [J]. Cytotherapy，2011，13（8）：903-912.

[9] 曹玲，崔琳琳，孙艳，等 . 威灵仙的药理作用及其机制研究进展 [J]. 药物评价研究，2022，45（11）：2364-2370.

[10] 邱光清，张敏，杨燕军 . 威灵仙总皂甙的抗肿瘤作用 [J]. 中药材，1999，22（7）：351-353.

[11] 赵英，余春粉，张桂英，等 . 威灵仙总皂苷抗肿瘤作用及其对癌细胞增殖周期的影响 [J]. 时珍国医国药，2010，21（8）：1908-1909.

[12] 黄莉，黄纯兰 . 威灵仙总皂苷诱导急性早幼粒细胞白血病细胞株 NB4 分化作用的研究 [J]. 中国中医急症，2012，21（8）：1248-1250.

[13] 陈玉茹，黄纯兰，李晓明 . 威灵仙皂苷对 HL-60 细胞生长抑制作用的研究 [J]. 泸州医学院学报，2011，34（3）：231-234.

[14] 张倩 . 甘肃产威灵仙总皂苷提取工艺及药效学研究 [D]. 兰州：兰州理工大学，2010.

[15] 童敏 . 基于均匀设计威灵仙总皂苷提取工艺的优选 [J]. 湖南中医杂志，2015，31（4）：173，182.

[16] 郝宁，于艳，张漫霞，等 . 威灵仙总皂苷和总黄酮超声提取工艺 [J]. 中药材，2014，37（5）：884-889.

[17] Karpinich NO，Tafani M，Rothman RJ，et al. The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and P53 activation to mitochondrial release of cytochrome c [J]. J Biol Chem，2002，277（19）：16547-16552.

[18] Jamil S，Lam I，Majd M，et al. Etoposide induces cell death via mitochondrial-dependent actions of P53 [J]. Cancer Cell Int，2015，15：79.

[19] Hou J，Wang L，Zhao J，et al. Inhibition of protein PMP22 enhances etoposide-induced cell apoptosis by P53 signaling pathway in gastric cancer [J]. Int J Biol Sci，2021，17（12）：3145-3157.

[20] Sun B，Ross SM，Rowley S，et al. Contribution of ATM and ATR kinase pathways to P53-mediated response in etoposide and methyl methanesulfonate induced DNA damage [J]. Environ Mol Mutagen，2017，58（2）：72-83.

[21] Kwon HK，Shin HJ，Lee JH，et al. Etoposide induces necrosis through P53-mediated antiapoptosis in human kidney proximal tubule cells [J]. Toxicol Sci，2015，148（1）：204-219.

[22] Li Z，Sun B，Clewell RA，et al. Dose-response modeling of etoposide-induced DNA damage response [J]. Toxicol Sci，2014，137（2）：371-384.

[23] 安雨轩，肖宗懿，王小燕，等 . A549 细胞氧糖剥夺 / 恢复模型中焦亡与凋亡的共享信号通路 [J]. 陆军军医大学学报，2022，44（11）：1119-1125.

（收稿日期：2022-12-13；修回日期：2023-03-19）

姜黄素联合盐酸阿霉素的协同抗肿瘤效应及机制研究

陆慧毓[1]，王凤玲[1, 4]，陈云娜[1]，王雷[1, 2, 3]，周婷婷[5*]，陈卫东[1, 2, 3*]（1.安徽中医药大学药学院，合肥 230012；2.省部共建安徽道地中药材品质提升协同创新中心，合肥 230012；3.中药复方安徽省重点实验室，合肥 230012；4.安徽医科大学附属合肥医院，合肥 230012；5. 中国人民解放军海军军医大学药学系，上海 200433）

摘要：目的 探讨姜黄素是否能够与盐酸阿霉素协同诱导 4T1 乳腺癌细胞产生自噬性细胞死亡并促进盐酸阿霉素诱导的细胞凋亡。**方法** 采用小鼠乳腺癌细胞系 4T1 为研究对象，分为对照组（PBS），姜黄素组（10 μmol•L^{-1} 姜黄素），盐酸阿霉素组（10 μmol•L^{-1} 盐酸阿霉素），联合应用组（10 μmol • L^{-1} 姜黄素＋ 10 μmol • L^{-1} 盐酸阿霉素）。通过 CCK-8 法比较不同处理对 4T1 细胞的细胞毒性；采用凋亡检测试剂盒检测不同处理诱导产生的细胞凋亡；通过 CCK-8 法及自噬抑制策略 [各组分别与 3- 甲基腺苷（3MA）共处理] 探究联合应用组是否能够诱导 4T1 细胞产生自噬性细胞死亡；采用免疫荧光法研究不同处理组的自噬相关蛋白（LC3 及 P62）的表达及免疫原性死亡相关蛋白（CRT 及 HMGB1）的表达；采用三磷酸腺苷（ATP）检测试剂盒研究不同处理组 ATP 的释放情况，以评价免疫原性细胞死亡的程度；采用流式细胞仪检测不同处理组肿瘤细胞被骨髓原代巨噬细胞（BMDCs）吞噬摄取的程度以及对 BMDCs 表面 MCH- Ⅱ表达的影响。**结果** CCK-8 结果显示，姜黄素组本身不会产生明显的细胞毒性及诱导细胞凋亡，但与盐酸阿霉素联用后显著增强了盐酸阿霉素的细胞毒性及诱导细胞凋亡水平，经自噬抑制剂 3MA 共孵育后，这种协同效果消失，细胞毒性显著降低；与单独处理组相比，联合应用组的 LC3 表达水平显著上调，P62 表达明显降低；免疫荧光结果显示姜黄素未能诱导免疫原性细胞死亡。与盐酸阿霉素组相比，联合应用组的 CRT 表达及 HMGB1 释放情况并无显著性差异，但 ATP 释放水平显著增加。流式细胞仪结果显示，与盐酸阿霉素组相比，联合应用组的肿瘤细胞能够更多的被 BMDCs 摄取吞噬，同时能够显著增强 BMDCs 表面 MCH- Ⅱ的表达。**结论** 姜黄素与盐酸阿霉素发挥协同抗肿瘤作用的机制与诱导肿瘤细胞产生自噬性细胞死亡，促进死亡肿瘤细胞释放 ATP，增强死亡肿瘤细胞被 BMDCs 吞噬摄取有关。

关键词：抗肿瘤；姜黄素；盐酸阿霉素；自噬性细胞死亡；免疫原性细胞死亡

中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0911-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.012

Synergistic antitumor effect of curcumin combined with doxorubicin hydrochloride on breast cancer cells and related mechanism

LU Hui-yu[1], WANG Feng-ling[1, 4], CHEN Yun-na[1], WANG Lei[1, 2, 3], ZHOU Ting-ting[5*], CHEN Wei-dong[1, 2, 3*] (1. *School of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *Ministry of Education Anhui Joint Collaborative Innovation Center for Quality Improvement of Anhui Genuine Chinese Medicinal Materials*, *Hefei* 230012; 3. *Anhui Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula*, *Hefei* 230012; 4. *Hefei Hospital Affiliated to Anhui Medical University*, *Hefei* 230012; 5. *Department of Pharmacy*, *Navy Military Medical University of People's Liberation Army* , *Shanghai* 200433)

Abstract: Objective To determine whether curcumin synergizes with doxorubicin hydrochloride to induce the death of autophagic cellsand promote doxorubicin hydrochloride-induced apoptosis in 4T1 breast cancer cells. **Methods** The 4T1 mouse breast cancer cell line was used as the study object.

基金项目：国家自然科学基金面上项目（No.82073923）。

作者简介：陆慧毓，女，硕士研究生，主要从事药物新剂型研究与开发，email：506550954@qq.com　*通信作者：周婷婷，女，博士，教授，主要从事药代动力学、药效学研究，email：tingting_zoo@163.com；陈卫东，男，博士，教授，主要从事药物制剂、药代动力学、药效学研究，email：wdchen@ahtcm.edu.cn

The mice were divided into a control group (PBS), a curcumin group (10 μmol • L^{-1} curcumin), a doxorubicin hydrochloride group (10 μmol • L^{-1} doxorubicin hydrochloride), and a combination group (10 μmol • L^{-1} curcumin ＋ 10 μmol • L^{-1} doxorubicin hydrochloride). The cytotoxicity of different treatments to 4T1 cells was compared with CCK-8 assay. Apoptosis induced by different treatments was detected with apoptosis detection kit. CCK-8 assay and autophagy inhibition strategy [co-treatment with 3-methyladenosine (3MA)] were used to determine the induction of autophagic cell death. Immunofluorescence technology was used to study the expression of autophagy-related proteins (LC3 and P62) and immunogenic death-related proteins (CRT and HMGB 1) in different treatment groups. To evaluate the extent of immunogenic cell death, ATP secretion of 4T1 cells in different groups was investigated with the ATP assay kit. The effect of different treatments on the phagocytosis and uptake of the dying tumor cells by bone marrow-derived macrophages (BMDCs) and the effect on MCH-Ⅱ expression of BMDCs were determined by flow cytometry. **Results** CCK-8 showed that curcumin did not obviously induce the cytotoxicity and apoptosis, but the combination of curcumin with doxorubicin hydrochloride significantly enhanced the level of cytotoxicity and cell apoptosis compared with that of doxorubicin hydrochloride alone. After co-incubation with autophagy inhibitor 3MA, the synergistic effect in the combination group disappeared and the cytotoxicity declined. Compared with the control group, the LC3 expression level was significantly increased and the P62 expression was decreased significantly in the combination group. The immunofluorescence showed that curcumin treatment failed to induce the death of immunogenic cells. The CRT expression and HMGB1 release in the doxorubicin hydrochloride group and the combination group were not significantly different, but the level of ATP release was significantly increased in the combined application group. The flow cytometic results showed that the 4T1 cells in the combined application group were engulfed more by BMDCs compared with in the doxorubicin hydrochloride group, and significantly induced more MCH-Ⅱ expression on the surface of BMDCs. **Conclusion** The synergistic effect of curcumin and doxorubicin hydrochloride is related to the induction of apoptosis of autophagic cells, which promotes the release of ATP from dying tumor cells, and enhances the phagocytic uptake of dying tumor cells by BMDCs.

Key words: antitumor; curcumin; doxorubicin hydrochloride; autophagic cell death; immunogenic cell death

乳腺癌是女性群体中常见的肿瘤，具有预后差，恶性程度高，器官转移能力强的特点[1]。目前临床针对乳腺癌的治疗手段以手术切除、放化疗为主。但残留的病灶及肿瘤细胞引起的肿瘤转移及复发是目前乳腺癌患者死亡的主要原因[2]。大量的研究已经证实，某些特定的化疗药物，例如盐酸阿霉素、奥沙利铂可以通过诱导肿瘤细胞发生免疫原性死亡，刺激肿瘤内免疫细胞浸润，从而产生长期抗肿瘤效应抑制肿瘤复发及转移[3-4]。但死亡肿瘤细胞在肿瘤微环境内的免疫原性通常较弱，释放的免疫刺激因子不足以激活机体免疫，从而限制了目前免疫化疗药物的临床疗效[5]。

化疗药物诱导肿瘤细胞发生免疫原性细胞死亡并激活免疫反应的过程高度依赖于自噬的参与，死亡肿瘤细胞中的自噬过程能够促进内源性抗原的释放[6]；除此之外，自噬还有助于死亡肿瘤细胞分泌三磷酸腺苷（ATP）[7]。死亡肿瘤细胞释放的 ATP 能够作为树突状细胞（DC）的“发现我”信号，促进 DC 对抗原及死亡肿瘤细胞的吞噬摄取。因此，自噬激活在维持抗肿瘤免疫反应方面发挥至关重要的作用。然而，自噬的激活在抗肿瘤过程中并不总是发挥有益的作用。大量的研究证实，当肿瘤细胞面对化学药物治疗或其他治疗时，能够通过启动自噬起到一定的自我保护作用[8-10]。自噬是一把双刃剑，当自噬水平轻度激活时能够作为细胞保护机制，通过清除受损细胞组分帮助肿瘤细胞抵抗药物治疗[11]。然而，当自噬被过度激活时，“过度激活的自噬”会失去其原有的细胞保护作用，通过

触发自噬性细胞死亡促进肿瘤细胞死亡[12-13]。但化疗药物诱导产生的均是自我保护性自噬，而不是自噬性细胞死亡[14]。

因此，采取联合用药的策略可能能够将化疗药物诱导产生的自噬水平进一步放大并诱导自噬性细胞死亡，这不仅会导致更强的肿瘤杀伤效果，而且能通过促进死亡细胞被 DC 的吞噬摄取过程增强抗肿瘤免疫的激活。随着越来越多的中药活性成分表现出了较好的直接或辅助抗肿瘤的作用，化疗药物与中药活性成分的组合应用逐渐成为研究热点[15]。姜黄素作为植物姜黄中的多酚类物质，已被证明具有显著的自噬诱导作用[16-17]。考虑到自噬在促进抗肿瘤免疫激活及肿瘤细胞死亡的作用，本研究将以 4T1 乳腺癌细胞为研究对象，盐酸阿霉素为模型化疗药物，探讨盐酸阿霉素与姜黄素联用时是否能够通过过度激活肿瘤细胞自噬水平产生一定的协同抗肿瘤作用。

1　材料

1.1　仪器

激光共聚焦显微镜（奥林巴斯 FV 3000）；荧光酶标仪（SpectraMAX iD5）；流式细胞仪（FACSCAlibur）；低温离心机（湖南湘仪公司）；恒温二氧化碳培养箱（Healforce-HF180）。

1.2　试药

姜黄素（纯度：98%，MCE 公司）；盐酸阿霉素（纯度：98%，上海源叶生物科技有限公司）；RPMI 1640 培养基（Sparkjade 公司）；胎牛血清（Gibco 公司）；青霉素 - 链霉素溶液、0.25% 胰酶细胞消化液、MTT（Biosharp 生物科技公司）；LC3 抗体（R381544）、P62 抗体（R25788）、CRT 抗体（220189）、HMGB1 抗体（R380710）（成都正能生物科技有限公司）；ATP 检测试剂盒（S0026，碧云天生物科技有限公司）；Annexin/PI 细胞凋亡检测试剂盒（BB-4101，贝博生物）；Cd11c、MCH-Ⅱ流式抗体（联科生物）。

1.3　细胞

小鼠乳腺癌 4T1 细胞系购自中国科学院上海细胞所，使用 RPMI 1640 完全培养基（含有 5% 血清及 1% 青霉素 - 链霉素）进行培养。

2　方法与结果

2.1　CCK-8 实验

为了测定不同处理对 4T1 细胞的毒性，将 4T1 细胞以 5000 个 / 孔的密度铺板至 96 孔板内（100 μL），培养 12 h 待细胞完全贴壁后分别加入新鲜配制的药物 [对照组（PBS），姜黄素组（10 μmol • L^{-1} 姜黄素），盐酸阿霉素组（10 μmol • L^{-1} 盐酸阿霉素），联合应用组（10 μmol • L^{-1} 姜黄素＋10 μmol • L^{-1} 盐酸阿霉素）]，同时预留空白孔（不含细胞）和对照孔（含细胞不加药）。每组均设立 5 个复孔，置于 37 ℃的含有 5%CO_2 的培养箱中继续培养 24 h。后将含药培养基吸出，加入 90 μL 新鲜的 RPMI 1640 培养基与 10 μL CCK-8，于 37 ℃孵育 1 ～ 2 h 后使用酶标仪测定每孔在 450 nm 的吸光度值并计算细胞存活率。

为了测定不同处理诱导产生的细胞凋亡，将 4T1 细胞铺板至培养皿中静置培养 12 h，待细胞完全贴壁后按照 CCK-8 实验中的药物浓度进行给药并处理 24 h，随后用不含 EDTA 的胰酶收集细胞，细胞经离心洗涤之后按照试剂盒说明书进行 Annexin/PI 双染，通过流式细胞仪检测细胞凋亡水平。在自噬抑制剂 3MA 干预实验时，共孵育使用的 3MA 使用浓度为 5 μmol • L^{-1}，其他实验条件保持一致（每管样品采集细胞数目至少为 10 000 个细胞）。如图 1A 所示，与化疗药物盐酸阿霉素诱导产生的显著的细胞毒性相比，姜黄素本身未能诱导产生明显的毒性。而与盐酸阿霉素组相比，联合应用组诱导产生了显著增强的细胞毒性（$P < 0.001$）。盐酸阿霉素组在与 3MA 共孵育之后，细胞毒性显著增加（$P < 0.01$）。与盐酸阿霉素组不同，联合应用组在与 3MA 共孵育之后，协同作用消失，细胞毒性显著降低（$P < 0.01$）。与细胞毒性的结果类似，联合应用组诱导产生了最为明显的细胞凋亡水平，盐酸阿霉素组次之（见图 2B）。盐酸阿霉素组在与 3MA 共孵育之后，细胞凋亡水平增加。而联合应用组在与 3MA 共孵育之后，细胞凋亡水平降低，这些结果提示：盐酸阿霉素处理细胞诱导产生了自我保护性自噬，而与姜黄素组合处理能够将自我保护性自噬转变为促细胞死亡性自噬，即自噬性细胞死亡。

2.2　免疫荧光染色

为了研究不同处理组诱导产生的细胞自噬水平及免疫原性细胞死亡水平，将 4T1 细胞铺板至预先放置细胞爬片的 24 孔板中静置培养 12 h，待细胞完全贴壁后分别加入新鲜配制的药物 [对照组（PBS），姜黄素组（10 μmol • L^{-1} 姜黄素），盐酸阿霉素组（10 μmol • L^{-1} 盐酸阿霉素），联合应用组（10 μmol • L^{-1} 姜黄素＋10 μmol • L^{-1} 盐酸阿霉素）] 处理 24 h，随后将细胞用 4% 多聚甲醛固定，经 PBS 洗涤之后使用 Triton-100 对细胞进行通透，随后使用 PBS 清洗 3 遍。使用山

羊血清对爬片进行封闭（37 ℃，1 h），将爬片上的山羊血清吸去后直接与对应的一抗孵育（anti-LC3，anti-p62，anti-CRT，anti-HMGB1），在 4 ℃下孵育 12 h 后用 PBS 清洗 3 遍，再与对应的荧光标记二抗孵育（37 ℃，1 h），用 PBS 清洗爬片 3 次，DAPI 复染细胞核。经 PBS 清洗及抗荧光淬灭封片剂封片后使用激光共聚焦进行拍照。LC3 蛋白参与自噬激活过程，而 p62 蛋白是需要自噬进行降解的底物蛋白；LC3 表达上调的同时伴随 p62 表达水平的下降代表自噬通量增加。结果见图 2，与对照组相比，姜黄素处理组及盐酸阿霉素处理组均能上调 4T1 细胞内 LC3 蛋白的表达（$P < 0.001$），同时促进 p62 蛋白的降解。与姜黄素处理组及盐酸阿霉素处理组相比，联合应用组能够更为显著的促进 LC3 蛋白表达及平 p62 降解水平（$P < 0.01$），进一步提示了姜黄素与盐酸阿霉素联用能够通过过度激活 4T1 细胞内自噬水平促进其细胞凋亡。

2.3　ATP 分泌测定

为了测定不同处理对 4T1 细胞释放 ATP 的影响，将 4T1 细胞以 5000 个 / 孔的密度铺板至 96 孔板内（100 μL），静置培养 12 h 待细胞完全贴壁后分别加入新鲜配制的药物 [对照组（PBS），姜黄素组（10 μmol • L^{-1} 姜黄素），盐酸阿霉素组（10 μmol • L^{-1} 盐酸阿霉素），联合应用组（10 μmol•L^{-1} 姜黄素＋ 10 μmol•L^{-1} 盐酸阿霉素）]，经 24 h 孵育后收集细胞培养上清液并按照 ATP 含量测定试剂盒说明书测定上清液中的 ATP 含量。CRT 蛋白在细胞膜上的表达、HMGB1 蛋白从细胞核内的释放以及 ATP 分泌增加均是免疫原性细胞死亡的代表性事件。结果见图 3，与对照组相比，姜黄素组未能诱导 CRT 在细胞膜上的表达以及 HMGB1 从细胞核内的释放。与之形成明显对比的是，盐酸阿霉素处理与联合应用组均能诱导产生显著的 CRT 表达以及核内 HMGB1 蛋白的释放（$P < 0.001$），但两组之间差异并无统计学意义，提示姜黄素并不能影响盐酸阿霉素诱导的 CRT 暴露及 HMGB1 释放的过程。细胞外 ATP 含量测定结果显示，与盐酸阿霉素组相比，联合应用组的 ATP 释放水平显著增加（$P < 0.05$）。

2.4　BMDCs 吞噬肿瘤细胞能力及表面 MCH-Ⅱ表达情况

根据文献中方法从 Balb/c 小鼠腿骨中提取分化 BMDCs[18]。将 4T1 细胞铺板至预先放置细胞爬片的 24 孔板中静置培养 12 h，待细胞完全贴壁后分别加入新鲜配制的药物 [对照组（PBS），姜黄素组（10 μmol • L^{-1} 姜黄素），盐酸阿霉素组（10 μmol • L^{-1} 盐酸阿霉素），联合应用组（10 μmol • L^{-1} 姜黄素 ＋ 10 μmol • L^{-1} 盐酸阿霉素）] 处理 24 h。使用胰酶小心地收集细胞并用细胞示踪探针 CFDA-SE 对 4T1 细胞进行荧光标记。经过离心洗涤后将一定数目的 4T1 细胞铺板至预先接种了 BMDCs 的孔板中，并置于 37 ℃培养箱继续孵育 24 h。收集孔板内的所有细胞，经过 CD11c 或 MCH-Ⅱ流式抗体染色后迅速用流式细胞仪进行检测。死亡肿瘤细胞释放的 ATP 能够作为“发现我”信号，促进树突状细胞对死亡肿瘤细胞的吞噬及处理，进而增强 T 细胞的激活及肿瘤内浸润。联合应用组能够显著增强死亡肿瘤细胞的 ATP 释放过程，因此我们检测了不同处理后的肿瘤细胞被 BMDCs 吞噬摄取的程度差异（见图 4A）。如图 4B 所示，与盐酸阿霉素组相比，联合应用组的 4T1 细胞被 BMDCs 吞噬的程度更高，提示联合应用组中更高的 ATP 释放水平有利于 BMDCs 对死亡肿瘤细胞的吞噬清除。BMDCs 在吞噬摄取肿瘤细胞后会将肿瘤相关抗原与 MCH-Ⅱ分子组装并进行呈递，以激活抗原特异性 T 细胞应答。因此，为了研究联合应用组增强的 BMDCs 吞噬是否会影响 MCH 分子在 BMDCs 细胞膜上的表达，我们进一步检测了共孵育后的 BMDCs 的 MCH-Ⅱ的表达情况。结果如图 4C 所示，与盐酸阿霉素组相比，联合应用组表现出显著增强的 MCH-Ⅱ表达，而姜黄素处理对 MCH-Ⅱ的表达并没有显著影响。

2.5　统计学分析

使用 Origin 和 SPSS 23.0 软件进行统计分析。采用双样本 t 检验分析两组之间的差异，$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3　讨论

以盐酸阿霉素为代表的蒽环类化疗药物是目前临床用于治疗乳腺癌以及其他癌症的常用药物，其能够嵌入肿瘤细胞的 DNA 使肿瘤细胞的 DNA 复制过程受阻进而诱导细胞凋亡及免疫原性细胞死亡。发生免疫原性死亡的肿瘤细胞能够释放一系列具有免疫刺激性的损伤相关分子（例如 CRT、HMGB1 及 ATP），从而有效地刺激肿瘤内免疫细胞的浸润，杀死残留的肿瘤细胞 [19]。但是，肿瘤细胞内普遍存在自我保护机制，会降低化疗药物产生的杀伤效果，进而导致临床疗效不佳。

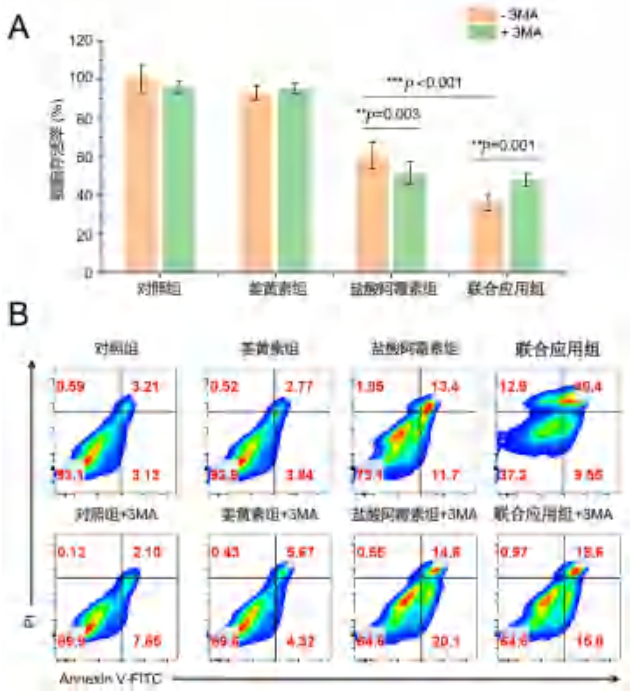


图 1　不同处理组诱导产生的细胞毒性（A）以及细胞凋亡（B）

Fig 1　Cytotoxicity（A）and cell apoptosis（B）induced by different treatments

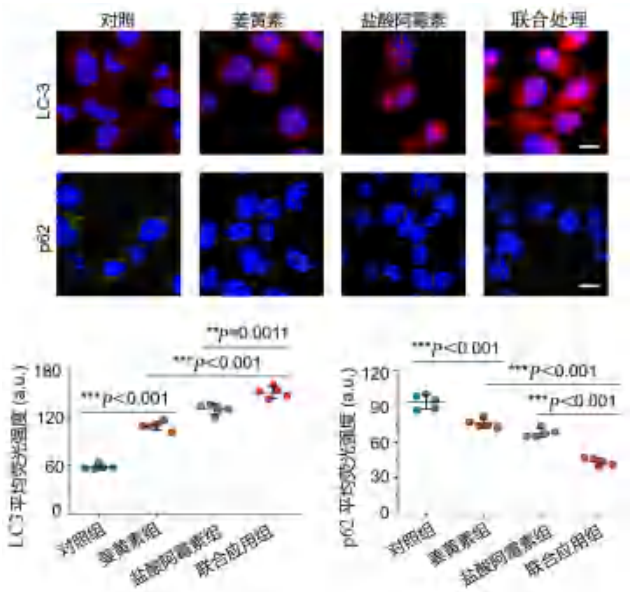


图 2　不同处理组的自噬相关蛋白 LC3 及 p62 的表达情况（标尺：10 μm）

Fig 2　Expression of autophagy-related proteins LC3 and p62（scale bar：10 μm）

细胞自噬是真核细胞内普遍存在的一种自我保护机制，自噬启动时细胞能够将受损或衰老的细胞器或蛋白用双层膜结构包裹并与溶酶体融合进行降解，产生营养小分子供细胞重复利用[20]。大多数化疗药物均可诱导肿瘤细胞产生自我保护性自噬，自噬水平的增加能够显著提升肿瘤细胞对药物的耐药性[8]。基于此机制，目前已有研究表明化疗药物

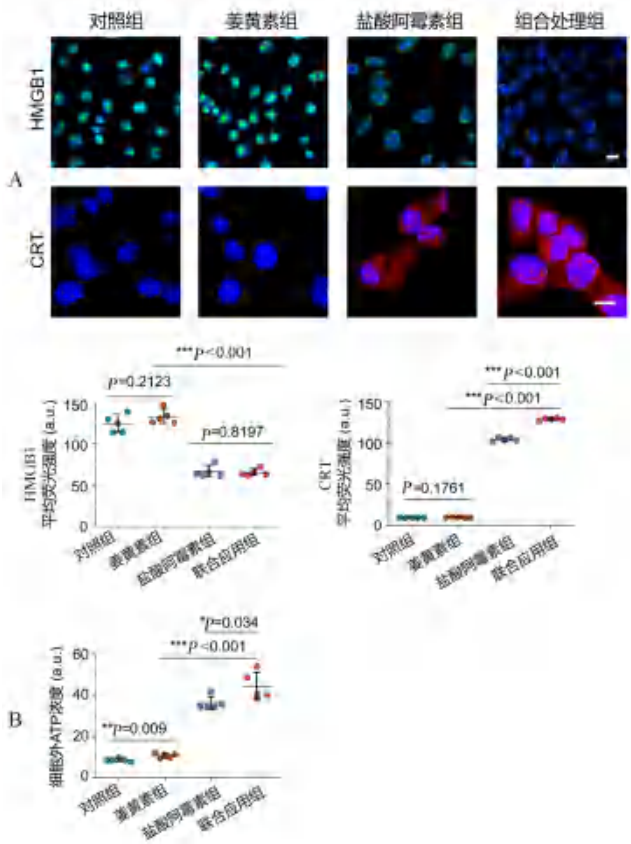


图 3　不同处理组诱导产生的 4T1 细胞的免疫原性细胞死亡

Fig 3　Immunogenic cell death of 4T1 cells in different treatment groups

A. 细胞核内 HMGB1 及细胞膜 CRT 蛋白的免疫荧光染色结果（Immunofluorescence staining of intranuclear HMGB 1 and CRT proteins）；B. 4T1 细胞分泌的 ATP 含量（标尺：10 μm）[ATP secretion of 4T1 cells after different treatments（scale bar，10 μm）]。

与自噬抑制剂（例如磷酸氯喹和 3MA）联合应用能够表现出更强的细胞毒性[21]。但死亡肿瘤细胞释放 ATP 的过程高度依赖自噬过程[7]。因此，自噬抑制策略在体内应用时会降低死亡肿瘤细胞的免疫刺激性，这会显著影响抗肿瘤免疫的激活效果。因此，目前仍迫切需要一些毒副作用较低的新型抗肿瘤药物以干预肿瘤细胞自我保护性自噬，降低肿瘤细胞的耐药性，促进化疗药物的有效性。

近年来研究发现植物姜黄中的活性成分姜黄素具有明显的自噬诱导作用[16]；此外其与多种化疗药物联用时都表现出了一定的协同抗肿瘤效果，但较少有研究阐明姜黄素与化疗药物联用对肿瘤细胞自噬及免疫原性的影响。因此，本研究旨在探讨姜黄素与盐酸阿霉素的联合应用协同抗肿瘤的作用机制（见图 5）。

本文研究结果表明，与姜黄素或盐酸阿霉素单独应用相比，两者联用能够更为显著地抑制 4T1 乳腺癌细胞的活性，同时诱导更高水平的细胞凋亡。自噬抑制剂 3MA 共同处理后，盐酸阿

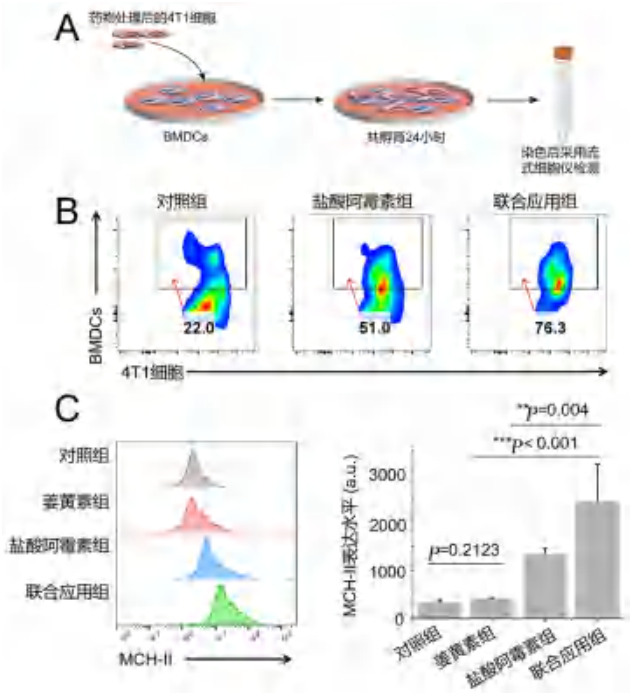


图 4　姜黄素与盐酸阿霉素联合应用对 BMDCs 吞噬死亡肿瘤细胞及 BMDC 表面 MCH- Ⅱ表达的影响

Fig 4　Effect of combination of curcumin and doxorubicin hydrochloride on the phagocytosis of dying tumor cells by BMDCs and the expression of MCH- Ⅱ on the surface of BMDCs

A.BMDCs 吞噬和 MCH- Ⅱ表达的实验方案（experiment protocol for the BMDCs phagocytosis and MCH- Ⅱ expression）；B. 4T1 细胞被 BMDCs 吞噬的流式结果图（flow cytometly of 4T1 cells engulfed by BMDCs）；C. BMDCs 表面的 MCH- Ⅱ的表达情况（expression of MCH- Ⅱ on the surface of BMDCs）

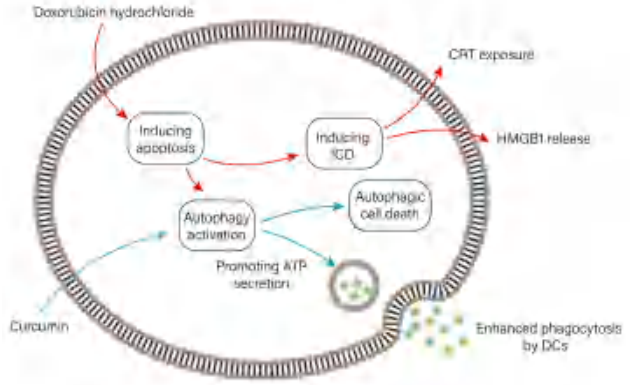


图 5　姜黄素联合盐酸阿霉素对 4T1 乳腺癌细胞的协同抗肿瘤作用机制

Fig 5　Illustration of the synergistic antitumor effect of the combination of curcumin and doxorubicin hydrochloride on 4T1 breast cancer cells

霉素组的细胞毒性显著增加，而联合应用组的细胞毒性显著降低，这一结果提示化疗药物能够诱导肿瘤细胞产生自我保护性自噬，而与姜黄素联用后可以将自噬的角色由“促细胞生存”转变为“促细胞死亡”。免疫荧光的结果也显示联合应用组能够诱导更高水平的自噬，进一步显示了联合应用能够通过促进肿瘤细胞自噬诱导增强的细胞死亡。虽然姜黄素不会影响盐酸阿霉素诱导产生的 CRT 暴露及 HMGB1 释放水平，但可通过增强自噬水平显著促进死亡肿瘤细胞分泌 ATP 的能力。将处理后的肿瘤细胞与 BMDCs 共孵育后发现，与盐酸阿霉素处理组相比，联合应用组更为显著地促进了树突状细胞对死亡肿瘤细胞的吞噬摄取以及 MCH- Ⅱ的表达。

综上所述，姜黄素与化疗药物在体内协同抗肿瘤的作用可能与诱导产生的自噬性细胞死亡及更强的树突状细胞摄取及抗原提呈有关。本文研究结果提示将传统的化疗药物与具有自噬诱导作用的中药单体联合应用以过度激活肿瘤细胞的自噬水平将是一种新的肿瘤治疗策略。

参考文献

[1] Anastasiadi Z，Lianos GD，Ignatiadou E，et al. Breast cancer in young women：an overview [J]. Updates Surg，2017，69（3）：313-317.

[2] Wang Y，Ye F，Liang Y，et al. Breast cancer brain metastasis：insight into molecular mechanisms and therapeutic strategies [J]. Br J Cancer，2021，125（8）：1056-1067.

[3] Feng B，Zhou F，Hou B，et al. Binary cooperative prodrug nanoparticles improve immunotherapy by synergistically modulating immune tumor microenvironment [J]. Adv Mater，2018，30（38）：e1803001.

[4] Zhou F，Feng B，Yu H，et al. Tumor microenvironment-activatable prodrug vesicles for nanoenabled cancer chemoimmunotherapy combining immunogenic cell death induction and CD47 blockade [J]. Adv Mater，2019，31（14）：e1805888.

[5] Mehta AK，Kadel S，Townsend MG，et al. Macrophage biology and mechanisms of immune suppression in breast cancer [J]. Front Immunol，2021，12：643771.

[6] Zhong Z，Sanchez-Lopez E，Karin M. Autophagy，inflammation，and immunity：a troika governing cancer and its treatment [J]. Cell，2016，166（2）：288-298.

[7] Ma Y，Galluzzi L，Zitvogel L，et al. Autophagy and cellular immune responses [J]. Immunity，2013，39（2）：211-227.

[8] Wang X，Li Y，Lu J，et al. Engineering nanoplatform for combined cancer therapeutics via complementary autophagy inhibition [J]. Int J Mol Sci，2022，23（2）：657.

[9] Zhou L，Huo M，Qian X，et al. Autophagy blockade synergistically enhances nanosonosensitizer-enabled sonodynamic cancer nanotherapeutics [J]. J Nanobiotechnology，2021，19（1）：112.

[10] Wolpin BM，Rubinson DA，Wang X，et al. Phase Ⅱ and pharmacodynamic study of autophagy inhibition using hydroxychloroquine in patients with metastatic pancreatic

adenocarcinoma [J]. Oncologist，2014，19（6）：637-638.
[11] Li YJ，Lei YH，Yao N，et al. Autophagy and multidrug resistance in cancer [J]. Chin J Cancer，2017，36（1）：52.
[12] Zhang Y，Zhang L，Gao J，et al. Pro-death or pro-survival：contrasting paradigms on nanomaterial-induced autophagy and exploitations for cancer therapy [J]. Acc Chem Res，2019，52（11）：3164-3176.
[13] Nikoletopoulou V，Markaki M，Palikaras K，et al. Crosstalk between apoptosis，necrosis and autophagy [J]. Biochim Biophys Acta，2013，1833（12）：3448-3459.
[14] Chen C，Lu L，Yan S，et al. Autophagy and doxorubicin resistance in cancer [J]. Anticancer Drugs，2018，29（1）：1-9.
[15] Qi F，Zhao L，Zhou A，et al. The advantages of using traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy in the whole course of cancer treatment instead of only terminal stage of cancer [J]. Biosci Trends，2015，9（1）：16-34.
[16] Li X，Zhu R，Jiang H，et al. Autophagy enhanced by curcumin ameliorates inflammation in atherogenesis via the TFEB-P300-BRD4 axis [J]. Acta Pharm Sin B，2022，12（5）：2280-2299.
[17] Di Tu Q，Jin J，Hu X，et al. Curcumin improves the renal autophagy in rat experimental membranous nephropathy via regulating the PI3K/AKT/mTOR and Nrf2/HO-1 signaling pathways [J]. Biomed Res Int，2020，2020：7069052.
[18] Helft J，Böttcher J，Chakravarty P，et al. GM-CSF mouse bone marrow cultures comprise a heterogeneous population of CD11c（＋）MHCII（＋）macrophages and dendritic cells [J]. Immunity，2015，42（6）：1197-1211.
[19] Zhou J，Wang G，Chen Y，et al. Immunogenic cell death in cancer therapy：present and emerging inducers [J]. J Cell Mol Med，2019，23（8）：4854-4865.
[20] Mizushima N，Komatsu M. Autophagy：renovation of cells and tissues [J]. Cell，2011，147（4）：728-741.
[21] Mauthe M，Orhon I，Rocchi C，et al. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion [J]. Autophagy，2018，14（8）：1435-1455.

（收稿日期：2022-10-02；修回日期：2022-12-08）

新型吖啶二酮类 GPR40 激动剂的结构优化和抗 2 型糖尿病的活性研究

巨世杰[1, 2]，魏朝[2]，郭凯蕾[1]，李琦[3]，梁佳龙[4]，马丽莎[2]，张东旭[2]，卫培峰[1*]，刘雪英[2*]（1. 陕西中医药大学药学院，陕西　咸阳　712046；2. 空军军医大学药学系药物化学与药物分析教研室，西安　710032；3. 河南大学生命科学学院，河南　开封　475004；4. 中国人民解放军陆军第九四六医院医疗保障中心，新疆　伊宁　835000）

摘要：目的　以 ADD-16 为先导化合物进行结构优化，总结构效关系，设计合成新型吖啶二酮类抗 2 型糖尿病药物。**方法**　采用生物电子等排体、同系物原则对 ADD-16 进行结构衍生化设计合成。利用糖刺激的胰岛素分泌实验（GSIS）评估目标化合物对 MIN6 细胞胰岛素分泌的影响。通过分子对接考察衍生物与 GPR40 的结合模式。**结果**　共设计合成 8 个新型 ADD-16 衍生物，体外活性筛选发现化合物 ADD-20 的活性显著优于 ADD-16，其刺激胰岛素分泌的能力更强。此外，在 3 μmol • L^{-1} 时，ADD-18、ADD-20 与 ADD-24 的活性显著优于 ADD-16，在 10 μmol • L^{-1} 时，ADD-20 与 ADD-21 活性显著优于 ADD-16，其他化合物在同等浓度下活性无显著差别。分子对接发现化合物 ADD-20 结合作用模式与 TAK-875 极其相似，ADD-20 结构中的羧基与 ARG-183 和 ARG-2258 的关键氨基酸残基之间形成氢键相互作用。**结论**　设计合成的新型 ADD-16 衍生物 ADD-20 具有更强的糖促胰岛素分泌能力，构效关系发现吖啶二酮 3，6 位氢由二甲基取代、苯甲酸上羧基在间位、1 位苯环 5 位上有取代基且为给电子基时可提高化合物活性，为进一步研究奠定了基础。

关键词：吖啶二酮；抗 2 型糖尿病；结构优化；胰岛素分泌；分子对接
中图分类号：R914，R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0917-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.013

基金项目：陕西省手性药物工程技术研究中心（No. 陕科计发 [2011]251）。
作者简介：巨世杰，男，硕士，主要从事计算机辅助药物设计、药物结构优化及合成研究，email：1782896249@qq.com　*通信作者：刘雪英，女，博士，副教授，主要从事基于靶标的药物设计合成与活性研究及药物代谢动力学研究，email：xyliu047@163.com；卫培峰，男，博士，教授，主要从事中药药性与新药临床研究，email：weipeifeng@163.com

Structural optimization and anti-type 2 diabetes activity of novel acridinedione GPR40 agonists

JU Shi-jie[1, 2], WEI Zhao[2], GUO Kai-lei[1], LI Qi[3], LIANG Jia-long[4], MA Li-sha[2], ZHANG Dong-xu[2], WEI Pei-feng[1*], LIU Xue-ying[2*] (1. *Department of Pharmacy*, *Shaanxi University of Chinese Medicine*, *Xianyang Shaanxi* 712046; 2. *Department of Medicinal Chemistry*, *School of Pharmacy*, *Air Force Medical University*, *Xi'an* 710032; 3. *School of Life Sciences*, *Henan University*, *Kaifeng Henan* 475004; 4. *No.* 946 *Hospital of the People's Liberation Army Ground Force*, *Yining Xingjiang* 835000)

Abstract: Objective To design and synthesize drugs with better anti-type 2 diabetes activity based on the ADD-16 acridinedione backbone. **Methods** Combination of bioelectronic isomers and homologue principles were used to synthesize ADD-16 acridinedione skeleton, synthesis by structural derivatization. The effect of the target compounds on insulin secretion in MIN6 cells was assessed with glucose-stimulated insulin secretion assay (GSIS). The binding mode of GPR40 to the derivatives was determined by molecular docking. **Results** Totally 8 new acridinedione derivatives were designed and synthesized, and in vitro activity screening revealed that ADD-20 was more active than ADD-16 and had a greater ability to stimulate insulin secretion. In addition, ADD-18, ADD-20 and ADD-24 activities were significantly better than ADD-16 at 3 μmol • L^{-1}, activities of ADD-20 and ADD-21 were significantly better than ADD-16 at 10 μmol • L^{-1}; other compounds showed essentially no obvious difference in activity at the same concentration. Molecular docking revealed that the binding mode of action of ADD-20 was very similar to that of TAK-875, with the carboxyl group in the ADD-20 structure forming a hydrogen bond interaction with the key amino acid residue of ARG-183 and ARG-2258. **Conclusion** Design and synthesis of a novel ADD-16 derivative, namely ADD-20, with enhanced glucagon secretory capacity are accomplished. The structure-effect relationship reveals that the activity of acridinedione is improved when hydrogen at 3, 6 position is substituted by dimethyl, the carboxyl group on benzoic acid is in the interposition, and the substituent at the 5-position of the benzene ring at 1 position is an electron donor group, laying the foundation for further study.

Key words: acridinedione; anti-type 2 diabetes; structural optimization; insulin secretion; molecular docking

据国际糖尿病联盟（IDF）数据，2021 年全球 20 ～ 79 岁的成年人中约有 5.37 亿人患有糖尿病，中国糖尿病患者已达到 1.4 亿，约占全球糖尿病人总数的 1/4[1]，其中 2 型糖尿病（T2DM）占糖尿病病例总数的 90%。T2DM 是一种慢性和进行性疾病，胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能障碍是其主要病因 [2]，而胰岛素抵抗导致的高血糖将带来一系列并发症的风险，如心血管系统疾病、糖尿病、肾病、糖尿病足和失明等 [3]。降血糖药物需要终身服用，但现有药物存在各种不良反应，多数会导致低血糖，甚至产生严重不良反应，半衰期短也是其一大弊端。理想的降糖药物应该靶点明确、安全性高、半衰期长、无低血糖反应 [4-6]。

GPR40 受体为抗 2 型糖尿病新型靶点，是 G 蛋白偶联受体家族成员之一，主要分布于胰岛 β 细胞、肠道 K 和 L 细胞 [7-8]，是脂肪酸特异性受体。研究发现，GPR40 介导的胰岛素分泌具有葡萄糖依赖性，无低血糖风险 [9]。同时，GPR40 介导肠促胰岛素（GLP-1 和 GIP）的分泌且 GPR40 组织分布集中。基于这种特性，开发以 GPR40 为靶点的相关药物，也成为了近年来的研究热点。

课题组前期以 GPR40 为靶标，通过计算机辅助药物设计（CADD）和体内外活性评价、毒性评价及药代动力学研究，筛选得到了具有吖啶二酮新型骨架的 GPR40 激动剂 ADD-16[10]，ADD-16 与 GPR40 的相互作用关系如图 1 所示，研究发现，

ADD-16 头部苯甲酸中羧基与 ARG-183、ARG-2258 关键氨基酸结合形成氢键相互作用，为活性必须基团，且羧基位置改变可能影响其活性大小，中间苯环 5 位上为吸电子基时与部分氨基酸 LEU-138 有 p-π 共轭相互作用，推测取代基类型不同时，将影响其活性大小，ADD-16 尾部虽然在活性口袋之外，但对 ADD-16 与 GPR40 结合的牢固程度有影响，因此，需探究 3，6 位 R_1 = CH_3 或 H 时对其活性大小的影响。基于此，本研究针对以上 3 个关键位置，以 ADD-16 为先导化合物（如图 2 所示，R_1 = CH_3，R_2 = Br，R_3 = 4-COOH），进行衍生化合成，初步探究其构效关系，以期得到活性更好的抗 2 型糖尿病候选药物，为发现 Me-better 药物奠定基础。

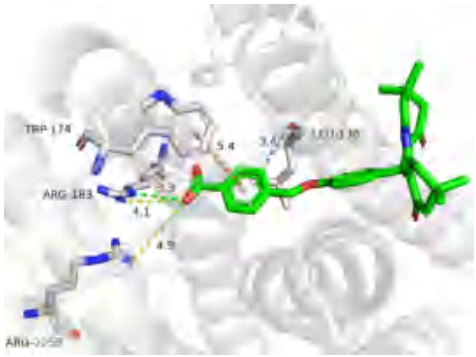


图 1　ADD-16 与 GPR40 的相互作用关系

Fig 1　Interaction of ADD-16 and GPR40

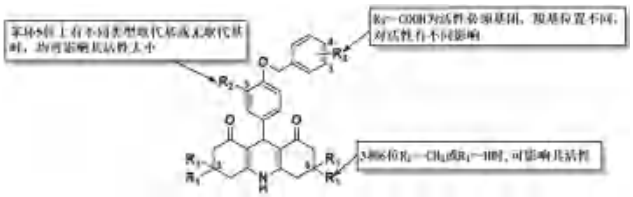


图 2　ADD-16 构效关系研究

Fig 2　Structure-activity relationship of ADD-16

1　材料

1.1　仪器与试药

核磁共振波谱仪（德国 Bruker 公司）；多功能酶标仪（美国 Molecular Devices 公司）；所有试剂和溶剂均为化学纯（安耐吉化学试剂有限公司或国药集团化学试剂有限公司）；RPMI Medium 1640 培养基（批号：20210727，索莱宝生物科技有限公司）；小鼠胰岛素 ELISA Kit 试剂盒（批号：20210810，武汉贝茵莱生物科技有限公司）；棕榈酸（批号：C13009297，纯度≥ 99%）、TAK-875（批号：17292，纯度≥ 98%）（上海麦克林生化有限公司）；无糖 KRB 缓冲液（批号：20210724，金克隆北京生物技术有限公司）；ADD-16 由空军军医大学化学实验室合成。

1.2　细胞

小鼠胰岛 β 细胞 MIN6（上海酶研生物科技有限公司）。

2　方法与结果

2.1　目标化合物的合成

2.1.1　离子液体催化剂的合成　离子液体催化剂的合成[11]如图 3 所示：将三乙烯二胺（1.12 g，0.01 mol）置于 100 mL 圆底烧瓶中，加入 20 mL 乙腈，再加入 1，3- 丙磺酸内酯（2.44 g，0.02 mol），室温下搅拌 24 h，抽滤，所得白色固体用乙腈和乙醚冲洗，70 ℃干燥，即得离子液体前体。将获得的两性离子盐完全溶解在去离子水中后，滴加浓硫酸（0.65 mL，0.01 mol），同时剧烈搅拌，加热至 60 ℃，反应 8 h，得所需离子液体，可直接用于催化下一步反应。

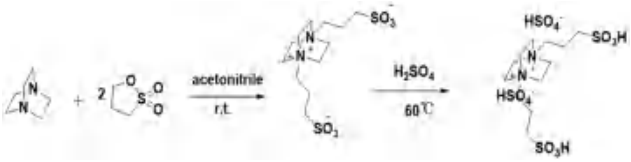


图 3　离子液体催化剂的合成

Fig 3　Synthesis of ionic liquid catalyzer

2.1.2　中间体的合成　中间体 A1 ～ A6 的合成如图 4 所示：在 50 mL 圆底烧瓶中分别加入 A 系列化合物（4 mol），B 系列化合物（8 mol），NH_4OAc（12 mol），再加入 10 mL 95% 乙醇和 1 mL 离子液体催化剂，油浴升温回流（90 ℃）。2 h 后停止加热进行 TLC 监测（CH_2Cl_2：CH_3OH = 20：1）。自然冷却至室温后，反应液抽滤，烘干得中间体 A1 ～ A6。

2.1.3　目标化合物的合成　目标化合物的合成[12]如图 4 所示：分别将中间体 A1 ～ A6（2 mol）和 95% 乙醇（12 mL）置于 50 mL 圆底烧瓶中，常温搅拌，滴入 5 mL NaOH 水溶液，逐渐溶解，反应液由淡黄色变澄清状，常温搅拌 5 min。另取 C 系列化合物（2 mol）加入至上述反应液中，常温下，慢慢滴入 NaOH（1 mL，2 mol），48 ℃油浴。15 h 后停止加热，反应液中加入 HCl（4 mL，4 mol），调溶液 pH 至 3 ～ 5 有固体析出，抽滤，再用少量乙醇乙酯冲洗，用洗脱剂 $V_{二氯甲烷}$：$V_{甲醇}$ = 10：1 洗脱，硅胶色谱法纯化，烘干得到目标化合物 ADD-17 ～ ADD-24[13]。

2.2　目标化合物的谱图数据

2.2.1　ADD-17：4-[（4-（1，8- 二氧基 -1，2，3，4，5，6，7，8，9，10- 十氢吖啶 -9- 基）苯氧基）甲基] 苯甲酸　采用上述合成方法，由中间体 A1 和 4-（溴甲基）苯甲酸反应生成，为白灰色固体，

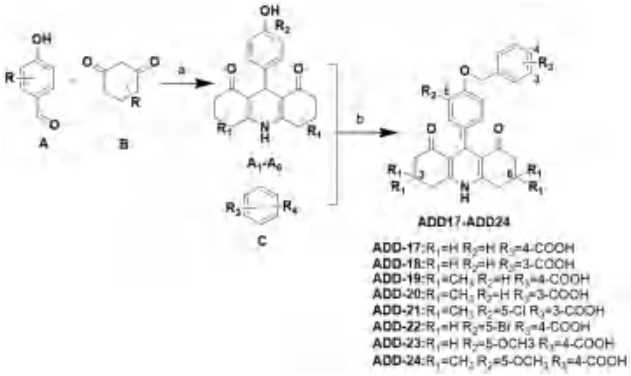


图 4　目标化合物的合成路线

Fig 4　Synthetic routes for target compounds

注（Note）：反应条件：a. NH_4OAc，离子液体催化剂，三乙胺，95% 乙 醇；b. NaOH（aq），95% 乙 醇，5 ～ 8 h [Reagents and conditions：a. NH_4OAc，ionic liquid catalyst，triethylamine，95% ethanol；b. NaOH（aq），95% ethanol，5 ～ 8 h]。

收率 52.3%（第二步反应）。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO）δ：7.91（d，J = 7.5 Hz，1H），7.45（d，J = 7.5 Hz，1H），7.05（d，J = 7.7 Hz，1H），6.81（d，J = 7.8 Hz，1H），5.06（s，1H），4.84（s，1H），2.53（s，5H），2.21（s，2H），1.91（s，2H），1.78（s，1H）。^{13}C NMR（100 MHz，DMSO）δ：194.76，156.17，151.07，140.01，129.26，128.39，126.87，113.96，112.63，68.72，36.77，31.16，26.27，21.28，20.79。HR-MS（ESI $^+$）：*m/z* cale for $C_{27}H_{25}NO_5$，444.1805；found，444.1803 [M + H] $^+$。

2.2.2　ADD-18：3-{[4-（1，8-二 氧 基 -1，2，3，4，5，6，7，8，9，10-十 氢 吖 啶 -9-基）苯 氧 基] 甲基 } 苯甲酸　采用上述合成方法，由中间体 A1 和 3-（氯甲基）苯甲酸反应生成，为白灰色固体，收率 55.8%（第二步反应）。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO）δ：7.97（s，1H），7.89（d，J = 7.2 Hz，1H），7.62（d，J = 7.2 Hz，1H），7.49（t，J = 7.6 Hz，1H），7.06（d，J = 7.9 Hz，2H），6.82（d，J = 7.7 Hz，2H），5.07（s，2H），4.84（s，1H），3.18（s，1H），2.53（d，J = 10.3 Hz，9H），2.22（s，4H），1.93（s，3H），1.77（s，2H）。^{13}C NMR（100 MHz，DMSO）δ：194.76，156.17，151.05，139.99，131.06，128.40，128.19，113.95，112.63，68.68，36.76，31.16，26.27，20.79。HR-MS（ESI $^+$）：*m/z* cale for $C_{27}H_{25}NO_5$，444.1805；found，444.1806 [M + H] $^+$。

2.2.3　ADD-19：4-（（4-（3，3，6，6-四甲基 -1，8-二 氧 基 -1，2，3，4，5，6，7，8，9，10-十氢吖啶 -9-基）苯氧基）甲基）苯甲酸　采用上述合成方法，由中间体 A2 和 4-（溴甲基）苯甲酸反应生成，为白灰色固体，收率 57.6%（第二步反应）。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO）δ：7.89（t，J = 6.2 Hz，1H），7.42（d，J = 8.1 Hz，1H），7.06（d，J = 8.6 Hz，1H），6.81（d，J = 8.6 Hz，1H），5.03（s，1H），4.75（s，1H），4.45（s，1H），3.24（d，J = 51.7 Hz，1H），2.44（dd，J = 37.6，20.5 Hz，1H），2.16（d，J = 16.1 Hz，1H），1.98（d，J = 16.0 Hz，1H），0.93（d，J = 54.8 Hz，1H）。^{13}C NMR（100 MHz，DMSO）δ：195.03，169.19，156.16，149.44，139.69，129.16，128.52，126.85，113.74，111.60，73.24，68.79，57.54，50.13，48.44，32.05，31.84，28.97，26.36。HR-MS（ESI $^+$）：*m/z* cale for $C_{31}H_{33}NO_5$，500.2431；found，500.2438 [M + H] $^+$。

2.2.4　ADD-20：3-{[4-（3，3，6，6-四 甲 基 -1，8-二氧基 -1，2，3，4，5，6，7，8，9，10-十氢吖啶 -9-基）苯氧基] 甲基 } 苯甲酸　采用上述合成方法，由中间体 A2 和 3-（氯甲基）苯甲酸反应生成，为白灰色固体，收率 57.2%。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO）δ：7.98（s，1H），7.89（s，1H），7.60（s，1H），7.48（s，1H），7.07（d，J = 5.6 Hz，2H），6.83（s，2H），5.06（s，2H），4.76（s，1H），3.72（s，8H），2.53（s，2H），2.42（s，2H），2.35（s，1H），2.20（s，1H），2.16（s，1H），2.02（s，1H），1.98（s，1H），1.01（s，7H），0.87（s，7H）。^{13}C NMR（100 MHz，DMSO）δ：194.84，156.11，149.28，139.75，137.45，131.24，128.52，128.25，113.76，111.60，68.66，50.15，32.07，31.85，28.99，26.40。HR-MS（ESI $^+$）：*m/z* cale for $C_{31}H_{33}NO_5$，500.2431；found，500.2434 [M + H] $^+$。

2.2.5　ADD-21：3-{[2-氯 -4-（3，3，6，6-四　甲基 -1，8-二 氧 基 -1，2，3，4，5，6，7，8，9，10-十氢吖啶 -9-基）苯氧基] 甲基 } 苯甲酸　采用上述合成方法，由中间体 A3 和 3-（氯甲基）苯甲酸反应生成，为白灰色固体，收率 56.6%（第二步反应）。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO）δ：8.03（s，1H），7.92（s，1H），7.90（s，1H），7.69（s，1H），7.67（s，1H），7.55（s，1H），7.53（s，1H），7.52（s，1H），7.17（s，1H），7.06（s，2H），5.18（s，2H），4.74（s，1H），3.18（s，1H），2.54（s，3H），2.48（s，1H），2.44（s，1H），2.37（s，1H），2.33（s，1H），2.22（s，1H），2.18（s，1H），2.04（s，1H），2.00（s，1H），1.02（s，6H），0.87（s，6H）。^{13}C NMR（100 MHz，DMSO）δ：195.04，167.21，151.27，149.69，140.88，137.17，131.72，131.10，128.93，128.79，128.12，127.13，120.46，113.56，111.05，

69.41，50.03，32.08，28.93，26.28。HR-MS（ESI $^+$）：*m/z* cale for $C_{31}H_{32}ClNO_5$，534.2024；found，534.2019 [M ＋ H] $^+$。

2.2.6　ADD-22：4-{[2-溴-4-（1，8-二氧基-1，2，3，4，5，6，7，8，9，10-十氢吖啶-9-基）苯氧基]甲基}苯甲酸　采用上述合成方法，由中间体 A4 和 4-（溴甲基）苯甲酸反应生成，为黄色固体，收率 58.6%（第二步反应）。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO）δ：7.93（d，J ＝ 7.9 Hz，1H），7.48（d，J ＝ 7.9 Hz，1H），7.18（s，1H），7.02（s，1H），5.16（s，1H），4.82（s，1H），3.93（s，5H），2.55（s，4H），2.22（d，J ＝ 4.8 Hz，2H），2.00 ～ 1.72（m，2H）。^{13}C NMR（100 MHz，DMSO）δ：195.78，151.84，129.27，126.91，120.56，113.69，112.04，36.52，31.36，26.06，20.60。HR-MS（ESI $^+$）：*m/z* cale for $C_{27}H_{24}BrNO_5$，522.0910；found，522.0910 [M ＋ H] $^+$。

2.2.7　ADD-23：4-{[4-（1，8-二氧基-1，2，3，4，5，6，7，8，9，10-十氢吖啶-9-基）-2-甲氧基苯氧基]甲基}苯甲酸　采用上述合成方法，由中间体 A5 和 4-（溴甲基）苯甲酸反应生成，为白色固体，收率 54.6%（第二步反应）。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO）δ：9.48（s，1H），7.92（d，J ＝ 7.9 Hz，2H），7.45（d，J ＝ 8.0 Hz，2H），6.91 ～ 6.65（m，2H），6.56（d，J ＝ 8.3 Hz，1H），5.76（s，1H），5.04（s，2H），4.87（s，1H），3.68（d，J ＝ 11.3 Hz，3H），3.17（s，1H），2.29 ～ 2.13（m，4H），2.00 ～ 1.84（m，6H），1.81（dd，J ＝ 15.3，7.1 Hz，3H），1.26（d，J ＝ 19.1 Hz，1H），0.87（d，J ＝ 5.2 Hz，1H）。^{13}C NMR（100 MHz，DMSO）δ：194.91（s），172.42（s），169.73 ～ 168.41（m），151.22（s），148.36（s），145.74（s），140.61（s），140.36（s），134.60（s），129.22（s），126.87（s），118.97（s），113.42（s），112.32（d，J ＝ 17.6 Hz），69.70（s），55.42（s），31.30（s），26.28（s），21.46（s），20.82（s）。HR-MS（ESI $^+$）：*m/z* cale for $C_{28}H_{27}NO_6$，474.1911；found，474.1913 [M ＋ H] $^+$。

2.2.8　ADD-24：4-{[2-甲氧基-4-（3，3，6，6-四甲基-1，8-二氧基-1，2，3，4，5，6，7，8，9，10-十氢吖啶-9-基）苯氧基]甲基}苯甲酸　采用上述合成方法，由中间体 A6 和 4-（溴甲基）苯甲酸反应生成，为浅黄色固体，收率 55.6%（第二步反应）。^{1}H NMR（400 MHz，DMSO）δ：7.94（d，J ＝ 8.0 Hz，1H），7.50（d，J ＝ 8.0 Hz，1H），6.96 ～ 6.74（m，1H），6.62（d，J ＝ 8.3 Hz，1H），5.05（s，1H），4.77（s，1H），3.83 ～ 3.10（m，1H），2.61 ～ 1.79（m，1H），0.95（d，J ＝ 50.1 Hz，1H）。^{13}C NMR（100 MHz，DMSO）δ：195.30，167.26，152.07，149.86，141.61，141.31，131.95，129.42，127.83，127.15，113.38，111.09，110.19，69.38，54.57，49.98，32.06，31.99，28.93，26.18。HR-MS（ESI $^+$）：*m/z* cale for $C_{32}H_{35}NO_6$，530.2537；found，530.2541 [M ＋ H] $^+$。

2.3　目标化合物体外降血糖活性测试

采用本课题组前期实验方法[14]，用 0.125 mmol • L^{-1} 棕榈酸（PA）处理 MIN6 细胞 24 h，诱导建立 MIN6 细胞胰岛素抵抗模型[15]。

MIN6 细胞建立胰岛素抵抗模型后，继续培养 24 h，吸掉上层培养液，进行目标化合物对 MIN6 细胞糖刺激胰岛素分泌的影响（GSIS 实验）。按课题组前期筛出的最佳浓度分组给药[15]：空白对照组（Con）、ADD 组（ADD-16 ～ ADD-24，给药浓度分别为 3 μmol • L^{-1}、10 μmol • L^{-1}）、TAK-875 组（给药浓度分别为 3 μmol • L^{-1}、10 μmol • L^{-1}），每组设置 3 个复孔。分组给药后按文献方法处理收集上清液，－ 20 ℃保存[16-17]。

采用小鼠胰岛素酶 ELISA 法检测胰岛素含量，取各组培养基上清液，按小鼠胰岛素酶 ELISA 检测试剂盒说明书操作并计算待测样品液中胰岛素含量。胰岛素分泌活性测试结果见表 1，结果显示，在 10 μmol • L^{-1} 时，ADD-20 活性均显著优于 ADD-16、TAK-875。 在 3 μmol • L^{-1} 时 ADD-18、ADD-20 与 ADD-24 活性显著优于 ADD-16，在 10 μmol • L^{-1} 时 ADD-20 与 ADD-21 活性显著优于 ADD-16，其他化合物在同等浓度下活性基本无显著差别。

2.4　目标化合物分子对接分析

Srivastava 等[18]解析了 TAK-875 和 GPR40 的晶体复合物的结构，这为后续的药物设计提供了更多的信息。晶体复合物结构（见图 5B）显示，GPR40 上有多个结合部位（游离脂肪酸以及 TAK-875），TAK-875 与 GPR40 受体的结合口袋靠近细胞膜外侧，TAK-875 苯丙酸头中的羧基与 ARG-183、ARG-2258、TYR-91 和 TYR-2240 氨基酸残基之间可以形成氢键相互作用。因此，将活性最好的化合物 ADD-20 与 GPR40 受体进行分子对接，研究其与 GPR40 关键氨基酸的相互作用并计算其结合能。

本实验使用 GPR40 与 TAK-875 结合作用模式作为对接参照物（PDB ID：4PHU），使用 Discovery Studio 3.5 进行分子对接实验[19]，以活性化合物 TAK-875 所处 GPR40 受体空腔位置作为对接口袋中心，对接口袋半径为 14Å，进行预

表 1　目标化合物刺激 MIN6 细胞分泌胰岛素 ($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

Tab 1　Target compounds stimulate insulin secretion from MIN6 cells ($\bar{x}\pm s$，$n=3$)

组别	不同给药浓度胰岛素分泌量 /（mU • L^{-1}）	
	3 μmol • L^{-1}	10 μmol • L^{-1}
ADD-16	12.94±0.26	24.22±0.55**
ADD-17	13.66±0.67	17.66±0.07
ADD-18	22.67±0.85$^{*\#\#}$	20.06±0.31*
ADD-19	12.19±0.72	22.91±1.12*
ADD-20	24.78±1.09$^{**\#\#}$	33.04±0$^{**\#\#\triangle\triangle}$
ADD-21	12.31±2.20	29.98±1.62$^{**\#\triangle}$
ADD-22	13.21±0.66	20.50±1.80*
ADD-23	13.27±2.50	22.91±1.75*
ADD-24	21.18±0.27$^{*\#\#}$	24.78±1.03**
TAK-875 组	25.96±0.75$^{**\#\#}$	27.07±0.82$^{**\#}$
空白对照组	17.69±1.10	

注（Note）：与空白对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与 ADD-16 组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与 TAK-875 组比较，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$（Compared with the blank control group，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；compared with the ADD-16 group，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；compared with the TAK-875 group，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$）。

实验，分别使用 Ligandfit、CDOCKER、LibDock 三种对接方法将 TAK-875 分子对接到活性口袋之中，以可以复现复合物晶体结构的方法作为最终的对接方法，最终选用 CDOCKER 将化合物 ADD-20 与活性口袋进行分子对接，对接参数选用默认参数，将 4PHU 复合物晶体结构之中原有的配体分子剔除，删除水分子，补齐氨基酸残基，选用 CHARMm 力场作为分子对接的力场，对接区域范围设定为原化合物中心区域半径 14Å 范围，保留对接结果得分最高的一个构象。

使用 Discovery Studio 3.5 中 calculate energy 工具计算活性最好的 ADD-20 与 GPR40 的结合自由能为 18 271 405 272 kcal • mol^{-1}；同时计算出 TAK-875 与 GPR40 的结合自由能为 18 271 405 218 kcal • mol^{-1}，两者结合自由能几乎相等。化合物 ADD-20、TAK-875 和 GPR40 的分子对接结果见图 5。如图 5 所示，化合物 ADD-20 结构中苯甲酸头中的羧基与氨基酸残基 ARG-183 和 ARG-2258 之间形成氢键相互作用，距离分别为 3.2Å、3.5Å，且 TAK-875 苯丙酸头中的羧基与 ARG-183 和 ARG-2258 氨基酸残基之间也形成氢键相互作用，距离均为 3.1Å，其与 TYR-91 和 TYR-2240 氢键距离分别为 2.8Å、2.9Å。

2.5　统计分析

使用 GraphPad Prism 9.3.1 进行数据分析，所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较用单因素 ANOVA 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3　讨论

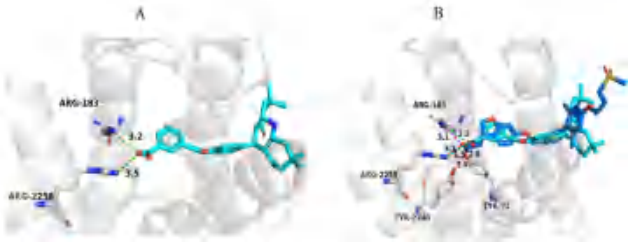


图 5　ADD-20 和 GPR40（A）及 ADD-20、TAK-875 和 GPR40（B）的分子对接图

Fig 5　Molecular docking diagram of ADD-20 and GPR40（A）and ADD-20，TAK-875，and GPR40（B）

本文建立了一种吖啶二酮类衍生物的两步合成方法，简化了 ADD-16 衍生物的合成步骤，第一步反应收率在 80% 以上，收率较高，第二步反应收率 50% ～ 60%，收率一般。主要原因为在后处理中，通过调 pH 方法将目标化合物由钠盐转变为羧酸形式使得产物从乙醇溶液中析出，但 8 个 ADD-16 衍生物结构不同，性质也不一样，造成部分产品溶解在溶剂中未析出，从而导致收率低。虽然该反应转化率较高，但本研究主要目的为得出纯度较高的产品进行活性测试，因此，残留在溶剂中的产品未通过其他方法收集。对于后续得出活性较好的化合物，会进一步研究提高其收率的方法。

由目标化合物对 MIN6 细胞糖刺激胰岛素分泌结果可初步分析总结构效关系：吖啶二酮 3，6 位氢由二甲基取代的化合物（ADD-20、ADD-16、ADD-24）优于无二甲基取代的化合物（ADD-18、ADD-22、ADD-23），表明吖啶二酮 3，6 位氢由二甲基取代可能提高细胞分泌胰岛素能力。吖啶二酮结构中苯甲酸上羧基在间位的化合物（ADD-18、ADD-20）优于羧基在对位的化合物（ADD-17、ADD-19），提示苯甲酸上羧基位置对活性有重要影响。吖啶二酮结构中 1 位苯环 5 位上有取代基（ADD-22、ADD-23）的化合物优于此位置无取代基的化合物（ADD-17），提示该位置有取代基可提高化合物活性。吖啶二酮结构中 1 位苯环 5 位上取代基为给电子基（ADD-23）活性优于该位置为吸电子基（ADD-22），表明该位置为给电子基团时可提高化合物活性。

为验证衍生物 ADD-20 的活性，选用 CDOCKER 对接方法，以活性化合物 TAK-875 所处 GPR40 受体空腔位置作为对接口袋中心，将 ADD-20 和 TAK-875 同时与 GPR40 受体进行分子对接，结果发现 ADD-20、TAK-875 与 GPR40 结合作用模式高度相似，ADD-20 结构中苯甲酸头中的羧基与氨基酸残基 ARG-183 和 ARG-2258 之间形成氢键相互作用，且 TAK-875 苯丙酸头中的羧基与 ARG-83 和 ARG-2258

氨基酸残基之间也形成氢键相互作用，两者氢键距离极为接近，推测这两组氢键的相互作用为活性关键相互作用，而 TAK-875 苯丙酸头中的羧基与 TYR-2240 和 TYR-91 氨基酸残基之间形成氢键相互作用，可能不是活性最为关键的氨基酸相互作用。ADD-20、TAK-875 两者与 GPR40 的结合自由能极为相近，再次验证了衍生物 ADD-20 的活性。

4　结论

本文建立了一种吖啶二酮类衍生物的两步合成方法，以 ADD-16 为先导化合物，进行结构衍生化并合成了 8 个化合物，体外活性筛选发现化合物 ADD-20 的活性显著优于 ADD-16 与 TAK-875，其促进胰岛素分泌的能力更强，并初步总结出 ADD-16 衍生物的构效关系：吖啶二酮 3，6 位氢由二甲基取代、苯甲酸上羧基在间位、1 位苯环 5 位上有取代基且为给电子基时可提高化合物活性。分子对接结果发现 ADD-20、TAK-875 与 GPR40 结合作用模式高度相似，结合自由能也极为接近，进一步验证了化合物 ADD-20 促胰岛素分泌的生物活性。

基于此，后续研究将围绕化合物 ADD-20 进行深入研究，充分探究不同结构单元侧链对活性的影响，系统性总结构效关系，最终获得成药性较好的化合物。

参考文献

[1] Williams R. IDF diabetes atlas ninth edition 2021 [C]. 2021：31-37.

[2] Wajchenberg BL. β-Cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment [J]. Endocr Rev，2007，28（2）：187-218.

[3] 刘永贵，解学星，吴疆，等 . 治疗 2 型糖尿病的新靶点药物研究进展 [J]. 现代药物与临床，2015，30（2）：222-227.

[4] Gregg EW，Li Y，Wang J，et al. Changes in diabetes-related complications in the United States，1990 — 2010 [J]. N Engl J Med，2014，370（16）：1514-1523.

[5] King P，Peacock I，Donnelly R. The UK prospective diabetes study（UKPDS）：clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes [J]. Br J Clin Pharmacol，2001，48（5）：643-648.

[6] Liang C，Decourcy K，Prater MR. High-saturated-fat diet induces gestational diabetes and placental vasculopathy in C57BL/6 mice [J]. Metabolism，2010，59（7）：943-950.

[7] 王杰，魏云林，季秀玲 . 基于 GPR40 受体新药的研制进展 [J]. 药物生物技术，2016，23（1）：86-90.

[8] Asu A，Kudva YC，Basu R. GPR40 modulators：new kid on the block [J]. Diabetes Care，2013，36（2）：185-187.

[9] Yamashima T. Dual effects of the non-esterified fatty acid receptor “GPR40” for human health [J]. Prog Lipid Res，2015，58：40-50.

[10] 刘雪英，沈歆，刘吉元，等 . 一种吖啶二酮类化合物在制备抗糖尿病药物中的应用：CN111303030B [P]. 2021-06-29.

[11] Li X，Lin Q，Cao R. A convenient approach for the synthesis of 1，3，5-trioxanes under solvent-free conditions at room temperature [J]. Monatsh Chem，2014，145（6）：1017-1022.

[12] Xiong H，Han J，Wang J，et al. Discovery of 1，8-acridinedione derivatives as novel GCN5 inhibitors via high throughput screening [J]. Eur J Med Chem，2018，151：740-751.

[13] 张代美，丁欢，张婷婷 . 一种 GPR40 激动剂药物组合物及其制备方法：CN108236609A [P]. 2018-07-03.

[14] 沈歆，胡梓朔，王力彬，等 . 棕榈酸通过抑制 IRS-1 表达诱导大鼠骨骼肌细胞胰岛素抵抗 [J]. 中国药师，2016，19（12）：2201-2205.

[15] 沈歆 . 新型吖啶二酮类 GPR40 激动剂的发现和抗 2 型糖尿病活性研究 [D]. 西安：中国人民解放军空军军医大学，2020.

[16] 吴鸿 . 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 对 β 细胞胰岛素分泌功能及其胰岛素信号转导通路的影响 [D]. 上海：第二军医大学，2009.

[17] 程瑞婷，王晨斌，田春雨，等 . MIN6 细胞损伤模型不同造模方法对比研究 [J]. 华北理工大学学报（医学版），2017，19（4）：258-262.

[18] Srivastava A，Yano J，Hirozane Y，et al. High-resolution structure of the human GPR40 receptor bound to allosteric agonist TAK-875 [J]. Nature，2014，513（7516）：124-127.

[19] 阎成炟，郭崇真，张东虎，等 . 新型 α- 葡萄糖苷酶抑制剂 YG-18 在小鼠体内的降糖作用、分子对接及急性毒性研究 [J]. 中南药学，2021，19（6）：1037-1042.

（收稿日期：2022-11-05；修回日期：2022-12-20）

基于 UFLC-Triple TOF-MS/MS 的活心丸全成分分析

郑苏楠，刘玉铃*，吴灏，王永刚*（中山大学生命科学学院，广东省中药上市后质量与药效再评价工程技术研究中心，广州　510275）

摘要：目的　应用超快速高效液相色谱串联三重四极杆飞行时间质谱（UFLC-Triple TOF-MS/MS）对中药活心丸的化学成分进行分析。**方法**　以 Waters HSS T3（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）为色谱柱，乙腈 -0.1% 甲酸为流动相，梯度洗脱，流速 0.3 mL • min^{-1}，采用配有 ESI 电喷雾源的高分辨三重四极杆飞行时间质谱，分别在正、负离子模式下进样检测。**结果**　通过准确分子量及碎片离子分析、对照品比对、相关文献查阅，共确证和指认出 96 个化学成分，其中三萜类化合物 25 个、皂苷类化合物 12 个、胆汁酸类化合物 11 个、黄酮类化合物 11 个、生物碱类化合物 10 个、蟾毒内酯类化合物 12 个、有机酸类化合物 7 个、氨基酸类化合物 4 个、核苷类化合物 1 个、甾酮类化合物 1 个、其他类化合物 2 个，并解释了代表性成分的裂解规律。**结论**　本研究阐明了活心丸的化学物质基础，为评价其质量及后续药理机制研究提供了科学依据。

关键词：中成药；活心丸；化学成分；UFLC-Triple TOF-MS/MS
中图分类号：R284　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0924-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.014

Full component analysis of Huoxin pills by UFLC-Triple TOF-MS/MS

ZHENG Su-nan, LIU Yu-ling*, WU Hao, WANG Yong-gang* (*Guangdong Engineering and Technology Research Center for Quality and Efficacy Re-evaluation of Post-marketed Traditional Chinese Medicine*, *School of Life Sciences*, *Sun Yat-sen University*, *Guangzhou* 510275)

Abstract: Objective　To identify the chemical constituents in Huoxin pills by UFLC-Triple TOF-MS/MS. **Methods**　Phenomenex Waters HSS T3 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) chromatographic column was used. Acetonitrile-0.1% formic acid was used as the mobile phase, gradient elution was adopted, and the flow rate was 0.3 mL • min^{-1}. High resolution triple quadrupole time-of-flight mass spectrometry with ESI was used for the detection in both positive and negative ion modes. **Results**　Based on the mass spectrometry and certification of reference substances, 96 compounds were confirmed, including 25 triterpenes, 12 saponins, 11 bile acids, 11 flavonoids, 10 alkaloids, 12 bufadienolides, 7 organic acids, 4 amino acids, 1 nucleoside, 1 sterone and 2 others. **Conclusion**　This comprehensive quality research on Huoxin pills provides the scientific basis for the quality and pharmacological mechanism reasearch.

Key words: Chinese patent medicine; Huoxin pill; chemical composition; UFLC-Triple TOF-MS/MS

活心丸常用于治疗冠心病、心绞痛，是由古代经典名方与现代药物相结合而成[1]。活心丸成分复杂，由人参、附子、蟾酥、红花、灵芝、体外培育牛黄、熊胆、人工麝香、珍珠、冰片十味药组成，具有益气活血、温经通脉的作用。临床研究证明，在西药治疗冠心病及心绞痛的基础上，给予活心丸能显著改善患者症状，提高疗效，对气虚血瘀型冠心病的疗效尤为明显[2-5]。活心丸对心脏损伤具有一定保护作用，且毒性较小，安全性良好[6-7]。本研究对活心丸中化学成分进行了提取分析，以期为该药的临床使用提供理论依据。

1　材料

1.1　仪器

基金项目：广州市重点研发计划项目（No. 202103000049）。

作者简介：郑苏楠，女，在读硕士研究生，主要从事药物分析研究，email：zhengsn3@mail2.sysu.edu.cn　*通信作者：王永刚，男，博士研究生，副教授，主要从事天然（岭南植物）药物的研究开发，email：wangyg@mail.sysu.edu.cn；刘玉铃，女，博士研究生，主要从事中药药效物质基础及药理学研究，email：liuyling26@mail2.sysu.edu.cn

半微量天平（Mettler Toledo，MS205DU）；数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司，KQ-250DE）；超纯水系统（Millipore）；超快速高效液相色谱仪（LC-20ADXR 二元泵，SIL-20AD-XR 自动进样器，CTO-20A 柱温箱，日本岛津）；SCIEX 高分辨质谱（ZenoTOF 7600 系统，AB SCIEX 公司）。

1.2　试药

熊去氧胆酸（批号：0755-9003）、牛磺熊去氧胆酸钠（批号：0816-9510）、去氧胆酸（批号：0724-200006）、人参皂苷 Rb_1（批号：704-200115）、牛磺胆酸钠（批号：0815-9702）、人参皂苷 Rg_1（批号：0703-200120）、牛磺鹅去氧胆酸钠（批号：0846-9702）、人参皂苷 Re（批号：754-200115）、胆酸（批号：078-9312）（供含量测定用，中国食品药品检定研究院），齐墩果酸（批号：110709-201206，纯度：94.9%）（中国食品药品检定研究院）；山柰酚（批号：110861-201310，上海源叶生物科技有限公司，纯度≥ 98%）；胆红素（批号：C12709116）、麝香酮（批号：C12207906）、蟾毒灵（批号：C12848401）、灵芝酸 A（批号：C13043358）、灵芝酸 B（批号：C13093195）（纯度均＞ 98%，上海麦克林生化科技有限公司）；苯甲酰乌头原碱（批号：211224）、苯甲酰新乌头原碱（批号：211224）、苯甲酰次乌头原碱（批号：220217）、华蟾毒配基（批号：210906）、酯蟾毒配基（批号：210906）（纯度均≥ 98%，中山市成诺科技有限公司）。无水甲醇（天津市大茂化学试剂厂）；乙腈（Fisher）；甲酸（Fluka）；水为超纯水系统制备。活心丸样品共 3 批（白云山制药总厂）。

2　方法与结果

2.1　溶液的制备

2.1.1　对照品溶液的制备　取胆酸、人参皂苷 Re、山柰酚、齐墩果酸、人参皂苷 Rb_1、牛磺胆酸钠、熊去氧胆酸、人参皂苷 Rg_1、牛磺熊去氧胆酸钠、苯甲酰乌头原碱、灵芝酸 B 对照品适量，加甲醇制成每 1 mL 含胆酸、人参皂苷 Re、齐墩果酸、人参皂苷 Rb_1、牛磺胆酸钠、熊去氧胆酸、人参皂苷 Rg_1、牛磺熊去氧胆酸钠、苯甲酰乌头原碱各 50 μg，山柰酚 32 μg，灵芝酸 B 36.5 μg 的混合对照品溶液Ⅰ；再分别取去氧胆酸、羟基红花黄色素 A、胆红素、苯甲酰次乌头原碱、酯蟾毒配基、苯甲酰新乌头原碱、牛磺鹅去氧胆酸、灵芝酸 A、蟾毒灵、麝香酮、华蟾毒配基适量，加甲醇制成每 1 mL 含去氧胆酸、羟基红花黄色素 A、胆红素、苯甲酰次乌头原碱、酯蟾毒配基、苯甲酰新乌头原碱各 50 μg，牛磺鹅去氧胆酸 25 μg，灵芝酸 A 21 μg，蟾毒灵 70 μg，麝香酮 64.5 μg，华蟾毒配基 41.5 μg 的混合对照品溶液Ⅱ。

2.1.2　供试品溶液的制备　取不同批次活心丸各一瓶，精密称量，置于 100 mL 具塞锥形瓶中，加入 70% 甲醇 50 mL，称重，超声提取 30 min，放冷，加入 70% 甲醇补足重量。10 000 r • min^{-1} 离心 5 min，取上清液过 0.22 μm 滤膜备用。

2.2　色谱及质谱条件

2.2.1　色谱条件　色谱柱：Waters HSS T3（2.1 mm× 100 mm，1.8 μm）。流动相：乙腈（A）-0.1% 甲酸水溶液（B），洗脱梯度（0 ～ 5 min，5%A；5 ～ 35 min，5% ～ 95%A；35 ～ 40 min，95%A；40 ～ 41 min，95% ～ 5%A；41 ～ 45 min，5%A），流速为 0.3 mL • min^{-1}，进样量为 5 μL，柱温为 40 ℃。

2.2.2　质谱条件　ESI 电喷雾源，喷雾电压正离子模式 5500 V，负离子模式－ 4500 V，载气 55 psi，离子源温度 550 ℃，气帘气 35 psi，碰撞器压力 10 psi，入口电压 60 V，扫描范围 *m/z* 50 ～ 2000，分别在正负离子模式下进行检测。

2.3　结果与分析

采用 UFLC-Triple TOF-MS/MS 技术，分别在正、负离子模式下对 3 批样品进行检测，总离子流图（TIC）见图 1。通过准确分子量及碎片离子分析、对照品比对、相关文献查阅，共确证和指认了 96 个化学成分，其中三萜类化合物 25 个、皂苷类化合物 12 个、胆汁酸类化合物 11 个、黄酮类化合物 11 个、生物碱类化合物 10 个、蟾毒内酯类化合物 12 个、有机酸类化合物 7 个、氨基酸类化合物 4 个、核苷类化合物 1 个、甾酮类化合物 1 个，其他类化合物 2 个，具体见表 1。

2.3.1　三萜类成分　主要来自灵芝，是高度氧化的羊毛甾烷衍生物，根据所含碳原子数可分为 C_{30}、C_{27}、C_{24} 三大类，其母核侧链中含有羟基、羰基、甲基等 [39]。在质谱裂解中，通常丢失侧链上的基团。以化合物 **71** 灵芝酸 B 为例，进行质谱裂解规律解析，如图 2 所示。化合物 **71** 分子式为 $C_{30}H_{44}O_7$，保留时间为 19.12 min。在负离子模式下，准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 *m/z* 515.2991，分子离子通过丢失一分子 H_2O 得到碎片离子 497.2908，接着再丢失一分子 CO_2，得到 *m/z* 453.2991，再丢失一分子 H_2O 得到碎片离子 *m/z* 438.2794。根据以上二级碎片离子信息及裂解规律，比对对照品，鉴定化合物 **71** 为灵芝酸 B。

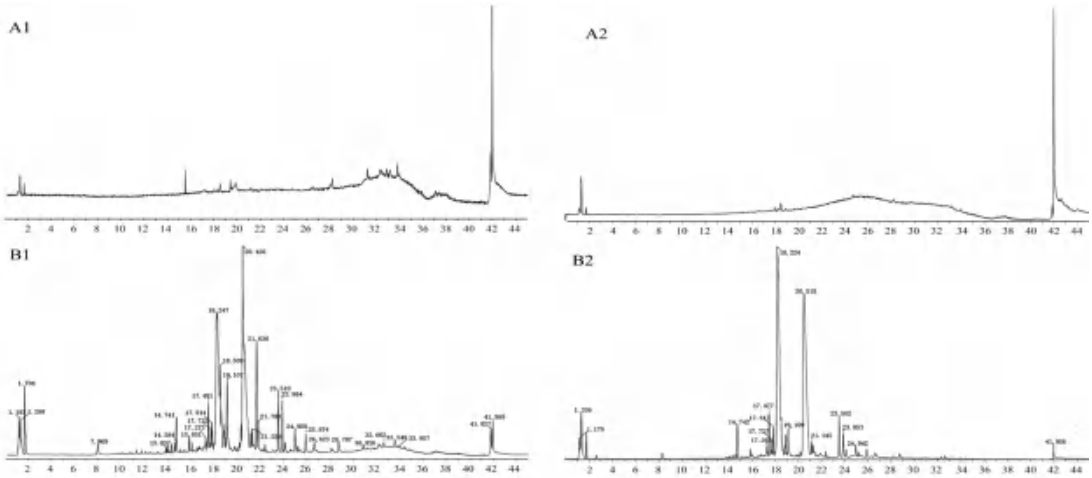


图 1　空白溶剂（A）及活心丸（B）总离子流图

Fig 1　Total ion chromatogram of blank solvent（A）and Huoxin pills（B）

A1 及 B1. 正离子模式（positive ion mode）；A2 及 B2. 负离子模式（negative ion mode）

表 1　活心丸化学成分鉴定

Tab 1　Identification of chemical constituents in Huoxin pill by UFLC-Triple TOF-MS/MS

No.	t_R/min	分子式	一级质谱信息		主要裂解碎片		化合物	药材归属	文献
			$[M+H]^+$（$\delta/\times10^{-6}$）	$[M-H]^-$（$\delta/\times10^{-6}$）	正离子模式	负离子模式			
1	1.18	$C_6H_{14}N_4O_2$	175.1190（0.8）	173.1042（－1.1）	116.0708、70.0652、60.0555	131.0837、114.0558、84.9612	精氨酸	人工合成牛黄、珍珠、灵芝	[8-9]
2	1.27	$C_2H_7NO_3S$	126.0219（－1）	124.0074（0.4）	108.0116、64.9693	106.9818、79.9610	牛磺酸	人工合成牛黄	[10-12]
3	1.36	$C_7H_{12}O_6$	－	191.0558（－1.5）	－	127.0390、93.0346、85.0296	奎尼酸	灵芝	[13]
4	1.37	$C_9H_{11}NO_2$	166.0863（0.4）	164.0718（0.9）	77.0386、107.0490	－	苯丙氨酸	珍珠、灵芝	[9]
5	1.49	$C_4H_6O_5$	－	133.0143（0.6）	－	115.0052、71.0149	苹果酸	灵芝、人参	[13-14]
6	1.49	$C_4H_4O_4$	－	115.0038（0.7）	－	97.9310、71.0139	马来酸	人参	[14]
7	1.70	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	268.1040（0.5）	－	136.0619	－	腺苷	灵芝、红花	[9，13，15-16]
8	1.74	$C_{12}H_{16}N_2O$	205.1335（－0.6）	203.1185（－2.6）	160.0762、115.0541、58.0659	144.0459、125.0253、86.9768	蟾毒色胺	蟾酥	[17]
9	1.86	$C_4H_6O_4$	－	117.0191（－1.7）	－	99.9264、73.0307	琥珀酸	－	－
10	8.99	$C_{21}H_{18}O_{11}$	447.0924（1.2）	445.0780（0.2）	271.0609、253.1440	269.0424	黄芩苷	－	－
11	9.50	$C_{33}H_{38}O_{23}$	－	801.1700（－3.9）	－	667.1453、625.1418	6-羟基山柰酚-3，6-二-*O*-葡萄糖苷-7-*O*-葡萄糖醛糖	红花	[18]
12	9.73	$C_7H_{12}O_4$	－	159.0661（－0.9）	－	115.0770、97.0670、70.9992	3-甲基己二酸	－	－
13	10.05	$C_{24}H_{39}NO_7$	454.2799（0.6）	－	436.2690、404.2425	－	附子灵	附子	[19]
14	10.44	$C_{24}H_{39}NO_6$	438.2850（0.6）	－	420.2748、388.2485、356.2232	－	尼奥灵	附子	[18]
15	11.18	$C_{33}H_{40}O_{21}$	－	771.1965（－3.2）	－	609.1448、463.0877、301.0347	6-羟基山柰酚3-*O*-*β*-芸香糖-6-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷	红花	[20]
16	11.19	$C_{24}H_{39}NO_5$	422.2901（0.1）	－	390.2637、358.2376	－	塔拉乌头胺	附子	[21]

续表 1

No.	t_R/min	分子式	一级质谱信息 $[M+H]^+$ ($\delta/\times10^{-6}$)	一级质谱信息 $[M-H]^-$ ($\delta/\times10^{-6}$)	主要裂解碎片 正离子模式	主要裂解碎片 负离子模式	化合物	药材归属	文献
17	11.34	$C_{27}H_{30}O_{17}$	627.1556 (0.5)	625.1392 (−3)	465.1031、303.0501	462.0795、301.0343	6-羟基山柰酚-3，6-二-*O*-葡萄糖苷	红花	[20]
18	11.74	$C_{22}H_{31}NO_3$	358.2377 (0.5)	—	340.2275	—	宋果灵	附子	[19，22]
19	12.01	$C_{27}H_{30}O_{16}$	—	609.1440 (−3.5)	—	463.0868、301.0365	槲皮素-3-*O*-*β*-芸香糖苷	红花	[18]
20	13.20	$C_{27}H_{30}O_{15}$	—	593.1495 (−2.9)	—	547.2702、285.0401、255.0295	红花黄色素（A）	红花	[22]
21	13.65	$C_{27}H_{29}NO_{13}$	—	574.1546 (−3.4)	—	466.0980、424.1033、364.0829	cartormin	红花	[18]
22	13.68	$C_{21}H_{20}O_{11}$	—	447.0918 (−3.4)	—	285.0404、136.9875	醌式红花苷	红花	—
23	13.96	$C_{21}H_{20}O_{12}$	—	463.0870 (−2.7)	—	417.2271、301.0354、271.0234	羟基山柰酚-3-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷	红花	[18]
24	13.97	$C_9H_{16}O_4$	—	187.0974 (−0.9)	—	125.0985、97.0668	壬二酸	灵芝	[14]
25	13.98	$C_{31}H_{43}NO_{10}$	590.2960 (0.9)	—	540.2597、508.2332		苯甲酰新乌头原碱[a]	附子	[19]
26	14.3	$C_{48}H_{82}O_{20}$	—	977.5304 (−2.3)	—	931.5263、799.4820、637.4319	人参皂苷 I	人参	—
27	14.59	$C_{24}H_{34}O_5$	403.2479 (0.8)	—	349.2163、253.1944、159.1166	—	日蟾毒它灵	蟾酥	[23]
28	14.63	$C_{32}H_{45}NO_{10}$	604.3103 (0.8)	—	554.2732、522.2512	—	苯甲酰乌头原碱[a]	附子	[19]
29	14.73	$C_{48}H_{82}O_{18}$	—	945.5400 (−3)	—	799.4836、637.4305	人参皂苷 Re[a]	人参	[15，24]
30	15.44	$C_{15}H_{10}O_4$	255.0652 (1)	253.0505 (−0.4)	199.0750、181.0647、137.0629	223.0402、208.0536	大豆苷元	—	—
31	15.55	$C_{30}H_{46}O_8$	535.3266 (0.1)	533.3107 (−2.4)	—	515.3113、485.2933、303.1601	羟基灵芝酸 C2	灵芝	—
32	15.7	$C_{30}H_{44}O_9$	—	547.2887 (−4.7)	—	529.2814、485.2894、319.1904	20-羟基灵芝酸 G	灵芝	—
33	15.78	$C_{16}H_{12}O_5$	285.0758 (0.9)	283.0602 (−3.5)	270.0529、242.0580、197.0599、141.0701	268.0379、240.0430、184.0529	金合欢素	灵芝	[14]
34	15.85	$C_{24}H_{32}O_6$	417.2272 (0.8)	415.2115 (−2.6)	399.2161、371.2214、159.0803	353.2114、277.1423、261.1481	沙蟾毒精	蟾酥	[17，25]
35	15.85	$C_{24}H_{30}O_5$	399.2166 (0.5)	397.2008 (−3)	257.1894、145.1010	—	脂蟾毒精	蟾酥	[23]
36	16.66	$C_7H_6O_3$	139.0390 (0.9)	137.0245 (0.7)	121.0285、95.0491、77.0384	93.0349、75.0243、65.0403	水杨酸	熊胆、红花、人参	[20，26-27]
37	16.70	$C_{24}H_{34}O_5$	403.2479 (0.7)	401.2320 (−3.4)	349.2163、253.1944、159.1166	303.1964、249.1490、207.1380	远华蟾毒精	蟾酥	[23]
38	17.27	$C_{42}H_{72}O_{14}$	801.4923 (0.4)	799.4826 (−2.9)	603.4273、441.3700、423.3577	637.4301、475.3777	人参皂苷 Rg_1[a]	人参	[24，28]
39	17.47	$C_{30}H_{44}O_6$	501.3211 (0.7)	—	483.3106、371.2216、215.1430	—	丹芝酸 A	灵芝	—
40	17.47	$C_{30}H_{46}O_7$	519.3316 (0.3)	517.3160 (−2.1)	—	499.3065、455.3150、287.1654	灵芝酸 C2	灵芝	[9-10，29]
41	17.48	$C_{30}H_{48}O$	425.3778 (0.4)	—	407.3667、217.1950、109.1009	—	羽扇烯酮	灵芝	[14]
42	17.48	$C_{36}H_{60}O_7$	605.4412 (0.1)	—	515.3865、207.1732、189.1629	—	人参皂苷 Rk_2	人参	—

续表 1

No.	t_R/min	分子式	一级质谱信息		主要裂解碎片		化合物	药材归属	文献
			$[M+H]^+$ ($\delta/\times10^{-6}$)	$[M-H]^-$ ($\delta/\times10^{-6}$)	正离子模式	负离子模式			
43	17.48	$C_{54}H_{92}O_{23}$	1109.6102 (−0.2)	1107.5928 (−2.5)	—	—	人参皂苷 Rb_1[a]	人参	[24]
44	17.52	$C_{15}H_{10}O_5$	271.0601 (1)	269.0450 (−2.2)	153.0180	133.0296	金雀异黄酮	—	—
45	17.57	$C_{27}H_{40}O_7$	477.2847 (0.3)	475.2687 (−3)	423.2530、406.2421、287.1274	457.2587	赤芝酸 C	灵芝	[29]
46	17.6	$C_{30}H_{44}O_8$	—	531.2951 (−2.3)	—	513.2847、469.2966、451.2859	灵芝酸 I	灵芝	[30]
47	17.6	$C_{30}H_{44}O_8$	—	531.2951 (−2.3)	—	513.2847、469.2966、451.2859	灵芝酸 G	灵芝	[9]
48	17.65	$C_{57}H_{94}O_{26}$	—	1193.5929 (−2.7)	—	1149.6047、1089.5815	丙烯酰基人参皂苷 Rb_1	人参	—
49	17.84	$C_{30}H_{42}O_8$	531.2953 (−0.4)	529.2790 (−3.2)	477.2623、383.2213、347.2005	511.2693、467.2784、434.2442、302.1970	灵芝酸 C6	灵芝	[10，14]
50	17.87	$C_{30}H_{40}O_7$	513.2847 (−1.5)	511.2692 (−1.7)	449.2683、227.1064	467.2805、437.2341、301.1802	灵芝烯酸 D	灵芝	[9-10]
51	17.91	$C_{27}H_{40}O_6$	—	459.2741 (−2.4)	—	441.2626、249.1489、207.1380	赤芝酸 N	灵芝	[29]
52	17.99	$C_{56}H_{92}O_{25}$	—	1163.58190 (−3.1)	—	1119.5934、1077.5813	丙二酰人参皂苷 Rb_2	人参	—
53	17.99	$C_{56}H_{92}O_{25}$	—	1163.58190 (−3.1)	—	1119.5934、1077.5813	丙二酰人参皂苷 Rb_2 同分异构体	人参	—
54	18.12	$C_{48}H_{76}O_{19}$	—	955.4869 (−4.1)	—	793.4358	人参皂苷 Ro	人参	[31]
55	18.13	$C_{30}H_{46}O_2$	439.3571 (−0.7)	—	203.1787、191.1789、189.1635	—	灵芝醇 A	灵芝	[32]
56	18.22	$C_{26}H_{45}NO_6S$	500.304 (0.1)	498.2889 (−1.2)	339.2864、208.0637、126.0217	—	牛磺熊去氧胆酸	人工合成牛黄、熊胆	[13，26，33]
57	18.25	$C_{26}H_{44}NNaO_6S$	522.2860 (−1.2)	520.2693 (−4.1)	486.2646、361.2510、148.0041	—	牛磺熊去氧胆酸钠[a]	人工合成牛黄、熊胆	[12，26]
58	18.25	$C_{30}H_{42}O_7$	515.3003 (−0.6)	513.2837 (−4)	497.2903、451.2842、349.2157	451.2844、436.2604、302.1871	灵芝烯酸 A	灵芝	—
59	18.34	$C_{26}H_{43}NO_6S$	498.2884 (−0.7)	496.2731 (−1.5)	337.2517	—	dihydroxycholenoyl taurine	—	—
60	18.51	$C_{26}H_{43}NO_6$	466.3163 (−0.7)	464.3008 (−2.2)	412.2846、337.2525、319.2419	402.3015、74.0254	甘氨胆酸	人工合成牛黄	[13]
61	18.56	$C_{30}H_{42}O_7$	515.3003 (−0.6)	513.2837 (−4)	497.2903、451.2842、349.2157	451.2844、436.2604、302.1871	灵芝烯酸 B	灵芝	[10]
62	18.56	$C_{24}H_{32}O_5$	401.2323 (−0.6)	399.2158 (−4.6)	365.2100、339.1949、159.1162	—	去乙酰华蟾蜍精	蟾酥	[23]
63	18.62	$C_{26}H_{36}O_6$	445.2584 (0.4)	—	385.2369、367.2261、349.2153	—	蟾毒它灵	蟾酥 灵芝	[14，23]
64	18.75	$C_{26}H_{44}NNaO_6S$	—	520.2693 (−4.1)	—	—	牛磺鹅去氧胆酸钠[a]	人工合成牛黄、熊胆	[13，26]
65	18.82	$C_{32}H_{46}O_9$	—	573.3044 (−4.3)	—	555.2957、469.2945、302.1888	灵芝酸 K	灵芝	—
66	18.89	$C_{42}H_{70}O_{12}$	767.4940 (−0.4)	765.4776 (−2.4)	605.4385、425.3788	603.4242、161.0456	人参皂苷 Rk1	人参	[24]
67	18.89	$C_{30}H_{40}O_8$	529.2796 (0.2)	527.2632 (−3.5)	399.2165、353.2104	465.2640、317.1758	灵芝烯酸 E	灵芝	—
68	19.04	$C_{51}H_{84}O_{21}$	—	1031.5402 (−2.9)	—	987.5504、945.5394、927.5298	丙烯酰基人参皂苷 Re	人参	—

续表 1

No.	t_R/min	分子式	一级质谱信息 $[M+H]^+$ ($\delta/\times10^{-6}$)	一级质谱信息 $[M-H]^-$ ($\delta/\times10^{-6}$)	主要裂解碎片 正离子模式	主要裂解碎片 负离子模式	化合物	药材归属	文献
69	19.10	$C_{26}H_{34}O_7$	459.2377 (0.1)	—	363.1961、201.1635	—	华蟾蜍它灵	蟾酥	[17，25]
70	19.11	$C_{32}H_{44}O_9$	573.3058 (−0.2)	571.2898 (−2.6)	477.2632、347.2004	553.2801、511.2697、467.2794	灵芝酸 H	灵芝	[10]
71	19.12	$C_{30}H_{44}O_7$	—	515.2991 (−1.4)	—	497.2908、453.2991、438.2794	灵芝酸 B[a]	灵芝	[9-10]
72	19.12	$C_{30}H_{44}O_7$	—	515.3002 (−2.4)	—	497.2903、285.1493	灵芝酸 A[a]	灵芝	[9-10，34]
73	19.73	$C_{27}H_{38}O_6$	459.2741 (−1.1)	457.2585 (−2.4)	423.2534、287.1277	439.2465、209.1172、149.0607	赤芝酸 A	灵芝	[9-10]
74	20.01	$C_{44}H_{72}O_{13}$	809.5046 (−0.8)	807.4870 (−3.8)	443.3881、425.3770、407.3666、205.0704	765.4767、747.4671、603.4240	人参皂苷 Rs5	人参	[31]
75	20.09	$C_{27}H_{36}O_6$	457.2585 (0.5)	455.2422 (−3.7)	457.2575、401.2317、347.1991	301.1806、163.1129、59.0139	脱氢赤芝酸 A	灵芝	[34]
76	20.30	$C_{24}H_{34}O_4$	387.2530 (1)	385.2371 (−3.5)	351.2320、255.2108	341.2491、215.1449、123.0812	蟾毒灵[a]	蟾酥	[23]
77	20.42	$C2_4H_{40}O_5$	409.2949 (−0.3)	407.2791 (−3)	—	343.2643、289.2172	胆酸[a]	人工合成牛黄	[13，35]
78	20.44	$C_{24}H_{38}O_4$	391.2843 (−0.4)	389.2690 (−1.9)	373.2727、355.2637、213.1639、149.0232	—	7-ketolithocholic acid	—	—
79	20.60	$C_{26}H_{45}NO_6S$	500.3040 (0.1)	—	339.2864、208.0637、126.0217	—	牛磺鹅去氧胆酸	人工合成牛黄、熊胆	[13，26，33]
80	20.88	$C_{32}H_{42}O_9$	571.2902 (0)	569.2734 (−3.9)	363.1960、345.1858、225.0912	551.2665、509.2553、465.2652	灵芝酸 F	灵芝	[9]
81	21.25	$C_{26}H_{43}NO_5$	450.3214 (0.4)	448.3062 (−1.4)	432.3109、414.3005、321.2582	404.3170、74.0254	甘氨脱氧胆酸	人工合成牛黄	[8，13]
82	21.26	$C_{26}H_{42}NNaO_5$	472.3034 (−0.7)	—	472.3041、454.2941	—	甘氨鹅去氧胆酸钠	人工合成牛黄	[13]
83	21.49	$C_{19}H_{28}O_2$	289.2162 (0.2)	—	271.2059、253.1950	—	去氢表雄酮	麝香	[36]
84	21.64	$C_{26}H_{34}O_6$	443.2428 (1)	—	365.2120、215.1796、187.1483	—	华蟾酥毒基[a]	蟾酥	[17]
85	21.78	$C_{24}H_{32}O_4$	385.2373 (0.8)	—	367.2272、349.2166、253.1954	—	酯蟾毒配基[a]	蟾酥	[23]
86	21.83	$C_{42}H_{66}O_{14}$	—	793.4355 (−3.1)	—	613.3700	chikusetsusaponin Ⅳ a	—	—
87	22.51	$C_{17}H_{24}O_2$	261.1849 (−0.5)	—	105.0330、77.0383	—	人参环氧炔醇	人参	[28]
88	23.51	$C_{24}H_{40}O_4$	393.2988 (−0.9)	391.2847 (−1.8)	391.2855、357.2751、243.2177、175.1436、161.1012、147.1105	345.2803、327.2695	去氧胆酸[a]	人工合成牛黄	[11-12，35]
89	23.85	$C_{24}H_{40}O_4$	393.2988 (−0.9)	391.2847 (−1.8)	—	345.2803、327.2695	熊去氧胆酸[a]	人工合成牛黄、熊胆	[12-13，26]
90	24.1	$C_{24}H_{38}O_4$	391.2843 (−0.4)	389.2690 (−1.9)	373.2727、355.2637、213.1639、149.0232	—	12-ketolithocholic acid	—	—
91	27.47	$C_{30}H_{48}O_3$	457.3676 (0)	455.3509 (−4.7)	439.3562、329.2477、189.1270	391.2540、61.9882	赤芝二醇	灵芝	—
92	28.08	$C_{30}H_{44}O_4$	469.3312 (−0.3)	467.3157 (−2.2)	259.1694	423.3249	灵芝酸 DM	灵芝	[10，34]
93	28.91	$C_{30}H_{44}O_2$	437.3414 (−0.7)	—	419.3351、309.2191、107.0856	—	灵芝醛 A	灵芝	—

续表 1

No.	t_R/min	分子式	一级质谱信息 $[M+H]^+$ ($\delta/\times10^{-6}$)	一级质谱信息 $[M-H]^-$ ($\delta/\times10^{-6}$)	主要裂解碎片 正离子模式	主要裂解碎片 负离子模式	化合物	药材归属	文献
94	30.82	$C_{32}H_{46}O_5$	—	509.3259 (−2.6)	—	467.3169、449.3050	灵芝酸 TQ	灵芝	—
95	32.27	$C_{20}H_{32}O_2$	305.2475 (0.2)	303.2326 (−1.3)	221.1521、95.0851、93.0691	259.2432、205.1959、83.0509	花生四烯酸	人工合成牛黄、灵芝	[8, 14]
96	33.55	$C_{16}H_{30}O$	239.2369 (0.7)	—	95.0856、81.0700、67.0542、55.0542	—	麝香酮 [a]	麝香	[36-38]

注：[a] 表示化合物经对照品确证。

Note：[a] means compound were confirmed in comparison with standards.

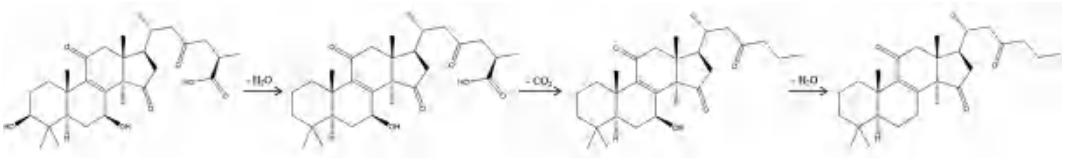


图 2　灵芝酸 B 的质谱裂解规律解析

Fig 2　Fragmentation pathway of ganoderic acid B

2.3.2　皂苷类成分　主要来自人参，以原人参二醇型皂苷和原人参三醇型皂苷为主。在质谱裂解中，皂苷类成分主要丢失母核上连接的糖苷碎片，如葡萄糖苷（Glc）*m/z* 162、鼠李糖苷（Rha）*m/z* 146 等，最终形成苷元离子。原人参二醇型皂苷裂解的特征碎片为 *m/z* 425、*m/z* 407；原人参三醇型皂苷裂解的特征碎片为 *m/z* 405、*m/z* 423。以化合物 **38** 人参皂苷 Rg_1 为例，进行质谱裂解规律解析，如图 3 所示。化合物 **38** 分子式为 $C_{42}H_{72}O_{14}$，保留时间为 17.27 min。在正离子模式下，准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 *m/z* 801.4923，分子离子通过丢失两分子 H_2O 和一分子葡萄糖苷，得到碎片离子 *m/z* 603.4273，接着再丢失一分子 Glc，得到特征碎片离子 *m/z* 441.3700，再丢失一分子 H_2O 得到特征碎片离子 *m/z* 423.3577。根据以上二级碎片离子信息及裂解规律，比对对照品，鉴定化合物 **38** 为人参皂苷 Rg_1。

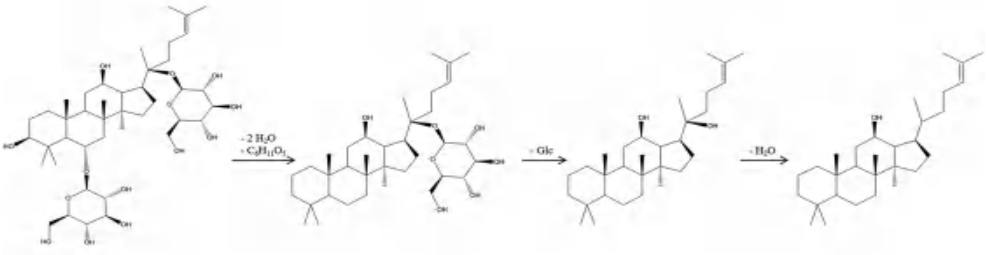


图 3　人参皂苷 Rg_1 的质谱裂解规律解析

Fig 3　Fragmentation pathway of ginsenoside Rg_1

2.3.3　胆汁酸类成分　主要来自熊胆和牛黄，是一类具有胆甾烷母核的化合物，可分为游离型胆汁酸和结合型胆汁酸，在质谱裂解中主要发生脱水、侧链断裂。正模式下，游离型胆汁酸脱水及断裂侧链后形成甾体母核 *m/z* 243，母核进一步裂解形成特征性碎片 175、161、147；结合型胆汁酸主要分为牛磺酸型和甘氨酸型，牛磺酸型胆汁酸断裂侧链形成特征碎片离子 *m/z* 126；甘氨酸型胆汁酸断裂侧链形成特征碎片离子 *m/z* 158[40]。以化合物 **88** 去氧胆酸为例，进行质谱裂解规律解析，见图 4。化合物 **88** 分子式为 $C_{24}H_{40}O_4$，保留时间为 23.51 min。在正离子模式下，准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 *m/z* 393.2988，分子离子通过丢失两分子 H_2O 得到碎片离子 *m/z* 357.2751，接着再丢失 C17 位侧链 $C_5H_4O_2$，得到甾体母核 *m/z* 243.2117，甾体母核裂解得到特征性碎片 175.1436、161.1012、147.1105。根据以上二级碎片离子信息及裂解规律，比对对照品，鉴定化合物 **88** 为去氧胆酸。

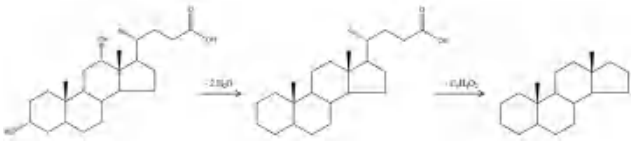


图 4　去氧胆酸的质谱裂解规律解析

Fig 4　Fragmentation pathway of deoxycholic acid

2.3.4　黄酮类成分　主要来自红花，分为黄酮氧苷类和醌式查耳酮苷类，其中醌式查耳酮苷类为

红花特有的活性成分。在质谱裂解中，黄酮氧苷类成分主要脱去黄酮母核连接的糖配基，黄酮母核则以逆迪尔斯 - 阿德尔反应（Retro-Diels-Alder reaction）裂解 [41]。醌式查耳酮苷类成分中，糖基以 C-C 键形式连接，不易断裂。正离子模式下，易发生糖羟基连续脱水；负离子模式下，可裂解生成 $[M-H-120Da]^-$ 和 $[M-H-90Da]^-$ 的特征碎片离子 [42]。以化合物 **10** 黄芩苷为例，进行质谱裂解规律解析，如图 5 所示。化合物 **10** 分子式为 $C_{21}H_{18}O_{11}$，保留时间为 8.99 min。在正离子模式下，准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 *m/z* 447.0924，分子离子通过丢失一分子葡萄糖醛酸苷（GlcUA）得到碎片离子 *m/z* 271.0609，接着再丢失一分子 H_2O，得到特征碎片离子 *m/z* 253.1440。在负离子模式下，准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 *m/z* 445.0780，分子离子通过丢失一分子葡萄糖醛酸苷（GlcUA）得到碎片离子 *m/z* 269.0424。根据以上二级碎片离子信息及裂解规律，比对对照品，鉴定化合物 **10** 为黄芩苷。

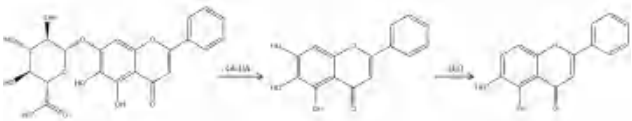


图 5　黄芩苷的质谱裂解规律解析

Fig 5　Fragmentation pathway of baicalin

2.3.5　生物碱类成分　生附子中含有毒性较大的双酯型二萜生物碱，在炮制过程中水解转化成单酯型二萜生物碱，毒性显著降低 [12]。活心丸中检测到的生物碱主要是单酯型二萜生物碱，该类化合物 C8 位取代基为 OH[43-44]。在质谱裂解中，单酯型二萜生物碱主要丢失 C8 位的 H_2O 及其他侧链的 CH_3OH、CH_2O、CO 等基团。以化合物 **28** 苯甲酰乌头原碱为例，进行质谱裂解规律解析，见图 6。化合物 **28** 分子式为 $C_{32}H_{45}NO_{10}$，保留时间为 14.63 min。在正离子模式下，准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 *m/z* 604.3103，分子离子通过丢失一分子 H_2O 和 CH_3OH 得到碎片离子 *m/z* 554.2732，根据以上二级碎片离子信息及裂解规律，比对对照品，鉴定化合物 **28** 为苯甲酰乌头原碱。

图 6　苯甲酰乌头原碱的质谱裂解规律解析

Fig 6　Fragmentation pathway of benzoylaconine

2.3.6　蟾毒内酯类成分　主要来自蟾酥，是蟾蜍二烯羟酸内酯类化合物，包括蟾蜍毒素类和蟾毒配基类化合物 [45]。此类化合物的特征是 C17 位连接 *α*- 吡喃酮，所以在质谱裂解中，通常丢失 *α*- 吡喃酮基团。以化合物 **63** 蟾毒它灵为例，进行质谱裂解规律解析，如图 7 所示。化合物 **63** 分子式为 $C_{26}H_{36}O_6$，保留时间为 18.62 min。在正离子模式下，准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 *m/z* 445.2584，分子离子通过丢失一分子 HOAc 得到碎片离子 *m/z* 385.2369，接着再丢失一分子 H_2O，得到 *m/z* 367.2261；此外，准分子离子峰 $[M+H]^+$ *m/z* 445.2584 通过丢失一分子 *α*- 吡喃酮得到碎片离子 *m/z* 349.2153。根据以上二级碎片离子信息及裂解规律，再结合文献报道 [46]，鉴定化合物 **63** 为蟾毒它灵。

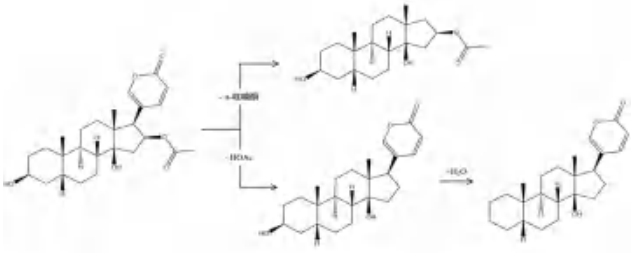


图 7　蟾毒它灵的质谱裂解规律解析

Fig 7　Fragmentation pathway of bufotaline

3　讨论

本实验采用 UFLC-Triple TOF-MS/MS 技术对活心丸 70% 甲醇提取液的化学成分进行分析，共确证和指认出 96 个化学物，其中三萜类 25 个、皂苷类 12 个、胆汁酸类 11 个、黄酮类 11 个、生物碱类 10 个、蟾毒内酯类 12 个、有机酸类 7 个、氨基酸类 4 个、核苷类 1 个、甾酮类 1 个，其他类 2 个，此外，解释了代表性成分的裂解规律。在活心丸中未检出毒性较大的双酯型二萜生物碱，是由于在炮制过程中生附子中的双酯型二萜生物碱水解转化成毒性较低的单酯型二萜生物碱，确保药物的安全性。

由于 UFLC-Triple TOF-MS/MS 技术主要用于检测小分子化合物，所以结果中归属于珍珠、蟾酥的化合物较少。针对这类富含多肽和蛋白的药材，需要用高分辨率蛋白质谱（如四极杆 - 静电场轨道阱 - 线性离子阱三合一傅里叶变换质谱）进行检测。本研究阐明了活心丸的化学物质基础，为后续活心丸研究提供了依据。

参考文献

[1]　梁仕达 . 新编中成药临床应用 [M]. 北京：中国中医药出版社，1997.

[2]　Peng MZ，Yang ML，Shen AL，et al. Huoxin Pill attenuates cardiac fibrosis by suppressing TGF-*β*1/Smad2/3 pathway in isoproterenol-induced heart failure rats [J]. Chin J Integr Med，2021，27（6）：424-431.

[3]　梁晓鹏 . 活心丸（浓缩丸）治疗冠心病稳定性心绞痛临床研究 [D]. 北京：北京协和医学院，2018.

[4]　梅冬环，谢志红 . 中西医结合治疗冠心病心绞痛 43 例临床

观察 [J]. 中国民族民间医药，2019，28（20）：90-92.
[5] 段文慧，徐浩，王翠萍，等 . 活心丸（浓缩丸）治疗冠心病稳定性心绞痛气虚血瘀证——一项多中心、随机、双盲、安慰剂对照临床研究 [J]. 中国循证心血管医学杂志，2016，8（9）：1110-1115.
[6] 周雪玲 . 基于 TLR4/NF-κB 信号通路探讨活心丸抗急性心肌缺血炎症反应的作用机制 [D]. 福州：福建中医药大学，2020.
[7] 莫尊汇，陈美先，王鹏程，等 . 活心丸对小鼠的急性毒性研究 [J]. 中国药物警戒，2021，18（10）：924-929.
[8] 柳温曦 . 中药牛黄及其代用品的真伪鉴别及牛黄药材及成药的质量控制方法研究 [D]. 北京：中国食品药品检定研究院，2019.
[9] 张佳莉，李莉 . LC-MS/MS 同时测定灵芝胶囊中 7 种三萜酸的含量 [J]. 中国现代应用药学，2021，38（22）：2852-2857.
[10] Peng C，Tian J，Lv M，et al. Development and validation of a sensitive LC-MS-MS method for the simultaneous determination of multicomponent contents in artificial calculus bovis [J]. J Chromatogr Sci，2014，52（2）：128-136.
[11] Feng C，Li X，Zhang C，et al. Development of a rapid and simple LC-MS/MS method for identification and quality control of natural Calculus bovis and Calculus bovis sativus [J]. Anal Methods-UK，2015，7（18）：766-7617.
[12] 冯承阳 . 基于胆汁酸成分的体外培育牛黄质量标准和药动学研究 [D]. 武汉：华中科技大学，2017.
[13] 姬利强，李山雷，王运杰，等 . 基于 HPLC-MS/MS 技术快速鉴定灵芝化学成分 [J]. 河南大学学报（医学版），2021，5（40）：313-321.
[14] 高健，吕邵娃 . 人参化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药导报，2021，27（1）：127-130.
[15] 温宝庆，李文庆，林坤霞，等 . 灵芝化学成分的 HPLC-QTOF MS 分析 [J]. 今日药学，2019，29（11）：761-764.
[16] 王凯红 . 红花注射液化学成分与生物活性研究 [D]. 太原：山西大学，2018.
[17] 孙崇峰，范圣此，毅罗，等 . 蟾酥化学成分及其人工合成的研究进展 [J]. 中草药，2018，49（13）：3183 -3792.
[18] 李馨蕊，刘娟，彭成，等 . 红花化学成分及药理活性研究进展 [J]. 成都中医药大学学报，2021，44（1）：102-112.
[19] 王勇，刘淑莹 . 乌头碱类生物碱的质谱研究进展 [J]. 质谱学报，2002，23（2）：112-119.
[20] 冯丹萍 . 红花化学成分的研究 [J]. 中成药，2021，43（8）：2253-2255.
[21] 包懿 . 乌头类二萜生物碱的分离方法及 ESI-MS 图谱分析 [D]. 沈阳：沈阳药科大学，2008.
[22] 吴克红 . 附子的化学成分及其活性研究 [D]. 北京：中国中医科学院，2013.
[23] 张英，邱鹰昆，刘珂，等 . 中华大蟾蜍的研究进展 [J]. 中草药，2006，37（12）：1905-1908.
[24] 赵立春 . 人参化学成分的提取及测试方法的优化研究 [D]. 北京：中国农业科学院，2019.
[25] 陈建新，邓洁薇，陈红，等 . 高效液相色谱 - 静电场轨道阱质谱鉴定大鼠血浆中蟾蜍二烯内酯及其代谢物 [J]. 分析化学，2011，39（12）：1858-1863.
[26] 师秀琴，阚全程，徐英 . HPLC-MS/MS 研究痰热清胶囊生产过程中熊胆粉化学成分的变化 [J]. 中国药学杂志，2017，52（22）：2023-2034.
[27] 罗君，赵琳珺，包江平，等 . UPLC-Q-TOF-MS 分析苗族药红花龙胆化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（24）：89-94.
[28] 杨秀伟，王洪平，张友波，等 . 人参根和根茎中新的聚乙炔类化学成分 [J]. 中草药，2021，52（1）：14-22.
[29] 孙雪飞 . 赤芝子实体化学成分研究 [D]. 北京：北京中医药大学，2015.
[30] 刘超 . 紫芝和松杉灵芝化学成分研究及灵芝三萜酸的含量测定 [D]. 北京：中国协和医科大学，2009.
[31] 赵幻希，王秋颖，孙秀丽，等 . HPLC-MS 结合多元统计分析区分人参产地及筛选皂苷类标志物 [J]. 高等学校化学学报，2019，40（2）：246-253.
[32] 王芳生，蔡辉，杨峻山，等 . 赤芝子实体中三萜化学成分的研究 [J]. 药学学报，1996，3（31）：200-204.
[33] 罗强，陈全成，吴瑶，等 . 熊胆的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志，2010，35（18）：2416-2419.
[34] 王芳生，蔡辉，杨峻山，等 . 赤芝子实体中灵芝酸类成分的研究 [J]. 药学学报，1997，32（6）：48-51.
[35] Qiao X，Ye M，Pan D，et al. Differentiation of various traditional Chinese medicines derived from animal bile and gallstone：simultaneous determination of bile acids by liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry [J]. J Chromatogr A，2011，1218（1）：107-117.
[36] 袁绿益，陈娟，常颜，等 . GC-MS 研究含天然麝香小金丸与含人工麝香小金丸特征化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（2）：43-47.
[37] 于娟 . 不同麝香的气相色谱指纹图谱 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（6）：175-182.
[38] 梁颖，汪小根 . GC-MS 法初步分析天然麝香与人工麝香 [J]. 中药新药与临床药理，2005，16（3）：204-205.
[39] 陈若芸，于德泉 . 灵芝三萜化学成分研究进展 [J]. 药学学报，1990，25（12）：940-953.
[40] 单国顺，赵启苗，潘多，等 . 基于 UHPLC-Q-TOF MS/MS 的胆南星中胆汁酸类成分的质谱裂解规律研究 [J]. 质谱学报，2020，41（4）：340-350.
[41] Cuyckens F，Rozenberg R，de Hoffmann E，et al. Structure characterization of flavonoid *O*-diglycosides by positive and negative nano-electrospray ionization ion trap mass spectrometry [J]. J Mass Spectrom，2001，36（11）：1203-1210.
[42] Cao J，Yin C，Qin Y，et al. Approach to the study of flavone di-C-glycosides by high performance liquid chromatography-tandem ion trap mass spectrometry and its application to characterization of flavonoid composition in Viola yedoensis [J]. J Mass Spectrom，2014，49（10）：1010-1024.
[43] 雷崎方，孙桂波，沈寿茂，等 . 附子的化学成分研究 [J]. 中草药，2013，44（6）：655-659.
[44] 葛京城，许庆轩，闫静，等 . 附子中脂类生物碱的电喷雾三重四极杆质谱研究 [J]. 质谱学报，2012，33（2）：123-128.
[45] 孙崇峰，范圣此，罗毅，等 . 蟾酥化学成分及其人工合成的研究进展 [J]. 中草药，2018，49（13）：3183-3192.
[46] Ye MGD. Analysis of bufadienolides in the Chinese drug Chan-Su by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Sp，2005，13（19）：1881-1892.

（收稿日期：2022-08-26；修回日期：2022-12-14）

五味子酮通过调节 AKT/GSK3 信号通路改善 2 型糖尿病大鼠血糖的研究

胡益杏[1, 2]，李逃明[1]，杨中保[1*]，左美玲[1*]（1. 湖南师范大学附属长沙医院，长沙　410006；2. 湖南师范大学 医学院，长沙　410205）

摘要：目的　探讨五味子酮的降血糖作用及其可能的作用机制。**方法**　构建 2 型糖尿病（T2DM）大鼠模型，给予低、中、高剂量五味子酮灌胃处理后，评估其空腹血糖、K 值与肝脏指数，并采用 PAS 染色检测肝组织的糖原含量。建立高糖（55 mmol • L^{-1}）诱导的 HepG2 细胞模型，给予五味子酮或 AKT 抑制剂 MK-2206 干预后，分别采用 NBDG 法和比色法检测细胞的糖摄取和糖生成能力。采用 Real-time PCR 和 Western blot 法进一步检测 T2DM 大鼠肝组织和高糖诱导 HepG2 细胞中磷酸化 AKT（p-AKT）和糖原合成酶（GSK3）的表达。**结果**　与正常组相比，T2DM 大鼠的空腹血糖和肝脏指数显著升高，胰岛素敏感性、糖原合成能力显著降低，高糖（55 mmol • L^{-1}）诱导的 HepG2 细胞葡萄糖摄取显著减少、而生成显著增多。分子生物学实验结果显示，T2DM 大鼠和高糖（55 mmol • L^{-1}）诱导的 HepG2 细胞 AKT 的磷酸化水平显著下调，而 GSK3 的表达水平显著上调，给予五味子酮干预能够有效逆转上述改变，且该逆转作用可被 AKT 抑制剂 MK-2206 终止。**结论**　五味子酮是一种潜在的降血糖药物，其降糖作用机制可能与调节 AKT/GSK3 信号通路有关。

关键词：2 型糖尿病；AKT；糖原合成酶；糖原合成；五味子酮
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0933-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.015

Schisandrone improves the blood glucose in rats with type 2 diabetes mellitus by regulating the AKT/GSK3 signal pathway

HU Yi-xing[1, 2], LI Tao-ming[1], YANG Zhong-bao[1*], ZUO Mei-ling[1*] (1. *Affiliated Changsha Hospital of Hunan Normal University, Changsha* 410006; 2. *College of Medicine, Hunan Normal University, Changsha* 410205)

Abstract: Objective　To determine the hypoglycemic effect of schisandrone and its possible action mechanism. **Methods**　Type 2 diabetes mellitus (T2DM) rat model was established to assess its fasting glucose, K value and liver index after the gavage intervention with low, medium and high doses of schisandrone. The glycogen content of the liver tissue was detected by PAS staining. A high glucose (55 mmol • L^{-1}) induced HepG2 cell model was established, and the glucose uptake and production capacity of the cells were detected by NBDG method and colorimetric method under the intervention of schisandrone or AKT inhibitor MK-2206, respectively. AKT phosphorylation and the glycogen synthase kinase-3 (GSK3) expression in the liver tissues of T2DM rats and high glucose-induced HepG2 cells were further detected by real-time PCR and Western blot. **Results**　Compared with rats in the normal group, T2DM rats showed significantly higher fasting glucose lever and liver index, lower insulin sensitivity and glycogen synthesis, and the glucose uptake of HepG2 cells induced by high glucose (55 mmol • L^{-1}) were decreased, while the production was much increased.

基金项目：湖南省卫健委资助项目（No. C20200350）；长沙市科技局资助项目（No. kq2208472）。
作者简介：胡益杏，男，硕士研究生，主要从事中药药效物质基础研究，email：630481009@ qq.com　*通信作者：杨中保，男，硕士研究生导师，副教授，主要从事中药药效物质基础与作用机制研究，email：yangzhongbao1984@163.com；左美玲，女，硕士研究生导师，教授，主要从事中药药效物质基础研究，email：1762985079@qq.com

Molecular biology experiments showed that the phosphorylation of AKT (p-AKT) level in T2DM rats and HepG2 cells was significantly down-regulated, but the expression level of GSK3 was significantly up-regulated. The above changes were all obviously reversed by schisandrone, but the effect of schisandrone on HepG2 cells was terminated by the AKT inhibitor MK-2206. **Conclusion** Schisandrone is a potential hypoglycemic drug, whose hypoglycemic mechanism may be related to the regulation of AKT/GSK3 signal pathway.

Key words: type 2 diabetes mellitus; AKT; glycogen synthase kinase-3; glycogen synthesis; schisandrone

2 型糖尿病（type 2 diabetes mellitus，T2DM）以血糖升高为主要特征，并伴有糖尿病视网膜病变和糖尿病神经病变等并发症，是心脑血管疾病的危险因素 [1]。根据世界卫生组织 2017 年的报告，全球糖尿病患者数量高达 8.51 亿人，其中 90% 以上为 T2DM[2]。胰岛素抵抗（insulin resistance，IR）或相对缺乏是 T2DM 的主要原因，既往研究表明 IR 是 T2DM 发病的始动因素 [3]，同时 PI3K/AKT 信号通路作为调节胰岛素水平的关键途径之一，与 IR 的发病机制密切相关。糖原合成酶 3（glycogen synthase kinase-3，GSK3）作为 AKT 的重要底物，是糖原合成的关键限速酶。在 T2DM 状态下，机体出现 IR，胰岛素效能绝对或相对不足，脱磷酸化的 GSK3 增多，进而肝糖原合成减少，肝糖原含量下降，导致血糖水平上升。据报道，AKT 主要通过调节 GSK3 途径参与糖原合成和葡萄糖转运等糖代谢过程，从而改善 IR，表明 AKT/GSK3 信号通路在 IR 中起关键作用 [4-5]。因此，本课题组预通过 AKT/GSK3 信号通路寻找治疗 T2DM 的新药或有效药物。

几千年来，中药一直以单味或复方的形式用于糖尿病（中医称之为“消渴病”）的治疗或辅助治疗 [6-7]，是治疗 T2DM 新药开发的重要来源，在改善 IR 方面具有显著优势 [8]。许多中药通过作用于 PI3K/AKT 信号通路上多个药物靶点来改善 IR[9-10]。五味子为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis*（Turcz.）Baill. 的干燥成熟果实，作为传统中药已有数千年历史。现代药理研究表明，五味子在治疗糖尿病方面具有独特优势，不仅能降低糖尿病大鼠血糖水平，还能保护胰岛 β 细胞，改善胰岛功能 [11]。然而，五味子降糖活性成分及机制研究相对较少。

五味子属植物化学成分丰富，其中木脂素是最主要的一类化学成分。已有报道证实木脂素类化合物五味子乙素能够使炎性因子白细胞介素（IL）-6、IL-1、IL-18 的含量明显降低，改善机体氧化应激，减轻相关炎症反应，进而激活胰岛素转导信号通路，缓解机体 IR 作用显著 [12]。五味子酮是从五味子中分离得到的一种具有 4- 苯代四氢萘骨架的木脂素，具有很强的抗氧化作用，能清除超氧阴离子，保护活性氧应激下的细胞 [13-14]。此外，五味子酮被证明是一种很有前途的抗毒力候选药物，可以以剂量依赖的方式抑制金黄色葡萄球菌毒力因子 α- 溶血素的产生 [15]。然而，目前尚无五味子酮降血糖作用及其机制方面的文献报道。

本研究首次探讨了五味子酮是否具有降血糖作用及其作用机制是否涉及 AKT/GSK3 信号通路。

1 材料与方法

1.1 材料

五味子酮（纯度＞98%，上海吉至生化科技有限公司）；BCA 蛋白测定试剂盒、MK-2206（AKT 抑制剂）、β-actin 兔抗人多克隆抗体（上海碧云天生物有限公司）；DMEM Gibco 细胞培养基、Gibco 胎牛血清、PCR 引物、RT-PCR Mix、ECL 发光液、1× 磷酸盐缓冲溶液（PBS）[赛默飞世尔科技（中国）有限公司]；葡萄糖摄取检测试剂盒 [西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司]；二甲基亚砜（国药集团化学试剂有限公司）；糖原 PAS 染色液（上海源叶生物科技有限公司）；2-NBDG 葡萄糖摄取荧光探针（上海集奇生物科技有限公司）；抗 GSK3 单克隆抗体、辣根过氧化物酶结合二抗 [圣克鲁斯生物技术（上海）有限公司]；血糖测量仪（三诺生物传感股份有限公司）；全波长多功能微孔板检测仪（上海新振仪器设备有限公司）；7900HT Fast Real-Time PCR System（美国应用生物系统公司）；奥林巴斯 IX71 200× 显微镜 [奥林巴斯（中国）有限公司]。辣根过氧化物酶偶联二抗（批号：A0208，羊抗兔抗体；批号：A0216，羊抗鼠抗体；稀释度 1∶2000，Beyotime Institute of Biotechnology）；化学发光试剂盒（GE Healthcare）。

1.2 动物培养及分组

雄性 SD 大鼠 48 只，8 周龄，体质量（270±

20）g [湖南斯莱克景达（SJA）实验动物有限公司]，饲养在昼夜交替 12 h、温度 25 ℃、湿度 60% 的标准条件下。所有大鼠自由饮食饮水。本研究按照实验动物的护理和使用指南进行，并得到湖南师范大学兽医动物护理和使用委员会的批准（批准号：2019111）。

T2DM 大鼠模型按 Ma 等[16]的方法建立。在实验开始时给予大鼠高脂饲料，并在第 1 ～ 4 周期间每 2 日腹腔注射 15 mg • kg^{-1} 的链脲佐菌素（STZ）。第 4 周末采集尾静脉血 500 μL 进行血糖测定，空腹血糖 > 11.1 mmol • L^{-1} 表示造模成功。然后将所有大鼠分成 6 组，每组 8 只，分别为正常组（正常饮食且注射 0.9% 氯化钠），模型组，五味子酮高剂量组（20 mg • kg^{-1}），五味子酮中剂量组（10 mg•kg^{-1}），五味子酮低剂量组（5 mg • kg^{-1}），溶媒组（生理盐水）。从第 5 周到第 8 周，糖尿病大鼠每日给药一次。第 8 周末测定血糖和胰岛素敏感性。实验结束时，腹腔注射 3% 戊巴比妥钠（40 mg • kg^{-1}）麻醉后急性失血死亡。收集肝组织进行 mRNA 和蛋白分析。

1.3　空腹血糖水平的测量

用 7 号针采集 500 μL 的尾静脉血，用血糖仪（SANO）测量血糖水平。

1.4　大鼠胰岛素敏感性实验

大鼠禁食 8 h 后，腹腔注射戊巴比妥钠（50 mg • kg^{-1}）麻醉，静脉注射给予葡萄糖 700 U • kg^{-1} 和胰岛素 0.175 U • kg^{-1}。分别于 3、6、9、12、15 min 采血测定血糖水平。用 K 值进行胰岛素敏感性分析，反映 3 ～ 15 min 的血糖下降率。

1.5　测量体重和肝脏指数

按照 Zhu 等[17]的方法测量饲养 8 周后大鼠体重、肝脏重量，并计算肝脏指数（肝脏重量与体重的比率）。

1.6　过碘酸 -Schiff（PAS）染色[18]

肝组织用 Carnoy’s 溶液在 4 ℃固定 20 min，在乙醇中脱水，在二甲苯中透明，石蜡包埋，在 5 μm 处切片。石蜡切片脱蜡，高碘酸水溶液氧化 10 min，Schiff 试剂染色 30 min，自来水冲洗 10 min，苏木精再染色 5 min，中性胶封住，并在光学显微镜下观察拍摄（放大倍率，×200）。

1.7　细胞培养及分组

HepG2 细胞系由中国典型培养物收集中心提供，细胞在 DMEM 中培养。加入 10% 胎牛血清、100 U • mL^{-1} 青霉素和 100 μg • mL^{-1} 链霉素，在 5%CO_2 培养箱中 37 ℃培养，细胞达到 70% 融合后进行不同处理。对照组细胞在含 5.5 mmol • L^{-1} 葡萄糖的 DMEM 中培养 24 h；高糖组在含 55 mmol • L^{-1} 葡萄糖的 DMEM 中培养 24 h；五味子酮＋ MK-2206 联合处理组细胞在含有 55 mmol • L^{-1} 葡萄糖、1×10^{-7} mol • L^{-1} 五味子酮和 3 μmol • L^{-1} MK-2206 的 DMEM 中培养 24 h；赋形剂组细胞在含 DMSO 的 DMEM 中培养 24 h。然后收集细胞进行 mRNA 和蛋白表达分析或葡萄糖生产和摄取分析。

1.8　HepG2 细胞葡萄糖产生和摄取的测定

在葡萄糖产生实验中，用 PBS 冲洗细胞，然后用无葡萄糖和酚红的 DMEM 葡萄糖产生实验液处理 3 h，收集上清液，使用试剂盒进行葡萄糖浓度测定，然后将读数归一化为从全细胞裂解物中测定的总蛋白质含量。在葡萄糖摄取方面，用 PBS 洗涤细胞两次，然后用 200 μmol • L^{-1} 2-NBDG 在无糖培养液中孵育 30 min。将不含 2-NBDG 的无糖培养液孵育的细胞作为阴性对照。最后，用 PBS 冲洗细胞，用微型平板阅读器测定荧光，激发波长为 488 nm，发射波长为 520 nm。

1.9　RNA 提取及实时定量聚合酶链式反应（real-time PCR）分析

从每个样品中提取总 RNA，并测定其浓度和纯度，使用试剂盒（CAT）从每个样品中提取 100 ng 的 RNA 进行逆转录扩增反应。10 μL 逆转录反应体系如下：随机引物（0.5 μL）、寡聚脱氧核糖核酸（DT）引物（0.5 μL）、5×PrimeScrip 缓冲液（2 μL）、逆转录酶（0.5 μL）、无酶水（4.5 μL）和 RNA（2 μL），逆转录反应参数设置为 37 ℃（10 min），85 ℃（5 s）。之后用 SYBR 预混试剂进行实时定量 PCR 扩增反应。PCR 引物序列如下：GSK3（正向：5'-GGACAAAGGTTCAAGAACCGAG-3'；反向：5'-TTTCTCTCCCCACTGGAGTA-3'）和 β-actin（正向：5'-CCCATCTATGAGGGTACGC-3'；反向：5'-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3'）。25 μL 实　时定量扩增反应体系：10 μLSYBR PreMix Ex Taq TM、0.5 μL 正向引物、0.5 μL 反向引物、0.5 μL 50×ROX 参考染料、4 μL cDNA 和 4.5 μL 无酶水，热循环参数设置为：预变性（95 ℃，30 s）、变性（95 ℃，30 s）、退火（60 ℃，30 s）和延伸率（70 ℃，31 s），35 个循环。

1.10　Western blot 分析

用含有 PMSF 和磷酸酶抑制剂 Cock-Tail A 的裂解缓冲液提取总蛋白，用 BCA 蛋白分析试剂盒测定蛋白浓度。每个样本中的 40 μL 蛋白质用于蛋白质印迹分析。采用十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺（SDS）凝胶电泳法分离蛋白，并与 PVDF 膜进行印迹。然后用 20% 的脱脂牛奶封闭膜，并用水冲洗。之后，将膜与抗 GSK3（No. sc-sc-5264）、

AKT（No. sc-81434）、p-AKT（No. sc-514032）（Santa Cruz Biotechnology，Inc.）和 β-actin 的一抗在 4 ℃下孵育 16 h，并在 25 ℃下与辣根过氧化物酶偶联二抗孵育 2 h。使用增强的化学发光试剂盒将信号可视化。采用美国国立卫生研究院（NIH）ImageJ Version 1.43 进行光密度分析，以 β-actin 作为内参照，校准蛋白质负载量。

1.11　统计分析

采用 SPSS 26.0 统计软件进行统计分析。数据用平均值 ± 标准偏差表示。组间比较采用单因素方差分析和 t 检验。所有实验重复 3 次。$P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　五味子酮对 T2DM 大鼠空腹血糖和胰岛素敏感性的影响

如图 1 所示，T2DM 大鼠的空腹血糖水平显著高于对照组（16.5 mmol•L^{-1} *vs* 5.9 mmol•L^{-1}），表明 T2DM 模型建立成功。与模型组比较，五味子酮以剂量依赖的方式显著降低 T2DM 大鼠的血糖水平，提示五味子酮具有降血糖作用。与对照组相比，T2DM 大鼠的胰岛素敏感性（K 值）显著降低，而五味子酮以剂量依赖的方式改善 T2DM 大鼠的胰岛素敏感性，提示五味子酮是治疗 T2DM 的潜在药物。

2.2　五味子酮对 T2DM 大鼠体重和肝脏指数的影响

检测五味子酮对 T2DM 大鼠体重、肝脏重量和肝脏指数的影响。造模前，各组大鼠体质量差异无统计学意义。造模成功且药物干预 4 周后，与健康大鼠相比，模型组大鼠出现多饮、多尿、多食，活动减少，体重显著降低，符合 T2DM 特征，而五味子酮高、中、低剂量组体重明显增加，差异具有统计学意义（见图 2）。结果表明，与模型组相比，五味子酮能降低 T2DM 大鼠肝脏重量以及降低肝脏指数，且呈剂量依赖性，提示五味子酮可能作用的靶器官在肝脏，且对肝脏具有保护作用。

2.3　五味子酮对 T2DM 大鼠肝糖原含量的影响

促进肝糖原合成是机体主要降血糖途径之一，本实验观察了五味子酮对肝糖原含量的影响。PAS 染色结果显示正常组肝脏可见丰富紫红色糖原颗粒均匀分布于肝细胞内。与正常组相比，模型组肝脏细胞可见显著脂肪空泡，胞浆中紫红色糖原颗粒显著减少，颜色较浅（见图 3）；其中五味子酮高、中、低剂量组染色更接近正常组。结果表明，与模型组相比，五味子酮以剂量依赖的方式提高 T2DM 大鼠肝糖原含量，提示五味子酮可能是通过促进肝糖原合成而达到降糖目的。

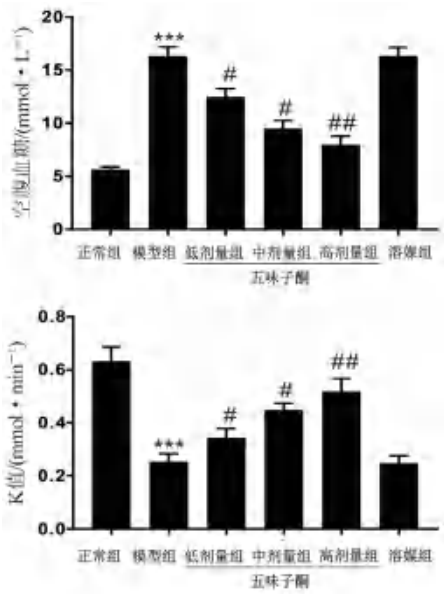


图 1　五味子酮对 T2DM 大鼠空腹血糖和胰岛素敏感性的影响

Fig 1　Effect of schisandrone on fasting glucose and insulin sensitivity in T2DM rats

注：*vs* 正常组，$^{***}P < 0.001$；*vs* 模型组，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note：*vs* normal group，$^{***}P < 0.001$；*vs* T2DM group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$.

2.4　五味子酮对 T2DM 大鼠 AKT/GSK3 通路的影响

进一步对五味子酮增加肝糖原合成开展机制探索。结果如图 4 所示，T2DM 大鼠 p-AKT 明显降低，五味子酮呈剂量依赖关系显著增加 p-AKT。GSK3 是参与肝脏葡萄糖代谢和肝脏葡萄糖合成代谢的关键酶，本实验观察了五味子酮是否对 GSK3 的表达有影响。与正常组相比，T2DM 大鼠肝组织中 GSK3 的表达水平显著上调，五味子酮明显抑制 T2DM 大鼠肝组织中 GSK3 的表达，并呈剂量依赖关系。提示五味子酮参与了 AKT/GSK3 信号通路的调节。

2.5　五味子酮对高糖诱导的 HepG2 细胞葡萄糖摄取和产生的影响

与对照组相比，高糖处理的 HepG2 细胞摄取葡萄糖能力显著降低，葡萄糖产生能力显著增强，而五味子酮逆转了这一趋势。然而，五味子酮引起的这种作用被 AKT 抑制剂 MK-2206 终止（见图 5）。这些结果表明五味子酮的降血糖机制与调节 AKT 的磷酸化有关。

2.6　五味子酮对高糖诱导的 HepG2 细胞 AKT/GSK3 通路的影响

与大鼠实验结果一致，高糖诱导的 HepG2 细胞 AKT 的磷酸化明显降低，五味子酮明显增加 AKT 的磷酸化。但五味子酮对 HepG2 细胞 p-AKT 的影

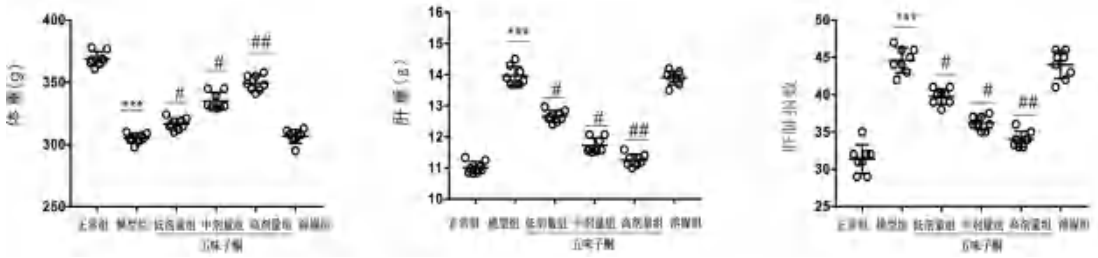


图 2　五味子酮对 T2DM 大鼠体重和肝脏指数的影响

Fig 2　Effect of schisandrone on body weight and liver index in T2DM rats

注：*vs* 正常组，$^{***}P < 0.001$；*vs* 模型组，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note：*vs* normal group，$^{***}P < 0.001$；*vs* T2DM group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$.

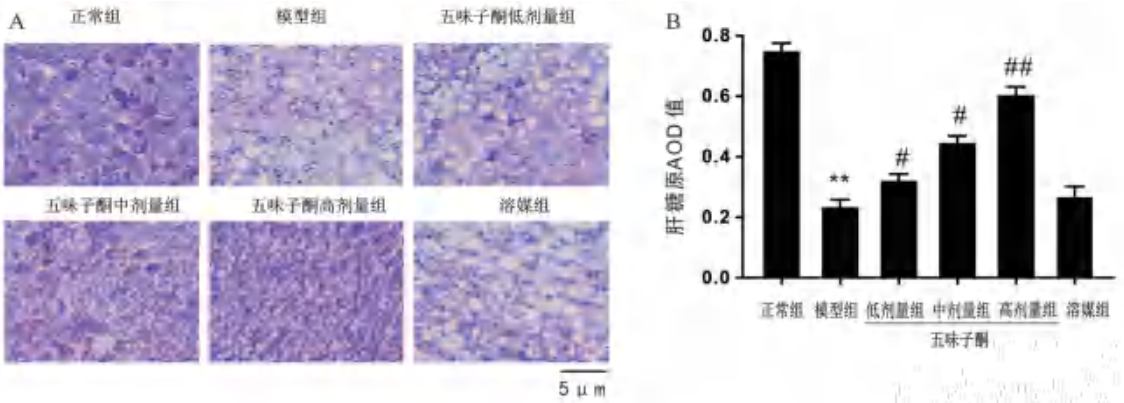


图 3　五味子酮对 T2DM 大鼠肝糖原含量的影响

Fig 3　Effect of schisandrone on hepatic glycogen synthesis in T2DM rats

注：*vs* 正常组，$^{**}P < 0.01$；*vs* 模型组，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note：*vs* normal group，$^{**}P < 0.01$；*vs* T2DM group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$.

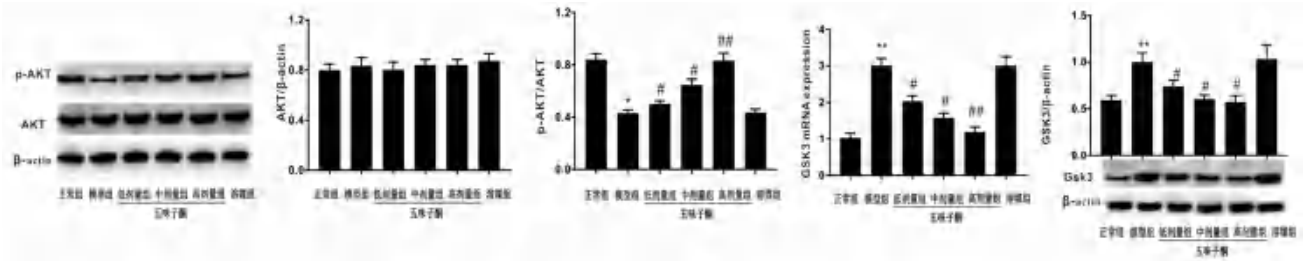


图 4　五味子酮对 T2DM 大鼠 AKT/GSK3 通路的影响

Fig 4　Effect of schisandrone on AKT/GSK3 axis in T2DM rats

注：*vs* 正常组，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；*vs* 模型组，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note：*vs* normal group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；*vs* T2DM group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$.

响可被 AKT 抑制剂 MK-2206 抑制（见图 6）。同样，与对照组相比，GSK3 在 HepG2 细胞中的表达水平显著上调，并被五味子酮抑制。然而，五味子酮对 HepG2 细胞中 GSK3 的抑制作用能够被 AKT 抑制剂 MK-2206 终止，提示五味子酮对 AKT/GSK3 通路的影响依赖于 AKT 的磷酸化。

3　讨论

基于改善 IR 的策略，与胰岛素信号通路相关的关键蛋白逐渐成为 T2DM 药物开发的新靶点[19]。GSK3 是糖原合成的关键调节因子，属于丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶家族。GSK3 有两种亚型（GSK-3α 和 GSK-3β），这两种亚型催化活性区域的氨基酸序列有 97% 的同源性，具有相似生物学特性，在细胞和组织中广泛表达[20]。研究发现，在 T2DM 患者的肝脏和肌肉组织中，GSK3 活性异常升高，损害胰岛素信号，抑制糖利用和糖原合成等过程，导致 IR[21]。在胰岛素信号通路中，GSK3 通过磷酸化糖原合酶，抑制其活性，并干扰胰岛素受体下游信号转导，还可通过葡萄糖转运蛋白 4（GLUT4）的转位调节骨骼肌葡萄糖转运，

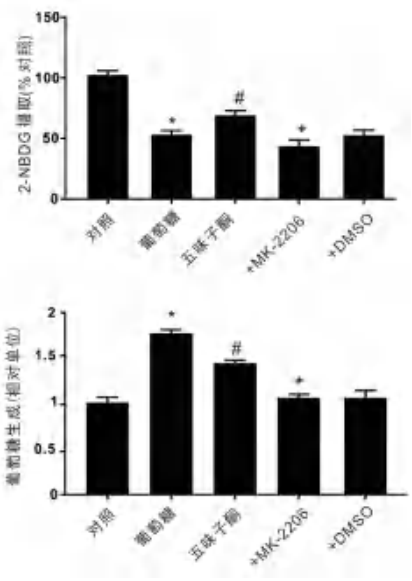


图 5　五味子酮对高糖诱导的 HepG2 细胞葡萄糖摄取和产生的影响

Fig 5　Effect of schisandrone on glucose uptake and production in HepG2 cells

注：*vs* 对照组，$^{*}P < 0.05$；*vs* 模型组，$^{\#}P < 0.05$；*vs* 五味子酮干预组，$^{+}P < 0.05$。

Note：*vs* control group，$^{*}P < 0.05$；*vs* + glucose group，$^{\#}P < 0.05$；*vs* + schisandrone group，$^{+}P < 0.05$.

从而调节肝糖原合成[22-23]。因此，GSK3 有望成为新兴治疗 T2DM 药物的研发靶点。本课题组通过 Real-time PCR 和 Western blot 法检测 T2DM 大鼠肝组织和高糖诱导 HepG2 细胞中 GSK3 mRNA 和蛋白的表达，发现五味子酮能显著下调 T2DM 大鼠肝组织和高糖诱导 HepG2 细胞中 GSK3 mRNA 和蛋白的表达，从而发挥缓解 IR 的作用。

AKT 是一种丝氨酸 / 苏氨酸激酶，也称为蛋白激酶 B（PKB），在细胞生存和生长、糖脂代谢的调节中发挥重要作用，是磷脂酰肌醇 3- 激酶（PI3K）下游信号通路的主要效应者之一[24]。PI3K/AKT 信号通路是胰岛素作用的主要信号传导途径，参与糖代谢调节[25]。胰岛素激活并与胰岛素受体结合，磷酸化 AKT 蛋白，诱导 PI3K/AKT 信号通路激活。活性 AKT 使 GSK3 磷酸化，降低其活性，进而上调糖原合酶（GS）活性，诱导肝糖原合成[26-27]。因此，AKT 信号通路在血糖稳态中起重要作用，而 AKT/GSK3 信号通路可能是 T2DM 治疗的潜在靶点。本课题组采用 Western blot 法检测 T2DM 大鼠肝组织和高糖诱导 HepG2 细胞中 AKT 和 p-AKT 蛋白的表达，发现与模型组相比，五味子酮显著上调 p-AKT 的表达水平。值得注意的是，五味子酮的这种作用可被 AKT 抑制剂 MK-2206 终止，表明五味子酮通过调节 AKT 介导的糖原合成产生降血糖作用。

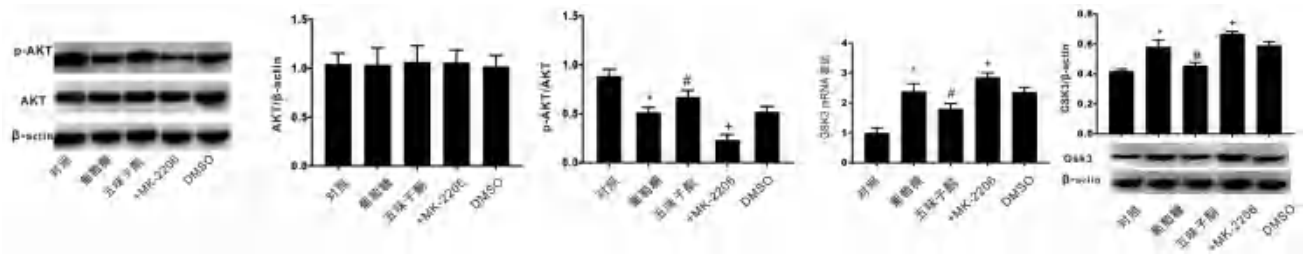


图 6　五味子酮对高糖诱导的 HepG2 细胞 AKT/GSK3 通路的影响

Fig 6　Effect of schisandrone on AKT/GSK3 axis in HepG2 cells

注：*vs* 对照组，$^{*}P < 0.05$；*vs* 模型组，$^{\#}P < 0.05$；*vs* 五味子酮干预组，$^{+}P < 0.05$。

Note：*vs* control group，$^{*}P < 0.05$；*vs* + glucose group，$^{\#}P < 0.05$；*vs* + schisandrone group，$^{+}P < 0.05$.

鉴于 IR 在 T2DM 发生发展中的重要作用，改善 IR 可能成为防治 T2DM 的有效方法，但目前还没有完全治愈 T2DM 的有效药物或手段。因此，迫切需要开发治疗 T2DM 的新药。五味子具有提高肝糖原、降低大鼠空腹血糖、调节总胆固醇代谢、改善胰岛素水平的作用。研究表明，五味子油能显著降低 T2DM 模型大鼠的血糖和血脂水平，调节糖脂代谢，改善胰岛素敏感指数，提高糖尿病大鼠对腹腔注射葡萄糖的耐受性[28]。此外，五味子油还能显著降低 T2DM 大鼠异常升高的胰岛素水平，减轻 IR[29]。五味子挥发油的主要成分是五味子木脂素，而五味子酮属于木脂素类的一种。在本研究中，我们首次证实了五味子酮通过改善胰岛素敏感性和降低血糖水平对 T2DM 大鼠起到保护作用，其机制可能与调节肝脏 GSK3 和 p-AKT 的表达有关，提示五味子酮可能是治疗 T2DM 的新候选药物。本研究将为五味子酮治疗 T2DM 的临床应用提供理论基础，同时也为其他中药及其单体的作用机制研究提供新思路。但本研究的局限性是实验只在雄性大鼠身上进行，因此五味子酮的性别作用差异无法评估，需要进一步的研究来解决这些问题。

参考文献

[1] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus [J]. Diabetes Care，2014，37（Suppl 1）：S81-S90.
[2] Sheikhpour M，Abolfathi H，Khatami S，et al. The interaction between gene profile and obesity in type 2 diabetes：a review [J]. Obes Med，2020，18：1-7.
[3] Cook JR，Langlet F，Kido Y，et al. Pathogenesis of selective insulin resistance in isolated hepatocytes [J]. J Biol Chem，2015，290（22）：13972-13980.
[4] Seo Y，Jung H，Shin H，et al. Enhanced glycogenesis is involved in cellular senescence via GSK3/GS modulation [J]. Aging Cell，2008，7（6）：894-907.
[5] Li X，Monks B，Ge Q，et al. AKT/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1α transcription coactivator [J]. Nature，2007，447（7147）：1012-1016.
[6] Pan L，Li Z，Wang Y，et al. Network pharmacology and metabolomics study on the intervention of traditional Chinese medicine Huanglian Decoction in rats with type 2 diabetes mellitus [J]. J Ethnopharmacol，2020，258：112842.
[7] Guo X，Sun W，Luo G，et al. Panax notoginseng saponins alleviate skeletal muscle insulin resistance by regulating the IRS1-PI3K-AKT signaling pathway and GLUT4 expression [J]. FEBS Open Bio，2019，9（5）：1008-1019.
[8] 毛建芳，孙丰雷 . Ⅱ型糖尿病胰岛素抵抗的中医药研究 [J]. 吉林中药，2012，32（2）：149-150.
[9] 邓晓威，谢宁 . 黄连素治疗 2 型糖尿病研究进展 [J]. 中国中药杂志，2014，39（8）：1374-1378.
[10] Li H，Zhao L，Zhang B，et al. A network pharmacology approach to determine active compounds and action mechanisms of ge-gen-qin-lian decoction for treatment of type 2 diabetes [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2014，2014：495840.
[11] An LP，Wang YP，Wang CM，et al. Protective effect of Schisandrae chinensis oil on pancreatic β-cells in diabetic rats [J]. Endocrine，2015，48（3）：818-825.
[12] 李蕾，王瑞锋，张丽晓，等 . 五味子乙素对 2 型糖尿病大鼠氧化应激和炎症反应的影响 [J]. 中国现代应用药学，2020，37（15）：1812-1817.
[13] 黄诒森，何燕，张均田 . 五味子三种成分的抗氧化作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志，1990（4）：275-277.
[14] 张明，蔡志平，赵志英 . 五味子酮保护大鼠皮层神经元对抗氯胺酮损伤的实验研究 [J]. 局解手术学杂志，2012，21（3）：266-267，270.
[15] Qi YX，Hou J，Zhao YC，et al. An inhibitory effect of schisandrone on α-hemolysin expression to combat methicillin-resistant staphylococcus aureus infections [J]. World J Microbiol Biotechnol，2022，39（1）：3.
[16] Ma C，Yu H，Xiao Y，et al. Momordica charantia extracts ameliorate insulin resistance by regulating the expression of SOCS-3 and JNK in type 2 diabetes mellitus rats [J]. Pharm Biol，2017，55：2170-2177.
[17] Zhu YX，Hu HQ，Zuo ML，et al. Effect of oxymatrine on liver gluconeogenesis is associated with the regulation of PEPCK and G6Pase expression and AKT phosphorylation [J]. Biomed Rep，2021，15（1）：56-66.
[18] Zuo ML，Wang AP，Tian Y，et al. Oxymatrine ameliorates insulin resistance in rats with type 2 diabetes by regulating the expression of KSRP，PETN，and AKT in the liver [J]. J Cell Biochem，2019，120：16185-16194.
[19] 周婷婷 . 基于胰岛 β 细胞功能改善 / 肝糖异生抑制策略的抗 T2DM 先导结构的发现及作用机制研究 [D]. 上海：中国科学院大学（中国科学院上海药物研究所），2017.
[20] 戴悦萱，李月春，梁芙茹 . PI3K/AKT/GSK3β 通路影响糖代谢与认知过程的研究进展 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志，2018，6（6）：28-29.
[21] 孔丽丽 . GSK3β 抑制剂对糖尿病肾病大鼠肾组织 TGF-β1 和血清 PAI-1 表达的影响 [D]. 吉林：吉林大学，2012.
[22] Henriksen EJ，Dokken BB. Role of glycogen synthase kinase-3 in insulin resistance and type 2 diabetes [J]. Curr Drug Targets，2006，7：1435-1441.
[23] Sudlow A，le Roux CW，Pournaras DJ. Review of multimodal treatment for type 2 diabetes：combining metabolic surgery and pharmacotherapy [J]. Ther Adv Endocrinol Metab，2019，10：2042018819875407.
[24] Engelman J A. Targeting PI3K signalling in cancer：opportunities，challenges，and limitations [J]. Nat Rev Cancer，2009，9（8）：550-562.
[25] Gao Y，Zhang M，Wu T，et al. Effects of d-pinitol on insulin resistance through the PI3K/AKT signaling pathway in type 2 diabetes mellitus rats [J]. J Agr Food Chem，2015，63：6019-6026.
[26] Liang G，Wang F，Song X，et al. 3-Deoxyglucosone induces insulin resistance by impairing insulin signaling in HepG2 cells [J]. Mol Med Rep，2016，13（5）：4506-4512.
[27] Liu TY，Shi CX，Gao R，et al. Irisin inhibits hepatic gluconeogenesis and increases glycogen synthesis via the PI3K/AKT pathway in T2DM mice and hepatocytes [J]. Clin Sci（Lond），2015，129（10）：839-850.
[28] 邓翀，张化为，姜祎等 . 五味子、金樱子、山茱萸抗 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢的比较 [J]. 天然产物研究与开发，2018，30（4）：568-574.
[29] Wang XY，Song XL，Zhang Y，et al. Evaluation of beneficial and adverse effects of a diet supplemented with Schisandrae Fructus seed ethanol extract on lipid and glucose metabolism in normal and hypercholesterolemic/hyperglycemic mice [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2021，2021：8858962.

（收稿日期：2023-02-20；修回日期：2023-03-16）

坤宁颗粒治疗功能性子宫出血的实验研究

解锦香，史斌琦，马世平，马占强*（中国药科大学中药学院，南京　211198）

摘要：目的　研究坤宁颗粒治疗功能性子宫出血的药理作用。**方法**　用剪尾法和玻璃毛细管法测定小鼠出血时间、凝血时间；用血凝仪测定大鼠凝血酶原时间（PT）、活化部分凝血活酶时间（APTT）、纤维蛋白原（FIB）；采用药物建立早孕大鼠不完全流产的功能性子宫出血模型，用紫外分光光度法检测大鼠的子宫出血量，ELISA 法测定血清雌二醇（E_2）、孕酮（P）含量，HE 染色观察子宫内膜的病理损伤；用全自动血液流变仪测定气滞血瘀大鼠模型全血黏度、血浆黏度。**结果**　与空白组比较，坤宁颗粒可以明显缩短小鼠的出血时间、凝血时间及大鼠 PT、APTT，升高大鼠 FIB 含量；与模型对照组比较，坤宁颗粒可以显著减少功能性子宫出血模型大鼠子宫出血量，升高血清 E_2、P 含量，改善子宫内膜病变；与模型组比较，坤宁颗粒可以显著降低气滞血瘀模型大鼠全血黏度和血浆黏度。**结论**　坤宁颗粒可治疗功能性子宫出血模型大鼠子宫出血，其机制可能与调节 E_2、P 水平，改善子宫血液循环，促进子宫修复有关。

关键词：坤宁颗粒；功能性子宫出血；雌孕激素；活血化瘀；子宫修复
中图分类号：R285.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0940-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.016

Experimental study of Kunning granules for dysfunctional uterine bleeding

XIE Jin-xiang, SHI Bin-qi, MA Shi-ping, MA Zhan-qiang* (*School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing* 211198)

Abstract: Objective　To determine the pharmacological basis of Kunning granules for dysfunctional uterine bleeding. **Methods**　The tail-cutting method and slide method were used to determine the bleeding time and clotting time (CT) in mice. The coagulation analyzer was applied to detect the prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT) and fibrinoge (FIB) in rats. Dysfunctional uterine bleeding model was established by drug abortion in rats with early pregnancy. Then ultraviolet spectrophotometry was used to measure the amount in uterine bleeding in rats. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of blood estradiol (E_2) and progesterone (P). HE staining was used to observe the pathological damage of the uterine endometrium. Qi stagnation and blood stasis (QSBS) rat models were established and automatic blood rheometer was used to detect the whole blood viscosity and plasma viscosity. **Results**　Compared with the blank group, Kunning granules significantly shortened the bleeding time, clotting time in the mice and the PT and APTT in the rats, while increased the content of FIB in the rats. Compared with the model control group, Kunning granules greatly reduced the amount of bleeding in the rats with dysfunctional uterine bleeding, while significantly increased the content of E_2 and P, and improved endometrial injuries. Compared with the model group, Kunning granules obviouslyly decreased the whole blood viscosity and plasma viscosity in the QSBS rats. **Conclusion**　Kunning granules can treat uterine bleeding in dysfunctional uterine bleeding model rats, and its mechanism may be related to regulating the level of E_2 and P, improving uterine blood circulation, and promoting uterine repair.

Key words: Kunning granule; dysfunctional uterine bleeding; estrogen and progesterone; activating blood and removing blood stasis; uterine repair

作者简介：解锦香，女，硕士研究生，主要从事中药药理研究，email：xiejinxiang666@163.com　*__通信作者：__马占强，男，博士，副教授，主要从事中药药理研究，email：mazhanqiang0427@163.com

坤宁颗粒出自 24 代中医世家崛山杨氏妇科圣方，其主要成分有益母草、当归、赤芍、丹参、郁金、牛膝、枳壳、木香、荆芥、干姜、茜草等，具有活血行气、止血调经的作用，用于气滞血瘀所致的妇女月经过多，经期延长。多个临床研究表明坤宁颗粒对治疗功能异常性子宫出血具有良好的止血功效[1-3]。本课题从实验角度全面探究坤宁颗粒对治疗功能性子宫出血的药理作用及途径，为治疗该疾病提供理论依据。

1　材料

1.1　试药

坤宁颗粒（批号：210501，宿州亿帆制药有限公司），宫血宁胶囊（批号：ZJC2101，云南白药集团股份有限公司），肾上腺素（货号：L137183-1g，阿拉丁生化科技有限公司），米非司酮片（规格：25 mg/ 片，批号：C019210304，上海新华联制药有限公司），米索前列醇片（规格：0.2 mg/ 片，批号：01201201，武汉九珑人福药业有限公司）。雌二醇（E_2）ELISA 试剂盒（货号：E-OSEL-R0001）、孕酮（P）ELISA 试剂盒（货号：E-EL-0154c）（Elabscience 公司），其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.2　动物

SPF 级 ICR 雌性小鼠，体质量 18 ～ 22 g [扬州大学比较医学中心，许可证号：SCXK（苏）2017-0007]。SPF 级健康雌性未孕 SD 大鼠，体质量 180 ～ 220 g，SPF 级雄性 SD 大鼠，体质量 200 ～ 220 g[上海市计划生育科学研究所实验动物经营部，许可证号：SCXK（沪）2018-0006]。动物饲养于中国药科大学药学动物实验中心，许可证号：SYXK（苏）2018-0019，室内温度为 22 ～ 26 ℃，相对湿度为 40% ～ 70%，自由摄食和饮水，适应性喂养 1 周后进行实验。该实验研究获得中国药科大学实验动物伦理委员会的批准（批准号：2021-12-020）。

1.3　仪器

5810R 台式高速冷冻离心机（德国 Eppendorf 公司）；血凝仪（法国 STAGO，试剂为原装进口配套）；全自动血液流变仪（SA-6000，北京赛科希德股份有限公司）；BSA124S 电子分析天平（北京赛多利斯科学仪器有限公司）；倒置生物显微镜（江南永新 XD202）；紫外可见分光光度计（上海菁华科技仪器有限公司）；全波长酶标仪（美国 Thermo 公司）。

2　方法及结果

2.1　坤宁颗粒对正常小鼠出血时间、凝血时间的影响

取 50 只 ICR 雌性小鼠随机平均分为 5 组，分别为空白组、宫血宁胶囊组（0.13 g • kg^{-1}）、坤宁颗粒低剂量组（2 g • kg^{-1}）、坤宁颗粒中剂量组（4 g • kg^{-1}）、坤宁颗粒高剂量组（8 g • kg^{-1}），宫血宁胶囊和坤宁颗粒中剂量为临床用药剂量按人和小鼠给药剂量比＝ 1：10 等效换算，空白组给予生理盐水，连续灌胃给药 7 d。末次给药 1 h 后，测定出血时间：用解剖剪距离小鼠尾尖 3 mm 处横剪断，待血液自行溢出计时，每隔 30 s 用滤纸吸一次，直到血液自然停止所需时间即为该小鼠的出血时间[4]。测定凝血时间：用玻璃毛细管眼内眦取血，待血液取满后平放于桌面，每隔 30 s 折断毛细管两端 0.5 cm，并缓慢左右拉开，观察折断处是否有凝血丝，自血液流入毛细管内开始计时，至凝血丝出现为止，所经历时间为凝血时间[5]。实验结果见表 1。与空白组相比，坤宁颗粒低、中、高剂量组的出血时间、凝血时间显著缩短（$P < 0.05$，$P < 0.01$），提示坤宁颗粒有较好的止血功效。

表 1　坤宁颗粒对正常小鼠出血时间、凝血时间的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

Tab 1　Effect of Kunning granules on the bleeding time and clotting time in normal mice（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

组别	剂量 /（g • kg^{-1}）	出血时间 /min	凝血时间 /min
空白组	—	18.9±3.1	3.8±0.6
宫血宁胶囊组	0.13	10.0±2.8**	2.7±0.7**
坤宁颗粒低剂量组	2	13.2±3.1*	2.6±0.6*
坤宁颗粒中剂量组	4	11.5±2.2**	1.7±0.6**
坤宁颗粒高剂量组	8	8.3±1.4**	1.5±0.4**

注：与空白组比较，*$P < 0.05$，**$P < 0.01$。

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

2.2　坤宁颗粒对正常大鼠凝血功能的影响

取 SD 雌性大鼠 40 只，随机平均分为 5 组，分别为空白组、宫血宁胶囊组（0.091 g • kg^{-1}）、坤宁颗粒低剂量组（1.4 g•kg^{-1}）、坤宁颗粒中剂量组（2.8 g • kg^{-1}）、坤宁颗粒高剂量组（5.6 g • kg^{-1}），宫血宁胶囊和坤宁颗粒中剂量为临床用药剂量按人和大鼠给药剂量比＝ 1：7 等效换算，空白组给予生理盐水连续灌胃给药 7 d。末次给药 1 h 后，用 10% 水合氯醛麻醉大鼠（300 mg•kg^{-1} 腹腔注射），用 3.2% 枸橼酸钠按 1：9 抗凝采血，取血浆进行指标检测。实验结果见表 2。与空白组相比，坤宁颗粒中、高剂量组的凝血酶原时间（PT）、活化部分凝血活酶时间（APTT）显著缩短（$P < 0.05$，$P < 0.01$），纤维蛋白原（FIB）含量显著升高（$P < 0.05$）。提示坤宁颗粒对凝血系统有一定的促进作用。

表 2　坤宁颗粒对正常大鼠凝血功能的影响 ($\bar{x}\pm s$，$n=8$)

Tab 2　Effect of Kunning granules on coagulation function in normal rats ($\bar{x}\pm s$，$n=8$)

组别	剂量 /（g • kg^{-1}）	PT/ s	APTT/s	FIB/（g • L^{-1}）
空白组	—	16.10±0.63	37.96±7.78	2.26±1.15
宫血宁胶囊组	0.091	14.85±0.93**	28.75±4.52*	3.65±1.02*
坤宁颗粒低剂量组	1.4	15.19±0.63	31.14±6.48	3.01±0.65
坤宁颗粒中剂量组	2.8	15.06±0.61*	28.49±3.76*	3.50±0.27*
坤宁颗粒高剂量组	5.6	14.76±0.37**	25.59±5.45**	3.59±0.77*

注：与空白组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

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

2.3　坤宁颗粒对功能性子宫出血模型大鼠出血量的影响

取动情期雌性大鼠每日下午 5 点按雌∶雄＝2∶1 的比例合笼饲养，次日清晨进行阴道涂片检查，以显微镜下发现精子为妊娠第 1 日。最后取 60 只受孕成功的雌性大鼠，取 10 只早孕大鼠为空白对照组，余 50 只随机分为 5 组，分别为模型对照组、宫血宁胶囊组（0.091 g • kg^{-1}）、坤宁颗粒低剂量组（1.4 g • kg^{-1}）、坤宁颗粒中剂量组（2.8 g • kg^{-1}）、坤宁颗粒高剂量组（5.6 g • kg^{-1}）。除空白对照组外，其余组在妊娠第 7 日早上 8 点灌胃米非司酮 8.8 mg • kg^{-1}，晚上 18 点灌胃米索前列醇 100 μg • kg^{-1}，建立早孕大鼠不完全流产的子宫出血模型[6]，并于大鼠阴道内置定量消毒棉球，次日取出，如棉球上有血则造模成功。于妊娠第 8 日各组开始灌胃给药，空白对照组与模型对照组给予生理盐水，连续 7 d，并每日早晚于大鼠阴道内更换定量消毒棉球，次日早晚分别取出，放入密封袋内冷藏保存。末次给药 1 h 后，用 10% 水合氯醛麻醉大鼠，腹主动脉采血，取 0.02 mL 血加入 4 mL 质量浓度为 50 g • L^{-1} 的 NaOH 溶液中，混匀待用。将收集的每只大鼠子宫出血棉球置于烧杯内，根据出血量情况加适量 50 g • L^{-1} 的 NaOH 浸提 24 h。分别将腹主动脉血的 NaOH 溶液、已过滤的浸提液以 50 g • L^{-1} 的 NaOH 为空白对照，用紫外分光光度计在 546 nm 波长下测吸光度 A 值。计算子宫出血量（mL），为腹主动脉血量（0.02 mL）×（浸提液 A_2 值 ×V）/（腹主动脉血 A_1 值 ×4 mL），V＝浸提子宫血所用的 NaOH 体积。结果见表 3，与空白对照组相比，模型对照组大鼠子宫出血量明显增加（$P<0.01$）；与模型对照组相比，坤宁颗粒中、高剂量组子宫出血量明显减少（$P<0.05$，$P<0.01$）。

2.4　坤宁颗粒对功能性子宫出血模型大鼠血清 E_2、P 的影响

表 3　坤宁颗粒对功能性子宫出血模型大鼠出血量的影响 ($\bar{x}\pm s$，$n=10$)

Tab 3　Effect of Kunning granules on the bleeding volume in rats with dysfunctional uterine bleeding ($\bar{x}\pm s$，$n=10$)

组别	剂量 /（g • kg^{-1}）	子宫出血量 /mL
空白对照组	—	0
模型对照组	—	0.53±0.03**
宫血宁胶囊组	0.091	0.34±0.04$^{\#\#}$
坤宁颗粒低剂量组	1.4	0.42±0.18
坤宁颗粒中剂量组	2.8	0.39±0.05$^{\#}$
坤宁颗粒高剂量组	5.6	0.36±0.13$^{\#\#}$

注：与空白对照组比较，$^{**}P<0.01$；与模型对照组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

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

将“2.3”项中取的血用高速冷冻离心机 3000 r • min^{-1} 离心 15 min，分离血清，ELISA 试剂盒测定血清中 E_2、P 的含量，结果见表 4。与空白对照组相比，模型对照组 E_2、P 含量显著降低（$P<0.05$，$P<0.01$）；与模型对照组比较，坤宁颗粒中、高剂量组的 E_2 及高剂量组的 P 含量显著上升（$P<0.05$，$P<0.01$）。提示坤宁颗粒具有一定的改善神经内分泌作用。

表 4　坤宁颗粒对功能性子宫出血模型大鼠血清 E_2 和 P 的影响 ($\bar{x}\pm s$，$n=8$)

Tab 4　Effect of Kunning granules on serum E_2 and P in rats with dysfunctional uterine bleeding ($\bar{x}\pm s$，$n=8$)

组别	剂量 /（g • kg^{-1}）	E_2/（pg • mL^{-1}）	P/（ng • mL^{-1}）
空白对照组	—	87.3±13.2	15.2±2.0
模型对照组	—	57.9±7.6*	10.2±2.0**
宫血宁胶囊组	0.091	89.1±25.1$^{\#}$	14.3±3.1$^{\#}$
坤宁颗粒低剂量组	1.4	86.0±25.7	12.9±1.9
坤宁颗粒中剂量组	2.8	90.8±17.3$^{\#}$	13.0±3.1
坤宁颗粒高剂量组	5.6	98.8±15.3$^{\#\#}$	14.4±2.6$^{\#}$

注：与空白对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与模型对照组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$。

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

2.5　坤宁颗粒对功能性子宫出血模型大鼠子宫组织病理学的影响

将大鼠脱颈椎处死，取其子宫组织，放于4%多聚甲醛中固定24 h，进行透明、浸蜡、包埋、切片，然后HE染色，实验结果见图1。正常对照组子宫组织结构完整，间质排列紧密，血管和腺体清晰可见；模型对照组子宫绒毛和蜕膜残留较多，内皮充血扩张，血管和腺体稀少；坤宁颗粒各剂量组血管和腺体数目略增多，上皮细胞排列紧密，子宫损伤程度呈不同程度的改善。

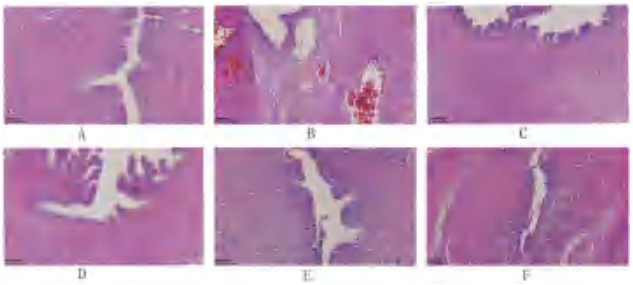


图 1　坤宁颗粒对功能性子宫出血模型大鼠子宫组织病理学的影响（HE染色，×200）

Fig 1　Effect of Kunning granules on the uterine histopathology in rats with dysfunctional uterine bleeding（HE staining，×200）

A. 空白对照（blank control）；B. 模型对照（model control）；C. 宫血宁胶囊 0.091 g•kg^{-1}（Gongxuening capsules 0.091 g•kg^{-1}）；D. 坤宁颗粒 1.4 g•kg^{-1}（Kunning granules 1.4 g•kg^{-1}）；E. 坤宁颗粒 2.8 g•kg^{-1}（Kunning granules 2.8 g•kg^{-1}）；F. 坤宁颗粒 5.6 g•kg^{-1}（Kunning granules 5.6 g•kg^{-1}）

2.6　坤宁颗粒对气滞血瘀模型大鼠血液流变学的影响

取48只雌性SD大鼠，随机平均分为6组，分别为空白组、模型组、宫血宁胶囊组（0.091 g•kg^{-1}）、坤宁颗粒低剂量组（1.4 g•kg^{-1}）、坤宁颗粒中剂量组（2.8 g•kg^{-1}）、坤宁颗粒高剂量组（5.6 g•kg^{-1}），除空白组外，其余组大鼠每日皮下注射0.1%肾上腺素0.9 mg•kg^{-1}，并且在4 h后随机给予一种刺激（禁食24 h、冰水浴5 min、夹尾10 min、45 ℃倾斜2 h、湿笼24 h），连续13 d，建立气滞血瘀模型[7]。宫血宁胶囊组、坤宁颗粒各剂量组于造模第7日开始灌胃给药。空白组和模型组给予生理盐水，第14日用10%水合氯醛麻醉大鼠，用肝素钠抗凝采血，测全血黏度，3000 r•min^{-1}离心10 min后，测血浆黏度。结果见表5，与空白组相比，模型组全血黏度、血浆黏度均明显升高（$P < 0.01$）；与模型组相比，坤宁颗粒中、高剂量组不同切变率下全血黏度、血浆黏度明显降低（$P < 0.05$，$P < 0.01$）。表明其具有活血化瘀的功效。

表 5　坤宁颗粒对气滞血瘀模型大鼠血液流变学的影响（$\bar{x}\pm s$，$n = 8$）

Tab 5　Effect of Kunning granules on hemorheology in Qi stagnation and blood stasis model rats（$\bar{x}\pm s$，$n = 8$）

组别	剂量 /（g•kg^{-1}）	全血黏度 /mPas				血浆黏度 /mPas
		1 s^{-1}	5 s^{-1}	50 s^{-1}	200 s^{-1}	
空白组	—	32.62±2.33	13.46±0.81	6.45±0.31	5.19±0.23	1.28±0.04
模型组	—	40.63±4.18**	16.15±1.44**	7.47±0.52**	6.01±0.29**	1.62±0.04**
宫血宁胶囊组	0.091	41.15±1.82	16.33±0.61	7.44±0.21	5.84±0.12	1.59±0.03
坤宁颗粒低剂量组	1.4	35.67±2.52$^{\#}$	14.50±0.85	6.91±0.28$^{\#}$	5.50±0.19$^{\#\#}$	1.58±0.11
坤宁颗粒中剂量组	2.8	35.01±2.76$^{\#}$	14.23±0.87$^{\#}$	6.87±0.24$^{\#}$	5.49±0.17$^{\#\#}$	1.37±0.07$^{\#\#}$
坤宁颗粒高剂量组	5.6	34.69±3.68$^{\#\#}$	14.00±1.70$^{\#\#}$	6.73±0.33$^{\#\#}$	5.48±0.26$^{\#\#}$	1.32±0.08$^{\#\#}$

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

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

2.7　统计方法

采用Graphpad Prism 7.00软件进行统计分析，所有数据用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，数据符合正态分布且方差齐，采用单因素方差分析（One-way ANOVA），进一步两两比较采用Tukey’s检验，$P < 0.05$为差异有统计学意义。

3　讨论

坤宁颗粒方中益母草可活血调经，化瘀止痛；当归、赤芍、丹参能补血和营，活血祛瘀，调经止痛；郁金能活血止痛，行气解郁，凉血止血；牛膝能活血化瘀，引血下行；枳壳、木香能疏利肝胆，调畅气机，以助行血，行气活血；荆芥炭能散风止血；干姜炭能温通血脉，以助血行；茜草能化瘀止血。诸药合用，共奏活血行气，止血调经之功。

出血时间的长短与毛细血管的功能、血小板的数量和功能等因素有关；凝血时间的长短与各种凝血因子的含量与功能有关[8]。PT主要反映了外源性凝血途径有关因子的含量；APTT主要反映内源性凝血途径有关因子的含量；FIB可转化为不溶性纤维蛋白从而参与凝血过程[9]。本研究结果提示坤宁颗粒可通过内源性凝血途径和外源

性凝血途径而激活 FIB，从而使血液凝固。欧莉等[10]研究表明茜草能够缩短出血、促进凝血、促进子宫内膜修复和血管增生，从而用于治疗功能性子宫出血。

功能性子宫出血是由于下丘脑 - 垂体 - 卵巢轴异常引起神经内分泌功能失调，影响体内雌孕激素水平，导致的非正常子宫出血[11]。本研究还构建了早孕大鼠不完全流产的子宫出血模型，模型组子宫中囊胚绒毛组织、脱膜细胞残留，组织受损严重，对收缩功能造成负面影响，因此子宫出血时间延长和出血量增加，而坤宁颗粒可以改善子宫内膜病理形态，促进子宫修复，从而使出血量减少。现代药理研究表明益母草含有的益母草总生物碱对药物流产大鼠蜕膜绒毛组织的排出具有促进作用[12]。雌孕激素是维持女性正常内分泌功能的重要激素，在子宫内膜变化中起重要作用[13]。雌激素可以使子宫内膜增生，覆盖子宫内膜脱落后的创面，从而起到修复、止血的作用；孕激素可以使增生的内膜发生分泌反应，增强内膜的稳定性[14]。临床研究表明雌孕激素可有效治疗药物流产后出血患者，缩短子宫出血时间，维持子宫内环境平衡[15]。本实验结果提示坤宁颗粒具有雌孕激素样作用，能促使子宫内膜的正常生长发育。

功能性子宫出血可致瘀血的形成，瘀血不去，新血不能归经，活血化瘀法是论治功能性子宫出血的基本法则[16]。血液流变学是诊断血瘀证的重要指标。本研究观察到气滞血瘀模型大鼠的全血黏度、血浆黏度较空白组明显升高，而坤宁颗粒能明显改善气滞血瘀模型大鼠血液流变学异常。现代药理研究表明当归中的当归多糖对妊娠期易栓症大鼠具有抗血栓的作用[17]；赤芍含有的赤芍内酯苷能够降低急性血瘀证大鼠的血液黏度，改善血液流变学[18]，并改善早孕期血瘀流产大鼠子宫内膜血流状态与容受性，增加子宫内膜血流灌注[19]。因此，坤宁颗粒具有活血化瘀的功效，可以改善不完全流产大鼠蜕膜组织残留而致的子宫局部气血运行失常，促进子宫局部血液循环。

综上所述，本研究表明坤宁颗粒可通过调节雌孕激素水平、活血化瘀作用从而改善子宫血液循环和促进子宫修复，达到止血的目的。

参考文献

[1] 夏光惠 . 坤宁颗粒治疗妇科血证临床观察 [J]. 中医药临床杂志，2008（5）：481-482.

[2] 张凡 . 探讨坤宁颗粒治疗功能异常性子宫出血的临床研究 [J]. 世界最新医学信息文摘，2019，19（98）：269-270.

[3] 杨胜华，杨君 . 坤宁颗粒联合米非司酮治疗围绝经期功能性子宫出血的临床研究 [J]. 药物评价研究，2021，44（5）：1066-1070.

[4] 张向阳，刘春燕，贾丽霞，等 . 炒地榆炭及烘地榆炭对小鼠出血、凝血时间的影响 [J]. 河南中医，2017，37（12）：2109-2110.

[5] 赵文秀，马骏，王志晓，等 . 铭悦茜白片对小鼠出血、凝血、血浆复钙时间及血小板计数的影响 [J]. 甘肃中医药大学学报，2020，37（1）：37-40.

[6] 欧莉，韩猛，张艺耀，等 . 茜草治疗功能性子宫出血的止血机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2015，21（21）：152-155.

[7] 李炜，段金廒，刘培，等 . 采用雌性 SD 大鼠探索建立适宜于气滞血瘀证妇科疾病特点的模型评价体系 [J]. 中国中药杂志，2013，38（8）：1211-1218.

[8] 邵敏，王琴，林青，等 . 雪菊和杭白菊的水提物对凝血功能和血小板聚集的影响 [J]. 新疆医科大学学报，2019，42（3）：372-377.

[9] Tang Q，Yang S，Tong J，et al. Hemostasis and uterine contraction promoting effect of the extract from drugs in the Zi-Yin-Tiao-Jing granule，a traditional Chinese compound preparation [J]. J Ethnopharmacol，2018，211：278-284.

[10] 欧莉，彭成，高晓庆，等 . 茜草治疗功能性子宫出血的药效学研究 [J]. 中医药导报，2015，21（13）：49-51.

[11] 张世应，孙绪举 . 围绝经期功能性子宫出血采用去氧孕烯炔雌醇（妈富隆）联合小剂量米非司酮治疗的临床疗效观察 [J]. 中国妇幼保健，2020，35（9）：1686-1689.

[12] 马静静，刘宇，梁艳，等 . 益母草总生物碱对药物流产大鼠蜕膜绒毛组织排出的促进作用及其机制 [J]. 吉林大学学报（医学版），2021，47（6）：1476-1484.

[13] Greening DW，Nguyen HPT，Evans J，et al. Modulating the endometrial epithelial proteome and secretome in preparation for pregnancy：the role of ovarian steroid and pregnancy hormones [J]. J Proteomics，2016，144：99-112.

[14] 李儒芝，林金芳 . 雌激素与孕激素控制青春期功能失调性子宫出血的比较 [J]. 上海医学，2008，31（2）：87-88.

[15] 亓小利，施晓燕，马丽 . 雌孕激素联合治疗对药物流产后出血患者血管因子及激素的影响 [J]. 实用临床医药杂志，2022，26（14）：101-104.

[16] 李绍林 . 功能性子宫出血的中医病机及治疗思路探析 [J]. 世界中西医结合杂志，2017，12（9）：1185-1188.

[17] 麻卻，李晓茹，吕志华，等 . 当归多糖对妊娠期易栓症大鼠的抗炎作用及对凝血功能的影响 [J]. 广州中医药大学学报，2022，39（3）：612-617.

[18] 乐娜，周雪，费文婷，等 . 赤芍、白芍及芍药苷、芍药内酯苷对急性血瘀证大鼠血液流变学及血管内皮功能的影响 [J]. 环球中医药，2019，12（9）：1302-1307.

[19] 李莹，陈建玲，吴佩蔚，等 . 赤芍内酯苷对早孕流产大鼠子宫内膜的作用 [J]. 西北药学杂志，2022，37（5）：46-51.

（收稿日期：2022-11-16；修回日期：2023-02-03）

基于“扶正培本”研究鼻咽解毒胶囊免疫调节作用

伍梦玲[1]，欧阳林旗[1, 2]，龙远雄[1]，何阳[1]，吴金鸿[1]，周鑫[1]，韩蜜[1, 3]，陈镇[1]，邓桂明[1*]（1.湖南中医药大学第一附属医院，长沙　410007；2. 湖南中医药大学药学院，长沙　410208；3. 湖南省肿瘤医院，长沙　410013）

摘要：目的　从免疫调节角度研究鼻咽解毒胶囊“扶正培本”功效的药效物质基础及作用。**方法**　采用 UHPLC-MS/MS 技术检测鼻咽解毒胶囊的入血成分。利用 TCMSP、SwissTargetPrediction、OMIM 和 GeneCards 数据库收集和获得鼻咽解毒胶囊入血成分和免疫调节的交集靶点，利用 Cytoscape 3.9.1 软件、DAVID 6.8 数据库构建“中药 - 成分 - 靶点 - 通路”网络图及进行 GO 和 KEGG 富集分析。通过 RAW264.7 巨噬细胞吞噬中性红活性实验和环磷酰胺诱导的免疫抑制模型小鼠体质量变化、脾脏指数、胸腺指数、血常规、脾脏和胸腺病理切片等指标验证鼻咽解毒胶囊的免疫调节作用。**结果**　从鼻咽解毒胶囊含药血清中共鉴定出黄酮类、萜类等 18 个入血成分，结合网络药理学筛选出关键成分 7 个，预测出成分和免疫调节交集靶点 159 个，分析出 *TNF*、*IL6* 等关键靶点 15 个，富集分析到的关键信号通路有 PI3K-Akt 和 MAPK 等。细胞和动物实验表明，鼻咽解毒胶囊可显著提高 RAW264.7 巨噬细胞吞噬活性（$P < 0.01$），恢复免疫抑制小鼠体质量、胸腺指数和外周血血红蛋白、淋巴细胞数量（$P < 0.05$，$P < 0.01$），减轻脾脏和胸腺组织的病理损伤。**结论**　鼻咽解毒胶囊“扶正培本”药效物质以黄酮类成分为主，可通过多靶点、多通路发挥免疫调节作用。

关键词：鼻咽解毒胶囊；免疫调节；免疫抑制模型；UHPLC-MS/MS；网络药理学
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0945-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.017

Mechanism of Biyan Jiedu capsules in immunoregulation based on “Fuzheng Peiben”

WU Meng-ling[1], OU YANG Lin-qi[1, 2], LONG Yuan-xiong[1], HE Yang[1], WU Jin-hong[1], ZHOU Xin[1], HAN Mi[1, 3], CHEN Zhen[1], DENG Gui-ming[1*] (1. *The First Hospital Affiliated to Hunan University of Chinese Medicine, Changsha* 410007; 2. *School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha* 410208; 3. *Hunan Cancer Hospital, Changsha* 410013)

Abstract: Objective To determine the therapeutic material basis and effect of Biyan Jiedu capsules (BYJD) in immunoregulation from the perspective of “Fuzheng Peiben”. **Methods** UHPLC-MS/MS was used to detect the absorbed components of BYJD. TCMSP, SwissTargetPrediction, OMIM and GeneCards databases were used to collect and obtain the intersection targets of the absorbed components and immunoregulation of BYJD. The network diagram of drug-component-target-pathway was construct by Cytoscape 3.9.1 software and DAVID 6.8. And the enrichment analysis of GO and KEGG conducted. The immunoregulation effect of BYJD was verified by RAW264.7 macrophage phagocytosis neutral red activity test, weight change, spleen index, thymus index, blood routine test, spleen and thymus pathological sections, and other immune indicators of immunosuppressed mice model induced by cyclophosphamide. **Results** Totally 18 components were identified from BYJD containing serum, covering flavonoids and terpenoids. By network pharmacology, 7 key components

基金项目：湖南省卫生健康委科研计划项目（No.C202313029546，No.D202302048885）；湖南省自然科学基金项目（No.2022JJ70104）；湖南省中医药科研计划项目（No.2021162）；长沙市科技局自然科学基金（No.kq2014219）。
作者简介：伍梦玲，女，硕士研究生，主要从事中药药效机制及特色中药制剂研究，email：2466867997@qq.com　*通信作者：邓桂明，女，博士（后），研究员，博士研究生导师，主要从事中药药效机制及特色中药制剂研究，email：guimingd1004@163.com

were screened, 159 cross targets of components and immunoregulation were predicted, 15 key targets such as *TNF* and *IL6* were determined, and key signal pathways such as PI3K-Akt and MAPK were enriched and analyzed. The cell and animal experiments showed that BYJD significantly increased the phagocytic activity of RAW264.7 macrophages ($P < 0.01$), restore the weight, thymus index, peripheral blood hemoglobin and number of lymphocytes immunosuppressed mice ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and reduced the pathological damage of the spleen and the thymus. **Conclusion** The effective material basis of BYJD is mainly flavonoids, which can play an immunoregulation role through multiple targets and pathways.

Key words: Biyan Jiedu capsule; immunoregulation; immunosuppressive model; UHPLC-MS/MS; network pharmacology

“扶正培本”是以扶助正气、培补本元的补益之法，调节人体阴阳气血和脏腑经络的生理功能，为中医重要治法之一，在中医药治疗肿瘤中具有显著特色与优势[1]。现代研究多从改善机体免疫、代谢、内分泌等系统功能等来阐释其科学内涵。研究表明，“扶正培本”类中药所含的皂苷类、黄酮类、萜类、多糖类等成分具有免疫调节活性[2-3]，其机制与调节免疫细胞因子，调控 Toll 样受体（TLRs）、核转录因子 κB（NF-κB）、高迁移率蛋白 B1、丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）等细胞信号通路有关[4]，为中药“扶正培本”功效研究提供了思路和方向。

鼻咽解毒胶囊（Biyan Jiedu capsule，BYJD）在湖南中医药大学第一附属医院临床应用30余年，由黄连、黄芩、黄芪、白花蛇舌草和甘草组成，具有清热解毒、扶正培本的功效，用于鼻咽炎、鼻咽癌及 EB 病毒阳性的鼻咽癌高危人群的治疗。课题组前期围绕本方的制剂开发、质量控制，抗菌、抗炎、鼻咽癌防治等进行了研究[5-6]，发现鼻咽解毒胶囊能调控炎症免疫重要信号通路 TLR4/NF-κB，改善脂多糖（LPS）诱导的肺损伤模型大鼠症状及炎症因子白细胞介素 6（IL-6）、肿瘤坏死因子 α（TNF-α）表达，提示鼻咽解毒胶囊可能具有调节机体免疫状态的作用。因此，从免疫调节角度开展研究可为科学阐释本方“扶正培本”功效提供依据。

本研究基于“扶正培本”功效分析鼻咽解毒胶囊的免疫调节作用，采用超高效液相色谱 - 串联质谱（UHPLC-MS/MS）技术明确其入血成分，结合网络药理学对其免疫调节靶标进行筛选，阐明鼻咽解毒胶囊入血成分与免疫调节靶点和通路之间的关系，并通过细胞和动物实验验证其免疫调节作用，为初步阐释鼻咽解毒胶囊“扶正培本”功效的活性成分和药理作用提供基础。

1 材料

1.1 数据库

TCMSP 数据库（https：//old.tcmsp-e.com/tcmsp.php），SwissTargetPrediction 数据库（https：//swisstargetprediction.ch/），Uniprot 数据库（https：//www.uniprot.org/），OMIM 数据库（https：//www.omim.org/）数据库，Genecards（https：//www.genecards.org/），E-Venn 在线软件（https：//www.ehbio.com/test/venn/），STRING11.5 数据库（https：//cn.string-db.org/），DAVID 6.8 数据库（https：//david.ncifcrf.gov/），微生信在线平台（https：//www.bioinformatics.com.cn/）。

1.2 细胞与动物

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 RAW264.7（武汉原代生物医药科技有限公司）。SPF 级 SD 雄性大鼠 12 只，体质量（200±20）g；SPF 级 Balb/c 雄性小鼠 30 只，8 周龄 [湖南斯莱克景达实验动物有限公司，许可证号：SCXK（湘）2019-0004，动物质量合格证号：430727221101311581]。在相对湿度（50±5）%，温度（22±2）℃的动物房正常喂养后用于实验。动物实验经湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准（批准号：ZYFY20220513-11）。

1.3 试药

鼻咽解毒胶囊（批号：20220426，湖南中医药大学第一附属医院）；PBS 缓冲液、胎牛血清、DMEM 高糖培养液、青霉素 - 链霉素溶液（双抗）（美国 Gibco 公司）；中性红染色剂（批号：No.1026G042，北京索莱宝科技有限公司）；注射用环磷酰胺（批号：1H490A，美国 Baxter 公司）；4% 多聚甲醛溶液（批号：01A220624，长沙艾碧维生物科技有限公司）；乙腈、甲醇和甲酸（色谱纯，美国 Thermo Fisher 公司）；其他试剂均为分析纯。

1.4 仪器

Q Exactive Plus Orbitrap 高分辨液质联用仪、U3000 超高效液相色谱仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；Vortex-2 Genie 型涡旋混合器（美国

Scientific Industries 公司）；5810R 型低温离心机（德国 Eppendorf 公司）；WD-9415C 型超声波清洗器（北京市六一仪器厂）；Enspire 型多功能酶标仪（美国 Perkinelmer 公司）；XDS-3 型倒置生物显微镜（广州粤显光学仪器有限责任公司）；H1850 型高速离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；BC-6800 型全自动血液细胞分析仪（深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司）。

2　方法与结果

2.1　鼻咽解毒胶囊入血成分分析

2.1.1　含药血清样品制备　取鼻咽解毒胶囊内容物适量，加入蒸馏水配制成质量浓度为 2 g • mL^{-1} 的灌胃药液。12 只 SD 大鼠适应性喂养后随机分为空白组和给药组，分别按蒸馏水 0.1 mL/（kg • d）、鼻咽解毒胶囊 15.31 g/（kg•d）（临床等效剂量 5 倍）灌胃 7 d；末次给药 1 h 后，大鼠深度麻醉，腹主动脉取血，室温下静置 1 h，3000 r • min^{-1} 离心 15 min，取上清，得到空白血清和含药血清。取上述血清各 100 μL，加入 500 μL 乙腈沉淀蛋白，涡旋 2 min，14 000 r • min^{-1} 离心 5 min，取上清液 500 μL，氮气吹干，100 μL 50% 乙腈水溶液复溶，过 0.22 μm 微孔滤膜，备用。

2.1.2　色谱条件　色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm），流动相：0.1% 甲酸水溶液（A）-0.1% 甲酸乙腈溶液（B），梯度洗脱程序（0 ～ 10 min，0% ～ 30%B；10 ～ 25 min，30% ～ 40%B；25 ～ 30 min，40% ～ 50%B；30 ～ 40 min，50% ～ 70%B；40 ～ 45 min，70% ～ 100%B；45 ～ 60 min，100%B；60 ～ 60.5 min，100% ～ 0%B；60.5 ～ 70 min，0%B），流速 0.3 mL • min^{-1}，柱温 35 ℃，进样量 10 μL。

2.1.3　质谱条件　采用电喷雾离子源（ESI），离子化模式为电喷雾正、负离子模式，扫描范围为 *m/z* 100 ～ 1200，离子源电压 3200 V，离子传输毛细管温度 320 ℃，雾化气体为氮气，辅助气加热温度 350 ℃，鞘气流速 40 L • min^{-1}，辅助气流速 15 L • min^{-1}。采用 Q Exactive Plus Orbitrap 高分辨质谱进行质谱数据采集，检测模式为 Full MS-dd MS^2，MS^1 分辨率设置为 70 000，MS^2 分辨率设置为 17 500。

2.1.4　入血成分定性分析　将鼻咽解毒胶囊全方及各单味药成分的分子式、相对分子质量、碎片离子、药材来源、中英文名称等进行整合，建立鼻咽解毒胶囊成分数据库。采用 QE plus 软件对空白血清和含药血清进行数据采集，结合 Compound discover 3.3 软件中的理论质谱数据，扣除内源性成分，对比上述数据库定性分析入血成分，得到总离子流图（见图 1）。共鉴定出入血成分 18 个，主要为黄酮类、萜类成分，结果见表 1。

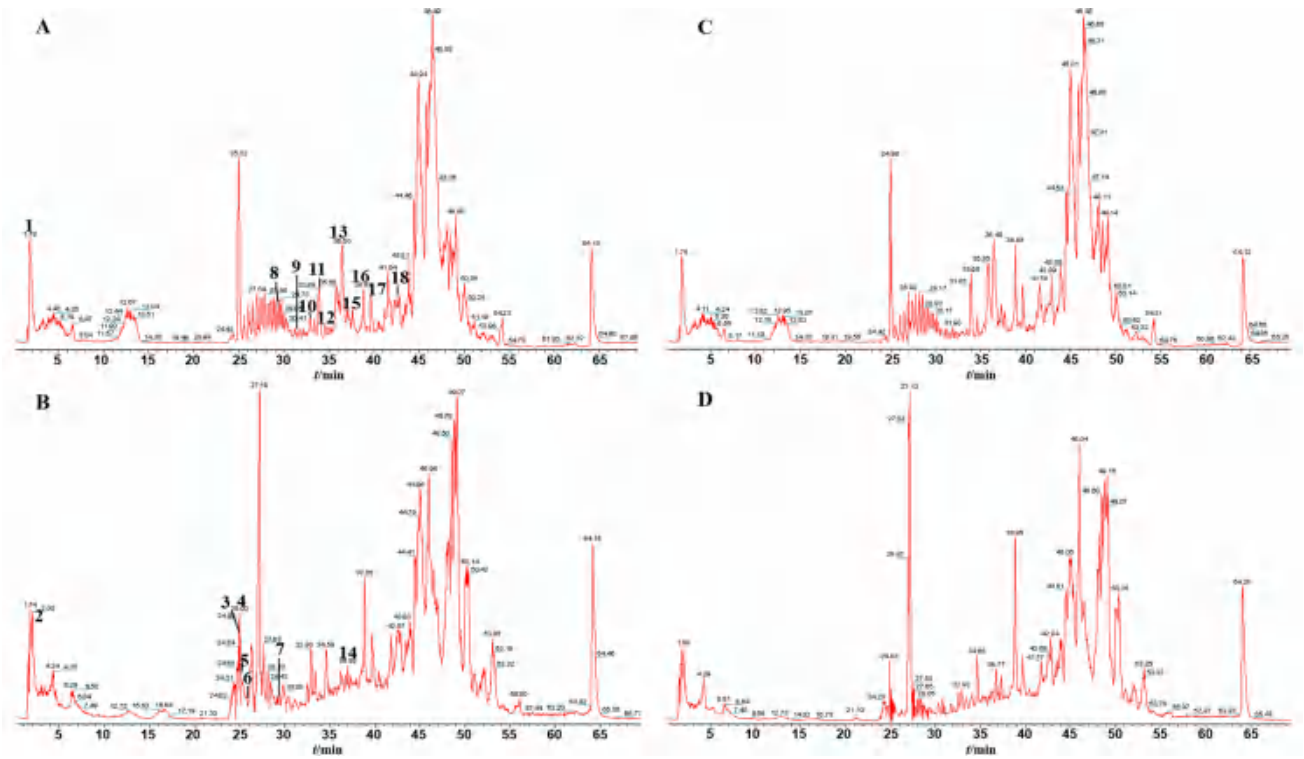


图 1　鼻咽解毒胶囊含药血清（A、B）和空白血清（C、D）的 UHPLC-MS/MS 总离子流图

Fig 1　Total ion chromatoglam of mouse serum after the administration of BYJD（A and B）and the blank serum（C and D）by UHPLC-MS/MS

A、C. 正离子模式（positive ion mode）；B、D. 负离子模式（negative ion mode）。

表 1　鼻咽解毒胶囊入血成分鉴定分析

Tab 1　Identification and analysis of absorbed components of Biyan Jiedu capsules

No.	t_R/min	误差 /（$\times10^{-6}$）	一级质谱信息		二级质谱信息	分子式	化合物名称	分类	来源
			$[M+H]^+$	$[M-H]^-$					
1	1.865	0.86	138.0551	—	94.0653$[M+H-CO_2]^+$	$C_7H_7NO_2$	葫芦巴碱 [7]	生物碱类	白花蛇舌草
2	2.086	0.25	—	191.0198	173.0091$[M-H-H_2O]^-$，129.0193$[M-H-H_2O-CO_2]^-$，111.0087$[M-H-CO_2-2H_2O]^-$，85.0295$[M-H-H_2O-2CO_2]^-$	$C_6H_8O_7$	柠檬酸 [8]	有机酸类	黄芩
3	24.597	0.43	—	373.1142	211.0609$[M-H-Glc]^-$，193.0508$[M-H-Glc-H_2O]^-$，149.0608$[M-H-Glc-H_2O-CO_2]^-$	$C_{16}H_{22}O_{10}$	京尼平苷酸 [9]	三萜类	白花蛇舌草
4	24.800	0.27	—	403.125	241.0723$[M-H-Glc]^-$	$C_{17}H_{24}O_{11}$	羟异栀子苷 [9]	三萜类	白花蛇舌草
5	25.300	0.21	—	299.1136	137.0607$[M-H-Glc]^-$，119.0501$[M-H-Glc-H_2O]^-$	$C_{14}H_{20}O_7$	红景天苷 [10]	苯乙醇苷类	黄连
6	25.600	0.05	—	153.0194	109.0295$[M-H-CO_2]^-$	$C_7H_6O_4$	龙胆酸 [11]	有机酸类	黄连
7	28.900	0.31	—	417.1192	255.0663$[M-H-Glc]^-$	$C_{21}H_{22}O_9$	异甘草苷 [12]	黄酮类	甘草
8	29.001	−0.18	257.0808	—	239.0703$[M+H-H_2O]^+$	$C_{15}H_{12}O_4$	异甘草素 [12]	黄酮类	黄芩 / 黄芪 / 甘草
9	31.483	−0.20	447.0921	—	271.0603$[M+H-Glu]^+$	$C_{21}H_{18}O_{11}$	黄芩苷 [13]	黄酮类	黄芩
10	32.821	0.14	461.1079	—	285.076$[M+H-Glu]^+$	$C_{22}H_{20}O_{11}$	千层纸素 A-7-*O*-*β*-*D*-葡萄糖醛酸苷 [14]	黄酮类	黄芩
11	33.257	−0.16	285.0758	—	270.0524$[M+H-CH_3]^+$，253.0498$[M+H-CH_3-OH]^+$，229.0865$[M+H-C_2O_2]^+$，225.0548$[M+H-C_2H_4O_2]^+$，137.0235$[M+H-C_9H_8O_2]$	$C_{16}H_{12}O_5$	毛蕊异黄酮 [15]	黄酮类	黄芪 / 甘草
12	33.375	0.14	461.1079	—	285.0760$[M+H-Glu]^+$，270.0525$[M+H-Glu-CH_3]^+$	$C_{22}H_{20}O_{11}$	汉黄芩苷 [13]	黄酮类	黄芩
13	36.813	0.28	471.347	—	453.3364$[M+H-H_2O]^+$，317.2117$[M+H-C_{10}H_{16}O-H_2O-]^+$	$C_{30}H_{46}O_4$	甘草次酸 [16]	三萜类	甘草
14	36.815	−0.02	—	821.3965	351.0572$[M-H-C_{30}H_{44}O_3]^-$，193.0354$[M-H-C_{36}H_{50}O_6]^-$，175.0250$[M-H-C_{36}H_{50}O_6-H_2O]^-$	$C_{42}H_{62}O_{16}$	甘草酸 [17]	三萜类	甘草
15	36.986	−0.13	269.0808	—	254.0573$[M+H-CH_3]^+$，137.0238$[M+H-CH_3-C_8H_5O]^+$	$C_{16}H_{12}O_4$	刺芒柄花素 [15]	黄酮类	黄芪 / 甘草
16	39.038	−0.13	285.0757	—	270.0524$[M+H-CH_3]^+$	$C_{16}H_{12}O_5$	汉黄芩素 [13]	黄酮类	黄连 / 黄芩 / 黄芪
17	39.747	−0.16	285.0756	—	270.0525$[M+H-CH_3]^+$	$C_{16}H_{12}O_5$	千层纸素 A[13]	黄酮类	黄芩 / 黄芪
18	42.347	0.09	469.3313	—	451.3206$[M+H-H_2O]^+$	$C_{30}H_{44}O_4$	光甘草内酯	三萜类	甘草

注（Note）：Glc：葡萄糖（glucose）；Glu：葡萄糖苷（glucoside）。

以黄酮类成分中化合物 **11** 和萜类成分中化合物 **14** 为例，分析鼻咽解毒胶囊入血成分可能的裂解途径。化合物 **11** 在正离子模式下准分子离子峰 *m/z* 285.0758$[M+H]^+$，可推断其分子式为 $C_{16}H_{12}O_5$，*m/z* 270.0524、229.0865、225.0548、137.0235 分别由母离子脱去 $-CH_3$、$-C_2O_2$、$-C_2H_4O_2$、$-C_9H_8O_2$ 基团产生的碎片离子，*m/z* 253.0498 是由 *m/z* 270.0524 脱去一分子 OH 产生的碎片离子，经文献比对 [15]，推测该化合物为毛蕊异黄酮。化合物 **14** 在负离子模式下准分子离子峰 *m/z* 821.3965$[M-H]^-$，可推断其分子式为 $C_{42}H_{62}O_{16}$，*m/z* 351.0572、193.0354 分别由母离子脱去 $-C_{30}H_{44}O_3$、$-C_{36}H_{50}O_6$ 基团产生的碎片离子，*m/z* 175.0250 是由 *m/z* 193.0354 脱去一分子 H_2O 产生的碎片离子，经文献比对 [17]，推测该化合物为甘草酸。

2.2　入血成分与免疫调节作用的网络药理学研究

将得到的 18 个鼻咽解毒胶囊入血成分通过 TCMSP 和 SwissTargetPrediction 数据库获取相关靶蛋白，利用 Uniprot 数据库将靶蛋白转化为靶基因，合并去重后得到 366 个靶点。以“immunity”“immunoregulation”“immunomodulation”“immunoenhancement”为关键词，在 OMIM 和 Genecards 数据库中筛选免疫调节相关靶点，合并去重后得到 2772 个靶点。将上述成分靶点与疾病靶点导入在线软件 E-Venn 绘制韦恩图，共筛查出 159 个交集靶点。通过 STRING 11.5 数据库和 Cytoscape 3.9.1 软件构建

PPI 网络图（见图 2A），利用 Network Analyzer 和 CycoNCA 工具进行拓扑分析，先筛选度（degree）值大于均值的靶点，再筛选同时满足大于 degree、中心度（betweenness）和紧密中心（closeness）值的均值且小于 Average Shortest Path Length 均值的靶点，得到 *TNF*、*IL6*、蛋白激酶 B（*AKT1*）、肿瘤蛋白 p53 基因（*TP53*）、前列素内环氧化物合成酶 2（*PTGS2*）、*MAPK3* 等 15 个核心靶点。

将 159 个交集靶点输入 DAVID 6.8 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析，微生信在线平台绘制富集图（见图 2B、2C）。共富集于 823 个生物学过程和 159 条信号通路（$P < 0.05$），包括 RNA 聚合酶Ⅱ启动子的转录正调控、炎症反应凋亡过程的负调控等生物进程（BP），质膜和胞质等细胞组分（CC）和蛋白质结合、相同蛋白结合等分子功能（MF）；信号通路主要包括 PI3K-Akt、白细胞介素 -17（IL-17）、TNF 和 MAPK 信号通路等。

利用 Cytoscape 3.9.1 软件构建“成分 - 交集靶点 - 通路 - 功能”关联网络图（见图 2D），拓扑分析发现 degree、betweenness 和 closeness 值排名前 20 的入血成分有汉黄芩素、千层纸素 A、异甘草素、甘草次酸、刺芒柄花素、光甘草内酯和毛蕊异黄酮，靶点有 *PTGS2*，通路有 PI3K-Akt 和 MAPK，推测这些成分、靶点和通路在鼻咽解毒胶囊免疫调节作用中最为关键。

2.3　鼻咽解毒胶囊免疫调节作用实验验证

2.3.1　RAW264.7 巨噬细胞吞噬活性实验　同“2.1.1”项下方法制备以 15.31、30.62、61.24 g • kg^{-1} 鼻咽解毒胶囊含药血清灌胃大鼠，灭活后于－80 ℃冻存备用。取对数生长期的 RAW264.7 巨噬细胞，以每孔 2×10^4 个细胞密度接种于 96 孔培养板中。细胞贴壁后，弃上清液，分组加药：空白组（只含培养基），对照组（含细胞和培养基），鼻咽解毒胶囊低、中、高剂量组（分别含细胞和 10% 上述含药血清的培养基）。培养 24 h，弃上清液，PBS 洗涤 1 次，每孔加入 1 mg • mL^{-1} 的中性红生理盐水溶液 100 μL，避光培养 1 h 后弃上清液，PBS 洗涤 2 次，每孔加入 100 μL 细胞裂解液（无水乙醇∶冰醋酸混合液＝1∶1），4 ℃避光过夜，酶标仪 540 nm 波长下测 *OD* 值，计算吞噬率 [吞噬率（%）＝（实验组 *OD* 值－空白组 *OD* 值）/（对照组 *OD* 值－空白组 *OD* 值）×100%]。结果见图 3A，与对照组比较，鼻咽解毒胶囊含药血清低、中、高剂量组均能提高 RAW264.7 巨噬细胞吞噬活性（$P < 0.01$）。

2.3.2　鼻咽解毒胶囊对免疫抑制小鼠的免疫调节作用　30 只 Balb/c 小鼠适应性喂养 7 d 后，随机分为对照组，模型组及鼻咽解毒胶囊低、中、高剂量给药组。对照组腹腔注射生理盐水，模型组和各给药组腹腔注射 80 mg/（kg • d）环磷酰胺，共 3 d。造模结束后，对照组和模型组灌胃给予蒸馏水 0.1 mL • kg^{-1}，各给药组分别灌胃给予 4.42、13.27、22.11 g • kg^{-1}（临床等效剂量 1 倍、3 倍、5 倍）鼻咽解毒胶囊，共 14 d。

实验期间每两日记录一次小鼠体质量；最后一次给药后禁食不禁水 12 h，称重后摘眼球取血于含有抗凝剂的采血管中，检测外周血血细胞数量；取各组小鼠脾脏和胸腺，精密称量并计算脏器指数 [脏器指数＝脏器质量（mg）/ 小鼠体质量（g）]；称重后的脏器立即用 4% 多聚甲醛室温固定 48 h，脱水、石蜡包埋、切片、烤片、脱蜡，苏木素 - 伊红（HE）染色，封片，于普通光学显微镜下观察组织病理形态。

体质量结果见图 3B，与对照组比较，给药第 4 日模型组小鼠体质量降低（$P < 0.01$）；与模型组比较，鼻咽解毒胶囊高剂量组小鼠体质量缓慢下降（$P < 0.05$）。给药第 14 日，与对照组比较，模型组小鼠体质量差异无统计学意义；与模型组比较，鼻咽解毒胶囊高剂量组小鼠体质量升高（$P < 0.05$）。外周血血细胞数量结果见表 2，与对照组比较，模型组小鼠外周血血小板和淋巴细胞数量下降（$P < 0.05$、0.01）；与模型组比较，鼻咽解毒胶囊中、高剂量组血红蛋白、淋巴细胞数量提高（$P < 0.01$）。

脏器指数结果见图 3C、3D，与对照组比较，模型组小鼠胸腺指数降低（$P < 0.01$），而脾脏指数差异无统计学意义；与模型组比较，鼻咽解毒胶囊高剂量组胸腺指数提高（$P < 0.05$）。病理学检查结果（见图 4）显示，与对照组比较，模型组脾脏白髓（WP）、红髓（RP）、边缘区（MZ）界限模糊，脾细胞排列稀疏，细胞核不明显；与模型组比较，鼻咽解毒胶囊低、中、高剂量组脾脏白髓结构逐渐清晰，脾细胞排列逐渐紧密。与对照组比较，模型组胸腺体积小，皮质（COR）和髓质（MED）界限模糊，皮质染色浅、面积小，淋巴细胞稀疏；与模型组比较，鼻咽解毒胶囊低、中、高剂量组胸腺皮质和髓质界限逐渐清晰，皮质面积逐渐增大，皮质淋巴细胞数量逐渐增加。

2.3.3　统计学分析　实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计分析，采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件绘图，计量资料差异比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA），多重比较选择 LSD 方法分析。

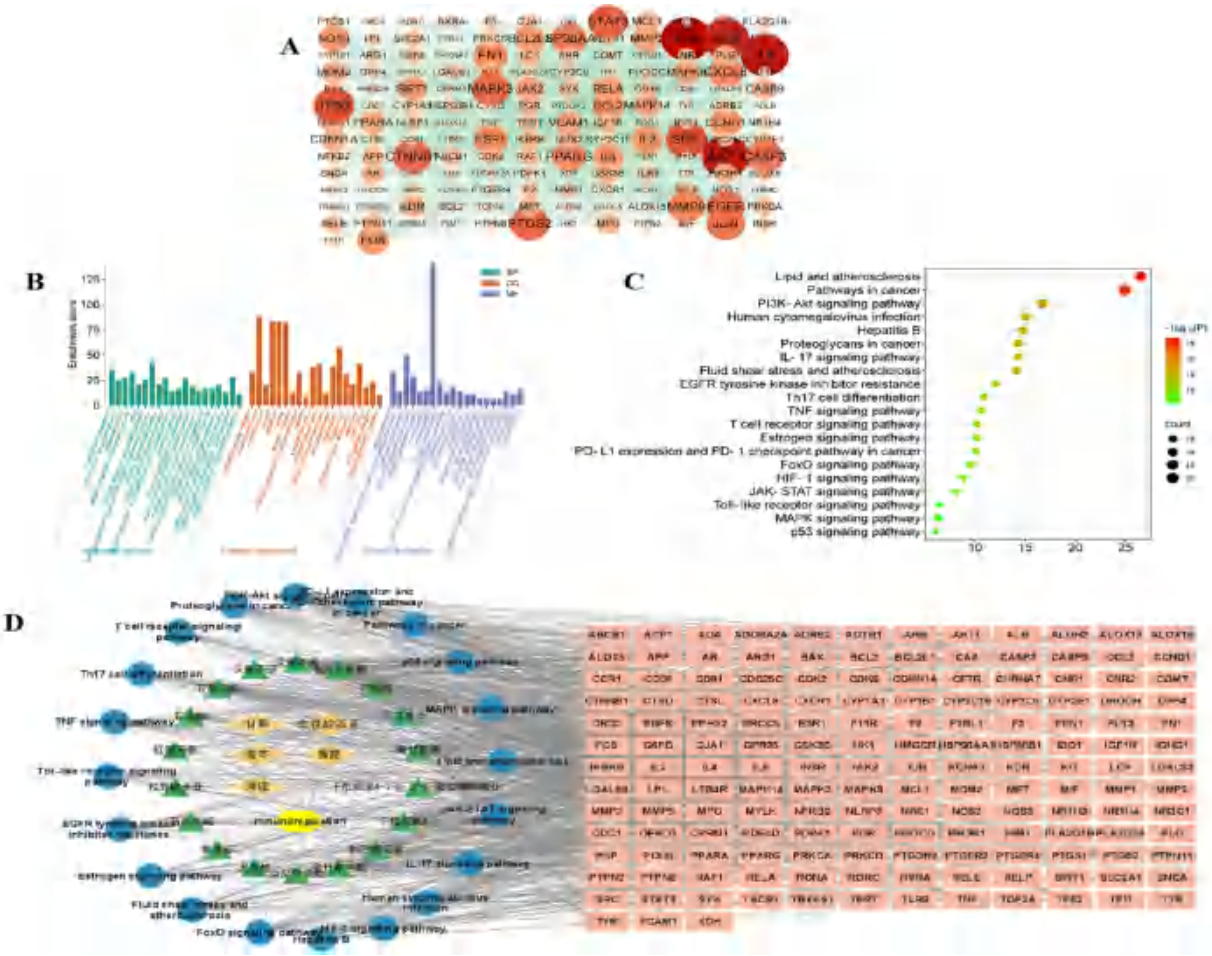


图 2　鼻咽解毒胶囊入血成分免疫调节作用的网络药理学研究

Fig 2　Network pharmacology of immunoregulation effect of Biyan Jiedu capsules in the serum

注：图 2D 中黄色为药物，绿色为入血成分，粉色为靶点，蓝色为信号通路，红色为疾病。

Note：Fig 2D yellow represents drug，green represents compond，pink represents target，blue represents signal pathway，red represents disease.

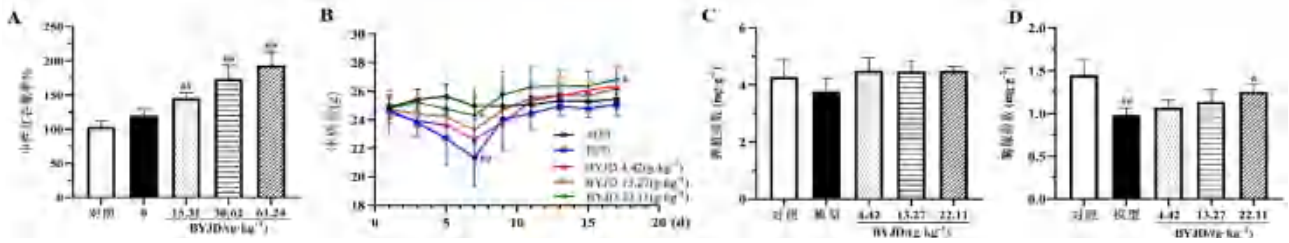


图 3　鼻咽解毒胶囊对 RAW264.7 巨噬细胞吞噬活性及免疫抑制小鼠体质量和脏器指数的影响

Fig 3　Effect of Biyan Jiedu capsules on phagocytosis activity of microphage RAW264.7，and weight，organ index

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

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

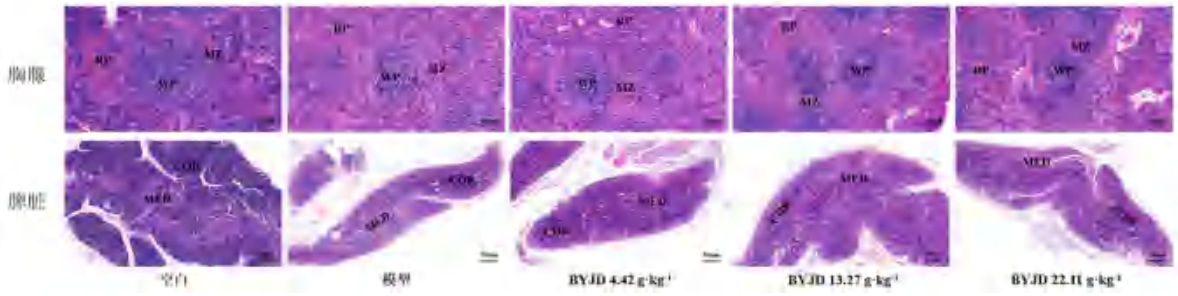


图 4　鼻咽解毒胶囊对免疫抑制小鼠胸腺（×100）、脾脏（×200）病理组织的影响

Fig 4　Effect of Biyan Jiedu capsules on pathological section of thymus（×100）and spleen（×200）in immunosuppressive mice

表 2　鼻咽解毒胶囊对免疫抑制小鼠外周血细胞数量的影响 ($\bar{x}\pm s$，$n=6$)

Tab 2　Effect of Biyan Jiedu capsules on the number o peripheral cell in immunosuppressive mice ($\bar{x}\pm s$，$n=6$)

组别	白细胞 / ($\times10^9\cdot L^{-1}$)	红细胞 / ($\times10^{12}\cdot L^{-1}$)	血红蛋白 / ($g\cdot L^{-1}$)	血小板 / ($\times10^9\cdot L^{-1}$)	嗜中性粒细胞 / ($\times10^9\cdot L^{-1}$)	淋巴细胞 / ($\times10^9\cdot L^{-1}$)
对照组	2.56±0.51	10.21±0.29	161.00±4.55	593.75±43.30	1.29±0.06	0.66±0.25
模型组	2.26±0.17	9.79±0.51	156.33±4.27	471.00±79.98#	1.25±0.18	0.06±0.02##
BYJD 4.42 $g\cdot kg^{-1}$	2.43±0.33	9.94±0.37	157.20±6.02	519.80±69.80	1.28±0.18	0.04±0.02
BYJD 13.27 $g\cdot kg^{-1}$	2.35±0.15	10.29±0.42	165.83±4.62**	530.60±48.73	1.40±0.06	0.67±0.19**
BYJD 22.11 $g\cdot kg^{-1}$	2.39±0.28	10.32±0.48	166.20±4.87**	577.33±94.98	1.43±0.35	0.70±0.15**

注：与对照组比较，#$P<0.05$，##$P<0.01$；与模型组比较，**$P<0.01$。

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

3　讨论

中医学认为“扶正培本”是通过补益机体精、气、血、津液，调补阴阳，以维持正常的脏腑、经络、血脉的生理功能。研究表明，调节机体免疫是“扶正培本”的重要作用机制之一[18]；“扶正培本”类中药能激活并提高巨噬细胞活性，提高机体免疫功能，调节机体内环境平衡，改善宿主免疫抑制状态[19]。为科学阐释鼻咽解毒胶囊“扶正培本”功效，本研究采用 UHPLC-MS/MS 技术分析鉴定出鼻咽解毒胶囊 18 个入血成分，主要为黄酮类和萜类成分；在此基础上运用网络药理学，通过鼻咽解毒胶囊“入血成分 - 靶点 - 信号通路”网络图筛选得到免疫调节作用度值较高的 7 个入血成分，其中汉黄芩素、毛蕊异黄酮和刺芒柄花素等黄酮类成分可通过提高脾脏指数和胸腺指数改善 C57BL/6 荷瘤小鼠免疫功能[20]；甘草次酸能够增强固有免疫细胞中 IFN-1 诱导基因的表达从而激活适应性免疫系统发挥消杀肿瘤细胞的作用[21]，由此推测这些成分可能是鼻咽解毒胶囊发挥免疫调节作用的主要药效成分。文献报道，鼻咽解毒胶囊中黄芩、黄芪、白花蛇舌草、甘草等多味中药具有免疫调节功能[20-23]，与本研究基于入血成分的网络药理学预测一致。

网络药理学结果显示，鼻咽解毒胶囊入血成分可通过多靶点发挥免疫调节作用，其中关键靶点为 *TNF*、*IL6*、*AKT1*、*TP53*、*MAPK3* 等 15 个。研究表明，TNF 和 IL6 既能够参与炎症反应，也能调节先天性免疫和获得性免疫[24]；白细胞减少症模型大鼠血清中 TNF-α、IL-6 表达升高，扶正类方药正源方能够改善白细胞数量和胸腺指数，降低 TNF-α、IL-6 表达[25]。AKT1、TP53、MAPK3 与机体炎症免疫、肿瘤免疫有关[26-27]；Akt 活化增加 IKKα 的磷酸化，从而激活 NF-κB 途径，而 MAPK 是 NF-κB 的上游激活剂，PI3K-Akt、MAPK 和 NF-κB 途径之间有着相对激活的关系[28]。通路富集结果表明，鼻咽解毒胶囊入血成分可能通过 PI3K-Akt 和 MAPK 等信号通路发挥免疫调节作用。而课题组前期研究与网络药理学预测的关键靶点和信号通路相符，提示本方具有免疫调节作用，其机制需进一步作实验验证。

巨噬细胞是机体重要免疫细胞，吞噬功能能反映其免疫调节能力；脏器指数可客观反映免疫器官的免疫水平和发育功能；外周血细胞数量能直接反映机体免疫功能和骨髓抑制等。本研究采用细胞和动物模型验证鼻咽解毒胶囊的免疫调节作用，发现鼻咽解毒胶囊含药血清能显著提高 RAW264.7 巨噬细胞吞噬活性；高剂量鼻咽解毒胶囊能显著改善免疫抑制模型小鼠体质量、胸腺指数、外周血红蛋白和淋巴细胞数量下降，减轻脾脏和胸腺病理损伤，这些结果表明鼻咽解毒胶囊具有免疫调节作用。本研究观察到免疫抑制模型小鼠体质量、外周血白细胞数量与对照组、鼻咽解毒胶囊给药组之间无差别，考虑可能与成年小鼠免疫系统较成熟，免疫细胞功能在无造模因素条件下可恢复至正常状态有关[29]。此外，免疫抑制模型小鼠脾脏指数与对照组、鼻咽解毒胶囊给药组均无差别，而脾脏组织却观察到病理损伤，可能是脾脏组织增生、修复，使得脏器指数无差别而病理有改变[30]。胸腺指数、脾脏指数的报道结果在不同的文献中并不一致[30-31]，因此，有必要选择在不同时间点观察不同模型，以全面评估本方的免疫调节作用。

综上所述，本研究通过 UHPLC-MS/MS 技术分析鉴定了鼻咽解毒胶囊入血成分，结合网络药理学预测了其免疫调节作用的主要药效成分，运用细胞和动物药效学实验验证了本方的免疫调节作用，为阐释本方“扶正培本”功效提供了科学证据。同时，本研究预测的关键靶点和信号通路也将为后续深入探讨鼻咽解毒胶囊免疫调节机制提供重要参考。

参考文献

[1] 郭秋均，张兴，刘瑞，等 . 中医肿瘤理论传承发展历程——“扶正培本”到“调气解毒”[J]. 世界中医药，2022，17（11）：1497-1501.
[2] 赵莉，郜玉钢，姬庆 . 人参化学成分的免疫作用及其机制的研究进展 [J]. 中南药学，2015，13（7）：741-745.
[3] 周刘华，姚涛，郭爱灵，等 . 近十年中药免疫双向调节研究进展 [J]. 中国中医基础医学杂志，2020，26（7）：1016-1020，1033.
[4] 樊启猛，潘雪，贺玉婷，等 . 中药及其复方对病毒性肺炎的免疫调节作用研究进展 [J]. 中草药，2020，51（8）：2065-2074.
[5] 何鸽飞，李燕飞，黄师琼，等 . 连芩解毒方联合万古霉素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌体外抗菌作用研究 [J]. 中南药学，2020，18（5）：789-793.
[6] Deng G，He H，Chen Z，et al. Lianqinjiedu decoction attenuates LPS-induced inflammation and acute lung injury in rats via TLR4/NF-κB pathway [J]. Biomed Pharmacother，2017，96：148-152.
[7] 庾丽峰 . 龙利叶乙酸乙酯部位质量分析及抗炎谱效关系的研究 [D]. 南宁：广西中医药大学，2020.
[8] 秦华珍，尹优，苏善美，等 .LC-MS 分析 5 味山姜属中药不同极性部位的共有成分研究 [J]. 中华中医药学刊，2020，38（9）：1-4，259.
[9] 汤丹，曹东敏，黄广枭，等 .HPLC-DAD-Q-Exactive 静电场轨道阱高分辨质谱快速分析栀子中主要成分 [J]. 广东化工，2019，46（13）：15-16.
[10] 梁玉婷，王静宇，苏薇薇，等 . 基于 UFLC-Triple TOF-MS/MS 的壮药战骨化学成分分析 [J]. 中南药学，2018，16（10）：1369-1373.
[11] 杨雅欣，廖尚高，王正，等 . 血人参水溶性化学成分的 UHPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20（23）：63-67.
[12] 徐东川，刘瑾，李晓晶，等 . 泻白散大鼠体内入血成分研究 [J]. 中国药房，2022，33（1）：38-45.
[13] 李彤，李宇，张彩娟，等 . 基于 UHPLC-Q-Orbitrap-MS 的葛根芩连汤治疗溃疡性结肠炎血清药效物质基础研究 [J]. 中国中药杂志，2022，47（4）：1073-1084.
[14] 胡丽娟 . 加味小柴胡汤抗菌抗炎有效物质部位及其血清药物化学研究 [D]. 武汉：湖北中医药大学，2016.
[15] 刘傲雪，王晶娟，张贵君，等 . 基于大鼠体内多成分代谢的黄芪质控成分遴选 [J]. 药物评价研究，2018，41（2）：216-222.
[16] 徐玉，石镇东，郑小伟 . 液质联用测定芍药甘草汤中 3 种有效成分的含量 [J]. 浙江中医杂志，2017，52（4）：303-304.
[17] 杨宗统，徐东川，刘瑾，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的甘草大鼠体内入血成分分析 [J]. 中国医院药学杂志，2022，42（18）：1897-1903.
[18] 裴正学，冯小荣，何红珍，等 . 扶正固本与免疫 [J]. 中医临床研究，2015，7（30）：4-6.
[19] 华海清 . 扶正培本药物治疗恶性肿瘤的现代研究 [J]. 中国中药杂志，2008，33（9）：1094-1097.
[20] 杨冰，于桂红，李明雨，等 . 基于“补气固表”探究黄芪黄酮组分抑制 C57BL/6 荷瘤小鼠肿瘤生长及免疫调节机制研究 [J]. 中国中药杂志，2019，44（23）：5184-5190.
[21] 李硕，白金钊，刘闰平 .18β- 甘草次酸增强固有免疫细胞中 I 型干扰素响应进而协同抑制肝癌生长的机制研究 [J]. 中草药，2022，53（16）：5034-5043.
[22] 龚发萍，郑鸣 . 黄芩的化学成分及药理作用 [J]. 临床合理用药杂志，2021，14（34）：176-178.
[23] 张林超 . 白花蛇舌草多糖对肾癌荷瘤小鼠肿瘤生长及免疫调节作用的影响 [J]. 中成药，2021，43（3）：765-769.
[24] Yokota K，Sato K，Miyazaki T，et al. Characterization and function of tumor necrosis factor and interleukin-6-induced osteoclasts in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheumatol，2021，73（7）：1145-1154.
[25] 张君威，唐志书，刘妍如，等 . 正源方干预化疗后白细胞减少症的网络药理学研究及实验验证 [J]. 中草药，2021，52（21）：6586-6597.
[26] Li L，Li M，Wang X. Cancer type-dependent correlations between TP53 mutations and antitumor immunity [J]. DNA Repair（Amst），2020，88：102785.
[27] Stefani C，Miricescu D，Stanescu-Spinu Ⅱ，et al. Growth factors，PI3K/AKT/mTOR and MAPK signaling pathways in colorectal cancer pathogenesis：where are we now? [J]. Int J Mol Sci，2021，22（19）：10260.
[28] 郭静，尚海，马丽炎，等 . 芦荟大黄素衍生物 AE-YJ 通过 PI3K-Akt/NF-κB 和 MAPK/NF-κB 途径抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症介质的释放 [J]. 中国药理学通报，2021，37（12）：1700-1708.
[29] 林帅，陈孟毅，刘冰，等 . 环磷酰胺对不同年龄小鼠免疫细胞损伤及修复作用的影响 [J]. 中国医药导报，2016，13（36）：8-13，35.
[30] 包汇慧，耿雪，贾旭东，等 . 环磷酰胺对大鼠脾细胞抑制作用的研究 [J]. 毒理学杂志，2014，28（3）：189-194.
[31] Wang X，Shen Y，Zhuang X，et al. Jintiange capsule alleviates rheumatoid arthritis and reverses changes of serum metabolic profile in collagen-induced arthritic rats [J]. J Inflamm Res，2021，14：6685.

（收稿日期：2022-10-02；修回日期：2022-12-20）

菊花提取物对肝旺痰阻型高血压大鼠的降压作用研究

汪诗沁[1]，朱芊芊[1]，尹宣[1]，吴诗雨[1]，汪波[2]，聂晶[3*]，叶晓川[1]，刘丹[1*]（1. 湖北中医药大学药学院中药资源与中药化学湖北省重点实验室，武汉　430065；2. 湖北省药品监督检验研究院 国家药品监督管理局中药质量控制重点实验室 湖北省药品质量检测与控制工程技术研究中心，武汉　430075；3. 湖北省药品（医疗器械）不良反应监测中心，武汉　430071）

摘要：目的　探讨菊花提取物对肝旺痰阻型高血压大鼠的降压作用。**方法**　除正常组外，造模组大鼠采用高脂高糖及梯度饮酒的方式制备肝旺痰阻型高血压大鼠模型。造模成功后，将造模大鼠随机分为模型组，缬沙坦组，菊花水提物低、中、高剂量组，菊花醇提物低、中、高剂量组，给药组给予相应的药物，正常组及模型组给予相同量的水，给药同时重复前法继续造模，连续给药 4 周。给药期间每周测量一次体质量、面温，每两周测量一次血压，分别在造模开始前、造模结束时及给药结束时测量血糖值。通过 HE 染色观察大鼠肝脏及胸主动脉的组织病变情况；检测总胆固醇（TC）、三酰甘油（TG）、谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）、C 反应蛋白（CRP）、内皮素 -1（ET-1）及内皮型一氧化氮合酶（eNOS）水平。**结果**　菊花水提物能显著降低肝旺痰阻型高血压大鼠的血压，改善大鼠肝脏病变及脂肪空泡情况，抑制胸主动脉中膜增厚情况；显著降低大鼠肝脏组织中 AST、ALT、TG 水平及血清中 TC、TG、CRP 水平。**结论**　菊花提取物对肝旺痰阻型高血压大鼠具有降压、降脂作用，其降压机制可能与其抑制炎症因子释放、改善高血压大鼠血管内皮细胞的炎症反应密切相关。

关键词：菊花；肝旺痰阻；高血压；血压；C 反应蛋白
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0953-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.018

Antihypertensive effect of *Chrysanthemum morifolium* extracts on hypertensive rats with liver prosperity and phlegm obstruction syndrome

WANG Shi-qin[1], ZHU Qian-qian[1], YIN Xuan[1], WU Shi-yu[1], WANG Bo[2], NIE Jing[3*], YE Xiao-chuan[1], LIU Dan[1*] (1. *Hubei Key Laboratory of Resource and Chemistry of Chinese Medicine*, *College of Pharmacy*, *Hubei University of Chinese Medicine*, *Wuhan* 430065; 2. *Hubei Institute for Drug Control*, *NMPA Key Laboratory of Quality Control of Chinese Medicine*, *Hubei Engineering Research Center for Drug Quality Control*, *Wuhan* 430075; 3. *Hubei Center for ADR Monitoring*, *Wuhan* 430071)

Abstract: Objective To determine the antihypertensive effect of *Chrysanthemum morifolium* extract on hypertensive rats with liver prosperity and phlegm obstruction syndrome. **Methods** Rats were given high glucose and high fat combination alcohol diet to prepare the hypertension rat models of liver prosperity and phlegm obstruction syndrome. After the successful modeling, the rats were randomly divided into a model group, a valsartan group, the low, medium and high dose water extract group of *Chrysanthemum morifolium*, and the low, medium and high dose alcohol extract group of *Chrysanthemum morifolium*. The rats in drug-treatment group were given corresponding drugs, while the normal and model groups were given the same amount of water for 4 weeks. The modeling rats were fed with high glucose and high fat diet during the administration of drugs for 4 weeks. The

基金项目：湖北省科技重大专项（No.2020ACA007-05）；湖北省自然科学基金创新群体项目（No.2020CFA024）；湖北省教育厅科学技术研究项目（No.D20222001）。
作者简介：汪诗沁，女，硕士研究生，主要从事中药及其制剂药效物质基础研究，email：1378571441@qq.com　*通信作者：刘丹，女，副研究员，硕士研究生导师，主要从事中药及其制剂药效物质基础研究，email：ztt661@hbtcm.edu.cn；聂晶，女，教授，博士研究生导师，主要从事药物分析研究，email：niejingwh@sina.com

weight and face temperature were measured once a week during the treatment, while blood pressure was measured once every two weeks. The blood glucose was measured before the modeling, end of modeling, and end of drug administration. The tissue lesions of the liver and thoracic aorta of the rats were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) in the serum and the liver tissue were measured. The levels of C-reactive protein (CRP), endothelin-1 (ET-1) and endothelial Nitric oxide synthase (eNOS) in the serum were measured by ELISA. **Results** The water extract of *Chrysanthemum morifolium* greatly reduced the blood pressure, improved the liver lesions and fat vacuoles, and inhibited the thickening of thoracic aorta in hypertensive rats. It obviously inhibited the levels of AST, ALT, and TG in the liver tissue, the levels of TC and TG in the serum, and improved the level of CRP in the serum. **Conclusion** Extract of *Chrysanthemum morifolium* has antihypertensive and lipid lowering effect on rats with liver prosperity and phlegm obstruction syndrome, whose mechanism may be closely related to inhibiting the release of inflammatory factors and improving the inflammatory response of vascular endothelial cells in hypertensive rats.

Key words: *Chrysanthemum morifolium*; liver prosperity and phlegm obstruction syndrome; hypertension; blood pressure; C-reactive protein

高血压为当今社会最常见的慢性心血管疾病，其患病率呈现逐年升高且年轻化趋势 [1]。高血压的发生、发展与不良生活因素密切相关，高脂、高糖膳食及嗜酒等不良饮食习惯已成为高血压产生的主要诱因 [2]。中医学将高血压病归于“眩晕”“头痛”等范畴，古今均以肝风、肝阳为病机立论 [3-4]，《素问·至真要大论》云“诸风掉眩，皆属于肝”；张仲景提出“痰饮致眩”的观点；朱丹溪亦认为“无痰不作眩”，表明肝旺痰阻是高血压的重要病机及常见证型，其治疗原则为平肝潜阳、镇肝熄风 [5]。

菊花为菊科植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 的干燥头状花序，始见于《神农本草经》，味甘、苦，微寒，归肺、肝经，具有清热解毒、平肝明目等传统功效 [6]。临床上，菊花常配伍其他平肝潜阳药物用于治疗高血压病所致的头痛眩晕、目赤肿痛等相关症状 [7]。现代药理研究表明菊花提取物可降低肾性高血压大鼠的血压并改善其心肌肥厚 [8]，菊花总黄酮对自发性高血压大鼠具有降压作用 [9]。然而，菊花对肝旺痰阻型高血压的治疗作用未见报道。因此本研究拟采用高脂高糖饲料及梯度饮酒的方式制备肝旺痰阻型高血压大鼠模型 [10]，研究菊花提取物对该高血压模型大鼠的降压作用，并初步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 仪器

ZS-Z 无创血压测量系统（北京众实科技有限公司）；BSA423S 型千分之一电子天平（北京赛多利斯科学仪器有限公司）；KQ-500DE 数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；Centrifuge 5810 R 离心机（Eppendorf 公司）；酶标仪（Spark 10M，瑞士 TECAN 公司）。

1.2 试药

菊花药材于 2020 年 11 月采自湖北省麻城市黄土岗镇洪家河村基地，经湖北中医药大学叶晓川教授鉴定为菊科植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 的干燥头状花序。高糖高脂饲料（20% 蔗糖、15% 猪油、1.2% 胆固醇、0.2% 胆酸钠、63.6% 普通饲料，武汉市万千佳兴生物科技有限公司）；52% 红星二锅头酒（5 L/ 瓶，北京红星股份有限公司）；C 反应蛋白（CRP）、内皮素 -1（ET-1）、内皮型一氧化氮合酶（NOS3/eNOS）酶联免疫吸附试剂盒及谷草转氨酶（AST）、谷丙转氨酶（ALT）、总胆固醇（TC）、三酰甘油（TG）试剂盒（武汉伊莱瑞特生物科技有限公司）。

1.3 实验动物

SD 大鼠 90 只，SPF 级，雄性，体质量 150 ～ 180 g [北京斯贝福生物技术有限公司，于湖北中医药大学中医药实验中心 SPF 级动物房进行饲养，许可证号：SCXK（京）2019-0010，动物实验由湖北中医药大学伦理委员会批准，批准号为 HUCMS202108001]。

2 方法

2.1 药物的制备

称取菊花药材 1.5 kg 两份，分别加入 15 倍量水、80% 乙醇浸泡 1 h，回流 30 min，过 8 层滤布

过滤，收集滤液，再向将药渣中加入 12 倍量水、80% 乙醇回流 30 min，合并两次滤液并浓缩，冷冻干燥后分别得到菊花水提物、菊花醇提物。

2.2 造模与分组

造模阶段：90 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后，其中 10 只为正常组给予普通饲料，自由饮水；剩余 80 只大鼠为造模组，给予高糖高脂饲料及梯度饮酒制备肝旺痰阻型高血压大鼠模型[10]，起始乙醇体积分数 4%，每 2 日递增 2%，梯度上升至 22%，第 19 日时乙醇浓度到达 22%，后续维持 22% 浓度继续造模给药，造模 5 周。

给药阶段：造模组大鼠造模 5 周后根据血压值随机分为模型组、阳性药缬沙坦组 8.4 mg•kg^{-1}、菊花水提物低（LW-CM）、中（MW-CM）、高剂量（HW-CM）组（剂量分别为 1.05、2.1、4.2 g • kg^{-1}，依据《中国药典》2020 年版临床人用药剂量转换为大鼠用药剂量[6]，分别为临床剂量的 1、2、4 倍）、菊花醇提物低（LE-CM）、中（ME-CM）、高剂量（HE-CM）组（分别为 1.05、2.1、4.2 g • kg^{-1}），共 9 组，每组 10 只。重复前法继续造模，给药组给予相应的药物，正常组及模型组灌胃蒸馏水，给药体积 10 mL • kg^{-1}，给药 4 周。

2.3 体质量、面温及血糖的测定

实验期间，每周记录一次大鼠的体质量，同时采用非接触式红外额温计对准大鼠的面部，记录其面温数据。采用 GA-3 型血糖仪，测量大鼠造模前、造模完成、给药完成三个时间点的血糖值，记录数据。

2.4 血压的测定

采用 ZS-Z 无创血压测量系统，测量大鼠血压变化情况，每两周测量一次。测定前，先将大鼠放入固定器中，尾巴合适位置上固定传感器，待脉搏信号稳定波动后，手动加压后记录收缩压（SBP）、舒张压（DBP）及平均压（MBP），连续测量 3 次，取平均值。

2.5 肝脏及胸主动脉病理组织情况

将大鼠麻醉后，迅速取其肝脏组织并剪取一段胸主动脉组织，取肝左叶组织、胸主动脉用 4% 多聚甲醛固定、脱水浸蜡及包埋，切片制成 3 μm 的组织切片，再进行 HE 染色，显微镜下观察分析。

2.6 肝脏组织中 ALT、AST、TC、TG 水平的测定

给药 4 周后，禁食不禁水 12 h，腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉，取肝脏组织约 0.4 g，放入匀浆容器中，按照重量:体积＝ 1：9 的比例加入匀浆溶剂，进行匀浆，12 000 r • min^{-1} 离心 15 min 后，吸取上清，置于－ 20 ℃冷冻保存。按照试剂盒说明书操作测定肝脏组织中 ALT、AST、TC、TG 水平。

2.7 血清中 TC、TG、CRP、ET-1 及 eNOS 水平的测定

给药 4 周后，禁食不禁水 12 h，腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉，腹主动脉取血，静置 2 h 后 3500 r • min^{-1} 离心 10 min，取上层血清，置于－ 20 ℃冷冻保存，按照试剂盒说明书操作测定血清中 TC、TG 水平，采用 ELISA 法测定其血清中 CRP、ET-1 及 eNOS 水平。

2.8 统计学方法

采用 IBM SPSS statistics 25 软件分析数据，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用独立样本 T 检验，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 Graphpad Prism 8.0.1 软件作图。

3 结果

3.1 菊花提取物对高血压大鼠体质量、面温及血糖值的影响

由表 1 可知，与正常组大鼠相比，造模 9 周后，模型组大鼠体质量、面温显著升高，血糖值出现升高趋势；与模型组大鼠相比，给药 4 周后，缬沙坦组，水提物中、高剂量组大鼠面温均显著降低，血糖值出现降低的趋势。

表 1　菊花提取物对大鼠体质量、面温和血糖值的影响

Tab 1　Effect of *Chrysanthemum morifolium* extract on the body mass，face temperature and blood glucose value of rats

组别	体质量 /g	面温 /℃	血糖 /（mmol • L^{-1}）
正常组	450.21±38.41	35.07±0.62	3.86±0.57
模型组	520.29±65.38$^{\#}$	35.61±0.40$^{\#}$	5.00±1.53
缬沙坦组	513.78±49.30	34.82±0.62**	4.72±0.94
水提物低剂量组	524.81±48.34	35.23±0.50	4.44±0.48
水提物中剂量组	490.26±53.17	34.56±0.49**	3.96±0.44
水提物高剂量组	471.64±49.84	34.66±0.43**	4.59±0.50
醇提物低剂量组	506.53±65.47	35.07±0.69	4.52±0.57
醇提物中剂量组	474.08±45.97	35.37±0.65	4.77±0.70
醇提物高剂量组	512.93±74.55	35.30±0.52	4.67±0.52

注：与正常组比较，$^{\#}P < 0.05$；与模型组比较，$^{**}P < 0.01$。

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

3.2 菊花提取物对高血压大鼠 SBP、DBP 及 MBP 的影响

由表 2 可知，与正常组大鼠比较，造模 9 周后，模型组大鼠 SBP、DBP 及 MBP 均显著升高；与模型组大鼠相比，给药 4 周后，给药各组 SBP 均显著降低；缬沙坦组及水提物高剂量组 DBP 明显降低；缬沙坦组及水提物各组 MBP 均显著降低。

表 2　菊花提取物对大鼠 SBP、DBP 及 MBP 的影响 (mmHg)

Tab 2　Effect of *Chrysanthemum morifolium* extract on SBP，DBP and MBP of rats (mmHg)

组别	SBP	DBP	MBP
正常组	124.12±1.26	80.56±3.79	95.27±2.63
模型组	134.56±2.98$^{\#\#}$	89.92±5.27$^{\#\#}$	104.82±4.46$^{\#\#}$
缬沙坦组	125.29±1.52**	84.11±3.50*	97.83±2.52**
水提物低剂量组	128.83±0.91**	86.44±3.86	100.58±2.55*
水提物中剂量组	129.16±0.49**	87.39±2.91	101.31±1.84*
水提物高剂量组	128.51±0.80**	84.17±3.11*	98.94±2.14**
醇提物低剂量组	129.34±1.69*	88.93±4.38	102.41±3.36
醇提物中剂量组	129.23±2.87*	86.68±4.74	100.87±3.90
醇提物高剂量组	128.65±1.68**	87.56±4.61	101.26±3.32

注：与正常组比较，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

3.3　菊花提取物对高血压大鼠肝脏、胸主动脉组织形态的影响

HE 染色结果显示，正常组大鼠肝脏结构完整，肝小叶结构清晰，可见肝索呈放射状整齐排列；与正常组相比，模型组大鼠肝脏结构破坏，肝索消失，且肝细胞出现水样变性，脂肪出现病变，胞浆内出现大小不等的空泡；给药 4 周后，各给药组可见脂肪空泡明显减少，肝小叶结构逐渐清晰，由图可知，水提物高剂量组可见肝索结构整齐排列，水样变性明显缓解，见图 1。

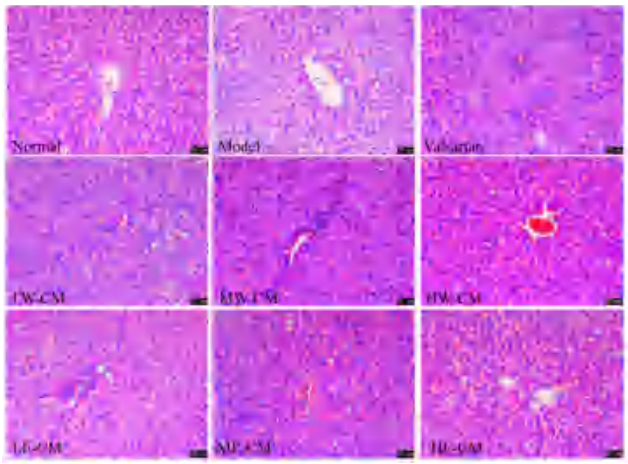


图 1　肝脏组织 HE 染色图（×200）

Fig 1　HE staining of liver tissue（×200）

正常组大鼠胸主动脉形态正常，血管壁各膜结构层次清晰，中膜厚度适中，外膜与中膜边界明显；与正常组相比，模型组胸主动脉膜结构排列紊乱，中膜增厚，外膜与中膜边界模糊，部分外膜结缔组织可见炎症浸润现象；给药组可见随给药剂量增加，中膜排列逐渐整齐且增厚现象逐渐改善，见图 2。

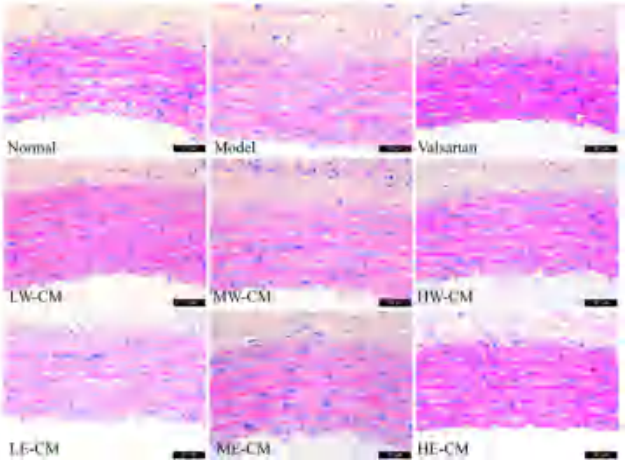


图 2　胸主动脉 HE 染色图（×400）

Fig 2　HE staining of thoracic aorta（×400）

3.4　菊花提取物对高血压大鼠肝脏组织中 ALT、AST、TC、TG 水平的影响

由图 3 可知，与正常组大鼠比较，造模 9 周后，模型组大鼠肝脏组织中 ALT、AST、TC 及 TG 均出现显著升高。与模型组大鼠相比，给药 4 周后，缬沙坦组及水提物中剂量组 ALT 明显降低且具有统计学意义；缬沙坦组，水提物中、高剂量组及醇提物各组 AST 显著降低，水提物低、中剂量组 TG 显著降低。

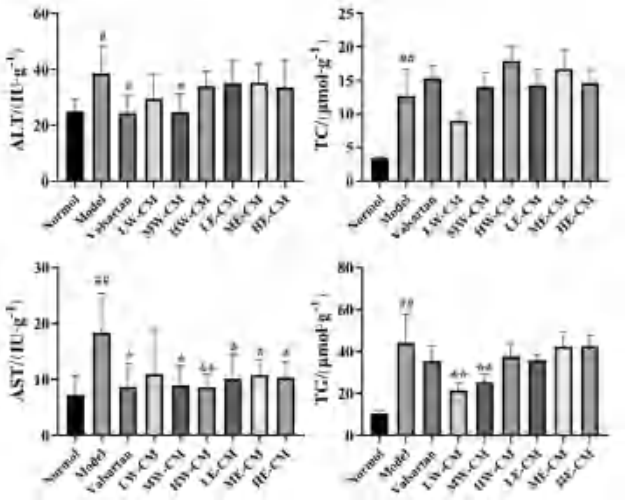


图 3　菊花提取物对大鼠肝脏组织中 ALT、AST、TC 及 TG 的影响

Fig 3　Effect of *Chrysanthemum morifolium* extract on ALT，AST，TC and TG in liver tissues of rats

注：与正常组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

3.5　菊花提取物对高血压大鼠血清中 TC、TG 水平的影响

由图 4 可知，与正常组大鼠比较，造模 9 周后，模型组大鼠血清中 TC、TG 均显著升高；与

模型组大鼠相比，给药 4 周后，水提物高剂量组 TC 显著降低，水提物、醇提物中剂量组 TG 明显降低且具有统计学意义。

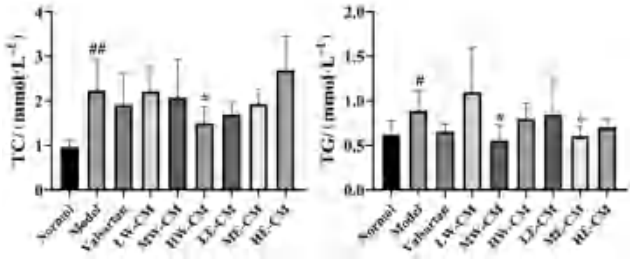


图 4　菊花提取物对大鼠血清中 TC、TG 的影响

Fig 4　Effect of *Chrysanthemum morifolium* extract on TC and TG in the serum of rats

注：与正常组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$。

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

3.6　菊花提取物对血清中 CRP、ET-1 及 eNOS 水平的影响

由图 5 可知，与正常组大鼠比较，造模 9 周后，模型组大鼠血清中 CRP、ET-1 均出现显著升高；与模型组大鼠相比，给药 4 周后，水提物、醇提物各组 CRP 均显著降低，且各组血清中 ET-1 水平较模型组有下降的趋势。

4　讨论

高血压病为临床最常见的心血管疾病之一，其病因与发病机制复杂，其中嗜食肥甘厚味及长期饮酒等不良饮食习惯与高血压发病密切相关。中医认为肝旺痰阻是高血压发病的重要机制：肝主疏泄，疏泄不畅，肝气郁结化火，上扰清窍，从而出现头痛、头晕的症状；或是嗜食肥甘厚味，嗜酒等不良饮食习惯，损伤脾胃，导致脾失健运，聚湿成痰，蒙蔽清窍也会引起眩晕 [5，11-12]。

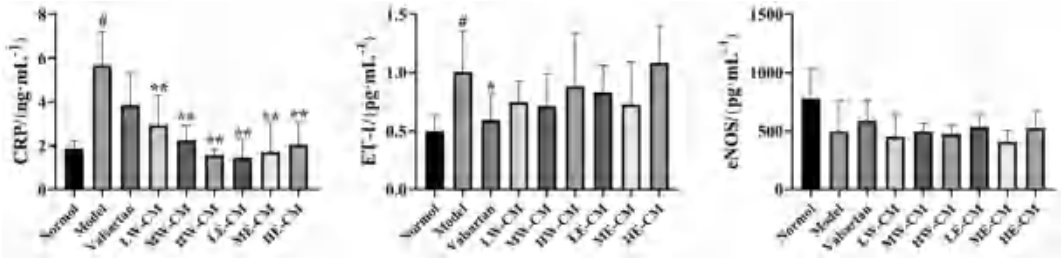


图 5　菊花提取物对大鼠血清中 CRP、ET-1 及 eNOS 的影响

Fig 5　Effect of *Chrysanthemum morifolium* extract on CRP，ET-1，and eNOS n serum of rats

注：与正常组比较，$^{\#}P < 0.05$；与模型组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

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

此外，血脂水平异常升高与痰浊生成密切相关，血脂异常也是高血压病发生的重要诱因 [13-14]。研究证实高脂高糖饲料结合饮酒能造成符合中医证候的肝旺痰阻型高血压大鼠模型 [10]。本研究参照文献造模方法进行造模，结果发现，与正常组相比，模型组大鼠造模 9 周后，其体质量、面温和血糖出现升高趋势，血压指标显著升高，肝功能指标及血脂指标均升高，且血清中 CRP、ET-1 水平明显升高，与文献报道高血压患者常常伴有超重、血脂、血糖异常等代谢性疾病的记录相一致 [15]，表明肝旺痰阻型高血压大鼠造模成功。

菊花味甘、苦，性微寒，归肺、肝经，具有平肝潜阳的功效，现代药理学表明菊花及其活性成分具有抗炎、抗氧化、降压、降脂等心血管保护作用。本研究发现菊花水提物和醇提物对肝旺痰阻高血压大鼠均具有降压作用，其中菊花水提物高剂量降压作用最佳。前期研究表明，黄酮类和有机酸类化合物是菊花水提液的主要化学成分 [16]。怀菊总黄酮能降低自发性高血压大鼠的血压，其降压机制可能是调节内皮功能及抑制肾素 - 血管紧张素 - 醛固酮（RAAS）系统活性 [9]。酚酸类化合物如咖啡酸、绿原酸等具有抗炎、抗氧化及保护心血管的作用，还能显著降低环孢素诱导高血压大鼠的收缩压和心率 [17]。提示菊花水提物中的黄酮类和酚酸类化合物是其发挥抗高血压作用的活性物质。

高血压病因复杂，研究发现其发生与 RAAS 系统、血管收缩及舒张功能紊乱、氧化应激及炎症反应等有关 [18-19]。其中血管内皮功能障碍与高血压密切相关，炎症反应是导致血管内皮功能损伤的原因之一，同时也是高血压病发生的重要机制 [20]。NO 是一种内皮源性血管舒张因子，由 eNOS 催化发挥调节血管功能的作用。ET-1 是血管内皮分泌的内源性血管收缩因子，可诱导血管收缩功能，起到升高血压的作用。ET-1、NO 相互制约，处于动态平衡状态；当血管内皮功能出现障碍，即 NO 的降低会导致 ET-1 的升高，引起血管收缩和血管重塑，导致血压升高 [21-22]。而 CRP 主要由促炎细胞因子 IL-6、IL-1β 及 TNF-α 诱导，由肝脏产生，且与炎症反应、损伤、感染及心血管疾病等有密切关系。目前研究认为血清中高浓度 CRP 是心血管疾病的

炎症标志物，参与高血压病炎症的发生及发展，导致血管内皮功能障碍[23-24]。研究发现 CRP 损伤血管内皮细胞后，可抑制 NO 及前列环素的产生，使得血管舒张功能出现障碍，引起高血压[25]。本研究结果发现菊花提取物能明显降低血清中 CRP 水平。

此外，本研究发现菊花水提物高剂量能改善模型组大鼠肝脏病变及脂肪空泡情况，抑制胸主动脉中膜增厚情况，且菊花水提物能显著抑制肝脏组织中 AST、ALT、TG 水平及血清中 TC、TG 水平，表明水提物较醇提物在改善肝旺痰阻型高血压大鼠的肝功能及血脂水平的效果上更好。调查结果显示，脂肪肝患者较非脂肪肝患者高血压患病率高，且其 SBP、DBP 也显著提高，说明高血压的发生与脂肪肝密切相关，而肥胖是脂肪肝形成的重要诱因，也是近年来高血压发生的主要病因[26]。因此，中药治疗高血压中也多采用降脂疏肝，改善患者血液流变学状态等方式达到降压的目的。以上结果表明，菊花水提物可能通过平肝降脂、抑制血管内炎症反应发挥降压效果，其具体作用机制有待进一步深入研究。

综上所述，菊花水提物具有降压、降脂作用，其降压机制可能与抑制炎症因子释放、改善高血压大鼠血管内皮细胞的炎症反应密切相关。

参考文献

[1] 中国高血压防治指南修订委员会，高血压联盟（中国），中华医学会心血管病学分会，等 . 中国高血压防治指南（2018 年修订版）[J]. 中国心血管杂志，2019，24（1）：24-56.

[2] 胡秀，李波，雷珊珊，等 . 三因素不良生活方式对大鼠血压、血生化及微循环的影响 [J]. 浙江中医药大学学报，2014，38（5）：608-612.

[3] 周海哲 . 张学文教授肝热血瘀学术思想及清肝化瘀法治疗高血压病的临床研究 [D]. 北京：中国中医科学院，2018.

[4] 肖烨 . 基于“肝风”理论运用天麻钩藤饮治疗原发性高血压病的临床观察 [D]. 北京：中国中医科学院，2018.

[5] 江秀东，谷万里 . 肝旺痰阻是高血压发病的重要机制 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2011，9（3）：346-348.

[6] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：323.

[7] 张海宇，张莉莉，韦宇，等 . 菊花的临床应用及其用量探究 [J]. 吉林中医药，2021，41（9）：1218-1221.

[8] Gao T，Zhu ZY，Zhou X，et al. Chrysanthemum morifolium extract improves hypertension-induced cardiac hypertrophy in rats by reduction of blood pressure and inhibition of myocardial hypoxia inducible factor-1alpha expression [J]. Pharm Biol，2016，54（12）：2895-2900.

[9] 张留记，张海波，屠万倩，等 . 怀菊花总黄酮对自发性高血压大鼠的降压作用及机制研究 [J]. 天然产物研究与开发，2015，27（4）：592-597.

[10] 何茂，许万枫，苏洁，等 . 复方野菊花提取物对高脂高糖饮酒致肝旺痰阻型高血压大鼠的作用研究 [J]. 中药新药与临床药理，2019，30（2）：156-161.

[11] 孙伟茗，焦晓民 . 高血压中医病名、病因、病机研究进展 [J]. 实用中医内科杂志，2021，35（1）：101-105.

[12] 肖倩倩 . 高血压病的现代中医病因病机探讨 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2016，14（10）：1108-1110.

[13] 梁长才 . 高血压病中医证型间血脂异常的相关性研究 [D]. 长沙：湖南中医药大学，2018.

[14] 姜雪红，徐峰，刘轩，等 . 痰湿与高血压病的相关性研究 [J]. 世界中西医结合杂志，2017，12（3）：433-436.

[15] 吕圭源，苏洁，陈素红 . 中药抗高血压药理学研究现状与展望 [J]. 中国药理学与毒理学杂志，2016，30（12）：1301-1311.

[16] 汪诗沁，刘丹，叶晓川，等 . UPLC-Q-TOF-MS/MS 结合网络药理学探讨福白菊药效物质基础及其抗炎作用机制 [J]. 中国中药杂志，2022，47（15）：4190-4201.

[17] Agunloye OM，Oboh G，Ademiluyi AO，et al. Cardio-protective and antioxidant properties of caffeic acid and chlorogenic acid：mechanistic role of angiotensin converting enzyme，cholinesterase and arginase activities in cyclosporine induced hypertensive rats [J]. Biomed Pharmacother，2019，109：450-458.

[18] Touyz RM，Rios FJ，Alves-Lopes R，et al. Oxidative stress：a unifying paradigm in hypertension [J]. Can J Cardiol，2020，36（5）：659-670.

[19] 翟昌明，鲁放，马重阳，等 . 试述肝火证、炎症反应、高血压三者之关系 [J]. 环球中医药，2019，12（12）：1858-1861.

[20] 刘阳 . 基于 NLRP3 炎症小体探讨钩藤莱菔子及其组分药对干预高血压血管内皮功能的机制研究 [D]. 济南：山东中医药大学，2021.

[21] 蔺晓源，易健，雍苏南，等 . 复方钩藤降压片对高血压模型大鼠血压及血管内皮功能的影响 [J]. 中国中医药信息杂志，2021，28（10）：75-80.

[22] 俞平，马常娥，王婕 . 半夏白术天麻汤联合血府逐瘀汤对高血压患者内皮功能的影响 [J]. 世界中医药，2019，14（9）：2408-2411.

[23] Sproston NR，Ashworth JJ. Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection [J]. Front Immunol，2018，9：754.

[24] Badimon L，Peña E，Arderiu G，et al. C-reactive protein in atherothrombosis and angiogenesis [J]. Front Immunol，2018，9：430.

[25] Venugopal SK，Devaraj S，Jialal I. Effect of C-reactive protein on vascular cells：evidence for a proinflammatory，proatherogenic role [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens，2005，14（1）：33-37.

[26] 张业 . 脂肪肝与高血压病、高血脂症、糖尿病以及体质量指数相关性分析 [J]. 泰山医学院学报，2019，40（5）：379-381.

（收稿日期：2022-10-02；修回日期：2022-12-10）

甘草香豆素平衡溶解度和油水分配系数的测定

汤玉梅[1]，欧水平[2]，叶林虎[1]，黄玉普[1]，王森[1*]（1. 遵义医科大学 药学院，贵州　遵义　563000；2. 遵义医科大学附属医院，贵州　遵义　563099）

摘要：目的　测定甘草香豆素的平衡溶解度及其油水分配系数，为甘草香豆素的剂型设计提供依据。**方法**　用烧瓶法测定其在不同 pH 缓冲液中的溶解度，用高效液相色谱法和摇瓶法测定甘草香豆素的油水分配系数。**结果**　37 ℃时甘草香豆素在 pH 为 1.2、2.0、5.0、6.8、7.4 的缓冲液以及水中的平衡溶解度分别为 39.17、38.26、24.00、23.83、25.44、28.00 μg • L^{-1}，高效液相色谱法测得油水分配系数为（3.06±0.0002），摇瓶法中 pH 2.0 缓冲液中油水分配系数最小。**结论**　本文建立的甘草香豆素的含量测定方法可行，37 ℃时甘草香豆素不溶或几乎不溶于水，在 pH 1.2 ～ 7.4 随着 pH 的增大平衡溶解度逐渐减小，属于水难溶性、高渗透性、亲脂性药物，可考虑通过提高溶解度改善其药物溶出和吸收。

关键词：甘草香豆素；溶解度；油水分配系数；烧瓶法；高效液相色谱法
中图分类号：R932　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0959-04
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.019

Determination of equilibrium solubility and oil-water partition coefficient of glycycoumarin

TANG Yu-mei[1], OU Shui-ping[2], YE Lin-hu[1], HUANG Yu-pu[1], WANG Sen[1*] (1. *College of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi Guizhou* 563000; 2. *Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi Guizhou* 563099)

Abstract: Objective To determine the equilibrium solubility and oil-water partition coefficient of glycycoumarin, and to provide a basis for the dosage form design of glycycoumarin. **Methods** The Flask method was used to determine its solubility in water and HPLC method and the shak-flask method were used to determine the oil-water partition coefficient collection of glycycoumarin. **Results** The equilibrium solubilities of glycycoumarin in buffers with pH 1.2, 2.0, 5.0, 6.8 and 7.4, and water at 37 ℃ were 39.17, 38.26, 24.00, 23.83, 25.44, and 28.00 μg • L^{-1}, respectively. The oil-water partition coefficient was (3.06±0.0002) by HPLC, and the oil-water partition coefficient was the smallest in pH 2.0 buffer by. **Conclusion** The content determination of glycycoumarin is feasible. It is almost insoluble in water at 37 ℃ . The equilibrium solubility decreases gradually with the increase of pH between 1.2 and 7.4, which is a water-insoluble, highly permeable, and lipophilic drug. The dissolution and absorption can be improved by increasing the solubility.

Key words: glycycoumarin; equilibrium solubility; apparent oil-water partition coefficient; shake-flask method; HPLC

甘草（*Glycyrrhizae Radix* et Rhizome）为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 或光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 的干燥根和根茎[1]，是中国古老的民族药，有补脾益气，清热解毒，调和诸药等功效[2]。研究表明，甘草具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤等多种药理活性[3]。甘草包括三萜类、黄酮类及香豆素类等化学成分[4]，其中香豆素是一类重要活性成分，包括 3- 芳基香豆

基金项目：贵州省科技计划项目（黔科合基础 -ZK[2023] 一般 561）；贵州省科技计划项目（No. 黔科合支撑 [2020]4Y118 号）。
作者简介：汤玉梅，女，硕士研究生，主要从事药物新剂型与新制剂研究，email：yumei_t@126.com　*通信作者：王森，男，教授，硕士研究生导师，主要从事药物新剂型与新制剂研究，email：wangsen912912@126.com

素、4-苯基香豆素、简单的香豆素和香豆苯醚[5]。甘草香豆素（glycycoumarin）属于3-芳基香豆素类，是甘草中具有代表性的香豆素化合物（见图1），甘草香豆素在体内具有良好的药理活性，如抗肿瘤[6]、抗肝损伤[7]、抗菌[8]等。溶解度和油水分配系数是评价药物渗透性的重要参数，可提示药物溶解性能并预估药物渗透能力，为药物的组织分布、代谢、排泄等后续的研究提供基础[9]。但目前尚未见测定甘草香豆素的平衡溶解度和油水分配系数的文献报道，本研究采用烧瓶法测定其平衡溶解度，用高效液相色谱法和摇瓶法测定甘草香豆素的油水分配系数，为甘草香豆素的剂型设计提供参考。

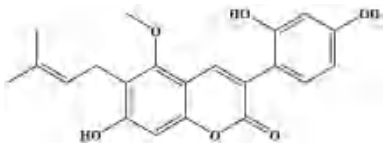


图1　甘草香豆素的结构式

Fig 1　Chemical structure of glycycoumarin

1　材料

WiSys 5000 高效液相色谱仪 [月旭科技（上海）股份有限公司]；Satrtorious BT 125D 型精密天平 [Satrtorious 科学仪器（北京）有限公司]；DURA12 型超纯水机 [泽拉布仪器科技（上海）有限公司]；SHZ-82A 数显恒温振荡器（金坛市朗博仪器制造有限公司）；TD5M 低速离心机（长沙湘智离心机仪器有限公司）；DL-820D 超声波清洗仪（上海之信仪器有限公司）；GENESYS 180 UV 紫外可见分光光度计 [赛默飞世尔科技（中国）有限公司]；LGJ-10C 型冷冻干燥机 [四环福瑞科仪科技发展（北京）有限公司]。

甘草香豆素对照品（纯度：99.68%，批号：DSTDG010801，成都德思特生物技术有限公司）；甲醇为色谱纯 [月旭材料科技（上海）有限公司]，其余均为分析纯，尿嘧啶（上海晶纯生化科技股份有限公司）；苯、苯甲酸苄酯、乙酰苯胺、二苯胺、萘（上海麦克林生化科技有限公司）；苯酚（成都市金龙化工试剂厂）；正辛醇、磷酸、氯化钠（天津市光复精细化工研究所）；磷酸氢二钾、磷酸二氢钠（成都市科龙化工试剂厂）；氢氧化钠、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾（国药集团化学试剂有限公司）；磷酸氢二钠、盐酸 [重庆川东化工（集团）有限公司化学试剂厂]；娃哈哈纯净水（贵阳娃哈哈饮料有限公司）。

2　方法与结果

2.1　对照品储备液

精密称取甘草香豆素对照品 2.00 mg，甲醇溶解至 1.00 mg • mL^{-1}，作为对照品储备液。

2.2　不同缓冲溶液的配制

按 2020 年版《中国药典》四部[10]缓冲液的制备方法，分别配制 pH 为 2.0、5.0、6.8、7.4 的磷酸盐缓冲液。

pH 为 1.2 的缓冲液：称取氯化钠 0.1 g，置于 50 mL 量瓶中，加入浓盐酸 0.35 mL，加水溶解并稀释至刻度，配成 pH 1.2 的缓冲液。

2.3　检测波长的确立

将甘草香豆素储备液稀释至质量浓度为 6.432 μg • mL^{-1}，以甲醇为空白对照溶液，于 200 ～ 800 nm 波长进行扫描，发现在 212 nm 和 350 nm 处有最大吸收，因 212 nm 接近末端吸收，故选 350 nm 为检测波长。

2.4　HPLC 分析方法的建立

2.4.1　色谱条件　Waters XBridgeTM-C18 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇 - 水（75∶25，*V*/*V*）；检测波长：350 nm；流速：1.0 mL • min^{-1}；柱温：30 ℃；进样量：20 μL。

2.4.2　线性关系的考察　精密量取“2.1”项下对照品储备液适量，配制成 0.1945、0.3242、0.5403、1.2864、6.432、12.864、20.10、30.00 μg • mL^{-1} 的对照品溶液。分别按“2.4.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图（见图 2）。以峰面积（*Y*）对质量浓度（*X*）进行线性回归，得回归方程：$Y = 54.74X - 6.878$，$r = 0.9999$。结果表明，甘草香豆素在 0.1945 ～ 30.00 μg • mL^{-1} 内与峰面积呈良好的线性关系。

2.4.3　定量限和检测限的测定　取“2.4.2”项下质量浓度为 0.1945 μg • mL^{-1} 的对照品溶液梯度稀释后进样测定，结果定量限为 0.0778 μg • mL^{-1}（信噪比 $S/N \approx 10$），检测限为 0.0389 μg • mL^{-1}（$S/N \approx 3$），能满足定量的要求。

2.4.4　精密度试验　取甘草香豆素低、中、高质量浓度（0.1945、6.432、20.1 μg • mL^{-1}）对照品溶液，按“2.4.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次，记录峰面积。计算 *RSD*，考察日内精密度；连续进样 3 日，每日 1 次，计算 *RSD*，考察日间精密度。结果测得低、中、高浓度日内 *RSD* 分别为 0.70%、1.3%、1.6%，日间 *RSD* 分别为 0.90%、0.30%、1.6%，表明精密度符合要求。

2.4.5　回收试验　取甘草香豆素低、中、高质量浓度（0.1945、6.432、20.1 μg•mL^{-1}）对照品溶液，按“2.4.1”项下色谱条件进样，记录峰面积。依据标准曲线得到对应的浓度，按准确度（%）＝测定浓度值 / 真实浓度值 ×100% 计算，得低、中、高浓度的准确度分别为 98.2%、99.6%、101.2%，*RSD* 均小于 2%，表明准确度符合要求。

2.4.6　稳定性试验　取甘草香豆素低、中、高质

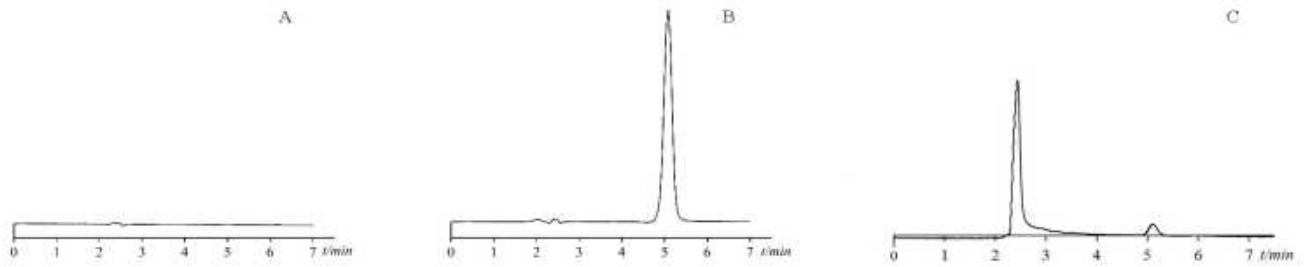


图 2　甲醇（A）、甘草香豆素对照品（B）、缓冲液样品（C）色谱图

Fig 2　Chromatogram of the methanol（A），glycycoumarin control（B），and buffer sample（C）

量浓度（0.1945、6.432、20.1 μg • mL^{-1}）对照品溶液，分别在 0、2、4、6、8、10、12 h 进样测定，记录峰面积。结果甘草香豆素低、中、高质量浓度对应峰面积的 *RSD* 分别为 0.50%、1.2%、0.40%，表明甘草香豆素溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.4.7　重复性试验　分别配制 3 份甘草香豆素低、中、高质量浓度（0.1945、6.432、20.1 μg•mL^{-1}）的对照品溶液，进样测定，结果甘草香豆素低、中、高质量浓度对应色谱峰面积的 *RSD* 分别为 0.040%、0.10%、0.10%，表明该方法重复性良好。

2.5　平衡溶解度的测定

分别量取不同 pH 缓冲液和水 40 mL 于 50 mL 离心管中，加入过量的甘草香豆素，置于恒温振荡器中 [（37±1）℃，120 r • min^{-1}] 振摇 72 h，过微孔滤膜后取 2 mL 续滤液冻干，0.4 mL 甲醇复溶，取续滤液按“2.4.1”项下色谱条件测定，记录色谱图，计算甘草香豆素在 pH 为 1.2 ～ 7.4 缓冲盐溶液及水中的平衡溶解度分别为 39.17、38.26、24.00、23.83、25.44、28.00 μg • L^{-1}。

2.6　RP-HPLC 法测定油水分配系数

2.6.1　死时间的测定　取尿嘧啶适量，80 ℃蒸馏水溶解，在 260 nm 处按“2.4.1”项下色谱条件进样分析，得死时间 t_0 为（2.69±0.01）min。

2.6.2　参比物的选择及线性　按 GB/T 21852-2008 化学品分配系数（正辛醇 - 水）高效液相色谱法试验选择乙酰苯胺、苯酚、苯、二苯胺、萘、苯甲酸苄酯为参比物，取参比物适量，甲醇溶解后取续滤液按“2.4.1”项下色谱条件进样分析，记录色谱图。保留时间用容量因子 *k* 表示，如式（1），其测定结果如表 1。

$$k = (t_R - t_0)/t_0 \quad (1)$$

其中：t_R 为受试物的保留时间（min）。

甘草香豆素的油水分配系数通过试验测定其容量因子 *k* 并代入由参比物的 log*P* 对其 log*k* 作线性回归的方程而得，如式（2）

$$\log P = a + b\log k \quad (2)$$

其中 *P* 为正辛醇 - 水分配系数；a、b 为线性回归系数。

表 1　参比物的测定结果 (*n* = 3)

Tab 1　Determination of reference materials (*n* = 3)

参比物	log*P*	t_R/min	*k*	log*k*
乙酰苯胺	1	2.88±0.00	0.0718	− 1.1441
苯酚	1.5	2.98±0.00	0.1072	− 0.9697
苯	2.1	4.46±0.00	0.6594	− 0.1809
二苯胺	3.4	5.70±0.00	1.1189	0.0488
萘	3.6	6.98±0.02	1.5969	0.2033
苯甲酸苄酯	4	7.40±0.01	1.7496	0.2429

以 log*k* 对 log*P* 进行线性拟合，线性方程为：log*P* = 1.935log*k* + 3.180，*r* = 0.952，将甘草香豆素的保留时间（5.013、5.012、5.012 min）代入方程，结果表明，RP-HPLC 法测定甘草香豆素的 log*P* 为（3.06±0.00）。

2.7　摇瓶法测定油水分配系数

2.7.1　正辛醇饱和的水与水饱和的正辛醇　量取 50 mL 蒸馏水，pH 为 1.2、2.0、5.0、6.8、7.4 的磷酸盐缓冲液并加入 50 mL 正辛醇，置于恒温摇床 [（25±1）℃，120 r • min^{-1}] 振摇 24 h，相同温度下静置 1 h，离心使两相完全分离，得到正辛醇饱和的缓冲液、正辛醇饱和的水、缓冲液饱和的正辛醇和水饱和的正辛醇。

2.7.2　油水分配系数的测定　量取水饱和的正辛醇溶液 25 mL 于离心管中，加入过量的甘草香豆素，超声配制含甘草香豆素的水饱和的正辛醇溶液，分别取含甘草香豆素的水饱和的正辛醇溶液与正辛醇饱和的水或正辛醇饱和的缓冲液以 1∶3、1∶6、1∶12 比例涡旋混合，于恒温摇床 [（25±1）℃，120 r • min^{-1}] 振摇 24 h，相同温度下静置 1 h，离心使两相分离，分别取油层和水层溶液过微孔滤膜，取油层续滤液 100 μL 用甲醇稀释至 1 mL，取水层续滤液 5 mL 冻干后用 0.5 mL 甲醇复溶，取续滤液按“2.4.1”项下色谱条件进样分析，记录色谱图，计算油相（C_O）和水相（C_W）中甘草香豆素的质量浓度，根据 $P = C_O/C_W$ 计算甘草香豆素油水分配系数，结果见表 2。

3　讨论

本研究建立了甘草香豆素的 HPLC 含量测定方法，并采用烧瓶法测定了甘草香豆素的溶解

表 2　甘草香豆素在不同 pH 值缓冲液中 *P* 和 log*P* 的测定结果

Tab 2　*P* and log*P* of glycycoumarin in different pH buffers

香豆素与缓冲液比例	指标	水	缓冲液				
			pH 1.2	pH 2.0	pH 5.0	pH 6.8	pH 7.4
1∶3	*P*	2789.99	2280.32	1827.13	2161.57	2895.12	3056.59
	log*P*	3.45	3.36	3.26	3.33	3.46	3.49
1∶6	*P*	2382.45	2905.38	1142.01	2584.62	2779.11	2706.42
	log*P*	3.38	3.46	3.06	3.41	3.44	3.43
1∶12	*P*	2194.55	2860.72	1106.93	2865.04	2982.34	2847.89
	log*P*	3.34	3.46	3.04	3.46	3.47	3.45

度，HPLC 法和经典摇瓶法测定了甘草香豆素油水分配系数，为甘草香豆素的剂型选择和制剂研究提供基础数据支持。

药物水溶解度的测定方法如酸碱滴定法[11]、柱洗提法和烧瓶法[12]等，其中烧瓶法是原始的 OECD105 方法[13]和 EC 方法[14]的一个修订版，是可靠并广泛使用的方法。溶解度和油水分配系数的测定受 pH、温度等因素影响，在特定条件下的测定结果才有意义。有研究采用饱和振摇法测定甘草香豆素在水中的溶解度，发现其几乎不溶于水，通过肠道 Caco-2 细胞单层的渗透性 P_{AB} 为 1.34×10^{-7} cm • s^{-1}[15]。完全吸收的药物具有高渗透系数（$P_{AB} > 1\times10\times10^{-7}$ cm • s^{-1}），而未完全吸收的药物具有低渗透系数（$P_{AB} < 1\times10^{-7}$ cm • s^{-1}）[16]，由此可预测甘草香豆素属于高渗透性化合物。本研究模拟人体温度和胃肠道 pH 值范围的条件，用烧瓶法测定了甘草香豆素在 37 ℃、pH 值 1.2 ～ 7.4 不同缓冲液中的平衡溶解度，结果显示甘草香豆素在水和不同 pH 缓冲液中的溶解度均低于 40 μg • L^{-1} 并随 pH 升高呈下降趋势。

油水分配系数对药物在胃肠道的吸收速度和程度很重要，有利于具有合适水溶性和脂溶性的药物通过生物脂质双分子膜被吸收后发挥疗效[17]。log*P* 值过低（log*P* < *P* < − 2）药物不易透过脂质双分子膜，若过高（log*P* > *P* > 3）则因脂溶性强而难以进入血管或淋巴管中，而不易发挥其药效[18]。测定油水分配系数的方法有产生柱法[9]、高效液相色谱法和摇瓶法[19]等，其中产生柱法过程烦琐、耗时，高效液相色谱法和摇瓶法操作简单、省时。高效液相色谱法适用于测定 log*P* 为 0 ～ 6、保留时间在 1 h 内的化学品，其流动相首选甲醇 - 水（3∶1，*V*/*V*），受柱温、流动相比例的影响保留时间可能会有差异，本法测定的 log*P* 为 3.06。经典摇瓶法的测定范围为 − 2 ～ 4，为了保证试验数据的可信度，本研究又采用摇瓶法进行测定，其测定结果为 3.0 < log*P* < *P* < 3.5，两法测定结果相差不大。

综上，甘草香豆素属于水难溶性、高渗透性、亲脂性药物，按 BCS 分类甘草香豆素属于Ⅱ型药物，药物在胃肠道的溶出是吸收的限速过程，对于此类药物可考虑增加溶解度或者减小药物粒径来改善吸收，如亲水性材料包合、增加药物的比表面积和加入表面活性剂等方法[20]。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：88-89.

[2] 刘颖，陈宏昊，文浩，等 . 甘草鲨烯合酶 1 基因多态性及其与 *β*- 香树脂醇合成酶共表达对 *β*- 香树脂醇积累的影响研究（英文）[J]. 药学学报，2014，49（5）：734-741.

[3] 张耀峰 . 甘草及其活性成分的药理活性研究进展 [J]. 中医临床研究，2019，11（9）：141-142.

[4] Yin L，Guan E，Zhang Y，et al. Chemical profile and anti-inflammatory activity of total flavonoids from *Glycyrrhiza Uralensis* Fisch [J]. Iran J Pharm Res，2018，17（2）：726-734.

[5] Zang YM. Pharmacological activities of coumarin compounds in licorice：a review [J]. Nat Prod Commun，2020，15（9）：1-17.

[6] 杨秀伟，徐波，冉福香，等 . 11 种香豆素类化合物对人膀胱癌细胞系 E-J 细胞株生长抑制活性的筛选 [J]. 中西医结合学报，2007，5（1）：56-60.

[7] Yan MZ，Ye LH，Yin ST，et al. Glycycoumarin protects mice against acetaminophen-induced liver injury predominantly via activating sustained autophagy [J]. Br J Pharmacol，2018，175（19）：3747-3757.

[8] Tanaka Y，Kikuzaki H，Fukuda S，et al. Antibacterial compounds of licorice against upper airway respiratory tract pathogens [J]. J Nutr Sci Vitaminol（Tokyo），2001，47（3）：270-273.

[9] 熊菁，吴芬，曾媛，等 . 盐酸地芬尼多平衡溶解度和油水分配系数的测定 [J]. 中国药师，2021，24（1）：156-158，175.

[10] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：424-425.

[11] 朱伊婷，陈英杰，夏媛媛，等 . 甲磺酸普依司他油水分配系数的测定 [J]. 广东化工，2018，45（10）：36-37.

[12] 中国检验检疫科学研究院 . 化学品水溶解度试验 [Z]. 2008：12.

[13] 经济合作与发展组织（OECD）化学品测试导则 105（1995）《水溶解度》（英文版）[Z]. 1995：1-7.

[14] Official Journal of the European Communities L 383 A [Z]. 1992：54-62.

[15] Ji S，Liang WF，Li ZW，et al. Efficient and selective glucosylation of prenylated phenolic compounds by Mucor hiemalis [J]. Rsc Adv，2016，6（25）：20791-20799.

[16] Artursson P，Palm K，Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport [J]. Adv Drug Deliv Rev，2001，46（1-3）：27-43.

[17] 陆秀玲，胡雄彬，向小四，等 . pH 值对盐酸小檗碱表观油水分配系数的影响 [J]. 中南药学，2011，9（10）：748-751.

[18] 孙进主编 . 口服药物吸收与转运等 [M]. 北京：人民卫生出版社，2006：322-323.

[19] 环境保护部化学品登记中心 . 化学品分配系数（正辛醇 - 水）高效液相色谱法试验 [Z]. 2008：8，16.

[20] 印晓星，杨帆 . 生物药剂学与药物动力学 [M]. 北京：科学出版社，2017：56-57.

（收稿日期：2022-08-23；修回日期：2022-11-07）

基于指纹图谱及多成分含量测定的泽泻汤单煎及共煎差异性研究

赵美奇[1, 2, 6]，武慧敏[1, 2, 6]，徐丽芝[1, 2, 6]，孟扬[2, 3, 6]，陈卫东[1]，杨瑞[4*]，王淑君[5*]（1.安徽中医药大学药学院，合肥　230012；2.南通市海门长三角药物高等研究院，江苏　南通　226133；3. 江西中医药大学，南昌　330004；4. 辽宁中医药大学附属第二医院，沈阳　110034；5. 沈阳药科大学药学院，沈阳　110016；6.江苏艾迪纳米生物医药有限公司，江苏　南通　226100）

摘要：目的　基于指纹图谱及多成分含量测定探讨泽泻汤各药味单煎及共煎的差异。**方法**　建立 HPLC 指纹图谱，对共有峰进行归属与指认，同时测定 3 种指标性成分含量，并结合特征峰峰面积，分析白术单煎、泽泻单煎及共煎时化学成分的变化。**结果**　15 批样品共有 14 个共有峰，其中 12 个峰归属于泽泻，2 个峰归属于白术，共指认了 3 个色谱峰，分别为白术内酯Ⅲ、23- 乙酰泽泻醇 B、23- 乙酰泽泻醇 C；单煎、共煎 23- 乙酰泽泻醇 B 含量差异不大，单煎时 23- 乙酰泽泻醇 C、白术内酯Ⅲ含量分别为共煎的 1.5、3.0 倍；共煎时仅有 2 个特征峰峰面积大于单煎。**结论**　建立的指纹图谱和含量测定方法准确、稳定、可行，可用于泽泻汤的质量控制。泽泻汤各药味单煎、共煎前后无新物质生成，从总体上看各成分含量单煎优于共煎，可为该方配方颗粒的开发提供数据参考。

关键词：泽泻汤；经典名方；单煎；共煎；指纹图谱；含量测定
中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0963-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.020

Difference between single decoction and total decoction of Zexie decoction based on fingerprint and multicomponent content determination

ZHAO Mei-qi[1, 2, 6], WU Hui-min[1, 2, 6], XU Li-zhi[1, 2, 6], MENG Yang[2, 3, 6], CHEN Wei-dong[1], YANG Rui[4*], WANG Shu-jun[5*] (1. *School of Pharmacy*, *Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230012; 2. *Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute*, *Nantong Jiangsu* 226133; 3. *Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang* 330004; 4. *The Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, *Shenyang* 110034; 5. *School of Pharmacy*, *Shenyang Pharmaceutical University*, *Shenyang* 110016; 6. *Jiangsu Aidi Nano Biopharmaceutical Co.*, *Ltd.*, *Nantong Jiangsu* 226100)

Abstract: Objective To determine the difference between single decoction and total decoction of each medicinal component of Zexie decoction based on fingerprint and multicomponent content determination. **Methods** HPLC fingerprint of Zexie decoction was established, and the common peaks were attributed and identified. The contents of 3 effective components were determined. According to the characteristic peak area, the changes of chemical compositions in the single decoction and total decoction were analyzed. **Results** There were 14 common peaks in the 15 batches of samples, 12 of which were attributed to *Alismatis Rhizoma* and the other 2 to *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*. Three common peaks were identified: atractylode Ⅲ , 23-acetyl alisol B and 23-acetyl alisol C, respectively. The content of 23-acetyl alisol B in single decoction and total

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81973494）。
作者简介：赵美奇，女，在读硕士研究生，主要从事中药药剂学研究，email：zmqupup@163.com　*通信作者：杨瑞，女，研究员，主要从事药剂学和药代动力学研究，email：yang_rui1983@163.com；王淑君，女，教授，主要从事药剂学和创新制剂研究，email：1252116911@qq.com

decoction showed no significant difference, while the content of 23-acetyl alisol C and atractylode Ⅲ in the single decoction was 1.5 and 3.0 times that of in the total decoction. In the total decoction, areas of two characteristic peak areas were larger than those of the single decoction. **Conclusion** The method is accurate, stable and reliable, which can be used for the quality control of Zexie decoction. No new substance is found before and after the single decoction and total decoction. The content of each component in the single decoction is better than that in the total decoction in general, which provides reference for the development of formula granules of this decoction.

Key words: Zexie decoction; classic formula; single decoction; total decoction; fingerprint; content determination

泽泻汤首载于医圣张仲景所著《金匮要略·痰饮咳嗽病脉证并治第十二》[1]，被收录入《古代经典名方目录（第一批）》[2]，为临床治疗痰饮致眩之要方。原方记载为“泽泻五两，白术二两，上二味，以水二升，煮取一升，分温再服”。方中泽泻甘淡性寒，得水之阴气而利水渗湿，领水之阴气以下行，使湿从小便出，为君药；白术甘苦性温，防水气下而复上，兼制泽泻之寒，为臣药，两者相须为用通利一身之水，具有利水除饮、健脾制水的功效，主治饮停心下、头晕目眩、胸中痞满和咳逆水肿等症。

目前，有关泽泻汤的研究主要集中于全方的药理、临床等方面[3-6]，也有对方中单独药味活性成分与质量的相关研究[7-10]，但对泽泻汤各药味单煎、共煎的相关研究报道相对较少。因此，本研究采用高效液相色谱法（HPLC）建立泽泻汤指纹图谱，并对多种成分进行含量测定，从定性定量两方面对泽泻汤进行评价和质量控制，并在此基础上，研究泽泻汤各药味单煎、共煎时化学成分的变化，为该方的开发及临床应用提供参考。

1　仪器与试药

1.1　仪器

PTX-FA210S 型电子天平（华志电子科技有限公司，d ＝ 0.1 mg），FTS-10A 型液体加热器（潮州市一壶百饮电器实业有限公司），LC-20AD 型高效液相色谱仪（日本岛津公司），YRE-2000E 型旋转蒸发仪（巩义市予华仪器有限责任公司）。

1.2　试药

23-乙酰泽泻醇 B（批号：111864-202006，纯度：98.30%）、23-乙酰泽泻醇 C（批号：112062-202102，纯度：99.20%）（中国食品药品检定研究院），白术内酯Ⅲ（批号：O0628AS，纯度：98.70%，大连美仑生物技术有限公司），乙腈、甲醇、磷酸、乙酸乙酯（国药集团化学试剂有限公司），白术、泽泻中药材均为市售，购自各大药房，饮片信息见表 1。

表 1　泽泻汤中各饮片来源

Tab 1　Source of each decoction piece in Zexie decoction

编号	泽泻		白术	
	批号	产地	批号	产地
S1	C22106043	四川	C22204150	安徽
S2	220601	四川	220601	安徽
S3	220400501	福建	C038220201	安徽
S4	211001	广西	220602	安徽
S5	190510	福建	220601CP060	浙江
S6	220201	四川	220501	安徽
S7	220301	四川	211101	安徽
S8	2207011	四川	20220606	河北
S9	210722	四川	201208	安徽
S10	220501	四川	C2242012003	浙江
S11	2205008	四川	C2242109001	浙江
S12	C3862012002	四川	C2242108002	浙江
S13	C3862112001	四川	2206020	安徽
S14	C3862203001	四川	220601	河北
S15	C3862206001	四川	C2242112001	浙江

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱为 Venusil MPC18 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈（A）-水（B），梯度洗脱（0 ～ 5 min，40%A；5 ～ 20 min，40% ～ 60%A；20 ～ 25 min，60%A；25 ～ 50 min，60% ～ 90%A；50 ～ 60 min，90%A；60.01 ～ 75 min，40%A）；流速 1 mL·min^{-1}；柱温 25 ℃；检测波长 208 nm；进样体积 20 μL。

2.2　溶液的制备

2.2.1　泽泻汤供试品溶液的制备　取泽泻 69.00 g，白术 27.60 g，精密称定，洗净，置于液体加热器内，加水 400 mL，浸泡 30 min 以上，至药材完全被浸透后，武火煮沸后转文火煎煮，煮取 200 mL，煎液纱布过滤，精密量取泽泻汤 20 mL

于分液漏斗中，加乙酸乙酯萃取 3 次，每次 40 mL，摇匀，取乙酸乙酯层，合并，经水洗涤后，减压蒸干，转移至 5 mL 量瓶中，加乙腈定容至刻度，摇匀，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.2.2　白术单煎液供试品溶液的制备　取白术 27.60 g，精密称定，按“2.2.1”项下方法制备。

2.2.3　泽泻单煎液供试品溶液的制备　取泽泻 69.00 g，精密称定，按“2.2.1”项下方法制备。

2.2.4　混合对照品溶液的制备　取各对照品适量，精密称定，加乙腈制成白术内酯Ⅲ、23- 乙酰泽泻醇 B、23- 乙酰泽泻醇 C 质量浓度分别为 19.8、100、40.0 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液，即得。

2.3　泽泻汤指纹图谱的建立

2.3.1　精密度试验　取同一供试品溶液（S15），连续进样测定 6 次，以白术内酯Ⅲ的保留时间和峰面积为参照，计算得其他 13 个共有峰的相对保留时间的 *RSD* 为 0.010% ～ 0.080%，相对峰面积的 *RSD* 为 0.61% ～ 2.1%，表明仪器的精密度良好。

2.3.2　稳定性试验　取泽泻汤（S15），按“2.2.1”项下方法制备，分别在 2.5、5、7.5、10 h 进样。以白术内酯Ⅲ的保留时间和峰面积为参照，计算得其他 13 个共有峰的相对保留时间的 *RSD* 为 0.010% ～ 0.080%，相对峰面积的 *RSD* 为 0.53% ～ 2.5%，表明泽泻汤供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.3.3　重复性试验　取泽泻汤（S15），按“2.2.1”项下方法平行制备 6 份泽泻汤供试品溶液，进样测定，以白术内酯Ⅲ的保留时间和峰面积为参照，计算得其他 13 个共有峰的相对保留时间的 *RSD* 为 0.030% ～ 0.20%，相对峰面积的 *RSD* 为 0.48% ～ 2.8%，表明该方法重复性良好。

2.4　指纹图谱的建立、相似度评价及共有峰指认

按“2.2.1”项下方法制备 15 批泽泻汤供试品溶液，进样测定，记录色谱图。将色谱图以 .cdf 格式导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2012. 版，生成 HPLC 叠加指纹图谱和对照指纹图谱（见图 1），并对所有色谱图进行相似度计算，得到 15 批次 S1 ～ S15 的相似度，结果见表 2。15 批次泽泻汤共标定了 14 个共有峰，并对共有峰进行归属，由图 2 可知，12 个色谱峰（1、2、3、4、5、7、8、9、11、12、13、14 号峰）来源于泽泻，2 个色谱峰（6、10 号峰）来源于白术；使用对照品对色谱峰进行指认，6 号色谱峰为白术内酯Ⅲ，8 号色谱峰为 23- 乙酰泽泻醇 C，13 号色谱峰为 23- 乙酰泽泻醇 B。

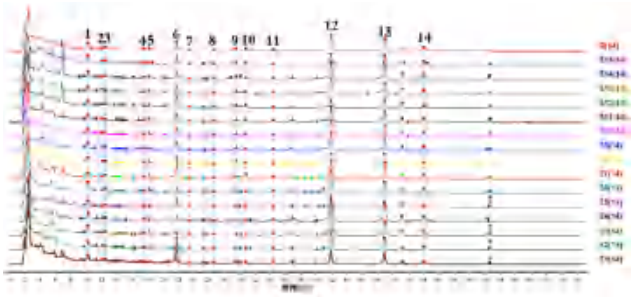


图 1　15 批泽泻汤 HPLC 指纹图谱（S1 ～ S15）及其对照指纹图谱（R）

Fig 1　Fingerprint for 15 batches of Zexie decoction（S1 ～ S15）and its reference fingerprint（R）

6. 白术内酯Ⅲ（atractylode Ⅲ）；8. 23- 乙酰泽泻醇 C（23-acetyl alisol C）；13. 23- 乙酰泽泻醇 B（23-acetyl alisol B）

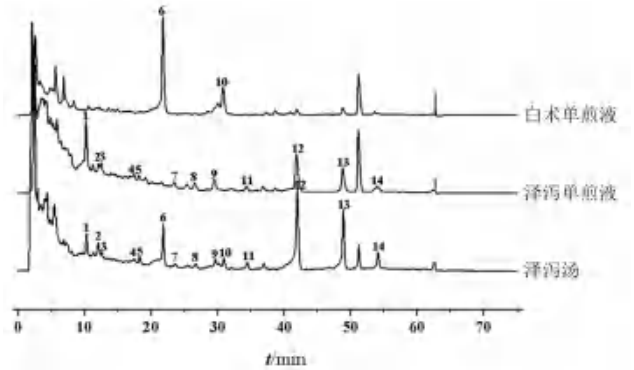


图 2　全方和单味药色谱图与特征峰归属

Fig 2　HPLC chromatogram and characteristic peak assignment of total and single-decoction drugs

2.5　多成分含量测定

2.5.1　对照品储备液的制备　取白术内酯Ⅲ、23- 乙酰泽泻醇 B、23- 乙酰泽泻醇 C 对照品适量，精密称定，加乙腈制成质量浓度分别为 198.0、1000、400.0 μg • mL^{-1} 的混合对照品储备液，即得。

2.5.2　线性关系考察　精密量取“2.5.1”项下制备的储备液 0.5、0.8、1.0、1.2、1.5 mL，置 10 mL 量瓶中，加乙腈稀释至刻度，摇匀，照“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，分别以各指标性成分的质量浓度为横坐标 *X*，色谱峰峰面积为纵坐标 *Y*，进行线性回归，结果见表 3。

2.5.3　精密度试验　取“2.2.4”项下混合对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，计算白术内酯Ⅲ、23- 乙酰泽泻醇 B 和 23- 乙酰泽泻醇 C 峰面积的 *RSD* 分别为 1.1%、1.1%、1.6%，表明仪精密度良好。

2.5.4　稳定性试验　取泽泻汤（S15），按“2.2.1”项下方法制备。按“2.1”项下色谱条件，分别在 0、2.5、5、7.5、10 h 进样，计算得白术内酯Ⅲ、23- 乙酰泽泻醇 B、23- 乙酰泽泻醇 C 峰面积的 *RSD*

表 2　15 批泽泻汤供试品与对照指纹图谱的相似度

Tab 2　Similarity of 15 batches samples and contrast chromatographic fingerprint

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	对照指纹图谱
S1	1.000	0.893	0.753	0.759	0.935	0.765	0.960	0.878	0.839	0.825	0.835	0.989	0.843	0.838	0.935	0.878
S2	0.893	1.000	0.966	0.967	0.968	0.957	0.968	0.972	0.988	0.990	0.990	0.903	0.992	0.985	0.972	0.997
S3	0.753	0.966	1.000	0.998	0.905	0.987	0.880	0.943	0.984	0.991	0.987	0.775	0.981	0.977	0.914	0.974
S4	0.759	0.967	0.998	1.000	0.902	0.982	0.887	0.948	0.987	0.991	0.990	0.782	0.981	0.981	0.916	0.977
S5	0.935	0.968	0.905	0.902	1.000	0.931	0.963	0.937	0.938	0.940	0.938	0.938	0.945	0.926	0.979	0.964
S6	0.765	0.957	0.987	0.982	0.931	1.000	0.872	0.934	0.972	0.978	0.971	0.787	0.967	0.958	0.929	0.968
S7	0.960	0.968	0.880	0.887	0.963	0.872	1.000	0.950	0.938	0.933	0.940	0.970	0.941	0.940	0.964	0.961
S8	0.878	0.972	0.943	0.948	0.937	0.934	0.950	1.000	0.984	0.969	0.977	0.912	0.961	0.987	0.978	0.983
S9	0.839	0.988	0.984	0.987	0.938	0.972	0.938	0.984	1.000	0.996	0.997	0.863	0.988	0.998	0.961	0.996
S10	0.825	0.990	0.991	0.991	0.940	0.978	0.933	0.969	0.996	1.000	0.997	0.847	0.994	0.992	0.949	0.994
S11	0.835	0.990	0.987	0.990	0.938	0.971	0.940	0.977	0.997	0.997	1.000	0.858	0.992	0.995	0.953	0.995
S12	0.989	0.903	0.775	0.782	0.938	0.787	0.970	0.912	0.863	0.847	0.858	1.000	0.859	0.867	0.950	0.896
S13	0.843	0.992	0.981	0.981	0.945	0.967	0.941	0.961	0.988	0.994	0.992	0.859	1.000	0.983	0.948	0.992
S14	0.838	0.985	0.977	0.981	0.926	0.958	0.940	0.987	0.998	0.992	0.995	0.867	0.983	1.000	0.957	0.992
S15	0.935	0.972	0.914	0.916	0.979	0.929	0.964	0.978	0.961	0.949	0.953	0.950	0.948	0.957	1.000	0.976
对照指纹图谱	0.878	0.997	0.974	0.977	0.964	0.968	0.961	0.983	0.996	0.994	0.995	0.896	0.992	0.992	0.976	1.000

表 3　回归方程及线性范围

Tab 3　Regression equation and linearity

指标性成分	回归方程	r	范围 /（μg・mL^{-1}）
白术内酯Ⅲ	$Y = 5.832\times10^4X - 3.794\times10^4$	0.9997	9.90 ～ 29.70
23- 乙酰泽泻醇 B	$Y = 1.188\times10^5X - 6.129\times10^4$	0.9995	50.00 ～ 150.00
23- 乙酰泽泻醇 C	$Y = 9.212\times10^3X - 3.435\times10^3$	0.9996	20.00 ～ 60.00

分别为 0.72%、0.33%、2.0%，结果表明泽泻汤供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.5.5　重复性试验　取泽泻汤（S15）6 份，按“2.2.1”项下方法平行制备。按“2.1”项下色谱条件进样，记录色谱图。计算得白术内酯Ⅲ、23- 乙酰泽泻醇 B、23- 乙酰泽泻醇 C 峰面积的 *RSD* 分别为 0.33%、0.33%、1.2%，表明该方法重复性良好。

2.5.6　回收试验　取已知含量的泽泻汤 6 份，按照“2.2.1”项下方法制备，分别加入适量的对照品。按照“2.1”项下方法进样测定，计算得白术内酯Ⅲ、23- 乙酰泽泻醇 B、23- 乙酰泽泻醇 C 平均加样回收率分别为 101.39%、101.44%、104.27%，*RSD* 分别为 1.2%、0.37%、0.97%，表明该方法的准确度良好。

2.5.7　多成分含量测定　取 15 批次泽泻汤（样品 S1 ～ S15），按“2.2.1”项下方法制备，按“2.1”项下色谱条件测定，计算 3 种成分的含量，结果见表 4。

取 S15 所用的泽泻、白术，按分别按“2.2.1”“2.2.2”“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，记录 1 ～ 14 号特征峰峰面积，计算各供试品中 3 种成分的含量，结果见表 5。

表 4　泽泻汤中 3 种成分含量测定结果 (μg・mL^{-1})

Tab 4　Content of 3 components in Zexie decoction (μg・mL^{-1})

样品编号	白术内酯Ⅲ	23- 乙酰泽泻醇 C	23- 乙酰泽泻醇 B
S1	12.022	10.727	19.854
S2	9.253	10.849	20.494
S3	4.288	25.957	28.339
S4	2.076	11.317	35.284
S5	11.953	29.922	16.026
S6	2.162	8.814	20.133
S7	15.513	12.009	30.686
S8	7.899	21.826	20.368
S9	6.188	8.122	24.339
S10	8.007	25.101	22.866
S11	8.088	26.828	22.177
S12	15.066	25.167	16.117
S13	9.557	13.531	23.106
S14	6.481	12.681	31.355
S15	4.698	7.512	11.631

表 5　不同供试品溶液中 3 种成分含量测定结果 (μg・mL^{-1})

Tab 5　Content of 3 components in different test solutions (μg・mL^{-1})

样品	白术内酯Ⅲ	23- 乙酰泽泻醇 C	23- 乙酰泽泻醇 B
白术单煎液	14.958	—	—
泽泻单煎液	—	11.510	10.304
泽泻汤	4.698	7.512	11.631

3　讨论

3.1　色谱条件考察

在泽泻汤指纹图谱建立过程中，采用 PDA 检测器在 190 ～ 400 nm 进行全波段扫描，主要考察不同波长 [11-14]（208、246、220、240 nm）、不同流动相体系（甲醇 - 水、乙腈 - 水、0.1% 磷酸 - 水）、不同柱温（25、30、35 ℃）、不同流速（0.8、1.0 mL•min^{-1}）对泽泻汤样品中各色谱峰的分离情况。结果表明，选择乙腈 - 水作为流动相，柱温为 25 ℃，检测波长为 208 nm，流速为 1.0 mL • min^{-1}，出峰数目最多，峰响应相对较高，各色谱峰分离度相对较好。

3.2　供试品溶液的制备方法考察

供试品溶液的制备考察了超声提取与乙酸乙酯萃取的影响，结果显示，采用乙酸乙酯萃取，指纹图谱信息较为丰富，峰响应也相对较高，故采用乙酸乙酯萃取。对煎液与乙酸乙酯体积比（1∶1、1∶2）及萃取次数（1、2、3 次）进行考察，最终确定煎液与乙酸乙酯体积比为 1∶2，萃取 3 次后制备供试品。

3.3　定量指标的确定

2020 年版《中国药典》中泽泻以 23- 乙酰泽泻醇 B、23- 乙酰泽泻醇 C 作为含量测定的指标性成分 [11]，明确了泽泻的活性成分。药理研究表明，泽泻醇类成分具有降血脂、降血压、利尿、抗炎作用 [15-17]。白术中的主要活性成分之一为内酯类成分 [18]，当前对于白术指标性成分含量测定多以白术内酯Ⅲ和苍术酮为指标 [19]。2020 年版《中国药典》以苍术酮作为白术的鉴定指标 [11]，但试验发现苍术酮不稳定 [20]，容易氧化为白术内酯Ⅲ[21]。且白术内酯Ⅲ具有调节胃肠运动、利尿、抗炎、降血压等药理作用 [22]。故本研究选择 23- 乙酰泽泻醇 B、23- 乙酰泽泻醇 C、白术内酯Ⅲ为定量指标。

3.4　指纹图谱分析

本研究建立了经典名方泽泻汤的 HPLC 指纹图谱，并对方中君药泽泻、臣药白术来自 3 个不同产地（道地产区 / 主产区）的总计 15 批次药材制备的泽泻汤进行研究，结果表明所建立的方法稳定，且重现性良好。15 批次泽泻汤指纹图谱的相似度在 0.878 ～ 0.997，能较好地反映其指纹特征。

该指纹图谱共标定了 14 个共有峰，通过对照品比对，指认了白术内酯Ⅲ、23- 乙酰泽泻醇 B 和 23- 乙酰泽泻醇 C 3 个色谱峰，并对其进行含量测定。结果 15 批泽泻汤样品中，23- 乙酰泽泻醇 B、23- 乙酰泽泻醇 C 含量相对较高，白术内酯Ⅲ含量相对较低，且不同批次含量波动较大，推测这可能与单味药材饮片成分含量不同或者单味药材基原及采收期不同有关。

3.5　泽泻汤各药味单煎及共煎分析

泽泻、白术共煎时 23- 乙酰泽泻醇 B 含量与泽泻单煎差异不大，单煎时 23- 乙酰泽泻醇 C、白术内酯Ⅲ含量分别约为共煎的 1.5、3.0 倍，表明白术、泽泻单煎、共煎前后部分活性成分发生了量变，提示药对的物质基础并不是完全由单味药的物质基础决定的；通过全方与单味药的图谱对比，特征峰均归属于泽泻、白术；将特征峰峰面积进行比较，发现 1 ～ 12 号特征峰峰面积单煎大于共煎，仅 13、14 号特征峰峰面积共煎大于单煎，说明共煎时绝大部分化学成分溶出相对减少，表明在研究单煎、共煎时，不能简单的以某几个指标性成分来定论，而应该从全方整体来充分分析；以上研究结果提示泽泻汤在后续开发中，可考虑进行配方颗粒的生产，但考虑到本研究仅指认了 3 个特征峰，后续需通过液质联用技术加强对未知色谱峰的指认，并结合相关体内外实验以对单煎共煎的药效进行评估，进一步探讨该方单煎和共煎的优劣。

综上，本研究主要探讨了白术单煎、泽泻单煎及共煎时化学成分的变化，可为泽泻汤物质基础及后续制剂的研发提供参考；本研究建立的分析方法虽相对稳定，但极性大的成分在前面有堆积，依据目前分析条件获得的全方图谱与单煎图谱对比，该图谱前部成分在白术单煎液、泽泻单煎液及泽泻汤中均有存在，故未对该物质进行归属，因此对该方法的开发仍有优化和进一步试验的空间。

参考文献

[1] 赵鸣芳，吴洁 . 伤寒论 • 金匮要略 [M]. 上海：上海中医药大学出版社，2006：66-68.

[2] 国家中医药管理局 . 关于发布《古代经典名方目录（第一批）》的通知 [EB/OL]. https：//kjs. satcm. gov. cn/zhengce-wenjian/2018-04-16/7017. html [2018-04-16].

[3] 杜建新 . 半夏白术天麻汤合泽泻汤治疗眩晕的临床疗效 [J]. 内蒙古中医药，2021，40（7）：74-75.

[4] 李洁儿 . 天麻泽泻汤治疗脑供血不足的临床疗效 [J]. 内蒙古中医药，2021，40（5）：10-11.

[5] 李二稳，高改，王梦瑶，等 . 泽泻汤抑制肝细胞铁死亡改善非酒精性脂肪性肝病的作用机制 [J]. 中医学报，2022，37（6）：1243-1253.

[6] 孙丽丽 . 加味泽泻汤治疗原发性高血压患者的疗效及对患者中医症状评分的影响 [J]. 中国现代药物应用，2021，15（12）：4-7.

[7] 巩克民，季宏建 . 白术多糖对 Ang-Ⅱ诱导的血管平滑肌细胞增殖及氧化应激的作用 [J]. 中成药，2022，44（1）：

235-239.
[8] 吴炜，杨淼，梁海 . 一测多评法测定白术中白术内酯类成分的含量 [J]. 中药材，2021，44（10）：2384-2388.
[9] 魏玮，相芳，许诺，等 . 泽泻不同炮制品中 7 个化学成分的含量测定 [J]. 中国药师，2021，24（12）：2284-2288.
[10] 黄小强，李宣宣，吴水生，等 . 泽泻三萜对小鼠急性肺损伤的保护作用 [J]. 中成药，2022，44（9）：2979-2984.
[11] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：107，239.
[12] 张兵，张丽娜，韩鹏军，等 . 白术中 3 种内酯成分的含量测定及指纹图谱研究 [J]. 天津中医药大学学报，2018，37（5）：411-415.
[13] 姚兆敏，汪电雷，彭华胜，等 . 白术 UPLC 指纹图谱模式识别及含量测定研究 [J]. 中药新药与临床药理，2018，29（5）：622-629.
[14] 伍蕊嗣，刘涛，梁悦，等 . 基于一测多评法的白术饮片成分含量测定 [J]. 成都大学学报（自然科学版），2018，37（4）：361-365.
[15] 刘珊珊，郭杰，李宗艾，等 . 泽泻化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志，2020，45（7）：1578-1595.
[16] 程志红，萧伟，王振中，等 . 泽泻调血脂活性成分及其药理和临床应用研究进展 [J]. 中草药，2015，46（22）：3420-3426.
[17] 徐飞，于慧，陆彩，等 . 泽泻醇类化合物调血脂作用及分子机制的研究 [J]. 南京中医药大学学报，2016，32（5）：451-455.
[18] 左军，张金龙，胡晓阳 . 白术化学成分及现代药理作用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报，2021，23（10）：6-9.
[19] 王丽敏，周燕红，杨莹，等 . 白术多指标成分含量测定方法优化 [J]. 浙江中医药大学学报，2020，44（7）：657-667.
[20] 严林，李新健，张冰冰，等 . 泽泻汤的研究现状 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（16）：191-197.
[21] 李鸿翔，彭腾，邓赟，等 . HPLC 测定不同产地白术水煎液中的白术内酯Ⅲ[J]. 华西药学杂志，2013，28（2）：197-198.
[22] 王涵，杨娜，谭静，等 . 白术化学成分、药理作用及临床应用的研究进展 [J]. 甘肃医药，2018，37（1）：23-26.

（收稿日期：2022-11-17；修回日期：2023-02-13）

注射用红花黄色素对大鼠颈总动脉血流动力学的影响及体外溶栓作用

刘雅楠，牛芬溪，郑晓春，张硕峰，方芳*（北京中医药大学中药学院，北京　102400）

摘要：目的　观察注射用红花黄色素（SYI）对大鼠颈总动脉血流量、血压和血流阻力的影响及其体外溶栓作用。**方法**　正常 SD 大鼠分别静脉给予不同浓度的 SYI，采用超声多普勒血流仪和 MP150 生理记录仪监测给药前及给药后 30、60、90 和 120 min 时颈总动脉血流量和血压，计算血流阻力。称重法观察不同浓度 SYI 对体外血凝块的溶解作用。**结果**　与给药前比较，SYI（0.2 mg • mL^{-1}）在给药 60 ～ 120 min 时，SYI（0.4 mg • mL^{-1}）在给药 30 ～ 60 min 时均能明显增加颈总动脉血流量，降低血流阻力，两者在给药 120 min 时均有降低血压的作用，SYI（0.2 mg • mL^{-1}）作用更显著。与对照组比较，SYI（0.4 mg • mL^{-1}）在给药 120 min 时，能显著降低血压，SYI（0.5 mg • mL^{-1}）可以显著增强体外血凝块的溶解作用。**结论**　SYI 具有增加大鼠颈总动脉血流量，降低血流阻力和血压及体外溶解血栓的作用。

关键词：注射用红花黄色素；红花黄色素 A；血流量；血压；血流阻力；血栓溶解
中图分类号：R285　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0968-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.021

Effect of safflor yellow injection on hemodynamics of common carotid artery in rats and thrombolysis in vitro

LIU Ya-nan, NIU Fen-xi, ZHENG Xiao-chun, ZHANG Shuo-feng, FANG Fang* (*School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102400)

作者简介：刘雅楠，女，硕士，主要从事中药神经药理研究，email：18340077925@163.com　*__通信作者：__方芳，女，博士，副教授，主要从事中药神经药理研究，email：fangf1166@126.com

Abstract: Objective To observe the effect of safflor yellow injection (SYI) on the blood flow, blood pressure and blood flow resistance of the carotid artery communis in normal rats and its thrombolytic effect in vitro. **Methods** The blood flow and blood pressure of the carotid artery communis were monitored by ultrasound doppler flowmeter and MP150 physiological recorder at 30, 60, 90 and 120 min after the intravenous administration of different concentrations of SYI in normal SD rats, and the blood flow resistance was calculated. The effect of different concentrations of SYI on the dissolution of blood clots in vitro was observed by weighing method. **Results** Compared with before the administration, SYI (0.2 mg • mL^{-1}) significantly increased the blood flow of carotid artery communis and reduced the blood flow resistance at 60 ～ 120 min after the administration. SYI (0.4 mg • mL^{-1}) significantly increased the blood flow of carotid artery communis and reduced the blood flow resistance at 30 ～ 60 min after the administration. SYI decreased the blood pressure at 120 min after the administration, and SYI (0.2 mg • mL^{-1}) showed more obvious effect. Compared with the control group, SYI (0.4 mg • mL^{-1}) reduced the blood pressure at 120 min after the administration. SYI (0.5 mg • mL^{-1}) enhanced the solubilization of blood clots in vitro. **Conclusion** SYI can increase the blood flow, reduce the blood flow resistance and blood pressure of the carotid artery communis in normal rats, and displays thrombolytic effect in vitro.

Key words: safflor yellow injection; hydroxysafflor yellow A; volume of blood flow; blood pressure; blood flow resistance; thrombolysis

颈总动脉是给大脑供血的主要血管，动脉粥样硬化斑块、血栓等因素导致的颈动脉血管阻塞或狭窄，会导致脑供血不足，严重者可造成神经元不可逆性死亡，出现神经功能障碍。及时扩张颈总动脉血管，降低血流阻力，增加脑血流量，改善血流动力学，对改善缺血所致的脑损伤具有重要作用。

红花是一种活血调经，祛瘀止痛的中药，在血瘀引起的心脑血管疾病中临床效果良好。其水溶性成分红花黄色素已被批准用于治疗心血瘀阻引起的心绞痛。近年来，注射用红花黄色素（safflower yellow injection，SYI）也被用于治疗脑缺血，能安全有效地改善急性脑缺血患者的神经功能障碍 [1-2]。本研究观察 SYI 对正常大鼠颈总动脉血流量、血压和血流阻力的影响，以及其体外溶栓作用，为其抗脑缺血的应用提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　仪器与试药

水合氯醛（上海源叶生物科技有限公司，批号：L10J10G90315），SYI（浙江永宁药业股份有限公司，规格：50 mg/瓶，含羟基红花黄色素 A 42.5 mg），临用前用 0.9% 生理盐水配制，TS420 超声多普勒血流仪（Transonic Systems Inc.），MP150 型 16 通道多导生理记录仪、2PS 型血流检测探头（BIOPAC Systems Inc.），WZ-50C2 型微量注射泵（浙江大学医学仪器有限公司）。

1.2　动物与分组

SPF 级雄性 SD 大鼠，体质量 220 ～ 240 g [斯贝福生物技术有限公司，许可证号 SCXK（京）2019-0010]。动物饲养条件为：室温（25±2）℃，12 h 明暗交替，自由饮水和进食。

1.3　颈总动脉血流量、血压及血流阻力测定

大鼠适应性饲养后，随机分成生理盐水对照组（Control）9 只、SYI 高剂量组（0.4 mg • mL^{-1}，H-SYI 组）8 只、SYI 低剂量组（0.2 mg•mL^{-1}，L-SYI 组）8 只。打开超声多普勒血流仪和 MP150 监测软件，对仪器进行校正后，用水合氯醛麻醉大鼠，分离左右两侧颈总动脉，左侧颈总动脉连接血压检测仪，在右侧颈总动脉部涂满螯合剂，并将流量检测探头连接在颈总动脉上，待血压和血流量图像稳定后，观察给药前 30 min 颈总动脉血流量的变化，通过股静脉给药，推注泵设置为 3 mL • h^{-1}，给药时间为 120 min，分别观察给药 30、60、90、120 min 内血流量变化。根据血流阻力＝血压 / 血流，观察血流阻力变化。

1.4　体外溶栓检测

动物禁食不禁水 12 h，麻醉大鼠，使用一次性使用输液器（带针）对大鼠进行腹主动脉取血，使用止血钳夹闭输液器两端，室温下静置 6 h 后，将血栓分成 2 cm 长的血凝块，用生理盐水冲去血凝块表面的血细胞和杂质，吸干水分后称重 W_1，置于 4 mL 离心管内，分组标号后，分别加入 3 mL 不同质量浓度（0.02、0.1、0.5 mg • mL^{-1}）的 SYI

和生理盐水，在 37 ℃的恒温水浴箱中孵育 24 h，取出血凝块，用生理盐水反复漂洗，吸干水分后，称重 W_2 并计算，血凝块溶解率（%）＝[（W_1 － W_2）/W_1]×100%。

1.5　统计学分析

各组数据均以均数 ± 标准差表示，通过运用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析（ANOVA），组间两两比较采用 LSD、SNK 检验，方差不齐采用非参数检验，给药前后比较进行配对 t 检验。$P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　SYI 对大鼠颈总动脉血流量的影响

与给药前颈总动脉血流量比较，对照组大鼠的血流量逐渐增加，60 min 和 90 min 时最明显（$P < 0.01$）。L-SYI 组大鼠的颈总动脉血流量在 60 min 显著增加并持续至 120 min（$P < 0.05$，$P < 0.01$），而 H-SYI 组大鼠的颈总动脉血流量在 30 ～ 60 min 时明显增加（$P < 0.05$，$P < 0.01$），30 min 时大鼠血流量的变化率尤为明显（$P < 0.01$），120 min 时血流量基本恢复。结果见表 1 和表 2。

表 1　SYI 对大鼠颈总动脉血流量的影响 ($\bar{x}\pm s$，mL・min^{-1})

Tab 1　Effect of SYI on the blood flow of common carotid artery in rats ($\bar{x}\pm s$，mL・min^{-1})

分组	n	大鼠颈总动脉血流量				
		给药前	给药后 30 min	给药后 60 min	给药后 90 min	给药后 120 min
对照组	9	5.65±0.73	6.12±0.83	6.70±0.81**	6.55±0.72**	6.08±0.59
L-SYI 组	8	6.31±0.63	6.89±0.59	7.22±0.54*	6.97±0.64**	6.84±0.64*
H-SYI 组	8	3.70±0.66	4.81±0.63**	4.38±0.73*	4.30±0.71	3.83±0.80

注：与各组自身给药前比较，*$P < 0.05$，**$P < 0.01$。

Note：Compared with those before the self-administration，*$P < 0.05$，**$P < 0.01$.

表 2　SYI 对大鼠颈总动脉血流量增加的变化率的影响 ($\bar{x}\pm s$，%)

Tab 2　Effect of SYI on the rate of change of increased blood flow in the rat common carotid artery ($\bar{x}\pm s$，%)

分组	n	给药后大鼠颈总动脉血流量增加的变化率			
		30 min	60 min	90 min	120 min
对照组	9	9.78±6.41	19.72±4.68	18.31±4.74	12.04±7.56
L-SYI 组	8	11.49±5.36	17.69±5.70	12.04±3.72	9.82±3.27
H-SYI 组	8	38.15±11.91##	20.52±6.91	20.31±10.19	3.15±8.77

注：与对照组比较，##$P < 0.01$。

Note：Comparison with the control group，##$P < 0.01$.

2.2　SYI 对大鼠颈总动脉血压的影响

与给药前血压相比，对照组大鼠颈总动脉的血压无明显变化，而 L-SYI 组大鼠在给药 120 min 时血压明显降低（$P < 0.05$），H-SYI 组大鼠血压也有降低趋势，但差异无统计学意义。而与对照组比较，H-SYI 组大鼠在给药 120 min 时的血压有明显降低（$P < 0.05$）。结果见表 3。

表 3　SYI 对大鼠颈总动脉血压变化的影响 ($\bar{x}\pm s$，mmHg)

Tab 3　Effect of SYI on the changes of common carotid artery blood pressure in rats ($\bar{x}\pm s$，mmHg)

分组	n	大鼠颈总动脉血压				
		给药前	给药后 30 min	给药后 60 min	给药后 90 min	给药后 120 min
对照组	9	70.22±3.45	70.00±2.63	72.68±2.77	73.25±3.30	73.82±4.32
L-SYI 组	8	72.60±3.23	76.96±3.81	74.47±3.06	68.49±3.02	64.15±4.03*
H-SYI 组	8	69.79±6.07	70.50±3.82	63.68±2.75	64.20±3.86	61.15±3.75#

注：与给药前比较，*$P < 0.05$；与对照组比较，#$P < 0.05$。

Note：Compared with before the drug administration，*$P < 0.05$；compared with the control group，#$P < 0.05$.

2.3　SYI 对大鼠颈总动脉血流阻力的影响

与给药前比较，对照组的大鼠颈总动脉血流阻力未见明显影响；而 L-SYI 组的大鼠在给药 60 ～ 120 min 时，大鼠颈总动脉的血流阻力出现明显下降（$P < 0.05$），H-SYI 组的大鼠在给药 30 ～ 60 min 时，大鼠颈总动脉血流阻力出现明显降低（$P < 0.05$）。

与对照组相比，L-SYI 组的大鼠颈总动脉血流阻力在给药 90 ～ 120 min 时降低的程度较大，H-SYI 组的大鼠在给药 30 min 时，血流阻力降低的程度尤为显著（$P < 0.05$）。结果见表 4 和表 5。

表 4　SYI 对大鼠颈总动脉血流阻力的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Effect of SYI on blood flow resistance of common carotid artery in rats ($\bar{x}\pm s$)

分组	n	大鼠颈总动脉血流阻力				
		给药前	给药后 30 min	给药后 60 min	给药后 90 min	给药后 120 min
对照组	9	14.21±1.78	13.33±1.85	12.38±1.65	12.45±1.58	13.24±1.57
L-SYI 组	8	12.31±1.29	11.59±0.83	10.74±0.93*	10.59±1.28*	9.72±0.66*
H-SYI 组	8	21.63±2.78	16.45±2.14*	16.92±2.28*	17.33±2.60	19.62±3.47

注：与给药前比较，$^{*}P < 0.05$。

Note：Compared with before the drug administration，$^{*}P < 0.05$.

表 5　SYI 对大鼠颈总动脉血流阻力降低的变化率的影响 ($\bar{x}\pm s$，%)

Tab 5　Effect of SYI on the rate of change of blood flow resistance reduction in common carotid artery in rats ($\bar{x}\pm s$，%)

分组	n	给药后大鼠颈总动脉血流阻力降低的变化率			
		30 min	60 min	90 min	120 min
对照组	9	－4.81±7.53	－11.10±5.70	－9.75±5.42	－3.66±5.25
L-SYI 组	8	－3.71±4.21	－11.72±3.01	－14.64±4.62	－18.75±4.87
H-SYI 组	8	－22.45±5.97#	－20.99±5.16	－17.91±9.12	－6.62±13.49

注：与对照组比较，$^{\#}P < 0.05$。

Note：Compared with the control group，$^{\#}P < 0.05$.

2.4　SYI 对体外血凝块溶解作用的影响

与对照组相比，SYI 可以剂量依赖性地促进体外血凝块的溶解，其中 0.5 mg・mL^{-1} 的 SYI 对体外血凝块的溶解作用更显著（$P < 0.05$），结果见图 1。

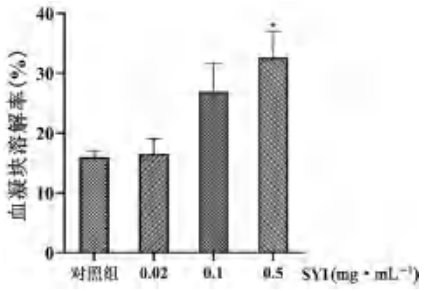


图 1　SYI 对体外血凝块溶解作用的影响

Fig 1　Effect of SYI on blood clot lysis in vitro

注：与对照组相比，$^{*}P < 0.05$。

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

3　讨论

脑血流量减少会引起脑组织能量合成障碍，诱发氧化应激、兴奋性神经毒性和炎症反应等级联反应，最终导致血脑屏障破坏，出现脑水肿，导致继发性脑损伤 [3-4]。现代研究认为，脑缺血属于中风“血瘀证”的范畴，血液流变学“浓、黏、凝、聚”异常，血压和血流阻力异常是导致血流减慢和血栓形成的重要因素，也是导致脑组织局部血液循环障碍、血流量少的关键环节 [5]。颈总动脉是给大脑供血的主要血管之一，超声多普勒检测发现短暂性脑缺血患者颈动脉狭窄，造成颈内动脉脑血流速度降低，血流阻力增加，影响脑部供血，也会造成脑内血管调节能力下降，侧支循环无法保障相应部位血流供应，加重血管病变和组织缺血损伤 [6-9]。由于短暂性脑缺血发作时，血流动力学参数的异常变化会导致大脑出现不可逆性损伤，因此也成为判断脑卒中进展的重要指标 [10]，同时血流动力学异常也对再灌注结束后机体自身调节血液供应有影响，不利于改善患者恢复期的神经功能 [11]。目前，临床治疗脑缺血主要采用扩张血管、溶栓或血管重构改善血管功能，增加脑血流量，及时恢复缺血区的血流供应。颈动脉狭窄引起的脑缺血，经颈动脉支架置入后，患者的脑血流和认知功能得到有效改善，氧化应激反应减轻，炎症因子水平降低。但手术操作依旧存在风险，因此开发促进脑血流的药物是治疗脑缺血再灌注疾病的方向 [12]。

红花是活血化瘀类中药的代表性药物之一，能够活血通经、祛瘀止痛。现代药理研究表明，红花及红花黄色素能够扩张血管、增加冠脉血流量，抗血小板聚集和抗血栓形成，改善微循环 [5]。红花黄色素静脉滴注 14 d 可以明显降低急性脑梗死患者脑组织血流丧失指数和神经功能评分，提高生存质量 [13]。动物实验也证实，红花黄色素可以增加缺血再灌注大鼠脑梗死区的血流量，降低血液黏稠度，减少脑梗死体积 [14]。本研究结果显示，L-SYI 组中，随着给药时间的延长，体内药量逐渐增加，颈总动脉血流量随之增加，血流阻力和血压逐渐降低；H-SYI 组中，在给药 30 ～ 60 min 时，颈总动脉血流量明显增加，血流阻力明显降低，但随着给药时间的延长，颈总动脉血流量和血流阻力的变化逐渐减弱，而血压随着给药时间的延长逐渐降低，尤其是在给

药 120 min 时，与对照组大鼠的血压比较，有明显降低血压的作用。注射用红花黄色素中主要成分为羟基红花黄色素 A（hydroxysafflor yellow A，HSYA）[15]，研究发现，红花、红花黄色素以及 HSYA 均有扩张血管作用 [16]，促进血液循环 [17]，改善微循环及血液流变学等作用 [18]，因此推测 SYI 可能通过扩张血管作用，降低了血管阻力，增加颈总动脉的血流量，改善脑供血。本研究结果也提示，给药剂量增加时，扩张血管作用可能导致血压降低，影响颈总动脉的血流量。此外，SYI 对体外血凝块有促进溶解的作用，呈现明显的量效关系，但促进血栓溶解的作用机制还有待深入研究。

综上所述，SYI 可增加正常大鼠颈总动脉血流量，降低血管阻力和血压，促进体外血栓溶解的作用，这可能是其增加脑供血，改善脑缺血损伤的重要原因。

参考文献

[1] Fan S，Lin N，Shan G，et al. Safflower yellow for acute ischemic stroke：a systematic review of randomized controlled trials [J]. Complement Ther Med，2014，22（2）：354-361.

[2] Li LJ，Li YM，Qiao BY，et al. Corrigendum to “the value of safflower yellow injection for the treatment of acute cerebral infarction：a randomized controlled trial” [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2016，2016：4270317.

[3] Ogoh S. Relationship between cognitive function and regulation of cerebral blood flow [J]. J Physiol Sci，2017，67（3）：345-351.

[4] Boyd K，Hammond-Haley M，Vroman R，et al. Imaging pericytes and the regulation of cerebral blood flow [J]. Methods Mol Biol，2021，2235：89-117.

[5] 彭成 . 中药药理学 [M]. 北京：中国中医药出版社，2016：249-250.

[6]《中国短暂性脑缺血发作早期诊治指导规范》发布 [J]. 临床合理用药杂志，2022，15（3）：154.

[7] 张莹，康黎，刘运安，等 . 短暂性脑缺血发作患者血流动力学及血压变异性与颈动脉狭窄严重程度的相关性研究 [J]. 实用临床医药杂志，2020，24（5）：53-59.

[8] 李秋萍，华扬，杨洁，等 . 椎动脉颅外段血流参数变化与颅内段狭窄病变程度的相关性分析 [J]. 中华超声影像学杂志，2019，28（11）：940-944.

[9] 裴文娜，舒娜 . 超声检测颈内动脉血流动力学在短暂性脑缺血发作评估中的应用 [J]. 临床医学，2022，42（1）：77-79.

[10] 陈娟，杜春华，陶景山，等 . MSCTA 联合 ABCD2 评分对短暂性脑缺血发作早期进展为脑梗死的预测价值 [J]. 卒中与神经疾病，2018，25（5）：525-528.

[11] 党英男，贾舒婷，赵伟，等 . 红景天对脑缺血 - 低氧大鼠血流动力学及神经元凋亡作用机制 [J]. 脑与神经疾病杂志，2021，29（12）：727-732.

[12] 王廉，吕美萱，徐佳良，等 . 颈动脉内膜剥脱术及颈动脉支架置入术对脑缺血患者血流动力学及认知功能的影响 [J]. 黑龙江医学，2021，45（6）：572-574.

[13] 刘青，黄德弘，黄坚红，等 . 红花黄色素改善急性脑梗死患者脑灌注的临床研究 [J]. 中国新药杂志，2017，26（23）：2822-2825.

[14] 张庆 . 红花黄素对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用 [D]. 济南：山东大学，2011.

[15] Ao H，Feng W，Peng C. Hydroxysafflor yellow A：a promising therapeutic agent for a broad spectrum of diseases [J]. Evid Based Complement Alternat Med，2018，2018：8259280.

[16] Sun Y，Xu DP，Qin Z，et al. Protective cerebrovascular effects of hydroxysafflor yellow A（HSYA）on ischemic stroke [J]. Eur J Pharmacol，2018，818：604-609.

[17] Wang LW，Cui XY，He JF，et al. Hydroxysafflor yellows alleviate thrombosis and acetaminophen-induced toxicity in vivo by enhancing blood circulation and poison excretion [J]. Phytomedicine，2021，87：153579.

[18] Zhu HB，Zhang L，Wang ZH，et al. Therapeutic effects of hydroxysafflor yellow A on focal cerebral ischemic injury in rats and its primary mechanisms [J]. J Asian Nat Prod Res，2005，7（4）：607-613.

（收稿日期：2022-08-25；修回日期：2022-09-30）

药品临床综合评价专题

【编者按】

2021 年 7 月 28 日，国家卫生健康委员会印发《关于规范开展药品临床综合评价工作的通知》（国卫办药政发〔2021〕16 号），标志着我国的药品临床应用管理进入新的阶段。国家层面陆续出台了心血管病药品、抗肿瘤药品、儿童用药三大重点领域的技术指南。全国各省正从工作方案、组织管理协调机制建设、课题试点等方面积极推进相关工作。

不同药品管理周期评价侧重点不同，如药监部门在审评审批时关注药品带来的获益是否大于其风险，医保部门在医保目录调整时会额外关注药品经济性，而卫生行政管理部门则需对药品多维价值进行评判以促进临床合理用药。本专题围绕全生命周期管理，提出不同场景下指标选择建议；同时，针对经济性、创新性两个非常重要的维度，比较了不同评价方案；最后，选择 PCSK9 类药品进行实证研究，旨在为相关研究提供参考。

【主持人简介】

李芬，女，博士，副研究员，上海市卫生和健康发展研究中心（上海市医学科学技术情报研究所）卫生政策研究部主任，兼上海市卫生经济学会副秘书长、理事，上海市卫生和健康发展研究中心嘉定分中心执行主任、长宁分中心副主任。主要服务卫生健康领域决策咨询，研究方向为卫生筹资和支付、医院管理和规划、药品管理政策和评估、大数据挖掘，获得上海市卫健委优青、上海市卫健委五四青年奖章。主持国家自然科学基金青年科学基金、上海市科委面上和重点项目、国家卫健委科研项目等 100 余项，主编论著 3 本，发表论文 105 篇，获得科研奖项 10 次。

基于药品全周期管理的药品评价指标体系构建

李芬[1]，谢印[2]，朱碧帆[1]，胡嘉浩[1]，刘宇晗[1]，倪元峰[3]，魏馨[3]，金春林[1*]（1. 上海市卫生和健康发展研究中心（上海市医学科学技术情报研究所），上海　200031；2. 上海中医药大学，上海　201203；3. 上海市卫生和健康委员会，上海　200125）

摘要：药品评价可用于药品全周期管理的不同场景，但在不同评价目的下，维度和评价方法选择有所差异，建立一个全面的、通用的药品评价体系，可减少决策成本、增加政策协同性。本研究通过综述中、英、法、美等国家和地区药品评价维度异同，将评价维度归结为安全性、有效性、经济性、创新性、适宜性和可及性，总结在不同情境下评价维度侧重点和同一维度内涵的差异。在药品上市准入、医保准入等具体政策应用场景下，基于决策目标、重点，选择所需的评价指标、设置适宜的权重，以提供最佳决策证据。

关键词：药品临床综合评价；指标体系；政策应用

中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0973-06

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.022

基金项目：上海市重点药品遴选及临床综合评价指标库构建项目（No.22Y10001）；依洛尤单抗药品临床综合评价项目（No.2022010B）；PD-1/PD-L1 抑制剂药品临床综合评价指标体系构建研究项目（No.2021043B）。

作者简介：李芬，女，博士，副研究员，主要从事卫生经济学研究，email：lifen@shdrc.org　*通信作者：金春林，男，博士，研究员，主要从事卫生政策、卫生经济学研究，email：jinchunlin@ shdrc.org

Drug evaluation index framework based on drug lifecycle management

LI Fen[1], XIE Yin[2], ZHU Bi-fan[1], HU Jia-hao[1], LIU Yu-han[1], NI Yuan-feng[3], WEI Xin[3], JIN Chun-lin[1*] (1. *Shanghai Health Development Research Center* (*Shanghai Medical Technology Intelligence Institute*), *Shanghai* 200031; 2. *Shanghai University of Traditional Chinese Medicine*, *Shanghai* 201203; 3. *Shanghai Health Commission*, *Shanghai* 200125)

Abstract: Drug evaluation can be used in different scenarios of full-cycle drug management, but under different evaluation purposes, the selection of dimensions and evaluation methods are different. Establishing a comprehensive and universal drug evaluation system can reduced the cost of decision-making and increase policy synergy. This paper reviewed the similarities and differences in drug evaluation dimension in China, Britain, France, the United States and other countries and regions. The dimensions covered security, effectiveness and economy, innovation, suitability and accessibility. Difference in evaluation dimensions in different situation and the connotation of the same dimension were summed up. In specific policy application scenarios, such as drug market access and medical insurance access, the required evaluation indicators are selected and appropriate weights are set based on the decision-making objectives and priorities to provide evidence for the best decision.

Key words: clinical comprehensive evaluation of drug; indicator system; policy application

药品全生命周期管理的各个环节相互关联，但受不同环节、不同管理主体关注点差异影响，各环节指标体系往往也不同，尚未形成共识。我国已发布相关药品评价指南，本文比较了中、英、法、美等国家和地区相关机构药品评价目标、维度和指标异同，总结在不同情境下评价维度侧重点，同一维度内涵的差异，提出全生命周期药品评价的指标体系，为更好地统筹开展药品决策证据集成、科学分析和准确评价提供参考。

1　基于药品全生命周期管理的评价内涵

药品管理全生命周期涵盖药品研发、注册评价、上市使用、再评价和淘汰退市等多个阶段[1-2]。药品全生命周期的各阶段是相互影响的。企业造“好”药、政府部门选“好”药，属于药品的“理论价值”，影响企业的产能（供应）、机构配备和报销水平（使用），也是真实世界药品临床价值表现的决定因素。而用“好”药、患者获得的真实世界的“实际价值”，受到供应、使用多个环节的影响（见图 1），例如医务人员处方行为的规范性、科学性，患者的依从性等因素[3]。全生命周期的药品综合评价体系，应涵盖体现“理论价值”和“实际价值”的各个方面。

本研究采用文献综述的方式开展，综述资料主要来源于两个方面：一是文献检索，利用“药品临床综合评价”“指标体系”“政策应用”“clinical comprehensive evaluation of drugs”“indicator system”“policy application”等主题词及其组合进行检索，检索的数据库包括中国知网、万方、Medline、

图 1　药品价值与相关环节的关系

Fig 1　Relationship between drug value and related links

Ovid、Emabase、Google Scholar 等；二是检索并纳入国家药品临床综合评价指南[4]、抗肿瘤药品[5]、儿童药品[6]等临床综合评价技术指南，法国国家卫生管理局[7]（French National Authority for Health，HAS）、美国食品药品监督管理局[8]（Food and Drug Administration，FDA）的获益 - 风险评估、英国国家卫生与临床优化研究所[9]（National Institute for Health and Care Excellence，NICE）药物价值评估、欧盟[10]发展的 HTA Core Model 3.0 方法学框架。文献评价维度和指标涵盖体现全生命周期“理论价值”和“实际价值”的所有维度和指标。

2　国内外不同情境下药品评价的维度

药品评价常用于上市准入、医保准入和确定支付标准以及综合评价等不同场景。在不同评价目的下，维度和评价方法选择有所差异，见表 1。

2.1　药品上市准入评价

上市前，主要对药品的安全性、有效性、质量

表 1　不同国家的药品价值评价维度和应用场景

Tab 1　Drug value evaluation dimensions and application scenarios in different countries

维度	纳入国家					纳入阶段			内涵	
	美国 FDA	法国 HAS	英国 NICE	欧盟 HTA Core Model	我国医保 / 卫健委	上市准入	医保准入和定价	准入后	相同点	差异
安全性	√	√	√	√	√	●	●	●	患者用药后出现的不良反应	欧盟：患者安全、职业安全和环境安全 我国：上市前后药品的安全性
有效性	√	√	√	√	√	●	●	●	（相对）临床疗效	除 FDA 外，其余机构均强调生命质量指标
经济性			√	√	√		●	●	成本效果分析（CEA）/ 成本效用分析（CUA）/ 成本效益分析（CBA）	我国和 NICE：强调条件允许下 CUA 优先使用
创新性	√	√		√	√	●	●	●	填补临床需求空白	FDA、HAS：相对临床疗效的显著性
可及性			√	√	√		●	●	均体现公平性	欧盟：以伦理、法律和社会角度体现药物获取和使用的可及性 NICE：从疾病严重程度等角度影响 ICER 标准阈值 我国：药品价格水平、可获得性和可负担性
适宜性	√	√	√	√	√	●	●	●	使用适宜性评价最为普遍，包括适应证、目标人群是否适宜，治疗持续时间是否符合患者、疾病和药品药理特点等	NICE：药品的详细信息等技术适宜性 HAS：包装、规格等技术适宜性 我国：技术、体系和监管适宜

可控性以及生产企业的质量管理、风险防控等进行审查。以美国为例，药品需通过 FDA 的获益 - 风险评估，确定在药品说明书所述的条件下使用是获益大于风险，才能批准上市。该评估框架主要围绕疾病背景分析、现有治疗选择、获益、风险和风险管理四个方面的证据和不确定性信息进行。其中，疾病背景分析指药物拟用于预防、治疗、治愈、缓解或诊断疾病的性质和疾病严重程度；现有治疗选择结合现有治疗负担等信息，对当前批准的治疗、标准治疗、其他非药物干预措施与新疗法的有效性、安全性、耐受性进行比较 [8]。FDA 需对其毒性大小的可接受性作出判断 [11]。例如某适应证尚无有效疗法，则药物潜在风险更容易被接受；当药物应用于预防疾病时，则对潜在风险的容忍性较低。获益、风险和风险管理还需对其证据的可靠性进行评价后，才能得出风险 - 获益结论 [12]。

2.2　医保准入和确定支付标准

NICE 药物价值评估要点主要包括两部分：一是综合评估药品自身特点信息，包括与药品适应证相关具体疾病背景信息、临床路径、适用人群、包装规格等药品详细使用信息、最佳对照药等；二是与对照药进行有效性评价和经济性评价。有效性的证据更倾向于高质量的随机对照试验（RCT）研究，在缺乏证据或证据有限的情况下，观察性研究可作为 RCT 的补充或构成主要证据来源 [1]。经济学评价使用增量成本 - 效果比（incremental cost effectiveness ratio，ICER）进行量化 [9]，在英国，当 ICER 低于或等于普遍认可的阈值时，该药品就会被推荐纳入英国国家医疗服务体系（National Health Service，NHS）。但该决策还受到创新、疾病严重程度、获益幅度、决策证据的不确定性等因素影响 [13]。

HAS 实施临床疗效（Service Médical Rendu，SMR）和临床疗效改善（Amélioration du Service Médical Rendu，ASMR）两阶段评估 [7]。SMR 评价决定药品是否纳入医保报销目录及其报销比例，其评价由三部分组成：

第一，疗效证据评估：其中疾病严重程度是影响该药品纳入医保的先决条件；有效性和安全性是评估的核心；根据治疗属性、产品治疗定位判断药品是否为临床上不可或缺的。第二，公共卫生效益：通过疾病负担中的流行病学证据，评价药品纳入医保目录后，对患者的发病率、病死率和公共卫生系统产生的影响。第三，其他评估内容：根据药品包装、规格、治疗持续时间等评估适宜性。

药品费用报销比例根据 SMR 级别及疾病严重程度确定，严重疾病且临床疗效好的药品报销比例最高，临床疗效不足的药品不予报销，其余情况均按同一比例进行报销。ASMR 用于药品定价，以评价新药在疗效方面是否较现有药品或治疗方案更有优势：1 ～ 3 级为创新药，可制订高于参比制剂的价格；4 ～ 5 级为常规药，其定价往往低于市场同类药价格水平。医保部门要求企业签订量价协议，方能纳入医保目录 [14]。

我国药品医保准入定价需经过形式审查、药

品评审、价格测算和现场谈判四个步骤。其中药品审查主要是通过国家医保局组织各学科领域专家，对药品的综合价值进行评审打分，从安全性、有效性、经济性、创新性、公平性五个维度进行判断，临床价值不高或价格特别昂贵的药就会止步于这个环节。根据药物经济学评价证据和基金支付能力形成谈判底价，再与企业进行价格谈判。经济学评价证据主要包括成本效果分析、预算影响分析、谈判药品的国内外价格现状等[15]。

2.3　准入后的临床综合评价

我国卫健委发布的《药品临床综合评价管理指南（2021 年版试行）》，围绕技术评价与政策评价两条主线，从安全性、有效性、经济性、创新性、适宜性、可及性六个维度开展科学规范的定性定量相结合的数据整合分析与综合研判[4]。药品临床综合评价是药品供应保障决策的重要技术工具，其结果预期应用于国家基本药物目录遴选和动态调整、提升医院合理用药水平、控制不合理药品费用支出等多个场景。

此外，欧盟制定了通用的 HTA Core Model 3.0 方法学框架，设立了当前健康问题状况、技术描述和技术特点、安全性、临床效果、成本和经济学评价、伦理、组织、法律、患者和社会等 9 个方面维度，但仅作为方法学上的倡议[10]。

2.4　药品评价维度内涵和场景比较

上述国家和地区评价的维度核心通常是有效性、安全性和经济性。安全性与有效性的评价通常是紧密相连的，例如 FDA 要求药品带来的临床疗效必须要高于风险才能上市。在安全有效的前提下，控制成本，改善效率也是评价的重点[16]。其他常用维度可概括为可及性、创新性、适宜性。可及性本质是人人可以公平获得和使用药物，我国从药品价格水平、可获得性和可负担性来评价可及性问题。在评价创新性时，HAS 以药品相对疗效的显著程度来定义创新药，同时根据治疗属性、产品定位来判定药物是否有独特作用；FDA 主要比较新旧疗法在疗效、安全性、耐受性、现有治疗负担等方面，及其相对疗效的显著程度。适宜性常通过给药途径、方案、使用方便性等药物自身特点，以及目标人群与药品适应证的相关性等来反映。其余维度如疾病严重程度、对公关卫生的影响等，影响决策最终结果，例如 FDA 根据治疗背景和目前的治疗选择情况对上市药物毒性的容忍性作出判断；HAS 通过疾病是否为严重疾病对药品的医保报销比例产生影响作出判断。

这些维度中，一类是反映药品本身价值属性的指标，包括安全性、有效性、经济性、创新性维度；另一类则是体现供应、保障等外生影响有可及性和适宜性维度的指标。不同的评价目的，其考虑的维度不同，例如，上市准入主要考虑疗效获益，而不纳入经济性、可及性。

3　各维度指标内涵及不同情境下的选择

3.1　安全性

安全性是判断药品临床价值的基础，上市前后关注点、选择指标不同。上市前安全性指药品在动物实验之后、未获准进入临床实际应用前所进行的相关试验的安全性评估，从药物毒理学和药理学两方面进行评价，相关的安全性信息来源于药品说明书[6]。上市后安全性评价，如医保准入、基本药物选择、合理用药评价等应用情境，其重点是发现上市前临床研究未能解决的安全性问题，包括特殊人群用药安全性、药物间的相互作用、药品不良反应的发生情况等[17]。目前评价药物不良反应的方法有“WHO 不良反应评价标准”和“美国国立癌症研究院通用毒性标准（Common Terminology Criteria for Adverse Events，CTCAE）”[18]。我国评价药物不良反应时，通常参考 CTCAE。在评价时需要注意药物与不良反应的因果关系，饮食、其他联用药物、患者自身疾病及相关并发症等因素均可能导致不良反应事件的发生[19-20]。

3.2　有效性

有效性可反映药物治疗效果、预测疾病进展、评判是否需要改变用药方案[21]，药品上市前、医保准入以 RCT 疗效为主，进入医疗机构使用后更关注真实世界数据实际效果。疗效和效果的主要区别在于疗效是干预措施在人为设计的理想条件下所能达到的最大期望作用，强调药物自身作用；效果指干预措施在实际真实条件下所能达到的作用大小，受疗效和外在的医疗卫生条件影响，强调的是研究结论的外推性。优先选择能够反映患者长期获益及用药后整个生命进程疾病转归的指标，如抗肿瘤患者的总生存期（overall survival，OS）和无进展生存期（progression-free survival，PFS）[22]；心血管病患者的全因死亡率、心血管死亡率、心血管事件发生率。次选可准确测量、有临床意义的指标，如高胆固醇血症时可选择低密度脂蛋白胆固醇（low density lipoprotein cholesterol，LDL-C）水平及其下降幅度、高密度脂蛋白胆固醇（high density lipoprotein cholesterol，HDL-C）水平[23]，原发性高血压可选择治疗后收缩压 / 舒张压水平、脉压[24]；冠心病溶栓治疗时选用纤维蛋白原、血小板计数、活化部分凝血活酶时间[25]。为强调“以病人为中心”的临床诊疗导向，纳入患者报告结局（patient-reported outcomes，PROs），包括症状、功能（活动限制）、健康形态 / 健康相

关生命质量（health-related quality of life，HRQL）或生命质量以及患者期望等各个层面的内容[5]。

3.3　经济性

经济性评估主要用于评价资源消耗与临床疗效的性价比，常用 ICER 和增量成本效用分析（incremental cost-utility analysis，ICUR）。但在有多个干预措施时，ICER 最小的干预措施不一定最经济，建议采用多方案比较。首先将各方案的健康产出结果由小到大排序，排除绝对劣势方案，即相对于另一个方案成本更高而产出更低的方案；再依次计算相邻两方案间的 ICER 或借助成本效果平面判断，排除拓展绝对劣势方案，剩余的干预措施可认为较有经济性。当临床疗效无差异时，可直接用价格、年治疗费用、疗程费用比较；但缺陷是对于多适应证的药品，对不同的适应证效果存在差异，若仅考虑费用绝对值而忽略了对疗效的考虑，可能无法选择出对某一适应证性价比高的药物。

3.4　创新性

目前药品创新性的评价方法和指标尚未形成共识，各项研究在开展评价时所划分的维度、采取的评价视角差异较大[26]。Angelis 等[27]提出的 MCDA 框架中对创新的定义包含创新作用机制，溢出效应（除现有治疗作用外，可用于治疗其他适应证或减少某些不良反应），以及患者有用性（患者对用药的依从性和满意度高）；有研究对药物创新性的解释：第一，健康收益，包括应对新疾病或适应证、以生活质量和 / 或寿命来衡量的健康收益、更快的健康改善、减少不良反应或提高耐受性、减少与其他疗法间的负相互作用、比目前的标准疗法更好地治疗特定的患者亚群；第二，患者或照顾者的便利；第三，其他社会收益，包括节省成本、释放其他（非）医疗资源、提升生产力等[28]。实践中，FDA 对临床疗效创新定义为需具有自主知识产权、新靶点或新机制、新疗效，或在尚无有效治疗手段疾病方面具有突出的临床治疗优势[29]。我国的《药品临床综合评价管理指南（2021 年版试行）》[4]则体现政策导向，分为临床创新性和产业创新性，前者为是否是罕见病用药、儿童肿瘤药，后者包括国内自主研发、国内专利、靶点创新、分子实体创新、制剂创新等。

无论从哪个角度去定义，创新的最终作用表现为提升药品有效性、安全性，提高适宜性（如给药途径等）或降低成本。在综合评价时注意避免重复评价，例如创新的作用表现为提高安全性，只需从创新性和安全性两个维度中选择其一进行评价即可；同时注意评价对象，如果为同类创新药品之间的比较，则不需要纳入创新维度[30]。

3.5　适宜性

适宜性是衡量药品临床使用情况的重要维度，可显著提高用药的依从性和合理性。适宜性可分为技术适宜性、使用适宜性、监管和体系适宜性。其中技术适宜性评价主要是药品本身的属性，包括标签标注、剂型剂量、服用方法、储存条件等。使用适宜性评价则应结合药品的临床使用情况进行评价，包括药品用法、给药途径是否符合患者的身体状况，药物特点以及治疗方案、适用人群、给药间隔和给药周期等方面是否适宜。易出现用药不规范或药品说明书中对某类人群用药信息缺失的药品，要对其适宜性进行重点评估，比如，第二代 H1 抗组胺药是治疗儿童过敏性疾病的常用药，临床需求大，但普遍存在用药不合理，药品说明书中低年龄段儿童适应证信息缺失及安全性不明确等问题[5，31-32]。在国际上，技术和使用适宜性常应用于药品上市、医保准入定价等场景，如 NICE 通过描述药品的规格包装等药品详细信息来反映[9]。体系和监管适宜性主要考量的是保障供应情况，不属于药品本身属性，在上市、医保准入时不予考虑，在遴选基本药物、促进合理用药评价时应纳入；对于药品临床综合评价得分高、但配置或保障不足的药品应予以重点关注和改进。

3.6　可及性

参考 WHO/HAI 药物可及性标准化方法，可及性分为可负担性和可获得性两个方面[15]。可负担性与经济性相关，但评价角度不同，可负担性考量的是药品价格在国际国内位置、费用对家庭可支配收入的影响，属于临床价值范围，在上市、准入应考虑；可获得性评价指的是企业生产能力、流通机构配送能力、药店和医疗机构配备情况，主要从保障供应角度来评价药品使用情况。

在药品全周期管理中，药品综合评价体系应涵盖体现“理论价值”和“实际价值”的各个方面，供多部门共用。不同的评价目的，其考虑的维度也不同，例如，上市准入主要考虑疗效获益，而不纳入经济性、可及性；医保准入定价及准入后阶段则还需强调社会和经济效益。同一个维度，在不同情境下，其内涵有所差异。例如，安全性评价上市前后关注点有所不同，上市后更关注未知的用药风险；药品上市前、医保准入有效性评价以 RCT 疗效为主，进入医疗机构使用后则更关注真实世界中药品实际效果。

经济学评价方法选择，准入、定价场景使用 ICER；准入后，药品临床综合评价往往针对同一类的多种药品，最常用到的是多方案比较。评价创新性维度时，应注意与其他维度去重，以避免

重复计算；同时注意评价对象，如果创新性相同的药品之间的比较，则不需要纳入创新性维度；体系和监管适宜性主要考量的是保障供应情况，不属于药品本身属性，在上市、医保准入时不予考虑，在遴选基药、促进合理用药评价时应纳入。

参考文献

[1] 肇晖 . 科学监管推动药品全生命周期管理 [J]. 上海医药，2020，41（13）：1-2.

[2] 国家药品监督管理局 . 中华人民共和国药品管理法 [EB/OL]. https：//www. nmpa. gov. cn/xxgk/fgwj/flxzhfg/20190827083801685. html. 2020-11-04/2022-01-20.

[3] 李成，孙强 . 促进合理用药的干预措施研究综述 [J]. 中国卫生政策研究，2012，5（10）：10-15.

[4] 国家药物和卫生技术综合评估中心 . 药品临床综合评价管理指南（试行）[EB/OL]. https：//www. nhc. gov. cn/cms-search/downFiles/863665c55fd74f29a656990 d1a4ea5ce. pdf. 2020-11-03 / 2022-09-04.

[5] 国家药物和卫生技术综合评估中心 . 抗肿瘤药品临床综合评价技术指南（2021 年版）[EB/OL]. https：//max. book118. com/html/2022/0510/8137011036004100. shtm. 2021-12-06 / 2022-08-29.

[6] 国家药物和卫生技术综合评估中心 . 儿童药品临床综合评价技术指南（2021 年版）[EB/OL]. https：//view. inews. qq. com/a/20220122A014EG00.2021-12-03 / 2022-08-29.

[7] Drummond M，De Pouvourville G，Jones E，et al. A comparative analysis of two contrasting European approaches for rewarding the value added by drugs for cancer：England versus France [J]. Pharmacoeconomics，2014，32（5）：509-520.

[8] FDA. Benefit-risk assessment for new drug and biological products：guidance for industry：draft guidance [EB/OL]. https：//www. fda. gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/benefit-risk-assessment-new-drug-and-biological-products. 2020-09-29/2022-09-03.

[9] NICE. NICE health technology evaluations：the manual [EB/OL]. https：//www. nice. org. uk/process/pmg36. 2022-01-31 /2022-08-03.

[10] European Network for Health Technology Assessment（EUnetHTA）. Joint action on HTA 2012-2015：HTA core model：version 3.0 [EB/OL]. https：//eunethta. eu/wp-content/uploads/2018/03/HTACoreModel3.0-1. pdf. 2016-01-25/2022-08-03.

[11] 萧惠来 . FDA《新药和生物制品的获益 - 风险评估供企业用的指导原则》介绍 [J]. 药物评价研究，2022，45（2）：210-220.

[12] 左书凝，何春俐，赵建中 . 药品评价中的获益风险评估 [J]. 中国临床药理学杂志，2021，37（13）：1757-1763.

[13] National Institute for Health and Care Excellence. Modifiers task and finish group report [EB/OL].（2020-11-04）[2022-1-20]. https://www.nice.org.uk/Media/Default/About/what-we-do/our-programmes/nice-guidance/chte-methods-consultation/Modifiers-task-and-finish-group-report.docx.

[14] 卢碧香，关轶茹，张方 . 法国药品临床疗效和临床疗效改善评级管理及其借鉴启示 [J]. 中国药物应用与监测，2018，15（2）：113-117.

[15] 官海静 . 这场关乎十几亿人健康的谈判，到底在谈什么？[EB/OL].（2021-11-23）[2022-8-3]. https：//www. nice. org. uk/process/pmg36.

[16] 周杰明 . 完善国家基本药物工作推进国家药物政策的制定和实施 [J]. 中国药事，2005，19（3）：131-133.

[17] 班雅倩 . 药品上市后安全性评价质量评估指标体系研究 [D]. 郑州：河南大学，2014.

[18] 皋文君，刘砚燕，袁长蓉 . 国际肿瘤化疗药物不良反应评价系统——通用不良反应术语标准 4.0 版 [J]. 肿瘤，2012，32（2）：142-144.

[19] 魏水易，王士民，舒丽芯 . 药物安全性的评价方法（Ⅲ）——药物不良事件的因果评价 [J]. 药物不良反应杂志，2001（4）：244-248.

[20] 魏戌，谢雁鸣 . 国内外不良反应因果判断原则及评价方法解读 [J]. 中国中药杂志，2012，37（18）：2744-2747.

[21] 张宏伟，刘建平，万霞，等 . 临床干预结局评估指标的分类及效应表达 [J]. 中西医结合学报，2007，5（5）：497-501.

[22] 廖方欣，夏良平 . 晚期结直肠癌临床研究终点：无进展生存期，总生存期或其他 [J]. 肿瘤学杂志，2016，22（5）：339-343.

[23] Zhu Y，Shen X，Jiang Q，et al. Effects of monoclonal antibodies against PCSK9 on clinical cardiovascular events：ameta-analysis of randomized controlled trials [J]. Harz，2017，44（4）：336-346.

[24] 中国医疗保健国际交流促进会高血压分会中国医师协会心血管分会中国高血压联盟《血管紧张素受体脑啡肽酶抑制剂》建议书专家组 . 沙库巴曲缬沙坦在高血压患者中临床应用的中国专家建议 [J]. 中华高血压杂志，2021，29（2）：108-114.

[25] 国家卫生计生委合理用药委员会，中国药师协会 . 冠心病合理用药指南 [J]. 中国医学前沿杂志（电子版），2016，8（6）：19-108.

[26] Caprino L，Russo P. Developing a paradigm of drug innovation：an evaluation algorithm [J]. Drug Discov Today，2006，11（21-22）：999-1006.

[27] Angelis A，Kanavos P. Multiple Criteria Decision Analysis（MCDA）for evaluating new medicines in Health technology assessment and beyond：the advance value framework [J]. Soc Sci Med，2017，188（9）：137-156.

[28] Rejonparrilla JC，Espin J，Epstein D. How innovation can be defined，evaluated and rewarded in health technology assessment [J]. Health Econ Rev，2022，12（1）：1-12.

[29] De Solà-Morales O，Cunningham D，Flume M，et al. Defining innovation with respect to new medicines：a systematic review from a payer perspective [J]. Int J Technol Assess，2018，34（3）：224-240.

[30] Wills TJ，Lipkus AH. Structural approach to assessing the innovativeness of new drugs finds accelerating rate of innovation [J]. ACS Med Chem Lett，2020，11（11）：2114-2119.

[31] 国家卫生健康委 . 关于印发加强医疗机构药事管理促进合理用药的意见的通知 [Z]. 2020.

[32] 刘璐，肖月，刘畅，等 . 儿童药品临床综合评价方法研究——以儿童抗过敏药物为例 [J]. 中国药房，2022，33（2）：142-145.

（收稿日期：2022-08-02；修回日期：2022-10-20）

药品临床综合评价创新性指标的构建——以 PD-1/PD-L1 抑制剂为例

朱碧帆，胡嘉浩，刘宇晗，金春林，李芬*（上海市卫生和健康发展研究中心（上海市医学科学技术情报研究所），上海　200030）

摘要：目的　以程序性死亡受体 1（PD-1）/ 程序性死亡受体 - 配体 1（PD-L1）抑制剂为例，对药品创新性评价指标进行综述，为构建适宜的创新性评价指标提供借鉴。**方法**　通过文献综述对适用于 PD-1/PD-L1 抑制剂的创新性评价指标进行检索并梳理汇总。**结果**　针对药品的创新性评价主要从新药审批情况、结构创新情况、获取专利情况、治疗需求创新、经济性创新 5 个维度开展。根据文献综述结果以及指南推荐情况，本研究构建了适用于 PD-1/PD-L1 抑制剂的创新性评价指标池，共包含 3 个二级指标、17 个三级指标。**结论**　对于药品创新性的评价方法和评价指标尚未形成共识，各项研究在开展评价时所划分的维度、采取的评价视角差异较大。在选取评价指标时，应当基于待评价药品的特性、具体的决策场景以及相应数据的可获得性等因素进行选择。

关键词：程序性死亡受体 1；程序性死亡受体 - 配体 1；临床综合评价；创新性
中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0979-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.023

Construction of indicator system for innovation in clinical comprehensive evaluation: taking PD-1/PD-L1 inhibition as an example

ZHU Bi-fan, HU Jia-hao, LIU Yu-han, JIN Chun-lin, LI Fen* (*Shanghai Research Center for Health Development* (*Shanghai Medical Information Center*), *Shanghai* 200030)

Abstract: Objective To establish an applicable evaluation system for the innovation of medicines. **Methods** PD-1/PD-L1 inhibitors were used as an example to review and retrieve relevant indicators. **Results** The innovation of medicines was mainly evaluated from the following perspectives: new drug approval, structural innovation, patent acquisition, innovation in unmet medical needs and cost restraint. According to the literature review and recommendations of the comprehensive medicines evaluation guidelines, we constructed an evaluation system applicable for PD-1/PD-L1 inhibitors, including 3 secondary indicators and 17 tertiary indicators. **Conclusion** There is a lack of consensus about the definition and evaluation of medicines innovation. The evaluation indicators vary widely. While conducting evaluation under different decision-making scenarios, the characteristics of the specific type of medicine evaluated need to be taken into account, as well as the availability of data.
Key words: PD-1; PD-L1; clinical comprehensive evaluation; innovation

中共中央办公厅、国务院办公厅《关于深化审评审批制度改革鼓励药品医疗器械创新的意见》提出，“鼓励药品医疗器械企业增加研发投入，加强新产品研发和已上市产品的继续研究，持续完善生产工艺”。医药技术的持续创新不仅为产业提供发展动能，更为患者带来了福祉。2021 年 7 月，国家卫生健康委员会发布《药品临床综合评价管理指南（2021 年版试行）》，将创新性作为药品临床综合评价的 6 个维度之一，用以辅助药品政策的决策，保障临床基本用药的供应

基金项目：上海市重点药品遴选及临床综合评价指标库构建（No.22Y10001）。
作者简介：朱碧帆，女，助理研究员，主要从事卫生政策、卫生经济研究，email：zhubifan@shdrc.org　*通信作者：李芬，女，副研究员，硕士研究生导师，主要从事卫生政策、卫生经济研究，email：lifen@shdrc.org

与规范使用[1]。然而，从现有的研究来看，患者、政策制定者、监管机构和制药公司等不同利益相关方对于如何评估药物的创新价值尚未达成共识[2]。本文以程序性死亡受体 1（PD-1）/ 程序性死亡受体 - 配体 1（PD-L1）抑制剂为例，对药品创新性评价指标进行综述，为构建适宜的创新性评价指标提供借鉴。

1　资料来源与方法

本研究采用文献综述的方式采集药品创新性评估指标，根据创新性的内涵划分不同维度，并对不同维度评估指标进行梳理，汇总形成创新性评价指标体系。资料主要来源于两个方面：一是文献检索，利用“PD-1”“PD-L1”“药品创新”“指标”“new drugs”“innovation indicator”等主题词及其组合进行检索，检索的数据库包括中国知网、万方、Medline、Ovid、Embase、Google Scholar 等；二是临床综合评价指南等相关文件，检索并纳入国家药品临床综合评价指南、抗肿瘤药品、心血管病药品、儿童药品等临床综合评价技术指南，以及全国、上海在开展药品招标采购等过程中所使用的评价指标，梳理并纳入创新性相关指标。

2　研究结果

共提取 3828 篇文献，剔除重复文献、阅读摘要及浏览全文后，共纳入 14 篇相关文献。在评价药品行业创新性的时候，通常采用美国食品药品监督管理局（FDA）每年批准的新分子实体（new molecular entities，NMEs）数量进行衡量。研究指出，全球前 50 的制药企业平均每年仅产出 0.5 ～ 0.8 个 NMEs，说明尽管研发投入巨大，产业创新速度整体依旧偏低[3]。然而，NMEs 数量无法衡量药品本身的创新性。有研究尝试对药物本身的创新性进行评估，采用的指标包括：新的作用机制（如是否是首创）、治疗需求（如是否是孤儿药）、基于现有诊疗标准的提升（如是否是突破性疗法）等指标[2]。也有文献将针对药品创新性的评估分为以下 4 个维度：诊疗价值、经济指标、专利情况以及新药审批通过情况[4]。2018 年，Oriol 等[5]通过系统综述将药品创新性指标分为治疗价值（therapeutic value）、新颖性（novelty）以及已有治疗手段（availability of existing treatments）3 个维度。结合文献和临床综合评价指南，本文从新药审批情况、结构创新情况、获取专利情况、治疗需求创新、经济性创新 5 个维度，对适用于 PD-1/PD-L1 抑制剂的创新性评价指标进行梳理。

2.1　新药审批情况

FDA 在新药审批时将创新药（novel drugs）分为 3 类：首创药物（与现有疗法相比通常具有新的作用机制，对居民健康具有很强的潜在积极影响）、罕见病药物以及其他药物，在更广泛的疾病诊疗领域有所进展。针对创新药，FDA 采取了多种审批手段来加速其上市，包括快速跟踪、突破性疗法、优先审查、加速审批。为提升创新药的可及性，FDA 还通过第一轮审批、在美国优先上市等方式加快创新药在美国上市。部分研究将相关生物制剂是否获批美国 FDA 首创药物、优先审查、快速跟踪以及突破性疗法等作为判断药物创新性的依据[3]。同样，国家药品监督管理局（NMPA）针对新药的注册分类也可作为评估新药创新性的指标[6]。2020 年，FDA 共审批通过 53 种新药，其审批类型见图 1。国家药品监督管理局药品评审中心（Center for Drug Evaluation，CDE）同样对创新药采取特殊的审批方式，包括优先审评、突破性疗法等。

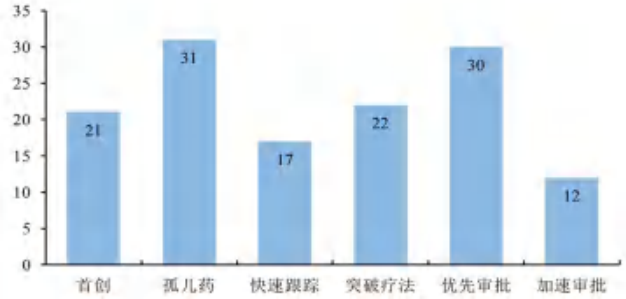


图 1　2020 年美国 FDA 审批通过的新药分类[7]

Fig 1　Novel drug designation approved by FDA 2020[7]

2.2　结构创新情况

有研究提出基于结构新颖性的评估方法，从结构创新的角度衡量药品（主要聚焦小分子和多肽药物）的创新性[8]。研究将新药结构与 FDA 批准的药物进行比较，评估药品的前瞻性创新潜力，对临床开发阶段公开结构的候选药物进行研究。同时，将结构创新分为开拓者、定居者、殖民者 3 个级别。开拓者是指形状和支架未用于任何先前批准的药物的 NMEs，定居者指以前使用过形状但其支架未用于任何以前批准的药物的 NMEs，殖民者则是指形状和支架已用于先前批准的药物的 NMEs[8]。

2.3　获取专利情况

专利作为创新活动的重要载体和标志，其申请数量在一定程度上反映了药品的创新价值[4]。有研究基于专利申请对 PD-1/PD-L1 抑制剂领域技术创新态势进行分析，截止至 2019 年 8 月，PD-1/PD-L1 抑制剂领域的专利创新共有 5500 余项，且专利申请数量呈上升趋势，科学基础研究主题主要集中在 3 个方向，即肿瘤免疫联合治疗、PD-1/PD-L1 通路在肿瘤免疫逃逸中的机制研究、PD-1/PD-L1 抑制剂在非小细胞肺癌中的临床研究。其

中，对 PD-1/PD-L1 通路在肿瘤免疫逃逸中的机制研究数量超过 115 项，专利申请热度位列第二 [9]。为量化专利情况与药品创新性的关系，有研究利用专利反向引用率排名来对药品创新性进行评价，即该项技术专利引用其他类别专利的比例，在同一个专利类别中，若某项技术专利的反向引用率在该类别中排名在前 5%，则认定为具有突破性创新 [10]。

2.4　治疗需求创新

创新药物应以临床应用为导向，主要针对有潜力治疗严重和危及生命疾病的 NMEs 化合物、比已上市药品或标准疗法有显著改进的药品 [11]。因此，治疗需求创新是药品创新性评估的重要指标。Angelis 等 [12] 提出的 MCDA 框架中对创新的定义包含溢出效应，即该药品可用于治疗新的适应证。有研究者认为药物创新的重点应为应对未满足的临床需求 [13]。以阿替利珠单抗为例，它是 FDA 批准的首个用于局部晚期或转移性尿路上皮癌的 PD-L1 抑制剂，是新型靶向人源化单克隆抗体，临床疗效显著 [14]。美国 FDA 认为新药需具有自主知识产权，拥有新靶点或新机制，产生新疗效，或在尚无有效治疗手段疾病方面具有突出的临床治疗优势 [15]。2022 年 8 月，度伐利尤单抗注射液获得 NMPA 批准用于广泛期小细胞肺癌（ES-SCLC）的一线治疗。我国 SCLC 患者预后差，中位无进展生存时间较短，仅为 4 ～ 6 个月，度伐利尤单抗注射液可为该人群提供一种新的有效的治疗选择 [16]。

意大利药品监管局（AIFA）于 2017 年开发了药品创新性评估系统 [17]，从治疗需求、附加治疗价值和临床试验证据质量 3 个维度评估药品创新。其中，治疗需求基于替代疗法的可用性和患者对新疗法的需求，表示引进新药以应对未满足治疗需求的迫切程度。治疗需求分为 5 个等级，评估结果分为完全创新、有条件的创新和非创新。完全创新的状态最长可达 36 个月，必须进行药物注册；第一次有条件创新认定的情况，如果提供额外的临床证据能改变第一次判断，可在 18 个月后审查并转为完全创新；非创新状态的产品可重新提交其申请，并在有新证据可用时重新进行评估 [18]。该种评估方法以治疗需求为药品创新的重要评估指标，灵活、透明地对治疗创新进行了定义（见表 1）。

表 1　意大利药品创新程度评估标准

Tab 1　Evaluation criteria of degree of innovation of medicines in Italy

维度	评价等级				
	高	较高	中等	较低	低
治疗需求	无其他治疗选择	有其他治疗选择，但无临床效果	有替代治疗方案，但临床效果有限	替代治疗方案有较好的临床结果	替代治疗方案可显著减缓疾病进程
附加治疗价值	与现有治疗方案相比有更好的功效，可治愈或改变疾病进程	满足以下 1 项：可降低严重并发症风险；风险 / 收益比优于替代治疗方案；可避免使用高风险临床举措；可在某个患者亚组显著改变疾病进程；可提供临床附加价值，如生命质量（QoL）	与现有治疗方案相比，在部分亚组人群临床功效略优，或能一定程度改善患者 QoL	非临床相关结局略优，或改善程度有限（如给药方式更受欢迎）	与现有治疗方案相比无附加的诊疗获益
临床试验证据质量	真实效果与临床预计效果非常接近	/	真实效果与临床预计效果可能相近，也可能有较大差异	真实效果与临床预计效果可能有较大差异	真实效果与临床预计效果可能有很大差异

注（Note）：/ 表示无此项分类（/ indicates there is no such a category）。

捷克共和国将治疗重大疾病的药物纳入高度创新药品范畴，其中重大疾病是指需要终身或长期住院或频繁住院，导致残疾或永久的健康损伤，完全或几乎完全的视力、听力、语言能力损失或导致预期寿命降低 20% 以上的疾病。捷克共和国在开展卫生技术评估的同时将临床疗效与创新性评估的结果进行了关联 [19]，具体标准见表 2。

2.5　经济性创新

除了药品疗效，药品的经济性也备受关注。当药品的研发价格非常高，其售价远高于患者的可承受能力时，药品再具有创新性，临床效果再好，它的创新价值都不会得到很好的体现。因而，在最大程度上达到所需的治疗效果，同时将研发费用降至尽可能低，也是评估药品创新性的一个重要指标。Rejonparrilla[20] 认为药物创新性的概念包含了社会收益这一维度，包括节省成本、释放其他（非）医疗资源、提升生产力等。国外 PD-1/PD-L1 药品价格高昂，最早进口药品在国内售价约 50 万元 / 年，这对于多数患者来说无疑是在承受能力之外的，患者由于价格过高而无法使用到这类药品，药品本身的创新价值也就无法体现。

2.6　PD-1/PD-L1 创新性评价指标框架

以 PD-1/PD-L1 抑制剂为例，在选取创新性评价指标时主要考虑以下几个方面：首先，由于结构创新评估主要适用于小分子药品，而 PD-1/PD-L1 抑制剂主要为免疫生物制剂，因此不应纳入；其次，临床综合评价中已纳入经济性维度，为避免重复计算，在构建 PD-1/PD-L1 抑制剂创新

表 2　捷克共和国对于高度创新药品的评估标准

Tab 2　Assessment criteria for highly innovative medicines in Czech Republic

与现有治疗方案相比满足以下 1 个条件：

n. 严重不良事件发生率下降 40% 以上；

n. 唯一一种可以减少治疗中断率 40% 以上的药品；

n. 唯一一种可以减少严重药物相互作用 40% 以上的药品；

n. 显著降低死亡率，提升中位总生存期 2 年以上，或在预期寿命低于 24 个月的患者中，提升中位生存时间 50% 以上（且大于等于 6 个月）；

n. 降低严重合并症发生率 40% 以上。

或与现有治疗方案相比，满足以下 1 个条件（在临床疗效或成本效果证据存在不确定性的情况下）：

n. 显著提升的临床功效（*降低死亡率 20% 以上，或在预期寿命低于 24 个月的患者中提升中位生存时间 40% 以上，或减少严重疾病症状 30% 以上*）；

n. 现有医保目录中无其他治疗选项；

n. 针对部分对现有标准治疗方案耐药的患者，创新治疗方案在临床上更有效（见斜体字）。

性指标体系时不纳入经济创新性指标；最后，根据《抗肿瘤药品临床综合评价技术指南（2022 年版试行）》[21]，主要推荐的创新性指标为存在未满足的临床需求、用药创新、可优化服务流程、可提高机构或地区卫生服务效率、是否为国内自主研发的原研药或全球首个仿制药、是否获得国内专利、是否获得国际专利、是否为儿童专用药品、是否为靶点创新、是否为分子实体创新以及是否为制剂创新 11 个指标。由于 PD-1/PD-L1 产品均为基于已知靶点的注射制剂，因此用药方式、靶点创新、分子实体创新以及制剂创新几个指标并不适用。综上，本研究构建了适用于 PD-1/PD-L1 抑制剂的创新性指标池，共包含 3 个二级指标，17 个三级指标。相关指标及来源见表 3。

表 3　PD-1/PD-L1 抑制剂创新性指标框架

Tab 3　Evaluation indicators of the innovativeness of PD-1/PD-L1 inhibitors

二级指标	三级指标	含义	数据来源
1. 新药审批情况	1. 是否为国内自主研发产品 [21]	技术国有化、国内专利价值	文献、专利信息查找
	2. 药品注册分类 [6]	根据《药品注册管理办法》，该药品所属的注册分类	药品注册信息查找
	3. 是否纳入优先审批等流程 [10]	当 FDA、CDE 认定该药物可能会在医疗保健方面取得重大进展，则会将其纳入突破性疗法、优先审评等审批流程	查阅 FDA、CDE 网站
	4. 获得科技奖项 [6]	获得国际和国家科学技术奖（如盖伦奖，国家最高科学技术奖、国家自然科学奖、国家技术发明奖、国家科学技术进步奖、中华人民共和国国际科学技术合作奖）二等奖及以上	查阅相关部门网站
	5. 首创药品（first-in-class）[3]	与现有疗法相比通常具有新的作用机制，对人们的健康具有很强的潜在积极影响	查阅药品审批信息、FDA 网站
	6. 首仿药品 [21]	药品是否获得相关的认证，如首仿国外药品	查阅药品审批信息
2. 专利情况	7. 与疗效相关的专利 [21]	药品拥有的产品、工艺和使用创新相关专利的情况，如是否获得国内药品结构或制剂工艺方面的专利，是否获得美国、日本、欧盟药品结构或制剂工艺方面的专利	专利信息查找
	8. 药品研发技术水平 [6]	研发该药需要的技术水平的高低	专家咨询
	9. 保护期内的国家一类新药、原研药 [21]	通过使用先进制剂技术、创新治疗手段等方式，填补临床治疗技术空白、改善技术短缺	专利信息查找
	10. 专利反向引用率排名 [10]	该项技术专利引用其他类别专利的比例在同类专利类别中的排名	专利信息查找
3. 治疗需求创新	11. 存在未满足的临床需求 [21]	填补现有抗肿瘤药物在治愈或改善目标疾病症状有显著效果，重点考虑对目标疾病的精准治疗，以及针对新的适应证有创新治疗效果	通过文献综述法、疾病登记数据、专家咨询，对所评估药物创新性程度得出差异性意见
	12. 重大疾病用药 [19]	待评价药品是否可用于重大疾病，指医疗花费巨大且在较长一段时间内严重影响患者及其家庭正常工作和生活的疾病	文献综述、专家咨询
	13. 罕见病用药 [3]	待评价药品是否可用于罕见病	查阅药品说明书
	14. 是否具有明显的治疗优势 [21]	与现有的药品或技术相比，有更高的安全性、有效性和实用性，包括生存时间的延长、生命质量的提升、不良反应以及并发症的减少	有效性评价（可参考捷克 HTA 评估过程中对于药品创新性的评价标准）
	15. 是否有助于提高患者依从性 [21]	通过改变制剂工艺，优化给药方式，提高患者用药依从性，促进患者预后	专家咨询、调查
	16. 可提高机构或地区卫生服务效率 [21]	是否提高区域或机构诊疗服务资源利用效率，如鼓励以社区为主提供治疗服务，减少医疗及社会资源的消耗	二手数据分析、调查
	17. 不可替代性 [6]	在治疗某种疾病的过程中，该种药品与其他药品相比，是否具有不可替代的优势	专家咨询

3 讨论

总的来说，对于药品创新性的评价方法和评价指标尚未形成共识，各项研究在开展评价时所划分的维度、采取的评价视角差异较大。不同领域专家认为，药物创新的本质是给临床医师、护士及患者带来益处，而这一理念在药品有效性、安全性、适宜性等维度均有所体现。为避免重复计算，针对 PD-1/PD-L1 创新性评估的指标从新药审批情况、获取专利情况以及治疗需求创新 3 个维度来构建。其中新药审批情况可通过药品监督管理部门等相关网站查询，获取专利情况则可通过专利信息网站查询，指标可获得性较高。针对治疗需求创新，则需综合药品说明书、文献查阅、专家咨询、二手数据分析等方式来进行采集，在可操作性方面存在一定的挑战。从已经发表的临床综合评价研究来看，部分研究（主要是儿童用药评价）在开展评价时并未纳入创新性指标[22-23]。其他研究在开展综合评价时创新性维度的权重也相对较低，在 5.00% ～ 9.49%[24-25]。本研究提出了药品临床综合评价中构建创新性评价指标的方法学框架，然而，在选取评价指标时，应当基于待评价药品的特性、具体的决策场景以及相应数据的可获得性等因素进行选择。

参考文献

[1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会，国家卫生健康委办公厅 . 关于规范开展药品临床综合评价工作的通知：国卫办药政发 [2021]16 号 [EB/OL].（2021-07-18）[2022-04-21]. http：//www. nhc. gov. cn/yaozs/s2908/202107/532e20800a-47415d84adf3797b0f4869. shtml.

[2] Caprino L，Russo P. Developing a paradigm of drug innovation：an evaluation algorithm [J]. Drug Discov Today，2006，11（21-22）：999-1006.

[3] Mark Robberson. An empirical analysis of innovation in the pharmaceutical industry by drug class：implications for regulatory policy [EB/OL] [2022-11-29]. https：//www. jhsph. edu/research/centers-and-institutes/center-of-excellence-in-regulatory-science-and-innovation/Mark%20Robberson%20CERSI%20paper%2020190505. pdf.

[4] Kesselheim AS，Wang B，Avorn J. Defining "innovativeness" in drug development：a systematic review [J]. Clin Pharmacol Thera，2013，94（3）：336-348.

[5] Oriol SM，David C，Mathias F，et al. Defining innovation with respect to new medicines：a systematic review from a payer perspective [J]. Int J Technol Assess，2018，34（3）：224-240.

[6] 夏聪 . 上市后药品价值评价指标体系的构建及应用研究 [D]. 佛山：南方医科大学，2018.

[7] U.S. Food & Drug Administration. New drug therapy approvals 2020 [EB/OL] [2022-11-28]. https：//www. fda. gov/drugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/new-drug-therapy-approvals-2020#breakthrough-therapy.

[8] Wills TJ，Lipkus AH. Structural approach to assessing the Innovativeness of new drugs finds accelerating rate of innovation [J]. ACS Med Chem Lett，2020，11（11）：2114-2119.

[9] 张婷，卢岩，陈娟，等 . PD-1/PD-L1 抑制剂领域技术创新态势及其科学基础研究 [J]. 中国药事，2020，34（10）：1171-1179.

[10] Stiller I，van Witteloostuijn A，Cambré B. Do current radical innovation measures actually measure radical drug innovation? [J]. Scientometrics，2021，126：1049-1078.

[11] Püntmann I，Schmacke N，Melander A，et al. EVITA：a tool for the early evaluation of pharmaceutical innovations with regard to therapeutic advantage [J]. BMC Clin Pharmacol，2010，10：5.

[12] Angelis A，Kanavos P. Multiple Criteria Decision Analysis（MCDA）for evaluating new medicines in health technology assessment and beyond：the advance value framework [J]. Soc Sci Med，2017，188（9）：137-156.

[13] Bryan S，Lee H，Mitton C. "Innovation" in health care coverage decisions：all talk and no substance? [J]. J Health Serv Res Po，2013，18（1）：57-60.

[14] 雷兵团，张雅琳，白秋江 . FDA 批准的首个 PD-1/PD-L1 抑制药阿特珠单抗 [J]. 中国药业，2018，27（22）：76-78.

[15] 陶秀梅，董江萍，黄蕾，等 . 刍议创新药物研发的生态环境与创新药物研发 [J]. 中国药学杂志，2016，51（7）：592-597.

[16] 国家药品监督管理局药品审评中心 . 度伐利尤单抗注射液（JXSS2000029-30）申请上市技术审评报告 [EB/OL] [2022-11-28]. https：//www. cde. org. cn/main/xxgk/postmarket-page? acceptidCODE=2c10585a4992d52f12c6b70be25f1536.

[17] Fortinguerra F，Perna S，Marini R，et al. The assessment of the innovativeness of a new medicine in Italy [J]. Front Med（Lausanne），2021，8：793640.

[18] Fortinguerra F，Tafuri G，Trotta F，et al. Using GRADE methodology to assess innovation of new medicinal products in Italy [J]. Br J Clin Pharmacol，2020，86（1）：93-105.

[19] Vostalová L，Mazelová J，Samek J，et al. Health technology assessment in evaluation of pharmaceuticals in the czech republic [J]. Int J Technol Assessment Health Care，2017，33（3）：339-344.

[20] Rejonparrilla JC，Espin J，Epstein D. How innovation can be defined，evaluated and rewarded in health technology assessment [J]. Health Econ Rev，2022，12（1）：1-12.

[21] 国家药物和卫生技术综合评估中心 . 抗肿瘤药品临床综合评价技术指南（2022 年版试行）. [EB/OL]. http://www. nhei. cn/nhei/znfb/202206/c01d87a290664b01bf42a9dad769d69f. shtml [2022-6-29].

[22] 刘璐，肖月，刘畅，等 . 儿童药品临床综合评价方法研究——以儿童抗过敏药物为例 [J]. 中国药房，2022，33（2）：142-145.

[23] 赵瑞玲，黄亚云，张夏丽，等 . 儿童退热药布洛芬制剂临床综合评价指标体系的构建 [J]. 中国医院药学杂志，2022，42（7）：758-761.

[24] 毛勇，严伟，李晴宇，等 . 心血管慢病药品临床综合评价杭州专家共识 [J]. 中国药房，2022，33（9）：1025-1030.

[25] 覃肖潇，金春林，王美凤，等 . 含钆对比剂的临床综合评价 [J]. 临床药物治疗杂志，2021，19（9）：34-40.

（收稿日期：2022-10-10；修回日期：2023-01-10）

综述

2 型糖尿病脑内糖代谢改变与神经退行性变性疾病的关系

莫子鑫，何玲，孙逸*（中国药科大学药学院，南京　211198）

摘要：以 2 型糖尿病为代表的内分泌系统疾病和以神经退行性变性疾病为代表的中枢系统疾病都是现今社会相对高发的慢性疾病，两者都以能量代谢的改变尤其是糖代谢的改变为主要特征，更有一种观点将阿尔茨海默病称为“3 型糖尿病”。由此可见，2 型糖尿病和神经退行性变性疾病可能存在某种关联，且已有的大量研究表明两者之间的联系密不可分。目前，这两种疾病发生的确切原因尚未完全研究清楚，也许从两者连接的桥梁出发再分别研究各自的病理机制可以更好地了解这两种疾病。本文将对 2 型糖尿病与神经退行性变性疾病之间的糖代谢关联作一综述。

关键词：2 型糖尿病；糖代谢；神经退行性变性疾病
中图分类号：R96　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0984-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.024

Relationship between altered cerebral glucose metabolism and neurodegenerative diseases in type 2 diabetes mellitus

MO Zi-xin, HE Ling, SUN Yi* (*College of Pharmacy*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 211198)

Abstract: Endocrine system diseases represented by type 2 diabetes mellitus (T2DM) and central system diseases represented by neurodegenerative diseases are both chronic diseases with relatively high incidence nowadays. Both types are characterized by energy metabolism changes, especially glucose metabolism. Some regarded Alzheimer’s disease as “type 3 diabetes mellitus”. There might be some kind of association between T2DM and neurodegenerative diseases, as shown by many studies. The exact causes of the two diseases are still unknown, and perhaps focusing on the association between them can better understand the diseases. This paper will review the relationship between T2DM and neurodegenerative diseases from glucose metabolism.

Key words: type 2 diabetes mellitus; glucose metabolism; neurodegenerative disease

随着现代社会不断进步，人们的生活方式及饮食结构也在不断改变，糖尿病和神经退行性变性疾病（NDs）等慢性疾病的发病率和致死率正在不断上升。据国际糖尿病联盟统计，截止至 2021 年全球约有 5.37 亿成年人患有糖尿病，到 2030 年将增加到 6.43 亿 [1]，这使得糖尿病正成为全世界密切关注的焦点疾病。以糖尿病为代表的代谢性疾病不仅影响人体外周各个组织器官的结构和功能，还有可能影响大脑的能量代谢，损害认知功能 [2-3]。

NDs 是以运动和 / 或认知功能进行性损伤为特征的疾病，通常伴有精神疾病，包括各种顽固性疾病，如阿尔茨海默病（AD）、帕金森病（PD）、亨廷顿病（HD）和肌萎缩侧索硬化（ALS）等。目前尚未出现可逆转疾病进程的治疗药物或方法 [4-5]。2 型糖尿病（T2DM）与 NDs 都是现代社会普遍高发的慢性疾病，且越来越多的证据表明两者之间也许存在密切关联。

1　T2DM

基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（No.81703520）；宁夏回族自治区重点研发计划重点项目（No.2019BFG02017）。
作者简介：莫子鑫，男，硕士研究生，主要从事神经退行性变性疾病病理机制研究及药物靶点发现方面的研究，email：mozixin1@163.com
*通信作者：孙逸，女，讲师，主要从事神经退行性变性疾病病理机制研究及药物靶点发现方面的研究，email：bio_lunar@163.com

糖尿病是一种以代谢紊乱、餐后血糖明显升高为主要特征的慢性内分泌疾病，其后期常伴有糖尿病足、视网膜受损、肾脏及外周神经病变等多种并发症[6]。糖尿病主要分为 1 型和 2 型，T2DM 患者占 90% 以上[7]。T2DM 是一种潜伏期相对较长的可逆性疾病，其特征是高血糖、胰岛素抵抗（IR）和胰岛素相对缺乏。IR 是 T2DM 最早的异常和主要病理生理因素[8]，是一种代谢异常的疾病状态，常与心血管疾病、血脂异常以及炎症状态共存[9]。IR 不仅与 T2DM 相关，还与肥胖等代谢综合征相关，都可能影响 NDs 的发生发展，导致认知障碍[10]。越来越多的流行病学调查表明，T2DM 的患者患 NDs 的风险几乎增加了一倍[11]。大规模研究表明，T2DM 与大脑结构变化和功能失调之间存在错综复杂的关系[12-13]。在这种背景下，有人提出，T2DM 和代谢机制改变存在相当大的重叠[14]，T2DM 已被确定为 NDs 的危险因素（见图 1）。糖尿病患者的群体数量正在快速增加，糖尿病本身以及并发症严重影响了患者本人及其家庭的生活质量，因此，进一步明确糖尿病的发病机制，研究糖尿病与 NDs 之间的关系，并找到潜在的药物靶点是当前迫切需要的。

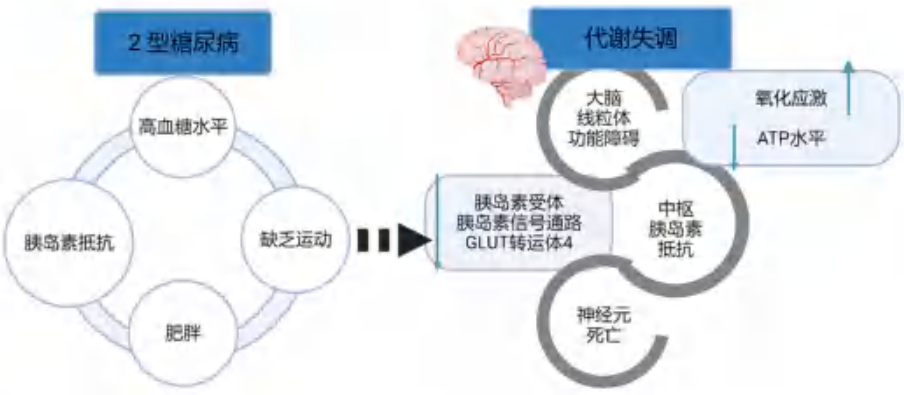


图 1　糖尿病和脑部代谢紊乱

Fig 1　Diabetes and metabolism disturbances in the brain

2　T2DM 引起的糖代谢改变

能量代谢紊乱是 T2DM 的一个重要病理特征[15]。正常情况下，人体能量主要来自食物中碳水化合物和脂肪酸的分解，能量摄入和消耗在精细调节下保持动态平衡[16-17]。在 T2DM 患者体内，能量摄入高于常人，但能量利用受损[18]。能量代谢紊乱会进一步导致一系列生理、心理、行为的异常改变，如疲劳、抑郁、免疫疾病等。糖代谢是调节人体能量产生的重要途径。有研究表明 IR 会改变参与糖代谢途径的基因表达[19]。T2DM 患者糖代谢的紊乱主要表现在糖酵解中间体的异常积累[20]：高血糖可增加葡萄糖氧化率，导致丙酮酸生成过多；过度增加的血糖会影响三羧酸循环中中间体的代谢。Rossetti 等[21]研究显示，在 T2DM 的进展过程中，T2DM 大鼠主要针对糖酵解途径进行糖代谢调节以保持体内血糖稳态。Chen 等[22]研究发现，Roux-en-Y 胃旁路术能有效改善 T2DM 模型大鼠的糖代谢，从而降低大鼠的空腹血糖，达到改善其糖尿病表征的作用。

与可以利用其他能量来源（主要是脂肪酸）的组织不同，大脑主要以葡萄糖作为能量来源，大脑对葡萄糖的需求相当高，成人大脑的重量约为体重的 2%，但在静息状态下消耗的葡萄糖约为身体总消耗量的 20%[23]。葡萄糖为神经细胞提供能量，维持突触活性、离子梯度，保障身体正常运转。大脑的高能量消耗主要来自葡萄糖代谢，因此其更容易受到能量代谢受损的影响。事实上，高血糖障碍和低血糖稳态都严重影响人脑功能，尤其是认知功能[24-25]。损伤和疾病期状态的神经元功能障碍伴随着能量代谢缺陷，如糖酵解缺陷及线粒体三羧酸循环和氧化磷酸化障碍[26-27]。线粒体功能障碍在 NDs 中很常见，通常与神经元变性和线粒体功能障碍状态相关的代谢现象是从通过三羧酸循环和氧化磷酸化产生三磷酸腺苷（ATP）到糖酵解产生 ATP 的明显转变，这通常被称为有氧糖酵解，因为尽管处于有氧条件，仍会随着糖酵解的持续而继续生成丙酮酸[28]。目前已知有氧糖酵解发生在与 AD、PD、HD 等几种主要 NDs 相关的病理条件下的神经元中[29]。在 NDs 中，不仅神经元会发生代谢改变和障碍，星形胶质细胞、小胶质细胞和少突胶质细胞也会发生，而这些细胞在脑内高血糖环境中的代谢改变也可能对 NDs 的发生和进展产生重要影响。

胰岛素因其参与调节外周组织中的葡萄糖代

谢而闻名，同时，这种激素也通过复杂的胰岛素 / 胰岛素受体信号通路影响大脑的糖代谢。大脑中广泛存在胰岛素受体，特别是在嗅球、下丘脑、海马体、大脑皮层、纹状体和小脑中 [30]。与外周一样，IR 被描述为由于胰岛素信号级联的几个步骤的连续异常，包括胰岛素受体数量减少，配体结合效率改变或下游信号分子的表达水平降低 [31]。而在 T2DM 患者中，普遍存在 IR，外周高胰岛素血症和 IR 导致胰岛素向大脑运输的效率降低以及胰岛素受体活性降低，从而导致中枢胰岛素抵抗大脑 [32]。脑葡萄糖摄取不依赖于胰岛素，但可能受特定亚细胞区室中的胰岛素控制 [33]。例如，突触的活动会动员胰岛素敏感的葡萄糖转运体 4（GLUT4）从细胞内转移到轴突质膜中，增加进入神经元的葡萄糖通量。胰岛素代谢异常和高血糖诱导的葡萄糖自氧化还促进了晚期糖基化终末产物（AGEs）的形成，并增加了 NDs 样神经病理学特征（例如 Tau 蛋白的异常过度磷酸化）的产生。

3　糖代谢障碍与 NDs

NDs 是指由脑内神经元退化和细胞凋亡引起的缓慢发展的各种神经系统疾病，主要表现为运动和认知功能障碍。病理学研究表明，NDs 患者的神经元缓慢凋亡，表现出异常的蛋白质聚集，并形成包涵体，提示 NDs 之间可能具有相似的疾病进展机制 [34]。在糖尿病的早期阶段，大脑中胰岛素敏感区域的脑葡萄糖代谢受损，且表现出一些 NDs 的早期病理特征。

3.1　AD

AD 是最常见的 NDs，已成为全球公共卫生威胁，其神经病理学特征是老年斑和神经原纤维缠结的形成 [35]，目前尚无治愈 AD 或逆转疾病进程的有效干预措施。糖代谢障碍是 AD 的发病基础之一，已有诸多研究证实，AD 患者脑内存在糖代谢紊乱，主要表现为血脑屏障上葡萄糖相关转运体表达水平下调与糖酵解通路受阻，多种参与三羧酸循环的酶活性下降 [36]。大脑作为各种高级活动的控制中枢，需要大量能量维持正常运转，但所需能量并不直接由神经元产生，而是通过星形胶质细胞进行有氧糖酵解产生。一方面，星形胶质细胞经过有氧糖酵解产生的 ATP 直接转运到神经元进行消耗，同时利用糖原输送可被神经元用于代谢的乳酸等的代谢原料 [37]；另一方面，星形胶质细胞还可以通过脂肪酸 β- 氧化产生酮体，经由酮体穿梭运送至细胞内。胰岛素信号传导的主要区域虽然集中于神经元上，但星形胶质细胞也存在胰岛素和胰岛素样生长因子受体，这可能是大脑调节葡萄糖利用的关键 [38]。对 AD 患者糖代谢相关的蛋白质组学研究发现，星形胶质细胞蛋白标志物在 AD 早期显著升高 [39]。在 AD 状态下，Aβ 斑块周围存在星形胶质细胞增生的情况，并且其能量代谢功能受损，由此引发的氧化应激与神经炎症会进一步增加 Tau 蛋白的异常磷酸化，从而进一步加重 AD[40-41]。

T2DM 患者体内长期处于高血糖水平，会导致全身性的代谢功能紊乱，其中脑部功能异常所引发的认知功能障碍是 T2DM 最常见的并发症之一 [42]，主要与糖化蛋白的加速氧化产生积累并发展成为的 AGEs 的神经毒性有关，并且后期很有可能会恶化，最终发展为 AD。此外，高血糖水平还会影响脑内线粒体稳态。线粒体主要负责脑细胞的能量供应、排出代谢废物、消除代谢产物的毒性以及进行细胞间交流。越来越多的证据表明，在 AD 的发病机制中线粒体可能在形态、线粒体动力学和生物能量学等方面受到不同程度的损害，加速脑内的 AD 病变 [43]。在链脲佐菌素诱导的糖尿病模型小鼠神经元中线粒体的氧化应激增加，脑线粒体的氧化损伤进一步导致运动和记忆行为功能受损 [44]。T2DM 患者脑葡萄糖代谢的降低还与线粒体能量相关蛋白（包括丙酮酸脱氢酶）的表达改变和活性降低相关，而相似的症状在 AD 患者的成纤维细胞和脑组织中也有发现 [45]。最近，一些研究表明 AD 和 T2DM 之间的共同因素是 AMP 依赖的蛋白激酶（AMPK）[46-47]。AMPK 是一种调节细胞能量供应的代谢酶，也被称为“能量受体”。在糖尿病中，AMPK 可以调节葡萄糖代谢，并通过相关基因途径影响血液的葡萄糖水平。AMPK 在 AD 中也起着重要作用，它通过诱导细胞核中的自噬，从而清除 Aβ 沉积并缓解 AD 病理 [48]（见图 2）。AMPK 活性还在 ATP 的产生中起推动作用。动物模型研究中发现，AMPK 活化可提高轴突中 GLUT4 或葡萄糖转运体 1（GLUT1）的表达，提高脑内葡萄糖利用率，促进大量 ATP 的产生 [49]。此外，在原代细胞中，高胰岛素可产生与 AD 相关的病理改变，并伴有能量代谢的受损，AMPK 激动剂治疗可改善这些变化 [50]。因此推测，AMPK 激动剂则可以增加能量产生，可能有助于改善 AD 病理。还有研究表明，临床上用于治疗 T2DM 的一线药物，如二甲双胍，可以通过激活细胞 AMPK 途径来降低

血糖[51]。这些发现为 AD 药物的研究开辟了新的方向。从这些结果来看，AMPK 可能是 AD 的可行药物靶标。

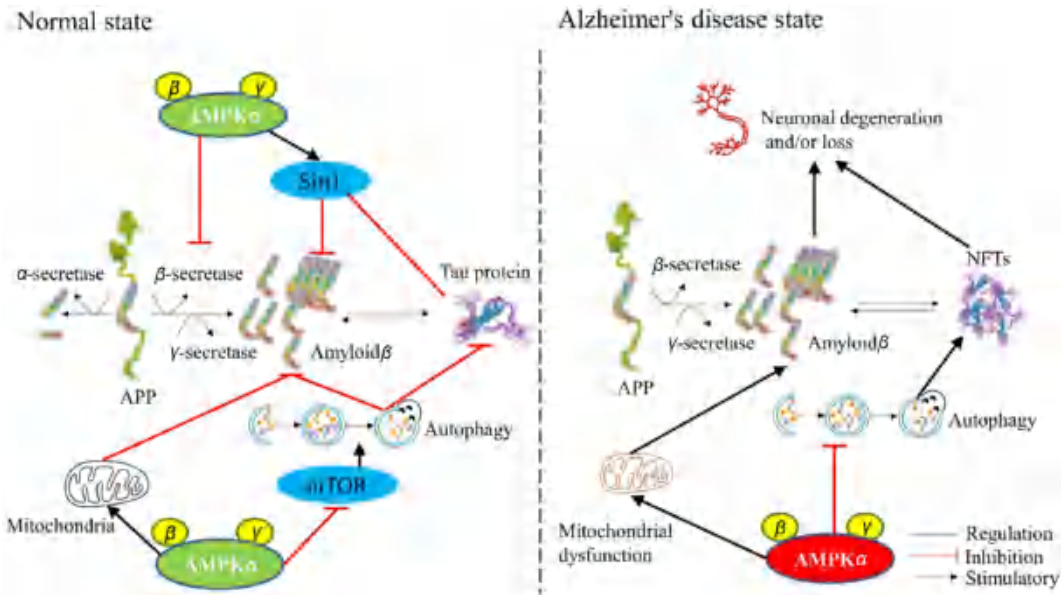


图 2　AMPK 在正常状态和 AD 状态大脑中的作用简图[52]

Fig 2　Role of AMPK in normal state and the AD state in the brain[52]

3.2　PD

PD 是一种与老年人运动和非运动功能进行性损伤相关的 NDs。线粒体功能障碍会损害能量代谢，是 PD 生理病理学中的一个核心因素，其特征是中脑黑质致密部区域中的多巴胺能神经元逐渐丧失。多巴胺能神经元的破坏减少了大脑运动回路中的多巴胺转换，导致运动功能障碍，如运动迟缓、僵硬、震颤[53-54]。目前 PD 的具体发病机制尚不清楚，但已知的风险因素有衰老、线粒体功能障碍、慢性全身炎症和基因突变等。目前已知 T2DM 会损害脑内葡萄糖代谢，减少线粒体周转，造成线粒体功能障碍。这种障碍会导致呼吸酶活性降低、ATP 产生减少和脑内能量耗竭[55]。线粒体这种功能障碍的特征在 T2DM 和 PD 中共同存在，因此近几年来，大量研究探讨了 T2DM 与 PD 风险之间的关联，这些研究都表明患有 T2DM 会使 PD 患病风险增加。例如，英国一项大型研究表明，T2DM 使 PD 患病风险增加 32%[56]；2016 年发表的一项荟萃分析得出的结论是，T2DM 患者发生 PD 的风险相较于健康受试者平均高出 28%[57]。胰岛素受体在基底神经节和黑质中都有表达，这也是 PD 患者大脑中受影响最严重的区域。在 PD 中，胰岛素信号传导的功能失调会增加氧化应激，而最近的一项研究表明，糖尿病模型（*db*/*db*）小鼠的慢性 IR 可导致线粒体破坏和多巴胺能神经元变性[58]。线粒体蛋白在功能失调时会增加氧化应激和细胞死亡。虽然与 T2DM 相关的线粒体功能障碍和氧化应激导致 PD 的确切机制仍不确定，但其可能在 PD 发病机制中具有重要作用。正电子发射型计算机断层显像扫描结果显示，早期 PD 患者的尾状核和小脑内的细胞也表现出血糖值异常，磷酸戊糖途径相关的葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶含量下降以及线粒体功能障碍[59-60]。糖酵解的增加可以在一定程度上缓解由线粒体功能障碍引起的能量衰竭和多巴胺能细胞的死亡[61]。最近研究发现糖酵解与 PD 之间的联系是磷酸甘油酸激酶 1（PGK1），这是糖酵解途径中第一个产生 ATP 的酶，其缺乏与帕金森综合征有关[62]。尽管神经元上调糖酵解的能力有限，但也提示我们可以通过人为药理干预刺激增强糖酵解增加 ATP 的产生，这可能对于早期 PD 有缓解和治疗的作用。同时，鉴于 T2DM 与 PD 潜在的共同疾病机制，临床试验正在研究使用已被批准用于针对 IR 的糖尿病药物治疗 PD。

3.3　HD

HD 或称亨廷顿舞蹈病，是一种常见的显性遗传的 NDs，最主要的症状为不自主的运动，是由亨廷顿蛋白（HTT）基因 N 末端的聚谷氨酰胺束的不稳定扩张引起的。除了神经系统症状外，HD 患者还面临一个相当严重的状况——尽管持续地摄入热量，体重却明显减轻[63]。这是糖代谢改变与 HD 发病机制相关联的第一个迹象。在参

与葡萄糖受体易位到细胞膜的成分中，液泡分拣因子控制不同细胞区室的蛋白质分选，包括高尔基体和细胞膜之间的运输。在血液中释放激素后，胰岛素易位到分泌途径是在分类蛋白的帮助下发挥的细胞作用[64]。HTT 影响糖尿病表型的首例报道是在 1972 年，当时观察发现 HD 患者 T2DM 患病率更高[65]。这一观察结果后来得到了支持，在随后的一段时间内，大量的流行病学研究都证明了 HD 患者糖耐量受损和糖尿病的患病率更高[66-69]。一些证据表明，HD 患者的能量代谢障碍是由脑葡萄糖摄取缺陷引起的[70-71]。在小鼠模型中，HD 模型小鼠胚胎皮质神经元吸收的葡萄糖已被证明明显少于野生型小鼠神经元[72]。据报道，与非 HD 对照相比，晚期 HD 患者死后尾状核和大脑皮层区域细胞膜中 GLUT1 和 GLUT3 的数量显著减少：在晚期 HD 患者尾状核中，GLUT1 和 GLUT3 的数量对比非 HD 对照均有显著降低[73]。现有研究表明，早期 HD 患者大脑中葡萄糖代谢处于较低水平，且随着病情发展逐渐降低。Naser 等[74]发现 HD 模型小鼠表现出糖酵解水平降低和乳酸产生增加以及线粒体功能的改变，伴随着氧化磷酸化受损，并且在大脑和外周组织中存在 ATP 耗竭。与其他 NDs 一样，HD 的发生发展过程中也存在线粒体肿胀、氧化应激以及轴突运输受损等病理过程，可能是由线粒体功能障碍和 ATP 生成受损引起的[75]。近年的研究表明 AMPK 已显示出作为 HD 药物靶标的潜力，因为它的激活可增加 HD 体外和体内模型中神经元的存活率和 HTT 清除率[76]。在发生脑内实质性功能改变和细胞死亡之前诱导 AMPK 激活，可以观察到神经保护作用[77]。总体而言，这些发现表明线粒体障碍和代谢缺陷发生在出现明显病理症状之前，并且在 HD 发病机制中起重要作用，尽管这些变化最初是补偿性的，但最终会导致一系列神经退行性病变的事件[78]。Dubinsky 等[79]的研究证明，磷酸戊糖途径的限速酶——葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶的过表达既延长了 HD 果蝇的寿命，又改善了 HD 果蝇的眼神经变性，并增强了果蝇对氧化应激的耐受性。HD 果蝇的生物能量缺陷可以通过增强葡萄糖摄取来改善，糖酵解和磷酸戊糖途径的相应增加似乎在这种有益效果中发挥了作用。因此，HD 大脑中的主要能量缺陷可能不是线粒体电子传递链或氧化磷酸化障碍，而是由于葡萄糖摄取受损及其通过糖酵解和磷酸戊糖途径的通量减少，这种通量减少则限制了 NADPH 生成并减少了抗氧化保护所需的谷胱甘肽产生[29]。然而，目前对糖尿病与 HD 之间确切的发病机制关联研究较少，直到最近才发现，星形胶质细胞代谢从糖酵解到脂肪酸氧化以及随后产生的氧化应激的纹状体特异性重编程可能会驱动 HD 发病机制[80-82]。这些研究表明，星形胶质细胞的缺陷可能是 HD 发病机制的关键，而不是神经元代谢的缺陷。关于 HD 影响细胞内葡萄糖转运的因素和机制则缺乏直接的证据，还需要对特征明确的病例进行额外的病理病学研究，以进一步确定 HD 与葡萄糖代谢改变或糖尿病之间的联系。

3.4　ALS

ALS 又称渐冻症，其特征是运动神经元的选择性老化和丧失，最终导致瘫痪和死亡。生物能量应激是 ALS 的病理生理学特征。一项针对散发性 ALS 患者在葡萄糖负荷后体内葡萄糖稳态的研究指出，与对照组相比，ALS 患者在摄入葡萄糖后表现出血糖和血清胰岛素水平显著增加，表明 IR 和葡萄糖耐受不良与 ALS 密切相关[83]。据报道，ALS 患者通常具有低体质量指数、高代谢率、高线粒体聚集的特征，同时普遍患有低脂血症[84-86]。这种异常的持续高代谢状态使得 ALS 患者脑内神经元对能量的需求极大。当脑内糖代谢不能产生足够的 ATP 以满足其巨大的能量需求时，神经元可能会消耗包裹在神经元轴突外的髓鞘来弥补，进一步导致突触结构的损坏，从而导致突触间兴奋的异常传递。在 Cu/Zn 超氧化物歧化酶 1-G93A 突变转基因小鼠 ALS 模型中，[^{14}C]-2- 脱氧葡萄糖放射自显影显示，皮质脊髓和球脊髓运动束的葡萄糖利用受损[87]。两项大规模的研究发现，与健康对照组相比，ALS 患者整个大脑皮层的葡萄糖代谢减退[88-89]。在 ALS 中，三羧酸循环的减少导致糖酵解的损伤，其特征是氧化磷酸化和 ATP 生成减少[90]。葡萄糖利用受损会导致葡萄糖来源的乙酰辅酶 A 水平降低，柠檬酸的生成随之减少，丙酮酸脱氢酶激酶（pyruvate dehydrogenase kinase，PDK）和乳酸脱氢酶 A 水平增加。高水平的 PDK 和乳酸脱氢酶 A 减少了线粒体氧化磷酸化和活性氧的产生，以维持 ATP 水平[91]。而与之相对的，二氯乙酸（一种 PDK 抑制剂）通过改善 hSOD1G39A 大鼠模型星形胶质细胞的三羧酸循环和线粒体代谢，促进葡萄糖氧化，增加了大鼠存活率[90]。此外，FDA 批准的一种治疗 ALS 的药物利鲁唑被发现通过增加葡萄糖转

运蛋白向质膜的易位来增加大鼠大脑和运动神经元样细胞的葡萄糖代谢[89，92]。而统计发现，伴有高脂血症的 ALS 患者生存预后较一般 ALS 患者更好，疾病进展相对缓慢[93]，提示我们可以通过人为营养干预策略有计划地增加 ALS 患者糖脂摄入，可能可以达到保护脑内突触结构，延缓 ALS 疾病进展的目的。总的来说，这些研究表明 ALS 中脑葡萄糖代谢显著异常，增强脑葡萄糖代谢可能是一种可行的治疗方法。可惜的是，糖尿病和 ALS 之间的实际临床和病理生理相关性尚不清楚，目前的研究多为流行病学调查及两者发病相关程度研究，证据表明 T2DM 虽然是 ALS 的风险因素，但也能延缓 ALS 进程[94-95]。综上所述，ALS 中的这些代谢变化是代偿性还是致病作用仍然需要进一步研究。然而，通过靶向糖酵解，提供葡萄糖的替代能量底物和恢复线粒体生物发生来提高代谢能力可能是 ALS 的有希望的治疗方案。

4 结语与展望

T2DM 与 NDs 都是目前难以治愈的广发性慢性疾病，两者早期均无明显症状，因此容易被人们忽略，而出现明显症状时病程已经发展较久，使治疗难度和成本大大提升。两者的发病机制都未明确，目前发现的许多病因也亟需更加明确的证据支持，亟待科研工作者进一步研究。本文结合此前已有研究介绍了 T2DM 患者体内出现的糖代谢改变情况，包括外周系统和中枢系统，并介绍了由于糖代谢改变而引起神经系统能量代谢异常这一 NDs 目前受到广泛关注的一条可能的发病机制，可为后续 T2DM 与 NDs 的关联研究提供参考。此外，这两种疾病目前的临床用药仅局限于降低血糖和改善认知功能等方向，仍需要在进一步明确病因后针对发病机制进行深入研究，发现新的靶点，开发更有效的药物。

参考文献

[1] Kubis-Kubiak A，Dyba A，Piwowar A. The interplay between diabetes and Alzheimer’s disease-in the hunt for biomarkers [J]. Int J Mol Sci，2020，21（8）：2744.

[2] Moran C，Phan TG，Chen J，et al. Brain atrophy in type 2 diabetes：regional distribution and influence on cognition [J]. Diabetes Care，2013，36（12）：4036-4042.

[3] Reijmer YD，Brundel M，De Bresser J，et al. Microstructural white matter abnormalities and cognitive functioning in type 2 diabetes：a diffusion tensor imaging study [J]. Diabetes Care，2013，36（1）：137-144.

[4] Cummings J. Disease modification and Neuroprotection in neurodegenerative disorders [J]. Transl Neurodegener，2017，6：25.

[5] Pihlstrom L，Wiethoff S，Houlden H. Genetics of neurodegenerative diseases：an overview [J]. Handb Clin Neurol，2017，145：309-323.

[6] Wu WJ，Qiu J，Wang A，et al. Impact of whole cereals and processing on type 2 diabetes mellitus：a review [J]. Crit Rev Food Sci Nutr，2020，60（9）：1447-1474.

[7] Ma Q，Li Y，Li P，et al. Research progress in the relationship between type 2 diabetes mellitus and intestinal flora [J]. Biomed Pharmacother，2019，117：109138.

[8] Jarosz-Popek J，Wolska M，Gasecka A，et al. The importance of non-coding RNAs in neurodegenerative processes of diabetes-related molecular pathways [J]. J Clin Med，2020，10（1）：9.

[9] Zhao PH，Zhang P，Lee JT，et al. The prevalence of metabolic disease multimorbidity and its associations with spending and health outcomes in middle-aged and elderly Chinese adults [J]. Front Public Health，2021，9：658706.

[10] Lee JE，Shin DW，Han K，et al. Changes in metabolic syndrome status and risk of dementia [J]. J Clin Med，2020，9（1）：122.

[11] Calvo-Ochoa E，Arias C. Cellular and metabolic alterations in the hippocampus caused by insulin signalling dysfunction and its association with cognitive impairment during aging and Alzheimer’s disease：studies in animal models [J]. Diabetes Metab Res Rev，2015，31（1）：1-13.

[12] Pedditzi E，Peters R，Beckett N. The risk of overweight/obesity in mid-life and late life for the development of dementia：a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies [J]. Age Ageing，2016，45（1）：14-21.

[13] Stillman CM，Weinstein AM，Marsland AL，et al. Body-brain connections：the effects of obesity and behavioral interventions on neurocognitive aging [J]. Front Aging Neurosci，2017，9：115.

[14] Ribeiro M，Castelhano J，Petrella LI，et al. High-fat diet induces a neurometabolic state characterized by changes in glutamate and *N*-acetylaspartate pools associated with early glucose intolerance：an in vivo multimodal MRI study [J]. J Magn Reson Imaging，2018，48（3）：757-766.

[15] Ripley EM，Clarke GD，Hamidi V，et al. Reduced skeletal muscle phosphocreatine concentration in type 2 diabetic patients：a quantitative image-based phosphorus-31 MR spectroscopy study [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab，2018，315（2）：E229-E239.

[16] Suarez RK. Energy and metabolism [J]. Compr Physiol，2012，2（4）：2527-2540.

[17] Judge A，Dodd MS. Metabolism [J]. Essays Biochem，2020，64（4）：607-647.

[18] Zhao J，Wang ZY，Li J，et al. Influence of diabetes mellitus on energy metabolism in patients with alcoholic liver cirrhosis [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol，2020，32（1）：110-115.

[19] Wang M，Wang XC，Zhao L，et al. Oligonucleotide

microarray analysis reveals dysregulation of energy-related metabolism in insulin-sensitive tissues of type 2 diabetes patients [J]. Genet Mol Res，2014，13（2）：4494-504.

[20] Mediani A，Abas F，Maulidiani M，et al. Metabolomic analysis and biochemical changes in the urine and serum of streptozotocin-induced normal-and obese-diabetic rats [J]. J Physiol Biochem，2018，74（3）：403-416.

[21] Rossetti L，Giaccari A. Relative contribution of glycogen synthesis and glycolysis to insulin-mediated glucose uptake. A dose-response euglycemic clamp study in normal and diabetic rats [J]. J Clin Invest，1990，85（6）：1785-1792.

[22] Chen WJ，Yin HX，Zhang N，et al. Changes of resting energy expenditure in type 2 diabetes rats after Roux-en-Y gastric bypass [J]. Obes Surg，2020，30（8）：2994-3000.

[23] Mergenthaler P，Lindauer U，Dienel GA，et al. Sugar for the brain：the role of glucose in physiological and pathological brain function [J]. Trends Neurosci，2013，36（10）：587-597.

[24] Chen ZC，Zhong CJ. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism：implications for diagnostic and therapeutic strategies [J]. Prog Neurobiol，2013，108：21-43.

[25] Biessels GJ，Staekenborg S，Brunner E，et al. Risk of dementia in diabetes mellitus：a systematic review [J]. Lancet Neurol，2006，5（1）：64-74.

[26] Anandhan A，Jacome MS，Lei S，et al. Metabolic dysfunction in Parkinson's disease：bioenergetics，redox homeostasis and central carbon metabolism [J]. Brain Res Bull，2017，133：12-30.

[27] Butterfield DA，Halliwell B. Oxidative stress，dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease [J]. Nat Rev Neurosci，2019，20（3）：148-160.

[28] Bauernfeind AL，Barks SK，Duka T，et al. Aerobic glycolysis in the primate brain：reconsidering the implications for growth and maintenance [J]. Brain Struct Funct，2014，219（4）：1149-1167.

[29] Tang BL. Glucose，glycolysis，and neurodegenerative diseases [J]. J Cell Physiol，2020，235（11）：7653-7662.

[30] Havrankova J，Roth J，Brownstein MJ. Concentrations of insulin and insulin receptors in the brain are independent of peripheral insulin levels. Studies of obese and streptozotocin-treated rodents [J]. J Clin Invest，1979，64（2）：636-642.

[31] Cardoso S，Moreira PI. Diabesity and brain disturbances：a metabolic perspective [J]. Mol Aspects Med，2019，66：71-79.

[32] Blazquez E，Hurtado-Carneiro V，Lebaut-Ayuso Y，et al. Significance of brain glucose hypometabolism，altered insulin signal transduction，and insulin resistance in several neurological diseases [J]. Frontiers in Endocrinology，2022，13：873301.

[33] Garcia-Serrano AM，Duarte JMN. Brain metabolism alterations in type 2 diabetes：what did we learn from diet-induced diabetes models? [J]. Front Neurosci，2020，14：229.

[34] Lau A，So RWL，Lau HHC，et al. alpha-Synuclein strains target distinct brain regions and cell types [J]. Nat Neurosci，2020，23（1）：21-31.

[35] Ossenkoppele R，Pijnenburg YAL，Perry DC，et al. The behavioural/dysexecutive variant of Alzheimer's disease：clinical，neuroimaging and pathological features [J]. Brain，2015，138：2732-2749.

[36] Kelliny S，Lin LY，Deng I，et al. A new approach to model sporadic Alzheimer's disease by intracerebroventricular streptozotocin injection in APP/PS1 mice [J]. Mol Neurobiol，2021，58（8）：3692-3711.

[37] Verkhratsky A，Nedergaard M. Physiology of astroglia [J]. Physiol Rev，2018，98（1）：239-389.

[38] Fernandez AM，Hernandez-Garzon E，Perez-Domper P，et al. Insulin regulates astrocytic glucose handling through cooperation with IGF-I [J]. Diabetes，2017，66（1）：64-74.

[39] Johnson ECB，Dammer EB，Duong DM，et al. Large-scale proteomic analysis of Alzheimer's disease brain and cerebrospinal fluid reveals early changes in energy metabolism associated with microglia and astrocyte activation [J]. Nat Med，2020，26（5）：769-780.

[40] Carter SF，Herholz K，Rosa-Neto P，et al. Astrocyte biomarkers in Alzheimer's disease [J]. Trends Mol Med，2019，25（2）：77-95.

[41] Olsson B，Lautner R，Andreasson U，et al. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease：a systematic review and meta-analysis [J]. Lancet Neurol，2016，15（7）：673-684.

[42] Wang QZ，Yuan J，Yu ZY，et al. FGF21 attenuates high-fat diet-induced cognitive impairment via metabolic regulation and anti-inflammation of obese mice [J]. Mol Neurobiol，2018，55（6）：4702-4717.

[43] Cabezas-Opazo FA，Vergara-Pulgar K，Perez MJ，et al. Mitochondrial dysfunction contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Oxid Med Cell Longev，2015，2015：509654.

[44] Solanki I，Parihar P，Shetty R，et al. Synaptosomal and mitochondrial oxidative damage followed by behavioral impairments in streptozotocin induced diabetes mellitus：restoration by Malvastrum tricuspidatum [J]. Cell Mol Biol（Noisylegrand），2017，63（7）：94-101.

[45] Zhang SY，Zhao J，Quan ZZ，et al. Mitochondria and other organelles in neural development and their potential as therapeutic targets in neurodegenerative diseases [J]. Front Neurosci，2022，16：853911.

[46] Cheng KK，Lam KS，Wang B，et al. Signaling mechanisms underlying the insulin-sensitizing effects of adiponectin [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab，2014，28（1）：3-13.

[47] Caberlotto L，Nguyen TP，Lauria M，et al. Cross-dis-

ease analysis of Alzheimer's disease and type-2 diabetes highlights the role of autophagy in the pathophysiology of two highly comorbid diseases [J]. Sci Rep，2019，9（1）：3965.

[48] Oh TS，Cho H，Cho JH，et al. Hypothalamic AMPK-induced autophagy increases food intake by regulating NPY and POMC expression [J]. Autophagy，2016，12（11）：2009-2025.

[49] Dyck JR，Lopaschuk GD. AMPK alterations in cardiac physiology and pathology：enemy or ally? [J]. J Physiol，2006，574（Pt 1）：95-112.

[50] Gupta A，Bisht B，Dey CS. Peripheral insulin-sensitizer drug metformin ameliorates neuronal insulin resistance and Alzheimer's-like changes [J]. Neuropharmacology，2011，60（6）：910-920.

[51] Chhunchha B，Kubo E，Singh DP. Obligatory role of AMPK activation and antioxidant defense pathway in the regulatory effects of metformin on cellular protection and prevention of lens opacity [J]. Cells，2022，11（19）：3021.

[52] Chen MX，Huang NQ，Liu J，et al. AMPK：a bridge between diabetes mellitus and Alzheimer's disease [J]. Behav Brain Res，2021，400：113043.

[53] Maiti P，Manna J，Dunbar GL. Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease：targets for potential treatments [J]. Transl Neurodegener，2017，6：28.

[54] Kalia LV，Lang AE. Parkinson's disease [J]. Lancet，2015，386（9996）：896-912.

[55] Onyango IG，Bennett JP，Stokin GB. Regulation of neuronal bioenergetics as a therapeutic strategy in neurodegenerative diseases [J]. Neural Regen Res，2021，16（8）：1467-1482.

[56] de Pablo-Fernandez E，Goldacre R，Pakpoor J，et al. Association between diabetes and subsequent Parkinson disease：a record-linkage cohort study [J]. Neurology，2018，91（2）：e139-e142.

[57] Yue XJ，Li HH，Yan HQ，et al. Risk of Parkinson disease in diabetes mellitus：an updated meta-analysis of population-based cohort studies [J]. Medicine（Baltimore），2016，95（18）：e3549.

[58] Kao YC，Wei WY，Tsai KJ，et al. High fat diet suppresses peroxisome proliferator-activated receptors and reduces dopaminergic neurons in the substantia nigra [J]. Int J Mol Sci，2019，21（1）：207.

[59] Ullah R，Khan M，Shah SA，et al. Natural antioxidant anthocyanins-a hidden therapeutic candidate in metabolic disorders with major focus in neurodegeneration [J]. Nutrients，2019，11（6）：1195.

[60] Camandola S，Mattson MP. Brain metabolism in health，aging，and neurodegeneration [J]. EMBO J，2017，36（11）：1474-1492.

[61] Smith AM，Depp C，Ryan BJ，et al. Mitochondrial dysfunction and increased glycolysis in prodromal and early Parkinson's blood cells [J]. Mov Disord，2018，33（10）：1580-1590.

[62] Sakaue S，Kasai T，Mizuta I，et al. Early-onset parkinsonism in a pedigree with phosphoglycerate kinase deficiency and a heterozygous carrier：do PGK-1 mutations contribute to vulnerability to parkinsonism? [J]. NPJ Parkinsons Dis，2017，3：13.

[63] Morea V，Bidollari E，Colotti G，et al. Glucose transportation in the brain and its impairment in Huntington disease：one more shade of the energetic metabolism failure? [J]. Amino Acids，2017，49（7）：1147-1157.

[64] Kebede MA，Oler AT，Gregg T，et al. SORCS1 is necessary for normal insulin secretory granule biogenesis in metabolically stressed beta cells [J]. J Clin Invest，2014，124（10）：4240-4256.

[65] Podolsky S，Leopold NA，Sax DS. Increased frequency of diabetes mellitus in patients with Huntington's chorea [J]. Lancet，1972，1（7765）：1356-1358.

[66] Montojo MT，Aganzo M，Gonzalez N. Huntington's disease and diabetes：chronological sequence of its association [J]. J Huntingtons Dis，2017，6（3）：179-188.

[67] Yelam A，Nagarajan E，Digala LP，et al. Hyperglycaemic chorea-ballism or unmasking of Huntington's chorea in a patient with diabetes [J]. BMJ Case Reports，2020，13（3）：e232726.

[68] Chaves G，Stanley J，Pourmand N. Mutant huntingtin affects diabetes and Alzheimer's markers in human and cell models of Huntington's disease [J]. Cells，2019，8（9）：962.

[69] Montojo MT，Aganzo M，Gonzalez N. Huntington's disease and diabetes：chronological sequence of its association [J]. J Huntingtons Dis，2017，6（3）：179-188.

[70] Powers WJ，Videen TO，Markham J，et al. Selective defect of in vivo glycolysis in early Huntington's disease striatum [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2007，104（8）：2945-2949.

[71] Adanyeguh IM，Rinaldi D，Henry PG，et al. Triheptanoin improves brain energy metabolism in patients with Huntington disease [J]. Neurology，2015，84（5）：490-495.

[72] Russo CV，Salvatore E，Sacca F，et al. Insulin sensitivity and early-phase insulin secretion in normoglycemic Huntington's disease patients [J]. J Huntingtons Dis，2013，2（4）：501-507.

[73] Li L，Sun Y，Zhang YN，et al. Mutant huntingtin impairs pancreatic beta-cells by recruiting IRS-2 and disturbing the PI3K/AKT/FoxO1 signaling pathway in Huntington's disease [J]. J Mol Neurosci，2021，71（12）：2646-2658.

[74] Naseri NN，Xu H，Bonica J，et al. Abnormalities in the tricarboxylic Acid cycle in Huntington disease and in a Huntington disease mouse model [J]. J Neuropathol Exp Neurol，2015，74（6）：527-537.

[75] Cherubini M，Lopez-Molina L，Gines S. Mitochondrial fission in Huntington’s disease mouse striatum disrupts ER-mitochondria contacts leading to disturbances in Ca^{2+} efflux and reactive oxygen species（ROS）homeostasis [J]. Neurobiol Dis，2020，136：104741.

[76] Vazquez-Manrique RP，Farina F，Cambon K，et al. AMPK activation protects from neuronal dysfunction and vulnerability across nematode，cellular and mouse models of Huntington’s disease [J]. Hum Mol Genet，2016，25（6）：1043-1058.

[77] Parker JA，Arango M，Abderrahmane S，et al. Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons [J]. Nat Genet，2005，37（4）：349-350.

[78] Jadiya P，Garbincius JF，Elrod JW. Reappraisal of metabolic dysfunction in neurodegeneration：focus on mitochondrial function and calcium signaling [J]. Acta Neuropathol Commun，2021，9（1）：124.

[79] Dubinsky JM. Towards an understanding of energy impairment in Huntington’s disease brain [J]. J Huntingtons Dis，2017，6（4）：267-302.

[80] Polyzos AA，Lee DY，Datta R，et al. Metabolic reprogramming in astrocytes distinguishes region-specific neuronal susceptibility in huntington mice [J]. Cell Metab，2019，29（6）：1258-1273 e11.

[81] Meyer T，Shimon D，Youssef S，et al. NAD^{+} metabolism drives astrocyte proinflammatory reprogramming in central nervous system autoimmunity [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2022，119（35）：e2211310119.

[82] Singh A，Agrawal N. Metabolism in Huntington’s disease：a major contributor to pathology [J]. Metab Brain Dis，2022，37（6）：1757-1771.

[83] Joardar A，Manzo E，Zarnescu DC. Metabolic dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis：challenges and opportunities [J]. Curr Genet Med Rep，2017，5（2）：108-114.

[84] Allen SP，Duffy LM，Shaw PJ，et al. Altered age-related changes in bioenergetic properties and mitochondrial morphology in fibroblasts from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients [J]. Neurobiol Aging，2015，36（10）：2893-903.

[85] Dodge JC，Treleaven CM，Fidler JA，et al. Metabolic signatures of amyotrophic lateral sclerosis reveal insights into disease pathogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2013，110（26）：10812-10817.

[86] Vandoorne T，de Bock K，van Den Bosch L. Energy metabolism in ALS：an underappreciated opportunity? [J]. Acta Neuropathol，2018，135（4）：489-509.

[87] Kawada K，Iwamoto M，Sakai Y. Mechanisms underlying（18）F-fluorodeoxyglucose accumulation in colorectal cancer [J]. World J Radiol，2016，8（11）：880-886.

[88] Van Laere K，Vanhee A，Verschueren J，et al. Value of 18fluorodeoxyglucose-positron-emission tomography in amyotrophic lateral sclerosis：a prospective study [J]. JAMA Neurol，2014，71（5）：553-561.

[89] Nelson AT，Trotti D. Altered bioenergetics and metabolic homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis [J]. Neurotherapeutics，2022，19（4）：1102-1118.

[90] Valbuena GN，Rizzardini M，Cimini S，et al. Metabolomic analysis reveals increased aerobic glycolysis and amino acid deficit in a cellular model of amyotrophic lateral sclerosis [J]. Mol Neurobiol，2016，53（4）：2222-2240.

[91] Vallee A，Lecarpentier Y，Guillevin R，et al. Aerobic glycolysis in amyotrophic lateral sclerosis and Huntington’s disease [J]. Rev Neurosci，2018，29（5）：547-555.

[92] Daniel B，Green O，Viskind O，et al. Riluzole increases the rate of glucose transport in L6 myotubes and NSC-34 motor neuron-like cells via AMPK pathway activation [J]. Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener，2013，14（5-6）：434-443.

[93] Su WM，Cheng YF，Jiang Z，et al. Predictors of survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis：a large meta-analysis [J]. EBioMedicine，2021，74：103732.

[94] Vasta R，D’ovidio F，Logroscino G，et al. The links between diabetes mellitus and amyotrophic lateral sclerosis [J]. Neurol Sci，2021，42（4）：1377-1387.

[95] Guillot SJ，Bolborea M，Dupuis L. Dysregulation of energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis [J]. Curr Opin Neurol，2021，34（5）：773-780.

（收稿日期：2022-09-26；修回日期：2022-12-16）

三伏贴临床应用及新剂型研究进展

刘雨薇，姜海波，吕颖，廖威，李文晴，秦国昭，冯宇飞*（黑龙江中医药大学药学院，哈尔滨　150040）

摘要：三伏贴主要由白芥子、延胡索、细辛以及甘遂等药材组成，由于三伏贴可以治疗多种疾病，且不良反应较少，近年来受到广泛关注。三伏贴通过选取不同的穴位治疗不同疾病，主要包括支气管哮喘、变应性鼻炎、慢性支气管炎等疾病，但长期使用会产生皮肤损伤等不良反应，因此有研究人员制备了三伏贴的不同剂型以此来降低不良反应。本文在中国知网数据库中以“三伏贴治疗”为主题检索 2010—2022 年期间的相关文献，对三伏贴的临床应用和新剂型的研究进展进行整理和总结，旨在为三伏贴的进一步研究提供理论支持。

关键词：三伏贴；临床应用；新剂型；穴位

中图分类号：R28　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-0993-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.025

Research progress on the clinical application and new dosage forms of Sanfu plaster

LIU Yu-wei, JIANG Hai-bo, LYU Ying, LIAO Wei, LI Wen-qing, QIN Guo-zhao, FENG Yu-fei*
(*College of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin* 150040)

Abstract: Sanfu plaster is mainly composed of four herbs: *Semen Brassicae, Rhizoma Corydalis, Asarum,* and *Euphorbia Kansui*. Sanfu plaster has attracted much attention in recent years because it can treat a variety of diseases and has few adverse reactions. It is mainly used for different diseases. Such as bronchial asthma, allergic rhinitis, chronic bronchitis, and other diseases by selecting different acupoints. However, the long-term use of plaster may cause skin damage and other adverse reactions, so some scholars have prepared different dosage forms of Sanfu plaster to reduce the adverse reactions. Relevant literature was retrieved from CNKI database under the theme of “Sanfu plaster therapy” from 2010 to 2022, and the research progress in clinical application and new dosage forms of Sanfu plaster were sorted out and summarized, to provide theoretical support for further research.

Key words: Sanfu plaster; clinical application; new dosage form; acupoint

三伏贴又称白芥子散，其主要成分有延胡索、白芥子、细辛以及甘遂，临床应用时，各医家多凭经验而定，对药物的选择有一定的差异，且呈现多样化。白芥子散来源于清代张璐所著的《张氏医通》，细辛辛温香窜，性温而烈，内化寒饮，芳香开窍，通络止痛，与白芥子合用加强祛除寒痰伏饮之功效，共为君药；甘遂苦寒，有大毒，逐水饮，利大肠，宣肺气，为臣药；延胡索味辛气温，入血分、气分，能行血中气滞、气中血滞，专治一身上下诸痛，可佐助君臣之药行气散结化痰，亦可缓解君药白芥子发疱引起的疼痛，为佐药。麝香芳香开窍、引药入经，《本草纲目》云：“盖麝香走窜，能通诸窍之不利，开经络之壅遏”。生姜汁引药入脾肺经，并作为液体调和三伏贴诸药粉，共为使药[1]。

近年来，三伏贴由于其可以治疗多种疾病且不良反应较少，能明显减轻患者症状，具有使用方便、经济实惠等特点，被广泛应用于呼吸系统、运动系统以及消化系统疾病等方面。但其长时间

基金项目：国家自然科学基金面上项目（No.82174232）；黑龙江省自然科学基金优秀青年项目（No.YQ2019H031）；黑龙江中医药大学“优秀创新人才支持计划”项目（2018 年）；黑龙江省博士后研究人员落户黑龙江科研启动资助项目（2020 年）；国家自然科学基金青年项目（No.81703944）。

作者简介：刘雨薇，女，在读硕士研究生，主要从事中药新剂型和新技术研究，email：2381940549@qq.com　*通信作者：冯宇飞，女，教授，主要从事中药新剂型和新技术研究，email：fuf-002@163.com

贴敷导致部分患者皮肤出现水疱，水疱破裂后会使创面肿胀、渗液等，疼痛难忍[2]。因此，为了探索便于控制剂量且疗效更好的新剂型，研究人员在原方的基础上，制备新的剂型如凝胶膏剂等，具有较好的安全性，可减少对皮肤的刺激。本文主要对近年来三伏贴的临床应用以及新剂型的研究进展进行综述，以期为三伏贴的临床应用及新剂型的开发提供参考。

1　三伏贴临床应用研究

三伏贴在我国药用历史悠久且药理活性广泛，可以治疗人体支气管哮喘（bronchial asthma，BA）、变应性鼻炎（allergic rhinitis，AR）、慢性支气管炎（chronic bronchitis，CB）以及原发性痛经等疾病，由于其廉价易得、使用方便，深受广大患者的认可，现将三伏贴的临床应用进行概述。

1.1　BA

BA 是一种由多种炎症细胞与细胞因子共同参与的慢性变应性气道炎症，常伴有胸闷、气促等。BA 的发病机制尚不明确，但可概括为免疫 - 炎症机制、神经机制、气道高反应机制及其相互作用。其炎症反应主要是由多种炎症细胞、炎症介质以及细胞因子参与相互作用的结果，因发病机制复杂且有多因素参与的慢性疾病，临床上的治疗方法也不同[3-4]。刘阳等[5]对采用三伏贴治疗 BA 缓解期患者的通气功能进行临床观察，发现对缓解期患者的疗效较为明显，可减轻症状，缓解肺功能下降，降低死亡率。对缓解期的肺肾两虚证患者进行临床观察[6]，发现患者使用三伏贴后发作时胸闷、气喘等现象明显减轻。BA 也是儿童的常见疾病之一，任辉杰等[7]观察用三伏贴改善哮喘儿童阳虚证候的临床疗效，发现治疗后儿童的各症候的积分均较治疗前降低，BA 发作次数降低，发作程度减轻。妊娠期 BA 是目前医学界面临的一重大难题，对妇女和孩子都会产生影响[8-9]，研究发现三伏贴与布地奈德气雾剂联用治疗妊娠期 BA，可降低血清降钙素（PCT）、血清 C 反应蛋白（CRP）水平，提高血清 25- 羟维生素 D_3 和唾液中免疫球蛋白 A（SIgA）、褪黑素和皮质醇水平，使妊娠期 BA 得到有效控制[10]。杨明明等[11]观察三伏贴与糖皮质激素联合应用治疗儿童哮喘的临床疗效，发现其可提高免疫球蛋白 IgA、IgG 的水平，降低 IgE 水平。与针灸联用也可治疗 BA，药物通过刺激相应穴位，由经络内传直达病处，达到治病目的。将三伏贴与伏针闪罐联合治疗 BA，伏针、闪罐以及药物三者共同发挥作用可提高患者免疫力，缓解症状，其效果强于单独使用三伏贴[12]。督脉灸广泛用于慢性、虚寒性疾病的治疗，三伏贴与督脉灸联用治疗后患者的症状明显减轻且发病概率也降低，该治疗方法简单安全，使用方便，有良好的应用前景[13]。三伏贴治疗 BA 的穴位选取及用药组成如表 1 所示。

表 1　三伏贴治疗支气管哮喘的选取穴位及用药组成

Tab 1　Selection of acupoints and drug compositions for bronchial asthma with Sanfu plaster

治疗病症	选取穴位	选用药物	文献
缓解期的 BA	定喘、肺俞（双）、肾俞（双）、膈俞（双）、大椎、天突、膻中	白芥子、延胡索、细辛、甘遂、法半夏、肉桂、沉香、冰片、樟脑	[5]
缓解期的肺肾两虚证	双定喘、双肺俞、双脾俞、双肾俞、双大肠俞	白芥子、甘遂、细辛、延胡索、巴戟天、防风、五味子、冰片	[6]
哮喘儿童阳虚证	双肺俞、双心俞、双膈俞	白芥子、甘遂、细辛、延胡索、肉桂	[7]
与布地奈德气雾剂联用治疗妊娠期 BA	天突、大椎、肺俞（双侧）、脾俞（双侧）、肾俞（双侧）、定喘（双侧）、足三里（双侧）	白芥子、蜜麻黄、生姜	[10]
与糖皮质激素联用治疗儿童哮喘	大椎、定喘、肺俞、脾俞、肾俞	白芥子、延胡索、细辛、甘遂、冰片	[11]
与伏针闪罐联用治疗 BA	璇玑、定喘（双）、肺俞（双）、膈俞（双）、脾俞（双）、肾俞（双）	白芥子、元胡、细辛、甘遂、	[12]
与督脉灸联用治疗 BA	天突、大椎、肺俞（双）、膏肓（双）	熟附块、白芥子、巴戟天、丁香、细辛、补骨脂、麻黄	[13]

1.2　AR

AR 又称过敏性鼻炎，是一种由 IgE 介导的炎症性疾病，常伴随鼻塞、鼻痒以及连续性喷嚏等。近年来，AR 在我国部分城市发病率逐年增加，部分中心城市患病率高达 8% ～ 24.1%[14]，降低了人们幸福生活指数，存在诱发哮喘的危险。使用西药治疗 AR 疗程较长，经济压力大[15]。在中医学中将鼻鼽分为 4 型：肺气虚寒型，脾气虚弱型，肾阳亏虚型和肺经伏热型[16]。三伏贴穴位贴敷治疗 AR 的作用机制主要与细胞因子 IFN-γ 和白细胞介素（interleukin，IL）-4 有关，与 Th1/Th2 介导的上呼吸道非特异性炎症相关。

张红丽等[17]研究三伏贴治疗 AR 的疗效，并随访半年及一年后患者的复发率，发现患者视觉模拟量表（VAS）评分、体征评分等均降低，且再复发的概率降低。对于脾气虚弱型、肾阳亏虚型以及肺气虚寒型患者，比较治疗前后鼻塞等主要症状积分，分泌物等主要体征积分，发现均降低，其中肺气虚寒型患者采用三伏贴分穴治疗效果最为明显[18]。针对肺气虚寒型患者，黄琪等[16]选用三伏贴及三伏贴与艾灸相结合治疗 AR，发现两者对 AR 均有一定疗效，但三伏贴与艾灸相结合时需要延长使用周期。三伏贴与鼻敏方联合应用治疗肺气虚寒型 AR，对血清总 lgE、IL-4 以及 IL-17 水平进行测定，发现各因子水平明显降低，患者免疫力提高[19]。三伏贴与通窍鼻渊汤合用治疗儿童 AR，治疗后发现 IL-4、IL-5 水平降低，IL-10 水平升高，表明两药使用可有效减轻患者的炎症反应，改善患者的呼吸功能[20]。将内服辛夷散与外服三伏贴联用治疗小儿 AR，患者临床症状以及体征均得到明显改善[21]。陈东辉等[22]将薯蓣丸与三伏贴联合治疗小儿 AR，根据不同证型，选取对应的穴位，比较治疗前后各症状积分以及 VAS 评分，发现症状积分及 VAS 评分降低，患者鼻塞、鼻痒等症状得到改善。三伏贴与川椒方、辛芷滴鼻剂、针刺结合治疗 AR 也有显著疗效[23-25]。三伏贴治疗 AR 的穴位选取以及用药组成如表 2 所示。

表 2　三伏贴治疗变应性鼻炎的选取穴位及用药组成

Tab 2　Selection of acupoints and drug compositions for allergic rhinitis with Sanfu plaster

治疗病症	选取穴位	应用药物	文献
治疗脾气虚寒型 AR	三伏贴取穴：双侧肺俞、脾俞、肾俞、足三里，气海，关元 三伏贴＋艾灸：双侧肺俞、脾俞、肾俞，气海，关元	黄芪、附子、白芥子、延胡索、甘遂、细辛	[16]
穴位贴敷治疗 AR	主穴选取大椎、肺俞（双侧）、脾俞（双侧）、肾俞（双侧）；辨证属肺气虚者，加膻中、天突；脾气虚者，加足三里；肾气虚者，加膏肓、命门、涌泉	甘遂、细辛、延胡索、白芥子	[17]
治疗脾气虚弱型、肾阳亏虚型、肺气虚寒型 AR	脾气虚弱型：中脘、足三里、脾俞、大椎；肾阳亏虚型：关元、定喘、肾俞、百劳穴 肺气虚寒型：气海、风门、肺俞、合谷穴	黄芪、桂枝、麻黄、附子、白芥子、细辛、丁香、冰片	[18]
与鼻敏方治疗 AR	肺俞、大椎、风门	细辛、延胡索、甘遂、白芥子	[19]
与通窍鼻渊汤联用治疗儿童 AR	膏肓、膻中、大椎穴	延胡索、白芥子、甘遂、细辛	[20]
与辛夷散联用治疗小儿 AR	天突、肺俞、大椎、定喘、膈俞、脾俞、肾俞	生白芥子、元胡、细辛、麻黄、牵牛子、肉桂	[21]
与薯蓣丸治疗小儿 AR	主穴：大椎、双侧脾俞、肾俞及肺俞，肺气虚者加天突、膻中，脾气虚者加足三里，肾气虚者加命门、涌泉及膏肓	细辛、延胡索、甘遂、白芥子	[22]
与辛芷滴鼻剂治疗 AR	大椎、肺俞（双侧）、脾俞（双侧）、肾俞（双侧）	白芥子、细辛、甘遂、麝香	[23]
与川椒方联用治疗 AR	大椎、肺俞、膏肓、内关	白芥子、延胡索、甘遂、细辛、黄芩	[24]
与针刺联用治疗 AR	① 初伏：大杼，肺俞，脾俞；② 中伏：风门俞，厥阴俞，肾俞；③ 末伏：风门，膏肓，足三里	细辛、延胡索、甘遂、白芥子	[25]

1.3　CB

CB 是一种常见且多发性的慢性非特异性炎症疾病。由于致炎因子使呼吸道黏膜受损，腺体分泌增加，肺泡巨噬细胞的抗病能力下降，呼吸道防御功能下降后，再受到寒冷等刺激，导致 CB 的发作。因反复发作、病程长，免疫功能降低，后期可发展为阻塞性肺气肿等。三伏贴可通过直接或间接调节机体的细胞免疫和体液免疫，从而减少炎症因子的释放，达到治疗疾病的目的[26]。三伏贴与拔火罐结合可通过人体的血液循环直达病灶，减少不良反应的发生，提高治愈率[27]；对于风邪伏肺证 CB 患者，研究采用三伏贴与疏风清肺汤结合治疗，发现患者咳嗽、呼吸困难等症状消失时间缩短，CRP、IL-4、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）-α 水平降低，此法可有效减轻患者炎症反应，改善患者肺功能[28]。三伏贴可与苏子降气汤联合用于治疗 CB，两者联合应用可改善患者肺功能，且疗效也优于单独采用西医治疗[29]。三伏贴治疗 CB 的穴位选取以及用药组成如表 3 所示。

1.4　其他疾病

痛经是常见的妇科症状，分为原发性痛经和继发性痛经。三伏贴不仅可以治疗 BA、AR 等，还可以治疗原发性痛经等疾病。在盛夏季节，使用三伏贴治疗原发性痛经，疼痛症状减轻[30]；对于寒凝血瘀型痛经，采用三伏贴与督脉灸相结合治疗，

表 3　三伏贴治疗慢性支气管炎的选取穴位及用药组成

Tab 3　Selection of acupoints and drug compositions for chronic bronchitis with Sanfu plaster

治疗病症	选取穴位	应用药物	文献
三伏贴治疗 CB 临床观察	主穴取膻中、膏肓、肺俞，发作期加选天突、大椎、定喘，缓解期加脾俞、肾俞	白芥子、延胡索、细辛、白芷、甘遂	[26]
与拔火罐相结合治疗 CB	大椎、风门（双）、肺俞（双）、脾俞（双）、肾俞（双）、天突、膻中	黄芪、半夏、红花、白芥子、麝香、姜汁	[27]
与疏风清肺汤治疗风邪伏肺证 CB	肺俞、脾俞、肾俞、足三里、定喘、膻中、天突	将细辛、白芷、炙麻黄、洋金花、延胡索、白芥子	[28]
与苏子降气汤联合应用治疗 CB	肺俞、大椎、定喘、肾俞	白芥子、延胡索、细辛、甘遂、肉桂	[29]

对患者进行 VAS 评分以及痛经症状平均严重程度评估，发现其疗效优于口服益母草颗粒 [31]；钱山海等 [32] 采用三伏贴配合 TDP（神灯）照射治疗寒湿凝滞型原发性痛经，发现其可以改善局部微循环，促进人体新陈代谢，修复人体病变部位，从而达到治疗疾病的目的。

膝骨性关节炎（knee osteoarthritis，KOA）又称增生性膝关节炎、老年性膝关节炎，是一种慢性退行性疾病。该疾病多发于老年人群。浦建枫等 [33] 将患者分为三伏贴组和针刺组，进行为期 3 年的临床观察，结果发现随着时间的推移，三伏贴的临床疗效以及膝关节评分要优于针刺组，远期疗效明显；在治疗寒湿痹阻型 KOA 时，比较治疗前后 VAS 评分以及膝骨关节炎严重指数（ISOA）量表评分（ISOA 评分越高，KOA 越严重），结果显示各项评分均低于治疗前，具有很好的临床疗效 [34]。对肝肾亏虚证的 KOA 患者，在三伏天进行穴位贴敷，治疗结束后，观察患者治疗前后、冬季三九天的 VAS 评分以及日本膝关节骨关节炎功能评分量表（JKOM），发现各项评分均明显降低，且复发次数降低 [35]。三伏贴可与其他治疗手段合用治疗 KOA，如臭氧（通过注射作用于病变部位，改善局部微循环，达到治疗疾病的效果），测定治疗前后五周膝关节液中 IL-1β、TNF-α、基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase，MMP）-13 的含量以及膝部疼痛 VAS 评分，发现测量结果均低于治疗前，表明此法可以有效抑制炎症反应，提高患者生活质量 [36]；三伏贴与独活寄生汤联合治疗 KOA，可减轻患者的疼痛感，有效抑制病情恶化，促进膝骨关节功能恢复 [37]。

慢性阻塞性肺疾病（chronic obstructive pulmonary disease，COPD）是一种常见的以气流受限为特征的可预防和治疗的慢性呼吸系统疾病，临床表现为咳嗽、气促、喘息等。目前西医治疗 COPD 稳定期主要采用药物治疗、透气支持、氧疗等。但病程较长，治疗价格昂贵。采用三伏贴治疗可有效改善微循环，抑制血栓的形成，减轻患者症状，减少发作次数，提高生命质量。研究表明穴位贴敷可能通过神经 - 炎症 - 免疫系统及神经 - 内分泌 - 免疫系统的调节，降低体内炎性反应，减少 COPD 急性发作次数 [38]。秦莹等 [39] 观察三伏贴用于治疗 COPD 稳定期的临床疗效，发现治疗后患者的 IgA、IgM、TNF-α 水平降低，白细胞、谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）变化不明显，证明此法用药安全，不影响患者的肝功能以及血常规；IL-8 及 TNF-α 因子水平显著降低，急性发作次数减少 [40]。将三伏贴与宁肺合剂治疗 COPD 稳定期临床疗效并持续观察治疗后一年及两年后患者身体各项指标，治疗后患者的体质量指数增加，肺功能得到改善，呼吸困难等级降低，且患者肝肾功能指标也正常，无不良反应发生 [41]。针对肺肾两虚型 COPD 患者，孙义田等 [42] 采用三伏贴与肺肾双补膏联用治疗疾病，通过观察治疗前后患者 IL-8 水平及 T 淋巴细胞亚群 CD_4^+、CD_8^+、CD_4^+/CD_8^+，发现 IL-8 水平及 CD_8^+ 均较治疗前降低，CD_4^+ 及 CD_4^+/CD_8^+ 升高，发现其可调节机体免疫功能，减少发作次数。三伏贴治疗其他疾病的穴位选取以及用药组成如表 4 所示。

综上，三伏贴可以治疗 BA、AR、KOA、CB、类风湿关节炎以及原发性痛经等。针对不同疾病，选用的穴位也各不相同，如对于治疗 BA、CB 等，主穴选取肺俞、脾俞以及肾俞等；根据不同疾病加减药物，但仍以白芥子、延胡索、细辛以及甘遂为主，这也与组方的君臣佐使一致。

2　三伏贴新剂型研究概况

长时间贴敷会对皮肤造成损伤 [43]，产生瘢痕，导致患者难以接受。为了更好地发挥三伏贴的临床药效，减少对皮肤的损伤。近年来，研究了新剂型如凝胶膏剂、贴剂等。相较于传统的三伏贴，上述剂型具有较好的安全性，可减少药物对皮肤的刺激。

2.1　凝胶膏剂

凝胶膏剂是以提取物、饮片或化学药物与适宜的亲水性基质混匀后，涂布于背衬材料上制成

表 4　三伏贴治疗其他疾病的选取穴位以及用药组成

Tab 4　Selection of acupoints and drug compositions for other diseases with Sanfu plaster

临床应用	选取穴位	应用药物	文献
治疗原发性痛经	气海、关元、神阙、子宫穴、三阴交、足三里、肾俞	川芎、炒白芥子、干姜、细辛、当归、延胡索、吴茱萸、艾叶	[30]
与督脉灸治疗寒凝血淤型痛经	神阙、关元、两侧三阴交腧穴	延胡索、白芥子、肉桂、细辛	[31]
TDP 照射治疗寒湿凝滞型原发性痛经	关元、气海、神阙及双侧子宫	延胡索、炒白芥子、细辛、肉桂、当归	[32]
治疗 KOA	犊鼻、内膝眼、阳陵泉、鹤顶、阿是穴	细辛、白芥子、延胡索、牛膝、杜仲、独活	[33]
治疗寒湿痹阻型 KOA	双侧犊鼻、内膝眼、足三里	芥子、延胡索、细辛、肉桂、炮姜、防风、威灵仙、独活	[34]
治疗肝肾亏虚型 KOA	内膝眼（双侧）、犊鼻（双侧）、血海（双侧）、肝俞（双侧）、肾俞（双侧）	白芥子、牛膝、续断、狗脊、杜仲、海桐皮、威灵仙、伸筋草、透骨草、制草乌、艾叶、干姜、炮附子、红花、鸡血藤、土鳖虫、赤芍、防风、细辛、元胡、苏木	[35]
联合臭氧关节腔注射治疗 KOA 阳虚寒凝证	主穴：风市、膝髎、膝海；配穴：犊鼻、阳陵泉、血海、足三里、三阴交	白芥子、延胡索、甘遂、细辛、麝香、冰片、附子	[36]
联合独活寄生汤治疗 KOA	主穴：膝海、风市、膝髎；配穴：足三里、血海、三阴交、阳陵泉及犊鼻	延胡索、细辛、冰片、生白芥子、甘遂、附子、麝香	[37]
治疗 COPD	定喘（双侧）、肺俞（双侧）、膏肓（双侧）、天突	白芥子、延胡索、细辛、甘遂	[39]
	双侧肺俞、脾俞、肾俞	白芥子、延胡索、细辛、甘遂	[40]
	肺俞、脾俞、肾俞、定喘、大椎、天突	白芥子、细辛、甘遂、元胡	[41]
	天突、大椎、膻中、风门、定喘、肺俞、脾俞、肾俞	白芥子、细辛、甘遂	[42]

的贴膏剂。其适用性广、安全性高、生产符合环保要求。李文静等[43]在原有三伏贴的基础上，将其二次开发为凝胶膏剂，原处方药物组成有麻黄、延胡索、白芥子、细辛、干姜以及姜汁，对聚丙烯酸钠（NP-700）、甘油、甘羟铝:酒石酸、羧甲基纤维素钠这四个因素进行用量以及配比的筛选，最终得出（甘羟铝:酒石酸）：NP-700：甘油：CMC-Na ＝（1.2：1.2）：24：360：9 时，制备的凝胶膏剂涂展性好且黏附性也适当。用薄层色谱法对处方中的麻黄和延胡索进行定性鉴别，对芥子碱硫氰酸盐进行含量测定，麻黄和延胡索的斑点清晰，分离度较好，芥子碱硫氰酸盐线性关系良好，且在 24 h 内较稳定[44]。李晓屏[45]将白芥子、紫菀、麻黄、延胡索、肉桂、丁香、细辛以及甘遂这 8 味药材按一定比例制备成巴布剂治疗 BA 缓解期，治疗后患者的各项指标均得到改善，且对皮肤的刺激也较传统膏剂降低，有较好的应用前景。

2.2　膏剂

由于传统的膏剂缺乏质量控制，不同批次的药物的疗效以及对皮肤的刺激也不同，会影响患者的治疗过程。三伏贴的制备大多根据《张氏医通・诸气门》中的消喘膏加减药物而成，将白芥子、延胡索以及细辛等 9 味中药材按照一定的比例制备三伏贴膏剂，对白芥子和延胡索进行薄层色谱定性鉴别，结果显示该剂型不良反应少，安全性好，可广泛使用[46]。

2.3　贴剂

贴剂可延长药物作用时间，减少给药次数，减少胃肠给药副作用。贴剂可延长药物作用时间，减少给药次数，减少胃肠给药不良反应。将白芥子、延胡索、细辛、甘遂、麻黄按一定比例制备成贴剂，探究不同促渗剂对白芥子散贴剂体外透皮吸收效果的影响[47]，结果显示以 2% 氮酮为促渗剂时，白芥子散贴剂累积透过量最高。

2.4　涂膜剂

传统剂型携带不方便，对皮肤刺激性较大，因此进行了剂型改革。郭燕蓉等[48]开发了控哮涂膜剂，采用穿山龙、白芥子、麻黄、甘遂、细辛等提取物以及卡波姆等制成涂膜剂，涂在相应的穴位上，治疗后患者的肺功能得到改善；测得控哮涂膜剂中芥子碱硫氰酸盐的含量为 0.724 $mg \cdot mL^{-1}$[49]；并对其进行皮肤致敏性实验，发现对正常的皮肤无致敏性[50]。

2.5　分散片

为了满足现代临床需求，将三伏贴制备成外用分散片[51]，并对制剂所需药用辅料的种类和用量进行筛选。为保证制剂质量稳定，采用薄层色谱以及高效液相色谱法建立质量标准。最终优选的处方为白芥子、延胡索、甘遂以及细辛按 1：1：1：1 比例混合均匀，以 25% 微晶纤维素作为填充剂，16% 交联聚乙烯吡咯烷酮与 4% 交联羧甲基纤维素纳作为联合崩解剂，内外加入比

例为 5∶1，30% 乙醇溶液作为润湿剂，1% 微粉硅胶作为润滑剂时所制备的分散片硬度适中，崩解时间短，符合分散片的质量要求。以延胡索乙素以及细辛脂素为指标测定其含量，结果显示本品重复性、精密度以及线性关系良好；采用豚鼠和家兔对皮肤致敏性进行考察，发现其对皮肤的刺激性较小。

3　结语与展望

穴位贴敷疗法是中医治疗疾病的一种经典的“内病外治”方法。穴位贴敷疗法的经典范例为三伏贴，其在临床用于防治 BA 等病症的效果得到广泛认可，备受医家推崇和患者信赖。通过文献研究不难发现三伏贴药用历史悠久，药理活性广泛，近年来，已在临床上取得显著成就。但目前还存在以下几个问题：① 现有的研究成果多限于临床疗效的观察和经验总结；② 药理作用及作用机制的研究多集中在治疗 BA、AR 及 CB 方面，而对于其他病种的研究开展相对较少；③ 穴位选择不规范，同种疾病选用不同穴位或选穴太多；④ 应用的方药选择不固定，多为自拟方或经验方；⑤ 目前对于三伏贴及有效成分在 BA、AR 及 CB 等方面药理作用的研究大部分处于基础性研究阶段，缺乏相应的药理学通路等实验数据；⑥ 新剂型种类欠缺，多停留在实验室阶段，尚无经国家批准上市的产品，缺少产业化推广。基于此，因三伏贴的组方种类不完全一致，各组方成分的组成和含量不完全相同，应进行标准化组方的制订及制备方法的统一，并严格按照循证医学原则，规范临床应用并需对相应的作用机制进行深入研究；在注重验方基础上，未来应注重对更多新剂型品种的研究开发，借鉴现代透皮给药新技术、新方法，积极引进中药缓控释、智能化、靶向制剂等新剂型；寻找可替代三伏贴穴位贴敷传统透皮给药的一种有效的方式，为解决传统外用制剂的缺陷提供了新的研究思路，从而更好地对三伏贴的功效进行传递，对三伏贴这一传统的制剂进行传承，也是扩大三伏贴治疗疾病的关键一步。

参考文献

[1] 武德龚，付海申 . 冬病夏治三伏贴药理分析及临床应用研究 [J]. 中医临床研究，2015，7（29）：3.

[2] 闫俊丽，李晓东，陈燕清 . 三伏贴不良反应原因分析与防治措施 [J]. 中国疗养医学，2020，29（2）：176-178.

[3] 李政杰，陈杨，汤臣建，等 . 三伏贴治疗支气管哮喘机理探析 [J]. 亚太传统医药，2018，14（3）：58-60.

[4] 金耿，朱振刚 . 穴位贴敷治疗支气管哮喘研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报，2018，20（8）：173-176.

[5] 刘阳，刘锦红，屈亚静，等 . 三伏穴位贴敷法对支气管哮喘缓解期通气功能的临床疗效观察 [J]. 河北医药，2017，39（15）：2350-2352.

[6] 王洋，张罗丹，尚芳，等 . 冬病夏治三伏贴治疗支气管哮喘缓解期肺肾两虚证临床观察 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（20）：185-189.

[7] 任辉杰，黄超，陈丽亚，等 . 三伏贴改善哮喘儿童阳虚证候 137 例临床观察 [J]. 中医儿科杂志，2016，12（3）：32-34.

[8] Louik C，Schatz M，Hwenandez-Diaz S，et al. Asthma in pregnancy and its pharmacologic treatment [J]. Ann Allergy Asthma Immunol，2010，105（2）：110-117.

[9] Cleary BJ，Butt H，Strawbridge JD，et al. Medication use in early pregnancy-prevalence and determinants of use in a prospective cohort of women [J]. Pharmacoepidemiol Drug Saf，2010，19（4）：408-417.

[10] 田福玲，李旗，赵岩，等 . 三伏贴联合西药治疗妊娠期支气管哮喘慢性持续期 50 例临床观察 [J]. 中医杂志，2015，56（13）：1112-1115.

[11] 杨明明，卢慧娜，周瑜，等 . 冬病夏治三伏贴联合吸入糖皮质激素治疗儿童哮喘的疗效分析 [J]. 重庆医学，2020，49（3）：387-390.

[12] 张蒙惠，张蒙阁，吴振英，等 . 三伏贴联合伏针闪罐治疗支气管哮喘的临床观察 [J]. 中华针灸电子杂志，2020，9（2）：53-55.

[13] 许春秀，陈宝瑾，舒适 . 三伏贴联合督脉灸治疗支气管哮喘临床观察 [J]. 中医药通报，2018，17（6）：51-54.

[14] Yuan Z，Luo Z. Increasing prevalence of allergic rhinitis in China [J]. Allergy Asthma Immunol Res，2014，6（2）：105-113.

[15] Khli-Wiesner A，Stahlberger L，Bieli C，et al. Induction of specific immunotherapy with hymenoptera venoms using ultrarush regimen in children：safety and tolerance [J]. J Allergy（Cairo），2012，2012：790910.

[16] 黄琪，陈丽，陈瑞，等 . 冬病夏治法治疗肺气虚寒型过敏性鼻炎的临床研究 [J]. 中华中医药杂志，2018，33（5）：2189-2193.

[17] 张红丽，赵铭辉，胡烨涛，等 .“三伏天”穴位贴敷治疗变应性鼻炎疗效观察 [J]. 上海针灸杂志，2017，36（5）：588-593

[18] 汤志锋，谢玉贤，徐信仪，等 . 三伏贴辨证分穴贴敷治疗过敏性鼻炎临床观察 [J]. 中医临床研究，2019，11（2）：123-126.

[19] 王亚琴，葛灏，傅晓东 . 三伏贴敷联合鼻敏方治疗变应性鼻炎的疗效分析 [J]. 世界中医药，2020，15（24）：3822-3825.

[20] 王慧涛，郝巧茸，马静 . 三伏贴联合通窍鼻渊汤对过敏性鼻炎患儿呼吸功能及血清 IL-4、IL-5、IL-10 的影响分析 [J]. 贵州医药，2022，46（4）：621-622.

[21] 兰亚娟，张可训，相里小萌 . 三伏贴配合辛夷散治疗小儿过敏性鼻炎 30 例疗效观察 [J]. 临床医学研究与实践，2016，1（15）：109.

[22] 陈东晖，杨慧艳 . 薯蓣丸联合穴位贴敷治疗小儿过敏性鼻炎临床观察 [J]. 光明中医，2020，35（20）：3213-3215.

[23] 张秀利，刘蕊 . 辛芷滴鼻剂结合“三伏贴”治疗变应性鼻炎的临床研究 [J]. 新疆中医药，2016，34（4）：14-16.

[24] 黄丽，贺严，高健生 . 三伏贴配合川椒方治疗过敏性鼻炎的临床研究 [J]. 中国中医基础医学杂志，2018，24（10）：1465-1466，1483.
[25] 杨衍聚，汪胤，曾莹莹 . 三伏贴结合针刺治疗过敏性鼻炎的疗效观察 [J]. 内蒙古中医药，2018，37（9）：79-80.
[26] 李萍，王梅生 . 三伏贴治疗慢性支气管炎 200 例观察 [J]. 实用中医药杂志，2011，27（10）：711-712.
[27] 党秀芳 . 拔火罐结合三伏贴治疗慢性支气管炎 50 例疗效观察 [J]. 中国城乡企业卫生，2020，35（5）：142-143.
[28] 黄焰，翟晴晴，朱广军，等 . 疏风清肺汤联合三伏贴治疗慢性支气管炎风邪伏肺证疗效观察 [J]. 现代中西医结合杂志，2020，29（35）：3955-3958.
[29] 丁新华 . 苏子降气汤配合穴位贴敷治疗慢性支气管炎 60 例临床观察 [J]. 新中医，2015，47（6）：52-54.
[30] 王腊梅，王慧丹 . 三伏贴治疗原发性痛经的效果观察 [J]. 医学理论与实践，2020，33（7）：1139-1140.
[31] 冯雯，张彤，盖云 . 三伏贴联合督脉灸治疗寒凝血瘀型痛经临床疗效观察 [J]. 天津中医药，2017，34（9）：595-597.
[32] 钱山海，童丽芳，周寅，等 . 三伏贴配合 TDP 照射治疗寒湿凝滞型原发性痛经疗效观察 [J]. 上海针灸杂志，2015，34（11）：1067-1069.
[33] 浦建枫，曹晔 . 三伏贴治疗膝骨性关节炎疗效观察 [J]. 新中医，2015，47（9）：181-183.
[34] 王家莹，吴近珠，苏旻，等 . 三伏贴贴敷治疗寒湿痹阻型膝骨关节炎的临床观察 [J]. 中国民间疗法，2020，28（22）：43-46.
[35] 刘钊 . “三伏贴” 对肝肾亏虚型膝骨性关节炎的疗效观察 [D]. 哈尔滨：黑龙江中医药大学，2019.
[36] 林涛，郭艳幸，吴丽芳，等 . 三伏贴贴敷联合臭氧关节腔注射治疗膝骨关节炎阳虚寒凝证 [J]. 中医正骨，2021，33（7）：59-61.
[37] 刘园园 . 三伏贴联合独活寄生汤治疗膝骨关节炎的临床观察 [J]. 中国误诊学杂志，2020，15（11）：512-514.
[38] 康艳，李耀辉，刘伊莎 . 冬病夏治穴位贴敷治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期研究进展 [J]. 陕西中医药大学学报，2022，45（3）：120-123.
[39] 秦莹，金琦，陈超源 . 冬病夏治穴位敷贴治疗慢性阻塞性肺疾病的临床疗效及免疫机制研究 [J]. 上海中医药杂志，2017，51（S1）：55-59.
[40] 姚诗清，朱裕林，赵皓，等 . 三伏贴治疗稳定期慢性阻塞性肺疾病的疗效及对白细胞介素 -8、肿瘤坏死因子 -α 的影响 [J]. 中国老年学杂志，2016，36（8）：1912-1914.
[41] 于鸿，卢丽艳，赵辉，等 . 宁肺合剂联合三伏贴对慢性阻塞性肺部疾病 BODE 指数的影响 [J]. 世界中西医结合杂志，2015，10（9）：1271-1273.
[42] 孙义田，张丽，尹玉松，等 . 肺肾双补膏联合三伏贴对肺肾两虚型慢性阻塞性肺疾病稳定期患者白细胞介素 8 及 T 淋巴细胞亚群的影响 [J]. 河北中医，2018，40（9）：1301-1305.
[43] 李文静，赵锦涛，宫凯敏，等 . “三伏贴” 凝胶膏剂的制备 [J]. 中国民族民间医药，2020，29（19）：47-51.
[44] 刘军，王银洁，李文静，等 . 三伏贴凝胶膏剂质量标准研究 [J]. 云南中医学院学报，2016，39（3）：22-25.
[45] 李晓屏 . 巴布剂贴膏穴位贴敷冬病夏治支气管哮喘缓解期 100 例总结 [J]. 湖南中医杂志，2012，28（5）：95-97.
[46] 包泽明，韩标 . 三伏贴膏剂的制备工艺及质量控制探讨 [J]. 临床医药文献电子杂志，2019，6（86）：15-16.
[47] 白云凤，宫凯敏，王银洁，等 . 不同促渗剂对白芥子散贴剂体外透皮吸收效果的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2015，21（2）：30-32.
[48] 郭燕蓉，朱蔚，郑媛，等 . 控哮涂剂与传统三伏贴治疗支气管哮喘的疗效观察 [J]. 世界中医药，2010，5（3）：189-190.
[49] 茆建国，任涛，郭燕蓉，等 . 高效液相色谱法测定控哮涂膜剂中芥子碱硫氰酸盐的含量 [J]. 中国中医药现代远程教育，2010，8（13）：204-205
[50] 郭燕蓉，董琳，朱蔚，等 . 控哮涂膜剂的皮肤致敏性实验研究 [J]. 中国药物经济学，2013（5）：25-26.
[51] 余杰 . 三伏贴外用分散片的制备工艺及质量标准研究 [D]. 成都：西华大学，2017.

（收稿日期：2022-09-05；修回日期：2022-11-06）

肿瘤药敏实验模型研究进展

黄传玉[1]，刘富垒[2*]，王晓丹[1*]，薛敬伟[2*]（1. 山东第一医科大学，山东　泰安　271000；2.青岛大学附属泰安市中心医院，山东　泰安　271000）

摘要：肿瘤是一种高度异质性的疾病，准确预测临床疗效的肿瘤模型对肿瘤药物筛选和开发至关重要。肿瘤药敏实验模型在新药研发、指导临床用药及个体化治疗方面具有重要作用。本文就目前常用的肿瘤药敏实验模型进行综述，包括细胞系来源、培养方式、不同模型优缺点以及模型在临床中的应用情况，以期为肿瘤个体化治疗研究提供参考。

关键词：肿瘤；药敏实验；临床前模型；优缺点；应用

中图分类号：R730.53　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-1000-08

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.026

Research progress in experimental model of tumor drug sensitivity

HUANG Chuan-yu[1], LIU Fu-lei[2*], WANG Xiao-dan[1*], XUE Jing-wei[2*] (1. *Shandong First Medical University, Taian Shandong* 271000; 2. *The Affiliated Tai'an Central Hospital of Qingdao University, Taian Shandong* 271000)

Abstract: Cancer is a highly heterogeneous disease. Therefore, tumor models that accurately predict clinical outcomes are essential for cancer drug screening and development. The experimental models of tumor drug sensitivity play an important role in drug development, guiding clinical medication and individualized therapies. This review, covered commonly used tumor drug sensitivity experimental models, including cell line sources, culture methods, advantages and disadvantages of different models and their clinical applications, to provide a reference for the research of individualized tumor treatment.

Key words: tumor; drug sensitivity experimental; preclinical model; advantage and disadvantage; application

恶性肿瘤具有高发病率，高死亡率的特征，近年来在肿瘤诊断和临床治疗方面取得了重大进展，但开发新型抗肿瘤药物及实现个体化治疗仍是亟待解决的难题[1]。现有的肿瘤药敏实验模型不能完全模拟人体内肿瘤的生物学特征，导致许多在临床前模型中显示出良好治疗效果的药物在临床试验中失败[2]。

在肿瘤发生和转移过程中，细胞类型逐渐多样化且具有不同的分子特征，使肿瘤组织具有异质性[3]。在实体肿瘤中，异质性普遍存在，并随着肿瘤的发展或治疗干预在空间或时间上发生变化[4]。多项研究结果表明，高水平的瘤内异质性降低患者对抗肿瘤药物的敏感性，肿瘤异质性驱动肿瘤进化并促进耐药[5]。为研究肿瘤异质性对肿瘤进展和获得性耐药的影响，需要开发不同的临床前模型模拟肿瘤异质性，因此精准的肿瘤药敏实验模型是基础研究向临床实践转化的关键，可以帮助患者选择有效的化疗药物，避免药物毒性和不良反应的发生。

目前，相关肿瘤药敏实验模型的应用范围已从基础研究（作为临床前活性评价模型）逐渐向临床实践拓展（指导临床选择最优抗肿瘤药物）。肿瘤药敏实验模型主要分为三大类：体外模型、离体模型和体内模型[6]。体外模型主要包括二维（two-dimensional，2D）肿瘤细胞和三维（three-dimensional，3D）培养模型。2D 肿瘤细胞长期被

基金项目：山东省医学会治疗药物监测科研基金（No.YXH2020ZX060）；泰安市科技创新发展计划（No.2020NS167）；泰安市科技创新发展计划（No.2021NS219）。

作者简介：黄传玉，女，硕士，主要从事肿瘤药理学研究，email：857480360@qq.com　*通信作者：薛敬伟，女，副主任药师，主要从事临床合理用药、肿瘤免疫治疗研究，email：xuejingwei11111@163.com；王晓丹，女，副教授，主要从事药理学教学与科研，email：xdwang@sdfmu.edu.cn；刘富垒，男，副主任药师，主要从事药物靶向递送与控释研究，email：liu_fulei@126.com

用作体外肿瘤药敏模型，然而，由于肿瘤类型的多样性以及 2D 肿瘤细胞系在捕捉肿瘤生物学信息方面的局限性 [7]，2D 肿瘤细胞无法准确模拟肿瘤病理生理环境，因此越来越多的研究围绕 3D 培养模型展开。3D 培养模型能够模拟肿瘤部分微环境进行药物安全性和疗效评估，在药物进入临床试验之前更好地预测药物的疗效和毒性。离体模型主要为患者来源外植体模型，该模型能完整保留原始肿瘤异质性，准确预测药物疗效，在转化研究方面有很大的应用前景。体内模型主要为患者源性异种移植（patient-derived xenograft，PDX）模型和基因工程小鼠模型（genetically engineered mouse models，GEMMs）。PDX 模型通过在免疫缺陷小鼠的原位或异位植入肿瘤细胞或组织形成，其保留了细胞间的相互作用和肿瘤微环境，因此在药物筛选、生物标志物开发和协同临床试验等方面具有独特优势 [8]。本文参考文献 [9-86]，围绕目前常用模型的优缺点（汇总见表 1）及其应用进行介绍，以期为抗肿瘤新药研发、肿瘤个体化治疗等领域提供参考。

表 1　不同肿瘤药敏实验模型特点及优缺点

Tab 1　Advantages and disadvantages of different models

模型	来源	培养条件	优点	缺点	参考文献
细胞系	肿瘤细胞库	含胎牛血清的培养基	易于培养和扩增、适合长期培养 易于进行基因修饰改造 培养周期短、成本低 适合高通量药物筛选	丧失肿瘤异质性 缺乏肿瘤微环境（基质细胞、免疫细胞等） 遗传漂变 药物反应结果不准确	[9-10，17]
球体	肿瘤细胞系的单细胞悬液	含胎牛血清的培养基 非黏附条件（低黏附板、悬滴板、生物反应器等）	维持细胞 - 细胞间相互作用 允许细胞共培养 适合高通量药物筛选	难以进行长期培养 缺乏肿瘤微环境（基质细胞、血管系统等） 实验结果重现性低	[18-19]
类器官	从医院获得临床样本	DMEM/F12 基础培养基并添加 Wnt 信号通路抑制剂、酪氨酸受体激酶配体、TGF-β 信号通路抑制剂	保持原始组织的组织学、基因组学和转录组学特征 维持肿瘤异质性 长期培养稳定性	成功率低、价格贵 缺乏肿瘤微环境（免疫细胞、血管系统等） 缺乏规范的操作流程 信号通路调节剂的添加影响药物敏感性	[36-38]
PDE	从医院获得临床样本	DMEM/F12 或 DMEM 基础培养基并添加谷氨酰胺、氢化可的松、胰岛素等细胞因子	快速生成药物反应数据 保留肿瘤组织结构、空间特征和肿瘤微环境 维持原始肿瘤组织异质性	只适用于手术切除的肿瘤 组织结构容易在短时间内解体和失去活力 肿瘤组织完整性影响实验结果 难以进行高通量药物筛选	[6，50，53-54]
PDX	从医院获得临床样本 免疫缺陷小鼠（无胸腺裸鼠、SCID 小鼠、NOD-SCID 小鼠等）	—	维持原始组织的组织学、基因组学和转录组学特征 重现原发肿瘤的性质（分型和异质性） 维持血管存在 药物反应结果准确	造模时间长且价格昂贵 缺乏免疫系统的研究 不适合高通量药物筛选	[8，18，64，71]
GEMMs	转基因技术、基因敲除或敲入等	—	重现肿瘤的发生、发展、转移 允许研究免疫系统的作用 重现人类肿瘤异质性	造模时间长、价格昂贵 缺乏人类肿瘤选择性过程 不适合高通量药物筛选	[62，72，85]

1　药敏实验模型

1.1　2D 肿瘤细胞培养模型

最初评估抗肿瘤药物活性是通过 2D 肿瘤细胞模型进行的，目前常用的 2D 肿瘤细胞培养模型包括肿瘤细胞系和肿瘤细胞原代培养。

2D 肿瘤细胞培养依靠为细胞提供机械支持的玻璃或聚苯乙烯平面，促使细胞均匀生长和增殖 [9]。肿瘤细胞系以原代肿瘤细胞培养为基础，经不断传代、筛选获得。肿瘤细胞系培养周期短、成本低，简单、高效的培养方式使肿瘤细胞系在各类研究中发挥重要的作用，包括药物筛选、药物代谢、细胞毒性、转移机制等 [10]。肿瘤细胞原代培养是将肿瘤组织从机体取出，经机械法或各种酶处理，筛选出肿瘤细胞，加入适量培养基，使之不断生长和增殖的过程 [11]。原代培养获取的肿瘤细胞仍具有二倍体遗传性，适用于药物敏感

性实验、细胞分化等研究[12]。

长期以来 2D 细胞培养是研究肿瘤细胞生物学和发现药物的首选方法。肿瘤细胞具有易于培养和扩增的特点，基因修饰改造后可用于肿瘤转移和药物疗效等机制的研究。但随着培养时间的延长或培养环境的改变，2D 肿瘤细胞培养模型会发生细胞形态，细胞分裂模式等特性的改变，导致细胞不同表型的缺失，不能再现原始肿瘤的结构或生理特征[13]。研究发现，在体外培养条件下，HepG2 细胞与原代肝细胞相比，细胞色素 P450 酶和外源性受体的表达有显著差异[14]。培养瓶、平面培养皿等高硬度平面的使用，会影响细胞基因表达谱和药物敏感性[15]。此外，2D 培养不能模拟肿瘤组织空间结构，缺少细胞 - 细胞和细胞 - 细胞外环境的相互作用，导致细胞分化、增殖、基因和蛋白质表达的改变，影响药物代谢和其他细胞功能。2D 肿瘤细胞培养模型缺少对肿瘤组织细胞功能和特性的反映，限制了其预测药物疗效的能力。鉴于 2D 肿瘤细胞培养模型的缺点，迫切需要找到替代模拟原始肿瘤组织的药敏模型。

1.2　3D 培养模型

3D 细胞培养方法的引入为研究细胞间的相互作用及肿瘤微环境的复杂性提供了可能，因此，肿瘤研究中 3D 培养模型逐渐代替了 2D 肿瘤细胞模型[16]。3D 培养模型可分为细胞球体培养、类器官、外植体培养、微载体培养和组织工程模型等[17]。下面就常用的 3D 培养模型进行介绍。

1.2.1　肿瘤球体模型　球状体培养是一种简单的 3D 细胞培养模型，可以由多种细胞产生。按培养方式的不同主要分为以下四类：多细胞肿瘤球体（multicellular tumor spheroids，MCTs）、肿瘤球、组织来源的肿瘤球体和有机型多细胞球体[18]。最经典的肿瘤球体模型是 MCTs，它所用的细胞通常来自于肿瘤细胞系或原代细胞，培养方法包括低黏附板法、悬滴法、生物反应器等[19]。球体的生理状态取决于球体的大小、肿瘤细胞类型、球体中的细胞密度以及培养时间[20]。MCTs 的直径可达 1 ～ 3 mm，在培养 1 ～ 7 d 后获得，在药敏实验中，球体模型的大小一般不超过 200 μm[21]。

球体模型保留了原始肿瘤生物学特征。Di 等[22]通过建立非小细胞肺癌的肿瘤球体模型发现，球体模型保留了原始肿瘤 PD-L1 和 Vimentin 蛋白的表达，且高通量测序分析显示，球体模型中 *TP53* 剪接位点单核苷酸变异和 *KRAS G12V* 突变的一致性升高与原始肿瘤一致。球体模型中细胞生长模式与体内更相近。如子宫内膜肿瘤细胞系在 3D 重组细胞基底膜培养中形成了腺体结构，在形态上更接近体内肿瘤[23]。球体模型可重现原始肿瘤的特征，如缺氧和坏死。随着球体模型的不断增长，接触培养基最外层的细胞不断增殖，中间层因细胞间的接触抑制停止生长，球体中心由于氧气和营养物质的缺乏会形成一个坏死的中心结构，这与活体肿瘤相似[24]，因此，3D 球体被认为是再现肿瘤血管间区域或转移特征的有效模型[25-26]。此外，球体模型允许肿瘤细胞与不同类型的细胞共培养，包括基质成纤维细胞、内皮细胞等，可以进一步模拟实体肿瘤或转移部位的细胞环境[27]。

球体模型已广泛用于抗肿瘤药物的耐药研究[28]。Graham 等[29]通过培养烷化剂耐药的 EMT-6 肿瘤细胞发现，当肿瘤细胞单层培养时，耐药性消失；而当细胞被培养为 MCTs 时，耐药性可以完全重现。Rodallec 等[30]通过比较免疫脂质体在球体模型和小鼠模型中的功效发现，球体模型可以用于药物筛选，特别是渗透依赖性药物，可以重现体内研究结果，提示球体模型可能为优化药物渗透提供一种可用的方法[31]。球体模型显示出与临床对应的药物疗效。通过建立非小细胞肺癌肿瘤球体模型，给予抗肿瘤药物帕博利珠单抗，在 10 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 剂量时达到抗增殖活性的最大值，这与帕博利珠单抗临床使用的治疗剂量相对应[22]。此外，肿瘤球体与免疫细胞共培养可用于免疫治疗、基因治疗和光动力治疗等[32]。虽然球体模型更接近体内细胞生长的真实结构，但细胞聚集技术需要昂贵的耗材或专门的设备，并且球体模型所用支架之间批次不同等原因，造成实验结果重现性差。由于缺乏标准化的、快速的分析工具，球体模型在药物筛选中的应用受到了阻碍[33]。

1.2.2　类器官　类器官是将干细胞进行体外 3D 培养而形成的具有一定空间结构的组织类似物，可来源于胚胎干细胞、多能诱导干细胞、成体干细胞，能够模拟人体器官的结构和功能[34]。类器官首次由小鼠肠道干细胞产生，Esser 等[35]将该方法进一步扩展到人体肿瘤组织类器官的培养，将其称为患者源性类器官（patient-derived organoid，PDO）。肿瘤组织生成类器官的方法为：① 去除非上皮组织（如肌肉或脂肪）；② 将原始组织切成小碎片；③ 使用消化酶将碎片组织消化成单细胞悬液；④ 将细胞接种于细胞外基质中（如基底膜提取物或 Matrigel 等）；类器官的培养方法[36]根据组织来源的不同而有所差异，通常以 DMEM/F12 为基础培养基，并添加三种细胞生长因子（Wnt 信号通路激活剂、酪氨酸受体激

酶的配体和 TGF-β 信号通路抑制剂）[37]，类器官可以从正常或肿瘤组织建立、传代和冷冻保存。

肿瘤类器官能够重现原始肿瘤的形态和表观遗传特征 [38]，多次传代仍保持遗传稳定性。如在胃癌类器官模型中，类器官重现了原始肿瘤组织结构、典型胃癌标志物的表达，包括钙黏蛋白 17、细胞角蛋白 7、癌胚抗原等 [39]。类器官展现了长期培养的稳定性，对胃癌类器官培养一年以上，类器官生长方式和形态表型均未变化 [39]。肿瘤类器官具有基因组学和转录组学稳定性，可以保持原始肿瘤组织的蛋白质表达模式。对卵巢癌 3D 类器官与原肿瘤组织进行免疫组化染色和基因组学分析，结果发现在卵巢癌 3D 类器官中 p53、Ki67、PAX8 肿瘤标志物与原肿瘤组织保持一致，大部分卵巢癌类器官与原肿瘤组织之间同源性可达 0.9，且类器官与原肿瘤组织之间存在较高的拷贝数变异（CNVs）相似性 [40]。

由于类器官模型与实体肿瘤的相似性，它在药物筛选、药物开发和评估肿瘤侵袭等应用中得到了发展 [41]。Sachs 等 [42] 通过建立 12 例乳腺癌活检样本类器官，证明类器官对他莫昔芬的药物反应与患者反应一致，展示了类器官预测药物敏感性的潜力。对人体直肠癌标本生成的 3D 肿瘤球和类器官作连续传代处理，结果显示类器官培养可以维持肿瘤异质性和化疗耐药细胞的水平，而 3D 肿瘤球增加了肿瘤干细胞和化疗耐药细胞的比例 [43]。因此，类器官比传统的肿瘤模型更优越，可以更精准地再现原始肿瘤的特征，是一种优秀的肿瘤临床前模型。研究发现，胃肠癌患者来源的类器官在预测患者对靶向药物或化疗反应方面，敏感度为 100%，特异度为 93%，阳性预测值为 88%，阴性预测值为 100% [44]。类器官可以作为评估肿瘤患者特异性反应的一个有效的模型，指导患者选择最佳治疗策略，促进了基础研究向临床实践的转化 [45]。此外，与药物相关的不良反应是药物开发和评估候选药物安全性的主要问题，从健康的人体肾脏、肝脏和肠道中构建类器官，可以补充药物毒理学分析 [46]。

虽然类器官有广泛的应用，但患者的个体性差异导致每例样本对生长条件需求不同，缺乏规范的操作流程导致其构建成功率低 [47]。类器官模型未重现完整的肿瘤微环境如脉管系统、神经群等。此外，培养基中的生长因子或小分子抑制剂等会影响类器官的基因表达和信号通路，从而影响药物敏感性 [48]。

1.2.3　外植体　Freeman 等 [49] 将人体肿瘤切割成碎片，将其培养在胶原蛋白基质中，这是第一例患者来源的外植体（patient-derived explant，PDE），也被称之为组织培养。PDE 培养方式根据组织来源的不同而有所差别，通常是将手术切除的肿瘤组织，去掉非肿瘤且无活性的部分，将剩余肿瘤组织切成 1 ～ 3 mm^3，将其培养在明胶海绵基质中 [50]。目前常用的 PDE 培养方法包括浸没法、网格法、海绵法等 [51]。培养基一般以 DMEM/F12 或 DMEM 为基础，添加谷氨酰胺、氢化可的松、胰岛素等 [52]。

肿瘤 PDE 培养直接由新鲜切除的肿瘤组织产生，因此与其他模型相比，它保持了原始肿瘤组织结构和空间特征以及大部分的肿瘤微环境 [53]。Mata 等 [54] 通过建立结直肠癌 PDE 模型发现，在培养期间腺体密度、基质细胞和免疫细胞可以维持在一定的水平并且随着培养时间的延长，仍观察到 T 淋巴细胞（CD3 阳性细胞）和巨噬细胞（CD68 阳性细胞）。PDE 培养简单，只需对肿瘤组织进行切割操作即可快速生成，因此其允许在短时间内进行药物敏感性测试，如果样本量足够，也可以为肿瘤患者生成个体化的治疗方法库 [55]。

将 PDE 模型用于化疗药物敏感性研究，被称为组织培养药物反应分析（histoculture drug response assay，HDRA）[56]。PDE 已被证明可以预测患者对药物的敏感性，HDRA 研究报告显示，PDE 模型预测胃肠道肿瘤耐药性准确率为 86%[57]；化疗药物的临床疗效为 92.1%，真阳性率为 66.7%，真阴性率为 100%，灵敏度为 100% 和特异性为 90.6%[58]。可见，PDE 模型可以用于个体化药物筛选和指导临床用药，因此在转化研究中有很大的应用前景。Jun 等 [59] 通过建立胰腺癌 PDE 模型，帮助术后患者筛选出双药联合的吉西他滨 / 贝洛替康和三药联合的替加氟 / 奥沙利铂 / 伊立替康是最有效的治疗方案。如果能通过临床验证，PDE 模型能够避免在临床中使用低敏感性或高毒性化合物。相较于球体模型、类器官等缺乏肿瘤异质性的完整表征，PDE 模型具有显著优势，但临床标本不易获取，不充分的组织可能无法进行完整的药物剂量反应研究或重复个体间的结果研究，并且即使有足够的组织，由于肿瘤异质性和个体间差异，很难对结果进行标准化 [60]。此外组织培养超过 72 h 后，很容易发生组织解体和失去细胞活力 [61]。

1.3　*动物模型*

目前，常用的动物模型主要包括患者来源的 PDX 和 GEMMs。与其他模型相比，动物模型可以重现人类肿瘤的异质性，以及病理和分子特征 [62]，因此动物模型是研究肿瘤病理特征，验证

抗肿瘤侯选药物疗效和安全性的首选工具。

1.3.1 PDX 模型　为了增强与人类肿瘤的相关性，将手术获得的临床肿瘤样本移植到免疫缺陷小鼠体内，称为 PDX 模型 [63]。目前常用的免疫小鼠主要包括无胸腺裸鼠，严重免疫缺陷（SCID）小鼠，非肥胖糖尿病（NOD-SCID）小鼠和重组激活基因 2（*Rag2*）敲除小鼠。建立 PDX 模型的方法包括将患者手术样本消化成单细胞悬液或将肿瘤组织切割成组织碎片移植于免疫缺陷小鼠体内。单细胞悬液能够收集整个肿瘤组织的细胞，进行无偏差采样避免空间上的干扰，但化学或机械力会损伤单细胞，导致细胞对失巢凋亡敏感，从而影响植入成功率 [8]，因此肿瘤碎片移植是目前建立 PDX 模型最常用的方法。为方便移植，肿瘤碎片应切成 2 ～ 3 mm^3，肿瘤植入需要 2 ～ 4 个月的时间。同时，移植成功率受肿瘤类型、植入部位和小鼠品种的影响 [64]。

PDX 模型中的肿瘤组织碎片保留了原始肿瘤异质性、病理和遗传特征，模拟了原始肿瘤微环境 [63]。肾细胞癌 PDX 模型中，PDX 模型保留了原始肿瘤的组织学、基因表达、DNA 拷贝数改变和超过 90% 的蛋白质编码基因突变 [65]。在药物筛选方面，PDX 模型对抗肿瘤药物敏感性与原始肿瘤相似 [66]，实验预测结果与临床数据高度一致。一项针对化疗药物使用 PDX 模型的回顾性研究显示，对于肺癌、胶质瘤、乳腺癌、胃癌等不同类型的肿瘤，药物在 PDX 模型中的敏感性与在人类肿瘤中相似 [67]。卵巢癌 PDX 模型数据显示，每个样本对化疗药物具有选择敏感性，这表明 PDX 模型可以用于精准医疗，为患者定制个体化治疗方案 [68]。此外，PDX 模型与临床试验之间的一致性促进肿瘤生物标志物的开发，通过建立临床患者的 PDX 模型，可以筛选肿瘤预后生物标志物，并研究潜在的药物反应机制 [69]。

Schütte 等 [70] 通过建立结直肠癌 PDX 模型和类器官模型发现，在人体细胞外基质缺失的限制下，原始肿瘤组织的主要特征被 PDX 模型保留，化疗药物 5- 氟尿嘧啶在患者和免疫缺陷小鼠中具有相似的药代动力学，PDX 模型目前被认为是精准医疗的金标准工具。尽管 PDX 模型是一种相对比较简单且理想的肿瘤临床前的模型，但因无法获得足够体积的临床样本进行移植限制了其使用。PDX 模型的建立需要几个月，模型建立和患者最佳治疗计划之间的时间差距是限制 PDX 模型应用于个体化治疗的主要因素。免疫缺陷型小鼠价格昂贵，开发 PDX 模型需要消耗大量的资金，并且一些肿瘤的移植成功率很低。若使用的免疫缺陷型小鼠无法模拟肿瘤与免疫系统之间的相互作用，此模型则不适用于免疫调节剂的筛选，也限制了 PDX 模型的使用 [71]。

1.3.2 GEMMs　转基因和基因靶向技术的发展促进了 GEMMs 的产生。Gordon 首次利用将外源基因注射到雄性前核的方法生成转基因小鼠 [72]，此后 GEMMs 得到了快速发展和广泛应用。GEMMs 是通过转基因和基因靶向方法（如敲除或敲入）在体内激活致癌基因或灭活抑癌基因形成的 [73]。与基因靶向方法相比，转基因方法可以直接评估基因的体内致瘤能力，并且生成肿瘤模型所需时间短。根据修饰基因不同，分为病毒基因、原癌基因、生长因子及肿瘤微环境等转基因模型 [74]。敲入动物体内的外源基因可以为单基因或双基因，单基因敲入成功率高，但发生肿瘤所需时间较长 [75]。目前已经建立多种肿瘤的 GEMMs，包括前列腺癌、肺癌、乳腺癌、结肠癌和胰腺癌等。

GEMMs 可以再现肿瘤的发生、进展和转移。通过 GEMMs 来阐明从癌前病变到原位癌、侵袭性癌以及转移癌的一系列变化，并测试在疾病进展过程中抗肿瘤药物在不同时间点的作用和疗效 [76]。GEMMs 能够重现人类肿瘤病理特征。Kersten 等 [77] 建立 $Trp53^{F/F}$（KB1P）小鼠模型，KB1P 小鼠的乳腺肿瘤与人类 *Brca1* 基因突变形成的乳腺癌具有相似的组织病理学特征，并对铂类药物和 PARP 抑制剂敏感。Mallya 等 [78] 开发了携带 $TP53^{R172H}$ 突变和 $KRAS^{G12D}$ 突变的胰腺癌 GEMMs，该模型产生了具有侵袭性的肿瘤，并再现了人类胰腺癌病理特征。此外，GEMMs 可以再现与人类肿瘤的相似的分子表型。Liu 等 [79] 对表达人类 $PIK3CA^{H1047R}$ 乳腺癌转基因的小鼠进行肿瘤的 SNP 阵列分析，结果表明在小鼠肿瘤模型中重现了人类肿瘤几种最常见的表观功能的丧失或获得。

GEMMs 可用于预测抗肿瘤药物的治疗效果。Singh 等 [80] 通过建立 $Kras^{LSL\text{-}G12D}$ 非小细胞肺癌转基因小鼠模型，发现 20% ～ 30%*KRAS* 突变的非小细胞肺癌患者对贝伐珠单抗治疗有阳性反应。GEMMs 常被用于研究肿瘤发生机制。通过构建乳腺组织过表达的 *MAEL* 转基因小鼠发现，过表达基因抑制乳腺管发育且 *MAEL* 可能是 *PTHRP* 的下游基因，为研究乳腺癌中 *MAEL* 基因的分子机制提供方向 [81]。GEMMs 广泛用于抗肿瘤药物耐药机制的研究。Zhang 等 [82] 通过建立胰腺癌 GEMMs 发现，布鲁蛋白 D 增强了吉西他滨抗胰腺癌化学敏感性，显著下调了小鼠肿瘤组织中

Nrf2 蛋白水平，阐明了吉西他滨耐药潜在分子机制。此外，大量侯选癌症基因通过肿瘤测序研究被发现，GEMMs 模型成为体内验证候选癌症基因的首选方法 [83]。

与 PDX 模型缺乏免疫系统相比，GEMMs 在具有免疫能力的原位环境中研究肿瘤的发生发展，为肿瘤靶向治疗和免疫疗法的联合研究提供了一种选择 [84]。但在 GEMMs 中，肿瘤进展速度加快，缺乏人类肿瘤选择过程（如环境暴露、慢性炎症共病）。在 GEMMs 中发现的基因改变的序列也不同于人类，GEMMs 中衍生的肿瘤异质性较低且突变基因远少于患者肿瘤 [85]。此外，转基因小鼠造模时间长、价格昂贵等缺点限制了其使用 [86]。

2　总结

近几十年来，由于肿瘤细胞系的普遍性、可重复性和易于维持等优点，仍是肿瘤研究和治疗的主要工具。然而，由于其原发肿瘤特征的丧失，细胞系研究的结果很少能直接应用于患者。与简单的细胞系模型相比，保存肿瘤 - 基质相互作用和原始肿瘤异质性的 3D 体外模型可以提供更准确的患者特异性反应，而 PDE 模型可以重现原发肿瘤的特异性，在保存肿瘤和基质细胞的空间分布同时避免使用昂贵的免疫缺陷小鼠。肿瘤异质性和原发肿瘤微环境在药物敏感性中起着重要作用，保存它们有望提高肿瘤药敏实验模型的预测价值。因此，基于患者的模型有望成为解决肿瘤异质性和药物敏感性等临床转化问题的相关工具。

如前所述几种肿瘤临床前药敏实验模型，没有一种模型能准确概括原位肿瘤的异质性，需要几个模型共同描述影响药物治疗反应的所有方面。随着我们进入高通量分子测序和个性化、精准医疗的新时代，肿瘤药敏实验模型应精准地重现人类疾病，包括肿瘤异质性、肿瘤微环境和肿瘤细胞与基质细胞间相互作用等特征 [87]。随着分子靶向治疗和免疫治疗的发展，肿瘤药敏实验模型逐渐朝着个体化和精确化的方向发展，目前仍需要一种精准的肿瘤药敏实验模型来提高个体化治疗的有效性。

参考文献

[1] 李娇，李睿，赵海洋，等 . 类器官——抗肿瘤药物研究的新模型 [J]. 中药药理与临床，2022，38（5）：200-208.

[2] Vasudev NS，Reynolds AR. Anti-angiogenic therapy for cancer：current progress，unresolved questions and future directions [J]. Angiogenesis，2014，17（3）：471-494.

[3] Jia Q，Wang A，Yuan Y，et al. Heterogeneity of the tumor immune microenvironment and its clinical relevance [J]. Exp Hematol Oncol，2022，11（1）：24.

[4] Prasetyanti PR，Medema JP. Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective [J]. Mol Cancer，2017，16（1）：41.

[5] Dagogo-Jack I，Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies [J]. Nat Rev Clin Oncol，2018，15（2）：81-94.

[6] Powley IR，Patel M，Miles G，et al. Patient-derived explants（PDEs）as a powerful preclinical platform for anti-cancer drug and biomarker discovery [J]. Br J Cancer，2020，122（6）：735-744.

[7] Ben-David U，Ha G，Tseng Y，et al. Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution [J]. Nat Genet，2017，49（11）：1567-1575.

[8] Jung J，Seol HS，Chang S. The generation and application of patient-derived xenograft model for cancer research [J]. Cancer Res Treat，2018，50（1）：1-10.

[9] Duval K，Grover H，Han L，et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture [J]. Physiology，2017，32（4）：266-277.

[10] Jensen C，Teng Y. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture? [J]. Front Mol Biosci，2020，7：33.

[11] 郭茜，高维实 . 乳腺癌原代细胞培养方法的研究进展 [J]. 内蒙古医学杂志，2012，44（S8）：45-47.

[12] 朱胜章，陆建波 . 肿瘤细胞原代培养的应用与发展 [J]. 肿瘤基础与临床，2012，25（1）：89-92.

[13] Brancato V，Oliveira JM，Correlo VM，et al. Could 3D models of cancer enhance drug screening? [J]. Biomaterials，2020，232：119744.

[14] Kaur P，Robin，Mehta RG，et al. Progression of conventional hepatic cell culture models to bioengineered HepG2 cells for evaluation of herbal bioactivities [J]. Biotechnol Lett，2018，40（6）：881-893.

[15] Skardal A，Mack D，Atala A，et al. Substrate elasticity controls cell proliferation，surface marker expression and motile phenotype in amniotic fluid-derived stem cells [J]. J Mech Behav Biomed Mater，2013，17：307-316.

[16] Habanjar O，Diab-Assaf M，Caldefie-Chezet F，et al. 3D cell culture systems：tumor application，advantages，and disadvantages [J]. Int J Mol Sci，2021，22（22）：12200.

[17] Haycock JW. 3D cell culture：a review of current approaches and techniques [J]. Methods Mol Biol，2011，695：1-15.

[18] Weiswald L，Bellet D，Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology [J]. Neoplasia，2015，17（1）：1-15.

[19] Fang Y，Eglen RM. Three-dimensional cell cultures in drug discovery and development [J]. SLAS Discov，2017，22（5）：456-472.

[20] Hirschhaeuser F，Menne H，Dittfeld C，et al. Multicellular tumor spheroids：an underestimated tool is catching up again [J]. J Biotechnol，2010，148（1）：3-15.

[21] Friedrich J，Seidel C，Ebner R，et al. Spheroid-based drug screen：considerations and practical approach [J]. Nat Protoc，2009，4（3）：309-324.

[22] Di Liello R，Ciaramella V，Barra G，et al. Ex vivo lung cancer spheroids resemble treatment response of a patient

with NSCLC to chemotherapy and immunotherapy：case report and translational study [J]. ESMO Open，2019，4（4）：e536.

[23] Chitcholtan K，Asselin E，Parent S，et al. Differences in growth properties of endometrial cancer in three dimensional（3D）culture and 2D cell monolayer [J]. Exp Cell Res，2013，319（1）：75-87.

[24] Fontoura JC，Viezzer C，Dos Santos FG，et al. Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth，gene expression and drug resistance [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl，2020，107：110264.

[25] Fennema E，Rivron N，Rouwkema J，et al. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues [J]. Trends Biotechnol，2013，31（2）：108-115.

[26] Chen R，Dong Y，Xie X，et al. Screening candidate metastasis-associated genes in three-dimensional HCC spheroids with different metastasis potential [J]. Int J Clin Exp Pathol，2014，7（5）：2527-2535.

[27] Kunz-Schughart LA，Freyer JP，Hofstaedter F，et al. The use of 3-D cultures for high-throughput screening：the multicellular spheroid model [J]. J Biomol Screen，2004，9（4）：273-285.

[28] Imamura Y，Mukohara T，Shimono Y，et al. Comparison of 2D-and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer [J]. Oncol Rep，2015，33（4）：1837-1843.

[29] Graham CH，Kobayashi H，Stankiewicz KS，et al. Rapid acquisition of multicellular drug resistance after a single exposure of mammary tumor cells to antitumor alkylating agents [J]. J Natl Cancer Inst，1994，86（13）：975-982.

[30] Rodallec A，Sicard G，Giacometti S，et al. From 3D spheroids to tumor bearing mice：efficacy and distribution studies of trastuzumab-docetaxel immunoliposome in breast cancer [J]. Int J Nanomedicine，2018，13：6677-6688.

[31] Fitzgerald AA，Li E，Weiner LM. 3D culture systems for exploring cancer immunology [J]. Cancers，2020，13（1）：56.

[32] Boucherit N，Gorvel L，Olive D. 3D tumor models and their use for the testing of immunotherapies [J]. Front Immunol，2020，11：603640.

[33] Maritan SM，Lian EY，Mulligan LM. An efficient and flexible cell aggregation method for 3D spheroid production [J]. J Vis Exp，2017（121）：55544.

[34] 谢雨欣，许峰晟，王彤，等 . 类器官培养在癌症中的应用及展望 [J]. 中国药理学通报，2021，37（9）：1197-1201.

[35] Esser LK，Branchi V，Leonardelli S，et al. Cultivation of clear cell renal cell carcinoma patient-derived organoids in an air-liquid interface system as a tool for studying individualized therapy [J]. Front Oncol，2020，10：1775.

[36] 刘晓丽，袁双虎 . 肿瘤类器官：发展、应用及挑战 [J]. 中华肿瘤防治杂志，2021，28（23）：1768-1774.

[37] Driehuis E，Kretzschmar K，Clevers H. Establishment of patient-derived cancer organoids for drug-screening applications [J]. Nat Protoc，2020，15（10）：3380-3409.

[38] Ballard DH，Boyer CJ，Alexander JS. Organoids-preclinical models of human disease [J]. N Engl J Med，2019，380（20）：1981-1982.

[39] Seidlitz T，Merker SR，Rothe A，et al. Human gastric cancer modelling using organoids [J]. Gut，2019，68（2）：207-217.

[40] 丁轶 . 人卵巢癌类器官培养体系的建立及应用研究 [D]. 武汉：华中科技大学，2021.

[41] Ranftl RE，Calvo F. Analysis of breast cancer cell invasion using an organotypic culture system [J]. Methods Mol Biol，2017，1612：199-212.

[42] Sachs N，Ligt JD，Kopper O，et al. A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity [J]. Cell，2018，172（1-2）：373-386.

[43] Zhao H，Yan C，Hu Y，et al. Sphere-forming assay vs. organoid culture：determining long-term stemness and the chemoresistant capacity of primary colorectal cancer cells.[J]. Int J Oncol，2019，54（3）：893-904.

[44] Vlachogiannis G，Hedayat S，Vatsiou A，et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers [J]. Science，2018，359（6378），920-926.

[45] Pauli C，Hopkins BD，Prandi D，et al. Personalized in vitro and in vivo cancer models to guide precision medicine [J]. Cancer Discov，2017，7（5）：462-477.

[46] Gunti S，Hoke A，Vu KP，et al. Organoid and spheroid tumor models：techniques and applications [J]. Cancers，2021，13（4）：874.

[47] 马可鑫，陈晓芳，李玥，等 . 肿瘤类器官的应用及展望 [J]. 中国肿瘤，2022，31（4）：284-291.

[48] Xu H，Lyu X，Yi M，et al. Organoid technology and applications in cancer research [J]. J Hematol Oncol，2018，11（1）：116.

[49] Freeman AE，Hoffman RM. In vivo-like growth of human tumors in vitro [J]. Proc Natl Acad Sci U S A，1986，83（8）：2694-2698.

[50] Gris-Cárdenas I，Rábano M，Vivanco MDM. Patient-derived explant cultures of normal and tumor human breast tissue [J]. Methods Mol Biol，2022，2471：301-307.

[51] Centenera MM，Raj GV，Knudsen KE，et al. Ex vivo culture of human prostate tissue and drug development [J]. Nat Rev Urol，2013，10（8）：483-487.

[52] Louandre C，Donnadieu J，Lachaier E，et al. Personalization of the medical treatment of solid tumours using patient-derived tumour explants [J]. Int J Oncol，2016，48（3）：895-899.

[53] Clark J，Fotopoulou C，Cunnea P，et al. Novel ex vivo models of epithelial ovarian cancer：the future of biomarker and therapeutic research [J]. Front Oncol，2022，12：837233.

[54] Mata SD，Franchi-Mendes T，Abreu S，et al. Patient-derived explants of colorectal cancer：histopathological and molecular analysis of long-term cultures [J]. Cancers，2021，13（18）：4695.

[55] Sivakumar R，Chan M，Shin JS，et al. Organotypic tumor slice cultures provide a versatile platform for immuno-oncology and drug discovery [J]. Oncoimmunology，2019，8（12）：

e1670019.

[56] Tanino H，Oura S，Hoffman RM，et al. Acquisition of multidrug resistance in recurrent breast cancer demonstrated by the histoculture drug response assay [J]. Anticancer Res，2001，21（6A）：4083-4086.

[57] Vescio RA，Connors KM，Kubota T，et al. Correlation of histology and drug response of human tumors grown in native-state three-dimensional histoculture and in nude mice [J]. Proc Natl Acad Sci USA，1991，88（12）：5163-5166.

[58] Hoffman RM. Clinical correlation of the histoculture drug response assay in gastrointestinal cancer [J]. Methods Mol Biol，2018，1760：61-72.

[59] Jun E，Park Y，Lee W，et al. The identification of candidate effective combination regimens for pancreatic cancer using the histoculture drug response assay [J]. Sci Rep，2020，10（1）：12004.

[60] Stackhouse CT，Gillespie GY，Willey CD. Cancer explant models [J]. Curr Top Microbiol Immunol，2021，430：131-160.

[61] Schäfer WR，Fischer L，Roth K，et al. Critical evaluation of human endometrial explants as an ex vivo model system：a molecular approach [J]. Mol Hum Reprod，2011，17（4）：255-265.

[62] Honkala A，Malhotra SV，Kummar S，et al. Harnessing the predictive power of preclinical models for oncology drug development [J]. Nat Rev Drug Discov，2022，21（2）：99-114.

[63] Yoshida GJ. Applications of patient-derived tumor xenograft models and tumor organoids [J]. J Hematol Oncol，2020，13（1）：4.

[64] Clohessy JG，Pandolfi PP. Mouse hospital and co-clinical trial project--from bench to bedside [J]. Nat Rev Clin Oncol，2015，12（8）：491-498.

[65] Sivanand S，Peña-Llopis S，Zhao H，et al. A validated tumorgraft model reveals activity of dovitinib against renal cell carcinoma [J]. Sci Transl Med，2012，4（137）：137r-175r.

[66] Topp MD，Hartley L，Cook M，et al. Molecular correlates of platinum response in human high-grade serous ovarian cancer patient-derived xenografts [J]. Mol Oncol，2014，8（3）：656-668.

[67] Kerbel RS. Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans：better than commonly perceived-but they can be improved [J]. Cancer Biol Ther，2003，2（4 Suppl 1）：S134-S139.

[68] Erriquez J，Olivero M，Mittica G，et al. Xenopatients show the need for precision medicine approach to chemotherapy in ovarian cancer [J]. Oncotarget，2016，7（18）：26181-26191.

[69] Rivera M，Fichtner I，Wulf-Goldenberg A，et al. Patient-derived xenograft（PDX）models of colorectal carcinoma（CRC）as a platform for chemosensitivity and biomarker analysis in personalized medicine [J]. Neoplasia，2021，23（1）：21-35.

[70] Schütte M，Risch T，Abdavi-Azar N，et al. Molecular dissection of colorectal cancer in pre-clinical models identifies biomarkers predicting sensitivity to EGFR inhibitors [J]. Nat Commun，2017，8：14262.

[71] Kondo J，Inoue M. Application of cancer organoid model for drug screening and personalized therapy [J]. Cells，2019，8（5）：470.

[72] 刘恩岐，北岛修司，森本正敏 . 实验小鼠在人类癌症研究中的应用及其进展 [J]. 癌症，2005，24（2）：249-254.

[73] Cheon D，Orsulic S. Mouse models of cancer [J]. Annu Rev Pathol，2011，6：95-119.

[74] 高重庆，周星言，刘均立，等 . 小鼠肝癌治疗模型的研究进展 [J]. 中国病理生理杂志，2022，38（9）：1686-1693.

[75] 赵颖华，孙薇 . 肝癌转基因小鼠模型的应用研究进展 [J]. 生物技术通报，2015，31（12）：56-62.

[76] Wu X，Gong S，Roy-Burman P，et al. Current mouse and cell models in prostate cancer research [J]. Endocr Relat Cancer，2013，20（4）：R155-R170.

[77] Kersten K，de Visser KE，van Miltenburg MH，et al. Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine [J]. EMBO Mol Med，2017，9（2）：137-153.

[78] Mallya K，Gautam SK，Aithal A，et al. Modeling pancreatic cancer in mice for experimental therapeutics [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer，2021，1876（1）：188554.

[79] Liu P，Cheng H，Santiago S，et al. Oncogenic PIK-3CA-driven mammary tumors frequently recur via PI3K pathway-dependent and PI3K pathway-independent mechanisms [J]. Nat Med，2011，17（9）：1116-1120.

[80] Singh M，Lima A，Molina R，et al. Assessing therapeutic responses in Kras mutant cancers using genetically engineered mouse models [J]. Nat Biotechnol，2010，28（6）：585-593.

[81] 张兴 . MAEL 在癌症中的作用及其分子机制 [D]. 长沙：湖南师范大学，2018.

[82] Zhang J，Xu H，Cho WCS，et al. Brucein D augments the chemosensitivity of gemcitabine in pancreatic cancer via inhibiting the Nrf2 pathway [J]. J Exp Clin Cancer Res，2022，41（1）：90.

[83] Sharma G，Sharma AR，Bhattacharya M，et al. CRISPR-Cas9：a preclinical and clinical perspective for the treatment of human diseases [J]. Mol Ther，2021，29（2）：571-586.

[84] Boumelha J，de Carné Trécesson S，Law EK，et al. An immunogenic model of KRAS-mutant lung cancer enables evaluation of targeted therapy and immunotherapy combinations [J]. Cancer Res，2022，82（19）：3435-3448.

[85] Patton EE，Mueller KL，Adams DJ，et al. Melanoma models for the next generation of therapies [J]. Cancer Cell，2021，39（5）：610-631.

[86] Hill W，Caswell DR，Swanton C. Capturing cancer evolution using genetically engineered mouse models（GEMMs）[J]. Trends Cell Biol，2021，31（12）：1007-1018.

[87] Daher A，Groot JD. Rapid identification and validation of novel targeted approaches for Glioblastoma：a combined ex vivo-in vivo pharmaco-omic model [J]. Exp Neurol，2018，299（Pt B）：281-288.

（收稿日期：2022-11-14；修回日期：2022-12-25）

第三代新型抗癫痫药物布瓦西坦的研究进展

李莹，王鸣璐，王成彬，赵明明，肇丽梅*（中国医科大学附属盛京医院药学部，沈阳　110004）

摘要：布瓦西坦是第三代新型抗癫痫药物，是第一个高亲和力的突触囊泡蛋白 2A（SV2A）配体，具有吸收速度快、生物利用度高、药物相互作用少等优点，被批准用于 4 岁及以上伴或不伴继发全面性发作的局灶性癫痫患者的单药治疗或辅助治疗。本文就布瓦西坦的抗癫痫作用机制、药动学特征、临床疗效、安全性及妊娠期应用等方面进行综述，以期为癫痫治疗提供更有效的药物选择。

关键词：布瓦西坦；抗癫痫药；药动学；药效学
中图分类号：R971.6　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-1008-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.027

Research progress in the third generation new antiepileptic drug brivaracetam

LI Ying, WANG Ming-lu, WANG Cheng-bin, ZHAO Ming-ming, ZHAO Li-mei* (*Department of Pharmacy*, *Shengjing Hospital of China Medical University*, *Shenyang* 110004)

Abstract: Brivaracetam is a third generation new antiepileptic drug and the first high-affinity synaptic vesicle protein 2A (SV2A) ligand. It has rapid absorption, high bioavailability, and few drug interactions. Brivaracetam has been approved as monotherapy or adjuvant for partial-onset seizures with or without secondary generalization in patients 4 years and older with epilepsy. The antiepileptic mechanism, pharmacokinetics, clinical efficacy, safety and application during pregnancy were reviewed in this paper to provide more effective choices for treatment of epileptic.

Key words: brivaracetam; antiepileptic drug; pharmacokinetics; pharmacodynamics

癫痫是一种以反复发作为特征的慢性神经系统疾病，全球约有 6500 万癫痫患者 [1]。抗癫痫药物（antiepileptic drugs，AEDs）是治疗癫痫的主要手段。目前，已有超过 20 种 AEDs 被批准用于癫痫治疗，然而，约有三分之一的患者对 AEDs 失应答，仍继续存在癫痫发作 [2]。因此，开发新的 AEDs 显得尤为重要。左乙拉西坦（levetiracetam，LEV）作为第二代 AEDs，主要作用于突触囊泡蛋白 2A（SV2A），具有广谱的抗癫痫活性、良好的药动学特点、优良的癫痫控制效果以及较低的生物毒性 [3]。基于 LEV 作用蛋白 SV2A，比利时优时比制药公司从 12 000 多个与 LEV 结构相似的分子中筛选出来了 SV2A 高亲和力化合物——布瓦西坦（brivaracetam，BRV）。经过一系列临床试验验证，BRV 于 2016 年经美国食品药品监督管理局（FDA）批准用于辅助治疗≥ 16 岁伴或不伴继发全面性发作的局灶性癫痫患者 [4]，在 2018 年 FDA 将以上适应证扩展到 4 岁及以上儿童并批准其作为单药治疗 [5]。本文就 BRV 的抗癫痫作用机制、药动学特征、临床疗效、安全性及妊娠期应用等方面进行综述，以期为癫痫治疗提供更有效的药物选择。

1　抗癫痫作用机制

BRV 作为 LEV 的 4- 正丙基类似物，其与 LEV 具有相同的作用机制，即与 SV2A 结合，但有研究表明这两种药物可能作用于 SV2A 不同结合位点或与其不同构象状态相互作用 [6]。BRV 对 SV2A 的亲和力是 LEV 的 15 ～ 30 倍 [7]。SV2A 是一种广泛分布的中枢神经系统蛋白，能够参与调节神经递质的释放继而维持脑内兴奋性递质与抑制性递质的平衡 [8]。此外，BRV 对神经元电压依赖性钠通道具有抑制活性 [9]。

2　BRV 体内药动学

BRV 可以口服或静脉注射。口服后，BRV 吸

基金项目：盛京自由研究者基金项目（No.M0779）。
作者简介：李莹，女，硕士研究生，主要从事临床药理学研究，email：1171779545@qq.com　*通信作者：肇丽梅，女，博士，教授，博士研究生导师，主要从事药动学与药物基因学研究，email：zhaolm@sj-hospital.org

收迅速，达峰时间（t_{max}）约 1 h，绝对生物利用度接近 100%[10]。高脂肪食物可影响其吸收速度，导致 t_{max} 延长至 3 h，最大血药浓度（C_{max}）降低约 33%，但对血浆浓度 - 时间曲线下面积（*AUC*）无影响 [10]。BRV 与血浆蛋白结合率低（＜ 20%），表观分布体积略低于人体总体液，为 0.5 L • kg^{-1}[11]。此外，BRV 具有高亲脂性，能够迅速透过血脑屏障 [12]。BRV 的消除半衰期（$t_{1/2}$）约 8 h[11]，主要通过乙酰胺基团的酶促水解以及细胞色素 P450（CYP）2C19 介导的羟基化进行代谢，且生成的代谢产物均无药理活性 [13]。8.6% 的药物以原形由肾脏消除，其余以代谢物形式排出 [10]。

3　BRV 临床疗效

3.1　局灶性癫痫

BRV 辅助治疗局灶性癫痫的有效性、安全性和耐受性已通过长期随访（≥ 8 年）得到证实 [14]。三项 BRV 给药剂量固定的Ⅲ期临床试验结果表明，三种剂量（50、100 和 200 mg • d^{-1}）BRV 对局灶性癫痫发作均有效且耐受性良好，并且疗效与是否合并使用 AEDs 无关 [15]。上市后研究进一步证实了 BRV 在临床应用中有较好的有效性和耐受性。一项多中心回顾性研究报道了 575 名难治性局灶性癫痫患者，采用 BRV 治疗后，癫痫发作频率平均减少 36.0%，有效率（癫痫发作频率减少≥ 50%）为 39.7%，其中 17.5% 的患者无癫痫发作 [16]。另一项德国多中心回顾性队列研究评估了 BRV 在 262 名患者中的疗效，3 个月时保留率为 79.4%，有效率为 41.2%，无癫痫发作率为 14.9%；6 个月时保留率为 75.8%，有效率为 40.5%，无癫痫发作率为 15.3%[17]。此外，Schoemaker 等 [18] 研究表明 BRV 作为单药治疗与作为辅助治疗的疗效相当，并且当从辅助治疗转换为单药治疗或初始接受单药治疗时，可以采用辅助治疗推荐的起始剂量。

截止至 2019 年，BRV 所有的Ⅱ / Ⅲ期临床试验均在成人患者中进行，未在儿童人群中评估 [19]。目前，儿童患者的相关研究数据较少。Schubert 等 [20] 进行了一项多中心回顾性研究以评估 BRV 对儿童和青少年局灶性癫痫的有效性，共纳入 34 名 3 ～ 17 岁患者，BRV 剂量为 50 ～ 200 mg•d^{-1}，3 个月时保留率为 97%，有效率为 47%；6 个月时有效率为 35%，其中 4 名患者无癫痫发作；12 个月时有效率为 21%，所有患者均经历了癫痫发作。另一项回顾性研究评估了 46 名 18 岁以下癫痫患者采用 BRV 治疗 12 个月后的疗效 [21]，其中 52.1% 为局灶性癫痫，39.1% 为癫痫脑病。在 3、6 和 12 个月时保留率分别为 78.2%、56.5% 和 43.4%；有效率分别为 52.7%、53.8% 和 65%。将有效率与癫痫发作类型进行比较发现局灶性癫痫患者有效率最高为 77.7%，其中 44.4% 患者无癫痫发作 [21]。这些研究结果表明，BRV 治疗儿童和青少年局灶性癫痫可取得较好疗效。

由于人口老龄化日趋严重，老年患者（≥ 65 岁）癫痫的治疗已成为癫痫治疗的重要组成部分。Lattanzi 等 [22] 进行了一项为期 12 个月的多中心回顾性研究，共纳入 1029 例局灶性癫痫患者，其中 111 例（10.8%）年龄≥ 65 岁。治疗 12 个月时，老年组与年轻组的有效率分别为 44.4% 和 36.4%（P ＝ 0.110），无癫痫发作率分别为 31.5% 和 14.6%（P ＜ 0.001），并且两组不良反应发生率差异没有统计学意义（P ＝ 0.185），最常见不良反应为嗜睡、紧张、眩晕和疲劳。此外，Sargentini 等 [23] 评估了 BRV 在健康老年志愿者中的药动学行为，发现 65 ～ 75 岁与＞ 75 岁受试者的 $t_{1/2}$ 相似，分别为 7.7 h 和 8.6 h，且 BRV 稳态血浆清除率仅略低于健康年轻志愿者 [（0.74 mL/（min•kg）*vs* 0.83 mL/（min • kg）]。这些变化并不显著，故老年癫痫患者并不需要进行 BRV 剂量调整。

3.2　全面性癫痫

虽然 BRV 目前还没有被批准用于治疗全面性癫痫，但有研究表明 BRV 可能对其有效 [24-25]。一项评估 18 名特发性全面性癫痫患者的Ⅱ a 期临床研究 [24] 发现，与安慰剂组相比，BRV 治疗组脑电图光敏性反应显著降低，其中 14 例（78%）患者光敏性反应消失，且当 BRV 剂量为 80 mg•d^{-1} 时，效果显著，可导致光敏性反应长久消失。Fonseca 等 [25] 回顾性分析了 2016—2018 年采用 BRV 超说明书治疗特发性全面性癫痫患者，以评估真实世界中 BRV 治疗全面性癫痫的有效性和保留率。共纳入 37 例患者，其中 32.4% 采用 BRV 单药治疗，6 个月时保留率为 81.1%，有效率为 83.8%。另一项多中心回顾性队列研究纳入了 61 例特发性全面性癫痫患者，保留率和有效率 3 个月时分别为 82% 和 36%，6 个月时分别为 69% 和 50%[26]。分析结果表明，BRV 治疗特发性全面性癫痫发作效果满意，可作为难治性全面性癫痫和其他 AEDs 不能耐受时的一种替代疗法。

3.3　癫痫持续状态

BRV 具有高亲脂性，可以迅速透过血脑屏障。静脉注射时，脑脊液中血药浓度在 10 min 内即可达到高峰 [27]。这种良好的药动学特征使其有望成为治疗癫痫持续状态的一种新药。Strzelczyk 等 [28] 系统性回顾并确定了 11 名采用 BRV 治疗的难治性或超难治性癫痫持续状态患者，发现在静

脉注射 BRV 24 h 内，27% 患者病情得到缓解。另一项研究评估了 BRV 暴露与临床疗效之间的关系，发现 BRV 剂量高于 1.9 mg • kg^{-1} 时与高有效率相关 [27]，因此对于癫痫持续状态患者建议 BRV 的最低治疗剂量为 2 mg • kg^{-1}。此外，一项意大利的多中心回顾性研究纳入了 56 例癫痫持续状态患者，采用 BRV 治疗，结果有效率为 57%，并且发作后 6 h 内使用 BRV 与早期癫痫持续状态缓解相关（$P = 0.002$）[29]。与 Santamarina 等 [30] 研究结果一致，在 43 名癫痫持续状态患者中，BRV 有效率为 54%，其中 13 名在 6 h 内癫痫发作缓解，当更早或更高剂量给药时，有效率会更高。目前，这些发现都是以少数病例报道为基础，有必要采用更大规模的观察性研究或可能的前瞻性对照试验以进一步探索静脉注射 BRV 对癫痫持续状态的有效性和耐受性。

3.4　既往采用其他 AEDs 治疗的癫痫

Asadi-Pooya 等 [31] 对三项Ⅲ期临床研究汇总分析发现，与既往未接受过 AEDs 治疗的患者相比，既往接受过 AEDs（包括 LEV、卡马西平、托吡酯和拉莫三嗪）治疗的患者 BRV 有效率降低，而与药物作用机制无关。Latttanzi 等 [32] 基于真实世界数据得到了相似结果，与既往 LEV 暴露的患者相比，初治患者使用 BRV 癫痫控制效果更佳。这可能是因为既往接受过治疗的患者本身疾病更加严重 [31]。此外，Snoeren 等 [33] 回顾性分析了 379 名成人癫痫患者以评估 BRV 对既往 LEV 治疗失败的难治性癫痫的有效性，其中 82.8% 为局灶性癫痫，9.8% 为全面性癫痫。结果表明，BRV 与 LEV 的有效率差异无统计学意义（72.0% *vs* 69.1%，$P > 0.05$），对 LEV 积极响应的患者中，有 78.0% 对 BRV 响应；对 LEV 治疗无效的患者中，有 46.2% 对 BRV 响应；与 LEV 相比，BRV 治疗期间发生的不良反应显著降低（86.5% *vs* 61.7%，$P < 0.05$）。在另一项上市后研究中，171 名患者因疗效不佳从 LEV 转换为 BRV，3 个月时有效率为 35.7%，无癫痫发作率为 11.7%，同时有 8.2% 的患者病情恶化；70 名患者因不良反应从 LEV 转换为 BRV，3 个月时有效率为 52.9%，无癫痫发作率为 38.6%，有 4.3% 的患者病情恶化 [16]。由此可知对于因不良反应而不能耐受 LEV 的患者使用 BRV 疗效会更佳，对于因缺乏疗效 LEV 治疗失败的患者可能从 BRV 中获益。

3.5　其他

癫痫患者经常会出现丛集性发作，若不及时治疗可能导致癫痫持续状态。Szaflarski 等 [34] 评估了静脉注射 BRV 与静脉注射劳拉西泮对急性发作患者的有效性，结果表明静脉注射 BRV（100 或 200 mg）与静脉注射劳拉西泮在控制癫痫发作方面疗效相当，大多数患者在 12 h 以上无癫痫发作。另一研究也表明静脉注射 BRV 对急性癫痫发作有效且耐受性良好 [35]。Kalviainen 等 [36] 进行了两项前瞻性双盲多中心Ⅲ期临床试验，以评估 BRV 辅助治疗 Unverricht-Lundborg 病的有效性，结果显示 BRV 对动作性肌阵挛评分无显著改善，但耐受性良好。在智力障碍患者中，癫痫患病率高，估计超过 20%[37]。有研究报道了 BRV 对癫痫共病智力障碍患者的疗效：Gillis 等 [38] 回顾性分析了 116 名癫痫共病智力障碍患者，发现 BRV 对这些患者有效且耐受性良好，在 3、6 和 12 个月时 BRV 的保留率分别为 84.4%、75.5% 和 58.1%；另一项研究评估了 BRV 对 33 名癫痫共病智力障碍住院患者的有效性和耐受性，结果显示有效率 6 个月时为 28%，12 个月时为 19%；保留率较低，12 个月时为 37%[39]。BRV 可能对少数癫痫共病智力障碍患者有效，仍需进一步研究以评估 BRV 对癫痫共病智力障碍患者的有效性和耐受性。此外，Lattanzi 等 [40] 回顾性研究表明，卒中后癫痫患者采用 BRV 辅助治疗有效且耐受性良好，BRV 辅助治疗可能是卒中后癫痫的有效治疗选择。

4　BRV 安全性

临床试验汇总的安全性数据表明，在 25 ～ 200 mg • d^{-1} 的剂量下，BRV 组与安慰剂组的不良反应发生率相似，分别为 66.9% 和 62.8%[41]。其中，神经系统相关不良反应发生率分别为 11.3% 和 8.2%，行为相关不良反应发生率分别为 4.0% 和 2.5%，最常见的不良反应有嗜睡、头痛、头晕和乏力。中枢神经系统相关的不良反应一般发生在 BRV 治疗早期，且随着时间推移发生率和严重程度会随之降低 [42]。目前无证据表明 BRV 能够增加患者的自杀风险 [43]。在高剂量（800 mg • d^{-1}）BRV 治疗下，也未见对心脏功能和 Q-T 间期有影响 [44]。BRV 可能有助于认知，一项针对 43 名癫痫患者的研究显示，采用 BRV 辅助治疗后，患者注意力和执行功能显著改善，反应时间也有改善趋势 [45]。

尽管目前尚无研究对 BRV 与 LEV 的安全性进行直接比较，但有研究表明，采用 LEV 治疗时出现了神经系统相关不良反应的患者转换为 BRV 后不良反应得到改善 [46]。在一项上市后回顾性研究中，76% 从 LEV 转换为 BRV 的患者神经系统相关不良反应严重程度降低，其中 19.5% 不良反应完全消失 [47]。此外，有研究表明，与 LEV 相比，BRV 行为相关不良反应如愤怒、抑郁和躁狂等发生率显著降低（55.1% *vs* 22.4%，$P < 0.05$），但如果患者既往采用 LEV 治疗时出现过行为相关不良

反应，转换为 BRV 后更有可能发生该反应 [48]。

5 妊娠期应用

动物实验研究表明，BRV 对生育能力无影响，并且在血浆暴露量大于临床暴露量时无潜在致畸性 [49]。当在兔母体中 BRV 暴露水平是最大推荐剂量的 8 倍时，会观察到胚胎毒性。关于 BRV 对人类生育力和致畸性的影响数据有限。在 BRV 临床试验期间报道的 31 例妊娠中，其中 15 例正常分娩，没有出现胎儿异常；14 例提前终止妊娠（包括 4 例自然流产、2 例流产和 8 例人工流产），未报道胎儿畸形 [19]。药物上市后仅有一项研究描述了 3 名癫痫妇女在妊娠期间接受 BRV 治疗的母婴结局，无明显产科并发症发生，产下了 3 名足月的婴儿，1 min 和 5 min 的 Apgar 评分均为 9 分，但发现其中 2 名婴儿患有轻微先天性畸形包括婴儿血管瘤和先天性真皮黑素细胞增多症 [50]。此外，Landmark 等 [51] 基于 2 个案例研究分析了妊娠期 BRV 药动学变化，发现 BRV 血浆水平在整个妊娠期间保持稳定。需要进一步研究来确定 BRV 在妊娠、母乳喂养的安全性以及药动学行为变化。

6 结语

BRV 是第一个高亲和力的 SV2A 配体，具有良好的药动学特征。在临床实践中，BRV 除了 FDA 批准的局灶性癫痫，对于全面性癫痫和癫痫持续状态亦均展示出了有效性，且安全性和耐受性良好。最常见的不良反应包括嗜睡、头痛、头晕和乏力。因不良反应而不能耐受 LEV 的患者使用 BRV 治疗效果会更佳，因缺乏疗效 LEV 治疗失败的患者可能从 BRV 中获益。目前关于 BRV 在特殊人群如妊娠期、哺乳期和老年人中应用的研究并不充分，仍需进一步评估。

参考文献

[1] Kanner AM，Bicchi MM. Antiseizure medications for adults with epilepsy：a review [J]. JAMA，2022，327（13）：1269-1281.

[2] Brodie MJ，Barry SJ，Bamagous GA，et al. Patterns of treatment response in newly diagnosed epilepsy [J]. Neurology，2012，78（20）：1548-1554.

[3] Shih JJ，WhitlockO JB，Chimato N，et al. Epilepsy treatment in adults and adolescents：expert opinion，2016 [J]. Epilepsy Behav，2017，69（1）：186-222.

[4] Markham A. Brivaracetam：first global approval [J]. Drugs，2016，76（4）：517-522.

[5] Ferragut FF，Soto IV，Bernardino CB，et al. Efficacy of brivaracetam in children with epilepsy [J]. Epilepsy Res，2021，177：106757.

[6] Wood MD，Gillard M. Evidence for a differential interaction of brivaracetam and levetiracetam with the synaptic vesicle 2A protein [J]. Epilepsia，2017，58（2）：255-262.

[7] Gillard M，Fuks B，Leclercq K，et al. Binding characteristics of brivaracetam，a selective，high affinity SV2A ligand in rat，mouse and human brain：relationship to anti-convulsant properties [J]. Eur J Pharmacol，2011，664（1-3）：36-44.

[8] Crowder KM，Gunther JM，Jones TA，et al. Abnormal neurotransmission in mice lacking synaptic vesicle protein 2A（SV2A）[J]. Proc Natl Acad Sci USA，1999，96（26）：15268-15273.

[9] Margineanu DG，Klitgaard H. Brivaracetam inhibits spreading depression in rat neocortical slices in vitro [J]. Seizure，2009，18（6）：453-456.

[10] Sargentini-Maier ML，Rolan P，Conell J，et al. The pharmacokinetics，CNS pharmacodynamics and adverse event profile of brivaracetam after single increasing oral doses in healthy males [J]. Br J Clin Pharmacol，2007，63（6）：680-688.

[11] Rolan P，Sargentini-Maier ML，Pigeolet E，et al. The pharmacokinetics，CNS pharmacodynamics and adverse event profile of brivaracetam after multiple increasing oral doses in healthy men [J]. Br J Clin Pharmacol，2008，66（1）：71-75.

[12] Finnema SJ，Rossano S，Naganawa M，et al. A single-center，open-label positron emission tomography study to evaluate brivaracetam and levetiracetam synaptic vesicle glycoprotein 2A binding in healthy volunteers [J]. Epilepsia，2019，60（5）：958-967.

[13] Von RP. Brivaracetam（UCB 34714）[J]. Neurotherapeutics，2007，4（1）：84-87.

[14] Toledo M，Whitesudes J，Schiemann J，et al. Safety，tolerability，and seizure control during long-term treatment with adjunctive brivaracetam for partial-onset seizures [J]. Epilepsia，2016，57（7）：1139-1151.

[15] Ben-Menachem E，Mamenikiene R，Quarato PP，et al. Efficacy and safety of brivaracetam for partial-onset seizures in 3 pooled clinical studies [J]. Neurology，2016，87（3）：314-323.

[16] Villanueva V，Lopz-Gonzalez FJ，Mauri JA，et al. BRIVA-LIFE-A multicenter retrospective study of the long-term use of brivaracetam in clinical practice [J]. Acta Neurol Scand，2019，139（4）：360-368.

[17] Steinig I，Von PF，Möddel G，et al. Postmarketing experience with brivaracetam in the treatment of epilepsies：a multicenter cohort study from Germany [J]. Epilepsia，2017，58（7）：1208-1216.

[18] Schoemaker R，Wade JR，Dsouza J，et al. Evaluation of brivaracetam efficacy as monotherapy in adult patients with focal seizures [J]. Epilepsy Res，2017，137：95-100.

[19] Makke Y，Abou-Khalil B. Brivaracetam efficacy and safety in focal epilepsy [J]. Expert Rev Neurother，2019，19（10）：955-964.

[20] Sucubert-Bast S，Willema LM，Kurlemann G，et al. Postmarketing experience with brivaracetam in the treatment of focal epilepsy in children and adolescents [J]. Epilepsy Behav，2018，89：89-93.

[21] Visa-Rene N，Raspall-Chaure M，Paredes-Carmona F，et al. Clinical experience with brivaracetam in a series of 46 children [J]. Epilepsy Behav，2020，107：107067.
[22] Lattanzi S，Canafoglia L，Canevini MP，et al. Adjunctive brivaracetam in older patients with focal seizures：evidence from the BRIVAracetam add-on first Italian netwoRk study（BRIVAFIRST）[J]. Drugs Aging，2022，39（4）：297-304.
[23] Sargentini-Maier ML，Homery MC，Stockis A. Pharmacokinetics，safety and tolerability of brivaracetam in healthy elderly subjects [J]. Epilepsia，2008，49（Suppl 7）：452.
[24] Kasteleun-Nolst DG，Gentonp，Parain D，et al. Evaluation of brivaracetam，a novel SV2A ligand，in the photosensitivity model [J]. Neurology，2007，69（10）：1027-1034.
[25] Fonseca E，Guzman L，Quintana M，et al. Efficacy，retention，and safety of brivaracetam in adult patients with genetic generalized epilepsy [J]. Epilepsy Behav，2020，102：106657.
[26] Strzelczyk A，Kay L，Bauer S，et al. Use of brivaracetam in genetic generalized epilepsies and for acute，intravenous treatment of absence status epilepticus [J]. Epilepsia，2018，59（8）：1549-1556.
[27] Aicua-Rapun I，Andre P，Rossetti AO，et al. Intravenous brivaracetam in status epilepticus：correlation between loading dose，plasma levels and clinical response [J]. Epilepsy Res，2019，149：88-91.
[28] Strzelczyk A，Stteinig I，Willms LM，et al. Treatment of refractory and super-refractory status epilepticus with brivaracetam：a cohort study from two German university hospitals [J]. Epilepsy Behav，2017，70（Pt A）：177-181.
[29] Orlandi N，Bartolini E，Audenino D，et al. Intravenous brivaracetam in status epilepticus：a multicentric retrospective study in Italy [J]. Seizure，2021，86：70-76.
[30] Santamarina E，Parejo CB，Sala J，et al. Use of intravenous brivaracetam in status epilepticus：a multicenter registry [J]. Epilepsia，2019，60（8）：1593-1601.
[31] Asadi-Pooya AA，Sperling MR，Chung S，et al. Efficacy and tolerability of adjunctive brivaracetam in patients with prior antiepileptic drug exposure：a post-hoc study [J]. Epilepsy Res，2017，131：70-75.
[32] Lattanzi S，De MG，Rosati E，et al. Brivaracetam as add-on treatment in focal epilepsy：a real-world time-based analysis [J]. Epilepsia，2021，62（1）：e1-e6.
[33] Snoeren A，Maioie M，Fasen K，et al. Brivaracetam for the treatment of refractory epilepsy in patients with prior exposure to levetiracetam：a retrospective outcome analysis [J]. Seizure，2022，96：102-107.
[34] Szaflarski JP，Sadek A，Greve B，et al. Randomized open-label trial of intravenous brivaracetam versus lorazepam for acute treatment of increased seizure activity [J]. Epilepsy Behav，2020，109：107127.
[35] Lee K，Klein P，Dongre P，et al. Intravenous brivaracetam in the management of acute seizures in the hospital setting：a scoping review [J]. J Intensive Care Med，2022，37（9）：1133-1145.
[36] Kalviainen R，Genton P，Anderrmann E，et al. Brivaracetam in Unverricht-Lundborg disease（EPM1）：results from two randomized，double-blind，placebo-controlled studies [J]. Epilepsia，2016，57（2）：210-221.
[37] Robertson J，Hatton C，Emerson E，et al. Prevalence of epilepsy among people with intellectual disabilities：a systematic review [J]. Seizure，2015，29：46-62.
[38] Gillis R，Wammes-Van DH，Schelhaas HJ，et al. Efficacy and tolerability of brivaracetam in patients with intellectual disability and epilepsy [J]. Acta Neurol Belg，2021，121（3）：677-684.
[39] Andres E，Kerling F，Hamer H，et al. Behavioural changes in patients with intellectual disability treated with brivaracetam [J]. Acta Neurol Scand，2018，138（3）：195-202.
[40] Lattanzi S，Canafoglia L，Canevini MP，et al. Brivaracetam as add-on treatment in patients with post-stroke epilepsy：real-world data from the BRIVAracetam add-on first Italian netwoRk study（BRIVAFIRST）[J]. Seizure，2022，97：37-42.
[41] Brandt C，Klein P，Badalamenti V，et al. Safety and tolerability of adjunctive brivaracetam in epilepsy：in-depth pooled analysis [J]. Epilepsy Behav，2020，103（Pt A）：106864.
[42] Meador KJ，Laloyaux C，Elmoufti S，et al. Time course of drug-related treatment-emergent adverse side effects of brivaracetam [J]. Epilepsy Behav，2020，111：107212.
[43] Klein P，Devinsky O，French J，et al. Suicidality risk of newer antiseizure medications：a meta-analysis [J]. JAMA Neurol，2021，78（9）：1118-1127.
[44] Rosillon D，Astruc B，Hulhoven R，et al. Effect of brivaracetam on cardiac repolarisation--a thorough QT study [J]. Curr Med Res Opin，2008，24（8）：2327-2337.
[45] Witt JA，Elger CE，Helmstaedter C. Short-term and longer-term effects of brivaracetam on cognition and behavior in a naturalistic clinical setting-preliminary data [J]. Seizure，2018，62：49-54.
[46] Hellerslia V，Asistido JM，Iyamu A. Brivaracetam for epilepsy [J]. JAAPA，2019，32（5）：21-22.
[47] Abraira L，Salas-Puig J，Quintana M，et al. Overnight switch from levetiracetam to brivaracetam. Safety and tolerability [J]. Epilepsy Behav Rep，2021，16：100504.
[48] Snoeren A，Majoie M，Fasen K，et al. Brivaracetam for the treatment of refractory epilepsy in patients with prior exposure to levetiracetam：a retrospective outcome analysis [J]. Seizure，2022，96：102-107.
[49] De BS，Gigli GL，Valente M. Brivaracetam for the treatment of focal-onset seizures：pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluations [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol，2020，16（10）：853-863.
[50] Paolini SL，Pilato M，Rajasekaran V，et al. Outcomes in three cases after brivaracetam treatment during pregnancy [J]. Acta Neurol Scand，2020，141（5）：438-441.
[51] Landmark CJ，Rektorli L，Burns ML，et al. Pharmacokinetic data on brivaracetam，lacosamide and perampanel during pregnancy and lactation [J]. Epileptic Disord，2021，23（2）：426-431.

（收稿日期：2022-09-15；修回日期：2022-10-20）

医药知识产权

抗痛风中药新药品种的专利布局分析

徐慧芳[1]，刘盼[2]，褚丹丹[1]，王铁融[1]，侯媛媛[1]，刘伟[1*]（1. 北京中医药大学管理学院，北京　100029；2. 北京中医药大学图书馆，北京　100029）

摘要：目的　分析抗痛风中药新药品种的专利布局，为各类创新主体在中药新药研发与技术创新过程中加强专利的保护与运用提供参考。**方法**　基于现有的抗痛风中药新药的专利申请情况，按新药阶段划分，选取重点品种梳理其技术发展脉络，分析专利布局特点。**结果**　筛选出具有代表性的 3 个新药品种，分别是作为未上市新药代表的芪桂痛风片、作为上市新药代表的虎贞清风胶囊和作为已上市新药的二次开发代表的青鹏软膏。**结论**　抗痛风中药新药的研发，不仅需要重视加减方的传承创新，综合考虑多维要素与多重价值来规划专利布局，还应深化政产学研合作，多方协力攻克关键技术，促进中医药产业的高质量发展。

关键词：抗痛风；新药品种；中药新药研发；专利布局
中图分类号：R288　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-1013-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.028

Patent portfolios of new anti-gout Chinese materia medica species

XU Hui-fang[1], LIU Pan[2], CHU Dan-dan[1], WANG Tie-rong[1], HOU Yuan-yuan[1], LIU Wei[1*] (1. *School of Management*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 100029; 2. *Library of Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 100029)

Abstract: Objective To analyze the patent portfolios of new anti-gout Chinese materia medica species, and provide reference for innovation subjects to strengthen patent protection and application in research and development of new Chinese medicine and technological innovation. **Methods** Based on the patent application of existing anti-gout new Chinese medicine, the key Chinese materia medica species were selected to sort out their technological development context and analyze the characteristics of patents according to the stage of new drugs. **Results** Totally 3 representative anti-gout Chinese materia medica species were selected, namely Qigui Tongfeng tablets as the representative of unmarketed new Chinese medicine, Huzhen Qingfeng capsules as the representative of marketed new Chinese medicine new, and Qingpeng ointment as the representative of secondary development of marketed new Chinese medicine. **Conclusion** The research and development of new anti-gout Chinese medicine not only needs attention in the inheritance and innovation of modified Chinese herbal prescriptions, comprehesive consideration of multidimensional elements and multiple values but also of patent portfolios. We also need to deepen the government-industry-university-research cooperation, and conquer the key technologies, thus promoting high-quality development of Chinese medicine.

Key words: anti-gout; species of new drug; new drug research and development in Chinese materia medica; patent portfolio

痛风病是指与高尿酸血症、尿酸盐沉积密切相关的进展性代谢疾病[1]。随着痛风病的进

基金项目：国家知识产权局专利专项研究项目（No.FX202212）。
作者简介：徐慧芳，女，硕士研究生，主要从事医药知识产权与成果转化研究，email：guiahua@163.com　*通信作者：刘伟，男，副教授，主要从事医药知识产权与成果转化研究，email：nolanlucky@163.com

展，不仅会导致反复发作性急性关节炎，甚至造成关节畸形、尿酸性肾结石、肾脏病变等，给患者带来经济和身心的多重负担。据产业研究预测，2022 年我国与全球高尿酸血症及痛风的患者人数将分别增长为 1.8 亿和 10.3 亿，2030 年我国药品市场规模将高达 108 亿元，临床与市场对抗痛风药的需求都极为迫切 [2]。

中医药在抗痛风领域体现出“整体论治”，有效应对各类兼夹症的优势。从中药新药受理审批趋势看，自 2000 年至今，仅虎贞清风胶囊 1 款原研创新中药上市。另有芹槐胶囊、土藤草颗粒、芪桂痛风片等 11 款新药尚处于临床试验阶段。通过检索发现芪桂痛风片、虎贞清风胶囊和青鹏软膏展现了新药研发不同阶段的专利布局特征，希冀通过剖析其发现之路、出道之路和突围之路，为抗痛风中药新药的产业发展提供借鉴。

1　案例收集与选择

首先，以“痛风”“尿酸”“历节风”“痛风石”“痹”作为药品名称或适应证的关键词，在国家药品监督管理局药品审评中心和药智网进行检索，设置药品类型为中药，申请类型为新药，摘录所有受理的新药品种。其次，在国家知识产权局专利检索系统和 incopat 数据库进行专利检索，检索日期截至 2022 年 7 月 30 日，简单同族合并和人工剔除不相关专利，收集抗痛风中药专利和新药品种的相关专利信息，检索要素如下：① 以前述痛风关键词，结合“中药”“植物药”“草药”“天然药”“原料药”作为中药关键词，实现中英互译，限定 IPC 领域为 A61P19/06、A61K36、A61K35/78；② 基于上述新药品种，分析专利文献或药品说明书中的主要组成药味，以中药商品名或组成药味作为关键词。

为确保研究目的的实现，严格采取以下标准选择抗痛风中药新药品种：第一，明确为国家药品监督管理局药品审评中心已受理的新药注册申请；第二，新药品种涉及专利量较多，且上市许可人或主要申请人具有较高的专利保护与运用技巧的优先考虑；第三，新药品种各上市环节的布局特征应更凸显、更具对比性；第四，以全球抗痛风中药的授权专利数据互为补充，是否有专利布局完善的未注册新药阶段可供分析。最终，纳入未上市新药芪桂痛风片，新批准上市新药虎贞清风胶囊和已上市新药青鹏软膏 3 个新药品种。

2　案例分析

2.1　芪桂痛风片核心组方的发现之路

芪桂痛风片属江苏康缘药业股份有限公司（简称“康缘药业”）独家研发品种，该品种于 2016 年 4 月获得临床批件，目前处于Ⅱ期临床试验阶段，临床试验的适应证为慢性期痛风。芪桂痛风片取自《金匮要略》的黄芪建中汤 [3]，黄芪建中汤由黄芪、桂枝、饴糖、芍药、生姜、大枣和甘草 7 味药组成，共同发挥健脾益气、温中补虚和缓急止痛的功效，主治脾胃虚寒、肝脾失调和阴阳不和等证候 [4]。芪桂痛风片取黄芪建中汤中的黄芪、桂枝两味，依据临床证候特点与经验，经不断开发，最终化裁为由黄芪、桂枝、五加皮、刘寄奴、浙贝母、秦皮、海风藤和野菊花 8 味中药材配伍的方剂，共奏扶正祛邪、通络止痛的功效，用于慢性痛风性关节炎，症见脏腑气弱、痰瘀阻滞、经络不通导致的轻、中度疼痛 [5]。

康缘药业围绕芪桂痛风片布局 7 件专利，其中 6 件专利已获授权。1 件技术主题涉及制备方法和检测方法，其他技术主题均以组合物为主。从芪桂痛风片专利布局情况来看，康缘药业主要聚焦于芪桂痛风片组合物的保护，并与江苏中康药物科技有限公司（简称“中康公司”）展开研发合作。康缘药业与中康公司合作申请专利 1 件，自中康公司受让专利 4 件。中康公司系南京中医药大学与康缘药业于 2001 年合作创建，主营业务包括中药新药开发、指纹图谱研究、药理毒理研究、技术转让 / 培训 / 咨询 / 服务等。康缘药业按市场化的运作方式，与南京中医药大学协同创新，不断优化配伍组合，从中药材到中药组分的研究，研发力度逐步深化，产出了一系列痛风中药组合物专利，见图 1。

芪桂痛风片专利的研发基础始于 2008 年（CN10732386B），以刘寄奴、秦皮和野菊花 3 味药为基础方，可随症选用海风藤、黄芩、泽兰和桂枝。刘寄奴有活血化瘀、通经止痛之功效；秦皮有祛风湿、通经络止痛之功效；野菊花则性微寒、善解毒，有清热解毒之功效。三药合用高效低毒，能有效降低血尿酸浓度，适用于痛风潜伏期。随后五年间，康缘药业通过增加药味、改变药量，以拓宽适应证的方式布局专利。

因浙贝母有消痰散结之功效，三七有化瘀止血、活血定痛之功效，汉桃叶有祛湿消肿之功效，2019 年康缘药业同时申请了两件专利并获得授权，一件在基础专利（CN10732386B）上加入浙贝母（CN101829264B），适用于高尿酸血症、尿酸性肾病或者痛风急性期；另一件在基础专利上加入浙贝母、三七、汉桃叶（CN101929265B），用于镇痛抗炎，降低血尿酸浓度，适用于风湿性 / 类风湿性 / 骨性关节炎和痛风急性期。因海风藤同秦皮共奏祛风湿、通经络止痛之功效，五加皮有补肝肾、祛风湿强筋骨之功效，康缘药业又开发了以刘寄奴、秦皮、浙贝母、野菊花、海风藤和五加皮为基础方的

专利（CN101953984B），适用于高尿酸血症与痛风性关节炎。

2012 年，在专利公开号为 CN101953984B 的基础上，深入研究黄芪、五加皮、桂枝、刘寄奴、秦皮、浙贝母、野菊花和海风藤，发现降低药量可以增强药效，取得了意想不到的效果，适用于痛风性关节炎，申请了芪桂痛风片的核心组方专利 CN103893512B。2013 年 12 月，芪桂痛风片的新药注册申请被国家药品监督管理局药品评审中心受理。

为增强对上述组合物的质量控制，康缘药业于 2016 年提交了 1 件片剂的制备方法和检测方法的专利（CN107753724A），该专利以药效筛选工艺为基础，使用常规提取设备，以便更好地保留有效成分和药效。且提供了黄芪、桂枝、浙贝母、秦皮、五加皮的薄层鉴别，解决了桂枝、五加皮缺乏专属性薄层鉴别的缺陷，增加了黄芪甲苷的高效液相色谱含量测定，有效提高了产品质量。

后续进一步改进配方，康缘药业申请保护以黄芪、桂枝、玫瑰花、浙贝母、五加皮为主要添加的中药组分及其在抗急性痛风性高尿酸血症、镇痛、抗炎中的应用（CN106421316B）。

由上述芪桂痛风片专利信息，发现其布局呈现如下特点：

① 专利申请与新药注册申请、临床试验进展平行。康缘药业于 2012 年 12 月申请专利，2013 年 12 月新药注册申请受理，2014 年 7 月获得专利授权，整个阶段具有连贯性。另外，随着临床前研究的完成，公司逐渐从产品组合物转向了制备方法与检测方法的布局，对药效稳定性、产品产业化研究的投入增加。② 根据权利要求，专利申请的保护范围呈明显的“核心组方＋非核心组方”递进式，且含多技术环节的布局。③ 康缘药业基础专利具有较大的保护范围，但并未急于纵深研究优化药量配比、有效成分、制备工艺等，而是先注重从组方加减方向考虑，布局加减方专利，尽可能多地申请不同的技术方案，阻碍竞争者的进入。

2.2　虎贞清风胶囊产学研的出道之路

虎贞清风胶囊（原名虎贞痛风胶囊）是由暨南大学生命科学学院王一飞教授、李久香教授团队在临床经验方的基础上，运用现代中药的研究方法，历时多年研制出的现代中药复方制剂。由虎杖、车前草、女贞子和蜂房 4 味中药配伍而成，共同发挥清热利尿、滋补肝肾、降尿酸、降血脂和抗炎止痛的作用，适用于轻中度急性痛风性关节炎（湿热蕴结证）的治疗。

虎贞清风胶囊的上市之路始于 2006 年，团队自行完成临床前研究后，与广东一力集团制药股份有限公司（简称“一力制药”）合力完成药物的临床研究，在 2008—2015 年 12 月期间陆续展开Ⅱ、Ⅲ期多项临床试验，最终于 2021 年 12 月获国家药品监督管理局批准为 1.1 类创新中药而成功上市，上市许可持有人为一力制药。经了解，虎贞清风胶囊项目从 2008 年始受国家、广东省政府和广州市政府对重大新药创制项目、生物产业科技重大专项、科技型中小企业技术创新基金、产学研创新平台等多方资助，为研究提供了有力保障。此外，在广东省肇庆市市场监管局的助推下，一力制药与北京中医科学院、中山大学、暨南大学等高校和科研机构建立了产学研合作，成立了新药、仿制药研究和药品二次开发等系列创新研发项目。

检索发现，虎贞清风胶囊从 2006 年开始累计申请 10 件专利，6 件获得授权。广州暨南生物医药研究开发基地有限公司（简称“暨南生物”）是主要申请人，其是暨南大学与广州市科技局在 2002 年共同成立的生物医药“研发＋孵化”一体化机构。近十五年其专利申请布局情况如图 2 所示，包含组合物、制备方法、剂型、检测方法和适应证五类常见中医药申请的技术主题的创新。其专利主要受让自合作伙伴——成立于 2015 年的广东大鹏医药科技有限公司（简称“大鹏医药”）。大鹏医药是由暨南大学与广州市科技和信息化局共同设立，致力于虎贞清风胶囊的新剂型和新适应证的开发。因此，虎贞清风胶囊的专利仍主要处于自研发、自运营阶段 [7]。

在复方产品方面，2006 年，暨南大学申请了治疗痛风性关节炎的组合物专利（CN1931245B），即虎贞清风胶囊的核心组方。2020 年，大鹏医药对核心药方再次进行改进，新增拐枣、洋金花、前胡、银杏叶和寻骨风等药味，全方在加强镇痛效果的同时，以片剂的制剂形式，更好地提高了患者依从性、物料流动性和疗效稳定性（CN11419945A）。

在检测方法方面，2013 年，暨南生物提交了一项名为“一种虎贞清风胶囊的检测方法”的专利（CN103134890B），之前的技术无法在同一色谱条件下同时测定虎杖中的虎杖苷与白藜芦醇苷、车前草中的大车前苷以及女贞子中的特女贞苷 4 种成分的含量，操作烦琐、检测成本高等问题。为解决上述问题，本专利优化了高效液相色谱法色谱条件和供试品的制备，确定的检测方法具有专属性好、灵敏度高、分离度好和准确性、重现性、稳定性符合要求等优势。

在功效方面，2015 年，暨南生物发现肾脏疾病、前列腺炎和代谢疾病（高血压病 / 高血脂症 / 高血糖症）与痛风有相似的病因病机，以补益肝肾、清

图 1　芪桂痛风片药品注册与专利布局分析

Fig 1　Registration and patent portfolios of Qigui Tongfeng tablets

图 2　虎贞清风胶囊的药品注册与专利布局分析

Fig 2　Registration and patent portfolios of Huzhen Qingfeng capsules

热利湿、化瘀利浊为治法治则，同一时间提交了三份公开号分别为 CN104644768A、CN104644769A、CN104644770A 的专利申请，即在发明精神与核心组方相同的保护范围内，通过改进和润饰该组方的不同的配比组合，拓宽了其适应证。

在剂型方面，暨南生物为克服传统方法中药资源浪费、药效低等问题，研发了利用药渣发酵制备颗粒剂的方法以提高资源利用率（CN104800298B）。同年，为使患者依从性更高、药物直达病处、减少不良反应，将组合物制备成喷雾剂（CN104825554B），更易于推广应用。

在制备方法方面，暨南生物于 2018 年申请一项名为“一种虎贞痛风超微粉的制备方法”的专利（CN108371676B）。针对药物有效成分低、疗效不明显的问题，暨南生物通过中药超微粉碎技术破碎药材的细胞壁，来提高细胞的破壁率、比表面积，提高有效成分溶出度，从而使药品的口感、气味和质量得到改善。同年，针对上述问题，暨南生物进一步提交一项名为“一种虎贞痛风纳米颗粒剂的制备”专利（CN108524612B）。

上述虎贞清风胶囊的专利申请，其布局呈现出如下特点：

① 具有典型的“核心专利＋外围专利”的障碍式布局模式，即围绕着一个核心组方申请专利后，将与之关联的制备方法、检测方法等技术进一步申请专利，以扩大该新药的专利保护网。虎贞清风胶囊的专利，较康缘药业的芪桂痛风片的布局相反，从技术纵深方向布局外围专利，制备方法、剂型、检测方法和功效均有涉及。② 纵深布局的时间轴与药品上市布局时间轴分阶段同步进行。在临床前研究

至Ⅱ期临床试验阶段，注重药品质量的改进；到了Ⅲ期临床试验时，试验的人群范围更大，发现其在肾脏类、代谢类、前列腺炎疾病方面有更好的疗效，并基于人体临床试验数据加以布局；再者，为提高药物使用的便捷性，申请了新剂型颗粒剂、喷雾剂、超微粉和纳米颗粒剂的制备方法。从核心处方专利开发到新药上市间隔了将近十六年。当前虎贞清风胶囊的首件核心组方专利期限将届满，在单纯片剂创新不具备授权前景的情况下，对组方加以改进，既增强药效，又有力地延长了药品的生命周期。③ 虎贞清风胶囊的成功，离不开产、学、研的合力。这提示我们，要充分整合产业及科研资源，打通各产业链环节，实现产学研合作，优势互补。

2.3　青鹏软膏二次开发的突围之路

青鹏软膏（藏文名：秀巴恰琼恩保）为藏药的经典方。该药成方于 16 世纪，最初记载于《藏医医诀补遗》，距今已有 500 多年的临床用药经验。处方收载于《卫生部颁药品标准》95 年版藏药第一册，由棘豆、亚大黄、宽筋藤、铁棒锤、安息香、麝香、诃子、毛诃子和余甘子这 9 味传统藏药材组成[8]，对痛风性关节炎止痛消肿疗效显著。经临床与药理学研究证实，该药具有调节炎症介质、保护关节软骨、激活类阿片机制等多重重要作用[9]。

青鹏软膏非独家品种，其生产厂家主要由西藏奇正藏药股份有限公司（简称“奇正藏药”）、金诃藏药股份有限公司（简称“金诃藏药”）和青海省通天河藏药制药有限责任公司（简称“通天河藏药”）生产。多数生产标准由奇正藏药提出，所生产产品已纳入国家医保目录乙类品种，年销售额过亿。

由图 3 可知，众药品生产企业对青鹏软膏这一经典方的开发始于 2003 年，累计申请 19 件专利，其中授权 18 件，1 件被驳回。专利的申请企业与生产企业紧密相关，奇正藏药依然是青鹏软膏相关专利开发的最重要主体，授权率高，拥有专利权 16 件。2003—2018 年，对其技术主题进行细分，涉及复方产品、制备方法、剂型、检测方法四类。剂型的开发是青鹏软膏的关键技术点。

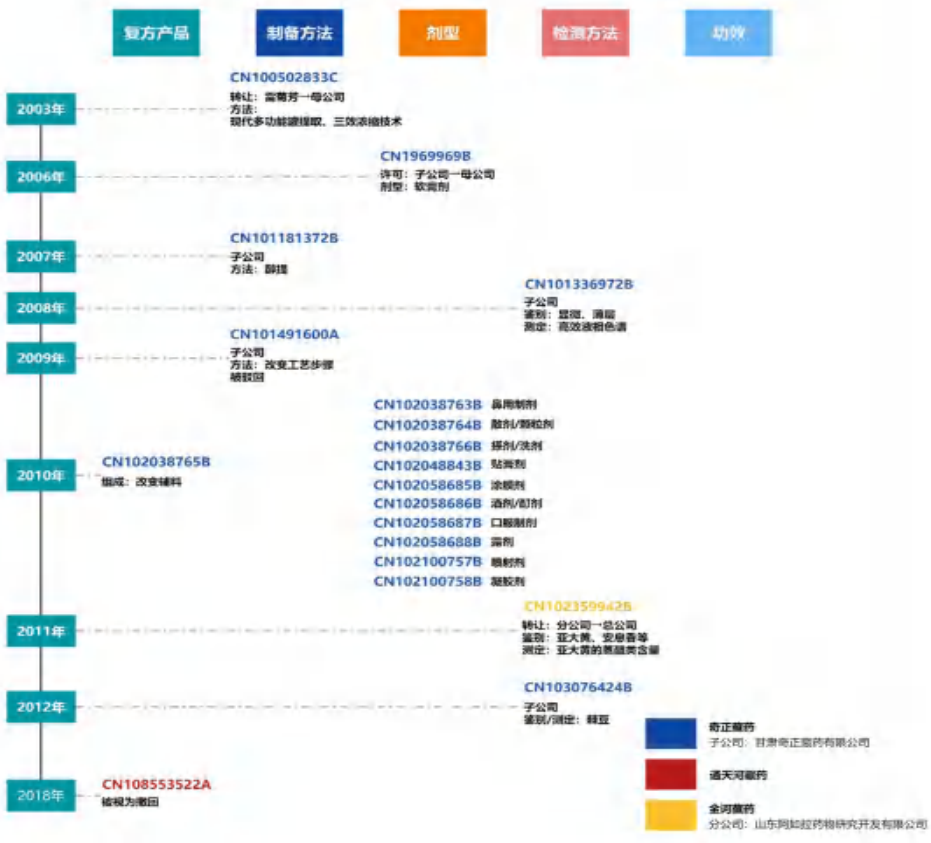


图 3　青鹏软膏专利布局分析

Fig 3　Analysis on the patent portfolios of Qingpeng ointment

在制备方法方面，奇正藏药以工艺稳定、零添加化学合成稳定剂与药效提高为主线对青鹏软膏进行了改进。2003 年，采用现代多功能罐提取和三效浓缩技术（CN100502833C）；2007 年，采用现代先进的醇提工艺（CN101181372B）；2009 年，通过改进制备步骤（CN101491600A），即“部分浓缩—部分粉碎—混合乳化—加入麝香”，得到青鹏膏剂。基于上述改进，极大地提高了软膏剂的生药成分，

使之更易吸收，更易产业化。

在复方产品方面，奇正藏药 2010 年在原基本方的基础上，通过增加辅料丹和油（CN102038765B），解决了原辅料来源困难、制备工艺不稳定，药物渗透性差，生物利用率低，存放、携带不便等难题。2018 年，通天河藏药申请了公开号为 CN108553522A 的专利，尽管限定了诃子为诃子（去核）、药物颜色、颗粒粒度和改进制备技术这一系列区别技术特征，但因其技术方案完全落入奇正藏药的保护范围内，审查员指出基于对比文件 CN101491600A，其区别技术特征不具备创造性，且通天河藏药未在规定期限内答复，该专利被视为撤回。

在剂型方面，奇正藏药首次布局在 2006 年，但多数集中于 2010 年。通过技术改革，采用添加不同的辅料成分与配套的制备工艺（见表 1）相结合的技术手段，向着病患依从性更高、药效吸收效果更好、剂型更丰富更现代化的方向发展。完成了“内服＋外用”制剂类型的专利布局，包括鼻用制剂、散剂或颗粒剂、搽剂或洗剂等 10 件，相关专利均已获得授权。

表 1　青鹏软膏不同剂型的辅料组成

Tab 1　Excipients of different dosage forms of Qingpeng ointment

公开（公告）号	剂型	辅料
CN102038763B	鼻用制剂	潜溶剂、缓冲剂、pH 调节剂、稳定剂、等渗调节剂、抑菌剂
CN102038764B	散剂或颗粒剂（药浴）	抑菌剂
CN102038766B	搽剂或洗剂	乙醇、甘油、液体石蜡、氮酮、蒸馏水
CN102048843B	贴膏剂	黏合剂（水溶性聚合物 / 胶黏剂 / 骨架型黏合剂），根据黏合剂选用填充剂、软化剂、增黏剂、保湿剂、抑菌剂、交联剂、pH 调节剂、透皮吸收促进剂、助溶剂
CN102058685B	涂膜剂	成膜剂、增塑剂、透皮吸收剂
CN102058686B	酒剂或酊剂	食用白酒或乙醇、吸附剂
CN102058687B	口服制剂	常规辅料
CN102058688B	露剂	无
CN102100757B	喷射剂	喷射剂、赋形剂、乳化剂、增溶剂、保湿剂、防腐剂
CN102100758B	凝胶剂	凝胶骨架材料、透皮促进剂、pH 调节剂、保湿剂、稳定剂、抑菌剂、表面活性剂

在检测方法方面，对青鹏软膏的改进呈现出从药物整体质量标准到单个组分质量标准的攻克，以及从定性到定量的递进。奇正藏药在 2008 年提出了青鹏软膏的质量标准组合物，同时建立了铁棒锤中乌头碱 $C_{34}H_{45}O_{11}N$ 的限量检测，提高了药品质量的稳定性，更利于工业化生产的检测（CN101336972B）。2011 年，金诃藏药提高了青鹏软膏质量标准，新增薄层色谱法鉴别亚大黄、安息香、没食子酸，以及亚大黄的蒽醌类含量测定项。金诃藏药该专利布局在一定程度上对奇正藏药构成了威胁，奇正藏药于 2012 年抓紧布局棘豆药材的薄层色谱法定性鉴别方法，以及用高效液相色谱法测定其中含有的 2'，4'- 二羟基查尔酮含量。以上改进路线，都使得测定方式的专属性更强。

从上述青鹏软膏的专利申请，其布局呈现出如下特点：

① 青鹏软膏是药企基于经典名方的二次开发，是从有到优的过程。其专利新颖性和创造性，因组方与功能主治均已固定而先天不足。奇正藏药从两方面进行“提质升效”的专利布局，一方面是保障药品质量稳定可控，如药材资源可得、利用高效，质量标准提升，制备工艺优化；另一方面是将药物的临床价值与市场价值相结合，在核心方的基础上，加入一定成分配比的辅料，注重色香味的改善，提高使用便捷度，适用人群更为广泛。②奇正藏药和金诃藏药为藏药市场发展的领头羊。奇正藏药对于青鹏软膏的专利布局与其经营战略相匹配，显得更具有针对性和策略性。于同日提交多份剂型专利，在避免专利间相互影响的同时，尽力阻止其他药企对青鹏软膏剂型进行后续的开发。

3　讨论

基于上述 3 个中药新药品种的专利布局与上市情况的进展分析，为推动抗痛风中药新药产业高质量发展，总结出如下共性与个性亮点。

3.1　重视加减方专利布局，巧用现代技术赋能

经药味或其用量筛选、或与基础方的对比实验，即可证明加减方取得了增强疗效或拓宽适应证等预料不到的技术效果属于专利法可保护的对象。常见的有相同功效的原料药替换、增加原料药、减少原料药和 / 或用量、合方运用以及改变已知方的主要药味。此外，亦可运用现代技术赋能传统医药，对已知方进行二次开发，包括阐明药理作用机制和特点，提取、分离、富集和结构鉴定中药有效成分；在现有成药基础上进行新技术、新工艺和体现临床应用优势的新剂型的改进等，提高生产质量与工艺 [10]。

3.2　多维审视专利布局，助力新药走出国门

新药专利布局时，可审视技术、时间、空间和

主体四维度，构建起关键核心技术的保护壁垒。芪桂痛风片和虎贞清风胶囊均通过“技术＋时间”的二维组合，在新药注册受理相近的时期提出专利保护，最大程度地保证了专利保护期，并随着研发的进展逐步布局外围专利，使其专利权更加稳固。此外，抗痛风中药新药重点品种现阶段尚未开展海外布局。文献提示，韩国韩医学研究院一件名为“含有甘菊及桂皮的混合提取物作为有效成分用于抑制痛风的组合物”的专利（CN107106623A）在进入中国市场时，康缘药业公开号为 CN10195398A 的专利被审查员在第一次实质审查引用为对比文件，从而判定其专利不具备新颖性。“技术＋时间＋空间”的组合预警创新主体，应适时关注疾病的国际流行趋势与相关药物的海外研发动态，重视市场导向和各地区的专利制度与植物药相关政策，进行技术的改进与布局。

3.3　政府引导、产学研合力，助推新药创新研发

打通漫长的新药研发产业链，需要稳定可持续的资金链、人才链、技术链和营商环境的融合。政府在其中充当了“补链强链”的关键角色，激励多主体共创共建中医药科技创新体系。首先，虎贞清风胶囊与芪桂痛风片项目均得到来自国家重大新药创制和地方性科技计划（专项、基金）等由政府统筹支持的科技创新项目的支持，充分发挥了财政在科技投入方面的引导作用。其次，地方政府创新组织形式，牵头项目的孵化，给予资源对接、平台服务、税费减免和多渠道融资等便利。虎贞清风胶囊项目通过与企业、高校等创新主体共建“研发＋孵化”平台，有效整合区域资源，优化了创新生态环境，进而加速产品的研发和专利技术的转化，后又以专利和技术推动与制药企业的合作开发。最后，经过相关政府部门对生物医药产业重点项目的持续监督追踪，实现中药新药上市。

3.4　精准化制订布局策略，打造新药品牌金名片

医药企业结合法律、科技、经济、管理等手段制订专利布局策略，是其能在激烈的竞争中勇立潮头的保证 [11]。在确保药品质量安全和疗效的基础上，挖掘更多产品的附加价值，把专利运营与学术价值、临床价值、市场价值相结合，以实施差异化的战略来提高企业的核心竞争力 [12]。青鹏软膏作为老药，在学术端，成功打造其成为外用治疗痛风的首选，并纳入痛风诊疗方案，巩固了该产品在专业领域的学术地位；在市场端，奇正藏药顺应互联网的发展，通过建立优质的痛风慢病管理社群，线上线下“医＋药＋患”一体化的联动方案精准营销，再次激发了青鹏软膏市场活力。在学术和市场的品牌竞争力得到提升，成功打造“奇正”品牌的金名片。金诃藏药对于青鹏软膏的布局和营销策略相对单薄，双方可结合自身发展，理性通过专利交叉许可等多种方式，改进青鹏软膏技术。

4　结语

如今，痛风已成为我国的第二大类代谢性疾病 [13]。中药从新药研发到成功上市，是一个复杂的系统过程，需借助多方的力量合力攻坚关键技术，合理统筹专利布局进程，持续创新，服务于临床需要的同时，开拓海内外市场，实现社会效益与经济效益的双提升。

参考文献

[1] 黄晶，杨婷，王雨，等 . 痛风病的国内外认识及治疗进展与思考 [J]. 世界中医药，2021，16（1）：1-7.

[2] 2022 年全球及中国高尿酸血症及痛风行业市场规模预测分　析 [EB/OL].（2022-11-10）[2022-02-09]. https：//baijiahao. baidu. com/s?id ＝ 1724273133112966814 &wfr ＝ spider&-for ＝ pc.

[3] 邓奕，张红，曹亮，等 . 芪桂痛风片对痛风性关节炎动物模型的镇痛研究 [J]. 现代药物与临床，2014，29（6）：589-593.

[4] 赵雨坤，罗丹，郑光，等 . 基于文本挖掘技术探索黄芪建中汤的应用规律 [J]. 中国中医基础医学杂志，2015，21（10）：1305-1306，1319.

[5] 张小强，李英，吴云，等 . 芪桂痛风片的质量标准研究 [J]. 中国新药杂志，2017，26（2）：169-173.

[6] 柯志鹏，张新庄，丁玥，等 . 利用网络药理学方法研究芪桂痛风片的药效物质基础与分子作用机制 [J]. 中国中药杂志，2015，40（14）：2837-2842.

[7] 陈创荣，张耿语，洪海都，等 . 粤港澳大湾区中医药专利运营现状分析与建议 [J]. 中国现代中药，2022，24（9）：1760-1769.

[8] 周晓妍，汪元元，孙娜，等 . 青鹏软膏治疗类风湿关节炎湿热痹阻证疗效观察 [J]. 临床医药文献电子杂志，2017，4（11）：2137.

[9] 谢靖萍，潘锐焕，詹杰，等 . 青鹏软膏药理作用及临床应用的研究进展 [J]. 中医药导报，2020，26（9）：164-167.

[10] 中共中央国务院 . 中共中央国务院关于促进中医药传承创新发展的意见 [EB/OL].（2019-10-26）[2023-01-09]. http：//www. gov. cn/zhengce/2019-10/26/content_5445336. html.

[11] 杨舒杰，袁红梅，王静 . 我国生物医药企业专利策略研究——以沈阳市为例 [J]. 中南药学，2013，11（12）：946-948.

[12] 江海龙 . LW 公司中成药二次开发专利管理研究 [D]. 杭州：浙江工业大学，2017.

[13] 赵敏，陈婷，黄振光，等 . 1990—2019 年中国痛风疾病负担研究 [J]. 现代预防医学，2021，48（21）：3974-3978.

（收稿日期：2022-10-10；修回日期：2022-12-20）

药物分析与检验

氢定量核磁共振法测定光甘草定含量

杨玉琴[1, 2]，海力马依·海米提[1]，热依木古丽·阿布都拉[1]，阿吉艾克拜尔·艾萨[1, 2*]，侯雪玲[1, 2*]
（1.中国科学院干旱区植物资源化学重点实验室，中国科学院新疆理化技术研究所，乌鲁木齐　830011；2. 中国科学院大学，北京　100049）

摘要：目的　建立氢定量核磁共振法（^{1}H qNMR）法测定光甘草定的含量。**方法**　采用 Bruker AVANCE NEO 600 MHz 核磁共振仪，以氘代甲醇为溶剂，磺胺多辛为内标，以磺胺多辛 δ_H 8.04（1H，s）、δ_H 7.73（2H，d）处的峰为内标定量峰，光甘草定 δ_H 6.87（1H，d）、δ_H 6.79（1H，d）、δ_H 5.56（1H，d）处的峰为样品定量峰，用内标法进行测定。测定条件：脉冲序列为 zg30，弛豫延迟时间为 30 s，温度为 298 K，扫描次数为 16 次，采集时间为 2.5 s，增益为 63.32。**结果**　建立的方法重复性好，精密度高，线性范围广。最终测得本批样品含量为 99.42%，与 HPLC 法所得结果基本一致。**结论**　本文建立的 ^{1}H qNMR 法预处理简单、检测快速高效、结果稳健可靠，为光甘草定的质量控制及对照品的赋值提供了新方法。

关键词：氢定量核磁共振法；含量测定；内标法；光甘草定
中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-1020-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.029

Determination of the absolute content of glabridin by ^{1}H quantitative nuclear magnetic resonance

YANG Yu-qin[1, 2], Helimay Himit[1], Rahima Abdulla[1], Haji Akber Aisa[1, 2*], HOU Xue-ling[1, 2*] (1. *Key Laboratory of Plant Resources and Chemistry in Arid Regions*, *Xinjiang Technical Institute of Physics & Chemistry*, *Chinese Academy of Sciences*, *Urumqi*　830011; 2. *University of Chinese Academy of Sciences*, *Beijing*　100049)

Abstract: Objective　To determine glabridin by ^{1}H quantitative nuclear magnetic resonance (^{1}H qNMR). **Methods**　The ^{1}H qNMR was obtained on Bruker AVANCE NEO 600 MHz NMR spectrometer with deuterated methanol as the solvent and sulfadoxine as internal standard. The characteristic peaks of sulfadoxine at δ_H 8.04 (1H, s) and δ_H 7.73 (2H, d) and glabridin at δ_H 6.87 (1H, d), δ_H 6.79 (1H, d), and δ_H 5.56 (1H, d) were selected for quantitative analysis. The internal standard method was used for the determination. Optimum parameters: pulse sequence at zg30, relaxation time delay was 30 s, measuring temperature at 298 K, 16 scans, acquisition time 2.5 s and receiver gain at 63.32. **Results**　Good repeatability, high precision and wide linearity ranges were shown. The average content of glabridin was 99.42%, consistent with that determined by HPLC. **Conclusion**　This method is easy, simple and reliable, which provides a new method for the quality control of glabridin and the assignment of controls.

Key words: ^{1}H quantitative nuclear magnetic resonance (^{1}H qNMR); content determination; internal standard method; glabridin

基金项目：国家重点研发计划资助项目（No.2020YFE0205600）。
作者简介：杨玉琴，女，硕士研究生，主要从事药物分析研究，email：yangyuqin20@mails.ucas.ac.cn　*通信作者：阿吉艾克拜尔·艾萨，男，博士，研究员，主要从事民族药学和天然药物化学研究，email：haji@ms.xjb.ac.cn；侯雪玲，女，博士，研究员，主要从事药物化学研究，email：xlhou@ms.xjb.ac.cn

甘草是中医处方中最常用的一味中药，它能调和诸药，被誉为“百药之王”，在临床上已被广泛使用。甘草含有多种三萜、黄酮和生物碱类物质，例如甘草酸、甘草苷等。光甘草定（glabridin，见图 1），又名甘草黄酮，化学名为 4-[（3*R*）-8，8- 二甲基 -3，4- 二氢 -2H- 吡喃并 [2，3-f] 色烯 -3- 基] 苯 -1，3- 二醇，是从光果甘草根中提取的一种异戊烯化异黄酮类物质 [1]，具有抗炎 [2]、抗菌 [3]、抗肿瘤 [4]、抗动脉粥样硬化 [5]、神经保护 [6]、调节血糖和血脂水平及改善代谢异常 [7] 等活性。光甘草定能有效消除自由基、抑制脂质过氧化反应导致的皮肤老化性损伤 [8] 以及抑制酪氨酸酶活性，阻断黑色素的合成 [9]，是皮肤的美白和抗衰老圣物，因其强大的美白作用而被誉称为“美白黄金”。市场上的许多美白、祛斑产品都添加了光果甘草提取物，作为光果甘草提取物的主要活性成分，光甘草定的含量测定对其产品及原料的质量控制具有重要意义。目前已报道的化妆品、食品和药材中的光甘草定定量分析方法主要是反相高效液相色谱法（RP-HPLC）[10]、液相色谱 - 质谱联用（HPLC-MS）[11]，虽然这些方法准确可靠，但需要消耗大量的流动相，还需要高纯度的对照品和复杂的操作程序。氢定量核磁共振法（^{1}H qNMR）不依赖于被测物的高纯度、不破坏样品，具有均一的信号响应，是对标准物质含量测定的一种良好的补充方法，目前，还未见使用 ^{1}H qNMR 对光甘草定进行含量测定的报道。

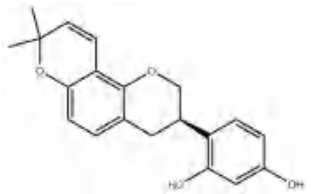


图 1　光甘草定的化学结构

Fig 1　Structure of glabridin

^{1}H qNMR 是基于核磁共振原理的一种定量分析方法，能够同时提供结构和含量信息 [12]。作为定量分析方法，^{1}H qNMR 为待测物的含量测定提供了一个直观真实的视角，凭借其独特的物理化学优势 [13]，定量核磁技术已经被美国药典（USP）、日本药方局（JP）、欧洲药典（EP）和中国药典（ChP）收载。目前，该技术已被国内外广泛应用于化学 [14]、环境科学 [15]、食品 [16] 等多个领域中，如在药学领域中，已用于药物的研发 [16-17]、质量控制 [18]、代谢组学 [19] 分析等方面。^{1}H qNMR 作为化合物定量的“黄金标准”具有其独特优势，如通用性强、重复性好、无需昂贵的自身对照品、预处理简单、分析速度快且无破坏性等，为此，本文采用内标法对光甘草定样品含量进行测定，并进行系统的方法学验证，用于在对照品标定过程中进行辅助定值以及为光甘草定原材料含量测定提供参考。

1　仪器与试药

Bruker AVANCE NEO 600MHz 超导核磁共振谱仪，配备超低温探头（德国 Bruker 公司）；Ultimate3000 型高效液相色谱仪（美国 Thermofisher 公司）；Quintix125D-1CN 半微量天平（赛多利斯仪器有限公司）；Eppendorf 微量移液器（德国 Eppendorf 公司）。

光甘草定（自制，中国科学院新疆理化技术研究所植物资源化学重点实验室，批号：21091002）；磺胺多辛（批号：21060604，质量分数 99.4%，坛墨质检科技股份有限公司）；氘代甲醇（CD_3OD，99.8% 氘代，美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司）；乙腈、甲酸（Sigma Aldrich 公司）。

2　方法与结果

2.1　^{1}H qNMR 试验

2.1.1　供试品溶液的制备　精密称取光甘草定和内标物磺胺多辛各适量，置同一小瓶中，再加入 1 mL CD_3OD，超声使其完全溶解，摇匀后，移入 5 mm 核磁管中待测。称取光甘草定 26.14 mg 置于 5 mL 离心管中，精密移取 2.2 mL CD_3OD，超声后摇匀，配制为 11.88 mg • mL^{-1} 的供试品储备液。再称取磺胺多辛 13.94 mg 置于 5 mL 离心管中，精密移取 3 mL CD_3OD，超声后摇匀，配制为 4.65 mg • mL^{-1} 的内标储备液，于 4 ℃冷藏备用，作为供试品储备液和内标储备液。

2.1.2　测定参数　以 CD_3OD 为溶剂，磺胺多辛为内标，采用如下参数进行 ^{1}H qNMR 测试：zg30 脉冲序列，温度为 298 K，谱宽（SW）为 7142.857 Hz，中心频率（O1）为 3001.15 Hz，时间域数据点（TD）为 35 714，采样时间（AT）2.5 s，弛豫延迟时间（D1）30 s，空扫次数（DS）2 次，采样次数（NS）16 次，增益（RG）63.32。

2.1.3　数据处理　采集到的 ^{1}H qNMR 数据用 MestreNova14.2.0 软件进行数据处理，对得到的谱图进行自动基线校正和相位矫正后再进行手动积分。积分时，设定磺胺多辛内标峰 δ_H 8.04（1H，s）处的峰峰面积为 1，为减少积分的人为误差，对所得的谱图重复处理 6 次，取峰面积平均值后，再分别取其积分面积之和，通过比较样品和内标积分面积，采用内标法利用定量公式 [20]（公式 1）进行待测样品光甘草定的含量计算。

$$W_s = \frac{A_s \times N_r \times M_s \times m_r \times W_r}{A_r \times N_s \times M_r \times m_s} \times 100\% \quad (1)$$

其中，W_s 为光甘草定的质量百分含量、W_r 为磺胺多辛的质量百分含量（W_r = 99.4%），A_s 为光甘草定定量峰的积分面积，A_r 为磺胺多辛定量峰的积分面积，N_s 为光甘草定定量峰的质子数（N_s = 3），N_r 为磺胺多辛定量峰的质子数（N_r = 3），M_s 为光甘草定的相对分子质量（M_s = 324.37），M_r 为磺胺多辛的相对分子质量（M_r = 310.33），m_s 为光甘草定质量，m_r 为磺胺多辛质量。

2.2　测定方法的建立

2.2.1　溶剂的选择　定量时，首选对待测成分和内标均具高溶解度且信号无重叠的氘代溶剂，保证样品和内标物在所选溶剂中有较好的溶解度。光甘草定不溶于水，在甲醇、丙酮中溶解性较好，磺胺多辛较易溶于甲醇中，因此，选用氘代甲醇作为溶剂。

2.2.2　内标的选择　光甘草定的 ^{1}H NMR 谱图（见图 2Ⅰ）显示其在低场区 δ_H 6.1 ～ 7.0 信号较为密集，因此，可选择在低场区 δ_H 7.0 ～ 9.0 出现信号的物质作为内标。最后挑选磺胺多辛 [21] 作为内标：其峰形简单，内标峰不遮盖样品定量峰；可定量内标峰也较多；性质稳定；内标峰弛豫时间较短，与光甘草定弛豫基本一致；其分子量（310.33）与样品分子量（324.37）接近，利于减少称量对结果的影响。

2.2.3　定量峰的选择　由图 2 可知，可以选择光甘草定位于 δ_H 6.87（1H，d）、δ_H 6.79（1H，d）、δ_H 5.56（1H，d）处的 A、B、C 峰为定量峰（见图 2Ⅰ），选择磺胺多辛 δ_H 8.04（1H，s）、δ_H 7.73（2H，d）的 a、b 峰为内标定量峰（见图 2Ⅱ），挑选的定量峰彼此独立，相互无重叠，且定量峰与内标峰包含质子数目相同。

2.3　^{1}H qNMR 试验参数的选择

2.3.1　扫描次数　扫描次数是 ^{1}H qNMR 的一个重要参数，随着扫描次数的增加，信号增强，信噪比会越高，但扫描次数越多，所耗时间就越长，成本也就越高。本试验将扫描次数设置为 1、4、8、16、32、64、128 次，结果显示当扫描次数≥ 8 时，A_s/A_r 比值趋于稳定，信噪比（*S/N*）大于 250，综合考虑谱图的质量和测试效率，将扫描次数设为 16 次。

2.3.2　弛豫延迟时间（D1）　延迟时间是影响测定结果准确性的主要参数，D1 太短，被激发的核不能通过弛豫达到平衡，D1 太长，又会浪费较多时间。根据所选定量峰；D1 一般设置为目标氢中最长纵向弛豫时间（T1）的 5 倍或 6 倍 [22]，反转 - 恢复试验是最常用的测量 T1 的试验，因此，本试验采用 t1ir

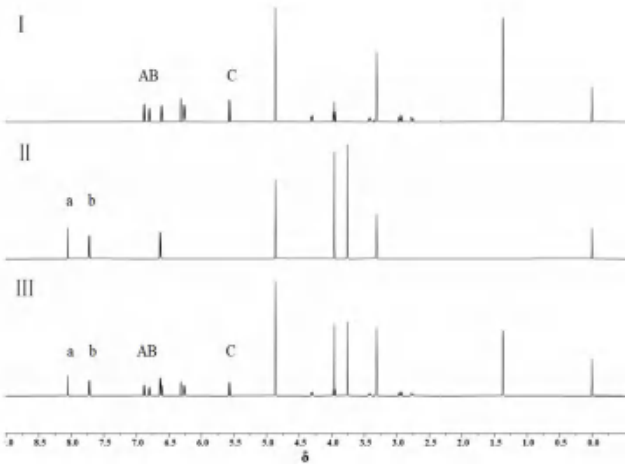


图 2　光甘草定（Ⅰ）和磺胺多辛（Ⅱ）与两者混合溶液（Ⅲ）的核磁共振氢谱

Fig 2　^{1}H NMR spectra of glabridin（Ⅰ），sulfadoxin（Ⅱ）and their mixed solutions（Ⅲ）

脉冲序列，进行反转恢复试验，利用 Bruker Topspin 4.0.7 下的 t_1t_2 模块，根据谱图质量，对峰值强度进行数据拟合，计算得到定量峰的 T1，结果如表 1 所示，为保证结果的准确性，将 D1 值设为 30 s。

表 1　T1 倒转回复强度数据

Tab 1　T1 reverse recovery strength data

物质	δ_H	T1
磺胺多辛	8.04	5.204
	7.73	3.238
光甘草定	6.87	1.253
	6.79	1.741
甲醇	5.56	2.060
	3.31	7.744

2.3.3　采集时间　为得到基底没有震荡的高质量谱图，需要有足够长的采集时间，以保证 FID 信号完全衰减，本实验采集时间设置为 2.5 s。

2.4　方法学考察

2.4.1　重复性实验　平行制备供试品溶液 3 份，按上述参数设定条件进行测定，每份样品平行测定 3 次，计算样品定量峰与内标峰峰面积（A_s/A_r）的比值，利用内标法计算待测样品光甘草定样品的含量，结果如表 2 所示，含量均值为 99.42%，*RSD* 为 0.30%，显示该方法具有良好的重复性。

2.4.2　线性关系考察　取配制的光甘草定和磺胺多辛储备液，按不同摩尔比平行配制 7 份样品溶液，移入 5 mm 核磁管中进行测定，对谱图进行积分，以光甘草定与内标磺胺多辛的质量比 X（m_s/m_r）对光甘草定、定量峰与磺胺多辛、内标定量峰的峰面积比 Y（A_s/A_r）作线性回归，得出回归方程：$Y = 1.0017X + 0.0346$，$R^2 = 0.9990$（$n = 7$），

表 2　光甘草定含量测定结果

Tab 2　Quantitative test of glabridin

取样量 /mg		含量 /%				
光甘草定	磺胺多辛	1 次	2 次	3 次	平均值	*RSD*
8.68	9.52	99.74	99.70	99.67	99.42	0.30
8.93	8.85	99.66	99.36	99.58		
8.10	9.17	99.03	99.01	99.02		

表明 m_s/m_r 在 0.48 ～ 1.91 内与峰面积比线性关系良好。

2.4.3　精密度试验　平行制备供试溶液 3 份，并于不同天进行 ^{1}H qNMR 测定，每份样品平行测定 3 次，计算 A_s/A_r 的比值，并计算光甘草定含量，考察该方法的日内精密度和日间精密度，结果表明，第 1 日、第 2 日和第 3 日测得光甘草定含量分别为 99.43%、99.39%、99.28%，日内 *RSD* 值分别为 0.43%、0.49%、0.35%（$n = 9$）；不同天测得样品中光甘草定含量平均值为 99.37%，日间 *RSD* 为 0.41%（$n = 3$），表明该方法的日内及日间精密度均良好。

2.4.4　稳定性测试　为考察光甘草定含量的变化，分别于 1、8、16、24、36、48、72 h 后测定 1 号供试品，并计算 A_s/A_r，结果其 *RSD* 值为 0.22%（$n = 7$），表明待测样品室温放置 72 h 内稳定。

2.4.5　耐用性实验　将 2 号供试品，基于对采集参数（扫描次数、弛豫延迟、采集时间、温度变化）的单因素变量测试的差异分析来评估稳健性，结果如表 3 所示。

表 3　光甘草定含量测定的耐用性试验结果

Tab 3　Robustness of glabridin determination

参数	目标值	改变值	光甘草定含量 /%	*RSD* /%
扫描次数	16	8	99.69	0.11
		32	99.48	
弛豫延迟 /s	30	25	99.55	0.040
		35	99.48	
采集时间 /s	2.5	1.5	99.82	0.20
		3.5	99.45	
温度 /K	298	295	99.93	0.10
		303	99.73	

2.4.6　不确定度评定　由定量公式（公式 1）可得到合成标准不确定度公式（公式 2）

$$u_{NMR} = \sqrt{u_M^2 + u_m^2 + u_r^2 + u_A^2} \quad (2)$$

其不确定度分量分别为：

u_M 为分子量相对标准不确定度，光甘草定和磺胺多辛分子量引入的相对标准不确定度计算公式如下：$u_M = \sqrt{u_{M_s}^2 + u_{M_r}^2} = 0.004\%$，其中 u_{M_s} 和 u_{M_r} 分别为光甘草定和磺胺多辛的相对分子质量的标准不确定度，其各元素原子量不确定分量可根据 IUPCA 给出的相对标准不确定度计算，计算得 $u_{M_s} = 2.87\times10^{-5}$，$u_{M_r} = 2.04\times10^{-5}$。

u_m 为总称量相对标准不确定度，$\sqrt{u_{m_s}^2 + u_{m_r}^2} = 0.082\%$，其中，$u_{m_s}$ 和 u_{m_r} 分别为光甘草定和磺胺多辛的称量相对标准不确定度。称量天平的精度为 0.01 mg，称量质量均为 10 mg，故 $u_{m_s} = u_{m_r} = 0.000\,58$。

u_r 为内标纯度相对标准不确定度，由磺胺多辛标准样品证书可知其扩展不确定度为 0.5%（$k = 2$），所以其相对标准不确定度为 0.25%。

u_A 为核磁共振测量不确定度，$u_A = 0.30\%$，用 9 次测量结果的 *RSD* 表示，故合成标准不确定度（u_{NMR}）为 0.40%。

扩展不确定度（U）是由合成标准不确定度的倍数表示的测量不确定，其公式为 $U = ku_{NMR}$（k 为置信因子），当在 95% 的置信水平时（即 $k = 2$），计算定量核磁法测定的扩展不确定度为 0.80%。因此，样品中光甘草定定量核磁法计算含量为 99.42%，扩展不确定度为 0.80%。

2.5　HPLC 方法验证

2.5.1　溶液的制备　精密称取光甘草定 2 mg 置于 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解并定容至刻度，摇匀，配制为 0.2 mg•mL^{-1} 的供试品溶液，于 4 ℃冷藏备用。

2.5.2　色谱条件　Waters Sunfire C18 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相：0.2% 甲酸水溶液 - 乙腈（65∶35），等度洗脱；流速：1 mL•min^{-1}；柱温：30 ℃；检测波长：230 nm；进样量：10 μL。

2.5.3　含量测定　随机抽取与用 ^{1}H qNMR 标定的相同批号的 3 瓶光甘草定，制备供试品溶液 3 份，按“2.5.2”项下色谱条件进样测定，每瓶样品平行检测 3 次，采用峰面积归一化法 [23] 进行含量计算，结果含量均值为 99.80%，其 *RSD* 值为 0.080%。

3　结论

本文以 CD_3OD 为溶剂，磺胺多辛为内标，建立了 ^{1}H qNMR 测定光甘草定的含量，并进行了完整的方法学试验验证，最后与 HPLC 进行交叉验证，验证结果无明显差异。为提高核磁定量方法的准确度，本文选取了两组干扰较少的内标定量峰，三组样品定量峰，分别取其积分面积之和作为定量结果，与 HPLC 法 [24] 相比，此方法虽然定量限稍高但可直接溯源，方便快捷，无需高纯度

自身对照品，样品便于回收和环境友好。光甘草定有广泛的应用前景，新的检测方法对其意义重大，本文为光甘草定原材料、对照品及其相关产品含量测定及研究提供了试验依据。

参考文献

[1] Guo QQ，Wu SJ，Liang WY，et al. Glabrol impurity exacerbates glabridin toxicity in zebrafish embryos by increasing myofibril disorganization [J]. J Ethnopharmacol，2021，287：114963.

[2] Dogan MF，Parlar A，Cam SA，et al. Glabridin attenuates airway inflammation and hyperresponsiveness in a mice model of ovalbumin-induced asthma [J]. Pulm Pharmacol Ther，2020，63：101936.

[3] Gangwar B，Kumar S，Darokar MP. Glabridin averts biofilms formation in methicillin resistant staphylococcus aureus by modulation of the surfaceome [J]. Front Microbiol，2020，11：01779.

[4] Modarresi M，Hajialyani M，Moasefi N，et al. Evaluation of the cytotoxic and apoptogenic effects of glabridin and its effect on cytotoxicity and apoptosis induced by doxorubicin toward cancerous cells [J]. Adv Pharm Bull，2019，9（3）：481-489.

[5] Huang K，Liu Y，Tang H，et al. Glabridin prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity through gut microbiota modulation and colonic macrophage polarization in mice [J]. Front Pharmacol，2019，10（107）：00107.

[6] Zou LY，Zhu JX，Dong Y，et al. Models for the binding channel of wild type and mutant transthyretin with glabridin [J]. RSC Adv，2016，6（99）：96816-96823.

[7] Lee JW，Choe SS，Jang H，et al. AMPK activation with glabridin ameliorates adiposity and lipid dysregulation in obesity [J]. J Lipid Res，2012，53（7）：1277-1286.

[8] Yokota T，Nishio H，Kubota Y，et al. The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation [J]. Pigm Cell Res，1998，11（6）：355-361.

[9] Simmler C，Pauli GF，Chen SN. Phytochemistry and biological properties of glabridin [J]. Fitoterapia，2013，90：160-184.

[10] Kamal YT，Singh M，Tamboli ET，et al. Rapid RP-HPLC method for the quantification of glabridin in crude drug and in polyherbal formulation [J]. J Chromatogr Sci，2012，50（9）：779-784.

[11] Aoki F，Nakagawa K，Tanaka A，et al. Determination of glabridin in human plasma by solid-phase extraction and LC-MS/MS [J]. J Chromatogr B，2005，828（1-2）：70-74.

[12] 张芬芬，蒋孟虹，沈文斌，等. 定量核磁共振（QNMR）技术及其在药学领域的应用进展 [J]. 南京师范大学学报（工程技术版），2014，14（2）：8-18.

[13] Pauli GF，Gödecke T，Jaki BU，et al. Quantitative ^{1}H NMR. development and potential of an analytical method：an update [J]. J Nat Prod，2012，75（4）：834-851.

[14] Barthlott I，Scharinger A，Golombek P，et al. A quantitative ^{1}H NMR method for screening cannabinoids in CBD oils [J]. Toxics，2021，9（6）：136.

[15] Peez N，Imhof W. Quantitative ^{1}H-NMR spectroscopy as an efficient method for identification and quantification of PVC，ABS and PA microparticles [J]. Analyst，2020，145（15）：5363-5371.

[16] Lall MS，Bassyouni A，Bradow J，et al. Late-stage lead diversification coupled with quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy to identify new structure activity relationship vectors at nanomole-scale synthesis：application to loratadine，a human histamine H_1 receptor inverse agonist [J]. J Med Chem，2020，63（13）：7268-7292.

[17] Caleja-Ballesteros HJR，Ballesteros JI，Villena MC. No-D quantitative ^{1}H nuclear magnetic resonance spectroscopy method for the determination of ethanol in distilled spirits [J]. Microchem J，2021，164：105999.

[18] DO NM，Olivier MA，Salisbury JJ，et al. Application of quantitative ^{19}F and ^{1}H NMR for reaction monitoring and in situ yield determinations for an early stage pharmaceutical candidate [J]. Anal Chem，2011，83（22）：8766-8771.

[19] Kim HC，Ko YJ，Jo C. Potential of 2D qNMR spectroscopy for distinguishing chicken breeds based on the metabolic differences [J]. Food Chem，2020，342（4）：128316.

[20] Malz F，Jancke H. Validation of quantitative NMR [J]. J Pharm Biomed Anal，2005，38（5）：813-823.

[21] 张芬芬，沈文斌，徐开兵，等. 定量核磁共振氢谱测定新药替格瑞洛 [J]. 波谱学杂志，2020，37（2）：216-223.

[22] 师小春，冯玉飞，陈忠兰，等. 6 种核磁共振法含量测定用标准物质纵向弛豫时间影响因素分析 [J]. 药物分析杂志，2020，40（11）：1928-1934.

[23] Snyder LR，Kirkland JJ，Dolan JW，等. 现代液相色谱技术导论 [M]. 3 版. 北京：人民卫生出版社，2012：253-256.

[24] Bharti SK，Roy R. Quantitative ^{1}H NMR spectroscopy [J]. Trac-Trend Anal Chem，2012，35：5-26.

（收稿日期：2022-08-27；修回日期：2022-10-26）

保元抗疲咀嚼片 HPLC-ELSD 特征图谱研究及 4 种功效成分的含量测定

杨颖，刘陶世*，刘漫，蒲莲莲，嵇晶，程建明（南京中医药大学药学院，江苏省经典名方工程研究中心，南京 210023）

摘要：目的　建立保元抗疲咀嚼片 HPLC-ELSD 特征图谱和 4 种代表性功效成分的含量测定方法。**方法**　采用 HPLC-ELSD 法，色谱柱为 Agilent 5 HC C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为乙腈 -0.1% 甲酸水溶液，梯度洗脱，柱温 25 ℃，流速 1.0 mL • min^{-1}，蒸发光散射检测器（ELSD）蒸发温度为 120 ℃，气体流量为 1.6 SLM。**结果**　建立了保元抗疲咀嚼片 HPLC-ELSD 特征图谱，标定了 11 个特征峰，并鉴定出甘草苷、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1、甘草酸铵 5 个成分，15 批样品特征图谱的相似度均＞ 0.920。建立了保元抗疲咀嚼片中 4 种功效成分的含量测定方法，人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1、甘草酸的含量分别为 1.01 ～ 1.09 mg • g^{-1}、0.85 ～ 0.96 mg • g^{-1}、1.42 ～ 1.70 mg • g^{-1}、1.53 ～ 1.84 mg • g^{-1}。**结论**　采用 HPLC-ELSD 特征图谱结合多功效成分含量测定，可全面评价与控制保元抗疲咀嚼片的质量。

关键词：保元抗疲咀嚼片；HPLC-ELSD；特征图谱；人参皂苷 Rg_1；人参皂苷 Re；人参皂苷 Rb_1；甘草酸

中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-1025-07

doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.030

Content determination of 4 effective ingredients in Baoyuan Kangpi chewable tablets by HPLC-ELSD

YANG Ying, LIU Tao-shi*, LIU Man, PU Lian-lian, JI Jing, CHENG Jian-ming (*School of Pharmacy*, *Nanjing University of Chinese Medicine*, *Jiangsu Province Engineering Research Center of Classical Prescription*, *Nanjing* 210023)

Abstract: Objective　To establish HPLC-ELSD characteristic chromatograms of Baoyuan Kangpi chewable tablets and determinate the content of 4 representative components. **Methods**　An Agilent 5 HC C_{18} chromatographic column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was acetonitrile-0.1% formic acid aqueous solution with gradient elution. The column temperature was 25 ℃ and the flow rate was 1.0 mL • min^{-1}. The evaporation temperature of the evaporative light scattering detector (ELSD) was 120 ℃ . The gas flow rate was 1.6 SLM. **Results**　The HPLC-ELSD characteristic chromatograms of Baoyuan Kangpi chewable tablets was established, and 11 characteristic peaks were calibrated. Totally 5 chromatographic peaks were identified, namely glycyrrhizin, ginsenoside Rg_1, ginsenoside Re, ginsenoside Rb_1 and ammonium glycyrrhizinate. The similarity of the characteristic chromatogram of 15 batches of samples was ＞ 0.920. The content of 4 effective components in Baoyuan Kangpi chewable tablets was determinated. The content of ginsenoside Rg_1, ginsenoside Re, ginsenoside Rb_1 and glycyrrhizic acid was 1.01 ～ 1.09 mg • g^{-1}, 0.85 ～ 0.96 mg • g^{-1}, 1.42 ～ 1.70 mg • g^{-1}, and 1.53 ～ 1.84 mg • g^{-1}, respectively. **Conclusion**　HPLC-ELSD characteristic chromatogram combined with multi-functional component content determination can comprehensively evaluate and control the quality of Baoyuan Kangpi chewable tablets.

作者简介：杨颖，女，硕士研究生，主要从事中药制药技术与产品开发，email：1216328142@qq.com　*通信作者：刘陶世，男，副研究员，硕士研究生导师，主要从事中药药剂学研究，email：tsliur4111@sina.com

Key words: Baoyuan Kangpi chewable tablet; HPLC-ELSD; characteristic chromatograms; ginsenoside Rg_1; ginsenoside Re; ginsenoside Rb_1; glycyrrhizic acid

保元咀嚼片处方来源于经典名方保元汤[1-2]，由黄芪、人参、甘草、肉桂组成，其功效是补气升阳，主治虚损劳怯、元气不足，症见倦怠乏力、少气懒言。药理研究表明保元汤及其组成药味黄芪、人参、肉桂和甘草均具有较好的抗疲劳、抗氧化、调节免疫功能等作用，临床应用也表明保元汤对体力疲劳、脑力疲劳、心力衰竭、糖尿病乏力等具有确切的疗效[3-6]。方中人参、甘草、肉桂均属药食同源品种，而黄芪目前属于按药食同源管理试点，即将正式获批。慢性疲劳是亚健康和三高人群的常见不适症状，但目前尚没有治疗这种慢性疲劳的专用药品，用于辅助治疗的保健品和用于调理的功能食品也很少。因此本文将此方研制成用于调理慢性疲劳的功能性食品，具有广阔的市场前景和经济价值。本品采用咀嚼片形式，具有口感好、服用方便、便于携带和储存等特点。

基于保元抗疲咀嚼片功效成分的多样性和复杂性，采用单一成分含量测定难以评价与控制其质量，而且本产品主要功效成分人参皂苷和黄芪甲苷在紫外区吸收弱，建立其 HPLC-UV 含量测定法比较困难。采用特征图谱评价和控制中药质量，可更全面地反映其整体特征，更准确地反映其内在质量的均一性[7-9]。因此本文拟采用 HPLC-ELSD 法建立保元抗疲咀嚼片的特征图谱，并同时测定人参皂苷等 4 种代表性功效成分的含量，为建立保元抗疲咀嚼片的质量标准打下基础。

1　仪器与试药

1.1　仪器

1260 型高效液相色谱仪、蒸发光散射检测器（美国 Agilent 公司），BT 125D 型十万分之一电子分析天平（赛多利斯科学仪器有限公司），STP FA2004 型万分之一电子分析天平（上海上平仪器有限公司），KQ-500DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2　试药

人参皂苷 Rg_1（纯度：94.0%，批号：110703-202034）、人参皂苷 Re（纯度：93.9%，批号：110754-202028）、人参皂苷 Rb_1（纯度：94.3%，批号：110704-202129）、甘草酸铵（纯度：96.2%，批号：110731-202021）、甘草苷（纯度：93.1%，批号：111610-201607）对照品（中国食品药品检定研究院）；保元抗疲咀嚼片（S1 ～ S15 批号依次为 20220701，20220702，20220703，20220801，20220802，20220803，20220901，20220902，20220903，20220904，20220905，20220906，20221001，20221002，20221003，规格：1.2 g/ 片，实验室自制）。甲醇、乙腈（美国 TEDIA 公司），甲酸 [阿拉丁试剂（上海）有限公司]，以上试剂均为色谱纯；水为超纯水。

2　方法与结果

2.1　保元抗疲咀嚼片特征图谱的研究

2.1.1　色谱条件　Agilent 5 HC C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相乙腈（A）-0.1% 甲酸（B），梯度洗脱（见表 1），柱温 25 ℃，流速 1.0 mL • min^{-1}，蒸发光散射检测器（ELSD）蒸发温度为 120 ℃，气体流量为 1.6 SLM。

表 1　梯度洗脱条件

Tab 1　Gradient elution

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	20	80
30	20	80
38	28	72
72	37	63
87	45	55

2.1.2　混合对照品溶液的制备　精密称取甘草苷、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1 及甘草酸铵对照品适量，加甲醇溶解，配制成质量浓度依次为 0.220、0.278、0.216、0.392、0.696 mg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.1.3　供试品溶液的制备　取保元抗疲咀嚼片 5 片，研成细粉，取约 2.4 g，精密称定，置于 150 mL 具塞锥形瓶中，加入 70% 乙醇 60 mL，超声处理 30 min，放冷，滤过，滤液蒸干，残渣加 50 mL 水溶解，水饱和正丁醇萃取 4 次（每次 50 mL），正丁醇层蒸干，用 5 mL 甲醇溶解，取续滤液，即得。

2.1.4　单味饮片供试品溶液的制备　按照保元抗疲咀嚼片制法中的提取工艺分别制备黄芪、人参、甘草、肉桂的提取浓缩液，按“2.1.3”项下方法制备单味饮片供试品溶液，即得。

2.1.5　精密度考察　取保元抗疲咀嚼片供试品溶液，连续进样 6 次，以 9 号峰为参照峰，计算各

特征峰的相对保留时间 *RSD* 均≤ 0.93%，相对峰面积 *RSD* 均≤ 6.9%，表明仪器精密度良好。

2.1.6　重复性考察　取保元抗疲咀嚼片，按“2.1.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，进样分析，以 9 号峰为参照峰，计算各特征峰的相对保留时间 *RSD* 均≤ 0.90%，相对峰面积 *RSD* 均≤ 6.0%，表明该方法重复性良好。

2.1.7　稳定性考察　取保元抗疲咀嚼片供试品溶液，分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 进样分析，计算各特征峰相对保留时间 *RSD* 均≤ 1.1%，相对峰面积 *RSD* 均≤ 5.7%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.8　特征图谱的建立及相似度评价　取 15 批保元抗疲咀嚼片（S1 ～ S15），分别制备供试品溶液，进样分析。将色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》（2012A 版）软件，对照图谱采用“中位数”法生成，使用多点校正对色谱峰进行匹配，生成样品叠加图谱及对照特征图谱，计算相似度，结果见图 1 和表 2。图 1 结果表明，保元抗疲咀嚼片供试品色谱中出现 11 个特征峰，其中峰 9 为人参皂苷 Rb_1 对照品对应的峰（S 峰）。15 批保元抗疲咀嚼片供试品色谱的各峰相对保留时间 *RSD* 均＜ 1.9%，表明各特征峰出峰时间较稳定。表 2 结果显示，15 批保元抗疲咀嚼片供试品色谱相似度均＞ 0.920，表明保元抗疲咀嚼片多批次产品的质量相对稳定。

2.1.9　特征图谱特征峰的归属与指认　取保元抗疲咀嚼片供试品溶液、单味饮片供试品溶液和混合对照品溶液进样分析，确定峰 1、峰 2、峰 4、峰 5 和峰 11 归属于甘草，峰 1 和峰 3 归属于黄芪，峰 1、峰 6 ～ 10 归属于人参，峰 1 归属于肉桂。其中峰 5 为甘草苷，峰 6 为人参皂苷 Rg_1，峰 7 为人参皂苷 Re，峰 9 为人参皂苷 Rb_1，峰 11 为甘草酸铵，见图 2。黄芪、人参、甘草、肉桂单味饮片溶液对标准特征图谱的相似度依次为 0.927、0.991、0.976、1.000。

2.1.10　聚类分析（CA）　以 15 批保元抗疲咀嚼片特征图谱中 11 个特征峰的峰面积为变量，以平方欧氏距离为测距，运用 SPSS v25.0 软件，采用系统聚类法，对 15 批保元抗疲咀嚼片进行聚类分析，结果见图 3。当平方欧氏距离为 15 时可分为两类，S1、S3 ～ S8、S10 ～ S11 聚为一类，S2、S9、S12 ～ S15 聚为一类，表明 15 批样品间差异不大，与相似度结果相符。

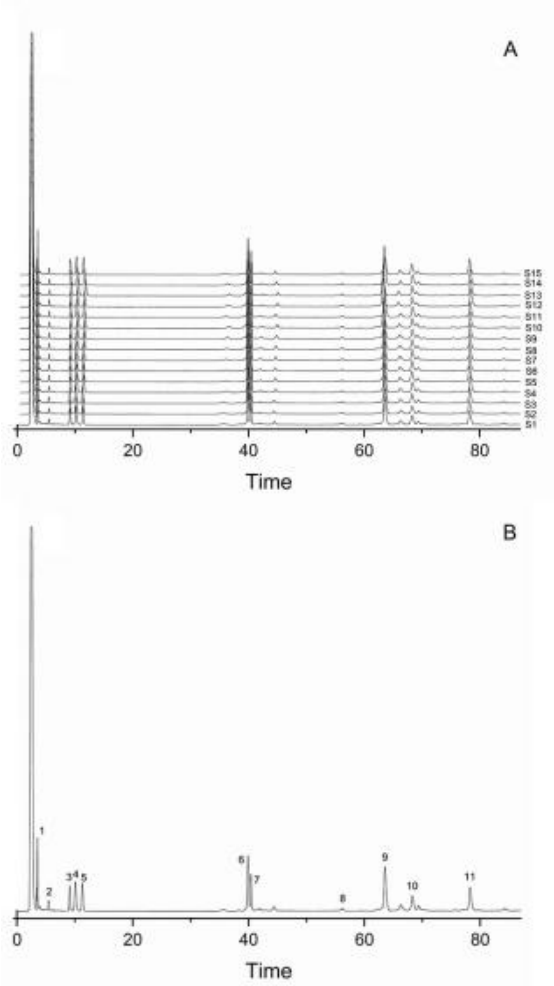


图 1　15 批保元抗疲咀嚼片的特征峰叠加图谱（A）及其对照图谱（B）

Fig 1　Characteristic chromatograms of 15 batch Baoyuan Kangpi chewable tablets（A）and control map（B）

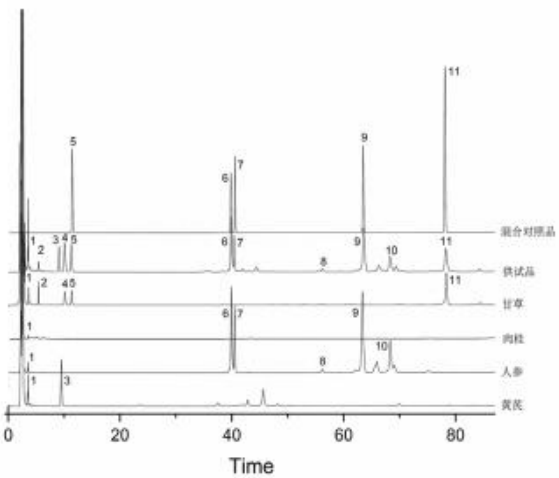


图 2　保元抗疲咀嚼片特征峰的归属与指认

Fig 2　Characteristic peak attribution of Baoyuan Kangpi chewable tablets

5. 甘草苷（glycyrrhizin）；6. 人参皂苷 Rg_1（ginsenoside Rg_1）；7. 人参皂苷 Re（ginsenoside Re）；9. 人参皂苷 Rb_1（ginsenoside Rb_1）；11. 甘草酸铵（ammonium glycyrrhizinate）

表 2　15 批保元抗疲咀嚼片特征图谱的相似度结果

Tab 2　Similarity of characteristic chromatogram of 15 batches of Baoyuan Kangpi chewable tablets

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	R
S1	1.000	0.941	0.988	0.994	0.977	0.973	0.941	0.985	0.988	0.989	0.980	0.984	0.978	0.896	0.978	0.991
S2	0.941	1.000	0.949	0.948	0.950	0.948	0.966	0.930	0.932	0.942	0.950	0.920	0.909	0.926	0.943	0.959
S3	0.988	0.949	1.000	0.979	0.993	0.969	0.971	0.978	0.999	1.000	0.991	0.987	0.975	0.929	0.995	0.998
S4	0.994	0.948	0.979	1.000	0.997	0.984	0.933	0.981	0.976	0.982	0.987	0.975	0.972	0.905	0.965	0.988
S5	0.977	0.950	0.993	0.970	1.000	0.972	0.957	0.983	0.991	0.992	0.984	0.977	0.977	0.916	0.990	0.993
S6	0.973	0.948	0.969	0.984	0.972	1.000	0.916	0.975	0.963	0.971	0.978	0.975	0.985	0.878	0.963	0.981
S7	0.941	0.966	0.971	0.933	0.957	0.916	1.000	0.918	0.961	0.964	0.958	0.938	0.903	0.967	0.965	0.966
S8	0.985	0.930	0.978	0.981	0.983	0.975	0.918	1.000	0.979	0.981	0.973	0.974	0.980	0.869	0.973	0.984
S9	0.988	0.932	0.999	0.976	0.991	0.963	0.961	0.979	1.000	0.999	0.985	0.988	0.977	0.915	0.994	0.995
S10	0.989	0.942	1.000	0.982	0.992	0.971	0.964	0.981	0.999	1.000	0.992	0.988	0.978	0.924	0.994	0.998
S11	0.980	0.950	0.991	0.987	0.984	0.978	0.958	0.973	0.985	0.992	1.000	0.975	0.966	0.943	0.977	0.994
S12	0.984	0.920	0.987	0.975	0.977	0.975	0.938	0.974	0.988	0.988	0.975	1.000	0.990	0.886	0.985	0.988
S13	0.978	0.909	0.975	0.972	0.977	0.985	0.903	0.980	0.977	0.978	0.966	0.990	1.000	0.846	0.975	0.979
S14	0.896	0.926	0.929	0.905	0.916	0.878	0.967	0.869	0.915	0.924	0.943	0.886	0.846	1.000	0.902	0.928
S15	0.978	0.943	0.995	0.965	0.990	0.963	0.965	0.973	0.994	0.994	0.977	0.985	0.975	0.902	1.000	0.991
R	0.991	0.959	0.998	0.988	0.993	0.981	0.966	0.984	0.995	0.998	0.994	0.988	0.979	0.928	0.991	1.000

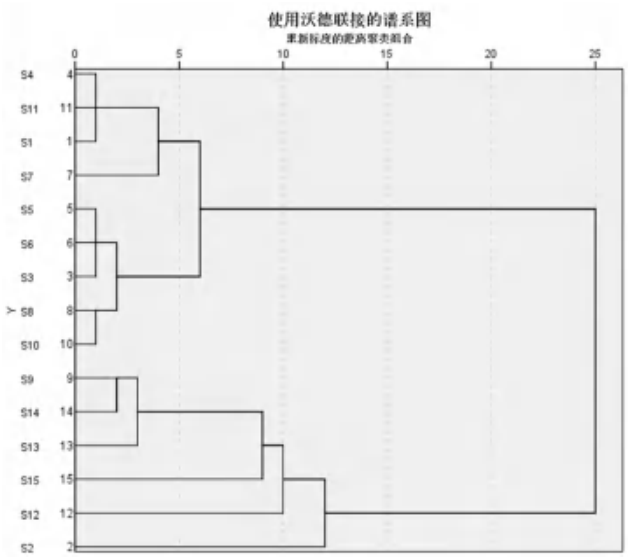


图 3　15 批保元抗疲咀嚼片样品聚类分析图

Fig 3　Cluster analysis of 15 batches of Baoyuan Kangpi chewable tablets

2.1.11　主成分分析（PCA）　为进一步比较不同批次保元抗疲咀嚼片间的质量差异，将 15 批次 11 个特征峰峰面积导入 SPSS v25.0 和 SIMCA 14.1 软件，进行 PCA，共有峰特征值见表 3。前 5 个主成分的初始特征值依次为 4.415、2.258、1.664、0.953、0.719，累积方差贡献率达到 90.990%，表明前 5 个主成分在反映不同批次保元抗疲咀嚼片之间的相似度和差异性方面起主导作用。表 4 结果表明，峰 3、峰 4、峰 5、峰 9、峰 10 是第一主成分中载荷量较大的变量，第二主成分主要反映了峰 6、峰 7 的信息，第三成分主要反映了峰 8、峰 11 的信息，第四主成分主要反映了峰 2、峰 11 的信息，第五主成分主要反映了峰 1、峰 8 的信息。图 4 表明 15 批保元抗疲咀嚼片样品可聚为两类，与 CA 结果一致。通过建立主成分综合模型，计算各批次综合得分，并进行排序，初步对 15 批保元抗疲咀嚼片质量进行分析，得到 S8 批次质量最优，见表 5。

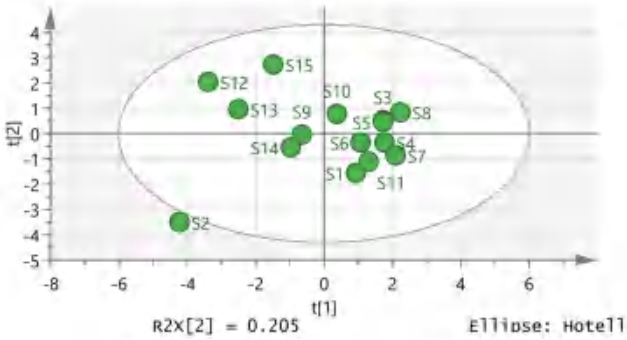


图 4　15 批保元抗疲咀嚼片 PCA 得分图

Fig 4　PCA scores of 15 batches of Baoyuan Kangpi chewable tablets

2.1.12　正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）　将特征图谱数据导入到 SIMCA 14.1 软件进行 OPLS-DA，以变量重要性投影（VIP）值＞ 1.0 为标准进行筛选，结果见图 5，表明共有 5 个特征峰的 VIP 值＞ 1.0，分别为峰 9 人参皂苷 Rb_1（VIP ＝ 1.530）、峰 11 甘草酸铵（VIP ＝ 1.298）、峰 6 人参皂苷 Rg_1（VIP ＝ 1.214）、峰 1（VIP ＝ 1.107）、峰 10（VIP ＝ 1.046），表明这 5 个成分是保元抗疲咀嚼片不同批次样品间质量差异贡献较大的标志物，对于研究保元抗疲咀嚼片批次间一致性具有重要意义。

2.2　保元抗疲咀嚼片中 4 种代表性成分的含量测定

表 3　主成分特征值及方差

Tab 3　Principal component eigenvalues and variances

成分	初始特征值			提取载荷平方和			旋转载荷平方和		
	总计	方差百分比	累积 /%	总计	方差百分比	累积 /%	总计	方差百分比	累积 /%
1	4.415	40.134	40.134	4.415	40.134	40.134	3.988	36.252	36.252
2	2.258	20.529	60.663	2.258	20.529	60.663	1.600	14.542	50.793
3	1.664	15.128	75.792	1.664	15.128	75.792	1.535	13.952	64.745
4	0.953	8.661	84.452	0.953	8.661	84.452	1.488	13.531	78.276
5	0.719	6.538	90.990	0.719	6.538	90.990	1.399	12.714	90.990
6	0.549	4.986	95.976						
7	0.229	2.082	98.058						
8	0.108	0.985	99.044						
9	0.056	0.507	99.551						
10	0.043	0.386	99.938						
11	0.007	0.062	100.000						

表 4　旋转后的成分矩阵

Tab 4　Rotated component matrix

峰号	1	2	3	4	5
1	0.163	0.161	−0.065	0.033	0.919
2	0.196	−0.151	−0.052	0.946	0.056
3	0.917	−0.005	−0.097	0.215	0.068
4	0.965	0.058	−0.162	0.105	0.057
5	0.952	−0.061	−0.198	0.030	0.140
6	−0.096	0.947	0.155	−0.054	0.156
7	0.600	0.724	−0.280	−0.025	−0.011
8	0.075	−0.017	0.507	0.180	0.653
9	0.738	0.294	0.414	−0.170	0.213
10	0.566	0.017	−0.759	0.009	0.005
11	−0.074	0.190	0.588	0.685	0.169

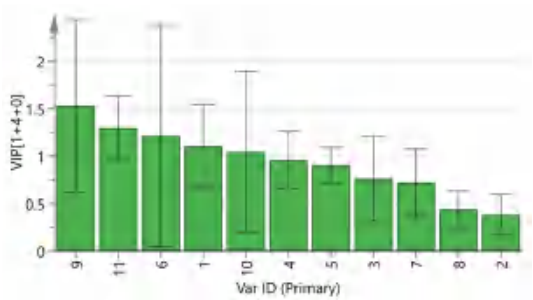


图 5　11 个共有特征峰 OPLS-DA 的 VIP 值图

Fig 5　VIP value plots of OPLS-DA of 11 common characteristic peaks

2.2.1　对照品溶液的制备　精密称取人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Re 对照品适量，加甲醇溶解，配制成质量浓度分别为 0.2765、0.3860 mg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。精密称取人参皂苷 Rb_1 和甘草酸铵对照品适量，分别加甲醇溶解，配制成质量浓度分别为 0.2510、0.2014 mg • mL^{-1} 的对照品溶液。

表 5　15 批保元抗疲咀嚼片主成分得分及综合得分排序

Tab 5　Principal component score and comprehensive score ranking of 15 batches of Baoyuan Kangpi chewable tablets

批号	批次	Z_1	Z_2	Z_3	Z_4	Z_5	Z
S1	S8	2.26	0.85	0.46	−0.95	−0.04	1.17
S2	S5	1.74	0.44	0.19	0.30	1.10	1.00
S3	S3	1.74	0.53	−0.34	0.17	0.59	0.89
S4	S7	2.07	−0.87	0.97	1.48	−1.96	0.88
S5	S4	1.76	−0.37	0.12	0.54	−0.46	0.73
S6	S6	1.08	−0.36	−0.40	0.29	1.07	0.43
S7	S11	1.31	−1.08	−0.02	0.18	0.30	0.37
S8	S10	0.36	0.76	−0.19	−1.18	0.33	0.21
S9	S1	0.94	−1.58	0.00	−0.24	−0.03	0.03
S10	S12	−3.40	2.06	3.03	1.28	0.43	−0.38
S11	S15	−1.46	2.76	−3.18	1.17	−0.16	−0.45
S12	S14	−0.98	−0.53	0.92	−1.14	0.67	−0.46
S13	S9	−0.67	−0.07	−0.81	−0.72	−0.94	−0.58
S14	S13	−2.52	0.95	0.23	−1.75	−1.23	−1.11
S15	S2	−4.24	−3.48	−0.97	0.59	0.89	−2.73

2.2.2　供试品溶液的制备　取保元抗疲咀嚼片 2 片，研成细粉，取约 1.2 g，精密称定，置于 50 mL 具塞锥形瓶中，加入 70% 乙醇 10 mL，称重，超声处理 30 min，放冷，补重，混匀，滤过，取续滤液，即得。

2.2.3　阴性样品溶液的制备　分别制备缺人参、缺甘草的阴性咀嚼片，按“2.2.2”项下方法制备阴性样品溶液。

2.2.4　系统适用性试验与专属性考察　取空白溶液、对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液，进样分析，结果显示各对照品溶液与供试品溶液在相同保留时间处均有相应的色谱峰出现，峰形较好，分离度均＞ 1.5，理论塔板数均＞ 3000，且空白溶液和阴性样品溶液对测定无干扰，色谱图见图 6。

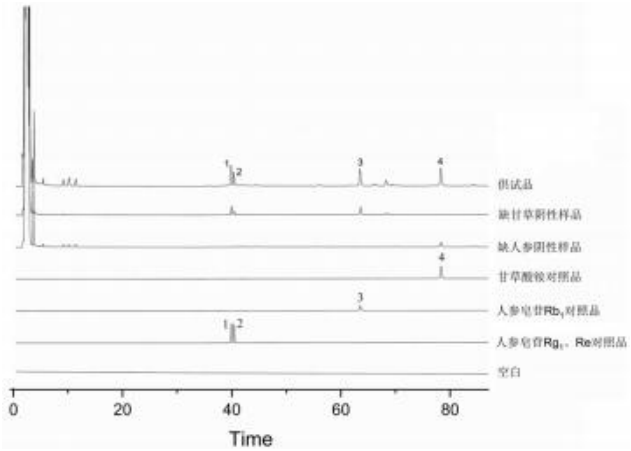


图 6　系统适用性试验 HPLC 图

Fig 6　HPLC chromatogram of system suitability test

1. 人参皂苷 Rg_1（ginsenoside Rg_1）；2. 人参皂苷 Re（ginsenoside Re）；3. 人参皂苷 Rb_1（ginsenoside Rb_1）；4. 甘草酸铵（ammonium glycyrrhizinate）

2.2.5　线性关系考察　精密吸取“2.2.1”项下人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 和甘草酸铵对照品溶液配制成系列浓度的对照品溶液，注入液相色谱仪。以进样量的对数值为横坐标，峰面积的对数值为纵坐标，绘制标准曲线，得人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1 及甘草酸铵回归方程以及线性范围，见表 6。

表 6　标准曲线及线性范围

Tab 6　Standard curve and linearity

成分	线性范围 /μg	回归方程	r
人参皂苷 Rg_1	1.1060 ～ 6.6360	$y = 1.518x + 2.476$	0.9992
人参皂苷 Re	0.7720 ～ 7.7200	$y = 1.550x + 2.351$	0.9994
人参皂苷 Rb_1	1.0040 ～ 6.0240	$y = 1.622x + 2.253$	0.9995
甘草酸铵	0.8056 ～ 4.8336	$y = 1.608x + 2.277$	0.9999

2.2.6　精密度试验　取保元抗疲咀嚼片，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，连续进样 6 次，记录峰面积，计算 4 种成分 *RSD* 均在 1.3% ～ 2.0%，表明仪器精密度良好。

2.2.7　稳定性试验　取保元抗疲咀嚼片，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 进样分析，结果 4 种成分的峰面积 *RSD* 均在 1.4% ～ 2.0%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.2.8　重复性试验　取保元抗疲咀嚼片，按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，进样分析，结果 4 种成分的含量 *RSD* 均在 1.5% ～ 2.7%，表明该方法重复性良好。

2.2.9　加样回收试验　取已知含量的同一批样品 6 份，分别精密加入人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1 及甘草酸铵对照品，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，测定含量，并计算加样回收率及 *RSD*。结果人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1 及甘草酸的平均加样回收率分别为 103.9%、100.2%、101.6%、99.5%，*RSD* 分别为 2.9%、2.2%、1.9%、3.5%。

2.2.10　保元抗疲咀嚼片含量测定　取 15 批保元抗疲咀嚼片，测定 4 种成分的含量。结果见表 7，人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1 及甘草酸含量分别为 1.01 ～ 1.09 mg • g^{-1}、0.85 ～ 0.96 mg•g^{-1}、1.42 ～ 1.70 mg•g^{-1}、1.53 ～ 1.84 mg•g^{-1}。

表 7　保元抗疲咀嚼片含量测定 (mg • g^{-1})

Tab 7　Content of Baoyuan Kangpi chewable tablets (mg • g^{-1})

批号	人参皂苷 Rg_1	人参皂苷 Re	人参皂苷 Rb_1	甘草酸
S1	1.08	0.89	1.63	1.69
S2	1.03	0.88	1.63	1.70
S3	1.02	0.90	1.60	1.68
S4	1.05	0.90	1.58	1.78
S5	1.01	0.85	1.57	1.62
S6	1.08	0.91	1.61	1.84
S7	1.09	0.93	1.59	1.76
S8	1.05	0.94	1.61	1.76
S9	1.07	0.94	1.63	1.80
S10	1.06	0.91	1.70	1.74
S11	1.02	0.91	1.58	1.64
S12	1.04	0.90	1.55	1.58
S13	1.05	0.96	1.42	1.56
S14	1.06	0.96	1.51	1.57
S15	1.05	0.94	1.52	1.53
均值	1.05	0.91	1.58	1.68
RSD/%	2.2	3.3	4.2	5.8

3　讨论

3.1　色谱条件考察

人参和黄芪是保元抗疲咀嚼片的主要药味，人参皂苷和黄芪甲苷分别是其代表性功效成分，但它们对可见 - 紫外光区的波长吸收很弱，采用 HPLC-UV 法测定其含量和建立特征图谱难度大，故选择适应性更好的通用检测器 ELSD。对 4 种 HPLC 色谱柱 Agilent HC C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）、Agilent TC C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）、Agilent ZORBAX SB C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）、Hedera ODS-2（250 mm×4.6 mm，5 μm）进行了筛选，发现 Agilent HC C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱的色谱图分离度和峰形最好。对 ELSD 参数进行了蒸发温度和气体流量的考察，综合响应值、信噪比、分离度情况，确定蒸发温度 120 ℃，气体流量 1.6 SLM。

3.2　特征图谱建立

保元抗疲咀嚼片特征图谱的共有峰有 18 个，通过综合分析，确定其中峰面积较大，峰形好，保留时间稳定的 11 个峰为特征峰，并通过对照品比对，指认出人参皂苷 Rg_1 和甘草酸等 5 个特征峰。15 批次保元抗疲咀嚼片的特征图谱相似度均＞ 0.920，表明多批次保元抗疲咀嚼片差异较小，制备工艺稳定。化学模式识别表明，该 15 批样品可分为两类，S1、S3 ～ S8、S10 ～ S11 聚为一类，S2、S9、S12 ～ S15 聚为一类，表明 15 批保元抗疲咀嚼片样品间差异不大，与相似度结果相符。VIP 值＞ 1.0 的色谱峰分别为峰 9 人参皂苷 Rb_1、峰 11 号甘草酸铵、峰 6 号人参皂苷 Rg_1、峰 1、峰 10，表明这 5 个成分是保元抗疲咀嚼片不同批次样品间质量差异贡献较大的标志物，对于研究保元抗疲咀嚼片批次间一致性具有重要意义。

3.3　含量测定指标成分的选择依据

黄芪是保元抗疲咀嚼片的君药，具有免疫调节、抗肿瘤等药理活性 [10-11]，黄芪甲苷是其代表性功效成分，但是在摸索色谱条件的过程中，发现在缺黄芪阴性样品中有干扰，故未选择黄芪甲苷作为含量测定的指标成分。人参为臣药，其皂苷类的生物活性主要体现在增强免疫、抗疲劳、延缓衰老等 [12-13]，同时，有文献报道人参总皂苷能够清除膜质过氧化物的产生，减少细胞损伤，减少运动性疲劳 [14]。并且人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rb_1 在 ELSD 下能达到较好的分离度，所以选择人参皂苷作为含量测定的指标成分。甘草酸是甘草的主要有效成分之一。肉桂中含有挥发油等成分，其代表性功效成分为桂皮醛，易氧化不稳定，故未测定其含量。基于成分与药效关联的质量标志物（Q-marker）预测分析结果表明，人参皂苷和甘草酸在保元汤的临床应用中都发挥了重要作用 [15]，这些成分可以作为保元抗疲咀嚼片的 Q-marker。同时结合 OPLS-DA 分析结果，人参皂苷 Rb_1、甘草酸铵、人参皂苷 Rg_1 是控制保元抗疲咀嚼片质量值得关注的成分。综合以上考虑，选择与功效相关且差异性较大的人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1 和甘草酸 4 个成分作为保元抗疲咀嚼片含量测定的指标性成分。

参考文献

[1] 孙志宏 . 简明医彀 [M]. 北京：人民卫生出版社，1984：368.

[2] 魏直 . 博爱心鉴 [M]. 东京：东武书堂，1734：54-56.

[3] 郭亮锋 . 保元煎抗疲劳临床疗效验证与机制及其军事应用价值 [D]. 西安：第四军医大学，2015.

[4] 顾展旭 . 保元汤汤剂与免煎剂对脾虚小鼠抗疲劳和免疫作用的对比研究 [D]. 长春：长春中医药大学，2012.

[5] 刘键，李锋 . 保元煎调治亚健康状态临床观察 [J]. 现代中西医结合杂志，2010，19（4）：414-415.

[6] 舒泽柳，曾克武，马晓丽，等 . 保元汤中具有心肌保护作用的活性成分及其潜在作用靶点研究 [J]. 中国中药杂志，2016，41（5）：922-927.

[7] 鄢海燕，邹纯才 .《中国药典》（2010 年版～ 2020 年版）中药指纹（特征）图谱应用进展与展望 [J]. 南方医科大学学报，2022，42（1）：150-155.

[8] 常红，袁腾腾，吕淑婕，等 . 骨疏灵的 UPLC 指纹图谱的建立及 8 种成分的含量测定 [J]. 中南药学，2022，20（1）：159-164.

[9] 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.

[10] 马艳春，胡建辉，吴文轩，等 . 黄芪化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药学报，2022，50（4）：92-95.

[11] 向璐，张巧艳，赵琦明，等 . 黄芪 - 当归化学成分、药理作用及临床应用的研究进展 [J]. 中草药，2022，53（7）：2196-2213.

[12] 高健，吕邵娃 . 人参化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药导报，2021，27（1）：127-130，137.

[13] 邢金月，杨涵童，韩莲花，等 . 人参及其药对的研究进展 [J]. 中华中医药学刊，2022，40（5）：176-179.

[14] 毕樱馨 . 五种食源性活性成分抗运动疲劳的作用及机制研究 [D]. 长春：长春工业大学，2022.

[15] 余格，梁慧慧，文雯，等 . 保元汤的研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中草药，2021，52（2）：567-577.

（收稿日期：2022-12-05；修回日期：2023-02-01）

UPLC-MS/MS 测定补肾填精口服液中乌头碱类生物碱的含量

汤逊尤[1]，孙辉[1*]，叶惠煊[2]，黄胜[2]，罗疆南[1]，曾静凯[1]，罗菲菲[2]，丁野[1]，方磊[1]，李文莉[1*]（1.湖南省药品检验检测研究院，长沙　410001；2. 九芝堂股份有限公司，长沙　410021）

摘要：目的　采用超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用仪测定补肾填精口服液中 6 种乌头碱类生物碱的含量。**方法**　将样品用甲醇稀释后进行分析：采用 Welch UPLC Ultimate LP-C_{18} 柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm），以 0.2% 甲酸溶液 - 甲醇为流动相，梯度洗脱，采用电喷雾离子源，在正离子模式下，进行多反应监测模式监测，采用标准曲线法进行含量计算。**结果**　6 种生物碱在相应浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系，r^2 为 0.9982 ～ 0.9996，方法的定量限为 0.185 ～ 0.690 μg • L^{-1}，检测限为 0.096 ～ 0.246 μg • L^{-1}，平均加样回收率为 82.1% ～ 121.2%。**结论**　所采用的方法灵敏度高，专属性强，前处理简单高效，可用于补肾填精口服液中乌头碱类生物碱的含量测定。

关键词：补肾填精口服液；超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用仪；乌头碱；含量测定
中图分类号：R284.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-1032-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.031

Determination of aconitine alkaloids in Bushen Tianjing oral liquid by UPLC-MS/MS

TANG Xun-you[1], SUN Hui[1*], YE Hui-xuan[2], HUANG Sheng[2], LUO Jiang-nan[1], ZENG Jing-kai[1], LUO Fei-fei[2], DING Ye[1], FANG Lei[1], LI Wen-li[1*] (1. *Hunan Institute for Drug Control, Changsha* 410001; 2. *Jiuzhitang Co., Ltd.*, *Changsha* 410021)

Abstract: Objective To determine 6 aconitine alkaloids in Bushen Tianjing oral liquid by UPLC-MS/MS. **Methods** The sample was diluted by methanol, and analyzed on a Welch UPLC Ultimate LP-C_{18} column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm). The mobile phase was 0.2% formic acid solution-methanol by gradient elution, and the target compounds were analyzed in the multiple reaction monitoring mode with positive electrospray ionization. The concentration was calculated by standard curve method. **Results** The linearity corresponded well to concentration ranges, and the correlation coefficient ranged 0.9982 ～ 0.9996. The limit of quantity was 0.185 ～ 0.690 μg • L^{-1}. The limit of detection was 0.096 ～ 0.246 μg • L^{-1}. The average recovery was 82.1% ～ 121.2%. **Conclusion** The method is sensitive and specific for the simultaneous detection of aconitine alkaloids in Bushen Tianjing oral liquid.

Key words: Bushen Tianjing oral liquid; UPLC-MS/MS; aconitine alkaloid; content determination

随着生活节奏的加快，生活压力的增加及环境污染，患有不育问题的男性日益增多，使得人们对这方面治疗需求增大[1-2]。补肾填精口服液作为治疗肾阳亏虚证、阳痿早泄患者有效的药物[3-6]，因其临床用药安全，未见明显不良反应，临床应用广泛[7-9]。补肾填精口服液处方中含有毒性药材黑顺片，它是附子通过炮制后的加工制品。在加工过程中，使既是有效成分又是毒性成分的双酯型乌头碱类生物碱结构中的乙酰基被水解脱去，生成活性及毒性都降低的单酯型生物碱[10-11]。

为控制产品的安全性及有效性，本研究建立超高效液相色谱串联质谱法同时测定补肾填精口

基金项目：湖南省科药联合基金项目（No.2021JJ80004）；2022 年国家药品标准提高课题（No.2022Z033）。
作者简介：汤逊尤，男，硕士，主要从事中药材及饮片的药品质量控制及研究，email：417767200@qq.com　*通信作者：孙辉，男，博士，副主任药师，主要从事中药材及饮片的药品质量控制及研究，email：470039516@qq.com；李文莉，女，主任药师，主要从事中药材及饮片的药品质量控制及研究，email：1838675867@qq.com

服液中含量较高的 3 种单酯型乌头碱（新乌头碱、次乌头碱、乌头碱）和 3 种双酯型乌头碱（苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱）共 6 种成分的含量，以期为评价和控制补肾填精口服液的质量提供相关依据。

1　材料

1.1　仪器

超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱仪（1290 INfinity Ⅱ -6470）（美国安捷伦有限公司）；XS205 型电子分析天平（梅特勒托利多仪器有限公司）；GenPure UV-TOC/UF 型超纯水（美国赛默飞科技有限公司）。

1.2　试药

乌头双酯型生物碱对照提取物（批号：112029-201601，含量以新乌头碱 31.7%，次乌头碱 30.0%，乌头碱 31.8% 计）、苯甲酰新乌头原碱（批号：111795-201805，纯度：93.1%）、苯甲酰次乌头原碱（批号：111796-201906，纯度：97.2%）、苯甲酰乌头原碱（批号：111794-202006，纯度：99.5%）（中国食品药品检定研究院）；补肾填精口服液（九芝堂股份有限公司，批号：20201003、20210401、20210502、20200702、20210201、20200701、20210501、20201203、20200905、20200904、20201004）；药材人参（批号：001A-191204-50M，产地：吉林）、鹿茸（酥）（批号：381H-190901-21M，产地：辽宁）、牛鞭（酥）（批号：390H-190301-3M，产地：河北）、狗鞭（酥）（批号：401H-190301-2M，产地：河北）、黄芪（批号：012A-2003003-623，产地：内蒙古）、当归（批号：009A-2005003-415，产地：甘肃）、肉苁蓉（批号：226A-191202-25M，产地：新疆）、阳起石（煅）（批号：417I-181201-12M，产地：山东）、枸杞子（批号：116B-2003002-175，产地：宁夏）、杜仲（批号：302E-191205-20M，产地：湖南）、菟丝子（批号：127B-191201-30M，产地：内蒙古）、熟地黄（批号：080AJ-2005020-825，产地：河南）、淫羊藿（批号：217C-190704-14M，产地：甘肃）、韭菜子（批号：165B-190201-8M，产地：山东）；山梨酸（批号：210101）（四川博利恒药业有限公司）；炼蜜（批号：20220304-03，广西梧州甜蜜家蜂业有限公司）；甲醇（Honeywell 公司，质谱纯）；甲酸（Sigma 公司，色谱纯）；其他试剂均为分析纯。

2　方法与结果

2.1　液质联用条件

2.1.1　色谱条件　色谱柱为 Welch UPLC Ultimate LP-C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）；流动相：甲醇（A）-0.2% 甲酸水（B）；流速 0.25 mL • min^{-1}；梯度洗脱（0 ～ 4.5 min，30% ～ 60%A；4.5 ～ 4.6 min，60% ～ 95%A；4.6 ～ 6.6 min，95%A；6.6 ～ 6.7 min，95% ～ 30%A；6.7 ～ 8.5 min，30%A），柱温 35 ℃，进样量 1 μL。

2.1.2　质谱条件　质谱离子源为电喷雾离子源（ESI），扫描方式为正离子模式，毛细管电压 3.5 kV，离子源温度 250 ℃，鞘气温度 325 ℃，鞘气流速 11 L • min^{-1}，动态多反应监测模式（dMRM）检测，详见表 1。

表 1　6 种生物碱的质谱参数

Tab 1　Mass spectrometric parameters of 6 alkaloids

化合物	定量离子对（*m/z*）	毛细管簇电压 /V	碰撞能 /eV
乌头碱	646.3 ～ 586.2	233	41
新乌头碱	632.3 ～ 572.2	228	37
次乌头碱	616.3 ～ 556.2	233	37
苯甲酰乌头原碱	604.3 ～ 105.0	243	61
苯甲酰新乌头原碱	590.3 ～ 105.0	228	65
苯甲酰次乌头原碱	574.3 ～ 105.0	228	53

2.2　溶液的配制

2.2.1　空白基质溶液的制备　取人参 40 g、鹿茸（酥）40 g、牛鞭（酥）20 g、狗鞭（酥）20 g、黄芪 120 g、当归 40 g、肉苁蓉 13.3 g、阳起石（煅）40 g、枸杞子 240 g、杜仲 80 g、菟丝子 80 g、熟地黄 80 g、淫羊藿 160 g、韭菜子 40 g，将人参、鹿茸粉碎成粗粉，加 70% 乙醇加热回流提取两次（每次 7 ～ 8 倍量），每次 2 h，滤过，滤液回收乙醇备用；药渣与其余 12 味药材加水煎煮两次（每次 7 ～ 8 倍量），每次 2 h，煎液滤过，滤液浓缩至相对密度为 1.16 ～ 1.18（60 ℃）的清膏，加乙醇充分搅拌，使含醇量达 60%，静置约 24 h，滤过，滤液减压回收乙醇，浓缩至相对密度为 1.10 ～ 1.15（60 ～ 70 ℃）的清膏，加水适量，冷藏 12 h 以上，滤过，滤液与人参、鹿茸提取液合并，加入炼蜜 270 ～ 330 g、山梨酸 3 g，加水至 1000 mL，冷藏 12 h 以上，滤过，制成缺黑顺片的阴性样品，按“2.2.4”项下方法制备缺黑顺片的阴性样品溶液，作为空白基质溶液。

2.2.2　对照品溶液的制备　精密称取乌头双酯型生物碱对照提取物 15.14 mg、苯甲酰新乌头原碱 10.12 mg、苯甲酰次乌头原碱 10.21 mg、苯甲酰乌头原碱 10.20 mg，分别置于 50 mL 量瓶中，稀释定容至刻度，得到质量浓度分别为 0.3028、0.2024、0.2042、0.204 mg•mL^{-1} 的对照品储备液。取乌头双酯型生物碱对照提取物储备液 2 mL，苯甲酰新乌头原碱储备液 1 mL、苯甲酰次乌头原碱储备液 1 mL、苯甲酰乌头原碱储备液 1 mL 置

200 mL 量瓶中，稀释定容，即得各化合物质量浓度约为 1 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.2.3　基质混合对照品溶液的制备　分别精密移取空白基质溶液 1.0 mL（8 份）于 10 mL 量瓶中，分别加入混合对照品溶液 10、20、50、100、200、500、1000、2000 μL，加甲醇稀释至刻度，摇匀，即得。

2.2.4　供试品溶液制备　精密移取补肾填精口服液样品 1 mL 置于 25 mL 量瓶中，甲醇稀释定容，再移取 1 mL 置于 10 mL 量瓶中，稀释定容后，过 0.22 μm 有机系滤膜后待测。

2.3　专属性试验

分别取基质混合对照品溶液、供试品溶液及空白基质溶液进样，结果分离效果良好，6 种生物碱的定量离子色谱图详见图 1。

2.4　线性关系考察

分别量取“2.2.3”项下逐级稀释后的基质混合对照品溶液，按照“2.1”项下条件进样分析，以质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。6 种乌头碱类生物碱成分均在考察范围内线性关系良好，以信噪比 *S/N* = 3 确定检测限、*S/N* = 10 确定定量限，结果见表 2。

2.5　重复性试验

取 6 份同一批号（批号：20200701）的补肾填精口服液 0.5 mL，向样品中加入 10 mL 质量浓度约为 1 μg • mL^{-1} 混合对照品溶液，用甲醇稀释定容至 25 mL，再移取 1 mL 混合对照品溶液至 10 mL 量瓶中，稀释定容后，过 0.22 μm 有机滤膜后进样，分别记录峰面积，计算 *RSD*。结果显示，乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱峰面积的 *RSD* 分别为 1.8%、2.6%、1.4%、2.1%、0.64%、1.8%，表明该方法重复性良好。

2.6　精密度试验

取“2.5”项下样品，连续进样 6 次，分别记录峰面积，计算 *RSD*。结果显示，乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱峰面积的 *RSD* 分别为 2.0%、2.7%、2.8%、2.4%、2.1%、3.5%，表明该方法精密度良好。

2.7　稳定性试验

取“2.5”项下样品，分别在 0、2、4、8、16、24 h 进样，记录峰面积并计算 *RSD*。结果显示乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱峰面积的 *RSD* 分别为 5.1%、5.1%、4.7%、4.3%、5.2%、4.7%，表明样品溶液在 24 h 内稳定性较好。

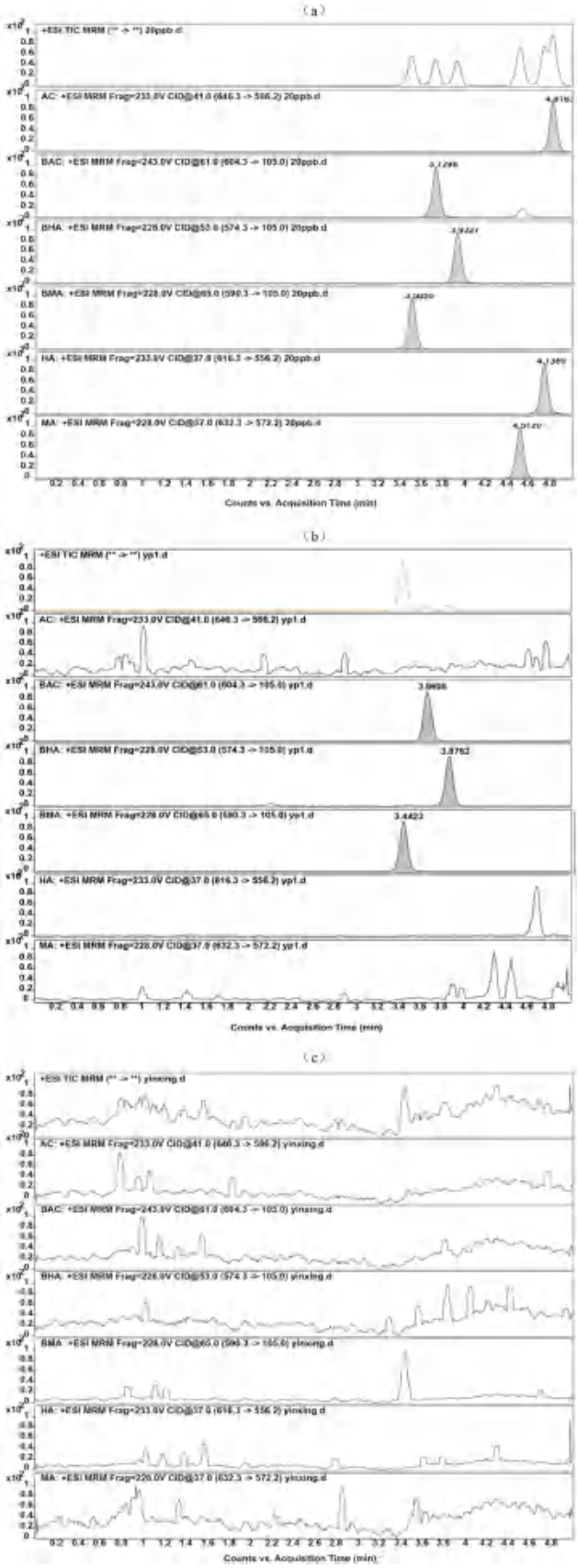


图 1　对照品溶液（a）、供试品溶液（b）和空白基质溶液（c）中 6 种生物碱的定量离子对 MRM 色谱图

Fig 1　MRM chromatogram of quantitative ion pair of 6 alkaloids in standard（a），sample（b）and blank（c）solution

表 2　6 种乌头碱类生物碱成分线性关系结果

Tab 2　Linear relationship for 6 alkaloids

化合物	线性范围 /（μg • L^{-1}）	线性方程	r^2	检测限 /（μg • L^{-1}）	定量限 /（μg • L^{-1}）
乌头碱	0.96 ～ 192.58	$y = 112.5x - 201.7$	0.9991	0.096	0.185
新乌头碱	0.96 ～ 191.97	$y = 77.1x - 96.7$	0.9988	0.131	0.457
次乌头碱	0.91 ～ 181.68	$y = 91.3x - 187.4$	0.9982	0.142	0.545
苯甲酰乌头原碱	1.01 ～ 202.98	$y = 52.0x - 18.7$	0.9996	0.246	0.690
苯甲酰新乌头原碱	0.94 ～ 188.43	$y = 55.9x + 40.4$	0.9995	0.112	0.290
苯甲酰次乌头原碱	0.99 ～ 198.48	$y = 62.9x - 95.2$	0.9989	0.108	0.295

2.8　回收试验

精密量取 6 份同一批号（批号：20200701）的补肾填精口服液 0.5 mL，加入 10 mL 质量浓度约为 1 μg • mL^{-1} 混合对照品溶液（含乌头碱 0.9626 μg • mL^{-1}，新乌头碱 0.9598 μg • mL^{-1}、次乌头碱 0.9084 μg•mL^{-1}、苯甲酰乌头原碱 1.0149 μg•mL^{-1}、苯甲酰新乌头原碱 0.9421 μg • mL^{-1}、苯甲酰次乌头原碱 0.9924 μg • mL^{-1}），用甲醇稀释定容至 25 mL，再移取 1 mL 混合对照品溶液至 10 mL 量瓶中，稀释定容后，过 0.22 μm 有机系滤膜后进样，分别记录峰面积，计算 *RSD*。结果乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱平均回收率分别为 97.7%、121.2%、94.6%、86.1%、82.1%、84.4%，*RSD* 分别为 1.2%、0.80%、1.0%、2.0%、1.9%、1.9%。其中新乌头碱的回收率为 121.2%，样品中该成分未检出，符合《中国药典》2020 版四部中 9101 提出的样品中含量 10×10^6 的回收率在 70% ～ 125% 的要求。

2.9　基质效应考察

取空白基质溶液，加入一定量的标准储备液进行分析，同时将用甲醇配制的相同浓度标准溶液进行分析。以式（1）计算生物碱的基质效应。

$$M_e = (1 - A_{me}/A_{se}) \times 100\% \quad (1)$$

式中，M_e 为基质溶液中目标物的基质效应；A_{me} 为空白基质样品中目标物的色谱峰面积；A_{se} 为纯溶剂中目标物的色谱峰面积。

$|M_e| < 20\%$ 为弱基质效应；$20\% \leqslant |M_e| \leqslant 50\%$ 为中等强度的基质效应；$|M_e| > 50\%$ 为强基质效应。一般当基质效应在中等程度以上，影响定量结果时就需要对基质效应进行校正 [12]。通过（1）式计算此 6 种生物碱的基质效应约为 70%，说明样品基质具有强基质的抑制效应。

基质效应的存在易干扰试验结果的准确性，因此，排除基质干扰就显得尤为重要，本试验尝试采用直接萃取法与固相萃取法排除基质干扰。

2.9.1　直接萃取法　取 1 mL 补肾填精口服液样品（批号：20200701）置于 25 mL 量瓶中，再向样品中加入 10 mL 质量浓度约为 1 μg • mL^{-1} 混合对照品溶液，用甲醇稀释定容至刻度作为加标样品液。取加标样品液 1 mL，加氨试液 10 mL，用三氯甲烷振摇提取 5 次，每次 15 mL，合并三氯甲烷液，加稀盐酸振摇提取 4 次，每次 15 mL，合并酸液，用浓氨溶液调节 pH 值至 10，加三氯甲烷振摇提取 4 次，每次 15 mL，合并三氯甲烷液，蒸干，残渣转移至 20 mL 量瓶中，甲醇定容，作为供试品溶液。

2.9.2　固相萃取法　取上面的加标样品液 1 mL，加稀盐酸 5 mL，作为预处理样品。将岛津 SHIMSEN Styra MCX 型 SPE 小柱分别用 100% 甲醇和 100% 水进行活化平衡，再将预处理样品进行上样。上样后先用 50 mL 2% 甲酸进行洗脱，再用 50 mL 甲醇进行洗脱，最后用 50 mL 5% 氨水甲醇溶液进行洗脱，收集洗脱液，蒸干，残渣转移至 20 mL 量瓶中，甲醇定容，作为供试品溶液。将两种供试品溶液过 0.22 μm 有机滤膜后进样，记录峰面积，计算回收率，结果见表 3。可知两种前处理方式的回收率一般，而从“2.8”项下可知，采用空白基质溶液配制标准工作液的方法，6 种乌头碱类化合物的回收率在 82.1% ～ 121.2%，效果优于直接萃取法和 SPE 法。因此选择该方法进行后续试验。

表 3　不同前处理方式对 6 种乌头碱类成分回收率的影响 (%)

Tab 3　Effect of different pretreatment on the recovery of 6 alkaloids (%)

前处理方法	乌头碱	新乌头碱	次乌头碱	苯甲酰乌头原碱	苯甲酰新乌头原碱	苯甲酰次乌头原碱
直接萃取法	50.1	52.4	58.6	64.7	52.0	53.6
SPE 法	70.4	72.4	65.1	77.6	71.3	78.9

2.10　耐用性试验

取“2.2.4”项下样品，更换仪器（安捷伦 1290 INfinity Ⅱ-6470、赛默飞 TSQ Endura）与色谱柱 [Welch UHPLC Ultimate LP-C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）、CAPCELL PAK C_{18} IF2（2.1 mm×100 mm，2 μm）] 进样测定，6 种乌头碱类化合物含量的 *RSD* 均< 2.2%，表明方法耐用性良好。

2.11　样品含量测定

取 11 批补肾填精口服液，稀释定容后，进样测定，记录峰面积并计算含量，结果见表 4。11 批样品中双酯型生物碱含量较低，而单酯型生

物碱的含量较高。《中国药典》2020 年版中对黑顺片双酯型生物碱的限量为总量不得过 0.010%，而对单酯型生物碱的含量要求不得低于 0.010%。按照补肾填精口服液的制法折算，每 1 mL 样品中约含黑顺片 0.06 g·mL^{-1}，折算后，每 1 mL 样品中双酯型生物碱的含量不得高于 6 μg·mL^{-1}，而单酯型生物碱的含量则不得低于 6 μg·mL^{-1}。由此可见，所有批次样品的安全性高。

表 4　不同批次样品中 6 种生物碱的含量测定结果 (μg·mL^{-1})

Tab 4　Content of 6 alkaloids in different batches of samples (μg·mL^{-1})

批号	双酯型乌头碱				单酯型乌头碱			
	乌头碱	新乌头碱	次乌头碱	总量	苯甲酰乌头原碱	苯甲酰新乌头原碱	苯甲酰次乌头原碱	总量
20201003	—	—	0.73	0.73	1.60	17.90	1.81	21.31
20210401	—	—	0.79	0.79	1.60	16.91	1.79	20.30
20210502	—	—	0.91	0.91	3.16	27.67	3.86	34.69
20200702	—	—	1.23	1.23	2.23	20.86	2.20	25.29
20210201	—	—	0.92	0.92	2.60	21.74	2.76	27.10
20200701	—	—	0.89	0.89	2.47	25.58	2.46	30.51
20210501	—	—	0.83	0.83	2.22	22.66	2.26	27.14
20201203	—	—	0.56	0.56	2.52	21.94	3.71	28.17
20200905	—	—	0.85	0.85	3.36	31.96	3.91	39.23
20200904	—	—	0.55	0.55	2.07	18.00	3.02	23.09
20201004	—	—	0.78		3.00	25.95	3.44	32.39

注（Note）：“—”表示未检出（“—”means non-detected）。

3　讨论

中成药的基质较为复杂，可能对目标物的离子化效果产生干扰，从而影响质谱的响应。一般直接采用液质联用进行分析时会有较大的基质干扰[13-14]。本试验直接将样品稀释后进样，需考察样品的基质影响。曾尝试采用直接萃取法与固相萃取法排除基质干扰，但这两种前处理方式的回收率一般，因此需采用空白基质溶液配制标准工作液，使得标准工作液和样品溶液具有相似的离子化环境，以确保所建立方法的准确性。

本研究采用 HPLC-MS/MS 法同时测定补肾填精口服液中 6 种乌头类生物碱的含量，通过对目标物离子对的选定、毛细管簇电压和碰撞电压的优化，获得了最高灵敏度的质谱条件。通过对样品的基质考察，发现补肾填精口服液对目标物的检测具有强抑制基质作用，因此在试验过程中为确保数据的准确性，考察了样品的基质效应。结果表明，该方法灵敏度高，重复性好，且具有较高的回收率，能够满足样品中限量及定量成分的检测要求，可为控制含乌头碱类生物碱成分的中成药的安全性提供参考。

参考文献

[1] 刘澄波 . 补肾填精口服液的临床疗效观察 [J]. 中国医药指南，2013，11（34）：21-22.

[2] 蔡振世，徐端琼，卢文斌 . 补肾壮阳类保健品中非法添加物检测方法在国内的研究进展 [J]. 海峡药学，2016，28（7）：61-64.

[3] 黄敏，陈会敏，周艳艳，等 . 补肾填精法对肾精亏虚孕鼠脾脏及 TLR4/MyD88/NF-κBp65 免疫通路的影响 [J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2020，22（6）：1786-1793.

[4] 刘慧慧，马丹，赵丹玉，等 . 补肾填精方对抑郁样模型大鼠海马 CaMKⅡ及 CREB 蛋白磷酸化水平的影响 [J]. 时珍国医国药，2020，31（3）：575-579.

[5] 朱仲康，张林，柳春，等 . 补肾填精法对肾虚阿尔茨海默小鼠海马自噬的干预作用 [J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25（20）：43-48.

[6] 伍新林，李俊彪，黎倩，等 . 补肾填精口服液临床疗效观察 [J]. 中药材，2005，28（5）：439-441.

[7] 罗懿妮，陈联辉，谢芳，等 . 补肾填精口服液中氨基酸薄层色谱鉴别方法的优化 [J]. 广东药学院学报，2004，20（3）：216-217，223.

[8] 曾祥珲，谢庆凤，颜芳，等 . 附子现代药理研究及临床应用差异探讨 [J]. 新中医，2022，54（4）：159-163.

[9] 刘念，尹飞，王伟强，等 . 从《伤寒论》附子的运用探讨张仲景扶阳之旨 [J]. 中国中医基础医学杂志，2022，28（1）：50-52.

[10] 丁劲峰，宋祥和，季阳，等 . 乌头类生物碱体内代谢机理研究进展 [J]. 中国法医学杂志，2019，34（4）：375-378.

[11] 党娟丽，郭东艳，韦焕丽，等 . 不同配伍对芍药甘草附子汤中苯甲酰类乌头碱含量变化的影响 [J]. 中南药学，2017，15（9）：1197-1200.

[12] 罗辉泰，黄晓兰，吴惠勤，等 . 分散固相萃取 - 液相色谱 - 串联质谱法同时快速测定化妆品中 81 种糖皮质激素 [J]. 色谱，2017，35（8）：816-825.

[13] 郭伟华，周金慧，黄京平，等 . 分散固相萃取 - 高效液相色谱 - 串联质谱法测定蜂蜜中生物碱 [J]. 分析化学，2014，42（10）：1453-1458.

[14] 吕小会，罗辉泰，黄晓兰，等 . 高效液相色谱 - 串联质谱法测定化妆品中 9 种禁用生物碱 [J]. 质谱学报，2021，42（1）：73-83.

（收稿日期：2022-08-25；修回日期：2022-11-09）

UPLC-MS/MS 法检测中药全蝎中 29 种抗感染药物的残留

任晓娜，郑磊*（山东省立第三医院药学部，济南　250031）

摘要：目的　建立超高效液相色谱 - 串联质谱（UPLC-MS/MS）法测定中药全蝎中 29 种抗感染药物的残留量。**方法**　全蝎样品经 50% 乙腈溶液提取，采用 C18 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.9 μm）进行分离，用 5 mmol • L^{-1} 甲酸铵缓冲溶液（pH 4.0）和乙腈（含 0.1% 甲酸）作为流动相，线性梯度洗脱，流速为 0.2 mL • min^{-1}；柱温为 40 ℃；进样量为 5 μL；电喷雾离子源（ESI）电离，正负离子同时切换扫描，多反应监测模式（MRM）采集信号。**结果**　29 种抗感染药物在 1 ～ 200 ng • mL^{-1} 内与峰面积呈良好的线性关系，相关系数（*r*）均大于 0.99；分别进行 2、10、20 ng • mL^{-1} 3 个浓度水平的加样回收试验，平均回收率为 88.2% ～ 112.3%，其 *RSD* 为 1.4% ～ 7.2%（$n = 3$）；检测限为 0.25 ng • mL^{-1}，定量限为 0.75 ng • mL^{-1}。**结论**　该方法操作简单、灵敏度高、准确度好、专属性强，适用于同时对全蝎中多种抗感染药物残留的定性定量分析。

关键词：超高效液相色谱质谱联用法；全蝎；抗感染药物；多反应监测
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-1037-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.032

Determination of 29 anti-infection drugs in scorpions by UPLC-MS/MS

REN Xiao-na, ZHENG Lei* (*Department of Pharmacy*, *Shandong Province Third Hospital*, *Jinan* 250031)

Abstract: Objective　To determine 29 anti-infection drugs in scorpions by UPLC-MS/MS method. **Methods**　Scorpion samples were extracted with 50% acetonitrile solution, and separated by C18 column (2.1 mm×100 mm, 1.9 μm). Gradient elution was carried out with 5 mmol • L^{-1} ammonium formate buffer (pH 4.0) and acetonitrile (containing 0.1% formic acid) as the mobile phase, the flow rate was 0.2 mL • min^{-1}, the column temperature was 40 ℃ , and the injection volume was 5 μL. The ionization signal was ionized by electrospray ionization, and the positive and negative ions were simultaneously switched and scanned. Multi response monitoring mode (MRM) was used to collect signals. **Results**　There was a good linearity between the peak area and the mass concentration of the 29 anti-infection drugs at 1 ～ 200 ng • mL^{-1}, with correlation coefficient (*r*) greater than 0.99. The average recovery was 88.2% ～ 112.3%, and the *RSD* was 1.4% ～ 7.2% ($n = 3$). The detection limit was 0.25 ng • mL^{-1} and the quantitative limit was 0.75 ng • mL^{-1}. **Conclusion**　The method has simple operation, high sensitivity, good accuracy and strong specificity. It is suitable for the qualitative and quantitative analysis of various anti-infection drug residues in scorpions simultaneously.

Key words: UPLC-MS/MS; scorpion; anti-infective drug; multiple reaction monitoring

全蝎为钳蝎科动物东亚钳蝎（*Buthus martensii* Karsch）的干燥体[1]，别名钳蝎、全虫、蝎子、问荆蝎，为传统名贵中药材。2020 年版《中国药典》记载全蝎：辛、平，有毒，归肝经。常用于肝风内动，痉挛抽搐，小儿惊风，中风口㖞，半身不遂，破伤风，风湿顽痹，偏正头痛，疮疡，瘰疬等[1]。现代药理研究表明，全蝎具有显著的抗肿瘤、抗癫痫、抗惊厥、抗凝、抗菌等药理作

基金项目：山东省医学会临床科研资金 - 齐鲁专项（No.YXH2022ZX02050）；山东省中医药科技项目（No.2021M199）；中国药学会全国医药信息网 2022 年科普研究重点项目（No.CMEI2022KPYJ00503）。
作者简介：任晓娜，女，主管药师，主要从事药品快速检测，email：280839370@qq.com　*通信作者：郑磊，男，副主任药师，硕士研究生导师，主要从事药物分析与临床药学工作，email：zhenglei8501@163.com

用[2-5]，另外还具镇痛抗炎、促生长、提高免疫力等多种活性[6-8]。临床多用于治疗惊风、抽搐痉挛、中风口渴、半身不遂、破伤风、风湿麻痹、偏正头痛、疮疡、瘰疬等[9]。

野生全蝎资源稀少，人工养殖全蝎已经成功，养殖全蝎与野生全蝎具有同等药用功效。由于在人工养殖过程中，养殖技术不当，全蝎会出黑腹病、蝎虱病、拖尾病等[10-11]。部分养殖户会在饲料中掺入四环素类、磺胺类以及氯霉素等抗感染药物进行防治[12]。抗感染药物在全蝎体内不能完全代谢清除，产生蓄积残留，进而引入到全蝎中药材以及含有全蝎的中药制剂中，影响患者健康。目前，对于全蝎中抗感染药物残留量检测的报道很少，仅曾鸣等[13]采用高效液相色谱法对全蝎中多西环素的残留量进行测定，但高效液相色谱法检测灵敏度较低，准确性差，且仅检测其中一种成分，检测效率低。本文建立 UPLC-MS/MS 方法对全蝎中四环素类、磺胺类、喹诺酮类、大环内酯类以及氯霉素等 29 种抗感染药物同时检测，该方法灵敏度高、准确度好、专属性强、检测效率高。

1　仪器与试药

岛津 LC-20AD 型超高效液相色谱仪（日本岛津公司），API 4500 三重四极杆液质联用仪（美国 AB Sciex 公司），配有自动进样器，ESI 离子源，Analyst1.6.2 化学工作站。电子分析天平（瑞士 MettlerToledo 公司，精度：0.01 mg）；KQ-800DE 超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；TG20WS 离心机（长沙湘智离心机仪器有限公司）；IKA MS 3 digital 涡旋振荡器（德国 IKA 公司）。

磺胺吡啶（批号：FH1917021，含量：95.9%）、磺胺甲嘧啶（批号：FH1917025，含量：98.6%）、磺胺甲二唑（批号：FH1917066，含量：98.2%）、磺胺甲氧嗪（批号：H1917015，含量：96.8%、磺胺氯哒嗪（批号：FH1917019，含量：97.7%）、磺胺甲噁唑（批号：FH1917043，含量：98.9%）、依诺沙星（批号：FX1915011，含量：96.3%）、沙拉沙星（批号：FX1915016，含量：97.3%）、培氟沙星（批号：FX1915022，含量：94.7%）、氧氟沙星（批号：FX1915036，含量：93.6%）、氟罗沙星（批号：FX1915005，含量：98.4%）、双氟沙星（批号：FX1915010，含量：97.7%）、莫西沙星（批号：FX1915043，含量：98.9%）、诺氟沙星（批号：FX1915051，含量：98.1%）、环丙沙星（批号：FX1915053，含量：98.4%）、恩诺沙星（批号：FX1915028，含量：99.3%）、林可霉素（批号：ALT801962，含量：95.3%）、克林霉素（批号：ALT801923，含量：96.6%）、克林霉素磷酸酯（批号：ALT801917，含量：97.2%）、四环素（批号：FS1614059，含量：95.7%）、多西环素（批号：FS1614060，含量：92.8%）、米诺环素（批号：FS1614242，含量：99.0%）、土霉素（批号：FS1614062，含量：95.6%）、金霉素（批号：ALT800996，含量：91.7%）、阿奇霉素（批号：ALT800943，含量：96.6%）、克拉霉素（批号：ALT800972，含量：97.1%）、罗红霉素（批号：ALT800919，含量：97.9%）、灰黄霉素（批号：ALT800923，含量：98.4%）、氯霉素（批号：ALT800991，含量：95.7%）（天津阿尔塔科技有限公司）。乙腈与甲酸均为色谱纯，水为超纯水，其他试剂均为分析纯。

共收集 15 批全蝎样品，其中 10 批样品购买于药材市场，采用匿名编码方式，分别编为 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J，5 批样品为作者采集的野生全蝎，分别采集于山东济南、泰安、莱芜、聊城和临沂地区，分别编为 K、L、M、N、O。15 批全蝎经本院张晓丽主任中药师鉴定，均为钳蝎科动物东亚钳蝎。

2　方法与结果

2.1　色谱和质谱条件

色谱条件：色谱柱 Shim-pack GIST AQ-HP C18（2.1 mm×100 mm，1.9 μm）；流动相 A：5 mmol・L^{-1} 甲酸铵缓冲溶液（pH 4.0），流动相 B：乙腈（含 0.1% 甲酸），线性梯度洗脱，见表 1；流速 0.2 mL・min^{-1}；柱温 40 ℃；进样量 5 μL。

表 1　线性梯度洗脱程序

Tab 1　Linear gradient elution procedure

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	98	2
14	1	99
17	1	99
17.1	98	2
20	98	2

质谱条件：采用 API 4500 三重四极杆质谱，离子源为电喷雾离子源（ESI），正负离子同时切换扫描，扫描方式为多反应监测（MRM），离子喷雾电压：正离子模式为 5.5 kV，负离子模式为－4.5 kV，雾化器压力（Gas1）55 kPa，辅助气压力（Gas2）60 kPa，干燥气为氮气，离子源温度 550 ℃。

2.2　溶液配制

2.2.1　对照品储备液　精密称取 29 种对照品各约 10.0 mg，置 100 mL 量瓶中，用 50% 乙腈溶液溶解并稀释至刻度，摇匀，制得质量浓度为 0.1 mg・mL^{-1} 的对照品储备液。

2.2.2　混合对照品溶液　精密量取对照品储备液 1 mL，置 100 mL 量瓶中，用 50% 乙腈溶液稀释至刻度，摇匀，制得质量浓度为 1 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.2.3　供试品溶液　取样品，研成细粉，精密称取样品粉末 5.0 g，置 50 mL 具塞离心管中，加 50% 乙腈溶液适量，涡旋 30 s，超声（功率 300 W，频率 50 kHz）提取 30 min，涡旋混合摇匀，以 0 ℃ 8000 r • min^{-1} 冷冻离心 10 min，精密量取上清液 5 mL，置 50 mL 量瓶中，用 50% 乙腈溶液稀释至刻度，摇匀，经 0.22 μm 滤膜过滤后，取续滤液作为供试品溶液，备用。

2.2.4　空白基质样品溶液　取不含待测成分的全蝎样品，研成细粉，即得空白基质样品。按供试品溶液方法处理即得空白溶液。

2.3　质谱条件的优化

取混合对照品溶液（质量浓度为 1.0 μg•mL^{-1}），选用 ESI 离子化模式，针泵直接进样，优化 29 种待测成分的最佳解簇电压（DP）值和各子离子最佳碰撞能量（CE）值。各化合物质谱参数优化结果见表 2。采用优化后的质谱条件进行测定，29 种对照品，样品提取定量离子流色谱图见图 1、2。

表 2　29 种抗感染药物质谱参数优化结果

Tab 2　Optimization of mass parameter of 29 anti-infection drugs

序号	化合物	电离方式	母离子（*m/z*）	子离子（*m/z*）	DP/eV	CE/eV	序号	化合物	电离方式	母离子（*m/z*）	子离子（*m/z*）	DP/eV	CE/eV
1	磺胺吡啶	ESI$^+$	250.1	156.0*	80	23	16	恩诺沙星	ESI$^+$	360.2	245.2*	104	39
		ESI$^+$	250.1	92.0	80	36			ESI$^+$	360.2	342.1	104	31
2	磺胺甲嘧啶	ESI$^+$	265.1	156.0*	83	23	17	林可霉素	ESI$^+$	407.2	126.1*	114	38
		ESI$^+$	265.1	92.1	83	39			ESI$^+$	407.2	359.3	114	27
3	磺胺甲二唑	ESI$^+$	271.1	156.0*	72	20	18	克林霉素	ESI$^+$	425.2	126.1*	128	40
		ESI$^+$	271.1	92.1	72	39			ESI$^+$	425.2	377.0	128	27
4	磺胺甲氧嗪	ESI$^+$	281.1	156.0*	95	23	19	克林霉素磷酸酯	ESI$^+$	505.2	126.1*	130	39
		ESI$^+$	281.1	92.0	95	42			ESI$^+$	505.2	457.2	130	30
5	磺胺氯哒嗪	ESI$^+$	285.0	155.9*	75	20	20	四环素	ESI$^+$	445.1	410.1*	90	29
		ESI$^+$	285.0	92.0	75	39			ESI$^+$	445.1	427.1	90	21
6	磺胺甲噁唑	ESI$^+$	254.0	155.9*	80	23	21	多西环素	ESI$^+$	445.1	428.1*	90	27
		ESI$^+$	254.0	108.0	80	34			ESI$^+$	445.1	154.1	90	35
7	依诺沙星	ESI$^+$	321.1	303.2*	100	32	22	米诺环素	ESI$^+$	458.2	441.3*	100	27
		ESI$^+$	321.1	232.0	100	48			ESI$^+$	458.2	283.1	100	61
8	沙拉沙星	ESI$^+$	386.1	299.2*	110	39	23	土霉素	ESI$^+$	461.2	426.1*	90	30
		ESI$^+$	386.1	342.1	110	27			ESI$^+$	461.2	444.2	90	22
9	培氟沙星	ESI$^+$	334.2	233.2*	96	35	24	金霉素	ESI$^+$	479.1	444.2*	90	30
		ESI$^+$	334.2	290.1	96	25			ESI$^+$	479.1	462.1	90	25
10	氧氟沙星	ESI$^+$	362.0	261.2*	105	39	25	阿奇霉素	ESI$^+$	749.4	591.4*	130	40
		ESI$^+$	362.0	318.1	105	18			ESI$^+$	749.4	116.1	130	68
11	氟罗沙星	ESI$^+$	370.1	269.1*	106	39	26	克拉霉素	ESI$^+$	748.5	158.0*	120	38
		ESI$^+$	370.1	326.1	106	28			ESI$^+$	748.5	590.5	120	27
12	双氟沙星	ESI$^+$	400.1	299.1*	118	41	27	罗红霉素	ESI$^+$	837.4	679.5*	120	32
		ESI$^+$	400.1	356.1	118	28			ESI$^+$	837.4	158.2	120	42
13	莫西沙星	ESI$^+$	402.2	261.1*	110	35	28	灰黄霉素	ESI$^+$	353.2	165.0*	95	27
		ESI$^+$	402.2	364.5	110	39			ESI$^+$	353.2	215.0	95	27
14	诺氟沙星	ESI$^+$	320.2	233.0*	105	35	29	氯霉素	ESI$^-$	320.9	152.0*	－88	－23
		ESI$^+$	320.2	276.1	105	25			ESI$^-$	320.9	256.9	－88	－17
15	环丙沙星	ESI$^+$	332.1	288.2*	96	26							
		ESI$^+$	332.1	231.0	96	50							

注（Note）：* 为定量离子（*is quantitative ion）。

2.4　线性关系考察

取空白基质样品 5 g 于 50 mL 具塞离心管中，平行 6 份，分别精密加入对照品储备液适量，按照“2.2”项下方法处理，配制各待测成分质量浓度分别为 1、10、20、50、100、200 ng • mL^{-1} 的基质标准工作溶液，进样测定，以质量浓度 X（ng•mL^{-1}）为横坐标，以峰面积 Y 为纵坐标，进行线性回归，制得回归方程。结果表明，29 种待测成分在 1 ～ 200 ng • mL^{-1} 内与峰面积线性关系良好。将对照品溶液逐步稀释，以 S/N ＝ 3 时，计算检测限（LOD），以 S/N ＝ 10 时，计算定量限（LOQ）。结果见表 3。

2.5　回收试验

称取不含 29 种待测成分的样品约 5.0 g，共 9 份，置 50 mL 具塞离心管中，分别精密加入对照品溶液（质量浓度为 1.0 μg • mL^{-1}）1.0、5.0、10.0 mL，制备约相当于 2、10、20 ng • mL^{-1} 的回收试

表 3　29 种成分的回归方程、相关系数、线性范围及检测限、定量限

Tab 3　Linear regression equation，correlation coefficient，linearity，LOD and LOQ of 29 anti-infection drugs

序号	化合物	回归方程	r	线性范围 /（ng • mL^{-1}）	LOD/（ng • mL^{-1}）	LOQ/（ng • mL^{-1}）
1	磺胺吡啶	$Y = 4.59\times10^4X - 1.19\times10^4$	0.994	1.01 ～ 202.54	0.25	0.75
2	磺胺甲嘧啶	$Y = 4.97\times10^4X - 3.10\times10^4$	0.997	1.01 ～ 201.34	0.25	0.75
3	磺胺甲二唑	$Y = 5.30\times10^4X - 4.30\times10^4$	0.997	1.00 ～ 200.92	0.25	0.75
4	磺胺甲氧嗪	$Y = 5.24\times10^4X - 1.37\times10^4$	0.993	1.01 ～ 202.31	0.25	0.75
5	磺胺氯哒嗪	$Y = 4.94\times10^4X - 1.83\times10^4$	0.998	1.04 ～ 207.51	0.25	0.75
6	磺胺甲噁唑	$Y = 3.99\times10^4X - 8.73\times10^3$	0.998	1.01 ～ 201.16	0.25	0.75
7	依诺沙星	$Y = 7.14\times10^4X - 7.33\times10^4$	0.995	0.99 ～ 198.57	0.25	0.75
8	沙拉沙星	$Y = 3.30\times10^4X - 1.80\times10^4$	0.998	1.00 ～ 199.85	0.25	0.75
9	培氟沙星	$Y = 2.09\times10^4X - 6.69\times10^3$	0.999	1.02 ～ 203.61	0.25	0.75
10	氧氟沙星	$Y = 4.70\times10^4X - 2.09\times10^4$	0.999	1.01 ～ 202.55	0.25	0.75
11	氟罗沙星	$Y = 2.81\times10^4X - 1.50\times10^4$	0.999	1.01 ～ 202.31	0.25	0.75
12	双氟沙星	$Y = 3.17\times10^4X - 2.19\times10^4$	0.998	1.01 ～ 201.46	0.25	0.75
13	莫西沙星	$Y = 8.63\times10^4X - 3.43\times10^3$	0.997	1.01 ～ 201.56	0.25	0.75
14	诺氟沙星	$Y = 1.21\times10^4X - 3.45\times10^3$	0.997	1.01 ～ 201.11	0.25	0.75
15	环丙沙星	$Y = 2.37\times10^4X - 6.10\times10^3$	0.998	1.00 ～ 199.95	0.25	0.75
16	恩诺沙星	$Y = 2.50\times10^4X - 1.52\times10^4$	0.999	1.01 ～ 202.17	0.25	0.75
17	林可霉素	$Y = 7.89\times10^4X - 2.62\times10^3$	0.998	1.00 ～ 199.56	0.25	0.75
18	克林霉素	$Y = 5.60\times10^4X - 5.73\times10^3$	0.992	0.99 ～ 197.64	0.25	0.75
19	克林霉素磷酸酯	$Y = 2.94\times10^4X - 3.01\times10^4$	0.998	0.99 ～ 197.70	0.25	0.75
20	四环素	$Y = 1.75\times10^4X - 1.06\times10^4$	0.995	1.02 ～ 203.27	0.25	0.75
21	多西环素	$Y = 3.01\times10^4X - 2.03\times10^4$	0.994	1.02 ～ 203.79	0.25	0.75
22	米诺环素	$Y = 3.90\times10^4X - 4.09\times10^3$	0.991	1.01 ～ 201.56	0.25	0.75
23	土霉素	$Y = 1.36\times10^4X - 8.04\times10^3$	0.993	0.99 ～ 198.66	0.25	0.75
24	金霉素	$Y = 1.05\times10^4X - 5.08\times10^3$	0.991	1.00 ～ 199.17	0.25	0.75
25	阿奇霉素	$Y = 3.03\times10^4X - 1.87\times10^4$	0.993	1.01 ～ 201.31	0.25	0.75
26	克拉霉素	$Y = 1.18\times10^4X - 5.16\times10^4$	0.998	1.02 ～ 203.52	0.25	0.75
27	罗红霉素	$Y = 7.23\times10^4X - 2.46\times10^4$	0.994	1.01 ～ 202.65	0.25	0.75
28	灰黄霉素	$Y = 3.85\times10^4X - 1.82\times10^4$	0.999	1.00 ～ 200.93	0.25	0.75
29	氯霉素	$Y = 2.26\times10^4X - 5.60\times10^4$	0.999	1.01 ～ 201.93	0.25	0.75

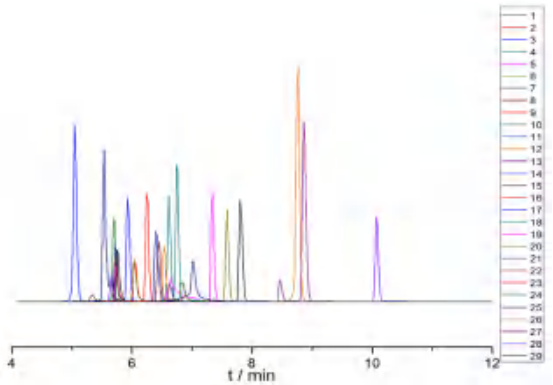


图 1　29 种抗感染药物对照品溶液的提取离子流色谱图

Fig 1　Extraction ion current of 29 anti-infection drugs

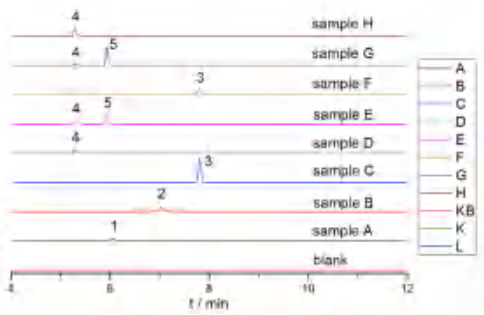


图 2　样品（A ～ H）与空白溶液提取离子流色谱图

Fig 2　Extraction ion current of samples A ～ H and blank solution

1. 四环素（tetracycline）；2. 多西环素（doxycycline）；3. 氯霉素（chloramphenicol）；4. 土霉素（oxytetracycline）；5. 磺胺吡啶（sulfapyridine）

验溶液，每个浓度水平分别制备 3 份。按“2.1”项下条件进样测定，结果 29 种待测成分的平均回收率为 88.2% ～ 112.3%，其 *RSD* 为 1.4% ～ 7.2%。

2.6　精密度试验

取混合对照品溶液（质量浓度为 10 ng•mL^{-1}），按照“2.1”项下条件连续进样 6 次，计算采集定量离子峰面积的 *RSD* 为 0.70% ～ 5.0%，表明仪器的精密度良好。

2.7　稳定性试验

取回收试验溶液（质量浓度为 10 ng • mL^{-1}），按照“2.1”项下条件分别在 0、2、8、12、16、24 h 检测，计算不同时间点采集定量离子峰面积的 *RSD* 为 1.1% ～ 5.0%，表明样品稳定性良好。

2.8　重复性试验

取样品 E，按照“2.2”项下供试品溶液制备方法制备供试品溶液 6 份，按照“2.1”项下条件进样

检测磺胺吡啶和土霉素的含量，结果磺胺吡啶和土霉素的含量的 *RSD* 值分别为 2.1% 和 2.3%，表明该方法的重复性良好。

2.9 样品含量测定

采用上述方法对 15 批中药全蝎样品进行检测，其中 10 批市售样品中 8 批次不同程度检出多种抗感染药物，而采集的野生全蝎样品均未检出抗感染药物。具体结果如下：样品 A 检出四环素 2.55 μg • g^{-1}；样品 B 检出多西环素 3.53 μg • g^{-1}；样品 C 检出氯霉素 7.37 μg • g^{-1}；样品 D 检出土霉素 3.61 μg • g^{-1}；样品 E 检出磺胺吡啶 3.17 μg • g^{-1} 和土霉素 2.84 μg • g^{-1}；样品 F 检出氯霉素 1.91 μg • g^{-1}；样品 G 检出磺胺吡啶 5.63 μg • g^{-1} 和土霉素 1.59 μg•g^{-1}；样品 H 检出土霉素 6.88 μg•g^{-1}。

3 讨论

本试验通过全扫描方式观测待测化合物离子情况，氯霉素为酸性化合物，容易丢失 H^+ 以形成稳定的 $[M-H]^-$ 分子离子；其余化合物易获得 H^+ 形成稳定的 $[M+H]^+$ 分子离子。因此，本试验采用正负离子同时切换扫描对样品进行分析。流动相中水相采用 5 mmol • L^{-1} 甲酸铵缓冲溶液（pH 4.0），可以增强氯霉素的离子化效率，在有机相中加入 0.1% 甲酸，可以增强其他待测成分的离子化效率，增加各待测化合物的质谱响应强度。同时比较了甲醇和乙腈分别作为有机相的分析效果，通过优化色谱条件均可以实现对待测化合物的分离。但是，本试验采用 1.9 μm 的小粒径色谱柱，其优点是柱效高、分离效率好，但会产生较高的色谱柱压力，因此选用乙腈作为有机相，可以有效降低柱压，保护色谱柱。

在 UPLC-MS/MS 中，由共流物引起的基质效应会影响分析方法的灵敏度、精密度和准确度。本试验采用空白基质样品制备基质标准工作溶液，可以有效扣除基质效应对定量结果的影响；同时，本试验还通过稀释样品溶液、优化色谱分离条件来减少基质对试验结果的影响。

本文对 29 种抗感染药物进行检测，由于检测成分多，且各成分理化性质差异较大，因此分别考察甲醇和乙腈作为提取溶剂的提取效率，结果两种溶剂提取效率无显著差异，并且甲醇提取液中干扰成分较多，影响质谱检测，因此选择乙腈作为提取溶剂。同时考察 40%、50%、60% 等不同浓度乙腈的提取效率，结果表明选择 50% 乙腈溶液作为提取溶剂，可以兼顾所有待测成分，将其最大限度提取出来。本文分别考察了超声提取和回流提取方法，并对提取时间进行了考察，结果表明超声提取方法效率高，操作简便，超声提取 30 min 时，各待测成分的提取浓度不再增加。因此，选择超声提取 30 min 作为提取条件。

供试品溶液处理过程相对简单，提取待测成分的同时，也将全蝎中极性干扰物质提取出来，产生基质影响。本文采用 MRM 模式，样品基质对测定的干扰较小，且色谱柱具备一定的分离净化功能，使得供试品溶液中极性较强的干扰成分在 3 min 之前被洗脱在质谱仪之外，大大地减轻了对质谱仪的污染。

本试验共收集 15 批全蝎样品，其中 10 批为市场购买，且均为人工养殖，其检测结果显示，有 8 批样品不同程度地检出了四环素、土霉素、多西环素、氯霉素和磺胺吡啶，且含量在 1.59 ～ 7.37 μg • g^{-1}，说明在全蝎养殖过程中，使用抗感染药物是一种普遍现象，且使用量大，应对其进行控制。2020 年版《中国药典》并未对全蝎中抗感染药物进行检测，国家药品监管部门也没有颁布相应的补充检验方法。本试验建立的 UPLC-MS/MS 方法灵敏度高、准确性好、专属性强、检测效率高，可为全蝎中抗感染药物的定性筛查及定量分析提供技术支持，并有效地提高中药全蝎的安全监管和监控水平。

参考文献

[1] 中国药典 2020 年版 . 一部 [S]. 2020：149.

[2] 张盼盼，贾伟，焦方文，等 . 全蝎蛋白抗肿瘤活性研究 [J]. 中南药学，2017，15（8）：1069-1071.

[3] 章红燕，何福根，王奇 . 全蝎抗肿瘤作用机制及临床应用研究进展 [J]. 中国药业，2013，22（1）：95-96.

[4] 高代丽，李江川，季秀娜，等 . 中药在抗癫痫中的应用及癫痫生物模型研究进展 [J]. 中华中医药学刊，2021，39（10）：26-34.

[5] 宋莹，王振，乌凯迪，等 . 毒药全蝎药理作用研究 [J]. 辽宁中医药大学学报，2020，22（12）：216-220.

[6] 杨志欣，汲丽丽，刘慧，等 . 全蝎化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 中南药学，2020，18（9）：1523-1529.

[7] 王立娜，王颖，刘春雨，等 . 全蝎酶解物增强小鼠免疫功能的研究 [J]. 中南药学，2017，15（10）：1387-1390.

[8] 刘芬，侯睿，费巧玲，等 . 全蝎水提物对巨噬细胞活化作用研究 [J]. 中国免疫学杂志，2016，32（5）：660-664.

[9] 吴福林，董庆海，王涵，等 . 中药全蝎研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报，2018，20（12）：108-111.

[10] 张丽坤，曹莉，韩日畴 . 全蝎养殖的研究进展 [J]. 时珍国医国药，2009，20（3）：735-734.

[11] 郭冬，张守纯，郑海辉 . 蝎子的生态学研究进展 [J]. 贵州学业科学，2011，39（3）：104-105.

[12] 郑延平 . 蝎子的人工养殖技术 [J]. 农村养殖技术，2009，（10）：24.

[13] 曾鸣 . 高效液相色谱测定全蝎中多西环素的含量 [J]. 按摩与康复医学，2021，12（22）：65-69.

（收稿日期：2022-08-27；修回日期：2022-09-19）

基于 HPLC 指纹图谱及多指标成分分析的化学模式识别评价补阳还五汤质量

崔亚玲[1]，李爽[2]，胡北[1]，姚东[1]，许子华[1*]（1. 中国人民解放军北部战区总医院 药学部，沈阳　110000；2. 朝阳市检验检测认证中心，辽宁　朝阳　122000）

摘要：目的　基于 HPLC 指纹图谱、多成分含量测定与化学模式识别相结合的方法评价不同批次补阳还五汤的质量，为其质量控制提供参考。**方法**　采用 Agilent SB-C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），以乙腈 -0.03% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱，检测波长 230 nm，流速 1.0 mL • min^{-1}，柱温 35 ℃。以毛蕊异黄酮葡萄糖苷为参照峰，建立 10 批补阳还五汤 HPLC 指纹图谱，确定共有峰，通过对照品比对指认化学成分并同时测定其含量。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统结合聚类分析和主成分分析对补阳还五汤进行质量评价。**结果**　建立了补阳还五汤指纹图谱，确定了 27 个共有峰，并指认了其中 8 个色谱峰（包括 6 号羟基红花黄色素 A、8 号芍药内酯苷、9 号芍药苷、11 号阿魏酸、12 号毛蕊异黄酮葡萄糖苷、16 号芒柄花苷、21 号毛蕊异黄酮、24 号芒柄花素）。10 批补阳还五汤 HPLC 指纹图谱的相似度在 0.91 ～ 1.00；主成分分析与聚类分析结果基本一致。羟基红花黄色素 A、芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素的含量分别为 0.50 ～ 0.76、0.23 ～ 1.83、1.65 ～ 3.02、0.63 ～ 1.33、0.79 ～ 1.22、0.51 ～ 1.06、0.85 ～ 1.09、0.21 ～ 0.44 mg • g^{-1}。**结论**　指纹图谱、多成分含量同时测定与化学模式识别相结合的方法可以更全面地评价补阳还五汤的内在质量，为其药效物质基础研究和临床应用提供理论依据。

关键词：补阳还五汤；指纹图谱；聚类分析；主成分分析；质量控制
中图分类号：R284　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-1042-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.033

Quality evaluation of Buyang Huanwu decoction based on HPLC fingerprints and chemical pattern recognition with multi-component content analysis

CUI Ya-ling[1], LI Shuang[2], HU Bei[1], YAO Dong[1], XU Zi-hua[1*] (1. *Department of Pharmacy, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang* 110000; 2. *Chaoyang Inspection, Examination & Certification Center, Chaoyang Liaoning* 122000)

Abstract: Objective To evaluate the quality of different batches of Buyang Huanwu decoction based on HPLC fingerprints, multi-component content and chemical pattern recognition to provide reference for its quality control. **Methods** The analysis was performed on an Agilent SB-C_{18} column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with acetonitrile and 0.03% phosphoric acid solution as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL • min^{-1} for gradient elution. The detection wavelength was 230 nm and the column temperature was 35 ℃ . The HPLC fingerprints of 10 batches of Buyang Huanwu decoction were established with the calycosin-7-glucoside as the reference peak, and the common peaks were determined. The chemical components and their contents were identified and determined simultaneously by comparison with the reference substances. The quality of Buyang Huanwu decoction was evaluated with the similarity evaluation system of traditional Chinese medicine chromatographic fingerprint, cluster analysis and principal component analysis. **Results** Totally 27 common peaks were confirmed and eight of them were identified (peak 6 was hydroxysafflor yellow A, peak 8 was

基金项目：军队卫勤保障能力创新与生成专项（No. 20WQ032）。
作者简介：崔亚玲，女，硕士研究生，主管中药师，主要从事中药药物分析及医院制剂的研发，email：cuiyaling0605@126.com
[*]**通信作者：**许子华，男，硕士研究生，副主任药师，主要从事中药药效物质基础和作用机制研究，email：xuzihua-668585@163.com

albiflorin, peak 9 was paeoniflorin, peak 11 was ferulic acid, peak 12 was calycosin-7-glucoside, peak 16 was mangiferin, peak 21 was calycosin, and peak 24 was formononetin). The similarity of the fingerprints of 10 batches of Buyang Huanwu decoction was between 0.91 ～ 1.00. The principal component analysis and cluster analysis were basically the same. The content of hydroxysafflor yellow A, albiflorin, paeoniflorin, ferulic acid, calycosin-7-glucoside, mangiferin, calycosin, and formononetin Buyang Huanwu decoction were at 0.50 ～ 0.76, 0.23 ～ 1.83, 1.65 ～ 3.02, 0.63 ～ 1.33, 0.79 ～ 1.22, 0.51 ～ 1.06, 0.85 ～ 1.09, and 0.21 ～ 0.44 mg • g^{-1}. **Conclusion** The method of combining fingerprints, multi-component simultaneous determination and chemical pattern recognition can comprehensively evaluate the intrinsic quality of Buyang Huanwu decoction, and provide theoretical basis for its pharmacodynamic material basis and clinical application.

Key words: Buyang Huanwu decoction; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis; quality control

补阳还五汤源自于清代王清任之《医林改错》，全方组成为黄芪、当归尾、赤芍、地龙、川芎、红花、桃仁 7 味中药，主要用于治疗中风后出现的半身不遂，口歪眼斜，嘴角流涎，小便次数增加或尿失禁，舌头暗淡，舌苔变白，脉缓无力 [1]。补阳还五汤沿用至今，因显著的临床疗效备受瞩目。随着人们对补阳还五汤化学物质基础和药理作用研究的不断深入，发现其可以通过多途径、多靶点治疗多种疾病，研究发现补阳还五汤可抑制血栓形成及血小板聚集程度，促进血管新生，增加脑血流量，改善脑侧支循环 [2-5]，其促神经增殖作用也十分显著，在临床中常应用于心脑血管意外出现的后遗症、小儿麻痹后遗症、冠心病的治疗 [6-7]。另有研究者发现，补阳还五汤亦能介导调节炎症减轻外周神经疼痛的作用 [8]，临床应用广泛，疗效显著，故建立全面反映补阳还五汤的整体内在质量的评价方法以保证其疗效具有重要的研究意义。

中药指纹图谱是一种全面反映中药或中药制剂整体性化学特征的质量分析方法，越来越多的中药材及中成药通过建立指纹图谱来提升其质量标准。本研究通过建立补阳还五汤的指纹图谱获得化学数据，同时进行多药效指标含量测定，并结合聚类分析、主成分分析对不同批次的补阳还五汤品质进行全面综合分析，以期为补阳还五汤质量的全面监控提供参考。

1　材料

1.1　仪器

岛津 LC-16 高效液相色谱仪（岛津仪器苏州有限公司）；KQ3200 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；AEL-160 十万分之一电子分析天平（SHIMADZU 公司）；YC-015 实验型喷雾干燥机（上海雅程仪器设备有限公司）。

1.2　试药

乙腈和甲醇（色谱纯，上海西格玛奥德里奇贸易有限公司）；甲醇（分析纯，天津市富宇精细化工有限公司）；磷酸（分析纯，天津市大茂化学试剂厂）；双蒸水（北部战区总医院）；羟基红花黄色素 A（批号：wkq20061509）、芍药内酯苷（批号：wkq20061207）、芍药苷（批号：wkq20041008）、阿魏酸（批号：wkq20001307）、毛蕊异黄酮葡萄糖苷（批号：wkq19011506）、芒柄花苷（批号:wkq19110503）、毛蕊异黄酮（批号：wkq20010906）、芒柄花素（批号：wkq19013002）（四川省维克奇生物科技有限公司）；补阳还五汤由黄芪、当归尾、赤芍、地龙、川芎、红花、桃仁组成，均由中国人民解放军北部战区总医院药剂科实验室购买，经北部战区总医院药检室副主任药师何静鉴定黄芪、当归尾、赤芍、地龙、川芎、红花、桃仁分别为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus*（Fisch.）Bge. var. *mongholicus*（Bge.）Hsiao 的干燥根、伞形科植物当归 *Angelica sinensis*（Oliv.）Diels 的干燥根、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、巨蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum*（E. Perrier）的干燥体、伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎、菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花、蔷薇科植物桃 *Prunus persica*（L.）Batsch 的干燥成熟种子。10 批（S1 ～ S10）样品批号分别为 20191021、20191106、20191122、20191126、20191203、20191217、20191225、20191227、20200110、20200118，均由北部战区总医院药剂科实验室制备。

2　方法与结果

2.1　补阳还五汤的制备

黄芪 120 g、当归尾 6 g、赤芍 5 g、地龙 3 g、川芎 3 g、红花 3 g、桃仁 3 g，以上 7 味，加 8 倍量水浸泡 2 h，煎煮二次，第一次 2 h、第二

次 1 h，煎液滤过，滤液合并，浓缩至相对密度为 1.0 ～ 1.1（40 ℃）的清膏，喷雾干燥成细粉，备用。

2.2　混合对照品溶液的制备

取羟基红花黄色素 A、芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素 8 种对照品适量，精密称定，置于 8 个量瓶中，分别加入甲醇制备成质量浓度分别为 1.320、1.552、2.081、1.227、1.174、1.428、1.572、1.361 mg • mL^{-1} 的对照品储备液。分别量取上述单一对照品储备液适量，置于同一 10 mL 量瓶中，加甲醇制得含羟基红花黄色素 A 40 μg • mL^{-1}、芍药内酯苷 50 μg • mL^{-1}、芍药苷 100 μg • mL^{-1}、阿魏酸 15 μg • mL^{-1}、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 40 μg • mL^{-1}、芒柄花苷 50 μg • mL^{-1}、毛蕊异黄酮 50 μg • mL^{-1}、芒柄花素 15 μg • mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.3　供试品溶液的制备

取补阳还五汤细粉 5.0 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 50% 甲醇 30 mL，密塞，称重，超声处理 30 min，静置至室温，加 50% 甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.4　色谱条件

色谱柱：Agilent SB-C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相：乙腈（B）-0.03% 的磷酸水（A）；检测波长：230 nm；流速：1.0 mL • min^{-1}；进样量：10 μL；柱温：35 ℃；梯度洗脱（0.01 ～ 10 min，5% ～ 10%B；10 ～ 40 min，10% ～ 21%B；40 ～ 50 min，21% ～ 29%B；50 ～ 57 min，29% ～ 32%B；57 ～ 60 min，32% ～ 45%B；60 ～ 70 min，45% ～ 55%B）。

2.5　指纹图谱方法学考察

2.5.1　精密度试验　取同一批补阳还五汤样品（S5），精密称定，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，进样 6 次，记录指纹图谱，以 12 号峰毛蕊异黄酮葡萄糖苷为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 值。结果表明，各共有峰的相对保留时间 *RSD* 值均在 0.25% ～ 1.2%，相对峰面积 *RSD* 值均在 0.18% ～ 3.0%，表明仪器精密度良好。

2.5.2　重复性试验　取同一批补阳还五汤样品（S5），精密称定 6 份，按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，进样测定，记录指纹图谱，以 12 号峰毛蕊异黄酮葡萄糖苷为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 值。结果表明，各共有峰的相对保留时间 *RSD* 值均在 0.12% ～ 1.5%，相对峰面积 *RSD* 值均在 1.6% ～ 3.0%，表明本方法重复性很好。

2.5.3　稳定性试验　取同一批补阳还五样品（S5），按“2.3”项下方法制备供试品溶液，分别于制备后的 0、3、6、9、12、24 h 进样测定，以 12 号峰毛蕊异黄酮葡萄糖苷为参照峰，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 值。结果表明，各共有峰的相对保留时间 *RSD* 值均在 0.12% ～ 2.0%，相对峰面积 *RSD* 值均在 0.79% ～ 2.9%，表明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.4　指纹图谱的建立及共有峰数据分析　取 10 批补阳还五汤样品按“2.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，得到 10 批补阳还五汤的 HPLC 色谱图，导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》（2012A 版）软件，设置 S1 图谱为参照图谱，采用多点校正建立指纹图谱后，生成叠加图及对照指纹图谱，见图 1。共确定 27 个色谱峰为补阳还五汤的指纹图谱共有峰。以 12 号峰毛蕊异黄酮葡萄糖苷为参照峰（S），计算各共有峰与 S 峰的相对峰面积和相对保留时间。结果表明，各共有峰的相对保留时间 *RSD* 值 0.15% ～ 0.71%，说明共有峰出峰时间均较稳定。但是相对峰面积的 *RSD* 值较大，说明这 10 批次间的补阳还五汤样品具有差异（见表 1、2）。

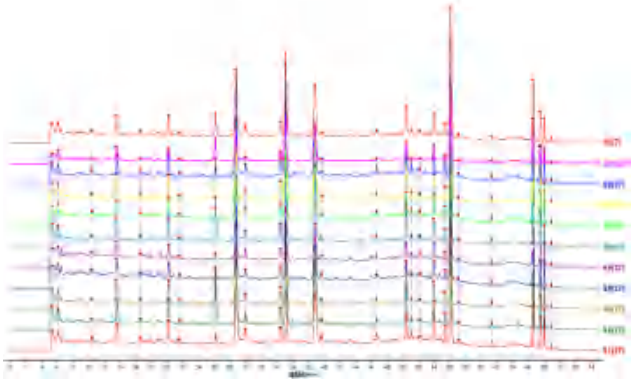


图 1　10 批补阳还五汤样品 HPLC 指纹图谱

Fig 1　HPLC fingerprints of 10 batches of sample

采用与对照品比对的方法对色谱峰进行指认，选择既是主要成分又分离度较好的色谱峰（12 号峰毛蕊异黄酮葡萄糖苷）为参照峰，对其中 8 个共有峰成分进行了指认，分别为 6 号峰羟基红花黄色素 A、8 号峰芍药内酯苷、9 号峰芍药苷、11 号峰阿魏酸、12 号峰毛蕊异黄酮葡萄糖苷、16 号峰芒柄花苷、21 号峰毛蕊异黄酮、24 号峰芒柄花素，见图 2。

2.5.5　相似度评价　将 10 批补阳还五汤指纹图谱录入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》，以中位数生成对照指纹图谱（R），并计算不同批次之间与对照指纹图谱的相似度。10 批补阳还五

表 1　10 批补阳还五汤指纹图谱各共有峰相对保留时间

Tab 1　Relative retention time of the common peaks of fingerprints of 10 batches of Buyang Huanwu decoction

编号	相对保留时间											
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	平均值	*RSD*/%
1	0.1509	0.1492	0.1494	0.1504	0.1521	0.1516	0.1504	0.1524	0.1512	0.1516	0.1509	0.71
2	0.1731	0.1729	0.1724	0.1733	0.1734	0.1729	0.1733	0.1741	0.1740	0.1746	0.1734	0.38
3	0.2979	0.2965	0.2960	0.2971	0.2971	0.2963	0.2967	0.2974	0.2978	0.2985	0.2971	0.26
4	0.3864	0.3852	0.3843	0.3853	0.3856	0.3848	0.3852	0.3870	0.3864	0.3887	0.3859	0.33
5	0.4732	0.4719	0.4717	0.4717	0.4727	0.4707	0.4712	0.4717	0.4717	0.4729	0.4719	0.16
6	0.5739	0.5732	0.5730	0.5738	0.5759	0.5740	0.5733	0.5756	0.5754	0.5779	0.5746	0.27
7	0.6119	0.6118	0.6141	0.6141	0.6136	0.6165	0.6215	0.6152	0.6156	0.6184	0.6153	0.48
8	0.7457	0.7452	0.7448	0.7455	0.7469	0.7449	0.7449	0.7456	0.7454	0.7460	0.7455	0.08
9	0.8193	0.8190	0.8188	0.8197	0.8212	0.8190	0.8192	0.8195	0.8199	0.8201	0.8196	0.085
10	0.8531	0.8535	0.8535	0.8545	0.8560	0.8536	0.8543	0.8546	0.8548	0.8544	0.8542	0.099
11	0.9797	0.9802	0.9804	0.9811	0.9829	0.9803	0.9812	0.9831	0.9839	0.9856	0.9818	0.20
12	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.000
13	1.1037	1.1038	1.1033	1.1040	1.1071	1.1040	1.1036	1.1063	1.1063	1.1084	1.1051	0.17
14	1.1282	1.1282	1.1285	1.1286	1.1320	1.1285	1.1290	1.1291	1.1298	1.1341	1.1296	0.17
15	1.3314	1.3296	1.3323	1.3313	1.3360	1.3316	1.3316	1.3302	1.3303	1.3279	1.3312	0.16
16	1.4356	1.4371	1.4375	1.4372	1.4427	1.4377	1.4375	1.4369	1.4361	1.4345	1.4373	0.15
17	1.4556	1.4565	1.4568	1.4563	1.4639	1.4587	1.4564	1.4560	1.4542	1.4522	1.4567	0.21
18	1.4856	1.4877	1.4884	1.4879	1.4939	1.4888	1.4880	1.4873	1.4846	1.4826	1.4875	0.20
19	1.5355	1.5374	1.5378	1.5374	1.5436	1.5384	1.5375	1.5370	1.5354	1.5334	1.5373	0.17
20	1.5784	1.5805	1.5809	1.5805	1.5869	1.5817	1.5804	1.5798	1.5780	1.5758	1.5803	0.18
21	1.5959	1.5982	1.5990	1.5986	1.6047	1.5995	1.5992	1.5989	1.5980	1.5961	1.5988	0.15
22	1.6230	1.6257	1.6267	1.6265	1.6324	1.6272	1.6264	1.6270	1.6232	1.6205	1.6259	0.20
23	1.7474	1.7496	1.7502	1.7496	1.7587	1.7527	1.7494	1.7485	1.7468	1.7434	1.7496	0.23
24	1.8955	1.8993	1.9001	1.8997	1.9076	1.9016	1.8995	1.8986	1.8965	1.8939	1.8992	0.20
25	1.9211	1.9250	1.9259	1.9254	1.9335	1.9275	1.9254	1.9245	1.9224	1.9198	1.9250	0.20
26	1.9357	1.9396	1.9404	1.9400	1.9482	1.9421	1.9399	1.9389	1.9367	1.9340	1.9396	0.20
27	1.9620	1.9662	1.9668	1.9669	1.9752	1.9689	1.9665	1.9652	1.9618	1.9592	1.9659	0.23

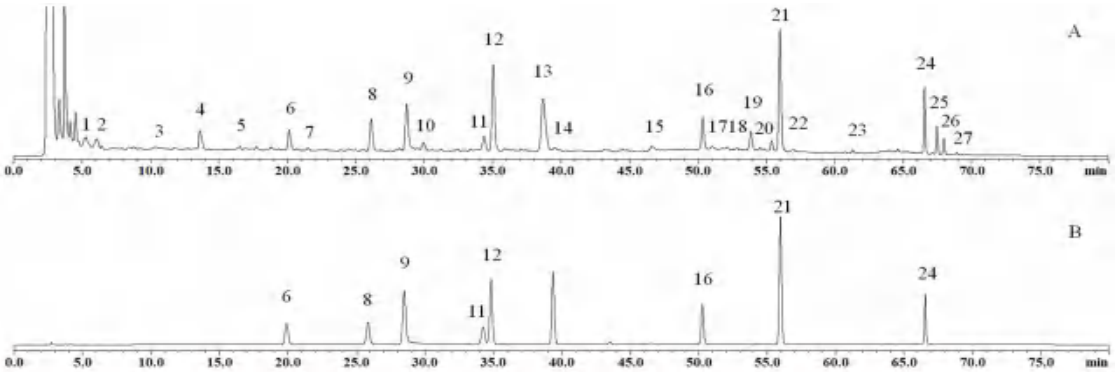


图 2　补阳还五汤与各对照品色谱图

Fig 2　HPLC chromatogram of Buyang Huanwu decoction and standard substance

A. 供试品（sample）；B. 混合对照品（mix standard substances）；6. 羟基红花黄色素 A（hydroxysafflor yellow A）；8. 芍药内酯苷（albiflorin）；9. 芍药苷（paeoniflorin）；11. 阿魏酸（ferulic acid）；12. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷（calycosin-7-glucoside）；16. 芒柄花苷（mangiferin）；21. 毛蕊异黄酮（calycosin）；24. 芒柄花素（formononetin）

汤样品的相似度均在 0.91 ～ 1.00，相似度较高（见表 3）。

2.5.6　聚类分析　将 10 批补阳还五汤样品 27 个共有峰的相对峰面积数据输入 SPSS 软件，进行系统聚类，采用组间连接法，以欧氏平方距离为分类依据。由图 3 可见，10 批补阳还五汤主要被聚为 2 类，第 1 类为 S1 ～ S6、S8、S10，第 2 类为 S7、S9。表明 10 批样品不完全相同，部分成分的含量存在一定差异。

2.5.7　主成分分析　将 10 批样品中的 27 个共有峰面积导入到 SPSS 软件中进行主成分分析。以特征值大于 1 为分类标准，结果特征值大于 1 的因子只有一个（主成分 1），对总方差的累计贡献率达 91.904%。主成分 2 ～ 10 特征值均小于 1，因

表 2　10 批补阳还五汤指纹图谱各共有峰相对峰面积

Tab 2　Relative peak area of the common peaks of fingerprints of 10 batches of Buyang Huanwu decoction

编号	相对峰面积											
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	平均值	*RSD*/%
1	0.3886	0.5554	0.5075	0.5697	0.5383	0.5367	0.4278	0.5041	0.3896	0.4009	0.4818	15.02
2	0.2714	0.4082	0.3705	0.4406	0.3417	0.4095	0.5663	0.3738	0.2853	0.4312	0.3898	21.64
3	0.1225	0.2391	0.2295	0.3974	0.2888	0.2777	0.3990	0.1818	0.2690	0.2110	0.2616	33.27
4	0.2057	0.4551	0.4272	1.0234	1.0104	0.5149	0.4389	0.4916	0.4023	0.5142	0.5484	47.81
5	0.0438	0.2737	0.1183	0.4317	0.4197	0.1871	0.1679	0.1663	0.1964	0.3129	0.2318	54.47
6	0.2375	0.2938	0.2703	0.5750	0.5774	0.3732	0.3321	0.3648	0.4002	0.3953	0.3820	30.22
7	0.1391	0.0428	0.0327	0.2257	0.2248	0.1167	0.0517	0.1311	0.1024	0.1797	0.1247	56.44
8	0.0897	0.4625	0.3930	0.2496	0.2499	0.5348	0.1373	0.4639	0.2014	0.5515	0.3334	50.46
9	1.0987	0.8175	0.7004	1.1249	1.1265	0.8349	1.5988	0.6805	1.0567	0.8490	0.9888	27.74
10	0.1946	0.1431	0.1382	0.3561	0.3632	0.1993	0.2403	0.1955	0.3367	0.2787	0.2446	34.68
11	0.2127	0.2321	0.2304	0.3239	0.3242	0.2777	0.2084	0.2271	0.2608	0.2873	0.2585	16.75
12	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.00
13	0.7948	1.0806	1.0198	1.0910	1.0989	1.0715	1.1517	1.0234	1.0019	1.2412	1.0575	10.96
14	0.0827	0.0854	0.0827	0.1485	0.1521	0.1091	0.1415	0.0945	0.2257	0.2177	0.1340	39.97
15	0.2250	0.1238	0.0894	0.1084	0.1198	0.1000	0.1682	0.1881	0.2350	0.2492	0.1607	37.59
16	0.3865	0.4604	0.3875	0.3096	0.2979	0.3803	0.5157	0.3762	0.5143	0.5981	0.4226	22.87
17	0.1294	0.0820	0.0533	0.0898	0.0868	0.0589	0.1493	0.0593	0.1516	0.1688	0.1029	41.91
18	0.1232	0.0805	0.0445	0.0931	0.0848	0.0500	0.1977	0.0448	0.1409	0.1602	0.1020	51.31
19	0.3390	0.2636	0.2101	0.2541	0.2407	0.2076	0.3646	0.1936	0.3950	0.3853	0.2854	27.33
20	0.1598	0.1159	0.0871	0.1001	0.1007	0.0843	0.1791	0.0856	0.2995	0.2261	0.1438	50.36
21	1.1055	1.2549	1.2109	1.6249	1.6234	1.1839	1.8020	1.1479	2.4467	1.2001	1.4600	29.02
22	0.0421	0.0348	0.0315	0.0527	0.0527	0.0305	0.0558	0.0213	0.0225	0.1101	0.0454	57.07
23	0.0378	0.0348	0.0371	0.0298	0.0298	0.0330	0.0675	0.0337	0.0340	0.0836	0.0421	43.25
24	0.2770	0.4369	0.4474	0.3526	0.3515	0.4236	0.4921	0.4235	0.2677	0.4206	0.3893	19.09
25	0.1878	0.2064	0.1979	0.2208	0.2211	0.1947	0.2522	0.1861	0.1857	0.2282	0.2081	10.58
26	0.1730	0.1176	0.1159	0.2231	0.2240	0.1127	0.2660	0.1101	0.1962	0.1407	0.1679	33.80
27	0.0199	0.0193	0.0194	0.0256	0.0253	0.0190	0.0302	0.0177	0.0437	0.0556	0.0276	45.70

表 3　10 批样品相似度

Tab 3　Similarities of 10 batches of samples

批号	相似度（参照）	相似度（对照）
S1	1.000	0.970
S2	0.959	0.990
S3	0.954	0.989
S4	0.911	0.969
S5	0.912	0.970
S6	0.947	0.988
S7	0.979	0.979
S8	0.943	0.986
S9	0.934	0.962
S10	0.944	0.979

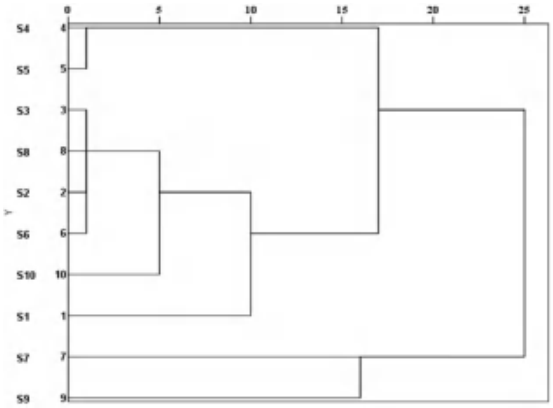


图 3　10 批样品聚类树状图

Fig 3　Dendrogram of 10 batches of samples

此不足以说明与主成分 1 具有较大的差异性。所以结合聚类分析来看，虽然 10 批补阳还五汤存在质量差异，但是差异并不大（见表 4）。

2.6　HPLC 法测定补阳还五汤中 8 种成分的含量

2.6.1　线性关系考察　按“2.2”项下方法制备各对照品储备液，分别用甲醇稀释，配制成系列浓度的对照品混合溶液，进样测定，记录色谱图，以对照品质量浓度为横坐标（*X*），峰面积积分值为纵坐标（*Y*）进行线性回归，结果见表 5。

2.6.2　精密度试验　精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液 10 μL，连续进样 6 次，记录峰面积，测得羟基红花黄色素 A、芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素峰面积的 *RSD* 值分别为 1.0%、2.8%、2.4%、1.8%、2.2%、2.0%、2.2%、3.0%，表明仪器精密度良好。

2.6.3　稳定性试验　取同一批补阳还五汤样品（S5），按“2.3”项下方法制备供试品溶液，分别于制备后 0、3、6、9、12、24 h 进样测定，记录

表 4　10 批样品主成分分析

Tab 4　Principal component analysis for 10 batches of samples

主成分	初始特征值		
	合计	方差贡献率 /%	累计贡献率 /%
1	9.190	91.904	91.904
2	0.325	3.245	95.149
3	0.294	2.936	98.085
4	0.117	1.166	99.251
5	0.039	0.387	99.638
6	0.025	0.248	99.886
7	0.006	0.060	99.946
8	0.004	0.036	99.982
9	0.001	0.015	99.997
10	0.000	0.001	100.000

表 5　8 种成分的线性关系考察结果

Tab 5　Linearity of the 8 components

待测物	线性方程	r	范围 /（μg•mL^{-1}）
羟基红花黄色素 A	$Y = 1.405\times10^4X - 7.262\times10^4$	0.9996	10 ～ 320
芍药内酯苷	$Y = 9.667\times10^3X + 1.741\times10^4$	0.9997	12.5 ～ 400
芍药苷	$Y = 1.542\times10^4X - 8.622\times10^4$	0.9998	25 ～ 800
阿魏酸	$Y = 3.360\times10^4X - 6.560\times10^4$	0.9993	3.75 ～ 120
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y = 3.455\times10^4X - 1.334\times10^5$	0.9996	10 ～ 320
芒柄花苷	$Y = 1.443\times10^4X - 2.171\times10^4$	0.9999	12.5 ～ 400
毛蕊异黄酮	$Y = 4.899\times10^4X - 3.582\times10^5$	0.9994	12.5 ～ 400
芒柄花素	$Y = 4.198\times10^4X - 6.420\times10^4$	0.9995	3.75 ～ 120

峰面积。测得羟基红花黄色素 A、芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素的峰面积 *RSD* 值分别为 2.2%、1.6%、2.3%、0.93%、1.4%、2.4%、0.88%、0.36%，表明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6.4　重复性试验　取同一批补阳还五汤样品（S5），精密称定 6 份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，注入色谱仪，进样测定，记录峰面积。计算得羟基红花黄色素 A、芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素质量分数的 *RSD* 值分别为 2.6%、2.9%、2.5%、2.4%、2.0%、2.9%、2.9%、2.4%，表明本方法重复性很好。

2.6.5　加样回收试验　取“2.6.4”项下已知各成分含量的供试品（S5）6 份，每份约 2.5 g，分别按照对照品加入量与供试品中相应成分含量的比为 1∶1 的量精密加入 8 种成分的对照品，按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，进样测定，并计算 8 种成分的加样回收率。结果羟基红花黄色素 A、芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素的平均加样回收率分别为 100.97%、99.34%、101.25%、99.82%、102.02%、101.07%、101.23%、98.64%，*RSD* 分别为 2.5%、2.2%、2.7%、2.7%、2.2%、2.6%、2.3%、2.9%。

2.6.6　样品含量测定　取 10 批补阳还五汤样品按“2.3”项下方法制备，进样测定，计算各成分含量，结果见表 6，表明不同批次样品中各化学成分含量存在一定差异。

表 6　10 批补阳还五汤样品 8 种成分含量测定结果 (mg・g^{-1})

Tab 6　Content of 8 components in 10 batches of sample (mg・g^{-1})

批号	羟基红花黄色素 A	芍药内酯苷	芍药苷	阿魏酸	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	芒柄花苷	毛蕊异黄酮	芒柄花素
S1	0.67	0.37	2.97	0.88	0.97	0.95	1.04	0.33
S2	0.75	0.29	2.96	1.26	0.97	0.77	0.93	0.29
S3	0.73	1.78	2.01	1.15	1.21	1.03	1.01	0.41
S4	0.72	1.53	1.71	1.14	1.13	0.99	0.98	0.41
S5	0.50	0.23	1.86	0.71	0.79	0.59	0.95	0.24
S6	0.59	0.62	1.65	0.63	0.79	0.51	0.85	0.21
S7	0.75	1.83	2.02	1.16	1.22	1.06	1.03	0.42
S8	0.68	0.36	3.02	0.90	1.00	0.81	1.09	0.36
S9	0.76	1.64	1.91	1.26	1.16	1.01	1.08	0.44
S10	0.76	0.33	2.79	1.33	1.02	0.77	0.98	0.31

3　讨论

本试验考察了以甲醇 - 水和乙腈 - 水为洗脱系统，结果显示乙腈 - 水的分离效果更好，且分析过程中基线稳定，所以选择乙腈 - 水进行洗脱；另在最初试验过程中发现图谱的峰形有拖尾现象，分析可能是补阳还五汤中含有酚酸类和脂肪酸类物质，所以考虑适当调整流动的 pH，以降低弱酸性物质的解离，改善峰形和提高分离度。结果以 0.03% 的磷酸水为水相时，可以抑制色谱峰拖尾的现象，改善峰形，提高分离度。

本研究参考文献 [9-10]，建立了高效液相色谱法同时测定补阳还五汤中 8 种活性成分的含量，以期更好地控制该制剂质量。本方主用生黄芪，具有补益元气的作用，意在气旺则血行，瘀去络通，是君药；当归尾则具有活血通络而不伤血的效果，故用为臣药；赤芍、川芎、桃仁、红花协同当归尾辅以活血祛瘀；地龙则是通经活络，力专营走而周行全身，以行药力，为佐药 [11-12]。该方中黄芪的专属性成分有毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素。现代研究表明，毛蕊异黄酮葡萄糖苷可提高免疫功能，具有抗氧化、抗辐射、抗肿瘤、抗血小板聚集、改善血液流变学及神经保护等作用 [13-15]；芒柄花苷具有抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、免疫调节和促血管生成等作用 [16-17]。羟基红花黄色素 A 是红花中活血化瘀最有效的水溶性活性成分，能够有效地延缓心肌缺血 / 再灌注损伤、高血压、缺血性脑卒中和神经退行性疾病等多种心脏和脑部疾病的病

理进程[18-20]。赤芍中的活性成分为芍药内酯苷、芍药苷，大量实验证明其有抑制凝血酶原的生成、抗血小板聚集、扩张静脉及外周小血管、改善血液微循环、抗氧化、抗惊厥等多种生物学效应，具有补血、抗抑郁、镇痛解痉和改善学习记忆以及对心脑血管的保护等作用[21-23]。当归尾、川芎的活性成分为阿魏酸，其具有抗氧化、抗血栓、降血脂，防治冠心病、心血管疾病、阿尔茨海默症等作用[24-25]。故本文选择羟基红花黄色素A、芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素作为指标性成分进行含量测定。

本研究建立了补阳还五汤的 HPLC 指纹图谱，共确认了 27 个共有峰，且相似度均在 0.9 以上，表明 27 个共有峰可以评价补阳还五汤的质量，所建立的指纹图谱可作为该制剂质量控制的依据。通过聚类分析及主成分分析显示补阳还五汤的部分化学成分含量会因批次的不同，而存在一定差异，这一结果可能与不同批次的原药材来源不同有关。

参考文献

[1] 王清任 . 医林改错（下卷）[M]. 北京：人民卫生出版社，2005：36.

[2] 唐映红，梁燕，张淑萍，等 . 补阳还五汤及其有效组分生物碱和苷对动脉血栓形成大鼠抗凝系统活性的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志，2007，13（6）：39-42.

[3] 储利胜，姜艳艳，柯庆，等 . 补阳还五汤促进大鼠局灶性脑缺血后血管生成和功能恢复 [J]. 中华中医药学刊，2011，29（2）：335-338.

[4] Cai GX，Liu BY. Buyang Huanwu decoction increases vascular endothelial growth factor expression and promotes angiogenesis in a rat model of local cerebral ischemia [J]. Neural Regener Res，2010，5（22）：1733-1738.

[5] 梁燕，张淑萍，邓常青 . 补养还五汤及其主要有效部位对小鼠动脉血栓形成的影响 [J]. 血栓与止血学，2005，11（4）：154-156.

[6] 佟丽，谭县辉，沈剑刚 . 补阳还五汤及不同配伍组方对缺血性脑中风后大鼠神经增殖作用的对比研究 [J]. 中国中西医结合杂志，2007，27（6）：519-522.

[7] 吴振林，吴先杰 . 补阳还五汤治疗冠心病的临床效果 [J]. 临床医学研究与实践，2021，6（27）：126-128.

[8] 缪霆，纪晓军，何宏，等 . 补阳还五汤对大鼠化疗相关外周神经痛的预防作用及其机制 [J]. 现代中西医结合杂志，2020，29（3）：229-233.

[9] 卢汝梅，张进燕，王肖，等 . 龙骨风 HPLC 指纹图谱建立及 5 种成分测定 [J]. 中成药，2021，43（7）：1788-1793.

[10] 毕映燕，李盛华，李喜香，等 . HPLC 法同时测定消肿止痛颗粒中 5 种成分 [J]. 中成药，2021，43（8）：2006-2009.

[11] 何松，苏悦，常永龙，等 . 王清任《医林改错》活血化瘀思想探骊 [J]. 福建中医药，2019，50（4）：46-47.

[12] 刘婉沂，张英丰，周欣，等 . 补阳还五汤促抗脑缺血的作用机制研究进展 [J]. 中药新药与临床药理，2022，33（3）：411-418.

[13] Pan H，Li X，Cheng X，et al. Evidence of calycosin-7-O-*β*-d-glucosides role as a major antioxidant molecule of *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus*（Bge.）Hsiao plants under freezing stress [J]. Environ Exp Botany，2015，109（1）：1-11.

[14] Liao FY，Yu AM，Yu JY，et al. Identification of active ingredients mediating anti-platelet aggregation effects of Buyanghuanwu decoction using a platelet binding assay，solid phase extraction，and HPLC-MS/MS [J]. J Chromatogr B，2018，1092：320-327.

[15] 李亮亮，黄金智 . 毛蕊异黄酮葡萄糖苷药理作用的研究进展 [J]. 海南医学院学报，2020，26（2）：156-160.

[16] Liao FY，Meng YJ，Zheng HZ，et al. Biospecific isolation and characterization of angiogenesis-promoting ingredients in Buyang Huanwu decoction using affinity chromatography on rat brain microvascular endothelial cells combined with solid phase extraction，and HPLC-MS/MS [J]. Talanta，2018，179：490-500.

[17] 戴瑜婷，张雪燕，王艺璇，等 . 黄芪的现代研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中国中药杂志，2022，47（7）：1754-1764.

[18] 乐世俊，白雪，黄昱曦，等 . 羟基红花黄色素 A 治疗心脑血管疾病作用机制的网络药理学研究 [J]. 陕西中医药大学学报，2021，44（5）：106-112.

[19] 刘小甜，张佩林，李萍，等 . 羟基红花黄色素 A 改善心脏和脑部疾病的研究进展 [J]. 中国野生植物资源，2021，40（8）：53-60.

[20] 姚苗苗，董仲才，任爱农，等 . 羟基红花黄色素 A 的研究进展 [J]. 中南药学，2009，7（12）：931-934.

[21] 乐娜，周雪，费文婷，等 . 赤芍、白芍及芍药苷、芍药内酯苷对急性血瘀证大鼠血液流变学及血管内皮功能的影响 [J]. 环球中医药，2019，12（9）：1302-1307.

[22] Kong Y，Peng Q，Lv N，et al. Paeoniflorin exerts neuroprotective effects in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease via activation of adenosine A1 receptor [J]. Neurosci Lett，2020，730：135016.

[23] Wu F，Ye B，Wu X，et al. Paeoniflorin on rat myocardial ischemia reperfusion injury of protection and mechanism research [J]. Pharmacology，2020，105（5-6）：281-288.

[24] 孟锐，陈逸青，陈勤 . 阿魏酸对痴呆小鼠脑内胶质细胞活化与炎性细胞因子表达的影响 [J]. 中国医院药学杂志，2018，38（1）：50-53.

[25] 张国治，杨徐宁，许柠 . 阿魏酸的功能性研究进展 [J]. 粮食加工，2019，44（6）：52-56.

（收稿日期：2022-08-23；修回日期：2022-10-08）

基于高效液相色谱的消痞和胃胶囊指纹图谱研究及多组分含量测定

孙耕[2]，徐浩然[1]，于庚原[1]，张童画[1]，罗杰[2]，向延柳[3]，刘力莉[3]，刘润花[1*]，孙毅坤[1*]（1. 北京中医药大学中药学院，北京　102488；2. 中国中医科学院望京医院，北京　100102；3. 亚宝九和（北京）健康管理有限公司，北京　100089）

摘要：目的　采用高效液相色谱法建立消痞和胃胶囊的指纹图谱，并测定其中 6 个组分的含量，为其质量控制和评价提供参考。**方法**　采用 XSelect HSS T3 色谱柱（4.6 mm×150 mm，5 μm）；柱温 30 ℃；水（A）和乙腈（B）为流动相梯度洗脱；流速为 1.0 mL·min^{-1}；检测波长为 203 nm；进样量为 5 μL。建立 10 批消痞和胃胶囊的指纹图谱，并采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”（2012 版）计算相似度；测定水杨苷、表儿茶素、4-羟基苯乙酮、三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1 的含量。**结果**　消痞和胃胶囊的 HPLC 指纹图谱有 17 个共有峰，10 批次消痞和胃胶囊的指纹图谱与对照指纹图谱的相似度在 0.993 ～ 0.999；水杨苷、表儿茶素、4-羟基苯乙酮、三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1 的含量分别为 0.223 ～ 0.230、0.073 ～ 0.090、0.063 ～ 0.067、1.357 ～ 1.477、4.747 ～ 5.327、4.547 ～ 4.927 mg·g^{-1}。**结论**　建立的消痞和胃胶囊 HPLC 指纹图谱和定量分析方法简便、高效、准确，可为其质量控制和评价提供参考。

关键词：消痞和胃胶囊；高效液相色谱法；指纹图谱；含量测定
中图分类号：R284，O657.72　　**文献标识码：**A　**文章编号：**1672-2981(2023)04-1049-07
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.034

Fingerprint and multi-component determination of Xiaopi Hewei capsules based on high performance liquid chromatography

SUN Geng[2], XU Hao-ran[1], YU Geng-yuan[1], ZHANG Tong-hua[1], LUO Jie[2], XIANG Yan-liu[3], LIU Li-li[3], LIU Run-hua[1*], SUN Yi-kun[1*] (1. *School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488; 2. *Wangjing Hospital*, *China Academy of Chinese Medical Sciences*, *Beijing* 100102; 3. *Yabao Jiuhe* (*Beijing*) *Health Management Co*., *Ltd*., *Beijing* 100089)

Abstract: Objective To establish the fingerprint of Xiaopi Hewei capsules and determine the content of 6 compounds based on high performance liquid chromatography (HPLC), and provide reference for its quality control and evaluation. **Methods** The analysis was conducted with XSelect HSS T3 analytical column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) and the column temperature was 30 ℃ . Water (A) and acetonitrile (B) were used as the mobile phase with gradient elution at 1.0 mL·min^{-1}. The detection wavelength was 203 nm and the injection volume was 5 μL. The HPLC fingerprints of 10 batches of Xiaopi Hewei capsules were constructed, whose similarities were calculated based on Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System (2012 Edition). The content of salicin, epicatechin, 4-hydroxyacetophenone, notoginsenoside R_1, ginsenoside Rg_1 and ginsenoside Rb_1 was determined. **Results** There were 17 common peaks in the HPLC fingerprints of Xiaopi Hewei capsules. The similarity between the HPLC fingerprints of 10 batches of Xiaopi Hewei capsules and control fingerprints was 0.993 ～ 0.999. Quantitative analysis showed that the content of salicin, epicatechin, 4-hydroxyacetophenone, notoginsenoside R_1, ginsenoside Rg_1 and ginsenoside

基金项目：西藏自治区科技重大专项（No.XZ201801-GA-16）；校企合作项目（No.2019110031001686）。
作者简介：孙耕，女，主管药师，主要从事临床药学研究，email：630065640@qq.com　*通信作者：孙毅坤，男，博士，教授，主要从事中药药效物质及质量控制研究，email：sunyk@bucm.edu.cn；刘润花，女，硕士，主要从事中药质量控制，email：lrh6793@163.com

Rb_1 among the 10 batches of samples ranged 0.223 ～ 0.230, 0.073 ～ 0.090, 0.063 ～ 0.067, 1.357 ～ 1.477, 4.747 ～ 5.327 and 4.547 ～ 4.927 mg • g^{-1}, respectively. **Conclusion** The method of HPLC fingerprints and quantitative analysis of Xiaopi Hewei capsules are simple, efficient and accurate, which can provide reference for its quality control and evaluation.

Key words: Xiaopi Hewei capsule; HPLC fingerprint; content determination

消痞和胃胶囊源于苗药验方，为御医世家黔中名医卢才荣先生所创，由隔山消（*Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight）、刺梨叶（leaves of *Rosa roxburghii* Tratt.）、柳枝（*Salix babylonica* L.）和三七 [*Panax notoginseng*（Burk.）F.H.Chen] 四味药组成。隔山消，又称白首乌，归脾、胃、肾经，消食化积、养阴补虚之为“君”[1]；刺梨叶归脾、肾、胃经，解除痞塞郁毒、健脾益胃之为“臣”[2]；杨柳枝为杨柳科植物垂柳的枝条，归胃、肝经，解毒消肿止痛之为“佐”[3]；三七为五加科植物三七的干燥根，专入胃、肝经，祛瘀消痞、止血止痛之为“使”[4]。全方具有理气和胃、消痞止痛、通脉活络的功效，可改善脾胃气滞所致的胃脘灼热胀痛、泛吐酸水、痞满嘈杂等症[5-6]。研究指出消痞和胃胶囊可治疗胃癌前病变，慢性非萎缩性胃炎，功能性消化不良等胃肠道疾病[6-7]。何孙香等[7]研究发现消痞和胃胶囊可通过提高生长激素抑制素（SST）、降低血清内皮素（ET-1）和胃泌素（GAS）的水平，改善肝胃气滞型胃癌前病变患者的胃黏膜萎缩程度，同时提高患者的幽门螺杆菌（Hp）清除率。临床研究表明，消痞和胃胶囊可有效缩短胃排空时间，减轻上腹痛和腹胀，从而缓解功能性消化不良患者的症状[6]。

指纹图谱技术具有整体性、模糊性和特征性的特点，可以充分反映中药复杂体系的整体情况。指纹图谱重在展示同一中药材或复方制剂的相似性，对中药材和复方制剂的质量控制及现代化发展具有重要意义[8]。高效液相色谱法（HPLC）具有适用范围广、灵敏度高及重现性好等特点，被广泛应用于中药复方制剂的指纹图谱研究[9]。

消痞和胃胶囊现收载于国家中成药标准汇编内科脾胃分册，现行的 2020 版部颁药品标准中，以薄层色谱法鉴定刺梨叶和三七，以 HPLC 测定三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1 含量作为质控指标。然而消痞和胃胶囊药材原料多样、成分复杂，针对单味药的分析测定方法并不能反映复方整体的质量水平，其质量稳定性也难以保证。因而，为了更全面有效地控制消痞和胃胶囊临床用药的质量，使其安全性和疗效具有更好的保障，亟需开发新的更加全面稳定的消痞和胃胶囊质量控制方法。基于此，本研究通过构建消痞和胃胶囊及各味药的化学成分指纹图谱，评价复方整体的质量水平。同时基于 HPLC 在同一色谱条件下建立指标性成分的含量测定方法，为其质量控制和评价提供参考。

1　仪器与试药

1.1　仪器

高效液相色谱仪（型号：U3000，赛默飞世尔科技有限公司）；电热恒温水浴锅（型号：HH-S4A，北京科伟永兴仪器有限公司）；XS105 型电子天平 [赛多利斯科学仪器（北京）有限公司]；Milli-Q 超纯水纯化系统（北京五洲东方科技有限公司）。

1.2　试药

水杨苷（批号：Y12S6S1）、4-羟基苯乙酮（批号：T21J6C1）（上海源叶生物科技有限公司），表儿茶素（批号：110878-201703）、三七皂苷 R_1（批号：110745-201921）、人参皂苷 Rg_1（批号：110703-202034）、人参皂苷 Rb_1（批号：110704-202129）（纯度 ≥ 98%，中国食品药品检定研究院）。乙腈、甲醇 [色谱纯，赛默飞世尔科技（中国）有限公司]；超纯水（经 Milli-Q Advantage A10 超纯水系统制得）。10 批消痞和胃胶囊（信息见表 1）、隔山消（批号：20190401）、刺梨叶（批号：20190302）、柳枝（批号：20190102）、三七（批号：20190201）均购于贵州永乐药业有限公司。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱为 XSelect HSS T3 柱（4.6 mm×150 mm，5 μm）；以水相为流动相 A，以乙腈为流动相 B；按照表 2 中的方法进行梯度洗脱；检测波长为 203 nm；柱温为 30 ℃；流速为 1.0 mL • min^{-1}，进样量为 5 μL。理论塔板数按照人参皂苷 Rb_1 计算应不低于 5000。

2.2　对照品溶液的制备

分别取水杨苷、表儿茶素、4-羟基苯乙酮、三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1 对照品，精密称定，加甲醇制成含有水杨苷 0.022 mg • mL^{-1}、表儿茶素 0.008 mg • mL^{-1}、4-羟基苯乙酮 0.007 mg • mL^{-1}、三七皂苷 R_1 0.114 mg • mL^{-1}、人参皂苷 Rg_1 0.408 mg • mL^{-1} 和人

表 1　消痞和胃胶囊测试样品批号

Tab 1　Batch numbers of Xiaopi Hewei capsules

编号	批号	编号	批号
S1	20190102	S6	20200602
S2	20200104	S7	20200603
S3	20200105	S8	20200604
S4	20200201	S9	20200701
S5	20200601	S10	20200702

表 2　梯度洗脱方法

Tab 2　Gradient elution

时间 /min	流动相 B/%	时间 /min	流动相 B/%
0 ～ 5	5 ～ 10	30 ～ 40	20 ～ 35
5 ～ 10	10	40 ～ 55	35 ～ 50
10 ～ 15	10 ～ 13	55 ～ 70	50 ～ 95
15 ～ 20	13	70 ～ 73	95 ～ 5
20 ～ 30	13 ～ 20	73 ～ 75	5

参皂苷 Rb_1 0.368 mg・mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.3　供试品溶液制备

取消痞和胃胶囊内容物，混匀，称取细粉 0.50 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入 75% 甲醇 25 mL，称重，水浴回流 2 h，放冷，称重，用 75% 甲醇补足重量，摇匀，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液即得。隔山消，刺梨叶，柳枝和三七单味药供试品溶液制备方法同上。

2.4　消痞和胃胶囊 HPLC 指纹图谱分析

2.4.1　精密度试验　取同一批次（批号：20200702）的供试品，连续进样 6 次，记录各共有色谱峰的保留时间和峰面积，以 12 号峰人参皂苷 Rb_1 的保留时间与峰面积为参照，结果表明各共有峰的相对保留时间 *RSD* 均小于 1.0%，相对峰面积的 *RSD* 均小于 2.7%，表明该方法稳定、系统精密度良好。

2.4.2　稳定性试验　取同一批次（批号：20200702）的供试品，在不同的时间点（0、2、4、6、8、12、24 h）进样分析，记录各共有色谱峰的保留时间和峰面积，以 12 号峰人参皂苷 Rb_1 的保留时间与峰面积为参照，结果表明各共有峰的相对保留时间 *RSD* 均小于 1.0%，相对峰面积的 *RSD* 均小于 2.7%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.3　重复性试验　取同一批次（批号：20200702）的供试品，按照“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，分别进样分析，并记录各共有色谱峰的保留时间和峰面积，以 12 号峰人参皂苷 Rb_1 的保留时间与峰面积为参照，结果表明各共有峰的相对保留时间 *RSD* 均小于 1.0%，相对峰面积的 *RSD* 均小于 3.3%，表明方法重复性良好。

2.4.4　消痞和胃胶囊 HPLC 指纹图谱的建立和相似度评价　取 10 批消痞和胃胶囊，按照“2.3”项下的方法制备供试品溶液，进样分析，记录色谱图。选择具有代表性的图谱（批号：20200702）为对照指纹图谱，采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》进行相似度评价，采用多点校正全谱匹配生成指纹图谱共有模式。10 批消痞和胃胶囊的指纹图谱与对照指纹图谱的相似度在 0.993 ～ 0.999（见表 3）。指纹图谱如图 1 所示。

表 3　10 批消痞和胃胶囊样品 (S1 ～ S10) 指纹图谱相似度结果

Tab 3　Fingerprint similarity of 10 batches of Xiaopi Hewei capsules (S1 ～ S10)

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.999	1.000	0.996	0.998	0.991	0.997	0.997	0.997	0.991	0.999
S2	0.999	1.000	0.999	0.994	0.998	0.991	0.996	0.997	0.998	0.989	0.999
S3	1.000	0.999	1.000	0.996	0.998	0.992	0.996	0.997	0.997	0.991	0.999
S4	0.996	0.994	0.996	1.000	0.996	0.984	0.995	0.995	0.995	0.983	0.996
S5	0.998	0.998	0.998	0.996	1.000	0.991	0.998	1.000	1.000	0.990	0.999
S6	0.991	0.991	0.992	0.984	0.991	1.000	0.987	0.988	0.989	0.999	0.994
S7	0.997	0.996	0.996	0.995	0.998	0.987	1.000	0.999	0.998	0.986	0.998
S8	0.997	0.997	0.997	0.995	1.000	0.988	0.999	1.000	1.000	0.986	0.998
S9	0.997	0.998	0.997	0.995	1.000	0.989	0.998	1.000	1.000	0.988	0.999
S10	0.991	0.989	0.991	0.983	0.990	0.999	0.986	0.986	0.988	1.000	0.993
R	0.999	0.999	0.999	0.996	0.999	0.994	0.998	0.998	0.999	0.993	1.000

利用相似度评价系统软件处理，10 批消痞和胃胶囊指纹图谱中共检测得到 17 个共有峰。与混合对照品比对，指认其中 6 个色谱峰：3 号峰为水杨苷、6 号峰为表儿茶素、7 号峰为 4- 羟基苯乙酮、9 号峰为三七皂苷 R_1、10 号峰为人参皂苷 Rg_1 和 12 号峰为人参皂苷 Rb_1，其保留时间分别为 6.26、8.52、14.56、34.97、35.91 和 41.96 min。其中 12 号峰峰形较好，前后无杂质峰干扰，分离完全，因此被选作参考峰，用于计算其他共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果表明 10 批消痞和胃胶囊指纹图谱中各共有峰的相对保留时间 *RSD* 均小于 1.0%，相对峰面积的 *RSD* 均小于 5.0%。

2.4.5　消痞和胃胶囊单味药 HPLC 指纹图谱的建立　取同一批次的隔山消、刺梨叶、柳枝和三七

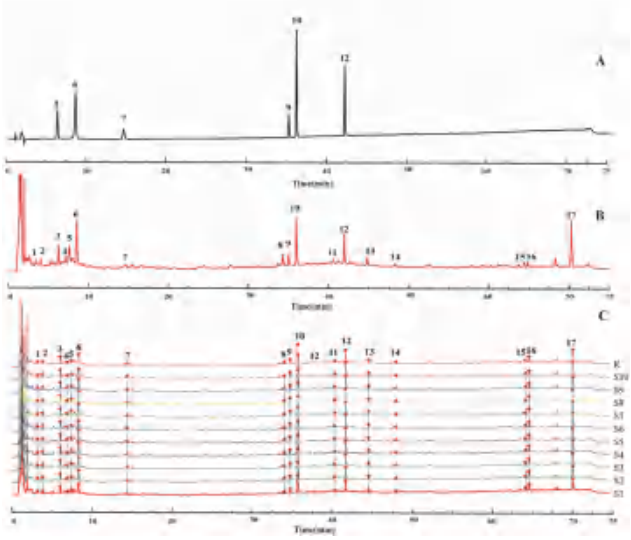


图 1　混合对照品 HPLC 色谱图（A），消痞和胃胶囊 HPLC 指纹图谱（B）及其叠加图（C）

Fig 1　HPLC chromatogram of the mixed reference（A），and HPLC fingerprint（B）and superimposed HPLC fingerprints（C）of Xiaopi Hewei capsules

3. 水杨苷（salicin）；6. 表儿茶素（epicatechin）；7. 4- 羟基苯乙酮（4-hydroxyacetophenone）；9. 三七皂苷 R_1（notoginsenoside R_1）；10. 人参皂苷 Rg_1（ginsenoside Rg_1）；12. 人参皂苷 Rb_1（ginsenoside Rb_1）

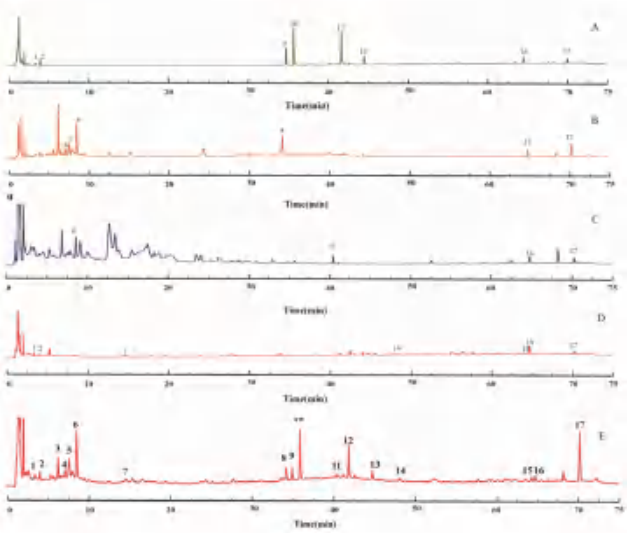


图 2　三七（A）、柳枝（B）、刺梨叶（C）、隔山消（D）及消痞和胃胶囊（E）的 HPLC 谱图

Fig 2　HPLC chromatogram of *Panax notoginseng*（Burk.）F.H.Chen（A），*Salix babylonica* L.（B），leaves of *Rosa roxburghii* Tratt.（C），*Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight（D），and Xiaopi Hewei capsules（E）

提取液，按照“2.1”项下色谱条件进样分析，记录色谱图，如图 2 所示。同时采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》进行处理，分析消痞和胃胶囊指纹图谱 17 个共有峰的归属。结果表明归属于隔山消的色谱峰有 1、2、7、14、15、16 和 17 号；归属于刺梨叶的色谱峰有 6、11、16 和 17 号；归属于柳枝的色谱峰有 3、4、5、6、8、16 和 17 号；归属于三七的色谱峰有 1、2、9、10、12、13、16 和 17 号。

2.4.6　主成分分析　利用 SPSS 20.0 软件对 10 批消痞和胃胶囊 17 个共有峰的峰面积进行 Z-score 标准化处理后做主成分分析。以特征值＞ 1 为提取标准，得到主成分相关矩阵的特征值及方差，结果见表 4。共得到 6 个主成分，累计贡献率达到 90.633%。因子载荷矩阵见表 5，其中第 1 主成分主要反映来自色谱峰 1、5、10、11、12 的信息，第 2 主成分主要反映来自色谱峰 3、7、9、11 的信息；第 3 主成分主要反映来自色谱峰 2、15、16 的信息；第 4 主成分主要反映来自色谱峰 8、14 的信息;第 5 主成分主要反映来自色谱峰 4、6 的信息；第 6 主成分主要反映来自色谱峰 13 的信息，可知前 6 个主成分能概括 HPLC 色谱图的绝大部分信息，基本显示出不同批次消痞和胃胶囊样品之间的相似性和差异性。同时，前 6 个主成分所反映的色谱峰信息包含了经对照品指认得到的 6 个组分。结合“2.4.5”项下消痞和胃胶囊各单味药指纹图谱分析结果可知，3 号峰水杨苷为杨柳枝特有成分，6 号峰表儿茶素为刺梨叶和柳枝共有成分，7 号峰 4- 羟基苯乙酮为隔山消特有成分，9 号峰三七皂苷 R_1、10 号峰人参皂苷 Rg_1 和 12 号峰人参皂苷 Rb_1 为三七特有成分。可见经对照品指认得到的 6 个组分可作为消痞和胃胶囊质量评价的重要指标。

2.5　消痞和胃胶囊多组分含量测定

2.5.1　专属性试验　由图 2 可知，水杨苷、表儿茶素、三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1 各待测成分达到了较为理想的分离效果，与相邻色谱峰的分离度均＞ 1.5，该方法专属性良好。

2.5.2　精密度试验　取同一批号（批号：20200702）的供试品，连续进样 6 次，分别记录各色谱峰峰面积。结果水杨苷、表儿茶素、4- 羟基苯乙酮、三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1 峰面积的 *RSD* 值分别为 1.6%、2.0%、1.9%、1.9%、1.1% 和 1.5%，表明测定方法精密度良好。

2.5.3　线性关系考察　精密量取“2.2”项下混合对照品溶液 1、2、3、4、5 mL，分别置于 5 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，配制成一系列浓度的混合对照品溶液，进样分析，记录色谱图。以各化合物的质量浓度（*X*）为横坐标，峰面积（*Y*）为纵坐标，绘制标准曲线，计算各组分的回归方程及相关系数，结果见表 6。

表 4　主成分特征值及方差

Tab 4　Principal component eigen values and variance

成分	初始特征值			提取平方和载入			旋转平方和载入		
	总计	方差百分比 /%	累计 /%	总计	方差百分比 /%	累计 /%	总计	方差百分比 /%	累计 /%
1	5.208	30.637	30.637	5.208	30.637	30.637	3.828	22.519	22.519
2	3.360	19.762	50.399	3.360	19.762	50.399	2.759	16.230	38.749
3	2.598	15.281	65.680	2.598	15.281	65.680	2.727	16.043	54.792
4	1.894	11.139	76.819	1.894	11.139	76.819	2.344	13.789	68.581
5	1.332	7.838	84.657	1.332	7.838	84.657	2.282	13.425	82.006
6	1.016	5.977	90.633	1.016	5.977	90.633	1.467	8.627	90.633
7	0.765	4.501	95.135						
8	0.572	3.363	98.497						
9	0255	1.503	100.000						

表 5　旋转后的因子载荷矩阵

Tab 5　Factor load matrix after rotation

峰号	成分					
	1	2	3	4	5	6
1	− 0.773	0.095	− 0.129	0.401	− 0.045	0.303
2	− 0.051	− 0.336	0.746	0.017	0.301	0.351
3	− 0.320	− 0.468	− 0.098	− 0.348	− 0.661	0.298
4	0.064	0.274	0.155	− 0.063	0.887	− 0.083
5	− 0.877	− 0.109	0.020	− 0.325	0.011	− 0.331
6	− 0.078	− 0.241	0.174	− 0.331	0.864	0.016
7	0.003	− 0.912	0.109	− 0.167	− 0.026	− 0.216
8	− 0.140	0.235	− 0.297	− 0.822	0.221	− 0.041
9	0.320	0.864	0.132	− 0.208	0.183	0.081
10	0.849	− 0.047	− 0.348	0.151	− 0.014	0.132
11	0.713	0.428	0.059	0.292	0.029	− 0.003
12	0.806	0.355	− 0.093	0.416	0.154	− 0.009
13	0.137	0.235	0.049	0.058	− 0.144	0.920
14	0.282	0.184	0.086	0.871	− 0.049	0.036
15	− 0.157	0.268	0.805	0.099	0.245	0.092
16	0.125	0.086	0.874	0.192	− 0.063	− 0.320
17	0.454	0.400	− 0.646	− 0.087	− 0.157	− 0.123

表 6　6 种化学成分的回归方程、相关系数和线性范围

Tab 6　Regression equation, correlation coefficient and linearity of 6 components

化合物	回归方程	r	线性范围 /（μg • mL^{-1}）
水杨苷	$Y = 0.3348X + 0.0851$	0.9996	4.36 ～ 21.80
表儿茶素	$Y = 2.1946X + 0.1420$	0.9995	1.61 ～ 8.04
4- 羟基苯乙酮	$Y = 0.7299X + 0.0210$	0.9996	1.33 ～ 6.66
三七皂苷 R_1	$Y = 0.0376X + 0.0057$	1.0000	22.88 ～ 114.40
人参皂苷 Rg_1	$Y = 0.0452X + 0.2183$	1.0000	81.60 ～ 408.00
人参皂苷 Rb_1	$Y = 0.0333X + 0.0577$	1.0000	73.60 ～ 368.00

2.5.4　稳定性试验　取同一批号（批号：20200702）供试品，在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样分析，分别记录峰面积，计算得到水杨苷、表儿茶素、4- 羟基苯乙酮、三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1 峰面积的 *RSD* 值分别为 1.3%、0.51%、0.55%、2.6%、1.4% 和 1.9%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.5　重复性试验　取同一批号（批号：20200702）的供试品，按照“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样分析，分别记录峰面积，计算得到水杨苷、表儿茶素、4- 羟基苯乙酮、三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1 峰面积的 *RSD* 值分别为 0.55%、1.5%、1.8%、1.5%、1.5% 和 0.54%。同时计算得到 0.50 g 的样品中含有各组分：水杨苷 0.225 mg、表儿茶素 0.085 mg、4- 羟基苯乙酮 0.066 mg、三七皂苷 R_1 1.387 mg、人参皂苷 Rg_1 5.171 mg 和人参皂苷 Rb_1 4.747 mg，各组分含量的 *RSD* 值分别为 0.43%、1.3%、2.0%、1.5%、0.92% 和 0.64%，表明方法的重复性良好。

2.5.6　加样回收试验　取消痞和胃胶囊（批号：20200702），倾出内容物，精密称取 0.25 g，置具塞锥形瓶中，平行 6 份，加入含水杨苷 0.1100 mg • mL^{-1}、表儿茶素 0.0400 mg • mL^{-1}、4- 羟基苯乙酮 0.0300 mg • mL^{-1}、三七皂苷 R_1 0.7000 mg • mL^{-1}、人参皂苷 Rg_1 2.5000 mg • mL^{-1} 和人参皂苷 Rb_1 2.3000 mg • mL^{-1} 的混合对照品溶液 1 mL，75% 甲醇 24 mL，按“2.3”项下方法制备，进样分析，结果 6 种成分的平均加样回收率分别为 98.18%、97.52%、95.16%、96.71%、100.94%、98.08%，*RSD* 分别为 2.0%、1.9%、2.7%、1.9%、2.1% 和 0.7%，表明本方法准确性良好。

2.5.7　样品测定　取 10 批供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样分析，分别记录各组分峰面积，计算得到水杨苷、表儿茶素、4- 羟基苯乙酮、三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1 的含量分别为 0.223 ～ 0.230 mg • g^{-1}、0.073 ～ 0.090 mg • g^{-1}、0.063 ～ 0.067 mg • g^{-1}、1.357 ～ 1.477 mg • g^{-1}、4.747 ～ 5.327 mg • g^{-1} 和 4.547 ～ 4.927 mg • g^{-1}，结果见表 7。

3　讨论

3.1　提取方法考察

本试验通过比较了不同提取溶剂甲醇、75% 甲醇、50% 甲醇和水；不同提取时间 30 min、1 h

表 7　10 批消痞和胃胶囊 6 种化学成分的含量测定结果 ($mg \cdot g^{-1}$，$n = 10$)

Tab 7　Determination of 6 compounds in 10 batches of Xiaopi Hewei capsules ($mg \cdot g^{-1}$，$n = 10$)

批号	水杨苷	表儿茶素	4-羟基苯乙酮	三七皂苷 R_1	人参皂苷 Rg_1	人参皂苷 Rb_1
S1	0.223	0.080	0.067	1.367	4.750	4.650
S2	0.223	0.080	0.067	1.367	5.107	4.593
S3	0.223	0.090	0.067	1.430	5.327	4.927
S4	0.227	0.077	0.063	1.413	5.037	4.547
S5	0.227	0.087	0.067	1.380	5.170	4.763
S6	0.223	0.087	0.067	1.477	5.107	4.793
S7	0.230	0.083	0.067	1.397	5.173	4.863
S8	0.223	0.087	0.067	1.437	5.267	4.883
S9	0.230	0.087	0.063	1.357	4.800	4.873
S10	0.227	0.073	0.067	1.413	4.747	4.633

和 2 h；不同提取方法超声提取和水浴回流提取。比较不同提取方法下的供试品溶液色谱图可知，75% 甲醇、水浴回流 2 h 所得的色谱图色谱峰信息较多，待测组分 4-羟基苯乙酮、表儿茶素、水杨苷、三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1 色谱峰峰面积较大，故而确定该方法为供试品溶液制备方法。

3.2　色谱条件的选择

本试验考察了 203 nm 处各待测物的吸收，因三七药材中大多三萜类有效成分为末端吸收，故本研究只选取 203 nm 为波长 [10]。曾考察了 SymmetryShieldTMRP18（4.6 mm×150 mm，5 μm）、Diamon C18（2）（4.6 mm×150 mm，5 μm）和 XBridge C18 色谱柱（4.6 mm×150 mm，5 μm），发现在 XBridge C18 色谱柱（4.6 mm×150 mm，5 μm）条件下分离得到的色谱图各组分的峰形较好，且具有较好的分离度，可作为后续研究优选的色谱柱。

3.3　指标性成分的选择

隔山消中主要的活性成分有 C21 甾体皂苷类、苯乙酮类、有机酸类、香豆素类、木质素类等多种化合物，具有改善胃肠功能、调节免疫、抗肿瘤等药理作用，其中甾体类和苯乙酮类化合物含量最多 [11]。C21 甾体皂苷具有保护肝脏和心肌，调节血脂，改善高脂血症大鼠肝脏功能，对抗高血脂大鼠脂质过氧化，缓解肝脂肪变性的生物作用 [12]。苯乙酮类化合物为隔山消第二大类化合物，具有显著的抗炎、舒张血管、保肝、降血糖、保护神经及抗氧化活性 [13]。隔山消代表性苯乙酮类化合物有 4-羟基苯乙酮、2，5-二羟基苯乙酮、2，4-二羟基苯乙酮和白首乌二苯酮等。研究指出白首乌二苯酮和 4-羟基苯乙酮有较强的抗氧化活性 [14]。此外，4-羟基苯乙酮在治疗炎症性疾病中具有显著疗效 [15]。因此，苯乙酮类化合物常作为指标性成分用于隔山消的质量控制 [16-18]。孙佳等 [19] 采用 HPLC 同时测定隔山消中 5 个苯乙酮类化合物的含量，其中 4-羟基苯乙酮为其代表性成分之一。刺梨叶具有滋补胃、排除食物的功效，主要含有氨基酸黄酮类、酚酸类、多糖、有机酸、三萜类化合物 [20-21]，其中黄酮类化合物具有良好的抗氧化活性，代表性组分为儿茶素和表儿茶素 [22]。表儿茶素药理作用广泛，具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化和免疫调节等作用。此外通过单味药指纹图谱及成分分析发现，表儿茶素在柳枝中含量较高。柳枝的化学成分主要包括水杨苷及其衍生物，黄酮类化合物等。柳枝的镇痛、解热、抗炎的特性与水杨苷及其衍生物密切相关 [23]。水杨苷在体内可水解为水杨醇，进而代谢为水杨酸，具有良好的镇痛消炎作用，从而缓解胃部的烧灼感 [24-25]。三七可通过减少胃分泌和抵抗自由基损伤，改善幽门螺杆菌小鼠的症状 [26]。三七总皂苷是三七的主要活性成分，其含量高达 12%，包括三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1、人参皂苷 Rb_1 和人参皂苷 Re 等组分，具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤的功效 [4]。研究指出，三七总皂苷能显著改善功能性消化不良大鼠的胃肠动力，调节胃肠激素含量，缓解胃肠动力障碍 [27]。

大多数中药质量标准的含量测定成分仅为指标成分而非有效成分，难以关联中药的有效性、安全性。中药各成分在体内的代谢过程因药物种类而异，以原形成分进入体内的化合物更有可能发挥治疗疾病的作用 [28-29]。因此，对消痞和胃胶囊的入血成分开展含量测定研究，能够真实反映复方整体的质量水平，保证其临床疗效。本课题组前期基于消痞和胃胶囊体内外成分分析，初步明确了消痞和胃胶囊的化学组成及血中移行成分 [30]。发现 4-羟基苯乙酮、表儿茶素、水杨苷、三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1 均可以原形形式吸收入血而发挥药效。因此选择以上 6 种成分作为消痞和胃胶囊质量控制的指标性成分，在反映复方整体的质量水平的同时可表征其在体内的药效物质。

4　结论

中药指纹图谱主要用于评价中药材及其制剂质量的稳定性和重现性 [31-32]。本试验采用化学指纹图谱质控方法快速、直观地辨识消痞和胃胶囊的化学组成。共确定了 17 个共有峰，指认了其中 6 个组分（水杨苷、表儿茶素、4-羟基苯乙酮、三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1），从而为消痞和胃胶囊质量控制和评价提供参考。通过单味药指

纹图谱分析，确定了共有峰的归属，明确单味药对复方的贡献。同时建立了水杨苷、表儿茶素、4-羟基苯乙酮、三七皂苷 R_1、人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Rb_1 的含量测定方法，操作简便快捷，试剂消耗低，成本低。通过选择合适的检测条件，使得该方法测定消痞和胃胶囊中各组分含量的分离度、准确性、重复性、稳定性等都满足标准要求，弥补了消痞和胃胶囊多组分含量测定方法的空白，为其全面质量标准的建立提供参考依据。

参考文献

[1] 李艳，黎开燕 . 隔山消的药理作用研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志，2015，24（2）：213-215.

[2] 李欣燃，朱淼，韩世明，等 . 刺梨叶总黄酮超声辅助提取工艺优化 [J]. 食品研究与开发，2019，40（12）：189-193.

[3] Maistro EL，Terrazzas PM，Perazzo FF，et al. Salix alba（white willow）medicinal plant presents genotoxic effects in human cultured leukocytes [J]. J Toxicol Environ Health A，2019，82（23-24）：1223-1234.

[4] 王莹，褚扬，李伟，等 . 三七中皂苷成分及其药理作用的研究进展 [J]. 中草药，2015，46（9）：1381-1392.

[5] 余佳峰，杨昆蓉 . 苗药·消痞和胃胶囊、砂连和胃胶囊防治脾胃病临床应用 [J]. 健康必读，2019（3）：50-51.

[6] 徐洪国 . 消痞和胃胶囊治疗功能性消化不良分析 [J]. 中国处方药，2016，14（3）：84-85.

[7] 何孙香，熊泽民，汪波 . 消痞和胃胶囊治疗胃癌前病变 32 例临床研究 [J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20（24）：233-236.

[8] 王美华，赵邯涛，潘梦雪，等 . 益胃汤物质基准的 HPLC 指纹图谱分析及多组分含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27（17）：9-15.

[9] 齐美欣 . 组分中药 CXWS 药效学试验及指纹图谱研究 [D]. 长春：吉林农业大学，2019.

[10] 付鹏，黄宽，陈凌云，等 . 基于 HPLC 指纹图谱结合化学计量学评价天龙竭胶囊质量及 5 个成分的含量测定 [J]. 药物分析杂志，2021，41（11）：1885-1893.

[11] 秦兰，游景瑞，潘洁，等 . 隔山消提取物对功能性消化不良模型大鼠脑肠肽及胃肠道功能的作用机制研究 [J]. 中国药业，2021，30（13）：23-26.

[12] 王新婕，李振麟，钱士辉，等 . 耳叶牛皮消中 C_{21} 甾体类成分研究进展 [J]. 中国野生植物资源，2018，37（3）：51-55，63.

[13] 张明，沈明晨，陈镭，等 . 白首乌的化学成分、药理作用及栽培技术综述 [J]. 江苏农业科学，2022，50（2）：22-29.

[14] 谢凯强 . 隔山消化学成分及生物活性研究 [D]. 贵州：贵州大学，2017.

[15] Chang CW，Chen YC，Lin YC，et al. p-hydroxyacetophenone suppresses nuclear factor-κB-related inflammation in nociceptive and inflammatory animal models [J]. J Nat Med，2017，71（2）：422-432.

[16] 秦兰，孙佳，刘春花，等 . UPLC-ESI-MS/MS 法测定苗药隔山消中 8 个成分含量 [J]. 贵州医科大学学报，2021，46（8）：886-892.

[17] 杨玲，向家俊，李齐激，等 . 高效液相色谱法结合一测多评法对隔山消发酵前后 3 种苯乙酮类化合物含量变化的分析 [J]. 理化检验（化学分册），2020，56（2）：130-135.

[18] 孙佳，勾健，秦兰，等 . 隔山消的指纹图谱建立、化学模式识别分析及多指标含量测定 [J]. 中国药房，2022，33（6）：673-679.

[19] 孙佳，赵珊，邹欢，等 . HPLC 同时测定隔山消中 5 个成分的含量 [J]. 药物分析杂志，2015，35（10）：1801-1805.

[20] 付阳洋，刘佳敏，卢小鸾，等 . 刺梨主要活性成分及药理作用研究进展 [J]. 食品工业科技，2020，41（13）：328-335，342.

[21] 李欣燃，田茹玉，陈胜贤，等 . 银杏与刺梨叶及杆中黄酮含量比较研究 [J]. 农产品加工，2020（19）：54-56，60.

[22] 李福明，汪洋，韦敏 . 刺梨叶醇提物体外抗氧化活性和 α-葡萄糖苷酶抑制活性研究 [J]. 中国现代应用药学，2015，32（6）：685-688.

[23] González-Alamilla EN，Gonzalez-Cortazar M，Valladares-Carranza B，et al. Chemical constituents of *Salix babylonica* L. and their antibacterial activity against gram-positive and gram-negative animal bacteria [J]. Molecules，2019，24（16）：2992.

[24] Kammerer B，Kahlich R，Biegert C，et al. HPLC-MS/MS analysis of willow bark extracts contained in pharmaceutical preparations [J]. Phytochem Anal，2005，16（6）：470-478.

[25] Zhao J，Zhao L，Zhang S，et al. Modified Liu-Jun-Zi decoction alleviates visceral hypersensitivity in functional dyspepsia by regulating EC cell-5HT3r signaling in duodenum [J]. J Ethnopharmacol，2020，250：112468.

[26] Shi X，Zhao F，Dai X，et al. Effects of san qi on gastric secretion and protective factors of gastric mucosa in the rat with precancerous lesion of stomach [J]. J Tradit Chin Med，2003，23（3）：220-224.

[27] Wang W，Yang L，Song L，et al. Combination of Panax notoginseng saponins and aspirin potentiates platelet inhibition with alleviated gastric injury via modulating arachidonic acid metabolism [J]. Biomed Pharmacother，2021，134：111165.

[28] 崔露，陶心悦，胡月迪，等 . 中药血清指纹图谱的研究进展 [J]. 中华中医药学刊，2021，39（9）：86-88.

[29] 崔素华，梁枫，张瑞，等 . 基于中药血清药理学与血清药物化学的中药药效物质基础的研究进展 [J]. 卫生职业教育，2020，38（1）：157-159.

[30] 孙雨，刘润花，向延柳，等 . 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析消痞和胃胶囊的化学成分 [J]. 国际药学研究杂志，2020，47（6）：463-470.

[31] 所千贺，肖会敏，王四旺 . 脉络通胶囊 HPLC 指纹图谱和 6 种成分的定量研究 [J]. 西北药学杂志，2020，35（2）：164-168.

[32] 农新维，王婵，黄雄梅，等 . 银翘散配方颗粒的 HPLC 特征图谱研究 [J]. 西北药学杂志，2022，37（3）：20-25.

（收稿日期：2022-08-24；修回日期：2022-10-14）

高效液相色谱法测定富马酸卢帕他定口崩片的有关物质

王璟[1]，刘伟[2]，刘为中[2]，周洁[2]，何广卫[1, 2*]（1. 安徽中医药大学，合肥　230012；2. 合肥医工医药股份有限公司，合肥　230601）

摘要：目的　建立高效液相色谱法测定富马酸卢帕他定口崩片的有关物质检查。**方法**　采用 Waters XBridge C18（4.6 mm×150 mm，3.5 μm）色谱柱，以 0.05 mol • L^{-1} 磷酸二氢钠溶液为流动相 A，乙腈为流动相 B，梯度洗脱，流速 1.0 mL • min^{-1}，柱温 35 ℃，检测波长 242 nm，进样量 50 μL。**结果**　卢帕他定与各杂质之间的分离度均大于 1.5；杂质 A、B、C、D、I、J 的定量限分别为 5.1975、5.5541、24.3482、2.0800、4.9305、5.1460 ng • mL^{-1}，且在相应范围内与峰面积线性关系良好；杂质 A 校正因子为 1.3，其余杂质校正因子均在 0.9 ～ 1.1。各杂质的平均回收率在 99.84% ～ 109.22%，*RSD* 均小于 2%。**结论**　本法专属性、精密度、准确度和耐用性良好，可用于富马酸卢帕他定口崩片有关物质的测定。

关键词：富马酸卢帕他定口崩片；有关物质；高效液相色谱法
中图分类号：R927　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-1056-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.035

HPLC determination of related substances in rupatadine fumarate orally disintegrating tablets

WANG Jing[1], LIU Wei[2], LIU Wei-zhong[2], ZHOU Jie[2], HE Guang-wei[1, 2*] (1. *Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei* 230012; 2. *Hefei Industrial Pharmaceutical Institute Co., Ltd., Hefei* 230601)

Abstract: Objective To determine the related substances in rupatadine fumarate orally disintegrating tablets by HPLC. **Methods** Waters XBridge C18 (4.6 mm×150 mm, 3.5 μm) column was used, with 0.05 mol • L^{-1} sodium dihydrogen phosphate solution as mobile phase A, and acetonitrile as mobile phase B, in the gradient elution. The flow rate was 1.0 mL • min^{-1}, the column temperature was 35 ℃ , the detection wavelength was 242 nm, and the injection volume was 50 μL. **Results** The resolution between rupatadine and impurities was greater than 1.5. The limit of quantitation of impurities A, B, C, D, I, and J was 5.1975, 5.5541, 24.3482, 2.0800, 4.9305, and 5.1460 ng • mL^{-1} respectively, and the linear relationship was good within the corresponding range; The correction factor of impurity A was 1.3, and the correction factor of other impurities was within 0.9 ～ 1.1. The average recoveries ranged 99.84% ～ 109.22%, with *RSD* all less than 2%. **Conclusion** This method is specific, precise, accurate and durable, which can be used for the determination of related substances in rupatadine fumarate orally disintegrating tablets.

Key words: rupatadine fumarate orally disintegrating tablet; related substance; HPLC

富马酸卢帕他定（rupatadine fumarate）作为 *N*-烷基吡啶衍生物，除了是组胺 H1 受体拮抗剂之外，还具有抑制血小板活化因子的作用[1]，于 2003 年首次在西班牙上市，临床上广泛应用于治疗变应性鼻炎[2-3]。口崩片指在口腔内不需要用水即能迅速崩解或溶解的片剂[4]，有研究人员成功设计了包裹富马酸卢帕他定的乙基纤维素微粒，其作为口服分散剂可以减少患者对苦味的感知，增加患者的用药体验和便利性[5]。将其制成口崩片易于被老年、儿科、精神病和卧床不起的患者

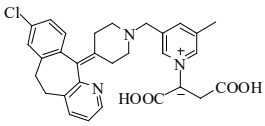
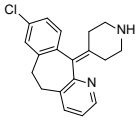
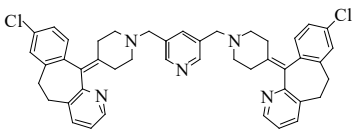
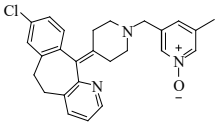
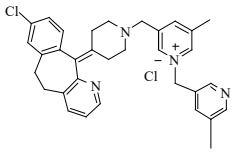
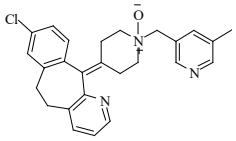
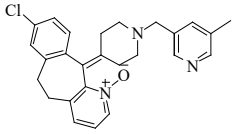
作者简介：王璟，女，硕士，主要从事药物分析研究，email：914368398@qq.com　*通信作者：何广卫，男，博士，主任药师，主要从事创新药物研究与开发，email：hgwhipi@hotmail.com

接受，给药方便、准确，且可避免肝脏首过效应，提高生物利用度[6]。

富马酸卢帕他定口崩片在国内外药典（ChP、JP、USP、EP、BP）中均未收载，相关文献报道较少[7-9]，尚无对其品种的杂质谱进行系统全面研究的报道，而杂质作为影响药品安全性和有效性的关键因素，一直是药品质量研究、安全性评价的重点。如何测定富马酸卢帕他定口崩片中原料引入、制剂制备过程及降解产生的杂质是难点。本文在分析富马酸卢帕他定口崩片原料合成工艺、制剂制备工艺、降解途径的基础上，推测出可能产生的杂质有工艺杂质 A、B、C、E，降解杂质 A、D、I、J（见表 1），针对上述杂质摸索建立 HPLC 法进行控制，以保证产品质量。

表 1　杂质信息

Tab 1　Impurity information

杂质名称	杂质结构
杂质 A	
杂质 B	
杂质 C	
杂质 D	
杂质 E	
杂质 I	
杂质 J	

1　仪器与试药

1.1　仪器

20AT 型高效液相色谱仪（日本岛津公司）；1260 型高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；十万分之一 XS105 电子分析天平（梅特勒 - 托利多公司）；Waters XBridge C18（4.6 mm×150 mm，3.5 μm）。

1.2　试药

富马酸卢帕他定对照品（批号：101241-202102，纯度：99.9%）、杂质 B 对照品（批号：100919-202105，纯度：99.8%）（中国食品药品检定研究院）；杂质 A 对照品（PANPHY，批号：08J-USX-06-1，纯度：99.36%）、杂质 C 对照品（批号：2161-037A9，纯度：97.5%）、杂质 D 对照品（批号：3550-043A5，纯度：97.3%）、杂质 E 对照品（批号：2126-048A5，纯度：94.1%）（TLC），杂质 I 对照品（批号：20-08-1313，纯度：99.73%）、杂质 J 对照品（批号：20-08-1314，纯度：99.67%）（SINCO）。富马酸卢帕他定口崩片（批号：211118、211129、211201）、富马酸卢帕他定口崩片空白片（批号：211206B）（合肥医工医药股份有限公司）；乙腈（BCR 公司，批号：0114220520，色谱级），30% 过氧化氢溶液（国药集团化学试剂有限公司，分析级），一水合磷酸二氢钠（Aladdin 公司，分析级），水为自制超纯水。

2　方法与结果

2.1　溶液配制

2.1.1　溶剂　0.05 mol·L^{-1} 磷酸二氢钠溶液 - 乙腈（77∶23）。

2.1.2　供试品溶液　取本品细粉适量（约相当于卢帕他定 10 mg），精密称定，置 20 mL 量瓶中，加溶剂适量，超声 5 min，放冷，用溶剂稀释至刻度，摇匀，过滤，取续滤液。

2.1.3　对照品溶液　取富马酸卢帕他定对照品适量（约相当于卢帕他定 10 mg），精密称定，置 20 mL 量瓶中，加溶剂溶解并稀释至刻度，摇匀。再精密量取适量，用溶剂定量稀释制成每 1 mL 中约含卢帕他定 0.5 μg 的溶液。

2.1.4　系统适用性溶液　精密称取富马酸卢帕他定及其杂质 A、B、C、D、E、I、J 对照品各适量，加溶剂溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含杂质 A、B、C、D、E、I、J 各 10 μg，卢帕他定 100 μg 的溶液。

2.1.5　空白辅料溶液　取空白片 4 片，置 20 mL 量瓶中，加溶剂适量，超声 5 min，放冷，用溶剂稀释至刻度，摇匀，过滤，取续滤液，即得。

2.1.6　杂质定位溶液　精密称取杂质 A ～ J 对照品适量，加溶剂溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含各杂质对照品 5 μg 的溶液。

2.2　色谱条件

色谱柱为 Waters XBridge C18（4.6 mm×150 mm，3.5 μm）；流动相 A 为 0.05 mol • L^{-1} 磷酸二氢钠溶液，流动相 B 为乙腈；流速为 1.0 mL • min^{-1}；检测波长为 242 nm；柱温为 35 ℃；进样体积为 50 μL；按表 2 进行梯度洗脱。

表 2　梯度洗脱程序

Tab 2　Gradient elution procedure

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	77	23
20	77	23
30	50	50
45	50	50
50	77	23
65	77	23

2.3　专属性

2.3.1　分离度试验　取“2.1”项下杂质定位溶液及系统适用性溶液各 50 μL，按“2.2”项下色谱条件进样测定。结果表明在该色谱条件下富马酸卢帕他定与杂质能完全分离，分离度均大于 1.5（见图 1、2）。

2.3.2　降解试验　取本品（批号：211118）细粉和空白辅料适量，各 5 份，各置于 20 mL 量瓶中，分别进行酸、碱、氧化、高温和光照强制降解破坏（其中酸、碱破坏样品须中和）[9]，按“2.1.2”项下方法操作，进样测定。结果显示，本品在氧化条件中主峰有较大的降解，高温条件中主峰稍有降解，酸、碱、光照条件中主峰基本无降解，降解杂质不干扰已知有关物质的检测。

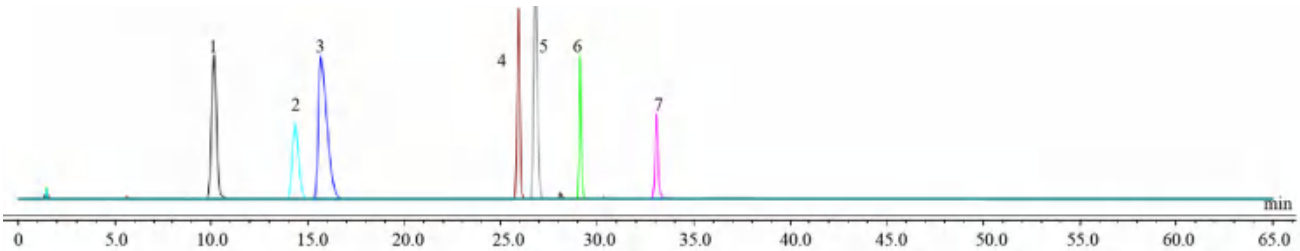


图 1　专属性杂质定位

Fig 1　Specific impurity localization

1. 杂质 A（impurity A）；2. 杂质 J（impurity J）；3. 杂质 B（impurity B）；4. 杂质 D（impurity D）；5. 杂质 I（impurity I）；6. 杂质 E（impurity E）；7. 杂质 C（impurity C）

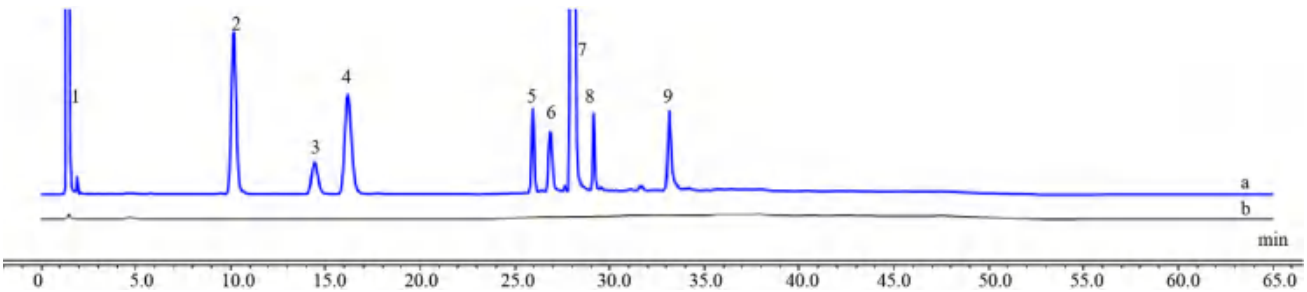


图 2　专属性考察结果（系统适用性）

Fig 2　Specificity test（system suitability）

a. 系统适用性溶液（system suitability solution）；b. 溶剂（solvent）；1. 富马酸（fumaric acid）；2. 杂质 A（impurity A）；3. 杂质 J（impurity J）；4. 杂质 B（impurity B）；5. 杂质 D（impurity D）；6. 杂质 I（impurity I）；7. 卢帕他定（rupatadine）；8. 杂质 E（impurity E）；9. 杂质 C（impurity C）

采用二极管阵列检测器（DAD）进行峰纯度检查，以富马酸卢帕他定口崩片未破坏样品溶液为对照溶液分别计算氧化、酸、碱、高温、光照降解后样品溶液中主药的浓度，再以各条件降解后主药浓度比降解前主药浓度计算出各条件降解后主药的残存率；以氧化、酸、碱、热、光照降解后样品溶液的 HPLC 色谱图中主药峰面积百分比作为降解后主药的纯度，通过降解后主药残存率和主药纯度是否基本一致来考察物料平衡情况。结果见表 3，表明物料基本平衡。

2.4　线性关系与校正因子

分别取富马酸卢帕他定对照品及各杂质对照品适量，以流动相稀释制成线性储备液，取线性储备液制备成多份含不同浓度的富马酸卢帕他定对照品（$n = 5$）及各杂质对照品的线性溶液，精密量取各线性溶液，按“2.2”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。以质量浓度（μg • mL^{-1}）为横坐标，峰面积为纵坐标，进行回归分析，计算回归方程。以主成分线性回归斜率与杂质线性回归斜率的比计算校正因子，结果见表 4。

表 3　专属性物料平衡结果

Tab 3　Specific material balance

降解样品	降解后主峰面积	降解前主药浓度 /（mg•mL^{-1}）	降解后主药残存率 /%	降解后主药纯度 /%	物料平衡情况
未破坏	394.6524	0.5029	/	99.869	基本平衡
光照固体降解	395.1230	0.4996	100.769	99.814	基本平衡
氧化降解	382.4042	0.5038	100.059	96.343	基本平衡
酸降解	395.5832	0.5016	100.484	99.913	基本平衡
碱降解	393.3303	0.5011	100.012	99.873	基本平衡
光照液体降解	377.8967	0.4819	99.916	99.641	基本平衡
高温降解	400.4128	0.5011	101.813	99.906	基本平衡

2.5　定量限与检测限

取富马酸卢帕他定对照品及杂质 A、B、I、C、D、J 各适量，精密称定，以溶剂溶解，并逐级稀释，按“2.2”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，当信噪比（*S/N*）约为 10 时为定量限、约为 3 时为检测限，结果见表 5。

2.6　精密度试验

2.6.1　重复性　取本品（批号：211129）细粉适量（约相当于卢帕他定 10 mg），精密称定，置 20 mL 量瓶中，制备供试品溶液（$n = 6$），进样测定。结果表明，杂质 A 检出在 0.0103% ～ 0.0105% 内，杂质 B 检出在 0.0274% ～ 0.0288%，杂质 C 检出在 0.0075% ～ 0.0080%，杂质 I 检出在 0.0432% ～ 0.0605%，最大其他单杂检出在 0.0375% ～ 0.0396%，总杂在 0.1082% ～ 0.1286%，杂质个数均为 3 个，表明方法重复性良好。

表 4　校正因子结果

Tab 4　Correction factor

化合物	线性方程	r	线性范围 /（μg • mL^{-1}）	斜率	校正因子
杂质 A	$A = 1.396C + 0.014$	0.999	1.070 ～ 8.025	1.396	1.3
杂质 B	$A = 1.994C + 0.049$	0.998	0.522 ～ 3.920	1.994	0.9
杂质 C	$A = 1.567C - 0.144$	0.998	0.211 ～ 1.582	1.567	1.1
杂质 D	$A = 1.792C + 0.016$	0.998	0.208 ～ 1.560	1.792	1.0
杂质 I	$A = 1.596C - 0.011$	1.000	0.212 ～ 1.592	1.596	1.1
杂质 J	$A = 2.286C - 0.025$	0.999	0.204 ～ 1.535	2.286	0.8
卢帕他定	$A = 1.769C + 0.041$	1.000	0.200 ～ 1.211	1.769	—

表 5　定量限和检测限结果

Tab 5　Quantitation limit and detection limit

化合物	定量限 /（ng • mL^{-1}）	定量限相当于供试品溶液浓度 /%	检测限 /（ng • mL^{-1}）	检测限相当于供试品溶液浓度 /%
杂质 A	5.1975	0.001 04	1.5592	0.000 31
杂质 J	5.1460	0.001 03	1.5438	0.000 31
杂质 B	5.5541	0.001 11	1.6662	0.000 33
杂质 D	2.0800	0.000 42	0.6240	0.000 12
杂质 I	4.9305	0.000 99	1.4792	0.000 30
卢帕他定	1.7259	0.000 35	0.5178	0.000 10
杂质 C	24.3482	0.004 87	12.7828	0.002 56

2.6.2　中间精密度　于不同天、由不同实验人员取本品（批号：211129）适量，平行配制 6 份供试品溶液，进样测定。结果表明，6 份供试品中各单杂和总杂质含量基本小于 0.01%，检出杂质的个数基本无差异，杂质含量 *RSD* 为 4.2%。说明本方法精密度良好。

2.7　准确度试验

称取富马酸卢帕他定杂质 A、B、C、D、I、J 及富马酸卢帕他定口崩片细粉（批号：211118）各适量，加溶剂溶解并定量稀释成每 1 mL 中约含杂质 A、B、C、D、I、J 各 1 μL，卢帕他定 0.5 mg 的溶液，平行 6 份，进样测定。结果表明，主成分平均回收率为 99.97%，杂质 A、B、C、D、I、J 平均回收率分别为 100.73%、100.30%、99.84%、102.26%、109.22%、100.85%，各杂质回收率 *RSD* 均小于 2%，方法准确度良好。

2.8　耐用性试验

按“2.1”项下方法配制供试品溶液、对照品溶液及系统适用性溶液，对“2.2”项下色谱条件中流速（0.9、1.0、1.1 mL • min^{-1}）；柱温（33 ℃、35 ℃、37 ℃）；流动相磷酸二氢钾溶液盐浓度（0.01、0.05、0.08 mol • L^{-1}）进行了考察。结果表明本方法对流速、柱温及对洗脱程序的变化小于 0.01%（总杂含量 *RSD* 为 0.15% ～ 0.18%），耐用性良好；对流动相盐浓度变化总杂含量 *RSD* 为 5.1%，耐用性较差。

2.9　稳定性试验

取“2.1”项下方法配制供试品溶液、对照品溶液在室温下放置，分别于 0、1、2、4、8、12、24 h 内进行检测，考察供试品溶液及对照品溶液稳定性，进样测定。结果表明对照品溶液各时间点峰面积相对 0 h 比例均在 98% ～ 102%，对照

品溶液在 24 h 内稳定；供试品溶液于室温条件下放置 24 h 后杂质个数由 6 个增长至 7 个，新增杂质含量小于报告限度（0.025%），检出杂质量无明显增加，说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.10　有关物质测定

取 3 批自研品，按“2.1”项下方法分别配制对照溶液、供试品溶液与空白辅料溶液，进样测定，结果见表 6，表明样品均符合规定。

表 6　有关物质检查结果 (%)

Tab 6　Related substance inspection (%)

批号	杂质 A	杂质 B	杂质 C	杂质 I	其他单杂	总杂
211118	0.01	0.03	未检出	0.06	0.04	0.15
211129	0.01	0.03	未检出	0.05	0.04	0.14
211201	0.01	0.03	未检出	0.04	0.04	0.11
限度	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.50

3　讨论

现有文献方法对富马酸卢帕他定口崩片中可能产生的杂质不能有效分离，且不能排除辅料对杂质测定的干扰。本文在参考文献和富马酸卢帕他定原料性质的基础上，优化了流动相盐浓度和洗脱梯度，有效地增强了杂质的分离效果和检出能力；基于本品新剂型制剂试验过程中使用的辅料，优化了检测波长，避免辅料干扰本品主成分及杂质检出。本方法对流动相盐浓度变化较为敏感，配制过程需注意。

3.1　流动相梯度洗脱程序筛选

采用文献方法[8]对上述杂质进行研究。结果降解杂质 I 未检出（见图 3），各杂质分离度较差，不能有效对富马酸卢帕他定口崩片的杂质进行控制。

经查阅富马酸卢帕他定 pK_a 约为 6.9，而文献流动相 pH 为 5.5，富马酸卢帕他定未能完全离子化，影响分离度，故本文调整流动相 pH 值并放缓流动相梯度。根据文献调整后的流动相洗脱梯度的参数，改善了已知杂质及未知杂质的分离效果，增强方法的耐用性及检出能力。

3.2　检测波长选择

试验过程中发现聚维酮 K30 在 210 nm 波长条件下有强烈的吸收峰干扰后续试验（见图 4），结合各已知杂质在现有方法条件下的最大吸收波长，选择 242 nm 作为本品有关物质检测波长进行后续研究。结果显示，更改波长为 242 nm 不影响本品系统适用性溶液检出，聚维酮 K30 在 242 nm 吸收波长条件下不干扰检测。

本法对强制降解样品进行检测显示，对各降解杂质均能准确检出，且分离度均能符合要求，适用于富马酸卢帕他定口崩片中有关物质的检查。

3.3　杂质分析

参照 ICH Q3B[11]，结合富马酸卢帕他定口崩

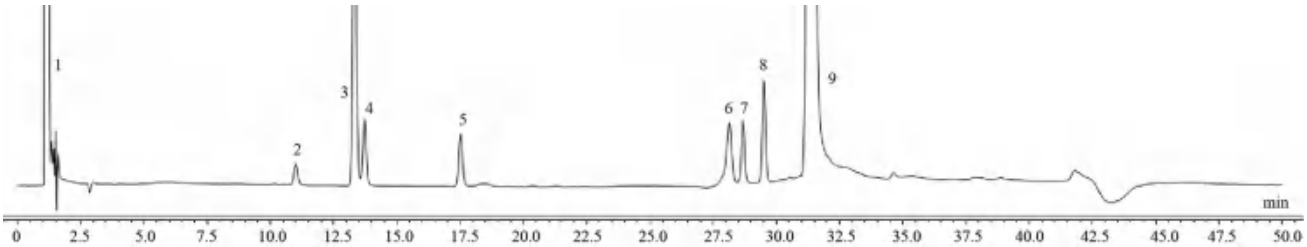


图 3　文献方法重现结果

Fig 3　Literature method reproduction

1. 富马酸（fumaric acid）；2. 杂质 A（impurity A）；3. 杂质 J（impurity J）；4. 杂质 J（impurity J）；5. 杂质 B（impurity B）；6. 杂质 D（impurity D）；7. 杂质 E（impurity E）；8. 杂质 C（impurity C）；9. 卢帕他定（rupatadine）

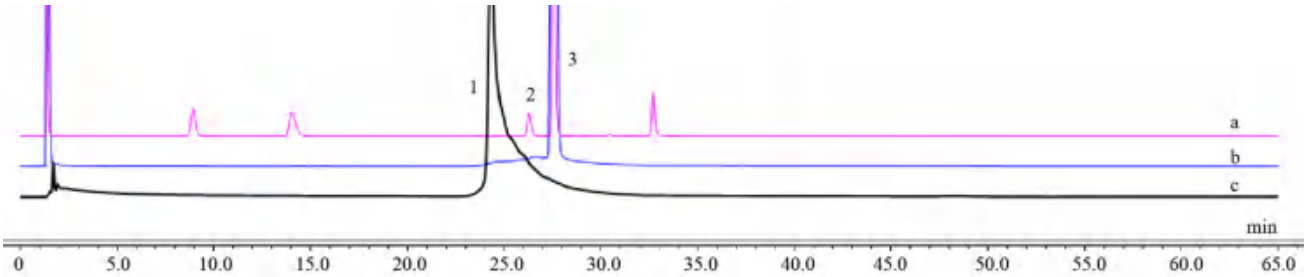


图 4　聚维酮 K30 溶液、供试品溶液与系统适用性溶液的测定结果

Fig 4　HPLC of povidone K30 solution，test solution and system suitability solution

a. 系统适用性溶液（system suitability solution）；b. 供试品溶液（test solution）；c. 聚维酮 K30 溶液（povidone K30 solution）；1. 聚维酮 K30（povidone K30）；2. 杂质 I（impurity I）；3. 卢帕他定（rupatadine）

片的检测结果，制订各杂质的控制策略。

杂质 A、I 为制剂主要降解杂质，储存过程中有所增长，故作为特定杂质进行控制，控制限度为≤ 0.2%；杂质 B 为工艺杂质地氯雷他定，杂质 C、E 为原料引入的工艺杂质，多批次样品检测均小于≤ 0.01%，作为非特定杂质进行控制。

杂质 D 与杂质 J 为氧化降解杂质，具有警示结构。同时采用基因毒性杂质预测软件 CASE Ultra 软件对杂质 D、J 进行杂质分类评估预测，结果显示，杂质 D 为 5 类杂质，杂质 J 为 4 类杂质。参照 ICH M7[12] 杂质 D、J 均可按一般杂质进行控制，限度均为≤ 0.2%。

参考文献

[1] Merlos M，Giral M，Balsa D，et al. Rupatadine，a new potent，orally active dual antagonist of histamine and platelet-activating factor（PAF）[J]. J Phaemacol Exp Ther，1997，280（1）：114-121.

[2] Mullol J，Izquierdo I，Okubo K，et al. Clinically relevant effect of rupatadine 20 mg and 10 mg in seasonal allergic rhinitis：a pooled responder analysis [J]. Clin Transl Allergy，2019，50（9）：1-10.

[3] Santamaría E，Izquierdo I，Valle M，et al. Rupatadine oral solution for 2 ～ 5-year-old children with allergic rhinitis：a safety，open-label，prospective study [J]. J Asthma Allergy，2018，11（4）：225-231.

[4] 中国药典 2020 年版 . 二部 [S]. 2020：1088.

[5] Olechno K，Maciejewski B，Głowacz K，et al. Orodispersible films with rupatadine Fumarate enclosed in ethylcellulose microparticles as drug delivery platform with taste-masking effect [J]. Materials（Basel），2022，14（3）：1-19.

[6] Ghourichay MP，Kiaie SH，Nokhodchi A，et al. Formulation and quality control of orally disintegrating tablets（ODTs）：recent advances and perspectives [J]. Biomed Res Int，2021，24（11）：1-12.

[7] 陈叶青，褚岩凤，丁军露，等 . 富马酸卢帕他定片有关物质的 HPLC 法测定 [J]. 中国医药工业杂志，2017，48（8）：1188-1193.

[8] 王海红，葛萍，赵卫，等 . RP-HPLC 法测定富马酸卢帕他定含量及有关物质 [J]. 药物分析杂志，2009，29（5）：791-794.

[9] 聂希霖，周本宏 . HPLC 法测定富马酸卢帕他定片剂的含量及有关物质 [J]. 中国药师，2011，14（5）：664-666.

[10] 中国药典 2020 年版 . 四部 [S]. 2020：480-483.

[11] ICH Q3B（R2）. Impurities in new drug products [EB/OL]. https：//database. ich. org/sites/default/files/Q3B%28R2%29%20Guideline. pdf.

[12] ICH M7. Assessment and Control of DNA Reactive（Mutagenic）Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potentical Carcinogenic Risk[EB/OL]. http：//www. Ich. org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M7/M7_Step_4. pdf.

（收稿日期：2022-08-02；修回日期：2022-09-10）

声明

近一段时间通过搜索引擎搜索《中南药学》，出现了很多假冒网站，骗取读者文章或者钱财，我刊声明，《中南药学》杂志的官方网站为：http://znyx.cbpt.cnki.net/，作者可以直接输入我刊网址或者从中国知网首页“作者投稿服务”搜索《中南药学》杂志进行注册投稿。其他网址均为仿冒，我刊也未与任何投稿服务网站合作，请作者不要将自己的文章交给他人或者通过其他中间网站投向我刊，由此造成的损失，作者自己承担后果。特此声明！

《中南药学》编辑部

医院药学

生物制剂治疗类风湿关节炎相关间质性肺病疗效与安全性的 meta 分析

项惟真[1, 2]，董蓉蓉[1, 2]，李美琪[2]，麻贞贞[1, 2*]，杨清锐[1, 2]（1. 山东大学，济南　250012；2. 山东省立医院，济南　250021）

摘要：目的　系统评价生物制剂治疗类风湿关节炎相关间质性肺病（RA-ILD）的有效性和安全性，为临床治疗提供循证依据。**方法**　在 PubMed、Cochrane Library、Embase、Web of Science、中国知网、万方、维普、中国生物医学文献数据库中检索关于生物制剂治疗 RA-ILD 的研究，采用 R 软件进行 meta 分析。**结果**　共纳入 10 项研究，其中关于利妥昔单抗（RTX）及阿巴西普（ABA）的研究各 4 项，肿瘤坏死因子 *α*（TNF-*α*）抑制剂的研究 2 项。Meta 分析结果显示：接受 RTX 治疗的患者，治疗后用力肺活量占预计值百分比（FVC%pred）较治疗前显著增加 [*WMD* = 9.58，95%*CI*（3.91，15.25），*P* < 0.05]；而治疗前后一氧化碳弥散量占预计值百分比（DLCO%pred）的差异无统计学意义 [*WMD* = 8.90，95%*CI*（－ 1.06，18.86），*P* > 0.05]。接受 ABA 治疗的患者，治疗前后 FVC%pred [*WMD* = － 1.10，95%*CI*（－ 3.83，1.63），*P* > 0.05] 和 DLCO%pred [*WMD* = 0.65，95%*CI*（－ 2.24，3.53），*P* > 0.05] 的差异均无统计学意义；治疗后患者肺高分辨率 CT 的好转、稳定、恶化合并率分别为 16%[95%*CI*（12%，22%）]、69%[95%*CI*（57%，79%）]、19%[95%*CI*（14%，24%）]。接受 TNF-*α* 抑制剂治疗的患者，治疗后的 FVC%pred 与治疗前相比未出现明显下降。RTX 的总体不良事件合并发生率为 33%[95%*CI*（21%，45%）]，与不良事件相关的死亡的合并发生率为 7%[95% *CI*（2%，16%）]。**结论**　生物制剂（RTX、ABA、TNF-*α* 抑制剂）具有稳定或改善 RA-ILD 患者肺功能和影像学表现的作用，是治疗 RA-ILD 有效且安全的方法。

关键词：类风湿关节炎；间质性肺疾病；生物制剂；meta 分析
中图分类号：R593.22　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-1062-08
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.036

Efficacy and safety of biological agents for rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: a meta-analysis

XIANG Wei-zhen[1, 2], DONG Rong-rong[1, 2], LI Mei-qi[2], MA Zhen-zhen[1, 2*], YANG Qing-rui[1, 2] (1. *Shandong University*, *Jinan* 250012; 2. *Shandong Provincial Hospital*, *Jinan* 250021)

Abstract: Objective To systematically evaluate the efficacy and safety of biological agents in patients with rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease (RA-ILD), and to provide evidence for clinical treatment. **Methods** Databases including PubMed, Cochrane Library, Embase, Web of Science, CNKI, Wanfang, VIP, and CBM were searched for studies on biological agents for RA-ILD. Meta-analysis was performed by R software. **Results** Totally 10 studies were included: 4 on rituximab (RTX), 4 on abatacept (ABA) and 2 on tumor necrosis factor-alpha (TNF-*α*) inhibitors. In patients treated with RTX, the percentage of forced vital capacity in predicted value (FVC%pred) after the treatment was significantly improved as compared with before [*WMD* = 9.58, 95%*CI* (3.91,

基金项目：山东省自然科学基金青年项目（No. ZR2021QH043）。
作者简介：项惟真，女，硕士研究生，主要从事风湿病学研究，email：chinaemilyxiang@163.com　*__通信作者：__麻贞贞，女，博士，主要从事结缔组织病相关间质性肺疾病的研究，email：mazhenzhendz@163.com

15.25), $P < 0.05$], while there was no significant difference in percentage of diffusion capacity of the lung for the carbon monoxide in predicted value (DLCO%pred) before and after the treatment [$WMD = 8.90$, 95%CI (− 1.06, 18.86), $P > 0.05$]. In patients treated with ABA, no significant difference was found in either FVC%pred [$WMD = 8.90$, 95%CI (− 3.85, 1.63), $P > 0.05$] or DLCO%pred [$WMD = 0.65$, 95%CI (− 2.24, 3.53), $P > 0.05$] before and after the treatment, and pooled proportions of improvement, stability, worsening in lung high resolution computed tomography (HRCT) after the treatment were 16%[95%CI (12%, 22%)], 69%[95%CI (57%, 79%)], and 19%[95%CI (14%, 24%)] respectively. In patients treated with TNF-α inhibitor, no significant decline was found in FVC%pred from before to after the treatment. The pooled proportion of overall adverse events for RTX was 33%[95%CI (21%, 45%)], and the pooled proportion of death related with adverse events was 7%[95%CI (2%, 16%)]. **Conclusion** Biological agents (RTX, ABA and TNF-α inhibitors) are safe and effective for patients with RA-ILD, contributing to the stability and improvement in pulmonary functions and HRCT results.

Key words: rheumatoid arthritis; interstitial lung disease; biological agent; meta-analysis

类风湿关节炎（rheumatoid arthritis，RA）是一种慢性系统性自身免疫性疾病，除关节破坏外，常有关节外组织和器官的受累，其中最常见的是肺部受累[1]。RA 肺部受累表现多样，以类风湿关节炎相关间质性肺病（rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease，RA-ILD）最多见[2]。RA-ILD 是 RA 的严重并发症，也是导致患者死亡的主要原因之一。

目前关于 RA-ILD 的最佳治疗方案未达成共识，指南中亦无针对 RA-ILD 首选治疗的明确建议[3-4]。糖皮质激素联合传统的改善病情抗风湿药（conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs，csDMARDs）是目前 RA 治疗的常用方案，但并非在所有患者中有效，尤其是合并间质性肺病（ILD）者。近年来，包括利妥昔单抗（RTX）、阿巴西普（ABA）及肿瘤坏死因子（TNF-α）抑制剂 [如依那西普（ETN）、英夫利昔单抗（IFX）、阿达木单抗（ADA）] 等在内的生物制剂逐渐得到广泛应用，然而其在 RA-ILD 治疗中的作用尚存在一定的争议：生物制剂能有效治疗 RA-ILD 的同时，亦能诱发或加重 RA 的肺部病变[5-6]。

本文汇总了生物制剂治疗 RA-ILD 的相关研究并进行 meta 分析，旨在评价不同类型生物制剂在 RA-ILD 中的疗效和安全性，为临床实践提供循证医学参考。

1　资料与方法

1.1　文献检索策略

在中国期刊全文数据库（CNKI）、万方数据库、维普数据库、中国生物医学文献数据库内的中文数据库中，检索类风湿关节炎、间质性肺病、生物制剂、利妥昔单抗、阿巴西普、托珠单抗、肿瘤坏死因子抑制剂的主题词及相关自由词；在 PubMed、Cochrane Library、Embase、Web of Science 数据库的英文数据库中，检索 Rheumatoid arthritis，Interstitial lung disease，Biological disease-modifying anti-rheumatic drugs，Rituximab，Abatacept，Tocilizumab，Tumor necrosis factor-alpha inhibitor 的主题词及相关自由词。文献检索起止时间自建库至 2022 年 5 月 1 日。

1.2　文献纳入与排除标准

纳入标准：① RA 诊断符合 1987 年美国风湿病学会（ACR）分类标准[7]或 2010 年 ACR 与欧洲抗风湿病联盟（EULAR）共同发布的标准[8]；② ILD 诊断由专业放射科医师阅读肺部高分辨率计算机断层扫描（high resolution computed tomography，HRCT）后得出；③ 研究对象接受生物制剂（RTX、ABA、TNF-α 抑制剂等）治疗；④ 结局指标中涵盖生物制剂治疗前后用力肺活量占预计值百分比（FVC%pred）、一氧化碳弥散量占预计值百分比（DLCO%pred）、HRCT 结果。排除标准：① 研究内容或结局变量不吻合；② 研究结果不能提取或无法将其转化为可合并数据；③ 研究对象来自同一人群的多篇文献；④ 个案报道、会议摘要、综述、动物或体外试验；⑤ 研究对象少于 10 人；⑥ 关于该种生物制剂的文章少于 2 篇。

1.3　文献筛选与质量评价

两位评价者分别进行文献筛选和质量评价，出现分歧讨论解决，必要时提交给第三位评价者。将重复的文献剔除后，浏览标题及摘要排除明显不符合纳入标准的文献，对余下的文献进行全文阅读，得到最终纳入分析的合格文献。未设置对照组的研究根据澳大利亚 Joanna Briggs Institute（JBI）循证卫生保健中心的病例系列质量评价工具[9]进行评价，有

对照组的研究则利用 JBI 随机对照研究（randomized controlled trail，RCT）质量评价工具 [10] 进行评价。

1.4　资料提取

提取纳入文献中第一作者、出版年、研究设计、病例数、使用的生物制剂、疗效和安全性结果等信息。

1.5　统计学处理

应用 R 4.1.2 软件进行 meta 分析，连续型变量采用加权均数差（weighted mean difference，*WMD*）作为效应量；单组率变量采用合并率作为效应量。结果均以效应量及其 95% 置信区间（*CI*）的形式表示，$P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。纳入研究的异质性通过 *Q* 检验及 I^2 统计量衡量，若 $I^2 \leqslant 50\%$、$P \geqslant 0.1$，认为研究间具有同质性，统计量合并时采用固定效应模型；若 $I^2 > 50\%$、$P < 0.1$，则认为研究间存在异质性，统计量合并时采用随机效应模型，并利用敏感性分析、亚组分析等方法对异质性来源进行探讨。采用 Egger 检验评估发表偏倚，如 $P \geqslant 0.05$ 认为不存在发表偏倚，反之则存在。

2　结果

2.1　文献检索结果

检索获得中英文文献共 390 篇，通过去除重复文献、综述、会议摘要、个案报道及浏览标题和摘要后筛选出 21 篇文章，进一步阅读全文后最终 10 篇合格文献 [11-20]，具体筛选流程见图 1。

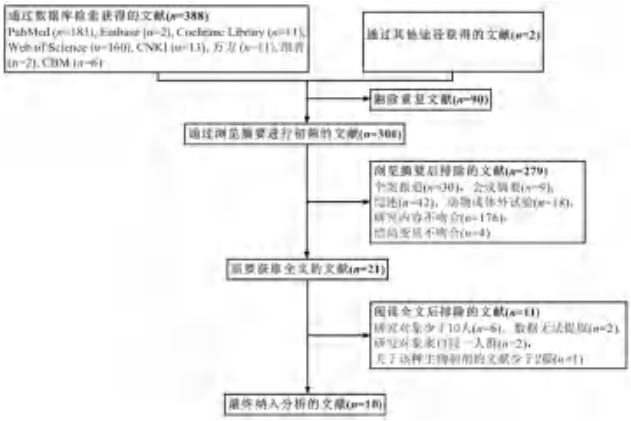


图 1　文献筛选流程图

Fig 1　Flow diagram of literature selection

2.2　纳入研究的基本特征及质量评价

纳入的 10 项研究中，共涉及 630 例 RA-ILD 患者，其中接受 RTX 治疗的患者 131 例，接受 ABA 治疗的患者 367 例，接受 TNF-*α* 抑制剂治疗的患者 132 例。单臂研究 [11-18] 采用 JBI 病例系列质量评价工具进行评价，RCT[19-20] 则采用 JBI 的 RCT 质量评价工具进行评价。研究基本信息及质量评价结果见表 1。

表 1　纳入研究的基本情况和质量评价

Tab 1　Basic information and quality evaluation of included studies

作者（年份）	研究地区	研究类型	生物制剂	病例数	性别（女 / 男）	平均年龄 / 岁	平均随访时间 / 月	JBI 质量评价
Narváez（2020）[11]	西班牙	回顾性单臂研究	RTX	31	18/13	61.0	65	8Y，2N，0U
Md Yusof（2017）[12]	英国	回顾性单臂研究	RTX	56	36/20	64.0	6 ～ 12	8Y，2N，0U
Fui（2020）[13]	意大利	前瞻性单臂研究	RTX	14	NA	62.6	12	7Y，3N，0U
叶路敏（2021）[14]	中国	回顾性单臂研究	RTX	30	17/13	60.8	24	7Y，3N，0U
Fernández-Díaz（2020）[15]	西班牙	前瞻性单臂研究	ABA	263	150/113	64.6	12	9Y，1N，0U
Tardella（2021）[16]	意大利	前瞻性单臂研究	ABA	44	36/8	59.1	18	7Y，3N，0U
Nakashita（2016）[17]	日本	回顾性单臂研究	ABA	16	10/6	71.1	12	7Y，3N，0U
Cassone（2020）[18]	意大利	回顾性单臂研究	ABA	44	32/12	65.0	27	9Y，1N，0U
Detorakis（2017）[19]	希腊	前瞻性对照研究	IFX/ADA/ETN	42	15/27	60.1	12	10Y，0N，3U
牛灵芝（2020）[20]	中国	前瞻性对照研究	ADA	90	43/47	62.9	NA	11Y，0N，2U

注（Note）：NA. 未提及（not available）；Y. 是（Yes）；N. 否（No）；U. 不清楚（unclear）。

2.3　meta 分析结果

2.3.1　RTX 疗效分析

① 治疗前后 FVC%pred 变化：共 4 项研究 [11-14] 的结局指标涉及 RTX 治疗前后的 FVC%pred。异质性检验：$I^2 = 10.0\%$，$P = 0.343$，应用固定效应模型分析，合并效应量 $WMD = 9.58$，95%$CI = 3.91 \sim 15.25$，$P = 0.002$，提示 RTX 治疗后 RA-ILD 患者的 FVC%pred 较治疗前有明显改善，增加 9.58%，见图 2A。

② 治疗前后 DLCO%pred 变化：共 4 项研究 [11-14] 的结局指标涉及 RTX 治疗前后的 DLCO%pred。异质性检验：$I^2 = 81.4\%$，$P = 0.001$，应用随机效应模型进行分析，合并效应量 $WMD = 8.90$，95%$CI = -1.06 \sim 18.86$，$P = 0.080$，提示 RTX 治疗前后 RA-ILD 患者 DLCO%pred 的差异无统计学意义，见图 2B。Egger 检验 $P = 0.441$，认为纳入的研究中无明显发表偏倚存在。敏感性分析亦未能发现对本次 meta 分析结果造成较大干扰的研究。进一步开展亚

组分析，其中随访时间＜24 个月和≥24 个月的亚组异质性检验 I^2 均为 0.0%，提示不同的随访时间是异质性的可能来源之一。随访时间＜24 个月的亚组合并效应量 *WMD* ＝ 0.16，95%*CI* ＝－ 6.28 ～ 6.60，*P* ＝ 0.961，提示随访时间＜24 个月时 RTX 治疗前后 DLCO%pred 的差异无统计学意义；随访时间≥24 个月的亚组合并效应量 *WMD* ＝ 17.52，95%*CI* ＝ 11.95 ～ 23.09，*P* ＜ 0.001，提示随访时间≥24 个月时 RTX 治疗后的 DLCO%pred 较治疗前有明显改善，增加 17.52%。具体结果见表 2。

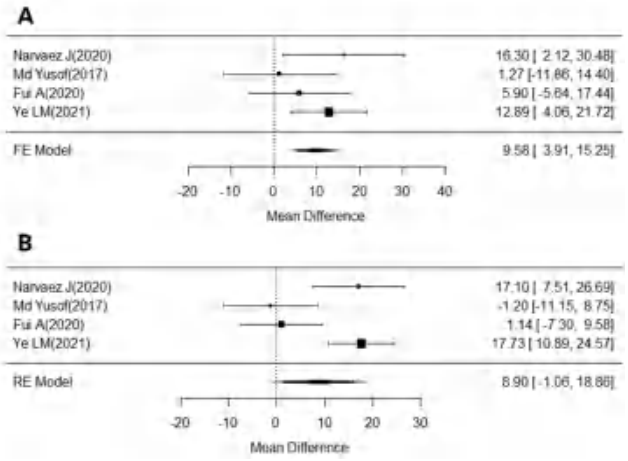


图 2　RTX 治疗前后 RA-ILD 患者肺功能指标 FVC%pred（A）及 DLCO%pred（B）变化的森林图

Fig 2　Change of pulmonary function FVC%pred（A）and DLCO%pred（B）before and after RTX treatment in patients with RA-ILD

表 2　RTX 治疗前后 RA-ILD 患者 DLCO%pred 变化的亚组分析结果

Tab 2　Subgroup analysis of DLCO%pred change before and after RTX treatment in patients with RA-ILD

亚组		研究数量	总效应量（95%*CI*）	异质性检验	
				I^2/%	*P*
研究地区	欧洲	3	5.63（－5.38，16.64）	76.1	0.015
	亚洲	1	17.73（10.89，24.57）	－	－
研究设计	前瞻性	1	1.14（－7.30，9.58）	－	－
	回顾性	3	11.54（0.06，23.02）	80.7	0.006
病例数	＜20	1	1.14（－7.30，9.58）	－	－
	≥20	3	11.54（0.06，23.02）	80.7	0.006
随访时间 / 月	＜24	2	0.16（－6.28，6.60）	0.0	0.725
	≥24	2	17.52（11.95，23.09）	0.0	0.971

2.3.2　ABA 疗效分析

① 治疗前后 FVC%pred 变化：共 2 项研究 [15-16] 的结局指标涉及 ABA 治疗前后的 FVC%pred。异质性检验：I^2 ＝ 0.0%，*P* ＝ 0.969，应用固定效应模型分析，合并效应量 *WMD* ＝－ 1.10，95%*CI* ＝－ 3.83 ～ 1.63，*P* ＝ 0.429，提示 ABA 治疗前后 RA-ILD 患者 FVC%pred 的差异无统计学意义，见图 3A。

② 治疗前后 DLCO%pred 变化：共 2 项研究 [15-16] 的结局指标涉及 ABA 治疗前后的 DLCO%pred。异质性检验：I^2 ＝ 39.5%，*P* ＝ 0.199，应用固定效应模型分析，合并效应量 *WMD* ＝ 0.65，95%*CI* ＝－ 2.24 ～ 3.53，*P* ＝ 0.661，提示 ABA 治疗前后 RA-ILD 患者 DLCO%pred 的差异无统计学意义，见图 3B。

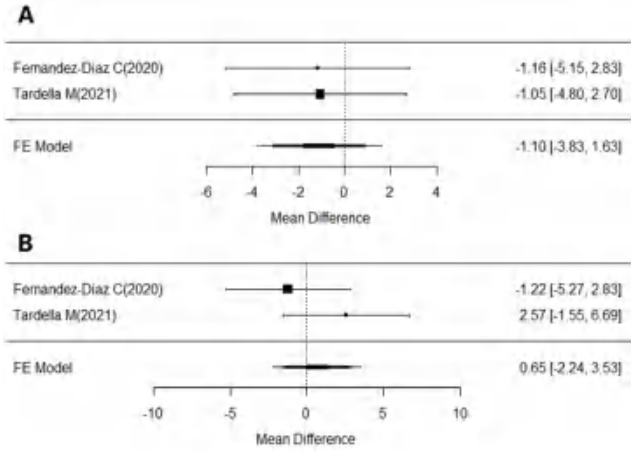


图 3　ABA 治疗前后 RA-ILD 患者肺功能指标 FVC%pred（A）及 DLCO%pred（B）变化的森林图

Fig 3　Change of pulmonary function FVC%pred（A）and DLCO%pred（B）before and after ABA treatment in patients with RA-ILD

③ 治疗前后 HRCT 变化：共 4 项研究 [15-18] 的结局指标涉及 ABA 治疗前后 HRCT 变化情况。HRCT 好转率：I^2 ＝ 0.0%，*P* ＝ 0.684，应用固定效应模型分析，合并效应量为 0.16，95%*CI* ＝ 0.12 ～ 0.22，提示 ABA 治疗后 16% 的 RA-ILD 患者 HRCT 结果较治疗前好转，见图 4A。HRCT 恶化率：I^2 ＝ 0.0%，*P* ＝ 0.394，认为纳入的研究具有同质性，应用固定效应模型分析，合并效应量为 0.19，95%*CI* ＝ 0.14 ～ 0.24，提示治疗后 19% 的患者 HRCT 结果较治疗前恶化，见图 4B。HRCT 稳定率：I^2 ＝ 61.0%，*P* ＝ 0.055，应用随机效应模型进行分析，合并效应量为 0.69，95%*CI* ＝ 0.57 ～ 0.79，提示治疗后 69% 的患者 HRCT 结果保持稳定，见图 4C；Egger 检验 *P* ＝ 0.063，认为纳入的研究中无明显发表偏倚存在；敏感性分析亦未发现对本次分析结果造成明显干扰的研究；随后展开亚组分析，其中欧洲亚组（I^2 ＝ 32.7%）、回顾性研究亚组（I^2 ＝ 50.0%）和研究人数≥20 人的亚组（I^2 ＝ 32.7%）的 I^2 ≤ 50.0%，提示研究地点、研究设计、研究病例数的差异可能导致了异质性的产生，具体结果见表 3。

2.3.3　TNF-*α* 抑制剂疗效分析　治疗前后 FVC%pred 变化：共 2 项研究 [19-20] 的结局指标涉及 TNF-*α* 抑制剂治疗前后的 FVC%pred。异质性检验：I^2 ＝ 98.7%，*P* ＜ 0.001，纳入的研究间具有

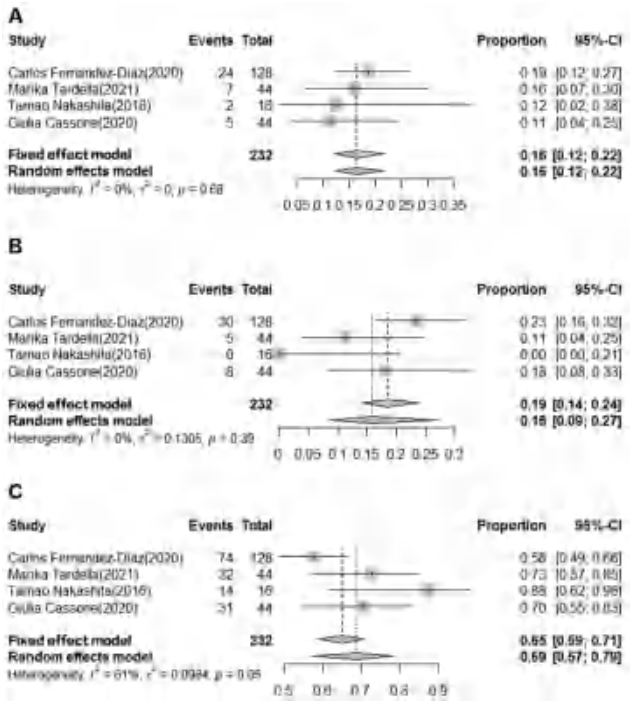


图 4　ABA 治疗前后 RA-ILD 患者 HRCT 变化的森林图

Fig 4　Forest plot for HRCT change before and after ABA treatment in patients with RA-ILD

A. 好转（improvement）；B. 恶化（worsening）；C. 稳定（stability）

表 3　ABA 治疗前后 RA-ILD 患者 HRCT 变化的亚组分析结果

Tab 3　Subgroup analysis of HRCT change before and after ABA treatment in patients with RA-ILD

亚组		研究数量	总效应量（95%*CI*）	异质性检验	
				I^2/%	*P*
研究地区	欧洲	3	0.66（0.56，0.75）	32.7	0.226
	亚洲	1	0.88（0.70，1.05）	—	—
研究设计	前瞻性	2	0.64（0.50，0.79）	57.3	0.126
	回顾性	2	0.79（0.62，0.95）	50.0	0.157
病例数	＜20	1	0.88（0.70，1.05）	—	—
	≥20	3	0.66（0.56，0.75）	32.7	0.226
随访时间 / 月	＜24	3	0.72（0.55，0.89）	76.1	0.015
	≥24	1	0.70（0.54，0.87）	—	—

极强的异质性，不能进行合并。Detorakis 等[19]的研究结果显示，应用 TNF-*α* 抑制剂治疗前后患者的 FVC%pred 差异无统计学意义（$P > 0.05$）；牛灵芝等[20]的研究结果显示，应用 TNF-*α* 抑制剂治疗后患者的 FVC%pred 较治疗前有显著改善（$P < 0.001$）。

2.3.4　安全性分析　共有 3 项研究[11，14-15]报告了 RA-ILD 患者接受生物制剂治疗后的不良事件发生率。其中 2 项关于 RTX，1 项关于 ABA。在关于 RTX 的 2 项研究[11，14]中，总体不良事件发生率：异质性检验 $I^2 = 0.0\%$，$P = 0.928$，应用固定效应模型分析，合并效应量 0.33，95%*CI* = 0.21 ～ 0.45，提示 33% 的 RA-ILD 患者接受 RTX 治疗后出现不良反应，见图 5A；呼吸道或泌尿系感染发生率：异质性检验 $I^2 = 0.0\%$，$P = 0.655$，应用固定效应模型分析，合并效应量 0.11，95%*CI* = 0.06 ～ 0.22，提示 11% 的患者出现呼吸道或泌尿系感染，见图 5B；IgG 和 / 或 IgM 低丙种球蛋白血症发生率：异质性检验 $I^2 = 0.0\%$，$P = 0.670$，应用固定效应模型分析，合并效应量 0.08，95%*CI* = 0.03 ～ 0.18，提示 8% 的患者在治疗后出现 IgG 和 / 或 IgM 低丙种球蛋白血症，见图 5C；短暂性轻度中性粒细胞减少症发生率：异质性检验 $I^2 = 0.0\%$，$P = 0.543$，应用固定效应模型分析，合并效应量 0.05，95%*CI* = 0.02 ～ 0.14，提示 5% 的患者治疗后出现短暂性轻度中性粒细胞减少症，见图 5D；不良事件相关的死亡发生率：异质性检验 $I^2 = 0.0\%$，$P = 0.973$，应用固定效应模型分析，合并效应量 0.07，95%*CI* = 0.02 ～ 0.16，提示 7% 的患者接受 RTX 治疗后出不良事件相关的死亡，见图 5E。而在关于 ABA 的 1 项研究[15]中，总体不良事件发生率为 11%，其中呼吸道或泌尿系感染发生率为 10%。

3　讨论

RA-ILD 是 RA 患者最严重的并发症之一，生物制剂在 RA-ILD 患者，尤其是常规治疗无效者的治疗中逐渐得到广泛应用。RTX 是一种作用于 B 淋巴细胞表面 CD20 受体的单克隆抗体，通过诱导 CD20 阳性 B 细胞消耗来减少自身抗体的产生及细胞因子的释放[21]，而 RA-ILD 患者肺活检标本中滤泡 B 细胞增生和浆细胞浸润为靶向 B 细胞治疗提供了理论基础[22]；ABA 是一种 T 细胞共刺激信号阻滞剂，通过与抗原递呈细胞表面上的 CD80 和 CD86 结合抑制 T 细胞活化[23]，研究表明 ABA 能在体外抑制 RA 患者单个核细胞向成熟纤维细胞的分化[24]；包括 ETN、IFX 及 ADA 等在内的 TNF-*α* 抑制剂主要通过阻断 TNF-*α* 发挥生物学效应，动物实验证实抗 TNF-*α* 治疗可有效减轻 RA 小鼠模型的肺部炎症[25]。多个研究表明在 RA 的治疗中，生物制剂具有稳定或改善患者肺部病变的功效；同时亦有研究指出生物制剂与 RA 肺部不良反应的发生有关，可能诱发或加重 RA-ILD。因此，生物制剂在 RA-ILD 治疗中疗效及安全性尚有争议，需要进一步探究。本文通过 meta 分析对现有的生物制剂治疗 RA-ILD 相关研究中疗效与安全性结果进行定量合成，以期获得比单个研究更全面、准确的评价结果。

本次 meta 分析共纳入了 10 项研究。有关

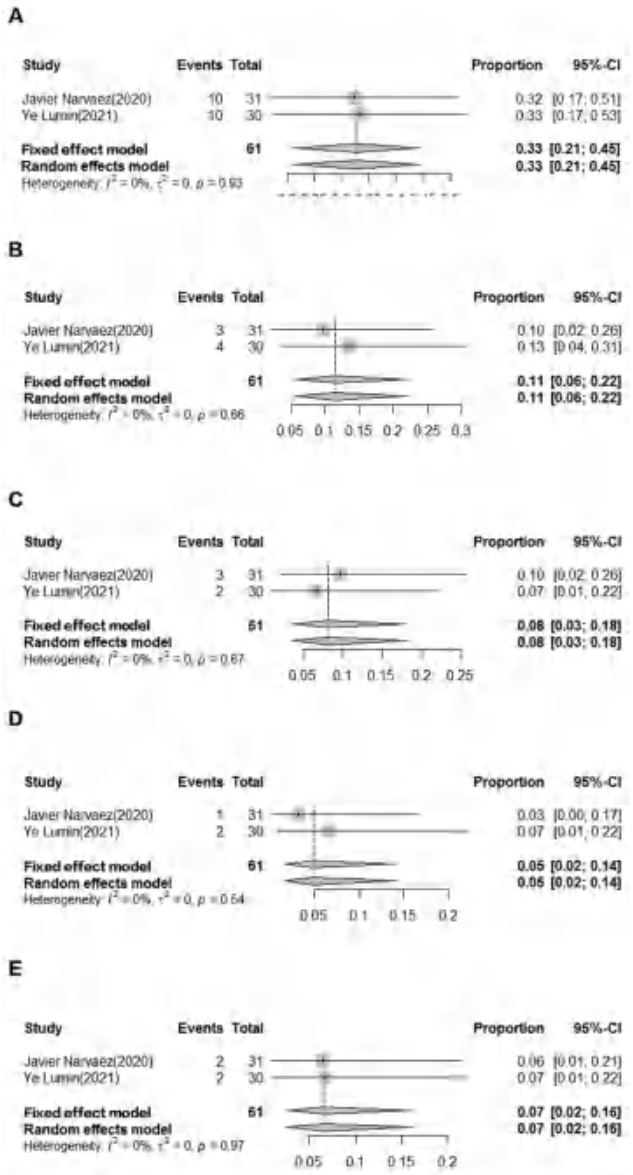


图 5　RTX 治疗 RA-ILD 不良事件发生率森林图

Fig 5　Forest plot for pooled proportion of adverse events of RTX for RA-ILD

A. 总体不良事件（overall adverse events）；B. 呼吸道或泌尿系感染（respiratory or urinary infections）；C. IgG 和 / 或 IgM 低丙种球蛋白血症（IgG and/or IgM hypogammaglobulinemia）；D. 短暂性轻度中性粒细胞减少症（transient mild neutropenia）；E. 不良事件相关的死亡（death related to adverse events）

RTX 的 4 项研究 [11-14] 进行效应量合并后的结果表明：治疗后 RA-ILD 患者的 FVC%pred 较治疗前有所改善，而 DLCO%pred 保持稳定。亚组分析显示随访观察时间＜24 个月的亚组治疗后的 DLCO%pred 和治疗前相比保持稳定，而在≥24 个月的亚组中则有明显改善；从 Narváez 等 [11] 和叶路敏等 [14] 的文章提供的患者接受 RTX 治疗 1 年和 2 年时的肺功能结果可看出，RTX 干预 2 年时 FVC%pred 和 DLCO%pred 相较干预 1 年升高，推测长期应用 RTX 能得到比短期治疗更好的效果。在关于 ABA 的 4 项研究 [15-18] 中，有 2 项研究 [15-16] 提供了患者治疗前后的肺功能结果，从效应量合并的结果可以了解到，ABA 治疗前后 RA-ILD 患者的 FVC%pred 和 DLCO%pred 均保持稳定；4 项研究均提供了患者治疗前后 HRCT 的变化情况，HRCT 的合并好转率、稳定率、恶化率分别为 16%、69%、19%，即大部分患者的 HRCT 未出现恶化表现。有关 TNF-*α* 抑制剂的 2 项研究 [19-20] 提供了患者治疗前后患者的 FVC%pred，这 2 项研究间存在极强异质性，推测可能与两者使用的 TNF-*α* 抑制剂种类不同有关，Detorakis 等 [19] 的研究中纳入了接受 3 种不同 TNF-*α* 抑制剂（IFX、ETN、ADA）治疗的患者，治疗前后 FVC%pred 的差异无统计学意义；而牛灵芝等 [20] 的研究中所有研究对象均接受 ADA 治疗，治疗后的 FVC%pred 较治疗前明显改善。总体来说，RTX、ABA、TNF-*α* 抑制剂这三类生物制剂都有阻止 RA-ILD 患者肺功能参数下降及影像学表现恶化的作用。

纳入的部分研究还给出了生物制剂治疗前后其他指标的变化情况，治疗后 DAS28 评分 [11，14-15，17，19]、使用的泼尼松剂量 [15，19] 及 C 反应蛋白水平 [20] 均较治疗前明显降低，提示生物制剂在降低 RA-ILD 患者疾病活动度及减少激素用量方面也有良好效果。

由于检索到有关托珠单抗（TCZ）的文献仅一篇符合纳入标准，本次 meta 分析未纳入相关研究。Manfredi 等 [26] 进行的一项回顾性研究显示，28 例接受 TCZ 治疗的 RA-ILD 患者中，多数患者的 FVC%pred 和 DLCO%pred 好转或保持稳定（5 例好转，14 例稳定），25 例患者的 HRCT 保持稳定，提示 TCZ 也是治疗 RA-ILD 的选择之一。

目前已有研究对不同类型生物制剂的疗效进行了对比：Kurata 等 [27] 的一项回顾性研究纳入了 49 例 RA-ILD 患者（30 例使用 TNF-*α* 抑制剂，12 例使用 ABA，7 例使用 TCZ），多因素回归分析的结果显示使用 ABA 的患者较其他两种的预后更好；Cubero 等 [28] 的系统评价则提到 RTX 和 ABA 比 TNF-*α* 抑制剂有更好的效果。但更具说服力的结论需依靠规模更大设计更严谨的前瞻性研究得出。

本次纳入的研究显示，呼吸道感染是 RTX 和 ABA 的主要不良反应，反复、严重的呼吸道感染则是患者停药和死亡的重要原因 [11，13，15]。虽然本次纳入的文献中未给出关于 TNF-*α* 抑制剂安全性方面的数据，但既往多个研究显示使用 TNF-*α* 抑制剂的患者的严重感染发生率高于使用 ABA

或 RTX 的患者[29-31]，Yun 等[31]的研究还指出使用 ABA 的 RA 患者的住院感染发生率是这三类生物制剂中最低的。除严重呼吸道感染外，非感染性呼吸道不良反应，如 ILD 本身的进展和药物过敏反应引起的肺炎等，也值得关注，Nakashita 等[32]的研究指出，使用 TNF-α 抑制剂治疗的 RA 患者 ILD 新发或进展风险均高于使用 ABA 和 TCZ 的患者。总体来说，生物制剂干预 RA-ILD 患者的不良事件发生率及病死率较低；且目前普遍认为，相较 TNF-α 抑制剂，ABA 和 RTX 的安全性更高[33-34]。尽管生物制剂的安全性尚可接受，但严重的不良反应有导致患者病情恶化甚至死亡的风险，需要引起临床医师的重视，在治疗开始前谨慎评估获益和潜在风险并告知患者，决定使用后采取预防措施并严密监测不良反应的发生。

本研究有一定的局限性。首先，目前关于生物制剂治疗 RA-ILD 的大多数研究规模较小，总样本量较少。其次，检索到的关于生物制剂治疗 RA-ILD 的文献多为单臂研究，通过对比治疗前后情况得出结论，很少有 RCT，因此难以排除吸烟情况、ILD 亚型等因素对疾病进展的影响。此外，多数研究中患者同时接受 csDMARDs 和生物制剂治疗，在缺少单用 csDMARDs 的对照组的情况下无法将生物制剂和常规治疗的效果进行对比，对肺部进展的影响不能明确归因于生物制剂本身；然而纳入研究的患者多因传统治疗无效才加用了生物制剂，且部分提供生物制剂单药疗效数据的研究也显示，是否联合 csDMARDs 对最终结果无显著影响[12，35]。

综上，生物制剂是治疗 RA-ILD 的有效方法，有利于患者肺部及全身情况的稳定和改善；尽管生物制剂安全性尚可，但在选择和使用过程中，临床医师要对其不良反应有足够的重视。想要更准确和全面地评估生物制剂在 RA-ILD 患者中疗效和安全性，还需要更多大规模高质量的随机对照研究。

参考文献

[1] Smolen JS，Aletaha D，Mcinnes IB. Rheumatoid arthritis [J]. Lancet，2016，388（10055）：2023-2038.

[2] Kadura S，Raghu G. Rheumatoid arthritis-interstitial lung disease：manifestations and current concepts in pathogenesis and management [J]. Eur Respir Rev，2021，30（160）：210011.

[3] Fraenkel L，Bathon JM，England BR，et al. 2021 American College of Rheumatology guideline for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheumatol，2021，73（7）：1108-1123.

[4] Smolen JS，Landewé R，Bijlsma J，et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs：2019 update [J]. Ann Rheum Dis，2020，79（6）：685-699.

[5] Roubille C，Haraoui B. Interstitial lung diseases induced or exacerbated by DMARDS and biologic agents in rheumatoid arthritis：a systematic literature review [J]. Semin Arthritis Rheum，2014，43（5）：613-626.

[6] Chen J，Chi S，Li F，et al. Biologics-induced interstitial lung diseases in rheumatic patients：facts and controversies [J]. Expert Opin Biol Ther，2017，17（3）：265-283.

[7] Arnett FC，Edworthy SM，Bloch DA，et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum，1988，31（3）：315-324.

[8] Aletaha D，Neogi T，Silman AJ，et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria：an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative [J]. Arthritis Rheum，2010，62（9）：2569-2581.

[9] Munn Z，Barker TH，Moola S，et al. Methodological quality of case series studies：an introduction to the JBI critical appraisal tool [J]. JBI Evid Synth，2020，18（10）：2127-2133.

[10] Tufanaru C，Munn Z，Aromataris E，et al. Critical appraisal checklist for randomized controlled trials [EB/OL]. https：//jbi. global/critical-appraisal-tools，2020-01-01/2022-09-20.

[11] Narváez J，Robles-Pérez A，Molina-Molina M，et al. Real-world clinical effectiveness of rituximab rescue therapy in patients with progressive rheumatoid arthritis-related interstitial lung disease [J]. Semin Arthritis Rheum，2020，50（5）：902-910.

[12] Md Yusof MY，Kabia A，Darby M，et al. Effect of rituximab on the progression of rheumatoid arthritis-related interstitial lung disease：10 years' experience at a single centre [J]. Rheumatology（Oxford），2017，56（8）：1348-1357.

[13] Fui A，Bergantini L，Selvi E，et al. Rituximab therapy in interstitial lung disease associated with rheumatoid arthritis [J]. Intern Med J，2020，50（3）：330-336.

[14] 叶路敏，赵美芳，应婉倩 . 利妥昔单抗抢救治疗在进行性类风湿关节炎相关性间质性肺疾病患者中的应用价值 [J]. 广东医学，2021，42（7）：854-857.

[15] Fernández-Díaz C，Castañeda S，Melero-González RB，et al. Abatacept in interstitial lung disease associated with rheumatoid arthritis：national multicenter study of 263 patients [J]. Rheumatology（Oxford），2020，59（12）：3906-3916.

[16] Tardella M，Di Carlo M，Carotti M，et al. Abatacept in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease：short-term outcomes and predictors of progression [J]. Clin

Rheumatol，2021，40（12）：4861-4867.

[17] Nakashita T，Ando K，Takahashi K，et al. Possible effect of abatacept on the progression of interstitial lung disease in rheumatoid arthritis patients [J]. Respir Investig，2016，54（5）：376-379.

[18] Cassone G，Manfredi A，Atzeni F，et al. Safety of abatacept in italian patients with rheumatoid arthritis and interstitial lung disease：a multicenter retrospective study [J]. J Clin Med，2020，9（1）：277.

[19] Detorakis EE，Magkanas E，Lasithiotaki I，et al. Evolution of imaging findings，laboratory and functional parameters in rheumatoid arthritis patients after one year of treatment with anti-TNF-α agents [J]. Clin Exp Rheumatol，2017，35（1）：43-52.

[20] 牛灵芝，杨浩杰，牛晨，等 . 高分辨率 CT 联合血清学指标考察阿达木单抗对 RA/ILD 患者的临床疗效 [J]. 实用放射学杂志，2020，36（12）：1933-1936.

[21] Pescovitz MD. Rituximab，an anti-CD20 monoclonal antibody：history and mechanism of action [J]. Am J Transplant，2006，6（5 Pt 1）：859-866.

[22] Atkins SR，Turesson C，Myers JL，et al. Morphologic and quantitative assessment of CD20 ＋ B cell infiltrates in rheumatoid arthritis-associated nonspecific interstitial pneumonia and usual interstitial pneumonia [J]. Arthritis Rheum，2006，54（2）：635-641.

[23] 徐东，曾小峰 . 阿巴西普治疗类风湿关节炎的机制及临床研究进展 [J]. 中华风湿病学杂志，2020，24（10）：702-709.

[24] Tenstad HB，Vinholt PJ，Nielsen C，et al. In vitro effect of biological and conventional disease-modifying antirheumatic drugs on fibrocyte differentiation in patients with rheumatoid arthritis and healthy controls [J]. Eur J Rheumatol，2021，8（4）：184-189.

[25] Wu EK，Henkes ZI，Mcgowan B，et al. TNF-induced interstitial lung disease in a murine arthritis model：accumulation of activated monocytes，conventional dendritic cells，and CD21（＋）/CD23（－）B cell follicles is prevented with anti-TNF therapy [J]. J Immunol，2019，203（11）：2837-2849.

[26] Manfredi A，Cassone G，Furini F，et al. Tocilizumab therapy in rheumatoid arthritis with interstitial lung disease：a multicentre retrospective study [J]. Intern Med J，2020，50（9）：1085-1090.

[27] Kurata I，Tsuboi H，Terasaki M，et al. Effect of biological disease-modifying anti-rheumatic drugs on airway and interstitial lung disease in patients with rheumatoid arthritis [J]. Intern Med，2019，58（12）：1703-1712.

[28] Cubero CC，Carmona CE，Casasempere PV. Systematic review of the impact of drugs on diffuse interstitial lung disease associated with rheumatoid arthritis [J]. Reumatol Clin（Engl Ed），2021，17（9）：504-513.

[29] Zamora-Legoff JA，Krause ML，Crowson CS，et al. Risk of serious infection in patients with rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease [J]. Clin Rheumatol，2016，35（10）：2585-2589.

[30] Chen SK，Liao KP，Liu J，et al. Risk of hospitalized infection and initiation of abatacept versus tumor necrosis factor inhibitors among patients with rheumatoid arthritis：a propensity score-matched cohort study [J]. Arthritis Care Res（Hoboken），2020，72（1）：9-17.

[31] Yun H，Xie F，Delzell E，et al. Comparative risk of hospitalized infection associated with biologic agents in rheumatoid arthritis patients enrolled in medicare [J]. Arthritis Rheumatol，2016，68（1）：56-66.

[32] Nakashita T，Ando K，Kaneko N，et al. Potential risk of TNF inhibitors on the progression of interstitial lung disease in patients with rheumatoid arthritis [J]. BMJ Open，2014，4（8）：e5615.

[33] Druce KL，Iqbal K，Watson KD，et al. Mortality in patients with interstitial lung disease treated with rituximab or TNFi as a first biologic [J]. RMD Open，2017，3（1）：e473.

[34] Holroyd CR，Seth R，Bukhari M，et al. The British society for rheumatology biologic DMARD safety guidelines in inflammatory arthritis [J]. Rheumatology（Oxford），2019，58（2）：e3-e42.

[35] Fernández-Díaz C，Atienza-Mateo B，Castañeda S，et al. Abatacept in monotherapy versus combined in interstitial lung disease of rheumatoid arthritis-multicentre study of 263 Caucasian patients [J]. Rheumatology（Oxford），2021，61（1）：299-308.

（收稿日期：2022-08-21；修回日期：2022-09-27）

智能药柜在医疗机构病区用药安全的系统评价

倪倩[1]，方丽涌[2]，齐伟[1]，陈露露[1]，周莫菲[1]，金鹏飞[1*]（北京医院，国家老年医学中心，中国医学科学院老年医学研究院，1. 药学部，北京市药物临床风险与个体化应用评价重点实验室；2. 信息中心，北京　100730）

摘要：目的　利用系统评价的方法对智能药柜（ADC）在医疗机构中的用药安全进行分析。**方法**　系统检索 PubMed、Cochrane、Embase、中国知网、万方和维普数据库，依据纳排标准，筛选文献，对文献进行质量评价，分析纳入研究的内容和结论。**结果**　共纳入 8 篇研究，纳入文献质量较好；3 篇研究通过条形码扫码策略，标记近效期药品并定期更换和将有效期的检查措施，降低了超过有效期药品构成比；1 篇研究通过制订 ADC 储存看似听似（LASA）药品管理策略，筛查出的 LASA 药品的构成比为 70%；3 篇研究通过准确填补、高警示药品存放维护和每月清点等核查策略，降低了调配差错率。1 篇研究定性描述了安全用药的责任归属、摆放环境和药品发放方面的内容。**结论**　本文系统综述了 ADC 的用药安全的策略和结论，为 ADC 在医疗机构的安全使用提供循证证据。

关键词：智能药柜；用药安全；系统评价
中图分类号：R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-1070-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.037

Systematic evaluation of medication safety of automated dispensing cabinet's in wards hospital

NI Qian[1], FANG Li-yong[2], QI Wei[1], CHEN Lu-lu[1], ZHOU Mo-fei[1], JIN Peng-fei[1*] (*1. Department of Pharmaceutical Sciences, Beijing Key Laboratory of Assessment of Clinical Drug Risks and Individual Application*; 2. *Information Center; Chinese Academy of Medical Sciences, National Center of Gerontology, Institute of Geriatric Medicine, Beijing Hospital, Beijing* 100730)

Abstrat: Objective To analyze the medication safety of automated dispensing cabinet (ADC) in medical institutions systematically. **Methods** We systematically searched the PubMed, Cochrane, Embase, CNKI, Wanfang and VIP databases. According to the acceptance and discharge standard, the literatures were screened and the quality of literatures was evaluated. The content and conclusions of the included studies were analyzed. **Results** Totally 8 studies were included, and the literature quality was good. Through barcode scanning, marking, regular replacement and validity inspection, in three studies, the composition ratio of expired drugs was reduced. In one study, the composition ratio of look alike sound alike (LASA) screened was 70% by developing LASA drug management strategy for drugs storage in ADC. Another three studies showed that the dispensing drug error rate had been reduced through correct filling, safe storage of dangerous or poinsonous medicines and monthly inventory. One study qualitatively described the responsibility for safe medication, the placement environment of ADC and drug distribution. **Conclusion** This paper reviews the strategy and conclusion of drug safety of ADC to provide evidence for the safe use of ADC in medical institutions.

Key words: automated dispensing cabinet; medication safety; system evaluation

基金项目：中央高水平医院临床科研业务费资助（No.BJ-2021-223）。
作者简介：倪倩，女，硕士，副主任药师，主要从事医院药学、药物评价工作，email：niqianqian@163.com　*通信作者：金鹏飞，男，主任药师，博士研究生导师，主要从事医院药学工作，email：j790101@163.com

智能药柜（automated dispensing cabinets，ADC）是指采用自动化药品管理方式管理、储存和分发的药品[1]。ADC 是一种自带电子锁的药品储备柜，当处方或者医嘱用药信息进入 ADC 的信息系统后，指定的药品储备单元会弹开，提供药品，并且整个过程会有电子监控记录。随着 ADC 在国内医疗机构的广泛使用，ADC 自身的用药安全问题受到越来越多的关注。ADC 与传统的药品储备柜不同，如何保障 ADC 药品调配准确性，减少用药差错事件发生，是 ADC 在安全使用过程中的重要内容[2]。

美国用药安全实践研究所（Institute for Safe Medication Practices，ISMP）和美国卫生系统药师协会（American Society of Health-System Pharmacists，ASHP）分别制定了 ADC 安全储存药品的指南[3-4]，ISMP 主要从建立安全使用系统、监控系统和库存管理系统等方面进行了明确的要求[3]。2016 年，合理用药国际网络中国中心组临床安全用药组指出 ADC 应用环节的用药错误和防范指导[5]。尚未有系统评价基于临床研究，分析 ADC 在医疗机构中真实的使用环境中，用药差错的风险模型，相关措施产生的具体效果。本文采用系统评价的方法对 ADC 在医疗机构中的风险点和防范措施进行分析和评价，干预前后的结局指标对比分析，为 ADC 在医疗机构的安全使用提供循证证据。

1　资料与方法

1.1　资料

1.1.1　纳入标准　研究类型：用定性或定量方法研究 ADC 使用过程中的用药安全的研究，若为定量研究不限队列或者 RCT 研究；仅限于在医疗机构中开展的研究，主要指住院病区，排除在门诊、急诊和手术室使用 ADC 的研究，因为这些部门的工作流程可能与住院病区有本质上的不同。研究对象：ADC 的用药安全，包括影响 ADC 用药安全的相关因素和实施方案。结局指标：量化指标包括看似听似（look alike sound alike，LASA）药品构成比、超过有效期药品（过期药品）构成比和调配差错率；定性描述可以包括技术、工作流程或者实施措施对 ADC 的用药安全产生的效果。

1.1.2　排除标准　重复报道的文献；研究类型不符的文献；综述论文和会议摘要；没有提供措施方案或者展现用药安全风险点的研究。

1.2　方法

1.2.1　检索策略　系统检索 PubMed、Cochrane、Embase 英文数据库，以及中国知网（CNKI）、万方数据库（Wanfang）和维普（VIP）中文数据库，中文检索词包括：智能药柜，电子药柜，智能药车，电子药车；英文检索词包括："Automated Dispensing Cabinet*""Automated Dispensing Vehicle*"，进行主题词和自由词检索，同时补充，手工检索纳入研究的参考文献。检索时间为建库至 2022 年 7 月 30 日。

1.2.2　文献筛选、数据提取和质量评价　由 2 名评价者独立地根据纳入排除标准筛选文献并提取相关内容和数据。如遇不同意见咨询第 3 位评价者解决。在提取内容时，对纳入的研究进行质量评估，按照设计的数据提取表分别对纳入研究进行数据和信息提取，内容包括研究的基本特征，如开展研究 ADC 使用情况、研究类型、研究内容、研究药物种类、研究目的和研究时间等信息。本文依据 PRISMA 2020 版清单[6-7]中适用项目的要求进行系统评价。

采用纽卡斯尔 - 渥太华量表（Newcastle-Ottawa Scale，NOS 量表）[8]对纳入的队列研究进行质量评价，采用 CASP 中定性研究的清单（Critical Appraisal Skills Programme on Qualitative Research）[9]对纳入的定性研究进行质量评价。

1.2.3　结果分析　纳入的定量研究使用了不同的结果衡量标准，没有做定量合并，采用描述性的方式汇总结论，展现提取的数据，定性研究采用相同的方式展现结果。

2　结果

2.1　文献资料

共获得文献 702 篇，包括 PubMed（n = 136），Cochrane（n = 5），Embase（n = 226），中国知网（n = 139），万方（n = 136），维普（n = 60）；去重 177 篇，阅读标题和摘要，初筛得到文献 147 篇，进一步阅读全文，纳入 8 篇。筛选流程见图 1。

纳入的研究中，有 7 篇是定量研究，1 篇是定性研究，4 项研究来自中国，3 项研究来自美国，1 项来自芬兰，纳入文献总体质量较好。

2.2　纳入研究的基本特征

纳入的 ADC 用药安全的研究基本特征及相应结论见表 1。

2.3　加强药品有效期管理的策略和结果

纳入的研究中，有 3 篇[11-12，14]研究了 ADC 储存药品的有效期管理策略和结果。Nanni 等[11]通过每月对 ADC 中的全部药格、开放式药格和

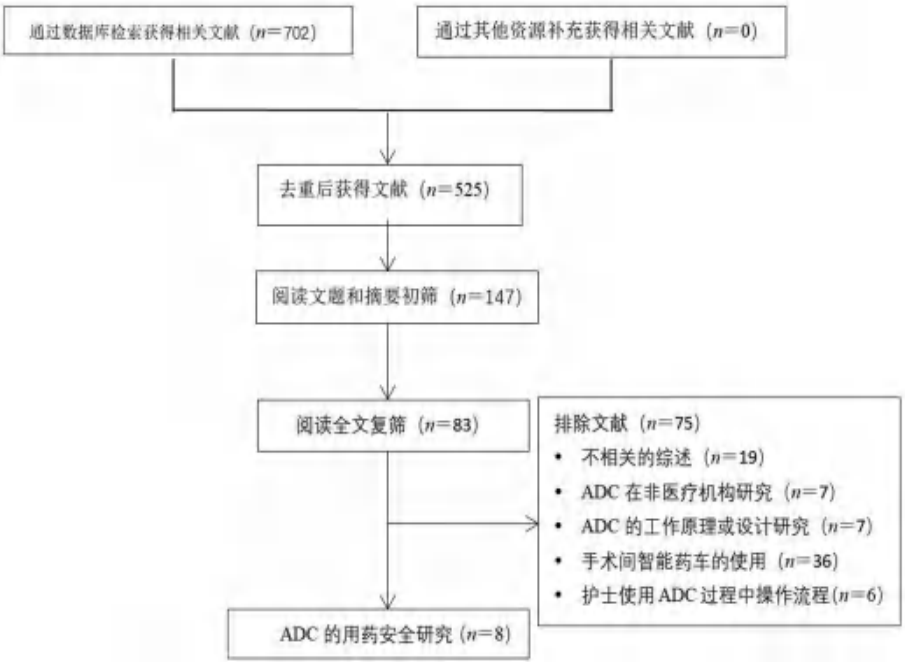


图 1　文献筛选流程图

Fig 1　Literature screening

表 1　纳入 8 篇研究的基本特征

Tab 1　General characteristics of 8 researches

文献	国家	ADC 使用情况	研究类型	研究内容	药物种类	研究目的	研究时间
Ruutiainen 等 2020[10]	芬兰	赫尔辛基大学医院 75 个 ADC	混合方法	对 ADC 中储存的药品进行 LASA 药品管理，包括定义 LASA 标准，制订 LASA 药品目录，评估 ADC 中 LASA 药品储存条件，评估混淆的可能性	全部药物	确定 LASA 药品在 ADC 中的安全储存相关因素	未提及
Nanni 等 2020[11]	美国	北卡罗纳大学医学中心 4 个 ADC	队列研究	观察不同的干预检查方法对 ADC 储存药品中产生过期药品的影响	全部药物	采取措施减少 ADC 中的过期药品	4 个月
Helmons 等 2012[12]	美国	386 张床位的教学医院，27 个 ADC	队列研究	采用一项由预先包装的药物递送和条形码辅助的 ADC 再充装计划，评估 ADC 的补药错误率	全部药物	研究重新填充程序对 ADC 药物填充错误率的影响	5 个月
Mandrack 等 2012[13]	美国	依据 ISMP 的 ADC 安全使用的 12 个方面进行描述分析	定性研究	制订 ADC 的标准化操作流程，包括护士操作 ADC 的流程、药师管理药品、ADC 摆放的环境要求等	全部药物	优化 ADC 的安全使用	未提及
黄灿等 2017[14]	中国	全院 21 个 ADC	队列研究	查找根本原因，实施改进措施	全部药物	减少 ADC 中的过期药品	6 个月
王雪儿等 2019[15]	中国	肿瘤专科全院的 ADC	队列研究	ADC 使用前后工作效率、高警示药品警示有效性和差错率的变化，病区护士对 ADC 的满意度调查	全部药物	评估 ADC 对药师工作量，患者用药安全的影响	6 个月
章建兵等 2020[16]	中国	150 例患者使用的 ADC	队列研究	ADC 使用前后相比较，分析药品管理时间，用药差错和取药错误的情况	麻醉药品	提高麻醉药品管理质量	8 个月
陈瑞娥等 2021[17]	中国	心血管病区的 ADC	队列研究	ADC 使用前后相比较，分析护士配药时间、药品调剂所需要时间、临时医嘱退药次数、药品相关不良事件的发生率的情况	全部药物	优化心血管病区药品管理流程	6 个月

矩阵式药格进行有效期检查的干预策略，与对照组不检查 ADC 中药品有效期相比较，检查 ADC 中所有药品策略的结果：没有发现过期药品；检查开放式药格策略的过期药品构成比为 0.2%，检查矩阵式药格和不进行干预的过期药品均为 0.3%。Helmons 等 [12] 采用条形码扫码策略，使过期药品从干预前的 3 例降到干预后的 1 例；黄灿等 [14] 采用标记近效期药品、放置提示牌，提示

护士取药环节、定期更换药品近效期药品和放置隔板分割有效期等不同的干预措施，使 ADC 中过期药品的构成比从 3.51% 降为 0。具体结果见表 2。

2.4　加强 LASA 药品管理的策略和结果

Ruutiainene 等 [10] 研究了 ADC 储存 LASA 药品管理策略和产生的结果。通过研究 ADC 中储存的药品名称的字母顺序和相似性的评估，逐一检查存储单元，筛查 LASA 药品，发现 LASA 药品的构成比为 70%，其中 16% 的 LASA 药品存在存储风险，4% 的高警示药品没有按照要求存放，分别进行了调整（见表 2）。

2.5　加强药品调配准确性的策略和结果

纳入的研究中，有 3 篇 [15-17] 研究了提高 ADC 中药品调配准确性相关策略和产生的结果，与使用 ADC 之前相比，调配差错率都有下降；有 1 篇 [13] 定性研究了减少用药错误的策略。王雪儿等 [15] 的研究提示了药师和护士从 ADC 取药时的注意要点，包括识别 LASA 药品，正确填补，取药时注意提示语等；章建兵等 [16] 的研究建立了从 ADC 的麻醉药品配备，高警示药品的单独存放，到加强药品核查，医务人员培训和相应的信息反馈机制等全面的措施减少 ADC 调配差错。陈瑞娥等 [17] 的研究考察了包括麻醉一类精神药品、高警示药品和普通药品在内全部药品的调配差错率，使用为药品设置低限值补药的方式，每月清点 ADC 的药品和有效期，使药品相关不良事件的发生率都显著降低（$P < 0.05$）。Mandrack 等 [13] 提出进行 ADC 安全用药挑战，包括减少护士取药的干扰，入职教育和培训，从纸质医嘱到电子医嘱的转变，标准化药物管理实践等（见表 2、3）。

表 2　纳入定量研究的结论

Tab 2　Qualitative data from included studies

文献	策略	结论
Ruutiainen 等 2020[10]	① 建立识别 LASA 药品的标准；② 按照字母顺序，形成 LASA 药品目录；③ 对 ADC 中的 LASA 药品进行评估；④ 逐一检查 ADC 的存储单元，将外包装相似的药品拍照列出；⑤ 评估混淆的可能性	ADC 中的药品中 有 70% 都是 LASA 药品，其中 20% 的 LASA 药品为高警示药品，16% 的 LASA 药品有存储风险，4% 的 LASA 药品没有按照高警示药品储存
Nanni 等 2020[11]	① 每月检查 ADC 中所有药品的有效期；② 每月只检查开放式药格中药品的有效期；③ 每月只检查矩阵式药柜中的药品有效期；④ 没有检查干预措施	经过 3 个月的试验期，出现过期药品的构成比从 0.4% ～ 0.7% 降低到 0.1% ～ 0.3%，其中实施策略 1 的过期药品数为 0，实施策略 2 的过期药品数占 0.2%，策略 3 和 4 的过期药品数均占 0.3%
Helmons 等 2012[12]	药品供应商直接打包 ADC 用药需求，并且附有条形码，可以直接扫码，ADC 相应的抽屉自动打开，补药	措施实施后，ADC 的填充错误有 0.91% 降低到 0.21%（$P < 0.0001$）；干预前有 3 种过期药品，干预后有 1 种过期药品
黄灿等 2017[14]	① 建立健全规章制度；② 加强 ADC 使用人员的培训和考核；③ 合理设置智能药柜药品基数；④ 加强药品有效期管理；⑤ 合理分配 ADC 药品存储空间；⑥ 使用条码技术；⑦ 完善网络系统	措施实施前，过期药品构成比 3.51%；措施实施后，过期药品构成比为 0（$P < 0.05$）
王雪儿等 2019[15]	药师应识别 LASA 药品，调整货位，关注药品数量和有效期，根据指示灯提示，正确填补药品；护士应按照指示灯取药，特殊管理药品注意提示语	使用药柜后的安全性提升了 88.79%，差错率降低了 86.92%
章建兵等 2020[16]	① 使用 ADC 设定药品种类和数量，高警示药品置于里层抽屉里；② 药品核查（有效期，批次和数量）与补药；③ 加强医务人员的培训（护士取药考核）；④ 制订信息反馈机制（易混淆药品及取药过程出现的问题）	ADC 使用之前用药差错和取药错误分别为 7.33% 和 8%，使用后分别为 0.67% 和 0（P 均< 0.05）
陈瑞娥等 2021[17]	① 麻醉一精神药品、高警示药品和普通药品分级管理；药品目录依据使用频率定期调整；② 依据用药频率补药，依据药品设置的低限值补药；③ 每月清点 ADC 中药品数量和有效期	ADC 使用前药品相关不良事件和取药错误的发生率分别为 0.58% 和 0.15%，使用后的发生率分别为 0.06% 和 0.01%（P 均< 0.05）

3　讨论

本文系统综述了 ADC 在医疗机构病区的防范用药错误的相关策略和策略实施后的结果。纳入的 8 篇研究主要包括药品有效期、LASA 药品和调配准确性这三个方面的风险点，采用如不同周期和不同的范围检查有效期的方法、进行 LASA 药品全面筛查、药师审核、优化 ADC 药品管理流程、使用警示标签及入职教育和持续培训等策略，增加识别出 LASA 药品的比例，降低过期药品构成比调配差错率，提高了 ADC 的安全用药水平。Wang 等 [2] 的研究中也提示到，临床护士取用药品时时间紧迫，当存储单元弹开时，

表 3　纳入定性研究的结论

Tab 3　Conclusions of quantitative data extracted from included studies

文献	存在的用药安全隐患	结论
Mandrack 等 2012[13]	护理、药学和院领导建立领导团队负责 ADC 用药安全	评估和优化护理和药学管理 ADC 药品的流程
	ADC 的摆放位置和环境	ADC 应该位于安全的医疗室，投入护理人员至关重要
	ADC 配置	屏幕提供药品信息，带锁的抽屉保障药品安全
	药师管理 ADC 中药品发放	ADC 的药物发放前，由药师审核；重点监测的需警示的药物，选择双人验证功能；停药功能的管理；标准化的药物传递到患者的过程
	安全用药挑战	护士取药穿着“不被打扰”的腰带或者背心，减少干扰，给药是一种被尊重的认知任务
		排队取药，要求更分散的药物分配模式
		需同时对多个患者停药操作易导致差错，入职教育和培训减少护士差错
		从纸质医嘱到电子医嘱的转变，标准化药物管理实践
	药物转移	药师和护士共同承担药物分发的责任
	其他相关的改善	继续教育和培训

需要辨识两种或两种以上的包装相似或者名称相似的药品，很容易发生拿取错误，将 LASA 药品分别码放在不同的存储单元中，从而减少发生调配错误的风险。本研究提示，ADC 的广泛使用必须伴随着各种安全实践措施，同时需要关注风险防控，全面的信息技术和安全监控系统支持 [18]，条形码扫码技术被用作减少过期药品和调配差错的重要手段 [12，14]。另外开发生物识别、特殊存储和报警功能等信息化手段 [4]，最大限度地减少 ADC 使用过程中出现的错误，探究不易发觉的系统差错，是 ADC 未来改进和拓展的重要内容。

在 ADC 使用过程中，部分 ADC 安放在护士不方便取药的位置 [13] 或者环境的照明度较低，这都是发生用药错误的风险因素 [19]。安全的监控系统可以增加 ADC 调配过程的透明度，明确责任人 [20]，与床旁的用药程序建立接口，可显示患者和药品的重要信息都是 ADC 安全运行的有力保障 [3]。对护士的满意度调查中发现，护理人员认为使用 ADC 可以减少分配和准备药品的时间，分配更多的时间用于护理患者，为临床获取药品提供便利，使临床工作轻松 [2，21]。

在国内，病房药房对病区的 ADC 统一管理，建立了以 ADC 为基础的分散调剂的闭环管理模式 [22-23]。ADC 利用信息化手段发挥储存药品和药品调剂的作用，实现了对病区基数药品的精细化管理 [24-25]，提高了医护人员的工作效率 [24]。目前 ADC 已实现对麻醉一类精神药品储存管理 [17，22]，有研究成功将麻醉药品的处方开具、审核，药品调配和账册登记等环节构建了智能管理体系，简化流程，提高了药品调配和批号追踪的准确性 [26-27]。同时完善 ADC 使用操作的各项标准化操作规范，提升 ADC 的规范化操作水平 [28]，提升用药安全管控能力。

综上，定期检查药品有效期，制订 ADC 中储存药品的目录，高警示药品单独存放，药品准确配备等策略，增加了 ADC 中药品的用药安全水平。安全用药管理的策略应该是多角度和多层面的，ADC 的合理规范安全使用，应与各个医疗机构药品分配流程紧密结合 [29]，建立各机构符合实际医疗环境的具体措施。目前纳入的研究，不同的 ADC 操作信息系统的差异，风险点的预测和策略实施显得单一，每个研究中纳入的 ADC 数量较少，未对从 ADC 调配的医嘱条目数进行统计，未来仍需要进一步开展大样本、多中心的研究，以丰富和完善相关证据，获得全面的风险管控模型，为医疗机构提供更好的参考。

参考文献

[1] Balka E，Kahnamoui N，Nutland K，et al. Who is in charge of patient safety? Work practice，work processes and utopian views of automatic drug dispensing systems [J]. Int J Med Inform，2007，76（Suppl）1：S48-57.

[2] Wang YC，Tsan CY，Chen MC，et al. Implementation of an automated dispensing cabinet system and its impact on drug administration：longitudinal study [J]. JMIR Form Res，2021，5（9）：e24542 p1-p7.

[3] Institue for Safe Medication Practices. Guidelines for the Safe Use of Automated Dispensing Cabinets [EB/OL]. https：//www. ismp. org/resources/guidelines-safe-use-automated-dispensing-cabinets [2019-02-07][2022-09-26].

[4] Cello R，Conley M，Cooley T，et al. ASHP guidelines on the safe use of automated dispensing cabinets [J]. Am J Health Syst Pharm，2022，79（1）：e71-e82.

[5] 合理用药国际网络中国中心组临床安全用药组，中国药理学会药源性疾病学专业委员会，中国药学会医院

药学专业委员会，等 . 智能药柜应用环节用药错误识别与防范指导原则 [J]. 药物不良反应杂志，2016，18（2）：83-87.

[6] 高亚，刘明，杨珂璐，等 . 系统评价报告规范：PRISMA 2020 与 PRISMA 2009 的对比分析与实例解读 [J]. 中国循证医学杂志，2021，21（5）：606-616.

[7] Page MJ，Moher D，Bossuyt PM，et al. PRISMA 2020 explanation and elaboration：updated guidance and examplars for reporting systematic reviews [J]. BMJ，2021，372：n160-n196.

[8] Stang Andreas. Critical evaluation of the Newcastle-Ottawa scale for the assessment of the quality of nonrandomized studies in meta-analyses [J]. Eur J Epidemiol，2015，25（9）：603-605.

[9] CASP UK. CASP Checklists. https：//casp-uk. net/images/checklist/documents/CASP-Qualitative-Studies-Checklist/CASP-Qualitative-Checklist-2018_fillable_form. pdf [2018] [2022-9-26].

[10] Ruutiainen HK，Kallio MM，Kuitunen SK. et al. Identification and safe storage of look-alike，sound-alike medicines in automated dispensing cabinets [J]. Eur J Hosp Pharm，2021，28（Suppl 2）：e151-e156.

[11] Nanni AN，Rana TS，Schenkat DH，et al. Screening for expired medications in automated dispensing cabinets [J]. Am J Health Syst Phar，2020，77（24）：2107-2111.

[12] Helmons PJ，Dalton AJ，Daniels CE. Effects of a direct refill program for automated dispensing cabinets on medication-refill errors [J]. Am J Health Syst Pharm，2012，69（19）：1659-1664.

[13] Mandrack M，Cohen MR，Featherling J，et al. Nursing best practices using automated dispensing cabinets：nurses’ key role in improving medication safety [J]. Medsurg Nurs，2012，21（3）：134-144.

[14] 黄灿，朱晓虹，孙岩芳，等 . 病区智能药柜过期药品的根因分析 [J]. 中国药业，2017，26（9）：90-93.

[15] 王雪儿，白羽，张淞，等 . 基于自动化 ADC 的肿瘤专科医院病区基数药品管理与应用 [J]. 中国卫生产业，2019，16（11）：35-40.

[16] 章建兵，付丽丽，翁桂红，等 . 应用 HSD 智能麻醉药品管理柜提高麻醉药品管理质量 [J]. 中医药管理杂志，2020，28（14）：113-114.

[17] 陈瑞娥，郑薇亮，闫丽娟，等 . 智能药柜管理系统在心血管病区药品管理流程优化中的应用价值 [J]. 中西医结合护理（中英文），2021，7（4）：187-189.

[18] Otero López MJ，Vicedo TB，Moreno Gómez AM，et al. Analysis of the implementation of safety practices in the automated medication dispensing cabinets [J]. Farm Hosp，2013，37（6）：469-481.

[19] Grissinger M. Safeguards for using and designing automated dispensing cabinets [J]. PT，2012，37（9）：490-530.

[20] Zheng WY，Lichtner V，Van Dort BA，et al. The impact of introducing automated dispensing cabinets，barcode medication administration，and closed-loop electronic medication management systems on work processes and safety of controlled medications in hospitals：a systematic review [J]. Res Social Adm Pharm，2021，17（5）：832-841.

[21] Metsämuuronen R，Kokki H，Naaranlahti T，et al. Nurses´ perceptions of automated dispensing cabinets-an observational study and an online survey [J]. BMC Nurs，2020，19（27）：1-9.

[22] 徐晋辉，吴青，王甲等自动化智能药柜分散调剂模式闭环管理效果分析 [J]. 中国药业，2020，29（8）：71-74.

[23] 宁华，王玲，佟菲，等 . 基于智能药柜的住院患者用药分散调剂模式构建 [J]. 中国医院药学杂志，2019，39（8）：865-869.

[24] 郝言，刘泽，李小娜等 . 药师应用智能药柜管理病区基数药品的分析与探讨 [J]. 中国药业，2019，28（17）：82-84.

[25] 张琪，梁欣，刘洋，等 . 智能药柜在美国医院的应用概况及在我国的发展 [J]. 中国药房，2016，27（13）：1865-1867.

[26] 邱婷婷，孔宪伟，闫盈盈，等 . 医院病区麻醉药品智能管控体系的构建与实施效果分析 [J]. 药物不良反应杂志，2021，23（8）：403-407.

[27] 沈国荣，王永，石新，等 . 我院中心药房智能麻精药品柜的开发与应用 [J]. 中国医学装备，2017，7：332-336.

[28] 周林光，孔火旺，段京莉 . 智能药品存储设备在医疗单元应用的文献计量分析 [J]. 中国处方药，2022，20（1）：18-21.

[29] Tsao NW，Lo C，Babich M，et al. Decentralized automated dispensing devices：systematic review of clinical and economic impacts in hospitals [J]. Can J Hosp Pharm，2014，67（2）：138-148.

（收稿日期：2022-08-31；修回日期：2022-10-26）

替加环素致凝血功能异常预测模型构建

李亚[1]，汪晓娟[1]，武东[1]，魏浩洁[1]，程丹丹[2]，余美玲[3*]（1. 阜阳市人民医院药剂科，安徽　阜阳　236000；2. 阜阳市人民医院肝胆胰外科，安徽　阜阳　236000；3. 蚌埠医学院第一附属医院药剂科，安徽　蚌埠　233004）

摘要：目的　研究替加环素对患者凝血功能的影响，分析危险因素，并建立其致凝血异常的预测模型。**方法**　对 2020 年 1 月至 2022 年 10 月使用替加环素患者进行回顾性分析，运用 Logistic 回归分析找出替加环素致凝血异常的独立危险因素，建立预测模型，并通过受试者工作特征（ROC）曲线和 Hosmer-Lemeshow 拟合优度检验对其效果进行综合评价。**结果**　187 例患者凝血功能异常发生率 35.83%。异常组患者在出血事件方面明显高于正常组患者（37.31% *vs* 15.83%，$P = 0.001$），主要集中在消化道方面。替加环素使用疗程（$OR = 3.56$，95%*CI*：1.325 ～ 9.569，$P = 0.012$）、日剂量（$OR = 2.772$，95%*CI*：1.324 ～ 5.802，$P = 0.007$）是凝血功能异常的独立危险因素；血红蛋白水平（$OR = 3.519$，95%*CI*：1.584 ～ 7.819，$P = 0.002$）是凝血异常的保护因素。构建替加环素致凝血异常的预测模型，Logit（P）$= -2.863 + 1.258X_2 + 1.270X_3 + 1.019X_4$，当 Logit（$P$）$> 0.3604$ 时，提示替加环素导致凝血异常风险高。**结论**　替加环素致凝血异常发生率较高，对血红蛋白水平较低、长疗程、大剂量使用的患者，应加强监测，确保用药安全。

关键词：替加环素；凝血功能；危险因素；Logistic 回归分析；预测因子
中图分类号：R978.1　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-1076-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.038

Predictive model for coagulation disorders induced by tigecycline

LI Ya[1], WANG Xiao-juan[1], WU Dong[1], WEI Hao-jie[1], CHENG Dan-dan[2], YU Mei-ling[3*] (1. *Department of Pharmacy*, *Fuyang People's Hospital*, *Fuyang Anhui* 236000; 2. *Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery*, *Fuyang People's Hospital*, *Fuyang Anhui* 236000; 3. *Department of Pharmacy*, *The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College*, *Bengbu Anhui* 233004)

Abstract: Objective To determine the influence factors of tigecycline on the coagulation of patients, and to establish a prediction model for the coagulation disorders. **Methods** Patients who used tigecycline from January 2020 to October 2022 were retrospectively analyzed. The independent risk factors for coagulation disorders induced by tigecycline were identified with Logistic regression analysis. Then we established a prediction mode, whose effect was comprehensively evaluated by the receiver operating characteristic (ROC) curve and Hosmer-Lemeshow test. **Results** Abnormal coagulation occurred in 187(35.83%) patients. Bleeding of patients in the abnormal group was significantly higher than that in the normal group (37.31% *vs* 15.83%, $P = 0.001$), mainly in the digestive tract. The treatment course ($OR = 3.56$, 95%*CI*: 1.325 ～ 9.569, $P = 0.012$), and daily dose ($OR = 2.772$, 95%*CI*: 1.324 ～ 5.802, $P = 0.007$) were independent risk factors. The hemoglobin level ($OR = 3.519$, 95%*CI*: 1.584 － 7.819, $P = 0.002$) was the protective factor. The prediction model of coagulation abnormalities caused by

基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（No.82204525）；安徽省自然科学基金面上项目（No.1908085MH293）；白求恩医学科学研究基金（No.B19071EN）。
作者简介：李亚，男，主管药师，主要从事临床药学工作，email：ysliya@126.com　*通信作者：余美玲，女，博士，主任药师，主要从事临床药学和医院药事管理工作，email：yumeiling409@sohu.com

tigecycline was set up: Logit (P) = $-2.863 + 1.258X_2 + 1.270X_3 + 1.019X_4$. When Logit ($P$) was over 0.3604, higher risks of coagulation abnormalities due to tigecycline were suggested. **Conclusion** Tigecycline may increase the incidence of coagulation abnormalities especially among patients with low hemoglobin level, long treatment course and high dose of tigecycline.

Key words: tigecycline; coagulation function; risk factor; Logistic regression analysis; predictive factor

替加环素是首个甘氨酰环素类抗菌药物，因其耐药率低、抗菌谱广、安全有效，在治疗耐药细菌所致感染中常被推荐[1-2]。随着替加环素的广泛应用，对其不良反应的报道也逐渐增多，其中凝血功能异常的报道陆续出现[3-4]。替加环素致凝血功能异常可能是影响维生素 K 及纤维蛋白原（FIB）的合成造成的[5-6]。目前，对替加环素致患者凝血异常影响因素的研究还较少，本文通过分析应用替加环素患者的资料，对比正常组与异常组实验室检查及用药情况等，寻找凝血异常的危险因素，并应用受试者工作特征（ROC）曲线对凝血异常发生概率进行预测，对具有高危因素的患者加强监测、必要时给予干预，降低发生凝血功能异常的风险，旨在保障患者用药安全。

1　资料与方法

1.1　研究对象

采用回顾性分析法，以阜阳市人民医院 2020 年 1 月至 2022 年 10 月使用替加环素患者为研究对象，另选取 2022 年 11 月至 2023 年 2 月使用替加环素患者用于交叉验证预测模型的准确率。入选标准：用药前后均有凝血功能监测。排除标准：① 年龄＜ 18 岁；② 对甘氨酰环素类抗菌药物过敏；③ 替加环素疗程＜ 72 h；④ 用药前后凝血功能检测缺乏；⑤ 有血友病、原发性血小板减少性紫癜等疾病。参照“实验诊断学”及我院检验值范围，凝血功能异常定义为凝血酶原时间（PT）延长超过 3 s 或活化部分凝血活酶时间（APTT）延长超过 10 s[7]。依据凝血功能是否异常，分为正常组和异常组。本研究获阜阳市人民医院伦理委员会审批（医伦理审查 [2022]178 号）。

1.2　治疗方法

所有患者用药途径均为静脉输注，给药方法主要分为两种。① 使用常规推荐剂量：首剂 100 mg 负荷，维持剂量 50 mg q12h；② 超说明书剂量：首剂 200 mg 负荷，维持剂量 100 mg q12h。用药剂量、疗程由医师根据患者病情、感染部位、微生物培养结果及患者肝肾功能等情况决定。

1.3　数据收集

通过医院电子病历信息系统（HIS）检索病历，并用 EXCEL 表格记录相关信息。① 患者信息：姓名、性别、年龄、住院号、入院时间、出院时间、基础疾病（心血管、脑血管等）、主要诊断、临床转归等；② 实验室检查：血红蛋白（HGB）、血小板计数（PLT）、血钙（Ca^{2+}），谷丙转氨酶（ALT）、血肌酐（Cr）、降钙素原（PCT）、C- 反应蛋白（CRP）等；③ 感染情况：感染部位，微生物检出结果；④ 凝血功能：PT、APTT 等；⑤ 用药情况：既往用药，替加环素疗程、日剂量，合并用药；⑥ 出血情况：出血部位、输血情况等。

1.4　统计学处理

采用 SPSS 23.0 统计软件进行数据处理，计量资料采用 t 检验或 U 检验以 $\bar{x}\pm s$ 或 M（P_{25}，P_{75}）表示。计数资料使用 χ^2 或 *Fisher* 精确检验。连续变量采用 MedCalc 进行 ROC 曲线分析取截断值。基于单因素分析和 ROC 曲线分析结果进行多因素 Logistic 回归分析，并建立预测模型，采用 ROC 曲线评价预测模型，并交叉验证模型的准确率。采用 R（R3.5.3）软件包列线图分析。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　患者情况

2020 年 1 月至 2022 年 10 月共计 509 例患者使用替加环素，根据纳排标准，最终 187 例患者纳入研究，其中凝血功能正常组 120 例（64.17%），异常组 67 例（35.83%）。

2.2　应用替加环素期间出血部位

异常组和正常组患者出血率分别为 37.31% 和 15.83%，均以消化道出血为主。异常组患者出血事件发生率显著高于正常组患者，亚组分析显示以消化道出血差异具有统计学意义，其余出血部位未见明显差异，具体情况见表 1。

2.3　单因素分析结果

与正常组患者相比，凝血功能异常组患者在年龄（$t = 2.018$，$P = 0.045$）、HGB（$t = 2.368$，$P = 0.018$）、替加环素疗程（$Z = 2.174$，$P = 0.038$）、

表 1　两组患者出血情况

Tab 1　Bleeding in both groups

出血类型	异常组（n = 67）	正常组（n = 120）	χ^2	P
消化道出血	17（25.37）	10（8.33）	10.105	0.001
口腔黏膜出血	2（2.99）	2（1.67）	0.005	0.944
尿路出血	2（2.99）	2（1.67）	0.005	0.944
其他部位出血	4（5.97）	5（4.17）	0.039	0.844
总出血事件	25（37.31）	19（15.83）	11.025	0.001

替加环素日剂量（Z = 2.594，P = 0.009）、休克（χ^2 = 4.480，P = 0.034）方面，差异具有统计学意义，而性别、基础疾病、入院血糖水平等方面差异无统计学意义（见表 2）。

2.4　ROC 曲线分析结果

根据单因素分析结果，连续变量年龄、HGB、替加环素疗程、替加环素日剂量在两组间差异有统计学意义（P < 0.05），可能是替加环素致凝血异常的危险因素，采用 ROC 曲线分析法研究以上因素的预测情况和截断值，见图 1，ROC 曲线分析结果显示：HGB（≤ 127 g • L^{-1}）、替加环素疗程（> 5 d）和替加环素日剂量（> 100 mg）对凝血异常的预测价值显著（P < 0.05），而年龄不是凝血异常的显著影响因素（P = 0.0742）。具体曲线下面积、截断值、敏感度、特异性、约登指数见表 3。

表 2　替加环素致凝血异常的单因素分析结果

Tab 2　Univariate analysis of coagulation disorders induced by tigecycline

变量	异常组（n = 67）	正常组（n = 120）	χ^2/Z/t	P
年龄 / 岁	68.3±15.72	63.42±15.94	2.018	0.045
性别（女）	26	38	0.973	0.324
脑血管疾病	19	24	1.696	0.193
心血管疾病	38	69	0.011	0.917
血液疾病	4	8	0.001	1.000
内分泌系统疾病	15	26	0.013	0.909
入院时血糖水平 /（mmol • L^{-1}）	6.970（5.458，9.212）	7.785（5.88，10.292）	1.357	0.175
Ca^{2+} /（mmol • L^{-1}）	2.06±0.19	2.04±0.25	0.703	0.483
ALT/（U • L^{-1}）	29.400（14.000，81.400）	28.300（17.550，51.500）	0.512	0.609
ALB/（g • L^{-1}）	33.65±6.72	33.13±6.73	0.514	0.608
CRP/（mg • L^{-1}）	45.395（15.455，133.835）	76.300（21.672，159.468）	1.400	0.162
PCT/（ng • mL^{-1}）	0.780（0.100，2.610）	0.680（0.230，4.680）	0.696	0.487
Cr/（μmol • L^{-1}）	63.900（45.700，114.200）	62.400（49.000，95.725）	0.328	0.743
PLT/（×10^9 • L^{-1}）	200.000（108.000，263.000）	194.500（127.250，278.500）	0.727	0.467
HGB/（g • L^{-1}）	104.57±26.67	114.7±26.20	2.368	0.018
查尔森合并症评分	1.00（0.00，2.00）	1.00（1.00，2.00）	0.610	0.542
用药指征			0.284	0.963
肺部感染	53	98		
腹腔感染	5	9		
血流感染	5	7		
其他	4	6		
细菌				
肺炎克雷伯菌	26	35	1.818	0.178
鲍曼不动杆菌	30	75	1.517	0.218
替加环素疗程 /d	11.00（7.00，17.00）	10.00（6.00，14.00）	2.174	0.038
替加环素日剂量 /mg	100（100，100）	100（100，200）	2.594	0.009
休克	37	47	4.480	0.034
合并影响凝血功能药物				
低分子肝素	22	55	2.999	0.083
头孢哌酮舒巴坦 / 头孢哌酮他唑巴坦	18	35	0.112	0.738
维生素 K	5	4	1.600	0.206
莫西沙星	1	2	0.001	1.000
联用影响凝血功能药物≥ 2 种	12	17	0.460	0.498

2.5　凝血异常模型的建立与评价

以年龄（> 62 岁）、HGB（≤ 127 g • L^{-1}）、替加环素疗程（> 5 d）、替加环素日剂量（> 100 mg）、休克为自变量进行多因素二元 Logistic

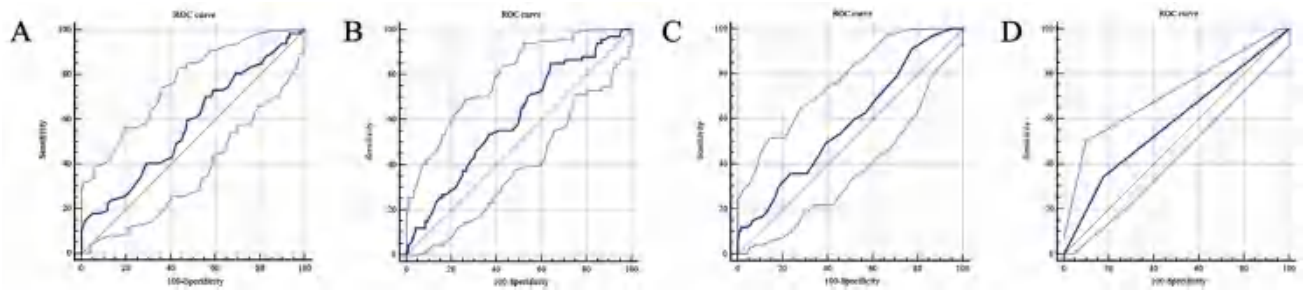


图 1　单因素危险因素预测替加环素致凝血异常的 ROC 曲线

Fig 1　ROC curve of predicting coagulation disorders induced by tigecycline by univariate analysis risk factors

A. 年龄（age）；B. HGB；C. 疗程（course of treatment）；D. 日剂量（daily dose）

表 3　ROC 曲线分析 4 种影响因素截断值

Tab 3　ROC curve of four risk factors cutoff values

影响因素	*AUC*	95%*CI*	截断值	*P* 值	敏感度 /%	特异性 /%	约登指数
年龄 / 岁	0.579	0.504 ～ 0.650	＞ 62	0.0742	70.15	44.17	0.1432
HGB/（g・L^{-1}）	0.605	0.531 ～ 0.675	≤ 127	0.0144	85.07	36.13	0.2121
替加环素疗程 /d	0.598	0.509 ～ 0.655	＞ 5	0.0480	91.04	22.5	0.1354
替加环素日剂量 /mg	0.584	0.510 ～ 0.656	＞ 100	0.0134	34.33	82.5	0.1683

回归分析，变量及赋值情况见表 4。Logistic 回归分析表明，疗程（＞ 5 d）、日剂量（＞ 100 mg）、HGB（≤ 127 g・L^{-1}）是替加环素致凝血异常的独立危险因素见表 5。

表 4　变量及赋值情况

Tab 4　Variables and assignments

变量名称	变量	赋值说明
凝血功能异常	Y	0：正常；1：异常
年龄 / 岁	X_1	0：≤ 62；1：＞ 62
HGB/（g・L^{-1}）	X_2	0：＞ 127；1：≤ 127
替加环素疗程 /d	X_3	0：≤ 5；1：＞ 5
替加环素日剂量 /mg	X_4	0：≤ 100；1：＞ 100
休克	X_5	0：否；1：是

表 5　替加环素致凝血异常的多因素二元 Logistic 回归分析

Tab 5　Multivariate Logistic regression analysis of coagulation disorders induced by tigecycline

影响因素	B	S.E.	Wald	*P*	*OR*	95%*CI*
HGB/（g・L^{-1}）	1.258	0.407	9.541	0.002	3.519	1.584 ～ 7.819
替加环素疗程 /d	1.27	0.504	6.336	0.012	3.56	1.325 ～ 9.569
替加环素日剂量 /mg	1.019	0.377	7.314	0.007	2.772	1.324 ～ 5.802
常量	－ 2.863	0.615	21.703			

建立 Logistic 回归拟合建立预测模型：凝血异常率预测值 Logit（P）＝－ 2.863 ＋ 1.258X_2 ＋ 1.270X_3 ＋ 1.019X_4。Hosmer-Lemeshow 检验结果显示，该模型拟合度良好（χ^2 ＝ 1.273，d_f ＝ 3，P ＝ 0.736 ＞ 0.05），以 187 例预测值的凝血异常率为观察指标建立 ROC 曲线评价预测模型，如图 2 所示，*AUC* 0.692，95%*CI*：0.621 ～ 0.758，P ＜ 0.001，敏感度 76.12%，特异性 51.26%，当 Logit（P）＞ 0.3604 时，预测替加环素导致凝血异常。依据拟合的预测模型交叉验证计算 21 例患者使用替加环素致凝血功能异常预测值，与截断值相比，凝血功能异常值 Logit（P）＞ 0.3604 时易发生凝血异常。将预测情况与实际凝血异常比较，21 例患者中 17 例预测正确，总正确率为 80.95%，阳性和阴性预测率分别是 83.33%、77.77%。

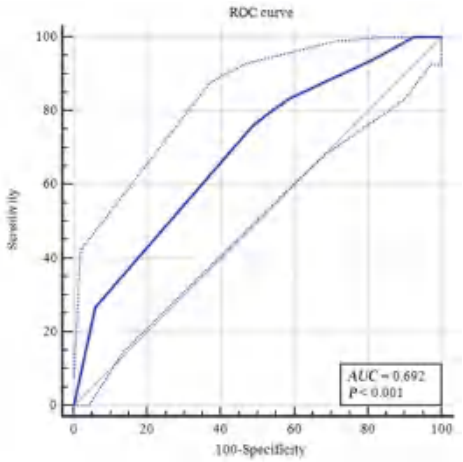


图 2　Logistic 回归拟合模型预测替加环素致凝血异常的 ROC 曲线

Fig 2　ROC curve of predicting coagulation disorders induced by tigecycline by Logistic regression model

2.6　列线图分析

基于以上 3 种独立危险因素，进行替加环素导致凝血异常的列线图分析，见图 3，3 种独立危险因素中，替加环素疗程和 HGB 水平占权重相对较大，给予各独立危险因素赋值，将各项危险因素分数相加得出总分后预测替加环素导致凝血异常的风险。

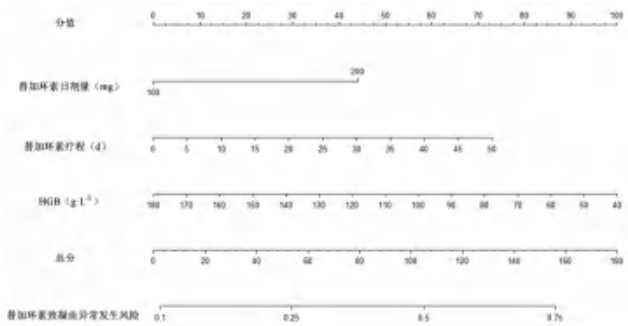


图 3　预测替加环素导致凝血异常的列线图分析

Fig 3　Nomogram for the prediction of coagulation disorders induced by tigecycline

3　讨论

目前替加环素导致凝血异常发生率研究结果不一致，何小梅等 [8] 对 164 例应用替加环素的患者进行研究，发现 58 例凝血功能异常，表现为 APTT、PT 延长，凝血异常发生率为 35.4%，与本研究相近。一项涉及 286 例鲍曼不动杆菌感染的研究发现，3.92% 的患者应用替加环素后凝血功能异常，表现为 PT、APTT 延长，国际标准化比值（INR）升高、PLT 下降 [9]。替加环素造成凝血异常发生率的差异原因可能是人群特点不同、纳入标准不同、病例数有限等。

本研究发现凝血功能异常组患者更易发生出血事件，消化道出血方面表现更为突出。文献报道出血事件在应用替加环素 3 ～ 7 d 发生，表现为消化道出血、外科伤口出血等，通过输血、维生素 K 治疗可恢复 [10]，对于出现凝血功能障碍的重症患者出血部位主要为消化道、腹腔 [11]。消化道出血事件的发生容易发生失血性休克进而累及患者脑、心、肝、肾等重要脏器，造成不良预后。通过本次研究提示应用替加环素需要仔细检查患者的口腔黏膜、皮肤和消化道，以确保没有出血，同时关注凝血功能，对于凝血功能异常的患者可适当干预。

本研究发现替加环素用药疗程、替加环素日剂量是凝血功能异常的独立危险因素，HGB 水平是凝血功能的保护因素。用药疗程是凝血功能异常的危险因素，这与报道的一致 [12-13]，进一步研究发现用药疗程超过 5 d，凝血功能异常的风险增加。替加环素可导致 FBG 降低，PT、APTT、TT 延长，FBG、TT、APTT、PT 发生异常中位时间为用药后 6、6、5、4 d[14]。疗程大于 14 d 是替加环素诱导凝血障碍的危险因素 [15]，可能是因为将 FIB 降低纳入研究、导致与本次研究结果有差异。研究发现凝血功能异常与替加环素日剂量有关，每日累计超过 100 mg，凝血功能异常风险增加。有学者报道替加环素日剂量超过 150 mg 是凝血异常的危险因素 [14]。苏丹等 [16] 研究显示高剂量替加环素治疗组凝血功能异常发生率高于低剂量组。在多重耐药菌感染的危重患者中，更好的临床结果与更高的替加环素剂量之间存在相关性 [17]，但是高剂量往往意味着凝血功能异常发生率的提高、出血风险的增加，所以在高剂量应用替加环素时应监测凝血功能的变化，权衡利弊，提前干预，保障用药安全。本研究发现，HGB 越低，凝血功能异常的风险越高，原因可能是：① HGB 位于红细胞内，其水平高低在一定程度上反映贫血程度，全身炎症反应会导致红细胞加速清除，导致贫血、HGB 减少、同时炎症反应也会影响凝血功能表现为凝血异常 [18]；② HGB 主要是负责运载氧气、二氧化碳等气体，HGB 水平高，身体代谢快，替加环素代谢排泄加快，导致血药浓度 - 时间曲线下面积变少，体内暴露量减少，进而影响凝血功能 [8]。

替加环素影响患者凝血功能，导致 PT、APTT 延长，对于入院时 HGB 水平偏低、接受替加环素治疗时间过长，高剂量治疗的患者要监测凝血功能。对于已经发生凝血功能异常的患者，要观察消化道、腹腔、皮下等部位防止出血事件的发生，保障患者用药安全。本研究以替加环素使用疗程、日剂量、血红蛋白水平为联合预测因子，基于 Logistic 回归分析和 ROC 曲线建立预测其致凝血功能异常模型，其准确率为 80.95%，具有很强的临床实用性，为临床及时制订干预措施提供参考依据。

参考文献

[1] Gong J，Su D，Shang J，et al. Efficacy and safety of high-dose tigecycline for the treatment of infectious diseases：a meta-analysis [J]. Medicine（Baltimore），2019，98（38）：e17091.

[2] Xu L，Wang YL，Du S，et al. Efficacy and safety of tigecycline for patients with hospital-acquired pneumonia [J]. Chemotherapy，2016，61（6）：323-330.

[3] Wu X，Zhao P，Dong L，et al. A case report of patient with severe acute cholangitis with tigecycline treatment causing coagulopathy and hypofibrinogenemia [J]. Medicine（Baltimore），2017，96（49）：e9124.

[4] Wu PC，Wu CC. Tigecycline-associated hypofibrinogenemia：a case report and review of the literature [J]. IDCases，2018，11：56-57.

[5] 黄梅娟，薛加玲，于维松 . 替加环素相关凝血功能障

碍文献概述 [J]. 中国药师，2017，20（11）：2046-2048，2095.
[6] 张明，王瑾，王睿，等 . 替加环素致凝血功能障碍文献分析 [J]. 中国新药杂志，2021，30（3）：285-288.
[7] 万学红，卢雪峰，刘成玉，等 . 诊断学 [M]. 北京：人民卫生出版社，2018：285-289.
[8] 何小梅，王林晓 . Logistic 模型和 ROC 曲线对替加环素致凝血异常的预测分析 [J]. 中南药学，2020，18（9）：1577-1580.
[9] Ni W，Han Y，Zhao J，et al. Tigecycline treatment experience against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections：a systematic review and meta-analysis [J]. Int J Antimicrob Agents，2016，47（2）：107-116.
[10] 杨晓璇，金路，罗雪梅，等 . 替加环素导致凝血系统不良反应的危险因素及可能机制研究进展 [J]. 中国医院药学杂志，2022，42（9）：967-970.
[11] 徐银丽，祁慧，江翊国，等 . 替加环素治疗对重症患者凝血功能的影响 [J]. 中国药物应用与监测，2020，17（1）：6-9.
[12] 杨钰华，李静，宋惠珠，等 . 替加环素致凝血功能异常的相关因素分析 [J]. 中国新药与临床杂志，2022，41（1）：52-56.
[13] Wang D，Lin C，Gu C，et al. Tigecycline-associated coagulopathy：a single-center retrospective analysis [J]. Pharmacology，2022，107（9-10）：524-536.
[14] 张静，张蓉 . 替加环素对患者凝血指标影响的临床研究 [J]. 第三军医大学学报，2019，41（15）：1485-1490.
[15] Cui N，Cai H，Li Z，et al. Tigecycline-induced coagulopathy：a literature review [J]. Int J Clin Pharm，2019，41（6）：1408-1413.
[16] 苏丹，徐姗，王君萍 . 某院 2013—2015 年替加环素使用安全性分析 [J]. 中国药房，2017，28（8）：1058-1063.
[17] De Pascale G，Montini L，Pennisi M，et al. High dose tigecycline in critically ill patients with severe infections due to multidrug-resistant bacteria [J]. Crit Care，2014，18（3）：R90.
[18] Helin TA，Lemponen M，Lahtiharju T，et al. Anaemia and enhancement of coagulation are associated with severe COVID-19 infection [J]. Scand J Clin Lab Invest，2021，81（8）：653-660.

（收稿日期：2023-01-13；修回日期：2023-02-16）

药物禁忌证规则在合理用药监测系统中的精细化设置

秦小莉，徐敏，杨玉洁，何春杨，徐超然，何琴*（成都市第三人民医院药学部，成都　610031）

摘要：目的　构建禁忌证的精细化审核模式，为进一步提高处方审核效率、规范合理用药寻找改进方向和措施。**方法**　收集我院合理用药监测系统 2020 年 8 月—2021 年 5 月门诊所有禁忌证监测数据，进行回顾性分析，并根据临床实际诊疗情况和循证证据，探索禁忌证的精细化审核规则。**结果**　2020 年 8 月—2021 年 5 月有关禁忌证提示的一共 3078 条，其中黑灯提示 913 条，占 29.66%；红灯提示 2165 条，占 70.34%。根据我院实际情况精细化维护禁忌证规则 15 432 条。规则精细化设置前后禁忌证问题占比分别为 14.8% 和 11.4%（$P < 0.05$）。**结论**　对禁忌证规则进行精细化设置促进了处方前置审核工作的有效开展，充分体现了药师在合理用药方面的积极作用，展现出药师的专业性。

关键词：药物禁忌证；合理用药监测系统；精细化设置；循证证据
中图分类号：TP319，R95　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-1081-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.039

Fine setting of drug contraindication rules in prescription automatic screening system

QIN Xiao-li, XU Min, YANG Yu-jie, HE Chun-yang, XU Chao-ran, HE Qin* (*Department of Pharmacy*, *The Third People's Hospital of Chengdu*, *Chengdu* 610031)

基金项目：四川省科技厅“创新创业苗子工程”课题（No.22MZGC0043）。
作者简介：秦小莉，女，在读硕士研究生，主管药师，主要从事临床药学工作，email：549279916@qq.com　*__通信作者：__何琴，女，硕士，主任药师，主要从事临床药学与药理学工作，email：yjkhq@sina.com

Abstract: Objective To build a refined review mode for contraindications, and to further improve the efficiency of prescription review and standardization of rational drug use. **Methods** The monitoring data of all contraindications in the out-patient clinic of the prescription automatic screening system of our hospital from August 2020 to May 2021 were analyzed retrospectively. According to the actual clinical diagnosis and evidence-based evidence, the refined review rules of contraindications were determined. **Results** From August 2020 to May 2021, there were 3078 tips on contraindications, including 913 (29.66%) black lights tips and 2165 (70.34%) red light tips. According to the actual situation of our hospital, 15 432 rules on contraindications should be carefully maintained. The proportion of contraindications before and after the refined rule setting was 14.8% and 11.4% ($P < 0.05$) with significant difference. **Conclusion** The refined setting of contraindication rules effectively promote the development of prescription preview and fully reflect the positive role of pharmacists in rational drug use.

Key words: drug contraindication; prescription automatic screening system; fine setting; evidence-based

《医疗机构处方审核规范》规定“所有处方（包括门诊处方和病区医嘱单）均应当经审核通过后方可进入划价收费和调配环节，未经审核通过的处方不得收费和调配”[1-3]。医疗机构应当积极推进处方审核信息化，通过信息系统为处方审核提供必要的信息[4-7]。我院于 2019 年引入合理用药监测系统（简称 PASS 系统），并在 2020 年 1 月正式开展处方前置审核工作。结果显示，开展处方前置审核工作后，我院门诊处方合格率从 84%（2019 年）上升至 97%（2020 年），成效显著。

PASS 系统对于禁忌证的审核规则基于安全性考虑，对说明书中有安全风险的禁忌证进行警示，系统根据风险高低将医师端提示分为四个等级，即黑灯、红灯、橙灯、黄灯，警示级别依次降低[8]。禁忌证提示一般设置为黑灯和红灯，黑灯是绝对禁忌，红灯是相对禁忌或说明书中不推荐和需要避免使用的。然而部分提示忽略了患者个体化诊疗方案和检验结果，容易造成审核结果出现假阳性和假阴性[9]，影响医师正常诊疗活动，降低诊疗效率。基于上述考虑，本文回顾性分析我院 PASS 系统审核中的禁忌证提示，以循证证据为基础，根据临床实际需求，加强规则精细化设置，为进一步提高处方审核效率、规范合理用药寻找改进方向和措施[10]。

1　资料

我院门诊处方前置审核工作实行分科室分批次上线，于 2020 年 7 月底实现门诊全范围覆盖。虽然规则精细化设置是一个动态且持续的工作，但数据显示大部分的规则设置集中在 2020 年下半年。故本研究选取 2020 年 8 月—2021 年 5 月 PASS 系统中所有禁忌证监测数据，进行回顾性分析。

2　方法

2.1　处方前置审核流程

我院采用“三审三拦截”模式进行处方审核。即医师开具的处方先由 PASS 系统初审拦截，若系统判定为不合理，则需处方医师返回修改或提请审核，后由专岗审方药师二次审核拦截，辨别真假阳性处方。药师审核通过的处方才能进行缴费和取药。待所有处方，包括假阴性处方，流转至发药窗口端时，再由窗口发药药师进行第三次审核拦截[11]。具体流程详见图 1。

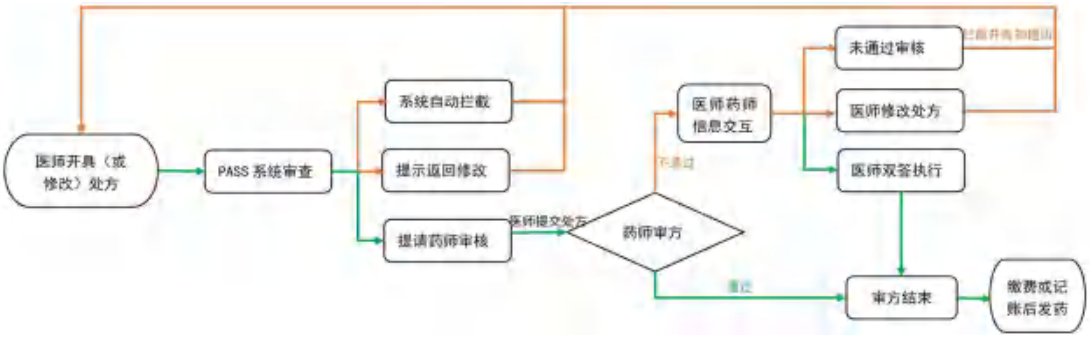


图 1　处方前置审核流程

Fig 1　Prescription pre-audit

2.2　精细化规则维护流程

成立由临床药师、审方药师、调剂药师、信息药师组成的处方审核工作组，同时建立规则维护制度和流程。药师在处方审核、点评、药学监护中发现系统缺失的审核规则，以及临床科室认为不适用于日常医疗工作的审核规则都可以提出修改申请。规则修改申请人查阅法律法规、循证医学证据，对拟修改的规则依据进行循证评价。并由处方审核工作组对评价意见再审议，审议通过的由规则维护药师修改规则；审议未通过的维持现有规则[12]。具体流程见图 2。

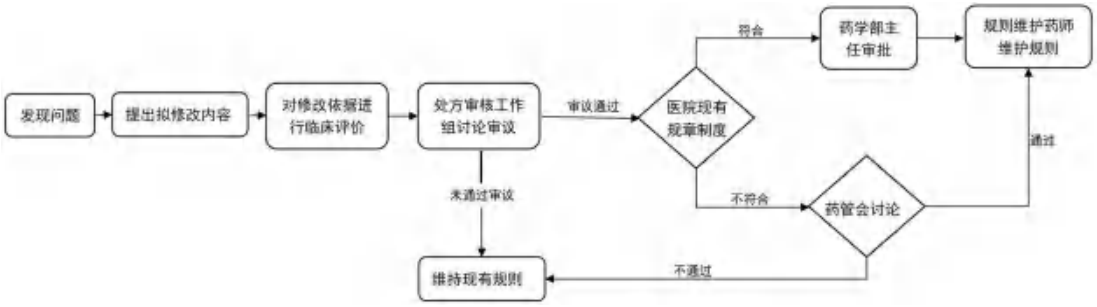


图 2　规则维护流程图

Fig 2　Rule maintenance

2.3　精细化规则维护的循证医学证据

规则修改申请人必须对修改依据进行医学实践证据评价，其中循证医学证据评价包括有效性等级、推荐等级和证据等级，评价等级参考《山东省超药品说明书用药专家共识（2021 年版）》[13]。我院精细化维护原则按照医学实践证据评价结果决定，详见表 1。

表 1　循证证据分级

Tab 1　Evidence based evidence classification

有效性等级	推荐等级	证据等级	维护原则
证据可靠	可使用级	1 级：美国、欧洲及日本等国家或地区的药品说明书中收录	蓝灯通过
		2 级：《中华人民共和国药典用药须知》《药物临床应用指导原则》、国际主流指南或《临床诊疗指南》最新版、普通高等教育本科国家级规定教材（人民卫生出版社最新版）中收录，国际经典药学工具书、参考书如《马丁代尔药物大典》和《热病》可根据具体内容研判	蓝灯通过
证据可靠性较高	建议使用级	3 级：治疗有效，有随机对照试验的荟萃分析或多个设计良好、大规模的随机对照试验（参考 Micromedex 有效等级Ⅰ级）	再评价有风险：黑灯拦截；再评价无风险：红灯警示
证据有一定的可靠性	可以采用级	4 级：治疗证据支持有效，有随机对照试验的荟萃分析（结论可能有争议），多个随机临床试验（参考 Micromedex 有效等级Ⅱ a）	再评价有风险：黑灯拦截；再评价无风险：红灯警示
证据可靠性较差	可供参考	5 级：业内主流指南 / 专家共识，专业参考书（“百佳”出版社、医药卫生类），临床 Meta 分析、随机对照试验及系列案例或个案报道（核心期刊、参考 Micromedex 有效等级Ⅱ b，有可能存在争议）	黑灯拦截
证据可靠性差	不推荐使用	6 级：相关临床研究等（Micromedex 未见）	黑灯拦截

3　结果

3.1　禁忌证提示问题汇总

2020 年 8 月—2021 年 5 月 PASS 系统中禁忌证问题总数 3078 条，其中黑灯提示 913 条，占 29.66%；红灯提示 2165 条，占 70.34%。禁忌证类型主要分为诊断相关性、肝肾功能不全，见表 2 和表 3。

3.2　禁忌证规则的精细化维护

2020 年 1 月—2021 年 5 月，根据我院实际情况精细化维护禁忌证规则 15 432 条。

3.2.1　黑灯拦截或者警示的禁忌证规则　说明书明确禁用的直接黑灯拦截，处方诊断和说明书禁忌证内容不完全一致，则保留黑灯警示，由审方药师与医师沟通确认（见表 4）。

3.2.2　红灯警示的禁忌证规则　为了谨慎起见，PASS 系统内置规则将相对禁忌证和说明书中不推荐使用都归为禁忌证模块，设置为红灯警示。实际上部分临床诊断和说明书的禁忌证具有差异，对于这部分规则，经临床药师、医师多方协商沟通，决议保留红灯警示，由医师再次确认签字后药师审核通过（见表 5）。

3.2.3　降级处理的禁忌证规则　有证据支持的超

表 2　禁忌证提示汇总（按类型）

Tab 2　Summary of contraindications (by type)

禁忌证类型	问题数 / 条	占比 /%	代表药物
诊断相关性	2504	81.3	碳酸钙 D_3 片、苯溴马隆片、托拉塞米片、甲泼尼龙片、华法林钠片、伊伐布雷定片、重组人促红素注射液、普罗布考片、环孢素软胶囊、阿罗洛尔片、乐卡地平片等
肝功能不全	153	5.0	异烟肼片、二甲双胍（缓释）片、复方阿嗪米特肠溶片、秋水仙碱片、恩他卡朋片等
肾功能不全	421	13.7	华法林钠片、葡萄糖酸钙注射液、坦索罗辛缓释胶囊、布洛芬缓释胶囊、甲氨蝶呤片、酚麻美敏片、多巴丝肼片等

表 3　禁忌证提示汇总（按警示级别）

Tab 3　Summary of contraindications (by warning level)

级别	问题数 / 条	占比 /%	代表药物
黑灯	913	29.66	碳酸钙 D_3 片、托拉塞米片、曲美他嗪片、复方磷酸可待因溶液、氟桂利嗪胶囊、普罗布考片、依托考昔片、酚麻美敏片、比索洛尔片等
红灯	2165	70.34	苯溴马隆片、甲泼尼龙片、华法林钠片、伊伐布雷定片、环孢素软胶囊、阿罗洛尔片、重组人促红素注射液等

表 4　保留黑灯的禁忌证规则

Tab 4　Contraindication rule of keeping black light

内置级别	药物	处方诊断	说明书禁忌证	维护级别
黑灯	碳酸钙 D_3 片	高尿酸血症	高尿酸血症	黑灯拦截
	托拉塞米片	低钾血症	低钾血症	黑灯拦截
	曲美他嗪片	帕金森病	帕金森病	黑灯拦截
	复方磷酸可待因溶液	冠状动脉粥样硬化性心脏病	冠心病患者	黑灯拦截
	普罗布考片	低钾血症	合并低血钾或低血镁者	黑灯拦截
	比索洛尔片	代谢性酸中毒	代谢性酸中毒	黑灯拦截
	新癀片	支气管哮喘	支气管哮喘者	黑灯拦截
	乐卡地平片	不稳定型心绞痛	不稳定型心绞痛禁用	黑灯拦截
	氟桂利嗪胶囊	焦虑性抑郁症	有抑郁症病史患者	黑灯拦截
黑灯	依托考昔片	冠状动脉粥样硬化性心脏病	缺血性心脏病	黑灯警示
	炔雌醇环丙孕酮片	子宫内膜增厚	子宫内膜增生	黑灯警示
	依托考昔片	多发性脑梗死	脑血管疾病	黑灯警示
	通心络胶囊	血小板减少	出血性疾病患者	黑灯警示

表 5　保留红灯的禁忌证规则

Tab 5　Contraindication rule of keeping red light

内置级别	药物	处方诊断	说明书内容	维护级别
红灯	甲泼尼龙片	焦虑状态	有精神病史患者不推荐使用	红灯警示
	华法林钠片	高血压 3 级	严重高血压不推荐使用	红灯警示
	重组人促红素注射液	高血压 3 级	严重高血压不推荐使用	红灯警示
	伊伐布雷定片	腔隙性脑梗死	脑卒中不推荐使用	红灯警示
	环孢素软胶囊	T- 细胞大颗粒淋巴细胞白血病	恶性肿瘤不推荐使用	红灯警示
	阿罗洛尔片	慢性心力衰竭	充血性心力衰竭不推荐使用	红灯警示
	二甲双胍（缓释）片	肝功能异常	肝功能不全不推荐使用	红灯警示
	甲氨蝶呤片	肝功能异常	肝功能不全不推荐使用	红灯警示

说明书禁忌证，根据证据等级对特定诊断或特定科室设置干预等级。例如双唑泰软膏的主要成分为甲硝唑、克霉唑和醋酸氯己定。BASHH 国家指南《外阴阴道念珠菌病的管理》[14]、中华医学会《细菌性阴道病诊治指南》（2021 修订版）[15] 等均指出妊娠期患细菌性阴道病推荐阴道给药甲硝唑，妊娠期患念珠菌性阴道炎推荐阴道给药克霉唑。氯己定在分娩时及新生儿中普遍使用，尚未见新生儿不良反应的报道。由此，我们设置当诊断为“妊娠期阴道炎”时，予以蓝灯通过。重组人血小板生成素注射液用于妊娠期妇女，系统提示妊娠期不推荐使用，但 2020 年版 - 中华医学会《成人原发免疫性血小板减少症诊断与治疗中国指南》[16] 中明确说明对于初始治疗失败的妊娠期合并血小板减少症患者，可使用该药。考虑妊娠患者的特殊性，此规则仅在血液科生效，予以蓝灯通过（见表 6）。

表 6　降级处理的禁忌证规则

Tab 6　Contraindication rules of degrading treatment

内置级别	药物	诊断	说明书内容	维护级别
黑灯	美托洛尔片	病态窦房结综合征＋安装心脏起搏器	病态窦房结综合征禁用	蓝灯
	双唑泰软膏	妊娠期阴道炎	妊娠期妇女禁用	蓝灯
红灯	异烟肼片	焦虑状态	周围神经病变患者密切监护	蓝灯
	华法林钠片	慢性肾脏病 1 期	肾功能损害不推荐使用	蓝灯
	丙戊酸钠片	肝功能不全	肝病或明显肝功能损害禁用	蓝灯
	左氧氟沙星	2 型糖尿病（内分泌代谢科）	密切监测血糖变化	蓝灯
	比索洛尔片	慢性阻塞性肺疾病	严重支气管哮喘禁用	蓝灯
	依诺肝素钠注射液	肾衰竭＋血液透析	严重肾衰竭患者应使用普通肝素	蓝灯
	重组人血小板生成素注射液	妊娠合并血小板减少（血液科）	对孕妇及哺乳期妇女原则上不宜使用	蓝灯
黑灯	坎地沙坦酯片	肾衰竭	有严重肾衰竭患者慎用	红灯
	替勃龙片	子宫平滑肌瘤	激素依赖型肿瘤不推荐	红灯

3.2.4　根据肝肾功能检验指标设置的禁忌证规则　PASS 系统对说明书中注明肝肾功能异常禁用的药品都会进行禁忌证提示，信息药师要求将 HIS 系统与 PASS 系统进行对接，将患者的检验结果进行传值。通过检验指标值来判定是否进行禁忌证提示，如苯溴马隆片，当患者肾小球滤过率≤ 20 mL・min^{-1} 时，系统直接黑灯拦截并在医师端进行提示。当肾小球滤过率＞ 20 mL・min^{-1} 则不提示。如患者无检验指标，一律进行禁忌证红灯警示，由审方药师与医师沟通后确定处置方式（见表 7）。

表 7　根据检验指标设置的禁忌证规则

Tab 7　Contraindication rules set according to test indicators

内置级别	药物	说明书内容	维护级别
黑灯 / 红灯	苯溴马隆片	肾小球滤过率≤ 20 mL・min^{-1} 禁用	黑灯拦截 / 红灯提示
	曲美他嗪片	严重肾功能损害（肌酐清除率＜ 30 mL・min^{-1}）禁用	黑灯拦截 / 红灯提示
	二甲双胍片	严重肾衰竭（肌酐清除率＜ 45 mL・min^{-1}）禁用	黑灯拦截 / 红灯提示
	阿卡波糖胶囊	严重肾功能损害（肌酐清除率＜ 25 mL・min^{-1}）禁用	黑灯拦截 / 红灯提示

3.3　门诊处方合格率和药物禁忌证问题占比

2020 年 8—12 月和 2021 年 1—5 月门诊任务总数分别为 426 121 条、447 461 条，不合理任务数分别为 11 779 条、11 710 条，处方合格率分别为 97.24%、97.38%（P ＞ 0.05）。规则精细化维护前后禁忌证问题占比分别为 14.8% 和 11.4%，（P ＜ 0.05），结果见表 8 和表 9。

表 8　2020 年与 2021 年门诊处方合格率对比

Tab 8　Outpatient prescription qualification rate between 2020 and 2021

月份	2020 年			月份	2021 年		
	任务总数 / 条	不合理任务数 / 条	合格率 /%		任务总数 / 条	不合理任务数 / 条	合格率 /%
8 月	78 857	2430	96.91	1 月	84 670	2205	97.39
9 月	89 435	2265	97.46	2 月	71 991	1921	97.33
10 月	83 868	2921	96.51	3 月	99 308	2513	97.47
11 月	88 490	2200	97.51	4 月	96 413	2752	97.14
12 月	85 471	1963	97.70	5 月	95 079	2319	97.56
合计	426 121	11 779	97.24	合计	447 461	11 710	97.38

4　讨论

在处方审核过程中，既要保证临床开具处方的合理与规范，最大程度减少禁忌证带来的不合理用药，又必须减少假阳性问题，避免医师端无意义的弹窗，提高诊疗效率。我院利用信息化手段实现了处方前置审核，改善了传统审方效率低和实效性差的问题，但系统作为辅助工具，不可避免地会出现假阳性和假阴性问题，究其原因主要有以下三个方面：

① 部分医师开具诊断不规范，未选择“国际疾病分类第十次修订本”（International Classification of Diseases-10，ICD-10）中的标准诊断，而 PASS 系统审核禁忌证时只能识别标准诊断，从而导致“假阴性”。② PASS 系统与 HIS 系统对接问题。HIS 系统数据的漏传，会导致审核过程中出现“假阳性”处方。以某心力衰竭伴有低钾

表 9　规则精细化维护前后禁忌证问题占比

Tab 9　Proportion of contraindications before and after the refined maintenance of rules

年份	月份	不合理任务数 / 条	禁忌证数 / 条	占比 /%	平均占比 /%
2020 年	8 月	2430	312	13	15.1
	9 月	2265	388	17	
	10 月	2921	350	12	
	11 月	2200	335	15	
	12 月	1963	358	18	
2021 年	1 月	2205	255	12	11.30*
	2 月	1921	195	10	
	3 月	2513	277	11	
	4 月	2752	352	13	
	5 月	2319	256	11	

注（Note）：与 2020 年比较，$^*P < 0.05$（Compared with 2020，$^*P < 0.05$）。

血症住院患者为例：HIS 系统只能提供入院诊断和出院诊断，无法对电子病历进行传值，即便患者低钾血症已得到纠正，医师开具医嘱时仍会出现“低钾血症禁用托拉塞米”的禁忌证提示，造成了不必要的工作量，影响了临床正常的诊疗活动。未来我们将积极融合 HIS 系统和 PASS 系统，更改流程、增加接口 [17]，提高审核效率，减少用药风险。③ 系统纳入数据的局限性和软件更新的滞后性。系统内置规则主要参考药品说明书，而药品说明书往往更新滞后；再者半年一次的软件升级都会导致审核规则的偏差。药师需要根据最新研究和循证依据查漏补缺，动态更新维护规则库，增加系统审核的准确性。

本研究通过对药物禁忌证的精细化设置，发现禁忌证问题占不合理问题比例显著下降。药物禁忌证精细化设置，一方面保障了患者的合理用药，另一方面有效降低了处方前置审核药师的工作量和医师端“假阳性”弹窗率 [18]。该项工作充分体现了药师在合理用药方面的积极作用，展现出药师的专业性，落实了药师在处方审核中的职责和担当。

参考文献

[1] 黄蓓 .《医疗机构处方审核规范》印发 [J]. 中医药管理杂志，2018，26（14）：68.

[2] 李彩云，陈刚，江翊国，等 . 门急诊处方前置性审核质量监测指标评价与分析 [J]. 安徽医药，2021，25（7）：1471-1473.

[3] 庞艳玉，孙慧，黄燕萍，等 . 妇产科专科特色处方前置审核系统的建设与应用 [J]. 中国药学杂志，2020，55（24）：2069-2073.

[4] 卢圆圆，李腾，唐芳，等 . 处方前置审核系统中的药物相互作用规则优化 [J]. 中国药师，2021，24（1）：105-108.

[5] 游茂锦，吴庆丰，张锦荣 . 某院处方前置审核干预门急诊质子泵抑制剂使用的用药分析 [J]. 海峡药学，2021，33（3）：196-198.

[6] 刘玲，王益富，沈伟芳，等 . 门诊药房前置审方系统的规则制订与应用效果评价 [J]. 中国药业，2021，30（12）：17-20.

[7] 谢灵波，阙富昌，周本杰，等 . 处方前置审核闭环管理模式的建立与应用 [J]. 今日药学，2021，31（7）：553-556.

[8] 李鑫，左静，廖丽娜，等 . 抗菌药物用药规则的精细化设置在门诊处方前置审核中的应用实践 [J]. 实用药物与临床，2020，23（3）：286-288.

[9] 曾露，郭敏，刘金玉，等 . 我院门诊及住院处方审核中重复用药模块规则的精细化设置 [J]. 药物流行病学杂志，2021，30（6）：388-392.

[10] 郭敏，刘金玉，曾露，等 . 某院在推进处方审核系统中给药途径存在的问题与对策 [J]. 中国医院药学杂志，2021，41（12）：1258-1263.

[11] 武明芬，史卫忠，赵志刚 . 国内处方前置审核系统的比较 [J]. 中南药学，2019，17（9）：1547-1552.

[12] 陈潞梅，廖丽娜，李鑫，等 . 药品精细化用法用量规则在我院门诊处方前置审核系统中的开发与实践 [J]. 中国医药导报，2018，15（32）：129-134.

[13] 侯宁 . 山东省超药品说明书用药专家共识（2021 年版）[J]. 临床药物治疗杂志，2021，19（6）：9-40.

[14] Saxon LAG，Edwards A，Rautemaa-Richardson R，et al. British Association for Sexual Health and HIV national guideline for the management of vulvovaginal candidiasis（2019）[J]. Int J Std Aids，2020，31（12）：1124-1144.

[15] 中华医学会妇产科学分会感染性疾病协作组 . 细菌性阴道病诊治指南（2021 修订版）[J]. 中华妇产科杂志，2021，56（1）：3-6.

[16] 中华医学会血液学分会血栓与止血学组 . 成人原发免疫性血小板减少症诊断与治疗中国指南（2020 年版）[J]. 中华血液学杂志，2020，41（8）：617-623.

[17] 郑晓玲，张吟，徐旭蔚，等 . 我院处方前置审核系统中消化系统药物规则库的建立及应用 [J]. 中国医药导刊，2021，23（3）：227-230.

[18] 赵成龙，付中华，贾海盼，等 . 分析处方前置审核系统对儿科处方的干预效果 [J]. 河南医学研究，2021，30（12）：2166-2168.

（收稿日期：2022-08-10；修回日期：2022-10-09）

信迪利单抗用药评价和分析

隋月，李雨，刘广宣*（中国医科大学肿瘤医院 辽宁省肿瘤医院 药学部，沈阳　110042）

摘要：目的　评价信迪利单抗在抗肿瘤治疗中的使用现状，为临床合理用药提供参考。**方法**　对本院 2021 年 1 月 1 日—12 月 31 日期间使用信迪利单抗的处方进行回顾性分析，统计患者基本信息，参考药品说明书、数据库等收集相关资料，对患者的用药情况进行分析和评价。**结果**　信迪利单抗说明书推荐 6 种适应证，112 例患者的数据分析表明，超说明书用药有 31 例（27.68%），涉及 10 个瘤种，排名前三的为子宫颈癌（32.26%）、子宫内膜癌（19.35%）、鼻咽癌（12.90%）。**结论**　信迪利单抗用药相对合理，但面对癌症患者复杂的病情，治疗过程中难免存在超说明用药情况，应进一步强化超说明书用药监管，针对新型抗肿瘤药物建立相应管理制度，在确保患者用药安全的同时，最大化保障医师权益。

关键词：信迪利单抗；合理用药；超说明书用药
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-1087-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.040

Evaluation and analysis of sintilimab medication

SUI Yue, LI Yu, LIU Guang-xuan* (*Department of Pharmacy*, *Liaoning Cancer Hospital*, *Cancer Hospital of China Medical University*, *Shenyang* 110042)

Abstract: Objective To evaluate the current status of sintilimab and promote the rational use of medicines in antitumor therapy. **Methods** We collected the basic information of cancer patients treated with sintilimab from January 1st to December 31st 2021, analyzed the instructions and searched databases for retrospective analysis and evaluation. **Results** The analysis of 112 patient data showed except for 6 recommended indications, there were 31(27.68%) off-label drug use, involving 10 tumor species. The top three off-label drug use were uterine cervical carcinoma (32.26%), endometrial carcinoma (19.35%), and nasopharyngeal carcinoma (12.90%). **Conclusion** The use of sintilimab is relatively reasonable. It is necessary to supervise off-label drug use, manage the novel anticancer drugs in complex conditions, ensure safe use of medicines and protect physicians' rights.
Key words: sintilimab; rational use of drug; off-label drug use

近年来，肿瘤免疫治疗为癌症患者带来了新的希望，免疫检查点（ICI）抑制剂在肿瘤治疗中炙手可热，国内外已有数十种产品上市，如纳武利尤单抗、卡瑞利珠单抗、帕博利珠单抗等。信迪利单抗（sintilimab）是一种全人源细胞程序性死亡 -1（PD-1）单克隆抗体，可以与 T 细胞表面的 PD-1 受体结合，阻断其与配体 PD-L1 结合，使 T 细胞和自身免疫发挥正常作用，进而消灭肿瘤细胞。2018 年 12 月，信迪利单抗获批成为治疗霍奇金淋巴瘤的首个国产 PD-1 抗体，2021 年 2 月获批联合培美曲塞和铂类用于局部晚期或转移性非鳞状非小细胞肺癌的一线治疗，6 月分别获批联合吉西他滨和铂类化疗用于局部晚期或转移性鳞状非小细胞肺癌的一线治疗，以及联合贝伐珠单抗用于晚期肝细胞癌的一线治疗。2021 年 12 月，信迪利单抗成为中国唯一具有四大适应证的 PD-1 抑制剂获批并纳入国家医保目录。2022 年 6 月信迪利单抗又分别获批联合紫杉醇和顺铂或氟尿嘧啶和顺铂用于食管鳞癌的一线治疗，以及联合含氟尿嘧啶类和铂类药物化疗用于不可切除的局部晚期、复发或转移性胃及胃食管交界处腺癌的一线治疗。2022 年 7 月公布的 ORIENT-31 研究中期分析表明，在接受表皮生长因子受体（EGFR）酪氨酸激酶抑制剂（TKI）治疗后疾病进展的 EGFR 突变非小细

作者简介：隋月，女，硕士，主管药师，主要从事静脉用药调配、临床药学方面的研究，email：suiyue629@163.com　*通信作者：刘广宣，男，主任药师，主要从事静脉用药调配、临床药学方面的研究，email：guanxuan2004@126.com

胞肺癌患者中，联合抗血管生成（IBI305）＋ PD-1 抑制剂（信迪利单抗）＋化疗（培美曲塞和顺铂）治疗有效且耐受性良好。本文根据某院患者用药数据，整理各种文献报道和临床试验情况，对信迪利单抗用药情况进行评价和分析，为临床合理、规范用药提供参考依据。

1　资料与研究方法

1.1　资料来源

提取某院医院信息系统 2021 年 1 月 1 日—12 月 31 日使用信迪利单抗的患者病历，排除诊断不明病例后共有 112 例纳入研究。通过 PASS 系统查阅相关的住院病历，收集患者的性别、年龄、诊断等相关信息。

1.2　研究方法

检索 CNKI、PubMed、ClinicalKey、Cochrane Library 等数据库，结合相关的临床治疗指南和专家共识等，采用英国牛津大学循证医学中心推荐标准对信迪利单抗超说明书用药情况进行评价。

2　结果

2.1　患者基本情况

112 名使用过信迪利单抗的患者中男性 71 例（63.39%），女性 41 例（36.61%），年龄 31 ～ 81 岁，平均年龄（58.23±10.18）岁，51 ～ 70 岁（78 例）患者所占比例较大，临床诊断肺癌患者居多，纳入研究患者的基本资料见表 1。

表 1　纳入研究患者基本资料

Tab 1　Clinical data of patients

系统分类	临床诊断	*n*（%）
血液系统	霍奇金淋巴瘤	4（4）
消化道系统	胃癌	14（13）
	食管癌	5（4）
	结肠癌	3（3）
	胰腺癌	2（2）
	肝癌	7（6）
头颈部	颈部淋巴结转移癌	1（1）
	鼻咽癌	4（4）
泌尿系统	肾癌	2（2）
呼吸系统	非小细胞肺癌	51（46）
	小细胞肺癌	1（1）
	胸膜间皮瘤	1（1）
妇科	子宫颈癌	10（9）
	子宫内膜癌	6（5）
	外阴癌（恶性黑色素瘤）	1（1）

2.2　适应证分析

目前，信迪利单抗获批适应证包括经典型霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、肝癌、食管鳞癌、胃及胃食管交界处腺癌。本研究中符合说明书适应证的有 81 例，其中包含非小细胞肺癌（51 例）、胃癌和食管癌（19 例）、肝癌（7 例）、霍奇金淋巴瘤（4 例），占比 72.32%；超说明书用药 31 例，包括结肠癌（3 例）、胰腺癌（2 例）、鼻咽癌（4 例）等，占比 27.68%。信迪利单抗一线治疗晚期胃癌、晚期食管鳞癌、肝细胞癌、非鳞状非小细胞肺癌、鳞状非小细胞肺癌均纳入 2022 版 CSCO 指南；2021 版中国淋巴瘤治疗指南推荐信迪利单抗治疗复发或难治性经典型霍奇金淋巴瘤。根据研究中所涉及的结肠癌、胰腺癌、小细胞肺癌、胸膜间皮瘤、子宫颈癌、子宫内膜癌、外阴癌等超说明书用药情况，结合相关的临床治疗指南、专家共识及文献等得到循证医学推荐意见（见表 2）。但目前信迪利单抗仅在国内批准上市，未见更多国际指南推荐，且信迪利单抗有多项临床试验正在进行中。

表 2　适应证外用药的推荐意见及证据

Tab 2　Recommendations and evidence for off-label drug use

系统分类	临床诊断	推荐意见	在研临床试验	指南推荐 PD-1 治疗	阶段性 / 已全部完成临床试验
头颈部	颈部淋巴结转移癌	C	有	有	—
	鼻咽癌	C	有	有	—
呼吸系统	小细胞肺癌	B	有	有	NCT04055792
	胸膜间皮瘤	D	有	有	—
消化道系统	结肠癌	B	有	有	NCT05171660
	胰腺癌	A	有	有	CISPD3（NCT03977272）
泌尿系统	肾癌	C	有	有	—
妇科	子宫颈癌	B	有	有	CTR20202017
	子宫内膜癌	B	有	有	NCT04157491
	外阴癌（恶性黑色素瘤）	D	—	有	—

注（Note）：“—”代表无（“—” refers to none）。

3　讨论

3.1　信迪利单抗超说明书用药分析

3.1.1　颈部肿瘤　本研究有 1 例颈部肿瘤患者超说明书用药，患者为术后化疗联合免疫治疗。当前免疫检查点抑制剂在头颈部肿瘤中应用已成为共识，得到了国际多个指南推荐[1-2]，其中帕博利珠单抗和纳武利尤单抗已获批用于治疗头颈部鳞状细胞癌。2022 版 CSCO 免疫检查点抑制剂临

床应用指南对于复发或转移性头颈部鳞癌，一级推荐非鼻咽癌帕博利珠单抗＋顺铂 / 卡铂＋ 5- 氟尿嘧啶，纳武利尤单抗一线治疗。

在评价信迪利单抗联合化疗和靶向治疗多种晚期恶性肿瘤研究中，包含 3 例头颈部鳞状细胞癌患者，其结果支持信迪利单抗联合治疗成为晚期恶性肿瘤治疗的一种选择 [3]。一项针对信迪利单抗联合诱导化疗（IC）治疗局部晚期头颈部鳞状细胞癌患者的研究表明 [4]，信迪利单抗联合 IC 可延长无进展生存期（PFS），且不会增加毒性事件。信迪利单抗联合放化疗（NCT05136768）以及联合多模式放射治疗（NCT04917770）的两项Ⅱ期临床试验正在进行中。信迪利单抗治疗颈部肿瘤循证医学推荐意见为 C 级，应谨慎应用。

3.1.2　鼻咽癌　本研究有 4 例鼻咽癌患者超说明书用药，患者主要经放疗＋化疗（DP/GP 等）＋免疫治疗。2022 版 CSCO 鼻咽癌指南表明晚期鼻咽癌已进入免疫治疗时代，GP ＋ PD-1 已成为新标准一线治疗。几项在复发性或转移性鼻咽癌中的临床试验评估表明，抗 PD-1 单抗在免疫检查点治疗中具有良好的临床疗效 [5-7]。信迪利单抗治疗鼻咽癌循证医学推荐意见为 C 级，目前尚无强有力的循证医学证据，应谨慎使用。有关信迪利单抗治疗鼻咽癌的正在进行中的临床试验汇总见表 3。

表 3　信迪利单抗治疗鼻咽癌正在进行中的临床试验

Tab 3　Ongoing clinical trial of sintilimab for nasopharyngeal carcinoma

项目编号	试验方案	对照方案	样本量	预计完成时间	临床阶段
NCT05162872	信迪利单抗联合尼拉帕利（Niraparib）治疗		99	2023.10	Ⅱ期
NCT04917770	信迪利单抗联合多模式放射治疗		28	2024.06	Ⅱ期
NCT03619824	吉西他滨＋顺铂＋信迪利单抗＋调强放疗		40	2024.03	Ⅱ期
NCT04945421	信迪利单抗联合 IBI310		121	2024.03	Ⅰ/Ⅱ期
NCT03700476	吉西他滨＋顺铂＋信迪利单抗＋调强放疗	吉西他滨＋顺铂＋调强放疗	425	2025.01	Ⅲ期
NCT05201859	信迪利单抗联合卡培他滨	卡培他滨	150	2026.02	Ⅱ期

3.1.3　小细胞肺癌　本研究包含 1 例小细胞肺癌患者超说明书用药，经化疗 EP 方案联合信迪利单抗治疗。2022 版原发性肺癌诊疗指南中关于广泛期小细胞肺癌的治疗，推荐化疗或在化疗基础上联合免疫治疗，如 PD-1 单抗等的综合治疗。2022 版 CSCO 免疫检查点抑制剂临床应用指南中一线推荐阿替利珠单抗＋依托泊苷 / 卡铂、度伐利尤单抗＋依托泊苷 / 卡铂一线治疗广泛期小细胞肺癌。NCCN 指南 2022V1 小细胞肺癌全身治疗的其他推荐方案包括纳武利尤单抗和帕博利珠单抗。

付培彪等 [8] 对 90 例广泛期小细胞肺癌患者进行分析，化疗联合信迪利单抗组总有效率远高于化疗组，且可抑制血管内皮生长因子表达，下调血清肿瘤标志物水平，恢复机体体力和功能状况。一项前瞻性Ⅱ期研究（NCT04055792）表明，信迪利单抗联合抗血管生成药物安罗替尼可作为广泛期小细胞肺癌的二线或二线以上治疗，表现出良好的抗肿瘤活性，且毒性可控，PFS 为 6 个月和 12 个月的占比分别为 50.5% 和 27.8%，12 个月和 18 个月的生存率分别为 56.7% 和 42.5%[9]。信迪利单抗治疗小细胞癌的正在进行中的临床试验汇总见表 4。信迪利单抗治疗小细胞肺癌循证医学推荐意见为 B 级，可推荐使用。

表 4　信迪利单抗治疗小细胞肺癌正在进行中的临床试验

Tab 4　Ongoing clinical trial of sintilimab for small cell lung cancer

项目编号	试验方案	对照方案	样本量	预计完成时间	临床阶段
NCT05026593	IBI110 ＋信迪利单抗＋依托泊苷＋卡铂 / 顺铂	信迪利单抗＋依托泊苷＋卡铂 / 顺铂	60	2023.12	Ⅰ期
NCT04189094	信迪利单抗＋依托泊苷＋卡铂 / 顺铂＋预防性颅脑照射	依托泊苷＋卡铂 / 顺铂＋预防性颅脑照射	140	2023.07	Ⅱ期

3.1.4　胸膜间皮瘤　本研究有 1 例胸膜间皮瘤超说明书用药，患者经化疗（培美曲塞二钠和顺铂）联合免疫治疗。恶性胸膜间皮瘤是一种具有高度侵袭性的罕见癌症，治疗选择十分有限。部分免疫检查点抑制剂已经应用在其临床治疗中，日本于 2018 年批准了纳武利尤单抗作为间皮瘤的挽救疗法，2021 年 6 月国家药品监督管理局（NMPA）批准纳武利尤单抗联合伊匹木单抗用于一线治疗不可手术切除的非上皮样、恶性胸膜间皮瘤成人患者。2022 中国免疫检查点抑制剂 CSCO 指南中，一级推荐纳武利尤单抗联合伊匹木单抗一线治疗、纳武利尤单抗二线治疗和三线治疗。信迪利单抗同样为 PD-1 抑制剂可能达到相似疗效，虽有一项信迪利单抗联合安罗替尼和含铂双药化疗一线治疗恶性胸膜间皮瘤的Ⅱ期试验（NCT05188859）正在进行中，但目前信迪利单抗治疗胸膜间皮瘤循证医学证据不充足，并不推荐使用，需要进一步的试验结果以提供充分支持。

3.1.5　结肠癌　本研究包含 3 例结肠癌患者超说明书用药病例，其中 2 例患者为术后化疗＋靶向，后因疾病进展，靶向联合免疫治疗；1 例患者为术后化疗联合免疫治疗。2022 版 CSCO 结直肠癌诊疗指南基于 KEYNOTE-177 研究结果，MSI-H/dMMR 的患者在转化治疗或姑息治疗中可考虑使用 PD-1 抑制剂免疫治疗。NCCN 结肠癌（2022.V1）对 dMMR/MSI-H 患者也有使用检查点抑制剂的建议。在转移性结直肠癌（mCRC）一线治疗中，帕博利珠单抗已被批准为首选方案，纳武利尤单抗单独或与伊匹单抗联合作为错配修复缺陷和微卫星不稳定性高（dMMR/MSI-H）患者的替代选择 [10]。

姬颖华等 [11] 进行的安罗替尼联合信迪利单抗治疗标准治疗失败后微卫星稳定型结直肠癌疗效研究，与蔡江霞等 [12] 进行的信迪利单抗联合二线 XELIRI 化疗方案治疗一线含奥沙利铂方案化疗失败的晚期结直肠癌得到的结果相似，能够有效缓解临床症状，改善患者生命质量，且不良反应可控。一项纳入 *RAS* 基因突变、MSS 型 mCRC 患者Ⅱ期临床试验（NCT05171660）表明，信迪利单抗联合 CapeOx 和贝伐单抗的一线治疗具有较高的客观缓解率（ORR），并且毒性反应小 [13]。一项回顾性分析表明在至少 1 周期信迪利单抗联合瑞戈非尼治疗的 35 例难治性 mCRC 患者中，ORR 为 20.0%，疾病控制率（DCR）为 45.7%，3/4 级不良事件发生率为 10.6%[14]。正在进行的关于信迪利单抗治疗肠道恶性肿瘤的临床试验见表 5。信迪利单抗治疗肠道恶性肿瘤循证医学推荐意见为 B 级，可推荐使用。

表 5　信迪利单抗治疗肠道肿瘤正在进行中的临床试验

Tab 5　Ongoing clinical trials of sintilimab for carcinomaofrectum

项目编号	试验方案	对照方案	样本量	预计完成时间	临床阶段
NCT04636008	信迪利单抗＋大分割放疗	—	20	2022.11	Ⅰ/Ⅱ期
NCT04304209	A 组：奥沙利铂＋卡培他滨＋信迪利单抗＋直肠全系膜切除术 B 组：奥沙利铂＋卡培他滨＋信迪利单抗＋放射治疗＋直肠全系膜切除术	奥沙利铂＋卡培他滨＋放射治疗＋直肠全系膜切除术	195	2026.10	Ⅱ/Ⅲ期
NCT04724239	1：信迪利单抗＋西达本胺＋ IBI305 2：信迪利单抗＋西达本胺	—	48	2023.12	Ⅱ期
NCT04194359	信迪利单抗＋ XELOX ＋贝伐珠单抗	XELOX ＋贝伐珠单抗	436	2025.06	Ⅲ期

3.1.6　胰腺癌　本研究包含 2 例胰腺癌患者，占超说明书用药病例的 6%，采用白蛋白紫杉醇＋替吉奥＋信迪利单抗治疗。2022 版胰腺癌诊疗指南表明对于有特殊基因变异的晚期胰腺癌（如 *NTRK* 基因融合、*ALK* 基因重排、*HER2* 扩增、微卫星高度不稳定）等，有研究显示其对应的靶向治疗或免疫检查点抑制剂治疗具有一定疗效，并且首先推荐此类患者参加与其对应的临床研究，也可考虑在有经验的肿瘤内科医师的指导下采用特殊靶点靶向药物的治疗或免疫治疗。信迪利单抗联合改良 FOLFRINOX 方案治疗中国转移性和复发性胰腺癌患者的单中心、随机、Ⅲ期 CISPD3 研究结果表明联合 PD-1 抑制剂可能会扩大化疗在转移性胰腺癌（PDAC）中的获益。多项研究表明经信迪利单抗联合其他治疗，如抗血管生成剂、化疗等在胰腺癌中获益，且不良反应多可耐受 [15-18]。目前，两项信迪利单抗治疗局部晚期或者转移性胰腺癌的临床试验（NCT05481476、NCT05346146）正在进行中。基于以上证据，信迪利单抗治疗胰腺癌循证医学推荐意见为 A 级，推荐使用。

3.1.7　肾癌　本研究有 2 例肾癌患者，占超说明书用药病例的 6%，经靶向治疗联合免疫治疗。肾细胞癌是起源于肾小管上皮的癌，占肾癌的 80% ～ 90%，肾细胞癌的组织病理类型最常见的为透明细胞癌。2022 版 CSCO 免疫检查点抑制剂临床应用指南推荐帕博利珠单抗、阿替利珠单抗联、纳武利尤单抗用于肾透明细胞癌一线治疗。杜羽等 [19] 回顾性分析了 10 例中高危晚期肾癌患者，阿昔替尼联合信迪利单抗治疗后，ORR 为 40.0%（4/10），DCR 为 90.0%（9/10）。Lu 等 [20] 对 17 名晚期肾细胞癌的研究表明，TKI 舒尼替尼联合 6 ～ 8 个周期的信迪利单抗，然后单次使用 TKI 帕唑帕尼，是转移性透明细胞患者作为二线治疗的可行治疗方法。一项安罗替尼联合信迪利单抗一线治疗晚期非透明细胞肾细胞癌的Ⅱ期临床研究（NCT05220267）正在进行中。信迪利单抗治疗肾癌循证医学推荐意见为 C 级，目前尚无强有力的循证医学证据，应谨慎应用。

3.1.8　子宫颈癌　本研究有 10 例子宫颈癌患者，占超说明书用药病例的 32.26%，患者术后经化疗（TP/TC 等）＋ / 贝伐珠单抗＋ / 放疗＋信迪利单抗。NCCN 子宫颈癌（2022.V1）中免疫治疗进入一线治疗推荐，复发转移性子宫颈癌（鳞状细胞癌、腺癌或腺鳞癌）PD-L1 阳性患者首选 PD-1 联合化疗和贝伐珠单抗（1 类证据）。一

项正在晚期宫颈癌患者中进行的临床Ⅱ期研究（CTR20202017）的第一阶段数据显示，IBI310（重组全人源抗 CTLA-4 单抗）拟订适应证为与信迪利单抗联合用于复发或转移性晚期宫颈癌患者的治疗。PD-1 抑制剂信迪利单抗和抗血管生成靶向药物安罗替尼的联合应用治疗宫颈癌备受关注，一项多中心、单臂、前瞻性Ⅱ期试验[21]采用信迪利单抗联合安罗替尼作为 PD-L1 阳性复发或转移性（R/M）CA 的二线或后续治疗，42 名患者 ORR 为 54.8%（95%*CI* 38.7 ～ 70.2），中位 PFS 为 9.4 个月（95%*CI* 8.0 ～ 14.6）。郝晓慧等[22]在信迪利单抗静脉注射联合全身化疗紫杉醇＋顺铂对照试验中的结果表明信迪利单抗联合全身化疗在治疗宫颈癌中也有较好疗效，且不良反应可耐受。信迪利单抗联合安罗替尼或全身化疗均能为宫颈癌患者提供更多选择。一项信迪利单抗联合同步放化疗治疗局部晚期宫颈癌的Ⅱ期临床研究（NCT05105672）正在进行中。信迪利单抗治疗宫颈癌循证医学推荐意见为 B 级，可推荐使用。

3.1.9　子宫内膜癌　本研究有 6 例子宫内膜恶性肿瘤患者，占超说明书用药病例的 19.35%，患者术后经化疗（TP/TC 等）＋ / 贝伐珠单抗＋ / 放疗＋信迪利单抗治疗。帕博利珠单抗的 KEYNOTE 系列临床试验为免疫检查点抑制剂在晚期 / 复发子宫内膜癌治疗中的使用提供依据。2022 版子宫内膜癌诊治指南中表明免疫检查点抑制剂及酪氨酸激酶抑制剂作为新型靶向治疗制剂，在基于分子标志物指导的子宫内膜癌二线治疗中显示了抗肿瘤活性。

一项Ⅱ期临床研究（NCT04157491）在中国人群中探讨了信迪利单抗联合安罗替尼用于复发或晚期子宫内膜癌的疗效和安全性，联合治疗的 ORR 和 DCR 分别为 73.9% 和 91.3%[23]。一项 Niraparib 联合信迪利单抗在复发 / 晚期子宫内膜癌患者中Ⅱ期试验（NCT04885413）正在进行中。此为信迪利单抗在子宫内膜癌的进一步使用和研究提供依据和指导。信迪利单抗治疗子宫内膜癌循证医学推荐意见为 B 级，可推荐使用。

3.1.10　外阴癌（恶性黑色素瘤）　本研究有 1 例外阴癌患者超说明书用药。目前国内获批的黑色素瘤 PD-1 抑制剂包括帕博利珠单抗和特瑞普利单抗。2021 版外阴、阴道黑色素瘤诊断与治疗的专家推荐意见推荐 PD-1 抑制剂作为Ⅲ～Ⅳ期外阴、阴道黑色素瘤术后辅助治疗的首选用药，推荐 PD-1 抑制剂或联合细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4（CTLA-4）抑制剂作为不可切除或转移性外阴、阴道黑色素瘤的一线治疗用药。

刘瑾[24]评价信迪利单抗治疗中国晚期恶性黑色素瘤、肺癌、消化系统肿瘤、神经内分泌癌的疗效及安全性，与既往研究抗 PD-1 单抗报道类似，安全性良好，毒性耐受。PD-1 单抗在外阴癌中的疗效毋庸置疑，但信迪利单抗用于外阴黑色素瘤循证医学证据不足，目前并不推荐使用，需要更进一步的临床证据支持。

4　小结

从传统化疗药物治疗到免疫治疗时代，带给患者更多的选择以及希望，也给医师和药师在用药中提出了更大的挑战。信迪利单抗除在研究中发现的适应证外，也在很多其他肿瘤中进行了尝试，如卵巢癌[25]、软组织肉瘤[26]、转移性尿路上皮膀胱癌[27]、滤泡树突状细胞肉瘤[28]、大细胞神经内分泌癌[29]、转移性集合管癌[30]、贲门神经内分泌癌[31]、淋巴瘤[32-33]等，其不仅包括与化疗、抗血管生成药物、酪氨酸激酶抑制剂的联用，还包括与 PD-1 抑制剂的联用探索等，但这些基本没有足够的循证医学证据支持，仍在探索阶段。

本研究经回顾性分析某院信迪利单抗超说明书用药的情况，其中头颈部癌、鼻咽癌、胸膜间皮瘤、肾癌、外阴癌循证医学证据不足，小细胞肺癌、结肠癌、胰腺癌、子宫颈癌、子宫内膜癌使用相对合理。面对癌症的复杂治疗过程中可能出现的超说明书用药情况，应结合最新的医师法要求，建议相关专业机构根据不断出现的循证依据实时更新和提供超说明书用药判断支持，在医院内部进一步强化超说明书用药监管，针对新型抗肿瘤药物建立相应管理制度，加强医师与药师间的合作，保证其充分了解最新的药品适应证和循证医学证据，在保证患者用药安全的同时，最大化保障医师权益。

参考文献

[1] Machiels JP，René Leemans C，Golusinski W，et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity，larynx，oropharynx and hypopharynx：EHNS-ESMO-ESTRO clinical practice guidelines for diagnosis，treatment and follow-up [J]. Ann Oncol，2020，31（11）：1462-1475.

[2] Pfister DG，Spencer S，Adelstein D，et al. Head and Neck Cancers，Version 2. 2020，NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [J]. J Natl Compr Canc Netw，2020，18（7）：873-898.

[3] Liu X，Yi Y. Recent updates on sintilimab in solid tumor immunotherapy [J]. Biomark Res，2020，8（1）：69.

[4] Li X，Fang Q，Du W，et al. Induction chemotherapy combined with immunotherapy in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma [J]. BMC Cancer，2021，21（1）：622.

[5] Hsu C，Lee SH，Ejadi S，et al. Safety and antitumor activity of pembrolizumab in patients with programmed death-ligand 1-positive nasopharyngeal carcinoma：results of the KEYNOTE-028 study [J]. J Clin Oncol，2017，35（36）：

4050-4056.
[6] Ma BBY，Lim WT，Goh BC，et al. Antitumor activity of nivolumab in recurrent and metastatic nasopharyngeal carcinoma：an international，multicenter study of the Mayo clinic phase 2 consortium（NCI-9742）[J]. J Clin Oncol，2018，36（14）：1412-1418.
[7] Fang W，Yang Y，Ma Y，et al. Camrelizumab（SHR-1210）alone or in combination with gemcitabine plus cisplatin for nasopharyngeal carcinoma：results from two single-arm，phase 1 trials [J]. Lancet Oncol，2018，19（10）：1338-1350.
[8] 付培彪，吕晶晶，邹明雷，等 . 信迪利单抗联合 EP 方案治疗广泛期小细胞肺癌的效果观察 [J]. 中国实用医刊，2022，48（21）：90-93.
[9] Ma S，He Z，Wang L，et al. Sintilimab plus anlotinib as second or further-line therapy for small cell lung cancer：an objective performance trial [J]. J Clin Oncol，2022，40（16 suppl）：8516-8516.
[10] Boukouris AE，Theochari M，Stefanou D，et al. Latest evidence on immune checkpoint inhibitors in metastatic colorectal cancer：a 2022 update [J]. Crit Rev Oncol Hematol，2022，173：103663.
[11] 姬颖华，杨晓煜，孟祥丽，等 . 盐酸安罗替尼联合信迪利单抗治疗标准治疗失败后微卫星稳定型结直肠癌疗效观察 [J]. 新乡医学院学报，2021，38（252）：25-30.
[12] 蔡江霞，陈思颖，董凯，等 . 信迪利单抗治疗晚期结直肠癌患者的疗效及安全性分析 [J]. 中国药物警戒，2022，19（182）：51-55.
[13] Fang X，Zhong C，Zhu N，et al. A phase 2 trial of sintilimab（IBI 308）in combination with CAPEOX and bevacizumab（BBCAPX）as first-line treatment in patients with RAS-mutant，microsatellite stable，unresectable metastatic colorectal cancer [J]. J Clin Oncol，2022，40（16 suppl）：3563-3563.
[14] Li R，Liu Z，Yin X，et al. The efficacy and safety of sintilimab plus regorafenib in refractory metastatic colorectal cancer [J]. J Clin Oncol，2022，40（16 suppl）：e15546-e15546.
[15] Liu Q，Zhao G，Zhang X，et al. Nab-paclitaxel plus S-1 with or without PD-1 inhibitor in pancreatic ductal adenocarcinoma with only hepatic metastases：a retrospective cohort study [J]. Langenbecks Arch Surg，2022，407（2）：633-643.
[16] 肖霞，王琦，过雪丹，等 . 信迪利单抗在晚期胰腺癌多线治疗中的疗效及安全性观察 [J]. 肿瘤研究与临床，2021，33（11）：857-860.
[17] Qin L，Shen J，Yang Y，et al. Rapid response to the combination of lenvatinib and sintilimab in a pancreatic acinar cell carcinoma patient with elevated alpha-fetoprotein：a case report [J]. Front Oncol，2021，11：692480.
[18] Ye Y，Zheng S. Successful immunotherapy for pancreatic cancer in a patient with TSC2 and SMAD4 mutations：a case report [J]. Front Immunol，2021，12：785400.
[19] 杜羽，斯璐，毛丽丽，等 . 阿昔替尼联合信迪利单抗治疗中高危晚期肾癌的研究 [J]. 中国肿瘤临床，2020，47（10）：513-516.
[20] Lu X，Gu W，Shi G，et al. Pazopanib together with 6-8 cycles of sintilimab followed by single use of pazopanib in the second-line treatment of advanced renal cell carcinoma [J]. Transl Androl Urol，2021，10（5）：2078-2083.
[21] Xu Q，Wang J，Sun Y，et al. Efficacy and safety of sintilimab plus anlotinib for PD-L1-positive recurrent or metastatic cervical cancer：a multicenter，single-arm，prospective phase Ⅱ trial [J]. J Clin Oncol，2022，40（16）：1795-1805.
[22] 郝晓慧，张志林，卢秀荣，等 . 信迪利单抗静注联合全身化疗治疗复发转移宫颈癌的临床疗效观察 [J]. 山东医药，2022，62（5）：78-81.
[23] Wei W，Ban X，Yang F，et al. Phase Ⅱ trial of efficacy，safety and biomarker analysis of sintilimab plus anlotinib for patients with recurrent or advanced endometrial cancer [J]. J Immunother Cancer，2022，10（5）：e004338.
[24] 刘瑾 . 抗 PD-1 单抗治疗晚期恶性肿瘤的疗效及安全性分析 [D]. 杭州：浙江大学，2019.
[25] 贺信橙，安改丽，杨尚臻，等 . 免疫检查点抑制剂联合抗血管生成药物治疗晚期衰竭卵巢癌 1 例 [J]. 中国临床研究，2022，35（3）：394-398.
[26] Tian Z，Dong S，Yang Y，et al. Nanoparticle albumin-bound paclitaxel and PD-1 inhibitor（sintilimab）combination therapy for soft tissue sarcoma：a retrospective study [J]. BMC Cancer，2022，22（1）：56.
[27] Cao JZ，Wu W，Pan JF，et al. Case report：anlotinib combined with sintilimab as third-line treatment in a metastatic urothelial bladder carcinoma patient with FGFR3 mutation [J]. Front Oncol，2021，11：643413.
[28] Lei Y，Zhao S，Jiang M. Unexpected favorable outcome to PD-1 antibody plus lenvatinib in a patient with recurrent intestinal follicular dendritic cell sarcoma：a case report and literature review [J]. Front Immunol，2021，12：653319.
[29] Chen F，Hua H，Huang H. Neoadjuvant chemotherapy combined with immunotherapy for pulmonary large-cell neuroendocrine carcinoma：a case report [J]. Ann Palliat Med，2021，10（7）：8479-8483.
[30] Zhou W，Huang J，He Q，et al. Persistent response to a combination treatment featuring a targeted agent and an immune checkpoint inhibitor in a patient with collecting duct renal carcinoma：a case report and literature review [J]. Front Oncol，2021，11：764352.
[31] Yang Y，Xu H，Zhang L，et al. Partial response of metastatic cardia neuroendocrine carcinoma with the combined therapy involving PD-1 blockade after failed multi-line chemotherapies：a case report and literature review [J]. Anticancer Drugs，2022，33（2）：214-219.
[32] Chen C，Zhang W，Zhou D，et al. Sintilimab and chidamide for refractory transformed diffuse large B cell lymphoma：a case report and a literature review [J]. Front Oncol，2021，11：757403.
[33] Xu J，Xu X，Chen J，et al. Sustained remission of multiline relapsed extranodal NK/T-cell lymphoma，nasal type，following sintilimab and chidamide：a case report [J]. Medicine（Baltimore），2021，100（10）：e24824.

（收稿日期：2022-08-30；修回日期：2022-10-08）

基于 CNKI 文献计量分析的中药矫味与掩味研究现状

赵佳柱[1, 2]，祝雨辰[1, 2]，邝柏宇[1, 2]，梁金萍[1, 2]，杨岩涛[1, 2, 3*]（1. 湖南中医药大学药学院，长沙　410208；2. 中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室，长沙　410208；3. 湖南中医药大学中医药超分子机理与数理特征化实验室，长沙　410208）

摘要：目的　分析国内中药矫味与掩味技术研究现状。**方法**　以 CNKI 数据库 2001—2021 年矫味与掩味研究文献为数据来源，利用 VOSviewer 对文献关键词进行聚类可视化分析。**结果**　限定学科为“中药学”后，2001—2021 年间发表矫味与掩味共 325 篇，其中共有 1569 个关键词，出现 4 次及以上的关键词共 48 个，前 10 个关键词分别为制备工艺、质量标准、掩味、中药、成型工艺、正交试验、口腔崩解片、苦味、电子舌、掩味技术。同时，48 个关键词被分为 7 个聚类。**结论**　当前矫味与掩味大部分研究热点都集中在制备工艺和质量标准上，对于新兴技术开发及应用涉及较少。在满足临床安全有效的基础上，开拓矫味新技术及规范质量标准制订，是推动中药现代化、国际化及生产智能化的有效途径。

关键词：矫味；掩味；VOSviewer；CNKI；制备工艺；质量标准
中图分类号：R943　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-1093-09
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.041

Research status of traditional Chinese medicine taste correction and masking based on CNKI bibliometric analysis

ZHAO Jia-zhu[1, 2], ZHU Yu-chen[1, 2], KUANG Bo-yu[1, 2], LIANG Jin-ping[1, 2], YANG Yan-tao[1, 2, 3*] (1. *School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha* 410208; 2. *Key Laboratory of Druggability and Preparation of Chinese Medicine in Hunan, Changsha* 410208; 3. *Laboratory of TCM Supramolecular Mechanism and Mathematical Physical Characterization, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha* 410208)

Abstract: Objective To analyze the current research on taste correcting and masking techniques of Chinese traditional medicine in China. **Methods** CNKI (China national knowledge infrastructure) China Journal Database from 2001 to 2021 was used as the data source. VOSviewer was used in the clustering and visual analysis of literature keywords. **Results** After the discipline was defined as “traditional Chinese medicine”, 325 papers were published from 2001 to 2021. There were 1569 keywords in total and 48 keywords appeared 4 times or more. The top 10 frequent keywords included preparation process, quality standard, taste masking, traditional Chinese medicine, molding process, orthogonal test, oral disintegrating tablet, bitter taste, electronic tongue, and taste masking technology. The 48 keywords were divided into 7 clusters. **Conclusion** Currently, most research focuses more on the preparation process and quality standards rather than on the development and application of emerging technologies. On the basis of clinical safety and effectiveness, developing new taste correcting technologies and quality standards helps promote the modernization, internationalization and intelligent production of traditional Chinese medicine.

Key words: correcting taste; concealing taste; VOSviewer; CNKI; preparation process; quality standard

基金项目：湖南省自然科学基金项目（No.2021JJ30512）；长沙市市自然科学基金资助项目（No.kq2014091）；湖南省教育厅一般项目（No.19C1406）；湖南省研究生科研创新项目（No.CX20210710）；湖南中医药大学化学工程与技术一流学科建设项目。
作者简介：赵佳柱，男，硕士研究生，主要从事中药制剂学、中药药理相关研究，email：503338719@qq.com　*通信作者：杨岩涛，男，教授，硕士研究生导师，主要从事中药药剂学、中药药理学、中药制药工程与工艺方面的教学与科研工作，email：xdyyt1@163.com

《史记·留侯世家》的“良药苦口利于病”反映了传统中草药中味道苦、涩、酸等，动物和其他中药还具有腥臭味。这对长期服药的慢性病患者、对特殊气味敏感的患者以及药物依从性差的患者造成了困扰，且在一定程度上影响了中药复方的应用，为提高中药复方临床依从性及使用率，矫味或者掩味处理已是一种常用的技术。因此，本文以中国知网（CNKI）2001—2021 年矫味与掩味研究文献为数据来源，利用 VOSviewer 对矫味与掩味相关文献的关键词进行聚类可视化分析，为促进中药矫味与掩味技术深入研究提供参考。

1　文献关键词分析

选择 CNKI 数据库，以“矫味”或“掩味”为主题词进行查询，限定时间为 2001 年 1 月 1 日至 2021 年 12 月 31 日，限定学科为“中药学”，剔除报纸、专利、图书及与中药矫味和掩味无关的文献，必要时通读文献题目、摘要、关键词及全文进行筛选剔除，共收集 325 篇文献。

导出所选文献，利用 VOSviewer 进行关键词可视化分析，“关键词出现的最少次数”选择 4，共得到 1569 个关键词，其中 48 个关键词符合条件。

2　结果分析

2.1　关键词出现次数

关键词是对文献主要内容的概括，对矫味与掩味相关文献关键词的分析有助于了解该领域的研究热点。其中，矫味与掩味文献出现次数前 20 的关键词见表 1。

表 1　关键词出现次数

Tab 1　Keywords occurrence

关键词	出现次数	关键词	出现次数
制备工艺	60	矫味剂	12
质量标准	35	辅料	12
掩味	35	模糊数学	11
中药	23	中药炮制	11
成型工艺	23	口感	10
正交试验	17	制备	10
口腔崩解片	16	炮制	10
苦味	14	稳定性	9
电子舌	13	盐酸小檗碱	9
掩味技术	13	提取工艺	9

2.2　关键词聚类视图

关键词聚类视图中圆圈和标签组成一个元素，元素的大小取决于节点的度、连线的强度、被引量等，元素的颜色代表其所属的聚类，不同的聚类用不同的颜色表示，通过此视图可以查看每个单独的聚类，如图 1 所示。

2.3　关键词标签视图

VOSviewer 节点颜色代表某一阶段的研究热点，各节点的线条表示知识流向，关键词标签视图如图 2 所示。按时间先后顺序从紫色过渡到黄色。图 2 中紫色节点表示 2013 年前，黄色表示 2017 年后，关键词节点越偏向黄色，说明研究领域越趋前沿。通过颜色变化，可直观体现从质量标准、中药制剂、制备、炮制等泛化研究领域到电子舌、含片、β-环糊精、指纹图谱等细化研究领域趋势流向。

2.4　关键词密度视图

关键词密度视图如图 3 所示，其图谱上每一点都会根据该点周围元素密度来填充颜色，密度越大越接近黄色，相反，密度越小越接近紫色。密度大小依赖周围区域元素的数量以及这些元素的重要性，可用来快速反映矫味与掩味的重要领域和这一领域知识及其密度情况。由图 3 可知，当前对矫味与掩味研究的热点集中在制备工艺和质量标准上，而对于新兴技术开发及应用涉及较少。

2.5　关键词聚类分析

本文进一步选取出现频率大于等于 4 的 48 个关键词进行聚类分析，共获得 7 个聚类族群，如表 2 及图 1 所示，不同的颜色表示不同的聚类族群，其中节点大小与关键词出现频率成正比，节点越大，关键词出现频率越高，反之亦然。

2.5.1　聚类族群一区——掩味技术相关研究　该聚类族群中“掩味”一词总连接强度为 52，在该区中为总连接强度为第一，即该区关键词皆围绕着掩味相关内容进行聚类。

对涉及掩味技术的中药频次及其功效进行分析，发现清热药穿心莲研究较多（5 篇），对于清热药黄连的提取物盐酸小檗碱的研究也不占少数 [1]。若将关键词出现的最少次数从 4 改为 2，其关键词类别属于中药的出现次数频次及其功效见表 3。可见多数清热药在制备过程中需进行矫味，这些苦味物质主要来源于生物碱类、萜类、黄酮类等物质 [2]。

中药苦味的掩盖与抑制，可明显改善儿童等患者的用药依从性。苦味抑制剂可以通过消除苦味物质、与苦味剂争夺苦味受体、增加苦味感受阈值或阻碍苦味受体与苦味剂的结合，进而抑制苦味受体对苦味剂的接触，达到遮盖苦味的效果 [3]。此外，苦味抑制剂能在特定范围选择苦味分子，如脂蛋白的苦味抑制剂，可以通过卵磷脂或脑磷脂抑制味觉神经对苦味物质的反应 [4]。在药物中添加苦味抑制剂，其除了具有基本的苦味抑制作用外，还应满足安全性、药效学惰性、对苦味的高选择性等要求。

中药苦味掩味效果常用评价方法有志愿者感

图 1　关键词聚类视图

Fig 1　Keywords network visualization

图 2　关键词标签视图

Fig 2　Keywords overlay visualization

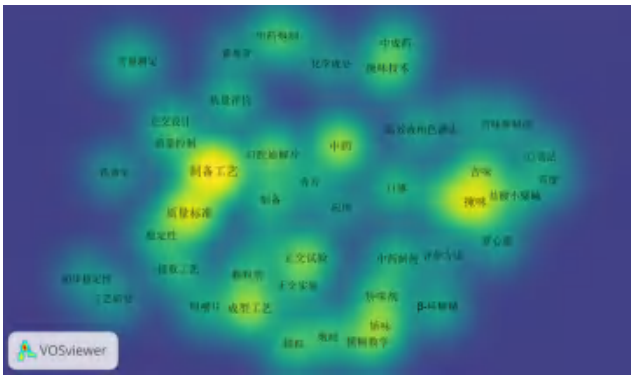


图 3　关键词密度视图

Fig 3　Keyword density visualization

官评价法、人工智能感官评价法、动物偏好实验。其原理及优缺点见表 4。由关键词数据分析可知，在对中药的矫味评价方法上使用最多的是口尝法（志愿者感官评价法，5 篇）与电子舌法（人工智能感官评价法，13 篇）。近些年，电子舌通常与口尝法联合使用，如两者联用，可科学合理地筛出五汁饮的矫味剂组合，并显著减少五汁饮中的生涩味 [5]。除此之外，微电极阵列可用于同一药物不同浓度和不同药物同一浓度的口感评价，功能性磁共振成像能测出人受到不同味道刺激后的血液流速变化 [6]，这些方法因其灵敏、客观、传质速率快也逐渐运用在矫味的评价上，但由于影响因素多、经济成本高，并未广泛推广。

表 2　48 个关键词的 7 个聚类族群

Tab 2　Seven clustering groups of 48 keywords

聚类族群	关键词
1	口尝法；指纹图谱；掩味；电子舌；盐酸小檗碱；穿心莲；苦味；苦味抑制剂；苦度；高效液相色谱法
2	制备；制备工艺；口腔崩解片；应用；正交设计；稳定性；药效学；质量控制；颗粒剂
3	*β*- 环糊精；中药制剂；模糊数学；炮制；矫味；矫味剂；评价方法；辅料
4	中成药；中药；中药炮制；化学成分；掩味技术；醋制；黄芩苷
5	初步稳定性；咀嚼片；工艺研究；星点设计 - 响应面法；正交实验；质量标准
6	口感；含片；成型工艺；提取工艺；正交试验
7	含量测定；工艺；质量评价

表 3　中药出现次数及功效

Tab 3　Frequency and efficacy of traditional Chinese medicine

中药名称	出现次数	功效
穿心莲	5	清热药
龙胆	3	清热药
灯心草	3	利水渗湿药
苦参	2	清热药
肉桂	2	温里药
黄连	2	清热药
红景天	2	补虚药
丹参	2	活血化瘀药

由于中药苦味物质成分复杂，且不同类型的化学成分极性差别较大，需要对中药及复方的掩味剂添加前后的化学成分与药效变化进行研究。对于其成分变化可运用化学及生物指纹图谱来进行评价，其中高效液相色谱指纹图谱应用最为广泛（6 篇）。利用高效液相色谱指纹图谱探究三种掩味剂单独或联合应用对黄柏的掩味作用及比较掩味前后化学成分，得到均具有较好的抑苦作用，且掩味前后对黄柏中化学成分的总量无显著影响 [7]。目前，对中药粉末及提取物的流动性、吸湿性、压缩性等中药制剂物理性质相关性的物理指纹图谱的研究，也能用来减少中药制剂研究的试错过程，提高制药效率 [8]。而对于药效的影响，还需相关研究判定，因此，需要在指纹图谱的基础上，关联药效学，利用

表 4　常用矫味效果评价方法原理及优缺点

Tab 4　Principles，advantages and disadvantages of commonly used methods for evaluation of taste correction effects

矫味效果评价方法	原理	优点	缺点
志愿者感官评价法	利用人体志愿者味觉及嗅觉感官对药物味道进行口尝或者鼻闻	最直观、最简单、最高效	受研究者主观因素的影响；准确度低、安全性低；耗时长、花费高；不适合儿童、老人等特殊人群
人工智能感官评价法	电子舌采用人工脂膜传感器技术，其工作原理与人类舌头的味觉细胞类似；电子鼻通过模拟人类嗅觉系统，将气味进行客观化、数字化表征	抗疲劳能力强；重复性好、客观性强、检测响应快、灵敏度高	无法完全代表人的真实感受，无法进行人类口干等定性反应；受自然环境影响；价格昂贵
动物偏好实验	利用大鼠等动物趋利避害的本能设计偏好测试来评估药物味道	能替代人品尝药物，降低危险系数	与临床试验源自不同物种，其合理性受到研究人员的质疑

谱效学展开研究，进一步可采用总量统计矩法对谱效学结果进行分析，为筛选不影响中药复方疗效的掩味技术提供支撑 [9]。

2.5.2　聚类族群二区——制备工艺相关内容的研究进展　该聚类族群中“制备工艺”一词总连接强度为 79，在该区中为总连接强度为第一，即该区关键词皆围绕着制备工艺相关内容进行聚类。

在中药制备及制备工艺中，矫味技术得到蓬勃发展与提高。混悬剂、口腔崩解片、咀嚼片、颗粒剂 [10-11] 等新剂型的出现，使中药制剂工业现代化进程加速，中药制备也将面对着更高的挑战。3D 打印技术制备、静电纺丝技术、超临界流体技术等新制备工艺正在应用于中药矫味制剂当中。然而，对于中药矫味效果的评估还没有建立一个标准的、通用的质量控制方法，大多数仍依赖于经验丰富的制剂研究人员的反复实验得出结果，鲜有量化。可通过正交设计来对矫味剂等需要添加在中药制剂中的辅料进行筛选。得到单一辅料或多种辅料联合使用后的最佳配比，并能调节制剂的口感与延长制剂的稳定性。另外，辅料在用于矫味掩味中也出现使用不规范现象，因此，在对中药制剂制备工艺中，还需对所得到的矫味制剂进行药效学的初步研究，为临床合理使用及进一步研制提供依据。

2.5.3　聚类族群三区——矫味剂相关内容的研究进展　该聚类族群中“矫味剂”一词总连接强度为 16，在该区中总连接强度为第一，即该区关键词皆围绕着矫味剂相关内容进行聚类。

在现代矫味剂广泛使用之前，早从春秋战国时期伊始，中药可通过炮制，起到矫味矫嗅、便于成型的作用。其主要原理是经过高温加热，经炒、煎、蒸、酒炙、煮等处理后中药材主体分子结构遭到破坏，如结合水逸出、大分子链破裂、大分子水解，中药材超分子主体性质由此改变，便于其中“印迹模板”客体分子的溶出 [12]。此外，在传统中药制剂工艺中，可通过添加精炼过的蜂蜜或蔗糖等辅料，以调节药方的效果，提高患者对药物的依从性，同时兼有黏合、矫味与药效作用，以达到“药辅合一”。加入蜂蜜和蔗糖，在去杂及降低含水率的同时，还能使后期储存不易发生酶变，以提高制剂稳定性，并矫正其特殊气味 [13]。

而在现代矫味技术中，常通过添加甜味剂、酸味剂、清凉剂、胶浆剂、芳香剂、泡腾剂等矫味剂，用于改善口感或屏蔽气味，使患者不易感受其辛辣、刺激性等异味以及强烈苦味的物质，以上也属于药用辅料，因其制备简便、价格低廉，已被广泛应用在现代中药制剂临床生产中。目前，新型矫味剂正向天然化学产物延伸，传统合成矫味剂也有突破性进展。开发出一种矫味效果良好、价格低廉、安全无毒的矫味剂是中药制剂的目标与方向，表 5 列举了不同矫味剂的矫味原理、常见的化学成分及其优缺点。中药制剂现代矫味技术包括包衣法、环糊精包合法、固体分散法、离子交换树脂法、微球微囊化技术等，中药矫味技术中应用最多的为 β- 环糊精包合法（7 篇）。值得注意的是，有研究表明，高剂量口服环糊精可致动物可逆性腹泻和盲肠膨大，且口服利用率低，在人体内也可产生某种程度的类似状况。β- 环糊精的不良作用是无法预测的，所以在利用 β- 环糊精进行包合法矫味的同时，需保证其安全性 [14]。随着对矫味剂型的深入研究，“一方一策、精准抑苦”的矫味伴侣概念也随之提出，分别使用 γ- 环糊精、mPEG2000-PLLA2000、纽甜、与 γ- 环糊精、甜菊糖苷、罗汉果甜苷等五种经典名方药液制备成两种汤剂伴侣剂，通过环糊精包合与竞争抑制苦味改善汤剂口感 [15]。以 Amberlite IRA-400 阴离子交换树脂制备的龙胆苦苷 - 树脂复合物 [16]，运用喷雾冷凝技术制备穿心莲内酯固体分散体 [17]；利用高效包衣机将薄膜包衣材料包覆在柴黄素片表面制得的柴黄片 [18]；通过化学偶联制

得姜黄素偶联壳聚糖微球[19]；这些矫味产物均有效地改善了原有中药化合物的口感，提高了患者用药的依从性。目前，多种矫味技术联合应用已经成为趋势，是中药矫味的一个新的发展方向。表 6 综合比较了各掩味技术的优缺点。

除了聚类族群一区所提到的质量评价方法，模糊数学综合评价法常应用于使用矫味剂等方式掩味前后的变化验证上，以筛选最佳掩味方案。模糊数学能使中药矫味中的模糊概念量化成为可能。利用模糊数学将中药矫味的理论内容以数学语言描述，可以极大地促进中药矫味制剂朝着客观化、现代化发展。如采用此法对腥臭异味突出的中药水蛭掩味方案进行评定，使感官定性评价定量化，可作为掩味方案筛选的重要依据。对利用 β- 环糊精研磨包合技术掩味前后腥臭异味指标成分正己醛变化的气相检测结果表明，模糊数学综合评价法筛选出的掩味方案可有效减少药材原粉中正己醛的溶出，证实该方法应用于口感评价准确有效[20]。但目前模糊数学在中药矫味制剂中的应用尚处于初级阶段，大部分临床科研人员还欠缺完备的模糊数学理论知识，可同该领域的研究人员共同完善此法，以促进中药制剂事业的发展。

表 5　不同矫味剂的矫味原理、常见的化学成分及优缺点

Tab 5　Principles，common chemical components，advantages and disadvantages of different taste correcting agents

矫味剂	矫味原理	化学成分	优点	缺点
甜味剂	刺激味蕾而形成一种复杂的物理、化学和生物过程；增强甜度感应，而混淆机体大脑的味觉感知	天然甜味剂：蜂蜜、甘蔗、糖醇、罗汉果甜苷、甜菊糖苷、甜茶苷；人工合成甜味剂：阿力甜、安赛蜜、糖精钠、阿斯巴甜、三氯蔗糖	天然甜味剂：安全性高；价格低廉；味觉良好；稳定性高；水溶性好。人工合成甜味剂：化学性质稳定；适合糖尿病人等特殊人群服用；甜度较高	天然甜味剂：渗透性差，分子量大。人工合成甜味剂：甜味不够纯正；安全性较低
酸味剂	通过味觉混淆实现矫味作用	柠檬酸、乳酸、水梨酸	在矫味的同时，兼有防腐、抗氧化、缓冲等作用	有一定刺激性，可引起消化功能疾病
清凉剂	刺激口腔黏膜冷觉感受器，并可达到生理性清凉效果，使药物更清凉爽口	桉树脑、薄荷脑、冰片	使药物爽口、清凉;效果温和而持久，几乎无味；具有一定药理活性	刺激性和挥发性较大
胶浆剂	使药物释放延迟，抑制其向味蕾的扩散	海藻酸钠、阿拉伯胶、明胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠	能在矫味的同时，实现药物的助悬与溶液的增稠，减少药物刺激	天然来源胶浆剂易腐败
芳香剂	影响嗅觉来改善药物气味	天然芳香剂：薄荷、茴香、樱桃等挥发油成分；人工合成芳香剂还有柠檬香精、柑橘香精、苯甲醛、桂皮醛等	天然芳香剂：其本身具有药理活性；大众接受度高。人工合成类芳香剂：成本低	天然芳香剂：安全性低；影响或干扰制剂的药效。人工合成芳香剂：成分较难控制
泡腾剂	生成的二氧化碳能够短暂麻痹味蕾而短暂起到矫味效果	碱源：碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸钾等；酸源：柠檬酸、水果酸、富马酸等	疗效迅速，生物利用度高；可增加部分药物溶解性和稳定性	黏冲；稳定性差；崩解时间长；生产工艺复杂

2.5.4　聚类族群四区——中药相关内容的研究进展　该聚类族群中“中药”一词总连接强度为 37，在该区中总连接强度为第一，即该区关键词皆围绕着中药相关内容进行聚类。

除了在聚类族群三区提到的炮制方法之外，醋制也是中药炮制应用于掩味技术最多的方式（4 篇）之一。醋制能在给人带来清爽和刺激的感觉的同时，还能中和乳香等中药对胃的刺激性，以及减轻五灵脂等中药的腥臭味，其机制可能为醋制可在温度升高的炮制过程中，促使各类中药不良气味的挥散[21]。

在中药按相应制剂工艺制成中成药前，需对其化学成分进行分析，并判断是否需要因成分引起的口感欠佳而对其使用掩味技术。“将关键词出现的最少次数”限定由 4 降至 2，其关键词属于中药化学成分及其所属中药、出现次数见表 7。由此可推测，从呈味物质来说，黄芩苷、盐酸小檗碱、芍药苷、麻黄碱等生物碱和苷类成分是所含其中药苦味原因的物质基础之一，没食子酸会引起酸味口感，甜菊素会引起明显的甜味口感。五味子具有酸、苦、甜、辛、咸五种味道，则分别有其化学成分物质基础[22]。基于中药口感及各化学成分的物质基础及药理特性，既能探讨出“药辅合一”的设计应用规律，又能够揭示传统矫味制剂的科学内涵，如附子与甘草经常在一起搭配使用，从化学成分角度分析是由于甘草中的甘草酸能与附子中的生物碱生产难溶性沉淀，该沉淀能在胃肠道中又分解为甘草酸和生物碱，既起到减毒作用，又缓解了附子的苦味[23-24]；将中药红景天的化学成分红景天苷和多糖物质完全提

表 6　掩味技术的原理及优缺点

Tab 6　Principle，advantages and disadvantages of odor masking technology

掩味技术	掩味原理	优点	缺点
矫味剂添加法	干扰神经中枢味觉信号整合	价格低廉，操作简便	某些成分存在着安全性问题；对极苦药物矫味效果差
包衣法	避免药物与味蕾的直接接触	粒径小，适合多种剂型	工艺要求高；药物包封率低；容易带来环境污染
环糊精包合法	避免药物与味蕾的直接接触	提高药物溶解度和溶出率以及稳定性	对药物分子大小有要求，不适用于水溶性及大剂量药物
固体分散法	避免药物与味蕾的直接接触	载体中药物以高度分散状态存在；利用载体的包载作用，可延缓药物的水解和氧化	对药物生产熔点有要求，不适用于熔点低、对热不稳定且易挥发的药物
离子交换树脂法	避免药物与味蕾的直接接触	增加药物稳定性和生物利用程度	药物需与离子树脂带相反电荷；不适用于水溶性及大剂量药物；长期服用影响胃肠道离子平衡
微球微囊化技术	避免药物与味蕾的直接接触	粒径小，适合多种剂型	工艺要求高；药物包封率低；容易带来环境污染

取释放出来，两者之间会形成复杂的分子作用力，明显延缓释放速率，可作为提高生物利用率的手段，用来充当药物辅料，替代或降低其他辅料的应用[25]。综上，能利用“药辅合一”的原理，对目前常用中药进行气味标准化测定，初步建立起常用中药的口感数据库，能够促进安全有效的新辅料的开发、推动稳定性高及成本低的新技术的发展和新的给药剂型的设计。

表 7　化学成分所属中药及出现次数

Tab 7　Chemical composition in Chinese medicine and its occurrence times

中药化学成分	所属中药	出现次数
盐酸小檗碱	黄连	9
黄芩苷	黄芩	4
葛根素	葛根	3
甜菊素	甜叶菊	3
芍药苷	芍药	3
没食子酸	五倍子	2
麻黄碱	麻黄	2

2.5.5　聚类族群五区——质量标准相关内容的研究进展　该聚类族群中“质量标准”一词总连接强度为 59，在该区中总连接强度为第一，即该区关键词皆围绕着质量标准相关内容进行聚类。

除了正交试验外，还可通过星点设计 - 效应面法进一步对咀嚼片等矫味新剂型进行工艺研究优化，如以黄精为原料，甘露醇、预胶化淀粉、羟丙基纤维素、木糖醇、山梨醇等为辅料，以咀嚼片外观、口感、风味和硬度为指标，在单因素试验基础上，再运用星点设计 - 效应面法进一步优化黄精咀嚼片处方[26]，通过处方筛选和工艺优化可制得口感适宜、表面光滑美观、色泽均匀、硬度适中的咀嚼片。星点设计结合效应面法可以集数学和统计于一体，与国内经常采用的均匀设计和正交设计相比具有精度高、预测性好、简便等优点。除此之外，均匀试验设计、D- 最优混料设计、析因试验设计等方式均被用于感官评价的中药制剂工艺试验设计中。在矫味与掩味工艺优化后，还需对制得的成品进行初步稳定性考察以及质量标准制订。可根据剂型不同，分别按照《中国药典》2020 年版相关标准，各项指标均应符合制剂标准草案的相关规定，可为进行长期稳定性试验提供参考依据。可运用双重实时荧光定量 PCR 技术，建立中药矫味制剂微生物限度检查方法[27]。而对于综合口感的评价方法，需参考所含药物的固有特征，制订与之对应的志愿者综合评分标准或基于电子舌与动物偏好实验等技术所建立的评价标准，可基于“苦味阈值浓度”测量的“苦味中药分子苦度当量”的测定方法，准确客观地测定矫味前后苦味中药及制剂的苦度，为药物的口感评价提供量化指标，并为药物矫味提供技术支撑[28]。

2.5.6　聚类族群六区——成型工艺相关内容的研究进展　该聚类族群中“成型工艺”一词总连接强度为 26，在该区中总连接强度为第一，即该区关键词皆围绕着成型工艺相关内容进行聚类。

为提高制剂稳定性与安全性，矫味与掩味技术的应用主要在中药制剂制备生产中的提取工艺（9 篇）与成型工艺（23 篇）上，绝大多数试验都是通过单因素及正交试验来优化提取工艺与成型工艺，在此基础上再引入星点设计 - 响应面法用于中药处方的提取工艺上，建立的响应方程可具有良好的预测性，能最大限度地优化提取工艺，稳定可靠，为后续成型工艺的进行建立基础。由数据分析可知，矫味在口腔崩解片（16 篇）的应用最多，其次是颗粒剂（8 篇）、含片（6 篇）。由此可知，大部分关于矫味的研究均集中在口服的固体制剂中，应深入加强对液体制剂以及外用制

剂的矫味研究。且口腔崩解片、含片等剂型可有效避免制剂与味蕾直接接触，避免带来口感问题，而颗粒剂、口服液等剂型会与味蕾直接接触，会充分暴露口感问题，因此，可选择不同剂型来达到矫味效果。除了提取和成型工艺的研究，还可以通过制剂包装来实现矫味，因色彩是视觉接收的第一信息，直观和强烈的视觉冲击能使人产生联想和想象，不同的色彩给人不同的情感体验，在符合药品包装管理的基础上，一定程度地改善包装的色彩也可起到一定的矫味作用。

对于口感改善，可以基于不同人群的不同特点而定，对于苦味耐受程度低而甜味耐受程度高的儿童患者，应在保证制剂物理稳定性的情况下，酌情使用矫味辅料，一般首选甜味、安全性以及稳定性高的三氯蔗糖和水果味香精；针对肥胖和糖尿病患者，选用安赛蜜、甜菊素、罗汉果甜苷等高甜度倍数甜味剂来代替蔗糖的使用是合理的选择；对耐受能力较强的成年人可考虑在掩盖苦味和气味的同时保持一定量的苦味，来确保更好的疗效，甚至不含苦味药物的处方可以在辅料中加入安全剂量的蔗糖八乙酸酯等苦味剂；对于中年女性患者来说，建议使用清新花香的香精进行制剂气味的调整，也不必完全掩盖苦味；患有常染色体隐性遗传性苯丙酮尿症的患者应慎用阿斯巴甜[29]。根据不同患者，每次服药之前根据个人喜好来添加矫味剂也能提高患者服药顺应性。

2.5.7　聚类族群七区——质量评价相关内容的研究进展　该聚类族群中“质量评价”一词总连接强度为 26，在该区中总连接强度为第一，即该区关键词皆围绕着质量评价相关内容进行聚类。

不同剂型的中药矫味制剂工艺进行研究中，最重要的是对工艺进行质量评价，其中含量测定为质量评价常用的方法。中药单组分与多组分含量测定手段大多采用的是高效液相指纹图谱法，但存在着重复性差、不稳定及用时长等缺点。近红外光谱、拉曼光谱、激光诱导分解光谱等光谱法以及生物检定、生物活性鉴定等生物评价也运用在制剂质量评价中。目前，大部分采用的是单一指标含量测定来监控中药有效成分，而中药和辅料是通过多成分、多靶点、多层次综合发挥药效作用的，因此难以保证矫味制剂质量稳定。若将人工神经网络技术应用于中药含量分析上，能与多元线性回归分析、主成分回归法、偏最小二乘法、随机森林等多种方法相结合，或能提高复杂中药体系多组分预测的准确度[30]。同时，中药制剂工艺，难以保证质量均一，不仅是矫味工艺，从前处理、提取分离纯化到浓缩干燥制剂成型，每一步都影响着中药制剂产品质量，可以从产品设计之初，就整体地保证产品质量，以及基于质量标志物等方法对药材种植、原辅料供应，到制剂的生产加工、检验与贮藏、流通与使用等环节的全过程进行全过程质量控制评价，要求对每一步规范化与精细化[31]。中药制药装备也应实现智能化与标准化，从制药装备的仿制时代到创新时代的跨越，使装备不断推陈出新，才能生产出标准化的中药产品。依据上述多种方法探寻能作为中药制剂质量控制的方法，为进一步保障制剂工艺质量及安全性提供科学有效的依据。除此之外，《中国药典》2020 年版在中药含量测定方面使用有毒的有机溶剂较多，而在不影响分析效果的情况下，应提倡使用更加环保高效、对人体与环境无害的试剂与物质。这不仅保证了含量测定结果有效，还符合绿色分析方法的原则，对质量评价有着重要的参考价值。

3　小结

本文运用文献计量学和 VOSviewer 软件对 2001—2021 年中药学科矫味与掩味密切相关的 325 篇文献进行了关键词可视化研究。本文的局限性在于只选择了 CNKI 数据库、限定了学科以及只分析了关键词。由于研究数据会不断更新，因此本研究结论具有一定的时效性。

根据目前已有的结果分析可知，中药矫味主要热点在于制备工艺和质量标准上。但在开展矫味研究之前，首先须对苦味类、腥臭类等中药的味觉产生机制进行深入研究，探明中药呈味物质与特征。其次，矫味应在保证中药的化学成分及其性质不变的基础上，不与中药制剂进行反应而产生毒性以及影响其生物利用度，科学匹配辅料组成与用量，采用最简便的矫味技术获得最佳的矫味效果，且矫味技术必须适用于工业化生产。接着需要掌握矫味技术原理以及现有的矫味技术的优缺点，以及根据不同剂型的中药制剂选择不同的矫味技术与加工条件，进一步加强对纳米技术和介孔分子筛技术等高新技术的开发与应用，可运用超分子化学理论，利用超分子的自组装、自组织、自识别及自复制的特点构成超分子物质，如采用 β- 环糊精作为超分子包合物，形成分子胶囊以增加生物利用度并掩盖中药的不良气味[32]。也需掌握现有矫味技术评价原理及方法，继续完善口感的评价方法，采用电子舌或电子舌与口尝

法联合使用的技术以及微电极阵列、功能性磁共振成像等技术，建立统一的感官评价标准，不受主观因素影响。最后，制订质量标准时应有统一的量化标准，考虑引进前沿的生物化学和电化学方法对中药中的多成分进行检测，升级制药设备，对全过程进行质量控制评价。

总之，随着现代中药制剂的新方法与新技术的发展以及相关领域的深入研究，因不良口感而被限制应用的中药制剂通过相关的矫味技术改善不良口味之后，必将广泛地应用临床，使中药矫味技术产业化，使“良药不再苦口”。

参考文献

[1] 付琳，付强，李冀，等 . 黄连化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药学报，2021，49（2）：87-92.

[2] 黄茜，季巧遇 . 中药苦味物质掩味技术及应用 [J]. 亚太传统医药，2017，13（22）：74-76.

[3] 李学林，仇继玺，刘瑞新，等 . 苦味抑制剂的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18（21）：335-338.

[4] 徐斌，马冬磊，刘忠 . 苦味受体抑制剂研究进展 [J]. 中国医药工业杂志，2015，46（7）：767-773.

[5] 谢亚妮，沈思涵，陈光宇，等 . 基于电子舌智能感官评定与人工评价结合的五汁饮矫味技术研究 [J]. 中国现代应用药学，2022，39（6）：772-776.

[6] 刘倩，范红，邓雨娇，等 . 药物制剂口感评价方法及其在中药制剂中的应用进展 [J]. 中成药，2022，44（5）：1531-1534.

[7] 李学林，王盼盼，刘瑞新，等 . 3 种掩味剂单独或联合应用对黄柏的掩味作用探究及掩味前后化学成分的比较 [J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23（2）：7-11.

[8] 王珏，胡丽，杨锐，等 . 基于交联聚维酮物理指纹图谱和关键质量属性预测奥氮平口崩片的崩解时限 [J]. 中国新药杂志，2022，31（10）：942-949.

[9] 肖佳妹，杨岩，周晋，等 . 基于总量统计矩理论的中药质量标志物研究策略 [J]. 中草药，2019，50（19）：4589-4594.

[10] 孙秉喆，邢嘉萌，严真，等 . 咀嚼片的研发要点及研究进展 [J]. 中南药学，2022，20（10）：2373-2378.

[11] 章斌，姚永秀 . 口腔崩解膜研究进展 [J]. 中南药学，2015，13（7）：749-751，762.

[12] 周逸群，陶叶琴，邱云，等 . 中药炮制的超分子化学机制探讨 [J]. 中国中药杂志，2016，41（18）：3496-3500.

[13] 梁晓 . 膏滋药的制备、储存及服用注意事项 [J]. 临床医学研究与实践，2018，3（28）：115-116.

[14] 张明，萧惠来 . EMA 对说明书中辅料乳糖和环糊精安全性资料的最新要求 [J]. 药物评价研究，2019，42（8）：1498-1502.

[15] 仇敏，杨静，王晓宇，等 . 中药汤剂伴侣用于经典名方抑苦掩味的适宜性研究 [J]. 中草药，2022，53（8）：2292-2301.

[16] 向志芸，李小芳，朱宁，等 . 龙胆总苷提取物掩味树脂复合物的制备 [J]. 中成药，2016，38（4）：785-790.

[17] 郭珏铄，董佳乐，杨秀芳，等 . 喷雾冷凝技术制备穿心莲内酯固体分散体的研究 [J]. 中药材，2019，42（9）：2113-2117.

[18] 郭田甜，房兆营，窦希波，等 . 响应面法优化柴黄片包衣工艺及其稳定性研究 [J]. 中国现代中药，2022，24（5）：876-881.

[19] Saranya TS，Rajan VK，Biswas R，et al. Synthesis，characterisation and biomedical applications of curcumin conjugated chitosan microspheres [J]. Int J Biol Macromol，2018，110：227-233.

[20] 杨梅，李蔚群，张微，等 . 基于模糊数学综合评价的水蛭掩味方法 [J]. 中国现代中药，2021，23（4）：685-690.

[21] 赵永恒，胡娇，郝新才，等 . 食醋的化学成分与中药醋制机理研究概述 [J]. 湖北医药学院学报，2021，40（6）：660-664.

[22] 马艳春，冯天甜，韩宇博，等 . 五味子的化学成分和药理研究进展 [J]. 中医药学报，2020，48（11）：67-71.

[23] 韩维维，方东军，李陆军，等 . 甘草化学成分及生物活性研究进展 [J]. 化学工程师，2022，36（2）：56-65.

[24] 毛营营，栗焕焕，任晓亮 . 附子 - 甘草药对配伍研究进展 [J]. 天津中医药大学学报，2021，40（1）：119-127.

[25] 林俊芝，邹亮，张定堃，等 . 红景天苷、酪醇在红景天提取物中和其单体溶出规律的比较 [J]. 中国医院药学杂志，2013，33（6）：425-429.

[26] 李继彬，邢正英，李晗，等 . 星点设计—效应面法优化五味子咀嚼片处方 [J]. 天津医科大学学报，2016，22（6）：537-540.

[27] 鄢雷娜，陈希，储梅君，等 . 双重实时荧光定量 PCR 技术检测中药制剂中沙门氏菌和大肠埃希菌 [J]. 中国药物评价，2022，39（4）：309-313.

[28] 王青晓，高晓洁，桂新景，等 . 基于苦味阈值浓度的苦味中药分子苦度当量定量方法研究 [J]. 中草药，2022，53（21）：6698-6705.

[29] 海莉丽，朱琳，李智平 . 药物制剂辅料在儿童群体中的安全性考量 [J]. 中国药学杂志，2019，54（14）：1121-1125.

[30] 杨岩，肖佳妹，王韧，等 . 人工神经网络在中药相关研究领域的应用 [J]. 中草药，2019，50（13）：3230-3236.

[31] 熊诗慧，邱婷，王学成，等 . 基于质量标志物（Q-Marker）的中药制剂质量过程控制方法与策略 [J]. 中草药，2021，52（9）：2534-2540.

[32] 贺福元，周逸群，邓凯文，等 . 超分子化学对中医药理论的特殊影响 [J]. 中国中药杂志，2014，39（8）：1534-1543.

（收稿日期：2022-11-07；修回日期：2022-12-18）

临床药师在临床

临床药师对腹膜透析患者实施肾性贫血药物治疗管理服务实践效果

雷雯朴[1, 2]，白迎文[1]，杨婷[1]，段艳[1, 2]，张晋萍[1]，王路路[1*]（1. 中国药科大学南京鼓楼医院，南京　210008；2. 中国药科大学基础医学与临床药学学院，南京　210009）

摘要：目的　观察临床药师在腹膜透析肾性贫血患者中实施药物治疗管理服务（MTMs）的效果。**方法**　随机选取行腹膜透析治疗的肾性贫血患者 200 例，分为对照组 100 例与试验组 100 例。两组随访期均为 6 个月，试验组每月随访一次，对照组仅在出院后第 6 个月随访一次。两组随访结束时记录患者复诊的血红蛋白（Hb）、红细胞计数（RBC）、红细胞压积（Hct）、血清铁蛋白（SF）、转铁蛋白饱和度（TSAT）等检查检验指标。试验组住院期间及出院之后持续接受由临床药师提供的肾性贫血 MTMs，每月评估试验组患者疾病情况，制订个体化用药方案。**结果**　经过 6 个月随访，试验组和对照组的 Hb 水平均显著高于观察起始时水平（$P < 0.05$），且试验组患者 Hb 水平显著高于对照组 [（108.97±11.70）*vs*（82.28±18.24）$g \cdot L^{-1}$，$P < 0.01$]，同时试验组 Hb 达标率较对照组显著提升（$P < 0.01$）。铁代谢指标方面，试验组与对照组 SF [（281.49±252.05）*vs*（301.42±261.66）$\mu g \cdot L^{-1}$，$P = 0.584$] 和 TSAT [（39.85±15.95）*vs*（39.39±18.37）%，$P = 0.852$] 差异均无统计学意义，随访期间始终维持在正常范围，肾性贫血得到改善的同时铁代谢未出现异常。**结论**　药师以 MTMs 模式应用于腹膜透析肾性贫血患者，与传统模式相比极大地改善了腹膜透析肾性贫血患者的病情，促进了患者合理用药，体现了临床药师的价值，可为其他慢病管理提供参考。

关键词：腹膜透析；肾性贫血；临床药师；药物治疗管理服务
中图分类号：R973，R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-1101-06
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.042

Medication therapy management for peritoneal dialysis patients with renal anemia

LEI Wen-pu[1, 2], BAI Ying-wen[1], YANG Ting[1], DUAN Yan[1, 2], ZHANG Jin-ping[1], WANG Lu-lu[1*] (1. *Nanjing Drum Tower Hospital*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 210008; 2. *School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy*, *China Pharmaceutical University*, *Nanjing* 210009)

Abstract: Objective To observe the effict of medication therapy management services (MTMs) for peritoneal dialysis patients with renal anemia. **Methods** Totally 200 patients with renal anemia undergoing peritoneal dialysis were randomly selected and evenly divided into a control group and a test group. The follow-up period was 6 months, with the test group being followed up once a month and the control group only once in the 6th month after the discharge. The hemoglobin (Hb), red blood cell count (RBC), red blood cell pressure (Hct), serum ferritin (SF), transferrin saturation (TSAT) and others were recorded at the end of follow-up. The test group received MTM for renal anemia provided

基金项目：国家自然科学基金项目（No.81903684）；南京药学会 - 常州四药医院药学科研基金（No.2019YX019）；中国药学会科技开发中心科普项目（No.CMEI2022KPYJ00201）。
作者简介：雷雯朴，女，硕士研究生，主要从事临床药学工作，email：leiwenpu@163. com　*通信作者：王路路，男，主管药师，主要从事临床药学工作，email：wuyuzhilu2012@163. com

by the clinical pharmacists during the hospitalization and after the discharge. We assessed the patients of the test group patients on a monthly basis to develop individualized medication regimens. **Results** After the 6-month follow-up, the Hb levels in both the test group and the control group were significantly higher than those at the beginning of the observation ($P < 0.05$); the Hb levels of patients in the test group was significantly higher than those in the control group [(108.97±11.70) *vs* (82.28±18.24) g • L^{-1}, $P < 0.01$]; the Hb compliance rate in the test group was improved as compared with the control group ($P < 0.01$). In terms of iron metabolism indexes, no significant difference was found between the test group and the control group in SF [(281.49±252.05) *vs* (301.42±261.66) μg • L^{-1}, $P = 0.584$] and TSAT [(39.85±15.95) vs (39.39±18.37)%, $P = 0.852$], which were maintained in the normal range throughout the follow-up period. Iron metabolism was not abnormal while renal anemia was improved. **Conclusion** Pharmacists help peritoneal dialysis patients with renal anemia with the MTM model, greatly improve the condition of patients as compared with the traditional model, and promote the rational use of medication.

Key words: peritoneal dialysis; renal anemia; clinical pharmacist; medication therapy management

慢性肾脏病（chronic kidney disease，CKD）是严重危害人类健康和生命的常见病，其发病率和病死率呈逐年上升趋势[1]，终末期肾病患者人数也在持续增加，患者肾功能不可逆性地下降，大量毒素无法排出体外。临床主要使用透析来延长终末期肾病患者生存时间，腹膜透析（peritoneal dialysis，PD）是终末期肾病的替代治疗方法之一，在我国，透析治疗前血红蛋白（Hb）超过 100 g • L^{-1} 的患者不足 2/3，腹膜透析患者的 Hb 达标率则更低[2]。有研究显示，腹膜透析患者肾性贫血的发生率高达 61.2%，其中约有 60% 的人群 Hb 水平不达标[3]，腹透患者体内的红细胞生成抑制剂及未清除的毒素很可能加重肾性贫血[4-5]，严重影响患者的生存质量。

由具有专业技术优势的临床药师为患者提供用药教育、药物咨询指导等一系列专业化服务称为药物治疗管理服务（medication therapy management services，MTMs）[6]。本研究以 MTMs 模式对行腹膜透析的肾性贫血患者提供以沟通、合作和记录为基础，以信息采集、问题评估、制订计划、实施计划、随访监测为循环步骤的专业药学服务，指导患者正确用药，提高患者依从性，以期提升贫血药物疗效，进一步改善腹膜透析患者 Hb 水平达标率，观察临床药师提供 MTMs 的效果。

1　资料与方法

1.1　研究对象

随机选取 2020 年 1 月 1 日—12 月 31 日在南京鼓楼医院治疗肾性贫血，且为 CKD5 期行腹膜透析的患者，纳入 100 例患者作为对照组，100 例患者为试验组。收集并记录所有入组患者的基本信息、一般情况及检验检查相关结果。

纳入标准：① 年龄大于 18 岁的，性别不限；② 诊断为 CKD5 期且行腹膜透析的患者；③ 符合肾性贫血临床诊断；④ 预期生存时间在 1 年以上者。排除标准：① 经评估无法与患者实现有效沟通和定期随访的；② 恶性肿瘤或血液病放化疗周期未结束的；③ 长期卧床患者无亲属长期照护的；④ 本人是临床医学 / 药学从业背景的；⑤ 近 3 个月内参加过其他临床试验的。本研究获得南京鼓楼医院医学伦理委员会批准（批件号 2021-511-02）。

1.2　治疗方案

对照组入院后，接受医护人员常规治疗，出院时由临床药师对患者进行用药教育，只在出院后第 6 个月随访一次；试验组除常规治疗外，住院期间及出院之后的 6 个月持续接受由临床药师提供的肾性贫血 MTMs，每个月随访一次，每次随访时依据患者的用药信息和诉求，对试验组患者进行一次完整的 MTMs。两组患者随访结束时记录相关检查指标。

MTMs 主要包含 5 个核心要素：药物治疗回顾、个人药物记录、药物相关治疗计划、干预和 / 或转诊、文档记录和后续随访[7]。本研究中，药师对腹膜透析肾性贫血患者实施 MTMs 具体方法为：

① 信息收集：患者入院时，通过本院 HIS 系统、瑞美系统查看患者既往医疗记录，收集患者基本信息，如体质基本状况、现病史、腹透方案、肾性贫血所用药物等，同时进行药学查房，面对面询问患者，详细掌握既往疾病与正在使用的药

物。② 药物记录：患者入院后 24 h 内审核已开具的医嘱，保证所用药物正确合理。将患者目前使用的肾性贫血药物及铁剂列出清单，包含药物的名称、规格、用法用量、开始用药日期。③ 制订药物方案：综合患者检查检验结果，与同组临床医师一起为患者制订个体化用药方案。治疗肾性贫血的药物可能出现血栓形成、高血压等不良反应，药师需全面评估患者用药的安全性、有效性及依从性。④ 药师干预：在院期间，药师指导患者正确服用药物，同时积极与护士沟通，保证给药时间无误。出院前给予患者用药指导单，对患者及患者家属进行用药教育，保证出院后按时按量服用药物，提高用药依从性。⑤ 定期随访：患者出院后，随访期为 6 个月，每个月随访一次，确定患者是否按时服药，并记录复查的肾性贫血相关检查检验指标。

治疗药物包括重组人促红素注射液、罗沙司他胶囊、琥珀酸亚铁缓释片、多糖铁复合物胶囊和蔗糖铁注射液。重组人促红素注射液皮下注射或静脉注射，每周使用一次，每次 10 000 单位。如升 Hb 速度达标，则继续目前方案；如 1 个月内 Hb 增加超过 20 g • L^{-1}，则要减量 25% 继续应用并观察；如 1 个月内 Hb 增加低于 10 g • L^{-1}，则调整给药频次为每 2 周 3 次，给药剂量不变。罗沙司他胶囊剂量调整根据过去 4 周内患者的 Hb 变化，具体方法见表 1。

表 1　罗沙司他胶囊剂量调整方案

Tab 1　Roxadustat dose adjustment protocol

过去 4 周内的 Hb 变化 /（g • L^{-1}）	罗沙司他进行剂量调整时的 Hb 水平 /（g • L^{-1}）			
	＜ 105	105 ～ 120	120 ～ 130	≥ 130
＜－ 10	剂量增加	剂量增加	无变化	暂停给药，监测 Hb 水平，至少每周 1 次
－ 10 ～ 10	无变化	无变化	剂量减少	
＞ 10	无变化	剂量减少	剂量减少	

当患者转铁蛋白饱和度（TSAT）≤ 20% 和 / 或铁蛋白≤ 100 μg • L^{-1} 时，腹膜透析患者首选口服补铁，琥珀酸亚铁缓释片 0.1 g/ 片，每日 3 次，每次 2 片。多糖铁复合物胶囊 0.15 g/ 片，每日 1 次，每次 1 ～ 2 片。若铁代谢指标及 Hb 没达到治疗目标或患者不耐受，则改用静脉补铁，蔗糖铁注射液（5 mL/100 mg），每次 100 mg，1 ～ 2 次 / 周。对于铁蛋白 ≥ 500 μg • L^{-1} 的患者，停止补充铁剂。

1.3　观察指标

患者使用治疗肾性贫血相关药物后，根据患者服药时长及疾病改善情况，由临床医师确定相关指标复查检测频率，至少每 3 个月复查一次，包括血常规、铁代谢组套、贫血四项、生化全套等。两组随访结束时记录患者复诊的 Hb、红细胞计数（RBC）、红细胞压积（HCT）、血清铁蛋白（SF）、TSAT 等指标具体监测结果。根据中国肾性贫血诊治临床实践指南 [8]，经过药物治疗后患者 Hb ≥ 110 g • L^{-1} 即为达标。

1.4　统计学处理

所有数据通过 SPSS 26.0 完成统计分析，计量资料均呈正态分布，采用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，两组间比较采用两独立样本 t 检验；计数资料用 n（%）表示，两组间比较采用 χ^2 检验。P ＜ 0.05 时认为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　一般资料

本研究共纳入患者 200 例，对照组与试验组各 100 例。比较两组患者各项基本资料情况，如表 2 所示，两组患者一般资料差异无统计学意义（P ＞ 0.05），具有可比性。

2.2　肾性贫血相关指标

肾性贫血治疗开始前，两组患者 Hb、RBC、Hct 水平相似，经统计学分析无显著性差异。经过 MTMs 后，试验组患者的 Hb、RBC、HCT 显著高于对照组，其中肾性贫血疗效关键指标 Hb 相较干预前改善明显，6 个月随访期结束后，对照组患者仅为（82.28±18.24）g • L^{-1}，试验组患者经临床药师根据 MTMs 模式干预后提高到（108.97±11.70）g • L^{-1}。两组患者其他肾性贫血相关指标如 RBC、Hct 差异均有统计学意义（P ＜ 0.01）。

2.3　治疗效果

随访结束后，对照组中只有 8 例患者的 Hb 符合达标标准（Hb ≥ 110 g • L^{-1}），达标率为 8%。试验组治疗全程经临床药师 MTMs 后，达标人数增加到 48 例，达标率提高至 48%，较对照组明显提升，两组患者达标率差异有统计学意义（P ＜ 0.01）。

2.4　铁代谢相关指标

比较对照组与试验组的铁代谢相关指标，经过治疗，对照组与试验组的 SF、TAST 均较治疗前基线值有所下降，其中试验组 TAST 治疗后下降显著（P ＜ 0.05）。治疗后两组所有指标结果比较差异均无统计学意义（P ＞ 0.05）。

表 2　病例一般资料比较

Tab 2　General information of patients

项目	对照组	试验组	t/χ^2	P
男 / 女	59/41	57/43	0.082	0.774
年龄 / 岁	53.97±14.71	50.72±13.86	1.608	0.109
老年人占比 /%	37	27	2.298	0.130
体质量 /kg	63.87±12.79	63.05±13.81	0.438	0.662
合并疾病				
高血压	87	92	1.33	0.249
糖尿病	32	31	0.023	0.879
冠心病	5	11	2.446	0.118
脑梗死	17	8	3.703	0.054
血脂异常	8	15	2.407	0.121
C 反应蛋白（CRP）/（mg・L^{-1}）	10.52±16.51	6.64±12.36	1.88	0.062
eGFR/[mL/（min・1.73 m^2）]	7.04±3.15	7.95±3.65	－1.883	0.061
病程年限 / 月	19.6±29.41	20.52±25.48	－0.236	0.813
透析频次 /（次・d^{-1}）	3.93±1.13	3.86±1.14	0.380	0.705

表 3　肾性贫血相关检查指标比较

Tab 3　Test indicators related to renal anemia

组别	Hb/（g・L^{-1}）				RBC/（×10^{12}・L^{-1}）				HCT/%			
	治疗前	治疗后	t	P	治疗前	治疗后	t	P	治疗前	治疗后	t	P
对照组	75.15±14.41	82.28±18.24	－3.04	0.003	2.56±0.53	2.76±0.65	－2.409	0.017	22.75±4.46	24.77±5.67	－2.77	0.006
试验组	75.45±16.01	108.97±11.70	－16.78	＜0.01	2.55±0.58	3.57±0.51	－12.97	＜0.01	22.57±4.84	32.17±3.59	－15.8	＜0.01
t	－0.14	12.32			0.052	－9.83			0.282	－11.02		
P	0.889	＜0.01			0.959	＜0.01			0.778	＜0.01		

表 4　治疗效果比较

Tab 4　Treatment results

组别	例数	达标人数	未达标人数	达标率 /%
对照组	100	8	92	8
试验组	100	48	52	48
χ^2	—	—	—	39.68
P	—	—	—	＜0.01

3　讨论

MTMs 起源于美国，药师逐渐成为医疗团队重要的一员，药师主导的 MTMs 在提高患者服药依从性、改善临床效果以及保证用药安全性方面，有极其重要的作用[9]。国外研究发现，药师为慢病患者提供 MTMs 效果显著，可以降低糖尿病患者的入院率、使更多高血压患者血压达标的同时进一步降低了患者的收缩压[10-12]。在慢性肾脏疾病中，药师在 CKD 管理方面发挥重要作用，经过药师规范干预后，可减少 CKD 患者累计住院时间，对患者预后有积极影响[13-14]。这些研究说明，MTMs 显著提升了药师参与慢病管理的效果。国内关于药师 MTMs 的研究在糖尿病、慢性心力衰竭、慢性阻塞性肺疾病（COPD）、脑血管病等慢病患者管理中有应用实践[15-17]，管理后患者症状改善明显，体现了临床药师的专业价值，同时改善了经济、临床、人文结局[18]，但还是欠缺更多的实证研究。在终末期肾病患者中，目前只有药师干预血液透析患者肾性贫血的研究，并未用到 MTMs，且无针对腹膜透析患者肾性贫血的 MTMs 实践经验。

表 5　铁代谢相关指标比较

Tab 5　Iron metabolism-related indicators

组别	SF/（μg・L^{-1}）				TSAT/%			
	治疗前	治疗后	t	P	治疗前	治疗后	t	P
对照组	304.42±269.26	301.42±261.66	0.015	0.988	34.83±17.47	39.39±18.37	－1.782	0.076
试验组	306.41±250.70	281.49±252.05	1.165	0.246	34.79±14.21	39.85±15.95	－2.333	0.021
t	－0.053	0.549			0.017	－0.19		
P	0.958	0.584			0.986	0.852		

肾性贫血在 CKD5 期患者中是逐渐发生的，

主要由于肾脏促红细胞生成素（EPO）生成减少、体内铁稳态改变、红细胞存活时间缩短和炎症等因素[4, 19]。肾性贫血发生的同时还大幅提升患者住院率和病死率，加重肾功能恶化，使患者生活质量大大下降[20-21]。本研究共纳入 200 例腹膜透析肾性贫血患者，比较患者基本资料得知，在性别、年龄和 CRP 等方面，两组差异无统计学意义（$P > 0.05$），且患者开始治疗前，肾性贫血相关指标 Hb、RBC 及 HCT 差异无统计学意义，可以进行后续对比研究。腹膜透析患者常发生各种因素引起的炎症，炎症又通过影响体内代谢而加重贫血[22]，两组患者的 CRP 平均值虽有较大不同，但差异并无统计学意义，炎症因素不影响本次关于肾性贫血的研究结果。

与健康人群相比，腹膜透析患者的红细胞生存率显著降低 20%，Hb 水平也会随着腹膜透析的开始逐渐下降[23]。本院贫血患者治疗药物主要使用重组人促红素注射液和罗沙司他胶囊，两个药物药理作用不同，但疗效相似，药师依据患者综合情况选择治疗药物，并给出个体化用药建议。当 Hb ≥ 110 g • L^{-1} 时，患者肾性贫血得到明显改善，达到治疗标准，但当 Hb 水平大于 130 g • L^{-1} 时，会增加严重心血管事件如卒中、高血压、心肌梗死、血管通路血栓等风险[24]。药师持续随访并干预患者用药方案，确保患者 Hb 水平保持在有效且安全范围，个体化 MTMs 更为重要。报道称，对非透析的 CKD 肾性贫血患者，药师主导的 MTMs 对肾性贫血患者的管理更加有效，Hb 值的达标率更高[25]。本研究对象为行腹膜透析的肾性贫血患者，对照组患者的 Hb 水平为（82.28±18.24）g • L^{-1}，达标率只有 8%，经过药师 MTMs 干预后，患者 Hb 提高到（108.97±11.70）g • L^{-1}，达标率也显著升高到 48%（$P < 0.01$）。RBC 与 HCT 同样属于评估肾性贫血的实验室指标，在体内，Hct 甚至比 Hb 能更快地反映出贫血改善情况。随访 6 个月后，对照组、试验组患者 RBC [（2.76±0.65）×10^{12} • L^{-1} *vs*（3.57±0.51）×10^{12} • L^{-1}] 与 HCT [（24.77±5.67）% *vs*（32.17±3.59）%] 有显著的差异（$P < 0.01$），这些指标的提升更加明确了药师 MTMs 干预能够改善患者疾病的情况。

铁剂在肾性贫血的治疗中也是一个重要部分，行腹膜透析的患者大多存在铁缺乏，而铁缺乏将直接引起患者贫血[26]，如忽视患者体内铁代谢或利用失调，将导致贫血与铁缺乏的恶性循环，故铁剂治疗方案也需做到个体化。依据指南建议，腹膜透析贫血患者理想目标值为 SF ＞ 100 μg • L^{-1} 且 TSAT ＞ 20%[8]。对照组与试验组的 SF 都大于目标值 100 μg • L^{-1}，但药师干预后，试验组患者 SF 较对照组明显下降 [（281.49±252.05）*vs*（301.42±261.66）μg • L^{-1}]，可能是由于体内迅速增加的 Hb 含量使储备铁的消耗增多[27]，引起铁蛋白数量减少。如患者铁剂治疗过度，体内成为 SF ＞ 800 μg • L^{-1}、TSAT ＞ 50% 的铁超载水平，患者体内铁元素将会对脾脏、肝脏等造成不可逆损害[8, 28]。两组的 SF 及 TSAT 均大于目标值且未达到铁超载水平，表明反应体内铁代谢的指标均控制良好。

指南中根据 Hb 值判断肾性贫血疗效，其他检查检验结果只作为辅助参考，而本研究过程中，额外关注了患者铁代谢情况以及炎症指标 CRP，全方位地为患者制订药物治疗方案，进行用药教育，接受患者关于药物方面的询问并定期随访患者疾病情况，使得贫血患者病情得到了极大的改善，促进了患者合理用药，使患者提高对贫血的认知，很好地发挥了临床药师在临床治疗团队中的作用。

随访期间治疗贫血药物（重组人促红素、罗沙司他）最常见的不良反应为高钾血症（血钾≥ 5.0 mmol • L^{-1}），随访过程中对照组出现 7 例，试验组出现 4 例。试验组的不良反应发生率少于对照组。随访过程中两组出现不良反应的患者较少，不足以进行统计学分析，这可能与纳入患者数量不够多、随访时间不够长有关。此外，受研究对象基础疾病状态、用药种类较多等因素影响，在不良反应观察方面仍存在一定的局限性。在后续研究中，可以增加研究对象数量、延长临床药师随访时间，进一步观察药物不良反应发生情况。

4　小结

综上所述，临床药师以 MTMs 模式参与腹膜透析患者肾性贫血的管理，为患者制订个体化用药方案，定期随访，持续关注患者依从性及用药效果，显著改善了患者肾性贫血状态，提高患者 Hb 等相关指标达标率。同时关注患者体内铁代谢情况，从多个方面对肾性贫血进行系统性全面评估，使得药物治疗的安全性与有效性得到保障，达到改善患者生活质量、降低心血管发生风险、保护残余肾功能且减少死亡风险的目的。公众在很大程度上仍然不知道 MTMs，后续需继续做 MTMs 研究，以期为慢性肾脏病及其他慢病患者药学服务提供参考。

参考文献

[1] Zhang L，Wang F，Wang L，et al. Prevalence of chronic kidney disease in China：a cross-sectional survey [J]. Lancet，2012，379（9818）：815-22.

[2] 高建军，蔡广研 . 肾性贫血的负担 [J]. 中国血液净化，2020，19（6）：361-363.

[3] Zhou QG，Jiang JP，Wu SJ，et al. Current pattern of Chinese dialysis units：a cohort study in a representative sample of units [J]. Chin Med J（Engl），2012，125（19）：3434-3439.

[4] Babitt JL，Lin HY. Mechanisms of anemia in CKD [J]. J Am Soc Nephrol，2012，23（10）：1631-1634.

[5] Lee SW，Kim JM，Lim HJ，et al. Serum hepcidin may be a novel uremic toxin，which might be related to erythropoietin resistance [J]. Sci Rep，2017，7（1）：4260.

[6] Pellegrino AN，Martin MT，Tilton JJ，et al. Medication therapy management services：definitions and outcomes [J]. Drugs，2009，69（4）：393-406.

[7] Medication therapy management in pharmacy practice：core elements of an MTM service model（version 2.0）[J]. J Am Pharm Assoc（2003），2008，48（3）：341-353.

[8] 中国医师协会肾脏内科医师分会肾性贫血指南工作组 . 中国肾性贫血诊治临床实践指南 [J]. 中华医学杂志，2021，101（20）：1463-1502.

[9] Wang X，Wang S，Yu X，et al. Impact of pharmacist-led medication therapy management in ambulatory elderly patients with chronic diseases [J]. Br J Clin Pharmacol，2021，87（7）：2937-2944.

[10] Erku DA，Ayele AA，Mekuria AB，et al. The impact of pharmacist-led medication therapy management on medication adherence in patients with type 2 diabetes mellitus：a randomized controlled study [J]. Pharm Pract（Granada），2017，15（3）：1026.

[11] Machado M，Bajcar J，Guzzo GC，et al. Sensitivity of patient outcomes to pharmacist interventions. Part Ⅱ：systematic review and meta-analysis in hypertension management [J]. Ann Pharmacother，2007，41（11）：1770-1781.

[12] Tilton JJ，Edakkunnathu MG，Moran KM，et al. Impact of a medication therapy management clinic on glycosylated hemoglobin，blood pressure，and resource utilization [J]. Ann Pharmacother，2019，53（1）：13-20.

[13] Chang AR，Evans M，Yule C，et al. Using pharmacists to improve risk stratification and management of stage 3A chronic kidney disease：a feasibility study [J]. BMC Nephrol，2016，17（1）：168.

[14] Salgado TM，Moles R，Benrimoj SI，et al. Pharmacists' interventions in the management of patients with chronic kidney disease：a systematic review [J]. Nephrol Dial Transplant，2012，27（1）：276-292.

[15] 罗列，王利苹，赵贝，等 . MTM 药学门诊服务对老年 2 型糖尿病患者的干预效果评价 [J]. 中国药业，2020，29（14）：26-29.

[16] 史轶，李晓霞 . 药师随访助力慢性心衰患者药物治疗管理 [J]. 中国现代应用药学，2021，38（15）：1855-1859.

[17] 王鸯鸯，吴秋惠，陈皓然，等 . 药物治疗管理服务对慢性阻塞性肺病患者的效果评价 [J]. 中国医院药学杂志，2020，40（23）：2453-2458.

[18] 刘艳辉，卢曼，陆燕，等 . 药物治疗管理服务对门诊慢病患者干预效果评价 [J]. 中国医院药学杂志，2022，42（2）：153-159.

[19] Webster AC，Nagler EV，Morton RL，et al. Chronic kidney disease [J]. Lancet，2017，389（10075）：1238-1252.

[20] Mukhopadhyay P，Sinha U，Banerjee J，et al. The effects in correction of anaemia in chronic kidney disease with erythropoietin therapy--preference to cardiovascular，neurologic and general well-being of patients from a tertiary care centre [J]. J Indian Med Assoc，2012，110（12）：885-888.

[21] Toft G，Heide-Jørgensen U，Van Haalen H，et al. Anemia and clinical outcomes in patients with non-dialysis dependent or dialysis dependent severe chronic kidney disease：a Danish population-based study [J]. J Nephrol，2020，33（1）：147-156.

[22] Radić J，Bašić-Jukić N，Vujičić B，et al. Anemia is correlated with malnutrition and inflammation in croatian peritoneal dialysis patients：a multicenter nationwide study [J]. Perit Dial Int，2017，37（4）：472-475.

[23] Fujimoto D，Adachi M，Miyasato Y，et al. Efficacy of continuous erythropoietin receptor activator for end-stage renal disease patients with renal anemia before and after peritoneal dialysis initiation [J]. Clin Exp Nephrol，2021，25（2）：191-199.

[24] Zhou J，Yuan WJ，Zhu N，et al. Hemoglobin targets for chronic kidney disease patients with anemia：a systematic review and meta-analysis [J]. PLoS One，2012，7（8）：e43655.

[25] Aspinall SL，Cunningham FE，Zhao X，et al. Impact of pharmacist-managed erythropoiesis-stimulating agents clinics for patients with non-dialysis-dependent CKD [J]. Am J Kidney Dis，2012，60（3）：371-379.

[26] Nakanishi T，Kimura T，Kuragano T. The hepcidin-anemia axis：pathogenesis of anemia in chronic kidney disease [J]. Contrib Nephrol，2019，198：124-134.

[27] 朱新旺，张艳宁，牛铁明，等 . 罗沙司他治疗腹膜透析患者贫血的多中心、回顾性、自身对照研究 [J]. 中国实用内科杂志，2022，42（1）：78-84.

[28] Ghoti H，Rachmilewitz EA，Simon-Lopez R，et al. Evidence for tissue iron overload in long-term hemodialysis patients and the impact of withdrawing parenteral iron [J]. Eur J Haematol，2012，89（1）：87-93.

（收稿日期：2022-09-27；修回日期：2022-11-01）

药品不良事件信号监测专题

基于美国 FAERS 数据库的盐酸决奈达隆不良反应信号挖掘

蒋罗兰[1, 2]，蒋新华[1*]（1. 湖南师范大学附属湘东医院，湖南　醴陵　412200；2. 湖南师范大学研究生院，长沙　410000）

摘要：目的　通过挖掘美国 FDA 不良事件报告系统（FAERS）数据库中关于盐酸决奈达隆的相关数据，探讨该药物潜在的不良反应（ADR），为临床合理安全用药提供参考。**方法**　收集美国 FDA 不良事件报告系统中 2009 年第 3 季度至 2022 年第 1 季度共 51 季度的盐酸决奈达隆的 ADR 报告，采用报告比值比法（ROR）和比例报告法（PRR）对其进行数据挖掘。利用国际医学用语词典（MedDRA）分析药物不良事件安全信号。**结果**　共提取到盐酸决奈达隆相关 ADR 报告 15 926 份，共 5142 例患者，除去信息未知的情况，其中女性 2466 例（47.96%），男性 2221 例（43.19%）；年龄主要分布在 65 ～ 85 岁（2623 例，占 51.01%）。经过多重筛查，ROR 法与 PRR 法得到的信号均一致，合计 88 个且挖掘出 50 个未在说明书收录的警戒信号，主要体现在心脏器官疾病、各类检查、呼吸系统、胸及纵膈疾病、肝胆系统疾病等不良事件。**结论**　利用 FAERS 数据库可较全面深入地分析盐酸决奈达隆的 ADR，为临床安全合理用药提供参考。

关键词：盐酸决奈达隆；美国 FDA 不良事件报告系统；比例失衡法；不良反应
中图分类号：R587.1，R969.3　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-1107-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.043

Data mining for adverse drug reactions of dronedarone based on FAERS database

JIANG Luo-lan[1, 2], JIANG Xin-hua[1*] (1. *Xiangdong Hospital, Hunan Normal University, Liling Hunan* 412200; 2. *School of Graduate, Hunan Normal University, Changsha* 410000)

Abstract: Objective　To analyze the possible adverse drug reactions (ADR) of dronedarone via data mining based on FAERS to provide reference for rational and safe drug use. **Methods**　Totally 51 quarterly ADR reports from the third quarter of 2009 to the first quarter of 2022 were collected from the FDA adverse event reporting system. The data were analyzed with the reporting odds ration (ROR) and the proportional reporting ratios (PRR) method. Safety signals of ADRs were analyzed with Medical Dictionary for Drug Regulatory Activities (MedDRA). **Results**　Totally 15 926 ADR reports related to dronedarone were collected, including 2466 (47.96%) females, 2221 (43.19%) males. Most patients were 65 ～ 85 years old (2623 patients, 51.01%). After multiple screenings, 88 signals obtained by ROR and PRR were consistent; 50 warning signals were not listed in the specification, covering the heart organ disease, various examinations, respiratory system, chest and mediastinal diseases, hepatobiliary system diseases, and other adverse events. **Conclusion**　The data of FAERS can be used to analyze the side effects of dronedarone and provide reference for clinical safety and rational drug use.

Key words: dronedarone; FAERS; method of disproportion; adverse drug reaction

作者简介：蒋罗兰，女，硕士研究生，主要从事心血管内科方面的研究，email：1025488698@qq.com　*通信作者：蒋新华，男，主任医师，教授，硕士研究生导师，主要从事心血管内科疾病研究，email：348675820@qq.com

盐酸决奈达隆（dronedarone）是一种的新型治疗心房纤颤和扑动的Ⅲ类抗心律失常药物，于2009 年 7 月被美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）批准上市，2009年在欧盟批准上市，2022年3月正式在我国上市，进入我国市场。盐酸决奈达隆本质是通过对胺碘酮结构修饰所获得的衍生物，具有与胺碘酮类似的电生理特性，为心脏电生理多通道抑制剂，其结构脱去了碘原子，引入了甲磺胺基团，增加了药物的亲水性，因此可以避免碘所引起的严重的心脏外不良反应，诸如对肺、甲状腺和肝脏的损害[1]。国外率先运用盐酸决奈达隆治疗心律失常，积累了一定的药物不良反应（adverse drug reactions，ADR）汇报信息，盐酸决奈达隆在我国上市较晚，临床使用经验比较不足，因此对其不良反应的监测及安全性的评价十分重要。

美国 FDA 不良事件报告系统（FDA Adverse Event Reporting System，FAERS）数据库为自发的报告系统，年接收药品及医疗设备不良事件信息报告约 150 万份左右，能够在一定程度上反映药品的安全性，为 ADR 监测提供了重要资料来源[2]。本文借助于 FAERS 数据库对盐酸决奈达隆药品不良事件进行信号分析，并对其安全性作出评估，旨在为其临床安全用药提供借鉴。

1　数据与方法

1.1　研究数据

研究资料来自 FAERS 数据库，其中包含 FDA 搜集到的全部 ADR 或者用药错误以及其他资料，系统数据库按季度进行更新，每季度的 FAERS 数据包含了 7 张表，患者人口统计和管理信息（DEMO）、药物使用情况（DRUG）、不良反应（REAC）、患者治疗结果（OUTC）、报告来源信息（RPSR）、药物治疗开始和结束日期（THER）以及药品的适应证（INDI），结合盐酸决奈达隆上市时间，本研究下载了从 2009 年第 3 季度到 2022 年第 1 季度共计 51 个季度的《美国信息交换标准编码》（American standard code for information interchange，ASCII）数据包，并导入 SAS 9.4 版本数据库中。

1.2　数据去重

按照 FDA 建议的剔除重复报告的办法，在 DEMO 表 中 选 择 PRIMARYID/ISR，CASEID，FDA_DT 字段对有同一 CASEID 报告保留 FDA_DT 数值最高的，其次是对 CASEID 与 FDA_DT 相同报告保留 PRIMARY/ISR 数值最高的[3]。

1.3　数据检索及标准化

通过精准检索药品名称“dronedarone”和商品名迈达龙“MULTAQ”筛选出盐酸决奈达隆的相关 ADR。数据库内纳入的 ADR 根据药物的预期参与程度分为四类：主要可疑药物（PS）、次要可疑药物（SS）、伴随（C）和相互作用（I），本次研究纳入盐酸决奈达隆为主要可疑药物的不良反应事件，同时删除存疑和空白数据，形成本次研究的原始数据。使用国际医学用语词典（medical dictionary for regulatory activities，MedDRA）25.0 版本中关于 ADR 的首选术语（preferred term，PT）和系统器官分类（system organ class，SOC）对有关 ADR 事件进行分类和描述[4]。

1.4　信号检测方法

比值失衡测量法[5]是目前国内外监测 ADR 广泛使用的数据挖掘算法之一，它灵敏度高，可消除大量偏倚，在该算法中每一个信号都代表了药品与不良事件在统计学上的联系。本研究综合利用了其中灵敏度较高的报告比值比法（reporting odds ration，ROR）和比例报告比值法（proportional reporting ratios，PRR）来挖掘信号。这两者的算法所得出的信号数值越大代表信号越强，盐酸决奈达隆和目标 ADR 在统计学上关联性越强。筛选标准为：报告数 ≥ 3；PRR ＞ 2，ROR 值 95%*CI* 下限＞ 1，均满足以上两个条件则提取此 ADR 内容[6-7]。

1.5　结局指标

抽取符合信号筛选标准的盐酸决奈达隆有关 ADR 报告，分析其基本信息和分布特点，将其与盐酸决奈达隆药物说明书进行比较，挖掘出说明书中没有提及的 ADR。

2　结果

2.1　盐酸决奈达隆不良事件报告基本信息

结果显示，2009 年 7 月至 2022 年 3 月美国 FAERS 数据库中以盐酸决奈达隆为首要怀疑药品的记录有 15 926 条，共筛选出 5142 例患者。上报国家主要集中于美国（65.54%），其次是德国、法国。在性别比例上，女性（47.96%）略高于男性（43.19%），但目前尚未有相关文献探讨性别对盐酸决奈达隆 ADR 发生的影响，还需进一步验证，而且还有一些性别不明的情况（8.85%），也可能对男女比例有所影响。报告的基本情况如表 1 所示。

2.2　ADR 信号挖掘结果

通过 ROR 法和 PRR 法对 FAERS 数据库中得

表 1　盐酸决奈达隆不良事件报告的基本信息 (n = 5142)

Tab 1　Basic information about ADRs on dronedarone (n = 5142)

信息	报告例数 / 例	构成比 /%
性别		
男	2221	43.19
女	2466	47.96
未知	455	8.85
年龄 / 岁		
＜ 18	3	0.05
18 ～ 65	911	17.72
65 ～ 85	2623	51.01
＞ 85	264	5.13
未知	1341	26.08
报告国家（前六）		
美国	3370	65.54
德国	658	12.80
法国	156	3.03
英国	130	2.53
瑞典	123	2.39
西班牙	108	2.10

到的数据都进行了检测，得到了完全符合警戒信号检测标准盐酸决奈达隆 ADR 信号 88 个。频次靠前的 ADR 信号是房颤（1004 次）、心力衰竭（307 次）和血肌酐升高（287 次）；信号较强的是心电图室早出现于前一心搏的 T 波上（RonT 现象）（PRR 162.84，95%*CI* 74.47）、房颤（PRR 13.29，95%*CI* 12.60）、心源性死亡（PRR 13.52，95%*CI* 8.22），临床使用时需要引起注意（见表 2）。

2.3　ADR 累及系统 / 器官及其临床表现

根据 MedDRA 系统器官分类，对以上筛选出的具有信号的 PT 进行了概括与整理，共涉及到 11 个系统 / 器官，主要体现在心脏器官疾病（31.82%）、各类检查（32.95%）、呼吸系统、胸及纵膈疾病（9.09%）、肝胆系统疾病（9.09%）等，与说明书基本一致，其中 50 个是说明书中未列出的新的 ADR 信号（见表 3）。

表 2　盐酸决奈达隆 ADR 频数及信号强度排名前 20 位 PT

Tab 2　Top 20 PT of dronedarone ADR frequency and signal strength

序号	ADR 频数前 20 位				95%*CI* 前 20 位			
	PT	频数	PRR	95%*CI*	PT	频数	PRR	95%*CI*
1	房颤	1004	13.29	12.60	心电图室早出现于前一心搏的 T 波上（RonT 现象）	5	162.84	74.47
2	心力衰竭	307	4.79	4.29	房颤	1004	13.29	12.60
3	血肌酐升高	287	5.40	4.83	心源性死亡	15	13.52	8.22
4	充血性心力衰竭	168	2.15	1.85	胆汁淤积性肝病损伤	16	13.16	8.13
5	国际标准化比值升高	150	6.54	5.59	尖端扭转型室速	58	10.22	7.96
6	心动过缓	117	2.86	2.39	房扑	62	8.71	6.83
7	谷丙转氨酶升高	115	2.43	2.02	头痛	97	8.02	6.61
8	心律失常	108	2.82	2.34	黄视症	4	16.62	6.28
9	头痛	97	8.02	6.61	肾小球滤过率降低	65	7.10	5.60
10	心率降低	90	2.75	2.24	国际标准化比率升高	150	6.54	5.59
11	谷草转氨酶升高	88	2.21	1.79	肺毒性	33	7.53	5.38
12	心电图 Q-T 间期延长	69	2.45	1.94	混合性肝脏损伤	13	8.31	4.85
13	肾小球滤过率降低	65	7.10	5.60	血肌酐升高	287	5.40	4.83
14	肝细胞损伤	63	4.53	3.55	脑利尿钠肽升高	18	7.32	4.63
15	房扑	62	8.71	6.83	心电图 Q-T 间期异常	4	11.70	4.41
16	肝功能检查异常	62	2.44	1.91	心力衰竭	307	4.79	4.29
17	γ- 谷氨酰转移酶升高	58	3.18	2.46	心脏消融术	11	7.70	4.28
18	尖端扭转型室速	58	10.22	7.96	窦性停搏	9	8.14	4.26
19	心率不规则	53	2.46	1.88	肺泡炎	9	7.04	3.68
20	肺纤维化	51	3.54	2.69	肝细胞损伤	63	4.53	3.55

3　讨论

心房颤动是临床常见的快速性心律失常之一。流行病学资料显示 [8]，我国≥ 35 岁居民的心房颤动患病率高达 0.7%，且随着年龄每增加 10 岁，发病率增加一倍。有研究表明，房颤可导致脑卒中、急性冠脉综合征等疾病的发病率和病死率升高，对患者健康和社会经济造成了重大负担 [9]。节律控制是房颤治疗的重要策略之一，窦性心律的恢复和维持是治疗中不可缺少的部分。盐酸决奈达隆被国内外指南 [10-11] 一致推荐用于阵发性或

表 3　盐酸决奈达隆 ADR 报告主要累及系统的信号结果

Tab 3　ADR reports of dronedarone and signals of the main systems involved

系统 / 器官	不良反应	个数	比例 /%
心脏器官疾病	房颤 *、心力衰竭、充血性心力衰竭、心动过缓、心律失常 *、房扑 *、尖端扭转型室速 *、室性期外收缩 *、室颤 *、期外收缩 *、窦性心动过缓、一度房室传导阻滞 *、完全性房室传导阻滞 *、心脏扑动 *、快速性心律失常 *、窦性停搏 *、室上性期外收缩 *、房性心动过速 *、缓慢型心律失常 *、二度房室传导阻滞 *、舒张功能紊乱、室性心律失常、心脏颤动、长 Q-T 综合征、室上性心律失常 *、窦性心律失常 *、心房扩张 *、窦房阻滞 *	28	31.82
各类检查	血肌酐升高、国际标准化比值升高 *、心率降低、谷草转氨酶升高、谷丙转氨酶升高、转氨酶升高、心电图 Q-T 间期延长、肾小球滤过率降低 *、肝功能检查异常、γ- 谷氨酰转移酶升高、心率不规则、血胆红素升高、血碱性磷酸酶升高、射血分数降低、血尿素升高 *、脑利尿钠肽升高 *、肾肌酐清除率降低 *、国际标准化比值降低 *、凝血酶原时间延长 *、活化部分凝血活酶时间延长 *、结合胆红素升高、脉搏异常 *、心电图室早出现于前一心搏的 T 波上（RonT 现象）*、血尿 *、强心药水平升高 *、心电图 Q-T 间期异常、肺功能检查异常、肺总容量降低、PO_2 降低	29	32.95
呼吸系统、胸及纵膈疾病	肺纤维化、肺毒性、急性肺水肿 *、机化性肺炎、端坐呼吸、肺泡炎、静息时呼吸困难、夜间呼吸困难	8	9.09
肝胆系统疾病	肝细胞损伤、胆汁淤积性肝病损伤 *、混合性肝脏损伤、急性肝炎、中毒性肝炎、肝坏死、肝肾综合征 *、缺血性肝炎	8	9.09
各类神经系统疾病	头痛 *、缺氧缺血性脑病 *、轴突神经病 *、昼夜节律性睡眠障碍 *	4	4.55
全身性疾病及给药部位各种反应	猝死 *、心源性猝死 *、心源性死亡 *	3	3.41
眼器官疾病	视神经乳头水肿 *、视神经病 *、黄视症 *	3	3.41
各种手术及医疗操作	心脏消融术 *、心脏复律 *	2	2.72
胃肠系统疾病	唾液改变 *	1	1.14
内分泌系统疾病	甲状腺功能亢进症 *	1	1.14
血管与淋巴管类疾病	主动脉瘤破裂 *	1	1.14

注：* 为说明书未描述的不良反应。

Note：* refer to adverse reactions not described in the instructions.

持续性房颤患者长期节律控制的药物，能显著减少患者因心血管事件住院治疗或全因死亡的复合终点危险的节律控制药物。值得注意的是，此次抽取的报道年龄 ADR 高发人群主要分布在老年患者（≥ 65 岁，56.14%），这可能与房颤高发人群及服用盐酸决奈达隆人群老龄化相关，老年人随着年龄增长其窦房结逐渐纤维化，窦房结功能退行性减退 [12]，且老年疾病人群合并基础疾病较多，因此 ADR 人数在老年人群中明显增加，在盐酸决奈达隆的临床应用中需引起警惕。

ATHENA 研究表明 [13] 盐酸决奈达隆主要 ADR 为胃肠道反应（如腹泻、恶心、呕吐），心血管不良反应（如心动过缓、Q-T 间期延长）和药物光毒性皮疹。本研究与药物说明书相比较，未提及的 ADR 信号症状表现主要涉及心脏器官疾病（28 个）、各类检查（29 个）、各类神经系统疾病（4 个）、全身性疾病及给药部位各种反应（3 个）、眼器官疾病（3 个）等。其中，心源性猝死、急性肺水肿、缺氧缺血性脑病等为严重的 ADR，在临床使用时应注意监测。本研究经过 ROR 法和 PRR 法计算得到的最强烈信号为心电图室早出现于前一心搏的 T 波上（RonT 现象），另外还出现房颤、窦性停搏及房室传导阻滞等较多新的心脏器官系统 ADR 信号，提示临床在应用盐酸决奈达隆时应密切注意监测心率，有研究报道显示盐酸决奈达隆会使左室功能下降的患者病死率增加，使心力衰竭加重 [14]。盐酸决奈达隆可使地高辛血清浓度增高 1.7 ～ 2.5 倍，在临床合并用药过程中，小剂量地高辛也可出现血清地高辛水平升高和交界性心动过缓的 ADR[15]，临床上合并用药时建议将地高辛剂量减半。

盐酸决奈达隆可影响肝细胞色素氧化酶 P450 3A4（CYP3A4）代谢 [16] 及 P- 糖蛋白转运的药物体内积累浓度。临床上与盐酸决奈达隆可能有相互作用的常见药物有：地高辛、利福平、苯巴比妥、卡马西平、吩噻嗪类、辛伐他汀、西沙比利、酮康唑、伊曲康唑、克拉霉素、环孢素、口服大环内酯类抗菌药物、三环类抗抑郁药物、Ⅰ类和Ⅲ类抗心律失常药、钙拮抗剂、华法林（同决奈达隆使用时应密切监测国际标准化比值）、新型口服抗凝药达比加群酯 [17] 及多西紫杉醇 [18] 等，临床使用时应避免与这几类药物联用，以免增加 ADR

风险。国内药物相互作用所致盐酸决奈达隆 ADR 发生率暂无报道，今后需要更多的循证依据，以供临床借鉴。

盐酸决奈达隆所致呼吸系统疾病 ADR，其肺毒性主要表现为闭塞性细支气管机化性肺炎，是一种弥漫性间质性肺疾病，临床症状多出现进行性呼吸困难或干咳，确诊此疾病金标准是肺组织活检，有研究表明经纤维支气管镜肺泡灌洗细胞学也可为此提供支持性证据 [19]。临床上高度怀疑此 ADR 时，其对类固醇的快速反应、微生物阴性筛查和及时停用药物都可高度提示此诊断。值得注意的是，案例报道中患者在改用决奈达隆之前都接受了胺碘酮治疗，决奈达隆是否会诱发既往胺碘酮服用者所致肺毒性有待进一步循证。

本研究归纳出盐酸决奈达隆所致胆汁淤积性肝病损伤、中毒性肝炎和肝肾综合征等肝胆系统疾病 ADR。有关临床试验表明，盐酸决奈达隆与多达 12% 的患者的轻度肝酶升高有关 [20-21]，其机制可能是决奈达隆能够抑制肝脏肉毒碱棕榈酰转移酶 -1，通过抑制脂肪酸的摄取来改变肝脏细胞的代谢，从而诱发肝脏毒性。欧洲药品管理局要求应用盐酸决奈达隆前半年需要每月检测患者肝生化指标 [22]。

本研究在筛选数据方面样本较多，但是仍然存在局限性，因果关系判定有待结合循证医学证据进一步评价和证实。

参考文献

[1] Tang LWT，Lim RYR，Venkatesan G，et al. Rational deuteration of dronedarone attenuates its toxicity in human hepatic HepG2 cells [J]. Toxicol Res，2022，11（2）：311-324.

[2] 丁艺文，陈永法 . 美国药品不良反应数据开放研究 [J]. 现代商贸工业，2022，43（4）：34-36.

[3] 张晟，唐宝玉 . 基于 FAERS 数据库挖掘米氮平失眠相关不良反应风险信号 [J]. 巴楚医学，2021，4（4）：85-90.

[4] 刘翠丽，田春华，夏东胜，等 . 药品不良反应报告中《监管活动医学词典》编码相关思考及建议 [J]. 中国药物警戒，2021，18（11）：1055-1057.

[5] Sakaeda T，Tamon A，Kadoyama K，et al. Data mining of the public version of the FDA adverse event reporting system [J]. Int J Med Sci，2013，10（7）：796-803.

[6] Akhtar T，Fratti JDC，Mattumpuram J，et al. Factors associated with bleeding events in patients on rivaroxaban for non-valvular atrial fibrillation：a real-world experience [J]. Int J Cardiol，2020，320：78-82.

[7] 张臣宇，钟雯，李灏，等 . 基于真实世界数据的氯吡格雷信号挖掘研究 [J]. 中南药学，2020，18（8）：1318-1322.

[8] 中国心血管健康与疾病报告编写组 . 中国心血管健康与疾病报告 2021 概要 [J]. 中国循环杂志，2022，37（6）：553-578.

[9] Doshi R，Adalja D，Kumar A，et al. Frequency，trends，and outcomes of cerebrovascular events associated with atrial fibrillation hospitalizations [J]. Am J Cardiol，2021，138：53-60.

[10] Hindricks G，Potpara T，Dagres N，et al. 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery（EACTS）[J]. Eur Heart J，2021，42（5）：373-498.

[11] 孙艺红，马长生，吴书林 . 决奈达隆临床应用的中国专家建议 [J]. 中华内科杂志，2021，60（12）：1139-1147.

[12] Guo Y，Tian Y，Wang H，et al. Prevalence，incidence，and lifetime risk of atrial fibrillation in China：new insights into the global burden of atrial fibrillation [J]. Chest，2015，147（1）：109-119.

[13] Vamos M，Calkins H，Kowey PR，et al. Efficacy and safety of dronedarone in patients with a prior ablation for atrial fibrillation/flutter：insights from the ATHENA study [J]. Clin Cardiol，2020，43（3）：291-297.

[14] De Vecchis R，Ariano C. Effects of dronedarone on all-cause mortality and on cardiovascular events in patients treated for atrial fibrillation：a meta-analysis of RCTs [J]. Minerva Cardioangiol，2019，67（2）：163-171.

[15] Vallakati A，Chandra PA，Pednekar M，et al. Dronedarone-induced digoxin toxicity：new drug，new interactions [J]. Am J Ther，2013，20（6）：e717-e719.

[16] Tadros R，Nattel S，Andrade JG. Dronedarone：basic pharmacology and clinical use [J]. Card Electrophysiol Clin，2016，8（2）：453-465.

[17] 徐小东，杨东辉 . 决奈达隆治疗心房颤动的现状及展望 [J]. 心血管病学进展，2016，37（4）：368-371.

[18] Vodovar D，Mongardon N，Moachon L，et al. Severe docetaxel overdose induced by pharmacokinetic interaction with dronedarone [J]. J Clin Oncol，2011，29（24）：e694-e695.

[19] Thornton D，Avery S，Edey AJ，et al. Organising pneumonia due to dronedarone [J]. J R Coll Physicians Edinb，2015，45（3）：213-214.

[20] Khan ZH，Mukhtar K，Ahmed MM，et al. Dronedarone-mediated acute hepatic and renal toxicity [J]. Cureus，2020，12（8）：e9611.

[21] Chong CR，Licari G，Westley I，et al. Dronedarone is a potent cardiac and hepatic CPT-1 inhibitor [J]. Circulation，2014，130（Suppl 2）：A12150.

[22] Boriani G，Blomström-Lundqvist C，Hohnloser SH，et al. Safety and efficacy of dronedarone from clinical trials to real-world evidence：implications for its use in atrial fibrillation [J]. Europace，2019，21（12）：1764-1775.

（收稿日期：2022-06-20；修回日期：2022-08-15）

药品不良反应

1 例伏立康唑药物相互作用致横纹肌溶解的案例报道并文献分析

胡功利[1]，韩丽珠[2]，雷洋[2]，陶春[1]，黄玉[1]，肖溢[1]，边原[2*]（1. 自贡市第四人民医院药剂科，四川　自贡　643000；2. 四川省医学科学院・四川省人民医院/电子科技大学附属医院药学部个体化药物治疗四川省重点实验室，成都　610072）

摘要：目的　探讨伏立康唑药物相互作用相关性肌损伤的临床特点，为该类不良反应的预防和药学监护提供参考。**方法**　分析我院 1 例伏立康唑联合阿托伐他汀致横纹肌溶解的病例，同时查阅国内外相关文献并进行综述分析。**结果**　我院 1 例肺曲霉菌感染合并颈动脉斑块患者使用伏立康唑联合阿托伐他汀治疗 15 d 后出现横纹肌溶解早期症状，最终进展为多器官衰竭。文献分析提示伏立康唑与塞来昔布、他克莫司、甲泼尼龙、奥美拉唑、埃索美拉唑、阿托伐他汀联用时发生药物相关性肌病风险增加，主要表现为肌痛、肌无力、肌酸激酶升高，严重者出现横纹肌溶解，通常于用药后 12 ～ 15 d 发生；有肝功能损害患者使用伏立康唑与奥美拉唑、埃索美拉唑、阿托伐他汀、阿托伐他汀联用时发生横纹肌溶解的风险更大，且大多预后不良。**结论**　使用伏立康唑时应充分评估合并用药和患者基础状况，密切监测患者伏立康唑血药浓度、肌酶及临床表现，警惕伏立康唑药物相互作用所致横纹肌溶解的严重罕见不良反应。

关键词：伏立康唑；横纹肌溶解；肌损伤；肌炎；药物相互作用
中图分类号：R969.3　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1672-2981(2023)04-1112-05
doi:10.7539/j.issn.1672-2981.2023.04.044

Rhabdomyolysis caused by voriconazole drug interaction: a case report and literature analysis

HU Gong-li[1], HAN Li-zhu[2], LEI Yang[2], TAO Chun[1], HUANG Yu[1], XIAO Yi[1], BIAN Yuan[2*] (1. *Zigong Fourth People's Hospital*, *Zigong Sichuan* 643000; 2. *Department of Pharmacy & Key Laboratory of Personalized Drug Therapy in Sichuan Province*, *Sichuan Academy of Medical Sciences*, *Sichuan Provincial People's Hospital/Affiliated Hospital of University of Electronic Science & Technology of China*, *Chengdu* 610072)

Abstract: Objective To investigate the clinical characteristics of voriconazole drug interaction related muscle injury, and to provide reference for the prevention and pharmaceutical care of such adverse reactions. **Methods** Analysis of a case of rhabdomyolysis caused by vorlikonazole combined with rosuvastatin in our hospital, while access to relevant literature review. **Results** A patient with pulmonary aspergillus infection complicated with carotid plaque in our hospital developed early symptoms of rhabdomyolysis after 15 days of treatment with voriconazole combined with rosuvastatin, and eventually progressed to multiple organ failure. Literature analysis suggests voriconazole with celecoxib, tacrolimus, methylprednisolone, omeprazole, esso beauty pull azole, atorvastatin drug correlation to increased risk of myopathy, main show is higher muscle pain, muscle weakness, creatine kinase, appear serious rhabdomyolysis, usually from 12 d to 15 d before and after

作者简介：胡功利，女，药师，硕士研究生，主要从事临床药学工作，email：807080229@qq.com　*通信作者：边原，男，副主任药师，主要从事临床药学工作，email：85778860@qq.com

the medication; voriconazole combined with omeprazole, esomeprazole, atorvastatin and rosuvastatin has a higher risk of rhabdomyolysis in patients with liver damage, and most of them have a poor prognosis. **Conclusion** Voriconazole should be used to fully evaluate the combination of drug use and the patient's basic condition, closely monitor the patient's blood drug concentration, muscle enzyme and clinical manifestations of voriconazole, and guard against the severe and rare adverse reactions of rhabdomyolysis caused by voriconazole drug interaction.

Key words: voriconazole; rhabdomyolysis; muscle injury; myositis; drug interaction

伏立康唑属于第二代三唑类广谱抗真菌药物，是临床用于治疗侵袭性肺曲霉病和念珠菌血症的一线用药；体内代谢呈非线性药代动力学特征，经细胞色素 P450 酶（CYP）代谢，易发生药物相互作用，导致药物不良反应增加[1]。阿托伐他汀是一种选择性羟甲基戊二酰辅酶 A（b-hydroxyl-b-methylglutaryl coenzyme A，HMG-CoA）还原酶抑制剂，通过增加肝低密度脂蛋白（low-density lipoprotein，LDL）细胞表面受体数目，促进 LDL 的吸收和分解代谢，抑制极低密度脂蛋白（very low density lipoprotein，VLDL）在肝的合成，由此降低 VLDL 和 LDL 微粒的数量发挥调脂作用。目前与伏立康唑联用发生药物相互作用致肌损伤的文献报道较少。本研究报道 1 例肺曲霉菌感染伴颈动脉斑块患者联用伏立康唑与阿托伐他汀相互作用致横纹肌溶解继发多器官衰竭的病例，并进行文献检索与分析，总结伏立康唑药物相互作用致肌损伤的特点，以提醒医务工作者警惕伏立康唑药物相互作用致横纹肌溶解的严重罕见不良反应，为该罕见且严重不良反应的防治与药学监护提供参考。

1　案例报道

患者，男，68 岁，身高 156 cm，体质量 75 kg，体质量指数（BMI）30.8 kg • m^{-2}，2021 年 11 月 19 日患者痰涂片见真菌孢子及菌丝，血清真菌细胞壁（1，3）-*β*-*D* 葡聚糖试验 232.97 pg • mL^{-1}↑，曾在外院培养出曲霉菌，考虑肺部曲霉菌感染，予以伏立康唑第一日负荷剂量 450 mg 后 300 mg 维持（q12h ivgtt）抗真菌治疗，颈动脉重度狭窄伴斑块形成，予以阿托伐他汀钙片 10 mg qn 调脂、氯吡格雷片 75 mg qd 抗血小板聚集。用药前辅助检查肝肾功能及肌酶指标：白蛋白（ALB）35.6 g • L^{-1}↓，谷草转氨酶（AST）54 U • L^{-1}↑，谷丙转氨酶（ALT）52 U • L^{-1}↑，其余未见异常。2021 年 11 月 24 日检测伏立康唑血药浓度 5.37 μg • mL^{-1}，调整给药剂量为 200 mg（q12h ivgtt）。2021 年 11 月 25 日持续口服伏立康唑片 200 mg q12h 抗真菌，多烯磷脂酰胆碱 456 mg tid 保肝。2021 年 12 月 3 日患者出现四肢乏力、活动后胸闷气紧，2021 年 12 月 13 日患者上诉症状进一步加重入院。入院辅助检查：ALB 23.7 g • L^{-1}↓，AST 596 U • L^{-1}↑，ALT 122 U • L^{-1}↑，肌酸激酶（CK）23 194 U • L^{-1}↑，肌红蛋白（MYO）86 110.9 ng • mL^{-1}↑，高敏肌钙蛋白 I（cTnI）51.1 ng • L^{-1}↑。既往有高血压病史 6 年，近 1 个月使用缬沙坦 80 mg qd 控制血压；慢性阻塞性肺疾病史 1 月余，使用沙美特罗替卡松吸入剂（50/250）1 揿 bid 改善症状；糖尿病史 1 月余，使用格列美脲 4 mg qd、米格列醇 50 mg bid、磷酸西格列汀 100 mg qd 控制血糖；无肌病史，无食物药物过敏史。入院诊断为：慢性肺源性心脏病、颈动脉重度狭窄伴斑块形成、肺曲霉菌病、2 型糖尿病伴周围神经损害、高血压病 3 级很高危组、脂肪肝、肝功能异常。

患者入院后停用阿托伐他汀钙，继续予以伏立康唑片 200 mg bid 抗真菌，哌拉西林钠他唑巴坦钠 4.5 g（q8h ivgtt）抗感染，盐酸氨溴索注射液 15 mg（q12h ivgtt）祛痰，沙美特罗替卡松吸入剂 1 揿 bid 吸入缓解气道痉挛，硫酸氢氯吡格雷片 75 mg qd 抗血小板聚集，异甘草酸镁注射液 20 mL（qd ivgtt）保肝，缬沙坦 80 mg qd 降压，格列美脲片 4 mg qd 联合米格列醇片 50 mg tid 和磷酸西格列汀片 100 mg qd 降糖治疗。2021 年 12 月 15 日患者诉四肢无力加重，全身酸痛，张口困难伴下颌部肌肉疼痛，尿量 450 mL，复查肝肾功能及肌酶：肾小球滤过率（eGFR）46.8 mL • min^{-1}↓，血肌肝（Scr）133.4 μmol • L^{-1}↑，ALB 24.1 g • L^{-1}↓，AST 998 U • L^{-1}↑，ALT 199 U • L^{-1}↑，CK 40 160 U • L^{-1}↑，MYO 106 079.9 ng • mL^{-1}↑，cTnI 61.7 ng • L^{-1}↑。磁共振提示左上臂、左大腿、左小腿中上段肌群 T2 信号增高，临床药师查阅文献告知临床医师怀疑伏立康唑与阿托伐他汀相互作用导致

肌损伤，建议停用伏立康唑，临床医师采纳临床药师建议，立即停用伏立康唑，先后予以碳酸氢钠碱化尿液，复方醋酸钠林格注射液和转化糖电解质注射液补液，甲泼尼龙抗炎、床旁连续性肾脏替代治疗（CRRT）等对症支持治疗。上述方案治疗 4 d，患者肌酶指标有所下降，但出现肝酶、血钾、肌酐、尿素氮、乳酸进行性升高，尿量进行性减少，茶色尿，逐渐发展至无尿，最终导致急性肝肾衰竭；同时凝血功能恶化，凝血酶原时间（PT）16.4 s↑，活化部分凝血活酶时间（APTT）41.8 s↑，纤维蛋白原降解产物（FDP）29.6 mg • L^{-1}↑，2021 年 12 月 18 日患者处于昏迷状态，病情危重，患者家属要求自动出院。出院诊断为：横纹肌溶解综合征、急性肾损伤、肺曲霉菌病、肝功能不全、低蛋白血症、高血压病 3 级很高危组、2 型糖尿病伴周围神经损害。患者住院期间肌酶变化趋势见图 1。

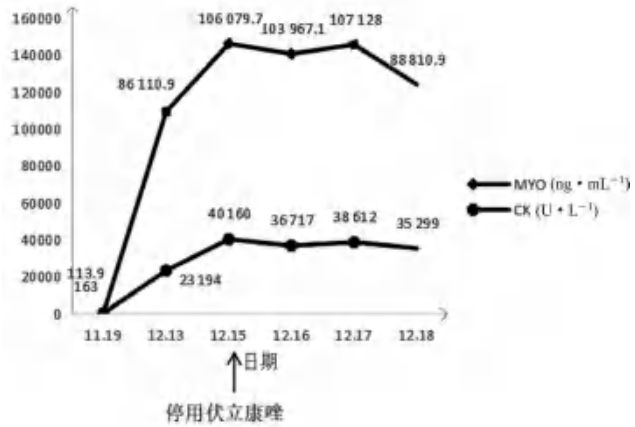


图 1　患者住院期间肌酶变化趋势图

Fig 1　Trend chart of creatinine changes during patient hospitalization

2　案例分析

2.1　伏立康唑联合阿托伐他汀相互作用致横纹肌溶解相关性分析

横纹肌溶解症是骨骼肌破坏和细胞内肌肉内容物释放到血液中，引起的一系列全身并发症，表现为 MYO 和 CK 水平显著升高，病情轻则为无症状的血清肌酶升高，部分严重患者可出现典型三联征（肌肉疼痛、乏力、深茶色尿伴肌酶极度升高）及电解质紊乱，甚至急性肾损伤危及生命；横纹肌溶解症的诊断目前尚无统一的定义，通常以 CK 升高大于正常值的 5 倍作为重要参考依据 [2]。该患者的临床症状和体征符合横纹肌溶解症的典型表现，由此可见，该患者横纹肌溶解症诊断明确。

成人发生横纹肌溶解多由外伤和药物所致，本例患者无外伤史，基础疾病多，用药复杂，合并用药包括多烯磷脂酰胆碱、缬沙坦、格列美脲、米格列醇、西格列汀、氯吡格雷、阿托伐他汀、沙美特罗替卡松吸入粉雾剂。说明书载明致肌损伤的药物包括伏立康唑、氯吡格雷、阿托伐他汀、沙美特罗替卡松。查阅文献尚未发现氯吡格雷、沙美特罗替卡松吸入粉雾剂单独使用或与其他药物联合使用致肌损伤的报道，故氯吡格雷与沙美特罗替卡松吸入粉雾剂导致横纹肌溶解可能性小。伏立康唑与阿托伐他汀单独使用导致横纹肌溶解十分罕见 [3-4]，仅有零星的个案报道伏立康唑单独使用致肌损伤 [1，5-6]，一项多研究、大样本荟萃分析结果显示，使用他汀类药物致横纹肌溶解的发生率仅为 0.0016%[4]。除药物固有的不良反应外，药物之间的相互作用也常是导致不良反应的另一诱因。已有多篇唑类抗真菌药物导致肌损伤的报道，通常与 HMG-CoA 还原酶抑制剂（他汀类药物）有关 [4]，符合药物已知的不良反应类型。本例患者因肺部曲霉菌感染伴颈动脉斑块形成使用伏立康唑联合阿托伐他汀治疗后逐渐出现横纹肌溶解相关症状，符合时间相关性。停用阿托伐他汀和伏立康唑对症治疗后患者肌酶指标有所下降。根据我国药品不良反应报告和监测管理办法中的因果判定关联性评价方法，判定该病例药品不良反应与伏立康唑和阿托伐他汀相互作用的相关性为很可能 [7]。

2.2　伏立康唑药物相关性肌损伤的文献报道及特点

计算机检索 PubMed、中国知网、万方数据库、维普网等国内外数据库自建库起至 2022 年 5 月公开发表的关于伏立康唑药物相关性肌损伤的中英文文献。共检索到相关文献报道 12 篇，均为案例报道，涉及 13 例患者。其中伏立康唑单独使用致肌损伤 3 例，与他克莫司和相同剂量的甲泼尼龙联用致肌损伤 2 例，与甲泼尼龙相互作用致肌损伤 3 例，与埃索美拉唑相互作用致肌损伤各 2 例，与奥美拉唑、塞来昔布、阿托伐他汀钙致肌损伤各 1 例。根据本次报道和文献汇总的 14 例病例分析，伏立康唑药物相关性肌病发生在成年人的各年龄阶段，男性为主占 71.43%（10/14）。与奥美拉唑、埃索美拉唑、阿托伐他汀、阿托伐他汀、塞来昔布联用发生肌毒性的时间集中在 13 ～ 15 d，占 83.33%（5/6），主要表现为肌痛、CK 升高；与免疫抑制剂（甲泼尼龙和他克莫司）联用发生肌毒性的时间稍晚，主要集中在用药后的 1 ～ 2 个月，占 60%（3/5），主要表现为肌无力。本次文献检索发现 2 例肝功能失代偿患者单独使用伏立康唑致肌痛、CK 升高的报道，提示肝功能受损可

能是导致伏立康唑相关性肌损伤的独立危险因素。大部分患者发生肌病停药或对症治疗后转归良好，发生横纹肌溶解的患者均为活动期肝病合并使用质子泵抑制剂或者他汀类调脂药的患者，75%（3/4）的患者进展为多器官衰竭，最终放弃治疗，提示肝功能失代偿患者使用伏立康唑联合质子泵抑制剂或者他汀类调脂药发生横纹肌溶解的风险非常高，且大多预后不良。具体文献检索资料见表 1。

表 1　伏立康唑药物相关性肌损伤文献总结

Tab 1　Summarized of voriconazole drug-related muscle injury in the literatures

作者	年龄	性别	疾病	发生时间 /d	合并用药	主要表现	治疗措施及转归
李梅等 [1]	41	男	重型肝炎	15	—	肌痛、CK 升高	停药后好转
曾芝雨等 [3]	47	男	慢加急性肝衰竭	14	埃索美拉唑	横纹肌溶解	停药后好转
杨燕 [4]	71	男	冠心病	3	阿托伐他汀钙	肌酶升高大于 10 倍	停药后好转
肖桂荣等 [5]	62	男	—	12	—	肌痛、肌无力、CK 升高	停药后好转
刘晓月等 [6]	78	男	心力衰竭、肝功能不全	2	—	肌酶升高大于 10 倍	停药后好转
Soliman 等 [8]	26	女	肺移植后	—	他克莫司、泼尼松	肌痛、CK 正常	停药后泼尼松龙治疗好转
曲彩红等 [9]	54	男	乙肝肝硬化失代偿期	15	埃索美拉唑	横纹肌溶解	停药后继发多器官衰竭，放弃治疗
曲彩红等 [10]	35	男	重型乙肝	14	奥美拉唑	横纹肌溶解	停药后继发多器官衰竭，放弃治疗
Shanmugam 等 [11]	34	女	肾移植后	60	他克莫司、泼尼松	肌痛，肌水肿，CK 正常	停药后好转
Happaerts 等 [12]	38	男	肝 - 肾移植后	21	他克莫司、甲泼尼龙	肌痛，CK 正常	停药后甲泼尼龙治疗好转
徐德铎等 [13]	31	女	变态反应性曲霉菌病	40	甲泼尼龙	肌无力、CK 正常	停药后好转
	53	女	变态反应性曲霉菌病	48	甲泼尼龙	肌无力、CK 正常	停药后好转
钟册俊等 [14]	61	男	高血压	13	塞来昔布	肌痛、CK 升高	停药后好转

2.3　伏立康唑药物相关性肌损伤影响因素分析

伏立康唑主要经细胞色素 P450（cytochrome CYP）2C19 代谢，其次经 CYP3A4 和 CYP2C9 代谢，其本身也是 CYP3A4 的强抑制剂和 CYP2C9 的弱抑制剂 [15]。CYP3A4 是 CYP 家族的重要成员之一，参与约 50% 以上药物的催化代谢，与临床用药的安全性有效性密切相关 [16]。本次文献检索发现与伏立康唑联用发生肌病的阿托伐他汀、泼尼松龙、他克莫司均是经 CYP3A4 代谢的，与对 CYP3A4 活性有强抑制作用的伏立康唑联用，会增加上述药物体内暴露量，使不良反应发生的风险增加 [4，12-13]。质子泵抑制剂埃索美拉唑为奥美拉唑的 *S* 异构体，在体内均主要经 CYP2C19 代谢，剩余部分通过 CYP3A4 代谢，有研究表明伏立康唑与奥美拉唑两者之间存在强烈的相互作用，奥美拉唑和埃索美拉唑对 CYP2C19 竞争抑制作用，导致伏立康唑在体内蓄积，增加其引起横纹肌溶解的风险，同样伏立康唑也会影响奥美拉唑和埃索美拉唑的代谢，增加其毒性 [3]。塞来昔布具有引起肝酶升高及 CK 激酶升高的不良反应，该药主要经 CYP2C9 代谢，伏立康唑通过抑制 CYP2C9 的活性，使塞来昔布体内蓄积，不良反应风险增加，伏立康唑说明书中提示两者联用必要时可能需要降低塞来昔布的剂量 [14]。

此外，伏立康唑相关性肌损伤的影响因素还有以下几种可能：

① CYP2C19 基因的多态性：CYP2C19 具有高度基因多态性，分为快速代谢型、中间代谢型和慢代谢型，中国人群中 CYP2C19 慢代谢型比例接近 15%，有研究表明慢代谢型的患者伏立康唑血药浓度明显高于其他基因型患者，从而导致伏立康唑体内蓄积，不良反应风险增加 [15]；② 肝功能对伏立康唑的处置能力：研究显示伏立康唑在体内代谢高度依赖肝药酶，在肝功能受损时肝脏细胞色素 P450 表达下降，伏立康唑在体内的代谢受阻，血药浓度增加，增加其引起药物相互作用的风险 [6]；③ 血浆白蛋白的浓度：有研究显示伏立康唑的蛋白结合率与白蛋白浓度成正比，说明白蛋白浓度下降会导致伏立康唑血药浓度升高，提示与一些高血浆蛋白结合率的药物联合使用时应注意监测伏立康唑血药浓度 [17]。本例患者前期使用伏立康唑联合阿托伐他汀治疗出现横纹肌溶解症状，可能与伏立康唑抑制 CYP3A4 导致阿托伐他汀体内蓄积致肌毒性相关；入院后患者由于肝酶升高停用阿托伐他汀后，CK 仍进一步升高，可能与此时患者肝功能严重异常，ALB 降低，肝脏对药物的处置能力下降，使伏立康唑血药浓度增加，导致进一步肌损伤有关。

2.4　伏立康唑合理用药建议

伏立康唑在体内的代谢、清除、血药浓度受CYP2C19基因多态性、药物相互作用等多种因素影响，个体差异较大，为确保临床用药安全有效，笔者建议对于在临床实践中需长期使用伏立康唑治疗的患者可通过以下方法制订个体化给药方案：① 建议有条件的医疗机构使用伏立康唑前进行基因检测，确定患者代谢类型，制订最初的给药方案；② 建议用药后 4 ～ 7 d进行血药浓度监测，根据血药浓度及时调整给药剂量，优化给药方案[15]；③ 充分掌握联合用药的药动学药效学特征，根据患者基础情况评估联合用药的必要性，减少治疗药物相互作用；④ 定期随访监测，及时发现可疑的不良反应，防止严重不良事件的发生；⑤ 加强患者教育，告知患者伏立康唑代谢的特殊性以及可能发生的严重不良反应，提高患者用药随访依从性。

3　小结

本例患者肺部曲霉菌感染伴颈动脉斑块，使用伏立康唑 0.2 g bid抗感染联合阿托伐他汀 10 mg qn 调脂治疗，联合用药 15 d后出现四肢乏力、活动后胸闷等肌损伤早期症状，患者未予以重视，延误治疗时机，入院考虑横纹肌溶解症后立即停用伏立康唑，先后予以 0.9% 氯化钠注射液、醋酸钠林格液、转化糖电解质补液，碳酸氢钠碱化尿液，CRRT 肾脏替代治疗，但是患者由于高龄、基础疾病复杂且就诊时间不及时，溶解的细胞内容物已经造成了器官功能的严重损伤，最终逐渐进展为肝肾衰竭、凝血机制异常，多器官功能衰竭。临床药师在该患者诊治过程中查阅大量国内外文献资料，分析患者 CK 升高、横纹肌溶解的原因是阿托伐他汀与伏立康唑的相互作用所致，为临床医师用药调整提供依据与文献支持。另外，临床药师在查阅文献时发现，伏立康唑与质子泵抑制剂奥美拉唑和埃索美拉唑、糖皮质激素注射用甲泼尼龙琥珀酸钠、免疫抑制剂他克莫司联用也存在肌损伤的报道，严重时可致横纹肌溶解、多器官衰竭。因此，伏立康唑在与上述药物联用时应充分评估患者基础状况，有条件的医疗机构应在基因检测结果的指导下联合血药浓度监测为患者制订个体化给药方案，并加强用药后的再评估，全面掌握伏立康唑在患者体内的代谢情况，同时加强患者教育，尽早发现药物相应不良反应，及时干预，避免进展为严重不良反应。

参考文献

[1] 李梅，何琬，马静，等 . 伏立康唑治疗重型肝炎并肺部真菌感染致横纹肌溶解症 1 例 [J]. 中华肝脏病杂志，2017，25（1）：50-51.

[2] Sawhney JS，Kasotakis G，Goldenberg A，et al. Management of rhabdomyolysis：a practice management guideline from the eastern association for the surgery of trauma [J]. Am J Surg，2021，22：S0002-9610（21）00681-4.

[3] 曾芝雨，李东良 . 伏立康唑与埃索美拉唑相互作用致肝衰竭患者横纹肌溶解一例 [J]. 中华传染病杂志，2018，36（2）：116-117.

[4] 杨燕 . 阿托伐他汀与伏立康唑联用致肝损和肌酸激酶升高 1 例 [J]. 临床合理用药杂志，2020，13（16）：21-24.

[5] 肖桂荣，徐珽 . 伏立康唑致肌病 1 例 [J]. 四川医学，2017，38（4）：481-482.

[6] 刘晓月，马洁，曹译丹，等 . 伏立康唑致肌酸激酶升高一例 [J]. 临床药物治疗杂志，2021，19（6）：90-92.

[7] Li B，Gao R，Li R，et al. Causal determination of the adverse events and adverse drug reactions in drug clinical trials [J]. Chin J New Drugs，2014，23（12）：1465-1470.

[8] Soliman M，Akanbi O，Harding C，et al. Voriconazole-induced myositis in a double lung transplant recipient [J]. Cureus，2019，11（2）：e3998.

[9] 曲彩红，雷姿颖 . 伏立康唑与埃索美拉唑联用致乙肝肝硬化并肺部侵袭性真菌感染患者横纹肌溶解症 [J]. 今日药学，2011，21（11）：686-688.

[10] 曲彩红，黎小妍 . 伏立康唑与奥美拉唑可能的不良相互作用致肌病及肝功能恶化 [J]. 药物不良反应杂志，2011，13（6）：374-377.

[11] Shanmugam VK，Matsumoto C，Pien E，et al. Voriconazole-associated myositis [J]. J Clin Rheumatol，2009，15（7）：350-353.

[12] Happaerts S，Wieërs M，Vander Mijnsbrugge W，et al. Azole-induced myositis after combined lung-liver transplantation [J]. Case Rep Transplant，2022，2022：7323755.

[13] 徐德铎，卢江燕，潘珏，等 . 甲泼尼龙联用伏立康唑致类固醇肌病 2 例 [J]. 中国药物应用与监测，2019，16（4）：243-245.

[14] 钟册俊，唐光敏，周陶友，等 . 伏立康唑少见不良反应 3 例报道并文献复习 [J]. 中国抗生素杂志，2017，42（12）：1081-1085.

[15] Chen K，Zhang X，Ke X，et al. Individualized medication of voriconazole：a practice guideline of the division of therapeutic drug monitoring，chinese pharmacological society [J]. Ther Drug Monit，2018，40（6）：663-674.

[16] 李蒙，朱传江 . CYP3A4 高表达细胞模型及其应用于药物代谢研究进展 [J]. 中国药理学通报，2012，28（1）：16-19.

[17] Vanstraelen K，Wauters J，Vercammen I，et al. Impact of hypoalbuminemia on voriconazole pharmacokinetics in critically ill adult patients [J]. Antimicrob Agents Chemother，2014，58（11）：6782-6789.

（收稿日期：2022-08-05；修回日期：2022-09-20）